

平成20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 環境安心イノベーションプログラム
エネルギーイノベーションプログラム
(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

環境と調和した持続的な経済・社会の実現と、安全・安心な国民生活の実現を図るため、化学物質のリスクの総合的な評価及びリスクを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、化学物質のリスクの総合的な評価を行いつつ、リスクを評価・管理するための技術体系の構築を目標とした環境安心イノベーション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。本プロジェクトでは、以下の研究開発項目および目標の研究開発を委託により実施する。

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

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19年度までの実施内容

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、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した。結果を基に試験プロトコールの課題を抽出して試験プロトコール・手順書を更に改良した。この案は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推進した。

（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、細胞内寿命30分程度のルシフェラーゼの開発を完了、及び免疫毒性評価に最適化されたインターナルコントロール用プロモーター配列を特定した。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した。また、発光PC12細胞を用いて遺伝子発現の時系列発現データの取得を開始した。さらに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た。平成19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への組込みを中心に実施した。

（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）、
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、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した。また、インターナルコントロールとして恒常発現プロモーター発光プローブを開発し、Jurkat細胞への一過的導入によるアッセイによってGAPDHを選択した。Jurkat細胞へこれらコンストラクトの安定導入作業を進めた。単色発光細胞を樹立し、マルチ発光細胞の樹立作業を進めた。

(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細胞の筋・骨格系への分化誘導手法を確立し、分化誘導技術を開発した。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選定した。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した。

(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した。更に培養液量の最適化を検討した。

(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、まず、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した。その知見をもとに、培養表皮細胞HaCat、単球由来細胞株U937にhemeoxygenase-1のプロモーター下流にルシフェラーゼを導入した発光細胞を開発した。また、T細胞については、既存の知見を基にして、interferon-gamma遺伝子を選定し、その遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼを導入した発光細胞を開発した。

(実施体制：国立大学法人東北大学)

並行して、国立大学法人東京医科歯科大学大学院寄附講座教員(客員准教授)渡辺 慎哉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「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」

既存化学物質に係わる毒性学的情報を基に対象化学物質(約5種類程度)とその投与実験方法を選択し、28日間反復投与実験を行い、主要臓器・組織(15種類程度)の採取・保存を進めた。また、これらからの遺伝子発現解析用RNAサンプルの取得を進めた。

(実施体制：株式会社メディクローム)

また、遺伝子発現解析用RNAサンプルを取得できたものから遺伝子発現プロファイル取得と解析を実施し、平成19年度目標を達成できる見通し。

(実施体制：株式会社メディクローム共同実施・東京医科歯科大学)

既存化学物質を投与したラット組織の遺伝子発現情報の編纂と登録を行うための準備作業を実施した。

(実施体制：株式会社メディクローム共同実施・東京医科歯科大学、国立遺伝学研究所)

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	479	388			
特許出願件数(件)：	0	1			
論文発表数(報)：	0	28			
フォーラム等(件)：	0	60			

5. 事業内容

5. 1 平成20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代替試験法研究部長 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細胞を用いた96ウェル法による形質転換試験について最終プロトコルを用いた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。この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については、実用化の為の多検体処理の基本的なプロトコルを作成すると同時に性能試験機での問題点を改良し量産のための評価検討を行なう。

(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、免疫毒性評価に最適化された複数プロモーター配列を多色発光プローブ化、毒性評価発光細胞の応答性の評価を実施、併せて、ハイスループット多色発光測定法を最適化する。またヒト人工染色体(HAC)ベクターに毒性評価多色発光プローブを挿入、毒性評価HAC導入細胞の構築を実施する。Bhas42細胞の形質転換と相関の高い初期遺伝子群をさらに

同定し、早期評価系の確立を目指す。また PC12 細胞を用いて遺伝子発現の時系列発現データから刺激の時間波形のデコードの解析も補足的に行う。

(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)、
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、発光プローブの最適化を行うとともに、現在進行中の Jurkat 細胞などの免疫毒性評価用細胞を用いたマルチ発光細胞の樹立を進める。また、Bhas42 細胞について、イ) 項にて選定された遺伝子について発光プローブの開発を進める。

(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、平成 19 年度に絞り込んだマウス ES 細胞の心筋分化過程に関する遺伝子の発光細胞を用いて、50 種類程度の化学物質により催奇形性マーカーとしての有用性およびマーカーの特徴を明らかにする。また、有用性が明らかになったマーカーを用いて試験系に適した高感度な細胞作成を目指す。神経細胞については平成 19 年度着目した遺伝子について、20 種類程度の化学物質を用いて絞込みを行い、順次発光細胞の作成を行う。

(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、代謝機能を取り入れた胎児培養法の確立とその反応における確認の最終プロトコールを実施し、本手法の有用性の判定を行う。また、培養液として使用するラット血清の少量化を目的として作成された培養装置における条件設定の最終調整を行い、問題点などの改良も進め、本培養装置の完成を目指す。

(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、これまでの解析に引き続き、さらに、免疫毒性が既知の化学物質を T 細胞、樹状細胞、表皮細胞に作用させて、その遺伝子発現変動をマイクロアレイ、定量的 PCR により解析する。また、これら 3 種類の細胞に加えて、最近特に注目をあびている肥満細胞についても、培養肥満細胞を用いて同様の検討を加える。以上の知見ならびに、文献的にすでに確定している情報を組み合わせて、免疫毒性評価に適した遺伝子を選定し、その遺伝子のプロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入した発光細胞の開発を行う。今年度は、東洋紡との共同研究で、表皮細胞、樹状細胞、各 1 種類の細胞を開発する。また、鳥取大学との共同研究で、発光遺伝子が HAC に導入された発光細胞の開発に着手する。

(実施体制：国立大学法人東北大学)

並行して、国立大学法人東京医科歯科大学大学院寄附講座教員（客員准教授）渡辺 慎哉氏をプロジェクトリーダーとして研究開発項目②「28日間反復投与試験結果と関連する遺伝子発現データセットの開発」を実施する。実施体制については、別紙2を参照のこと。

研究開発項目②「28日間反復投与試験結果と関連する遺伝子発現データセットの開発」
既存化学物質に係わる毒性学的情報を基に選定した対象化学物質20種類程度の28日間反復投与実験を実施し、ラット臓器・組織サンプルを前年度と合わせ約1,300種類ほど取得し、これから遺伝子発現解析用RNAサンプルを得る。

（実施体制：株式会社メディクローム）

前項で得られたRNAサンプルから厳選した500種類程度について遺伝子発現プロファイルを取得し解析する。また、単独の化合物またはある特徴を共有する複数の化合物群に特異的な発現変化を示す遺伝子群を特定する。

（実施体制：株式会社メディクロームー共同実施・東京医科歯科大学）

前項で取得・解析した遺伝子発現プロファイルを全て登録・開示する。取得した遺伝子発現プロファイルを単一のデータ集合体に編纂し、毒性参照データベースの構築を進める。

（実施体制：株式会社メディクローム

ー共同実施・東京医科歯科大学、国立遺伝学研究所）

5. 2 平成20年度事業規模

エネルギー対策特別会計（需給） 359百万円（委託・継続）

事業規模については、変動があり得る。

6. その他重要事項

6. 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10月に実施する。

6. 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。

6. 3 複数年度契約の実施

平成18～20年度の複数年度契約を行う。

6. 4 継続事業に係る取扱いについて

委託先は前年度と変更はない。

平成20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、株式会社メディクローム

7. スケジュール

7. 1 本年度スケジュール

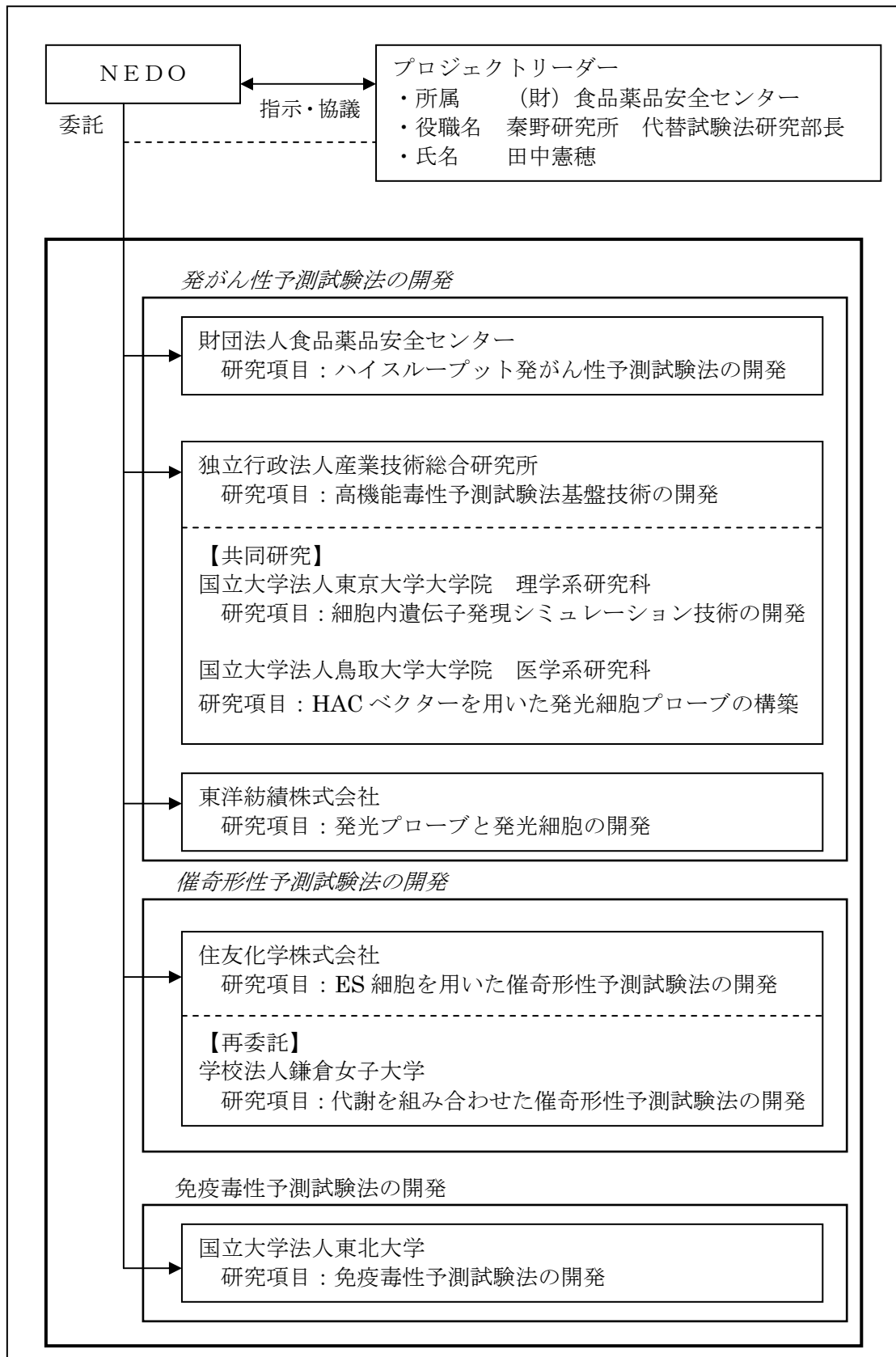
平成20年9月上旬・・・開発推進委員会（委託先で開催）

平成20年10月・・・中間評価委員会

平成21年2月下旬・・・開発推進委員会（委託先で開催）

(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／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」実施体制

