

(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②

肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試 験法の開発

研究開発プロジェクトの概要

平成28年12月15日

産業製造局化学物質管理課

目次

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

本事業に関連する国の計画

○第4期科学技術基本計画（2011年8月閣議決定）

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

○技術戦略マップ^o（2010年6月経済産業省編）

◆化学物質総合評価管理分野の技術マップ

関連する技術課題

- (75) 発がん性、生殖毒性、神経毒性の長期毒性についての高速のin vivo試験法
- (76) マルチエンドポイントのin vivo試験法
- (83) 網羅的解析技術を用いた有害性バイオマーカーの探索手法
- (72) E S細胞を用いたin vitroの試験法
- (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の試験法
- (78) マルチエンドポイントの有害性評価手法

遺伝子P J

細胞P J

世界的な動向における本プロジェクトの位置づけ

WSSD目標達成のための取り組み例

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

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

当省(国)が実施することの必要性

①多様な研究機関の結集

- ・本研究開発は、迅速且つ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。

②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。

③国際競争力強化のための国際ルールづくり

- ・本研究開発は、行政的な取り組みでの活用も想定しつつ、産業競争力を強化することを目的として国際標準化を目指すものであり、国が先導して開発を推進すべきものである。



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。

目次

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

2. 事前及び中間評価の結果

2-1. 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

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
<p>○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。</p> <p>○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。</p>	<p>○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。</p> <p>○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（図1）。</p>

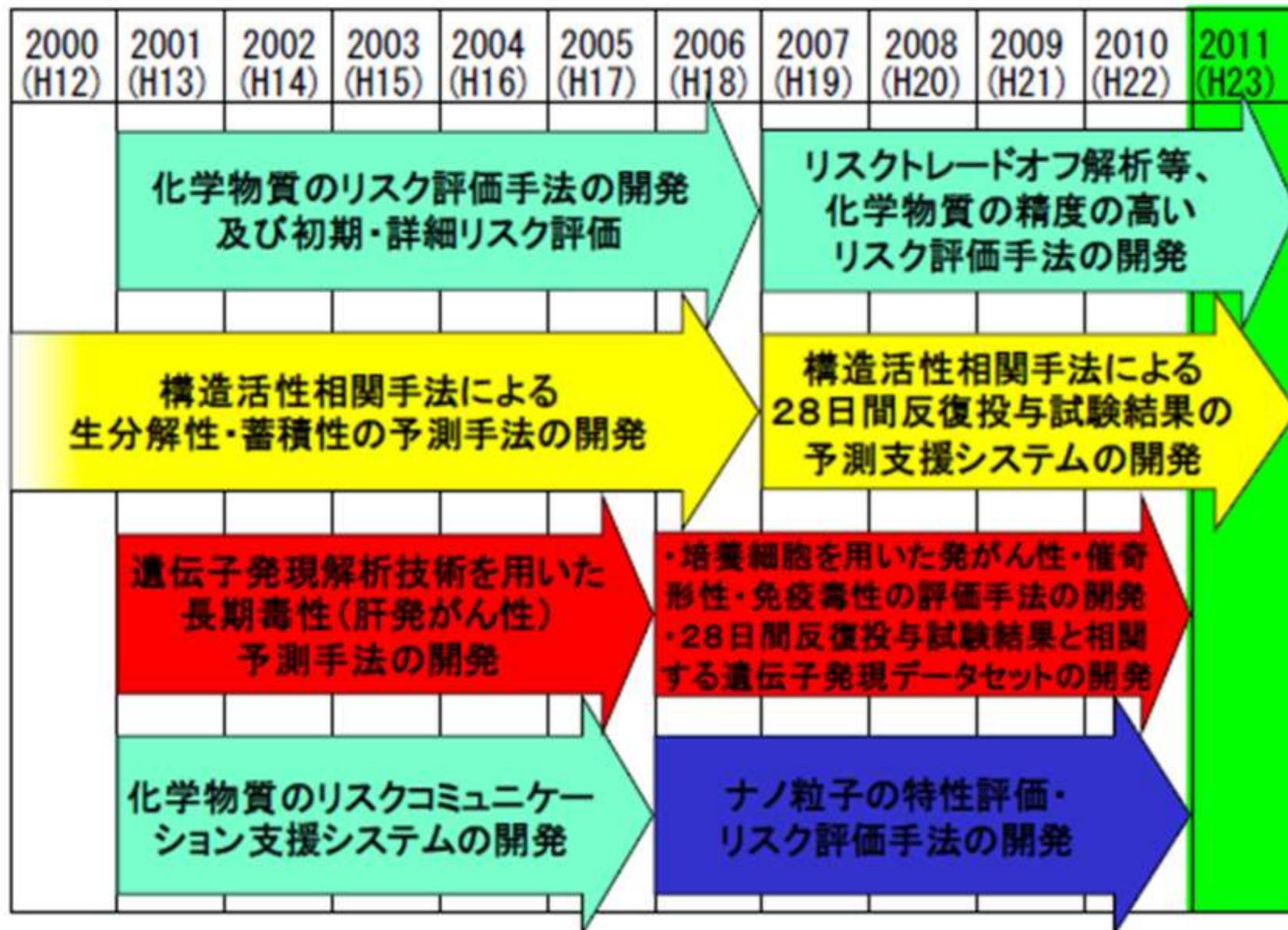


図1. 経済産業省における化学物質管理に関する研究開発

2-2. 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 (肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発)	
評価検討会 委員	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
	委員	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

2. 総合評価

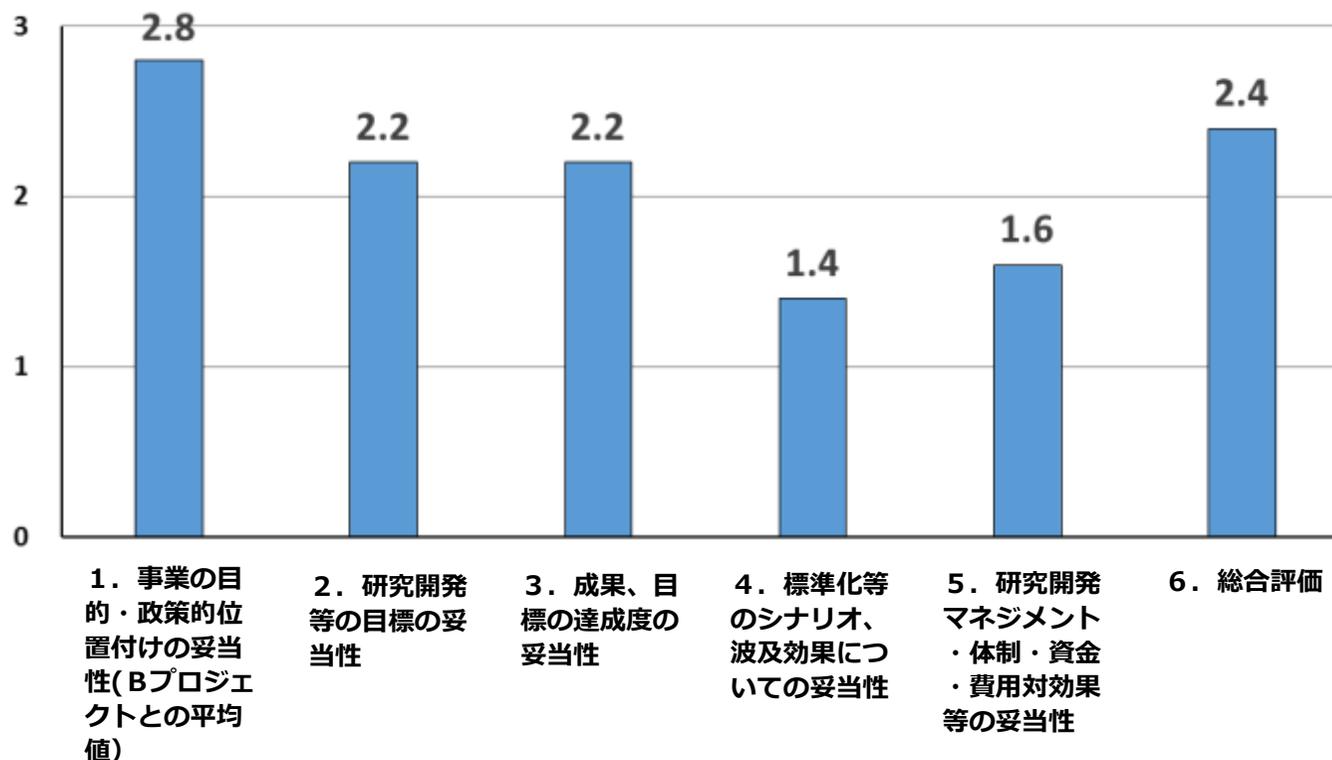
- 近年の科学技術を活用して新規のin vitro毒性試験系を構築することは、**極めて重要な研究テーマ**であり、国家政策上、極めて意義の高い取り組みであると評価できる。また、**我が国発の科学・技術導入が計られている点は魅力的**であり、我が国が世界でリーダーシップをとる上でひとつの切り札となりうる研究と思われる。
- 現状の技術を出発点とし、まずは、実験動物レベルで確実にin vivoで発現する毒性をin vitroで評価できる系の構築を目指すという現実的な戦略は妥当であり、**中間目標を適切に達成しながら問題なく実施されていると評価**する。また、本プロジェクトの成果は、医薬品や化粧品など、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。

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。

「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、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の理由から評点が低かった。

「5.研究開発マネジメント等の妥当性」については、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る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。

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. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 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。

提言に対する対処方針

1. これまでも厚生労働省トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト（TGP2）やNEDO「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」等で開発された複数のデータベース活用を図っており、in vitro細胞試験のメリットを活かせるメカニズムに基づくマーカー遺伝子の選択にも今後注力する方針である。
2. これまでも専門家を招いた勉強会を複数回実施しており、遺伝子発現解析プロジェクトを推進する一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）との連携を一層深めつつ戦略的なマーカー遺伝子の選定に注力する方針である。
3. 採用した培養条件と比較可能な環境下でのマーカー遺伝子のmRNA発現の確認については、近々実施する方針である。
4. 肝臓については、発光マウスより単離した肝細胞での平面（2D）培養によりマーカー遺伝子のmRNAレベルの発現量と発光量を確認する予定である。一方、腎臓については、ラットKS細胞（岡山大喜多村らがすでに樹立した培養細胞株）やその他の近位尿細管由来培養細胞を用いた有用性評価等を行ない、種々の条件でのデータを比較する予定である。

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

5. 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。
6. 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。

提言に対する対処方針

5. 平成25年度地域イノベーション戦略支援プログラムに「鳥取大学発染色体工学技術を用いた創薬支援等新産業クラスターの創出」というテーマで提案、採択され、事業を推進しているところである。また、本研究の成果を大学発ベンチャーに技術移転することも視野に入れている。さらに、アドバイザーとして各種専門家を招き適宜アドバイスを受けているところでもある。
6. ヒトを含めたiPS細胞の毒性試験については、最新情報の入手を図っており、これらの成果の活用についても考慮しているところである。in vitro分化誘導によってヒトiPS細胞から目的の組織を構築する研究が盛んに行なわれているが、腎臓や肝臓はその組織を構成する細胞種や構造の複雑さから、生体内の組織を反映させることは極めて困難であり、in vitroとin vivoの違いの問題が生じる。一方、マウス細胞を用いた場合、ヒトとマウスの種差の問題が生じる。しかし、マウスES細胞からはキメラマウスを容易に作製でき、この個体では機能的な組織が構築出来るという優位性がある。また、この組織からは機能細胞を取り出して試験に用いることが可能である。すなわち本事業では、ヒトiPS細胞の分化誘導では困難であるin vitroとin vivoを比較した試験が可能になる。

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. 本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。

8. 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おいて早くルールを作り、いいポジションを得られるような展開を期待したい。

提言に対する対処方針

7. 人工染色体ベクターと発光レポーター技術の優位性については、これまでの研究で実証しているところであり、成果の1つとしては種々の毒性試験に応用可能な基盤技術の確立である。さらに、肝臓・腎臓・神経毒性については、当初より想定しているin vitroアッセイ試験系の確立とプロトコール化を出口目標としているところである。

8. 小島PLはJaCVAMとしてEU（ECVAM）、米国（ICCVAM）及び韓国（KoCVAM）との連携を保ち、国際競争力に遅れを取らぬよう本プロジェクト推進を図っている。引き続き国際的な動向を把握し、国際協力体制を保ちながら、いち早くOECDやICHのテストガイドラインを目指していく予定である。

目次

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

3.事業の概要

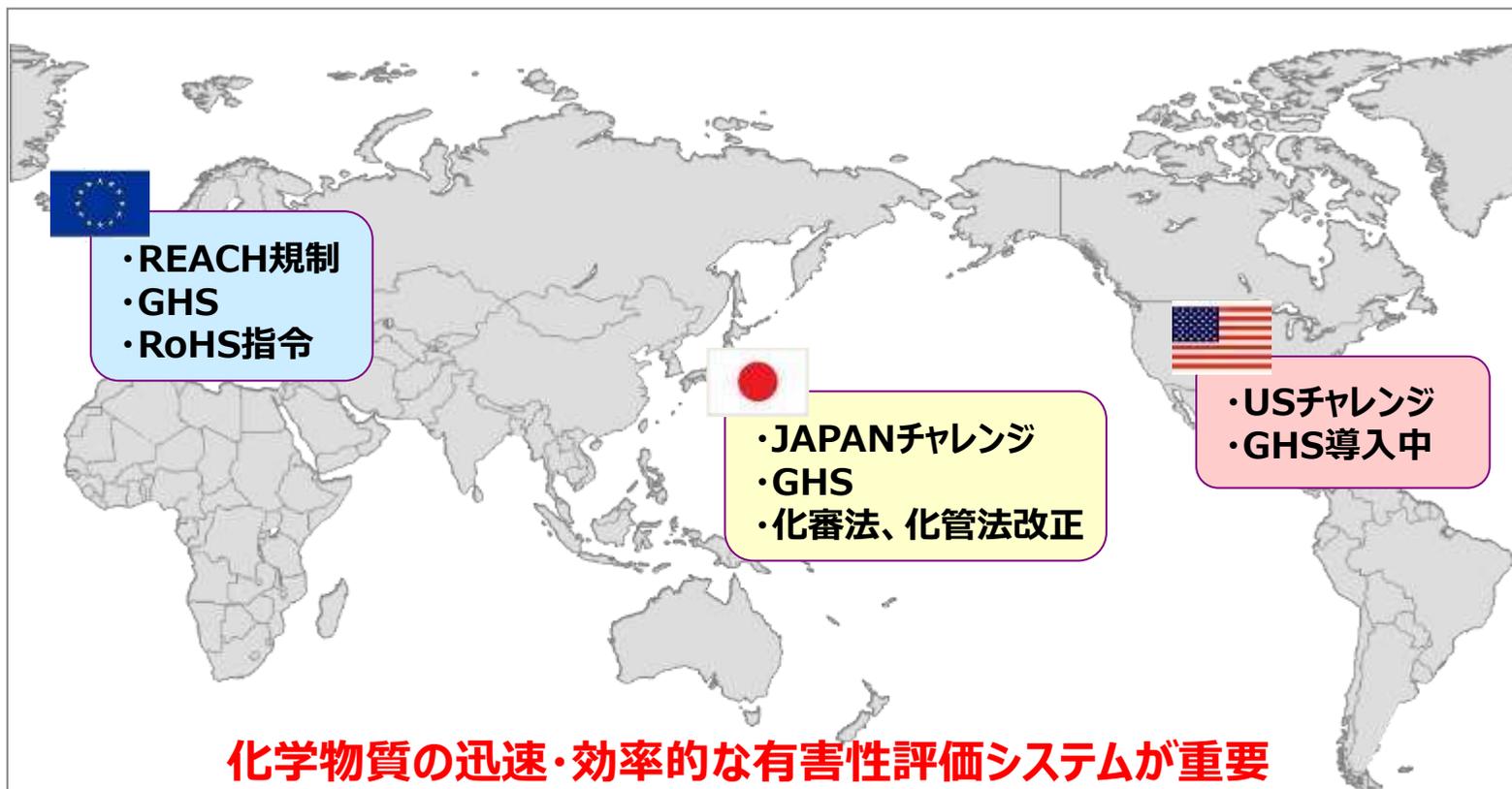
概 要	本研究開発では、石油精製物質等の化学物質において、国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、培養細胞手法等による評価技術の確立を目指す。
実施期間	平成23年度～平成27年度（5年間）
実施形態	国からの直執行 (石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発への委託事業)
予算総額	4.95億円 (平成23年度：1.03億円 平成25年度：1.02億円 平成27年度：0.90億円)
実施者	公益財団法人 鳥取県産業振興機構、国立大学法人 鳥取大学、国立大学法人 岡山大学、住友化学株式会社、国立研究開発法人 産業技術総合研究所、一般財団法人 食品薬品安全センター
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 安全性予測評価部 室長
テーマリーダー	田中 憲穂 一般財団法人食品薬品安全センター(H23.4～H24.9) 押村 光雄 国立大学法人鳥取大学 特任教授(H24.10～H28.3)

背景

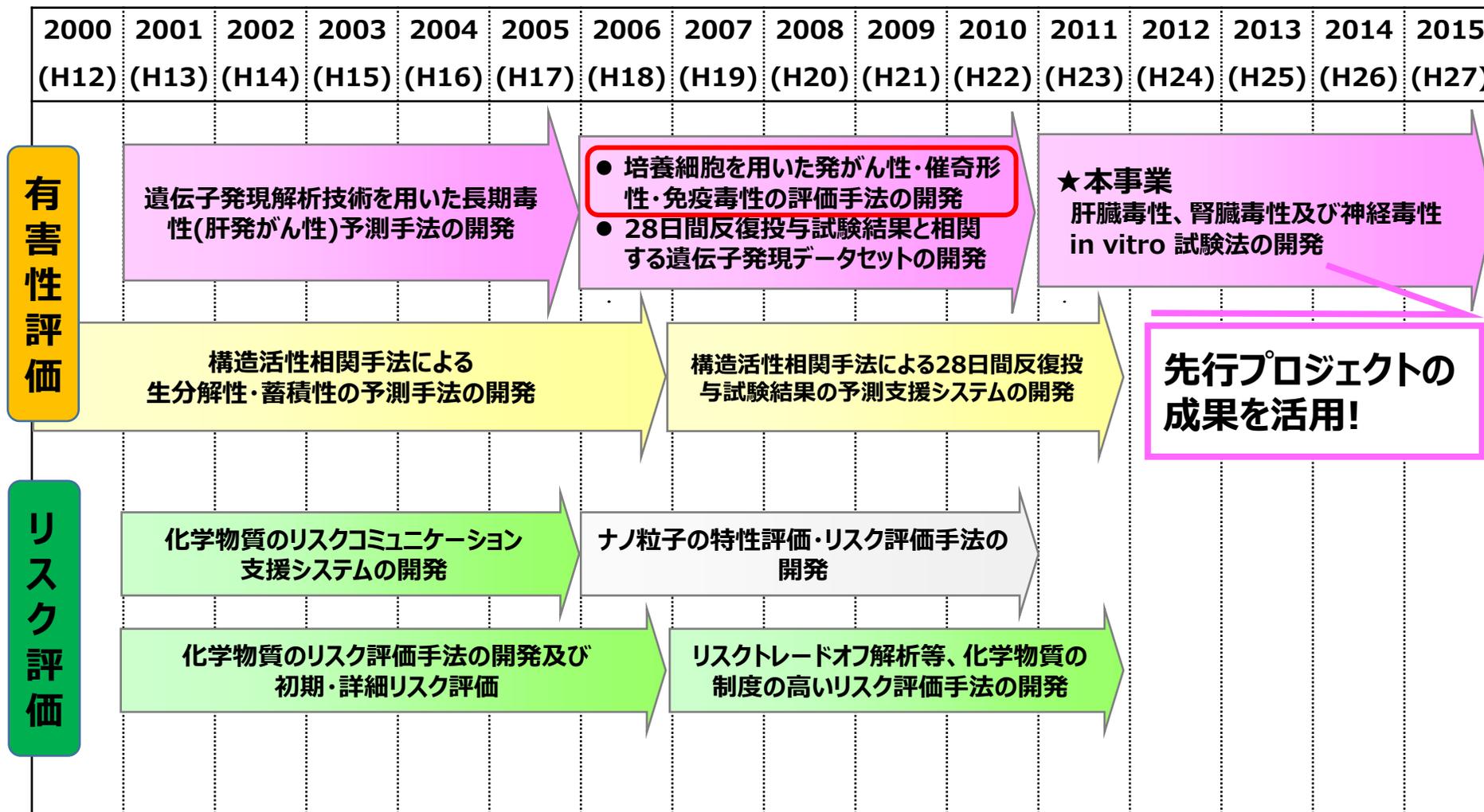
世界的な化学物質管理の流れ

2002年「持続可能な開発に関する世界首脳会議(WSSD)」

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



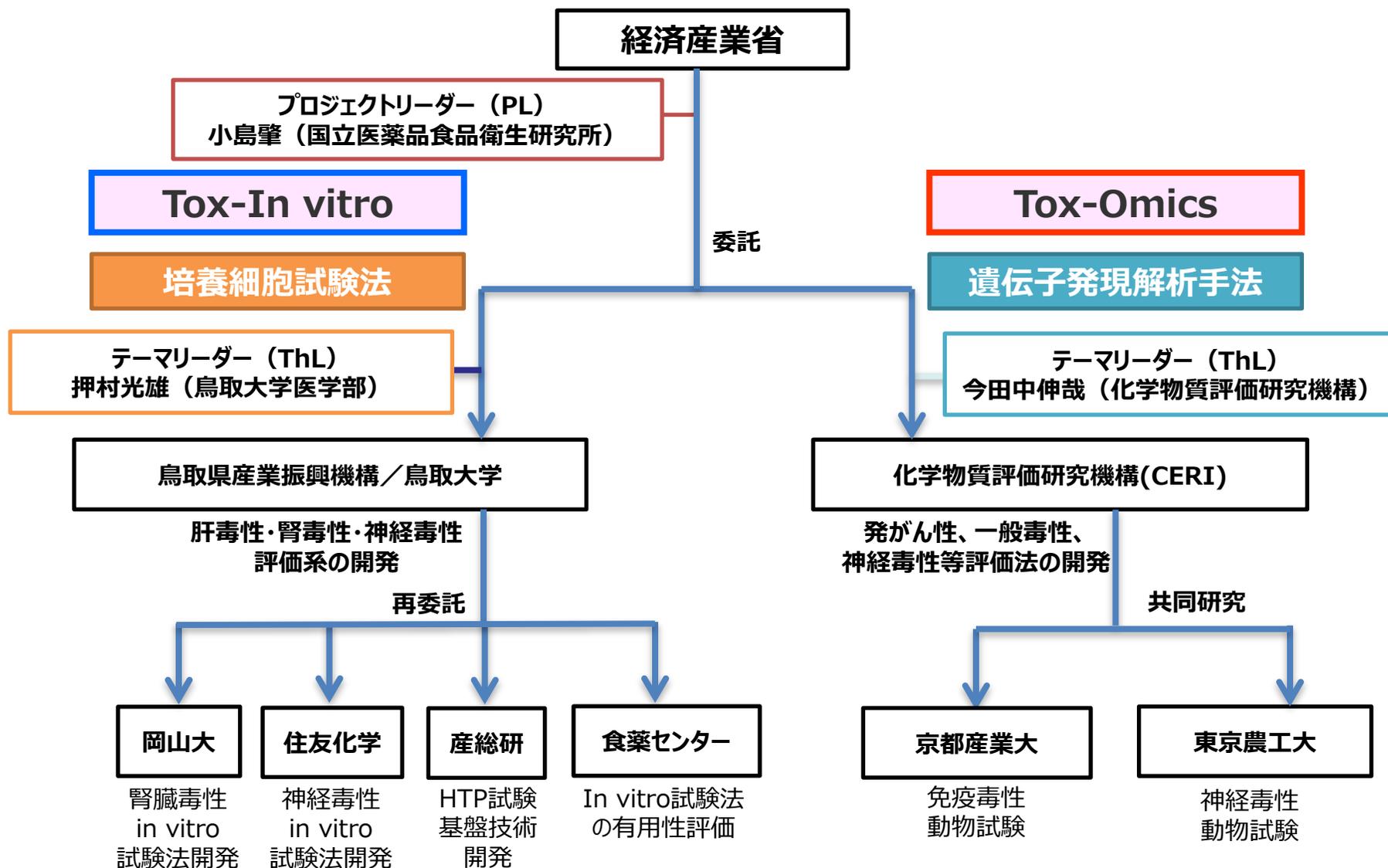
過去のプロジェクトとの関連性



研究開発の化審法への適用と具体的目標

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

プロジェクトの実施体制 (ARCH-Tox)

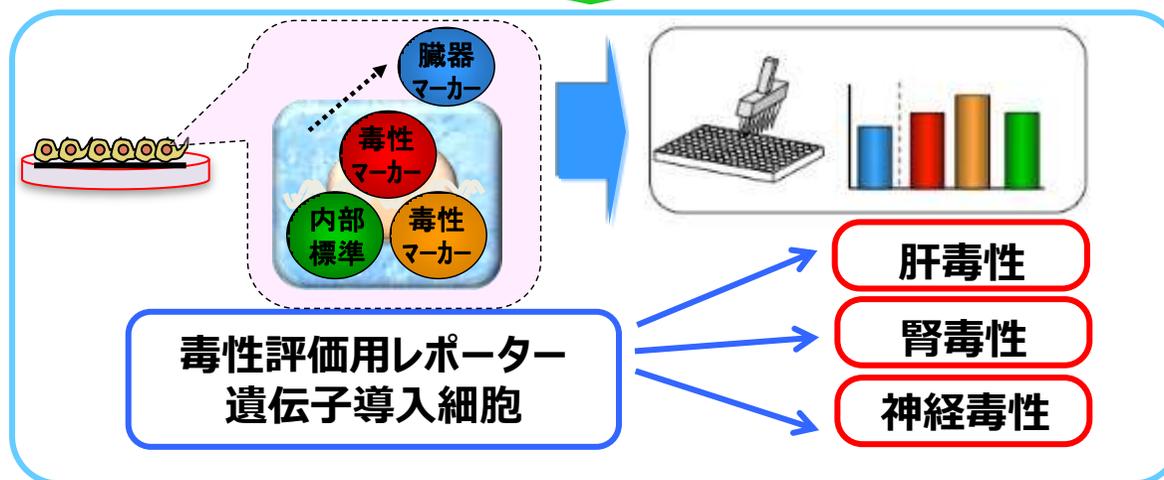


Tox-in vitro研究開発の目標

本研究では、**石油精製化学物質等**の動物試験を**培養細胞**を用いた
***in vitro*試験法**で補完できる有害性スクリーニングシステムを開発

〔目標〕毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、
効率的に有害性を評価できる新たな試験法を開発する

化学物質の毒性スクリーニング



研究開発の流れ



外部有識者からの助言等

■ 研究推進委員会の開催（2回/年×5年）

研究推進委員会（五十音順）〔年2回開催；計10回〕

板垣 宏（委員長）	横浜国立大学
一戸 紀孝	国立精神・神経研究医療センター
春山 哲也	九州工業大学
松本 一彦	学習院大学
宮城嶋 利一	システム薬学研究機構

■ In vitro肝毒性評価分科会関係者との意見交換会（1回）

→肝細胞3次元培養法開発へ

■ 製薬・細胞販売メーカー関係者との意見交換（5回）

→試験細胞販売に向けた意見交換

最新動向入手、民間利用に向けたアウトカム戦略検討

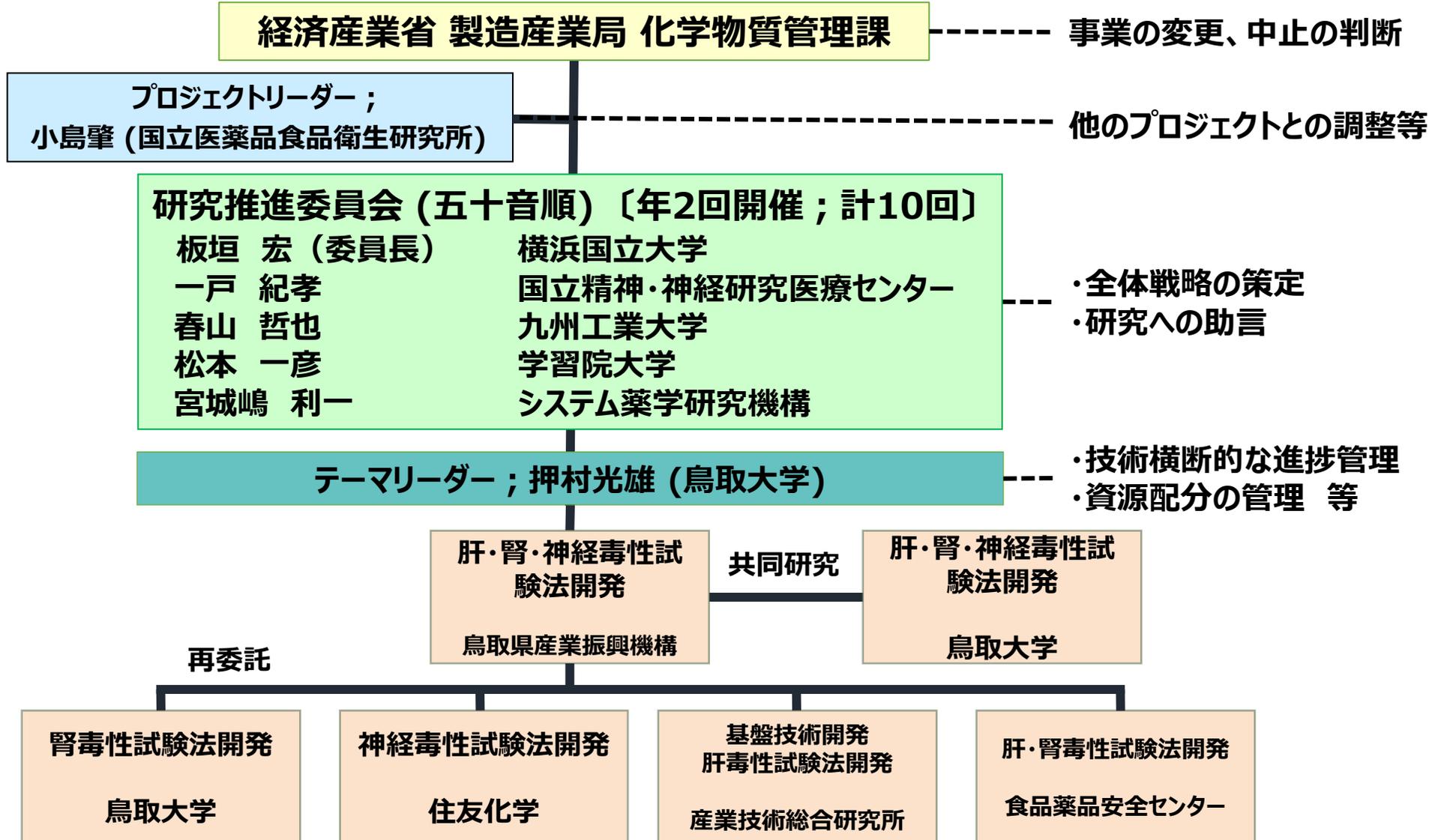
■ 各細胞毒性の専門家との意見交換(適宜)

→試験系開発の妥当性確認

目次

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

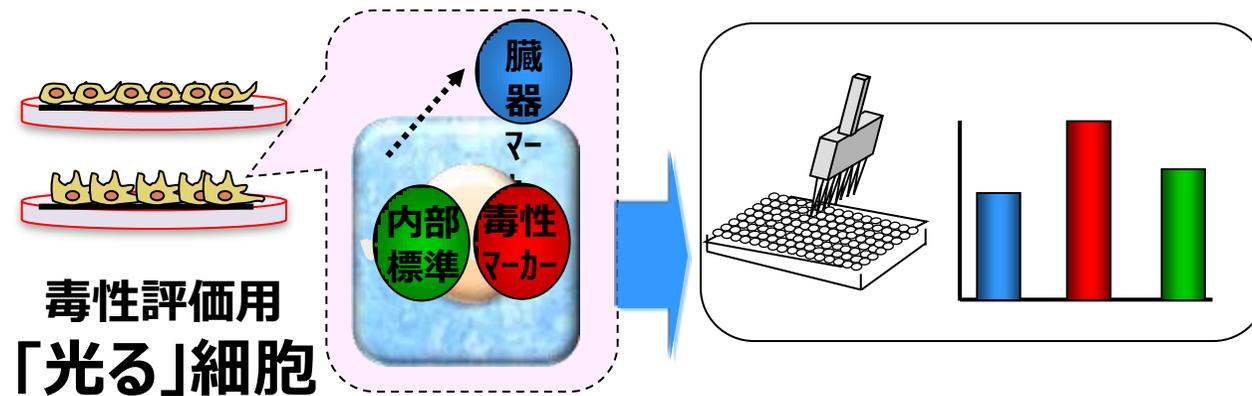
4. 研究開発の実施・マネジメント体制等



年2～3回の実施メンバーでの進捗報告会、年2回の研究開発推進委員会を開催
→報告会・推進委員会での意見を研究開発にフィードバック

本プロジェクトで用いたコア技術

- 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)発光レポーターシステム…毒性を簡便に発光で定量化



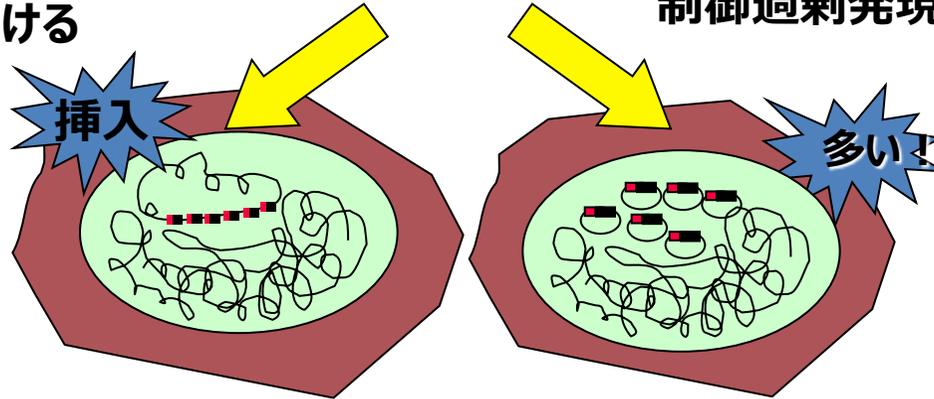
1) 人工染色体ベクター 安定で高品質

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

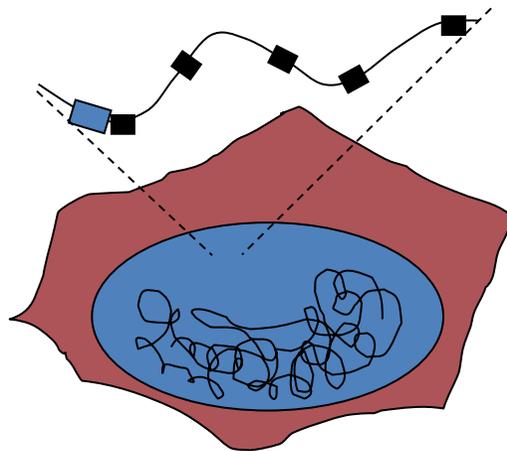


長い制御領域全長を導入できない
制御過剰発現／発現消失が起きる



宿主遺伝子を破壊する可能性がある 導入コピー数のコントロール不可

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**

(調節領域を含む遺伝子全長の導入が可能)

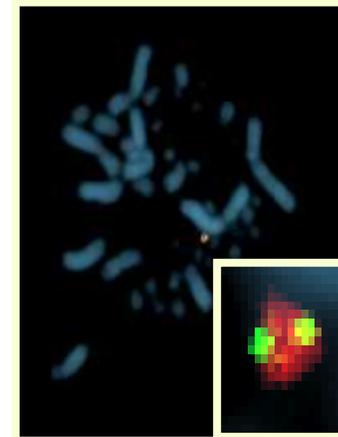
複数の遺伝子の導入が可能

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

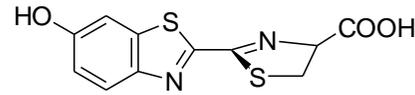
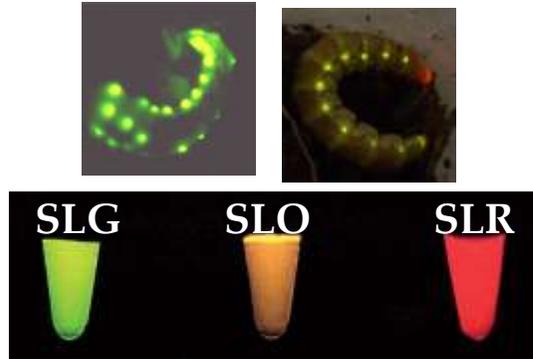
長期間、安定に機能する

哺乳類人工染色体



2) 発光レポーターシステム 簡便に定量化

多色発光レポーター

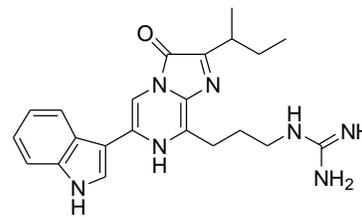
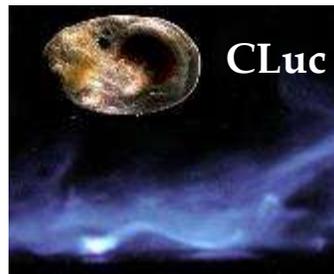


Firefly luciferin
(1961, E. H. White)

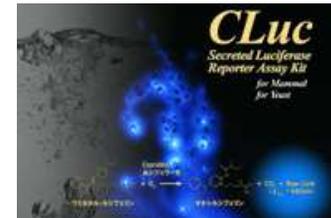


Tripluc Luciferase Assay
Reagent (TOYOBO)

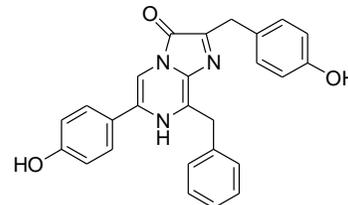
分泌型発光レポーター



Cypridina luciferin
(1965, Y. Hirata)



CLuc Assay Reagent (ATTO)



coelenterazine
(1975, S. Inoue)



BioLux Gaussia Luciferase
Flex Assay Kit (NEB)

実施項目の詳細説明

- ① **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**
- ② **肝臓毒性in vitro試験法の開発**
- ③ **腎臓毒性in vitro試験法の開発**
- ④ **神経毒性in vitro試験法の開発**

ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた 基盤技術の開発

●最終目標（平成27年度末）

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検証

発光レポーター遺伝子の改良

複数レポーター導入安定細胞株の均一性と安定性の検証

レポーター導入細胞株（1種～3種レポーター導入）の継代安定性を確認

●個体・臓器等の発光検出の検証、試験系の測定条件の最適化

各種発光レポーターの発光測定方法の最適化

発光基質の培地中での安定性

初代肝細胞の非破碎的発光測定方法の確立と検証

腎臓、神経についても連携

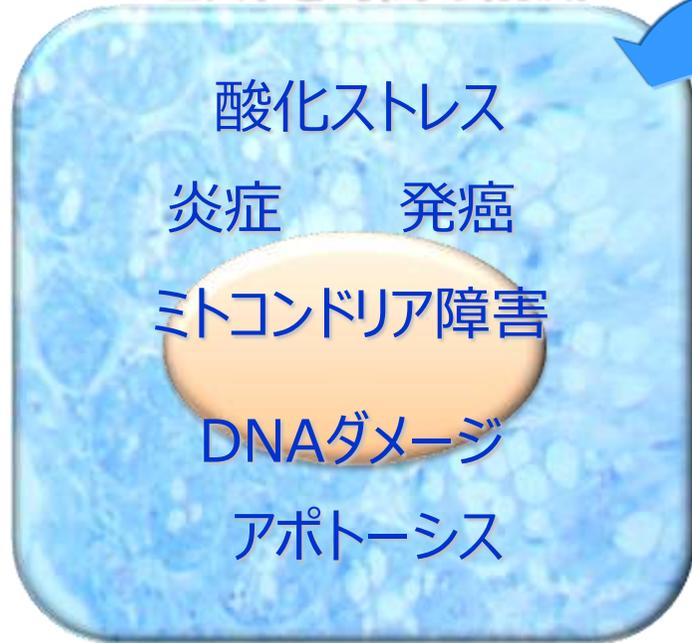
●各試験法のプロトコル案への反映

発光測定の精度、毒性の検出感度等を勘案し、各試験法へ測定方法を反映。

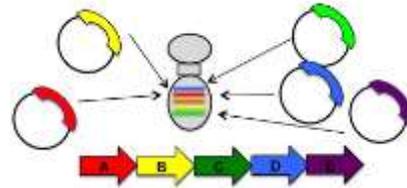
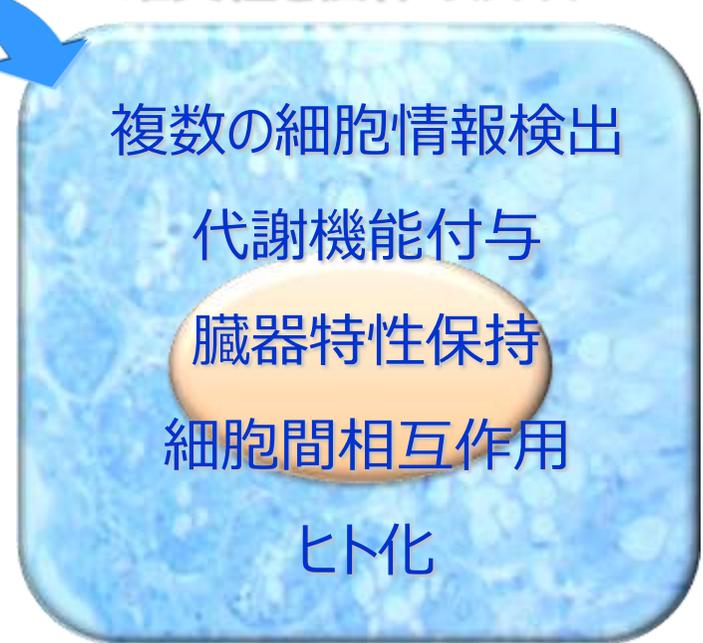
各試験系に最適な発光測定方法を提案

In vitro毒性試験系のコンセプト

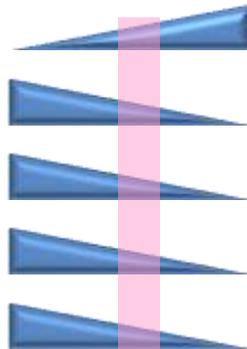
簡便性を重視
コストと時間の削減



精度を重視
確実性と個体の反映



精度、個体の反映度
汎用性
スループット性
コスト
簡便さ

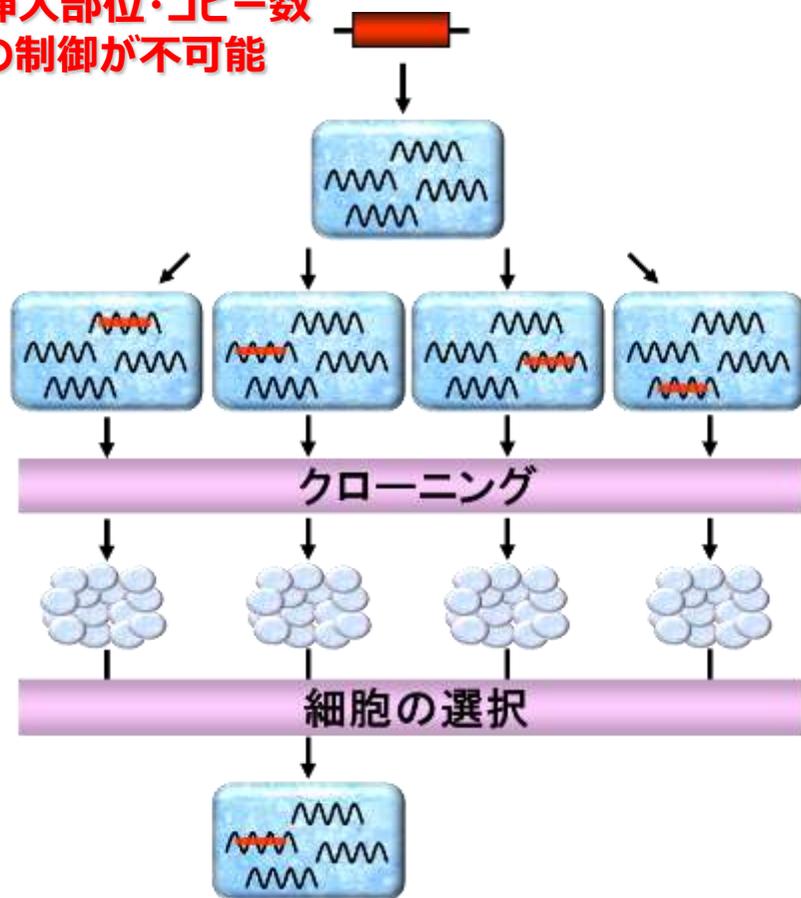


- 市販化されている発光測定装置、発光試薬の使用を前提
- 日本発の技術を重視
- 96ウェルプレートベース

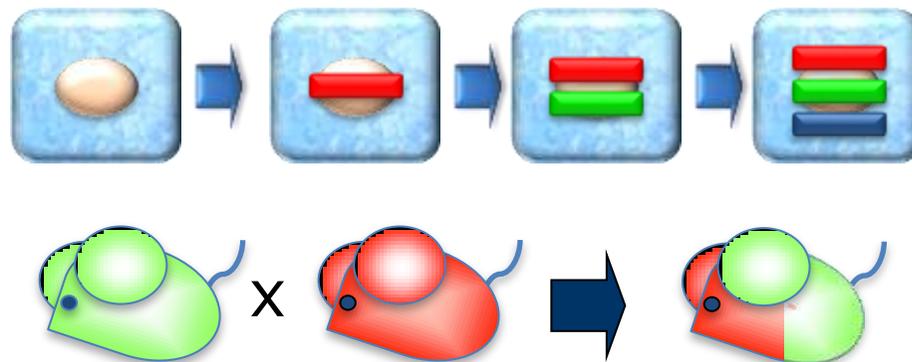
評価用安定細胞株作製の課題と問題点

従来法（ランダムインテグレーション法） での安定細胞株作成

挿入部位・コピー数
の制御が不可能

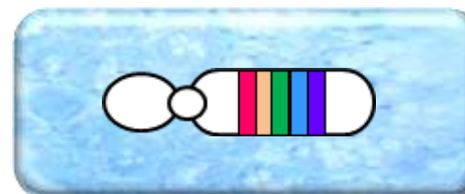


複数のレポーター遺伝子の導入



- 多大な時間と労力
- サイレンシング

人工染色体ベクターへの導入



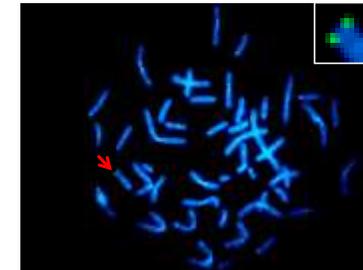
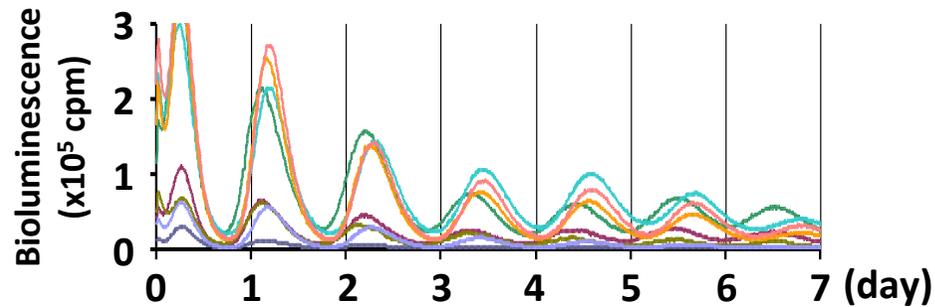
- 樹立細胞の均一性
- 継代安定性

樹立クローンの均一性の検証 (A9細胞)



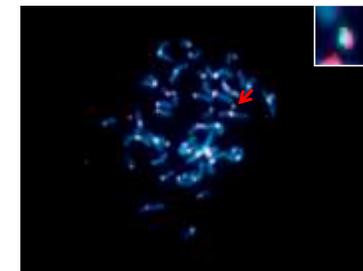
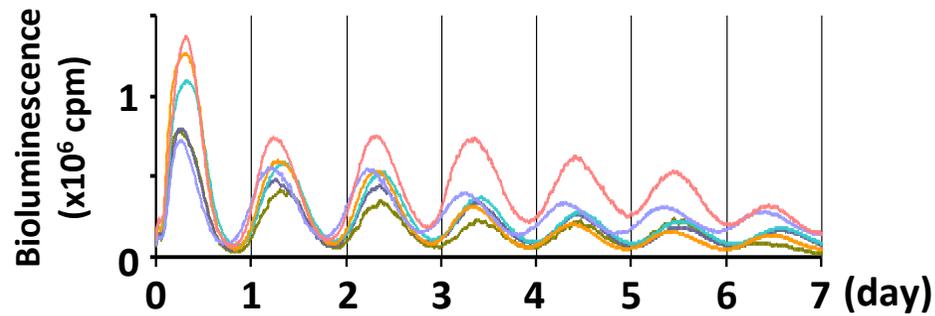
ランダムインテグレーション

6 clones



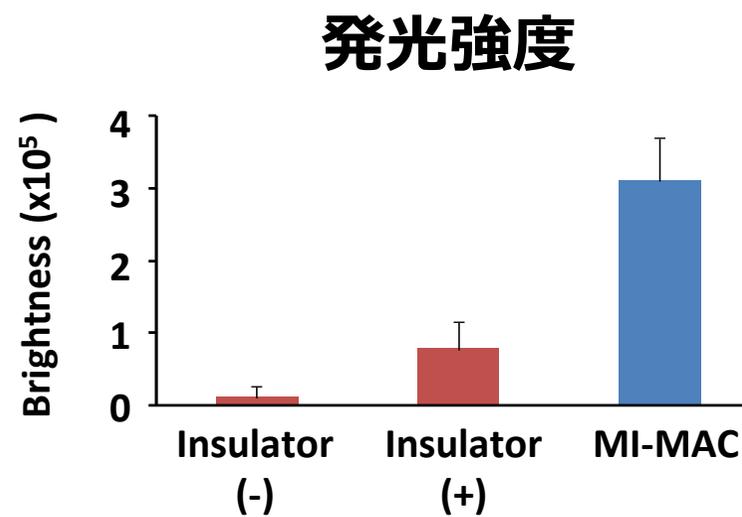
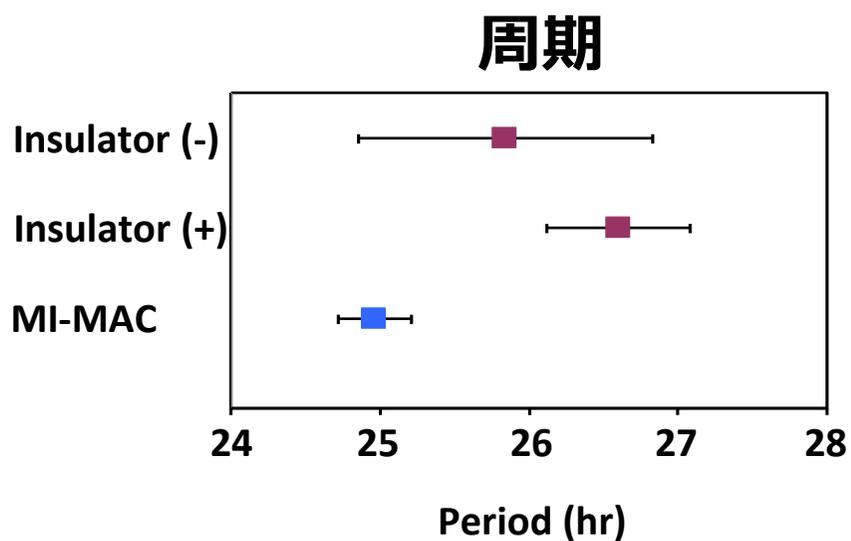
人工染色体ベクター

6 clones



特開2015-119643, Murotomi et al., submitted

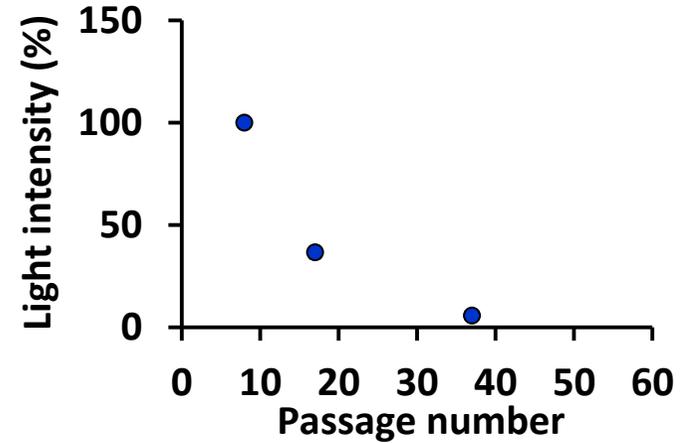
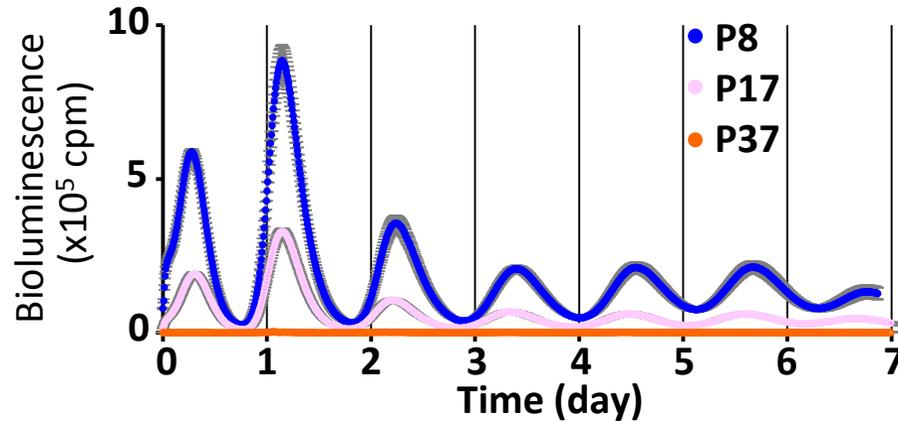
人工染色体ベクターを利用することで正確に遺伝子発現をモニターできる



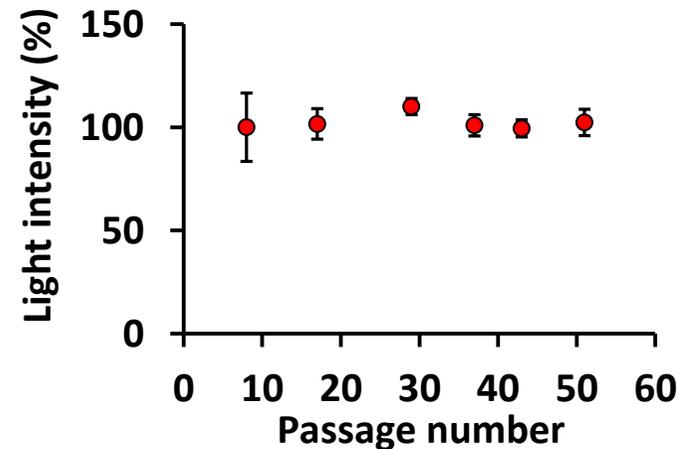
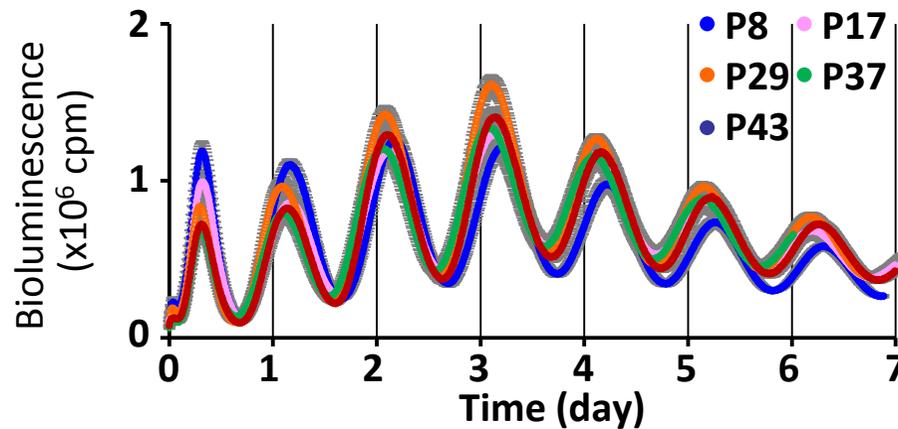
特開2015-119643, Murotomi et al., submitted

長期継代安定性の検証

ランダムインテグレーション



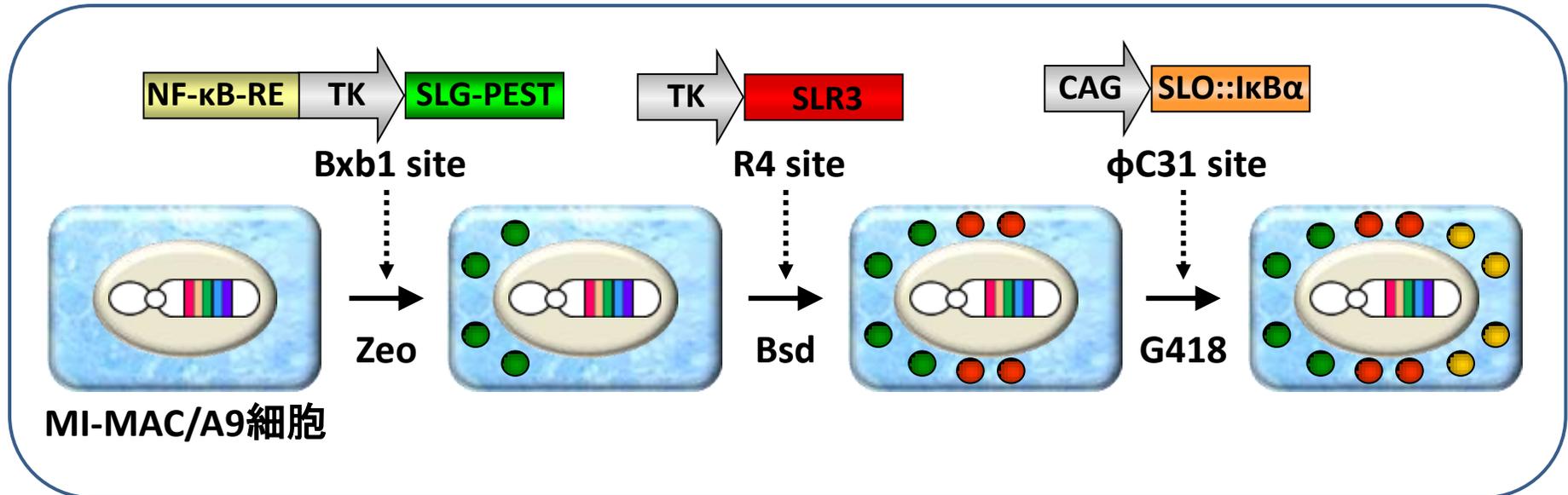
人工染色体ベクター



- 人工染色体ベクターにルシフェラーゼを挿入した安定細胞株では長期間発光が安定に維持される

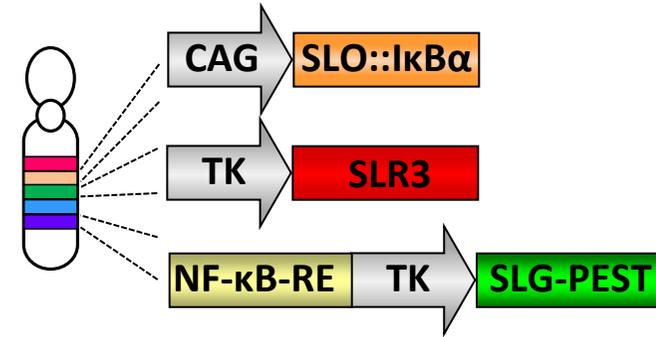
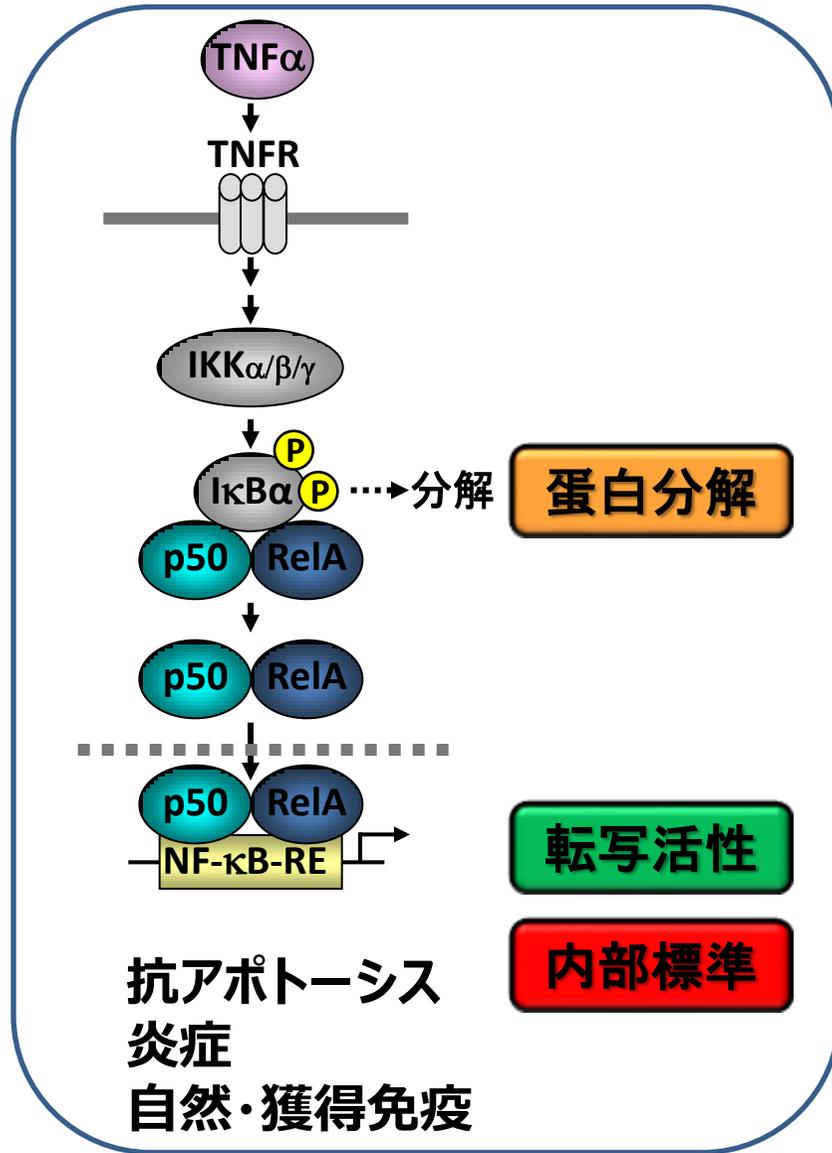
特開2015-119643, Murotomi et al., submitted

炎症シグナルモニター用3色発光細胞

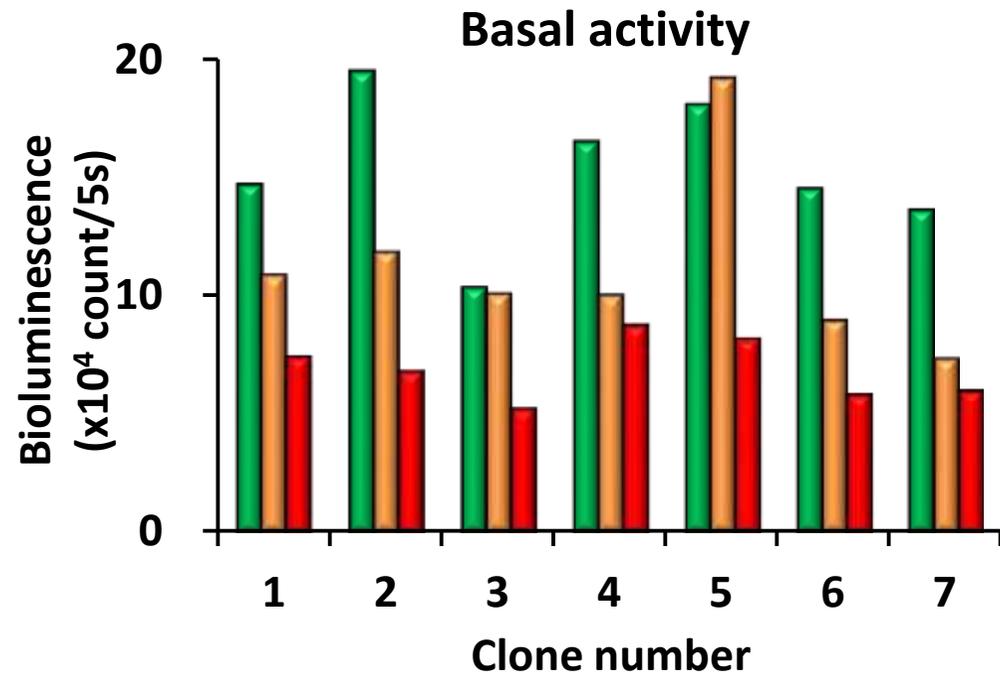


- 各ステップでクローニングをせずにバルクで細胞を樹立
- 樹立した細胞の均一性と安定性を検証

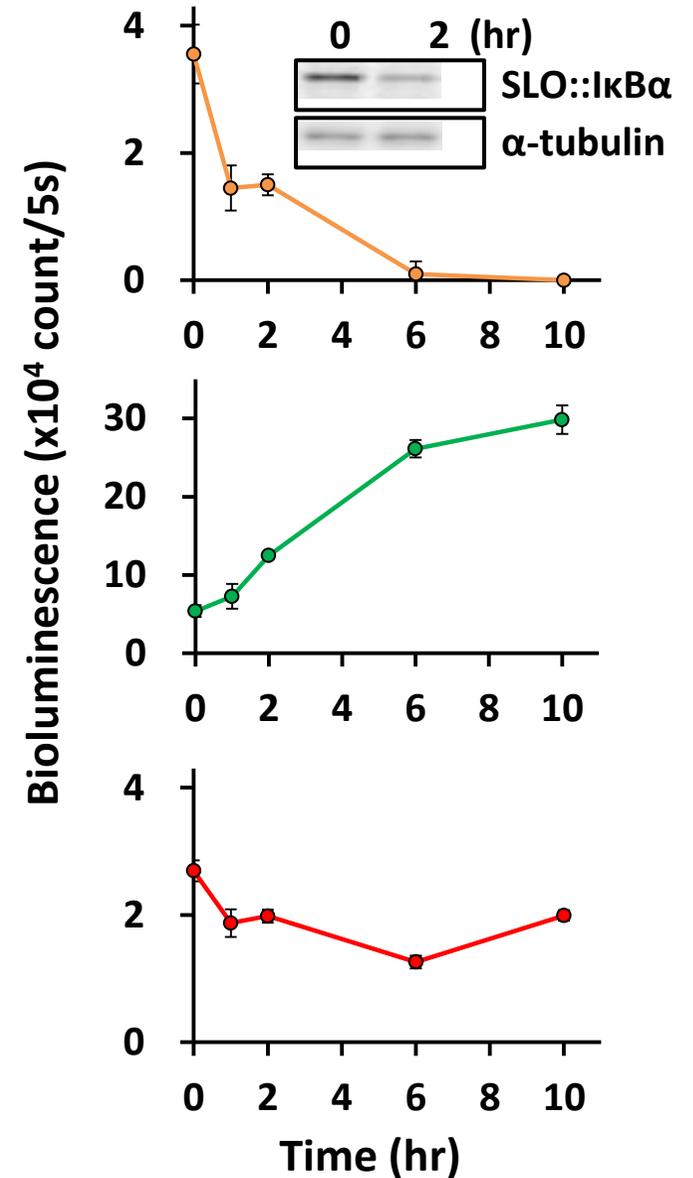
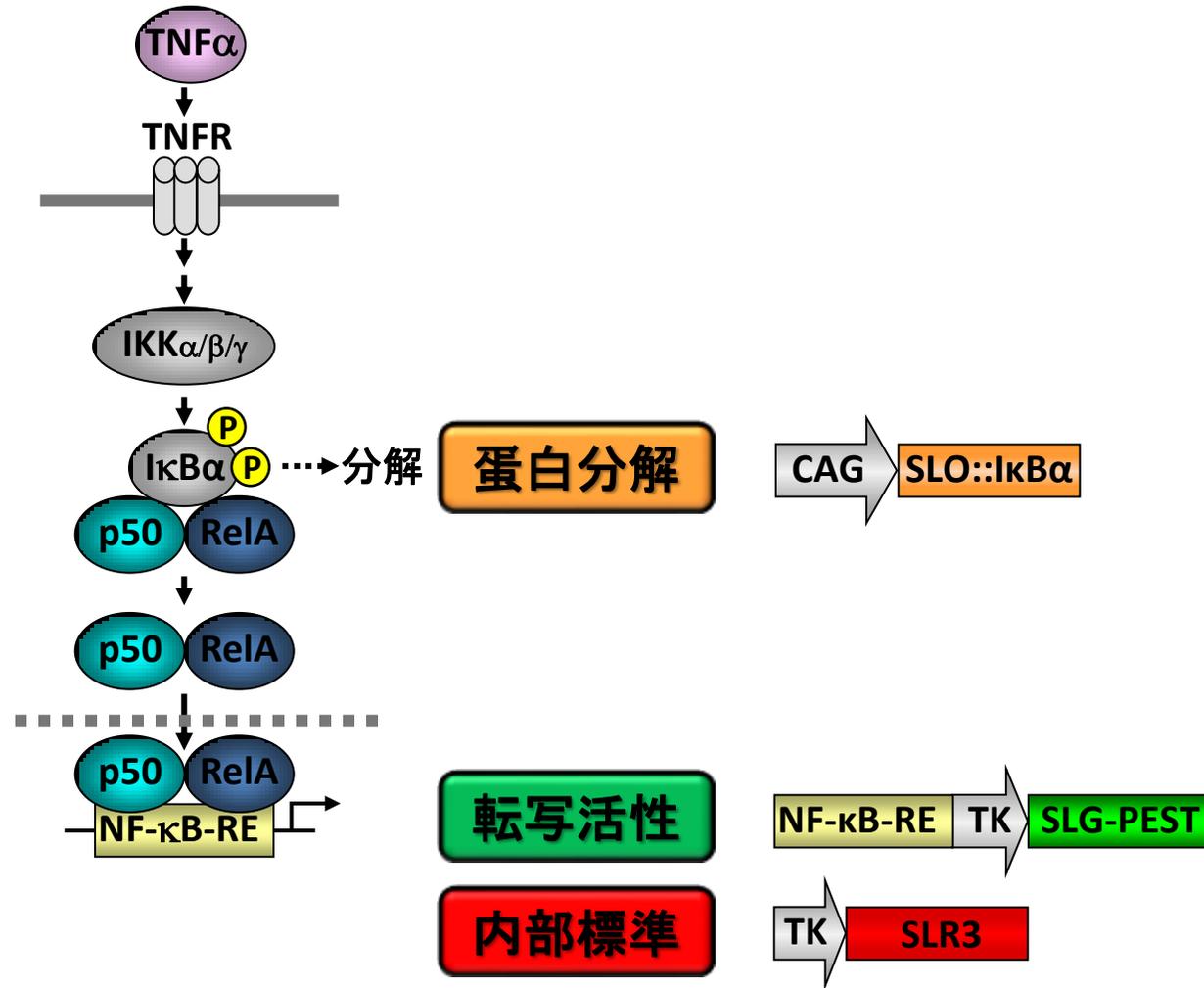
樹立した3色発光細胞の均一性



MI-MAC/A9細胞

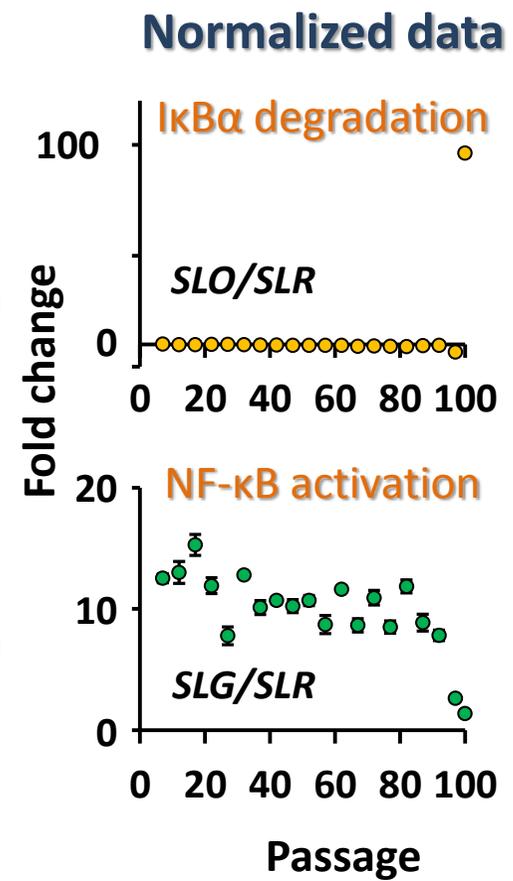
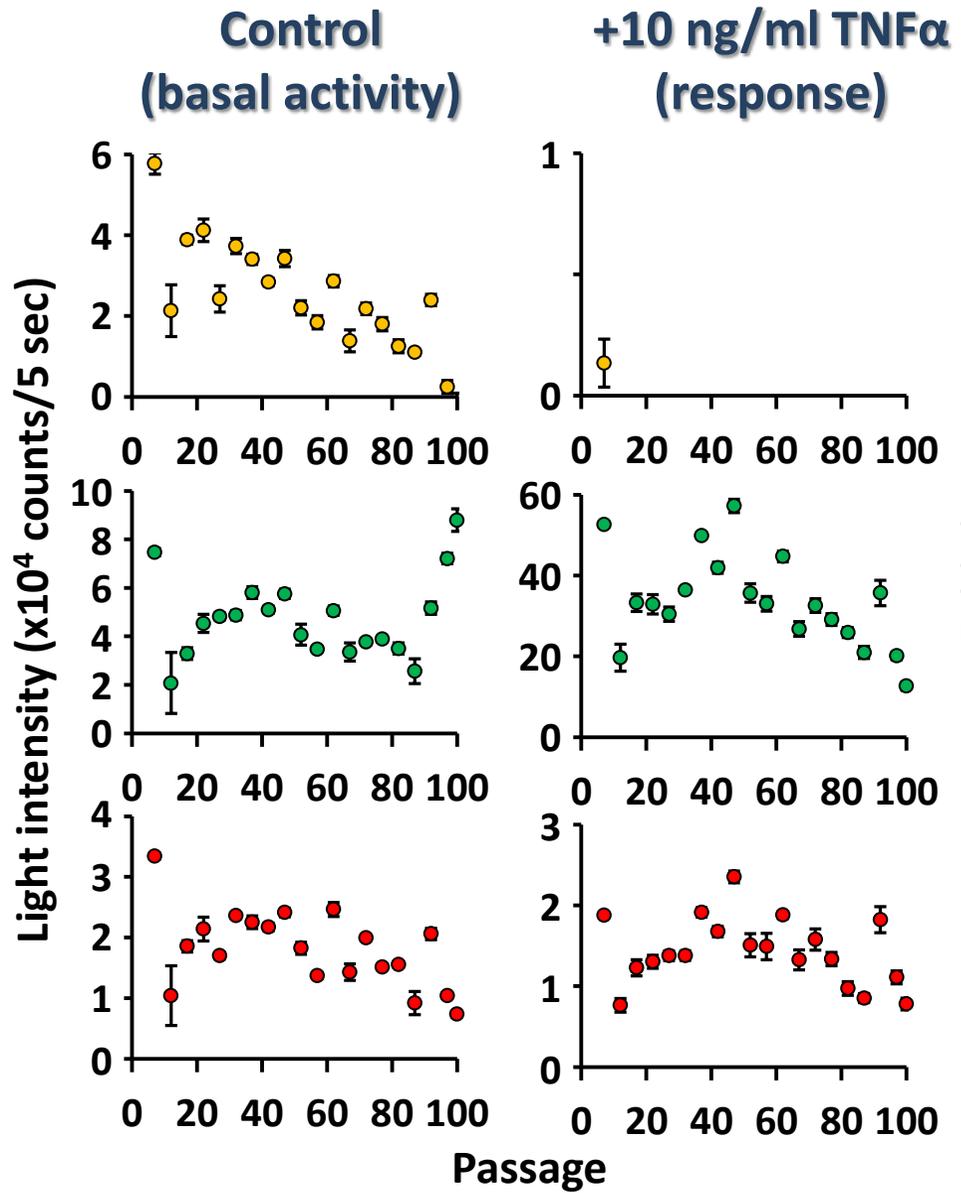
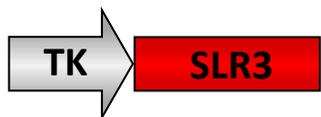
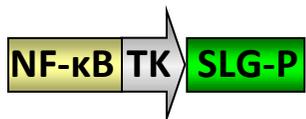


炎症シグナルモニター用3色発光細胞



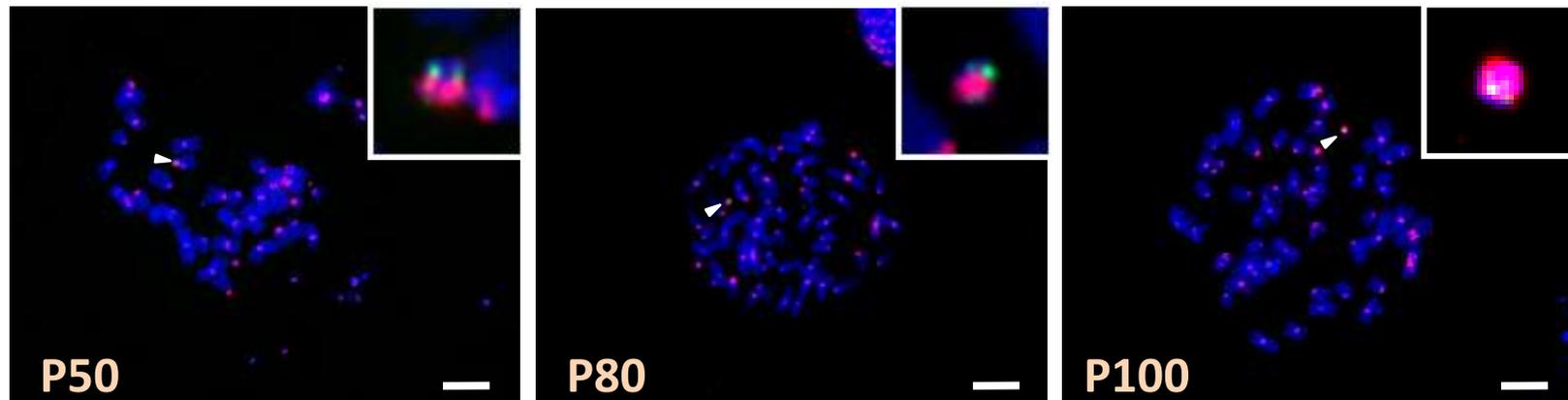
3色発光細胞の継代安定性

Line 8



FISH解析

Line 8



Bar=10 μ m

Green: NF- κ B-TK-SLG/Bxb1
Red: mouse minor satellite
Blue : DAPI

- Passage 100でもMACの転座はなく、導入遺伝子はMAC上に保持
- 細胞の品質が低下しない限り安定に発光測定可能

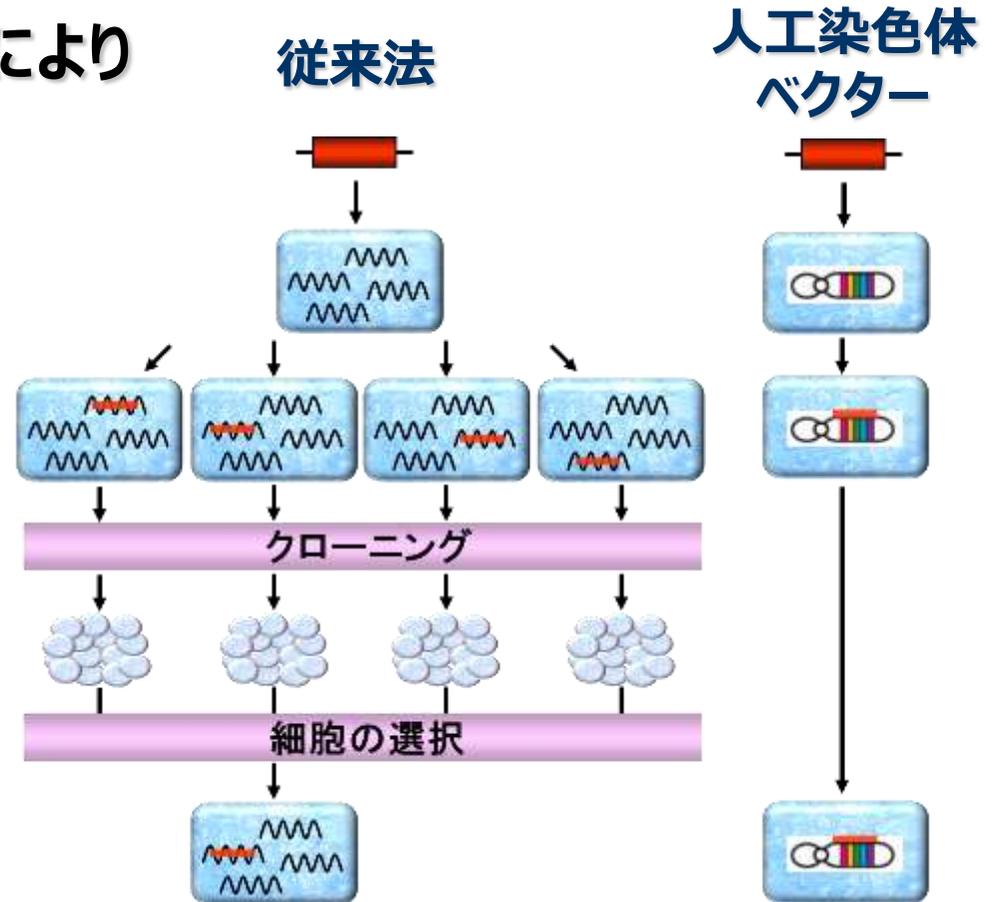
人工染色体ベクターの性能検証のまとめ

人工染色体ベクターへの導入により

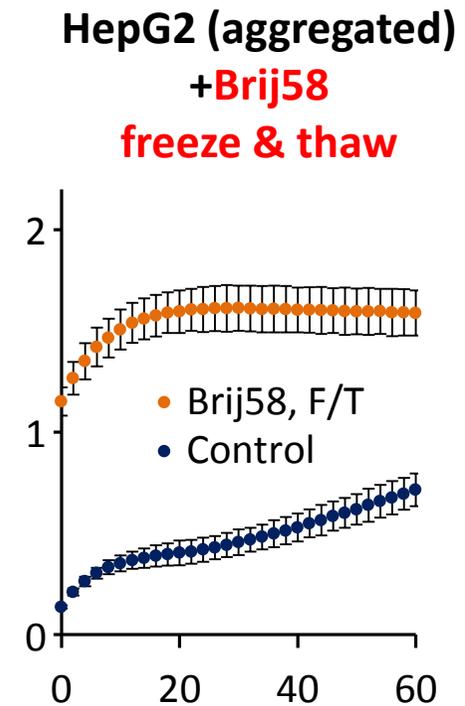
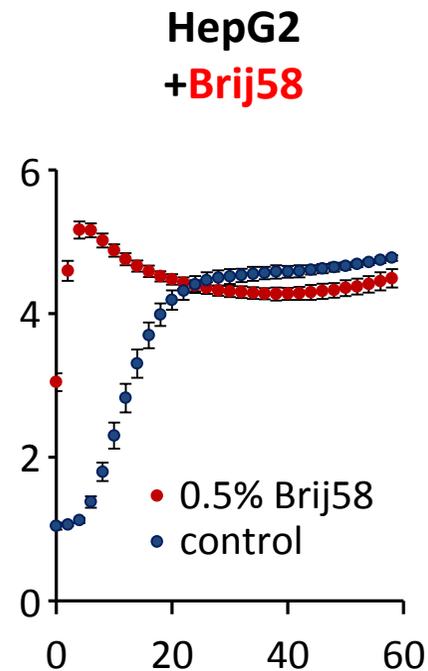
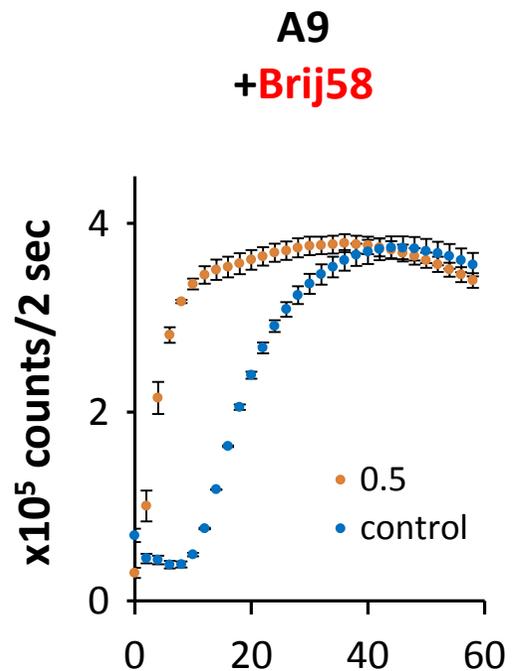
- ・均一
- ・安定性が高い
- ・明るい

安定細胞株が樹立

- 効率的に複数レポーターを導入可能
- 高い精度でアッセイ可能

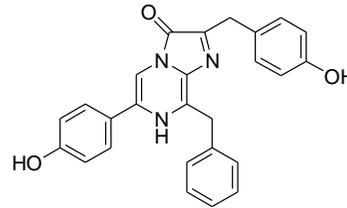
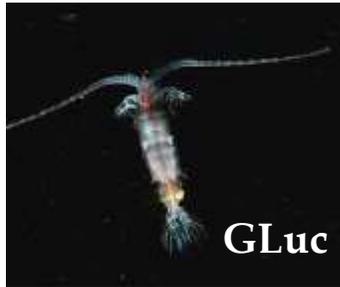


多色発光レポーターの発光測定条件の最適化



Time (min)

分泌型ルシフェラーゼの発光測定最適化

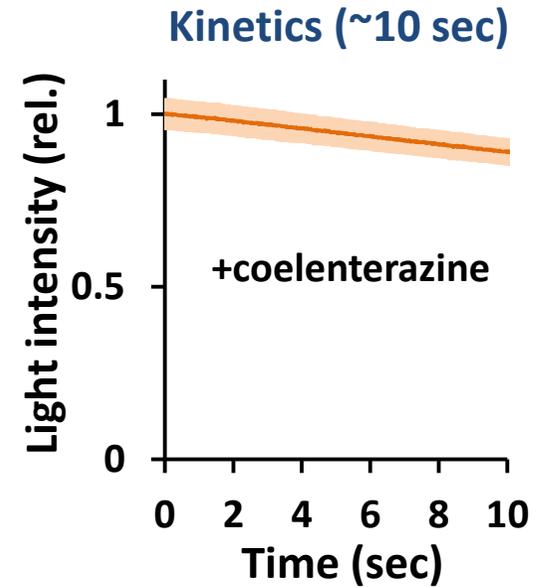
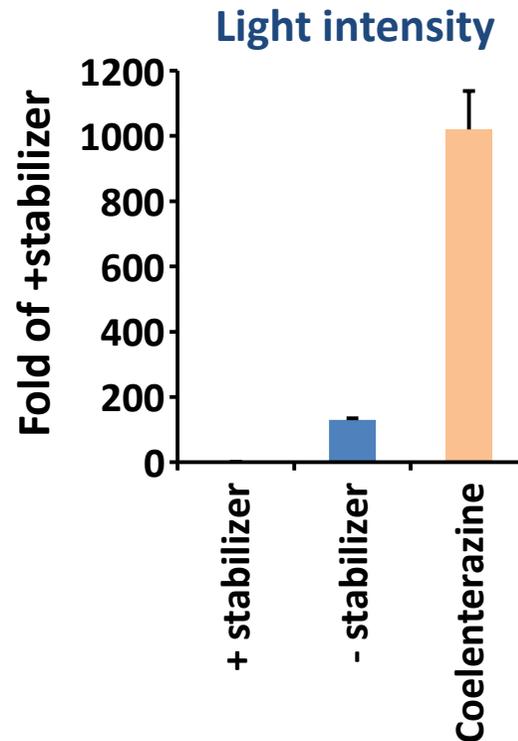
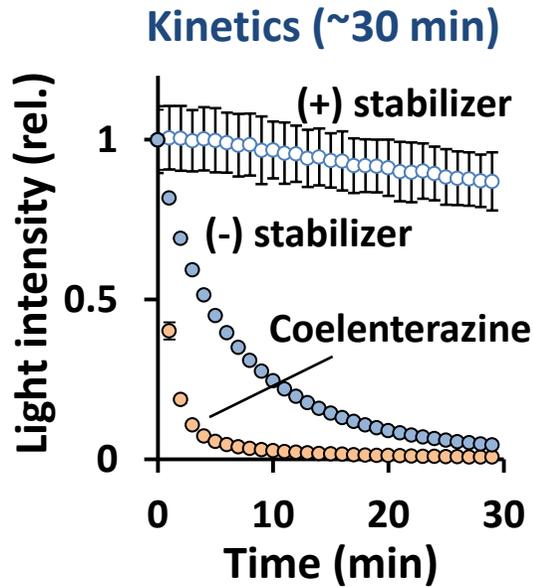


coelenterazine
(1975, S. Inoue)



BioLux Gaussia Luciferase
Flex Assay Kit (NEB)

GLuc+KDELの発光強度およびキネティクス



ポンプでcoelenterazineを
添加し発光測定

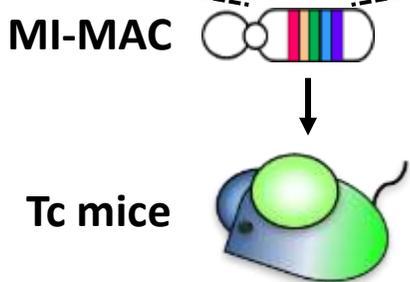
個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況

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）
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	1)人工染色体ベクターの性能の 検証および発光検出の検証	達成 ；1～2種の発光レポーターをマウス人工染色体ベクターに挿入した安定細胞株を用い、 従来法で作製した安定細胞株と比較して発光強度および継代安定性が高い ことを実証。
	2) 試験系の設計私案の作成	達成 ；上記の結果より、各試験系において96ウェルプレートベースのin vitro毒性試験系を設計。
	3) 人工染色体ベクターの性能検証	達成 ；3種の発光レポーターをマウス人工染色体ベクターに導入した安定細胞株を樹立し、従来法と比べて 樹立期間を1/6程度に短縮 可能であること、また長期間継代を重ねても、細胞の発光強度と人工染色体ベクターが極めて 長期間安定に維持 されることを実証。
	4) 当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出の検証および試験系の測定条件の最適化	達成 ；発光レポーター導入株化培養細胞或は遺伝子改変マウスの臓器由来細胞等を用い、 発光強度の検証・測定方法の最適化 を行い、各試験法のプロトコル案に反映した。
	5)国際標準化にむけた取り組み	達成 ；経済産業省平成28年度国際標準化加速事業（発光株化培養細胞の保存管理法に関する国際標準化）において、 発光計測・管理法および細胞検定法の国際規格化 をISO/TC276 WG3で実施中。

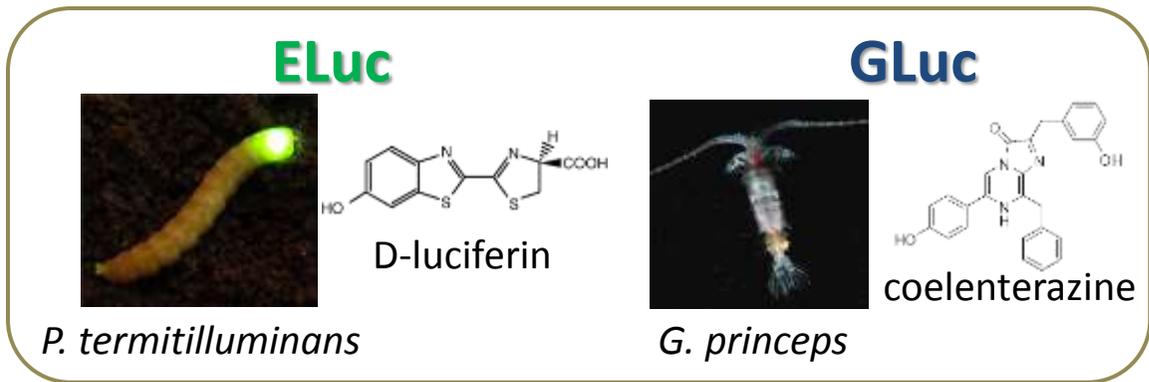
実施項目の詳細説明

- ① 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
- ② **肝臓毒性in vitro試験法の開発**
- ③ 腎臓毒性in vitro試験法の開発
- ④ 神経毒性in vitro試験法の開発

遺伝子選定・人工染色体ベクター開発



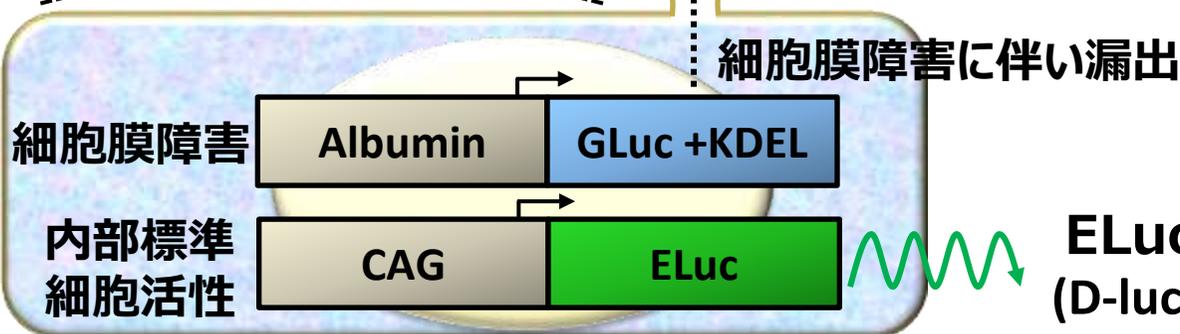
肝臓毒性を評価可能なin vitro試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウスES細胞、遺伝子改変マウスを作製し、肝臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。



培養上清



GLuc活性
(coelenterazine)



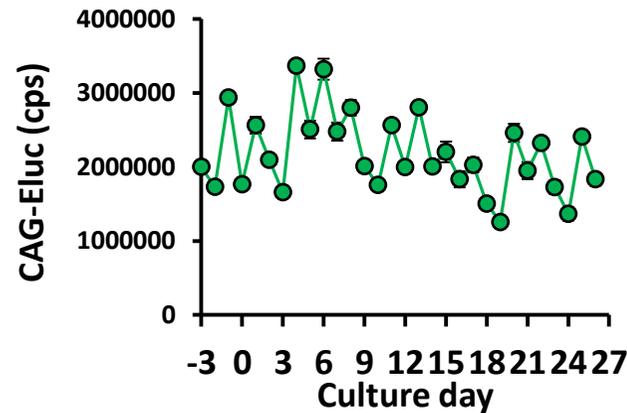
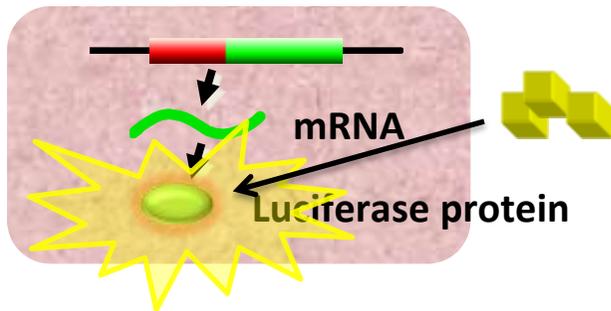
ELuc活性
(D-luciferin)

ポイント：細胞を破壊せずに細胞内のルシフェラーゼ活性を経時的に測定可能



遺伝子選定・人工
染色体ベクター開発

ELucおよびGLuc (KDEL) の発光反応機構
および非破砕発光測定方法

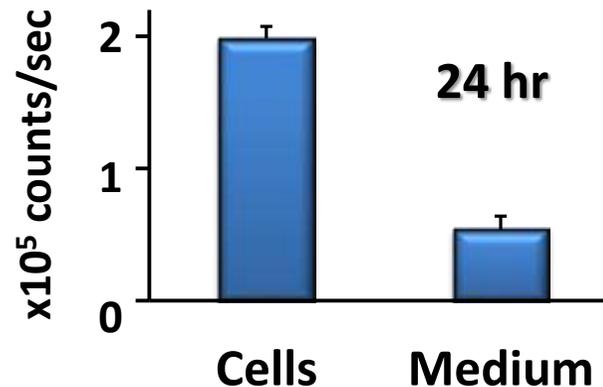
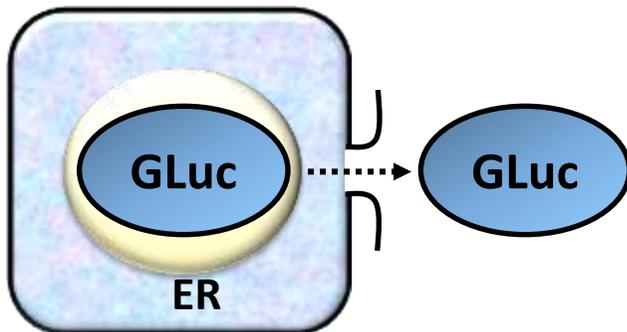


毎日に非破砕的に
発光活性を測定

Yasunaga et al.,
submitted.



ER retention signal



2~3日毎に培養
液を回収し、発光
活性を測定

Tsuji et al.,
PLOS One (2015)

- ポイント：①細胞を破壊せずに細胞内のルシフェラーゼ活性を測定可能
②GLucを含む培養液は凍結保存可能



作製したTcマウス	プロモーター	ルシフェラーゼ
CAG-ELuc マウス	CAG	ELuc (<i>Pyrearinus termitilluminans</i> 由来、緑色)
CAG-ELuc ; NFκB-SLR3マウス	CAG	ELuc
	Nuclear factor-κB 応答配列	SLR3 (<i>Phrixothrix hirtus</i> 由来、赤色)
CAG-ELuc ; Alb-GLuc (KDEL)マウス	CAG	ELuc
	アルブミン	GLuc (KDEL) (小胞体移行配列がC末端に付加された <i>Gaussia princeps</i> 由来分泌型ルシフェラーゼ、青色)

ポイント：肝毒性物質に対する応答性、発光強度、発光測定の安定性および簡便さ等を勘案



発光培養細胞作製

3次元培養した肝細胞の遺伝子発現プロファイルと肝機能



Phase I (Cyp)	Cyp1a1, Cyp1a2 , Cyp21a1, Cyp27a1, Cyp2a12, Cyp2a4, Cyp2a4, Cyp2b10 , Cyp2b9, Cyp2c29 , Cyp2c37, Cyp2c38 , Cyp2c38, Cyp2c39, Cyp2c44, Cyp2c54, Cyp2c54, Cyp2c66 , Cyp2c67, Cyp2c67, Cyp2c68, Cyp2c70, Cyp2d10, Cyp2d11, Cyp2d12, Cyp2d13, Cyp2d22 , Cyp2d26, Cyp2d34, Cyp2d34, Cyp2d37-ps, Cyp2d40, Cyp2d9, Cyp2e1 , Cyp2e1, Cyp2f2, Cyp2j13, Cyp2j6, Cyp2j6, Cyp2j8, Cyp2r1, Cyp2r1, Cyp3a11, Cyp3a11, Cyp3a13, Cyp3a13 , Cyp3a16, Cyp3a25, Cyp3a41b, Cyp3a57, Cyp3a59, Cyp3a59, Cyp4a10, Cyp4a10, Cyp4a10, Cyp4a12b, Cyp4a31, Cyp4a31, Cyp4a32, Cyp4b1, Cyp4f13, Cyp4f14, Cyp4f15, Cyp4f17, Cyp4f39, Cyp4v3, Cyp7b1, Cyp17a1, Cyp39a1, (Cyp1b1), (Cyp26b1)
Transferase	A3galt2, Aanat, Acaa2, Acac2, Acac3, Acnat1, Acnat2, Acnat2, Agpat9, Agxt, Agxt2, Agxt2, Alg5, Amt, As3mt, Ate1, B3gat1, B4galnt1, B4galnt2, B4galt3, Baat, Bhmt, Bhmt, Bhmt, Bhmt, Cdipt, Chst13, Chst7, Comt , Comtd1, Cpt2, Dgat2, Dntt, Dot1l, Eogt, Eogt, Ftcd, Fut1, Fut4, Gal3st1, Galnt14, Galnt16, Galnt6, Gamt, Gamt, Gcnt2, Gcnt3, Ggct, Ggt1, Ggt5, Ggt5, Ggt6, Ggt6, Glrx2, Glt1d1, Glt1d1, Glyat, Gm8479, Gnmt, Gnpat1, Gnpat1, Gpam, Gpam, Gpat2, Gpt2, Gsta2, Gsta3, Gsta3, Gstcd, Gstk1, Gstm1, Gstm3, Gstm4, Gstm6, Gstm6, Gstm6, Gstm7, Gstm7, Gstp1, Gstp1, Gstp2, Gstt1 , Gstt2, Gstz1, Gylt1b, Gylt1b, Hnmt, Hnmt, Hpmt, Hs2st1, Hs3st6, Hs6st1, Kmt2d, Lcat, Lcmt2, LOC102635514, LOC102637973, Lpgat1, Lpgat1, Lrat, Mat1a, Mettl20, Mettl5, Mettl7a1, Mettl7a3, Mettl7b, Mfng, Mfng, Mgst1, Mgst1, Mogat2, Naprt1, Nat1 , Nat8, Nat9, Nmnat3, Nmt2, Oxct2a, Oxct2b, Oxct2b, Pcyt2, Pemt, Pemt, Pemt, Pfas, Pnmt, Ppat, Qpct, Qprt, Sat1, Shmt1, Shmt1, Shmt2, Soat2, St3gal4, St3gal5, St6gal1, St6gal1, St6galnac1, St6galnac2, St8sia3, St8sia6, Sult1a1, Sult1a1, Sult1b1 , Sult1c2, Sult1d1, Sult1d1, Sult1e1 , Sult2b1, Sult4a1, Tat, Tpmt, Tpmt , Tpst1, Trmt5, Trmt61b, Tst, Tst, Tstd1, Ugt2a3, Ugt2b1, Ugt2b34, Ugt2b35, Ugt2b35 , Ugt2b36, Ugt2b37, Ugt2b38, Ugt2b5, Ugt3a1, Ugt3a2, Vcpkmt
ABC transporter	Abca17, Abca3, Abca5, Abca6 , Abca8a, Abca8b, Abcb11 , Abcb1a, Abcb4 , Abcb8, Abcc12, Abcc2 , Abcc3, Abcc6, Abcc6, Abcc8, Abcd3, Abcg1, Abcg5
Transporter	Atp8a1, Atp8a1, Atp8a2, Magt1, Magt1, Rtp2, Rtp3, Slc10a1 , Slc11a1, Slc13a2, Slc13a3, Slc13a5, Slc13a5, Slc14a1, Slc14a2, Slc16a10, Slc16a10, Slc16a11, Slc16a12, Slc16a2, Slc16a3, Slc16a3, Slc16a6, Slc16a6, Slc16a7, Slc16a7, Slc16a7, Slc16a7, Slc17a5, Slc17a8, Slc17a8, Slc19a2, Slc1a2, Slc1a4, Slc22a1 , Slc22a13, Slc22a18, Slc22a26, Slc22a7, Slc23a1, Slc25a1, Slc25a15, Slc26a1, Slc27a2, Slc27a5, Slc27a5, Slc29a4, Slc2a1, Slc2a2, Slc2a5, Slc2a9, Slc30a1, Slc30a7, Slc33a1, Slc33a1, Slc35a3, Slc35d1, Slc37a1, Slc37a4, Slc39a14, Slc39a2, Slc39a4, Slc39a8, Slc40a1, Slc4a9, Slc5a10, Slc5a9, Slc6a1, Slc6a12, Slc6a13, Slc6a2, Slc6a20a, Slc7a11, Slc7a2, Slc7a4, Slc7a7, Slco1a1, Slco1a4, Slco1b2 , Slco2a1, Slco2b1, Slco2b1

ポイント : 3次元培養した肝細胞の肝機能維持が維持されている



発光培養細胞作製

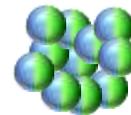
3次元培養した肝細胞の代謝活性化能

Acetaminophen
(Cyp1A2, 2A5, 3A11, 2E1)



CAG-ELuc;
Alb-GLuc (KDEL) Tc mice

hepatocytes



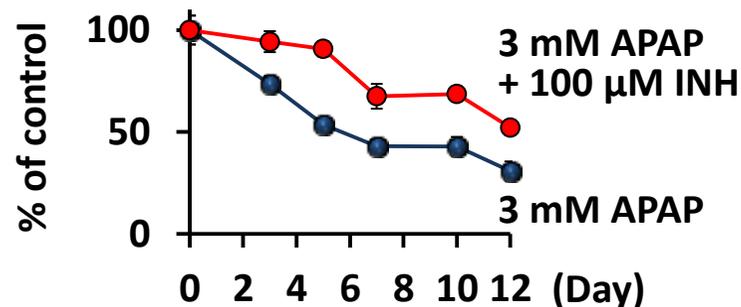
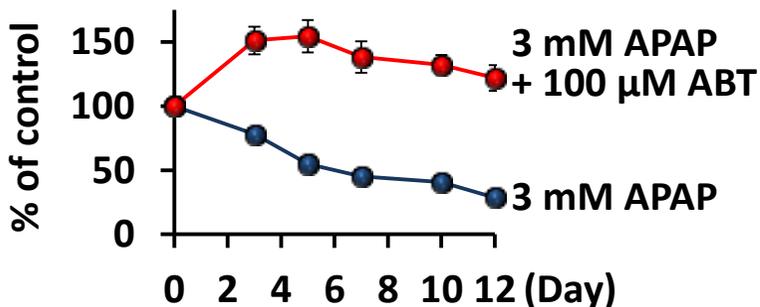
3D culture

1-Aminobenzotriazole
(non-specific)

Isoniazid
(Cyp1A2, 2A4, 2C38, 3A11)

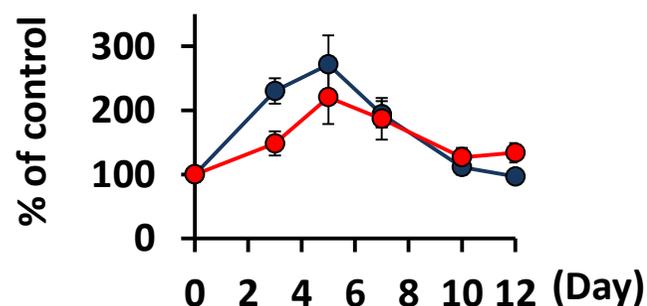
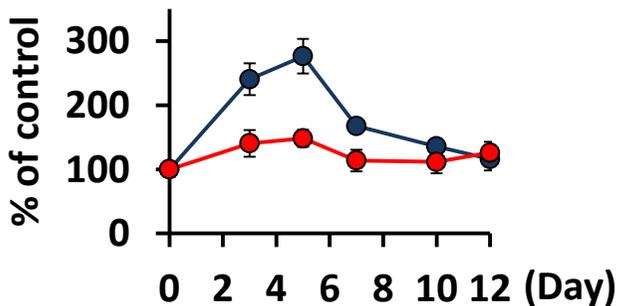
CAG-ELuc

CAG-ELuc



Alb-GLuc(KDEL)

Alb-GLuc(KDEL)

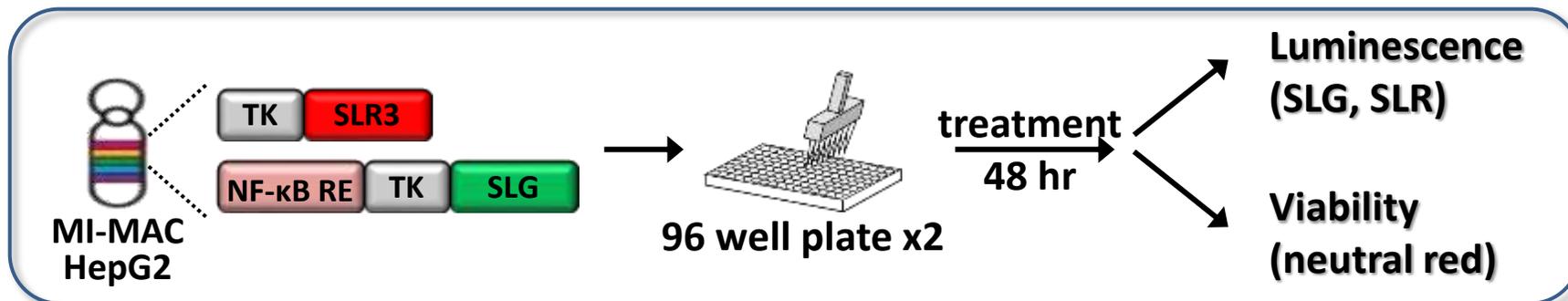


ポイント：3次元培養した肝細胞の肝機能が維持されている

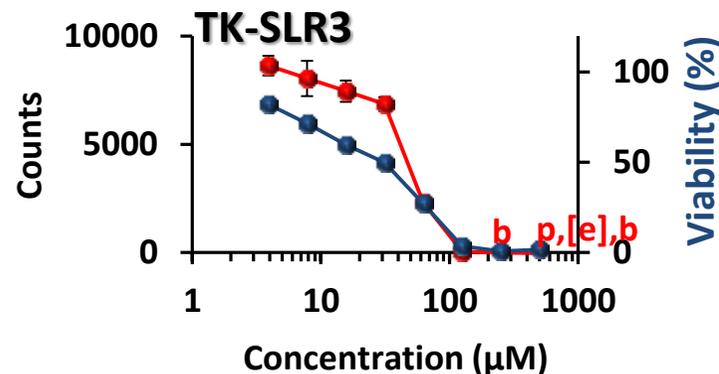
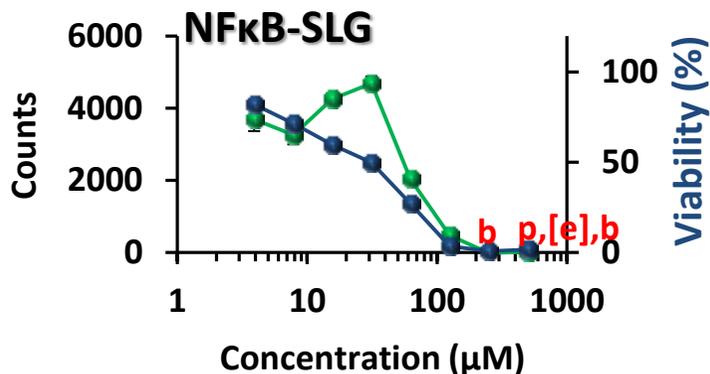


In vitro試験系開発

MI-MAC HepG2発光細胞を用いた 被験物質選定



4-Isopropylaminodiphenylamine



p: 沈殿

[e]: 処理終了時、わずかに底面腐食

b: 薄茶(化学物質の色)

Top dose, 0.1 mM

Wakuri et al., submitted.

ポイント：物性(揮発性)、in vitro試験条件での適用性(沈殿・培養器溶解)による選定
3次元培養に適用する濃度の選定



In vitro試験系開発

1	Acenaphthylene	23	Caffeine	45	Furan	67	Piroxicam
2	Acetaminophene	24	Captafol	46	Halothane	68	(+)-Pulegone
3	Acetylsalicylic acid	25	Carbamazepine	47	Hydralazine hydrochloride	69	Pyrazinamide
4	Afratoxin B1 (AFB1)	26	Carbon tetrachlorid (CCl4)	48	Isoniazid	70	8-Quinolinol
5	Alachlor	27	2-Chlorobenzonitrile	49	4-Isopropylaminodiphenylamine	71	SDS
6	Allyl acetate	28	Cisplatin	50	Levetiracetam	72	Sterigmatocystin
7	Allyl alcohol	29	Clozapine	51	Loxoprofen sodium salt dihydrate	73	Tetracycline hydrochloride
8	1-Amino-2,4-dibromoanthraquinone	30	Coumarin	52	D-Mannitol	74	Theophylline
9	2-Amino-4-nitrophenol	31	Diallyl phthalate	53	2-Mercaptobenzothiazole	75	2-(4-Thiazolyl) benzimidazole
10	3-Aminophenol	32	1,4-Dibromobenzene	54	4-(Methylamino)phenol sulfate	76	4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)
11	4-Aminophenol	33	2,4-Dichloro-1-nitrobenzene	55	Methylcholanthren (MCA)	77	Thiophene
12	Amiodarone HCl	34	2,4-Dichloro-4'-nitrobiphenyl ether	56	4,4'-Methylene-bis (2-chloroaniline)	78	Thiourea dioxide
13	o-Anisidine hydrochloride	35	Diclofenac sodium salt	57	4,4'-Methylenedianiline	79	Tiopronin
14	Anthranilic Acid	36	1,3-Dicyanobenzene	58	Methylhydrazine	80	Triallyl Isocyanurate
15	Anthraquinone	37	Dihydralazine sulfate	59	Nifedipine	81	1,2,3-Trichloropropane
16	L-Ascorbic acid	38	Dimethyl fumarate	60	4-Nitroanisole	82	Triisobutylene
17	Benzbromarone	39	3,4-Dimethylaniline	61	o-Nitroanisole	83	Tris(2-chloroethyl) phosphate
18	2,2-Bis(bromomethyl)-1,3-propanediol	40	3,5-Dimethylaniline	62	1-Nitropyrene	84	Trisodium nitrilotriacetate monohydrate
19	Bromodichloromethane	41	N,N-Dimethyl-p-toluidine	63	Omeprazole	85	Trp-P-1 acetate
20	2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	42	Fenofibrate	64	Phenolphthalein	86	(±)-Verapamil hydrochloride
21	tert-Butyl alcohol	43	Fipexide HCl	65	Phenytoin	87	
22	2-tert-Butyl-5-methylphenol	44	Flutamide	66	Phoxim	88	

ポイント : 86物質からin vitro試験系適用可能な38物質を選定



物質名	肝毒性	CAS No.
3-Aminophenol	28-day, 肝細胞の単細胞壊死	591-27-5
4-Aminophenol	肝絶対及び相対重量増加（腎：近位票再勘定日の凝固壊死、好塩基性尿細管、ヒトで皮膚感作性あり） ¹⁾	123-30-8
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	28-day, hepatocyte necrosis at 150 mg/kg	52-51-7
3,4-Dimethylaniline	28-day, necrosis at 250 mg/kg	95-64-7
3,5-Dimethylaniline	28-day, hepatocyte necrosis at 360 mg/kg	108-69-0
<i>N,N</i> -Dimethyl- <i>p</i> -toluidine	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	99-97-8
4-Isopropylaminodiphenylamine	28-day, necrosis hepatocyte at 100 mg/kg	101-72-4
4,4'-Methylene-bis (2-chloroaniline)	42-day, necrosis at 50mg/kg	101-14-4
4,4'-Methylenedianiline	中毒性肝障害 ²⁾ ,胆管過形成,肝細胞変性,脂肪肝,肝細胞壊死 ³⁾	101-77-9
(+)-Pulegone	91-day, necrosis at 150mg/kg	89-82-7
Sodium dodecyl sulfate	肝重量増加、ALT増加 (ラット28日) ⁴⁾	151-21-3
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	91-day, necrosis at 62.5 mg/kg	96-69-5
Thiourea dioxide	反復・生殖、肝臓重量の増加,小葉中心性の肝細胞肥大,胆管内の好塩基性物,空胞変性	1758-73-2, 4189-44-0
Tris(2-chloroethyl) phosphate	肝絶対及び相対重量増加(ラット16日,16週,66週, マウス16週) ⁵⁾	115-96-8

HESS (ver. 3.0) 化学物質毒性試験報告書 化学物質点検推進連絡協議会

1) OECD化学物質対策の動向第19報, 第30回OECD HPV 化学物質初期評価会議(2010, パリ)

2) 労働基準法施行規則の規定に基づき労働大臣が指定する単体たる化学物質及び化合物（合金を含む。）並びに労働大臣が定める疾病を定める告示

3) 有害性評価書 ver. 1.0, No.42, 化学物質排出把握管理促進法政令号番号: 1-340, NEDO

4) SIDS Initial Assessment Report for SIAM 5, Belgirate, Italy, 28-30 October 1995, OECD SIDS

5) 有害性評価書 ver. 1.0, No.205, 化学物質排出把握管理促進法政令号番号: 1-352, NITE

NTP Technical Report Series No. 391, F344/N RATS and B6C3FI MICE (GAVAGE STUDIES), NIH



物質名	肝毒性*	CAS No.
Acetaminophen	解熱鎮痛剤, 中毒性, 肝細胞障害型肝障害 necrosis hepatocyte at 25000 ppm (91-day, HESS, ver 3.0)	103-90-2
Acetylsalicylic acid	中毒性肝障害、通常はほぼ無症状、ひどい場合は小葉中心の巣状壊死、門脈域の軽度の炎症、高濃度でミトコンドリアの機能を阻害	50-78-2
Amiodarone HCl	抗不整脈薬、ミトコンドリアに対する障害による脂肪肝炎、[中毒性+代謝特異体質 (日本医科大学麻醉科学講座より)]、idiosyncratic toxicity, hypersensitivity	19774-82-4
Benzbromarone	尿酸排泄薬、劇症肝炎の報告あり、原体または代謝物によるミトコンドリア機能障害が考えられる	3562-84-3
Carbamazepine	イミノスチルベン系薬物、抗てんかん薬、混合型、hypersensitivityか代謝物の薬剤-タンパク複合体に対する免疫反応によると考えられる	298-46-4
Cisplatin	抗がん剤、腎毒性物質	15663-27-1
Clozapine	抗精神病薬、肝障害の機序は不明、肝臓で代謝(CYP1A2も関与)、急性肝障害、死亡等の報告あり	5786-21-0
Flutamide	抗がん剤、非ステロイド性アンドロゲン受容体拮抗薬、劇症肝炎、代謝物によると考えられる	13311-84-7
Pyrazinamide	抗真菌薬、肝細胞障害型肝障害、ミトコンドリア障害、おそらく代謝物が作用、一部は直接的な毒性作用	98-96-4
(±)-Verapamil hydrochloride	カルシウム拮抗薬、肝細胞障害型肝障害、脂肪肝炎、おそらくhypersensitivity	152-11-4
Dimethyl fumarate	多発性硬化症薬、肝毒性は特になし	624-49-7

*ヒトに対する肝毒性 (acetaminophenのHESSデータを除く)

LiverTox (<http://livertox.nlm.nih.gov/index.html>)

重篤副作用疾患別対応マニュアル 薬物性肝障害 平成20年4月 厚生労働省



- : 肝毒性物質
- : 非肝毒性物質
- : 非毒性物質

物質名	肝毒性	CAS No.
<i>o</i> -Anisidine Hydrochloride	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	134-29-2
2-Amino-4-nitrophenol	小葉周辺性肝細胞肥大, くもり硝子変性, 類洞内色素沈着	99-57-0
<i>o</i> -Nitroanisole	小葉中心性肝細胞肥大、くもり硝子変性	91-23-6
Anthranilic Acid	肝毒性なし	118-92-3
2,2-Bis(bromomethyl)-1,3-propanediol	肝毒性なし	3296-90-0
Phenolphthalein	肝毒性なし	77-09-8
Trisodium nitrilotriacetate monohydrate	肝毒性なし	18662-53-8

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 評価用資料 (Version 130927)



In vitro試験系開発

- : 肝毒性物質
- : 非肝毒性物質
- : 非毒性物質

農薬 (1物質)

物質名	肝毒性	CAS No.
Alachlor	相対及び絶対肝重量の増加 (90日、マウス)、胆管増生 (6ヶ月、イヌ)、小葉中心性肝細胞壊死等(2年慢性、ラット)	15972-60-8

農薬評価書(案) アラクロール、2011年3月 食品安全委員会農薬調査会

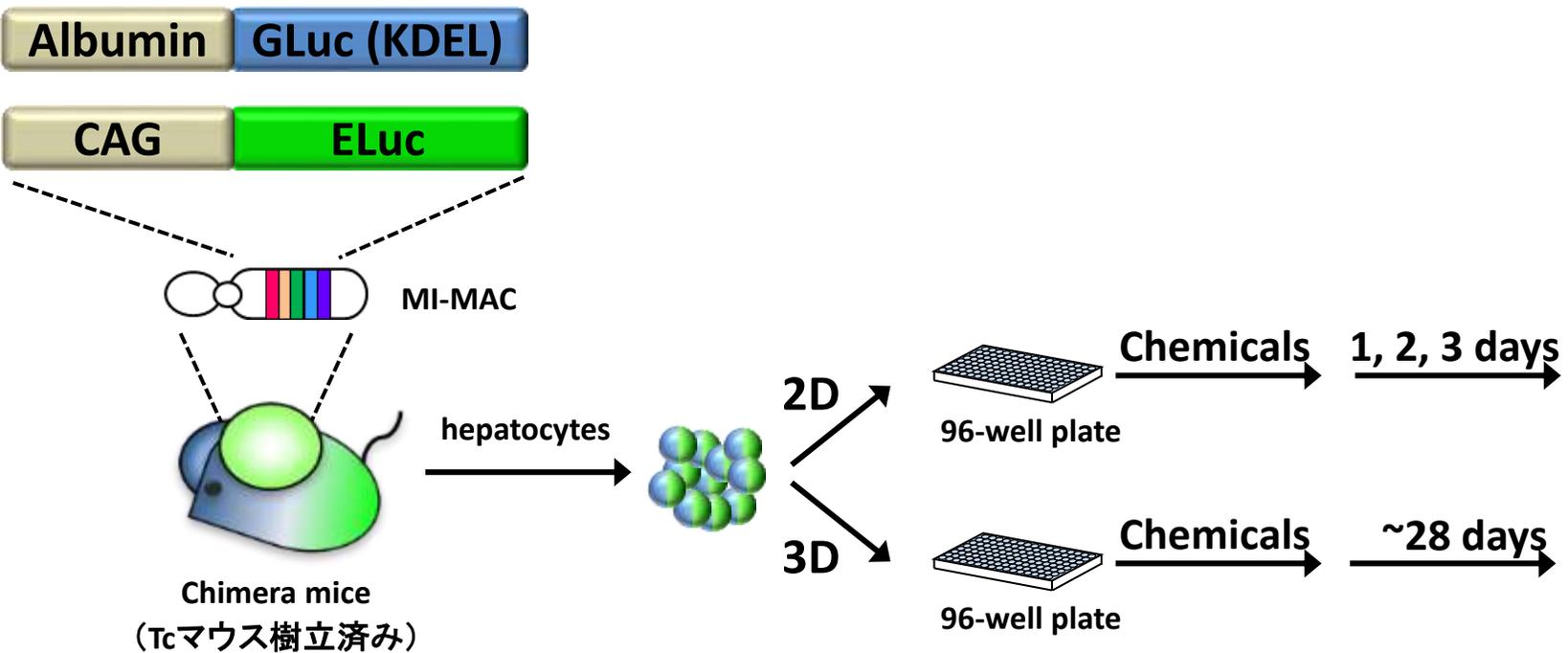
その他 (5物質)

物質名	肝毒性	CAS No.
Aflatoxin B1	カビ毒 (陽性対象に使用)	1162-65-8
3-Methylcholanthrene	多環芳香族炭化水素	56-49-5
Caffeine	アルカロイド, ヒトに対して興奮作用	58-08-2
3-Nitropropionic acid	神経毒性物質	504-88-1
D-Mannitol	糖アルコール	69-65-8

肝毒性 30物質
 非肝毒性 7物質
 非毒性 1物質



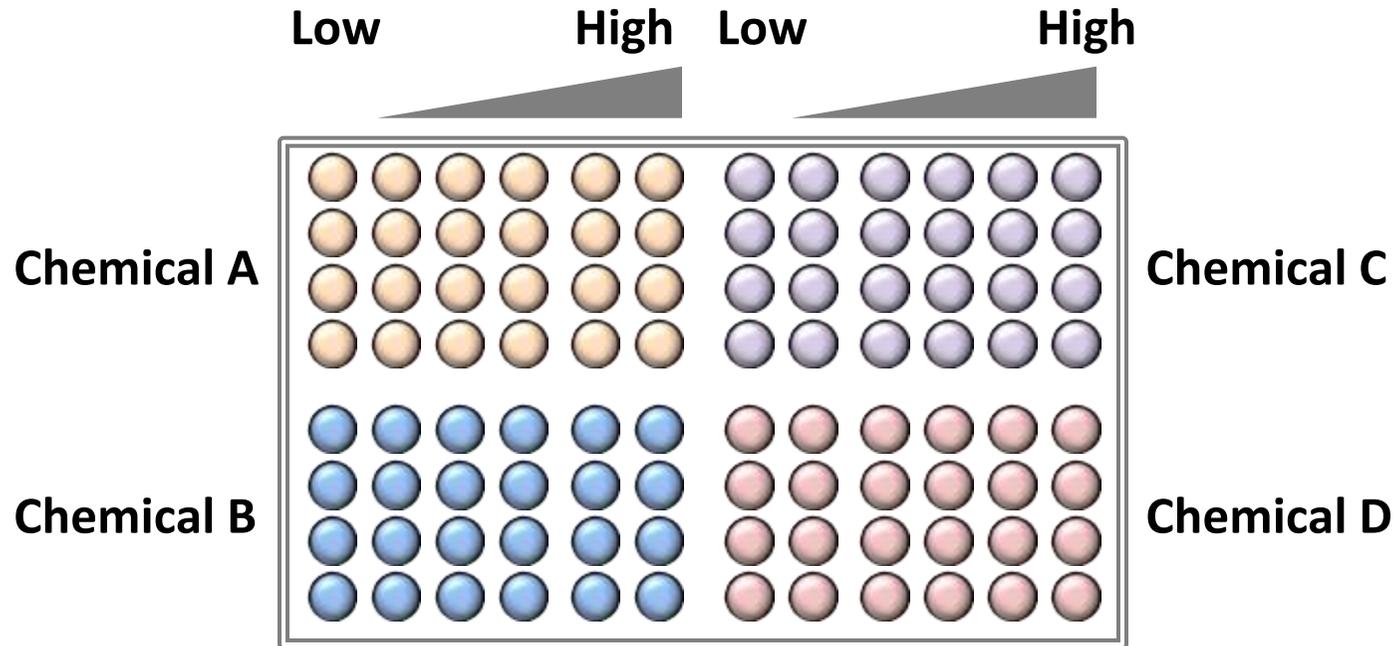
In vitro試験系開発



**ポイント：1匹のTcマウスから96ウェルプレート約50～80枚分作製可能
2次元培養と3次元培養による試験を同時実施可能**



In vitro試験系開発



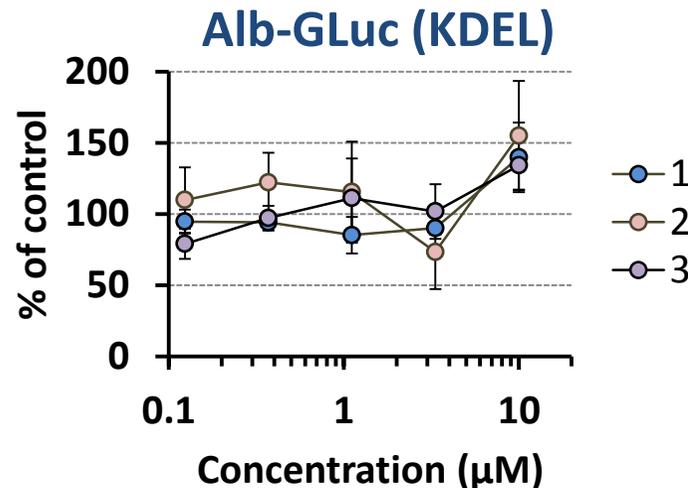
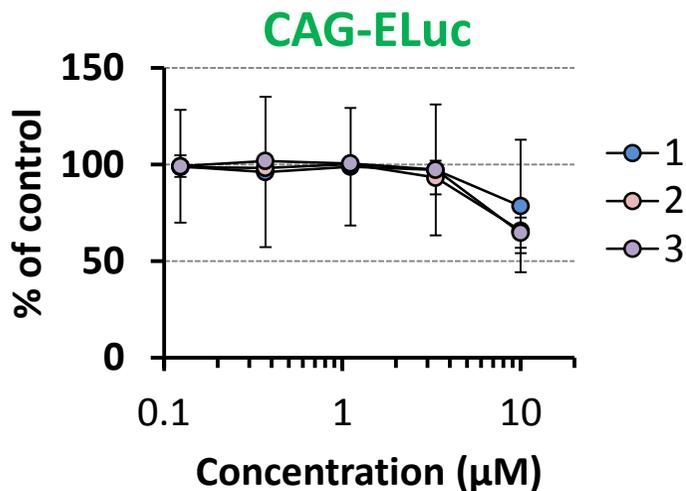
- 公比3、5濃度、4反復
- 最高濃度は、HepG2細胞を用いたdose-finding test（neutral redおよび発光測定）での細胞毒性および沈殿、揮発性、プレート底面腐食等を考慮して決定

ポイント：1プレートで4物質の試験を同時実施可能

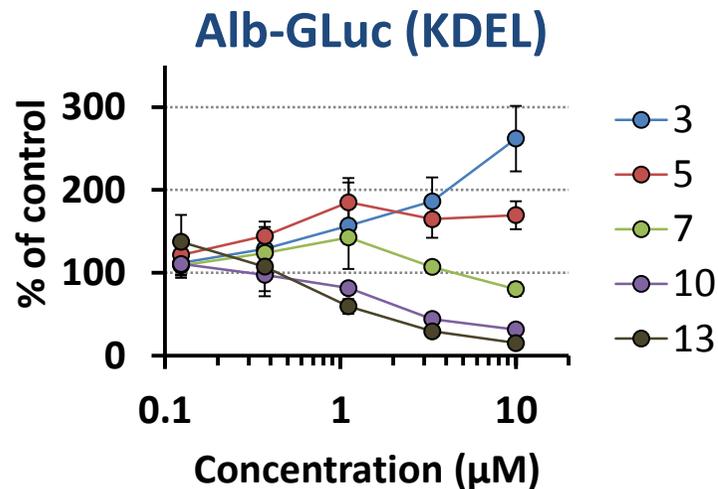
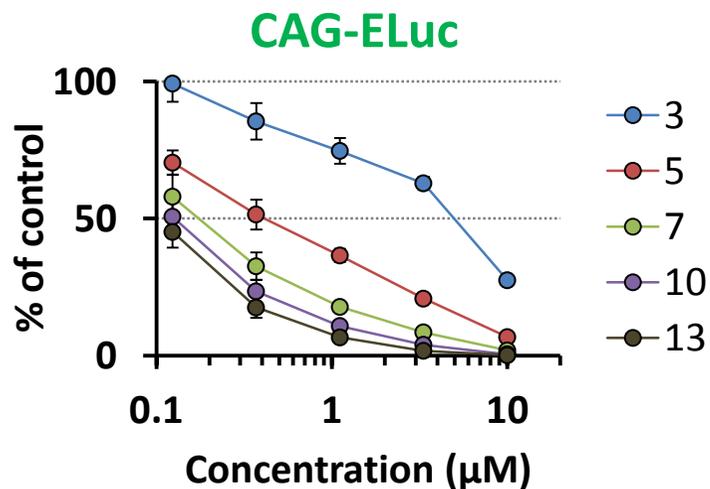


Aflatoxin B1 (肝毒性物質)

2D



3D

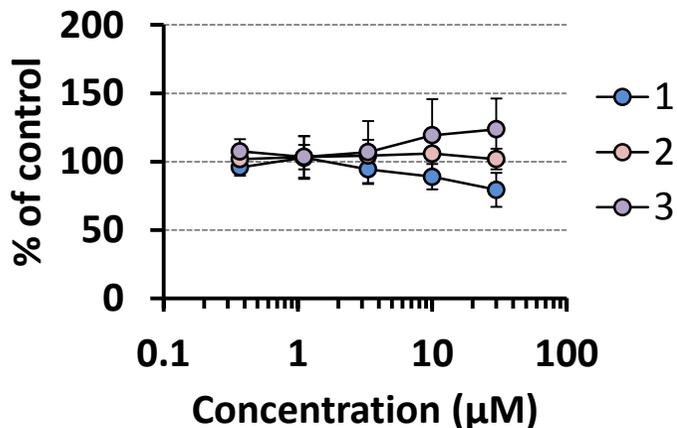


ポイント：繰り返し実験でも再現性のある結果取得可能

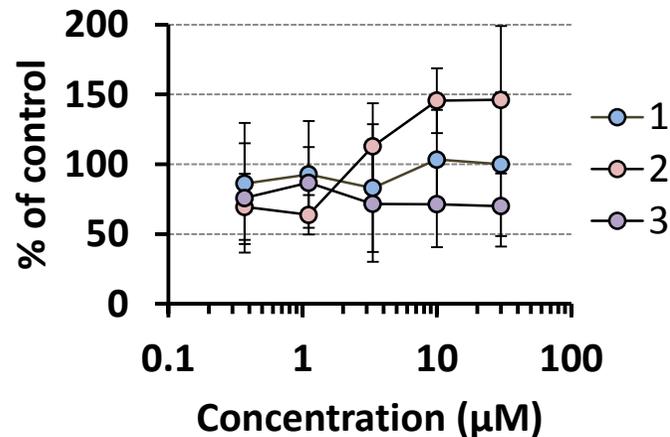


2D

CAG-ELuc

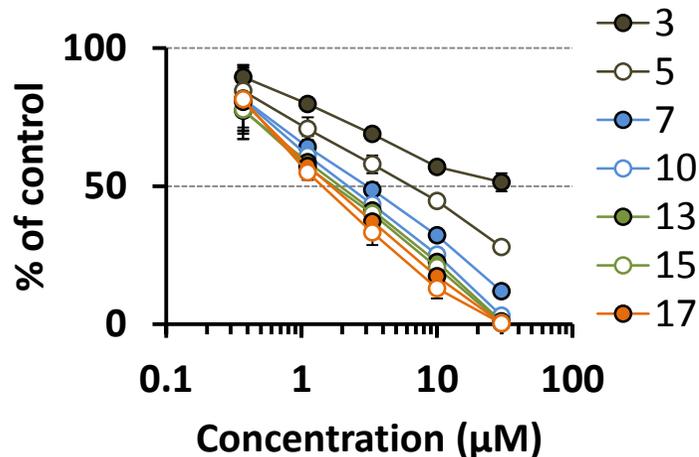


Alb-GLuc (KDEL)

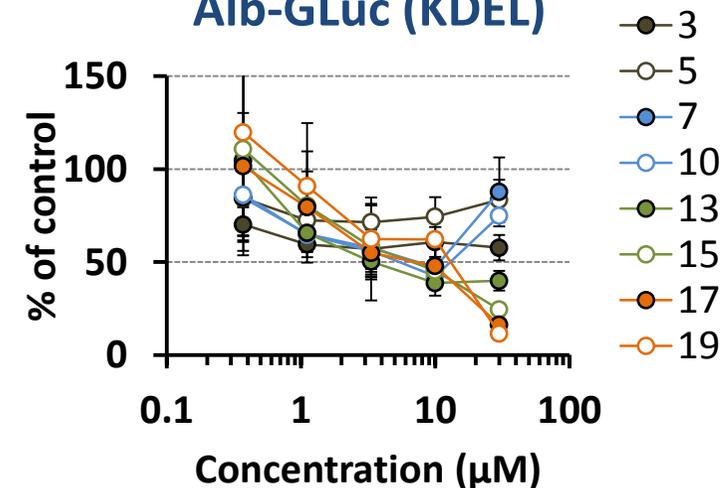


3D

CAG-ELuc



Alb-GLuc (KDEL)

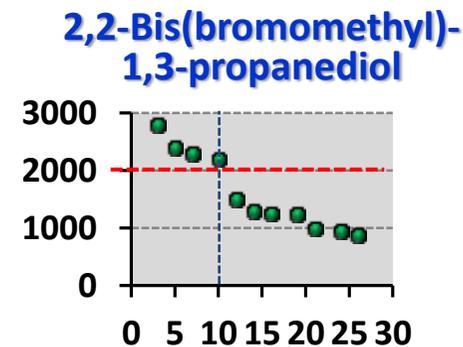
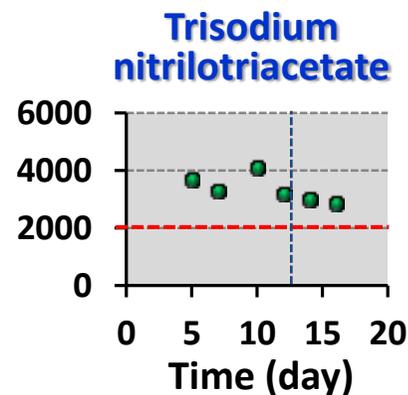
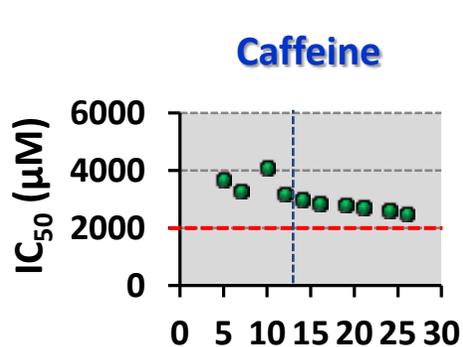


ポイント：2次元培養で陰性の物質を3次元培養で陽性として検出可能

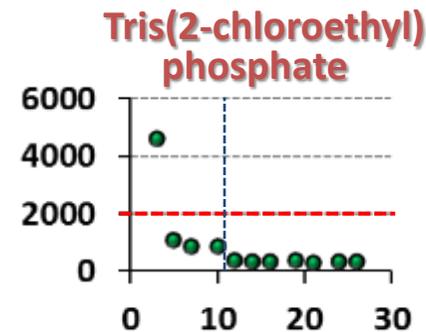
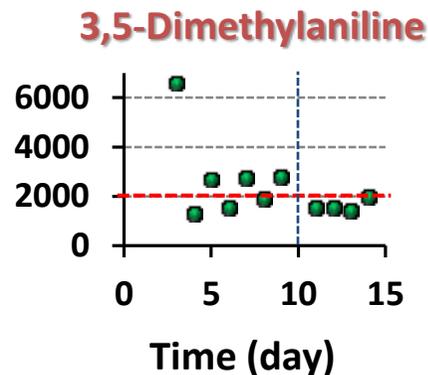
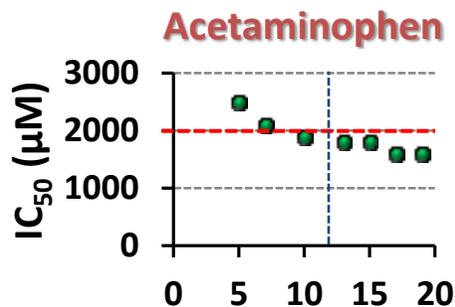


最初にELucの発光が半減してから1週間以内にIC₅₀値が2 mM以下に低下するか

非肝毒性物質



肝毒性物質





In vitro 試験系開発

物質名	CAG-ELuc	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (day)	Alb-GLuc	Judge
Aflatoxin B1 (1st)	↓	5	3	↑	P
Aflatoxin B1 (2nd)	↓	10	3	↑	P
Aflatoxin B1 (3rd)	↓	9	3	↑	P
Acetaminophen	↓	2500	5	↑	P
Acetylsalicylic acid	↓	7000	3	↑	N
Alachlor	↓	40	3	↑	P
Amiodarone	↓	60	3	↑	P
2-Amino-4-nitrophenol	↓	1000	3	↓	P
3-Aminophenol	↓	4500	5	→	N
4-Aminophenol	↓	370	3	→	P
o-Anisidine	↓	1900	10	↓	P
Benzbromarone	↓	50	3	↓	P
2-Bromo-2-nitro-1,3-propanediol	↓	110	3	↑	P
Carbamazepine	↓	200	14	↓	P
Cisplatin	↓	50	3	↑	P
Clozapine	↓	50	3	↑	P
3,4-Dimethylaniline	↓	1000	7	→	P

物質名	CAG-Eluc	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (day)	Alb-GLuc	Judge
3,5-Dimethylaniline	↓	6650	7	↑	P
N,N-Dimethyl- <i>p</i> -toluidine	↓	8000	14	↑	N
Flutamide	↓	90	3	↑	P
4-Isopropylamino-diphenylamine	↓	60	3	↑	P
3-Methylcholanthrene	↓	6	3	↓	P
4,4'-Methylene-bis(2-chloro aniline)	↓	70	5	微増	P
4,4'-Methylenedianiline	↓	580	3	↑	P
o-Nitroanisole	↓	1500	11	↑	P
(+)-Pulegone	↓	1000	10	微増	P
Pyrazinamide	→	N.D.	N.D.	→	N
4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-m-cresol)	↓	29	3	↑	P
Sodium dodecyl sulfate	↓	200	3	↑	P
Thiourea dioxide	↓	6040	3	微増	N
Tris(2-chloroethyl) phosphate	↓	4000	3	↑	P
(±)-Verapamil	↓	50	5	↑	P



In vitro 試験系開発

非肝毒性物質

物質名	CAG-ELuc	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (day)	Alb-GLuc	Judge
Anthranilic acid	→	N.D.	N.D.	→	N
2,2-Bis(bromomethyl)-1,3-propanediol	↓	2500	3	↑	N
Caffeine	↓	5000	3	↓	N
Dimethyl fumarate	↓	100	5	↑	P
3-Nitropropionic acid	→	N.D.	N.D.	→	N
Phenolphthalein	→	N.D.	N.D.	→	N
Trisodium nitrilotriacetate	↓	2860	3	↑	N
非毒性物質					
D-Mannitol	→	N.D.	N.D.	→	N



In vitro試験系開発

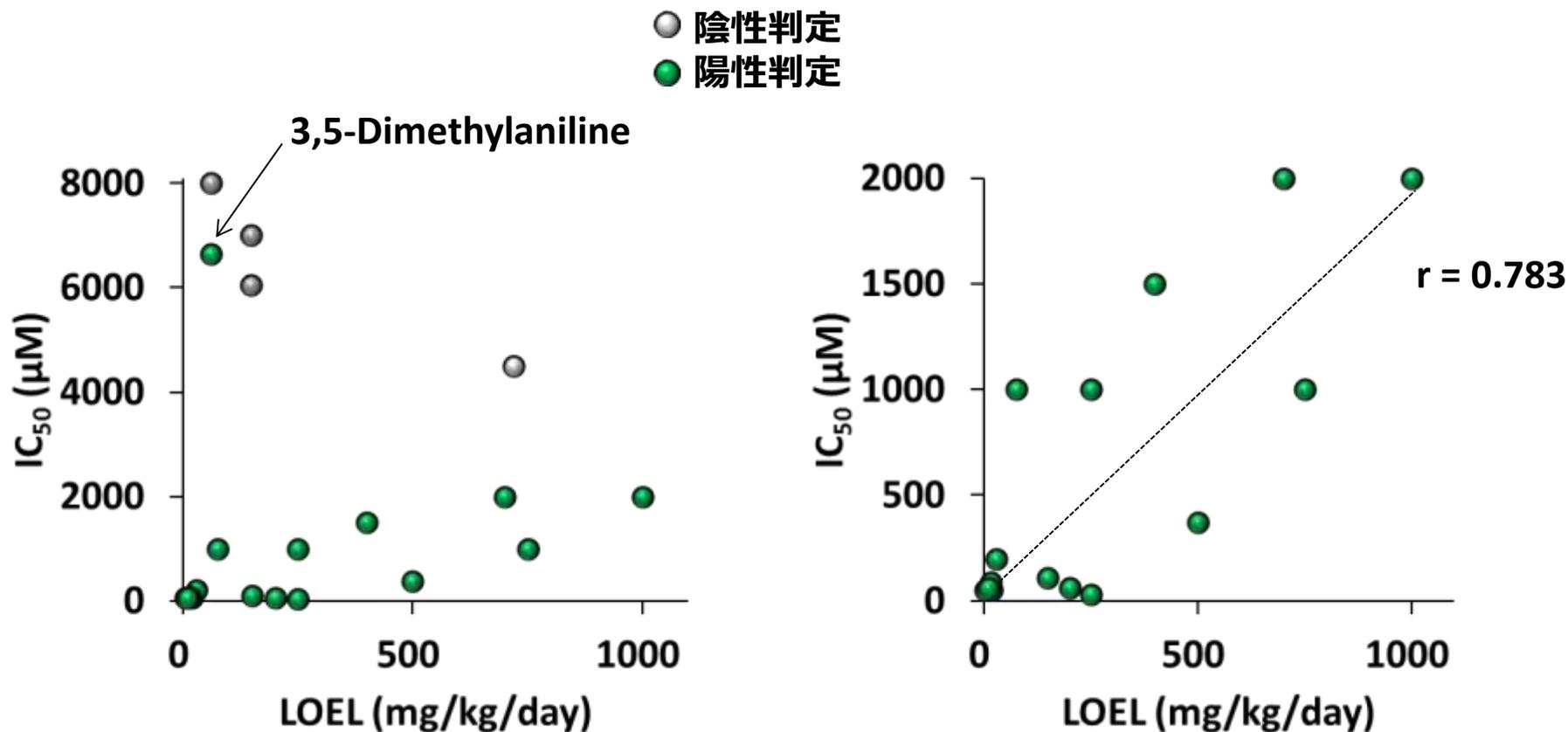
3次元培養によるin vitro肝毒性試験系の予測能

		in vitro	
		Positive	Negative
in vivo	Positive	25	5
	Negative	1	7

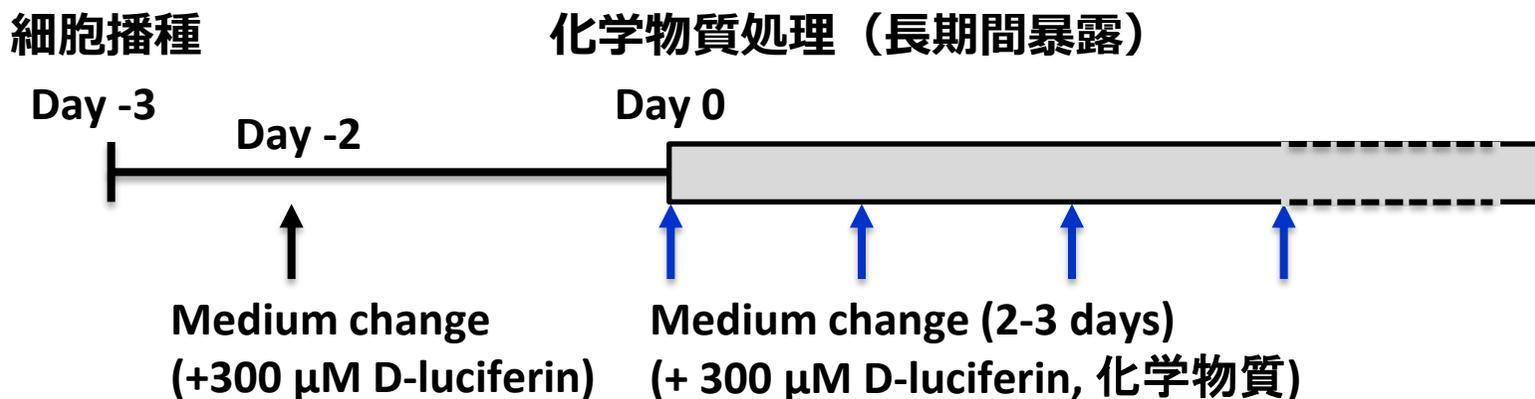
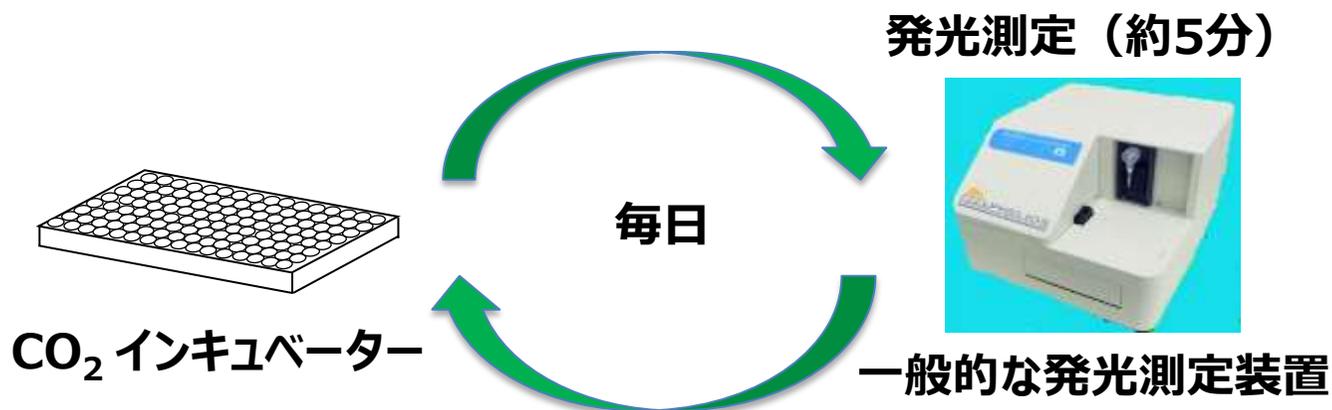
Sensitivity	83%	(25/30)
Specificity	88%	(7/8)
Positive predict values	96%	(25/26)
Negative predict values	58%	(7/12)
Accuracy	84%	(32/38)



28～91日ラット反復投与試験における肝臓（病理組織学的検査）
に対する最小影響量とELucのIC₅₀値を比較



ポイント：例外物質はあるが、LOELとの良い相関が得られた。



ポイント：同一プレートを用いて化学物質の反復処理による試験プロトコルを作成



- 処理濃度：溶解性の検討で決定した最高濃度から公比3で濃度を設定（5濃度）
- 肝細胞の培養開始から3日目に処理開始
- 2～3日毎に培地交換により反復処理実施と同時にELucおよびGLuc活性測定

処理開始14日以内にELucの発光が50%以下に減衰するか



ポイント：反復処理を考慮した試験プロトコールを作成

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況

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）
a) 肝臓毒性in vitro 試験法の開発	1) 肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	達成 ；肝毒性・組織マーカープロモーターとしてAFP, Albumin等を選定。選定プロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を挿入した人工染色体ベクターを各種作製。
	2) 人工染色体ベクター導入マウスES細胞作製	達成 ；肝毒性評価用人工染色体ベクターを保持するマウスES細胞を作製。
	3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウス作製	達成 ；6種類のキメラ或はtranschromosomicマウスを作製し、アッセイ精度、発光測定感度等を勘案しCAG-ELuc; Albumin-GLuc(KDEL)マウスを毒性評価用マウスとして選定。
	4) 肝臓細胞の三次元培養等による培養細胞の樹立	達成 ； ・高細胞生存率を示す初代肝細胞調製法を確立するとともに、30日間以上アルブミン産生および発光活性を維持した三次元培養に成功。
	5) 樹立した培養細胞を用いた肝臓毒性評価系の構築と試験法プロトコル案作成	達成 ；38物質を選定、開発したin vitro肝毒性試験法に適用し、26日間の連続データをもとに、最適な試験プロトコル案を作成。
	6) 国際標準化にむけた取り組み	経済産業省平成28年度化学物質安全対策事業（発光レポーターを導入したマウス初代肝細胞を用いたin vitro肝毒性試験法開発に関する調査）で施設間・施設内再現性、肝細胞凍結法開発等を実施中。

実施項目の詳細説明

- ① 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
- ② 肝臓毒性in vitro試験法の開発
- ③ **腎臓毒性in vitro試験法の開発**
- ④ 神経毒性in vitro試験法の開発



遺伝子選定・人工染色体ベクター開発



プロトコル作成・公表

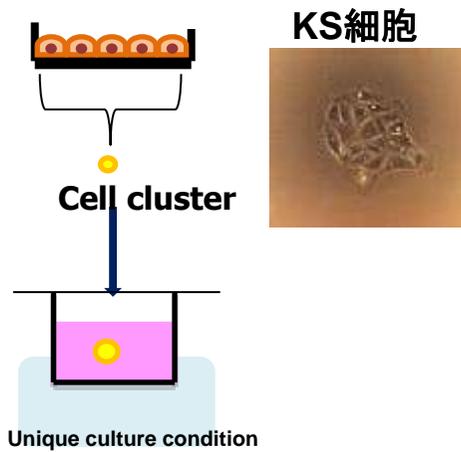
	試験法	細胞(人工染色体)/培養方法	評価方法	特徴:レポーター遺伝子
腎毒性試験1)	未標識rKS56細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験	ラットKS細胞/3D	3D解析ソフトによる形態、表面積、体積変化、細胞死	経時的変化観察可能、非破壊全サンプル品質検査が可能、ハイスループット化は困難 レポーター遺伝子:なし
腎毒性試験2)	EGFP発現人工染色体を搭載したrKS56細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験	EGFP MAC-KS細胞/3D	3D解析ソフトによる形態、表面積、体積変化、細胞死	経時的変化観察可能、既存の蛍光プローブ(毒性メカニズム)との併用が可能、ハイスループット化は困難 CAG-EGFP(緑色蛍光)
腎毒性試験3)	発光レポーター搭載rKS細胞の2次元培養での腎毒性評価	3色 MAC-KS細胞/3D	プレートリーダーによるKim1発光上昇(近位尿細管障害)、蛍光減少(細胞死)	ハイスループット化が可能、安価 Kim1-Cluc(分泌型青色 Luciferase) Aqp1-mCherry(赤色蛍光) CAG-EGFP(緑色蛍光)
腎毒性試験4)	発光レポーター搭載マウス近位尿細管S3由来不死化細胞の2次元培養での腎毒性評価	2色 MAC-マウスS3細胞/3D	プレートリーダーによるKim1発光上昇(近位尿細管障害)、蛍光減少(細胞死)	ハイスループット化が可能、最も安価 Kim1-SLG(青色 Luciferase) HPRT-SLR(赤色 Luciferase)



発光培養細胞作製

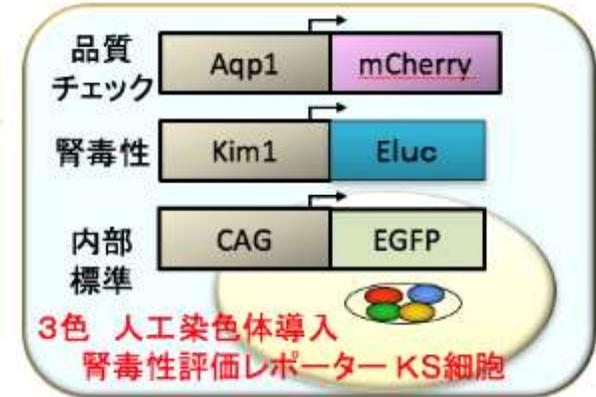
2種の腎臓由来細胞を利用した

ラット成体腎臓幹/前駆細胞 (KS細胞)



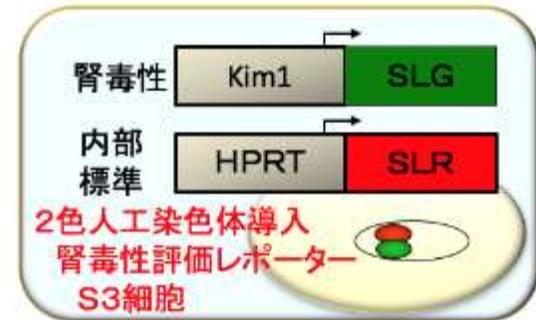
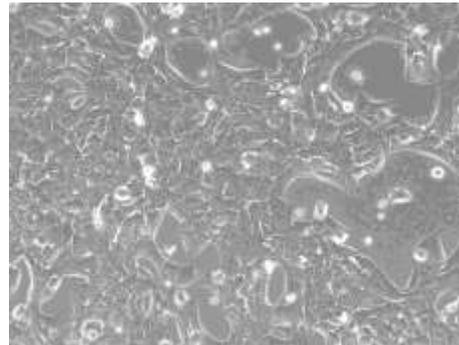
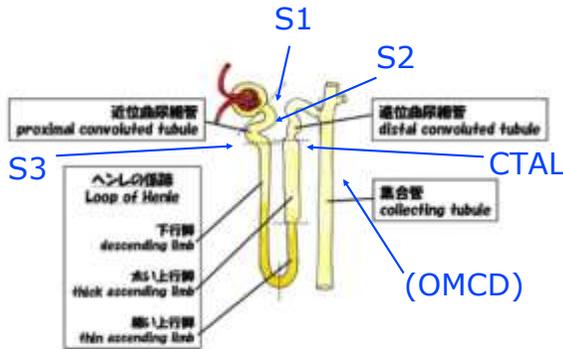
ラット成体腎臓幹/前駆細胞 (KS細胞)から腎臓様構造を再構築

Kitamura S. et al. *Stem Cells* 2015



マウス腎臓腎近位尿管S3部位由来不死化細胞

杏林大学 遠藤仁先生らが作製
シスプラチン感受性が高い

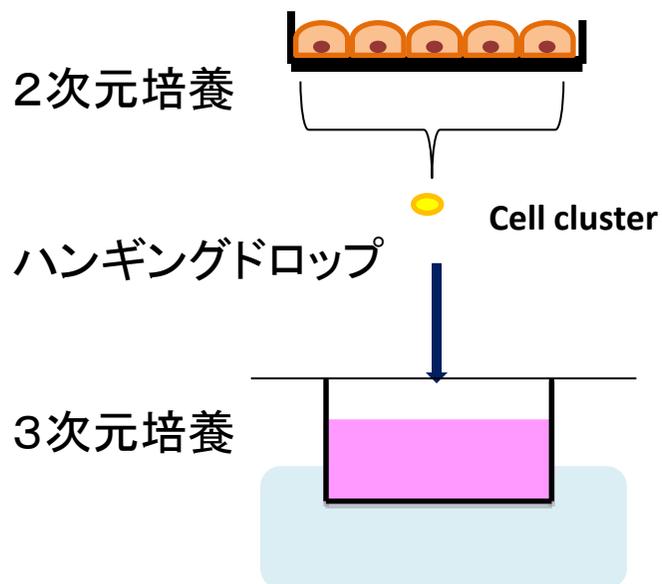


<http://www.ninomiya.med.tottori-u.ac.jp>より



発光培養細胞作製

シンプルな培養法で腎様構造体を作成できる。



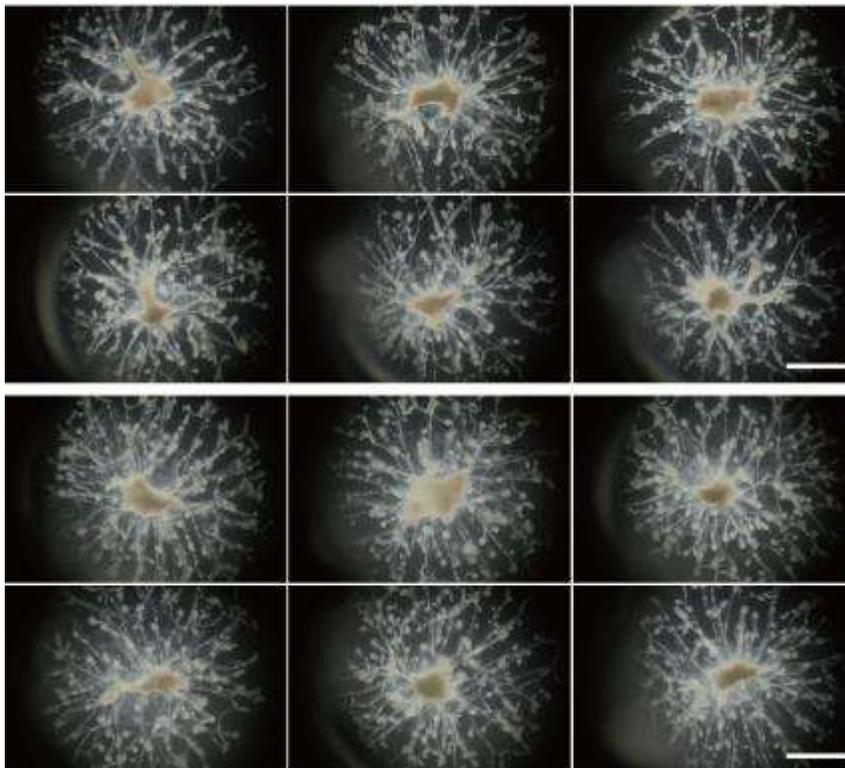
毒性試験に活用するには？

- 1) 簡便に作成できる
- 2) 複数の施設で再現できる
- 3) 一定品質のサンプルを作成できる
- 4) 生体の機序を再現する
- 5) 障害を定量的に計測できる

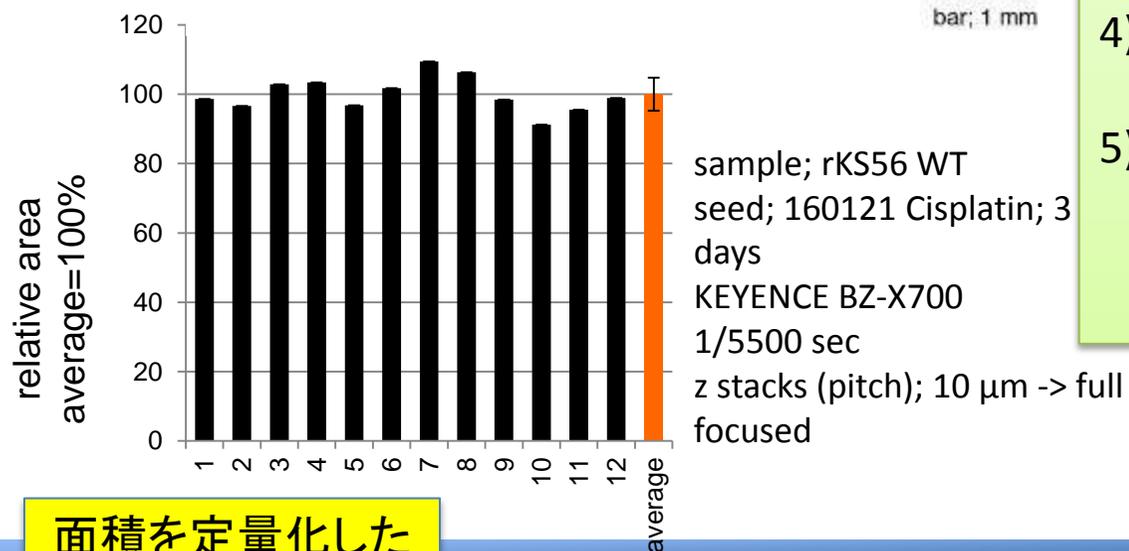
岡山大学で確立した培養方法を鳥取大学に
技術移転。

3次元培養では、培地交換せず3週間培養するのみ

rKS56 3D Culture (Day 28)



bar; 1 mm



面積を定量化した

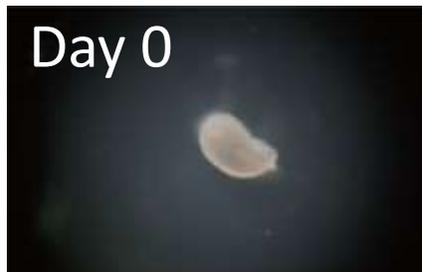
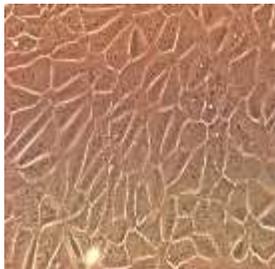
毒性試験に活用するには？

- 1) 簡便に作成できる
- 2) 複数の施設で再現できる
- 3) 一定品質のサンプルを作成できる
- 4) 生体の機序を再現する
- 5) 障害を定量的に計測できる



発光培養細胞作製

2次元培養



rKS56 3D Culture (Day 21)



腎様構造体の形成を経時的に観察した

毒性試験に活用するには？

- 1) 簡便に作製できる
- 2) 複数の施設で再現できる
- 3) 一定品質のサンプルを作製できる
- 4) **生体の機序を再現する**
- 5) 障害を定量的に計測できる



発光培養細胞作製

明視野画像での3次元細胞の画像解析システム
→すべてのサンプルに対して**非破壊試験**による
経時的測定が可能



毒性試験に活用するには？

5) **障害を定量的に計測できる**

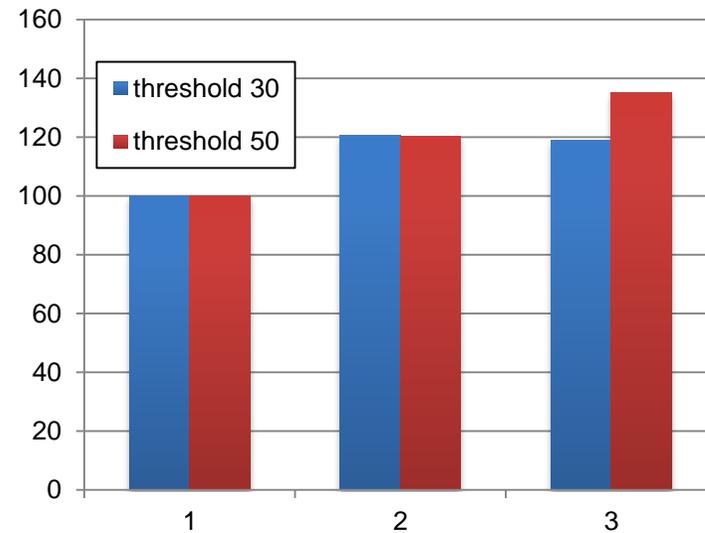
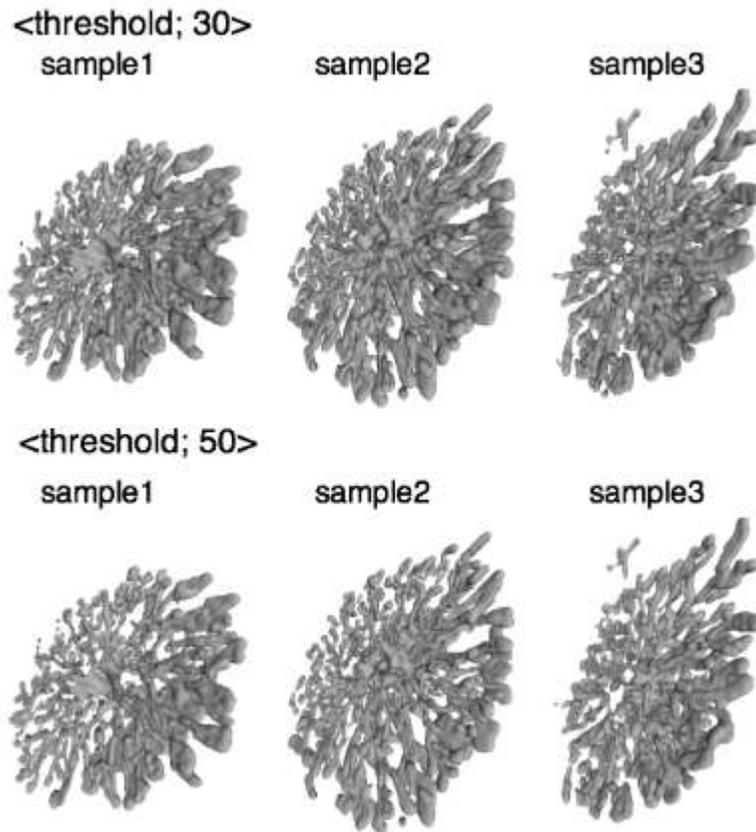
非破壊試験

- ・ 再生医療や創薬スクリーニングに用いる直前の細胞(構造体)の品質管理に有用
 - 細胞にダメージを与えない
 - 細胞に操作を加えない



発光培養細胞作製

- ・3D Viewerで3次元構築(threshold30/50)後、表面情報を保存
- ・表面情報をMeshLabを用いて、①Remove Isolated pieces (wrt Face Num.)フィルタ処理(threshold100)、②Snap Mismatched Bordersフィルタ処理(Edge Distance Ratio; 0.01)



非侵襲性3D画像解析による
新システムを開発中
→特許申請準備中

非侵襲性3D画像解析でできること

(1) 試験前の品質管理

→ 一定基準のサンプルを安全性評価試験に用いる

・作成過程で経時的に解析し、機械学習で基準を構築する

(2) 試験による細胞障害測定

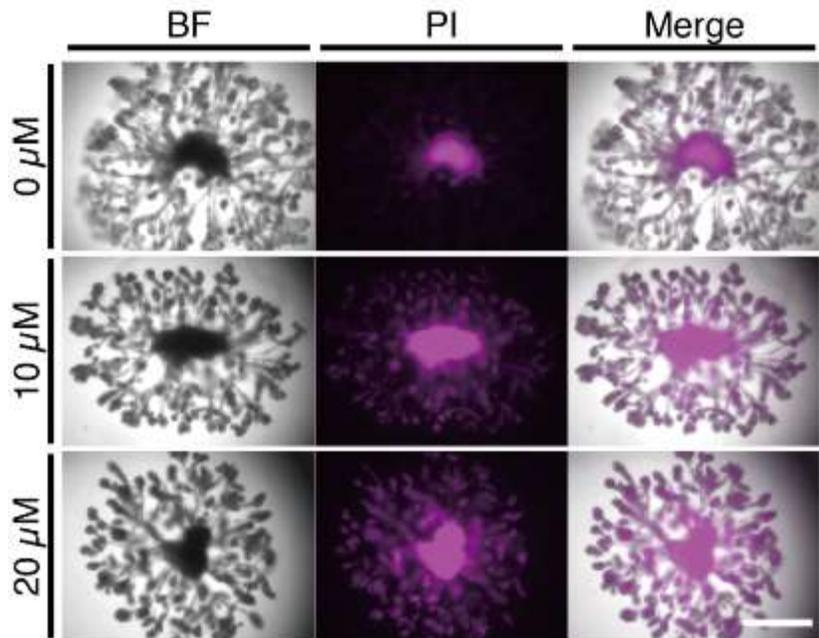
→ 化学物質による3次元での形態変化を測定し定量化



In vitro試験系開発 腎毒性試験 1

未標識rKS56細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験

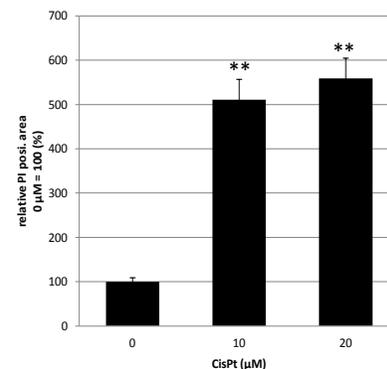
3D rKS56 cisplatin for 6 days



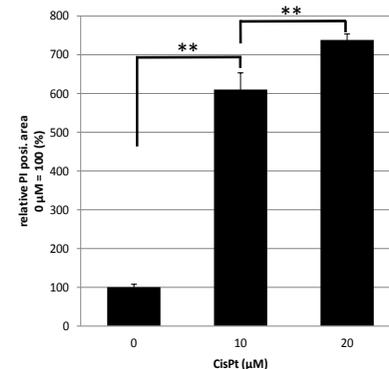
area change (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 WT
cell; 1×10^5 cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days
seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20)
KEYENCE BZ-X700
1/7500 sec (bright field)
z stacks (pitch); 10 μ m -> full focused
relative growth rate = ((day 20)/(day 14))/((con. day 20)/(con. day 14))x100

PI (- core) posi. area



relative PI posi. area



(**p<0.01)



シスプラチンの投与により、近位尿細管様部位の死細胞が増加する

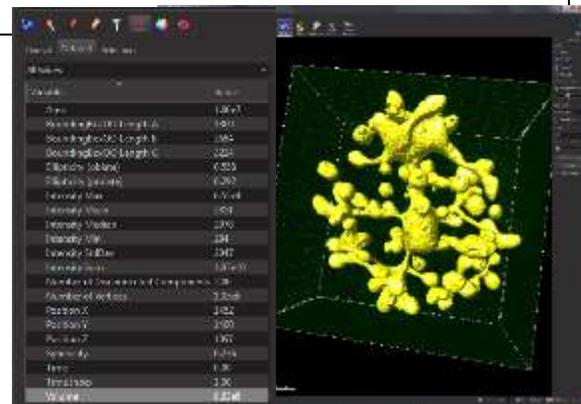
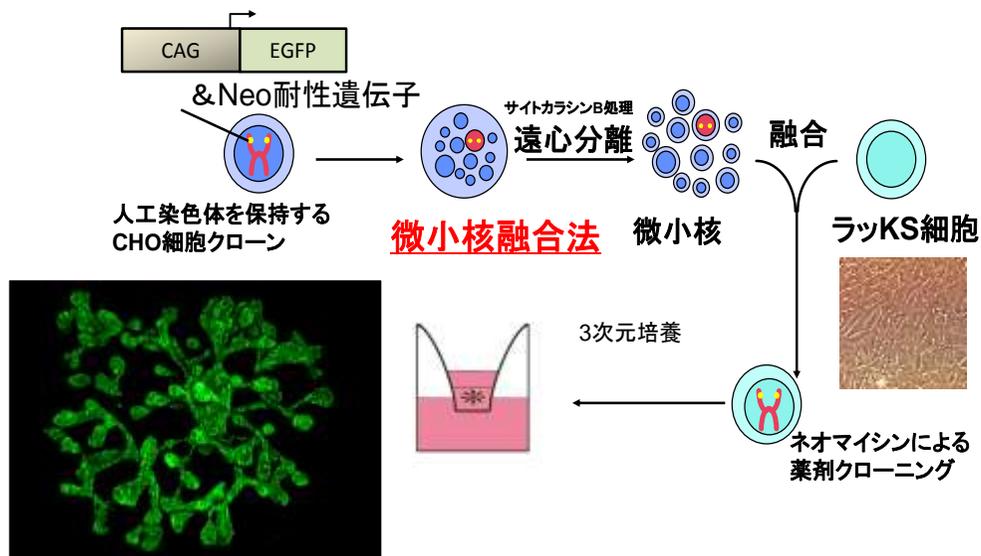


In vitro試験系開発 腎毒性試験 2

EGFP発現人工染色体を搭載した rKS56細胞三次元構造体を利用した 腎毒性試験

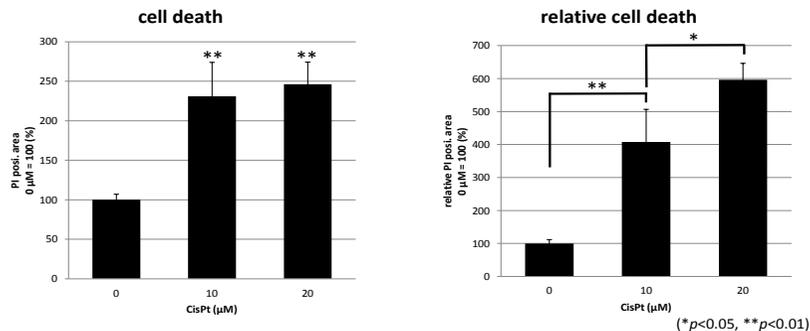
ラット KS 細胞に人工染色体ベクターを導入

1色CAG-EGFP MAC1導入ラット KS 細胞



rKS56 green 3D area change (PI) (CisPt for 6 days)

sample; rKS56 MAC1 #B3
cell; 1×10^5 cells/well (cultured for 14 days) -> CisPt for 6 days
seed; 160121 (day 14 -> CisPt (6 days) -> day 20)
KEYENCE BZ-X700
1/7500 sec (bright field)
1/35 sec (EGFP)
1/20 sec (PI)
1/50 sec (Hoechst33324)
z stacks (pitch); 10 μm -> full focused

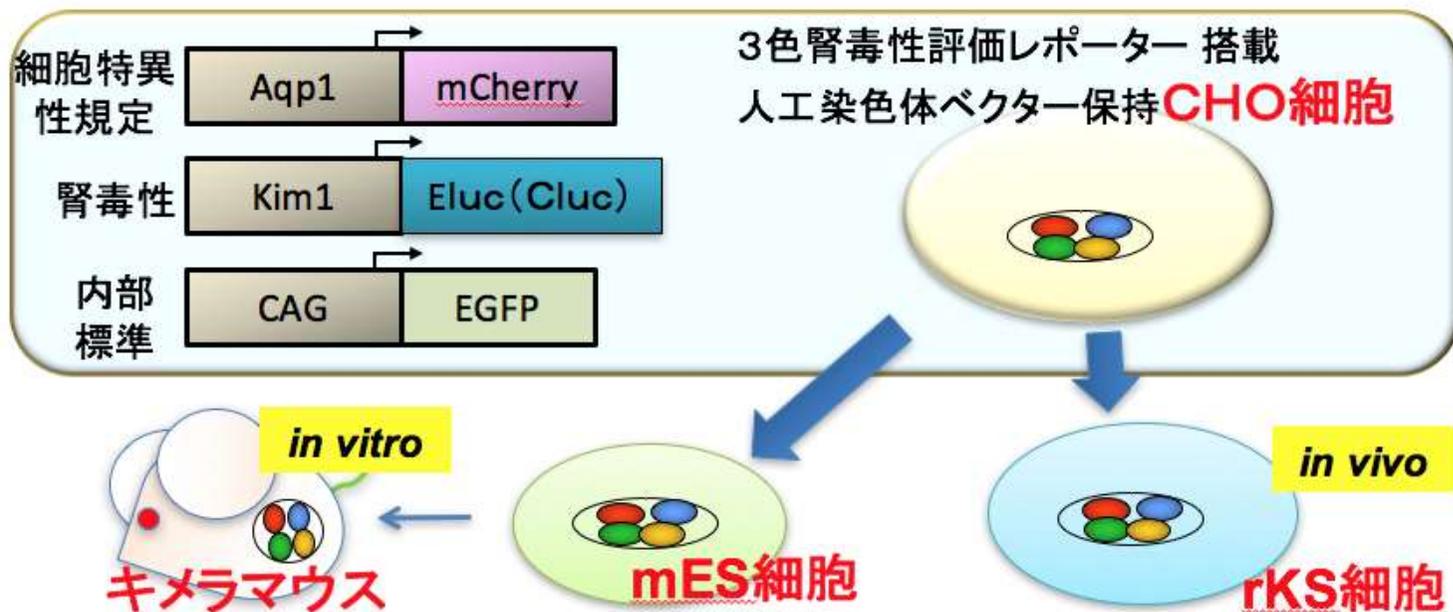


人工染色体ベクターによりEGFPを発現させることで、シスプラチンにより誘発される腎障害を効率良く解析することができる



In vitro試験系開発 腎毒性試験3

3色発光レポーター搭載rKS細胞の 2次元培養での腎毒性評価



CAG-EGFP: すべての組織で恒常的に発現

→ 人工染色体ベクターの保持の確認、細胞数の測定に使用

Kim1-Eluc(Cluc): 近位尿細管障害時に発現上昇

→ 化学物質による腎障害の検出に使用

Aqp1mCherry: 腎臓では近位尿細管に特異的に発現

→ 腎近位尿細管細胞の性質を保持していることを規定

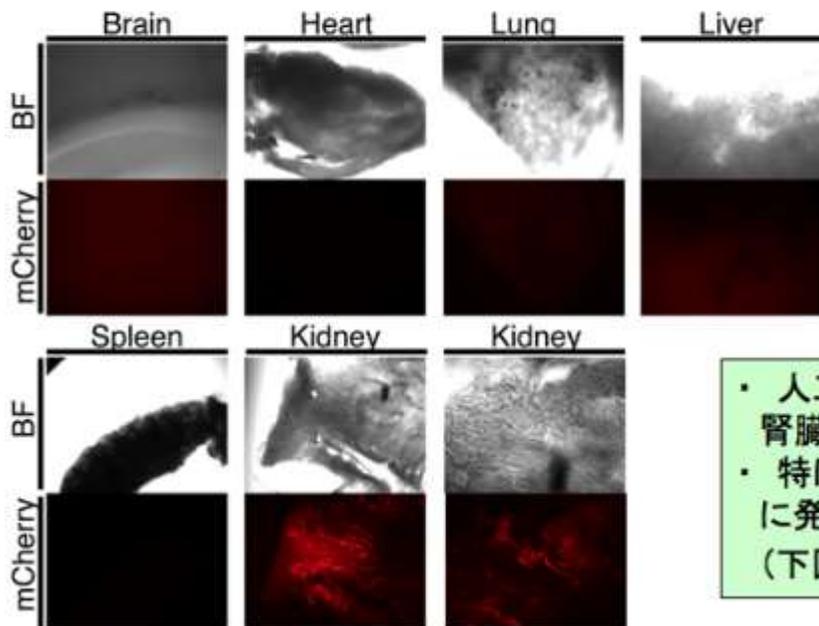


In vitro試験系開発
腎毒性試験3

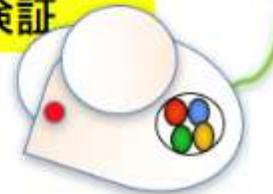
3色発光レポーター搭載rKS細胞の
2次元培養での腎毒性評価

Aqp1mCherry : 腎臓では近位尿細管に特異的に発現

→ 腎近位尿細管細胞の性質を保持していることを規定



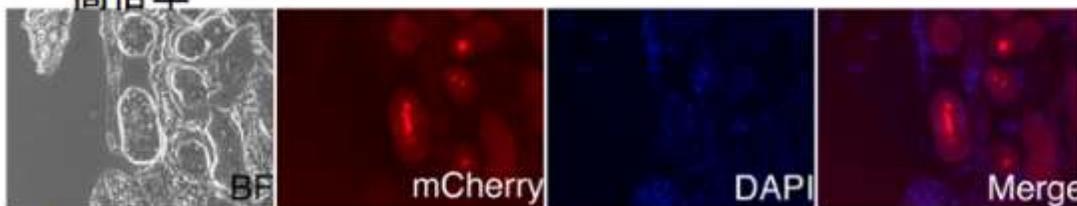
mAqp1 -mCherry
人工染色体導入chimera
mouseを作製して検証



腎臓で特異的に
mCherry発現

- 人工染色体導入キメラマウスで腎臓で特異的に発現している(左図)
- 特に腎臓近位尿細管細胞で特異的に発現していることが観察される。(下図)。*in vivo*

高倍率



➔ 近位尿細管上皮細胞で赤色蛍光 **mCherry**発現



In vitro試験系開発 腎毒性試験3

3色発光レポーター搭載rKS細胞の 2次元培養での腎毒性評価

Eluc activity (AKE rKS56 CP, APAP treatment)

2D培養

sample; MAC1 rKS56 Kim1-Eluc/Aqp1-mCherry #A1-1

cell density; 2×10^4 cells/well

kit; TOYOBO Eluc Luciferase Assay Kit

plate; 96-Well Black-Clear Bottom

<Phelios>

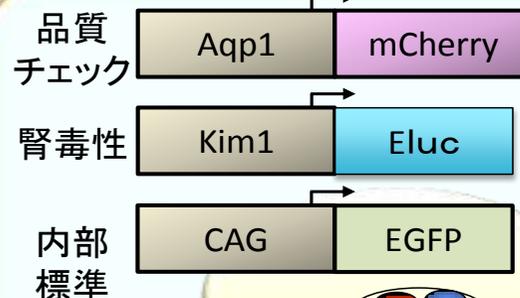
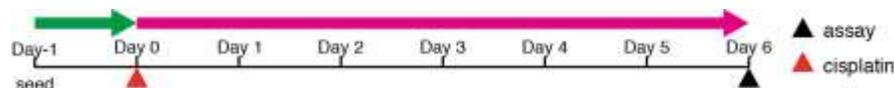
reaction; sample:assay solu. = 50uL:50uL

1 sec x 100 times=100 sec

<TECAN infinite 500>

Fluorescence (EGFP); ex. 485 (20) nm, em. 510 (25)nm

Gain; 65 Integration Time; 20 μ s

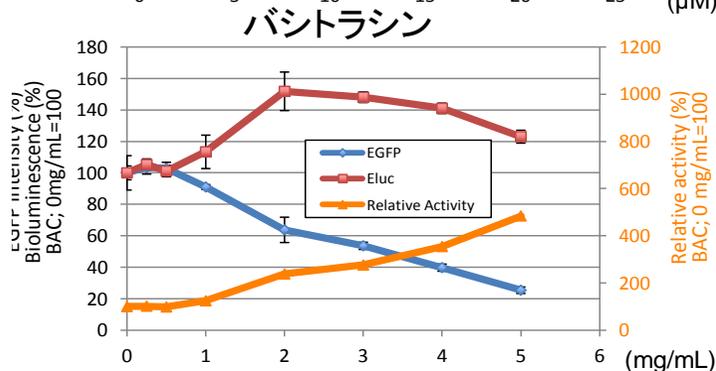
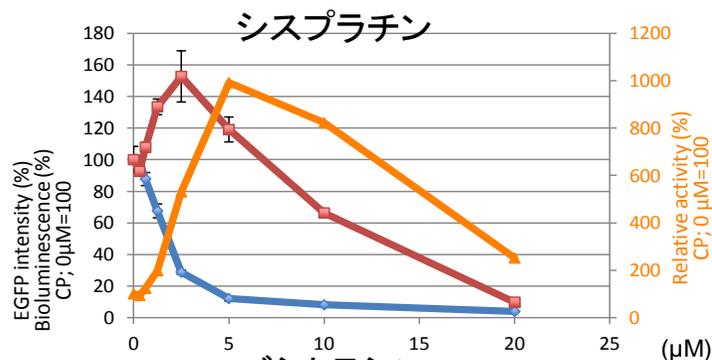


3色 人工染色体導入
腎毒性評価レポーターKS細胞

2次元培養にて解析

・ CAG-EGFPで補正

3色腎障害レポーター遺伝子を搭載したrKS細胞の2D培養でも毒性評価は可能
→HTSシステムへ

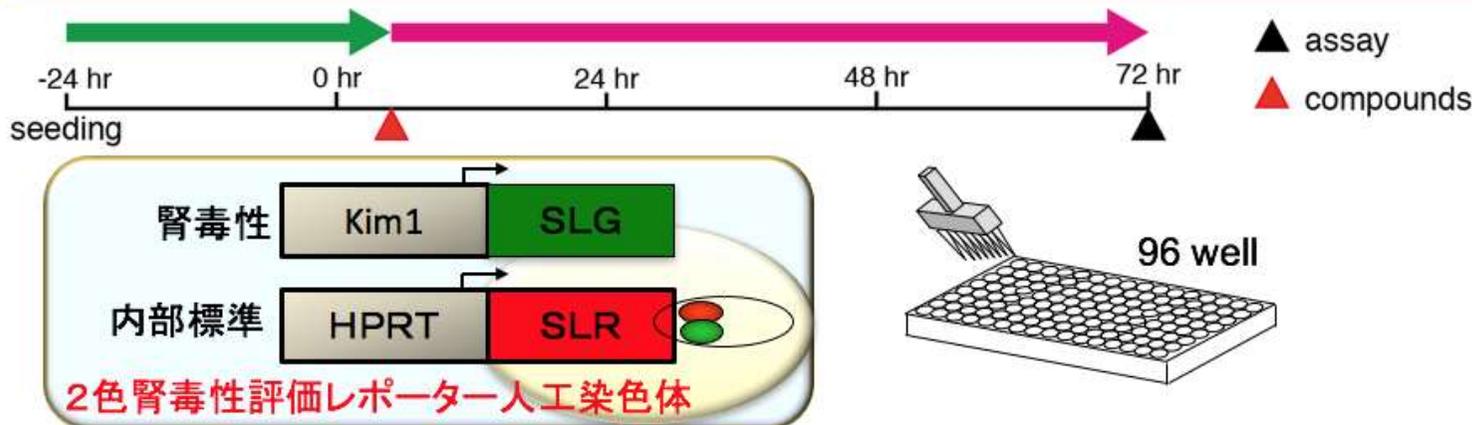




In vitro試験系開発
腎毒性試験4

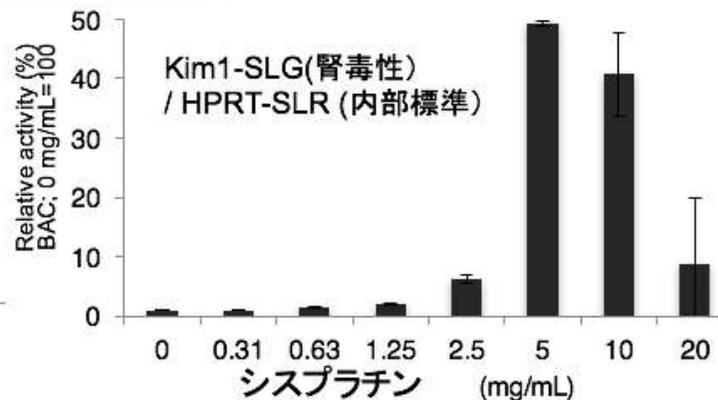
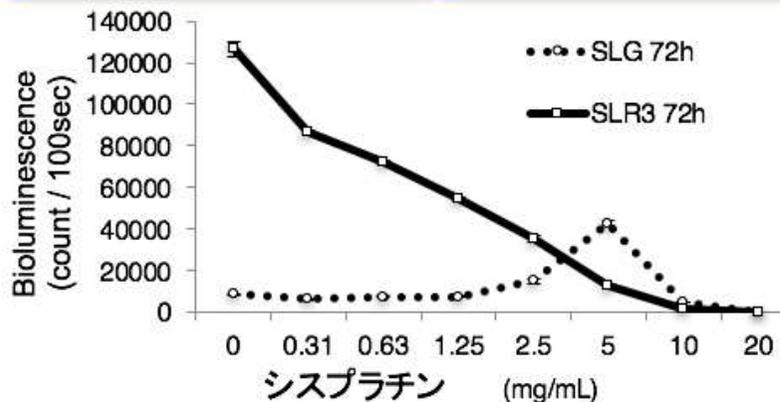
発光レポーター搭載マウス近位尿管S3由来不死化細胞の2次元培養での腎毒性評価

人工染色体導入S3細胞→シスプラチンによる腎障害を発光で検出



腎障害マーカー(点線)
→ 腎障害で上昇

内部標準マーカー(実線)
→ 細胞死(一般毒性)で減少





4種類の試験プロトコルを作成・公表

- 1) 未標識rKS56細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験
- 2) EGFP発現人工染色体を搭載したrKS56細胞三次元構造体を利用した腎毒性試験
- 3) 3色発光レポーター搭載rKS細胞の2次元培養での腎毒性評価
- 4) 発光レポーター搭載マウス近位尿細管S3由来不死化細胞の2次元培養での腎毒性評価

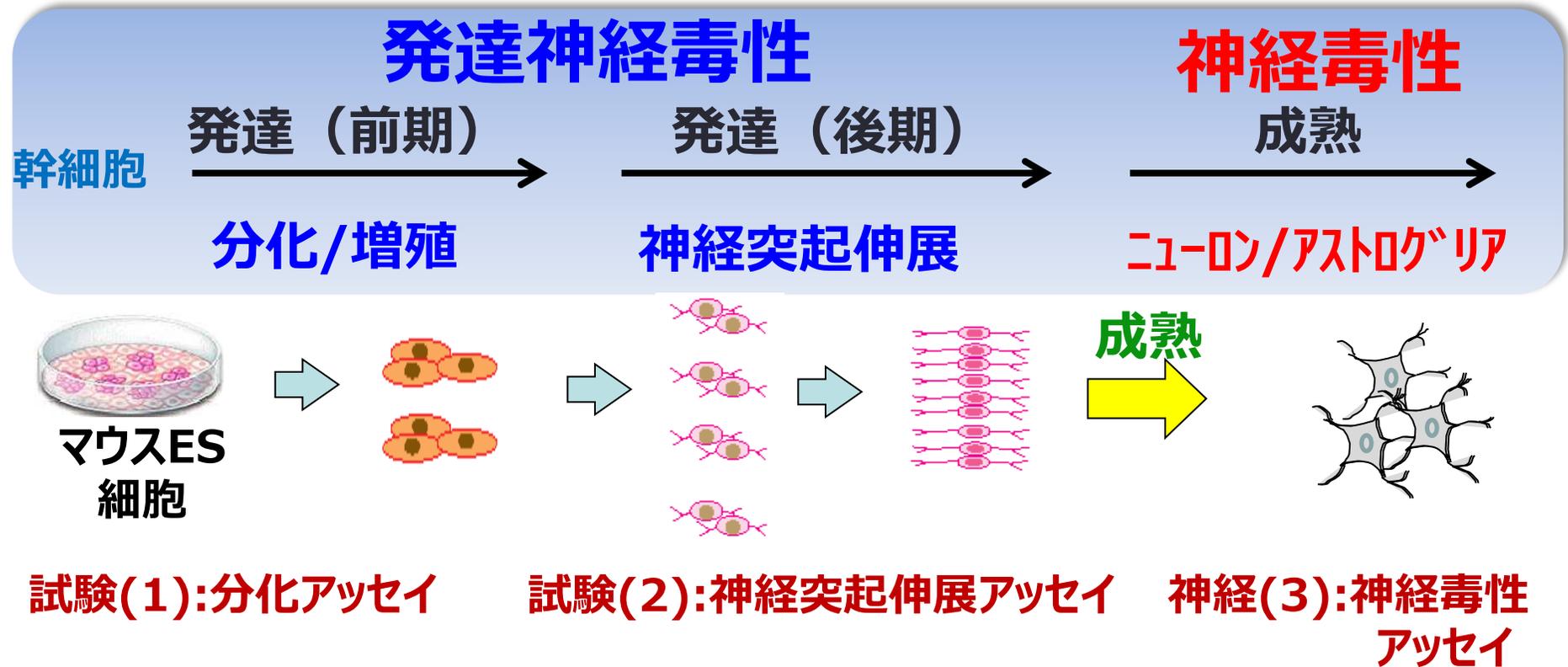
個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況

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）
b)腎臓毒性in vitro 試験法の開発	1) 腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	達成 ；腎臓毒性マーカーを選定し、これらマーカー遺伝子の発現をモニターできるレポーター遺伝子を作成して人工染色体ベクターに導入した。Kim1(近位尿細管障害), Aqp1(組織特異性), HPRT(内部標準)
	2) 人工染色体ベクター導入マウスES細胞作製	達成 ；腎毒性評価用人工染色体ベクターを保持するマウスES細胞を作製した。
	3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウス作製	達成 ；腎毒性評価用マウスES細胞からキメラマウスを作成し、目的のマーカー遺伝子が生体内 (in vivo)で機能していることを確認した。
	4) ラット腎臓細胞の三次元培養等による培養細胞の樹立	達成 ；複数の研究機関で一定の品質の腎3次元構造体を作製できる培養細胞を樹立した。
	5) 樹立した培養細胞を用い、腎臓毒性を評価可能な試験系の構築と試験法プロトコル案作成	達成 ；シスプラチンによる近位尿細管障害を検出し、定量化できる4種の試験法のプロトコルを作成し公開した。

実施項目の詳細説明

- ① 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
- ② 肝臓毒性in vitro試験法の開発
- ③ 腎臓毒性in vitro試験法の開発
- ④ **神経毒性in vitro試験法の開発**

In vitro神経毒性試験の概要



- ES細胞を使ってin vivoの各ステージをin vitroで模倣
- 人工染色体、発光技術により発光ES細胞を作製
- 簡便な3種のin vitro神経毒性評価法を構築



遺伝子選定・人工染色体ベクター開発

	試験 (1)	試験(2)	試験 (3)
神経毒性の分類	発達神経毒性/催奇形性	発達神経毒性	神経毒性
時期	発達前期	発達後期	成熟期
細胞イベント	神経分化	神経突起伸展	ニューロン/アストログリア
マーカー遺伝子 (*:前回NEDOPJ成果)	・Tubb3 ・Reln*	イメージング による形態観察	・MAP2 ・GFAP
人工染色体ベクター	・Tubb3 p-SLG-2A-AcGFP		・GFAP p-SLG-2A-AcGFP
その他ベクター	・Reln p_Luc ・Tubb p_Luc		・MAP2 p_SLG ・MAP2 p_SLR-2A-mCherry

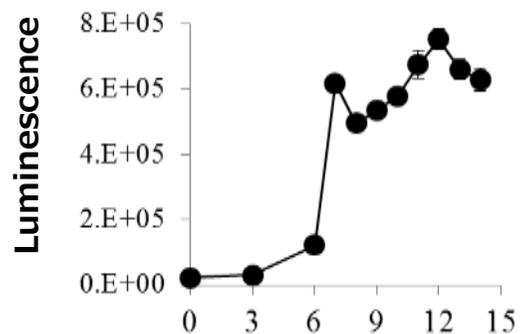
- ポイント : ①神経毒性全般を捉えられるよう複数のステージでのマーカー遺伝子の選定
②蛍光と発光を両方検出できる人工染色体ベクターの作製



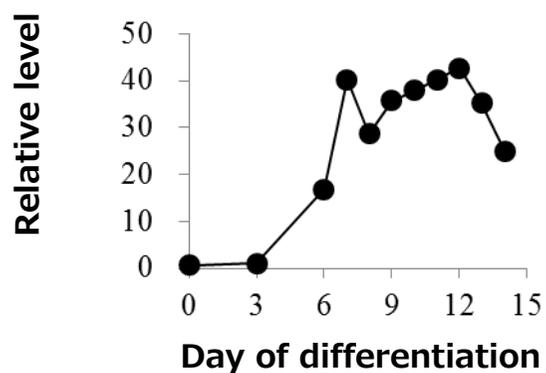
発光培養細胞作製

Tubb3p-Luc ES

Luciferase activity

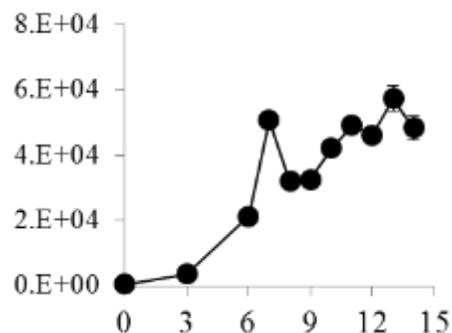


mRNA expression level

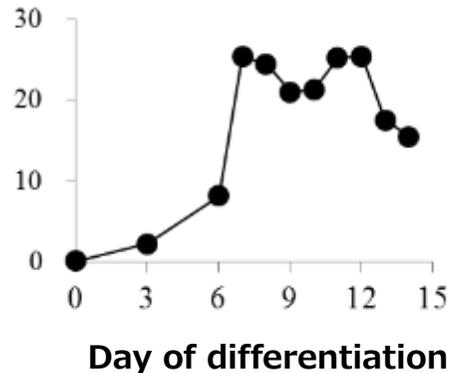


Relnp-Luc ES

Luciferase activity

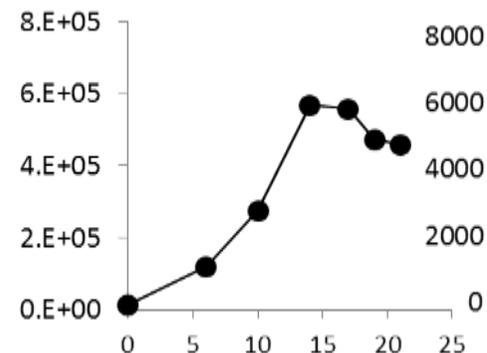


mRNA expression level

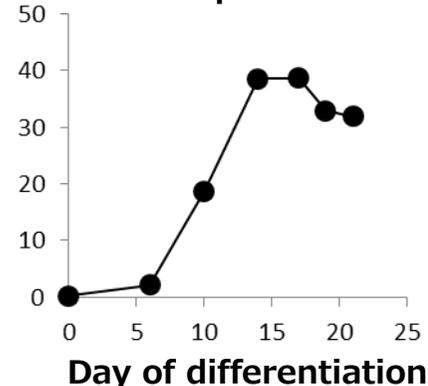


MAP2p-SLG ES

Luciferase activity

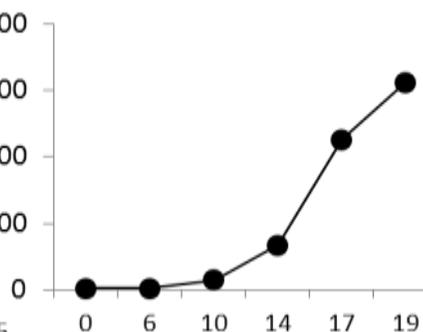


mRNA expression level

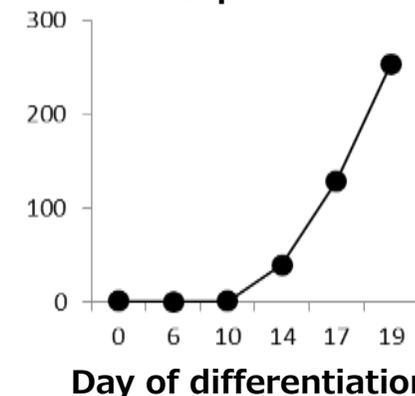


GFAPP-SLG ES

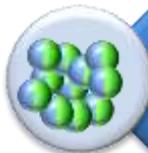
Luciferase activity



mRNA expression level

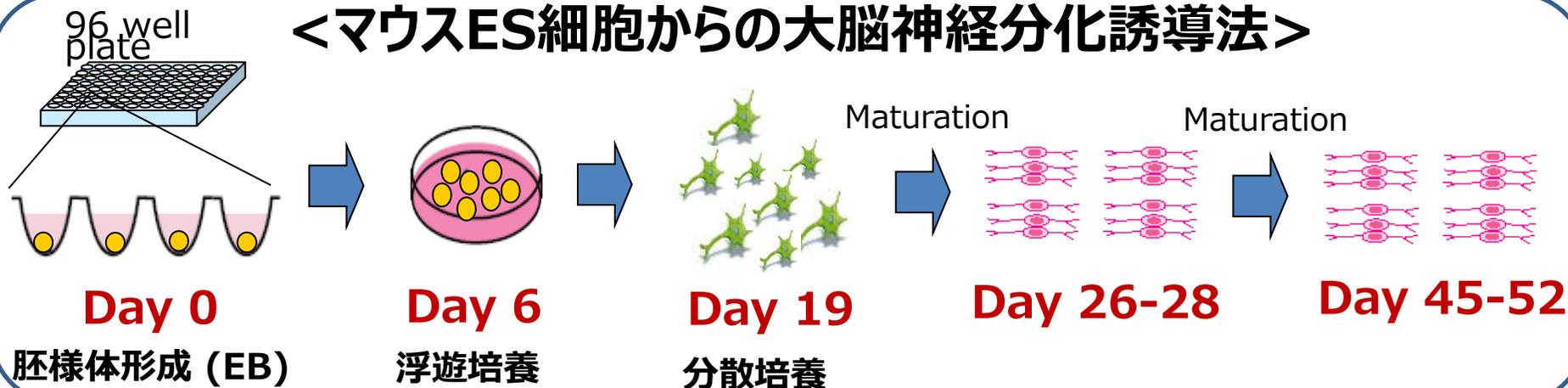


ポイント：4種類の発光培養細胞を作製、発光量で遺伝子発現を簡便にモニター可能

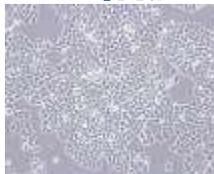


神経分化誘導法開発

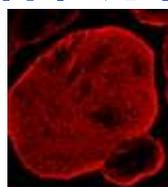
<マウスES細胞からの大脳神経分化誘導法>



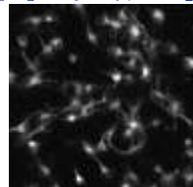
ES細胞



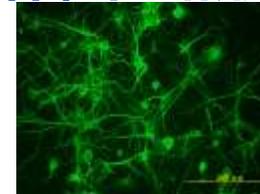
神経分化



神経突起伸展

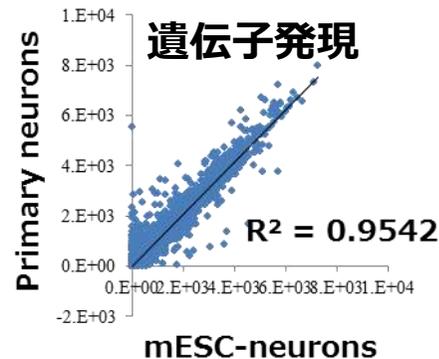


神経回路形成

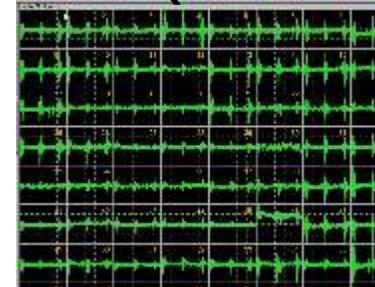


ポイント：

- ① 高効率で安定した神経細胞作製法を確立
- ② 初代細胞と類似の遺伝子発現、神経機能を有する

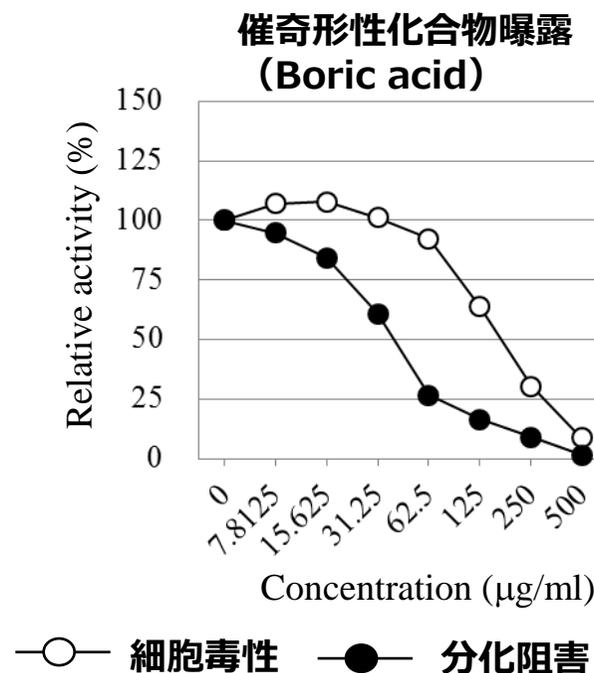
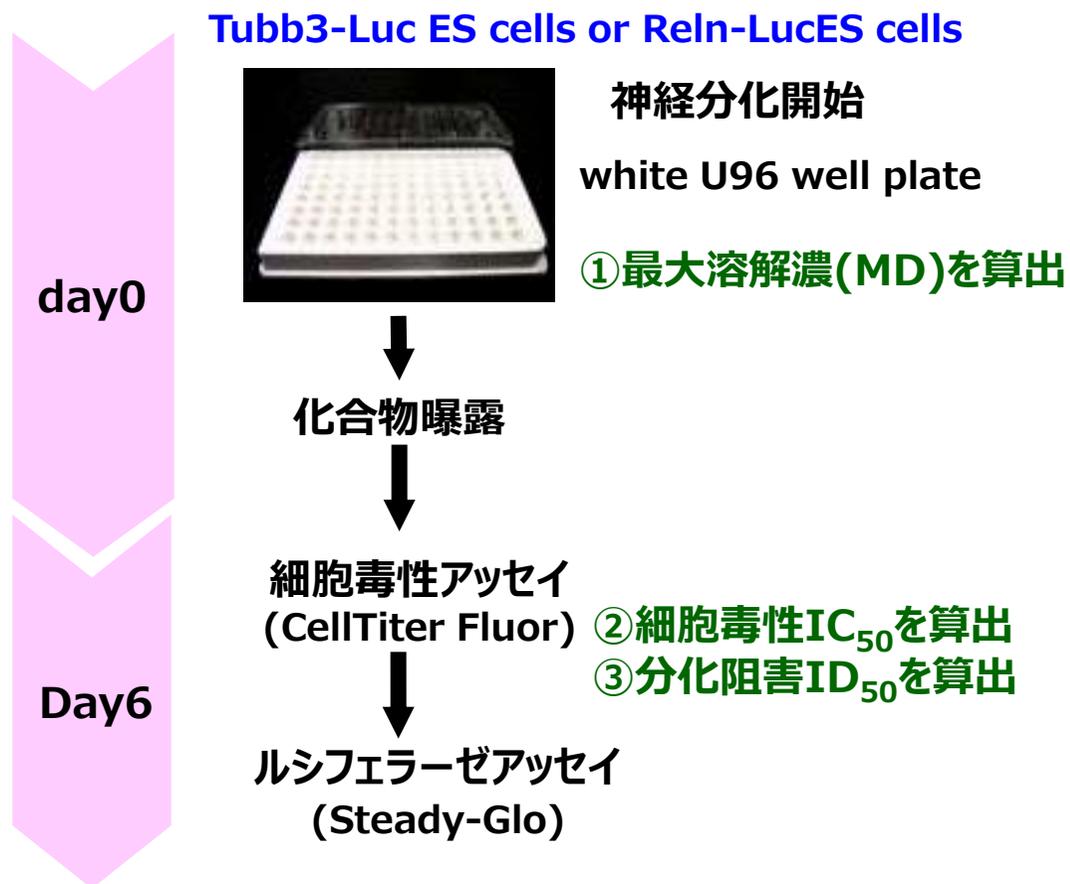


神経活動(細胞外電位)





In vitro試験系開発 試験(1) - 1 (神経分化アッセイ)



ポイント：培地交換不要、化合物添加後、発光測定のための簡便なアッセイ



In vitro試験系開発 試験 (1) - 2 (神経分化アッセイ)

予測式

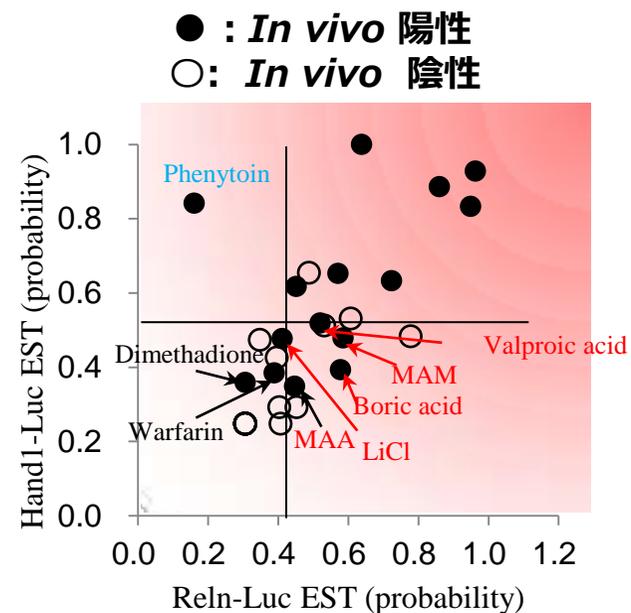
$$\text{Score} = 1.112 \times \log(\text{IC50}/\text{ID50}) + 0.928 \times \log(\text{MD}/\text{IC50}) - 0.822$$

逆ロジット変換でprobability計算 (0~1表記に変換)

陽性 probability ≥ 0.41
陰性 probability < 0.41

		<i>in vitro</i>	
		P	N
<i>in vivo</i>			
Positive	15	12	3
Negative	17	5	12

Sensitivity	80%
Specificity	71%
Positive predict values	71%
Negative predict values	80%
Accuracy	75%



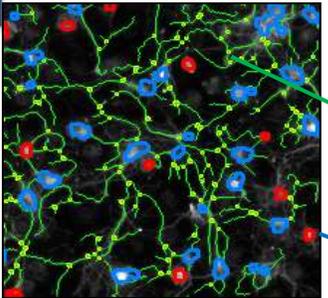
ポイント :
前回NEDOPJの心筋分化誘導を利用した催奇形性予測試験、Hand1-Luc EST法で捉えられなかった化合物を検出できる



In vitro試験系開発

試験 (2) - 1 (神経突起アッセイ)

複雑な神経突起の形態を自動で識別



最適なパラメータ設定を実施

神経突起

生存神経細胞

神経分化誘導
12日分散

mESC 由来神経細胞



day0

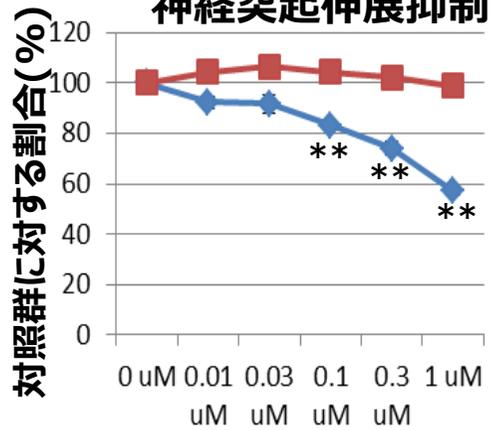
化合物曝露(24時間)

固定
抗Tubb3抗体で免疫染色

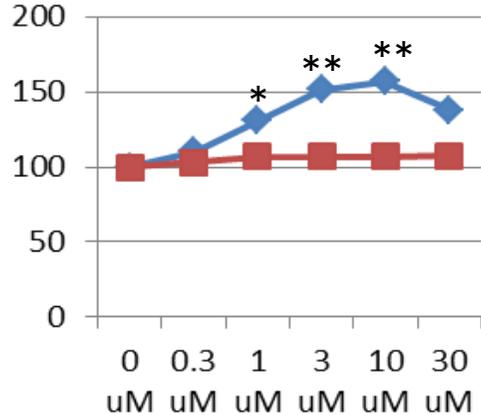
Day 1

ハイコンテンツイメージングの自動定量
神経突起の長さ・生存神経細胞数

神経突起伸展抑制



神経突起伸展促進



生存神経細胞数

神経突起の長さ

- ポイント :
- ① 最適な細胞播種濃度、曝露時間を設定
 - ② 神経突起伸展の抑制・促進、両方向の特異的影響を検出



In vitro試験系開発 試験（２）－２（神経突起アッセイ）

DNT懸念化合物6剤、陰性化合物11剤を評価

	化合物	IC ₂₅ values (μM)		検定結果
		生存神経細胞数	神経突起の長さ	
DNT懸念化合物	NaAsO ₂	1.6	1.2	<i>p</i> <0.01
	MnCl ₂	112.8	59.8	<i>p</i> <0.05
	Dieldrin	42.1	24.2	<i>p</i> <0.05
	DDE	16.9	11.9	<i>p</i> <0.01
	MeHg	0.203	0.104	<i>p</i> <0.01
	Tetrachloroethylene	>1000	>1000	n.a.
陰性化合物	SDS	404	398	n.s.
	Etoposide	0.85	0.83	n.s.
	Warfarin	304	252	n.s.
	Cyclamen aldehyde	64	22	<i>p</i> <0.01
	Bromohexane	383	273	n.s.
	Methylphenylpiperazine	>1000	>1000	n.a.
	Saccharine	>1000	>1000	n.a.
	Aspirine	>1000	>1000	n.a.
	Buthionine-sulfoximine	>1000	>1000	n.a.
	Diethylene glycol	>1000	>1000	n.a.
	Sorbitol	>1000	>1000	n.a.

n.a.: statistical comparison not analyzed

n.s.: not significant

DNT懸念化合物： 5/6

陰性化合物： 10/11

ポイント：神経細胞数と神経突起の長さの25%抑制値を比較することでDNT化合物を分類



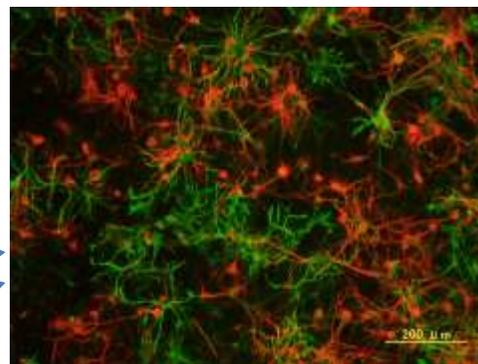
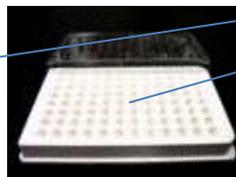
In vitro試験系開発

試験(3) - 1 (神経毒性アッセイ)

分化誘導19日
分散神経

MAP2-SLG ES cells

GFAP-SLG ES cells



化合物曝露

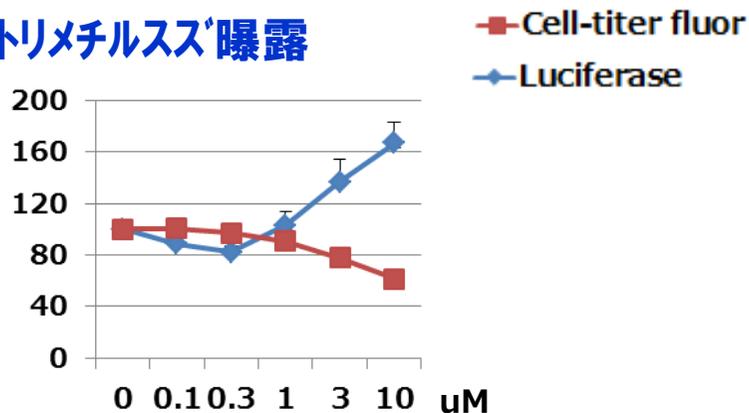
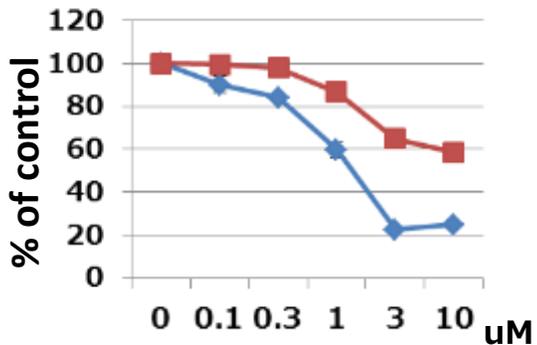
化合物曝露

- ・細胞毒性アッセイ
- ・ルシフェラーゼアッセイ

- ・細胞毒性アッセイ(Cell-titer flour)
- ・ルシフェラーゼアッセイ

ポイント：
・神経細胞とグリア細胞の
共培養系でアッセイを実施
・2種のマーカーを利用

結果例： **神経毒性物質トリメチルスズ曝露**



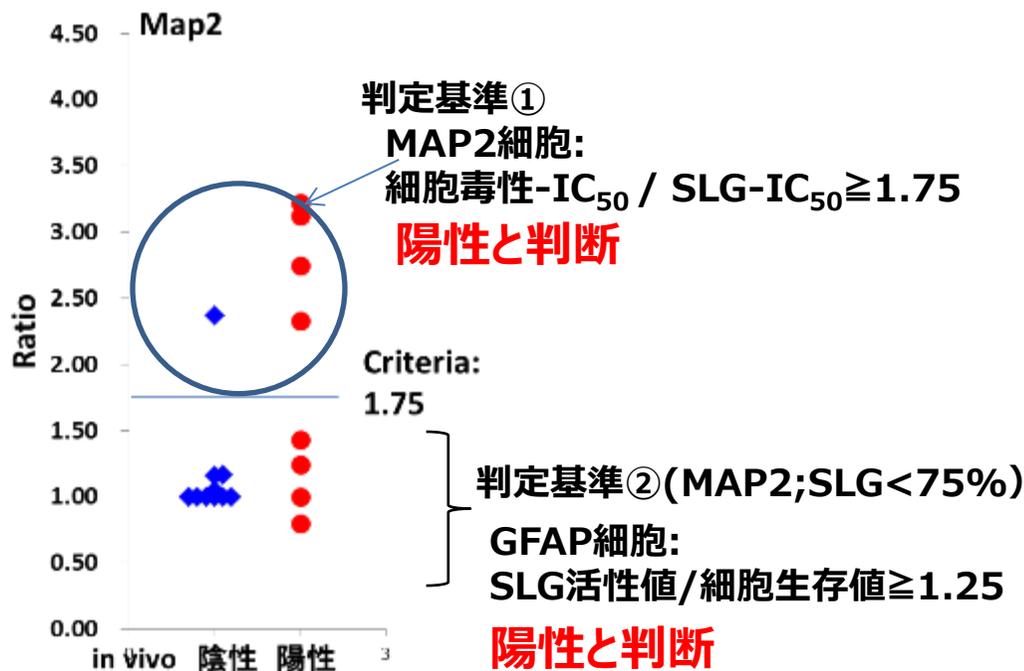


In vitro試験系開発 試験 (3) - 2 (神経毒性アッセイ)

算出項目

MAP2細胞: SLG -IC₅₀/細胞毒性-IC₅₀

GFAP細胞: SLG活性値/細胞生存値



基準①で偽陰性となった化合物を基準②のグリア細胞の指標 (GFAPの増加) を取り入れ、予測率を改善

神経毒性化合物9剤 陰性化合物11剤の評価結果

		<i>in vitro</i>	
<i>in vivo</i>		P	N
Positive	9	9	0
Negative	11	3	8

Sensitivity	100%	9/9
Specificity	73%	8/11
Positive predict values	75%	9/12
Negative predict values	10%	8/8
Accuracy	85%	17/20

課題:

- ・多数化合物で検証が必要
- ・2色細胞に置きかえ、より簡便に



In vitro試験系開発 分化神経細胞の凍結・解凍

凍結細胞：分化誘導12、19日の分散神経細胞

検討項目：凍結試薬、遠心回転数、解凍手順

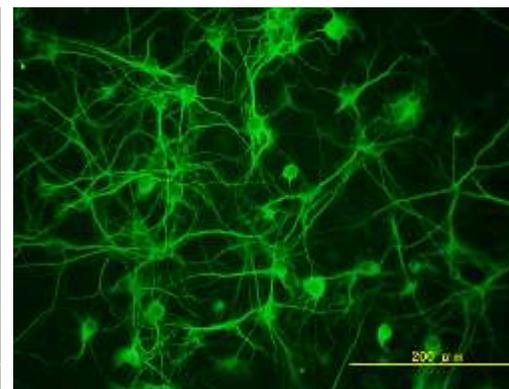
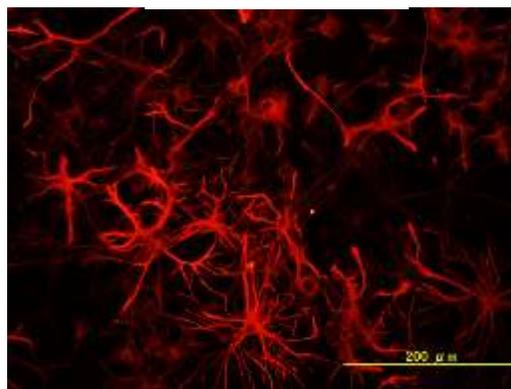
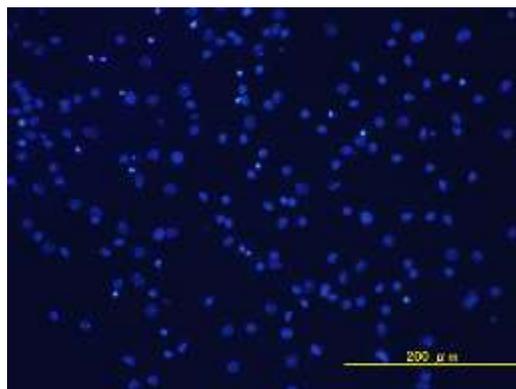
凍結試薬：CELL BANKER[®]

冷却法：緩慢冷却法

保存条件：-150℃

アストログリア

神経細胞



Day19分散神経細胞の起眠5日目の様子

Point：分化神経細胞を凍結保存できることを確認

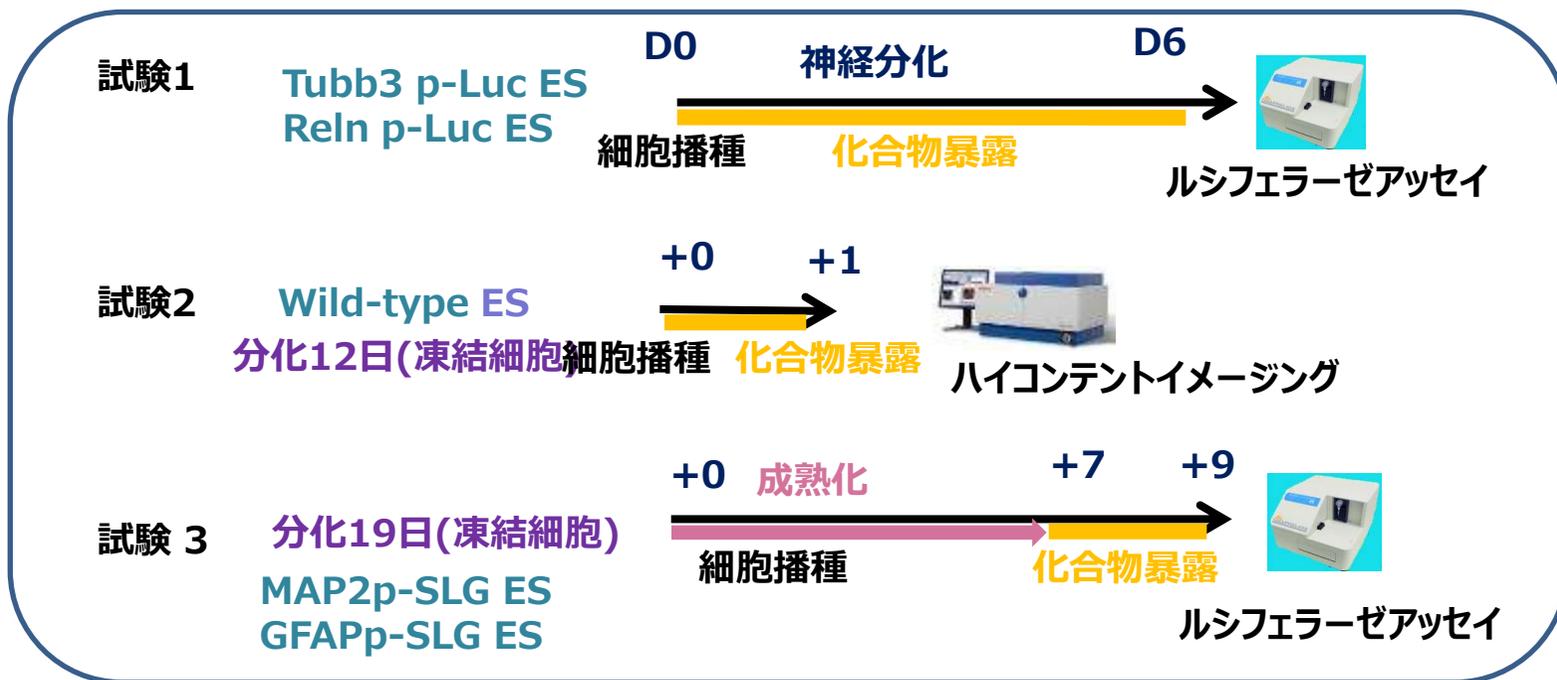


3種類の試験プロトコルを作成・公表

試験1: Tubb3-ES/ReIn-ES細胞を利用した神経分化アッセイ プロトコル

試験2 : マウス ES細胞由来神経細胞を利用した神経突起伸展アッセイ プロトコル

試験3 : MAP2-ESおよびGFAP-ES細胞を利用した簡便な神経毒性アッセイ プロトコル



ポイント : 短期間で3試験同時に実施できるプロトコルを作成

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況

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）
C)神経毒性in vitro 試験法の開発	1) 神経毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	<p>達成；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経毒性マーカーを選定した Tubb3, Reln, MAP2, GFAP ・人工染色体ベクターを作製した Tubb3_SLG, GFAP_SLG+GFP
	2) 毒性評価用のES細胞作製	<p>達成；</p> <p>神経毒性評価用のマウス組換えES細胞を作製した Tubb3_Luc ES, Reln_Luc ES, MAP2_Luc ES, GFAP_SLG+GFP ES, MAP2_SLR+mCherry ES</p>
	3) 毒性評価用の神経細胞培養方法の確立	<p>達成； 発達ステージ毎に神経毒性評価用の神経細胞培養法を確立した（発達前期、発達後期、成熟期の3種）</p>
	4) 樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系の構築と試験法プロトコル案作成	<p>達成； 3種類の神経毒性プロトコルを作成した（Test1.神経分化アッセイ、Test2.神経突起伸展アッセイ、Test3.成熟神経への神経毒性アッセイ）</p>
	5) 国際標準化にむけた取り組み	<p>達成； 海外企業と共同でマウス E S 細胞由来の神経細胞の評価（ばらつきや再現性等）の検討を開始した</p>

目次

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

5.事業アウトプット①

事業アウトプット指標 (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>〔事業アウトプット指標〕 ・本事業で開発した試験プロトコル数</p> <p>〔妥当性〕 本事業における目標は「人工染色体および生物発光レポーター技術を基盤としたin vitro試験法を利用した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、汎用性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) 3件	<p>達成 ; 8件 :</p> <p>3次元培養による肝毒性試験法、ラット腎幹細胞およびマウス近位尿細管不死化細胞を用いた腎毒性試験法およびマウスES細胞を用いた神経毒性について、合計8件のプロトコルを作成した。</p>

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

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）
a) 肝臓毒性in vitro 試験法の開発	1) 肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	達成 ；肝毒性・組織マーカープロモーターとしてAFP, Albumin等を選定。選定プロモーターおよびルシフェラーゼ遺伝子を挿入した人工染色体ベクターを各種作製。
	2) 人工染色体ベクター導入マウスES細胞作製	達成 ；肝毒性評価用人工染色体ベクターを保持するマウスES細胞を作製。
	3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウス作製	達成 ；6種類のキメラ或はtranschromosomicマウスを作製し、アッセイ精度、発光測定感度等を勘案しCAG-ELuc; Albumin-GLuc(KDEL)マウスを毒性評価用マウスとして選定。
	4) 肝臓細胞の三次元培養等による培養細胞の樹立	達成 ； ・高細胞生存率を示す初代肝細胞調製法を確立するとともに、30日間以上アルブミン産生および発光活性を維持した三次元培養に成功。
	5) 樹立した培養細胞を用いた肝臓毒性評価系の構築と試験法プロトコル案作成	達成 ；38物質を選定、開発したin vitro肝毒性試験法に適用し、26日間の連続データをもとに、最適な試験プロトコル案を作成。
	6) 国際標準化にむけた取り組み	経済産業省平成28年度化学物質安全対策事業（発光レポーターを導入したマウス初代肝細胞を用いたin vitro肝毒性試験法開発に関する調査）で施設間・施設内再現性、肝細胞凍結法開発等を実施中。

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

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）
b)腎臓毒性in vitro 試験法の開発	1) 腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	達成 ；腎臓毒性マーカーを選定し、これらマーカー遺伝子の発現をモニターできるレポーター遺伝子を作成して人工染色体ベクターに導入した。Kim1(近位尿細管障害), Aqp1(組織特異性), HPRT(内部標準)
	2) 人工染色体ベクター導入マウスES細胞作製	達成 ；腎毒性評価用人工染色体ベクターを保持するマウスES細胞を作製した。
	3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウス作製	達成 ；腎毒性評価用マウスES細胞からキメラマウスを作成し、目的のマーカー遺伝子が生体内(in vivo)で機能していることを確認した。
	4) ラット腎臓細胞の三次元培養等による培養細胞の樹立	達成 ；複数の研究機関で一定の品質の腎3次元構造体を作製できる培養細胞を樹立した。
	5) 樹立した培養細胞を用い、腎臓毒性を評価可能な試験系の構築と試験法プロトコル案作成	達成 ；シスプラチンによる近位尿細管障害を検出し、定量化できる4種の試験法のプロトコルを作成し公開した。

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－③

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）
C)神経毒性in vitro 試験法の開発	1) 神経毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子の選定と人工染色体ベクター作製	<p>達成；</p> <ul style="list-style-type: none"> ・神経毒性マーカーを選定した Tubb3, Reln, MAP2, GFAP ・人工染色体ベクターを作製した Tubb3_SLG, GFAP_SLG+GFP
	2) 毒性評価用のES細胞作製	<p>達成；</p> <p>神経毒性評価用のマウス組換えES細胞を作製した Tubb3_Luc ES, Reln_Luc ES, MAP2_Luc ES, GFAP_SLG+GFP ES, MAP2_SLR+mCherry ES</p>
	3) 毒性評価用の神経細胞培養方法の確立	<p>達成； 発達ステージ毎に神経毒性評価用の神経細胞培養法を確立した（発達前期、発達後期、成熟期の3種）</p>
	4) 樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系の構築と試験法プロトコル案作成	<p>達成； 3種類の神経毒性プロトコルを作成した（Test1.神経分化アッセイ、Test2.神経突起伸展アッセイ、Test3.成熟神経への神経毒性アッセイ）</p>
	5) 国際標準化にむけた取り組み	<p>達成； 海外企業と共同でマウスES細胞由来の神経細胞の評価（ばらつきや再現性等）の検討を開始した</p>

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－④

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）
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	1)人工染色体ベクターの性能の 検証および発光検出の検証	達成 ；1～2種の発光レポーターをマウス人工染色体ベクターに挿入した安定細胞株を用い、従来法で作製した安定細胞株と比較して発光強度および継代安定性が高いことを実証。
	2) 試験系の設計私案の作成	達成 ；上記の結果より、各試験系において96ウェルプレートベースのin vitro毒性試験系を設計。
	3) 人工染色体ベクターの性能検証	達成 ；3種の発光レポーターをマウス人工染色体ベクターに導入した安定細胞株を樹立し、従来法と比べて樹立期間を1/6程度に短縮可能であること、また長期間継代を重ねても、細胞の発光強度と人工染色体ベクターが極めて長期間安定に維持されることを実証。
	4) 当該ベクター及び遺伝子改 変マウスの個体・臓器等の発 光検出の検証および試験系 の測定条件の最適化	達成 ；発光レポーター導入株化培養細胞或は遺伝子 改変マウスの臓器由来細胞等を用い、発光強度の検 証・測定方法の最適化を行い、各試験法のプロトコ ル案に反映した。
	5)国際標準化にむけた取り組み	達成 ；経済産業省平成28年度国際標準化加速事 業（発光株化培養細胞の保存管理法に関する国際 標準化）において、発光計測・管理法および細胞検定 法の国際規格化をISO/TC276 WG3で実施中。

個別要素技術のアウトプット指標・目標値及び達成状況－⑤

＜共通指標実績＞

論文	特許	受賞	国民との対話
28	1	1	61
学会発表			
国際学会招待	国際学会一般発表	国内学会招待	国内学会一般発表
7	9	31	37

目次

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

6.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〕 ①化学物質リスク管理全般への活用による有害性情報の早期取得 ②試験方法の技術移転による国内企業の産業の創出と国際競争力の強化 ③各種試験に関連する試薬・機器の販売促進・開始 ①～③に係る民間利用件数</p> <p>〔妥当性〕 膨大な数の既存化学物質の安全性情報の早期取得は世界的な課題であり、民間企業による安全性の高い新規化学物質の早期開発は当該企業の国際競争力強化に必須であるため。</p> <p>〔設定理由・根拠〕 複数のエンドポイントの毒性情報を短期間、低コストのin vitro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、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。上記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>	(事業開始時) 民間利用：0件	民間利用：0件
	(中間評価時) 民間利用：0件	民間利用：0件
	(事業終了時) 民間利用：3件	達成 ；民間利用：5件
	(事業目的達成時) 民間利用：50件	<ul style="list-style-type: none"> ・各種試験法の公定法化またはその可能性の検討 ・国内企業（化学・食品・医薬・農薬等）に対する動物実験代替となる新たなin vitro試験法の提供 ・国内受託機関への試験法 ・ルシフェラーゼ関連製品の拡販 ・試薬キットの販売 ・試薬細胞・動物販売 ・発光測定装置・参照用光源の販売 ・3次元培養細胞対応ハイコンテンツアナライザー、ソフトウェアの開発販売 ・新規受託ビジネス開始

目次

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

7. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

年度	平成23年	平成25年	平成27年	平成32年	平成37年
①化学物質管理先般への活用					
計画	試験法立案	試験法開発	試験プロトコルの作成	各種試験法の公定法化またはその可能性の検討	
・各種試験法の公定法化またはその可能性の検討				小規模検証試験	公定法化の可否検討
・国内企業(化学・食品・医薬・農薬等)に対する動物実験の代替となる新たなin vitro試験法の提供	立案済み	試験法開発	プロトコル作成	国内企業への技術移転・活用	
②試験方法の技術移転による国内企業の産業の創出と技術力向上					
計画	試験法立案	試験法開発	試験プロトコルの作成	販売に向けた、検証、販路の開拓と販売	
・新規受託ビジネス開始				受託機関への移転	
・企業における自社製品開発における活用	立案済み	試験法開発	プロトコル作成	国内企業への技術移転・活用	
③各種試験に関連する試薬・機器の販売開始					
計画	試薬・機器の立案	試薬・機器の試作と検証	安全性試薬・機器(装置)の作成	販売に向けた、検証、販路の開拓と販売	
・ルシフェラーゼ関連製品の拡販(東洋紡製品等)口	立案済み	試作・検証	試薬作成	販売開始・販路開拓	
			特許出願		
・試験キットの販売	立案済み	試作・検証済み	キット作成・検証	販路開拓	
・試験用細胞販売	立案済み	試作・検証済み	細胞作製・検証	販路開拓	
・測定装置販売	立案済み	試作・検証済み	装置・検証	販路開拓	

目次

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

8.費用対効果

現状

- 28日間**反復投与毒性試験**の委託費用は**1000万円/物質**が想定される。また、農薬の安全性評価では、一般毒性試験に加えて、実施が要求されている**神経毒性試験**（急性神経、亜急性神経、発達神経）の委託費用は**約1億3000万円/物質**と非常に高額である。これらは、長期の試験期間とそれにかかる作業量（人件費）のウェートが大きい。
- 動物福祉の観点から国際的に求められている動物実験の置換法（Replacement）であり、かつ、一度に**複数の被験物質の処理が可能な短期試験法**であることから、非常に効率的試験法である。

本事業で開発を目指しているin vitro試験法は、日本発のOECDガイドライン誕生も期待できる信頼性および再現性が高く、コストの低い試験法である。

8.費用対効果

〔動物を用いる試験〕

〔開発したin vitro試験〕

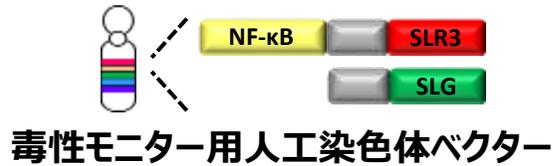
28日反復投与、神経毒性3試験実施の場合

× 実験期間	3ヶ月～1年	X 1/12	1週間～1ヶ月
× 処理効率	1物質/2-3名	X 1/3	複数物質/1人
× 動物数	100匹以上	X 1/100	1匹
コスト	1億4000万円	X 1/36	約380万円

根拠：1億4000万円÷ (12×3)=約380万円

人工染色体を導入したHepG2細胞を用いた 毒性モニタ一系

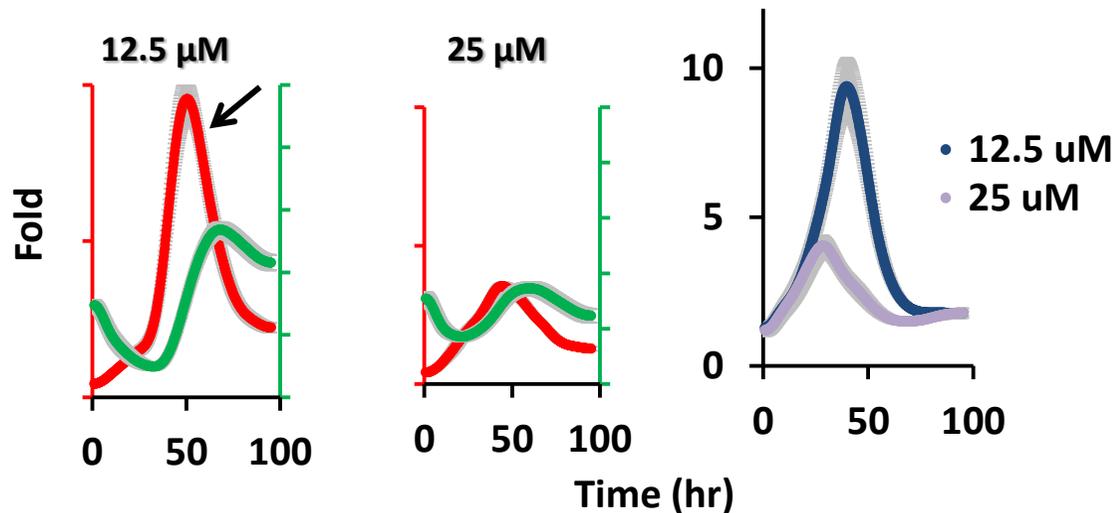
NF- κ B活性化をモニターする多色HepG2細胞



SLR(赤): 細胞ストレスモニター
SLG(緑): 細胞生存数モニター



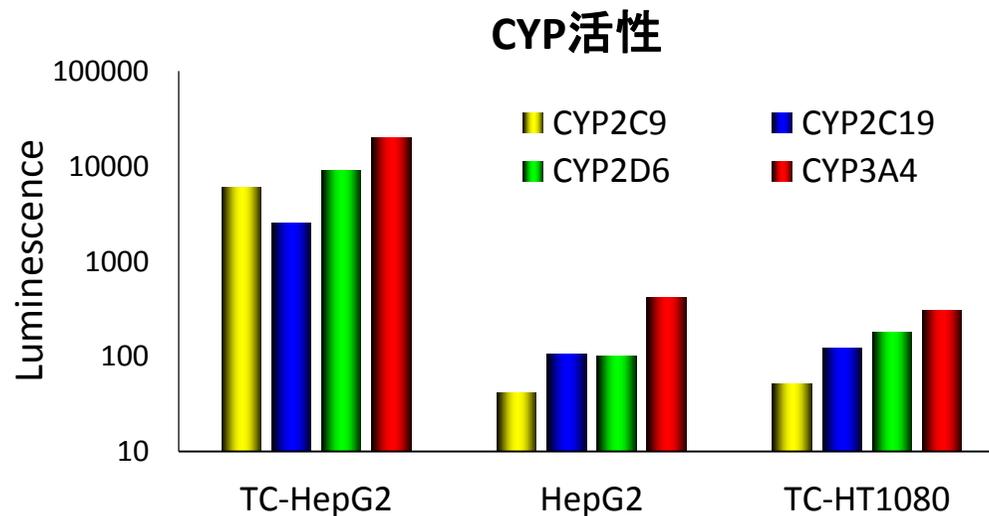
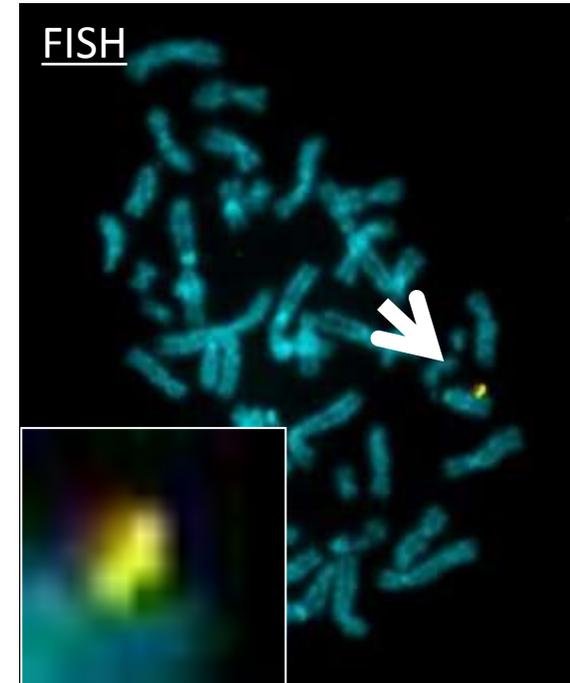
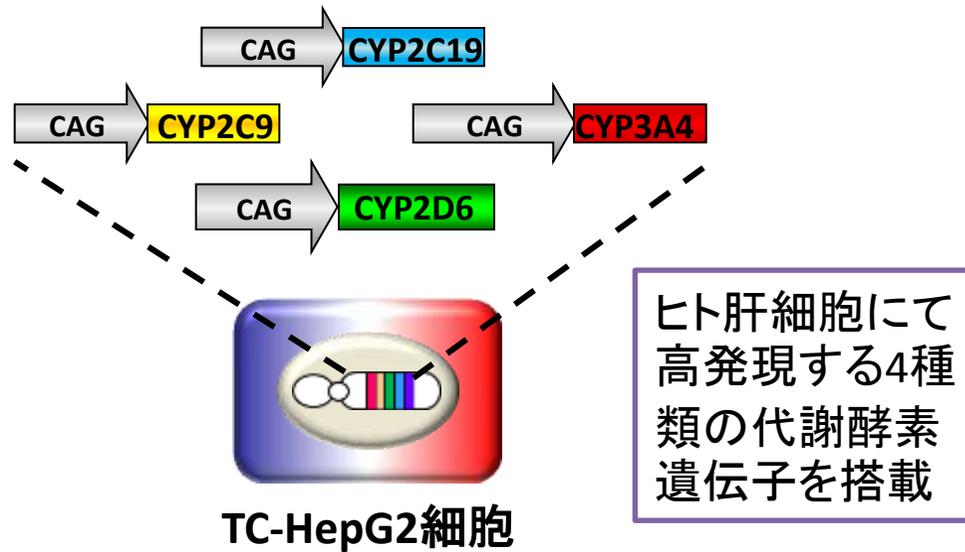
Clozapine処置による毒性モニター評価



光発光系(ルシフェラーゼ)

- 高い定量性
- 簡便且つ迅速
- 複数マーカー遺伝子モニター
- リアルタイム測定
- ハイスループット評価

肝代謝毒性を評価可能なHepG2細胞

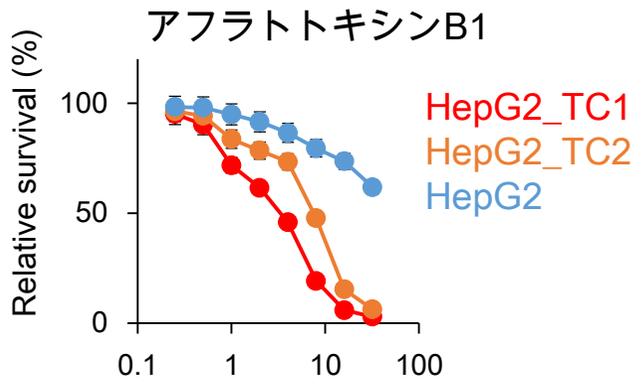


代謝酵素発現系 (CYP、POR)

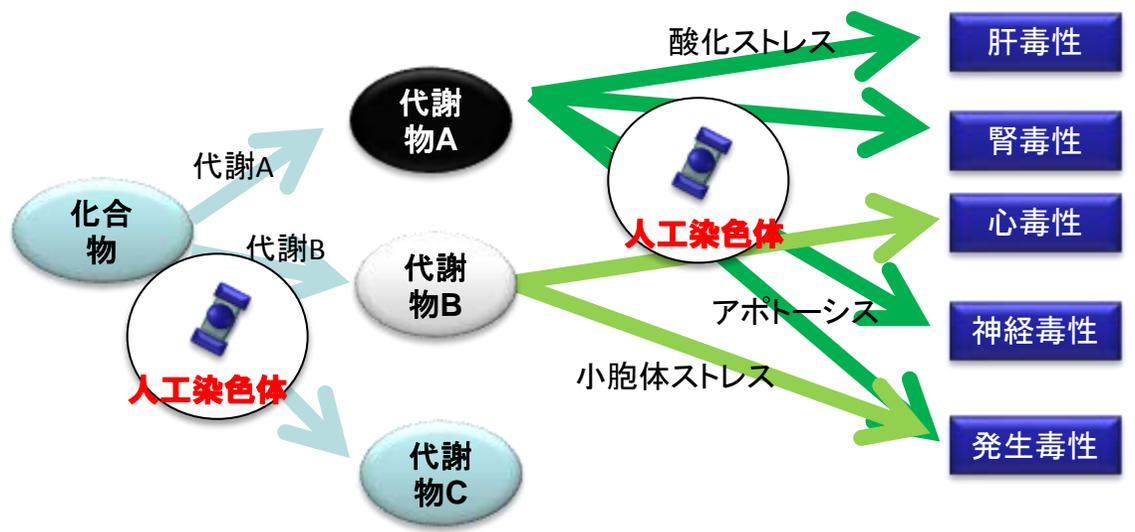
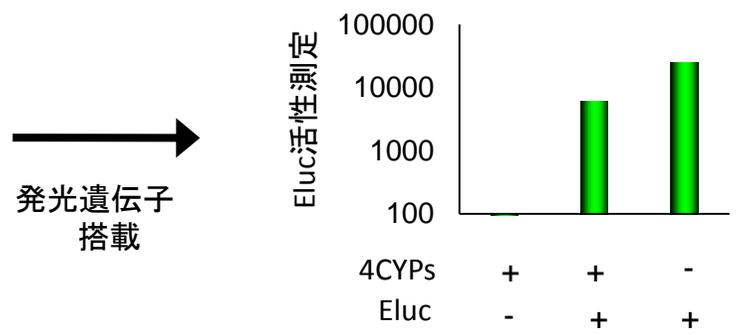
- ヒト肝細胞と同等レベルの活性
- 細胞内にて長期安定発現
- 複数代謝を同時評価可能
- 安価、大量保存可能
- 肝代謝、肝毒性を評価可能

肝代謝毒性を発光モニター可能なHepG2細胞

肝代謝毒性を評価可能な系



肝代謝毒性を**発光**評価可能な系



肝細胞に特徴的な化合物代謝経路-シグナル伝達-細胞毒性のパスウェイ解析に応用可能