

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

中間評価の概要

平成26年1月24日

製造産業局

化学物質管理課

目 次

1. プロジェクトの概要

2. 目的・政策的位置付け

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

A-3. 目標

A-4. 成果、目標の達成度

A-5. 標準化等のシナリオ、波及効果

A-6. 研究開発マネジメント・体制等

A-7. 評価

A-8. 提言及び提言に対する対処方針

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

B-3. 目標

B-4. 成果、目標の達成度

B-5. 標準化等のシナリオ、波及効果

B-6. 研究開発マネジメント・体制等

A-7. 評価

A-8. 提言及び提言に対する対処方針

1. プロジェクトの概要(1)

概要

消費者の身近で使用す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。

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。

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

実施期間

平成23年度～平成27年度 （5年間）

プロジェクト リーダー

小島 肇 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究
センター 薬理部 新規試験法評価室 室長

1. プロジェクトの概要(1)

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

予算総額	5. 0億円 (平成23年度:1. 8億円 平成24年度:1. 7億円 平成25年度:1. 5億円)
実施者	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

予算総額	3. 08億円 (平成23年度:1. 03億円 平成24年度:1. 03億円 平成25年度:1. 03億円)
実施者	公益財団法人鳥取県産業振興機構、国立大学法人鳥取大学、国立大学法人岡山大学、住友化学株式会社、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

1. プロジェクトの概要(2)

●社会的背景

◆2002年持続可能な開発に関する世界首脳会議で「WSSD目標」

“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科学的根拠に基づく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”ことが国際合意された。

世界の化学物質管理政策の流れはハザードベース管理からリスクベース管理へとシフト

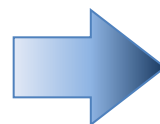
$$\boxed{\text{リスク}} = \boxed{\text{有害性}} \times \boxed{\text{暴露量}}$$

1. プロジェクトの概要(3)

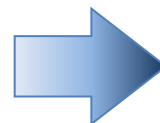
●社会的背景

WSSD目標達成のための取り組み例

- ◆ 欧州: REACH規制
- ◆ 日本: 化学物質審査規制法
- ◆ 各国: 化学物質の分類及び表示に関する世界調和システム(GHS)の導入



すべての化学物質を
リスク評価の対象



化学物質の有害性
情報の分類、表示



多様なエンドポイントについて有害性評価を実施するニーズが高まっている。

従来の化学物質の有害性評価

- ◆ 数ヶ月から数年の試験期間
- ◆ 動物を多数用いる
- ◆ 高額な費用



多様なエンドポイントに係る迅速かつ効率的な試験法が必要

1. プロジェクトの概要(4)

有害性評価手法

in silico手法

化学物質の構造等から有害性を推定する試験方法

Q S A R 等

本プロジェクト

in vitro試験法

細胞培養により有害性を評価する試験方法

毒性に関連した遺伝子を導入した細胞を培養し、毒性を予測する試験方法

本プロジェクト

in vivo試験法

動物試験により有害性を評価する試験方法

短期試験

(28日間反復投与毒性試験等)

毒性に関連した遺伝子発現量を解析して、毒性を予測する試験方法

中期試験

(90日間反復投与毒性試験等)

長期試験

(2年間投与試験等)

2. 政策的位置付け(1)

○産業構造審議会化学・バイオ部会化学物質政策基本問題小委員会

平成18年度に今後の化学物質政策の在るべき姿について検討された産業構造審議会化学・バイオ部会化学物質政策基本問題小委員会の中間とりまとめで「化学物質管理を推進していくためにはハザード評価や暴露・リスク評価手法の確立や知的基盤の整備が必要。」とされており、平成21年改正化審法の附帯決議には、「事業者の自主的なリスク評価・管理を推進するため、低コストのリスク評価手法の開発・普及等により事業者の負担軽減に努めること」「試験に要する費用・期間の効率化とともに国際的な動物試験削減の要請（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）を踏まえて動物試験の代替法の開発・活用をはかること」とされている。

2. 政策的位置付け(2)

○第4期科学技術基本計画（2011年8月閣議決定）

◆我が国が取り組むべき重要課題として、産業競争力の強化に向けた共通基盤の強化を設定

◆課題達成のため、新たなものづくり技術の共通基盤として、安全性に関する評価手法等を構築としている

○技術戦略マップ2010（平成22年6月経済産業省編）

◆化学物質総合評価管理分野の技術マップ

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

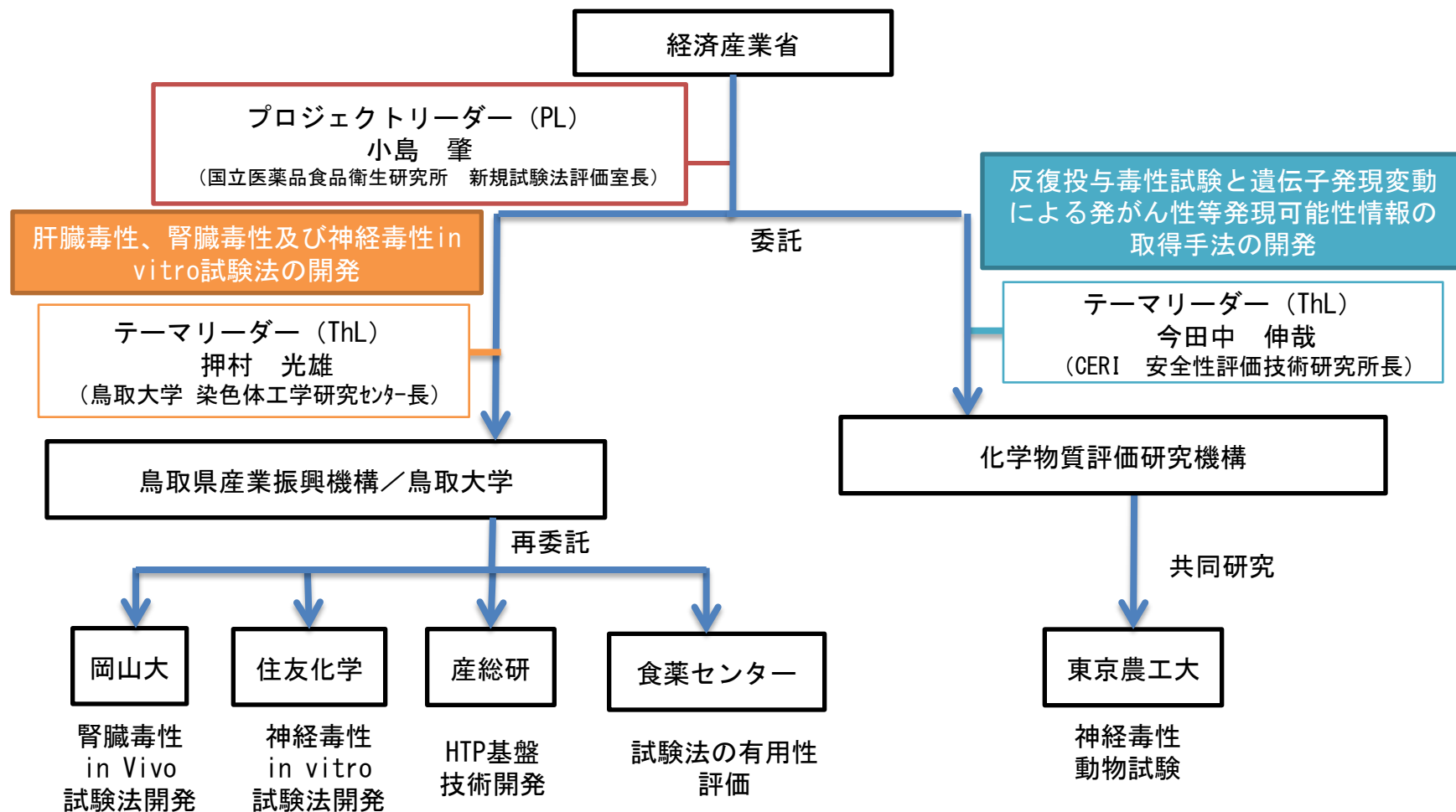
B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

(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

●体制



3. 研究開発マネジメント・体制等(2)

●研究開発推進委員会

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

◆委員リスト(五十音順、敬称略)

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	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

◆開催日

平成23年度：2回 平成24年度：2回 平成25年度：1回（平成26年1月時点）

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

◆委員リスト(五十音順、敬称略)

板垣 宏	横浜国立大学
一戸 紀孝	国立精神・神経医療研究センター
春山 哲也	九州工業大学大学院
宮城島 利一	システム薬学研究機構
松本 一彦	学習院大学（元安評センター）

◆開催日

平成23年度：2回 平成24年度：2回 平成25年度：1回（平成26年1月時点）

●推進調整会議

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

◆開催日

平成23年度：7回 平成24年度：11回 平成25年度：2回（平成26年1月時点）

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

◆開催日

平成23年度：3回 平成24年度：3回 平成25年度：2回（平成26年1月時点）

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

A－4. 目標

A－5. 成果、目標の達成度

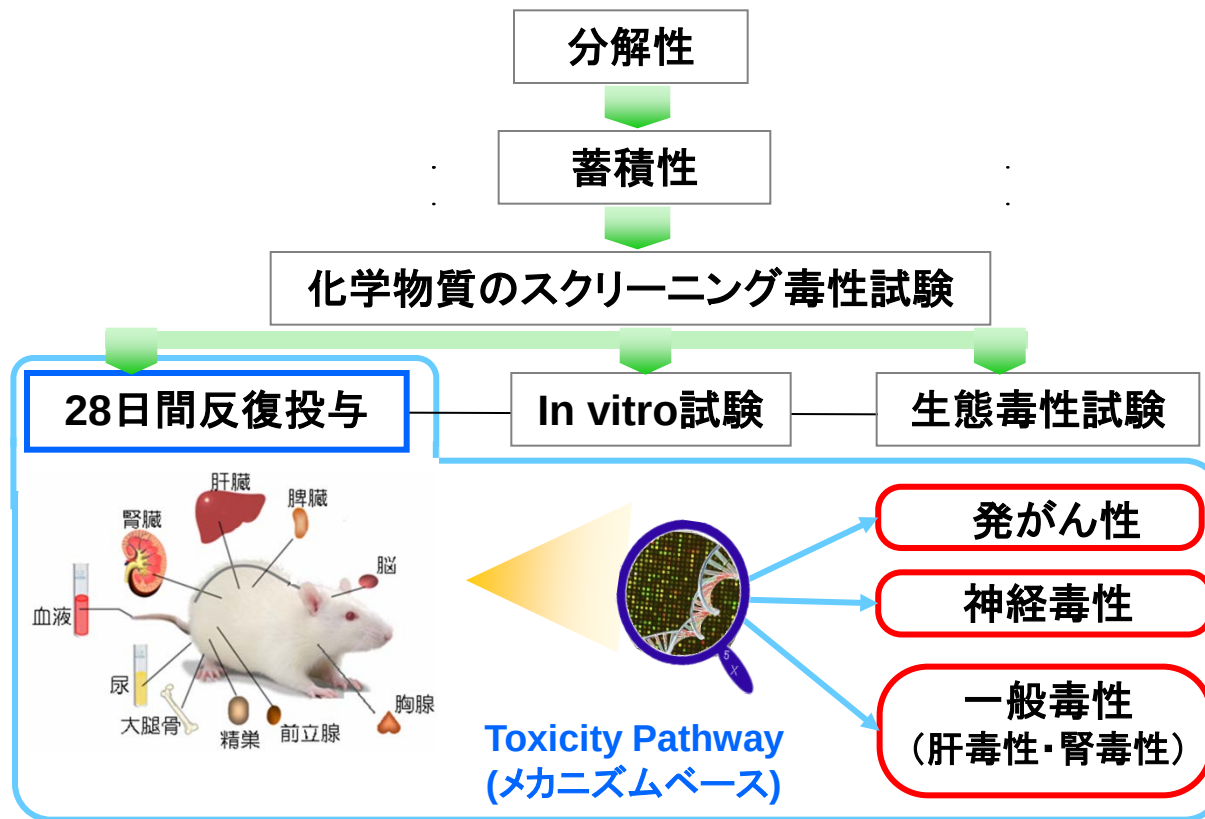
A－6. 標準化等のシナリオ、波及効果

A－7. 評価

A－8. 提言及び提言に対する対処方針

A-4. 目標(1)

28日間反復投与試験の動物サンプルから取得した遺伝子発現変動データを活用して有害性を予測する手法を開発する。



A-4. 目標(2)

要素技術	目標・指標	妥当性・設定理由・根拠等
(a) 各毒性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。	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の予測に有用な遺伝子発現データが取得可能であるため。
	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め。
(b) 各毒性の発現可能性を検出し得る方法の確立	【一般毒性(肝毒性・腎毒性)】 【発がん性(肝発がん・腎発がん)】 【神経毒性】 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、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。
	【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。	

A-4. 目標(3)

(参考:事後評価時点の目標)

要素技術	目標・指標(事後評価時点)
(a) 各毒性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。

A-5. 成果、目標の達成度(1)

要素技術	目標・指標	成 果	達成度
(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。	【一般毒性(肝毒性・腎毒性)】 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、遺伝子発現量データを取得した。 【発がん性】 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、遺伝子発現量データを取得した。 【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。	達成 達成 達成
	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。	【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。 【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。 【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。	達成 達成 達成

A-5. 成果、目標の達成度(2)

要素技術	目標・指標	成 果	達成度
(b)各毒性の 発現可能性 を検出し得る 方法の確立	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 チャート式に判定結果を可視化できる もの)を考案した。 【発がん性】 ・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。	前倒しで実施 前倒しで実施 達成
	【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。	【神経毒性】 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。	達成

A-6. 標準化等のシナリオ、波及効果(1)

●標準化等のシナリオ

本事業は化学物質管理のための試験法開発であることから、**OECDテストガイドライン化を将来の目標としてOECD会合及び国内外の試験法開発に関連する学会等での活動を成果の展開先として位置付けている。**

- OECDを中心とした国際会議での発表により国際的認知度の上昇及び国際協力関係の構築を目指す。
- JaCVAM等の代替法検証機関との連携
- リスクコミュニケーションによる認知度の向上
 - 化学物質評価研究機構研究発表会(公開)
 - CERI寄附講座(公開)
 - 市民公開講座(公開)
 - 成果報告会等の開催を検討(公開)
 - 2013 EUSAAT(欧州代替法学会)での口頭発表の際、本プロジェクトのシンポジウム開催の打診(2014 国際代替法学会)

●取得データの公開

●動物試験データ

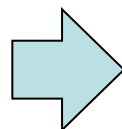
約40の化学物質について、化審法28日間反復投与毒性を実施、毒性情報をNITEデータベースのHESSに登録予定。

●遺伝子発現データ

公共データベース(GEO等)にH25年度中に基礎データの一部に登録予定。その後、随時データの公表を目指す。

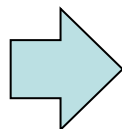
●波及効果

●単一の動物試験では取得できなかった情報を、遺伝子発現変動解析技術を駆使することで多様なエンドポイントの毒性発現情報を取得する手法を提供



- 毒性試験数の削減、すなわち、試験費用、試験期間等の削減に寄与
- 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・管理する環境が整備される
- 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)への寄与

●これまでの化審法スクリーニング毒性試験では評価できなかった長期毒性、発がん性、神経毒性等に関する情報の取得



●安全性の面から、安価・迅速に安全性情報が得られることから、産業界の国際競争力の向上に資することが期待されるとともに、消費者の安全性に対する懸念も払しょくすることができる

A-7. 評価(1)

●評価検討会

評価検討会
名称

石油精製物質等の新たな化学物質規制に必要な国際先導的有害性試験法の開発
(反復投与毒性試験と遺伝子発現変動による発がん性等発現可能性情報の
取得手法の開発)

評価検討会
委員

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

委員

堀之内 彰

武田薬品工業株式会社 CMC研究センター 主席研究員

宮城島 利一

特定非営利活動法人システム薬学研究機構 理事

山田 弘

独立行政法人医薬基盤研究所 創薬基盤研究部
トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト
プロジェクトリーダー

吉村 功

学校法人東京理科大学 名誉教授

A-7. 評価(2)

●総合評価(コメント)

○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、その取り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3者による評価が必要である。(提言に対する対処方針の2. 7. 8. 参照)

○国際規格化に向けて指標や基準を策定するには、組織採取法や遺伝子発現データ取得などにおいてデータの再現性や施設間差などを考慮することが必要である。(提言に対する対処方針の2. 参照)

○また、これまでに多くの研究者が提案しているいろいろな手法を適切に取り入れるとともに、併せて、限られた資金の中では、公表されている厚生労働省及びNEDOプロジェクトのノウハウやデータを積極的活用すべきである。(提言に対する対処方針の6. 参照)

A-7. 評価(3)

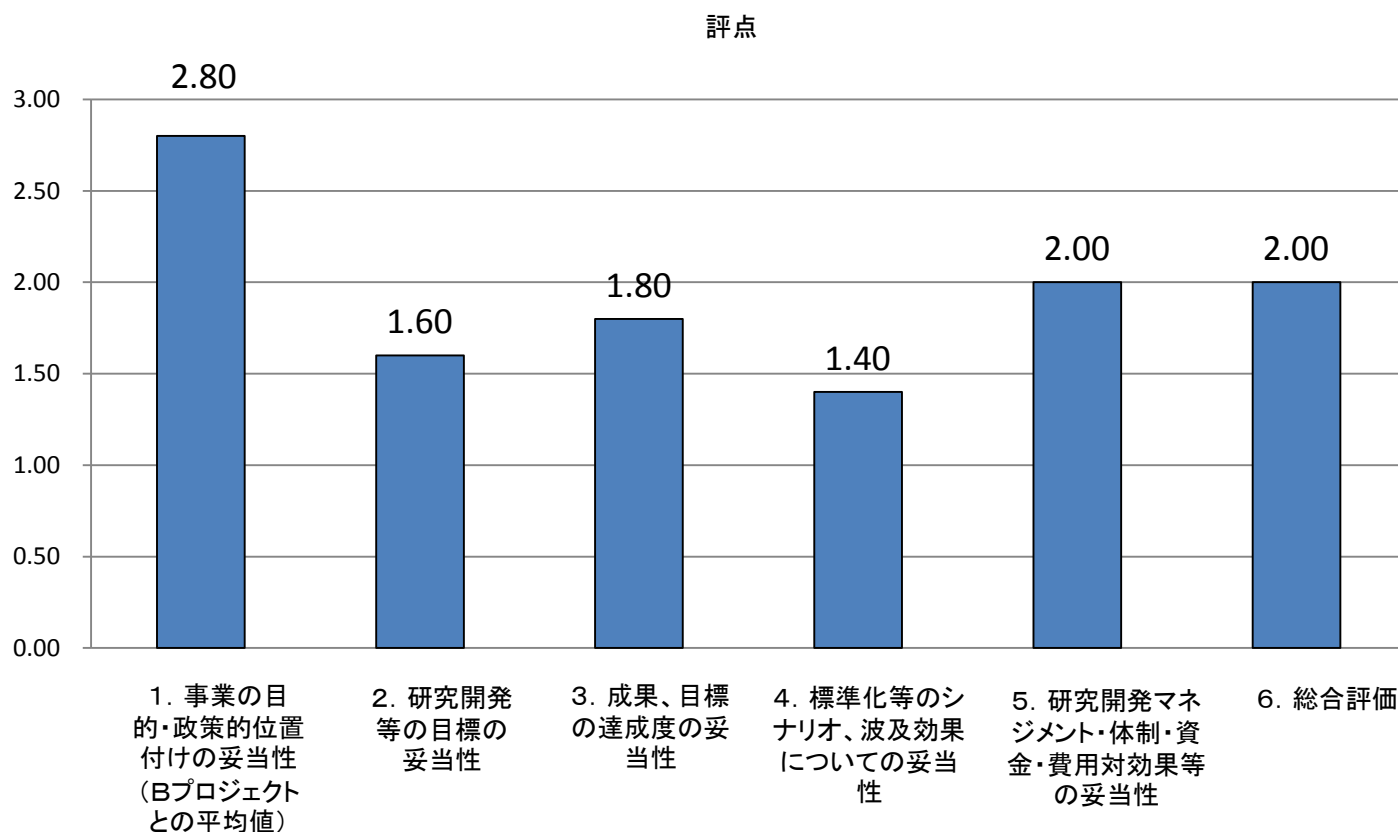
● 評価点結果

○「経済産業省技術評価指針」に基づき、プロジェクト中間評価において、評点法による評価を実施した。

○「2. 研究開発等の目標の妥当性」については、具体的な数値目標が設定されていないとの理由から評点が低かった。

○「3. 成果、目標の達成度の妥当性」については、ガイドライン化に向けて、解析手法の情報開示と第3者による再評価が必要であるとの理由から評点が低かった。

○「4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性」については、特に国際標準化に向けた具体的な方法が明確でない、標準化を目指すならば関連する研究成果の情報を公開するべきとの理由から評点が低かった。



【評価項目の判定基準】

評価項目1.~5.

3点: 非常に重要又は非常によい

2点: 重要又はよい

1点: 概ね妥当

0点: 妥当でない

6. 総合評価

3点: 事業は優れており、より積極的に推進すべきである。

2点: 事業は良好であり、継続すべきである。

1点: 事業は継続して良いが、大幅に見直す必要がある。

0点: 事業を中止することが望ましい。

A-8. 提言及び提言に対する対応方針(1)

今後の研究開発の方向等に関する提言

1. 被験物質の中にタイトルにある「石油精製物質等」に含まれる物質を入れておいた方がよい。
2. 発がん予測系アルゴリズムを速やかに公開して、国内外の第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。
3. メカニズムベースで毒性評価可能なバイオマーカー遺伝子の選択に対し積極的に挑戦すること。

提言に対する対応方針

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

A-8. 提言及び提言に対する対処方針(2)

今後の研究開発の方向等に関する提言

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

提言に対する対処方針

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

A-8. 提言及び提言に対する対処方針(3)

今後の研究開発の方向等に関する提言

4. 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。
5. 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。
6. 麻酔の遺伝子発現データへの影響等に関する基礎データは、ガイドライン化を考えた場合に非常に重要な情報となる。必要に応じて、追加の基礎データの取得を行い、これらの情報を整理し、速やかに論文等により公表して情報共有を進めて頂きたい。

提言に対する対処方針

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

B. 肝臓毒性、腎臓毒性及び神経毒性in vitro試験法の開発

B-4. 目標

B-5. 成果、目標の達成度

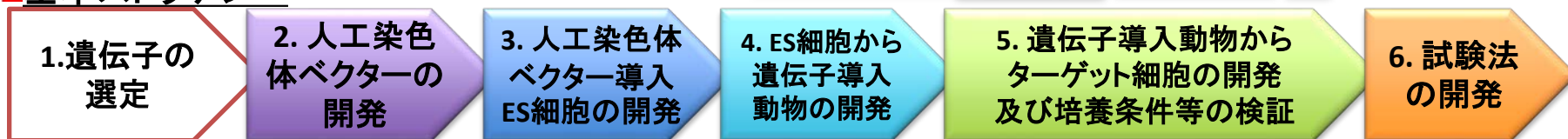
B-6. 標準化等のシナリオ、波及効果

B-7. 評価

B-8. 提言及び提言に対する対処方針

細胞プロジェクト(Tox-In vitro)イメージ

■基本ストラテジー



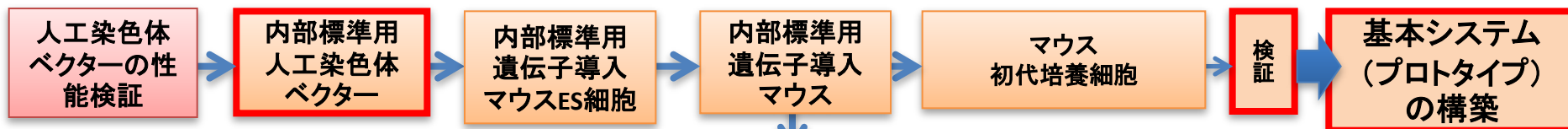
鳥取県産業振興
機構・鳥取大

岡山大
住友化学

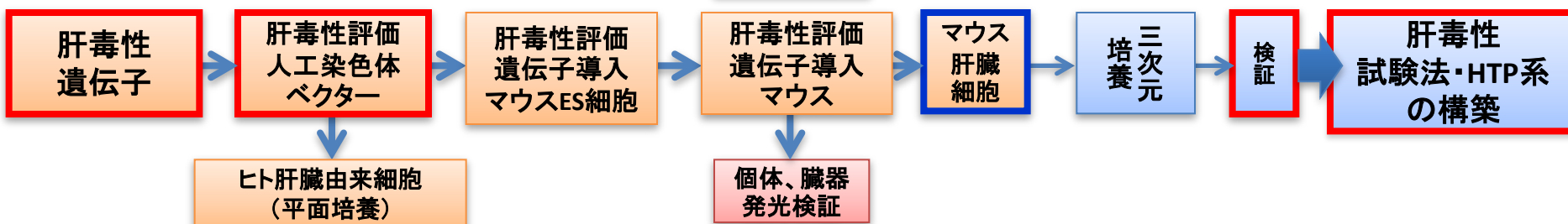
食薬センター
産総研

☐ : 食薬センターと連携して実施
☐ : 産総研と連携して実施

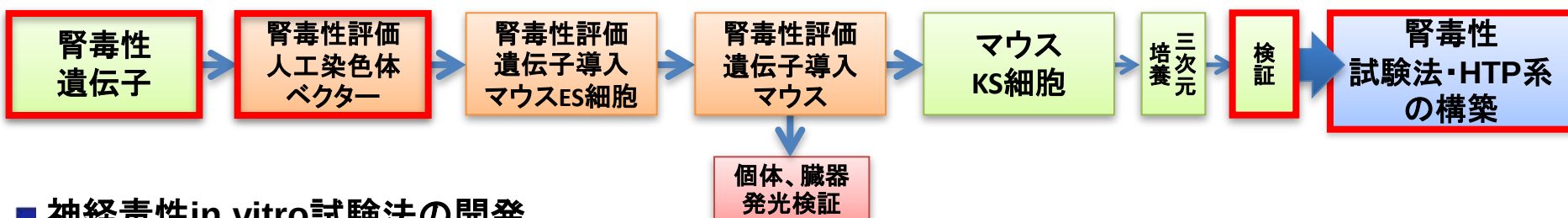
■ハイスループットスクリーニング試験系の構築に向けた基盤技術の開発



■肝臓臓毒性in vitro試験法の開発



■腎臓臓毒性in vitro試験法の開発

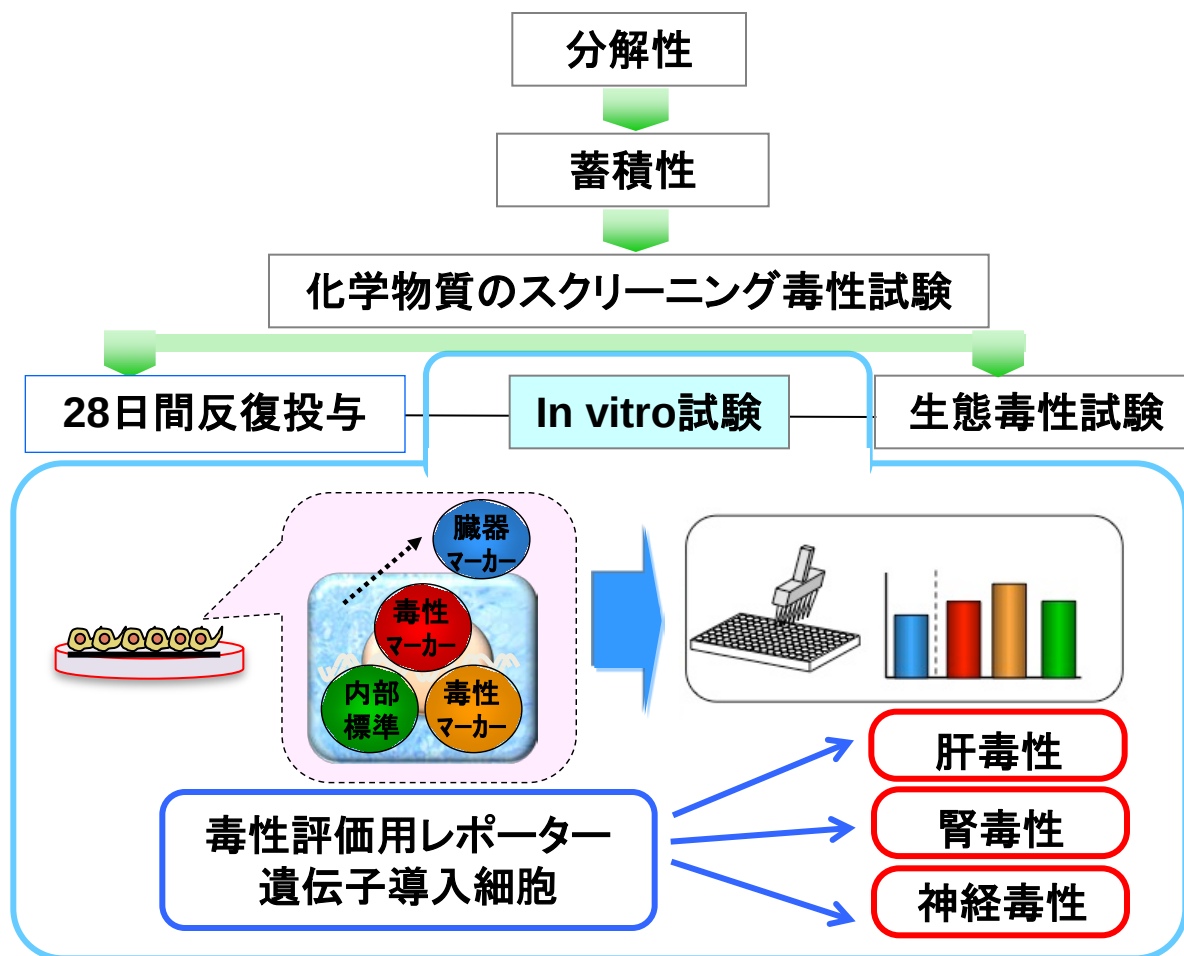


■神経毒性in vitro試験法の開発



B-4. 目標(1)

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。



B-4. 目標(2)

要素技術	目標・指標	妥当性・設定理由・根拠等
(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。	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。
(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。	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。
(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。	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。
(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。	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。

B-4. 目標(3)

(参考:事後評価時点の目標)

要素技術	目標・指標(事後評価時点)
(a)肝臓毒性in vitro試験法の開発	人工染色体ベクター、マウスES細胞、遺伝子改変マウスを作製し、肝臓細胞の三次元培養等により培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、肝臓毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコール案を作成する。
(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、試験法のプロトコール案を作成する。
(c)神経毒性in vitro試験法の開発	人工染色体ベクター、マウスES細胞を作製し、当該ES細胞の分化誘導及び培養等により神経細胞の培養細胞を樹立する。樹立した培養細胞を用い、神経毒性を評価可能な試験系を構築し、試験法のプロトコール案を作成する。
(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ール案に反映する。

B-5. 成果、目標の達成度(1)

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を作製もいくつか順調に進展している。	達成
(b) 腎 臓 毒 性 in vitro試験法の開発	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いる。	達成

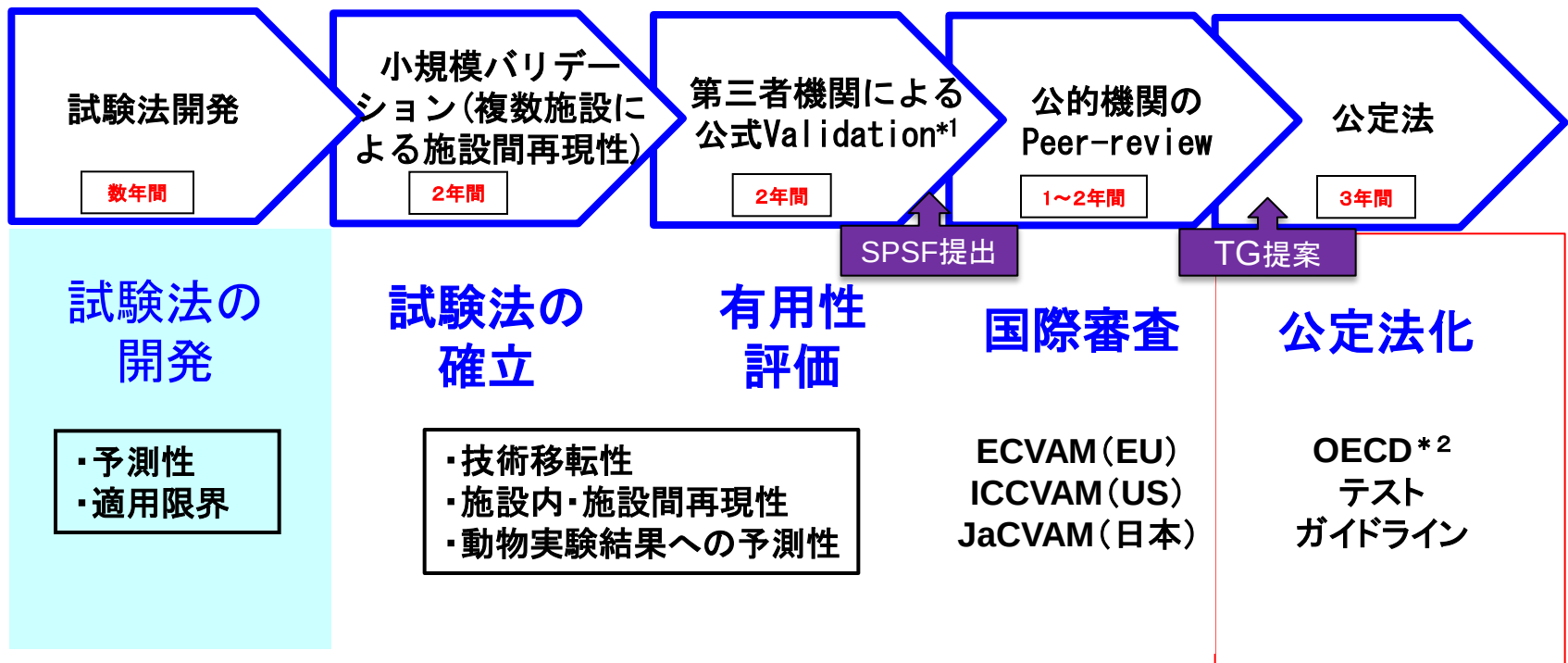
B-5. 成果、目標の達成度(2)

要素技術	目標・指標	成果	達成度
(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及び発光検出の検証を行い、試験系の設計試案を作成する。	MI-MACベクターに発光レポーターを挿入した各種発光細胞を作製し、MI-MACベクターの基本性能を検証した結果、MI-MACがレポーターベクターとして非常に優れていることを実証した。また2色発光細胞を用い、アッセイシステムの測定精度を検証した。	達成

B-6. 標準化等のシナリオ、波及効果(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、将来的にはOECDのテストガイドライン化(TG)に向けた国際提案を行うことを目標に掲げている。ECVAMレポートによると、OECD-TG化までには10年近い期間が必要となる。



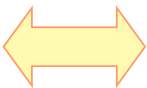
*1バリデーション(Validation): 複数の施設において、試験法の有用性、再現性などを確認するための試験

*2OECD: 経済協力開発機構

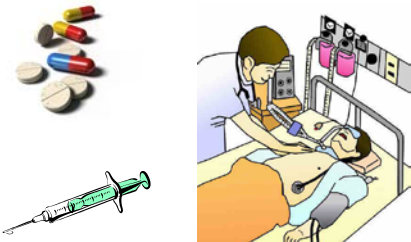
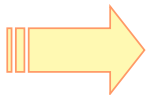
B-6. 標準化等のシナリオ、波及効果(2)

●波及効果

細胞を用いる
有害性評価手
法の開発



試験期間の短縮
試験費用の削減
動物数の削減



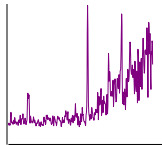
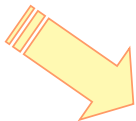
医療分野での
開発促進

医薬品開発における候補物質の安全性評価検討に活用でき、評価法の迅速性等から開発促進が図れる



国民の安全安心の増大

農薬、食品、化粧品等の広い分野での開発品の安全性評価に迅速に活用でき、国民の安全安心につながる



有用化学物質の開発促進

肝臓毒性、腎臓毒性、神経毒性を始め様々な毒性評価が可能であり、化学物質の有害性評価の加速化に寄与し、産業的に有用化学物質の開発促進が期待できる

B-7. 評価(1)

●評価検討会

評価検討会
名称

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

評価検討会
委員

座長

堀井 郁夫
堀井サイエンスアソシエイト株式会社 代表取締役社長

委員

上原 健城
塩野義製薬株式会社 医薬開発部 医薬開発III 主任

絵野沢 伸
独立行政法人国立成育医療研究センター 臨床研究センター
先端医療開発室 室長

金村 米博
独立行政法人国立病院機構大阪医療センター
臨床研究センター 再生医療研究室 室長

畑尾 正人
株式会社資生堂 品質評価センター 安全性研究開発室 室長

B-7. 評価(2)

●総合評価(コメント)

○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。(提言に対する対処方針の7. 8. 参照)

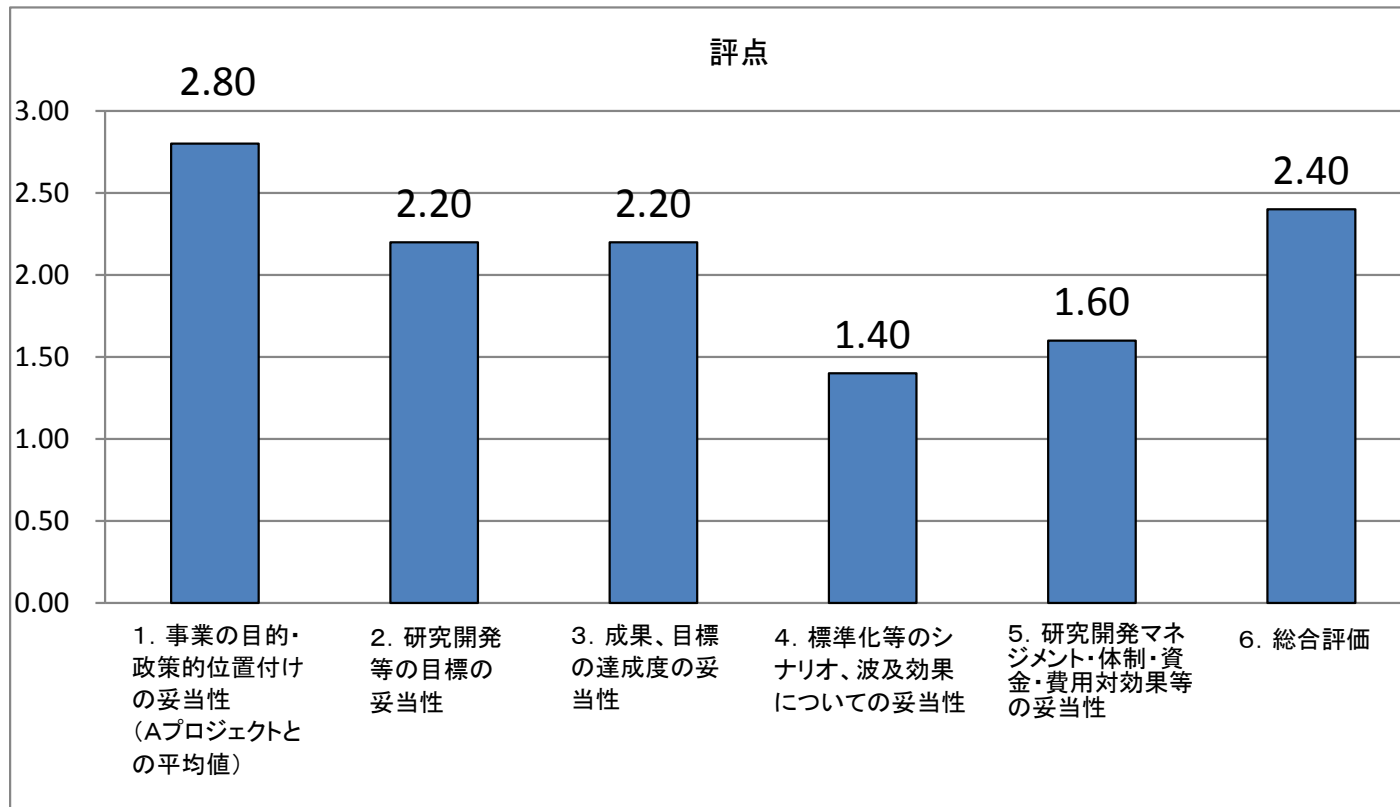
○また、国際的標準化、手法の一般化、ハイスループット性の獲得には一層の努力が必要である。

○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。(提言に対する対処方針の10. 11. 参照)

B-7. 評価(2)

●評価点結果

- 「経済産業省技術評価指針」に基づき、プロジェクト中間評価において、評点法による評価を実施した。
- 「4. 標準化等のシナリオ、波及効果についての妥当性」については、国際標準化に向けた取り組みや、得られた成果の具体的な活用方法が明確でないとの理由から評点が低かった。
- 「5. 研究開発マネジメント・体制・資金・費用対効果の妥当性」については、このプロジェクトの予算規模だけではEUのSEURATなどと比較すると小規模であり、国際競争力に資するというには十分とはいえないとの理由から評点が低かった。



【評価項目の判定基準】

評価項目1.~5.

3点: 非常に重要又は非常によい

2点: 重要又はよい

1点: 概ね妥当

0点: 妥当でない

6. 総合評価

3点: 事業は優れており、より積極的に推進すべきである。

2点: 事業は良好であり、継続すべきである。

1点: 事業は継続して良いが、大幅に見直す必要がある。

0点: 事業を中止することが望ましい。

B-8. 提言及び提言に対する対処方針(1)

今後の研究開発の方向等に関する提言

1. 肝毒性、腎毒性に関しては、公共のデータベースにある遺伝子発現変動データを積極的に活用し、メカニズムベースで活用可能な適切なマーカー遺伝子を選択することを期待する。
2. 毒性学的な視点での評価系の意義をより一層高めるためにも、外部からの専門家を交えて、マーカー遺伝子の選定を戦略的に進めることを推奨したい。
3. 選定したマーカー遺伝子に関して、遺伝子導入を進める前に、本プロジェクトで採用している培養条件と同一環境下で、毒性発現に関連した誘導を確認できるかどうかを事前に確認することで、より確度の高いマーカー遺伝子の選定と効率的な試験系（遺伝子導入細胞）の構築が可能になると考えられる。
4. 構築した新規試験系の成功要因を確認するためにも、従来型の2D培養条件での導入遺伝子の有用性評価を行うなど、複数の条件のデータを比較することを推奨したい。

提言に対する対処方針

1. これまでも厚生労働省トキシコゲノミクス・インフォマティクスプロジェクト（TGP2）やNEDO「28 日間反復投与試験結果と相関する遺伝子発現データセットの開発」等で開発された複数のデータベース活用を図っており、in vitro細胞試験のメリットを活かせるメカニズムに基づくマーカー遺伝子の選択にも今後注力する方針である。
2. これまでも専門家を招いた勉強会を複数回実施しており、遺伝子発現解析プロジェクトを推進する一般財団法人化学物質評価研究機構（CERI）との連携を一層深めつつ戦略的なマーカー遺伝子の選定に注力する方針である。
3. 採用した培養条件と比較可能な環境下でのマーカー遺伝子のmRNA発現の確認については、近々実施する方針である。
4. 肝臓については、発光マウスより単離した肝細胞での平面（2D）培養によりマーカー遺伝子のmRNAレベルの発現量と発光量を確認する予定である。一方、腎臓については、ラットKS細胞(岡山大喜多村らがすでに樹立した培養細胞株)やその他の近位尿細管由来培養細胞を用いた有用性評価等を行ない、種々の条件でのデータを比較する予定である。

B-8. 提言及び提言に対する対応方針(2)

今後の研究開発の方向等に関する提言

5. 地方の研究コンソーシアムを積極的に支援することはわが国の発展という意味で非常に意義深いため、目利きの人材を活用し、地方に根ざした優れた個別技術を国レベルの研究に組み入れることが重要と考える。
6. 他の事業、特にヒトiPS細胞を応用した類似研究と対比して、マウス細胞を用いた技術体系を構築していくことの必要性和優位性が十分に示されることを望む。
7. 本活動の出口（成果）について、焦点を明確にする。

提言に対する対応方針

5. 平成25年度地域イノベーション戦略支援プログラムに「鳥取大学発染色体工学技術を用いた創薬支援等新産業クラスターの創出」というテーマで提案、採択され、事業を推進しているところである。また、本研究の成果を大学発ベンチャーに技術移転することも視野に入れている。さらに、アドバイザーとして各種専門家を招き適宜アドバイスを受けているところでもある。
6. ヒトを含めたiPS細胞の毒性試験については、最新情報の入手を図っており、これらの成果の活用についても考慮しているところである。in vitro分化誘導によってヒトiPS細胞から目的の組織を構築する研究が盛んに行なわれているが、腎臓や肝臓はその組織を構成する細胞種や構造の複雑さから、生体内の組織を反映させることは極めて困難であり、in vitroとin vivo 違いの問題が生じる。一方、マウス細胞を用いた場合、ヒトとマウスの種差の問題が生じる。しかし、マウス ES 細胞からはキメラマウスを容易に作製でき、この個体では機能的な組織が構築出来るという優位性がある。また、この組織からは機能細胞を取り出して試験に用いることが可能である。すなわち本事業では、ヒトiPS細胞の分化誘導では困難であるin vitroとin vivoを比較した試験が可能になる。
7. 人工染色体ベクターと発光レポーター技術の優位性については、これまでの研究で実証しているところであり、成果の1つとしては種々の毒性試験に応用可能な基盤技術の確立である。さらに、肝臓・腎臓・神経毒性については、当初より想定しているin vitroアッセイ試験系の確立とプロトコール化を出口目標としているところである。

B-8. 提言及び提言に対する対応方針(3)

今後の研究開発の方向等に関する提言

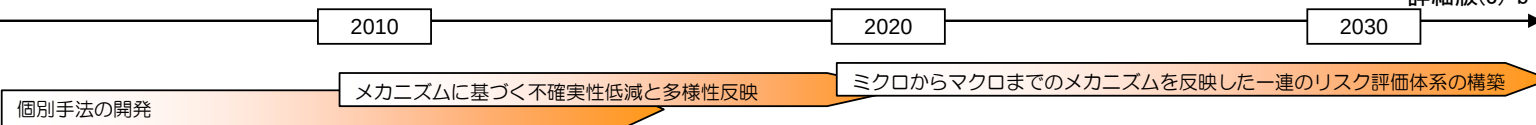
8. 国際的標準化を目指すためのハードルが何であることを提示し、それを超えるための手立てを明示する。
9. 個々の手法の優れた科学的技術に関しては、公に広める手立てを立てる。
10. 他の関連活動との連携を活発にし、全体として本活動が標準手法として融和できるような体制を取れる方策を考慮しておくといい。
11. EUの枠組みを最大限に利用し、日本が国際競争力を示していくためにも他国に先駆けて、まだルールのないところにいち早くルールを作り、いいポジションを得られるような展開を期待したい。

提言に対する対応方針

8. 標準化を目指すために解決している点としては、「発光測定装置や試薬を含めた発光測定方法」、「発光マウスの配布」などが挙げられる。一方、課題(ハードル)として残されている点は「三次元培養による細胞機能の再現性」、「アッセイ結果の再現性」などが挙げられ、いずれも次期プロジェクト等でのバリデーション試験が必要とされる内容である。
9. 鳥取大学で一般市民を対象としたセミナーの複数回開催、国内外の関連学会で当該プロジェクトの成果についてのシンポジウムを開催を図っており、「当該成果の論文化、知財化」についても進めているところである。
10. 初代肝細胞の3次元培養法については、スフェロイド研究会の情報を的確につかみ活用しており、引き続き必要情報入手を徹底する。また、標準化手法としての体制づくり等を考慮していく方針である。なお本事業開始当初から化合物選定には独立行政法人製品評価技術基盤機構化学物質管理センター(NITE)のHESSデータベースを有効的に活用すること、マーカー遺伝子選定には一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI)の研究成果を活用できるように情報交換を行なっている。今後も引き続き、連携を進める予定である。
11. 小島PLはJaCVAMとしてEU(ECVAM)、米国(ICCVAM)及び韓国(KoCVAM)との連携を保ち、国際競争力に遅れを取らぬよう本プロジェクト推進を図っている。引き続き国際的な動向を把握し、国際協力体制を保ちながら、いち早くOECDやICHのテストガイドラインを目指していく予定である。

化学物質総合評価管理分野の技術ロードマップ (8/14)

詳細版(3)-b



有害性

in silico
(人体モデル化)重要技術課題(62) in silico 人体
(分子～細胞～組織～臓器～全身を全てつないだモデル)

細胞、組織、臓器等、それぞれで開発されてきたモデルをつなげる

重要技術課題(63) 詳細な PBTK/TD モデル
(細胞応答、組織応答、臓器応答のシミュレーション)

動態 (PBTK)

応答 (TD)

技術課題(64) 単純な PBTK/TD モデル
(in vitro 等の試験結果を適用して改善)試験結果をもとに、モデルの精度向上
(逆に、モデルをもとに試験方法等を改善)

in vitro

試験結果をもとに、モデルの精度向上
(逆に、モデルをもとに試験方法等を改善)

重要技術課題(69) 臓器の in vitro 試験法 (生理学的な臓器モデル)

動態制御臓器について開発

標的臓器について開発

重要技術課題(70) 分子レベルでのメカニズムを考
慮し検出する in vitro 試験法

重要技術課題(73/72) ヒト iPS/ES 細胞を用いた in vitro 試験

正常組織・臓器と同じ応答の得られる細胞を得る。
効率化のため、自己複製能を利用して株化細胞にし、不死化させ
て繰り返し複製できるようにする。

試験に網羅的解析を組み込んでいき、メカニズムの情報を得る(逆に、メカニズムの情報によりモデルや試験方法等を改善)

網羅的解析

技術課題(80) 分子から生体までのメカニズムを把握するための遺伝子～たんぱく質
～代謝産物の網羅的解析の統合的解釈重要技術課題(83/81) 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/同技術を用いた種差
による感受性差の評価手法