

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

基本計画

「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」 基本計画

1. 研究開発の目的、目標及び内容

(1) 研究開発の目的

石油の精製工程を経て得られる石油製品や精製の過程で生成される物質（以下「石油精製物質」という。）には、消費者の身近で使用される製品も多いが、有害性情報が明らかになっていない物質が数多く存在している。

2020年までに化学物質の影響を最小化するという国際目標（持続可能な開発に関する世界首脳会議（World Summit on Sustainable Development、WSSD）目標）達成のため、近年、欧州（Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals、REACH）や日本（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律、化審法）が新規化学物質、既存化学物質に関わらず化学物質をリスク評価の対象とする新たな化学物質規制手法を導入したところである。

また、化学物質の有害性を含む評価項目（エンドポイント：発がん性、一般毒性、神経毒性等）や評価基準の統一化に向けた国連勧告（Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals、GHS）に関し各国における規制への導入が近年急速に進みつつある。このように、多様なエンドポイントに対応した有害性評価を実施するニーズが高まっている。

しかし、これらの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、これまでの研究開発において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開発を進めてきた我が国の先導的な取り組み成果を活用し、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、国際的なニーズにも対応するものであり、緊急性かつ必要性が高いものである。

本研究開発により、効率的な有害性評価手法を我が国主導で開発して、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。

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、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。

(2) 研究開発の目標

本事業では、石油精製物質等の化学物質における多様なエンドポイントにかかる化学物質の迅速かつ効率的に行う有害性評価手法の開発を行う。

具体的には、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や、複数の *in vitro* 試験法の開発及び迅速かつ効率的に実施できる有害性評価システム等を構築することを目標とする。

なお、プロジェクト実施期間中に得られた研究成果については、学会や論文での発表を行う。

(3) 研究開発の内容

本事業の研究開発目標を達成するため、以下の研究開発項目について別紙の研究開発計画に基づき実施する。

- ①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
- ②肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

本研究開発は、経済産業省が、企業、大学、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、本邦の企業等で、日本国内に研究開発拠点を有していること。ただし、国外企業の特別な研究開発能力、研究施設等の活用あるいは国際標準獲得の観点からの国外企業との連携が必要な部分はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者（研究体）を選定して実施する。

本研究開発においては、産業創出などの波及効果を最大限ならしめるため、プロジェクトの組織体制等を策定し、プロジェクトが適切に推進されていることを定期的に確認することとする。

なお、研究開発ポテンシャルの最大限の活用により効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究開発責任者（以下、「プロジェクトリーダー」という。）を置き、その下に研究者を結集して効率的・効果的な研究開発を実施することとする。

(2) 研究開発の運営管理

経済産業省は、プロジェクトリーダー等と密接な関係を維持しつつ、本研究開発の目的、目標及び理念に照らし適切な運営管理を実施する。具体的には、プロジェクトリーダーが研究進捗状況に応じた柔軟性・機能性の高い研究の実施を行えるよう配慮するとともに、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、プロジェクトリーダー等を通じてプロジェクトの進捗について報告を受けること等を行う。

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の期間は、平成23年度から平成27年度までの5年間とする。

4. 評価に関する項目

経済産業省は、技術的及び政策的観点から、研究開発の意義、目標達成度、成果の技術的意義並びに将来産業への波及効果等について、外部有識者による研究開発の中間評価を平成25年度、事後評価を平成28年度に実施し、中間評価結果を踏まえ、事業の加速・縮小など必要な体制の再構築を含め、後年度の研究開発に反映することとする。なお、評価の時期については、当該研究開発に係る技術動向、政策動向や当該研究開発の進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

実施者は、得られた研究成果の普及及び保有する知的財産等の活用を含め、シンポジウム等の開催を通じて普及・発信に努めることとする。

②知的財産権の帰属

委託研究開発の成果に関わる知的財産権については、「産業技術力強化法（平成12年4月19日法

律第44号)」第19条及び同法施行令第11条の既定等に基づき、同法令を遵守することを条件に原則として、委託先に帰属させることとする。

③人材の育成

将来の研究開発リーダーの育成を図るため、若手研究者等の参加に努めることとする。

④成果の実用化

得られた研究開発成果のうち、戦略的視点から重要な研究成果（例えば手法等）について、国際機関（OECD や ISO 等）及び欧米等の国際動向を的確に把握しつつ、国際標準化に向けた取組みを行い、実用化及び普及に努めるものとする。また、取得データは、広く一般に利用できるような適切な条件や方法を立案し、国際動向を踏まえ公開ための取組を進めるものとする。

(2) 基本計画の変更

経済産業省は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済状況、内外の研究開発動向、政策動向、プログラム基本計画の変更、第三者の視点からの評価結果、研究開発費の確保状況、当該研究開発の進捗状況等を総合的に勘案し、達成目標、実施期間、研究開発体制等、基本計画を毎年必要に応じて前倒しも含め見直すこととする。

(3) 担当課

本基本計画の作成責任課は、製造産業局化学物質管理課である。

6. 基本計画の改訂履歴

平成23年3月制定

平成25年3月改訂

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目① 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

1. 研究開発の必要性

近年、化学物質に暴露された実験動物の遺伝子発現の変動を測定・解析することにより、多様なエンドポイントに関する毒性の発現可能性を検出する技術が進歩してきた。これにより従来の試験法では検出が困難と考えられるエンドポイントの発現可能性に関する情報の取得が可能となってきた。

本研究開発においては、化学物質の有害性評価を高度化し、迅速で効率的な試験の実施のために化学物質の有害性を確認する際に主要な臓器である肝臓、腎臓の一般毒性及び発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性に関して、28日間反復投与毒性試験に供した実験動物から得られる遺伝子発現変動データを活用し、予兆的な情報を得る手法の開発を行う。

2. 研究開発の具体的内容

化学物質の有害性を確認する際に主要な臓器である肝臓、腎臓の一般毒性及び発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性に関して、28日間反復投与毒性試験に供した実験動物から得られる遺伝子発現変動データを活用し、予兆的な情報を得る手法を開発する。さらに、神経毒性についても上記のようなアプローチが可能であるかフィージビリティを検討するとともに、可能と判断される場合には予兆的な情報を得る手法を開発するための基礎データを整備する。

(a) 各毒性関連遺伝子の絞り込み

各毒性の明確な毒性既知物質を選定し、これらをラットに28日間投与し、ラットの臓器及び組織等から可能な限り多様な遺伝子発現変動データを取得する。これらデータから特異的な遺伝子発現変動を示す毒性関連遺伝子の絞り込みを行う。

さらに、絞り込みを行った各毒性関連遺伝子から毒性発現のマーカーとして利用し得る特異的遺伝子の選定を行う。

(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立

各毒性既知物質を投与した実験動物から取得できる遺伝子発現変動データの解析・絞り込みを踏まえ、肝臓、腎臓の一般毒性及び発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性について予測するための遺伝子発現変動データの解析手法を確立する。また、神経毒性についても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について予測するための手法を確立する。

3. 研究開発の目標

(1) 最終目標（平成27年度末）

(a) 各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み

- ・ 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

マーカーとして利用しうる遺伝子を選定する。

(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。

【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】

・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。

【発がん性（肝発がん・腎発がん）】

・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。

【神経毒性】

・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。

(2) 中間目標（平成25年度末）

(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

- ・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異的な発現変動を示す遺伝子の絞り込みを行う。

(b) 各種毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立

【全てのエンドポイントに共通】

・遺伝子発現変動データの取得方法を確立する。

【神経毒性】

・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。

4. 変更履歴（平成25年3月）

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ーとして、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ところ、免疫毒性影響評価を行う上で最も重要な臓器と想定された脾臓での影響評価手法の確立が困難と考えられる結果となり、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）でのコメント等を踏まえ、PL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、本基本計画から削除することとした。

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

1. 研究開発の必要性

我が国では、平成 23 年に化審法を改正し、全ての既存化学物質に関するリスク評価を行う法体系が整備された。2020 年までに数百の優先評価化学物質が選定され、その中からリスクの懸念のある化学物質に関して有害性を判断するための有害性調査（文献調査又は追加試験）を製造・輸入事業者に指示する可能性が見込まれる。試験を行う場合は、発がん性等に関する従来試験法による試験を実施することになるが、これら試験は多大な時間やコストがかかるため、重点的に評価すべきと考えられるエンドポイントや、試験を行う必要がないと考えられるエンドポイントを考慮し、効果的かつ効率的に試験が実施できるよう、調査すべき有害性項目を指示することが重要となっている。

リスク評価や有害性項目指示の的確な実施を行うため、様々なエンドポイントでの有害性発現の可能性を迅速かつ効率的な有害性試験法により、スクリーニングレベルの有害性データが取得できることが極めて有用である。

こうした背景を踏まえ、迅速かつ効率的に実施できるハイスループットを考慮した肝臓・腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発を行い、既存化学物質のリスク評価や有害性調査指示の的確な実施に貢献することを目的とする。

2. 研究開発の具体的内容

染色体工学技術及び細胞発光技術等の先端技術を活用し、培養細胞を用いた in vitro 試験法を開発する。

具体的には、以下の研究開発戦略のもと、反復投与毒性試験における肝臓毒性及び腎臓毒性を評価可能な in vitro 試験法、並びに神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発する。さらに、迅速かつ効率的な試験実施を目指し、ハイスループットスクリーニング試験系の構築に資する基盤技術を開発する。

<研究開発の流れ>

① 毒性評価のためのマーカー遺伝子の選定

文献情報等をもとに肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性のマーカーとなる遺伝子を選定する。

② 毒性評価に資する人工染色体ベクターの作製

複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入した人工染色体ベクターを効率的に作製する。

③ 毒性評価に資する ES 細胞の作製

人工染色体ベクターを用い、複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入したマウス ES 細胞を効率的に作製する。

④ 毒性評価に資する遺伝子改変動物の作製

複数の発光遺伝子及びマーカー遺伝子等を導入したマウス ES 細胞を用い、遺伝子改変マウスを作製する。

⑤ 毒性評価可能な培養細胞の作製

臓器細胞の培養方法を確立し、発光遺伝子等を導入した遺伝子改変マウスからターゲット臓器の培養細胞を樹立する。

⑥ 毒性評価可能な in vitro 試験法の開発

当該培養細胞による試験系を確立し、当該試験系のプロトコル案を作成する。

なお、当該研究開発の流れを基本としつつ、毒性毎に最適な方法を検討し *in vitro* 試験法の開発を行う。

(a) 肝臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

研究開発の流れ①～⑥をもとに、肝臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発する。

具体的には、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該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、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。作製した遺伝子改変マウスから肝臓細胞を採取し、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、肝臓毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(b) 腎臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

研究開発の流れ①～⑥をもとに、腎臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発する。

具体的には、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該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、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。作製した遺伝子改変マウスから腎臓細胞を採取し、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、腎臓毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(c) 神経毒性 *in vitro* 試験法の開発

研究開発の流れ①～③、⑤、⑥をもとに、神経毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発する。

具体的には、ES 細胞から神経細胞への分化誘導の手法を整備し、その分化誘導した神経細胞を用いて、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の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、マウス ES 細胞の順に作製する。作製したマウス ES 細胞を分化誘導し、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、神経毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(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

ハイスループットスクリーニングとして肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性を評価できる *in vitro* 試験系の構築に向け、研究開発戦略の基盤技術となる発光技術等の開発を行う。

具体的には、複数種の発光遺伝子等を導入した人工染色体ベクターの性能、当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出等について検証し、測定条件を最適化する。

3. 研究開発の目標

(1) 最終目標（平成 27 年度末）

(a) 肝臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

肝臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発するため、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し、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し、試験法のプロトコル案を作成する。

(b) 腎臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

腎臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発するため、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し、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、腎臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発

神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞を作製し、当該 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し、試験法のプロトコル案を作成する。

(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

人工染色体ベクターの性能を検証するとともに、当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出を検証し、試験系の測定条件を最適化する。最適な測定条件について各試験法のプロトコル案に反映する。

(2) 中間目標（平成 25 年度末）

(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発

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し、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。また、野生型マウスの肝臓細胞を用い、培養条件を見出す。

(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発

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し、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。

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発

ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の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。

(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

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

4. 変更履歴（平成 25 年 3 月）

当初、基本計画に、ヒト代謝機能導入の試験法開発を含んでいたが、フィージビリティスタディーとして、ヒト遺伝子導入マウスによる代謝酵素の検討を行ったが酵素の特異性を確立することができず、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）でのコメント等を踏まえ、PL 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、本基本計画から削除することとした。