人工知能を用いた薬物副作用としての痙攣誘発活性の予測

高 夢璇^a 佐藤元重^a 池谷裕二^{*,a,b}

Machine Learning-based Prediction of Seizure-inducing Action as an Adverse Drug Effect

Mengxuan Gao,^a Motoshige Sato,^a and Yuji Ikegaya^{*,a,b}^aGraduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo; 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan; and ^bCenter for Information and Neural Networks; 1-4 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.

(Received October 11, 2017)

During the preclinical research period of drug development, animal testing is widely used to help screen out a drug's dangerous side effects. However, it remains difficult to predict side effects within the central nervous system. Here, we introduce a machine learning-based *in vitro* system designed to detect seizure-inducing side effects before clinical trial. We recorded local field potentials from the CA1 alveus in acute mouse neocortico-hippocampal slices that were bath-perfused with each of 14 different drugs, and at 5 different concentrations of each drug. For each of these experimental conditions, we collected seizure-like neuronal activity and merged their waveforms as one graphic image, which was further converted into a feature vector using Caffe, an open framework for deep learning. In the space of the first two principal components, the support vector machine completely separated the vectors (*i.e.*, doses of individual drugs) that induced seizure-like events, and identified diphenhydramine, enoxacin, strychnine and theophylline as “seizure-inducing” drugs, which have indeed been reported to induce seizures in clinical situations. Thus, this artificial intelligence-based classification may provide a new platform to pre-clinically detect seizure-inducing side effects of drugs.

Key words——artificial intelligence; side effect; epilepsy; clinical; toxicity

はじめに

2016年3月、世界中を駆け巡ったニュースは記憶に新しく、誰もが衝撃を受けたことだろう。人工知能 AlphaGo が世界最強のプロ囲碁棋士、李世石 9 段（国際棋戦で 18 回の優勝経験あり）を見事に下した。長年の人類 vs. 人工知能（artificial intelligence; AI）というボードゲームにおける勝負の中で人類にとっては最後の砦であった囲碁で、ついに、AI が人類を凌駕した瞬間である。近い将来は不可能と言われてきた中でのこの勝利は、AI 技術が予想を上回る加速度的進歩を遂げていることを裏付けるものとなった。

AI は医療界にも進出している。特に畳み込みニューラルネットワークを用いた「ディープラーニ

ング」の医療画像分析に関する論文は 2015 年以降急増した。¹⁾ 病態の分類や腫瘍の検出などの正確性（Accuracy）において 90% を超える報告も多い。Guan *et al.* では、ニューラルネットワーク「self-validation cerebellar model articulation controller; SVCMAC」を用いて、乳がんの診断における腫瘍の良性・悪性を分類している。²⁾ 従来の型のニューラルネットワークに自己検証（self validation）の機能を追加しているのが特徴で、683 の乳がんデータを 50% 学習用に、30% を validation 用に、20% をテスト用に用いたところ Accuracy で 96.5% を実現した。また、ニューラルネットワーク以外の例としてファジー論理を用いた人工知能も活躍をみせている。Shankar *et al.* ではグレーレベル同時生起行列（gray level cooccurrence matrix; GLCM）による空間フィルタ処理により脳の MRI 画像から特徴量を抽出し、Gustafson-Kessel Fuzzy 分類アルゴリズムにより正常か異常かを判別させたところ、全データセットで 95% を超える Accuracy となった。³⁾ また、私たちの本研究では、ニューラルネットワーク

^a東京大学大学院薬学系研究科（〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1）、^b脳情報通信融合研究センター（CiNet）（〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-4）

*e-mail: yuji@ikegaya.jp

本総説は、日本薬学会第 137 年会シンポジウム S15 で発表した内容を中心に記述したものである。

Caffe を用いた手法で薬剤の痙攣誘発性副作用の検出に検討薬物は少量ながら 100% の Accuracy を達成した。

ヒトにおいて痙攣を誘発する副作用が報告されている薬物は、解熱鎮痛剤や抗生物質を始めとして様々知られている。当然、医薬品が出回る前にあらかじめこの副作用の存在を検出することは肝要である。その検出法として、この種の薬物の投与により海馬急性スライスに特徴的な局所場電位 (local field potential; LFP) の変化が引き起こされることが知られている。しかし、この変化は視認は容易だが、電位の変動を古典的な数学により定義し、統計学的に判別することが困難であった。

そこで、電位の変動に着目するのではなく、人間の視認による判断に着想を得て LFP を画像として扱い、AI に画像認識させることにした。マウスの海馬急性スライスにおいて、薬物適用時に記録された LFP から神経活動をすべて検出して画像に変換し、画像をニューラルネットワーク Caffe に識別させることで、痙攣誘発性の有無を判定させた。結果は、Accuracy で 100% となり、AI の威力を存分に思い知らされる結果となった。

この研究成果は医薬品開発の前臨床試験における新たな評価方法になると期待される。現在まで、前臨床試験において中枢神経系に対する副作用の検出は困難とされているが、⁴⁾ AI を用いた前臨床試験が実現できれば、人間の目による判断に伴うバイアスや疲れを排除でき、明瞭な基準による正確な振り分けが可能となるはずである。以下に詳細に記述する。

海馬急性スライスにおける痙攣様発火の観察

痙攣誘発作用を持つ薬物は、海馬急性スライスにおいて同期かつ持続的な異常発火を引き起こすことが知られている。⁵⁾ こうした発火は痙攣様発火 (seizure-like event; SLE) と呼称され、LFP の記録により検出できる。私たちは SLE の発生を確認するために、まず γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) 拮抗薬であるピクロトキシンをマウスの海馬急性スライスに適用した。また、神経細胞の興奮性を高め、SLE の発生を促進するために、スライスを還流する人工脳脊髄液中の Mg^{2+} 濃度をあらかじめ低下させた。⁶⁾

私たちはピクロトキシンを人工脳脊髄液に溶かし、1, 3, 10, 30, 100 μM という 5 段階の濃度で、スライ

Fig. 1. Picrotoxin Induced SLEs in a Concentration-dependent Manner

Picrotoxin was applied for 10 min at each concentration. An SLE, enlarged in the bottom inset, comprising an initial burst and subsequent repetitive bursts.

ス上に徐々に濃度を上げて還流し、LFP の変化を記録した (Fig. 1)。LFP の記録には 64 チャンネル多電極アレイを利用しており、海馬白板という海馬と皮質をつなぐ脳領域からとったデータを解析に用いた。Figure 1 の LFP トレースが示すように、ピクロトキシンの濃度が 10 μM を超えると、繰り返して生じる電位変化が観察されるようになった。これらの電位変化を拡大すると、最初の高いピークに小さい振動が続くという形になっている。このような神経活動は SLE の特徴に一致し、ピクロトキシンの濃度に依存して発生する。

痙攣誘発作用を持つ薬物は痙攣様発火を引き起こす

私たちは、臨床上痙攣誘発性の副作用が報告された薬物が脳スライスでも SLE を誘発するか、また逆に、痙攣の副作用の報告がない薬物が SLE を生じさせないかを調べた。そのため、作用機序が異なる 13 種類の薬物を選定した。これらの薬物のうち、ジフェンヒドラミン (ヒスタミン H1 受容体拮抗薬)、エノキサシン (DNA ジャイレース阻害薬)、ストリキニーネ (グリシン受容体阻害薬) 及びテオフィリン (アデノシン受容体拮抗薬) の 4 種は、臨床上に痙攣を誘発する副作用が報告されている。各薬物をヒトにおける血漿中濃度の 0.3 倍、1 倍、3 倍、10 倍及び 30 倍の 5 段階の濃度でスライス上に還流し、同時に LFP の変化を記録した (Fig. 2)。

記録された各薬物の LFP から見ると、痙攣誘発作用が報告された薬物は、濃度依存的に SLE を引き起こすことがわかった。これに対して、ほかの薬物は SLE を誘発しなかった。そのうち、ケタミン

Fig. 2. Example Traces of Alveus LFPs Recorded in the Presence of 14 Different Drugs

The drugs reported to exhibit seizure-inducing side effects, including diphenhydramine, enoxacin, strychnine, and theophylline, indeed induced SLEs.

やメタンフェタミンといった精神作用を持つ薬物もSLEを誘発しなかった。つまり、今回の実験系では、SLEがみられるかどうかを判別することで、痙攣誘発作用を持つ薬物を見分けることが可能である。

LFPの画像化とAIによる痙攣誘発作用の判別

薬物の適用により、痙攣誘発作用を持つ薬物はSLEを引き起こしたが、Fig. 2のオセルタミビルのように、SLE以外の同期的な神経活動が観察されることもある。SLEとSLEではない神経活動はヒトの目で見れば容易に区別できるが、これを数学的に厳密に定義して検出することが困難である。そこで、すべての神経活動からSLEのみを選別し、痙攣誘発作用を持つ薬物を自動的に判別するために、

Fig. 3. LFP Images

Large activity events detected from the LFP trace at each drug concentration were aligned to their onsets and superimposed onto a 227×227 pixel picture ($n=5$ slices for each drug). Pictures containing at least one SLE are outlined in black.

私たちはAIによる画像識別を利用した。

まず、記録されたLFPから傾きが $1 \mu\text{V}/\text{ms}$ 以上の電位変化をすべて検出した。検出された最初の高いピークに対して、ピークの -200 ms から $+2070 \text{ ms}$ の時間帯でのトレースを取り出し、 -50 から $+177 \mu\text{V}$ の振幅の範囲を、 227×227 ピクセルの画像に変換した。つまり、画像上の1つのピクセルは $10 \text{ ms} \times 1 \mu\text{V}$ の情報を含んでいる。

次に、各薬物に対して、各濃度で検出されたすべての神経活動から得た画像を重ね合わせ、一枚の画像にした。これにより、ピクロトキシンを含め、全14種類の薬物のそれぞれ5段階の濃度から70枚の

画像が得られた (Fig. 3). 太枠で示したように, SLE を誘発した 5 種の薬物において, 計 12 枚の画像が SLE を含んでいる. 一方, メタンフェタミンやオセルタミビルなどの場合, 自発的な LFP 活動が観察されるが, これらの神経活動では最初のピークに持続的な発火がついておらず, SLE ではないことを画像から確認できる.

私たちは AI を用いて, SLE と SLE ではない神経活動を正確かつ客観的に判別させようと考えた. そのために, ニューラルネットワークの層構造を模した, 画像識別に特化された AI である Caffe を利用した.⁷⁾ Caffe は画像を解析し, ニューラルネットワークの第六層にて, 画像の特徴を抽出して 4096 次元のベクトルデータに変換できる. この多次元のベクトルデータに対して主成分分析 (principal component analysis; PCA) を行い, データ間のばらつきを最大に保存しながら, 2 次元に圧縮して第一及び第二主成分 (PC1, PC2) の空間にプロットした [Fig. 4(A)]. プロットでは, 1 つの点が一枚の LFP 画像に対応している. SLE を含む画像が対応する点を丸で示すと, これらの点は SLE を含まない点と異なる空間象限を占めることが分かった. さらに, 判別関数の一種であるサポートベクターマシン (support vector machine; SVM) を用いて, 単一の直線により, これらの点を分離することができた. すなわち, 痙攣誘発作用を持つすべての薬物は, SVM で引いた境界線の右側に少なくとも 1 つの点を持つものに対して, 痙攣誘発作用を持たない薬物はすべての点が境界線の左側にある. つまり, Caffe 及び SVM を用いて, LFP の画像からその特徴を見出し, SLE を誘発する薬物を正しく識別することができたことになる.

薬物の痙攣誘発作用を高精度で予測できる

最後に, 交差検証を用いて薬物の痙攣誘発作用の予測を行った. 検討した 14 種類の薬物から 1 種を除き, 残りの薬物のデータのみから, 上記と同じ方法で, 痙攣誘発作用を持つ薬物を分離する境界線を SVM で引いた. この境界線を用いて, 先ほど除かれた薬物が境界線のどちらにプロットされるかを見ることで, 当該薬物は痙攣誘発作用を持つかどうかを予測した. 試行の結果, 14 種類すべての薬物について, 正確な予測が得られた. つまり, 予測の Accuracy が 100% であった.

Fig. 4. Detection and Prediction of SLEs Using PCA and SVM

A: Concentration-response curves in the PC space. The 4096-dimensional feature vectors were reduced in dimension using PCA and plotted in the space of the first two PCs, in which each concentration of each drug is indicated in a single point, and different concentrations of the same drug are connected with a line. Black circles indicate doses that induced SLEs (the same as Fig. 3). A boundary (black line) was defined using SVM. All data points containing SLEs were located in the right area, indicating a perfect separation of SLEs in the PC space. B: The boundary determined in (A) correctly predicted the SLE-inducing effects of two new drugs, isoniazid and metoclopramide. In both drugs, parts of data of contained points that were located in the right area of the boundary, indicating their SLE-inducing effects.

この実験系を用いて, 全く新しい 2 種類の薬物について追加予測を行った. この 2 種類の薬物はイソニアジド (ミコール酸合成阻害薬) とメトクロプラミド (ドパミン D2 受容体拮抗薬) であり, どちらも痙攣誘発作用が報告されている. 既に実験を行った 14 種類の薬物のデータに基づいて, SVM で境界線を引き, 新しい 2 種の薬物を同じプロトコルでプロットした. Figure 4(B) のように, どちらの薬物も境界線の右側までプロットされ, 痙攣誘発作用を持つと判別され, 実際の報告と一致している.

展望

本研究は AI による画像認識を用いて, LFP を画像化し解析することで, 薬物の痙攣誘発作用を予測

する実験系を構築した。この実験系は薬品開発の前臨床段階において、動物試験の代わりに、化合物の痙攣誘発作用を精度よく予測できる手法の1つとなることが期待される。また、本研究で用いられた画像認識のモデルは、おそらく多くの一般的な実験データ解析にも応用できると考えている。これからAIを用いたデータ解析は、自動化や高速化のみならず、人為バイアスのかからない高確度化・高精度化を実現するものと期待される。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Litjens G., Kooi T., Bejnordi B. E., Setio A. A., Ciompi F., Ghafoorian M., van der Laak J. A. W. M., van Ginneken B., Sánchez C. I., *Med. Image Anal.*, **42**, 60–88 (2017).
- 2) Guan J. S., Lin L. Y., Ji G. L., Lin C. M., Le T. L., Rudas I. J., *Acta Polytech. Hungarica*, **13**, 39–52 (2016).
- 3) Shankar A. S., Asokan A., Sivakumar D., *Int. J. Latest Eng. Res. Appl.*, **1**(5), 68–72 (2016).
- 4) Tamaki C., Nagayama T., Hashiba M., Fujiyoshi M., Hizue M., Kodaira H., Nishida M., Suzuki K., Takashima Y., Ogino Y., Yasugi D., Yoneta Y., Hisada S., Ohkura T., Nakamura K., *J. Toxicol. Sci.*, **38**, 581–598 (2013).
- 5) Easter A., Sharp T. H., Valentin J. P., Pollard C. E., *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.*, **56**, 223–233 (2007).
- 6) Anderson W. W., Lewis D. V., Swartzwelder H. S., Wilson W. A., *Brain Res.*, **398**, 215–219 (1986).
- 7) Jia Y., Shelhamer E., Donahue J., Karayev S., Long J., Girshick R., Guadarrama S., Darrell T., *arXiv.org*, 1408.5093 (2014).