

プロジェクトの概要について

平成25年9月26日

資料5-1 事業の目的・政策的位置付けについて

資料5-2 概要について

資料5-3 研究会開発マネジメント・体制等について

資料5-4 標準化等のシナリオ、波及効果について

資料5-5 成果詳細について(非公開)

「肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro試験法の開発」の 事業の目的・政策的位置付けについて

平成25年9月26日
経済産業省 化学物質管理課

目次

- | | |
|-------------|--------|
| 1. 事業の目的 | p. 2-3 |
| 2. 政策的位置付け | p. 4-5 |
| 3. 国の関与の必要性 | p. 5 |

1. 事業の目的

●社会的背景(1)

◆2002年持続可能な開発に関する世界首脳会議で「WSSD目標」

“予防的取組方法に留意しつつ、透明性のある科学的根拠に基づくリスク評価手順と科学的根拠に基づくリスク管理手順を用いて、化学物質が、人の健康と環境にもたらす著しい悪影響を最小化する方法で使用、生産されることを2020年までに達成する”ことが国際合意された。

世界の化学物質管理政策の流れはハザードベース管理からリスクベース管理へとシフト

$$\boxed{\text{リスク}} = \boxed{\text{有害性}} \times \boxed{\text{暴露量}}$$

1. 事業の目的

●社会的背景(2)

WSSD目標達成のための取り組み例

◆ 欧州: REACH規制

◆ 日本: 化学物質審査規制法

◆ 各国: 化学物質の分類及び表示に関する世界調和システム(GHS)の導入

すべての化学物質を**リスク評価**の対象

化学物質の**有害性情報**の分類、表示

多様なエンドポイントについて**有害性評価**を実施するニーズが高まっている。

1. 事業の目的

●社会的背景(3)

従来の化学物質の有害性評価

- ◆ 数ヶ月から数年の試験期間
- ◆ 動物を多数用いる
- ◆ 高額な費用



多様なエンドポイントに係る**迅速かつ効率的**な試験法が必要

1. 事業の目的

●目的

国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、培養細胞手法等による評価技術の確立を目的とする。

上記目的のために本事業が実施する研究開発

培養細胞手法等により、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進める。更に国際標準へと発展させ、我が国の石油精製物質の安定供給に資することが可能となる。

2. 政策的位置付け

●本事業に関連する国の計画

○第4期科学技術基本計画（2011年8月閣議決定）

- ◆我が国が取り組むべき重要課題として、産業競争力の強化に向けた共通基盤の強化を設定
- ◆課題達成のため、新たなものづくり技術の共通基盤として、安全性に関する評価手法等を構築するとしている

○技術戦略マップ（2010年6月経済産業省編）

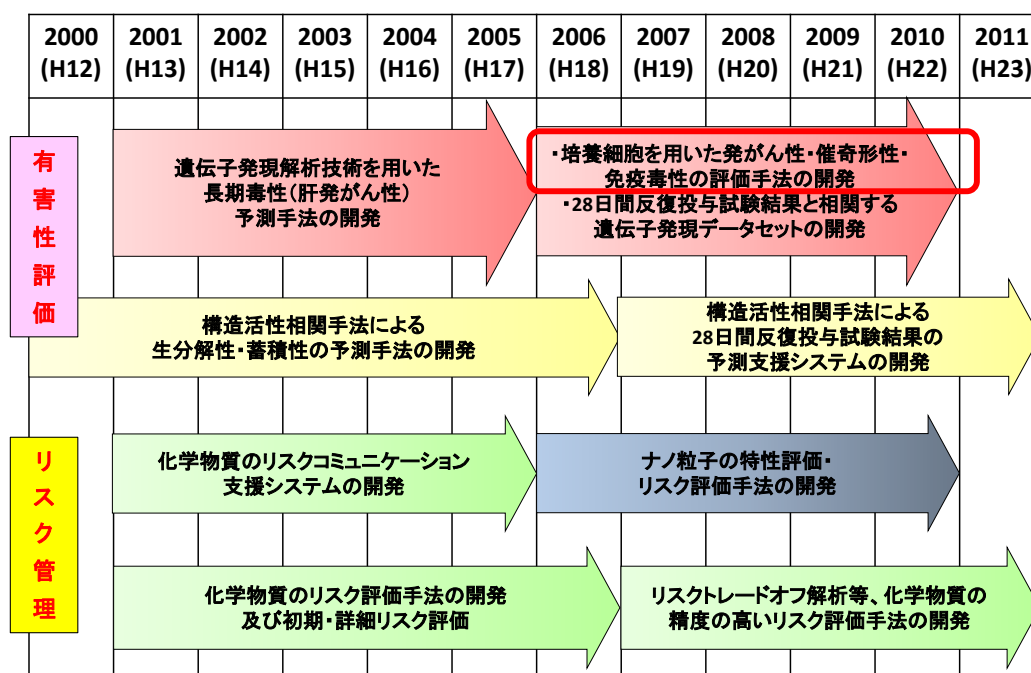
- ◆化学物質総合評価管理分野の技術マップ

関連する技術課題

- (72) ES細胞を用いたin vitro試験法
- (74) 長期毒性についての簡易でハイスループット可能なin vitro試験法
- (78) マルチエンドポイントの有害性評価手法

2. 政策的位置付け

●先行するNEDO事業の成果の活用



2. 政策的位置付け

● 化学物質管理の世界的な動向における本プロジェクトの位置づけ

WSSD目標達成のための取り組み例

- ◆ 欧州: REACH規制
 - ◆ 日本: 化学物質審査規制法
 - ◆ 各国: 化学物質の分類及び表示に関する世界調和システム(GHS)の導入
- すべての化学物質を**リスク評価**の対象
- 化学物質の**有害性情報**の分類、表示

本プロジェクトで開発する有害性評価手法はこうした法規制等の裏付けとなる技術である

3. 国の関与の必要性

- ◆ 国内の化学物質管理の円滑な実施に資する研究開発である。
- ◆ 化学物質管理規制等の行政の裏付けとなる技術であるため、国が主導して判断基準やルールを構築することにより、公平、中立な手法として信頼性が確保される。
- ◆ 将来的には、国際標準化にむけた取り組みを行い、実用化、普及を目指す。
- ◆ 平成22年度までNEDOにおいて実施した化学物質のリスクに対応する技術開発により得られた知見等を活かす。

経済産業省の研究開発マネジメント機能を提供して実施することが適当

「肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro試験法の開発」の概要について

平成25年9月26日

総括PL 小島 肇(国立衛研)

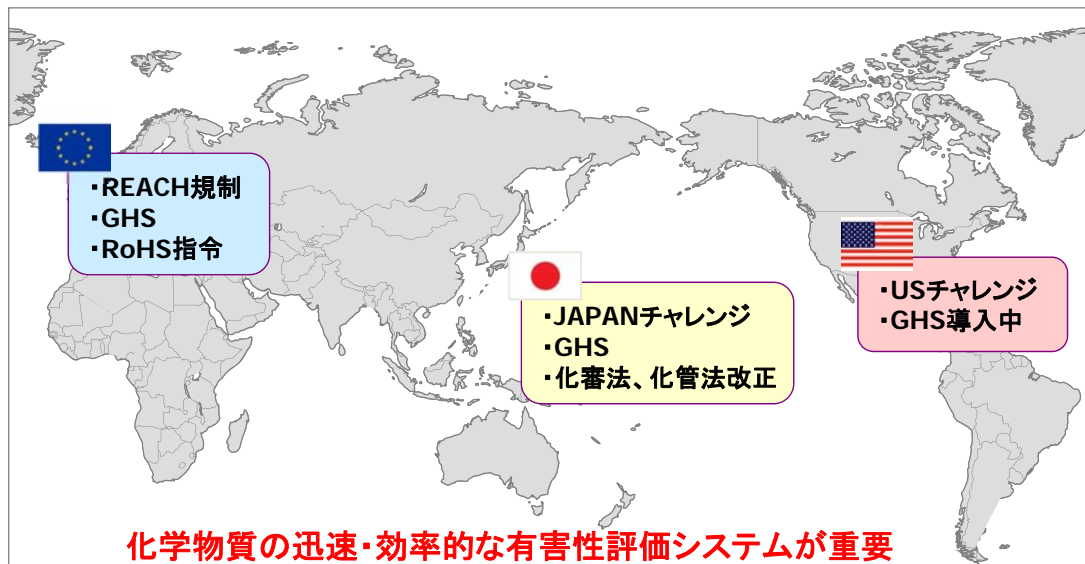
目次

1. プロジェクトの位置付け p. 2
2. 目標 p. 2-4
3. プロジェクトの概要 p. 4-5
4. 成果、目標の達成度 p. 6

背景 世界的な化学物質管理の流れ

2002年「持続可能な開発に関する世界首脳会議(WSSD)」

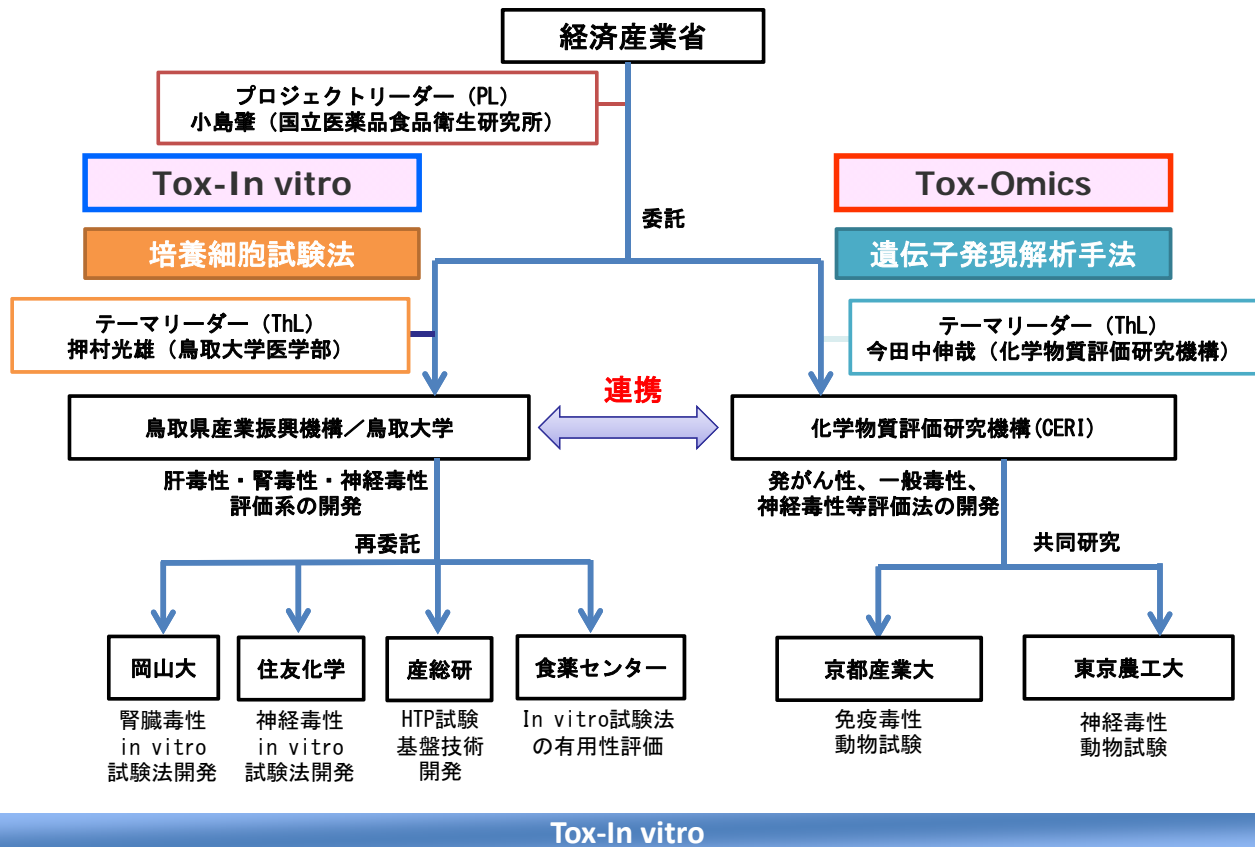
- ・2020年までに化学物質の製造と使用による人健康と環境への悪影響の最小化
- ・国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ(SAICM)の策定を決定⇒2006年採択
- ・化学品分類表示調和システム(GHS)の実施を決定



研究開発の化審法への適用と具体的目標

化審法： 有害性評価項目 ⇒限定的	化学物質のスクリーニング毒性試験 28日間反復投与試験 <i>in vitro</i> 試験(変異原性試験) 生態毒性
化審法改正	新規・既存化学物質をリスク評価の対象とする新たな規制手法を導入
ヒト健康影響に関する有害性評価項目の課題	<ul style="list-style-type: none"> ● エンドポイント(発がん性、一般毒性、神経毒性等)の多くは動物への反復投与試験等で数ヶ月から数年の期間を要する ● スクリーニング手法として、信頼性が高く、効率的な評価技術は十分に確立されていない
先導的取り組み	特定のエンドポイントについて 遺伝子発現変動解析 や 培養細胞 を活用した迅速で効率的な評価技術の活用が注目されている
具体的目標	<ul style="list-style-type: none"> ● 反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用した有害性予測手法の開発 ● 複数の<i>in vitro</i>試験法の開発 ● 迅速かつ効率的に実施できる有害性評価システム等の構築

プロジェクトの実施体制(ARCH-Tox)



Tox-Omics研究開発の目標

試験から得られる組織・器官の遺伝子発現量を解析し、化学物質の迅速かつ効率的な評価手法を開発することで、化学物質の有害性評価を高度化し、迅速かつ効率的な試験の実施に貢献することを目的とする。

【目標】28日間反復投与試験で複数の毒性エンドポイントが検出できる新たな試験法を開発する

本研究では、石油精製化学物質等の反復投与毒性試験を対象

化審法

分解性

蓄積性

化学物質のスクリーニング毒性試験

28日間反復投与

In vitro試験

生態毒性試験



発がん性

免疫毒性

神経毒性

一般毒性

【期待される成果】

- ✓ 動物数削減/費用削減; 一つの動物実験で複数の毒性を検出/予測できる
- ✓ 毒性メカニズム (i.e. Mode of Action) に基づいた毒性評価
- ✓ 定量性の向上/高精度化; 遺伝子発現量による客観的かつ定量的な評価
- ✓ 有害性情報の取得; 石油精製物質等の反復投与毒性試験

Tox-in vitro研究開発の目標

化審法

分解性

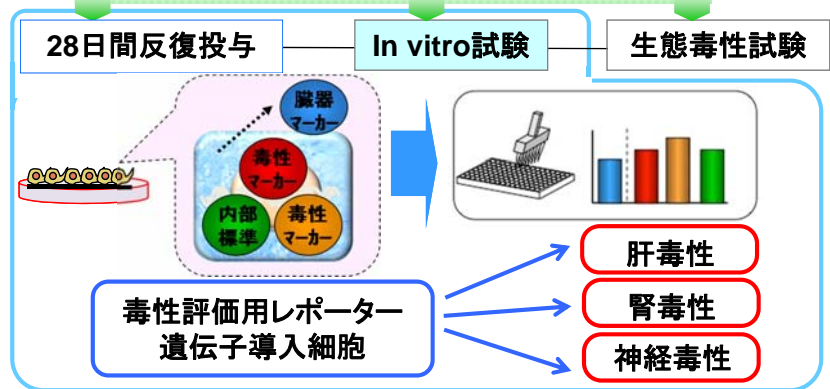
蓄積性

本研究では、**石油精製化学物質等の反復投与毒性試験**を対象

28日間反復投与と動物試験を培養細胞を用いた**in vitro**試験法で補完できる有害性スクリーニングシステムを開発することで、**化学物質の有害性評価を高度化し、迅速かつ効率的な試験の実施に貢献すること**を目的とする。

【目標】毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、迅速かつ効率良く有害性を評価できる新たな試験法を開発する

化学物質のスクリーニング毒性試験



【期待される成果】

- ✓ **時間削減/費用削減**; HTPスクリーニングにより多検体の迅速な解析が可能
- ✓ **再現性向上/高精度化**; 将来的に国際的ガイドライン化が可能な試験法を開発
- ✓ **複数のエンドポイントの試験法の開発**; 新しい腎毒性、肝毒性、神経毒性試験法
- ✓ **In vitro有害性評価試験法を開発する基盤システムの構築**; 信頼性が高く、効率の良いスクリーニング手法を開発する際に広く活用されるメソッドへの発展

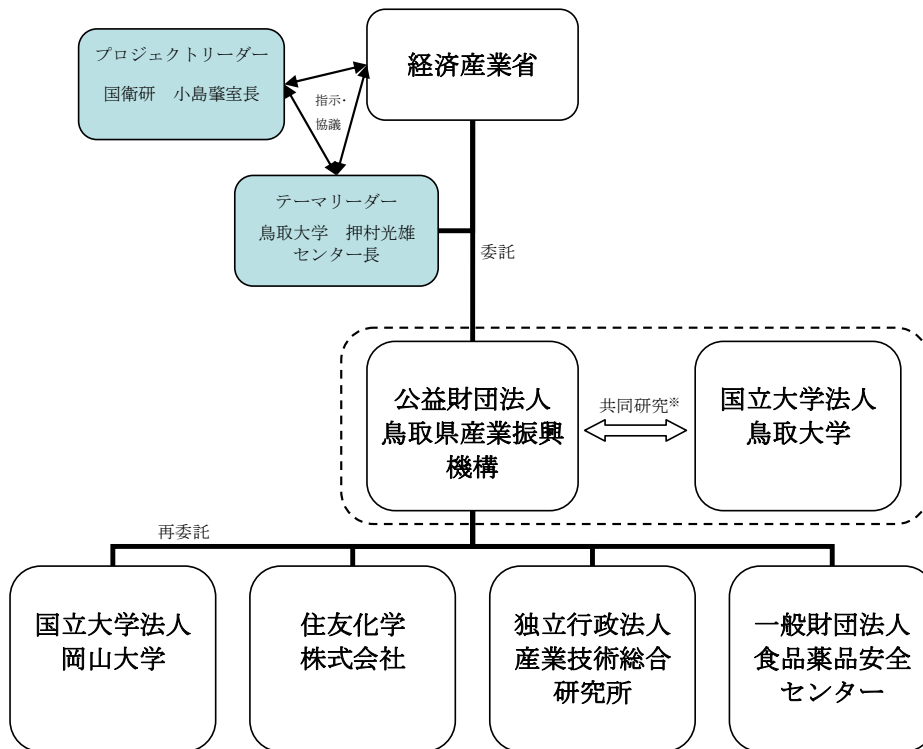
Tox-In vitro

7

2. プロジェクトの概要

概要	本研究開発では、石油精製物質等の化学物質において、国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、培養細胞手法等による評価技術の確立を目指す。
実施期間	平成23年度～平成27年度（5年間）
予算総額	3.08億円（委託） （平成23年度：1.03億円 平成24年度：1.03億円 平成25年度：1.02億円）
実施者	公益財団法人鳥取県産業振興機構、国立大学法人鳥取大学、国立大学法人岡山大学、独立行政法人産業技術総合研究所、一般財団法人食品薬品安全センター、住友化学株式会社
プロジェクトリーダー	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験センター 新規試験法評価室（室長） 小島 肇

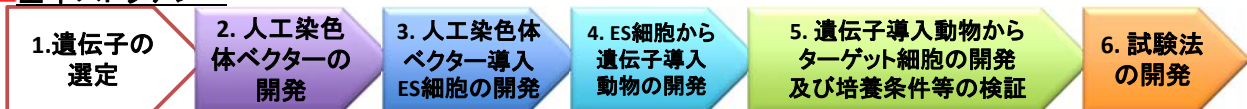
研究開発実施体制



※公益財団法人鳥取県産業振興機構及び国立大学法人鳥取大学は共同研究契約を締結し協力体制により本事業を実施

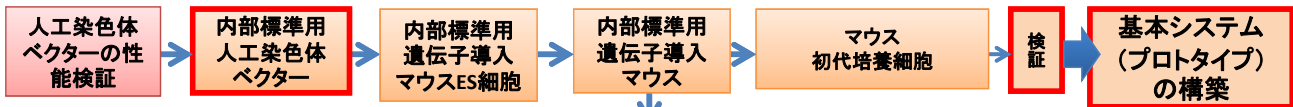
細胞プロジェクト (Tox-In vitro) イメージ

■ 基本戦略

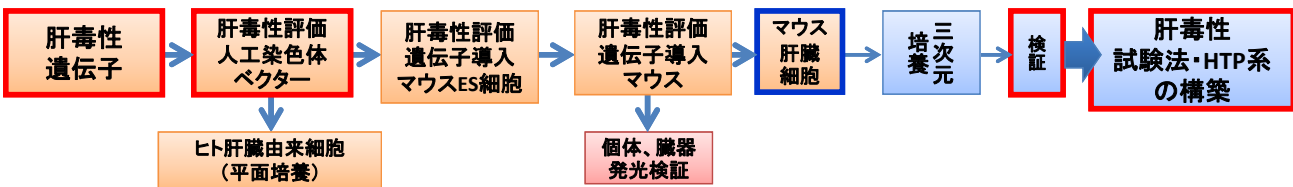


鳥取県産業振興機構・鳥取大 岡山大 食薬センター 産総研
住友化学 産総研
: 食薬センターと連携して実施
: 産総研と連携して実施

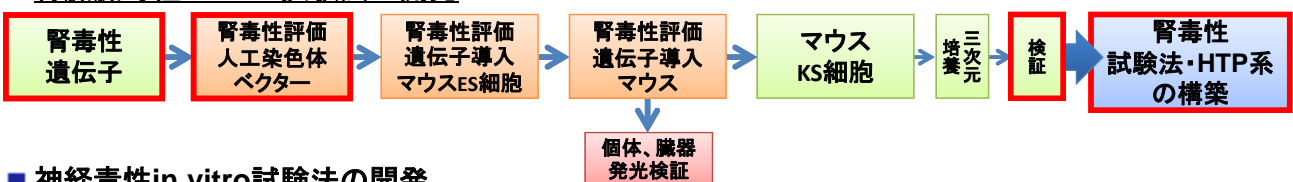
■ ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■ 肝臓毒性in vitro試験法の開発



■ 腎臓毒性in vitro試験法の開発



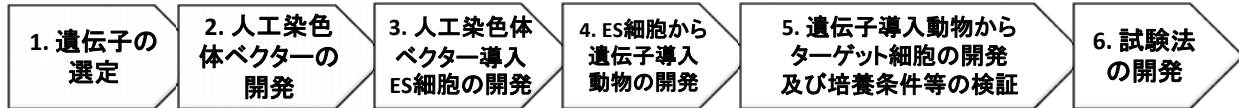
■ 神経毒性in vitro試験法の開発



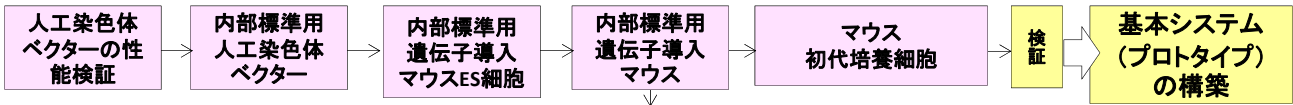
細胞プロジェクト(Tox-In vitro)進捗状況

50%以上達成
 25%程度達成
 達成済み
 25%未満

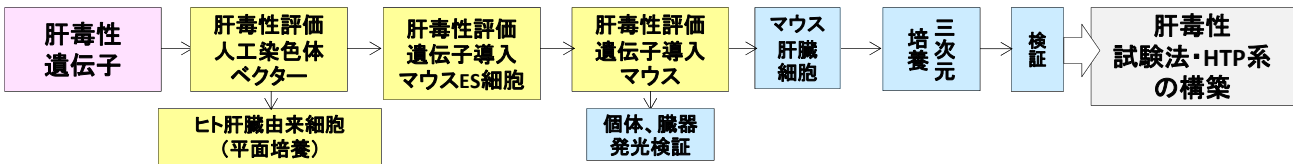
■基本ストラテジー



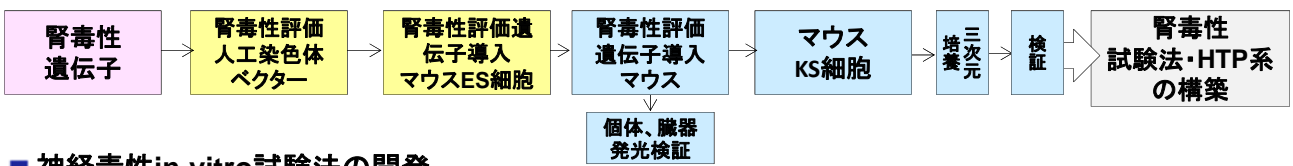
■ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■肝臓毒性in vitro試験法の開発



■腎臓毒性in vitro試験法の開発



■神経毒性in vitro試験法の開発



資料6 p.17

Tox-In vitro

11

●長期間

●高コスト

●多数の動物

●大量の化合物

現行の化審法による有害性試験

遺伝子発現解析手法(CERI)

- 短時間
- 低コスト
- 動物数の削減
- 化合物量の削減

Toxicity Pathway (メカニズムベース)

毒性関連遺伝子の探索

培養細胞試験法

- 短時間
- 低コスト
- 高精度
- 多数の化合物の評価

多色発光細胞の開発
新規試験法の開発

化合物の各毒性発現可能性を短時間・高精度に予測できる新規スクリーニングシステムの開発

有害性評価試験では、主に肝障害、腎障害、神経障害などの毒性が観察される(28日間反復投与試験(げっ歯類)では45%が肝臓、次いで腎臓(13%))
 ➔ **肝毒性、腎毒性、神経毒性**に注目

Tox-In vitro

12

「肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro試験法の開発」の 研究開発マネージメント・体制等について

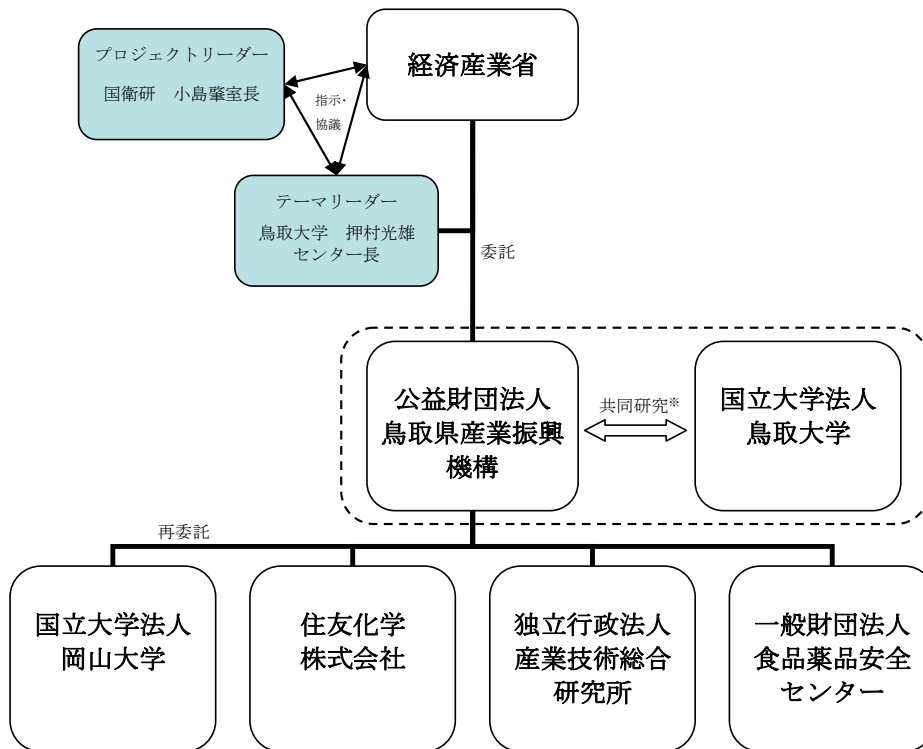
平成25年9月26日

ThL 押村 光雄(鳥取大学)

目次

1. 研究開発マネージメント・体制等
p. 2-5
2. 成果、目標の達成度
p. 6-10

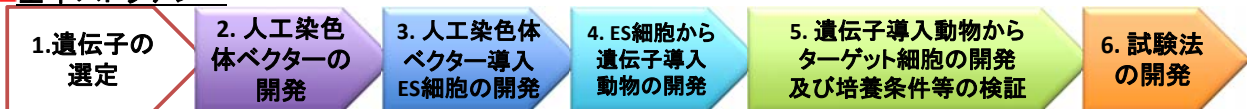
研究開発実施体制



※公益財団法人鳥取県産業振興機構及び国立大学法人鳥取大学は共同研究契約を締結し協力体制により本事業を実施

細胞プロジェクト (Tox-In vitro) イメージ

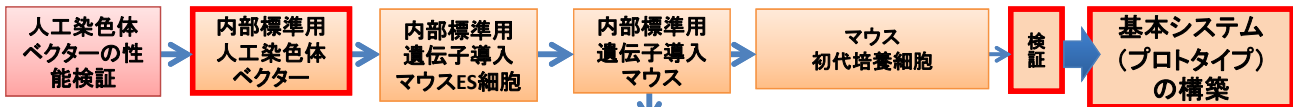
■ 基本ストラテジー



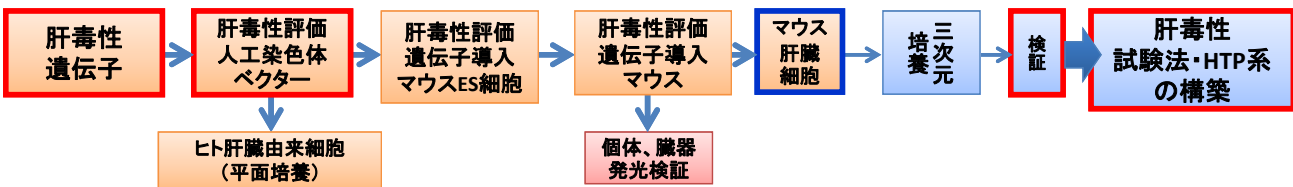
鳥取県産業振興機構・鳥取大 岡山大 食薬センター
住友化学 産総研

□ : 食薬センターと連携して実施
□ : 産総研と連携して実施

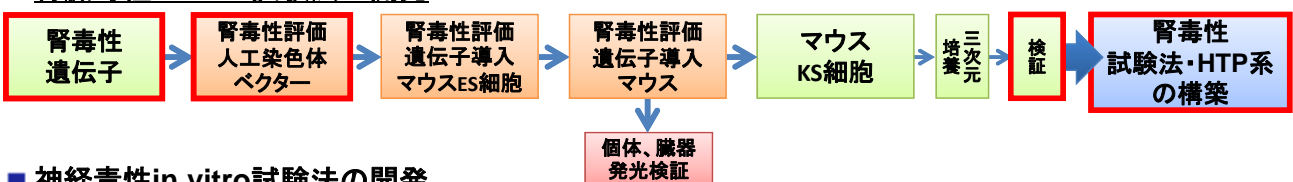
■ ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■ 肝臓毒性in vitro試験法の開発



■ 腎臓毒性in vitro試験法の開発

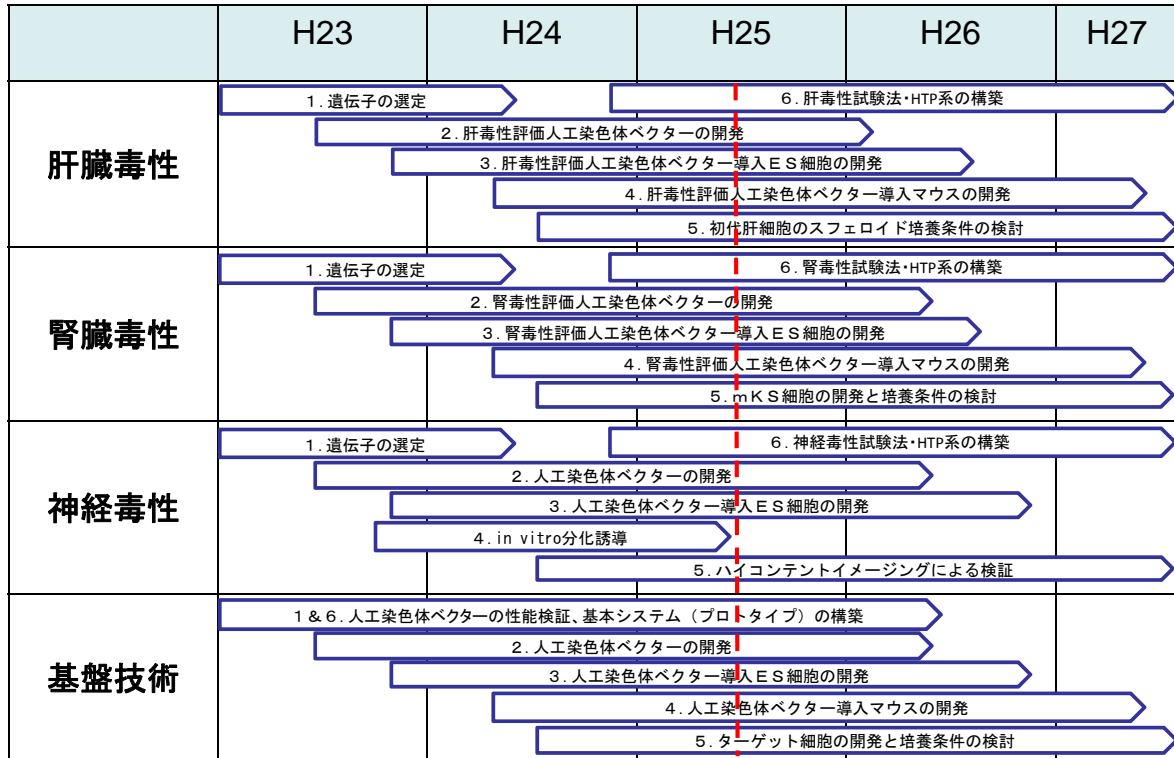


■ 神経毒性in vitro試験法の開発



研究開発計画

★中間評価



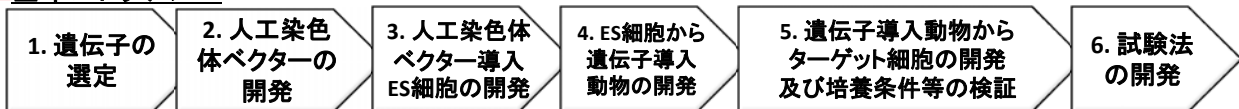
資料6 p.178

Tox-In vitro

5

細胞プロジェクト(Tox-In vitro)進捗状況

■基本ストラテジー



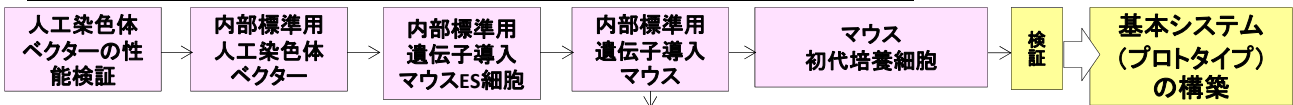
達成済み

50%以上達成

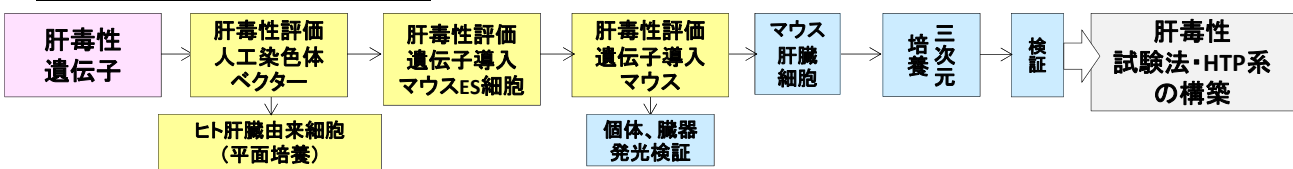
25%程度達成

25%未満

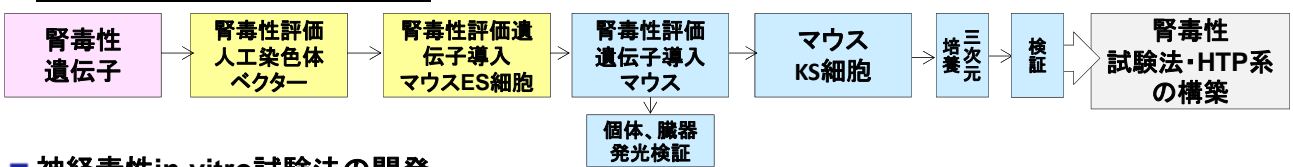
■ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■肝臓毒性in vitro試験法の開発



■腎臓毒性in vitro試験法の開発



■神経毒性in vitro試験法の開発



資料6 p.17

Tox-In vitro

6

研究推進委員会

(外部有識者の参加を得た委員会で、2回/年開催)

委員リスト(五十音順、敬称略)

板垣 宏	横浜国立大学
一戸 紀孝	国立精神・神経医療研究センター
春山 哲也	九州工業大学大学院
宮城島 利一	システム薬学研究機構
松本 一彦	学習院大学(元安評センター)

開催日等

平成23年10月14日	経済産業省会議室	出席者	21名
平成24年 2月10日	経済産業省会議室	出席者	26名
平成24年 9月25日	経済産業省会議室	出席者	25名
平成25年 2月 8日	経済産業省会議室	出席者	27名
平成25年 7月31日	キャンパスイノベーションセンター	出席者	28名

プロジェクト推進調整会議等の実施状況

推進調整会議

平成23年度:3回

(研究開発項目①(遺伝子発現変動解析)との合同1回)

平成24年度:3回

(研究開発項目①(遺伝子発現変動解析)との合同1回)

研究開発項目①(遺伝子発現変動解析)との連携
合同の推進調整会議の開催、相互の研究開発推進
委員会への出席等

資金配分

	年度 平成			合計 (単位：百万円)
	23	24	25	
(a) 肝臓毒性in vitro試験法の開発	76	76	75	227
(b) 腎臓毒性in vitro試験法の開発				
(c) 神経毒性in vitro試験法の開発	17	17	17	51
(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発	10	10	10	30
合計	103	103	102	308

費用対効果

- 本事業で開発を目指しているin vitro試験法では、日本発の複数の**OECDガイドライン**誕生も期待できる信頼性の高い試験法完成を目指している。
- そのコストは、数十万～200万円/検体が見込まれ、動物を用いるin vivo試験法、例えば28日間反復投与試験での約1000万円/検体のコストに比べて極めて**低いコスト**が期待できる。本in vitro試験法にて試験を実施すれば、in vivo試験法の約5～10倍の試験数を実施できることになり、このように試験数をこなせる本事業に投資された費用は投入されうる費用に見合った効果が期待できる。
- 今後、事業者がこれを活用して化学物質の有害性情報を低コストで取得して、自ら取り扱う化学製品のGHS分類に活用したり、改正化審法下の届出データとして国に提供し、国が優先評価化学物質指定のための**スクリーニング評価**に活用したりすることが期待できる。
- また、OECDテストガイドライン化が実現すれば、事業者による自主的な有害性評価ばかりでなく、**改正化審法の審査制度**においても正式に位置付けられる可能性が高まる。
- これらにより、化学物質を用いる産業の健全な発展及び化学物質による健康被害の未然防止が図られ、投入費用に比べ十分な効果が得られるものと考えられる。

細胞プロジェクト (Tox-In vitro) イメージ

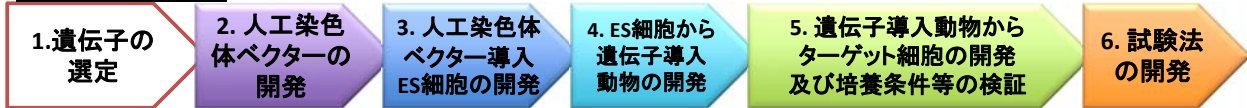
鳥取県産業振興
機構・鳥取大

岡山大
住友化学

食薬センター
産総研

□ : 食薬センターと連携して実施
□ : 産総研と連携して実施

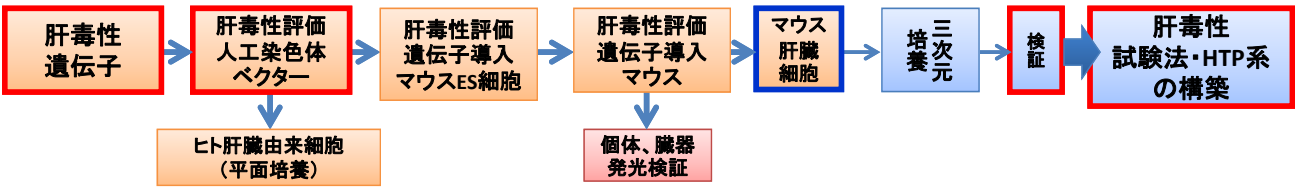
■ 基本戦略



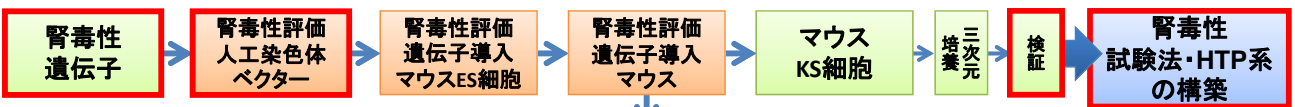
■ ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■ 肝臓毒性in vitro試験法の開発



■ 腎臓毒性in vitro試験法の開発



■ 神経毒性in vitro試験法の開発



ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた

基盤技術の開発

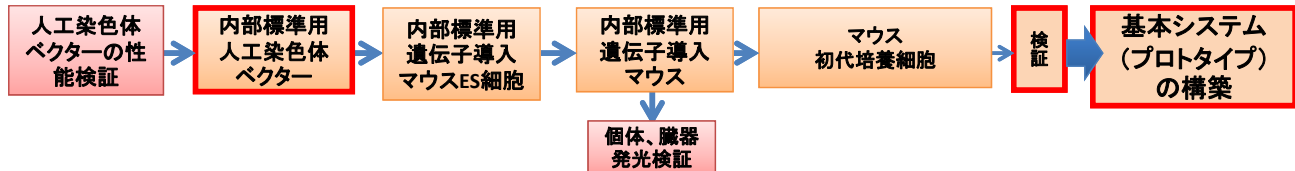
～目標(基本計画)～

鳥取県産業振興
機構・鳥取大

岡山大
住友化学

食薬センター
産総研

□ : 食薬センターと連携して実施
□ : 産総研と連携して実施



目標・指標 (事後評価時点)

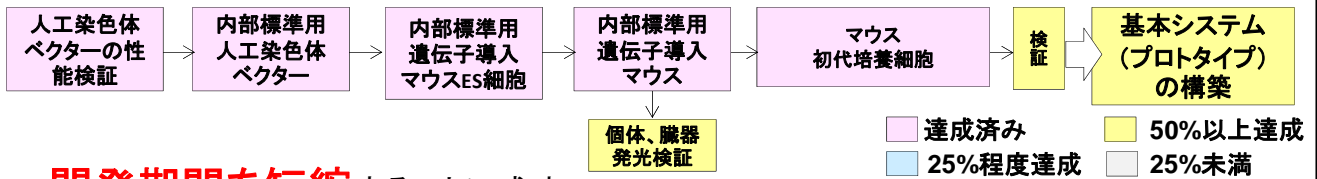
- 人工染色体ベクターの性能を検証する
- 人工染色体ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光を検証する。
- 試験系の測定条件を最適化し、各試験法のプロトコル案に反映する。

目標・指標 (中間評価時点)

- 人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を行う。
- 試験系の設計試案を作成する。

基盤技術の開発

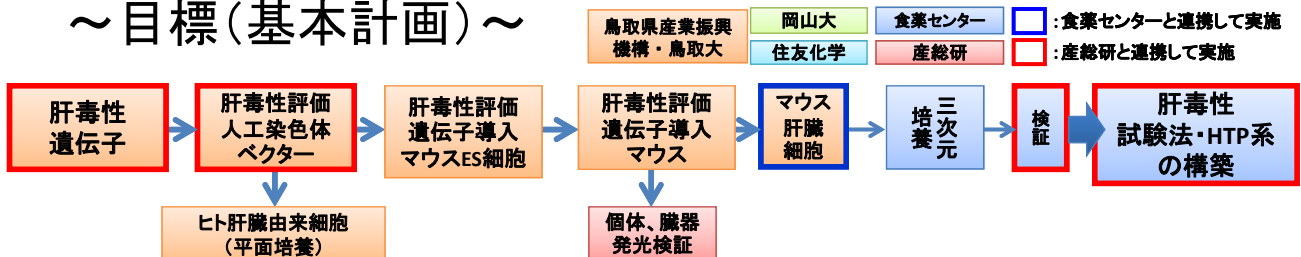
～進捗成果まとめ～



- 開発期間を短縮**することに成功
→ レポーター遺伝子の構築から遺伝子導入マウスを作製して初代培養細胞作製まで、最短6週間で行った(染色体工学、遺伝子工学、細胞工学、発生工学技術の融合)。
- 高品質**の遺伝子導入毒性評価レポーター細胞の作製が可能であることを実証
→ 長期間培養しても導入遺伝子の機能が変化しない(安定)。
→ 導入レポーター遺伝子が目的遺伝子の生理的な発現を再現している(高い再現性)。
→ 複数のレポーター遺伝子の導入を可能にした(精度の向上)。
- レポーター遺伝子導入**ES細胞から**目的の**組織(細胞)を構築**できることを実証
→ 胚盤補完法により、in vitro分化誘導では作製困難な腎臓や肝臓の構築を実現した
→ 「光るマウス」と「光る細胞」を用いて、in vivoとin vitroの**相互比較**ができた。
- In vitro有害性評価試験法を開発する**基盤システム(プロトタイプ)**を構築した。
→ 様々なエンドポイントに対応可能な試験法の国際標準化になるメソッドを目指す。
- 発光レポーターによる**HTPアッセイの条件設定**を開始した。

肝臓毒性in vitro試験法の開発

～目標(基本計画)～



目標・指標 (事後評価時点)

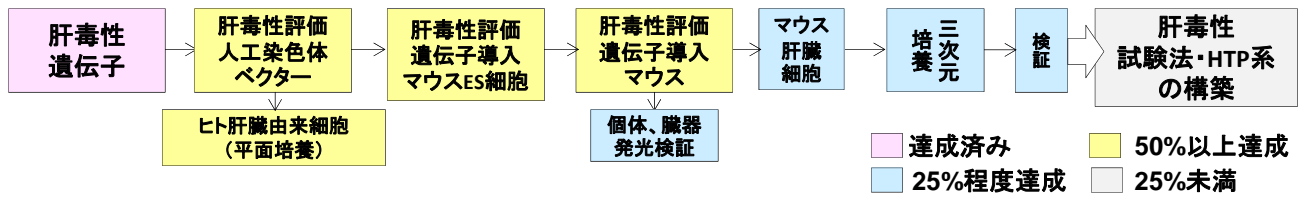
- 肝臓毒性を評価可能なin vitro試験法を開発するための、人工染色体ベクター、マウスES細胞、遺伝子改変マウスを作製する。
- 肝臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。
- 樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築する。
- 試験法のプロトコル案を作製する。

目標・指標 (中間評価時点)

- 肝臓毒性に関連すると考えられる**マーカー遺伝子**を選定する。
- 肝毒性評価**人工染色体ベクター**、**マウスES細胞**、**遺伝子改変マウス**を作製する。
- 野生型マウスの**肝臓細胞**を用い、**培養条件**を見出す。

肝臓毒性in vitro試験法の開発

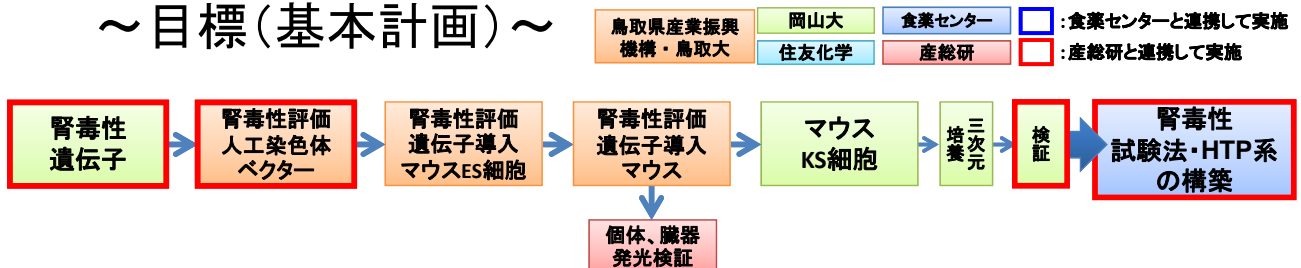
～進捗成果まとめ～



- 肝毒性評価のためのエンドポイントを選定した。
 - **肝細胞死、肝再生**（実験動物を用いた肝障害の主たるエンドポイント）
- 肝細胞死を定量化**する発光レポーターをデザインし、その**機能を実証**した。
 - 代表的な肝障害誘発物質として**四塩化炭素**を選択した。
 - ヒト肝臓由来 HepG2細胞でレポーター遺伝子の有効性を実証した。
 - 細胞死にともない分泌型ルシフェラーゼの発光量が増大するシステム
- 肝再生を定量化**する遺伝子導入細胞、遺伝子導入マウスの開発に成功した。
 - **肝再生で光るマウス**を作製した。**In vivo**でシステムの有効性を実証した。
- マウス肝臓から作製した肝臓細胞からスフェロイド培養により**三次元構造体**を構築した。

腎臓毒性in vitro試験法の開発

～目標(基本計画)～



目標・指標（事後評価時点）

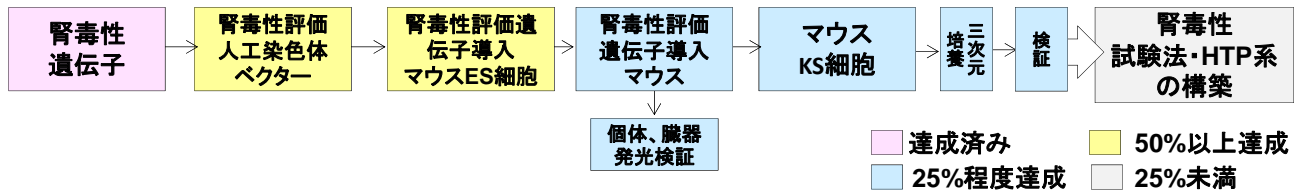
- 腎臓毒性を評価可能なin vitro試験法を開発するための、人工染色体ベクター、マウスES細胞、遺伝子改変マウスを作製する。
- 腎臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。
- 樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築する。
- 試験法のプロトコル案を作成する。

目標・指標（中間評価時点）

- 腎臓毒性に関連すると考えられる**マーカー遺伝子**を選定する。
- 腎毒性評価**人工染色体ベクター**、**マウスES細胞**、**遺伝子改変マウス**を作製する。

腎臓毒性in vitro試験法の開発

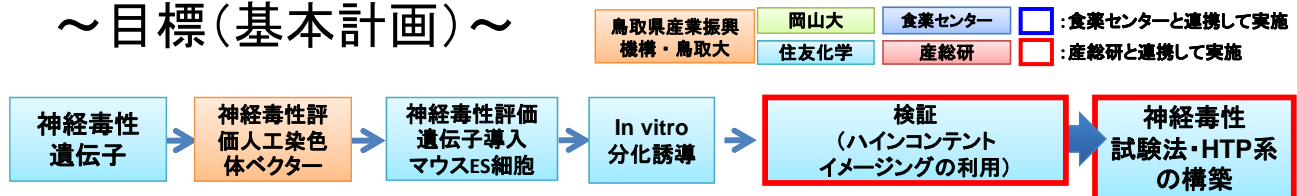
～進捗成果まとめ～



- 腎毒性評価のためのエンドポイントを選定した。
 - **近位尿細管障害**（化合物による腎毒性が最も起こりやすい部位として選択）
 - 代表的な近位尿細管障害誘発物質として**シスプラチン**を選択した。
- 近位尿細管障害を定量化**するレポーター遺伝子をデザインした。
 - 現在、遺伝子導入ES細胞を作製中。マウスを作製予定。
- 近位尿細管が光るマウス**を作製した。
 - マウス腎臓における近位尿細管の局在を赤色蛍光タンパク質で観察することが可能。
- マウス腎臓から**腎臓幹/前駆細胞（KS細胞）の樹立**に成功した。
 （これまでラットでKS細胞を樹立し、三次元培養で腎臓様構造体の構築に成功していた。）
 - マウスでも、三次元培養システムを腎臓様構造体構築が観察された。

神経毒性in vitro試験法の開発

～目標(基本計画)～



目標・指標(事後評価時点)

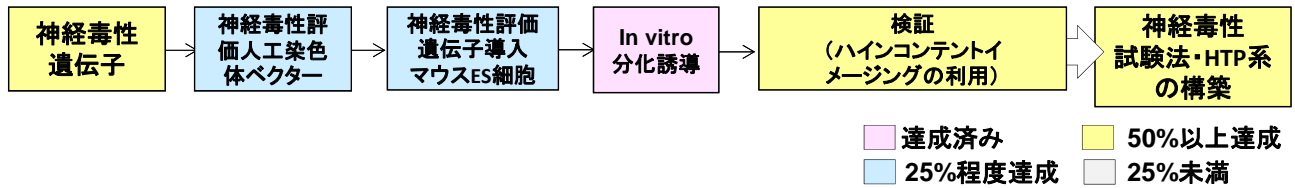
- 神経毒性を評価可能なin vitro試験法を開発するための、人工染色体ベクター、マウスES細胞を作製する。
- ES細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞を樹立する。
- 樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築する。
- 試験法のプロトコル案を作成する。

目標・指標(中間評価時点)

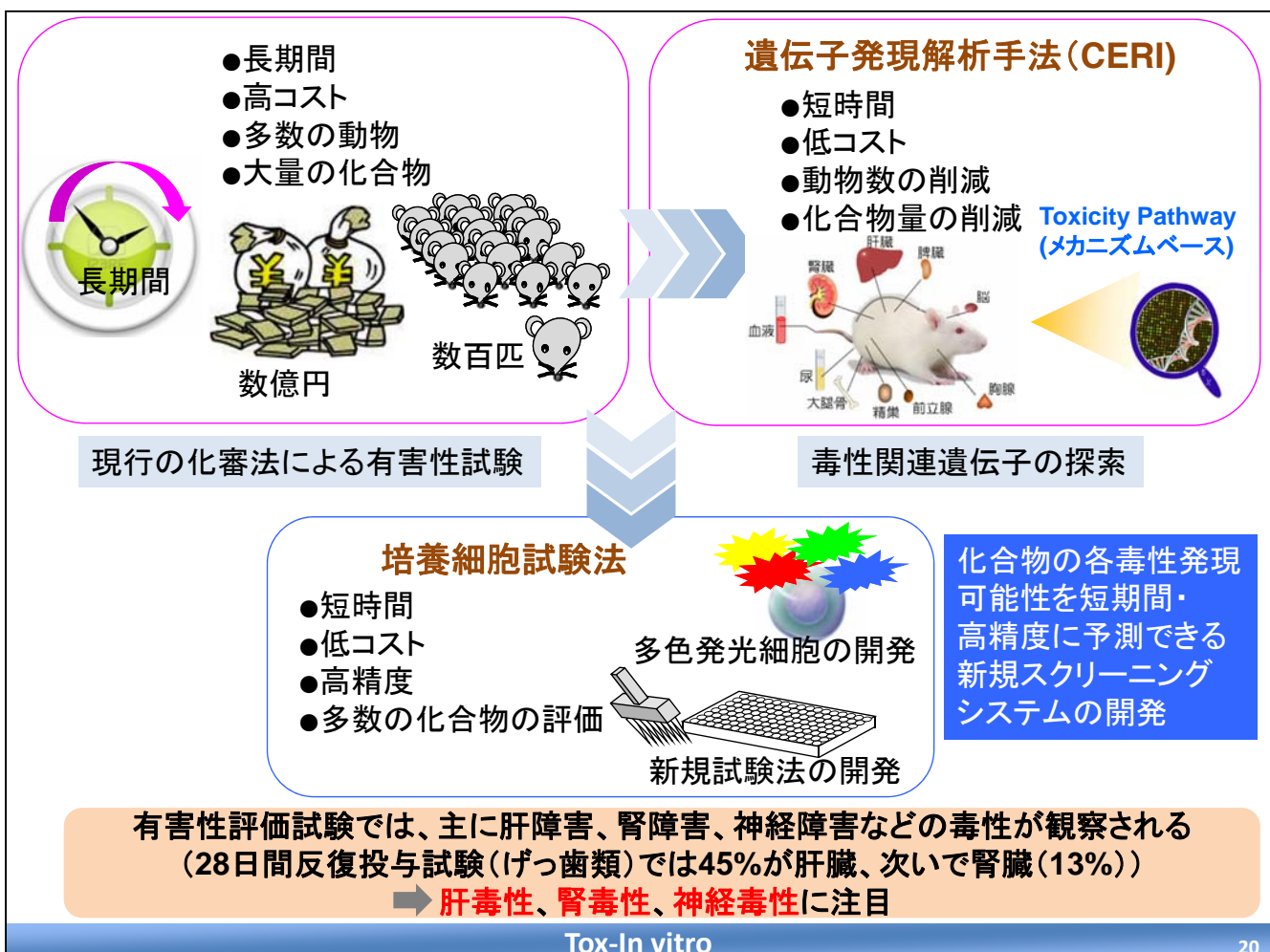
- ES細胞から**分化誘導した神経細胞**を用い、神経毒性化学物質に対する形態変化及び発現等を確認し**マーカー遺伝子**を選定する。
- 選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、**人工染色体ベクター**を作製する。

神経毒性in vitro試験法の開発

～進捗成果まとめ～



1. 神経分化誘導効率の高いマウスES細胞株を選択し、**大脳神経への分化法**を確立した。
2. 分化神経細胞は主に**GABAおよびグルタミン神経**を含み、神経伝達レセプター等の**性状・成熟度はマウス大脳初代培養と類似**していることを示した。
3. 自動画像解析により神経毒性物質特異的な**神経変性を定量可能な形態観察法を確立**した。
→新規神経毒性マーカーの探索、検証、詳細解析等に活用
4. 既知神経マーカー **β III tubulin**を選択し**人工染色体ベクターを作製**した。
5. 新規マーカー探索のためにDNAマイクロアレイによる網羅的解析に着手した。



「肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro試験法の開発」の 標準化のシナリオ、波及効果について

平成25年9月26日

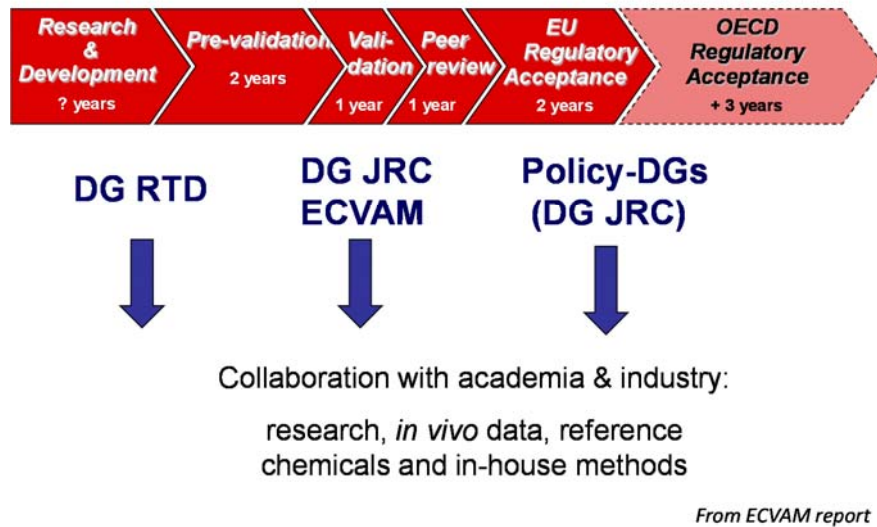
ThL 押村 光雄(鳥取大学)

目次

1. 標準化等のシナリオ
2. 波及効果

1. 標準化へのシナリオ

本事業の研究開発成果である新規の有害性評価手法については、OECD-TG化に向けた国際提案を行うことを将来的には目標となるように掲げている。OECD-TG化完成までには以下のECVAMレポートによると10年近い期間が必要となる。



2. 波及効果



* 下記の資料は非公開
資料5-5 成果詳細について