

第2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（肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発）

中間評価検討会

資料2

# 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

## 中間評価報告書 (案)

平成〇〇年〇月  
産業構造審議会産業技術環境分科会  
研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ

## はじめに

研究開発の評価は、研究開発活動の効率化・活性化、優れた成果の獲得や社会・経済への還元等を図るとともに、国民に対して説明責任を果たすために、極めて重要な活動であり、このため、経済産業省では、「国の研究開発評価に関する大綱的指針」（平成24年12月6日、内閣総理大臣決定）等に沿った適切な評価を実施すべく「経済産業省技術評価指針」（平成21年3月31日改正）を定め、これに基づいて研究開発の評価を実施している。

経済産業省において実施している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し、化学物質の迅速かつ効率的な有害性評価手法を開発するため、平成23年度より実施しているものである。

今回の評価は、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の中間評価であり、実際の評価に際しては、省外の有識者からなる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（座長：今井田 克己 国立大学法人香川大学医学研究院病理病態・生体防御医学講座腫瘍病理学教授）及び、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（肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発）中間評価検討会（座長：堀井 郁夫 堀井サイエンスアソシエイト株式会社代表取締役社長）を開催した。

今般、当該検討会における検討結果が評価報告書の原案として産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（座長：渡部 俊也 東京大学政策ビジョン研究センター教授）に付議され、内容を審議し、了承された。

本書は、これらの評価結果を取りまとめたものである。

平成26年〇月

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ

委員名簿

座長	渡部 俊也	東京大学政策ビジョン研究センター教授
	大島 まり	東京大学大学院情報学環教授 東京大学生産技術研究所教授
	太田 健一郎	横浜国立大学工学研究院グリーン水素研究センター長 ・特任教授
	菊池 純一	青山学院大学法学部長・大学院法学研究科長
	小林 直人	早稲田大学研究戦略センター教授
	鈴木 潤	政策研究大学院大学教授
	森 俊介	東京理科大学理工学研究科長 東京理科大学理工学部経営工学科教授
	吉本 陽子	三菱UFJリサーチ&コンサルティング株式会社 経済・社会政策部主席研究員

(委員長除き、五十音順)

事務局：経済産業省産業技術環境局技術評価室

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  
中間評価検討会  
委員名簿

A. 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

座長	今井田 克己	国立大学法人香川大学医学研究院 病理病態・生体防御医学講座 腫瘍病理学 教授
	堀之内 彰	武田薬品工業株式会社 CMC研究センター 主席研究員
	宮城島 利一	特定非営利活動法人システム薬学研究機構 理事
	山田 弘	独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部 トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト プロジェクトリーダー
	吉村 功	学校法人東京理科大学 名誉教授

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

座長	堀井 郁夫	堀井サイエンスアソシエイト株式会社 代表取締役社長
	上原 健城	塩野義製薬株式会社 医薬開発部 医薬開発III 主任
	絵野沢 伸	独立行政法人国立成育医療研究センター 臨床研究センター 先端医療開発室 室長
	金村 米博	独立行政法人国立病院機構大阪医療センター 臨床研究センター 再生医療研究室 室長
	畑尾 正人	株式会社資生堂 品質評価センター 安全性研究開発室 室長

(敬称略、五十音順)

事務局：経済産業省製造産業局化学物質管理課

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の  
評価に係る省内関係者

【中間評価時】

(平成25年度)

製造産業局 化学物質管理課課長 三木 健 (事業担当課長)

産業技術環境局 産業技術政策課 技術評価室長 飯村 亜紀子

【事前評価時】 (事業初年度予算要求時)

製造産業局 化学物質管理課課長 河本 光明 (事業担当課長)

# 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 中間評価

## 審議経過

### A. 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

#### ○第1回中間評価検討会（平成25年10月7日）

- ・評価の方法等について
- ・プロジェクトの概要について
- ・評価の進め方について

#### ○第2回中間評価検討会（平成25年〇月〇日）

- ・評価報告書(案)について

#### ○産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（平成26年〇月〇日）

- ・評価報告書(案)について

### B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

#### ○第1回中間評価検討会（平成25年9月26日）

- ・評価の方法等について
- ・プロジェクトの概要について
- ・評価の進め方について

#### ○第2回中間評価検討会（平成25年〇月〇日）

- ・評価報告書(案)について

#### ○産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（平成26年〇月〇日）

- ・評価報告書(案)について

# 目 次

はじめに

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ 委員名簿

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中間評価検討会  
委員名簿

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の評価に係る省  
内関係者

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中間評価 審議  
経過

	ページ
中間評価報告書概要 .....	i
<b>第1章 評価の実施方法</b>	
1. 評価目的 .....	2
2. 評価者 .....	3
3. 評価対象 .....	3
4. 評価方法 .....	4
5. 評価項目 .....	4
<b>第2章 プロジェクトの概要</b>	
1. 事業の目的・政策的位置付け .....	9
A. 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. 研究開発等の目標 .....	16
3. 成果、目標の達成度 .....	20
4. 標準化等のシナリオ、波及効果について .....	96
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等 .....	98
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発	
2. 研究開発等の目標 .....	110
3. 成果、目標の達成度 .....	117
4. 標準化等のシナリオ、波及効果について .....	275
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等 .....	278
<b>第3章 評価</b>	
A. 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. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性 .....	288
2. 研究開発等の目標の妥当性 .....	291
3. 成果、目標の達成度の妥当性 .....	293
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性 .....	296
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性 .....	298
6. 総合評価 .....	300
7. 今後の研究開発の方向等に関する提言 .....	303
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発	
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性 .....	308

2. 研究開発等の目標の妥当性	3 1 0
3. 成果、目標の達成度の妥当性	3 1 2
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	3 1 4
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	3 1 6
6. 総合評価	3 1 8
7. 今後の研究開発の方向等に関する提言	3 2 1
第4章 評点法による評点結果	3 2 5

#### 参考資料

- 参考資料 1 経済産業省技術評価指針
- 参考資料 2 経済産業省技術評価指針に基づく標準的評価項目・評価基準
- 参考資料 3 平成22年度事前評価報告書（概要版）
- 参考資料 4 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



# 中間評価報告書概要

## 中間評価報告書概要

プロジェクト名	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			
上位施策名	化学物質総合評価管理			
事業担当課	製造産業局化学物質管理課			
<b>プロジェクトの目的・概要</b>				
<p>石油精製物質等の化学物質において、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一方で、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。このため、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し、迅速かつ効率的な有害性評価手法の開発を行う。</p> <p>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 <i>in vitro</i> 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し、以下の研究開発項目について実施する。</p> <p>A. 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          B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 <i>in vitro</i> 試験法の開発</p>				
予算額等（委託） <span style="float: right;">（単位：千円）</span> <b>B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 <i>in vitro</i> 試験法の開発</b>				
開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体
平成23年度	平成27年度	平成25年度	平成28年度	鳥取県産業振興機構
H23FY 予算額	H24FY 予算額	H25FY 予算額	総予算額	総執行額
102,820	102,820	102,000	307,622	200,366

目標・指標及び成果・達成度

(1) 全体目標に対する成果・達成度

**B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発**

・肝臓毒性及び腎臓毒性 in vitro 試験法の開発において、本プロジェクトで開発した人工染色体ベクターにより、人工染色体導入マウスを作製し、当該マウスの肝臓及び腎臓から、培養細胞を作製、さらに各組織内での機能を再現できる三次元構造体を構築した。

・神経毒性 in vitro 試験法の開発において、自動画像解析による神経変性を定量可能な形態観察法を確立した。また、既知神経マーカーと発光遺伝子等を用いて人工染色体ベクターを作製した。

・基盤技術の開発において、人工染色体ベクターのレポーターベクターとしての基本性能を検証した結果、ばらつきが少なく、長期間培養しても安定に遺伝子発現を検出できる細胞を効率的に樹立できることを実証した。また、レポーター遺伝子の構築から人工染色体導入マウスを作製して初代培養細胞作製までの期間を短縮できることを実証した。

個別要素技術	目標・指標		成果	達成度
	最終時点	中間時点		
<b>B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発</b>				
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発	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、試験法のプロトコール案を作成する。	肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー一遺伝子を選定し、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。	内部標準マーカーを始め、肝特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。肝毒性バイオマーカーとして、細胞死と肝再生をモニターするレポーター等を作製しつつあり、人工染色体導入マウスを作製もいくつか順調に進展している。	達成
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発	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	腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー一遺伝子を選定し、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。	内部標準マーカーを始め、腎特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。腎毒性バイオマーカーは既に臨床で利用されているので進めている。	達成

	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。		人工染色体導入マウス作製も順調に進展している。	
(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発	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。	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。	ES 細胞から神経細胞への分化誘導法を確定し、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てマーカー遺伝子候補を選定した。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した。	達成
(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。	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。	MI-MAC ベクターに発光レポーターを挿入した各種発光細胞を作製し、MI-MAC ベクターの基本性能を検証した結果、MI-MAC がレポーターベクターとして非常に優れていることを実証した。また 2 色発光細胞を用い、アッセイシステムの測定精度を検証した。	達成

(2) 目標及び計画の変更の有無

### B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

平成 25 年度からは、フィージビリティスタディーとして開始していたヒト遺伝子導入マウスによる代謝酵素の検討を中止した。

< 共通指標 >

研究開発項目	論文・投稿	学会発表・講演等
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発	4	57

### 評価概要

#### B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

##### 1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

化学産業の分野において、安全性確保は社会的に非常に重要な課題であり、国際的な規制の観点などからも今後ますますスピード感と低コスト化が要求されるようになっている。加速度的に増加する化学物質の有害性評価の実施にあたり、わが国が世界的に認められる評価技術の開発を行い、標準技法を生み出すことは、国家政策上極めて重要であり、国が主導して研究開発を進めていくことに大きな意義を感じる。

また、人工染色体ベクター技術を活用した遺伝子導入技術や各種培養技術は独創的かつ革新性の高いものであると評価でき、国際競争力を持つための基盤技術として有意義であると考え。未だ標準的手法が確立していない中、事業計画の新規性及び先進性を考慮すると、国が積極的にサポートすべき緊要性の高い事業であると考えられる。

また民間では投資をしにくい分野であり、大規模な投資により、国が関与することが必要な事業と考える。

本プロジェクトは、社会的背景・国際的ニーズに対して新規性の高い科学的思考とそれに伴う技術導入を計っており、事業の目的・政策的位置付けに対する立ち位置は明確に示されている。

一方で、現段階ではまだ研究レベルの課題が多く、評価方法の公定化、実用化に向けたロードマップが明確にされていない点は目標管理の上で改善を要する。また、国内外で進行している他の関連活動との接点をもう少し明確にし、積極的に融和する方向性が望まれる。

##### 2. 研究開発等の目標の妥当性

事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として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ことを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。

人工染色体技術と発光レポーターシステムという個別技術の統合による戦略は独創的で価値が高く、人工染色体ベクターのマウス ES 細胞への遺伝子導入などの特異的かつ新規科学的技術に関する評価目

標が具体的に提示されている。

個別の課題への取組みは適切に行われており、実現性、妥当性ともに適切な目標水準にあると考える。

一方で、全体のスケジュール感が明確でなく、達成度評価の政策的インパクトが判断しにくい。本活動の最終的な出口が何であるかの焦点が絞られていない感がある。最終的に構築したそれぞれの系に関して、評価系の有用性や完成度を判断できる数値指標を示すことの必要性について検討されたい。

また、実質的な成果として決して低いアウトプットではないと考えるが、このプロジェクトだけで公定化を目指すことがゴールであれば、中間点としては不十分である。

さらに、近年の関連領域の研究動向、特にヒト iPS 細胞を応用した in vitro 毒性試験系開発研究等と対比した時、マウス細胞を応用した本事業の目標、必要性並びに優位性を明確に示し、他事業との差別化を行うことが重要であると考ええる。

### 3. 成果、目標の達成度の妥当性

4 つの個別要素技術開発（ハイスループットスクリーニング試験系構築、肝臓毒性 in vitro 試験法開発、腎臓毒性 in vitro 試験法開発、神経毒性 in vitro 試験法開発）のいずれにおいても、中間評価時点として適切な成果が得られ、事業全体として問題ない進捗であると評価する。

試験法の構築に向けての基盤技術の開発は着実に進捗しており、基盤技術の開発に関しては、進捗と成果に関して非常に高く評価できる。

得られた成果の中で、最大 5 か所に遺伝子導入が可能な人工染色体ベクターシステム（MI-MAC ベクター）とそれを応用したハイスループットスクリーニング試験系の開発、腎臓様構造再構築に使用可能な腎幹/前駆細胞（mKS 細胞）を用いた腎臓様 3 次元構造体構築に関わる成果は、特に新規性が高いものと評価される。

一方で、具体的な達成基準事項を提示し、それに対する到達点を明記し、達成度の妥当性を測るとより分かり易くなる。特に、マーカー遺伝子の選定に関して、できるだけ早く具体的な戦略と計画を示した上で、研究を進めることが望ましい。

国際標準化に向けての達成度については、十分というにはまだかなり距離がある。

また、成果の一部には、既存論文の追試や再現に止まる内容も散見され、既知・既存技術の再現および活用を行う場合は、その必要性和妥当性を十分に検討し、本事業の成果として適当となり得るための十分な付加価値を付与されることを希望する。

### 4. 事業化、波及効果についての妥当性

構築した毒性評価系に関しては、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価など、広範な範囲での活用が期待できる。また、遺伝子導入技術を用いた毒性評価の基盤技術に関しては、肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性のみならず、様々な毒性に応用可能であると考えられることから、高い波及効果が期待できる。

我が国主導型の国際標準化に向けた意図はシナリオとして十分示されている。

一方で、国際的な標準化については、ハイスループット性も含めて普及時の実際面での標準化の目線には未だ至っていない感があり、具体的なアクションも実施されているとはいえない。

国際標準化に向けて、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関する実現可能性などについての検討や、構築した評価系の妥当性判断の根拠となる指標や基準について明確に設定することが望まし

い。

また、得られた成果の具体的な活用方法が明確ではないため、成果の具体的な体裁とその波及方法について、事業終了時点までの残り期間でより明確かつ戦略的に検討されることを希望する。

#### 5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

プロジェクトリーダー及びテーマリーダーの強力なリーダーシップの下、各事業実施者は適切に研究事業を実施され、問題のない進捗を達成している。事業全体として研究開発マネジメントは適切に機能し、良い体制で事業が実施されていると評価する。

また、現状の技術の応用の観点から見た場合、課題設定は適切にされており、研究の切り口も納得性は高い。

研究の人的リソースの集め方も適切な選択がされており、個別技術の専門家を毒性評価の専門家がよくまとめている。

一方、構築した評価系を国際標準化し、広く普及させるためには、明確な計画と戦略を持って研究開発マネジメントを進めることが望ましい。

国際的な競争が激しい分野であるため、状況の変化に臨機応変に対応して、当該事業の研究分野内における立ち位置を継続的に再評価し、絶えずその必要性と先進性を担保しながら、随時計画の微修正を行いながら柔軟に事業を実施する体制を希望する。

資金配分・費用対効果については、具体的な解析からの詳細な検討事項として提示されるとより分かり易い

資金配分については国際競争力という観点からは、このプロジェクトだけではEUのSEURATなどと比較すると小規模であり、競争力に資するというには十分とはいえない。

#### 6. 総合評価

近年の科学技術を活用して新規の *in vitro* 毒性試験系を構築することは、極めて重要な研究テーマであり、国家政策上、極めて意義の高い取り組みであると評価できる。

また、我が国発の科学・技術導入が計られている点は魅力的であり、我が国が世界でリーダーシップをとる上でひとつの切り札となりうる研究と思われる。

現状の技術を出発点とし、まずは、実験動物レベルで確実に *in vivo* で発現する毒性を *in vitro* で評価できる系の構築を目指すという現実的な戦略は妥当であり、中間目標を適切に達成しながら問題なく実施されていると評価する。

また、本プロジェクトの成果は、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価での活用が期待でき、さらに、肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性以外の様々な毒性にも応用可能であると考えられることから、得られた研究成果は高い波及効果が期待できる。

一方、具体的な戦略と計画が示されておらず、残りのプロジェクト期間内に活用可能な評価系の構築することに関しての実現可能性に懸念を感じる。また、高度な培養法が使用されていることから、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関して懸念を感じる。

本事業の先進性と必要性、並びに優位性をさらに強固に対外的に示すためにも、各個別要素技術開発において、核となる成果の更なる充実を希望する。

また、国際的標準化、手法の一般化、ハイスループット性の獲得には一層の努力が必要であり。

さらに、標準化までの道筋を研究以外の観点からも計画すべきであり、今後の事業戦略の構築に期待したい。

#### 7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

- 肝毒性、腎毒性に関しては、公共のデータベースにある遺伝子発現変動データを積極的に活用し、メカニズムベースで活用可能な適切なマーカー遺伝子を選択することを期待する。
- 毒性学的な視点での評価系の意義をより一層高めるためにも、外部からの専門家を交えて、マーカー遺伝子の選定を戦略的に進めることを推奨したい。
- 選定したマーカー遺伝子に関して、遺伝子導入を進める前に、本プロジェクトで採用している培養条件と同一環境下で、毒性発現に関連した誘導を確認できるかどうかを事前に確認することで、より確度の高いマーカー遺伝子の選定と効率的な試験系（遺伝子導入細胞）の構築が可能になると考えられる。
- 構築した新規試験系の成功要因を確認するためにも、従来型の 2D 培養条件での導入遺伝子の有用性評価を行うなど、複数の条件のデータを比較することを推奨したい。
- 地方の研究コンソーシアムを積極的に支援することはわが国の発展という意味で非常に意義深いため、目利きの人材を活用し、地方に根ざした優れた個別技術を国レベルの研究に組み入れることが重要と考える。
- 他の事業、特にヒト iPS 細胞を応用した類似研究と対比して、マウス細胞を用いた技術体系を構築していくことの必要性和優位性が十分に示されることを望む。
- 本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。
- 国際的標準化を目指すためのハードルが何であるかを提示し、それを超えるための手立てを明示する。
- 個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。
- 他の関連活動との連携を活発にし、全体として本活動が標準手法として融和できるような体制を取れる方策を考慮しておくが良い。
- EU の枠組みを最大限に利用し、日本が国際競争力を示していくためにも他国に先駆けて、まだルールのないところにいち早くルールを作り、いいポジションを得られるような展開を期待したい。



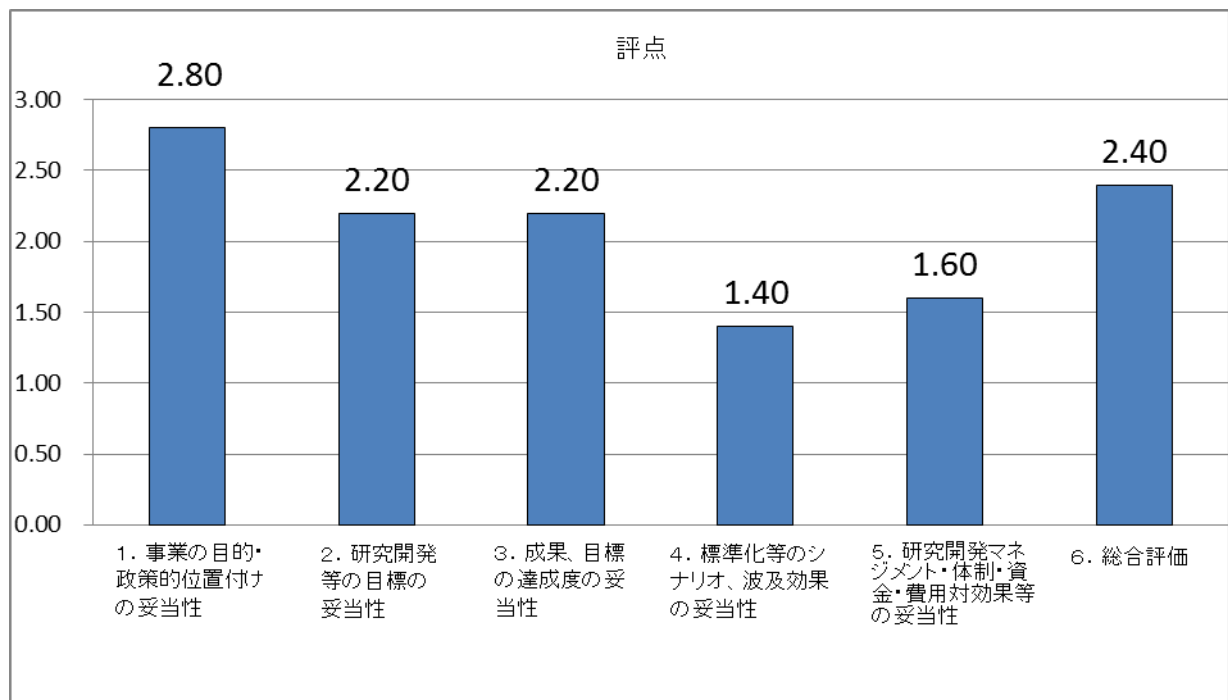
## 評点結果

### 評点法による評点結果

#### 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

#### B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

	評点	F 委員	G 委員	H 委員	I 委員	J 委員
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	2.80	3	3	2	3	3
2. 研究開発等の目標の妥当性	2.20	2	3	2	2	2
3. 成果、目標の達成度の妥当性	2.20	2	2	2	2	3
4. 標準化等のシナリオ、波及効果の妥当性	1.40	2	1	1	2	1
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	1.60	2	2	2	2	0
6. 総合評価	2.40	2	3	2	2	3



# 第 1 章 評価の実施方法

# 第1章 評価の実施方法

本プロジェクト評価は、「経済産業省技術評価指針」（平成21年3月31日改定、以下「評価指針」という。）及び第25回産業構造審議会産業技術部会評価小委員会（平成21年1月28日）において審議・了承された「技術に関する施策の評価」に基づき、実施した。

## 1. 評価の目的

以下の（1）～（4）を目的として評価を実施した。

### （1）より良い政策・施策への反映

評価を適切かつ公正に行うことにより、研究者の創造性が十分に発揮されるような、柔軟かつ競争的で開かれた研究開発環境の創出など、より良い政策・施策の形成等につなげること。

### （2）より効率的・効果的な研究開発の実施

評価を支援的に行うことにより、研究開発の前進や質の向上、独創的で有望な優れた研究開発や研究者の発掘、研究者の意欲の向上など、研究開発を効果的・効率的に推進すること。

### （3）国民への技術に関する施策・事業の開示

高度かつ専門的な内容を含む技術に関する施策・事業の意義や内容について、一般国民にわかりやすく開示すること。

### （4）資源の重点的・効率的配分への反映

評価の結果を技術に関する施策・事業の継続、拡大・縮小・中止など資源の配分へ反映させることにより資源の重点化及び効率化を促進すること。また、研究開発をその評価の結果に基づく適切な資源配分等通じて次の段階に連続してつなげることなどにより、研究開発成果の国民・社会への還元効率化・迅速化に資すること。

また、評価の実施に当たっては、以下の①～④を基本理念として実施した。

#### ① 透明性の確保

推進課、主管課及び研究開発機関においては、積極的に成果を公開し、その内容について広く有識者等の意見を聴くこと。評価事務局においては、透明で公正な評価システムの形成、定着を図るため、評価手続、評価項目・評価基準を含めた評価システム全般についてあらかじめ明確に定め、これを公開することにより、評価システム自体を誰にも分かるものとするとともに、評

評価結果のみならず評価の過程についても可能な限り公開すること。

② 中立性の確保

評価を行う場合には、被評価者に直接利害を有しない中立的な者である外部評価の導入等により、中立性の確保に努めること。

③ 継続性の確保

技術に関する施策・事業においては、個々の評価がそれ自体意義を持つだけでなく、評価とそれを反映した技術に関する施策・事業の推進というプロセスを繰り返していく時系列のつながりにも意義がある。したがって、推進課及び主管課にとって評価結果を後の技術に関する施策・事業の企画立案等に反映させる際に有用な知見を抽出し、継続性のある評価方法で評価を行うこと。

④ 実効性の確保

政策目的に照らし、効果的な技術に関する施策・事業が行われているか判断するための効率的評価が行われるよう、明確で実効性のある評価システムを確立・維持するとともに、技術に関する施策・事業の運営に支障が生じたり、評価者及び被評価者双方に過重な負担をかけることのない費用対効果の高い評価を行うこと。

## 2. 評価者

評価を実施するにあたり、評価指針に定められた「評価を行う場合には、被評価者に直接利害を有しない中立的な者である外部評価者の導入等により、中立性の確保に努めること」との規定に基づき、外部の有識者・専門家で構成する検討会を設置し、評価を行うこととした。

これに基づき、評価検討会を設置し、技術に関する施策、技術に関する事業（プロジェクト等）の目的や研究内容に即した専門家や経済・社会ニーズについて指摘できる有識者等から評価検討会委員名簿にある5名が選任された。

なお、本評価検討会の事務局については、指針に基づき経済産業省製造産業局化学物質管理課が担当した。

## 3. 評価対象

### 技術に関する事業

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  
(実施期間：平成23年度から平成25年度)

を評価対象として、研究開発実施者 (A. 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：一般財団法人化学物質評価研究機構、国立大学法人東京農工大学、学校法人京都産業大学) (B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in

vitro 試験法の開発：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、住友化学株式会社、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）から提出された資料をもとに、技術に関する事業（プロジェクト）の評価を行うとともに、それらの事業評価の結果を踏まえて、各事業を俯瞰する形で各事業の相互関係等に着目し、技術に関する施策の評価を実施した。

#### 4. 評価方法

第1回評価検討会においては、研究開発実施者からの資料提供、説明及び質疑応答、並びに委員による意見交換が行われた。

第2回評価検討会においては、それらを踏まえて「プロジェクト評価における標準的評価項目・評価基準」、今後の研究開発の方向等に関する提言等及び要素技術について評価を実施し、併せて4段階評点法による評価を行い、評価報告書(案)を審議、確定した。

また、本評価検討会は、知的財産権保護等の観点から、一部非公開として実施した。

#### 5. 評価項目

##### 【技術に関する事業】

##### ○事業の目的・政策的位置付けの妥当性

- ・事業の目的は妥当で、政策的位置付けは明確か。
- ・国の事業として妥当であるか、国の関与が必要とされる事業か。

##### ○研究開発等の目標の妥当性

- ・研究開発等の目標は適切かつ妥当か。

##### ○成果、目標の達成度の妥当性

- ・成果は妥当か。
- ・目標の達成度は妥当か。

##### ○標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

- ・標準化等のシナリオは妥当か。
- ・波及効果は妥当か。

##### ○研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

- ・研究開発計画は適切かつ妥当か。
- ・研究開発実施者の実施体制・運営は適切かつ妥当か。
- ・資金配分は妥当か。
- ・費用対効果は妥当か。
- ・変化への対応は妥当か。

##### ○総合評価

## 第2章 プロジェクトの概要

## 目 次

1. 事業の目的・政策的位置付け.....	9
1-1 事業の目的.....	9
1-2 政策的位置付け.....	11
1-3 国の関与の必要性.....	14
 (A. 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. 研究開発目標.....	16
2-1 研究開発目標.....	16
2-1-1 全体の目標設定.....	16
2-1-2 個別要素技術の目標設定.....	17
3. 成果、目標の達成度.....	20
3-1 成果.....	20
3-1-1 全体成果.....	20
3-1-2 個別要素技術成果.....	22
(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性.....	22
(2) 発がん性.....	53
(3) 神経毒性(非公開).....	68
(4) 免疫毒性.....	83
3-1-3 論文、外部発表等.....	86
3-2 目標の達成度.....	93
4. 標準化等のシナリオ、波及効果.....	96
4-1 標準化等のシナリオ.....	96
4-2 波及効果.....	96
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等.....	98
5-1 研究開発計画.....	98
5-2 研究開発実施者の実施体制・運営.....	100
5-3 資金配分.....	104
5-4 費用対効果.....	105
5-5 変化への対応.....	106

(B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発)

用語集.....	108
2. 研究開発目標.....	110
2-1 研究開発目標.....	110
2-1-1 全体の目標設定.....	114
2-1-2 個別要素技術の目標設定.....	115
3. 成果、目標の達成度.....	117
3-1 成果.....	117
3-1-1 全体成果.....	117
3-1-2 個別要素技術成果 (非公開).....	129
3-1-3 特許出願状況等.....	268
3-2 目標の達成度.....	273
4. 標準化等のシナリオ、波及効果.....	275
4-1 標準化等のシナリオ.....	275
4-2 波及効果.....	277
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等.....	278
5-1 研究開発計画.....	278
5-2 研究開発実施者の実施体制・運営.....	280
5-3 資金配分.....	282
5-4 費用対効果.....	283
5-5 変化への対応.....	284





## 1. 事業の目的・政策的位置付け

### 1-1 事業目的

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、ヒト健康影響に関する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や成果を活用し、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。

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し、以下の研究開発項目について実施する。

A. 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

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

## 1-2 政策的位置付け

### (1) 第4期科学技術基本計画（平成23年8月19日閣議決定）

平成23年度から5カ年を計画期間とする第4期科学技術基本計画が平成23年8月19日に閣議決定された。第4期科学技術基本計画は、国として取り組むべき重要課題を設定し、その達成に向けて重点的に推進すべき研究開発をはじめとする関連施策の基本的方向性を提示している。重要課題の1つとして、産業競争力の強化に向けた共通基盤の強化を設定しており、課題を達成するために、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。本プロジェクトはこれに対応する研究開発である。

### (2) 技術戦略マップ（2010年6月経済産業省編）

経済産業省では、産業技術政策の研究開発マネジメント・ツール整備、産学官における知の共有と総合力の結集、国民理解の増進を実現することを目標に、技術戦略マップを策定している。技術戦略マップ2010の化学物質総合評価管理分野では、WSSD目標達成のため、リスク評価・管理及びリスク削減に用いられる技術の研究開発に取り組んでいくとしており、そのための技術体系を構築し、技術課題を整理している。

リスク評価管理技術の有害性評価の技術課題として、本研究が関与している技術課題は以下の通りである。

A. 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

・(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

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 *in vitro* 試験法の開発

・(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

### (3) 先行するNEDO事業の成果の活用

経済産業省は、化学物質のリスクの総合的な評価を行い、リスクを適切に管理する社会システムを構築するため、化学物質総合評価管理プログラムを平成12年に制定した。また、政策目標を達成するために必要な研究開発と、成果の市場化に必要な関連施策（規制改革、標準化等）を一体化した施策パッケージである7つのイノベーションプログラムを平成20年度に制定した。このうちの1つである環境安心イノベーションプログラム基本計画は、従前の化学物質総合

評価管理プログラムを取り込んで、資源制約を克服し、環境と調和した持続的な経済・社会と、安全・安心な国民生活の実現を図ることを目標に制定された。

NEDO（独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構）では、経済産業省の化学物質総合評価管理プログラム／環境安心イノベーションプログラム基本計画に基づき、化学物質のリスク評価・管理のための研究開発を体系的に推進し、平成13年度から平成17年度まで「遺伝子発現解析技術を用いた長期毒性（肝発がん性）予測手法の開発」、平成18年度から平成22年度まで「28日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」、「培養細胞を用いた発がん性・催奇形性・免疫毒性の評価手法の開発」を実施した。本プロジェクトでは、NEDOで実施された研究開発の成果や培われた基盤技術を活用しながら、有害性評価手法の開発を実施する。

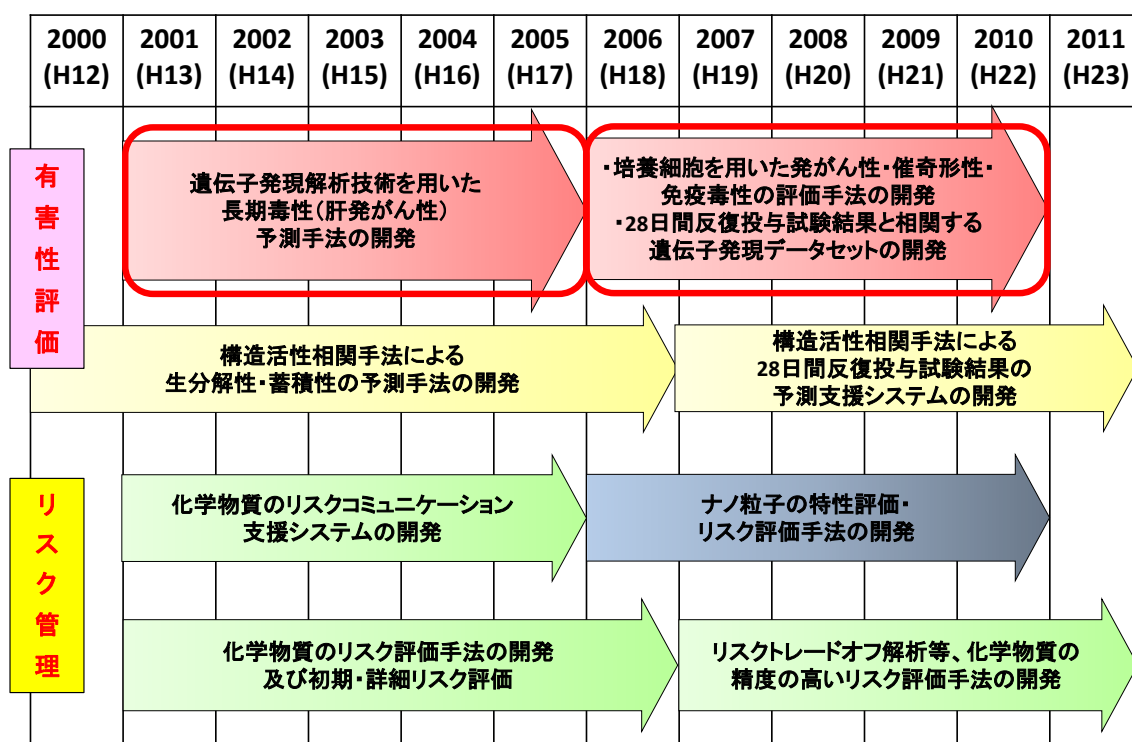


図 1-1. NEDO による化学物質のリスク評価・管理のための体系的な研究開発

#### （４）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

2002年に開催された「持続可能な開発に関する世界首脳会議（WSSD）」において、「ライフサイクルを考慮に入れた化学物質と有害廃棄物の健全な管理のためのアジェンダ 21 の約束を新たにするとともに、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」との、首脳レベルでの長期的な化学

物質管理に関する国際合意（WSSD 目標）がなされている。また、2006 年 2 月には、これを具体化するための行動指針として、「国際的な化学物質管理のための戦略的アプローチ（SAICM）」が取りまとめられている。

こうした国際目標の実現に向け、化学物質管理に関する国際標準化・国際協調の活動等、国際的に調和した取組が進められている。例えば、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム（GHS）は、化学品のハザード（有害性）情報の分類及び表示方法について国際的に調和されたシステムを作ることを目的としており、さらには、化学物質等安全データシート（SDS）の提供等によりこれらのハザード情報を伝達することが期待されている。

技術戦略マップの化学物質総合評価管理分野では、我が国としても、まずは WSSD 目標の達成のため、リスク評価・管理に用いられる技術の研究開発に取り組んでいく必要があるとしている。

また、日本国内においては、平成 21 年に化審法が改正され（平成 21 年 5 月 20 日公布）、一定数量を超えて市場に出されるすべての化学物質について、リスクが十分に低いとは判断できないものを「優先評価化学物質」に指定・公表し、国が 1 次リスク評価を実施し、更なる詳細な 2 次リスク評価が必要となる化学物質については、その製造・輸入事業者に対して長期毒性試験結果の収集・提出を求めている。また、新規化学物質についても、リスクが十分に低いと判断できないものについては優先評価化学物質として分類することによって、上市後の化学物質と同様にリスクに着目した評価を実施しているところである。WSSD 目標達成に向けて、化学物質のリスク評価・管理を適切に実施するためには、こうした法規制的的確な制度設計が重要であり、本プロジェクトで開発する有害性評価手法はこうした制度の裏付けとなる技術である。

### 1-3 国の関与の必要性

本研究で開発された手法は、多様なエンドポイントに関する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を目標としており、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、化学物質管理規制等の行政の裏付けとなる技術であり、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。

さらに、開発した有害性評価手法について、将来的には、国際標準化にむけた取り組みを行い、実用化、普及を目指している。このため、国が施策の中心となって事業を進めることは妥当である。

また、平成 22 年度まで NEDO において実施した「28 日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」、「培養細胞を用いた発がん性・催奇形性・免疫毒性の評価手法の開発」等、化学物質のリスクに対応する技術開発については、一定の評価方法や判断基準が構築されてきており、これまでに得られた知見等を活かして、引き続き国が主導して研究開発を進めていくことは妥当である。

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro  
試験法の開発



用語集

用語	用語説明
アルブミン	動・植物の細胞、体液中に含まれる、一群の可溶性タンパク質
アポトーシス	生理的条 細胞自らが積極的にひき起こす細胞の死。細胞は萎縮し、細胞の内容物が細胞外に放出されることなく周囲の細胞に速やかに取込まれて処理されるので、炎症がひき起こされず、周囲の細胞に影響を与えない。
キメラマウス	2種類以上の遺伝的に異なる細胞が混在するマウス。系統の異なるマウスの発生初期の胚を融合して人工的に作製する。
スフェロイド	スフェロイドとは、細胞が多数凝集して3次元状態になったものである。スフェロイド培養は、従来の単層培養に比べ、細胞の機能を長期間維持することが可能で、より生体に近い培養法である。
セントロメア	染色体の長腕と短腕が交差する部位で、染色体のほぼ中央に位置する。染色体が有糸分裂により分配されるのに必要な DNA 配列を含む。
トランスクリプトーム	特定の状況下において細胞中に存在する全ての mRNA（ないしは一次転写産物、transcripts）の総体を指す呼称である
トランスジェニックマウス	遺伝子改変マウス的一种で、遺伝子工学を用いて人為的に個体の遺伝情報を変化させたマウスである。その作製法により、外部から特定の遺伝子を導入したトランスジェニックマウス（TG マウス）という。
ハイスループットスクリーニング (HTS)	膨大な化合物のデータベースから目的化合物を迅速に短時間で検出する技術。創薬開発などの様々な局面で利用されている。
胚性幹細胞 (ES 細胞)	さまざまな種類の細胞に分化し、増殖する能力を持つ発生初期由来の万能細胞の一種。受精卵の一段階である胚盤胞の内部細胞塊から樹立する。樹立のために受精卵を殺すことになるため倫理面の問題がある。

微小核細胞融合法 (MMCT)	優性選択マーカーでマークした染色体を保持する細胞にコルセミド処理を行い、サイトカラシンや遠心分離を行うことでマークした染色体を取り出し、細胞融合を行うことで、任意の染色体を目的の細胞に導入する方法。
プロモーター	mRNA合成(転写)の開始に関与するDNA上の特定領域の短い塩基配列。遺伝子の転写の開始部位を決定し、またその頻度を直接的に調節する。
ベクター	遺伝子運搬体。遺伝子を細胞などに導入するための媒体。
内部標準用遺伝子	内部標準マーカー遺伝子、あるいは内部コントロールと呼ばれる補正用の遺伝子を指す。
薬物スクリーニング	多数の薬物候補物質から、効果や安全性を検証し、有用な物質を選抜する一連の試験を指す。
レポーター遺伝子	特定の遺伝子の量を調べるために使用する目印となる遺伝子。発光したり、蛍光を発する遺伝子をレポーター遺伝子にすることで遺伝子発現量を定量することができる。
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼの略。肝障害のバイオマーカーのひとつ。
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼの略。肝障害のバイオマーカーのひとつ。
HAC ベクター	ヒト人工染色体 (human artificial chromosome) ベクター。
ICR マウス	クローズドコロニーで繁殖したマウスの系統の一つ。
iPS 細胞	誘導多能性幹細胞。体細胞から樹立された分化多能性を持つ幹細胞。
IVIS	生体内の遺伝子発現やタンパク質の挙動を生きのまま体外からモニタリングする発光・蛍光イメージング装置。
in vivo	生物個体を使った実験手法を指す。
in vitro	試験管内で行う実験手法を指す。
MI-MAC ベクター	マルチインテグレースマウス人工染色体ベクター
TCF	肝臓の主要な転写因子。別名 hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A)。

## 2. 研究開発目標

### 2-1 研究開発目標

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、発がん性等のエンドポイントごとに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確かな実施を行うため、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、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的とする。

具体的に中心となる基盤技術は、鳥取大学で開発してきた人工染色体ベクターと産総研で開発してきた発光レポーターシステムである。まずは、これらの技術を、有害性評価試験法開発に応用することで、様々なエンドポイントについて培養細胞の発光量を測定することで有害性を評価できる基盤システムを構築する。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%））。したがって、肝毒性、腎毒性、神経毒性に注目して、構築した基盤システムを用いて、肝臓、腎臓、神経の 3 種の組織における毒性試験法を開発する。

本研究課題では、目標とするシステム構築のために必要な先端技術を有する研究機関が参画し、連携してプロジェクトを推進している。研究を進める上での、共通した基本ストラテジーを図 2-1-1 および図 2-1-2 に示す。

- ① 遺伝子の選定
- ② 人工染色体ベクターの作製
- ③ 人工染色体導入 ES 細胞の開発
- ④ 人工染色体導入マウスの開発
- ⑤ ターゲット細胞の開発
- ⑥ 試験法の開発

## 有害性評価試験開発の方針①

目標達成のために、4つのカテゴリーに分けられる

### ■ HTP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と多色多様発光技術を用いたシステムの構築

- ・科学的なエビデンス(動物の反応との相互評価)を持った in vitro 試験法を開発する( in vivo と in vitro の壁)。
- ・効率的でかつ低コストの試験法の構築ができるシステムである。
- ・再現性の高い試験法の構築ができるシステムである。

→ 様々なエンドポイントに対応可能な有害性評価試験法の構築に対応できる基盤システムを構築する。

### ■ 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

構築したシステムを用い各組織での毒性試験法を開発

図 2-1-1. 有害性評価試験開発の方針 (1)

## 有害性評価試験開発の方針 ②

目標達成のために、

- 1)各グループはそれぞれの担当部分の「**基盤**」技術を向上させ、試験法開発に必要な技術を構築する
- 2)各グループで構築した技術が毒性試験法で実際に**機能するか「実証」**する。
- 3)それぞれのグループが**連携**することで、目的の安全性試験法を構築し、**プロトコール化**する。さらに代表的な化合物を用いて**試験法が機能することを実証**する。

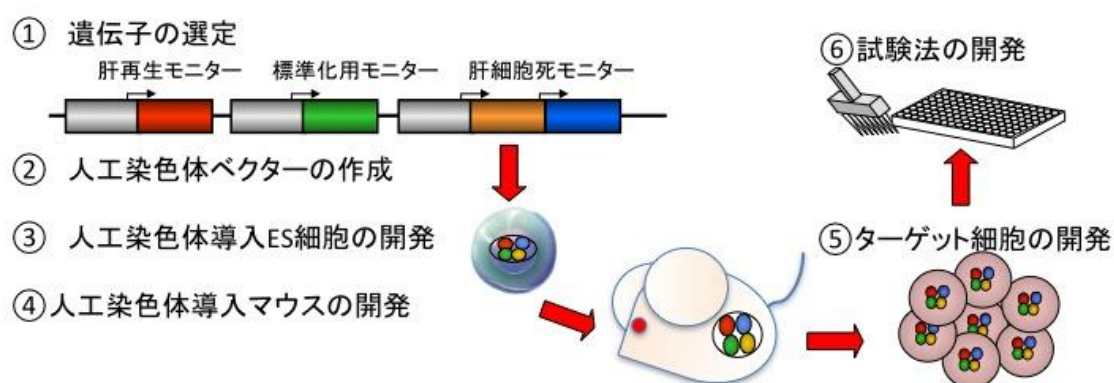
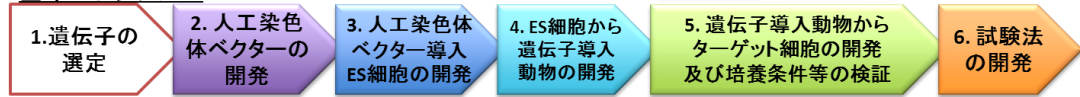


図 2-1-2. 有害性評価試験開発の方針 (2)

また、この方針に基づき、それぞれの基盤技術に対して特徴を持つ研究機関が参画し、連携しながら研究を進めている。各参画研究機関の役割および連携体制を図 2-1-3 に示す。

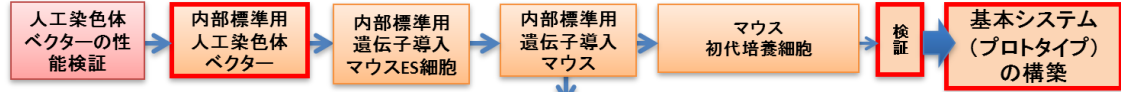
## 細胞プロジェクト(Tox-In vitro)イメージ

### ■基本ストラテジー

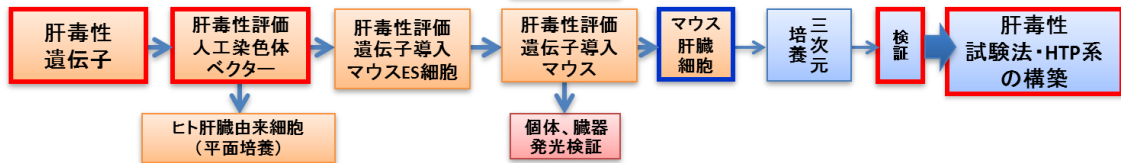


鳥取県産業振興機構・鳥取大      岡山大      食薬センター      □: 食薬センターと連携して実施  
住友化学      産総研      □: 産総研と連携して実施

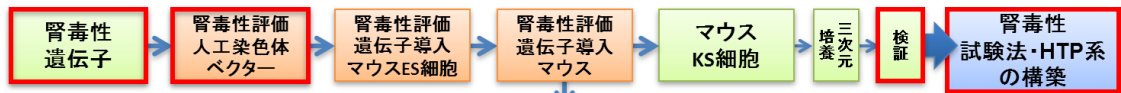
### ■ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



### ■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



図 2-1-3. 当該プロジェクトの試験系開発に向けた各研究機関の役割と連携体制のイメージ図

## 2-1-1 全体の目標設定

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。この事業全体の目標は以下のとおりである。

表 2-1-1 全体の目標

目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
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。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。	2-1-2 個別要素技術の目標設定の項に記載	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、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した目標に設定した。

## 2-1-2 個別要素技術の目標設定

個別要素技術毎の目標は以下のとおりである。

表 2-1-2 個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(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 コール案を作成する。	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。	肝臓毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。
(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 コール案を作成する。	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。	腎臓毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。
(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	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	神経毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。



	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、試験法のプロトコール案を作成する。	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ール案に反映する。	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。	研究開発戦略の基盤技術となる発光技術等を開発するために、個々の技術を確立する必要があるため、左記目標を設定した。

### 3. 成果、目標の達成度

#### 3-1 成果

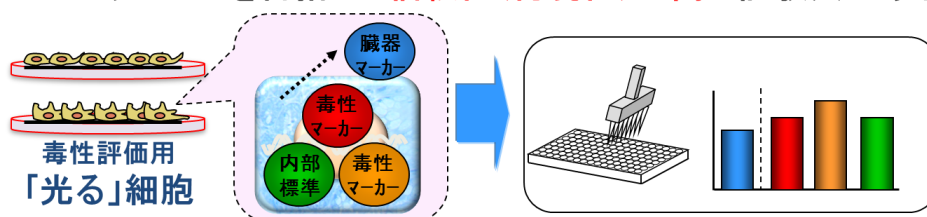
##### 3-1-1 全体成果

本研究課題で開発する新しい in vitro 有害性評価システムは図 3-1-1 に示す特徴をもつ。

- ① 28 日間反復投与動物試験を遺伝子導入した細胞を用い 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。
- ② 迅速かつ低コストで評価できる。
- ③ ガイドライン化を目指した信頼性（再現性）の高い試験法である。

#### 新しい in vitro 有害性評価システム

- ① 28日間反復投与動物試験を**遺伝子導入した細胞**を用い **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
- ② **迅速**かつ**低コスト**で評価できる。
- ③ ガイドライン化を目指した**信頼性(再現性)**の**高い**試験法である。



#### 最新の技術を活用

- 1) **人工染色体ベクター**…高品質な遺伝子導入細胞の樹立
- 2) **多色多様発光システム**…毒性を発光で定量化
- 3) **遺伝子導入キメラマウス**…in vitroと in vivoの比較解析
- 4) **細胞培養技術**…初代培養細胞/組織幹細胞の三次元培養

図 3-1-1. 本研究で開発する新しい in vitro 有害性評価システムの概要

このようなシステムを構築するために、以下の最新のテクノロジーを活用した。

- 1) 人工染色体ベクター
- 2) 多色多様発光システム
- 3) 遺伝子導入キメラマウス
- 4) 細胞培養技術

これらの技術は、本研究課題に参画する研究機関が独自に開発してきた技術である。図 2-1-3 に示すような役割を分担するとともに、連携しながら事業を進めた。各課題における進捗状況は、図 3-1-2 に示す。中間評価まで、順調に目的の各課題を達成している。

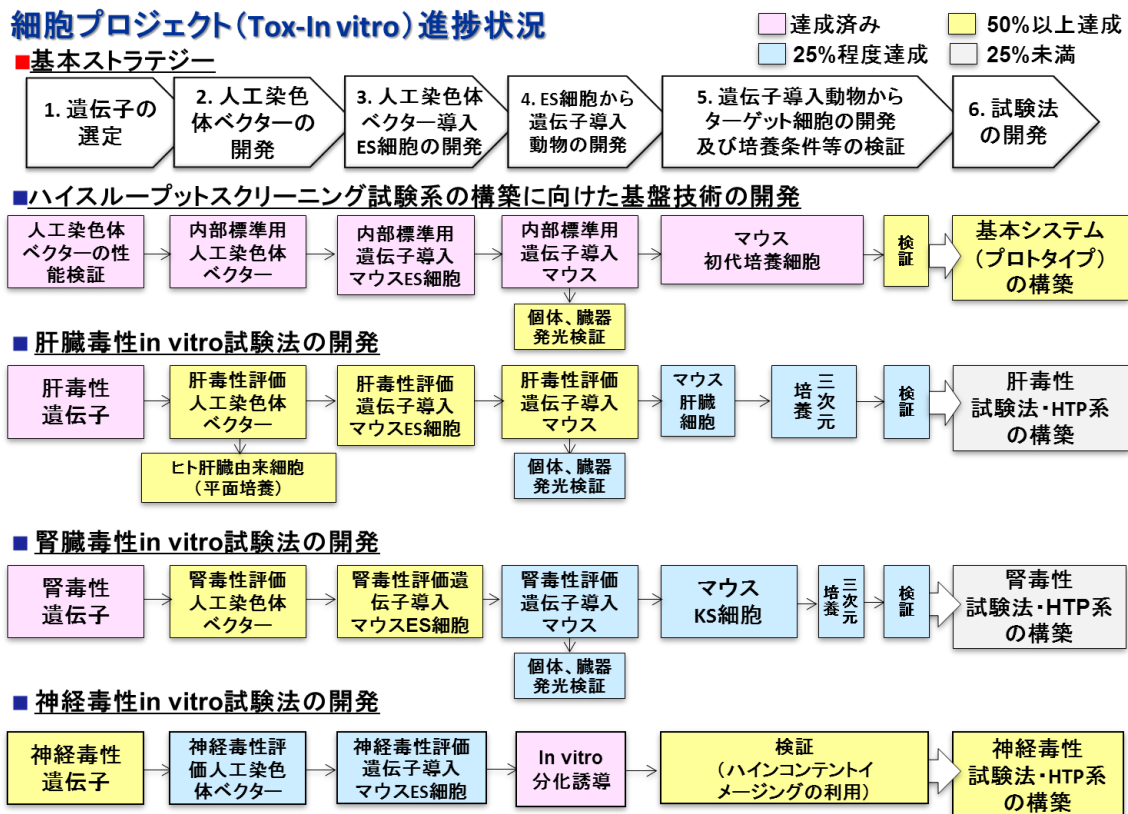


図 3-1-2. 細胞プロジェクト (Tox-In vitro) 進捗状況概要

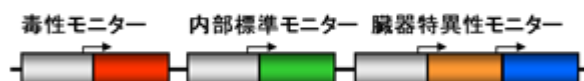
本研究課題では、肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性における in vitro 有害性評価法を開発することが目標であり、それら毒性の主要なエンドポイントを決定し、各毒性に対する試験法の開発に取り組んでいる。

一方で、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に検出するための基盤システムの確立に関しても目標に掲げている。バイオテクノロジーの進歩により、遺伝子導入細胞や ES 細胞、或いは iPS 細胞といった多能性幹細胞を用いた in vitro 有害性試験法の開発が国際的に行われているが、導入した遺伝子の不安定性や、in vitro 分化誘導に用いられている従来技術の問題から、国際標準になり得るような技術は十分に確立されていない。今回参画している研究機関の独自技術を活用し、それぞれが連携することで、従来の技術的問題を克服可能な in vitro 有害性試験法を開発するための基盤システムを確立できると考えた。確立を目指している基盤システムの基本ストラテジーを図 3-1-3 に示す。

## 有害性評価試験開発の基盤システムの基本ストラテジー

① **遺伝子の選定**：対象となる有害性エンドポイントのマーカ―遺伝子を選定。同時に、内部標準マーカ―遺伝子、組織特異マーカ―遺伝子を選定。

② **人工染色体ベクターの作製**：選定したマーカ―遺伝子の発現が再現するようにデザインしたプロモーターと発光レポーターを連結し、人工染色体ベクターに導入するためのレポーター遺伝子を構築。



③ **人工染色体導入ES細胞の開発**：レポーター遺伝子を人工染色体ベクターを有するマウスES細胞に導入。



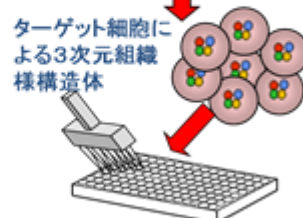
④ **人工染色体導入キメラマウスの開発**

発生工学技術を用いて人工染色体導入マウスES細胞から人工染色体導入キメラマウスを作製。マウス個体での発生を利用してES細胞由来の目的組織(細胞)を構築。作製したマウスを用いて個体 (in vivo)でのイメージング解析 (in vitro とin vivo の比較)。

人工染色体導入キメラマウス

⑤ **ターゲット細胞の開発および培養条件の検討**

人工染色体導入キメラマウスの組織からターゲット細胞を作製。作製した細胞の個体(組織)内での性質が維持されるような3次元培養条件などを検討。



⑥ **試験法の開発** 化学物質を曝露して発光による定量的な毒性スクリーニングを行う。

図 3-1-3. 有害性評価試験開発の基盤システムのストラテジー

この基本ストラテジーに従い、モデルケースとしてEGFP(緑色蛍光タンパク質)が高発現する初代培養細胞MEF(マウス胎児性線維芽細胞)の作製を試みた。その結果、後述するように、6週間という短期間で、図3-1-3の①から⑤の工程にあたるマーカ―遺伝子の選定からターゲット細胞の開発まで行うことに成功し、極めて効率的に遺伝子導入マウスから発光細胞を樹立できることを実証した。

基盤システムを構築するための中心となる各要素技術の概要を以下に説明する。

### 1) 人工染色体ベクター(図 3-1-4)

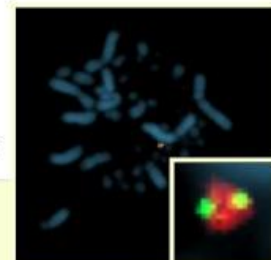
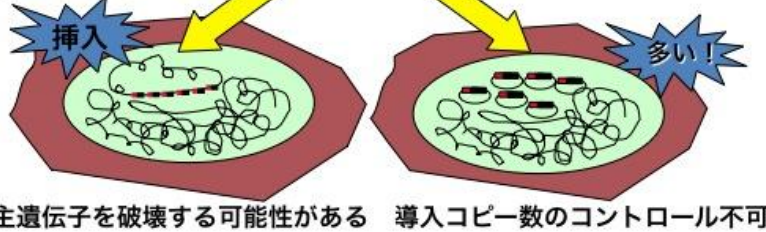
人工染色体ベクターは、鳥取大学の染色体工学を発展させて開発してきた技術である。スクリーニングシステムの効率化を目指す場合、測定の簡便さや定量性の高さといった利点を活かした発光評価システムが極めて有効である。このようなシステムを構築する場合、ルシフェラーゼなどの発光レポーター遺伝子や EGFP などの蛍光レポーター遺伝子を目的の細胞に導入した遺伝子導入細胞を作製する必要がある。OECD ガイドライン化など国際標準を形成する上では、樹立した細胞が安定に機能する必要があるが、従来の技術で作製した遺伝子導入細胞は、導入したレポーター遺伝子の発現が継代により消失することがあり、安定性に欠けるといふ大きな欠点がある。一方、人工染色体ベクターを用いた遺伝子導入細胞では、導入した遺伝子が長期間安定に機能することが明らかとなっている。

また、様々なエンドポイントの有害性評価法を構築するためには、複数のレポーター遺伝子を導入する必要があるが、鳥取大学では既に複数の遺伝子を導入した人工染色体ベクターの開発(マルチインテグレーションシステム)にも成功している。

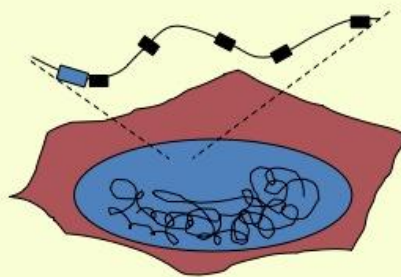
## 1) 人工染色体ベクター 安定で高品質

ウイルス/プラスミドベクター + 外来遺伝子制御領域 + 遺伝子

**従来法: 不安定**  
再現性に欠ける



**人工染色体ベクター (HAC) + ゲノム遺伝子**



導入DNAサイズに制約がない ヒト人工染色体  
(調節領域を含む遺伝子全長の導入が可能)

複数の遺伝子の導入が可能

→ 宿主細胞の生理的発現制御を受ける  
過剰発現/発現消失が起きにくい

**長期間、安定に機能する**

図 3-1-4. 人工染色体ベクター概要

## 2) 多色多様発光システム(図 3-1-5)

これまで産業技術総合研究所では、発光色の異なる3色の発光レポーターを用いることで3つの遺伝子発現を同時に計測できるセルベースアッセイシステムや、発光基質が異なる2種の分泌型発光レポーターを用いることで2つの遺伝子発現を細胞培地、尿や血液といった分泌液で計測するシステムを確立してきた。本プロジェクトでは、多様な複数の発光レポーターで複数の遺伝子発現を同時計測することにより、より高精度で効率の良いスクリーニングシステムを開発することが可能になる。

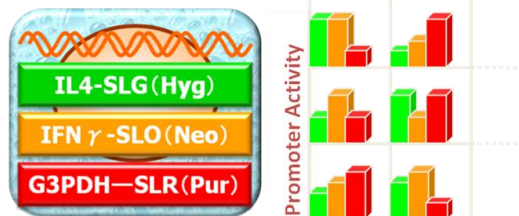
## 2) 多色多様発光技術 効率的なスクリーニングシステム

### 3つの遺伝子発現を同時に計測

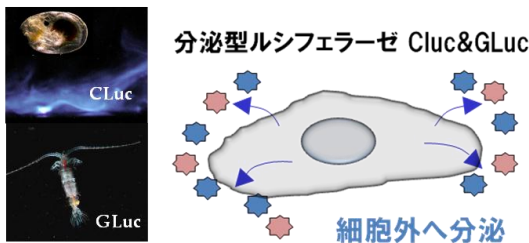


・マルチ遺伝子転写活性測定システム  
第4385135号、米国US7572629、中国CN1784496、欧州EP1784496

2免疫系・1コントロール遺伝子発現  
をハイスループットに計測可能



### 2つの遺伝子発現を分泌液で計測



・ウミホタルルシフェリン発光基質及びその製造法: PCT/JP2006/319000日本、EC、中国で審査中、米国公開中  
・ウミホタルルシフェラーゼ遺伝子: 日本4484429(H22/04/02)

細胞培地(in vitro)、  
血液や尿(in vivo)  
で計測可能

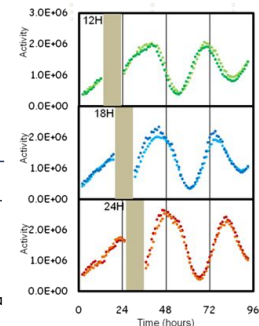


図 3-1-5. 多色多様発光システム概要

## 3) 遺伝子導入キメラマウス(図 3-1-6)

これまで化合物や薬品の安全性試験は、主に実験動物を用いた動物実験により評価されてきている。これまでも、各種レポーター遺伝子を導入した遺伝子導入細胞やES細胞或いはiPS細胞を用いた動物実験代替試験法が開発されてきているが、それら培養細胞のin vitro試験法が、実験動物を用いたin vivoでの試験法を再現しているかどうかを検証することは困難であり、in vitroとin vivo試験法には壁が存在するとされてきた。本プロジェクトでは、同じ人工染色体ベクターを用いて作製された遺伝子導入細胞と遺伝子導入マウス

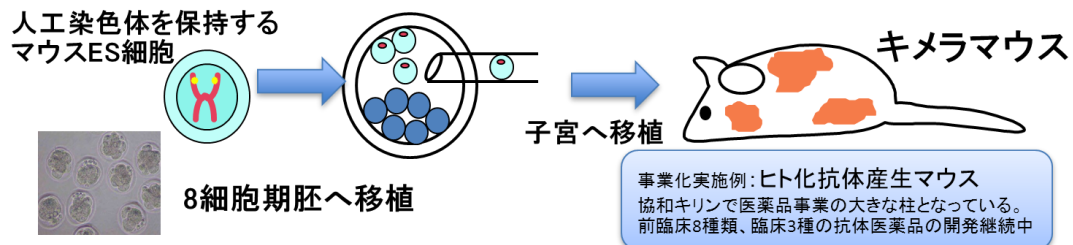
を用いて毒性評価試験を行うことで、*in vitro* と *in vivo* を相互検証することができる。

また、腎臓や肝臓といった多様な種類の細胞によって構築された組織を、ES細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞の *in vitro* 分化誘導により構築することは極めて困難である。しかしながら個体での胚発生を利用することで多様性肝細胞から目的の組織を構築することができる。

### 3) 遺伝子導入キメラマウス

#### *in vitro* と *in vivo* の壁

→人工染色体導入マウス:「染色体工学」と「発生工学」技術を融合して開発した新しい遺伝子改変動物作製技術



人工染色体導入 ES細胞から人工染色体導入キメラマウス作製

#### 胚盤胞補完法

多能性幹細胞から*in vitro*で臓器を作製することは、構成細胞の多様性や3次元的な立体構造を再現するため非常に困難

→個体での胚発生を利用して目的の組織(細胞)を構築する。  
(再生医療では、ブタにヒトiPS細胞を移植して膵臓を作製する試み)

図 3-1-6. 遺伝子導入キメラマウス概要

#### 4) 細胞培養技術(図 3-1-7)

組織から作製した初代培養細胞や組織幹細胞の作製や単離には極めて専門的な技術が必要である。腎臓は多様な種類の細胞で構築されており、その幹細胞を分離、培養することは極めて困難である。岡山大学の喜多村らは、ラットより腎幹細胞である rKS 細胞を樹立することに成功している。また通常、組織からの作製した初代培養細胞や組織幹細胞を平面培養すると、従来の活性や性質を失うことが知られている。一方で、三次元培養することで、組織内での細胞の機能を再現することができる。トランスパレント社製の cell-able プレートを用いて肝細胞を培養すると肝スフェロイドを形成する。また喜多村は rKS 細胞を三次元培養することで、試験管内で腎臓様構造体の作製に成功している。

#### 4) 細胞培養技術 三次元培養／幹細胞分化誘導

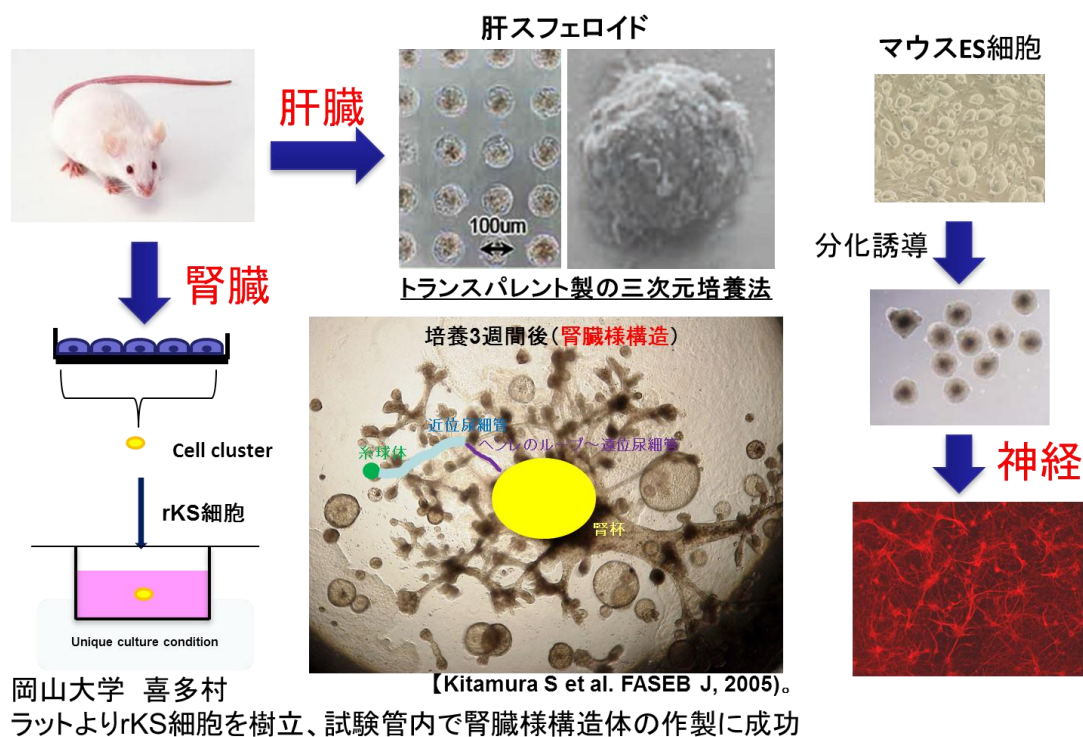


図 3-1-7. 肝臓、腎臓および神経細胞培養技術の概要

以下に、全体成果として、複数の目標項目別にそれら成果概要を記載する。

##### (a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-8)

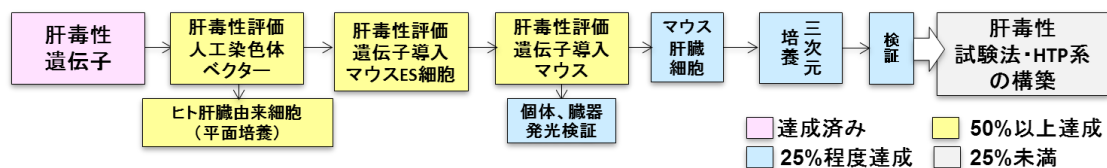
肝臓細胞は再生組織であり、細胞毒性による細胞死に加え肝再生が引き続き起きる。この時、胎仔性の幼若な肝芽細胞マーカーの再活性化が誘導される。そこで、肝臓毒性評価法として「a. 肝細胞死」と「b. 肝再生」をモニターする 2 つの方法を立案した。その方法に適したマーカー遺伝子の選定と検出用発光レポーターの開発を行った。第一段階として、開発した a. 肝細胞死評価用レポーターシステムの作動性をヒト肝癌由来細胞株である HepG2 細胞株で評価すると共に、化合物投与と毒性評価のスケジュールを検討した。一方、b. 肝再生レポーターシステムは、マウス ES 細胞と HepG2 細胞内に導入した人工染色体ベクター(MI-MAC)に搭載した。更に、この ES 細胞を用いてキメラマウスを作製し、肝毒性を誘導する化合物の一例として四塩化炭素を投与した。その結果、導入した b. 肝再生レポーターシステムを用いて、四塩化炭素投与後 2 日目に発光によって肝再生を検出できた。また、レポーターシステムを導入した HepG2 細胞を用いて、四塩化炭素投与後から毒性評価までの暫定的なスケジュールを決定する。今後、これらの開発段階のマウスから肝



細胞を取り出し、作製したレポーターシステムが肝細胞死や肝再生の評価に適しているかスフェロイド培養条件下で検討する。最終的に、マウス肝細胞のスフェロイド培養を用いた、肝臓毒性 in vitro 評価系の出口イメージの構築を支援する。

## 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発光レポーター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。

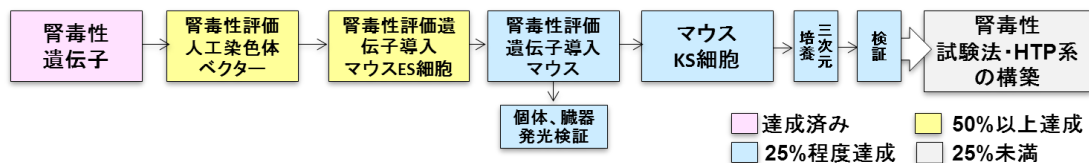
図 3-1-8. 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発の進捗と成果の概要

## (b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-9)

最初に、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た。腎臓機能の評価は現行ではクレアチニンや尿素窒素といった血清マーカーと尿蛋白、尿潜血といった尿異常による評価が行われている。しかし、それらのマーカーでは、腎臓の特異的部位の毒性評価や機能評価を行うことはできない。そこで我々は、既報や腎臓機能、構造、また世界的に推奨されている腎臓マーカーなどを勘案し、毒性評価が腎臓において最も起こりやすい近位尿細管をターゲットに、そして毒性評価マーカーとしてL-FABPとKim-1を選定した。また腎臓特異的な遺伝子として尿を調整する遺伝子の一つであり、近位尿細管に発現しているアクアポリン1、およびそれらの遺伝子発現を補正するための内部標準マーカーとしてHprtを選定した。それらのマーカーを基に、発光および蛍光レポーターを挿入した人工染色体ベクターを作製し、マウスES細胞、さらに遺伝子改変マウスを作製した。また、アクアポリン1遺伝子プロモーターを用いた近位尿細管レポーターの開発、L-FABPあるいはKim-1遺伝子プロモーターを用いた腎障害レポーターの開発を行なうための発光レポーターベクターについても作製した。

## 腎臓毒性in vitro試験法の開発

～進捗成果まとめ～



1. 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。
2. **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
3. **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。
4. 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、3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、3次元培養システムを腎臓様構造体構築が観察された。

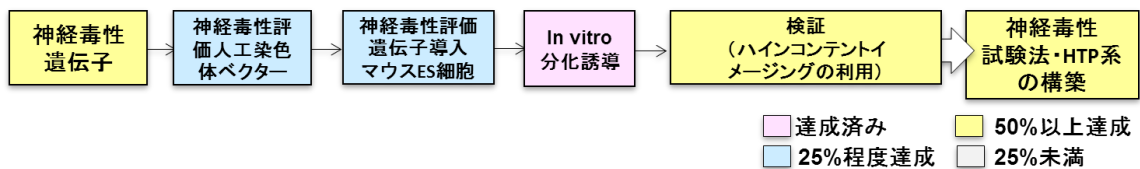
図 3-1-9. 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発の進捗と成果の概要

### (c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-10)

3種類のES細胞株から最も効率よく神経細胞へと分化する細胞株を選抜し、大脳神経細胞への分化誘導法を確立した。この分化神経細胞はGABAおよびグルタミン酸作動性神経細胞を含み、初代大脳神経培養と比較したところ、同様の各種神経伝達物質のレセプターの発現が確認された。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（細胞死および神経突起伸展の変化）を、ハイコンテンツアナリシスを用いて自動定量解析した。現在、形態変化と関連する新規マーカー遺伝子をDNAマイクロアレイにより探索中である。また、新規マーカー探索と並行し、文献で報告されている既知神経マーカー遺伝子（ $\beta$  III-tubulin）と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製した。

## 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  **$\beta$  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。

図 3-1-10. 神経毒性 in vitro 試験法の開発の進捗と成果の概要

### (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 (図 3-1-11)

本プロジェクトの根幹となる基盤技術の開発に関しては、染色体工学技術と発光技術の融合が重要なため、それぞれの技術を持つ鳥取大学と産業技術総合研究所が密に連携をとりながらシームレス開発を進めた結果、それぞれ

の特性を生かした技術の構築が行なえた。

また、これら基盤技術を毒性評価に利用するための実証研究も同時に開始した。具体的には、内部標準マーカーとして選定した Hprt 遺伝子プロモーターを用いた内部標準用発光レポーター、分泌型発光レポーターを活用した肝細胞死発光レポーター、Afp 遺伝子プロモーターの転写活性化を肝再生の指標とするレポーターシステムを開発し、さらにこれらが機能するかをヒト肝臓由来細胞として汎用的に利用されている HepG2 細胞株を用いて検証をしている。

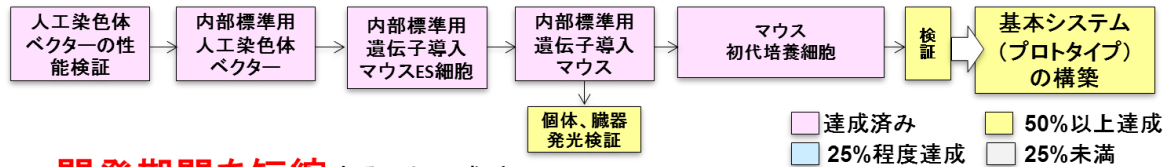
さらに内部標準マーカーである Hprt 遺伝子の発現をモニターできるキメラマウス、Afp 遺伝子をマーカーとした肝再生をモニターできるキメラマウスの樹立に成功し、これらが個体で想定通りに光ることを確認した。

また、MI-MAC ベクターのレポーターベクターとしての基本性能を検証するため、MI-MAC ベクターが導入されたモデル株化細胞（A9 細胞）に各種発光レポーターを挿入した発光細胞を樹立し、発光特性等の詳細な解析を行った。その結果、MI-MAC ベクターへのレポーター遺伝子の挿入により、クローン間のバラツキの極めて小さい均一な細胞集団が、従来の安定細胞株の樹立方法と比較し簡便に短期間で樹立できることを明らかにした。また、これらの樹立した細胞の発光強度は、従来法で樹立した細胞よりも顕著に高いこと、さらに数カ月に渡り長期間継代培養しても安定に発現（発光）することも明らかにした。さらに緑色及び赤色に発光する MI-MAC 導入 A9 細胞をモデルとして、96 ウェルマルチプレートを用いた HTP アッセイを実施したところ、各ウェルから発する発光は高い精度で測定可能な発光値を示すこと、また細胞刺激に応じた転写活性及び転写抑制を高い精度で測定できることを確認した。以上の結果より、今後樹立する各臓器特異的毒性評価用細胞の発光強度が、本研究で樹立した A9 細胞と同程度であれば、本プロジェクトで想定している 96 ウェルマルチプレートを用い、15～20 分程度の測定により毒性評価が可能であると推定された。

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

～進捗成果まとめ～



1. **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週間でおこなった(染色体工学、遺伝子工学、細胞工学、発生工学技術の融合)。
2. **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)。
3. 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。
4. 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。
5. 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。

図 3-1-11. 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の進捗と成果の概要

### 3 - 1 - 2 個別要素技術成果

\* 「3 - 1 - 2 個別要素技術成果」(p. 129~p. 267) は非公開

### 3-1-3 特許出願状況等

各要素技術に関する特許・論文等の件数は論文3報の他、学会等での発表が多数ある（表3-1-1参照）。

表3-1-1 論文、投稿、発表、特許リスト

	題目・メディア等	時期
論文	「A novel and stable mouse artificial chromosome vector」 ACS Synthetic Biology. 2012	H24. 3
	「A dual-color luciferase assay system reveals circadian resetting of cultured fibroblasts by co-cultured adrenal glands」 PLoS One, 7, e37093, 2012	H24. 5
	「Mizoribine Inhibits the Proliferation of Renal Stem / Progenitor Cells by G1/S Arrest during Renal Regeneration」 Acta Medica Okayama, In Press.	H25. 4
投稿	腎臓領域における再生医療実用化の手ごたえと使わなくなるであろう薬剤・機器・治療法、先端医療に関する医療ニーズ／製品開発戦略と臨床で使わなくなる（であろう）薬剤・製品 予測、技術情報協会誌	H24. 5
発表	「成体腎臓幹/前駆細胞を使用した三次元的な腎臓構造再構築」、日本再生医療学会	H23. 3
	「包括的な腎臓領域再生治療～臨床応用に向けて」、日本再生医療学会	H23. 4
	「An <i>in vitro</i> method for neurotoxicity using neuronal cells derived from mouse embryonic stem cells」、14th international neurotoxicology association meeting, 2011	H23. 6
	「免疫抑制剤による腎臓の発生・再生過程に及ぼす検討」、第54回日本腎臓学会学術総会	H23. 6
	「生物発光技術による細胞情報解析の新展開」、生物発光化学発光研究会第28回学術講演会特別講演	H23. 7
	「Development of multicolor luciferase assay system for <i>in vitro</i> chemical risk analysis」 The 8th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences (2011)	H23. 8
	「Ifosmaide 投与後に慢性経過で腎障害をきたした3例」、日本腎臓学会西部学術集会、	H23. 9

	「ヒト人工染色体ベクターを用いた高感度毒性評価システムの開発」日本実験動物代替法学会 第24回大会	H23.11
	「ヒト人工染色体ベクターを用いた <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> デュアルバイオイメージングシステムの開発」日本実験動物代替法学会 第24回大会	H23.11
	「人工染色体ベクターと多色・多様発光システムを融合した細胞アッセイシステムの開発」日本実験動物代替法学会 第24回大会	H23.11
	多色蛍光技術を用いた CYP3A 遺伝子発現誘導のリアルタイム <i>in vitro</i> 評価系の構築	H23.11
	「発生中期マウス胎児のライブイメージングシステムの開発」第34回日本分子生物学会年会	H23.12
	「Development of a highly sensitivity test system using chromosome engineering and bio-luminescence technology」第34回日本分子生物学会年会	H23.12
	「発光と蛍光を組み合わせた多色イメージング細胞/動物の開発」第34回日本分子生物学会年会	H23.12
	「ヒト人工染色体ベクターを用いた活性型 p53 モニタリング細胞の樹立」第34回日本分子生物学会年会	H23.12
	「バイオコントローラー人工染色体による次世代型遺伝子導入モデル動物の作成法の開発」、第59回日本実験動物学会総会	H24.5
	「Dual-color system for monitoring hepatic differentiation and drug-mediated induction based on CYP3A4 and 7 expression.」CiRA International Symposium 2013	H24.6
	「成体腎臓幹/前駆細胞を使用した腎臓再構築の機能解析：尿細管機能を中心に」日本再生医療学会	H24.6
	「2色蛍光による CYP3A 遺伝子発現誘導性と肝細胞分化過程のライブイメージング系の開発」	H24.7
	「毒性試験法開発における人工染色体ベクターの応用」第39回日本毒性学会学術年会	H24.7
	「哺乳類人工染色体ベクターを活用した新たな遺伝子導入細胞/動物作製システム」、「細胞を創る」研究会 5.0	H24.11
	「細胞系譜を追跡する、多色発光/蛍光を用いたイメージングシステムの開発」、「細胞を創る」研究会 5.0	H24.11



	「多色蛍光技術を用いた CYP3A 遺伝子発現誘導のリアルタイム in vitro 評価系の構築」染色体工学技術を用いた創薬研究支援へ向けて	H24. 11
	「Dual-color fluorescent imaging of human CYP3A7 and CYP3A4 expression upon developmental switching and drug-mediated induction」第 35 回日本分子生物学会年会	H24. 12
	「Human artificial chromosome vector and its use for genome editing」第 35 回日本分子生物学会年会	H24. 12
	「Dual-color fluorescent imaging of CYP3A4 and CYP3A7 in the human hepatic carcinoma HepG2」第 35 回日本分子生物学会年会	H24. 12
	「ES 細胞由来神経細胞を用いた in vitro 神経毒性試験の検討」日本動物実験代替法学会第 25 回大会	H24. 12
	「細胞系譜を追跡する発光と蛍光を組み合わせた多色イメージングシステムの開発」、第 35 回日本分子生物学会年会	H24. 12
	「成体腎臓幹/前駆細胞からの腎臓構造再構築とその解析」日本動物実験代替法学会	H24. 12
	「2 色蛍光による CYP3A 遺伝子発現誘導性と肝細胞分化過程のライブイメージング系の開発」、第 12 回日本再生医療学会総会	H25. 3
	「Development of multicolor luciferase assay system and analysis of clock gene expressions」BfR-ZEBET seminar.	H25. 3
	Development of artificial chromosome-based multi-color luciferase assay system」第 90 回日本生理学会大会	H25. 3
	「成体腎臓幹/前駆細胞からの腎臓再構築時における経時的な遺伝子発現の検討」日本腎臓学会	H25. 5
	「An in vitro method for neurotoxicity using neuronal cells derived from mouse embryonic stem cells」14th International Neurotoxicology Association Meeting.	H25. 6
	「人工染色体を用いた腎臓幹細胞からの臓器作製技術による HTS 毒性評価法の開発」、第 40 回日本毒性学会学術年会	H25. 6
	「臨床現場での腎毒性評価の現状」、第 40 回日本毒性学会学術年会	H25. 6
	「腎臓幹細胞からの腎臓構造再構築技術を用いた新たな評価法の開発」第 40 回日本毒性学会学術年会	H25. 6

発表 (講演)	「腎臓の機能評価の基礎及び臨床」日本たばこ株式会社 秦野 安全性研究所	H24. 11
	「2色蛍光を用いた Cell-based CYP3A4/7 遺伝子発現誘導評価法の開発」 秦野研究所研究講演会（一般財団法人食品薬品安全センター）	H25. 6
「国民との対話」 関連講演	「実験機器使用説明講座」（とっとりバイオフィロンティアに設置してある機器の操作方法や解析方法などについて説明を行う講座）	H23. 4 以降随時
	「バイオ基礎知識講座」（生命現象の基礎となる生体内の種々の構造・機能・反応から、遺伝子・染色体・細胞や代謝の概念について幅広く教えることで、バイオに関しての知見を深めると共に、バイオ研究に興味を持って取り組める人材の育成を目指す講座）	H23. 9 全 4 回
	「動物実験技術講座」（創薬研究や機能性食品開発研究における動物実験の意義・手法や、飼育・投与・採血といった基本的な動物実験手技を教えることで、研究開発において有効かつ適切な動物実験を行える人材の育成を目指す講座）	H23. 9 全 4 回
	「バイオ実験技術講座」（バイオ実験の基本となる細胞・遺伝子を用いた基本的な実験手法を教えることで、鳥取県のバイオ産業の発展に寄与できる人材の育成を目指す講座）	H23. 10 全 6 回
	「バイオビジネス講座」（「新製品開発戦略のポイントとは何か」「技術開発と市場戦略をどう組み合わせるのか」「単に製品を開発するだけでなく、ビジネスとして成功させるためには何が必要か」—地方のバイオ中小企業をモデルとした事例研究（ケーススタディ）による「ビジネススクール形式」の講座）	H23. 10 全 4 回
	「染色体工学技術講座」（染色体工学研究を行う上で必要となる基本的な実験操作を教えることで、適切な染色体工学実験を行える人材の育成を目指す講座）	H23. 11 全 6 回
	「バイオフィロンティアセミナー」（鳥取県外から講師を招いて行なった創薬に必要な薬物動態のメカニズムから創薬関連ベンチャーの起業についてなど幅広い内容の講義）	H24. 6
	「食品・医薬品・化学薬品の毒性勉強」（安全性・毒性評価の現場で実際に活躍する専門家を講師とした様々な場面における安全性評価の現状と今後の展開について講義）	H24. 6 &11
	「バイオフィロンティアってなあに？」（施設見学を兼ねて開催したとっとりバイオフィロンティアについて広く知っても	H24. 7

	らうための講座。染色体工学やバイオビジネスについて一般向けのわかりやすい講義を行なった)	
	「染色体工学セミナー」(染色体工学研究に必要な各種解析法についての実験手技・手法および観察・解析法の習得を目指す実践的な講座)	H24. 8
	「バイオビジネス戦略入門」(「製品を開発するだけでなく、ビジネスとして成功させるためには何が必要か」など販売戦略・製品開発戦略について、地方のバイオ中小企業をモデルとした事例に対してグループディスカッションで挑むビジネススクール形式の講座)	H24. 9
	「バイオベンチャー起業化のための人材育成講座」(医薬品開発を支援するバイオベンチャー企業を立ち上げるための人脈の作り方、起業化精神の養成、医薬品開発の知識について解説する講座)	H24. 8 ~10
	「研究開発戦略セミナー」(医薬品開発研究における戦略としてどのようなものか効果的か、さまざまな視点から分析し、有効な戦略を選択することができる人材を育成することを目指した講座)	H24. 11
	「実験動物技術セミナー」(採卵、体外受精、凍結保存、胚移植などの技術習得を目指す実習形式の講座)	H24. 12
	「ライフサイエンスにおける新たな電子顕微鏡技術の展開」(ライフサイエンスにおける電子顕微鏡技術のトレンドを概説すると共に、注目されている①FIB/SEM Volume 3 D Imaging、②Correlative Microscopy (蛍光顕微鏡と電子顕微鏡の相関顕微鏡法)、Cryo 電子顕微鏡法を事例とともに紹介)	H25. 4
	「バイオフィロンティアセミナー」(創薬関連企業研究者の育成事業を専門に行う研究機関の協力のもとに開催し、創薬研究のほか就職、キャリアマネジメントについても紹介)	H25. 6
	「共焦点レーザー顕微鏡個別相談会」(メーカーの担当者により実験者個々のニーズに合わせた使用方法を説明した)	H25. 7
	「研究開発戦略のための人脈づくり講座」(「製薬企業が置かれている環境と将来展望」をテーマに、多方面から考察。人工染色体工学技術の創薬研究についてもディスカッションを行った)	H25. 7
特許		

### 3-2 目標の達成度

設定された複数の目標に対する成果・達成度を以下の表のとおり示す。

表 3-2-1. 目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(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。	内部標準マーカーを始め、肝特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。肝毒性バイオマーカーとして、細胞死と肝再生をモニターするレポーター等を作製しつつあり、人工染色体導入マウス作製もいくつか順調に進展しており最終目標に向かって着実に歩みつつある。	達成
(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。	内部標準マーカーを始め、腎特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。腎毒性バイオマーカーは既に臨床で利用されてもので進めている。人工染色体導入マウス作製も順調に進展しており、最終目標に向かって着実に歩みつつある。	達成
(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。	ES 細胞から神経細胞への分化誘導法を明確し、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てマーカー遺伝子候補を選定した。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しており、最終目標に向かって順調に進展している。	達成
(d) ハイスルー プットスクリ	人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を	MI-MAC 導入モデル株化細胞 (A9 細胞) に発光レポーターを挿入	達成

<p>ーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発</p>	<p>行い、試験系の設計試案を作成する。</p>	<p>した各種の発光細胞樹立し、MI-MAC ベクターのレポーターベクターとしての基本性能を検証した。また2色発光細胞を用いたアッセイシステムの精度検証を行い、最終目標に向かって着実に試験系の設計試案を作製している。</p>	
------------------------------	--------------------------	--	--

## 4. 標準化等のシナリオ、波及効果について

### 4-1 標準化等のシナリオ

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、既述のとおり、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化は、成果の実用化にとって必須のことと考えられる。現在、事業開始から2年半の中間地点であるが、プロジェクト基本計画に規定された中間目標、最終目標の達成に向けて、着実に進展しており、「OECD-TG化に向けた国際提案」についても、視野にとらえたいと考えている。

OECD-TG化を図る上で考慮しなければならない点は、新規の手法開発からバリデーションを経てOECDの承認を得るまでの必要期間である。これまでの例では、新規TG開発事業としてOECDに登録してから新規TGとして承認されるまでに10年近い期間が必要となっている。図4-1-1は、欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)の科学諮問委員会が示した、OECD-TG化までの道のりである。

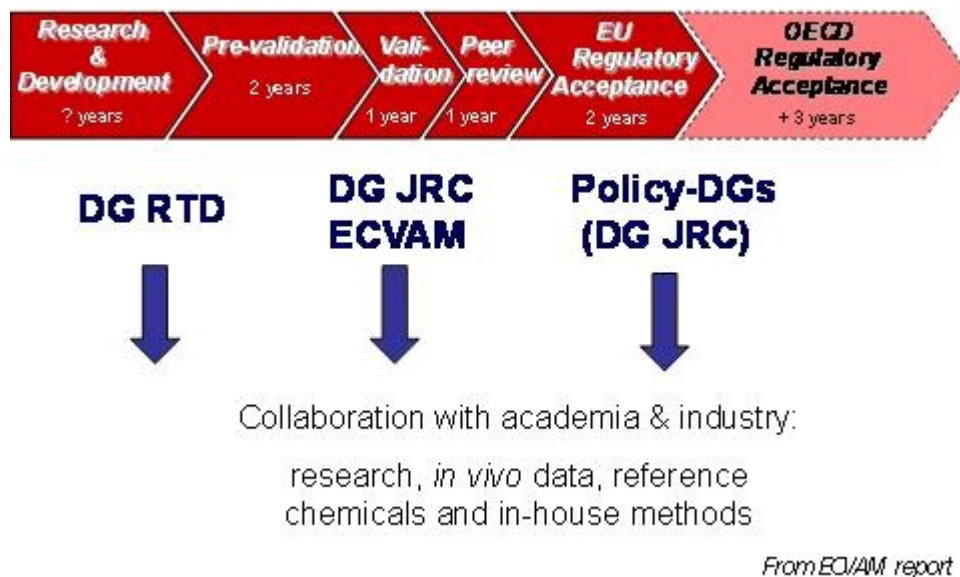


図 4-1-1. OECD-TG化への道筋と必要期間

新規試験法の国際標準化・OECD-TG化に当たっては、日米欧評価機関の中枢、JaCVAM(日本)、ICCVAM(米国)及びECVAM(EU)の協力を得て、国際協調の下でバリデーションを行うことが必須であり、本事業による新規試験法の場合も、事業終了後5年以上かかるとの見通しに立ちつつ、これら機関と密接に連携をとりながら、OECD-TG化に向けた取組を着実に進める必要がある。

OECD-TG化は、提案から承認されるまで通常5～10年の期間を要す

る。したがって、「肝臓毒性 invitro 試験法」、「腎臓毒性 invitro 試験法」「神経毒性 in vitro 試験法」については、OECD-TG提案は本事業終了後に検討することとなろう。また、OECD-TG化に向けて着実なプロセスの展開を図るためには、バリデーションの推進などが必要である。

広報活動についても積極的に実施した。平成 23 年度から 25 年度に実施された内容では、テレビ報道 2 件、新聞・雑誌掲載 4 件であり、公益財団法人鳥取県産業振興機構が管理する『とっとりバイオフィロンティア』に関連する記事、報道であった。特に本事業に関連する記事として以下の内容が挙げられる。

①山陰中央新報 平成 23 年 6 月 15 日

記事タイトル「とっとりバイオフィロンティア 経産省研究事業に」

②日本海新聞 平成 25 年 3 月 30 日

記事タイトル「細胞への遺伝子導入技術活用」ニーズとのマッチングを  
力に本事業関連した紹介記事として「新薬開発の毒性判別に特化」と  
して研究紹介あり

この他、当該プロジェクトの成果を海外、国内での動物実験代替法学会等にて適宜発表しており、学会参加者等に知らしめている。

## 4-2 波及効果

波及効果については、以下のとおりである。

本事業により得られる新規 invitro 試験法は、簡易で高感受性であり、また、試験対象検体数の多さや試験プロセスの省力化も期待でき、コスト削減などでも大きなメリットがある。そのため、製造企業での自主的な化学物質管理や試験受託機関での有効利用が期待されるものである。

さらに、化学物質の有害性評価手法として、世界的な視野で、技術的及び経済的な波及効果を大いに導くとともに、広範な分野での研究開発を促進するなどの大きな波及効果をも期待できる。例えば、有害性が陰性の化学物質については、食品、医薬品、農薬等への利用も考えられることから、こうした分野における候補化学物質の安全性評価手法としての活用も期待される。

また鳥取県産業振興機構では、染色体工学技術の事業化への発展を進めた取り組みを積極的に行っている。鳥取県内の産学官金（鳥取県、米子市、境港市、（公財）鳥取県産業振興機構、鳥取大学、及び商工会議所等）からなる「鳥取県イノベーション推進協議会」は、文部科学省による支援が地域イノベーション戦略の実現へ大きく貢献すると認められる地域に対して、戦略の中核を担う研究者の大学への集積や、戦略実現のための人材育成プログラムの開発・実施等について支援する「地域イノベーション戦略支援プログラム」に、染色体工学を中心とした「鳥取次世代創薬・健康産業創出地域」として申請し、平成 25 年度に採択された。このなかでも、国内外の大手製薬企業、食品企業、化学企業と連携し、鳥取大学発のバイオベンチャーが中心となり事業化への実現を積極的に行うことが計画されている。



## 5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等

### 5-1 研究開発計画

本研究開発は、各研究開発項目に対して計画された平成 23 年度～平成 27 年度の実施スケジュール（表 5-1-1）に沿って実施されている。現時点において、各研究開発項目の中間目標は計画どおりに達成される見通しであり、研究開発計画は妥当であると考えられる。

当初、基本計画に、動物種の違いを考慮してヒトでの有害性評価を想定とした『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。

表 5-1-1. 事業全体の実施スケジュール

★ 中間評価

	H23	H24	H25	H26	H27
肝臓毒性	1. 遺伝子の選定	2. 肝毒性評価人工染色体ベクターの開発 3. 肝毒性評価人工染色体ベクター導入ES細胞の開発	4. 肝毒性評価人工染色体ベクター導入マウスの開発 5. 初代肝細胞のスフェロイド培養条件の検討	6. 肝毒性試験法・HTP系の構築	
腎臓毒性	1. 遺伝子の選定	2. 腎毒性評価人工染色体ベクターの開発 3. 腎毒性評価人工染色体ベクター導入ES細胞の開発	4. 腎毒性評価人工染色体ベクター導入マウスの開発 5. mK S細胞の開発と培養条件の検討	6. 腎毒性試験法・HTP系の構築	
神経毒性	1. 遺伝子の選定	2. 人工染色体ベクターの開発 3. 人工染色体ベクター導入ES細胞の開発	4. in vitro分化誘導	5. ハイコンテンツイメージングによる検証 6. 神経毒性試験法・HTP系の構築	
基盤技術	1&6. 人工染色体ベクターの性能検証、基本システム (ProTAX) の構築	2. 人工染色体ベクターの開発	3. 人工染色体ベクター導入ES細胞の開発 4. 人工染色体ベクター導入マウスの開発	5. ターゲット細胞の開発と培養条件の検討	
その他	ヒト代謝機能の導入		中止		計画変更 ES細胞を用いた遺伝子導入ラット作製

## 5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

本研究開発は、公募による選定審査手続きを経て、公益財団法人鳥取県産業振興機構が国立大学法人鳥取大学との共同研究契約を締結して協力体制の下、一体化して、経済産業省からの委託を受けて実施した。また、再委託先として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（四国センター）、一般財団法人食品薬品安全センター、及び住友化学株式会社（生物環境科学研究所）が参加した。

また、研究開発の実施に当たっては、研究開発を統括するためのプロジェクトリーダー（国立医薬品食品衛生研究所 小島 肇）、プロジェクトテマリーダー（鳥取大学 押村光雄）を設置するとともに、プロジェクト推進助言協力のため、5名からなる推進委員会（板垣 宏（横浜国立大学 教授）、松本一彦（学習院大学 非常勤講師）、宮城嶋利一（システム薬学研究機構 理事）、春山哲也（九州工業大学 教授）、一戸紀孝（独立行政法人国立精神・神経研究医療センター 部長））を設置した。推進委員会の実績は以下の通りである。

- ・推進委員会（原則2回/年開催）

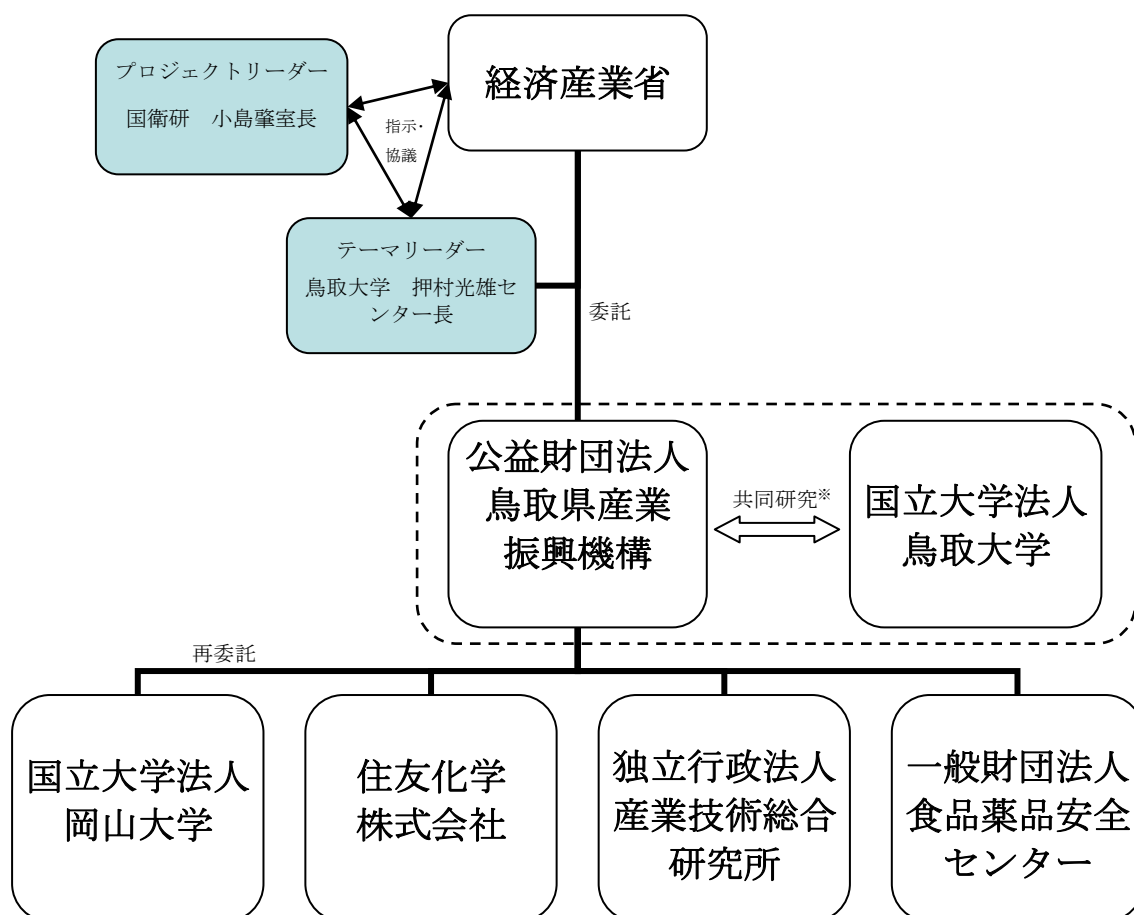
平成23年度 2回、平成24年度 2回、平成25年度（上期） 1回

この他、本事業の推進状況を定期的に確認する目的で推進調整会議を適宜開催した。推進調整会議の実績は以下の通りである。

- ・推進調整会議（原則3回/年開催、うち1回は研究開発項目①と合同）

平成23年度 3回（打ち1回合同）、平成24年度 3回（うち1回合同）

「国民との科学・技術対話」については、本事業の受託者である公益財団法人鳥取県産業振興機構では鳥取大学と共同で、各種講座を一般市民参加の基に実施しており、平成23年度から具体的な公開講座を推進している。年間8項目ほどの公開講座が実施されており、その詳細は表3-1-1に記載した通りである。



※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

図 5-2-1. 研究開発実施体制

当該実施体制については、染色体工学技術の鳥取大学を始め、腎臓前駆体・幹細胞作製技術を持つ岡山大学、神経毒性の研究を積み重ねた住友化学、発色レポーター技術を持つ産総研、及び動物実験代替法試験 (in vitro 試験法) 技術を持つ食薬センター等、本プロジェクト成果を得るに必要な技術・経験を持つ研究機関が的確に組み込まれており、極めて高い妥当性があると言える。

総括プロジェクトリーダーとしての小島 肇氏は JaCVAM (日本動物実験代替法センター) の代表者、及び日本動物実験代替法学会会長であり、本プロジェクトの進捗管理を的確に実施できる。また、テーマリーダーの押村光雄氏は当該研究開発テーマの基本技術である人工染色体技術の開発者であり、テーマ全体について効果的に機能を発揮できる環境整備に的確な研究者であると言える。

当該プロジェクトの実施者は得られている成果、知的財団などを当該分野と関連深い学会等に積極的に発表し、的確な広報活動を行っていると言える。

### 5-3 資金配分

本プロジェクトの平成23年度から平成25年度までの資金配分は下表のとおり実施された。研究開発の前半にあたるこの時期においては、各種毒性マーカー遺伝子の探索、試験法開発に用いられる培養細胞等の分化誘導等の基本検討などをはじめ、発光レポーターベクター作製のためなど、実施計画に基づいた課題を推進し、成果を上げた資金配分であると言える。

表 5-3-1. 資金度配分

(単位：百万円)

年度 平成	23	24	25	26	27	合計
(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

#### 5-4 費用対効果

本事業の実施によりもたらされる費用対効果は、以下のように期待できる。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。

さらに発光レポーターという簡便で再現性の高い測定系を使う本 *in vitro* 試験法では、熟練した技術者が必要なくなり、人件費という面からでもコストダウンにつながると考えられる。

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、改正化審査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。もし、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、改正化審査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。

## 5-5 変化への対応

技術動向・社会情勢・市場ニーズの変化など、事業に影響を与える情勢変化としては、大きな変化はないが、敢えて考えられる変化としては2011年3月に発生した東日本大震災、及びそれによる原発被害の影響による資金不足が挙げられるが、現在までは必要な資金の配分を受けており、ほとんど影響がないと考えられる。

## 第 3 章 評価





B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro  
試験法の開発

## 第3章 評価

### 1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

化学産業の分野において、安全性確保は社会的に非常に重要な課題であり、国際的な規制の観点などからも今後ますますスピード感と低コスト化が要求されるようになってきている。加速度的に増加する化学物質の有害性評価の実施にあたり、わが国が世界的に認められる評価技術の開発を行い、標準技法を生み出すことは、国家政策上極めて重要であり、国が主導して研究開発を進めていくことに大きな意義を感じる。

また、人工染色体ベクター技術を活用した遺伝子導入技術や各種培養技術は独創的かつ革新性の高いものであると評価でき、国際競争力を持つための基盤技術として有意義であると考えられる。未だ標準的手法が確立していない中、事業計画の新規性及び先進性を考慮すると、国が積極的にサポートすべき緊要性の高い事業であると考えられる。

また民間では投資をしにくい分野であり、大規模な投資により、国が関与することが必要な事業と考える。

本プロジェクトは、社会的背景・国際的ニーズに対して新規性の高い科学的思考とそれに伴う技術導入を計っており、事業の目的・政策的位置付けに対する立ち位置は明確に示されている。

一方で、現段階ではまだ研究レベルの課題が多く、評価方法の公定化、実用化に向けたロードマップが明確にされていない点は目標管理の上で改善を要する。また、国内外で進行している他の関連活動との接点をもう少し明確にし、積極的に融和する方向性が望まれる。

#### 【肯定的意見】

(F委員) 加速度的に増加する化学物質の有害性評価の実施にあたり、動物実験に基づく毒性評価のみに依存せず、近年の科学技術を活用して新規の *in vitro* 毒性試験系を構築することは、国家政策上極めて重要なものである。従って、本プロジェクトの事業目的や政策的位置づけは明確であり、国家が主導して研究開発を進めていくことに大きな意義を感じる。また、人工染色体ベクター技術を活用した遺伝子導入技術や各種培養技術は独創的かつ革新性の高いものであると評価できる。得られた成果物の普及と国際標準化を念頭に取り組んでいることから、構築された系が広く活用されることで、毒性情報が十分に確認されていない新規化学物質による国民の健康被害のリスクの低減に繋がり、社会的、経済的な意義も極めて高いと評価できる。

(G委員) 化学物質の毒性評価は文明の持続的な発展と人類を含む地球上の全生物

の共存のためにきわめて重要な情報を与える。この課題に対し、わが国が世界的に認められる評価技術の開発を行い、標準技法を生み出すことは国益に則したことと考える。

(H委員) 当該分野に関わる社会的背景と必要性、並びに未だ標準的手法が確立していない技術体系の中に新たな技術プラットフォームの構築を目指す事業計画の新規性及び先進性を考慮すると、国が積極的にサポートすべき緊要性の高い事業であると考えられる。

(I委員) 事業の目的・政策的位置付けに対する立ち位置は明確に示されている。特に、社会的背景・国際的ニーズに対して新規性の高い科学的思考とそれに伴う技術導入を計っている点は評価できる。

(J委員) 化学産業の分野において、安全性確保は社会的に非常に重要な課題であり、国際的な規制の観点などからも今後ますますスピード感と低コスト化が要求されるようになっている。本事業は科学的妥当性・優位性もあり、この分野で国際競争力を持つための基盤技術として有意義であると考え。また民間では投資をしにくい分野であり、大規模な投資により、国が関与することが必要な事業と考える。

#### 【問題点・改善すべき点】

(F委員) 問題点・改善すべき点として、特記すべき事項はない。

(H委員) 事業の目的・政策的位置付けに関しては大きな問題点は無い。

(I委員) 国内外で同時進行している（もしくは既に帰結している）他の関連活動（NEDO、REACHの活動など）との接点をもう少し明確にし、積極的に融和する方向性が望まれる。

(J委員) 本事業の現段階ではまだ研究レベルの課題が多く、評価方法の公定化、実用化に向けたロードマップが明確にされていない点は目標管理の上で改善を要する。

## 2. 研究開発等の目標の妥当性

事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として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ことを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。

人工染色体技術と発光レポーターシステムという個別技術の統合による戦略は独創的で価値が高く、人工染色体ベクターのマウス ES 細胞への遺伝子導入などの特異的かつ新規科学的技術に関する評価目標が具体的に提示されている。

個別の課題への取り組みは適切に行われており、実現性、妥当性ともに適切な目標水準にあると考える。

一方で、全体のスケジュール感が明確でなく、達成度評価の政策的インパクトが判断しにくい。本活動の最終的な出口が何であるかの焦点が絞られていない感がある。最終的に構築したそれぞれの系に関して、評価系の有用性や完成度を判断できる数値指標を示すことの必要性について検討されたい。

さらに、近年の関連領域の研究動向、特にヒト iPS 細胞を応用した *in vitro* 毒性試験系開発研究等と対比した時、マウス細胞を応用した本事業の目標、必要性並びに優位性を明確に示し、他事業との差別化を行うことが重要であると考ええる。

### 【肯定的意見】

(F 委員) 基盤技術構築及び各 *in vitro* 試験法の開発ともに、中間評価時点において、具体的かつ明確に目標及び目標水準が設定されており、指標設定も適切であると判断できる。

(G 委員) 動物愛護は世界的な潮流である。本研究の目標である細胞を用いた動物実験代替評価系の確立はまさに時宜を得たものといえる。ことにわが国が誇る人工染色体技術と発光レポーターシステムという個別技術の統合による戦略は独創的で価値が高い。中間評価時点ではモデル系の成果が得られており、後半において評価系の validation が進むと期待される。少々各論的になるが、私は評価系構築において、細胞株を用いるよりはマウスの系統を樹立し、初代細胞を用いる方が系の安定性において優れると考えており、本研究の目標設定は適切と思う。

(H 委員) 事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として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ことを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。これらはいずれも適切なものであると評価する。各論部分に関しても個別に具体的な達成目標が設置されており、適切である

と評価する。

- (I 委員) 非常に挑戦的な目標を掲げており、人工染色体ベクターのマウス ES 細胞への遺伝子導入などの特異的かつ新規科学的技術に関する評価目標がきちんと提示されている。
- (J 委員) 示された個別の課題への取組みは適切に行われており、実現性、妥当性ともに適切な水準にあると考える。

#### 【問題点・改善すべき点】

- (F 委員) 各毒性評価系に関して、最終評価時点で設定された目標に数値指標が設定されていないことから、最終的に構築したそれぞれの系に関して、評価系の有用性や完成度を判断できる数値指標を示すことの必要性について検討されたい。
- (H 委員) 本事業は、マウス細胞を用いた評価系の構築に特化した内容になっているが、近年の関連領域の研究動向、特にヒト iPS 細胞を応用した *in vitro* 毒性試験系開発研究等と対比した時、マウス細胞を応用した本事業の目標、必要性並びに優位性を明確に示し、他事業との差別化を行うことが重要であると考え。この部分に関しての十分な対応を希望する。
- (I 委員) 成果の明示が何点か示されているが、本活動の最終的な出口が何であるかの焦点が絞られていない感がある
- (J 委員) 動物によって行われていた毒性試験を *in vitro* 試験で置き換えるという視点で見た場合に、全体のスケジュール感が明確でなく、達成度評価の政策的インパクトが判断しにくい。このプロジェクトだけで公定化を目指すことがゴールであれば、中間点としては不十分であるが、実質的な成果として決して低いアウトプットではないと考える。

### 3. 成果、目標の達成度の妥当性

4つの個別要素技術開発（ハイスループットスクリーニング試験系構築、肝臓毒性 in vitro 試験法開発、腎臓毒性 in vitro 試験法開発、神経毒性 in vitro 試験法開発）のいずれにおいても、中間評価時点として適切な成果が得られ、事業全体として問題ない進捗であると評価する。

試験法の構築に向けての基盤技術の開発は着実に進捗しており、基盤技術の開発に関しては、進捗と成果に関して非常に高く評価できる。

得られた成果の中で、最大5か所に遺伝子導入が可能な人工染色体ベクターシステム（MI-MAC ベクター）とそれを応用したハイスループットスクリーニング試験系の開発、腎臓様構造再構築に使用可能な腎幹/前駆細胞（mKS 細胞）を用いた腎臓様3次元構造体構築に関わる成果は、特に新規性が高いものと評価される。

一方で、具体的な達成基準事項を提示し、それに対する到達点を明記し、達成度の妥当性を測るとより分かり易くなる。特に、マーカー遺伝子の選定に関して、できるだけ早く具体的な戦略と計画を示した上で、研究を進めることが望ましい。

国際標準化に向けての達成度については、十分というにはまだかなり距離がある。

また、成果の一部には、既存論文の追試や再現に止まる内容も散見され、既知・既存技術の再現および活用を行う場合は、その必要性和妥当性を十分に検討し、本事業の成果として適当となり得るための十分な付加価値を付与されることを希望する。

#### 【肯定的意見】

（F委員） 基盤技術の開発において、内部標準マーカーや組織特異マーカー遺伝子を適切に選抜し、ベクター作製、キメラマウスの作製、培養条件の検討など、試験法の構築に向けての基盤技術の開発は着実に進捗しており、基盤技術の開発に関しては、進捗と成果に関して非常に高く評価できる。論文、学会等で広く研究成果を公表している点も評価できる。各種 in vitro 培養評価系の基礎的な検討にも確実な進捗が見られる。

（G委員） 細胞を用いた毒性評価に関するモデル系の構築が行なわれている。後半においてこの系を発展させて一般化できるようになるかでのこの研究グループの力量が試されるものとする。

（H委員） 4つの個別要素技術開発（ハイスループットスクリーニング試験系構築、肝臓毒性 in vitro 試験法開発、腎臓毒性 in vitro 試験法開発、神経毒性 in vitro 試験法開発）のいずれにおいても、中間評価時点として適切な成果が得られ、事業全体として問題ない進捗であると評価する。  
得られた成果の中で、最大5か所に遺伝子導入が可能な人工染色体ベクター

システム（MI-MAC ベクター）とそれを応用したハイスループットスクリーニング試験系の開発、腎臓様構造再構築に使用可能な腎幹/前駆細胞（mKS 細胞）を用いた腎臓様 3 次元構造体構築に関わる成果は、特に新規性が高いものと評価される。

（I 委員） 目標に対する成果の大枠は提示されている。

（J 委員） 課題を絞り込んだ研究成果としてみた場合、得られた価値は明確にある。科学の進歩という観点から考えた場合、論文 3 報について期待値はより高いが、実績としてある程度評価できる。

#### 【問題点・改善すべき点】

（F 委員） 多様な機序により毒性を惹起する種々の化学物質の毒性評価を可能にするために、毒性発現機序や各種のエンドポイントに関連した複数のマーカー遺伝子を指標として選定することが計画されているが、マーカー遺伝子の選定に関して、できるだけ早く具体的な戦略と計画を示した上で、研究を進めることが望ましい。

（H 委員） 成果の一部には、既存論文の追試や再現に止まる内容も散見され、事業全体の新規性およびインパクトの低下につながっていると判断される。既知・既存技術の再現および活用を行う場合は、その必要性和妥当性を十分に検討し、得られた成果が本事業の成果として適当となり得るための十分な付加価値を付与されることを希望する。

（I 委員） 評価の指標（到達点とその基準）に関して、やや不透明さがある。  
具体的な達成基準事項を提示し（メトリックス提示）、それに対する到達点（マイルストーン）を明記し達成度の妥当性を測るとより分かり易くなる。

（J 委員） 国際標準に向けて十分というにはまだかなり距離がある。



#### 4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

構築した毒性評価系に関しては、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価など、広範な範囲での活用が期待できる。また、遺伝子導入技術を用いた毒性評価の基盤技術に関しては、肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性のみならず、様々な毒性に応用可能であると考えられることから、高い波及効果が期待できる。

我が国主導型の国際標準化に向けた意図はシナリオとして十分示されている。

一方で、国際的な標準化については、ハイスループット性も含めて普及時の実際面での標準化の目線には未だ至っていない感があり、具体的なアクションも実施されているとはいえない。

国際標準化に向けて、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関する実現可能性などについての検討や、構築した評価系の妥当性判断の根拠となる指標や基準について明確に設定することが望ましい。

また、得られた成果の具体的な活用方法が明確ではないため、成果の具体的な体裁とその波及方法について、事業終了時点までの残り期間でより明確かつ戦略的に検討されることを希望する。

#### 【肯定的意見】

(F委員) キメラマウスを安定生産することで、構築した遺伝子導入細胞の安定供給が可能であり、今後、得られた細胞の普及にあたっての見通しが得られている。

構築した毒性評価系に関しては、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価など、広範な範囲での活用が期待できる。また、遺伝子導入技術を用いた毒性評価の基盤技術に関しては、他のマーカー遺伝子や、異なる細胞、培養系を使用することで、肝、腎、神経毒性のみならず、様々な毒性に応用可能であると考えられることから、本プロジェクトを通じて確立した基盤技術に関して、高い波及効果が期待できる。

(G委員) 現状のモデル系は標準化に潜在的な価値を有している。

(H委員) 得られた成果を国際標準とするための、具体的なシナリオの検討と国際的協調体制構築が既に実施されており、概ね妥当な対応が図られていると評価する。

(I委員) 我が国主導型の国際化への意図はシナリオとして十分示されている。ヒトへの外挿性への期待度は高い。

(J 委員) 現段階では研究レベルにあるため国際規格などへの対応はまだ遠いと考えられるが、波及効果は期待できる。

**【問題点・改善すべき点】**

(F 委員) 国際標準化を視野に入れて研究が計画されているものの、最新の技術に基づく、特殊な培養法が使用されていることから、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関する実現可能性などに懸念を感じる。国際標準化に向けて、こうした想定されるリスクを考慮した上で、今後の研究計画を検討することが望ましい。

国際標準化に向けて、構築した評価系の妥当性判断の根拠となる指標や基準が示されていないことから、プロジェクト内で可能な限り明確な基準を設定し、多数の化合物で構築した評価系の有用性や妥当性、適応基準などを評価することが望ましい。

(H 委員) 得られた成果の具体的な活用方法が明確ではない。すなわち、今回の事業の具体的な成果物は、技術、細胞、プロトコールのいずれであるのか、またこれら成果物をどのような手法にて一般に普及させる計画であるのかが、明確ではない。成果の波及効果を議論する上では、成果の具体的な体裁とその波及方法を論ずる必要があり、この部分は事業終了時点までの残り期間でより明確かつ戦略的に検討されることを希望する。

(I 委員) 国際的な標準化については、ハイスループット性も含めて普及時の実際面での標準化の目線には未だ至っていない感がある。

(J 委員) 公定化にむけた見通しは不明確で、具体的なアクションも実施されていないとはいえない。

## 5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

プロジェクトリーダー及びテマリーダーの強力なリーダーシップの下、各事業実施者は適切に研究事業を実施され、問題のない進捗を達成している。事業全体として研究開発マネジメントは適切に機能し、良い体制で事業が実施されていると評価する。

また、現状の技術の応用の観点から見た場合、課題設定は適切にされており、研究の切り口も納得性は高い。

研究の人的リソースの集め方も適切な選択がされており、個別技術の専門家を毒性評価の専門家がよくまとめている。

一方、構築した評価系を国際標準化し、広く普及させるためには、明確な計画と戦略を持って研究開発マネジメントを進めることが望ましい。

国際的な競争が激しい分野であるため、状況の変化に臨機応変に対応して、当該事業の研究分野内における立ち位置を継続的に再評価し、絶えずその必要性和先進性を担保しながら、随時計画の微修正を行いながら柔軟に事業を実施する体制を希望する。

資金配分・費用対効果については、具体的な解析からの詳細な検討事項として提示されるとより分かり易い

本プロジェクトの予算規模として、国際競争力という観点からは、このプロジェクトだけではEUのSEURATなどと比較すると小規模であり、競争力に資するというには十分とはいえない。

### 【肯定的意見】

(F委員) 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等に関して、適切かつ妥当であると判断できる。国民との科学・技術対話を積極的に実施し、プロジェクトの研究計画に反映している。

(G委員) 個別技術の専門家を毒性評価の専門家がよくまとめていると思う。

(H委員) プロジェクトリーダーおよびテマリーダーの強力なリーダーシップの下、各事業実施者は適切に研究事業を実施され、問題のない進捗を達成していると評価する。事業全体として研究開発マネジメントは適切に機能し、良い体制で事業が実施されていると評価する。

事業実施者の選定およびその研究開発能力、並びに研究資金の配分にも問題は無く、妥当であると評価する

(I委員) 概ね検討されている。

(J委員) 現状の技術の応用の観点から見た場合、課題設定は適切にされており、

研究の切り口も納得性は高い。研究の人的リソースの集め方も適切な選択がされていると考えられる。

**【問題点・改善すべき点】**

(F 委員) 国際代替法学会での Project 進捗の発表など、国際化や普及に向けての活動の取り組みに関して評価できるが、今後、構築した評価系を国際標準化し、広く普及させるためには、明確な計画と戦略を持って研究開発マネジメントを進めることが望ましい。

(H 委員) 当該分野は国際競争の激しい研究開発分野の 1 つであり、日進月歩で研究発展がみられ、状況が変化する分野である。状況の変化に臨機応変に対応して、当該事業の研究分野内における立ち位置を継続的に再評価し、絶えずその必要性和先進性を担保しながら、随時計画の微修正を行いながら柔軟に事業を実施する体制を希望する。

(I 委員) 資金配分・費用対効果については、具体的な解析からの詳細な検討事項として提示されるとより分かり易い

(J 委員) 本プロジェクトの予算規模として、国際競争力という観点からは、このプロジェクトだけでは EU の SEURAT\*などと比較すると小規模であり、競争力に資するというには十分とはいえない。

\*SEURAT (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) : in vivo 反復投与毒性試験の代替法の実現を目指す EU における産官学連携機関の活動

## 6. 総合評価

近年の科学技術を活用して新規の *in vitro* 毒性試験系を構築することは、極めて重要な研究テーマであり、国家政策上、極めて意義の高い取り組みであると評価できる。

また、我が国発の科学・技術導入が計られている点は魅力的であり、我が国が世界でリーダーシップをとる上でひとつの切り札となりうる研究と思われる。

現状の技術を出発点とし、まずは、実験動物レベルで確実に *in vivo* で発現する毒性を *in vitro* で評価できる系の構築を目指すという現実的な戦略は妥当であり、中間目標を適切に達成しながら問題なく実施されていると評価する。

また、本プロジェクトの成果は、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価での活用が期待でき、さらに、肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性以外の様々な毒性にも応用可能であると考えられることから、得られた研究成果は高い波及効果が期待できる。

一方、具体的な戦略と計画が示されておらず、残りのプロジェクト期間内に活用可能な評価系の構築することに関しての実現可能性に懸念を感じる。また、高度な培養法が使用されていることから、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関して懸念を感じる。

本事業の先進性と必要性、並びに優位性をさらに強固に対外的に示すためにも、各個別要素技術開発において、核となる成果の更なる充実を希望する。

また、国際的標準化、手法の一般化、ハイスループット性の獲得には一層の努力が必要である。

さらに、標準化までの道筋を研究以外の観点からも計画すべきであり、今後の事業戦略の構築に期待したい。

### 【肯定的意見】

(F 委員) 上述の通り、近年の科学技術を活用して新規の *in vitro* 毒性試験系を構築することは、極めて重要な研究テーマであり、独創的かつ革新性の高い人工染色体ベクターを活用した遺伝子導入技術を基盤とした *in vitro* 毒性評価系の基盤を構築することは、国家政策上、極めて意義の高い取り組みであると判断できる。

動物とヒトの毒性感受性に関する種差の壁に関しては、本プロジェクトの研究成果のみでは克服できないであろう大きな課題が残ることが推察されるが、まずは、実験動物レベルで確実に *in vivo* で発現する毒性を *in vitro* で評価できる系の構築を目指すという現実的な戦略は、現時点の科学技術においては妥当であり、合意できる。こうした背景のもと研究が進められ、これまで、*in vitro* 試験法の構築に向けての基盤技術の開発が着実に進捗しており、中間評価時点で設定された目標と、その到達度に関して高く評価できる。

また、ES細胞からの分化が必要となる神経毒性評価系を除き、キメラマウス由来の動物臓器からの細胞を用いた *in vitro* 評価系の構築を進めていることから、遺伝子導入細胞の安定供給も見込める。また、構築した毒性評価系に関しては、医薬品や化粧品など、化学物質以外の毒性評価での活用が期待でき、本プロジェクトを通じて確立した基盤技術に関しても、マーカー遺伝子や、細胞、培養系を変更することで、肝、腎、神経以外の毒性のみならず、様々な毒性に応用可能であると考えられることから、本プロジェクトを通じて得られる研究成果に高い波及効果が期待できる。

(G委員) わが国が世界でリーダーシップをとる上でひとつの切り札となりうる研究と思う。是非、掲げた目標を達成していただきたい

(H委員) 事業全体としては、当初計画に沿って、中間目標を適切に達成しながら問題なく実施されていると評価する。現在のペースをさらに加速して、最終目標達成に向けてさらに事業を推進していただくことを望む。

(I委員) 我が国発の科学・技術導入が計られている点は魅力的である。

(J委員) 技術開発の観点から現状の技術を出発点とした場合に研究テーマ設定の方向性は適切であり、得られた技術的進歩も評価できる。技術の波及性も期待ができ、今後のさらなる進展が望まれる。また現状の人的リソースの活用についても適切な選択がされている。

#### 【問題点・改善すべき点】

(F委員) 多様な機序により毒性を惹起する種々の化学物質の毒性評価を可能にするために、毒性発現機序や各種のエンドポイントに関連した複数のマーカー遺伝子を指標として選定することが計画されているが、マーカー遺伝子の選定に関して、具体的な戦略と計画が示されていないことから、残りのプロジェクト期間内に活用可能な評価系の構築することに関しての実現可能性に懸念を感じる。また、国際標準化を視野に入れて研究が計画されているものの、高度な培養法が使用されていることから、データの再現性や施設間差、培養技術の普及に関しても懸念を感じる。

(H委員) 本事業の先進性と必要性、並びに優位性をさらに強固に対外的に示すためにも、各個別要素技術開発において、核となる成果の更なる充実を希望する。また、得られた成果を一般に還元するための、より具体的な標準化戦略

の策定を希望する。

(I 委員) 新規科学的技術導入に相反して、国際的標準化、手法の一般化、ハイスループット性の獲得には一層の努力が必要と考える。

(J 委員) 到達点から考えると、事業としての目標到達点が明確でなく、事業戦略については戦略性をもっと考慮すべきと考える。公定化を目標とすることは国際競争力の観点からも必須であり、公定化までの道筋を研究以外の観点からも計画すべきである。今後の戦略構築に期待したい。

## 7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

○肝毒性、腎毒性に関しては、公共のデータベースにある遺伝子発現変動データを積極的に活用し、メカニズムベースで活用可能な適切なマーカー遺伝子を選択することを期待する。

○毒性学的な視点での評価系の意義をより一層高めるためにも、外部からの専門家を交えて、マーカー遺伝子の選定を戦略的に進めることを推奨したい。

○選定したマーカー遺伝子に関して、遺伝子導入を進める前に、本プロジェクトで採用している培養条件と同一環境下で、毒性発現に関連した誘導を確認できるかどうかを事前に確認することで、より確度の高いマーカー遺伝子の選定と効率的な試験系（遺伝子導入細胞）の構築が可能になると考えられる。

○構築した新規試験系の成功要因を確認するためにも、従来型の2D培養条件での導入遺伝子の有用性評価を行うなど、複数の条件のデータを比較することを推奨したい。

○地方の研究コンソーシアムを積極的に支援することはわが国の発展という意味で非常に意義深いため、目利きの人材を活用し、地方に根ざした優れた個別技術を国レベルの研究に組み入れることが重要と考える。

○他の事業、特にヒトiPS細胞を応用した類似研究と対比して、マウス細胞を用いた技術体系を構築していくことの必要性和優位性が十分に示されることを望む。

○本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。

○国際的標準化を目指すためのハードルが何であるかを提示し、それを超えるための手立てを明示する。

○個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。

○他の関連活動との連携を活発にし、全体として本活動が標準手法として融和できるような体制を取れる方策を考慮しておくが良い。

○EUの枠組みを最大限に利用し、日本が国際競争力を示していくためにも他国に先駆けて、まだルールのないところにいち早くルールを作り、いいポジションを得られるような展開を期待したい。

### 【各委員の提言】

(F委員) 化学物質による毒性発現の機序は複雑かつ多様であることから、こうした様々な機序に基づいて発現する *in vivo* の全ての毒性（エンドポイント、pathway ベースでのメカニズム）を、限られたマーカー遺伝子を指標とした単一の *in vitro* 評価系で高精度に評価することに対して困難が生じることが予想される。近年、リスクとなり得る特定の毒性メカニズムに関して、メカニズムベースで影響の有無を簡便に評価できる *in vitro* の試験系の構築を進めるとともに、複数の指標の組み合わせによる毒性評価の精緻化に注力



されている。今後、メカニズムベースで影響の有無を簡便に評価できる *in vitro* の試験系の構築にあたり、マーカー遺伝子の選定を戦略的に行い、プロジェクトを実行していくことが望ましい。

肝毒性、腎毒性に関しては、Toxicogenomics Informatics Project や欧米の Toxicogenomics 研究を通じて、公共のデータベースに多数の化合物の遺伝子発現変動データが取得されており、これらの情報を積極的に活用し、メカニズムベースで活用可能な適切なマーカー遺伝子を選択することを期待する。今後、毒性学的な視点での評価系の意義をより一層高めるためにも、プロジェクトメンバー内のみならず、研究推進委員会など、外部からの専門家を交えて、マーカー遺伝子の選定を戦略的に進めることを推奨したい。また、選定したマーカー遺伝子に関して、遺伝子導入を進める前に、本プロジェクトで採用している培養条件と同一環境下で、毒性発現に関連した誘導を確認できるかどうかを事前に確認することで、より確度の高いマーカー遺伝子の選定と効率的な試験系（遺伝子導入細胞）の構築が可能になると考えられる。

肝、腎細胞の 3D 培養、ES 細胞からの神経細胞分化など、近年の優れた培養技術の成果を取り入れて試験系の構築を検討することは極めて高い研究意義を有すると考えるが、培養系のスループット性や汎用性、得られるデータの再現性等を考慮すると、国際標準化を目指す上では、可能な限り使用する培養系を簡便化することが望ましいのも事実である。本プロジェクトでは、3D 培養以外にも、遺伝子導入によるマーカー遺伝子の安定発現、発光ベクターを活用することによる発光指標の安定性、正確な細胞毒性評価、など、様々な新規技術を活用した新規試験系の構築を進めている。構築した試験系の成功要因を確認するためにも、今後、こうした新規技術のすべてを複合的に組み込んだ条件単一での試験結果のみならず、従来型の 2D 培養条件での導入遺伝子の有用性評価を行うなど、複数の条件のデータを比較することを推奨したい。

(G委員) 鳥取大学の人工染色体技術のように地方の研究コンソーシアムを積極的に支援することはわが国の発展という意味で非常に意義深いと思う。目利きの人材を活用し、地方に根ざした優れた個別技術を国レベルの研究に組み入れることが重要と考える。

(H委員) 重要な研究課題でかつ国際競争の激しい分野で、確実に成果を上げている研究グループの努力と情熱に心より敬意を示したい。今後も更に本事業が計画通り実施され、より完成度の高い多くの成果が得られることを期待する。

数多くの先進性に富む要素技術開発を実施されているが、ヒト iPS 細胞の当該分野への応用が検討されつつある現在に至っては、マウス細胞を用いた技術体系を構築していくことの必要性和優位性が十分に示されていない印象がある。他の事業、特にヒト iPS 細胞を応用した類似研究と対比して、本事業の特徴を十分に示し、その重要性を示し得る説得力に富む数多くの成果が今後の残り期間で得られることを望む。

(I 委員) 本活動の出口(成果)について、焦点を明確にする。

国際的標準化を目指すためのハードルが何であるかを提示し、それを超えるための手立てを明示する。

個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。

個々の手法毎のハイスループット性を考慮する事は必要であるが、全体としてのハイスループット性(in vivo に対する)については、それ程追及する努力はいらないと考える。それより標準化の方が重要で、かつヒトへの外挿性を強調できる系の提示が良いと考える。

他の関連活動(NEDO、REACH など)との連携を活発にし、全体として本活動が標準手法として融和できるような体制を取れる方策を考慮しておくが良い。

(J 委員) 国際競争力という観点で考えると、EU は OECD や ISO などを国際標準という形にしたビジネスモデルを展開している。ルールを作って広めること自体もビジネスにしているが、さらに自らに都合のいいルールを作って、他国に対して有利なポジションをつくるというやり方までもすっかり定着してしまい、既定路線となってしまった。ここに日本が対抗するにもルールを作るビジネスモデルを作るには遅すぎ、新しく国際的な巻き込みを作り上げることは並大抵のことではない。そうであれば、現在の枠組みを最大限に利用するほうが近道であり、得策であろう。EU の枠組みを最大限に利用し、日本が国際競争力を示していくためにも他国に先駆けて、まだルールのないところにいち早くルールを作り、いいポジションを得ることと考える。このプロジェクトもそのような展開を期待したい。



## 第4章 評点法による評点結果

## 第4章 評点法による評点結果

「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」に係るプロジェクト評価の実施に併せて、以下に基づき、本評価検討会委員による「評点法による評価」を実施した。その結果は「3. 評点結果」のとおりである。

### 1. 趣 旨

評点法による評価については、産業技術審議会評価部会の下で平成 11 年度に評価を行った研究開発事業（39 プロジェクト）について「試行」を行い、本格的導入の是非について評価部会において検討を行ってきたところである。その結果、第 9 回評価部会（平成 12 年 5 月 12 日開催）において、評価手法としての評点法について、

(1) 数値での提示は評価結果の全体的傾向の把握に有効である、

(2) 個々のプロジェクト毎に評価者は異なっても相対評価はある程度可能である、との判断がなされ、これを受けて今後のプロジェクト評価において評点法による評価を行っていくことが確認されている。

また、平成 21 年 3 月 31 日に改定された「経済産業省技術評価指針」においても、プロジェクト評価の実施に当たって、評点法の活用による評価の定量化を行うことが規定されている。

これらを踏まえ、プロジェクトの中間・事後評価においては、

(1) 評価結果をできる限りわかりやすく提示すること、

(2) プロジェクト間の相対評価がある程度可能となるようにすること、

を目的として、評価委員全員による評点法による評価を実施することとする。

本評点法は、各評価委員の概括的な判断に基づき点数による評価を行うもので、評価報告書を取りまとめる際の議論の参考に供するとともに、それ自体評価報告書を補足する資料とする。また、評点法は研究開発制度評価にも活用する。

### 2. 評価方法

- ・各項目ごとに4段階（A（優）、B（良）、C（可）、D（不可）〈a, b, c, dも同様〉）で評価する。
- ・4段階はそれぞれ、A（a）= 3点、B（b）= 2点、C（c）= 1点、D（d）= 0点に該当する。
- ・評価シートの記入に際しては、評価シートの《判定基準》に示された基準を参照し、該当と思われる段階に○を付ける。
- ・大項目（A, B, C, D）及び小項目（a, b, c, d）は、それぞれ別に評点を付ける。
- ・総合評価は、各項目の評点とは別に、プロジェクト全体に総合点を付ける。

### 3. 評点結果

#### 評点法による評点結果

#### B. 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 (肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発)

	評点	F 委員	G 委員	H 委員	I 委員	J 委員
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	2.80	3	3	2	3	3
2. 研究開発等の目標の妥当性	2.20	2	3	2	2	2
3. 成果、目標の達成度の妥当性	2.20	2	2	2	2	3
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	1.40	2	1	1	2	1
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	1.60	2	2	2	2	0
6. 総合評価	2.40	2	3	2	2	3

