

2021-12-15 (Wed)

令和3年度 化学物質の安全管理に関するシンポジウム
「新規技術による化学物質リスク評価・管理の高度化」

有害性評価の合理化に向けた数理科学の役割と応用

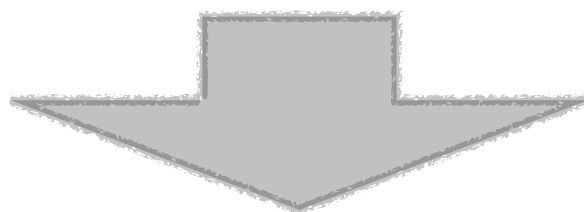
国立研究開発法人産業技術総合研究所
安全科学研究部門

竹下 潤一



現在の有害性評価は、実験動物を用いた毒性試験の結果に基づいている
もちろん、動物実験の3R原則への対応も重要

- Replacement（代替法の利用）
- Reduction（使用動物数の削減）
- Refinement（実験方法の洗練、実験動物の苦痛軽減）



考えられる有害性評価の合理化/高度化の方向性

①これまでの毒性試験の更なる有効活用

これまでの毒性試験結果から、より詳細・高度な有害性評価を実施する

②動物実験代替法や、負担の少ない毒性試験への移行

新たな試験方法を開発し、有害性評価を実施する

③既存毒性試験結果の活用

QSAR（定量的構造活性相関）やリードアクロス手法で有害性評価を実施する

①これまでの毒性試験の更なる有効活用

これまでの毒性試験結果から、より詳細・高度な有害性評価を実施する

種の感受性分布(SSD)の推定手法

- ・生態リスク評価分野での研究成果
- ・典型3種の有害性データの平均とばらつきからSSDを推定

②動物実験代替法や、負担の少ない毒性試験への移行

新たな試験方法を開発し、有害性評価を実施する

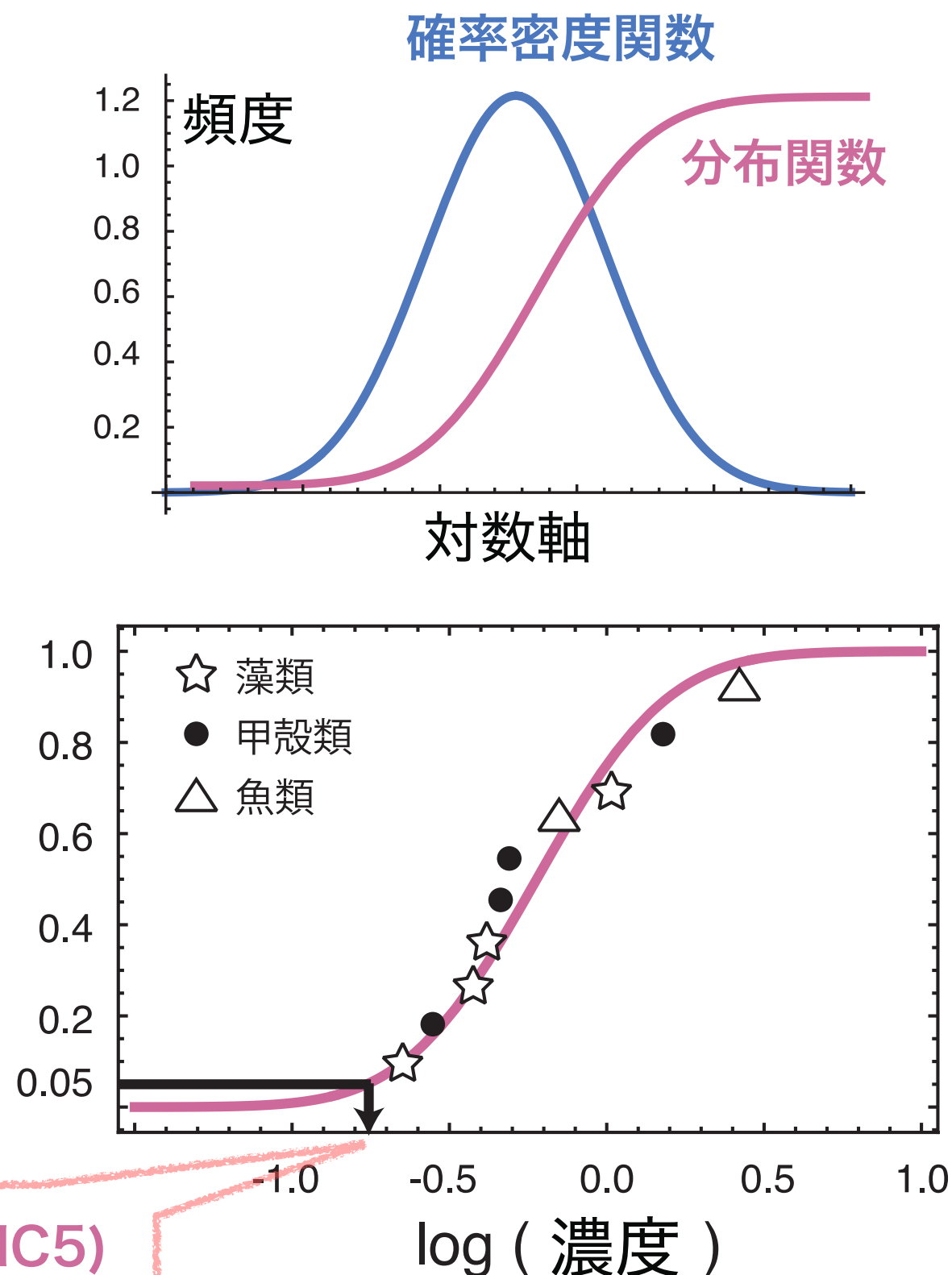
測定方法の統計的精度評価手法

- ・質的データの測定方法に対する統計的精度評価手法の研究
- ・ISO/TC 69（統計的方法の適用）における活動の紹介

種 of 感受性分布(SSD) of 推定

◎ 生物種ごとの化学物質の有害性を統計分布で表したものの

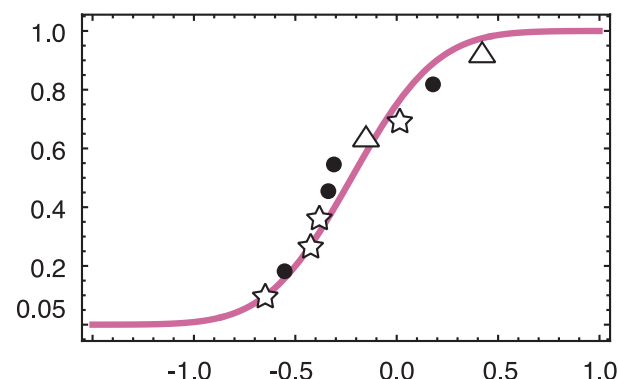
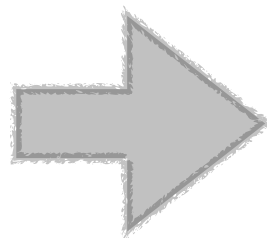
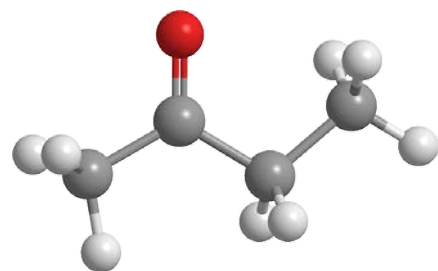
- 対数正規分布を仮定する場合は多い
 - ・ 横軸に濃度の対数値
 - ・ 縦軸にその濃度で影響を受ける種の割合➡正規分布になる
- 典型的には（最低）5~10種の有害性データから分布を求める
- 分布から求められる95%の種が保護できる濃度(HC5)、またはHC5を不確実係数で除したものが予測無影響濃度(PNEC)として用いられる



- 欧米では生態リスク評価に用いられ始めている
- 日本においては、その利用は検討段階
 - サンプルサイズ（有害性データ）が少なく分布の推定が怪しい（？）
 - 有害性データを増やすのも困難

SSDを推定する試み

分子記述子を説明変数として、SSDの分布パラメータ（平均値と標準偏差）を推定



Hoondert et al.,
Environ Toxicol Chem(2019)

Environmental Toxicology

QSAR-Based Estimation of Species Sensitivity Distribution Parameters: An Exploratory Investigation

Renske P.J. Hoondert,^{a,b} Rik Oldenkamp,^b Dick de Zwart,^c Dik van de Meent,^{b,c} and Leo Posthuma^{a,b,*}

^aRIVM, Centre for Sustainability, Environment and Health, Bilthoven, The Netherlands

^bDepartment of Environmental Sciences, Faculty of Science, Radboud University Nijmegen, Nijmegen, The Netherlands

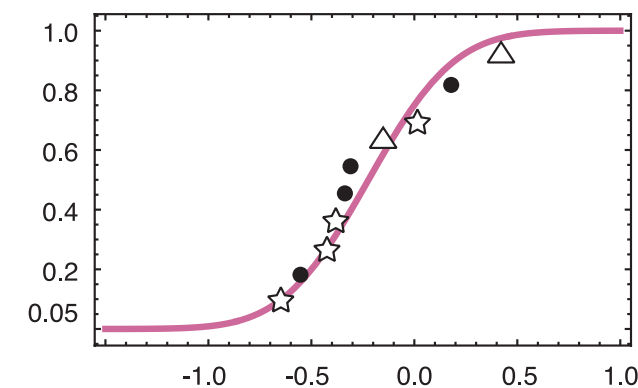
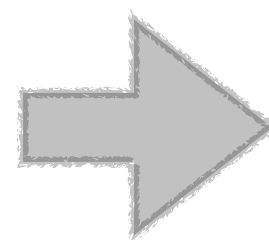
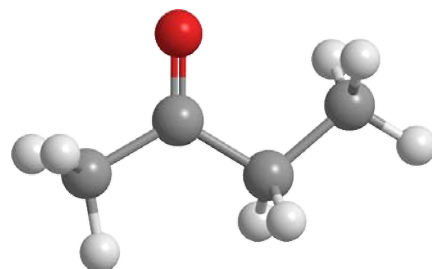
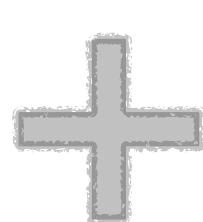
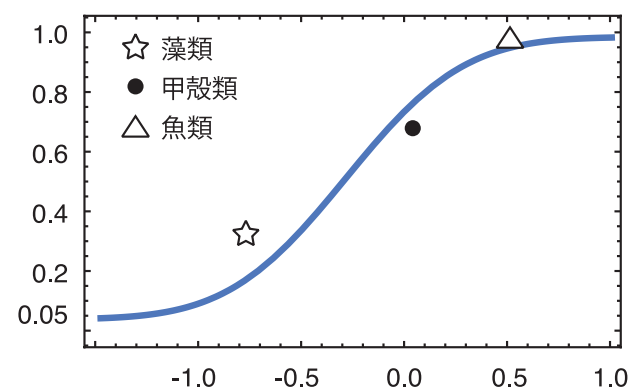
^cARES, Odijk, The Netherlands

Hoondert et al., Environ Toxicol Chem (2019)

- ・ 分子記述子を説明変数として、SSDの分布パラメータを推定
- ・ SSDの平均値は推定可能、一方、標準偏差の推定は困難

必要最低限の毒性試験の実施を前提としたら、推定精度は向上するか？

代表的な3つの生物グループ（藻類、甲殻類、魚類）から、それぞれ1種ずつ抽出した3種の平均と標準偏差を元にし、SSDの予測を行う



Iwasaki & Sorgog,
PeerJ (2021)

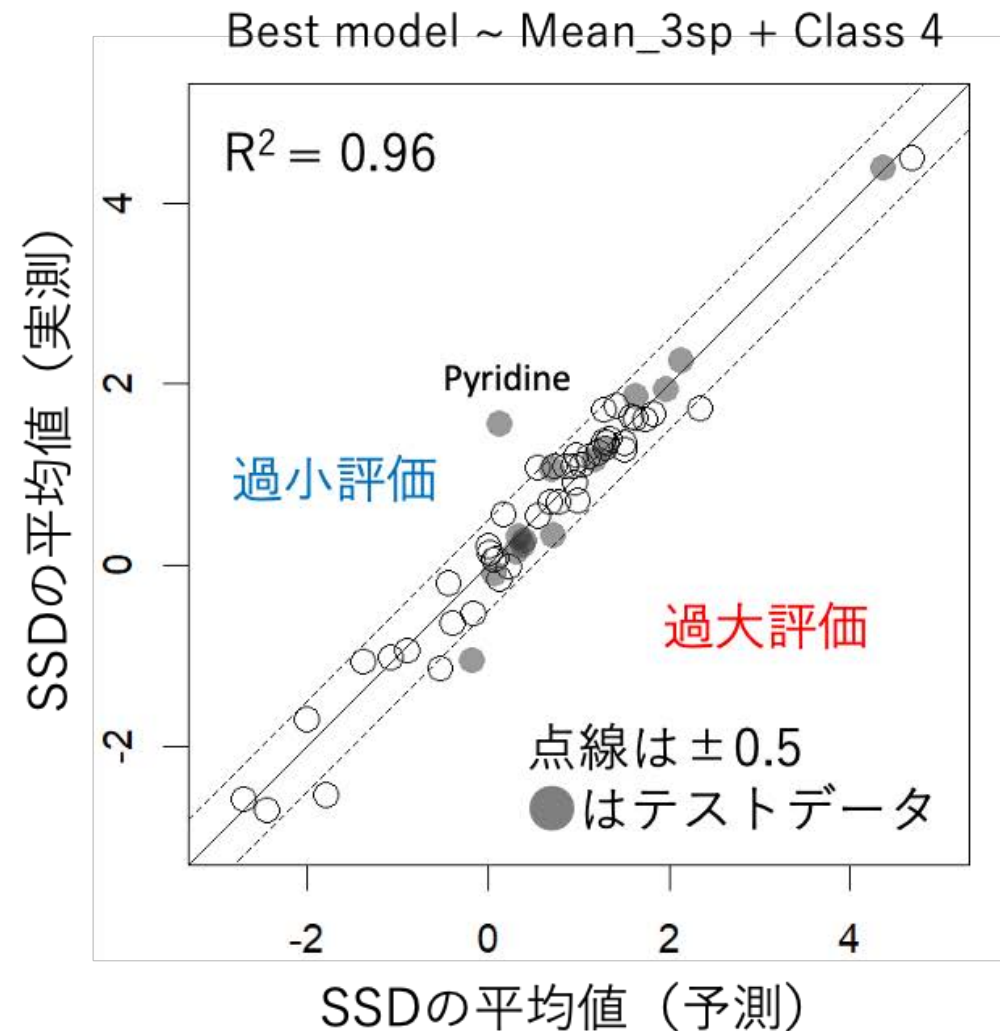


Estimating species sensitivity distributions on the basis of readily obtainable descriptors and toxicity data for three species of algae, crustaceans, and fish

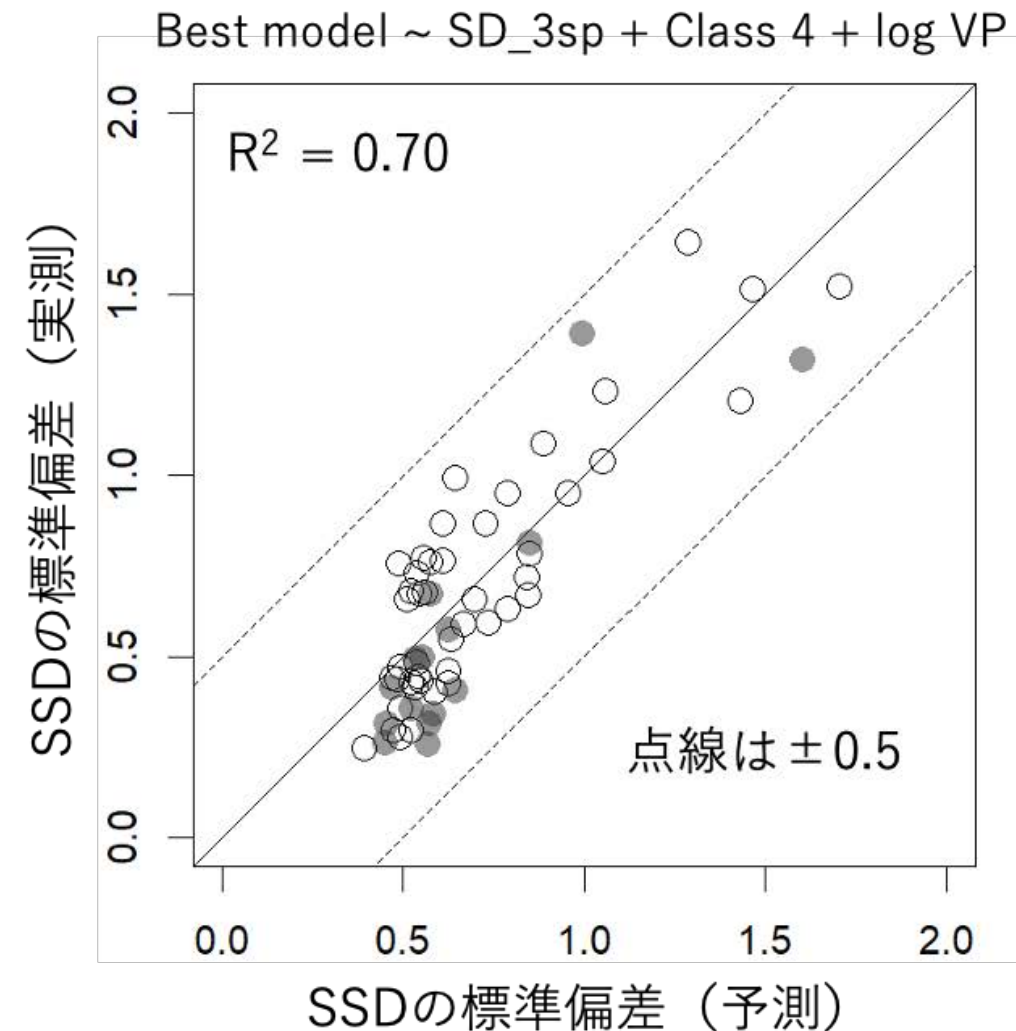
Yuichi Iwasaki and Kiyan Sorgog

Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Ibaraki, Japan

SSDの平均値



SSDの標準偏差



- Mean_3sp: 3種の毒性値の平均、SD_3sp: 3種の毒性値の標準偏差
- Class 4: Verhaarによる化合物の分類で、specifically acting chemicalsであるかどうか
- Log VP: 25°Cにおける蒸気圧の常用対数変換値

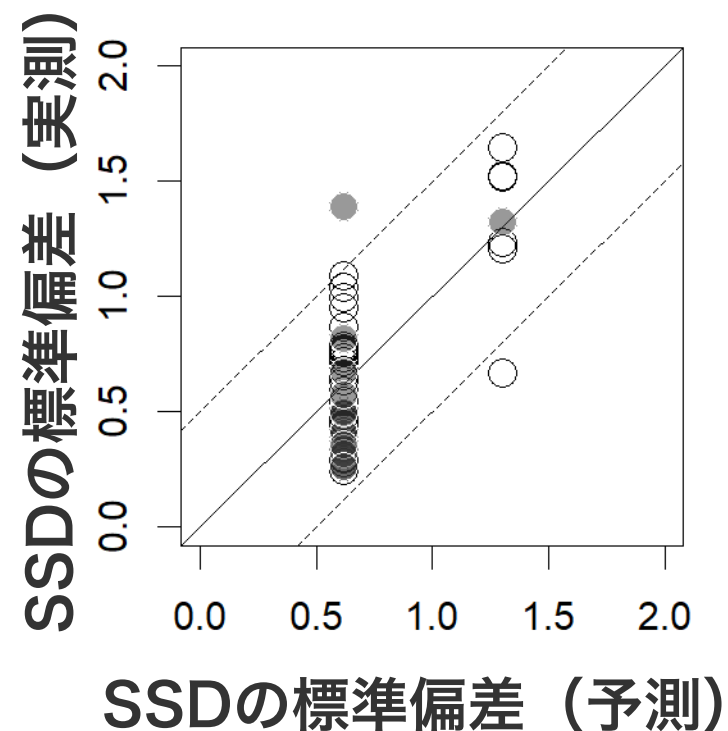
多くの場合で誤差0.5未満の範囲で推定できた

急性毒性SSDの標準偏差の推定精度の比較

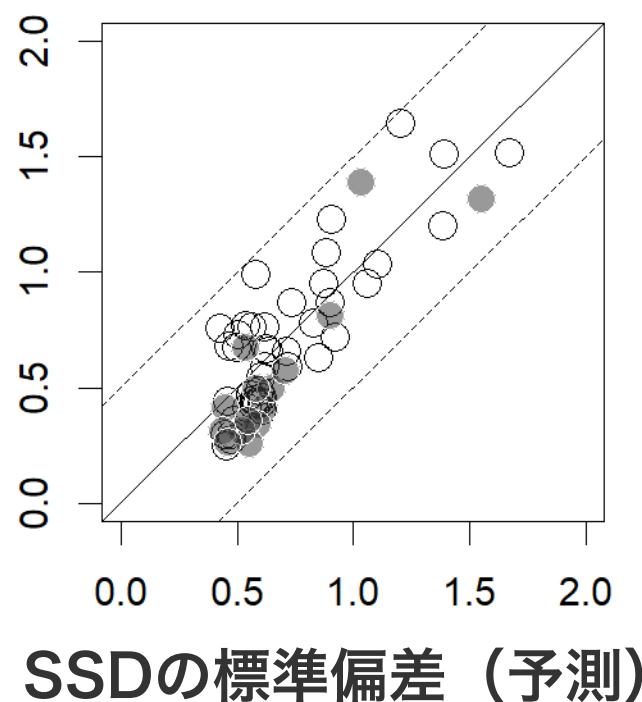
9

※散布図の点線は ± 0.5 , ●はテストデータ

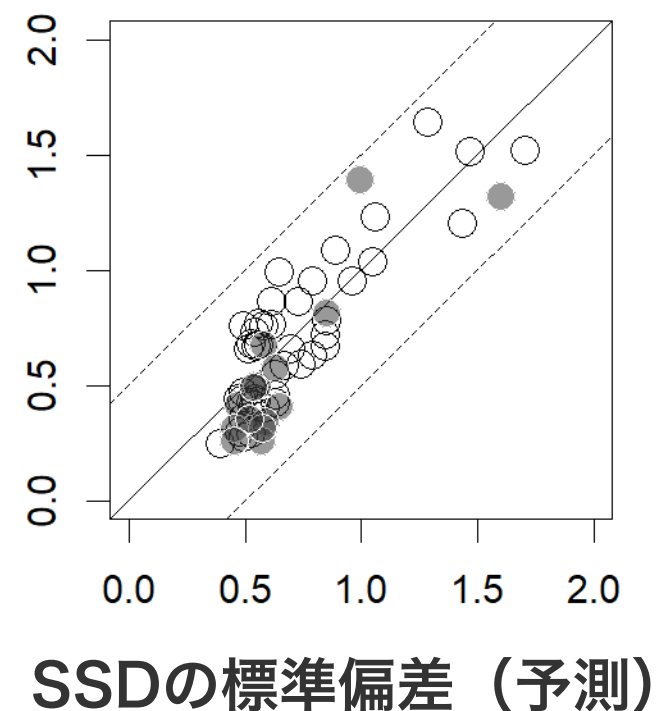
分子記述子のみ



3種のデータのみ



3種のデータ
+ 分子記述子

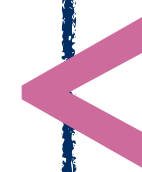


◎ q^2 : (交差検証による) 決定係数 ← 大きい方が予測モデルが頑健である (良い)

0.41



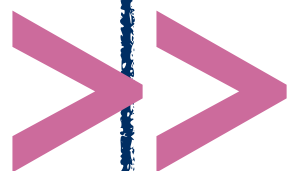
0.67



0.69

◎RMSE: 平均二乗誤差 ← 小さい方が予測モデルが適合している (良い)

0.24



0.18



0.17

慢性毒性SSDについて有害性データが少なく、急性毒性SSDと同様のアプローチは困難であった

既存の研究結果を併用することで、慢性毒性SSDもある程度は推定できる

- ・ 慢性SSDの平均値 $\div$ 急性SSDの平均値 $\times 0.1$
- ・ 慢性SSDの標準偏差 $\div$ 急性SSDの標準偏差

おおまかには、慢性毒性SSDは、急性毒性SSDを負の方向に平行移動すれば良い



Hiki & Iwasaki,
Environ Sci Technol (2020)

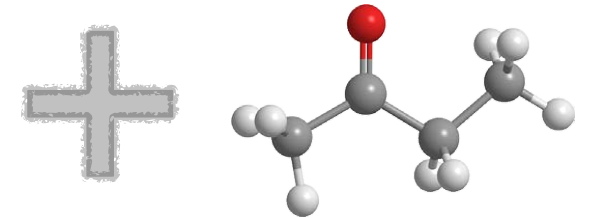
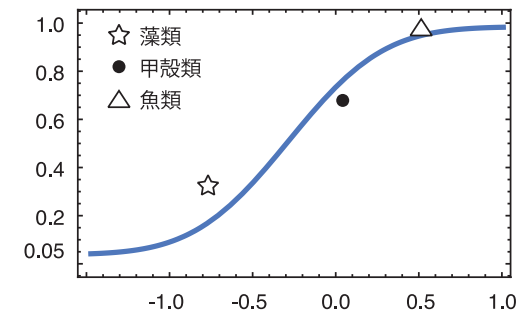
pubs.acs.org/est

Article

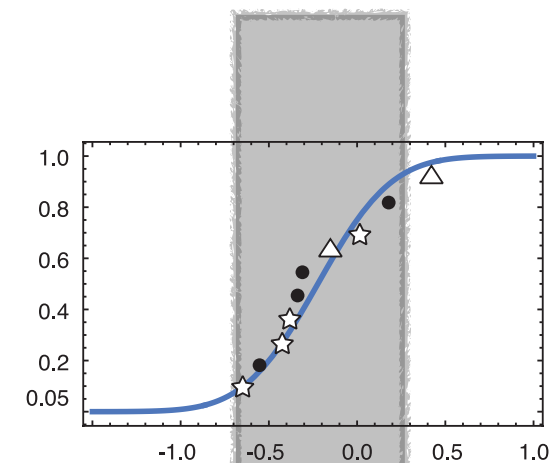
Can We Reasonably Predict Chronic Species Sensitivity Distributions from Acute Species Sensitivity Distributions?

Kyoshiro Hiki and Yuichi Iwasaki*

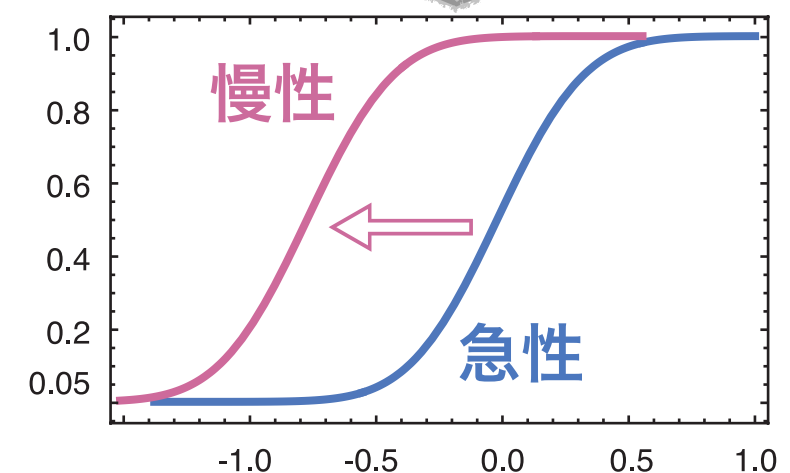
※ 推定の推定になっているので、
不確実性は大きくなる



代表的な3種の急性毒性試験＋分子記述子



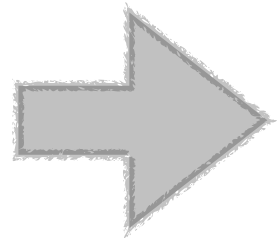
急性毒性SSD



慢性毒性SSD

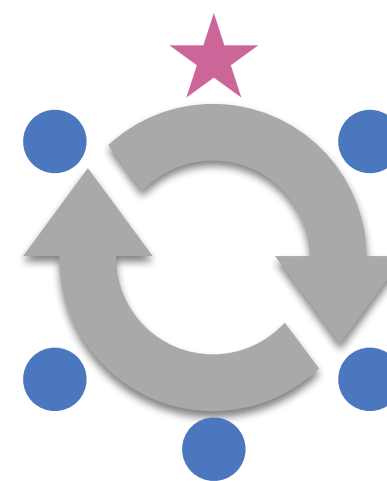
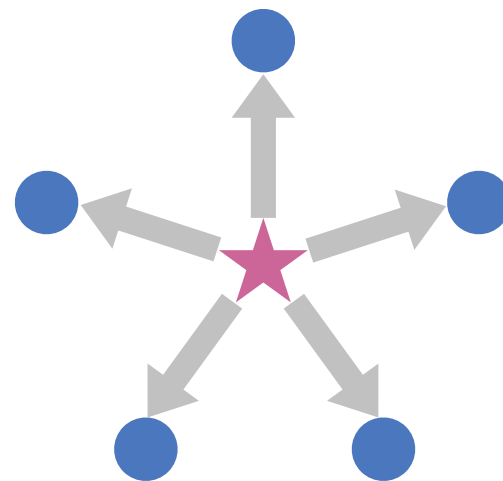
測定方法の統計的精度評価手法

- 新たな試験方法（例えば、動物実験代替法）を普及するためには・・・
 - 試験方法そのものの精度が十分であること
 - 異なるラボで同一試験を実施した際の結果のばらつきを把握すること
- の2つが（統計的観点では）重要



これらを統計的に把握すること = 統計的測定精度評価

一般的には、共同実験（ラウンドロビンテストなど）を実施して行う



★ 試料提供者
● 試料測定ラボ

共同実験の実施方法と結果の統計解析手法についての国際規格が存在する

- ISO 5725シリーズ：測定方法及び測定結果の精確さ（真度及び精度）
 - ← ISO/TC 69（統計的方法の適用）で議論されている
- JIS Z 8402シリーズ：一致規格

併行精度

(試験室内のばらつき)

σ_r^2 併行分散 (偶然誤差)

同じ測定方法、同じ条件で
得られた測定結果の精度



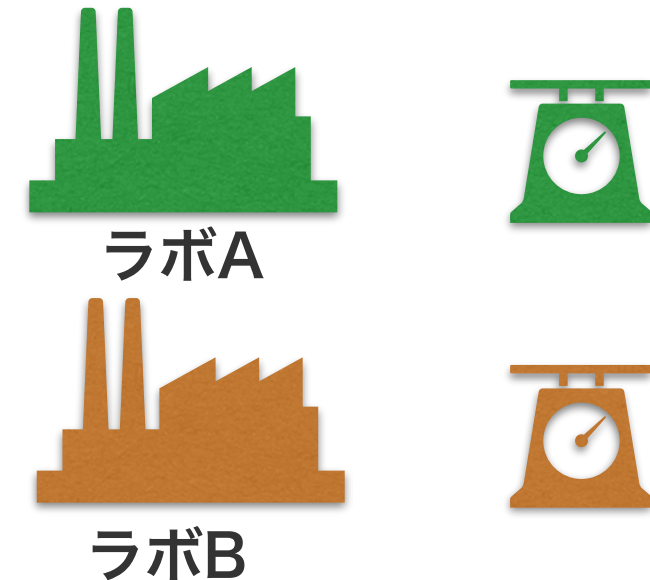
同じ検査員・装置で測定しても
必ず同じ結果になるとは限らない

再現精度

(試験室間のばらつき)

σ_R^2 再現分散

同じ測定方法、異なる条件
で得られた測定結果の精度



異なる検査員・装置で測定したとき
測定結果はばらつく

※ 再現分散 $\sigma_r^2 =$ 併行分散 $\sigma_R^2 +$ 室間分散 σ_L^2

純粋なラボ間でのばらつき

要因	平方和	自由度	平均平方	平均平方の期待値
試験室	$n \sum_{i=1}^L (\bar{y}_i - \bar{\bar{y}})^2$	$L - 1$	$s_{ }^2$	$n\sigma_L^2 + \sigma_r^2$
繰返し	$\sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$L(n - 1)$	s_I^2	σ_r^2
合計	$\sum_{i=1}^L \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{\bar{y}})^2$	$Ln - 1$		

L : ラボ数, n : 各ラボの反復数,

y_{ij} : ラボ i の j 回目の測定値, $\bar{y}_i$: y_{ij} の j に関する平均, $\bar{\bar{y}}$ の y_{ij} の平均

- ▷ 併行分散 (偶然誤差): $\hat{\sigma}_r^2 = s_I^2$
- ▷ 室間分散 (純粋なラボ間のばらつき): $\hat{\sigma}_L^2 = (s_{||}^2 - s_I^2)/n$
- ▷ 再現分散: $\hat{\sigma}_R^2 (= \hat{\sigma}_r^2 + \hat{\sigma}_L^2) = (s_{||}^2 + (n - 1)s_I^2)/n$

データの種類	尺度	例
量的データ	間隔尺度	気温・西暦
	比例尺度	身長・体重
質的データ	名義尺度	血液型
	順序尺度	成績（優/良/可/不可）

- ・ ISO 5725は量的データが対象（分散分析がベース）
- ・ 測定結果が質的データとなる測定方法も少なくない
 - 特に生物学的反応を測定する測定方法（有害性の有無、強／弱／無 etc）
 - 有害性評価に関連する試験方法は、多いに関連する

Q. ISO 5725を質的データに対する試験方法に適用できるのか？

基本的には



2値尺度が対象

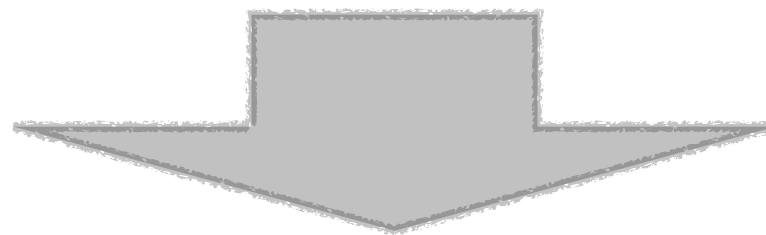
- Langton et al. Int J of Food Micro (2002)
 - 2つの計測結果が同一となる確率に基づく方法
- Wilrich, Accred Qual Assur (2010)
 - 二項分布を仮定し、一元配置分散分析をダイレクトに利用する方法

どちらも、ISO/TC 34/SC 9（食品/微生物学）での議論が発端

- 食品中のリステリア・モノサイトゲネスの検査方法の測定精度

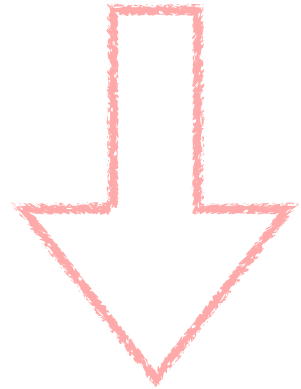
一般の順序尺度が対象

- Gadrich and Bashkansky, J Stat Plan Inference (2012)
 - 離散版の一元配置分散分析 (**ORDANOVA**) を提案



Q. 質的データに対する統計的な測定精度評価手法としては、どれが良いのか？
また、どうやって計算すれば良いのかが、わからない。

Q. 質的データに対する統計的な測定精度評価手法としては、どれが良いのか？
また、どうやって計算すれば良いのかが、わからない。

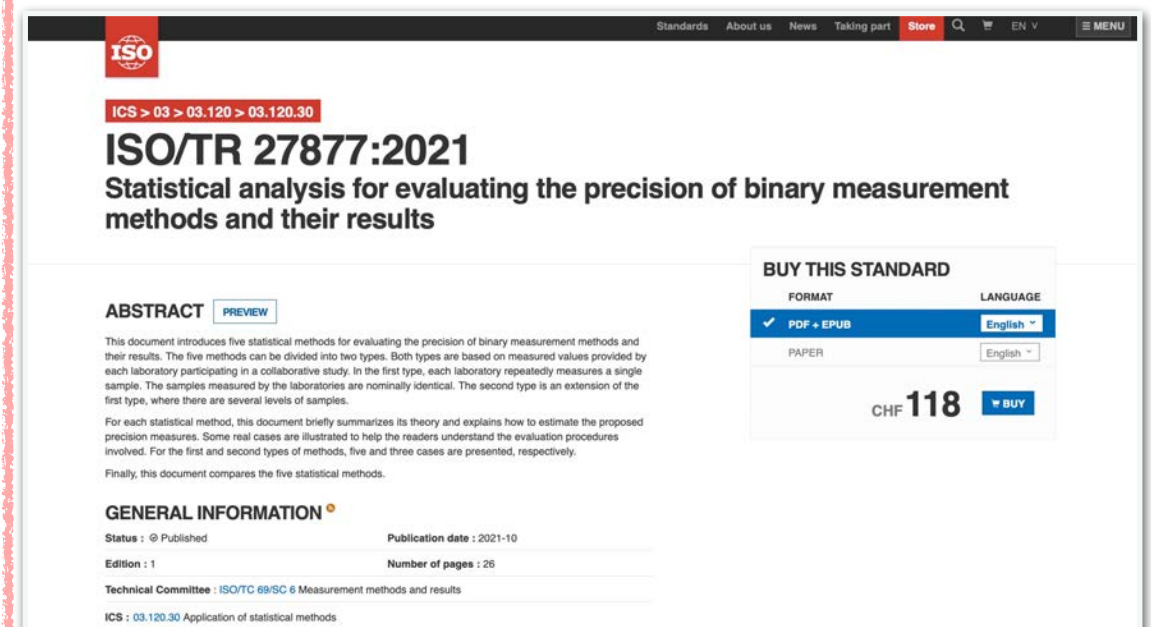


- ・ 2008年にISO/TC 69/SC 6/WG 1で2値データのガイダンス文章を作成することが決定
- ・ 2018年より、竹下がプロジェクトリーダーとなり、大改定
- ・ 2021年に発行

ISO/TR 27877:2021 (TR : Technical Report (技術報告書))

2値の測定方法とその結果の精度評価のための統計的方法

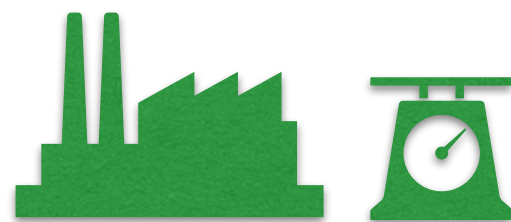
- ・ 3つの既存研究について、それぞれの基礎となっている考え方を概説
- ・ 複数の同一実例を、途中の計算式を省略することなく解析し、各手法で提案されている精度指標を算出
- ・ 各手法で提案されている「併行精度」「再現精度」に相当する指標の換算式を算出し、本質的に同等であることを証明



Gardrich and Bashkansky,
J Stat Plan Inference (2012)

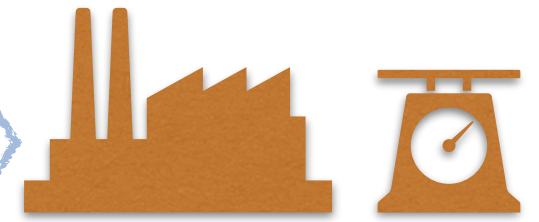
- ・ 順序尺度に対する分散様の指標をベースに、
離散版の一元配置分散分析を提案
- ・ ラボ間差の有無（室間分散=0? or $\neq 0$?) を判定する検定方法は、提案されていない
→ カテゴリー数が3以上（有害性：強／弱／無 etc）の場合は、ラボ間差の有無を検定する方法は提案されていない

カテゴリー数が2の場合は、Wilrich, Accred Qual Assur (2010)が提案済み



ラボA

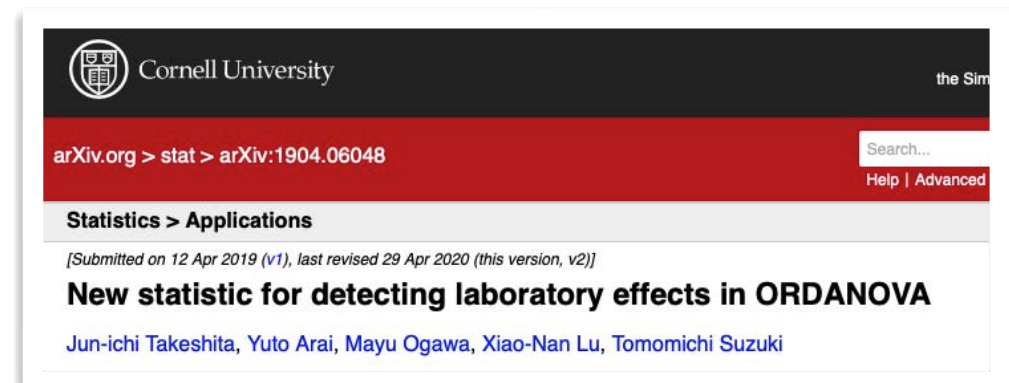
○：平均的な差は●●くらいです
×：本質的に差があります／ありません

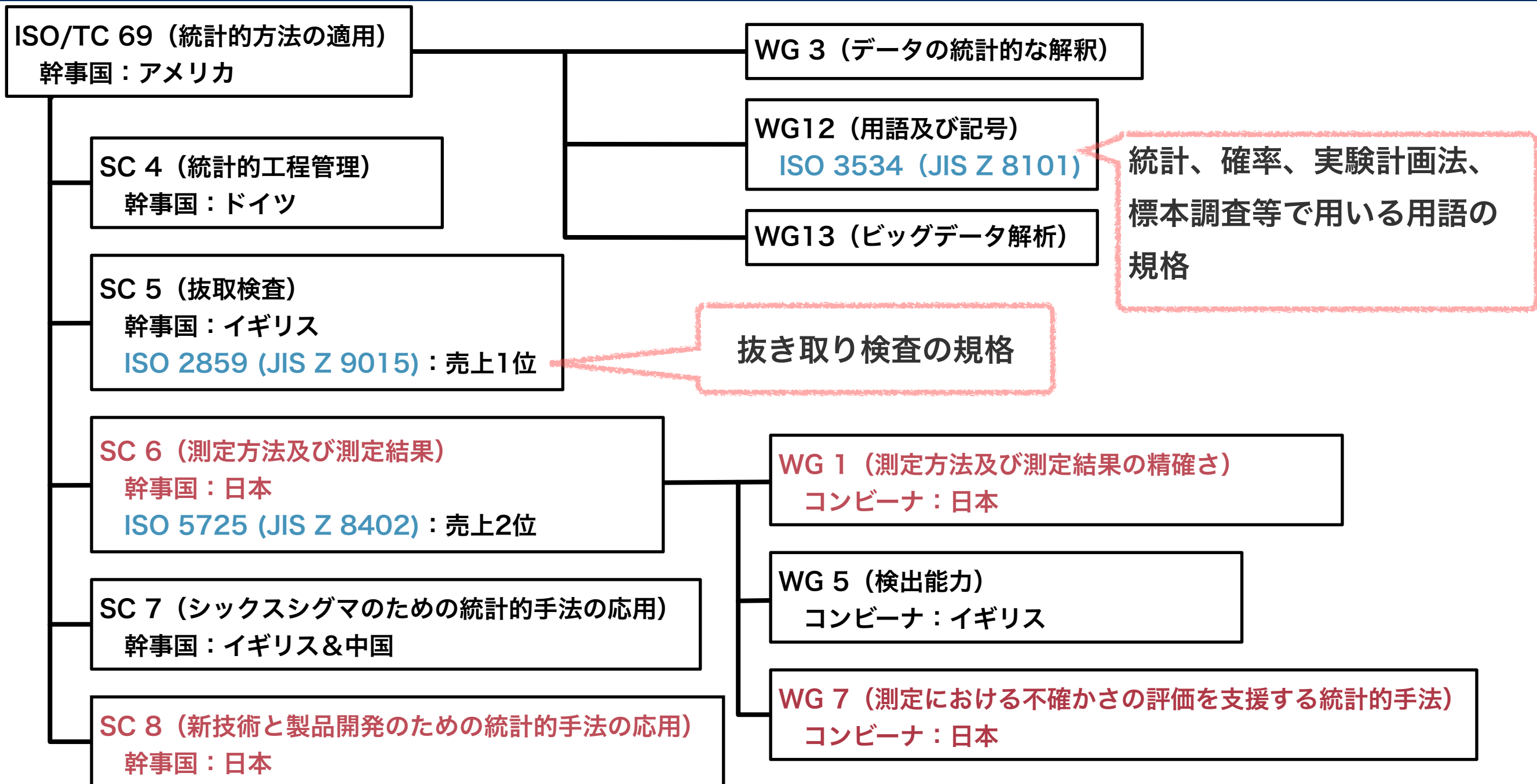


ラボB

JT et al. (preprint on arXiv)で提案

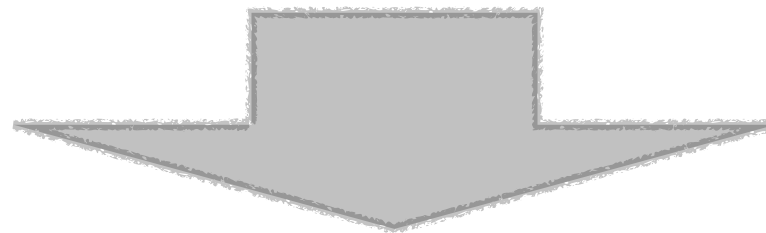
- ・ 検定統計量と、帰無仮説の元で理論的に従う分布関数を導出





- ◎日本は、TC69内の主要なポストを長年、数多く担当しており、影響力は大きい
- ◎竹下は、TC69とSC6のエキスパート、TC69国内対応委員会の委員、SC6国内対応委員会の幹事を担当している
- ◎統計的方法の応用に関連がある規格等の新規提案（のご相談）は随時受付中とのこと

- ◎ ISO 5725は、化学分析、物理分析などが念頭におかれている
 - 生物学的影響を測定する方法に対する統計的精度評価手法は？
 - 質的データに対する測定精度評価手法の整備が必要
 - 生物学的影響の測定は、偶然誤差が大きくサンプルサイズが小さいことへの対応が必要
- ◎ ISO 5725では、1回の測定で1つの量的な数値が得られる方法を対象としている
 - 1回の測定で複数/大量の結果が得られる方法に対する統計的精度評価手法は？
 - 用量反応関係をみる実験のように、複数の測定結果全体で考えたいケースへの対応が必要
 - 次世代シーケンサーのように1回の測定で大量のデータが出てくるケースへの対応が必要



有害性評価のための測定方法に関連する（参考となる）
規格や文章が、今後作られる可能性が高い

有害性評価の合理化に向けた数理科学の役割と応用

種の感受性分布(SSD)の推定手法

- ・ 生態リスク評価分野での研究成果
- ・ 典型3種の有害性データの平均とばらつきからSSDを推定

測定方法の統計的精度評価手法

- ・ 質的データの測定方法に対する統計的精度評価手法の研究
- ・ ISO/TC 69（統計的手法の適用）における活動の紹介

国立研究開発法人産業技術総合研究所
安全科学研究部門

竹下 潤一

Email: jun-takeshita@aist.go.jp

