

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な
国際先導的有害性試験法の開発

中間評価報告書

平成26年1月
産業構造審議会産業技術環境分科会
研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ

はじめに

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

経済産業省において実施している石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発は、石油精製物質等の化学物質において、国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、遺伝子発現変動解析手法、培養細胞手法等による評価技術の確立を目的とし、化学物質の迅速かつ効率的な有害性評価手法を開発するため、平成23年度より実施しているものである。

今回の評価は、石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発の中間評価であり、実際の評価に際しては、省外の有識者からなる石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発（反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発）中間評価検討会（座長：今井田 克己 国立大学法人香川大学医学研究院病理病態・生体防御医学講座腫瘍病理学教授）及び、石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発（肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発）中間評価検討会（座長：堀井 郁夫 堀井サイエンスアソシエイト株式会社代表取締役社長）を開催した。

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

本書は、これらの評価結果を取りまとめたものである。

平成26年1月

産業構造審議会産業技術環境分科会

研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ

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

委員名簿

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

(委員長除き、五十音順)

事務局：経済産業省産業技術環境局技術評価室

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発
中間評価検討会
委員名簿

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

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

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

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

(敬称略、五十音順)

事務局：経済産業省製造産業局化学物質管理課

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発の
評価に係る省内関係者

【中間評価時】

(平成25年度)

製造産業局 化学物質管理課課長 三木 健 (事業担当課長)

産業技術環境局 産業技術政策課 技術評価室長 飯村 亜紀子

【事前評価時】 (事業初年度予算要求時)

製造産業局 化学物質管理課課長 河本 光明 (事業担当課長)

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発 中間評価

審議経過

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

○第1回中間評価検討会（平成25年10月7日）

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

○第2回中間評価検討会（平成25年11月26日～平成25年12月3日）

- ・評価報告書(案)について
- * 書面審議にて行われた。

○産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（平成26年1月24日）

- ・評価報告書(案)について

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

○第1回中間評価検討会（平成25年9月26日）

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

○第2回中間評価検討会（平成25年11月27日～平成25年12月3日）

- ・評価報告書(案)について
- * 書面審議にて行われた。

○産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ（平成26年1月24日）

- ・評価報告書(案)について

目 次

はじめに

産業構造審議会産業技術環境分科会研究開発・評価小委員会評価ワーキンググループ 委員名簿
石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発中間評価検討会
委員名簿
石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発の評価に係る省
内関係者
石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発中間評価 審議
経過

	ページ
中間評価報告書概要	i
第1章 評価の実施方法	
1. 評価目的	2
2. 評価者	3
3. 評価対象	3
4. 評価方法	4
5. 評価項目	4
第2章 プロジェクトの概要	
1. 事業の目的・政策的位置付け	9
A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発	
2. 研究開発等の目標	16
3. 成果、目標の達成度	20
4. 標準化等のシナリオ、波及効果について	96
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等	98
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発	
2. 研究開発等の目標	110
3. 成果、目標の達成度	117
4. 標準化等のシナリオ、波及効果について	275
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等	278
第3章 評価	
A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発	
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	288
2. 研究開発等の目標の妥当性	291
3. 成果、目標の達成度の妥当性	293
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	296
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	298
6. 総合評価	300
7. 今後の研究開発の方向等に関する提言	303
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発	
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	308
2. 研究開発等の目標の妥当性	310
3. 成果、目標の達成度の妥当性	312

4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	3 1 4
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	3 1 6
6. 総合評価	3 1 8
7. 今後の研究開発の方向等に関する提言	3 2 1
第4章 評点法による評点結果	3 2 6
第5章 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	3 3 0
参考資料	
参考資料 1 経済産業省技術評価指針	
参考資料 2 経済産業省技術評価指針に基づく標準的評価項目・評価基準	
参考資料 3 平成22年度事前評価報告書（概要版）	
参考資料 4 石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発基本計画	

中間評価報告書概要

中間評価報告書概要

プロジェクト名	石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発																																											
上位施策名	化学物質総合評価管理																																											
事業担当課	製造産業局化学物質管理課																																											
<p>プロジェクトの目的・概要</p> <p>消費者の身近で使用される製品に含まれる化学物質には、有害性情報が明らかになっていない物質が数多く存在している。2020年までに化学物質の影響を最小化するという国際目標達成のため、石油精製物質などを含む膨大な数の既存化学物質について有害性評価のニーズが高まっている。しかし、信頼性が高く、かつ、効率的な評価技術は十分に確立されていない。</p> <p>このため、遺伝子発現変動解析手法、培養細胞手法等による評価技術の確立を目的とし、以下の研究開発項目について実施する。</p> <p>A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発 B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発</p>																																												
<p>予算額等（委託） （単位：千円）</p> <p>A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">開始年度</th> <th style="width: 20%;">終了年度</th> <th style="width: 20%;">中間評価時期</th> <th style="width: 20%;">事後評価時期</th> <th style="width: 20%;">事業実施主体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>平成23年度</td> <td>平成27年度</td> <td>平成25年度</td> <td>平成28年度</td> <td>化学物質評価研究機構</td> </tr> <tr> <td>H23FY 予算額</td> <td>H24FY 予算額</td> <td>H25FY 予算額</td> <td>総予算額</td> <td>総執行額</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">180,075</td> <td style="text-align: center;">165,376</td> <td style="text-align: center;">152,786</td> <td style="text-align: center;">498,238</td> <td style="text-align: center;">345,452</td> </tr> </tbody> </table> <p>B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 20%;">開始年度</th> <th style="width: 20%;">終了年度</th> <th style="width: 20%;">中間評価時期</th> <th style="width: 20%;">事後評価時期</th> <th style="width: 20%;">事業実施主体</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>平成23年度</td> <td>平成27年度</td> <td>平成25年度</td> <td>平成28年度</td> <td>鳥取県産業振興機構</td> </tr> <tr> <td>H23FY 予算額</td> <td>H24FY 予算額</td> <td>H25FY 予算額</td> <td>総予算額</td> <td>総執行額</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">102,820</td> <td style="text-align: center;">102,820</td> <td style="text-align: center;">102,000</td> <td style="text-align: center;">307,622</td> <td style="text-align: center;">200,366</td> </tr> </tbody> </table>					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	化学物質評価研究機構	H23FY 予算額	H24FY 予算額	H25FY 予算額	総予算額	総執行額	180,075	165,376	152,786	498,238	345,452	開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体	平成23年度	平成27年度	平成25年度	平成28年度	鳥取県産業振興機構	H23FY 予算額	H24FY 予算額	H25FY 予算額	総予算額	総執行額	102,820	102,820	102,000	307,622	200,366
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	化学物質評価研究機構																																								
H23FY 予算額	H24FY 予算額	H25FY 予算額	総予算額	総執行額																																								
180,075	165,376	152,786	498,238	345,452																																								
開始年度	終了年度	中間評価時期	事後評価時期	事業実施主体																																								
平成23年度	平成27年度	平成25年度	平成28年度	鳥取県産業振興機構																																								
H23FY 予算額	H24FY 予算額	H25FY 予算額	総予算額	総執行額																																								
102,820	102,820	102,000	307,622	200,366																																								

	<p>・ 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ルとして利用しうる遺伝子を選定する。</p>	<p>組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する。</p>	<p>て28日間反復経口投与実験を実施し、遺伝子発現量データを取得した。</p> <p>【神経毒性】 毒性機序の異なる2つの既知の神経毒性物質について発達期暴露実験及び28日間反復経口投与実験を実施し、遺伝子発現量データを取得した。</p>	達成
		<p>・ 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う。</p>	<p>【一般毒性(肝毒性・腎毒性)】 肝毒性では4種の毒性症状、腎毒性でも4種の毒性症状について、10~2,019プローブのバイオマーカー候補遺伝子を選定した。</p> <p>【発がん性】 早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補として、25プローブを選定した。</p> <p>【神経毒性】 脳の各部位で発達神経毒性を反映する候補遺伝子を見出した。</p>	達成
(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	【全てのエンドポイントに共通】 ・ 遺伝子発現変動データの取得法の確立	【一般毒性(肝毒性・腎毒性)】 判定システムのプロトタイプ(レーダー	前倒しで実施

	<p>の結論を得る。</p> <p>【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 <p>【発がん性（肝発がん・腎発がん）】</p> <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。 <p>【神経毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・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。 	<p>【神経毒性】</p> <p>遺伝子発現変動データを用いることで当該毒性の評価が可能であるかについて結論する。</p>	<p>チャート式に判定結果を可視化できるもの)を考案した。</p> <p>【発がん性】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・腎発がん性予測の初期的パイロットモデル（暫定版）を構築した。 ・肝発がん予測システムの陰性物質を中心とした検証を実施した。 <p>【神経毒性】</p> <p>脳の各部位で発達神経毒性を反映する遺伝子発現変動に着目した神経毒性検出は可能であると判断した。</p>	<p>前倒しで実施</p> <p>達成</p> <p>達成</p>
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発				
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発	人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製し、肝臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法の	肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー一遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。また、野生型マウスの肝臓細胞を用い、培養条件を見出す。	内部標準マーカーを始め、肝特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。肝毒性バイオマーカーとして、細胞死と肝再生をモニターするレポーター等を作製しつつあり、人工染色体導入マウスを作製も	達成

	プロトコル案を作成する。		いくつか順調に進展している。	
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発	人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製し、腎臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、腎臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。	腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。	内部標準マーカーを始め、腎特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。腎毒性バイオマーカーは既に臨床で利用されているもので進めている。人工染色体導入マウス作製も順調に進展している。	達成
(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発	人工染色体ベクター、マウス ES 細胞を作製し、当該 ES 細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。	ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認しマーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製する。	ES 細胞から神経細胞への分化誘導法を確定し、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認してマーカー遺伝子候補を選定した。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製した。	達成
(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発	人工染色体ベクターの性能を検証するとともに、当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出を検証し、試験系の測定条件を最適化する。最適な測定条件につい	人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を行い、試験系の設計試案を作成する。	MI-MAC ベクターに発光レポーターを挿入した各種発光細胞を作製し、MI-MAC ベクターの基本性能を検証した結果、MI-MAC がレポーターベクターとして非常に優れていることを実証した。また 2 色発光細	達成

	て各試験法のプロトコル案に反映する。		胞を用い、アッセイシステムの測定精度を検証した。	
--	--------------------	--	--------------------------	--

(2) 目標及び計画の変更の有無

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

平成 25 年度からは、フィージビリティスタディとして開始していた免疫毒性を中止した。

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

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

< 共通指標 >

研究開発項目	論文・投稿	学会発表・講演等
A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発	10 (内 3 件は投稿中)	23
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発	4	57
計	14	80

評価概要

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

人の健康、環境にもたらすリスクをできるだけ少なくした化学物質の生産・使用は重要である。2020 年に向けた取り組みとしての政策的意義は明確であり、先導性を意識して実行されている。国の事業として重要なテーマであると思われる。

個々の企業や研究機関において、有害性評価用データベースを構築し予測手法を開発するのは人材・費用・期間の面で困難であり、また中立性・信頼性の観点からも国が主導して事業を進めていくことは意義がある。

代替法の 3R 原則の実現に資する事業であると同時に、資源・労力・時間・費用の節約という面で、時代の要求に応じた適切な事業である。

また、網羅的遺伝子発現変動データを活用して化学物質の有害性予測手法を開発することは、より科学的で精度の高いアプローチとして意義がある。特に発がん性に関する新たな試験法の開発は、ハードルは高いが重要な意味を持っており、是非ともガイドライン化につながる研究成果を達成して頂きたい。

この研究成果が OECD ガイドラインに取り入れられれば、国際貢献できる上、化学物質の評価のコスト削減が図られる。その結果、科学的に評価された安全な化学物質が流通することになり、国民の安全性を担保できると考えられる。

一方、遺伝子発現解析結果から新たな評価基準を生み出す研究は非常に高度であるにもかかわらず、その研究を全面的に CERI に依存している印象であるが、CERI 以外の専門家を入れて、OECD ガイドライン化を目指して内容を精査した方がいいと思われる。

また、事業内容は、石油精製物質に関連するものではあるが、「石油精製物質」という束縛は緩やかにしておく方がよい。

2. 研究開発等の目標の妥当性

遺伝子発現データの取得と関連遺伝子の絞り込みを行うという目標は適切かつ妥当であり、遺伝子発現データに影響を与える要素を明らかにするための基礎データの取得も配慮されている。

評価未着手の大量の化学物質の効率的な評価方法の確立は、民間企業が主導して実施するには公平性の点も含めて困難であると考えられることから国が主導して、その手法を確立し OECD ガイドライン化を目指すことは価値が高い。特に、28 日間反復投与試験で、発がん性を予測する評価系の確立は価値の高い研究であるため、成功が期待される。そのためには、論文化を通して解析手法の情報公開することにより、国内外の専門家による方法論の追加検証が必要である。

一方、中間目標に対する具体的な目標及び達成すべき基準値（数値目標など）が設定されていないので達成度を正確に判断することが難しく、5 年事業計画において評価する化合物数、開発する一般毒性用エンドポイント（バイオマーカー）数等の具体的な数値目標を明確にする必要がある。

また、疾患関連遺伝子の同定を、この程度の規模の実験データで確定的に行うのはデータ解析上無理であるため、どの程度の精度で絞り込みが行えるのか、限界を明確にすべきである。

同じような遺伝子発現解析を用いた肝毒性評価や腎毒性評価は、すでに終了した厚労省プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクトのデータの有効活用が可能であるが、両者の連携が取れていなかったのが残念である。

3. 成果、目標の達成度の妥当性

バイオマーカー候補遺伝子の選定や、肝毒性及び腎毒性判定システムとして、レーダーチャート方式を考案し、毒性プロファイルを可視化したこと、腎発がん予測システムのプロトタイプを構築したことなど、事業計画で示された中間評価時の目標は、ほぼ達成されていると考えられる。

また、学会発表や論文発表も、適切に行われており、データの取得法と結果の提示については、かなりの進展が認められる。

一方、中間評価の時点では、予測システムの構築に焦点が当てられているが、最終的には、システムの性能の評価が新しいデータ（テストセット）で確認できなければならない。システムが OECD 等で公に認められるために、どのようなエビデンスが必要か、予め検討しておくことが必要である。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。また、今後の標準化を目指すためにも、プロジェクト全体として統一した麻酔法の確定が望まれる。

残り事業期間を考えた場合、より一層の研究活動のスピード化が必要と考えられる。

28 日間反復投与と終了時の肝毒性と腎毒性については、従来の生化学検査や病理検査で検出可能であり、費用が高く検査成績までの時間がかかる遺伝子発現解析を実施する意味が明確でないように感じられる。

4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

論文投稿、学会発表などの情報発信・普及活動は評価できる。

本プロジェクトで開発する有害性予測システムは、化学物質以外の医薬品や化粧品など広範囲での活用が期待できる。また、肝臓、腎臓、神経毒性のみならず、種々な毒性に応用可能であると考えられることから、本プロジェクトを通じて確立した技術の波及効果が期待できる。

また、中間評価時点で判断を下すのは困難であるが、国際規格化に向けた今後の取り組みに期待する。

一方、標準化に向けてのシナリオとして、現時点ではこれに関連する具体的な方法、特に国際化に向けての事項がはっきりしない。ガイドライン化を目指すのであれば、先行する事業の関連研究成果（肝発がん予測システムに関わる情報等）も速やかに公表すべきである。

また、データの再現性や施設間差などを検証して国際規格（標準）化に向け指標や基準を策定することが望まれる。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

先行する事業の成果やノウハウの応用も考慮した研究活動が行われており、研究施設の選定、事業実施スケジュール、実施体制は妥当と感じられる。

各種学会発表や論文発表などで公表されていることから費用対効果は認められたと考えられる。

一方で、最終目標が、我が国主導の国際規格化であるならば、研究開発計画が若干遅れていると感じられる。特に、期待の大きい発がん予測系については、前のプロジェクトの延長であるため、次のステップへの速やかな展開を期待する。

個々の実施者での研究成果は得られていると考えられるが、実施者間の連携によるシナジー効果は十分に見られていないように感じる。

毒性関連遺伝子の絞り込み及び特定遺伝子の選定、発がん性予測などにおいて、バイオインフォマティクスの知識・能力が重要であり、また毒性研究者との協力・連携体制が必須である。

中間時点での研究内容や進捗を再評価し、免疫毒性試験系の評価を中止し、資源の再配分を図った点は、柔軟な対応ができており、リソースの有効活用の観点からも適切な判断であるが、免疫毒性を中止したのは、周囲の状況変化への対応というより、当初計画の不備によるものと感じられる。

6. 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。

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。

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。

7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

○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。

○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3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。

○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。

○本プロジェクトはラットの動物試験データに基づいて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。

○優秀なバイオインフォマティシャンと毒性研究者との協力・連携体制で推進すること。

○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。

○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。

○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。

○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。

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

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

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

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

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

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

2. 研究開発等の目標の妥当性

事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、迅速かつ効率良く有害性を評価できる新たな試験法を開発することを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。

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

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

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

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

3. 成果、目標の達成度の妥当性

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

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

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

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

国際標準化に向けての達成度については、十分というにはまだかなり距離がある。

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

4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

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

我が国主導型の国際標準化に向けた意図はシナリオとして十分示されている。

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

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

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

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

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

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

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

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

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

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

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

6. 総合評価

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

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

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

く実施されていると評価する。

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

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

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

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

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

7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

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

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

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

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

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

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

○本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。

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

○個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。

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

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

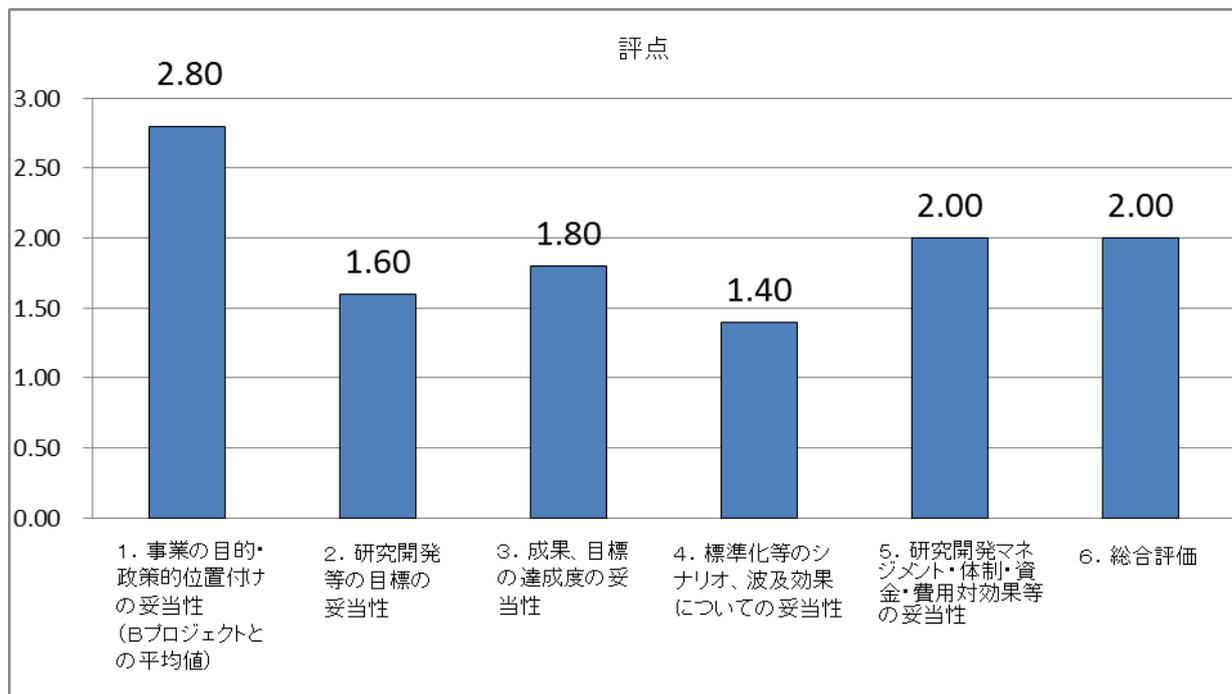
評点結果

評点法による評点結果

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発

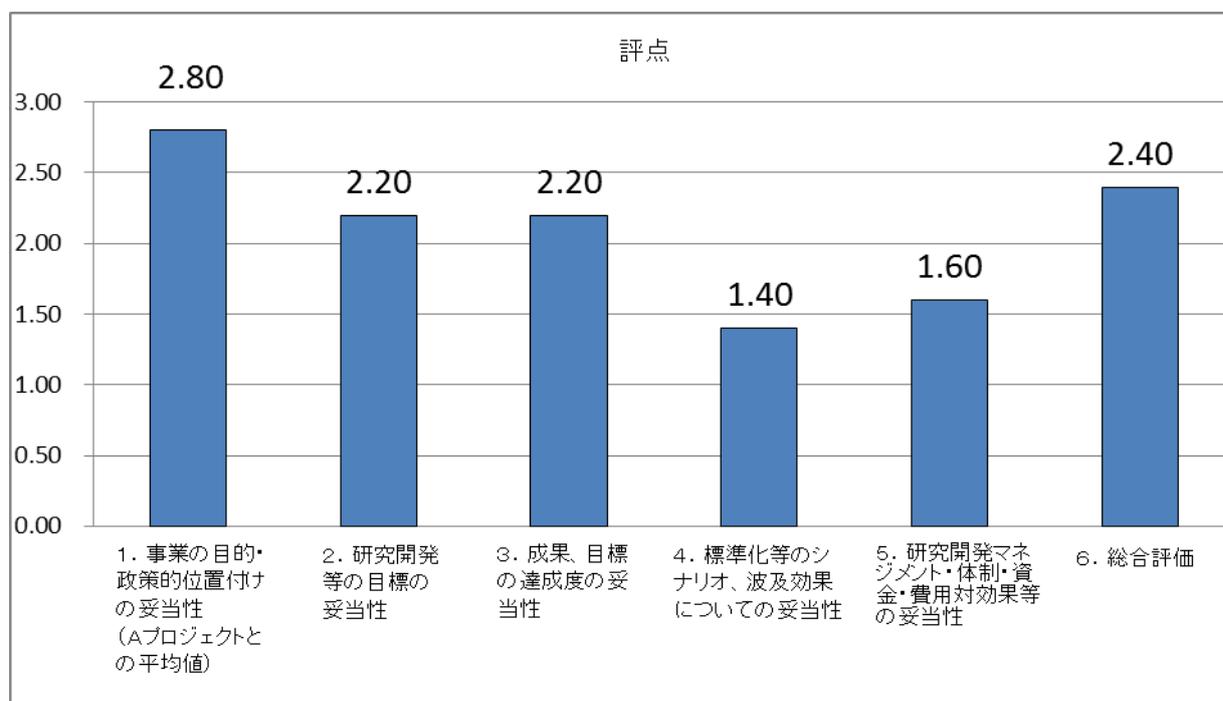
A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の 取得手法の開発

	評点	A 委員	B 委員	C 委員	D 委員	E 委員
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	2.80	3	3	3	3	2
2. 研究開発等の目標の妥当性	1.60	2	2	1	1	2
3. 成果、目標の達成度の妥当性	1.80	2	1	2	2	2
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	1.40	1	1	2	1	2
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	2.00	1	2	2	2	3
6. 総合評価	2.00	2	2	2	2	2



B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

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



第 1 章 評価の実施方法

第1章 評価の実施方法

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

1. 評価の目的

以下の（1）～（4）を目的として評価を実施した。

（1）より良い政策・施策への反映

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

（2）より効率的・効果的な研究開発の実施

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

（3）国民への技術に関する施策・事業の開示

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

（4）資源の重点的・効率的配分への反映

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

また、評価の実施に当たっては、以下の①～④を基本理念として実施した。

① 透明性の確保

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

評価結果のみならず評価の過程についても可能な限り公開すること。

② 中立性の確保

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

③ 継続性の確保

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

④ 実効性の確保

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

2. 評価者

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

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

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

3. 評価対象

技術に関する事業

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発
(実施期間：平成23年度から平成25年度)

を評価対象として、研究開発実施者 (A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発：一般財団法人化学物質評価研究機構、国立大学法人東京農工大学、学校法人京都産業大学) (B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in

vitro 試験法の開発：公益財団法人鳥取県産業振興機構、国立大学法人鳥取大学、国立大学法人岡山大学、住友化学株式会社、独立行政法人産業技術総合研究所、一般財団法人食品薬品安全センター）から提出された資料をもとに、技術に関する事業（プロジェクト）の評価を行うとともに、それらの事業評価の結果を踏まえて、各事業を俯瞰する形で各事業の相互関係等に着目し、技術に関する施策の評価を実施した。

4. 評価方法

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

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

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

5. 評価項目

【技術に関する事業】

○事業の目的・政策的位置付けの妥当性

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

○研究開発等の目標の妥当性

- ・研究開発等の目標は適切かつ妥当か。

○成果、目標の達成度の妥当性

- ・成果は妥当か。
- ・目標の達成度は妥当か。

○標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

- ・標準化等のシナリオは妥当か。
- ・波及効果は妥当か。

○研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

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

○総合評価

第2章 プロジェクトの概要

目 次

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

(B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発)

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

1. 事業の目的・政策的位置付け

1-1 事業目的

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

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

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

しかし、これらの有害性評価項目に関して信頼性が高く、かつ、効率的な評価技術は十分に確立されていない部分が多く、また一般的にヒト健康影響に関する有害性評価項目の多くは動物への反復投与試験等で数ヶ月から数年の期間を要するため、新たな規制導入による評価実施ニーズに答えられていない状況である。

このため、これまでの研究開発において特定のエンドポイントについて遺伝子発現変動解析や培養細胞を活用した迅速で効率的な評価技術の開発を進めてきた我が国の先導的な取り組みや成果を活用し、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進めることは、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、国際的なニーズにも対応するものである。

本研究開発により、効率的な有害性評価手法を我が国主導で開発して、更に国際標準へと発展させ、我が国の石油精製物質の安定供給に資することが可能となる。

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

具体的には、28日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発や、複数のin vitro試験法の開発及び迅速かつ効率的に実施できる有害性評価システム等を構築することを目標とし、以下の研究開発項目について実施する。

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の
取得手法の開発

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

1-2 政策的位置付け

(1) 第4期科学技術基本計画（平成23年8月19日閣議決定）

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

(2) 技術戦略マップ（2010年6月経済産業省編）

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

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

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

・(75) 発がん性、生殖毒性、神経毒性の長期毒性についての高速の *in vivo* 試験法

・(76) マルチエンドポイントの *in vivo* 試験法

・(83) 網羅的解析技術を用いた有害性バイオマーカーの探索手法

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 *in vitro* 試験法の開発

・(72) ES細胞を用いた *in vitro* 試験法

・(74) 長期毒性についての簡易でハイスループット可能な *in vitro* 試験法

・(78) マルチエンドポイントの有害性評価手法

(3) 先行するNEDO事業の成果の活用

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

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

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

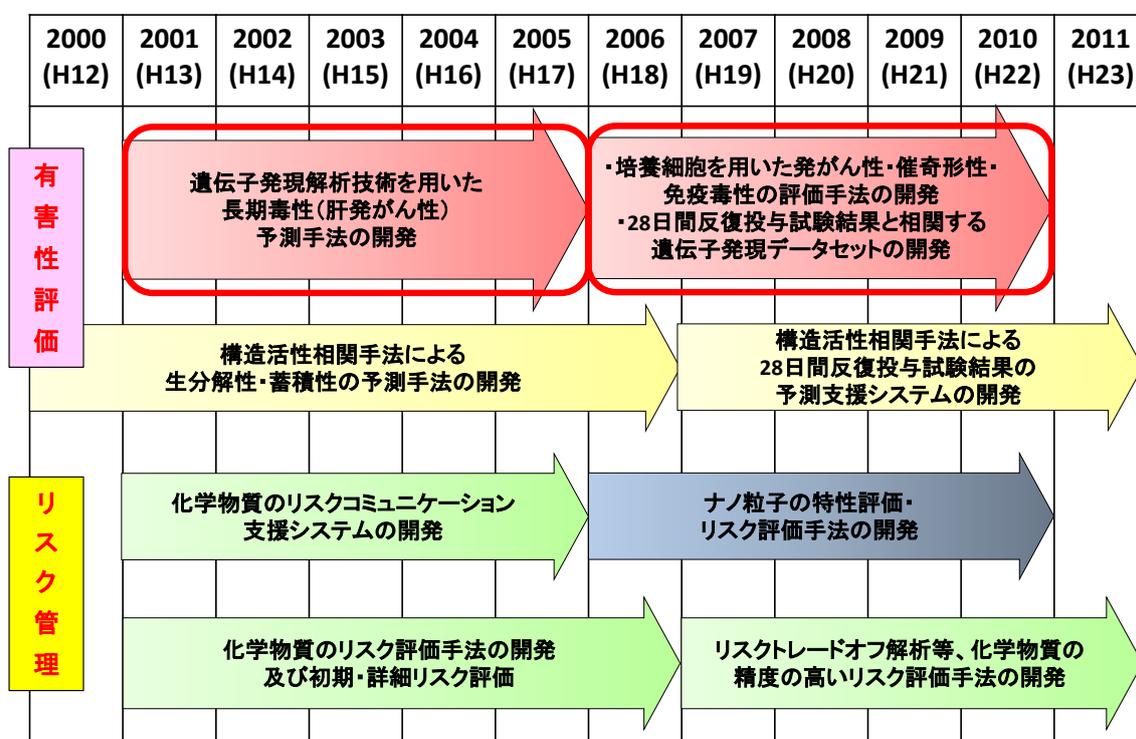


図 1-1. NEDO による化学物質のリスク評価・管理のための体系的な研究開発

（４）化学物質管理の世界的な動向における本プロジェクトの位置づけ

2002年に開催された「持続可能な開発に関する世界首脳会議（WSSD）」において、「ライフサイクルを考慮に入れた化学物質と有害廃棄物の健全な管理のためのアジェンダ21の約束を新たにするとともに、予防的取組方法に留意しつつ透明性のある科学的根拠に基づくリスク評価手順とリスク管理手順を用いて、化学物質が、人の健康と環境にもたらす著しい悪影響を最小化する方法で使用、生産されることを2020年までに達成する」との、首脳レベルでの長期的な化学

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

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

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

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

1-3 国の関与の必要性

本研究で開発された手法は、多様なエンドポイントに関する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を目標としており、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、化学物質管理規制等の行政の裏付けとなる技術であり、国が主導して判断基準やルールを構築することにより、公平、中立な手法として信頼性が確保される。

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

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

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による
発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

2. 研究開発目標

2-1 研究開発目標

2-1-1 全体の目標設定

本研究では、効果的且つ効率的な有害性評価手法が十分整備されていない毒性エンドポイントとして、特に重要と考えられる「(1) 発がん性」、「(2) 主要臓器における一般毒性」及び「(3) 神経毒性」について、遺伝子発現変動解析手法等の最新技術を活用し、化学物質の効果的且つ効率的な有害性評価手法を開発すると共に、開発した手法の国際標準化をも図ることで、世界規模で化学物質の有害性評価を高度化し、効果的且つ効率的な試験・評価の実施に貢献することを目的とした。具体的には、化学物質審査規制法において公定法とされている等、化学物質の毒性スクリーニング試験として汎用されている28日間反復投与毒性試験（単一の動物試験）の実施を前提として、当該試験に供された実験動物の臓器等を生体サンプルとして遺伝子発現変動データを取得し、そのデータを解析して、投与された化学物質の前述の(1)～(3)の有害性に関する予兆的情報を得る手法の開発を目指している。

プロジェクト実施期間中に得られた研究成果については、学会や論文での発表に加えて、適宜、OECD等の国際機関での国際標準作りに向けて活用している。

なお、本プロジェクト開始当初には毒性エンドポイントとして免疫毒性も対象としていたが、予算の有効活用を考慮して2年目で終了時に対象から除外した。

全体目標	中間目標	設定理由
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	個別指標で対応	効果的且つ効率的な有害性評価手法が十分整備されていない毒性エンドポイントとして、特に重要と考えられる「(1) 発がん性」、「(2) 主要臓器における一般毒性」及び「(3) 神経毒性」について、遺伝子発現変動解析手法等の最新技術を活用し、化学物質の効果的且つ効率的な有害性評価手法を開発すると共に、開

		発した手法の国際標準化をも図ることで、世界規模で化学物質の有害性評価を高度化し、効果的且つ効率的な試験・評価の実施に貢献することを目的として設定した。
--	--	---

2-1-2 個別要素技術の目標設定

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
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。	(a) 各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み。	・ 以下に記載。
	・ 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。	・ 適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する。	・ 毒性既知の被験物質を選択しデータを取得することで有害性を予測に有用な遺伝子発現データが取得可能であるため。
	・ 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	・ 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う。	・ 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動する遺伝子は各毒性のマーカー遺伝子となる可能性が高いた

	として利用しうる遺伝子を選定する。		め。
	(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。		・ 以下に記載。
	【全てのエンドポイントに共通】 ・ 実施可能な範囲で、「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」と共通の物質を用いた in vivo 試験を実施する。	・ 設定なし。	・ in vitro 試験法及び HTS 試験システムの対象遺伝子の生体内での変動と毒性影響の関係を明らかにすることで、対象遺伝子の信頼性の証明を行うことができ、さらには in vivo(生体)と in vitro(試験管内)のブリッジングも期待できる。
	【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】 ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。	・ 遺伝子発現変動データの取得法の確立	・ 遺伝子による毒性評価の基本技術であるため。また、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進めることは、

	る。		国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、国際的なニーズにも対応する。
	<p>【発がん性（肝発がん・腎発がん）】</p> <p>・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。</p>	<p>・遺伝子発現変動データの取得法の確立</p>	
	<p>【神経毒性】</p> <p>・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。</p>	<p>・遺伝子発現変動データの取得法の確立</p> <p>・遺伝子発現変動データを用いることで当該毒性の評価が可能であるかについて結論する。</p>	

3. 成果、目標の達成度

3-1 成果

3-1-1 全体成果

ヒト健康影響に対する有害性情報が明らかになっていない物質は多数存在しており、特に重要度の高い(1)主要臓器(肝臓・腎臓)における一般毒性、(2)発がん性、(3)神経毒性、(4)免疫毒性について、それらの有害性情報を効率的かつ高精度に取得するための試験法として、遺伝子発現量解析を取り入れた新たな検出方法の開発を行った。

これまでに(1)主要臓器(肝臓・腎臓)における一般毒性については、目的臓器である肝臓及び腎臓における遺伝子発現量データの取得法について標準プロトコルを確立し、16試験(14物質)の28日間反復投与試験を行い、数万種類の遺伝子について包括的な発現量データを取得した。その後、動物実験で得られた毒性所見と遺伝子発現量データとの関係性についてバイオインフォマテクス技術を駆使して解析し、これまでに肝臓では単細胞壊死、肝細胞肥大、肝細胞脂肪変性を、腎臓では近位尿細管空胞変性、近位尿細管核濃縮、近位尿細管核大小不同、乳頭壊死について、特徴的に発現変動するマーカー候補遺伝子を選定することができた。さらに、これらのマーカー候補遺伝子群を用いて「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」のプロトタイプの開発を行った。

(2)発がん性については、化学発がんにおいて標的性の高い肝臓及び腎臓に着目し、化審法で行われる28日間反復投与試験で取得した遺伝子発現量データを活用し、長期間投与が必要な発がん性を予測できる“短期発がん性予測手法”の開発を行った。これまでに、16試験(14物質)について28日間反復投与試験を実施し、肝臓及び腎臓の遺伝子発現量データを取得した。肝臓については前身のプロジェクトで新規の短期発がん性予測手法を開発することができたために、本プロジェクトで取得した16試験(14物質)を外データとして活用し、短期発がん性予測手法の予測精度の確認を行った。さらに厚生労働省トキシコゲノミクスプロジェクト(2002-2012年度)で取得され、既に一般公開されている遺伝子発現量データを活用し、本システムに適用し、どの程度の予測結果が得られるかを検証した。腎臓については、16試験(14物質)の遺伝子発現量データと腎臓発がん性との関連性をバイオインフォマテクス技術により解析し、これまでに腎臓発がんに関連したマーカー候補遺伝子を選定することができた。さらに、これらのマーカー候補遺伝子群を用いて腎臓における短期発がん性予測手法のプロトタイプを作成した。

(3)神経毒性については、遺伝子発現量解析のための脳の採材方法について標準プロトコルを確立し、2物質について妊娠期・授乳期暴露及び28日間反

復投与試験を行った。その後、妊娠期・授乳期暴露と 28 日間反復投与試験で発現変動した遺伝子群を比較して、暴露時期や採材時期がことなる脳サンプルにおいて共通に変動する遺伝子群を選定し、神経毒性のマーカ候補遺伝子とした。

なお、(4)免疫毒性に関しては脾臓を除く免疫関連組織からの RNA 調製法や主要な免疫機能検出方法の開発は終了したものの、本事業の全体予算縮小を考慮し、リソースの有効利用のため基本計画から削除することとした。

将来的には、本プロジェクトで同定された遺伝子バイオマーカー及び毒性判定もしくは予測手法を化審法で実施される 28 日間反復投与試験に組み込みこむことで、これまで毒性エンドポイントごとに個別の異なる動物試験が必要だった有害性評価手法を、1 本の毒性試験でマルチに検出できるような試験系に発展させることを目指す(図 1)。これにより大幅なコスト削減と時間短縮、動物数削減が見込まれ、さらに遺伝子発現量をベースにした測定法により定量性の高い、かつメカニズムベースの毒性評価ができることが期待される。

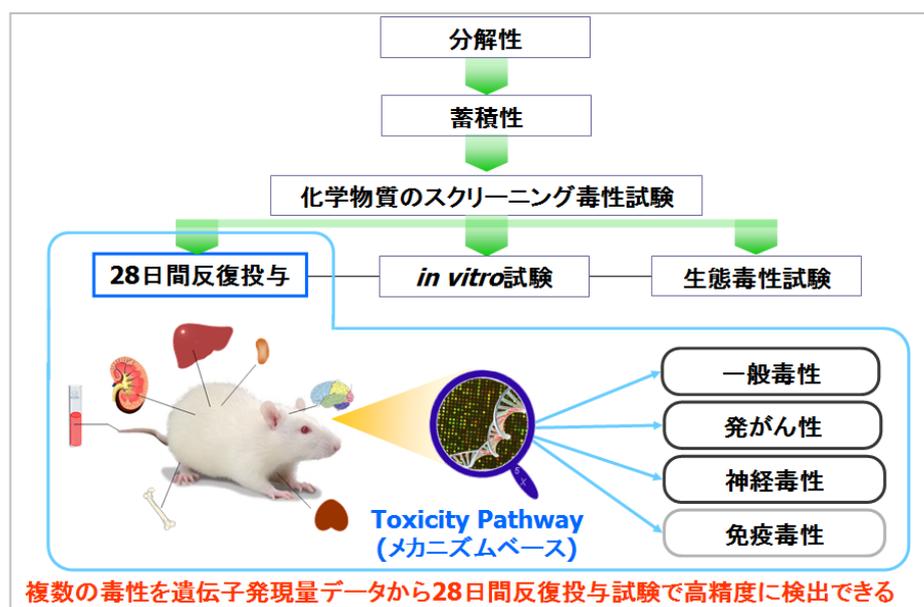


図 1 開発した新規評価方法の化審法への適用(構想図).

3-1-2 個別要素技術成果

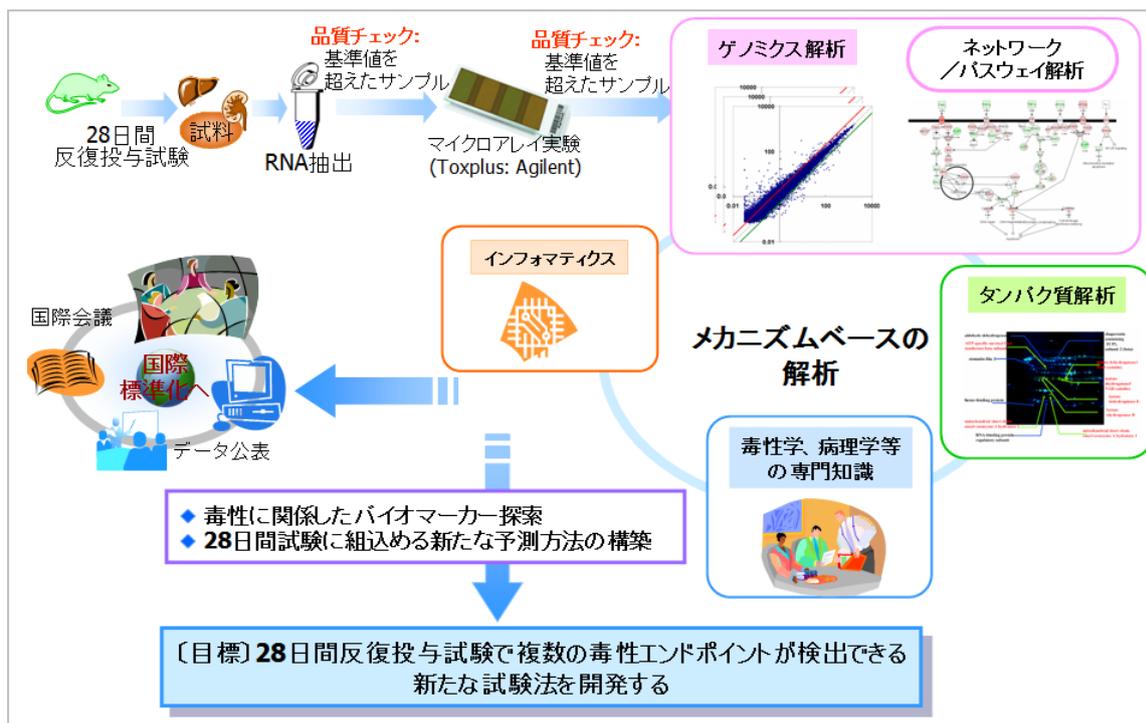
(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性

1. 研究開発の概要

化学物質の一般毒性に関しては、代謝を担う肝臓と排泄を担う腎臓が主要な標的臓器である。加えて、肝毒性及び腎毒性はヒトにおいても重篤な疾患に繋がるため、創薬段階において開発中止となる主要な要因となっており、化学物質のげっ歯類を用いた有害性評価においても特に重要視すべき毒性エンドポイントである。そこで本研究では、化学物質の標的性が高く、毒性発現が起こりやすい肝臓と腎臓を開発対象のエンドポイントとする。これまでに肝臓についてはグルタチオン枯渇や PPAR による肝毒性、腎臓については尿細管壊死などいくつかのエンドポイントについて個別のバイオマーカー遺伝子が見出されているものの、それらを一つの試験系でマルチに検出できる評価系は確立されていないのが現状である。また、血液生化学的検査から肝臓もしくは腎臓の個々の毒性症状を判定しようという試みもなされているが、十分な相関性が得られていない。

そこで、本研究では、一般毒性の中でも特に重要性が高いエンドポイントである肝毒性及び腎毒性に着目し、28 日間反復投与試験から得られる肝臓及び腎臓サンプルの遺伝子発現変動データを用いて、既存の測定方法（臓器重量、血液生化学的検査、病理組織学的検査など）では判定が困難な毒性メカニズムをより詳細に同定し、毒性情報を精緻化する手法の開発を目的とする(図(1)-1)。

これまでの2年間で、16 試験(14 物質)について、28 日間の反復投与毒性試験を行い、経時的(1、7、14、28 日間)に肝臓及び腎臓をサンプリングし、それぞれの臓器で遺伝子発現量データの取得を行い、バイオマーカー遺伝子の探索を試みた(表(1)-1)。加えて、厚生労働省が実施した TGP (トキシコゲノミクスプロジェクト)で主に医薬品から得られた動物実験データや遺伝子発現量データについても本PJで取得した遺伝子発現データと合わせて石油精製物質等の幅広い工業化学物質における肝毒性・腎毒性のメカニズムに基づくマーカー遺伝子の同定を目指すこととした。



図(1)-1 研究計画の概要.

表(1)-1 実施した試験一覧(16 試験).

試験数	物質名	略称	実施年度
1	Bromodichloromethane	BDCM	H23 年度
2	Phenolphthalein	PP	
3	o-Nitroanisole	o-NA	
4	2-Amino-4-nitrophenol	2A4Np	
5	tert-Butyl alcohol	TBA	
6	tert-Butyl alcohol /イソフルラン麻酔	TBA_I	
7	o-Anthranilic acid	2-AA	H24 年度
8	o-Anisidine hydrochloride	o-AH	
9	Tris(2-Chloroethyl) Phosphate	TCEP	
10	2, 2-Bis(Bromomethyl)-1, 3-Propanediol	DBNPG	
11	Nitrilotriacetic acid trisodium monohydrate	Na3-NTA-H2O	
12	1-Amino-2, 4-Dibromoanthraquinone	ADBAQ	
13	Bromodichloromethane/イソフルラン麻酔	BDCM_I	
14	Anthraquinone	AQ	
15	1, 2, 3-Trichloropropane	TCP	
16	N-Nitrosodimethylamine	DMN	

2. 条件検討

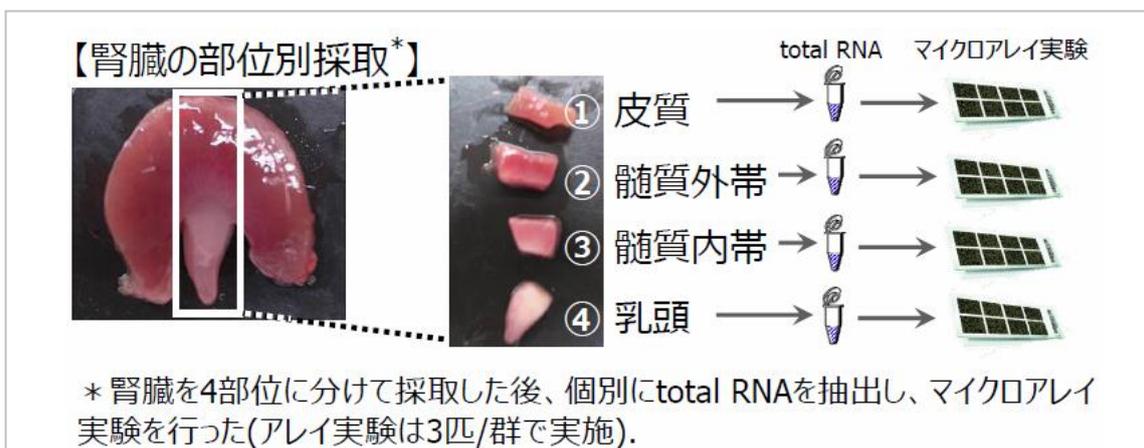
2.1 各臓器の採材方法の検討

2.1.1 背景及び実施内容

研究を進めるにあたり、対象臓器である肝臓及び腎臓からの遺伝子発現量解析用のサンプル採取方法について、条件の最適化を行った。

肝臓からの採取及び保存方法、RNA 抽出方法については、前身のプロジェクトで検討しており、プロトコールとしては確立しているため、本プロジェクトにおいても同様の手法で実施した。

腎臓については、組織学的に血管系、腎乳頭、尿細管系、糸球体に大きく分けることができ、それらが存在する部位の違いによって解剖学的にも皮質、髓質、乳頭の大きく3部位に分かれている。また化学物質によって引き起こされる腎毒性についても、尿細管壊死のように組織特異的に起こるものが多いために、各組織もしくは部位ごとに通常発現している遺伝子の種類や発現量が大きく異なり、さらには化学物質投与後に影響を受ける遺伝子群も異なることが予想された。そこで事前検討として腎臓の部位別で発現している遺伝子の種類や量に違いがあるのかを調べるために、媒体(コーン油)を3日間投与したSDラットから解剖学的に分離可能と判断された皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の4種を個別に採取し、それぞれからtotal RNAを抽出したのち、個別にマイクロアレイ実験を行い、部位別の遺伝子プロファイルと比較した。また、同時に部位別採取の手技的な再現性と個体間差についても検討した。なお、マイクロアレイ実験の方法については、「3.2.2 遺伝子発現量解析」(後述)に記載の通りである。



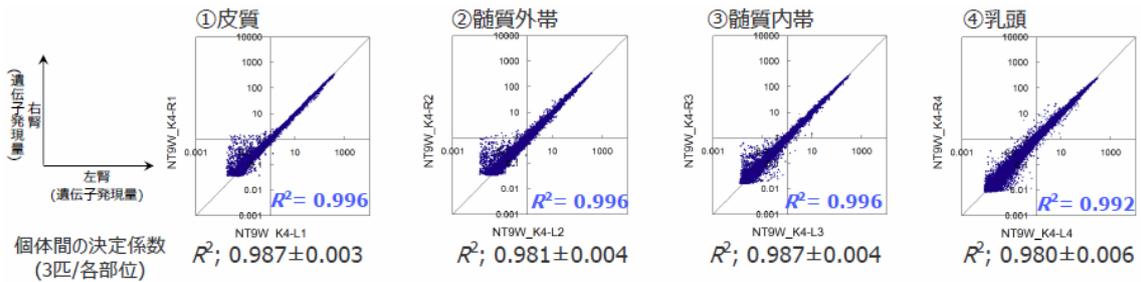
図(1)-2 腎臓における各部位の採取方法及び実験の概要.

2.1.2 結果

媒体を3日間投与したSDラットの腎臓を皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の4部位に分けて採取し、同一個体の左腎及び右腎の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。その結果、4部位とも決定係数(R^2)が0.992~0.996と非常に高い相関性を示したことから、同一個体内の左右の腎臓間では類似した遺伝子発現

プロファイルを示していることが分かった(図(1)-3)。

次に個体間のばらつきを調べるために、右腎の各部位について3個体総当たりで相関性解析を行ったところ、何れの部位も決定係数(R^2)が0.980以上を示した(図(1)-3)。このことから、腎臓の各部位における個体間のばらつきは非常に小さいことが分かり、また、動物実験後の部位別採取の手技についても大きなばらつきがないことが確認できた。

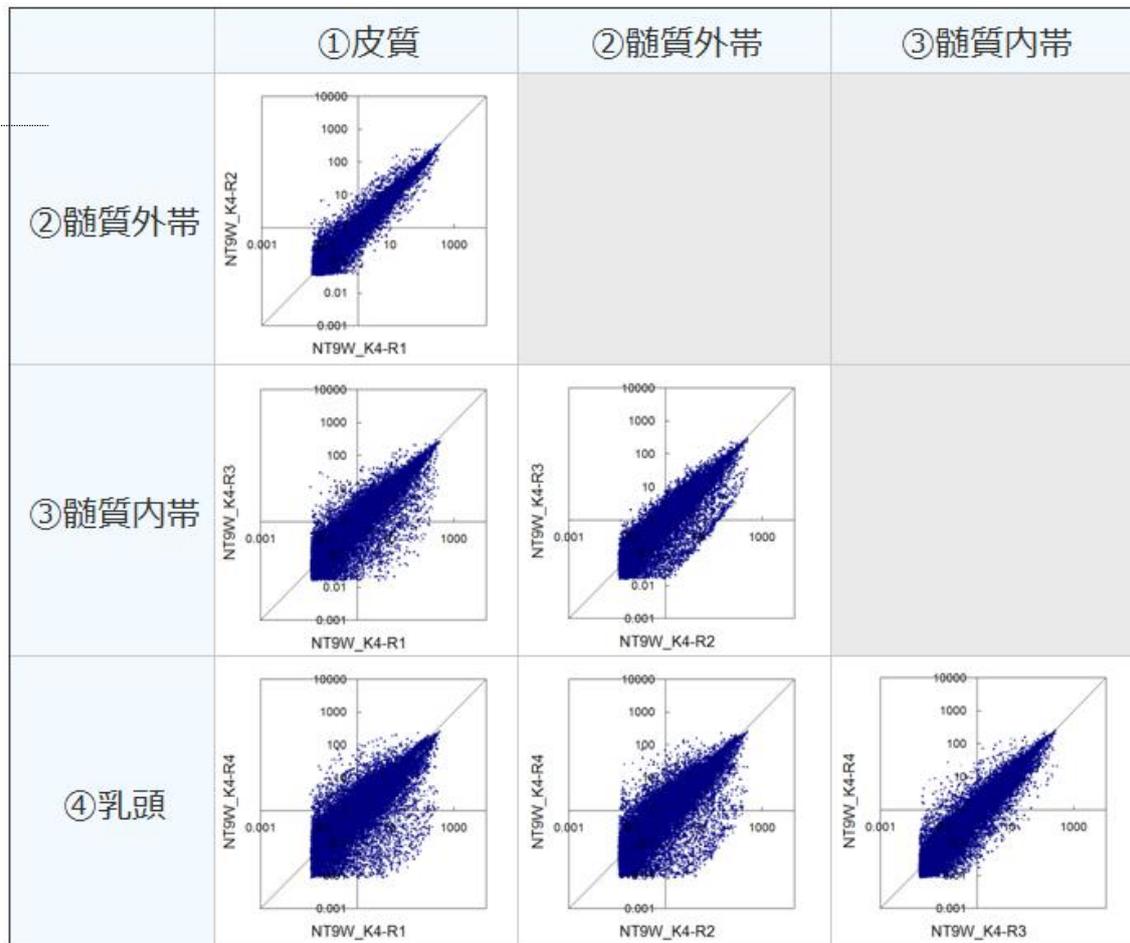


図(1)-3 腎臓各部位の左右及び個体間の遺伝子発現量データのばらつき。

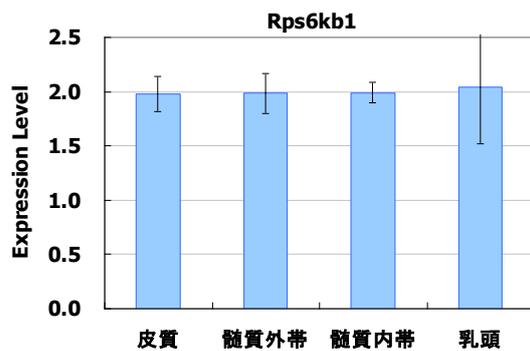
次に、各部位について3個体の遺伝子発現量の平均値を算出した後、発現レベルを腎臓部位間で比較したところ、部位間で大きく遺伝子発現プロファイルが異なることが分かった(図(1)-4A)。隣接する部位間では比較的大きな差異を示す遺伝子数はそれほど多くないものの、離れた部位、特に皮質と乳頭では大きく発現レベルが異なる遺伝子が数多く存在することが分かった。4部位の何れかで発現していることが確認できたものは42,255プローブで、それらを用いて部位間の分散分析(ANOVA)を行ったところ、有意差のないもの($p > 0.05$)は6,882プローブと全体の16.3%にしか過ぎなかった。また、これらの遺伝子機能を調べたところ、Gene Expression、RNA Post-Transcriptional Modification、Protein Synthesis、Cell-To-Cell Signaling and Interactionと細胞の恒常性維持に関連したものが多く、最も p 値が大きかったものは*Rps6kb1*遺伝子(ribosomal protein S6 kinase, 70kDa, polypeptide 1)でタンパク質合成に関与したものであった(図(1)-4B)。

部位間で発現レベルに有意差があったものは腎臓で発現している遺伝子の8割以上を占め、その中でも最も p 値が小さかったものに*Dhtkd1*遺伝子(dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1)があり、皮質と乳頭では45倍の発現レベルの差がみられた(図(1)-4C)。また、各部位で特異的な発現レベルを示す遺伝子群の機能を調べたところ、乳頭で発現している遺伝子群の機能は他の3部位と全く逆の傾向(皮質・髓質外帯では分子輸送や脂質代謝、薬物代謝が盛ん)を示すことが分かった(表(1)-2)。

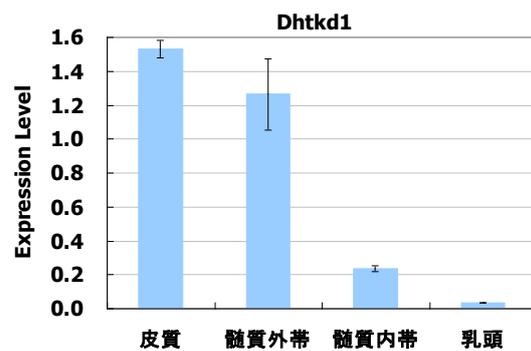
(A) 部位間の遺伝子発現プロファイルの比較



(B) 有意差のない遺伝子 ($p=0.999$)



(C) 有意差のある遺伝子 ($p=2.72E-15$)



図(1)-4 腎臓・各部位の遺伝子発現プロファイルの比較.

表(1)-2 部位特異的に発現している遺伝子群の機能分類.

部位	Functional Analysis	
	High expressed	Low expressed
皮質	<ul style="list-style-type: none"> ・ Molecular Transport ・ Lipid Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Cellular Movement ・ Organismal Development

髄質(外帯)	<ul style="list-style-type: none"> ・ Molecular Transport ・ Lipid Metabolism ・ Drug Metabolism 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Cellular Movement ・ Immune Cell Trafficking
髄質(内帯)	<ul style="list-style-type: none"> ・ Molecular Transport ・ Skeletal and Muscular System ・ Development and Function 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Cellular Movement ・ Drug Metabolism
乳頭	<ul style="list-style-type: none"> ・ Cellular Movement ・ Immune Cell Trafficking 	<ul style="list-style-type: none"> ・ Molecular Transport ・ Lipid Metabolism

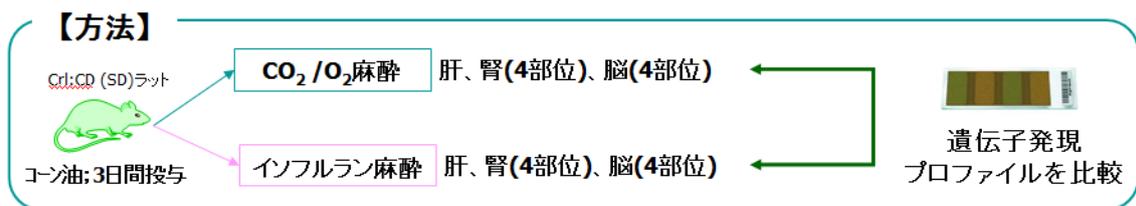
以上の結果から、定常状態の腎臓では部位間で発現している遺伝子の種類も発現量も大きく異なり、それぞれ異なる遺伝子機能に関与していることが分かったため、化学物質投与による影響は部位別で大きく異なる可能性が考えられた。そこで、本プロジェクトでは、化学物質投与後の腎臓における遺伝子発現量解析について、皮質・髄質(外帯)・髄質(内帯)・乳頭の4部位に分けて取得することとした。また、同時に腎臓(全体)の遺伝子発現量データも取得し、各部位で得られたデータと比較することとした。

2.2 麻酔法の検討

2.2.1 背景及び実施内容

前身のプロジェクトにおいて、エーテル麻酔と CO₂/O₂ 混合麻酔(4:1)を比較したところ、CO₂/O₂ 混合麻酔の方が肝臓の遺伝子発現プロファイルの個体間のばらつきが小さかったため、これまでのデータについてはCO₂/O₂ 混合麻酔で取得してきた。他方、麻酔の導入及び覚醒が速いために麻酔深度を容易に迅速に変えることができるという理由から、イソフルラン麻酔が動物実験で多用されるようになった。しかし、イソフルラン麻酔はマウス海馬の遺伝子発現プロファイルに影響するとの報告があるため、麻酔法の違いによって遺伝子発現プロファイルに影響を与える可能性が考えられた。

そこで、麻酔法の違いが遺伝子発現プロファイルにどの程度影響するかを調べるために、媒体(コーン油)を3日間投与したSDラットをCO₂/O₂ 混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、肝臓、腎臓(皮質、髄質(外帯)、髄質(内帯)、乳頭)、脳(海馬歯状回、帯状回、脳梁、小脳)を採取してマイクロアレイによる遺伝子発現量解析を行った(図(1)-5)。なお、マイクロアレイ実験の方法については、「3.2.2 遺伝子発現量解析」(後述)に記載の通りである。



図(1)-5 麻酔法検討実験の概要.

2.2.2 結果

媒体を3日間投与したSDラットCO₂/O₂混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、目的臓器を採取した後、個体間の同一個体の左腎及び右腎の遺伝子発現プロファイルの比較を行った。一例として肝臓及び脳梁で個体間のばらつきをスキャッタープロットで示したところ、CO₂/O₂混合麻酔及びイソフルラン麻酔ともに各プロットの広がり小さく、決定係数(R^2)も0.976以上と高い相関性を示した(図(1)-6)。その他の部位についても個体間のばらつきを相関性解析により調べたところ、何れの決定係数(R^2)も0.976以上を示した(表(1)-3)。

このことから、何れの麻酔法においても、個体間の遺伝子発現プロファイルのばらつきは小さく、麻酔法としては遺伝子発現解析に用いても問題ないことが確認できた。

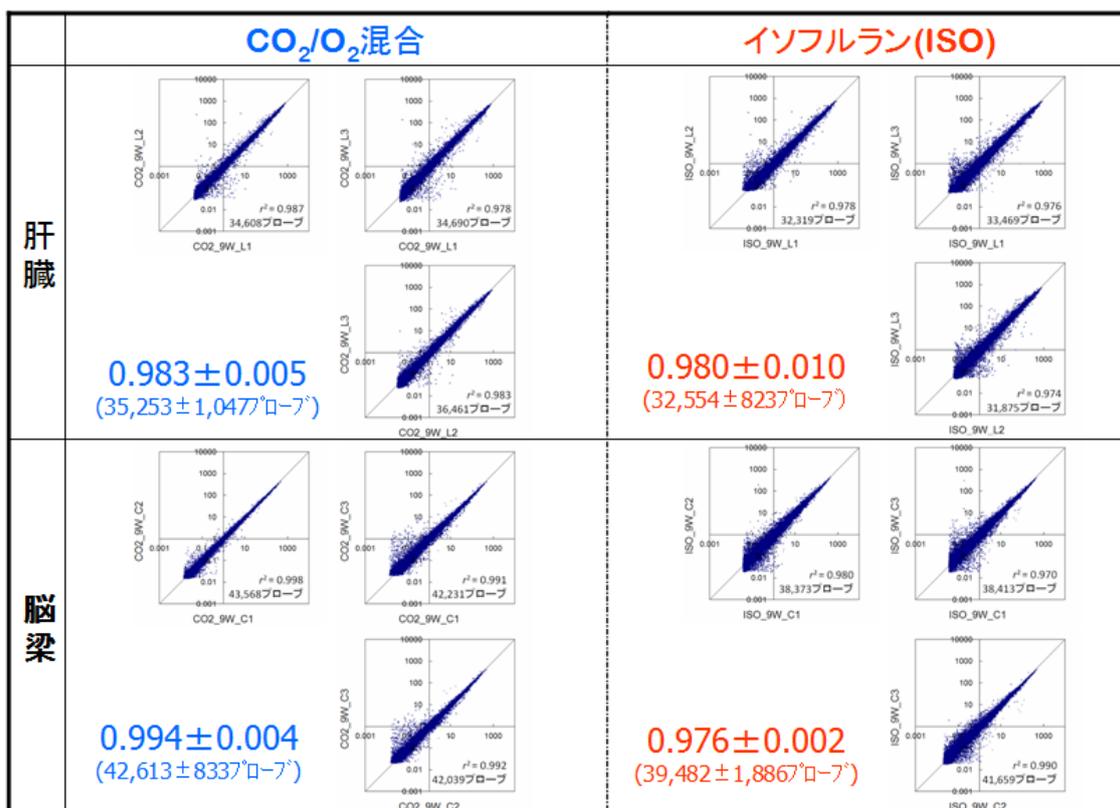
次に、各臓器もしくは部位について、CO₂/O₂混合麻酔とイソフルラン麻酔との間で発現レベルに有意差のあるものを調べたところ、108~278プローブが選定された。一例として海馬歯状回において麻酔法の違いによって発現レベルに有意差があった遺伝子を調べたところ、イソフルラン麻酔で発現レベルが高かったものに *NAMPT* 遺伝子 (nicotinamide phosphoribosyltransferase)、*NPAS2* 遺伝子 (neuronal PAS domain protein 2)があり、CO₂/O₂混合麻酔で発現レベルが高かったものに、*GCNT1* 遺伝子 (glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2)があった。

以上の結果から、各組織もしくは部位について麻酔法の違いによって影響を受ける遺伝子が数百プローブ(検出プローブの約0.6%)あることが分かったため、化学物質投与後のバイオマーカー探索の際にはこれらの遺伝子の変動に注意し、場合によっては除外対象とすることとした。また、遺伝子発現レベルでは麻酔法の違いによって受ける影響が1%以下と小さいことが分かったため、何れの麻酔法も本手法に適用できる可能性が示唆された。そこで、本プロジェクトではこれまで取得してきた遺伝子発現量データとの整合性を図るため、CO₂/O₂混合麻酔を採用することとした。

しかしながら、イソフルラン麻酔が化学物質投与後の対象サンプルにどのような影響を与えるかについては、現時点でははっきりとしていないため、2物質について同じ条件で動物実験を行った後、CO₂/O₂混合麻酔もしくはイソフルラン麻酔後にと殺し、遺伝子発現プロファイルを比較してバイオマーカー探索に適用可

能かについて検討した。この結果については「3. 主要臓器に対する一般毒性のバイオマーカー候補遺伝子の探索」に記載した。

なお、本プロジェクトでは化学物質投与後のデータを取得していないエーテル麻酔については、TGP（トキシコゲノミクスプロジェクト）においてエーテル麻酔後にと殺を行っており、それらのデータが本手法に適用可能なことを確認している（後述）。



図(1)-6 肝臓と脳梁における個体間の遺伝子発現レベルのばらつき(R^2)。

表(1)-3 各臓器における個体間遺伝子発現レベルのばらつき(R^2)。

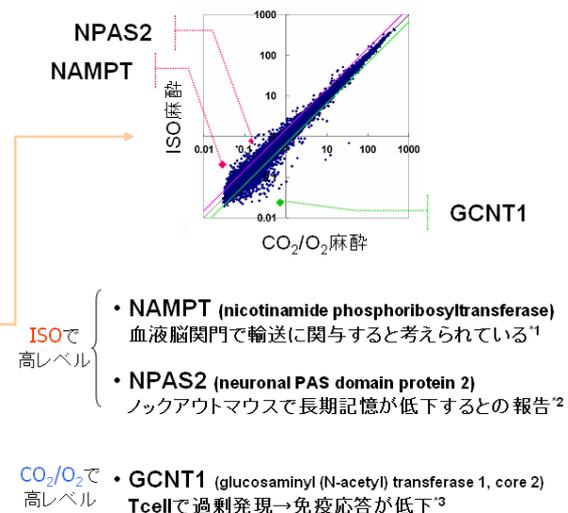
臓器	CO ₂ /O ₂ 混合麻酔	イソフルラン麻酔	
肝臓	0.983 ± 0.005	0.980 ± 0.010	
腎臓	皮質	0.983 ± 0.005	0.976 ± 0.002
	髄質外帯	0.979 ± 0.010	0.981 ± 0.002
	髄質内帯	0.987 ± 0.006	0.988 ± 0.002
	乳頭	0.984 ± 0.007	0.986 ± 0.004
脳	海馬歯状回	0.987 ± 0.004	0.981 ± 0.007
	脳梁	0.994 ± 0.004	0.976 ± 0.002
	帯状回	0.992 ± 0.005	0.995 ± 0.000
	小脳	0.987 ± 0.008	0.995 ± 0.002

■ 発現レベルが高かった遺伝子(プローブ数)*

臓器		CO ₂ /O ₂	ISO
	肝臓	141	68
腎臓	皮質	93	68
	髄質外帯	89	32
	髄質内帯	87	85
	乳頭	81	47
脳	海馬歯状回	75	178
	脳梁	166	112
	帯状回	43	65
	小脳	66	87

* $p < 0.05$ かつ 1.5倍以上 or 1/1.5倍以下

■ 海馬歯状回(CO₂/O₂混合vs ISO)



図(1)-7 麻酔間の遺伝子発現プロファイルの差異.

3. 主要臓器に対する一般毒性のバイオマーカー候補遺伝子の探索

3.1 被験物質

本プロジェクトの目標として一つの動物実験で様々な毒性エンドポイントをメカニズムベースに検出することがあり、効率的に研究成果を得るためには、1物質で複数の毒性を示す物質が望ましい。しかしながら、この条件に合致する化合物は非常に少ないために、各毒性エンドポイント(一般毒性/肝毒性、一般毒性/腎毒性、肝発がん性、腎発がん性)で優先順位をつけて化合物を選定することとした。また、先述の条件検討で腎臓の部位別採取が有効であることが分かったため、腎毒性に関する種々のMoA (Mode of Action)をカバーできるように幅広く陽性物質を選定した方が良いと考え、腎毒性を示す物質を優先的に選定することとし、これまでに14物質を選定した(表(1)-4及び図(1)-8)。

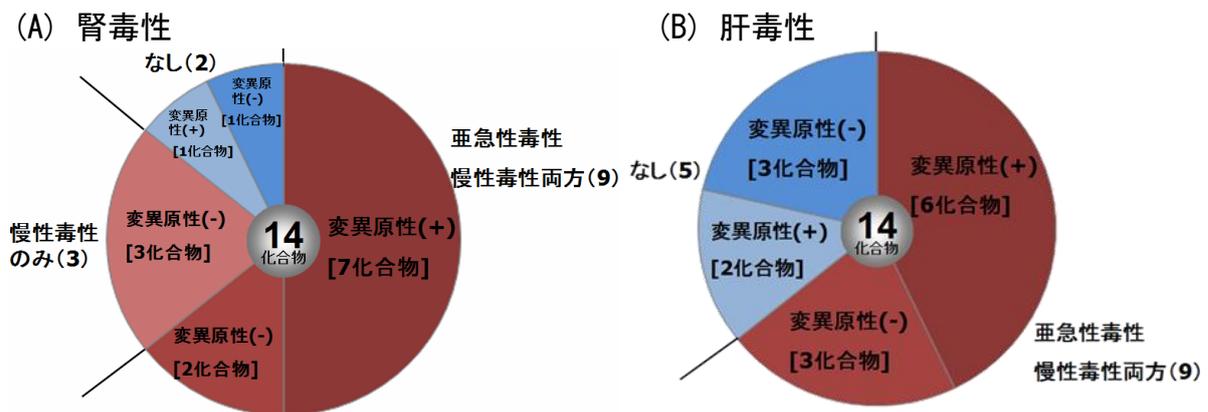
なお、BDCM及びTBAの2物質については、投与後28日目のみ、CO₂/O₂混合麻酔に加えて、化学物質投与後の生体において麻酔法の違いがどの程度影響するのかを調べるためにイソフルラン麻酔後の遺伝子発現プロファイルを取得した。そのため、データ数としては合計で16試験となった。

表(1)-4 被験物質(14物質)の既知の一般毒性情報及び本試験での投与量.

物質 #	略称	試験番号	一般毒性*		変異原性 Ames 試験	投与量 (mg/kg/day)
			肝臓	腎臓		
1	BDCM	B10-0092(C)	有	有	N	40, 200
		B10-0103(I)				
2	PP	B10-0093	有	有(慢毒)	N	200, 1000
3	o-NA	B10-0094	有	有	P	80, 400
4	2A4Np	B10-0095	有	有	P	150, 750
5	TBA	B10-0096-C	有	有	N	200, 1000
		B10-0096-I				
6	2-AA	B10-0097	影響なし	影響なし	N	200, 1000
7	o-AH	B10-0098	影響なし	影響なし	P	140, 700
8	TCEP	B10-0099	影響なし	有(慢毒)	N	80, 400
9	DBNPG	B10-0100	影響なし	有	P	200, 1000
10	Na3-NTA-H2O	B10-0101	影響なし	有(慢毒)	N	200, 1000
11	ADBAQ	B10-0102	有	有	P	200, 1000
12	AQ	B10-0104	有	有	P	200, 1000
13	TCP	B10-0105	有	有	P	15, 75
14	DMN	B10-0106	有	有	P	0.8, 4

P: 陽性、N: 陰性、(P): 雌ラット肝臓で陽性

* 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」、その中で慢性毒性のみを示す物質には「有(慢毒)」と記載.



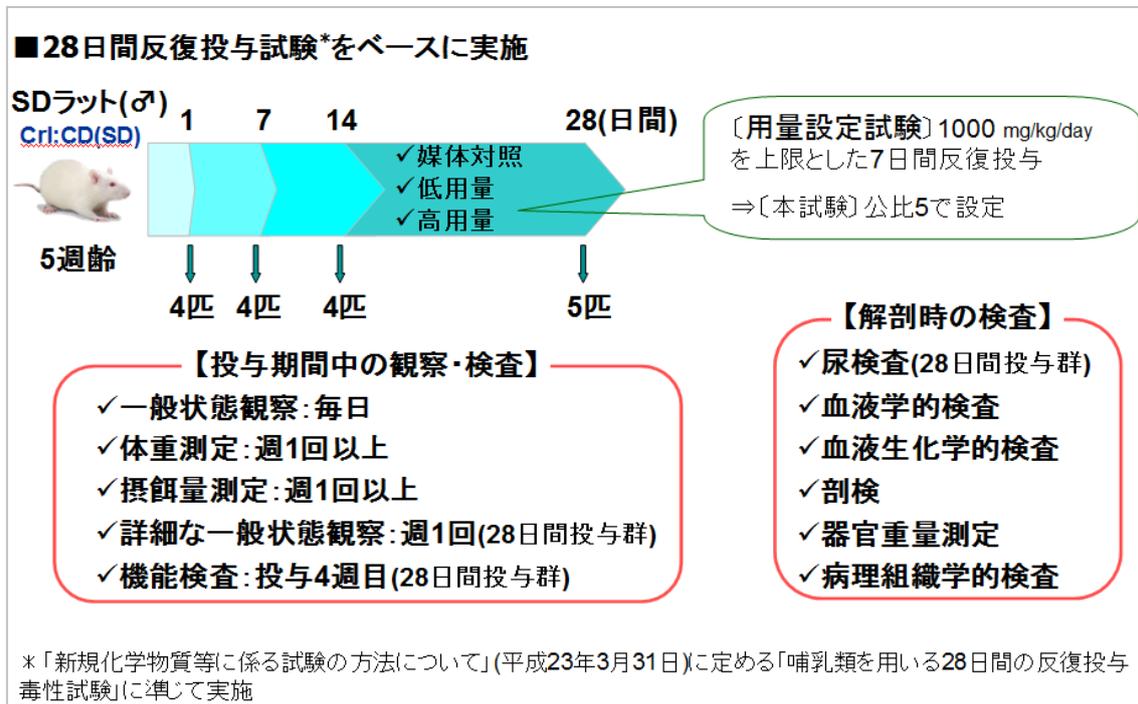
図(1)-8 14物質の毒性分類(一般毒性).

3.2 実験方法

3.2.1 動物実験

選定した14物質について、「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、1、7、14、もしくは28日間の反復投与毒性試験を行った。なお、BDCM及びTBAの2物質については28日間の反復投与後にイソフルラン麻酔を行い、目

的臓器を採取した(図(1)-9及び表(1)-5)。



図(1)-9 動物実験の概要.

表(1)-5 動物実験条件.

動物試験	動物種	ラット
	系統	CrI:CD (SD)
	性	雄
	週齢	投与開始時: 5週齢
	体重範囲	投与開始時: 平均体重±20%
	動物数	5匹/群(サテライト群; 4匹/群) *ただし、遺伝子発現量解析には3匹/群を用いる
	麻酔法	CO ₂ /O ₂ 混合麻酔(一部、イソフルラン麻酔)
試験物質	投与方法	強制経口投与
	用量	媒体対照+2用量
	投与期間	28日間(サテライト群として、1日、7日、14日間投与群を設定する)
	回復試験	なし
検査項目	観察(一般状態、詳細観察、機能観察、体重、摂餌量)、血液学的検査、血液生化学的検査、尿検査、病理学的検査(剖検、器官重量、病理組織学的検査)	
採材	遺伝子用	肝臓、腎臓、脾臓、胸腺、骨髄、脳 *所定の核酸安定化剤へ浸漬(4℃、24時間)し、-80℃保存。 脳は所定の方法で固定化
	タンパク用	脳 *氷冷後、速やかに-80℃保存

3.2.2 遺伝子発現量解析

RNA 抽出用に保存された各種臓器から total RNA を抽出した後、ND-1000 (NanoDrop)によって RNA 濃度を、バイオアナライザ(Agilent)によって RNA 品質を測定し、RNA 濃度としては 50 ng/ μ l、純度としては A260/280>1.8、A260/230 >1.5、RIN 値 (RNA Integrity Number) >7.0 を合格とした。また、マイクロアレイ実験は Agilent 社フォーマットを用いたカスタムアレイを使用し、その後のデータ解析には GeneSpring GX (Agilent)や Ingenuity Pathways Analysis 等を用いた(表(1)-6)。

表(1)-6 遺伝子発現量解析の実験条件.

実施項目		キットもしくは機器
RNA サンプルの調製	RNA 抽出	miRNeasy Mini Kit (QIAGEN)
	濃度測定	ND-1000 (NanoDrop)
	RNA 品質検査	RNA6000 Nano キット、RNA6000 Pico キット
遺伝子発現量解析	マイクロアレイ	Whole Rat Genome Toxplus Array ver. 1 (60K \times 8) Whole Rat Genome Toxplus Array ver. 2 (60K \times 8) * 61,537 プローブが搭載
	データ解析	GeneSpring GX ver 12.0 Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity) GeneMaths Ver.2.01 (Applied Maths)

さらに、中間目標には含まれていなかったものの、最終目標として掲げている肝毒性及び腎毒性の判定システムの構築について、これまでに実施した 16 試験 (14 物質)の遺伝子発現量データを用いて、プロトタイプを作成した。その解析条件については表(1)-7に示す。

表(1)-7 判定式構築の条件.

実施項目	実施内容
対象データ	16 試験(14 物質)
化合物のグループ化	階層的クラスタリング
バイオマーカー候補の選定	Welch' s t-test
判別式の構築	SVM (Support Vector Machine)
予測式の最適化	Random calculation

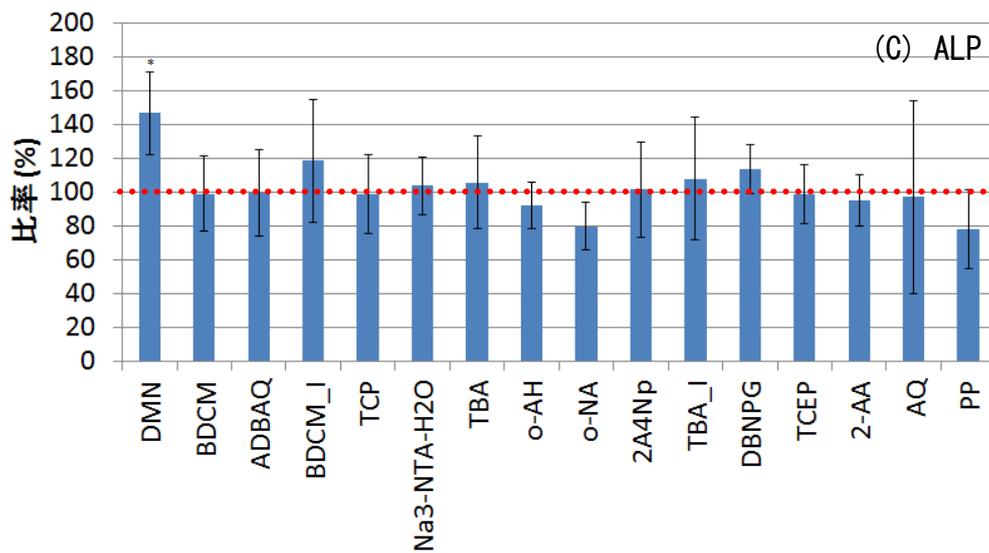
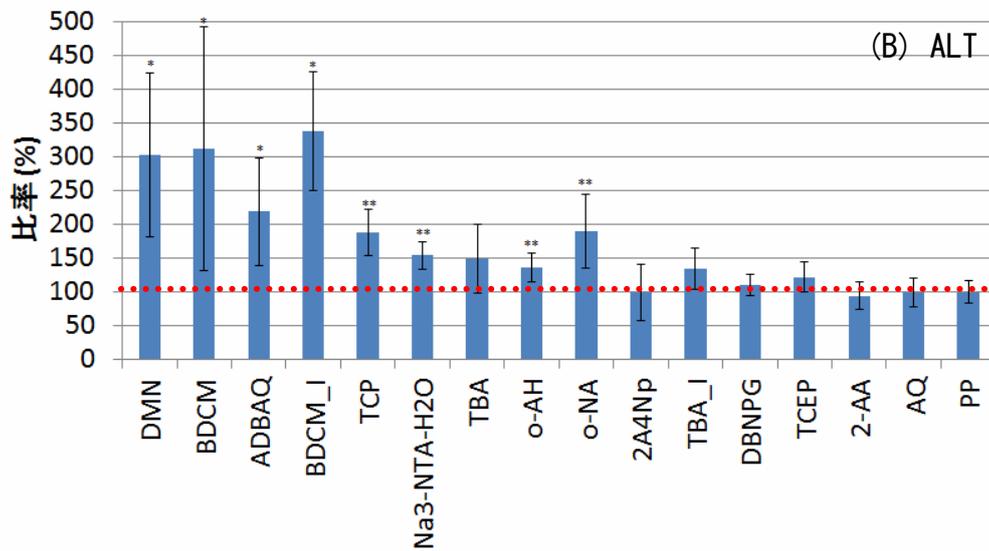
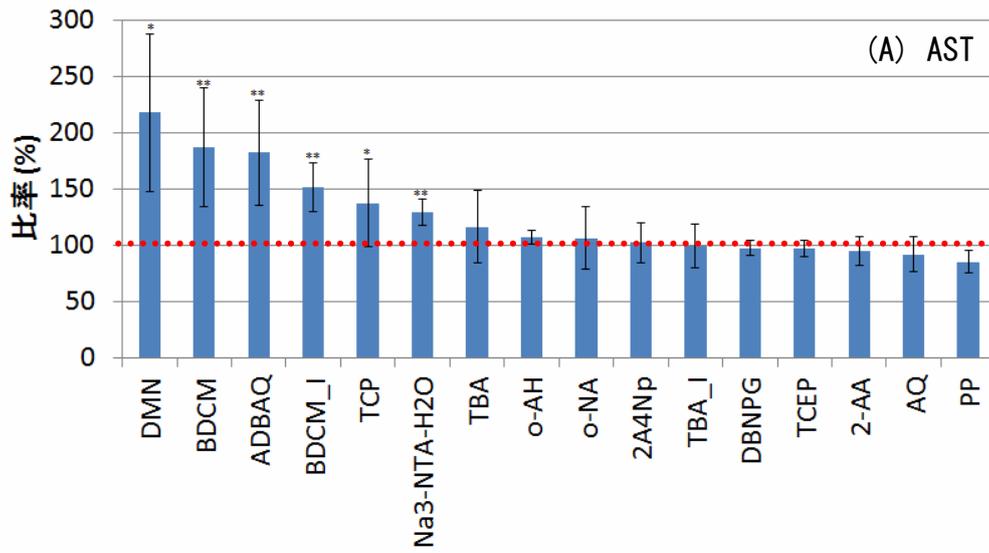
3.3 結果

3.3.1 肝毒性バイオマーカー候補の探索

3.3.1.1 動物試験結果

動物試験結果については、投与 28 日目の高用量群に注目してデータ解析を行った。肝毒性に関連した毒性パラメーターとして血液生化学的検査では AST、ALT、ALP を 16 試験(14 物質)について、媒体対照群に対する変化率をパーセンテージで表示した後、物質間の比較を行った。この際、AST レベルの高いものから化合物を並び替え、ALT 及び ALP についてもその順番に沿って表した。その結果、AST と ALP については、有意な増加を示す物質の重なりが多く、変化の程度も類似していたものの、ALP については、全体的に有意な増加もしくは減少を示した物質が少なかった(図(1)-10)。

次に病理組織学的検査で肝臓に何らかの所見がみられた物質を調べたところ、16 試験(14 物質)中、9 試験(8 物質)が該当した(表(1)-8)。血液生化学的検査と病理組織学的検査の結果を比較したところ、DMN, BDCM, ADBAQ, BDCM_I, TCP の 5 試験(4 物質)については何らかの病理所見が観察されており、かつ AST レベルが有意に増加していた上位 5 物質に全て含まれていた。特に DMN, BDCM, ADBAQ, BDCM_I の 4 試験(3 物質)については、共通して肝細胞単細胞壊死が観察されていた(図(1)-10 及び表(1)-8)。一方で、2A4NP 及び AQ については、AST、ALT、ALP の何れのパラメーターも有意な変化はみられなかったものの、病理所見では肝細胞肥大が共通して観察された(図(1)-10 及び表(1)-8)。これらの物質で観察された肝細胞肥大は化学物質投与による適用性応答である可能性が考えられた。



图(1)-10(続き) 血液生化学的検査(投与 28 日、高用量). * ; p < 0.05

表(1)-8 肝重量、剖検及び病理組織学的検査(投与 28 日、高用量).

物質名	重量 (相対)	剖検	病理組織学的検査
DMN	—	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 葉の小型化 (3/5) 変色部及び葉間癒着 (1/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞変性 (5/5) 肝細胞単細胞壊死 (5/5) 線維芽細胞増生 (5/5) リンパ球浸潤 (5/5) 類洞内ヘモジデリン沈着 (5/5) アポトーシス (4/5) 有糸分裂像増加 (3/5)
BDCM_I	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞脂肪変性 (5/5) 肝細胞単細胞壊死 (3/5) 小肉芽腫 (5/5)
BDCM	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞脂肪変性 (5/5) 肝細胞単細胞壊死 (5/5) 小肉芽腫 (5/5)
2A4NP	↑	—	<ul style="list-style-type: none"> 小葉周辺性肝細胞肥大 (5/5) くもり硝子変性 (4/5) 類洞内色素沈着 (1/5)
ADBAQ	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 暗褐色化 (1/5) 	<ul style="list-style-type: none"> びまん性肝細胞肥大 (5/5) くもり硝子変性 (5/5) 肝細胞単細胞壊死 (4/5) 小肉芽腫 (4/5)
TCP	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (4/5) 	<ul style="list-style-type: none"> びまん性肝細胞肥大 (5/5) 小葉中心性くもり硝子変性 (5/5)
AQ	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞肥大 (5/5) くもり硝子変性 (5/5)
o-AH	↑	—	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞肥大 (4/5) くもり硝子変性 (4/5)
o-NA	↑	<ul style="list-style-type: none"> 肝腫大 (5/5) 	<ul style="list-style-type: none"> 小葉中心性肝細胞肥大 (4/5) くもり硝子変性 (4/5)

↑ ; 媒体対照群に対して有意な増加を示した ($p < 0.05$). — ; 所見がみられなかった.

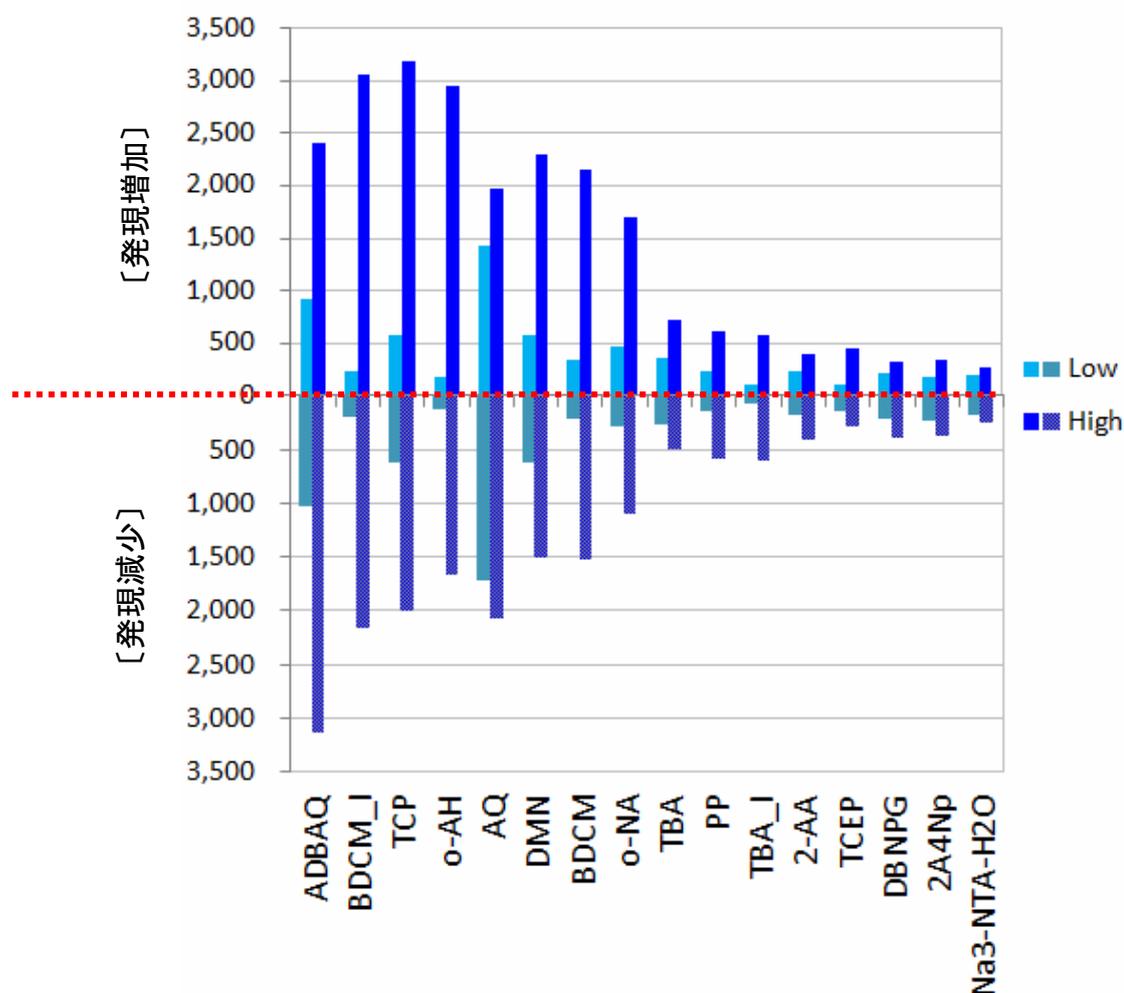
カッコ内の数値は所見がみられた動物の例数

3.3.1.2 遺伝子発現量解析及びバイオマーカー候補の探索

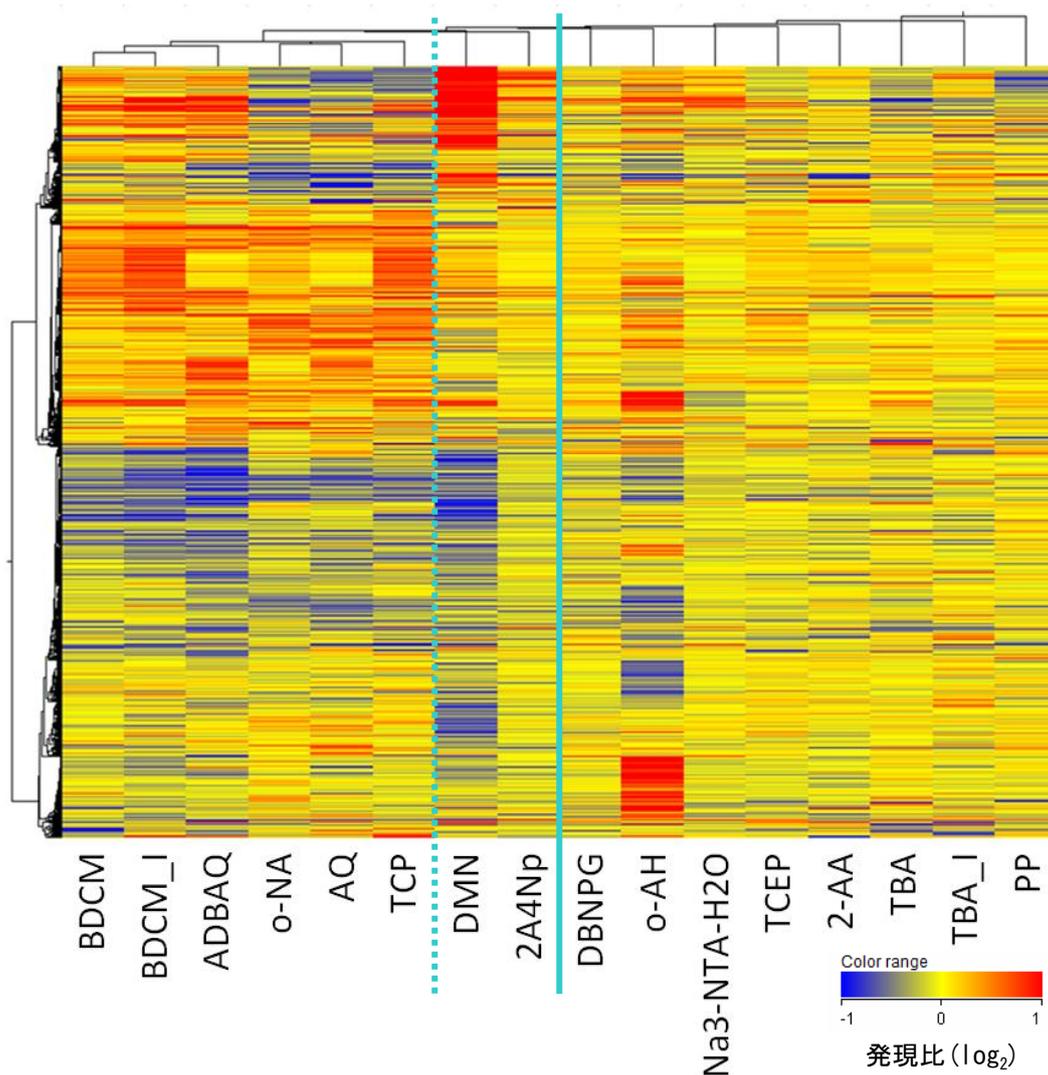
1、7、14、及び 28 日間反復投与後の肝臓から total RNA を抽出し、RNA 濃度、純度、及び品質が基準を満たしていることを確認した。その後、投与後 28 日目の検体について、媒体対照群、低用量群、高用量群の各 3 匹を用い、マイクロア

レイ実験 (Agilent Whole Rat Genome Toxplus, 60K×8) を行った。媒体対照群と投与群との間で有意差検定を行い、有意な発現変動を示す遺伝子を抽出し、そのプローブ数をカウントした。その結果、ADBAQ, BDCM_I, TCP, o-AH, AQ の順に高用量群の変動遺伝子数が多く最大で約 5,000 プローブの有意な変動がみられ、また、何れの物質も用量相関的に変動遺伝子数が増加していることが分かった (図(1)-11)。また、動物実験において何らかの病理所見を示す物質で変動遺伝子数が多い傾向にあった。

次に階層的クラスタリングによって化合物間の遺伝子発現プロファイルを比較したところ、BDCM_I, BDCM, ADBAQ, TCP, AQ, o-NA が比較的近いプロファイルを示すことが分かった (図(1)-12)。これらの物質群で共通した毒性所見を調べたところ、部分的に重なりのあるものはあったものの、6 試験 (5 物質) 全てに共通した所見は全くなかった。このことから、遺伝子発現プロファイルが全体的に類似していても、それらは様々な毒性症状の複合的な作用の結果である可能性が考えられた。そこで、動物試験結果と照合し、物質間で共通性の高い毒性症状に絞ってマーカー遺伝子を探索することとした。

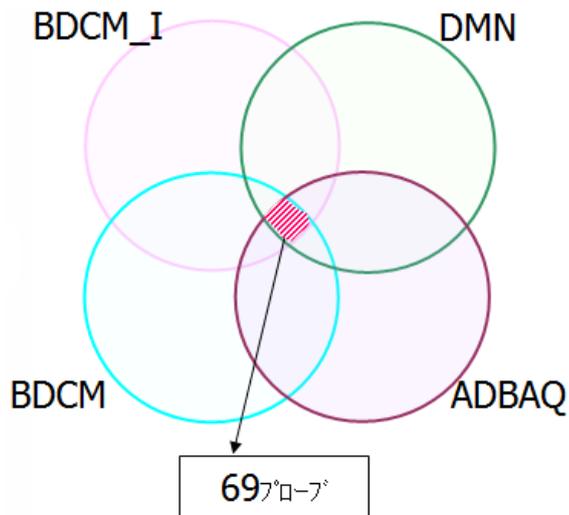


図(1)-11 有意な変動を示したプローブ数(肝臓、投与 28 日目)。

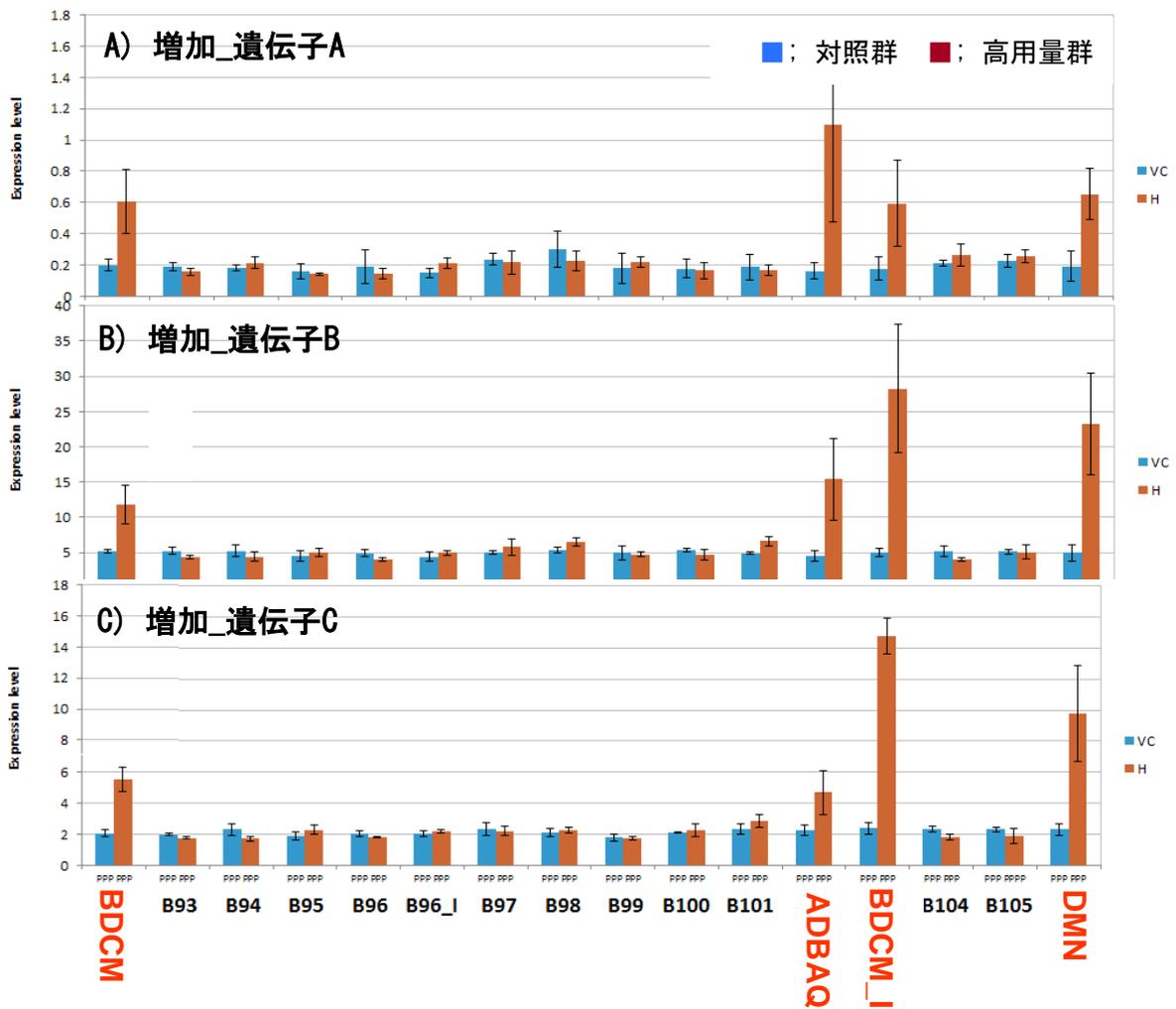


図(1)-12 遺伝子発現量データの階層的クラスタリング(肝臓、投与28日目).
 何れか1物質でも有意な変動を示した23,237プローブを用いた
 (distance metric ; Peason Uncentered, linkage rule ; Ward' s).

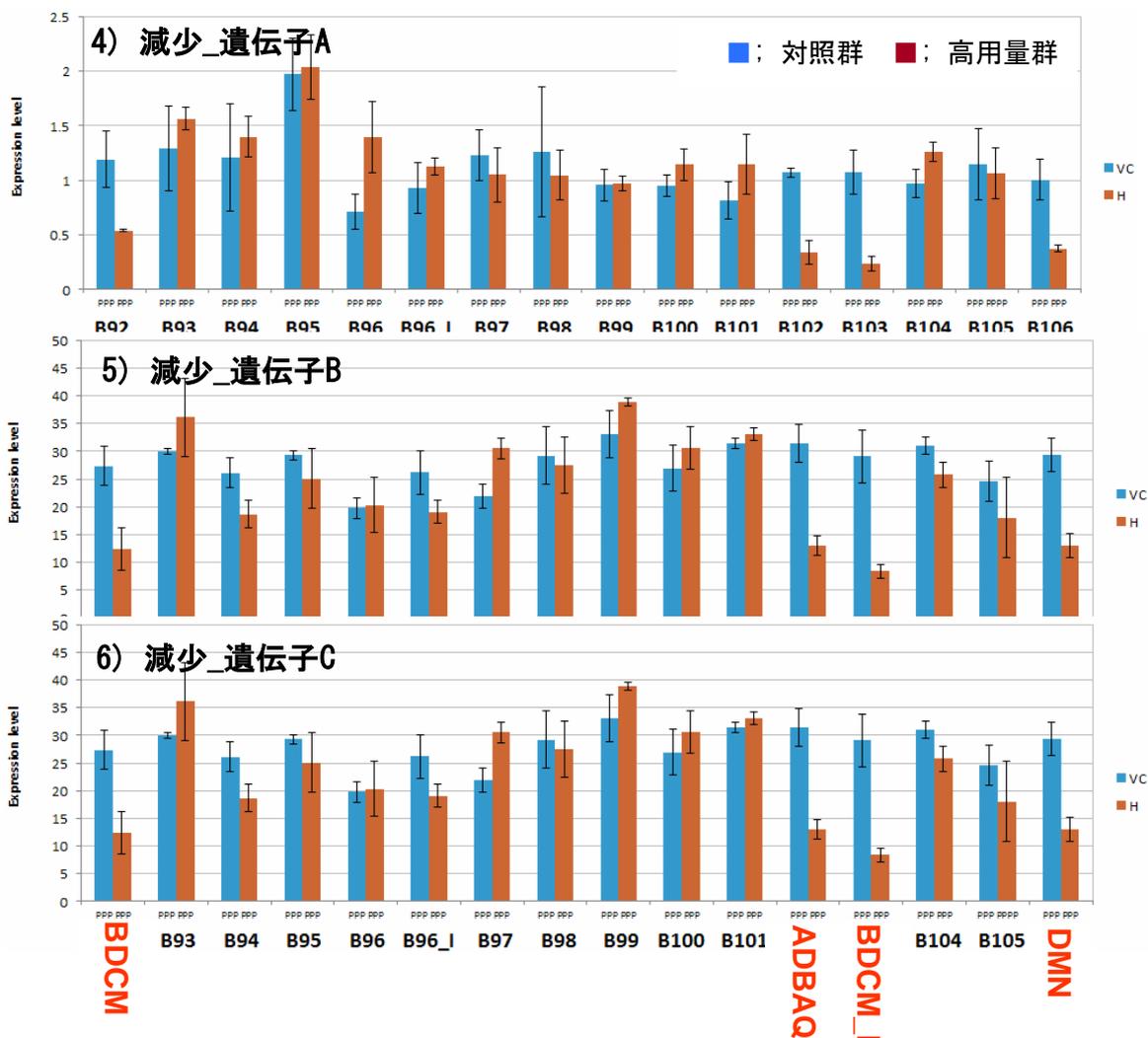
まず、共通性の高い毒性症状として、肝細胞単細胞壊死があり、DMN, BDCM, ADBAQ, BDCM_I の4試験(3物質)で観察された(表(1)-8)。そこで、これら4試験(3物質)で有意に発現変動した遺伝子群のベン図解析を行い、物質間の共通性について調べた。その結果、4試験(3物質)で共通して発現変動したものが69プローブ選定された(図(1)-13)。これらの遺伝子群について、発現変動幅の大きいものを調べたところ、発現増加及び減少ともに4試験(3物質)特異的に生じていることが分かった(図(1)-14)。そこで、これらの遺伝子群を肝細胞単細胞壊死のバイオマーカー候補とすることとした。



図(1)-13 4試験(3物質)間のベン図解析.



図(1)-14 肝細胞単細胞壊死のバイオマーカー候補遺伝子.



図(1)-14(続き) 肝細胞単細胞壊死のバイオマーカー候補遺伝子。

上記の検討から、肝細胞単細胞壊死が観察された化合物グループに共通して、かつ特異的に変動する遺伝子群を抽出することができたため、その他の毒性症状についても動物試験結果と遺伝子発現量データの照合を行い、ある毒性を示した化合物グループ特異的に変動する遺伝子群を同様の方法を用いて抽出した。その結果、肝細胞単細胞壊死以外に、肝細胞脂肪変性、肝細胞肥大(小葉中心性及びびまん性)、肝細胞肥大(小葉周辺性)について、それぞれ、45プローブ、87プローブ、165プローブがバイオマーカー候補遺伝子として選定された(表(1)-9)。

なお、肝細胞肥大については観察された部位の違い、すなわち「小葉中心性及びびまん性」と「小葉周辺性」では遺伝子発現プロファイルが大きく異なり、ベン図解析の結果では両者のバイオマーカー候補遺伝子の共通性は非常に乏しかった(データ示さず)。このことから、同じ肝細胞肥大が生じている場合でも、その部位の違いによって毒性メカニズムが異なる可能性が示唆された。

表(1)-9 バイオマーカー候補遺伝子(肝毒性).

#	毒性症状	毒性分類		バイオマーカー 候補遺伝子 (プローブ数)	陽性物質名
		陽性	陰性		
1	肝細胞単細胞壊死	4	12	69	BDCM, BDCM_I, ADBAQ, DMN
2	肝細胞脂肪変性	3*	13	45	BDCM BDCM_I, ADBAQ
3	肝細胞肥大	5	11	87	o-NA、o-AH、ADBAQ、AQ、TCP
4	肝細胞肥大 (小葉周辺性)	1*	15	165	2A4Np

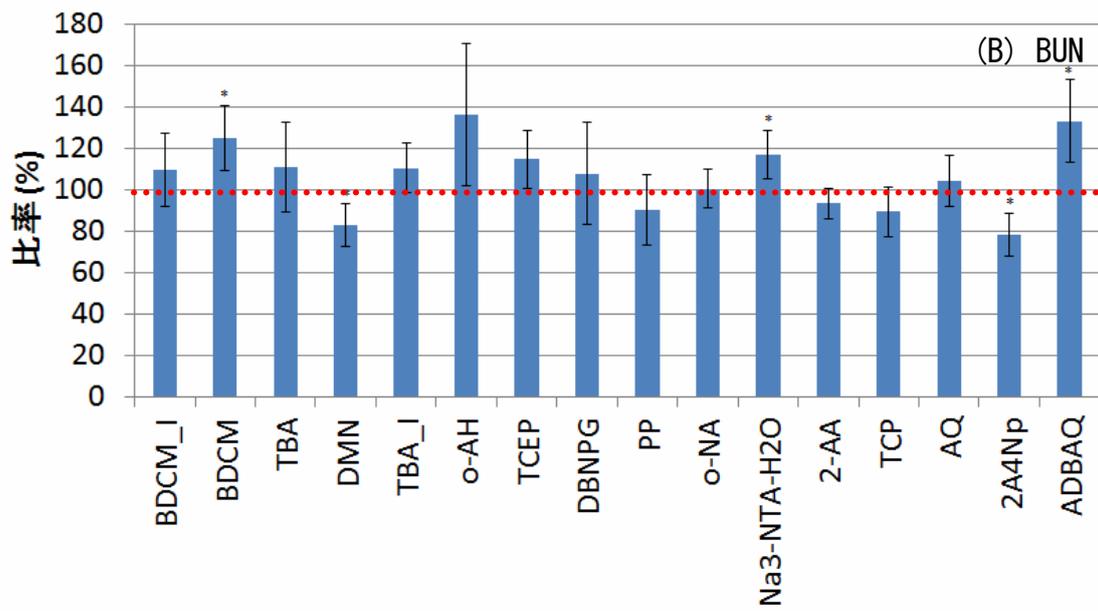
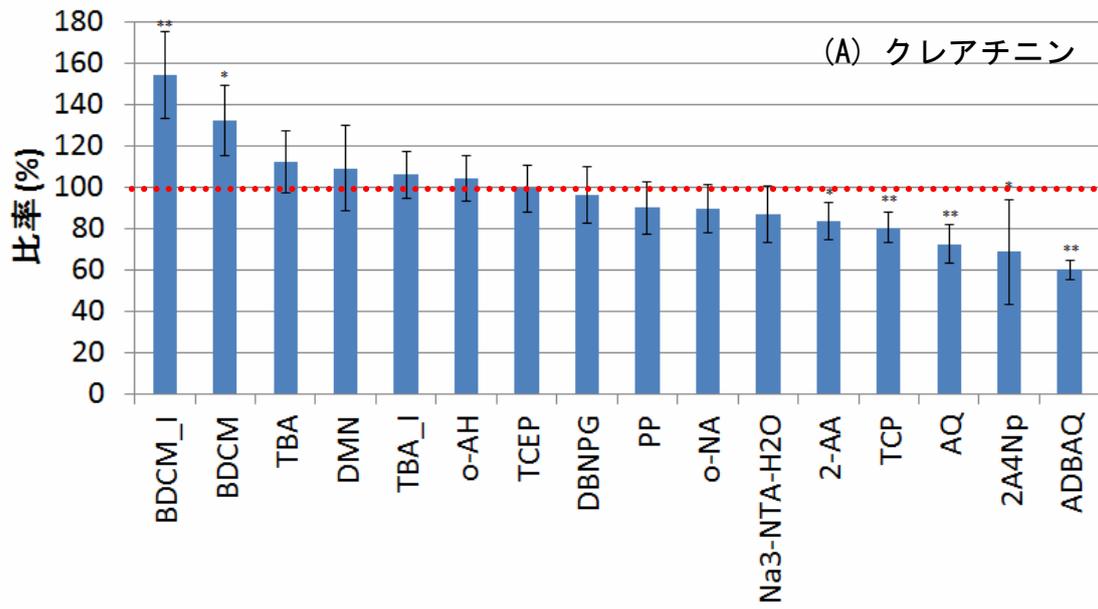
* 化合物数が少ないため、個体別データ (n=3) を用いた.

3.3.2 腎毒性バイオマーカー候補の探索

3.3.2.1 動物試験結果

動物試験結果については、投与 28 日目の高用量群に注目してデータ解析を行った。肝毒性に関連した毒性パラメーターとして血液生化学的検査ではクレアチニン、BUN を 16 試験 (14 物質) について、媒体対照群に対する変化率をパーセンテージで表示した後、物質間の比較を行った。この際、クレアチニンレベルの高いものから化合物を並び替え、BUN についてもその順番に沿って表した。その結果、クレアチニンと BUN の値はあまり相関しておらず、両方で同じような変化をしめた物質は BDCM (有意な増加) 及び 2A4Np (有意な減少) のみであった (図(1)-15)。

次に病理組織学的検査で腎臓に何らかの所見がみられた物質を調べたところ、16 試験 (14 物質) 中、10 試験 (8 物質) が該当した (表(1)-10)。血液生化学的検査と病理組織学的検査の結果を比較したところ、クレアチニンレベルが有意に高かった BDCM, BDCM_I では、剖検及び病理組織学的検査で共通した所見が観察されたものの、例数については一致しないものがあった (図(1)-15 及び表(1)-10)。また、BUN レベルは BDCM のみで有意な増加を示し、腎臓の相対重量は BDCM_I のみで有意な増加を示したことから腎毒性の程度としては必ずしも同じではなかった。その他の物質については、血液生化学的検査の結果と病理組織学的検査の間に関連性のあるものは見出せなかった。これは腎臓の組織構造が複雑であるために、化学物質による毒性メカニズムも複雑であることが関係しているものと考えられた。



図(1)-15 血液生化学的検査(投与 28 日、高用量). * ; $p < 0.05$

表(1)-10 腎重量、剖検及び病理組織学的検査(投与 28 日、高用量).

物質名	重量 (相対)	剖検	病理組織学的検査
BDCM_I	↑	腎臓腫大 (3/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の空胞変性 (4/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (4/5) ・皮質/近位尿細管の再生 (5/5)
BDCM	--	腎臓腫大 (1/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の空胞変性 (5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (2/5) ・皮質/近位尿細管の再生 (5/5)
TBA	↑	腎臓の表面点状模様明瞭 (4/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の硝子滴 (5/5) ・皮質/近位尿細管の核濃縮 (1/5)
TBA_I	↑	腎臓の表面点状模様明瞭 (2/5)	--
DMN	--	--	<ul style="list-style-type: none"> ・皮質/近位尿細管の核大小不同 (2/5) ・腎盂拡張 (1/5)
o-AH	--	<ul style="list-style-type: none"> ・暗褐色化 (5/5) ・腫大 (1/5) 	<ul style="list-style-type: none"> ・乳頭管好塩基性化 (4/5) ・乳頭壊死 (2/5) ・皮質/近位尿細管へモジデリン沈着 (5/5) ・皮質/遠位尿細管拡張 (2/5) ・皮質及び髓質/遠位尿細管拡張 (2/5) ・皮質/近位尿細管硝子滴 (2/5) ・皮質/近位尿細管再生 (2/5)
Na3-NTA-H2O	↑	・腫大 (1/5)	<ul style="list-style-type: none"> ・尿路上皮(移行上皮)過形成 (1/5) ・尿路上皮空胞化 (4/5) ・腎盂炎 (1/5)
AQ	↑	・腫大 (1/5)	・髓質外帯/近位尿細管空胞変性 (2/5)
2A4NP	--	<ul style="list-style-type: none"> ・暗褐色化 (4/5) ・腫大 (4/5) 	<ul style="list-style-type: none"> ・髓質外帯/近位尿細管の再生 (1/5) ・髓質外帯/色素沈着 (3/5)
ADBAQ	--	・暗褐色化 (5/5)	・皮質/近位尿細管色素沈着 (5/5)

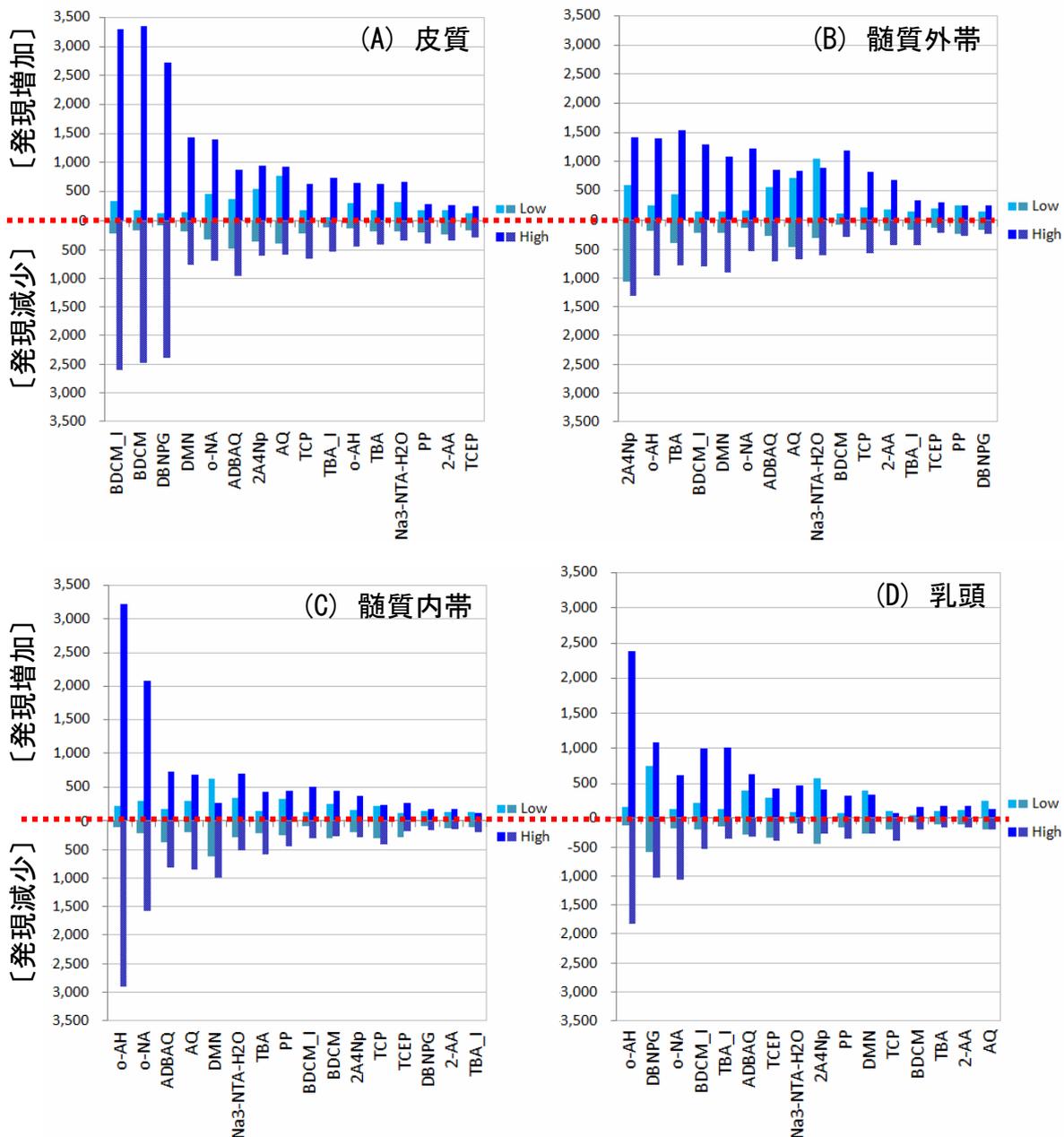
↑ ; 媒体対照群に対して有意な増加を示した ($p < 0.05$). -- ; 所見がみられなかった.

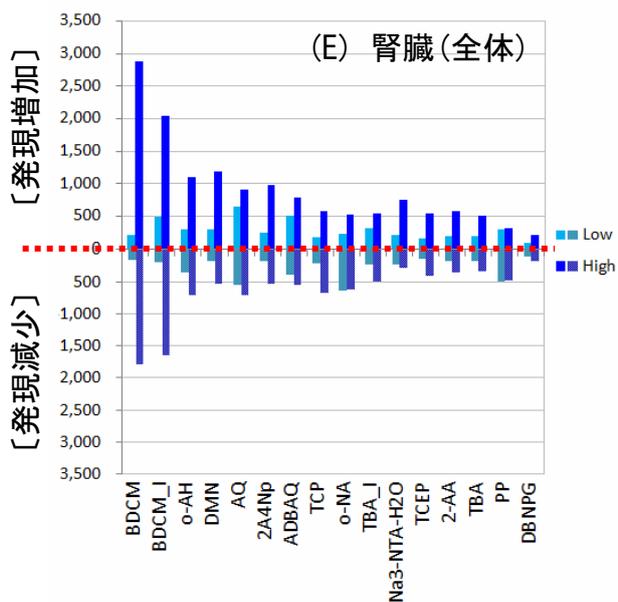
カッコ内の数値は所見がみられた動物の例数

3.3.2.2 遺伝子発現量解析及びバイオマーカー候補の探索

1、7、14、及び 28 日間反復投与後の腎臓を腎臓(全体)に加えて皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の 4 部位に分けて、それぞれから total RNA を抽出し、RNA 濃度、純度、及び品質が基準を満たしていることを確認した。その後、投与後 28 日目の検体について、媒体対照群、低用量群、高用量群の各 3 匹を用い、マイクロアレイ実験 (Agilent Whole Rat Genome Toxplus, 60K×8) を行った。

媒体対照群と投与群との間で有意差検定を行い、有意な発現変動を示す遺伝子を抽出し、そのプローブ数をカウントし、その数の多い物質から順に表示した。その結果、腎臓の各部位で変動遺伝子数の多い物質は異なっており、皮質では BDCM_I, BDCM, DBNPG が、髄質外帯では 2A4Np, o-AH, TBA が、髄質内帯では o-AH, o-NA, ADBAQ が、乳頭では o-AH, DBNPG, o-NA がそれぞれ上位 3 種に含まれていた(図(1)-16)。また、腎臓(全体)で変動遺伝子数の多かったものは BDCM_I 及び BDCM となり、皮質での遺伝子変動を反映する傾向を示した(図(1)-16)。また、腎臓(全体)での変動遺伝子数は最大で 4,500 プローブと、各部位での変動遺伝子数の総和より大幅に少ないことから、化学物質投与後に各部位で生じた遺伝子発現量変化が腎臓(全体)の RNA サンプルでは相殺されている可能性が考えられた。

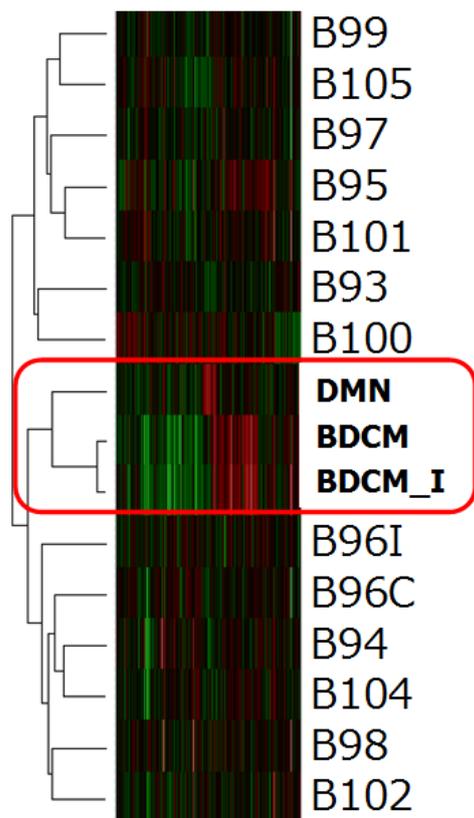




図(1)-16 有意な変動を示したプローブ数(肝臓、投与 28 日目)。

次に、動物試験結果と照合し、物質間で共通性の高い毒性症状に絞ってマーカ一遺伝子を探ることとした。この際、病理組織学的検査で多数の所見が観察された皮質と壊死が観察された乳頭に注目してデータ解析を進めた。まず、皮質の遺伝子発現量データを階層的クラスタリングによって化合物の分類を行ったところ、DMN, BDCM, BDCM_I の 3 物質が 16 試験(14 物質)の中で最も近いクラスターを形成した(図(1)-17)。そこでこれら 3 試験(2 物質)に共通した毒性症状を調べたところ、これら全てに共通したものはなかったものの、比較的共通性の高かった病理所見はいくつか見出され、それらは皮質・近位尿細管の空胞変性、核濃縮、核大小不同があることが分かった。そこでこれら 3 種の病理所見について詳細に調べたところ、空胞変性については、BDCM, BDCM_I の 2 試験(1 物質)のみで、核濃縮については、BDCM, BDCM_I の 2 試験(1 物質)に加えて TBA の 3 試験(2 物質)で、核大小不同については、DMN と TGP データに含まれる Monocrotaline の 2 物質で観察されていることが分かった(表(1)-11)。

上記 3 種の病理所見に特異的な遺伝子群を抽出するために、ベン図解析を行った。その結果、皮質・近位尿細管の空胞変性、核濃縮、核大小不同のそれぞれで 1,817 プローブ、50 プローブ、10 プローブが選定された(表(1)-12)。また、乳頭壊死については 2,019 プローブが選定された(表(1)-12)。これらの遺伝子群については、腎毒性の各症状のバイオマーカー候補遺伝子とすることにした。



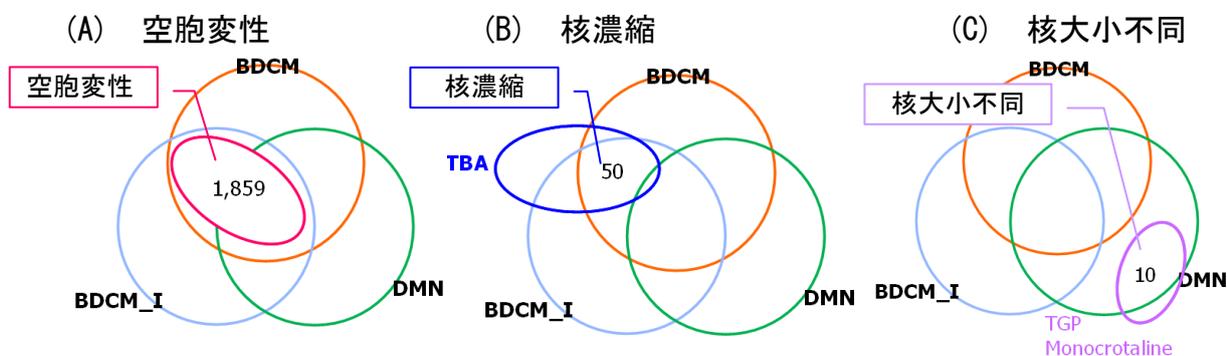
図(1)-17 遺伝子発現量データの階層的クラスタリング(皮質、投与 28 日目、高用量)

遺伝子数:20,709, log2ratio, 物質数:16, 処理群:高用量群, 解析条件:Pearson & Ward's

表(1)-11 物質間での病理所見の共通性.

物質	所見		
	皮質/近位尿細管		
	空胞変性	核濃縮	核大小不同
BDCM	○	○	--
BDCM_I	○	○	--
DMN	--	--	○
その他	--	TBA	Monocrotaline

○; 所見がみられた. --; 所見がみられなかった.



図(1)-18 物質間のベン図解析(皮質、投与 28 日目、高用量).

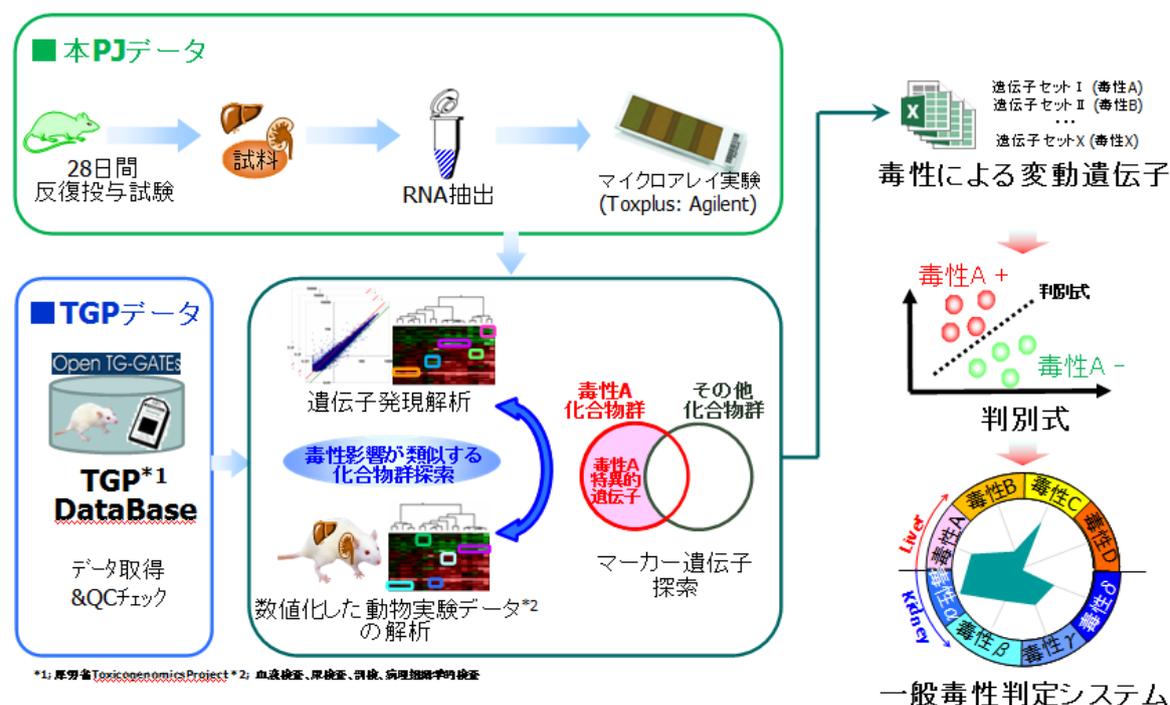
表(1)-12 バイオマーカー候補遺伝子(腎毒性).

#	部位	所見	毒性分類		バイオマーカー 候補遺伝子 (プローブ数)	陽性物質名
			陽性	陰性		
1	皮質	空胞変性	2*	14	1,859	BDCM, BDCM_I
2		核濃縮	3*	13	50	BDCM, BDCM_I TBA
3	近位尿細管	核大小不同	(2)*	15	10	DMN、MCT [TGP データ]
4	乳頭	壊死	1*	15	2,019	o-AH

* 化合物数が少ないため、個体別データ (n=3) を用いた。

4. 毒性判定システムの構築(プロトタイプ)

「3.3.1 肝毒性バイオマーカー候補の探索」及び「3.3.2 腎毒性バイオマーカー候補の探索」において、合計 8 種の病理所見について中間目標に掲げていたバイオマーカー候補遺伝子の選定を達成することができた。今後は最終評価に向けて、遺伝子発現量データから肝毒性もしくは腎毒性に関連した各種症状を判定できる高精度かつ簡易なシステムを構築しなければならないが、どのような形のものを開発するかは、本プロジェクトにおいて重要なポイントとなる。その際、一つの毒性し症状に複数のマーカー遺伝子が含まれている上、数多くの毒性症状を広く検出できるようにするには、マーカー遺伝子はさらに増加し、各毒性症状の判定も複雑になる。そこで、これまでに選定されたバイオマーカー候補遺伝子を利用して、毒性判定システムのプロトタイプの構築を試みた。



図(1)-19 毒性判定システム構築のストラテジー.

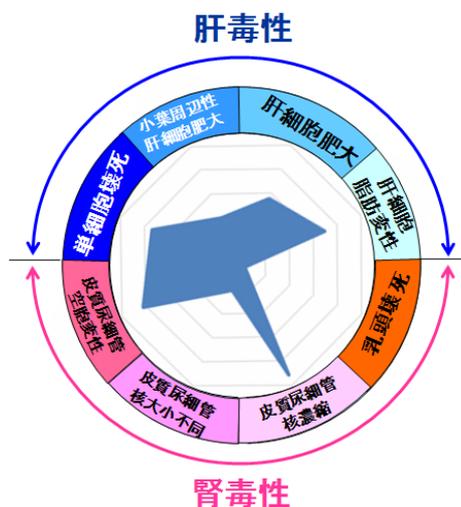
毒性判定システムを構築するためのストラテジーを図(1)-19 に示す。これまでの取り組みにより、本プロジェクトで取得した遺伝子発現量データと外部データである TGP データの遺伝子発現量データを活用し、毒性症状に関連したバイオマーカー候補遺伝子を選定してきた。そこで、それらの遺伝子群を用いて個別の毒性症状について判別式を構築した後、複数の毒性症状を一つの結果として表示させるために、レーダーチャート型の結果表示ができるようなシステム案を考えた。

まず、合計 8 種類の病理所見についてこれまでに選定したバイオマーカー候補遺伝子から、判別式構築のために最適なものに絞り込んだところ、7~75 遺伝子が選定された。次にそれらの遺伝子群について 8 種類の病理所見ごとに SVM (Support Vector Machine) を用いて判別式を構築した。その後、個別の判定結果をレーダーチャート形式で全てプロットすることで、化合物ごとに一つの結果として表示した(図(1)-20)。その後、レーダーチャート形式判定結果を 16 試験(14 物質)間で比較した。その結果、麻酔法が異なる BDCM と BDCM_I、TBA と TBA_I では非常に類似した予測結果が得られた(図(1)-21)。BDCM と BDCM_I と同様に肝毒性と腎毒性を両方示した DMN と o-AH については、それら 2 試験と判定結果の形状が異なることから毒性影響が異なることが分かった(図(1)-21)。また、肝毒性のみを示す 5 物質については、AQ, TCP, o-NA の 3 物質の形状が比較的類似していた(図(1)-21)。なお、ADBAQ と AQ は基本骨格にアントラキノンをもつ構造類縁体で、両方とも肝毒性を有するものの、発がん性については ADBAQ のみが陽性を示すことが分かっている。本判別式においては、両者のレーダーチャートの形状は大きく異なることから、28 日間投与の段階で両者の毒性影響の差が遺伝子レベルで生じていることが分かった。また、肝毒性も腎毒性も示さなかった 6 物質については、全体的にレーダーチャートの形状が小さかったことから、実際の毒性影響を反映しているものと思われる。

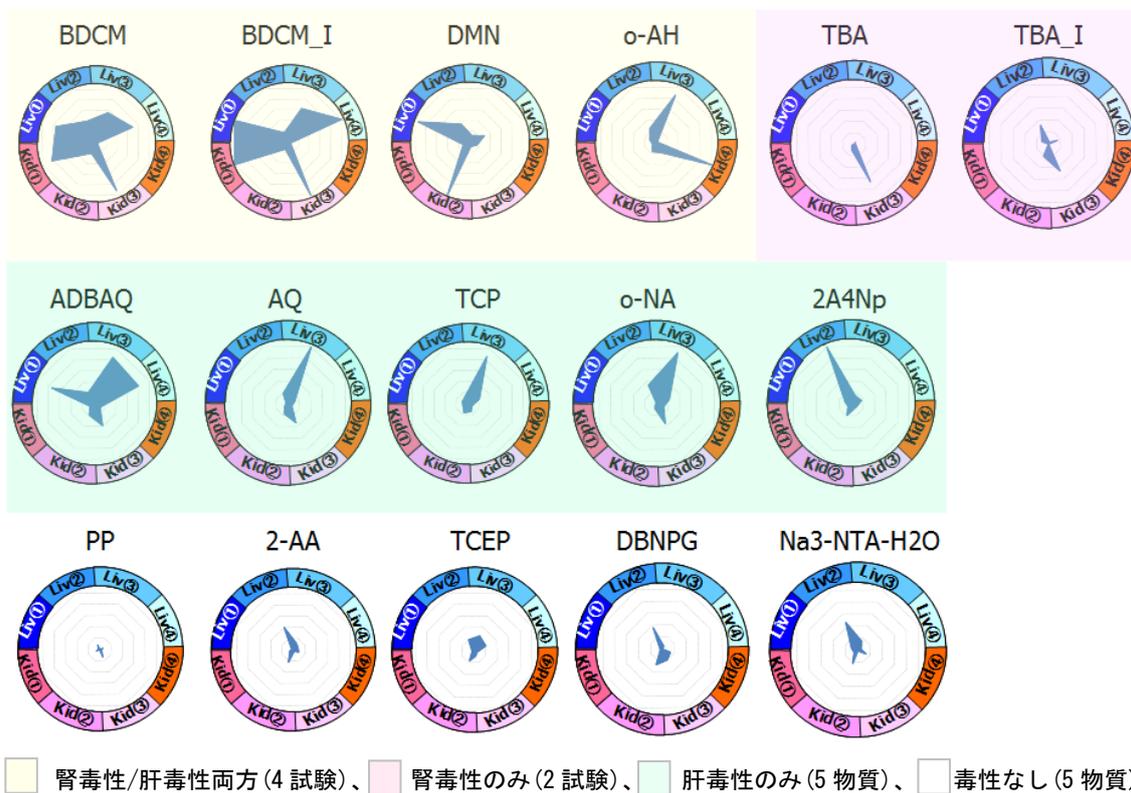
今回検討した毒性判定システムのプロトタイプについては、視覚的に毒性影響を俯瞰して捉えることができるため、非常に有用な方法であると考えられる。また、今後さらに毒性エンドポイントが増加していく場合でもシステムとして対応できるため、拡充性も兼ね備えたシステムを考案することができた。

表(1)-13 判別式構築に用いた遺伝子数.

#	臓器	部位	所見	毒性分類		判別式に用いた遺伝子数
				陽性	陰性	
1	肝臓	-	単細胞壊死	4	12	13
2			肝細胞脂肪変性	3*	13	13
3			肝細胞肥大	5	11	75
4			小葉周辺性肝細胞肥大	1*	15	7
5	腎臓	皮質 近位尿細管	空胞変性	2*	14	15
6			核濃縮	3*	13	14
7			核大小不同	(2)*	15	9
8			乳頭	壊死	1*	15



図(1)-20 レーダーチャート形式での判別結果の表示(例; BDCM).



図(1)-21 肝毒性及び腎毒性の判定結果.

Liv①: 肝細胞単細胞壊死 Liv②: 小葉周辺性肝細胞肥大 Liv③: 肝細胞肥大、Liv④: 肝細胞脂肪変性、
Kid①: 皮質尿管空砲変性 Kid②: 皮質尿管核大小不同、Kid③: 皮質尿管核濃縮 Kid④: 乳頭壊死

5. 最終評価に向けての今後の取り組み

今後は、試験物質数を増やして今回選定された遺伝子群の再現性を確認することで、今回選定されたバイオマーカー候補遺伝子の精度を高め、さらなる絞込みを行い、最終選定を進めていく必要がある。具体的には、本年度は10試験(9物質)のデータが取得できるため、本年度末までに累計データ数が26試験(23物質)となり、最終評価までに30-40試験分のデータを取得する予定である。また、それらの遺伝子群を使って、遺伝子発現量データから肝毒性及び腎毒性に関連した各種症状を判定できる高精度かつ簡易なシステムを構築する。その際、腎臓については、試験ごとに部位別採取及び遺伝子発現量データを取得することは、コスト面でも作業面でも負担が大きいため、今後はバイオマーカー遺伝子について、各部位で得られた遺伝子発現レベルと腎臓(全体)で得られた遺伝子発現レベルを比較して関係性を見出すことで、新たな補正式を構築し、将来的には腎臓(全体)の遺伝子発現量データのみで部位別に生じた毒性を高精度に検出できるシステムにする予定である。

また、これまでの成果として合計8種の毒性症状についてバイオマーカー候補遺伝子を選定でき、さらに「4. 毒性判定システムの構築(プロトタイプ)」により、

最終的なアウトプットについて具体化することができたため、今後さらに毒性症状の種類を増やし、広く肝毒性及び腎毒性を検出できるようなシステムに高めていく予定である。

6. 評価項目に対する自己評価

・ 得られた成果は何か。

腎臓の部位別採取方法(皮質、髓質外帯、髓質内帯、乳頭)及び部位別の遺伝子発現量データを取得することができ、腎臓からの採取方法についてプロトコルを確立できた。

主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性の高精度化及び精緻化に向けて、肝毒性に関しては肝細胞単細胞壊死、肝細胞脂肪変性、肝細胞肥大、肝細胞肥大(小葉周辺性)の4種の毒性症状について、45~165プローブのバイオマーカー候補を選定することができた。腎毒性に関しては、皮質近位尿細管の空胞変性、核濃縮、核大小不同、乳頭壊死の4種の毒性症状について、10~2,019プローブのバイオマーカー候補を選定することができた。

・ 設定された目標以外に得られた成果はあるか。

麻酔法の検討によりこれまで採用してきたCO₂/O₂混合麻酔に加え、イソフルラン麻酔法も適用できることを示した。また、TGPデータの本法への適用を検討し、適用可能であることが分かったため、TGPで実施していたエーテル麻酔も適用できることが確認でき、実験条件の拡充を図ることができた。

また、試験条件の検討によって、腎臓を部位別に採取して個別に遺伝子発現量解析を行うことが有効と判断されたため、化学物質投与後の腎臓についても全て部位別採取を行うことに決定して研究を進めた。これにより、腎臓の組織特異的な毒性についてより詳細な遺伝子発現量データを取得できるようになり、動物実験で得られた表現型に近い結果を得ることができるようになった。一例として、2-Amino-4-nitrophenolの腎臓・髓質外帯特異的に生じた毒性について、動物試験結果と遺伝子発現量データを部位別に照合して考察し、毒性メカニズムの推定を行うことができ、外部発表を行った。

最終評価に掲げている「各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立」について、どのような形のものを開発するかは、本プロジェクトにおいて重要なポイントとなるが、この点について、これまでに得られた16試験(14物質)のバイオマーカー候補遺伝子を利用して、毒性判定システムのプロトタイプ構築を試みた。その結果、複数の毒性症状を一つの結果としてみることで、レーダーチャート式に判定結果を表示し、視覚的に毒性影響を俯瞰して捉えることができるシステムを考案した。

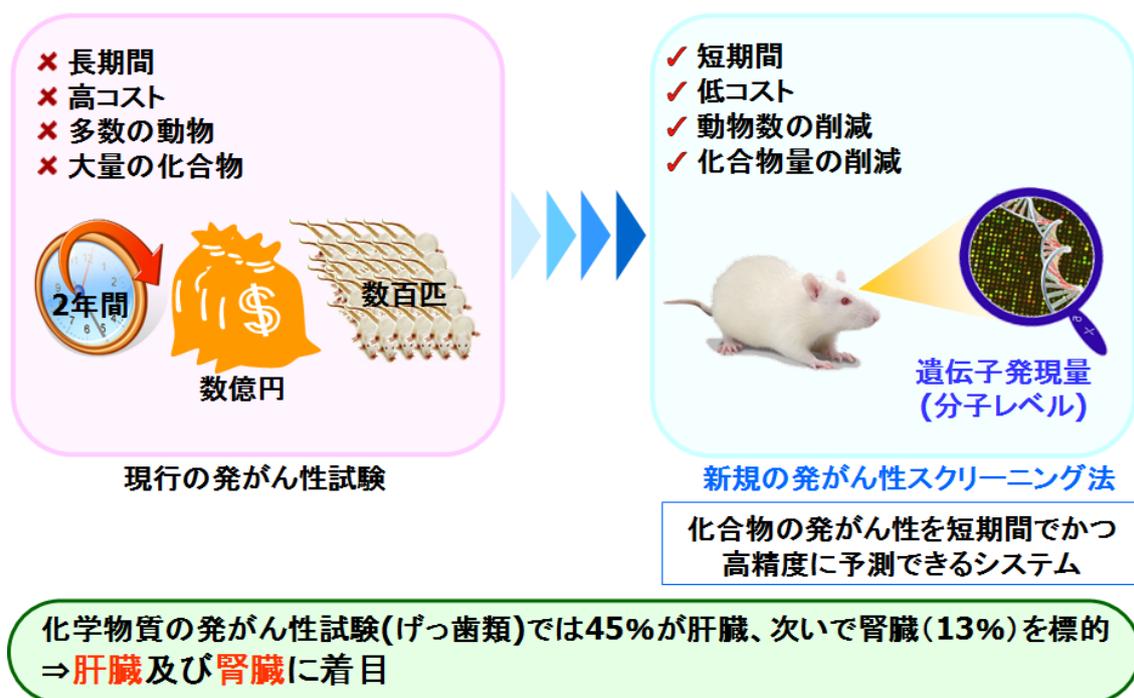
・共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成（OECDでの活動）、プロトタイプの作製等があったか。（3-1-3参照）

本プロジェクトの概要及び成果については、2012年にOECD会議での発表を行った。また、腎臓の部位別採取方法や腎臓の組織特異的に生じる毒性と遺伝子発現量変化との関係性については、論文作成中である。

(2) 発がん性

1. 研究開発の概要

化学物質による発がん性は非常に重要な毒性エンドポイントであるにも関わらず、現行の発がん性試験では長期間の投与実験(2年間)を行うため、多数の実験動物及び大量の化合物が必要となり、非常に高コストで負担の大きいものになっている(図(2)-1)。そのため、ガイドラインに沿った方法で実施された発がん性試験は1,000物質にも満たないのが現状である(NTP; National Toxicology Program)。そこで本研究では、化学物質による発がん性で標的性の高い肝臓及び腎臓に着目し、短期間かつ低コストの新規発がん性スクリーニング手法の開発を試みた。具体的には肝臓及び腎臓の遺伝子発現量をマイクロアレイで網羅的に調べることで、早期の発がんマーカー遺伝子を探索し、その変動から長期間投与によって将来的に起こる発がん性を予測することを目標にした。

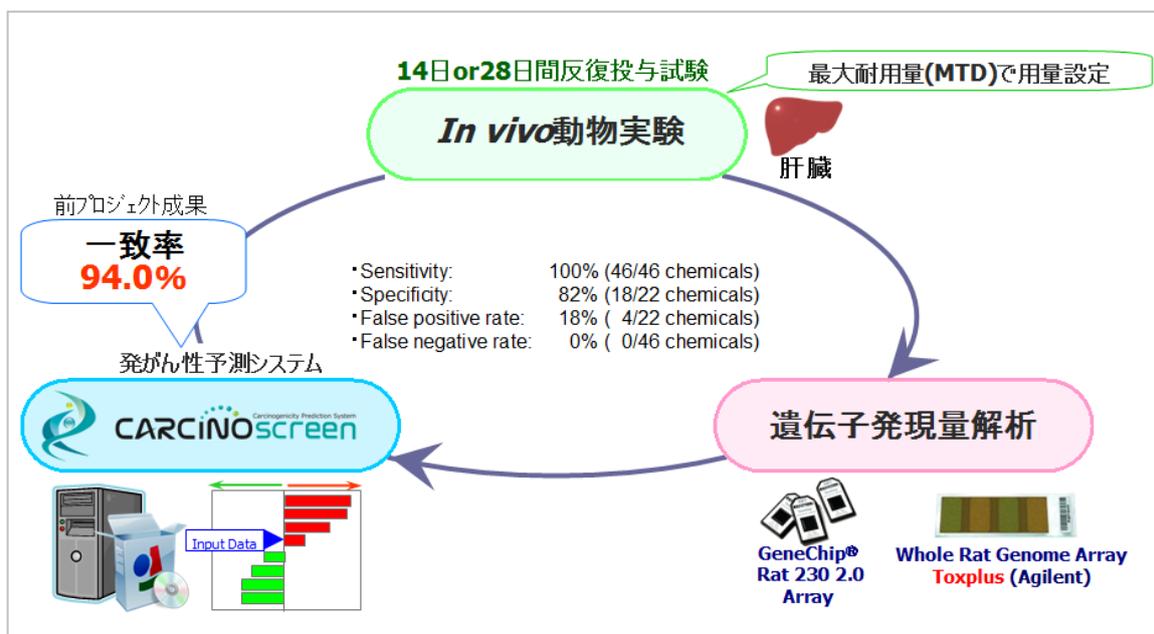


図(2)-1 研究開発のストラテジー(発がん性).

これまでに前身のプロジェクトを通じて肝臓を標的とした発がん性については、14日間もしくは28日間の反復投与試験後の肝臓サンプルの遺伝子発現量データから、94%の一致率で発がん性を予測できるシステムを既に構築し、CARCINOscreen[®]と名付けた(図(2)-2)。そこで、肝臓については、このCARCINOscreen[®]の精度を確認するため、外部データの取得を行い、発がん性の予測を行うこととした。具体的には、本プロジェクトで得られた16試験(14物質)の肝臓に遺伝子発現量データのCARCINOscreen[®]への適用を行った。次に

外部機関で動物実験及びマイクロアレイ実験を実施して取得された遺伝子発現量データ；TGP データを本システムに供して、どの程度の一致率を示すかを調べた。さらに、本システムの適用範囲を明確化するため、既存の発がん性スクリーニング手法である中期発がん性試験及び Bhas-42 試験 (*in vitro*系)との比較を行った。

腎臓については、本プロジェクトで短期発がん性予測手法の開発を開始するため、化学物質投与後の遺伝子発現量データの取得から始めることとした。この際、「(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性」での検討で、腎臓組織の部位別採取が有効であることが示されたため、腎発がん性予測のためのマーカー遺伝子探索についても部位別に取得された遺伝子発現量データを活用することにした。



図(2)-2 これまでに開発した短期の肝発がん性予測システムの概要。

2. 短期発がん性予測手法の開発

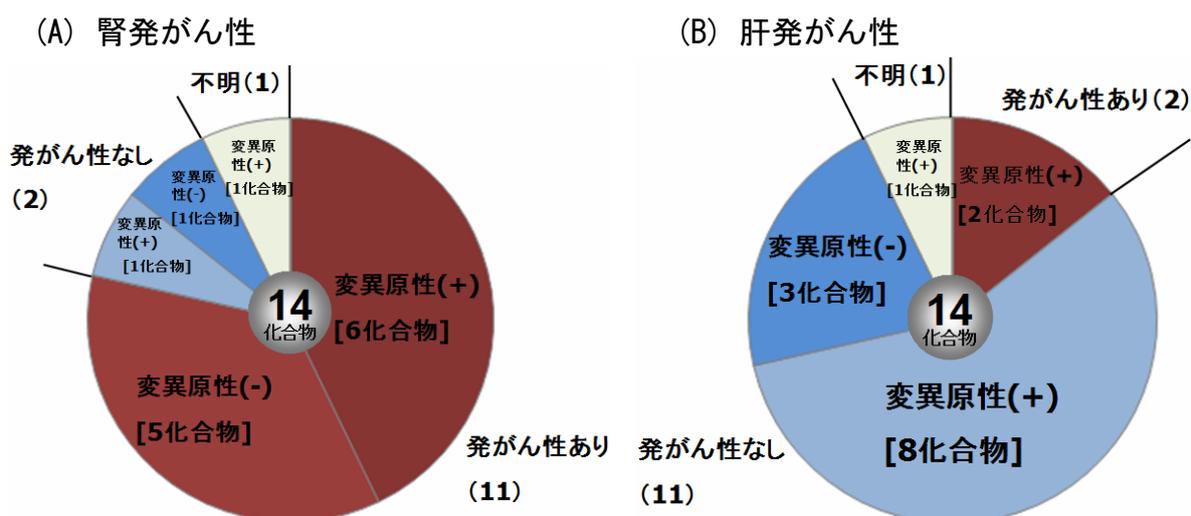
2.1 被験物質

肝臓及び腎臓の遺伝子発現量データについては、「(1) 主要臓器(肝臓・腎臓)に対する一般毒性」で取得した 16 試験(14 物質)のデータを活用した。それらの化学物質の既知の発がん性情報については、表(2)-1 及び図(2)-3 に示す。なお、腎臓については早期の発がん性バイオマーカー探索から始めるため、腎発がん性を示す物質を優先的に選択した。

表(2)-1 被験物質(14物質)の発がん情報.

物質#	略称	CAS	試験番号	発がん性		変異原性 Ames 試験
				肝臓	腎臓	
1	BDCM	75-27-4	B10-0092 B10-0103	(P)	P	N
2	PP	77-09-8	B10-0093	N	P	N
3	o-NA	91-23-6	B10-0094	N	P	P
4	2A4Np	99-57-0	B10-0095	N	P	P
5	TBA	75-65-0	B10-0096 (C) B10-0096 (I)	N	P	N
6	2-AA	118-92-3	B10-0097	N	N	N
7	o-AH	134-29-2	B10-0098	N	P	P
8	TCEP	115-96-8	B10-0099	E	P	N
9	DBNPG	3296-90-0	B10-0100	N	P(膀胱)	P
10	Na3-NTA-H2O	18662-53-8	B10-0101	N	P(膀胱)	N
11	ADBAQ	81-49-2	B10-0102	P	P	P
12	AQ	84-65-1	B10-0104	N	P	P
13	TCP	96-18-4	B10-0105	N	P	P
14	DMN	62-75-9	B10-0106	P	P	P

P: 陽性、N: 陰性、(P): 雌ラット肝臓で陽性



図(2)-3 14物質の毒性分類(発がん性).

2.2 実験方法

2.2.1 動物実験

「(1)3.2.1 動物実験」に記載した内容と同じ方法で実施した。

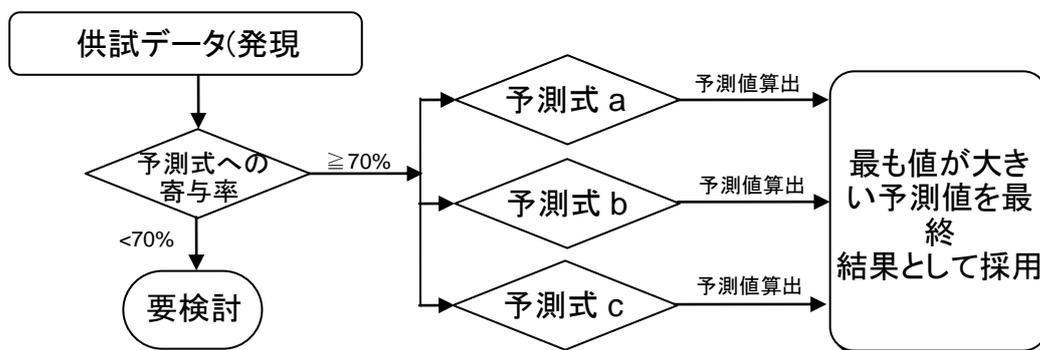
2.2.2 遺伝子発現量解析

「(1)3.2.2 遺伝子発現量解析」に記載した内容と同じ方法で実施した。

2.2.3 発がん性予測システムの構築

2.2.3.1 肝発がん(予測システムの検証)

取得した肝臓の遺伝子発現量データが CARCINOscreen[®]に供することができるかを確認するために、解析可能と判断された予測遺伝子の寄与率を集計した。CARCINOscreen[®]予測システムは、発がん性のメカニズム別に構築した3種類の異なる発がん性予測式から成り立っているため(Matsumoto et al., 2009; Matsumoto et al., 2011)、各発がん性予測式について寄与率が70%以上を示した場合を合格とした(図(2)-4)。次に、CARCINOscreen[®]予測システムに含まれる全ての発がん性予測式にアレイデータを供し、最も値が大きな予測値(PVC値; the Prediction Value of CARCINOscreen[®])を最終結果として採用した。



図(2)-4 CARCINOscreen[®]予測システムの概要.

また、TGP データについては、発がん性の有無が明確になっている40物質について14日間反復投与試験を行ったものを用いて(表(2)-2及び表(2)-3)、本システムによって予測を行った。

表(2)-2 実験条件(TGP データ).

項目	内容
生物種/系統/性別	Crj:CD(SD) IGS ラット、雄
投与開始時の週齢	6 週齢
動物 実験	用量設定 公比 $\sqrt{10}$
	群構成 媒体対照、低用量、中用量、高用量(3 匹/群)
	投与期間 14 日間反復投与
	麻酔方法 エーテル麻酔
GE	マイクロアレイ GeneChip [®] Rat Genome 230 2.0 Array

表(2)-3 TGP データの化合物一覧.

#	化合物	略称	投与量 (mg/kg/day) ^{*1}			TD ₅₀ ^{*2}	C ^{*3}	M ^{*4}
			L	M	H			
1	2-Acetamidofluorene	2AAF	30	100	300	1.22	+	+
2	Carbon tetrachloride	CCL4	30	100	300	529	+	-
3	Clofibrate	CFB	30	100	300	169	+	-
4	Ethanol	ETN	400	1,200	4,000	9,110	+	-
5	Ethionine	ET	25	80	250	5.24	+	-
6	Fenofibrate	FFB	10	100	1000	--	+	?
7	Gemfibrozil	GFZ	30	100	300	247	+	?
8	Hexachlorobenzene	HCB	30	100	300	3.86	+	-
9	Methapyrilene	MP	10	30	100	9.13	+	-
10	Monocrotaline	MCT	3	10	30	0.94	+	-
11	N-Nitrosodiethylamine	DEN	3	10	30	0.052	+	+
12	Phenobarbital	PB	10	30	100	--	+	+
13	Tamoxifen	TMX	6	20	60	--	+	?
14	Thioacetamide	TAA	4.5	15	45	11.5	+	-
15	WY-14643	WY	10	30	100	--	+	?
16	Allopurinol	APL	15	50	150	--	-	?
17	Allyl alcohol	AA	3	10	30	--	-	-
18	Aspirin	ASA	45	150	450	--	-	-
19	Chlorpheniramine	CHL	3	10	30	--	-	?
20	Cimetidine	CIM	100	300	1,000	--	-	?
21	Coumarin	CMA	15	50	150	--	-	+
22	Cyclosporine A	CSA	10	30	100	--	-	-
23	Disulfiram	DSF	60	200	600	--	-	-

24	Etoposide	ETP	3	10	30	--	—	?
25	Furosemide	FUR	30	100	300	---	—	—
26	Glibenclamide	GBC	100	300	1,000	---	—	?
27	Ibuprofen	IBU	20	60	200	---	—	?
28	Isoniazid	INAH	50	100	200	---	—	+
29	Labetalol	LBT	45	150	450	---	—	?
30	Metformin	MFM	100	300	1,000	---	—	?
31	Methyldopa	MDP	60	200	600	---	—	?
32	Pemoline	PML	7.5	25	75	---	—	?
33	Penicillamine	PEN	100	300	1,000	---	—	?
34	Perhexiline	PH	15	50	150	---	—	?
35	Promethazine	PMZ	20	60	200	---	—	?
36	Ranitidine	RAN	100	300	1,000	---	—	?
37	Tannic acid	TAN	100	300	1,000	---	—	+
38	Tetracycline	TC	100	300	1,000	---	—	?
39	Theophylline	TEO	20	60	200	---	—	—
40	Tolbutamide	TLB	100	300	1,000	---	—	—

*1 L: 低用量, M: 中用量, H: 高用量.

*2 TD₅₀: ラット肝臓における TD₅₀ 値 (mg/kg/day; carcinogenic potency database) で, --はラット肝臓の TD₅₀ 値が得られなかったものを示す.

*3 C: ラット肝臓がん性(2年間の投与試験)の結果で+が陽性、-が陰性を示す.

*4 M: 変異原性(Ames)の結果で+が陽性、-が陰性、?が情報がなかったものを示す.

2.2.3.2 腎発がん

早期の腎発がん性に関連する遺伝子の探索は表(2)-4に記載の方法で実施した。

さらに、中間目標には含まれていなかったものの、最終目標として掲げている腎発がん性の予測システムの構築について、これまでに実施した16試験(14物質)の遺伝子発現量データを用いて、プロトタイプを作成した。その解析条件については表(2)-5に示す。

表(2)-4 判定式構築の条件.

実施項目	方法	補足情報
対象データ	16 試験(14 物質)	—
化合物のグループ化	階層的クラスタリング	—
バイオマーカー候補の選定	Welch' s t-test	<ul style="list-style-type: none"> ・全ての物質で A フラグを示す遺伝子を除外 ・発がん性物質と非発がん性物質群との間で有意差検定を実施して遺伝子候補(1 次)を選定 ・1 次選定リストで発がん性物質グループの 70% 以上の物質で変動*し、かつ非発がん性物質群の 40% 以下の物質でのみ変動する遺伝子(1.5 倍以上もしくは 1/1.5 倍以下)を候補遺伝子として選定

表(2)-5 腎発がん性予測式構築の条件.

実施項目	実施内容
対象データ	16 試験(14 物質)
判別式の構築	SVM (Support Vector Machine)
予測式の最適化	Random calculation

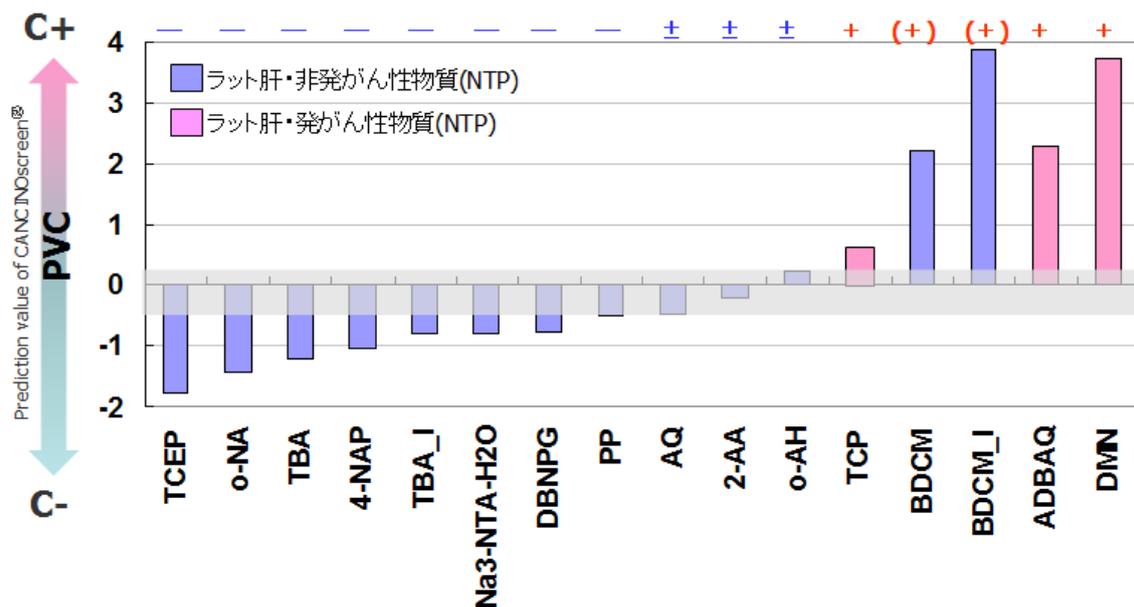
2.3 結果

2.3.1 肝発がん性の短期予測手法の開発

2.3.1.1 本プロジェクトで取得した遺伝子発現量データ

本プロジェクトで取得した 16 試験(14 物質)の 28 日間反復投与後の肝臓における遺伝子発現量データを CARCINOscreen[®]へ供して PVC 値を算出した。その結果、既知の肝発がん性物質である ADBAQ 及び DMN については正しく発がん性ありと予測された(図(2)-5)。雌ラットの肝臓で発がん性を示す BDCM は CO₂/O₂ 混合麻酔の場合でもイソフルラン麻酔の場合でも発がん性ありと判定された(図(2)-5)。非発がん性物質については、全ての物質において陰性(-)もしくは Marginal (±)と判定され、発がんの可能性は低いことが遺伝子発現量データによる予測でも確認できた(図(2)-5)。なお、既知の発がん性情報では Equivocal とされていた TCP について、本システムでの予測結果は PVC 値としては既知の発がん性物質に比べると低かったものの、発がん性あり(+)となった。

これらの結果より CARCINOscreen[®]は陰性物質を含めて高い予測精度を示すことが確認できた。



図(2)-5 CARCINOscreen®による予測結果(肝臓、28日目、高用量)。

CARCINOscreen®の判定結果で+が陽性(カッコ付きは雌ラット肝臓で陽性)、±がMarginal、-が陰性を示す。

2.3.1.2 TGP で取得された遺伝子発現量データ

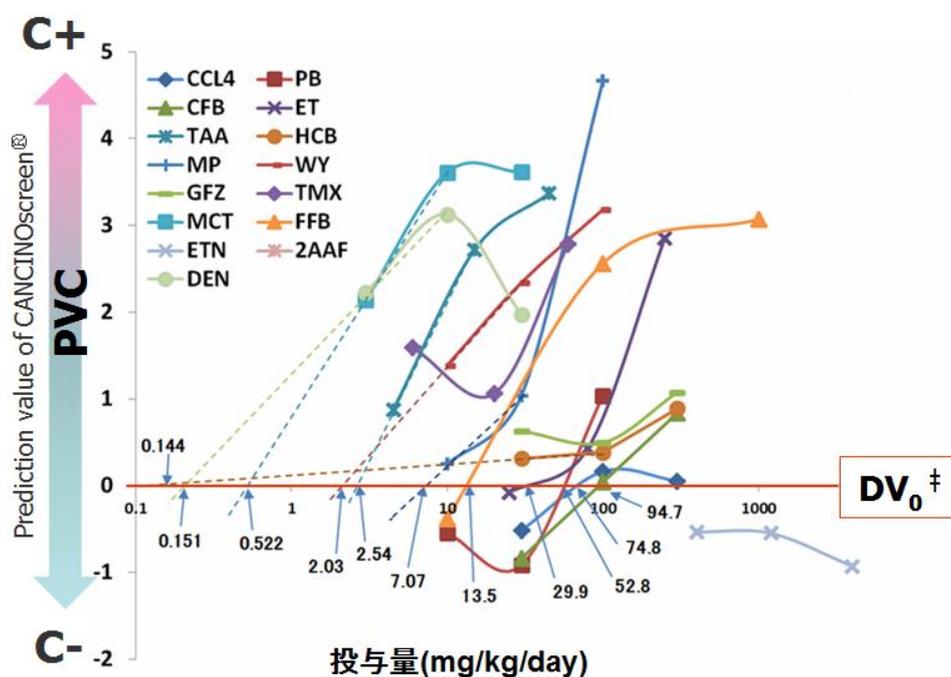
外部機関で取得された遺伝子発現量データに対する CARCINOscreen®の適用性を調べるために、TGP データベースである TG-GATE から、40 物質の 14 日間反復投与試験後の肝臓の遺伝子発現量データ (GeneChip®を使用) をダウンロードし、データチェックを行った後、媒体対照群に対する投与群(低用量、中用量、高用量)の発現比を算出した。それらのデータを CARCINOscreen®に供して一致率を調べたところ、低用量群で 85%、中用量群で 95%、高用量群で 92.5% と高い予測結果を得ることができた(表(2)-6)。次に、発がん性を示す 15 物質について、CARCINOscreen®で得られた PVC 値と用量との関係性を調べた。その結果、低用量群では発がん性なし(陰性)と判定される物質がいくつかみられ、全体的に用量相関的に PVC 値が増加する傾向を示すことが分かった(図(2)-6)。このことが、表(2)-6 で得られた予測結果において、低用量群では陽性一致率が 60%と低かった原因となり、全体の一致率が 3 用量群の中で最も低いことに繋がっていた。一方で、高用量群では陽性一致率が 93.3%と 3 用量群の中で最も高かったものの、陰性一致率は中用量では 100%だったのに対し、高用量群では 92.0%と低下した(表(2)-6)。このことから、全体の一致率では中用量群で 95% だったのに対して高用量群では 92.5%と若干値が下がったことが分かった。これらの検討より、投与量と CARCINOscreen®による予測結果(PVC 値)にはある一定の関係性があることが示唆された。

そこで、3 用量の用量反応曲線から PVC 値が 0(ゼロ)になる投与量、すなわち DV₀ 値を算出し、既存の発がん性試験で得られている TD₅₀ 値との相関性を調べた。その結果、両者の相関係数は 0.8 を示し、比較的高い値を示すことが分

かった(図(2)-7)。以上の結果より、CARCINOscreen[®]による予測結果(PVC値)で定量的評価ができる可能性が示唆された。

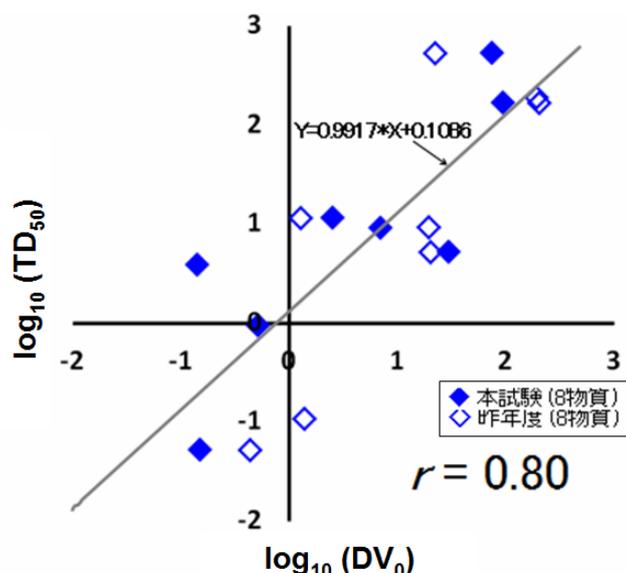
表(2)-6 TGPデータの予測結果.

	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)



図(2)-6 PVC値と用量との関係性(15物質、肝臓、14日目).

‡ DV₀: Doses at which the predictive Value curves crossed zero.



図(2)-7 DV_0 値と TD_{50} 値との相関性.

2.3.1.3 他の発がん性スクリーニング手法との比較

次に、新たに開発した CARCINOscreen[®]の適用範囲を確認するため、既存の発がん性のスクリーニング手法として用いられている中期発がん性試験及び Bhas42 試験 (*in vitro*)との結果の比較を行った。なお、予測結果の比較については、両試験で予測結果が得られているものに限定し、中期発がん性試験では 11 物質(参考データとしてさらに 9 物質)、Bhas42 試験では 22 物質について比較を行った。その結果、中期発がん性試験との比較では、両試験ともラット肝臓を標的とした発がん性物質で、変異発がん性物質(3 物質)及び非変異発がん性物質(7 物質)を全て正しく予測することができた。また、非発がん性物質(1 物質)についても両試験で陰性と正しく判定できた(表(2)-7)。参考データとしてラット肝臓以外の臓器もしくは生物種を標的とする発がん性物質について予測結果を比較したところ、CARCINOscreen[®]では全て陽性と判定されたものの、中期発がん性試験では、一部の物質を陰性と判定した(表(2)-7)。

次に *in vitro* 系の発がん性スクリーニング手法である Bhas42 試験との比較を行った。その結果、Bhas42 試験では非変異発がん性物質の 3 物質、ラット肝臓以外の発がん性物質の 1 物質、陰性物質の 3 物質の合計 7 物質が正答しなかった(表(2)-8)。CARCINOscreen[®]ではラット肝臓以外の発がん性物質の 2 物質、陰性物質の 1 物質の合計 3 物質が正答しなかった(表(2)-8)。ここでも CARCINOscreen[®]では、非変異発がん性を含むラット肝臓発がん性物質及び非発がん性物質の検出力が高いことが確認できたものの、ラット肝臓以外を標的とした発がん性物質に対する検出力が低い結果が得られた。

このことから、CARCINOscreen[®]ではラット肝臓で発がん性を示す物質、特に非変異発がん性物質の検出力は高く、非発がん性物質の検出力も高い一方で、他生物種や他臓器で発がん性を示す物質の検出力が低いことが分かった。

表(2)-7 中期発がん性試験との予測結果の比較.

#	Chemicals	C ^{*1}	Cr ^{*2}	Muta ^{*3}	発がん性予測結果	
					中期発がん ^{*4}	CARCINO ^{*4}
1	Quinoline	C+	Cr+	M+	+	+
2	Safrole	C+	Cr+	M+	+	+
3	MelQx	C+	Cr+	M+	+	+
4	Phenobarbital	C+	Cr+	M-	+	+
5	Hexachlorobenzene	C+	Cr+	M-	+	+
6	α-Hexachlorocyclohexane	C+	Cr+	M-	+	+
7	Thioacetamide	C+	Cr+	M-	+	+
8	Urethane	C+	Cr+	M-	+	+
9	Chlorendic acid	C+	Cr+	M-	+	+
10	DDT	C+	Cr+	M-	+	+
11	Caprolactam	C-	Cr-	M-	-	-
1	PhIP	C+	Cr-	M+	-	+
2	7,12-Dimethylbenz [a]anthracene	C+	Cr-	M+	-	+
3	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	+	+
4	Aldrin	C+	Cr-	M-	+	+
5	Di(2-ethylhexyl)adipate	C+	Cr-	M-	-	+
6	d-Limonene	C+	Cr-	M-	+	+
7	Trichloroacetic acid	C+	Cr-	M-	-	+
8	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	+	+
9	Dieldrin	C+	Cr-	M-	+	+

*1 C: げっ歯類における発がん性で C+が陽性、C-が陰性. *2 Cr: ラット肝臓における発がん性で Cr+が陽性、Cr-が陰性. *3 Muta: 変異原性(Ames test)で M+が陽性、M-が陰性. *4: 予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」。中期発がん性試験は Hasegawa R. et al., 1992 より引用. CARCINOscreen®は ToxIII, 投与 28 日目の結果を示す.

表(2)-8 Bhas42 試験 (*in vitro*) との予測結果の比較.

#	Chemicals	C ^{*1}	Cr ^{*2}	Muta ^{*3}	発がん性予測結果	
					Bhas42 ^{*4}	CARCINO ^{*4}
1	2,4-Diaminotoluene	C+	Cr+	M+	+	+
2	2-Acetylaminofluorene	C+	Cr+	M+	+	+
3	1,4-Dioxane	C+	Cr+	M-	-	+
4	Methyl carbamate	C+	Cr+	M-	-	+
5	Urethane	C+	Cr+	M-	-	+
6	Benz[a]anthracene	C+	Cr-	M+	+	+
7	3-Methylcholanthrene	C+	Cr-	M+	+	+
8	Benzo[a]pyrene	C+	Cr-	M+	+	+
9	Quercetin	C+	Cr-	M+	+	-
10	MNNG	C+	Cr-	M+	+	-
11	d-Limonene	C+	Cr-	M-	+	+
12	Diethylstilbestrol	C+	Cr-	M-	-	+
13	2,6-Diaminotoluene	C-	Cr-	M+	-	-
14	8-Hydroxyquinoline	C-	Cr-	M+	+	-
15	2-Chloroethanol	C-	Cr-	M+	-	-
16	p-Phenylenediamine 2HCl	C-	Cr-	M+	-	-
17	4-Acetylaminofluorene	C-	Cr-	M+	-	+
18	D-Mannitol	C-	Cr-	M-	-	-
19	Caprolactam	C-	Cr-	M-	-	-
20	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	+	-
21	Benzoin	C-	Cr-	M-	+	-
22	Tetracycline hydrochloride	C-	Cr-	M-	+	-

*1 C: げっ歯類での発がん性で C+が陽性、C-が陰性. *2 Cr: ラット肝臓における発がん性で Cr+が陽性、Cr-が陰性. *3 Muta: 変異原性(Ames test)で M+が陽性、M-が陰性. *4: 予測結果を示しており、発がん性ありと判定されたものは「+」、発がん性なしと判定されたものは「-」。Bhas42 assay (Sakai A. et al., 2010) の Initiation assay 若しくは Promotion assay の何れかで Positive であれば発がん性あり、両 assay で Negative であれば発がん性なし. CARCINOscreen®は ToxIII, 投与 28 日目の結果を示す.

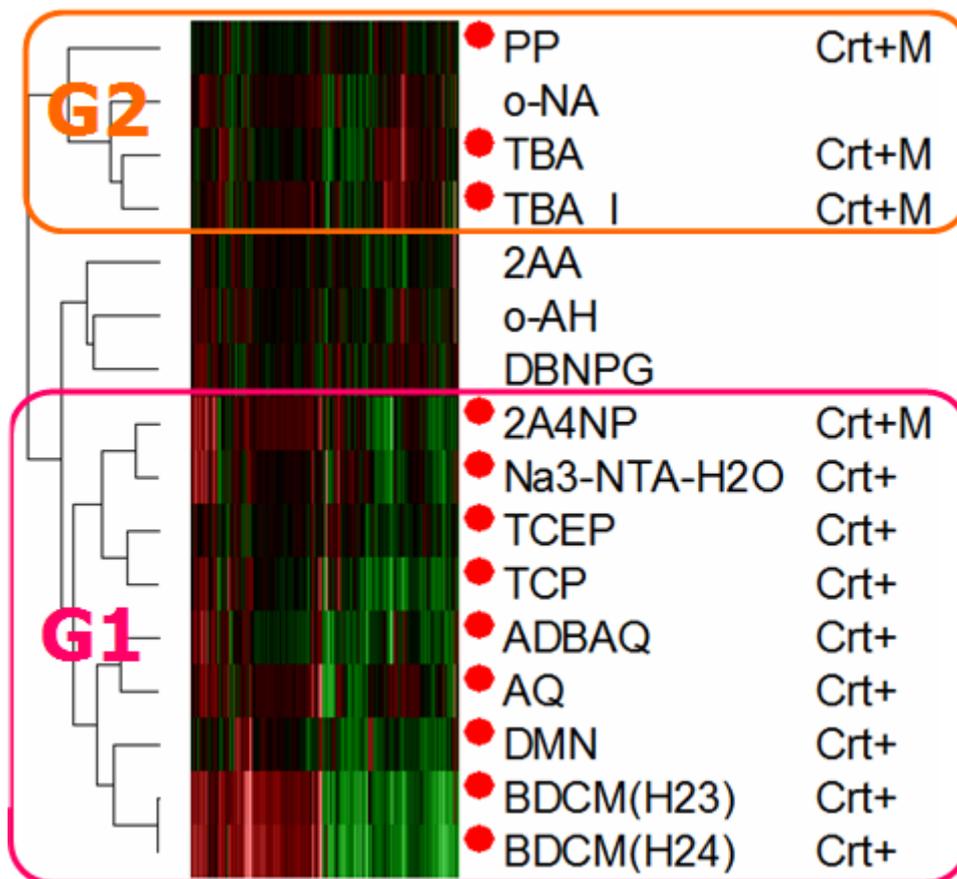
2.3.2 腎発がん性の短期予測手法の開発(候補遺伝子の探索)

腎臓の発がん性については、その所見を調べたところ、尿細管がんを示す物質が腎発がん性物質(11物質)中10物質と多数を占めることが分かった(表(2)-9)。そこで、皮質の遺伝子発現量データを中心に解析し、早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子の探索を行うこととした。まず、尿細管がんを示す10物質を陽性データセットとし、この中の4物質以上で有意な発現変動を示す遺伝子を調べたところ、390プローブが選定された。そこで、これらの遺伝子発現量データを用いて階層的クラスタリングを行ったところ、尿細管がん・グループ1(7物質)とグループ2(3物質)に大きく分かれた。次にそれぞれのグループについて、発がん性物質グループの70%以上の物質で変動し、かつ非発がん性物質群の40%以下の物質でのみ変動する遺伝子(1.5倍以上もしくは1/1.5倍以下)を選定したところ、グループ1(7物質)では22遺伝子、グループ2(3物質)では3遺伝子が早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子として選定された。

表(2)-9 腎発がん性物質の内訳(14物質)。

#	化合物名(略称)	腎発がん性	尿細管	腎盂
1	BDCM	P	○	--
2	PP	P	○	--
3	2A4Np	P	○	--
4	TBA	P	○	--
5	TCEP	P	○	--
6	Na3-NTA-H2O	P	○	--
7	ADBAQ	P	○	--
8	AQ	P	○	--
9	TCP	P	○	--
10	DMN	P	○	--
11	o-AH	P	--	○
12	o-NA	N	--	--
13	2-AA	N	--	--
14	DBNPG	E	--	--

P; 陽性、N; 陰性、E; Equivocal. ○は毒性症状がみられたもので、--は毒性症状がみられなかったもの。



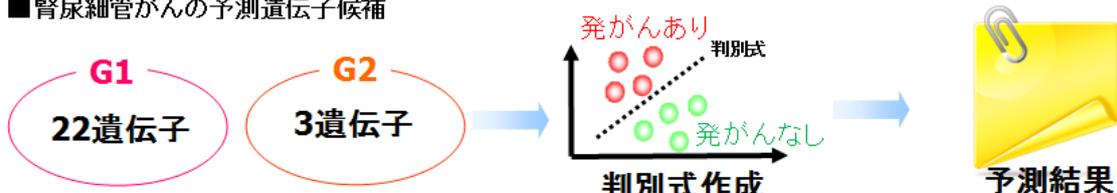
図(2)-8 遺伝子発現量データの階層的クラスタリング(腎臓・皮質、投与28日目).
 4物質以上で有意な変動を示した390プローブを用いた(distance metric; Pearson, linkage rule; Ward's).
 Crt+: 尿細管がんが認められている物質. M: 雄のみで発がんするもの.

3. 腎発がん性の短期予測手法(プロトタイプ)の開発

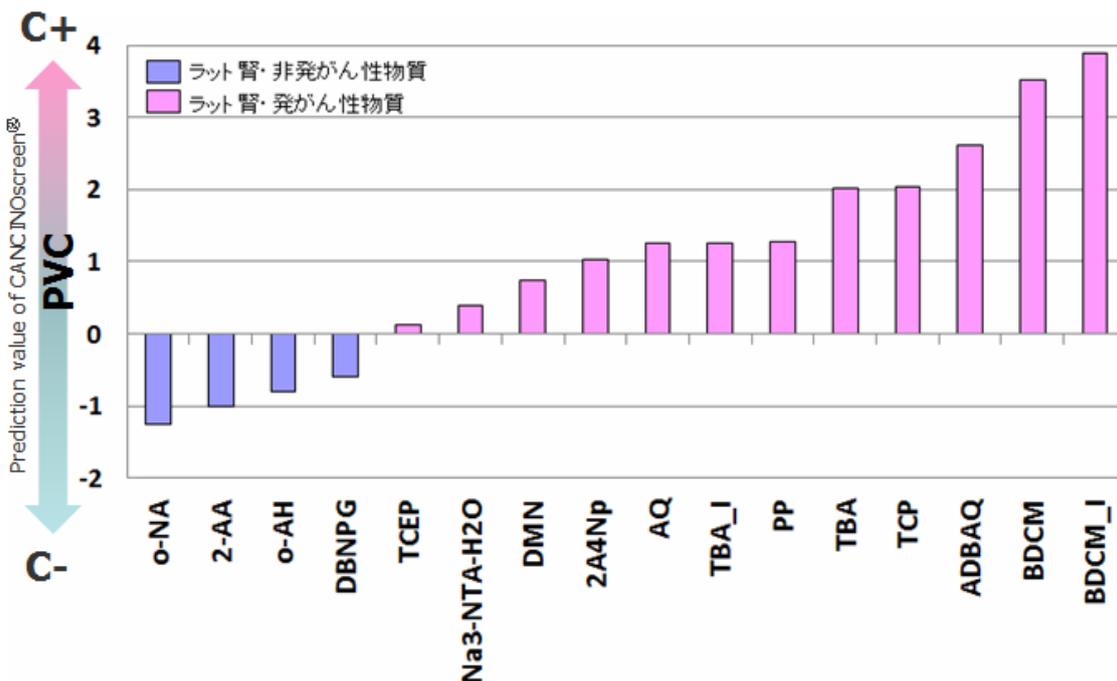
「2.3.2 腎発がん性の短期予測手法の開発(候補遺伝子の探索)」において、中間目標に掲げていたバイオマーカー候補遺伝子の選定を達成することができた。今後は最終評価に向けて、遺伝子発現量データから腎発がん性を予測できるシステムを構築しなければならないが、現在までに選定した早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子がどの程度の有用性を示すかは重要なポイントである。そこで、これまでに選定したバイオマーカー候補遺伝子を用いて腎発がん性の短期予測手法(プロトタイプ)の開発を行った。具体的には選定された候補遺伝子を用いてグループごとに判別式を構築し、予測結果を得た(図(2)-9)。

その結果、16試験(14物質)全てを予測できた(図(2)-10)。しかしながら、予測式を構築したトレーニングデータでそれ自身を予測した結果であるため、予測結果が良好であることは当然の結果といえる。

■腎尿細管がんの予測遺伝子候補



図(2)-9 腎発がん性の短期予測システムのストラテジー.



図(2)-10 腎発がん性の短期予測システムによる予測結果.

4. 最終評価に向けての今後の取り組み

肝臓に対する発がん性については、今後も陰性物質を中心に遺伝子発現量データを蓄積し、外部データに対する予測精度の確認を継続して行う予定である。

腎臓については、試験物質数を増やして今回選定された遺伝子群の再現性を確認することで、今回選定されたバイオマーカー候補遺伝子の精度を高め、さらなる絞り込みを行い、最終選定を進めていく必要がある。

また、物質選定の段階で腎尿細管がん以外の腎発がん性物質についても選定し、それらの遺伝子発現量データを蓄積し、幅広い腎発がん性物質を検出できるシステムにする。この際、腎臓の部位別の遺伝子発現量データを活用し、毒性メカニズムに基づいた予測遺伝子を抽出する予定である。

5. 評価項目に対する自己評価

・ 得られた成果は何か。

肝発がん性に関しては、外部データに対する予測精度の確認及び適用範囲の明確化を達成できた。

具体的には、これまで確立してきた短期発がん性予測システム (CARCINOscreen[®]) に、本プロジェクトで得られた16試験 (14試験) の肝臓の遺伝子発現量データを適用したところ、陰性物質を中心に高い正答率を示すことが分かった。また、外部施設で動物実験からマイクロアレイ実験まで行われたTGPデータを活用し、発がん性情報が明らかな40物質のデータをCARCINOscreen[®]に供したところ、中用量以上で90%以上の一致率を示し、外部データに対して高い予測精度を示すことが分かった。別の発がん性スクリーニング手法として既に使用されている中期発がん性試験とBhas42試験 (*in vitro*) との比較を行い、CARCINOscreen[®]の適用範囲について検討したところ、本法では、ラット肝臓で発がん性を示す物質、特に非変異発がん性物質の検出力は高いものの、他生物種 (例 ; マウス) や他臓器 (腎臓等) で発がん性を示す物質の検出力が低いことを確認できた。

腎発がん性に関しては、早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子 (25種類) の選定を行うことができた。

・ 設定された目標以外に得られた成果はあるか。

また、最終評価に掲げている「各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立」について、腎発がん性に関しては、選定されたバイオマーカー候補遺伝子を活用して、判別式を作成し、腎発がん性予測システムのプロトタイプを構築した。

・ 共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成 (OECD での活動)、プロトタイプの作製等があったか。(3-1-3 参照)

本プロジェクトの概要及び成果については、2012年にOECD会議での発表を行った。また、肝発がん性に関連して、ラット系統間 (SD, F344, Wistar-Han ラット) の化学物質投与後の遺伝子発現量プロファイルの差異については、論文作成中である。

* (3) 神経毒性 (p. 68~p. 82) は非公開

(4) 免疫毒性

1. 目的

化審法における化学物質の毒性スクリーニング試験としては 28 日間反復投与試験が実施されているが、これまでの 28D-RDT の試験設計では免疫毒性、すなわち動物の免疫機能への影響を評価することは困難である。免疫毒性には「a. 免疫抑制」、「b. 免疫亢進（過敏症）」、「c. 自己免疫」等がある。「b. 免疫亢進（過敏症）」で懸念される皮膚感作性は、Local lymph node assay (LLNA) 等いくつかの試験法が既に OECD テストガイドライン化されており、更に invitro 法も開発され、検証が進められている。また、「c. 自己免疫」については、実験動物で発症させるためには特殊なモデル動物に負荷を加えることが必要となることなどから、本研究で想定している汎用ラットを用いる 28D-RDT での検出は困難である。

そこで、本研究では、化学物質による障害を受けることによって、医薬品等の免疫毒性評価において最も重要な項目であり、初期スクリーニングとして実施される、1) 生体の液性免疫である抗体産生能、2) 特に細菌感染に最も重要である好中球と肺胞マクロファージ及びウイルス感染や発がんの監視に重要であるナチュラルキラー細胞等の免疫細胞への影響、3) 免疫細胞の産生・補給に重要な骨髄機能を対象として、免疫毒性の影響を検討し、化学物質を投与した実験動物の免疫毒性に関連する臓器（骨髄、脾臓、リンパ球、全血）の遺伝子発現データ取得法を構築するとともに取得した遺伝子発現変動データ等を用いることで、28 日間反復投与試験の通常プロトコールで免疫抑制作用が評価可能な手法の開発を目的として実施した。

2. 組織採取法の確立

対象臓器である脾臓、骨髄等の採材法及び遺伝子発現データ取得法を構築するため、脾臓、骨髄、リンパ球及び全血の RNA 調製法に関し、①採材方法、② RNA 保存液、③経時劣化、④保存条件、⑤輸送条件等について検討を実施した。

その結果、骨髄、リンパ球、全血からの RNA 調製法は確立し、動物実験実施場所である化学物質評価研究機構日田事業所（大分県日田市）及び京都産業大学（京都市）から遺伝子解析実施場所である化学物質評価研究機構安全性評価技術研究所（埼玉県杉戸町）への輸送による RNA 品質の劣化は観察されなかった。しかしながら、免疫毒性の主要ターゲット臓器となる脾臓は経時的及び輸送ストレスにより RNA 分解が起こりやすく、各種 RNA 保存液を用いた冷凍条件下での輸送やドライシッパー（液体窒素容器）を用いた輸送を試みたが RNA の分解による品質劣化が生じ、現時点では確実な脾臓サンプルの輸送手法を確立するには至らなかった。また、フィージビリティスタディの結果、免疫抑制作用の表現型は免疫系細胞（リンパ球や好中球等）の細胞数減少として現れることから、遺伝子解析に要する total RNA 調製量の確実な確保が困難となる事

例も多くみられた。

3. 免疫毒性関連パラメーターの測定法の確立

免疫毒性関連パラメーターとして、「液性免疫応答」及び「細胞性免疫応答」の2点を最も重要な項目として設定した。「液性免疫応答」の検出系としては、T細胞依存性抗原に対する抗体産生能(外来異物に対する防御に関与する)、「細胞性免疫応答」の検出系として、NK(ナチュラルキラー)活性(生体内で発生する腫瘍細胞やウイルス感染細胞などの除去に関わる)を検討した。

フィージビリティスタディとして検討した“免疫毒性作用既知物質(シクロフォスファミド:CYP、シクロスポリンA:CSA)”の影響として、T細胞依存性抗原に対する抗体産生能に対する影響は観察されるものの、NK活性に関する明らかな影響は観察されなかった。

表(4)-1 免疫機能検査結果のまとめ

投与日数	投与物質	Mφ		リンパ球		NK		好中球		骨髄		抗体産生
		数	貪食能	数	マイトゲン応答	比率	活性	数		数	CSF応答	
1D	CYP	↑		↓	(↓)					↓	↓	
3D	CYP			↓	↓	↑		↓		↓	↓	
7D	CYP											
14D	CYP											
28D	CYP		↓	↓	↓	↓				↓		↓
1D	CSA											
3D	CSA	↓			(↓)			↓			(↓)	
7D	CSA				(↓)	↑					↓	
14D	CSA				↓	↑					↑	
28D	CSA				(↓)	↑					↓	↓

CYP:シクロフォスファミド、CSA:シクロスポリンA

↓:機能もしくは数の減少、↑:機能もしくは数の増加

4. 免疫毒性開発中止理由

当初、基本計画に、免疫毒性の検出方法の開発を含んでいたが、フィージビリティスタディとして、免疫関連組織を対象とした遺伝子発現量解析と表現型の変化から免疫毒性影響評価手法の開発を検討したが、免疫抑制作用の表現型の多くが免疫系細胞(リンパ球や好中球等)の細胞数減少として現れ、結果として遺伝子解析に十分なtotal RNA調製量の確保が困難と考えられたことから免疫機能影響の遺伝子レベルでの評価手法確立はフィージビリティスタディとして設定していた当初の2年以内の確立が難しいという結果となった。また、本事業の全体予算の縮小も検討されており、リソースの有効活用のため、外部有識者による研究開発推進委員会(平成25年2月開催)での議論を経て、プ

ロジェクトリーダー及び経済産業省は当該毒性の検出方法の開発に関し、現時点において技術的に困難であると判断し、基本計画から削除することとした。

3-1-3 論文、外部発表等

本事業成果の論文、外部発表等の実績は以下のとおりである。

論文投稿(件数、H25年8月末現在)

掲載あるいは受理	投稿中	準備中
7	3	3

学会発表(件数、H25年8月末現在)

国際学会	国内学会	講演等
3	13	7

特許出願

・特許出願実績なし。(H25年8月末現在)

*本事業により開発した試験手法はOECDガイドライン化等による国際標準化により幅広く普及させることを前提としているため、積極的な特許出願は考慮していない。

(1) 論文投稿詳細

著者	表題	雑誌等
Akane, H., Saito, F., Yamanaka, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Morita, R., Mitsumori, K., Shibutani, M.	Methacarn as a whole brain fixative for gene and protein expression analyses of specific brain regions in rats.	J. Toxicol. Sci. 38(3): 431-443, 2013
Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Ohishi, T., Mitsumori, K., Shibutani, M.	Glycidol induces axonopathy by adult stage-exposure and aberration of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by developmental exposure in rats	Toxicol. Sci. 134(1):140-154, 2013
松本博士	学会報告「遺伝子発現変動を用いた短期	安研協 会報、第

	発がん性システム;CARCINOscreen®」	24号 : pp. 84-85, 2012
赤堀有美、今田中伸哉	新規試験法開発を目指す Tox-Omics について	JSAAE News Letter (日本動物実験代替法学会), 2012
赤堀有美	オミクス技術を用いた新規試験法開発プロジェクト Tox-Omics について	安研協会報, 第24号 : pp79-81, 2012
Shiraki, A., Akane, H., Ohishi, T., Wang, L., Morita, R., Suzuki, K., Mitsumori, K., Shibutani, M.	Similar distribution changes of GABAergic interneuron subpopulations in contrast to the different impact on neurogenesis between developmental and adult-stage hypothyroidism in the hippocampal dentate gyrus in rats	Arch. Toxicol. 86(10): 1559-1569, 2012
Matsumoto, H., Yakabe, Y., Saito, F., Miyaura, H., Otsuka, M., Saito, K., Sumida, K., Sekijima, M., Nakayama, K. and Shirai, T.	New short term prediction method for chemical carcinogenicity by hepatic transcript profiling following 28-day toxicity tests in rats	Cancer Informatics, 10: 259-271, 2011
Yamanaka, H., Takeyoshi, M.	Identification of sheep red blood cell (SRBC) surface immune-responsive peptides detected by antisera from SRBC immunized rat	投稿中
Akane, H., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Abe, H., Shibutani, M.	Glycidol induces axonopathy and aberrations of hippocampal neurogenesis affecting late-stage differentiation by adult-stage exposure in rats	投稿中
Akane, H., Saito, F., Shiraki, A., Imatanaka, N., Akahori, Y., Itahashi, M., Wang,	Gene expression profile of the brain regions reflecting aberrations in nervous system development targeting the process of neurite extension of rat offspring exposed developmentally	投稿中

L., Shibutani, M.	to glycidol	
Saito F., Hoshuyama S., Matsumoto H., Takeyoshi M., Imatanaka N.	Inter-strain difference between SD and F344 and Wistar-Han rats in hepatotoxicity administrated by TAA	投稿準備中
Saito F., Hoshuyama S., Matsumoto H., Takeyoshi M., Imatanaka N.	Time course analysis of zone specific gene expression profiles of kidney in 28-day repeated dose study in SD rats of 2-Amino-4-nitrophenol.	投稿準備中
Hiroshi Matsumoto, Fumiyo Saito, Masahiro Takeyoshi	CARCINOscreen; New Short term prediction method for carcinogenicity of chemicals by hepatic transcript profiling in rats.	投稿準備中

(2) 口頭発表・講演等詳細 (○: 発表者)

発表者	演題	発表学会等
○齋藤文代	遺伝子の発現量測定による発がん性スクリーニング手法について	化学物質のリスク評価検討会 第4回有害性評価小委員会(厚生労働省), 東京, 2013
○齋藤文代	2-Amino-4-nitrophenolのSDラットを用いた28日間反復投与試験における腎臓部位別の経時的な遺伝子発現プロファイル解析 Time course analysis of zone specific gene expression profiles of kidney in 28-day repeated dose study in SD rats of 2-Amino-4-nitrophenol.	第40回日本毒理学学会学術集会, 千葉, 2013
○松本博士	TGPデータを用いた化学物質の短期発がん性スクリーニング法: CARCINOscreen®の検証 Validation of a short-term prediction system for carcinogenicity (CARCINOscreen®) using dataset of Toxicogenomics Project.	第40回日本毒理学学会学術集会, 千葉, 2013

○Saito, F.	CARCINOscreen®: Novel short-term prediction system for carcinogenicity of chemicals by hepatic transcriptome analysis in a 28-day repeated dose toxicity study	Genetic Engineering-2013 the International Conference on Genetic Engineering & Genetically Modified Organisms, NC, 2013
○赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、白木彩子、大石 巧、Wang Liyun、林 仁美、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	ラットの脳部位特異的な網羅的解析を可能とするメタカーン全脳固定法の検討	第28回日本毒性病理学会学術集会, 東京, 2013
○渋谷 淳	化学物質と神経発達	第5回応用トキシコロジー リカレント講座, 東京, 2013
○赤根弘敏、齋藤文代、白木彩子、板橋 恵、Wang Liyun、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	グリシドールのラットへの28日間反復投与による海馬歯状回におけるニューロン新生に対する影響	第29回日本毒性病理学会学術集会, つくば, 2013
○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、赤堀有美、今田中伸哉、板橋 恵、Wang Liyun、大石 巧、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	6-propyl-2-thiouracil (PTU)のラット発達期暴露による甲状腺機能低下を介したニューロン・グリア発達障害に関連する遺伝子発現プロファイルの異なる脳部位での同定	第29回日本毒性病理学会学術集会, つくば, 2013
○渋谷 淳	ニューロン新生: 発達神経毒性の新たな標的性	公益社団法人日本獣医学会、日本小動物獣医学会一シンポジウム「毒性病理学とヒトの健康」ーモデル動物を通じたメカニズ

		ム解明一平成 24 年度日本獣医師会 獣医学術学会年次大会、大阪市, 2013
○赤根弘敏、齋藤文代、白木彩子、板橋 恵、Wang Liyun、赤堀有美、今田中伸哉、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	グリシドールのラット 28 日間反復投与による海馬ニューロン新生への影響	第 40 回日本毒性学会学術集会, 千葉, 2013
○松本博士、矢可部芳州、齋藤文代、武吉正博、白井智之	CARCINOscreen: a new short term screening method for chemical carcinogenicity 特徴的な遺伝子発現パターンを用いた短期発がん性予測法 CARCINOscreen	日本環境変異原学会 第 40 回大会, 東京, 2012
○武吉正博	新規経済産業省プロジェクト「遺伝子プロジェクト」	第 24 回日本動物実験代替法学会学術大会 市民公開講座「日本における代替法研究の新しい胎動」, 仙台, 2012
○齋藤文代、松本博士、武吉正博、矢可部芳州	短期発がん性システムの Wister Hannover ラットへの適用性及び系統間差の検討 Applicability evaluation of the short-term prediction system for carcinogenicity of Wister Hannover rats and interstrain difference.	第 39 回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
○松本博士、齋藤文代、武吉正博	Improvement of a dose setting method for the short-term chemical carcinogenicity screening method 化学物質の短期発がん性スクリーニングの用量設定方法の検討	第 39 回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
○Saito, F.	Japanese New Project :Assay Developments by Omics Technologies (日本の新プロジェクトについて;オミクス技術によるアッセイ系の開発)	5th Meeting of The Extended Advisory Group on Molecular

		Screening and Toxicogenomics AXLR8-3 Workshop Berlin, 2012
○Kojima, H., Tanaka, N., Oshimura, M., Saito, K., Saito, F. and Imatanaka, N.	New Projects in Japan to Alternative Methods for Repeated Dose Oral Toxicity Studies.	EUROTOX, Stockholm, 2012
○Saito, F., Matsumoto, H. and Takeyoshi, M.	CARCINOscreen®:Novel short term prediction system for carcinogenicity of chemicals by hepatic transcript profiling in a repeated dose 28-day toxicity study	生命医薬情報学連合大会(日本バイオインフォマティックス学会年会), 東京, 2012
○松本博士	遺伝子発現変動を用いた化学物質の毒性予測	CERI 寄附講座(九州大学) 先端材料化学 ~ 設計, 構造・物性から機能化まで ~, 福岡, 2012
○白木彩子、赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、Liyun Wang、大石 巧、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	6-propyl-2-thiouracil (PTU)の発達期暴露によるラット海馬歯状回における甲状腺機能低下を介したニューロン新生の永続的な影響検出とその遺伝子発現プロファイルの同定	第39回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
○赤根弘敏、齋藤文代、山中秀徳、白木彩子、盛田怜子、八舟宏典、谷合枝里子、鈴木和彦、三森国敏、渋谷 淳	グリシドールのラット母動物暴露による母動物と児動物の神経系に対する影響	第39回日本毒性学会学術集会, 仙台, 2012
○Hirotooshi Akane, Fumiyo Saito, Ayako Shiraki, Kunitoshi Mitsumori, Makoto Shibutani	Effect of maternal exposure to glycidol on nervous system of dams and offspring in rats.	30th Meeting of the European Society of Veterinary Pathology, Annual Meeting of the European College of

		Veterinary Pathologist 24th Annual Meeting of the Spanish Society of Veterinary Pathology. León, Spain, 2012
OHIRONO Yuriko, NOSE Masahito, KAWAZOE Ayaka, SHIGEYOSHI Eri, SASAKI Kazuma, TANAHASHI Yasuyuki, SAKURA Masaaki, TAKEYOSHI Masahiro, SAITO Fumiyo, AKAHORI Yumi, IMATANAKA Nobuya, TAKEUCHI Minoru	Immunotoxic effects by oral gavage of cyclophosphamide or cyclosporine A as immunosuppressive drug in Rats	第 41 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2012
OY Hirono, M Nose, A Kawazoe, E Shigeyoshi, K Sasaki, Y Tanahashi, M Sakura, M Takeyoshi, F Saito, Y Akahori, N Imatanaka, M Takeuchi	Effects of cyclophosphamide as immunosuppressive drug on Alveolar Macrophages by oral administration in rats	The 17th Congress of the APSR (第 17 回アジア太平洋呼吸器学会議, 香港, 2012

3-2 目標の達成度

表 3-2-1 中間目標に対する成果・達成度の一覧表

中間目標（平成25年度末）	成果	達成度
<p>(a) 各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する。 	<p>(1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 動物試験の実施 ⇒毒性機序の異なる14物質(16試験)について28日間反復経口投与実験を実施した ・ 採材法(腎臓)の開発 ⇒腎臓を皮質、髓質(外帯)、髓質(内帯)、乳頭の4部位に分けて採取し、手技や個体間差の小さな遺伝子発現量データを取得することができた。 <p>(2) 発がん性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 動物試験の実施 ⇒毒性機序の異なる14物質(16試験)について28日間反復経口投与実験を実施した ・ 採材法(腎臓)の開発 ⇒一般毒性で得られた結果を適用した。 <p>(4) 神経毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 動物試験の実施 ⇒毒性機序の異なる2つの既知の神経毒性物質について発達期暴露実験及び28日間反復経口投与実験を実施した ・ 脳からの特定部位の採材法の開発 	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p>

<ul style="list-style-type: none"> 各毒性の発現との関係で特徴的な発現変動を示していると考えられる遺伝子の絞り込みを行う。 	<p>⇒メタカーン全脳固定法を用い、遺伝子発現量解析のための RNA 品質を保持した採材法を開発した。</p> <p>(1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性) ・特定の機序に基づく特徴的遺伝子群候補の探索 ⇒肝毒性では4種の毒性症状、腎毒性でも4種の毒性症状について、10~2,019 プローブのバイオマーカー候補遺伝子を選定することができた。</p> <p>(2) 発がん性 ・腎発がん性に関する特徴的遺伝子群候補の探索 ⇒早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補として、25 プローブを選定した。</p> <p>(3) 神経毒性 ・特徴的遺伝子の候補探索 ⇒脳の各部位で発達神経毒性を反映する候補遺伝子を見出した。特に、海馬歯状回でニューロン分化、軸索形成に関わる候補遺伝子を見出した。</p> <p>・遺伝子発現変動データの公開 ⇒H25 年度末までに一部のデータについて公開予定。</p>	<p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成</p> <p>達成見込み。</p>
<p>(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立 【全てのエンドポイントに共通】</p> <ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現変動データの取得法の確立 	<p>(1) 一般毒性(肝毒性・腎毒性) ⇒肝毒性及び腎毒性の判定システムのプロトタイプ(レーダーチャ</p>	<p>前倒しで実施</p>

<p>【神経毒性】</p> <ul style="list-style-type: none"> 遺伝子発現変動データを用いることで当該毒性の評価が可能であるかについて結論する。 	<p>一ト式に判定結果を可視化できるもの)を考案した。</p> <p>(2) 発がん性</p> <ul style="list-style-type: none"> 腎発がん性予測の初期的パイロットモデル(暫定版)の開発 ⇒早期の尿細管がんに関連したバイオマーカー候補遺伝子を用いて判別式を作成し、予測システムのプロトタイプを構築した。 肝発がん予測システムの陰性物質を中心とした検証 ⇒本プロジェクトで11物質、外部実施データであるTGPデータで25物質の陰性物質について予測を行い、高い確率で一致することを確認した。 <p>(3) 神経毒性</p> <ul style="list-style-type: none"> ⇒脳部位特異的に発達神経毒性を反映する発現変動検出系を確立した。 神経毒性検出可能性に関する結論 ⇒脳の各部位で発達神経毒性を反映する遺伝子発現変動に着目した神経毒性検出は可能であると判断した。特に、海馬歯状回でニューロン新生障害を反映する遺伝子発現変動に着目した神経毒性検出は可能であると判断した。 	<p>前倒しで実施</p> <p>達成 (今後も継続してデータを増やす)</p> <p>達成</p> <p>達成</p>
--	--	--

4. 標準化等のシナリオ、波及効果について

4-1 標準化等のシナリオ

本事業の成果は国際規格化を目指し、OECD ガイドラインなど公的試験法として、広く普及させることを想定しており、それを実現するためには、得られる成果を可能な限り速やかに取りまとめ、外部専門家によるレビューによる評価を受けた後、経済産業省及び関係省庁、関係機関と協議した上で、関連国際会議、学会、論文等でその成果を公表し、国内外における本事業の認知度を上げるための活動を行っており、これまでに論文投稿 11 件（内 1 件は投稿中、内 3 件準備中）、学会発表・講演等 23 件を実施している。

また、得られた成果の国内における発信・普及のために、CERI で毎年実施している化学物質評価研究機構研究発表会（公開）での成果の発表を通じて事業者とのコミュニケーションを図るとともに、CERI が実施している学生や一般の方々も受講できる寄附講座や関連学会の市民公開講座での情報発信を通して、本研究で用いられる技術や成果について分かり易く解説し、広く国民の理解向上に努めている。また、必要に応じ中間報告及び最終報告時点付近における成果報告会等の開催も検討する予定である。（3-1-3 参照）

なお、発がん性予測法に関しては先行 NEDO プロジェクト「遺伝子発現解析技術を用いた長期毒性（肝発がん性）予測手法の開発」の成果の発展型としての開発を目指しており、さらに厚生労働省の先行プロジェクト（Toxico Genomics Project）の成果の有効利用も実施しており、OECD ガイドライン化を目指すことにより、化学物質の発がん性リスク評価に要するコスト、時間の大幅な短縮に貢献することが想定される。

さらに、取得データ（動物実験データ及び遺伝子発現データ）は、広く一般に利用できるよう国際動向を踏まえ公開ための取組を進める予定である。

4-2 波及効果

本研究の成果は、化審法等で実施されるげっ歯類を用いた 28 日間反復投与試験という単一の動物試験では従来は取得できなかった情報を、遺伝子発現変動解析等の解析技術を駆使することで多様なエンドポイントにおいて毒性発現に関わる情報を取得する手法を提供するもので、行政及び産業界にとって毒性試験の数を削減、すなわち、試験費用、試験期間等の削減に寄与する。このことは化学産業界等にとっての新規化学物質開発の促進に繋がると期待できる。さらに、これにより、石油精製物質等の化学物質のリスクを迅速・効率的に評価・

管理される環境が整備され、石油精製物質等の化学物質の実用化・産業化を有効に進める事が可能となる。さらに遺伝子発現データ等を用いたメカニズム解析も実施することから、化学物質による毒性発現に関する理解を深めることができ、将来的に動物試験から *in vitro* あるいはコンピューターシミュレーションによる毒性評価を目指す欧米を中心とした世界的取組みにも大きく寄与することとなる。このことは、動物福祉の原点である3R、すなわち、Replacement（置換）、Reduction（削減）、Refinement（苦痛軽減）の精神に合致したものとなる。

また、世界的にも困難さが指摘されている信頼できる遺伝子発現データの取得法について、標準的な手法をOECD等の関連会議において発信し、普及に努めることで、遺伝子発現変動解析における組織採取法、正確な遺伝子発現情報の取得法の標準化などの課題を解決する方向に導くことができる。

これまで知りえなかった毒性に関する情報の取得が可能になることで、国民生活がより安心・安全になることが期待でき、新規化学物質の上市のため情報取得の短期化・低コスト化・高精度化が図れることにより、産業活性化ひいては日本の国際的経済及び技術地位の維持向上が実現できる。

なお、本研究と並行して進めている「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」（肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 *in vitro* 試験法の開発）では毒性マーカー遺伝子を導入した細胞による肝臓毒性及び腎臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法、並びに神経毒性を評価可能な *in vitro* 試験法の開発（細胞プロジェクト）を進めており、本事業成果による毒性マーカー遺伝子の信頼性の確認や本事業によって新たに同定された毒性マーカー遺伝子の *in vitro* 試験法への応用も計画している。細胞プロジェクトでは本プロジェクトで同定された毒性関連遺伝子（マーカー遺伝子）を *in vitro*-HTS試験系に組み込むことを計画しており、両プロジェクトで共通の物質を用いて実験を実施することにより、*in vivo*（生体）と *in vitro*（試験管内）で共通の毒性メカニズムに基づいた試験法開発を行うことができる。さらに細胞プロジェクトでの対象遺伝子の生体内での変動と毒性影響の関係を明らかにすることで、対象遺伝子の信頼性の証明を行うことができ、さらには *in vivo*（生体）と *in vitro*（試験管内）のブリッジングも期待できると考えられる。さらに、本事業でのデータの蓄積により先行NEDOプロジェクト「遺伝子発現解析技術を用いた長期毒性（肝発がん性）予測手法の開発」の発展型である発がん性予測法（CARCINOscreen）の精度向上並びに適用範囲の拡大が波及効果として期待される。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等

5-1 研究開発計画

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

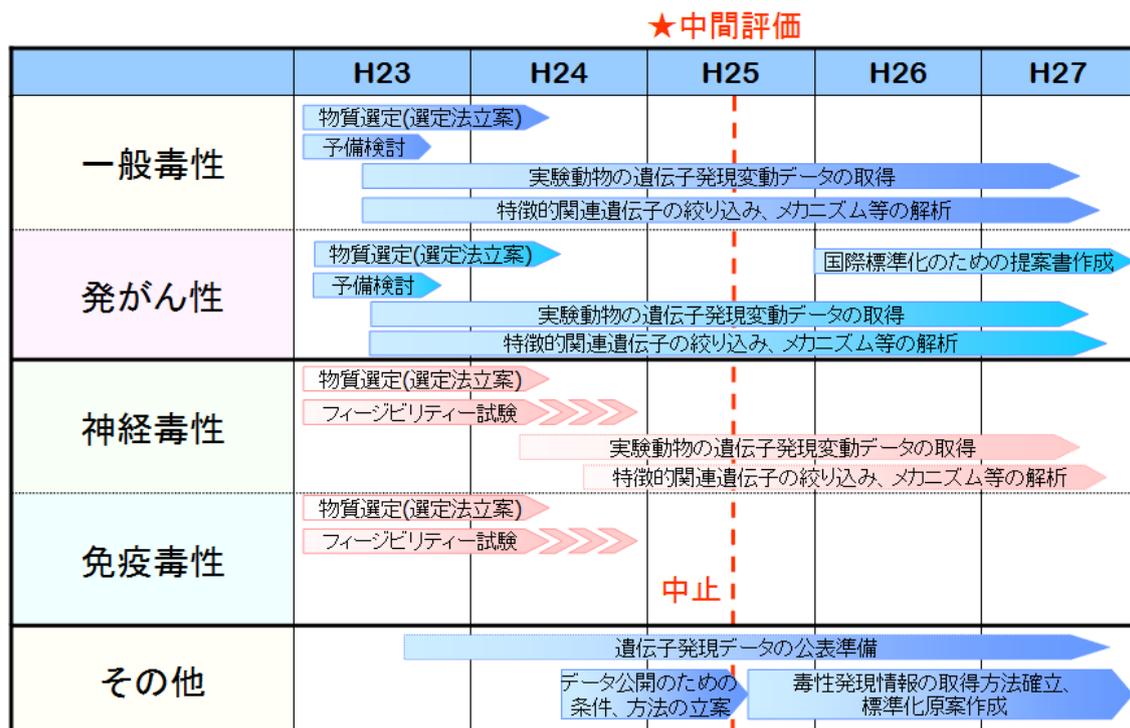


図5-1-1 事業全体の実施スケジュール

研究開発項目と実施機関の連携関係を、表5-1-1にまとめた。研究開発項目は、「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」であり、遺伝子発現量データの取得方法確立、被験物質選定、動物試験、遺伝子発現量解析、成果発信という研究の流れに沿って整理した。フィージビリティースタディについては、遺伝子発現変動による毒性発現可能性が取得可能と判断された場合に手法開発のための基礎データを整備することとした。

表5-1-1 研究開発項目と参加機関の連携関係

	反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による毒性発現可能性情報の取得方法の開発			
	取得方法の開発		フィージビリティースタディ	
	一般毒性	発がん性	神経毒性	免疫毒性
遺伝子発現データの取得方法確立	部位別採取 肝臓・腎臓・脾臓等(CERI) 脳(東京農工大)		遺伝子発現解析 (CERI)	
被験物質選定	複数エンドポイント対応のための物質選定(CERI)		陽性対照物質 (東京農工大)	陽性対照物質 (京都産業大)
動物試験	28日間反復投与毒性試験 (CERI) 30~40物質/5年間		妊娠期・授乳期暴露試験 28日間反復投与毒性試験 (東京農工大)	28日間反復投与毒性試験 (京都産業大)
遺伝子の発現変動解析 (CERI)	毒性関連遺伝子の絞り込み → 特定遺伝子の選定 各毒性発現可能性を予測するための遺伝子発現変動データの解析手法確立			
成果発信	国際会議及び学会への情報発信(CERI・東京農工大・京都産業大) 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)			

5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

本研究開発は、平成23年3月1日から3月31日に経済産業省が公募を行い、採択審査委員会での厳正な審査を経て、研究開発実施者として研究開発項目①（遺伝子発現解析手法）として一般財団法人化学物質評価研究機構、研究開発項目②（培養細胞試験法）として財団法人鳥取県産業振興機構、鳥取大学を選定後、経済産業省との委託契約に基づく研究実施体制を構築した。また、研究開発項目①の共同研究先として東京農工大学、京都産業大学、研究開発項目②の再委託先として財団法人食品薬品安全センター、独立行政法人産業技術総合研究所、住友化学株式会社、鳥取大学医学部生理学研究室が参加した。

研究開発の実施にあたっては、委託先決定後に経済産業省により、研究開発を統括するためのプロジェクトリーダーとして国立医薬品食品衛生研究所小島肇氏が、研究開発項目①のテーマリーダーとして化学物質評価研究機構の今田中伸哉氏、研究開発項目②のテーマリーダーとして食品薬品安全センターの田中憲穂氏（現在 鳥取大学の押村光雄氏）が指名され、各研究機関の研究開発ポテンシャルを最大限に活用することによって効率的な研究開発を実施した（図5-2-1）。

プロジェクトの実施体制 (ARCH-Tox)

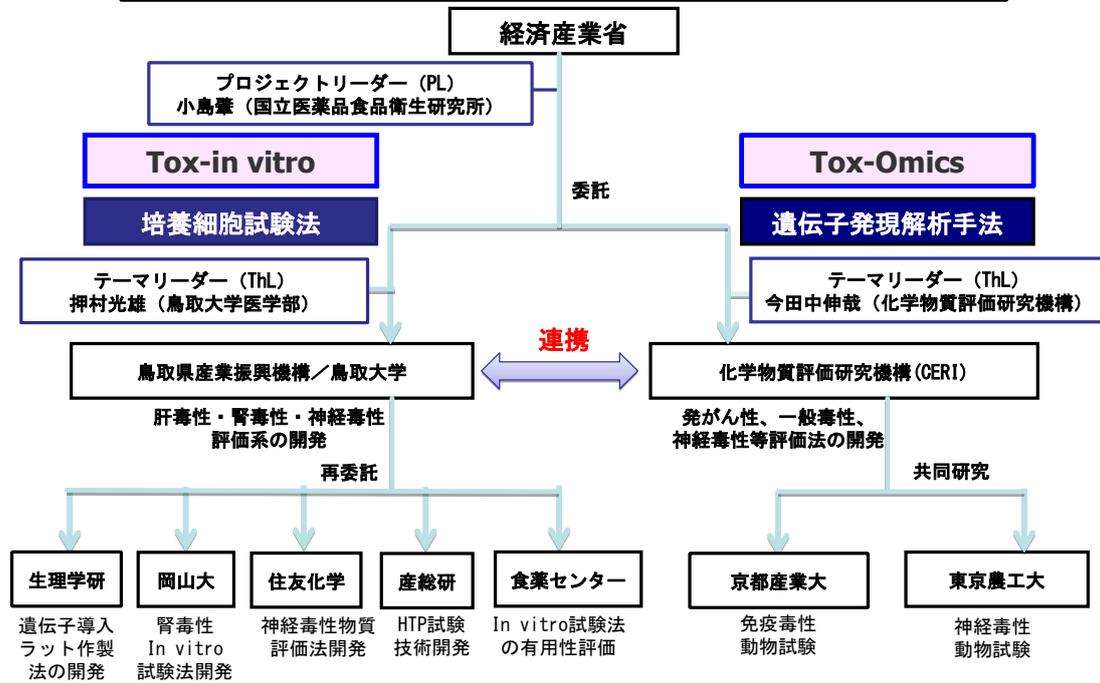


図 5-2-1 事業実施体制の全体図

小島プロジェクトリーダーは、長年毒性試験の開発に携わり、国立医薬品食品衛生研究所新規試験法評価室 (JaCVAM) の室長として、欧州 (ECVAM)、米国 (ICCVAM) を初めとする海外の新試験法評価機関と太いパイプを持つと共に、現在は OECD WNT 会合の副議長を務めており、新試験法の開発に当たり OECD 等の国際機関及び行政との連携を図ることが可能である。

テーマリーダーは、研究開発全体の管理・執行に責任を有する経済産業省との密接な関係を維持しつつ、本事業の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施している。具体的には、研究推進委員会を開催して、外部有識者の意見を運営管理に反映させるとともに、推進調整会議等を通じてプロジェクトの推進管理を行っている。

5-2-1 研究推進委員会

外部有識者の参加を得た研究推進委員会を以下のとおり年間2回開催した。

委員リスト(平成25年度、五十音順)

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

平成23年9月15日	化学物質評価研究機構後楽本部、出席者 20名
平成24年2月9日	化学物質評価研究機構後楽本部、出席者 21名
平成24年7月12日	化学物質評価研究機構後楽本部、出席者 23名
平成25年2月4日	化学物質評価研究機構後楽本部、出席者 23名
平成25年7月29日	化学物質評価研究機構後楽本部、出席者 25名

5-2-2 推進調整会議

研究開発を推進するために、推進調整会議を以下のとおり開催した。

平成23年度	(15回)8/31、9/12、13、14、10/12、13、25、12/6、15、 1/26、31、2/1、6、15、28
平成24年度	(20回)4/11、17、24、5/10、15、22、7/2、6、8/7、9/27、 10/18、19、11/14、27、1/18、25、28、31、2/15、26

5-2-3 研究開発項目②(培養細胞試験法)との連携会議/委員会

研究開発にあたっては、研究開発項目①(遺伝子発現解析法)と研究開発項目②(培養細胞試験法)間で連携するため、合同の推進調整会議を開催したほか、テーマリーダーは相互の研究推進委員会に出席し、連携、情報の共有化を図った。

平成23年度	(5回)10/14、11/17、12/27、1/13、2/10
平成24年度	(8回)5/28、29、7/10、8/2、9/28、11/16、1/11、2/8

5-2-4 電子メール・テレビ会議等の有効利用

遠隔地にある実施担当者間のコミュニケーションを図り、能動的な報告/

連絡/相談等を機動的に実施するため、電子メール・テレビ会議等を積極的に活用し、問題点の共有化、決定事項の共有化を図っている。

5-2-5 国民との科学・技術対話の実施

本事業の意義等について市民公開講座「日本における代替法研究の新しい胎動」：第24回日本動物実験代替法学会学術大会、2012（仙台）において新規経済産業省プロジェクト「遺伝子プロジェクト」として紹介するとともに、本技術の有用性について CERI 寄附講座（九州大学）において「遺伝子発現変動を用いた化学物質の毒性予測」と題して講義を実施し、本事業内容の普及に努めた。さらに本年度内に細胞プロジェクトと共同で一般対象のセミナーを開催予定である。

5-3 資金配分

本事業の平成23年度～25年度の予算(実績額)の推移を表5-3に示す。資金配分は、共同研究先への配分と、化学物質評価研究機構の研究課題で整理した。年度ごとの各研究課題の進捗が順調であることから、資金配分は妥当であったと考えられる。

なお、事業の予算額が毎年対前年比で一割弱減額となってきたため、研究経費の節約に努めた。また、平成25年度からは、フィージビリティスタディとして開始していた免疫毒性を中止し、研究資金の有効活用を図った。

表5-3 資金年度配分

(単位：百万円)

	年度(平成)			合計
	23	24	25	
化学物質評価研究機構 遺伝子発現解析等	86	77	71	234
化学物質評価研究機構 動物試験	50	46	46	142
化学物質評価研究機構 物質選定、情報公開準備等	8	11	10	29
共同研究先 : 東京農工大学 神経毒性	20	16	18	54
共同研究先 : 京都産業大学 免疫毒性	7	7	—	14
合計	171	157	145	473

5-4 費用対効果

2020年までに化学物質の影響を最小化するという国際目標(WSSD)達成のため、欧州(REACH)や日本(化審法)が新規化学物質、既存化学物質に関わらず化学物質をリスク評価の対象とする新たな化学物質規制手法を導入したところである。

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

しかし、これらの有害性評価項目に関して信頼性が高く、かつ、効率的な評価技術は十分に確立されていない部分が多く、また一般的にヒト健康影響に関する有害性評価項目の多くは動物への反復投与試験等で数ヶ月から数年の期間と多額の費用を要するため、新たな規制導入による評価実施ニーズに応えられていない状況である。具体例としては化学物質の発がん性評価に関しては従来の発がん性試験の費用は約2億円/物質の経費が必要と言われている。本事業成果が実用化された場合、1/40程度(500万円/物質)の経費で発がん性評価が可能となるため、国内で5物質/年の発がん性試験が実施されると仮定すると9億円/年以上の経費が圧縮されると考えられ、本事業の年間投資額を十分に回収できる成果となると期待される。

このため、これまでの研究開発において特定のエンドポイントについて遺伝子発現変動解析を活用した迅速で効率的な評価技術の開発を進めてきた我が国の先導的な取り組み成果を活用し、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進めることは、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、国際的ニーズにも対応するものであり、緊急性かつ必要性の高いものである。

したがって、本事業への予算投入は、効率的な有害性評価手法を開発することで、我が国の石油精製物質の安定供給に資するとともに、化学物質の適切な管理・規制により安全・安心な国民生活の実現にも寄与することとなり、十分な効果が得られると考えられる。

5-5 変化への対応

平成 25 年度までの事業期間中に大きな計画の変更を要する社会経済情勢等の変化は生じなかった。なお、事業の予算額が毎年対前年比で一割弱減額となってきたため、各年ともに研究経費の節約に努めた。また、平成 25 年度からは、フーズビリティスタディとして開始していた免疫毒性を中止し、研究資金の有効活用を図った。

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro
試験法の開発

用語集

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

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

2. 研究開発目標

2-1 研究開発目標

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

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

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

具体的に中心となる基盤技術は、鳥取大学で開発してきた人工染色体ベクターと産総研で開発してきた発光レポーターシステムである。まずは、これらの技術を、有害性評価試験法開発に応用することで、様々なエンドポイントについて培養細胞の発光量を測定することで有害性を評価できる基盤システムを構築する。有害性評価試験では、主に肝障害、腎障害、神経障害などの毒性が観察される（28 日間反復投与試験（げっ歯類）では 45%が肝臓、次いで腎臓（13%））。したがって、肝毒性、腎毒性、神経毒性に注目して、構築した基盤システムを用いて、肝臓、腎臓、神経の 3 種の組織における毒性試験法を開発する。

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

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

有害性評価試験開発の方針①

目標達成のために、4つのカテゴリーに分けられる

■ HTPスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

→ 人工染色体ベクターと多色多様発光技術を用いたシステムの構築

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

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

■ 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発

■ 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発

■ 神経毒性 in vitro 試験法の開発

構築したシステムを用い各組織での毒性試験法を開発

図 2-1-1. 有害性評価試験開発の方針 (1)

有害性評価試験開発の方針 ②

目標達成のために、

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

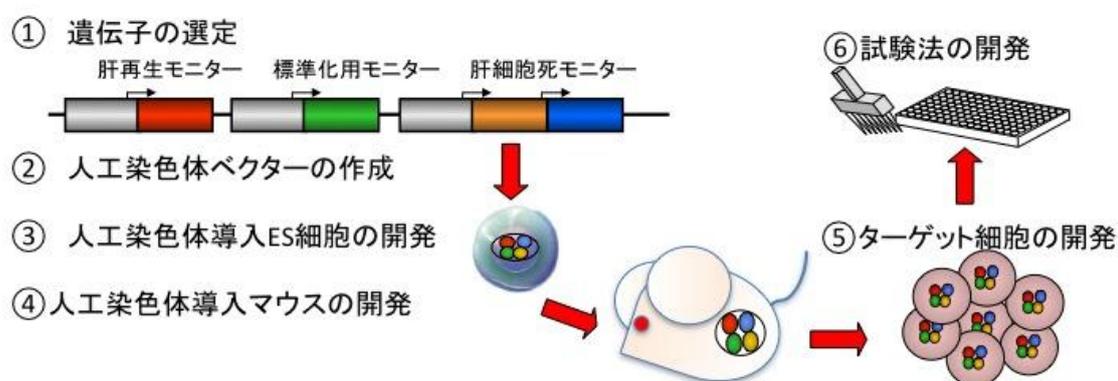
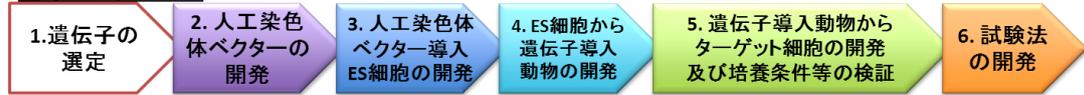


図 2-1-2. 有害性評価試験開発の方針 (2)

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

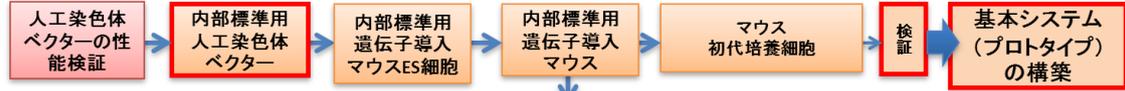
細胞プロジェクト(Tox-In vitro)イメージ

■基本ストラテジー



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

■ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■肝臓毒性in vitro試験法の開発



■腎臓毒性in vitro試験法の開発



■神経毒性in vitro試験法の開発



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

2-1-1 全体の目標設定

石油精製物質等の化学物質における多様なエンドポイントにかかる化学物質の迅速かつ効率的に行う有害性評価手法の開発を行う。この事業全体の目標は以下のとおりである。

表 2-1-1 全体の目標

目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
複数の in vitro 試験法の開発及び迅速かつ効率的に実施できる有害性評価システム等を構築すること。なお、プロジェクト実施期間中に得られた研究成果については、学会や論文での発表を行う。	2-1-2 個別要素技術の目標設定の項に記載	リスク評価や有害性項目指示の的確な実施を行うため、様々なエンドポイントでの有害性発現の可能性を迅速かつ効率的な有害性試験法により、スクリーニングレベルの有害性データが取得できることが極めて有用である。 こうした背景を踏まえ、本研究開発では、石油精製物質等の化学物質において、国際的なニーズがあり十分整備されていない多様なエンドポイントの有害性評価手法について、培養細胞手法等による評価技術の確立を目指した目標に設定した。

2-1-2 個別要素技術の目標設定

個別要素技術毎の目標は以下のとおりである。

表 2-1-2 個別要素技術の目標

要素技術	目標・指標 (事後評価時点)	目標・指標 (中間評価時点)	設定理由・根拠等
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験 法の開発	肝臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発 するため、人工染色体ベ クター、マウス ES 細胞、 遺伝子改変マウスを作 製し、肝臓細胞の三次元 培養等により培養細胞 を樹立する。樹立した培 養細胞を用い、肝臓毒性 を評価可能な試験系を 構築し、試験法のプロト コール案を作成する。	肝臓毒性に関連する と考えられるマーカ ー遺伝子を選定し、 人工染色体ベクタ ー、マウス ES 細胞、 遺伝子改変マウスを 作製する。また、野 生型マウスの肝臓細 胞を用い、培養条件 を見出す。	肝臓毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験 法の開発	腎臓毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発 するため、人工染色体ベ クター、マウス ES 細胞、 遺伝子改変マウスを作 製し、腎臓細胞の三次元 培養等により培養細胞 を樹立する。樹立した培 養細胞を用い、腎臓毒性 を評価可能な試験系を 構築し、試験法のプロト コール案を作成する。	腎臓毒性に関連する と考えられるマーカ ー遺伝子を選定し、 人工染色体ベクタ ー、マウス ES 細胞、 遺伝子改変マウスを 作製する。	腎臓毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。
(c) 神経毒性 in vitro 試験 法の開発	神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発 するため、人工染色体ベ クター、マウス ES 細胞 を作製し、当該 ES 細胞 の分化誘導及び培養等	ES 細胞から分化誘導 した神経細胞を用 い、既知の神経毒性 化学物質に対する当 該神経細胞の形態変 化及び発現等を確認	神経毒性の有害性評 価に用いる培養細胞 を作製するために、 個々の技術を確立す る必要があるため、左 記目標を設定した。

	により神経細胞の培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコール案を作成する。	しマーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製する。	
(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発	人工染色体ベクターの性能を検証するとともに、当該ベクター及び遺伝子改変マウスの個体・臓器等の発光検出を検証し、試験系の測定条件を最適化する。最適な測定条件について各試験法のプロトコール案に反映する。	人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を行い、試験系の設計試案を作成する。	研究開発戦略の基盤技術となる発光技術等を開発するために、個々の技術を確立する必要があるため、左記目標を設定した。

3. 成果、目標の達成度

3-1 成果

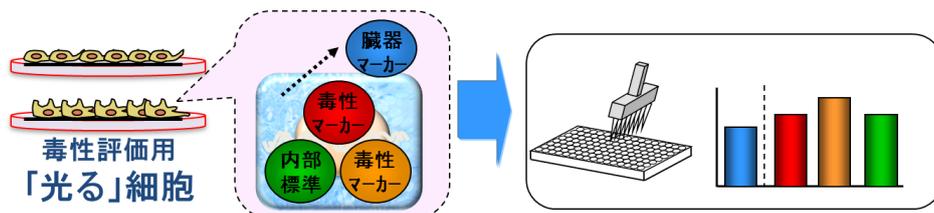
3-1-1 全体成果

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

- ① 28 日間反復投与動物試験を遺伝子導入した細胞を用い in vitro 試験法で補完できる有害性スクリーニングシステム。
- ② 迅速かつ低コストで評価できる。
- ③ ガイドライン化を目指した信頼性（再現性）の高い試験法である。

新しい in vitro 有害性評価システム

- ① 28日間反復投与動物試験を**遺伝子導入した細胞**を用い **in vitro 試験法で補完**できる有害性スクリーニングシステム
- ② **迅速**かつ**低コスト**で評価できる。
- ③ ガイドライン化を目指した**信頼性(再現性)の高い**試験法である。



最新の技術を活用

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

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

このようなシステムを構築するために、以下の最新のテクノロジーを活用した。

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

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

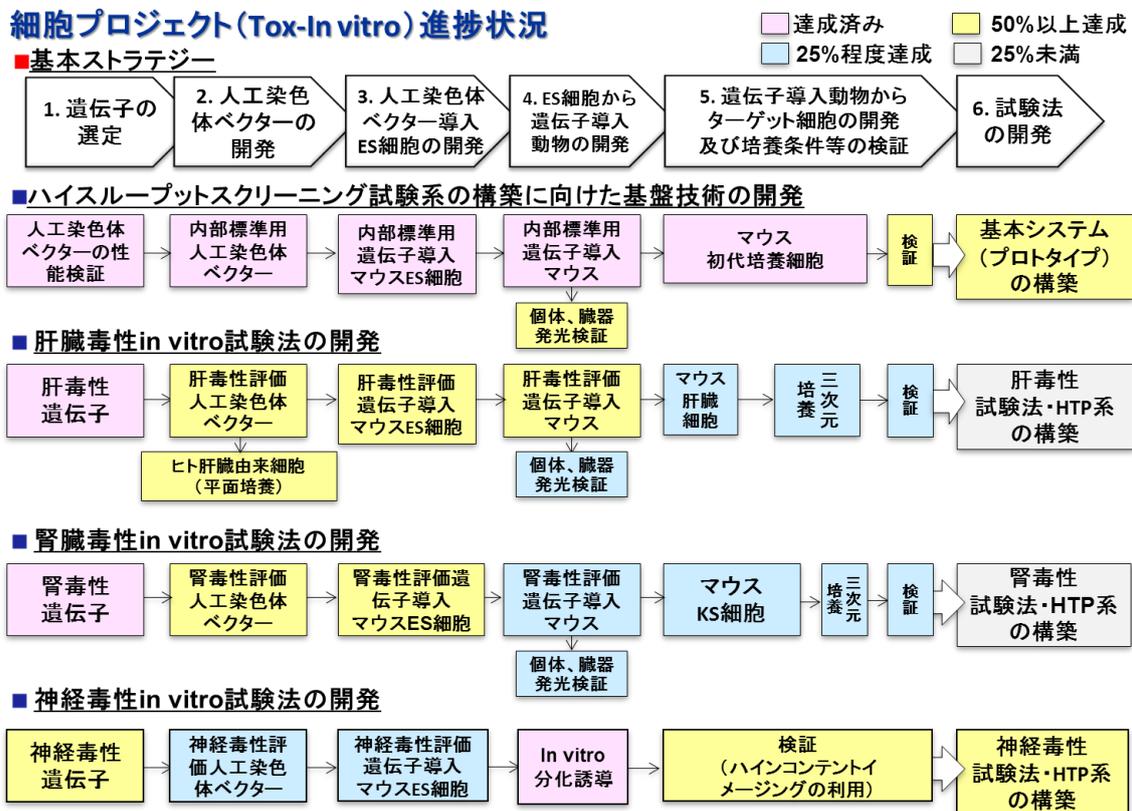


図 3-1-2. 細胞プロジェクト (Tox-In vitro) 進捗状況概要

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

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

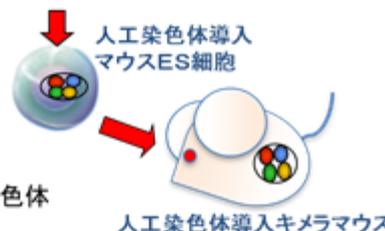
有害性評価試験開発の基盤システムの基本ストラテジー

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

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



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



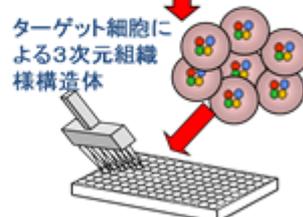
④ **人工染色体導入キメラマウスの開発**

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

人工染色体導入キメラマウス

⑤ **ターゲット細胞の開発および培養条件の検討**

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



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

図 3-1-3. 有害性評価試験開発の基盤システムのストラテジー

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

基盤システムを構築するための中心となる各要素技術の概要を以下に説明する。

1) 人工染色体ベクター(図 3-1-4)

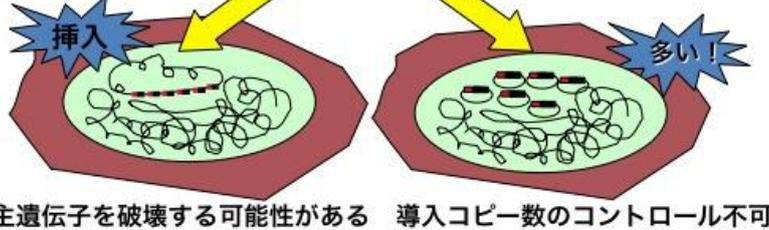
人工染色体ベクターは、鳥取大学の染色体工学を発展させて開発してきた技術である。スクリーニングシステムの効率化を目指す場合、測定の簡便さや定量性の高さといった利点を活かした発光評価システムが極めて有効である。このようなシステムを構築する場合、ルシフェラーゼなどの発光レポーター遺伝子や EGFP などの蛍光レポーター遺伝子を目的の細胞に導入した遺伝子導入細胞を作製する必要がある。OECD ガイドライン化など国際標準を形成する上では、樹立した細胞が安定に機能する必要があるが、従来の技術で作製した遺伝子導入細胞は、導入したレポーター遺伝子の発現が継代により消失することがあり、安定性に欠けるといふ大きな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

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

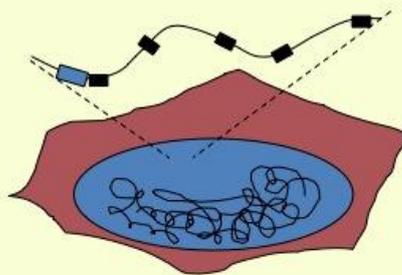
1) 人工染色体ベクター 安定で高品質

ウイルス/プラスミドベクター + 外来遺伝子制御領域 + 遺伝子

従来法: 不安定
再現性に欠ける



人工染色体ベクター (HAC) + ゲノム遺伝子



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

複数の遺伝子の導入が可能

→ 宿主細胞の生理的発現制御を受ける
過剰発現/発現消失が起きにくい

長期間、安定に機能する

図 3-1-4. 人工染色体ベクター概要

2) 多色多様発光システム(図 3-1-5)

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

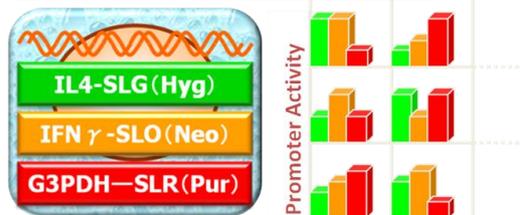
2) 多色多様発光技術 効率的なスクリーニングシステム

3つの遺伝子発現を同時に計測

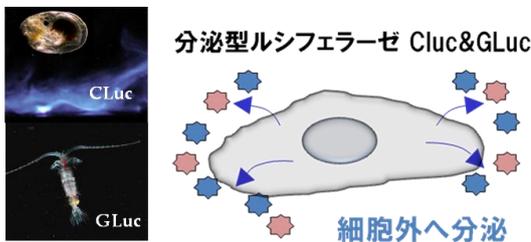


・マルチ遺伝子転写活性測定システム
第4385135号、米国US7572629、中国CN1784496、欧州EP1784496

2免疫系・1コントロール遺伝子発現
をハイスループットに計測可能



2つの遺伝子発現を分泌液で計測



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

細胞培地(in vitro)、
血液や尿(in vivo)
で計測可能

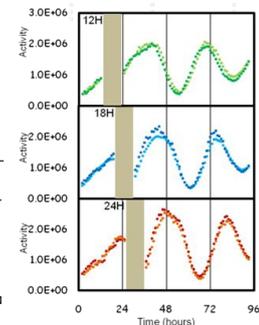


図 3-1-5. 多色多様発光システム概要

3) 遺伝子導入キメラマウス(図 3-1-6)

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

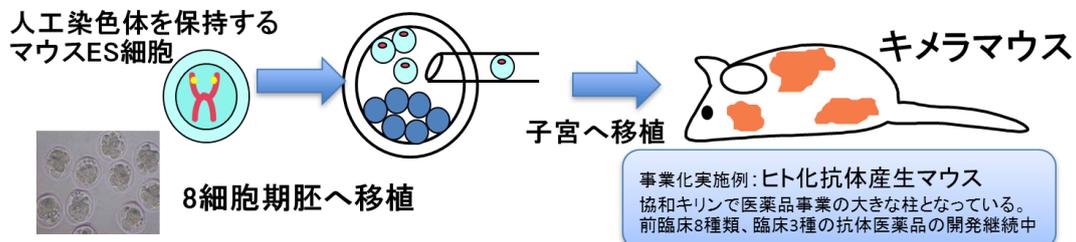
を用いて毒性評価試験を行うことで、*in vitro* と *in vivo* を相互検証することができる。

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

3) 遺伝子導入キメラマウス

in vitro と *in vivo* の壁

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



人工染色体導入 ES細胞から人工染色体導入キメラマウス作製

胚盤胞補完法

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

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

図 3-1-6. 遺伝子導入キメラマウス概要

4) 細胞培養技術(図 3-1-7)

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

4) 細胞培養技術 三次元培養／幹細胞分化誘導

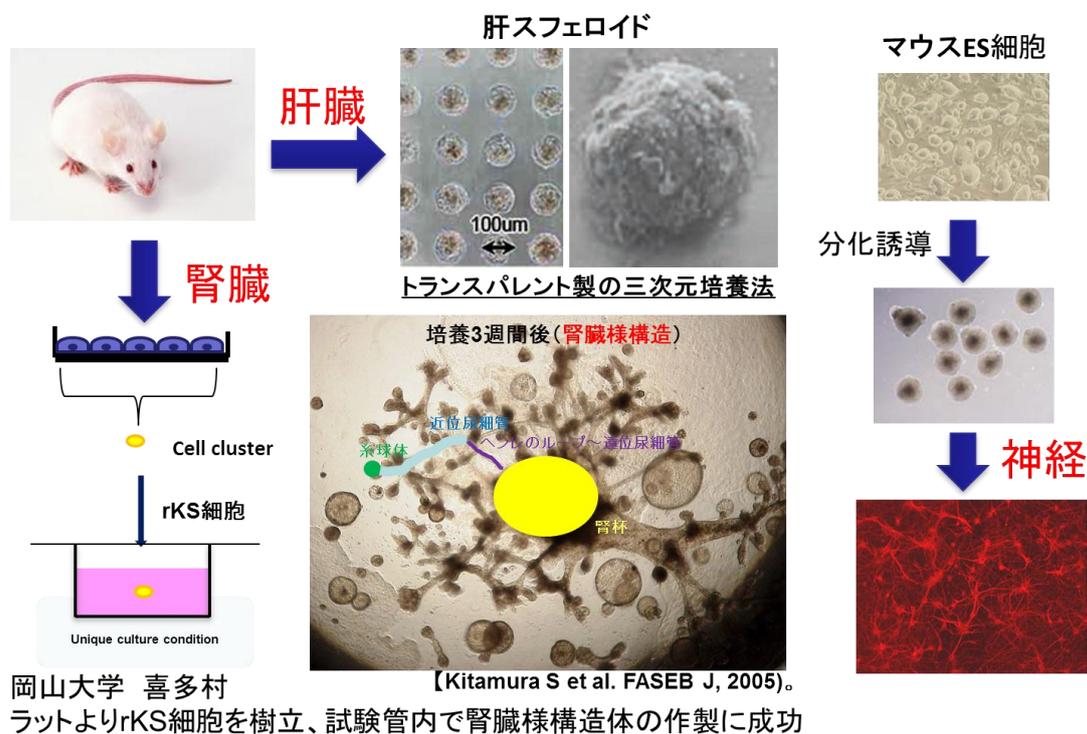


図 3-1-7. 肝臓、腎臓および神経細胞培養技術の概要

以下に、全体成果として、複数の目標項目別にそれら成果概要を記載する。

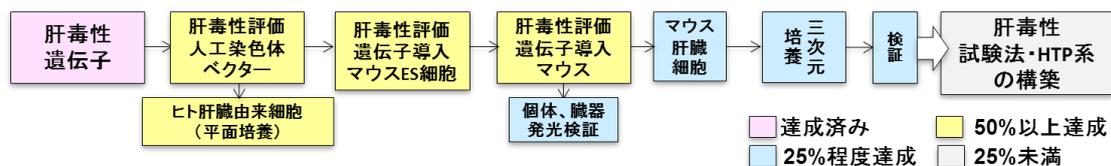
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-8)

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

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

肝臓毒性in vitro試験法の開発

～進捗成果まとめ～



- 肝毒性評価のためのエンドポイントを選定した。
 - **肝細胞死、肝再生** (実験動物を用いた肝障害の主たるエンドポイント)
- 肝細胞死を定量化**する発光レポーターをデザインし、その**機能を実証**した。
 - 代表的な肝障害誘発物質として**四塩化炭素**を選択した。
 - ヒト肝臓由来 HepG2細胞でレポーター遺伝子の有効性を実証した。
 - 細胞死ともない分泌型発光レポーターの発光量が増大するシステム
- 肝再生を定量化**する遺伝子導入細胞、遺伝子導入マウスの開発に成功した。
 - **肝再生で光るマウス**を作製した。**In vivo**でシステムの有効性を実証した。
- マウス肝臓から作製した肝臓細胞からスフェロイド培養により**三次元構造体**を構築した。

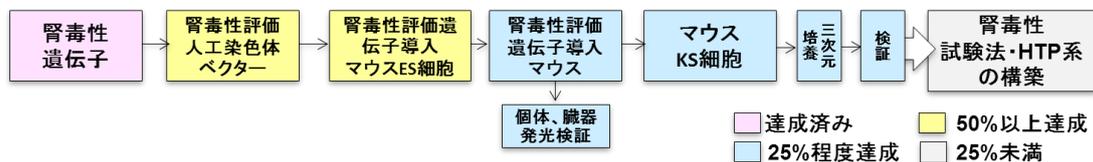
図 3-1-8. 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発の進捗と成果の概要

(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-9)

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

腎臓毒性in vitro試験法の開発

～進捗成果まとめ～



1. 腎毒性評価のためのエンドポイントを選定した。
 - **近位尿細管障害** (化合物による腎毒性が最も起こりやすい部位として選択)
 - 代表的な近位尿細管障害誘発物質として**シスプラチン**を選択した。
2. **近位尿細管障害を定量化**するレポーター遺伝子をデザインした。
 - 現在、遺伝子導入ES細胞を作製中。マウスを作製予定
3. **近位尿細管が光るマウス**を作製した。
 - マウス腎臓における近位尿細管の局在を赤色蛍光タンパク質で観察することが可能。
4. マウス腎臓から**腎臓幹/前駆細胞 (KS細胞)の樹立**に成功した。
(これまでラットでKS細胞を樹立し、3次元培養で腎臓様構造体の構築に成功していた。)
 - マウスでも、3次元培養システムを腎臓様構造体構築が観察された。

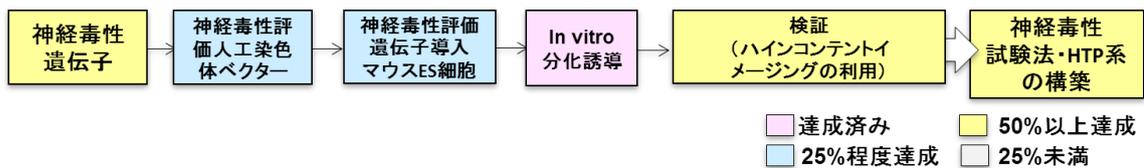
図 3-1-9. 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発の進捗と成果の概要

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発 (図 3-1-10)

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

神経毒性in vitro試験法の開発

～進捗成果まとめ～



1. 神経分化誘導効率の高いマウスES細胞株を選択し、**大脳神経への分化法**を確立した。
2. 分化神経細胞は主に**GABAおよびグルタミン神経**を含み、神経伝達レセプター等の**性状・成熟度はマウス大脳初代培養と類似**していることを示した。
3. 自動画像解析により神経毒性物質特異的な**神経変性を定量可能な形態観察法を確立**した。
→新規神経毒性マーカーの探索、検証、詳細解析等に活用
4. 既知神経マーカー **β III tubulin**を選択し**人工染色体ベクターを作製**した。
5. 新規マーカー探索のためにDNAマイクロアレイによる網羅的解析に着手した。

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

(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発 (図 3-1-11)

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

の特性を生かした技術の構築が行なえた。

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

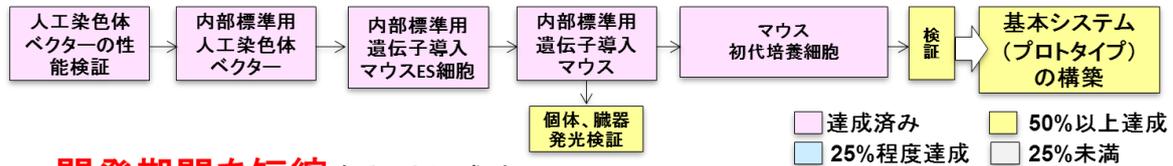
さらに内部標準マーカーである Hprt 遺伝子の発現をモニターできるキメラマウス、Afp 遺伝子をマーカーとした肝再生をモニターできるキメラマウスの樹立に成功し、これらが個体で想定通りに光ることを確認した。

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

ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた

基盤技術の開発

～進捗成果まとめ～



1. **開発期間を短縮**することに成功
→ レポーター遺伝子の構築から遺伝子導入マウスを作製して初代培養細胞作製まで、最短6週間でおこなった(染色体工学、遺伝子工学、細胞工学、発生工学技術の融合)。
2. **高品質**の遺伝子導入毒性評価レポーター細胞の作製が可能であることを実証
→ 長期間培養しても導入遺伝子の機能が変化しない(安定)。
→ 導入レポーター遺伝子が遺伝子の生理的な発現を再現している(高い再現性)。
→ 複数のレポーター遺伝子の導入を可能にした(精度の向上)。
3. レポーター遺伝子導入**ES細胞から**目的の**組織(細胞)を構築**できることを実証
→ 胚盤補完法により、in vitro分化誘導では作製困難な腎臓や肝臓の構築を実現した
→ 「光るマウス」と「光る細胞」を用いて、in vivoとin vitroの**相互比較**ができた。
4. In vitro有害性評価試験法を開発する**基盤システム(プロトタイプ)**を構築した。
→ 様々なエンドポイントに対応可能な試験法の国際標準化になるメソッドを目指す。
5. 発光レポーターによる**HTPアッセイの条件設定**を開始した。

図 3-1-11. ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発の進捗と成果の概要

3-1-2 個別要素技術成果

* 「3-1-2 個別要素技術成果」(p.129~p.267) は非公開

3-1-3 特許出願状況等

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

表3-1-1 論文、投稿、発表、特許リスト

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

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

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

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

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

3-2 目標の達成度

設定された複数の目標に対する成果・達成度を以下の表のとおり示す。

表 3-2-1. 目標に対する成果・達成度の一覧表

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験 法の開発	肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。また、野生型マウスの肝臓細胞を用い、培養条件を見出す。	内部標準マーカーを始め、肝特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。肝毒性バイオマーカーとして、細胞死と肝再生をモニターするレポーター等を作製しつつあり、人工染色体導入マウス作製もいくつか順調に進展しており最終目標に向かって着実に歩みつつある。	達成
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験 法の開発	腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。	内部標準マーカーを始め、腎特異的遺伝子等を明確にし、それらの機能性について検証した。腎毒性バイオマーカーは既に臨床で利用されてもので進めている。人工染色体導入マウス作製も順調に進展しており、最終目標に向かって着実に歩みつつある。	達成
(c) 神経毒性 in vitro 試験 法の開発	ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認しマーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製する。	ES 細胞から神経細胞への分化誘導法を明確し、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認してマーカー遺伝子候補を選定した。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製しており、最終目標に向かって順調に進展している。	達成
(d) ハイスルー プットスクリ	人工染色体ベクターの性能及び発光検出の検証を	MI-MAC 導入モデル株化細胞 (A9 細胞) に発光レポーターを挿入	達成

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

4. 標準化等のシナリオ、波及効果について

4-1 標準化等のシナリオ

本事業の研究開発成果である新規の有害性評価手法については、既述のとおり、OECD-TG化に向けた国際提案を行うことを将来的には目標となるように掲げている。OECD-TG化は、成果の実用化にとって必須のことと考えられる。現在、事業開始から2年半の中間地点であるが、プロジェクト基本計画に規定された中間目標、最終目標の達成に向けて、着実に進展しており、「OECD-TG化に向けた国際提案」についても、視野にとらえたいと考えている。

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

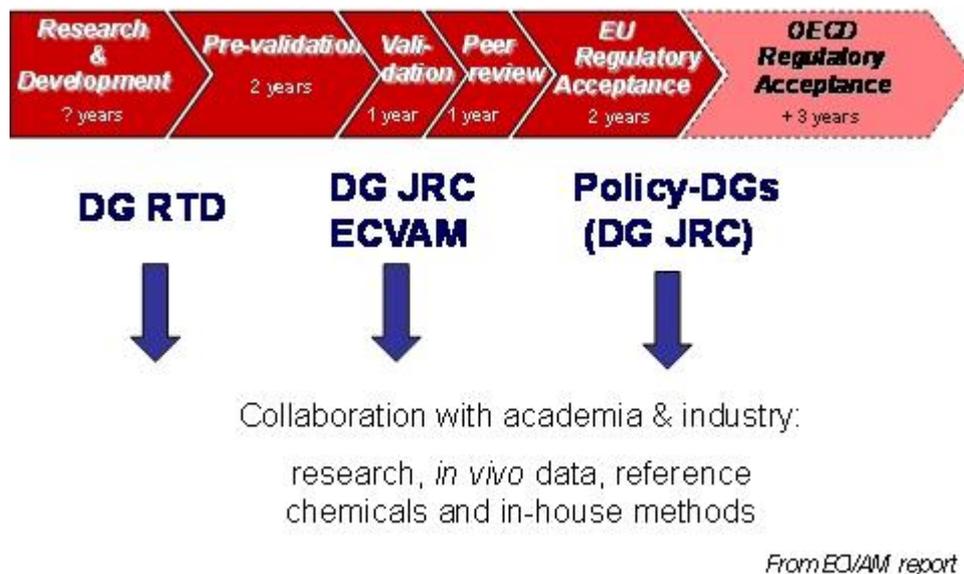


図 4-1-1. OECD-TG化への道筋と必要期間

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

OECD-TG化は、提案から承認されるまで通常5～10年の期間を要す

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

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

①山陰中央新報 平成 23 年 6 月 15 日

記事タイトル「とっとりバイオフィロンティア 経産省研究事業に」

②日本海新聞 平成 25 年 3 月 30 日

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

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

4-2 波及効果

波及効果については、以下のとおりである。

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

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

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

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等

5-1 研究開発計画

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

当初、基本計画に、動物種の違いを考慮してヒトでの有害性評価を想定とした『ヒト代謝機能導入の試験法開発』を含んでいたが、フィージビリティスタディーとして、ヒト遺伝子導入マウスによる代謝酵素の検討を行ったが酵素の特異性を確立することができず、外部有識者による研究開発推進委員会（平成 25 年 2 月開催）でのコメント等を踏まえ、PL 及び経済産業省は当該毒性の検出方法の開発に関し、現時点において技術的に困難であると判断し、本基本計画から削除することとした。

表 5-1-1. 事業全体の実施スケジュール

★ 中間評価

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

5-2 研究開発実施者の実施体制・運営

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

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

- ・推進委員会（原則2回/年開催）

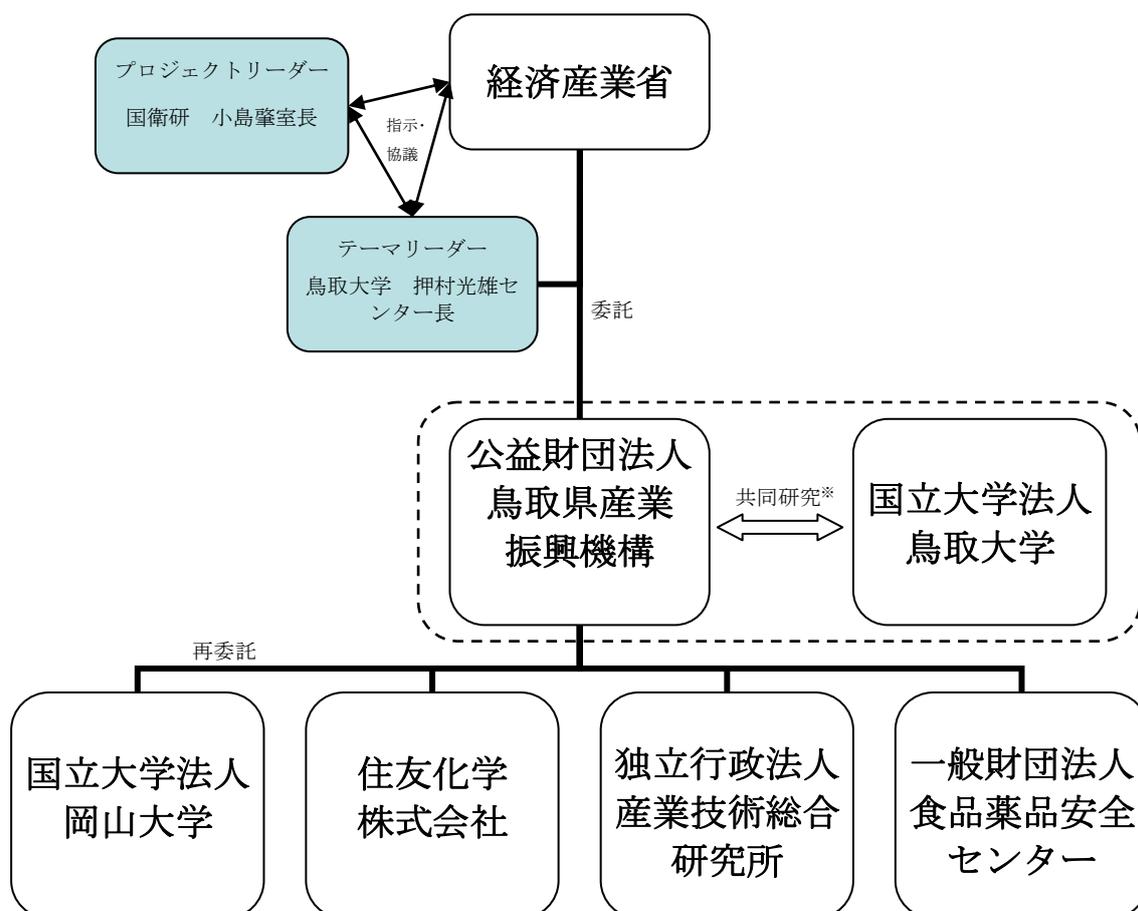
平成23年度 2回、平成24年度 2回、平成25年度（上期） 1回

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

- ・推進調整会議（原則3回/年開催、うち1回は研究開発項目①と合同）

平成23年度 3回（打ち1回合同）、平成24年度 3回（うち1回合同）

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



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

図 5-2-1. 研究開発実施体制

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

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

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

5-3 資金配分

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

表 5-3-1. 資金度配分

(単位：百万円)

年度 平成	23	24	25	26	27	合計
(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発	76	76	75			227
(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発						
(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発	17	17	17			51
(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発	10	10	10			30
合計	103	103	102			308

5-4 費用対効果

本事業の実施によりもたらされる費用対効果は、以下のように期待できる。本事業で開発を目指している *in vitro* 試験法では、日本発の複数の OECD ガイドライン誕生も期待できる信頼性の高い試験法完成を目指している。そのコストは、数十万～200万円/検体が見込まれ、動物を用いる *in vivo* 試験法、例えば28日間反復投与試験での約1000万円/検体のコストに比べて極めて低いコストが期待できる。本 *in vitro* 試験法にて試験を実施すれば、*in vivo* 試験法の約5～10倍の試験数を実施できることになり、このように試験数をこなせる本事業に投資された費用は投入されうる費用に見合った効果が期待できる。

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

今後、事業者がこれを活用して化学物質の有害性情報を低コストで取得して、自ら取り扱う化学製品の GHS 分類に活用したり、改正化審査下の届出データとして国に提供し、国が優先評価化学物質指定のためのスクリーニング評価に活用したりすることが期待できる。もし、OECD テストガイドライン化が実現すれば、事業者による自主的な有害性評価ばかりでなく、改正化審査の審査制度においても正式に位置付けられる可能性が高まる。

これらにより、化学物質を用いる産業の健全な発展及び化学物質による健康被害の未然防止が図られ、投入費用に比べ十分な効果が得られるものと考えられる。

5-5 変化への対応

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

第 3 章 評価

A. 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による
発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

第3章 評価

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

人の健康、環境にもたらすリスクをできるだけ少なくした化学物質の生産・使用は重要である。2020年に向けた取り組みとしての政策的意義は明確であり、先導性を意識して実行されている。国の事業として重要なテーマであると思われる。

個々の企業や研究機関において、有害性評価用データベースを構築し予測手法を開発するのは人材・費用・期間の面で困難であり、また中立性・信頼性の観点からも国が主導して事業を進めていくことは意義がある。

代替法の3R原則の実現に資する事業であると同時に、資源・労力・時間・費用の節約という面で、時代の要求に応じた適切な事業である。

また、網羅的遺伝子発現変動データを活用して化学物質の有害性予測手法を開発することは、より科学的で精度の高いアプローチとして意義がある。特に発がん性に関する新たな試験法の開発は、ハードルは高いが重要な意味を持っており、是非ともガイドライン化につながる研究成果を達成して頂きたい。

この研究成果がOECDガイドラインに取り入れられれば、国際貢献できる上、化学物質の評価のコスト削減が図られる。その結果、科学的に評価された安全な化学物質が流通することになり、国民の安全性を担保できると考えられる。

一方、遺伝子発現解析結果から新たな評価基準を生み出す研究は非常に高度であるにもかかわらず、その研究を全面的にCERIに依存している印象であるが、CERI以外の専門家を入れて、OECDガイドライン化を目指して内容を精査した方がいいと思われる。

また、事業内容は、石油精製物質に関連するものではあるが、「石油精製物質」という束縛は緩やかにしておく方がよい。

【肯定的意見】

(A委員) 国の事業として重要なテーマであると思われる。

(B委員) 2020年に向けた取り組みとしての政策的意義は明確であり、民間企業で実施するには難しい課題であることを考慮すると国の事業としては妥当で、事業は、先導性を意識して実行されています。

この研究成果がOECDガイドラインに取り入れられれば、国際貢献できた上、化学物質の評価のコスト削減が図られます。その結果、科学的に評価された安全な化学物質が流通することになり、国民の安全性を担保できると考えられます。

(C委員) 人の健康、環境にもたらすリスクをできるだけ少なくした化学物質の生産・使用は重要である。

化学物質の有害性評価において、従来の動物実験に基づく毒性評価は長年の毒性学的知見の蓄積により洗練化されているものの、多くの労力・期間・費用を必要とし、データの評価や解釈は毒性学者の経験に拠る面も大きく、不確実を伴う。

網羅的遺伝子発現変動データを活用して化学物質の有害性予測手法を開発することは、より科学的で精度の高いアプローチとして意義がある。

個々の企業や研究機関において、有害性評価用データベースを構築し予測手法を開発するのは人材・費用・期間の面で困難であり、また中立性・信頼性の観点からも国が主導して事業を進めていくことは意義がある。

(D委員) 特に発がん性に関する新たな試験法の開発は、ハードルは高いのですが重要な意味を持っており、是非ともガイドライン化につながる研究成果を達成して頂きたい。

(E委員) 代替法の3R原則の実現に資する事業であると同時に、資源・労力・時間・費用の節約という面で、時代の要求に応じた適切な事業である。国が関与しないと遂行が難しい事業である。

【問題点・改善すべき点】

(B委員) 遺伝子発現解析結果から新たな評価基準を生み出す研究は非常に高度であるにもかかわらず、その研究を全面的にCERIに依存している印象であるが、CERI以外の専門家を入れて、OECDガイドライン化を目指して内容を精査した方がいいと思われます。

(C委員) ・一般毒性について

肝毒性、腎毒性については、トキシコゲノミクスプロジェクト(TGP)をはじめとして多くの報告があるので、これらのデータを戦略的に活用するとともに、より独創性・信頼性の高い評価法を開発する必要がある。

・28日間反復試験で得られた病理情報に基づいてその毒性エンドポイントの有無を評価するバイオマーカーについては、診断バイオマーカーか予測バイオマーカーかの区別を明確にすべきである。

・ヒトを視野に入れた取り組み

本プロジェクトはラットの動物試験データに基づく有害性予測手法の開

発である。しかし、最終目標は人へのリスクを最小にすることである。参考とする化学物質の人への毒性や発がん性に対する信頼性の高いデータは少ないと思われるが、ヒトを視野に入れた取り組みの必要性がある。

(E委員) 事業内容は、石油精製物質に関連するものではあるが、それに限定すべきものでないので、厳しく言えば予算の流用である。資金の出所を問題にするほどではないにしろ、それに制約されて被験物質選択が左右されるのは望ましくないので、「石油精製物質」という束縛は緩やかにしておく方がよい。

2. 研究開発等の目標の妥当性

遺伝子発現データの取得と関連遺伝子の絞り込みを行うという目標は適切かつ妥当であり、遺伝子発現データに影響を与える要素を明らかにするための基礎データの取得も配慮されている。

評価未着手の大量の化学物質の効率的な評価方法の確立は、民間企業が主導して実施するには公平性の点も含めて困難であると考えられることから国が主導して、その手法を確立し OECD ガイドライン化を目指すことは価値が高い。特に、28 日間反復投与試験で、発がん性を予測する評価系の確立は価値の高い研究であるため、成功が期待される。そのためには、論文化を通して解析手法の情報公開することにより、国内外の専門家による方法論の追加検証が必要である。

一方、中間目標に対する具体的な目標及び達成すべき基準値（数値目標など）が設定されていないので達成度を正確に判断することが難しく、5 ヶ年事業計画において評価する化合物数、開発する一般毒性用エンドポイント（バイオマーカー）数等の具体的な数値目標を明確にする必要がある。

また、疾患関連遺伝子の同定を、この程度の規模の実験データで確定的に行うのはデータ解析上無理であるため、どの程度の精度で絞り込みが行えるのか、限界を明確にすべきである。

同じような遺伝子発現解析を用いた肝毒性評価や腎毒性評価は、すでに終了した厚労省プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクトのデータの有効活用が可能であるが、両者の連携が取れていなかったのが残念である。

【肯定的意見】

(A 委員) 中間評価時点での目標は設定されている。

(B 委員) 評価未着手の大量の化学物質の効率的な評価方法の確立は、民間企業が主導して実施するには公平性の点も含めて困難であると考えられることから国が主導して、その手法を確立し OECD ガイドライン化を目指すことは価値が高いと思います。

特に、28 日間試験で、発がん性予測する評価系の確立は価値の高い研究であるため、成功を期待しています。そのためには、論文化を通して解析手法の情報公開することにより、国内外の専門家による方法論の追加検証が必要です。

(D 委員) 遺伝子発現データに影響を与える要素を明らかにするための基礎データの取得も配慮されている。

(E委員) 遺伝子発現データの取得と関連遺伝子の絞り込みを行うという目標は適切かつ妥当である。

【問題点・改善すべき点】

(B委員) 同じような遺伝子発現解析を用いた肝毒性評価や腎毒性評価は、すでに終了した厚労省プロジェクトであるトキシコゲノミクスプロジェクトでも平行実施されていたが、両者の連携が取れていなかったのが残念です。しかし、トキシコゲノミクスプロジェクトの遺伝子解析データ、血液学データ、血液性化学データ、病理データ（個々の病理写真を含む）は、すでに公開されています。動物愛護の観点から、近年、安全性評価試験の麻酔方法が変更されていますが、麻酔方法の条件が異なっても取得された上記データの有効活用は可能です。そのため、肝毒性評価のために、動物実験を追加する必要はなく、その原資はプロジェクト内の別の研究に割り振りする方がよいと考えられます。一方、トキシコゲノミクスプロジェクトでは、腎毒性物質評価については、毒性発現部位を分けて遺伝子解析データを取得していないため、本プロジェクトで部位を分けた追加データ取得の価値はあると考えられます。

(C委員) 目標・指標が大まかである。

中間目標に対する具体的な目標及び達成すべき基準値（数値目標など）が設定されていないので達成度を正確に判断することが難しい。

例えば、動物試験を行う化学物質数、肝臓及び腎臓に対する毒性の種類を中間目標として設定すべきである。

予算（資金）上、実施できる試験・研究内容は限定されると思う。

肝・腎の毒性の種類などを考慮して、被験物質を選定したと思う。

事後評価時点を考慮した進捗率（達成度）を判断できる指標（数値）が必要と思う。

(D委員) 5ヵ年事業計画において評価する化合物数、開発する一般毒性用エンドポイント（バイオマーカー）数等の具体的な数値目標を明確にする必要がある。

(E委員) 疾患関連遺伝子の同定を、この程度の規模の実験データで確定的に行うのは、データ解析上無理である。どの程度の精度で絞り込みが行えるのか、限界を明確にすべきである。

3. 成果、目標の達成度の妥当性

バイオマーカー候補遺伝子の選定や、肝毒性及び腎毒性判定システムとして、レーダーチャート方式を考案し、毒性プロファイルを可視化したこと、腎発がん予測システムのプロトタイプを構築したことなど、事業計画で示された中間評価時の目標は、ほぼ達成されていると考えられる。

また、学会発表や論文発表も、適切に行われており、データの取得法と結果の提示については、かなりの進展が認められる。

一方、中間評価の時点では、予測システムの構築に焦点が当てられているが、最終的には、システムの性能の評価が新しいデータ（テストセット）で確認できなければならない。システムが OECD 等で公に認められるために、どのようなエビデンスが必要か、予め検討しておくことが必要である。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。また、今後の標準化を目指すためにも、プロジェクト全体として統一した麻酔法の確定が望まれる。

残り事業期間を考えた場合、より一層の研究活動のスピード化が必要と考えられる。

28 日間反復投与終了時の肝毒性と腎毒性については、従来の生化学検査や病理検査で検出可能であり、費用が高く検査成績までの時間がかかる遺伝子発現解析を実施する意味が明確でないように感じられる。

【肯定的意見】

(B委員) データ取得などの手法確立などについては、問題なく進行し、学会発表や論文発表により情報公開が進んでいます。

免疫毒性については、免疫抑制のため標的器官で遺伝子発現データ収集ができないため、研究を中止し、費用等を再配分する点は良い判断と思われま

す。

(C委員) 一般毒性として、4種類の肝毒性及び4種類の腎毒性について、バイオマーカー候補遺伝子を選定したこと。

肝毒性及び腎毒性判定システムとして、レーダーチャート方式を考案し、毒性プロファイルを可視化したこと。

腎尿細管がんに対するバイオマーカー遺伝子を選定し、腎発がん予測システムのプロトタイプを構築したこと。

(D委員) 事業計画で示された中間評価時の目標は、ほぼ達成されていると考えられる。

(E委員) 疾患関連遺伝子がある程度絞り込んだのは一つの成果である。論文発表も、

適切に行われている。データの取得法と結果の提示については、かなりの進展が認められる。

【問題点・改善すべき点】

(A委員) 腎病変に関しては、麻酔法の違いによる検討はなされているが、今後の標準化を目指すためにも、プロジェクト全体として（神経毒性を含めて）統一した麻酔法の確定が望まれる。

(B委員) 一番期待している発がん予測系開発については、CERIに依存しすぎの印象で、ガイドライン化に向けた戦略練り直しが必要と考えられます。即ち、情報開示と第三者による発がん予測系の再評価です。情報未開示のため第三者による予測系の有効性が確認できていません。

さらに、肝毒性と腎毒性の戦略も不明確の印象です。発がん予測系では、肝発がんが認められない投与期間の短い28日の肝臓から得られた遺伝子発現解析結果を用いて、投与期間が12倍延長した2年後の発がんを予想しています。一方、肝毒性と腎毒性は、何らかの表現系（例えば、肝細胞壊死や脂肪蓄積など）と直接リンクした遺伝子発現データを用いています。しかし、この場合、従来の生化学検査や病理検査で検出可能であり、費用が高く検査成績までの時間がかかる遺伝子発現解析を実施する意味が明確でないように感じられます。

(C委員) 28日間反復投与試験で得られた病情報に基づいてその毒性エンドポイントの有無を評価するマーカーの開発をしているが、診断バイオマーカーか、あるいは予測バイオマーカーかを明確にすべき。

バイオマーカー選定の際、毒性病理変化及び遺伝子発現量に対する時間的経過、用量の差をどのように考慮したかが不明である。

(D委員) 残り事業期間を考えた場合、より一層の研究活動のスピード化が必要と考えられる。

(E委員) 既存の他の試験法より優れた予測システムを構築するのが事業目的であるから、既存試験法の結果との比較をより丁寧に行うことが望まれる。サンプルサイズ1での比較は不適切である。

中間評価の時点では、予測システムの構築に焦点が当てられているが、最終的には、システムの性能の評価が新しいデータ（テストセット）で確認できなければならない。システムがOECD等で公に認められるために、どのよ

うなエビデンスが必要か、予め検討しておく必要がある。

4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

論文投稿、学会発表などの情報発信・普及活動は評価できる。

本プロジェクトで開発する有害性予測システムは、化学物質以外の医薬品や化粧品など広範囲での活用が期待できる。また、肝臓、腎臓、神経毒性のみならず、種々な毒性に応用可能であると考えられることから、本プロジェクトを通じて確立した技術の波及効果が期待できる。

また、中間評価時点で判断を下すのは困難であるが、国際規格化に向けた今後の取り組みに期待する。

一方、標準化に向けてのシナリオとして、現時点ではこれに関連する具体的な方法、特に国際化に向けての事項がはっきりしない。ガイドライン化を目指すのであれば、先行する事業の関連研究成果（肝発がん予測システムに関わる情報等）も速やかに公表すべきである。

また、データの再現性や施設間差などを検証して国際規格（標準）化に向け指標や基準を策定することが望まれる。

【肯定的意見】

(B委員) 方向性の意図は感じられ、データが揃ってきている部分については、標準化に向けた今後の取り組みに期待しています。研究内容は、学会の場などで公表されているため広報も進展しています。

(C委員) ・広報活動

論文投稿、学会発表などの情報発信・普及活動は評価できる。

・波及効果

本プロジェクトで開発する有害性予測システムは、化学物質以外の医薬品や化粧品など広範囲での活用が期待できる。

また、肝臓、腎臓、神経毒性のみならず、種々な毒性に応用可能であると考えられることから、本プロジェクトを通じて確立した技術の波及効果が期待できる。

(E委員) 中間評価時点でこれについて判断を下すのは困難であるが、国際規格化を指向していることは認められる。提出された報告・報告書で見たところでは、広報活動も適切と感じられる。

【問題点・改善すべき点】

(A委員) 標準化に向けてのシナリオとして、現時点ではこれに関連する具体的な方法、特に国際化に向けての事項がはっきりしない。

(B委員) 肝毒性、腎毒性や神経毒性は、中間段階でデータ取得が継続されているため、標準化のシナリオまで至っていない感があります。一方、発がん予測系は、前者に比べてデータが整っているにもかかわらず、J I S化や我が国主導の国際規格化等に向けた対策は遅れている印象です。

(C委員) 「本事業の成果は国際規格化を目指し、OECD ガイドラインなど公的試験法として、広く普及させることを想定している」と記載されているが、中間評価時点ではそれらに向けた具体的な対応は図られていない(文書化は実施)。

組織採取法や遺伝子発現データ取得・解析及び選定した毒性バイオマーカーに対し、データの再現性や施設間差などを検証して国際規格(標準)化に向け指標や基準を策定することが望まれる。

(D委員) ガイドライン化を目指すのであれば、先行する事業の関連研究成果(肝発がん予測システムに関わる情報等)も速やかに公表すべきである。

(E委員) この項目は中間評価の時点で評価しにくいものである。最終的に、波及効果をどのように想定するか、事前に方針を明確にしておくことが望まれる。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

先行する事業の成果やノウハウの応用も考慮した研究活動が行われており、研究施設の選定、事業実施スケジュール、実施体制は妥当と感じられる。

各種学会発表や論文発表などで公表されていることから費用対効果は認められたと考えられる。

一方で、最終目標が、我が国主導の国際規格化であるならば、研究開発計画が若干遅れていると感じられる。特に、期待の大きい発がん予測系については、前のプロジェクトの延長であるため、次のステップへの速やかな展開を期待する。

個々の実施者での研究成果は得られていると考えられるが、実施者間の連携によるシナジー効果は十分に見られていないように感じる。

毒性関連遺伝子の絞り込み及び特定遺伝子の選定、発がん性予測などにおいて、バイオインフォマティクスの知識・能力が重要であり、また毒性研究者との協力・連携体制が必須である。

中間時点での研究内容や進捗を再評価し、免疫毒性試験系の評価を中止し、資源の再配分を図った点は、柔軟な対応ができており、リソースの有効活用の観点からも適切な判断であるが、免疫毒性を中止したのは、周囲の状況変化への対応というより、当初計画の不備によるものと感じられる。

【肯定的意見】

(B委員) 10%の資金カットの事実は説明会で紹介されていましたが、費用削減により事業進行に遅延が生じているとの内容の説明がなかったことから、資金配分の過不足は感じられませんでした。研究内容については、各種学会発表や論文発表などで公表されていることから費用対効果は認められたと考えられます。更に、中間時点での研究内容や進捗を再評価し、免疫毒性試験系の評価を中止し、資源の再配分を図った点は、柔軟な対応ができていると考えられます。

(C委員) 研究開発の資金配分・費用対効果・実施者間の連携等は妥当である。
免疫毒性の開発中止はリソースの有効活用の観点からも適切な判断である。

(D委員) 先行する事業の成果やノウハウの応用も考慮した研究活動が行われている。

(E委員) 研究施設の選定、事業実施スケジュール、実施体制は妥当と感じられる。

【問題点・改善すべき点】

- (B委員) 最終目標が、我が国主導の国際規格化であるならば、研究開発計画が若干遅れていると感じられます。特に、期待の大きい発がん予測系については、前のプロジェクトの延長であるため、次のステップへの速やかな展開を期待します。発がん予測系の遅れの原因は不明ですが、大規模データを扱っている CERI の一部の担当者への過度な負担などを懸念します。
- (C委員) 研究内容に対する具体的な目標設定を行う研究マネジメント体制が望まれる。
- 毒性関連遺伝子の絞り込み及び特定遺伝子の選定、発がん性予測などにおいて、バイオインフォマティクスの知識・能力が重要であり、また毒性研究者との協力・連携体制が必須である。本プロジェクトにおけるこの体制については不明であるが、この連携関係を大事にして研究を進めていただきたい。
- (D委員) 個々の実施者での研究成果は得られていると考えられるが、実施者間の連携によるシナジー効果は十分に見られていないように感じる。
- (E委員) 資金の内部配分の妥当性や、他に費用対効果が優れているものがないかどうかは、報告書で適切に考察されていないので評価が困難である。報告書を読んだところでは、免疫毒性を中止したのは、周囲の状況変化への対応というより、当初計画の不備によるものと感じられる。

6. 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。

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。

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。

【肯定的意見】

(B委員) 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ます。しかし、今後、発がんや肝毒性評価に関して既知物質データを追加することは、価値が高くありません。実践では、微妙な結果が出る場合が多く、現行の成績からカットオフ値を決定して、(今回のプロジェクトとして評価した方がいいと考えられる評価未了の) 石油系の物質を用いて、*in vitro* 評価系と同時に発がん性を評価して、結果を雑誌に投稿して、レフリーやエキスパートと議論した方がいいと思います。

(C委員) 化学物質の有害性評価手法の開発が、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科学的に評価するアプローチであること。

開発目標の化学物質の有害性評価手法は、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が期待できること。

個々の企業や研究機関において化学物質の有害性評価手法を研究開発す

るのではなく、国が主導して事業を進めていくこと。

Tox-in vitro 研究と Tox-omics 研究との連携。

(D委員) 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いる。

(E委員) 研究課題は非常に重要なものである。実験の進め方は適切で、実験結果の妥当性も認められる。

【問題点・改善すべき点】

(B委員) 非発がん時点のサンプルから将来の発がんを予測するのは、非常に難しいと思います。今回の発がん予測システムは、いわゆる発がんすると考えられる物質を28日間投与し、摘出した肝臓を遺伝子発現量解析して標的遺伝子の発現解析値の集合を肝臓発がん予測に利用しています。しかし、発がん物質を投与した個体全例が腫瘍を形成するわけではありません。28日間投与では、肝臓に発がんし易い状況を提供しているだけで、発がんしているわけではありません。従って、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ています。この点が、遺伝子発現解析データを用いた発がん予測系の落とし穴と考えられるため、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す。

(C委員) 28日間反復投与試験で得られた病理情報に基づいてその毒性エンドポイントの有無を評価するバイオマーカーの開発において、そのマーカーが診断バイオマーカーか、あるいは予測バイオマーカーかを明確にして検討すべきである。

具体的な目標及び達成すべき基準値が設定されていない。より具体的な数値目標などを設定することが望ましい。

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。

今後も、本事業資金は限られると考えられるので、今までに実施された厚生労働省及び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。

(D委員) 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。

(E委員) 得られる情報の量と信頼性は、データの取得量に応じたものにならざるを得ない。データ取得計画（動物数、群数、被験物質数等）と結果の報告において、これについての適切な考察が必要である。

疾患関連遺伝子を同定する手法については、多くの研究者が様々な提案をしているが、今回の報告にはその提案が適切に取り入れられていないと感じられる。提案されているいろいろな手法の利点・欠点と限界を吟味し、少しでも信頼性の高い結果が得られる手法を用いて、疾患関連遺伝子の同定を行い、その信頼性についての的確な判断を下し、情報として提供することを勧めたい。

構築した判別法の性能をリサンプリング等の手法で評価しているが、少量のデータだけで性能の十分な評価は無理である。性能評価のためのテスト用データの取得計画、妥当性評価のための解析計画を事前に準備しておくことが望ましい。

7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

○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。

○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3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。

○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。

○本プロジェクトはラットの動物試験データに基づいて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。

○優秀なバイオインフォマティシャンと毒性研究者との協力・連携体制で推進すること。

○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。

○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。

○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。

○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。

【各委員の提言】

(A委員) 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。

(B委員) 本事業は 2020 年に向けた取り組みとしての政策的意義は明確であり、国の事業としては妥当で、先導性を意識して実行されています。J I S 化や我が国主導の国際規格化等に向けて対応することにより、評価方法が最終的に OECD ガイドラインに取り入れられれば、化学物質のプロファイル評価のコスト削減が図られ、国際貢献につながるため、事業継続を望みます。

一方、発がん予測系は、アルゴリズムが未公表であるため、外部評価が完了していません。そのため、発がん予測系の価値が不明確です。一番の懸念は、評価系を公表して国内外の第 3 者（遺伝子解析の研究者、学会、雑誌のレフリー、規制当局）が否定的な見解になった場合、結果的に再度データ解析することによる評価系の再構築を迫られることです（振り出しに戻る）。そのため、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 3 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ます。

(C委員) 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。

本プロジェクトはラットの動物試験データに基づいて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。

優秀なバイオインフォマティシャンと毒性研究者との協力・連携体制で推進すること。

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。

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。

特に今後の被験物質の選定やバイオマーカー遺伝子の精度の向上・絞り込みについては、TGP のノウハウを活用することが、本プロジェクトの効率的な推進につながると考える。

さらに、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。

(D委員) 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。

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro
試験法の開発

第3章 評価

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

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

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

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

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

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

【肯定的意見】

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

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

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

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

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

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

【問題点・改善すべき点】

(F委員) 問題点・改善すべき点として、特記すべき事項はない。

(H委員) 事業の目的・政策的位置付けに関しては大きな問題点は無い。

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

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

2. 研究開発等の目標の妥当性

事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、迅速かつ効率良く有害性を評価できる新たな試験法を開発することを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。

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

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

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

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

【肯定的意見】

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

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

(H 委員) 事業全体として明確な目標が設置され、その解決手段として毒性評価用レポーター遺伝子を導入した細胞を用いて、迅速かつ効率良く有害性を評価できる新たな試験法を開発することを中心に据えた、具体的な個別目標が設定されている。これらはいずれも適切なものであると評価する。各論部分に関しても個別に具体的な達成目標が設置されており、適切である

と評価する。

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

【問題点・改善すべき点】

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

3. 成果、目標の達成度の妥当性

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

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

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

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

国際標準化に向けての達成度については、十分というにはまだかなり距離がある。

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

【肯定的意見】

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

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

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

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

（I 委員） 目標に対する成果の大枠は提示されている。

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

【問題点・改善すべき点】

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

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

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

（J 委員） 国際標準に向けて十分というにはまだかなり距離がある。

4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性

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

我が国主導型の国際標準化に向けた意図はシナリオとして十分示されている。

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

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

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

【肯定的意見】

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

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

(G委員) 現状のモデル系は標準化に潜在的な価値を有している。

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

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

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

【問題点・改善すべき点】

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

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

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

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

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

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

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

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

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

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

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

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

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

【肯定的意見】

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

(G委員) 個別技術の専門家を毒性評価の専門家がよくまとめていると思う。

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

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

(I委員) 概ね検討されている。

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

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

【問題点・改善すべき点】

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

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

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

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

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

6. 総合評価

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

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

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

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

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

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

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

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

【肯定的意見】

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

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

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

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

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

(I委員) 我が国発の科学・技術導入が計られている点は魅力的である。

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

【問題点・改善すべき点】

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

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

の策定を希望する。

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

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

7. 今後の研究開発の方向等に関する提言

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

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

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

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

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

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

○本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。

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

○個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。

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

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

【各委員の提言】

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

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

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

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

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

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

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

(I 委員) 本活動の出口(成果)について、焦点を明確にする。

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

個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。

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

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

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

第4章 評点法による評点結果

第4章 評点法による評点結果

「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」に係るプロジェクト評価の実施に併せて、以下に基づき、本評価検討会委員による「評点法による評価」を実施した。その結果は「3. 評点結果」のとおりである。

1. 趣旨

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

(1)数値での提示は評価結果の全体的傾向の把握に有効である、

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

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

これらを踏まえ、プロジェクトの中間・事後評価においては、

(1)評価結果をできる限りわかりやすく提示すること、

(2)プロジェクト間の相対評価がある程度可能となるようにすること、

を目的として、評価委員全員による評点法による評価を実施することとする。

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

2. 評価方法

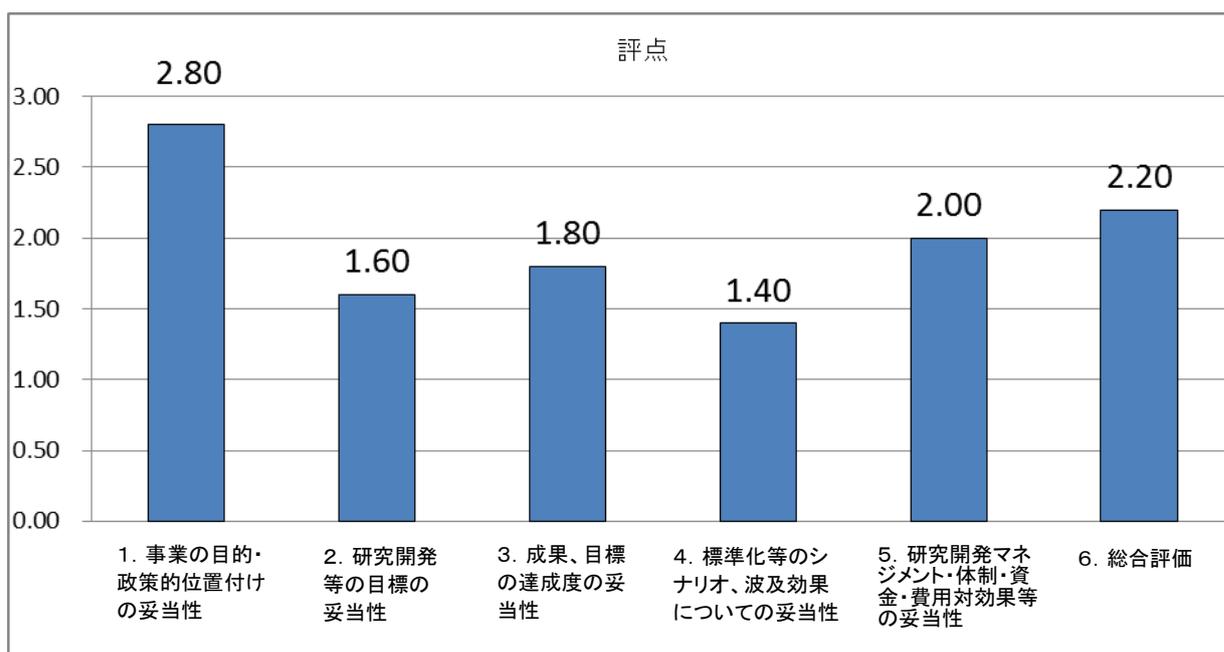
- ・各項目ごとに4段階(A(優)、B(良)、C(可)、D(不可)<a, b, c, dも同様>)で評価する。
- ・4段階はそれぞれ、 $A(a) = 3$ 点、 $B(b) = 2$ 点、 $C(c) = 1$ 点、 $D(d) = 0$ 点に該当する。
- ・評価シートの記入に際しては、評価シートの《判定基準》に示された基準を参照し、該当と思われる段階に○を付ける。
- ・大項目(A, B, C, D)及び小項目(a, b, c, d)は、それぞれ別に評点を付ける。
- ・総合評価は、各項目の評点とは別に、プロジェクト全体に総合点を付ける。

3. 評点結果

評点法による評点結果

A. 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)

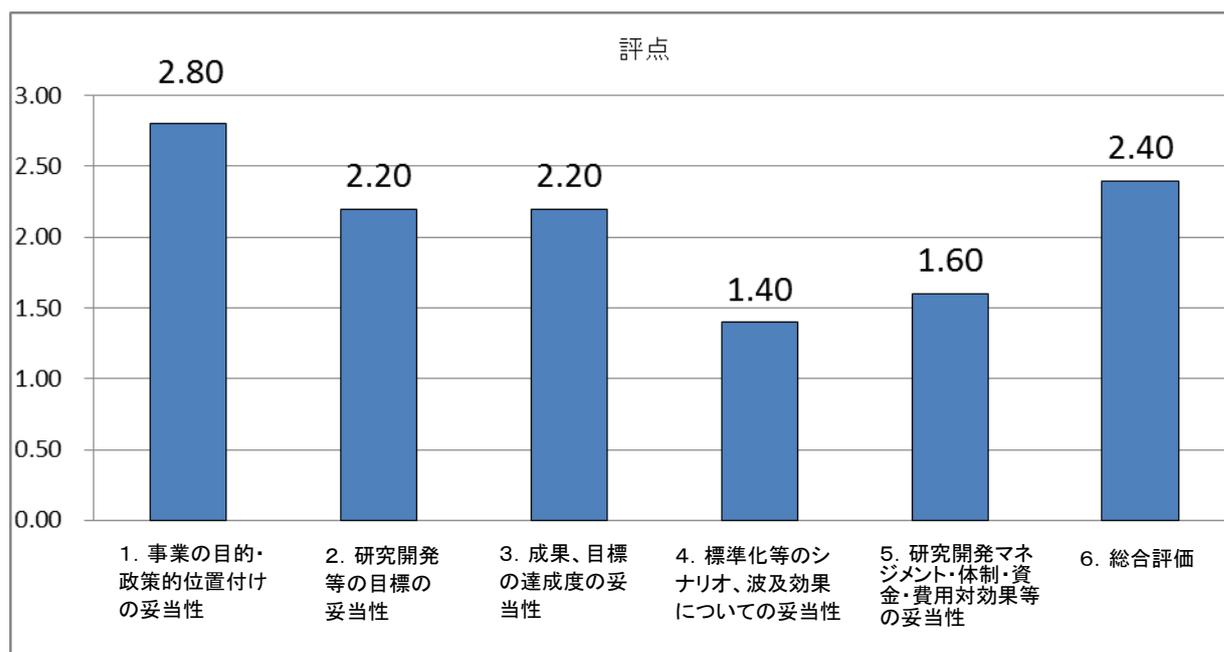
	評点	A 委員	B 委員	C 委員	D 委員	E 委員
1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性	2.80	3	3	3	3	2
2. 研究開発等の目標の妥当性	1.60	2	2	1	1	2
3. 成果、目標の達成度の妥当性	1.80	2	1	2	2	2
4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性	1.40	1	1	2	1	2
5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性	2.00	1	2	2	2	3
6. 総合評価	2.20	2	3	2	2	2



評点法による評点結果

B. 石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発 (肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発)

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



第5章 評価ワーキンググループのコメント 及び対処方針

第5章 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

「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」の中間評価に対する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推進課の対処方針は、以下のとおり。

(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。

經濟產業省技術評価指針

平成 2 1 年 3 月 3 1 日

目次

経済産業省技術評価指針の位置付け	1
I. 評価の基本的考え方	4
1. 評価目的	4
2. 評価の基本理念	4
3. 指針の適用範囲	5
4. 評価の類型・階層構造及びリンクージュ	5
5. 評価方法等	5
6. 評価結果の取扱い等	6
7. 評価システムの不断の見直し	7
8. 評価体制の充実	7
9. 評価データベース等の整備	7
10. 評価における留意事項	7
II. 評価の類型と実施方法	9
II. 1. 技術に関する施策評価	9
(1) 事前評価	9
(2) 中間・終了時評価	9
II. 2. 技術に関する事業評価	10
II. 2. 1. 研究開発制度評価	10
(1) 事前評価	10
(2) 中間・終了時評価	10
II. 2. 2. プロジェクト評価	11
(1) 事前評価	11
(2) 中間・終了時評価	11
II. 2. 3. 競争的資金制度による研究課題に関する評価	12
(1) 事前評価	12
(2) 中間・終了時評価	13
II. 3. 追跡評価	14

経済産業省技術評価指針の位置付け

経済産業省技術評価指針（以下、「本指針」という。）は、経済産業省が、経済産業省における技術に関する施策及び技術に関する事業（以下、「技術に関する施策・事業」という。）の評価を行うに当たって配慮しなければならない事項を取りまとめたガイドラインである。

本指針は、「産業技術力強化法」（平成12年法律第44号）第10条の規定、「科学技術基本計画」（平成18年3月閣議決定）、「研究開発システムの改革の推進等による研究開発能力の強化及び研究開発等の効率的推進等に関する法律」（平成20年法律第63号）第34条の規定及び「国の研究開発評価に関する大綱的指針」（平成20年10月内閣総理大臣決定）（以下、「大綱的指針」という。）に沿った適切な評価を遂行するための方法を示す。

同時に、「行政機関が行う政策の評価に関する法律」（平成13年法律第86号）（以下、「政策評価法」という。）に基づく「経済産業省政策評価基本計画」（以下、「政策評価基本計画」という。）に沿った、経済産業省政策評価のうち研究開発に関する部分の実施要領としての性格を持つ。したがって、技術に関する施策・事業についての評価の結果は、政策評価基本計画に基づき実施される事前評価及び事後評価に適切に反映・活用を図る。

技術評価は、政策評価法上要請される評価を含め政策評価の一環としての位置付けを有することから、本指針は、技術に関する施策・事業の成果や実績等を厳正に評価し、それを後の技術に関する施策・事業の企画立案等に反映させる政策サイクルの一角としての評価の在り方について定めるものである。

ただし、技術に関する施策・事業に係る評価は、競争的資金制度による研究課題、プロジェクトといった研究開発の内容や性格、実施体制等の態様に応じた評価方法に拠るべきであるとともに、評価の厳正さと効率性を両立するためには、評価をとりまく様々な状況に応じた臨機応変な評価手順を設定する必要がある。さらに、評価手法は日進月歩であり、今後よりよい評価手法が提案されることも十分考えられる。したがって、本指針では共通的なルール及び配慮事項を取り上げることとし、より詳細な実施のプロトコルは評価マニュアルの作成等により記述することで、機動的な実施を図ることとする。

研究開発機関が自ら実施する評価をその機関の自己改革の契機とするような自律的なシステムの構築に努め、研究開発を実施する独立行政法人が、大綱的指針及び本指針に沿って、研究開発評価の実施に関する事項について、明確なルールを定め、研究開発評価の実施及び評価結果の活用が適切かつ責任を持って行われるよう、所管官庁としての責務を果たすものとする。

◎本指針における用語については、次に定めるところによる。

- ・競争的資金制度：資金を配分する主体が、広く一般の研究者（研究開発に従事している者又はそれらの者から構成されるグループをいう。）、企業等又は特定の研究者、企業等を対象に、特定の研究開発領域を定め、又は特定の研究開発領域を定めずに研究課題を募り、研究者、企業等から提案された研究課題の中から、当該課題が属する分野の専門家（当該分野での研究開発に従事した経験を有する者をいう。）を含む複数の者による、研究開発の着想の独創性、研究開発成果の先導性、研究開発手法の斬新性その他の科学的・技術評価又は経済的・社会的評価に基づき、実施する課題を採択し、当該課題の研究開発を実施する研究者等又は研究者等が属する組織若しくは企業等に資金を配分する制度をいう。
- ・研究開発制度：資源配分主体が研究課題を募り、提案された課題の中から採択した課題に研究開発資金を配分する制度をいう。
- ・プロジェクト：具体的に研究開発を行う個別の実施単位であり、明確な目的や目標に沿って実施されるものをいう。研究開発制度（競争的資金制度を含む）による研究課題は、本指針上プロジェクトには該当しない。
- ・研究開発機関：国からの出資、補助等の交付を受けて研究開発を実施し、又は研究開発の運営管理を行う機関をいう。
- ・技術に関する事業：具体的に研究開発を行う個別の実施単位をいい、「研究開発制度（競争的資金制度を含む）」、「プロジェクト」及び「競争的資金制度による研究課題」により構成される。
- ・技術に関する施策：同一又は類似の目的を有する技術に関する事業のまとまりをいい、当該目的との関係で必要な研究開発以外の要素（調査等）を含む場合がある。
- ・政策評価書：本指針において用いる「政策評価書」とは経済産業省政策評価実施要領を踏まえた評価書をいう。
- ・政策サイクル：政策の企画立案・実施・評価・改善（plan-do-check-action）の循環過程をいう。
- ・評価システム：評価目的、評価時期、評価対象、評価方法等、評価に係るあらゆる概念、要素を包含した評価制度、体制の全体をいう。
- ・推進課：技術に関する事業を推進する課室（研究開発担当課室）をいう。推進課は、評価結果を反映させるよう努力する義務がある。
- ・主管課：技術に関する施策の企画立案を主管する課室及び予算等の要求事項を主管する課室をいう。
- ・査定課：予算等の査定を行う課室（大臣官房会計課、資源エネルギー庁総合政策課等）をいう。
- ・有識者等：評価対象となる技術に関する施策・事業について知見を有する者及び研究開発成果の経済的・社会的意義につき指摘できる人材（マスコミ、ユーザ、人文・社会学者、投資家等）をいう。
- ・外部評価者：経済産業省に属さない外部の有識者等であって、評価対象となる技術に関する施策・事業の推進に携わっていない者をいう。
- ・外部評価：外部評価者による評価をいい、評価コメントのとりまとめ方法としてパネルレビュー

(評価者からなる委員会を設置(インターネット等を利用した電子会議を含む。)して評価を行う形態)による場合とメールレビュー(評価者に対して郵便・FAX・電子メール等の手段を利用して情報を提供し、評価を行う形態)による場合とがある。

- 評価事務局：技術に関する施策・事業の評価の事務局となる部署をいい、評価者の行う評価の取りまとめ責任を負う。
- 評価者：評価の責任主体をいい、パネルレビューによる場合には外部評価者からなる委員会が責任主体となる。また、評価の結果を踏まえて、資源配分の停止や変更、技術に関する施策・事業の内容の変更に責任を有するのは企画立案部門である技術に関する施策・事業の推進課及び主管課である。
- 終了時評価：事業終了時に行う評価であり、事業が終了する前の適切な時期に行う終了前評価と事業の終了直後に行う事後評価がある。

I. 評価の基本的考え方

1. 評価目的

(1) より良い政策・施策への反映

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

(2) より効率的・効果的な研究開発の実施

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

(3) 国民への技術に関する施策・事業の開示

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

(4) 資源の重点的・効率的配分への反映

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

2. 評価の基本理念

評価の実施に当たっては、以下の考え方を基本理念とする。

(1) 透明性の確保

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

(2) 中立性の確保

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

(3) 継続性の確保

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

(4) 実効性の確保

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

とのない費用対効果の高い評価を行うこと。

3. 指針の適用範囲

- (1) 本指針においては、多面的・階層的な評価を行う観点から、経済産業省における具体的に研究開発を行う個別の実施単位である研究開発制度、プロジェクト及び競争的資金制度による研究課題である技術に関する事業並びに同一又は類似の目的を有する技術に関する事業のまとめである技術に関する施策を評価対象とする。
- (2) 国費の支出を受けて技術に関する事業を実施する民間機関、公設試験研究機関等の評価については、当該事業の評価の際等に、これら機関における当該事業の研究開発体制に関わる運営面に関し、国費の効果的・効率的執行を確保する観点から、必要な範囲で評価を行う。
- (3) 上記(2)の規定にかかわらず、独立行政法人が運営費交付金により自ら実施し、又は運営管理する技術に関する事業については、独立行政法人通則法（平成11年法律第103号）及び大綱的指針に基づいて実施されるものであり、本指針の対象としない。なお、技術に関する施策には、これら事業は含まれるものとする。
- (4) 評価の種類としてはこの他に研究者等の業績の評価が存在するが、これは研究開発機関の長が評価のためのルールを整備した上で、責任を持って実施することが基本であり、本指針の対象としない。

4. 評価の類型・階層構造及びリンケージ

(1) 実施時期による類型

評価はその実施時期により、事前評価、中間・終了時評価及び追跡評価に類型化される。

(2) 評価の階層構造

経済産業省における技術評価では、技術に関する施策・事業での評価を基本的な評価単位とするが、政策効果をあげるために、特に必要があると認められるときには、関連する複数の技術に関する施策・事業が有機的に連携をとって

体系的に政策効果をあげているかを評価することとする（これは経済産業省政策評価実施要領における「政策体系評価」に対応するものと位置付ける。）。

(3) 実施時期による評価のリンケージ

中間・終了時評価は、技術に関する施策・事業の達成状況や社会経済情勢の変化を判断し、計画の見直しや後継事業への展開等の是非を判断するものである。また、事前評価での予想が実際にどのような結果となったか、予算措置は妥当であったか等を確認することにより、事前評価の方法を検証し得るものである。したがって、中間・終了時評価の結果をその後の産業技術政策・戦略の企画立案や、より効果的な事前評価の評価手法の確立に反映させるよう努めるものとする。

また、中間・終了時評価の結果は、追跡評価にて検証されるものである。

5. 評価方法等

厳正な評価を行うためには、評価方法、評価項目等に客観性を持たせることが必要であること

から、本指針をはじめ評価実施に係る諸規程等を整備の上、公開するものとする。

技術評価室は本指針を踏まえ、評価マニュアル等を策定するとともに、円滑な評価の実施のための指導及び評価システムの維持管理を行う。

(1) 施策原簿

技術に関する施策の基本実施計画書、政策評価書等をもって施策原簿とする。施策原簿を作成・改定した場合は、速やかにその写しを技術評価室へ提出する。

(2) 事業原簿

技術に関する事業の基本実施計画書、政策評価書等をもって事業原簿とする。研究開発制度及びプロジェクトの事業原簿を作成・改定した場合は、速やかにその写しを技術評価室へ提出する。

(3) 評価項目・評価基準

評価の類型及び技術に関する施策・事業の態様等に応じて標準的な評価項目・評価基準を技術評価室が別に定めることとする。

(4) 評価手続・評価手法

評価の類型に応じて適切な評価手法を用いるものとする。なお、複数の事業間の相対的評価を行う場合等においては、評点法の活用が有効と考えられ、評価の類型及び対象案件の態様に応じ適宜活用することが望ましい。

(5) 評価の簡略化

評価の実施に当たっては、評価コストや被評価者側の過重な負担を回避するため、評価対象となる事業に係る予算額が比較的少額である場合には、評価項目を限定する等の簡略化を行うことができるものとする。なお、簡略化の標準的な方法については技術評価室が別に定める。

6. 評価結果の取扱い等

(1) 評価結果の取扱い

評価事務局は、評価終了後速やかに評価書の写しを技術評価室に提出する。技術評価室は全ての評価結果について、これまでに実施された関連調査及び評価の結果、評価の実施状況等を踏まえつつ意見をまとめ、査定課、秘書課及び政策評価広報課に報告することができる。

(2) 予算査定との関係

査定課は、技術評価室から事前評価及び中間評価の評価書の提出を受けた場合は、技術評価室の意見を踏まえつつ技術に関する施策・事業の評価等を行う。事前評価に関しては査定課の評価を終えた事前評価書に記載された技術に関する施策・事業の内容をもって、推進課又は主管課と査定課との間の合意事項とみなし、査定課はこれを踏まえて予算査定を行う。中間評価に関しては、査定課は中間評価結果を踏まえて予算査定を行う。

(3) 評価結果等の公開の在り方

評価結果及びこれに基づいて講ずる又は講じた措置については、機密の保持が必要な場合を除き、個人情報や企業秘密の保護、知的財産権の取得等に配慮しつつ、一般に公開することとする。なお、事前評価については、政策立案過程の透明化を図る観点から、評価事務局は予算が経済産業省の案として確定した後に、公開するものとする。パネルレビューを行う場合にお

ける議事録の公開、委員会の公開等については、「審議会等の透明化、見直し等について」（平成7年9月閣議決定）に準じて行うものとする。

7. 評価システムの不断の見直し

いかなる評価システムにおいても、評価は評価者の主観的判断によってなされるものであり、その限りにおいては、完璧な客観性、公平性を求めることは困難である。したがって、評価作業が終了するたびごとにその評価方法を点検し、より精度の高いものとしていく努力が必要である。また、本指針については、こうした一連の作業を踏まえ、原則として毎年度見直しの要否を検討する。

8. 評価体制の充実

評価体制の充実を図るため、研究者の評価者としての活用などにより評価業務に携わる人材を育成・確保するとともに、研究開発費の一部を評価費用に充てるなど評価に必要な資源を確保する。

9. 評価データベース等の整備

技術評価室は、国内外の適切な評価者を選任できるようにするため、及び個々の評価において普遍性・信頼性の高い評価を実現するため、個々の技術に関する施策・事業についての研究者、資金、成果、評価者、評価結果等をまとめたデータベースを整備する。

また、競争的資金制度による研究課題に関する評価など、審査業務等を高度化・効率化するために必要な電子システムの導入も促進する。

10. 評価における留意事項

(1) 評価者と被評価者との対等性

① 評価者と被評価者との関係

評価作業を効果的に機能させるためには、評価者と被評価者の双方が積極的にその知見と情報を提供し合うという協調的関係と、評価者もその評価能力を評価されるという意味で評価者と被評価者とが相互に相手进行评估するという緊張関係とを構築し、この中で、討論を行い、評価を確定していく必要がある。

この際、評価者は、不十分な成果等被評価者が自ら進んで提示しない事実があるかどうかを見極める能力が要求される。一方、被評価者は、評価対象の技術に関する施策・事業の位置付けを明確に認識するとともに、評価結果を正確に理解し、確実にその後の技術に関する施策・事業の創設、運営等に反映させていくものとする。

② 評価者に係る留意事項

研究者が評価者となる場合、評価者は、評価作業を評価者自らの研究を妨げるものとして捉えるべきではなく、自らの研究の刺激になる行為として、積極的に取り組むことが必要である。

また、研究開発成果を、イノベーションを通じて国民・社会に迅速に還元していく観点から、産業界の専門家等を積極的に評価者に選任する。

③ 被評価者に係る留意事項

被評価者は、評価を事業の質をより高めるものとして積極的に捉え、評価は評価者と被評価者の双方の共同作業であるとの認識の下、真摯な対応を図ることが必要である。

(2) 評価の不確実性

評価時点では見通し得なかった技術、社会情勢の変化が将来的に発生し得るという点で評価作業は常に不確実性を伴うものである。したがって、評価者は評価の精度の向上には、必然的に限界があることを認識した上で、評価時点で最良と考えられる評価手法をとるよう努めることが必要である。かかる観点からは、厳正さを追求するあまりネガティブな面のみを過度に減点法で評価を行うこととなると、将来大きな発展をもたらす技術を阻害するおそれがある点にも留意する必要がある。

また、成果に係る評価において、目標の達成度合いを評価の判定基準にすることが原則であるが、併せて、副次的成果等、次につながる成果を幅広い視野からとらえる。

(3) その他の留意事項

① 海外の研究者、若手研究者の活用

研究者には、研究開発の発展を図る上で専門的見地からの評価が重要な役割を果たすものであることから、評価者としての評価への積極的参加が求められる。一方、特定の研究者に評価実施の依頼が集中する場合には、評価への参加が大きな負担となり、また、評価者となる幅広い人材の養成確保にもつながらないことから、海外の研究者や若手研究者も評価者として積極的に参加させることなどにより評価者確保の対象について裾野の拡大を図るよう努める。

② 所期の成果を上げられなかった研究開発

研究開発は必ずしも成功するとは限らず、また、失敗から貴重な教訓が得られることもある。したがって、失敗した場合には、まずその原因を究明し、今後の研究開発にこれを生かすことが重要であり、成果を上げられなかったことをもって短絡的に従事した研究者や組織、機関を否定的に評価すべきものではない。また、評価が野心的な研究開発の実施の阻害要因とならないよう留意しなければならない。

③ 数値的指標の活用

論文の被引用度数、特許の申請状況等による成果の定量的評価は一定の客観性を有するが、技術に関する施策・事業においては研究分野や内容により、その意味は大きく異なり得るものであり、必ずしも研究開発成果の価値を一義的に表すものではない。したがって、これらを参考資料として有効に活用しつつも、偏重しないよう留意すべきである。

④ 評価結果の制度間での相互活用

研究開発をその評価の結果に基づく適切な資源配分等を通じて次の段階の研究開発に連続してつなげるなどの観点から、関係府省、研究開発機関及び制度を越えて相互活用するよう努める。

⑤ 自己点検の活用

評価への被評価者等の主体的な取組を促進し、また、評価の効率的な実施を推進するため、推進課及び主管課は、自ら技術に関する施策・事業の計画段階において具体的かつ明確な目標とその達成状況の判定基準等を明示し、技術に関する施策・事業の開始後には目標の達成状況、

今後の発展見込み等の自己点検を行い、評価者はその内容の確認などを行うことにより評価を行う。

⑥ 評価の国際的な水準の向上

研究開発の国際化への対応に伴い、評価者として海外の専門家を参加させる、評価項目に国際的なベンチマーク等を積極的に取り入れるなど評価に関して、実施体制や実施方法などの全般にわたり、評価が国際的にも高い水準で実施されるよう取り組む。

II. 評価の種類と実施方法

II. 1. 技術に関する施策評価

技術に関する施策の評価は、当該技術分野全体の方向性等を勘案しつつ、当該施策の下に位置付けられる技術に関する事業のまとまりを俯瞰する形で、各事業の相互関係等に着目し、個々の事業に係る評価結果を踏まえて行う。

(1) 事前評価

新規の技術に関する施策の創設に当たって行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課及び主管課

③ 評価事務局

推進課及び主管課。ただし、必要に応じて技術評価室が行うこともできる。

④ 評価手続・評価手法

外部評価を行う。

評価対象とする技術に関する施策は、技術評価室が推進課及び主管課と協議の上、定める。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

(2) 中間・終了時評価

技術に関する施策創設後、一定期間継続的に実施しているものについて、技術に関する施策ごとに中間・終了時評価を行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課及び主管課

③ 評価事務局

推進課及び主管課。ただし、必要に応じて技術評価室が行うこともできる。

④ 評価手続・評価手法

施策原簿、成果報告、運営状況報告等を基に外部評価を行う。

評価対象とする技術に関する施策は、技術評価室が推進課及び主管課と協議の上、定める。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

⑥ 実施時期

中間評価については、実施が4年以上にわたる又は実施期間の定めのない技術に関する施策について3年程度ごとに定期的に行う。なお、モニタリング（進捗状況を把握する作業）については毎年行うこととする。

終了時評価については、当該技術に関する施策の成果を切れ目なく次の技術に関する施策につなげていく場合には、当該技術に関する施策が終了する前の適切な時期に終了前評価を行うこととし、その他の場合には、当該技術に関する施策の終了直後に事後評価を行うものとする。

なお、中間・終了時評価は、効果的・効率的な評価の実施の観点から、技術に関する施策を構成する技術に関する事業の評価を前提として実施する。

II. 2. 技術に関する事業評価

II. 2. 1. 研究開発制度評価

研究開発制度評価は、個々にその目的・政策的位置付け、目標、成果、目標の達成度、必要性、効率性、有効性等について、事前評価及び中間・終了時評価を行う。

(1) 事前評価

新規の研究開発制度の創設に当たって行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課

③ 評価事務局

推進課

④ 評価手続・評価手法

外部評価を行う。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。研究開発制度について制度実施予定期間及び中間評価の時期の妥当性に関して評価する。

(2) 中間・終了時評価

研究開発制度創設後、一定期間継続的に実施しているものについて、研究開発制度ごとに中間・終了時評価を行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課及び研究開発機関

③ 評価事務局

推進課又は研究開発機関（独立行政法人であって、研究開発制度の推進部門から独立した評価部門が評価を行う場合に限る。）。ただし、必要に応じて技術評価室が行うこともできる。

④ 評価手続・評価手法

事業原簿、研究開発制度から得られた成果、研究開発制度の運営状況等を基に外部評価を行う。また、必要に応じ、評点法の活用による評価の定量化を行うこととする。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

⑥ 実施時期

中間評価については、実施期間が5年以上の研究開発制度又は実施期間の定めのない研究開発制度については、その目的、内容、性格、規模等を考慮し、3年程度ごとに定期的に行う。なお、モニタリング（進捗状況を把握する作業）については毎年行うこととする。

終了時評価については、当該研究開発制度の成果を切れ目なく次の研究開発制度につなげていく場合には、当該研究開発制度が終了する前の適切な時期に終了前評価を行うこととし、その他の場合には、当該研究開発制度終了直後に事後評価を行うものとする。

なお、中間・終了時評価は、効果的・効率的な評価の実施の観点から研究開発制度に関する評価結果の情報を集積し、関連する技術に関する施策の評価に際しその情報を提供する。

II. 2. 2. プロジェクト評価

プロジェクト評価は、個々にその目的・政策的位置付け、目標、成果、有効性、効率性等について評価を行う。事前評価及び中間・終了時評価を行う。

(1) 事前評価

新規のプロジェクトの創設に当たって行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課

③ 評価事務局

推進課

④ 評価手続・評価手法

外部評価を行う。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。プロジェクトについて実施予定期間及び中間評価の時期の妥当性に関して評価する。

(2) 中間・終了時評価

プロジェクト創設後、一定期間継続的に実施しているものについて、プロジェクトごとに中間・終了時評価を行う。

① 評価者

外部評価者

② 被評価者

推進課、研究開発機関及び実施者（研究開発機関から委託又は補助を受けてプロジェクトを実施する機関又は個人をいう。）

③ 評価事務局

推進課又は研究開発機関（独立行政法人であって、事業の推進部門から独立した評価部門が評価を行う場合に限る。）。ただし、必要に応じて技術評価室が行うこともできる。

④ 評価手続・評価手法

事業原簿、成果報告、運営状況報告等を基に外部評価を行う。また、必要に応じ、評点法の活用による評価の定量化を行うこととする。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

⑥ 実施時期

中間評価は、実施期間が5年以上のプロジェクト又は実施期間の定めのないプロジェクトについては、その目的、内容、性格、規模等を考慮し、3年程度ごとに定期的に行う。なお、モニタリング（進捗状況を把握する作業）については毎年行うこととする。

終了時評価は、当該プロジェクトの成果を切れ目なく次のプロジェクトにつなげていく場合には、当該プロジェクトが終了する前の適切な時期に終了前評価を行うこととし、その他の場合には、当該プロジェクト終了直後に事後評価を行うものとする。

なお、中間・終了時評価は、効果的・効率的な評価の実施の観点から個別プロジェクトに関する評価結果の情報を集積し、関連する技術に関する施策の評価に際しその情報を提供する。

II. 2. 3. 競争的資金制度による研究課題に関する評価

競争的資金制度に提案された個々の研究課題について、当該競争的資金制度の目的に照らして、目標・計画、科学的・技術的意義、実施体制、実用化の見通し等について評価を行う。複数の候補の中から優れた研究課題を採択するための事前評価及び目標の達成状況や成果の内容等を把握するための中間・終了時評価を行う。

(1) 事前評価

新規研究課題の採択時に行う。

① 評価者

外部評価者。

研究課題の採択の際、被評価者と同じ研究開発機関に所属する等の専門家は排除する必要があるため、例えば評価事務局はあらかじめ全評価者名を公表し、被評価者に対して申請時に利害関係者の存在を併せて書面にて宣誓することを求める等の措置を講ずる。また、評価者には秘密保持を義務付ける。

なお、評価者としてふさわしい者であることを示すため、評価者の業績又は実績について適切な時期にホームページ等で公開する。

② 被評価者

研究課題の提案者

③ 評価事務局

推進課又は研究開発機関

④ 評価手続・評価手法

研究課題の採択に当たっては、エフォート（一研究員の全研究活動時間のうち当該競争的資金制度による研究活動に充てる時間の割合をいう。）の明記を原則求める。また、被評価者と利害関係のない有識者等によるパネルレビュー又はメールレビューによる評価を行う。採択に当たっては、他の競争的資金制度による研究課題等との重複が生じないようにする。評価事務局は研究課題の提案者へ不採択の結果を通知する場合には、原則として評価項目別に詳細な評価内容を提示するとともに、不採択となった提案者からの問い合わせに応じるための環境を整備する。

なお、研究課題の評価に際しては、研究分野や当該競争的資金制度の趣旨を踏まえ、必要に応じて、主に業績が十分に定まらない若手研究者等について、マスキング評価の導入を図ることとする。主に中堅以上の研究者に関する研究者としての評価は、所属組織や機関のみに着目するのではなく、過去の実績を十分に考慮した評価とする。

また、研究者の研究遂行能力を示している過去の研究実績について、定量化を試みつつ、研究者としての評価を過去の実績を十分考慮して行った上で研究課題の採否を決定する。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。研究課題について実施予定期間及び中間評価の時期の妥当性に関して評価する。

(2) 中間・終了時評価

研究課題の目標達成度の把握とともに研究課題の継続、拡大・縮小、中止等の資源配分の判断、および必要に応じ被評価者に対する支援的助言を行うための評価。

① 評価者

外部評価者

なお、評価者としてふさわしい者であることを示すため、評価者の業績又は実績について適切な時期にホームページ等で公開する。

② 被評価者

研究課題の実施者

③ 評価事務局

推進課又は研究開発機関。ただし、必要に応じて技術評価室が行うこともできる。

④ 評価手続・評価手法

事業原簿、成果報告、運営状況報告等を基に外部評価を行う。

競争的資金制度による継続的な研究の必要性及びプロジェクトへの発展の可能性（主として技術シーズの創造を目的とする研究の場合に限る。）の有無が判断できる手法により評価を行う。

また、研究課題の終了時評価の結果については、採択された研究課題ごとに定量化されたも

のについては結果を公表する。

⑤ 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

⑥ 実施時期

中間評価については、実施期間が5年以上の研究課題又は実施期間の定めのない研究課題については、その目的、内容、性格、規模等を考慮し、3年程度ごとに定期的に行う。

終了時評価については、当該研究課題の成果を切れ目なく次の研究課題又はプロジェクト等につなげていく場合には、原則、当該研究課題が終了する前の適切な時期に終了前評価を行うこととし、その他の場合には、当該研究課題終了直後に事後評価を行う。

II. 3. 追跡評価

終了して数年経った技術に関する施策・事業を対象に、その研究開発活動や研究開発成果が産業、社会に及ぼした効果について調査し、その調査結果を基に現在の視点から総合的に評価を行う。

(1) 評価者

外部評価者

(2) 被評価者

評価対象となる技術に関する施策・事業及びこれに関連する技術に関する施策・事業に携わった推進課及び研究開発機関

(3) 評価事務局

推進課又は技術評価室

(4) 評価手続・評価手法

過去の事業原簿等の文献データ、関連部署・機関及びその他関係者等からの聞き取り調査等による情報を基にパネルレビュー又は第三者機関への委託による外部評価を行う。また、可能な限り定量的な評価に努める。

(5) 評価項目・評価基準

技術評価室が定める標準的な評価項目・評価基準又は評価者が定めるものとする。

(6) 実施時期

技術に関する施策・事業終了後、成果の産業社会への波及が見極められる時点とする。

(プロジェクトの抜粋)

経済産業省技術評価指針に基づく
標準的評価項目・評価基準

平成23年7月

経済産業省産業技術環境局

技術評価室

Ⅱ. 技術に関する事業評価

Ⅱ－１ プロジェクト評価

【事前評価】

1. 事業の目的・政策的位置付け

(1) 事業目的は妥当で、政策的位置付け（上位の施策における位置付け）は明確か。

(2) 官民の役割分担は適当か。

※ 事業目的の妥当性、政策的位置付けを技術戦略マップを用いて説明し、官民、国と地方公共団体、他省庁との役割分担についても記述すること。目標（目指す結果、効果）については、技術戦略マップのロードマップとの整合性を説明すること。

2. 研究開発目標の妥当性

①目標（目指す結果、効果）は、具体的かつ明確か。

②目標達成度を測定・判断することが容易な指標が設定されているか。

※ 事業の進捗を示す指標については、技術戦略マップのロードマップ、技術マップを参考に設定すること。

③最終目標に至るまでのマイルストーンとして戦略的に中間目標が立てられているか。

※ 事業の目指す結果、効果については、技術戦略マップのロードマップとの整合性をとったマイルストーンを設定すること。

④中間・事後評価時期が明確に設定されているか。

3. 有効性・効率性等

(1) 手段の適正性

①他の政策手段（事業を実施しない場合の影響を含む。）との比較検討において、提案する事業が最も優れている根拠が明確であるか。

②実施する事業が目的や目標の達成に役立つ根拠は明確か。

・目的達成のための妥当なスケジュール、予算となっているか。

・事業終了後の実用化や事業化のシナリオは明確になっているか。

※ 技術戦略マップの導入シナリオを用いて、研究開発事業と関連事業の関係を説明すること。

・研究開発実施者の事業体制・運営は適切かつ妥当であるか。

(2) 効果とコストに関する分析

・可能な限り、各選択肢についての社会的便益と社会的費用の比較（費用便益分析、費用効果分析、コスト分析等）が行われているか。定量的な評価が困難な場合

は、少なくとも、各々の想定される結果と長所・短所の定性的な比較に基づいて行う。

(3) 適切な受益者負担

- ・ 実用化、事業化のシナリオを踏まえて、事業者等が得る利益に応じて適切な負担を求める委託費や補助制度となっているか。

※知的基盤・標準整備等のための研究開発に特有の評価項目

- ・ 成果に公共性は見込まれているか。
- ・ 成果の公共性を担保するための措置が想定されているか、又は標準化した場合に得られる経済効果は十分にあるか。無差別に公開されるものであるか。
- ・ 公共財としての需要は見込まれているか。
- ・ 公共財整備のための技術を民間能力を活用して開発することの妥当性はあるか。
- ・ 成果を国際標準として提案する場合に、他国から賛同を得られる見通しはあるか。

【中間・事後評価】

1. 事業の目的・政策的位置付けの妥当性

- (1) 事業目的は妥当で、政策的位置付けは明確か。
 - ・ 事業の政策的意義（上位の施策との関連付け等）
 - ・ 事業の科学的・技術的意義（新規性・先進性・独創性・革新性・先導性等）
 - ・ 社会的・経済的意義（実用性等）
- (2) 国の事業として妥当であるか、国の関与が必要とされる事業か。
 - ・ 国民や社会のニーズに合っているか。
 - ・ 官民の役割分担は適切か。

2. 研究開発等の目標の妥当性

- (1) 研究開発等の目標は適切かつ妥当か。
 - ・ 目的達成のために具体的かつ明確な研究開発等の目標及び目標水準を設定しているか。特に、中間評価の場合、中間評価時点で、達成すべき水準（基準値）が設定されているか。
 - ・ 目標達成度を測定・判断するための適切な指標が設定されているか。

3. 成果、目標の達成度の妥当性

- (1) 成果は妥当か。
 - ・ 得られた成果は何か。
 - ・ 設定された目標以外に得られた成果はあるか。
 - ・ 共通指標である、論文の発表、特許の出願、国際標準の形成、プロトタイプの作製等があったか。
- (2) 目標の達成度は妥当か。

- ・ 設定された目標の達成度（指標により測定し、中間及び事後評価時点の達成すべき水準（基準値）との比較）はどうか。

4. 事業化、波及効果についての妥当性

- (1) 事業化については妥当か。
 - ・ 事業化の見通し（事業化に向けてのシナリオ、事業化に関する問題点及び解決方策の明確化等）は立っているか。
- (2) 波及効果は妥当か。
 - ・ 成果に基づいた波及効果を生じたか、期待できるか。
 - ・ 当初想定していなかった波及効果を生じたか、期待できるか。

* 知的基盤・標準整備等の研究開発の場合、以下の評価項目・評価基準による。

4. 標準化等のシナリオ、波及効果の妥当性

- (1) 標準化等のシナリオは妥当か。
 - ・ J I S化や我が国主導の国際規格化等に向けた対応は図られているか。
- (2) 波及効果は妥当か。
 - ・ 成果に基づいた波及効果を生じたか、期待できるか。
 - ・ 当初想定していなかった波及効果を生じたか、期待できるか。

5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果等の妥当性

- (1) 研究開発計画は適切かつ妥当か。
 - ・ 事業の目標を達成するために本計画は適切であったか（想定された課題への対応の妥当性）。
 - ・ 採択スケジュール等は妥当であったか。
 - ・ 選別過程は適切であったか。
 - ・ 採択された実施者は妥当であったか。
- (2) 研究開発実施者の実施体制・運営は適切かつ妥当か。
 - ・ 適切な研究開発チーム構成での実施体制になっているか、いたか。
 - ・ 全体を統括するプロジェクトリーダー等が選任され、十分に活躍できる環境が整備されているか、いたか。
 - ・ 目標達成及び効率的実施のために必要な、実施者間の連携／競争が十分に行われる体制となっているか、いたか。
 - ・ 成果の利用主体に対して、成果を普及し関与を求める取組を積極的に実施しているか、いたか。
 - ・ 国民との科学・技術対話を効果的に実施したか、又は実施することとしているか。（ただし、公募要項に当該対話を実施することが明記されている研究開発で、3千万円以上の公的研究費の配分を受ける研究開発を実施する研究者等を対象とする。）ここで、国民との科学・技術対話とは、研究活動の内容や成果を社会・国民に対して分かりやすく説明する、未来への希望を抱かせる心の通った双方向

コミュニケーション活動をいう（「国民との科学・技術対話」の推進について（基本的取組方針）（平成 22 年 6 月 19 日））。

（3）資金配分は妥当か。

- ・ 資金の過不足はなかったか。
- ・ 資金の内部配分は妥当か。

（4）費用対効果等は妥当か。

- ・ 投入された資源量に見合った効果が生じたか、期待できるか。
- ・ 必要な効果がより少ない資源量で得られるものが他にないか。

（5）変化への対応は妥当か。

- ・ 社会経済情勢等周囲の状況変化に柔軟に対応しているか（新たな課題への対応の妥当性）。
- ・ 代替手段との比較を適切に行ったか。

6. 総合評価

新規研究開発事業
「新たな化学物質規制に必要な
国際先導的有害性試験法の開発」に関する
事前評価報告書
(概要版)

平成22年7月

産業構造審議会産業技術分科会

評価小委員会

事前評価報告書概要

新規研究開発テーマ	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※ ※事前評価検討会の実施後、「リスク評価スキームの高度化に資する有害性試験手法の開発（仮称）」は「新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」に名称を変更。
技術に関する施策名	化学物質総合評価管理
事業担当課	製造産業局化学物質管理課

技術に関する施策及び新規研究開発テーマの概要

規制的手法や事業者による自主管理との組み合わせにより化学物質の最適管理を実現するため、国として化学物質の有害性評価手法の開発を行う。このため、毒性発現メカニズムを踏まえた、慢性毒性(28日反復投与毒性など)、および化学物質の有害性評価に必要な各種毒性の予測に適用できる、新たなin vitro試験法の開発や慢性毒性等発現に係る重要エンドポイントに関する毒性マーカーの探索による試験法の開発を行う。

評価概要

1. 事業の目的・政策的位置付け（新規研究開発事業の創設）の妥当性

昨今の欧米の動向（米国：Tox21、欧州：総合的試験戦略 I T S）を踏まえると、慢性影響を標的としたin vitro評価法開発や網羅的解析技術を用いたバイオマーカーの開発は、緊急を要する開発テーマであるとともに、比較的開発に時間を要する研究課題と思われるので、早く着手することが望ましい。

リスク評価スキームの内容については、公的な関与が期待されている。化学物質評価管理に関して国際的な協調体制が主流となりつつある現状においては、国が施策の中心となって事業を展開することは妥当である。

今後開発される新規化学物質や一般化学物質の安全性・有害性の評価に当たって、従来の化審法試験法では考慮されていない毒性に目を向けることは極めて重要である。また、慢性毒性試験のように旧来の方法を踏襲したものは、試験動物への考え方の変化等により、今後実施不能となることが考えられることから、in vitroなどの新しい方法論を確立しておくことは必須である。本研究開発テーマは的を射たものであり、事業を遂行することは妥当である。

一方、この研究開発テーマに含まれる2つの課題は、各々がかなりの研究リソースを要するテーマであると考えられるので、一つのプロジェクトの中で行うことで十分なリソースを割り当てられるかどうかについて多少の懸念を感じる。

具体的な研究課題の設定については、何故、反復投与毒性試験のin vitro試験法、生殖発生毒性の遺伝子解析が必要なのか、その重要性や緊急性が明確でない。また、培養細胞を用いた28日間反復投与毒性の評価系を確立するのであれば、エンドポイントの多様性を考慮して、毒性ターゲットや標的臓器を絞り、その重要性などを明確にすべきである。さらに、生殖発生毒性の遺伝子解析については、生殖発生毒性のエン

ドポイントの多様性を考慮すると、成果の達成は極めて困難な研究課題であり、催奇形性など焦点を絞り、成果を明確にする必要がある。

2. 今後の新規研究開発事業の実施に向けての提言

現時点で行われているリスク評価スキームは、多くのものが動物実験から得られる試験データに依存しているが、欧米等の動向は動物実験から別の方法への移行を目指している。まだ動物実験が可能なアジアで、動物実験との対比が可能うちに、多くの可能な評価スキームを確立する方向が望ましい。

in vitro評価法開発や網羅的解析技術を用いたバイオマーカーの開発という2つの課題は、各々がかなりの研究リソースを要するテーマであると考えられるので、開発を進めるに当たっては、利用可能な既存データやこれまでの研究成果（特に他省庁の研究プロジェクト）の収集を最大限に行うことが肝要である。

Omics 技術等を用いた最新のハザード評価手法（日本はこの分野で大きな遅れをとっている）による細胞レベルでの情報の集約とその解析が今後重要となると考えられる。Omics やHTS を用いた細胞レベルでの新たなリスク評価方法の開発、それらの情報集約と解析のためのツール開発に期待する。

国際的な協調が必須である。海外、特にアジア諸国との連携を検討されることが望ましい。

一方、現在の課題の一つに生殖毒性に関する遺伝子探索があげられているが、現状の化審法上の評価物質の中では生殖毒性を示す物質数は少なく、解析に有効な物質数を得ることに多少の懸念が感じられるため、開発研究を行う前の十分な情報収集や国内外の他プロジェクトとの連携の可能性を探っておいた方が良い。

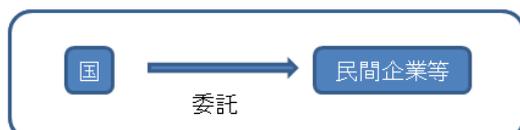
化審法リスク評価スキームの高度化に資する 有害性試験手法の開発（仮称）

製造産業局化学物質管理課
03-3501-0080

改正化審法における化学物質の有害性評価に活用できる、高精度、短期間、低コストの試験法の開発を行う。

このため、全身毒性等を予測できるような毒性発現メカニズムを考慮した複数のin vitro試験法を確立し、ハイスループットを活用した多数のエンドポイント（有害性評価項目）の有害性評価手法を構築するとともに、重要エンドポイントに関する毒性マーカーの探索による試験法の開発を行う。

条件（対象者、対象行為、補助率等）



公募により、手法の開発を民間企業等に委託する。



石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的

有害性試験法の開発

基本計画

「石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発」

基本計画

1. 研究開発の目的、目標及び内容

(1) 研究開発の目的

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

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

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

しかし、これらの有害性評価項目に関して信頼性が高く、かつ、効率的な評価技術は十分に確立されていない部分が多く、また一般的にヒト健康影響に関する有害性評価項目の多くは動物への反復投与試験等で数ヶ月から数年の期間を要するため、新たな規制導入による評価実施ニーズに答えられていない状況である。

このため、これまでの研究開発において特定のエンドポイントについて遺伝子発現変動解析や培養細胞を活用した迅速で効率的な評価技術の開発を進めてきた我が国の先導的な取り組み成果を活用し、多様なエンドポイントに対応する迅速で効率的な有害性評価技術の開発を進めることは、国内の化学物質管理の円滑な実施に資するとともに、国際的なニーズにも対応するものであり、緊急性かつ必要性が高いものである。

本研究開発により、効率的な有害性評価手法を我が国主導で開発して、更に国際標準へと発展させ、我が国の石油精製物質の安定供給に資することが可能となる。

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

(2) 研究開発の目標

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

具体的には、28日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法の開発や、複数の *in vitro* 試験法の開発及び迅速かつ効率的に実施できる有害性評価システム等を構築することを目標とする。

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

(3) 研究開発の内容

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

- ①反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発
- ②肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 in vitro 試験法の開発

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発の実施体制

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

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

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

(2) 研究開発の運営管理

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

3. 研究開発の実施期間

本研究開発の期間は、平成23年度から平成27年度までの5年間とする。

4. 評価に関する項目

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

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の普及

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

②知的財産権の帰属

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

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

③人材の育成

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

④成果の実用化

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

(2) 基本計画の変更

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

(3) 担当課

本基本計画の作成責任課は、製造産業局化学物質管理課である。

6. 基本計画の改訂履歴

平成23年3月制定

平成25年3月改訂

(別紙) 研究開発計画

研究開発項目① 反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の取得手法の開発

1. 研究開発の必要性

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

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

2. 研究開発の具体的内容

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

(a) 各毒性関連遺伝子の絞り込み

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

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

(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立

各毒性既知物質を投与した実験動物から取得できる遺伝子発現変動データの解析・絞り込みを踏まえ、肝臓、腎臓の一般毒性及び発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性について予測するための遺伝子発現変動データの解析手法を確立する。また、神経毒性についても本事業で取得した新たな科学的知見にもとづき、可能な範囲でその毒性発現可能性について予測するための手法を確立する。

3. 研究開発の目標

(1) 最終目標（平成27年度末）

(a) 各毒性に関する関連遺伝子の絞り込み

- ・ 主要臓器（肝臓・腎臓）の毒性、発がん性（肝発がん、腎発がん）及び神経毒性を有する毒性既知物質を効率的に選定して実験動物に投与し、遺伝子の発現変動に関する包括的なデータを取得する。
- ・ 毒性の発現に特異的と考えられる遺伝子を絞り込み、各毒性既知物質の投与による毒性発現の

マーカーとして利用しうる遺伝子を選定する。

(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立

各毒性既知物質の投与による毒性発現に伴う遺伝子発現変動の特徴分析の結論を得る。

【主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性】

・主要臓器（肝臓・腎臓）の一般毒性の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。

【発がん性（肝発がん・腎発がん）】

・発がん性（肝発がん・腎発がん）の発現可能性を予測する解析手法を確立し、文書化する。

【神経毒性】

・本事業で取得した新たな科学的知見にもとづき、可能な範囲でその毒性発現可能性を予測する解析手法を確立する。

(2) 中間目標（平成25年度末）

(a) 各毒性に関する実験動物の遺伝子発現変動データの取得、及びそれぞれの毒性に特徴的な関連遺伝子の絞り込み

- ・適切な被験物質選定を実施し、各毒性既知物質の投与による動物実験を行い、投与動物の臓器及び組織等から遺伝子の包括的な発現変動データを取得する。
- ・各毒性の発現との関係で特異的な発現変動を示す遺伝子の絞り込みを行う。

(b) 各種毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立

【全てのエンドポイントに共通】

・遺伝子発現変動データの取得方法を確立する。

【神経毒性】

・遺伝子発現変動データを用いることで当該毒性の評価が可能であるかについて結論する。

4. 変更履歴（平成25年3月）

当初、基本計画に、免疫毒性の検出方法の開発を含んでいたが、フィージビリティスタディーとして、免疫関連組織を対象とした遺伝子発現量解析と表現型の変化から免疫毒性影響評価手法の開発を検討したところ、免疫毒性影響評価を行う上で最も重要な臓器と想定された脾臓での影響評価手法の確立が困難と考えられる結果となり、外部有識者による研究開発推進委員会（平成25年2月開催）でのコメント等を踏まえ、PL及び経済産業省は当該毒性の検出方法の開発に関し、現時点において技術的に困難であると判断し、本基本計画から削除することとした。

研究開発項目② 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性 *in vitro* 試験法の開発

1. 研究開発の必要性

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

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

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

2. 研究開発の具体的内容

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

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

<研究開発の流れ>

① 毒性評価のためのマーカー遺伝子の選定

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

② 毒性評価に資する人工染色体ベクターの作製

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

③ 毒性評価に資する ES 細胞の作製

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

④ 毒性評価に資する遺伝子改変動物の作製

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

⑤ 毒性評価可能な培養細胞の作製

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

⑥ 毒性評価可能な *in vitro* 試験法の開発

当該培養細胞による試験系を確立し、当該試験系のプロトコル案を作成する。

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

(a) 肝臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

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

具体的には、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該マーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。作製した遺伝子改変マウスから肝臓細胞を採取し、三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(b) 腎臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

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

具体的には、文献情報等をもとにマーカー遺伝子を選定し、当該マーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスの順に作製する。作製した遺伝子改変マウスから腎臓細胞を採取し、三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、腎臓毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(c) 神経毒性 *in vitro* 試験法の開発

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

具体的には、ES 細胞から神経細胞への分化誘導の手法を整備し、その分化誘導した神経細胞を用いて、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認し、マーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞の順に作製する。作製したマウス ES 細胞を分化誘導し、神経細胞の培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価できる *in vitro* 試験法を開発する。

(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

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

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

3. 研究開発の目標

(1) 最終目標（平成 27 年度末）

(a) 肝臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

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

(b) 腎臓毒性 *in vitro* 試験法の開発

腎臓毒性を評価可能な *in vitro* 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝

子改変マウスを作製し、腎臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、腎臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発

神経毒性を評価可能な in vitro 試験法を開発するため、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞を作製し、当該 ES 細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコル案を作成する。

(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

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

(2) 中間目標（平成 25 年度末）

(a) 肝臓毒性 in vitro 試験法の開発

肝臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。また、野生型マウスの肝臓細胞を用い、培養条件を見出す。

(b) 腎臓毒性 in vitro 試験法の開発

腎臓毒性に関連すると考えられるマーカー遺伝子を選定し、人工染色体ベクター、マウス ES 細胞、遺伝子改変マウスを作製する。

(c) 神経毒性 in vitro 試験法の開発

ES 細胞から分化誘導した神経細胞を用い、既知の神経毒性化学物質に対する当該神経細胞の形態変化及び発現等を確認しマーカー遺伝子を選定する。選定したマーカー遺伝子と発光遺伝子等を用い、人工染色体ベクターを作製する。

(d) ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発

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

4. 変更履歴（平成 25 年 3 月）

当初、基本計画に、ヒト代謝機能導入の試験法開発を含んでいたが、フィージビリティスタディーとして、ヒト遺伝子導入マウスによる代謝酵素の検討を行ったが酵素の特異性を確立することができず、外部有識者による研究開発推進委員会（平成 25 年 2 月開催）でのコメント等を踏まえ、PL 及び経済産業省は当該毒性の検出方法の開発に関し、現時点において技術的に困難であると判断し、本基本計画から削除することとした。