

## 平成19年度実施方針（変更）

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 件名：プログラム名 化学物質総合評価管理プログラム  
(大項目) 高機能簡易型有害性評価手法の開発

2. 根拠法

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構法第15条第1項第1号ハ

3. 背景及び目的・目標

環境と調和した健全な経済産業活動と安心・安全な国民生活の実現を図るためには、化学物質のリスクを評価し、適切に管理する社会システムを構築することが必要である。このため平成13年度から、化学物質のリスクの総合的な評価管理を行うための手法と知的基盤の整備を目標とした化学物質総合評価管理プログラムを進めている。

化学物質のリスク評価においては、一般的に細菌等を用いた簡便な試験や動物を用いた長期間の毒性試験によって評価の基礎となる有害性情報を取得しているが、このような簡易試験で得られる情報の種類は限られており、また長期毒性試験についてはその費用や効率が課題として指摘されている。

これらの欠点を補う手法として培養細胞を用いた手法が注目されており、近年急速に発展してきた生命科学の手法と組み合わせることによって、短期間で精度よく効率的に有害性情報を取得する簡便な試験系を実現できる可能性が開けてきている。また、短期動物実験から遺伝子発現解析によって、長期毒性試験の結果を予測する手法が検討されるなど、その応用の拡大も期待されている。

本プロジェクトは、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の近代生命科学を培養細胞や動物を用いた短期試験に活用し、高機能で簡易な有害性評価手法を開発することを目的とし、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に貢献する。

## 研究開発項目①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

中間目標（平成20年度末）

遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用して発がん性、催奇形性および免疫毒性を予測する培養細胞とその試験方法を設計し、この培養細胞を製作して再現性、安定性等を評価する試験を行い、その有効性を確認するとともに課題を抽出する。

最終目標（平成22年度）

遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、

試験期間 1 ヶ月程度で発がん性、催奇形性および免疫毒性を予測評価できる試験方法を開発し、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。

研究開発項目②28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\*<sup>1)</sup>

\*<sup>1)</sup> 平成 19 年 8 月 31 日までは研究開発項目②として「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」を推進し、その後、新たな②として本テーマに変更する。

中間目標（平成 20 年度末）

28 日間反復投与試験の結果が出ている化学物質を用いた短期動物実験を行って、各臓器の遺伝子発現状況を解析し、遺伝子情報データを集積する。

最終目標（平成 22 年度）

遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、28 日間反復投与試験結果と相関する遺伝子情報データセットを完成させる。また、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。

#### 4. 実施内容及び進捗（達成）状況

##### 4. 1 平成 18 年度事業内容

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所遺伝毒性部長 田中 憲穂氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発項目①を実施した。

研究開発項目①「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

発がん性予測試験法の開発ア) ハイスループット発がん性予測試験法の開発については、化学物質のヒトへの発がん性について分類し、施設間評価試験に用いる被験物質を選択してスクリーニングを開始した。また評価試験に用いるプロトコールを作成し、それに従って多施設間評価試験を実施した。一方、ハイスループット化に対応する為、本試験法に特化した自動化機器の基本設計を終え、部品の製作を開始した。ガイドライン (GL) 化を目標とするため、本試験法開発に関連する Balb3T3 細胞の ECVAM 主催国際協同評価試験、および OECD GL 形質転換試験専門家会議 (2006, Washington DC.) に参加し意見を交換した。

(実施体制：財団法人食品薬品安全センター)

発がん性予測試験法の開発イ) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発については、毒性予測に最適化された半減期 30 分程度に制御された赤、緑色発光プローブを PEST 配列の導入により開発し、発光プローブ群の細胞内への導入法を最適化した。また毒性評価モデルとして PC12 細胞において注目すべき遺伝子群を選定して発光プローブの開発、一過性の発光 PC12 細胞を試作した。さらに小腸や肝臓細胞との簡便複合 Bhas 42 細胞試験の実用化を目指し、底面からの直接酸素供給を可能とする複合培養器具の開発を終了した。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所)

ー共同実施・国立大学法人東京大学 (大学院理学系研究科、生産技術研究所)

発がん性予測試験法の開発ウ) 発光プローブと発光細胞の開発については、発光細胞

構築のため、安定導入可能な発光プローブ搭載ベクターのプロトタイプを構築した。また、PC12細胞において選定された遺伝子プロモーターを取得し、PC12細胞へ一過的導入した。この細胞を用いて発光プローブが遺伝子発現をモニターできることを確認した。さらに免疫毒性関連遺伝子プロモーター (INF $\gamma$ 、IL4) の候補領域をクローニングした。

(実施体制：東洋紡績株式会社)

催奇形性予測試験法の開発ア) ES細胞を用いた催奇形性予測試験法の開発については、マウスES細胞を用い、時経列的に心筋分化過程における網羅的遺伝子発現解析を実施し、心筋分化に伴って顕著に発現変動する約100遺伝子を見出した。催奇形性の有無が知られた物質により処理した心筋細胞での遺伝子発現量を測定・解析することにより、着目する遺伝子を選定し、年度目標に則した成果を得る見込み。また、ES細胞の未分化維持培養法や分化誘導培地等の誘導条件を検討した。大脳領域の神経細胞分化誘導法を検討する等、年度目標である神経分化誘導法を確立する見込み。

(実施体制：住友化学株式会社)

催奇形性予測試験法の開発イ) 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発については、ラット胎児培養法に代謝系を組み込むことにより、代謝酵素の添加方法の検討等、年度目標である数種の化学物質における(妥当性の)検証まで十分な成果を得る見込み。また、*in vivo*試験をより反映できる代謝機能を組み込んだ胎児培養法の新しい手法を確立するために、胎児培養におけるラット薬物代謝酵素であるラットS-9mixの詳細な無毒性添加量を確定した。さらに代謝酵素の反応について検証を進めた。

(実施体制：住友化学株式会社ー再委託・学校法人鎌倉女子大学)

免疫毒性予測試験法の開発については、T細胞について既存の知見を基に着目する遺伝子の選定を完了し、それに発光プローブを導入した発光細胞の開発を開始した。また、T細胞を中心に、免疫毒性の有無が知られた物質で細胞の遺伝子発現変動をマイクロアレイ等で測定・解析して、新規に着目する遺伝子を選定した。また、樹状細胞、上皮細胞に関しても着目する遺伝子の同定に着手した。

(実施体制：国立大学法人東北大学)

並行して、公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科教授 白井 智之氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発項目②を実施した。

研究開発項目②「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」

マイクロアレイ実験に適した腎臓の採材方法、保存方法、そして保存した臓器からのRNA精製方法を確立した。また、腎臓採取部位(皮質もしくは髄質)の違いにより遺伝子発現が異なることを明らかにした。そして、皮質部と髄質部の両方を含む部位を解析試料に用いることにより、腎臓全体の発現遺伝子を網羅できることを見出した。また、腎臓がん性の有無が既に知られている6種類の化学物質各々についてラットへの投与試験を行い、腎臓の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて測定した。また、既存のマイクロアレイのラット腎臓がん予測への適用性を評価し、予測式を開発する見込みである。また、腎臓に関する試験データおよび化合物の公開毒性情報を収載したデータベースの

仕様を策定し、開発を開始した。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構)

上記で選定した 6 種類を含む 10 種類の化学物質を選定し、ラット肝がん、ラット腎がん及びヒト腎がんの培養細胞株を用いた暴露試験を実施した。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構－共同実施・公立大学法人名古屋市立大学)

NEDO プロジェクト「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」（平成 13～17 年度）で取得した肝臓における遺伝子発現データを用いて、腎発がん物質に特徴的な発現変動を示すマーカー遺伝子の選定手法を検討した。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構－共同実施・学校法人埼玉医科大学)

#### 4. 2 実績推移

	18年度	19年度	20年度	21年度	22年度
実績額推移（百万円）：					
石特会計	491				
特許出願件数（件）：	0				
論文発表数（報）：	0				
フォーラム等（件）：	0				

#### 5. 事業内容

##### 5. 1 平成 19 年度事業内容

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所遺伝毒性部長 田中 憲穂氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発項目①を実施する。実施体制については、別紙 1 を参照のこと。

研究開発項目①「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

発がん性予測試験法の開発ア) ハイスループット発がん性予測試験法の開発については、Bhas42 細胞について施設間試験を実施し、結果を解析して再現性と安定性を確認する。結果を基に試験プロトコルの課題を抽出して試験プロトコル・手順書を更に改良し最終案を作成する。本最終案は OECD テストガイドライン案検討のベースとする。また、試験をハイスループット化するための自動化機器の基本設計を完了する。

(実施体制：財団法人食品薬品安全センター)

発がん性予測試験法の開発イ) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発については、細胞内寿命 30 分程度のルシフェラーゼの開発を完了する。また発光PC12 細胞で遺伝子の時系列的発現データを測定し、これを基にシミュレーション技術を開発する。また、PC12 細胞及びBhas42 細胞の形質転換と相関の高い初期遺伝子群を同定し、早い評価系の確立を目指す。S9mixのマイクロカプセル化によるBhas42 試験系への適用を試みる。平成 1

9年度下期より、新たに共同実施先を加え、ヒト人工染色体（HAC）ベクターを用いた発光細胞プローブの構築について取り組み、特に、発光プローブ遺伝子のHACへの組み込み、並びにそのHACの目的細胞への導入を中心に実施する。

（実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所

－共同実施・国立大学法人東京大学（大学院理学系研究科、生産技術研究所）、  
国立大学法人鳥取大学（大学院医学系研究科）

発がん性予測試験法の開発ウ）発光プローブと発光細胞の開発については、PC12細胞の最適化を開始し、また Bhas42 細胞について、イ）項にて選定した遺伝子に導入する発光プローブの開発に着手する。並行して、後述する免疫毒性予測試験法の開発で平成18年度に選定した遺伝子に導入する発光プローブの開発を完了し、平成19年度に選定した遺伝子に導入する発光プローブを開発する。

（実施体制：東洋紡績株式会社）

催奇形性予測試験法の開発ア）ES細胞を用いた催奇形性予測試験法の開発については、マウス ES 細胞の筋・骨格系への分化誘導手法を確立し、分化誘導技術の開発を完了する。また、試験を実施して平成18年度に選定した心筋分化過程に関する遺伝子の中から催奇形性に関わる遺伝子を確定し、それに発光プローブを導入した発光細胞の開発を行う。また催奇形性の有無が知られた物質で神経分化過程における遺伝子発現の測定・解析を行って、着目する遺伝子を選定する。

（実施体制：住友化学株式会社）

催奇形性予測試験法の開発イ）代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発については、陽性対照化合物を用いた妥当性の検証を完了し、ラット代謝酵素添加試験法の有効性を確認する。更に培養液量の最適化を検討する。

（実施体制：住友化学株式会社－再委託・学校法人鎌倉女子大学）

免疫毒性予測試験法の開発については、T細胞について既存の知見を基にして選定した遺伝子に発光プローブを導入した発光細胞の開発を完了する。樹状細胞について既知の知見を基に着目する遺伝子の選定を完了し、それに発光プローブを導入した発光細胞の開発を開始する。また T 細胞を中心に、新規に選定した遺伝子に発光プローブを導入した細胞の開発を行う。樹状細胞を中心に各細胞について、免疫毒性の有無が知られた物質で細胞の遺伝子発現変動をマイクロアレイ等で測定・解析して、着目する遺伝子を新規に選定する。

（実施体制：国立大学法人東北大学）

並行して、公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科教授 白井 智之氏をプロジェクトリーダーとし、以下の研究開発項目②-1 を実施したが、本研究開発項目は平成19年8月31日まで実施して中止した。実施体制については、別紙2を参照のこと。

その後、研究開発項目を②-2「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」に改め、追加公募して実施する。プロジェクトリーダーは委託先決定後に改めて設置する。

## 研究開発項目②-1「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」

腎発がん性の有無が既に知られている 6 種類の化学物質各々についてラットへの投与試験を行い、腎臓の遺伝子発現をマイクロアレイ等を用いて測定する。本試験結果を基にラット腎発がん予測に有効な遺伝子を選定し、ラット腎発がん予測用マイクロアレイの仕様案を設定する。また、上記試験結果を全て用いてラット腎発がん性予測に適した予測式を開発する。また、腎臓に関する試験データおよび化合物の公開毒性情報を収載し、また解析等の処理速度に配慮したデータベースの開発を完了する。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構)

腎発がん性の有無が既に知られている化学物質から適切なものを選定し、ラットの肝細胞がん培養細胞を用いた暴露試験を行い、マイクロアレイ等を用いて遺伝子発現変動を測定・解析する。その遺伝子発現プロファイルから、腎発がん性物質と非発がん性物質の区別が可能であるかを検討するとともに、ラットを用いた *in vivo* アッセイ系における遺伝子発現プロファイルとの相関性についても解析する。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構－共同実施・公立大学法人名古屋市立大学)

最新の分子生物学研究から得られた遺伝子の発現機序情報に基づいてマイクロアレイデータの数理モデル化を行い、統計解析法を新しく考案し、統計学的手法と比較し有効性を検討する。多変量解析的観点からの解析法の開発に着手し、単変量解析に対する優位性を検証する。

(実施体制：財団法人化学物質評価研究機構－共同実施・学校法人埼玉医科大学)

## 5. 2 平成19年度事業規模

石特会計（石油） 376百万円（委託・継続・新規）

※うち追加公募分 96百万円程度（新規）

(注) 事業規模については、多少の変動があり得る。

## 6. 事業の実施方式

研究開発項目①については平成18年度採択テーマを継続して推進するとともに、研究開発項目②については、項目名を②-1から②-2に変更して公募により新規テーマを採択する。

### 6. 1 公募

#### (1) 掲載する媒体

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（以下「NEDO 技術開発機構」という。）ホームページで行う。

#### (2) 公募開始前の事前周知

公募開始のおよそ1ヶ月前に、NEDO 技術開発機構ホームページで行う。

#### (3) 公募時期

平成19年11月上旬に行う（予定）。

#### (4) 公募期間

30日間程度とする（平成19年11月上旬～12月上旬を予定）。

(5) 公募説明会

公募後速やかに行う。

6. 2 採択方法

(1) 審査方法

委託事業者の選定・審査は、公募要領に合致した応募を対象に NEDO 技術開発機構が設置する審査委員会（外部有識者で構成）で行う。審査委員会（非公開）は事業者の提案内容を審査し、本事業の目的の達成に有効と認められる事業者を選定した後、NEDO 技術開発機構はその結果を踏まえて委託事業者を決定する。

(2) 公募締切から採択決定までの審査等の期間

45日以内とする。

(3) 採択結果の通知

採択結果については、NEDO 技術開発機構から申請者に通知する。なお、不採択の場合は、その明確な理由を添えて通知する。

(4) 採択結果の公表

採択案件については、申請者の名称、研究開発テーマの名称・概要を公表する。

7. その他重要事項

(1) 評価

NEDO 技術開発機構は、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の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20年6月に実施する。

(2) 運営・管理

本研究開発は、培養細胞を用いた有害性評価手法の開発、遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発、の2つの研究開発項目について各々別の研究体制を構築し委託して実施する。

研究開発に参加する各研究開発グループの有する研究開発ポテンシャルを最大限に活用して効率的に研究開発を推進する観点から、各々別の研究体制には、研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を各1名置き、その下に研究者を可能な限り結集して効果的な研究開発を実施する。

また、適宜、事業の進捗状況に応じた点検を行い、事業の進捗管理等を実施する。

(3) 複数年度契約の実施

平成18～19年度の複数年度契約を行う。

(4) 継続事業に係る取扱いについて

研究開発項目①については、委託先は前年度と変更はない。

平成19年度委託先：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、東洋紡績株式会社、住友化学株式会社、国立大学法人東北大学

## 8. スケジュール

### (1) 本年度スケジュール

平成19年10月中旬・・・部長会

10月中旬・・・運営会議

11月上旬・・・公募開始

11月上旬・・・公募説明会

12月上旬・・・公募締切

12月下旬・・・契約・助成審査委員会、採択決定

平成19年9月上旬・・・開発推進委員会（委託先で開催）

平成20年2月下旬・・・開発推進委員会（委託先で開催）

## 9. 改訂履歴

(1) 平成19年3月 制定

(2) 平成19年7月 改訂（研究開発項目①の共同実施先：東京大学（大学院理学系研究科、生産技術研究所）の実施内容に関する変更）

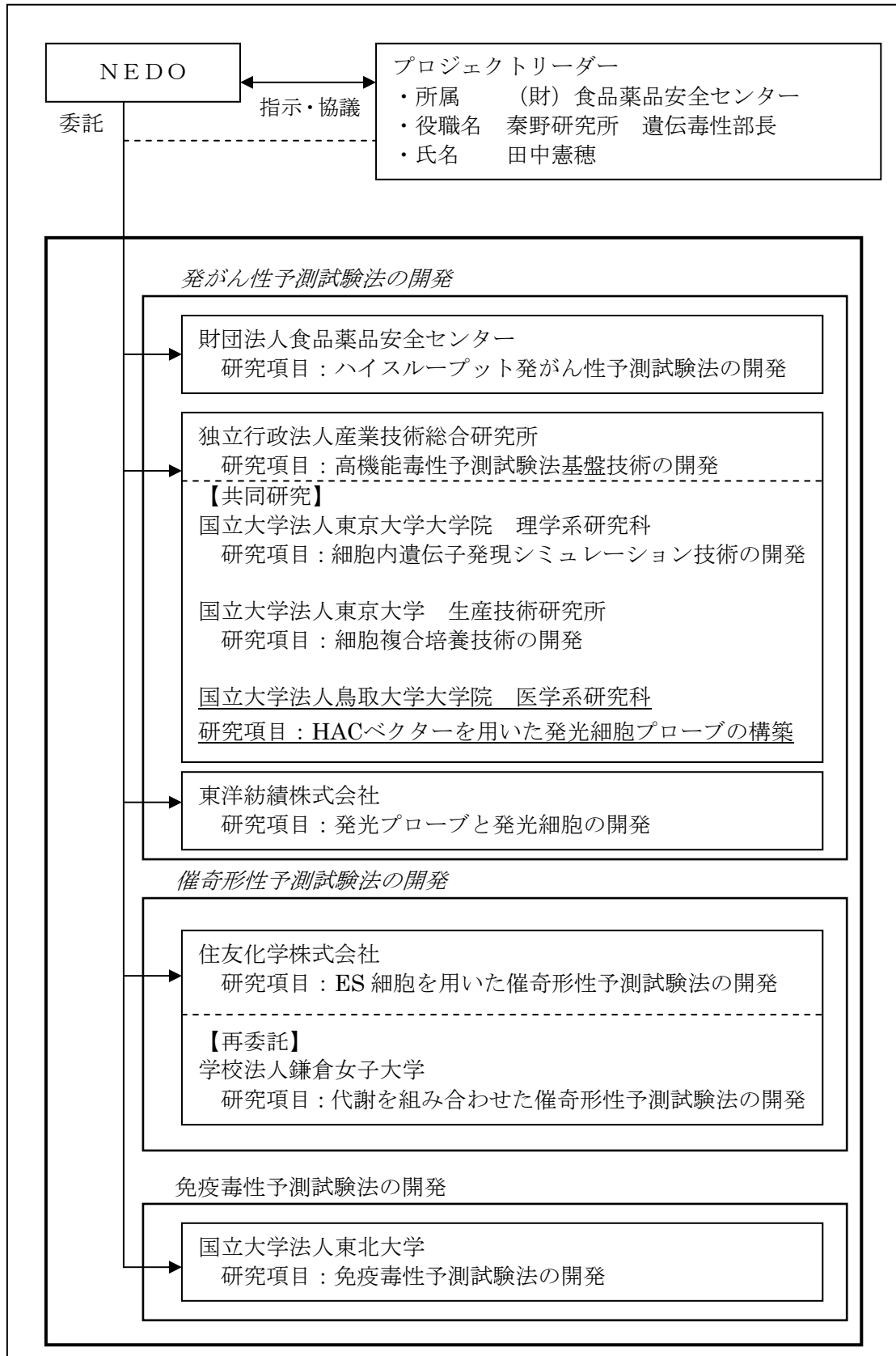
(3) 平成19年10月改訂（研究開発項目②-1 の中止、およびこれに伴う研究開発項目②-2 の追加公募に関する変更）

(4) 平成19年11月改訂（研究開発項目①に関する研究テーマの修正に関する変更）



(別紙1) 事業実施体制の全体図

「高機能簡易型有害性評価手法の開発/培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」実施体制



(別紙2) 事業実施体制の全体図

「高機能簡易型有害性評価手法の開発／遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」実施体制

