

第1回 石油精製物質等の新たな化学物質
規制に必要な国際先導的有害性試験法の開
発(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動に
よる発がん性等発現可能性情報の取得手法
の開発) 中間評価検討会

資料5

プロジェクトの概要について

平成25年10月7日

資料5-1 事業の目的・政策的位置付け

資料5-2 目標・成果概要

資料5-3 研究会開発マネジメント・体制等

資料5-4 標準化等のシナリオ、波及効果

資料5-5 成果詳細-1(主要臓器に対する一般毒性)
成果詳細-2(発がん性)

資料5-6 成果詳細-3(免疫毒性)

資料5-7 成果詳細-4(神経毒性)【非公開】

事業の目的・政策的位置付け

平成25年10月7日

経済産業省 化学物質管理課

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

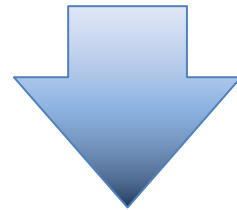
多様なエンドポイントについて有害性評価を実施するニーズが高まっている。

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、遺伝子発現変動解析手法、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

28日間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て有害性を予測する手法を開発する。

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

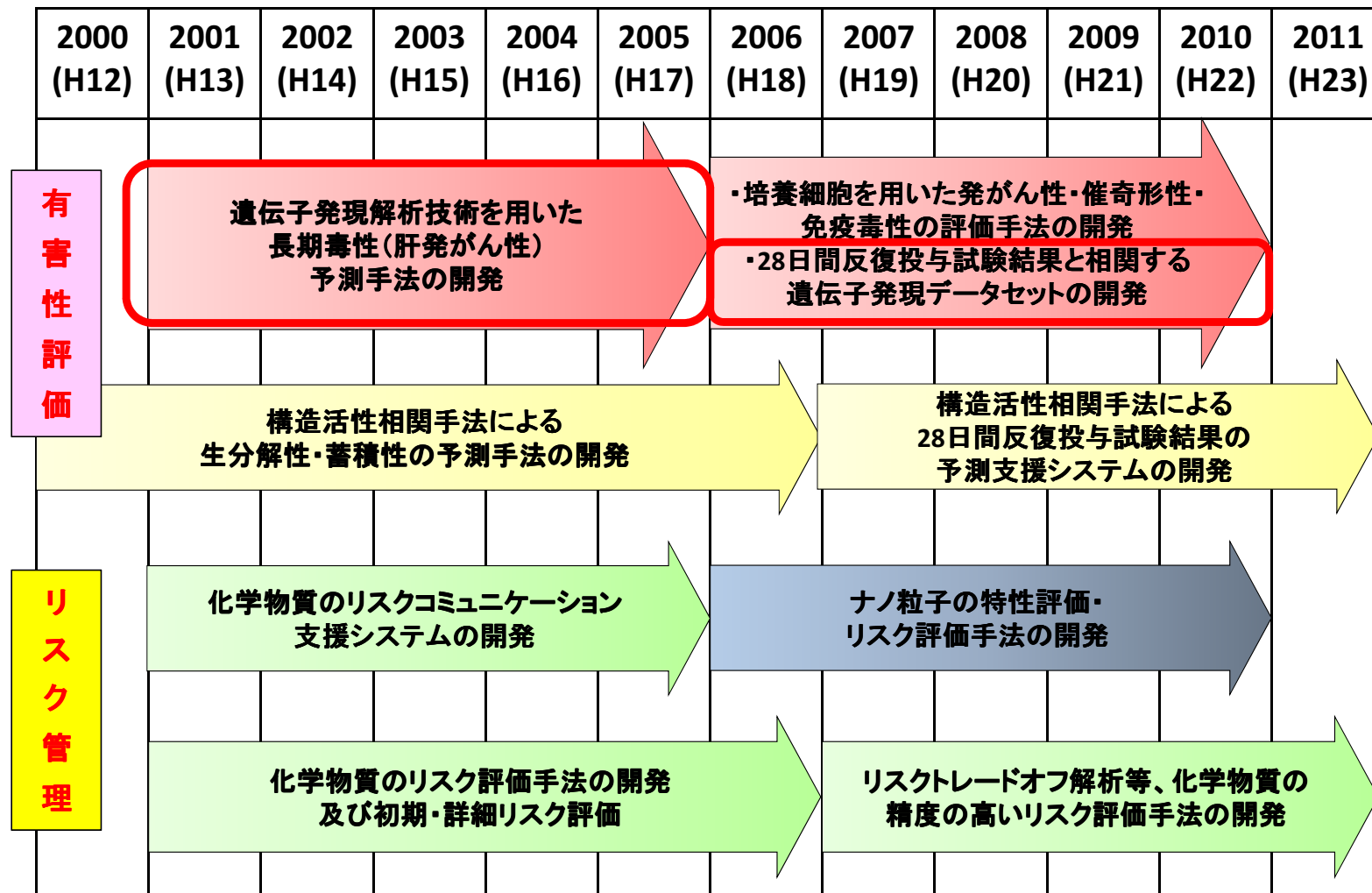
(75) 発がん性、生殖毒性、神経毒性の長期毒性についての高速のin vivo試験法

(76) マルチエンドポイントのin vivo試験法

(83) 網羅的解析技術を用いた有害性バイオマーカーの探索手法

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

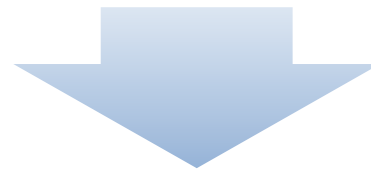
すべての化学
物質をリスク
評価の対象

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

第1回 石油精製物質等の新たな化学物質
規制に必要な国際先導的有害性試験法の開
発(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動に
よる発がん性等発現可能性情報の取得手法
の開発) 中間評価検討会

資料5-2

目標・成果概要

平成25年10月7日

国立医薬品食品衛生研究所

小島 肇

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)」

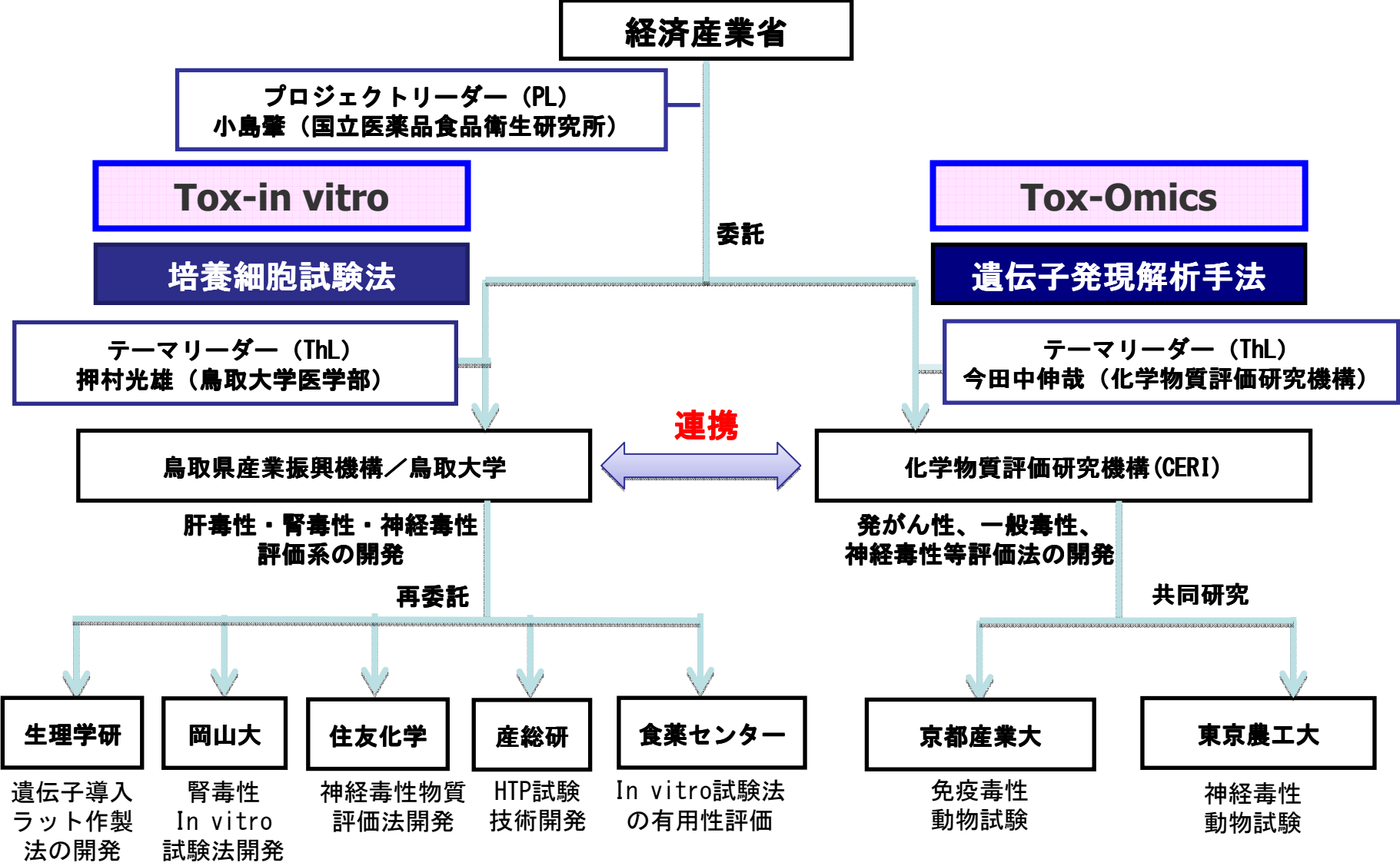
- ・2020年までに化学物質の製造と使用による人健康と環境への悪影響の最小化
- ・国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ(SAICM)の策定を決定⇒2006年採択
- ・化学品分類表示調和システム(GHS)の実施を決定



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-in vitro研究開発の目標 化審法

本研究では、**石油精製化学物質等の反復投与毒性試験の実施**

分解性

蓄積性

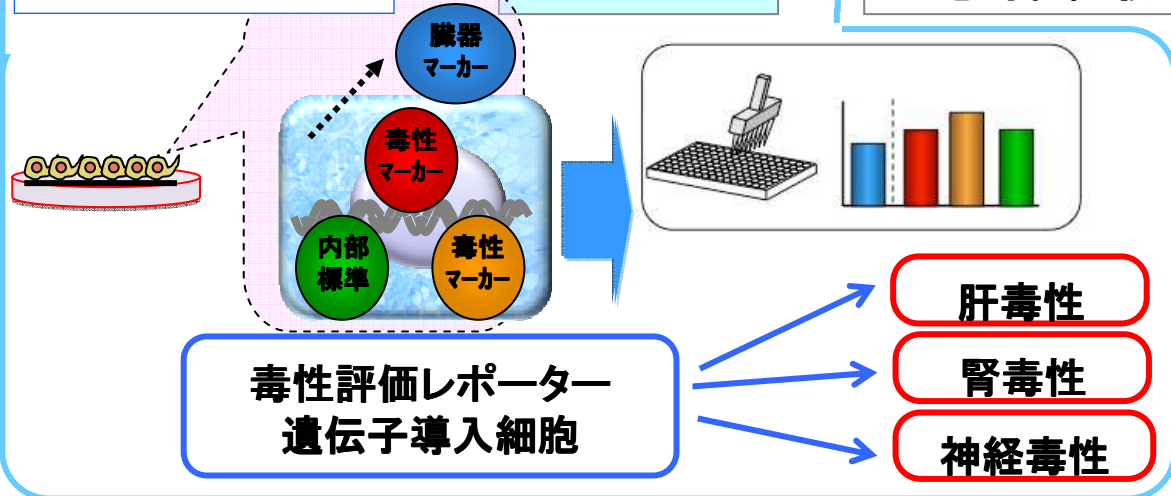
28日間反復投与動物試験を培養細胞を用いた**in vitro**試験法で補完できる有害性スクリーニングシステムを開発することで、**化学物質の有害性評価を高度化し、迅速かつ効率的な試験の実施に貢献すること**を目的とする。

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



【目標】毒性評価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

【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-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

【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

本研究では、石油精製化学物質等の反復投与毒性試験の実施

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



Toxicity Pathway
(メカニズムベース)

発がん性

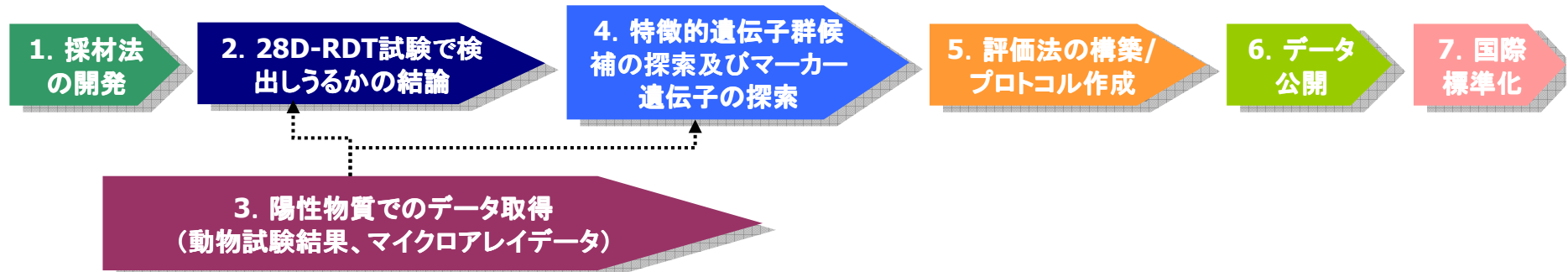
免疫毒性

神経毒性

一般毒性

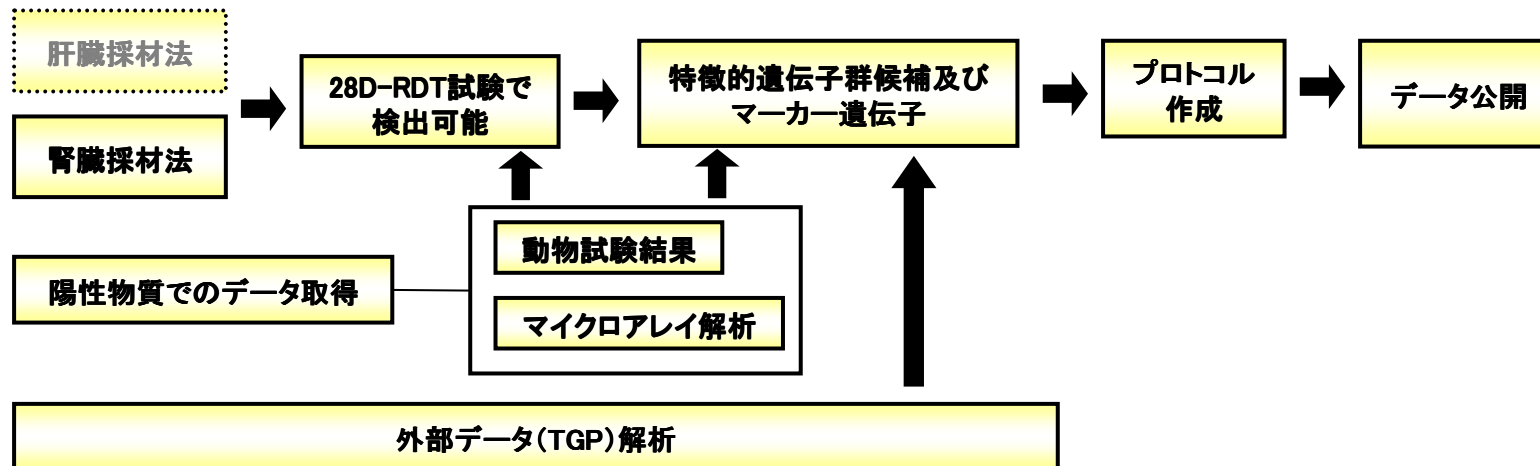
遺伝子発現解析プロジェクト(Tox-Omics)イメージ図-1

●基本ストラテジー



●主要臓器(肝臓・腎臓)/一般毒性

グレー字はNEDO PJ

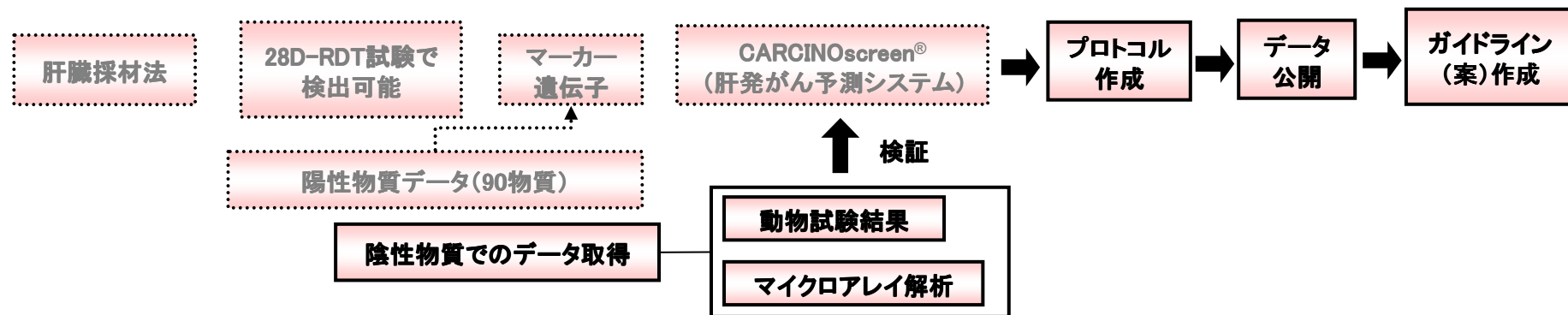


遺伝子発現解析プロジェクト(Tox-Omics)イメージ図-2

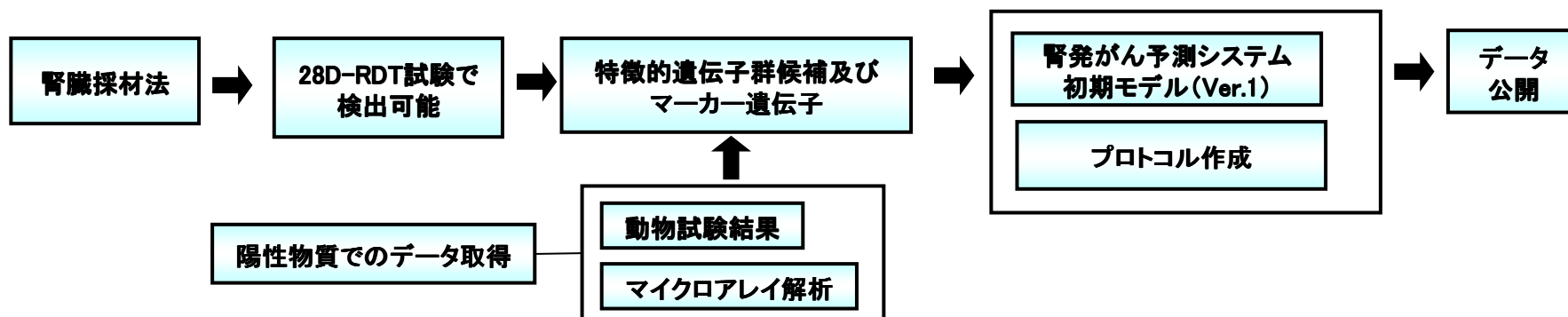
●発がん性

【肝臓】

グレー字はNEDO PJ

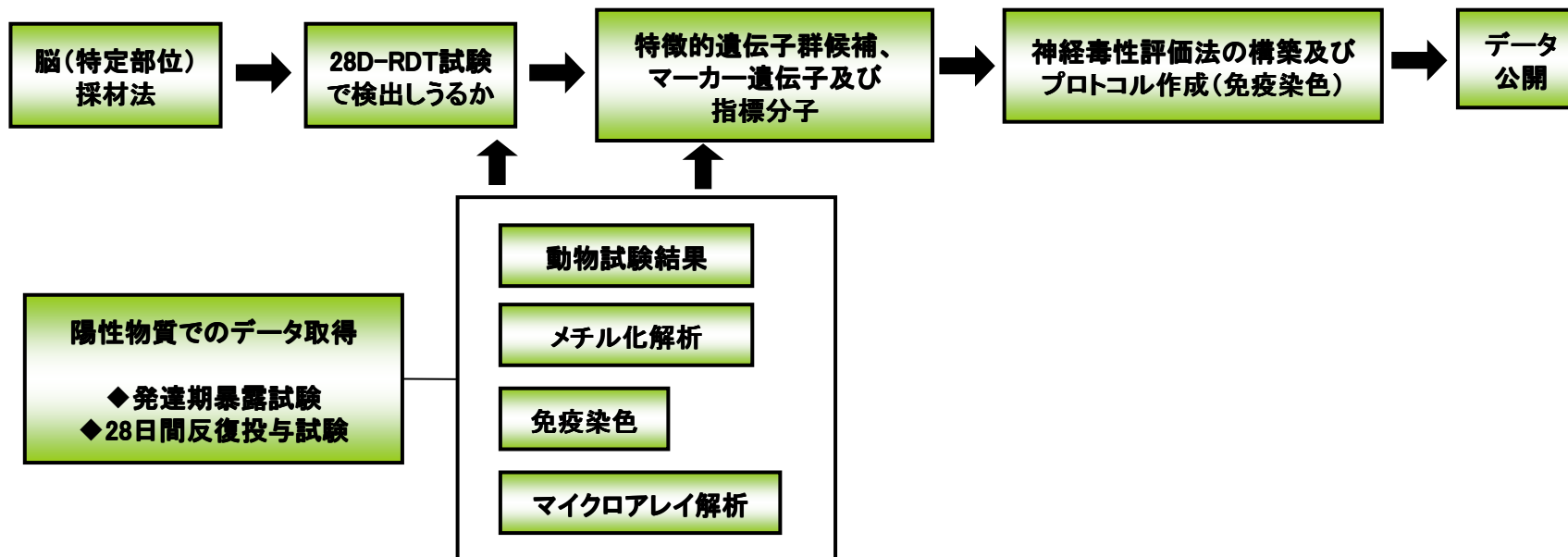


【腎臓】



遺伝子発現解析プロジェクト(Tox-Omics)イメージ図-3

● 神経毒性



研究開発成果目標

全体目標:28日間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て有害性を予測する手法の開発

目標・指標（事後評価時点）	目標・指標（中間評価時点）
<p>(a) 各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の毒性、発がん性（肝発がん、腎発がん）及び神経毒性を有する毒性既知物質を効率的に選定して実験動物に投与し、遺伝子の発現変動に関する包括的なデータを取得する。 ・ 毒性の発現に特異的と考えられる遺伝子を絞り込み、各毒性既知物質の投与による毒性発現のマーカースとして利用しうる遺伝子を選定する。 	<p>(a) 各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する。 ・ 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う。

研究開発成果目標

目標・指標（事後評価時点）	目標・指標（中間評価時点）
<p>(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立 各毒性既知物質の投与による毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析の結論を得る。</p> <p>【全てのエンドポイントに共通】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・実施可能な範囲で、「研究開発項目②肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発」と共通の物質を用いたin vivo試験を実施する。 <p>【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。 <p>【発がん性（肝発がん・腎発がん）】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。 <p>【神経毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・本事業で取得した新たな科学的知見にもとづき、可能な範囲でその毒性発現可能性を予測する解析手法を確立する。 	<p>(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立</p> <ul style="list-style-type: none"> ・設定なし。 ・遺伝子発現変動データの取得法の確立 ・遺伝子発現変動データの取得法の確立 ・遺伝子発現変動データの取得法の確立 ・遺伝子発現変動データを用いることで当該毒性の評価が可能であるかについて結論する。

第1回 石油精製物質等の新たな化学物質
規制に必要な国際先導的有害性試験法の開
発(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動に
よる発がん性等発現可能性情報の取得手法
の開発) 中間評価検討会

資料5-3

研究開発マネジメント・体制等

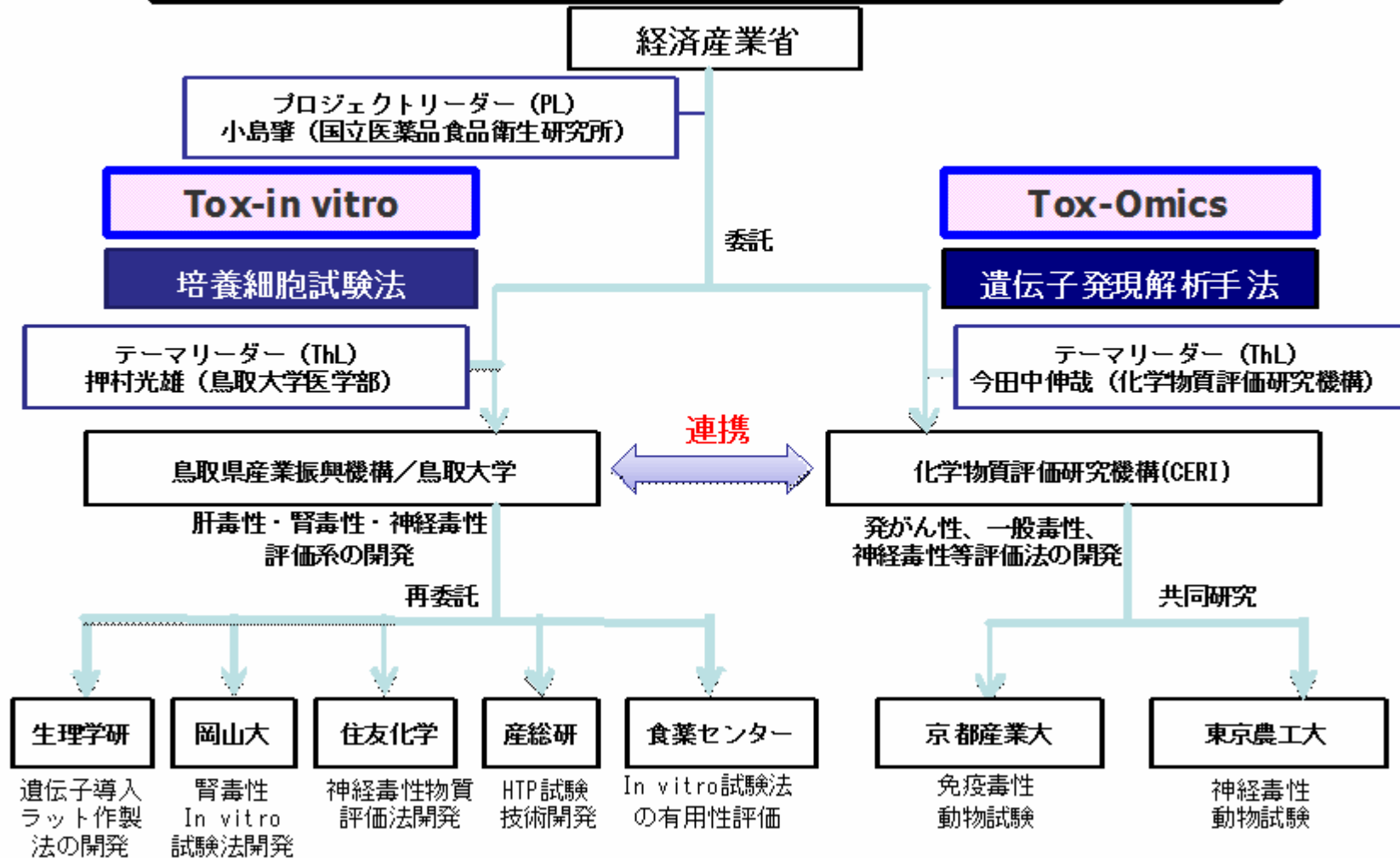
平成25年10月7日

一般財団法人化学物質評価研究機構

今田中伸哉

プロジェクトの実施体制

プロジェクトの実施体制 (ARCH-Tox)



研究開発項目と参加機関の連携関係

	反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による毒性発現可能性情報の取得方法の開発			
	取得方法の開発		フィージビリティースタディ	
	一般毒性	発がん性	神経毒性	免疫毒性
遺伝子発現データの取得方法確立	部位別採取 肝臓・腎臓・脾臓等(CERI) 脳(東京農工大)		遺伝子発現解析 (CERI)	
被験物質選定	複数エンドポイント対応のための物質選定(CERI)		陽性対照物質 (東京農工大)	陽性対照物質 (京都産業大)
動物試験	28日間反復投与毒性試験 (CERI) 30~40物質/5年間		妊娠期・授乳期暴露試験 28日間反復投与毒性試験 (東京農工大)	28日間反復投与毒性試験 (京都産業大)
遺伝子の発現変動解析 (CERI)	毒性関連遺伝子の絞り込み → 特定遺伝子の選定 各毒性発現可能性を予測するための遺伝子発現変動データの解析手法確立			
成果発信	国際会議及び学会への情報発信(CERI・東京農工大・京都産業大) NITE HESSでの毒性データ情報の公開(CERI) 公的データベース(GEO)での遺伝子発現量データの公開(CERI)			

研究開発計画 Tox-Omicsプロジェクト(H23-27年度)

★中間評価

	H23	H24	H25	H26	H27
一般毒性	物質選定(選定法立案) 予備検討	実験動物の遺伝子発現変動データの取得 特徴的関連遺伝子の絞り込み、メカニズム等の解析			
発がん性	物質選定(選定法立案) 予備検討	実験動物の遺伝子発現変動データの取得 特徴的関連遺伝子の絞り込み、メカニズム等の解析		国際標準化のための提案書作成	
神経毒性	物質選定(選定法立案) フィージビリティー試験	実験動物の遺伝子発現変動データの取得 特徴的関連遺伝子の絞り込み、メカニズム等の解析			
免疫毒性	物質選定(選定法立案) フィージビリティー試験	実験動物の遺伝子発現変動データの取得 特徴的関連遺伝子の絞り込み、メカニズム等の解析			
その他		遺伝子発現データの公表準備 データ公開のための条件、方法の立案		毒性発現情報の取得方法確立、標準化原案作成	

研究推進委員会

(外部有識者の参加を得た研究推進委員会を2回/年開催)

委員リスト(五十音順、敬称略)

岡崎 康司	埼玉医科大学
澤田 純一	独立行政法人医薬品医療機器総合機構
高橋 宏明	日本たばこ産業株式会社
西川 秋佳(委員長)	国立医薬品食品衛生研究所
福島 昭治	日本バイオアッセー研究センター

開催日時

平成23年9月15日	CERI後楽本部、出席者	20名
平成24年2月 9日	CERI後楽本部、出席者	21名
平成24年7月12日	CERI後楽本部、出席者	23名
平成25年2月 4日	CERI後楽本部、出席者	23名
平成25年7月29日	CERI後楽本部、出席者	25名

プロジェクト内の進捗管理、意思疎通

推進調整会議

平成23年度:15回

平成24年度:20回

研究開発項目②(培養細胞試験法)との連携

合同の推進調整会議の開催、相互の研究推進委員会への出席等

平成23年度:5回

平成24年度:8回

資金配分

	年度 平成			合計 (単位:百万円)
	23	24	25	
遺伝子発現解析等(CERI)	86	77	71	234
動物試験(CERI)	50	46	46	142
物質選定、情報公開準備等(CERI)	8	11	10	29
神経毒性(東京農工大)	20	16	18	54
免疫毒性(京都産業大)	7	7	—	14
合計(単位:百万円)	171	157	145	473

費用対効果

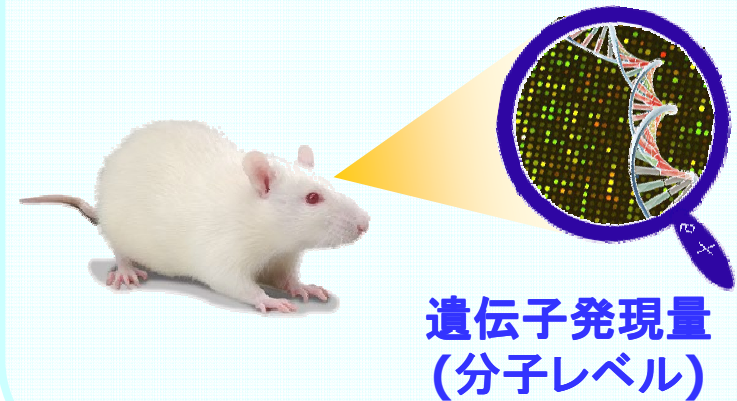
- 有害性評価項目に関して信頼性が高く、かつ、効率的な評価技術は十分に確立されていない部分が多く、また一般的にヒト健康影響に関する有害性評価項目の多くは動物への反復投与試験等で数ヶ月から数年の期間と多額の費用を要するため、新たな規制導入による評価実施ニーズに答えられていない状況である。
- このため、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進めることは、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、国際的ニーズにも対応するものであり、緊急性かつ必要性の高いものである。
- したがって、本事業への予算投入は、効率的な有害性評価手法を開発することで、我が国の石油精製物質の安定供給に資するとともに、化学物質の適切な管理・規制により安全・安心な国民生活の実現にも寄与できる。

- 長期間
- 高コスト
- 多数の動物
- 大量の化合物



現行の発がん性試験

- 短期間
- 低コスト
- 動物数の削減
- 化合物量の削減



新規のスクリーニング法

化合物の発がん性を短期間でかつ
高精度に予測できるシステム

化学物質の発がん性試験(げっ歯類)では45%が肝臓、次いで腎臓(13%)を標的
⇒**肝臓**及び**腎臓**に着目

第1回 石油精製物質等の新たな化学物質
規制に必要な国際先導的有害性試験法の開
発(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動に
よる発がん性等発現可能性情報の取得手法
の開発) 中間評価検討会

資料5-4

標準化等のシナリオ・波及効果

平成25年10月7日

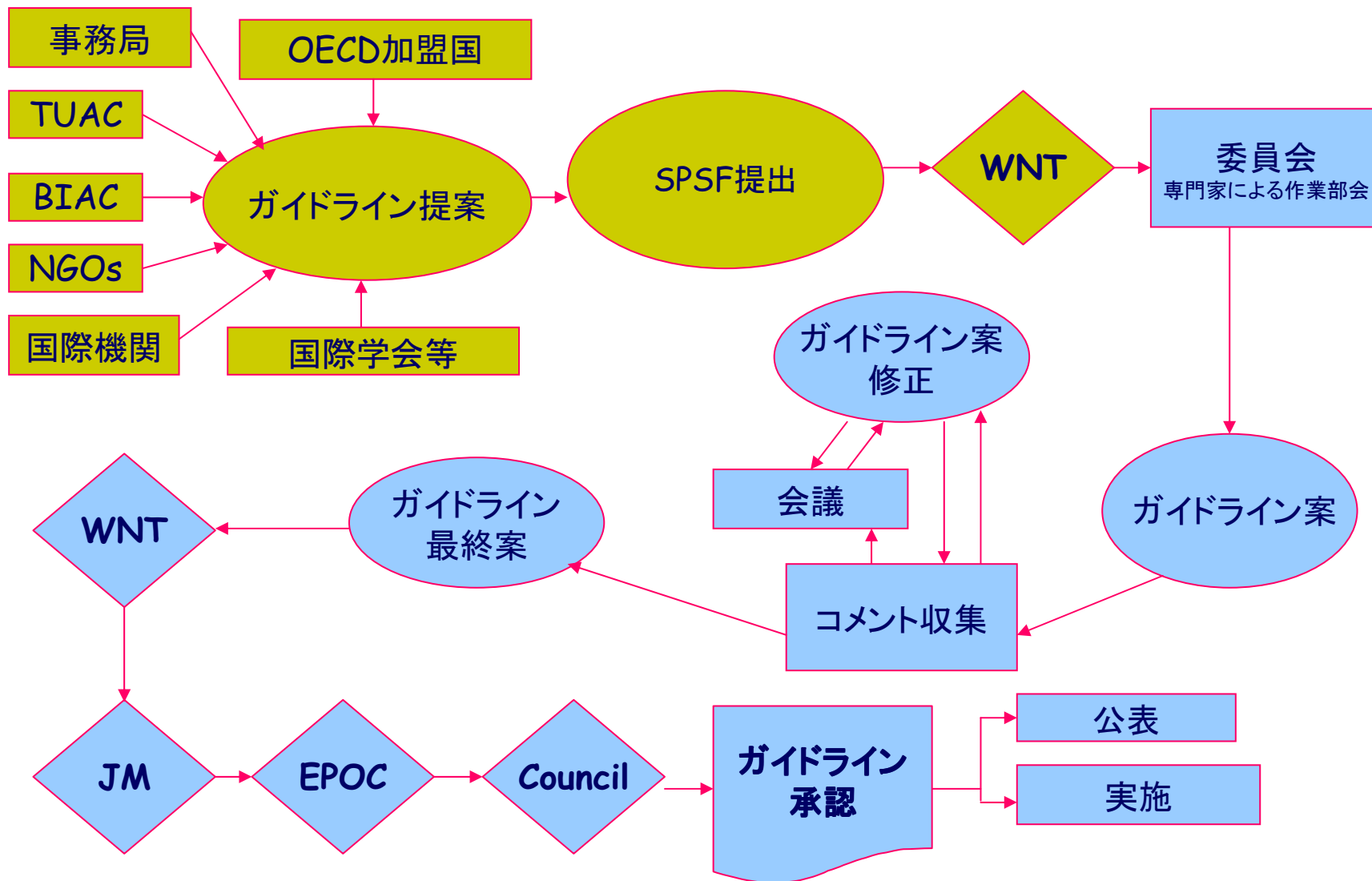
一般財団法人化学物質評価研究機構

今田中伸哉

標準化等のシナリオ

- OECDの環境・健康・安全プログラムは、世界の化学物質管理政策を先導し、化学物質管理に係る国際標準化の舞台となってきた。
例: OECDテストガイドライン、優良試験所基準(GLP)原則
- 本事業は化学物質管理のための試験法開発であることから、OECDテストガイドライン化を目標としてOECD会合及び国内外の試験法開発に関連する学会等での活動を成果の展開先として位置付けている。

目標であるOECDガイドライン化のプロセス



展開シナリオ

- OECDを中心とした国際会議での発表により国際的認知度の上昇及び国際協力関係の構築を目指す。
- JaCVAM等の代替法検証機関との連携
- リスクコミュニケーションによる認知度の向上
 - 化学物質評価研究機構研究発表会(公開)
 - CERI寄附講座(公開)
 - 市民公開講座(公開)
 - 成果報告会等の開催を検討(公開)
 - 2013 EUSAAT(欧州代替法学会)での口頭発表の際、本プロジェクトのシンポジウム開催の打診(2014 国際代替法学会)

国際会議、学会、論文化

論文投稿(件数、H25年8月末現在)

掲載あるいは受理	投稿中	準備中
7	3	3

学会発表(件数、H25年8月末現在)

国際学会	国内学会	講演等
3	13	7

取得データの公開

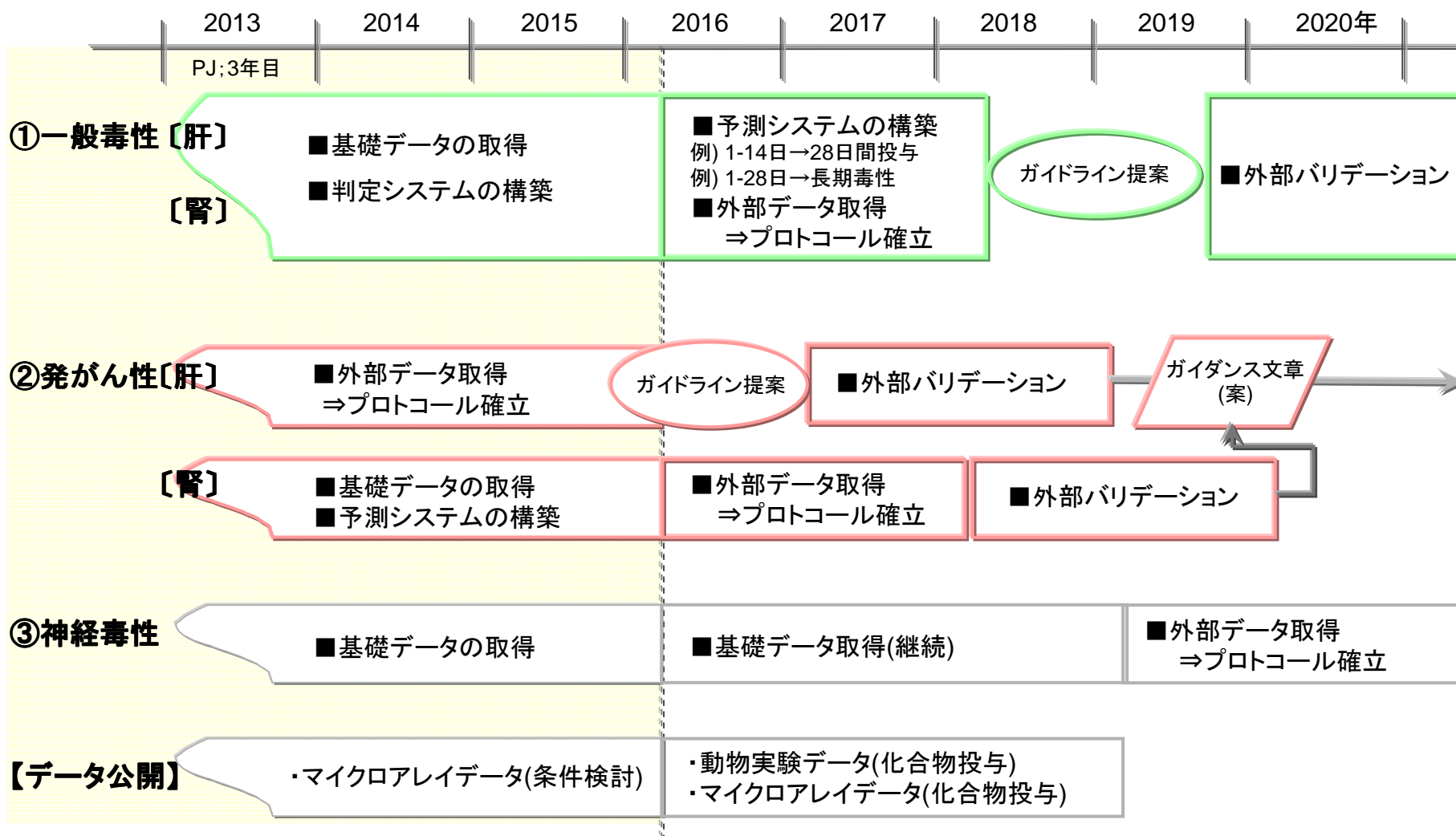
- 動物試験データ

約40の化学物質について、化審法28日間反復投与毒性を実施、毒性情報をNITEデータベースのHESSに登録予定。

- 遺伝子発現データ

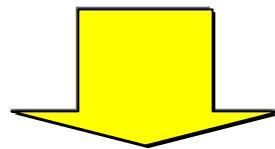
公共データベース(GEO等)にH25年度中に基礎データの一部を登録予定。その後、随時データの公表を目指す。

ガイドライン化のロードマップ



波及効果1

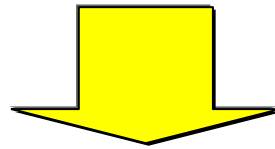
- 単一の動物試験では取得できなかった情報を、遺伝子発現変動解析技術を駆使することで多様なエンドポイントの毒性発現情報を取得する手法を提供



- 毒性試験数の削減、すなわち、試験費用、試験期間等の削減に寄与
- 石油精製物質等の化学物質のリスクを迅速・効率的に評価・管理する環境が整備される
- 動物福祉の原点である3R、すなわち、Replacement(置換)、Reduction(削減)、Refinement(苦痛軽減)への寄与

波及効果2

- これまでの化審法スクリーニング毒性試験では評価できなかった長期毒性、発がん性、神経毒性等に関する情報の取得



- 安全性の面から、安価・迅速に安全性情報が得られることから、産業界の国際競争力の向上に資することが期待されるとともに、消費者の安全性に対する懸念も払しょくすることができる

成果詳細-1 (主要臓器に対する一般毒性)

成果詳細-2 (発がん性)

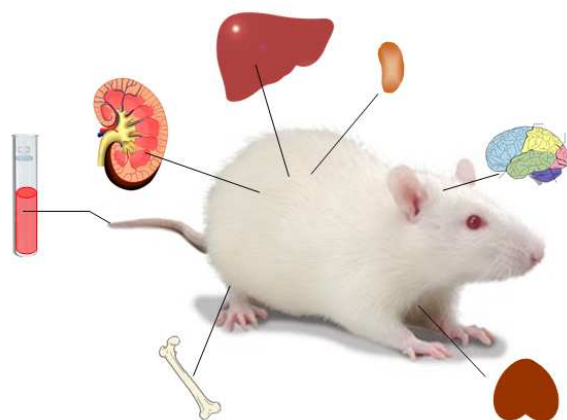
平成25年10月7日

一般財団法人化学物質評価研究機構

齋藤 文代

研究目的 遺伝子発現量解析による有害性評価の高精度化

本研究では、**遺伝子発現量解析**等の最新技術を活用し、**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



①主要臓器における一般毒性

②発がん性

③神経毒性

④免疫毒性

【期待されるメリット】

- ✓ **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

目標設定(1)

全体目標:28日間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て有害性を予測する手法の開発

目標・指標(事後評価時点)	目標・指標(中間評価時点)
<p>(a)各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み</p> <p>1) 主要臓器(肝臓・腎臓)の毒性、発がん性(肝発がん、腎発がん)及び神経毒性を有する毒性既知物質を効率的に選定して実験動物に投与し、遺伝子の発現変動に関する包括的なデータを取得する</p> <p>2) 毒性の発現に特異的と考えられる遺伝子を絞り込み、各毒性既知物質の投与による毒性発現のマーカーとして利用しうる遺伝子を選定する</p>	<p>(a)各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み</p> <p>1) 適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する</p> <p>2) 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う</p>

目標設定(2)

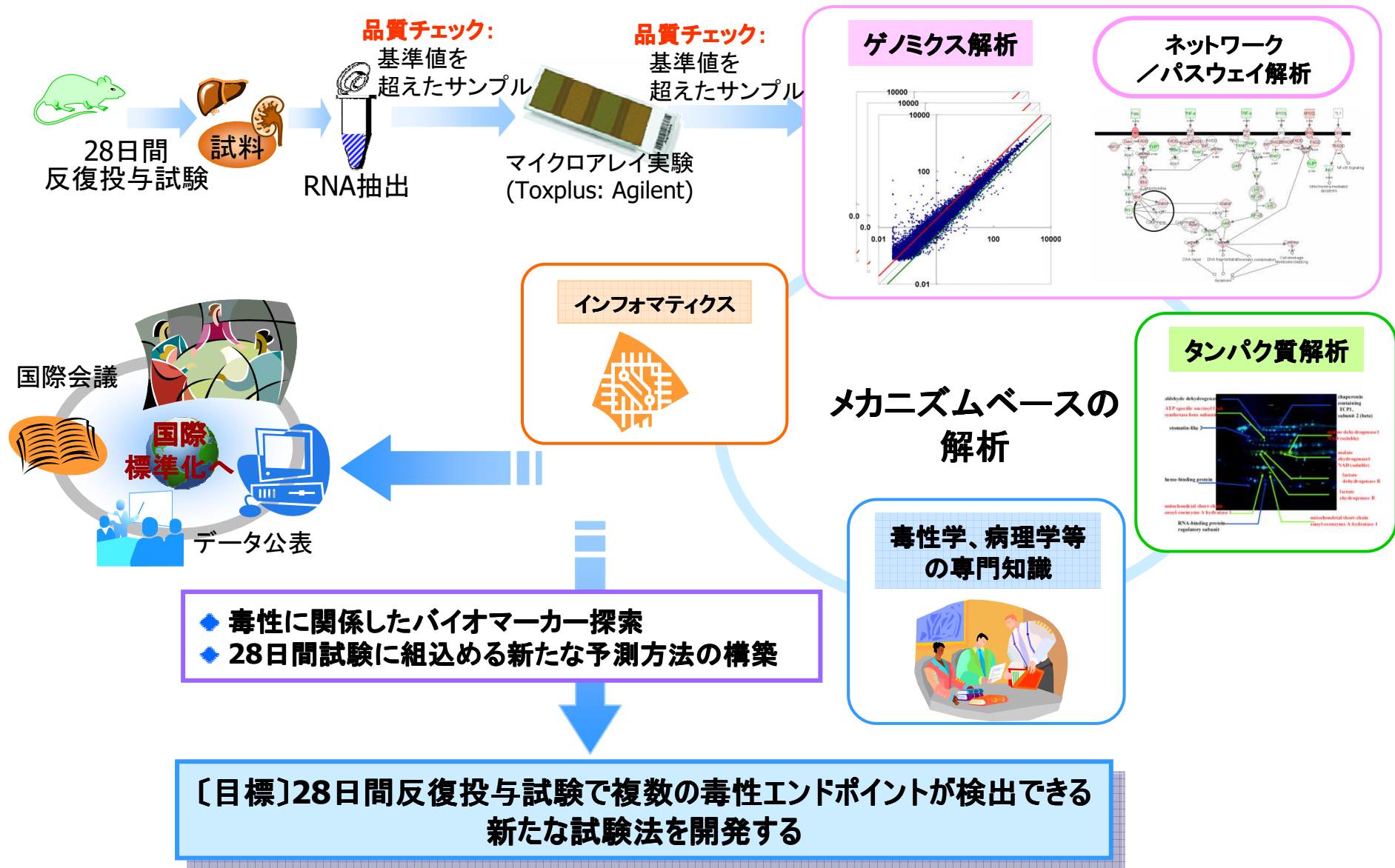
全体目標:28日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発

目標・指標（事後評価時点）	目標・指標（中間評価時点）
(b)各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立 1) 各毒性既知物質の投与による毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析の結論を得る	(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立 1) 設定なし *トレーニングデータ(30~40物質)を取得してから実施予定
【全てのエンドポイントに共通】 1) 実施可能な範囲で、「研究開発項目②肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発」と共通の物質を用いたin vivo試験を実施する	【全てのエンドポイントに共通】 1) 設定なし * H25年度末までに共通物質;2種類を実施する予定

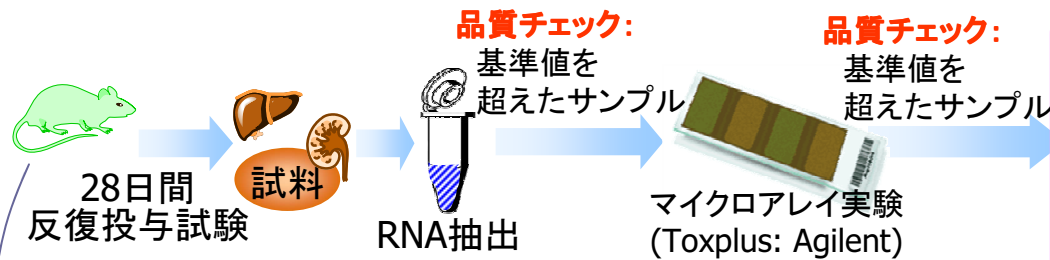
3.4 成果の詳細(目次)

- 条件検討
 - 遺伝子発現解析用の採材方法;腎臓の部位別採取法
 - 麻酔法の検討
- ①主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 毒性判定システム[プロトタイプ]
- ②発がん性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 発がん性予測結果

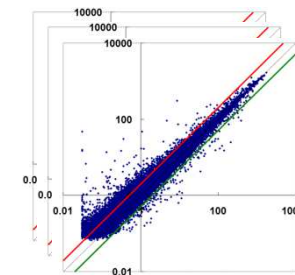
研究計画の概要 Tox-Omicsプロジェクト



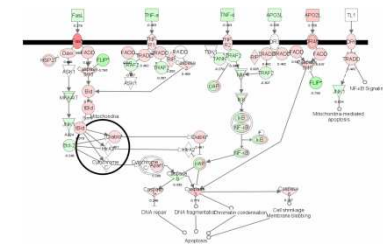
研究計画の概要 Tox-Omicsプロジェクト



ゲノミクス解析



ネットワーク /パスウェイ解析



一般毒性の主要臓器⇒肝臓及び腎臓

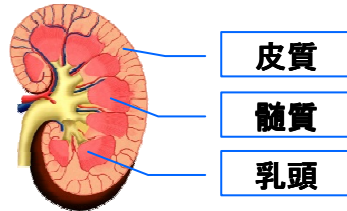
- ・〔採材法〕肝臓は前プロジェクトで採取部位によって遺伝子発現プロファイルに差がないことを確認済み
- ・〔採材法〕腎臓は組織構造が複雑で、採取部位によって遺伝子発現プロファイルに差がある可能性が考えられた ⇒ **条件検討①**

麻酔法の検討(CO₂/O₂混合 vs ISO)

- ・前プロジェクトにおいて、エーテル麻酔とCO₂/O₂麻酔を比較したところ、CO₂/O₂麻酔の方が個体間のばらつきが小さかった⇒CO₂/O₂麻酔を採用
- ・毒性試験では近年イソフルラン麻酔が使用されている⇒**条件検討②**

条件検討① 腎臓の部位別採取法の検討-1

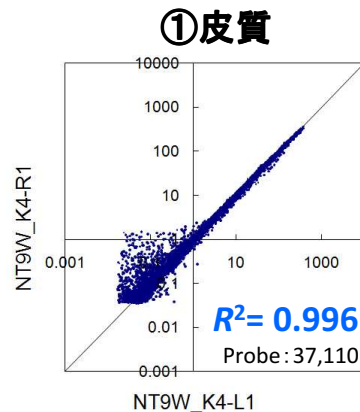
【目的・方法】



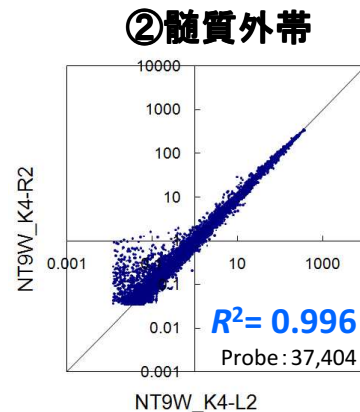
採取部位の差が遺伝子発現量解析にどのような影響を与えるか？



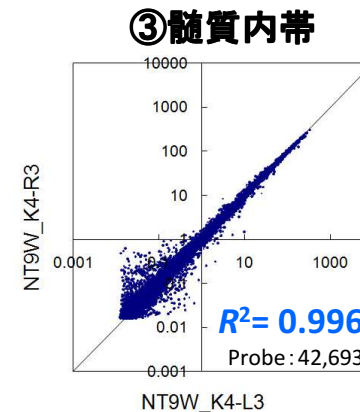
【解析結果-1】左右の比較(4部位別)



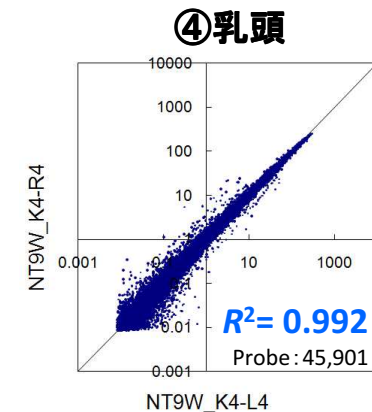
個体間の相関性⇒ R^2 ; 0.987 ± 0.003



R^2 ; 0.981 ± 0.004



R^2 ; 0.987 ± 0.004

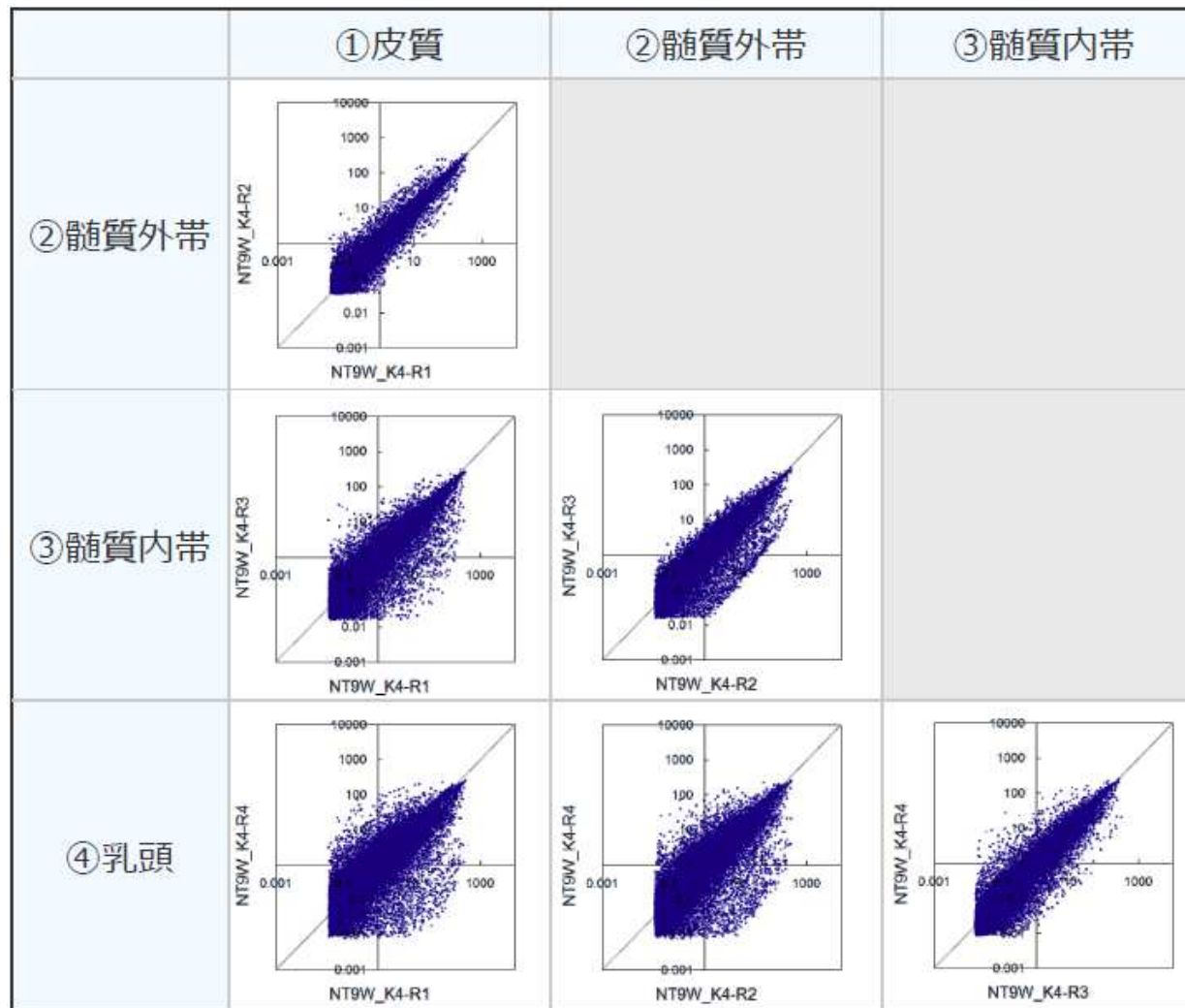


R^2 ; 0.980 ± 0.006

⇒左右及び個体間の各腎組織では大きなばらつきはない(4部位ともに)

条件検討① 腎臓の部位別採取法の検討-2

■ 腎臓・部位間の遺伝子発現プロファイルの比較



【部位間で発現レベルに差のない遺伝子】

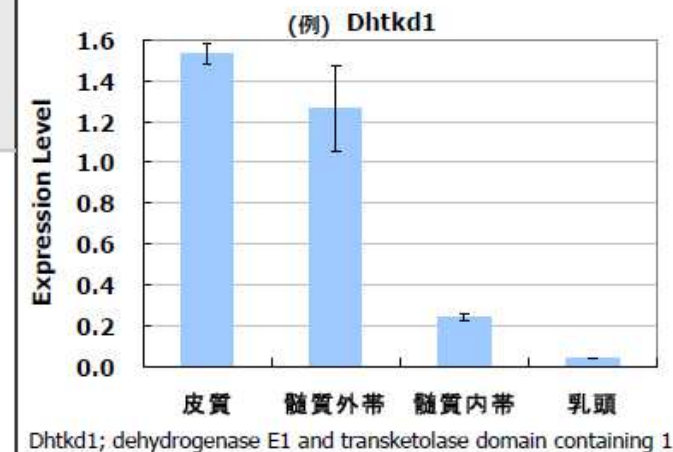
4部位の何れかで発現：42,255 probe
⇒部位間で有意差なし；**6,882 probe (16.3%)**

■ Function Analysis (6,882 probe)

- Gene Expression
- RNA Post-Transcriptional Modification
- Protein Synthesis
- Cell-To-Cell Signaling and Interaction

⇒細胞/組織で恒常的に働くHouse Keeping遺伝子が多く含まれる

【部位間で発現レベルに差のある遺伝子】



条件検討① 腎臓の部位別採取法の検討-3

■ 腎臓・部位間の遺伝子発現プロファイルの比較(遺伝子機能の分類)

各部位で差のある遺伝子群 (Functional Analysis)	①皮質 高; 1,578 probe 低; 1,974 probe	②髄質外帯 高; 934 probe 低; 428 probe	③髄質内帯 高; 500 probe 低; 508 probe	④乳頭 高; 2,393 probe 低; 2,533 probe
発現レベル高い	<ul style="list-style-type: none"> •Molecular Transport •Lipid Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> •Molecular Transport •Lipid Metabolism •Drug Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> •Molecular Transport •Skeletal and Muscular System Development and Function 	<ul style="list-style-type: none"> •Cellular Movement •Immune Cell Trafficking
発現レベル低い	<ul style="list-style-type: none"> •Cellular Movement •Organismal Development 	<ul style="list-style-type: none"> •Cellular Movement •Immune Cell Trafficking 	<ul style="list-style-type: none"> •Cellular Movement •Drug Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> •Molecular Transport •Lipid Metabolism

【結果のまとめ】

- 遺伝子発現レベルは左右の腎臓間及び個体間で高い相関性を示した
⇒ 部位別の遺伝子発現量解析は問題ない
- 部位間で遺伝子発現プロファイルは大きく異なる(部位特異的に発現している遺伝子は皮質と乳頭が多かった)

- 8割以上の遺伝子が部位間で発現レベルに有意差あり
- 腎毒性は組織特異的に起こることが多いため、部位別での基礎的な遺伝子発現量データを取得し、毒性影響を検討した方が良い

⇒ 本プロジェクトでは腎臓は部位別に遺伝子発現量データを取得することとした

条件検討② 麻酔法の検討(背景及び目的)

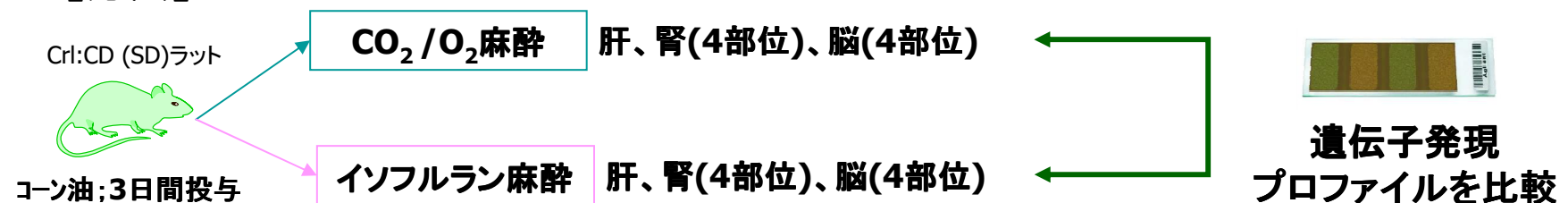
【背景】

- ・前プロジェクトにおいて、エーテル麻酔とCO₂/O₂麻酔を比較したところ、CO₂/O₂麻酔の方が個体間のばらつきが小さかったため、これまでのデータについてはCO₂麻酔で取得
- ・麻酔の導入および覚醒が速いために麻酔深度を容易に変えることができるという理由から、イソフルラン麻酔が動物実験で多用されるようになった
- ✖ CO₂(単独)麻酔は脳に悪影響(ニューロンの形態など)与える
- ✖ イソフルラン麻酔はマウス海馬の遺伝子発現プロファイルに影響するとの報告あり(2010)

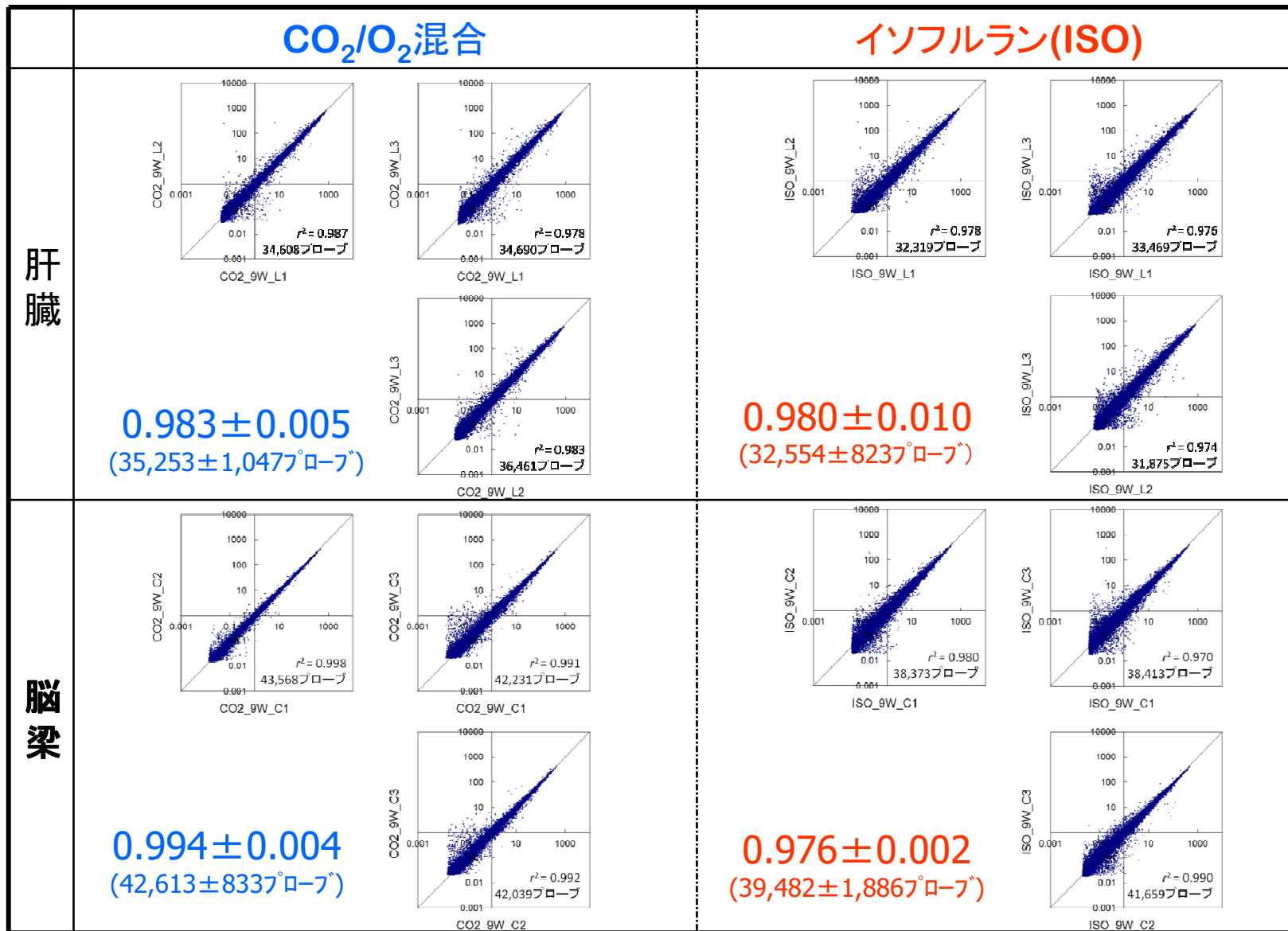
【目的】

定常状態のラットで、CO₂/O₂麻酔とイソフルラン麻酔を実施し、解析対象となっている臓器の遺伝子発現プロファイルを調べ、どの程度の違いがあるかを調べる

【方法】



条件検討② 麻酔法の検討(個体間のばらつき)



条件検討② 麻酔法の検討(個体間のばらつき)

■〔遺伝子〕個体間の相関性解析; 決定係数(R^2)_3匹/群

臓器		CO ₂ /O ₂ 混合	イソフルラン(ISO)
肝臓		0.983±0.005	0.980±0.010
腎臓	皮質	0.983±0.005	0.976±0.002
	髄質外帯	0.979±0.010	0.981±0.002
	髄質内帯	0.987±0.006	0.988±0.002
	乳頭	0.984±0.007	0.986±0.004
脳	海馬歯状回	0.987±0.004	0.981±0.007
	脳梁	0.994±0.004	0.976±0.002
	帯状回	0.992±0.005	0.995±0.000
	小脳	0.987±0.008	0.995±0.002

⇒何れの麻酔法においても、個体間の遺伝子発現プロファイルのばらつきは小さい(麻酔法としては遺伝子発現解析に用いても問題ない)

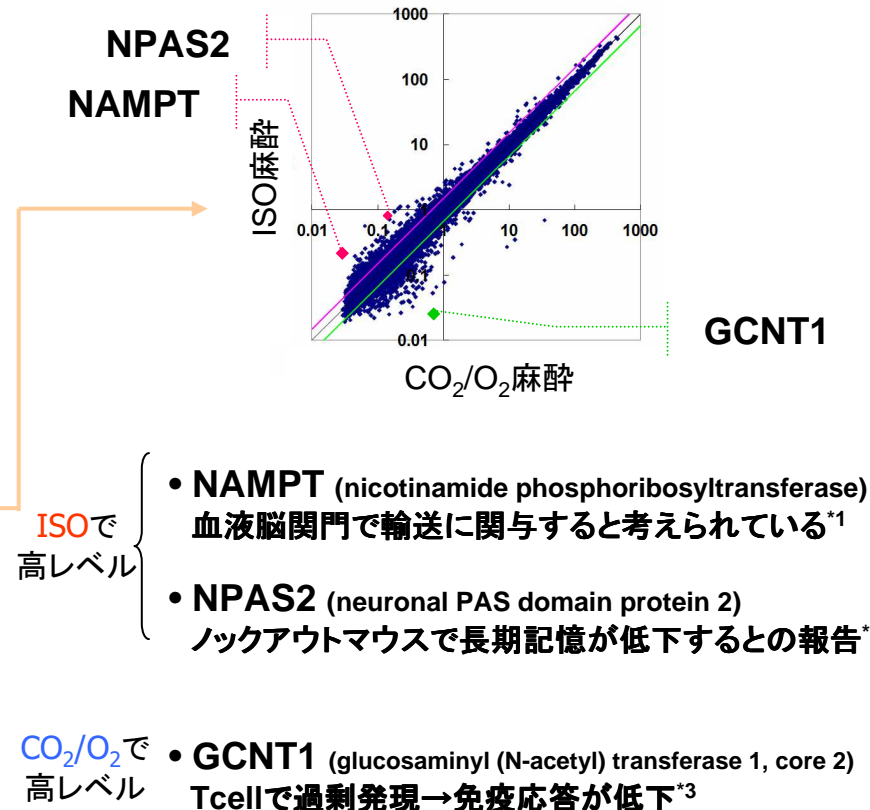
条件検討② 麻酔法の検討(麻酔間で有意差のある遺伝子)

■ 発現レベルが高かった遺伝子(プローブ数)*

臓器		CO ₂ /O ₂	ISO
	肝臓	141	68
腎臓	皮質	93	68
	髄質外帯	89	32
	髄質内帯	87	85
	乳頭	81	47
脳	海馬歯状回	75	178
	脳梁	166	112
	帯状回	43	65
	小脳	66	87

* P < 0.05 かつ 1.5倍以上 or 1/1.5倍以下

■ 海馬歯状回(CO₂/O₂混合vs ISO)



⇒[結論]・麻酔法に違いによって影響を受ける遺伝子が数百プローブ(検出プローブの約0.6%)あるため、バイオマーカー探索の際にはこれらの遺伝子を除外対象とする

・本PJでの麻酔法はこれまでのデータと合わせるためにCO₂/O₂混合麻酔とする

^{*1} Diabetes. 2009 Mar;58(3):637-40.

^{*2} Science 2000 Jun 23;288(5474):2226-30.

^{*3} EMBO J. 1997 Nov 3;16(21):6364-73.

3.4 成果の詳細(目次)

- 条件検討
 - 遺伝子発現解析用の採材方法;腎臓の部位別採取法
 - 麻酔法の検討
- ①主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 毒性判定システム[プロトタイプ]
- ②発がん性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 発がん性予測結果

1)物質選定 物質選定のストラテジー

【本プロジェクトの目標】

一つの動物実験で様々な毒性エンドポイントをメカニズムベースに検出したい



⇒ 効率的に研究成果を得るため、1物質で複数の毒性を示す物質が望ましい

- 以下の理由から、「**腎毒性(及び腎発がん性)物質**」を優先的に選定した
 - **腎毒性**: フィージビリティー試験で腎臓の部位別採取が有効であることが分かったため、種々の**MoA**をカバーできるように、幅広く陽性物質を選定した方が良い * 発がん性(後述)についても物質選定の際には同時に考慮した。
 - **腎発がん**: 本プロジェクトでの開発に必要な「腎発がん性のある物質」が乏しい⇒腎発がん性を示す物質が必要
 - **肝発がん性**: 既に開発が進んでいるため、「陰性」物質の検証が主体

1)物質選定 14物質の内訳(H23,24年度)

#	略称	試験番号	一般毒性*		変異原性	投与量 (mg/kg/day)
			肝臓	腎臓	Ames試験	
1	BDCM	B10-0092(C) B10-0103(I)	有	有	N	40, 200
2	PP	B10-0093	有	有(慢毒)	N	200, 1000
3	o-NA	B10-0094	有	有	P	80, 400
4	2A4Np	B10-0095	有	有	P	150, 750
5	TBA	B10-0096-C B10-0096-I	有	有	N	200, 1000
6	2-AA	B10-0097	影響なし	影響なし	N	200, 1000
7	o-AH	B10-0098	影響なし	影響なし	P	140, 700
8	TCEP	B10-0099	影響なし	有(慢毒)	N	80, 400
9	DBNPG	B10-0100	影響なし	有	P	200, 1000
10	Na3-NTA-H2O	B10-0101	影響なし	有(慢毒)	N	200, 1000
11	ADBAQ	B10-0102	有	有	P	200, 1000
12	AQ	B10-0104	有	有	P	200, 1000
13	TCP	B10-0105	有	有	P	15, 75
14	DMN	B10-0106	有	有	P	0.8, 4

P; 陽性、N; 陰性、(P); 雌ラット肝臓で陽性

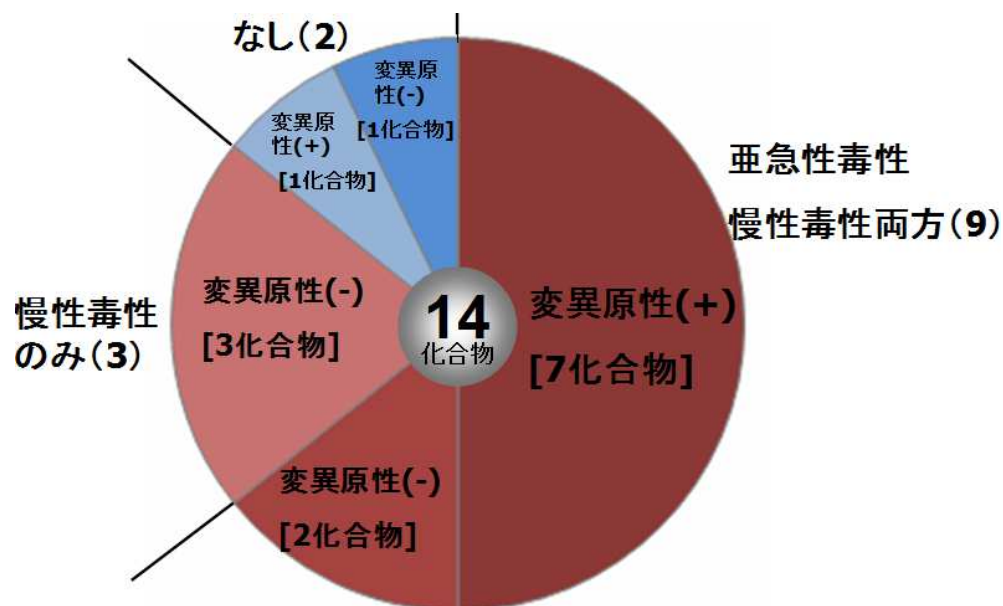
* 既報の亜急性もしくは慢性毒性試験で毒性が観察された場合は「有」、何も観察されていない場合は「影響なし」、その中で慢性毒性のみを示す物質には「有(慢毒)」と記載。

1)物質選定 14物質の内訳(H23,24年度)

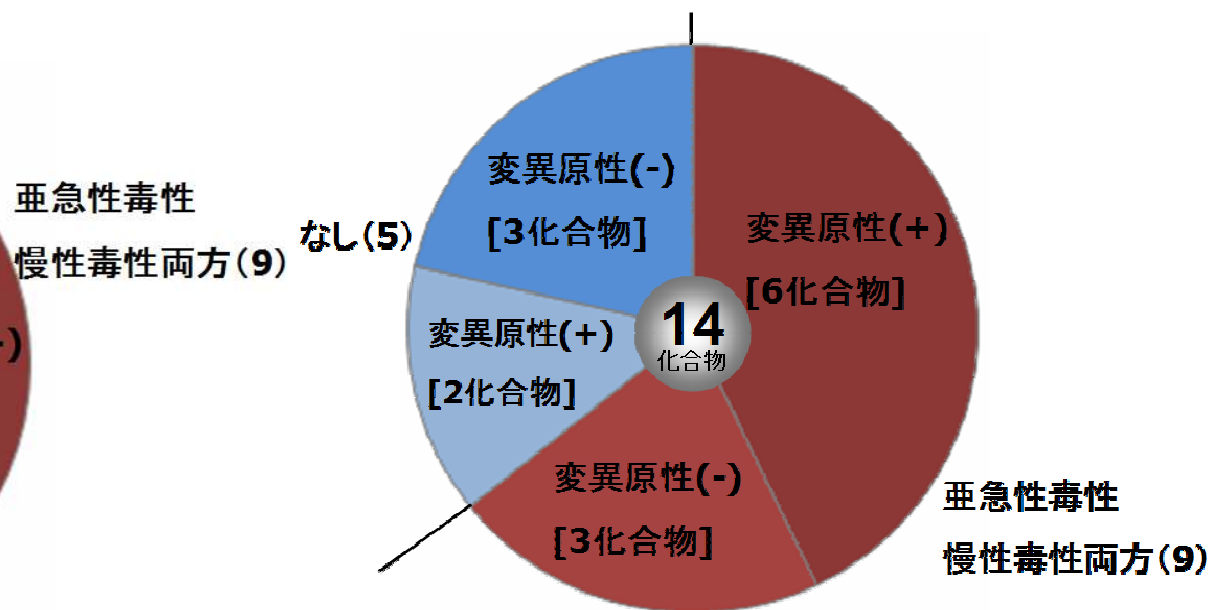
〔物質選定の基準〕 腎毒性物質を優先的に選択する

・腎毒性及び肝毒性について、亜急性毒性と長期毒性で14物質(H23, H24実施)を分類した(参考;Ames試験についても調査)

■ 腎毒性



■ 肝毒性



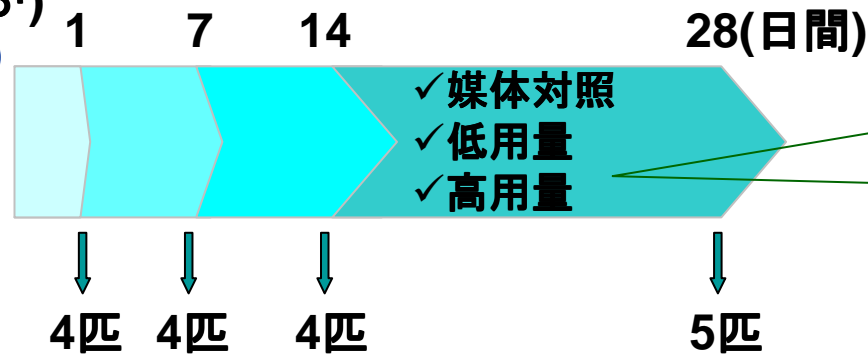
2)動物実験及び遺伝子発現量解析 動物実験プロトコール

■28日間反復投与試験*をベースに実施

SDラット(♂)
Cri:CD(SD)



5週齢



〔用量設定試験〕1000 mg/kg/day
を上限とした7日間反復投与
⇒〔本試験〕公比5で設定

【投与期間中の観察・検査】

- ✓一般状態観察:毎日
- ✓体重測定:週1回以上
- ✓摂餌量測定:週1回以上
- ✓詳細な一般状態観察:週1回(28日間投与群)
- ✓機能検査:投与4週目(28日間投与群)

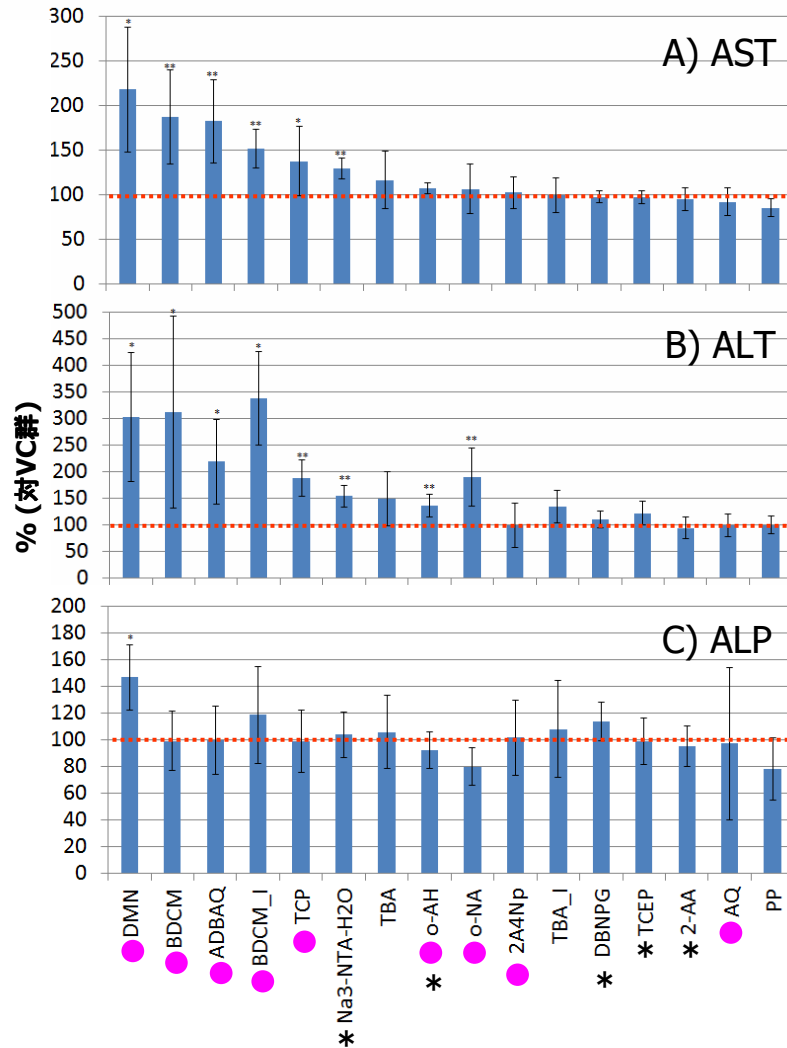
【解剖時の検査】

- ✓尿検査(28日間投与群)
- ✓血液学的検査
- ✓血液生化学的検査
- ✓剖検
- ✓器官重量測定
- ✓病理組織学的検査

*「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成23年3月31日)に定める「哺乳類を用いる28日間の反復投与毒性試験」に準じて実施

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 動物実験結果(肝臓)

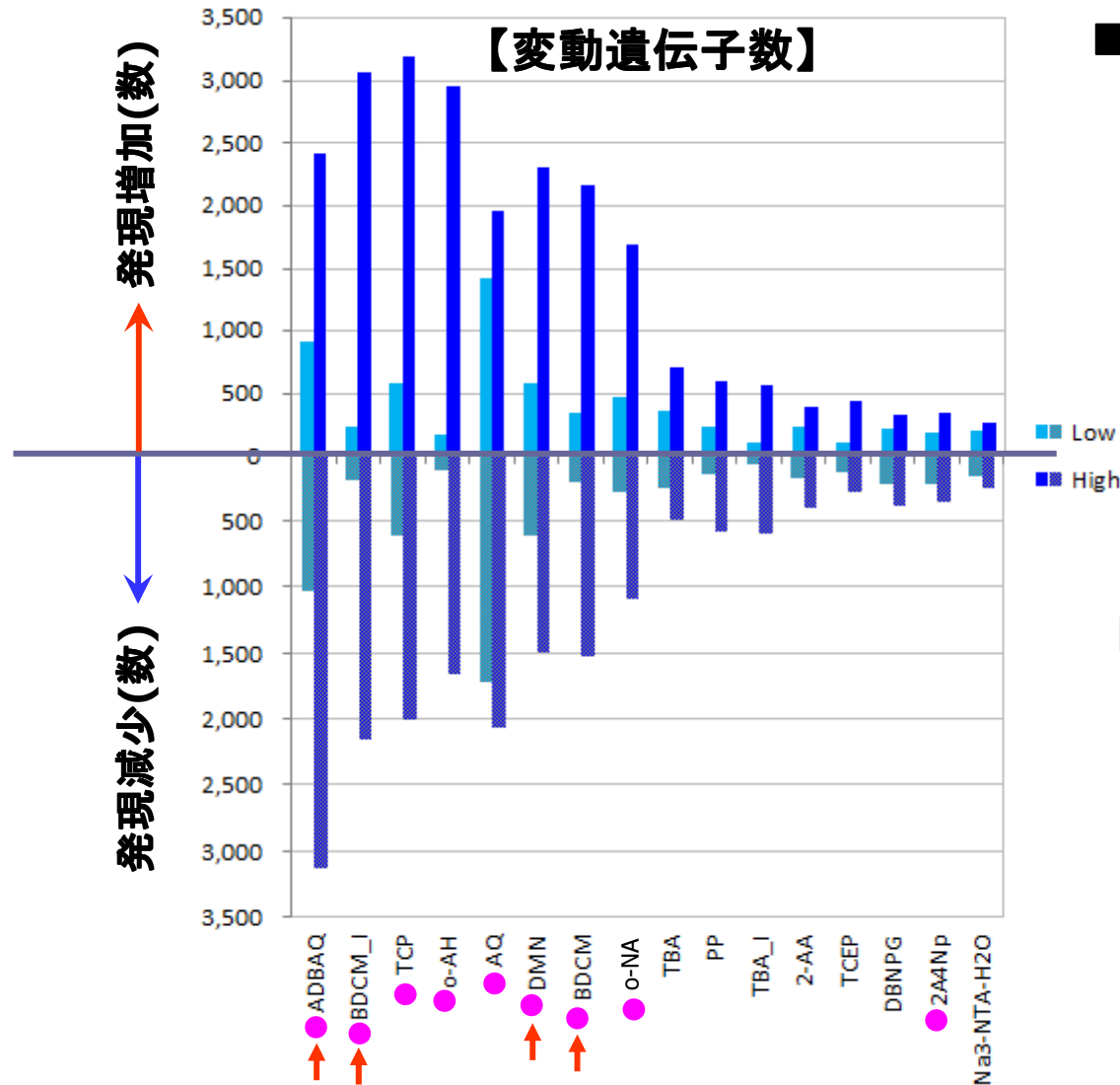
■血液生化学的検査(28日、高用量)



● 本PJの28日間反復投与(高用量)で病理所見がみられたもの

* 既知情報で肝毒性なし; o-AH, 2-AA, TDEP, DBNPG, Na3-NTA-H2O (計5物質)

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 遺伝子/結果(肝臓)



■ バイオマーカー候補の探索

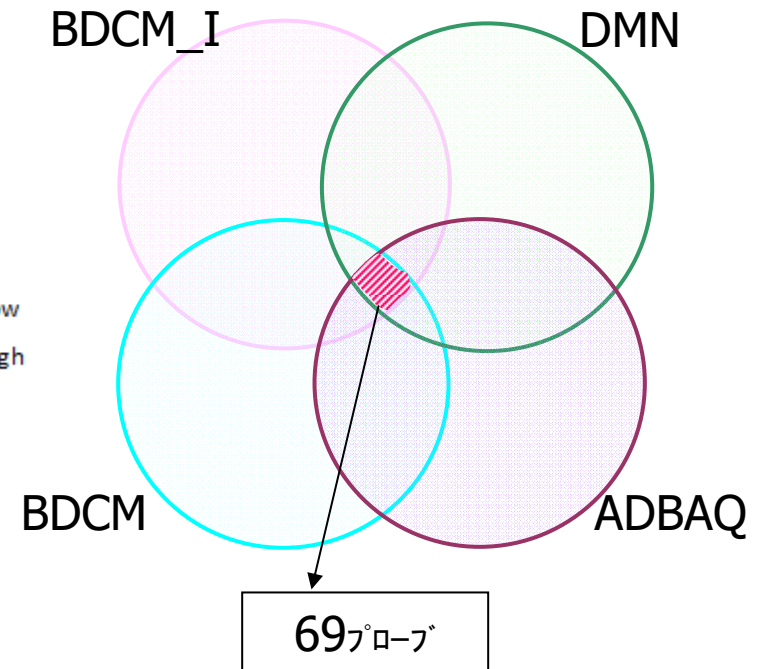
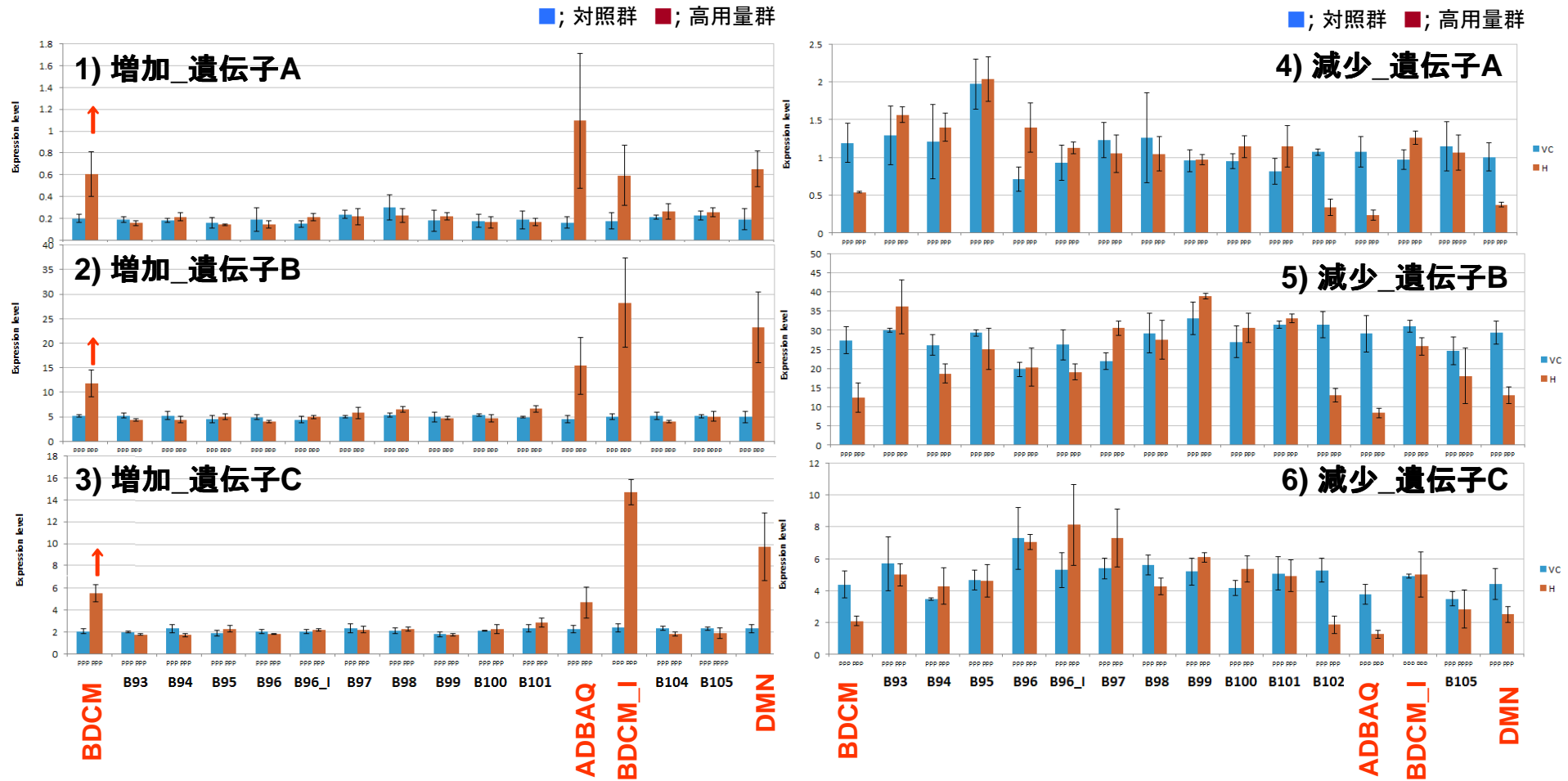


図 変動遺伝子リストのベン図解析 (単細胞壊死がみられた4物質)

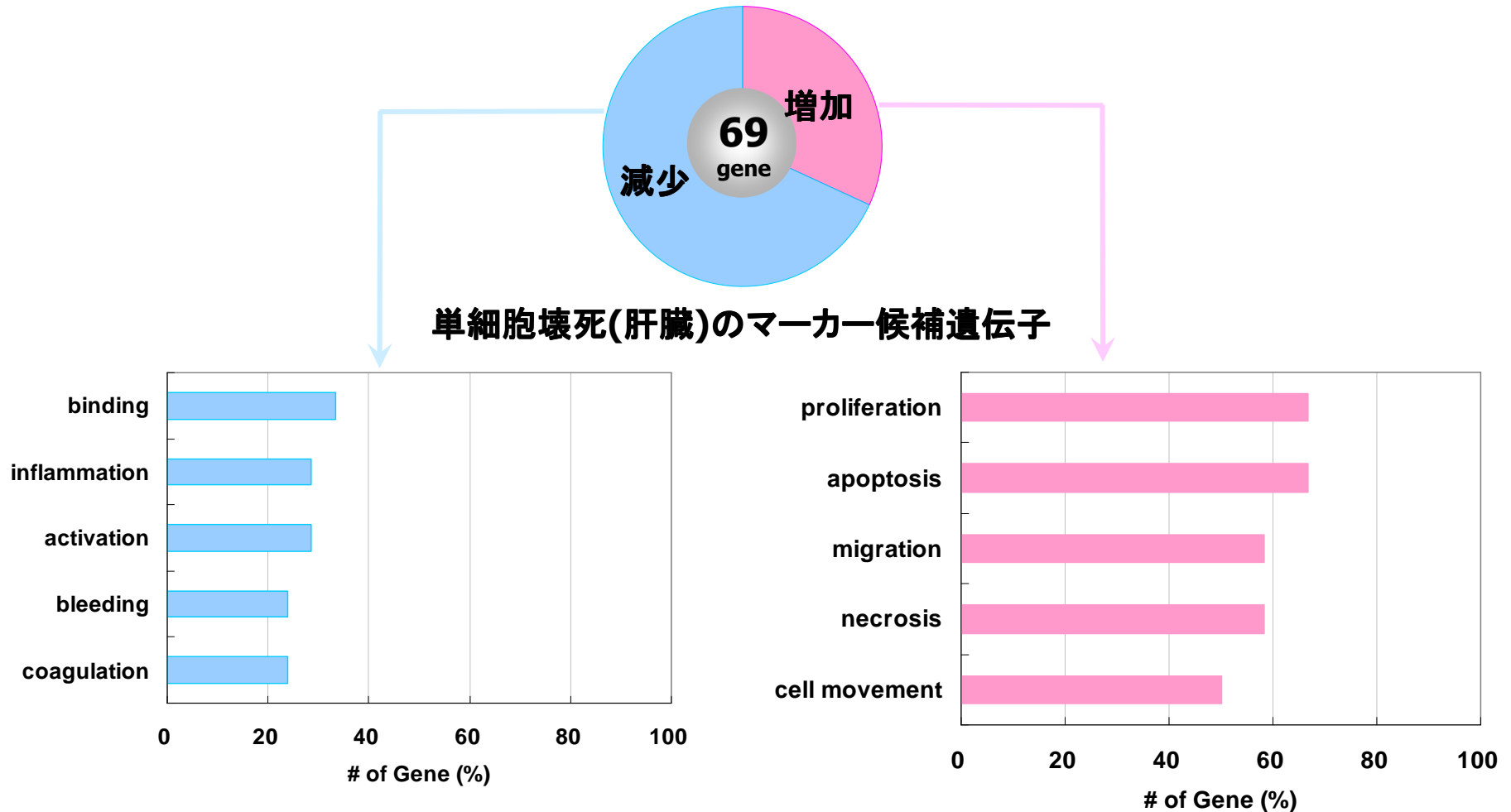
● 本PJ; 28日間反復投与(高用量)で病理所見がみられたもの

↑ 本PJ; 28日間反復投与(高用量)で単細胞壊死がみられたもの

2) 動物実験及び遺伝子発現量解析 単細胞壊死のマーカ候補



2)動物実験及び遺伝子発現量解析 単細胞壊死のマーカ-候補



細胞死(apoptosis, necrosis)や炎症応答(migration, cell movement)に関連した遺伝子が発現増加していた

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 マーカー候補遺伝子(肝臓)

表 バイオマーカー候補遺伝子(肝毒性).

#	毒性症状	毒性分類		バイオマーカー 候補遺伝子 (プローブ数)	陽性物質名
		陽性	陰性		
1	肝細胞単細胞壊死	4	12	69	BDCM, BDCM_I, ADBAQ, DMN
2	肝細胞脂肪変性	3*	13	45	BDCM BDCM_I, ADBAQ
3	肝細胞肥大	5	11	87	o-NA、o-AH、ADBAQ、 AQ、TCP
4	肝細胞肥大 (小葉周辺性)	1*	15	165	2A4Np

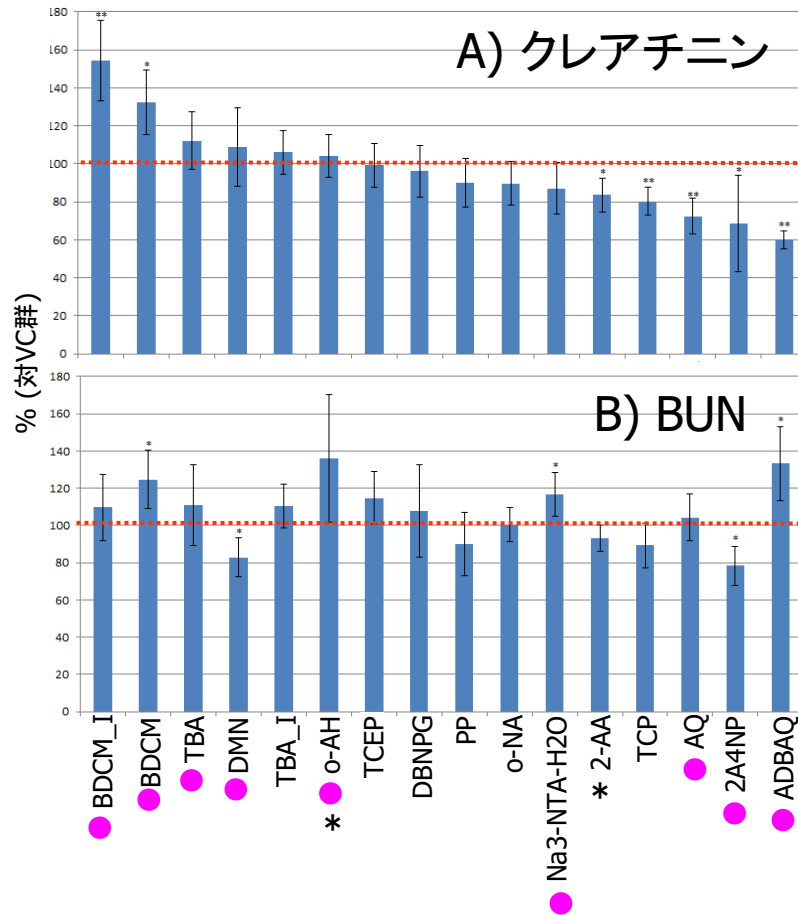
* 化合物数が少ないため、個別データ(n=3)を用いた。

【課題】

- ・物質数を増やし、各毒性症状のマーカー遺伝子の精度を向上させる
- ・その他の毒性症状についても、マーカー候補を選定する
- ・選定されたマーカー遺伝子と毒性メカニズムとの関係性を明らかにする

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 動物実験結果(腎臓)

■血液生化学的検査(28日、高用量)

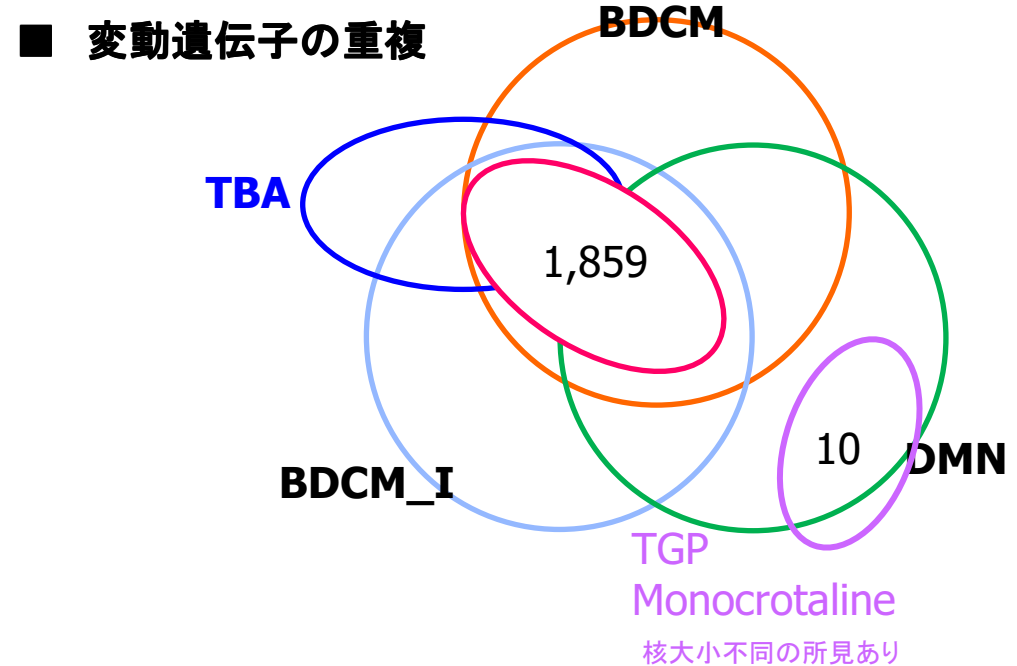
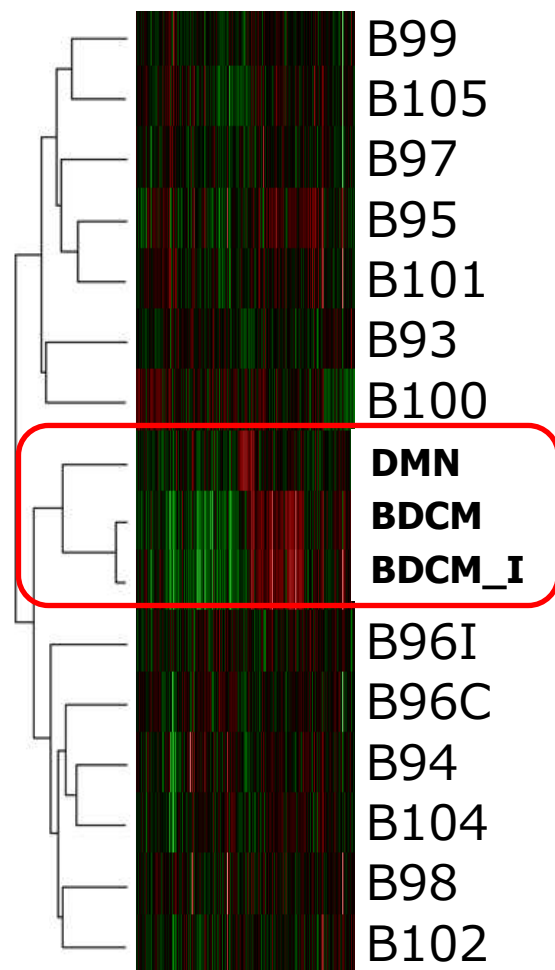


● 本PJ; 28日間反復投与(高用量)で病理所見がみられたもの

* 既知情報で腎毒性なし; o-AH, 2-AA (計2物質)

物質名	重量	剖検	病理組織学的検査
BDCM_I	↑	腎臓腫大(3/5)	・皮質/近位尿細管の空胞変性(4/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮(4/5) ・皮質/近位尿細管の再生(5/5)
BDCM	--	腎臓腫大(1/5)	・皮質/近位尿細管の空胞変性(5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮(2/5) ・皮質/近位尿細管の再生(5/5)
TBA	↑	腎臓の表面点状模様明瞭(4/5)	・皮質/近位尿細管の硝子滴(5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮(1/5)
TBA_I	↑	腎臓の表面点状模様明瞭(2/5)	--
DMN	--	--	・皮質/近位尿細管の核大小不同(2/5) ・腎盂拡張(1/5)
o-AH	--	・暗褐色化(5/5) ・腫大(1/5)	・乳頭管好塩基性化(4/5) ・乳頭壊死(2/5) ・皮質/近位尿細管ヘモジデリン沈着(5/5) ・皮質/遠位尿細管拡張(2/5) ・皮質及び髄質/遠位尿細管拡張(2/5) ・皮質/近位尿細管硝子滴(2/5) ・皮質/近位尿細管再生(2/5)
Na3-NTA-H2O	↑	・腫大(1/5)	・尿路上皮(移行上皮)過形成(1/5) ・尿路上皮空胞化(4/5) ・腎盂炎(1/5)
AQ	↑	・腫大(1/5)	・髄質外帯/近位尿細管空胞変性(2/5)
2A4NP	--	・暗褐色化(4/5) ・腫大(4/5)	・髄質外帯/近位尿細管の再生(1/5) ・髄質外帯/色素沈着(3/5)
ADBAQ	--	・暗褐色化(5/5)	・皮質/近位尿細管色素沈着(5/5)

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 遺伝子/結果(腎臓・皮質)



毒性所見	皮質/近位尿細管		
	空胞変性	核濃縮	核大小不同
BDCM	○	○	--
BDCM_I	○	○	--
DMN	--	--	○
その他	--	TBA	Monocrotaline

マーカー候補 ⇒ 1,859プローブ

50プローブ

10プローブ

図. 遺伝子発現データの階層的クラスタリング(皮質)

遺伝子数;20,709, log₂ratio, 物質数; 16,
処理群; 高用量群, 解析条件; Pearson & Ward's

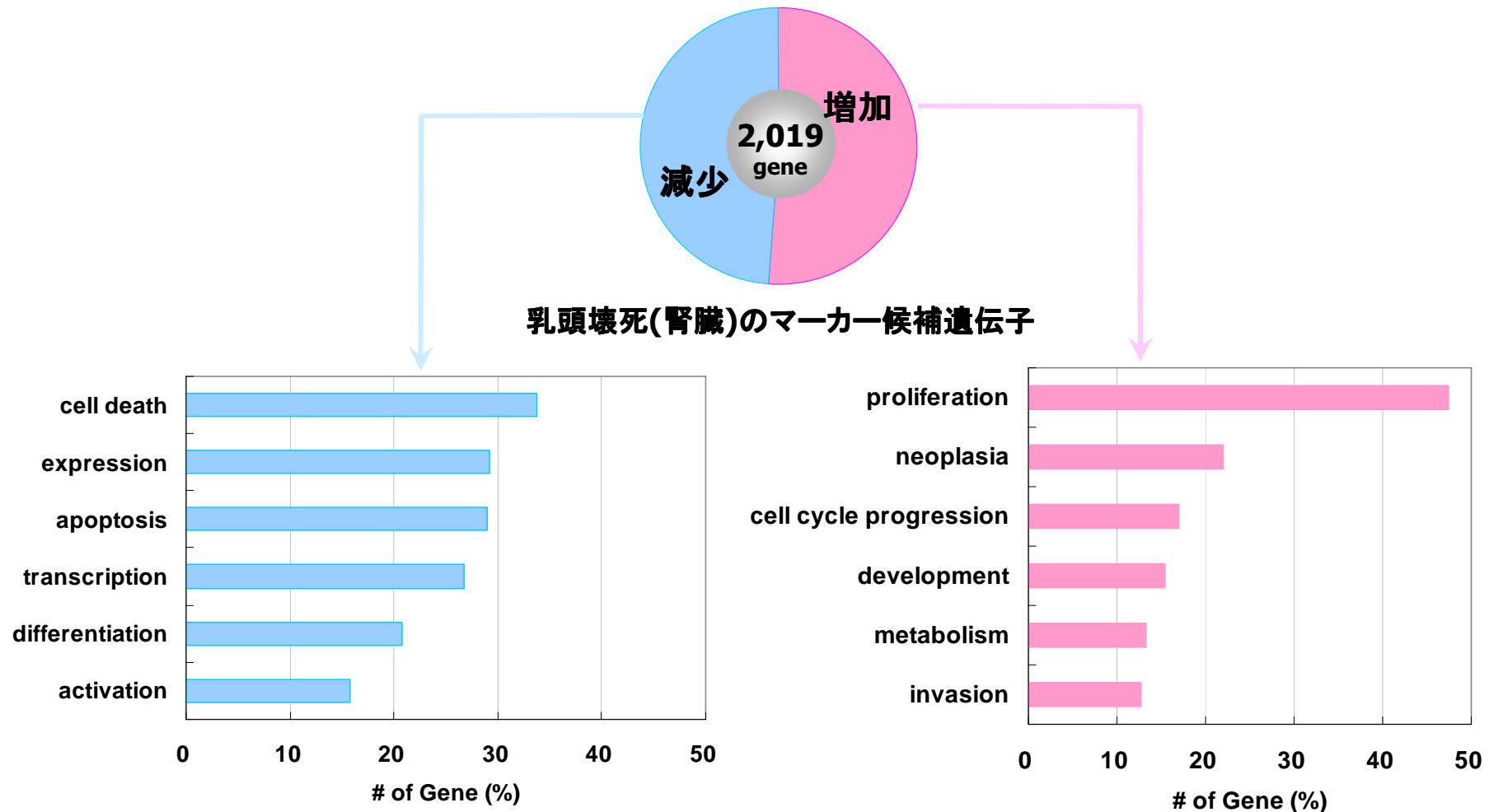
2)動物実験及び遺伝子発現量解析 マーカー候補遺伝子(腎臓)

表 バイオマーカー候補遺伝子(腎毒性).

#	部位	毒性症状	毒性分類		バイオマーカー 候補遺伝子 (プローブ数)	陽性物質名
			陽性	陰性		
1	皮質尿細管	空胞変性	2	14	1,859	BDCM, BDCM_I
2		核濃縮	3	13	50	BDCM, BDCM_I TBA
3		核大小不同	2	15	10	DMN、MCT [TGPデータ]
4	乳頭	壊死	1	15	2,019	o-AH

* 化合物数が少ないため、個体別データ(n=3)を用いた.

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 毒性症状のマーカ-候補



細胞死(cell death, apoptosis)に関与した遺伝子が発現減少し、細胞増殖(proliferation, cell cycle progression)が発現増加していた

2)動物実験及び遺伝子発現量解析 マーカー候補遺伝子(腎臓)

表 バイオマーカー候補遺伝子(腎毒性).

#	部位	毒性症状	毒性分類		バイオマーカー 候補遺伝子 (プローブ数)	陽性物質名
			陽性	陰性		
1	皮質尿細管	空胞変性	2	14	1,859	BDCM, BDCM_I
2		核濃縮	3	13	50	BDCM, BDCM_I TBA
3		核大小不同	2	15	10	DMN、MCT [TGPデータ]
4	乳頭	壊死	1	15	2,019	o-AH

* 化合物数が少ないため、個体別データ(n=3)を用いた。

【課題】

- ・物質数を増やし、各毒性マーカー遺伝子の精度を向上させる
- ・その他の毒性症状についても、マーカー候補を選定する
- ・選定されたマーカー遺伝子と毒性メカニズムとの関係性を明らかにする
- ・腎臓各部位で得られた遺伝子発現量変化を腎臓(全体)で検出できるようなデータ補正法を考案する

3.4 成果の詳細(目次)

- 条件検討
 - ・ 遺伝子発現解析用の採材方法;腎臓の部位別採取法
 - ・ 麻酔法の検討
- ①**主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性**
 - ・ 1) 物質選定(14物質)
 - ・ 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析

[これまでの結果]

肝・腎とも一部の病変についてはマーカー候補遺伝子を選定できた

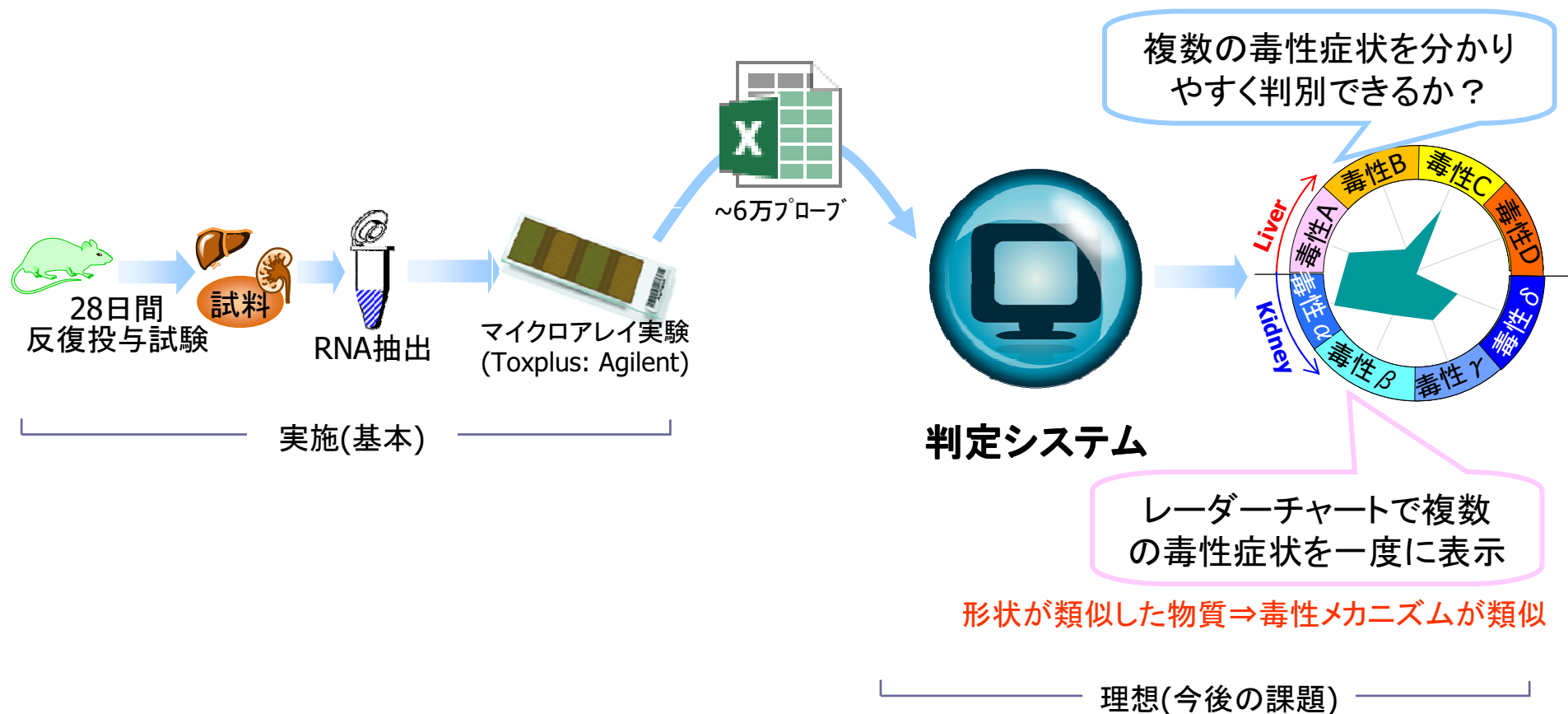
⇒中間目標として設定したレベルを達成できた

この結果をどのように試験法に組み込んでいくのか？

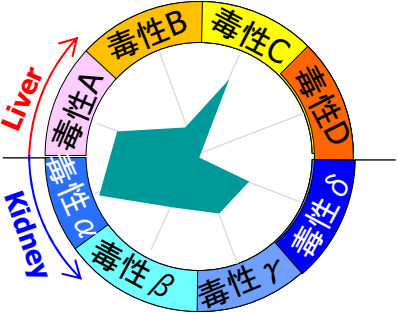
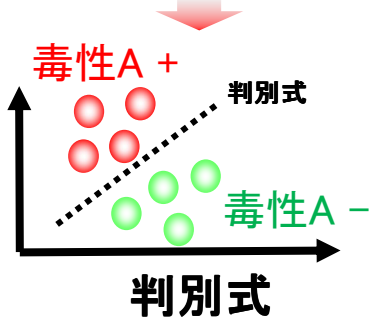
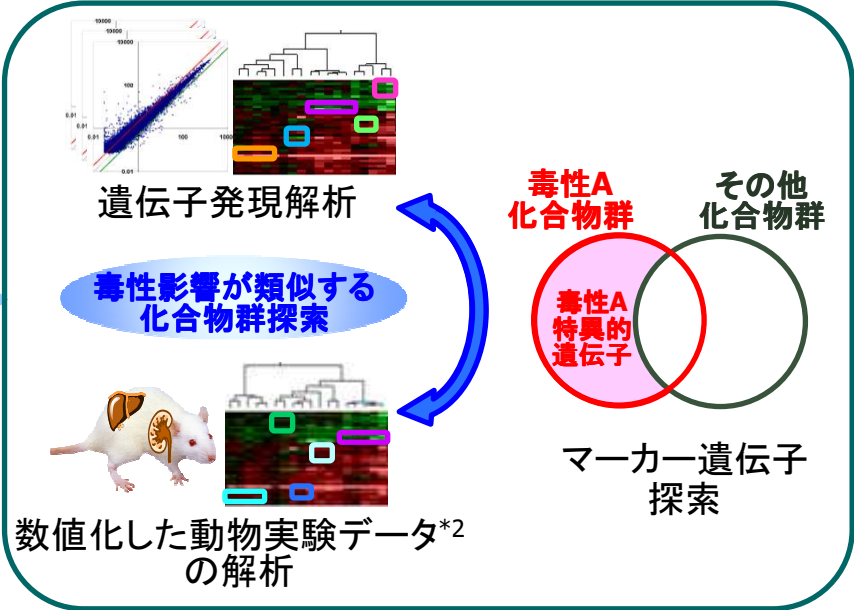
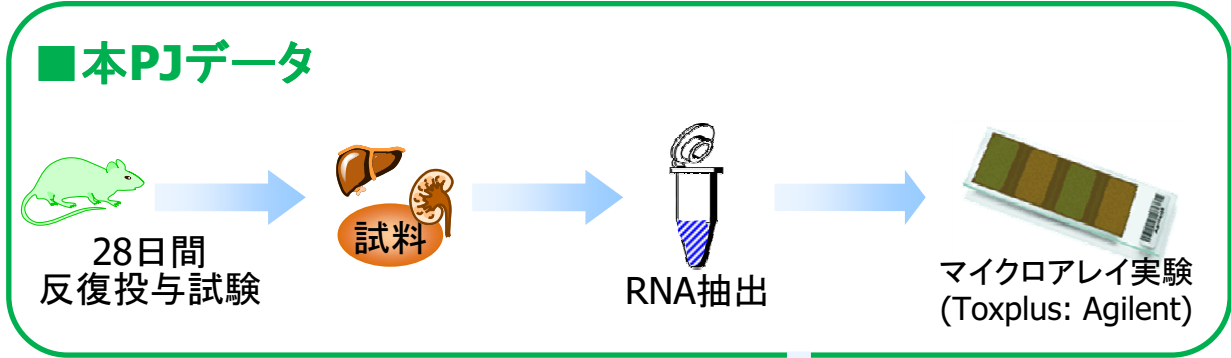
一般毒性試験の高精度化(モデル図)

【問題点】

- ✖ マーカー候補遺伝子が複数ある場合、個別に発現量解析を行うのか？
- ✖ 複数の毒性症状に対応する場合、マーカー遺伝子はさらに増加し、判定も複雑になる



毒性判定システム[プロトタイプ] 判別式の作成方法(ストラテジー)



一般毒性判定システム

*1; 厚労省ToxicogenomicsProject *2; 血液検査、尿検査、剖検、病理組織学的検査

毒性判定システム[プロトタイプ] 判別式の作成方法

■学習データ(遺伝子発現量)

#	臓器	部位	所見	毒性分類		判別式に用いた 遺伝子数
				陽性	陰性	
1	肝臓	-	単細胞壊死	4	12	13
2			肝細胞脂肪変性	3*	13	13
3			肝細胞肥大	5	11	75
4			小葉周辺性肝細胞肥大	1*	15	7
5	腎臓	皮質 近位尿細管	空胞変性	2*	14	15
6			核濃縮	3	13	14
7			核大小不同	(2)*	15	9
8		乳頭	壊死	1*	15	17

* 化合物数が少ないため、個体別データ(n=3)を用いた

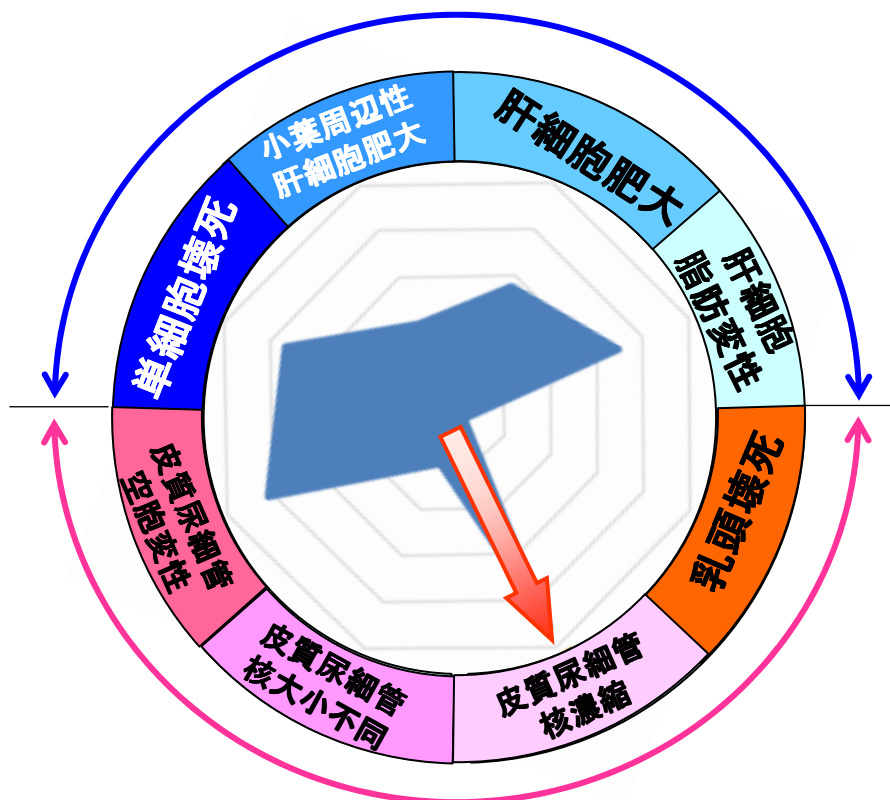
■判別式作成法

- ・判別式 ; サポートベクターマシン(SVMLight)
- ・学習データ; 陽性物質数(2~3倍)に応じて陰性物質をランダムサンプリング
- ・計算回数; 異なる化合物の組合せで6回

毒性判定システム[プロトタイプ] レーダーチャート形式での可視化

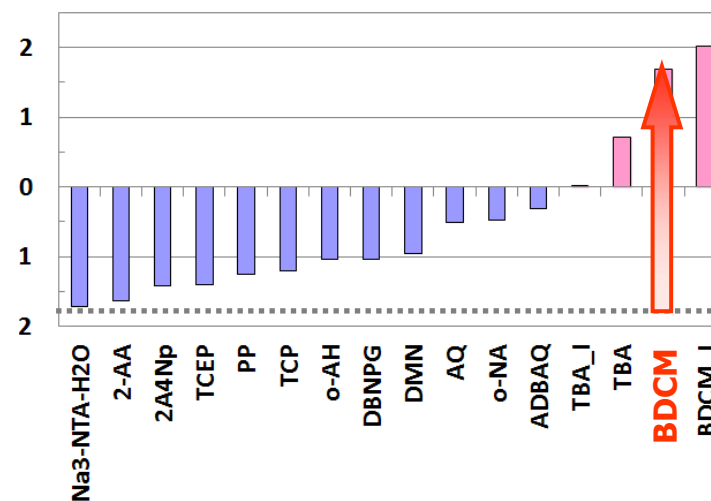
- 個々の判別式の結果をレーダーチャート形式で表示
⇒各毒性の判別結果を一度に可視化

肝毒性

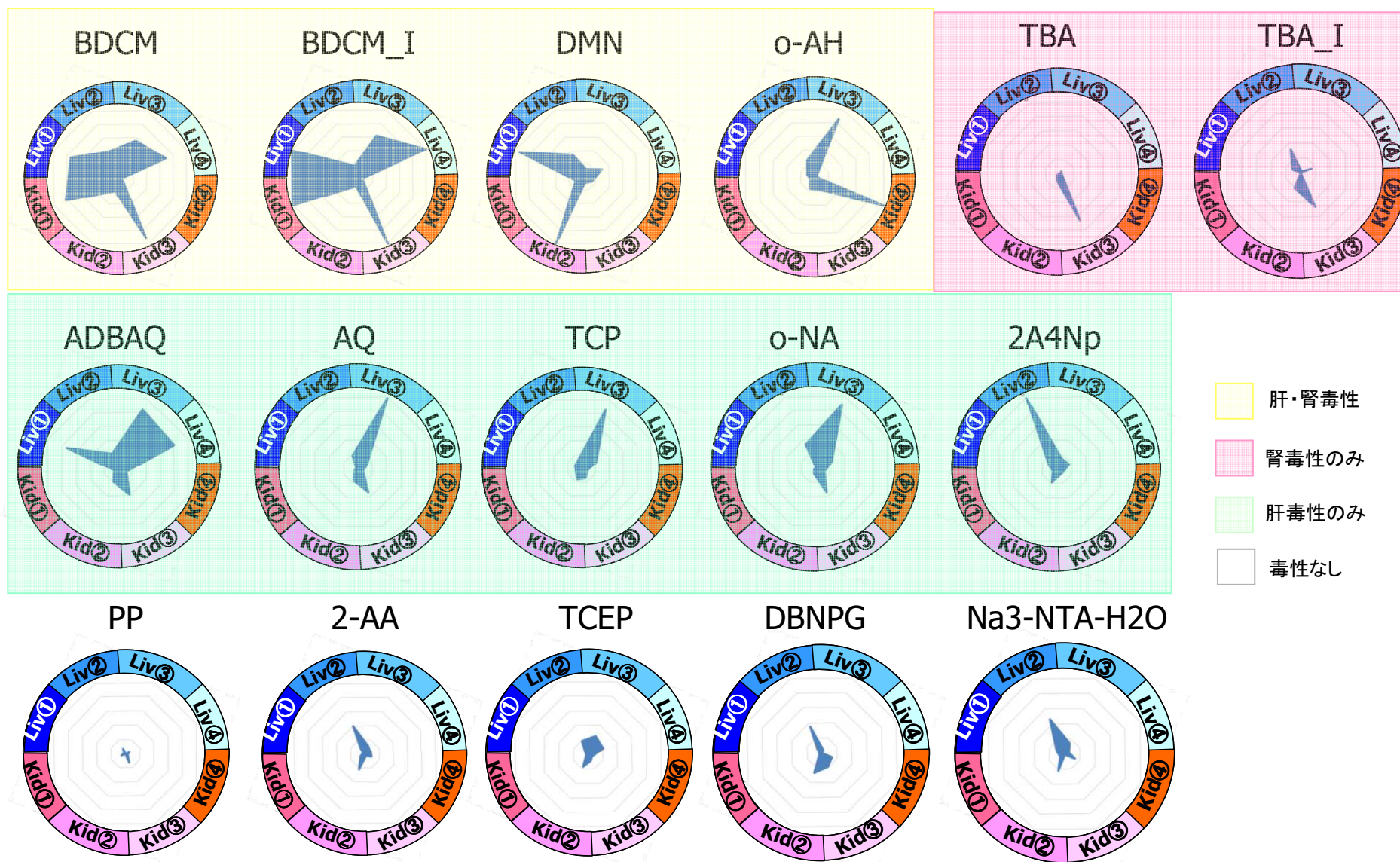


腎毒性

例) 皮質_尿細管核濃縮



毒性判定システム[プロトタイプ] 14物質(16試験)の判定結果



Liv①: 肝細胞単細胞壊死 Liv②: 小葉周辺性肝細胞肥大 Liv③: 肝細胞肥大、Liv④: 肝細胞脂肪変性
Kid①: 皮質尿細管空砲変性 Kid②: 皮質尿細管核大小不同、Kid③: 皮質尿細管核濃縮 Kid④: 乳頭壊死

まとめ ①主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性

- これまで14物質(16試験)の動物実験を実施し、遺伝子発現量データ(肝臓、腎臓、腎臓/部位別)を取得した
⇒H25年度までに23物質(26試験)を実施する予定
- 肝臓では、単細胞壊死に関連したバイオマーカー候補遺伝子を選定した
- 腎臓では、皮質/近位尿細管の空胞変性、核濃縮、核大小不同、乳頭壊死に関連したバイオマーカー候補遺伝子を選定した
⇒中間目標はほぼ達成できた

● 同定されたバイオマーカー候補遺伝子を用いて、一般毒性試験の判定方法についてプロトタイプ案を提示した

- ✓ 個々の毒性症状について判別式を構築した
- ✓ 複数の毒性判定結果を結合してレーダーチャート形式で可視化した
⇒毒性あり/なし及び毒性の程度を可視化することで、化合物間の毒性プロファイルを比較できる

3.4 成果の詳細(目次)

- 条件検討
 - 遺伝子発現解析用の採材方法;腎臓の部位別採取法
 - 麻酔法の検討
- ①主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 毒性判定システム[プロトタイプ]
- ②発がん性
 - 1) 物質選定(14物質)
 - 2) 動物実験及び遺伝子発現量解析
 - 3) 発がん性予測結果

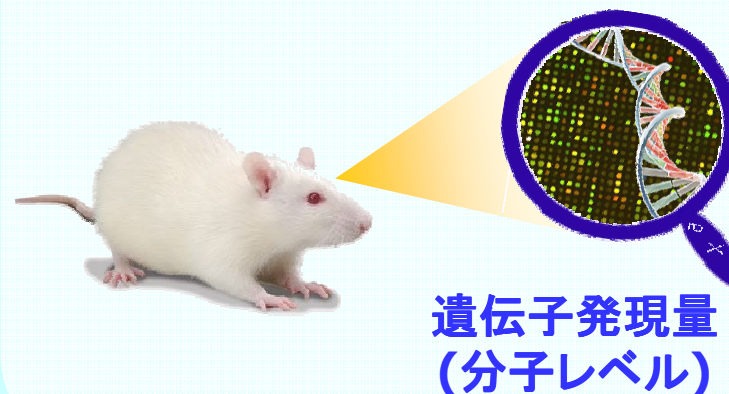
②発がん性 研究開発の背景

- ✗ 長期間
- ✗ 高コスト
- ✗ 多数の動物
- ✗ 大量の化合物



現行の発がん性試験

- ✓ 短期間
- ✓ 低コスト
- ✓ 動物数の削減
- ✓ 化合物量の削減



新規の発がん性スクリーニング法

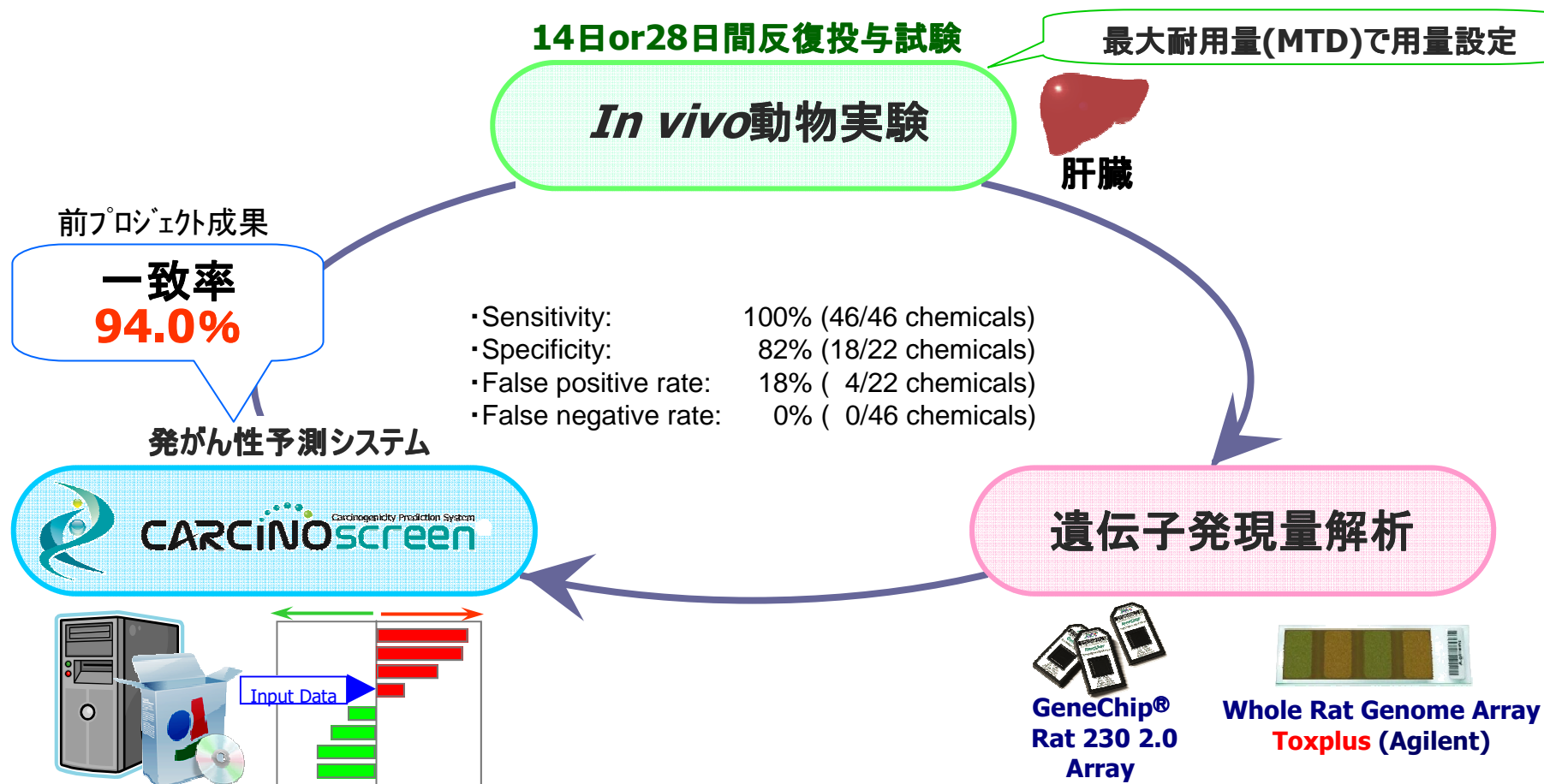
化合物の発がん性を短期間でかつ
高精度に予測できるシステム

化学物質の発がん性試験(げっ歯類)では45%が肝臓、次いで腎臓(13%)を標的
⇒**肝臓**及び**腎臓**に着目

②発がん性 予測システムの概要(肝臓)

【目標】

- ・網羅的な遺伝子発現量データを発がん性予測システムにインプットすれば、発がん性のポテンシャルに応じて、予測結果が定量的に得られる。
- ・2年間の投与が必要ながん原性を28日間以下の動物実験で予測できる。



②発がん性 本プロジェクトでの実施内容

【肝臓】

- これまでに構築した発がん性予測システムの精度を確認するため、外部データの取得を行う
 - ✓ 本プロジェクトで得られた遺伝子発現量データを本システムに供して予測する
 - ✓ 外部機関で取得したデータ(TGPデータ)を活用し、本システムに供して予測する
 - ✓ 類似のスクリーニング手法と予測精度を比較し、適用範囲を明確にする
 - ✓ [最終目標]標準化原案を作成する

【腎臓】

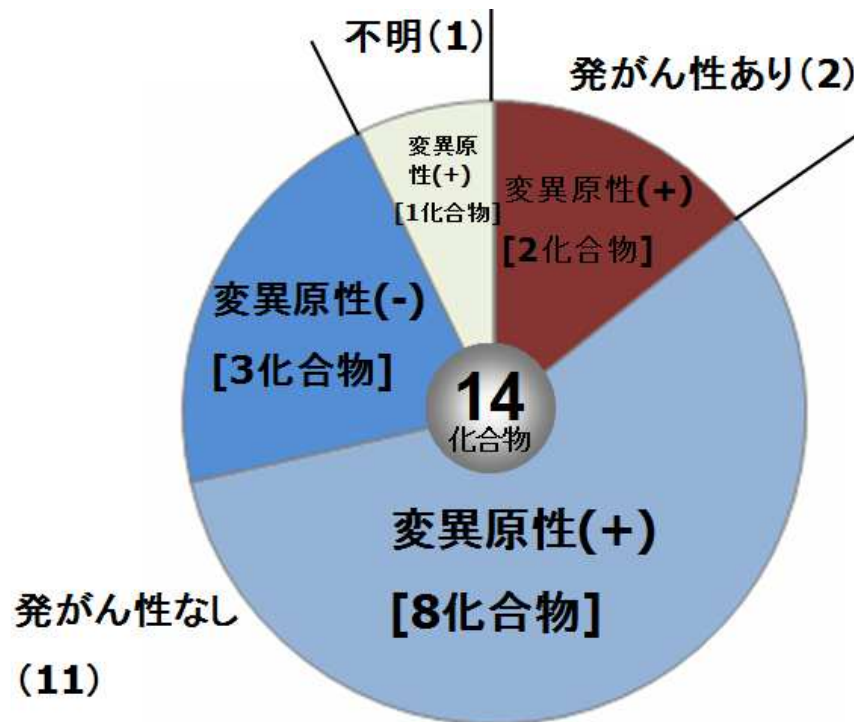
- 腎臓に対する発がん性予測システムを新たに構築する
 - ✓ 本プロジェクトで得られた遺伝子発現量データから腎発がん予測遺伝子を選定する
 - ✓ 予測遺伝子をもとに新たな発がん性予測式を構築する
 - ✓ 外部データ(例;TGPデータ)を活用し、本システムに供して予測;予測精度の確認

②発がん性 本プロジェクトで実施した化合物数(H23, 24年度)

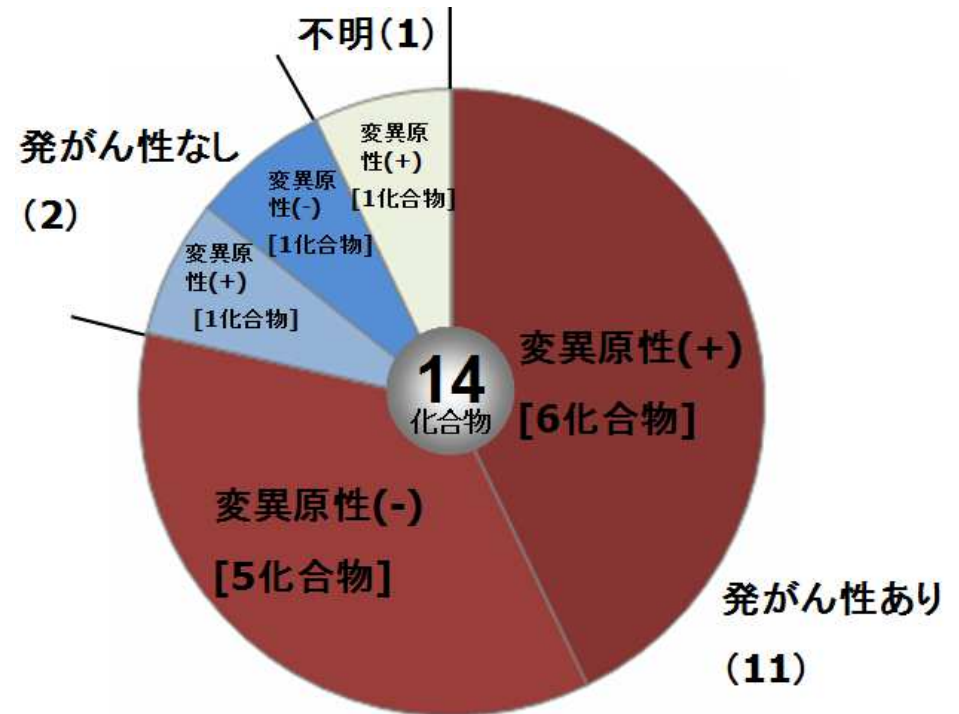
〔物質選定の基準〕腎発がん性/腎毒性物質を優先的に選択する

・発がん性について、肝臓と腎臓それぞれで14物質(H23, H24実施)を分類した

■ 肝発がん

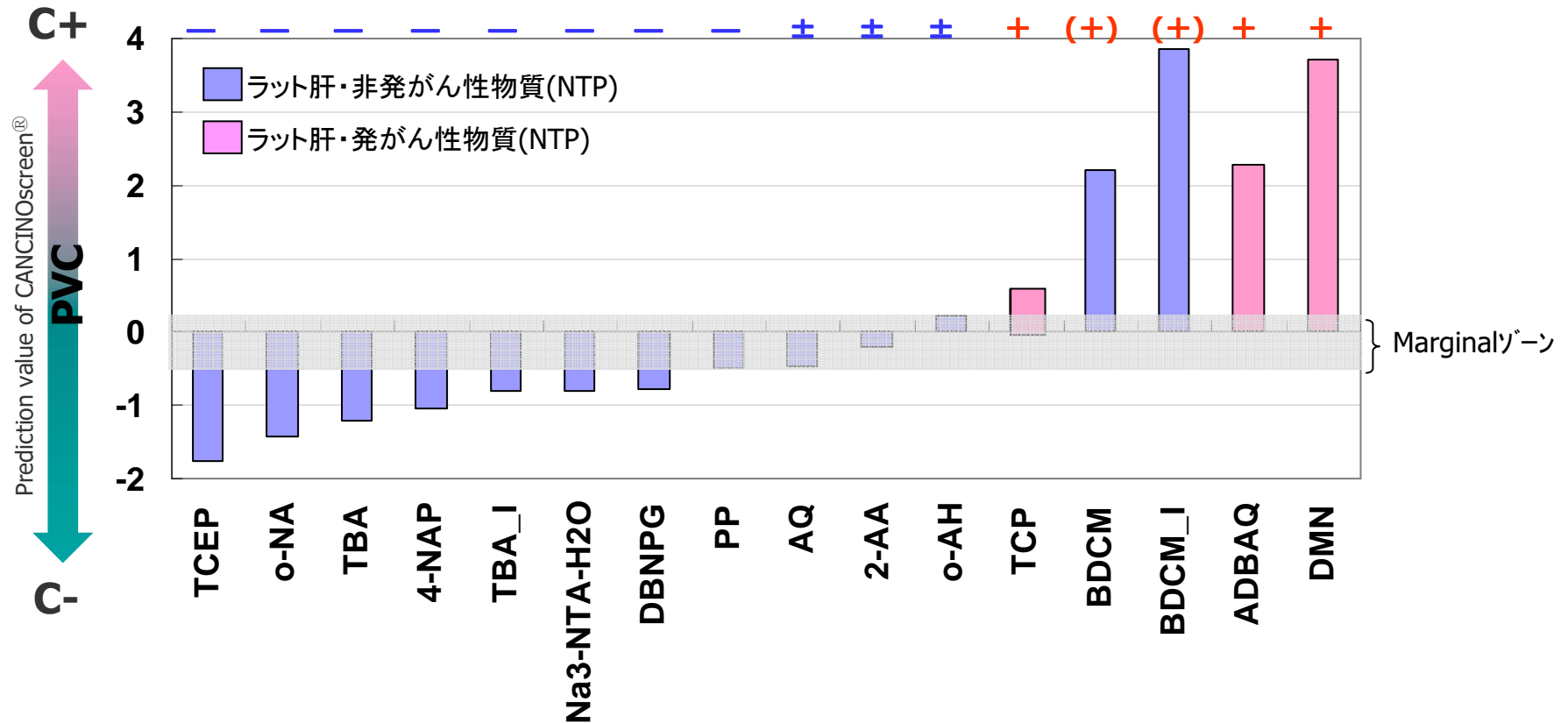


■ 腎発がん



②発がん性 本プロジェクトで得られた14化合物の予測結果

■ CARCINOscreen[®]による発がん性予測(14+2物質、28日投与、肝臓)



- ・発がん性物質は3物質とも正答し、非発がん性物質は一もしくは±と判定された
- ・BDCMの類縁体であるジクロロメタンはヒト胆管がんを誘発することが報告(BDCMはラット雌・肝で発がん性有)

②発がん性 外部データ[TGPデータ]の予測

■ TGPデータの予測結果 (SDラット、14日間投与、肝臓、GeneChipデータ)

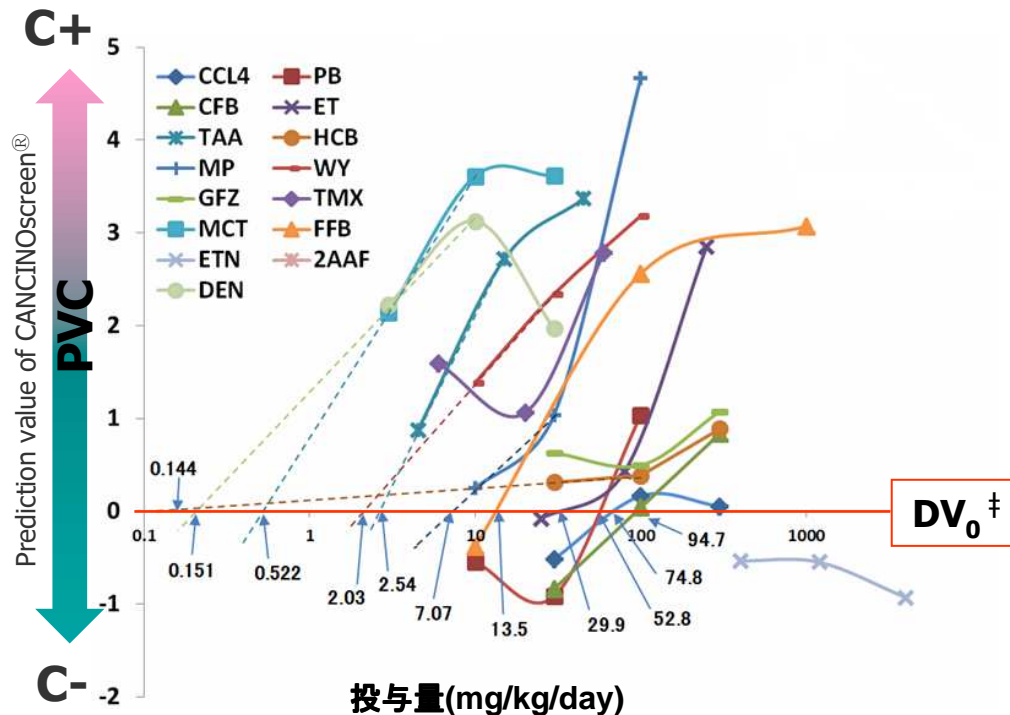
* 発がん性について明確な情報が得られた40化合物*(発がん性;15化合物, 非発がん性; 25化合物)

	CARCINOscreen®による予測結果		
	低用量	中用量	高用量
Concordance	85.0% (34/40)	95.0% (38/40)	92.5% (37/40)
Sensitivity	60.0% (9/15)	86.7% (13/15)	93.3% (14/15)
Specificity	100% (25/25)	100% (25/25)	92.0% (23/25)
False Positive	0% (0/25)	0% (0/25)	8.0% (2/25)
False Negative	40.0% (6/15)	13.3% (2/15)	6.7% (1/15)

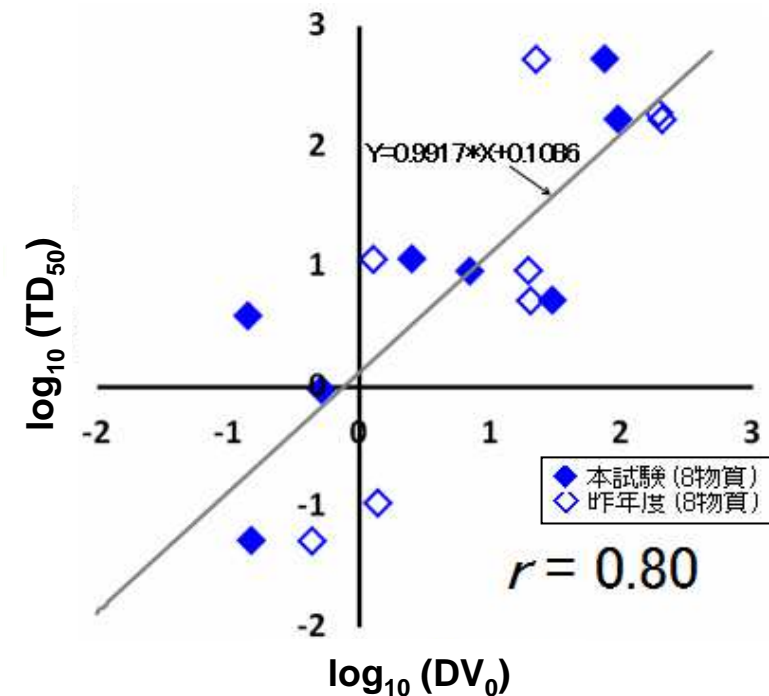
中用量以上で90%以上の精度で発がん性を予測することができた

②発がん性 外部データ[TGPデータ]の予測

■ 発がん性予測結果(PVC)と用量との関係性



■ DV_0^{\ddagger} と TD_{50} (既報)との相関性



- ・ 発がん性予測値(PVC)は用量依存的な増加を示す傾向(低用量では陰性を示す物質もある)
- ・ TD_{50} 値との相関性も高く、PVCによる定量的評価ができる可能性が示唆された

‡ DV_0 : Doses at which the predictive Value curves crossed zero.

②発がん性 他のスクリーニング手法との比較

■中期発がん性試験との比較(11+9化合物/両試験で情報があったもの)

#	Chemicals	C ^{*1}	Cr ^{*2}	Muta ^{*3}	発がん性予測結果		
					中期発がん ^{*4}	CARCINO ^{*4}	
1	Quinoline	C+	Cr+	M+	+	+	
2	Safrole	C+	Cr+	M+	+	+	
3	MelQx	C+	Cr+	M+	+	+	
4	Phenobarbital	C+	Cr+	M-	+	+	
5	Hexachlorobenzene	C+	Cr+	M-	+	+	
6	α -Hexachlorocyclohexane	C+	Cr+	M-	+	+	
7	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	+	+	
8	Urethane	C+	Cr+	M-	+	+	
9	Chlorendic acid	C+	Cr+	M-	+	+	
10	DDT	C+	Cr+	M-	+	+	
11	Caprolactam	C-	Cr-	M-	—	—	
参考データ	1	PhIP	C+	Cr-	M+	—	+
	2	7,12-Dimethylbenz [a]anthracene	C+	Cr-	M+	—	+
	3	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	+	+
	4	Aldrin	C+	Cr-	M-	+	+
	5	Di(2-ethylhexyl)adipate	C+	Cr-	M-	—	+
	6	d-Limonene	C+	Cr-	M-	+	+
	7	Trichloroacetic acid	C+	Cr-	M-	—	+
	8	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	+	+
	9	Dieldrin	C+	Cr-	M-	+	+

*1 C: げっ歯類における発がん性でC+が陽性、C-が陰性。 *2 Cr: ラット肝臓における発がん性でCr+が陽性、Cr-が陰性。 *3 Muta: 変異原性(Ames test)でM+が陽性、M-が陰性。

*4: 予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」。中期発がん性試験はHasegawa R. *et al.*, 1992より引用。

CARCINOscreen®はToxIII, 投与28日目の結果を示す。

②発がん性 他のスクリーニング手法との比較

■ Bhas42試験(*in vitro*)との比較(22化合物/両試験で情報があつたもの)

#	Chemicals	C* ¹	Cr* ²	Muta* ³	発がん性予測結果	
					Bhas42* ⁴	CARCINO* ⁴
1	2,4-Diaminotoluene	C+	Cr+	M+	+	+
2	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	M+	+	+
3	1,4-Dioxane	C+	Cr+	M-	—	+
4	Methyl carbamate	C+	Cr+	M-	—	+
5	Urethane	C+	Cr+	M-	—	+
6	Benz[a]anthracene	C+	Cr-	M+	+	+
7	3-Methylcholanthrene	C+	Cr-	M+	+	+
8	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	+	+
9	Quercetin	C+	Cr-	M+	+	—
10	MNNG	C+	Cr-	M+	+	—
11	d-Limonene	C+	Cr-	M-	+	+
12	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	—	+
13	2,6-Diaminotoluene	C-	Cr-	M+	—	—
14	8-Hydroxyquinoline	C-	Cr-	M+	+	—
15	2-Chloroethanol	C-	Cr-	M+	—	—
16	p-Phenylenediamine 2HCl	C-	Cr-	M+	—	—
17	4-Acetylaminofluorene	C-	Cr-	M+	—	+
18	D-Mannitol	C-	Cr-	M-	—	—
19	Caprolactam	C-	Cr-	M-	—	—
20	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	+	—
21	Benzoin	C-	Cr-	M-	+	—
22	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	+	—

*1 C: げっ歯類における発がん性でC+が陽性、C-が陰性, *2 Cr: ラット肝臓における発がん性でCr+が陽性、Cr-が陰性, *3 Muta: 変異原性(Ames test)でM+が陽性、M-が陰性, *4 : 予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」.

Bhas42 assay (Sakai A. *et al.*, 2010)のInitiation assay若しくはPromotion assayの何れかでPositiveであれば発がん性あり、両assayでNegativeであれば発がん性なし。CARCINOscreen®はToxIII, 投与28日目の結果を示す。

②発がん性 他のスクリーニング手法との比較

	中期発がん性試験 (ラット肝発がん物質のみ)		Bhas42 assay	
	中期発がん性試験*	CARCINOscreen®	Bhas42 assay [†]	CARCINOscreen®
Concordance	100% (11/11)	100% (11/11)	68.2% (15/22)	86.4% (19/22)
Sensitivity	100% (10/10)	100% (10/10)	66.7% (8/12)	83.3% (10/12)
Specificity	100% (1/1)	100% (1/1)	70.0% (7/10)	90.0% (9/10)
False Positive	0% (0/1)	0% (0/1)	30.0% (3/10)	10.0% (1/10)
False Negative	0% (0/10)	0% (0/10)	33.3% (4/12)	16.7% (2/12)

* 中期発がん性試験 (Hasegawa R. *et al.*, 1992), CARCINOscreen® ToxIII, 投与28日目

† Bhas42 assay (Sakai A. *et al.*, 2010)のInitiation assay若しくはPromotion assayの何れかでPositiveであれば発がん性あり、両assayでNegativeであれば発がん性なし、

・試験法によってスクリーニングできる物質が異なる

- ✓ 本予測システムでは他生物種(例:マウス)や他臓器(腎臓等)で発がん性を示す物質の検出力が低い
- ✓ 一方で、ラット肝臓で発がん性を示す物質、特に非変異発がん性物質の検出力は高い
- ✓ 非発がん性物質の検出力も比較的高い

⇒今後も外部データを蓄積し、既存スクリーニングとの比較を継続して行う

②発がん性 本プロジェクトでの実施内容

【肝臓】

- これまでに構築した発がん性予測システムの精度を確認するため、外部データの取得を行う
 - ✓ 本プロジェクトで得られた遺伝子発現量データをシステムに供して予測する
 - ✓ 外部データ(例;TGPデータ)を活用し、本システムに供して予測する
 - ✓ 類似のスクリーニング手法と予測精度を比較し、適用範囲を明確にする
 - ✓ [最終目標]標準化原案を作成する

【腎臓】

- 腎臓に対する発がん性予測システムを新たに構築する
 - ✓ 本プロジェクトで得られた遺伝子発現量データから腎発がん予測遺伝子を選定する
 - ✓ 予測遺伝子をもとに新たな発がん性予測式を構築する
 - ✓ 外部データ(例;TGPデータ)を活用し、本システムに供して予測;予測精度の確認

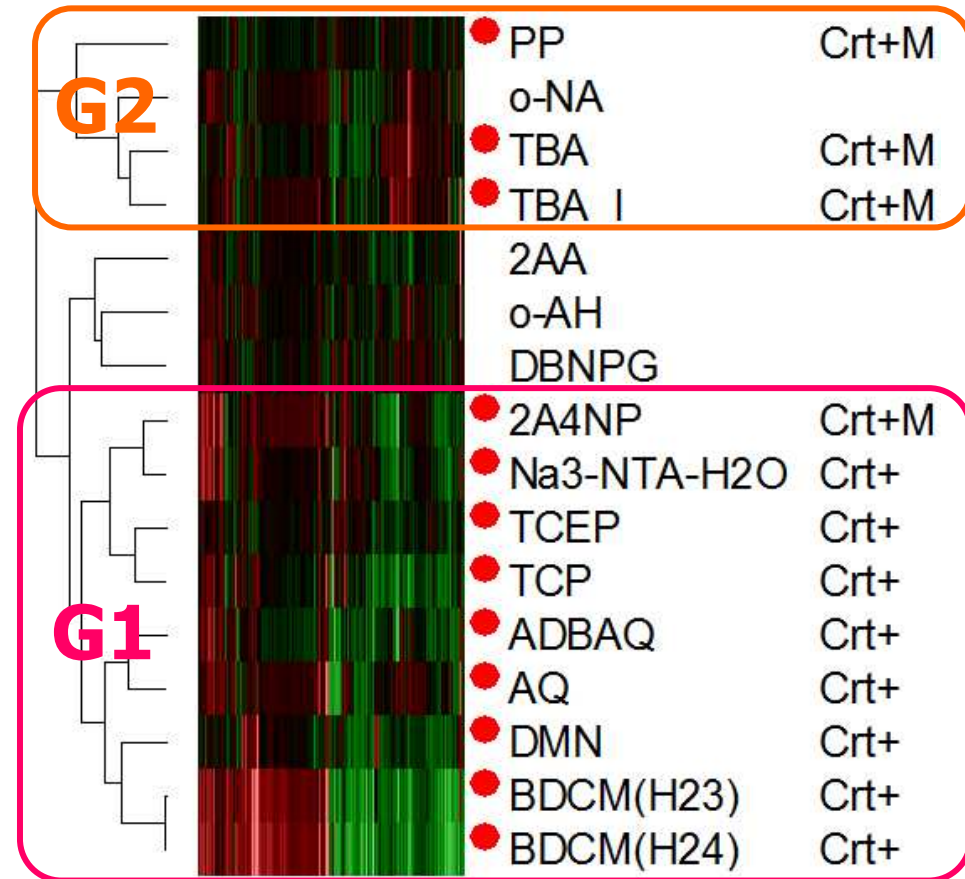
②発がん性 腎臓における発がん性分類

■ 腎発がん性物質の分類

#	化合物	腎 発がん	尿細管	腎盂
1	BDCM	P	○	--
2	PP	P	○	--
3	2A4Np	P	○	--
4	TBA	P	○	--
5	TCEP	P	○	--
6	Na3-NTA-H2O	P	○	--
7	ADBAQ	P	○	--
8	AQ	P	○	--
9	TCP	P	○	--
10	DMN	P	○	--
11	o-AH	P	--	○
12	o-NA	N	--	--
13	2-AA	N	--	--
14	DBNPG	E	--	--

尿細管がん注目し、腎臓/皮質の遺伝子
発現量データを解析した

■ 腎臓(皮質)の階層的クラスタリング



グループ1及び2それぞれで特異的に発現変動する
遺伝子を抽出⇒予測遺伝子

Crt: 尿細管がんが認められている物質。 +M; 雄のみで発がんする

②発がん性 予測遺伝子の選定及び予測式構築[プロトタイプ](腎臓)

【遺伝子選定条件】

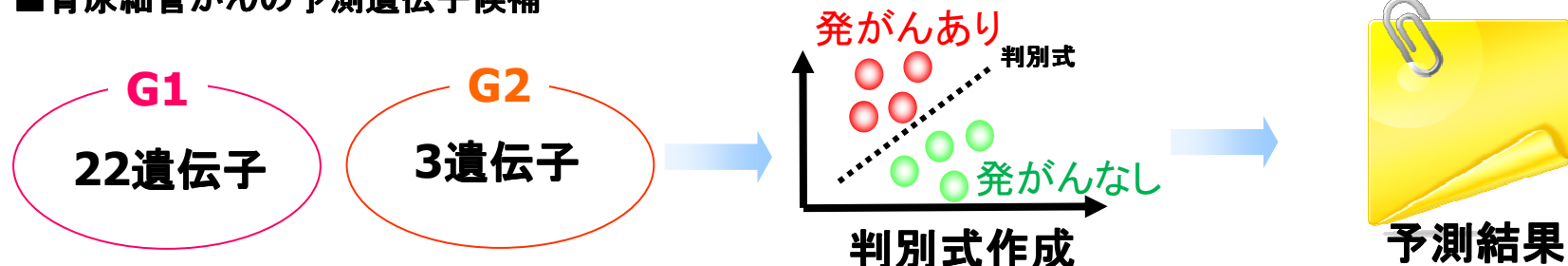
- ・全ての物質でAフラグを示す遺伝子を除外
- ・発がん性物質グループと非発がん性物質群間でウェルチのt値が2以上を示し、かつ発現増加を示す遺伝子については投与群でAフラグを含まず、発現減少を示す遺伝子については対照群でAフラグを含まないものを採用
- ・上記の遺伝子セットから発がん性物質グループの70%以上の物質で変動*し、かつ非発がん性物質群の40%以下の物質でのみ変動する遺伝子(1.5倍以上もしくは1/1.5倍以下)を候補遺伝子として選定

【予測システム構築の条件】

- ・トレーニングデータ: 14化合物(SDラット、28日間反復、腎臓)
- ・マイクロアレイ; Whole Rat Genome Toxplus、一色法
- ・予測式の構築: SVM (Support Vector Machine)
- ・予測式の最適化: ランダム計算法*

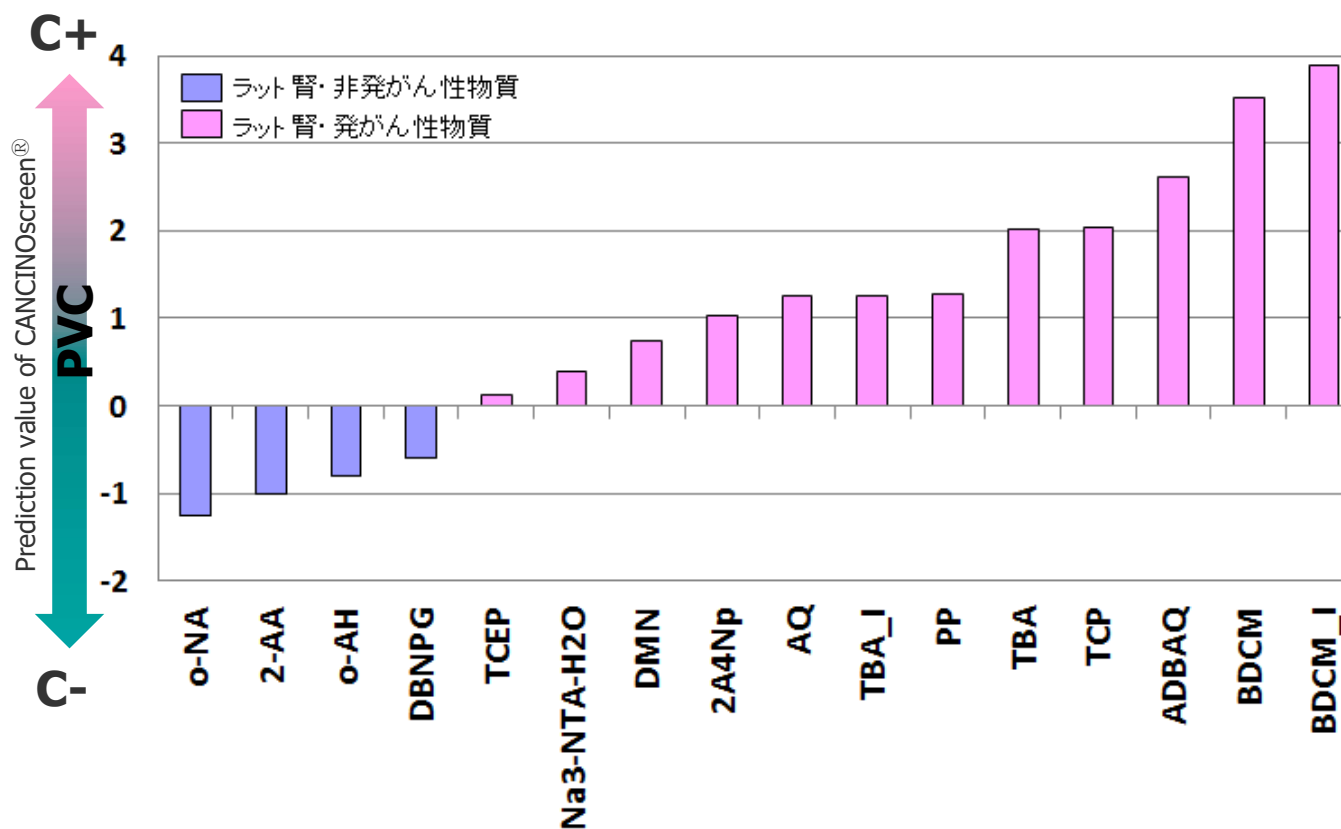
*: SVMで得られた境界線の係数について、トレーニングデータをランダムに入れ替え、3,000回の繰り返し計算を行い最適化した

■腎尿細管がんの予測遺伝子候補



②発がん性 予測結果[プロトタイプ](腎臓)

■腎尿細管がんの予測結果(14+2物質、28日投与、腎臓)



・14物質(16データ)全て、腎尿細管がんの有無を正しく予測できた

⇒今後も遺伝子発現量データを蓄積し、幅広い腎発がん性物質を検出できるシステムにする

⇒腎臓の部位別データを活用し、毒性メカニズムに基づいた予測遺伝子を抽出する

まとめ ② 発がん性

【肝臓】

- 本プロジェクトで取得した14物質(16試験)の発がん性はほぼ正しく予測できた
- TGP (外部データ、40物質)を本システムで予測したところ、中用量以上で90%以上の正答率を示した
- 他の発がん性スクリーニング手法と比較することで、本システムは肝臓以外の臓器で発がんする物質に対して予測精度が低下する傾向にあることが分かった

⇒中間目標はほぼ達成できた

【腎臓】

- 腎尿細管がん(腎発がん物質の10/11物質)について、予測遺伝子(候補)を25遺伝子同定することができた。

⇒中間目標はほぼ達成できた

- 予測候補遺伝子を用いて腎発がん予測式[プロトタイプ]を構築し、14物質(16データ)を予測したところ、全て正答した

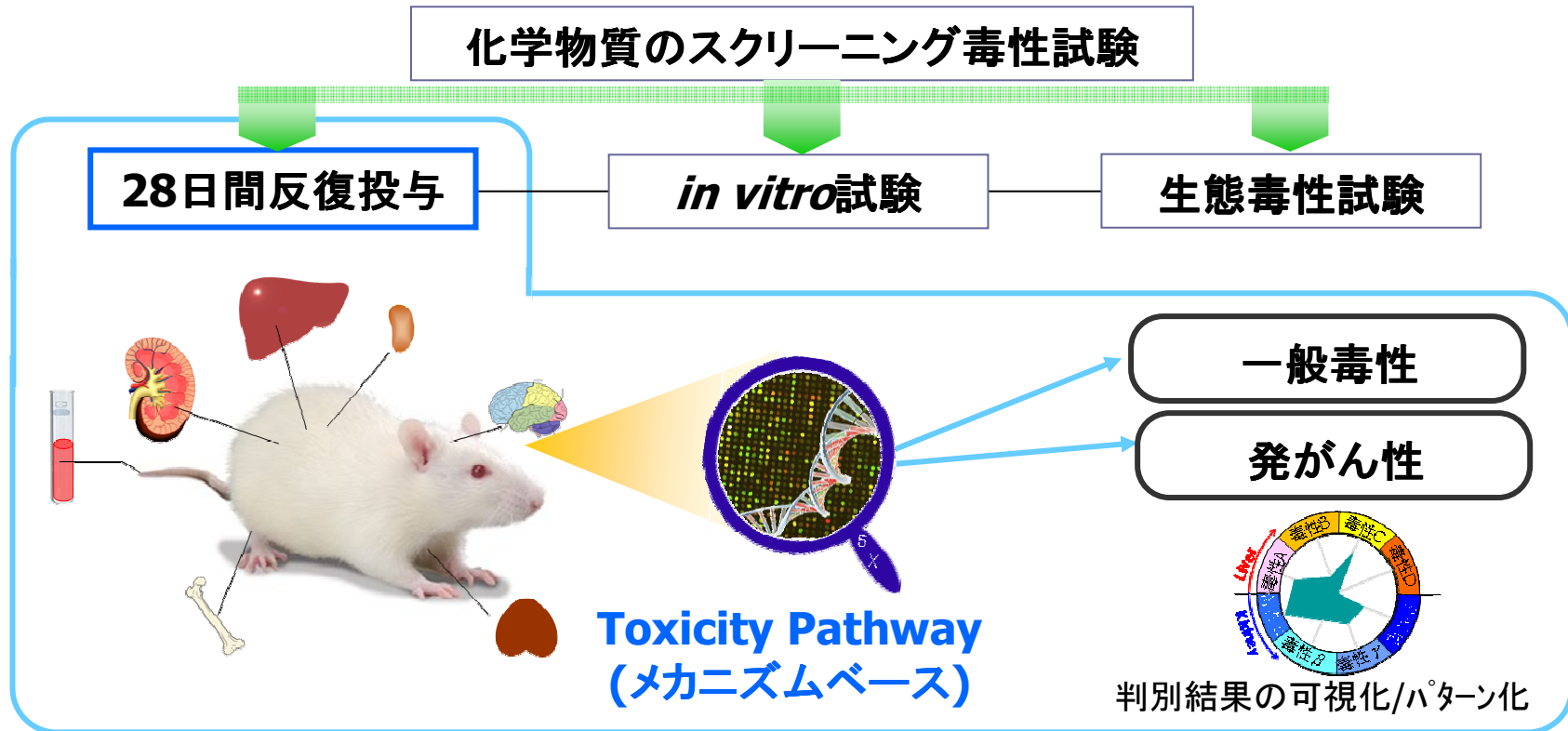
中間評価(1)

中間目標	成果	達成度
<p>(a)各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み</p> <p>1) 適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する</p>	<p>1-1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・動物試験の実施 ⇒毒性機序の異なる14物質(16試験)について28日間反復経口投与実験を実施した ・採材法(腎臓)の開発 ⇒腎臓を皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の4部位に分けて採取し、手技や個体間差の小さな遺伝子発現量データを取得することができた <p>1-2) 発がん性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・動物試験の実施 ⇒毒性機序の異なる14物質(16試験)について28日間反復経口投与実験を実施した ・採材法(腎臓)の開発 ⇒一般毒性で得られた結果を適用 	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p>

中間評価(1)

中間目標	成果	達成度
<p>2) 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う</p>	<p>2-1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性) ・特定の機序に基づく特徴的遺伝子群候補の探索 ⇒肝毒性では4種の毒性症状、腎毒性でも4種の毒性症状について、10~2,019プローブのバイオマーカー候補遺伝子を選定することができた。</p> <p>2-2) 発がん性 ・腎発がん性に関する特徴的遺伝子群候補の探索 ⇒早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補として、25プローブを選定した。</p>	<p>達成</p> <p>達成</p>
<p>(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立</p>	<p>1-1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性) ⇒肝毒性及び腎毒性の判定システムのプロトタイプ(レーダーチャート式に判定結果を可視化できるもの)を考案した。</p> <p>1-2) 発がん性 ・腎発がん性予測の初期的パイロットモデル(暫定版)の開発 ⇒早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子を用いて判別式を作成し、予測システムのプロトタイプを構築した。 ・肝発がん予測システムの陰性物質を中心とした検証 ⇒本プロジェクトで11物質、外部実施データであるTGPデータで25物質の陰性物質について予測を行い、高い確率で一致することを確認した。</p>	<p>前倒しで実施</p> <p>前倒しで実施</p> <p>前倒しで実施</p>

将来像 化審法への適用及び今後の課題



【課題】

- ・今後も継続して物質数を増やし、一般毒性や発がん性のマーカー遺伝子の精度を向上させる
 - ・その他の毒性症状についても、マーカー候補遺伝子を選定する(パラメーターを増やす)
 - ・選定されたマーカー遺伝子と毒性メカニズムの関係性を明らかにする
- * 腎臓については、将来的に組織全体の遺伝子発現量データで判定できるように、腎臓・各部位で得られている遺伝子発現量データを変換/補正する方法も考案する予定

第1回 石油精製物質等の新たな化学物質
規制に必要な国際先導的有害性試験法の開
発(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動に
よる発がん性等発現可能性情報の取得手法
の開発) 中間評価検討会

資料5-6

成果詳細- 3 (免疫毒性)

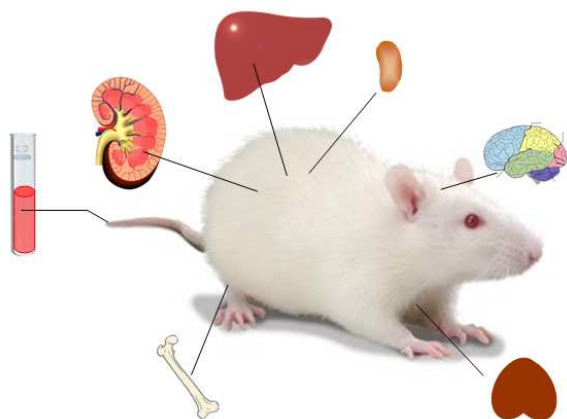
平成25年10月7日

一般財団法人化学物質評価研究機構

武吉正博

研究目的 遺伝子発現量解析による有害性評価の高精度化

本研究では、**遺伝子発現量解析**等の最新技術を活用し、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。



①主要臓器における一般毒性

②発がん性

③神経毒性

④免疫毒性

【期待されるメリット】

- ✓ **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

表現型としての免疫毒性

- 免疫抑制

- 免疫亢進(過敏症)

- 自己免疫

医薬品免疫毒性試験ガイドラインの概要

標準的な毒性試験に於いて免疫毒性が疑われる所見が
みられた場合・・・

【第一段階として実施する試験】(対象組織)

- ・ Tリンパ球依存性抗原に対する抗体産生(血清)
- ・ 抗体産生検査に用いた試験動物について、一般状態、体重、脾臓重量、胸腺重量及びその他特に必要とされる項目の検査を行う。
- ・ 必要に応じて、NK 細胞活性(脾臓・リンパ球(末梢血))

第2段階で要求される試験系(対象組織)

1. 骨髄細胞の型別百分率(骨髄)
2. リンパ球サブセット検査:リンパ球サブセット、NK 細胞の構成比を求める。(リンパ球(末梢血))
3. 血液化学的検査:血清タンパク質の電気泳動を行う。(血清)
4. 免疫グロブリンクラス検査:ELISA 等により、免疫グロブリンクラス(IgM、IgG、IgA、IgE)の測定。(血清)
5. 免疫組織化学的検査:リンパ系組織、腎臓(免疫複合体沈着)、皮膚等の免疫組織化学染色を行う。(組織)

第2段階で要求される試験系

6. 免疫機能検査(対象組織)
 - 抗体産生(血清)
 - NK 細胞活性(脾臓・リンパ球(末梢血))
 - マイトゲン反応(脾臓・リンパ球(末梢血))
 - 細胞障害性T 細胞活性(脾臓・リンパ球(末梢血))
 - 血清補体価(血清)
 - サイトカイン産生(脾臓・リンパ球(末梢血))
 - マクロファージ又は多型核白血球の貪食活性(肺胞・脾臓・リンパ球(末梢血))
 - 遅延型アレルギー反応(皮膚・足)

遺伝子解析対象組織

- **脾臓**

→抗体産生の場合であると共に多くの免疫毒性試験項目の対象臓器である。

- **リンパ球**

→免疫系において重要な機能を有する細胞である。

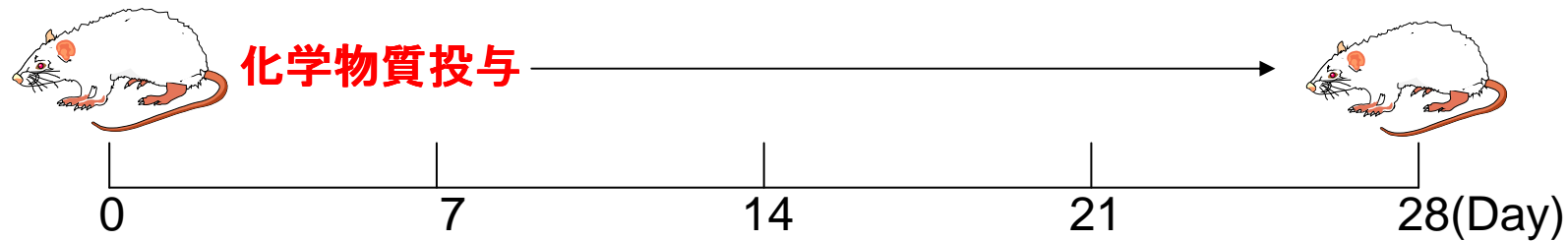
- **全血**

→リンパ球等の免疫関連細胞を含み採材が容易。

- **骨髄**

→免疫系の細胞の重要な供給源である。

目指した試験系



免疫抑制可能性情報の取得

- T細胞依存性抗原への応答能
- NK活性
- 食細胞の貪食能
- 骨髄機能への影響 etc.

脾臓摘出



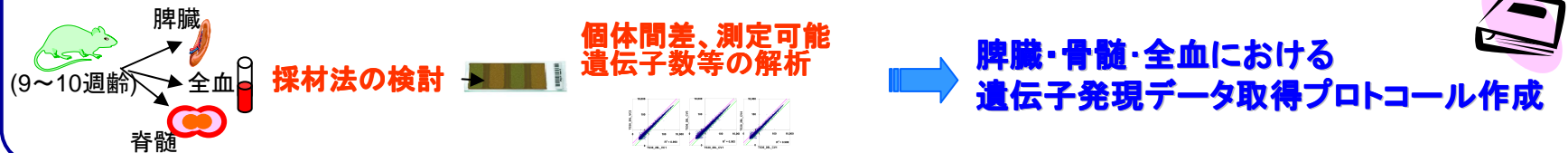
全血及び
骨髄採取



遺伝子発現情報取得
(マーカー遺伝子の発現量測定等)

全体計画

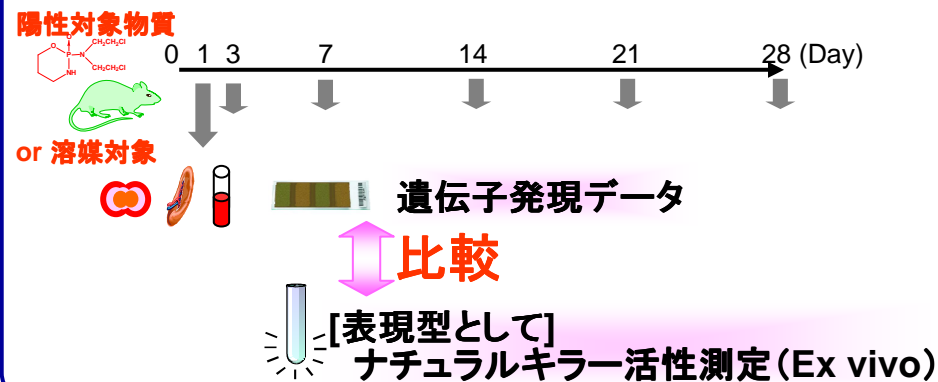
(1) 採材方法及びマイクロアレイ解析のためのサンプル調製法の構築



(2) フィージビリティ試験：28日間反復投与後のサンプルの遺伝子発現データから免疫抑制を検出可能か？

【細胞性免疫評価系の開発】

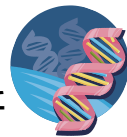
(2年目までを目処に)



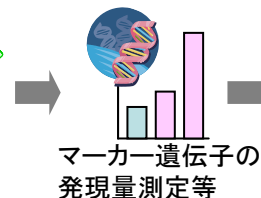
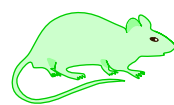
- 短期間(1-3日間)投与実験による影響評価及びアレイ解析を実施
- 基本的には機能解析データのある項目(脾臓、Mφ、骨髄、好中球)について優先的に実施し、各機能に影響をしていると思われる遺伝子候補を選定

(3) 本検討：マーカー探索

作用既知物質の28日間反復投与試験の臓器・血液サンプルから取得した遺伝子発現データからマーカー探索



28日間反復投与試験後...



従来より簡易な手法による免疫抑制の可能性情報の取得

(2)陽性物質でのデータ取得(フィージビリティ試験)

①表現型の確認



比較

②遺伝子発現解析

陽性対照物質:免疫毒性作用既知物質

- シクロフォスファミド(CYP) :

核酸(主にDNA)やその他の細胞構成成分をアルキル化してDNAの合成、複製を阻害し、細胞分裂を抑制。

- シクロスポリンA(CS-A):

強力な免疫抑制特性を有する真菌代謝物。カルシニューリン(プロテインホスファターゼ2B)を阻害するシクロスポリン-シクロフィリン複合体の形成を介して、T細胞シグナル伝達経路を阻害。インターロイキン 1α 、リポ多糖、TNF α により誘導される一酸化窒素合成を阻害。ミトコンドリアからのチトクロムCの放出を遮断。

免疫機能検査測定結果

投与日数	投与物質	Mφ		リンパ球		NK		好中球		骨髄		抗体産生
		数	貪食能	数	マイトゲン応答	比率	活性	数		数	CSF応答	
1D	CYP	↑		↓	(↓)					↓	↓	
3D	CYP			↓	↓	↑		↓		↓	↓	
7D	CYP											
14D	CYP											
28D	CYP		↓	↓	↓	↓				↓		↓
1D	CSA											
3D	CSA	↓			(↓)			↓			(↓)	
7D	CSA				(↓)	↑					↓	
14D	CSA				↓	↑					↑	
28D	CSA				(↓)	↑					↓	↓

略号 CYP:Cyclophosphamide, CSA:Cyclosporine A, ↓:抑制或いは低下, ↑:増加,
(括弧内は傾向としてみられた項目)

免疫毒性の検討中止理由

当初、基本計画に、免疫毒性の検出方法の開発を含んでいたが、フィージビリティスタディとして、免疫関連組織を対象とした遺伝子発現量解析と表現型の変化から免疫毒性影響評価手法の開発を検討したが、免疫抑制作用の表現型の多くが免疫系細胞(リンパ球や好中球等)の細胞数減少として現れ、結果として遺伝子解析に十分なtotal RNA調製量の確保が困難



フィージビリティスタディとして設定していた当初の2年以内の確立が困難



本事業の全体予算の縮小も検討されており、リソースの有効活用のため、外部有識者による研究開発推進委員会(平成25年2月開催)での議論を経て、プロジェクトリーダー及び経済産業省は当該毒性の検出方法の開発に関し、現時点において技術的に困難であると判断し、基本計画から削除することとした。

* 下記の資料は非公開

資料5-7 成果詳細-4(神経毒性)