

## 平成21年度実施方針（変更）

環境技術開発部

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及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、催奇形性及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た培養細胞を用い

て、試験期間 1 か月程度で発がん性、催奇形性及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関連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関連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20年度の実施内容 4. 1. 1 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」

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（研究開発責任者）とし、以下のとおり実施した。

(A) 発がん性予測試験法の開発

ア) Bhas42 細胞を用いた形質転換試験法の開発

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試験用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した。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・手順書をさらに改良して、OECDテストガイドライン案検討のベースとなる最終案を目指し、基本プロトコルの作成を開始した。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、実用化のための多検体処理の基本的なプロトコルを作成するとともに、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開始した。

（実施体制：財団法人食品薬品安全センター）

イ) 発光 Bhas42 細胞を用いた試験法の開発

Bhas42細胞の形質転換と関連の高い初期遺伝子群をさらに同定し、発光 Bhas42細胞の製作を開始した。

（実施体制：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（一共同実施：国立大学法人東京大学（大学院理学系研究科））、東洋紡績株式会社）

## (B) 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

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について、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及び特徴を明らかにした。有用性が明らかになったマーカー遺伝子を用いて試験系に適した高感度な細胞製作を開始した。神経細胞については、平成19年度に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、順次発光細胞の製作を行った。

(実施体制：住友化学株式会社)

### イ) 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発

代謝機能を取り入れた胎児培養法の確立とその最終プロトコールの作成を実施し、本手法の有用性の判定を行った。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製作された培養装置における条件設定の最終調整を行い、問題点等の改良も進め、本培養装置の基本部分を完成した。

(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)

## (C) 免疫毒性予測試験法の開発

平成19年度に引き続き、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により解析した。最近特に注目を浴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た。以上の知見及び文献情報に基づき、免疫毒性評価に適した遺伝子を選定した。

(実施体制：国立大学法人東北大学)

## (D) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発

Bhas42 細胞の選定した遺伝子について発光プローブの開発を進めた。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社)

免疫毒性評価に最適化された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した。表皮細胞及び樹状細胞について、多色発光細胞各1種類を製作した。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社)

ヒト人工染色体 (HAC) ベクターに多色発光プローブ (複数の遺伝子) を高効率に導入する新技術を開発し、これによる発光細胞の製作に着手した。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所 (－共同実施：国立大学法人鳥取大学 (大学院医学系研究科))、東洋紡績株式会社)

発光 PC12 細胞をモデルとした基礎研究として、選定した遺伝子群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を行った。

(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)) 4. 1. 2 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」

公立大学法人福島県立医科大学トランスレーショナルリサーチセンター (東京分室) 臨床ゲノム学講座教授 渡邊慎哉氏をプロジェクトリーダー (研究開発責任者) とし、

以下のとおり実施した。

毒性学的情報を基に既存化学物質（20種類）とその投与方法を選択し、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）

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た。取得プロファイルの総数は、500を超えた。

取得・解析した遺伝子発現プロファイルから化学物質が生体へ与える影響を評価できる遺伝子セットを抽出し、それらの中から毒性評価バイオマーカーとして新規性・進歩性・有用性のあるものを選択して特許出願準備を完了した。

（実施体制：株式会社メディクロームー共同実施：公立大学法人福島県立医科大学）

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、第1回のデータ登録・開示の準備を完了した。

（実施体制：株式会社メディクロームー共同実施：公立大学法人福島県立医科大学、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	238		
特許出願件数（件）：	0	1	2		
論文発表数（報）：	0	28	18		
フォーラム等（件）：	0	60	28		

## 5. 事業内容

### 5. 1 平成21年度事業内容

#### 5. 1. 1 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」

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、別紙1の実施体制により、以下のとおり実施する。

##### (A) 発がん性予測試験法の開発

###### ア) Bhas42 細胞を用いた形質転換試験法の開発

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基本的なプロトコルを用い、より多くの検体を用いてphaseⅡの施設間バリデーション試験を実施する。これらの結果を基に試験プロトコルを細部にわたり検討し、OECDテストガイドラインを提案するための最終プロトコルを作成する。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、実用化のため多検体処理に適した基本プロトコルを作成し、性能試験機での評価検討を行う。

(実施体制：財団法人食品薬品安全センター)

###### イ) 発光 Bhas42 細胞を用いた試験法の開発

発光 Bhas42 細胞を複数製作してクローニングし、発がん性予測に最適な細胞を絞り込み、その有用性を詳細に検討する。

(実施体制：財団法人食品薬品安全センター)

##### (B) 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

平成20年度に新たに作製したマウス ES 細胞の心筋分化過程に関する催奇形性マーカー遺伝子の評価用発光細胞を用いて、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の検討及び特徴付けを継続する。平成20年度に検討した結果と比較し、有用性が明らかになったマーカー遺伝子を用いて試験系に適した高感度な細胞製作を目指す。また心筋分化過程に関する催奇形性予測試験プロトコル作成に着手する。

神経細胞については、平成20年度に絞り込んだ催奇形性マーカー遺伝子の評価用発光細胞を製作し、順次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及び特徴を明らかにする。

(実施体制：住友化学株式会社)

###### イ) 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発

平成20年度に確立された代謝機能を取り入れた胎児培養法を用いて、ES細胞で用いられた化学物質の数種類について試験を行い、ES細胞試験法との相関性等を確認する。さらに、ヒトS-9 mixの導入の検討を進める。また、ラット血清の少量化を目的として作製された培養装置(平成20年度までに培養条件設定を確立。)に、ラットS-9mixの導入を試みるとともに、ハイスループットで多くのラット胎児を同時に培養できる装置の開発を進め、試験法として実用可能な装置の製作を目指す。

(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)

### (C) 免疫毒性予測試験法の開発

平成20年度までに決定した7つの免疫毒性マーカー遺伝子に関して、樹状細胞、表皮細胞、T細胞の発光細胞を製作する。既に安定細胞が樹立されている4つの発光細胞について、再クローニングを行い、化学物質刺激により鋭敏に反応するクローンを取得する。また、その他のマーカー遺伝子に関しては、新たに6つの発光細胞を製作する。さらに、樹立した発光細胞を組み合わせた免疫毒性評価システムを構築し、また、施設間でのバリデーションを進めるための細胞培養法、発光測定法を含めたプロトコールを作成する。

(実施体制：国立大学法人東北大学)

### (D) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発

Bhas42細胞の選定した遺伝子について発光プローブの開発をさらに進め、発がん性評価用発光細胞を製作する。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社)

発光プローブを導入したHACベクターを用い、2色発光免疫細胞及び発光ES細胞を樹立する。また、HACベクターに多色発光プローブ(複数の遺伝子)を高効率に導入する新たな技術について有効性を検証するとともに、この技術を用いて、3色発光プローブ遺伝子をHACベクターに導入し、3色発光評価用HAC導入細胞の製作を順次試みる。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所(一共同実施：国立大学法人鳥取大学(大学院医学系研究科))、東洋紡績株式会社)

上記すべての予測試験法について基盤技術部分のプロトコール作成を支援するとともに、効率的標準化の方法を調査・検討する。

(実施体制：独立行政法人産業技術総合研究所)

## 5. 1. 2 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」

公立大学法人福島県立医科大学トランスレーショナルリサーチセンター(東京分室)臨床ゲノム学講座教授 渡邊慎哉氏をプロジェクトリーダーとして、別紙2の実施体制により、以下のとおり実施する。

毒性学的情報を基に選定した15類程度の既存化学物質について28日間反復投与実験を実施し、ラット臓器・組織サンプルを約900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)

得られたRNAサンプルから厳選した300~350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、単独の化合物又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。これらの中から毒性評価用バイオマーカーとして新規性・有用性を持つものを選択し、特許出願を行う。

(実施体制：株式会社メディクローム-共同実施：公立大学法人福島県立医科大学)

取得・解析した遺伝子発現プロファイルを、必要に応じて特許出願等の知的財産権確

保措置を実施後に、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：公立大学法人福島県立医科大学、国立遺伝学研究所)

## 5. 2 平成21年度事業規模

エネルギー対策特別会計（需給） 286百万円（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 運営・管理

本研究開発は、二つの研究開発項目について、委託によりそれぞれ別の実施体制を構築し、各1人のプロジェクトリーダーを置いて実施する。

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDO技術開発機構は、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標並びに本研究開発の目的及び目標に照らして適切な運営管理を実施する。具体的には、委託先に設置される開発推進委員会等における外部有識者の意見を運営管理に反映させるほか、研究開発の進捗について四半期に1回程度プロジェクトリーダーから受ける報告等を踏まえ、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. 2 複数年度契約の実施

研究開発項目①については、平成18～22年度の複数年度契約を行う。研究開発項目②については、平成19～22年度の複数年度契約を行う。

## 7. 平成21年度スケジュール

平成21年9月及び平成22年2月に委託先において開発推進委員会を開催する。

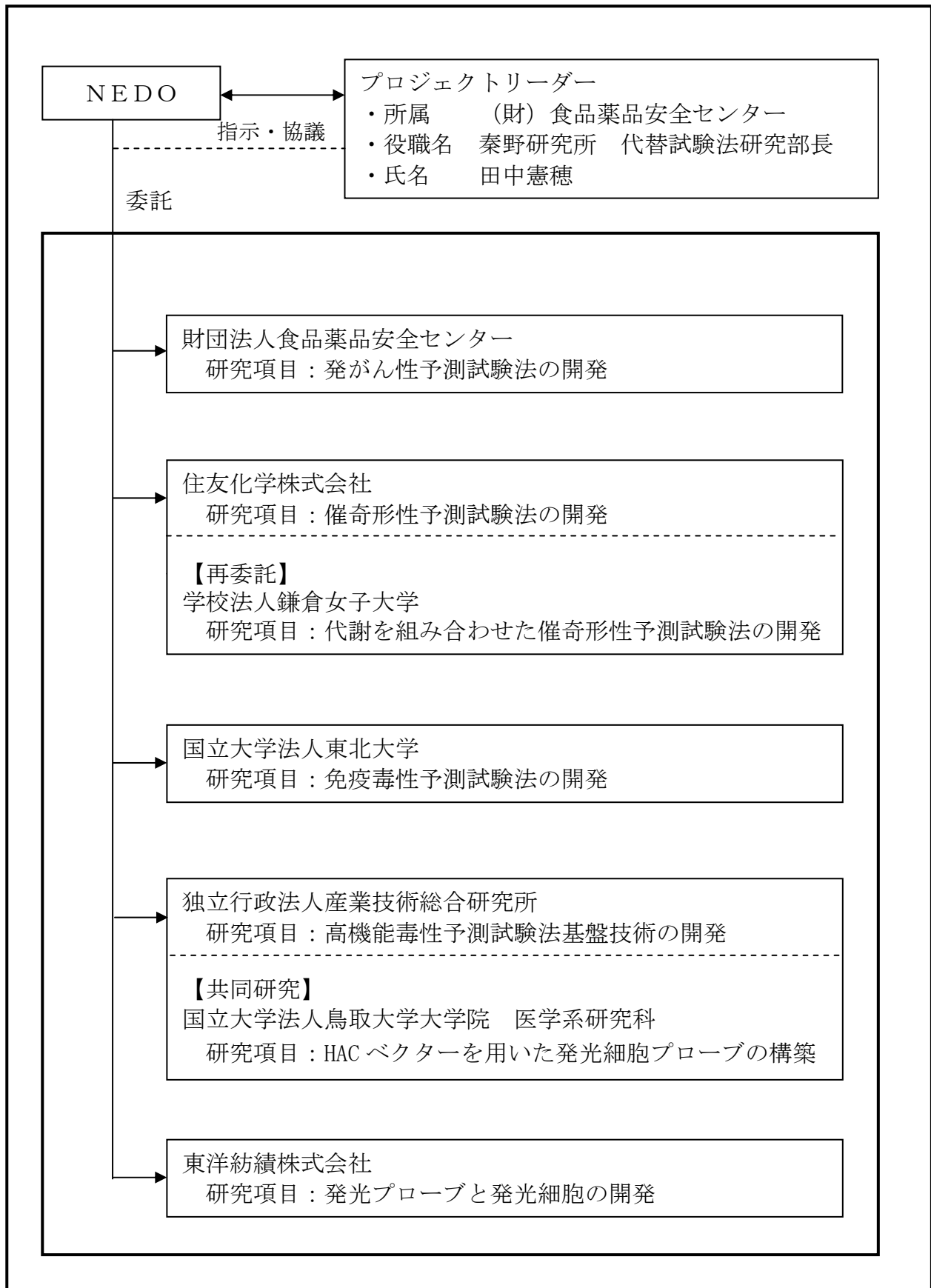
## 8. 実施方針の改訂履歴

(1) 平成21年3月、制定。

(2) 平成21年7月、改訂。

(別紙1)

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」の実施体制





(別紙2)

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」  
の実施体制

