

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
(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)」
終了時評価(事後評価)検討会
資料5

(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)

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 研究開発プロジェクトの概要

平成28年10月31日

製造産業局化学物質管理課

目次

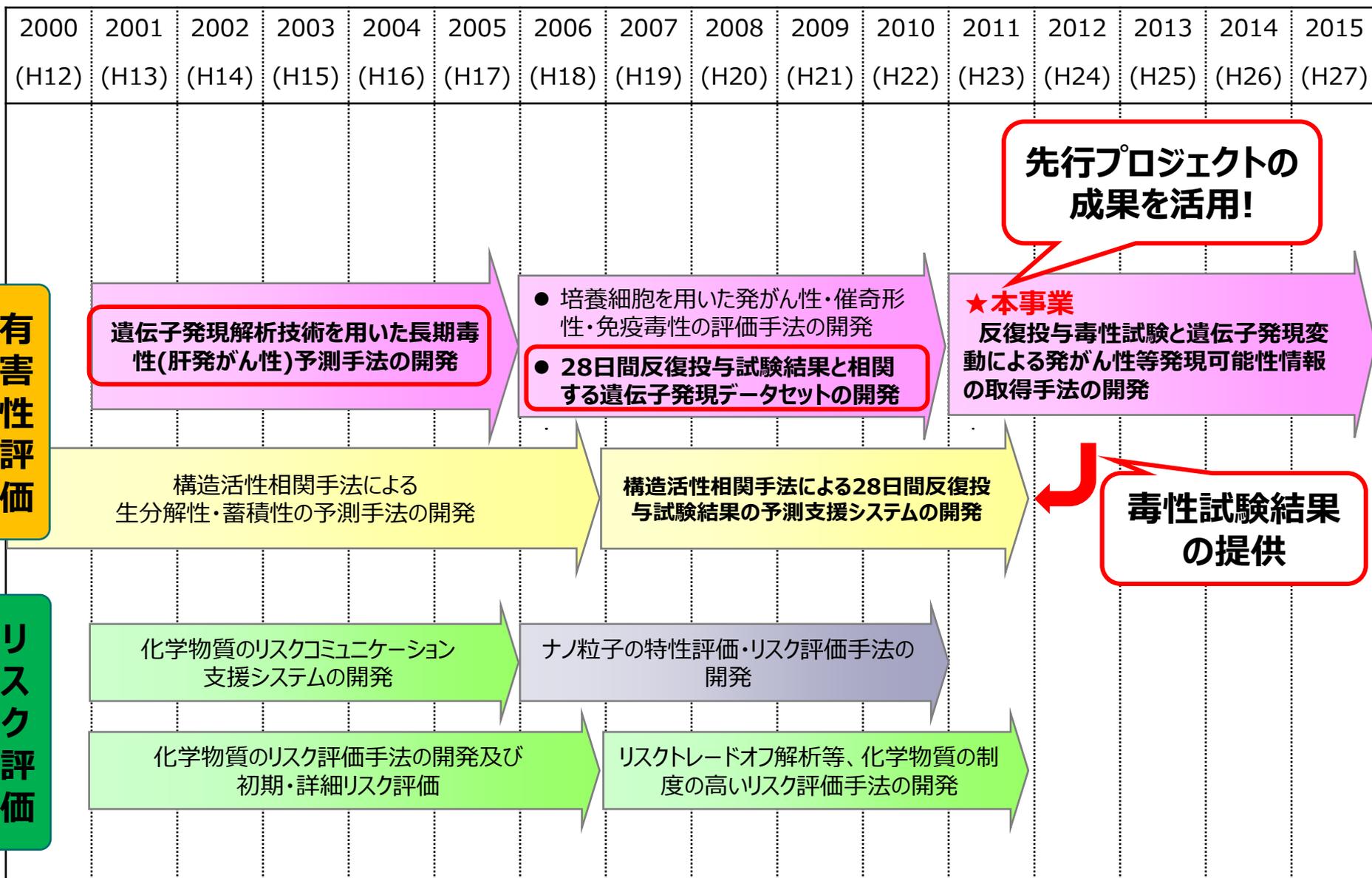
1. 事業の概要
2. 事業アウトカム
3. 事業アウトプット
4. 当省（国）が実施することの必要性
5. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ
6. 研究開発の実施・マネジメント体制等
7. 費用対効果
8. 事前及び中間評価の結果

1.事業の概要

1.事業の概要

<p>概 要</p>	<ul style="list-style-type: none"> ◆事業の目的：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による評価技術の確立を目的とする。 ◆事業概要：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。
<p>実施期間</p>	<p>平成23年度～平成27年度（5年間）</p>
<p>実施形態</p>	<p>国からの直執行 (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への委託事業)</p>
<p>予算総額</p>	<p>7.5億円 (平成23年度：1.8億円 平成25年度：1.5億円 平成27年度：1.2億円)</p>
<p>実施者</p>	<p>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</p>
<p>プロジェクトリーダー</p>	<p>小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全性予測評価部 室長</p>
<p>テーマリーダー</p>	<p>今田中 伸哉 一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所所長</p>

過去のプロジェクトとの関連性



研究開発の背景



原油



精製物



石油製品

石油精製物の暴露



現状

多様な毒性エンドポイントを、効率的に検出できる評価手法がない

多様な毒性エンドポイント

問題点

どのようにして効率的に有害性情報を得るか？

解決すべき課題



亜急性毒性試験
(反復投与)



がん原性試験



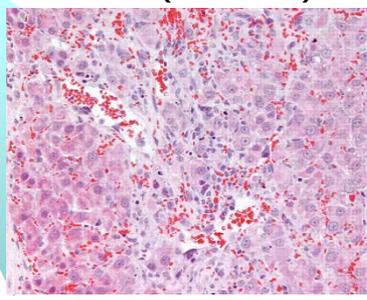
神経毒性試験

課題1 毒性エンドポイントに応じて、複数の動物実験が必要

- ・化学物質開発において、コスト/試験期間の長さが足かせに
→できるだけ少なくできないか？

課題2 行政利用されている既存の試験を有効活用できないか？

- ・化審法 (日本) やREACH (欧州) では、スクリーニング毒性試験として、28日間反復投与試験が数多く実施されている



肝臓 (HE染色)

物質A、28日間反復投与

課題3 発がん性のような長期毒性を、スクリーニング毒性試験 (28日間投与) で検出できるのか？

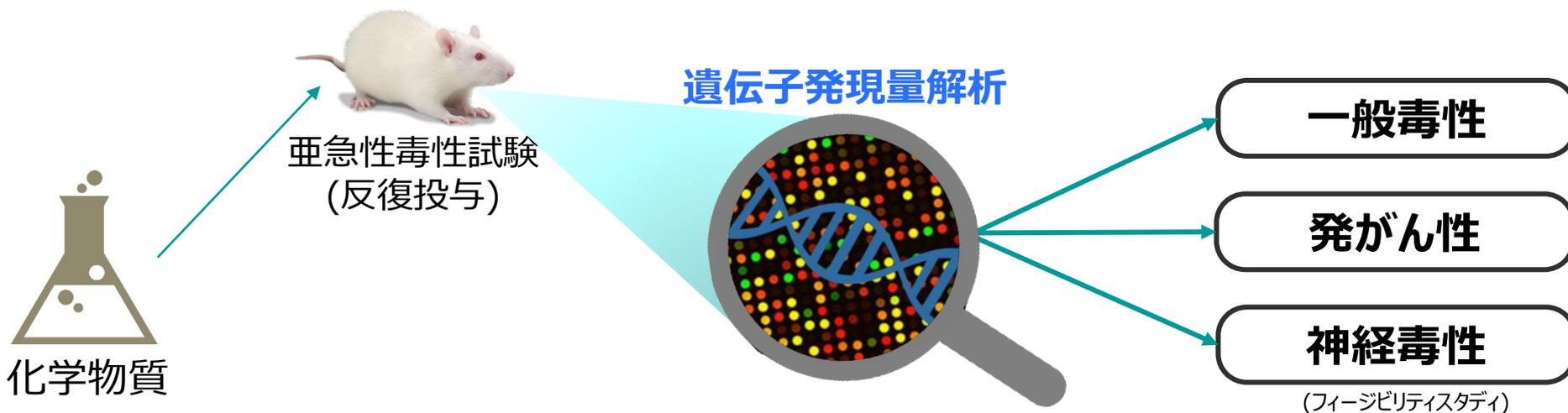
- ・病理所見などの従来の検査項目では、28日間反復投与試験で発がん等の長期毒性の所見は検出できない

毒性影響に関連した初期応答を、
遺伝子発現量の変化等で捉えられれば、
長期毒性等の複数の毒性を短期間で検出できるのでは？

研究目的及び目標

〔チャレンジ〕

- ・単一の毒性試験（28日間反復投与試験）から複数の毒性を検出できないか？ → **迅速かつ効率的**
- ・従来法は評価できなかった毒性を検出できないか？ → **高度化**



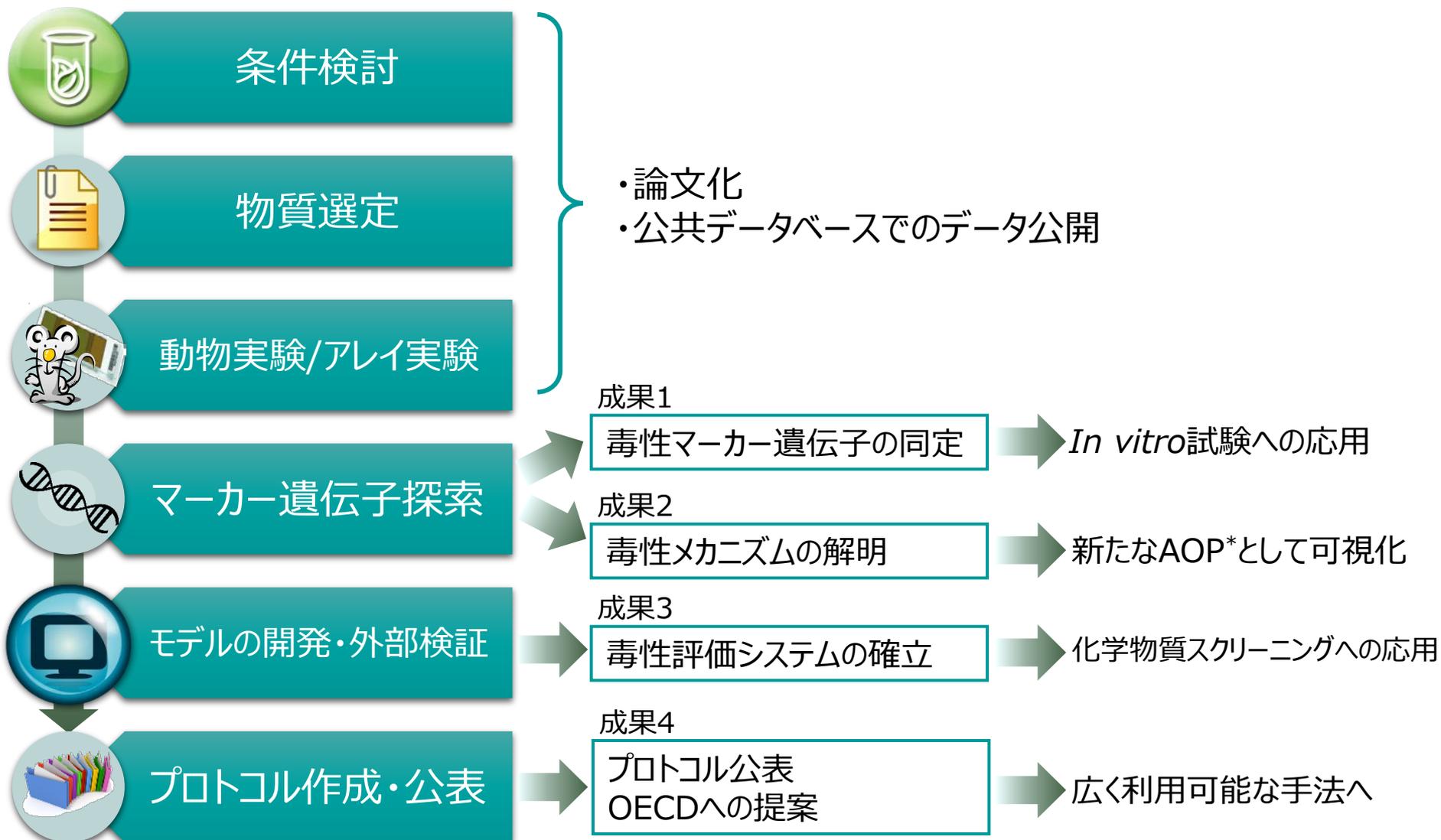
〔本研究の目的〕

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。

〔目標〕 28日間反復投与試験の遺伝子発現変動データを活用して
複数の有害性を予測できる手法を開発する

研究開発の流れ

■ 実施項目と成果/波及効果のイメージ



*AOP : Adverse Outcome Pathway

外部有識者からの意見収集 → 実施内容に反映

- 研究推進委員会の開催 (2回/年×5年)
※さらに、個別訪問によって実験プロトコール等への助言をいただいた (4回)

研究推進委員会 (五十音順) [年2回開催; 計10回]

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	日本バイオアッセイ研究センター

- トキシコゲノミクスプロジェクト関係者との意見交換会 (1回)
 - 日本化学工業協会 (日化協) 関係者との意見交換 (1回)
- 国際標準化のためには
より簡易な手法開発が
必要との指摘
⇒ **定量PCR法開発へ**
(SL29~30)
- 病理学者 (今井清氏) との毒性メカニズムに関わる議論/考察 (5回)
⇒ **毒性メカニズムをAOPとして整理・可視化**
(SL17~18)

実施項目

★中間評価での指摘事項への対応

	1.一般毒性		2.発がん性		3.神経毒性
	肝臓	腎臓	肝臓	腎臓	脳
条件検討	(先行プロジェクトで構築済み)	採材法の構築	(先行プロジェクトで構築済み)	(一般毒性と共通)	固定法の改良
	麻酔法の影響データ取得				
		部位別データ		(一般毒性と共通)	部位別データ
物質選定	高品質な遺伝子発現量データの蓄積				
動物試験/アレイ実験					
マーカー遺伝子探索	★外部有識者と連携		★外部有識者と連携		
	マーカー候補選定		簡易法のための最小遺伝子選定	マーカー候補選定	
モデル開発・外部検証	モデル構築			モデル構築	
★TGP関係者や日化協との意見交換	外部検証				
			簡易手法構築・検証		
プロトコルの作成・公表	プロトコルの作成・公表				
			★標準化に向けた活動		
			OECDへの提案 Preliminary SPSF提出		

条件検討

〔研究開発の流れ〕



条件検討



物質選定



動物実験/アレイ実験



マーカー遺伝子探索



モデルの開発・外部検証



プロトコル作成・公表

■ 〔神経毒性〕脳部位採材の開発

【結果】メカーン固定法で海馬、帯状回、脳梁、小脳を部位別に採取でき、RNA分解も最小限にできた *Akane., et al (2013) J Toxicol Sci. 38(3): 431-443.

■ 〔一般毒性/発がん性〕腎臓の採取方法



【結果】部位間比較で、約8割の遺伝子の発現量に有意差がついた

【結論】基礎データ収集のために部位別でアレイ実験を行う *Saito., et al, submitted

■ 〔全般〕麻酔法の検討

【結果】CO₂/O₂混合麻酔とイソフルラン麻酔では、一部の遺伝子で発現量に差がみられた (肝・腎・脳それぞれで)

【結論】発現レベルに差があった遺伝子はマーカー候補から除外する

*Yamashita., et al (2015) J Toxicol Sci. 40(6): 829-836.

ポイント：標準化に向けた基礎検討

高品質な遺伝子発現量データの取得



〔一般毒性/発がん性〕1～28日間反復投与試験

- ✓ TG407 (OECD) 及び化審法に定める28日間反復投与毒性試験に準拠
 - CrI:CD(SD) ラット、雄
 - 3群 (媒体、低用量、高用量)
 - 4時点 (1、7、14、及び28日間投与)
- ✓ 32物質* *動物実験としては35試験 (麻酔法、投与経路が異なる)

HESS/HESS-DB ※前PJ (2006～2010年) で開発

有害性評価支援システム統合プラットフォーム (Hazard Evaluation Support System Integrated Platform)

2015年7月に動物実験データを公開

http://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess_update.html

〔一般毒性/発がん性〕網羅的な遺伝子発現量解析

- ✓ DNAマイクロアレイを使用
(安価かつ再現性の高いデータを取得可能)
- ✓ 幅広いデータから特異的な毒性マーカーを探索
→ 堅牢な毒性モデル開発へ
- ✓ 毒性メカニズムを解明するため、網羅的なデータを蓄積



Agilent Whole Rat
Genome Toxplus Array

3,636アレイ × 61,453プローブ (遺伝子) = 233Mデータ

論文文化に伴って順次データを公開中

ポイント：高品質な動物試験及びマイクロアレイデータの取得及び公開

一般毒性（肝毒性・腎毒性） 毒性モデルの開発

〔一般毒性〕 毒性マーカー遺伝子の選定



様々な改良を重ねて…

〔最適なマーカー遺伝子〕

統計学的：遺伝子発現プロファイルの数値解析

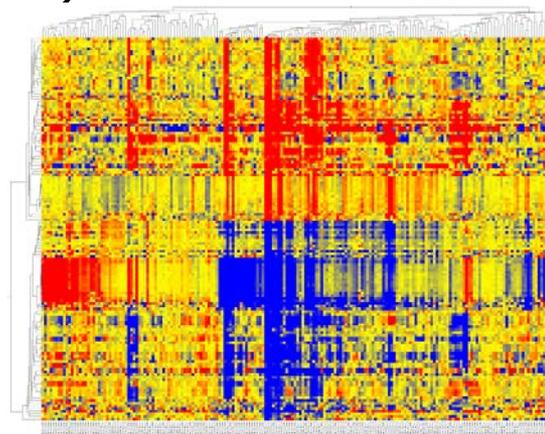
+

生物学的：メカニズム関連遺伝子

〔一般毒性〕 毒性マーカー遺伝子の選定

← 毒性マーカー遺伝子の選定
(統計学的) →

1) 階層的クラスタリング



- ・遺伝子発現パターンから化合物を分類
- ・全データを一度に解析
(1~28日の4時点、低/高用量)

⇒ 第一次候補

2) ベン図解析



- ・化合物グループ内で共通して変動した遺伝子に絞り込む

⇒ 第二次候補

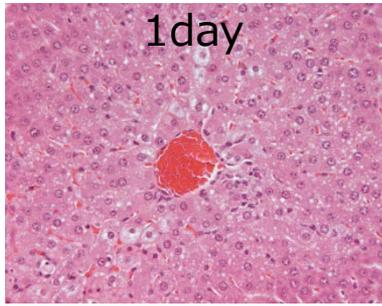
毒性判定システム

MoA/AOP
で選定された遺伝子 = 生物学的

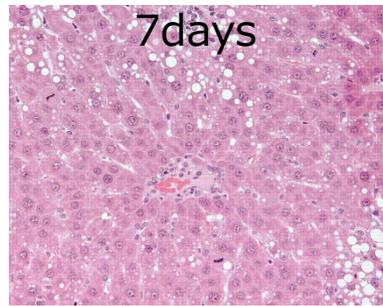
ポイント：統計学的+生物学的な遺伝子を選定することで、より堅牢なシステムへ

〔一般毒性〕 毒性メカニズムの解析 (MoA/AOP)

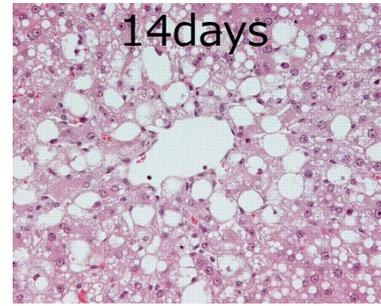
■ ケーススタディ：四塩化炭素 (100 mg/kg/day)



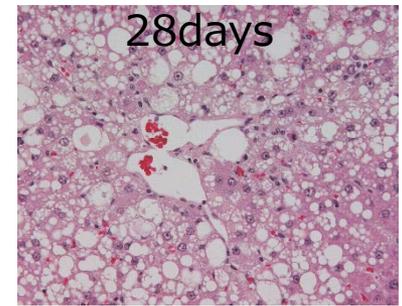
1day



7days



14days



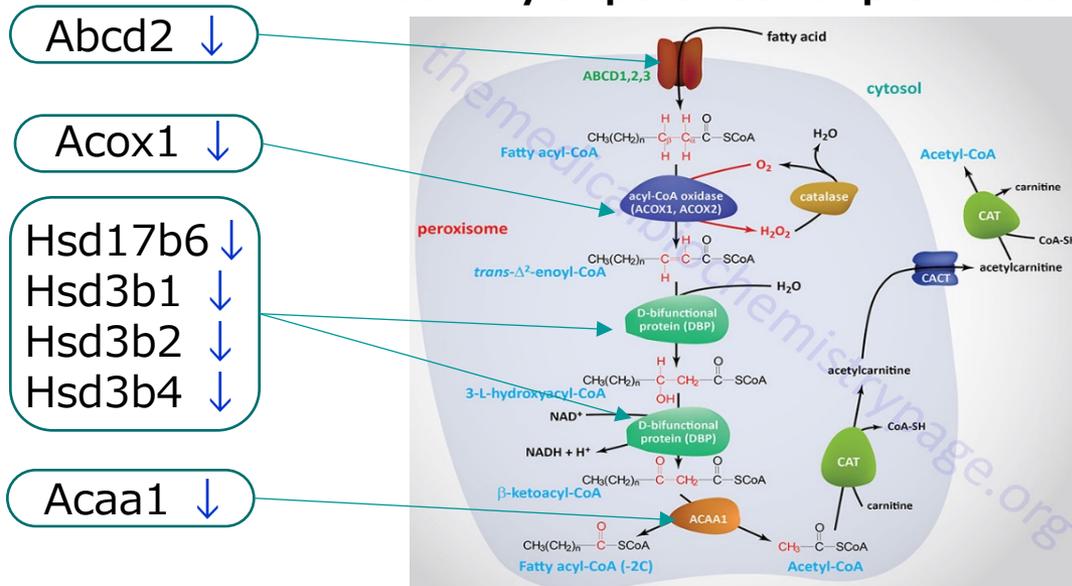
28days

GEX*

- Cholesterol biosynthesis (↑)
- Fatty Acid β-Oxidation(↓)
- Fatty Acid metabolism (↓)
- Transport of lipid (↓)
- Bile Acid Biosynthesis (↓)
- Fatty Acid metabolism (↓)
- Transport of lipid (↓)
- Cleavage of lipid (↓)
- Fatty Acid metabolism (↓)
- Transport of lipid (↓)
- Cleavage of lipid (↓)

*媒体対照群に対して有意に変動した遺伝子

Pathway of peroxisomal β-oxidation



Transport of lipids

- ApoA4 ↓
- ApoA5 ↓
- ApoE ↓
- ApoH ↓
- Fabp7 ↓
- Slc27A5 ↓

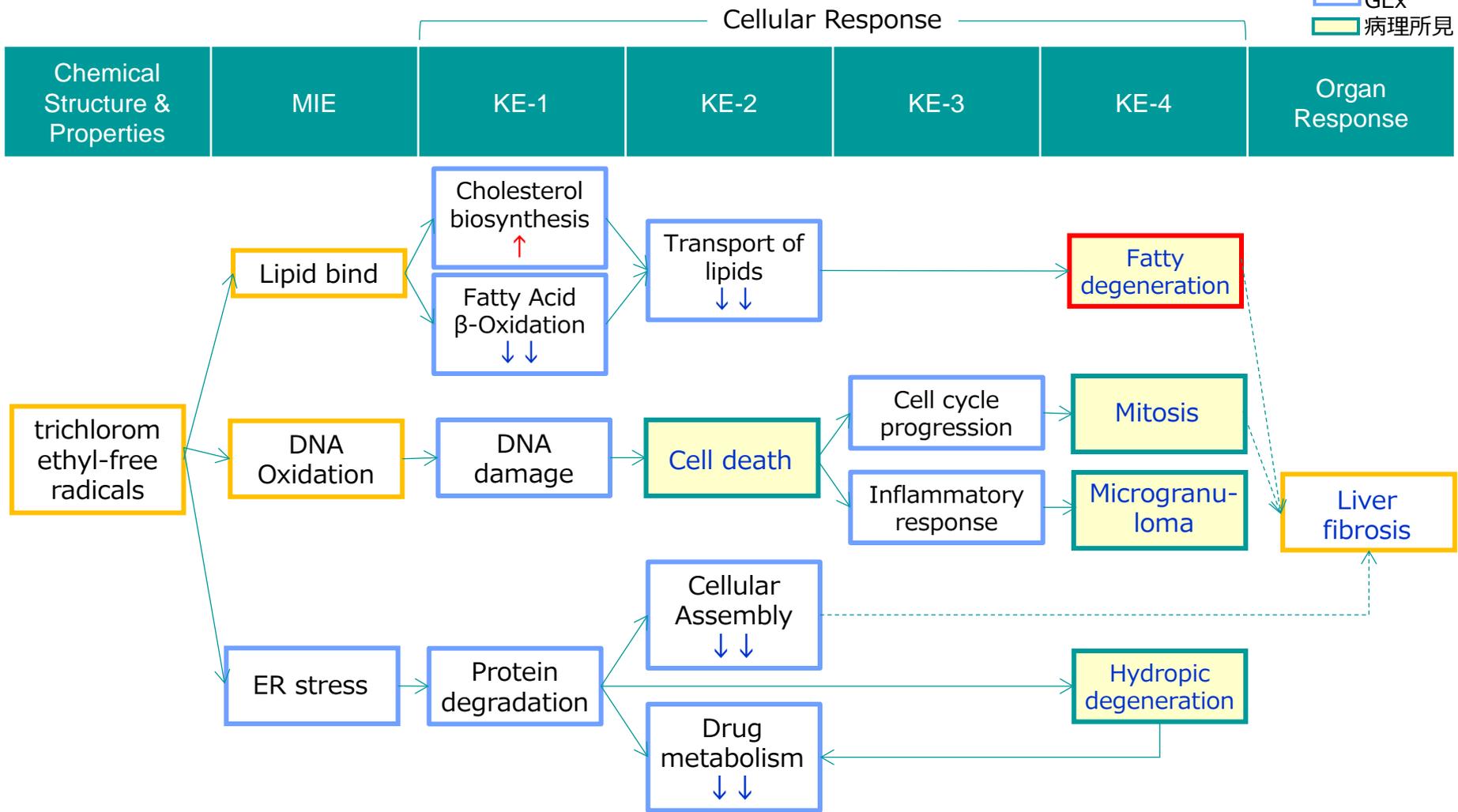
脂肪酸の取り込みから、
脂肪代謝、細胞外への輸送まで
一連の遺伝子群が発現抑制

<http://themedicalbiochemistrypage.org/fatty-acid-oxidation.php>

〔一般毒性〕 毒性メカニズムの解析 (MoA/AOP)

■ ケーススタディ：四塩化炭素

論文情報
GEx
病理所見



ポイント： 各症状との関連性が高い遺伝子群 → 『メカニズム関連遺伝子』として判定システムに利用

〔一般毒性〕 選定された毒性マーカー数(まとめ)

HESS-DBで出現頻度の高い所見に着目

統計学的+分子生物学的に選定

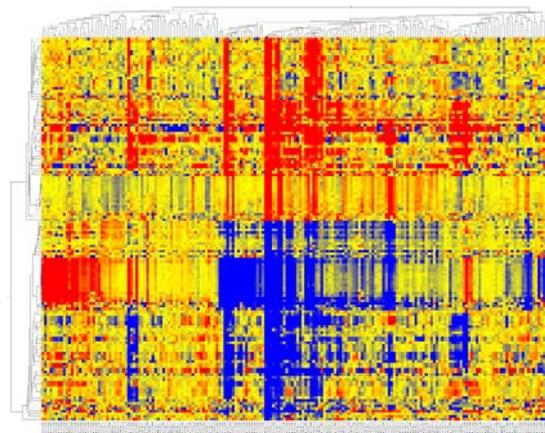
	#	毒性症状		候補 (プローブ数)	判別式 (最適条件)	陽性物質名
肝臓	1	小葉中心性	肝細胞脂肪変性	73	→ 8	BDCM、BDCM_I、DMN、CCl ₄
	2	小葉周辺性		106	→ 36	ADBAQ、TBBC
	3	—	単細胞壊死	148	→ 14	BDCM、BDCM_I、DMN、ADBAQ
	4	小葉中心性	肝細胞肥大	50	→ 24	o-NA、o-AH、AQ、TBBC
	5	びまん性		75	→ 18	o-NA、ADBAQ、TCP
腎臓	1	皮質・尿細管	空胞変性	67	→ 3	BDCM、BDCM_I
	2	皮質・尿細管	核大小不同	87	→ 4	DMN*
	3	皮質・尿細管	核濃縮	8	→ 4	BDCM、BDCM_I、TBA
	4	髄質外帯・尿細管	単細胞壊死	20	→ 10	TBBC、CP(gav)、CP(iv)
	5	乳頭	壊死/鉍質沈着	37	→ 9	o-AH、Na3-NTA-H2O

*対象の陽性物質数が少ないため、個体別データで解析した。

〔一般毒性〕 毒性判別式の構築



1) 階層的クラスタリング



- ・遺伝子発現パターンから化合物を分類
- ・全データを一度に解析 (1~28日の4時点、低/高用量)

⇒ 第一次候補

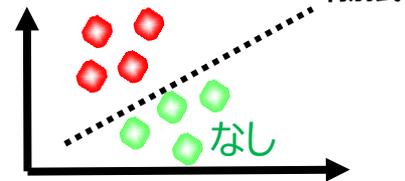
2) ベン図解析



- ・化合物グループ内で共通して変動した遺伝子に絞り込む

⇒ 第二次候補

毒性あり



SVM

(Support Vector Machine)

- ・最適条件の遺伝子セットを用いて、毒性あり/なしを判定する

MoA/AOP
で選定された遺伝子 = 生物学的

〔一般毒性〕 毒性判定結果の可視化

複数の毒性症状の判定結果をどのように評価につなげるか？

- ✓判定結果を定量的に提示！
- ✓毒性の特徴も（可能な範囲で）明らかにする

条件検討

物質選定

動物実験/アレイ実験

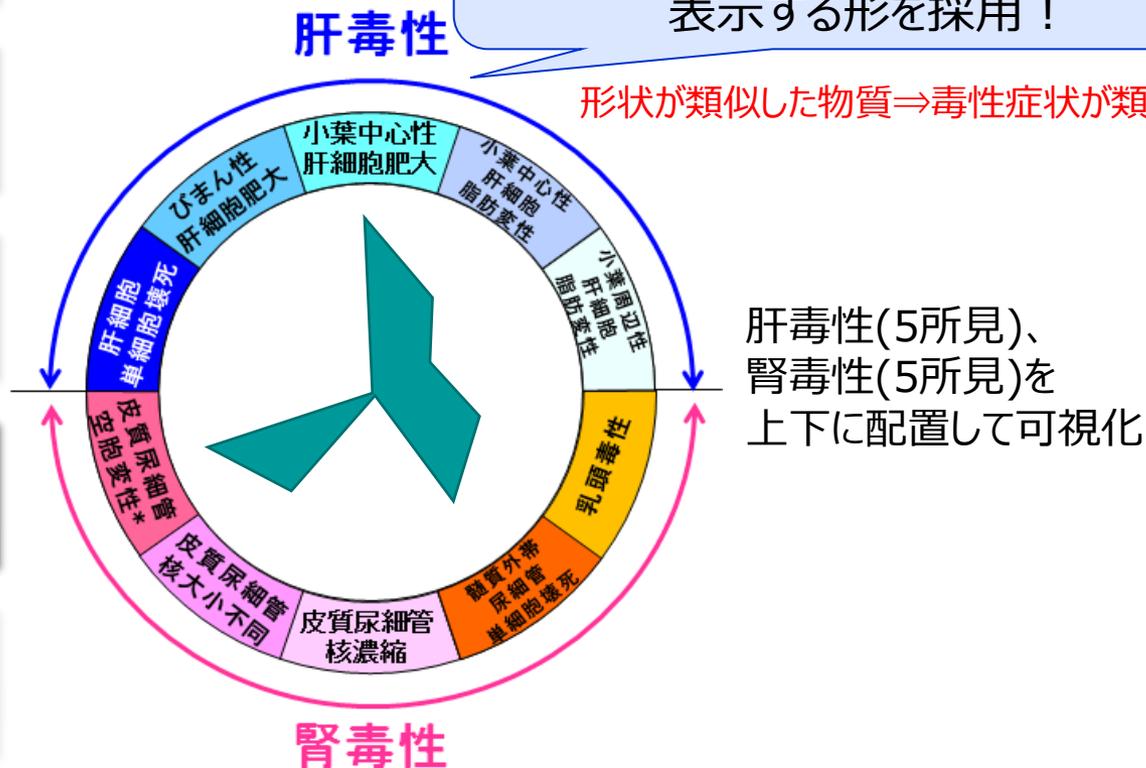
マーカー遺伝子探索

モデルの開発・外部検証

プロトコル作成・公表

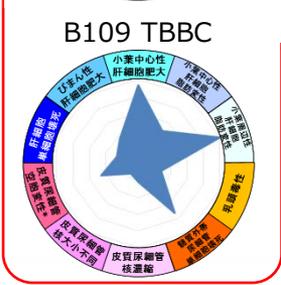
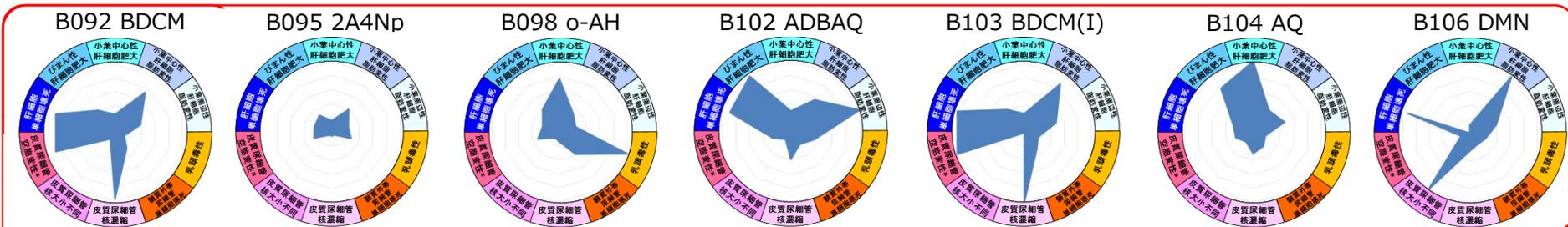
ポイント：レーダーチャートで
複数の毒性症状を一度に
表示する形を採用！

形状が類似した物質⇒毒性症状が類似

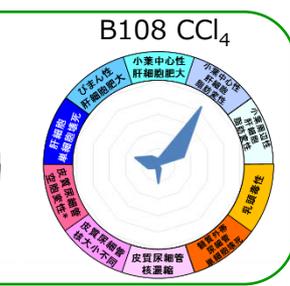
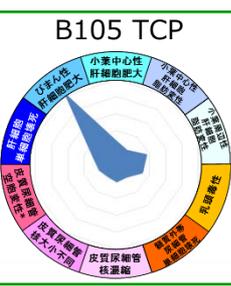
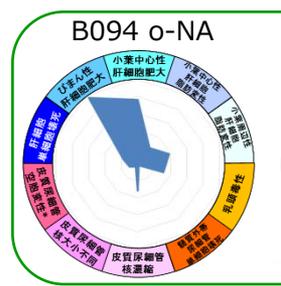
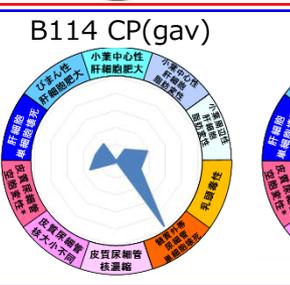
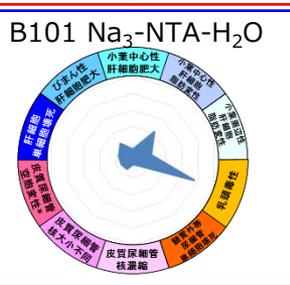
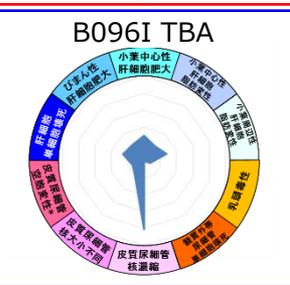
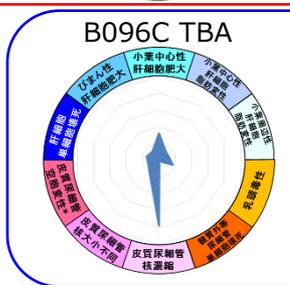


〔一般毒性〕 判定結果 (25試験)/ トレーニングデータ

肝毒性:有、腎毒性:有 (8)

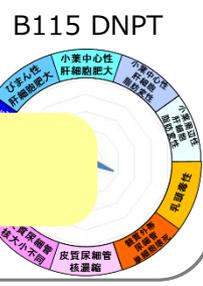
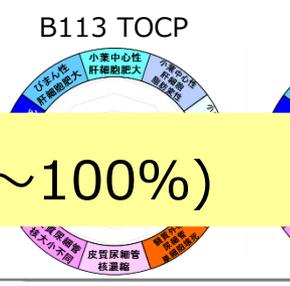
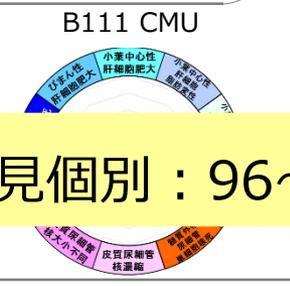
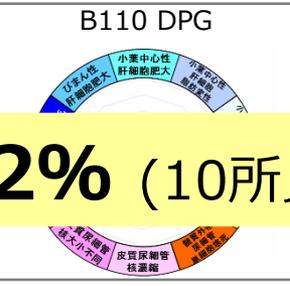
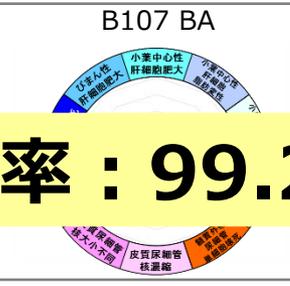
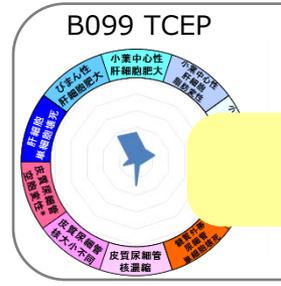
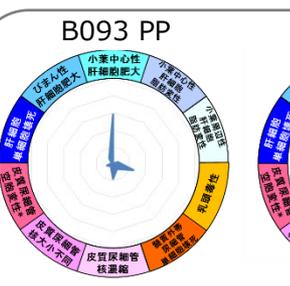


肝毒性:無
腎毒性:有
(5)



肝毒性:有
腎毒性:無
(3)

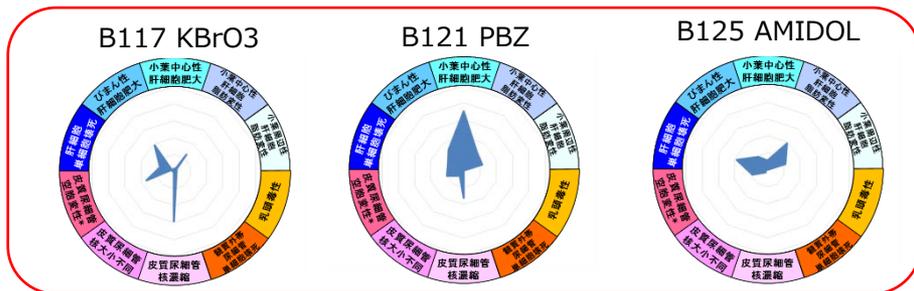
肝毒性:無
腎毒性:無
(9)



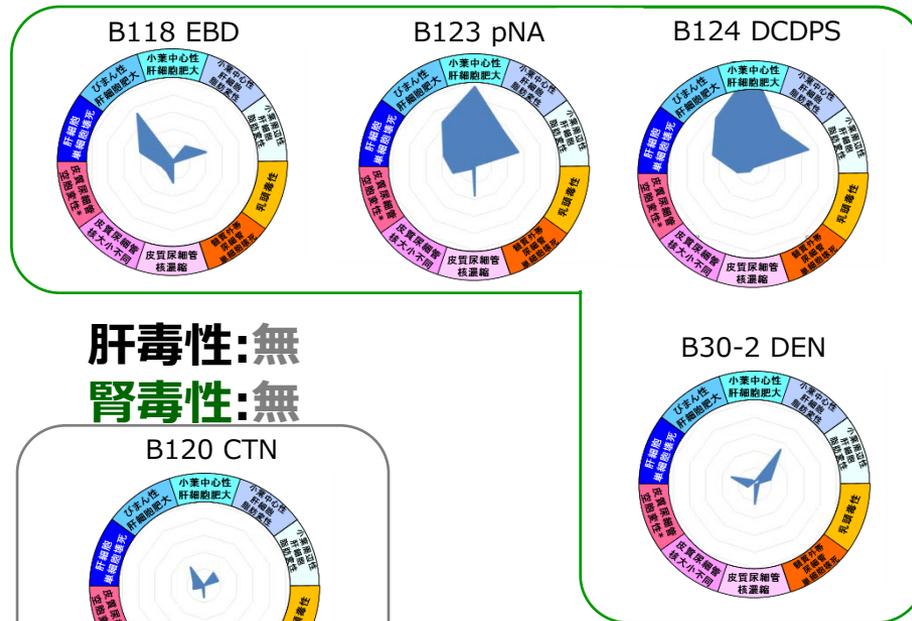
一致率 : 99.2% (10所見個別 : 96~100%)

〔一般毒性〕 判定結果 (10試験)/ 外部データ

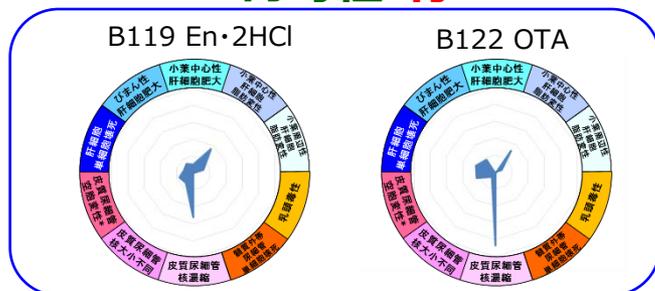
肝毒性:有
腎毒性:有



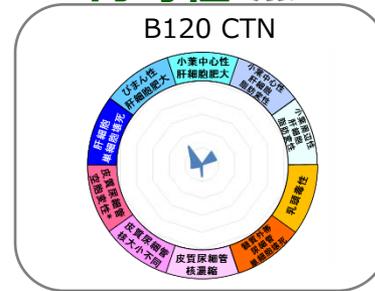
肝毒性:有
腎毒性:無



肝毒性:無
腎毒性:有



肝毒性:無
腎毒性:無



一致率 : 96.7% (10所見個別 : 80~100%)

判定が外れたものは全て偽陽性だった(偽陰性は10所見とも全くなかった)

ポイント : 高精度に毒性を判定できるマーカー遺伝子を選定できた
→新たな毒性マーカー遺伝子として利用できる可能性も示された

発がん性（肝臓・腎臓） 予測モデルの開発

〔発がん性〕 研究開発の流れ



『一般毒性(肝毒性・腎毒性)』で得られた成果を活用

【肝発がん】	【腎発がん】
(前PJで開発済み)	腎発がんの早期マーカーを選定
(モデル開発：前PJで開発済み) 外部データによる精度確認 18週間投与試験での検証	予測モデル開発 外部データによる精度確認
標準プロトコルの作成 Preliminary SPSF提出	標準プロトコルの作成

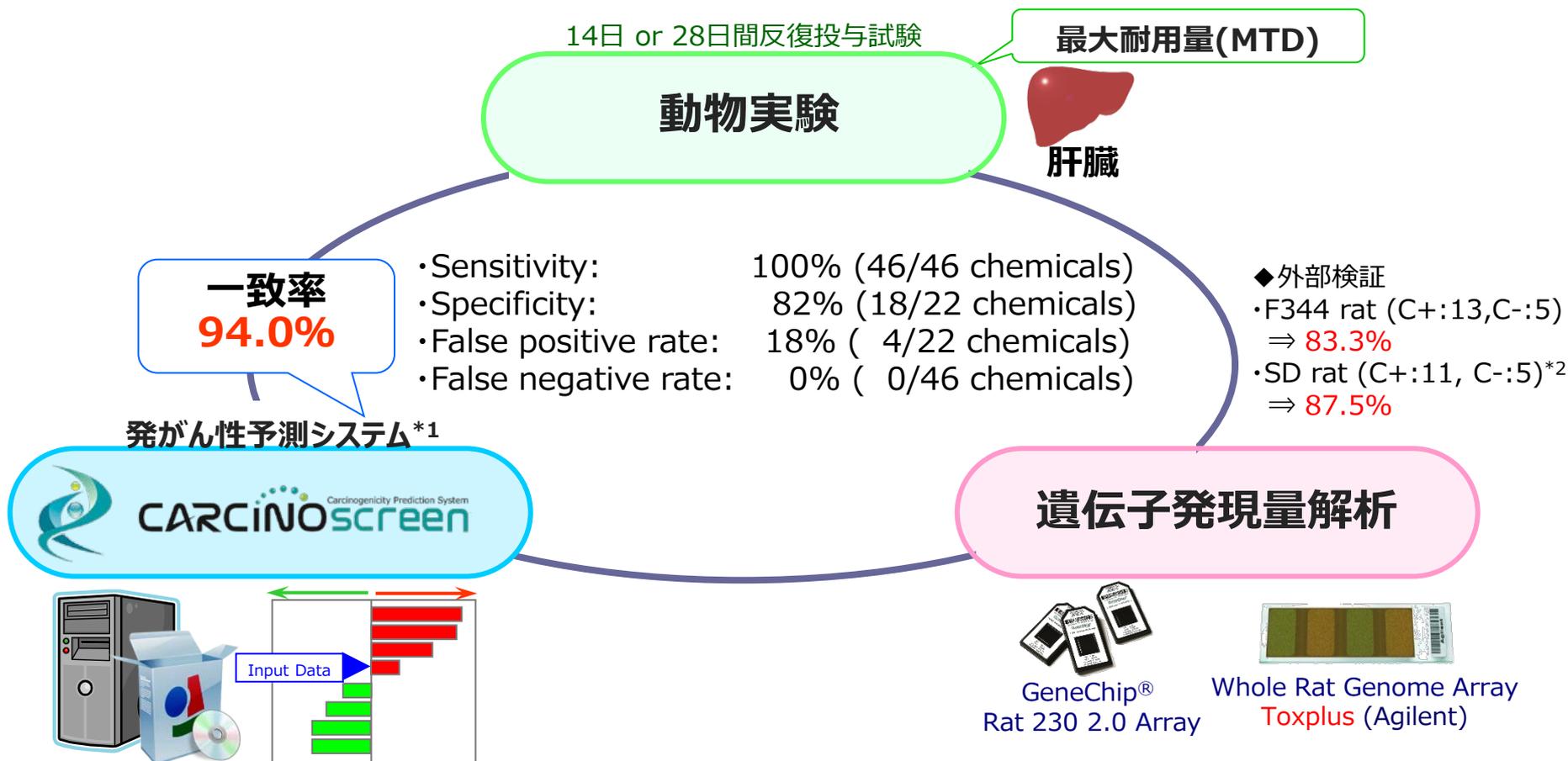


〔発がん性(肝臓)〕 CARCINOscreen®の概要

【目標】

※前PJ (2001~2005年) で開発済み

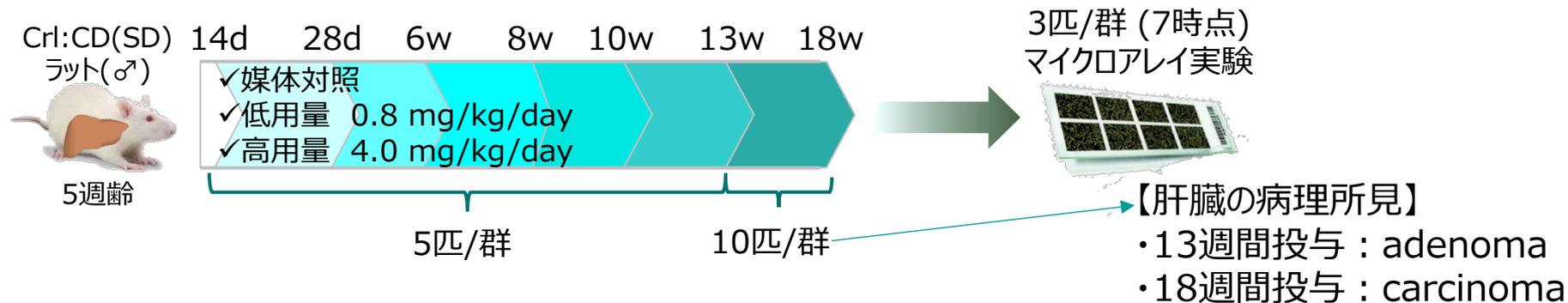
- ・遺伝子発現量データを発がん性予測システムにインプットすれば、発がん性のポテンシャルに応じて、予測結果が定量的に得られる。
- ・2年間投与が必要ながん原性を、短期間 (28日間以下) の動物実験で予測できる。



*1 Matsumoto et al., Cancer Inform. 2011; 259-71. *2 Matsumoto et al. J Toxicol Sci, 2015; 805-7.

〔発がん性(肝臓)〕 予測遺伝子と発がんとの関連

【目的】発がんプロセスと予測遺伝子の関係性を調べるため、発がん性物質：ジエチルニトロソアミン (DEN) を用いた18週間投与試験を実施した。

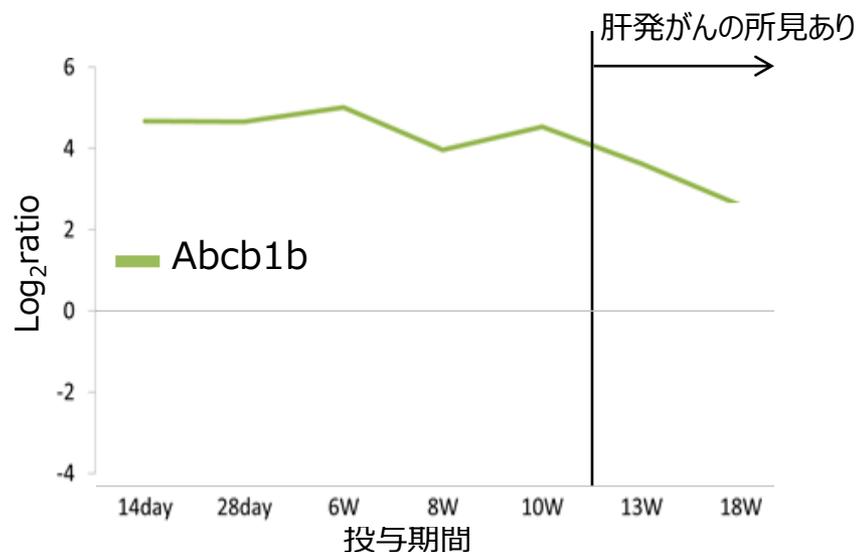


ポイント： 発がんに至るまでの網羅的な遺伝子発現量データを取得した世界初のデータ!!

■ Abcb1b 遺伝子

- ・発がん性予測遺伝子の一つ
- ・トランスポーター

⇒投与早期から発がんに至るまで高発現していることを確認！



〔発がん性(肝臓)〕 TGPデータによる外部検証

■ TGPデータ (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)

90%以上 (中用量以上) の精度で発がん性を予測することができた

〔発がん性(肝臓)〕 発がん性予測法の簡易化

- ◆ 背景
 - CARCINOScreen®は標準化へのハードルが高いとの指摘
 - 標準化にはより簡易な方法が必要

工業界、TGPメンバーとの意見交換

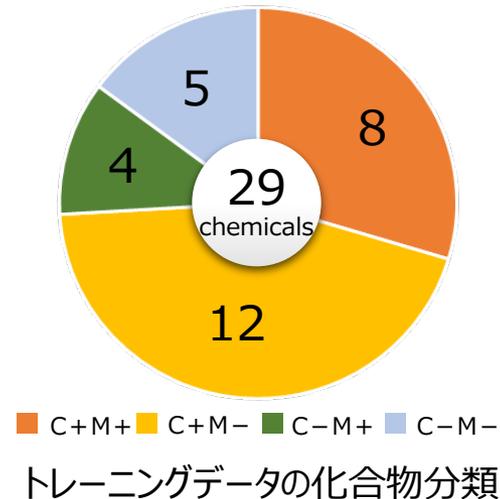
- ◆ 予測法^{*1}
 - 定量PCR法による遺伝子発現量測定を採用

■ 予測遺伝子(4種^{*2})

Gene Symbol	投与後の変動方向
Abcb1b	Up
Map3K8	Down
Eprs	Up
Igh-6	Up

*2 最適化された遺伝子セット

■ F344 rats (28days, 高用量)



*1 Saito et al., J Toxicol Sci. 2016; 41, 383-90.

■ 判定方法

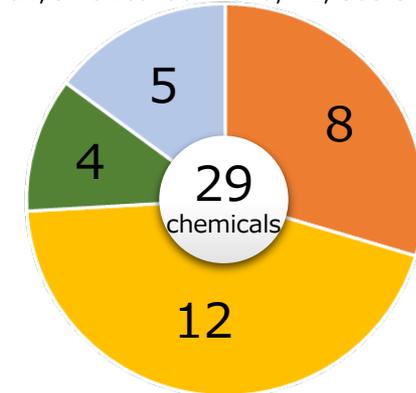
4種の予測遺伝子のうち、いずれか1遺伝子でも
2倍以上(3遺伝子)もしくは1/2倍以下(1遺伝子)を示せば、“肝発がん性あり”と判定

〔発がん性(肝臓)〕 発がん性予測法の簡易化(予測結果)

■ トレーニングデータ (F344ラット) の予測結果*

* Saito et al., J Toxicol Sci. 2016; 41, 383-90.

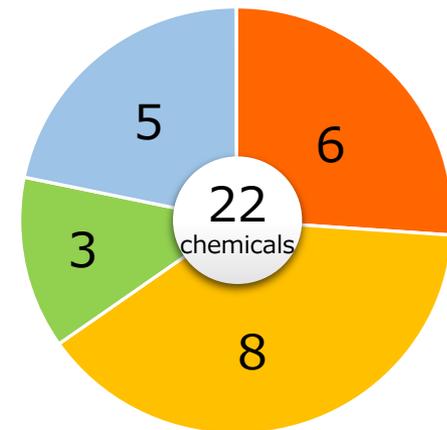
	高用量
Concordance	82.8% (24/29)
Sensitivity	80.0% (16/20)
Specificity	88.9% (8/9)
False Positive	11.1% (1/9)
False Negative	20.0% (4/20)



■ C+M+ ■ C+M- ■ C-M+ ■ C-M-
トレーニングデータの化合物分類

■ 検証データ (F344ラット : 5試験、SDラット : 17試験) の予測結果*

	高用量
Concordance	86.4% (19/22)
Sensitivity	78.6% (11/14)
Specificity	100% (8/8)
False Positive	0% (0/8)
False Negative	21.4% (3/14)



■ C+M+ ■ C+M- ■ C-M+ ■ C-M-
検証データの化合物分類

ポイント : 定量PCR法による予測法はOECDへpreliminary SPSF提出済み

Preliminary SPSF : OECD加盟国等にテストガイドライン化への関心等の意見を募るための様式

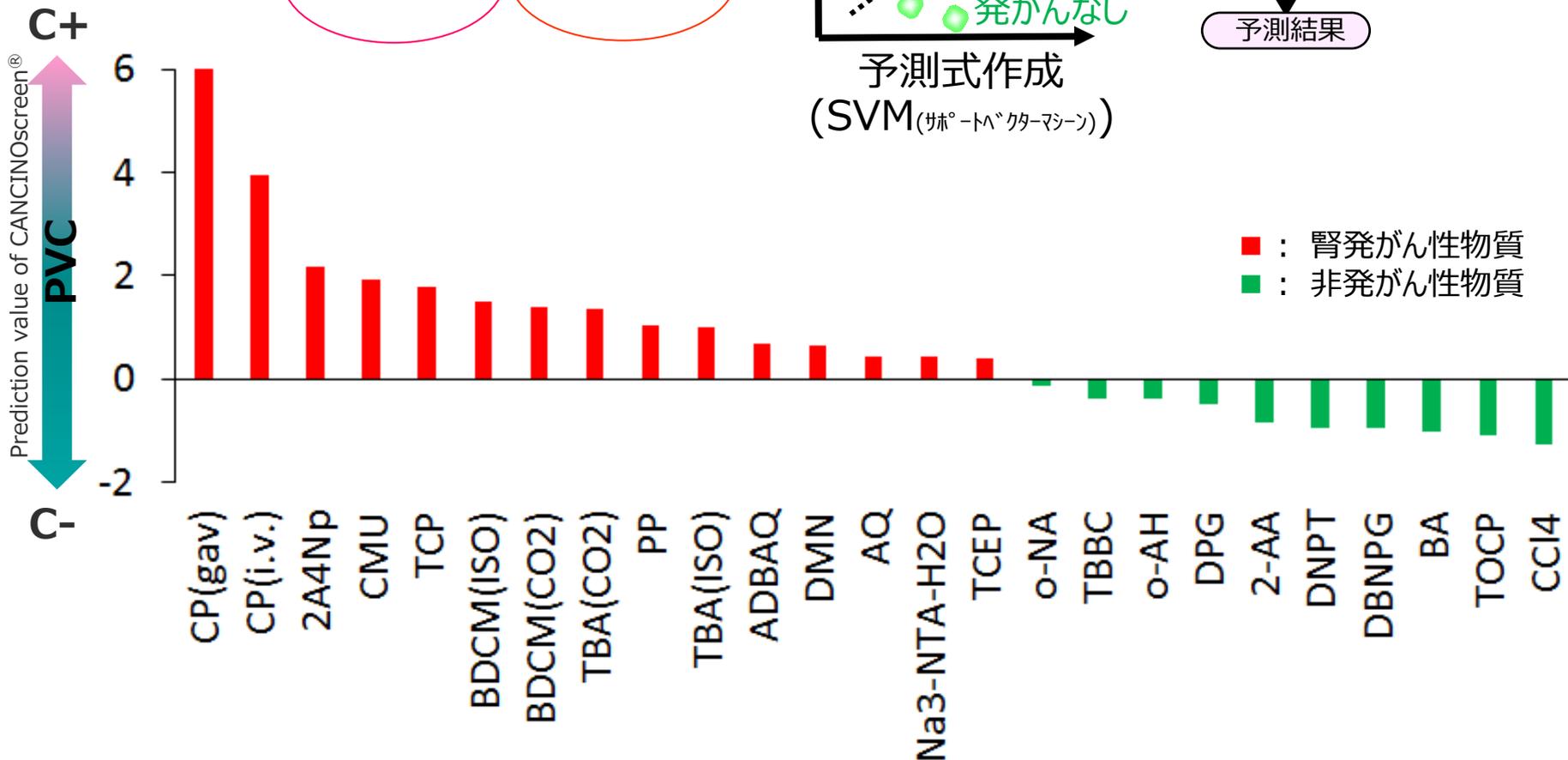
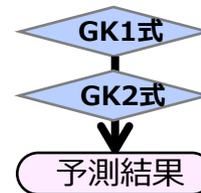
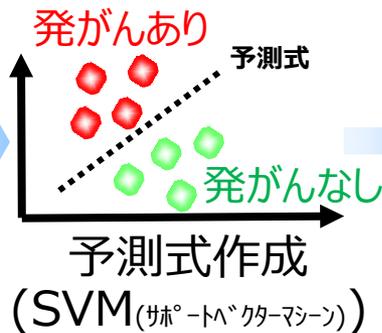
〔発がん性(腎臓)〕 予測システムの開発

予測結果[トレーニングデータ; 皮質]
22物質(25試験)*

【解析の流れ】

GK1
5遺伝子

GK2
5遺伝子



全物質について、腎発がん性の予測結果が既知情報 (がん原性試験) と一致した

* Matsumoto et al., submitted.

〔発がん性(腎臓)〕 外部検証

予測結果[検証データ; 皮質]*(10物質)

■ 発がん性予測結果(28日間、高用量、腎臓)

- : 腎発がん性物質
- : 非発がん性物質
- : 発がん性不明



- ・発がん性物質は3物質は全て正答した。
- ・Amidol (非発がん性物質で陽性と判定) は、雄マウスで腎臓を標的とする発がん性であった。

* Matsumoto *et al.*, submitted.

〔一般毒性・発がん性〕プロトコル

CERI 一般財団法人 化学物質評価研究機構
 Chemicals Evaluation and Research Institute Japan

Topics 事業所案内 サイト内検索 更新履歴 サイトマップ お問い合わせ

Home 業務案内 機構概要 採用情報 研究開発・支援等 CERi NEWS 指定・登録等 公開データベース

研究開発・支援等 Research Assistant Project

研究開発 Home > 研究開発・支援等 > 研究開発 > Tox-Omicsにおける取組

研究助成事業
研究表彰事業

ご利用案内
試験のご依頼・ご相談手順
このページのお問い合わせ

サービスカテゴリ
化学物質・医薬・医薬品等の安全性試験
in vitro試験
オミクス解析
医薬品の安全性・品質・規格・薬

研究開発

研究業績 発がん性予測手法開発への取り組み Tox-Omicsにおける取組

Tox-Omicsにおける取組

- ◆ はじめに
- ◆ Tox-Omicsの研究内容
- ◆ 動物試験
- ◆ 遺伝子発現量解析
- ◆ Tox-Omicsで開発した判定・予測を行うためのプロトコル
- ◆ 外部発表

プロトコル及び解析ソフト (Tox-Screen) をWebで公表

http://www.cerij.or.jp/research_assistant_project/tox_omics.html

- プロトコルには、評価に必要な材料、試薬、機器や方法論のほか、遺伝子発現量データ取得に必要な品質基準等を含む。
- 毒性判別/予測についてはTox-Screenをダウンロードすることで、**煩雑な解析を行うことなく、結果を導ける。**

◆Tox-Omics で開発した判定・予測を行うためのプロトコル

Tox-omics project の成果として、肝毒性、腎毒性の判別及び腎発がん性の予測ができる

Tox-screen システムを開発しました。(ダウンロードは[こちら](#))。

詳しい手順は、[こちら](#)のプロトコルをご参照下さい。




◆一般毒性 判別結果シリーダシート	
項目	結果
急性毒性	判定済
慢性毒性	判定済
発がん性	判定済
生殖毒性	判定済
環境毒性	判定済
生態毒性	判定済
水生毒性	判定済
土壌毒性	判定済
大気毒性	判定済
気候変動	判定済
化学物質	判定済
医薬品	判定済
食品添加物	判定済
化粧品	判定済
農薬	判定済
その他	判定済

ポイント : 28日間反復投与試験の遺伝子発現量データ (肝臓または腎臓) があれば、
煩雑な解析を行うことなく、誰でも毒性の判別/予測を行うことができる

神経毒性 フィージビリティスタディ

〔神経毒性〕研究課題と研究戦略

神経毒性は煩雑ではあるが現行の28日間反復投与毒性試験でも検出できているが

- 研究課題-1：28日間反復投与試験で発達神経毒性を検出できるのか？
- 研究課題-2：遺伝子で神経毒性を検出するのか？
〔どの遺伝子が毒性と関連があるのか？どの部位を測定するか？〕
- 研究課題-3：遺伝子発現量データをどのように毒性発現可能性の検出に用いるか？

従来の28日間の試験では評価できない

脳の採材・固定法・マイクロアレイデータ取得法に関する検討 (SL-10参照)

〔解析対象：成熟期〕

28日間反復投与毒性試験

遺伝子や分子の変化を網羅的に評価

〔解析対象：発達期〕

妊娠期・授乳期の暴露試験

遺伝子や分子の変化を網羅的に評価

比較

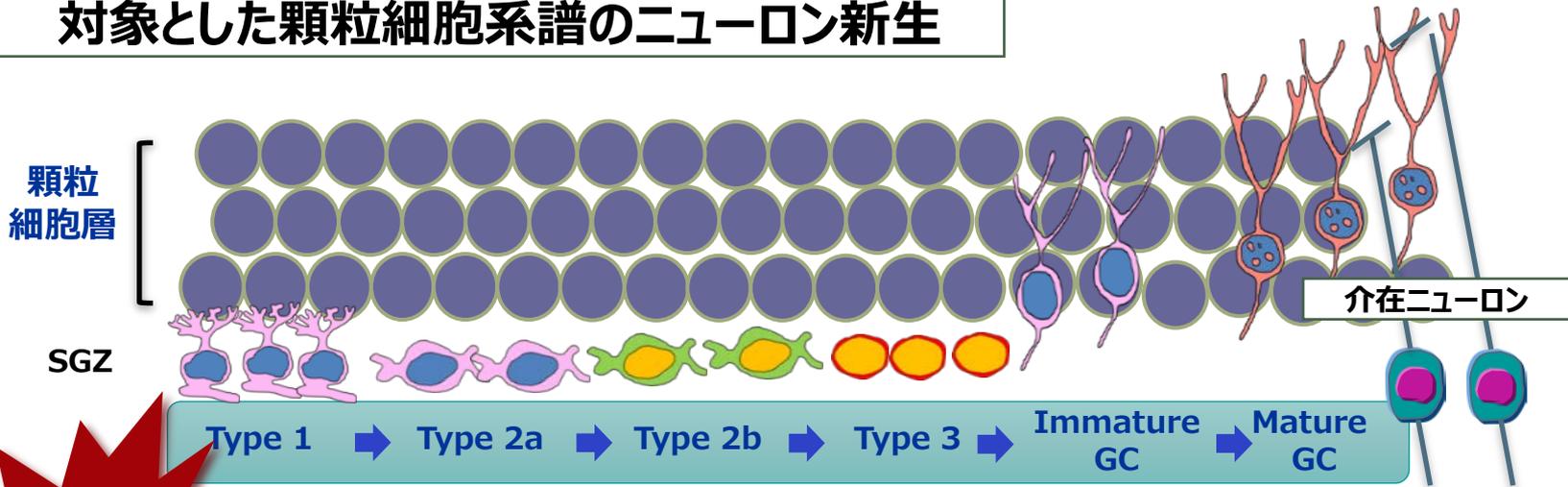
神経毒性の
バイオマーカー探索

28日間試験で評価できる発達神経毒性の
バイオマーカー探索

作用機序の異なる
5物質を用いて検討した

〔神経毒性〕 神経毒性ターゲット

対象とした顆粒細胞系譜のニューロン新生



神経毒性物質
の標的性

幹細胞の
自己複製

前駆細胞の増殖・
分化・移動

軸索の
伸長

髄鞘の
形成

成熟

神経幹細胞傷害
DNA傷害物質

細胞増殖阻害物質
細胞移動障害物質

軸索障害
物質

髄鞘障害
物質

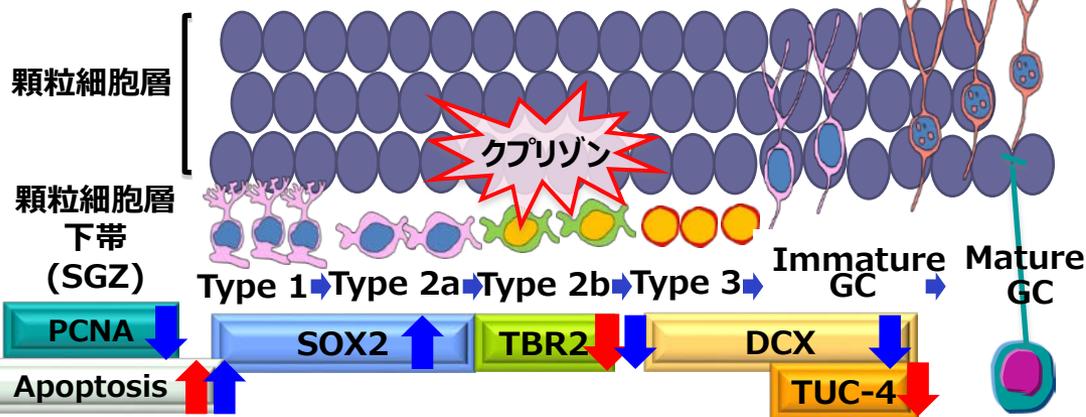
プロピルチオウラシル(PTU) :
神経幹細胞傷害
グリシドール : 軸索遠位端傷害
クプリゾン : 髄鞘形成障害
バルプロ酸 : ニューロン移動障害
メチルニトロソウレア : DNA傷害

ポイント : 発達期と成熟期で同じ段階を経るニューロン新生に着目した

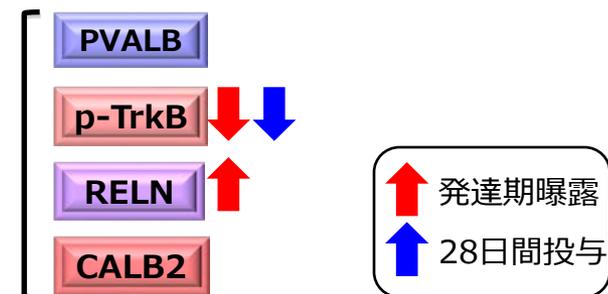


〔神経毒性〕

例) 髄鞘形成障害を機序とする クプリゾンの結果



歯状回門のGABA性介在ニューロン



マイクロアレイ解析

- 発達期曝露：海馬・脳梁でニューロン新生・シナプス伝達障害、帯状回でミエリン形成障害を反映
- 28日間反復投与：海馬・帯状回でニューロン新生・ミエリン形成障害、随伴する炎症反応を反映

免疫染色

- 発達期曝露・28日間反復投与で共通
分化中期～後期を標的とした海馬ニューロン新生障害性と、介在ニューロン群の変動を検出
海馬でシナプス可塑性指標が変動 (COX2、ARC、FOS)
脳梁でミエリン形成指標が変動 (MBP、CNPase、OLIG2、KLOTTHO)
➡ □髄鞘傷害性を反映

一般毒性試験の枠組みで、帯状回がミエリン形成障害性に高感受性
遺伝子発現変動・免疫染色で評価可能



〔神経毒性〕マーカー遺伝子と 毒性に対する高感受性部位の特定

赤字：発達期曝露でも変動

神経毒性機序	高感受性標的部位	遺伝子発現プロファイル
髄鞘傷害	海馬・帯状回	ミエリン形成、オリゴデンドロサイト分化
ニューロン新生障害	海馬	ニューロン新生、シナプス伝達
軸索傷害	海馬	ニューロン新生、軸索形成
ニューロン移動障害	海馬・帯状回	ニューロン新生、細胞移動
DNA傷害	広範な領域	ニューロン新生、アポトーシス

神経毒性発現機序	高感受性標的部位	毒性指標遺伝子セット
ミエリン形成障害	海馬・帯状回	<i>Cnp, Mag, Mal, Mbp, Plp1</i>
ニューロン新生障害	海馬	<i>Eph family genes</i>
シナプス可塑性変動	海馬	<i>Arc, Fos, Jun, Eph family genes</i>
細胞移動障害	海馬・帯状回	<i>Reln, Ret, Robo3, Gfra3, Tbx1</i>

- ポイント：〔研究課題-1〕⇒28日間反復投与試験で発達神経毒性を検出できる
- ポイント：〔研究課題-2〕⇒遺伝子で神経毒性を検出できる

評価に用いる遺伝子マーカーと測定部位を特定した



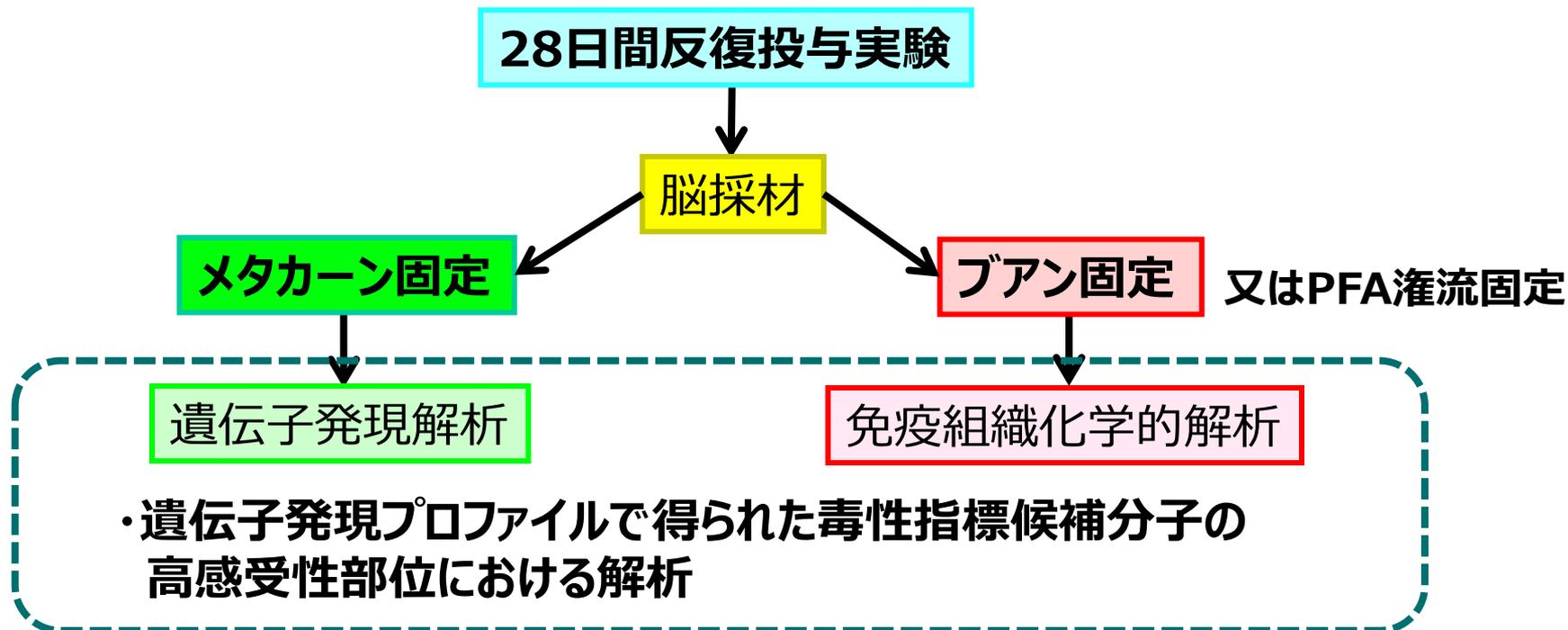
〔神経毒性〕免疫組織学的な分子マーカーと 毒性に対する高感受性部位の特定

赤字：発達期曝露でも変動

神経毒性発現指標	高感受性標的部位	毒性指標分子セット (タンパク質)
ニューロン新生障害	海馬 顆粒細胞層	PAX6, TBR2, DCX, TUC4
ニューロン新生、シナプス伝達、細胞 移動障害(GABA性介在ニューロン)	海馬 歯状回門	RELN, PVALB, CALB2, SST
	帯状回・小脳	RELN, PVALB, CALB2 (発達期のみ)
シナプス可塑性	海馬 顆粒細胞層	ARC, FOS, COX2, EPHA4
	帯状回	ARC, FOS
髄鞘障害	海馬・帯状回	MBP, CNPase
グリア新生障害	帯状回	KLOTHO, OLIG2 (発達期のみ)

ポイント： 遺伝子マーカーだけでなく、免疫組織学的な検出が可能な
高感受性部位における毒性指標分子セットも特定した

〔神経毒性〕簡易プロトコル(案)の概要



遺伝子解析：毒性プロファイルに基づき選定した遺伝子を候補とし、リアルタイムPCRによるmRNAの発現変動により評価

免疫組織化学的解析：各毒性機序に応じて変動した各指標分子（既知・新規）を候補とし、広範な脳部位での発現分布変動により評価

ポイント：〔研究課題-3〕⇒本事業で取得したフィジビリティ研究の結果に基づき、発達神経毒性の評価も含めた簡易プロトコル(案)を構築できた。

研究成果のまとめ

毒性	臓器	取得データ数	マーカー数及び構築モデルの精度*3	プロトコルのステータス
一般毒性	肝臓	• 32物質/35試験*1	<ul style="list-style-type: none"> 肝臓5所見でそれぞれ8～36種類の遺伝子を選定 腎臓5所見でそれぞれ3～10種類の遺伝子を選定 トレーニングデータでは99.2%、外部データでは96.7%の一致率 	• Webで公表済み
	腎臓	• 32物質/35試験 (腎臓4部位+腎臓全体)*1		• Webで公表済み
発がん性	肝臓	<ul style="list-style-type: none"> 32物質/35試験*1 1物質 (発がんするまでの試験) 	<ul style="list-style-type: none"> 予測システムのバリデーション：85%以上の一致率 (TGPデータで90%以上) 簡易予測法：トレーニングデータでは82.8%、外部データでは86.4%の一致率 	<ul style="list-style-type: none"> Webで公表済み 簡易予測法は Preliminary SPSFを OECDへ提出済み
	肝臓	• 32物質/35試験 (腎臓4部位+腎臓全体)*1		<ul style="list-style-type: none"> 10遺伝子を選定 93.9%の一致率
神経毒性	脳	• 5物質/10試験*2	<ul style="list-style-type: none"> 遺伝子セット (のべ15遺伝子) 及び 免役組織化学的な検査を行う分子セット (16分子) を選定 	

*1：一般毒性と発がん性のデータは共通

*2：28日間反復投与毒性試験及び妊娠期・授乳期暴露試験

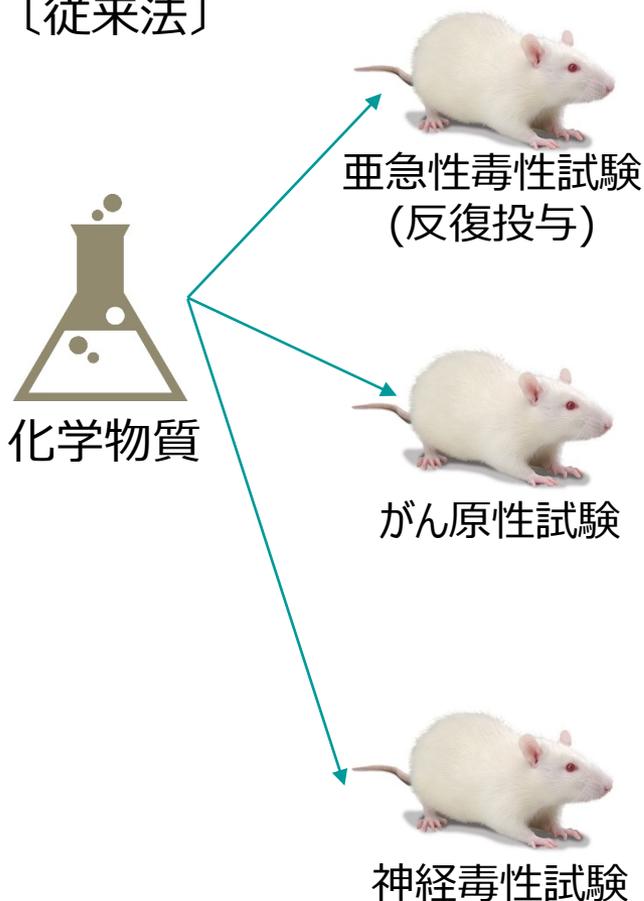
*3：一般毒性及び発がん性のみ

本研究で開発した新規の有害性予測手法

〔チャレンジ〕

- ・単一の毒性試験（28日間反復投与試験）から複数の毒性を検出できないか？ → **迅速かつ効率的**
- ・従来法では評価できなかった毒性を検出できないか？ → **高度化**

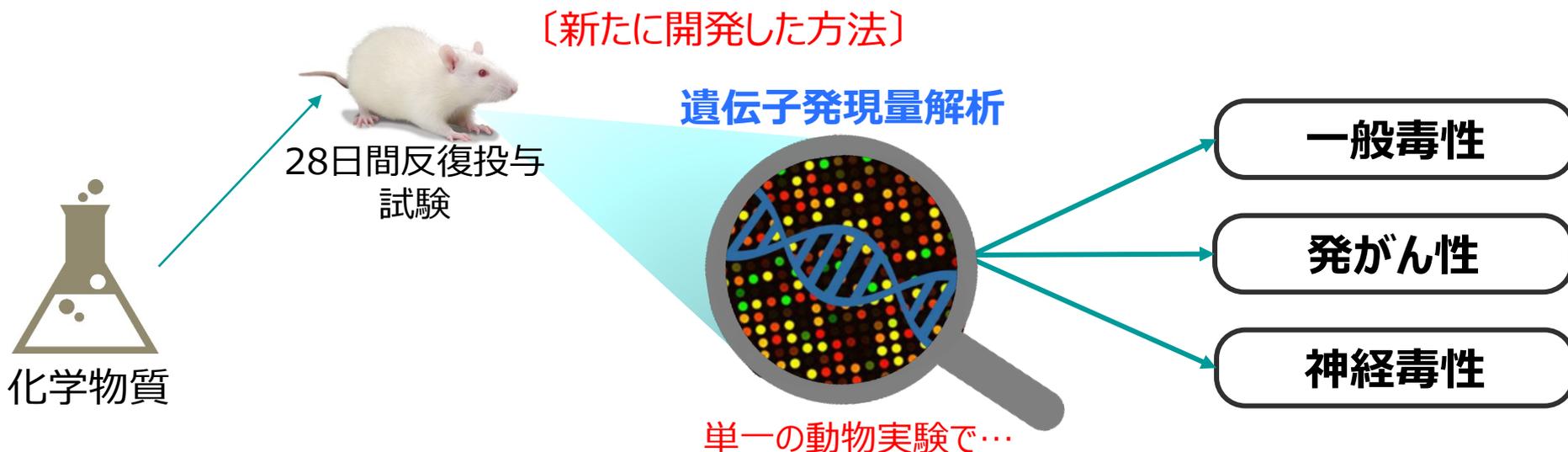
〔従来法〕



本研究で開発した新規の有害性予測手法

〔チャレンジ〕

- ・単一の毒性試験（28日間反復投与試験）から複数の毒性を検出できないか？ → **迅速かつ効率的**
- ・従来法では評価できなかった毒性を検出できないか？ → **高度化**



〔5カ年の成果〕

28日間反復投与試験の遺伝子発現変動データを活用して
複数の有害性を予測できる手法を開発できた

- ・一般毒性：毒性所見の判定システム、毒性メカニズムの解明 (MoA/AOP)
- ・発がん性：短期試験からの発がん性予測システム
- ・神経毒性：神経毒性マーカーの同定 等

研究の波及効果

〔一般毒性（肝毒性・腎毒性）〕

- 本手法を構築することにより、毒性と遺伝子の関係性を紐付けることができ、今後*in vitro*試験法開発が促進されることが期待できる。

〔発がん性(肝臓・腎臓)〕

- 本予測システムにより従来の28日間試験では評価できなかった発がん性を短期間で予測できるようになり、データギャップの補完と大幅な費用削減等が期待できる。

〔神経毒性〕

- 病理組織学的検査によってもその判断が難しい神経毒性を脳の部位特異的な遺伝子発現変動により評価できる可能性を示した。このことにより、今後より簡易かつ簡便な神経毒性評価手法の構築に貢献することが期待できる。

〔全体〕

- 公表したプロトコルを28日間反復投与毒性試験を行う事業者が活用することで、不要な試験を削減するとともに、評価期間の短縮が図れる。
- OECDに提案した手法に対する諸外国からのコメントを反映させ、今後国際標準化に取り組む。

2.事業アウトカム

2.事業アウトカム

事業アウトカム指標 (妥当性・設定理由・根拠等)	目標値 (計画)	達成状況 (実績値・達成度)
<p>〔アウトカム指標〕</p> <p>遺伝子発現量データを用いた毒性評価の民間利用件数をアウトカム指標とした。</p>	<p>(事業開始時) 民間利用：0件</p>	<p>民間利用：0件</p>
<p>〔妥当性〕</p>	<p>(中間評価時) 民間利用：2件</p>	<p>達成；民間利用：4件</p>
<p>方法論として普及していない点、標準化された手法(公定法)ではない点から、一般的には民間利用されにくい中での目標値である。</p> <p>〔設定理由・根拠〕</p> <p>複数エンドポイントの情報を短期間の単一の試験から取得可能になることで、試験費用及び期間を削減できることにより、動物福祉3Rに寄与しつつ、迅速な有害性評価、リスク評価が可能となる。また、国内における円滑な化学物質管理の実施が促進され、石油精製物質の安定供給が可能になるとともに、産業界の国際競争力の向上に繋がる。これらが本事業のアウトカムとなるが、これらは、広く民間利用されることで実現されるものであるため、民間利用件数をアウトカム指標とした。</p>	<p>(事業終了時) 民間利用：5件</p>	<p>達成；民間利用：5件 この他、厚生労働省「職場で使用される化学物質の発がん性評価の加速化」のスキームに採用された (http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/2r9852000002s7m7-att/2r9852000002s7q4.pdf)。</p>
	<p>(事業目的達成時) 民間利用：100件程度</p>	

3.事業アウトプット

3.事業アウトプット①

事業アウトカム指標 (妥当性・設定理由・根拠等)	目標値 (計画)	達成状況 (実績値・達成度)
<p>〔事業アウトカム指標〕</p> <ul style="list-style-type: none"> • 本事業で開発したプロトコル数 • 本事業で開発した評価法のOECDへの提案数 <p>〔妥当性〕 本事業における目標は「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」であり、一般に利用できる環境整備が必要であるため。</p> <p>〔設定根拠・理由〕 プロトコルは評価法が開発できなければ作成できない。また、当該評価法を認知してもらい、利用を促進するにはプロトコルを提供する必要がある。また、国際的な認知を高めるために国際的な場への働きかけも必要である。</p>	(事業開始時) 0件	0件
	(中間評価時) 0件	0件
	(事業終了時) 5件	達成 ; 5件 : 肝毒性及び腎毒性、肝臓及び腎臓における発がん性について4プロトコル、神経毒性について1プロトコル案を作成した。
	(事業目的達成時) 6件	達成 ; 6件 : 上記に加え、肝発がん性の定量PCR法をOECDに提案した(1件)。 2016年10月現在、提案法に対する各国からのコメント対応中である。

研究課題と開発項目

開発項目 研究課題		1. 一般毒性		2. 発がん性		3. 神経毒性
		肝臓	腎臓	肝臓	腎臓	脳
• 遺伝子解析用の採材法がない			採材法開発		採材法開発 (一般毒性と共通)	採材法開発
• 毒性に特徴的な遺伝子がない		関連遺伝子の絞込み	関連遺伝子の絞込み	先行PJで実施済み ⇒最小遺伝子セット選定	関連遺伝子の絞込み	作用既知5物質による フィージビリティ検討 関連遺伝子の絞込み
〔最終目標〕(a) 各毒性に関連遺伝子の絞り込み						
• 毒性の発現可能性を遺伝子発現量から判定/予測する方法がない		<ul style="list-style-type: none"> ● 毒性判定モデルの構築 ● 検証 ● プロトコル作成 	<ul style="list-style-type: none"> ● 毒性判定モデルの構築 ● 検証 ● プロトコル作成 	<ul style="list-style-type: none"> ● 定量PCR法による簡易評価法の構築 ● 検証 ● プロトコル作成 	<ul style="list-style-type: none"> ● 毒性予測モデルの構築 ● 検証 ● プロトコル作成 	<ul style="list-style-type: none"> ● 神経毒性を遺伝子発現量変化で捕らえられるか? ● 28日試験で発達神経毒性を検出しえるか? <p style="text-align: center;">↓</p> <ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル(案)作成
〔最終目標〕(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立						
アウトカムに向けた取り組み	公表	<ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル公表 ● 論文化(投稿中) 	<ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル公表 ● 論文化(投稿中) 	<ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル公表 ● 論文化 	<ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル公表 ● 論文化(投稿中) 	<ul style="list-style-type: none"> ● プロトコル(案)公表 ● 論文化
	標準化			OECDへの提案 (Preliminary SPSF)		

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－① ■ 主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性

個別要素技術	アウトプット指標・目標値	達成状況（実績値・達成度）	
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	(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。	達成	● 6万プローブ（約3万遺伝子）が搭載されたマイクロアレイを用いて、全サンプルについて包括的な遺伝子発現量データを取得した。 ● 被験物質として 35試験/32物質 について、28日間反復投与毒性試験（サテライト群：1、7、14日間投与群）を行い、肝臓及び腎臓の5部位（皮質、髓質外帯、髓質内帯、乳頭、全体）の遺伝子の発現変動に関する品質が確保された包括的なデータを取得した（ 合計：3,369サンプル ）。
	● 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 として利用し る遺伝子を選定 する。	達成	● 肝毒性は5所見 （小葉中心性肝細胞脂肪変性、小葉周辺性肝細胞脂肪変性、(単細胞)壊死、小葉中心性肝細胞肥大、びまん性小葉中心性）について、それぞれ 8～36種類の毒性発現マーカ 遺伝子を選定した。 ● 腎毒性は5所見 （空胞変性、核大小不同、核濃縮、尿細管(単細胞)壊死、乳頭壊死)について、それぞれ 3～10種類の毒性発現マーカ 遺伝子を選定した。
	(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。	達成	● 肝毒性については、四塩化炭素、腎毒性についてはシスプラチンをケーススタディとして、 毒性メカニズムをMoA/AOPとして整理 した。 ● 肝毒性及び腎毒性の合計10所見の毒性判定結果については、1化合物あたり 1つのレーダーチャート形式で可視化する手法を開発 した。また、判定モデルの 一致率はトレーニングデータ（25試験/22物質）で99.2%、テストデータ（10試験/10物質）で96.7% と高い値を示した。
	● 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。	達成	● 肝毒性及び腎毒性の毒性判定システムについての プロトコルを作成し、公表 した。

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－② ■発がん性

個別要素技術	アウトプット指標・目標値	達成状況（実績値・達成度）	
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	<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。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 6万プローブ（約3万遺伝子）が搭載されたマイクロアレイを用いて、全サンプルについて包括的な遺伝子発現量データを取得した。 ● 遺伝子発現量データについては、一般毒性と共有した。さらに、肝発がんが生じるまでの遺伝子発現量データを取得するために、Diethylnitrosamine (DEN) を14日～18週間(発がんするまで)反復投与した肝臓サンプルについてマイクロアレイ実験を行った（肝臓：3個体/群×3群×7時点=63サンプル）
	<ul style="list-style-type: none"> ● 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。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 肝発がん性はこれまでに15遺伝子の予測遺伝子を選定した。 ● 肝発がん性の簡易法（定量PCR法による簡易予測法）では最小予測遺伝子セットとして4遺伝子を選定した。 ● 腎発がん性は、新たに皮質と髄質外帯の遺伝子発現量データから10遺伝子を選定した
	<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"> ● 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。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 肝発がん性についてはDiethylnitrosamine (DEN) をケーススタディとして、毒性メカニズムをMoA (Mode of Action) /AOP (Adverse Outcome Pathway) として整理した。 ● 肝発がん性は、各種外部データに対して、平均85%以上の高い一致率で発がん性を予測できた。 ● 腎発がん性はトレーニングデータと外部データを合せた35試験/32物質（分類不明を除く33試験/30物質）を予測したところ、正答率は94.0%と高い予測結果を示した。
<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。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 肝発がん性及び腎発がん性の予測システムについてのプロトコルを作成し、公表した。 ● 肝発がん性の簡易法（定量PCR法による簡易予測法）のPreliminary SPSFをOECDへ提出した。2016年10月現在、各国からのコメントに対応中である。 	

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－③ ■ 神経毒性

個別要素技術	アウトプット指標・目標値	達成状況（実績値・達成度）	
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	<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する遺伝子を選定する。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 神経毒性作用既知の5物質を選定し、28日間反復投与毒性試験及び妊娠期・授乳期暴露試験を行い(10試験/5物質)、脳の4部位（海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳）のマイクロアレイによる遺伝子の発現変動に関する品質が確保された包括的なデータを取得した（3個体/群×3群×4部位×2試験/物質×5物質=360サンプル）。 ● 神経毒性作用既知の5物質の詳細な毒性所見や免疫染色が可能な分子等のデータを取得した。
	<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"> ● 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。 ● 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。 	達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 神経毒性の作用機序が異なる物質で特異的に変動する遺伝子セット（のべ15遺伝子）及び免疫組織化学的な検査を行う分子セット（16分子）を選定した。
		達成	<ul style="list-style-type: none"> ● 28日間反復投与毒性試験の枠組みで得られる脳の部位別の遺伝子発現量データを用いることで神経毒性が評価できる可能性を示した。 ● また、28日間反復投与毒性試験の枠組みで発達神経毒性を評価できる可能性を示した。 ● 本事業で試験を実施した5物質のデータに基づき神経毒性の作用機序に応じて高感受性の脳部位を特定することができた。 ● 限られた物質ではあるが、獲得した神経毒性機序ごとの測定対象部位と、毒性機序に基づく毒性指標遺伝子セット及び免疫組織化学的に評価可能な分子セットに基づき、神経毒性の発現可能性を予測する解析プロトコルを考案した。

4.当省(国)が実施することの必要性

当省(国)が実施することの必要性

①民間企業では十分な研究開発が実施されない

- ・安全性評価に係る本技術開発は、遺伝子発現変動データの解析という基礎レベルの研究開発であり、技術的難易度は極めて高い。
- ・本研究開発は、長期の研究開発期間を要するとともに、企業利益には直結し難いものであるため、民間企業では十分な研究開発は困難である。

②民間企業には研究開発実施のインセンティブが期待できない

- ・化学物質の安全性評価は、企業にとって重要なプロセスであるが、企業利益に直ちに資することはなく、市場原理に基づく研究開発実施のインセンティブが働きにくく、民間企業での研究開発実施は困難である。

③知的基盤の形成に資する研究開発

- ・本研究開発は、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り、開発する安全性評価手法は、公平、中立な手法として信頼性を確保していくことが求められる。
- ・将来的には、国際標準化に繋げていく研究開発である。

④国が主体的役割を果たす必要性のあるものである

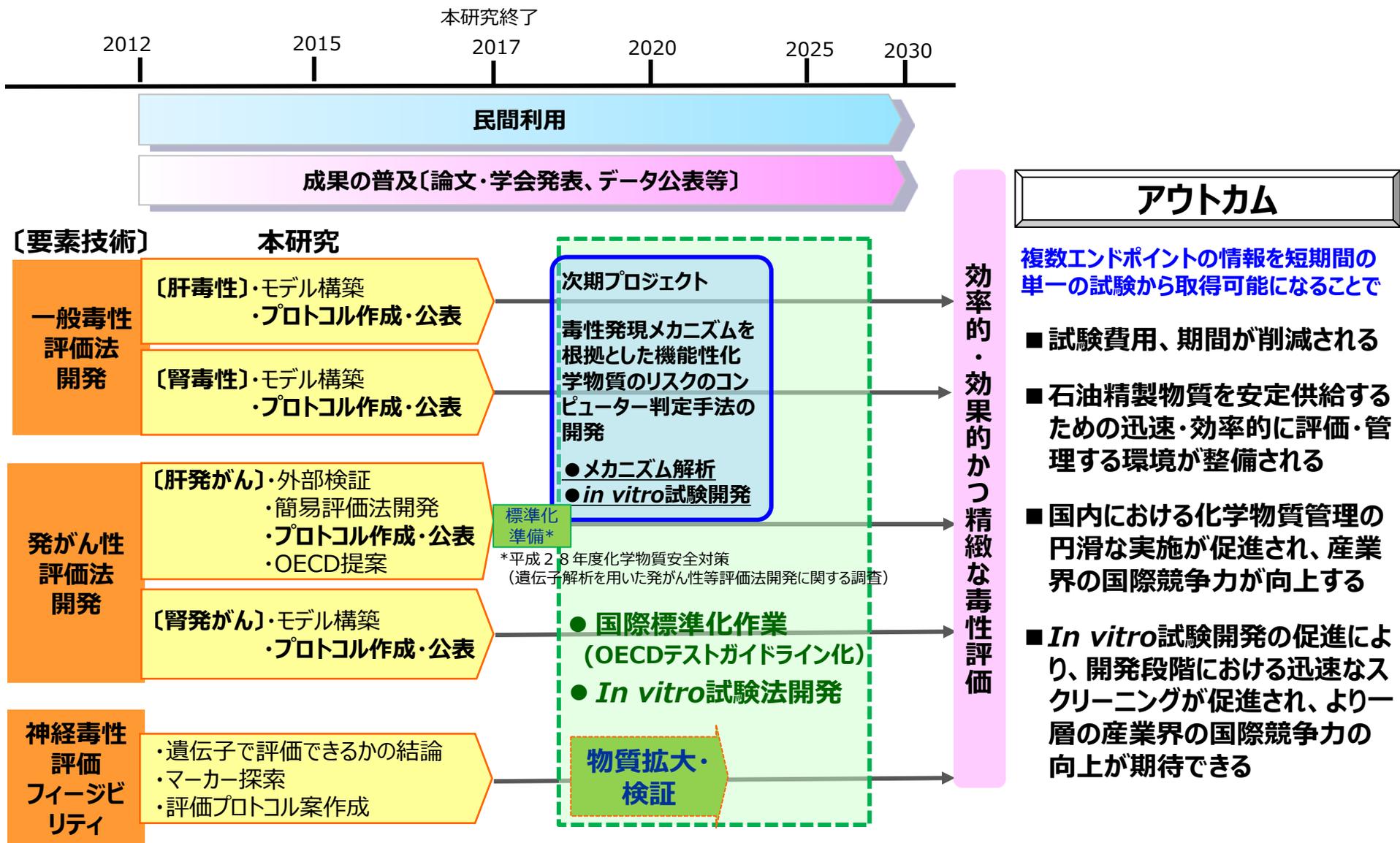
- ・本研究開発は、迅速活高効率な安全性評価手法を開発するものであり、その先導性ゆえ、基礎研究レベルのシーズを有する研究機関、大学を結集させて取り組む必要がある。



本研究開発プロジェクトは、国が主導的に取り組むことが適当である。

5.事業アウトカム達成に至るまでの ロードマップ

5. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ①



5. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ②

■ 民間利用にむけた取り組み

論文発表	学会発表等		講演等
	海外	国内	
23	15	31	7

● 論文及び学会発表

- シンポジウム「経産省プロジェクト ARCH-Tox研究成果報告会 – 毒性評価のパラダイムシフトに向けてー」(日本動物実験代替法学会第28回大会・横浜)
- シンポジウム「経済産業省プロジェクト 新規反復投与毒性試験代替法の開発 : ARCH-Tox」(第43回日本毒性学会学術年会、名古屋)

● 公開講座等

- CERI寄附講座 九州大学 (公開)
- 日本動物実験代替法学会学術大会市民公開講座 (公開) 等

● データの公表

- 取得した毒性データの公表
HESS/HESS-DB(前METI-PJで開発)にて2015年7月に公開済み
[http://www.nite.go.jp/chem/qsar/hess_update.html]
- 取得した遺伝子発現量データの公表

● プロトコルの公表

● 受託試験の実施 (これまでに、11件実施)

5. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ③

■ 標準化(OECDテストガイドライン化)にむけた取り組み

○ 民間利用に向けた取り組みに加え(SL-57)、以下を実施した；

- OECD EAMGST^{*1}での発表 ⇒ 4遺伝子で予測できることに好印象

*1 Meeting of the Extended Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics

- OECDへの提案 (Preliminary^{*2} SPSFの提出)

*2 テストガイドライン化等に関する各国の関心を聞くための様式

○ 今後以下を実施予定；

- 定量PCR法による発がん性予測についての標準化作業準備
 - ✓ 平成28年度化学物質安全対策(遺伝子解析を用いた発がん性等評価法開発に関する調査)を実施中
 - Preliminary SPSFへの各国からのコメント対応等
 - ✓ メカニズム研究等の実施

6. 研究開発の実施

- ・マネジメント体制等

6. 研究開発の実施・マネジメント体制等

経済産業省製造産業局化学物質管理課

----- 事業の変更、中止の判断

プロジェクトリーダー；
小島肇 (国立医薬品食品衛生研究所)

----- 他のプロジェクトとの調整 等

研究推進委員会 (五十音順) [年2回開催；計10回]

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 株式会社スリーエス・ジャパン
西川 秋佳(委員長) 国立医薬品食品衛生研究所
福島 昭治 日本バイオアッセイ研究センター

・全体戦略の策定
・研究への助言

テーマリーダー；今田中伸哉 (化学物質評価研究機構)

・技術横断的な進捗管理
・資源配分の管理 等

発がん性・一般毒性評価法開発
(※毎月の進捗確認会議)

共同研究

発がん性・一般毒性用
動物試験

化学物質評価研究機構

遺伝子発現量データ解析
(マイクロアレイ解析含む)

化学物質評価研究機構

神経毒性用動物試験、免
疫化学的検査等

東京農工大学

メカニズム考察

神経毒性評価法開発

外部有識者
(病理と分子生物学の専門家)

〔意見交換会の実施〕

- ・ 日化協メンバー
[2014年10月]
- ・ TGPメンバー
[2014年11月]

↓
開発戦略へのフィードバック

研究開発項目と参加機関の連携関係

	一般毒性	発がん性	神経毒性 (フィージビリティスタディ)
採材法確立	<ul style="list-style-type: none"> ● 部位別採取 腎臓・脾臓等(CERI) ● 遺伝子発現解析(CERI) 		脳(東京農工大)
被験物質選定	肝/腎毒性、肝/腎発がん対応のための物質選定 (CERI)		(発達)神経毒性のための物質選定 (東京農工大)
動物試験	28日間反復投与毒性試験〔35試験/32物質〕(CERI)		妊娠期・授乳期暴露試験 28日間反復投与毒性試験〔各5物質〕(東京農工大)
	18w試験〔1物質〕(CERI)		
遺伝子発現データの取得	(CERI)		
遺伝子の選定	(CERI)		(東京農工大)
手法確立	手法確立・検証(CERI)		手法確立(東京農工大)
成果発信	<ul style="list-style-type: none"> ● 国際会議及び学会への情報発信(CERI・東京農工大) ● 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) ● Tox-Omics (本事業の呼称) 取り組みのWeb公開 (CERI) 		

7. 費用対効果

7.費用対効果-1

- 本事業では総額7.5億円が投入されている。
- 本事業ではアウトカムである「化学物質管理の円滑な実施の促進」には、アウトプットのひとつである「28日間の反復投与毒性試験によるマルチエンドポイントの毒性データ取得」が大きく貢献する。28日間反復投与毒性試験は我が国の化学物質審査規正法（化審法）にも取入れられている試験法である。
- ここで、試験の実施に膨大な費用と長期間を要するエンドポイントとして発がん性がある。従来の発がん性試験は、最終結果を得るまでに3年相当の期間と約2億円/物質の経費とが必要と言われている。

〔従来の発がん性試験〕



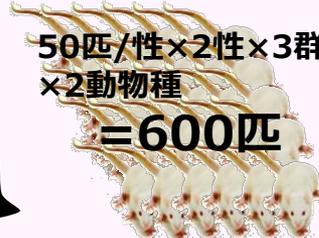
3年間

2億円



50匹/性×2性×3群
×2動物種

=600匹



- × 長期間
- × 高コスト
- × 多数の動物

7.費用対効果-2

〔従来の発がん性試験〕

〔開発した試験〕

× 長期間



約92%短縮

数ヶ月

× 高コスト

2億円



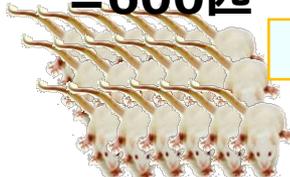
約97%削減

500万円

× 多数の動物

50匹/性×2性×3群
×2動物種

=600匹



約97%削減

最大20匹

× 大量の化合物

大幅削減

大幅削減

7.費用対効果-3

国内で5物質/年の発がん性試験が実施されると仮定

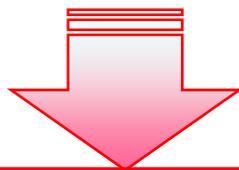


本事業で開発した試験法を適用すると

9億7500万円/年の経費が圧縮



本事業の全投資額（7.5億円）を十分に回収できる



国内の化学物質管理の円滑な実施

5物質/年×2億円/物質
=10億円/年



97.5%削減
〔9億7500万円/年の削減〕

5物質/年×500万円/物質
=2500万円/年

8. 事前及び中間評価の結果

8. 事前及び中間評価の結果

8-1. 事前評価の結果

1. 産業構造審議会産業技術分科会評価小委員会委員名簿

委員長	平澤 冷	東京大学名誉教授
	池村 淑道	長浜バイオ大学バイオサイエンス学部教授
	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	横浜国立大学大学院工学研究院教授
	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
	富田 房男	北海道大学名誉教授
	中小路 久美代	株式会社SRA先端技術研究所 リサーチディレクター
	森 俊介	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・社会政策部主任研究員

(委員敬称略、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

2. 第32回産業構造審議会産業技術分科会評価小委員会開催日

平成22年7月7日

8 - 1. 事前評価の結果

3. 評価小委員会委員からのコメント

評価小委員会委員から本研究開発事業に対して頂いたコメントは以下のとおり。

- ・課題の多様性を勘案すると、バイオマーカーの開発費が分散する傾向にある。WHO等の研究においても同様のことが指摘されている。
- ・重要な課題であり、我が国のこれまでの「リスク評価」実績を生かして世界をリードする成果が望まれる。また、他の化学物質管理に関する事業と共にプログラムの一環として推進することが望ましい。

4. 新規研究開発事業の実施に向けての評価小委員会委員からのコメントに対する対処方針

コメント	対処法
<ul style="list-style-type: none"> ○課題の多様性を勘案すると、バイオマーカーの開発費が分散する傾向にある。WHO等の研究においても同様のことが指摘されている。 ○重要な課題であり、我が国のこれまでの「リスク評価」実績を生かして世界をリードする成果が望まれる。また、他の化学物質管理に関する事業と共にプログラムの一環として推進することが望ましい。 	<ul style="list-style-type: none"> ○本プロジェクトでは、「課題の多様性」という観点を踏まえ、化学物質の毒性の多様なエンドポイントについて、汎用的でかつ効率的な評価手法の開発を目的としており、バイオマーカー開発の方向性の集約に貢献するものと考えている。 ○発がん性、催奇形性、免疫毒性等の有害性評価手法の簡素化（in vitro化）は、化学物質の多様な毒性を効率的に評価可能な手法として世界に先駆けた開発であり、国際標準を目指していく。また、本プロジェクトは、他の化学物質管理に関する事業とともに化学物質のリスク評価・管理技術に係わる体系的な研究開発を実施している（次ページ；図1）。

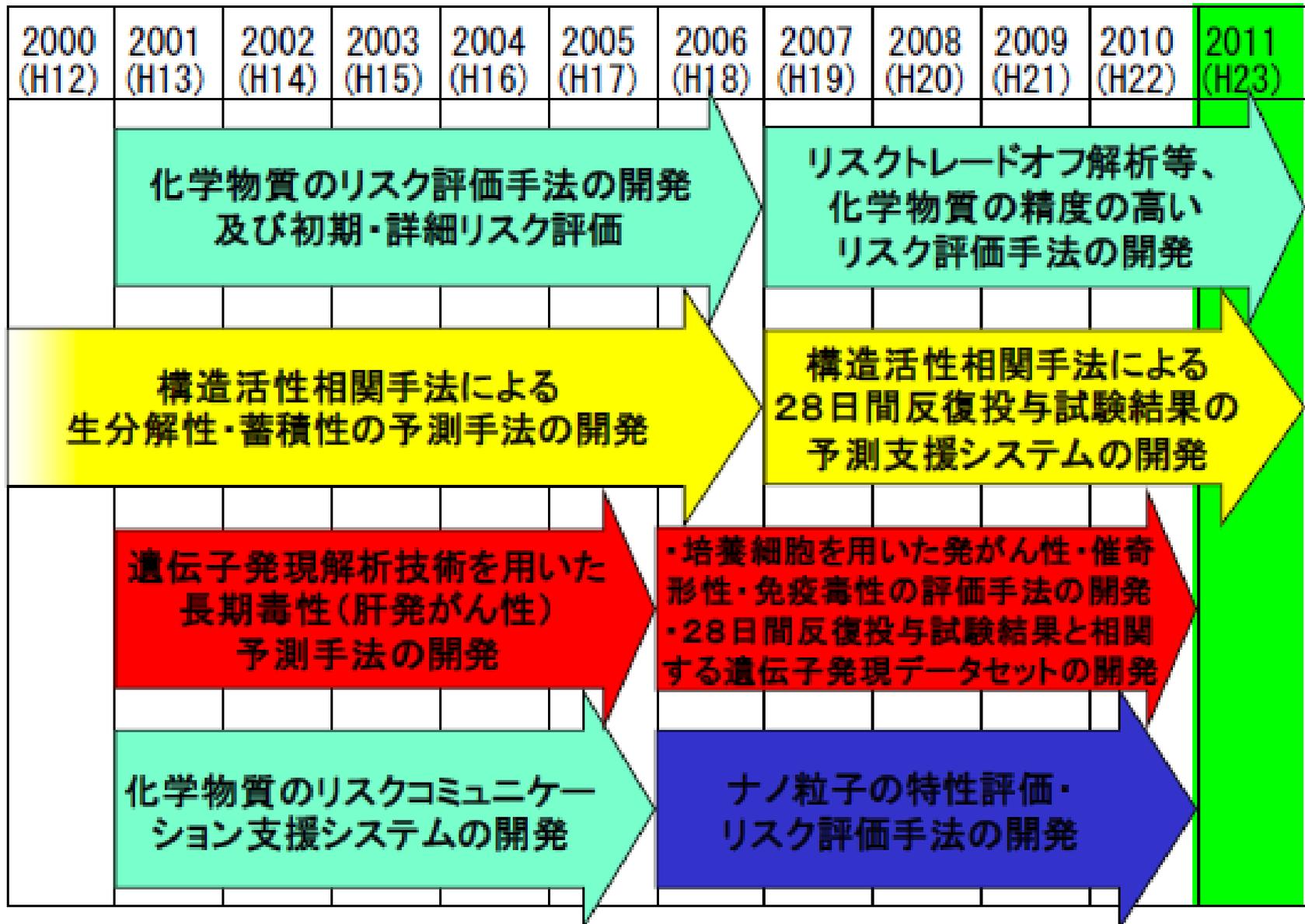


図1 経済産業省における化学物質管理に関する研究開発

8-2. 中間評価結果

出所) 中間評価の概要 平成26年1月24日 製造産業局化学物質管理課 より転記

1. 評価検討会

評価検討会
名称

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)

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

評価検討会
委員

委員

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

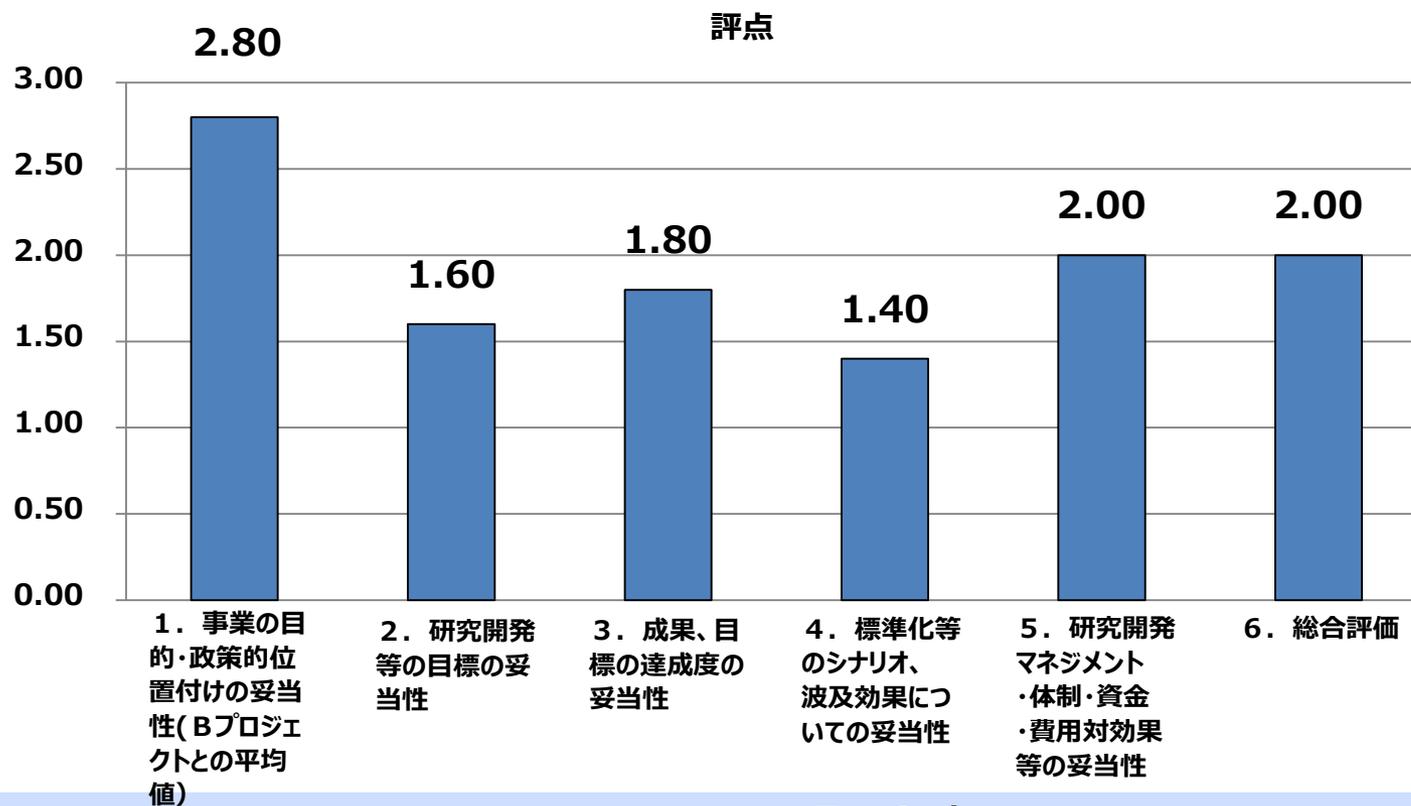
吉村 功
学校法人東京理科大学 名誉教授

2. 総合評価

- 本プロジェクトの有害性評価手法の開発は、従来の毒性学者の経験的な評価から、網羅的遺伝子発現変動データを活用した、より客観的に評価するアプローチである。個々の企業や研究機関において研究開発するのではなく、国が主導して事業を進めていくことは評価できる。
- また、ガイドライン化を想定した長期のビジョンの下で事業計画が立案されており、実験の進め方は適切で、実験結果の妥当性も認められる。
- 現行の毒性評価方法に遺伝子発現量解析を追加することにより、新たな毒性発現メカニズムが発見できる可能性があるため、研究を継続することには価値があり、化学物質以外の医薬品や化粧品などの毒性評価での活用も期待できる。
- 一方、ガイドライン化を目標とする場合は、情報の共有化が重要となってくるが、その取組みが十分とはいえない。必要条件だけで、発がん性予測モデルを形成しているが、十分条件を満たしていないと感じられ、評価方法のアルゴリズム開示と第三者による評価が必要である。（提言に対する対処方針の2. 7. 及び8. 参照）
- 国際規格化に向けて指標や基準を策定するには、組織採取法や遺伝子発現データ取得などにおいてデータの再現性や施設間差などを考慮することが必要である。
（提言に対する対処方針の2. 参照）
- また、これまでに多くの研究者が提案しているいろいろな手法を適切に取り入れるとともに、併せて、限られた資金の中では、公表されている厚生労働省及びNEDOプロジェクトのノウハウやデータを積極的に活用すべきである。（提言に対する対処方針の6. 参照）

3. 評点結果

- 「経済産業省技術評価指針」に基づき、プロジェクト中間評価において、評点法による評価を実施した。
- 「2.研究開発等の目標の妥当性」については、具体的な数値目標が設定されていないとの理由から評点が低かった。
- 「3.成果、目標の達成度の妥当性」については、ガイドライン化に向けて、解析手法の情報開示と第三者による再評価が必要であるとの理由から評点が低かった。
- 「4.標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性」については、特に国際標準化に向けた具体的な方法が明確でない、標準化を目指すならば関連する研究成果の情報を公開するべきとの理由から評点が低かった。



- 【評価項目の判定基準】
評価項目 1.~5.
3点：非常に重要又は非常によい
2点：重要又はよい
1点：概ね妥当
0点：妥当でない
6. 総合評価
3点：事業は優れており、より積極的に推進すべきである。
2点：事業は良好であり、継続すべきである。
1点：事業は継続して良いが、大幅に見直す必要がある。
0点：事業を中止することが望ましい。

8-2. 中間評価結果

4. 提言及び提言に対する対処方針（1）

今後の研究開発の方向等に関する提言

1. 被験物質の中にタイトルにある「石油精製物質等」に含まれる物質を入れておいた方がよい。
2. 発がん予測系アルゴリズムを速やかに公開して、国内外の第三者が肯定的な評価を引き出すことにより、国際規格化への弾みがつくと考えられる。
3. メカニズムベースで毒性評価可能なバイオマーカー遺伝子の選択に対し積極的に挑戦すること。

提言に対する対処方針

1. 「石油精製物質等」に相当する物質については、今後、試験を実施する予定です。
2. ご示唆いただいた内容は、国際規格化に向け重要だと考えています。
 発がん予測システムは、計算アルゴリズムは公開されているものを活用し、発がんメカニズムに応じた予測遺伝子(マーカー遺伝子)を選定して予測式を構築し、一つのシステムとしています。
 発がん予測システムの概要及び予測遺伝子(マーカー遺伝子)リストにつきましては、これまでに学会発表等や特許公報により情報公開していますが、予測式に用いている係数などの情報については、本プロジェクト開始以前に本事業実施者の費用で独自に開発したものであり、開発者の知的財産権の観点から直ちに公開することは難しいと考えています。
 なお、特許公報で既に公開されています肝発がんに関する一連の予測遺伝子(マーカー遺伝子)については、本プロジェクトの成果も考慮して論文化する予定にしております。今後、本プロジェクトの成果を可能な範囲で論文化し、国内外の第三者に評価していただくことを考えております。
3. ご示唆のとおり、毒性発現機構からのバイオマーカー遺伝子の選択は重要だと考えています。
 現在、代表的な肝毒性物質として四塩化炭素を、腎毒性物質としてシスプラチンを選定し、化学物質の毒性メカニズムを考慮した研究を進めています。
 今後、さらに遺伝子発現量データを蓄積し、遺伝子ネットワーク解析や遺伝子機能情報調査を積み重ねることで、プロジェクトの終了時までには個々の毒性症状の作用機序を類推し、メカニズムに基づく毒性評価のためのバイオマーカー遺伝子の選択検討につなげたいと考えています。

8-2. 中間評価結果

4. 提言及び提言に対する対処方針（2）

今後の研究開発の方向等に関する提言

4. 本プロジェクトはラットの動物試験データに基づいた有害性予測手法の研究開発であるが、課題はヒトへのリスク評価であるのでヒトを視野に入れた取り組みが重要である。
5. 優秀なバイオインフォマティクソンと毒性研究者との協力・連携体制で推進すること。
6. 日本でのToxicogenomics Project (TGP) や欧米でのToxicogenomics研究において、多くの化合物の遺伝子発現変動データが取得されている。これらの情報を単に検証などに用いるだけでなく計画立案時から戦略的に活用することを期待する。

提言に対する対処方針

4. 本プロジェクトでは、まず動物試験の既存結果との比較から予測手法の有効性を確認することを優先して進めています。したがって、ヒトへの外挿につきましては、将来的な課題と考えています。
5. 推進委員会にバイオインフォマティクス分野の第一人者である専門家に入っただき、ご意見を伺い進めております。
バイオインフォマティクスとしては、日本バイオインフォマティクス学会(JSBi)認定のバイオインフォマティクソンを解析担当としています。
なお、推進委員会には第一線の毒性研究者にご参加いただき研究を推進しています。
今後、さらに協力・連携等が必要な場合は、経済産業省の担当官とも調整し、対応することを考えています。
6. ご指摘いただいたとおり、本プロジェクトで試験できる物質には予算、期間の制約から限界があり、得られる遺伝子情報も限られます。
そこで、本プロジェクトの計画立案時からToxicogenomics Project (TGP) データの活用を積極的に進めることを考えていました。具体的には、発がん性予測法の検証にTGPデータを用いるのみでなく、肝毒性、腎毒性の評価手法においても、TGPの動物試験データ及び遺伝子発現データの解析を進め、その結果を毒性判別式のプロトタイプ案作成に利用しています。その結果として、信頼性の高い毒性分類が可能となり、さらにマーカー遺伝子候補選定についても精度向上を図ることができております。今後もさらにTGPデータを活用していく方針です。

8-2. 中間評価結果

4. 提言及び提言に対する対処方針（3）

今後の研究開発の方向等に関する提言

7. 残されたプロジェクト期間で、戦略的かつ効率的に有害性評価手法の精度をより一層向上するため及び更なる波及効果を高めるために、外部からの専門家（TGPの元メンバー、化学系企業の毒性専門家など）を交えて、バイオマーカー遺伝子の選定や発がん予測システムの充実化を図ることを提案したい。
8. 今後国際規格（標準）化に向け、技術の確立と実用化には化学系企業の毒性専門家の意見・協力も必要である。
9. 麻酔の遺伝子発現データへの影響等に関する基礎データは、ガイドライン化を考えた場合に非常に重要な情報となる。必要に応じて、追加の基礎データの取得を行い、これらの情報を整理し、速やかに論文等により公表して情報共有を進めて頂きたい。

提言に対する対処方針

7. 先にご紹介のとおり、研究推進委員会を設置し、外部の先生方のご意見を取り入れながら研究を進めているところです。
さらに、外部専門家（TGP元メンバー、化学系企業の毒性専門家など）を交えたプロジェクトの推進、国際標準化、技術確立のためのご意見、協力等のご提案は、本プロジェクト成果に大きく影響するものと考えます。
さらなる専門家を交えた形で、バイオマーカー遺伝子の選定については検討して参りたいと考えております。
8. 前述のとおりです。
9. これまでに取得した基礎データは、腎臓の部位別遺伝子発現データ及び麻酔法の違いによる遺伝子発現データです。腎臓の部位別遺伝子発現データに関する論文を先行させ、麻酔法の違いによる遺伝子発現データについても順次論文等において公表する予定です。

8 - 3. 評価ワーキンググループのコメント及びコメントに対する対処方針

(中間評価)

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

(プロジェクトの事業内容の明確化について)

本プロジェクトは、経済産業省のプロジェクトとして化学物質管理に必要な新たな有害性試験方法の標準化を目的としているが、EU等と比べて予算的に小規模のプロジェクトであり、本プロジェクトで実施する事業の範囲と経済産業省が実施する意義を明確にして着実に事業を実施すべきである。

対処方針

EUの事業 (SEURAT) は、EUの化粧品産業界が参加している同分野における動物を使わない試験手法開発であり、皮膚感作性、刺激性試験など化粧品に求められる試験項目を網羅しています。それらとくらべると本プロジェクトは金額的に小さいものの、将来、化審法による新規化学物質の製造・輸入に求められる試験がより簡便・低コストで行われるよう、*in vitro*、*in vivo* の新たな有害性評価の試験方法に的を絞って開発を実施しています。

参考) SEURAT (Safety Evaluation Ultimately Replacing Animal Testing) : 欧州の化粧品の代替試験法開発プロジェクト

參考資料

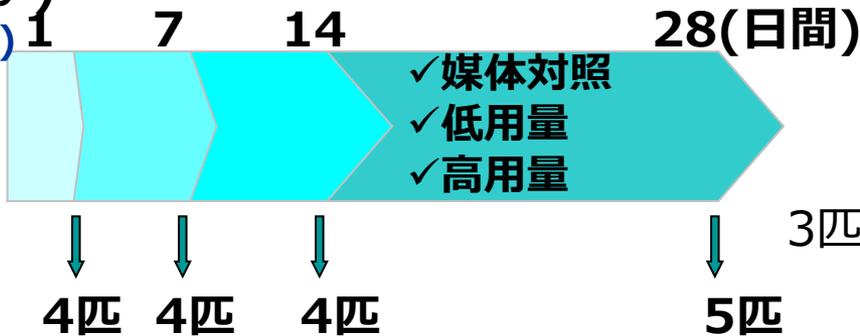
実験系 動物実験及びマイクロアレイ実験

■ 28日間反復投与試験*をベースに実施

SDラット(♂)
Cri:CD(SD)

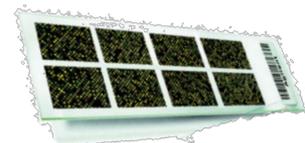


5週齢



[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



Agilent Whole Rat
Genome Toxplus Array

3匹/群 (4時点)

5匹

【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

〔一般毒性・発がん性〕

被験物質リスト-1 14物質(16試験) : H23-24年度実施

#	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 Bromodichloromethane	B10-0092(C) B10-0103(I)	有	有	P	40, 200
2	PP Phenolphthalein	B10-0093	有	有(慢毒)	N	200, 1000
3	o-NA o-Nitroanisole	B10-0094	有	有	P	80, 400
4	2A4Np 2-Amino-4-nitrophenol	B10-0095	有	有	P	150, 750
5	TBA tert-Butyl alcohol	B10-0096-C B10-0096-I	有	有	N	200, 1000
6	2-AA o-Anthranilic acid	B10-0097	影響なし	影響なし	N	200, 1000
7	o-AH o-Anisidine hydrochloride	B10-0098	影響なし	影響なし	P	140, 700
8	TCEP Tris(2-Chloroethyl) Phosphate	B10-0099	影響なし	有(慢毒)	P	80, 400
9	DBNPG 2,2-Bis(Bromomethyl)-1,3-Propanediol	B10-0100	影響なし	有	P	200, 1000
10	Na3-NTA-H2O Nitrilotriacetic acid trisodium monohydrate	B10-0101	影響なし	有(慢毒)	N	200, 1000
11	ADBAQ 1-Amino-2,4-Dibromoanthraquinone	B10-0102	有	有	P	200, 1000
12	AQ Anthraquinone	B10-0104	有	有	P	200, 1000
13	TCP 1,2,3-Trichloropropane	B10-0105	有	有	P	15, 75
14	DMN N-Nitrosodimethylamine	B10-0106	有	有	P	0.8, 4

〔一般毒性・発がん性〕

被験物質リスト-2

8物質(9試験) : H25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	CCl ₄ Carbon-tetrachloride	B10-0108	有	有	P	20、100
2	CP Cisplatin	B10-0114(経口) B15-0006(静注)	影響なし	有	P	0.75、3.75 0.15、0.75
3	CMU Monuron	B10-0111	影響なし	有	N	40、200
4	BA Benzyl Acetate	B10-0107	影響なし	有	N	200、1,000
5	TBBC 4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	B10-0109	影響なし	有	N	60、300
6	DPG Dipropylene glycol	B10-0110	影響なし	有	N	200、1,000
7	TOCP Tricresyl Phosphate	B10-0115	影響なし	有	N	40、200
8	DNPT N,N'- Dinitrosopentamethylenetetramine	B10-0113	影響なし	Equivocal	P	40、200

P; 陽性、N; 陰性、NT; No Test

* 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」

被験物質リスト-1 H26-27年度→合計：32物質(35試験)

#	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	KBrO3 Potassium bromate	B10-0117	影響なし	影響なし	P	20, 100
2	EBD 1,2-Dibromoethane	B10-0118	有(慢毒)	影響なし	P	15, 75
3	En•2HCl Ethylenediamine dihydrochlorid	B10-0119	有(慢毒)	有(慢毒)	N	100, 500
4	CTN Chlorothalonil	B10-0120	影響なし	有(慢毒)	N	100, 500
5	PBZ Phenylbutazone	B10-0121	有	有	N	40, 200
6	OTA Ochratoxin A	B10-0122	影響なし	有	P	0.2, 1
7	pNA p-Nitroanisole	B10-0123	有	有	P	100, 500
8	DCDPS Sulfone, bis(p-chlorophenyl)	B10-0124	有	有	N	50, 250
9	AMIDOL 4-hydroxy-m-phenylenediammonium dichloride	B10-0125	影響なし	有	P	20, 100
10	DEN N-Diethylnitrosamine	B30-0002 (腫瘍性変化が現れるまでの投与)	有	影響なし	P	0.8, 4

P; 陽性、N; 陰性、* 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」

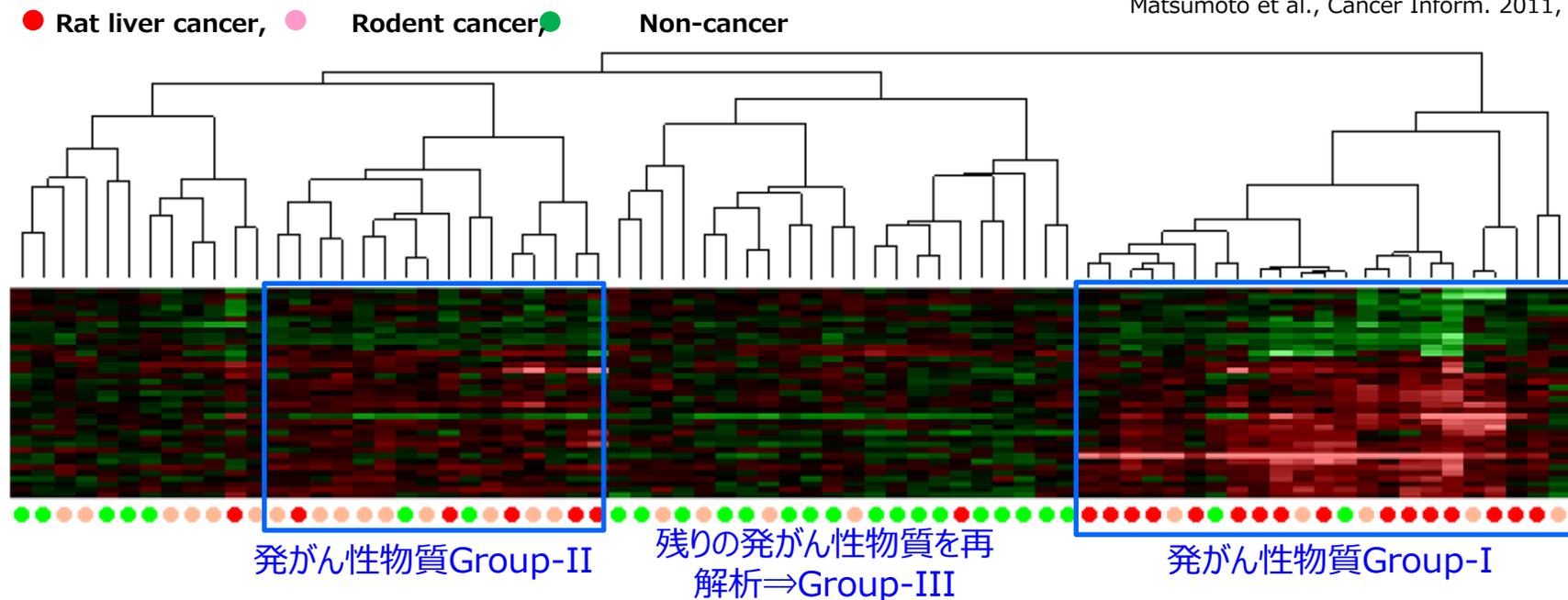
〔発がん性(肝臓)〕

短期肝発がん性スクリーニング法：CARCINOscreen[®]とは？

仮説 化合物の種類によって様々な発がん性メカニズムが存在する

遺伝子発現量データから階層的クラスタリングを行い、68化合物を
グループ分類 ⇒ Group-I, II, III*

* Matsumoto et al., Cancer Inform. 2009, 253-69.
Matsumoto et al., Cancer Inform. 2011, 259-71.



各化合物グループはAmes試験の陽性/陰性に関係なく形成され、
発がんメカニズムが類似する化合物群に分類された可能性がある。

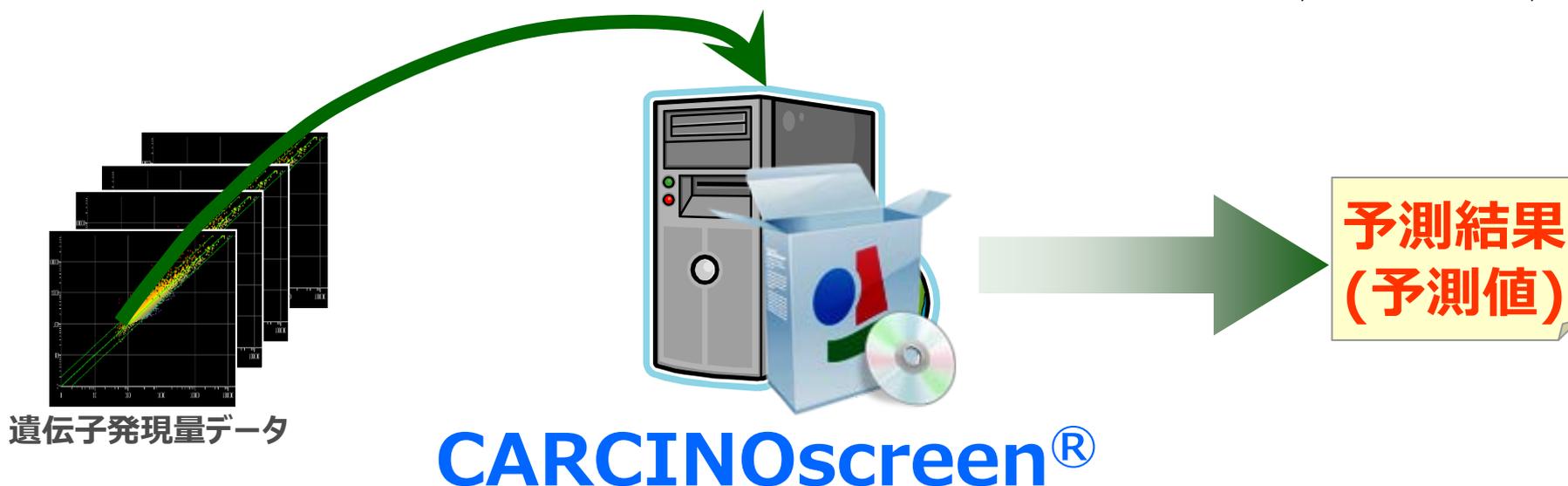
〔発がん性(肝臓)〕

短期肝発がん性スクリーニング法：CARCINOscreen[®]とは？

仮説 化合物の種類によって様々な発がん性メカニズムが存在する

遺伝子発現量データから階層的クラスタリングを行い、68化合物を
グループ分類 ⇒ Group-I, II, III*

* Matsumoto et al., Cancer Inform. 2009, 253-69.
Matsumoto et al., Cancer Inform. 2011, 259-71.



化合物グループに応じて個別の予測式を構築し、それぞれを組合わせて1つのシステムとした