

「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）」
評価用資料

平成28年12月15日

経済産業省製造産業局化学物質管理課
公益財団法人鳥取県産業振興機構

プロジェクト名	石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発 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
行政事業レビューとの関係	(平成27年度 事業番号 0269)
上位施策名	主要政策・施策：科学技術・イノベーション 関係する計画、通知等：第四期科学技術基本計画（平成23年8月19日閣議決定） 政策・施策名：5.エネルギー・環境、5-1.資源・燃料
担当課室	製造産業局化学物質管理課

プロジェクトの目的・概要

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

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

こうした背景を踏まえ、本研究開発では、石油精製物質等の化学物質において、国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、培養細胞手法等による評価技術の確立を目的とする。

予算額等（委託）

（単位：千円）

開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体
平成23年度	平成27年度	平成25年度	平成28年度	鳥取県産業振興機構
平成25年度執行額	平成26年執行額	平成27年執行額	総予算額	総執行額
102,000	97,000	90,000	494,641	489,245

I. 研究開発課題（プロジェクト）概要

1. 事業アウトカム【複数設定可】

事業アウトカム指標

①化学物質リスク管理全般への活用

動物実験から細胞実験に移行することで以下のような活用が可能

- ・ 毒性プロファイルが不明の多数の化学物質の安全性の予測・評価
- ・ 安全性が不明の多数の化学物質の安全性試験の優先順位付け
- ・ 実験動物削減による動物福祉の推進

安全性評価に係る費用は研究費の約 20%を占め、現在、我が国化学産業においては年間約 1500 億円と推定される。当該事業で開発した in vitro 試験法の普及により、安価且つ短期間での化学物質の安全性の予測・評価が可能となり、安全性評価にかかる費用は数年後には大幅に低減することが期待される。さらに、例えば、開始から報告書作成まで約半年を要する 28 日間反復投与毒性試験等の実施回数が減少することにより、化学物質開発に係る開発期間が大幅に短縮される。またこれまで実験動物で行われていた安全性試験評価が、in vitro 試験法に代替されることにより実験動物の削減が見込まれるとともに、国内企業が実施している動物実験廃止の動向を加速することが予想される。

指標目標値

事業開始時（平成 23 年度）	計画：試験法立案	実績：達成済み
中間評価時（平成 25 年度）	計画：試験法開発	実績：達成済み
事業終了時（平成 27 年度）	計画：試験プロトコールの作成	実績：肝臓、腎臓、神経毒性 in vitro 試験法に関する各プロトコールの作成
事業目的達成時（平成 29 年度予定）	計画： <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）に対する動物実験の代替となる新たな in vitro 試験法の提供 	

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

- ・ 新規受託ビジネス開始

3次元細胞培養の国際市場は 2016 年の 4 億 6680 万米ドルから、2021 年には 13 億 4520 万米ドルの規模に成長すると予測されている。2014 年の国内開発業務受託機関(CRO)の売上高は 1435 億円であるが、当該事業で開発した in vitro 毒性試験法を CRO に提供することにより事業の拡大と将来的な国際競争力の強化に貢献できるものと予測される。現在の 3次元細胞培養の主要標的臓器は肝臓であること、さらに腎臓障害試験法として活用できる有用な技術はまだ開発されて

いない状況を勘案し、当該事業で開発した in vitro 試験法は安全性試験分野における新規市場の獲得に貢献するものと期待される。

・企業における自社製品開発における活用

神経毒性に関しては、例えば農薬企業においては各種の神経毒性試験（急性神経、亜急性神経、発達神経毒性）の実施が要求されており、全て試験を実施する場合はそのコストは1億円を超える。今回、提案する in vitro 神経毒性試験を用いることにより、早期に神経毒性ポテンシャルを認識し、毒性の低減した、より安全性の高い製品を初期開発段階でスクリーニング出来れば大幅な開発コスト削減が可能となる。

指標目標値

事業開始時（平成23年度）	計画：試験法立案	実績：達成済み
中間評価時（平成25年度）	計画：試験法開発	実績：達成済み
事業終了時（平成27年度）	計画：試験プロトコールの作成	実績：肝臓、腎臓、神経毒性 in vitro 試験法に関する各プロトコールの作成
事業目的達成時（平成29年度予定）	計画： <ul style="list-style-type: none"> ・国内受託機関への試験法の技術移転および特定企業との試験法を用いた共同研究開始 ・動物実験による安全性試験を中止した国内企業（化学・食品）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 	

③各種試験に関連する試薬・機器の販売促進・開始

- ・ルシフェラーゼ関連製品の拡販（東洋紡製品の TripLuc 試薬や D-luciferin 等）
- ・試験キットの販売
- ・試験用細胞・動物販売
- ・発光測定装置・参照用光源等の販売
- ・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

製薬企業で行なわれている創薬スクリーニングや安全性試験ではハイコンテンツアナライザーが普及しているが大部分が海外企業に占められている。また現状のハイコンテンツアナライザーは3次元培養細胞に対応していない。腎毒性では3次元培養細胞に対応している3次元培養細胞対応ハイコンテンツアナライザー・ソフトウェアを当該事業の成果を元に開発を開始しており、上市を目指している。これらの機器およびソフトウェアにより新規市場参入が期待できる。

一方、発光試薬および発光計測装置の市場は年率2~3%の増加を示し、その国際市場は発光試薬300億円、発光計測装置1200億円と推定される。しかし、国際市場における日本企業のシェアは数%に留まり、大部分が米国企業に占められている。当該事業で開発した in vitro 毒性試験法の普及および公定法化により、発光試薬・発光装置関連の国内企業の販売促進、さらには国際市場への新規参入とシェアの増加が期待される。

指標目標値		
事業開始時（平成23年度）	計画：試薬・機器の立案	実績：達成済み
中間評価時（平成25年度）	計画：試薬・機器の試作と検証	実績：達成済み
事業終了時（平成27年度）	計画：試薬・機器（装置）の作成	実績： ・ルシフェラーゼ関連試薬3種（東洋紡より販売中） ・試験用細胞7種（一部は販路相談中） ・装置は共同で開発中 ・試験用動物1種（販路相談中）
事業目的達成時（平成29年度予定）	計画：販売に向けた、検証、販路の開拓と販売	

2. 研究開発内容及び事業アウトプット

(1) 研究開発内容

鳥取大学および産業技術総合研究所で基本特許を有している、人工染色体ベクター技術および生物発光レポーター技術を有害性評価試験法開発に応用し、ハイスループットスクリーニング試験系を開発する。そのためにまず、様々なエンドポイントについて培養細胞の発光量により有害性を評価できる基盤システムを構築する。有害性評価のエンドポイントとしては、主に肝障害、腎障害、神経障害などの毒性が観察される（げっ歯類の発がん性試験では45%が肝臓、次いで13%が腎臓でがんの発生が認められる）。したがって、構築した基盤システムを用いて反復投与毒性試験における肝臓毒性および腎臓毒性評価可能な *in vitro* 試験法、並びに神経毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発する。

さらに安全性評価を実施している国内化学企業等への技術移転および国際規格化を見据え、論文発表等での成果発信・特許出願による知財確保に加え、開発した肝臓・腎臓・神経における各々の *in vitro* 毒性試験法の標準的プロトコールを作成する。

(2) 事業アウトプット【複数設定可】

事業アウトプット指標

日本で開発された先端技術を活用し、化学物質の有害性の *in vitro* 評価系を開発するためには、評価組織細胞の機能を維持または組織構造を形成した培養細胞を作製し、それらを用いた試験系を構築する必要がある。そのためには以下に示した課題を達成する必要がある。

(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
- 2) 人工染色体ベクター導入マウス ES 細胞作製
- 3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウス作製
- 4) 肝臓細胞の三次元培養等による培養細胞の樹立

- 5) 樹立した培養細胞を用いた肝臓毒性を評価系の構築と試験法プロトコール案作成
- 6) 国際標準化にむけた取り組み

(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
- 2) 人工染色体ベクター導入マウス ES 細胞作製
- 3) 人工染色体ベクター導入遺伝子改変マウスを作製
- 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
- 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ール案作成

(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
- 2) 遺伝子導入マウス ES 細胞作製
- 3) 遺伝子導入マウス ES 細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞の樹立
- 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ール案作成
- 5) 国際標準化にむけた取り組み

(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
- 2) 試験系の設計私案の作成
- 3) 人工染色体ベクターの性能検証
- 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
- 5) 国際標準化にむけた取り組み

指標目標値（計画及び実績）

(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発

事業開始時（23年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～5)まで	実績：変更無し
中間評価時（25年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～4)まで	実績：進行中もあるが、1)～4)までほぼ達成。
事業終了時（27年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～5)まで	実績：1)～5)まで達成。 6)の国際標準化にむけた取り組みについては、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）で実

		施中。
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発		
事業開始時（23年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～5)まで	実績：遺伝子改変マウスから腎臓様構造体を形成するマウス腎臓幹培養細胞を樹立することが難しいことが判明したことから、すでに三次元培養による細胞の樹立に実績のあるラット腎臓幹細胞等を用いることとした。
中間評価時（25年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～3)まで	実績：進行中もあるが、1)～3)までほぼ達成。
事業終了時（27年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～5)まで	実績：1)～5)まで達成。
(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発		
事業開始時（23年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～4)まで	実績：変更無し
中間評価時（25年度）	計画：事業アウトプット指標の1)まで	実績：進行中もあるが、ほぼ達成。
事業終了時（27年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～4)まで	実績：1)～4)までほぼ達成。 5)の国際標準化にむけた取り組みについては、未定。
(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		
事業開始時（23年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～4)まで	実績：変更無し
中間評価時（25年度）	計画：事業アウトプット指標の1)まで	実績：達成。
事業終了時（27年度）	計画：事業アウトプット指標の1)～4)まで	実績：1)～4)まで達成。 5)の国際標準化にむけた取り組みについては経済産業省平成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）で実施中。

3. 当省(国)が実施することの必要性

本研究は、多様なエンドポイントに関する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を目標としており、開発した有害性評価手法について、将来的には、国際標準化にむけた取り組みを行い、実用化、普及を目指している。

①多様な研究機関の結集

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。

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。

以上のことから、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。

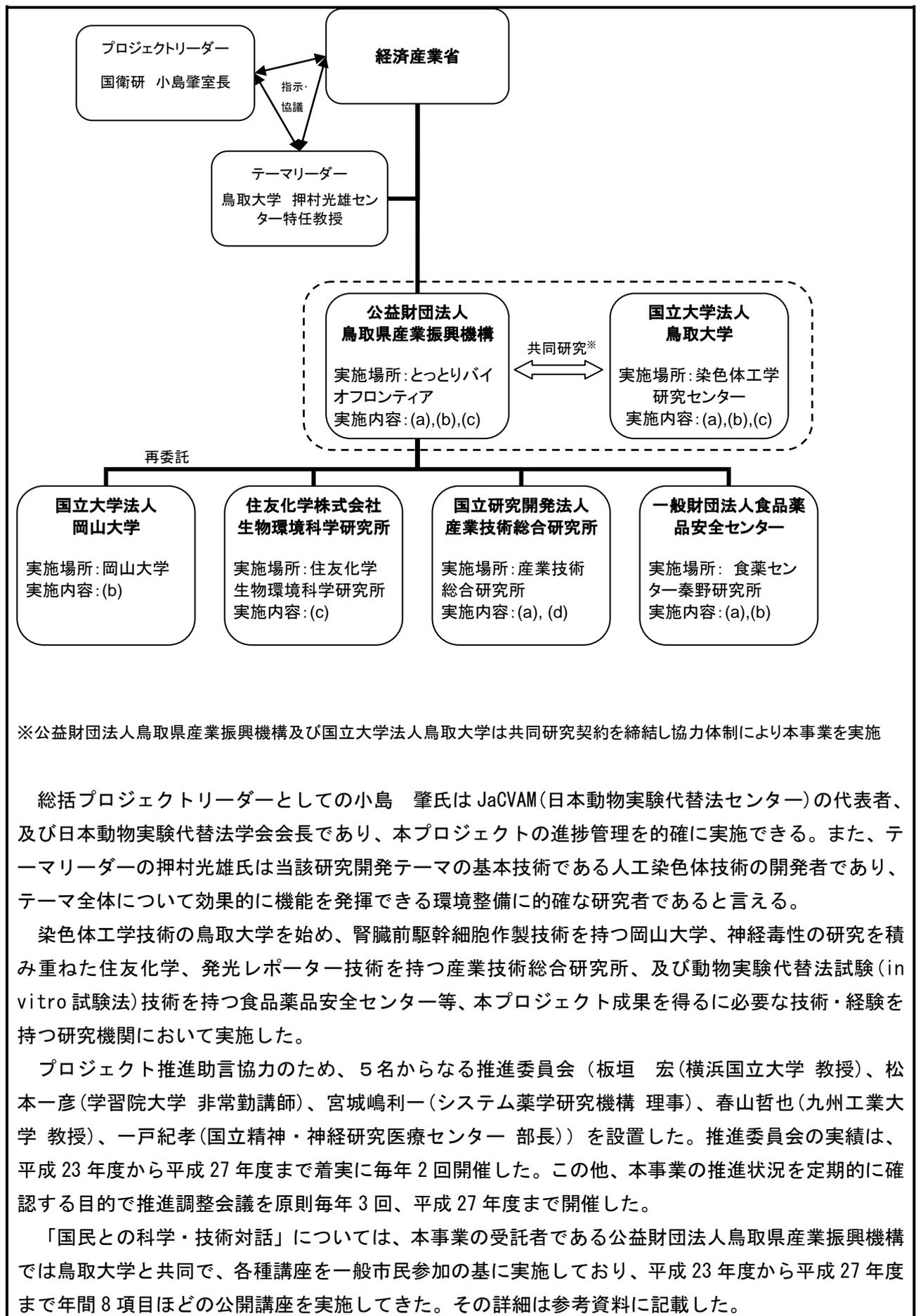
4. 事業アウトカム達成に至るまでのロードマップ

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・農業等)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口				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口	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		
・試験キットの販売口	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	

5. 研究開発の実施・マネジメント体制等

人工染色体ベクターおよび生物発光レポーター技術を基盤とした反復投与毒性試験における肝臓、腎臓、神経毒性を評価可能な in vitro 試験法の開発を、下記の4テーマで実施する。

- (a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発
- (b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発
- (c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発
- (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



※公益財団法人鳥取県産業振興機構及び国立大学法人鳥取大学は共同研究契約を締結し協力体制により本事業を実施

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

染色体工学技術の鳥取大学を始め、腎臓前駆幹細胞作製技術を持つ岡山大学、神経毒性の研究を積み重ねた住友化学、発光レポーター技術を持つ産業技術総合研究所、及び動物実験代替法試験(in vitro 試験法)技術を持つ食品薬品安全センター等、本プロジェクト成果を得るに必要な技術・経験を持つ研究機関において実施した。

プロジェクト推進助言協力のため、5名からなる推進委員会(板垣 宏(横浜国立大学 教授)、松本一彦(学習院大学 非常勤講師)、宮城嶋利一(システム薬学研究機構 理事)、春山哲也(九州工業大学 教授)、一戸紀孝(国立精神・神経研究医療センター 部長))を設置した。推進委員会の実績は、平成23年度から平成27年度まで着実に毎年2回開催した。この他、本事業の推進状況を定期的に確認する目的で推進調整会議を原則毎年3回、平成27年度まで開催した。

「国民との科学・技術対話」については、本事業の受託者である公益財団法人鳥取県産業振興機構では鳥取大学と共同で、各種講座を一般市民参加の基に実施しており、平成23年度から平成27年度まで年間8項目ほどの公開講座を実施してきた。その詳細は参考資料に記載した。

本プロジェクトの平成 23 年度から平成 27 年度までの資金配分は下表のとおり実施された。研究開発の前半では、人工染色体ベクターおよび生物発光レポーター技術を基盤とした反復投与毒性試験における肝臓、腎臓、神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発し、その後半では、肝臓、腎臓、神経毒性に関する試験プロトコール作成に基づいた課題を重点的に推進し、成果を上げた資金配分であると言える。

資金度配分 (単位：百万円)

年度 平成	23	24	25	26	27	合計
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発	76	76	75	70	61	358
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発						
(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発	17	17	17	12	12	75
(d) ハイスループット スクリーニング試験 系の構築に向けた 基盤技術の開発	10	10	10	15	17	62
合計	103	103	102	97	90	495

6. 費用対効果

本事業の実施によりもたらされる費用対効果は、以下のように期待できる。

本事業で開発を目指している in vitro 試験法は、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。

動物を用いる試験、例えば 28 日間反復投与毒性試験の委託費用は 1 被験物質あたり 600~1000 万円が想定されるが、この試験は一般的に 40 匹の 28 日間の連続投与・症状観察と体重測定、生化学的検査、組織学的検査が必要であり、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。一方、本事業で開発した in vitro 試験法で試験を実施する場合、試薬や測定機器が必要となるが、短い試験期間で一人の作業員でも複数の被験物質を同時に処理することが可能である。発光レポーターは簡便で定量的に測定できることから、in vivo 試験法の 10 倍以上の試験数を実施できることになる。

また、化学物質の中でも農薬の安全性評価では、一般毒性試験に加えて、各種の神経毒性試験（急性神経、亜急性神経、発達神経毒性）の実施が要求されている。そのコストは、1 化合物につき急性神経毒性試験で約 1500 万円、亜急性神経毒性試験で約 3500 万円、発達神経毒性試験で約 8000 万円と非常に高額である。今回、提案する in vitro 神経毒性試験は成獣期と発達期の神経毒性を幅広く検出できるように 3 試験から構成されており、1 化合物につき、神経分化アッセイ (Test1) は約 12000 円、神経突起伸展アッセイ (Test2) は約 16000 円、また簡便な神経毒性試験 (Test3) は約 6 万円と 3 試験合わせても約 8 万 8000 円（人件費等を除いた実費計算）と算出された。これは、in vivo 試験のコ

ストと比較すると非常に低コストである。さらに、in vivo 試験は数か月から1年ほど期間を要するのに対して、当該 in vitro 試験では、3試験同時に1週間で実施可能であることから、多数の化学物質のスクリーニング用途に多大な力を発揮することが期待できる。よって、本事業に投資された費用は投入されうる費用に見合った効果が期待できる。

動物実験の廃止を求める社会的活動の高まりから、EUでは2013年3月11日で化粧品の全ての動物実験が廃止された。さらに化粧品業界だけでなく製薬や食品、化学といった企業に対しても、動物実験に反対する団体からは動物実験の廃止が求められている。実際に国際的に事業展開している国内食品メーカーや化粧品メーカーが動物実験を廃止している。一方で、自社製品の安全性試験は製品開発には重要であるため、新たに動物実験の安全性試験を代替した培養細胞等を用いた in vitro 試験法が必要となる。本事業で開発した in vitro 腎毒性試験は、生体の腎臓に極めて近い腎様構造体を用いた試験法であり、ラットを用いた in vivo 試験法を代替することが期待できる。これにより動物実験を廃止した国内企業でも新たな製品の開発を継続することが可能になる。

さらに今後、事業者がこれを活用して化学物質の有害性情報を低コストで取得して、自ら取り扱う化学製品のGHS分類に活用したり、改正化審法下の届出データとして国に提供し、国が優先評価化学物質指定のためのスクリーニング評価に活用したりすることが期待できる。また、OECDテストガイドライン化が実現すれば、事業者による自主的な有害性評価ばかりでなく、改正化審法の審査制度においても正式に位置付けられる可能性が高まる。これらにより、化学物質を用いる産業の健全な発展及び化学物質による健康被害の未然防止が図られ、投入費用に比べ十分な効果が得られるものと考えられる。