

# 細胞生存率曲線に基づくサブクラスの推定による 酵素反応パターンからの化合物毒性予測

遠山 耕平<sup>1,a)</sup> 矢島 大嗣<sup>1</sup> 今石 浩正<sup>2,b)</sup> 大川 剛直<sup>1,c)</sup>

**概要:** 食品化合物の毒性予測のため、一般に動物実験や細胞毒性試験などが用いられているが、高コストで長時間を要することが問題となる。そこで、より簡便な方式として、P450 酵素の反応パターンの利用が注目されている。本研究では、細胞毒性試験の結果を教師データとして用い、酵素反応パターンをもとに毒性予測を行う手法を提案する。このとき、単に毒性の有無を見るだけでなく、毒性クラスの細分化によって作成したサブクラスの推定を用いて分類精度の向上を図る。実験の結果、分類精度の向上を確認した。

**キーワード:** 蛍光センサー, SVM, P450, 毒性予測

## Compound toxicity prediction from enzymatic reaction patterns by estimating subclasses based on cell survival curves

KOHEI TOHYAMA<sup>1,a)</sup> DAISHI YAJIMA<sup>1</sup> HIROMASA IMAISHI<sup>2,b)</sup> TAKENAO OHKAWA<sup>1,c)</sup>

### 1. はじめに

近年、食品添加物などの食品関連化合物が多く利用され多様化している一方で、その安全性に対して消費者の注目が集まっている。食品関連化合物の安全性の評価には機器を用いた分析や動物実験による評価法が利用されている。例えば、マウスなどの実験動物に化合物を実際に投与し、症状の推移から毒性を評価する急性毒性試験や、培養細胞に化合物を加え、化合物濃度に応じた細胞生存率により、毒性を評価する細胞毒性試験などが挙げられる。しかし、これらの評価手法では、動物の種の違いによる代謝活性能力の差異を考慮できないこと、長時間・高コストを必要とすること、などの問題点がある。そこで、これらの問題点を解決するような新たな安全性評価技術の開発が必要とされている。

このような取り組みの1つとして、食品関連化合物などの代謝活性化を行う P450 酵素に着目し、化合物に対する

P450 の代謝反応から毒性を予測する試みが挙げられる [1]。代謝活性化反応とは、本来毒性を持たない化合物が代謝によって強い毒性を示すようになる反応である。例えば、Benzpyrene は本来発がん性を持たないが、ヒトの P450 の1つである CYP1A1 により高い発がん性が生じることが知られている。近年、ヒトの P450 で 100 万種類の化合物が代謝されるとの報告があり、P450 による代謝活性化反応に関与する食品関連化合物が明らかになれば、それを食品関連化合物の毒性予測のために利用できると考えられている。

このような考えに基づき、食品関連化合物と P450 の相互作用を評価する蛍光センサーの開発が進められている [2]。この蛍光センサーでは、数種の P450 のそれぞれに対して、化合物を添加した場合としなかった場合における蛍光性代謝物の生成量を数値データとして取得することができ、添加した化合物が各 P450 の代謝をどの程度阻害するかを示したパターン (以下、シグネチャと呼ぶ) を化合物ごとに得ることが可能である。この代謝物生成量のパターンと細胞毒性試験による毒性評価結果の関連性を見出すことができれば、細胞毒性試験を行うことなく、より簡便で安価に得られるセンサー情報をもとに毒性予測を行うことが可能と

<sup>1</sup> 神戸大学 システム情報学研究科

<sup>2</sup> 神戸大学 バイオシグナル総合研究センター

a) tohyama@cs25.scitec.kobe-u.ac.jp

b) himaish@kobe-u.ac.jp

c) ohkawa@kobe-u.ac.jp

なる。

細胞毒性試験では、加えた化合物の濃度に対する細胞生存率の値が得られる。一般に、有毒・無毒の判断には高濃度における細胞生存率が半数以上で無毒、半数以下で有毒とすることが多いため、細胞毒性試験の結果を用いて化合物を有毒クラス・無毒クラスに分類できる。そこで、細胞毒性試験結果が既知の化合物を訓練データとして、その化合物に対するシグネチャから化合物が有毒であるか無毒であるかを判断する分類器を学習することで、細胞毒性試験結果が得られていない化合物の毒性の有無を予測する。このとき、毒性の判断に高濃度における細胞生存率のみを使用すると、他の濃度における細胞生存率および細胞生存率の変化の様子を考慮できていない。このため、生存率の変化とシグネチャの間に関連性が潜在する場合、単純な2クラス分類として捉えると正しい分類規則を見出すことができず、結果として毒性予測精度の低下を招く可能性がある。

そこで本研究では、細胞生存率のデータを生存率の変化に基づいて簡易な形でパラメータ表現し、パラメータ空間において化合物をクラスターリングすることにより、細胞生存率の挙動の相違に対応した毒性予測手法を提案する。提案手法では、代謝物生成量の差から毒性クラスのサブクラスを推定する分類器を学習し、出力されるサブクラスが属する毒性クラスをもとに毒性を予測する。

## 2. 細胞毒性試験と代謝反応センサー

### 2.1 細胞毒性試験の評価

細胞毒性試験とは、培養細胞に対して化合物を加え、そのときの細胞の生存率により化合物の毒性を評価する手法である。このとき、化合物を加えていない状態の細胞生存率を100%とする。本研究で扱う試験結果は化合物濃度0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000( $\mu\text{M}$ )に対して細胞生存率を取得したものである。化合物濃度が上昇するにつれて細胞生存率は下がっていくため、グラフ化すると単調減少を示すのが通常である。しかし、細胞毒性試験はわずかな培養条件の違いによる細胞生育速度の差や測定誤差の影響を受けるため、グラフにおいて増加する部分が見られる。一例として、化合物 Sesamin および Curucumin に対する細胞毒性試験の結果を図1に例示する。

このような試験結果からの安全性評価に関して、半数致死濃度という概念がある。半数致死濃度とは、対象となる生物の50%が死亡する濃度を表している。また、高濃度の化合物が加えられたときの毒性の有無も重要である。そこで、本研究では、細胞に対し高濃度の化合物を加えた場合の生存率が半数を切るかどうかに着目し、化合物濃度が1000  $\mu\text{M}$ 時に細胞生存率が50%未満となるものを有毒、それ以外を無毒として扱う。図1では Sesamin は無毒、Curucumin は有毒と判断する。

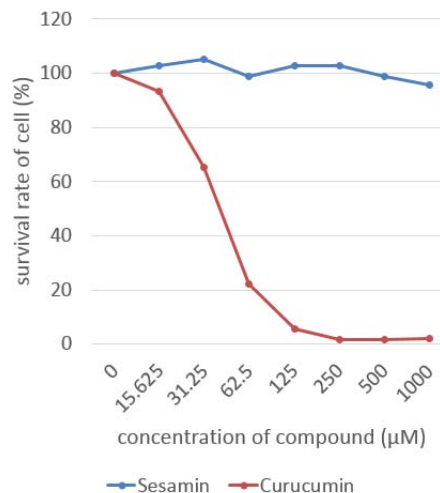


図1 Result of cytotoxicity test

### 2.2 酵素代謝反応により取得されるシグネチャ

一般に、化合物の安全性評価試験には、時間を要し、コストがかかるという問題がある。例えば、前述の細胞毒性試験は毒性を評価するまでに5日程度を必要とする。そこで、食品添加物などの代謝活性化を行うP450酵素に注目し、化合物に対するP450の代謝反応から毒性を予測する試みが進められている[1][3]。現在、ヒトのP450は57種類確認されており、その中の数種の化合物代謝反応を評価できるセンサーの開発が行われている[2][4][5]。

本研究では、蛍光基質に対するP450の代謝反応を評価するセンサーにより取得される酵素代謝パターンに注目し、機械学習により毒性予測を行う。このセンサーを用いると、複数種のP450それぞれが化合物に対して行う代謝を蛍光性代謝物生成量として取得でき、化合物ごとに異なる酵素反応パターン(シグネチャ)が得られる。具体的には、各P450による蛍光基質の代謝が化合物なしで行われた場合の蛍光性代謝物生成量と、化合物によって蛍光基質の代謝が阻害された場合の蛍光性代謝物生成量をそれぞれ測定することにより、酵素反応パターンを取得できる。

現在、開発が進められているセンサーでは、1つの化合物に対して、12種類のP450それぞれによる化合物を添加した場合の蛍光性代謝物生成量と無添加の場合の生成量が、それぞれ4回ずつ同時に取得される。センサーが実装されたプレートの写真を図2に示す。このプレートの縦8行のうち、上4行では化合物無添加の場合、下行では化合物を添加した場合が対応し、横12列は列ごとに異なるP450酵素が対応している。

## 3. 化合物濃度に依存する毒性変化を考慮した細胞毒性予測

### 3.1 機械学習を用いた細胞毒性予測の枠組み

細胞毒性予測は、有毒・無毒の2クラス分類問題として扱うことができる。そして、毒性が既知の化合物(訓練事



図 2 A plate where multiple sensors are embedded

例) に対してシグネチャを用いた毒性の分類規則を発見し、その分類規則に従い毒性が未知の化合物 (予測対象事例) の毒性を予測することが機械学習による細胞毒性予測の考え方である。ここで、シグネチャは化合物が P450 の代謝をどの程度阻害するかという酵素反応パターンのものであり、蛍光性代謝物生成量の化合物を添加する場合と添加しない場合の差を用いるものとする。この代謝物生成量の差をすべての P450 に対して得ることで事例 (訓練事例・予測対象事例) を記述する。訓練事例には、これに加えて細胞毒性試験の結果から判断された毒性クラスが付与される。

### 3.2 細胞生存率の変化を考慮した細胞毒性予測

#### 3.2.1 毒性クラスの細分化を用いた細胞毒性予測の枠組み

前述のように 2 クラス分類問題として毒性予測を捉えると、有毒・無毒の判定は化合物濃度 1000  $\mu\text{M}$  の細胞生存率のみに基づいており、他の濃度における細胞生存率および細胞生存率の変化の動きは考慮されていない。そのため、それらに起因する分類規則を見逃し、有毒・無毒の分類精度が低下する恐れがある。

そこで、それらを考慮した手法を提案する。まず、各毒性クラスの事例群を類似した細胞生存率の変化パターンごとに分割するクラス細分化を行い、分割した事例群に対してサブクラスを付与する。そして、代謝物生成量の差からサブクラスに分類する分類器を構築する。毒性予測の際には、予測対象事例の代謝物生成量の差を分類器に入力し、出力されたサブクラスの属する毒性クラスを予測結果とする。これにより、詳細な分類規則を発見し、誤分類の軽減を目指す。この際、細胞生存率の変化パターンの類似性を得るための指標が必要である。

この指標として、細胞生存率を曲線近似し、その曲線の係数パラメータを使用する。その係数パラメータ空間上でクラスタリングを行い、有毒クラスと無毒クラスのそれぞれでクラスタを生成することで、それらをサブクラスに対応させる。クラスタリングには、代表的な手法である  $k$ -means 法を用いるが、 $k$ -means 法では、最初のグループの割り当てにランダム性があり、毒性予測を行うたびに結果に相違が生じるため、毒性予測を複数回行い多数決で毒性を決定する。

以上より、細胞毒性予測の手順を以下にまとめて示す。ま

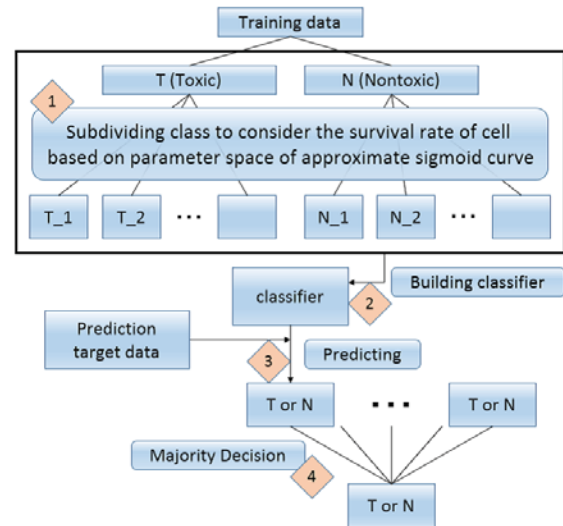


図 3 Overview of proposed method

た、概要図を図 3 に示す。

1. 訓練事例に含まれる各化合物に対して、細胞生存率の近似曲線のクラスタリング結果から、クラス細分化を行い、サブクラスラベルを付与する。
2. 代謝物生成量の差とサブクラスラベルの組を学習器に与え、分類器を構築する。
3. 予測対象事例のサブクラスを推定し、毒性を予測する。
4. 上記の予測を複数回行い、多数決で最終的な毒性を決定する。

#### 3.2.2 パラメータ空間を利用したサブクラスの決定

細胞生存率のデータを、以下のシグモイド曲線に近似し、係数パラメータ  $a, b$  を導出する。

$$y = \frac{100}{1 + e^{a(x-b)}}$$

ここで、 $x$  は濃度を底 10 で対数をとった値、 $y$  は細胞生存率の値である。なお、濃度  $0\mu\text{M}$ 、生存率 100% のデータは使用しない。パラメータ  $a$  は曲線の下がり方、パラメータ  $b$  は近似曲線において細胞生存率が 50% を下回りはじめる濃度または曲線の点対称な中心での濃度を示している。シグモイド曲線への近似は、まず細胞生存率のデータを最小二乗法で直線近似し、上記のシグモイド曲線の生存率 50% の傾きおよび座標がその直線と一致するようにパラメータ  $a, b$  を決定する。すなわち、濃度  $0\mu\text{M}$  での生存率 100% を除いたデータ  $n$  点に対し、その  $n$  点のデータの番号を  $i(1 \sim n)$ 、直線近似した式を  $y = Ax + B$  とすると、以下の式を用いてパラメータ  $a, b$  を導出する。

$$A = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}$$

$$B = \frac{\sum_{i=1}^n x_i^2 \sum_{i=1}^n y_i - \sum_{i=1}^n x_i y_i \sum_{i=1}^n x_i}{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - (\sum_{i=1}^n x_i)^2}$$

$$a = \frac{A}{25}, b = \frac{50 - B}{A}$$



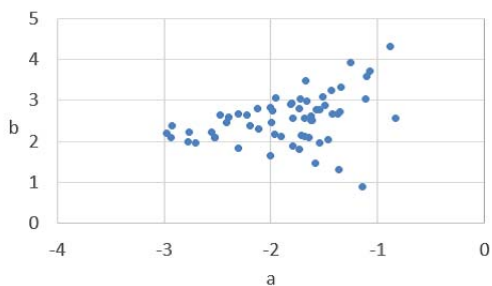


図 4 Distribution of parameters  $a$  and  $b$ (Tox)

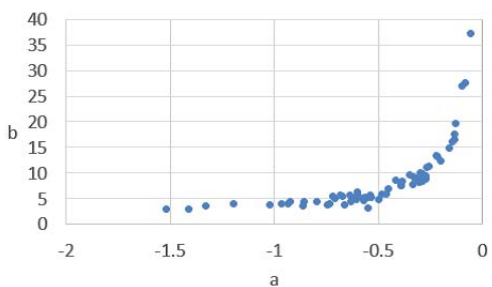


図 5 Distribution of parameters  $a$  and  $b$ (Nontox)

係数パラメータ  $a$ ,  $b$  を軸とする 2次元空間を考え、導出した  $a$  と  $b$  の値をもとに各化合物を空間上に配置する。有毒クラスに属する化合物を配置した例を図 4 に、無毒クラスに属する化合物を配置した例を図 5 に示す。

この空間上でクラスタリングを行いサブクラスを決定する。

## 4. 評価実験及び考察

### 4.1 評価実験

食品関連化合物 142 種類に対する P450 による代謝物生成量の測定結果 (シグネチャ) と細胞生存率実験結果を用いて評価実験を実施した。評価方法は、leave-one-out cross-validation(LOOCV), すなわち、1 種類の化合物をテスト用の化合物として取り扱い、毒性が未知であると仮定し、残りの化合物を訓練用の化合物として分類器を学習し、テスト用化合物の毒性を予測することで評価を行う。ここで、訓練用化合物のデータから得られる訓練事例とテスト用化合物のデータから得られるテスト事例について説明する。

3.1 に示したように、シグネチャにおける各 P450 に対して化合物を加えた場合と加えなかった場合の代謝物生成量の差を全ての P450 に対して求めることで事例を記述する。そのため、化合物を加えた場合と加えなかった場合の代謝物生成量の組が 1 つの事例に対応する。2.2 で述べたセンサーの利用によるシグネチャ取得では、化合物添加の場合と無添加の場合における蛍光性代謝物生成量が同じ環境のもとでそれぞれ同時に 4 回ずつ取得されており、対応する組み合わせは定められていない。そこで、訓練事例を構成する際には、化合物添加の場合における蛍光性代謝物生成

量と無添加の場合における蛍光性代謝物生成量を総当りで組み合わせ、最大で、16 通りの代謝物生成量の差を利用する。ただし、蛍光性代謝物生成量に欠損値を含むものもあるため、欠損値を含む組み合わせは除くものとする。テスト事例を構成する際には、上記の 16 通りの代謝物生成量の差から酵素ごとに欠損値を避けて平均をとり、1 通りの代謝物生成量の差を求める。

細胞毒性試験について、化合物濃度として 2.1 で述べた化合物濃度 8 点から濃度  $0\mu\text{M}$ , 生存率 100% のデータを除いた 7 点を使用する。また、各化合物濃度に対して細胞生存率が 3 回取得されており、3 回の平均を利用する。

分類器構築のための学習アルゴリズムは、汎化能力が高く過学習しにくい Support Vector Machine (SVM) を利用する [6]。SVM にはデータマイニングソフトウェア Weka の SMO 法を使用し、線形カーネルを用いる。

ここでは、有毒と無毒に分類する単純な 2 クラス分類手法と、毒性ごとのいくつかのサブクラスに分類する提案手法のそれぞれを用いて毒性予測を行い、予測精度を比較した。提案手法において、有毒の化合物を分割するサブクラスの個数  $k_T$  の最大値を  $k_{T\text{Max}}$ , 無毒の化合物を分割するサブクラスの個数  $k_N$  の最大値を  $k_{N\text{Max}}$ , 多数決をするために行う推定の回数を  $cp$  とする。すなわち、サブクラスの分割数のパターンは有毒の場合、 $k_T = 1, \dots, k_{T\text{Max}}$ , 無毒の場合は、 $k_N = 1, \dots, k_{N\text{Max}}$  となる。また、予測精度を以下のように定義する。

$$Accuracy = \frac{\text{毒性予測に成功した化合物の数}}{\text{テスト事例に使った化合物の数}}$$

$k_{T\text{Max}}=5$ ,  $k_{N\text{Max}}=5$ ,  $cp=5$  として  $k_T$ ,  $k_N$  の値を変えながら評価実験を実施した。また、 $0 < b < 100$  の範囲に無い化合物はクラスタリングの際に悪影響を与えるおそれがあるため、外れ値として訓練データから除外する。

### 4.2 考察

通常の単純な 2 クラス分類手法 (Simple Classification method 1:SC1) での精度と  $0 < b < 100$  でない化合物は外れ値として学習データから排除した 2 クラス分類手法 (Simple Classification method 2:SC2) での精度、および提案手法 (Proposed Method:PM) で得られた最良の予測精度を図 6 に示す。また、提案手法において、 $k_T$ ,  $k_N$  の値を変えて求めた予測精度を表 1 に示す。

図 6 より、PM による最も良い精度は SC1 および SC2 での精度より高い値を示していることがわかる。表 1 より、高い精度を示したのは  $(k_T, k_N) = (3, 4)$  の時であり、 $k_T$  と  $k_N$  の差が大きい時に悪い精度を示している傾向がある。 $(k_T, k_N) = (3, 4)$  の時に最も良い精度を示したことから、そのときのクラスタリングは細胞生存率曲線の変化の特徴を適切に抽出できていることがわかる。一方で、クラスタ数をさらに増加させると、精度の低下が見られ、細胞

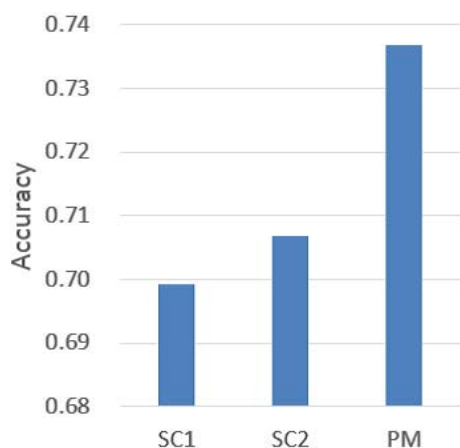


図 6 Prediction accuracy by simple classification method and proposed method

表 1 Prediction accuracy

		$k_T$				
		1	2	3	4	5
$k_N$	1	0.707	0.677	0.647	0.617	0.556
	2	0.714	0.699	0.707	0.677	0.662
	3	0.714	0.729	0.729	0.699	0.677
	4	0.617	0.729	0.737	0.684	0.684
	5	0.534	0.699	0.684	0.707	0.684

生存率曲線の過度なクラスタリングが汎化能力を減じている可能性が示唆される。また、 $k_T$  と  $k_N$  の差が大きい時は、各サブクラスの訓練データ数を有毒の場合と無毒の場合で比較すると大きな偏りが存在し、データ数の多いサブクラスが強調されるために予測精度に悪影響があるのではないかと考えられる。

上記の結果より、細胞生存率の変化が類似している事例ごとにサブクラスに分割し、それを推定することで予測精度の向上が達成されていることがわかる。

## 5. おわりに

本稿では、食品関連化合物に対する P450 の酵素反応を短時間、低コストで測定できるセンサーにより取得される酵素反応パターンをもとに、化合物の毒性を予測する手法について論じた。毒性予測は、細胞毒性試験の結果として得られる化合物の毒性の有無に基づく 2 クラス分類問題と見なすことができる。しかしながら、このときの毒性の判断は化合物が高濃度であるときの細胞生存率に基づいており、低濃度状態から高濃度状態に至る細胞生存率の変化を考慮していないため、同じクラスに属する複数の化合物における酵素反応パターンの違いを見逃し、毒性予測の精度が低下する恐れがある。

そこで、提案手法では、各毒性クラスのデータを細胞生存率の挙動の類似性に基づいて複数のサブクラスに分割し、サブクラスへの分類器を学習することによって細胞生存率

の変化に対応する。このとき、細胞生存率の変化をシグモイド曲線に近似し、その曲線の化合物ごとのパラメータを用いたパラメータ空間でのユークリッド距離を用いて類似性を評価し、これをもとにサブクラスに分割する枠組みを導入した。

提案手法と単純な 2 クラス分類手法を比較した結果、毒性予測精度の向上が見られ、提案手法の有効性が確認された。

本研究における今後の課題として、以下のことが挙げられる。

- 細胞生存率の変化の類似性を評価するにあたり、近似曲線のパラメータに基づく 2 次元空間におけるユークリッド距離を用いたが、距離を求める際に傾きを示すパラメータと曲線の中心を示すパラメータを等価に扱っているため、一方のパラメータが支配的になっている可能性がある。パラメータの正規化などにより、これに対処する必要がある。
- クラスタ数を必要以上に大きく設定すると、精度の低下につながるため、精度が最も高くなる最適なクラスタ数の組を発見する手法が必要である。
- クラスタリングに悪影響が起こる可能性があるために  $0 < b < 100$  の化合物を訓練データから排除したが、訓練データの数が減ってしまうため、パラメータの生成過程などを見直してそれらを使用できるようにすれば訓練データの増加および精度向上につながると期待できる。

## 謝辞

本研究の一部は科学研究費・基盤研究 (B) 24300056 の補助による。

## 参考文献

- G. Chang, Y. Mori, S. Mori, T. Irie, H. Nagai, T. Goto, Y. Tatsu, K. Morigaki, and H. Imaishi, "Microarray of human P450 with an integrated oxygen sensing film for high-throughput detection of metabolic activities", *Anal. Chem.* Vol. 84, No. 12, pp. 5292-5297, 2012.
- G. Chang, K. Morigaki, Y. Tatsu, T. Hikawa, T. Goto, and H. Imaishi, "Vertically integrated human P450 and oxygen sensing film for the assays of P450 metabolic activities", *Anal. Chem.*, Vol. 83, No. 8, pp. 2956-2963, 2011.
- D. Yajima, T. Ohkawa, K. Muroi, and H. Imaishi, "Prediction toxicity of food-related compounds using fuzzy decision trees", *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, Vol. 4, No. 1, pp. 33-38, 2014.
- Y. Ueda, K. Morigaki, Y. Tatsu, N. Yumoto, and H. Imaishi, "Immobilization and activity assay of cytochrome P450 on patterned lipid membranes", *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 355, No. 4, pp. 926-931, 2007.
- K. Morigaki, K. Mizutani, E. Kanemura, Y. Tatsu, N. Yumoto, and H. Imaishi, "Photoregulation of cytochrome P450 activity by using caged compound", *Anal. Chem.*, Vol. 84, No. 1, pp. 155-160, 2011.

- [6] N. V. Vapnik, “The Nature of Statistical Learning Theory”, *Springer*, 1995.