

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」

事業原簿(公開)

担当部	新エネルギー・産業技術総合開発機構 環境部
-----	--------------------------

— 目次 —

概要	A-1～9
プロジェクト用語集	B-1～13
プロジェクト用語集の作成に当たり参照・引用した主なウェブサイト及び書籍	B-14～17
I. 事業の位置付け・必要性について	
1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性	I-1～8
1. 1 NEDOが関与することの意義	
1. 2 実施の効果（費用対効果）	
2. 事業の背景・目的・位置付け	I-9～14
2. 1 背景	
2. 2 事業の目的	
2. 3 事業の位置付け	
II. 研究開発マネジメントについて	
1. 事業の目標	II-1
2. 事業の計画内容	II-2～15
2. 1 研究開発の内容	
2. 2 研究開発の実施体制	
2. 3 研究開発の運営管理	
2. 4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性	
3. 情勢変化への対応	II-16～18
4. 中間評価結果への対応	II-19～23
5. 評価に関する事項	II-24～29
III. 研究開発の成果について	
1. 事業全体の成果	III. 1-1～9
1. 1 成果物	
1. 2 成果の普及・啓蒙活動	
2. 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」の成果	
2. 1 概要	III. 2. 1-1～3
2. 1. 1 各有害性評価手法開発の概要	
2. 1. 2 最終目標に対する達成度	
2. 2 発がん性予測試験法の開発	III. 2. 2-1～63
2. 2. 1 背景と目標	
2. 2. 2 最終目標に対する達成度	
2. 2. 3 進捗状況と成果	

2. 3	催奇形性予測試験法の開発	Ⅲ. 2. 3-1～82
2. 3. 1	背景と目標	
2. 3. 2	最終目標に対する達成度	
2. 3. 3	進捗状況と成果	
2. 4	免疫毒性予測試験法の開発	Ⅲ. 2. 4-1～67
2. 4. 1	背景と目標	
2. 4. 2	最終目標に対する達成度	
2. 4. 3	進捗状況と成果	
2. 5	基盤技術の開発	Ⅲ. 2. 5-1～28
2. 5. 1	背景と目標	
2. 5. 2	最終目標に対する達成度	
2. 5. 3	進捗状況と成果	
3.	「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」の成果	Ⅲ. 3-1～182
3. 1	背景と目標	
3. 2	最終目標に対する達成度	
3. 3	進捗状況と成果	

IV. 実用化の見通しについて

1.	概要	IV-1
2.	詳細内容	IV-2～23
2. 1	培養細胞を用いた有害性評価手法の開発	
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	

添付資料

- ①分野別推進戦略
 - 1) 平成18年度 分野別推進戦略（環境分野、エネルギー分野）
 - 2) 平成18年度 分野別推進戦略、別紙（環境分野、エネルギー分野）
- ②イノベーションプログラム
 - 1) 平成21年度 エネルギー、環境安心イノベーションプログラム
- ③プロジェクト基本計画
 - 1) 平成18年 プロジェクト開始
 - 2) 平成19年 プロジェクトB-2開始
 - 3) 平成22年 最新版
- ④技術戦略マップ
 - 1) 平成22年度 技術戦略マップ（化学物質総合評価管理分野）
- ⑤事前評価関連資料

- 1) 平成17年 事前評価書
 - 2) 平成18年 NEDO POST 3
 - 3) 平成18年 パブリックコメント募集結果
- ⑥特許、論文、外部発表等のリスト
- 1) -1 査読付き論文
 - 1) -2 総説、解説、著書
 - 2) 特許
 - 3) 報道、受賞
 - 4) 講演、学会発表
- ⑦B-1 プロジェクト報告書
- 1) 平成18年度～19年度 成果報告書(要約版)

概 要

		作成日	平成23年8月17日
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		
プロジェクト名	高機能簡易型有害性評価手法の 開発	プロジェクト番号	P06040
担当推進部/担当者	<担当推進部> 環境部 (平成22年7月～平成23年8月現在) 環境技術開発部 (平成20年7月～平成22年7月) バイテクノロジー・医療技術開発部 (平成18年6月～平成20年7月)		
	<担当者> 西川 賢之 (平成22年4月～平成23年8月現在) 鈴木 保之 (平成20年4月～平成22年9月) 宮崎 秀 (平成20年4月～平成22年3月) 山崎 晶次郎 (平成19年4月～平成20年6月) 新木 清 (平成18年9月～平成19年3月) 小畑 政道 (平成18年6月～平成18年8月)		
0. 事業の概要	本事業は、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に貢献すべく、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の最先端の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、以下の2項目について、研究開発を実施する。 A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」 B-1 (基本計画変更前)「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」 B-2 (基本計画変更後)「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」		
I. 事業の位置付け・必要性について	化学物質のリスクを評価管理する技術体系は、化学物質のリスクに係る国民の理解増進の基礎、事業者が自ら化学物質管理を行うための基盤及び国が規制等の施策を講じる際の手段となることから、その整備は、国として実施することが必要である。 加えて、欧州では新たな化学物質規制 (REACH) が2007年6月に施行され、その制度の下では、発がん性、変異原性、生殖毒性を有する物質は、リスクがないことを証明しないと使用許可とならないところ、我が国においても同様の厳しい化学物質管理を求める声が高まっている。同じく欧州での化粧品に関する規制の動き (皮膚アレルギー等安全性試験の非動物実験化) 等、有害性評価に代替法を求める流れもある。 このような中で、従来手法に比べ、簡易かつ高精度で化学物質の有害性を評価する手法を確立し、早急に安全性を証明していくことが急務となっている。		

開発予算 (会計・勘定別に 事業費の実績額を 記載) (単位:百万円)	会計・勘定	H18fy	H19fy	H20fy	H21fy	H22fy
	一般会計	—	—	—	—	—
	特別会計 (需給)	479	388	360	315	249
	総予算額	479	388	360	315	249
開発体制	経産省担当原課	製造産業局化学物質管理課				
	プロジェクトリーダー	A 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 B-1 (基本計画変更前) 公立大学法人名古屋市立大学大学院教授 白井智之 B-2 (基本計画変更後) 公立大学法人福島県立医科大学教授 渡辺慎哉				
	委託先	A 財団法人食品薬品安全センター、住友化学株式会社、国立大学法人東北大学病院、独立行政法人産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社 共同実施先：国立大学法人東京大学、国立大学法人鳥取大学 再委託先：学校法人鎌倉女子大学 B-1 (基本計画変更前) 財団法人化学物質評価研究機構 共同実施先：公立大学法人名古屋市大学、学校法人埼玉医科大学 B-2 (基本計画変更後) 株式会社メディクローム 共同実施先：公立大学法人福島県立医科大学、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所				

<p>情勢変化への対応</p>	<p>1. 平成19年8月31日までは、研究開発項目B-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」を実施していたが、平成17年度に終了した先行プロジェクト「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」（P01004）の事後評価（平成19年3月28日研究評価委員会）を踏まえて、これを中止し、研究開発項目B-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」に変更し、公募により新たな委託先を平成19年12月28日に採択した（平成20年1月25日契約）。</p> <p>2-1. 研究開発項目Aの共同実施先変更 平成19年度下期から、より効率的な発光細胞製作のため、共同実施先として鳥取大学を追加し、押村研究室が有するHAC技術を導入した。また、平成20年度から、研究開発課題の集中化のため、共同実施先である東京大学生産技術研究所の研究開発課題「組織複合培養法による毒性評価法の開発」を中止した。</p> <p>2-2. 研究開発項目B-2の開発項目追加 平成22年度に重点的に、先に取得した遺伝子発現変動データの高度活用のため、肝臓等で毒性が発現する際に特徴的に影響を受ける遺伝子の解析に取り組んだ。</p> <p>3. 平成20年度には、研究開発項目Aに3件80百万円、研究開発項目B-2に42百万円、計122百万円の加速資金を投入した。 平成21年度には、研究開発項目Aに3件68百万円、研究開発項目B-2に11百万円、計79百万円の加速資金を投入した。 平成22年度には、研究開発項目Aに3件35百万円の加速資金を投入した。</p>	
<p>中間評価結果への対応</p>	<p>総論の指摘事項に対しては、実施方針または実施計画書に反映させることにより、指摘事項への対応を図った。特に、試験法バリデーションの実施、知的財産権の確保、成果の公表と普及、プロジェクト間の研究協力等に注力した。</p> <p>研究開発項目Aについては、評価用細胞の性状解析と品質管理、代謝影響と視覚評価のための全胚培養法の確立、標準プロトコールの共有化、免疫毒性評価システムの構築等に注力した。</p> <p>研究開発項目B-2については、被検化学物質の増大、知的財産権確保、標準プロトコールの公表と標準化、得られたデータの信頼性向上、毒性バイオマーカーの抽出等に注力した。</p>	
<p>評価に関する事項</p>	<p>事前評価</p>	<p>平成17年10月に内部評価を実施 平成18年1月にNEDOPOST3実施 平成18年2月にパブリックコメントに対する方針決定 担当部：バイオテクノロジー・医療技術開発部</p>

		<p>中間評価</p>	<p>平成20年11月5日に中間評価分科会を開催 平成21年2月18日に研究評価委員会を開催 担当部：研究評価広報部 平成21年3月19日に中間評価結果の反映を決定 担当部：企画調整部、研究評価広報部、環境技術開発部</p>
		<p>事後評価</p>	<p>平成23年8月17日に事後評価分科会を開催 担当部：評価部</p>
<p>Ⅲ. 研究開発成果について</p>	<p>研究開発項目A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」 (a)発がん性予測試験法の開発（食品薬品安全センター、東京大理学系研究科、産業技術総合研究所） Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法について、1) 98 物質を調べ in vivo のデータと比較した、2) 6 ウェル法と 96 ウェル法の同等性を確認した、3) 国内・国際バリデーションを実施した。さらに、Bhas 42 細胞の性状解析を行った。その結果、OECD-TG 収載のためのデータが十分に揃ったことから、OECD に SPSF (Standard Project Submission Form) を平成22年1月末に提出し、3月のOECD-WNT会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。 また Bhas 42 細胞形質転換試験のハイスループット化を目指し、1) 培養細胞を用いた毒性試験の基本的な一連の作業（細胞の播種、被験物質の処理、培地交換など）を行う自動化システムを開発した、2) 過酸化水素と生存細胞に反応する色素を組み合わせることで、形質転換をマイクロプレートリーダーで客観的にかつ迅速に定量する方法を開発した（日米：特許審査中、欧：特許登録手続中）。 一方、Bhas 42 細胞形質転換において、発がんプロモーター処理により発現が増加する遺伝子をスクリーニングし、マトリックスメタロプロテインナーゼ 10 遺伝子を選択した。次にこの遺伝子を Bhas 42 細胞に導入し、よく発光するクローンを 6 株樹立した。さらにその中から、発がんプロモーターTPA 処理により、形質転換巣が明瞭に誘発されるクローンを 1 株選んだ。 (b) 催奇形性予測試験法の開発（住友化学、鎌倉女子大学、鳥取大学） ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法では、マウス ES 細胞から心筋、神経および筋骨格系への分化誘導法を確立した。催奇形性（発生毒性）に関与するマーカー遺伝子を複数同定した（心筋：13 種、神経：22 種）。 次にこれらのマーカー遺伝子の発現を、レポーター遺伝子を利用して簡便に評価可能な組換え ES 細胞（心筋分化過程：Hand1-、Cmya1-ES 細胞など 3 種、神経分化過程：Reln-ES 細胞）を作製した。作製した細胞を利用した簡便な発生毒性予測試験方法（Hand1-</p>		

、Cmya1-および Reln-EST 法) を提案した。Hand1-および Cmya1-EST 法の予測性を、標準化合物を用いて従来の EST 法と比較した結果、同等以上の予測性を有することが明らかとなり、従来の EST 法よりも短期間(約 1 週間)に多数の化合物を評価可能な方法が確立できた。さらに施設間での再現性の確認や、規格化のための細胞の品質検査も実施した。また、ヒト ES 細胞を用いた検討を行い、マウス ES 細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにした。

一方、ラット全胚培養法にラット代謝酵素(S-9 mix)を組み合わせ、代謝による被験物質の変化を考慮した催奇形性予測試験法を開発した。24穴プレートと酸素透過フィルムを用いた培養装置を開発し、培養用の血清を採取する動物数の削減とハイスループット化を達成した。

ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法 (EST) とラットの初期胚を用いた全胚培養法 (WEC) を組み合わせることにより、代謝機能を考慮した、より *in vivo* に近い毒性予測が可能であることがわかった。

(c)免疫毒性予測試験法の開発 (東北大学、東洋紡績)

[上皮細胞 (HaCat)]

同定したマーカー遺伝子 3 種のうち、2 種(hemeoxygenase-1、IL-1 β)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH)遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 2 色安定発光細胞株 (HR38H6、KIL01) を樹立し、その内 HR38H6 を用いて酸化ストレス、ER ストレス、重金属刺激など幅広いストレスを検出できるハイスループット評価系を構築した。

[マクロファージ系細胞 (U937)]

同定したマーカー遺伝子 17 種のうち、3 種(IL-8、IL-1 β 、hemeoxygenase-1)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 2 色安定発光細胞株 (UR2H4114、UIL01、TGC17EA01)、また、2 種について、それらの遺伝子と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 3 色安定発光発行細胞株 (6C12) を樹立した。その内、TGC17EA01 に関しては、これを用いた皮膚感作性試験代替法を開発した。また、6C12 を用いては、単球、樹状細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。

[T 細胞 (Jurkat)]

同定したマーカー遺伝子 10 種のうち、3 種(IL-2、IL-4、IFN- γ)について、そのうち 2 つの遺伝子の組み合わせと内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 3 色安定発光細胞株(10C6、2H4)を樹立した。その内、2H4 を用いては、T 細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。また、6C12

と 2H4 を組みあわせることにより、多様な免疫毒性を評価できるシステムを構築した。

[標準的な試験プロトコル]

TGC17EA01 を用いた皮膚感作性試験代替法および 6C12 と 2H4 を用いた免疫毒性評価系に関しては、標準的な試験プロトコルを作製して複数施設での試験法の安定性を検討した。

(d) 基盤技術 (産業技術総合研究所、東洋紡績、鳥取大学)

① 多色発光システムの高精度化と測定法標準化

発光プローブの応答性を向上させた細胞内半減期が短い多色発光ルシフェラーゼの創製、及び細胞内安定性や耐熱性が向上した赤色発光プローブの改良に成功した。

一方、多色発光システムの高精度化を目指し、標準発光物質として値付けされたルシフェラーゼタンパク質の作製法及び長期安定保存法の開発、さらには外部機関等への供給体制を構築した。さらには値付けられたルシフェラーゼタンパク質を標準光源の代替とした発光測定装置ルミノメーターの絶対感度校正法を確立した。

② ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築

毒性評価発光細胞の安定化及び効率的な作成法を確立するため、ヒト人工染色体 (HAC) 技術を活用、HAC 発光ベクターを導入した免疫毒性評価用細胞を樹立した。樹立した評価細胞は化学物質を感度よく評価でき、併せて樹立した細胞間のクローナルバリエーションが少ないことを明らかにした。

また、多色発光プローブと HAC ベクターをマルチインテグレーションシステムで融合させた多色発光遺伝子導入システムの開発に成功、複数の遺伝子を効率よく、染色体の特定部位に導入することが可能になった。

研究開発項目 B-1 (基本計画変更前) 「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測手法の開発」

平成 19 年度 8 月末で基本計画を見直し中止した研究開発項目である。本研究開発成果については、本事業原簿巻末の添付資料⑦-1) 「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」平成 18 年度～平成 19 年度報告書 (要約) を参照されたい。

研究開発項目 B-2 (基本計画変更後) 「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対象化学物質 (40 種類) 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 (ラット一匹あたり 24～26 種類程度) の採取、これらからの遺伝子発現解析用 RNA サンプルの取得、遺伝子発現プロファイル取得と解析を実施した。本事業終了時まで、3,611 種類の臓器・組織を採取した後すべて RNA サンプルとして保存した。さらに、その中から厳選した

	<p>1, 028サンプルについて遺伝子発現プロファイルを取得した。次に、取得した遺伝子発現プロファイルから、それぞれの化学物質を28日間反復投与したことにより各種臓器において発現変動した遺伝子群を抽出した。さらに、それらの遺伝子群と従来の28日間反復投与毒性試験の結果と比較し、複数の化学物質の機能や構造上の共通点に相関する、あるいは、各種の毒性学的所見に関連する遺伝子発現データセットの抽出を行った。その結果、脾臓・腎臓・肝臓・小脳・皮下脂肪などについて合計78セットの遺伝子発現データセットを特定した。</p> <p>本事業で取得した生データは、国立遺伝学研究所が運営する遺伝子発現データベースであるCIBEX (Center for Information Biology gene Expression database) に全て登録して公開した。</p> <table border="1" data-bbox="486 683 1437 833"> <tr> <td data-bbox="486 683 662 734">投稿論文</td> <td data-bbox="662 683 1437 734">「査読付き」51件、「総説・解説・著書」26件</td> </tr> <tr> <td data-bbox="486 734 662 786">特許</td> <td data-bbox="662 734 1437 786">「出願済」21件、「登録」0件、「実施」0件</td> </tr> <tr> <td data-bbox="486 786 662 833">外部発表</td> <td data-bbox="662 786 1437 833">「報道」7件、「講演・学会発表」165件</td> </tr> </table>	投稿論文	「査読付き」51件、「総説・解説・著書」26件	特許	「出願済」21件、「登録」0件、「実施」0件	外部発表	「報道」7件、「講演・学会発表」165件
投稿論文	「査読付き」51件、「総説・解説・著書」26件						
特許	「出願済」21件、「登録」0件、「実施」0件						
外部発表	「報道」7件、「講演・学会発表」165件						
IV. 実用化の見通しについて	<p>研究開発項目A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」</p> <p>「環境安心イノベーションプログラム」の中で、「2014年度を目途に有害性評価手法等を経済協力開発機構(OECD)にテストガイドラインとして提案することを検討し、国際標準化を推進する。」と規定されている。このため、発がん性予測のためのBhas 42細胞による形質転換試験については、プレバリデーションを平成18年度から実施しており(6ウェル法)、平成21年度には本格的なバリデーションを実施して(96ウェル法)OECDテストガイドライン提案に値する評価結果を得た上で、Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の提案書を平成22年1月末にOECDに提出し、3月のOECD-WNT会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。</p> <p>一方、発光細胞による催奇形性・免疫毒性予測法についても、マーカー遺伝子の選択、評価用発光細胞の樹立、標準的な試験プロトコール作成を終了し、施設間差確認試験を実施した。平成23年以降は、免疫毒性・催奇形性については、OECDテストガイドライン提案に向けてバリデーションを開始する予定である。</p> <p>この他、得られた成果を基盤にレポーターアッセイ系の応用、その試薬の市販化など、数多くの実用化に向けた計画も進行しつつある。</p>						

	<p>研究開発項目B-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」</p> <p>開発された遺伝子発現データセットにより、既存化学物質の28日間反復投与試験に係わる既存の膨大な「言語による記述的要素」のやや多い毒性学的情報に、「計算可能な数値的要素」からなるトキシコゲノミクスの情報を関連づけられることが可能となり、新たな視点からの有害性評価手法開発のための知的基盤を提供し得るものと考えている。そのため、化学物質の有害性評価に特に有用であると考えられる遺伝子セットについて特許出願により知的財産権の確保を行った後、順次、本事業で得られたすべての遺伝子発現データを国立遺伝学研究所のデータベースで公開することとしている。さらに、本事業で取得したデータを広く社会で使えるようなシステムとして編集・編纂した本事業の成果データベース「遺伝子発現情報統合データベース（仮称）」を別途構築し、「既存化学物質毒性評価データベース」（国立医薬品食品衛生研究所）、「CIBEX（Center for Information Biology gene EXpression database）」（国立遺伝学研究所）、および「H-Inv DB（Annotated Human Gene Database）」（産業技術総合研究所）とインターネット上の直接リンクの構築を依頼する予定である。これにより、膨大な従来の毒性学的知見と本事業で取得・開発するトキシコゲノミクスの知見の融合と相互の円滑な連携的發展が図れることとなる。</p> <p>さらに、本事業で同定した各種臓器における毒性バイオマーカーまたは有害性評価用遺伝子セット（生体応答遺伝子セット）に関しては、キット化または受託解析ビジネスへの展開が期待できる。</p>	
V. 基本計画に関する事項	作成時期	平成18年3月制定。
	変更履歴	平成19年10月改訂、研究開発項目B-2の開始。 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改訂。 平成22年3月、「化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第2期）」基本計画に統合。

プロジェクト用語集

この用語集は、NEDO環境部が多くのウェブサイトや書籍（そのうちの主要なものを用語集の末尾に掲げる。）を参照・引用して作成したものである。

プロジェクト用語集「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

用語	説明
3 R、三つのR	1954年に開始された動物福祉のための大学連合(University Federation of Animal Welfare: UFAW)の活動に基づき、1959年にラッセル氏とバーチ氏によって提唱された「人道的実験の3原則」：Reduction of numbers（実験動物の削減）、Refinement of methods（実験動物の苦痛の軽減）、Replacement by alternatives（動物を使わない実験への代替）のこと。 第3回生命科学における代替法と動物使用に関する世界会議（1999年8月、イタリア・ボローニャで開催）において「ボローニャ宣言」として再確認された。
3色発光細胞（毒性評価用の）	コントロールプロモーターと化学物質毒性により発現量が増減する別の2つの遺伝子に対して、その発現量に対応して発光するように発光タンパク質の遺伝子（レポーター遺伝子）を組み込むことを可能にした細胞。3色発光を同時に測定することで、3つの遺伝子発現量の相対値を同時に比較測定できるため、コントロールプロモーターの発現量を基準にして、毒性感受性の2つの遺伝子の発現量を相対比較により定量化できる。細胞間での発現のばらつき等に対して精度が格段に高くでき、さらに、同時測定によってハイスループット（迅速）に結果が得られる。
6ウェル法、96ウェル法	プレートに細胞を入れるウェル（well=穴）がつけられ、そこに細胞、培養液と共に、試験する化学物質を入れ、細胞を培養をしながら細胞の形態変化を観察する方法において、その1プレートのウェル数を指し、数が多いほど、同時に多数の検体を処理できることを意味する。
BAC	Bacterial Artificial Chromosome、細菌人工染色体。
BALB/c 3T3細胞	マウスの胎児の繊維芽細胞（皮膚にある体細胞の一種）から樹立された細胞株。BALB：実験用マウスでBagg氏の育てたAlbinoの意味からの命名。c：アルビノ遺伝子。3T3：マウスの胚から30万個の細胞を3日毎に3分の1の細胞数で継代し樹立されたことを示す。
Bhas 42細胞	v-H-ras-transfected BALB/c 3T3 cells。BALB/c 3T3細胞にras遺伝子を導入した細胞株。1998年に国立医薬品食品衛生研究所の佐々木らによって樹立された。活性型ras遺伝子を持つことから、発がんの2段階説にいうイニシエートとされた細胞と見なされている。 ras遺伝子：rat sarcoma(肉腫)の略。最初に発見されたがん遺伝子。正常細胞中にも発見され、活性化すると、がんを発生させる。
CHO細胞	Chinese Hamster Ovary cell。チャイニーズハムスターの卵巣から樹立された繊維芽細胞株。大腸菌同様、遺伝子組換えによる有用物質の生産によく用いられる。

用語	説明
ES細胞	Embryonic Stem cells、胚性幹細胞。生体外にて、理論上すべての組織に分化する分化多能性を保ちつつ、ほぼ無限に増殖させることができる。動物由来のES細胞は、体外培養後、胚に戻し、発生させることで、個体中の様々な組織に分化することができる。また、その高い増殖能から遺伝子に様々な操作を加えることが可能である。ES細胞を用いた試験（EST）は、MM、WECと並ぶ有力なin vitro発生毒性試験の一つ。
G3PDH、GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素（解糖系の主要酵素）、又はこれを産生する遺伝子。この遺伝子は、代表的なハウスキーピング遺伝子であり、このため、遺伝子操作やリアルタイムPCRなどによる遺伝子発現解析の際にインターナルコントロール（=内部標準）遺伝子として利用される。
GHS	<p>The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals、化学品の分類及び表示に関する世界調和システム。世界的に統一されたルールに従って、天然・人工の化学品を危険有害性の種類と程度によって分類し、その情報を分かりやすく伝えるため、絵表示などを用いてラベル表示したり安全データシートを提供したりするシステム。2003年7月に国連勧告として発出され、2005年7月には改訂版が出された（第3.10章「吸引力呼吸器有害性」の追加など）。</p> <p>http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev01/01files_e.html http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/GHS/texts.htm</p> <p>国連は、GHSを世界的に実施する時期について、2008年を努力目標として掲げており、また、APEC（アジア太平洋経済協力）は、導入目標を2006年としている。我が国では、厚生労働省、経済産業省、環境省等の関係省庁で法制度や情報基盤の整備等の対応を進めている。</p> <p>http://secure.exbiz.jp/GHS/</p> <p>GHSの危険有害性は、物理学的危険性、健康に対する有害性、環境に対する有害性の三つに大別されている。うち、健康に対する有害性の区分は、以下のとおり。</p> <p>(1)急性毒性、(2)皮膚腐食性／皮膚刺激性、(3)眼に対する重篤な損傷性／眼刺激性、(4)呼吸器感作性又は皮膚感作性、(5)生殖細胞変異原性、(6)発がん性、(7)生殖毒性（a.性機能及び生殖能に対する悪影響、b.子の発生に対する悪影響）、(8)特定標的臓器毒性／全身毒性（単回暴露）、(9)特定標的臓器毒性／全身毒性（反復暴露）、(10)吸引力呼吸器有害性</p>
HAC	Human Artificial Chromosome、ヒト人工染色体。 →「ヒト人工染色体ベクター」の項
HaCat	NHEK（正常ヒト表皮角化細胞）から樹立された細胞株。
HO-1とHMOX-1	ヘムオキシゲナーゼ（heme oxygenase : HO）は、ヘム（heme）のポルフィリン環を開裂し酸素分子を添加して、ビリベルジン（biliverdin）と還元鉄と一酸化炭素に分解する酵素。HOには、HO-1、HO-2、HO-3の3種類が知られている。HO-2が恒常的に発現するのに対し、HO-1は、環境汚染物質などによるストレス刺激によって（遺伝子HMOX1が活性化して）発現誘導されるストレス誘導タンパク質である。酵素HO-1（遺伝子HMOX1）は、生体内に生じた活性酸素種（ROS）の消去により、種々の疾患を予防している。

用語	説明
Ionomycin	Streptomyces conglobatusという細菌が産生する物質。イオノフォア（Ionophore：生体内でイオンを水相から油相に取り込むのを促進する物質）の一つで、Ca ²⁺ を強制的に細胞内に流入させるために実験で頻用される。特に、細胞内のサイトカイン（インターフェロン、インターロイキンなど）やプロテインキナーゼCの産生を刺激するために、PMAと組み合わせて用いられる。CAS登録番号56092-81-0、56092-82-1（カルシウム塩）。
Jurkat	ヒト急性T細胞性白血病細胞から樹立された細胞株。
LCA	lithocholic acid、リトコール酸。肝臓で作られるコール酸とケノデオキシコール酸を一次胆汁酸と呼ぶのに対し、腸内細菌により二次的に作られるデオキシコール酸とリトコール酸は二次胆汁酸と呼ぶ。リトコール酸は、DNA障害作用があり、発がんプロモーターとして知られる。CAS登録番号434-13-9。
MM	Micromass culture tests、小塊培養試験。EST、WECと並ぶ有力なin vitro発生毒性試験の一つ。胎児から未分化細胞（肢芽Limb Budなど）を取り出し、その増殖能を見る試験方法。肢芽培養試験が代表的。
MoDC	Monocyte-derived Dendritic Cell、単球由来樹状細胞。
NHEK	Normal Human Epidermal Keratinocytes、（初代培養）正常ヒト表皮角化細胞。
OECDテストガイドライン	当初、OECD加盟国が独自に開発していた化学物質の安全性等に関する試験法について、試験結果を各国が共通に使用できるようにすることを目的に、OECDにおいて統一的な試験方法として定めたもの。1981年のOECD理事会の「化学品評価におけるデータ相互受入れ（MDA）に関する決定」は、OECDテストガイドライン及びGLP（Good Laboratory Practice：優良試験所基準）に基づくデータであれば、あるOECD加盟国において作成された試験データでも、ほかのOECD加盟国に受入れを求めた。OECDテストガイドラインは、信頼できる試験方法を保証するだけでなく、実験動物の数を減らし、苦痛を最小限に抑えることも目指している。また、特定のテストガイドラインの必要性や適用方法、関連する科学分野の現状などを解説したガイダンス文書も作成されている。
OKA	オカダ酸、9,10-デエピチオ-9,10-ジデヒドロアカンチフォリシン、9,10-Deepithio-9,10-didehydroacanthifolicin。渦鞭毛藻により産生される毒素で貝毒の一種。クロイソカイメンから初めて単離された。オカダ酸の名称は、クロイソカイメンの学名Halichondria okadaiにちなんだもの。プロテインキナーゼCの活性化を阻害することで、強力な発がんプロモーターとして働く。CAS登録番号78111-17-8。
ORF	Open Reading Frame、オープンリーディングフレーム。DNA又はRNA上に存在するタンパク質に翻訳され得る塩基配列のこと。タンパク質は開始コドン（開始コード配列）で始まり、終始コドン（終了コード配列）の前で終わる部分でコードされているが、どのようなタンパク質か分からない場合にORFと呼び、読み枠の可能性を示す。ORFの存在、特に長いものの存在は、その配列の周辺に遺伝子が存在していることの良い指標となっている。

用語	説明
PC12	ラット副腎髄質褐色細胞腫から樹立された細胞株。1976年にGreenらによって樹立された。神経成長因子NGFに応答して神経細胞様に分化する機能を保持している。
PCR リアルタイムPCR	<p>Polymerase chain reaction。ポリメラーゼ連鎖反応は、DNAを増幅するための原理又はそれを用いた手法で、手法を指す場合はPCR法と呼ばれることのほうが多い。英語をそのまま片仮名読みにしたポリメラーゼチェーンリアクションとも呼ばれる。次の特徴がある。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ヒトのゲノム（30億塩基対）のような非常に複雑な、しかも極めて微量なDNAの溶液の中から、自分の望んだ特定のDNA断片（数百から数千塩基対）だけを選択的に増幅させることができる。 ・増幅に要する時間が2時間程度と短い。 ・プロセスが単純で、全自動の卓上用装置で増幅できることである。 <p>PCR法そのものや派生した様々な技術は、分子生物学の研究から、医療、犯罪捜査、生物の分類といったDNAを扱う作業全般で極めて重要な役割を担っている。</p> <p>リアルタイムPCR、Real-time PCR、RT-PCR。定量PCR（Q-PCR）の一つ。ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅を経時的（リアルタイム）に測定することで、増幅率に基づいて鋳型となるDNAの定量を行う。</p>
PMA、TPA	<p>phorbol 12-myristate 13-acetate、ホルボール-12-ミリステート-13-アセテート、12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate、12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート。トウダイグサ科のハズ（巴豆）の種子に含まれるテルペノイドで、強力な発がんプロモーターとして知られる。CAS登録番号16561-29-8。天然のリガンドであるジアシルグリセロール（DAG）のミミックとして作用するため、細胞内のサイトカイン（インターフェロン、インターロイキンなど）やプロテインキナーゼC（PKC）の産生を刺激するために、Ionomycinと組み合わせて実験で用いられる。</p>
ras遺伝子を導入	<p>発がんには2段階の作用が必要とされ、その1段階（イニシエーション段階）をras遺伝子を導入することで既に引き起こした状態にしてあることを指す。Bhas42細胞はこのras遺伝子導入をしているため、発がんのもう1つの段階（プロモーション段階）で作用する化学物質に対しても発がん性を評価でき、化学物質の発がん性を調べるのに最適である。</p>

用語	説明
REACH	<p>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals、化学物質の登録・評価・認可及び制限に関する規則、リーチ規制。EUが2006年12月18日に採択し、2007年6月1日から段階的に施行している新しい化学物質管理の法制度。REACHでは、既存物質か新規物質かを問わず、1事業者当たりの年間製造・輸入量が1トンを超えるすべての化学物質について登録を義務付け、年間10トンを超える化学物質については、化学物質安全性評価書（CSR：Chemical Safety Report）の提出を義務付け。登録された化学物質の情報は、欧州化学物質庁（ECHA）及び加盟国管轄機関が評価し、認可対象物質の候補となる場合や制限対象となる場合もある。登録情報は、インターネットで無料公開する。既存化学物質の登録については、2008年6月1日に受け付けを開始し、事業者当たりの製造・輸入量の程度や予備登録の有無に応じて登録期限を設定しているが、2018年5月31日までにすべて完了する予定。EUが1967年に導入した既存の化学物質管理制度の下では、1981年9月18日を基点に「新規化学物質」と「既存化学物質」を区分し、新規化学物質については、EU指令67/548/EECに基づき、製造・輸入業者が行った安全性評価をもとに政府が審査を行ってすべての物質の安全性を確認する一方、約3万種類が市場に流通しているとされる既存化学物質については、EU規則793/93に基づき、政府が安全性評価を行い規制等の措置をとっていたが、政府側が規制措置の妥当性を業者に対し証明する必要があったことや、他の加盟国政府との調整に時間を要することなどから、ごくわずかな数の物質についてしか安全性評価が実施されていなかった。これに対し、REACHでは、既存化学物質と新規化学物質の扱いをほぼ同等に変更し、これまで政府が実施していたリスク評価を事業者の義務に変更し、サプライチェーン（流通経路）を通じた化学物質の安全性や取扱いに関する情報の共有を双方向で強化し、また、成型品に含まれる化学物質の有無や用途についても、情報の把握を要求している。</p>
S-9mix	<p>ラット肝ホモジネート上清分画（S-9）に補酵素などを加えたもの。被検物質と共にS-9mixを組織や細胞に与えて、例えば、遺伝子に異常を起こすかどうかを調べる。代表的な変異原性試験法であるエームスAmes試験法（細菌を用いる復帰突然変異試験法）では、サルモネラ菌に被検物質とS-9ミックスを投与することによって、被検物質がS-9ミックスの酵素で代謝され活性体になり、復帰突然変異原性を容易に検出できるようになった。</p>
T細胞	<p>T-cell。リンパ球の一種。樹状細胞から刺激を受けてTh1, Th2, Th17, Tregなどの異なった機能を担う細胞に分化し、種々の免疫疾患のeffector細胞又は調節性細胞となる。</p>
THP-1	<p>ヒト急性骨髄性白血病由来の細胞株。</p>
U937	<p>ヒトびまん性組織球性リンパ腫由来の細胞株。</p>

用語	説明
WEC	Whole embryo culture tests、全胚培養試験、全胎児培養試験。EST、MMと並ぶ有力なin vitro発生毒性試験の一つ。ラット、マウス、ウサギ等のほ乳動物の母体から胎盤が付いている状態の器官形成期の胎児（全胚）を取り出して培養装置に入れて、その成長と分化の過程を確認する試験方法である。培養液としては、被験物質を暴露した動物の血清を用いるか、又は被験物質を添加したものをを用いる。今日広く使用されている培養装置は、恒温器の中に回転培養器を設置したもので、D. A. T. Newらによって1970年代に開発されたものを基本としている。胚の時期に応じて酸素濃度や流量を調整し、回転培養器を20rpmで常に回転させてガス交換を促し、培養期間中を通じて37℃に保つ。全胚培養を開始できる時期は、器官形成初期（中胚葉形成の開始時期）から器官形成後期（四肢の指の形成時期）の間に限られ、ラット9日胚で4～5日間の培養が可能である。
イニシエーション段階	発がんには2段階の作用が必要とされ、その第1段階をイニシエーション段階といい、この段階は、化学物質の作用等により細胞の遺伝子を変化させること（変異原性）により発がん性に関与する段階を指す。
ギムザ染色	ギムザ液（アズールⅡとエオシンの混合液）による細胞染色法の一つ。細胞核のクロマチンが固有の赤紫色に染まり、細胞質の各種顆粒が好酸性と好塩基性に染め分けられる。マラリア研究の先駆である医学者グスタフ・フォン・ギムザの名にちなむ。ドイツ・ハンブルグの熱帯病研究所にて、マラリア原虫の染色法として開発された。
クリスタルバイオレット	核染色を行う試薬の一つ。また、グラム染色に不可欠な色素。
コントロールプロモーター	化学物質毒性と関係なく通常に細胞で発現する遺伝子が発現するときに発光するように細胞に組み込んだ発光タンパク質の遺伝子のこと。
サリドマイド禍	サリドマイドthalidomideは、1957年に開発された睡眠・鎮静剤。ラットの催奇形性試験で陰性であったが、実際にはヒトに対して重大な催奇形性があり、サルに用いると奇形が発生した。過ちを繰り返さないために発せられた世界医師会の「ヘルシンキ宣言」（1964年）では、「人間を対象にした医学研究は十分な動物実験に基づいていなければならない」とうたっており、それが現在に至るまでの医学研究における基本的な考え方となっている。
シクロホスファミド	cyclophosphamide、CPA、シクロフォスファミド。水やエタノールに可溶のアルキル化剤で、肝臓で代謝されて活性をみせ、DNA合成を阻害する。史上初の抗がん剤ナイトロジェンマスタードの誘導体としてドイツで開発され、同じく日本で開発されたナイトロジェンマスタード誘導体・ナイトロミンに代わって、抗がん剤として広く用いられた。また、抗体産生中のβリンパ球の増殖を妨げるので、免疫抑制作用があり、臓器移植時の拒絶反応を抑える免疫抑制剤として使われる。CAS登録番号50-18-0。
バイオインフォマティクス	Bioinformatics、生物情報学：応用数学、情報学、統計学、計算機科学などの技術応用によって生物学の問題を解こうとする学問である。主な研究対象分野は、配列アラインメント、遺伝子発見、ゲノムアセンブリ、タンパク質構造アラインメント、タンパク質構造予測、遺伝子発現とタンパク質間相互作用の予測、進化のモデリングなどである。

用語	説明
ハイスルー プット	一定時間に大量のサンプルや情報を処理すること。バイオテクノロジーの分野では特に、自動機械（ロボット）をもちいた高速、多検体処理をいう。
ハウスキーピ ング遺伝子	多くの細胞に共通して恒常的に一定量発現する、細胞の維持・増殖に不可欠な遺伝子。このため、遺伝子操作やリアルタイムPCRなどによる遺伝子発現解析の際にインターナルコントロール（＝内部標準）遺伝子として利用される。
ヒト人工染色 体（HAC： Human Artificial Chromosome） ベクター	ヒト染色体、例えば、ヒト21番染色体を用い、その染色体に乗っている遺伝子をすべて空にして、荷物を積んでいないトラックのようなものに、細胞に導入する必要のある遺伝子のみを積んでベクターとして用いるもの。他のベクターとして通常使われているプラスミドやウイルスベクターでは遺伝子が細胞のどの部分に入るかを制御できず、性能が安定しないなどの問題があるが、HACベクターではそうした問題がなく、精度、効率において優れている。さらに積み込むべき遺伝子の大きさ、数にも制限がなく、また、いかなる哺乳細胞にも組み込むことができるため、ベクターとしては最も優れた機能を持っているといえる。
プラスミド	Plasmid。大腸菌のような細菌の中で染色体とは別に存在する環状二本鎖DNAで、細胞分裂や染色体DNAの合成とは無関係に増殖できる。組換えDNA実験において、プラスミドにほかのDNA断片を組み込み、プラスミドの自立的増殖能を利用してベクターとして用いられる。
プローブ	トレーサーと同義。蛍光物質、発光物質、フォスフォターゼのような酵素などで検出器で測定できる物質。
プロモーション 段階	発がんの2段階の作用の第2段階。遺伝子への影響（変異原性）がない化学物質でも、発がんに関与することがあり、このプロモーション段階で作用すると考えられる。Bhas試験法は、この段階の発がん性評価も可能な優れた試験法である。
ベクター	遺伝子導入の際に、目的とする異種遺伝子を宿主細胞の中へ運ぶ道具、遺伝子の運び屋。
マイクロアレ イ ー解析	本事業では、DNAマイクロアレイのこと。別名DNAチップ。スライドガラスなどの基盤の上に数千～数万種類のDNAを高密度に配置し固定化したものである。これを用いることにより、数万種類に至る遺伝子を一度に調べることが可能である。例えば、ヒトの遺伝子数は約2万数千といわれているが、これらのすべての遺伝子断片を一つのガラス基板上に固定化することが可能で、この遺伝子断片（プローブ）と、ヒトの細胞から抽出した遺伝子の転写産物（mRNA）又はそれに由来する標識核酸（蛍光色素を結合させたDNAなど）をハイブリダイゼーション（特異的に結合させる）させることによって、ヒト細胞内で発現している遺伝子情報を網羅的に検出できる。ラットなどの遺伝子でも同様な検出ができる。 ー解析：DNAマイクロアレイを用いて遺伝子の発現（遺伝子が実際に働き、それに対応したmRNAやタンパク質の合成が起きていること）を網羅的に調べること。又は、その方法。

用語	説明
マーカー遺伝子	本事業では、化学物質に対する細胞の特定の反応が、ある遺伝子の発現レベルの変化として捉えられる場合、その特定の反応の指標（マーカー）となる遺伝子のことを指す。マーカー遺伝子の発現（活性）の強度によって、投与した化学物質の特定の有害性の有無を知ることができる。
ルシフェラーゼ	発光基質（ルシフェリン→次項参照）の酸化を触媒することで、発光を引き起こす酵素の総称。ホタルルシフェラーゼが最も有名であるが、そのほかに、イクオリン（オワンクラゲ）、ウミシイタケルシフェラーゼ、ウミホタルルシフェラーゼなどがある。
ルシフェリン	ルシフェラーゼの発光基質の総称。ルシフェラーゼの存在下、ルシフェリンが酸化されてオキシルシフェリンと二酸化炭素になるときに発光する。ホタルルシフェリンが最も有名であるが、ほかにセレンテラジン（ウミシイタケルシフェリンとも言う。）、ウミホタルルシフェリンなどがある。
レポーター遺伝子	目的とする特定の遺伝子（例えば、マーカー遺伝子）の発現の有無や発現の強度を知る（可視化する）ために用いられる遺伝子のこと。目的とする遺伝子のプロモーターの下流に導入連結させる。レポーター遺伝子の産生物、例えば、励起光によって蛍光を発する蛍光タンパク質（1962年に下村脩博士がオワンクラゲで発見した緑色蛍光タンパク質が有名。）や特定の基質と反応して発光・発色する酵素（ホタルのルシフェラーゼが有名。）の活性を光や色で測定することで、目的とする遺伝子の発現の有無や強度を知ることができる。様々な生物の遺伝子がレポーター遺伝子として利用されている。レポーター遺伝子の産生物としては、活性の測定が容易である、細胞毒性がないといった条件が要求される。逆に、レポーター遺伝子の上流にランダムなDNA断片を挿入し、プロモーター活性をもつ配列を検索するためにも用いられる。
遺伝子発現一解析	染色体（ゲノム）上に存在する遺伝子からメッセンジャーRNAが合成されてくる現象を「転写」と呼ぶ。この「転写」が狭義の遺伝子発現そのものである。 一解析：上記の「転写」の産物（＝メッセンジャーRNA）について、どのような種類のものがどの程度の量で細胞内に存在しているのかを調べること。
幹細胞	細胞分裂を経ても、同じ分化能を維持する細胞のこと。発生における細胞系譜の幹（stem）になり、細胞を供給する役割を担っている。
形質転換試験法	形質転換（正常な細胞ががん化すること）を試験する化学物質の発がん性試験方法。形質転換すると、細胞の形態が変化し、重なり合い、形質転換巣（フォーカス）を形成するので、これを染色して確認できる。実験動物による発がん性試験法の代替法として開発が進められている。
細胞株	培養開始後、細胞は何回か分裂を繰り返すと、急に分裂しなくなる。その後、細胞は死滅してしまうのが普通で、ここまでの細胞を『初代培養』又は『プライマリカルチャー』と呼ぶ。しかし、その後死滅したかと思われた中から再び分裂を開始し、細胞が増殖してくることがある（ヒトではまだ成功した例は無い）。こうした細胞は染色体の構成が正常の場合と大きく変わるが、以後は死滅することなく何年にもわたって分裂を繰り返すことになる（不死化）。こうなった細胞を『株』化細胞、『細胞株』と呼び、「細胞株を樹立した」などのように用いる。英語では Cell Line と呼ぶ。

用語	説明
樹状細胞	Dendritic cell。抗原提示細胞として機能する免疫細胞の一種であり、哺乳類の免疫系の一部を担う。抗原提示細胞とは、自分が取り込んだ抗原の一部を自分の表面に差し出して、抗原の情報をほかの免疫系の細胞に伝える役割を持つ。皮膚組織をはじめとして、外界に触れる鼻腔や肺、胃、腸管に存在し、その名のとおりに周囲に突起を伸ばしている。
制限酵素	Restriction Enzyme。DNA鎖を切断する酵素のこと。2本鎖DNAの特定の塩基配列を認識して切断する性質がある。切断の位置によって制限酵素の種類も異なる。制限酵素は、DNA鎖を切断する「はさみ」に相当し、これで切り出したDNA断片を別のDNAに貼り付ける働きをもつ酵素を利用して、遺伝子組換えを行う。逆に、制限酵素の種類によって切断するDNAの位置が異なることを利用して、遺伝子の解析にも利用される。
生殖毒性	GHSでは、生殖毒性として、雌雄の成体の性機能及び生殖能、子の発生に対する毒性を対象としている。前者は、化学物質による性機能又は生殖能を阻害するあらゆる影響をいい、これには雌雄生殖器官の変化、生殖可能年齢の開始時期、配偶子の生成及び移動、生殖周期の正常性、性的行動、受胎能や分娩に対する悪影響、生殖機能の早期老化、又はその他の正常な生殖機能からの変化などを含む。後者の発生毒性を広義にとらえると、胎盤、胎児又は生後の児の正常な発生を妨害するあらゆる作用が含まれるが、本質的に妊娠中又は親の暴露によって誘発される悪影響をいう。催奇形性は、後者の発生毒性に含まれる。
生物発光と蛍光	一般的に、生物発光とは発光基質（ルシフェリン）の酸化反応を発光酵素（ルシフェラーゼ）が触媒する酵素反応をいう。ルシフェリンが酸化されてできるオキシルシフェリンの高いエネルギー状態（励起状態という）から低いエネルギー状態（基底状態）に遷移する過程で放出されるエネルギーの一部が光となる。一方、蛍光とは、蛍光物質に適当な波長の光を当てることにより、励起状態を誘発し、基底状態に戻る際に放出されるエネルギーの一部が光となる現象である。生物発光と蛍光の違いは、前者がルシフェリンの酸化反応をエネルギー源とするのに対して、蛍光では励起光をエネルギー源とする点にある。
発現ベクター	Expression Vector。導入しようとする遺伝子が組み込まれたベクターのこと。細胞内で特定の外来遺伝子を発現させようとする場合に用いられるベクターであり、発現ベクターは、発現させようとするタンパク質の塩基配列のほか、転写の開始を指令する塩基配列や転写の終了を指令する塩基配列などの遺伝情報を含んでいる。遺伝子組換え技術では、発現ベクターを用いて目的とする遺伝子の形質発現を行わせる。
発光タンパク質の遺伝子	発光タンパク質（ルシフェラーゼ）を産生する遺伝子。レポーター遺伝子として用いられる。
変異原、変異原性	Mutagen /Mutagenicity。生物の遺伝情報（DNA又は染色体）に変化をひき起こす作用を有する物質又は物理的作用（放射線など）をいう。変異原としての性質又は作用の強さを変異原性と呼ぶ。遺伝毒性（Genotoxicity）又は遺伝子毒性と呼ぶこともある。

用語	説明
優先評価化学物質（仮称）	平成20年、厚生労働省、経済産業省及び環境省の「化審法見直し合同委員会」は、化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）の改正により、既存化学物質・新規化学物質を問わず、上市後の化学物質を対象として、リスク評価を優先的に行うべき物質を絞り込み、それらについてハザード情報等を段階的に収集しリスク評価を実施する新たな制度の創設を提言している。すなわち、一定数量以上製造・輸入されている既存化学物質について、製造・輸入量、用途等を事業者が国に定期的に届け出る。国は製造・輸入量、用途、既知の有害性情報からスクリーニング評価を行い、リスクが十分に低いと判断できない物質を優先評価化学物質（仮称）に指定する。新規化学物質の事前審査にもリスクの観点からの評価を導入し、製造・輸入予定数量等を考慮して優先評価化学物質への指定につき判定する。優先評価化学物質については、製造・輸入事業者に対し、有害性情報及び詳細な用途情報の提出を段階的に求め（用途情報は、使用事業者も対象）、国がリスク評価を実施。その結果、リスクが低いと判断されない場合は、有害性調査指示により長期毒性試験データを事業者に求め、第二種特定化学物質に相当するかどうかを判断する。リスクが高いと評価された化学物質を第二種特定化学物質に指定し、現行化審法と同様の規制を行う。第二種特定化学物質が使用されている製品についても、所要のリスク管理措置を求める。優先評価化学物質制度の導入に伴い、現行化審法の第二種及び第三種監視化学物質は発展的に廃止される。

プロジェクト用語集「28日間反復投与試験と相関する遺伝子発現データセットの開発」

用語	説明
28日間反復投与試験	化学物質の長期毒性は本来、慢性毒性試験、がん原性試験、催奇形性試験など様々な試験法を組み合わせるものであるが、膨大なコストと時間が必要である。そこで、化学物質の人への長期毒性の疑いを調べることを目的に、OECDテストガイドラインに準拠した簡便な試験が、スクリーニング毒性試験として実施されている。その一つが28日間反復投与試験と呼ばれ、文字どおり化学物質を28日間にわたり実験動物（ラット）に投与して、化学物質の作用による病理学的変化が現れない最大投与量を求める試験である。
mRNA	メッセンジャーRNA、伝令RNA。通常はmRNAと表記する。mはmessenger（メッセンジャー）の略である。DNAからコピーした遺伝情報（タンパク質に翻訳され得る塩基配列情報と構造）を担うRNAのこと。その遺伝情報は、特定のアミノ酸に対応するコドンと呼ばれる3塩基配列を基本単位としている。
poly A+RNA	真核生物のmRNAは、RNAポリメラーゼIIによって転写されたRNAに由来する。5'末端にはm7Gキャップがあり、3'末端は一般にpoly (A)鎖で終了している。これらの構造やmRNAの塩基配列は、翻訳活性やmRNAの分解を制御する機能も持っている。古細菌、真正細菌も3'末端に短いpoly (A)鎖を持つが、5'末端のキャップ構造は持たない。poly (A)鎖はrRNAやtRNAには存在しないmRNAの特徴であり、このことを利用してmRNAを特異的に精製することができる。

用語	説明
RNA	ribonucleic acid、リボ核酸。RNAと略されることが多い。リボヌクレオチドがホスホジエステル結合でつながった核酸である。一本鎖のポリマーであるが、例外も存在する。RNAのヌクレオチドは、リボース、リン酸、塩基から構成される。基本的に塩基はアデニン (A)、グアニン (G)、シトシン (C)、ウラシル (U)のいずれかである。RNAポリメラーゼによりDNAを鋳型にして転写 (合成) される。各塩基はDNAのそれと対応しているが、ウラシルはチミンに対応する。RNAは生体内でタンパク質合成を行う際に必要なリボソームの活性中心部位を構成している。生体内での挙動や構造により、伝令RNA (メッセンジャーRNA、mRNA)、運搬RNA (トランスファーRNA、tRNA)、リボソームRNA (rRNA)、ノンコーディングRNA (ncRNA)、リボザイム、二重らせんRNA (dsRNA) などさまざまな分類がなされる。本事業では、mRNAを指す。
t 検定	帰無仮説が正しいと仮定した場合に、統計量がt分布に従うことを利用する統計学的検定法の総称である。母集団が正規分布に従うと仮定するパラメトリック検定法であり、t分布が直接もとの平均や標準偏差にはよらない (ただし自由度による) ことを利用している。2組の標本について平均に有意差があるかどうかの検定などに用いられる。
クラスタ分析	クラスタリング (clustering)、クラスタ解析 (cluster analysis)。データ解析手法の一つ。教師なしデータ分類手法、つまり、与えられたデータを外的基準なしに自動的に分類する手法。又は、そのアルゴリズム。さまざまな手法が提案されているが、データの分類が階層的になされる階層型手法と、特定のクラスタ数に分類する非階層的手法とに大別される。それぞれの代表的な手法として、ウォード法 (Ward's method)、K平均法 (K-means) などがある。
ゲノミクス	Genomics、ジェノミクス、ゲノム学、ゲノム科学。ゲノムと遺伝子について研究する生命科学の一分野。ゲノム情報を網羅的にシステムティックに取り扱うもの。
ゲノム	古典的遺伝学の立場からは、二倍体生物におけるゲノムは生殖細胞に含まれる染色体又は遺伝子全体を指し、このため体細胞には2組のゲノムが存在すると考える。原核生物、細胞内小器官、ウイルス等の一倍体生物においては、全遺伝情報を含むDNA (一部のウイルスやウイロイドではRNA) を指す。 分子生物学の立場からは、すべての生物を一元的に扱いたいという考えのもと、ゲノムはある生物のもつすべての遺伝情報としている。ゲノムには、タンパク質のアミノ酸配列をコードするコーディング領域と、それ以外のいわゆるノンコーディング領域に大別される。ゲノム配列解読当初、ノンコーディング領域については、その一部が遺伝子発現調節等に関与することが知られていたものの、大部分は意味をもたないものと考えられ、ジャンクDNAとも呼ばれていた。現在では、遺伝子発現調節のほか、RNA遺伝子などの生体機能に必須の情報が、この領域に多く含まれることが明らかにされてきている。
トキシコゲノミクス	toxicogenomics。薬物や化学物質に対して副作用や毒性が生じる原因をこれまでの情報をもとに、ゲノムベース (遺伝子レベル) で調べる毒性評価法である。
ニュートリゲノミクス	Nutrigenomics。遺伝子中のタンパク質・代謝物などを解析して、食品が体に与える影響を研究する手法。

用語	説明
ハイブリダイゼーション	Hybridization。原義としては生物の交雑又は雑種形成のこと。しかし現代では、核酸（DNA又はRNA）の分子が相補的に複合体を形成することをハイブリダイゼーションといい、分子交雑（ぶんしこうざつ）ともいう。特に、遺伝子の検出・同定・定量や、相同性の定量のために、人工的にこれを行う実験方法を指すことが多い（通称「ハイブリ」）。
ファーマコゲノミクス	ファーマコジェノミクス、薬理ゲノミクス、薬理ゲノム学。Pharmacology（薬理学）とGenomics（ゲノム学）の造語。ゲノム情報に基づいた「個の医療（投薬）」と「創薬研究開発」を目指すことで、特定の疾患群に対して有効かつ安全な医薬品を探索・開発するために、患者のゲノム情報（遺伝的特徴）の解析を行いアプローチする手法である。また、薬剤投与に関してゲノム情報を広く臨床領域に応用することを研究する分野という意味でも使われる。
プローブ	解析する遺伝子を捕捉するためにDNAマイクロアレイ上に設置された遺伝子のことを指す。本事業では、80個塩基からなる種々の遺伝子をプローブとして用いている。
マイクロアレイ －解析	本事業では、DNAマイクロアレイのこと。別名DNAチップ。スライドガラスなどの基盤の上に数千～数万種類のDNAを高密度に配置し固定化したものである。これを用いることにより、数万種類に至る遺伝子を一度に調べることが可能である。例えば、ヒトの遺伝子数は約2万数千といわれているが、これらのすべての遺伝子断片を一つのガラス基板上に固定化することが可能で、この遺伝子断片（プローブ）と、ヒトの細胞から抽出した遺伝子の転写産物（メッセンジャーRNA）又はそれに由来する標識核酸（蛍光色素を結合させたDNAなど）をハイブリダイゼーション（特異的に結合させる）させることによって、ヒト細胞内で発現している遺伝子情報を網羅的に検出できる。ラットなどの遺伝子でも同様な検出ができる。 －解析：DNAマイクロアレイを用いて遺伝子の発現（遺伝子が実際に働き、それに対応したmRNAやタンパク質の合成が起きていること）を網羅的に調べること。又は、その方法。
遺伝子発現 －解析 －プロファイル －データセット	染色体（ゲノム）上に存在する遺伝子からメッセンジャーRNAが合成されてくる現象を「転写」と呼ぶ。この「転写」が狭義の遺伝子発現そのものである。 －解析：上記の「転写」の産物（＝メッセンジャーRNA）について、どのような種類のものがどの程度の量で細胞内に存在しているのかを調べること。 －プロファイル：遺伝子発現解析の結果の全体像（一覧表）のこと。 －データセット：毒性学的所見（化学物質により引き起こされた生化学的、免疫学的及び病理組織学的な臓器・組織における定性的な変化）を、遺伝子発現として定量的に捉え、両者を関連付けたデータの組み合わせ群のこと。数値化されたデータであるため、異なる化学物質の毒性（生物に与える影響）の類似性の比較が容易となる。
試験プロトコール	protocol（プロトコルとも表記する）。複数の者が対象となる事項を確実に実行するための手順等について定めたもの。分子生物学や生化学などの実験において、実験の手順、条件等について記述したものである。

用 語	説 明
末梢血	白血球・赤血球・血小板は、元々同じ細胞が起源となっている。これを「多能性造血幹細胞」といい、骨髄でサイトカインと呼ばれる液性因子によって指令が出され、それぞれの血液細胞に分化し、最終的には成長した細胞のみが血管の中に出現してくる。この血管の中の血液のことを「末梢血」という。

プロジェクト用語集の作成に当たり参照・引用した主なウェブサイト及び書籍

●=ウェブサイト、★=書籍

- 日本動物実験代替法学会HPの「ボロニア宣言」の項 <http://wwwsoc.nii.ac.jp/jsaae/bo.html>
- 日本クレア株式会社HPの実験動物、近交系の「BALB/cAJcl」の項 http://www.clea-japan.com/animalpege/a_1/e_03.html
- ★「生化学事典 第3版」(株式会社東京化学同人刊)の「3T3細胞」の項
- ★「最新医学大事典 第3版」(医歯薬出版(株)刊)の「バルブ (BALB) /c マウス」の項
- 「実験用マウスの過去と未来」(「蛋白質 核酸 酵素」Vol. 31、No. 12、1151-1159 (1986))の「系統の命名」の項 http://lifesciencedb.jp/dbsearch/Literature/get_pne_cgpdf.php?year=1986&number=3112&file=C/1npVPBA6qUh6Zkc3KPLUSCA==
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「胚性幹細胞」の項 <http://ja.wikipedia.org/wiki/%E8%83%9A%E6%80%A7%E5%B9%B9%E7%B4%B0%E8%83%9E>
- 「生殖・発生毒性試験の代替法 (現状と近未来)」日本薬学会「YAKUGAKU ZASSHI」128(5)765-772(2008)
http://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/128/5/765/_pdf/-char/ja/
- 日本語バイオポータルサイト Jabion の用語辞書の「グリセルアルデヒド 3-リン酸脱水素酵素」の項 <http://www.bioportal.jp/BioTerms/cgi-bin/search.cgi?order=C&term=%E3%82%B0%E3%83%AA%E3%82%BB%E3%83%AA%E3%83%B3&id=&list=>
- 実験医学 HP のバイオキーワード集の「ハウスキーピング遺伝子」の項 <http://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/keyword/279.html>
- 安全衛生情報センターHP のGHS モデルラベル表示の「GHS とは」の項 http://www.jaish.gr.jp/user/anzen/kag/ankg_ghs.htm
- 脂質と血栓の医学 HP のミニ医学知識の「ヘムオキシゲナーゼ (H0)」の項 <http://hobab.fc2web.com/sub2-H0.htm>
- 株式会社共同病理 HP の免疫組織化学 (免疫抗体法・免疫染色) の「Heme oxygenase-1 (H0-1)」の項 <http://www.kbkb.jp/list/h.html>
- 「ストレス蛋白質遺伝子のプロモーター活性の可視化と評価」日本薬学会「YAKUGAKU ZASSHI」127(4)757-764(2007)
http://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/127/4/757/_pdf/-char/ja/
- 岡山大学工学部生物機能工学科細胞機能工学研究室HPのテクニカルタームインフォメーション (薬品別) の「ionomycin」の項 http://www.biotech.okayama-u.ac.jp/labs/ohmori/Japanese/tips/reagent_description/ionomycin.html
- 「血液イオン検出のためのイオノフォア分子設計とセンサーデバイス化」第15回日本エム・イー学会秋季大会 Japan Soc. ME & BE (Dec. 2001)
<http://plaza.umin.ac.jp/~biosig/no20-1.pdf>

- 日本化学物質辞書 Web (日化辞 Web)
http://nikkajiweb.jst.go.jp/nikkaji_web/pages/top.html
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「プロテインキナーゼ」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%97%E3%83%AD%E3%83%86%E3%82%A4%E3%83%B3%E3%82%AD%E3%83%8A%E3%83%BC%E3%82%BC>
- 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団 HP のヒューマンサイエンス研究資源バンク、細胞バンク、細胞株の検索、由来種・組織名順リスト (日本語版)
<http://www.jhsf.or.jp/bank/Category-IndexJ.html>
- 通信用語の基礎知識の「胆汁酸」の項
<http://www.wdic.org/w/SCI/%E8%83%86%E6%B1%81%E9%85%B8>
- 大阪大学大学院生命機能研究科個体機能学講座病態医科学研究室 (下村研究室) HP の図4の説明
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labo/16a.html>
- 財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 HP の安全性試験、生殖発生毒性試験の「肢芽培養・全胚培養試験」の項
<http://www.fdsc.or.jp/Anzensei/Seishoku.html#Zenpai>
- 環境省 HP のパンフレット「OECDの環境保健安全プログラム」(環境省環境保健部環境安全課) 全文
http://www.env.go.jp/chemi/oecd_programme/oecd_programme.pdf
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「オカダ酸」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%AA%E3%82%AB%E3%83%80%E9%85%B8>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ORF」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E4%BC%9D%E4%BB%A4RNA>
- 「神経細胞様モデル細胞 PC12 細胞の保存に対する栄養因子カクテルの効果」(産総研特許生物寄託センター技術報告書 2006 年)
http://unit.aist.go.jp/pod/ci/tech_report/TR2006.2.pdf
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ポリメラーゼ連鎖反応」及び「リアルタイムPCR」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%9D%E3%83%AA%E3%83%A1%E3%83%A9%E3%83%BC%E3%82%BC%E9%80%A3%E9%8E%96%E5%8F%8D%E5%BF%9C>
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%AA%E3%82%A2%E3%83%AB%E3%82%BF%E3%82%A4%E3%83%A0PCR>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ホルボール」、「12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテート」及び「ジアシルグリセロール」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%9B%E3%83%AB%E3%83%9C%E3%83%BC%E3%83%AB>
<http://ja.wikipedia.org/wiki/12-O-%E3%83%86%E3%83%88%E3%83%A9%E3%83%87%E3%82%AB%E3%83%8E%E3%82%A4%E3%83%AB%E3%83%9B%E3%83%AB%E3%83%9C%E3%83%BC%E3%83%AB-13-%E3%82%A2%E3%82%BB%E3%83%86%E3%83%BC%E3%83%88>
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B8%E3%82%A2%E3%82%B7%E3%83%AB%E3%82%B0%E3%83%AA%E3%82%BB%E3%83%AD%E3%83%BC%E3%83%AB>
- 東北大学大学院薬学研究科附属薬用植物園 HP の「園内で観察できる植物」の「【ハズ】(毒)」の項
http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~yakusoen/plant/plant_file/hazu.html
- 外務省HPの「EUの新たな化学物質規制 (REACH規則案) の動向 平成 19 年 6

- 月」 http://www.mofa.go.jp/mofaj/area/eu/reach_0602.html
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「T細胞」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E7%89%B9%E5%88%A5:Search?search=%EF%BC%B4%E7%B4%B0%E8%83%9E&go=%E8%A8%98%E4%BA%8B%E8%A1%A8%E7%A4%BA>
 - 「テクニカルノート：哺乳類胚の全胚培養(whole embryo culture)」日本比較内分泌学会ニュース、
Vol.2002;105_14-105_17, (2002) http://www.jstage.jst.go.jp/article/nl2001jsce/2002/105/105_14/_pdf/-char/ja/
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「染色 (生物学)」の項 [http://ja.wikipedia.org/wiki/%E6%9F%93%E8%89%B2_\(%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6\)](http://ja.wikipedia.org/wiki/%E6%9F%93%E8%89%B2_(%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6))
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「シクロホスファミド」の項 <http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B7%E3%82%AF%E3%83%AD%E3%83%9B%E3%82%B9%E3%83%95%E3%82%A1%E3%83%9F%E3%83%89>
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「バイオインフォマティクス」の項 <http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%90%E3%82%A4%E3%82%AA%E3%82%A4%E3%83%B3%E3%83%95%E3%82%A9%E3%83%9E%E3%83%86%E3%82%A3%E3%82%AF%E3%82%B9>
 - 島根大学HPの第11回病態生化学セミナー案内「ヒト人工染色体の医学応用」 <http://www.shimane-med.ac.jp/biochem2/061608.pdf>
 - 特開 2007-295860 「内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター」
<http://www.j-tokkyo.com/2007/C12N/JP2007-295860.shtml>
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「プラスミド」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%97%E3%83%A9%E3%82%B9%E3%83%9F%E3%83%89>
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「レポーター遺伝子」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%AC%E3%83%9D%E3%83%BC%E3%82%BF%E3%83%BC%E9%81%BA%E4%BC%9D%E5%AD%90>
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「幹細胞」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E5%B9%B9%E7%B4%B0%E8%83%9E>
 - 愛媛大学HP分子細胞生物学研究室図書館の「遺伝子発現」の項
<http://web-mcb.agr.ehime-u.ac.jp/library/know/knowgenexp.htm>
 - 独立行政法人医薬基盤研究所のJCRB細胞バンクHP「細胞株ってなに」の項
<http://cellbank.nibio.go.jp/visitercenter/whatsculture/cellculture01.html>
 - フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「樹状細胞」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E6%A8%B9%E7%8A%B6%E7%B4%B0%E8%83%9E>
 - 社団法人農林水産先端技術産業振興センターHPのバイオテク用語集「制限酵素」の項
http://www.biotech-house.jp/glossary/glos_69.html
 - 経済産業省 HP の化学物質管理政策、国際協調と調和の促進、GHS テキスト、第3.7章 生殖毒性 http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/ghs_text_3_7.html
 - 産総研プレスリリース 2007/7/9「自ら光る蛍光タンパク質による高精度細胞イメージング技術の開発」の用語解説の「ルシフェリン」及び「ルシフェラーゼ」の項
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2007/pr20070709/pr20070709.html

- 社団法人農林水産先端技術産業振興センターHP のバイテク用語集「発現ベクター」の項
http://www.biotech-house.jp/glossary/glos_150.html
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「変異原」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E5%A4%89%E7%95%B0%E5%8E%9F>
- 経済産業省 HP の第3回化審法見直し合同委員会の資料3「化審法見直し合同委員会報告書(案)」
<http://www.meti.go.jp/committee/materials2/downloadfiles/g81023b04j.pdf>
- 科学技術動向2004年3月号(文部科学省 科学技術政策研究所 科学技術動向研究センター)特集2「化学物質の健康影響評価における緊急の課題」 3-1. わが国の新規化学物質の有害性評の項
http://www.nistep.go.jp/achiev/ftx/jpn/stfc/stt036j/0403_03_feature_articles/200403_fa02/200403_fa02.html
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「伝令RNA」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/MRNA>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「リボ核酸」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%AA%E3%83%9C%E6%A0%B8%E9%85%B8>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「t検定」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/T%E6%A4%9C%E5%AE%9A>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「データ・クラスタリング」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%87%E3%83%BC%E3%82%BF%E3%83%BB%E3%82%AF%E3%83%A9%E3%82%B9%E3%82%BF%E3%83%AA%E3%83%B3%E3%82%B0>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ゲノミクス」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B2%E3%83%8E%E3%83%9F%E3%82%AF%E3%82%B9>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ゲノム」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%82%B2%E3%83%8E%E3%83%A0>
- 治験ナビー治験・医薬用語集の「トキシコゲノミクス」の項
<http://www.chikennavi.net/word/toxicogenomics.htm>
- 日本薬学会『薬学用語解説』の「ニュートリゲノミクス」の項
<http://www.pharm.or.jp/dictionary/wiki.cgi?%E3%83%8B%E3%83%A5%E3%83%BC%E3%83%88%E3%83%AA%E3%82%B2%E3%83%8E%E3%83%9F%E3%82%AF%E3%82%B9>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「ハイブリダイゼーション」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%8F%E3%82%A4%E3%83%96%E3%83%AA%E3%83%80%E3%82%A4%E3%82%BC%E3%83%BC%E3%82%B7%E3%83%A7%E3%83%B3>
- 治験ナビー治験・医薬用語集の「ファーマコゲノミクス」の項
<http://www.chikennavi.net/word/pharmacogenomics.htm>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「DNAマイクロアレイ」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/DNA%E3%83%9E%E3%82%A4%E3%82%AF%E3%83%AD%E3%82%A2%E3%83%AC%E3%82%A4>
- フリー百科事典『ウィキペディア (Wikipedia)』の「プロトコル」の項
<http://ja.wikipedia.org/wiki/%E3%83%97%E3%83%AD%E3%83%88%E3%82%B3%E3%83%AB>

- 富山市立富山市民病院 HP の「血液内科のご紹介」の「1. 血液とは」の項
http://www.tch.toyama.toyama.jp/main/shinryo_info/ketsueki/index.htm

I. 事業の位置づけ・必要性について

1. NEDOの関与の必要性・制度への適合性

1. 1 NEDOが関与することの意義

1. 1. 1 政策への適合性

本事業に関連する国の計画等は、以下のとおりである。

(1) 第3期科学技術基本計画の分野別推進戦略【添付資料①-1）、-2）参照】

平成18年～22年度を計画期間とする「第3期科学技術基本計画」が平成18年3月28日に閣議決定された。これを受けて同日付けで総合科学技術会議が策定した「分野別推進戦略」では、その環境分野とエネルギー分野の両分野で、重要な研究開発課題に該当するものとして本事業を位置付けている。

まず、環境分野では、個別政策目標として「③-9 環境と経済の好循環に貢献する化学物質のリスク・安全管理を実現する。」を掲げている。環境分野の中に設定した「化学物質・安全管理研究領域」では、「有害性評価・暴露評価・環境動態解析」及び「リスク評価管理・対策技術」の2つのプログラムを設定している。前者の「有害性評価・暴露評価・環境動態解析」の下の重要な研究開発課題の一つとして、「3.2 多様な有害性の迅速な評価技術」を選定し、「正確で迅速な有害性評価を可能にするとともに、長期の体内蓄積や発現まで長時間を有する影響、複合影響などの新たな有害性について予見的に評価する新技術・新手法を開発する」としている。そして、研究開発目標は「2010年度までに、従来の手法に比べ、簡易かつ高精度な *in vitro* 試験手法やトキシコゲノミクス手法、シミュレーション手法を活用した有害性評価手法を開発する。【経済産業省】」としている。

一方、エネルギー分野では、「①大分類 エネルギー源の多様化」の、「中分類 化石燃料の開発・利用の推進」に係る重要な研究開発課題の一つとして「1.7 石油精製・利用技術」を選定し、「石油の精製・利用に際して生成する環境負荷物質を処理する技術、多様化する石油精製物質等に対応して、簡易で迅速に有害性（発ガン性等）を評価可能な技術等を開発する」としている。そして、研究開発目標は「2010年度までに、石油精製物質等に係る簡易で迅速な有害性評価技術を確立する。【経済産業省】」としている。

(2) 本事業に関連する経済産業省の計画・提言

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の中間取りまとめ（平成18年12月／平成19年3月）

化学物質に係る安全性情報（ハザード情報、暴露関連情報）の収集・把握のあり方について論じる中で、「スクリーニングに活用するデータについては、細胞を用いた簡易有害性評価手法や(Q)SARといった動物試験を代替する方法の精度を見極めながら、その活用を検討する等、ハザード情報の効率的な取得に向けた対応を本格化していくことも必要となろう」と指摘している。

②イノベーションプログラム基本計画（平成21年4月）【添付資料②-1）参照】

経済産業省が実施している全ての研究開発事業は、七つの政策目標の下にまとめられ、市場化に必要な関連施策（規制改革、標準化等）と一体となった施策パッケージである「イノベーションプログラム」として推進されている。

「環境安心イノベーションプログラム」の「4. 研究開発内容 IV-1. 化学物質総合評価管理」において、また、「エネルギーイノベーションプログラム」の「4. 研究開発内容 4-V. 化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用」において、「石油精製物質等簡易有害性評価手法開発」の名称で本事業が記載されている。

さらに、「環境安心イノベーションプログラム」の「5. 政策目標の実現に向けた環境整備（成果の実用化、導入普及に向けた取組）」の【基準・標準化】の項では、本事業について、「2014年度を目途に有害性評価手法等を経済協力開発機構（OECD）にテストガイドラインとして提案することを検討し、国際標準化を推進する」としている。

両イノベーションプログラム基本計画の概要は、図 I-1 及び図 I-2 のとおりである。

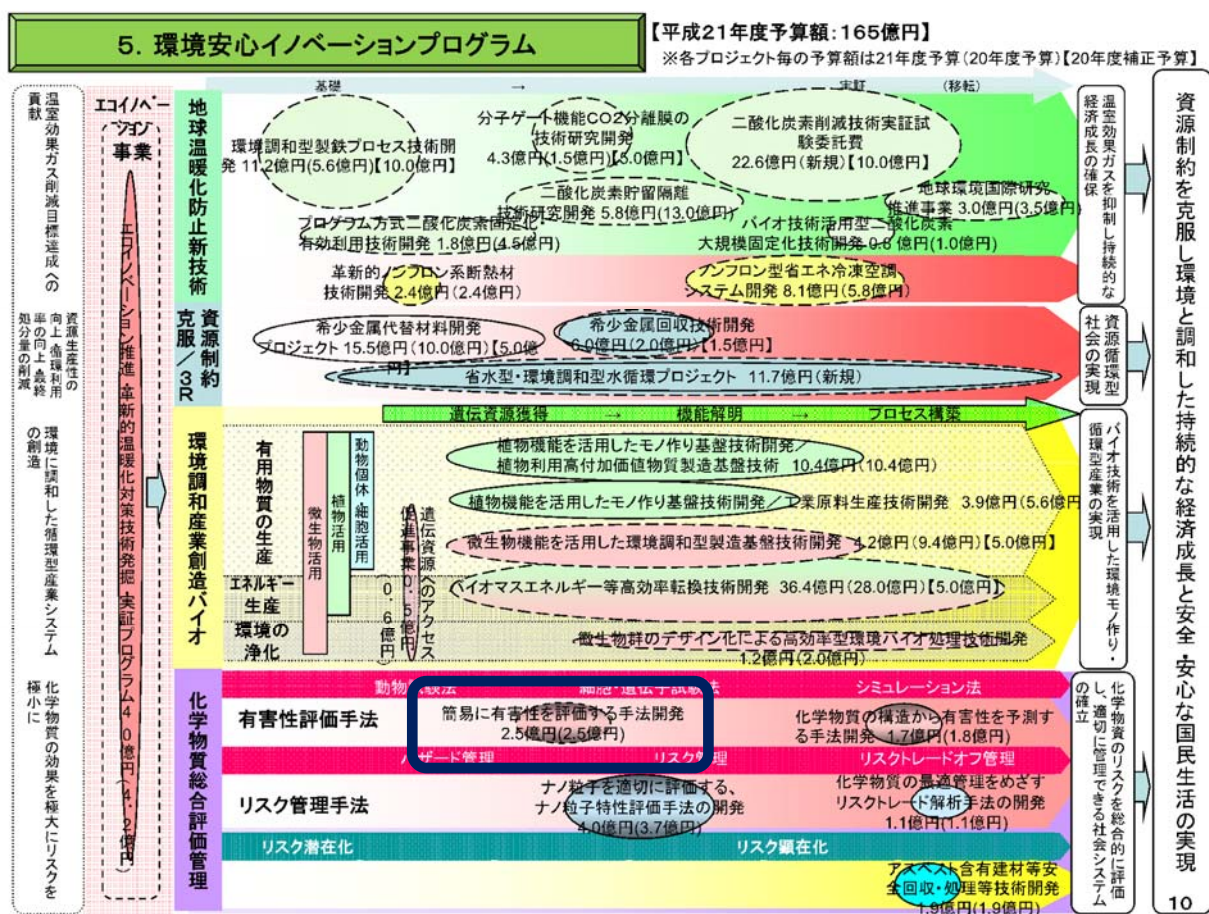


図 I-1 環境安心イノベーションプログラム (抜粋)

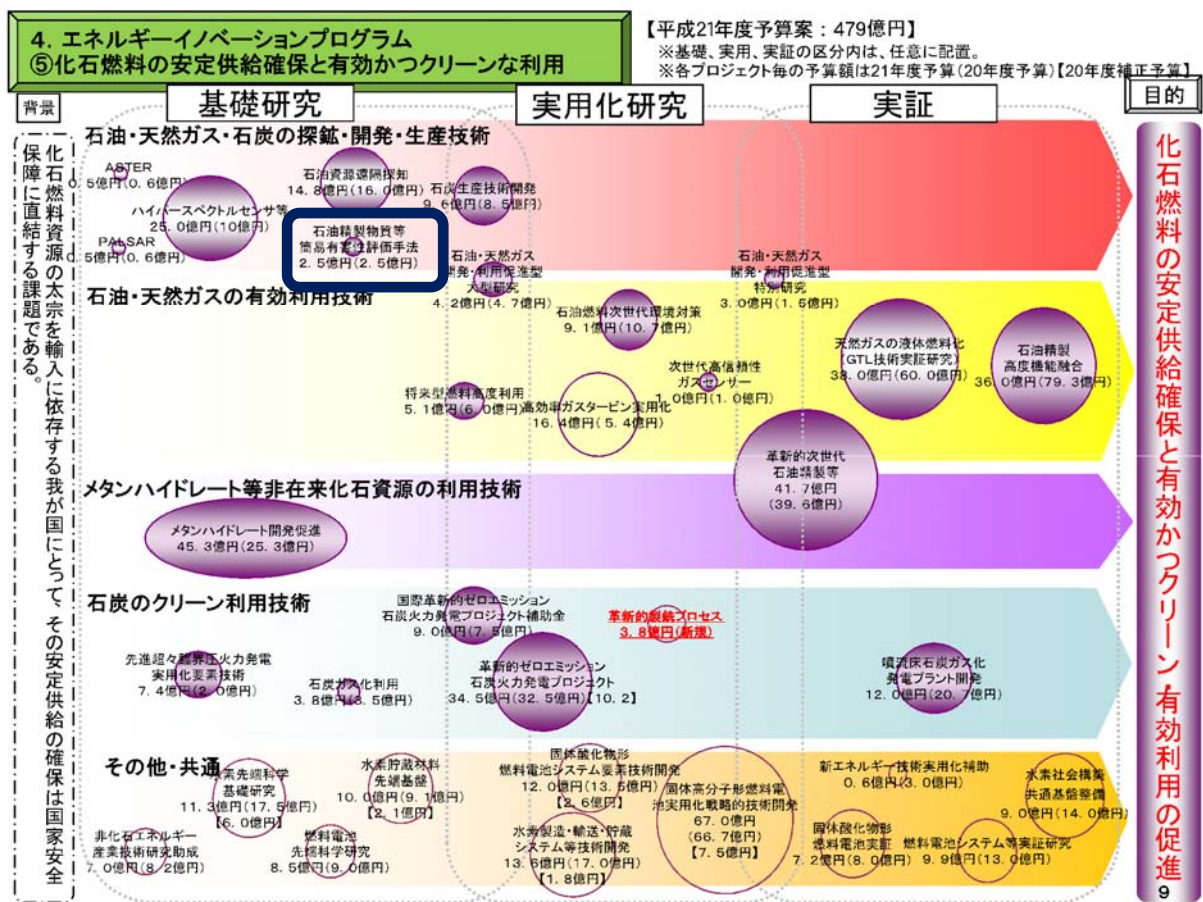


図 I - 2 エネルギーイノベーションプログラム (抜粋)

③技術戦略マップ2010 (平成22年6月)【添付資料④-1) 参照】

技術戦略マップ2010のうち、化学物質総合評価管理分野のリスク評価・管理技術開発に係る技術マップ11/36 (図 I - 3) では、「有害性評価に必要な技術開発」のうち「*in vitro* 高速・安価・物質適用性拡大」として「74 長期毒性についての簡便でハイスループット可能な *in vitro* 試験法」と、「*in vivo* 高速・安価・物質適用性拡大 動物数削減」として「76 マルチエンドポイントの *in vivo* 試験法」を掲げている。

これらの開発・実用化により、「発がん性等、高コスト・長期を要する毒性が安価・高速に評価可能に」なり、また「物質や毒性に適した評価手法が体系化され、必要性の低い物質は安価・高速に評価し、必要性の高い物質は詳細に *in vivo* で試験するという試験戦略が可能に」なり、さらに「Tiered Approach により、効率的なリスク評価 (緊急性の高い物質から順番にリスク評価) が可能に」なるとしている。

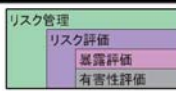
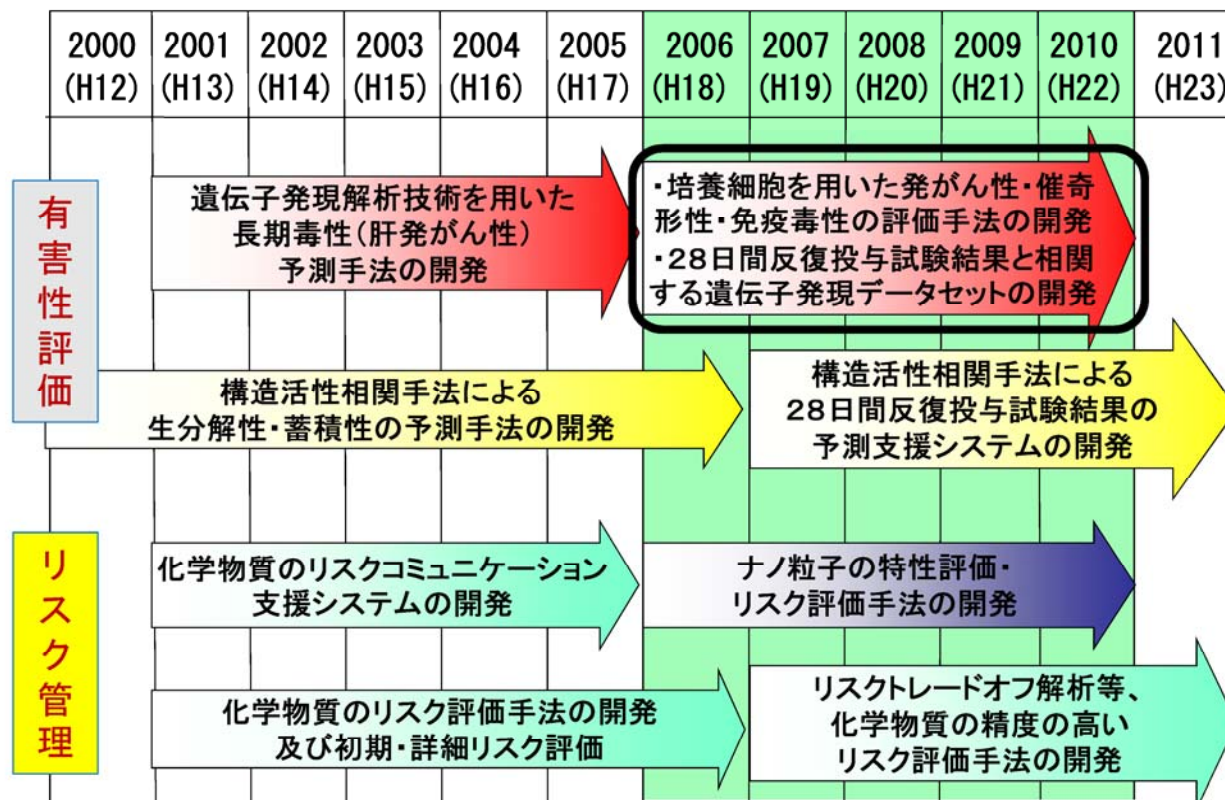
技術課題が「リスク管理、リスク評価、暴露評価、有害性評価」のどれに該当するか。		No.	技術課題	補足	技術課題の評価結果
<p>リスク評価管理の技術は目的指向型であり、問題解決のために有害性評価や暴露評価等の個々の技術を組合せていくものである。それを本表では、下記のような「入れ子構造」で表現している。</p> 				<p>技術課題の評価は、次の観点から行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ニーズ(社会の安全安心と適正管理の実現からのニーズ、産業競争力からのニーズ) ・シーズ(技術の波及効果) <p>また、日本の技術が世界で優位であり、今後日本で伸ばしていくべき技術であるかについても考慮した。</p>	
リスク管理 リスク評価 有害性評価 暴露評価	in vitro	72	ES細胞を用いたin vitro試験法	ES細胞のメリットは、次の可能性を有することである。①あらゆる正常組織臓器のソースとなりうる。②それらに遺伝子多型等に基づく感受性の差異を反映する多様性を与えうる。③正常機能応答と増殖性を併せ持つ評価用の細胞を作成しうる。	◎
		73	ヒトiPS細胞を用いたin vitro試験法	iPS細胞のメリットは、次の可能性を有することである。①あらゆる正常組織臓器のソースとなりうる。②それらに遺伝子多型等に基づく感受性の差異を反映する多様性を与えうる(特にiPSでは容易)。③正常機能応答と増殖性を併せ持つ評価用の細胞を作成しうる。これらを活かし、今後、次のような開発を行う。評価できる臓器を増やすため、iPS細胞の分化能を利用し、特殊な代謝系であっても提供された細胞からすべての臓器の細胞を復元できるようにする。個々の多様性を評価できるようにするため、多型対応の細胞セットを開発する。評価の効率化のため、iPS細胞の自己複製能を利用して株化細胞にし、特定の細胞を不死亡させて繰り返し複製できるようにする。	◎
		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	発がん性、生殖毒性、神経毒性等の長期毒性を効率的に評価するため、多数の物質等に対しロボットを用いて、自動的に高速で評価しうるin vitroの試験法。	○
		in vivo	毒性についての高速のin vivo試験法	例えば、次のような方法がある。 <例> ・変異原性を評価するための遺伝子改変マウス(OECDでは、試験法をレビューし、規制で使う可能性を調査) ・発がん性を評価するための2段階発がんモデル(最初にイニシエーション処置をほどこし、次に被験物質を投与してプロモーション作用を検出するもの)、遺伝子改変マウス(遺伝子改変により発がん物質への感受性を高めたマウス)	○
		76	マルチエンドポイントのin vivo試験法	試験動物を使うが、試験期間終了までに、複数のエンドポイントを評価する試験法。 例えば、次のような研究がなされている。 <例> ・変異原性についての複数のエンドポイント(遺伝子突然変異と染色体異常)を同時に評価する研究がなされている。	○
			法	る試験法。 例えば、次のような研究がなされている。 <例> ・感受性を評価するための遺伝子改変マウス(局所リンパ節増殖試験において、リンパ球を発光させ、定量するもの)	○

図 I - 3 化学物質総合評価管理分野の技術マップ(抜粋)

1. 1. 2 化学物質のリスク評価・管理のための体系的な研究開発

NEDOは、通商産業省／経済産業省の化学物質総合評価管理プログラム基本計画／環境安心イノベーションプログラム基本計画に基づき、図I-4に示すように、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ている。第1期は平成12年・13年から、第2期は平成18年・19年から開始しており、本研究開発事業は、第2期の4事業の内の一つである。

NEDO化学物質総合評価管理技術体系の構築



図I-4 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

環境安心イノベーションプログラム基本計画では、化学物質総合評価管理に係る達成目標として、「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を構築する。そのために、化学物質のリスクに係る国民の理解増進のための基盤、事業者が自らリスクを判断する手段及び国が規制等の施策を講ずる際の手段として、化学物質のライフサイクルにわたるリスクの総合的な評価管理を行うための手法を確立するとともに、リスクの削減に資するプロセス、手法の開発、さらには知的基盤を整備する」ことを掲げている。

本研究開発事業は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現解析等の最先端の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ものであり、その成果は、他のNEDO事業の成果とあいまって、化学物質のリスクに係る国民の理解増進のための基礎、事業者が自ら化学物質管理を行うための基盤及び国が規制等の施策を講ずる際の手段となるものである。

1. 1. 3 先行するNEDO事業の成果の活用

本研究開発事業は、表I-1に示す先行NEDO事業（研究開発事業・調査事業）の成果を踏まえて構想し、また、その成果を活用しながら実施している。

表I-1 本事業で成果を活用する先行NEDO事業

研究開発項目A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」関連	
NEDO基盤技術研究促進事業（民間基盤技術研究支援制度） 「環境化学物質の簡易型化学物質推定・毒性評価システムの開発」 平成13～17年度、(株)ダイキン環境・空調技術研究所 ※酵母を用いた多指標型レポーター・ジーン・アッセイ法による化学物質応答遺伝子組換え体ライブラリーを構築しており、本事業の計画の参考となった。	
NEDO「細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発」 平成14～18年度 (独)産業技術総合研究所、大学共同利用機関法人情報・システム研究機構、バイオテクノロジー開発技術研究組合、横河電気(株) ※多色多様生物発光システムを利用した細胞内マルチ標識技術を開発しており、その成果を本事業で大いに活用。	
NEDO「化学物質の有害性評価手法の高度化に関する調査」 平成16年度、みずほ情報総研(株)	
NEDO「化学物質の有害性試験方法開発の動向に関する調査」 平成17年度、みずほ情報総研(株)	
※両調査で把握したシーズとニーズから、本事業の計画を立案した。	
研究開発項目B-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」関連	
NEDO「高機能・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」 平成13～17年度 (財)化学物質評価研究機構・(株)三菱安全科学研究所・住友化学(株)	
NEDO「トキシコゲノミクスへのバイオインフォマティクス適用性に関する調査」平成18年度、(株)三菱化学安全科学研究所	
研究開発項目B-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」関連	
NEDO「タンパク質機能解析プロジェクト」 平成12～14年度、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム	
NEDO「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」 平成15～17年度、(社)バイオ産業情報化コンソーシアム	
※合成DNAマイクロアレイシステムを開発しており、その成果を本事業で大いに活用。	

1. 1. 4 OECDテストガイドライン化を目指した長期的な取組

環境安心イノベーションプログラム基本計画では、本研究開発事業について、「2014年度を目途に有害性評価手法等をOECDにテストガイドラインとして提案することを検討し、国際標準化を推進する」と規定している。新規の試験方法のOECDテストガイドライン化のためには、日米欧の国際協調の下で施設間バリデーションを実施してデータを積み重ねていく必要があり、達成には事業終了後5年以上を要すると見込まれるところ、NEDOが経済産業省、厚生労働省及び事業実施者と密接に連携しながら着実に取り組んでいかなくてはならない。

◆まとめ

以上に述べた1. 1. 2～1. 1. 4の3項目から、本研究開発事業は、NEDOがその研究開発マネジメント機能を提供し、関係者を組織して実施する必要性・意義があると認められる。

1. 2 実施の効果（費用対効果）

1. 2. 1 事業費

本事業では、以下の研究開発項目について研究開発を実施した。

- 研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」
- 研究開発項目 B - 1 （基本計画変更前）
「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」
- 研究開発項目 B - 2 （基本計画変更後）
「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」

本事業の支出額の推移を表 I - 2 に示す。

表 I - 2 事業の支出額の推移

単位：百万円

	平成18 年度	平成19 年度	平成20年 度	平成21 年度	平成22 年度	計
総支出額 (うち加速)	479	388	360 (122)	315 (79)	249 (35)	1,790 (236)
研究開発項目 A (うち加速)	353	299	251 (80)	254 (68)	204 (35)	1,361 (183)
研究開発項目 B - 1	126	9	—	—	—	135
研究開発項目 B - 2 (うち加速)	—	80	109 (42)	61 (11)	45 (0)	294 (53)

1. 2. 2 効果

本事業の実施により、有害性評価手法の高度化及び成果実用化の着実な推進を図ることが出来た。また、本プロジェクトの成果に基づき、平成23年度以降経済産業省において、OECDテストガイドライン化推進事業及び新たな有害性評価手法開発プロジェクトが実施されている。

今後、有害性評価手法完成時には、前述の技術戦略マップ2010で紹介したように、まず、①発がん性等、高コスト・長期を要する毒性が安価・高速に評価可能になり、②物質や毒性に適した評価手法が体系化され、必要性の低い物質は安価・高速に評価し、必要性の高い物質は詳細に *in vivo* で試験するという試験戦略 (Tiered Approach) が可能になり、③効率的なリスク評価 (緊急性の高い物質から順番にリスク評価) が可能になることが期待できる。合わせて、日本発の複数のOECDガイドラインの誕生も期待できる。

例えば、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、現在検討が進められている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。

2. 事業の背景・目的・位置付け

2. 1 背景

2. 1. 1 化学物質管理の世界的な進展

化学物質は、極めて広範な分野で活用される有用な基礎素材として、我々の社会・暮らしに不可欠なものである一方、適切に取り扱わないと、人の健康や環境に悪影響を及ぼし得るため、製造されてから廃棄されるまでの、化学物質のライフサイクルの各段階で適切に管理することが重要となる。

化学物質管理に係る国際的な対応を示すものとしては、1992年の国連環境開発会議（地球サミット）で採択された「アジェンダ21」がある。さらには、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（MSDS）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。また、2004年に発効した残留性有機汚染物質に関するストックホルム条約（POPs条約）は、環境中での残留性、生物蓄積性、人や生物への高い毒性及び長距離移動性が懸念される残留性有機汚染物質の廃絶・最小化を目指している。また、OECDにおいても、試験法など、化学物質管理に関する国際標準化等の活動のほか、新規化学物質のハザード評価（又はリスク評価結果の一部）の他国による受入れや、低リスクであるなどの理由から事前審査の対象外とすべき新規化学物質の国際整合化に向けた取組が進められている。

同時に、各国もそれぞれ特徴を生かした取組を鋭意進めている。例えば、欧州においては、新たな化学物質の規制であるREACH（化学物質の登録・評価・認可及び制限に関する規則）が成立し、2007年6月から段階的に施行され、2018年5月までに、一定量を超えて上市されたすべての化学物質の登録を完了することとなっている。米国においても、有害物質規制法（TSCA）の運用に加え、北米3か国による中生産量化学物質の安全性評価等のWSSD目標の達成に向けた地域協力に基づく取組が行われている。

このように、WSSD目標の達成に向けて、すべての化学物質についてリスクを評価した上で、ライフサイクルの全般を通じた一層の適正管理を実現するための取組が進みつつあり、今後は、川上事業者のみならず、川下事業者も含めたサプライチェーン全体で、各事業者が適切に化学物質を管理する必要性が高まっている。

2. 1. 2 化学物質管理におけるリスク評価の役割

リスク評価では、ハザード評価（有害性等の物質固有の性状を基とした評価）と暴露評価（化学物質に人又は動植物がさらされる量を基にした評価）を行い、その化学物質のリスク（化学物質が環境中に排出された後に人の健康や動植物に悪影響を及ぼす可能性の程度）を評価することとなる。ただし、その手法については、全国一律な水準やある一定の地域における水準などの広域性を踏まえて行うものや、作業現場における労働者の健康等への影響や排出源周辺の環境への影響などの局所性を踏まえて行うものなど様々な種類がある。

化審法（化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律）の「新規化学物質事前審査制度」は、新たに製造・輸入される化学物質がP C B類似の難分解性・高蓄積性等を有する第一種特定化学物質に該当するおそれがあるかどうかを、その上市前にスクリーニングする制度として、世界に先駆けて設けられた。その後、ハザード評価（長期的な毒性の有無）に加え、上市後における環境中への残留状況等の広域性を踏まえた暴露状況を考慮して第二種特定化学物質を指定し、製造・輸入数量の制限等を行う制度が導入された。

世界的にも、リスク評価の手法等に関する科学的知見の蓄積が進み、現在では、ハザード評価だけでなく、上市後の製造量・使用状況等も踏まえたリスクの総合的な評価・管理に重点が移りつつある状況にある。

例えば、米国では、上市前審査において国がリスク評価を実施し、リスクが高いとの懸念がある化学物質については、取扱い等に関する規則等を定めることにより、物質毎に適切な管理措置を講じている。このため、新規化学物質のハザード評価項目は決まっておらず、上市前は所有しているデータの提出でよいとされているが、リスクが高い疑いがあると政府が考える場合は、上市後に追加的な情報提供を事業者を求めることがある。

欧州では、R E A C Hの導入に伴って、新規化学物質と既存化学物質（法制定前から製造・輸入されていた化学物質）を区別することなく、事業者がリスクの評価・管理を行う仕組みとしている。また、適切な安全性情報の収集及びサプライチェーンを通じた情報共有により、事業者毎の適切なリスク管理を求めている。さらに、行政側で懸念が高いと判断する物質については、製造、使用等を認可制とするとともに、共同体レベルで対応する必要がある場合には、特定の物質の製造、上市及び使用に制限をかけることも可能としている。

このような各国の法規制を補完し、化学物質のリスク評価を促進するための取組として、各国の既存化学物質について、事業者の自主的な協力の下、ハザード情報を収集する取組が進められている。国際的には、O E C Dにおいて、高生産量（H P V）化学物質を対象として、有害性の初期評価を行うために必要とされたハザード項目（S I D S項目、初期評価データセット）を加盟国で分担して収集し、評価を行うH P Vプログラムが実施されており、また、米国においてはH P Vチャレンジプログラムが実施されている。我が国でも、参議院における化審法改正案に対する附帯決議（2003年5月）にも見られるように、既存化学物質の安全性点検の促進が課題とされており、国による安全性点検に加え、Japan チャレンジプログラムが官民協力による取組として進められているところである。

2. 1. 3 OECDの環境健康安全プログラム

1971年、OECDは、環境政策委員会傘下の化学品・農薬・バイオテクノロジー作業部会と化学品委員会との合同により、化学品プログラムを開始した。その後、環境健康安全(EHS)プログラムに拡大して現在に至っている。工業化学品、農薬、バイオテクノロジーに関連する安全問題を担当し、以下のことを目的としている。

- ・実験動物の保護を念頭に置きつつ、化学物質の試験評価のための質の高い手段を提供
- ・化学物質の管理における効率性と有効性を向上
- ・化学物質及びそれを含む製品の貿易における非関税障壁を最小化

表I-3に、OECDの環境健康安全プログラムの主要な内容を示す。

表I-3 OECDの環境健康安全プログラムの主要な内容

<p>■化学品プログラム</p> <ul style="list-style-type: none">◆国際調和と役割分担・テストガイドライン<ul style="list-style-type: none">・優良試験所基準 (GLP)・データの相互受入れと非加盟国の参加・新規化学物質・既存化学物質 ~ HPVプログラム・有害性の分類と表示の調和 ~ ILOと共同でGHSを策定◆意志決定のためのツール<ul style="list-style-type: none">・定量的構造活性相関 (QSAR) ~ Application Toolboxを開発・暴露評価 ~ 排出シナリオ文書の作成・リスク管理と持続可能な化学 <p>■その他のプログラム</p> <ul style="list-style-type: none">・PRTTR・農薬・バイオサイド・化学事故・バイオテクノロジーにおける規制の調和・新規の食料・飼料の安全性・工業ナノ材料の安全性

このうち、本事業と最も関係が深いのが「テストガイドライン」である。OECDテストガイドラインは、活動当初、OECD加盟国が独自に開発していた化学物質の安全性等に関する試験法について、試験結果を各国が共通に使用できるようにすることを目的に、OECDにおいて統一的な試験方法として定めたものである。

1981年のOECD理事会の「化学品評価におけるデータ相互受入れ(MDA)に関する決定」は、OECDテストガイドライン及びGLP (Good Laboratory Practice: 優良試験所基準) に基づくデータであれば、あるOECD加盟国において作成された試験データでも、ほかのOECD加盟国に受入れを求めた。OECDテストガイドラインは、信

頼できる試験方法を保証するだけでなく、実験動物の数を減らし、苦痛を最小限に抑えることも目指している。また、特定のテストガイドラインの必要性や適用方法、関連する科学分野の現状などを解説したガイダンス文書も作成されている。

OECDテストガイドラインは、五つの分野(Section)について100程度が策定されており、日本がリード国のものは、Section 2、Section 4、Section 5 で、それぞれ4つ、7つ、1つの計12となっている。

表I-4に分野毎に化審法との関連が深いものの例を挙げているが、現在、内分泌かく乱作用の評価や3R対応などのため、新規テストガイドラインの開発事業や既存テストガイドラインの改訂事業がいくつも進行している。

本研究開発事業による Bhas42 細胞を用いた形質転換試験法は、平成22年3月に Section 4: Health Effects における新規テストガイドラインの開発事業のうち、Project 4.54 のバリデーション事業として新規採択された。

◆Project 4.54: Validation a cell Transformation Assay Using Bhas 42 Cell Line for Detection of Nongenotoxic and genotoxic Carcinogens.

また、Bhas42 細胞を用いた形質転換試験法と密接な関係があるのは、以下の形質転換法である。

◆Project 4.5: New TG for in vitro SHE Cell Transformation Assay

Lead: France

Inclusion in work plan: 2003

Project status and milestones:

- Ongoing validation study by EC;
- EC Phase 1 of pre-validation finalized;
- Await the outcome of the validation study by EC
(anticipated to be finished by 2nd-3rd quarter of 2008)

◆Project 4.26: Cell Transformation Assay using Balb/c 3T3 Cell Line

Lead: Japan

Inclusion in work plan: 2007

Project status and milestones:

- EC pre-validation;
- Await the outcome of the validation study by EC
that is anticipated to be finished by 3rd-4th quarter of 2008.

表 I - 4 OECDテストガイドラインの例

Section 1: Physical Chemical Properties に係るガイドラインの例
107 Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method
117 Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method
Section 2: Effects on Biotic Systems に係るガイドラインの例
201 Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test
203 Fish, Acute Toxicity Test
205 Avian Dietary Toxicity Test
211 Daphnia Magna Reproduction Test
218 Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment
Section 3: Degradation and Accumulation に係るガイドラインの例
301 Ready Biodegradability C: Modified MITI Test (I)
302C Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II)
305 Bioconcentration: Flow-through Fish Test
Section 4: Health Effects に係るガイドラインの例
402 Acute Dermal Toxicity
403 Acute Inhalation Toxicity
407 Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents
408 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents
409 Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Non-Rodents
410 Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study
411 Subchronic Dermal Toxicity: 90-day Study
412 Repeated Dose Inhalation Toxicity: 28-day or 14-day Study
413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study
420 Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Method
422 Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test
423 Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method
425 Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure
440 Uterotrophic Bioassay in Rodents: A short-term screening test for oestrogenic properties
476 In vitro Mammalian Cell Gene Mutation Test
Section 5: Other OECD Test Guidelines

2. 2 事業の目的

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毒性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、短期間で精度良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、毒性既知の物質を実験動物に投与して遺伝子発現の変動を解析・データベース化すると共に、毒性未知の物質を投与した場合の毒性を予測する手法が検討されている。

本事業は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現解析等の最先端の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ものである。

2. 3 事業の位置付け

2. 3. 1 国内外の研究開発動向と事業の位置付け

平成17年度に実施した「化学物質の有害性試験方法開発の動向に関する調査」により、代替法の開発が進んでいない「技術の空白域」の毒性として、ECVAMの論文に基づき、代替に時間を要すると見込まれる慢性毒性、発がん性、生殖・発生毒性、皮膚感作性（広義には免疫毒性に含まれる。）が抽出された。これらの毒性に対しては、高精度でありながら簡易・安価な評価手法へのニーズが高いことが示されており、また、トキシコゲノミクスやヒト細胞等が代替法の精度向上につながる手法として期待されていることが示された。

加えて、欧州では、新たな化学物質規制（REACH）が2007年6月に施行され、また、我が国でも改正化審法が施行され、中小企業の負担増への懸念から、高機能簡易型有害性評価手法の開発への期待はますます高まっている。さらに、欧州での化粧品に関する規制の動き（すべての安全性試験の非動物実験化等）に対応できる代替法への期待も大きい。

【備考】2003年3月11日付けでEU化粧品指令第7次改正が公布された。その内容は、上市禁止と動物試験禁止であり、①ECVAMやOECDで承認された代替法があるものは即時禁止、②動物試験を2009年までに全面禁止、③現時点で考えられる代替法がない薬物動態・生殖毒性・反復投与毒性試験の禁止は2013年まで猶予するというもの。

II. 研究開発マネジメントについて

1. 事業の目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

●研究開発項目A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

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B-1（基本計画変更前）

「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」

遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、試験期間1ヶ月程度で腎臓等における発がん性を精度90%以上で予測する手法を開発し、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B-2（基本計画変更後）

「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」

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。

(2) 最終目標設定の根拠

●研究開発項目A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

発がん性・催奇形性・免疫毒性予測試験法については、迅速で安価に化学物質の毒性を評価できる動物実験代替法がないため、本開発で予測試験法を確立することとした。また、多色発光細胞化技術を用いる理由として、生物発光レポーター遺伝子の導入により、細胞毎に時系列で同時に2～3のマーカー遺伝子の発現量を迅速に計測できるという利点が挙げられる。

●研究開発項目B-1（基本計画変更前）

「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」

化学物質の安全性情報を取得するための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。そこで、ラット腎臓からのRNA抽出・精製法の開発と発がん性予測用マイクロアレイの開発を行い、開発した手法とマイクロアレイを用いて得られた遺伝子発現測定結果を基にして、腎臓等における発がん性を短期間で予測する手法を開発することとした。

●研究開発項目B-2（基本計画変更後）

「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」

28日間反復投与試験の結果が既知の化学物質を用いた短期動物実験を行い、多数の臓器の遺伝子発現状況をマイクロアレイにより解析し、化学物質の構造別あるいは臓器等の毒性別などに特有な遺伝子発現情報データセットを取得し、毒性学的知見とゲノム学的知見の統合に資することとした。

以上から、設定した目標は妥当と言える。

2. 事業の計画内容

2. 1 研究開発の内容

前項の目標を達成するために、以下の研究開発項目について研究開発を実施する。

- 研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」
- 研究開発項目 B-1 (基本計画変更前)
「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」
- 研究開発項目 B-2 (基本計画変更後)
「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」

本事業全体の実施スケジュールは、図Ⅱ-1に示すとおりである。

	H18	H19	H20	H21	H22
A 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発	←				→
(a) 発がん性予測試験法の開発	←				→
(b) 催奇形性予測試験法の開発	←				→
(c) 免疫毒性予測試験法の開発	←				→
(d) 基盤技術の開発	←				→
B-1 遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発	←	→			
B-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			←		→

図Ⅱ-1 事業全体の実施スケジュール

- 研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

(1) 研究計画の必要性

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。

本研究開発項目は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の技術を培養細胞に活用し、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。

(2) 研究開発の具体的内容 (図Ⅱ-2 参照)

(a) 発がん性予測試験法の開発

Bhas 42 細胞等を用いて、100物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また施設間評価試験を実施して1ヶ月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法の実験を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECDテストガイドライン(以下、OECD-TG)化に向けた国際提案の原案を作成する。

(b) 催奇形性予測試験法の開発

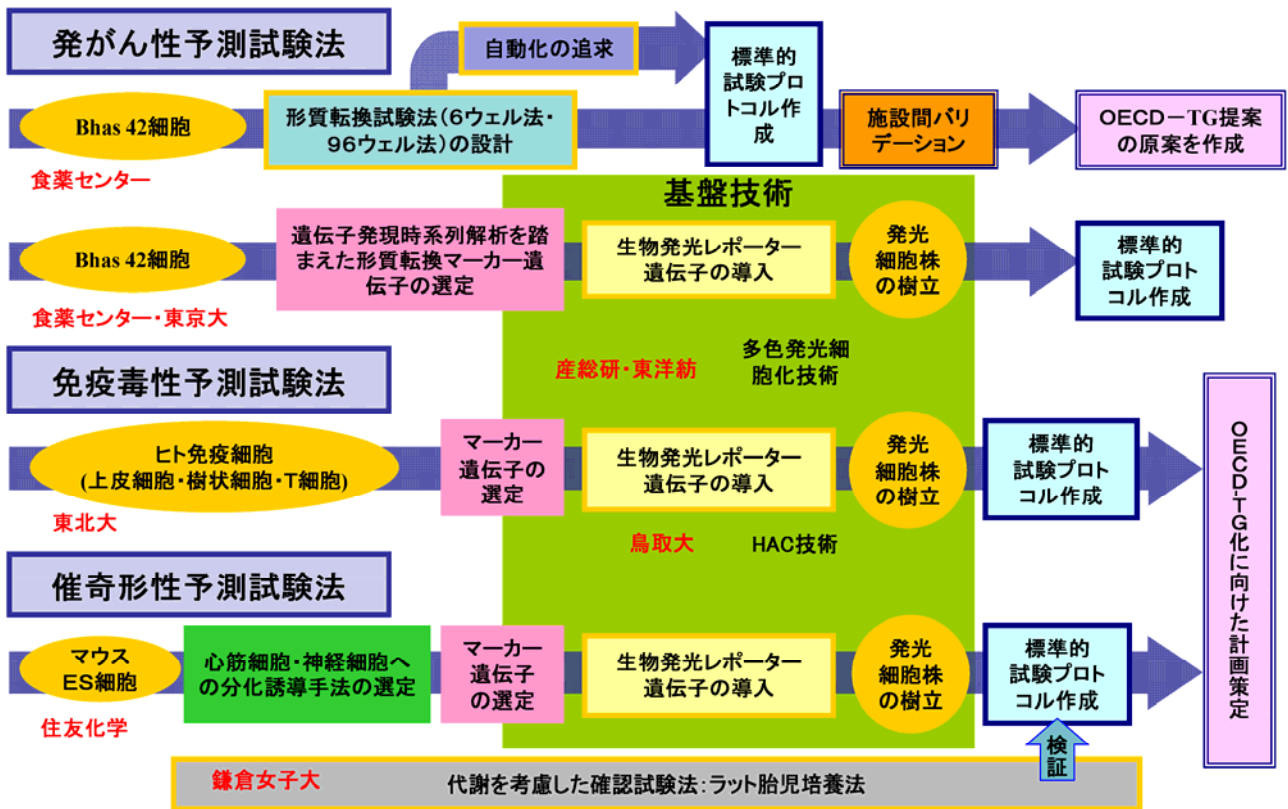
マウスES細胞が心筋、神経、筋・骨格系の各々へ分化する試験手順を開発し、100物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後20物質程度を用いて、催奇形性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験法を開発し、50物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。さらに、化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験法を開発する。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

免疫反応(化学物質で受けるストレスに対する生体防御反応)で重要な役割を担う、数種類の細胞(マクロファージ(異物を捕らえリンパ球に信号を出す)、リンパ球(異物の攻撃をつかさどる)、上皮細胞(化学物質の侵入の入口・免疫反応の場)等)について、免疫毒性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現や産生されるタンパク質との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で免疫毒性を検出する試験法を開発し、30物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。

(d) 基盤技術の開発

培養細胞を用いた毒性予測試験法を確立するため、各種細胞において見出された毒性発現にいたる過程に関与する複数の遺伝子をレポートする化学物質毒性評価用多色発光ルシフェラーゼ系を構築し、多色発光機能を組み込んだ発がんや免疫毒性評価細胞を樹立する。また、多色発光細胞株に適した標準的試験プロトコールを作成し、測定法を標準化する。併せて、評価用発光細胞の安定化と樹立の効率化を目指したヒト人工染色体技術の導入を検討する。



図Ⅱ-2 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

●研究開発項目 B-1 (基本計画変更前)「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」

(1) 研究開発の必要性

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。

こうした中、短期動物実験から遺伝子発現解析によってラット肝臓の発がん性を予測する手法で著しい進歩が見られており、その応用の拡大も期待されている。

本研究開発項目は、遺伝子発現等の技術を、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。

(2) 研究開発の具体的内容

ラット腎臓からのRNA抽出・精製法を開発し、また、腎臓に関する発がん性予測用マイクロアレイを開発する。開発した手法とマイクロアレイを用いて得られた遺伝子発現測定結果を基にして、腎臓における発がん性を予測する手法を開発する。併せて、開発を推進する過程で得られる遺伝子発現情報、毒性学的データを始めとする、文献及び公開データベース情報等を含めた、リレーショナルデータベースを構築する。

●研究開発項目B-2（基本計画変更後）「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」

(1) 研究開発の必要性

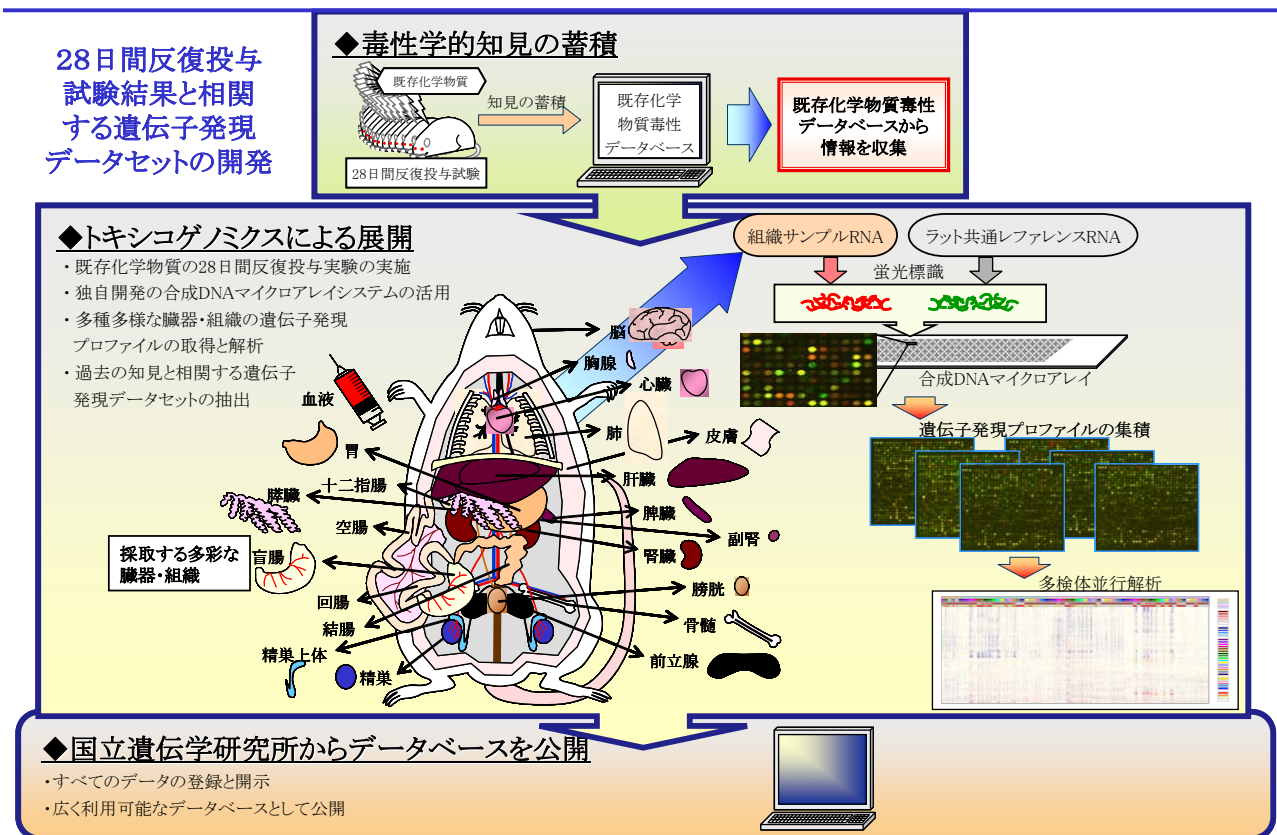
化学物質のリスク評価においては、一般的に細菌等を用いた簡便な試験や動物を用いた長期間の毒性試験によって評価の基礎となる有害性情報を取得しているが、このような簡易試験で得られる情報の種類は限られており、また、長期毒性試験についてはその費用や効率が課題として指摘されている。

こうした中、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。

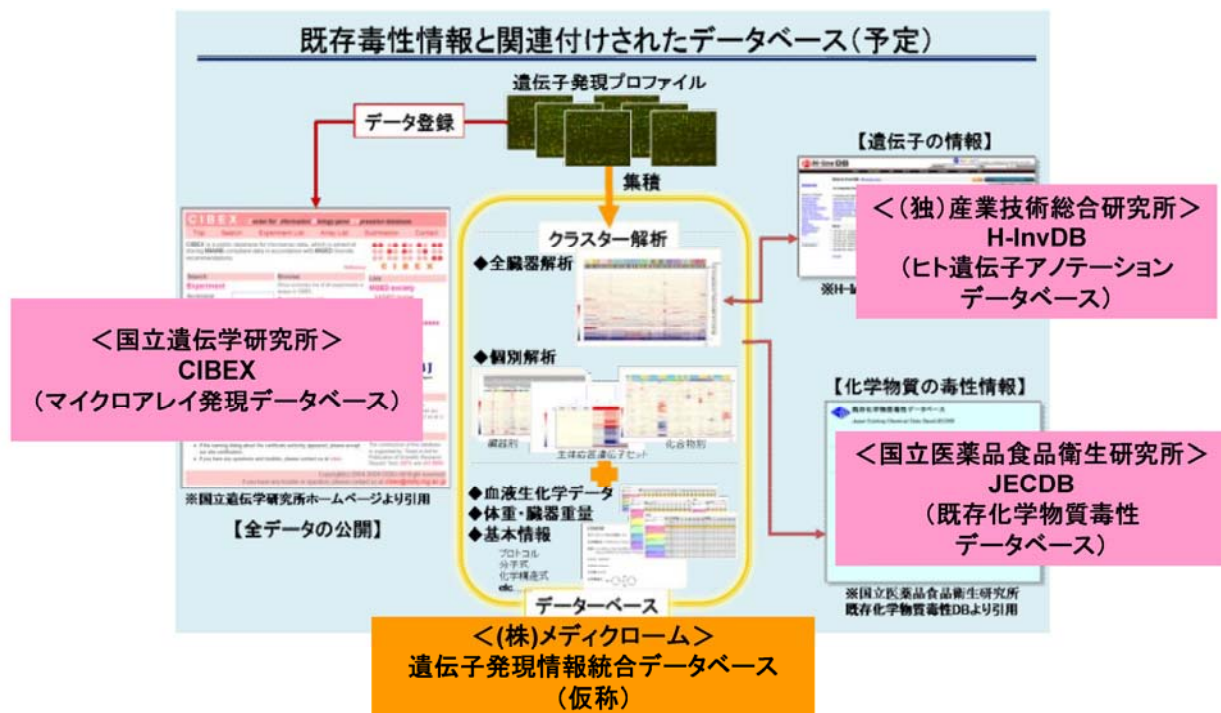
本研究開発項目は、遺伝子発現等の技術を動物に用いた短期試験に活用し、高機能で簡易な有害性評価手法を開発することを目的とし、化学物質のリスク評価管理の効率的な実施に貢献する。

(2) 研究開発の内容

28日間反復投与試験の結果が出ている40種類程度の化学物質を用いた短期動物実験を行って、20種類程度の各臓器の遺伝子発現状況をマイクロアレイにより解析する。この解析結果を基に、化学物質の構造別、あるいは臓器等の毒性別などに特有な、遺伝子発現情報データセットを検討する。また、得られたデータについては、順次公開し、政府及び民間等が活用可能な状況とする。（図II-3参照）



図II-3 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



図Ⅱ－４ 既存毒性情報と関連付けされたデータベースの構築

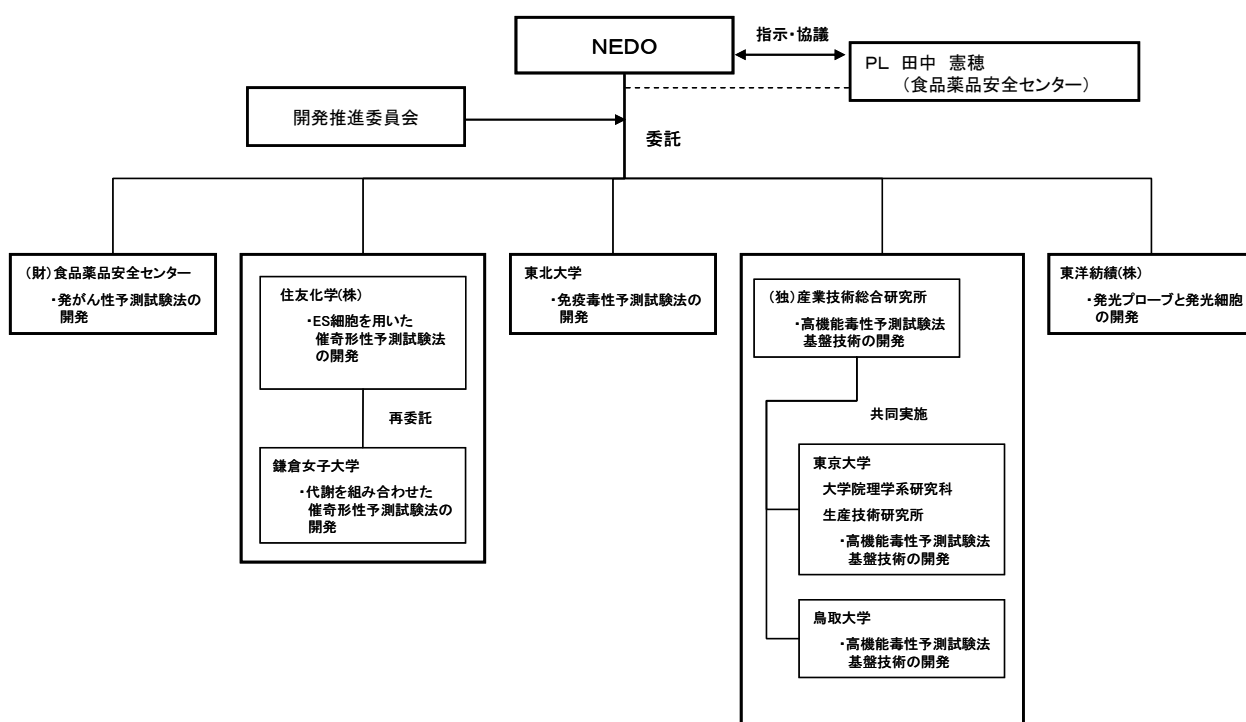
本事業で得られた各種化学物質または各種臓器における遺伝子発現プロフィールとその解析結果を編集・編纂し、一般の研究者にも容易に利用可能な基盤的参照データベースとして確立することを目的として、新規に「遺伝子発現情報統合データベース（仮称）」を構築する。本データベースを使用することにより、化学物質に対する生体応答の類似性を横並びに比較することができるため、新規化学物質の毒性予測ができる可能性がある。また、外部データベースとのリンクにより従来の毒性学的知見にゲノム学的知見を加えた新たな展開が期待できる（図Ⅱ－４）。

2. 2 研究開発の実施体制

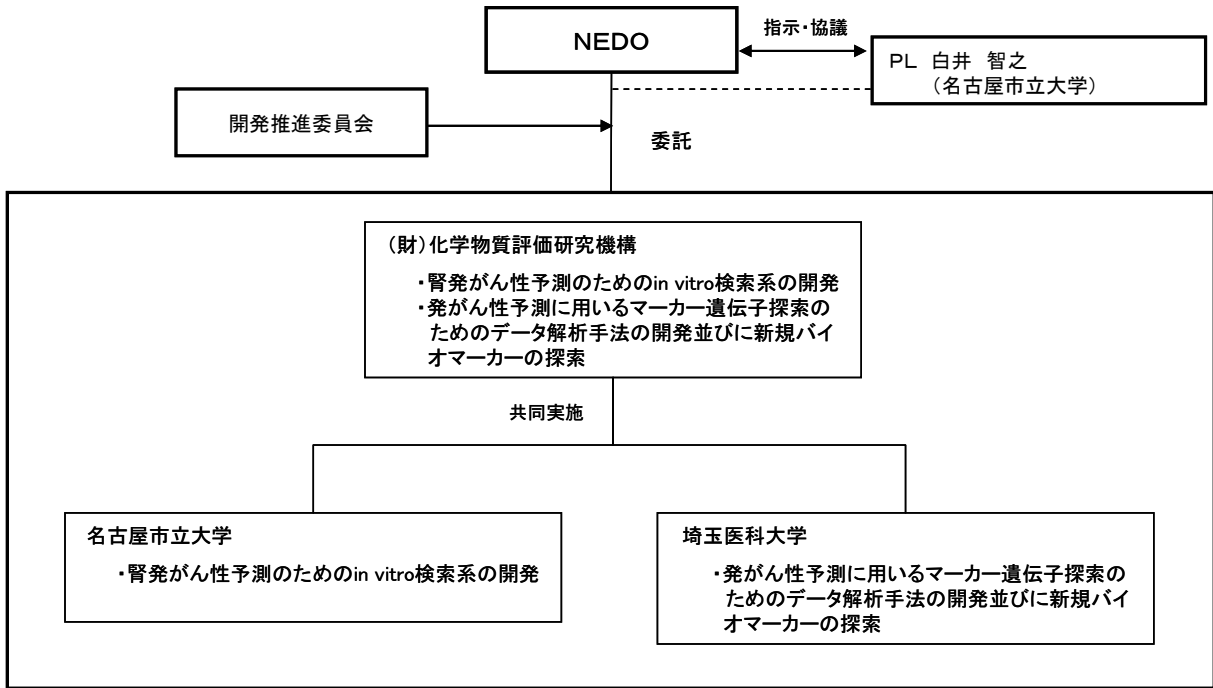
本研究開発は、NEDOが、単独又は複数の、原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関から公募によって研究開発実施者を選定後、委託契約を締結する研究体を構築し、委託して実施することとなっている。このため、研究開発項目AとB-1については、平成18年3月24日から4月24日に公募を行い、採択審査委員会を経て厳正な審査の結果、平成18年6月6日に委託予定先を決定した。

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することにより効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体にはNEDOが委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施することとなっている。このため、研究開発項目Aについては、財団法人食品薬品安全センター 代替試験法研究部長 田中憲穂氏を、研究開発項目B-1については、名古屋市立大学 教授 白井智之氏を、及び研究開発項目B-2については福島県立医科大学 教授 渡辺慎哉氏をプロジェクトリーダーとした。

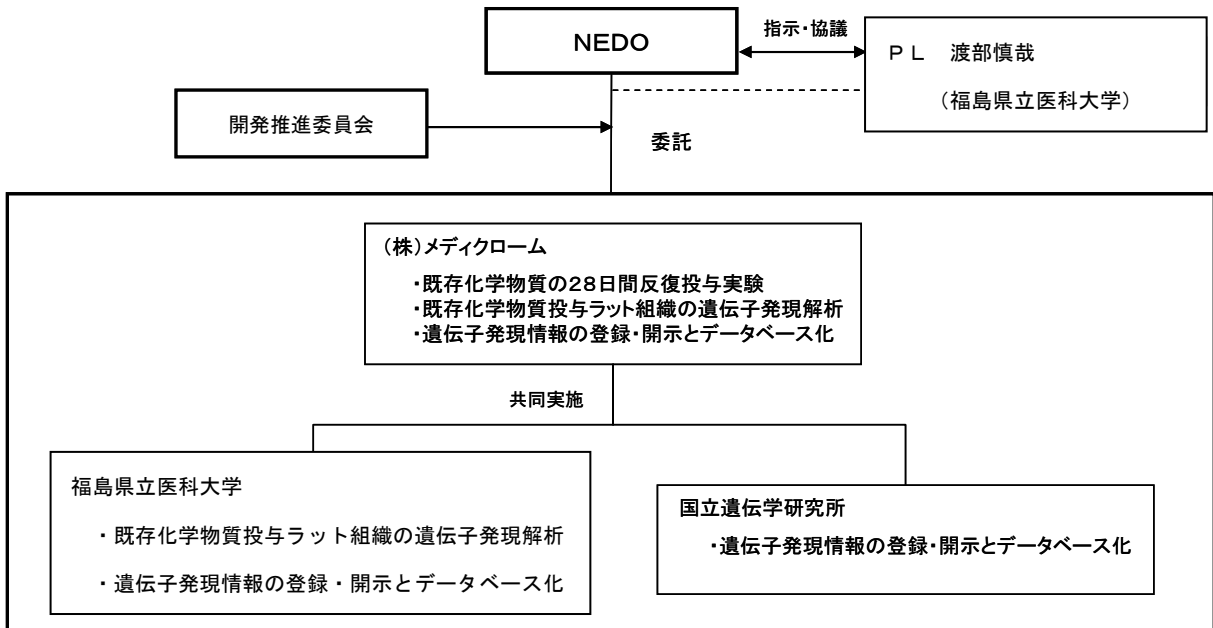
●研究開発項目A



●研究開発項目 B-1



●研究開発項目 B-2



2. 3 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及び研究開発責任者と密接な関係を維持しつつ、プログラムの目的及び目標、並びに本事業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、必要に応じて、技術検討委員会等を活用して、外部有識者の意見を運営管理に反映させるほか、四半期に一回程度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。

●研究開発項目A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

(1) 開発推進委員会

外部有識者の参加を得た開発推進委員会を以下のとおり年間2回程度開催した。

委員リスト（平成18年度～平成19年度）

三森 国敏 (委員長)	東京農工大学 農学部獣医学科 教授
江馬 眞	(独)産業技術総合研究所 安全科学研究部門招聘研究員
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 発がん研究部 部長
押村 光雄	鳥取大学大学院 医学系研究科 教授
戸倉 新樹	産業医科大学 医学部 教授
林 眞	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部長

委員リスト（平成20年度～平成21年度）

林 眞 (委員長)	(財)食品農医薬品安全性評価センター 技術統括部長
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 発がん研究部 部長
大沢 基保	元帝京大学教授 (財)食品薬品安全センター 研究顧問
筒井 健機	日本歯科大学 教授
戸倉 新樹	産業医科大学 医学部 教授
長尾 哲二	近畿大学 理工学部生命科学科 教授
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 室長

委員リスト（平成22年度）

牛島 俊和	国立がんセンター研究所 発がん研究部 部長
大沢 基保	元帝京大学教授 (財)食品薬品安全センター 研究顧問
筒井 健機	日本歯科大学 教授
戸倉 新樹	産業医科大学 医学部 教授 → 浜松医科大学 皮膚科学教室 教授
長尾 哲二	近畿大学 理工学部生命科学科 教授
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 室長

第1回	平成18年	9月26日	第一オカモトヤビル	25名
第2回	平成19年	3月7日	(財)化学物質評価研究機構本部	24名
第3回	平成19年	9月18日	虎ノ門実業会館会議室	28名
第4回	平成20年	3月6日	NEDO白金台研修センター	26名
第5回	平成20年	7月17日	NEDO川崎会議室	28名
第6回	平成21年	2月13日	NEDO川崎会議室	33名
第7回	平成21年	9月18日	NEDO川崎会議室	29名
第8回	平成22年	2月19日	NEDO川崎会議室	31名
第9回	平成22年	9月24日	NEDO川崎会議室	31名
第10回	平成23年	2月4日	NEDO川崎会議室	29名

(2) 運営会議

すべての事業参加者による運営会議を以下のとおり開催した。

平成18年度：(2回) 9月4日、2月20日

平成19年度：(2回) 7月19日、2月21日

平成20年度：(4回) 6月19日、9月18日、11月20日、1月15日

平成21年度：(4回) 5月15日、7月21日、12月11日、2月5日

平成22年度：(4回) 5月24日、7月23日、11月12日、1月14日

(3) 研究調整会議（平成20年度から開催）

平成20年度からは、各グループ間での研究連携強化のため、必要に応じて研究調整会議を開催した。

平成20年4月21日：免疫毒性評価用レポーター細胞作製について
(東北大学、産業技術総合研究所、東洋紡績、鳥取大学)

平成20年5月27日：催奇形性評価用レポーター細胞作製について
(住友化学、産業技術総合研究所、東洋紡績、鳥取大学)

平成20年9月5日：発がん性評価用レポーター細胞作製について
(東京大学、食品薬品安全センター、産業技術総合研究所)

平成21年4月6日：発がん性評価用レポーター細胞作製について
(食品薬品安全センター、産業技術総合研究所)

平成21年4月21日：免疫毒性評価用レポーター細胞作製について
(東北大学、産業技術総合研究所、東洋紡績、鳥取大学)

平成21年4月24日：催奇形性評価用レポーター細胞作製について
(住友化学、産業技術総合研究所、東洋紡績、鳥取大学)

平成21年5月28日：発がん性評価用レポーター細胞作製について
(食品薬品安全センター、産業技術総合研究所)

平成22年6月10日：催奇形性評価試験系の確立について

(住友化学)

平成22年6月29日：免疫毒性評価試験系の確立について

(東北大学)

(4) 田中憲穂PLとNEDO担当者による研究現場訪問（平成19年度から実施）

平成19年度から、共同実施先の研究内容等を中心に事業の進捗確認と見直しを図るため、田中憲穂PL及びNEDO担当者が参加組織の研究現場へ赴き、具体的な研究進捗状況を確認し、意見交換を行った。

平成19年 6月14日：(財)食品安全センター秦野研究所

平成19年 7月25日：住友化学(株)生物環境科学研究所

平成19年 7月30日：(独)産業技術総合研究所関西センター

平成19年10月12日：東北大学医学部皮膚科相場研究室

平成19年12月27日：鎌倉女子大学秋田研究室

平成20年 2月 4日：鳥取大学医学系押村研究室

平成20年 2月19日：東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所

平成22年 7月27日：東洋紡績(株)敦賀バイオ研究所

平成22年 8月 5日：鎌倉女子大学秋田研究室

●研究開発項目B-1（基本計画変更前）

「遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発」

(1) 開発推進委員会

外部有識者の参加を得た開発推進委員会を以下のとおり開催した。

委員リスト（平成18年度～平成19年度）

三森 国敏	東京農工大学 農学部獣医学科 教授
牛島 俊和	国立がんセンター研究所 発がん研究部 部長
江馬 眞	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 総合評価研究室 室長
押村 光雄	鳥取大学大学院 医学系研究科 遺伝子機能工学部門 教授
戸倉 新樹	産業医科大学 医学部 教授
林 眞	国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部 部長

第1回 平成18年12月 5日 (財)化学物質評価研究機構本部 20名

第2回 平成19年 3月 7日 (財)化学物質評価研究機構本部 24名

●研究開発項目B-2（基本計画変更後）

「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」

(1) 開発推進委員会

外部有識者の参加を得た開発推進委員会を以下のとおり年間2回程度開催した。

委員リスト（平成20年度～平成22年度）

田中 憲徳 (委員長)	(財)食品薬品安全センター秦野研究所 代替試験法研究部 部長
今井 清	(財)食品農医薬品安全評価センター 常勤技術顧問 → 非常勤顧問
平野 隆	(独)産業技術総合研究所 セルエンジニアリング研究部門主幹研究員 →産学連携業務推進部門 産学官連携コーディネーター
水沢 博	(独)医薬基盤研究所 生物資源研究部 部長 →国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員
山添 康	東北大学大学院薬学研究科 医療薬学講座 薬物動態学分野 教授

第1回	平成20年10月	2日	NEDO川崎会議室	17名	
第2回	平成21年	3月	9日	NEDO川崎会議室	19名
第3回	平成21年10月	6日	NEDO川崎会議室	21名	
第4回	平成22年	3月10日	NEDO川崎会議室	19名	
第5回	平成22年	9月27日	NEDO川崎会議室	18名	
第6回	平成23年	2月23日	NEDO川崎会議室	20名	

2. 4 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

2. 4. 1 実用化につなげる戦略

●研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

VMT (Validation Management Team) 委員会の役割は、本研究で開発中の Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験の基本的な方法について客観的な評価を行なう為、5～6 施設の国際共同研究で実施する国際バリデーションスタディについてアドバイスを受ける委員会である。本試験法の国際的な普及にむけて、国内委員に加え海外の専門家にも助言と指導を受けた。

国内及び海外専門家による VMT 委員会（7 名）

氏名	所属・役職	専門領域
ラファエラ・コルビー	ECVAM 研究員 (EU)	発がん性試験/ 動物実験代替法
アビー・ヤコブ	ICCVAM (アメリカ)	発がん性試験
ウィリアム・ストークス	NIEHS (アメリカ)	動物実験代替法
レオナルド・シュクトマン	前 ICCVAM 会長 (アメリカ)	形質転換試験/ 動物実験代替法
林 真	財団法人食品農医薬品安全性評価センター	細胞遺伝学、変異遺伝
小島 肇	国立医薬品食品衛生研究所	代替試験法のバリデーション
森田 健	国立医薬品食品衛生研究所	化学物質安全性評価

VMT 委員会アドバイザー

大森 崇	京都大学	統計専門家/ 動物実験代替法
------	------	----------------

ECVAM : 欧州動物実験代替法評価センター、ICCVAM : 米国動物実験代替法評価センター
NIEHS : 米国国立環境保健科学研究所、

第 1 回	平成 20 年 10 月 29 日、30 日	食薬センター秦野研究所	18 名
第 2 回	平成 21 年 11 月 9 日、10 日	NEDO 白金台研修センター	23 名
第 3 回	平成 22 年 10 月 6 日、7 日	NEDO 川崎会議室	20 名

●研究開発項目 B-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」

(1) 「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」の研究成果の実用化等に関する検討委員会

本プロジェクトの研究成果を実用化するために、外部有識者を招いて知識・情報・意見等を交換し検討を行うために、委員会を開催した。

相場 節也	東北大学大学院医学系研究科神経・感覚器病態学 皮膚科学講座 教授
今井 清	財団法人食品農医薬品安全性評価センター 技術顧問アドバイザー
北嶋 聡	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 毒性部 第 5 室 室長
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
広瀬 明彦	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 総合評価研究室 室長
山田 隆志	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 安全審査課 研究専門官
田中 憲穂	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 部長
斎藤 幸一	住友化学株式会社 生物環境科学研究所 分子生物グループ グループマネージャー

アドバイザー

斉藤 文代	一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究第一部 研究第一課 副長
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 サブプロジェクトリーダー

オブザーバー

今田中 伸哉	一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究企画部長 研究第二部長
赤堀 有美	一般財団法人化学物質評価研究機構 安全性評価技術研究所 研究企画部 主任

第1回 平成22年11月18日 NEDO日比谷会議室 16名

第2回 平成22年12月24日 METI会議室 22名

2. 4. 2 実用化につなげる知財マネジメント

●研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

当初の方針では、知的財産権の取得を前提として開発を進めており、積極的に特許出願を実施してきた。将来、積極的に進めてきた知的財産権の取得が、開発した試験法の広い一般使用に支障となることがあれば、その時点でその支障の排除を考慮することとした。

その結果、平成19年度1件、20年度2件、21年度7件、22年度1件の特許出願を実施し、知的財産権の取得を推進した。

●研究開発項目 B-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」

中間評価において、「ホームページ上での遺伝子発現プロファイルの公開は本プロジェクトの公益性に鑑みて評価できるが、知的財産権の取得を前提として開発を進めて欲しい。」との指摘を受けたため、遺伝子発現プロファイルの全てを直ちに公開し、特許出願はしないという当初の方針から、新規性・有用性があるものを選択し特許出願等の知的財産権確保措置を実施後に公開する方針へ変更した。

その結果、平成20年度1件、21年度4件、22年度5件の特許出願を実施し、知的財産権の取得を推進した。

3. 情勢変化への対応

(1) 先行プロジェクトの事後評価を踏まえた研究開発項目Bの変更【添付資料③—1)～3) 参照】

事業開始から数か月が経過した平成18年11月24日に、平成17年度で終了した先行研究開発事業である「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」（P01004）の事後評価が実施され、

- ・発がん性を遺伝子発現で予測するための手法の科学的根拠が希薄である。
- ・肝臓のみのデータ取得にとどまっている。
- ・得られたデータが未公開である。

といった指摘を含む評価が下された。このため、この先行プロジェクトとの関わりが強い本研究開発事業を平成19年2月以降全面的に見直し、特に、同じ戦略で実施していた研究開発項目B-1（遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験法の開発）を平成19年8月末をもって中止した。プロジェクト基本計画を見直し、全臓器を対象とした反復投与試験と相関する遺伝子発現データセットの取得・蓄積を目的とし、得られたデータを公開する研究開発項目B-2を新たに設定し、公募により新たな委託先を採択した。

(2-1) 研究開発項目Aの共同実施先変更

研究開発項目Aについても、平成19年度下期から、より効率的な発光細胞製作のため、共同実施先として鳥取大学を追加し、押村研究室が有するHAC技術を導入した。また、平成20年度から、研究開発課題の集中化のため、共同実施先である東京大学生産技術研究所の研究開発課題「組織複合培養法による毒性評価法の開発」を中止した。

(2-2) 研究開発項目B-2の開発項目追加

平成22年度に重点的に、先に取得した遺伝子発現変動データの高度活用のため、肝臓等で毒性が発現する際に特徴的に影響を受ける遺伝子の解析に取り組んだ。

(3) 研究開発項目AとB-2に対する加速資金の投入と効果

①加速資金の投入

平成20年度 122百万円

研究開発項目	委託先	目的、理由	実施内容	金額 (百万円)
A	(財)食品薬品安全センター	形質転換試験法の一層のハイスループット化	自動測定装置を6ウェル法から96ウェル法に改造する機械の改造	10
		発がん性予測試験法としてのBhas 42細胞を用いた形質転換試験法の開発に関連して、OECD-TG提案を早期化する	バリデーション試験(Phase I)の施設間試験	30
	産業技術総合研究所／鳥取大学	HACベクター導入による発光細胞群作成の効率化及びハイスループットマルチ発光測定による評価法の最適化	発光測定装置、多色ルミノメーター等の購入	20
	東北大学	免疫毒性予測試験法に係わる候補遺伝子	リアルタイムPCRの購	20

		の評価において、当初想定していなかった数十種の候補遺伝子が見つかったので、効率的な絞込みが必要になった	入	
B-2	メディック ローム	投与する既存化学物質を 40 物質に拡大し、また、解析する臓器を 15 臓器に拡大するためマイクロアレイ作成装置の増設が必要になった	マイクロアレイ作成装置 購入、試薬購入	4 2

平成 2 1 年度 7 9 百万円

研究開 発項目	委託先	目的、理由	実施内容	金額 (百万円)
A	(財)食品 薬品安全 センター	発がん性予測試験法としての Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発に関連して、OECD-TG 提案を早期化する	Bhas42 細胞の特性解析と Phase II バリデーション試験	3 8
	産業技術 総合研究 所	国際バリデーションに必須の発光標準品として 3 種の発光酵素の大量生産・精製・安定化手法の開発、及びその発光強度の値づけ手順の確立を行う	異なるタイプの発光スペクトル測定装置の購入と 研究員増員	1 3
	東北大学	免疫毒性予測試験法に係わる評価用発光細胞の開発において、候補細胞の効率的選別により高品質な細胞株を樹立させる	選別作業を自動化するためのフローサイトメーター購入と研究員増員	1 7
B-2	メディック ローム	中間評価での指摘事項である成果公開前の特許出願業務に関わる費用を補填する	マイクロアレイ解析に関する消耗品	1 1

平成 2 2 年度 3 5 百万円

研究開 発項目	委託先	目的、理由	実施内容	金額 (百万円)
A	(財)食品 薬品安全 センター	発がん性予測試験法としての Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発に関連して、OECD-TG 化を推進する	6 ウェル法と 96 ウェル法による国際バリデーション結果を OECD 提出報告書としてまとめる	4
	住友化学	催奇形性予測試験法に係わる評価用発光細胞の開発において、OECD-TG 提案を早期化する	細胞の特性解析と導入遺伝子解析	1 3
	東北大学	免疫毒性予測試験法に係わる評価用発光細胞の開発において、OECD-TG 提案を早期化する	細胞の特性解析と導入遺伝子解析	1 8

②加速による効果

●研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

加速資金投入により、基盤技術開発と3つの予測試験法において、当初の目標を1年以上先行して達成することができた。特に発がん性予測試験法の開発においては、当初はOECD-TG提案の準備完了を目標にしていたが、加速により平成21年度中に提案申請を行うことができた。

●研究開発項目 B-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」

加速資金投入により、当初目標にしていた以上に多くの臓器を対象とした遺伝子発現データセットを開発することができた。また、特許出願後のデータ公開に方針を転換し、10件の特許出願を行うことができた。

加速による効果

研究開発項目	テーマ	項目	平成22年度末の加速前目標設定と加速後目標達成状況	
			加速前	加速後
A	(a) 発がん性予測試験法の開発	OECD-TG化	提案に必要な詳細レビューペーパーの原案作成まで	計画よりも1年以上先行し、平成21年度中に提案申請を行った。
	(b) 催奇形性予測試験法の開発	OECD-TG化	試験法の標準プロトコルの確定まで	樹立した評価用発光細胞の品質安定性を明確にし、施設間差確認試験を先行実施した。
	(c) 免疫毒性予測試験法の開発	OECD-TG化	試験法の標準プロトコルの確定まで	多くの遺伝子と候補細胞を効率的に選別し、評価用発光細胞を多数樹立した。細胞の品質安定性を明確にし、施設間差確認試験を先行実施した。
	基盤技術	評価用発光細胞の樹立と標準化	発光細胞の樹立まで	発光細胞の樹立に加えて、国際バリデーションに必須の発光標準酵素の安定化と発光測定標準化を確立した。
B-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	遺伝子発現データセットの充実化	ターゲットは5～10臓器	マイクロアレイ作成装置の増強により、26臓器の情報を獲得することができ、78のデータセットを確立した。
		知財権の確保	考慮せず	新規性、有用性があるバイオマーカー遺伝子を選択し、特許出願を10件(但しH23年度に10件追加)実施した。

4. 中間評価結果への対応

(1) 総論

実施方針または実施計画書に反映させることにより、指摘事項への対応を図った。特に、試験法バリデーションの実施、知的財産権の確保、成果の公表と普及、プロジェクト間の研究協力等に注力した。

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」の中間評価の反映について

平成21年3月19日 企画調整部、研究評価広報部、環境技術開発部

総論

問題点・改善すべき指摘点	対処方針	計画等への反映
<p>【1】日本発の OECD テストガイドラインの実現に向けた試験法バリデーションの実施には、本事業終了後も予算面を含む長期的なフォローアップが必要であり、かつ、早い段階からのグローバルな発信が必要である。既に良い結果が得られている試験法については多施設バリデーションなど早期に取り組むことが望ましい。</p>	<p>日本発の OECD テストガイドラインの実現に向けた取は、経済産業省の環境安心イノベーションプログラム基本計画に明記されており、長期的なフォローアップが期待できる。研究開発項目 A の催奇形性予測手法・免疫毒性予測手法については、効率的標準化の方法を調査・検討しつつ、バリデーションの前提となる合理的プロトコルの確立に早期に取り組んでいく。</p> <p>また、グローバル発信として、第 7 回国際動物実験代替法会議(2009年8-9月ローマ)での成果発表をはじめ、国際誌への論文投稿等を進める。</p>	<p>平成 21 年度実施方針及び実施計画書に反映</p>
<p>【2】なお、研究テーマ間で進捗内容に差がみられることから、課題の絞り込みや研究資源の再配分・重点化なども検討すべきである。</p>	<p>テーマ間での資源再配分等を検討し、目標達成への貢献度の低いもの、例えば、遺伝子発現時系列解析や肥満細胞の検討を中止する等の重点化を行う。</p>	<p>平成 21 年度実施方針に反映</p>
<p>【3】生み出された技術の保護・活用のためには、特に知的財産権の視点を重視した研究マネジメントが必要である。</p>	<p>本事業は、知的財産権の確保に配慮しつつも、国際標準化や知的基盤の整備に向けた取組を優先させるという統一的戦略の下に実施することとした。</p>	<p>研究開発項目 A については、計画等への反映はなし</p> <p>研究開発項目 B-2 については、平成 20 年度実施方針に反映済み、引続き平成 21 年度実施方針に反映</p>
<p>【4】本事業の成果は、化学物質政策及び規制等へ反映させていくことが重要であり、OECD のテストガ</p>	<p>国内の標準化を視野に入れ、学会、民間団体を通じて成果の普及に努める。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>

<p>イドライン化だけではなく、国内の標準化に対しても働きかける指針を示していく必要がある。</p>		
<p>【5】成果の商品化・商業化など、民間活動の活性化への展開方法をプロジェクトの後半で明確にして、日本企業・経済の発展につなげるべきである。</p>	<p>例えば、成果の一つであるハイスループット化のための自動化測定機器については、展示会へ出品する等により普及に努めている。</p>	<p>計画等への反映はなし</p>
<p>【10】催奇形性予測試験法、免疫毒性予測試験法では、ガイドライン化への到達には、プロトコルの確立とともに、データの再現性、試験法の頑健性などについての十分な詰めが必要である。</p>	<p>OECD のガイダンス文書 34 に従い、施設間等の再現性等を評価するバリデーションスタディを実施し、その結果を総括してプロトコルを作成する。</p>	<p>計画等への反映はなし</p>
<p>【11】遺伝子発現データベースによる成果の公開は、広い成果の実用化を促す上で有効であるが、ユーザーニーズに合わせたデータベース設定の骨格を明確にするとともに、関連データベースとの接点の持たせ方についてより挑戦的な展開が期待される。</p>	<p>データ公開しながらユーザーの声を聴き、ユーザーニーズに合わせたデータ項目等を明確にし、改修していくとともに、遺伝子発現データとフェノタイプとの整合性の観点等から、関連する毒性データベース等との接点の持たせ方を検討し、開発を進める。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>
<p>【14】研究テーマ毎の達成度に応じた設定目標の見直しも必要である。発がん性予測試験法以外については、現在の研究状況では早期にテストガイドライン化を達成することは困難であると推察される。</p>	<p>研究開発項目 A の催奇形性予測手法・免疫毒性予測手法については、御指摘のとおり、早期にテストガイドライン化を達成することは困難である。効率的標準化の方法を調査・検討しつつ、基本計画に定められた最終目標である合理的プロトコルの確立（テストガイドライン化の前提となる。）に取り組んでいく。</p>	<p>平成 21 年度実施方針に反映</p>
<p>【16】研究実施の上で「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」と「遺伝子発現データセットの開発」との間の関連性が低く、今後、どのように協力して行くのが良いか検討することが望まれる。</p>	<p>両研究開発項目には、それぞれ異なる技術的背景があり、互いに独立性が高いものの、遺伝子発現解析を行っている観点では関連性があるため、研究開発項目 A の P L が研究開発項目 B - 2 の開発推進委員会の委員長を務め、両研究開発項目の関連付けを既に図っている。</p>	<p>平成 20 年度実施計画書に記載済み</p>

(2) 個別テーマ

●開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」

実施方針または実施計画書に反映させることにより、指摘事項への対応を図った。特に、評価用細胞の性状解析と品質管理、代謝影響と視覚評価のための全胚培養法の確立、標準プロトコールの共有化、免疫毒性評価システムの構築等に注力した。

開発項目 A

問題点・改善すべき指摘点	対処方針	計画等への反映
【22】 発がん性予測試験法では、開発細胞における CYP (チトクローム P-450) の発現状況を明らかにするなど学問的な背景を整備するとともに、OECD テストガイドライン化に重点を置き、取り進めを早めることが望まれる。	Bhas42 細胞について、分子生物学的性状の解析を進め、さらに、海外の機関が品質管理された細胞を利用できるよう公的細胞バンクへ寄託済みであり、英文の補助文書の整備を進める。	平成 21 年度実施計画書に反映
【23】 催奇形性予測試験法では、サリドマイドによる催奇形性を予知できる系の確立が急務である。	サリドマイドによる催奇形性を予知するため、代謝影響を評価できる試験法の確立に取り組む。	平成 21 年度実施方針に反映
【24】 ガイドライン化には、催奇形性を評価するための肉眼的な異常を示す 3 次元構造の違いに結びつく新たなマーカーや指標の組み合わせなどを検討する必要がある。	ラット胎児を用いた視覚的な催奇形性評価法である全胚培養法と発光細胞法とのデータ比較による新たなマーカー検討等を行う。	平成 21 年度実施計画書に反映
【25】 免疫毒性予測試験法では非特異的な免疫反応に絞っているが、化学物質の幅広い免疫毒性の評価には、外界からの細菌、ウイルスなどの異物に対する特異性を評価する試験法が求められる。	本事業では、一般産業用化学物質に対する免疫毒性評価法に重点を置いて、その確立を目指す。外界からの異物に対する特異性評価については、本事業の範囲外である。	計画等への反映はなし
【26】 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発では、遺伝子導入細胞を作製するだけにとどまらず、多指標型の毒性評価システムとして完成されることを期待する。	本事業の範囲外である。当初基本計画を的確に実施し、着実に成果を出すことに注力する。	計画等への反映はなし
【27】 レポーター遺伝子アッセイをベースとした手法では、今後の開発戦略について公的な評価機関と情報交換を行うとともに、統一性を念頭に置いた標準プロトコールの共有化を可能にする方向性も考慮して欲しい。	【14】 の再掲。後段の御指摘については、統一性を念頭に置いた標準プロトコールの共有化を可能にする方向性も考慮する。	平成 21 年度実施方針に反映

<p>【28】 免疫毒性に関しては臨床上の問題点を中軸にして、追求すべき内容を明確にする必要がある。</p>	<p>臨床上の問題点を4つ（免疫賦活作用、アレルギー誘発作用、自己免疫誘発作用、免疫制御）に整理し、これらと関連付けて免疫毒性評価システムの構築に取り組む。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>
---	--	-------------------------

●開発項目 B-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」
 実施方針または実施計画書に反映させることにより、指摘事項への対応を図った。特に、被検化学物質の増大、知的財産権確保、標準プロトコールの公表と標準化、得られたデータの信頼性向上、毒性バイオマーカーの抽出等に注力した。

開発項目 B-2

問題点・改善すべき指摘点	対処方針	計画等への反映
<p>【32】 遺伝子発現データベースは、既存化学物質を対象とした新規化学物質を含まない遺伝子版毒性データベースであるが、今後は被験物質数や用量段階を増やしてデータベースとして充実させて欲しい。</p>	<p>事業予算内で、被験物質の構造・作用機序カテゴリーの多様性を確保すべく被験物質数の増大に努めるとともに、特に必要性が認められる場合には、用量段階を増やすことも検討する。</p>	<p>計画等への反映はなし</p>
<p>【34】 ホームページ上での公開は本プロジェクトの公益性に鑑みて評価できるが、知的財産権の取得を前提として開発を進めて欲しい。</p>	<p>【3】 の再掲。遺伝子発現プロファイルをすべて直ちに公開し、特許出願はしない方針から、新規性・有用性があるものを選択し特許出願等の知的財産権確保措置を実施後に公開する方針へ変更した。</p>	<p>平成 20 年度実施方針に反映済み、引続き平成 21 年度実施方針に反映</p>
<p>【35】 動物実験についても、倫理的に適正に行われていることについて確認する必要がある。</p>	<p>実施者が動物実験委員会を設置し、外部有識者によるレビューを取り入れているところ。今後も、動物実験委員会や開発推進委員会によるレビュー等で確認していく。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>
<p>【37】 生データの羅列でなく、研究領域、機能別に提示するなど分かりやすく、また利用しやすく成果を公表し、国内外の標準化に向けて展開して欲しい。</p>	<p>【11】 の再掲。後段の御指摘については、ノウハウを盛り込んだ標準プロトコールを公表し、標準化に資することとしている。</p>	
<p>【38】 遺伝子発現解析の再現性、個体差などの信頼性に関して議論を詰める</p>	<p>特異的な発現変化を示す遺伝子群について別法、再実験等による検証を行う。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>

<p>【41】研究のスピードアップとともに、得られたデータに関しては、個体数やサンプル数との相関や、暴露濃度の選択についての手法の妥当性を裏付ける根拠を明確に示し、遺伝子プロファイル取得の信頼性を示す必要がある。</p>	<p>現状の事業予算内では、更なるスピードアップを図ることは困難であるものの、再実験（個体数やサンプル数が増える）や別法による検証を行うことを優先し、信頼性を示す。</p>	<p>平成 21 年度実施計画書に反映</p>
<p>【42】多くの化学物質に対する各臓器内の遺伝子発現データベース構築にとどまらず、投与物質のカテゴリとバイオマーカーとを連関させる新たな技術開発や、遺伝子発現パターンと実際の各臓器に対する毒性を比較し、データベースの有用性などについても検討を望む。</p>	<p>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。これらの中から各臓器に対する毒性に関連付けられる毒性バイオマーカーを抽出する。さらに、新規性・進歩性などの特許権利化の観点から有用性について検討する。</p>	<p>平成 20 年度実施方針に反映済み、引続き平成 21 年度実施方針に反映</p>
<p>【43】遺伝子発現に関しては、mRNA レベルの観点だけでなく、Non-Coding RNA のような制御因子との関連を取り込んでいくことを推奨する。</p>	<p>本事業の範囲外である。当初基本計画を的確に実施し、着実に成果を出すことに注力する。</p>	<p>計画等への反映はなし</p>

5. 評価に関する事項

(1) 事前評価

①事前評価書【添付資料⑤-1) 参照】

「高機能簡易型有害性評価手法の開発 (石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)」

- ・実施時期 平成17年10月31日
- ・評価手法 内部評価
- ・評価事務局 バイオテクノロジー・医療技術開発部

事前評価結果 (抜粋)

5. 総合評価

石油精製物質等の有害性を簡易に評価する手法は、石油産業のみならず、広く化学物質の健康影響評価あるいは基準・規制の立案に資する点からも実現が望まれる技術である。これまでの手法に比べて高精度かつ簡易な手法を確立し、あわせて検査コストの削減に資する本プロジェクトは、NEDOの実施する事業として適切であると判断する。

②NEDO POST 3【添付資料⑤-2) 参照】

「高機能簡易型有害性評価手法の開発 (石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)」

- ・実施時期 平成18年1月

NEDO POST 3 18年度新規研究開発プロジェクト(案) 概要

高機能簡易型有害性評価手法の開発(石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)

目的

背景、目的、必要性

①背景：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得られる物質(石油精製物質)には、消費者の身近で使用される製品も多く、安全・安心な市民生活を確保するため、その有害性評価を簡易かつ迅速に行うための手法が求められている。

②市場ニーズ(目的)：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性が課題として指摘されている。

③技術ニーズ：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目ざされており、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ラット肝臓の発癌性を予測する手法で著しい進歩が見られており、その応用の拡大も期待されている。

規模

○事業費と研究開発期間：18年度事業費想定約5億円、研究開発期間5年

内容

○研究開発課題

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発
 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ヶ月程度で発癌性、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ルを取り纏める。

②遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発
 遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、試験期間1ヶ月程度でラット腎臓等における発癌性を予測する手法を開発し、標準的な試験プロトコルを取り纏める。

○キーテクノロジー、ブレークスルーのポイント、オリジナリティ

①細胞、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術、遺伝子発現時系列解析技術
 ②腎臓等の臓器の発がん性試験予測手法開発に対応できるトキシコゲノミクス技術

○目標値(技術水準)とその条件および設定理由(根拠)

①目標値
 ・培養細胞を用いた有害性評価手法の開発：試験期間1ヶ月程度。国際標準化に対応できる試験法
 ・遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発：試験期間1ヶ月程度。予測精度90%以上

②設定根拠
 培養細胞を用いた研究例から現実的な目標値として設定。遺伝子発現技術を用いた方法については目標値レベルの進展がみられると認識し設定。

技術戦略マップ上の位置付け

化学物質総合管理分野ロードマップの、「リスク評価・管理技術開発」のうち、「科学的かつ合理的な有害性評価「体系」の構築」-「簡易有害性評価の開発」に位置付けられる。

その他関連図表

培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

細胞
 ・遺伝子操作
 ・分化誘導、他

培養・処理
 ・器具、培地
 ・化学物質投与

測定
 ・自動計測
 ・多色発光

データ解析・判定
 多色発光装置
 発光抽出
 フォーカス抽出

細胞の網膜で、発がん性、催奇形性、免疫毒性を予測

遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験手法の開発

ラット短期試験
 ・化学物質投与
 ・採材

RNA抽出・精製
 ・抽出精製条件
 ・保存条件、他

マイクロアレイ測定
 ・ハイブリダイゼーション条件

データ解析・判定
 データベース
 発がん性予測

マイクロアレイの遺伝子発現パターンからラット腎臓がん様態予測

2006年1月 現在

③「高機能簡易型有害性評価手法の開発基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について【添付資料⑤－3）参照】

- ・実施時期 平成18年2月17日
- ・評価手法 第三者評価
- ・評価事務局 バイオテクノロジー・医療技術開発部

パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
1. 研究開発の実施方式		
(2)研究開発の運営管理		
<p>できあがった方法からバリデーションしていかないと5年ではOECDガイドラインへの提案にたどり着けません。特にOECDを意識するならば、国際的なバリデーションが必要であり、大変な時間がかかります。一方、バリデーションが済んでいない方法でデータを溜めても、欠点が後から見つかった場合、すべてのデータが無になる場合も考えられます。</p> <p>20-40 物質を用いて1-2年で試験法プロトコルを開発して頂き、バリデーションをしながら、試験法をもんで行く手法をお勧めします。</p> <p>バリデーションや評価には動物実験代替法学会やJaCVAMをご利用して頂ければ幸いです。</p>	<p>ご指摘のと通りの課題認識をし、計画を具体化する所存であります。本研究開発は、国内・国際でのバリデーション（施設間評価試験）を行いながら進める考えであり、これを通じて課題を抽出し解決しながら開発を進める考えです。また、バリデーションは動物実験代替法学会殿やJaCVAM殿に参画・関与しておられる企業・研究機関殿、特にGLP（Good Laboratory Practice）機関殿のご助力を頂きながら行うことになろうと予想致しております。</p>	<p>特になし。 （現状で反映済み）</p>

(2) 中間評価

- ・実施時期 第1回分科会（平成20年11月5日）
第20回研究評価委員会（平成21年2月18日）
- ・評価手法 第三者評価
- ・評価事務局 評価部
- ・評価項目、基準 標準的評価項目・評価基準に基づく

中間評価結果（抜粋）

1. 総論
1) 総合評価 予測性が高く効率的な有害性評価手法の開発は、国民の安全な生活を確保する上で重要性が高く、安全な化学物質の開発促進にもつながることから、NEDO の事業として意義がある。 本事業では目標が明確に設定され、チャレンジングな課題に対し先端技術を応用して動物実験代替法の開発につながる成果を上げ、中間目標を達成している。化学物質のリスク評価・管理に関して、世界をリードする技術開発であり、グローバル・スタンダードに向けた技術確立に十分資すると評価する。 日本発のOECD テストガイドラインの実現に向けた試験法バリデーションの実施には、本事業終了後も予算面を含む長期的なフォローアップが必要であり、かつ、早い段階からのグローバルな発信が必要である。既に良い結果が得られている試験法については多施設バリデーションなど早期に取り組むことが望ましい。なお、研究テーマ間で進捗内容に差がみられることから、課題の絞り込みや研究資源の再配分・重点化なども検討すべきである。 生み出された技術の保護・活用のためには、特に知的財産権の視点を重視した研究マネジメントが必要である。
2) 今後に対する提言 新たに開発された培養細胞を用いた有害性評価手法が国際的に認められるためには、OECD の基準に従った施設内及び施設間バリデーションによる細胞の組み合わせによる試験プロトコールの完成と再現性・頑健性の確認など、かなりの作業が必要である。これらの作業を見込んだ長期計画を立てて国際的な実用化を推進すべきであり、これらに対する国およびNEDO の支援を期待したい。一方、研究テーマ毎の達成度に応じた設定目標の見直しも必要である。発がん性予測試験法以外については、現在の研究状況では早期にテストガイドライン化を達成することは困難であると推察される。 「遺伝子発現データセットの開発」では、ユーザー側に立った実用化への展望が明確にされていないため、改善の必要がある。また、既存のデータベースに加えて、フェノタイプの変化とジェノタイプの変化との関連付けができるような構造設定が望まれる。 また、研究実施の上で「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」と「遺伝子発現データセットの開発」との間の関連性が低く、今後、どのように協力して行くのが良いか検討することが望まれる。

評価委員（リスト）

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」

中間評価分科会委員名簿

（平成20年11月現在）

	氏名	所属、肩書き
分科 会長	おおの やすお 大野 泰雄	国立医薬品食品衛生研究所 副所長
分科 会長 代理	ふじまき ひでかず 藤巻 秀和	独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター 高感受性影響研究室 室長
委員	えんどう ひとし 遠藤 仁	ジェイファーマ株式会社 代表取締役 CEO
	おかべ さとし 岡部 聡	北海道大学大学院 工学研究科 環境創生工学専攻 教授
	くろさわ つとむ 黒澤 努	大阪大学大学院 医学系研究科 実験動物医学教室 准教授
	すがの みつこ 菅野 美津子	株式会社東芝 研究開発センター 機能材料ラボラトリー 主任研究員
	ほりい いくお 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

敬称略、五十音順

研究評価委員会
委員名簿（敬称略、五十音順）

職 位	氏 名	所属、肩書き
委員長	西村 吉雄	国立大学法人東京工業大学 監事
委 員	伊東 弘一	早稲田大学 理工学術院総合研究所 客員教授（専任）
委 員	稲葉 陽二	日本大学 法学部 教授
委 員	大西 優	株式会社カネカ 顧問
委 員	尾形 仁士	三菱電機エンジニアリング株式会社 取締役社長
委 員	小林 直人	独立行政法人産業技術総合研究所 理事
委 員	小柳 光正	国立大学法人東北大学大学院 工学研究科バイオロボティクス専攻 教授
委 員	佐久間一郎	国立大学法人東京大学大学院 工学系研究科精密機械工学 精密機械工学専攻 教授
委 員	菅野 純夫	国立大学法人東京大学大学院 新領域創成科学研究科 メディカルゲノム専攻 教授
委 員	富田 房男	放送大学 北海道学習センター 所長
委 員	架谷 昌信	愛知工業大学 工学部機械学科 教授・総合技術研究所所長
委 員	平澤 洽	東京大学名誉教授
委 員	吉原 一紘	アルバック・ファイ株式会社 技術開発部 理事

(3) 事後評価

- ・実施時期 分科会（平成23年8月17日）
研究評価委員会（平成 年 月 日）
- ・評価手法 外部有識者による
- ・評価事務局 評価部
- ・評価項目、基準 標準的評価項目・評価基準に基づく

NEDO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について、外部有識者による研究開発の事後評価を平成23年度に実施する。

評価委員（リスト）

	氏名	所属・役職
分科会長	白石 寛明	国立環境研究所 環境リスク研究センター センター長
分科会長代理	吉岡 義正	大分大学 教育福祉科学部 教授
委員	板垣 宏	横浜国立大学大学院 工学研究院 機能の創生部門 教授
委員	川本 俊弘	産業医科大学 医学部 衛生学講座 教授
委員	津田 修治	岩手県環境保健研究センター 環境研究指導専門員
委員	藤原 道夫	アステラス製薬株式会社 研究部 安全性研究所 開発毒性研究室 室長
委員	堀井 郁夫	ファイザー株式会社 グローバルコンサルタント

敬称略、五十音順

Ⅲ. 研究開発の成果について

1. 事業全体の成果

本事業全体として、最終目標を大幅に達成することができた。

以下に概要を記述する。

●研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」について

(a) 発がん性予測試験法の開発（食薬センター、東京大学理学系研究科、産総研）

① Bhas 42 細胞を用いた発がん性予測試験法のガイドライン化のための評価

Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法のガイドライン化のための評価では、遺伝子操作で導入した *v-Ha-ras* について詳細な項目にわたる性状解析を進め、安定した品質の細胞株であることを確かめた。

また、6 ウェル試験法によるバリデーションを国内 6 施設、海外 2 施設で実施し、再現性・安定性を評価した。さらに、96 ウェル試験法を用いたバリデーションを海外 3 施設で 2 度実施し、その結果を 2 度の VMT ミーティングで説明し、高い評価を得た。

Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の提案書を平成 22 年 1 月末に OECD に提出し、3 月の OECD-WNT 会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。これは、計画していた研究開発の具体的な内容（OECD-TG 化に向けた国際提案の原案を作成する。）よりも約 1 年早い進捗である。

② Bhas 42 細胞を用いた発がん性予測試験法のハイスループット化

Bhas 42 細胞形質転換試験を 96 ウェル法にて実施し、一連の作業を自動化する機能を有するシステムを開発した。手作業と同様の結果を得ている。

一方、発光 Bhas 42 細胞を用いた試験法の開発では、形質転換に係る細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に解析して、形質転換マーカー遺伝子 (*Mmp10*) を絞り込み、平成 21 年度末には、2 色発光 Bhas 42 細胞 1 株を樹立した。

(b) 催奇形性予測試験法の開発（住友化学、鎌倉女子大学、鳥取大学）

① ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発

心筋細胞、神経細胞、筋・骨格系細胞への分化誘導法を確定した。

心筋細胞については、心筋分化過程で発現が変動する 13 種類の遺伝子の中から絞り込んだマーカー遺伝子 2 種 (*Hand1*、*Cmya1*) に係る発光細胞株を樹立した。基本プロトコールを作成後、45 化合物にて高い予測精度を確認した。その後、国内 4 施設でプレバリデーションを実施し、再現性・安定性等を評価した。また、細胞の性状解析を進め、安定した品質の細胞株であることを確かめた。

神経細胞については、神経分化過程で発現が変動する 22 種類の遺伝子の中から絞り込んだマーカー遺伝子 1 種 (*Reln*) に係る発光細胞株を樹立し、基本プロトコールを作成した。

② 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法 (WEC) の開発

ラット全胚培養法にラット代謝酵素 (S-9 mix) を組み合わせ、代謝による被験物質の変化を考慮した催奇形性予測試験法を開発した。

24穴プレートと酸素透過フィルムを用いた培養装置を開発し、培養用の血清を採取する動物数の削減とハイスループット化を達成した。

ES細胞を利用した催奇形性予測試験法（EST）とWECの試験法を組み合わせることにより、代謝機能を考慮した、より *in vivo* に近い毒性予測が可能であることがわかった。

（c）免疫毒性予測試験法の開発（東北大学、東洋紡績）

① 発光細胞の樹立と評価

DNA array を用いた解析により決定された、5種類の化学物質による免疫毒性の指標となる評価遺伝子7種類（HMOX-1、IL-1 β 、IL-8、IFN- γ 、IL-10、IL-4、IL-22）に関して、樹状細胞・表皮細胞・T細胞に係る2色・3色の発光細胞株を樹立した。

樹立した発光細胞に対して、化学物質刺激に対する応答性の確認、細胞培養法、発光測定法を確立した。

② 免疫毒性評価システムの構築

樹立した発光細胞（IL-8、IL-2/IFN- γ 、IL-1 β /IL-8、HMOX-1 レポーター細胞）により、免疫学的作用が既知の化学物質15～24種類の免疫毒性評価を行い、免疫評価システム1～4が免疫学的作用（感作性、免疫賦活/免疫抑制、酸化ストレス）を適切に評価できることが明らかになった。

2種類の発光細胞用の施設間差試験プロトコールを作成後、国内5施設でプレバリデーションを実施し、再現性・安定性等を評価した。また、細胞の性状解析を進め、安定した品質の細胞株であることを確かめた。

（d）基盤技術の開発（産総研、東洋紡、鳥取大学）

① 多色発光システムの高精度化と測定法の標準化

発光プローブの応答性を向上させた細胞内半減期が短い多色発光ルシフェラーゼの創製、及び細胞内安定性や耐熱性が向上した赤色発光プローブの改良に成功した。

一方、多色発光システムの高精度化を目指し、標準発光物質として値付けされたルシフェラーゼタンパク質の作製法及び長期安定保存法の開発、さらには外部機関等への供給体制を構築した。さらには値付けられたルシフェラーゼタンパク質を標準光源の代替とした発光測定装置ルミノメーターの絶対感度校正法を確立した。

② ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築

毒性評価発光細胞の安定化及び効率的な作成法を確立するため、ヒト人工染色体（HAC）技術を活用、HAC発光ベクターを導入した免疫毒性評価用細胞を樹立した。樹立した評価細胞は化学物質を感度よく評価でき、併せて樹立した細胞間のクローナルバリエーションが少ないことを明らかにした。

また、多色発光プローブとHACベクターをマルチインテグレーションシステムで融合させた多色発光遺伝子導入システムの開発に成功、複数の遺伝子を効率よく、染色体の特定部位に導入することが可能になった。

●研究開発項目B-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」について

① 28日間反復投与試験実施と遺伝子発現プロファイルの取得

国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベースに登録されている化学物質の中から40種類の対象化学物質を選択し、該データベースに記載のプロトコールに従って28日間反復投与実験を行った。その後、主要臓器・組織（ラット一匹当たり24～26種類程度）の採取、これらからの遺伝子発現解析用RNAサンプルの取得、遺伝子発現プロファイル取得と解析を実施した。平成22年度末までに3,611種類のRNAサンプルを採取し、1,028種類の遺伝子発現プロファイルを取得した。

② 遺伝子発現データセットの開発

化学物質投与群と対照群の間で発現レベルに有意差のある遺伝子群を抽出するなどして、生体応答遺伝子発現データセットを78セット取得した。さらに、生体応答遺伝子発現データセットを用いたクラスタ分析をすることにより、各化学物質の類似性・相違性が判別できた。また、これらの遺伝子発現解析結果は、国立医薬品食品衛生研究所の既存化学物質毒性データベースに記載の各種所見との相関があることが判明した。

③ 遺伝子発現情報統合データベースの構築

平成22年度末までに委託先である（株）メディクロームに「遺伝子発現情報統合データベース」のプロトタイプを構築した。目的は、動物実験から得られた遺伝子発現変動解析結果を、一般の研究者にも利用可能な基盤的参照データベースとして確立することにある。本データベースを使用することにより、化学物質に対する生体応答の類似性を横並びに比較することができるため、新規化学物質の毒性予測ができる可能性がある。

そのために、CIBEX（マイクロアレイ発現データベース）：国立遺伝学研究所、H-InvDB（ヒト遺伝子アノテーションデータベース）：産業技術総合研究所、JECDB（既存化学物質毒性データベース）：国立医薬品食品衛生研究所などの外部データベースとリンクを張る予定である。

また、CIBEXに遺伝子発現プロファイルに係る全ての生データ（1,025プロファイル）を登録し公開した。

上記により、基本計画で定めた最終目標（平成22年度末）の達成度は、表Ⅲ.1-1のとおりである。

なお、研究開発項目B-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」については、基本計画を改訂し、平成19年8月に中止したことから、達成度の評価を省略する【添付資料⑦-1）参照】。

表Ⅲ.1-1 最終目標（平成22年度末）の達成度

研究開発項目	最終目標	研究開発成果	達成度
A 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発	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。	短期間での発がん性、催奇形性及び免疫毒性予測評価試験方法を開発し、標準的な試験プロトコル作成を終了。発がん性では、OECD-TG提案済み。催奇形性及び免疫毒性では、OECD-TG提案に向けてプレバリデーションを実施した。	◎
B-2 28日間反復投与試験と関連する遺伝子発現データセットの開発	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発現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。	40種類の化学物質を反復投与し、最大26臓器で1,028種類の遺伝子発現プロファイルを取得・解析し、78種類の生体応答遺伝子発現データセットを同定した。また、新規に「遺伝子発現情報データベース」のプロトタイプを構築した。	◎

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

1. 1 成果物

本事業に係る外部発表及び特許出願のリストを、表Ⅲ. 1-2 に示す。【添付資料⑥-1) ~ 4) 参照】

表Ⅲ. 1-2 成果物の集計表

●研究開発項目 A： 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発
年度別論文、総説等、特許、報道、講演等の件数一覧

年度	論文	総説、解説、著書	特許	報道	講演、学会発表
平成18年度	1	3	0	2	25
平成19年度	10	17	1	3	40
平成20年度	15	3	2	0	32
平成21年度	10	1	7	2	41
平成22年度	14	1	1	0	26
計	50	25	11	7	164

●研究開発項目 B-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
年度別論文、総説等、特許、報道、講演等の件数一覧

年度	論文	総説、解説、著書	特許	報道	講演、学会発表
平成19年度	0	0	0	0	0
平成20年度	0	0	1	0	0
平成21年度	0	0	4	0	0
平成22年度	1	1	5	0	1
計	1	1	10	0	1

但し、平成23年度に特許を10件追加出願した。

また、受賞実績を以下に記す。

第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会

優秀演題賞「ES細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討」

住友化学株式会社

鈴木紀之、斉藤幸一、安藤寛、堀江宣行

H21.11.14

1. 2 成果の普及・啓蒙活動

●研究開発項目A：培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

(1) バイオジャパン 2008 (横浜パシフィコ) でのシンポジウム開催

2008年10月15日～17日に開催されたバイオジャパン2008において、10月15日NEDO当該プロジェクトに関するセミナーが開催され、約200名の会場で満席の参加者のもと、NEDO五十嵐主任研究員、田中憲穂PL、及び近江谷克裕SPLの3名がそれぞれ担当の立場で「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」に関するプロジェクト中間期の成果内容を中心に発表され、好評を得た。

(2) 国際動物実験代替法学会 (WC7、ローマ) での発表並びにブース展示

2009年8月29日～9月3日にローマで開催されたWC7では、口頭発表4件、ポスター発表2件を行い、国際的な参加者のもとでも当該プロジェクトの成果は好評を得た。この他、ブース展示も行い、このために新たに作成した当該プロジェクト紹介用のパンフレットを配備し、参加したプロジェクト関係者が代わる代わるブースを訪れる方々に当該プロジェクトの成果を説明した。

(3) NEDO成果特別シンポジウム開催 (日本動物実験代替法学会 H21 年度、H22 年度年会)

NEDO当該プロジェクト成果に関する特別シンポジウムがH21年度(11/13～15の年会開催期間中の11/14)並びにH22年度(12/3～5の年会開催期間中の12/5)にそれぞれ学会事務局に企画していただき、シンポジウムを開催した。基本的にはNEDO推進側の立場、田中PLの概要、そして発がん性、催奇形性、免疫毒性の試験法開発に関して、当該プロジェクトの後半期の目覚ましい成果内容が発表され、その進捗度が際立った時期でもあり、それぞれの開催で極めて高い評価を得た。

(4) NCR3 形質転換試験法に関する特別ワークショップ (H22 年 11 月 ロンドン)

2010年11月9日に開催されたNCR3主催の形質転換試験に関するワークショップにBhas 42細胞を用いた形質転換法を開発した食薬センターのチームが招待され、非遺伝毒性物質の検出に有用なアッセイ法に関する内容を報告した。本ワークショップでは、主に①機器を使って定量する必要性(赤外線、酵素反応、画像解析などで分析)、②非遺伝毒性物質の検出に有用な試験法、③発がん機構の解析に有用なアッセイ法、などの観点から数々の報告がなされた。食薬センターのチームに関する報告では、高い注目度を得、大変好評であった。

(5) 新規発光レポーターアッセイ法の紹介 (H23 年 1 月、ZEBET ベルリン、ECVAM イスプラ)

産業技術総合研究所で開発されている化学物質評価用発光細胞を用いた技術を、欧州の代替法専門家に紹介し、意見を伺う目的で、ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)およびZEBET(ドイツ代替法バリデーションセンター)を訪問した(訪問者:近江谷克裕、丹羽一樹(以上、産総研)、小島 肇(国立衛生研)、なお、丹羽はECVAM訪問のみに参加)。近江谷がセミナーでその技術を説明するとともに、今後の共同研究も視野に意見交換を行った。それぞれ、発光技術に関する問題に興味を持った研究者が多かったという印象を得、バリデーション等を含めた、共同研究推進の可能性が感じられた。

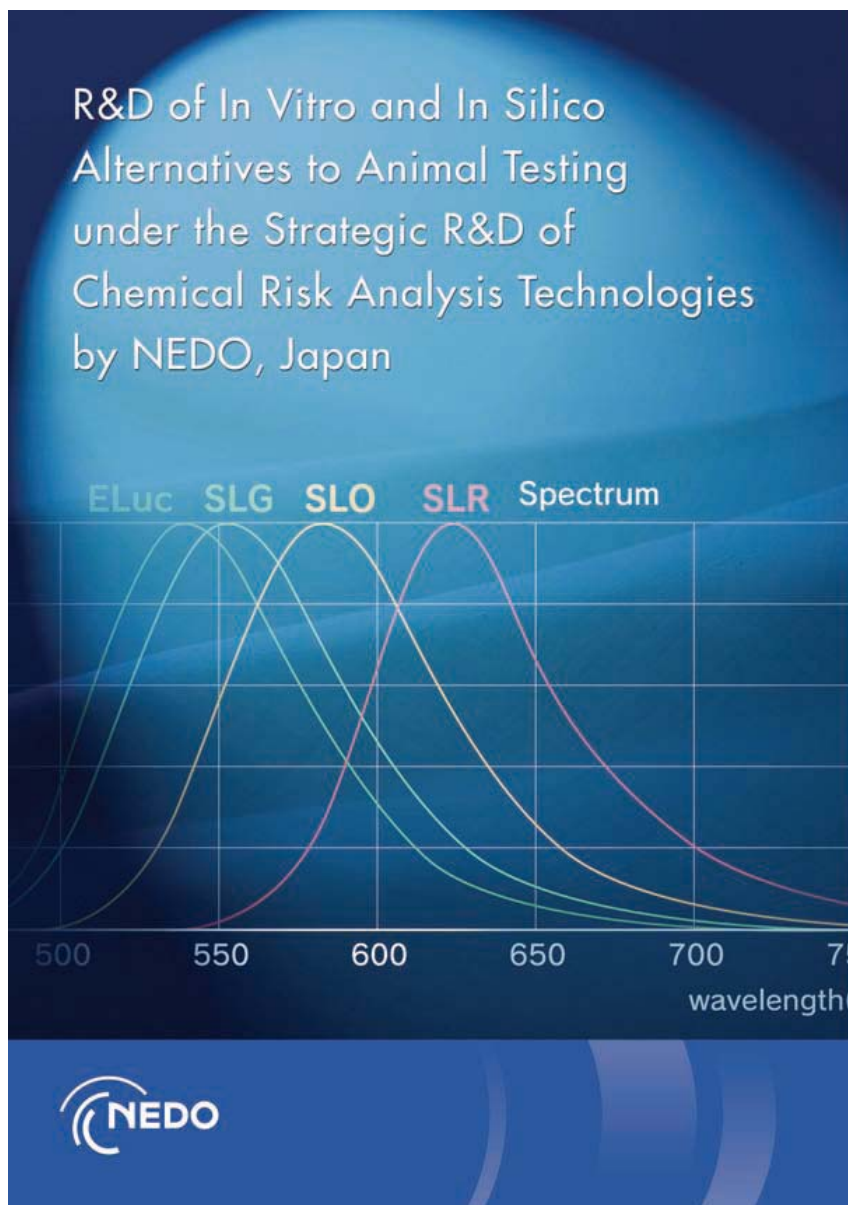
(6) 海外主要研究者の招聘 (Hornst Spielmann、Thomas Hertton、William Stokes)

海外主要研究者の招聘としては、Hornst Spielmann（2回：2006年10月並びに2011年2月）、Thomas Herton（2006年12月）、William Stokes（2010年10月）の3氏であり、プロジェクト成果に関して、それぞれ専門分野で有益な意見交換を行い、OECDガイドライン化等に向けた今後の計画にとって極めて良い結果を得た。なお、Hornst Spielmann氏は発生毒性に関する動物実験代替試験法の専門家でプロジェクト中の催奇形性予測試験法の開発にとって、Thomas Herton氏は動物実験代替法の専門家で発がん性、免疫毒性、催奇形性予測試験法開発にとって、またWilliam Stokes氏は毒性全般の広い知識を持った方で免疫毒性予測試験法等の多色発光システムによるレポーターアッセイ法活用にとって、それぞれ有益な意見交換を行ったものである。

（7）パンフレットの作成

平成21年度、本プロジェクトの成果を普及するために英文パンフレットを作成し、以下のように国内外研究者に配布するとともに、NEDOホームページで公開している。

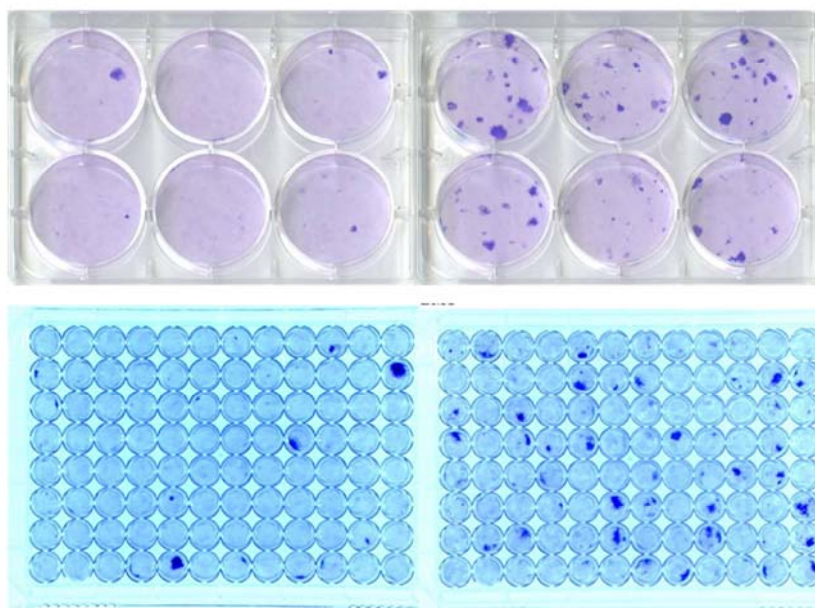
- ① 100部配布：7th World Congress on Alternatives to Animal Experimentation, Rome on August 30 - September 3, 2009



平成22年度、研究開発項目A「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」の成果を普及するために英文パンフレットを作成し、以下のように国内外の研究者に配布するとともに、NEDOホームページで公開している。

- ① 300部配布：第23回日本動物実験代替法学会学術大会
平成22年12月3日～5日 北里大学薬学部 東京
- ② 40部配布：Advisory Group on Molecular Screening and Toxicogenomics,
Washington DC on 6-7 December 2010
- ③ 200部配布：日本動物実験代替法学会・J a C V A M合同ワークショップ
「動物実験の3Rにおける国際動向」
平成23年2月14日 東京大学駒場キャンパス
- ④ 30部配布：AXLR8-2 Workshop, Berlin on 22-25 May 2011

High-throughput Assay Systems That Use Cultured Cells Developed by NEDO



New Energy and Industrial Technology Development Organization

●研究開発項目B-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

(1) データベースへの登録

平成21年度から国立遺伝学研究所の公的データベースへ遺伝子発現情報を登録・開示し始め、現時点(平成23年8月2日)において、本プロジェクトで取得した化学物質の反復投与に係る全ての生データ(1,025プロファイル)の登録・開示が完了している。

(2) 新規データベースの構築

遺伝子発現情報をもとにして、一般の研究者に利用しやすい形に編纂した遺伝子発現変動解析結果を開示・利用するための新規データベースの構築に着手している。

(3) パンフレットの作成

平成23年10月、研究開発項目B-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」の成果を普及するために和文と英文パンフレットを各500部作成し、国内外の研究者に配布するとともに、NEDOホームページで公開する予定である。

2. 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」の成果

2. 1 概要

2. 1. 1 各有害性評価手法開発の概要

各有害性評価手法の具体的な研究開発内容は以下の通りである。

(a) 発がん性予測試験法の開発

Bhas 42 細胞等を用いて、100物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また、施設間評価試験を実施して1か月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法を開発を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECDテストガイドライン（以下「OECD-TG」という。）化に向けた国際提案の原案を作成する。

(b) 催奇形性予測試験法の開発

マウスES細胞が心筋、神経、筋・骨格系のそれぞれへ分化する試験手順を開発し、10物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後20物質程度を用いて、催奇形性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1か月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験法を開発し、50物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。さらに、化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験法を開発する。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

免疫担当細胞であるT細胞、樹状細胞および上皮細胞を対象に、既存の知見から着目すべき遺伝子を選定する。また、5種類の化学物質、すなわちDinitrochlorobenzene、NiCl₂、ディーゼルエンジン排気微粒子、ホルマリン、メチル水銀で刺激後、遺伝子発現解析を行い、免疫毒性評価の指標となる遺伝子を選定する。次に、選定した遺伝子のプロモーター支配下に発光機能を組み込んだT細胞、マクロファージ、上皮細胞の培養株を開発し、免疫毒性評価細胞とする。更に、本開発を通じて得られた知見を基にしてOECDテストガイドライン化に向けた課題を整理し対応策を策定する。

(d) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発

産総研は寿命の短い多色ルシフェラーゼを開発し、また細胞の発光を時系列的に測定する技術を開発する。鳥取大は、ヒト人工染色体ベクターを用いることで毒性評価用培養細胞にモニターとなる遺伝子の導入を簡便に行う技術を開発する。

2. 1. 2 最終目標に対する達成度

研究開発課題毎の最終目標に対する達成状況を、表Ⅲ. 2. 1-1 に示した。

表Ⅲ. 2. 1-1 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」最終目標の達成度

研究開発課題	最終目標 (平成 22 年度末)	最終目標の達成状況	達成度
(a) がん性予測試験法の開発	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 か月程度でがん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。	[Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発] Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法について、1) 98 物質を調べ in vivo のデータと比較した、2) 6 ウェル法と 96 ウェル法の同等性を確認した、3) 国内・国際バリデーションを実施した。さらに、Bhas 42 細胞の性状解析を行った。その結果、OECD-TG 収載のためのデータが十分に揃ったことから、OECD に SPSF (Standard Project Submission Form) を提出した。 また Bhas 42 細胞形質転換試験のハイスループット化を目指し、1) 培養細胞を用いた毒性試験の基本的な一連の作業(細胞の播種、被験物質の処理、培地交換など)を行う自動化システムを開発した、2) 過酸化水素と生存細胞に反応する色素を組み合わせることで、形質転換をマイクロプレートリーダーで客観的にかつ迅速に定量する方法を開発した(日米：特許審査中、欧：特許取得)。	◎
		[発光 Bhas 42 細胞を用いた試験法の開発] Bhas 42 細胞形質転換において、発がんプロモーター処理により発現が増加する遺伝子をスクリーニングし、マトリックスメタロプロテインゼン 10 遺伝子を選択した。次にこの遺伝子を Bhas 42 細胞に導入し、よく発光するクローンを 6 株樹立した。さらにその中から、発がんプロモーター TPA 処理により、形質転換巣が明瞭に誘発されるクローンを 1 株選んだ。	○
(b) 催奇形性予測試験法の開発	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 か月程度で催奇形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。	[マウス ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法] マウス ES 細胞から心筋、神経および筋骨格系への分化誘導法を確立した。催奇形性(発生毒性)に関与するマーカー遺伝子を複数同定した(心筋：13 種、神経：22 種)。 次にこれらのマーカー遺伝子の発現を、レポーター遺伝子を利用して簡便に評価可能な組換え ES 細胞(心筋分化過程:Hand1-、Cmya1-ES 細胞など 3 種、神経分化過程:Reln-ES 細胞)を作製した。作製した細胞を利用した簡便な発生毒性予測試験方法(Hand1-、Cmya1-および Reln-EST 法)を提案した。Hand1-および Cmya1-EST 法の予測性を、標準化合物を用いて従来の EST 法と比較した結果、同等以上の予測性を有することが明らかとなり、従来の EST 法よりも短期間(約 1 週間)に多数の化合物を評価可能な方法が確立できた。さらに施設間での再現性の確認や、規格化のための細胞の品質検査も実施した。また、ヒト ES 細胞を用いた検討を行い、マウス ES 細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにした。	◎
		[代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法] マウス ES 発光細胞を用いた試験法の確認法として、ラット全胚培養法を設計した。ラット S-9mix を組み入れた胎児培養法を用い、より in vivo 試験に近い結果が得られた。	○
(c) 免疫毒性予測試験法の開発	遺伝子導入技術、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 か月程度で免疫毒性を予測評価でき	[上皮細胞 (HaCat)] 同定したマーカー遺伝子 3 種のうち、2 種(hemeoxygenase-1、IL-1β)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 2 色安定発光細胞株(HR38H6、KIL01)を樹立し、その内 HR38H6 を用いて酸化ストレス、ER ストレス、重金属刺激など幅広いストレスを検出できるハイスループット評価系を構築した。	◎

	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。	[マクロファージ系細胞 (U937)] 同定したマーカー遺伝子 17 種のうち、3 種 (IL-8、IL-1β、hemeoxygenase-1) について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 2 色安定発光細胞株 (UR2H4114、UIL01、TGC17EA01)、また、2 種について、それらの遺伝子と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 3 色安定発光細胞株 (6C12) を樹立した。その内、TGC17EA01 に関しては、これを用いた皮膚感作性試験代替法を開発した。また、6C12 を用いては、単球、樹状細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。	◎
		[T 細胞 (Jurkat)] 同定したマーカー遺伝子 10 種のうち、3 種 (IL-2、IL-4、IFN-γ) について、そのうち 2 つの遺伝子の組み合わせと内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる 3 色安定発光細胞株 (10C6、2H4) を樹立した。その内、2H4 を用いては、T 細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。また、6C12 と 2H4 を組みあわせることにより、多様な免疫毒性を評価できるシステムを構築した。	◎
		[標準的な試験プロトコル] TGC17EA01 を用いた皮膚感作性試験代替法および 6C12 と 2H4 を用いた免疫毒性評価系に関しては、標準的な試験プロトコルを作製して複数施設での試験法の安定性を検討した。	◎
(d) 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発	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。	① 多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立：細胞内安定性や耐熱性が向上した各種発光プローブの改良に成功した。これらのプローブを基盤に免疫毒性評価 3 色発光細胞、発がん毒性評価 2 色発光細胞の樹立に成功した。	◎
		② 多色発光システムの測定法の標準化：標準発光物質として値付けされたルシフェラーゼタンパク質の作製、これを標準光源の代替とした発光測定装置ルミノメーターの絶対感度校正法を確立した。	◎
		③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築：毒性評価発光細胞の安定化及び効率的な作成法を確立するため、ヒト人工染色体 (HAC) 技術を活用、HAC 発光ベクターを導入した免疫毒性評価用細胞を樹立した。また、多色発光プローブと HAC ベクターをマルチインテグレーションシステムで融合させた多色発光遺伝子導入システムの開発に成功した。	○

◎ 大幅達成、○達成、△達成見込み、×未達

2.2 発がん性予測試験法の開発

2.2.1 背景と目標

(1) 背景

① Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発

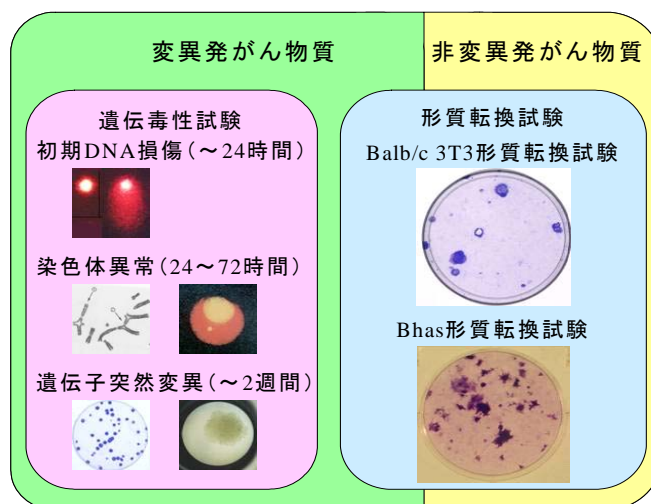
発がん性は、化学物質のリスク評価において重要な位置を占めている。化学物質の発がん性は、実験動物を用いる長期発がん試験や疫学調査によってのみ明らかにすることができるというのが従来の学会における考え方である。これは、がんが長期にわたって進行する疾病であるからである。しかしながら、今後評価しなければならない約 30,000 の既存化学物質の存在を考えると、実験動物を用いる発がん実験をすべての既存化学物質に適用することは、時間的にも経費的にも不可能であり、遅々として評価が進まないという結果を招くばかりである。そこで、既存化学物質ばかりでなく、新しく開発される化学物質のリスク評価においても、細菌や培養細胞を用いる簡便な短期試験法をスクリーニング法として用い、発がん性を予測することが行われている。現在は、*in vitro* 試験である Ames 試験と染色体異常試験に *in vivo* の小核試験を加えた、いわゆる「3点セット」を化学物質の発がん性予測に用いるのが一般的である。これらの短期試験法は、食品添加物、医薬品添加物、日用品などから発がん性が疑われる化学的合成物を排除することや、ヒト環境中において多環芳香族などの発がん性物質を低減することに貢献した。

ところが最近になって、3点セットでは発がん性を予測することができない化学物質の存在が問題になっている。これらの短期試験は、いずれも遺伝毒性試験に属する方法であるため、遺伝子に損傷をもたらす化学物質だけを検出するものであることが原因として考えられる。発がん性物質には、大きく分けて、発がんプロモーターと発がんイニシエーターがある。発がんイニシエーターは、遺伝子に損傷を与え、不可逆的な変化をもたらす物質であり、遺伝毒性試験で検出することができる。発がんプロモーターの作用機序は、多様であるが、遺伝子に損傷を与えないか、与えたとしても間接的であるために、遺伝毒性試験では検出できないか、検出しにくい。ここに、遺伝毒性試験のセットで発がん性を予測することの限界があり、遺伝毒性試験とはカテゴリーの異なる発がん性予測法を組み合わせる必要に迫られている。

培養細胞を用いる形質転換試験(CTA: Cell Transformation Assay)は、化学物質による細胞の悪性化(がん化)そのものを指標とし、制御を逸脱した細胞の増殖を観察する方法で、遺伝毒性試験とはカテゴリーを異にする。試験管内発がん試験とも言われ、遺伝毒性試験とは異なり *in vivo* 発がん類似した現象を観察している。がん化へ向かわせる化学物質の作用(直接的又は間接的な DNA 損傷、遺伝子発現変化やシグナル伝達の異常を含めた遺伝子や細胞内機械装置の障害)を包括的に検出できる優れた方法である。

細胞形質転換試験には、いくつかの手法があるが、従来法の中から、近年の動物愛護運動の高まりを考慮に入れた上で報告例の多い方法を選ぶならば、樹立細胞株である BALB/c 3T3 又は C3H10T1/2 を用いるフォーカス形成法である。この方法では、本来は培養器に接着して単層で増殖して重なり合い増殖を起こさない繊維芽様細胞が、発がん性物質の作用で形態が変化し、重なり合い増殖を起こして盛り上がったフォーカスを形成するのを観察する(図 III.2.2-1)。

発がん物質の検出になぜ形質転換試験が注目されるか？



変異発がん物質のみならず、非変異発がん物質も検出可能である

9

図Ⅲ.2.2-1 In vitro 発がん試験系

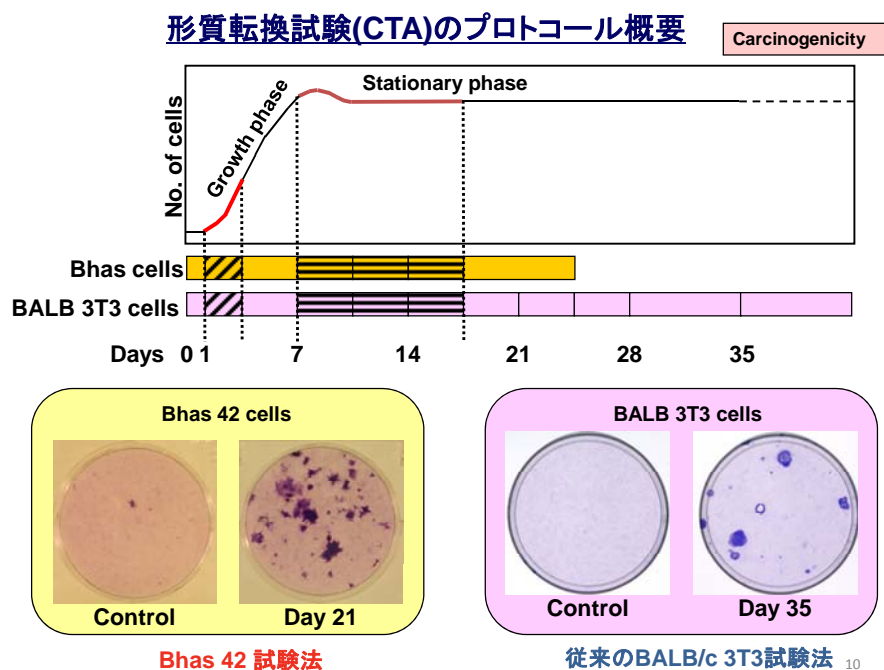
BALB/c 3T3 細胞や C3H10T1/2 細胞を用いる形質転換試験は、発がんイニシエーターだけでなく、発がんプロモーターをも検出することができる。すなわち、最も一般的な標準法は、培養開始の初期に発がん物質で処理し、その後も培養を継続してフォーカスの形成を観察するものであるが、発がんイニシエーターの検出に適している。一方、培養細胞形質転換には、実験動物の2段階発がんに類似した2段階形質転換の現象が知られている。この現象に基づいて、実験動物における2段階発がん試験に類似した2段階形質転換試験を実施することができる。すなわち、培養開始初期に単独では形質転換を誘導しない低濃度の既知発がん物質(イニシエーター、3-メチルコラントレンなど)で処理して標的細胞をイニシエートした後、被験物質で継続処理することでプロモーション作用を検出することができる。

標準法、2段階法ともに多数の化学物質に適用され、実験動物を用いた結果と良好な相関性が報告されているにもかかわらず、化学物質の発がん性予測における利用は、限定的である。その一番の原因は、形質転換試験は、遺伝毒性試験に比べ、試験期間、費用、労力が長大であることによる。

1998年、国立衛生研究所(当時)の佐々木らは、BALB/c 3T3 細胞に活性型 *ras* 遺伝子(*v-Ha-ras*)を導入して Bhas 42 細胞を樹立した(K. Sasaki, H. Mizusawa, M. Ishidate: Isolation and characterization of *ras*-transfected BALB/3T3 clone showing morphological transformation by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Jpn J Cancer Res.* 79(8):921-30 (1988 Aug))。Bhas 42

細胞は、活性型 *ras* 遺伝子を持つことから、発がんの2段階説にいうイニシエートとされた細胞と見なされている。その後、Bhas 42 細胞を用いた短期形質転換試験が開発された。この方法は、当初既知発がん物質によるイニシエーション処理を必要としない発がんプロモーターの検出法として紹介された。やがて、食薬センターを中心とした研究により、プロトコルに応じて発がんイニシエーターをも検出できることが明らかになった。すなわち、低密度で播種した Bhas 42 細胞を培養の初期に被験物質で処理し、その後数回細胞を倍加させることで、遺伝子に生じた損傷を変異として固定させ、細胞のがん化によるフォーカス形成を促すことで、発がんのイニシエーション作用を検出することができる。発がんプロモーション作用を検出するには、やや密度を上げて細胞を播種し、細胞の倍加がほぼ終了して増殖の接触阻止が開始されようとするサブコンフルエントに達したときに被験物質による処理を開始して、フォーカスの形成を観察する。Bhas 42 細胞形質転換試験は、BALB/c 3T3 細胞を用いる従来の2段階形質転換試験に比べて、試験期間、費用、労力の総合で、おおむね 1/2~1/3 に省力化されていると考えている。化学物質の発がん性予測の精度は、遺伝毒性試験と組み合わせて本法を用いることで格段に向上すると考えられる。

そこで、「発がん性予測試験法の開発」では、Bhas 42 細胞短期形質転換試験のOECDテストガイドライン化を目指して、100以上の物質について試験データを集積するとともに、多施設間でバリデーションを実施し、再現性・安定性を評価した。さらに、並行して、本法のハイスループット化を目指した研究も行っている。ここでは、96ウェルプレートを用いて形質転換試験を行い、新しい発見に基づいた新手法の導入と一部作業の自動化により、一層客観的かつ迅速な試験法に改善できつつある(図III.2.2-2)。



図III.2.2-2 形質転換試験プロトコル

② 発光 Bhas 42 細胞を用いた試験法の開発

形質転換試験は、上述のように、がん化へ向かわせる化学物質の作用(直接的又は間接的な DNA 損傷、遺伝子発現変化やシグナル伝達の異常を含めた遺伝子や細胞内機械装置の障害)を包括的に検出できる優れた方法である。

そこで、形質転換試験をベースにした、発光 Bhas 42 細胞を用いる発がん性予測試験法の開発研究を行っている。この研究では、Bhas 42 細胞形質転換試験において発がん性物質による細胞の形質転換を経時的に観察しつつ遺伝子発現変化を DNA アレイを用いて時系列に測定・解析して、形質転換に相関して発現が増加又は減少する遺伝子を抽出する。さらに、形質転換促進物質(TPA、オカダ酸、リトコール酸、 FeCl_3)に反応して共通して発現が増加又は減少する遺伝子を選択する。選択された遺伝子の中から、発現時期、発現変化の持続性、発現変化の比率の大きさ、発現量、共通性等を DNA アレイやリアルタイム-PCR によって解析し、それぞれの遺伝子についての既知情報も参考にして、マーカー遺伝子を選定する。マーカー遺伝子の発現制御領域をホタルルシフェラーゼの上流に挿入したレポーターコンストラクトを構築し、多色発光プラスミド又は多色発光人工染色体として Bhas 42 細胞に導入して発光細胞を作製する。この発光 Bhas 42 細胞を用い、プロジェクト終了時までには、標準的な試験法のプロトコールを取りまとめる。

(2) 最終目標

① Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発

遺伝子導入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。

② 発光 Bhas 42 細胞を用いた試験法の開発

遺伝子導入技術、生物発光技術等を適用した培養細胞を用いて、発がん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。

2.2.2 最終目標に対する達成度

最終目標に対する達成度は、以下のとおりである。

研究開発課題	最終目標 (平成22年度末)	研究開発の 具体的な内容	最終目標の達成状況	達成 度
A 発がん性予測試験法の開発 ①Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の開発	遺伝子導入技術、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術等を用いた培養細胞を用いて、試験期間1か月程度で発がん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。	Bhas 42細胞等を用いて、100物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また、施設間評価試験を実施して1か月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法の開発を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECDテストガイドライン(以下「OECD-TG」という。)化に向けた国際提案の原案を作成する。	Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法について、1)98物質を調べ in vivo のデータと比較した、2)6ウェル法と96ウェル法の同等性を確認した、3)国内・国際バリデーションを実施した。さらに、Bhas 42細胞の性状解析を行った。その結果、OECD-TG 収載のためのデータが十分に揃ったことから、OECD に SPSF (Standard Project Submission Form)を提出した。 また Bhas 42細胞形質転換試験のハイスループット化を目指し、1)培養細胞を用いた毒性試験の基本的な一連の作業(細胞の播種、被験物質の処理、培地交換など)を行う自動化システムを開発した、2)過酸化水素と生存細胞に反応する色素を組み合わせることで、形質転換をマイクロプレートリーダーで客観的にかつ迅速に定量する方法を開発した(日米:特許審査中、欧:特許取得)。	◎
A 発がん性予測試験法の開発 ②発光 Bhas 42細胞を用いた試験法の開発			Bhas 42細胞形質転換において、発がんプロモーター処理により発現が増加する遺伝子をスクリーニングし、マトリックスメタロプロテイナーゼ10遺伝子を選択した。次にこの遺伝子を Bhas 42細胞に導入し、よく発光するクローンを6株樹立した。さらにその中から、発がんプロモーターTPA 処理により、形質転換巣が明瞭に誘発されるクローンを1株選んだ。	○

Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の開発については、6ウェルプレートを用いる方法のバリデーションを終了し、再現性・安定性等を評価した。さらに、この方法をハイスループット化するために、96ウェルプレートを用いる方法を開発すると同時に、一連の作業を自動化する装置を開発した。なお、本プロジェクト中に、新しい発見に基づいた、形質転換試験を客観的かつ迅速に行える新手法を開発した。

また、発光 Bhas 42細胞を用いた試験法の開発については、形質転換のマーカーとなりそうな遺伝子を特定したことから、今年度末までに発光細胞を樹立する予定である。

2. 2. 3 進捗状況と成果

(1) Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の開発(食薬センター)

1. OECD ガイドライン化

形質転換試験は、遺伝毒性を有する発がん性物質だけでなく、遺伝毒性試験で検出できない非変異がん原性物質をも検出することができる。Bhas 42 細胞形質転換試験は、従来の形質転換試験に比べて、簡便で、試験費用が安く、試験期間も短い。Bhas 42 細胞は、安定した樹立細胞株であって、ヒューマンサイエンス研究資源バンク(HSRRB)に登録・保管され、世界に配布されているので、常に品質の一定した細胞の入手が可能である。初代培養細胞を用いる一部の方法と異なり、試験のために動物を殺す必要がないので、動物愛護の点からも、推奨すべき方法である。このような利点を備えたBhas 42細胞形質転換試験であるが、企業や規制当局が化学物質の発がん性予測のために活用するには、この方法の信頼性を証明し、公表して、方法が広く受け入れられるようにする必要があった。物が国境を越えて流通する現在にあっては、新しい試験法を普及するには、その方法が世界的な信頼基準を満たしている必要がある。そこで、本プロジェクトでは、Bhas 42 細胞形質転換試験の OECD ガイドラインへの収載を目標として事業を展開した。

Bhas 42 細胞形質転換試験の試験法・プロトコルを確立するために、一定のプロトコルに従ってインハウス(食品薬品安全センター)で98物質にBhas 42細胞形質転換試験を適用した。この結果を実験動物における発がん試験や人の疫学調査と比較し、*in vivo*における発がん性との相関性を調べたところ、従来の遺伝毒性試験よりも優れた結果が得られた。同時に、Bhas 42 細胞形質転換試験の自動化を目指して、従来の6-ウェルプレートを用いる方法に加え、96-ウェルプレートを用いて形質転換試験を実施できる方法を開発した。さらに、6-ウェル法と96-ウェル法は、等しい試験結果を与えることを確認した。このようにして、試験法とその具体的なプロトコルを確立することができたので、多施設間でバリデーション研究を実施し、Bhas 42 細胞形質転換試験の施設間再現性を検証する段階へと事業を進めた。先に6-ウェル法を用いて「プレバリデーション研究」と「バリデーション研究」を実施したところ、施設間再現性の良さが証明された。また、バリデーション研究の結果とインハウス研究の結果とを比較することによって、施設内再現性の良さも証明された。次に、96-ウェル法を対象としたバリデーション研究を行った。96-ウェル法バリデーション研究は、「プレバリデーション」、「Phase I 研究」、「Phase II 研究」に分けて段階的に実施した。96-ウェル法についても施設間並びに施設内再現性の良さが証明された。また、バリデーション研究においても、化学物質の試験結果は、96-ウェル法と6-ウェル法とでほぼ一致した。一方で、98物質へのインハウス適用研究並びに6-ウェル法バリデーション研究においてよい結果が得られた段階で、ガイドラインへの収載のための審議を開始してくれるように OECD に対して Standard Project Submission Form (SPSF)を提出した。現在は、来春の Peer Review Meeting を経て、翌春の Working Group of National Coordinator for Test Guidelines (WNT)会議にて収載を採択されるべく、食品薬品安全センターで提出書類の作成を急いでいる。さらに、Bhas 42 細胞は、遺伝子導入の手法を用いて開発された細胞であるため、OECD ガイドラインへの収載に当たっては、導入遺伝子の安定性、導入

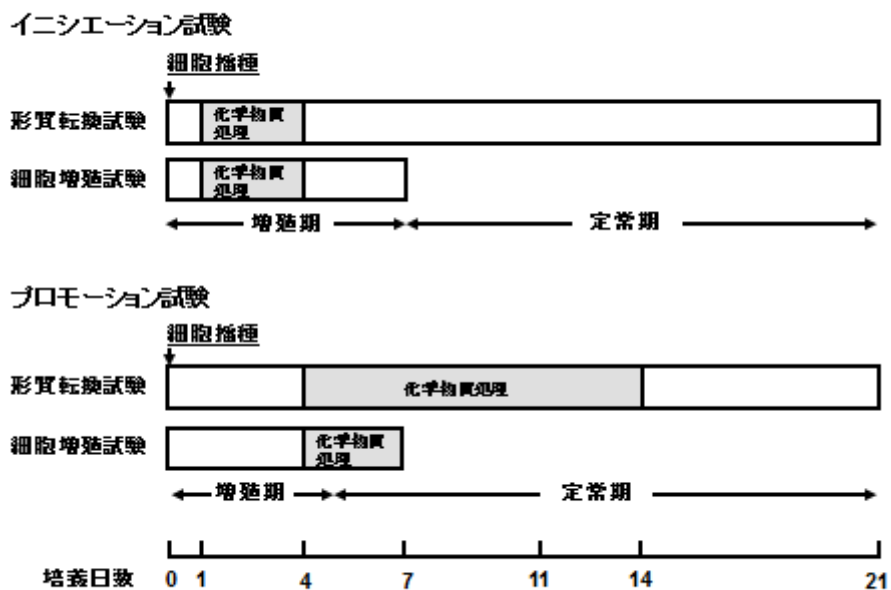
位置、導入数、導入塩基配列、導入遺伝子の発現等についての情報を求められる可能性が強いので、一般的な細胞の性状解析に加えて分子生物学的な解析も行った。

1-1. 試験法・プロトコール

現在の Bhas 42 細胞形質転換試験は、大森らが^{注1)}Bhas 42 細胞を用いて発がんプロモーション作用の検出系として開発した方法に端を発している。日本環境変異原学会の下で活動していた非変異がん原性物質対策研究会 (Non-genotoxic Carcinogen Study Group) が、大森らと共にこの方法に検討を加え、発がんプロモーターの検出法として有効な試験法が作り上げられた。さらに、浅田らは、この方法の一部を改変することによって、発がんイニシエーション作用を検出できることを明らかにし、発がんイニシエーション作用を検出するためのイニシエーション試験と発がんプロモーション作用を検出するためのプロモーション試験の2つの要素からなる Bhas 42 細胞形質転換試験を発表した^{注2)}。NEDO プロジェクトでは、浅田らの方法を基本として、Bhas 42 細胞形質転換試験の標準プロトコールを作成し、試験法とプロトコールの検証を開始した。

Bhas 42 細胞形質転換試験は、6-ウェルプレートを用いて開発されたので、まず、6-ウェル法のプロトコールを作成した。図Ⅲ.2.2-3 に、試験法の概要を示した。イニシエーション試験では、細胞を薄く播いて培養の初期に被験物質で細胞を処理する。細胞は、被験物質による処理を受けてから集密状態(コンフルエンス)に達する前に数回分裂することができ、被験物質が DNA に何らかの損傷を与えた場合、突然変異として固定される。遺伝子の変異によって形質転換を起こした細胞は、その後の発現期間を経て形質転換フォーカスを形成するので、これを計数する。一方、プロモーション試験では、細胞をイニシエーション試験よりも多く播いて、細胞がほぼウェルいっぱいまで増殖したサブ-コンフルエンスの状態では化学物質処理を開始する。処理期間も長くしてある。これは、現在までの研究から、細胞は、サブコンフルエンスの状態にあるとき発がんプロモーターに対する感受性が最も高いこと、また発がんプロモーターによる形質転換には長期間処理が必要であることなどが、すでに明らかにされているためである。イニシエーション試験とプロモーション試験には、どちらにも細胞増殖試験が付随している。細胞増殖試験は、形質転換試験を実施する濃度域を決定するために形質転換試験に先立って行われる他、化学物質処理が細胞に与える影響を推量するために形質転換試験と併行して実施される。

次に、Bhas 42 細胞形質転換試験の将来の自動化に備えて、6-ウェルプレートよりも機械装置に馴染みやすい 96-ウェルプレートを用いる方法を開発し、そのプロトコールを作成した。6-ウェル法と 96-ウェル法の間には、プレートの違いに従った若干の操作の違いはあるが、両試験法は、基本的には同じ条件下で化学物質によって細胞を処理し、同じ期間培養を続けるように作成されている。従って、図Ⅲ.2.2-3 は、6-ウェル法、96-ウェル法の両方に共通している。しかしながら、形質転換頻度の表し方(データのタイプ)が異なるため、統計解析法は両者で異なっている。



図Ⅲ.2.2-3 Bhas 42 細胞形質転換試験

1-1-1. 6-ウェルプレートを用いる Bhas 42 細胞形質転換試験

細胞培養

形質転換試験を開始する前に、試験に用いるための貯蔵細胞を大量に一括調製した。Bhas 42 細胞を10%牛胎児血清を添加したEagle's minimum essential medium (M10F) 中で増殖させ、約70%コンフルエンスに達したところで、0.25%トリプシンを用いて新しいM10Fに継代して、再び70%コンフルエンスまで増殖させた。こうして増やしたBhas 42 細胞を5% ジメチルスルフォキシド(DMSO)を含む新鮮なM10Fに 5×10^5 個/mLの密度で浮遊させ、0.5 mLずつ小分けして凍結し、液体窒素中で保存した。形質転換試験は、常にこの凍結保存細胞から出発した。形質転換試験には、5%牛胎児血清を添加したDulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 (DF5F)を用いた。牛胎児血清は、あらかじめ試験して、DMSO処理ではBhas 42細胞に最小限度の形質転換フォーカスしか生じないが、陽性コントロールの3-methylcholanthrene (MCA、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) や 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA、0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$)で十分な数の形質転換フォーカスを生ずる2種類のbatchを選んで本プロジェクト全体を通じて用いた。

イニシエーション試験

液体窒素中に凍結保存されているBhas 42細胞を37°Cで急速融解し、M10F中で一旦約70%コンフルエンスまで増殖させた。DF5F中へ継代して再び約70%コンフルエンスまで増殖させた。これをトリプシンで処理してDF5F中に2000個/mLの密度で浮遊させ、6-ウェルプレートの各ウェルへ2 mL (4000個/ウェル) ずつ播種した。1群当たり6-ウェル (1プレート)

を準備した。別に、併行して行う細胞増殖試験用に1群当たり3ウェルを準備した。播種24時間後に、培養に被験物質溶液を直接添加するか被験物質を含む培地による培地交換によって細胞の被験物質処理を開始した。イニシエーション処理は、72時間続けた。イニシエーション処理終了後（播種4日目）培地を新鮮培地2 mLに換え、7日目、11日目、14日目に培地交換を行って、21日目まで培養した。メタノールで固定してギムザ液で染色、ウェル毎に形質転換フォーカスを計数した。被験物質は、滅菌蒸留水またはDMSOに溶解した。被験物質毎に、溶媒対照群、陽性対照としてMCA（1 µg/mL）群（被験物質の溶媒がMCAの溶媒と異なる場合は、さらにMCAのための溶媒対照群として0.1% DMSO群）を設けた。

プロモーション試験

プロモーション試験は、以下の点を除いてイニシエーション試験と同様に行った。細胞は、7000個/mLで浮遊させて、ウェル当たり2 mLずつ播種した（14,000個/ウェル）。4日間培地交換を行わないで培養した後、4日目、7日目、11日目に被験物質を含む培地2 mLで培地交換を行い、14日目まで（合計10日間）被験物質処理を行った。14日目に普通培地に交換して、21日目まで培養した。陽性対照としては、TPA（0.05 µg/mL）を用いた。

形質転換フォーカスの計数と統計解析

形質転換フォーカスは、形態的な特性によって判別した：(a)100個以上の細胞から成り立っている；(b)周囲の単層細胞とは異なるスピンドル形をしている；(c)塩基性に強く染まる；(d)フォーカスの周辺で細胞の方向が不揃いになっている；(e)細胞が厚く積み重なっている；(f)周囲の単層細胞へ浸潤増殖している。ウェル毎に形質転換フォーカス数を記録した。統計解析は、Dunnett法による多重比較を行った（ $p < 0.05$ ）。

細胞増殖試験

細胞増殖試験は、クリスタルバイオレット（CV）染色法によった。イニシエーション試験またはプロモーション試験と全く同じ方法で、細胞を播種し、被験物質による処理を施した。一群当たり3ウェルを用いた。培養を7日目に10%ホルマリンで固定、0.1% CV 溶液で染色した。CV を染色細胞から0.03 M クエン酸と0.02 M 塩酸を含む50%エタノールで抽出し、540 nmで吸光度を測定した。細胞生存率（細胞増殖率）は、対照群に対するパーセンテージとして表した。細胞増殖試験は、形質転換試験を実施する濃度を設定するために、形質転換試験に先立って行われた。また、化学物質処理が細胞に与える影響を推量するために、形質転換試験と併行して実施された。

形質転換試験のための濃度設定

細胞増殖試験の結果に基づいて5濃度以上を設定した。

イニシエーション試験では、毒性が全くないかほとんどない濃度からコントロールに比べた細胞生存率が20%以下になる濃度に渡るように試験濃度を設定した。実際には、少なくとも、最大無作用量（NOEL）以下に1濃度、NOELと50%抑制濃度（ IC_{50} ）の間に2濃度、 IC_{50} と90%抑制濃度（ IC_{90} ）との間に2濃度を設定した。

プロモーション試験では、顕著な増殖促進作用がある被験物質の場合、増殖にほとんど

影響がない濃度から細胞増殖作用がある濃度に渡るように試験濃度を設定した。具体的には、少なくとも、NOEL以下に1濃度、細胞増殖作用がある濃度域に3濃度、弱い増殖抑制がある濃度域に1濃度を設定した。顕著な細胞増殖作用がない被験物質の場合、増殖に影響がない濃度よりも2, 3レベル低い濃度から細胞生存率が50%以下になる濃度に渡るように試験濃度を設定した。具体的には、少なくとも、NOEL以下に2濃度、NOELとIC₅₀の間に2濃度、IC₅₀を超える濃度に1濃度を設定した。

狭い濃度域で急激な細胞増殖率の落ち込みを起こす被験物質に対しては、実験間の変動を考慮して、上記で設定した濃度の外側に1または2濃度を余分に設定した。細胞毒性をほとんど示さない被験物質の最高試験濃度は、5 mg/mLまたは10 mMのうち、どちらか低い方とした。

注¹⁾ K. Ohmori, K. Sasaki, S. Asada, N. Tanaka, M. Umeda, An assay method for the prediction of tumor promoting potential of chemicals by the use of Bhas 42 cells, *Mutat. Res.* 557 (2004) 191-202.

注²⁾ S. Asada, K. Sasaki, N. Tanaka, K. Takeda, M. Hayashi, M. Umeda, Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells), *Mutat. Res.* 588 (2005) 7-21.

1-1-2. 96-ウェルプレートを用いる Bhas 42 細胞形質転換試験

細胞培養

6-ウェル法と全く同様に行った。

イニシエーション試験

以下の操作を除いて、6-ウェル法と同様に行った。

Bhas 42細胞をDF5F中に4000個/mLの密度で浮遊させ、96-ウェルプレートの各ウェルへ0.05 mL (200個/ウェル) ずつ播種した。1群当たり96ウェル (1プレート) を準備した。別に、併行して行う細胞増殖試験用に1群当たり8ウェルを準備した。播種24時間後に、被験物質を最終濃度の2倍含む培地を0.05 mLずつを各ウェルに加えて (培地量は播種時の0.05 mLと合わせて合計0.1 mL/ウェルとなる)、細胞のイニシエーション処理を開始した。以後の培地交換は、0.1 mL/ウェルで行った。

プロモーション試験

以下の操作を除いて、6-ウェル法と同様に行った。Bhas 42細胞をDF5F中に4000個/mLの密度で浮遊させ、96-ウェルプレートの各ウェルへ0.1 mL (400個/ウェル) ずつ播種した。播種後、4日目、7日目、11日目に、最終濃度の被験物質を含む培地0.1 mLで培地交換を行い、14日目まで被験物質処理を行った。

形質転換頻度と統計解析

形質転換フォーカスは、6-ウェル法の基準と同じ基準で判別した。ただし、形質転換頻度の記録は、6-ウェル法とは異なっている。観察可能であったウェル（細胞毒性、コンタミネーションやピペット操作の失敗によって細胞がはがれておらず、ウェルがコンフルエントになっている）の数（通常は、96ウェル）当たり、形質転換フォーカスが1つでもあるウェルが何個あったかを記録した。また、形質転換フォーカスは、ウェルの底面にあるものだけを観察した。すなわち、96-ウェルの場合、側壁にできたフォーカスは、実体顕微鏡による観察が困難であるので観察の対象外とした。統計解析は、Bonferroniの調整付きカイ二乗検定を用いた。

1-2. Bhas 42 細胞形質転換試験の発がん性予測能

Bhas 42 細胞形質転換試験の特性を明らかにすると共に、作成したプロトコールの妥当性と試験法の化学物質発がん性予測法としての能力を評価するため、Bhas 42 細胞形質転換試験を 98 物質に in-house で適用した。98 物質の試験は、6-ウェル法で行った。98 物質のうち発がん性の有無を文献から確認することができた 89 物質の試験結果から、Bhas 42 細胞形質転換試験のパフォーマンスの各インデックスを算出したところ、遺伝毒性試験に等しいかそれより優れた値が得られた。次に、98 物質の中からランダムに選んだ 32 物質を 96-ウェル法で試験し、6-ウェル法と 96-ウェル法との同等性を検討した。得られた判定結果は、32 物質のうち 31 物質で一致し、96-ウェル法は、6-ウェル法と同等に発がん性を予測できると考えられた。

1-2-1. 98化学物質のin-house試験

Bhas 42 細胞形質転換試験 6-ウェル法を用いて98物質を試験した。ヒトにおける疫学調査や実験動物における発がん試験の結果を文献的に検索し、被験物質を発がん物質、非発がん物質、発がん性未知の物質に分類した上で、イニシエーション試験並びにプロモーション試験の結果を表Ⅲ.2.2-1にまとめた。表中アンダーラインを付した物質は、代表的な遺伝毒性試験であるAmes試験で陰性であるか、陰性か陽性かの結果がデータベースによって一定しない物質である。Bhas 42細胞形質転換試験は、Ames試験陰性あるいはAmes試験不合物質の相当数を検出できることが明らかになった。また、Bhas 42細胞形質転換試験で陽性となったAmes試験陰性あるいはAmes試験不合物質は、主にプロモーション試験で検出することができた。

表Ⅲ.2.2-1 Bhas 42 細胞形質転換試験：98 化学物質のin-house試験 結果

化学物質	Bhas 42 形質転換試験		備考
	イニシエーション	プロモーション	
<i>発がん性物質</i>			
2-Acetylaminofluorene	+	+	
Benz[<i>a</i>]anthracene	+	+	
IQ	+	-	
5-Azacytidine	+	-	
<u>Barium chromate</u>	+	-	
Benzo[<i>a</i>]pyrene	+	-	
Cyclophosphamide	+	-	
<u>Cyclosporin A</u>	+	-	
2,4-Diaminotoluene	+	-	
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	+	-	
Melphalan	+	-	
MCA	+	-	
Mitomycin C	+	-	
MNNG	+	-	
Sterigmatocystin	+	-	
Thio-TEPA	+	-	
<u>Cadmium chloride</u>	-	+	
<u>Chenodeoxycholic acid</u>	-	+	発がんプロモーター
<u>4-Chloro-σ-toluidine HCl</u>	-	+	
<u>Cholic acid</u>	-	+	発がんプロモーター
<u>Deoxycholic acid</u>	-	+	発がんプロモーター
Dichlorvos	-	+w	
Epichlorohydrin	-	+	
<u>D-Limonene</u>	-	+	
<u>Lithocholic acid</u>	-	+	発がんプロモーター
<u>Methapyrilene HCl</u>	-	+	
<u>Methylarsonic acid</u>	-	+	発がんプロモーター
<u>Mezerein</u>	-	+	発がんプロモーター
2-Naphthylamine	±	+	
Phorbol 12,13-didecanoate	+	+	発がんプロモーター
Quercetin	-	+	
<u>Sodium arsenate</u>	-	+	
<u>Sodium arsenite</u>	±	+	
<u>Sodium saccharin</u>	-	+	
Styrene oxide	-	+	
<u>TPA</u>	±	+	発がんプロモーター
<u>σ-Toluidine</u>	-	+	
Zinc chloride	-	+	発がんプロモーター
σ -Anisidine	-	-	

表Ⅲ.2.2-1 続き

化学物質	Bhas 42 形質転換試験		備考
	イニシエーション	プロモーション	
Benzene	-	-	
Cobalt sulfate	-	-	
Diethylstilbestrol	-	-	
Dimethylarsinic acid	-	-	
1,4-Dioxane	-	-	
Ethyl carbamate	-	-	
Formaldehyde	-	-	
Furylfuramide	-	-	
Methyl carbamate	-	-	
Nickel (II) chloride	-	-	
Nickel monooxide	-	-	
Phenobarbital sodium	-	-	
<i>p</i> -Toluidine	-	-	
非発がん性物質			
4-Acetylaminofluorene	-	-	
Acid red 14	-	-	
Ampicillin	-	-	
Anthracene	-	-	
L-Ascorbic acid	-	-	
Aspartame	-	-	
Benzoin	-	-	
Caffeine	-	-	
Caprolactam	-	-	
2-Chloroethanol	-	-	
Chromium(III) Chloride	-	-	
2,6-Diaminotoluene	-	-	
Diazepam	-	-	
<i>N,N</i> -Dimethylformamide	-	-	
Eugenol	-	-	
HC Blue 2	-	-	
Hydrocortisone	-	-	
D-Mannitol	-	-	
Methotrexate	-	-	
1-Naphthylamine	-	-	
Phenanthrene	-	-	
Phenol	-	-	
<i>p</i> -Phenylenediamine 2HCl	-	-	
Phthalic anhydride	-	-	
Rotenone	-	-	

表Ⅲ. 2. 2-1 続き

化学物質	Bhas 42 形質転換試験		備考
	イニシエーション	プロモーション	
Sodium chloride	-	-	
Sodium nitrite	-	-	
Sunset yellow FCF	-	-	
Thiabendazole	-	-	
<i>m</i> -Toluidine	-	-	
Triphenyltin hydroxide	-	-	
Barium chloride	-	+	
<i>tert</i> Butylhydroquinone	-	+	
8-Hydroxyquinoline	-	+	
Propyl gallate	+	+	
Sodium fluoride	-	+	
Tetracycline HCl	-	+	
<i>発がん性未知の物質</i>			
Sodium Valproate	+	+	
Valproic acid	+	+	
2,3-Diaminotoluene	-	+	
2,5-Diaminotoluene 2HCl	-	+	
3,4-Diaminotoluene	-	+	
Sodium orthovanadate	-	+	
Capsaicin	-	-	
Ethidium bromide	-	-	
Salicylic acid	-	-	

下線を施した物質は、Ames 試験で陰性であるか、データベースによって陰性か陽性かが一定しない物質である。

Bhas 42細胞形質転換試験は、*in vivo*における発がん性が明らかな52物質のうち、38物質を陽性に、14物質を陰性に判定した。また、発がん性がないという報告がある37物質のうち31物質を陰性に、6物質を陽性に判定した（表Ⅲ. 2. 2-2）。これらの値から、Bhas 42細胞形質転換試験の化学物質発がん性予測に関するパフォーマンスの各インデックスを算出した（表Ⅲ. 2. 2-2）。一致率（concordance）、78%；感受性（sensitivity）、73%；特異性（specificity）、84%；陽性予測率（positive predictivity）、86%；陰性予測率（negative predictivity）、69%；偽陰性（false negative）、27%；偽陽性（false positive）、16%であった。これらの値のうち、一致率、特異性、陰性予測率並びに偽陽性は、従来の遺伝毒性試験に比べて優れており、そのほかのパフォーマンスインデックスも従来の遺伝毒性試験と同等であった。98物質へのBhas 42細胞形質転換試験適用研究の結果、我々は、Bhas 42細胞形質転換試験を化学物質の発がん性予測のための*in vitro*試験に組み入れるこ

とによって、予測の正確度を上げることができると結論した。なお、この研究の概要は、Mutation Research誌に発表した^{注)}。

表Ⅲ.2.2-2 Bhas 42 細胞形質転換試験の化学物質発がん性予測パフォーマンス

a) Bhas 42 細胞形質転換試験結果の Contingency table

		<i>In vivo</i> carcinogenicity		Total
		Carcinogen	Non-carcinogen	
Bhas 42 cell transformation assay	+	38	6	44
	-	14	31	45
Total		52	37	89

b) パフォーマンス

Concordance	78 %
Sensitivity	73
Specificity	84
Positive predictivity	86
Negative predictivity	69
False negative	27
False positive	16

^{注)} A. Sakai, K. Sasaki, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, K. Hayashi, Y.-M. Lim, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka, A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: The characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity, Mutat. Res. 702(2010)100-122.

1-2-2. 6-ウェル法と96-ウェル法の同等性

96-ウェルプレートを用いる Bhas 42 細胞形質転換試験と6-ウェルプレートを用いる Bhas 42 細胞形質転換試験とが同じ試験結果を与えることを確認するために、6-ウェル法を用いて in-house で試験した98物質のうちからランダムに32物質を選んで、96-ウェル法を適用した。ここに96-ウェル法で試験された物質は、2-acetylaminofluorene、acid red 14、amino-3-methylimidazo[4,5-f]2-quinoline (IQ)、ampicillin sodium salt、L-ascorbic acid、5-azacytidine、benz[a]anthracene、benzo[a]pyrene、cadmium chloride、caffeine、cholic acid、dibenz[a,h]anthracene、eugenol、lithocholic acid、D-mannitol、melphalan、methapyrilene hydrochloride、mezerein、mitomycin C、1-naphthylamine、N-methyl-N²-nitro-N-nitrosoguanidine

(MNNG)、phenol、*p*-phenylenediamine dihydrochloride、phorbol、sunset yellow FCF、phorbol 12,13-didecanoate (PDD)、sodium arsenite、sodium saccharin、sterigmatocystin、styrene oxide、urethane、zinc chloride である。このうち、sodium arsenite を除く 31 物質の結果は、先に行った 6-ウェル法による in-house 試験の結果と一致した。Sodium arsenite は、6-ウェル法でプロモーション試験陽性であったが、96-ウェル法では、イニシエーション試験、プロモーション試験共に陰性であった。この原因は、sodium arsenite は、形質転換フォーカスを好んでウェルの壁面に形成する傾向があり、ウェルの底面にできたフォーカスだけを観察して壁面のフォーカスを数えない 96-ウェル法では、陰性になってしまうものと考えられた。後に述べる過酸化水素と WST 8 を用いるハイスループレットのための比色による形質転換測定法が完成すれば、sodium arsenite における不一致の問題は、解決することができると考えている。以上のことから、96-ウェル法による Bhas 42 細胞形質転換試験は、6-ウェル法と同等の結果を与えることが示された。

1-3. バリデーション

以上の研究によって、Bhas 42細胞形質転換試験は、作成したプロトコールに従って化学物質を試験するとき、既存の遺伝毒性試験に匹敵するあるいはそれを超えるパフォーマンスを持って化学物質の発がん性を予見することができることを明らかにすることができた。そこで、次にバリデーション研究を実施して、Bhas 42細胞形質転換試験の施設間技術移転性、施設間再現性、施設内再現性を調べた。先に6-ウェル法を、次に96-ウェル法を用いたバリデーション研究を行った。6ウェル法によるバリデーション研究では、「プレバリデーション研究」、次いで「バリデーション研究」を行った。96-ウェル法を用いたバリデーション研究は、「プレバリデーション研究」、「Phase I研究」、「Phase II研究」の順に、段階的に実施した。

1-3-1. 6-ウェル法によるバリデーション研究

プレバリデーション研究

6施設が参加した。参加機関は、試験を開始する前に開催された講習会においてBhas 42細胞形質転換試験の手法と形質転換フォーカスの判定法について実地に訓練を受けた後、試験を開始した。被験物質は、合計9物質で、MNNG、phorbol、pyrene、benz[a]anthracene、anthracene、mezelein、lithocholic acid、methapyrilene hydrochlorideおよびbenzo[a]pyreneを用いた。第三者によってコード化した後、参加機関に配布した。1物質を3施設が試験した。この研究では、各被験物質を溶解する溶媒、最終最高濃度、おおよその試験濃度域が参加施設に前もって知らされた。9物質を3施設で試験したので、イニシエーション試験とプロモーション試験を合わせると合計54試験が行われた計算である。表III. 2. 2-3に結果を要約して示した。

9物質のうち、イニシエーション試験では、7物質の判定が、プロモーション試験では、6物質の判定が3施設で完全に一致し、Bhas 42細胞形質転換試験は、施設間再現性がよい

方法であることが示された。発試験を行った3施設全体の判定で、発がん性物質、MNNGとBenz[a]pyreneとは、イニシエーション試験で陽性、プロモーション試験で陰性であった。実験動物においてbenz[a]anthraceneは発がん性があり、pyreneは発がん性がないと報告されているけれども、両物質は、イニシエーション試験とプロモーション試験の両方で陽性であった。非発がん性物質anthraceneは、イニシエーション試験、プロモーション試験共に陰性であった。Methapyrilene hydrochlorideは、発がん性の報告の他に、発がんプロモーション作用があるという報告があり、mezeireinとlithocholic acidは、発がんプロモーターとして作用することが知られているが、これらの物質は、プロモーション試験で陽性、イニシエーション試験で陰性であった。様々な研究で、発がんプロモーター、ホルボールエステル類の陰性対照物質として用いられるphorbolは、イニシエーション試験、プロモーション試験共に陰性であった。このように、Bhas 42細胞形質転換試験の判定結果は、pyreneを除いて*in vivo*における発がん性と一致した。

表III.2.2-3 6-ウェル法によるプレバリデーション研究の結果

化学物質	研究所	Bhas 42 細胞形質転換試験				総合判定	発がん性 <i>in vivo</i>
		イニシエーション試験		プロモーション試験			
		各研究所	全研究所	各研究所	全研究所		
Benz[a]anthracene	B	+	+	+	+	+	+
	E	+		-			
	F	+		+			
Benzo[a]pyrene	A	+	+	-	-	+	+
	E	+		-			
	F	+		-			
Methapyrilene HCl	B	-	-	+	+	+	+
	E	-		+			
	F	+		+			
MNNG	A	+	+	-	-	+	+
	C	-		-			
	F	+		-			
Lithocholic acid	A	-	-	+	+	+	+(TP ^a)
	C	-		+			
	F	-		+			
Mezeirein	A	-	-	+	+	+	+(TP)
	D	-		+			
	F	-		+			
Anthracene	A	-	-	-	-	-	-
	C	-		-			
	F	-		-			
Phorbol	A	-	-	-	-	-	-
	D	-		-			
	F	-		±			
Pyrene	B	+	+	+	+	+	-
	E	+		-			
	F	+		+			

^a 発がんプロモーター

バリデーション研究

日本の4施設、米国の1施設、ドイツの1施設、合計6施設が参加した。このバリデーション研究は、国際バリデーション研究として実施され、研究の初期は、海外を含めたバリデーション研究の専門家によって構成されたAdvisory Committeeの助言を受けた。研究結果は、後で正式に発足したValidation Management Team (VMT)の会議で審議され、承認された。被験物質は、合計12で、第三者によってコード化され、参加施設に配布された。物質のコードは、全施設がデータの提出を終えた後に開示された。1物質を3施設が試験した。表Ⅲ.2.2-4に結果を要約して示した。

イニシエーション試験では、研究期間中に試験を終えた10物質のうち8物質で3施設の判定結果が完全に一致した。プロモーション試験では、12物質のうち10物質で3施設の判定結果が完全に一致した。

3施設全体の判定で、2-acetylaminofluoreneと *o*-toluidine hydrochlorideは、イニシエーション試験、プロモーション試験共に陽性であった。Dibenz[*a, h*]anthraceneは、イニシエーション試験で陽性、プロモーション試験で陰性であった。Cadmium chloride、methapyrilene hydrochloride、sodium arsenite、lithocholic acidおよび mezereinは、プロモーション試験で陽性で、(1施設の濃度設定が不適切であったため、全施設の判定を下せなかったsodium arseniteを除いて)イニシエーション試験で陰性であった。Anthracene、D-mannitol、caffeineおよびL-ascorbic acidは、イニシエーション試験、プロモーション試験ともに陰性であった。このように、バリデーション研究においても、Bhas 42細胞形質転換試験は、発がんプロモーターを含めた発がん性物質を非発がん性物質と区別することができた。

以上のことから、Bhas 42細胞形質転換試験は、施設間技術移転が容易で、施設間再現性がよく、化学物質の発がん性予測に適用可能であることが示された。さらに、この研究に用いた12物質のうち11物質は、先にin-houseで試験された98物質に含まれていたため、同一施設のデータを比較したところ、Bhas 42細胞形質転換試験は、施設内再現性も、優れていることが示された。

表Ⅲ.2.2-4 6-ウェル法によるバリデーション研究の結果

化学物質	研究所	Bhas 42 細胞形質転換試験				総合判定	発がん性 <i>in vivo</i>
		イニシエーション試験		プロモーション試験			
		各研究所	全研究所	各研究所	全研究所		
2-Acetylaminofluorene	I	+	+	+	+	+	
	IV	+		+			
	VI	+		+			
Cadmium chloride	I	-	-	+	+	+	
	II	-		+			
	III	-		+			
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	I	+	+	-	-	+	
	II	+		-			
	V	+		-			
Methapyrilene HCl	I	-	-	+	+	+	
	II	-		+			
	IV	-		+			
Sodium arsenite	I	-		+	+	+	
	III	+		+			
	VI	Incomplete		+			
<i>o</i> -Toluidine HCl	I	-	+	-	+	+	
	V	+		+			
	VI	+		+			
Lithocholic acid	I	-	-	+	+	+	
	IV	-		+			
	VI	-		+			
Mezerein	I	-	-	+	+	+	
	III	±		+			
	IV	±		+			
Anthracene	I	-	-	-	-	-	
	II	-		-			
	VI	-		+			
D-Mannitol	I	-	-	-	-	-	
	III	-		-			
	IV	-		-			
Caffeine	I	-	-	-	-	-	
	V	-		-			
	VI	Incomplete		-			
L-Ascorbic acid	I	-	-	-	-	-	
	II	-		-			
	IV	-		-			

^a 発がんプロモーター

1-3-2. 96-ウェル法によるバリデーション研究

この研究は、Validation Management Team (VMT) の指揮の下で実施された。VMTは、Japanese Center for the Validation of Alternative Methods (JaCVAM) 主導で組織された。また、研究は、プレバリデーション、Phase I、Phase IIの順に、段階的に進められた。

プレバリデーション研究

4施設が参加した。参加施設は、すべて6-ウェル法によるバリデーション研究に参加した施設であったが、96-ウェル法の経験がなかったため、試験を開始する前に96-ウェル法

の技術指導を受けた。プレバリデーション研究は、MCAとTPAを被験物質とし、被験物質のコード化はせず、各参加施設は、施設毎に配布された被験物質（同一ロット）を、VMTから指定された溶媒であるDMSOに溶解して、指定された最終濃度（MCA；0.03, 0.1, 0.3 および 1 µg/mL；TPA；0.025, 0.05, 0.1 および 0.2 µg/mL）で試験を行った。表Ⅲ.2.2-5に結果を要約して示した。

MCAは、4施設とも、イニシエーション試験で陽性、TPAは、4施設とも、プロモーション試験で陽性。また、MCAのイニシエーション試験で統計学的に有意差が付く最低濃度は、4施設とも、0.1 µg/mLであり、TPAのプロモーション試験で統計学的に有意差が付く最低濃度は、4施設とも、0.025 µg/mLであった。このように、MCAとTPAでは、きわめて高い施設間再現性が示された。

表Ⅲ.2.2-5 96-ウェル法によるプレバリデーション研究の結果

化学物質	研究所	Bhas 42 細胞形質転換試験				総合判定	発がん性 <i>in vivo</i>
		イニシエーション試験		プロモーション試験			
		各研究所	全研究所	各研究所	全研究所		
MCA	1	+	+	-	-	+	+
	2	+		±			
	3	+		-			
	4	+		-			
TPA	1	-	-	+	+	+	+(TP ^a)
	2	-		+			
	3	-		+			
	4	-		+			

^a 発がんプロモーター

バリデーション研究 Phase I

4施設が参加した。被験物質は、合計7で、VMTによってコード化され、参加施設に配布された。物質のコードは、全施設がデータの提出を終えた後に開示された。1物質を4施設全部が試験した。表Ⅲ.2.2-6に結果を要約して示した。

イニシエーション試験では、7物質のうち6物質の判定結果が4施設で完全に一致した。また、プロモーション試験では、4物質の判定結果が完全に一致した。4施設の結果が完全に一致しなかった試験でも、1施設の結果だけが他の3施設と違う判定（equivocalを含む）になったもので、全体としては、施設間再現性がよいことが示された。

MCAとTPAの結果をプレバリデーション研究の結果と比較すると、各施設とも、Phase I研究における判定とプレバリデーション研究における判定とは一致しており（MCAのプロモーション試験において高濃度で有意差が付いて±になった施設があるものの）、施設内再現性も、よいことが証明された。

4施設全体の判定で、発がん性物質、2-acetylaminofluoreneは、イニシエーション試験、

プロモーション試験共に陽性であった。同じく発がん物質のbenzo[a]pyreneおよびMCAは、イニシエーション試験陽性で、プロモーション試験陰性であった。発がんプロモーター、TPAは、プロモーション試験陽性で、イニシエーション試験陰性であった。o-toluidineは、発がん性物質であるが、イニシエーション試験、プロモーション試験共に陰性であった。非発がん性物質、anthraceneとphenanthreneは、両試験とも、陰性であった。これらの結果は、o-toluidineを除いて*in vivo*における発がん性と一致している。

表Ⅲ. 2. 2-6 96-ウェル法によるバリデーション研究 Phase I の結果

化学物質	研究所	Bhas 42 細胞形質転換試験				総合判定	発がん性 <i>in vivo</i>
		イニシエーション試験		プロモーション試験			
		各研究所	全研究所	各研究所	全研究所		
2-Acetylaminofluorene	1	-	+	+	+	+	+
	2	+		-			
	3	+		+			
	4	+		+			
Benzo[a]pyrene	1	+	+	-	-	+	+
	2	+		-			
	3	+		-			
	4	+		-			
MCA	1	+	+	-	-	+	+
	2	+		-			
	3	+		-			
	4	+		±			
o-Toluidine	1	-	-	-	-	-	+
	2	-		-			
	3	-		-			
	4	-		-			
TPA	1	-	-	+	+	+	+(TP ^a)
	2	-		+			
	3	-		+			
	4	-		+			
Anthracene	1	-	-	-	-	-	-
	2	-		-			
	3	-		-			
	4	-		-			
Phenanthrene	1	-	-	-	-	-	-
	2	-		+			
	3	-		-			
	4	-		-			

^a 発がんプロモーター

バリデーション研究 Phase II

3施設が参加した。被験物質は、合計16物質で、VMTによってコード化され、参加施設に配布された。物質のコードは、全施設がデータの提出を終えた後に開示された。プレバリデーション研究並びにPhase I 研究からBhas 42細胞形質転換試験は、施設間並びに施設内再現性のよい試験法であることがほぼ証明されたので、Phase IIでは、1物質を2施設が試験した。結果を要約して表Ⅲ. 2. 2-7に示した。

表Ⅲ.2.2-7 96-ウェル法によるバリデーション研究 Phase II の結果

化学物質	研究所	Bhas 42 細胞形質転換試験				総合判定	発がん性 <i>in vivo</i>
		イニシエーション試験		プロモーション試験			
		各研究所	全研究所	各研究所	全研究所		
Benzo[<i>a</i>]pyrene	1	+	+	-	-	+	+
	3	+		-			
Cadmium chloride	1	-	-	+	+	+	+
	3	-		+			
Dibenz[<i>a,h</i>]anthracene	2	+	+	-	-	+	+
	3	+		-			
Methapyrilene HCl	2	-	-	+	+	+	+
	3	-		+			
MNNG	1	+	+	-	-	+	+
	3	+		-			
Sodium arsenite	1	-	-	-	-	-	+
	3	-		-			
Lithocholic acid	2	-	-	+	+	+	+(TP ^a)
	3	-		+			
Mezerein	2	+	+	+	+	+	+(TP)
	3	+		+			
Ampicillin sodium	1	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
L-Ascorbic acid	1	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
Caffeine	2	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
ε-Caprolactam	1	- ^b	-	-	-	-	-
	3	- ^b		-			
Eugenol	2	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
D-Mannitol	2	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
Phorbol	1	-	-	-	-	-	-
	3	-		-			
Pyrene	2	+	+	+	+	+	-
	3	+		+			

^a 発がんプロモーター

^b 10 mM 以下

試験した16物質のすべてで、イニシエーション試験、プロモーション試験ともに、試験した2つの施設の判定が一致した。これによって、Bhas 42細胞形質転換試験は、施設間再現性が、よい方法であることが示された。すべてのバリデーション研究の中で、最後に実施された96-ウェル法によるバリデーション研究 Phase IIにおいて最も優れた(完璧な)施設間再現性が得られた。これは、Bhas 42細胞形質転換試験は、試験法に慣れること、つま

り若干の訓練によって、より高い再現性が保証されることを示唆していると考えられる。

Benz[a]pyreneは、Phase IでもPhase IIに参加した2つの施設によって試験されているが、2施設とも、Phase IとPhase IIで全く同じ判定結果を報告しており、ここでも、施設内再現性の良さが証明された。

さらに、イニシエーション試験とプロモーション試験の両方またはどちらか一方が陽性であれば、Bhas 42細胞形質転換試験陽性とする総合判定で、sodium arsenite以外の発がん性物質（発がんプロモーターを含む）を陽性に、pyrene以外の非発がん性物質を陰性に判定し、*in vivo*における発がん性との高い一致性が証明された。

1-4. OECDガイドライン化

1-4-1. OECD ガイドライン化の意味

化学物質のヒトに対する有害性を確認する試験の中で、国際的に標準化されている試験系として OECD テストガイドラインがあり、現在50種類以上の試験系が OECD に承認された試験として認定されている。OECDガイドラインは化学物質だけでなく、医薬品や医療機器、農薬、化粧品等、多くのものについて各国の行政規制にも準用され、有害性評価のための生物試験として実施している国が多い。最近では、動物愛護の観点から、動物試験に代わる代替試験法の開発が活発に行われており、新たに開発された新規試験法がバリデーションされ、レビューされた後、OECD ガイドライン化の為に申請が行われている。

この様にして、新しい試験法が開発されると、まず技術移転性や試験法の研修を経てプレバリデーションが行われ、プロトコル案が確定される。その後、その試験法について安定性、頑健性、再現性、正確性が十分得られるかについて、コード化した検体を用い、統一したプロトコルに従って本格的なバリデーション試験が実施されその有用性を検証する。また、動物実験で得られた毒性データに比べて感度 (sensitivity) や特異性 (specificity) と低率の疑陽性および疑陰性などが十分に確保されているかについて、多くの検体数を用いて確認されていなければならない(図 III.2.2-4)。

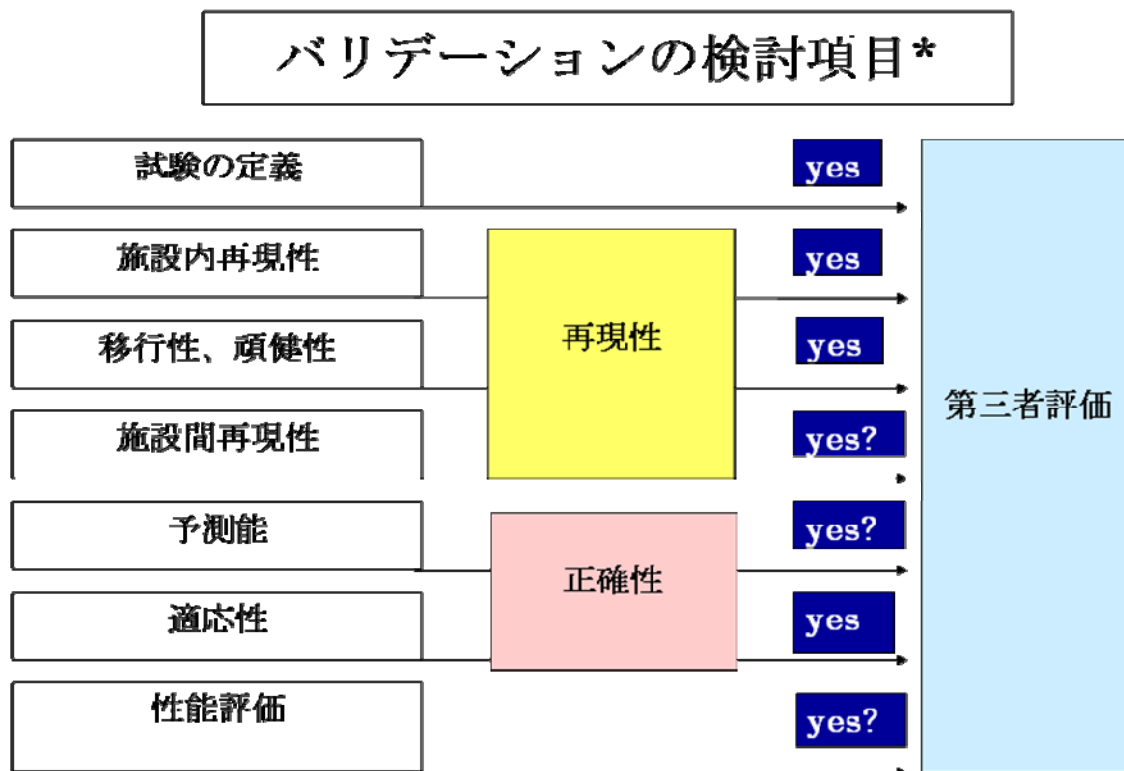


図 III.2.2-4 バリデーションの検討項目

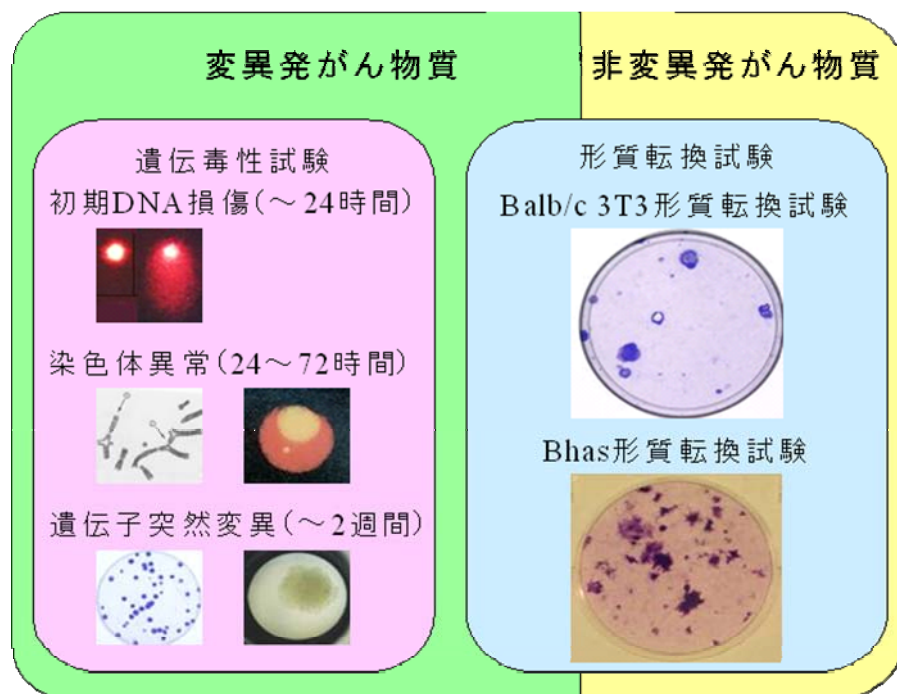
1-4-2. Bhas 42 形質転換試験の位置づけ

現在、OECD のガイドラインにあげられている発がん物質を予知する試験法として、図Ⅲ.2.2-5 に示す試験系がある。そのほとんどの試験は遺伝毒性試験が用いられており、指標として、遺伝的障害の有無、もしくは遺伝的障害に起因して生じる突然変異や染色体異常により発がん性を予測する試験である。この原理は、がんの要因は 1 個の細胞に生じたDNAの変異の基づくもので、これまで調べられた遺伝毒性(変異原性)試験の多くのデータと哺乳動物で得られた発がん試験のデータの相関性から論証されている。しかしながら最近、発がん物質の中には遺伝毒性を直接に示さない化学物質が報告されるようになってきた。非遺伝毒性発がん物質のあるものはプロモーターと呼ばれる発がんを促進するような物質であり、その細胞が保有している DNA 障害や化学物質や放射線により生じた DNA 障害を有する細胞に対して細胞増殖を促進する事により、細胞のがん化を促進する。したがって、遺伝毒性物質も非遺伝毒性物質も検知できる in vitro 試験法の必要性が高まっているところである。

本試験法の特徴は、まさに遺伝毒性発がん物質も非遺伝毒性発がん物質の両方を検知できるところにある。加えて、発がん物質に対して感度が高く、試験期間も短くなるという特徴を有している。それらの特徴に加え、本研究では、更にハイスループット化する事にも成功した。

Carcinogenicity

形質転換試験による発がん物質の検出



Bhas 42 CTA の系では、変異発がん物質と非変異発がん物質も検出できる。

図Ⅲ.2.2-5 形質転換試験による発がん物質の検出

1-4-3. Bhas 42 形質転換試験法の OECD ガイドライン化、SPSF の提出等

① 背景

形質転換試験の OECD/GL 化に関しては、2003 年にシリアンハムスターの胎児を用いる SHE (Syrian Hamster Embryo) 細胞法がフランスから OECD に提案され、その後、OECD 加盟国の中で論議されてきた。議論の過程で、日本では SHE 細胞を用いる試験法が普及していない事や、むしろ日本でやられている株化した Balb/c3T3 細胞を用いる方法が、動物を用いることなく形質転換巢の観察が容易であることから、Balb/c3T3 を用いる試験系もガイドライン化すべきであることを主張した。

2007 年には、形質転換試験に関する専門家会議がワシントンで開催され、SHE 細胞も Balb/c3T3 細胞もバリデーションを実施すべきとの結論が出され、ECVAM が主催して両細胞を用いてバリデーションが実施された。Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験はこの時点でプロトコールがほぼ出来上がっていた事から、この ECVAM のバリデーションに Bhas 42 細胞も加えることを主張したが、欧米ではあまり用いられていない等の理由で、Bhas42 をバリデーションに加えることはできなかった。

よって、Bhas42 を用いる形質転換試験に関しては、日本化学品協会(日化協)のサポートにより NGCS(非変異発がん研究)グループで共同実験を実施し、更に、NEDO/METI の研究プロジェクトの中で、試験系を完成し、バリデーションを実施した。OECD では、ECVAM のバリデーションとほぼ並行して、形質転換試験に関するレビュー:Draft Review Paper (DRP) 31 が、2007 年に刊行された。

② Bhas 42 形質転換試験法の OECD ガイドライン化のための SPSF 提出

上記の背景により、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験に関し、数回のバリデーションを実施し、有用な結果が得られた事から、VMT メンバーより OECD テストガイドラインに申請する事をすすめられた。したがって、2010 年 1 月末に経済産業省を通じて SPSF (Standard Project Submission Form) を OECD に提出した。同 2010 年 4 月、パリの OECD 事務局で開催された WNT 会議において提案理由を説明し、ガイドラインの審議に載せる事の承認が得られた。

1-4-4. 現状

現在の状況は、OECD テストガイドライン化を目指して、バリデーションレポートの作成、ならびに得られた多くのデータについての論文化を進めているところであるが、2012 年には、BRD (Background Review Document) も完成させ、ピアレビューを受け OECD/TG 化への道筋をつける予定である。

1-5. 細胞の性状解析

OECD ガイドラインに使用される細胞には、詳しい性状解析が要求される。Bhas 42 細胞は既に JCRB 細胞バンクに登録されており、その時点で細胞寄託者及び JCRB によりある程度の性状解析は行われている(マイコプラズマ汚染、注意深く培養しないと性質が変わってしまう点など 図 III. 2. 2-6)。しかし、導入された *v-Ha-ras* 遺伝子に関しては、樹立時にサザンハイブリダイゼーション分析により、複数コピーが染色体に組み込まれていることが示唆されている程度で、あまりよく調べられていなかった。そこで、Bhas 42 細胞または形質転換した Bhas 42 細胞を用い、*v-Ha-ras* 遺伝子のコピー数、塩基配列、発現を分析した。また、腫瘍原性も調べた。

Culture Methods for the Bhas 42

[General caution]

- Please note the distributed ampoule(plastic tube) of the Bhas42 cells contain 0.5 ml(0.6×10^6 cells) of cell suspension (1.2×10^6 cells/ml).
- Culture medium, subculture methods, cell numbers at passages are the same as cell culture of the BALB 3T3 A31-1-1. However, points of caution for the Bhas 42 cells are different from the BALB/c 3T3 cells. Differences are indicated below.
- The Bhas 42 have ras gene transfected and the natural transformation rate of the Bhas 42 is higher than the BALB 3T3 A31-1-1. Thus repeated subculture will cause an accumulation of naturally transformed cells in population and it is better to avoid the repeated manipulation of the subculture.
- Thus user must propagate cells upon receiving and create many ampoules first. Use one by one in each experiment.

[Brief protocol of the culture method]

1. Take one ampoule and spread them into two 100mm dishes(3×10^5 cells each) and start cell culture at 37 °C in CO₂ incubator.
2. When cells reached to $2-2.5 \times 10^6$ cells/dish (subconfluent) , harvest cells and divide them into many dishes (less than 3×10^6 cells in a dish, approximately 50 dishes) and culture continuously.
3. End point of the cell culture must be before confluent state.
4. Harvest cells and suspend in fresh culture medium containing 5% DMSO at the concentration of 1.2×10^6 cells/ml.
5. Pour cell suspension into serum tubes at 0.5 ml each and then cells are frozen and keep them in the liquid nitrogen reservoir.

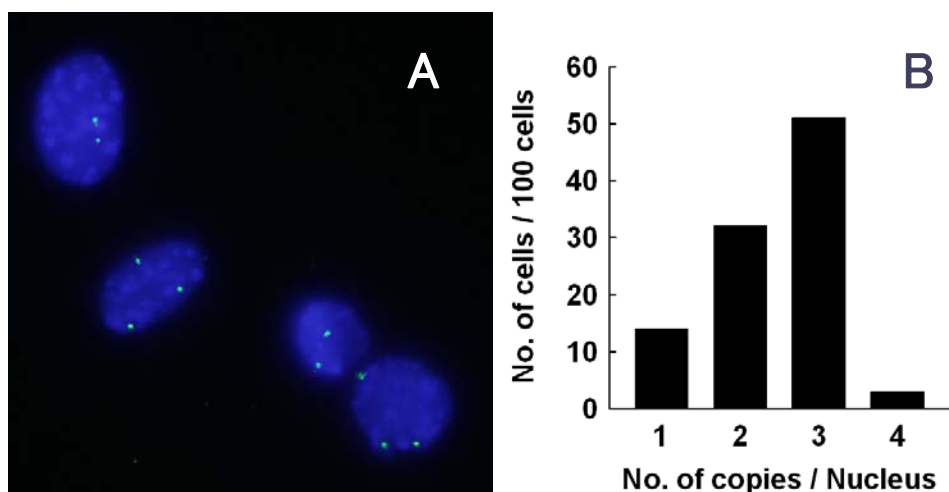
[Points of caution]

1. Important point of the cell culture of the Bhas 42 is to avoid confluency at the end of the cell culture. Naturally occurring transformations are accumulated at the confluent state of the cell culture and it is important to harvest cells before cells reach to the confluent state.
2. Another caution to have reproducibility of the experiments using the Bhas 42 is promised by starting each experiment from the same batch of the frozen ampoules derived from well controlled single cell culture.

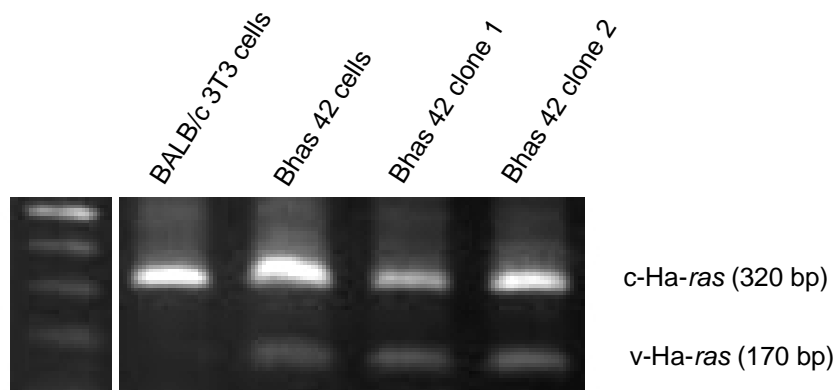
図 III. 2. 2-6 JCRB 細胞バンクのウェブサイトに掲載している Bhas 42 細胞の詳しい扱い方

Bhas 42 細胞に導入されている *v-Ha-ras* 遺伝子のコピー数は、FISH 法を用いて調べた(総合研究大学院大学の田辺秀之準教授との共同研究)。*v-Ha-ras* 遺伝子が組み込まれたプラスミドをビオチン標識しプローブとして調べたところ、全ての細胞の核に蛍光シグナルが 1~4 個観察された。また 100 個の細胞を観察した結果、平均シグナル数は 2.4 個であった。以上の結果から、*v-Ha-ras* 遺伝子は Bhas 42 細胞に 100% 導入されており、そのコピー数は平均 2.4 個であると結論した(図 III. 2. 2-7)。なお、何%の Bhas 42 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子が導入されているかは、FISH 法だけでなく、PCR 分析を用いても確認した。*v-Ha-ras* 遺伝子はイントロンが無いので、PCR で増幅後、電気泳動で分析すると、プライマー間の長さの DNA バンドを見ることができる。一方、同じプラ

イマーを用いて Bhas 42 細胞の親株である BALB/c 3T3 細胞の DNA を増幅させると、内在性の *c-Ha-ras* 遺伝子はイントロンを含むため、より長いバンドとして観察される。従って、Bhas 42 細胞の DNA を分析すると、*v-Ha-ras* 遺伝子の短いバンドの他に、*c-Ha-ras* 遺伝子の長いバンドの二本が認められる。そこで、Bhas 42 細胞から 100 クローンを分離し分析したところ、全てのクローンにおいてバンドが二本観察され、100% の Bhas 42 細胞に *v-Ha-ras* 遺伝子が導入されていることが確認された(図Ⅲ. 2. 2-8)。

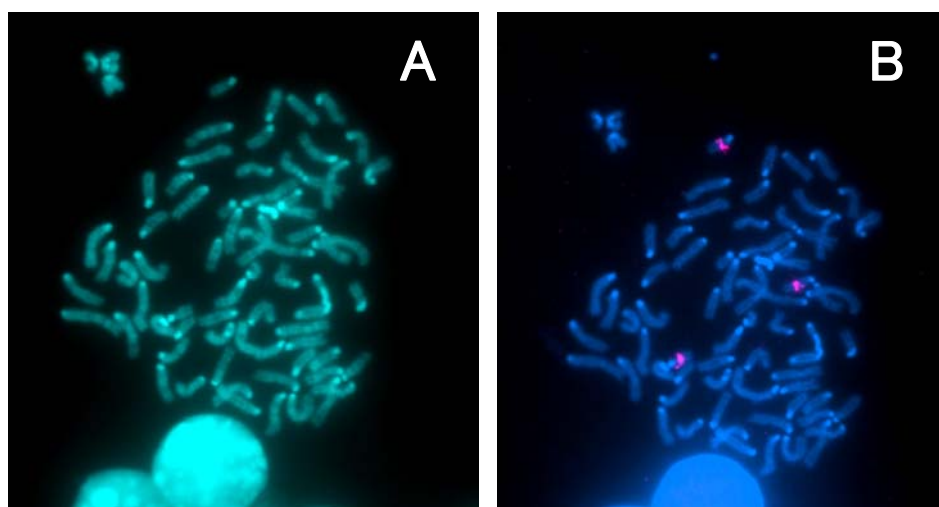


図Ⅲ. 2. 2-7 Bhas 42 細胞の核における FISH 法による *v-Ha-ras* 遺伝子の検出。A:核上に存在する *v-Ha-ras* 遺伝子のシグナル、B:細胞あたりに含まれる *v-Ha-ras* 遺伝子コピー数の分布図。



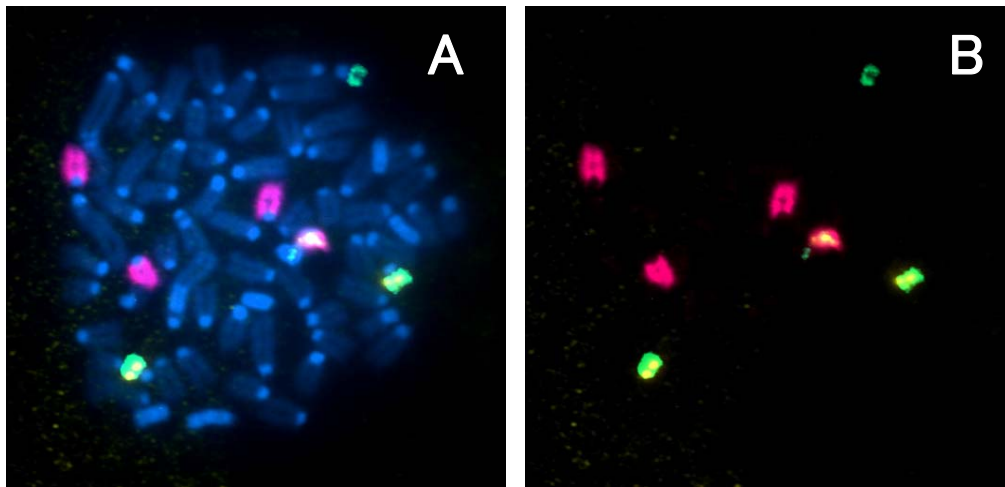
図Ⅲ. 2. 2-8 Bhas 42 細胞クローンにおける *v-Ha-ras* 遺伝子の存在

Bhas 42 細胞の染色体数は 55-65 本の近 3 倍体であり、基本的に各番号の染色体数は 2~4 本ずつ持つものと考えられた。Bhas 42 細胞より作製した染色体スライド標本に対して、キナクリン-ヘキストバンディング法を行った後、*v-Ha-ras* 遺伝子の蛍光シグナルを FISH 法により検出した。合計 12 個の分裂期細胞について、染色体番号の同定を試みた結果、17 番、18 番、19 番のいずれかに存在することが示唆された(図Ⅲ. 2. 2-9)。この染色体番号の同定には、キナクリン-ヘキストバンディング法のみでは困難であるため、次に示す、染色体特異的ペインティングプローブとの併用により、確実な番号の同定を行うこととした。



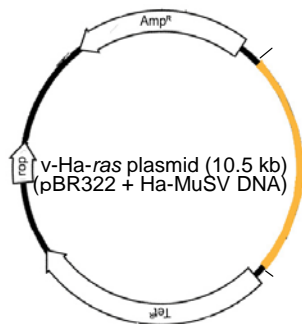
図Ⅲ. 2. 2-9 Bhas 42 細胞の染色体における FISH 法による *v-Ha-ras* 遺伝子の検出。A: キナクリン-ヘキストバンディング像、B: 染色体上に存在する *v-Ha-ras* 遺伝子のシグナル。

マウス染色体ペインティングプローブとして、Dr. Michael Speicher (The University of Wien) より 供与された 17 番、18 番、19 番の 3 本の染色体特異的ペインティングプローブを用いた。これらを Bio、Dig、DNP でそれぞれ DOP-PCR 法により標識し、*v-Ha-ras* 遺伝子と混合させて 3 色の蛍光色素を検出する FISH 法を行った。その結果、*v-Ha-ras* 遺伝子は 17 番染色体および 19 番染色体の両方またはいずれか上に存在し、その出現頻度は 1 細胞あたり 17 番染色体上には 0.9 個、19 番染色体上には 1.5 個 (36 細胞での平均) となった(図Ⅲ. 2. 2-10)。また、18 番染色体上には *v-Ha-ras* 遺伝子は検出されなかった。従って、Bhas 42 細胞中における *v-Ha-ras* 遺伝子の導入は、少なくとも 17 番染色体上と 19 番染色体上への 2 回の独立したイベントから成るものと考えられた。*v-Ha-ras* 遺伝子が存在する同じ染色体番号のものが複数本見られたが、これは *v-Ha-ras* 遺伝子のキナクリン-ヘキスト染色体バンディングサイトがほぼ同一であることから、遺伝子導入後に 3 倍体化に伴って、染色体ごと増幅したものと考えられた。

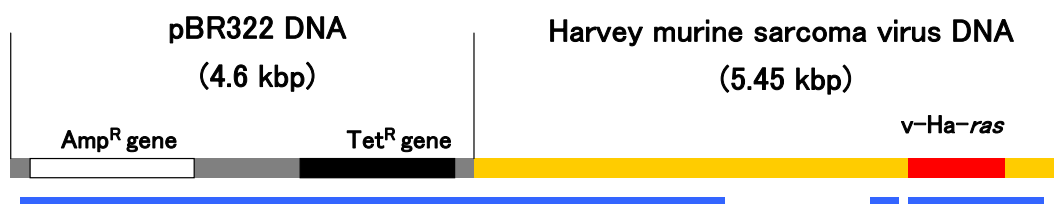


図Ⅲ. 2. 2-10 Bhas 42 細胞におけるマウス染色体特異的ペインティングプローブを用いた FISH 法による *v-Ha-ras* 遺伝子の検出。A:全染色体も染色、B:17 番、19 番染色体のみを染色。青:DNA、赤:17 番染色体、緑:19 番染色体、黄:*v-Ha-ras* 遺伝子。

Bhas 42 細胞は、pBR322 の中に *v-Ha-ras* 遺伝子を挿入したプラスミドを遺伝子導入することによって樹立された。*v-Ha-ras* 遺伝子は、*c-Ha-ras* 遺伝子が突然変異したものであり、その結果活性化し、通常、種々の細胞において形質転換を誘発する。ところが Bhas 42 細胞は、*v-Ha-ras* 遺伝子が導入されているにもかかわらず接触阻止を示し、がん原性物質を処理することで初めて形質転換巣が形成される。そこで、Bhas 42 細胞がそのような性質を持っているのは、*v-Ha-ras* 遺伝子の塩基配列が変わってしまったためなのかどうか調べるため、導入された *v-Ha-ras* 遺伝子の塩基配列を決定し、元のプラスミドの塩基配列と比較した(東洋紡バイオロジックス株式会社に外注)。その結果、技術的な問題からプラスミドの全塩基配列は決定できなかったが(71.6%を解析)、*v-Ha-ras* 遺伝子が挿入されている部分は全部解析することができ、元と同じ配列をしていることが分かった(図Ⅲ. 2. 2-11)。この結果から、Bhas 42 細胞に導入された *v-Ha-ras* 遺伝子は、元の遺伝子と同じ活性能力を持っているが、何らかの影響により(形質転換を誘発しない染色体位置に組み込まれた、がん抑制遺伝子が働いているなど)、普段は形質転換が抑制されていることが示唆された。

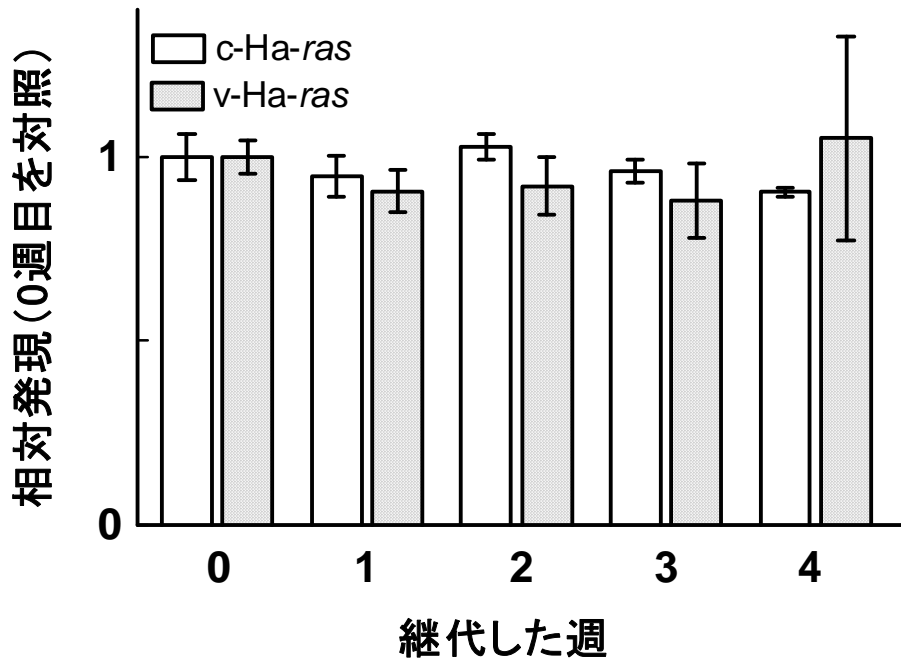


解析完了 71.6% = 7502 bp / 10473 bp



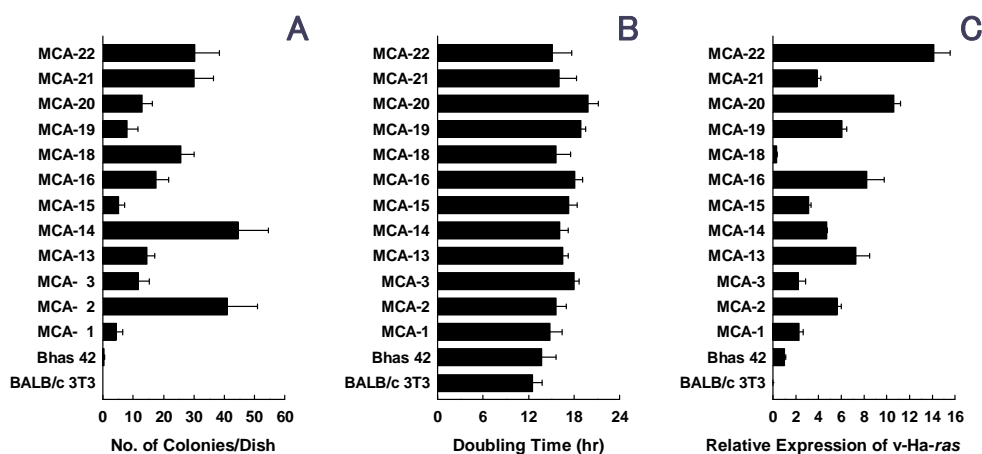
図Ⅲ. 2. 2-11 Bhas 42 細胞における v-Ha-ras 遺伝子の塩基配列解析。青部分:解析できた部分。

Bhas 42 細胞における v-Ha-ras 遺伝子の発現をリアルタイム RT-PCR 法により調べた。なお、内部標準遺伝子として、 β -アクチン遺伝子を用いた。Bhas 42 細胞に限らず、フォーカス形成法により形質転換試験を行う細胞は、一般的に高い細胞密度で頻繁に継代を繰り返したり、confluent の状態で長く放置したりすると性質が変化してしまうことがある。そこで、Bhas 42 細胞を一週間に一回、次の継代時には subconfluent になるように細胞を低い密度で播種し(5000 個/100 mm ディッシュ)、subconfluent 時における v-Ha-ras 遺伝子の発現を調べた。その結果、4 週間培養しても v-Ha-ras 遺伝子の発現に変化は認められなかった。また、形質転換細胞において高い発現を示すことがある c-Ha-ras 遺伝子も分析したが、同様に変化は認められなかった(図Ⅲ. 2. 2-12)。このことから Bhas 42 細胞は、適切に継代を繰り返す限り、形質転換せず、v-Ha-ras 遺伝子を安定して発現していることが示された。



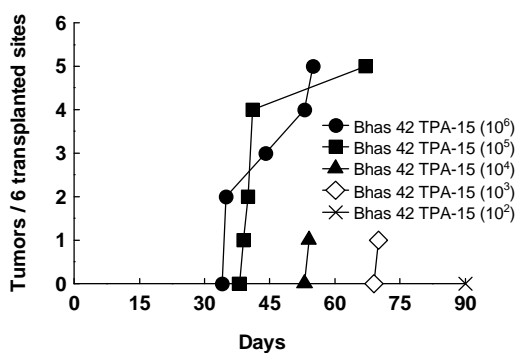
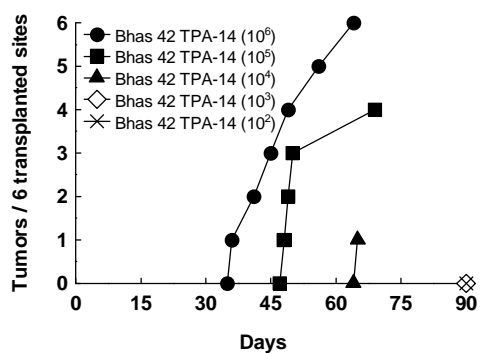
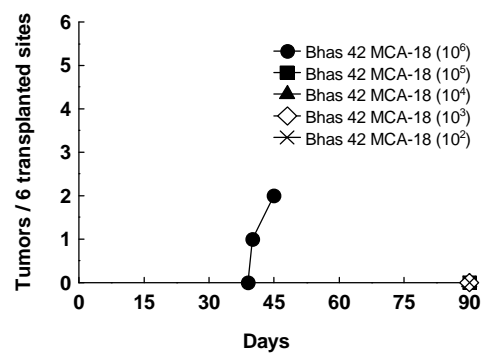
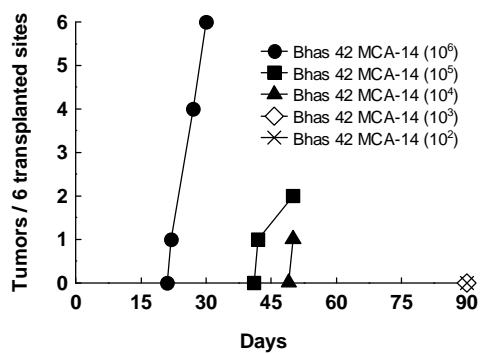
図Ⅲ. 2. 2-12 Bhas 42 細胞の継代と v-Ha-ras 及び c-Ha-ras 遺伝子の発現

典型的な Bhas 42 形質転換細胞は、紡錘状を示し、多層に重なり合って増殖するが、クローンによってその程度が異なり、それぞれ違った形態を示す。このことは、クローンによって細胞の性質も異なっていることを示唆している。そこで、形質転換細胞の悪性度、倍加時間、v-Ha-ras 遺伝子の発現の関連性を調べるため、MCA により形質転換した Bhas 42 細胞 (12 クローン) を用いて検討した。悪性度は、軟寒天コロニー形成法を用いて評価した。すなわち、細胞を 0.33% 軟寒天培地に播種し (60 mm ディッシュあたり、Bhas 42 形質転換細胞は 100 個、Bhas 42 細胞は 10^3 個、BALB/c 3T3 細胞は 10^4 個播種した)、3 週間培養して顕微鏡下でコロニーを数え、軟寒天コロニー形成率を算出した。倍加時間は、細胞を 6 ウェルプレートにウェルあたり 10^5 個播種し、播種後 2~4 日目の細胞数を数えることで算出した。軟寒天コロニー形成率を求めた結果、全ての形質転換細胞が Bhas 42 細胞より高い値を示した。なお、BALB/c 3T3 細胞は全くコロニーを形成しなかった。また倍加時間を見ると、全ての形質転換細胞が Bhas 42 細胞より遅く分裂し、BALB/c 3T3 細胞は最も早く分裂していることが分かった。v-Ha-ras 遺伝子の発現は、Bhas 42 MCA-18 では Bhas 42 細胞より低下していたが、他の全ての形質転換細胞では Bhas 42 細胞より 2~14 倍増加していた (図Ⅲ. 2. 2-13)。これらの結果から、v-Ha-ras 遺伝子の発現は、Bhas 42 細胞の形質転換に関与していると考えられた。しかし、発現量、悪性度、倍加時間の間には相関性が認められなかったことから、形質転換細胞の性質は v-Ha-ras 遺伝子の発現のみでは決定されないことが示唆された。



図Ⅲ. 2. 2-13 Bhas 42 形質転換細胞における軟寒天コロニー形成率、倍加時間、v-Ha-ras 遺伝子の発現。A: 軟寒天コロニー形成率、B: 倍加時間、C: v-Ha-ras 遺伝子の発現。

形質転換試験は *in vitro* 発がん試験である。すなわち、腫瘍を形成しない細胞が、腫瘍原性を獲得するまでを見る試験と定義される(一部の形質転換試験は、形態変化した細胞が腫瘍原性を示さなくても、その細胞を長期培養すると腫瘍原性を示すようになるため、形態変化した時点で培養を終了する)。Bhas 42 細胞は v-Ha-ras 遺伝子が導入されているにもかかわらず、腫瘍を形成しない親株の BALB/c 3T3 細胞と同様に接触阻止を示す。そこで、Bhas 42 細胞形質転換試験は、*in vitro* 発がん試験と言えるのかどうか、すなわち Bhas 42 細胞は腫瘍原性を示さないが、形質転換した Bhas 42 細胞は腫瘍原性を示すのか、ヌードマウスを用いて検討した。BALB/c 3T3 細胞、Bhas 42 細胞、そして MCA または TPA により形質転換した Bhas 42 細胞のクローン 4 種 (Bhas 42 MCA-14、Bhas 42 MCA-18、Bhas 42 TPA-14、Bhas 42 TPA-15) をヌードマウス (BALB/CNU、6 週齢、メス) の背面皮下に注射した (各細胞 100、10³、10⁴、10⁵、10⁶ 個/箇所。BALB/c 3T3 細胞のみ 10⁶ 個/箇所。一匹あたり 3 箇所に移植し、細胞あたり 2 匹使用)。移植後 90 日間飼育した結果、全ての形質転換細胞が腫瘍を形成したが、BALB/c 3T3 細胞及び Bhas 42 細胞は腫瘍を形成しなかった。なお、形質転換細胞のクローン間には悪性度の違いがあり、Bhas 42 TPA-15 細胞は 10³ 個移植しても腫瘍を形成したが、Bhas 42 MCA-18 細胞は 10⁶ 個移植した場合だけ、しかも 2 箇所のみには腫瘍が認められなかった。また、形質転換細胞の潜伏期間は、10⁶ 個移植した群では約 20~60 日であった (図Ⅲ. 2. 2-14)。この結果より、Bhas 42 細胞形質転換試験は、細胞の悪性化を見ている実験系であり、*in vitro* 発がん試験であることが確認された。



図Ⅲ. 2. 2-14 Bhas 42 形質転換細胞の腫瘍原性。Bhas 42 及び BALB/c 3T3 細胞は腫瘍を形成しなかった。

2. Bhas 42細胞形質転換試験のハイスループット化

2-1. 過酸化水素法による形質転換の定量化

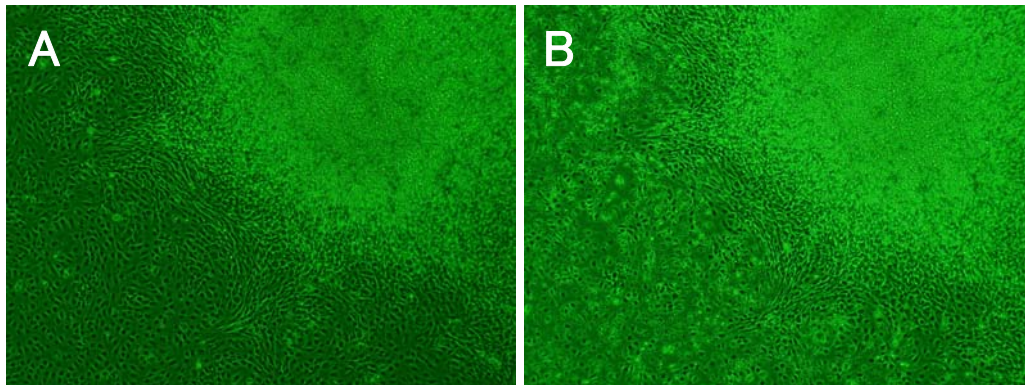
形質転換試験において形質転換細胞を定量するには、1)形態変化したコロニーを数える方法(コロニー形成法)、2)単層状態の正常細胞の中に見られる多層でかつ形態変化したコロニー(形質転換巣またはフォーカス)を数える方法(フォーカス形成法)、3)軟寒天培地中に形成されるコロニーを数える方法(軟寒天コロニー形成法)の3種の方法が確立されている。しかし、これらの方法は、細胞の形態を見て形質転換細胞かどうかを判断しなければならないため、主観が入ると同時に、多くの時間が費やされてしまう欠点がある。そこで、Bhas 42 細胞形質転換試験において(フォーカス形成法)、形質転換を客観的に、早く、機器を用いて定量できる方法の開発を試みた。なお、以下の方法は全て96ウェルプレート法を用いて実施した。

最初に、パソコンを用いた画像解析による方法を検討した。一部のBhas 42 形質転換巣は明瞭にギムザ染色で染まり、肉眼でもはっきりと認識できる。ところが、画像解析により定量しようとする、一般の画像解析ソフトはもちろんのこと、免疫染色された細胞などを解析する専門ソフトを用いても非常に困難であった。すなわち、画面全体に目的の細胞(他の細胞と色が異なる)がばらついて存在していることが条件で、形質転換試験のように目的の細胞が画面の端に固まって存在するような場合は分析できなかった。当然ながら、形態変化も分析できなかった。さらに96ウェルプレートを用いた場合、ウェル底面の面積と比べると側面の面積は比較的広いので、側面に形質転換巣が存在することが多く、このような場合、底面のみを分析する画像解析では形質転換巣が無いと判定されてしまう欠点があることが分かった。

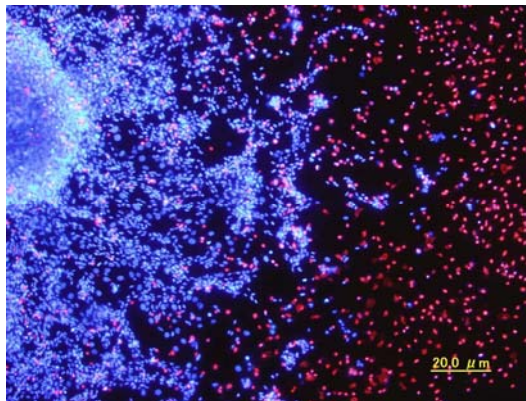
二番目に、染色した細胞の吸光度を測定する方法を検討した。すなわち、形質転換巣は濃く染まるため、固定したBhas 42 細胞をクリスタルバイオレットで染色後、メタノール酢酸溶液で抽出して吸光度を測定すれば、形質転換巣を含むウェルの吸光度は高い値を示すと考えた。ところが、正常細胞のみのウェルと形質転換巣が見られるウェル間ではっきりとした差は認められなかった。

三番目に、細胞の代謝によって吸光度が変わる色素(WST-8 など)または蛍光度が変わる色素(alarBlue など)を用いる方法を検討した。播種後21日目のBhas 42 細胞において、正常細胞は殆ど増殖をしていないが、形質転換細胞は活発に増殖していると考えられる。そこで、このような色素を添加すれば、形質転換巣を定量できると考えた。ところが、この実験においても、正常細胞のみのウェルと形質転換巣が見られるウェル間で明らかな差は観察されなかった。

ここで、正常細胞と形質転換細胞が共存する中で、もし正常細胞のみを薬剤で選択的に死滅させた後、WST-8 や alamarBlueなどを添加すれば、明瞭に形質転換巣を定量できると考えた。そこで、薬剤のスクリーニングを行った結果、活性酸素を有する過酸化水素が正常細胞のみを死滅させることを見出した。すなわち、過酸化水素を添加し、24時間後にその形質転換巣を観察したところ、形質転換巣は過酸化水素添加以前と形態が変わらなかったのに反し、正常細胞では細胞質の変性が見られた(図Ⅲ. 2. 2-15)。なお、細胞死の機構を調べるため、3重染色を行って観察したところ、過酸化水素による正常細胞の死滅は、アポトーシスではなくネクローシスであることが明らかとなった(図Ⅲ. 2. 2-16)。

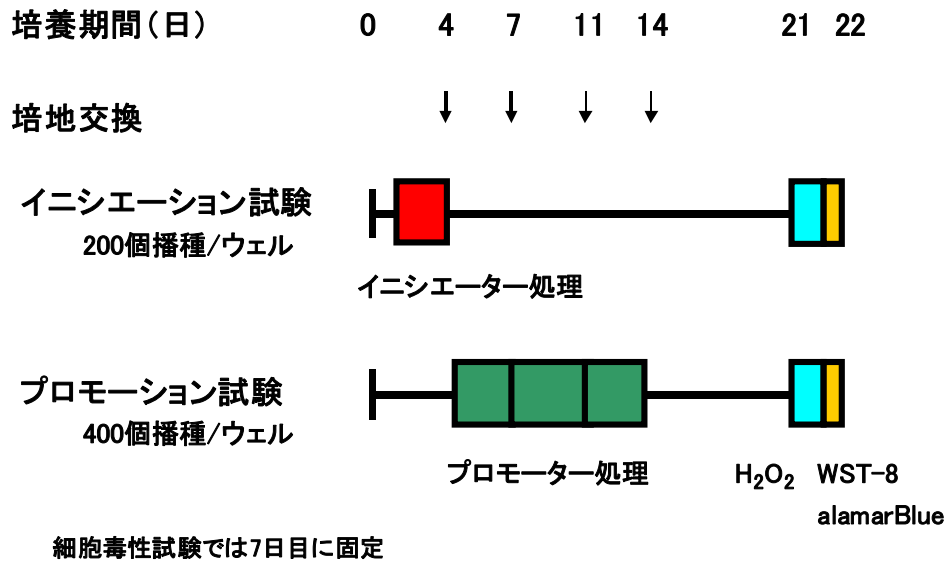


図Ⅲ. 2. 2-15 過酸化水素による Bhas 42 形質転換細胞の選択。A: 過酸化水素添加前、B: 過酸化水素 (0.0015%) で 24 時間処理後。A と B はウェルの同じ位置を撮影した。



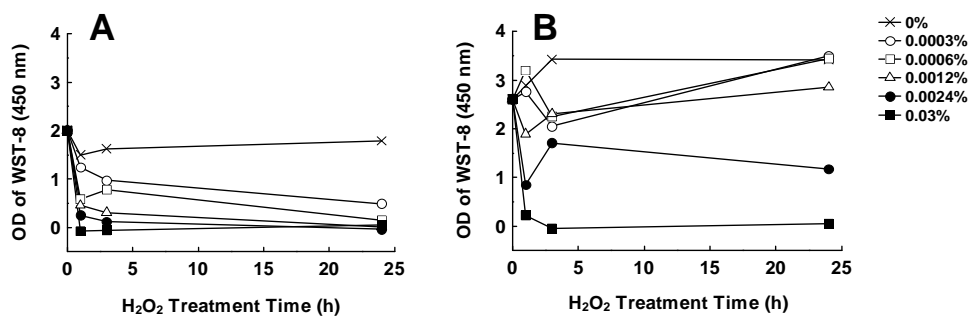
図Ⅲ. 2. 2-16 過酸化水素による Bhas 42 正常細胞のネクロシス。過酸化水素 (0.0015%) で 24 時間処理後、3 重染色した。形質転換細胞: ヘキスト 33342 により青く染まっているので生存している、正常細胞: エチジウムホモダイマー III により赤く染まっているのでネクロシスで死滅している、FITC-Aannexin V により緑に染まっている細胞は無いのでアポトーシスは誘発されていない。

この観察結果を元に、基本的な実験は以下のように行った。96 ウェルプレートを用いる Bhas 42 細胞形質転換試験において (培地 0.1 mL/ウェル)、細胞播種 21 日目に過酸化水素 (最終濃度の 3 倍) を含む培地を 0.05 mL 添加した。1~24 時間後、WST-8 または alamarBlue を含む培地を 0.05 mL (色素 0.01 mL + 培地 0.04 mL) 添加し、3 時間後、吸光度 (450 nm) または蛍光度 (励起: 530 nm、測定: 590 nm) を測定した (図Ⅲ. 2. 2-17)。



図Ⅲ. 2. 2-17 Bhas 42 細胞を用いた過酸化水素法のスケジュール

正常細胞は死滅するが、形質転換細胞は生きていような条件を見出すため、過酸化水素の適正な濃度と処理時間を求める実験を行った。すなわち、正常細胞のみのウェルと MCA 1 μg/mL により誘発された形質転換巣が1個含むウェルをあらかじめ選んでおき、過酸化水素の濃度と処理時間の影響を調べた。WST-8 の吸光度を指標にして測定した結果、過酸化水素は濃度及び処理時間に依存して正常細胞を特異的に死滅させることが分かった(図Ⅲ. 2. 2-18)。そこで Bhas 42 細胞の形質転換試験では、過酸化水素は 0.0015% で処理し、24 時間後に色素を添加して測定することにした。



図Ⅲ. 2. 2-18 Bhas 42 形質転換細胞を含むウェルにおける過酸化水素の濃度及び処理時間の影響。A:形質転換巣を含まないウェル、B:形質転換巣を含むウェル。

Bhas 42 細胞の形質転換が色素により定量可能かどうか、MCA を用いて検討した。WST-8 の吸光度及び alamarBlue の蛍光度を測定した後、glutaraldehyde (2.5% : 最終濃度 0.25% の約 10 倍) を 0.02 mL 加え、30 分以上放置して固定し、ギムザ染色した。その結果、MCA の用量に依存して形質転換巣と吸光度または蛍光度は増加した。また、ウェル一つ一つを顕微鏡観察したところ、高い測定値を示したウェルは形質転換巣を含んでいることが分かった (図 III. 2. 2-19、20)。MCA 以外の被験物質 (がん原性物質: 13 個、非がん原性物質: 8 個) を用いても、過酸化水素法と観察で定量する通常の方法の結果が一致したことから、過酸化水素法により形質転換を定量できることが確認された (表 III. 2. 2-8)。なお、ウェル側面に形質転換巣がある場合でも定量可能であった。さらに、Bhas 42 細胞の親株である BALB/c 3T3 細胞においても定量可能であったことから、過酸化水素の作用は v-Ha-ras 遺伝子特異的でないことが明らかとなった。

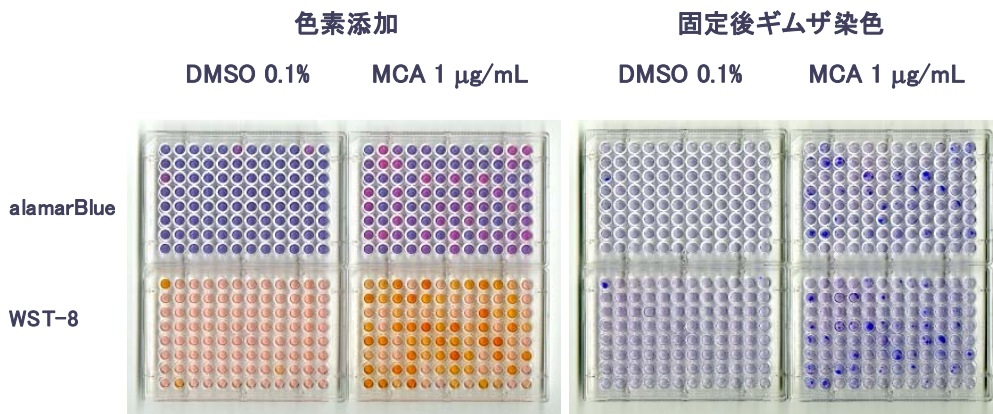


図 III. 2. 2-19 過酸化水素法における色素の変化と形質転換巣を含むウェルの一致

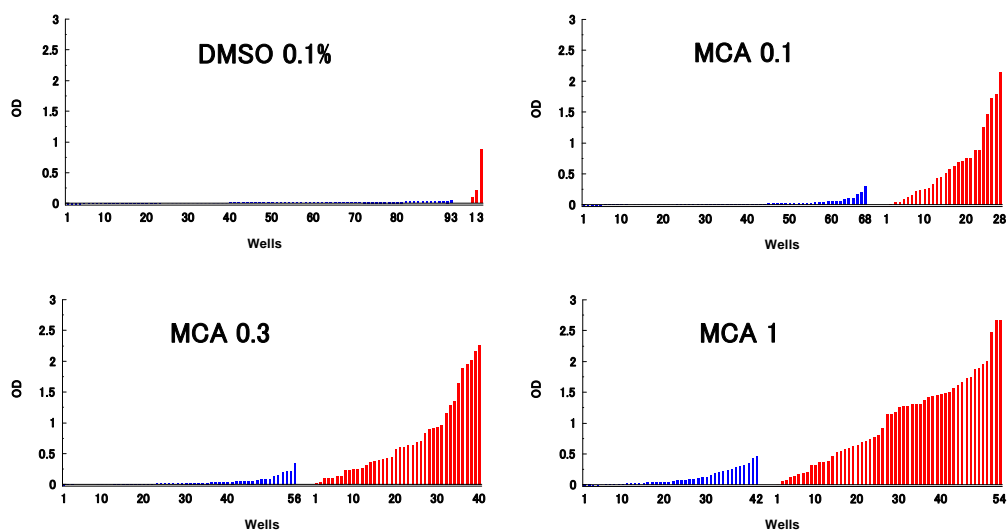


図 III. 2. 2-20 過酸化水素法における MCA の用量依存性 (WST-8 使用)。青: 正常細胞のみのウェル、赤: 形質転換巣を含むウェル。

表Ⅲ. 2. 2-8 過酸化水素法と観察法の結果の一致

物質名	イニシエーション試験		プロモーション試験	
	観察法	H ₂ O ₂ 法	観察法	H ₂ O ₂ 法
がん原性物質				
2-Acetylaminofluorene	+	+	+	+
5-Azacytidine	+	+	+	+
Benzo[a]pyrene	+	+	-	±
Dibenz[a,h]anthracene	+	+	±	±
Lithocholic acid	-	-	+	+
MNNG	+	+	+	+
Methapyrilene HCl	-	-	+	+
Mezerein	-	-	+	+
Mytomycin C	+	+	-	-
Sodium arsenite	-	±	+	+
Sterigmatocystin	+	+	-	-
Styrene oxide	+	+	+	+
Zinc chloride	-	-	+	+
非がん原性物質				
Ampicillin sodium salt	-	-	-	-
Benz[a]anthracene	-	-	-	-
Caffeine	-	-	-	-
Eugenol	-	-	-	-
D(-)-Mannitol	-	-	-	-
1-Naphthylamine	-	-	-	-
Phorbol	-	-	-	-
m-Toluidine	-	-	-	-

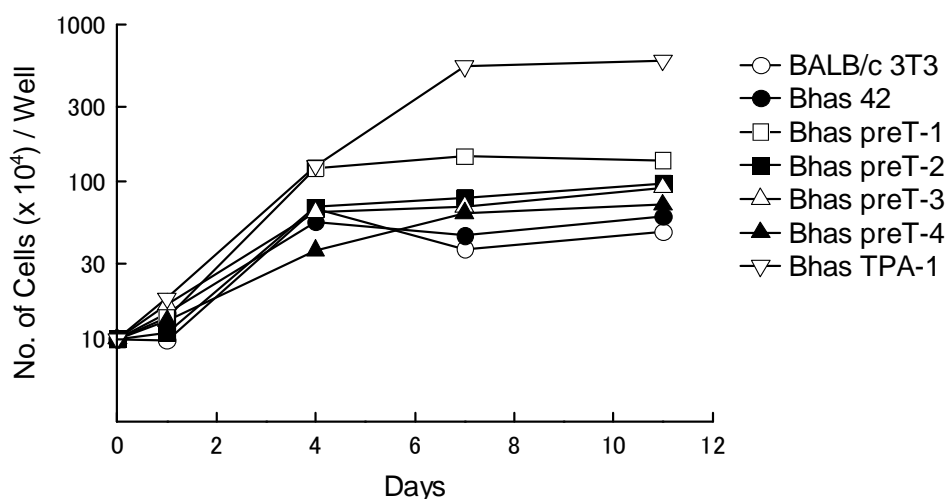
吸光度や蛍光度が高いにもかかわらず、形質転換巣が観察されないウェルが少数認められたことから、このようなウェルに存在する Bhas 42 細胞は、形質転換する前の細胞、すなわち形態変化は見られないが、分子レベルでは異常が起きている細胞ではないかと考えた。そこで、形質転換していないが過酸化水素を添加しても死ななかつた細胞 (Bhas preT 細胞、4 株) を分離し、軟寒天コロニー形成法を用いて細胞の悪性度を調べた。細胞の軟寒天培養では、まず 0.5% 寒天培地を 3 mL ずつ 60 mm ディッシュに分注し、0.5% 寒天培地による支持層を作製した。支持層が固まった後、その上に細胞を含む 0.33% 軟寒天培地 2 mL を重層し、細胞播種層とした (100~10⁴ 個/ディッシュ。各細胞の播種数は予想されるコロニー形成率から設定した)。播種後、3 週間培養し、顕微鏡下でディッシュあたりのコロニー数を数えた。また軟寒天培養と並行して、液体培地を用いた通常の接着培養も行った。すなわち、各細胞を 60 mm ディッシュに播種し (100 個/培地 4 mL/ディッシュ)、播種後 8 日目に固定後、ギムザ液で染色し、ディッシュあたりのコロニー数を数えた。このコロニー数から生存細胞数あたりの軟寒天コロニー数を求め、軟寒天コロニー形成率とした。また、各細胞を 6 ウェルプレートに播種し (10⁵ 個/培地 2 mL/ウェル)、経時的にトリプシンで剥がしてウェルあたりの細胞数を求め、増殖曲線を描くことで各細胞の細胞密度を比較した。BALB/c 3T3 細胞、Bhas 42 細胞、及び完全に形質転換した細胞 (Bhas TPA-1 細胞) と比較した結果、全ての Bhas

preT 細胞は、軟寒天コロニー形成率では BALB/c 3T3 細胞 < Bhas 42 細胞 < Bhas preT 細胞 < Bhas T 細胞(表Ⅲ. 2. 2-9)、また細胞密度においても BALB/c 3T3 細胞 < Bhas 42 細胞 < Bhas preT 細胞 < Bhas T 細胞を示した(図Ⅲ. 2. 2-21)。つまり過酸化水素法を用いれば、形質転換細胞はもちろんのこと、前形質転換細胞をも選択することが可能であることが分かった。

表Ⅲ. 2. 2-9 Bhas preT 細胞の軟寒天コロニー形成率

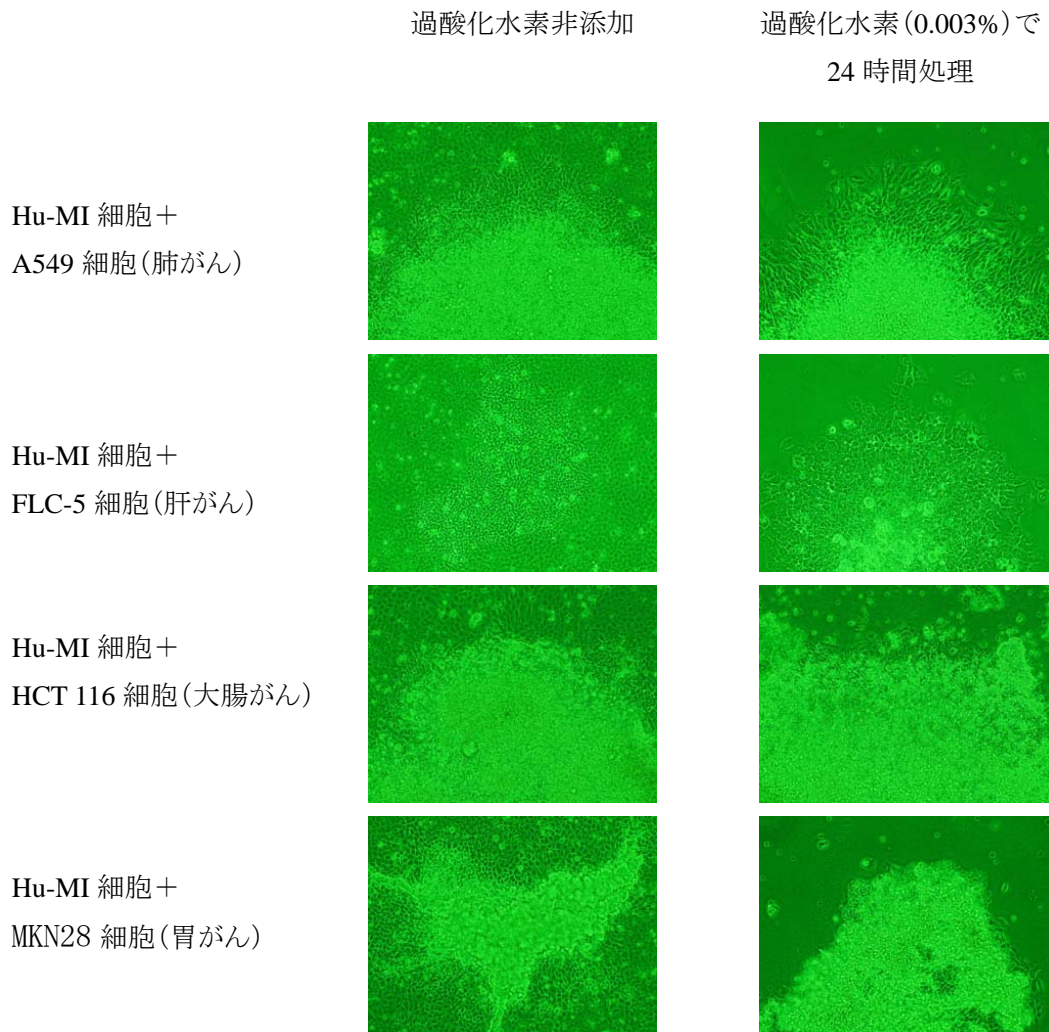
細胞	接着培養		軟寒天培養		
	播種数 (個/dish)	コロニー数 (個/dish)	播種数 (個/dish)	コロニー数 (個/dish)	コロニー 形成率(%)*
BALB/c 3T3	100	64.3	10000	0	0
Bhas 42	100	48.3	10000	30.3	0.6
Bhas preT-1	100	54.0	1000	98.7	18.3
Bhas preT-2	100	52.7	1000	135.7	25.8
Bhas preT-3	100	58.3	1000	64.0	11.0
Bhas preT-4	100	51.0	1000	24.7	4.8
Bhas TPA-1	100	32.3	100	33.3	103.1

*:(軟寒天培地中におけるコロニー数/軟寒天培地への播種数)÷(液体培地中におけるコロニー数/液体培地への播種数)×100

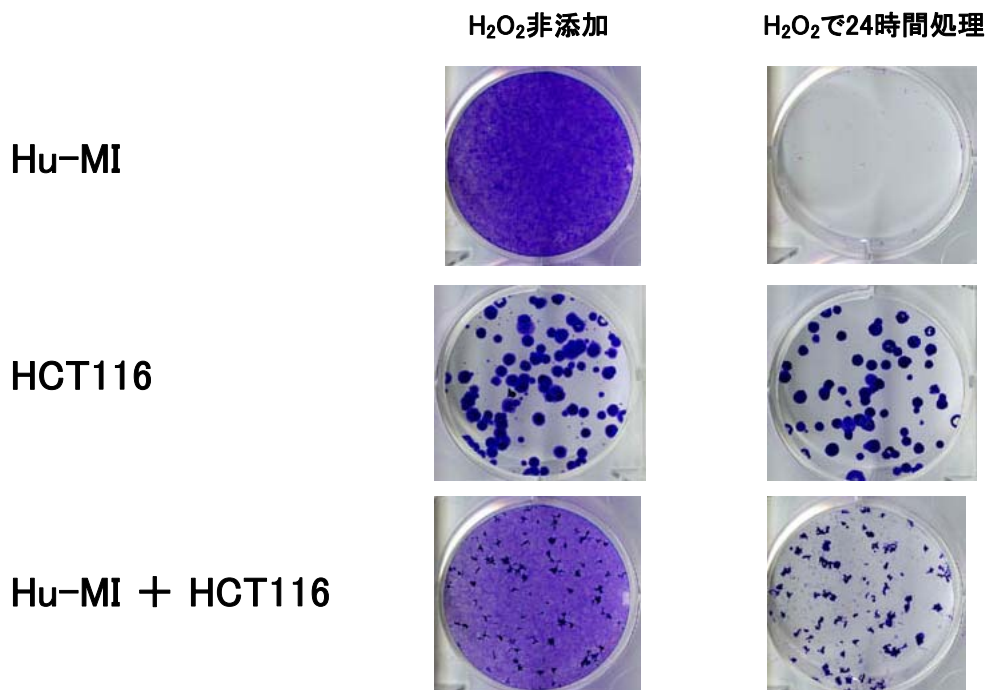


図Ⅲ. 2. 2-21 Bhas preT 細胞の増殖曲線

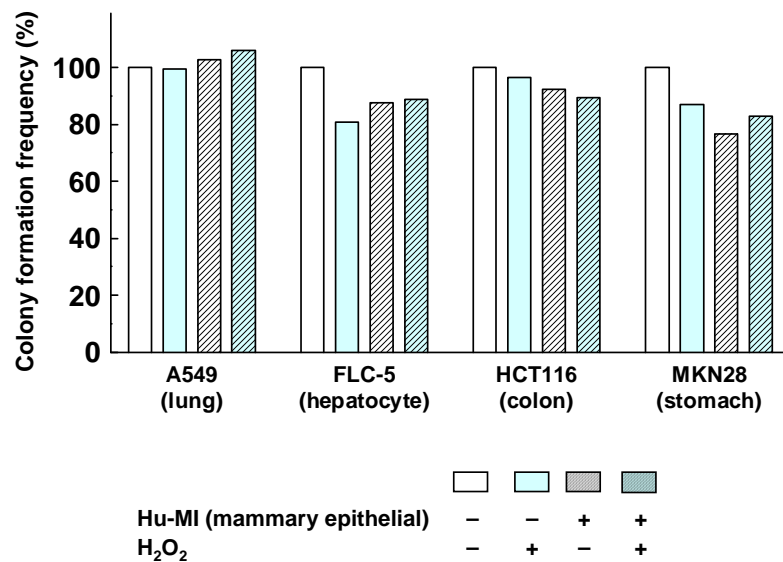
Bhas 42 細胞はマウス細胞である。そこで、過酸化水素による形質転換細胞の選択が、種特異的な現象であるかどうか、ヒト形質転換細胞を用いて検討した。しかし現在、ヒト正常細胞を用いた定量的な形質転換試験は存在しないため、Hu-MI 細胞(SV40 遺伝子の導入により無限増殖能を獲得したが、ヌードマウスにおいて腫瘍原性は示さないヒト乳房上皮細胞。単層状態を維持する)を正常細胞とみなし、多数個の Hu-MI 細胞と少数個のヒトがん細胞(A549 細胞:肺がん、FLC-5 細胞:肝がん、HCT 116 細胞:大腸がん、MKN28 細胞:胃がん)を同時に播種し、共培養する実験系を組んだ。すなわち、しばらく培養すると、単層の Hu-MI 細胞の中に多層になったヒトがん細胞がコロニーとして形成される。Hu-MI 細胞(10^4 個/ウェル)と各がん細胞(FLC-5 細胞のみ 500 個、他は 100 個/ウェル)を 6 ウェルプレートに播種し(培地 2 mL/ウェル)、播種から 14 日目に過酸化水素(0.033%:最終濃度 0.003%の 11 倍)を含む培地を 0.2 mL 添加し、24 時間後に観察した。なお、培地は MEM+ウシ胎児血清 10%を用いた。その結果、Hu-MI 細胞は死滅により剥離したのに対し、全てのヒトがん細胞はコロニーの状態を維持し生存が確認された(図 III. 2. 2-22)。培養終了後、固定、ギムザ染色してコロニーを観察すると、Hu-MI 細胞と共培養し過酸化水素を添加しなかった群では、対照群(がん細胞を単独で培養し、過酸化水素を添加しなかった群)と比較してコロニーの大きさは小さくなるものの、いずれのがん細胞でもコロニー形成率の著しい低下は認められなかった。さらに、過酸化水素を添加した群では、Hu-MI 細胞との共培養の有無にかかわらず、対照群と比較して、コロニー形成率の大きな変化は見られなかった(図 III. 2. 2-23、24)。これらの結果から、マウスの形質転換細胞だけでなく、ヒトの、しかも異なった組織由来のいずれのがん細胞も過酸化水素で選択できることが示され、過酸化水素法は哺乳動物細胞一般に応用できることが示唆された。



図Ⅲ. 2. 2-22 Hu-MI 細胞(SV40 遺伝子導入ヒト乳房上皮)と共培養したヒトがん細胞の過酸化水素による選択



図Ⅲ. 2. 2-23 Hu-MI 細胞と共培養した HCT116 細胞の過酸化水素による選択。固定後、ギムザ染色をした。



図Ⅲ. 2. 2-24 ヒトがん細胞のコロニー形成率における Hu-MI 細胞と過酸化水素の影響

活性酸素には、過酸化水素の他にスーパーオキシドアニオンラジカル、ヒドロキシラジカル、一重項酸素が含まれ、いずれも強い酸化力を示す。そこで、過酸化水素以外の活性酸素でも形質転換細胞が選択可能かどうか検討した。なお、過酸化水素以外の活性酸素は非常に不安定で寿命が短いため、試薬として添加できない。従って、benzo(a)pyrene (BP) が光によりスーパーオキシドアニオンラジカルを発生する性質を利用した。Bhas 42 細胞において形質転換巣を誘発させた後、培地をリン酸緩衝生理食塩水と交換し(2 mL/ウェル)、BP 溶液(20 $\mu\text{g/mL}$:最終濃度 20 ng/mL の 1000 倍)を 2 mL 添加した。太陽類似光照射装置で光を照射後(300~800 nm、UVA の照射強度: 5.6 mW/cm^2 、照射時間:6 分、照射量:2 J/cm^2)、培地と交換し、24 時間後に観察した。その結果、BP 処理+光照射群においてのみ形質転換細胞の選択が見られ、他の群では何の変化も認められなかった(図 III. 2. 2-25)。BP 処理と光照射を組み合わせる時に、過酸化水素を添加した時と同様の結果が得られたことから、どの活性酸素種を用いても形質転換細胞を選択できることが示唆された。

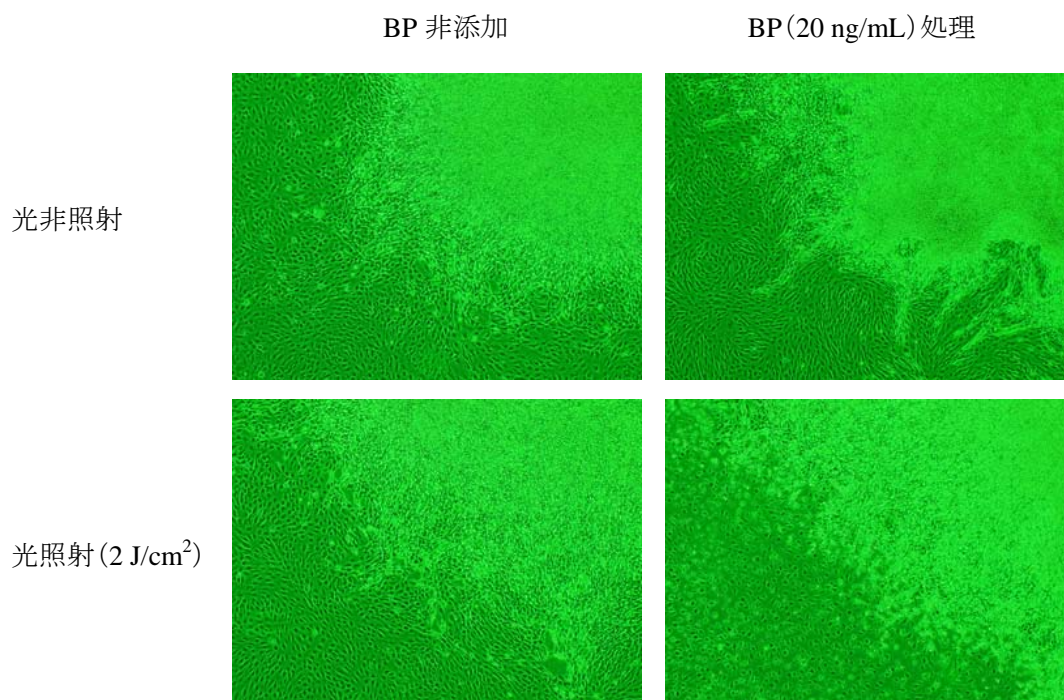
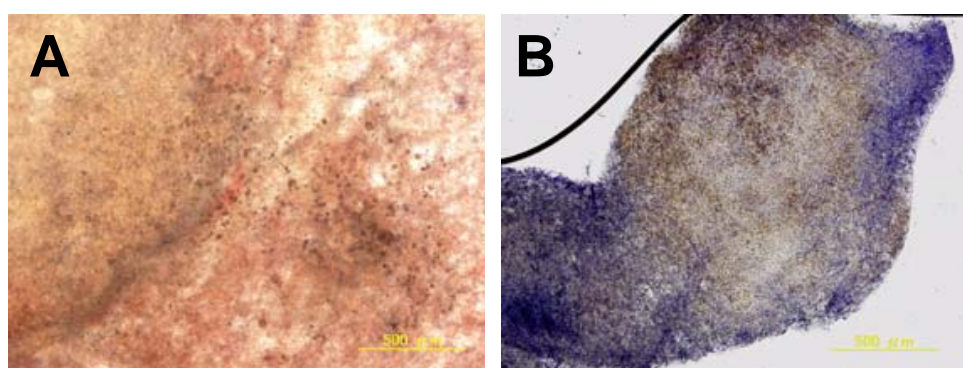


図 III. 2. 2-25 BP 処理と光照射による Bhas 42 形質転換細胞の選択

今までの実験から、過酸化水素法は培養細胞を用いた実験系に応用できることが分かった。そこで、生体から採取した組織においても形質転換細胞の選択が可能かどうか、rasH2 マウス(ヒト c-Ha-ras 遺伝子導入マウス、メス、6 週齢)を用いて検討した。イニシエーターとして N-ethyl-N-nitrosourea を腹腔内投与し(120 $\text{mg/kg}/10 \text{ mL}$ 生理食塩水)、その1週間後から週1回、プロモーターである butylhydroxytoluene を7週間反復経口投与し(400 $\text{mg/kg}/10 \text{ mL}$ コーン

油)、さらに 2 週間飼育した。肺に形成された腫瘍をその周囲と一緒に切除後、薄切し、過酸化水素添加培地(最終濃度 0.015%)に入れた。CO₂ インキュベーター(5% CO₂, 37°C)内で 24 時間静置した後、トリパンブルー溶液(リン酸緩衝生理食塩水に 0.002% 添加)で 10 分間染色した。なお、トリパンブルーは生細胞には取り込まれないが、死細胞には取り込まれ、細胞を青く染色する性質を持つ。腫瘍は解剖した時点で、明らかに存在が認められる位はつきりしていたため、切片を顕微鏡下で観察すると、腫瘍部と非腫瘍部が形態的に区別できた。過酸化水素非処理群では腫瘍部及び非腫瘍部共に染色されなかったが、過酸化水素処理群では非腫瘍部のみが青く染色された(図Ⅲ. 2. 2-26)。組織学的には、腫瘍部は腫瘍細胞で構成されていたことから、生体内の腫瘍も過酸化水素で選択できることが明らかとなった。従って、過酸化水素法は培養細胞だけでなく、哺乳動物個体から取り出した細胞に対しても応用可能なことが示唆された。



図Ⅲ. 2. 2-26 過酸化水素によるマウス肺腫瘍細胞の選択。A: 過酸化水素非添加、B: 過酸化水素(0.015%)で 24 時間処理。

本プロジェクトにおいて開発した過酸化水素法は、過酸化水素に対する耐性という新しいマーカーによって形質転換細胞を正常細胞から選択し、機器を用いて客観的に定量することを可能とした。今まで、形質転換細胞を定量するには、通常のコロニー形成法及びフォーカス形成法では、固定、染色、観察が必要であり、また軟寒天コロニー形成法では固定、染色は不必要だが、観察が必要であった。これに対し過酸化水素法は、1) 固定、染色、観察の一連、もしくは一部の作業を省いたことによる簡便な定量法であり、大幅に労力と時間を削減できる、2) 形質転換細胞を吸光度や蛍光度により測定機器で定量するため、測定者の違いによる差が全く無い、客観的な方法である、3) 過酸化水素や色素を添加する単純作業なので、機器を使った自動化が可能である、などの利点を持っており、有用な試験法になると考えられた。

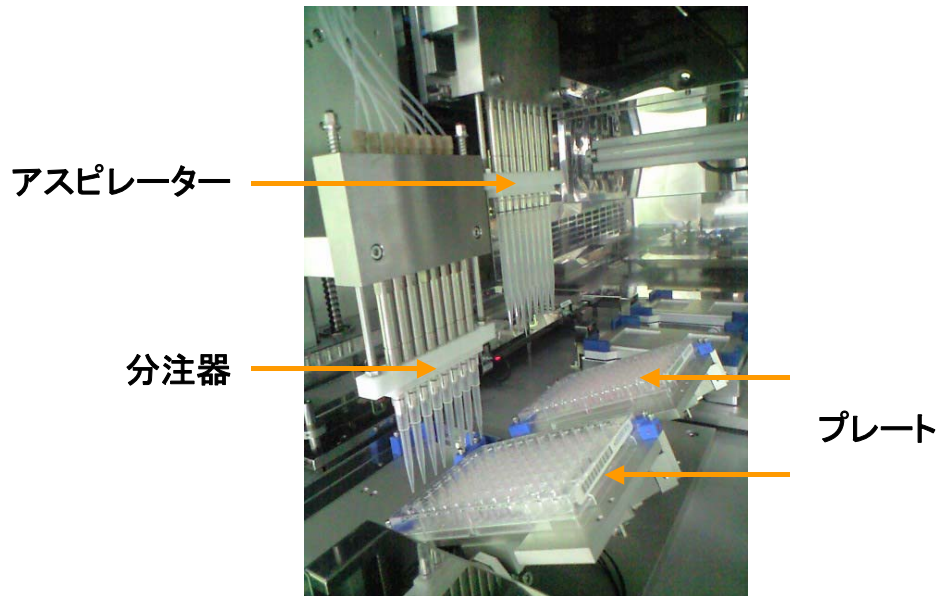
2-2. 自動化システムの開発

近年、マルチウェルプレートのウェルへの分注作業などを自動化したシステムによるハイスループットスクリーニング技術が、新薬の開発や毒性の検出に広く導入されている。さらに、細胞培養の全自動システムなども開発されつつある。一方、培養細胞を用いた毒性試験の基本的な一連の作業（細胞の播種、被験物質の処理、培地交換など）を行う自動化システムはまだ開発されていない。Bhas 42 細胞形質転換試験には、これら一連の作業が全て含まれている。そこで、Bhas 42 細胞形質転換試験の自動化システムの開発を試みた（エイブル株式会社との共同研究）。

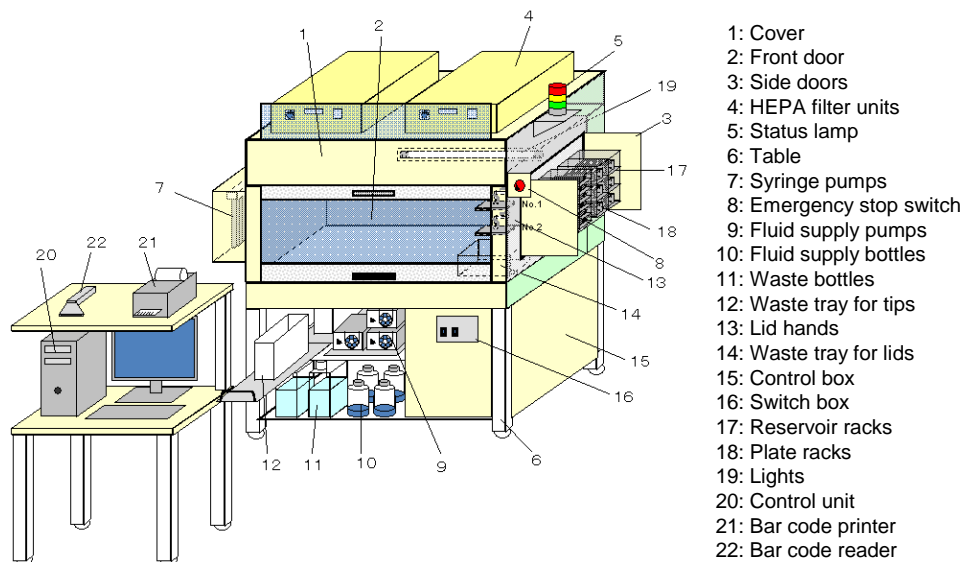
本自動化システムは、プレート移動装置、液体分注装置、液体吸引装置が組み込まれているクリーンベンチユニット、並びにパソコンによる制御ユニットの 2 ユニットからなり、形質転換試験の一連の作業（細胞播種、被験物質処理、培地交換、固定、染色）を自動で行える。ただし、自動化システムで作業を行うため、細胞をインキュベーターから出し入れする時は、96 ウェルプレートが入っているラックを人が持ち運ぶ（図Ⅲ. 2. 2-27～30）。



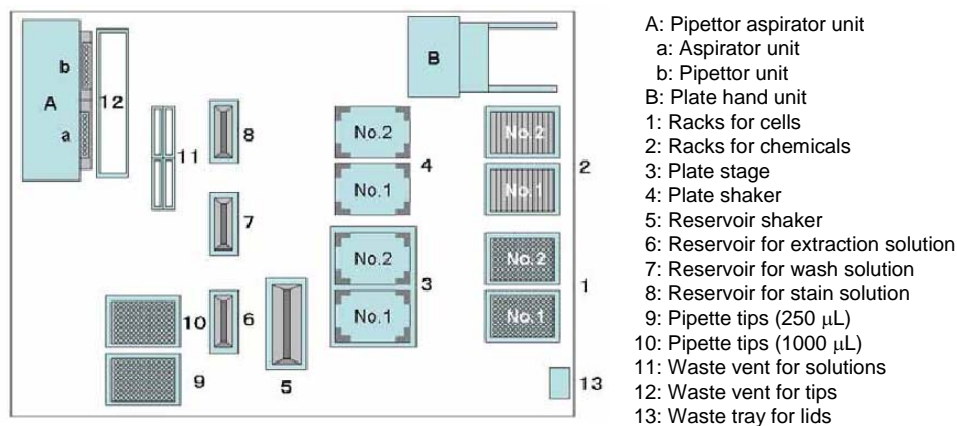
図Ⅲ. 2. 2-27 自動化システム。A: 全体像（正面がクリーンベンチユニット、右が制御ユニット）、B: インキュベーターの上段に、自動化システムで用いるラックが入っている（6個入っているが、前面の3個のみ見える。各ラックは6段から成り、各段に96ウェルプレートが一枚ずつ置いてある）。また、下段には手作業で行う時に用いるトレイが入っている（赤いシールが貼ってある6個。各トレイには、96ウェルプレートが複数枚置いてある）。



図Ⅲ. 2. 2-28 培地交換をしているところ。培地を分注する時は細胞に直接培地が当たらないように、また培地を吸引する時は細胞に触れずにできるだけ培地を除けるように、プレートが斜めになっている。



図Ⅲ. 2. 2-29 自動化システムの詳細



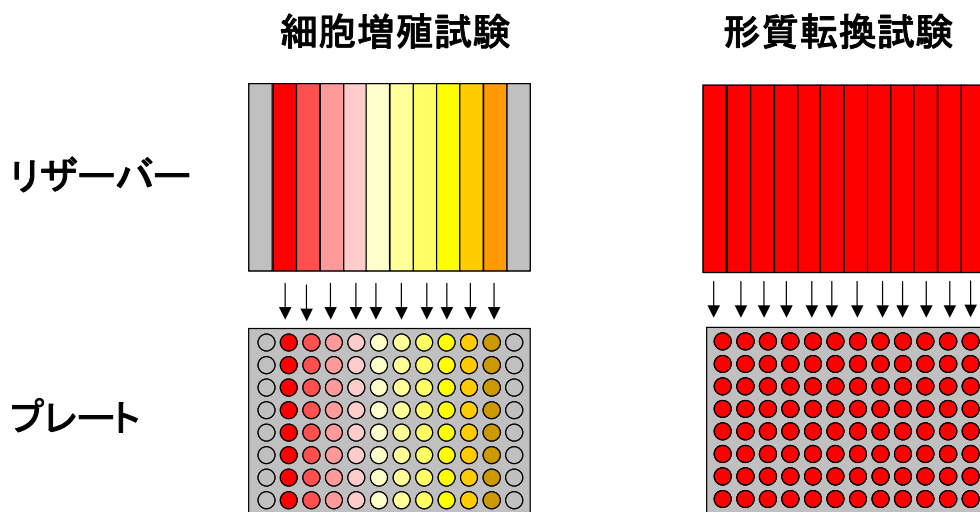
図Ⅲ. 2. 2-30 ワークテーブルのレイアウト

プログラムはできるだけ単純化した。すなわち、モードは二つだけにし、「分注モード」では分注器による分注作業のみ、「培地交換モード」では分注器とアスピレーターによる分注と吸引作業を実施するようにした。そして、分注する液体を細胞懸濁液、被験物質添加培地、新鮮培地、メタノール、ギムザまたはクリスタルバイオレット染色液と変えることによって、細胞播種、被験物質処理、培地交換、固定、染色の作業ができるようにした(表Ⅲ. 2. 2-10)。また、分注器とアスピレーターは8連とし、リザーバーの1レーンを96ウェルプレートのウェル1列に対応させることで、直感的にどの培地がどのウェルに移動するか分かるようにし、間違いを防ぐようにした(図Ⅲ. 2. 2-31)。なお、溶解性が悪く、沈殿する被験物質のことを考え、リザーバーから被験物質添加培地を取る時、ピペッティングする機能を付けた。

表Ⅲ. 2. 2-10 自動化システムのプログラムモードと作業

モード	播種後の作業日(日)		作業
	イニシエーション試験	プロモーション試験	
分注	0, 1, 21	0, 21	分注
培地交換	4, 7, 10, 14	4, 7, 10, 14	吸引と分注

Bhas 42 細胞形質転換試験におけるプログラムにおいて、イニシエーション試験では播種した翌日に被験物質を分注する作業がある点だけが、プロモーション試験と違う。

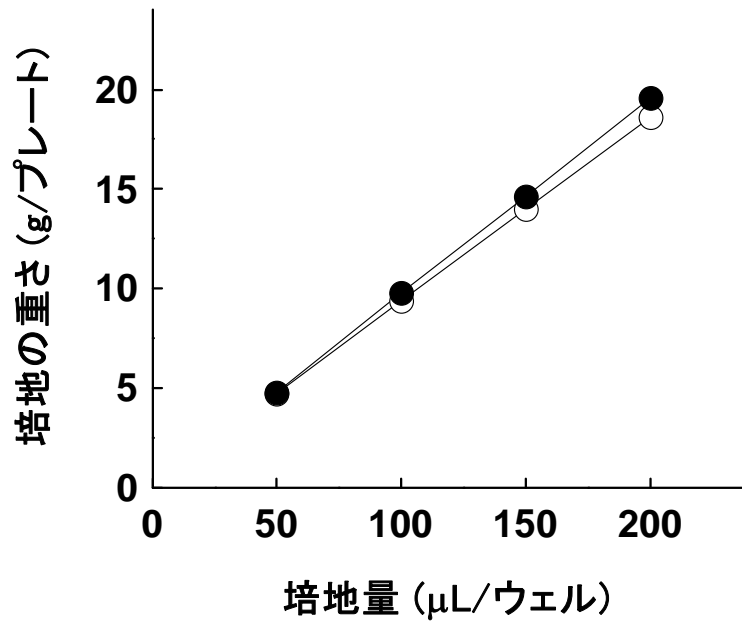


図Ⅲ. 2. 2-31 リザーバーの各レーンに対応する 96 ウェルプレートウェルのウェル。細胞増殖試験では、1 群あたり 8 ウェルを用いるので、リザーバーの各レーンに濃度の異なる被験物質を含む培地が入っている。一方、形質転換試験では、1 群あたり 96 ウェルを用いるので、リザーバーの全レーンに同じ濃度の被験物質を含む培地が入っている。分注器はリザーバーの 1 レーンから培地を取り、対応する 96 ウェルプレートのウェル 1 列に分注する。

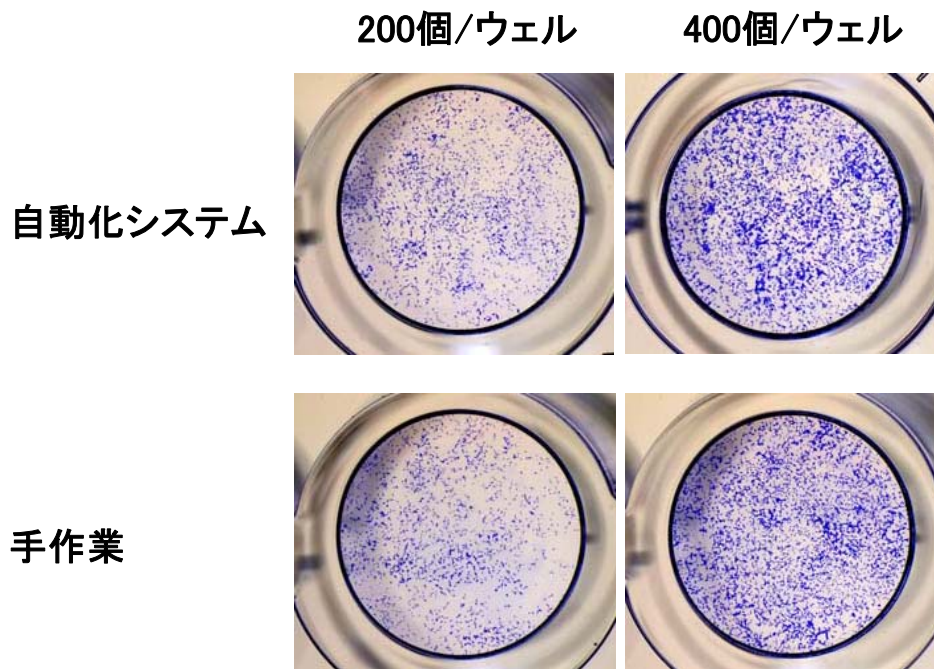
最初に、自動化システムが正確に培地を分注できるかどうか検討した。96 ウェルプレートの全ウェルに培地を 50~200 μL 添加し、重さを測定したところ、手作業で分注した時と殆ど変わらない結果が得られた(図Ⅲ. 2. 2-32)。

次に、自動化システムが細胞を均一に播種できるかどうか検討した。細胞懸濁液は、しばらく放置すると細胞が沈んでしまい、細胞濃度のむらが出てしまう。そこで細胞を播種している間は、細胞懸濁液を入れておきリザーバーが振盪し続けるような機能を付けた。細胞を播種後、3 日目に固定、ギムザ染色した。その結果、細胞は自動化システムを用いた場合でも、手作業で播種した時と変わらず、同じような細胞数が播種されており、かつウェル底面に均一に増殖していた(図Ⅲ. 2. 2-33)。

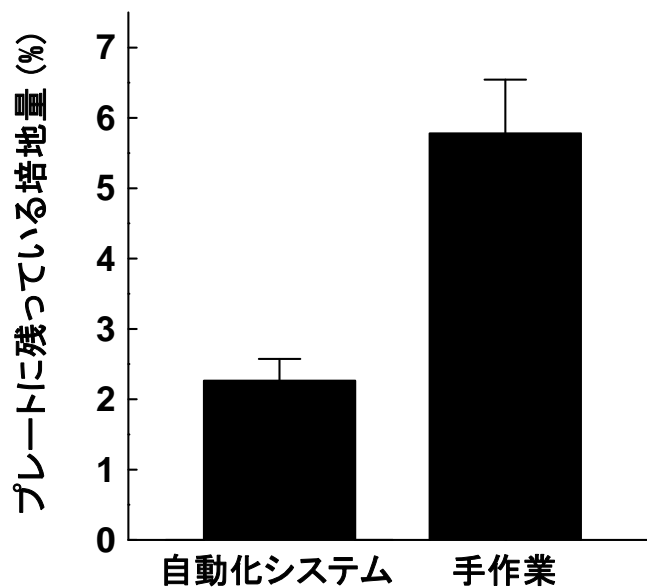
さらに、自動化システムが培地を残すことなく吸引できるかどうか検討した。96 ウェルプレートに培地を 100 μL ずつ分注した後、培地をアスピレーターで除いた。また手作業では、プレートを逆さにし、3 回振り切ることで培地を除いた。培地を除く前後で重さを量り、残存培地量(%)を求めたところ、手作業で培地を除いた時よりも、自動化システムを用いた時の方がよく培地を除けることが分かった(図Ⅲ. 2. 2-34)。



図Ⅲ. 2. 2-32 自動化システムと手作業における培地添加量の比較。●:自動化システム、○:手作業。

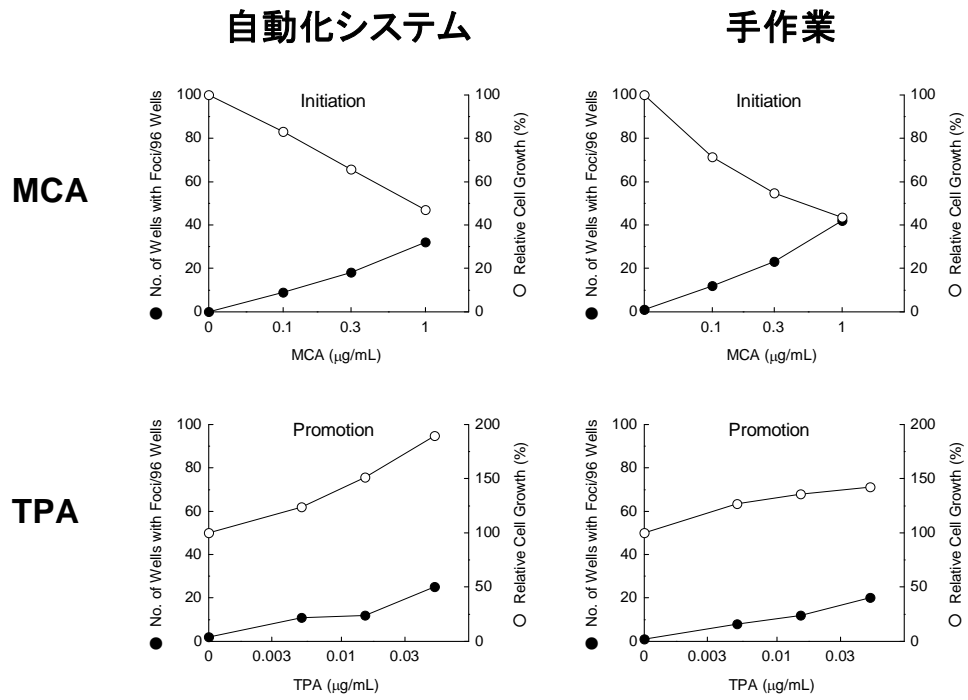


図Ⅲ. 2. 2-33 自動化システムと手作業における細胞播種数と細胞の広がり具合の比較



図Ⅲ. 2. 2-34 自動化システムと手作業における培地残存量の比較

本自動化システムの基本性能が、手作業と同様であることが分かったため、MCA と TPA を用い、Bhas 42 細胞形質転換試験のイニシエーション試験とプロモーション試験を実施した。その結果、手作業で実施した時と同様の形質転換率が得られた(図Ⅲ. 2. 2-35)。形質転換試験は、細胞を播種後、被験物質を処理し、培地交換をしながら長期培養するだけの一見単純な試験に見えるが、各過程を完璧にこなさないと、色々トラブルが生じてしまう。例えば、細菌汚染が起こったり、形質転換率があまり誘発されなかったり、逆に自然形質転換率が多く誘発されたりすることがある。形質転換試験で手作業と同じ結果が得られたことは、本自動化システムが正確に動いていることを示しており、形質転換試験だけでなく、細胞毒性試験など他の試験にも利用可能なことが示唆された。また、過酸化水素法を用いれば、Bhas 42 細胞形質転換試験がハイスループット化できる可能性が示された。



図Ⅲ. 2. 2-35 Bhas 42 細胞形質転換試験における自動化システムと手作業との比較

2-3. 発光細胞の開発

Bhas 42 細胞形質転換試験をハイスループット化する一つの方法として、過酸化水素法を開発した。しかし、この方法では形質転換巣を誘発するまで培養しなければならず、3 週間の培養期間が必要となる。そこで、より短い培養期間ですみ、かつ簡便な方法を確立するため、発光ベクターを導入した Bhas 42 細胞による形質転換の可視化を試みた。

最初に、マイクロアレイ解析により発光ベクターに導入する候補となる遺伝子の検索を行った(東大の黒田真也教授との共同研究)。Bhas 42 細胞のプロモーション試験において、3 種の発がんプロモーター(FeCl₃:30 及び 300 µg/mL、リトコール酸:20 µg/mL、オカダ酸:10 ng/mL、TPA:50 ng/mL)を添加し、播種後 7、10、14 日目にトータル RNA を抽出した。得られた RNA を用いてマイクロアレイ解析を実施し、発現が変動している遺伝子の検索を行った。その結果、全ての発がんプロモーターにおいて、7、10、14 日目の全ての日で共通して発現の増加または減少が見られた遺伝子は無かった。そこで、部分的条件において共通の変動が見られた遺伝子を 13 個に絞り込み(発現が増加した遺伝子:6 個、発現が減少した遺伝子:7 個、表Ⅲ. 2. 2-11)、さらにその中からマトリックスメタロプロテイナーゼ 10(MMP-10)を発現が増加する標的遺伝子として選択した。また、β-アクチンを内部標準遺伝子として選んだ。

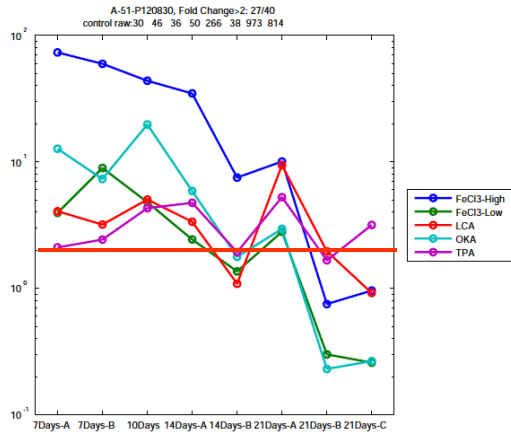
マイクロアレイ解析はあまり定量性が高くないことが知られている。そこでリアルタイム RT-PCR 法を用いて、MMP-10 と β-アクチン発現量の再現性確認を実施した。その結果、MMP-10 においてはマイクロアレイ解析の結果と殆ど同じような発現量の変化が見られ、高い再現性を示したが(図Ⅲ. 2. 2-36)、β-アクチンにおいてはマイクロアレイ解析と異なり、どの発がんプロモーターを用いても一定の発現量を示した(図Ⅲ. 2. 2-37)。β-アクチンでは二つの分析法で結果が違ったものの、リアルタイム RT-PCR 法の方が定量性に関しては高い信頼性を持っているため、β-アクチンは内部標準遺伝子に適していると判断した。

表Ⅲ. 2. 2-11 候補遺伝子(13 遺伝子)のリスト

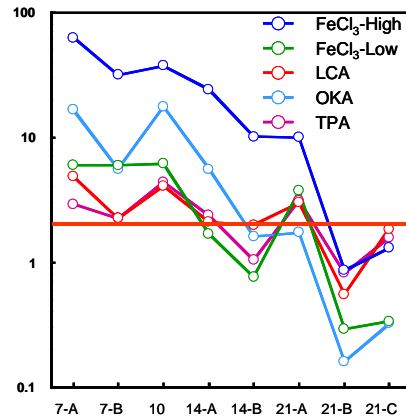
遺伝子名	Accession No.

発現が増加した遺伝子(6 遺伝子)	
1. Mus musculus cDNA clone IMAGE:30033403	BC052650
2. Mus musculus RIKEN cDNA 4930486L24 gene (4930486L24Rik)	NM_178098
3. Mus musculus transcription factor CP2-like 3 (Tcfcp2l3)	NM_026496
4. Mus musculus cDNA sequence BC016201	NM_145601
5. Mus musculus matrix metalloproteinase 10 (MMP-10)	NM_019471
6. Mus musculus 11 days embryo whole body cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:2700078F24	AK012530
発現が減少した遺伝子(7 遺伝子)	
1. Mus musculus RIKEN library, D230032H18 product:pentaxin related gene	AK084367
2. Mus musculus leucine-rich repeat LGI family, member 4 (Lgi4)	NM_144556
3. Mus musculus FXYD domain-containing ion transport regulator 1 (Fxyd1)	NM_019503
4. Mus musculus periostin, osteoblast specific factor (Postn)	NM_015784
5. Mus musculus 10 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4732458B12 product:ADAMTS-12	AK028812
6. Mus musculus GPI-anchored HDL-binding protein 1 (Gpihbp1)	NM_026730
7. Mus musculus 10 days neonate skin cDNA, RIKEN full-length enriched library, clone:4732479G04	AK028992

マイクロアレイ解析による
MMP-10の発現量

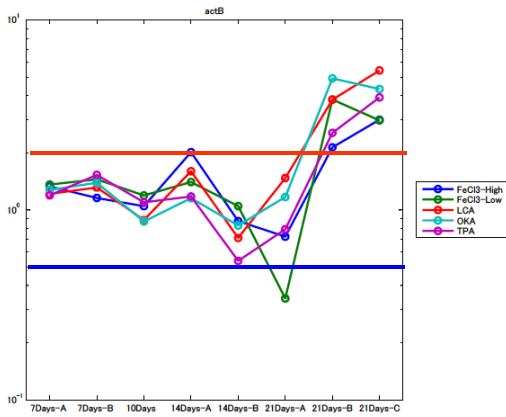


リアルタイムPCR解析による
MMP-10の発現量

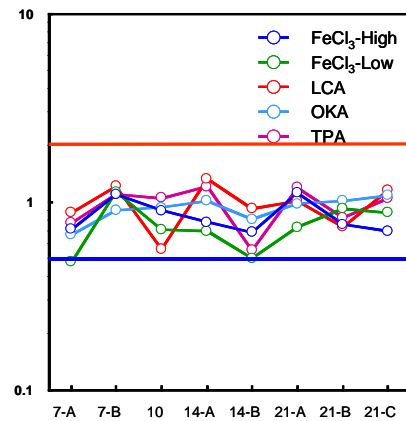


図Ⅲ. 2. 2-36 MMP-10 発現量の比較。FeCl₃-High: 300 μg/mL、FeCl₃-Low: 30 μg/mL、LCA: リコール酸 20 μg/mL、OKA: オカダ酸 10 ng/mL、TPA: 50 ng/mL。

マイクロアレイ解析による
β-アクチンの発現量

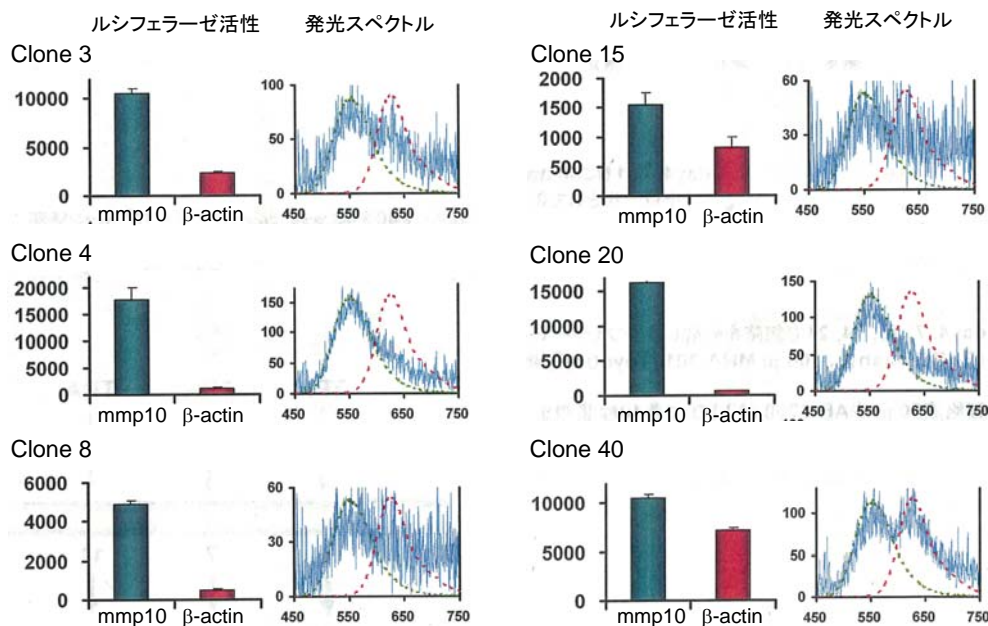


リアルタイムPCR解析による
β-アクチンの発現量



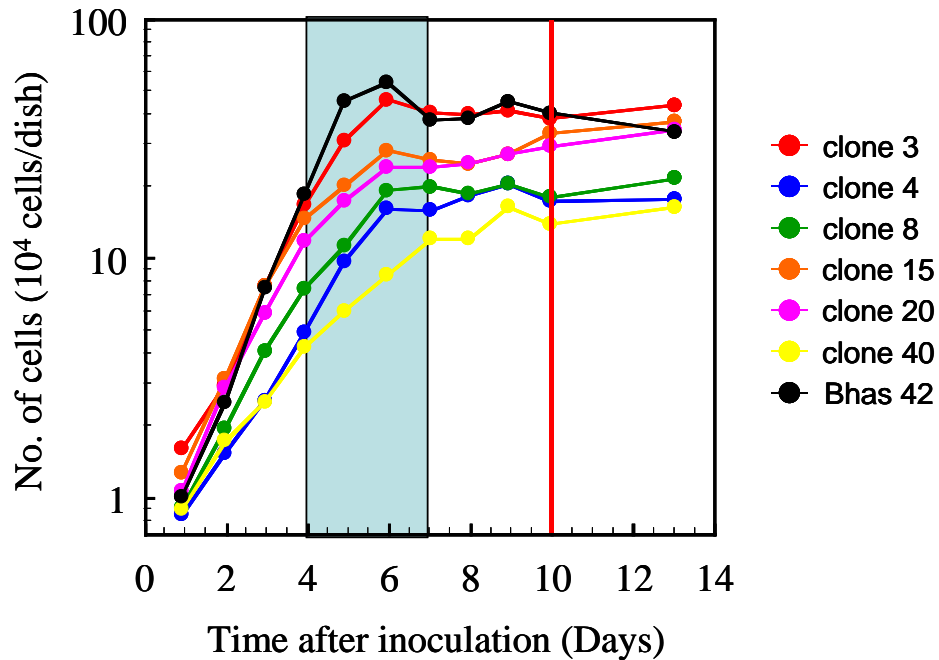
図Ⅲ. 2. 2-37 β-actin 発現量の比較。FeCl₃-High: 300 μg/mL、FeCl₃-Low: 30 μg/mL、LCA: リコール酸 20 μg/mL、OKA: オカダ酸 10 ng/mL、TPA: 50 ng/mL。

MMP-10 並びにβ-アクチンのプロモーターにルシフェラーゼ遺伝子を結合し、Bhas 42 細胞への導入を行った(産業総合研究所の近江谷克裕氏との共同研究)。スクリーニングを行い、ルシフェラーゼ活性を持つ 6 クローンを分離した(図Ⅲ. 2. 2-38)。



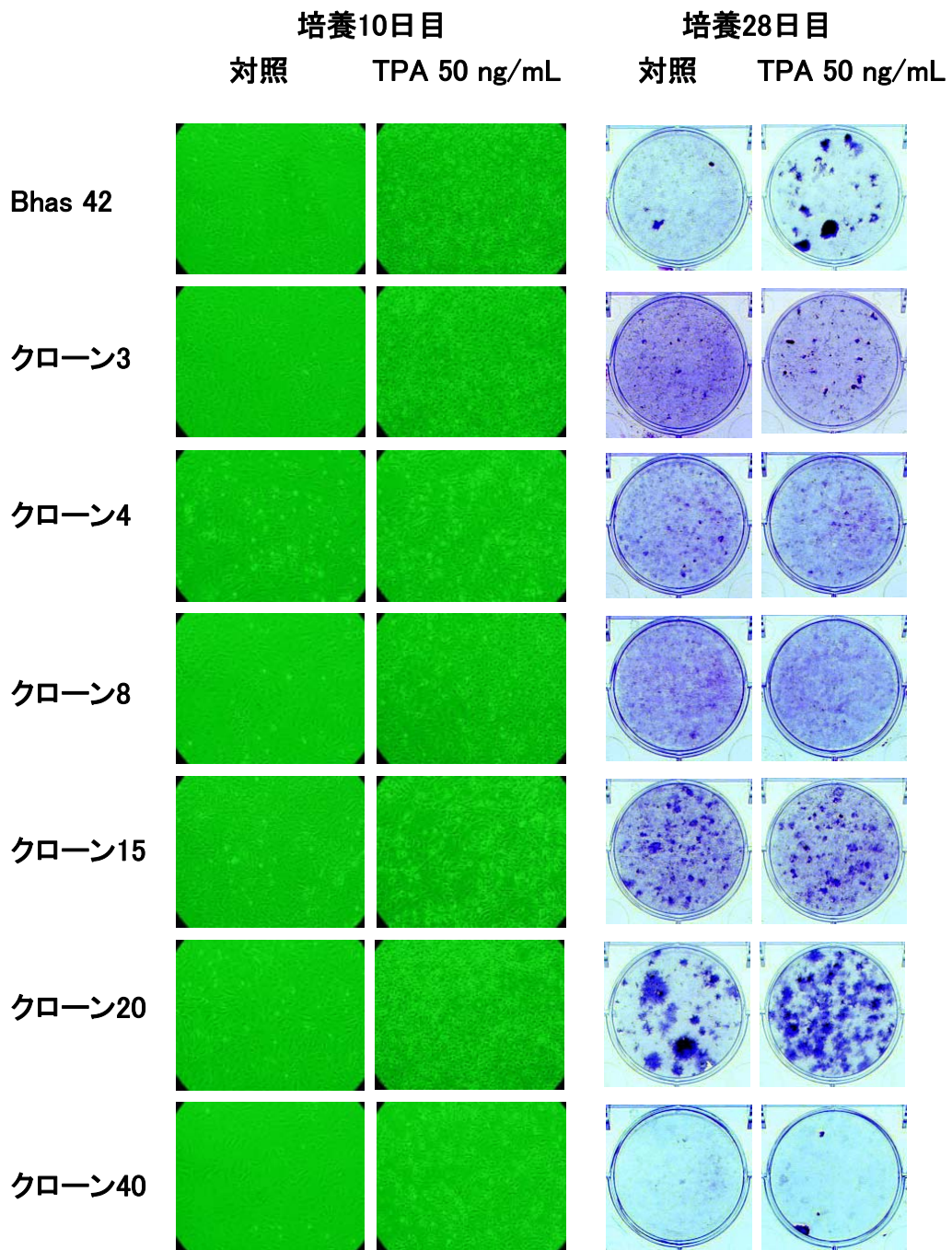
図Ⅲ. 2. 2-38 発光 Bhas 42 細胞のルシフェラーゼ活性と発光スペクトル

発光 Bhas 42 細胞 6 クローン(クローン 3、4、8、15、20、40)が、形質転換試験用細胞として基本的な性質を持っているかどうか検討した。すなわち、第一に長期間培養しても接触阻止を示すかどうか、そして第二に TPA 添加により細胞密度が上昇し、形質転換を誘発するかどうかを調べた。接触阻止は、細胞を 6 ウェルプレートにウェルあたり 1.4×10^4 個播種し、コールターカウンターを用いて 13 日間細胞数を測定することで観察した。播種後 7 日目と 13 日目の細胞数を比較した結果、クローン 15、20、40 では細胞密度がやや高くなったものの、他のクローンは Bhas 42 細胞と同様に接触阻止を維持した。また、クローン 15 は Bhas 42 細胞と同等に最も高い細胞密度を示し、一方クローン 40 は最も低い細胞密度を示した。さらに、播種後 2~5 日目の細胞を用いて倍加時間を算出したところ、Bhas 42 細胞が約 17 時間で最も早かったのに対し、発光細胞は全て Bhas 42 細胞より遅く、クローン 3 は約 21 時間、クローン 4、8、15、20 は約 26~28 時間、クローン 40 は約 38 時間であった(図Ⅲ. 2. 2-39)。



図Ⅲ. 2. 2-39 発光 Bhas 42 細胞の増殖曲線

6種のクローンの中で、形質転換細胞のように明らかに細胞密度が上昇し続けるクローンは無かった。このことから、全てのクローンを用いて TPA 処理による形質転換試験を行った。一般的に、フォーカス形成法による形質転換試験では、発がんプロモーターの処理を、細胞が subconfluent の時から開始し、confluent になってからも十分な期間続けると多くの形質転換巣が誘発されることが知られている。そこで TPA の処理期間は、上記の細胞増殖試験を基に決定した。すなわち、一番増殖の遅いクローン 40 でもその条件を満たすように、全てのクローンにおいて播種後 4 日目から 21 日目まで TPA 50 ng/mL の処理を行い、28 日目に固定、ギムザ染色をした。また Bhas 42 細胞は、TPA 処理により形態が紡錘状に変化し、細胞密度が上昇するため、播種後 10 日目に形態変化を観察すると同時に細胞数を測定した。形質転換試験の結果、自然形質転換巣が多く出現したものの、TPA による形質転換巣の誘発が明瞭に確認された細胞はクローン 20 のみであった(図Ⅲ. 2. 2-40)。また、形態変化が認められた細胞はクローン 3、20、40 であったが、TPA により 20% 以上の細胞密度の増加が見られた細胞はクローン 20 と 40 であった(図Ⅲ. 2. 2-40、表Ⅲ. 2. 2-12)。以上の結果から、クローンの種類によって、TPA に対する反応が異なることが分かった(表Ⅲ. 2. 2-13)。クローン 20 は、多くの自然形質転換巣が観察されたため、一見、形質転換試験には不適のように思われる。しかし、TPA による明らかなプロモーション作用が確認されたことから、この細胞の中には TPA により高い形質転換率を示し、かつ低い自然形質転換率を示すサブクローンが存在している可能性が示唆された。今後の課題として、このようなサブクローンをスクリーニングにより分離し、形質転換試験に有用な発光細胞を樹立することが考えられた。



図Ⅲ. 2. 2-40 発光 Bhas 42 細胞の形態変化及び形質転換誘発に対する TPA の影響

表Ⅲ. 2. 2-12 培養 10 日目における発光 Bhas 42 細胞の細胞密度に対する TPA の影響

細胞	Bhas 42 細胞の対照を 100%		各細胞の対照を 100%	
	対照	TPA 50 ng/mL	対照	TPA 50 ng/mL
Bhas 42	100.0	112.5	100.0	112.5
クローン 3	113.5	122.0	100.0	107.4
クローン 4	109.1	117.2	100.0	107.4
クローン 8	94.9	92.2	100.0	97.2
クローン 15	142.9	147.3	100.0	103.1
クローン 20	94.6	113.9	100.0	120.4
クローン 40	70.6	91.9	100.0	130.1

表Ⅲ. 2. 2-13 発光 Bhas 42 細胞の性状のまとめ

細胞	倍加時間 (h)	TPA の影響					発光
		細胞密度 ^a (%)	細胞密度 ^b (%)	形態変化	形質転換巢 の誘発		
Bhas 42	17	100.0	+12.5	あり	あり	-	
クローン 3	21	113.5	+7.4	あり	弱	強(緑>赤)	
クローン 4	26	109.1	+7.4	なし	なし	強(緑>>赤)	
クローン 8	28	94.9	-2.8	弱い	なし	中	
クローン 15	26	142.9	+3.1	弱い	なし(対照が高い)	弱	
クローン 20	27	94.6	+20.4	あり	あり(対照が高い)	強(緑>>赤)	
クローン 40	38	70.6	+30.1	あり	弱	強(緑>>赤)	

a: Bhas 42 細胞に対する相対値、b: 各細胞に対する相対値、緑: MMP10、赤: β -アクチン。

3. 新しい代謝活性化法の開発(東大生産技術研究所)

3.1 組織複合培養法による毒性評価法の開発

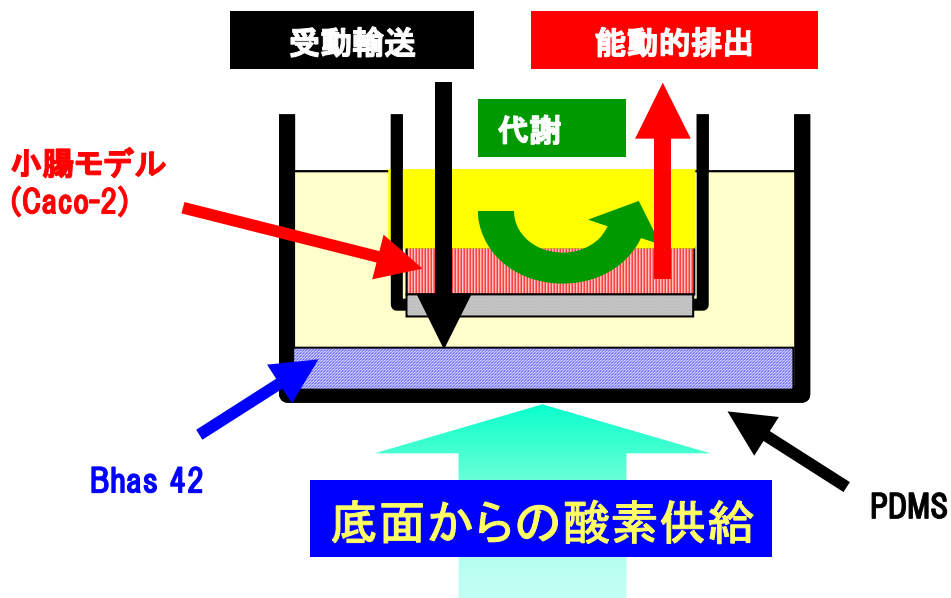
化学物質は、*in vivo* において様々な代謝経路により、別の物質へと変換され、無毒化あるいは有毒化される。一方、*in vitro* においては、殆どの試験系が一部の代謝経路しか働いていないため、化学物質と試験系の組み合わせによっては *in vivo* で見られる反応を全くしない。従って、*in vitro* の試験(特に遺伝毒性試験)においては、通常 S9 mix を添加することで化学物質を代謝活性化させ、毒性を評価している。ところが、殆どの S9 はラット肝から調製したものであることから、ヒトに対する毒性作用を正しく見ていない可能性がある。そこで、ヒトの代謝機能を持つヒト培養細胞を Bhas 42 細胞と複合培養することで、ヒトの代謝を反映する試験系の開発を試みた。

Caco-2 細胞(ヒト結腸がん)は、フィルター上で培養すると、微絨毛が形成され、小腸の上皮細胞と同様の形態を示すと同時に P 糖タンパク質など、小腸特異的なタンパク質を発現するようになる。そこで、ヒト培養細胞として Caco-2 細胞を選び、セルカルチャーインサートのフィルター上で培養し、モデル小腸膜による腸管吸収率を補正できる試験系を作製した。最初に、Caco-2 細胞の下で培養されている Bhas 42 細胞への上面からの酸素供給が期待できない状況においても、Bhas 42 細胞を長期に渡り安定して複合培養できるように、酸素を多く供給できるように工夫した。すなわち、ウェルの底面を通常材質として使われているポリスチレンから高酸素透過性のシリコン系材質であるポリジメチルシロキサン(PDMS)に代えた(図Ⅲ. 2. 2-41)。このことにより、酸素はウェル底面から直接細胞に達するため、通常底面液中培養に比べ約 10 倍供給されることになった。しかしシリコン系材質は細胞が接着しにくいことから、次に PDMS の表面改質を行った。表面改質としては、プラズマ照射、続いてアミノ基の付加を行った。また各群において、コラーゲンを付加した群も設定した。なお、コラーゲンは被覆と(無処理の PDMS 群、プラズマ照射群、アミノ基付加群)、共有結合(アミノ基付加後に光架橋剤を処理)の影響を検討した。Bhas 42 細胞を 21 日間培養し、グルコース消費量により細胞増殖を測定したところ、プラズマ処理以降のどの表面もポリスチレンよりやや良好な増殖を示した。一方、コラーゲンの付加はかえって増殖を低下させ、Bhas 42 細胞試験には適当でないと考えられた(図Ⅲ. 2. 2-42)。

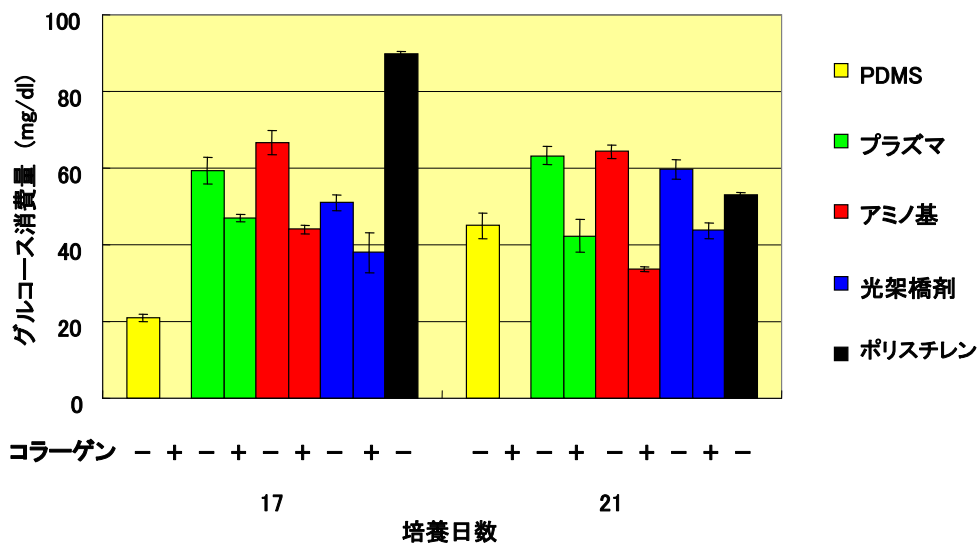
初代肝細胞は酸素消費量が激しく、またその長期培養にはコラーゲン付加が有効なことが知られている。そこで、BALB/c 3T3 細胞とラット初代肝細胞を二層化共培養し(BALB/c 3T3 細胞をウェル底面に接着させた後、その上に肝細胞を播種。またはその逆)、PDMS-コラーゲンウェルが肝細胞のアルブミン分泌に与える影響を調べた。その結果、PDMS-コラーゲンウェルで培養すると、ポリスチレンで培養した時と比較して、アルブミンは約 20 倍分泌されることが認められた。また、肝細胞単独培養ではアルブミン量が培養直後から低下したのに反し、二層化共培養においては逆にアルブミンは培養 7~9 日目まで増加して分泌され、しかも 13 日間もの長期間に渡って安定して分泌されることが分かった(図Ⅲ. 2. 2-43)。

以上、Bhas 42 細胞の付着伸展増殖に適した表面改質を施した高酸素透過性材質である PDMS を底面とするプレートとセルカルチャーインサートとの組み合わせは、腸管吸収に加えて正

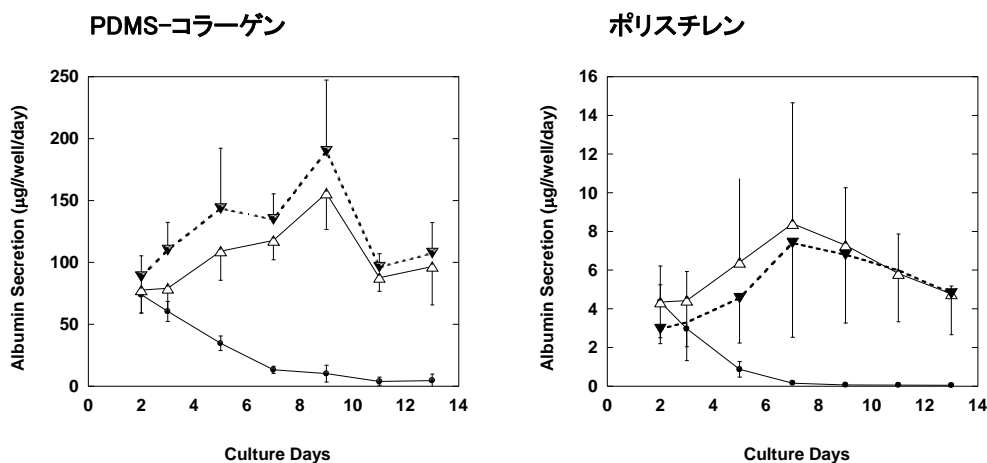
常肝細胞との共培養による肝代謝の影響をも補正する複合培養のための有用な系になることが示唆された。



図Ⅲ. 2. 2-41 Caco-2 細胞と Bhas 42 細胞との組織複合培養モデル



図Ⅲ. 2. 2-42 Bhas 42 細胞のグルコース消費に対するウェル底面の材質の影響



図Ⅲ. 2. 2-43 BALB/c 3T3 細胞とラット肝細胞との二層化共培養における PDMS-コラーゲンウェルによるアルブミン分泌の増加。▼:BALB/c 3T3 細胞の上にラット肝細胞、△:ラット肝細胞の上に BALB/c 3T3 細胞、●:ラット肝細胞。

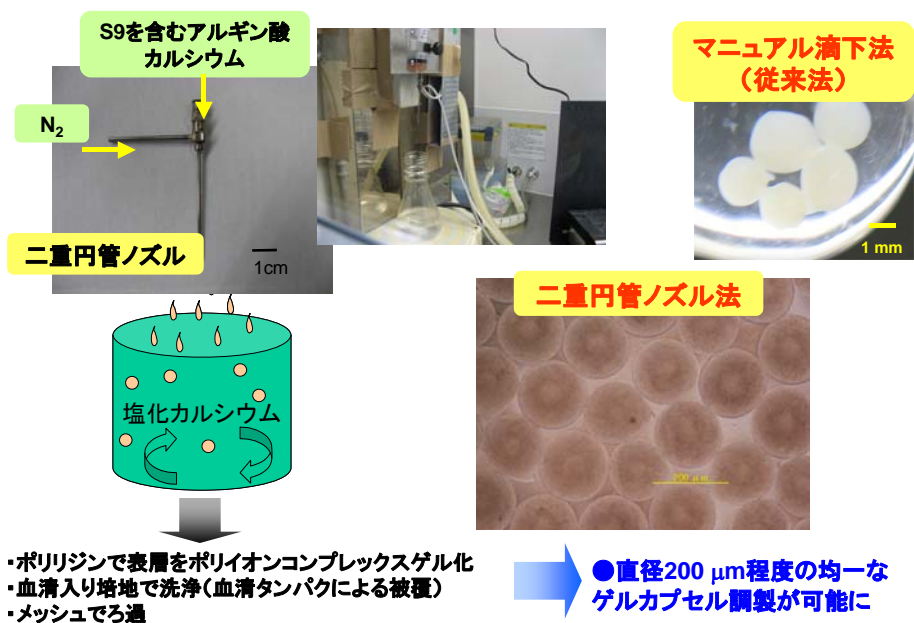
3.2 肝代謝酵素群のマイクロカプセル化

S9 mix を添加する方法は、優れた代謝活性化法であるが、S9 mix 自身に細胞毒性作用があるため、長時間処理できないという欠点を持つ。一方、肝細胞との共培養法は、細胞毒性作用はないが、S9 法と比べて代謝活性化作用は弱い。そこで Bhas 42 細胞形質転換試験において、肝代謝酵素群のマイクロカプセル化を行い、細胞毒性作用を低減させた代謝活性化系を開発することを目的とした。

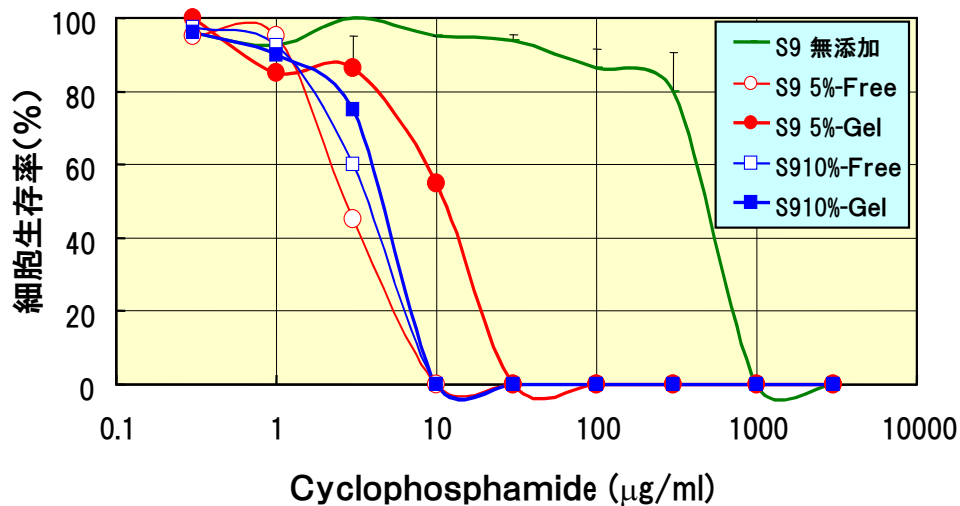
まず、S9 mix 構成成分の細胞毒性作用を検討し、補酵素類には殆ど毒性が無く、代謝酵素を含むマイクロソーム分画の凍結融解によって生じる不溶性物質による物理的な毒性が大きいことを明らかとした。この知見を踏まえ、二重円管ノズル法にてマイクロソームを含む直径約 200 μm のアルギン酸カルシウムゲルを安定的に調製したところ(図Ⅲ. 2. 2-44)、カプセル添加は S9 mix 直接添加に比べて Bhas 42 細胞への毒性を顕著に低減することを確認した。また、このカプセルの見かけの代謝反応速度は S9 mix 直接添加の約 1/3 程度であったが、少なくとも数百の分子量の基質・代謝物のカプセル内外のやり取りは問題ないことが分かった。さらに、代謝活性化によって強い毒性を発現する変異原物質(シクロフォスファミド)について、カプセル系と S9 mix 直接添加系とでの Bhas 42 細胞への毒性を測定したところ、カプセル系でも S9 mix 直接添加系と遜色のない毒性亢進を観察することができた(図Ⅲ. 2. 2-45)。

以上、更なるカプセル径の縮小による反応速度向上が必要であるものの、S9 mix を固定化したゲルカプセルは、細胞毒性作用が弱い、新しい S9 mix 代謝活性化系となることが示された。これ

は、Bhas 42 細胞だけでなく、特に S9 mix の毒性が顕著に現れる評価細胞に肝代謝機能を与える手法として、より有効であると考えられた。



図Ⅲ. 2. 2-44 S9 包括アルギン酸カルシウムゲルカプセルの調製



図Ⅲ. 2. 2-45 Bhas 42 細胞におけるシクロフォスファミドの細胞毒性作用に対する S9 調製法の影響。細胞播種後 3 日目に 4 時間処理し、28 日目に DNA 量を測定し、相対細胞生存率を求めた。

2. 3 催奇形性予測試験法の開発

2. 3. 1 背景と目標

(1) 背景

我々の身の回りには、医薬品、農薬、化粧品、工業製品などの多数の化学物質が存在する。現在、これらのヒトへの安全性を高精度に評価するために、発がん性、生殖発生毒性、刺激性、感作性などを調べる多くの実験動物を用いた毒性試験が行われている。しかし、動物実験は総じて多大な時間と経費がかかるため、多数存在する全ての化学物質で実験動物を用いた全ての毒性試験を行うことは不可能であり、現状では、一部の化学物質しか実施されていない。また、近年、動物福祉の見地から実験動物の使用が制限されるようになってきている。こうした中、動物細胞や微生物などを用いた試験法は、短期間に少量の化合物で評価できる簡便な試験法であり、化学物質の安全性評価の効率化に大きく貢献するため、世界的に研究が進められている。欧州では 1991 年に ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods)、米国では 1993 年に ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods) がそれぞれ公的な推進機関として設置され、各種毒性試験の動物実験代替法の開発、バリデーション及び科学的評価を行っている。一方、日本国内においても 2005 年に代替法研究の評価機関として JaCVAM (Japanese Center for the Validation of Alternative Methods) が設立されている。

毒性試験の中で、生殖性や胎児・新生児の発生等に対する毒性は、総じて生殖・発生毒性と呼ばれている。生殖・発生毒性試験が対象としている項目は、配偶子（精子、卵子）の形成及び生殖機能（受胎、妊娠維持、分娩、哺育）並びに次世代の発生及び成長といった世代を越えた幅広いものである。1961 年に発生したアザラシ肢症などを主徴としたサリドマイド禍をきっかけに、世界各国で生殖・発生毒性試験の重要性が認識されるようになった。特に、発生毒性試験として、次世代（胎児）の形態的な異常を評価する催奇形性試験は生殖・発生毒性試験の中で最も重要視されている試験である。催奇形性試験は被験物質を哺乳動物の妊娠期に投与し、当該哺乳動物の胎児に及ぼす形態的な変化の有無及びその程度等を調べる試験であり、一般的には、化学物質をラット、マウス、ウサギ、サル等の実験動物の妊娠雌動物に一定期間投与し、当該実験哺乳動物の胎児の外形、内臓及び骨格等を詳細に観察することにより、当該化学物質が有する胎児に対する毒性評価を行う。このように、催奇形性試験を含む生殖・発生毒性試験は、多くの毒性試験の中でも特に時間と多くの動物や経費が必要な試験といわれている。しかし、個体の発生は、受精後、初期胚から様々な分化の過程を経て成立するため、一般的な培養細胞等を用いた方法で発生毒性を評価することは困難である。そこで、現在までに、マウス ES 細胞を用いた試験法 (EST: Embryonic Stem cell Test)、ラット胎児の肢芽を用いる小塊培養法 (Micromass culture) 及びラットの初期胚を用いた全胚培養法 (WEC: Whole embryo culture) 等が実施されている。EST、小塊培養法及び全胚培養法については、1996~2000 年に ECVAM が母体となり欧州各国の製薬企業や公的機関等が参画して検証試験が実施された。これらの検証は同時期に一つのプロジェクトとして実施され、3つの試験は *in vivo* 動物実験と 70~80%前後の高い一致率が認められた。特に EST は、培養細胞を用いる点で小塊培養法及び全胚培養法に比べ、汎用性の高い代替法として注目された。EST は、ES 細胞が持つ分化能に着目した試験で、ドイツ連邦リスク評価研究所 (BfR) の Dr. H. Spielmann ら (H. Spielmann, I. Pohl, B. Doring, M. Liebsch, and F. Moldenhauer, *In vitro Toxicology*, 10 (1), 119 (1997)) によって考案された。試験の概要は、①マウス由来 ES 細胞の心筋細胞への分化に対する影響の検討、②ES 細胞の増殖に対する影響の検討、③繊維芽細胞の増殖に対する影響の検討、の 3 試験を実施し、それぞれの IC₅₀ 値を評価式に代入して、発生毒性を判定

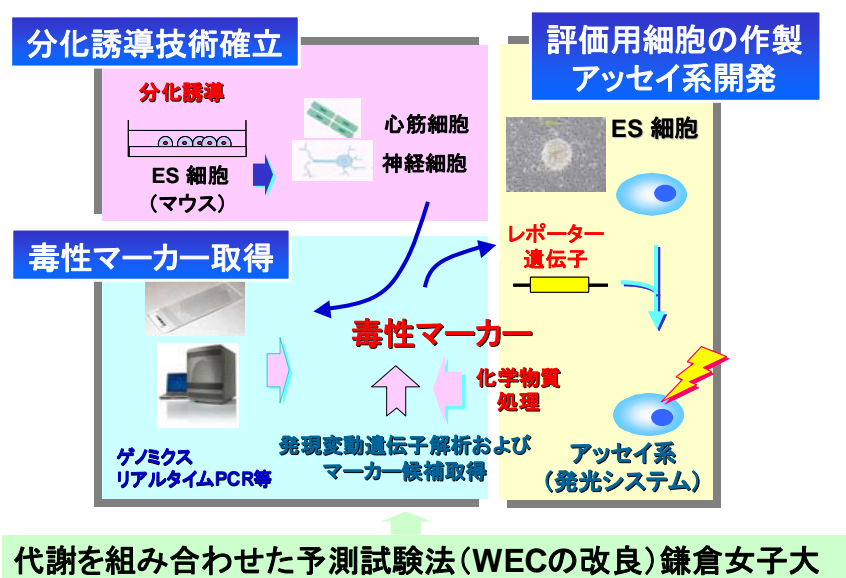
するものである。検証試験の結果を受けて、ESTは、2001年、ECVAMの諮問機関であるESAC（ECVAM Scientific Advisory Committee）によって代替試験法として提案されたが、よりグローバルなOECDのガイドライン化には至っていない。その理由として、2003年に開かれたECVAMのワークショップにおいていくつかの課題が指摘された(Curr Pharm Design, 10, 2733-2747)。すなわち、精度向上のための予測式改良、医薬品以外の化合物の検証、様々な毒性メカニズムをもつ被験物質の検証、神経や骨など心筋以外の細胞への分化誘導系の導入、代謝活性化の評価の導入等である。さらに、ESTの大きな問題は、心筋分化に対する影響の評価方法が心筋細胞の拍動の有無を顕微鏡下で観察するため、煩雑かつ熟練した技術・ノウハウが必要とし汎用性に欠ける点であった。また、現存のEST法ではハイスループットスクリーニング等の多数の検体を同時に扱うことが難しいという点であった。

(2) 目標

このような発生毒性試験の代替法に関する背景の下、もし、簡便で汎用性の高い発生毒性の評価方法を開発できれば、現存する発生毒性が未知の化学物質の安全性評価や、安全性の高い新たな化学物質の効率的な開発に有効である。そこで、我々は高精度で簡便かつ汎用性の高い発生毒性試験の代替試験法の開発を目的に、住友化学株式会社において「ES細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発」、住友化学株式会社の再委託先である学校法人鎌倉女子大学においてラットの初期胚を用いた全胚培養法を改良した「代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発」を実施した。本開発の概略図を図Ⅲ.2.3-1に示した。

本試験法開発では、まず、マウスES細胞から心筋、神経、筋・骨格系への効率的な分化誘導法を開発し、既に知られている催奇形性物質を利用して催奇形性マーカー遺伝子を同定することとした。そして、同定したマーカー遺伝子の発現を簡便に検出可能な発光細胞を作製し、1か月以内の試験期間で催奇形性（発生毒性）を検出する試験法を開発し、さらに、精度や再現性の確認を行うとともに、OECDテストガイドライン提案に向けた計画を策定することを最終目標とした。また、代謝による被験物質の影響を評価可能な催奇形性予測試験法をラット全胚培養法により開発することとした。

ES細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発



図Ⅲ.2.3-1 本開発項目の研究概略

① ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発

具体的には、「分化誘導技術確立」「毒性マーカー取得」「評価用細胞の作製、アッセイ系開発」の3段階で実施することとした。「分化誘導技術確立」段階では、マウス ES 細胞を分化誘導する方法を、文献を参考にして催奇形性試験法として適切な分化誘導方法を選定する。分化の対象組織は、化学物質の毒性データベース RTECS を用い、標的臓器別に催奇形性が文献報告されている化学物質の数を調査して決定した（表Ⅲ.2.3-1）。

表Ⅲ.2.3-1 催奇形性物質の標的臓器

催奇形性の標的臓器	化合物数	カバー率	難易度
心血管系	250	10.7	*
泌尿器系	543	23.2	****
中枢神経系	567	24.2	**
筋骨格系	1526	65.1	***
心血管系＋中枢神経系	710	30.3	**
心血管系＋中枢神経系＋筋骨格系	1799	76.7	***
心血管系＋中枢神経系＋泌尿器系＋筋骨格系	1991	84.9	*****
全催奇形性物質	2345	100.0	—

毒性データベースRTECSによる検索で、催奇形性の標的臓器別に文献報告されている催奇形性物質の数を示した。

化合物数： 各臓器における催奇形性物質数。複数の臓器にまたがって催奇形性が現れる場合はそれぞれの標的臓器に化合物が重複して含まれている。

カバー率： 報告されている全催奇形性物質数2345個のうち、特定の(1~複数の)標的臓器を調べて検出される催奇形性物質の割合を示した。

難易度： ES細胞の分化誘導系を開発する難易度を*の数で示した(数が多いほど開発が困難)。

心血管系、泌尿器系、中枢神経系、筋骨格系の臓器で催奇形性が報告されている化合物数をもとに、全体に占めるカバー率を算出した結果、心血管系と中枢神経系と筋骨格系を組み合わせた場合、催奇形性物質の約77%をカバーすることが判明した。泌尿器系への影響を含めるとカバー率は上昇するが、ES細胞からの分化誘導方法の難易度を勘案し、本プロジェクトにおける標的組織として、心筋細胞、神経細胞及び筋・骨格系細胞の分化誘導細胞を本試験開発の対象とすることとした。「毒性マーカー取得」段階では、まずES細胞から各組織細胞への分化過程で発現する遺伝子群についてゲノミクス・リアルタイムPCR等の遺伝子発現解析技術を利用してマーカーとなる候補遺伝子を取得する。次に催奇形性の有無が知られた物質を用いて、催奇形性物質の影響により共通して発現変動し、高精度に催奇形性を評価可能なマーカー遺伝子の探索を行う。「評価用細胞の作製、アッセイ系開発」段階では、マーカー遺伝子のプロモーターと生物発光技術を利用して、マーカー遺伝子の発現量を簡便に測定可能な発光評価用細胞を作製する。

② 代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法の開発

マウス ES 発光細胞を用いた試験 (EST) 法の確認法として、胎児培養法の改良を試みる。胎児培養法は、子宮より胎児を取り出して、ラット血清中で培養する手法であるため、培養ラット胎児は母獣の環境因子が外された状態で成長ならびに発育す

る。既存の胎児培養法における試験結果を *in vivo* 試験の結果により近づけるためには、母獣の環境因子を胎児培養法に組み込むことが必要と考える。そこで今までの胎児培養法にラット母体の代謝機能を組み込むため、ラット S-9mix を培養液中に添加する手法の確立を目指す。具体的には、培養液中加入するラット S-9mix 濃度設定の確立と、この代謝を組み入れた胎児培養法を用い、催奇形性が認められている化学物質の試験を試みて、既存の *in vivo* 試験データと比較しその精度を確認する（ラット代謝酵素の添加方法の最適化と試験法の確立）。さらに本手法を用いて、住友化学が確立した EST 法において、false positive および false negative と判定された化学物質において本法を用いて検討し、代謝機能を取り入れた胎児培養法の使用可能性も検討する（代謝評価試験系を組み合わせた催奇形性試験の確立）。

次に、胎児培養法は培養液として 100%ラット血清を用いるため、使用動物数が他の培養法と比較し多くなることが、動物実験代替法として用いる場合の課題とされている。そこで、使用動物数の削減を目的として、培養液として使用しているラット血清の使用量を減らしても培養可能な培養装置の開発を行うとともに、ハイスループット化を実現するための培養装置を作成する。

2. 3. 2 最終目標に対する達成度

最終目標に対する達成度は、以下のとおりである。

研究開発課題	最終目標 (平成 22 年度末)	研究開発の 具体的な内容	最終目標の達成状況	達成度
B 催奇形性 予測試験法の 開発	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 で催奇形性を予測 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。	マウス ES 細胞が心 筋、神経、筋・骨格系 のそれぞれへ分化する 試験手順を開発し、1 0 物質程度の催奇形性 物質を用いて被験物質 の投与を含めた試験方 法を開発する。その後 20 物質程度を用い て、催奇形性に関与し ている遺伝子を、細胞 の変化と遺伝子発現と の関係を時系列的に測 定し解析して、同定す る。同定した遺伝子に 発光する機能を組み込 んで 1 か月以内の試験 期間で催奇形性を検出 する試験法を開発し、 50 物質程度で精度や 再現性の確認試験を行 う。さらに、化学物質 の代謝酵素を共存させ て、代謝による被験物 質の変化を考慮できる 試験法を開発する。ま た、OECD-TG 提 案に向けた計画を策定 する。	[マウス ES 細胞を利用した催奇形 性予測試験法] マウス ES 細胞から心筋、神経およ び筋骨格系への分化誘導法を確立 した。催奇形性（発生毒性）に関与 するマーカー遺伝子を複数同定し た（心筋：13 種、神経：22 種）。 次にこれらのマーカー遺伝子の発 現を、レポーター遺伝子を利用して 簡便に評価可能な組換え ES 細胞 （心筋分化過程：Hand1-、Cmya1-ES 細胞など 3 種、神経分化過程： Reln-ES 細胞）を作製した。作製し た細胞を利用した簡便な発生毒性 予測試験方法（Hand1-、Cmya1-お よび Reln-EST 法）を提案した。 Hand1-および Cmya1-EST 法の予測 性を、標準化合物を用いて従来の EST 法と比較した結果、同等以上の 予測性を有することが明らかとなり 、従来の EST 法よりも短期間(約 1 週間)に多数の化合物を評価可能 な方法が確立できた。さらに施設間 での再現性の確認や、規格化のため の細胞の品質検査も実施した。ま た、ヒト ES 細胞を用いた検討を行 い、マウス ES 細胞で選定したマー カー遺伝子群のヒトにおける有効 性も明らかにした。	◎

			[代謝を組み合わせた催奇形性予測試験法] マウス ES 発光細胞を用いた試験法の確認法として、ラット全胚培養法を設計した。ラット S-9mix を組み入れた胎児培養法を用い、より in vivo 試験に近い結果が得られた。	○
--	--	--	--	---

催奇形性予測試験法の開発において、最終年度までに、予定どおりの研究成果を上げることができた。

「ES 細胞を利用した催奇形性試験法の開発」においては、マウス ES 細胞から心筋、神経および筋骨格細胞への分化誘導法を確立し、その分化誘導過程で催奇形性（発生毒性）の有無が知られている化合物を処理した。分化細胞中の遺伝子発現を解析した結果、発生毒性陽性化合物に共通して変動が認められる遺伝子を見出し、これらを発生毒性関連マーカー遺伝子として同定した（心筋分化過程：13 遺伝子、神経分化過程：22 遺伝子、特許出願済み）。心筋分化過程におけるマーカー遺伝子は心臓の形態形成過程や心臓構造に関与する遺伝子であり、また神経分化過程におけるマーカー遺伝子は神経発生過程や神経疾患に関与する遺伝子であった。複数の発生毒性の有無が知られている化合物で再評価した結果、有用な発生毒性予測マーカー遺伝子の可能性が示唆された。

次にこれらのマーカー遺伝子の発現を、レポーター遺伝子を利用して簡便に評価可能な組換え ES 細胞（心筋分化過程：Hand1-、Cmya1-ES 細胞など 3 種類、神経分化過程：Reln-ES 細胞）を作製した。様々な条件検討を加え、これらの作製細胞を利用した簡便な発生毒性予測試験方法（Hand1-、Cmya1-および Reln-EST 法）を提案し、基本プロトコールを作成した。Hand1-および Cmya1-EST 法の予測性を、24 種の標準化合物を用いて従来の EST 法と比較した結果、同等以上の予測性を有することが明らかとなった。また、従来の EST 法よりも短期間（約 1 週間）に多数の化合物を評価可能な方法が確立できた。さらに多数の化合物を用いて有用性の検討も実施した。Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法は、基本プロトコールに従って 4 施設で施設間差の確認実験を行い、技術易習得性を確認し、さらに再現性の高い試験法であることがわかった。Reln-EST 法についても、一群の標準的な発生毒性化合物で検証し有用性を示した。その他、ヒト ES 細胞を用いた検討を行い、マウス ES 細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにした。

以上のように簡便で予測性が高い発生毒性予測試験法が開発できた。施設間差の確認実験から本試験法の高い再現性が認められたことから、今後 OECD テストガイドライン化に向けた取組みを進めることも可能と考えられた。また、本試験法は、現状でも企業の化合物の開発において利用可能で、産業分野での波及効果も期待できる。

「代謝を組み合わせた催奇形性」においては、in vivo 試験法の結果をより正確に再現できる試験法を開発することを目的とし、従来の胎児培養法（WEC）にラット S-9mix を添加する手法の開発を行った。まず S-9mix の添加濃度設定を検討し、その結果 S-9 として 3%濃度が適切と判断した。この条件下において、imipramine を使用して代謝機能があることも確認した。また、この代謝機能を取り入れた WEC 試験法を用いて、Thalidomide を含む 9 化合物における培養胎児の影響を検討したところ、すべてにおいて in vivo と同様の成績が認められた。さらに、住友化学が開発した EST 法において false positive と判定された物質（Cyclobenzoprine-HCl）、および false negative と判定された物質（Busulfan）について、代謝を取り入れた WEC を用いて毒性評価を行った結果、両化学物質において in vivo データと同様の結果が得られた。以上のことから、住友化学が開発した EST 法と代謝を取り入れた WEC を組み合わせて使用することによ

り、極めて高い確率で *in vivo* 試験法と同様の結果が得られると判断された。

次に、胎児培養法は培養液としてラット血清を用いるため、他の代替法を比較し使用動物数が多くなることが課題とされている。そこで使用血清量の減少を目的とし、新規培養装置の開発を行った結果、使用培養液量を約 1/3 に減少できる装置の開発に成功した。さらに、ハイスループット化を目指し、省スペースで大量の培養胎児が処理できるように、24 穴プレートを使用した培養装置も確立した。これにより本装置を用いることで、3Rs の **Reduction** という視点から、WEC はより有力な試験法として位置付けられることになる。

またこの装置は、既存装置と比較し培養液の少量化を実現したばかりでなく、省スペースで試験可能、さらに安価で大量に処理できる装置でもあり、今後様々な分野における活用も期待できる。

2. 3. 3 進捗状況と成果

①ES 細胞を利用した催奇形性予測試験法の開発 (住友化学)

①-1 ES 細胞の分化誘導法の確立

マウス ES (ES-D3 株、ATCC より入手) を用いて、文献等で報告されている分化誘導方法を参考に、心筋、神経細胞、骨芽細胞への分化誘導法の最適化を行った。心筋分化においては、未分化維持および心筋分化誘導に用いる胎児牛血清のロット、維持培養条件、播種細胞数等を、心筋の拍動する効率を指標に決定した。神経分化においては、未分化維持培養条件、無血清培養に用いる KSR、播種濃度、培養日数、二酸化炭素酸素濃度等を、免疫染色やリアルタイム PCR 法を用いて神経の代表的遺伝子の発現量を指標に決定した。また、骨芽細胞に関しては、播種濃度、胚様体の分散方法、添加剤の種類および濃度の諸条件を検討し、リアルタイム PCR による骨芽細胞特異的な遺伝子の発現量の定量や、アリザリン染色による石灰化を指標に、効率のよい分化誘導法を決定した。

心筋細胞への分化誘導の確立

簡便な催奇形性予測試験法に適した ES 細胞の心筋への分化誘導法を確立するため、ECVAM の Spielmann らの Embryonic stem cell test プロトコルを参考に分化誘導を実施した。その方法を以下に説明するとともに概略を図 III.2.3-2 に示す。

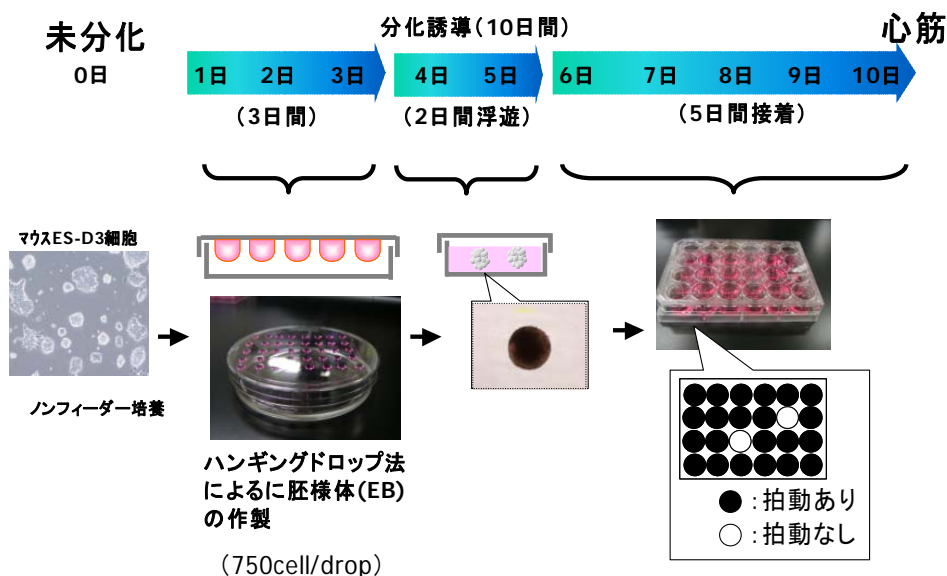
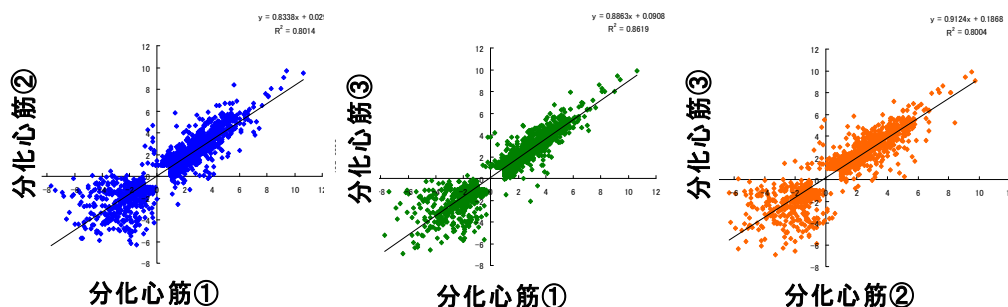


図 III.2.3-2 ES 細胞の心筋分化方法の概略

まず、ATCC (American Type Culture Collection) よりマウス ES 細胞 (ES-D3 株) を入手した。ES-D3 株は、マウス LIF (白血病阻害因子 : leukemia inhibitory factor) を添加した 15% の非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地において、未分化維持培養を行った後、0.25% トリプシン / 1mM EDTA を用いて細胞を分散させた。LIF を含まない 15% の非働化処理済み牛胎児血清を含む培地を用いて、1 滴あたり約 750 個の細胞を含むように、直径 10cm ディッシュに懸滴培養 (本培養方法をハンギングドロップ培養又はハンギング

ドロップ法とも呼ぶ) により 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 3 日間培養を行い、胚様体(EB; embryoid body)を形成させた。この EB を更に 2 日間、非接着系のシャーレの中で浮遊培養した後、EB を接着系のシャーレに移行した。ハンギングドロップ開始から 10 日後に、24 個の EB を顕微鏡下で観察し、拍動する心筋細胞の像を視認して心筋への分化効率を算出した。また、血清のロット間の分化誘導効率を比較し 80%以上の効率で心筋分化誘導を行える条件を決定した。

つぎに、決定した心筋分化方法の再現性を確認するため、心筋分化誘導法で得られた分化細胞の DNA チップ解析を行った。3 回の独立した実験で、未分化 ES 細胞と、分化開始後 10 日目の細胞を 50 個以上の EB を混合して 1 群として 3 群の細胞集団を取得し、Trisol 試薬(インビトロジェン社)により total RNA を抽出した。抽出した RNA は RiboGreen RNA 定量キット (インビトロジェン社) による濃度測定、及び電気泳動による RNA 分解の品質確認を行った。濃度測定の結果に基づき 4µg に調製した RNA を用いて、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array (アフィメトリクス社) を利用して網羅的に遺伝子発現データを取得し、未分化培養時の ES 細胞をベースに、3 群の分化心筋①～③で 2 倍以上上昇または減少する遺伝子を抽出した。変動量 (Log2) を 3 群間で比較した図を図 III.2.3-3 に示す。その結果、3 回の分化誘導により変動する遺伝子は試験毎の相関性が良く、再現良く発現変動遺伝子を評価することが可能であった。また変動遺伝子中に、代表的未分化マーカー遺伝子 Oct3/4 の分化後における発現減少や、代表的心筋の分化マーカー遺伝子 Myh6 の発現上昇を確認した。

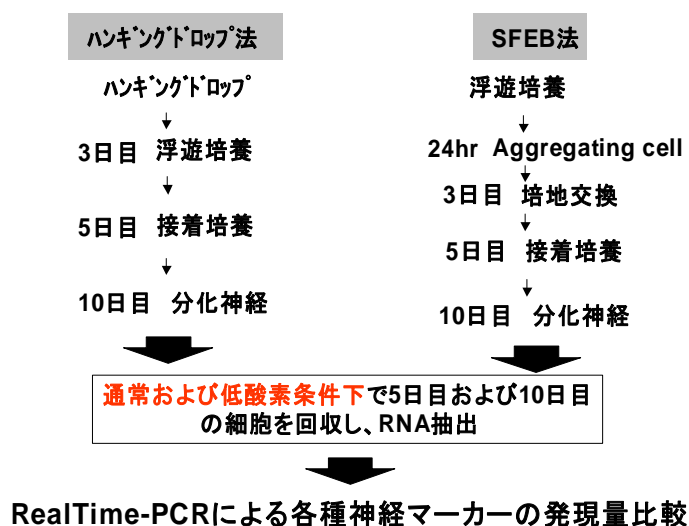


- 1) 未分化ES細胞発現データをbaseとして、分化心筋で2倍以上または1/2以下発現変動した遺伝子を抽出。
- 2) 1)により抽出した遺伝子について、変動量(Log2)を横軸・縦軸にプロットし、相関を解析した。

図III.2.3-3 心筋分化方法の再現性の検討

神経細胞への分化誘導の確立

簡便な催奇形性予測試験法に適した神経細胞への分化誘導として、本開発では脳の主要構成部分であり奇形の標的部位と考えられる大脳皮質神経への分化の影響を評価することとした。そこで、ES 細胞の神経への分化誘導法を確立するため、多数の神経分化誘導法のうち、代表的なハンギングドロップ法と大脳神経分化誘導法として知られる SFEB 法 (Serum free Floating culture of Embroid bodies-like aggregates) を用い、それぞれ通常酸素条件 (37°C、5%CO₂) と低酸素条件 (37°C、5%CO₂ 及び 5%O₂) の 2 つの培養条件で分化誘導し、分化誘導開始から 5 日目および 10 日目の細胞内での代表的神経関連マーカーの発現量をリアルタイム PCR 法により測定して神経分化誘導効率を比較した (図 III.2.3-4)。



図III.2.3-4 神経分化誘導法の比較

以下に実験の詳細を記載した。

ハンギングドロップ法は、まず ES-D3 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、LIF 添加 15%非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地で未分化維持培養を行った。0.25%トリプシン/1mM EDTA を用いて分散させた後、LIF 添加 15%非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地にて細胞を懸濁した後、遠心操作及び上清の吸引操作により、残余トリプシン及び血清を除去して、0.1%牛胎児血清および 5%KSR（インビトロジェン社）、2mM グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1mM 2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸溶液を添加した DMEM 培地からなる分化培地に懸濁した。少量の細胞溶液を用いて、細胞数を数えた後、1 滴あたり約 2000 個の細胞を含むように、直径 10cm ディッシュにハンギングドロップ法により 3 日間培養を行い、EB を形成させた。培養開始後 4 日目に、DMEM 培地で 50 倍希釈したマトリゲル（BD フアルコン社）にて予めコートした細胞接着性 24 ウェルプレートに、10 個/ウェル程度の EB を播種し、分化培地中で分化開始から 10 日間培養を継続した。分化開始より 10 日目に、一部のウェルについて位相差顕微鏡下で神経突起を観察した。SFEB 法は、まず ES-D3 細胞を 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で、LIF 添加 15%非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地で未分化維持培養を行った。0.25%トリプシン/1mM EDTA を用いて分散させた後、LIF 添加 15%非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地にて細胞を懸濁した後、遠心操作及び上清の吸引操作により、残余トリプシン及び血清を除去して、5%KSR、2mM グルタミン、1mM ピルビン酸ナトリウム、1mM 2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸溶液を添加した DMEM 培地からなる神経分化培地に懸濁した。少量の細胞溶液を用いて、細胞数を数えた後、非接着系の 10cm シャーレ中に 5×10⁵/mL 個の細胞密度にて 10mL の細胞を播種し培養した。分化開始から 3 日に 10mL の神経分化培地を追加して 2 日間の浮遊培養を継続した。分化開始から 5 日目にすべての細胞及び培養液を遠心管に移し、室温で 10 分間静置して、EB を沈降させた。静かに上清を除いたのち、神経分化培地にて EB を懸濁して 6cm シャーレに移行した。前記 6cm シャーレ中の EB を実体顕微鏡を用いて、5μg/mL に調製したフィブロネクチン/PBS(-)溶液によりコート処理を施した Poly-D-Lysine/Laminin コート 24 ウェル

プレートの各ウェルに 10~20 個の EB になるように播種し、更に 5 日間、培養を継続した。分化開始より 10 日目に、一部のウェルについて位相差顕微鏡下で神経突起を観察した。

それぞれの培養法および培養条件で分化誘導した細胞は、Trisol 試薬により RNA を抽出したのち、逆転写法やリアルタイム PCR により Map2 (代表的な神経マーカー遺伝子)、Gfap (代表的なグリア細胞マーカー遺伝子)、Bf1 (代表的な大脳皮質前駆細胞のマーカー遺伝子) の発現量を比較した。その結果、分化開始 10 日目の Map2 の誘導効率はハンギングドロップ培養法よりも SFEB 法が高いことがわかり、神経細胞への分化効率は SFEB 法のほうが優れていることが分かった。SFEB 法においては、通常酸素条件に比べ、低酸素条件ではグリア細胞マーカーである Gfap の発現量は顕著に低下したことから、低酸素条件の方が神経細胞への分化に適していることが考えられた。また、通常酸素条件下において、ハンギングドロップ法よりも SFEB 法で大脳皮質マーカーである Bf1 は 5.3 倍誘導し、さらに低酸素条件下ではその 2 倍誘導されることが分かった (図 III.2.3-5)。

以上の結果より、本プロジェクトにおいては、神経細胞への分化誘導率が高く脳の主要構成部分であり奇形の標的部位と考えられる大脳皮質への分化効率が高い「低酸素条件下による SFEB 法」を採用することとした。

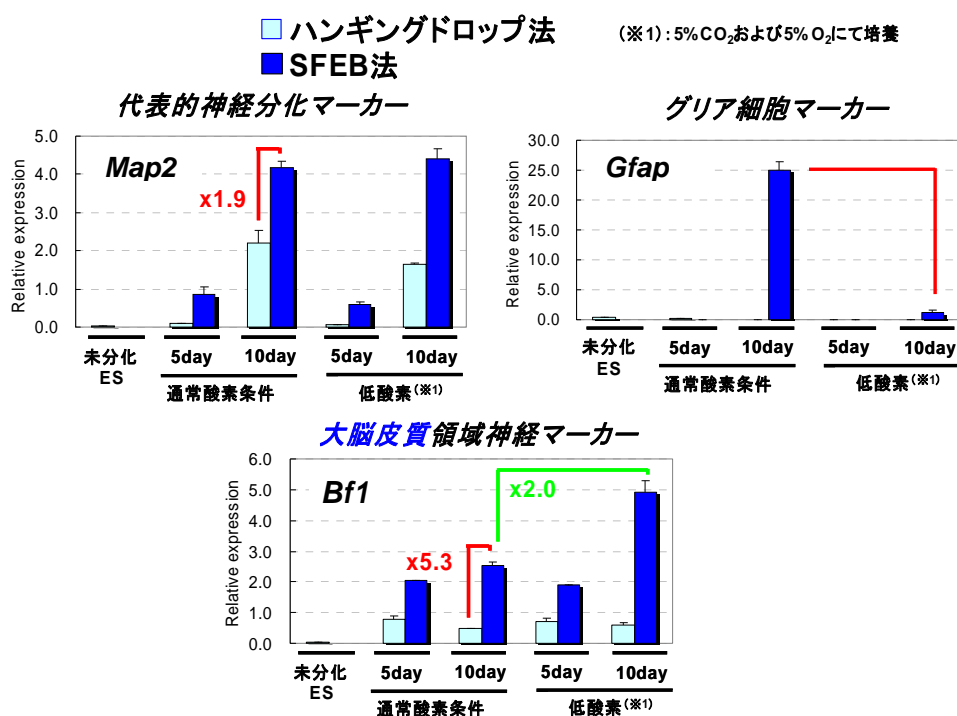
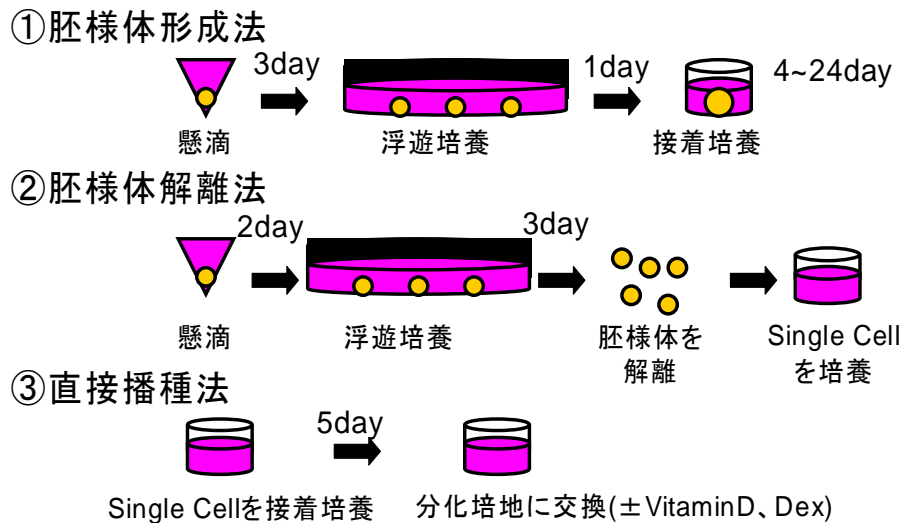


図 III.2.3-5 各種分化誘導法における神経マーカー遺伝子の発現量

骨芽細胞への分化誘導の確立

簡便な催奇形性予測試験法に適した ES 細胞の筋・骨格系細胞への分化誘導法を確立するため、文献情報を参考に、骨芽細胞の分化誘導誘導方法 3 種類 (①胚様体形成法、②胚様体解離法、③直接播種法) について検討した。3 種の分化誘導方法の概要を図 III.2.3-6 に示す。



図III.2.3-6 骨芽細胞分化誘導法の比較

以下に3種の分化方法の詳細を記載した。

胚様体形成法では、ES-D3細胞を、37°C、5%CO₂インキュベーター内で、LIF添加15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地で未分化維持培養を行った。0.25%トリプシン/1mMEDTAを用いて分散させた後、15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地にて細胞を懸濁し、遠心操作および上清の吸引操作により、残余トリプシンおよび血清を除去した。その後、15%非働化処理済み牛胎児血清、50μg/mlアスコルビン酸、10mMβグリセロリン酸を添加した骨芽細胞分化誘導培地に再度懸濁し、少量の細胞溶液を用いて細胞数を計測した。計測後、1滴あたり約1000個の細胞を含むように、直径10cmディッシュにハンギングドロップ法により37°C、5%CO₂インキュベーター内で3日間培養を行い、EBを形成させた。このEBを更に1日間、非接着系のシャーレの中で浮遊培養した後、EBを24ウェルプレートに移行し骨芽細胞分化誘導培地で2~3日毎に培地交換をして25日間培養を継続した。

胚様体解離法では胚様体形成法と同様に、2日間のハンギングドロップに続き、3日間の浮遊培養によりEBを形成させた。EBを試験管に回収し、遠心操作により培地を除き、さらにPBS(-)で洗浄した後、0.25%トリプシン/1mMEDTAを用いて分散させた。その後、骨芽細胞分化誘導培地に再度懸濁し、少量の細胞溶液を用いて細胞数を計測した。計測後、0.1%ゼラチンコートをした24ウェルプレートに、1.0×10⁴cells/mlの濃度となるように調製した細胞懸濁液を2ml加え、37°C、5%CO₂インキュベーター内で培養を開始した。2~3日毎に培地交換をして25日間培養を継続した。

直接播種法ではES-D3細胞を、37°C、5%CO₂インキュベーター内で、LIF添加15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地で未分化維持培養を行った。0.25%トリプシン/1mMEDTAを用いて分散させた後、15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地にて細胞を懸濁し、遠心操作および上清の吸引操作により、残余トリプシンおよび血清を除去した。その後、15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地に再度懸濁し、少量

の細胞溶液を用いて細胞数を計測した。計測後、0.1%ゼラチンコートをした 35mm dish に、 1.0×10^4 cells/ml の濃度となるように調製した細胞懸濁液を 2ml 加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。培養開始より 4 日後に PBS によりディッシュを洗浄し、骨芽細胞分化誘導培地、または 100nM vitamin D、100nM dexamethasone を添加した骨芽細胞分化誘導培地に交換した。その後、2~3 日毎に培地交換をして 25 日間培養を継続した。

上記 3 種の培養方法において、培養開始より経時的に 1 ウェルまたは 1 枚のシャーレ中の細胞を 3 群回収し、RNA を抽出した後に骨芽細胞系に特異的な遺伝子 Runx2 等の発現量解析を行った。その結果、胚様体形成法と直接播種法では Runx2 遺伝子が 12 日から 19 日目にかけて顕著に発現誘導するが、胚様体解離法では発現誘導が低下した。また、直接播種法では、骨芽細胞分化誘導培地への vitamin D および dexamethasone 添加の効果は認められなかった (図 III.2.3-7)。Runx2 遺伝子以外にも、Collagen1a1 (主要な骨基質タンパク質)、Osteoprotegerin (TNF 受容体ファミリーに属するサイトカイン) においても同様の結果を得た。

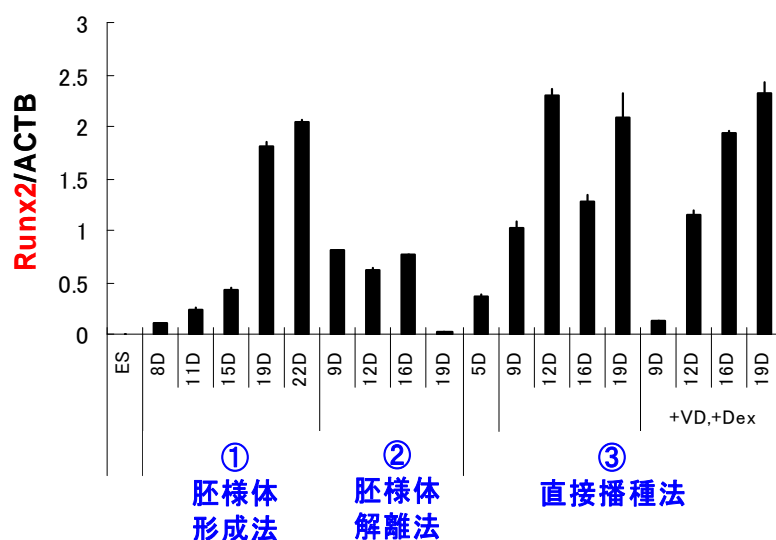
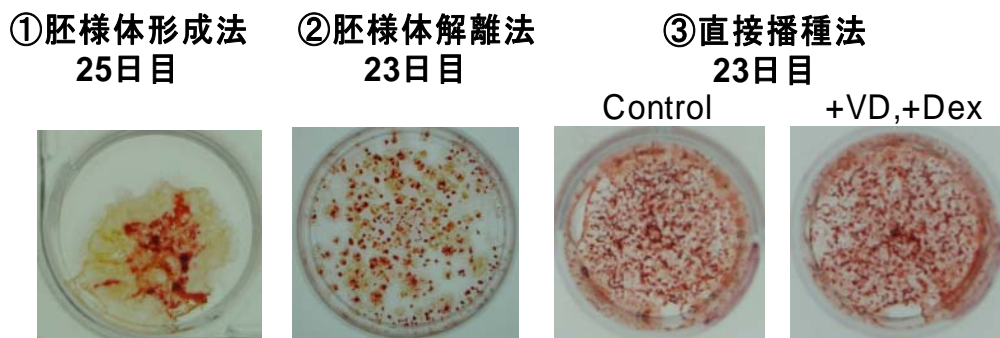


図 III.2.3-7 各分化誘導法における骨分化マーカー Runx2 の発現解析

また、骨基質形成能は、細胞外へのカルシウムの蓄積を指標にして確認することができるため、培養開始後 23 または 25 日目の細胞をアリザリン染色により比較した (図 III.2.3-8)。赤色のアリザリン陽性細胞は胚様体形成法では一部の領域にしか認められなかったのに対して、直接播種法では細胞全体がアリザリンにより染色された。また、直接播種法では、骨芽細胞分化誘導培地への vitamin D および dexamethasone の添加による差は認められなかった。



図Ⅲ.2.3-8 骨芽細胞のアリザリン染色結果

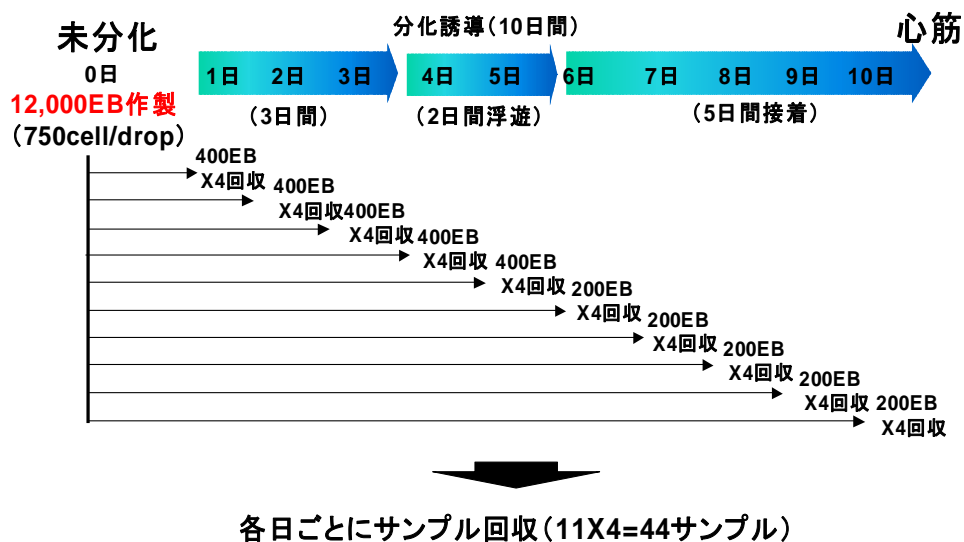
以上の結果より、本プロジェクトにおいては、骨芽細胞への分化誘導率の高い直接播種法を採用することとした。

①-2 遺伝子発現解析と遺伝子探索(心筋分化関連マーカー遺伝子の選定)

(a)マーカー候補遺伝子の選定

心筋分化細胞の調製

ES 細胞から心筋への分化過程で発現変動する遺伝子群を経時的かつ網羅的に解析するため、先述の分化誘導法を用いて0日、1日、2日、3日、4日には400EBを1群として4群の細胞を、5日、6日、7日、8日、9日、10日には200EBを1群として4群の細胞を回収し、合計44群の細胞を回収した(図Ⅲ.2.3-9)。10日目に、ES細胞の心筋分化を拍動を指標にして顕微鏡下で観察した結果、基準を満たす87.5%のEBで心筋分化を確認した。



図Ⅲ.2.3-9 心筋分化細胞サンプルの取得

心筋分化過程の網羅的発現変動解析

分化誘導後0日、2日、4日、6日、8日、10日目、計6時点の保存サンプル合計24サンプル(1日あたり4群)からTrisol試薬を用いてRNAを抽出した。抽出したすべてのRNAはRiboGreen RNA定量キット(インビトロジェン社)による濃度測定、及び電気泳動によるRNA分解の品質確認を行った。濃度測定の結果に基づき4μgのRNAを用いて、

GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array により網羅的に遺伝子発現変動プロファイルデータを取得・解析した。具体的な解析法は、0 日群と各日群のシグナル値を t 検定し、有意 ($p < 0.05$) に発現変動した遺伝子を絞り込んだ。次いで、0 日群と各日群の平均シグナル値を比較し、2 倍以上発現が上昇した遺伝子を絞り込んだ。さらに、遺伝子発現量に相当するシグナル値の差を用いて 0 日に対して各日 (2 日、4 日、6 日、8 日、10 日) において発現変化量の大きい順に候補遺伝子 92 遺伝子を選定した。その結果、選定した 92 遺伝子の発現プロファイルから、本分化誘導法により様々な時間で多くの遺伝子の発現変動が認められた (図 III.2.3-10)。

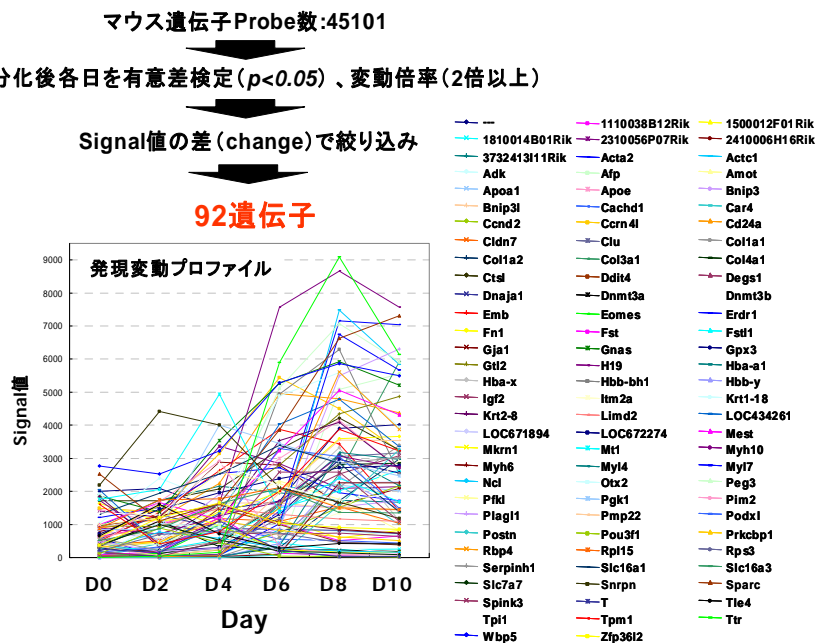
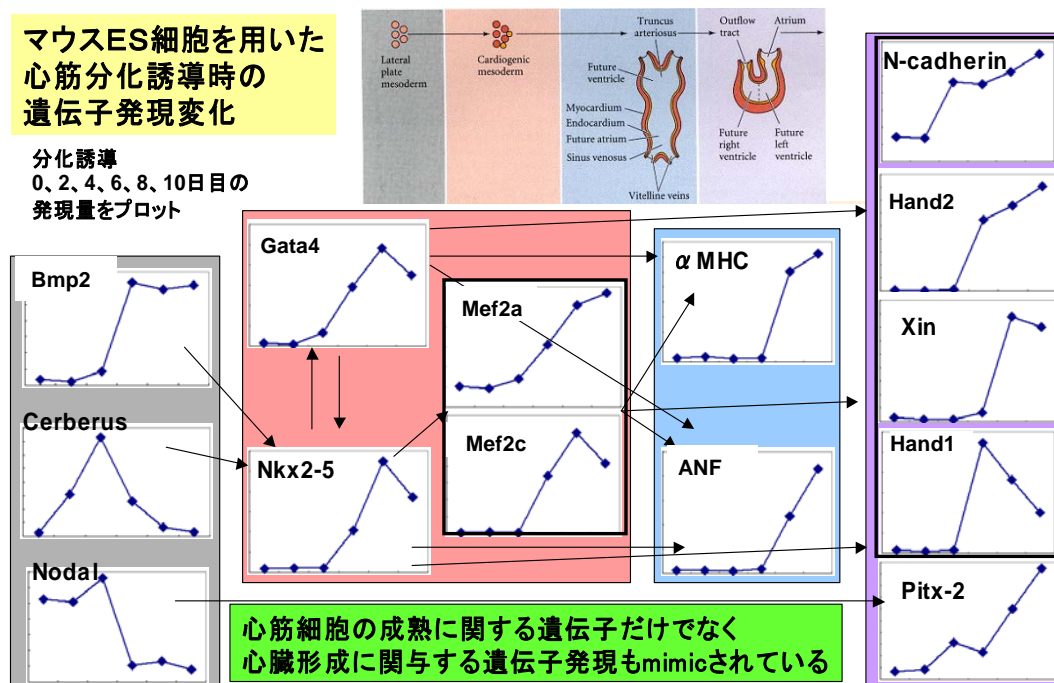


図 III.2.3-10 マーカー候補遺伝子の選定

既知の心筋分化関連変動遺伝子の解析

つぎに文献情報を利用して、心臓分化関連遺伝子や心臓発生過程に関与する遺伝子を調査した。心臓は脊椎動物の胚発生において中胚葉から分化誘導され最初に形成される臓器である。マウス胚では 6.0~7.5 日胚にかけて予定心臓領域となる胚最前部に馬蹄形の心臓原基 (cardiac crescent) を形成する。さらに、心臓原基は一旦筒状の組織を形成した後、輪状化と呼ばれる行程により 2 室 2 房の心臓の形体が形成される。この前駆細胞の分化段階や、輪状化段階には心筋特異的遺伝子が関与することが報告されている。例えば心臓の欠損した変異ショウジョウバエの原因遺伝子として同定された homeobox 転写因子 Nkx2-5 や、Zinc finger 転写因子 Gata-4、MADS box 転写因子 MEF-2c、さらに T-box 転写因子 Tbx-5、bHLH 転写因子 dHAND/Hand2、eHAND/Hand1 が発現し、これらの転写因子群の相互作用を介して心筋細胞に特異的な構造蛋白質 (心筋型アクチン、心室型ミオシン軽鎖等) の発現が誘導される。これら心筋特異的遺伝子や、心臓形成過程に関与する遺伝子について、DNA チップ解析により得られたデータから当該遺伝子の発現プロファイルを解析した。その結果、心臓形成に関与する遺伝子群は、ES 細胞から 10 日間の心筋分化誘導過程で発現上昇しており、in vitro での ES 細胞から心筋細胞への分化過程は、マウス胚の心臓発生過程を反映していると考えられた (図 III.2.3-11)。そこで、DNA チップ解

析データで発現上昇することが認められた Bmp2, Cer1(cerberus), Nodal, Gata4, Nkx2-5, Mef2a, Mef2c, Nppa, Cdh2, Hand1, Hand2, Pitx2, Xin (cmya1), Isl1, Smyd1, Foxh1, Tbx20, Shh, Foxc1, Foxc2, Tbx1, Foa2, Fgf10, Tbx5, Bmp10, Irx4, Nfatc1, Nfatc4, Adam19 の 29 遺伝子を候補遺伝子としてさらに選定した。



図III.2.3-11 ES細胞分化過程における心臓形成既知遺伝子の発現変動

リアルタイムPCRを用いた発現変動の確認

解析候補として選定した合計 121 遺伝子 (92 遺伝子および 29 遺伝子) については、DNA チップデータの確認と、詳細な発現変動プロファイルを取得する目的で、リアルタイム PCR 解析を行った。解析に用いた RNA は DNA チップ解析時に抽出した同一サンプルを利用し、分化誘導後の奇数日を含む 0 日から 10 日のすべての日を対象とした (DNA チップでは偶数日のみ解析対象)。RNA は、RiboGreen RNA 定量キットを用いて RNA 濃度を測定した。300ng 相当の RNA を oligo dT プライマー及び Superscript III RT (インビトロジェン社) の逆転写酵素を用いて、42°C、1 時間反応させ、各日の cDNA を作製した。得られた cDNA 1 μL、TaqMan プローブ 1 μL、TaqMan Fast Universal PCR Master Mix 8 μL (アプライドバイオシステムズ) を解析用プレートで混合し、95°C10 分間の保温後、95°C10 秒間と 60°C20 秒間の反応を 40 サイクル繰り返す反応条件にて、7900HT Real-time PCR system を用いて実施した。各サンプルについては 3 反復にて実施した。解析に用いた各遺伝子の TaqMan プローブは全てアプライドバイオシステムズが提供する標準 probe を使用した。解析により得られたデータは、分化誘導各日のマーカー遺伝子発現量を、同日のマウス β アクチン遺伝子発現量で除することにより、各マーカー遺伝子の経時的発現量変化を評価した。

全 121 の遺伝子の解析した結果、120 の遺伝子で分化誘導時の発現上昇を確認し、最終的なマーカー候補遺伝子とした。また、各々の遺伝子については最も発現が上昇する解析対象日として特定した。

(b) 催奇形性マーカーの絞込み

被験物質の選定

ECVAM による EST 法のバリデーション試験に用いられた化合物を参考に、6 種類の催奇形性物質と 6 種類の非催奇形性物質を選択した（表Ⅲ.2.3-2）。

表Ⅲ.2.3-2 被験物質リスト

催奇形性6物質	5-Fluorouracil hydroxyurea 6-aminonicotinamide 5-bromo-2'-deoxyuridine methotrexate all-trans -retinoic acid
非催奇形性6物質	Ascorbic acid isoniazid acrylamide D-(+)-camphor penicillin G sodium salt saccharin sodium hydrate

被験物質処理濃度の決定

まず、酵素処理により分散した約 500 個の未分化 ES 細胞を細胞培養用 96 ウェルプレートに播種し、EST バリデーション試験データを参考に適当な濃度で希釈した被験物質を含む 100 μ L の培地で培養開始から 2 回培地交換して 10 日間培養した。そして、最終日に CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay（プロメガ社）で生細胞数を算出し、細胞増殖に影響を与えない被験物質の最大濃度を決定した。次に決定した被験物質の最大濃度において心筋分化実験を行い、分化開始 10 日目に顕微鏡観察による EB の拍動および形態を確認し心筋の分化阻害を確認した。検討した被験物質の中で心筋に分化させた EB の 100% が拍動阻害を受けた場合は、適当に被験物質を希釈した培地でさらに心筋分化誘導実験を行った。そして、100% の EB の心筋分化阻害が認められる最低濃度を被験物質処理濃度とした。その他においては細胞増殖により求めた被験物質の最大濃度を処理濃度とした。最終的な被験物質処理濃度は以下の通りである（表Ⅲ.2.3-3）。

表Ⅲ.2.3-3 被験物質処理濃度

5-Fluorouracil	0.05 μ g/mL
Hydroxyurea	4.0 μ g/mL
6-aminonicotinamide	1.0 μ g/mL
5-bromo-2'-deoxyuridine	1.5 μ g/mL
Methotrexate	0.6 μ g/mL
All-trans -retinoic acid	0.001 μ g/mL
Saccharin sodium hydrate	1000 μ g/mL
Ascorbic acid	7.5 μ g/mL
Isoniazide	125 μ g/mL
Penicillin G sodium salt	1500 μ g/mL
Acrylamide	25 μ g/mL
D-(+)-camphor	100 μ g/mL

被験物質処理

心筋分化誘導時の被験物質処理サンプルの回収は以下の通り行った。決定した被験物質

処理濃度を含む培地で ES-D3 細胞をプロトコールに従い心筋に分化した。ハンギングドロップ開始から 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日の各日当たり 50 個以上の細胞を混合して 1 群とし、4 群以上の細胞を回収した。回収した細胞は Trisol 試薬に溶解して-80℃にて保存した。そして定法に従って RNA を抽出した後、RNeasy mini kit (キアゲン社) により精製した。

マーカー遺伝子の 1 次絞込み

催奇形性物質処理群で特異的に発現が変化する遺伝子をマーカー遺伝子として絞り込む目的で、被験物質処理サンプルにおける上記 120 のマーカー候補遺伝子の発現変動をリアルタイム PCR により解析した。予め決定した各マーカー候補遺伝子の発現ピーク時を解析対象日とし、溶媒対照処理 1 群、催奇形性物質処理 6 群、非催奇形性物質処理 6 群の遺伝子発現量をリアルタイム PCR により定量した。解析により得られたデータはマウス β アクチン遺伝子発現量で除して標準化し比較した。

一例として Hand1 遺伝子の分化 6 日目の発現量を比較した結果を示した (図 III.2.3-12)。溶媒対照群 (control) との発現量を比較し、非催奇形性物質では発現量の変動が少ないのに対し、催奇形性物質処理細胞では明らかに発現量が減少していた。このような催奇形性物質に共通して発現減少が認められた遺伝子として Hand1 遺伝子以外に、Adam19 遺伝子、Cmya1 遺伝子、Pitx2 遺伝子、Smyd1 遺伝子、Pim2 遺伝子、Tbx20 遺伝子、Myl4 遺伝子、Myl7 遺伝子、Hbb-bh1 遺伝子、Hba-a1 遺伝子、Colla2 遺伝子又は Hba-x 遺伝子の計 13 種を見出した。

リアルタイムPCRによる発現量比較

Hand1 (分化6日目)

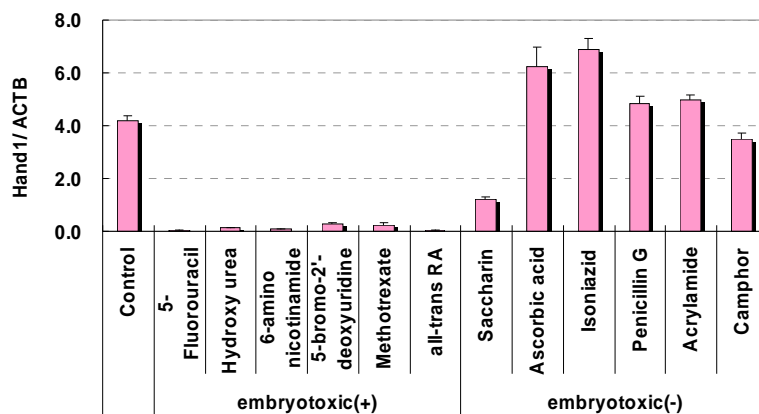


図 III.2.3-12 Hand1 遺伝子の発現量比較

マーカー遺伝子の 2 次絞込み

12 化合物の処理細胞群を用いて絞り込んだ 13 遺伝子について、ECVAM における EST 法のバリデーション試験で使用された 15 化合物 (9 種類の催奇形性物質と 6 種類の非催奇形性物質、表 III.2.3-4) を用いてマーカー遺伝子としての有用性を検証し、さらに絞込みを行った。被験物質の処理濃度は、先述した ES 細胞の増殖阻害試験により決定し、細胞の増殖に影響を及ぼさない濃度以下の範囲で適当に 5 段階に希釈した物質を含む培地を用いて EST 法に準じて心筋分化誘導を行い、ハンギングドロップ開始から 1 日、2 日、3 日、

4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日の各日当たり50個以上の細胞を混合して1群とし、4群以上の細胞を回収した。回収した細胞は Trisol 試薬に溶解して-80℃にて保存した。回収したサンプルは、RNA抽出を行った後、RNeasy mini kit (キアゲン社)により精製した。

表Ⅲ.2.3-4 追加被験物質リスト

催奇形性9物質	Cytosine β-D-arabinofuranoside HCl Busulphan d-Penicillamine Valproic acid (VPA) Diphenyl hydantoin sodium salt (Phenytoin) Lithium chloride Salicylic acid sodium salt Methoxyacetic acid Acetylsalicylic acid (Aspirin)
非催奇形性6物質	Dimethyl phthalate Benzophenone Triamterene Acetaminophen Diphenhydramin hydrochloride Doxylamine succinate salt

まず9種の催奇形性物質処理群についてリアルタイムPCRにより上記の絞り込んだ13遺伝子を解析した。解析対象日は、Hand1 遺伝子(6日目)、ADAM19 遺伝子(10日目)、Cmya1 遺伝子(8日目)、Pitx2 遺伝子(9日目)、Smyd1 遺伝子(8日目)、Pim2 遺伝子(4日目)、Tbx20 遺伝子(9日目)、Myl14 遺伝子(10日目)、Myl7 遺伝子(10日目)、Hbb-bh1 遺伝子(7日目)、Hba-a1 遺伝子(7日目)、Colla2 (10日目) 遺伝子、Hba-x 遺伝子(7日目)とした。取得したデータはマウス β アクチン遺伝子により補正して発現量を比較した。今回、マーカー遺伝子の検証の基準として溶媒対照群の発現量と比較して50%以上発現低下した場合を催奇形性陽性(P)、50%以上発現低下しない場合を催奇形性陰性(N)として計算した結果を表Ⅲ.2.3-5に示す。

表Ⅲ.2.3-5 13種のマーカー遺伝子の催奇形性物質の発生毒性予測率

マーカー遺伝子	Cytosine β-D- arabino furanoside HCl	Busulphan	d- Penicillamine	Valproic acid	Phenytoin	Lithium chloride	Salicylic acid sodium salt	Methoxy acetic acid	Acetyl salicylic acid	予測率 1 (%)	予測率 2 (%)
Cmya1	P	N	P	P	P	P	P	P	P	89	93
Col 1a2	P	N	P	P	P	P	P	P	P	89	93
Myl4	P	N	P	P	P	P	P	P	P	89	93
Hba-x	P	P	P	N	P	P	N	P	P	78	87
Smyd1	P	N	P	P	P	N	N	P	P	67	80
Hand1	P	P	N	N	N	P	P	P	P	67	80
Myl7	N	P	N	P	P	P	P	P	P	67	80
Hbb-bh1	P	N	P	N	P	P	N	P	N	56	73
Adam19	P	N	P	N	P	P	N	P	N	56	73
Hba-a1	N	P	N	P	P	N	P	N	N	44	67
Pim2	P	P	N	N	N	P	N	N	N	33	60
Pitx2	N	N	N	P	N	P	N	P	N	33	60
Tbx20	P	N	P	N	N	P	N	P	N	33	60

P: 溶媒対照群発現量と比較して50%以上の発現低下

N: 溶媒対照群発現量と比較して50%以上発現低下しない

予測率1: 今回実施9化合物での結果

予測率2: 実施済みを含めた15化合物

2次絞込みで実施した催奇形性9化合物について集計した結果を予測率1、既に実施した催奇形性6物質での結果を含めた合計15物質の結果を予測率2として表した。13遺伝子のうちCmya1(Xin)、Col1a2、Myh4、Hba-x、Smyd1、Hand1、Myl7の7遺伝子が80%以上の高い予測率を示し、さらに有用な予測マーカー遺伝子と考えられた。

つぎに催奇形性物質処理群で予測率の高かった7遺伝子について、同様の解析方法により非催奇形性6物質処理群の発現量を比較した。結果を同様にまとめ、表Ⅲ.2.3-6に示した。実施済み非催奇形性物質と併せた12化合物での予測率(表中、予測率2)においていずれの遺伝子も高い予測率を示した。

表Ⅲ.2.3-6 新たな非催奇形性物質の結果を加えた、予測率の高い7種のマーカー遺伝子の催奇形性物質の発生毒性予測率

マーカー遺伝子	Dimethyl phthalate	Benzo- phenone	Triamterene	Acet aminophen	Diphen hydramin hydrochloride	Doxylamine succinate salt	予測率 1 (%)	予測率 2 (%)
Cmya1	N	N	N	P	N	N	83	92
Col 1a2	P	N	N	N	P	N	67	83
Myl4	N	N	N	N	N	N	100	100
Hba-x	N	N	N	N	P	N	83	92
Smyd1	N	N	N	N	N	N	100	100
Hand1	N	N	N	P	P	N	67	83
Myl7	N	N	P	N	N	N	83	92

P: 溶媒対照群発現量と比較して50%以上の発現低下

N: 溶媒対照群発現量と比較して50%以上発現低下しない

予測率1: 今回実施6化合物での結果

予測率2: 実施済みを含めた12化合物

以上の結果を踏まえ、陽性予測率、陰性予測率、正確性をまとめて表Ⅲ.2.3-7に示した。1次絞込みにより選出した13遺伝子のうち、Cmya1(Xin)、Col1a2、Myh4、Hba-x、Smyd1、Hand1、Myl7の7遺伝子はさらに催奇形性予測に有用なマーカー遺伝子と考えられた。

表Ⅲ.2.3-7 予測率の高い7種のマーカー遺伝子の発生毒性予測率（まとめ）

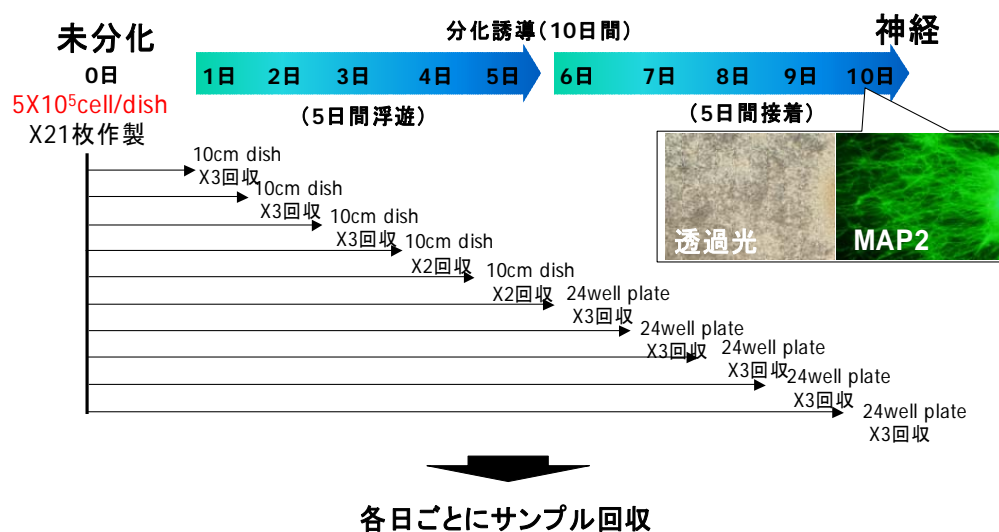
マーカー遺伝子	<i>in vivo</i>	化合物数	<i>in vitro</i>				正確性(%)
			予測結果		予測率(%)		
			陽性	陰性	陽性	陰性	
Cmya1	発生毒性陽性	15	14	1	93	92	93
	発生毒性陰性	12	1	11			
Col 1a2	発生毒性陽性	15	14	1	93	83	89
	発生毒性陰性	12	2	10			
Myl4	発生毒性陽性	15	14	1	93	100	96
	発生毒性陰性	12	0	12			
Hba-x	発生毒性陽性	15	13	2	87	92	89
	発生毒性陰性	12	1	11			
Smyd1	発生毒性陽性	15	12	3	80	100	89
	発生毒性陰性	12	0	12			
Hand1	発生毒性陽性	15	12	3	80	83	81
	発生毒性陰性	12	2	10			
Myl7	発生毒性陽性	15	12	3	80	92	85
	発生毒性陰性	12	1	11			

①-3 遺伝子発現解析と遺伝子探索(神経分化関連マーカー遺伝子の選定)

(a) マーカー候補遺伝子の選定

神経分化細胞の調製

ES 細胞から神経への分化過程で発現変動する遺伝子群を経時的かつ網羅的に解析するため、低酸素条件下による SFEB 法を用いて 0 日、1 日、2 日、3 日には 10cm シャーレ 3 枚分の細胞、4 日、5 日には 10cm シャーレ 2 枚分の細胞を 1 群として 4 群の細胞を、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日には 24 ウェルプレート 3 枚分の細胞を 1 群として 4 群の細胞を回収し、合計 44 群の細胞を回収した（図Ⅲ.2.3-13）。



図Ⅲ.2.3-13 神経分化細胞サンプルの取得

分化開始より 10 日目に、一部のウェルについて位相差顕微鏡下で神経突起を観察、更に神経分化の代表的なマーカー遺伝子 Map2 に対する抗体を用いて免疫染色を実施し、Map2 陽性細胞の有無を観察した。

神経分化過程の網羅的発現変動解析

分化誘導後 0 日、2 日、4 日、6 日、8 日、10 日目、計 6 時点の保存サンプル合計 24 サンプル（1 日あたり 4 群）から Trisol 試薬を用いて RNA を抽出した。抽出したすべての RNA は RiboGreen RNA 定量キットによる濃度測定、及び電気泳動による RNA 分解の品質確認を行った。濃度測定の結果に基づき 4 μ g の RNA を用いて、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 Array により網羅的に遺伝子発現変動プロファイルデータを取得・解析した。具体的な解析法は、0 日群と各日群のシグナル値を t 検定し、有意 ($p < 0.05$) に発現変動した遺伝子を絞り込んだ。次いで、0 日群と各日群の平均シグナル値を比較し、2 倍以上発現が上昇した遺伝子を絞り込んだ。さらに、遺伝子発現量に相当するシグナル値の差を用いて 0 日に対して各日（2 日、4 日、6 日、8 日、10 日）において発現変化量の大きい順に候補遺伝子 60 遺伝子を選定した。選定した 60 遺伝子の発現プロファイルから、本分化誘導法により様々な時間で多くの遺伝子の発現変動が認められた（図 III.2.3-14）。

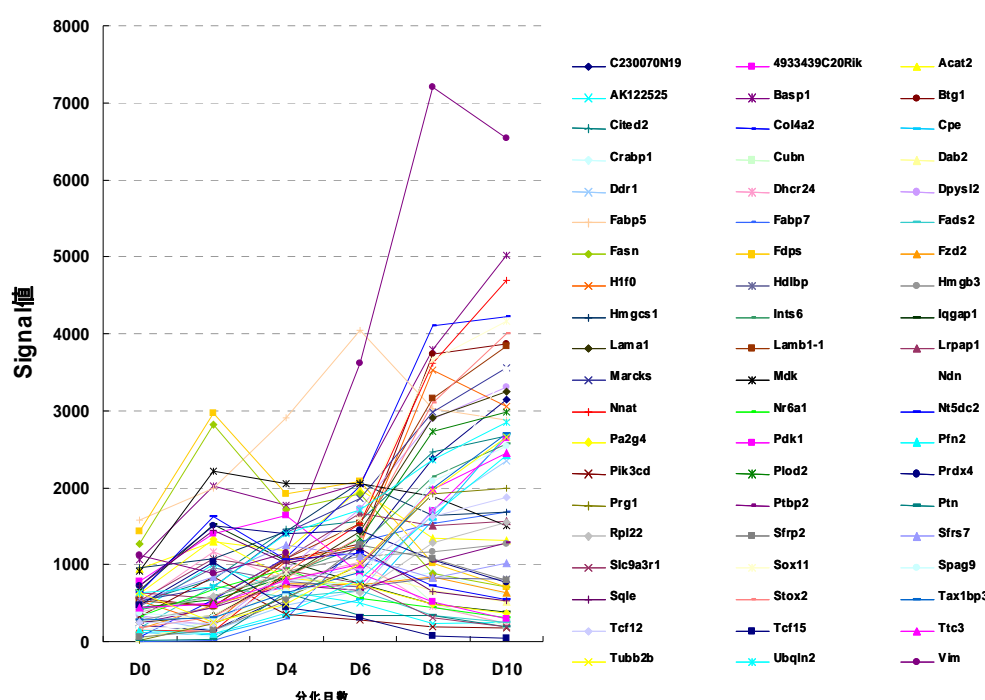


図 III.2.3-14 マーカー遺伝子候補取得の概要

既知の神経分化関連変動遺伝子の解析

心筋分化過程の研究と同様に、脳の発生過程に関する知見、ES 細胞からの神経分化誘導に関わる基礎研究で神経マーカー遺伝子として用いられる遺伝子を情報収集し、DNA チップデータから遺伝子の発現変動の有無を確認した。DNA チップ解析データで発現上昇することが認められた Mthfr、Six3、Zic2、Ptch1、Pafah1b1、Arx、Dcx、Pomt1、Pomt2、L1cam、Otx1、Otx2、Lhx1、Emx1、Emx2、En1、En2、Wnt1、Pax6、Reln、Pou3f2、Fcmd、Bfl の 23 遺伝子を候補遺伝子としてさらに選定した。

リアルタイム PCR を用いた発現変動の確認

解析候補として選定した合計 83 遺伝子（60 遺伝子および 23 遺伝子）については、DNA チップデータの確認と、詳細な発現変動プロファイルを取得する目的で、リアルタイム PCR 解析を行った。解析に用いた RNA は DNA チップ解析時に抽出した同一サンプルを

利用し、分化誘導後の奇数日を含む0日から10日のすべての日を対象とした（DNAチップでは偶数日のみ解析対象）。すべての解析方法は心筋での研究と同様に行い、最終的に全83遺伝子の解析した結果、すべての遺伝子で分化誘導時の発現上昇を確認し、最終的なマーカー候補遺伝子として解析対象とした。また、各々の遺伝子については発現上昇日を特定した。

(b) 催奇形性マーカーの絞込み

被験物質の選定

心筋での研究と同一の12化合物（表Ⅲ.2.3-8）を選択した。

被験物質処理濃度の決定

心筋の研究で決定したES細胞の細胞増殖への無影響濃度により神経分化阻害実験を行った。検討した被験物質の中で神経に分化させたEBの100%が分化阻害を受けた場合は、各被験物質を公比3~10で適当に希釈し、神経分化誘導培地を用いて低酸素条件下でES細胞をSFEB法により神経に分化し、分化開始から3日目、および5日目に再度調製した被験物質を含む神経分化誘導培地に交換して10日間培養した。培養開始から10日目の神経細胞の一部を顕微鏡観察し、神経突起の有無、細胞形態を確認した。そして、100%のEBの神経分化阻害が認められる最低濃度を被験物質処理濃度とした。その他においては細胞増殖により求めた被験物質の最大濃度を処理濃度とした。最終的な被験物質処理濃度は以下の通りである。なお、6-aminonicotinamide、5-bromo-2'-deoxyuridine、all-trans-retinoic acid 処理では神経分化への影響が強く細胞数が少なくなり十分なRNAが抽出できなかったため、今回は解析対象としなかった。

表Ⅲ.2.3-8 被験物質処理濃度

5-Fluorouracil	0.03 μ g/mL
Hydroxy urea	4.0 μ g/mL
Methotrexate	0.2 μ g/mL
Saccharin sodium hydrate	4000 μ g/mL
Ascorbic acid	20 μ g/mL
Isoniazide	150 μ g/mL
Penicillin G sodium salt	600 μ g/mL
Acrylamide	50 μ g/mL
D-(+)-camphor	100 μ g/mL

被験物質処理

神経分化誘導時の被験物質接触サンプルの回収は以下の通り行った。未分化維持培養中のES-D3を記載した方法に従い神経細胞に分化誘導した。分化開始から3日目及び5日目に再度調製した化合物を添加した培地に交換して10日間の培養を行った。分化開始から0日、1日、2日、3日には10cmシャーレ2枚分の細胞、4日、5日には10cmシャーレ1枚分の細胞を1群とし、5日、6日、7日、8日、9日、10日には24ウェルプレート1枚分の細胞を1群として細胞を回収した。回収した細胞はTrisol試薬に溶解して-80℃にて保存した。回収したサンプルは、定法に従ってRNA抽出を行った後、RNeasy mini kitにより精製した。

マーカー遺伝子の1次絞込み

催奇形性物質処理群で特異的に発現が変化する遺伝子をマーカー遺伝子として絞り込

む目的で、被験物質サンプルにおける上記 83 のマーカー候補遺伝子の発現量変動をリアルタイム PCR により解析した。予め決定した各候補遺伝子の発現ピーク時を解析対象日とし、溶媒対象処理 1 群、催奇形性物質処理 3 群、非催奇形性物質処理 6 群の遺伝子発現量を定量した。解析により得られたデータは、分化誘導各日のマーカー遺伝子発現量を、同日のマウス β アクチン遺伝子発現量で除して標準化し比較した。

一例として Map2 遺伝子の分化 10 日目の発現量を比較した結果と、Pax6 遺伝子の分化 10 日目の発現量を比較した結果を示す (図 III.2.3-15)。

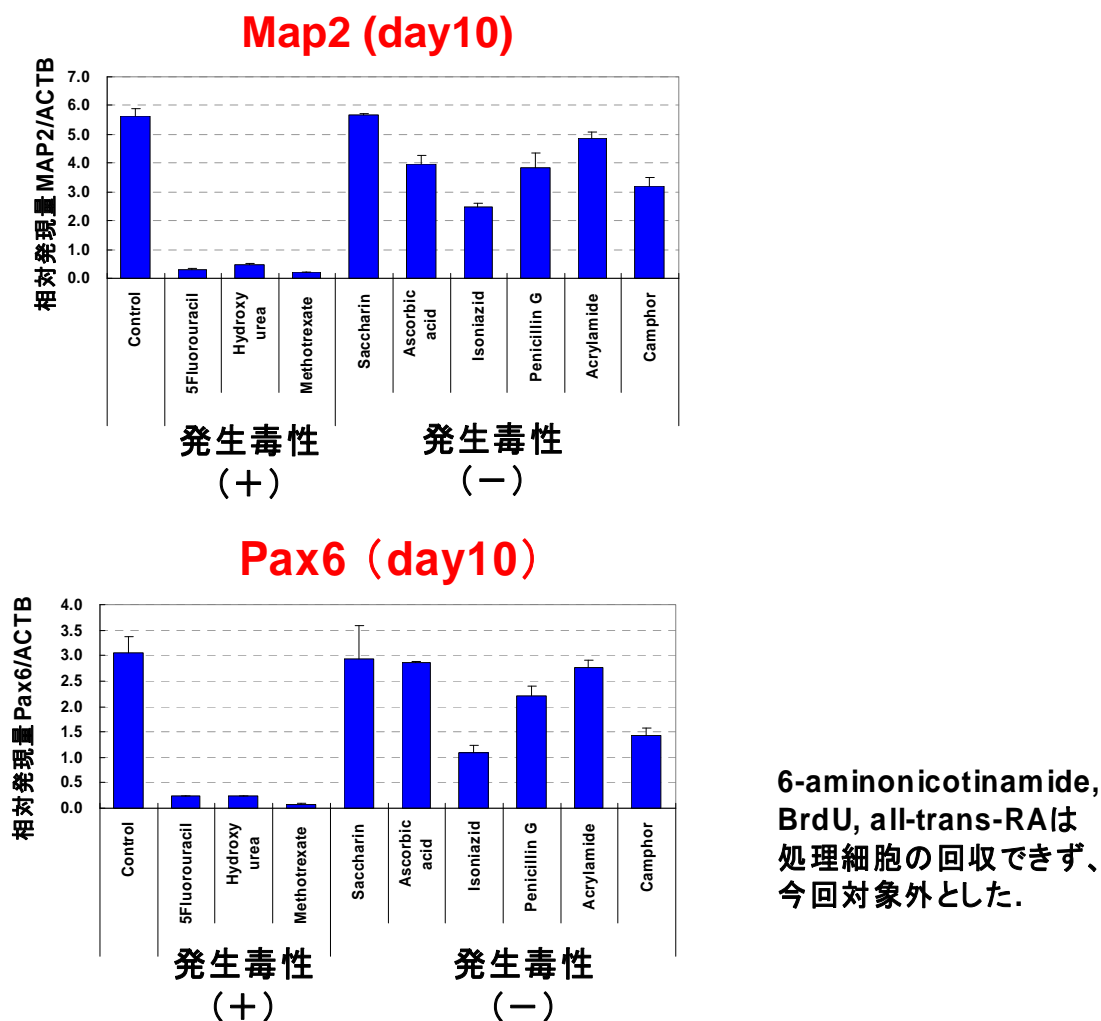


図 III.2.3-15 Map2 および Pax6 遺伝子の発現量比較

溶媒対照群 (control) での発現量と比較し、非催奇形性物質では発現量の減少が少ないのに対し、催奇形性物質処理細胞では発現量が顕著に減少していた。

このような催奇形性物質に共通して発現減少が認められた遺伝子として Map2 遺伝子、Pax6 遺伝子を含む計 22 遺伝子候補を見出した。22 遺伝子の symbol 名および full name をまとめ、表 III.2.3-9 に示した。

表Ⅲ.2.3-9 マーカー候補遺伝子リスト

Symbol	Full Name
Arx	aristaless related homeobox gene
Dcx	doublecortin
L1cam	L1 cell adhesion molecule
Six3	sine oculis homeobox homolog 3 (Drosophila)
Emx2	empty spiracles homolog 2
Reln	reelin
Ndn	necdin
Map2	microtubule-associated protein 2
Pax6	paired box gene 6
Basp1	brain abundant, membrane attached signal protein 1
Cpe	carboxypeptidase E
Ddr1	discoidin domain receptor family, member 1
Nnat	neuronatin
Ptbp2	polypyrimidine tract binding protein 2
Marcks	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate
Sfrp2	secreted frizzled-related protein 2
Sox11	SRY-box containing gene 11
Ttc3	tetratricopeptide repeat domain 3
Tubb2b	tubulin, beta 2b
Ubqln2	ubiquilin 2
Vim	vimentin
Wnt1	wingless-related MMTV integration site 1

22 遺伝子のうち、7 遺伝子については滑脳症やてんかんおよび水頭症の原因との関係が示唆されていることや、遺伝子の変異によりマウス脳の異常が報告されるなどの神経疾患に関与することが判明した。また別の 8 遺伝子は脳神経または胚の発生に関与する遺伝子が含まれており、催奇形性試験法において有用なマーカー遺伝子候補と考えられた（表Ⅲ.2.3-10 および 11）。

表Ⅲ.2.3-10 マーカー候補遺伝子の機能等 (1)

神経疾患に関与する遺伝子群

Arx	転写因子 滑脳症、てんかん、精神遅滞との関連が示唆 Arx遺伝子KOマウス: 大脳と嗅球で神経細胞の配置異常
Dcx	連鎖解析により滑脳症の原因遺伝子候補 ニューロン移動を指示する細胞質タンパク質
L1cam	X連鎖性劣性遺伝性水頭症の原因遺伝子
Six3	全前脳胞症・単眼奇形の原因遺伝子候補
Emx2	皮質形成期に将来大脳皮質となる背側神経上皮で発現する Emx2変異マウスでは歯状回の一部が失われる
Reln	reelinの突然変異マウスreelerは皮質神経細胞の配置異常を示す
Ndn	プラダー・ウィリー症候群(※)の原因遺伝子候補

※ 幼児期早期の重度の筋緊張低下と摂食障害と、それに引き続いて起こる幼児期後期あるいは小児期早期の過食、徐々に進行する病的肥満症、運動発達と言語発達は遅れる。

表Ⅲ.2.3-11 マーカー候補遺伝子の機能等 (2)

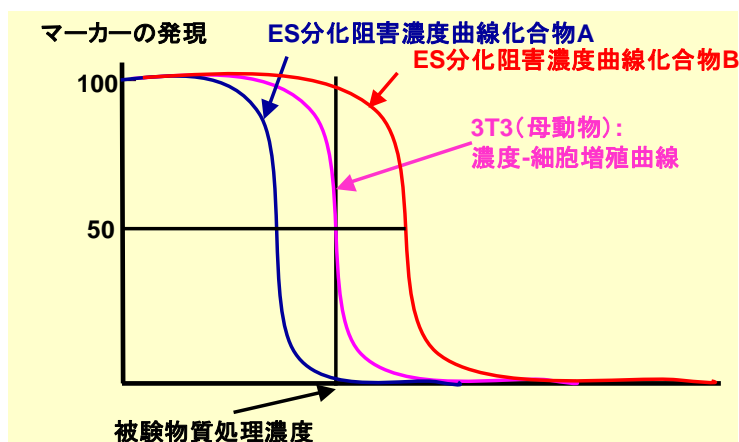
脳神経および発生に関する遺伝子群

Map2	神経細胞特異的な細胞骨格タンパク質
Pax6	大脳領域神経前駆細胞に発現
Basp1	脳に発現
Cpe	神経ペプチドのプロセッシングに関するC末端ペプチド加水分解酵素
Ddr1	脳に発現
Nnat	imprinting遺伝子
Ptbp2	脳に発現
Wnt1	発生分化過程での調節遺伝子/wntシグナルリガンド

マーカー遺伝子の2次絞込み

12化合物によって絞り込んだ22遺伝子について、さらに化合物数を増やしてマーカー遺伝子としての有用性を検証した。一般に動物実験では、被験物質を投与した母動物に毒性が認められる濃度で胎児が無影響であれば発生に対する毒性は陰性と評価し、その濃度よりも低い濃度域で胎児に影響が認められれば陽性と評価している。EST法では母動物に対する毒性として繊維芽細胞 Balb/c 3T3 細胞を用いて細胞増殖への影響を評価し、発生毒性の判定法に反映させている。そこで今回、Balb/c 3T3 細胞の細胞毒性と、ES細胞の分化阻害濃度の強弱を評価するために、Balb/c 3T3 細胞の細胞毒性指標 3T3-IC₅₀ 値を予め決定し、その濃度で神経分化した細胞中でのマーカー遺伝子の発現量を測定した。もしマーカー遺伝子の発現量が未処理群の神経細胞中での発現量の50%以下となった場合、3T3の細胞毒性よりも低濃度で分化阻害され、発生毒性への影響が強いと考えられる。また、逆にマーカー遺伝子の発現量が未処理群の神経細胞中での発現量の50%より高い場合、3T3の細胞毒性よりも高濃度で分化阻害され、発生毒性への影響は少ないと考えられる(図Ⅲ.2.3-16)。

3T3細胞毒性濃度とES分化阻害濃度の比較→発生毒性を予測



図Ⅲ.2.3-16 マーカー絞込みの考え方

被験物質は ECVAM による EST 法のバリデーション試験に用いられた化合物を参考に、8 種類の催奇形性物質と 16 種類の非催奇形性物質を選択した。EST 法の Balb/c 3T3 細胞の増殖阻害試験を実施して神経分化処理濃度を決定した（表Ⅲ.2.3-12）。

表Ⅲ.2.3-12 被験物質処理濃度

		被験物質名	µg/ml
非催奇形性物質	1	Ascorbic acid	15.16
	2	Isoniazid	262.12
	3	Penicillin G Na salt	1000.00
	4	Acrylamide	53.99
	5	Saccharin sodium salt	1000.00
	6	D-(+)-camphor	1000.00
	7	Dimethyl phthalate	681.00
	8	Diphenhydramine HCl	72.86
催奇形性物質	9	Dimethadione	1000.00
	10	Caffeine	214.80
	11	Dexamethasone	36.67
	12	Diphenylhydantoin	100.00
	13	Boric acid	300.00
	14	Salicylic acid Na salt	464.81
	15	Valproic acid Na salt	155.40
	16	Lithium chloride	600.00
	17	Methoxyacetic acid	697.89
	18	Cytosine arabinoside	0.10
	19	5-Fluorouracil	0.16
	20	all-trans Retinoic acid	13.23
	21	Hydroxyurea	4.72
	22	6-Aminonictinamide	7.86
	23	Methotrexate	0.01
	24	5-Bromo-2'-deoxyuridine	0.80

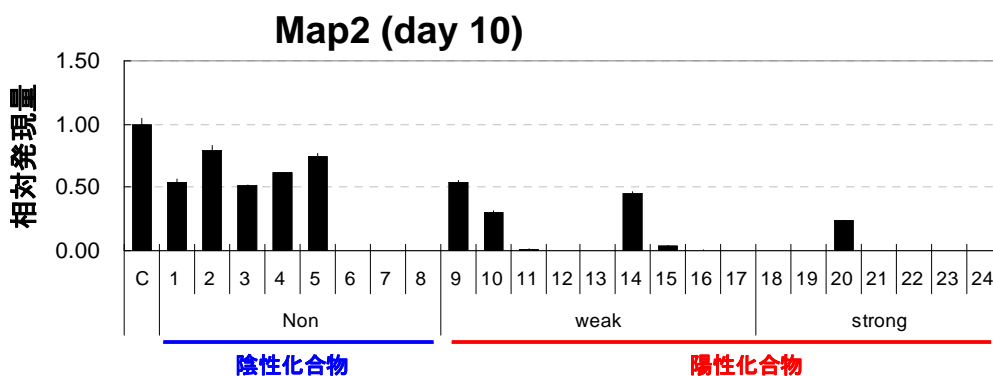
決定した処理濃度にて ES 細胞を神経細胞へ分化誘導し、7、8、9、10 日目に TaqMan Cells-to-Ct kit を用いて細胞から直接リアルタイム PCR を実施して 22 遺伝子の発現量を定量した。解析対象日は、それぞれの遺伝子で最も発現量の高い日とし、Map2 遺伝子（10 日目）、Cpe 遺伝子（10 日目）、Pax6 遺伝子（10 日目）、L1cam 遺伝子（10 日目）、Ndn 遺伝子（10 日目）、Arx 遺伝子（9 日目）、Dcx 遺伝子（9 日目）、Six3 遺伝子（9 日目）、Emx2 遺伝子（9 日目）、Reln 遺伝子（9 日目）、Basp1 遺伝子（9 日目）、Ddr1 遺伝子（9 日目）、Sox11 遺伝子（9 日目）、Ubqln2 遺伝子（9 日目）、Marcks 遺伝子（9 日目）、Ttc3 遺伝子（9 日目）、Nnat 遺伝子（9 日目）、Tubb2b 遺伝子（9 日目）、Ptbp2 遺伝子（9 日目）、Vim 遺伝子（8 日目）、Wnt1 遺伝子（7 日目）、Sfrp2 遺伝子（7 日目）とした。取得したデータは溶媒対照群（control）の発現量と比較した相対値に換算した（表Ⅲ.2.3-13）。

表Ⅲ.2.3-13 各マーカー遺伝子の各被験物質における相対発現量

			Non								weak								strong								
			C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
Day10	ACTB	Ave.	1.00	1.89	2.64	1.00	1.01	1.43	0.54	0.00	0.00	2.54	0.08	0.00	2.88	0.00	2.24	2.52	1.42	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Map2	Ave.	1.00	0.54	0.80	0.52	0.62	0.74	0.00	0.00	0.00	0.54	0.30	0.01	0.00	0.00	0.46	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Cpe	Ave.	1.00	0.89	0.62	0.52	0.52	0.53	0.01	0.00	0.00	0.53	0.35	0.01	0.00	0.00	0.38	0.08	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	Psip6	Ave.	1.00	0.93	1.07	0.50	0.53	0.31	0.00	0.00	0.00	0.75	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	L1Cam	Ave.	1.00	0.87	0.99	0.53	0.53	0.66	0.01	0.00	0.00	0.59	0.21	0.02	0.00	0.00	0.42	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Day9	ACTB	Ave.	1.00	2.98	2.28	1.66	1.08	1.33	0.05	0.00	0.00	1.77	2.05	0.01	0.08	0.00	1.19	0.50	0.68	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Arx	Ave.	1.00	0.85	1.56	1.00	0.60	0.58	0.00	0.00	0.00	0.52	0.66	0.07	0.00	0.00	0.04	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Dcx	Ave.	1.00	0.69	0.95	0.98	0.54	0.35	0.00	0.00	0.00	0.55	0.17	0.94	0.00	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Six3	Ave.	1.00	0.95	1.03	0.51	0.57	0.33	0.02	0.00	0.00	0.91	0.62	0.22	0.06	0.00	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Emx2	Ave.	1.00	0.57	0.67	0.69	0.53	0.02	0.00	0.00	0.00	0.23	1.43	0.02	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
Day8	ACTB	Ave.	1.00	0.91	0.91	0.73	0.28	0.78	0.13	0.00	0.00	1.32	2.98	0.27	0.48	0.00	0.92	0.35	0.19	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Map2	Ave.	1.00	0.94	0.77	0.97	0.75	0.97	0.01	0.00	0.00	1.19	3.37	0.23	0.15	0.00	1.15	0.06	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Lim1	Ave.	1.00	0.11	0.04	0.06	0.01	0.00	0.01	0.00	0.00	0.03	0.07	0.01	0.06	0.01	0.02	0.03	0.03	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Wnt1	Ave.	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
	Strp2	Ave.	1.00	0.03	0.01	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	

■ 相対発現量0.5以上

Map2 遺伝子は、非催奇形性 8 物質中 5 物質はコントロール (1.0) と比べて 0.5 以上の相対発現量を示しており、この 5 物質は 3T3 細胞の細胞毒性よりも分化への影響が弱いと考えられる。また、催奇形性 16 物質中 15 物質はコントロールと比べて 0.5 以下の相対発現量を示しており、この 15 化合物は 3T3 細胞の細胞毒性よりも分化への影響が強いと考えられる。したがって、Map2 遺伝子は非催奇形性 8 物質中 5 物質で発生毒性陰性と予測し、催奇形性 16 物質中 15 物質で陽性と予測できると考えられた (図Ⅲ.2.3-17)。



図Ⅲ.2.3-17 Map2 遺伝子の各被験物質における相対発現量

同様に他のマーカー遺伝子についても陰性予測率、陽性予測率、全体の予測率をまとめた (表Ⅲ.2.3-14)。その結果、22 遺伝子はすべて高い予測率を示し、さらに予測率が高い遺伝子は Map2 遺伝子、Ndn 遺伝子および Reln 遺伝子であることがわかった。

表Ⅲ.2.3-14 各マーカー遺伝子の予測率

解析日	遺伝子	一致化合物数			予測率
		陰性	陽性	合計	
Day10	Map2	5/8	15/16	20/24	83%
	Cpe	5/8	14/16	19/24	79%
	Pax6	4/8	15/16	19/24	79%
	L1Cam	5/8	14/16	19/24	79%
	Ndn	4/8	16/16	20/24	83%
Day9	Arx	5/8	14/16	19/24	79%
	Dcx	4/8	15/16	19/24	79%
	Six3	4/8	14/16	18/24	75%
	Emx2	4/8	15/16	19/24	79%
	Reln	5/8	15/16	20/24	83%
	Basp1	2/8	15/16	17/24	71%
	Ddr1	4/8	14/16	18/24	75%
	Sox11	4/8	15/16	19/24	79%
	Ubqln2	3/8	15/16	18/24	75%
	Marcks	2/8	16/16	18/24	75%
	Ttc3	3/8	15/16	18/24	75%
	Nnat	5/8	14/16	19/24	79%
	Tubb2b	3/8	16/16	19/24	79%
	Ptbp2	3/8	16/16	19/24	79%
	Day8	Vim	5/8	13/16	18/24
Day7	Wnt1	0/8	16/16	16/24	67%
	Sfrp2	0/8	16/16	16/24	67%

①-4 発光測定用細胞作製とマーカーの決定（心筋）

(a) 発光測定用細胞の作製

マーカー遺伝子プロモーターを利用したレポータープラスミドの構築

絞り込んだマーカー遺伝子の発現量を簡便に測定するため、以下の方法でルシフェラーゼの発光機能を組み込んだ組換え ES 細胞を樹立した。まずマーカー遺伝子のプロモーター発現制御下にルシフェラーゼ遺伝子を連結したプラスミドを作製するため、マーカー遺伝子のプロモーターをクローニングした。

各マーカー遺伝子のプロモーター領域は、NCBI データベースを利用し転写開始点から 5kb 上流の配列情報を入手した。配列を元に、Hand1 プロモーター 5kb 領域の増幅するため、5'-ccggtacccttgagaatctagctgatg-3'および 5'-ccggtaccaggggaaaataatcccagg-3'を、Cmyl1 プロモーター 5kb 領域の増幅するため、5'-ccttctgggaagaaggggagaacctg-3'および 5'-acagagagacctatctctaaag-3'を、Smyd1 プロモーター 5kb 領域の増幅するため、5'-cccaagcttctcaccaagggtctggctgg-3'および 5'-cccaagcttgaggtcagcctgatccacagag-3'を作製した。

ES-D3 細胞より抽出したゲノム DNA20ng と 10 μ M に調製した上記プライマーとを Platinum Taq polymerase（インビトロジェン社）を用いて PCR 法にて増幅した。PCR 反応は GeneAmp PCR System9700 にて、95 $^{\circ}$ C5 分間反応させた後、95 $^{\circ}$ C30 秒間、55 $^{\circ}$ C30 秒間、72 $^{\circ}$ C1 分間を 30 サイクル行い、72 $^{\circ}$ C7 分間の反応条件で実施した。

Hand1、Smyd1 遺伝子プロモーターの各 PCR 産物は Kpn I（タカラバイオ社）にて消化した後、電気泳動を行い、ゲル中より精製した。精製した DNA 断片はそれぞれ、Kpn I にて消化し、Alkaline phosphatase（タカラバイオ社）にて脱リン酸化処理を行った

pGL4.17[Luc2/Neo]vector (プロメガ社) と Ligation kit (タカラバイオ社) を用いて連結し、DH5 α コンピテントセル (タカラバイオ社) に形質転換して、37°C で LB/アンピシリン培地にて一晚培養した。出現したコロニーは LB/アンピシリン液体培地にて培養し、増殖した大腸菌よりプラスミド DNA を抽出した。取得したプラスミド DNA は挿入断片のシーケンスを決定し、変異等の有無を確認した。

ES 細胞へトランスフェクションに用いるため、各プラスミドは Qiafilter プラスミド抽出キット (キアゲン社) にて再度抽出した。得られたプラスミド DNA 20 μ g を Hand1 および Cmyc1 プロモーターに関しては Sal I にて、Smyd1 については Not I にて制限酵素処理を行った後、精製を行い、線状化 DNA を取得した。

組換え ES 細胞の作製方法

未分化維持培養を行った ES-D3 細胞を、0.25%トリプシン/1mM EDTA を用いて分散させた後、0.1%ゼラチンコートした 35mm シャーレ中に 0.3×10^5 個の細胞を播種し、LIF を添加した 15%の非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地により培養した。その後、Opti-MEM 培地と 4 μ g の線状化 DNA、12 μ L のリポフェクトアミン 2000 (インビトロジェン社) とを混合し、30 分室温にて反応させた後、全量を細胞培養液中に添加した。

37°C にて 5%CO₂ インキュベーターで 1 時間培養したのち、LIF を添加した 15%の非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地に交換した。12 時間後、各細胞を 0.25%トリプシン/1mM EDTA を用いて細胞を分散させた後、0.1%ゼラチンコートした 10cm シャーレに 100 μ g/mL の G418 を含む LIF 添加 15%の非働化処理済み牛胎児血清を含む DMEM 培地を用いて播種し、薬剤選択培養を開始した。7 日~10 日後、実体顕微鏡下でシャーレ中に形成した ES 細胞コロニーを単離し、96 ウェルプレートに播種し、薬剤選択培養を継続した。3 日毎に培地交換を行い、7~10 日後に増殖した細胞を継代培養して 48 ウェルプレートに播種して薬剤選択培養を継続し、薬剤耐性の安定形質転換した発光細胞 (Hand1-ES、Cmyc1-ES および Smyd1-ES) を取得した。

(b) 催奇形性予測試験プロトコールの作成

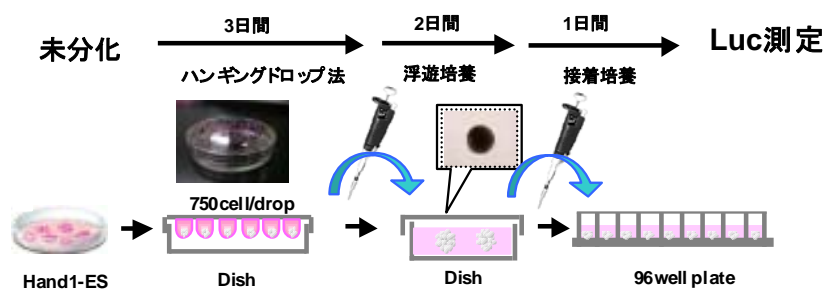
心筋分化誘導法の最適化

EST 法では、ハンギングドロップ法により EB を形成した後、3 日目に浮遊培養に移行し、さらに 5 日目に接着培養に移行する方法を用いる。この方法は、煩雑な作業であり熟練した技術が必要である。また得られる EB に個人差があり、EB 毎に大きさがばらつく点が問題であった。新規試験法を開発する上で、この問題を解決することが必須と考えられたため、いくつかの検討を実施した。

まず、非接着性 U 底 96 ウェルプレートを利用した EB 作製方法を本予測試験法に応用することとし、Hand1-ES 細胞を用いてハンギングドロップ法と非接着性 U 底 96 ウェルプレートを利用した方法を比較した。未分化維持した Hand1-ES 細胞を用いて、ハンギングドロップ法では、心筋分化培地にて 750cell/drop になるようにハンギングドロップを開始し、3、5 日目に目視により形成した EB を採取して 96 ウェルプレートに播種した。非接着性 U 底プレートを用いた EB 作製法では、0 日目に 750cell/ウェルとなるように心筋分化培地にて非接着性 U 底プレートに播種し、6 日間培養した (図 III.2.3-18A および B)。培養開始 6 日目に、それぞれの 96 ウェルプレートの各ウェルに、ルシフェラーゼ発光試薬 Steady-Glo を 50 μ L 添加し、10 分間振とうした後、TopCount NXT ルミネッセンス検出カウンター (パッカー社) にてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ルシフェラーゼ活性は、ハンギングドロップ法では大きくばらついていたが (CV 値 : 97%)、非接着性 U

底 96 ウェルプレートを用いた方法ではばらつきが顕著に低減されることが分かった（CV 値：25%）（図Ⅲ.2.3-18C）。

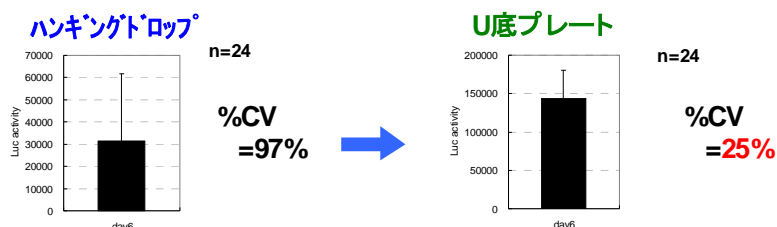
A) ハンギングドロップ法を用いた方法



B) U底プレートを用いた方法



C) 分化6日目のルシフェラーゼ活性



図Ⅲ.2.3-18 心筋分化誘導法の最適化

次に非接着性U底プレートを用いたEB作製法で、プレート内誤差およびプレート間の誤差を検討した。12ウェルを1群として統計処理した結果、プレート内誤差およびプレート間誤差が少なく再現性の良いデータが取得できることが分かった。また、EB毎の心筋分化効率が安定するかどうか、試験実施者毎のデータ再現性について細胞の継代方法や、細胞分散条件についても検討し、基本プロトコールに反映した（基本プロトコールの項で後述）。

非接着性U底プレートの改良

一般的にルシフェラーゼを測定する際には、透明のウェルでは隣り合ったウェルに発光が漏れるため、漏れを防止するために白色または黒色のプレートを用いて測定する。市販されている非接着性U底96ウェルプレートは透明の素材で加工されているため、発光試薬で溶解したサンプルは、測定用の白色96ウェルプレートに移してルシフェラーゼ活性を測定する必要がある。そこで、白色の非接着性U底プレートの作製をメーカーに依頼し、独自の白色U底96ウェルプレート（Prime Surface96U白色プレート：住友ベークライト）を作製した。そこでHand1-ES細胞を用いて、透明のU底96ウェルプレートを用いた現行法と白色U底96ウェルプレートを用いた改良法の比較を行った（図Ⅲ.2.3-19）。



図Ⅲ.2.3-19 心筋分化法の改良

作製した2種のU底プレートについてはそれぞれ5枚ずつのプレートにHand1-ES細胞を播種し、分化6日目にルシフェラーゼ活性を測定してプレート内誤差、プレート間での誤差を検討した。その結果、現行法のプレート内での誤差(CV値:18~36%)と比べて、改良法ではプレート内誤差が明らかに低減した(CV値:11~16%)。さらに5枚のプレート間の誤差も現行法に比べて改良法ではばらつきが低減することがわかった(表Ⅲ.2.3-15)。

表Ⅲ.2.3-15 既存法と改良法の比較

		Mean ± SD	%CV	Mean ± SD	%CV	
現行法 (透明/移し替え)	Plate 1	333289	74475	22	356494±83620	23
	Plate 2	266155	97138	36		
	Plate 3	463089	83617	18		
	Plate 4	422749	88468	21		
	Plate 5	297186	78471	26		
改良法 (白色U底プレート)	Plate 1	411816	43915	11	413432±20665	5
	Plate 2	435397	54412	12		
	Plate 3	429045	60879	14		
	Plate 4	382555	54235	14		
	Plate 5	408345	65152	16		

これは、移し替えによるサンプルロスが少ない事等が要因と考えられた。また、この方法によりプレート1枚あたり約10分要していた移し替えの工程を省くことができるようになり、精度の向上と時間の短縮を飛躍的に進めることができた。

組換えES細胞のLuc誘導活性

作製したHand1-ES、Cmya1-ESおよびSmyd1-ES細胞のルシフェラーゼ活性の測定は改良した心筋分化方法に従って以下の通り実施した。100µg/mLのG418を含むLIF添加15%非働化処理済み牛胎児血清を含むDMEM培地で未分化維持培養を行い、0.25%トリプシン/1mM EDTAを用いて分散させた。LIF未添加の15%の非働化処理済み牛胎児血清を含む

DMEM 培地に培地交換を行ったのち、開発した白色の非接着性 U 底プレートに、750cell/ウェルとなるように細胞を播種した。37°C CO₂ インキュベーターで 6 日間培養した後、各ウェルにルシフェラーゼ発光試薬 Steady-Glo を 100μL 添加し、30 分間振とうした後、TopCount NXT ルミネッセンス検出カウンターにてルシフェラーゼ活性を測定した。また、一部のプレートから各日毎に EB を回収して RNA を抽出した。抽出した RNA は先述のリアルタイム PCR の解析手順に従い、Hand1 遺伝子、Cmya1 遺伝子および smyd1 遺伝子の経時的な発現量を定量した。

Hand1-ES、Cmya1-ES および Smyd1-ES 細胞について、リアルタイム PCR による内在性遺伝子の発現変化と、ルシフェラーゼ活性の変動を図 III.2.3-20 に示す。

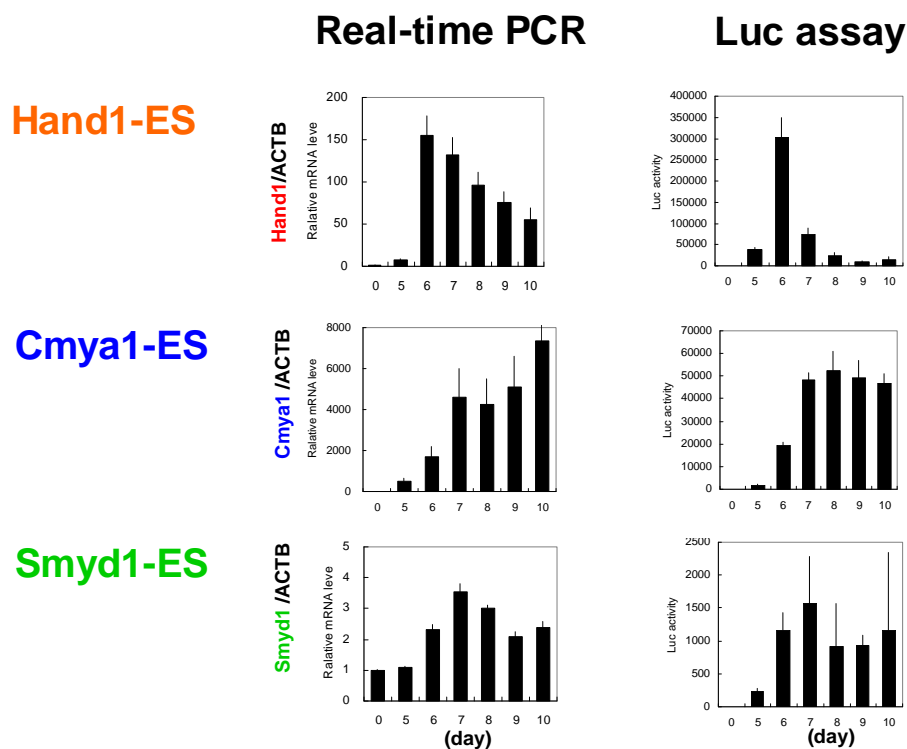
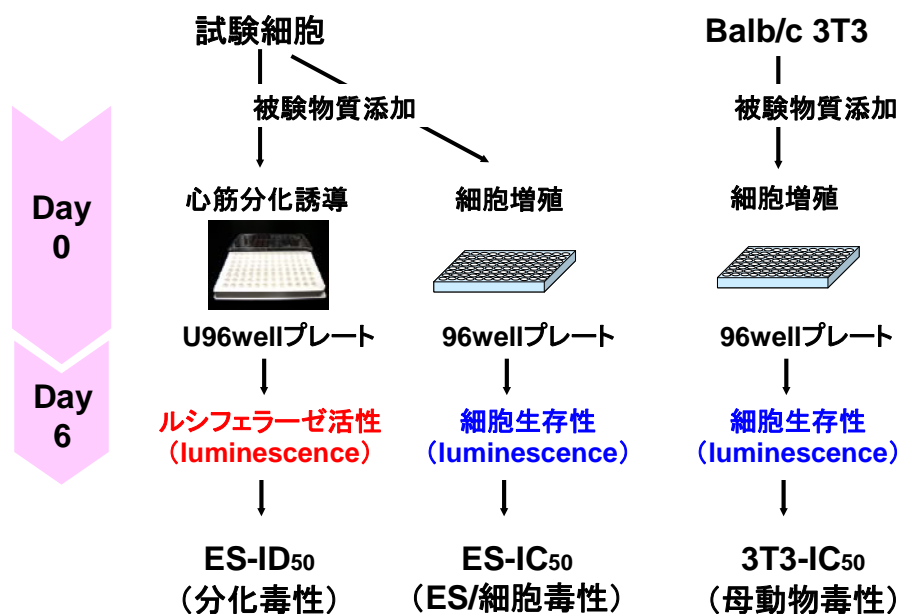


図 III.2.3-20 発光測定用細胞の遺伝子発現とルシフェラーゼ活性

Hand1-ES 細胞においては、内在性 Hand1 遺伝子が 6 日目に上昇し 8 日目以降急激に減少する発現プロファイルとルシフェラーゼ活性の変動パターンが一致しており、取得した Hand1-ES 細胞は内在性 Hand1 遺伝子の発現量評価として利用可能な細胞であると考えられた。同様に Cmya1-ES も内在性遺伝子とルシフェラーゼ活性の変動プロファイルが一致することがわかった。また、Smyd1-ES 細胞についても、未分化時に対するルシフェラーゼ活性の変動量は小さいが、変動プロファイルは一致しており、Smyd1 遺伝子の発現量評価として利用可能な細胞であると考えられた。

基本プロトコールの作成

EST 法では被験物質の心筋分化に及ぼす影響を評価する分化阻害試験以外に、ES 細胞の増殖に対する毒性試験、および繊維芽細胞 Balb/c 3T3 細胞の増殖に対する毒性試験、の 3 つの試験を行う。細胞毒性試験条件は EST 法に準じて実施し、測定日は分化阻害試験と同じ 6 日目に行うこととした (図 III.2.3-21)。



図III.2.3-21 提案する試験法の概要

Hand1-ES または Cmya1-ES 細胞を用いた催奇形性予測試験法（Hand1-EST 法または Cmya1-EST 法）の基本プロトコールについて以下にまとめた。

1. 試薬・材料

1.1. 細胞

- Hand1-ES 細胞
- Cmya1-ES 細胞
- Balb/c 3T3 細胞 cloneA31 (American Type Culture Collection[ATCC No.CCL-163])

1.2. 試薬および調製法

<試薬類>

- 陽性対照化合物：Hydroxyurea [H8627, SIGMA (CAS No. 127-07-1)]
- PBS(-) [Cat No. 10010-023(500ml), Invitrogen]
- 0.25% Trypsin /1mM EDTA 溶液 [Cat.35554-64, Nacalai]
- Geneticin Disulfate (G418) [和光純薬]
- セルバンカー1 [BLC-1(100ml), 日本全薬工業]
- Steady-glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Cat No. G7571, Promega)
- CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Cat No. G7571, Promega)
- DMSO 生化学用 (和光純薬、SIGMA 等)
- 超純水

<調製法>

◆未分化維持培養培地 100ml 調製の場合/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
DMEM	82 ml	11965-092 (Invitrogen)
FBS(非働化済み)	15 ml	
GlutaMax I 溶液(100×)	1 ml	35050-061 (Invitrogen)
100mM NEAA	1 ml	11140-050(Invitrogen)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	1 ml	26252-94(Nacalai)
100mM 2-ME 溶液	100 µl	
ESGRO (10 ⁷ unit) (=LIF)	10 µl	ESG1107(Millipore)

注意点

調製後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。

100mM 2-ME 溶液および ESGRO は、溶解後は4℃保存。

(注意) Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞の維持培養には終濃度 100µg/ml になるように G418 を添加する。

◆心筋分化培地/4℃保管

LIF を含まない未分化維持培養培地 (G418 も含まない)

◆0.1%ゼラチン溶液 500mL 調製の場合/室温保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
Gelatin	0.5 g	G2500 from porcine skin(SIGMA)
純水	500 ml	W3500 (SIGMA)

調製方法

- ・上記を混合し、オートクレーブ。室温で保管する。
- ・ディッシュのゼラチンコートは底面を覆う程度の液量にて 37℃, 30 分以上で使用可能。使用前にゼラチンを吸引除去し、洗浄は不要。

◆100mM 2-メルカプトエタノール溶液 /-80℃保存

試薬名	必要量	
2-メルカプトエタノール(原液=14.3M)	70 µl	指定なし
純水	10 ml	W3500 (SIGMA)

調製方法

上記を混合し、0.22 µm フィルターで滅菌する。0.5ml ずつ分注し、-80℃保存。一度溶解した場合、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。

◆非働化牛胎児血清 /-20℃保存

試薬名
FBS
調製方法
冷凍保存の FBS を 37℃温浴にて溶解後、56℃、30 分間非働化処理を行う。処理後は 50ml チューブに小分けして-20℃で保存。溶解後は冷蔵保存する。

事前にロットチェックして、心筋への分化効率(拍動)が高いロットを使用する。

◆Balb/c 3T3 細胞用培地 100ml 調製の場合/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
DMEM	88 ml	11965-092 (Invitrogen)
FBS(非働化済み)	10 ml	
GlutaMax I 溶液(100×)	1 ml	35050-061 (Invitrogen)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	1 ml	26252-94(Nacalai)
注意点		
調製後は冷蔵保存。		

1.3. 器材

- ・ 6cm セルカルチャーディッシュ イージーグリップ[Falcon Cat.353004]
- ・ 96 ウェルアッセイブロック[Corning-Coster, #3960]
- ・ U 底プレート (透明)
 - Lipidure-coat U 底プレート (7 枚入) [和研薬 (日油) 145399LC]
 - スミロンセルタイト X96U プレート[住友ベーク, MS-9096U]
- ・ U 底プレート (白色)
 - スミロン Prime Surface96U 白色プレート[住友ベーク, MS-9096W]
- ・ 96 ウェル平底プレート [Corning Cat No. 3917 または 3903]
- ・ プレートシール (Uプレート用) : タイタースティック HC フィルム[Watson, Cat No. 547-KTC-HC]
- ・ プレートシール (平底プレート用) : TopSeal-A [PerkinElmer No. 6005185]

2. 方法

2.1 ES 細胞の培養

2.1.1 起眠

10ml の未分化維持培養培地に、37℃温浴にて解凍した細胞液 (セルバンカー液) を添加し、低回転数 (5 分間、室温) にて細胞を集める。上清を廃棄後、新たな未分化維持培養培地 5ml 程度に細胞を分散し、0.1%ゼラチンコートディッシュ上に播種する (起眠時のみゼラチンコートした方が細胞生存率良)。翌日培地交換する。

2.1.2 継代培養

培地を吸引除去した後、PBS(-)で洗浄する。0.25% Trypsin/1mM EDTA 溶液 1ml を添加し、全体に行き渡らした後、すぐに除去する。37℃、2 分静置。

未分化維持培地 2ml を添加し、1000 μ l ピペットマンを用いて細胞を分散した後、遠心操作により細胞を集める。新たな未分化維持培養培地 2ml 程度に細胞を分散し、細胞数を算出。6cm ディッシュ当たり 1.0×10^6 cell を播種した場合、3 日後にコンフルエントとなる。

大量に細胞数が必要な場合は、高密度での培養も可能。コロニー同士が接触する前が継代のタイミング。基本的に 1 ヶ月以内に細胞を交換する。

2.2. Balb/c 3T3 細胞の培養

2.2.1 継代培養

培地を吸引除去した後、PBS(-)で洗浄する。0.25% Trypsin/1mM EDTA 溶液 1ml を添加し、全体に行き渡らした後、すぐに除去する。37℃、1 分静置。

Balb/c 3T3 細胞用培地 5ml を添加し、ピペッティングにて細胞を分散した後、遠心操作により細胞を集める。新たな Balb/c 3T3 細胞用培地 5ml 程度に細胞を分散し、細胞数を算出。10cm ディッシュ当たり 2.0×10^6 cell を播種した場合、3 日後にコンフルエントとなる。高密度培養を継続した場合に、接触阻害を起し細胞の性質に変化が認められる場合がある（顕微鏡観察により識別可能）。基本的に 1 ヶ月以内に細胞を交換する。

2.3 試験方法

分化阻害試験

◆0 日目

1. 溶解した被験化合物を準備する。
2. Prime Surface96U 白色プレートに化合物を含む培地 50 μ l を添加する。
3. 未分化維持した Hand1-ES または Cmya1-ES 細胞を基本操作に従って single cell に分散する。トリプシン処理後、2ml の心筋分化培地を添加する。1000 μ l ピペットマンを用いて細胞を乖離させた後、セルストレーナー40 μ m を通して、細胞塊を除去する。一部の細胞溶解液により細胞数を計算後、心筋分化培地にて 750cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。
4. リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、2.で準備したプレートに 8 チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ横方向 12 列添加する。また、試験細胞の性状確認および分散方法の確認するため、スミロンセルタイト X96U プレート 1 枚にも播種する（総培地量は 100 μ l とする）。
5. プレートをタッピングして混和し、37 $^{\circ}$ CCO₂ インキュベーターで 6 日間培養する。

* 被験物質及び陽性対照物質は、下図の配置例に従って Prime Surface96U 白色プレートの各ウェルに添加する。

	陽性対照物質 または 被験物質 1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VC	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	濃度 1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	濃度 2	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	濃度 3	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	濃度 4	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	濃度 5	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	濃度 6	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	濃度 7	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

VC: Vehicle control (DMSO or PBS(-))

◆6 日目

1. 前項(4)にて播種したプレートについて顕微鏡により EB の形成を確認する。各ウェルを観察し、単一で均等な大きさの EB が形成されていることを確認する。
2. Steady-glo Luciferase assay system (Promega, Cat.E2510 等)を水浴にて溶解し、室温にする。
3. 前項 (5) のプレートの全ウェルに 8 チャンネル自動ピペットを使用して 100 μ l ずつ添加する。
4. プレートシール (U 底プレート用) を貼り、遮光のためにアルミホイルで全体を覆った後、30 分ボルテックス。
5. プレート内の溶解液を低速回転でスピンドウン。
6. プレートリーダーで Luciferase 活性を測定する。

細胞毒性試験

◆0 日目

1. 溶解した被験化合物を準備する。
2. 96 ウェル平底プレートに化合物を含む培地 50 μ l を添加する。
3. 未分化維持した Hand1-ES または Cmya1-ES 細胞を基本操作に従って single cell に分散する。トリプシン処理後、2ml の心筋分化培地を添加する。1000 μ l ピペットマンを用いて細胞を乖離させた後、セルストレーナー40 μ m を通して、細胞塊を除去する。一部の細胞溶解液により細胞数を計算後、心筋分化培地にて 500cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。Balb/c 3T3 細胞は専用培地で 500cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。
4. リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、2.で準備したプレートに 8 チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ横方向 12 列添加する。
5. プレートをタッピングして混和し、37 $^{\circ}$ CCO₂ インキュベーターで 6 日間培養する。





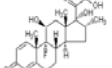

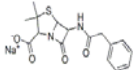










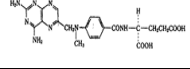





◆6 日目

1. Celltiter-glo Luciferase assay system を水浴にて溶解し、室温にする。PBS(-)を加えて 1/2 に希釈する。
2. 前項 4.のプレートの全ウェルから培地を吸引除去する。
3. 1.で調製した溶液を 8 チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ添加する。
4. プレートシール(平底プレート用)を貼り、遮光のためにアルミホイル等で全体を覆った後、30 分ボルテックス。
5. プレート内の溶解液を低速回転でスピンドウン。
6. プレートリーダーで Luciferase 活性を測定する。

(c) Hand1-EST および Cmya1-EST 法のバリデーション

作成した基本プロトコールに従って、動物実験により発生毒性の有無が知られている代表的な化合物を用いて Hand1-EST および Cmya1-EST 法の予測能を検証した。被験物質は EST 法の国際バリデーション試験 (Elke Genschow et al, ALTA 32, 209-244,2004) に使用された 27 化合物のうち、入手可能な 24 化合物を選択した (表Ⅲ.2.3-16)。被験物質は DMSO または PBS(-)を用いて溶解性、最大溶解濃度を検討した。被験物質の最大終濃度は 1000µg/ml に設定し、最大決定濃度より、適宜、段階的 7 濃度段階的に設定した。

表Ⅲ.2.3-16 被験物質リスト

Non-embryotoxic	Weak-embryotoxic	Strong-embryotoxic
Ascorbic acid CAS 50-81-7 ビタミン 	Caffeine CAS 58-08-2 食品添加物/中枢神経刺激薬 	Cytosine β-D-arabinofuranoside CAS 147-94-4 抗腫瘍薬 
Isoniazid CAS 54-85-3 結核症治療薬 	Dexamethasone CAS 50-02-2 ステロイド系抗炎症薬 	5-Fluorouracil CAS 51-21-8 抗腫瘍薬 
Penicillin G sodium salt CAS 69-57-8 抗生物質 	Diphenylhydantoin CAS 57-41-0 抗てんかん薬 	Hydroxyurea CAS 127-07-1 抗腫瘍薬 
Acrylamide CAS 79-06-1 合成原料 	Boric acid CAS 10043-35-3 殺菌剤/殺虫剤 	<i>all-trans</i> -Retinoic acid CAS 302-79-4 ビタミンA誘導体/抗腫瘍薬 
Dimethyl phthalate CAS 131-11-3 殺虫剤/昆虫忌避薬 	Salicylic acid sodium salt CAS 54-21-7 解熱鎮痛薬 	6-Aminonicotinamide CAS 329-89-5 細胞増殖抑制剤 
Saccharin sodium salt hydrate CAS 82385-42-0 食品添加物 	Valproic acid sodium salt CAS 1069-66-5 抗てんかん薬 	Methotrexate CAS 59-05-2 抗腫瘍薬 
Diphenhydramine hydrochloride CAS 147-24-0 抗アレルギー薬 	Lithium chloride CAS 7447-41-8 無機薬品/工業原料 $Li^+ Cl^-$	5-Bromo-2'-deoxyuridine CAS 59-14-3 チミジンアナログ 
D-(+)-camphor CAS 464-49-3 外用医薬品/虫除 	Methoxyacetic acid CAS 625-45-6 有機薬品 	
	Dimethadione CAS 695-53-4 トリメタジオンの活性代謝物 	

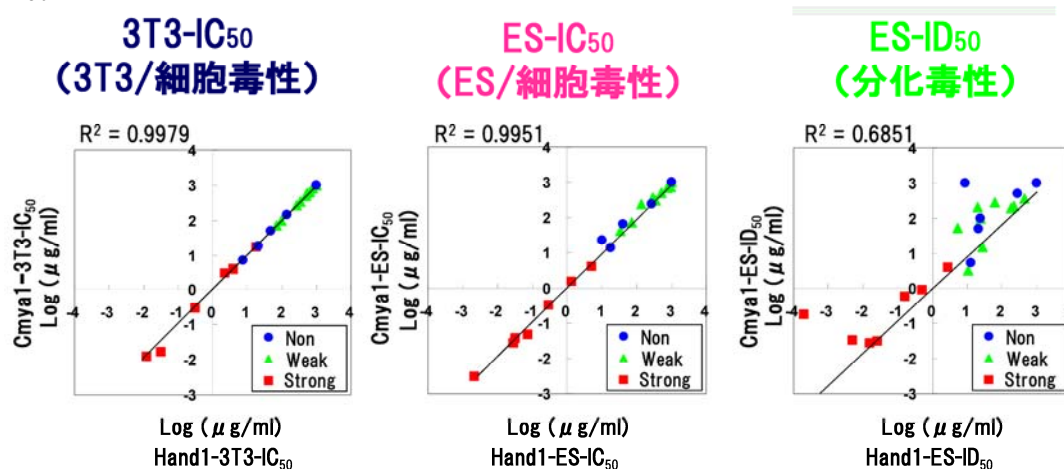
Elke Genschow et al, ALTA 32, 209-244,2004

Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞による ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、および Balb/c 3T3 の IC₅₀ 値を表Ⅲ.2.3-17 に示した。

表Ⅲ.2.3-17 Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法の結果 (1)

	in vivo	Hand1-ES			Cmya1-ES	
		3T3-IC50	-ID50	-IC50	-ID50	-IC50
Hydroxyurea	strong	4.08	2.90	5.30	3.82	4.18
5-Fluorouracil	strong	0.31	0.02	0.07	0.03	0.05
Cytosine arabinoside	strong	0.01	0.01	0.03	0.03	0.04
6-Aminonictinamide	strong	2.26	0.50	1.39	0.87	1.48
all-trans Retinoic acid	strong	18.34	0.00	0.00	0.17	0.00
Methotrexate	strong	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03
5-Bromo-2'-deoxyuridine	strong	4.00	0.16	0.29	0.59	0.33
Lithium chloride	weak	525.38	223.16	949.03	219.62	720.12
Dimethadione	weak	1000.00	446.77	1000.00	379.23	1000.00
Boric acid	weak	350.00	27.98	134.39	15.28	238.46
Dexamethasone	weak	68.97	10.91	35.23	3.19	41.76
Diphenhydantoin HCl	weak	95.05	5.31	74.36	53.71	76.24
Salicylic acid Na salt	weak	500.00	63.00	500.00	291.15	500.00
Methoxyacetic acid	weak	800.00	180.71	767.79	200.81	675.85
Valproic acid sodium salt	weak	638.69	23.73	364.04	102.58	311.96
Caffeine	weak	266.27	19.95	283.57	207.87	369.63
Penicillin G	non	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Saccharin	non	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Ascorbic acid	non	7.45	21.60	10.44	51.87	22.91
D-(+)-Camphor	non	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Diphenhydramine HCl	non	20.71	13.39	18.15	5.23	13.78
Isoniazid	non	144.27	293.17	276.55	512.35	245.23
Dimethyl phthalate	non	1000.00	9.09	1000.00	1000.00	1000.00
Acrylamide	non	49.25	23.88	42.42	101.60	64.13

Hand1-ES 細胞と Cmya1-ES 細胞を比較するため、Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法で得られた 24 化合物の ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、および Balb/c 3T3 の IC₅₀ 値の相関を検証した (図Ⅲ.2.3-22)。まず、Hand1-EST および Cmya1-EST それぞれで独立して実施した 2 回の 3T3-IC₅₀ 値は、相関性が高く (相関係数 R²=0.9979)、再現性の高い結果と考えられた。そこで ES-IC₅₀ 値について比較した結果、24 物質すべてでほぼ同等の数値が得られ、相関性の高い結果となった (相関係数 R²=0.9951)。このことから Hand1-ES 細胞、Cmya1-ES 細胞の細胞毒性の感受性は同等と考えられ、細胞のクローンによる差はないと考えられた。また、ES-ID₅₀ 値について比較した結果、Cmya1-ES-ID₅₀ 値が Hand1-ES-ID₅₀ 値より高い傾向があり、一部の化合物 (all-trans retinoic acid および diphenhydramine HCl) では異なる ES-ID₅₀ 値が得られる傾向が認められた。



図Ⅲ.2.3-22 Hand1-および Cmya1-EST の比較

ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、および Balb/c 3T3 の IC₅₀ 値を EST 法の予測モデル式 (Elke Genschow et al, ALTA 32, 209-244, 2004) に代入して 3 つのクラス分類 (Strong、weak、non-embryotoxic) を行った。その結果、Hand1-EST では、in vivo で strong 分類の hydroxyurea を weak と予測、in vivo で weak 分類の 9 化合物は全て weak として予測、in vivo で non 分類の 8 化合物のうち、diphenhydramine HCl、dimethyl phthalate、acrylamide を weak と予測した。また、Cmya1-EST では、in vivo で strong 分類の hydroxyurea を weak と予測分類、in vivo で weak 分類の 9 化合物は全て weak として予測、in vivo で non 分類の 8 化合物のうち、diphenhydramine HCl を weak と予測した (表 III.2.3-18)。

表 III.2.3-18 Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法の結果 (2)

	<i>in vivo</i>	Hand1-EST	Cmya1-EST	EST	
Hydroxyurea	Strong	Weak	Weak	Strong (7/8)	Weak (1/8)
5-Fluorouracil	Strong	Strong	Strong	Strong (3/3)	
Cytosine arabinoside	Strong	Strong	Strong	Strong (3/3)	
6-Aminonictinamide	Strong	Strong	Strong	Strong (7/8)	Non (1/8)
<i>all-trans</i> Retinoic acid	Strong	Strong	Strong	Strong (8/8)	
Methotrexate	Strong	Strong	Strong	Strong (8/8)	
5-Bromo-2'-deoxyuridine	Strong	Strong	Strong	Strong (6/8)	Weak (2/8)
Lithium chloride	Weak	Weak	Weak	Weak (8/8)	
Dimethadione	Weak	Weak	Weak	Weak (1/8)	Non (7/8)
Boric acid	Weak	Weak	Weak	Weak (8/8)	
Dexamethasone	Weak	Weak	Weak	Weak (3/3)	
Diphenhydantoin HCl	Weak	Weak	Weak	Weak (3/3)	
Salicylic acid Na salt	Weak	Weak	Weak	Weak (6/8)	Non (2/8)
Methoxyacetic acid	Weak	Weak	Weak	Weak (8/8)	
Valproic acid sodium salt	Weak	Weak	Weak	Weak (8/8)	
Caffeine	Weak	Weak	Weak	Weak (2/3)	Non (1/3)
Penicillin G	Non	Non	Non		Non (8/8)
Saccharin	Non	Non	Non		Non (8/8)
Ascorbic acid	Non	Non	Non		Non (3/3)
D-(+)-Camphor	Non	Non	Non	Weak (2/8)	Non (6/8)
Diphenhydramine HCl	Non	Weak	Weak	Weak (8/8)	
Isoniazid	Non	Non	Non		Non (3/3)
Dimethyl phthalate	Non	Weak	Weak	Weak (4/8)	Non (4/8)
Acrylamide	Non	Weak	Weak	Weak (2/8)	Non (6/8)

被験物質の *in vivo* 分類と各試験の予測化合物数を集計した (表 III.2.3-19)。また、予測性、精度、全体の正確性についても集計した (表 III.2.3-20)。

表Ⅲ.2.3-19 Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法の結果 (3)

A) Hand1-EST

<i>in vivo</i>	Chemical number	<i>in vitro</i> prediction		
		high risk strong	moderate risk weak	low risk non
strong	7	6	1	0
weak	9	0	9	0
non	8	0	3	5

B) Cmya1-EST

<i>in vivo</i>	Chemical number	<i>in vitro</i> prediction		
		high risk strong	moderate risk weak	low risk non
strong	7	6	1	0
weak	9	0	9	0
non	8	0	1	7

表Ⅲ.2.3-20 各試験の予測率

	Hand1-EST	Cmya1-EST	Original-EST
予測性 (strong-embryotoxicity)(%)	86	86	100
予測性 (weak-embryotoxicity) (%)	100	100	71
予測性 (non-embryotoxicity) (%)	63	88	78
精度 (strong-embryotoxicity) (%)	100	100	91
精度 (weak-embryotoxicity) (%)	69	82	82
精度 (non-embryotoxicity) (%)	100	100	70
正確性 (%)	83	92	81

Hand1-EST については、strong-embryotoxicity の予測性 (in vivo で strong 分類の化合物のうち、strong と予測した確率)、weak-embryotoxicity の予測性、non-embryotoxicity の予測性はそれぞれ 86、100、63%、strong-embryotoxicity の予測精度 (strong と予測した化合物が、in vivo で strong 分類である確立)、weak-embryotoxicity の予測精度、non-embryotoxicity の予測精度はそれぞれ 100、63、100%であった。また全体の正確性は 83%であった。Cmya1-EST については、strong-embryotoxicity の予測性、weak-embryotoxicity の予測性、non-embryotoxicity の予測性はそれぞれ 86、100、88%、strong-embryotoxicity の予測精度、weak-embryotoxicity の予測精度、non-embryotoxicity の予測精度はそれぞれ 100、82、100%であった。また全体の正確性は 92%であった。EST 法の国際バリデーション試験の結果では、24 化合物の正確性は 81%であり、Hand1-EST ならびに Cmya1-EST 法は既存法よりも同等以上の予測能力があることがわかった。

またさらに、被験物質数を増やして合計 72 物質（発生毒性陽性 44 物質、陰性 28 物質）を評価した。その結果、24 物質の評価と比較し、正確性は減少したが Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法とともに 70%以上の正確性であることが分かった（表Ⅲ.2.3-21）。既存の EST 法と同様に偽陽性が多い傾向も認められた。

表Ⅲ.2.3-21 Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法による 72 物質の評価結果

	Hand1-EST	Cmya1-EST	%
予測性（発生毒性陽性⇒陽性）	98	86	
予測性（発生毒性陰性⇒陰性）	32	61	
予測精度（陽性と予測⇒発生毒性陽性）	69	78	
予測精度（陰性と予測⇒発生毒性陰性）	90	74	
正確性	72	76	

以下に Hand1-EST 法、Cmya1-EST 法および EST 法等の特徴について比較した（表Ⅲ.2.3-22）。

表Ⅲ.2.3-22 各試験方法の比較

	Original-EST	NEDO-EST	FACS-EST *
試験日数	10日間	6日間	7日間
分化評価 endpoint	拍動 (顕微鏡観察)	ルシフェラーゼ 活性測定	FACSIによる MHCの検出
化合物 必要量	500mg以上	50mg(スクリーニング 用途5~10mg)	500mg以上
処理能力	低 (4化合物/回)	高 (20化合物/回)	低~中 (機器操作性に依存)
機器	顕微鏡	ルミノメーター	FACS

* TOXICOLOGICAL SCIENCES 108(2), 389-400 (2009)

開発した試験法は報告されている EST 法や改良 EST 法（Buesen R. *et al.*, Toxicological Sciences 108, 389-400, 2009）のなかで最も短期間の 6 日間で評価でき、ルシフェラーゼ活性の評価法を用いて評価を単純化できることから、1 試験あたり 20 以上の化合物数を評価することが可能となった。また、96 ウェルプレートを用いた試験方法であり、一般的に用いられるロボットを使用することでハイスループットスクリーニングにも使用可能な方法となった。さらに、Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法については、被験物質数を追加して計 72 化合物を評価して、代替法としての有用性も確認できた（論文投稿準備中）。

以上のように Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法の代替法としての有用性を評価した結

果、簡便で高い予測性を有し、さらに多検体処理も可能な催奇形性予測試験法を確立できたと考えられた。

①-5 発光測定用細胞作製とマーカーの決定（神経）

(a) 発光測定用細胞の作製

マーカー遺伝子プロモーターを利用したレポータープラスミドの構築

神経分化過程における発生毒性マーカー遺伝子として予測性が高かった遺伝子群の中から、神経分化誘導後に最も発現時期が早い *Reln* 遺伝子を選定した。*Reln* 遺伝子は、6層からなる大脳の層構造形成に必須で、突然変異マウス *reeler* は脳の配置異常に伴う行動異常を示すことが知られている。*Reln* 遺伝子の発現量を簡便に測定する発光細胞を作製するため、*Hand1-ES* および *Cmya1-ES* を作製した方法に準じて、*Reln* 遺伝子プロモーター 5kb 領域とルシフェラーゼを連結したレポータープラスミドを作製した。

組換え ES 細胞の作製方法

LIF および 2-mercaptoethanol (2-ME) を添加した Stem Medium 溶液 (DS ファーマバイオメディカル) で未分化維持培養を行った ES 細胞に上記レポータープラスミドを導入した。導入方法は *Hand1-ES* 作製時に実施した方法に準じて行い、50 μ g/mL の G418 を含む LIF 添加 Stem Medium 溶液で薬剤選択培養を行った。7日~10日後、実体顕微鏡下でシャーレ中に形成した ES 細胞コロニーを単離し、96 ウェルプレートに播種し、薬剤選択培養を継続した。3日毎に培地交換を行い、7~10日後に増殖した細胞を継代培養して 48 ウェルプレートに播種して薬剤選択培養を継続し、薬剤耐性の安定形質転換細胞株 (*Reln-ES* 細胞) を取得した。

(b) 催奇形性予測試験プロトコールの作成

神経分化誘導法の最適化

Reln-ES 細胞を用いて播種細胞数の検討を行った。50 μ g/mL の G418 を含む LIF、2-ME 含有 Stem Medium 溶液で培養した *Reln-ES* 細胞を、トリプシン EDTA 溶液により分散した後、5%KSR、ピルビン酸 Na 含有 GMEM に 500cell、1000cell、3000cell、5000cell、7000cell、9000cell/100 μ l となるように懸濁し、白色 U 底 96 ウェルプレートに播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ インキュベーター内で 6 日間培養を行った。6 日目にルシフェラーゼ発光試薬 Steady-Glo 溶液を 100 μ l 添加し、30 分間振とうした後、TopCount NXT ルミネッセンス検出カウンターにてルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、3000 から 7000cell/ウェルの条件でルシフェラーゼ活性が最も高い値を示し、5000cell/ウェルの条件でウェル毎の誤差が少ないことが分かった。そのため、播種細胞数 5000cell/ウェルにて今後の評価を実施することとした。また試験反復数は *Hand1-ES* および *Cmya1-ES* と同じく 12 ウェルを使用することとした。

組換え ES 細胞の Luc 誘導活性

薬剤耐性細胞株の分化誘導後のルシフェラーゼ活性測定は以下の通り実施した。まず、*Reln-ES* 細胞を 0.25%トリプシン/1mM EDTA を用いて分散させた。15%KSR 含有 GMEM 培地に 50,000cell/ml の密度になるように調製したのち、非接着性 U 底 96 ウェルプレートに 100 μ l ずつ播種し、37 $^{\circ}$ Cにて培養を継続した。分化誘導開始 6 日目から 10 日目の各日毎に、96 ウェルプレートの各ウェルに、ルシフェラーゼ発光試薬 Steady-Glo を 100 μ L 添加した。30 分間振とうした後、TopCount NXT ルミネッセンス検出カウンターにてルシフェ

ラーゼ活性を測定した。また、一部のプレートから各日毎に 24 ウェル分の EB を回収してまとめ、RNA 抽出に供した。抽出した RNA は先述のリアルタイム PCR の解析手順に従い、Reln 遺伝子の発現量を定量した。

Reln-ES 細胞について、リアルタイム PCR による内在性遺伝子の発現変化と、Luc 活性の変動を図 III.2.3-23 に示す。内在性 Reln 遺伝子は分化後 5 日目より発現上昇が認められ、分化にともなって発現量が上昇した。また Luc 活性の変動パターンも、内在性 Reln 遺伝子と同時期に変動が認められ分化に伴って活性が上昇することがわかった。これらの結果より、取得した Reln-ES 細胞は内在性 Reln 遺伝子の発現量評価として利用可能な細胞であると考えられた。また、ルシフェラーゼ活性は分化 5 日目以降に測定が可能と考えられた。

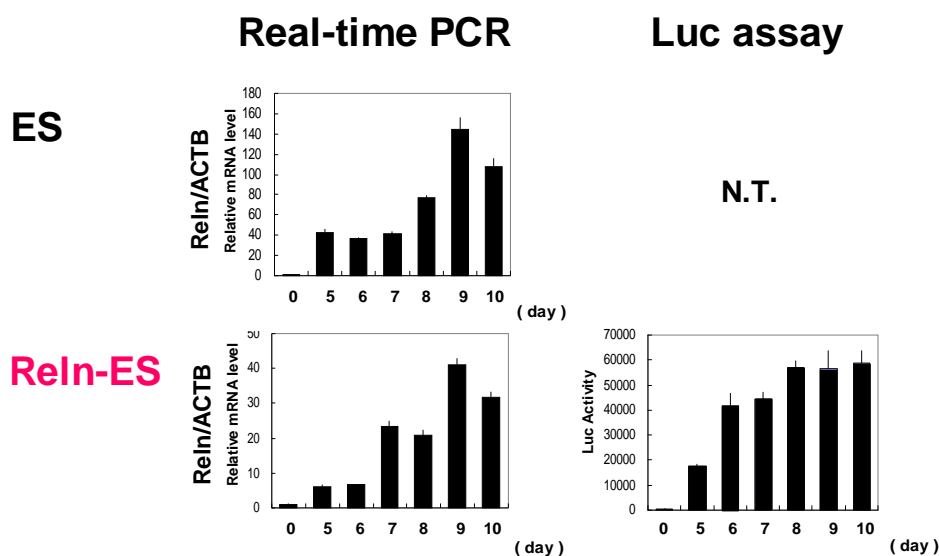
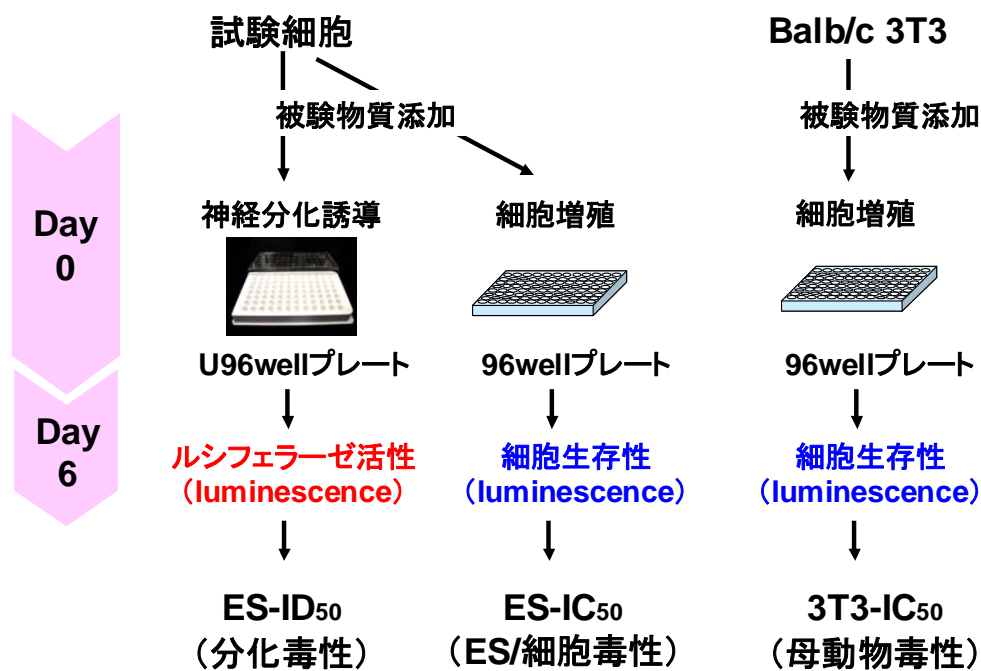


図 III.2.3-23 Reln-ES 細胞の遺伝子発現と luc 活性

基本プロトコールの作成

Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法では被験物質の心筋分化に及ぼす影響を評価する分化阻害試験、ES 細胞の増殖に対する毒性試験および Balb/c 3T3 細胞の増殖に対する毒性試験の 3 つの試験を行った。Reln-ES 細胞を利用した簡便な催奇形性予測試験法 Reln-EST 法では、神経分化に及ぼす影響を評価する分化阻害試験、ES 細胞の増殖に対する毒性試験および Balb/c 3T3 細胞の増殖に対する毒性試験の 3 つの試験を行うこととした (図 III.2.3-24)。



図Ⅲ.2.3-24 提案する試験法の概要

ReIn-ES 細胞を利用した簡便な催奇形性予測試験法 (ReIn-EST 法) の基本プロトコールについて以下にまとめた。

1. 試薬・材料

1.1. 細胞

- ・ ReIn1-ES 細胞
- ・ Balb/c 3T3 細胞 cloneA31 (American Type Culture Collection[ATCC No.CCL-163])

1.2. 試薬および調製法

< 試薬類 >

- ・ 陽性対照化合物 : Hydroxyurea [H8627, SIGMA (CAS No. 127-07-1)]
- ・ PBS(-) [Cat No. 10010-023(500ml), Invitrogen]
- ・ 0.25% Trypsin /1mM EDTA 溶液 [Cat.35554-64, Nacalai]
- ・ Geneticin Disulfate (G418) [和光純薬]
- ・ セルバンカー1 [BLC-1(100ml), 日本全薬工業]
- ・ Steady-glo ルシフェラーゼアッセイシステム (Cat No. G7571, Promega)
- ・ CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Cat No. G7571, Promega)
- ・ DMSO 生化学用 (和光純薬、SIGMA 等)
- ・ 超純水

<調製法>

◆未分化維持培養培地 100ml 調製の場合/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
StemMedium®	100 ml	1007100T7 (DS フェーマ)
100mM 2-ME 溶液	100 µl	
ESGRO (10 ⁷ unit) (=LIF)	10 µl	ESG1107(Millipore)
注意点		
調製後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。 100mM 2-ME 溶液および ESGRO は、溶解後は4℃保存。 (注意) 維持培養には終濃度 50µg/ml になるように G418 を添加する。		

◆神経分化培地/4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
GMEM	93 ml	11710-035 (Invitrogen)
KSR	5 ml	10828-028 (Invitrogen)
100mM NEAA	1 ml	11140-050 (Invitrogen)
100mM Sodium pyruvate	1 ml	11360-070 (Invitrogen)
100mM 2-ME 溶液	10 µl	
注意点		
調製後は冷蔵保存し、2週間以内に使用する。 100mM 2-ME 溶液および ESGRO は、溶解後は4℃保存。		

◆0.1%ゼラチン溶液 500mL 調製の場合/室温保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
Gelatin	0.5 g	G2500 from porcine skin(SIGMA)
純水	500 ml	W3500 (SIGMA)
調製方法		
<ul style="list-style-type: none"> ・上記を混合し、オートクレーブ。室温で保管する。 ・ディッシュのゼラチンコートは底面を覆う程度の液量にて 37℃, 30 分以上で使用可能。使用前にゼラチンを吸引除去し、洗浄は不要。 		

◆100mM 2-メルカプトエタノール溶液 /-80℃保存

試薬名	必要量	
2-メルカプトエタノール(原液 =14.3M)	70 µl	指定なし
純水	10 ml	W3500 (SIGMA)
調製方法		
上記を混合し、0.22 µm フィルターで滅菌する。0.5ml ずつ分注し、-80℃保存。一度溶解した場合、冷蔵保存で1ヶ月以内に使用。		

◆非働化牛胎児血清 /-20℃保存

試薬名
FBS
調製方法

冷凍保存の FBS を 37℃ 温浴にて溶解後、56℃、30 分間非働化処理を行う。
 処理後は 50ml チューブに小分けして-20℃で保存。溶解後は冷蔵保存する。

事前にロットチェックして、心筋への分化効率（拍動）が高いロットを使用する。

◆Balb/c 3T3 細胞用培地 100ml 調製の場合／4℃保管

試薬名	必要量	Cat No(メーカー)
DMEM	88 ml	11965-092 (Invitrogen)
FBS(非働化済み)	10 ml	
GlutaMax I 溶液(100×)	1 ml	35050-061 (Invitrogen)
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液	1 ml	26252-94(Nacalai)
注意点		
調製後は冷蔵保存。		

1.3. 器材

- 6cm セルカルチャーディッシュ イージーグリップ[Falcon Cat.353004]
- 96 ウェルアッセイブロック[Corning-Coster, #3960]
- U 底プレート (透明)
 - Lipidure-coat U 底プレート (7 枚入) [和研薬 (日油) 145399LC]
 - スミロンセルタイト X96Uプレート[住友ベーク, MS-9096U]
- U 底プレート (白色)
 - スミロン Prime Surface96U 白色プレート[住友ベーク, MS-9096W]
- 96 ウェル平底プレート [Corning Cat No. 3917 または 3903]
- プレートシール (Uプレート用) : タイタースティック HC フィルム[Watson, Cat No. 547-KTC-HC]
- プレートシール (平底プレート用) : TopSeal-A [PerkinElmer No. 6005185]

2. 方法

2.1 ES 細胞の培養

2.1.1 起眠

10ml の未分化維持培養培地に、37℃温浴にて解凍した細胞液（セルバンカー液）を添加し、低回転数（5 分間,室温）にて細胞を集める。上清を廃棄後、新たな未分化維持培養培地 5ml 程度に細胞を分散し、0.1%ゼラチンコートディッシュ上に播種する。翌日培地交換する。

2.1.2 継代培養

培地を吸引除去した後、PBS(-)で洗浄する。0.25% Trypsin/1mM EDTA 溶液 1ml を添加し、全体に行き渡らした後、すぐに除去する。37℃、2 分静置。未分化維持培地 2ml を添加し、1000 μl ピペットマンを用いて細胞を分散した後、遠心操作により細胞を集める。新たな未分化維持培養培地 2ml 程度に細胞を分散し、細胞数を算出。6cm ディッシュ (0.1%ゼラチンコート) 当たり 1.0×10^6 cell を播種した場合、3 日後にコンフルエントとなる。大量に細胞数が必要な場合は、高密度での培養も可能。コロニー同士が接触する前が継代のタイミング。基本的に 1 ヶ月以内に細胞を交換する。

2.2. Balb/c 3T3 細胞の培養

2.2.1 継代培養

培地を吸引除去した後、PBS(-)で洗浄する。0.25% Trypsin/1mM EDTA 溶液 1ml を添加し、全体に行き渡らした後、すぐに除去する。37°C、1分静置。
Balb/c 3T3 細胞用培地 5ml を添加し、ピペッティングにて細胞を分散した後、遠心操作により細胞を集める。新たな Balb/c 3T3 細胞用培地 5ml 程度に細胞を分散し、細胞数を算出。10cm ディッシュ当たり 2.0×10^6 cell を播種した場合、3日後にコンフルエントとなる。高密度培養を継続した場合に、接触阻害を起こし細胞の性質に変化が認められる場合がある（顕微鏡観察により識別可能）。基本的に1ヶ月以内に細胞を交換する。

2.3 試験方法

分化阻害試験

◆0日目

1. 溶解した被験化合物を準備する。
2. Prime Surface96U白色プレートに化合物を含む培地 50 μ l を添加する。
3. 未分化維持した Reln-ES 細胞を基本操作に従って single cell に分散する。トリプシン処理後、2ml の神経分化培地を添加する。1000 μ l ピペットマンを用いて細胞を乖離させた後、セルストレーナー40 μ m を通して、細胞塊を除去する。一部の細胞溶解液により細胞数を計算後、神経分化培地にて 5000cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。
4. リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、2.で準備したプレートに 8チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ横方向 12列添加する。また、試験細胞の性状確認および分散方法の確認するため、スミロンセルタイト X96Uプレート1枚にも播種する（総培地量は 100 μ l とする）。
5. プレートをタッピングして混和し、37°C CO₂ インキュベーターで6日間培養する。

*被験物質及び陽性対照物質は、下図の配置例に従って Prime Surface96U白色プレートの各ウェルに添加する。

	陽性対照物質 または 被験物質 1											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	VC	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
B	濃度 1	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
C	濃度 2	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
D	濃度 3	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
E	濃度 4	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
F	濃度 5	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
G	濃度 6	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	濃度 7	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→

VC: Vehicle control (DMSO or PBS(-))

◆6日目

1. 前項(4)にて播種したプレートについて顕微鏡により EB の形成を確認する。各

- ウェルを観察し、単一で均等な大きさの EB が形成されていることを確認する。
2. Steady-glo Luciferase assay system (Promega, Cat.E2510 等)を水浴にて溶解し、室温にする。
 3. 前項 (5) のプレートの全ウェルに 8 チャンネル自動ピペットを使用して 100 μ l ずつ添加する。
 4. プレートシール (U 底プレート用) を貼り、遮光のためにアルミホイルで全体を覆った後、30 分ボルテックス。
 5. プレート内の溶解液を低速回転でスピンドウン。
 6. プレートリーダーで Luciferase 活性を測定する。

細胞毒性試験

◆0 日目

1. 溶解した被験化合物を準備する。
2. 96 ウェル平底プレートに化合物を含む培地 50 μ l を添加する。
3. 未分化維持した ReIn-ES 細胞を基本操作に従って single cell に分散する。トリプシン処理後、2ml の心筋分化培地を添加する。1000 μ l ピペットマンを用いて細胞を乖離させた後、セルストレーナー40 μ m を通して、細胞塊を除去する。一部の細胞溶解液により細胞数を計算後、分化培地にて 500cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。Balb/c 3T3 細胞は専用培地で 500cell/50 μ l となるように細胞懸濁液を調製する。
4. リザーバーに細胞懸濁液を入れた後、2. で準備したプレートに 8 チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ横方向 12 列添加する。
5. プレートをタッピングして混和し、37 $^{\circ}$ CCO₂ インキュベーターで 6 日間培養する。

◆6 日目

1. Celltiter-glo Luciferase assay system を水浴にて溶解し、室温にする。PBS(-)を加えて 1/2 に希釈する。
2. 前項 4. のプレートの全ウェルから培地を吸引除去する。
3. 1. で調製した溶液を 8 チャンネル自動ピペットを使用して 50 μ l ずつ添加する。
4. プレートシール(平底プレート用)を貼り、遮光のためにアルミホイル等で全体を覆った後、30 分ボルテックス。
5. プレート内の溶解液を低速回転でスピンドウン。
6. プレートリーダーで Luciferase 活性を測定する。

(c) ReIn-EST 法のバリデーション

作成した基本プロトコールに従って、動物実験により発生毒性の有無が知られている代表的な化合物を用いて ReIn-EST 法の予測性を検証した。被験物質は *in vivo* において strong-embryotoxic 分類の hydroxyurea、6-aminonicotinamide、non-embryotoxic 分類の penicillinG を選択した。分化阻害試験、および細胞毒性試験においては、分化 6 日目に Luc 活性、細胞生存率を測定後、ReIn-ES、Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞それぞれの ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、および Balb/c 3T3-IC₅₀ 値を求めた (表 III.2.3-23)。

表Ⅲ.2.3-23 Reln-ES 細胞と各試験法の比較

<i>in vivo</i>	神経分化			心筋分化					
	Reln-ES			Hand1-ES			Cmya1-ES		
	Reln-ES -ID50	Reln-ES -IC50	3T3 -IC50	Hand1- ES	Hand1- ES	3T3 -IC50	Cmya1- ES	Cmya1- ES	3T3 -IC50
Strong Hydroxyurea	3.03	4.59	5.80	3.45	4.80	4.32	4.26	4.79	4.32
Strong 6-Aminonicotinamide	0.62	1.30	2.80	0.50	1.39	2.26	0.90	1.48	2.26
Non PenicillinG	639.67	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

その結果、Reln-ES 細胞においても心筋分化と同等のデータが取得できた。
strong-embryotoxic 分類の 2 化合物では強い分化阻害が認められ、non-embryotoxic 分類の penicillinG では阻害活性が弱いことがわかった。

つぎに Reln-EST 法を利用してバルプロ酸類縁化合物について発生毒性の予測を行った。バルプロ酸は、発生時に神経系に影響を及ぼすことが知られており、代謝体等の多くの類縁化合物についてインビボでの毒性の強さが詳細に報告されている (Eikel D et al., Chem Res Toxicol. 2006, 19:272-8.)。発生毒性の強さとして 0 (陰性) および 1 プラスから 5 プラスまで分類されているバルプロ酸 (valproic acid) を含む 7 化合物 (A : (±)-4-Methyl-2-ethyl-pentanoic acid、B : Valpromide、C : (±)-2-propyl-4-pentenoic acid、D : Valproic acid、E : (±)-2-Pentyl-4-pentynoic acid、F : (±)-2-hexyl-4-pentynoic acid、G : (±)-2-Heptyl-4-pentynoic acid) を用い、基本プロトコールに従って Reln-EST 法で評価した。その結果、インビボで発生毒性が陰性の (±)-4-Methyl-2-ethyl-pentanoic acid は non-embryotoxic と分類し、それ以外の発生毒性陽性の 6 化合物は weak-embryotoxic と分類した (表Ⅲ.2.3-24)。

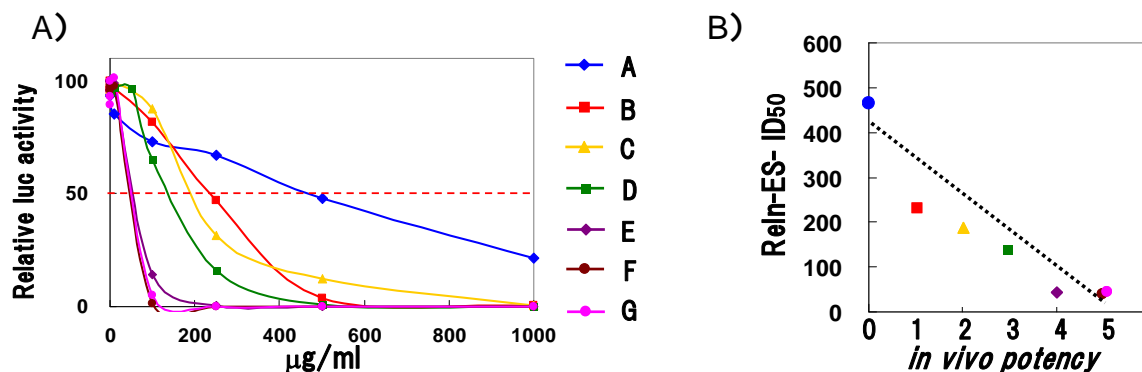
表Ⅲ.2.3-24 Reln-EST 法によるバルプロ酸類縁体の評価 (1)

物質名	<i>in vivo</i> potency *	Reln-EST 予測
A. (±)-4-Methyl-2-ethyl-pentanoic acid	—	non
B. Valpromide	+	weak
C. (±)-2-propyl-4-pentenoic acid	++	weak
D. Valproic acid	+++	weak
E. (±)-2-Pentyl-4-pentynoic acid	++++	weak
F. (±)-2-hexyl-4-pentynoic acid	+++++	weak
G. (±)-2-Heptyl-4-pentynoic acid	+++++	weak

* Chem. Res. Toxicol. 2006, 19, 272-278

Reln-EST における各化合物の分化阻害曲線を図Ⅲ.2.3-25 A に示した。阻害曲線より求めた 7 化合物の Reln-ES-ID₅₀ 値と、インビボでの発生毒性の強さとの関係を解析した結果、発生毒性の強さが増すに伴って Reln-ES-ID₅₀ 値は低くなり、Reln-ES-ID₅₀ 値とインビボでの発生毒性の強さは相関すると考えられた (図Ⅲ.2.3-25 B)。この結果より、判定式による予測に加えて、さらに Reln-ES-ID₅₀ 値で発生毒性の強さを順位付けすることも可能と考

えられた。



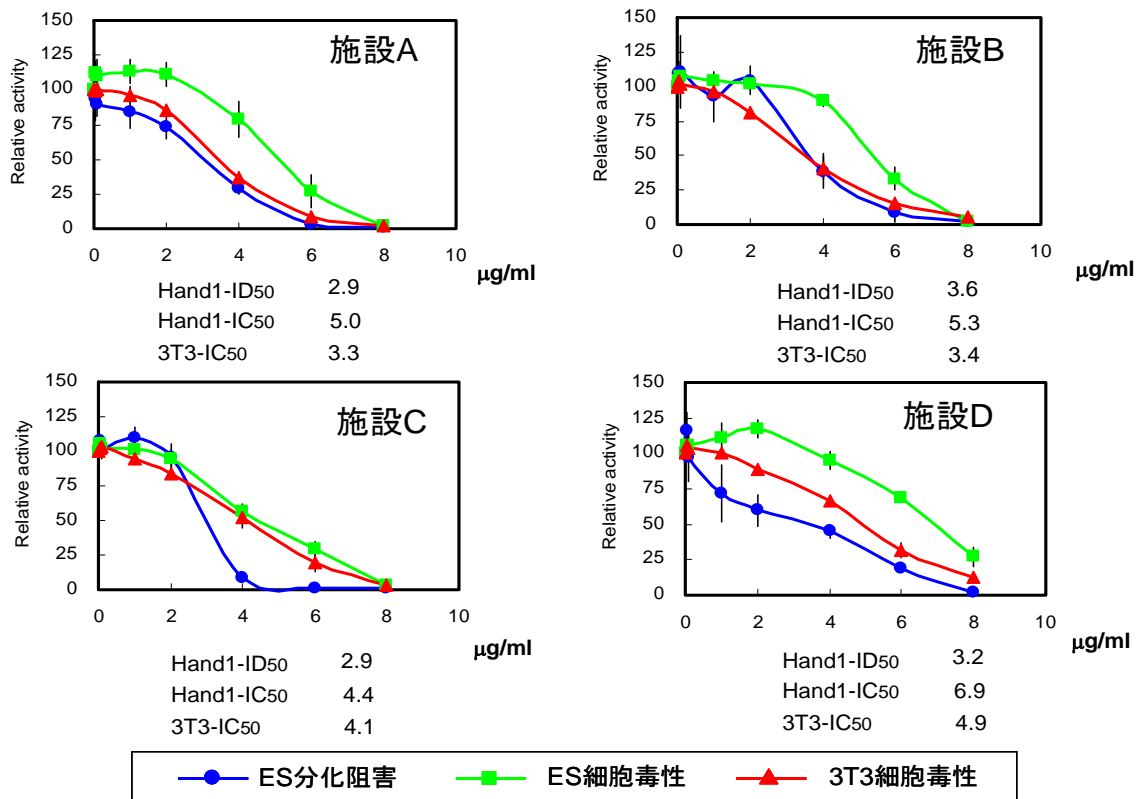
図III.2.3-25 ReIn-EST 法によるバルプロ酸類縁体の評価 (2)

①-6 施設間差の確認実験

Hand1-EST 法、および Cmya1-EST 法に関しては、OECD テストガイドライン化など公定法への提案を念頭に、広く一般的に利用する場面を想定し、試験方法の易習得性、施設間再現性を確認するため、複数施設の協力のもと、小規模な施設間差の確認試験を行った。参加施設は、財団法人食品薬品安全センター秦野研究所、東北大学病院、大日本住友製薬、住友化学の 4 施設とし、標準物質 1 化合物を用いた試験による技術易習得性の確認、共通の被験物質 (コード化 6 物質) を用いた試験による施設間再現性の確認を行った。本確認試験は全て基本プロトコールに準じて実施した。また、細胞、培地や血清などの培養関連試薬、被験物質、測定試薬、白色プレートなどは全て同一ロットで統一するとともに、被験化合物に関しては溶媒や希釈方法を統一して行った。

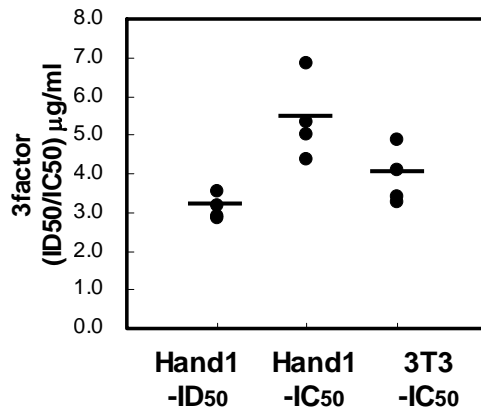
技術易習得性の確認

標準被験物質として hydroxyurea を用いて Hand1-EST 法により 4 施設の結果を比較した。施設毎 (施設 A から D) に ES 分化阻害曲線より Hand1-ES-ID₅₀ 値、ES 細胞毒性曲線より Hand1-ES-IC₅₀ 値、3T3 細胞毒性曲線より 3T3-IC₅₀ 値を計算した (図 III.2.3-26)。



図Ⅲ.2.3-26 4施設のhydroxyureaの結果(1)

これらES-ID₅₀値、ES-IC₅₀値、3T3-IC₅₀値のばらつきを図Ⅲ.2.3-27にまとめ、さらに平均値、標準偏差、CVを算出して表Ⅲ.2.3-25に示した。



図Ⅲ.2.3-27 4施設のhydroxyureaの結果(2)

表Ⅲ.2.3-25 4施設のhydroxyureaの結果(3)

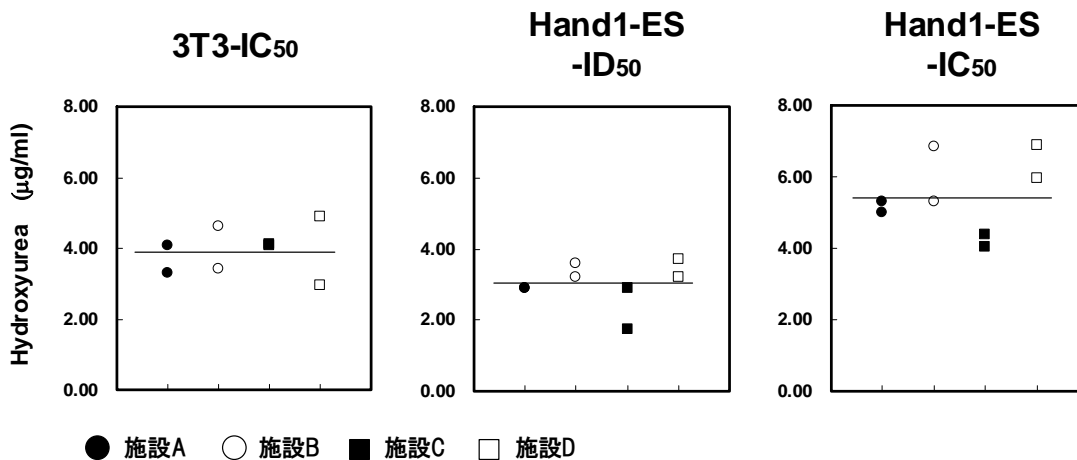
	mean±SD	CV
Hand1-ID ₅₀	3.1±0.3	10%
Hand1-IC ₅₀	5.4±1.1	20%
3T3-IC ₅₀	3.9±0.7	19%

この結果、ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値のいずれも施設間でばらつきは少なく施設間で同等のデータが取得できた。従って、各施設間において技術面、測定装置等の施設面で問題がないことが明らかとなり、技術易習得性が確認できた。

再現性の確認

次に、技術易習得性の確認で用いたhydroxyureaを含むコード化した被験物質6化合物(hydroxyurea、6-aminonicotinamide、boric acid、valproic acid sodium salt、penicillin G sodium salt、ascorbic acid)をHand1-EST法およびCmya1-EST法の両EST法で評価した。

まず、Hand1-EST法で評価したhydroxyureaについて技術易習得性の確認で得られたデータと比較し、施設内の再現性を解析した。以下にの2回の試験結果をまとめた(図Ⅲ.2.3-28)。



図Ⅲ.2.3-28 Hand1-EST法の施設内の再現性

3T3-IC₅₀ 値、ES-ID₅₀ 値および ES-IC₅₀ 値は4施設の施設内で殆ど同じ値を示し施設内での再現性が認められた。また、施設間でも3T3-IC₅₀ 値、ES-ID₅₀ 値および ES-IC₅₀ 値はほぼ同じ値を示した。

次にHand1-EST法について、化合物毎に各施設でのES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値をまとめた(表Ⅲ.2.3-26)。

表Ⅲ.2.3-26 Hand1-EST による各施設の 3T3-IC₅₀ 値、ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値

Chemicals	施設	3T3 -IC ₅₀	Hand1-ES -ID ₅₀	Hand1-ES -IC ₅₀
Hydroxyurea	A	4.08	2.90	5.30
	B	4.62	3.22	6.84
	C	4.07	1.75	4.05
	D	2.95	3.71	5.95
6-Aminonicotinamide	A	2.26	0.50	1.39
	B	2.98	0.34	0.89
	C	1.65	0.75	0.69
	D	1.63	0.78	0.63
Boric acid	A	350.00	27.98	134.39
	B	409.27	92.37	144.64
	C	437.60	148.40	226.51
	D	243.72	32.10	10.06
Valproic acid sodium salt	A	638.69	23.73	364.04
	B	577.36	28.43	371.07
	C	500.57	84.09	678.02
	D	382.99	40.34	108.93
Penicillin G sodium salt	A	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	B	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	C	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	D	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
Ascorbic acid	A	7.45	21.60	10.44
	B	5.98	34.34	20.54
	C	60.63	70.25	80.00
	D	5.52	1.12	53.39

Hydroxyurea、6-aminonicotinamide においては 4 施設で同等の ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値が得られた。Boric acid、valproic acid sodium salt において施設 D の ES-IC₅₀ 値が他施設と比べて低い傾向を示した。また penicillin G sodium salt においてはいずれの施設も最大設定濃度で 50% の阻害に達しなかったため 1000µg/mL となった。また ascorbic acid においては、施設 C で ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値のいずれも高い傾向を示し、施設 D においては ES-ID₅₀ 値が低値を示した。

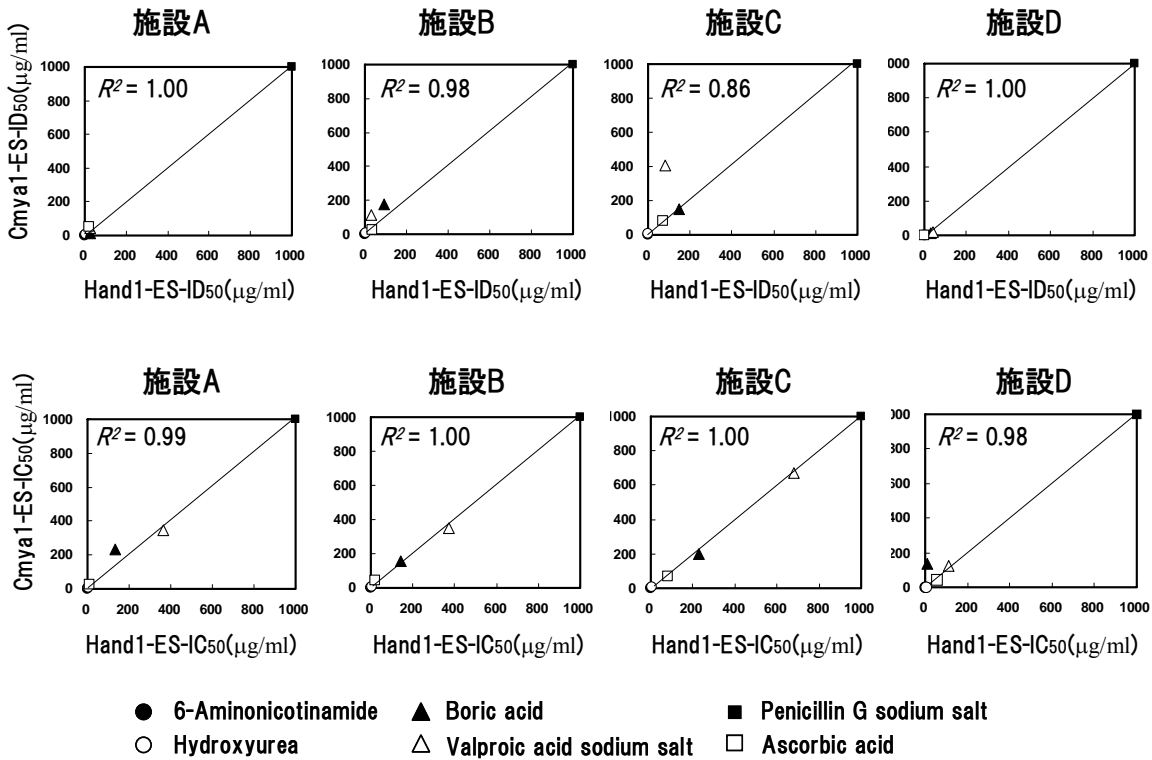
次に Cmya1-EST 法についても Hand11-EST 法と同様に、化合物毎に各施設での ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値をまとめた (表Ⅲ.2.3-27)。

表Ⅲ.2.3-27 Cmya1-EST による各施設の 3T3-IC₅₀ 値、ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値

Chemicals	施設	3T3 -IC ₅₀	Cmya1-ES -ID ₅₀	Cmya1-ES -IC ₅₀
Hydroxyurea	A	4.32	4.26	4.79
	B	4.62	7.53	6.87
	C	4.07	7.03	6.87
	D	2.95	2.62	2.02
6-Aminonicotinamide	A	2.26	0.90	1.48
	B	2.98	0.58	0.91
	C	1.65	1.18	0.83
	D	1.63	0.66	0.76
Boric acid	A	350.00	15.46	234.96
	B	409.27	177.30	154.70
	C	437.60	152.03	198.10
	D	243.72	14.68	135.72
Valproic acid sodium salt	A	643.59	42.33	346.88
	B	577.36	115.39	348.03
	C	500.57	404.41	672.95
	D	382.99	18.82	122.31
Penicillin G sodium salt	A	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	B	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	C	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
	D	> 1000.00	> 1000.00	> 1000.00
Ascorbic acid	A	7.41	51.87	22.91
	B	5.98	28.28	45.68
	C	60.63	80.00	68.78
	D	5.52	1.41	43.14

Hand1-EST 法同様、hydroxyurea、6-aminonicotinamide においては 4 施設で同等の ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値が得られた。Boric acid、valproic acid sodium salt の ES-ID₅₀ 値は施設 A、D、と施設 B、C が近い値を示したがその値は約 10 倍乖離した数値が得られた。Penicillin G sodium salt においてはいずれの施設も最大設定濃度で 50% の障害に達しなかったため 1000µg/mL となった。また ascorbic acid においては、Hand1-EST 法同様、施設 C で ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値のいずれも高い傾向を示し、施設 D においては ES-ID₅₀ 値が著しく低値を示した。

以上のように一部の被験化合物の数値で施設間に差異が見られたことから、その要因を探るためまず各施設における各被験物質の Hand1-EST 法と Cmya1-EST 法の ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値を比較して相関性を解析した (図Ⅲ.2.3-29)。



図III.2.3-29 各施設の Hand1-EST 法と Cmya1-EST 法の相関性

その結果、各施設において各化合物の ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値は Hand1-EST 法と Cmya1-EST 法の間で高い相関性が認められた。このことから、一部の被験化合物の数値に施設間で差異が見られた理由は手法によるものではなく、被験化合物の調製等による被験サンプルに関連する可能性が推定された。

次に Hand-EST 法で得られた ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値を予測式に代入して発生毒性を予測した。今回用いた 6 化合物は in vivo の発生毒性分類が strong-, weak-non-embryotoxic 分類それぞれ、2 化合物を選択したが、表 III.2.3-18 より strong-embryotoxic 分類の hydroxyurea は weak-embryotoxic 分類になることが予想された。その結果、hydroxyurea は予想通り 4 施設中 3 施設で weak-embryotoxic 分類となった。また、6-aminonicotinamide は全施設で strong-embryotoxic 分類、boric acid 及び valproic acid sodium salt は全施設で weak-embryotoxic 分類、penicillin G sodium salt は全施設で non-embryotoxic 分類であった。Ascorbic acid は 2 施設で non-embryotoxic 分類、他 2 施設で weak-embryotoxic 分類となった。予想された分類に対する各施設の予測結果を集計した結果は 87.5% となり、施設間で高い再現性が認められた (表 III.2.3-28)。

表Ⅲ.2.3-28 Hand1-EST 法による予測結果

被験物質	<i>in vivo</i>	予想される分類	施設				一致率(%)	全試験の一致率(%)
			A	B	C	D		
Hydroxyurea	strong	weak	weak	weak	strong	weak	75	87.5
6-Aminonicotinamide	strong	strong	strong	strong	strong	strong	100	
Boric acid	weak	weak	weak	weak	weak	weak	100	
Valproic acid sodium salt	weak	weak	weak	weak	weak	weak	100	
Penicillin G sodium salt	non	non	non	non	non	non	100	
Ascorbic acid	non	non	non	non	weak	weak	50	

Cmya1-EST 法で得られた ES-ID₅₀ 値、ES-IC₅₀ 値、3T3-IC₅₀ 値を予測式に代入して発生毒性を予測した結果、hydroxyurea は 4 施設中 3 施設で weak-embryotoxic 分類、6-aminonicotinamide は全施設で strong-embryotoxic 分類、boric acid 及び valproic acid sodium salt は全施設で weak-embryotoxic 分類、penicillin G sodium salt は全施設で non-embryotoxic 分類であった。Ascorbic acid は 2 施設で non-embryotoxic 分類、他 2 施設で weak -embryotoxic 分類となった。予想された分類に対する各施設の予測結果を集計した結果は 87.5% となり、施設間で高い再現性が認められた (表Ⅲ.2.3-29)。

表Ⅲ.2.3-29 Cmya1-EST 法による予測結果

被験物質	<i>in vivo</i>	予想される分類	施設				一致率(%)	全試験の一致率(%)
			A	B	C	D		
Hydroxyurea	strong	weak	weak	weak	weak	strong	75	87.5
6-Aminonicotinamide	strong	strong	strong	strong	strong	strong	100	
Boric acid	weak	weak	weak	weak	weak	weak	100	
Valproic acid sodium salt	weak	weak	weak	weak	weak	weak	100	
Penicillin G sodium salt	non	non	non	non	non	non	100	
Ascorbic acid	non	non	non	non	weak	weak	50	

以上のように、4 施設間で 6 化合物に対して予想どおりの予測結果を高い割合で出すことができたことから、施設間の再現性が検証できた。従って、いずれの施設でも簡便に本試験が実施でき、基本プロトコールにも問題がないことが明らかとなった。

①-7 細胞の性状解析

今回開発した簡便な発生毒性予測試験法である Hand1-EST 法および Cmya1-EST 法は OECD テストガイドライン化など広く一般に利用されることを考えている。これら培養細胞を用いた試験法を広く普及するには、使用する細胞の規格を明らかにする必要がある。そこで、細胞の標準化の指標となる品質を明らかにするために、Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞の細胞増殖性、マイコプラズマ汚染検査、核型解析を行った。評価は外部受託機関 (財団法人食品薬品安全センター秦野研究所) に委託して実施した。

細胞増殖性試験

基本プロトコールに従って起眠して培養した Hand1-ES 細胞および Cmya1-ES 細胞をト

トリプシン/EDTA で分散した後、6 ウェルプレート の 12 個のウェルに 5×10^4 cell/ウェルずつ播種した。翌日より 6 日間、トリプシン/EDTA で分散して細胞浮遊液を作製し、トリパンブルー溶液と混和した後、血球計算盤を用いて位相差顕微鏡下で生細胞数と死細胞数を測定した。前回の生細胞数、今回の総細胞数 (生細胞数に死細胞数を加えたもの) と測定間の経過時間より、次の式で倍加時間を求めた。

$$\text{細胞倍加時間 (h)} = \text{経過時間 (h)} / \log_2(\text{今回平均総細胞数} / \text{前回生細胞数})$$

また、生細胞数および総細胞数の細胞増殖曲線グラフを作成し、グラフより対数増殖期にあると考えられた期間の 2 つ以上を平均して、それぞれの細胞の細胞倍加時間を求めた (表 III.2.3-30、31 および図 III.2.3-30)。

表 III.2.3-30 Hand1-ES 細胞の細胞増殖試験

播種後 日数	経過時間 (h) ¹⁾	浮遊液量 (mL)	希釈倍率 ²⁾	カウント		生細胞数	死細胞数	生存率(%)	平均生細胞数 ($\times 10^4$ /well)	平均総細胞数 ($\times 10^4$ /well)	細胞倍加 時間 (h) ⁵⁾
				ウェル ³⁾	種数 ⁴⁾						
1	-	1	2	Well 1	18	90	0	100.0	9.39	9.50	-
				Well 2	18	79	2	97.5			
				平均		84.5	1.0	98.8			
2	25.93	1	2	Well 1	9	157	1	99.4	34.44	34.78	13.7
				Well 2	9	153	2	98.7			
				平均		155.0	1.5	99.1			
3	18.88	1	4	Well 1	9	269	9	96.8	119.78	123.56	10.2
				Well 2	9	270	8	97.1			
				平均		269.5	8.5	97.0			
4	24.88	1	10	Well 1	9	157	4	97.5	166.11	173.89	46.3
				Well 2	9	142	10	93.4			
				平均		149.5	7.0	95.5			
5	24.18	1	10	Well 1	9	182	84	68.4	212.78	296.11	29.0
				Well 2	9	201	66	75.3			
				平均		191.5	75.0	71.9			
6	25.60	1	10	Well 1	9	112	78	58.9	128.89	227.22	270.2
				Well 2	9	120	99	54.8			
				平均		116.0	88.5	56.9			

1) 前回カウントから今回カウントまでの経過時間

2) 生死判定のため、トリパンブルー溶液で希釈した倍率

3) カウントには、1 回につき 6 ウェルプレート の 2 個のウェルを用いた。それぞれ、表中で 1、2 とした。

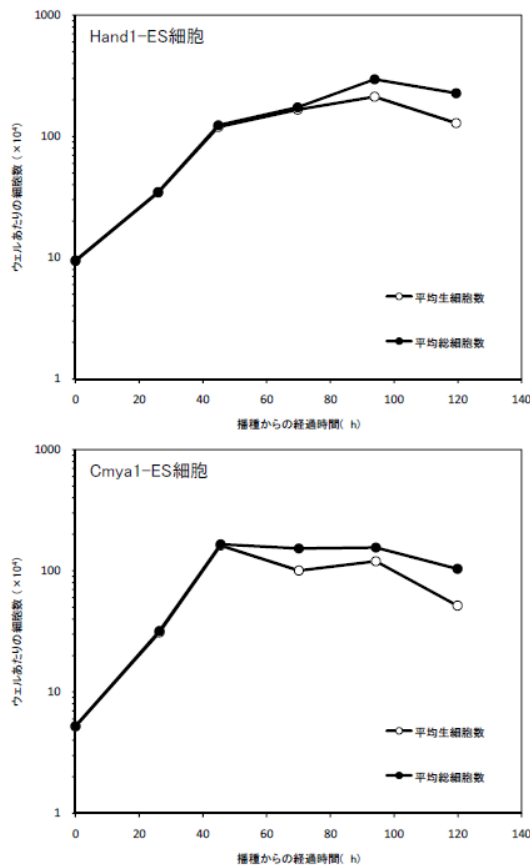
4) 血球計算盤の種数であり、種数 1 個あたり 1×10^4 細胞に相当する。

5) 前回の生細胞数、今回の総細胞数と経過時間から細胞倍加時間を求めた。細胞倍加時間 = 経過時間 / \log_2 (今回平均総細胞数 / 前回平均生細胞数)

表Ⅲ.2.3-31 Cmya1-ES 細胞の細胞増殖試験

播種後 日数	経過時間 (h) ¹⁾	浮遊液量 (mL)	希釈倍率 ²⁾	ウェル ³⁾		カウント			平均生細胞数 ($\times 10^4$ /well)	平均総細胞数 ($\times 10^4$ /well)	細胞倍加 時間 (h) ⁵⁾
				ウェル ³⁾	ウェル ³⁾	生細胞数	死細胞数	生存率(%)			
1	-	1	2	Well 1	18	43	0	100.0	5.22	5.22	-
				Well 2	18	51	0	100.0			
				平均		47.0	0.0	100.0			
2	26.33	1	2	Well 1	9	138	1	99.3	31.00	31.89	10.1
				Well 2	9	141	7	95.3			
				平均		139.5	4.0	97.3			
3	19.22	1	4	Well 1	9	380	10	97.4	161.56	165.56	8.0
				Well 2	9	347	8	97.7			
				平均		363.5	9.0	97.6			
4	24.55	1	10	Well 1	9	100	51	66.2	100.56	152.78	-304.5
				Well 2	9	81	43	65.3			
				平均		90.5	47.0	65.8			
5	24.18	1	10	Well 1	9	98	44	69.0	120.00	155.56	38.4
				Well 2	9	118	20	85.5			
				平均		108.0	32.0	77.3			
6	25.60	1	2	Well 1	9	233	213	52.2	51.67	103.89	-123.1
				Well 2	9	232	257	47.4			
				平均		232.5	235.0	49.8			

- 1) 前回カウントから今回カウントまでの経過時間
- 2) 生死判定のため、トリパンブルー溶液で希釈した倍率
- 3) カウントには、1回につき6ウェルプレートの中の2つのウェルを用いた。それぞれ、表中で1、2とした。
- 4) 血球計算盤の枠数であり、枠数1個あたり 1×10^4 細胞に相当する。
- 5) 前回の生細胞数、今回の総細胞数と経過時間から細胞倍加時間を求めた。細胞倍加時間=経過時間/ \log_2 (今回平均総細胞数/前回平均生細胞数)



図Ⅲ.2.3-30 Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞の細胞増殖曲線

Hand1-ES 細胞の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日の 13.7 時間と播種後 2~3 日の 10.2 時間を平均した 12.0 時間を細胞倍加時間とした。Cmya1-ES 細胞の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日の 10.1 時間と播種後 2~3 日の 8.0 時間を平均した 9.0 時間を細胞倍加時間とした。いずれの細胞もマウス ES 細胞の標準的な細胞倍化時間であることがわかった。

マイコプラズマ汚染検査

本試験は、「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞

基材に対するマイコプラズマ否定試験、第十五改正日本薬局方 2」」を参考にして DNA 染色法および PCR 法により実施した。DNA 染色法においては、Vero 細胞 (JCRB 細胞バンクより入手、継代数 142 代) を評価用の細胞として用い、抗生剤・抗菌剤を含まない培地で 4 日間培養した Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞の培養上清を Vero 細胞に添加し、さらに 4 日間培養した。陽性対照は NCC-IT-A3 細胞 (ヒト奇形癌細胞、JCRB 細胞バンクより入手、継代数 9 代) の培養上清を用いた。培養上清を除いた後、カルノア液 (メタノールと酢酸を 3:1 の容量で混合した溶液) で固定し、ヘキストで染色した。蛍光顕微鏡で各群 1000 細胞を観察し、細胞核を囲む微小な核外蛍光斑点を持つ細胞の数 (マイコプラズマ陽性細胞) を記録した。1000 細胞のうち、陽性細胞が 5 細胞以上観察された群を陽性と判定した。陽性対照細胞 (NCC-IT-A3) の培養上清を添加したウェルでは、観察した 1000 細胞中の 242 細胞に核を囲むように微小な核外蛍光斑点が認められたが、陰性対照、Hand1-ES 細胞および Cmya 1 -ES 細胞の培養上清を添加したウェルでは、観察した 1000 細胞中に、細胞核を囲むような微小な核外蛍光斑点が観察された細胞は無かった (表 III.2.3-32)。

表III.2.3-32 DNA 染色法によるマイコプラズマ汚染検査

被験細胞名	陽性細胞数*/観察数		
	ウェル 1	ウェル 2	合計
陰性対照	0/500	0/500	0/1000
Hand1-ES 細胞	0/500	0/500	0/1000
Cmya1-ES 細胞	0/500	0/500	0/1000
陽性対照 (NCC-IT-A3 細胞)	113/500	129/500	242/1000

*: 細胞核を囲むような微小な核外蛍光斑点が観察された細胞の数

また PCR 法においては、DNA 染色体法において回収した培養上清から DNA を抽出し PCR の鋳型として用いた。マイコプラズマの検出にはマイコプラズマの rRNA 16S- 23S 遺伝子に設定したプライマーを用いて実施した (Harasawa, R. et al., Res. Microbiol, 144, 1993)。その結果、陽性対照細胞では PCR 産物が認められたが、陰性対照、Hand1-ES 細胞および Cmya 1 -ES 細胞では PCR 産物が認められなかった (表 III.2.3-33)。以上の結果から、Hand1-ES 細胞および Cmya 1 -ES 細胞は DNA 染色法と PCR 法の両方で陰性であったことから、いずれの細胞株もマイコプラズマに汚染していないことが示された。

表III.2.3-33 PCR 法によるマイコプラズマ汚染検査

被験細胞名	200 - 500 塩基対の PCR 産物の有無	
	ウェル 1	ウェル 2
陰性対照	-	-
Hand1-ES 細胞	-	-
Cmya1-ES 細胞	-	-
陽性対照 (NCC-IT-A3 細胞)	+	+

核型検査

基本プロトコールに従って培養した Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞に、デメコルシンの濃度を 0.1 μ g/mL となるように添加し 2 時間培養した。トリプシン/EDTA により分散し、0.075 mol/L 塩化カリウム水溶液による低張処理、カルノア液で固定処理を行い、染色体標本を作製した。標本はギムザ染色を行い、顕微鏡を用いて観察してまとめた（表 III.2.3-34）。Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞ともに異数体が認められたが、親細胞 ES-D3 で報告されている異数性と同程度であった（Doetschman TC. et al., J. Embryol. Exp. Morph. 87, 27-45, 1985）。また Hand1-ES 細胞、Cmya1-ES 細胞はともに、観察した 100 細胞に染色体交換や切断などの染色体構造異常は観察されなかったことから、染色体の構造的な異常を誘発するような遺伝的不安定性は認められなかった。

表 III.2.3-34 Hand1-ES および Cmya1-ES 細胞の核型解析

染色体数	100 細胞あたりの細胞数	
	Hand1-ES 細胞	Cmya1-ES 細胞
39	0	1
40 ¹⁾	14	11
41	76*	47*
42	4	30
80	2	0
81	1	1
82	3	6
83	0	1
84	0	2
85	0	1

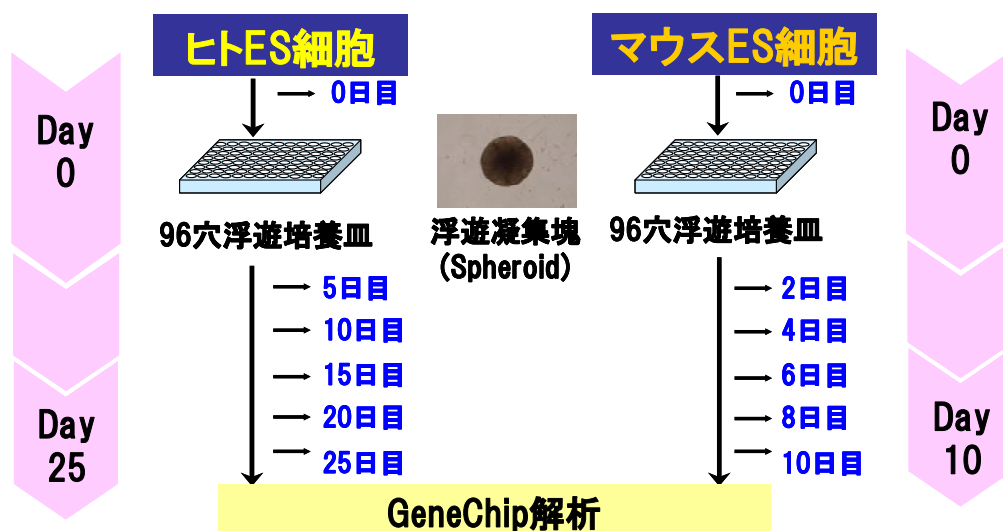
1) 正常マウスの染色体数

*:最頻値

以上の結果より、Hand1-ES 細胞および Cmya1-ES 細胞はマイコプラズマに汚染されておらず、それぞれの細胞の細胞倍加時間および核型の基準値が明らかとなった。

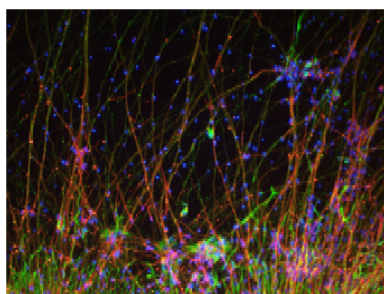
①-8 マーカー遺伝子のヒトとの種差の検討

本研究は、マウス ES 細胞の心筋、神経分化過程を利用して、発生毒性のマーカー遺伝子の探索を行い、マーカー遺伝子を利用した *in vitro* 催奇形性予測試験法の開発を目指して研究を開始した。近年、脚光を浴びているヒト ES/iPS 細胞は様々な「正常組織細胞に分化する性質」をもつことから、再生医療分野への活用だけでなく、医薬品等の有用化学物質開発におけるヒトでの毒性・薬効評価の精緻化に強力なツールとなると考えられている。住友化学では 2009 年、ヒト ES 細胞の使用に関して文部科学省大臣確認を得て、「ヒト ES 細胞を用いた毒性／薬効に関する基礎評価研究」を実施している。そこで本プロジェクトにおいても、ヒト ES 細胞を利用して、先行したマウス ES 研究で選択したマーカー遺伝子の有用性について検討した（図 III.2.3-31）。



図Ⅲ.2.3-31 ヒト及びマウス ES 細胞の神経分化誘導過程におけるマーカー遺伝子発現パターンの比較

フィーダー細胞上で未分化維持培養を行ったヒト ES 細胞 (KhES-1: 京都大学より供与) は KSR を含む無血清培地中で細胞塊を形成させて神経分化誘導を開始し、0、5、10、15、20、25 に複数の細胞塊を回収した。分化後の細胞の一部はホルマリンで染色した後に、代表的な神経マーカー遺伝子の MAP2、NES (nestin) に対する抗体により免疫染色を行い、神経に分化していることを確認した (図Ⅲ.2.3-32)。

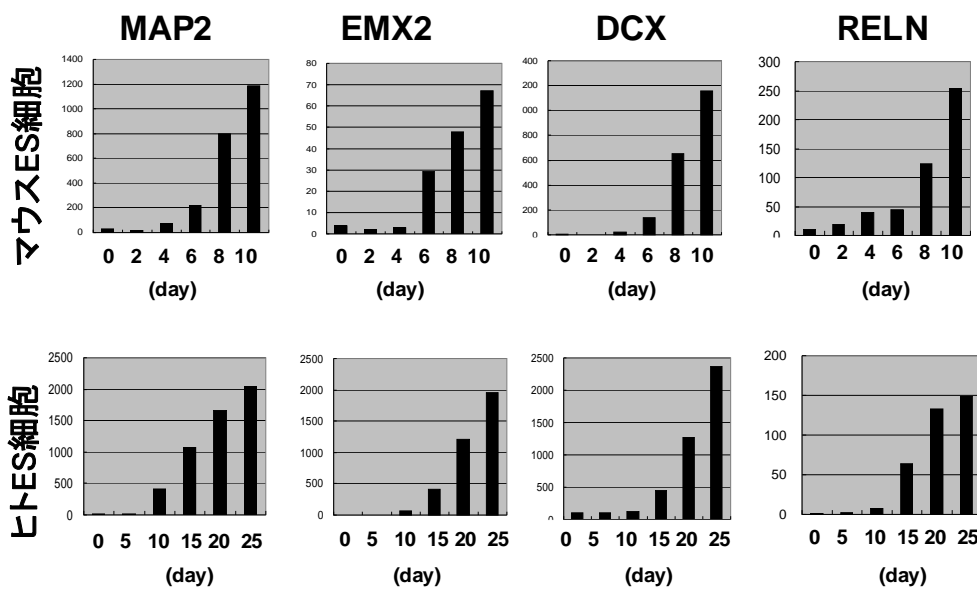


(赤:MAP2, 緑:Nestin, 青:核)

図Ⅲ.2.3-32 ヒト ES 細胞由来神経細胞の免疫染色像

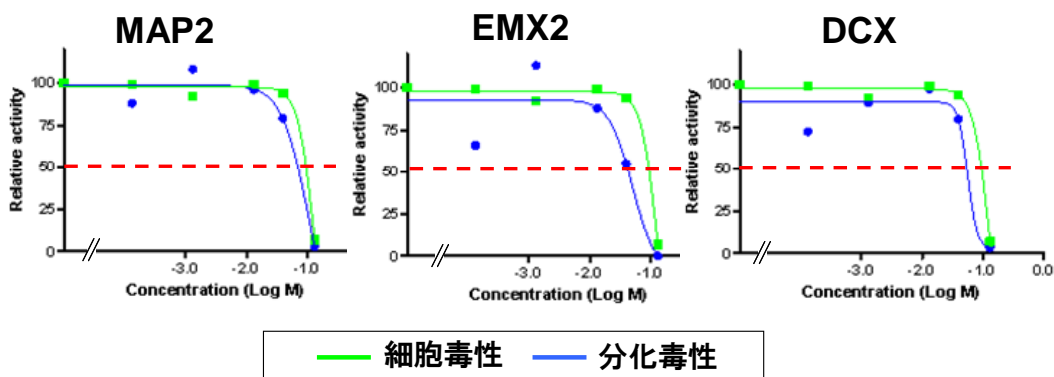
またマウス ES 細胞は、本研究の分化誘導法に準じて神経分化誘導を開始し、0、2、4、6、8、10 日目に分化神経細胞塊を回収した。回収した細胞塊は RNAeasy mini Kit の RLT 緩衝液中に溶解して -80°C 保存した。保存サンプルから定法に従い RNA を抽出し、cDNA を合成した。リアルタイム PCR 法は先述の方法に従って実施した。

まずヒト ES 細胞については、分化誘導後 10 日以降に代表的神経骨格マーカー遺伝子 MAP2 が発現し、大脳神経のマーカー遺伝子 BF1 も同時期に発現することがわかった。そこで、マウス ES 細胞の研究で選択したマーカー遺伝子 22 種について、発現量を測定しマウス ES 細胞とヒト ES 細胞の発現パターンを比較した。その結果、すべての遺伝子はヒト ES 細胞の神経分化中で発現することがわかり、それぞれの遺伝子発現プロファイルが一致した。MAP2 遺伝子、EMX2 遺伝子、DCX 遺伝子、RELN 遺伝子はヒト ES 細胞において分化 10 日から 15 日に発現が認められ、分化に伴って発現上昇した (図Ⅲ.2.3-33)。



図Ⅲ.2.3-33 各マーカー遺伝子の神経分化による発現変動

ヒト ES 細胞を用いた発生毒性の予測において選定したマーカー遺伝子の有用性を検討するため、代表的な既知発生毒性物質がマーカー遺伝子に及ぼす影響を評価した。代表的な発生毒性陰性物質として penicillin G、陽性物質として hydroxyurea を使い、それぞれ 0.01、0.1、1、3、100 μ g/ml となるように分化中の神経細胞に添加した。分化 15 日目に一部の細胞を回収して RNeasy kit にて RNA を抽出した後 cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法でヒト MAP2 遺伝子、EMX2 遺伝子、DCX 遺伝子の発現量を定量した。また一部の細胞は、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay kit を利用して各濃度における細胞生存率を測定した。その結果、陽性物質の hydroxyurea では細胞毒性よりも低い濃度域で、MAP2 遺伝子、EMX2 遺伝子、DCX 遺伝子のマーカー遺伝子の発現量が低減することがわかった（図Ⅲ.2.3-34）。陰性物質の penicillin G では、最高濃度まで細胞生存率に影響は認められず、各マーカー遺伝子の発現量にも影響が認められなかった。これらの結果より、本研究で選定したマーカー遺伝子は、ヒト ES 細胞を利用した発生毒性の予測にも応用できる可能性が示唆された（論文投稿準備中）。



図Ⅲ.2.3-34 各マーカー遺伝子の神経分化による発現変動

①-9 まとめ

「ES細胞を利用した催奇形性試験法の開発」についての成果を以下にまとめた。

まず発生毒性マーカー遺伝子を取得して特許出願を行った（心筋：13 遺伝子、神経：22 遺伝子）。その中から Hand1、Cmya1、Reln 遺伝子等の発現を簡便に評価するレポーター遺伝子アッセイ用 ES 細胞を作製した。アッセイ用細胞を利用した Hand1-、Cmya1-、Reln-EST 法を確立し、標準化合物を用いて従来の EST 法と比較した結果、Hand1-、Cmya1-EST では従来の EST 法と同等以上の予測性を有することが明らかとなった。また、従来の EST 法よりも短期間（約 1 週間）に多数の化合物を評価可能な方法が確立できた。さらに多数の化合物を用いて代替法として有用性の検討も実施した（72 被験物質評価）。Hand1-、Cmya1-EST については、小規模施設間差の確認試験を実施し、試験の易習得性を確認し、再現性の高い試験法であることがわかった。また、細胞の規格化のための性状解析も終了した。

Reln-EST 法についても、一群の標準的な発生毒性化合物およびバルプロ酸類縁化合物で検証し有用性を示した。その他、ヒト ES 細胞を用いた検討を行い、マウス ES 細胞で選定したマーカー遺伝子群のヒトにおける有効性も明らかにした。

また、成果の外部発表に関しては、論文（3 報）、学会発表（13 題）、特許（3 件）、受賞（1 件）、成果の普及に関しては新聞報道（2 件）を行った。

以上のように、最終年度までに、予定どおりの研究成果を上げることができ、簡便で予測性が高い発生毒性予測試験法の確立ができた。

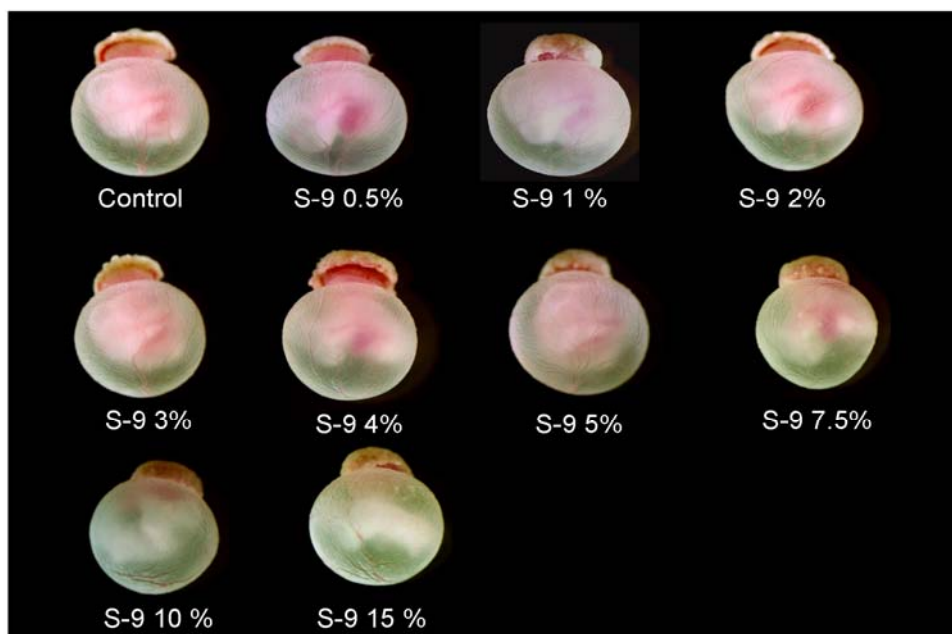
②ラット代謝酵素の添加方法の最適化と試験法の確立（鎌倉女子大学）

②-1 ラット代謝酵素の無毒性用量の検討

・代謝酵素濃度の設定と代謝誘導の確認

ラット肝臓の薬物代謝酵素を多く含むホモジネート（ラット S-9）は、それ自体に毒性が認められている。そこで、まず胎児培養における無毒性量の検討を行うため、ラット S-9 の濃度を 0.5、1、2、3、4、5、7.5、10 および 15% の 9 群を設定し、ラット胎齢 11.5 日目の胎児培養において培養液中に投与した。そして培養 24 時間後に卵黄嚢開放という操作を加えて、培養 48 時間後の培養胎児の状況を確認した。培養液には、W-I ラットより採血し調整された血清を用い、気相は 95%O₂ + 5%CO₂ の混合ガスを用い 100~120ml/min. の割合で送気した。なお、ラット S-9 とコファクターはキッコーマン株式会社のものを使用し、S-9:コファクター=1:2 の割合で処理を行った。

その結果、培養 24 時間までは、S-9 濃度 0.5、1、2、3、4、5% の処理群においては、対照群と比較費変化は認められなかったが、7.5、10% の処理群において、卵黄嚢表面の血液が細くなり血液循環量が低下している状況が確認された。また S-9 15% 処理群においては培養 24 時間時点で培養胎児は死亡した（図Ⅲ. 2. 3-35）。更に培養 48 時間後において、4% 以上の S-9 処理群において、血液循環の低下、胎児外表における出血などが確認された（図Ⅲ. 2. 3-36、37）。また、頂殿長、総体節数においては 5% 処理の胎児群において、対照群と比較し有意に低下が確認されるとともに、形態形成異常が 4% 処理群以上で認められ、7.5% 以上の処理群においては全ての培養胎児において奇形が誘発された（表Ⅲ. 2. 3-35）。これらの結果より、最終的に培養液中のラット S-9 添加濃度は、補酵素の濃度等の関係から安全域をとり 3% と設定された。



図Ⅲ.2.3-35 Morphological change in the cultured rat embryos 24 hr after incubation in the medium containing S-9mix derivates

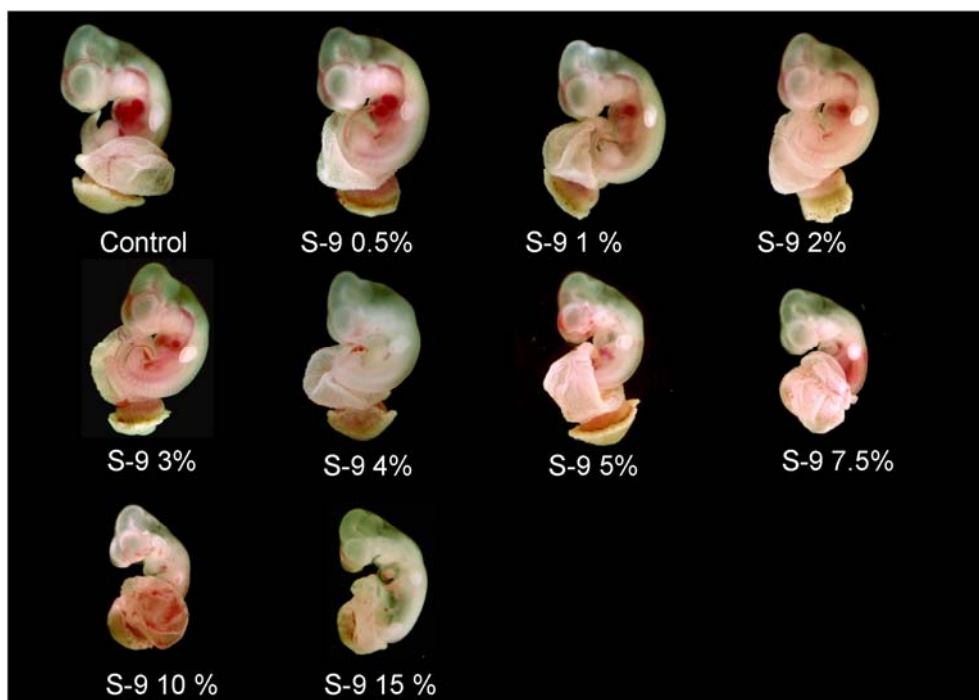


图 III.2.3-36 Morphological change in the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing S-9mix derivatives

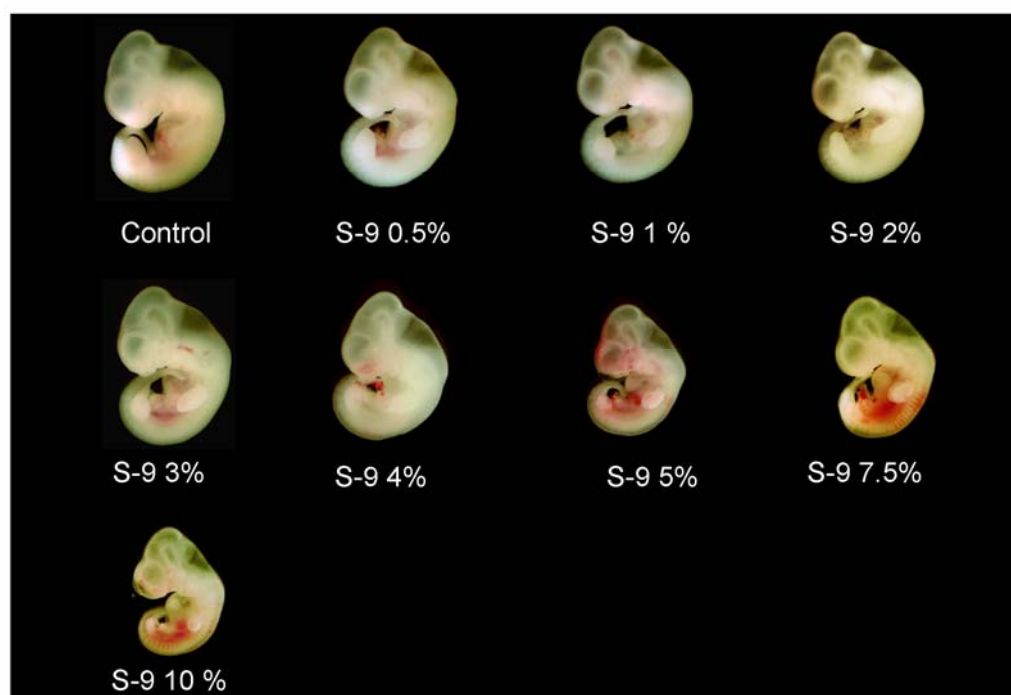


图 III.2.3-37 Morphological change in the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing S-9mix derivatives without placenta and yolk sac

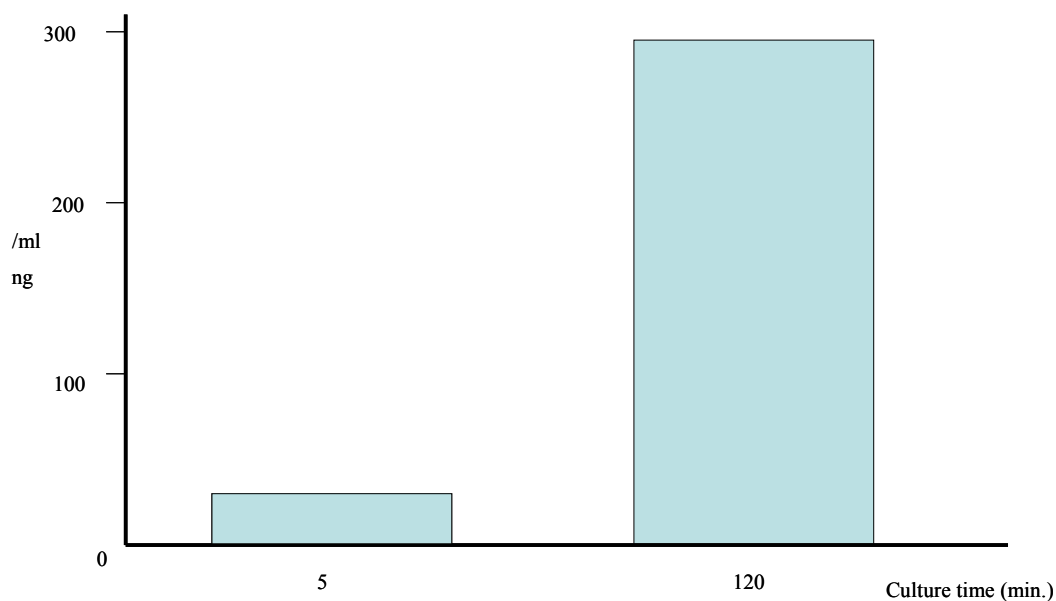
表Ⅲ.2.3-35 Results of whole embryo culture

Groups	n	Crown-rump length (mm)	Total number of Somites (No.)	Number of fetuses with abnormality
Control	10	7.7 ± 0.2	49 ± 1	0
S-9 (%)				
0.5	4	7.9 ± 0.1	49 ± 1	0
1	4	7.8 ± 0.2	49 ± 1	0
2	4	7.7 ± 0.2	48 ± 1	0
3	12	7.6 ± 0.3	48 ± 1	0
4	10	7.4 ± 0.3	48 ± 3	3 (33.3%)
5	16	6.9 ± 0.5 *	48 ± 3	6 (38%)
7.5	4	6.8 ± 0.1 *	42 ± 2 *	4 (100%)
10	4	6.6 ± 0.1 *	39 ± 1 *	4 (100%)
15	3	6.5 ± 0.2 *	36 ± 0 *	3 (100%)

mean ± S.E.

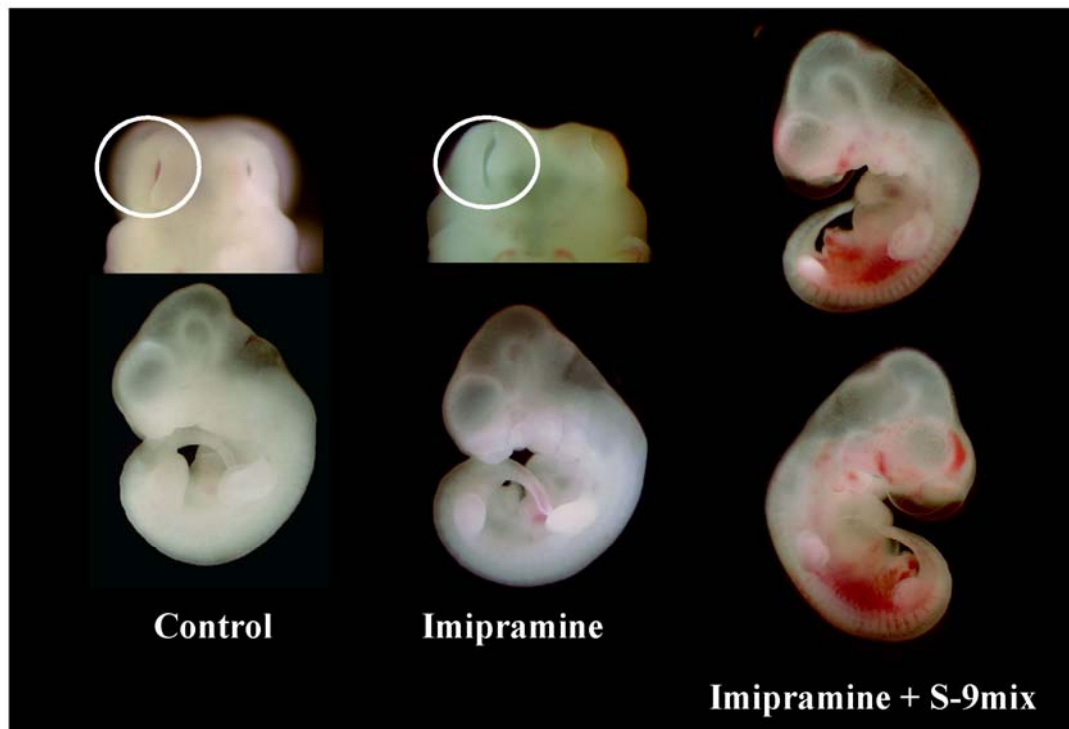
*: <0.05 VS Control

次に、添加した S-9 の機能を確認するために、S-9 添加濃度 3% を添加した培養液中にイミプラミンを投与した。その結果、培養 5 分後、培養液中から Imipramine の代謝産物 (M1 : Desipramine) が検出された。そして 2 時間後には 300ng/ml の Desipramine が存在していた。このことから、濃度 3% の S-9 は培養液中で代謝誘導機能が働いていることが確認された (図Ⅲ.2.3-38)



図Ⅲ.2.3-38 Concentration of Desipramine in medium

さらに培養胎児に Imipramine を 10 $\mu\text{g/ml}$ を投与すると、培養 48 時間後の胎児の奇形率は、ラット S-9mix 添加群では 67%、未添加群では 56%となり、S-9mix 添加群は未添加群と比較し 11%高値を示した。また S-9mix 未添加群では口唇裂、短尾および上顎形成異常が多く発現したのに対し、S-9mix 添加群では胎児萎縮、血腫、浮腫等の異常が多く、両群の異常のタイプに明らかな差異が認められた。これは、イミプラミンが S-9mix により代謝されたか否かに起因すると考えられた (図Ⅲ. 2. 3-39、表Ⅲ. 2. 3-36、37)。これらのことから代謝系を取り入れた胎児培養法は、既存の胎児培養法より代謝産物を含めた化学物質による影響を確認できる可能性が高いと示唆された。



図Ⅲ.2.3-39 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation without placenta and yolk sac

表Ⅲ. 2. 3-36 Crown-rump length, total number of somites and heart beats of cultured rat embryos 48 hrs after incubation

S-9	imipramine ($\mu\text{g}/4\text{mlRS}$)	n	Crown-Rump Length (mm)	Total number of Somits (No.)	Heart beats (beats/min.)
-	0	8	7.5 \pm 0.34	46 \pm 0.9	174 \pm 13
-	10	12	7.6 \pm 0.26	47 \pm 0.6	169 \pm 17
+	10	13	7.7 \pm 0.38	7.9 \pm 0.8	163 \pm 15

Rat embryos of day 11.5 of gestation (Plug Day = 0) were cultured for 48 hours.
Mean \pm S.E.

表Ⅲ. 2. 3-37 Frequency of certain anomalies found on cultured rat embryos 48 hrs after incubation

Groups	n	Dead embryo	Embryos of anomaly	Type of anomaly						
				Dysphasia of maxillary prominence	Cleft lip	Short tail	Atrophy	Edema	Hematoma	Laceration of vascular
Control	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
IMP	13	0	7(54%)	2	4	2	0	0	1	1
S-9mix + IMP	12	1	8(67%)	0	0	0	4	4	3	3

Rat embryos were cultured for 48 hours from day 11.5 of gestation (Plug Day = 0).

②-2 代謝評価試験系を組み合わせた催奇形性試験の確立

- ・陽性対照化学物質を用いた妥当性の検証

前実験で設定された手法を導入した胎児培養法を用いて、化学物質（催奇形性物質）における培養胎児の影響を確認した。化学物質は Sodium valproate、Warfarin、Benzo[a]pyrene、Aflatoxin B1、Phenytoin、Methotrexate、Acetazolamide 及び Thalidomide とし、Dimethyl sulfoxide あるいは生理食塩水を溶媒として、培養液中に 10 μl 暴露した。ラット胎齢 11.5 日目の胎児を培養液中（100%ラット血清）で 48 時間培養し、化学物質は培養 2 時間後から培養終了時まで添加し続けた。Warfarin、Benzo[a]pyrene、Aflatoxin B1、Phenytoin 及び Methotrexate において、S-9 添加された培養液で培養した胎児は、S-9 無添加で培養した胎児と比較して、全て低濃度で強い影響が観察された。Benzo[a]pyrene の結果を例として図Ⅲ. 2. 3-40 および表Ⅲ. 2. 3-38 に示す。

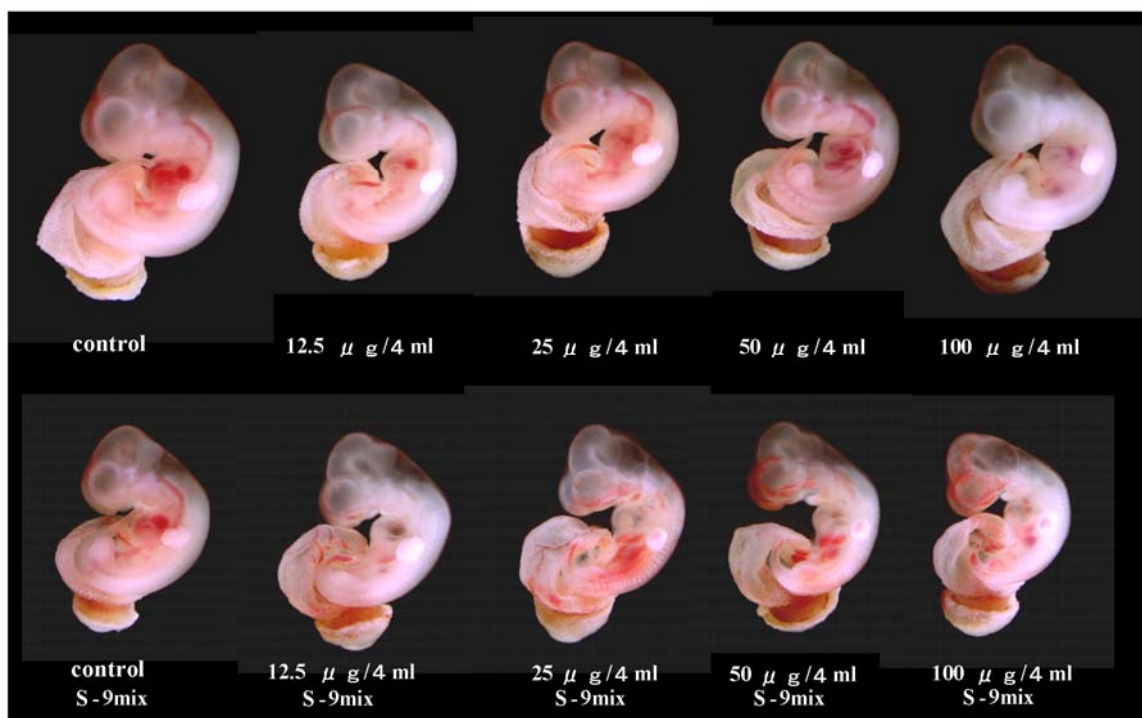


图 III.2.3-40 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing benzo(a)pyrene

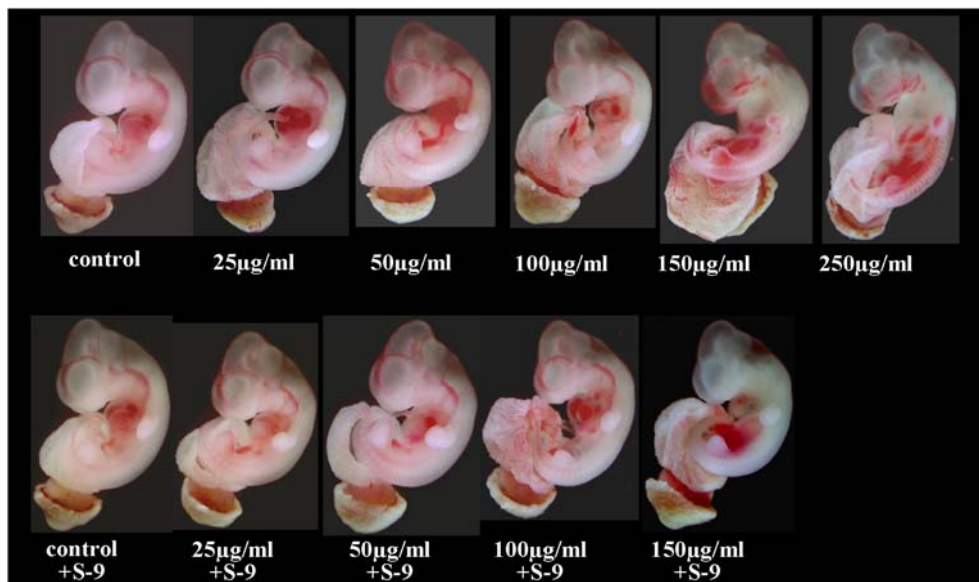
表 III. 2. 3-38 Effects of Benzo(a)pyrene on cultured rat embryo

S - 9	Benzo[a]pyrene		Crown -Rump Length	Total number of Somits	Number of fetuses
	(μ g/4mlRS)	n	(mm)	(No.)	with abnormality
-	0	6	15 \pm 0.99	7.5 \pm 0.11	0
-	12.5	10	15 \pm 0.46	7.6 \pm 0.08	2 (20 %)
-	25	12	16 \pm 0.46	7.9 \pm 0.07	1 (8.3 %)
-	50	15	14 \pm 0.60	7.5 \pm 0.07	10 (66.6 %)
-	100	15	13 \pm 0.65	7.3 \pm 0.12	10 (66.6 %)
+	0	11	15 \pm 0.88	7.4 \pm 0.10	0
+	12.5	11	12 \pm 0.93	7.4 \pm 0.14	10 (90.9 %)
+	25	10	13 \pm 0.90	7.4 \pm 0.09	9 (90 %)
+	50	11	12 \pm 0.73	7.3 \pm 0.11	10 (90.9 %)
+	100	11	14 \pm 0.72	7.3 \pm 0.14	11 (100 %)

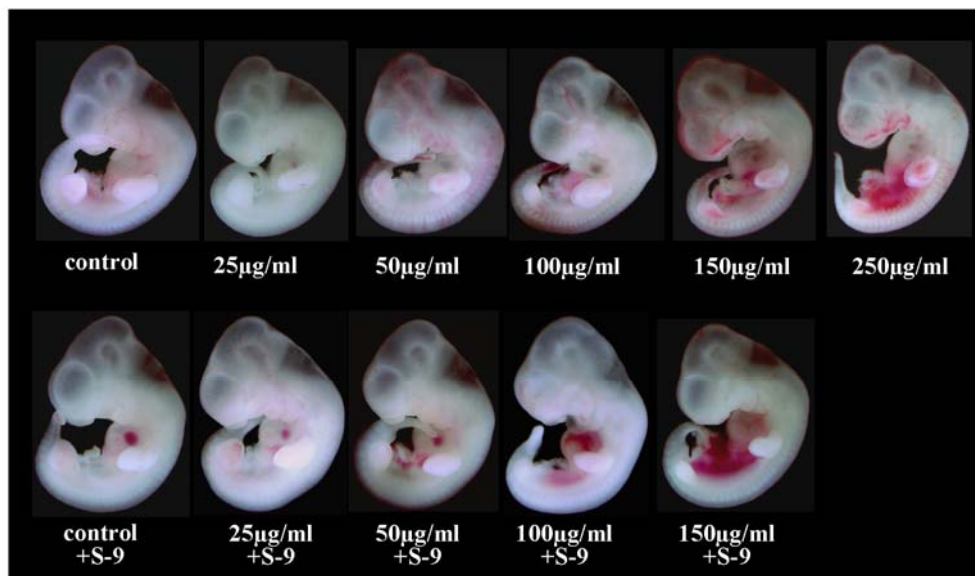
一方、Sodium valproate においては、ラット S-9mix を添加した胎児の方が弱い影響が確認された（図Ⅲ.2.3-41、42、43、表Ⅲ.2.3-39）。in vivo 試験において Sodium valproate の催奇形性は、その代謝産物よりも Sodium valproate 自体（未変化体）により強い奇形誘発が認められると報告されていることから、今回の結果は、in vivo 試験結果を反映しているものと考えられた。



図Ⅲ.2.3-41 Morphological change of the cultured rat embryos 24 hr after incubation in the medium containing sodium valproate(VPA)



図Ⅲ.2.3-42 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing sodium valproate(VPA)



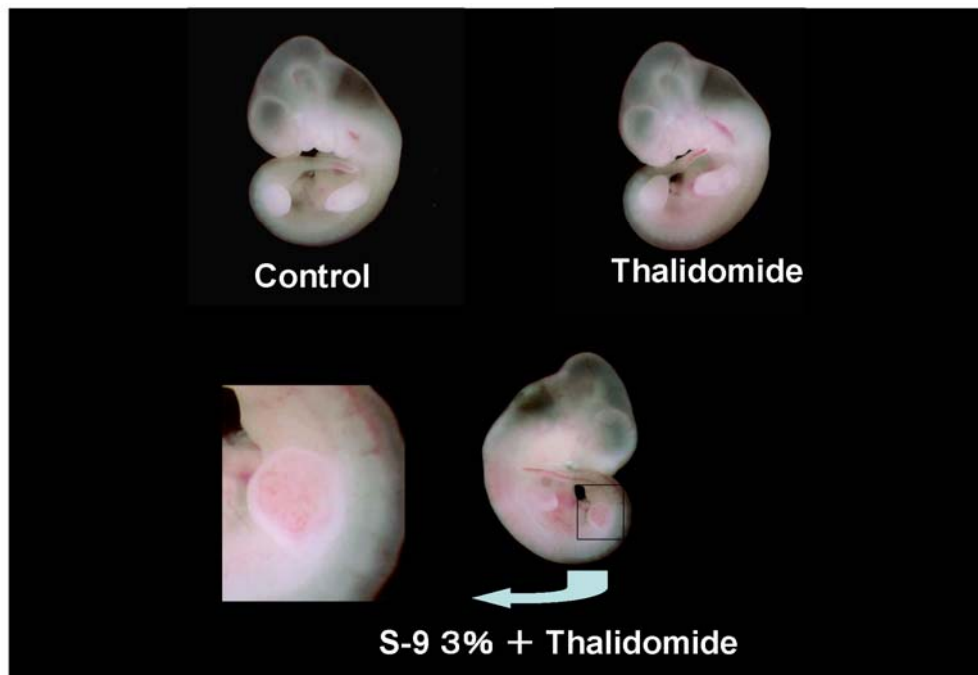
図Ⅲ.2.3-43 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing sodium valproate(VPA) without yolk sac and placenta

表Ⅲ.2.3-39 Effects of sodium valproate on cultured rat embryos

S-9mix	Sodium Valproate µg/4ml	n	Number of fetuses with abnormality
-	0	10	0
-	25	8	4 (50%)
-	50	11	6 (55%)
-	100	12	10 (83%)
-	150	10	10 (100%)
-	250	4	4 (100%)
+	0	11	0
+	25	8	1 (13%)
+	50	14	6 (43%)
+	100	12	7 (58%)
+	150	11	11 (100%)
+	250	0	-

上述した全ての結果は、in vivo データを反映していると考えられた。一方、Thalidomide においては、ラット S-9 投与された胎児において、後肢に若干の出血が確認されたのみで、S-9 無添加、添加の両群とも顕著な変化は認められなかった (図Ⅲ.2.3-44)。in vivo 試験における Thalidomide の催奇形性の発現には種差があり、ラットでは催奇形性が認められないとされている。今回の結果からも in vivo と同様に Thalidomide における影響は確

認できなかった。



図Ⅲ.2.3-44 Effects of Thalidomide on cultured rat embryos after 48 hr

これらの結果から、代謝機能を取り入れた胎児培養法は、Thalidomide を含めた 9 種類の化学物質は全て、従来手法と比較しより *in vivo* に近い結果を得ることが出来ると判断された。

なお、*in vivo* における催奇形性試験では妊娠 9.5 日目の母獣に投与するが、今回の実験では、胎齢 11.5 日目のラット胎児を用いた。これは、培養胎児の場合、胎齢 9.5 日目の胎児よりも胎齢 11.5 日目の胎児の方がより影響が出やすいと判断したためである。無論、本手法は胎齢 9.5 日目からでも可能であり、培養開始ステージは今後の検討事項とされた。

・ EST との組み合わせ効果の確認

EST と WEC の組み合わせた催奇形性試験の確立を目指すため、EST によって false positive と判定された物質 (Cyclobenzaprine-HCl)、および false negative と判定された物質 (Busulfan) について、代謝機能を取り入れた WEC を用いて毒性評価を行った。

false positive と判定された物質 (Cyclobenzaprine-HCl) についての結果を図Ⅲ.2.3-45、46、表Ⅲ.2.3-40 に示した。ラット S-9mix 処理を行った培養胎児群は未処理群と比較し、明らかな異常誘発率の低下が認められた (Table 6)。さらにラット S-9mix 処理群においては、死亡胎児は全群において確認されなかったが、Cyclobenzaprine-HCl 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理群で 50%、さらに Cyclobenzaprine-HCl 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では 100% となり、ラット S-9mix 処理における毒性の低下が顕著であった。また Cyclobenzaprine-HCl の未変化体は、培養胎児の卵黄囊表面の血管の萎縮を誘発させることが、異常を誘発する原因の一つと考えられた (図Ⅲ.2.3-47)。

EST においては Cyclobenzaprine-HCl は positive と判定されたが、代謝機能を取り入れた WEC 試験の結果においては negative と判定され、この WEC の結果は *in vivo* 試験の結果と一致した。

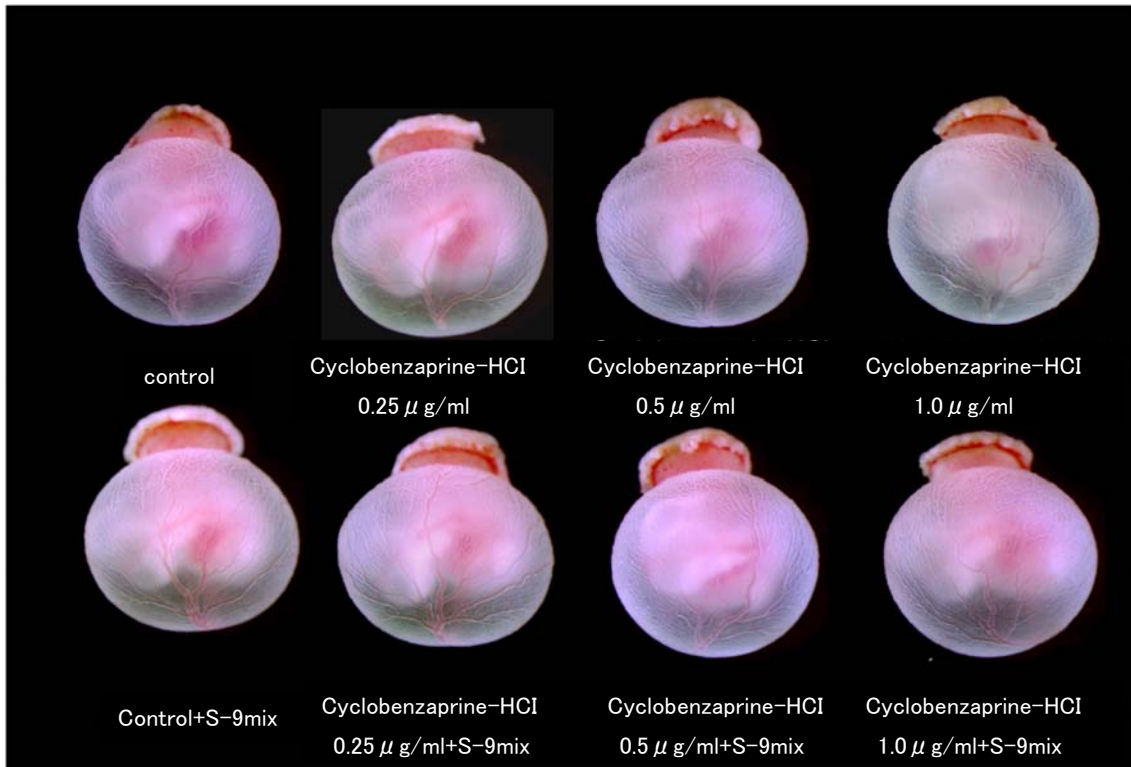


图 III.2.3-45 Morphological change of the cultured rat embryos 24 hr after incubation in the medium containing Cyclobenzaprine-HCl

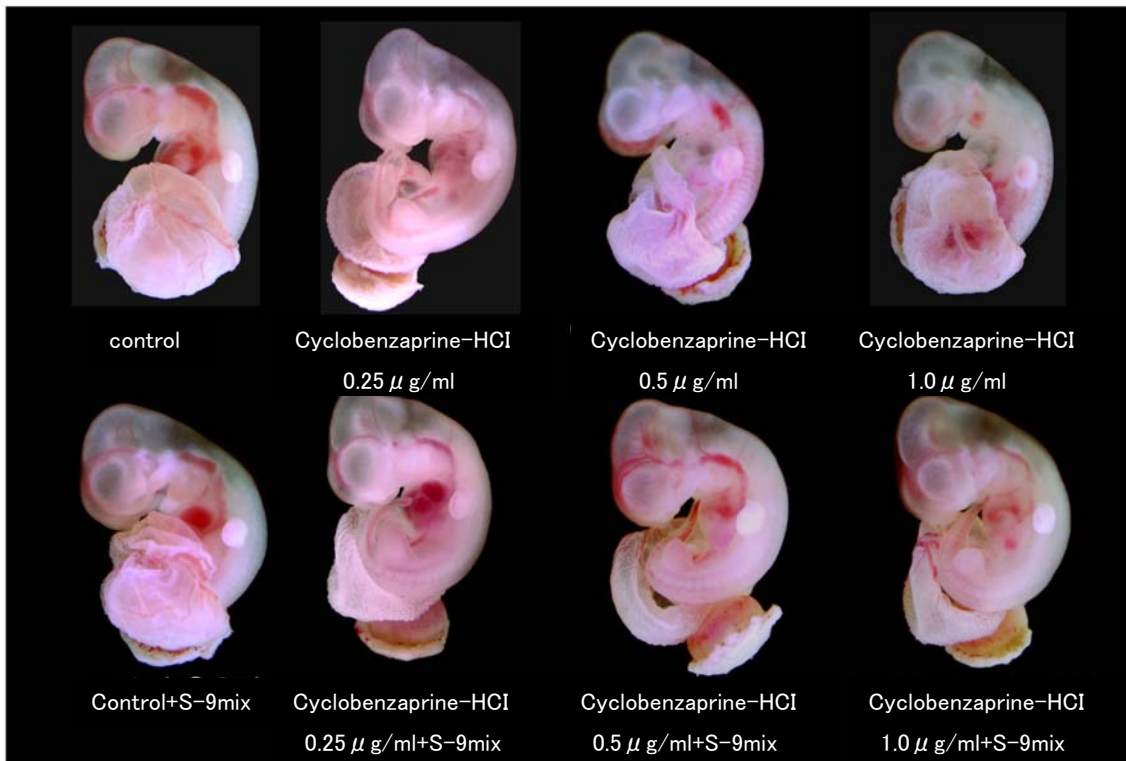


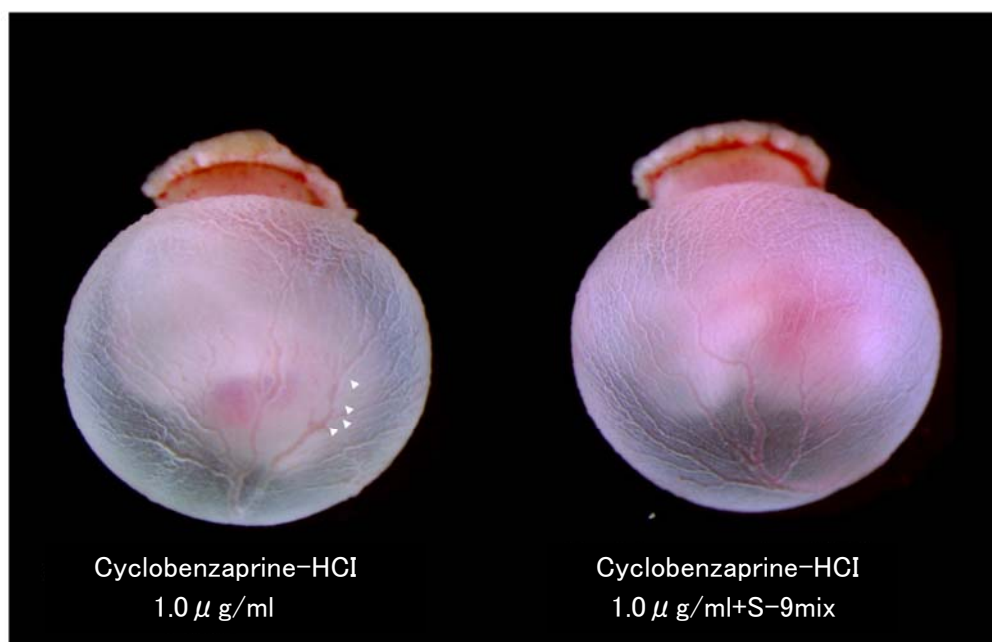
图 III.2.3-46 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing Cyclobenzaprine-HCl

表Ⅲ.2.3-40 Effects of Cyclobenzaprine-HCl on cultured rat embryo

S-9	Cyclobenzaprine -HCl(g/ml)	n	Crown-Rump Length(mm)	Total number of Somits(No.)	Number of fetuses with abnormality
-	0	4	7.8 ± 0.10	48.0 ± 0.90	0
-	0.25	10	7.7 ± 0.13	47.5 ± 1.42	3(30.0%)
-	0.50	8	7.5 ± 0.19	44.3 ± 2.59 *	8(100%)
-	1.00	5	7.5 ± 0.18	43.3 ± 1.94 *	5(100%)
+	0	4	7.7 ± 0.12	48.2 ± 0.41	0
+	0.25	11	7.8 ± 0.15	48.3 ± 0.87	0
+	0.50	9	7.6 ± 0.21	47.8 ± 1.21	1(11.1%)
+	1.00	8	7.6 ± 0.20	48.0 ± 0.90	4(50.0%)

mean±S.E.

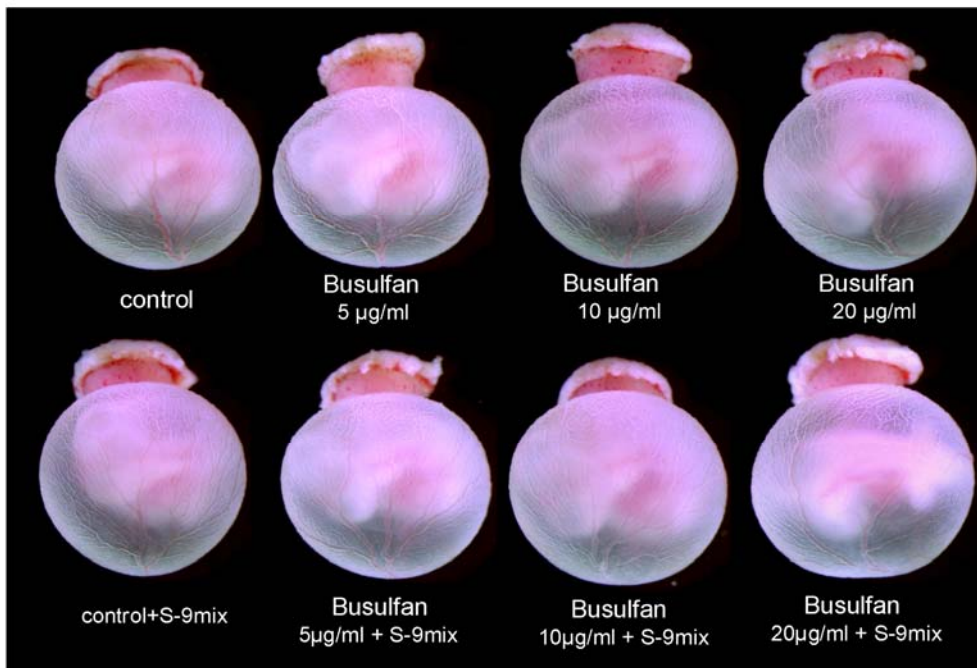
* p<0.05 VS control



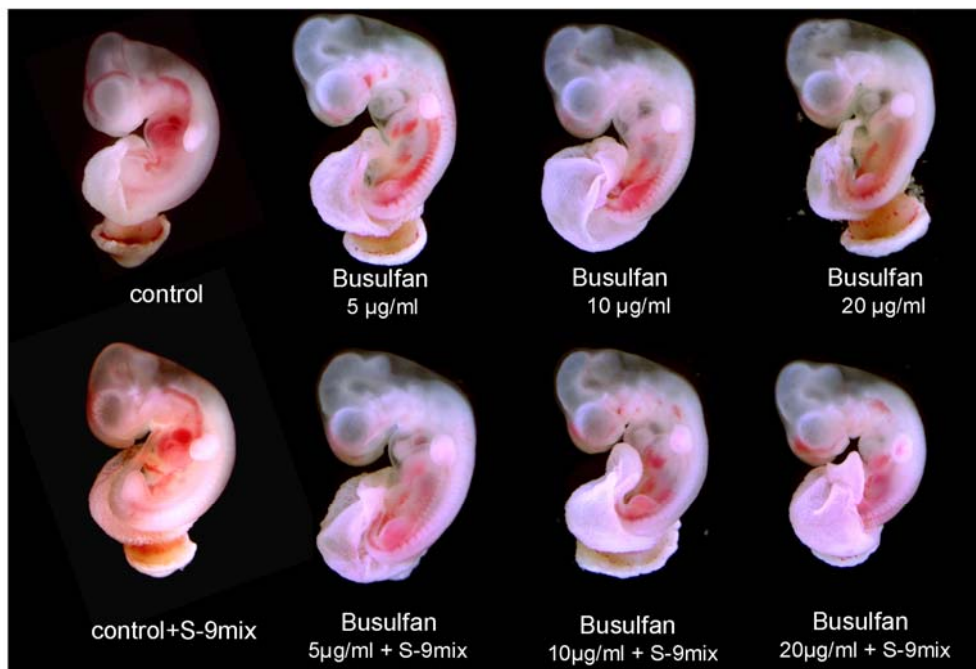
図Ⅲ.2.3-47 Morphological change of yolk sac vessel on the cultured rat embryos 24 hr after incubation in the medium containing Cyclobenzaprine-HCl

次に false negative と判定された物質 (Busulfan) についての結果は、次の通りとなった (図Ⅲ.2.3-48、49)。代謝を取り入れた WEC 試験において、Busulfan は S-9mix 処理

群および未処理群の両群とも、濃度 5 μ g/ml において強い毒性を示した。この結果から、Busulfan は、代謝機能に関係なく毒性を示す物質であると考えられた。よって、EST においては、Busulfan は negative と判定されたが、この結果より WEC においては、in vivo 試験と同じ positive と判定された。



図Ⅲ.2.3-48 Morphological change of the cultured rat embryos 24 hr after incubation in the medium containing Busulfan



図Ⅲ.2.3-49 Morphological change of the cultured rat embryos 48 hr after incubation in the medium containing Busulfan

これら EST において false positive と判定された物質 (Cyclobenzaprine-HCl) 、およ

び false negative と判定された物質 (Busulfan) は、代謝機能を取り入れた WEC を用いて判定した場合、いずれも in vivo 試験と同様の結果となった。

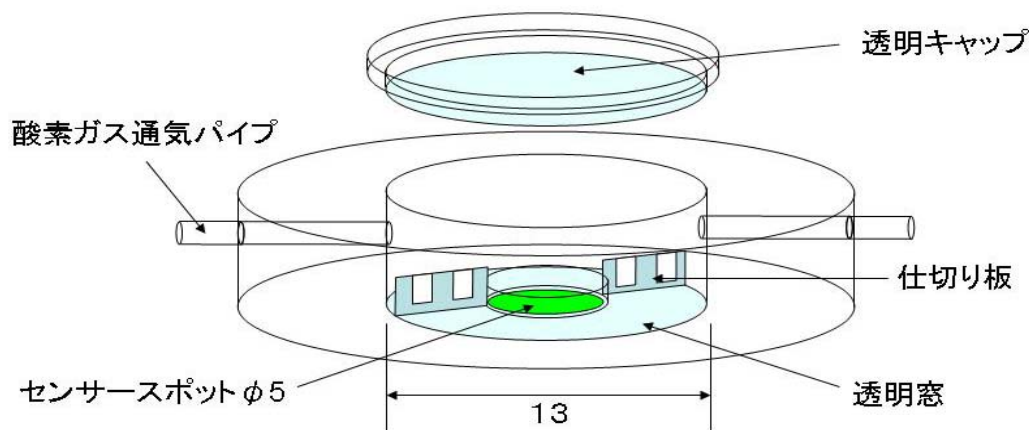
この結果からもこの WEC における試験結果は、in vivo 試験の再現性に優れていると考えられた。よって、EST と WEC を組み合わせた試験を行うことにより、in vivo 試験の結果との一致率が、飛躍的に向上できると示唆された。

②-3 簡易性を追求した培養法の開発

・培養措置圧力等における条件の検討

胎児培養法は、培養液として 100%ラット血清を使用する。以前から担当者は、本法における様々な培養液の検討を行ったが、ラット血清と同等以上の培養成績は得られなかった。そのため本法を動物実験代替法にするためには、可及的に培養液であるラット血清の使用量を減少させることが必至となる。OECD においても発生毒性試験法の代替法として胎児培養法の議論がされているが、最大の懸案事項として使用動物数が挙げられている。そこで培養液の少量化を目指し、新型の培養装置の開発を行った。

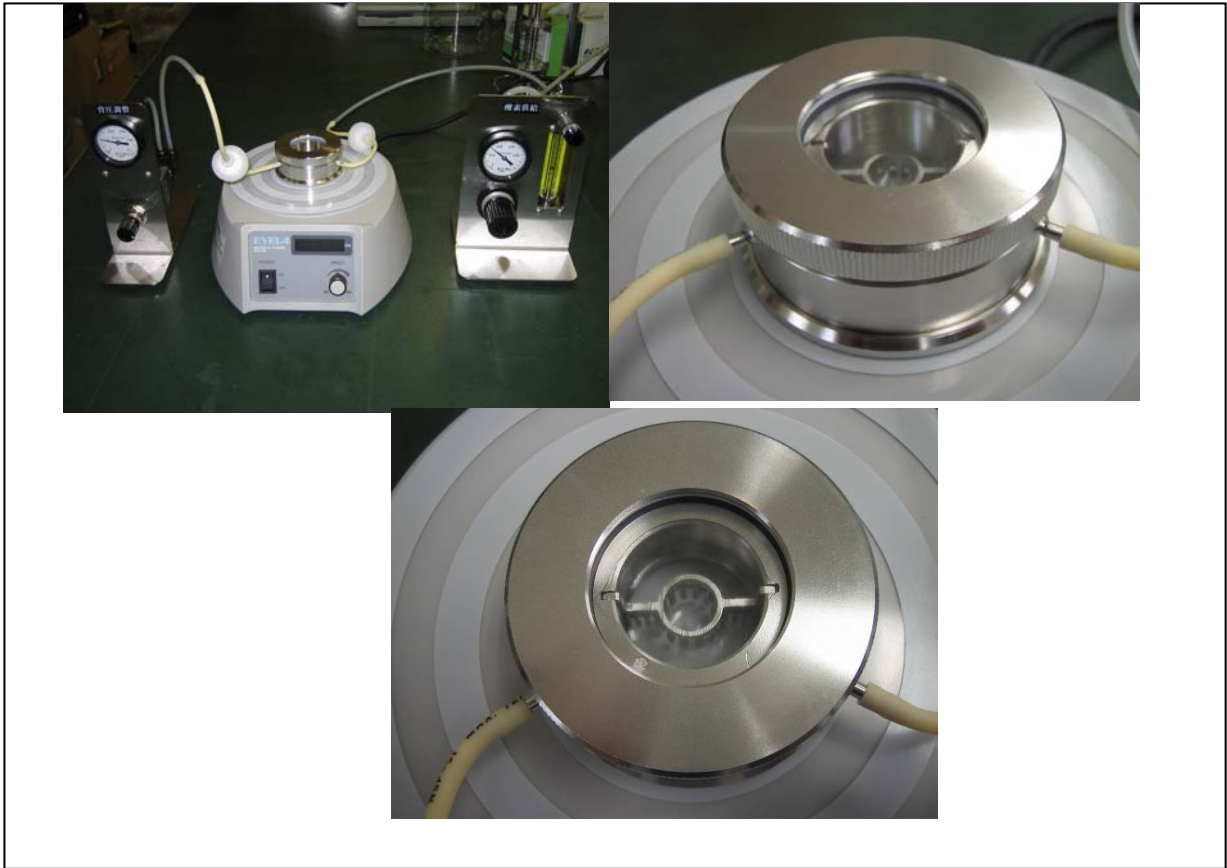
胎児が成長発育するために、最も重要な条件は、培養液内の溶存酸素量が常に安定していることであり、少ない培養液でも安定した酸素の供給が可能となるように、培養液に圧力を加えられる培養チャンバーの試作を行った (図Ⅲ. 2. 3-50)。



図Ⅲ. 2. 3-50 胎児培養チャンバーの図面

この胎児培養チャンバーの特徴は次の通りである。

- ・ 培養液 3ml 使用 (液深約 4mm)
- ・ チャンバー底面に仕切り板を有し、ラット胎児を同時に 2 匹培養可能である
- ・ 底面中央に PreSens 社蛍光式 DO センサースポットを配置できるようにする
- ・ 酸素ガス通気パイプから純酸素を送気し上面通気にて酸素を付加する
- ・ 培養部上下を透明材質にすることにより顕微鏡観察が可能である
- ・ 部材の接着に接着剤は極力使わない。使う場合は細胞毒性の無いものを選択する
- ・ ベリダンサーシェーカーによる攪拌で酸素溶解の効率を上げることが可能である



図Ⅲ.2.3-51 試作されたチャンバー

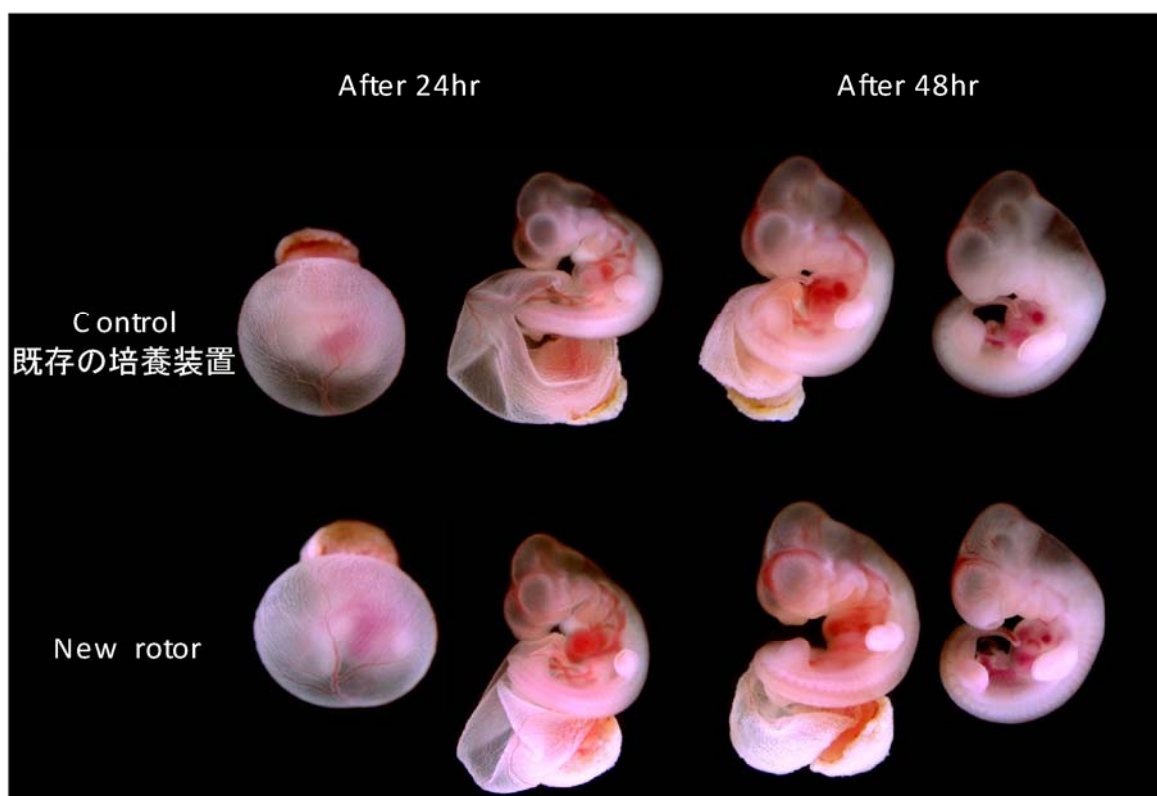
この培養装置（図Ⅲ.2.3-51）にラット胎児を2匹入れ、ガスの送気量と圧力さらに培養液の攪拌数の調整を行い、本培養装置（New rotor）における次の通りの培養条件が確定した（表Ⅲ.2.3-41）。この条件で培養された胎児は図Ⅲ.2.3-52の通り、既存の培養装置で培養した胎児と同等の成長・発育が認められた。

表Ⅲ.2.3-41 New rotor の培養最適条件

ガス送気量： 0～24時間……………140 ml/min.
 24～48時間……………160ml/min.

ガス圧力： 0.01 Mpa

培養液攪拌数： 250rpm

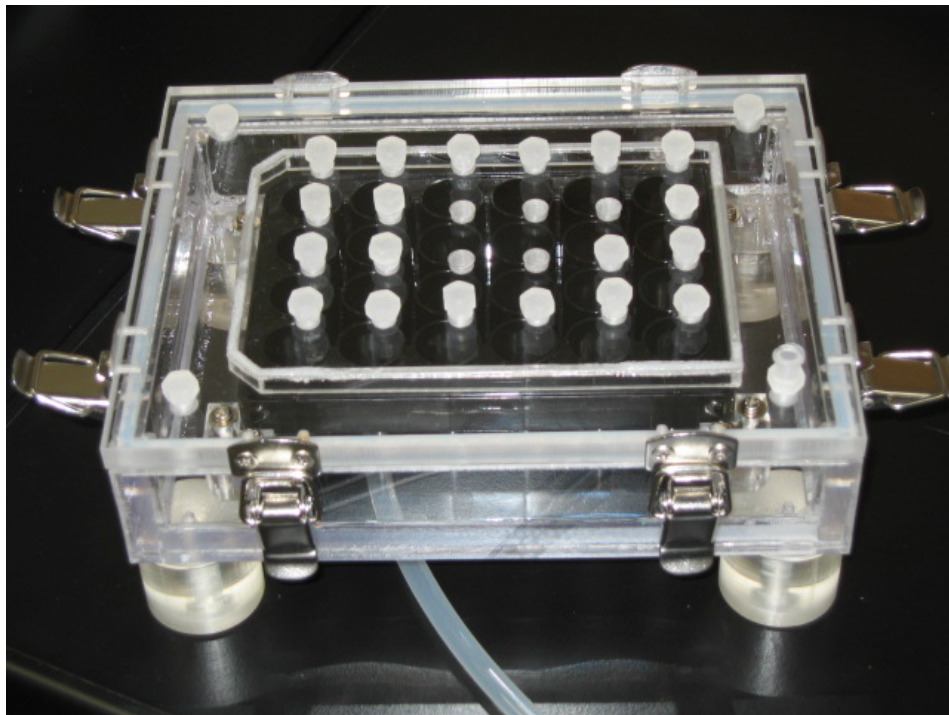


図Ⅲ.2.3-52 New rotor を用いたラット胎齢 11.5 日目から 24 時間後および 48 時間後の胎児

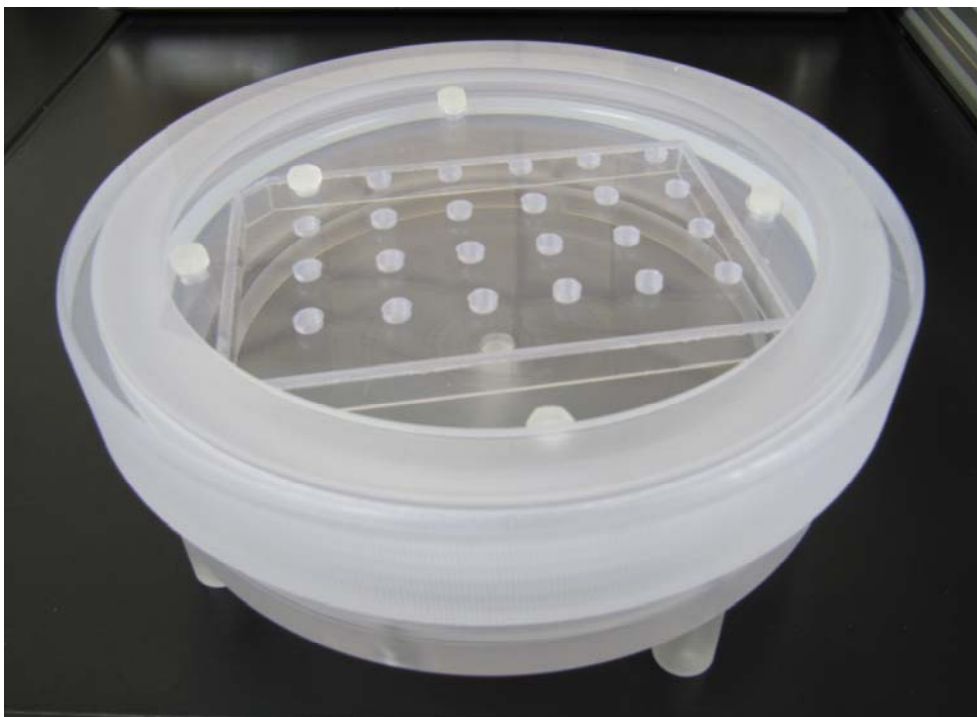
この new rotor は、胎児 2 匹を 3ml のラット血清で培養することが可能であり、すなわち 1.5ml のラット血清で 1 匹の胎児を培養できるようになったことを意味する。既存の培養装置では、1 匹のラット胎児を培養するためには 4ml が必要とされていたが、今回開発した培養装置により使用ラット血清において約 60% の削減が可能となった。これは、Reduction として十分な納得できる結果と考えられた。

・ハイスルーブット化した培養装置の検討

前項の開発において、培養液を約 1/3 に減少できる培養装置の開発ならびに条件設定に成功したが、この培養装置は、一度に 2 匹の胎児しか培養できないため、ハイスルーブットに向けた in vitro 毒性試験には不適である。そのため、多くの胎児を培養できる装置を開発することを目的として、24 穴プレートを用いた培養装置の開発を試みた。試作品として、図Ⅲ.2.3-53 のような培養装置を作成したが圧力が一定にならなかったため、外形を円形にすることにより 0.1Mpa までの圧力に耐えられ培養装置 (図Ⅲ.2.3-54) を作成し、この培養装置の培養条件の設定を行った。また、滅菌できるようポリカーボネートで作成し、可及的にシンプルに構造になるよう改良も加えた。さらに①で作成した培養装置と同様に、培養液にガスが直接送気されさらにガスが培養液に浸透することができるよう、図Ⅲ.2.3-54 の装置においても 24 穴の全てに送気ノズルを取り付けガスが培養液に直接送気できるよう配慮した。

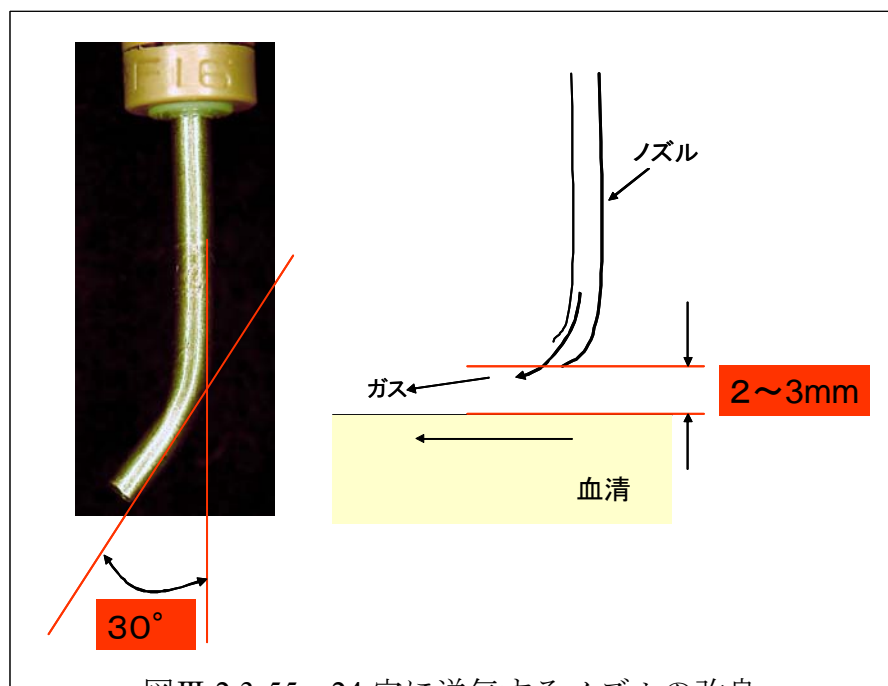


図Ⅲ.2.3-53 24穴プレートを使用した胎児培養装置

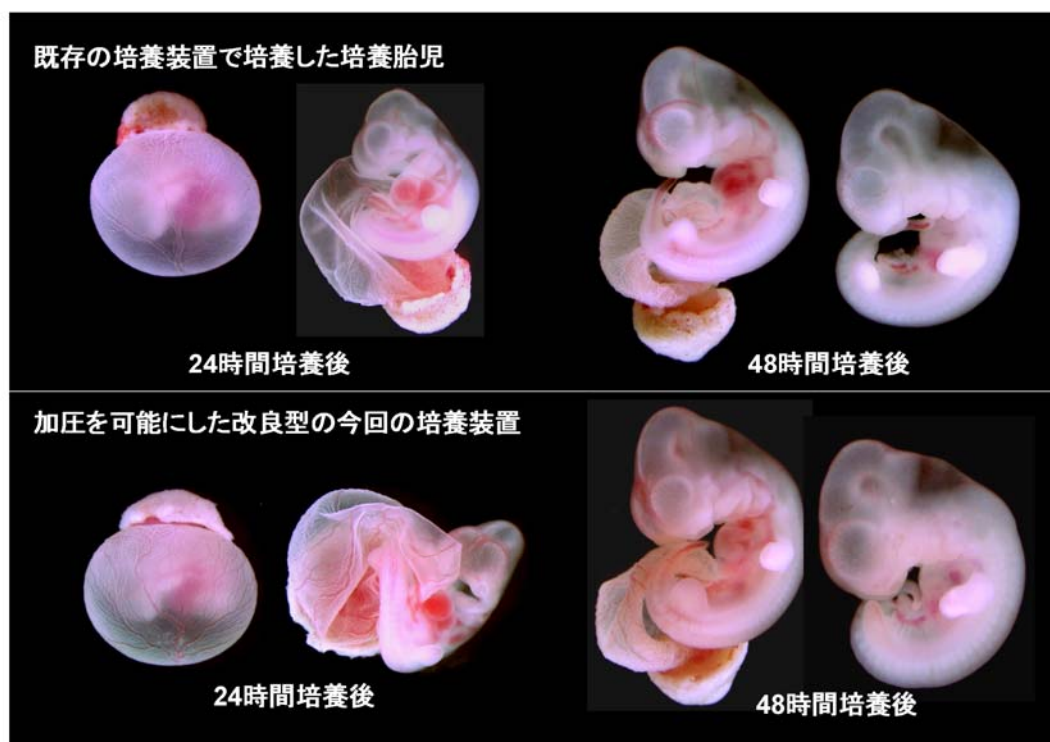


図Ⅲ.2.3-54 圧力を一定に保持できる24穴プレートを使用した胎児培養装置

この図Ⅲ.2.3-54の培養装置を用いて、24穴プレートにおける培養条件の設定を行った。しかし、一定の圧力は加えることは可能となったが、培養液にガスが一定に浸透していなため、培養胎児の成長・発育が、①で作成した培養装置で培養を行った胎児と比較し低下してしまった。そこで、送気ノズルを図Ⅲ.2.3-55の通り改良を加えた。



このノズルの改良と共に、圧力および送気量の調整を行った結果、既存の培養装置と同様に、培養胎児の成長・発育が可能な培養が可能となった（図Ⅲ.2.3-56）。培養条件は表Ⅲ.2.3-40の通りである。また、24穴の全てにおいて安定した培養も実証済みである。



図III.2.3-56 圧力設定ができる改良型培養装置における胎児の培養成績

表III.2.3-40 圧力を一定に保持できる24穴プレートを使用した培養装置における培養最適条件

-
- ・圧力:0.01MPa
 - ・流量:0～24時間……180ml/min.
24～48時間……250ml/min.
 - ・攪拌数:0～24時間……30rpm
24～48時間……20rpm
-

この培養装置は、24穴にそれぞれ1.5mlの培養液で培養を行うことができる。すなわち、本培養装置は、既存の培養装置と比較し、培養液は約1/3に削減でき、一つのチャンバーで24匹の胎児の培養が可能である。この装置の完成により、本研究目的である簡易性を追及した培養法の開発が完結でき、WECはこの装置を使用することにより、催奇形性予測試験法として、更に有力な手法となったことを意味する。

2. 4 免疫毒性毒性予測試験法の開発

2. 4. 1 背景と目標

免疫毒性とは、皮膚、腸管、気道などから生体内に取り込まれた化学物質により免疫系の機能が損なわれ、その結果、人体に何らかの障害が生じることと定義される。表に免疫毒性の分類と代表的免疫毒性物質を示す(表Ⅲ.2.4-1)。しかし、新聞報道によれば、これまでに人類が見つけたり作り出したりした化学物質は既に5千万種を超え(参照新聞報道記事)、その中には認知されていないが極めて多数の免疫毒性物質が含まれていることが推測される。

表Ⅲ.2.4-1 免疫毒性物質とその分類

免疫毒性の分類	化学薬品、環境汚染物質
免疫抑制	ハロゲン化芳香族炭化水素類:TCD, TCDO, PBB, ヘキサクロロベンゼン 芳香族炭化水素類:ベンゼン 多環芳香族炭化水素族:ベンゾピレン, ジメチルベンズアントラセン アミン類:ベンジン, N-ジメチルニトロサミン 重金属化合物:Hg, Cd, バナジウム, アルキルスズ, Pb 酸化性ガス:二酸化窒素, オゾン その他:パラチオン
自己免疫 劇症肝炎 ループス型腎炎 強皮症様疾患	Hg, Cd 塩化ビニルモノマー, シリカ
アレルギー 即時型過敏症 (I~III型反応)	ベリリウム ホルムアルデヒド プラスチックゴム原材料:エチレンジアミン, 無水トリメリト酸, 無水フタル酸, ジイソシネアート(TDI, MDI) 綿・木材・穀物・タンパク質製剤等粉じん ディーゼル排気微粒子
遅延型過敏症 (IV型反応)	重金属:Pt, Ni, Cr, Co, Hg ジニトロクロロベンゼン, オキサゾロン, パラフェニレンジアミン, SADBE, DPCP

これまでの免疫毒性検出法は、Gell and Coombsの分類に基づく古典的免疫学を基盤とし、主に、実験動物あるいは実験動物から採取された細胞を用いて行われてきた。そのため、免疫毒性物質の検出には多くの実験動物が用いられ、また、多大な時間と経費を必要とした。参考までに、平成18年度に厚生労働省医薬食品局から提案された医薬品に関する免疫毒性試験ガイドラインを示す(表Ⅲ.2.4-2)。

表III. 2.4-2 医薬品の免疫毒性試験に関するガイドライン

(平成18年厚生労働省医薬食品局)

標準的毒性試験

パラメータ	特定の項目
血液学的検査	総白血球数及び白血球型別絶対数
血液生化学的検査	グロブリン量及びA/G比
剖検	免疫系器官/組織
臓器重量	胸腺、脾臓 (オプションとして、リンパ節)
病理組織学的検査	胸腺、脾臓、リンパ節 (所属リンパ節及び1箇所以上の他のリンパ節)、骨髄、パイエル板

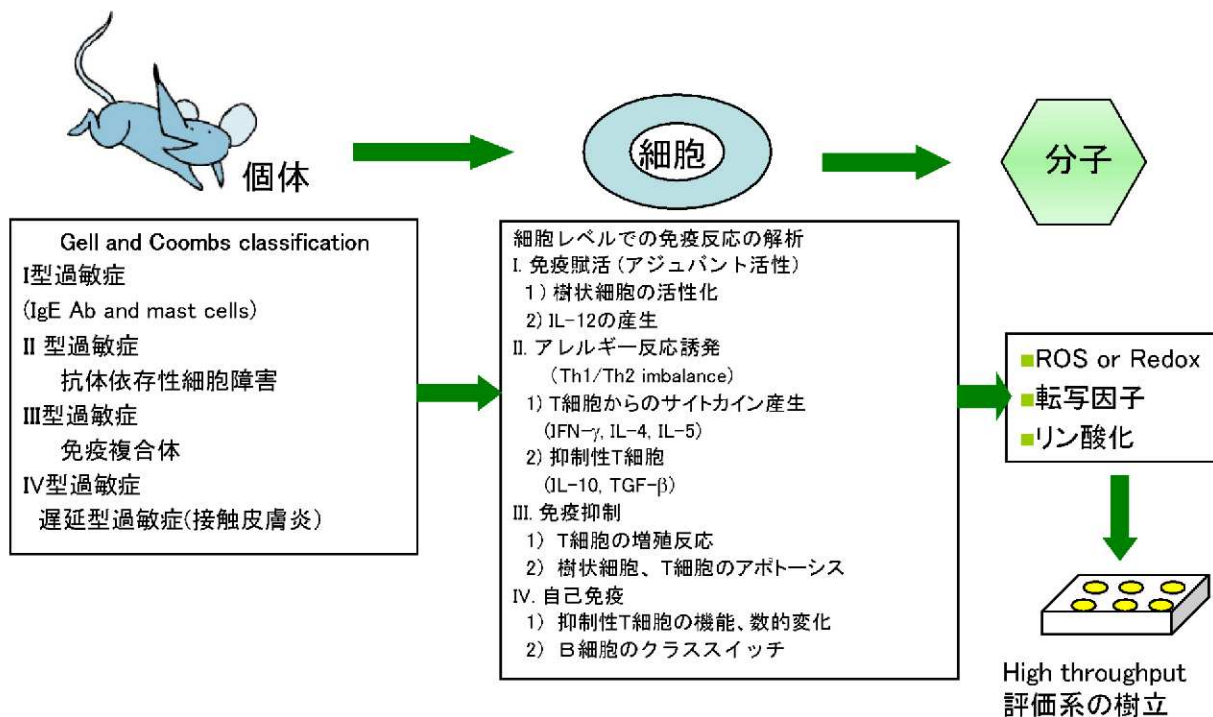
免疫毒性試験

T細胞依存性抗体産生 (TDAR)
 イムノフェノタイピング
 ナチュラルキラー細胞活性検査
 宿主抵抗性試験
 マクロファージ/好中球機能
 細胞性免疫の機能検査

問題点

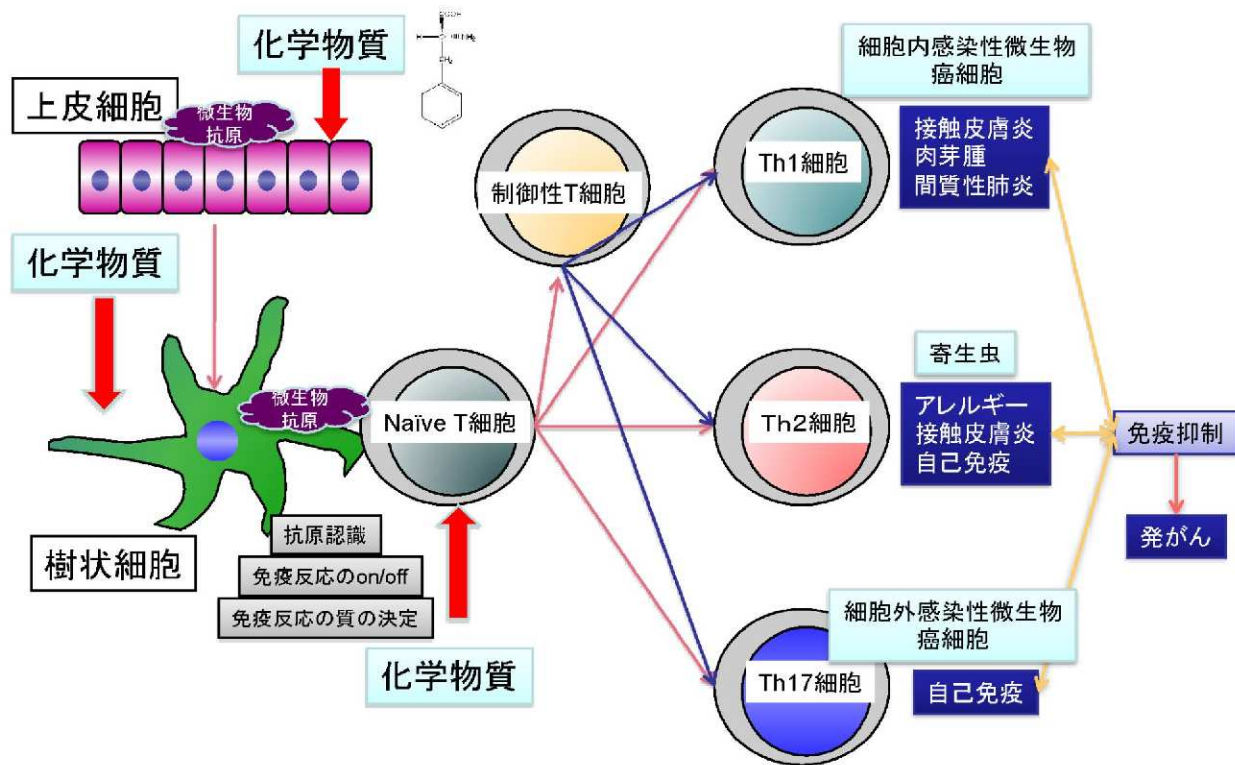
- 1) 多数の動物を使用する (3Rs).
- 2) High throughput化しにくい.
- 3) 最近の免疫学, アレルギー学の進歩を反映していない.

しかし、現状の動物を用いた免疫毒性検出法では五千万種を超す膨大な数の化学物質を評価することは不可能であり、そのため一部の医薬品、化粧品などを除いては、ほとんどの化学物質は免疫毒性を全く評価されることなく市場に流通している。そのため、化学物質による接触皮膚炎、喘息、アトピー性皮膚炎等の有病率の増加や難治化、肺炎、膠原病様症状の誘発など、化学物質の免疫毒性による被害は後を絶たない。そこで、本研究開発では、これまで主として行われてきた実験動物を用いた免疫毒性評価手法に替わる、分子レベルでの免疫毒性発現機序に基づいた高機能かつhigh throughputな評価手法の確立を目指す (図III. 2.4-1)。



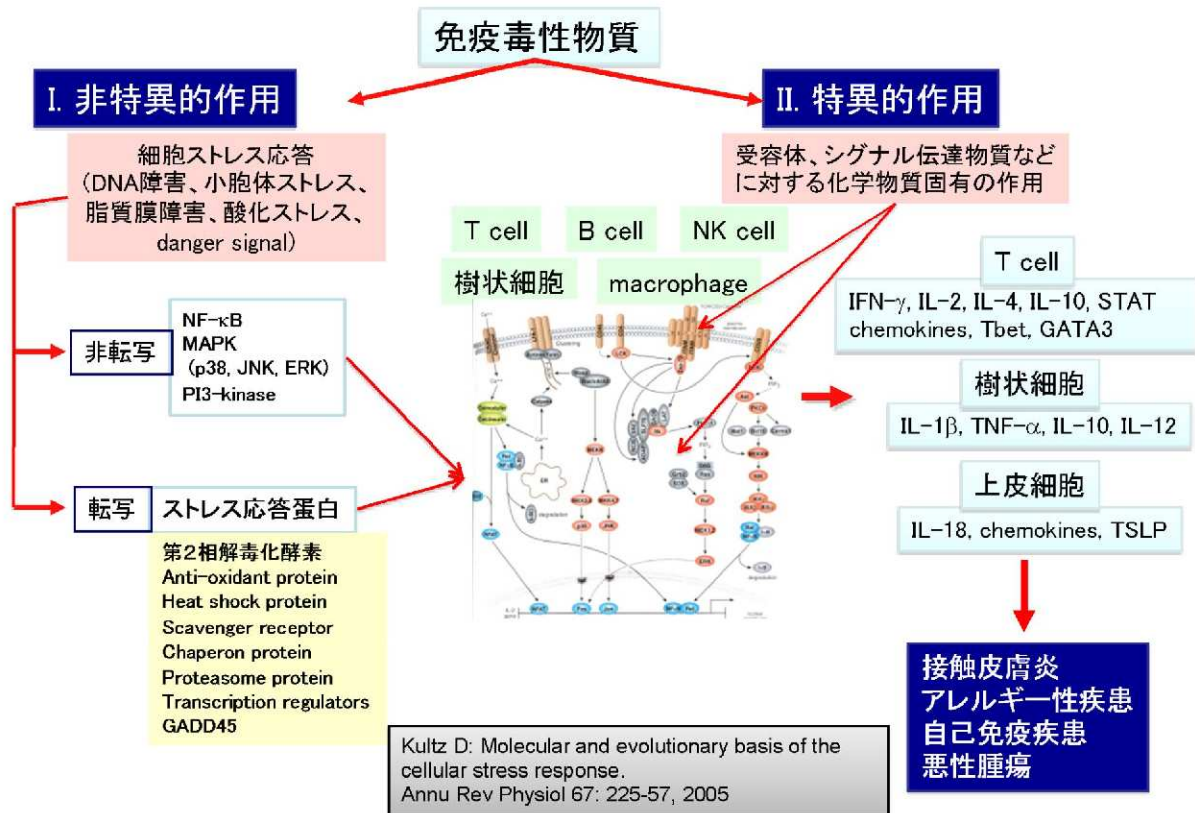
図III. 2.4-1 免疫毒性評価法の流れ

免疫反応には、T細胞、B細胞、NK細胞、樹状細胞、マクロファージ、肥満細胞、上皮細胞など様々な細胞が関与する。本研究においては、それらの細胞のなかでも、免疫反応成立の根幹をになう3種類の細胞、すなわち、外界と接し化学物質に直接暴露される上皮細胞、免疫の司令塔ともいわれる樹状細胞、また、樹状細胞から刺激を受けてTh1、Th2、Th17、Tregなどの異なった機能を担う細胞に分化し、種々の免疫疾患のeffector細胞あるいは調節性細胞となるT細胞をターゲットとして免疫毒性予測試験法を開発することとした（図III. 2.4-2）。



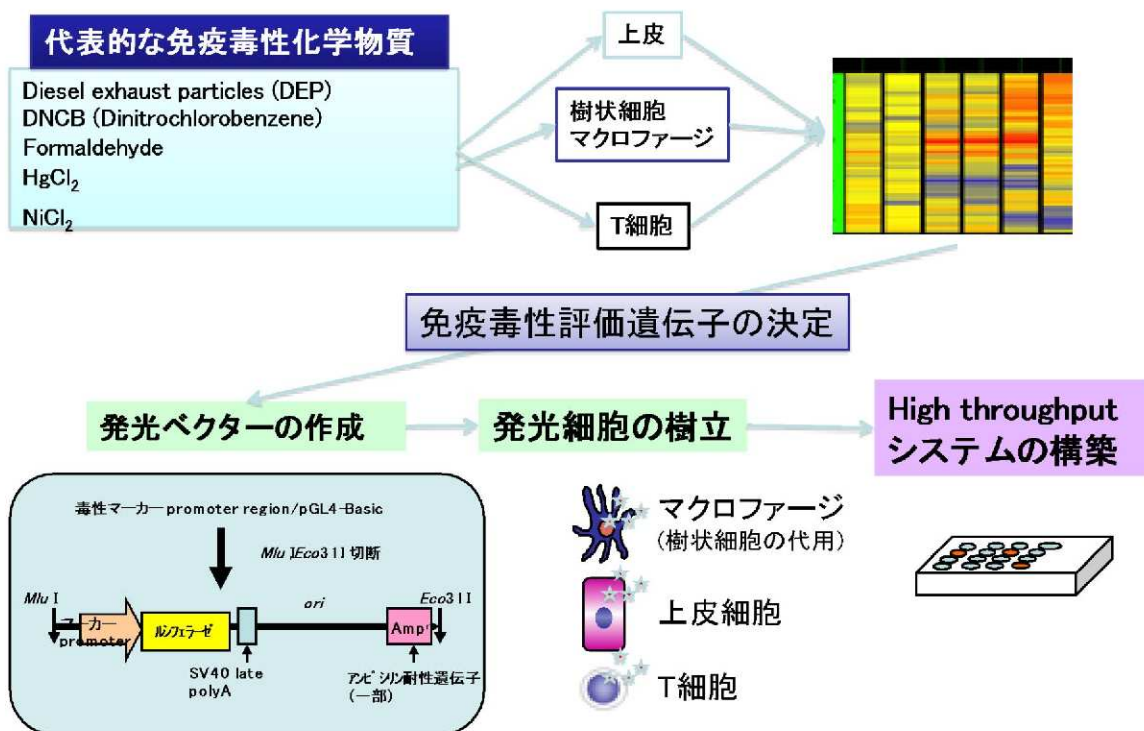
図Ⅲ. 2.4-2 化学物質による免疫毒性発症メカニズム（細胞レベル）

化学物質が免疫毒性を発揮する分子レベルのメカニズムは、大きく2つに分類される。一つは、主に医薬品などの限られた化学物質が免疫担当細胞の受容体、細胞内シグナル伝達物質などに特異的に作用し、その細胞機能を変化させ免疫毒性を発揮する機序である（特異的作用）。もう一つは、近年明らかになってきた、化学物質が細胞を構成するDNA、蛋白、膜脂質など生体構成分子を修飾することにより誘導されるcellular stress response（細胞ストレス反応）を介して免疫担当細胞に影響を及ぼし、結果として免疫毒性を発揮する機序である（非特異的作用）。前者のメカニズムによる免疫毒性の解析には、標的となっている分子それぞれに対応した評価系が必要になる。細胞ストレス反応も多岐にわたっているが、それらは最終的には比較的限られた細胞内シグナル分子を共有していることが知られている。そこで、本研究においては、後者の細胞ストレス反応を介して生じる免疫毒性を対象に評価系を構築する（図Ⅲ.2.4-3）。



図Ⅲ. 2.4-3 化学物質による免疫毒性発症メカニズム（分子レベル）

具体的には、まず、上皮細胞（本研究開発では、皮膚を覆う上皮細胞である表皮細胞）、樹状細胞、T細胞に代表的な免疫毒性物質を作用させ、その際の遺伝子変動をDNA microarrayを用いて網羅的に解析した。その結果をもとにして、より多くの免疫毒性物質により共通して変動する遺伝子を標的遺伝子の候補とした。定量的polymerase chain reaction (PCR)にて候補遺伝子の発現変動を確認した後、文献情報、バイオインフォマティクスを応用し免疫毒性評価遺伝子を選定した。その結果を踏まえて、免疫毒性評価遺伝子の転写調節領域の下流にルシフェラーゼ遺伝子を導入したプラスミド（発光プローブ）を作成し、さらに、それを上皮細胞、樹状細胞、T細胞由来の長期培養細胞株であるHaCaT細胞、U937細胞ないしはTHP-1細胞（マクロファージ細胞株であるが、比較的性質が類似しているため樹状細胞株の代用として用いる）、Jurkat細胞に導入し免疫毒性評価細胞を樹立した。これらの細胞を単独ないしは組み合わせることにより精度の高い化学物質免疫毒性評価系構築目指した（図Ⅲ. 2.4-4）。



図III. 2.4-4 免疫毒性評価系の開発

なお、本研究では、代表的免疫毒性物質として、表に示したDiesel exhaust particles (DEP)、dinitrochlorobenzene (DNCB)、formaldehyde、HgCl₂、NiCl₂の5種類を使用した (表III. 2.4-3)。

表III. 2.4-3 研究に用いた免疫毒性化学物質

免疫毒性化学物質	免疫毒性
Diesel exhaust particles (DEP)	Th1/Th2 不均衡、アレルギー性疾患
Dinitrochlorobenzene (DNCB)	代表的な接触皮膚炎惹起物質
Formaldehyde	Th1/Th2 不均衡、アレルギー性疾患、sick house syndrome
HgCl ₂	自己免疫性疾患
NiCl ₂	代表的な接触皮膚炎惹起物質、金属アレルギー

2. 4. 2 最終目標に対する達成度

最終目標に対する達成度は、以下のとおりである。

研究開発課題	最終目標(平成22年度末)	最終目標の達成状況	達成度
C 免疫毒性予測試験法の開発	遺伝子導入技術、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。	[上皮細胞 (HaCat)] 同定したマーカー遺伝子3種のうち、2種(hemeoxygenase-1、IL-1β)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる2色安定発光細胞株 (HR38H6、KIL01) を樹立し、その内 HR38H6 を用いて酸化ストレス、ER ストレス、重金属刺激など幅広いストレスを検出できるハイスループット評価系を構築した。	◎
		[マクロファージ系細胞 (U937)] 同定したマーカー遺伝子17種のうち、3種(IL-8、IL-1β、hemeoxygenase-1)について、そのうちいずれかの遺伝子と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる2色安定発光細胞株 (UR2H4114、UIL01、THP-G8) を樹立した。また、マーカー遺伝子2種と内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる3色安定発光細胞株 (6C12) も樹立した。その内、THP-G8 に関しては、これを用いた皮膚感作性試験代替法を開発した。また、6C12 を用いては、単球、樹状細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。	◎
		[T細胞 (Jurkat)] 同定したマーカー遺伝子10種のうち、3種(IL-2、IL-4、IFN-γ)について、そのうち2つの遺伝子の組み合わせと内在性コントロール G3PDH 遺伝子のプロモーター活性を同時に評価できる3色安定発光細胞株(10C6、2H4)を樹立した。その内、2H4 を用いては、T細胞作用性免疫毒性物質のハイスループット評価系を構築した。また、6C12 と 2H4 を組みあわせることにより、多様な免疫毒性を評価できるシステムを構築した。	◎
		[標準的な試験プロトコール] THP-G8 を用いた皮膚感作性試験代替法および 6C12 と 2H4 を用いた免疫毒性評価系に関しては、標準的な試験プロトコールを作製して複数施設での試験法の安定性を検討した。	◎

上皮細胞に関しては、免疫毒性評価遺伝子探索に用いた5種類の化学物質の内、3種類の化学物質により共通して発現が誘導された hemeoxygenase-1 (HMOX1)に関し、2色発光細胞 HR38H6 を樹立した。HMOX1は、ヘム刺激、活性酸素ストレス、ER ストレス、重金属ストレスなどにより誘導される代表的なストレス応答遺伝子であるが、樹立した HR38H6 もそれらの刺激によりルシフェラーゼ活性を増強し、生体に影響を及ぼす様々なストレスを評価できる細胞であることが明らかとなった。また、この細胞は少なくとも1ヶ月の培養後にも評価細胞としての特性を失わず、マイコ

ラズマの感染も認められていない。

IL-8 遺伝子の発現を評価できる発光細胞 TGC17EA01 に関しては、特に皮膚感作性試験の代替法を念頭に評価系を構築した。この評価系は、抗酸化物質である N-acetylcysteine と組み合わせることにより、24 種類のハプテンを含む 35 種類の化学物質の検討において、local lymph node assay による評価と 86%の精度で一致する結果を示した。この値は、現在 ECVAM で検討中の h-CLAT と遜色のない精度である。さらに、この測定系は、測定に要する時間が化学物質添加後 6 時間と短く、96 multi-well を用いた多検体同時測定が可能であり、さらに発光測定も既に全自動化されていることから次世代の皮膚感作性試験代替法の有力な候補と考えられる。実際に、国際的にもこの評価法は注目されており、今年の 8 月の COLIP 主催の Task force skin tolerance の会合において発表の機会を与えられていた。この評価法に関する論文は、Toxicological Science に投稿中である。

さらに、IL-2、IFN- γ 遺伝子の発現を 1 種類の細胞株で同時に評価できる 2H4 を用いて、T 細胞に直接作用する免疫毒性物質の評価系を構築した。我々は、この評価細胞を用いることで、これまで知られていなかったニッケルによる T 細胞からのサイトカイン産生抑制作用を見だし、関連論文が Toxicology and Applied Pharmacology に掲載予定である。

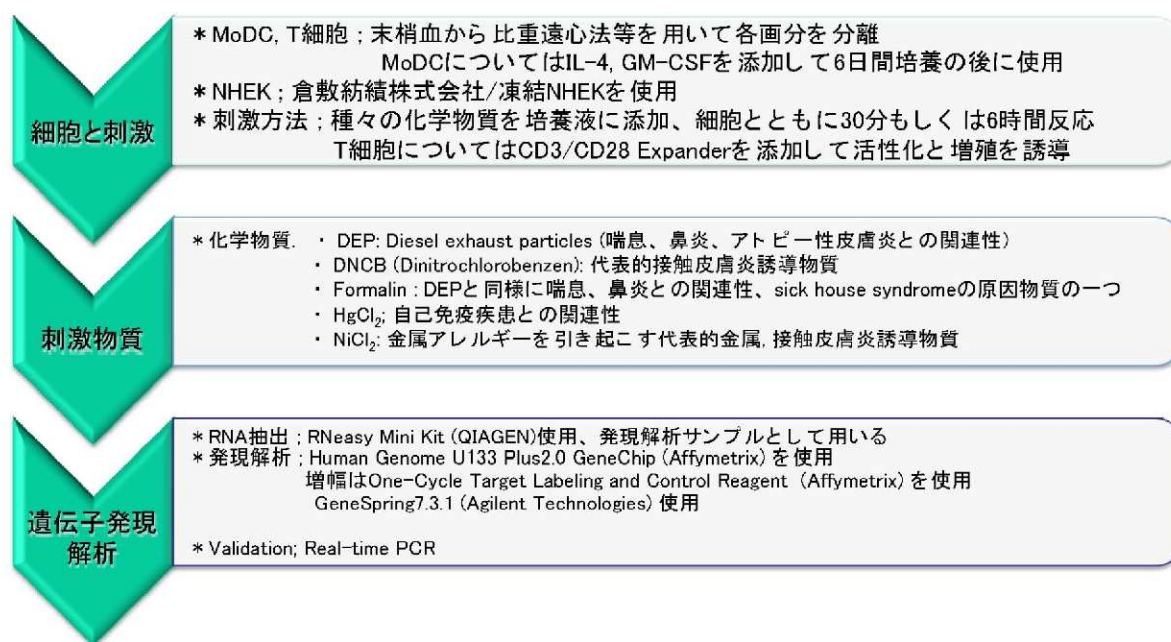
また、2H4 細胞と IL-1 β 、IL-8 遺伝子発現を同時に評価できる 6C12 細胞を併用することにより、T 細胞、単球、樹状細胞に作用する免疫毒性物質を薬剤添加後 6 時間という短時間にハイスループットで評価できるシステムも構築した。この評価系により、臓器移植や種々の自己免疫性疾患治療に用いられる免疫抑制剤の T 細胞、樹状細胞機能への影響が容易に評価できることから、新規免疫抑制剤開発における有用性が想定される。現在、この 2 細胞を用いた免疫毒性評価系は、国内特許が認められ、さらに、外国特許を出願した。

TGC17EA01 を用いた感作性試験代替法および 6C12 と 2H4 を用いた免疫毒性評価系に関してはプロトコールを作成し、食品薬品安全センター、東洋紡、住友化学と施設間差比較試験を実施し高い一致率が得られている。

2. 4. 3 進捗状況と成果

① 免疫毒性評価遺伝子の選定

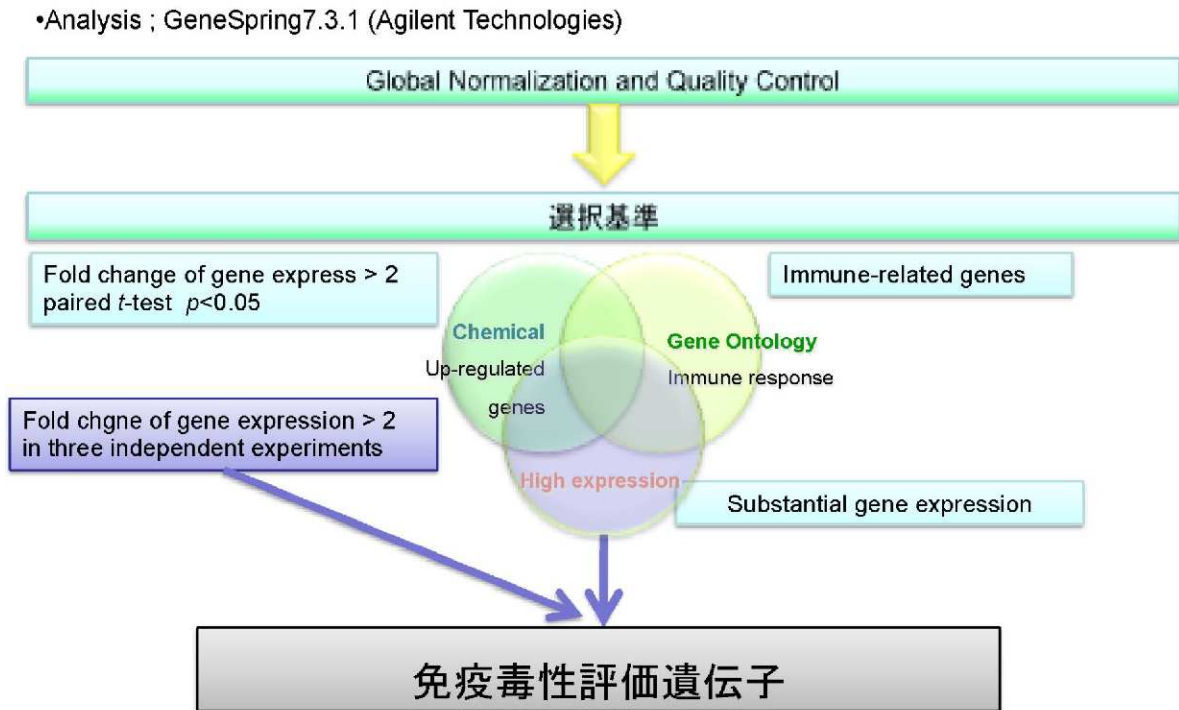
免疫毒性評価遺伝子の特定方法の概略を図に示す（図Ⅲ. 2. 4-5）。



図Ⅲ. 2.4-5 免疫毒性評価遺伝子の選定

①-1. 樹状細胞の免疫毒性評価遺伝子の選定

健康人の末梢血単核球由来樹状細胞を至適濃度の5種類の化学物質で刺激し、6時間後にmRNAを抽出し、Human Genome U133 Plus2.0 GeneChip (Affimatrix)を用いて遺伝子発現解析を行った。また、データ解析には、GeneSpring7.3.1を使用した。3人以上の異なったドナー由来の樹状細胞で検討を行い、統計的に有意差をもって2倍以上の発現増強を示した遺伝子ないしは、3回の実験で常に2倍以上の発現増強を示した遺伝子で、一定以上の発現量のある遺伝子を選択した。さらに、それらの中から、バイオインフォマティクスを利用して免疫関連遺伝子を抽出した（図Ⅲ. 2. 4-6）。



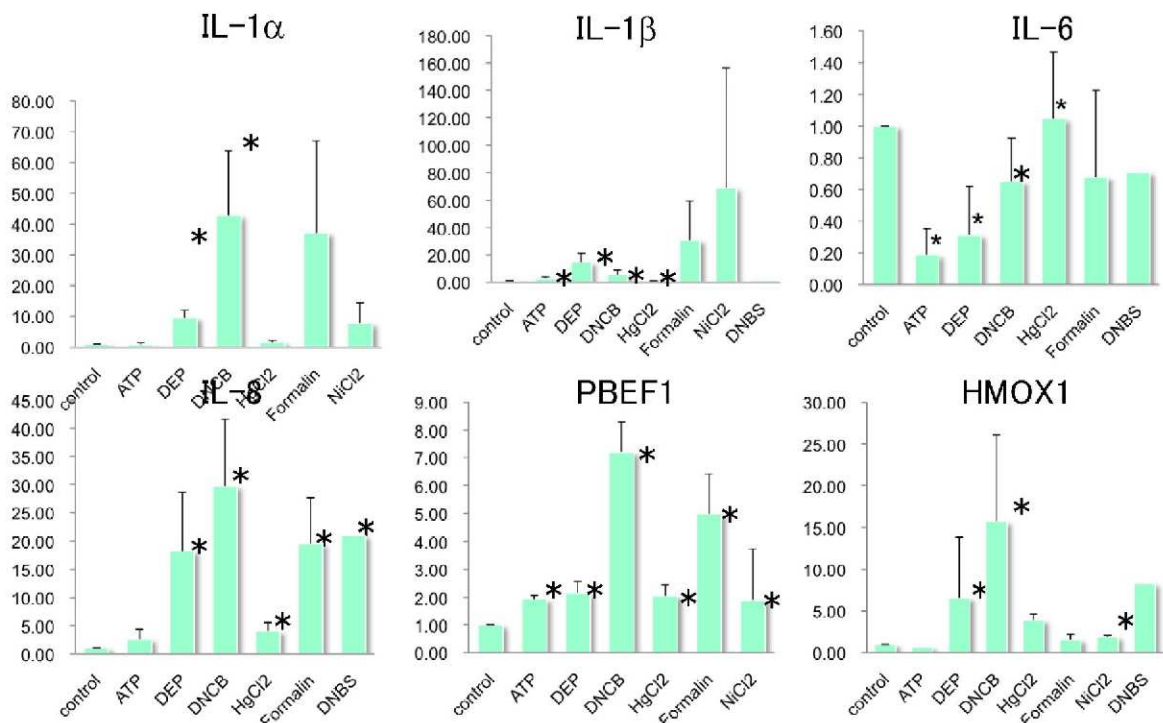
図III. 2.4-6 樹状細胞における免疫毒性評価遺伝子の選択基準

樹状細胞においては、化学物質処理により変動した免疫関連遺伝子として、発現が
 増強したものがDNCB刺激で31、Formalin刺激で37、NiCl₂刺激で52、DEP刺激で13、
 HgCl₂刺激で13遺伝子が確認できた（表III. 2.4-4）。

表III. 2.4-4 化学物質処理により変動した免疫関連遺伝子

	DNCB	Formalin	NiCl ₂	DEP	HgCl ₂
樹状細胞	31	37	52	13	13
表皮細胞	3	11	0	7	3
T細胞 (発現増加)	53	8	6	12	0
T細胞 (発現減少)	104	19	7	17	2

また、DNA microarrayから得られたデータの信憑性は、定量的PCRにより確認した
 (図III. 2.4-7)。



ATPは、細胞内に存在し細胞が壊死に陥る寸前に放出する免疫刺激活性物質で danger signalと呼ばれる。DNBSは、DNCB類似物質で水溶性の物質。*: $p < 0.05$

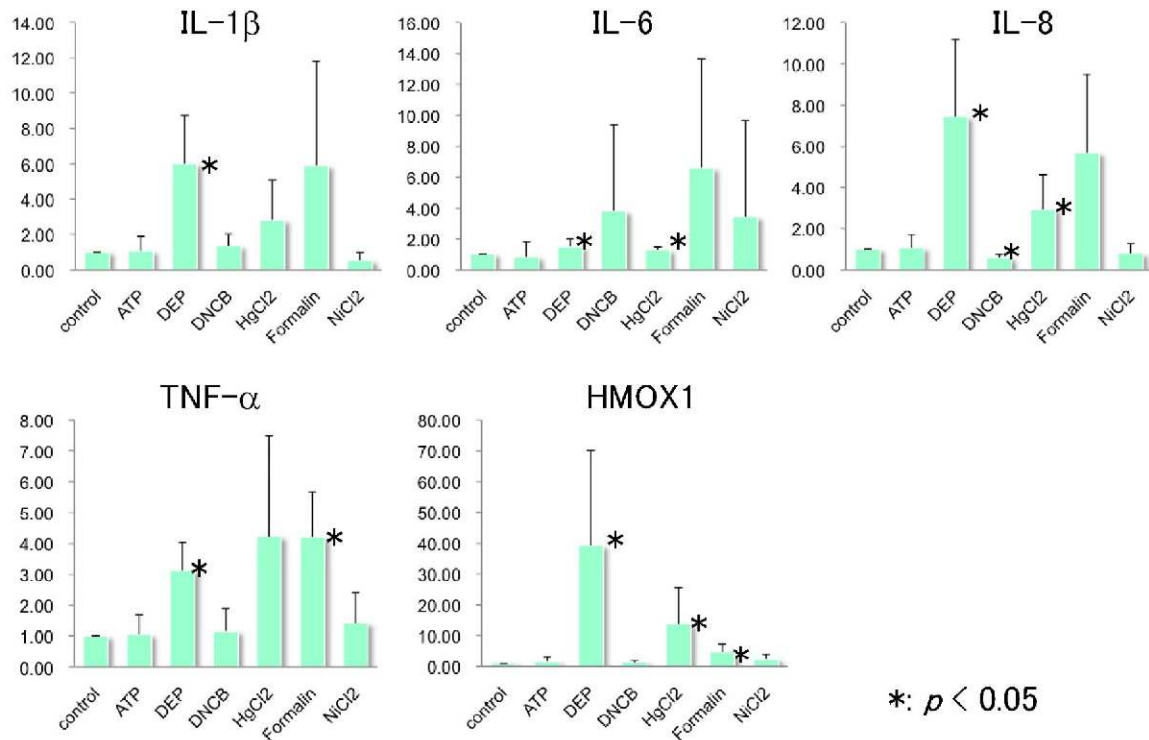
図III. 2.4-7 樹状細胞における免疫関連遺伝子発現の定量PCRによる確認

それらの遺伝子の内、異なる化学物質刺激に対しても同様の変動パターンを示すものを探したところ、IL-8、PBEF1、C5AR1、CXCL3、IHBA、ZEB1、CCL3、CXCL2、HMOX1、GADD45A、HSPAA4L、IL-1β、IRAK2、IRF1、TNF、TNAIP2、TNFSP18の遺伝子が少なくとも3種類の化学物質で共通して発現が増強することが明らかとなった。

①-2. 上皮細胞（表皮細胞）の免疫毒性評価遺伝子の選定

ドナーの異なる3種類の新生児包皮由来培養表皮細胞を用い、樹状細胞と同様に5種類の化学物質で刺激し、樹状細胞の時と同様の基準を用いて免疫関連遺伝子を抽出した。

表皮細胞においては、化学物質処理により変動した免疫関連遺伝子として、発現が増強したものがDNCB刺激で3、Formalin刺激で11、NiCl2刺激で0、DEP刺激で7、HgCl2刺激で7遺伝子が確認できた（表III. 2.4-4）。また、DNA microarrayから得られたデータの信憑性は定量的PCRにより確認した（図III. 2.4-8）。



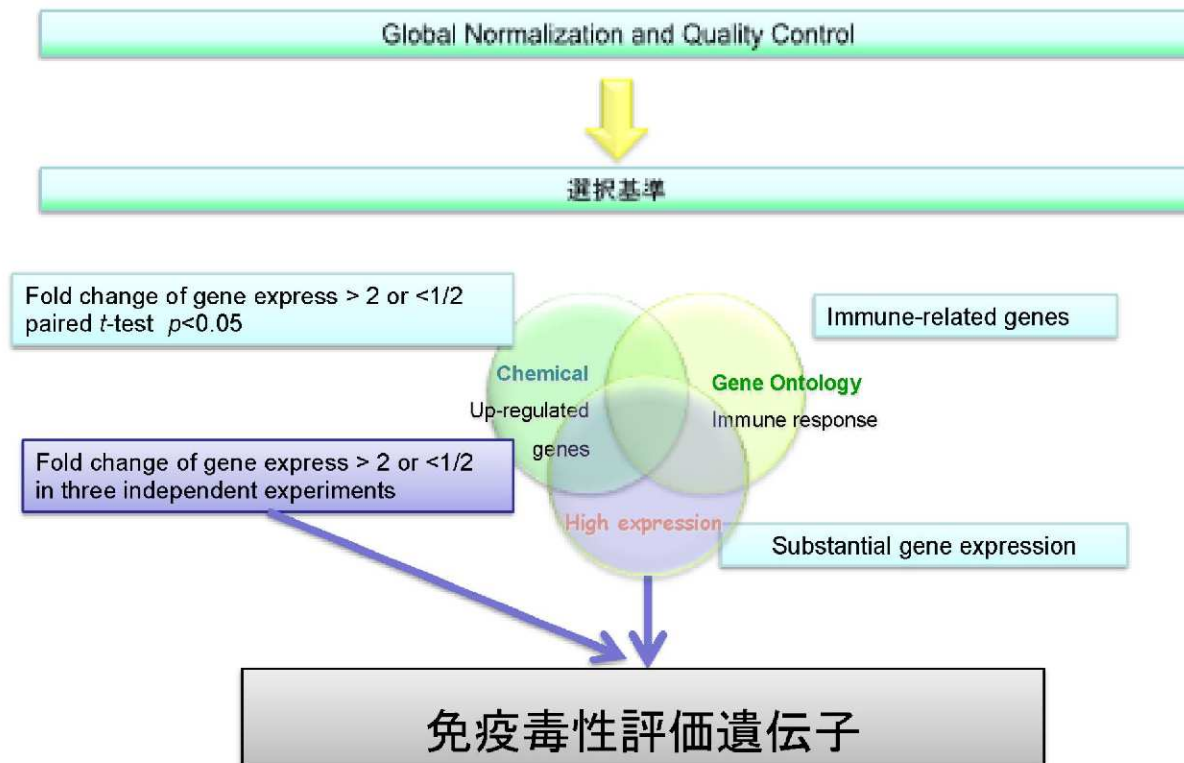
図III. 2.4-8 表皮細胞における免疫関連遺伝子発現の定量PCRによる確認

表皮細胞では、3種類以上の化学物質で共通して発現が増強する遺伝子は存在せず、GAAD45A、HMOX1、HSPA6、IL-1 β 、IL-8、PBEF1が2種類の化学物質で共通して発現が増強した。

①-3. T細胞の免疫毒性評価遺伝子の選定

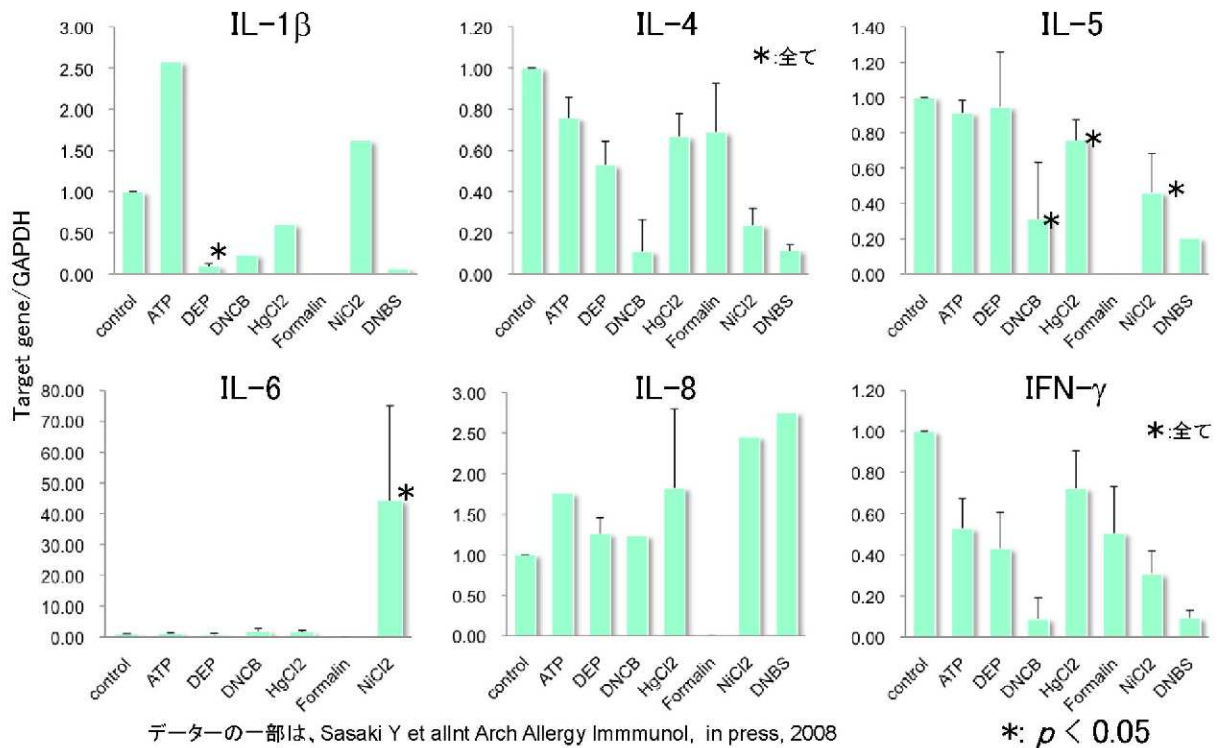
健康人の末梢血単核球より抗体と磁気ビーズの組み合わせによりT細胞を分離し、それらを5種類の化学物質の存在下に抗CD3抗体、抗CD28抗体の結合した磁気ビーズで刺激した。刺激6時間後にmRNAを回収し免疫関連遺伝子の変動を確認した（図III. 2.4-9）。

Analysis ; GeneSpring7.3.1 (Agilent Technologies)



図Ⅲ. 2.4-9 T細胞における免疫毒性評価遺伝子の選択基準

その結果、化学物質の存在下に発現が増強した遺伝子が、DNCB刺激により53遺伝子、ホルマリン刺激により8遺伝子、 NiCl_2 刺激により6遺伝子、DEP刺激により12遺伝子、 HgCl_2 刺激により0遺伝子であった。また、発現が低下した遺伝子は、DNCB刺激により104遺伝子、ホルマリン刺激により19遺伝子、 NiCl_2 刺激により7遺伝子、DEP刺激により17遺伝子、 HgCl_2 刺激により2遺伝子であった（表Ⅲ. 2.4-4）。DNA microarrayから得られたデータの信憑性は定量的PCRにより確認した（図Ⅲ. 2.4-10）。



図III. 2.4-10 T細胞における免疫関連遺伝子発現のreal-time PCRによる確認

少なくとも3種類の化学物質で発現が増強する遺伝子として、CXCL3、GADD45Aが確認された。2種類の化学物質で発現が増強する遺伝子としてIL-24、HMOX1、IL-7R、TXNIPが抽出された。一方、発現が抑制する遺伝子としては、4種類の化学物質で共通して抑制される遺伝子としてIL-12 β 、3種類で抑制される遺伝子としてCCL17、CCL22、IL-9、LIF、2種類で抑制される遺伝子としてIFN- γ 、IL-10、Tbet、CCR1、CD80、CTLA4、CXCL10、CXCL11、IL-22、INDO、IRF8、KLRC4、TBX21が抽出された。また、DNA array解析では検出できなかったが、定量的PCRによりIL-4、IFN- γ 遺伝子の発現が5種類の化学物質全てで抑制されることを確認した。(データの一部分は、Sasaki Y et al. Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon- γ and interleukin-10 production. Int Arch Allergy Immunol, 148:239-250, 2008にて発表)

①-4. 免疫毒性評価遺伝子の選定のまとめ

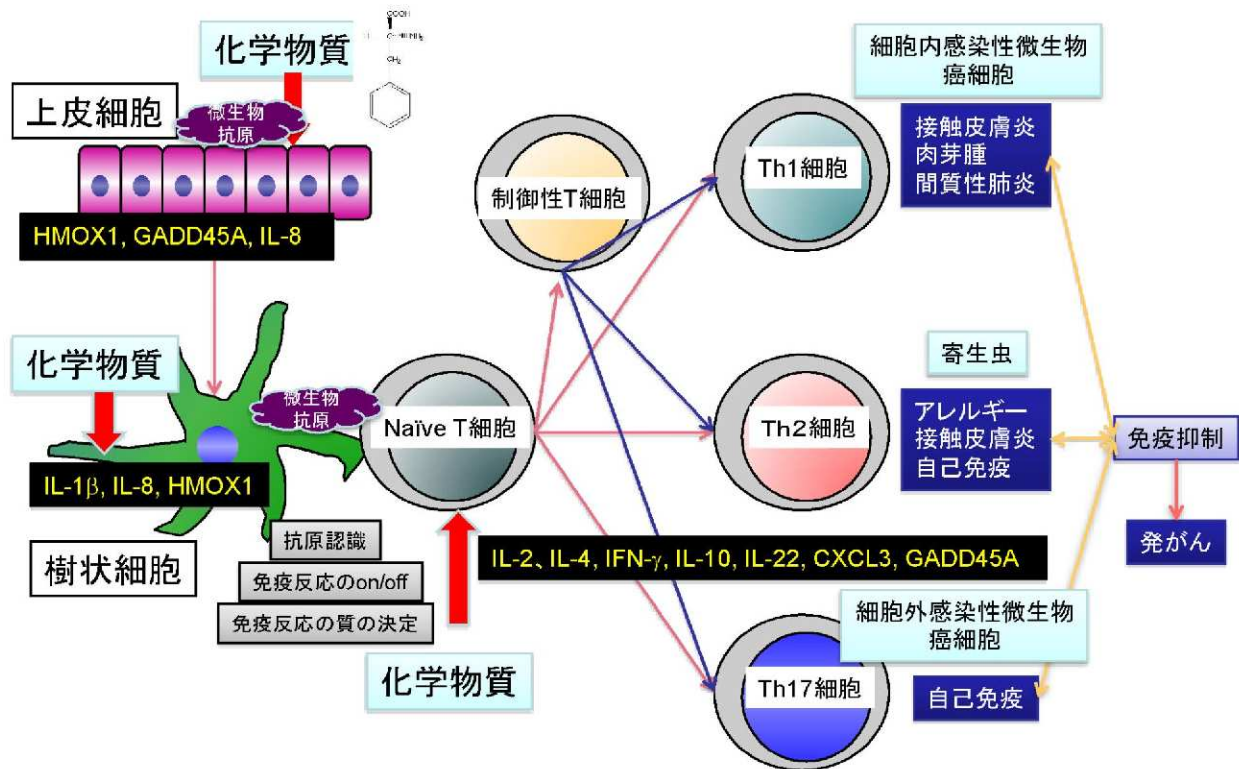
表III. 2.4-4に化学物質処理により変動した免疫関連遺伝子数を示し、表III. 2.4-5には、その中で、複数の化学物質により共通して変動した遺伝子を提示した。更に、それらの内、定量的PCRでの確認の得られたものを赤字で示した。

表Ⅲ. 2.4-5 免疫毒性評価遺伝子のまとめ

	5 chemicals	4 chemicals	3 chemicals	2 chemicals
樹状細胞	IL-8	C5AR1	CCL3	CCL15, 20
	PBEF1	CXCL3	CXCL2	CD55
		INHBA	HMOX1	CXCL10
		ZEB1	GADD45A	FOSL1
			HSPA4L	GADD45B
			IL-1β	SPA1A, 1B1, 1B, CB, D1, E1, H1
			IRAK2	IL-1α
			IRF1	LY9
			TNF	SLAMF7
			TNAIP2	S100A9
表皮細胞			TNFSP18	SOD2
				THBS1
				TREM1
			IL-8	GAAD45A
			HMOX1	HSPA6
			HSP1A	IL-1β, IL-6
				PBEF1
				TNF-α
				FAIM3
				HMOX1
T細胞 (発現増加)			CXCL3	IL-7R
			GADD45A	TXNIP
T細胞 (発現減少)	IFN-γ	IL-12β	CCL17	CCR1
	IL-4		CCL22	CD80
			IL-5	IL-10, 22
			IL-9	CTLA4
			LIF	CXCL10, 11
				INDO
				IRF8
			KLRC4	
			TBX21	

①-5. 免疫毒性評価遺伝子の決定

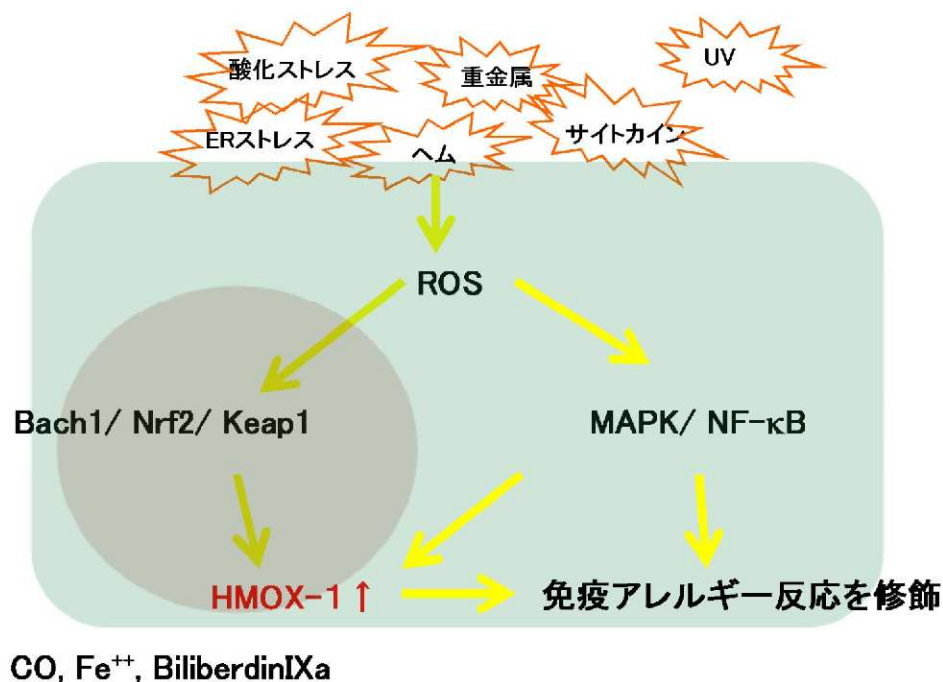
以上の各細胞種における免疫毒性評価候補遺伝子のなかから、多くの化学物質刺激において共通して発現が変化する遺伝子を免疫毒性評価遺伝子とし、それらを対象としてレポーターアッセイ系を構築することとした。樹状細胞に関しては、樹状細胞がT細胞を刺激する抗原提示において重要な役割を果たすことの知られているIL-1βと多くの化学物質刺激で共通して発現が増強するIL-8を評価遺伝子とした。上皮細胞に関しては、ストレス応答分子であり、同時に免疫系にも種々の影響を与えることが知られているHMOX1と表皮細胞においても3種類の化学物質で発現が増加したIL-8を評価遺伝子とした。T細胞に関しては、化学物質刺激で発現が抑制される遺伝子としてIL-4、IFN-γを評価遺伝子と特定した。また、以上の候補遺伝子に加えて、T細胞の活性の指標の一つとしてIL-2遺伝子を評価遺伝子に加えた(図Ⅲ. 2.4-11)。以上の結果を踏まえて、発光プローブ、発光細胞の樹立に着手した。



図III. 2.4-11 免疫毒性評価遺伝子

ちなみに、本研究開発において、評価遺伝子に選定したHMOX1 (heme oxygenase-1) は、ヘムを分解して抗酸化作用を発揮する分子であるが、同時に種々のストレスに反応して発現が誘導される、いわば、ストレスセンサーとも呼ばれる遺伝子である (図 III. 2. 4-12)。最近、このHMOX1に以下のような免疫作用が存在することが明らかとなり、免疫毒性評価遺伝子として最もふさわしい遺伝子の一つと考える。

- i) HMOX1が欠損するとサイトカイン反応はTh1にシフトする。HMOX1は早期の炎症反応を調節する。 (Kaptureczak MH, et al. Am J Pathol 165:1045-53, 2004)
- ii) IL-10の抗炎症作用は主にHMOX1の誘導とその産物であるCOが媒介している。 (Lee TS, Chau LY. Nat Med 8:240-6, 2002)
- iii) HMOX1が産生したCOはIL-2の産生を抑制しT細胞の増殖を抑制する。 (Pae HO, et al. J Immunol 172:4744-51, 2004)
- iv) COは抗CD 3抗体で刺激されたT細胞の増殖を著明に抑制する。 (Song R, et al. J Immunol 172:1220-6, 2004)
- v) TregではHMOX1が恒常的に発現している。 (Choi BM, et al. Biochem Biophys Res Commun 327:1066-71, 2005)



Alam J and Cook JL. How many transcription factors does it take to turn on the heme oxygenase-1 gene? Am J Respir Cell Mol Biol. 36(2):166-74, 2007

図III. 2.4-12 HMOX1は免疫アレルギー反応を修飾するstress responsive gene

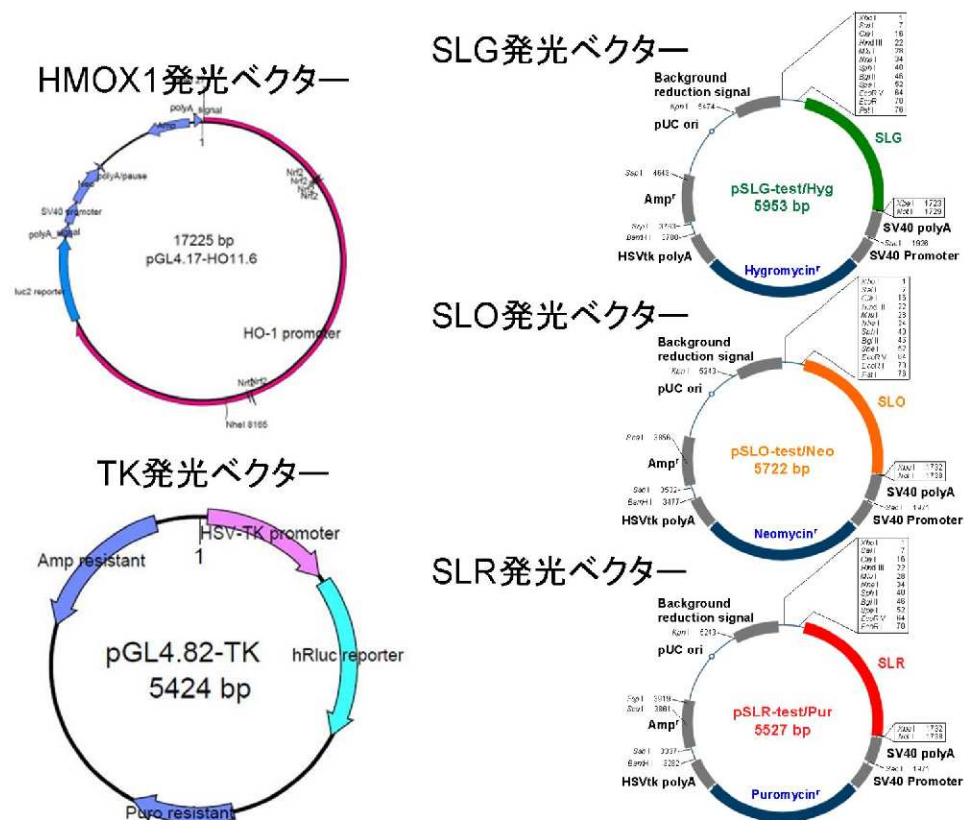
①-6. まとめ

プロジェクト中間期までに予定通りの研究成果を上げることができた。具体的には、免疫毒性を有する5種類の代表的化学物質である dinitrochlorobenzene (DNCB)、NiCl₂、ディーゼルエンジン排気微粒子(DEP)、ホルマリン、塩化水銀が、ヒト上皮細胞、樹状細胞、T細胞の遺伝子発現に及ぼす影響をDNA microarray、real-time PCRを用いて解析し、免疫毒性評価遺伝子を選定することができた。選定した評価遺伝子は、5種類の化学物質のうち複数の化学物質刺激で共通に遺伝子変動が誘導され、さらに、バイオインフォマティクスに基づく検討で免疫反応に重要な役割をはたしている遺伝子である。この一連の研究により、免疫毒性を有する化学物質それぞれが、免疫担当細胞を化学物質固有の pathway で刺激し、全く異なった免疫関連分子の発現変動を誘導するのではなく、異なった化学物質でもいくつかの共通した免疫関連分子の発現を誘導することが明らかとなった。この知見は、膨大な化学物質に由来する免疫毒性を比較的限られた指標で評価できることを示唆するもので、本プロジェクトの妥当性を支持する結果であった。

② 発光プローブの作成

本実験では、IL-1β、IL-8、IL-2、IL-4、IFN-γ、HMOA-1並びにデータ標準化のための内部標準遺伝子G3PDH、Thymidine kinase (TK) の計8遺伝子を用いてレポーターアッセイ系の構築を行った。MultiReporter Assay System -Tripluc[®]- (東洋紡績株式会社)においては、緑色発光ルシフェラーゼ (Green, 最大発光波長λ_{max} 550 nm)、橙色発光

ルシフェラーゼ (Orange, λ_{max} 580 nm)、赤色発光ルシフェラーゼ (Red, λ_{max} 630 nm) は全てD-ルシフェリンを基質とし、色分離測定によって一度の測定で最大3種類までのレポーター酵素の活性を測定することが可能である (Nakajima Y, et al. *Biotechniques* 38: 891-894, 2005)。また、樹状細胞と表皮細胞のいずれにおいても評価遺伝子として含まれる、HMOX1に関しては、その転写調節領域をクローニングしてルシフェラーゼ遺伝子 (Luc2) 発現ベクター pGL4.17 に遺伝子導入した。また、刺激のいかんに関わらず恒常的にルシフェラーゼを発現させる細胞を作成するため、thymidine kinase遺伝子の転写調節領域をルシフェラーゼ (hRluc) 発現ベクターpGL4.82に組み込んだpGL4.82-TKを作成した。図III.2.4-13に作成した発光プローブのgene mapを示す。



図III.2.4-13 免疫毒性評価細胞作成に用いたプラスミド

各遺伝子のプロモーター領域のクローニングを行うに当たり、各遺伝子の転写開始点をmRNA転写開始点データベースDBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/>) を用いて検索した。続いて、THP-1 由来ゲノムDNAからKOD-Plus- (IL-1 β およびIL-8: 東洋紡績株式会社)、また、Jurkat由来ゲノムDNAからKOD-Plus- (IL-2, IL-4 及びG3PDH: 東洋紡績株式会社) もしくはKOD-Plus-ver.2 (IFN- γ : 東洋紡績株式会社) を用いてPCRにより各遺伝子のプロモーター領域をクローニングした。続いて、クローニングした各遺伝子のプロモーター領域を、先に構築したルシフェラーゼ発現ベクターにライゲーションした。代表的な遺伝子に関して挿入部位と方法は以下に示す。

(A) IL-2→pSLG-test/Hyg^rに挿入 (IL-2 プロモーター-SLG)

制限酵素処理後、直接ベクターに挿入

挿入部位: *Mlu*I/*Xho*I

(B) IFN- γ →pSL0-test/Neo^rに挿入 (IFN- γ プロモーター-SL0)

Target Clone™ -PLUS- (東洋紡績株式会社) を用いて TA クローニング実施

TA クローニング後、制限酵素処理してベクターに挿入

挿入部位: *MluI/SaII*

(C) G3PDH→pSLR-test/Pur^rに挿入 (G3PDH プロモーター-SLR)

制限酵素処理後、直接ベクターに挿入

挿入部位: *MluI/EcoRI*

構築した各プラスミドは、3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて挿入部位の 5' 及び 3' 領域のシーケンス解析を行い、目的配列の挿入を確認した。最終的に構築できた発光ベクターのまとめを表III.2.4-6 に示す。

表III. 2.4-6 発光ベクターまとめ

評価遺伝子	プロモーター領域	ルシフェラーゼ
G3PDH	-1373~ +128	SLR
IL-2	-3006~ +286	SLG
IL-4	-4855~ +65	SLG
IFN- γ	-4971~ +111	SLO
IL-8	-5059~ +144	SLO
IL-1 β	-5006~ +56	SLG
HMOX1	-3300~ ?	luc2
Thymidine kinase	市販	hRluc

③発光細胞の開発、免疫毒性評価細胞の樹立、応答性の確認

③-1 遺伝子導入ならびに免疫毒性評価細胞の樹立

安定株を作製するにあたり、ホスト細胞としてヒト T 細胞株 Jurkat、単球由来細胞株 U937、THP-1 (ATCC, Manassas, VA, USA) を使用した。生育培地 (Jurkat growth medium) には、抗生物質 (Antibiotic-Antimycotic; Invitrogen)、10% ウシ胎仔血清 (HyClone™ fetal calf serum; Thermo Fisher Scientific) を含む基礎培地 RPMI-1640 (Invitrogen) を用い、37°C、5% CO₂ の条件下で培養した。また、遺伝子導入後の薬剤選択条件は以下のように行った。まず、一次選択で薬剤存在下に 1 週間培養し、二次選択培養で、一次選択培養で生存した細胞を 96 ウェル細胞培養用プレートに 1 cell/ウェルで播種した後に、同薬剤存在下に 2 週間培養した。また二次選択培養後、シグナル強度及び薬剤処理によるシグナル誘導の 2 点からクローニング選択を行った。

具体的には、Jurkat 細胞への遺伝子導入は、細胞 5.2×10^5 個に対し、1 μ g のプラスミドを用いた。また導入試薬には SuperFect (Qiagen) を使用した。遺伝子導入の際には前日に 2×10^5 cells/ml で継代した細胞を使用した。遺伝子導入は、最初に内部標準である G3PDH プロモーター-SLR を前述の手順で導入し、選択抗生剤 0.15 μ g/ml puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いてシグナル強度が良好な一色安定株#14D1 を樹

立した。続いて、#14D1 を親株として IFN- γ プロモーター-SLO を同様に導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ G418 (ナカライテスク, 京都) を用いて 2 色安定株#2B12 を樹立した。続いて、#2B12 を親株として IL-2 プロモーター-SLG を同様に導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin、300 $\mu\text{g/ml}$ G418、及び 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin (InvivoGen) を用いて 3 色安定株#2H4 を樹立した (特許出願中: 出願番号 2010-151362, 出願日 2010 年 7 月 1 日)。なお、樹立した安定細胞株#2H4 は、3730 DNA Analyzer を用いてシーケンス解析を行い、各プラスミドがゲノム DNA に挿入されていることを確認した。

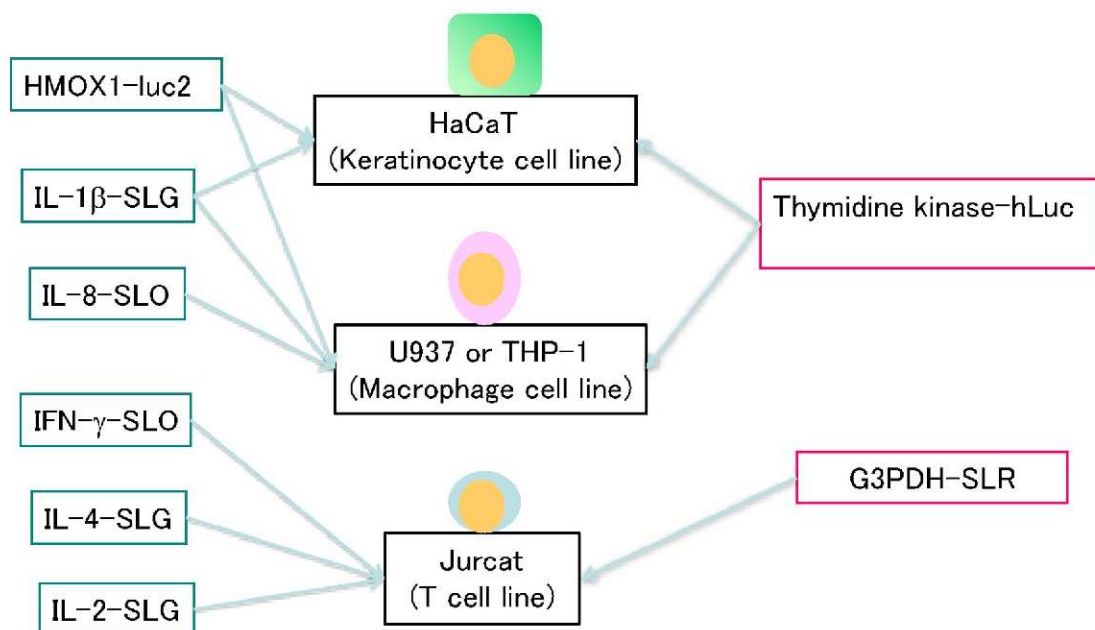
U937 細胞への遺伝子導入は、細胞 1.0×10^6 個に対し、1 μg のプラスミドを用い、導入試薬には SuperFect (Qiagen) を使用した。遺伝子導入の際には前日に 2×10^5 cells/ml で継代した細胞を使用し、遺伝子導入は、最初に内部標準である G3PDH プロモーター-SLR を前述の手順で導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いてシグナル強度が良好な一色安定株#9A5 を樹立した。続いて、#9A5 を親株として IL-8 プロモーター-SLO を同様に導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ G418 (ナカライテスク, 京都) を用いて 2 色安定株を樹立した。続いて、得られた 2 色安定株を親株として IL-1 β プロモーター-SLG を同様に導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin、300 $\mu\text{g/ml}$ G418、及び 200 $\mu\text{g/ml}$ hygromycin (InvivoGen) を用いて 3 色安定株#6C12 を樹立した (特許出願中: 出願番号 2010-151362, 出願日 2010 年 7 月 1 日)。なお、樹立した安定細胞株#6C12 は、3730 DNA Analyzer を用いてシーケンス解析を行い、各プラスミドがゲノム DNA に挿入されていることを確認した。(より反応性の高い安定株を得るため、再度 96 ウェル細胞培養用プレートにて選択培養を行い、#7A9 を樹立した。)

THP-1 細胞への遺伝子導入は、細胞 1.0×10^6 個に対し、1 μg のプラスミドを用い、導入試薬には Nucleofector (Lonza) を使用した。遺伝子導入の際には 2 日前に 2×10^5 cells/ml で継代した細胞を使用し、遺伝子導入は、最初に内部標準である G3PDH プロモーター-SLR を electroporation で導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いてシグナル強度が良好な一色安定株 TGC17 を樹立した。続いて、TGC17 を親株として IL-8 プロモーター-SLO を electroporation にて導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ G418 (ナカライテスク, 京都) を用いて 2 色安定株 THP-G8 を樹立した。なお、樹立した安定細胞株 THP-G8 は、3730 DNA Analyzer を用いてシーケンス解析を行い、各プラスミドがゲノム DNA に挿入されていることを確認した。

HaCaT 細胞、U937 細胞への HMOX1 および TK 遺伝子導入は、細胞 1.0×10^6 個に対し、1 μg のプラスミドを用い、導入試薬には Nucleofector (Lonza) を使用した。遺伝子導入の際には 2 日前に 2×10^5 cells/ml で継代した細胞を使用し、遺伝子導入は、最初に内部標準である TK プロモーター-hRluc を electroporation で導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin (InvivoGen, San Diego, CA, USA) を用いてシグナル強度が良好な一色安定株を樹立した。続いて、同細胞を親株として HMOX1 プロモーター-Luc2 を同様に electroporation を用いて導入し、選択抗生剤 0.15 $\mu\text{g/ml}$ puromycin 及び 300 $\mu\text{g/ml}$ G418 (ナカライテスク, 京都) を用いて 2 色安定株#HR38H6 と#UR2H4117 を樹立した。発現ベクターと導入細胞との組み合わせを図 III.2.4-14 に、また、これまで樹立した細胞

の一覧を表III.2.4-7 に示す。

候補遺伝子プロモーター下流にluc2, SLG, SLO、また、internal controlとしてthymidine kinaseあるいはG3PDH下流にhLuc, SLRを導入した発光細胞を作成した。



図III. 2.4-14 発光プローブならびに発光細胞の開発

表III. 2.4-7 これまでに樹立した主な免疫毒性評価細胞

親細胞		導入遺伝子			作製主担当	備考
		SLR	SLG	SLO		
Jurkat細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	TOYOBO、東北大	#14D1
	2色細胞	G3PDH	IL4	-	TOYOBO、東北大	#4A4
	3色細胞	G3PDH	-	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12
	3色細胞	G3PDH	IL4	IFN γ	TOYOBO、東北大	#10C8
U937細胞	3色細胞	G3PDH	IL2	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12、#2F12、#2H4、#2A12、#2A5、#7C2、#8D5
	1色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	TOYOBO、AIST	#UGA12、#9A6
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	TOYOBO、AIST	#4D5、#6C12、#7A9
THP-1細胞	1色細胞	TK	-	-	東北大	#UR2
	2色細胞	TK	HO-1	-	東北大	#UR2H4117
	1色細胞	G3PDH	-	-	AIST、東北大	#TGC17
	1色細胞	G3PDH	-	-	東北大	#TGC17
	2色細胞	G3PDH	IL1 β	-	東北大	#TGC17bA16.19
HaCaT細胞	2色細胞	G3PDH	-	IL8	東北大	#TGC17EA01(THP-G8)
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	東北大	#TGC17bA16EA140-5 (THP-G18)
	1色細胞	TK	-	-	東北大	#HR38H6

③-2 樹立した評価細胞の性状解析: 培養細胞の品質検査 (依頼先: 財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所)

樹立した各培養細胞の品質検査について、財団法人 食品薬品安全センター秦野研究所にマイコプラズマ汚染検査及び細胞増殖性試験を依頼し解析を行った。なお、依頼詳細及び結果は以下の通りである (秦野研究所最終報告書より抜粋、一部改変)。

1) 試験目的

本試験は培養細胞（導入親株 Jurkat、U937、THP-1、HaCaT 計4種類、樹立細胞株 THP-1#THP-G8、HaCaT#HR38H6、Jurkat_3 色細胞株#2H4、#11C7、U937_3 色細胞株#4D5、#6c12 計6種類）の品質検査を目的として行った。即ち、全ての細胞株についてマイコプラズマ汚染検査を行い、5細胞株（THP-1#THP-G8、Jurkat_3 色細胞株#2H4、#11C7、U937_3 色細胞株#4D5、#6c12）については細胞増殖性試験も合わせて行った。

2) 試験ガイドライン

本試験のマイコプラズマ汚染検査は「バイオテクノロジー応用医薬品/細胞起源医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験、第十五改正日本薬局方」を参考にして実施した。

3) マイコプラズマ汚染検査

i) 培養上清の調整と指標細胞への添加

抗生剤・抗菌剤を含まない培地で6日間継代培養した被験細胞を、さらに4日間培地交換や継代せずに培養して培養上清を調整し、その上清を指標細胞に添加して4日間培地交換や継代せずに培養し、指標細胞上でマイコプラズマを増殖させた。

ii) 検査方法

その後、DNA染色法、PCR法にてマイコプラズマの感染の有無を検討した。

iii) 結果

ヘキスト染色標本の観察結果を表Ⅲ.2.4-8に示した。陰性対照、THP-1、HaCaT、THP-1#THP-G8、HaCaT#HR38H6、Jurkat_3 色細胞株#2H4、#11C7の培養上清を添加したウェルでは観察した1000細胞中に細胞核を囲むような微小な核外蛍光斑点が観察された細胞はなかった。U937の培養上清を添加したウェルでは1細胞（0.1%）に蛍光斑点が観察されたものの、陽性判定基準である0.5%以下であったことから、デブリスや微小核などがマイコプラズマ様に見えるアーティファクトであると判断された。一方、Jurkatの培養上清を添加したウェルでは、観察した1000細胞の全てに核外蛍光斑点が観察され、斑点の形状とサイズからもマイコプラズマ汚染が疑われた。U937_3 色細胞株#4D5、#6c12の培養上清を添加したウェルでは、核外蛍光斑点が観察された細胞の頻度がそれぞれ0.6%と1.1%であり、陽性判定基準（0.5%）を超えていたが、斑点の形状とサイズから、死細胞由来のデブリスが混入したものと考えられた。

陽性対照細胞（NCC-IT-A3）の培養上清を添加したウェルでは、観察した1000細胞中の242細胞に核を囲むように微小な核外蛍光斑点が認められた。

PCR法のゲルの観察結果を表Ⅲ.2.4-9に示した。陰性対照、THP-1、HaCaT、U937、THP-1#THP-G8、HaCaT#HR38H6、Jurkat_3 色細胞株#2H4、#11C7、U937_3 色細胞株#4D5及び#6c12の培養上清を添加したウェルには、200-500塩基対のサイズにPCR産物は認められなかったものの、Jurkat及び陽性対照細胞の培養上清を添加したウェルでは、それぞれの両方のウェルで200-500塩基対のサイズにPCR産物が認められた。

以上の結果より、U937、THP-1、HaCaT、THP-1#THP-G8、HaCaT#HR38H6、Jurkat_3 色

細胞株#2H4、#11C7 は DNA 染色法と PCR 法の両方で陰性であり、U937_3 色細胞株#4D5 及び#6c12 は DNA 染色法で偽陽性、PCR 法で陰性であったことから、マイコプラズマに汚染していないことが示されたものの、Jurkat は両方の方法で陽性であったことから、マイコプラズマに汚染していることが示された。幸い、Jurkat 細胞由来#2H4、#11C7 に関しては汚染が認められなかったが、その理由として遺伝子導入後のセレクションに用いた種々の抗生剤によりマイコプラズマが除染されたものと推測される。

陽性対照細胞は DNA 染色法と PCR 法の両方で陽性の結果が得られたこと、PCR 法においては鋳型 DNA の代わりに局方注射用水を加えた群は陰性であり、試薬などの汚染に由来するものではないことが示されたことから、本試験条件下で正しくマイコプラズマが検出できているものと判断される。

表Ⅲ. 2. 4-8 被験細胞の DNA 染色法によるマイコプラズマ汚染検査

検体名	陽性細胞数 ¹⁾ /観察数			判定 ²⁾
	ウェル 1	ウェル 2	合計	
陰性対照	0/500	0/500	0/1000	-
Jurkat	500/500	500/500	1000/1000	+
U937	1/500	0/500	1/1000	-
THP-1	0/500	0/500	0/1000	-
HaCaT	0/500	0/500	0/1000	-
THP-1 #TGC17EA01	0/500	0/500	0/1000	-
HaCaT #HR38H6	0/500	0/500	0/1000	-
Jurkat 3 色細胞 #2H4	0/500	0/500	0/1000	-
Jurkat 3 色細胞 #11C7	0/500	0/500	0/1000	-
U937 3 色細胞 #4D5	4/500	2/500	6/1000	+*
U937 3 色細胞 #6C12	5/500	6/500	11/1000	+*
陽性対照 (NCC-IT-A3)	113/500	129/500	242/1000	+

1) 細胞核を囲むような微小な核外蛍光斑点が観察された細胞の数

2) 陽性細胞数が 0.5%以上観察された場合を+ (陽性) とした

*: 核外蛍光斑点の形状とサイズから、死細胞などに由来するデブリと考えられた

表Ⅲ. 2. 4-9 被験細胞の PCR 法によるマイコプラズマ汚染検査

検体名	200 - 500 塩基対の PCR 産物の有無	
	ウェル 1	ウェル 2
陰性対照	-	-
Jurkat	+	+
U937	-	-
THP-1	-	-
HaCaT	-	-
THP-1 #TGC17EA01	-	-
Jurkat 3 色細胞 #2H4	-	-
Jurkat 3 色細胞 #11C7	-	-
U937 3 色細胞 #4D5	-	-
U937 3 色細胞 #6C12	-	-
HaCaT #HR38H6	-	-
陽性対照 (NCC-IT-A3)	+	+

4) 細胞増殖性試験

Jurkat_3 色細胞#2H4 の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日の 25.7 時間と播種後 2~3 日の 29.3 時間を平均した 27.5 時間とした。Jurkat_3 色細胞#11C7 の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日の 25.5 時間と播種後 2~3 日の 27.7 時間を平均した 26.6 時間とした。U937_3 色細胞#4D5 は解凍後の細胞増殖の回復が遅かったものの、対数増殖期に入った播種後 4~5 日の 19.8 時間と播種後 5~6 日の 23.1 時間を平均した 21.5 時間とした。U937_3 色細胞#6c12 の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日の 25.3 時間、播種後 2~3 日の 36.3 時間及び播種後 3~4 日の 27.2 時間を平均した 29.6 時間とした。THP-1#THP-G8 の細胞倍加時間は、播種後 1~2 日では 21.7 時間、播種後 2~3 日では 55.1 時間、播種後 3~4 日では 38.3 時間であった。

③-3 培養細胞の塩基配列解析 (依頼先: 東洋紡バイオロジックス株式会社)

樹立した各培養細胞の配列解析について、東洋紡バイオロジックス株式会社にシーケンスを依頼し、導入配列の解析を行った。

1) 解析目的

本プロジェクトで樹立した各培養細胞 (Jurkat_3 色細胞株#2H4、THP-1#THP-G8、U937_3 色細胞株#6C12、HaCaT#HR38H6) の配列解析を目的として行った。Jurkat_3 色細

胞株#2H4、THP-1#THP-G8、U937_3色細胞株#6c12の3細胞株においては、ゲノム上に挿入されている領域を確認するため、導入ベクター全長を解析対象とし、両鎖配列解析を実施した。またHaCaT#HR38H6においては、ベクターに組み込んだ導入配列（プロモーター領域）の前後を解析対象とし、両鎖配列解析を実施した。

2) 材料と方法

1) 被験細胞

被験細胞4種類の細胞ペレット（ 1×10^6 細胞を2本）は冷凍宅配便により、東北大学病院もしくは東洋紡績敦賀バイオ研究所から東洋紡バイオロジックス株式会社に送付した。被験細胞は使用するまで -70°C 以下で冷凍保管した。

2) 方法

i) 被験細胞のDNA抽出

PCR法を用いて目的領域を増幅するため、被験細胞からのゲノムDNA抽出を行った。ゲノムDNA抽出にはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用し、添付プロトコールに従って抽出を行い、鋳型DNAとして用いた。

ii) PCR及びシーケンス

配列解析に先立ち、増幅領域が約500~600 bpとなるようにPCR及びシーケンスのプライマーを解析全領域にわたって設定し、シグマジエノシスに合成を依頼した。合成したプライマー及びi)で得られた鋳型DNAを用いて、PCRによる目的領域の増幅を行った。また、PCRはKOD FX (TOYOBO) を使用し、添付プロトコールに従って増幅を行った。得られた増幅産物はMagExtractor™ -PCR&Gel Clean up- (TOYOBO) を用い精製を行いシーケンスサンプルとした。シーケンスにはBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 及び3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いて行った。

3) 配列解析結果

i) Jurkat_3色細胞#2H4

本細胞株にはIL-2/pSLG、IFN- γ /pSLO及びG3PDH/pSLRの3遺伝子が導入されている。概要を以下に示す。

IL-2/pSLGでは、polyA配列によりシーケンス困難な部分が存在したものの、目的配列は全て入っているものと考えられた。従ってluc遺伝子 (SLG) と連結している、連続したIL-2プロモーター領域の長さは約3 kbpであると考えられた。IFN- γ /pSLOにおいても、polyT配列により部分的に配列解析が行えない部分が存在したものの、IL-2と同様に目的配列は全て入っているものと考えられた。従ってluc遺伝子 (SLO) と連結している連続したIFN- γ プロモーター領域の長さは約5 kbpであると考えられる。G3PDH/pSLRでは、PCR法による目的産物の増幅を行った結果、G3PDHプロモーター領域として導入した-1100~-500 bp付近でPCR法を用いた目的産物の増幅を行うことができず、ゲノム上での遺伝子の分断の可能性があると考えられた。それ以外の領域では目的配列が全て入っていることが確認された。従ってluc遺伝子 (SLR) と連結している

連続したG3PDHプロモーター領域の長さは約500 bpと推測された。

ii) THP-1#THP-G8

本細胞株にはIL-8/pSLO及びG3PDH/pSLRの2遺伝子が導入されている。概要を以下に示す。

IL-8/pSLOでは、polyT配列によりシーケンス困難な部分が存在した。また、PCR法による目的産物の増幅を行った結果、-2.6 kbp~-1.5 kbp付近において目的産物の増幅を行うことができず、ゲノム上での遺伝子の分断の可能性があると考えられた。この結果より、luc遺伝子 (SLO) と連結している、連続したIL-8プロモーター領域の長さは約500 bpであった。G3PDH/pSLRでは、配列解析中に複数シグナルが存在したものの、目的配列は全て入っているものと考えられた。従ってluc遺伝子 (SLR) と連結している、連続したG3PDHプロモーター領域の長さは約1.5 kbpであると考えられた。

iii) U937_3色細胞#6C12

本細胞株にはIL-1 β /pSLG、IL-8/pSLO及びG3PDH/pSLRの3遺伝子が導入されている。概要を以下に示す。

IL-1 β /pSLGでは、polyA配列によるシーケンス解析不可部分、また複数シグナルが存在したものの、基本的には目的配列は全て入っているものと考えられた。従ってluc遺伝子 (SLG) と連結している、連続したIL-1 β プロモーター領域の長さは約5 kbpであった。IL-8/pSLOにおいては、polyT配列によりシーケンス困難な部分が存在した。また、PCR法による目的産物の増幅を行った結果、-2.6 kbp~-1.5 kbp付近において目的産物の増幅を行うことができず、ゲノム上での遺伝子の分断の可能性があると考えられた。この結果より、luc遺伝子 (SLO) と連結している、連続したIL-8プロモーター領域の長さは約1.5 kbpであった。G3PDH/pSLRでは、配列解析中に複数シグナルが存在したものの、目的配列は全て入っているものと考えられた。従ってluc遺伝子 (SLR) と連結している、連続したG3PDHプロモーター領域の長さは約1.5 kbpであると考えられた。

iv) HaCaT#HR38H6

本細胞株にはHMOX1-Firefly及びTK-Renillaの2遺伝子が導入されている。概要を以下に示す。

HMOX1-Fireflyでは、GC rich、AT rich、TGリピート配列等や複数シグナル領域が存在した。また、途中の-4.8~-3.3 kbp付近 (約1.5 kbp) の配列が欠損していることに加え、当該部分に350 bpの挿入配列が確認された。この結果より、luc遺伝子 (Firefly) と連結している、連続したHMOX1プロモーター領域の長さは約3.3 kbpであった。TK-Renillaでは、導入した目的配列は全て入っていることが確認された。従ってluc遺伝子 (Renilla) と連結している、連続したTKプロモーター領域の長さは740 bpであった。

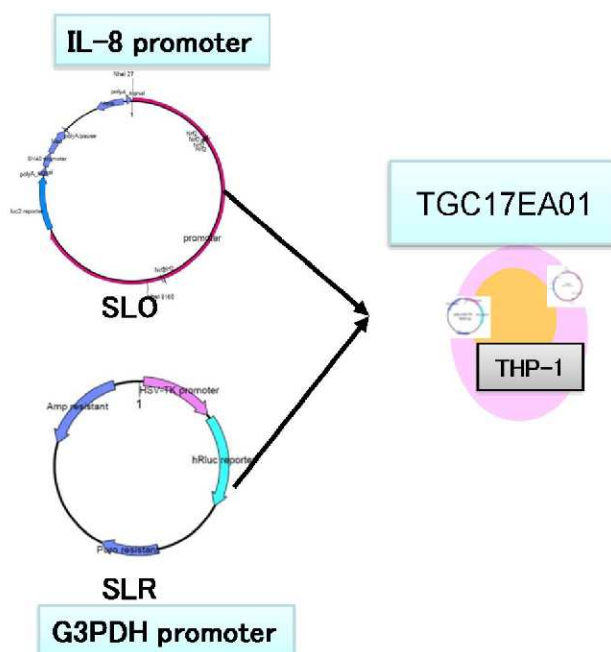
③-4 THP-G8細胞の安定性

THP-G8 細胞に関しては、凍結細胞を解凍、培養開始からの安定性を抗生物質のあるなしで経時的に検討した。その結果、抗生物質存在下に培養した際には、少なくとも6週間は、LPS に対する反応性の低下は認められないことが明らかとなり、THP-G8 細胞の安定性が証明された。

③-5 評価細胞の応答性の確認

③-5-1 IL-8 評価細胞の応答性の検討

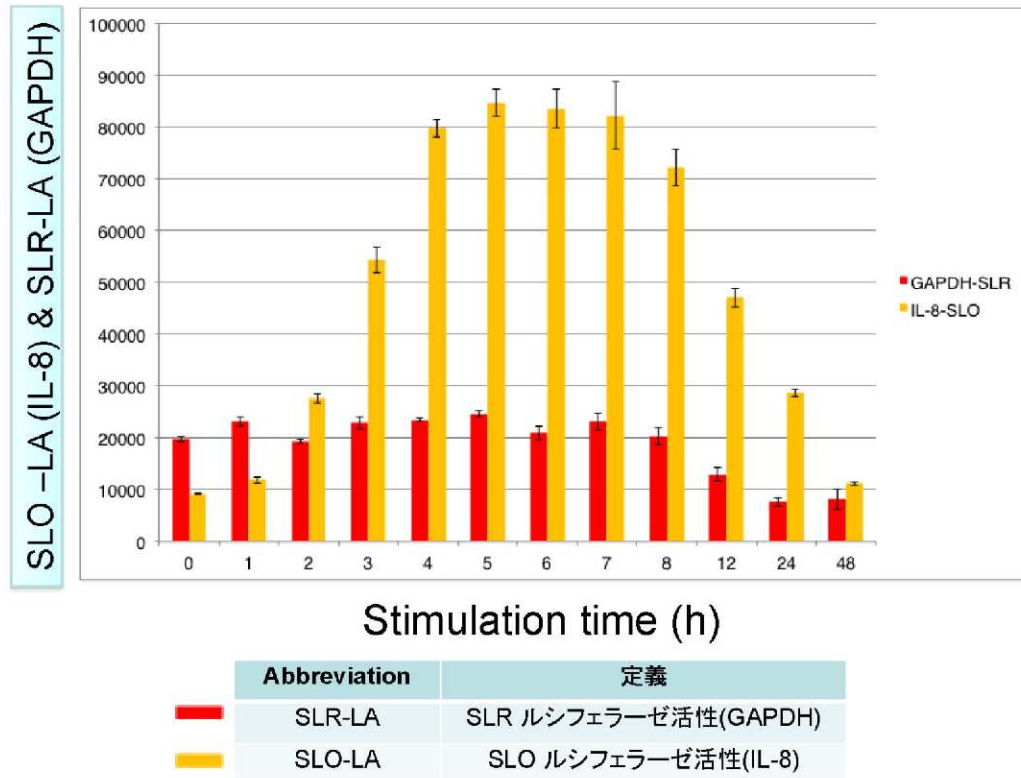
本プロジェクトにおいては、IL-8 レポーター細胞 THP-G8 を樹立することができた (図 III.2.4-15)。



図III. 2.4-15 IL-8レポーター細胞 (THP-G8)

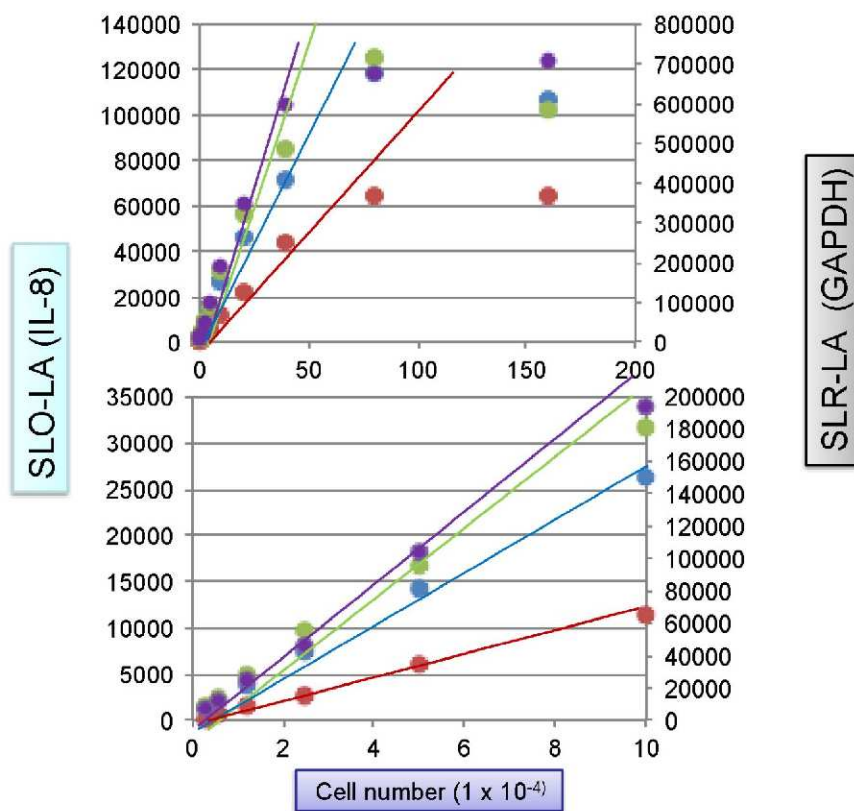
そこで、この細胞が、代表的な IL-8 産生刺激である lipopolysaccharide (LPS) に対して、レポーター活性を増強させるか否かを検討した。測定方法は、Tripluc® luciferase assay reagent (TOYOBO)を使用し Phelios (Atto Co. Tokyo, Japan)の multi-color detection system により行った。まず、THP-G8 細胞を 96 well multiplate に 2×10^4 cells/well で播種し、LPS 刺激後経時的に IL-8 レポーター活性を SLO ルシフェラーゼの活性を測定することにより評価した。その結果、LPS 刺激後2時間目から SLO ルシフェラーゼ活性 (以後 SLO-LA) は増加し、24 時間目まで未刺激に比較して高値を示した。その間、4 時間目から 8 時間目の間に最も高い SLO-LA が認められ、ほぼ一定の値で推移した。この結果を踏まえて、THP-G8 を刺激し SLO-LA を測定する際の刺激時間を 6 時間に設定した。この細胞には IL-8 発光ベクター以外に GAPDH 発光ベクターも遺伝子導入されており GAPDH レポーター活性も SLR ルシフェラーゼ活性(以後 SLR-LA)として定量可能である。GAPDH は多くの場合、細胞にいかなる刺激が加わってもほぼ一定の発現レベルが保たれていることが知られている遺伝子であり、GAPDH の発現量は細胞数に相関するといわれている。実際、THP-G8 細胞に LPS 刺激を加

えても IL-8 レポーター活性の指標である SLO-LA と異なり、GAPDH レポーター活性の指標である SLR-LA には変動が認められなかった。このことは、SLR-LA が内因性コントロールとして機能し、およそその細胞数の指標となることを示唆している (図III.2.4-16)。



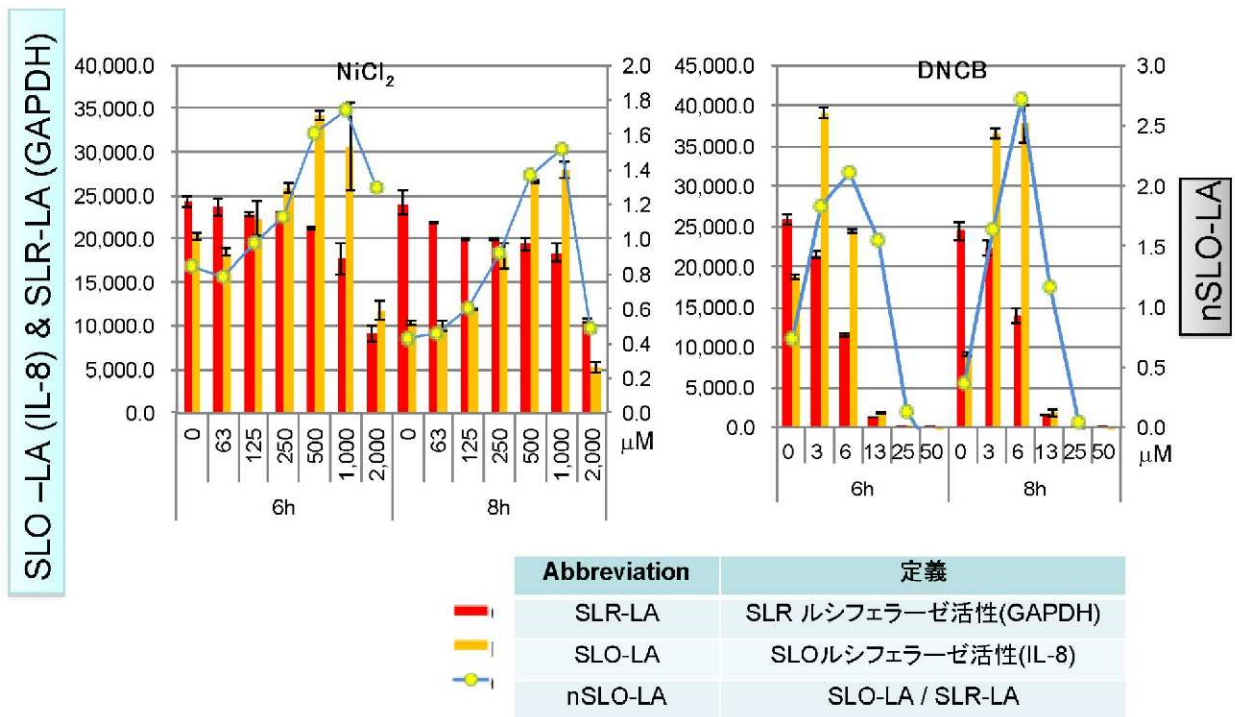
図III. 2.4-16 THP-G8細胞のLPSに対する応答性

次に、96-well multiplate に播種する THP-G8 細胞の量を 0.5×10^4 から 1.6×10^6 cells/well の範囲で変化させてルシフェラーゼ活性の変動を観察した。その結果、 1.25×10^4 から 2×10^5 cells/well の範囲で細胞数と SLO および SLR ルシフェラーゼ活性との間には直線的相関が認められた (図III.2.4-17)。この結果をもとに以降の実験では、播種する細胞数を 5×10^4 cells/well に決定した。



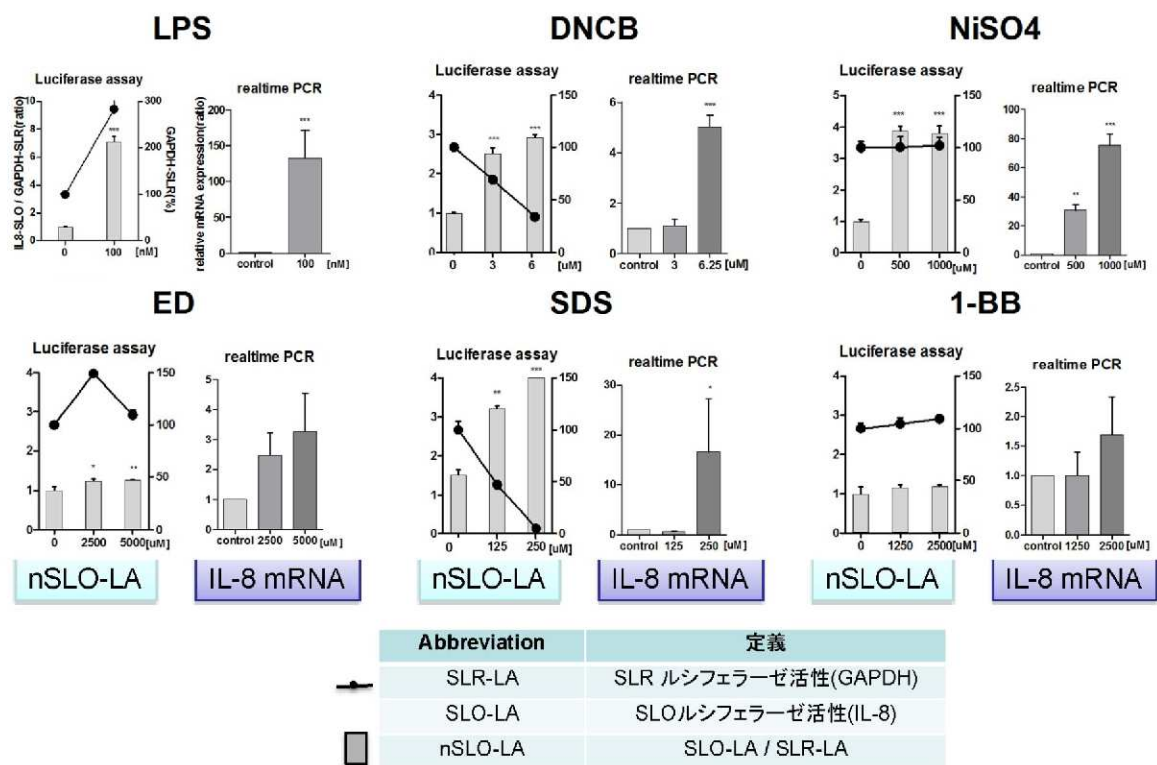
図Ⅲ.2.4-17 THP-G8細胞の至適播種細胞数の決定

また、刺激を代表的ハプテンである NiCl_2 と DNCB に変更し、刺激物質の濃度、刺激時間を変えて THP-G8 細胞の反応性を検討した。その結果、この細胞が、ハプテンに対して濃度依存性、また、刺激6ないし8時間目に SLO-LA を増加させることが明らかとなった。特に DNCB 刺激から明らかになったこととして、細胞毒性のある化学物質刺激に際しては、単なる SLO-LA ではなく、SLO-LA を SLR-LA で補正した活性(nSLO-LA)がより忠実に細胞の IL-8 レポーター活性の指標となることが明らかとなった (図Ⅲ.2.4-18)。



図III. 2.4-18 THP-G8細胞のDNCBおよびNiCl₂に対する応答性

最後に、化学物質刺激後の THP-G8 細胞の IL-8 レポーター活性と同様の刺激を加えた後の THP-1 細胞の IL-8 mRNA との相関性を検討した。その結果、LPS、ハプテンである DNCB、NiCl₂、および非感作性物質 1-BB の刺激に対して、nSLO-LA の値は、定量的 real-time PCR で測定した IL-8 mRNA の値と正の相関を示した (図III.2.4-19)。

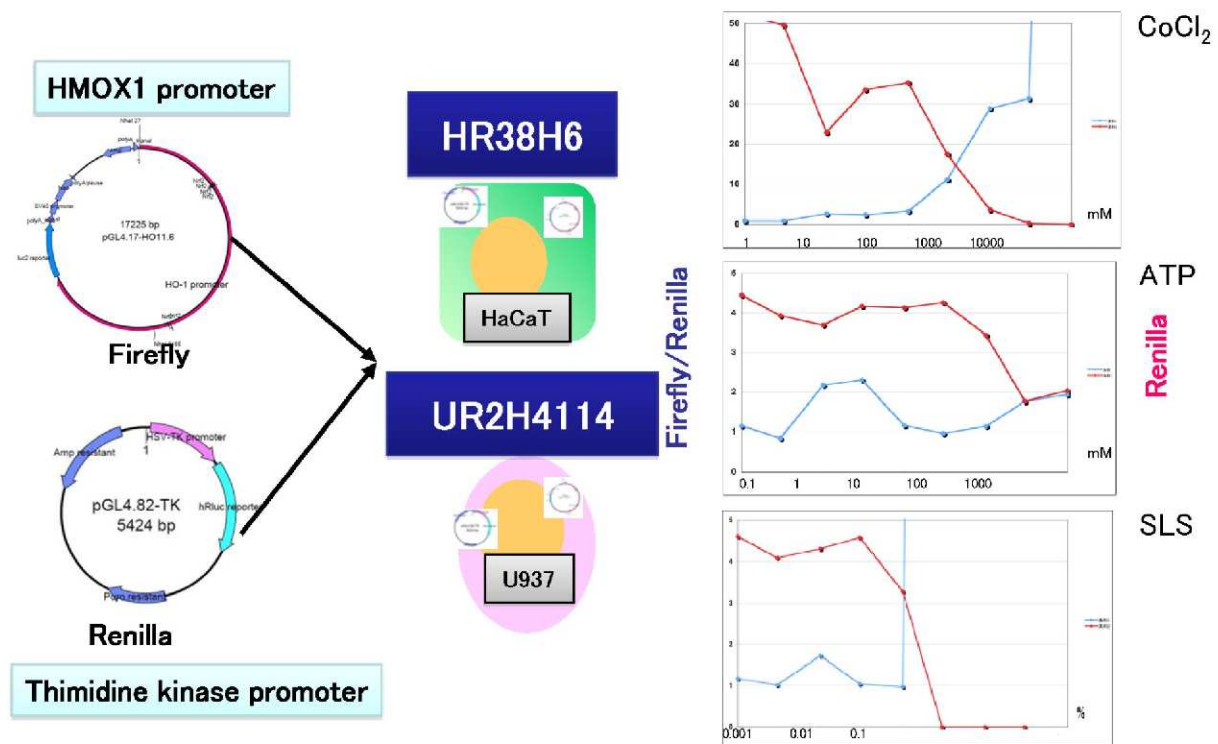


図III. 2.4-19 化学物質刺激後のTHP-G8細胞IL-8レポーター活性とIL-8mRNA発現との相関

以上より、THP-G8 細胞は、IL-8 の転写活性を簡便かつ短時間に測定できる有用な細胞であることが明らかとなった。

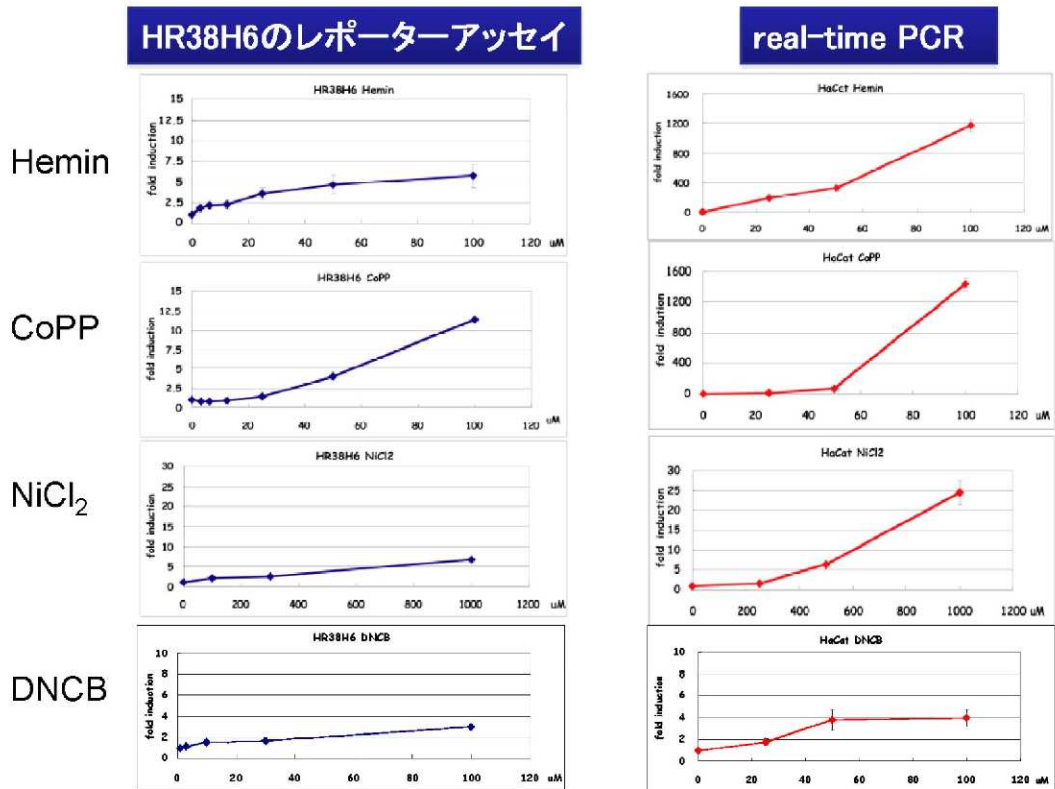
③-5-2 HMOX1評価細胞の反応性の検討

本研究において、まず、HMOX1に関する発光プローブをU937細胞、HaCat細胞に導入したHMOX1レポーター細胞、UR2H4114 (U937由来)、HR38H6(HaCat由来)を樹立した(いずれもクローニングが完了し、長期培養が可能であることを確認済み)(図III. 2. 4-20)。

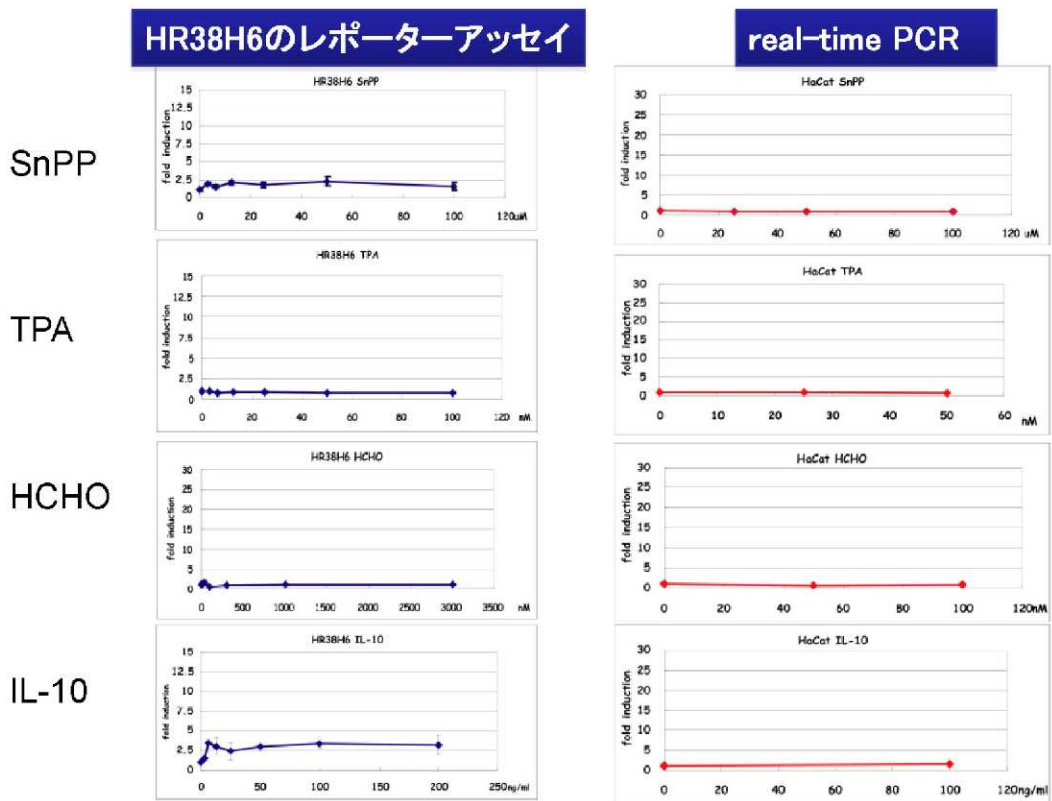


図Ⅲ. 2.4-20 HMOX1レポーター細胞株の樹立

次に、樹立したHMOX1レポーター細胞に種々の化学物質を作用させ反応性を検討したところ、代表的HMOX1誘導物質であるCoproporphyrin、Heminに加えて、酸化ストレスを誘導するH₂O₂、DEP、ER ストレスを誘導するthapsigargin、tunicamycin、dithiothreitol、低酸素ストレスを誘導するCoCl₂、接触皮膚炎の原因物質であるDNCB、NiCl₂などに幅広く反応してルシフェラーゼ活性の増加が検出された(図Ⅲ. 2.4-21)(表Ⅲ. 2.4-10)。一方、Sn protoporphyrin (SnPP)、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)、ホルマリン(HCHO)、IL-10、細胞内に多量に含まれ、細胞が壊死すると周囲に放出され免疫系を賦活することが知られているATPや、界面活性剤であるsodium lauryl sulfateなどではルシフェラーゼ活性は変化しなかった(図Ⅲ. 2.4-22)(表Ⅲ. 2.4-10)。また、それらが実際の化学物質処理後のHMOX1 mRNAの誘導とも相関していることを化学物質処理後の細胞からmRNAを抽出し、その中に含まれるHMOX1 mRNAをreal-time PCRで定量することにより確認した。さらに、2種類のHMOX1レポーター細胞であるUR2H4114とHR38H6では、一部の化学物質に対する反応を除いては同様の反応性を示した(表Ⅲ. 2.4-10)。



図III. 2.4-21 HMOX1レポーターアッセイとreal-time PCRとの比較(1)



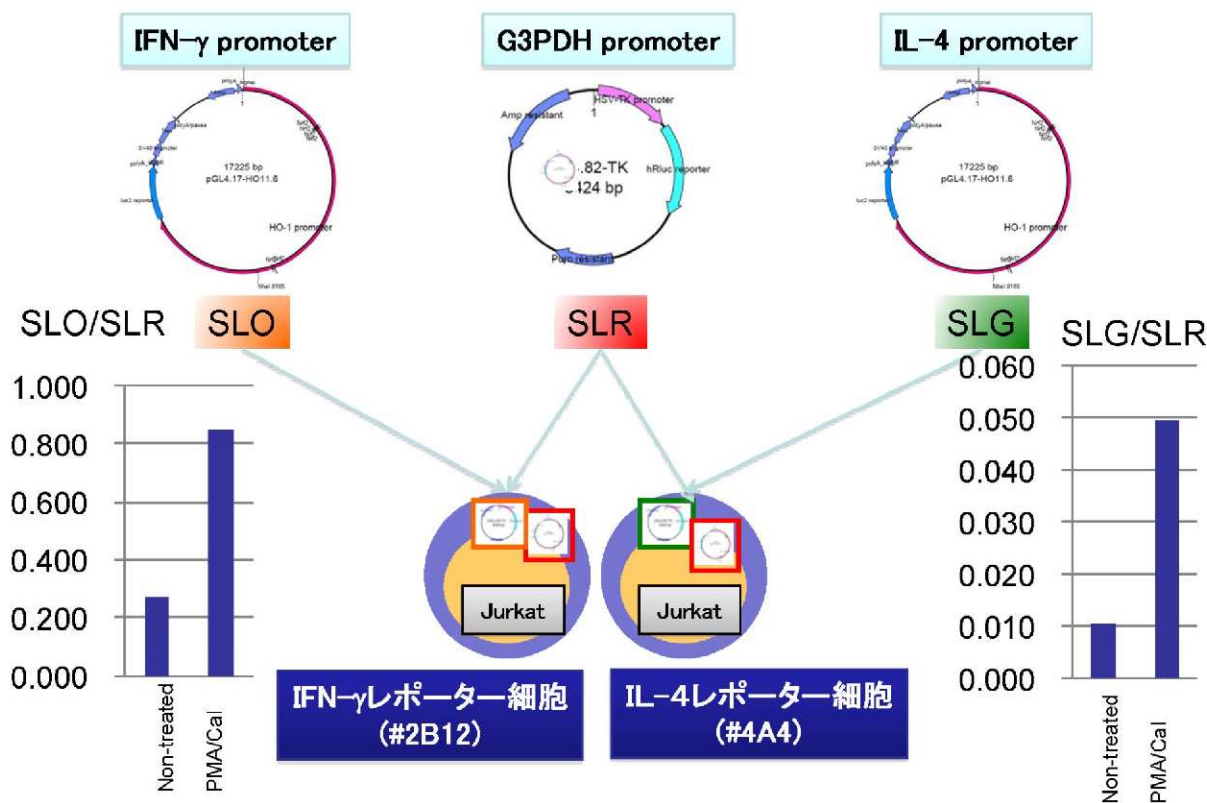
図III. 2.4-22 HMOX1レポーターアッセイとreal-time PCRとの比較(2)

表III. 2.4-10 HMOX1 レポーターアッセイのまとめ

ストレス、免疫疾患	Chemicals	HR38H6	UR2H4114
Heme関連	CoPP	+	+
Heme関連	Hemin	+	+
活性酸素ストレス	H ₂ O ₂	+	+
活性酸素ストレス, アトピー性疾患	DEP	+	+
金属アレルギー, 接触皮膚炎	NiCl ₂	+	+
活性酸素ストレス, 接触皮膚炎	DNCB	+	+
アトピー性疾患, シックハウス症候群	HCHO	-	+
小胞体ストレス	Thapsigargin	+	+
小胞体ストレス	Tunicamycin	+	+
小胞体ストレス	DTT	+	+
低酸素ストレス, 接触皮膚炎	CoCl ₂	+	+
Danger signal	ATP	-	n.d
界面活性剤	SLS	-	n.d
溶剤	DMSO	-	-

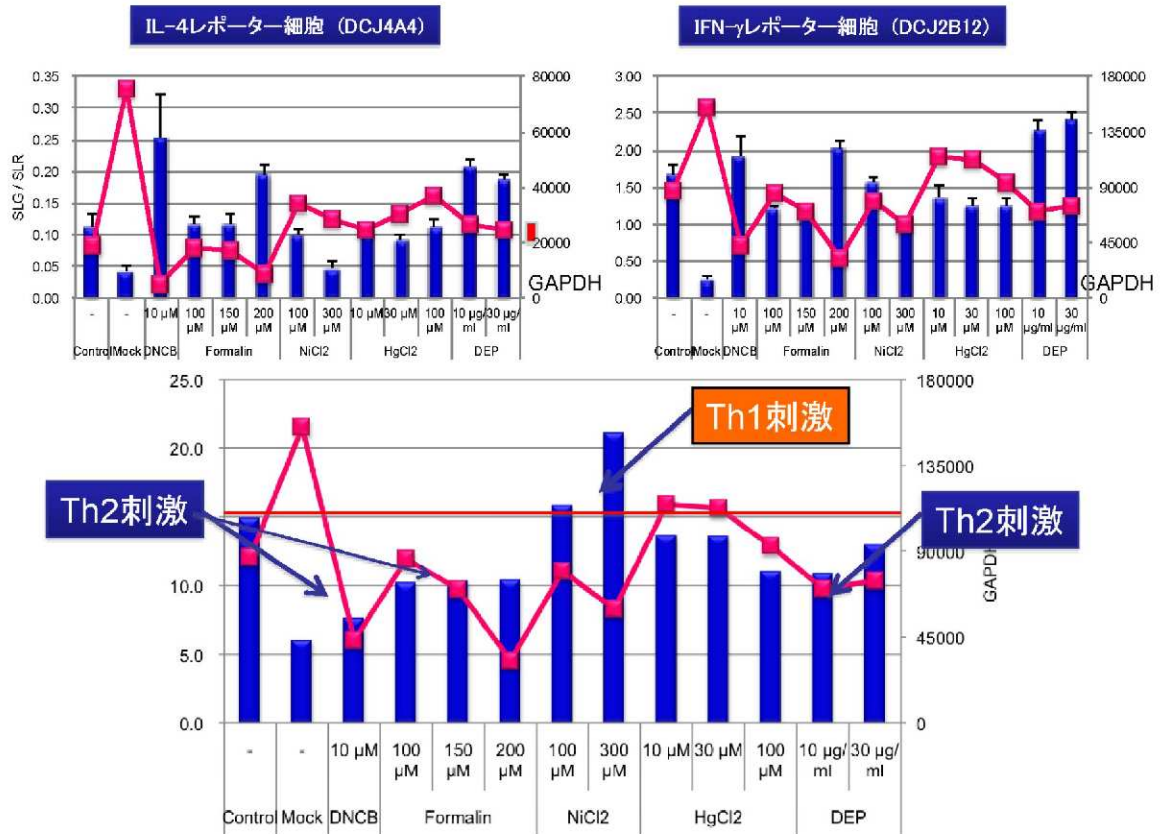
③-5-3 IFN- γ 、IL-4評価細胞の応答性の検討

T 細胞に関しては、生体防御反応に中心的役割を果たし、一方で、種々の免疫疾患の発症にも関与する IFN- γ 、IL-4 を対象にレポーター細胞を樹立した（図 III.2.4-23）。これらのサイトカイン遺伝子は、今回の研究においてもほぼすべての化学物質で発現が抑制されることが示された遺伝子でもある。具体的には、Jurkat 細胞へ内部標準である G3PDH プロモーターにより発現が制御される SLR 遺伝子と IFN- γ プロモーターにより発現が制御される SLO 遺伝子を導入した#2B12、IL-4 プロモーターにより発現が制御される SLG 遺伝子を導入し#4A4 細胞を樹立した。



図III. 2.4-23 IFN- γ 、IL-4レポーター細胞株の樹立

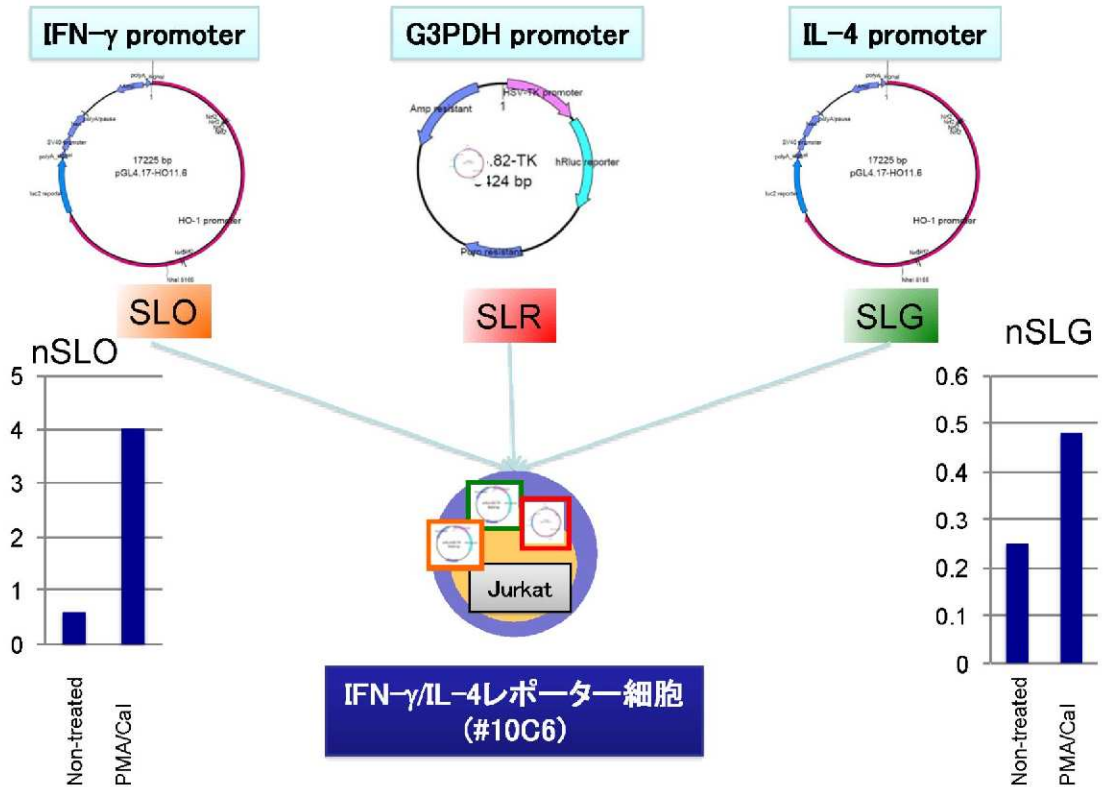
作製したIFN- γ 、IL-4レポーター細胞は、T細胞の活性化を引き起こすPMA/Ionomycinの刺激によりルシフェラーゼ活性の増加が認められた。また、これらの発光細胞にDEP、DNCB、NiCl₂、ホルマリンを作用させ、IFN- γ 発光細胞のルシフェラーゼ活性とIL-4発光細胞のルシフェラーゼ活性を測定し、その比率を計算した。その結果は、文献的な報告と一致して、DEP、DNCBはIL-4優位、NiCl₂はIFN- γ 優位の反応を惹起した。この結果は、我々が樹立したIFN- γ 、IL-4発光細胞が、化学物質のTh1/Th2バランスに及ぼす影響を評価できることを示している（図III. 2.4-24）。



図III. 2.4-24 IFN- γ 、IL-4レポーター細胞株を用いたTh1/Th2刺激活性の評価 (PMA/CaI(+))

次に、IFN- γ 、IL-4のプロモーター活性を一種類の細胞で評価可能とするため、Jurkat細胞へ内部標準であるG3PDHプロモーターにより発現が制御されるSLR遺伝子、IFN- γ プロモーターにより発現が制御されるSLO遺伝子、IL-4プロモーターにより発現が制御されるSLG遺伝子を導入した3色細胞#10C6細胞を樹立した。

この細胞が、親細胞であるJurkat細胞と同様に、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/Ca ionophore (CaI)の刺激に反応しIFN- γ 、IL-4のプロモーター活性を増強するか否かをSLO-LAとSLG-LAを測定することにより検討した。測定方法は、IL-8レポーター細胞と同様にTripluc® luciferase assay reagent (Toyobo)を使用しPhelios (Atto Co. Tokyo, Japan)のmulti-color detection systemにより行った。また、その際に、PMA/CaI処理により細胞数の変化が生じることから、各ルシフェラーゼ活性の値をGAPDHのレポーター活性であるSLR-LAで補正したnSLO-LAとnSLG-LAを算出した。測定結果は、予想どおりPMA/CaI処理によりSLO-LAとnSLG-LAの増強が確認できた(図III.2.4-25)。

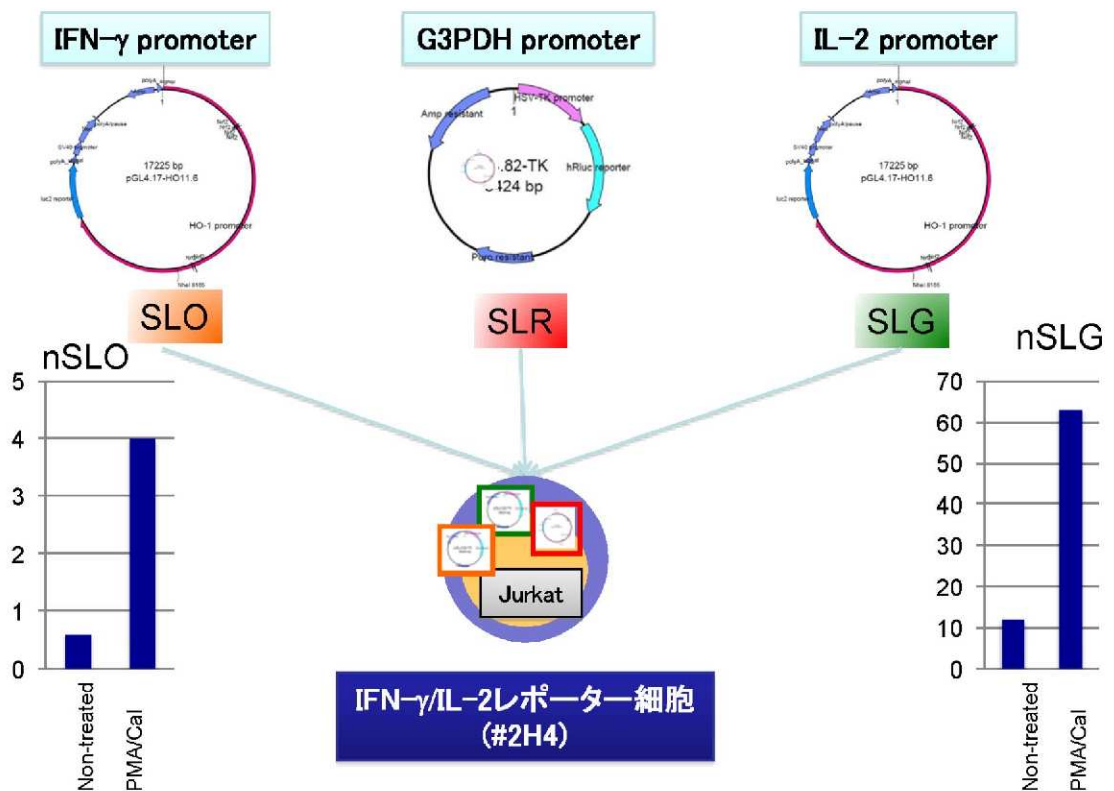


図III. 2.4-25 IFN- γ 、IL-4レポーター細胞株の樹立

③-5-4 IFN- γ 、IL-2評価細胞の応答性の検討

T細胞に関しては、次にIFN- γ 、IL-2を対象にレポーター細胞を樹立した(図III.2.4-26)。これらのサイトカイン遺伝子も、今回の研究においてほぼすべての化学物質で発現が抑制されることが示された遺伝子である。具体的には、Jurkat細胞へ内部標準であるG3PDHプロモーターにより発現が制御されるSLR遺伝子、IFN- γ プロモーターにより発現が制御されるSLO遺伝子、IL-2プロモーターにより発現が制御されるSLG遺伝子を導入し#2H4細胞を樹立した。

この細胞が、親細胞であるJurkat細胞と同様に、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/Ca ionophore (CaI)の刺激に反応しIFN- γ 、IL-2のプロモーター活性を増強するか否かをSLO-LAとSLG-LAを測定することにより検討した。測定方法は、#10C6細胞と同様にTripluc® luciferase assay reagent (Toyobo)を使用しPhelios (Atto Co. Tokyo, Japan)のmulti-color detection systemにより行った。また、その際に、PMA/CaI処理により細胞数の変化が生じることから、各ルシフェラーゼ活性の値をGAPDHのレポーター活性であるSLR-LAで補正したnSLO-LAとnSLG-LAを算出した。測定結果は、予想どおりPMA/CaI処理によりnSLO-LAとnSLG-LAの増強が確認できた(図III.2.4-26)。

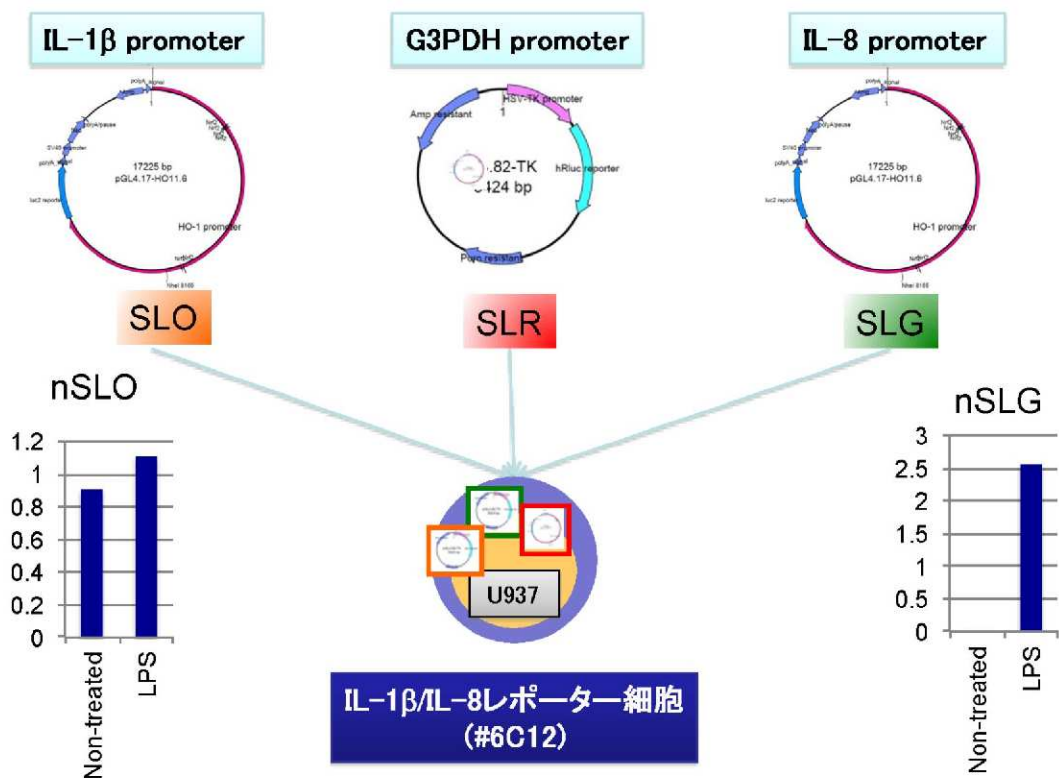


図III. 2.4-26 IFN- γ 、IL-2レポーター細胞株の樹立

③・5・5 IL-1 β 、IL-8 評価細胞の応答性の検討

U937 細胞に関して、IL-1 β 、IL-8 のプロモーター活性を同時に測定できる細胞#6C12 を開発した。IL-1 β や IL-8 は単球、樹状細胞などが産生する免疫誘導に必須なサイトカインである。今回の化学物質処理後のバイオマーカー検索においてもハプテンなどいくつかの化学物質刺激で誘導が確認されている。具体的には、U937 細胞へ内部標準である G3PDH プロモーターにより発現が制御される SLR 遺伝子、IL-8 プロモーターにより発現が制御される SLO 遺伝子、IL-1 β プロモーターにより発現が制御される SLG 遺伝子を導入し#6C12 細胞を樹立した。

この細胞が、親細胞である U937 細胞と同様に、LPS の刺激に反応し IL-1 β 、IL-8 のプロモーター活性を増強するか否かを SLO-LA と SLG-LA を測定することにより検討した。測定方法は、#6C12 細胞と同様に Tripluc® luciferase assay reagent (Toyobo)を使用し Phelios (Atto Co. Tokyo, Japan)の multi-color detection system により行った。また、その際に、LSP 処理により細胞数の変化が生じることから、各ルシフェラーゼ活性の値を GAPDH のレポーター活性である SLR-LA で補正した nSLO-LA と nSLG-LA を算出した。測定結果は、予想どおり LPS 処理により nSLO-LA と nSLG-LA の増強が確認できた (図III.2.4-27)。



図III. 2.4-27 IL-1 β 、IL-8レポーター細胞株の樹立

③-5-6 まとめ

選定した9個の免疫毒性評価遺伝子の中から HMOX1、IL-1 β 、IFN- γ 、IL-4、IL-2、IL-8 の6種類の遺伝子に着目して、これらの発現を誘導する化学物質刺激に反応してルシフェラーゼ活性が変化するレポーター細胞（発光細胞）を樹立した。HMOX1 レポーター細胞は、細胞にストレスを与えることにより何らかの免疫毒性を発揮する化学物質のスクリーニング細胞として、IL-1 β レポーター細胞、IL-8レポーター細胞は、接触皮膚炎をはじめとする免疫系を賦活化する化学物質の評価細胞として、また、IFN- γ 、IL-4、IL-2レポーター細胞は、それぞれを組み合わせることで、免疫抑制、Th1/Th2 バランスに影響を与える化学物質の評価細胞としての有用性が示唆された。

④ 免疫毒性評価システムの構築

④-1 接触皮膚炎感作性試験代替法

身の回りに多くの化学物質が溢れる現代社会においては、接触皮膚炎を引き起こす化学物質をそれが市場に出る前に明らかにし、健康被害の発生を未然に防ぐことが強く求められている（図III.2.4-28）。

患者：50歳女性、主婦

主訴：治療抵抗性の両前腕、手のひらのそう痒性皮疹

既往歴：アレルギー性疾患の既往なし

現病歴：約2年前から、両前腕に痒みのある皮疹が出現し、4か所の皮膚科専門医を受診し、種々の加療を受けるも難治のため東北大学病院皮膚科を受診した。

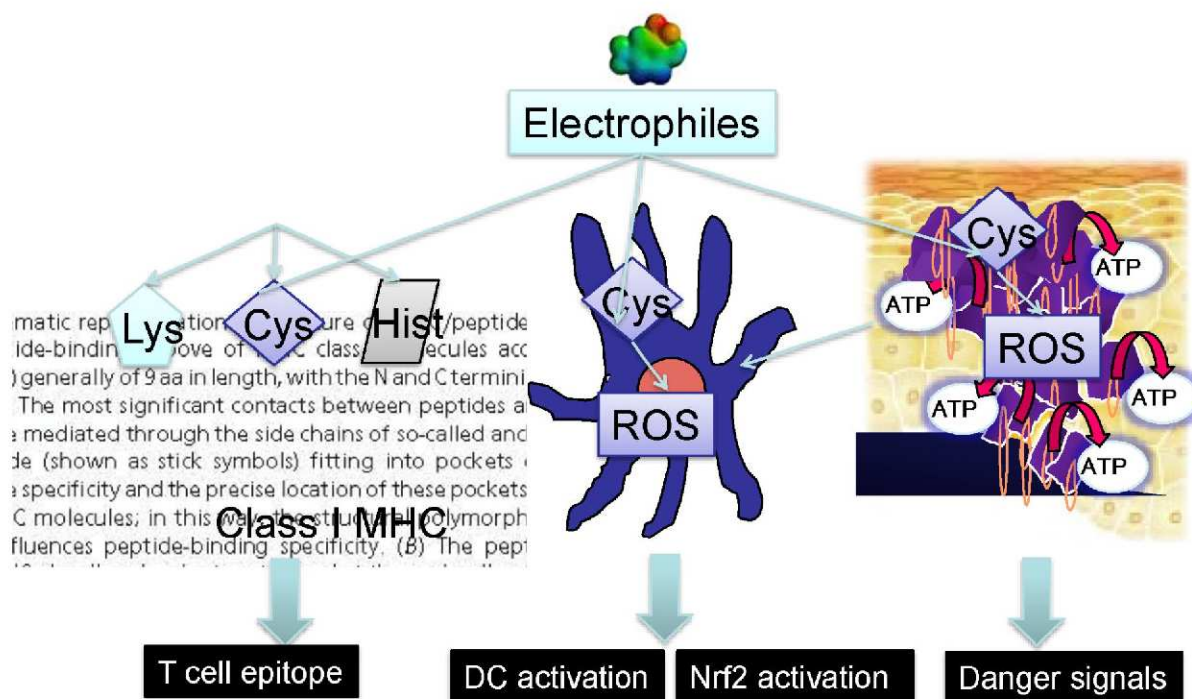


抗菌デスクマットの抗菌剤による接触皮膚炎

図Ⅲ.2.4-28 両前腕を主体とする難治性接触皮膚炎
-野放しの免疫毒性化学物質-

従来は、その目的のために多くの実験動物を犠牲にする local lymph node assay や Maximization test が行われてきた。しかし、近年、動物愛護精神の高まりとともに動物を用いない感作性試験法の開発が強く求められるようになった。特に、EU で 2013 年までに化粧品原材料の開発における動物実験の廃止が決定されたことにより、よりよい感作性試験代替法の開発は国内外の化粧品業界の急務となっている。

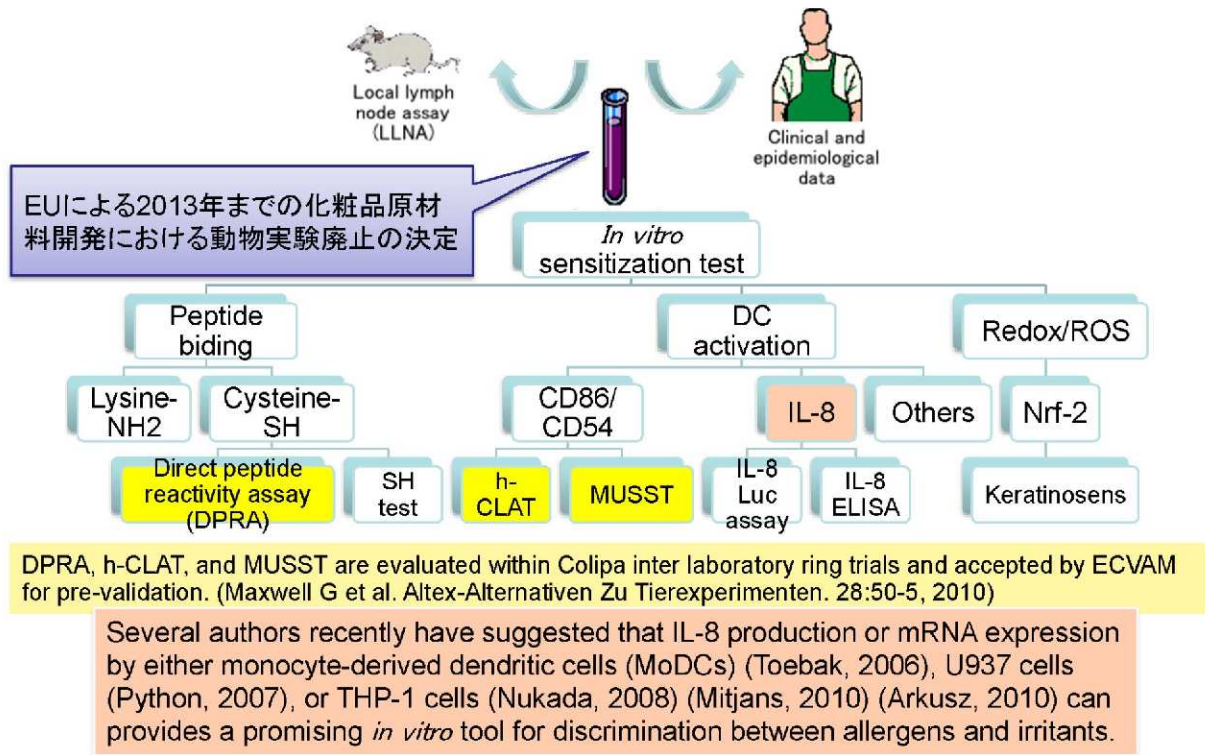
感作性試験代替法は、接触皮膚炎感作相におけるハプテンの免疫系におよぼす作用メカニズム (図Ⅲ.2.4-29) に基づいて開発されている。感作相においては、ハプテンは、その親電子性物質としての特性により、1) 抗原提示細胞表面の組織適合性抗原上の自己ペプチドと反応し T 細胞により認識される抗原決定基を形成する、2) 活性酸素産生や細胞内シグナル分子のチオール基と反応し樹状細胞を活性化する、3) 樹状細胞や表皮細胞を刺激して ATP などの danger signal を放出する。



Toebak MJ et al. Dendritic cells: biology of the skin. *Contact Dermatitis* (2009) 60:2-20
 Sasaki and Aiba. Dendritic cells and contact dermatitis. *Clinic Rev Allerg Immunol* (2007) 33:27-34

図Ⅲ.2.4-29 接触皮膚炎感作相における分子メカニズム

現在、感作性試験代替法として、ECVAM により direct peptide reactivity assay (DPRA)、human Cell Line Activation Test (h-CLAT)、myeloid U937 Skin Sensitisation Test (MUSST)の prevalidation が行われているが、いずれも正確性、簡便性、迅速性などの観点で多くの問題点を残している(Maxwell *et al.*, 2011)。最近、新たにハプテンと非感作性物質とを区別する分子マーカーとして IL-8 が多くの研究者により注目されている(Toebak *et al.*, 2006; Python *et al.*, 2007; Nukada *et al.*, 2008) (図Ⅲ.2.4-30)。そこで、本プロジェクトにおいて樹立した IL-8 プロモーター活性の定量が可能な THP-G8 細胞を用いて感作性試験代替法開発の可能性を検討した。



図Ⅲ.2.4-30 感作性試験代替法の現状

文献

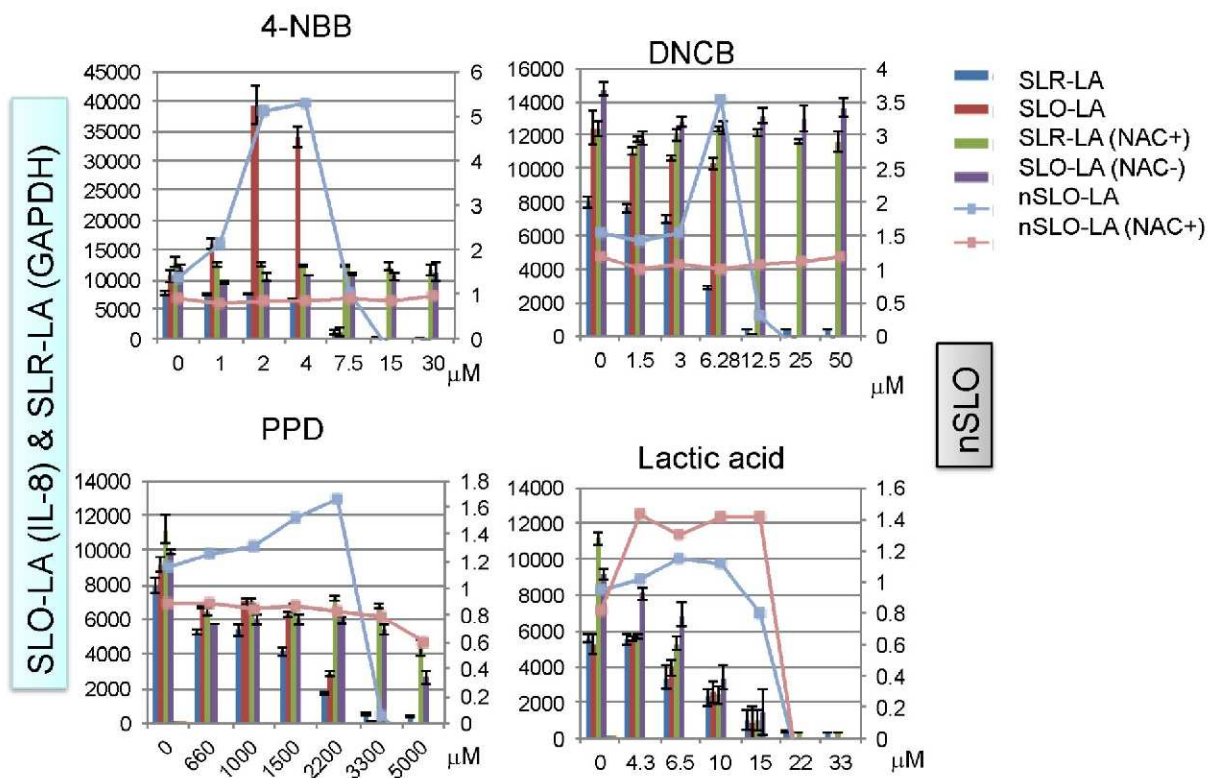
- Maxwell, G., Aeby, P., Ashikaga, T., Bessou-Touya, S., Diembeck, W., Gerberick, F., Kern, P., Marrec-Fairley, M., Ovigne, J. M., Sakaguchi, H., Schroeder, K., Tailhardat, M., Teissier, S., and Winkler, P. (2011). Skin sensitisation: the Colipa strategy for developing and evaluating non-animal test methods for risk assessment. *Altex* **28**, 50-55.
- Nukada, Y., Miyazawa, M., Kosaka, N., Ito, Y., Sakaguchi, H., and Nishiyama, N. (2008). Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor-alpha production. *J. Toxicol. Sci.* **33**, 175-185.
- Python, F., Goebel, C., and Aeby, P. (2007). Assessment of the U937 cell line for the detection of contact allergens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **220**, 113-124.
- Toebak, M. J., Pohlmann, P. R., Sampat-Sardjoepersad, S. C., von Blomberg, B. M., Bruynzeel, D. P., Scheper, R. J., Rustemeyer, T., and Gibbs, S. (2006). CXCL8 secretion by dendritic cells predicts contact allergens from irritants. *Toxicol In Vitro* **20**, 117-124.

解析方法は、IL-8 評価細胞の応答性の検討で確立した方法に従い、まず、Nukada ら (Nukada *et al.*, 2008) の報告にある 15 種類のハプテンと 7 種類の非感作性物質に関して THP-G8 細胞の反応性を検討した。その際に、表 III. 2.4-11 に示すようなパラメーターを設定した。

表III. 2.4-11 IL-8 Luc assay において用いるパラメーター

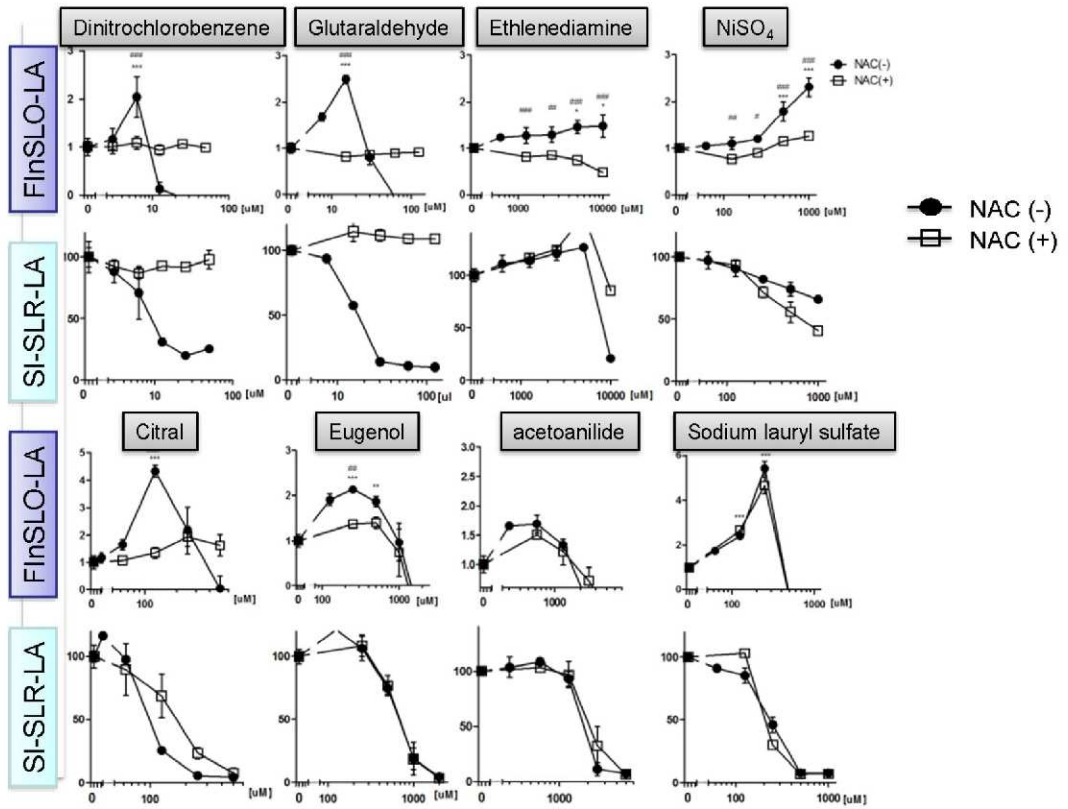
Abbreviation	パラメーターの定義
SLO-LA	SLO luciferase 活性
SLR-LA	SLR luciferase 活性
nSLO-LA	SLO-LA / SLR-LA (SLO-LAの値をSLR-LAの値で標準化した値)
SI-SLR-LA	SLR-LA of THP-G8 treated with chemicals / SLR-LA of non-treated THP-G8 (化学物質処理の有無によるSLR-LAの変化)
FInSLO-LA	nSLO-LA of THP-G8 cells treated with chemicals / nSLO-LA of non-stimulated THP-G8 cells (化学物質処理の有無によるnSLO-LAの変化)
SI	FInSLO-LA of THP-G8 cells stimulated with a chemical and NAC / FInSLO-LA stimulated with the chemical alone (NACの有無によるFInSLO-LAの変化)

この評価法のあらましを代表的実験データから概説する (図III.2.4-31)。化学物質処理 6 時間後に SLO-LA および SLR-LA を同時測定したところ、代表的ハプテン 4-NBB 刺激では、2 および 4 μ M の濃度で SLO-LA の有意な増加が認められ、一方、SLR-LA は 4 μ M 以下の濃度では著明な変動を示さなかった。また、刺激の 30 分前に抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) を加えることにより、SLO-LA の増加は完全に抑制された。ほぼ同様の変化は、nSLO-LA でも認めた。一方、別なハプテン dinitrochlorobenzene (DNCB) およびプロハプテン paraphenylen diamine (PPD) では、SLO-LA の明らかな増加は認められなかったが、nSLO-LA は SLR-LA がコントロールの 20%以上の濃度で有意な増加を認め、それらは、やはり NAC 処理により完全に抑制された。対照的に、非感作性物質である Lactic acid 刺激では、SLO-LA、nSLO-LA のいずれもがいかなる濃度においても有意な増加を示さなかった。



図Ⅲ.2.4-31 THP-G8細胞を用いた感作性試験法のあらまし

次に、15 種類のハプテンと 7 種類の非感作性物質に関して、化学物質処理前後の nSLO-LA の増加率 (FInSLO-LA) と NAC 処理の有無による FInSLO-LA の抑制率 (SI) を検討した。代表的結果を図Ⅲ.2.4-32 に、また、3 回の実験結果のまとめを表Ⅲ.2.4-12 に示す。なお、THP-G8 を用いたルシフェラーゼアッセイでは、coefficient of variation (CV) が 10% 以下であったので、FInSLO-LA が 1.4 以上は統計的に有為と判定される。そこで、表Ⅲ.2.4-13 に記載した感作性物質と非感作性物質の判定基準を設け、これら 22 種類の化学物質を判定したところ 15 ハプテン中 13 をハプテン、7 非感作性物質中 5 を非感作性物質と評価し、その accuracy は 86% となった (表Ⅲ.2.4-13)。



図Ⅲ.2.4-32 IL-8 Luc assayの代表的結果

表Ⅲ. 2. 4-12 IL-8 Luc assay (Nukadaらの用いた化学物質)

Nukada, Y., et al. *J. Toxicol. Sci.* **33**, 175-85, 2008.

Abbreviation	LLNA	1st*		2nd*		3rd*		Positive number(3)	Determination
		FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI	FInSLO-LA	SI		
1-Benzoylacetone	extreme	3.0	0.7	2.3	1.0	2.6	0.6	2	allergen
Dinitrochlorobenzene	extreme	3.8	1.0	2.0	0.5	2.4	0.4	3	allergen
Glutaraldehyde	strong	1.7	0.6	2.2	0.3	2.5	0.4	3	allergen
Benzoyl peroxide	strong	1.5	0.6	1.7	0.7	1.4	0.7	3	allergen
Phthalic anhydride	strong	1.9	0.5	2.6	0.4	1.9	0.5	3	allergen
2-Mercaptobenzothiazole	moderate	1.4	0.7	3.4	0.3	1.6	0.7	3	allergen
Ethylenediamine	moderate	1.3	0.6	1.3	0.5	1.5	0.6	1	non-allergen
Methyl-2-nonynoate	moderate	1.5	0.6	1.4	0.7	1.3	0.7	2	allergen
NiSO4	moderate	3.3	0.7	3.9	0.4	2.3	0.5	3	allergen
Diethyl maleate	moderate	1.7	0.6	1.2	0.8	1.7	0.7	2	allergen
Hexylcinnamaldehyde	weak	2.1	0.7	2.0	0.8	1.7	0.8	3	allergen
Citral	weak	1.7	0.8	2.3	0.4	1.4	0.6	3	allergen
Eugenol	weak	2.1	0.7	2.4	0.6	2.3	0.7	3	allergen
Geraniol	weak	1.6	0.5	1.7	0.5	1.7	0.7	3	allergen
Aniline	weak	1.2	0.8	1.2	0.6	1.0	0.9	0	non-allergen
1-Bromobutane	non-allergen	1.4	0.7	1.2	0.9	1.3	0.8	1	non-allergen
Diethyl phthalate	non-allergen	1.8	0.9	2.2	0.6	1.5	1.1	1	non-allergen
Benzalkonium chloride	non-allergen	2.7	0.7	2.5	1.1	1.4	1.0	1	non-allergen
Vanillin	non-allergen	2.8	0.8	4.2	0.5	1.9	0.9	2	allergen
2-Hydroxypropyl methacrylate	non-allergen	1.5	0.8	1.6	0.6	1.6	0.8	1	non-allergen
Acetoanisole	non-allergen	1.7	0.9	1.8	0.8	1.8	1.0	1	non-allergen
6-Methylcoumarin	non-allergen	1.2	1.1	1.2	0.9	1.3	0.9	0	non-allergen

*FInSLO-LA:

+ = FInSLO >= 1.4; - = FInSLO-LA < 1.4

SI:

+ = SI <= 0.8; - = SI > 0.8

表Ⅲ. 2.4-13 IL-8 Luc assay (Nukadaらの用いた化学物質)まとめ

IL-8 Luc assayにおけるアレルゲンの判定基準
 独立した3回の実験において2回以上で以下の値を満たした時に感作性物質 (Allergen) と判定する。
 1) FInSLO-LA ≥ 1.4
 2) SI ≤ 0.8
 3) SI-SLR-LA ≥ 0.2

LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
Allergen	13	1	15
Non-allergen	2	6	7
Total	15	7	22

IL-8 Luc assay	
False negative	13
False positive	14
Sensitivity	87
Specificity	86
Accuracy	86

さらにこの基準を用いて ECVAM が提案した感作性試験代替法の正確性評価のための化学物質リストに記載されている 16 化学物質を評価すると、10 感作性物質中 8 を感作性物質、4 非感作性物質中 4 を非感作性物質と判定し、その accuracy は 88%であった

た(表Ⅲ.2.4-14、表Ⅲ.2.4-15)。以上より、THP-G8 細胞を用い、上記の培養方法、刺激方法ならびに判定基準を組み合わせた評価法を IL-8 Luc assay と呼称することとした。

表Ⅲ. 2.4-14 IL-8 Luc assay (ECVAM & Colipa が提案した化学物質)

Casati, S., et al. *Altern. Lab. Anim.* 37, 305-12, 2009.

Abbreviation	LLNA	1st*		2nd*		3rd*		Positive number(/3)	Determination
		FlnSLO-LA	SI	FlnSLO-LA	SI	FlnSLO-LA	SI		
Oxazolone	extreme	1	1	1	1			0	non-allergen
4-Nitrobenzylbromide	extreme	3.9	0.27	4.4	0.21			2	allergen
Dinitrochlorobenzene	strong	2.3	0.44	1.8	0.53			2	allergen
Methyldibromoglutaronitrile	strong	1.6	0.65	2.7	0.50			2	allergen
Glyoxal	strong	1.7	0.77	1.4	0.78			2	allergen
2-Mercaptobenzothiazole	moderate	1.9	0.70	1.9	0.72			2	allergen
Cinnamal	moderate	2.0	0.54	2.7	0.44			2	irritant
Tetramethyl thiuram disulphide	moderate	1.7	0.63	3.6	0.44			2	allergen
Paraphenylenediamine	moderate	1.5	0.66	1.5	0.80			2	allergen
Isoeugenol	moderate	1.8	0.79	1.8	0.86	1.55	1.04	1	non-allergen
Eugenol	weak	2.1	0.64	1.7	0.77			2	allergen
Cinnamic alcohol	weak	2.1	0.47	2.3	0.76			2	allergen
Glycerol	non-allergen	1.5	0.82	1.4	0.83			0	non-allergen
Salicylic acid	non-allergen	1.3	1.27	1.1	1			0	non-allergen
Lactic acid	non-allergen	1.2	0.82	1.1	1.32			0	non-allergen
Sodium lauryl sulphate	non-allergen	3.1	0.88	3.7	1.6			0	non-allergen

*FlnSLO-LA:

+ = FlnSLO >= 1.4; - = FlnSLO-LA < 1.4

SI:

+ = SI <= 0.8; - = SI > 0.8

表Ⅲ. 2.4-15 IL-8 Luc assay (Casatiらの提案した化学物質) まとめ

LLNA		IL-8 Luc assay		
TGC17EA		allergen	irritant	Total
allergen	10	0	10	10
irritant	2	4	6	6
Total	12	4	16	16

False negative	17
False positive	0
Sensitivity	83
Specificity	100
Accuracy	88

なお、今回の解析では、Nukada らが THP-1 細胞による IL-8 産生に及ぼす影響を検討した 15 種類のハプテンと 7 種類の非感作性物質に関して IL-8 レポーター活性を測定したので、化学物質刺激後の IL-8 産生量と IL-8 レポーター活性の相関を調べることができた。Nukada らの論文にある IL-8 の測定値は共同研究者の Kao 株式会社、坂口齊博士より供与頂いた。予想外に IL-8 Luc assay と Nukada らの結果には明らかな相関は認められず、IL-8 の産生に転写調節以外のメカニズムが関与していることが示唆された。

また、IL-8 Luc assay において FInSLO-LA が 1.4 以上に増加する化学物質の最低濃度を EC1.4 と定義し、文献的に調べられた化学物質の LLNA における EC3 との相関性も検討したが明らかな相関は認められなかった。

最後に用いた全化学物質の IL-8 Luc assay による評価結果を表 III. 2.4-16 に示す。35 種類の化学物質を評価し、感度 83、特異度 90、正確性 86 で、代表的な細胞を用いた感作性試験代替法である h-CLAT、Keratinosens に比較して遜色の無い結果であった。また、IL-8 Luc assay は、mRNA 発現を評価する手法であるため、タンパク発現を評価する他の手法と異なり、化学物質処理に要する時間はわずか 6 時間と極めて短時間である。さらに、化学物質処理後、96 multiwell plate をルミノメーターにセットすれば、それ以降の処理は一切器械が行うため、人手がかからず、その上 human error を最小限に減らすことが可能な方法である。以上より、IL-8 Luc assay の感作性試験代替法としての有用性が示された。

表III. 2.4-16 IL-8 Luc assay (用いた全化学物質)まとめと他のassay方法との比較

LLNA THP-G8	Allergen	Non-allergen	Total
	Allergen	20	1
Non-allergen	4	10	6
Total	24	11	35

	IL-8 Luc assay	h-CLAT ¹⁾	Keratinosens ²⁾
False negative	17	13	11
False positive	9	25	20
Sensitivity	83	88	88
Specificity	90	75	79
Accuracy	86	84	85
Incubation time	6 hr	24 hr	48 hr

1) Ashikaga T et al. ATLA 38:2 275, 2010

2) Emter R et al. Toxicol Appl Phramacol 245: 281, 2010

1) IL-8 Luc assayは、他の代表的な感作性試験代替法と遜色の無い感度、特異度、正確性を有している。

2) IL-8 Luc assayは、mRNA発現を評価する手法であり、タンパク発現を評価する他の手法と異なり化学物質処理に要する時間はわずか6時間と極めて短時間である。

3) 化学物質処理後、96-multiwell plateをルミノメーターにセットすれば、それ以降の処理は一切器械が行うため、人手がかからず、その上human errorを最小限に減らすことが可能な方法である。

④-2 多面的免疫毒性評価システム

工業化社会においては、日々環境中に様々な化学物質が排出され、それらの中には、少なからず免疫毒性を有しているものが存在する。ディーゼル排気微粒子を例にとれば、450 種以上の有機化合物を含み、それらの多くは私たちの体に生体異物 (xenobiotic) として働く。さらに、ディーゼル排気微粒子は、多くの疫学的調査、また、動物実験により近年のアトピー性疾患増加との関連性が疑われている (図 III. 2.4-33)。

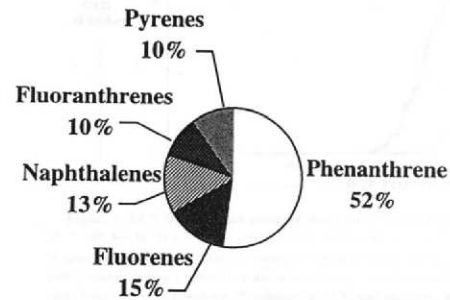


Figure 1. Chemical composition of DEP. The major active constituents of DEP are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH).

Ann Allergy Asthma Immunology 1999; 83: 624-629.

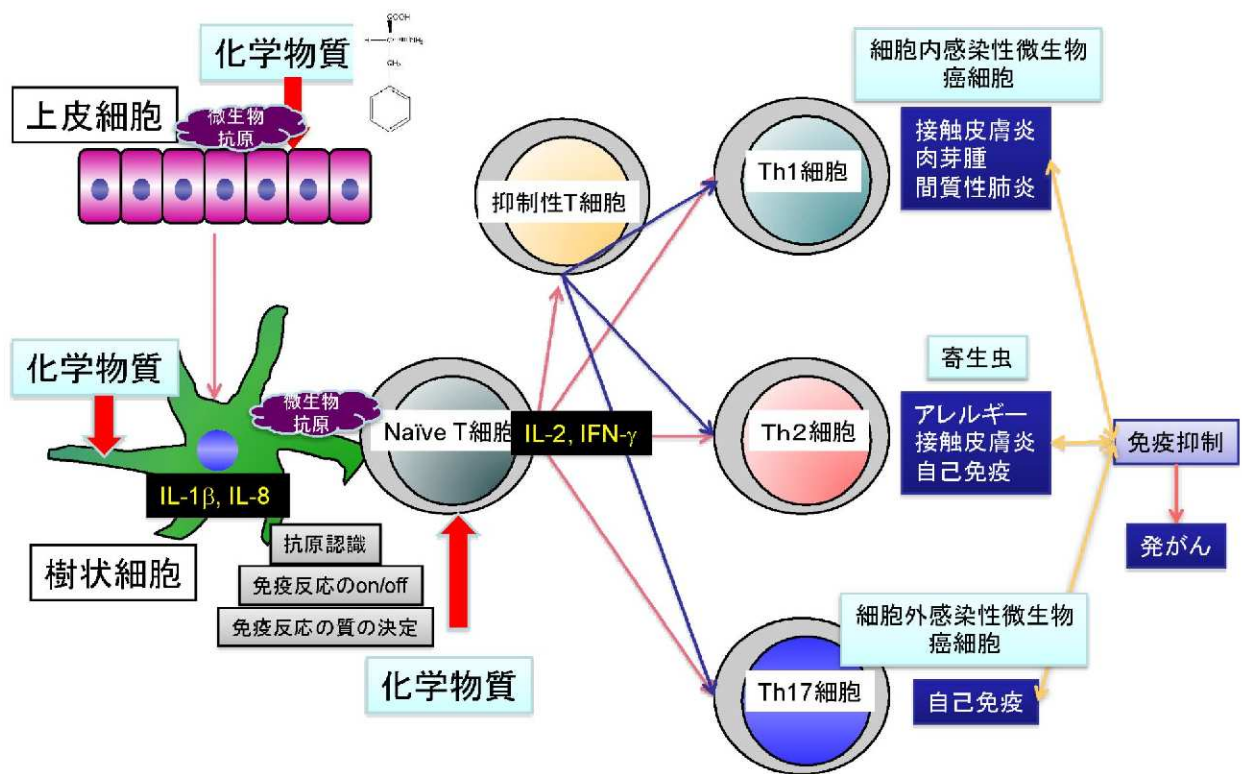
ディーゼル排気微粒子は、450種以上の有機化合物を含み、polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), halogenated aromatic hydrocarbons (HAH), redox-active quinonesなどの、生体異物 (xenobiotics)から構成されている。

最近、疫学的に、アレルギー性鼻炎、喘息などのアトピー性疾患有病率の増加の原因の一つとして、環境中のディーゼル排気微粒子の増加が注目されている(1-4)。

1. Ishizaki T et al. Ann Allergy 1987, 2. Corbo G M et al. J Allergy Clin Immunol 1993, 3. Nitta H et al. Arch Environ Health 1993, 4. English P et al. Environ Health Persp 1999; 107: 761-767.

図III. 2.4-33 環境汚染と免疫毒性

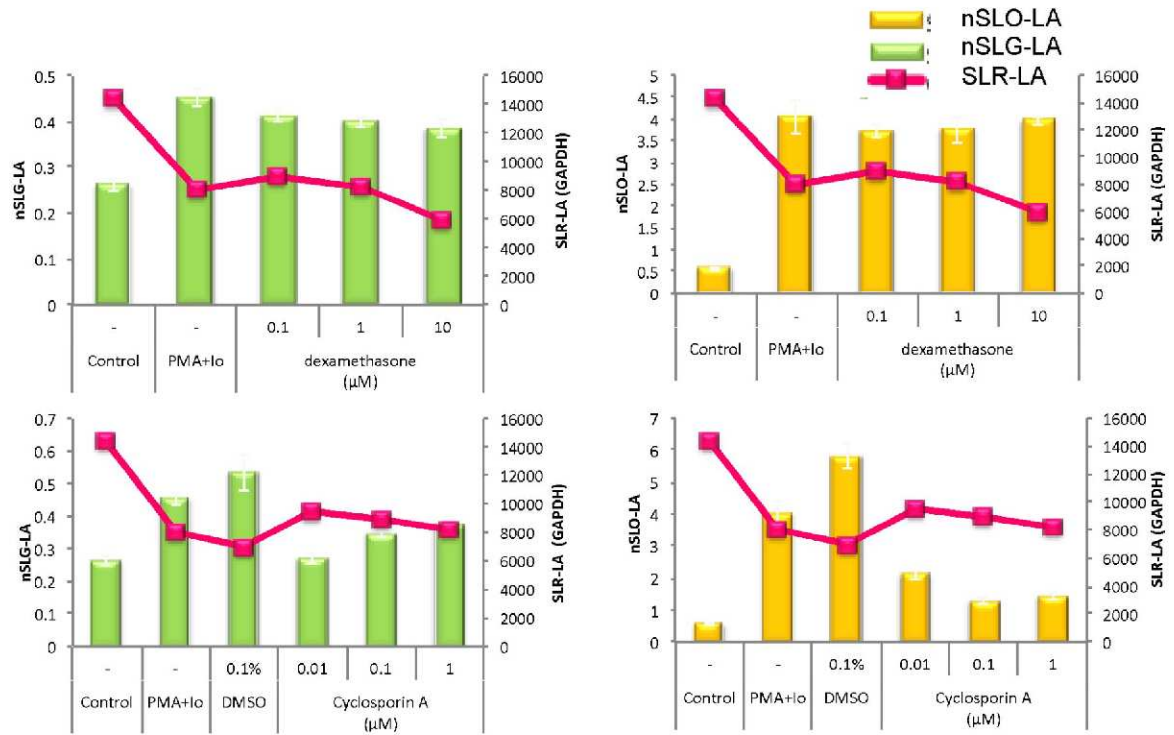
図 III. 2.4-34 に示すように、複雑な免疫系に及ぼす化学物質の毒性を評価するためには、可能な限り多面的な解析が求められる。そこで、本プロジェクトでは、開発した IFN- γ /IL-4 評価細胞、IFN- γ /IL-2 評価細胞、さらに、IL-1 β /IL-8 評価細胞を組み合わせて多面的免疫毒性評価系の構築を試みた。



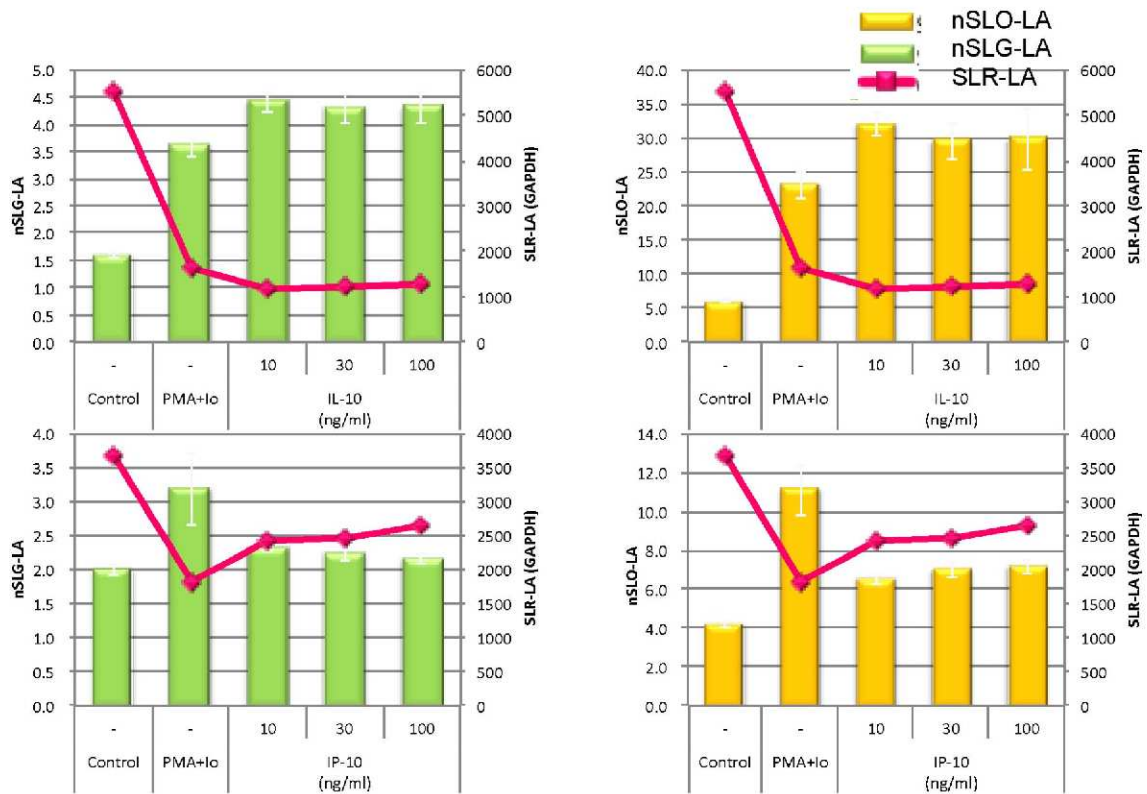
図III 2.4-34 多面的免疫毒性評価
Multi-ImmunoTox assay

④-2-1 IFN- γ 、IL-4 評価細胞 (#10C6)

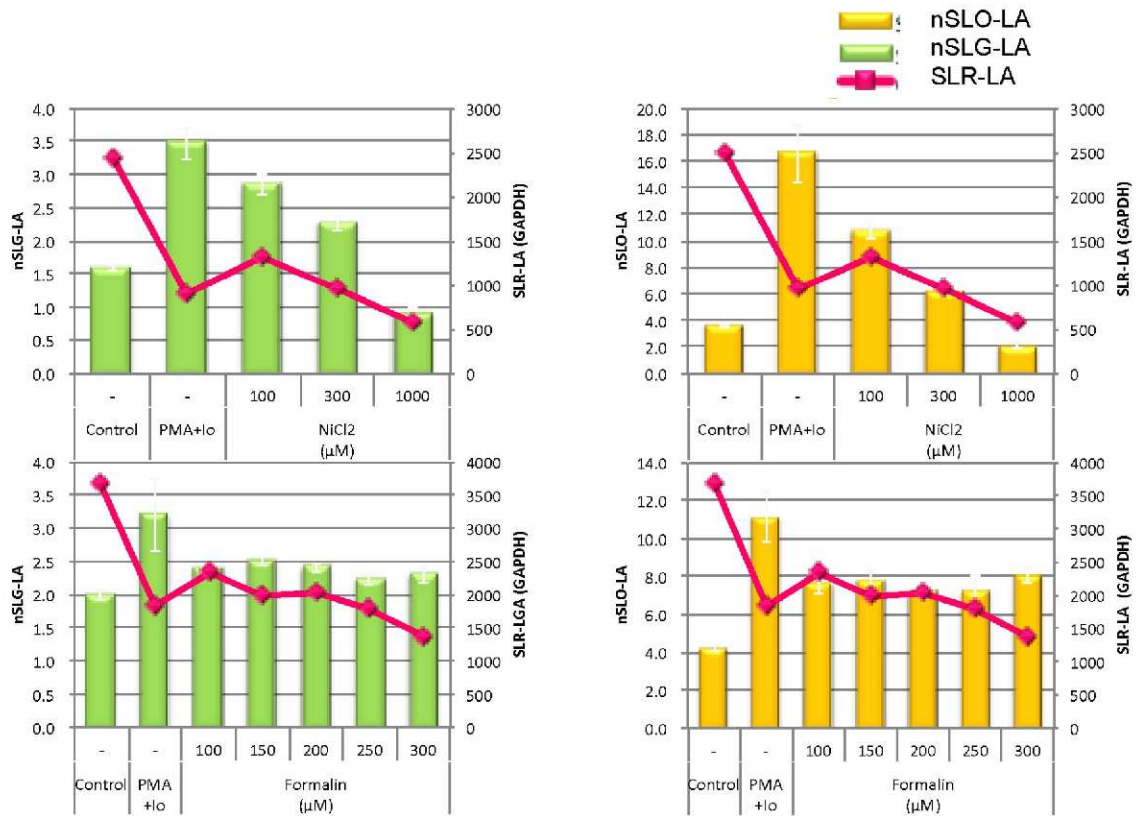
まず、PMA/CaIにて刺激した#10C6細胞に代表的免疫抑制剤である dexamethasone と cyclosporin A を作用させ nSLO-LA と nSLR-LA を測定したところ、いずれの免疫抑制剤によっても両ルシフェラーゼ活性の抑制が観察された (図III.2.4-35)。さらに、dexamethasone と cyclosporin A の比較では、cyclosporin A により強力な抑制効果が認められた。次に免疫抑制性 IL-10 サイトカインと Th1 系 IP-10 ケモカインに関して検討したところ IP-10 に抑制効果が認められた (図III.2.4-36)。また、代表的ハプテンである NiCl₂ と Formalin の作用を検討したところ、NiCl₂ において容量依存的抑制効果が認められた (図III.2.4-37)。同様の実験を 12 種類の物質について 3 回実験を繰り返し、その結果を表にまとめた。ただし、#10C6 細胞に関しては、nSLG-LA の変化が、PMA/CaI 刺激前後で大きく変動しなかったため評価は定性的に行った (表III.2.4-17)。



図III. 2.4-35 #10C6を用いた免疫調節性薬剤の評価
Dex and CyA



図III. 2.4-36 #10C6を用いたサイトカイン & ケモカインの評価
IL-10 and IP-10



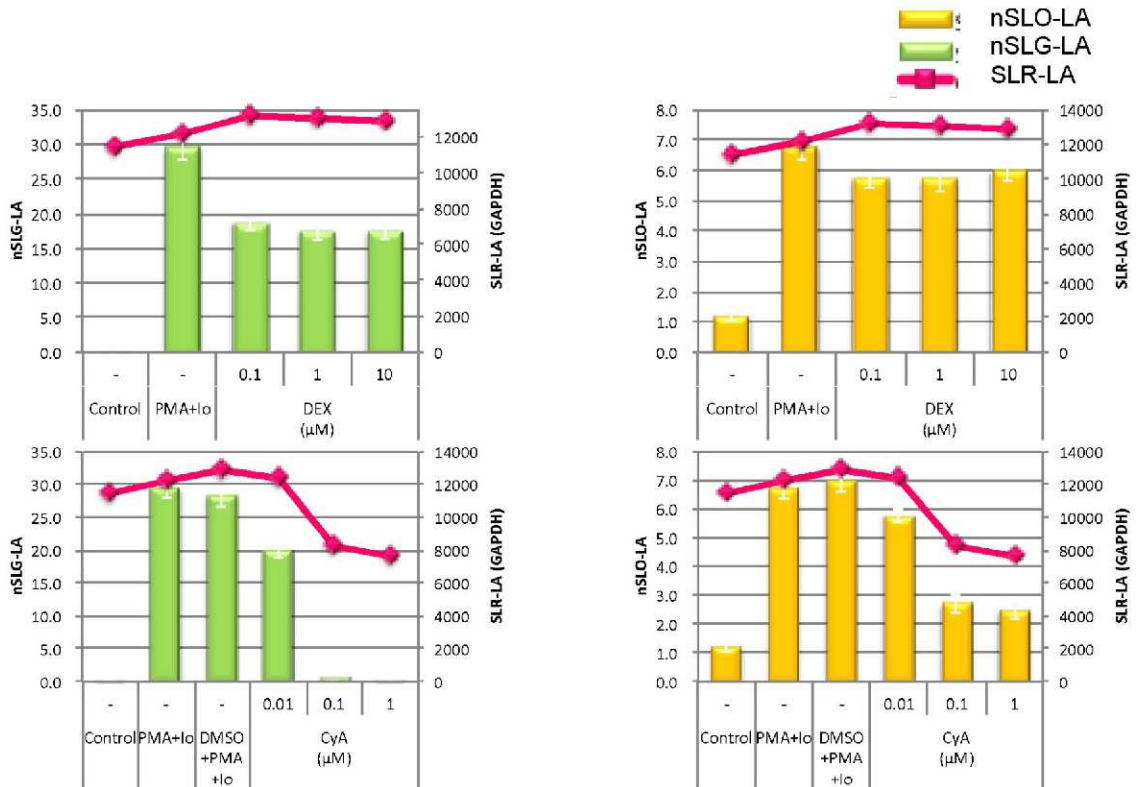
図III. 2.4-37 #10C6を用いたアレルゲンの評価
NiCl₂ and Formalin

表III. 2.4-17 #10C6を用いた免疫毒性試験まとめ

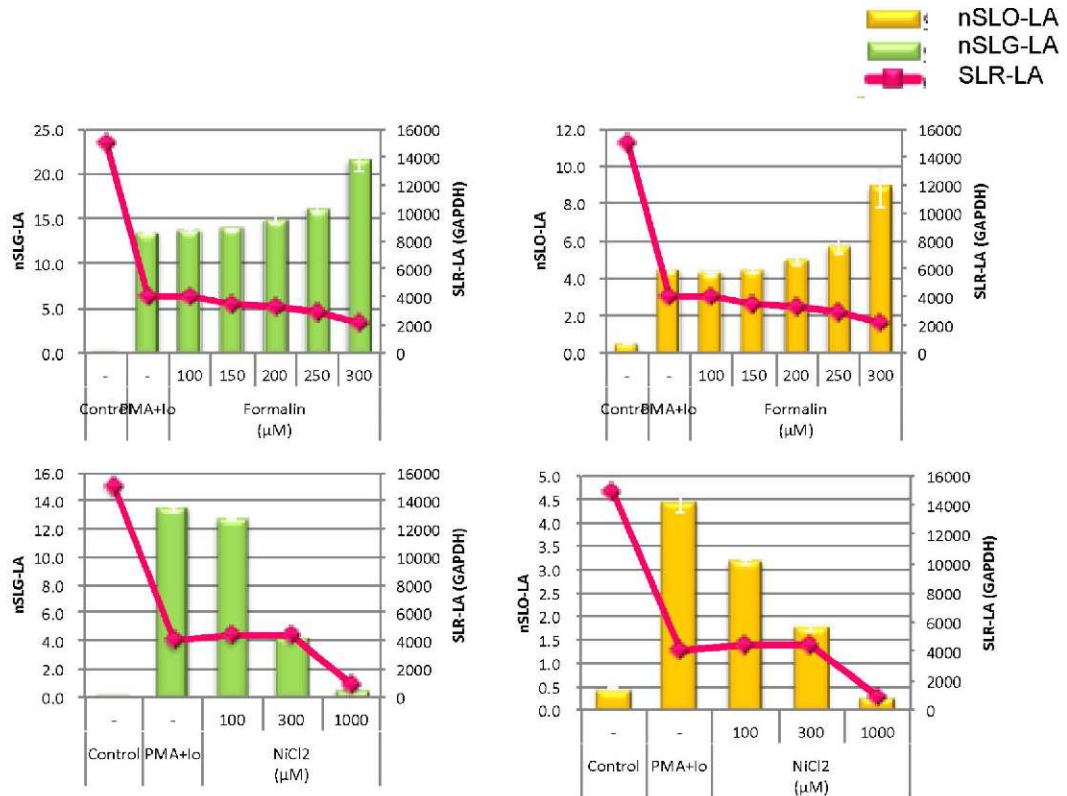
	Name	IL4-SLG			評価	IFN γ -SLO			評価	
		1st	2nd	3rd		1st	2nd	3rd		
1	Cytokine	IL-4	→	→	→	No Change	→	→	→	No Change
2	Cytokine	IL-10	→	↑	→	No Change	↑	↑	→	Up
3	Cytokine	IFN- γ	→	→	→	No Change	↑	↑	↑	Up
4	Chemokine	IP-10	↓	↓	/	Down	↓	↓	/	Down
5	Drug	Dexamethasone	↓	↓	↓	Down	↓	↓	↓	Down
6	Drug	Cyclosporin A	↓	↓	↓	Down	↓	↓	↓	Down
7	Drug	Mitomycin C	↑	↑	→	Up	↑	↑	↑	Up
8	Drug	Vitamine D3	↑	↑	→	Up	↑	↑	→	Up
9	Allergen	NiCl ₂	↓	↓	↓	Down	↓	↓	↓	Down
10	Allergen	Formalin	↓	↓	↓	Down	↓	↓	↓	Down
11	Allergen	Trimellitic anhydride chloride	→	→	↓	No Change	→	→	→	No Change
12	Allergen	DNCB	↓	↓	↓	Down	→	→	→	No Change

④-2-2 IFN- γ 、IL-2 評価細胞 (#2H4)

同様に、PMA/CaI にて刺激した#2H4 細胞に代表的免疫抑制剤である dexamethasone と cyclosporin A を作用させ nSLO-LA と nSLR-LA を測定したところ、いずれの免疫抑制剤によっても両ルシフェラーゼ活性の抑制が観察された (図III.2.4-38)。さらに、dexamethasone と cyclosporin A の比較では、cyclosporin A により強力な抑制効果が認められた。次に、代表的ハプテンである NiCl₂ と Formalin の作用を検討したところ、NiCl₂ において容量依存的抑制効果が認められたが、Formalin による抑制効果は認められなかった (図III.2.4-39)。



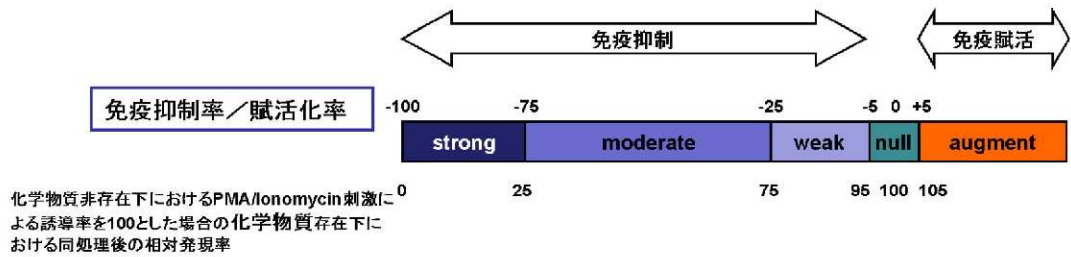
図III. 2.4-38 #2H4を用いた免疫調節性薬剤の評価
Dex and CyA



図III. 2.4-39 #10C6を用いたアレルゲンの評価
NiCl₂ and Formalin

#2H4 細胞の評価においては、図 III. 2.4-40 に示すように、PMA/CaI の刺激前後の FInSLG-LA と FInSLO-LA を求め、さらに、それぞれに関して化学物質処理前後の抑制率(%)を計算した。また、免疫抑制の程度を抑制率を指標に Null ; <+5 ~<=5, Weak; >5 ~ <=25, Moderate; >25 ~ <=75, Strong; >75、抑制がかからずにむしろ化学物質処理により FInSLG-LA ないし FInSLO-LA が 1.05 より増加した場合は Augmentation と定義した。また、SLG-LA 抑制率/ SLO-LA 抑制率の比率を計算した。この評価法基準にしたがい、#2H4 を用いて 23 種類の物質を評価した。

PMA/I α 刺激#2H4細胞細胞に種々の化学物質を添加し、培養6時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、以下の基準で各サイトカインに対するルシフェラーゼ活性の変化を評価する。



Abbreviation	パラメーターの定義
SLO(G)-LA	SLO(G) luciferase 活性
SLR-LA	SLR luciferase 活性
nSLO(G)-LA	SLO(G)-LA / SLR-LA (SLO(G)-LAの値をSLR-LAの値で補正した値)
FInSLO(G)-LA	nSLO(G)-LA of PMA/I α -stimulated #2H4 cells / nSLO(G)-LA of non-stimulated #2H4 cells (PMA/I α 処理の有無によるnSLO(G)-LAの変化)
SLO(G)抑制率	(1-FInSLO(G)-LA of #2H4 cells treated with chemicals / FInSLO(G)-LA of #2H4 cells without chemical treatment) x 100% (化学物質処理の有無によるFInSLO(G)-LAの変化)

図III. 2.4-40 免疫毒性評価パラメーター(#2H4)

表III.2.4-18 に 23 種類の被検物質を評価したまとめを示す。この方法によりサイトカイン、医薬品から環境化学物質にいたるまで多くの物質の免疫作用を一元的に評価できた。さらに、SLG-LA 抑制率/ SLO-LA 抑制率により免疫抑制の質まで評価できる可能性が示された。実際に治療に用いられている免疫抑制剤の T 細胞から産生されるサイトカイン産生抑制効果の比較では、シクロスポリンの抑制効果が最大で、中等度のものにデキサメサゾン、マイトマイシンC、メソトレキセートが分類された。この結果は、我々がヒト末梢血から分離した T 細胞を用いて検討した値と概ね一致していた (Ohtani T et al., 2005)。一方、SLG-LA 抑制率/ SLO-LA 抑制率は、免疫反応を Th2 優位に導くことが知られている医薬品や環境化学物質 (Ohtani T et al., 2005; Sasaki Y et al., 2008) により高い値が得られた。

Ohtani T, Nakagawa S, Kurosawa M, Mizuashi M, Ozawa M, Aiba S. (2005). Cellular basis of the role of diesel exhaust particels in inducing Th2-dominant response. J Immunol 174, 2412-9.

Sasaki Y, Ohtani T, Ito Y, Mizuashi M, Nakagawa S, Furukawa T, Horii A, Aiba S. (2009) Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production. Int Arch Allergy Immunol. 148, 239-50.

表III. 2.4-18 #2H4を用いた免疫毒性試験まとめ

	種類	化学物質	IL-2	IFN- γ	免疫抑制効果	IL-2/IFN- γ
1	サイトカイン	IL-10	27	15	M/W	1.8
2		IL-4	28	22	M/W	1.3
3		IFN- γ	14	+14	W/A	
4		IP-10	22	11	W/W	2
5	医薬品	デキサメサゾン	41	11	M/W	3.7
6		シクロスポリン	100	65	S/M	1.5
7		マイトマイシンC	46	0	M/N	>>
8		ビタミンD	+1	8	N/W	
10		アザチオプリン	22	17	W/W	1.3
11		エンドキサン	15	5	W/N	3
12		メソトレキセート	47	34	M/M	1.4
13		ミゾリピン	8	13	W/W	0.6
14	環境化学物質	ニッケル	75	65	S/M	1.2
15		ホルマリン	45	+1	M/N	>>
16		DEP	67	18	M/M	3,7
17	試薬	TMA	+28	+16	A/A	
18		DNCB	+100	+39	A/A	

表III. 2.4-18 #2H4を用いた免疫毒性試験まとめ (続き)

	種類	化学物質	IL-2	IFN- γ	免疫抑制効果	IL2/IFN- γ
19	金属	BaCl ₂	94.4	49.4	S/M	1.9
20	金属	NiCl ₂	89.9	73.9	S/W	1.2
21	金属	MnCl ₂	91.6	9.8	S/M	9.3
22	金属	ZnCl ₂	81.6	33.6	S/M	2.4
23	金属	FeCl ₃	91.9	50.7	S/M	1.8

抑制率: **Augmentation** ; >+5, **Null** ; <+5~<=5, **Weak** ; >5~<=25, **Moderate** ; >25~<=75, **Strong** ; >75

④-2-3 IL-1 β 、IL-8 評価細胞 (#6C12)

IL-1 β 、IL-8 評価細胞#6C12 を LPS で刺激すると IL-1 β プロモーター活性 (nSLG-LA)、IL-8 プロモーター活性 (nSLO-LA) が有意に増加する。そこで LPS 刺激した #6C12 に代表的免疫抑制剤である dexamethasone と cyclosporin A を作用させ nSLO-LA と nSLR-LA を測定したところ、dexamethasone は nSLG-LA および nSLO-LA の両方を有意に抑制したが、cyclosporin A は明らかな抑制効果を示さなかった (図 III.2.4-41)。さらに、同様の系に NiCl₂ と diesel exhaust particles (DEP) を加えたところ、NiCl₂ では、nSLG-LA と nSLO-LA いずれも増加したが、DEP では、nSLG-LA の増加と nSLO-LA の抑制が認められた (図 III.2.4-42)。

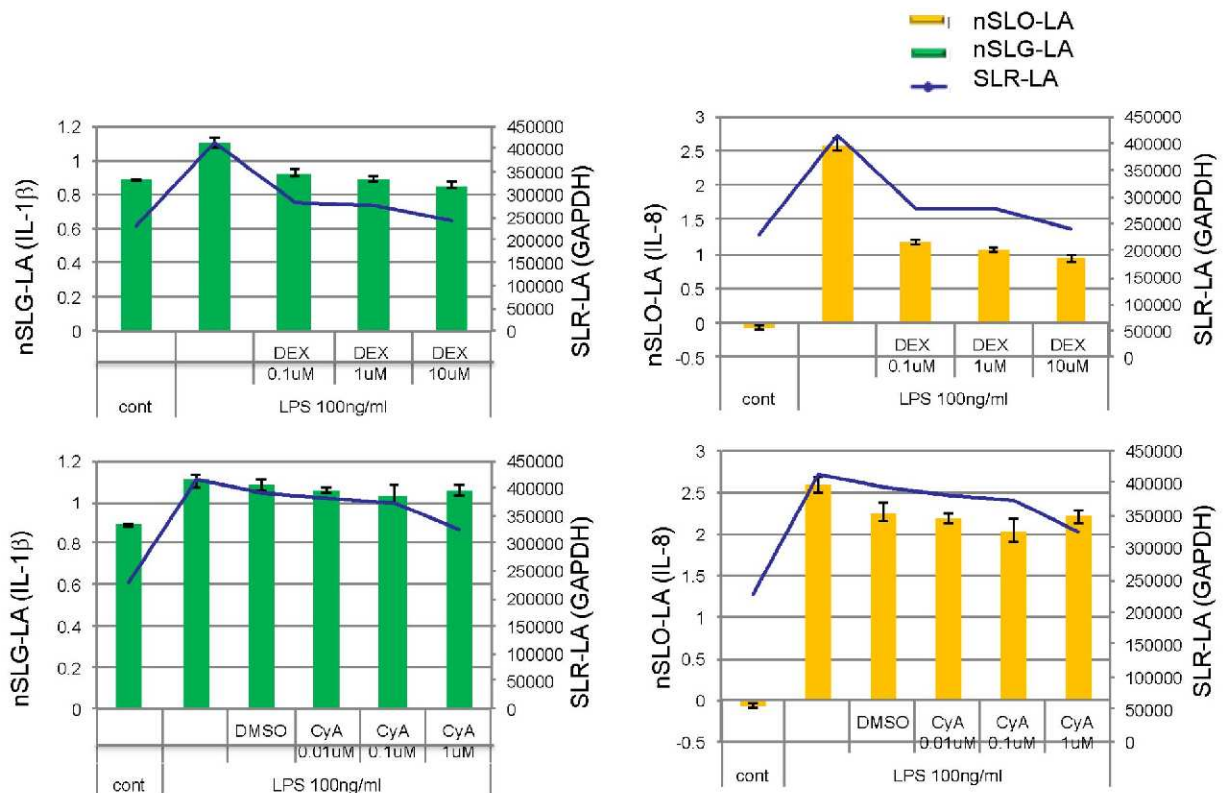
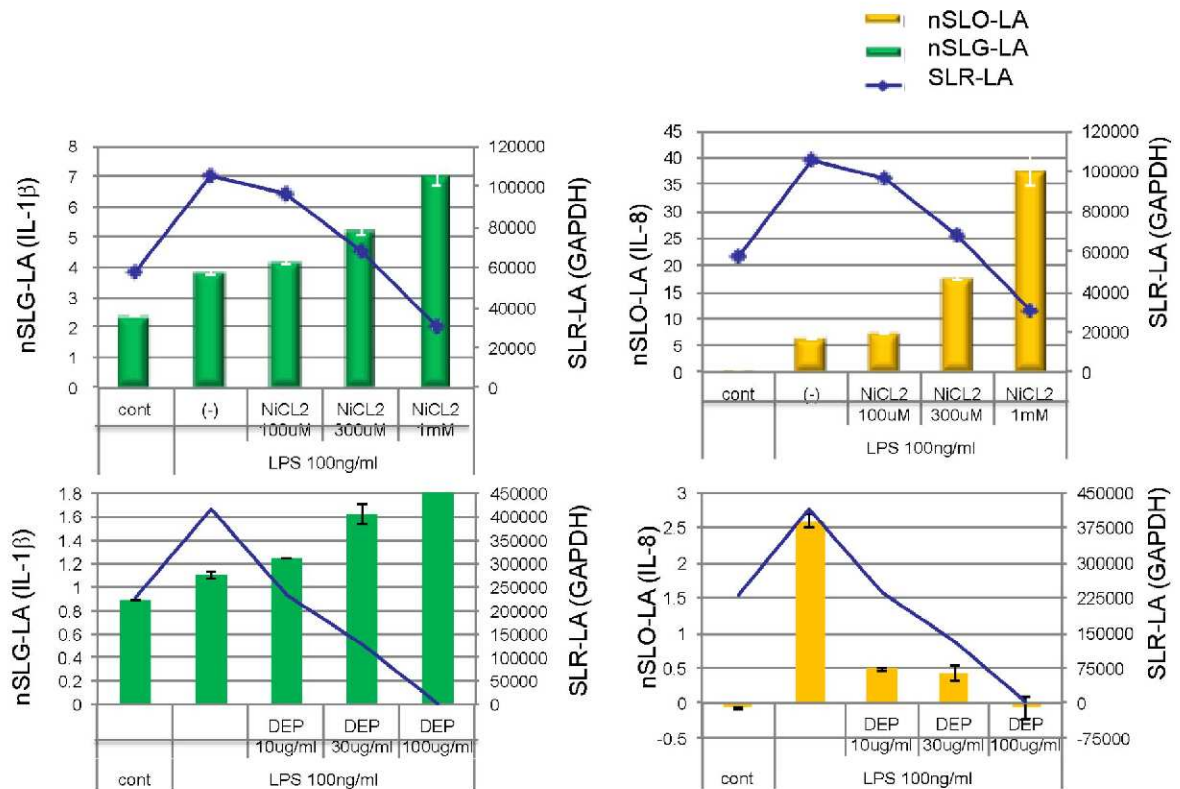


図 III. 2.4-41 #6C12を用いた免疫調節性薬剤の評価
Dex and CyA

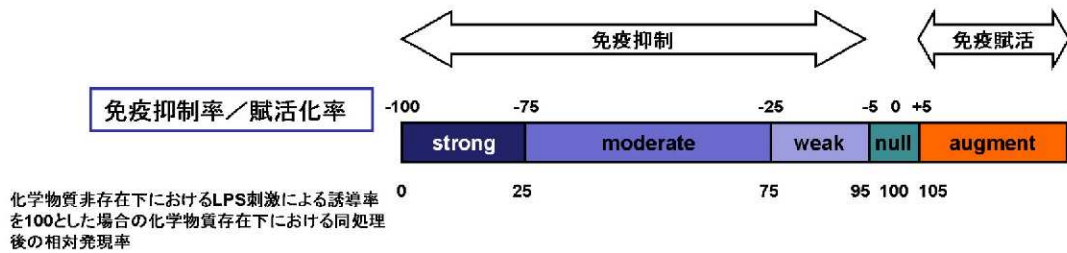


図III. 2.4-42 #6C12を用いたアレルゲンの評価
NiCl₂ and DEP

④-2-4 IFN- γ 、IL-2 評価細胞 (#2H4)と IL-1 β 、IL-8 評価細胞 (#6C12)を用いた化学物質免疫毒性の多面的解析 (Multi-ImmunoTox assay)

次に、IFN- γ 、IL-2 評価細胞 #2H4 と IL-1 β 、IL-8 評価細胞 #6C12 を併用した多面的免疫毒性評価系を構築した。その際に、免疫毒性が簡便に評価可能となるように、#6C12 に関しても#2H4 同様に図 III 2.4-43 のように抑制率を定義した。

LPS刺激#6C12細胞に種々の化学物質を添加し、培養6時間後にルシフェラーゼ活性を測定し、以下の基準で各サイトカインに対するルシフェラーゼ活性の変化を評価する。



Abbreviation	パラメーターの定義
SLO(G)-LA	SLO(G) luciferase 活性
SLR-LA	SLR luciferase 活性
nSLO(G)-LA	SLO(G)-LA / SLR-LA (SLO(G)-LAの値をSLR-LAの値で補正した値)
FInSLO(G)-LA	nSLO(G)-LA of LPS-stimulated #6C12 cells / nSLO(G)-LA of non-stimulated #6C12 cells (LPS処理の有無によるnSLO(G)-LAの変化)
SLO(G)抑制率	(1-FInSLO(G)-LA of #6C12 cells treated with chemicals / FInSLO(G)-LA of #6C12 cells without chemical treatment) x 100% (化学物質処理の有無によるFInSLO(G)-LAの変化)

図III. 2.4-43 免疫毒性評価パラメーター (#6C12)

また、免疫抑制の程度を抑制率を指標に Null ; <+5 ~ <=5、Weak ; >5 ~ <=25, Moderate ; >25 ~ <=75, Strong ; >75、抑制がかからずにむしろ化学物質処理により FInSLG-LA ないし FInSLO-LA が 1.05 より増加した場合は Augmentation と定義した。また、SLG-LA 抑制率/ SLO-LA 抑制率の比率を計算した。この評価法を用いて、#2H4 を用いて評価した 21 種類の物質を評価した。表III.2.4-18 に#2H4 と#6C12 の両細胞による評価結果のまとめを示す。その結果、この方法によりサイトカイン、薬剤、環境化学物質など多岐にわたる物質を免疫毒性の特性により分類できることが明らかとなった (表III.2.4-19)。

表III. 2.4-19 #2H4と#6C12を組み合わせた多面的免疫毒性評価
Multi-ImmunoTox assay

Classification	chemicals	IL-2 suppression rate	INF- γ suppression rate	Immunomodulation	IL-2/INF- γ	IL-1 β suppression rate	IL-8 suppression rate	Immunomodulation	IL-1 β /IL-8
Cytokines	IL-10	27	15	M/W	1.8	+10	12	A/W	
	IL-4	28	22	M/W	1.3	3	13	N/W	0.23
	INF- γ	14	+14	W/A		34	38	M/M	0.89
	IP-10	22	11	W/W	2.0	+15	+9	A/A	
	Dexamethasone	41	11	M/W	2.7	23	53	W/M	0.43
Drugs	Cyclosporine	100	65	S/M	1.5	+12	+28	A/A	
	Mitomycin C	46	0	M/N	>>1	3	+59	N/A	
	Vitamin D ₃	+1	8	N/W		+78	+243	A/A	
	Azathioprine	22	17	W/W	1.3	5	+20	N/A	
	Cyclophosphamide	15	5	W/N	3.0	+2	+20	N/A	
	Methotrexate	47	34	M/M	1.4	+5	+20	N/A	
	Mizoribine	8	13	W/W	0.6	+4	8	N/W	
Pollutions	NiCl ₂	75	65	S/M	1.2	26	+61	M/A	
	Formaldehyde	45	+1	M/N	>>1	+67	+154	A/A	
	Diesel exhaust particles (DEP)	67	18	M/M	3.7	+59	19	A/W	
Metals	BaCl ₂	94	49	S/M	1.9	40	29	M/M	1.4
	MnCl ₂	92	10	S/W	9.3	4	+118	N/A	
	ZnCl ₂	82	34	S/M	2.4	13	+207	W/A	
	FeCl ₂	92	51	S/M	1.8	3	+35	N/A	
Others	Trimellitic anhydrate	+28	+16	A/A		+1	+10	N/A	
	Dinitrochlorobenzene(DNCB)	+100	+39	A/A		23	13	W/W	1.8

免疫抑制効果 : Augmentation ; >+5, Null ; <+5~<=5, Weak ; >5~<=25, Moderate ; >25~<=75, Strong ; >75

さらに、図 III. 2.4-44 に示すように、Multi-ImmunoTox assay の各種パラメーターを作用機序が既知の免疫毒性物質のパターンと比較することにより、新規の化学物質の免疫毒性作用を推測できる可能性が示唆された。

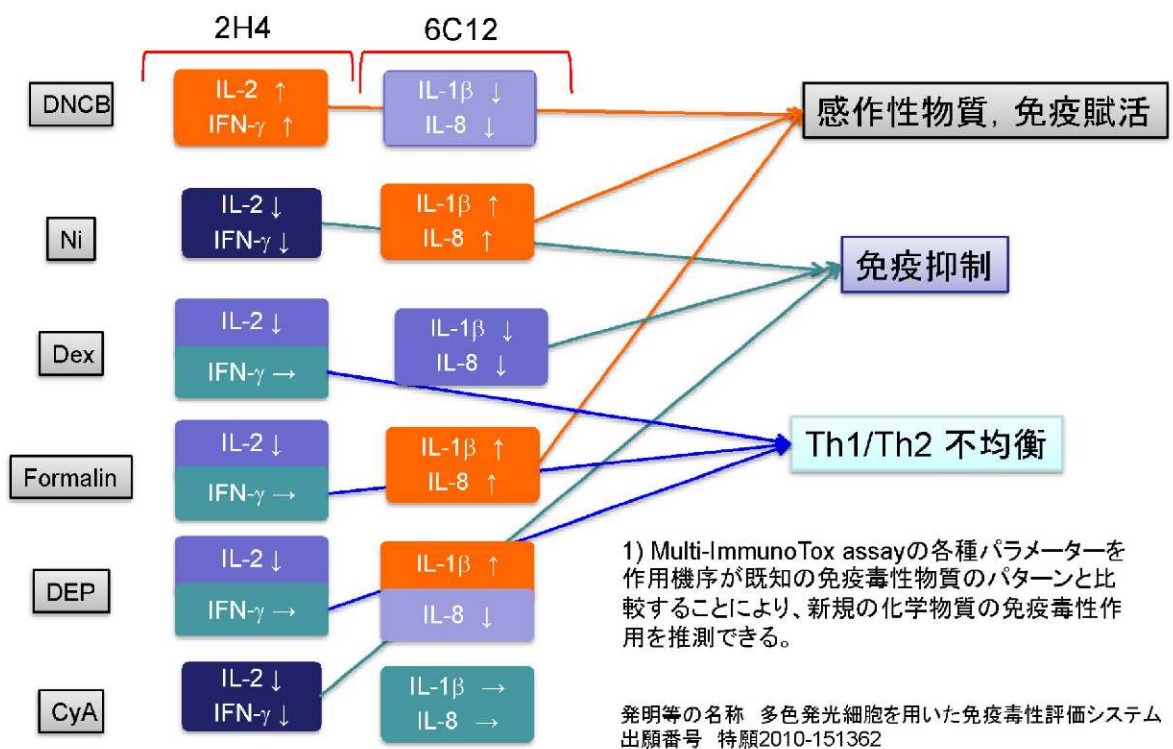


図 III. 2.4-44 Multi-ImmunoTox assayによる免疫毒性物質分類

④-3 細胞ストレス評価システム (HMOX1 assay)

HMOX1 レポーター細胞の有用性を評価する目的で、我々の生活環境に存在し、文献的に何らかの細胞障害性や免疫毒性が報告されている25種類の金属化合物に関して、HMOX1 レポーター細胞を用いた免疫毒性評価を試みた(表III.2.4-20)。検討した金属化合物のなかでは、Au、Cd、In、Li、Ni、Pd、Snにより強いルシフェラーゼ活性の増加が認められた。Cdはイタイイタイ病の原因としてよく知られ、Auは免疫調節作用がありリウマチの治療薬でもある。Ni、Snは、接触皮膚炎を引き起こす代表的化学物質として有名であり、一方、Pd、Inなどは、歯科金属に含まれ、これらが原因の接触皮膚炎、肉芽腫性口唇炎などの報告がある。以上の結果より、本研究により作成したHMOX1 レポーター細胞の化学物質免疫毒性、細胞ストレスの一次スクリーニングにおける有用性が示された。

表III. 2.4-20. HMOX1 assayによる金属化合物の毒性評価

金属	HMOX1 reporter assay	免疫毒性
AgNO ₃ Silver nitrate	+	アレルギー、免疫賦活
C ₄ H ₃ AuNaO ₄ S Gold sodium thiomalate	++	アレルギー、接触皮膚炎
BeSO ₄ Beryllium sulfate	+	遅延型過敏症、肉芽腫性肺炎、慢性ペリリウム病
CdCl ₂ Cadmium chloride	++	アレルギー
CoCl ₂ Cobalt chloride	+	アレルギー、肉芽腫
FeCl ₃ Iron chloride	-	
FeSO ₄ Iron sulfate	+	
HgCl ₂ Mercury chloride	+	アレルギー、肉芽腫、自己免疫
InCl ₃ Indium chloride	++	アレルギー、間質性肺炎
IrCl ₃ Iridium chloride	-	
K ₂ Cr ₂ O ₇ Potassium dichromate	+	アレルギー、接触皮膚炎、肉芽腫
LiCl ₂ Lithium chloride	++	白血球増加、乾癬の発症
MnO ₂ Manganase dioxide	-	
NiCl ₂ Nickel chloride	++	アレルギー
Pb(O ₂ COCH ₃) Lead acetate	+	
PbCl ₂ Lead chloride	+	免疫毒性?
PdCl ₂ Palladium chloride	++	アレルギー
(NH ₄) ₂ PtCl ₄ Platinum diamine chloride	-	アレルギー
RbI Rubidium iodide	-	
Rh ₂ (SO ₄) ₂ Rhodium sulfate	+	アレルギー
SnCl ₂ Tin chloride	++	
C ₉ H ₉ HgNaO ₂ S Thimerosal	+	アレルギー
TiO ₂ Titanium oxide	-	
ZnSO ₄ Zinc sulfate	+	
V ₂ O ₅ Vanadium pentoxide	+	免疫毒性

++: ルシフェラーゼ活性の強い増加; +: 弱い増加; -: 増加なし

④-4 まとめ

本プロジェクトにより開発されたIL-8レポーター細胞を用いたIL-8 Luc assayが新たな接触皮膚炎感作性物質代替法となりうる可能性が示された。また、IFN- γ 、IL-2評価細胞とIL-1 β 、IL-8評価細胞を組み合わせたMulti-ImmunoTox assayにより種々の免疫毒性物質のprofilingが可能となった。最後に、HMOX1レポーター細胞を用いたHMOX1 assayにより種々の細胞ストレスを総合的に評価することが可能となった。

⑤複数施設での施設間差検討試験

⑤-1 施設間差検討実験 (Jurkat_3 色細胞#2H4)

本プロジェクトで樹立した IL-2/pSLG、IFN- γ /pSLO 及び G3PDH/pSLR を含む Jurkat_3 色細胞株#2H4 を利用した化学物質の免疫毒性試験法における技術確認、及び被験物質に対する評価の施設間差について検討することを目的とし、東北大学病院、東洋紡績株式会社、(独) 産業技術総合研究所、(財) 食品薬品安全センター秦野研究所及び住友化学株式会社の 5 施設において施設間差試験を実施した。なお、実験方法詳細及び結果は以下の通りである。

①試験目的

1. 本プロジェクトで樹立した Jurkat_3 色細胞株#2H4 の試験プロトコールに従って、練習物質 (1 種類) の評価を行い、試験の技術易習得性の確認を行う。
2. 参加施設で同じ盲験試料 3 化合物を評価し、施設間再現性について評価する。

②試験プロトコール及び試験で使用する細胞・消耗品の発送について

本試験で使用したプロトコールは「多色発光安定細胞株を用いた免疫毒性試験法 施設間差試験プロトコール-Jurkat#2H4 編-」に基づいて行った。

また、デモンストレーションを含む試験説明会を 2010 年 10 月 26 日に実施し、試験で使用する細胞・試薬等を同年 11 月 1 日及び 10 日に各施設に送付した。従って、本試験で使用した全ての細胞・試薬等における Lot 差はなく、施設間で全て同一のものである。

③結果

1. 練習物質による技術易習得性の評価

盲験試料の評価に先立ち、練習物質である塩化ニッケルの評価を行い、試験の技術易習得性の確認を行った。塩化ニッケルは、IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のプロモーター領域における抑制効果があること、加えて濃度依存的にその発現は抑制されることがこれまでの検討により既に示されていることから、練習物質として採用した。

試験法提案施設である東北大学病院を含む全施設において、IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性は濃度依存的に低下していることが示されたことから、技術易習得性があると判断できた。

2. 盲験物質による施設間再現性の評価

練習物質による技術易習得性の評価が終わった施設から順に、盲験物質 3 種類を使用しての施設間再現性評価を行った。全ての施設において、盲験物質 1 種類につき各 3 回の反復試験を行い、盲験物質に対する施設内標準偏差及び施設間差標準偏差を算出した。加えて本実験の手技を各施設に慣れてもらうことを目的とし、先に使用した練習物質 (塩化ニッケル) も盲験物質と同様に試験を行った。

結果を表Ⅲ.2.4-21 に示す。今回用いた盲験物質は、デキサメサゾン、シクロスポリン A 及びメトトレキサートの 3 種類であり、いずれも免疫抑制剤として汎用されているものである。デキサメサゾンについては、全施設において IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性は濃度依存的に低下していることが示された。シクロスポリ

ン A も同様に、全施設において IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性は濃度依存的に低下していることが示された。メトトレキサートでは、4 施設において IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性は変化せず、1 施設において両遺伝子のルシフェラーゼ活性が濃度依存的に低下することが示された。加えて、各施設における盲験物質及び練習物質の 3 回の反復試験結果を精査したところ、施設内の盲験物質の結果はいずれも傾向が同じであることから、試験技術には問題がないと考えられた。

表Ⅲ.2.4-21 盲験物質及び練習物質の施設間結果比較

	PMA/Ionomycin + 100 μ M NiCl ₂ (%)		PMA/Ionomycin + 300 μ M NiCl ₂ (%)		PMA/Ionomycin + 1 mM NiCl ₂ (%)	
	※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合	
	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ
Lab. A	73.5 \pm 3.3	92.6 \pm 0.7	40.7 \pm 4.1	72.5 \pm 3.3	5.1 \pm 1.3	27.2 \pm 1.1
Lab. B	73.0 \pm 7.2	91.8 \pm 3.8	36.4 \pm 9.4	61.6 \pm 8.0	5.4 \pm 0.6	9.4 \pm 4.2
Lab. C	115.9 \pm 56.3	107.3 \pm 16.9	46.2 \pm 4.8	71.0 \pm 4.0	13.4 \pm 0.2	26.6 \pm 5.2
Lab. D	86.6	90.2	54.7	64.5	9.0	15.0
Lab. E	92.1 \pm 9.5	95.4 \pm 4.8	61.1 \pm 8.6	82.8 \pm 5.1	13.7 \pm 2.1	35.7 \pm 4.3
Average	88.2 \pm 17.5	95.5 \pm 6.9	47.8 \pm 10.1	70.5 \pm 8.2	9.3 \pm 4.1	22.7 \pm 10.5

	PMA/Ionomycin + 100 nM DEX (%)		PMA/Ionomycin + 1 μ M DEX (%)		PMA/Ionomycin + 1 μ M DEX (%)	
	※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合	
	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ
Lab. A	82.7 \pm 6.8	96.5 \pm 2.9	82.5 \pm 9.0	98.5 \pm 3.2	73.6 \pm 6.7	95.8 \pm 2.2
Lab. B	82.0 \pm 5.5	96.6 \pm 3.3	81.0 \pm 5.3	97.0 \pm 4.2	77.4 \pm 3.1	97.5 \pm 3.3
Lab. C	77.2 \pm 10.2	95.3 \pm 7.2	71.2 \pm 2.1	93.7 \pm 1.7	77.6 \pm 5.6	97.9 \pm 2.7
Lab. D	86.9	95.2	75.3	87.6	74.8	88.5
Lab. E	87.1 \pm 5.9	99.8 \pm 2.3	82.8 \pm 4.5	98.0 \pm 1.7	76.8 \pm 4.0	96.6 \pm 3.2
Average	83.2 \pm 4.1	96.7 \pm 1.9	78.6 \pm 5.1	95.0 \pm 4.5	76.0 \pm 1.8	95.3 \pm 3.9

	PMA/Ionomycin + 10 nM CyA (%)		PMA/Ionomycin + 100 nM CyA (%)		PMA/Ionomycin + 1 μ M CyA (%)	
	※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合	
	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ
Lab. A	55.3 \pm 7.6	85.1 \pm 3.5	4.3 \pm 1.6	46.4 \pm 3.9	1.6 \pm 1.1	37.8 \pm 2.1
Lab. B	83.4 \pm 9.6	93.1 \pm 5.1	8.9 \pm 10.0	37.7 \pm 17.2	2.1 \pm 0.9	22.7 \pm 1.7
Lab. C	9.5 \pm 5.5	44.8 \pm 8.7	3.6 \pm 1.3	25.8 \pm 3.9	3.4 \pm 0.4	24.6 \pm 2.7
Lab. D	43.8	59.9	0.5	13.6	0.4	12.3
Lab. E	42.4 \pm 8.9	74.9 \pm 6.0	0.74 \pm 0.5	32.5 \pm 1.0	1.0 \pm 0.0	21.9 \pm 0.6
Average	46.9 \pm 26.6	71.6 \pm 19.4	3.59 \pm 3.4	31.2 \pm 12.4	1.7 \pm 1.1	24.5 \pm 9.1

	PMA/Ionomycin + 1 μ M MTX (%)		PMA/Ionomycin + 10 μ M MTX (%)		PMA/Ionomycin + 100 μ M MTX (%)	
	※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合		※P/I刺激を100%とした場合	
	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ	IL-2	IFN- γ
Lab. A	96.8 \pm 5.2	105.7 \pm 5.7	97.3 \pm 5.9	105.4 \pm 7.4	94.5 \pm 15.1	100.2 \pm 7.5
Lab. B	91.0 \pm 19.3	100.4 \pm 13.8	94.0 \pm 21.5	101.4 \pm 14.4	92.0 \pm 18.6	99.2 \pm 13.2
Lab. C	148.4 \pm 51.3	130.7 \pm 18.7	101.9 \pm 37.0	115.9 \pm 7.5	76.1 \pm 15.0	90.4 \pm 8.9
Lab. D	101.9	103.0	112.0	110.5	120.4	115.3
Lab. E	112.2 \pm 3.3	113.6 \pm 1.8	108.9 \pm 2.9	113.2 \pm 0.5	109.3 \pm 7.0	112.4 \pm 2.2
Average	110.0 \pm 22.8	110.5 \pm 11.8	102.8 \pm 7.6	109.3 \pm 5.9	98.5 \pm 17.0	103.5 \pm 10.3

表Ⅲ.2.4-21 (続き)

	IL-2					IFN- γ				
	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E	Lab. A	Lab. B	Lab. C	Lab. D	Lab. E
① Dexamethasone (10 μ M)	-26	-23	-22	-27	-23	-4	-3	-2	-16	-3
② Cyclosporin A (1 μ M)	-98	-98	-97	-100	-99	-62	-77	-75	-100	-75
③ Methotrexate hydrate (100 μ M)	-4	-8	-24	+6	+9	0	-1	-10	+5	+12
④ NiCl ₂ (1 mM)	-95	-95	-87	-95	-86	-73	-91	-73	-73	-64

	$x < -75$	strong
	$-75 \leq x < -25$	moderate
	$-25 \leq x < -5$	weak
	$-5 \leq x < +5$	non
	$+5 < x$	augment

3. 総合考察及び今後の課題について

盲験物質及び練習物質の施設間差試験を行った。結果はいずれも試験で使用了最も高い濃度で比較を行い、IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性の変化を数値で示した。その結果、メトトレキサート以外の全ての被験物質において、共通の傾向が得られたと考えられた。今回用いたデキサメサゾン、シクロスポリンは、いずれも IL-2 及び IFN- γ 両遺伝子のルシフェラーゼ活性を抑制する傾向があるものであり、結果も概ね反映していると考えられた。メトトレキサートについては、施設内においてもバラつきが大きい傾向が見られ、その原因として試薬調整が非常に難しいこと、また、メソトレキサートの抑制効果が軽微であることなどが考えられた。

以上から、今回行った試験により技術易習得性及び高い施設間差再現性が確認できた。また同時に試験物質の調整方法や濃度設定は今後の重要な課題として考えられた。

⑤-2 施設間差検討実験 (THP-1_2 色細胞 THP-G8)

本プロジェクトで樹立した IL-8/pSLO 及び G3PDH/pSLR を含む THP-1_2 色細胞株 THP-G8 を利用した化学物質の免疫毒性試験法における技術確認、及び被験物質に対する評価の施設間差について検討することを目的とし、東北大学病院、東洋紡績株式会社、(独) 産業技術総合研究所、(財) 食品薬品安全センター秦野研究所及び住友化学株式会社の 5 施設において施設間差試験を実施した。なお、実験方法詳細及び結果は以下の通りである。

①試験目的

1. 本プロジェクトで樹立した THP-1_2 色細胞株 THP-G8 の試験プロトコールに従って、練習物質 (2 種類) の評価を行い、試験の技術易習得性の確認を行う。
2. 参加施設で同じ盲験試料 6 化合物を評価し、施設間再現性について評価する。

②試験プロトコール及び試験で使用する細胞・消耗品の発送について

本試験でを使用したプロトコールは「多色発光安定細胞株を用いた免疫毒性試験法 施設間差試験プロトコール-THP-G8 編-」に基づいて行った。

また、デモンストレーションを含む試験説明会を 2010 年 10 月 26 日に実施し、試験

で使用する細胞・試薬等を同年 11 月 1 日及び 10 日に各施設に送付した。従って、本試験で使用した全ての細胞・試薬等における Lot 差はなく、施設間で全て同一のものである。

③結果

1. 練習物質による技術易習得性の評価

盲験試料の評価に先立ち、練習物質である 4-NBB, Lactic acid の評価を行い、試験の技術易習得性の確認を行った。4-NBB は、nSLO-LA を誘導すること、およびその誘導が NAC 添加により抑制されることがこれまでの検討により既に示されていることから、陽性対照の練習物質として採用した。Lactic acid は nSLO-LA を誘導しないことがこれまでの検討により示されていることから、陰性対照の練習物質として採用した。結果は、全施設において、4-NBB 刺激により nSLO-LA の誘導が認められ、その誘導は NAC 添加により抑制され、また Lactic acid 刺激で nSLO-LA の誘導は認められなかった。以上より技術易習得性があると判断できた。

2. 盲験物質による施設間再現性の評価

練習物質による技術易習得性の評価が終わった施設から順に、盲験物質 6 種類を使用しての施設間再現性評価を行った。全ての施設において、盲験物質 1 種類につき各 3 回の反復試験を行い、盲験物質に対する施設内標準偏差及び施設間差標準偏差を算出した。

今回用いた盲験物質は、4-NBB, DNCB, NiSO₄, Citral, Glycerol, Lactic acid の 6 種類であり、LLNA では DNCB が Extreme sensitizer, NiSO₄ が Moderate sensitizer, Citral が Weak sensitizer, Glycerol と Lactic acid は Non-sensitizer として分類されている。一方、Casati らは皮膚感作性のための In Vitro 試験に使用する化学物質 16 種類を挙げているが、その中で 4-NBB, DNCB は Positive control, Glycerol, Lactic acid は Negative control として分類されている。Non-sensitizer または Negative control に分類されている Glycerol と Lactic acid については全施設にて nSLO-LA の誘導は認められず、本施設間差試験で設定した IL-8 誘導値(FInSLO-LA)の閾値である 1.5 を下回り non-sensitizer と判別できた。4-NBB, DNCB, NiSO₄, Citral については多くのアッセイでその化学物質の刺激性に応じた FInSLO-LA の上昇がみられた。また、NAC 添加によりほとんどで IL-8 誘導率の抑制が認められた。各施設における盲験物質の 3 回の反復試験結果を精査したところ、数値のばらつきはあるもののいずれも同じ傾向が認められ、試験技術には問題がないと考えられた。

3. 総合考察及び今後の課題について

本施設間試験では FInSLO-LA の閾値を 1.5、NAC 抑制率 (SI-SLR-LA)の閾値を 80% とし、判定をおこなった。FInSLO-LA が 1.5 以上かつ SI-SLR-LA が 80%以下のもの（抑制されるもの）を sensitizer と判定し、FInSLO-LA が 1.5 未満のもの、または FInSLO-LA が 1.5 以上であるが SI-SLR-LA が 80%を超えるもの（抑制されないもの）を non-sensitizer を判定した。

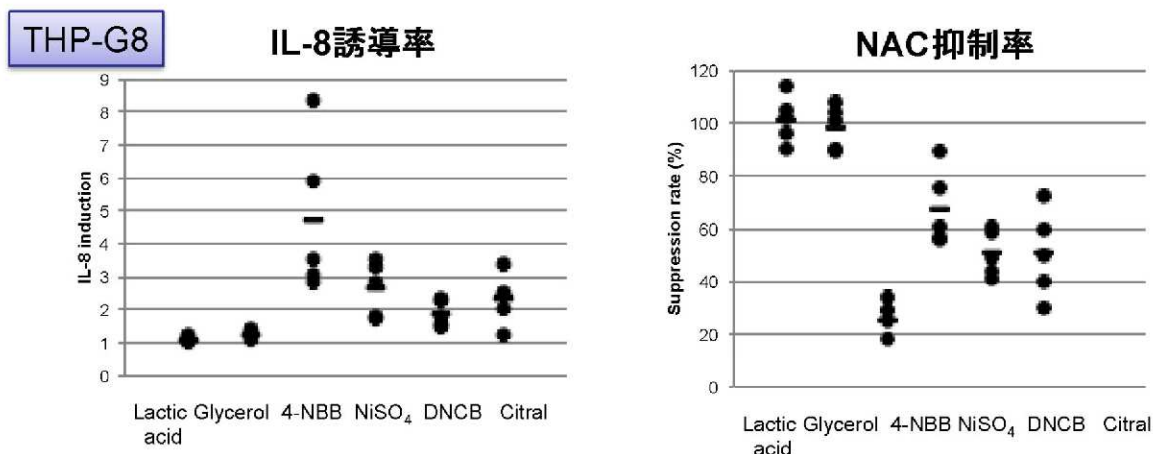
6 個の盲験物質の施設間差試験の結果を図 III. 2. 4-45 に示す。Glycerol と Lactic acid についてはすべての施設、すべてのアッセイで non-sensitizer と正しく判定された。一

方、4-NBB, DNCB, NiSO₄, Citral については non-sensitizer と判定される偽陰性が散見された。試験結果を精査したところ、今回の試薬の段階希釈が 1.5-2.0 倍と比較的粗い濃度設定としており、そのため FInSLO-LA がピークとなる濃度をはずし実際より低い値しか得られなかった可能性が考えられた。さらに NiSO₄ で刺激したアッセイでみられるように FInSLO-LA がピークとなる NiSO₄ の濃度で NAC 存在時の FInSLO-LA の立ち上がりが見られ、結果として NAC による抑制がみられず偽陰性になるという事象も認められた。

今後、これらの問題を解決する方法として、濃度の設定を見直すとともに、一度おおよかな濃度設定を行い、FInSLO-LA のピークとなる濃度の付近で再度こまかい濃度設定を行って2回目のアッセイを行うという 2 段階の試験をおこなうことも検討する必要がある。さらに必要であれば FInSLO-LA、SI-SLR-LA の閾値についても今後見直していく必要がある。

以上から、今回行った試験により技術易習得性及び施設間差再現性が確認できた。しかしながら本施設間差試験で採用した判定法では偽陰性が散見し、試薬の濃度設定や判定法が今後の重要な課題として考えられた。

	A : Lactic acid		B : Glycerol		C : 4-NBB		D : NiSO ₄		E : DNCB		F : Citral	
	IL-8誘導率	NAC抑制率	IL-8誘導率	NAC抑制率	IL-8誘導率	NAC抑制率	IL-8誘導率	NAC抑制率	IL-8誘導率	NAC抑制率	IL-8誘導率	NAC抑制率
東北大	1.04±0.03	113.6±12.6	1.26±0.13	108.2±5.7	5.93±3.03	18.7±6.1	3.51±1.04	60.4±15.9	2.37±0.99	43.9±16.9	2.48±0.18	49.8±5.4
東洋紡	1.02±0.03	101.7±2.2	1.07±0.05	100.9±7.1	2.82±0.16	33.9±2.1	2.83±0.20	56.5±5.8	1.51±0.25	58.2±8.6	2.40±0.62	39.7±10.3
産総研	1.06±0.07	95.9±3.8	1.25±0.09	88.9±7.3	3.07±0.19	29.3±3.2	1.80±0.42	75.1±15.8	1.79±0.11	46.5±3.3	3.34±0.85	29.7±9.6
産業センター	1.12±0.01	89.7±7.6	1.39±0.02	90.5±0.6	3.49±0.64	25.2±6.3	3.29±0.46	56.0±9.0	1.49±0.25	60.5±10.3	1.25±0.24	72.8±14.6
住友化学	1.20±0.15	105.2±5.1	1.28±0.12	103.5±11.0	8.34±8.15	29.4±33.0	1.73±0.41	89.2±13.6	2.28±0.27	41.0±4.7	2.01±0.96	59.6±23.4
Average	1.09±0.07	101.2±9.1	1.26±0.11	98.4±6.4	4.73±2.37	24.7±5.7	2.63±0.83	67.4±14.4	1.88±0.42	50.4±8.7	2.30±0.81	50.3±16.8
CV (%)	6.6	8.9	9.0	8.5	50.0	20.8	31.6	21.4	22.0	17.1	33.0	33.4



図Ⅲ.2.4-45 THP-1#THP-G8 施設間試験結果まとめ

結論

本研究開発において、化学物質が免疫系に有害作用を及ぼした際の指標となりうる遺伝子を toxicogenomics により抽出し、免疫毒性評価遺伝子として樹状細胞においては、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8 など5遺伝子、表皮細胞に関しては aldo-ketoreductase1、heme oxygenase-1 (HMOX1) など5遺伝子、また、T細胞に関しては HMOX1、GADD45A など5遺伝子を同定した。それらのうち、HMOX1、IFN- γ 、IL-4、IL-2、IL-1 β 、IL-8 遺伝子に関してレポーター細胞を樹立した。IL-8 レポーター細胞を用いた IL-8 Luc assay は、接触皮膚炎感作性試験代替法としての有用性が明らかとなり、今後、多施設での validation を経て OECD test guideline 化を目指す予定である。一方、IL-2/IFN- γ レポーター細胞 2H4 と IL-1 β /IL-8 レポーター細胞 6C12 を用いる Multi-ImmunoTox assay は免疫毒性を多面的に評価できる検査法として有用性が認められ国内特許(特願 2010-151362)、国際特許(PCT/JP2011/65090)の出願を行っている。今後、実用化に向けてさらに技術移転の可能性、施設間差の比較、validation などを重ねていく予定であり、それに対して METI からの予算措置も確定している。ストレスセンサーとも言われる HMOX1 レポーター細胞を用いた HMOX1 assay は、活性酸素産生、酸化還元バランス、ER ストレスなど細胞にストレスを与える化学物質のスクリーニング系としての有用性が示唆された。

以上、化学物質であふれる現代社会において、化学物質の免疫毒性を科学的根拠に基づき評価する新たな方法を確立することができた。一方、これらの技術の実用化に向けての更なる研究と検討の必要性が明らかとなった。

今後の展望

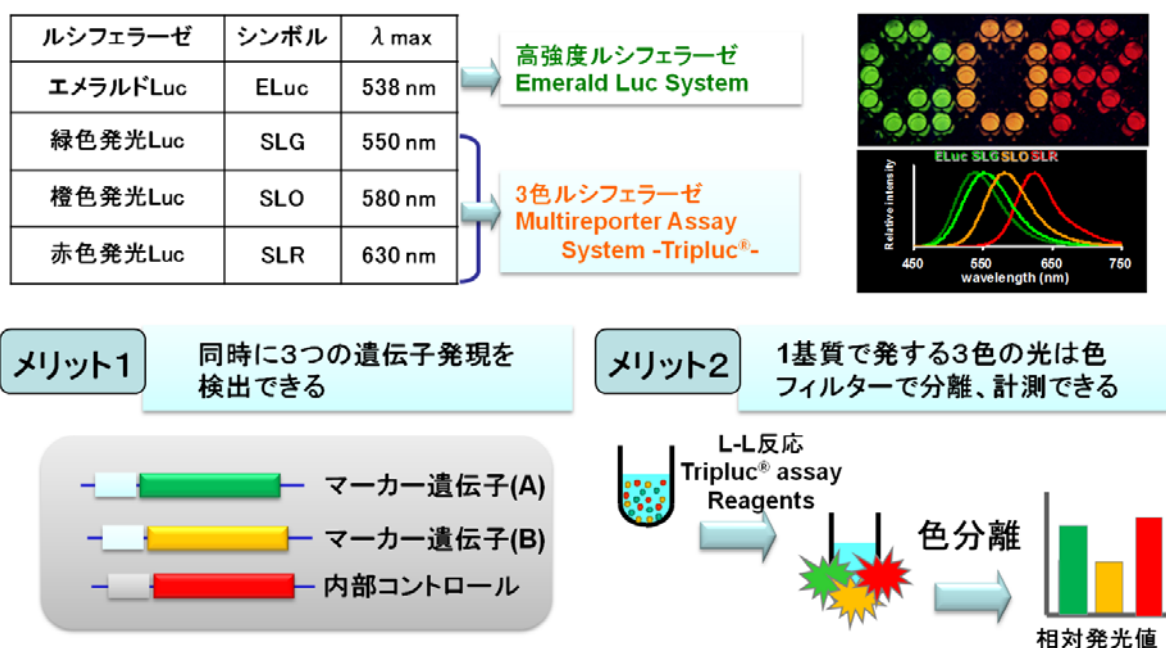
1. COLIPA の招請を受け、8月21日、カナダ モントリオールにて開催される COLIPA 主催 TASK FORCE SKIN TORELANCE 会議にて IL-8 Luc assay に関して発表予定である。
2. IL-8 Luc assay に関しては、本試験の国際化に向けて更なる validation 試験が今年度 METI のフォローアップ事業に採択されている。

2. 5 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発

2. 5. 1 背景と目標

本研究は、簡易かつ迅速で高精度な化学物質のリスク評価管理を行うための手法の開発を目標とする「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」の一環として行われた。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。しかし、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。これらの結果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ある。

これまでに、細胞内の有害性情報を取得する簡便且つ定量的な手法としてルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイが普及、例えば、2005年9月には環境省から「環境大臣が定める測定法」として、内分泌攪乱化学物質によって誘導される特定の遺伝子のレポーターアッセイが認可されている。しかしながら、従来、検出できる細胞内の遺伝子発現は2つに限定され、細胞内の多くの遺伝子発現情報を引き出すことはできなかった。一方、(独)産業技術総合研究所はNEDOプロジェクト「遺伝子ネットワーク解析技術の開発—細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発(2002-2006)」において、色識別可能な赤、橙、緑色の甲虫ルシフェラーゼに着目し、多色発光システムをベースとしたマルチレポーターアッセイ法を確立した(図Ⅲ. 2. 5-1)。本法は遺伝子発現を検出したい対象マーカー遺伝子の遺伝子転写調節領域を3色ルシフェラーゼ遺伝子上流部分に挿入したベクター群を細胞に導入して細胞内の3つの遺伝子発現を同時に検出、評価できるシステムで



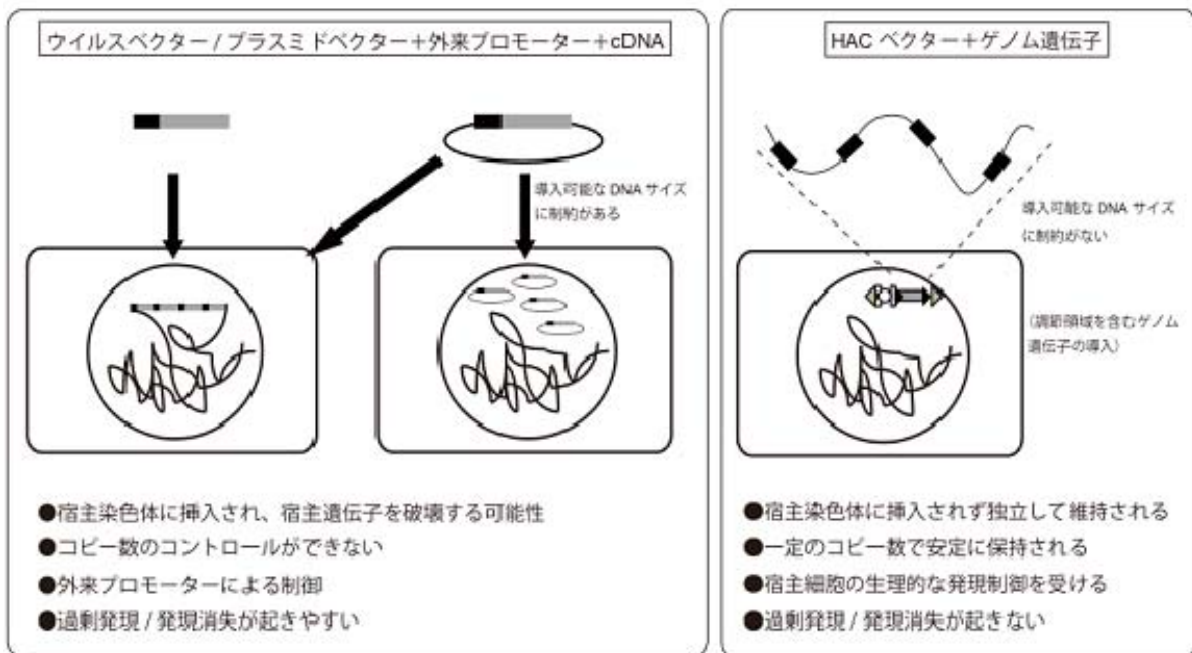
図Ⅲ. 2. 5-1 マルチレポーターアッセイ法 (NEDO 細胞内ネットワークのダイナミズム解析技術開発の研究成果) の原理とそのメリット

ある。最大発光波長は 630、580、550nm であり、溶液の pH や温度に影響されず安定なスペクトルの発光であることから色フィルターを用いることで簡単に色分離でき、短時間に 3つの相対発光値を評価できる。よって、本方法を化学物質評価細胞の中に導入できれば 3つの遺伝子発現を指標に毒性を評価できることになる。なお、既に本レポータアッセイ法に関する特許は各国で成立している（日本第 4385135 号、米国第 7572629 号、中国第 1784496 号、フランス第 1621634 号、ドイツ第 602004030104.3-0 号、英国第 1621634 号）。

鳥取大学では、遺伝子導入細胞を樹立するために有効なヒト人工染色体ベクターを開発している。ヒト人工染色体ベクターは染色体であるがゆえに導入サイズに制約がないため、遺伝子発現に必要な領域全てを導入することで生理的な発現を再現でき、かつランダムインデグレーションによる宿主染色体の破壊がないため、本来の遺伝子発現を損なわないという利点がある。これらにより、評価系に適した安定な発現株を取得できる可能性がある。また、任意のゲノムの発現制御領域を含む転写開始点に発光遺伝子を導入することで本来の遺伝子発現に近い発現量をモニターできる可能性がある。

鳥取大学で開発してきたヒト人工染色体ベクターは、ヒト 21 番染色体を染色体工学技術にて改変したものである。この人工染色体は、本来染色体に存在していたすべての内在性の遺伝子を除去染色体上の遺伝子を除去している。さらに、この染色体ベクターには、緑色蛍光タンパク質(EGFP)が恒常的に発現するシステム、必要に応じて細胞を除去するためのシステム、Cre/loxP で遺伝子を導入するシステムなどが構築されている。

このヒト人工染色体ベクターを用いることで再現性、頑健性の高い発光モニター細胞や複数の発光プローブを導入した細胞を効率よく構築することが可能になる（図Ⅲ. 2. 5-2）。



図Ⅲ. 2. 5-2 人工染色体の原理とそのメリット

そこで、多色発光マルチレポータ法及び人工染色体技術を特色とする基盤技術グループは発がん性、催奇形性及び免疫毒性予測技術開発グループを次世代技術と標準化の観点で支えることを目標に、研究課題として、①多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立（東洋紡&産総研）②多色発光システムの測定法の標準化（産総研）③ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築（鳥取大学）を目標に研究開発を行った（図Ⅲ. 2. 5-3）。より具体的には（独）産業技術総合研究所と東洋紡績株式会社は毒性予測試験法に適した多色発光システムの改変、改良を実施、これを元に免疫毒性評価細胞の樹立を東北大学と協力して実施した。また、発がん性評価細胞の樹立を秦野食薬センターと協力して行った。一方、今後予想されるバリデーションを円滑に行うため、誰が、どこで測定しても同じ結果が出るための測定法の構築を目指し、（独）産業技術総合研究所は3色の発光タンパク質の安定標品を元にした測定法の標準化を検討した。さらに国立大学法人鳥取大学医学系研究科は独自に開発した人工染色体技術を基盤技術という側面から発がん・催奇毒性・免疫毒性を評価する手法の開発に寄与した。



図Ⅲ. 2. 5-3 基盤研究グループと発がん性、催奇形性、免疫毒性評価グループの相互関係

2. 5. 2 最終目標に対する達成度

最終目標に対する達成度は、以下のとおりである。

研究開発課題	最終目標(平成22年度末)	最終目標の達成状況	達成度
D 高機能毒性予測試験法基盤技術の開発	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。	① 多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立：細胞内安定性や耐熱性が向上した各種発光プローブの改良に成功した。これらのプローブを基盤に免疫毒性評価3色発光細胞、発がん毒性評価2色発光細胞の樹立に成功した。	◎
		② 多色発光システムの測定法の標準化：標準発光物質として値付けされたルシフェラーゼタンパク質の作製、これを標準光源の代替とした発光測定装置ルミノメーターの絶対感度校正法を確立した。	◎
		③ ヒト人工染色体技術の導入した多色発光細胞の構築：毒性評価発光細胞の安定化及び効率的な作成法を確立するため、ヒト人工染色体(HAC)技術を活用、HAC発光ベクターを導入した免疫毒性評価用細胞を樹立した。また、多色発光プローブとHACベクターをマルチインテグレーションシステムで融合させた多色発光遺伝子導入システムの開発に成功した。	○

2. 5. 3 進捗状況と成果

① 多色発光システムの最適化と評価細胞の樹立

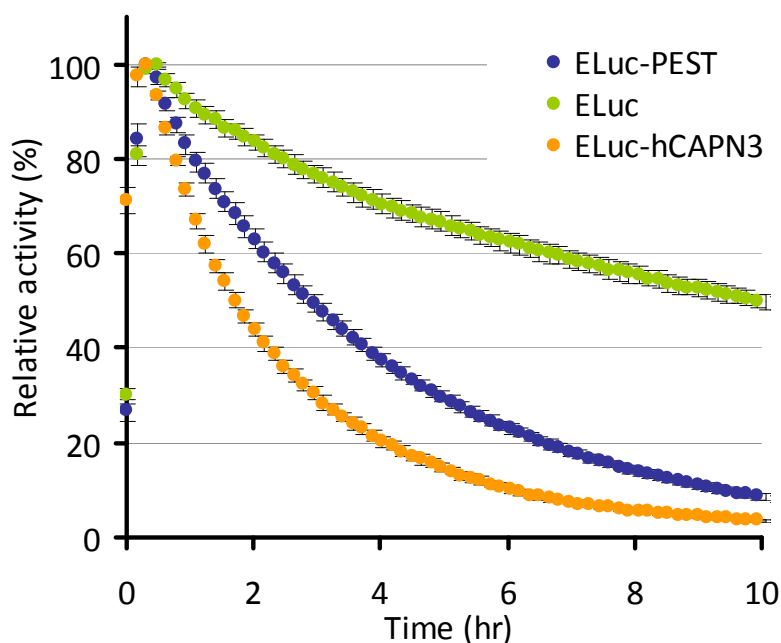
①-1-1 毒性評価用発光プローブの最適化：細胞内安定性制御

発光プローブを導入した細胞に化合物を暴露して数時間以内の応答を見る場合、細胞内寿命の長い発光プローブを用いると暴露前に細胞内で合成された発光プローブが残存するために、化合物に対する応答を十分にモニターできないことが懸念される。この問題を克服するため、細胞内寿命を短くする手法が用いられる。一般的には、発光プローブとなるレポータータンパク質にマウス由来オルニチンデヒドロゲナーゼのPEST配列を融合する技術が知られ、我々の発光プローブにも既に適用している。しかしながら、さらに応答性のよい発光プローブが必要とされるケースが想定される。そこで、PESTを融合させた場合よりも細胞内での寿命を短縮した発光プローブの開発を行った。

はじめに細胞内での不安定性の高いタンパク質遺伝子を情報収集し(表Ⅲ. 2. 5-1)、発光プローブ(ELuc)のC末端にこれらのタンパク質を融合させた発現ベクターを作製、マウス繊維芽細胞NIH3T3に一過的に導入後、タンパク質生合成阻害剤であるシクロヘキシミド存在下で35mmディッシュベースのリアルタイムルミノメーターにより発光プローブの安定性を検討した。その結果、カルパインタンパク質(hCAPN3)を融合させた場合、PEST配列を融合させた発光プローブよりも短寿命化効果が認められた(図Ⅲ. 2. 5-4)。

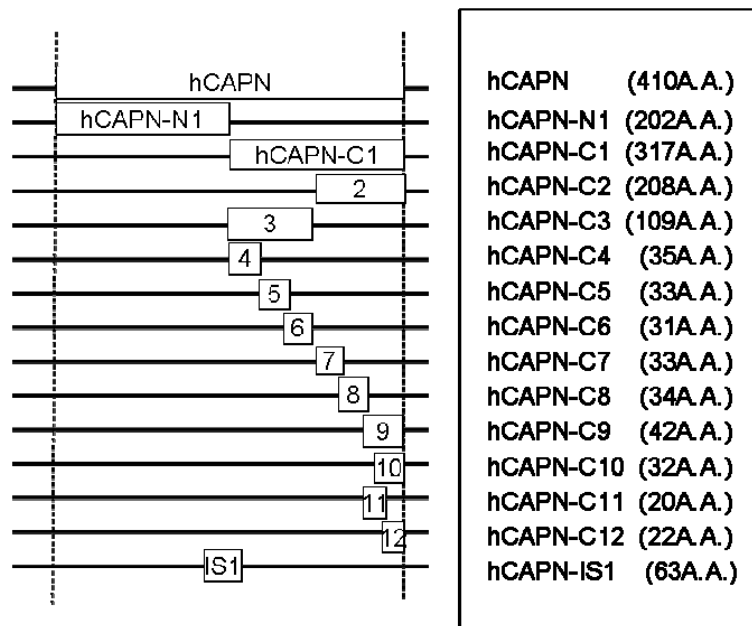
表Ⅲ. 2. 5-1 細胞内短寿命タンパク質遺伝子群

Accession No.	Gene description	TOYOBO Clone	FLJ Clone
AF209502	Calpain		FLJ44082
U87277	Splicing factor SRp30c	FCC138B10	
BC000804	Adaptor-related protein complex	FCC119B05	
BC011384	ATP synthase, H ⁺ transporting	FCC138B10	
BC007513	H19, imprinted maternally expressed		FLJ35167
BC003128	CGI-89 protein		FLJ10250
X89399	Ins(1,3,4,5)P4-binding protein	FCC157A12	
BC057397	Heat shock 70 kDa protein 1A	FCC134C11	
NM_015416	Cervical cancer 1 proto-oncogene protein p40	FCC127B03	
NM_000062	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor	FCC164B10	
AK054590	Function unknown	FCC104G07	



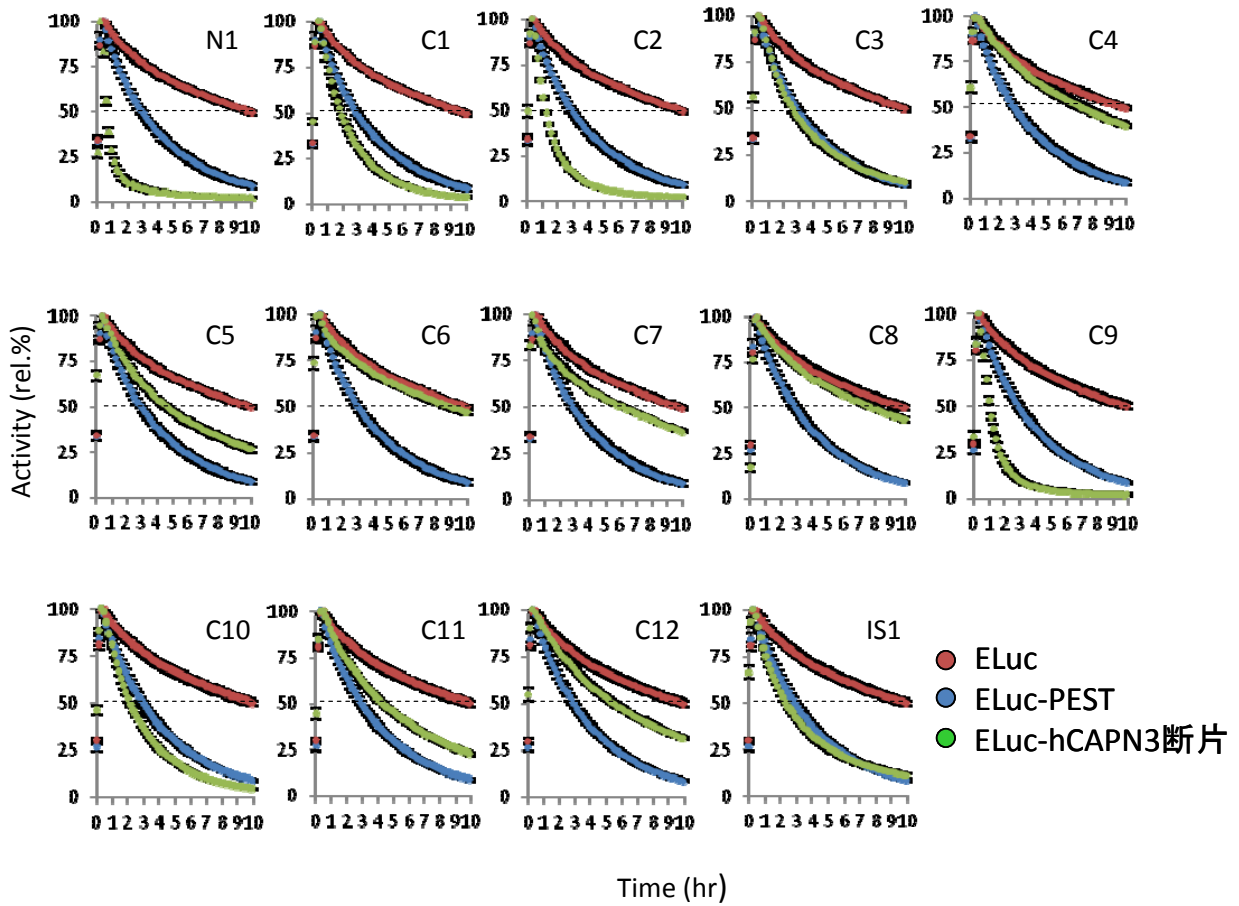
図Ⅲ. 2. 5-4 hCAPN3 融合による発光プローブの細胞内短寿命化

続いて、CAPN3 のタンパク質分解ドメイン（プロテアーゼ認識配列）を同定するため、inverse PCR 法により CAPN3 を 14 分割し、各々を ELuc の C 末端に融合させたコンストラクションを作製した（図Ⅲ. 2. 5-5）。細胞内半減期測定のための発光測定にあたり、これまでの 35 mm ディッシュベースのルミノメーター Kronos では多検体の測定が不可能であるため、96 ウェルプレートベースのルミノメーター（Phelios）を用いたリアルタイムの発光測定によりルシフェラーゼの細胞内安定性を評価した。作製した全てのコンストラクションを 96 ウェルプレートに播種した NIH3T3 細胞に一過的に導入（n=6）、一晚培養後、シクロヘキシミド、ルシフェリンおよび血清を含む DMEM 培地に交換し、20 分間隔で 10 時間、リアルタイム発光測定を行い、各々の断片を融合させた場合のルシフェラーゼの半減期を算出した。

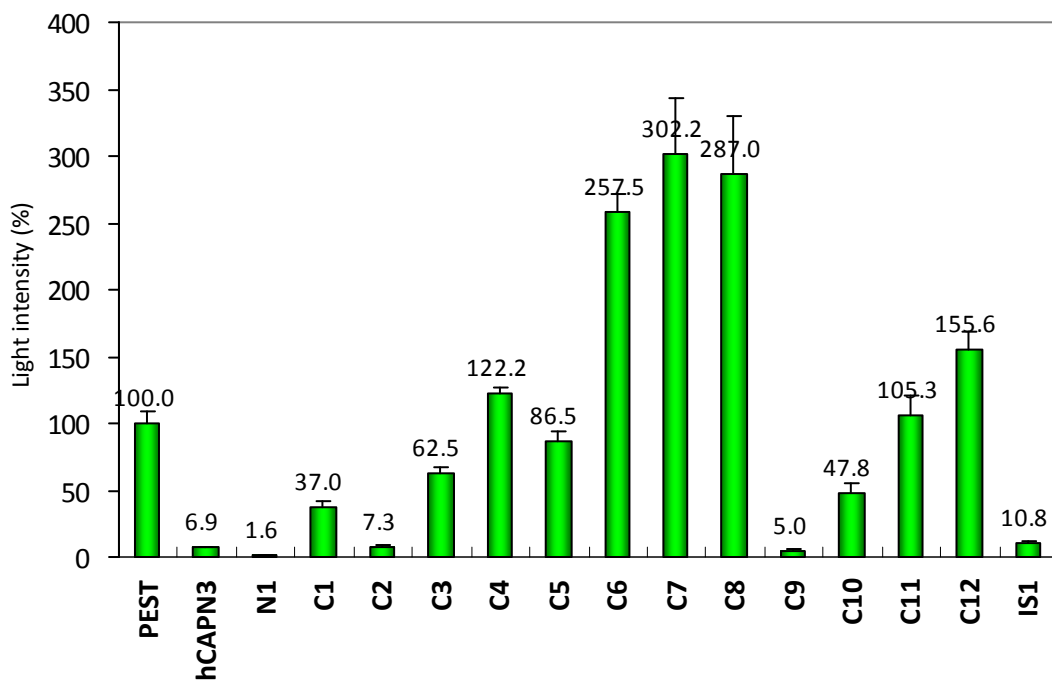


図Ⅲ. 2. 5-5 発光プローブ ELuc に融合した hCAPN3 断片の模式図

図Ⅲ. 2. 5-6は発光キネティクスを、表Ⅲ. 2. 5-2は各融合ルシフェラーゼの半減期、また、図Ⅲ. 2. 5-7には各々の相対発光強度を示す。CAPN3 の N 末端 (N1) と ELuc を融合させた場合、ルシフェラーゼの半減期は 0.57 時間と極めて短縮されたが、発光強度が従来の 1.6%以下と著しく低下、多色発光細胞による毒性評価には発光量が不十分であると判断した。そこで、CAPN3 の C 末端側 (C1) から分解ドメインを探索することとした。分割したドメインのうち、C 末端側の 42 アミノ酸からなる C9 (N-DDSEVICSFLVALMQ KNRRKDRKLGASLFTIGFAIYEVKPEV-C) を融合させることにより、目的とする半減期 1 時間程度にルシフェラーゼを不安定化することに成功した。なお、これまで汎用されている短寿命化シグナルであるオルニチンデカルボキシラーゼの PEST ドメインを融合させた場合、その半減期は 3 時間であることから、今回創出した CAPN3 の C 末端配列 (C9) により、PEST よりも約 3 倍の細胞内での不安定性を付与出来ることが明らかとなった。またこの際の発光強度は、PEST を融合させた ELuc と比べ約 5%の発光強度を保持しており、毒性評価に用いる発光プローブとしては十分な発光強度を示すことが判明した。以上の結果は、特開 2009-136154「タンパク質短寿命化ペプチドをコードする遺伝子及びその使用方法」として産総研、東洋紡の共同特許の出願を行った。



図Ⅲ. 2. 5-6 NIH3T3 細胞における CAPN3 断片融合 ELuc のリアルタイム



図Ⅲ. 2. 5-7 NIH3T3 細胞における CAPN3 断片融合 ELuc の相対発光強度

表Ⅲ. 2. 5-2 NIH3T3 細胞における各 CAPN3 断片融合 ELuc の細胞内半減期

Fusion fragment	Half-life (hr)	S.D.
None	9.83	0.33
PEST	2.79	0.14
N1	0.40	0.33
C1	1.26	1.04
C2	0.79	0.67
C3	1.72	1.42
C4	5.04	4.03
C5	2.99	2.44
C6	5.87	4.70
C7	4.12	3.43
C8	7.83	0.21
C9	0.99	0.03
C10	2.12	0.06

①-1-2 毒性評価用発光プローブの最適化：免疫毒性評価コントロール用プロモーター配列の特定

遺伝子発現解析いわゆるレポーターアッセイにおいては、目的とする標的遺伝子のプロモーターに加え、細胞数やトランスフェクション効率等の実験で生じる誤差を補正し、アッセイ系の精度を高めるためには適正な内部標準（インターナルコントロール）プロモーターが必要である。一方、毒性評価試験においては、化合物を暴露した際の細胞毒性による細胞生存率としてインターナルコントロールの使用が有効であり、毒性評価の精度向上に極めて重要である。

一般にインターナルコントロールとして用いられるプロモーターとして、ウイルス由来の恒常性プロモーターであるチミジンキナーゼ（TK）プロモーター、シミアンウイルス40（SV40）プロモーター、サイトメガルウイルス（CMV）プロモーターが知られている。しかし、細胞生理に様々な影響を及ぼす毒性評価試験において、これらのインターナルコントロールプロモーターの使用が適しているかは検討されていない。実際に、CMV プロモーターは、Phorbol 12-myristate 13-acetate（PMA）と Ionomycin との刺激により大きく変動することが予備実験的に確認された。そこで、毒性評価試験（特に免疫毒性試験）に適したインターナルコントロール用プロモーターを選択するため、従来使用されていたウイルス由来のインターナルコントロールプロモーターに加え、種々のヒト由来ハウスキーピング遺伝子プロモーターについて、それらの細胞内での basal 活性や薬剤応答性を指標に検討した。

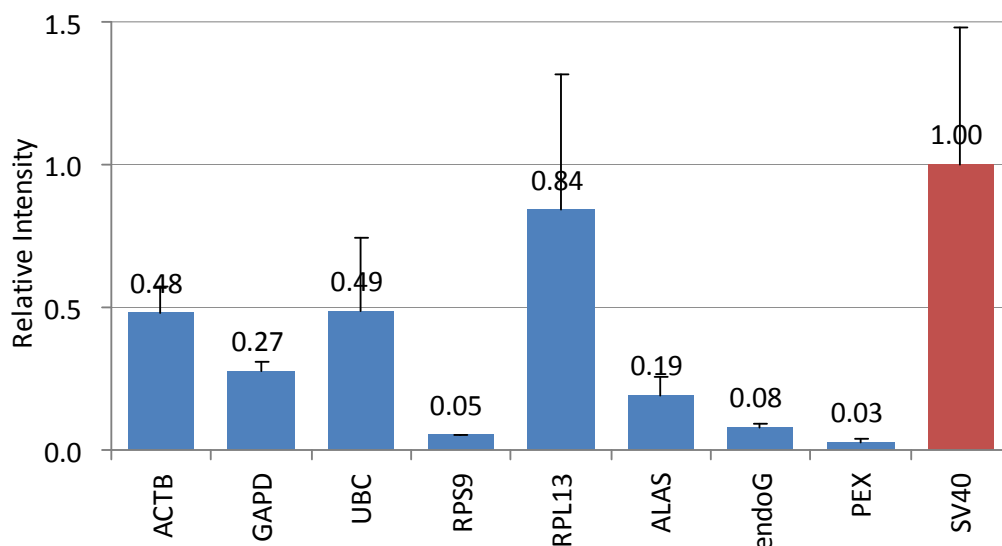
発光プローブとしては、免疫毒性のマーカとなる遺伝子の細胞内での発現量が低いことを想定し、免疫毒性マーカのプロモーターに発光強度の高い緑色（SLG, $\lambda_{\max} = 550$ nm）および橙色（SLO, $\lambda_{\max} = 580$ nm）ルシフェラーゼを、一方インターナルコントロールには赤色（SLR, $\lambda_{\max} = 630$ nm）ルシフェラーゼを用いることとした。

東洋紡が所有する9種類の内在性ハウスキーピング遺伝子プロモーター（表Ⅲ. 2. 5-

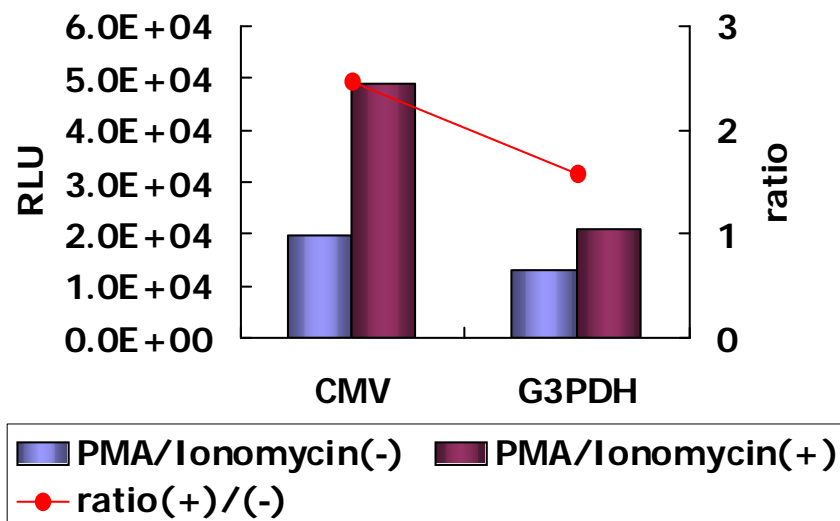
表Ⅲ. 2. 5-3. 使用したヒト由来ハウスキーピング遺伝子プロモーター

Gene name	Symbol	Accession No.
β-actin	ACTB	NM_001101
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3PDH	NM_002046
α-tubulin	K-ALP HA1	NM_006082
Cubiquitin	UBC	NM_021009
ribosomal protein S9	RPS9	NM_001013
ribosomal protein L13	RPL13	NM_000977
aminolevulinate, delta, synthase1	ALAS1	NM_199166
Endonuclease G, precursor	endoG	NM_004435
peroxisomal biogenesis factor 19	PEX19	NM_002857

3) を SLR の上流に連結したレポーターベクターを作製した。続いてこれらのプロモーターの細胞内でのプロモーター活性および細胞内キネティクスを検討するため、各レポーターベクターを96ウェルマルチプレートに播種した NIH3T3 細胞にリポフェクション法により一過的に導入した。プロモーター活性の測定は、Tripluc Luciferase Assay Reagent を用いて細胞破碎液中のルシフェラーゼ活性を測定した (図Ⅲ. 2. 5-8)。その結果、ACTB、G3PDH(GAPDH)、UBC、RPL13 は SV40 プロモーターの 48、27、49、84%の発光活性を示した。ただし、このうち、RPL13 については別途実施したリアルタイム発光測定によるキネティクス測定において、ウイルス由来のプロモーターと同様の非特異的ピークが認められ、不採用とした。



図Ⅲ. 2. 5-8 NIH3T3 細胞におけるハウスキーピング遺伝子のプロモーター活性 (SV40 プロモーターの発光活性を1としてノーマライズした相対発光値を示す)



図Ⅲ. 2. 5-9 Jurkat 細胞におけるインターナルコントロールの安定性

次に、ハウスキーピング遺伝子プロモーターの薬剤刺激に対する応答性について検討するため、各レポーターベクターを Jurkat 細胞に一過的に導入後、25 nM PMA と 1 μ M ionomycin で処理を行い、SLR の発現誘導の程度について評価した。その結果、G3PDH 遺伝子プロモーターは無処理の場合の発光値と比較し、大きな変動が見られなかったことから（図 III. 2. 5-9）、G3PDH 遺伝子プロモーターがインターナルコントロールとして適していることが示唆された。一方、マーカー遺伝子を探索する際の RNA の発現解析にはインターナルコントロールとして G3PDH 遺伝子を用いていることから、その相関を見る上でも G3PDH 遺伝子プロモーターが適切であると判断した。以上より、免疫毒性試験のインターナルコントロールベクターとして G3PDH 遺伝子プロモーターを挿入した SLR ベクターを用いることとした。

①-1-3 毒性評価用発光プローブの最適化：赤色発光ルシフェラーゼの高機能化

本研究において使用する 3 種の多色発光プローブのうち、鉄道虫 (*Phrixothrix hirtus*) 由来の赤色発光ルシフェラーゼ (SLR) は、他の緑色 (SLG) および橙色 (SLO) 発光ルシフェラーゼと比べ細胞内での安定性が低く、また細胞破碎液中における熱安定性が十分でないため、SLG および SLO よりも相対的に発光強度が低い。そこで、多色発光プローブを用いた毒性評価試験の精度向上のため、遺伝子工学的手法による細胞内安定性および細胞破碎液中の熱安定性を高めた SLR の改変を実施した。

SLR の改変は、CMV プロモーター下流に SLR が挿入されたレポーターベクター (CMV-SLR) を鋳型とし、inverse PCR 法により SLR 活性中心近傍に部位特異的変異を導入、I212L、N351K、S463R、I212L/N351K、I212L/S463R のシングルおよびダブル変異体を作成した。各変異体のレポーターベクターを NIH3T3 細胞に一過的に導入後、各々のタンパク質発現量および細胞破碎液中の発光強度を測定した (図 III. 2. 5-10)。タンパク質発現量は抗 SLR 抗体を用いた western blot 法により、また細胞破碎液中の発光活性は

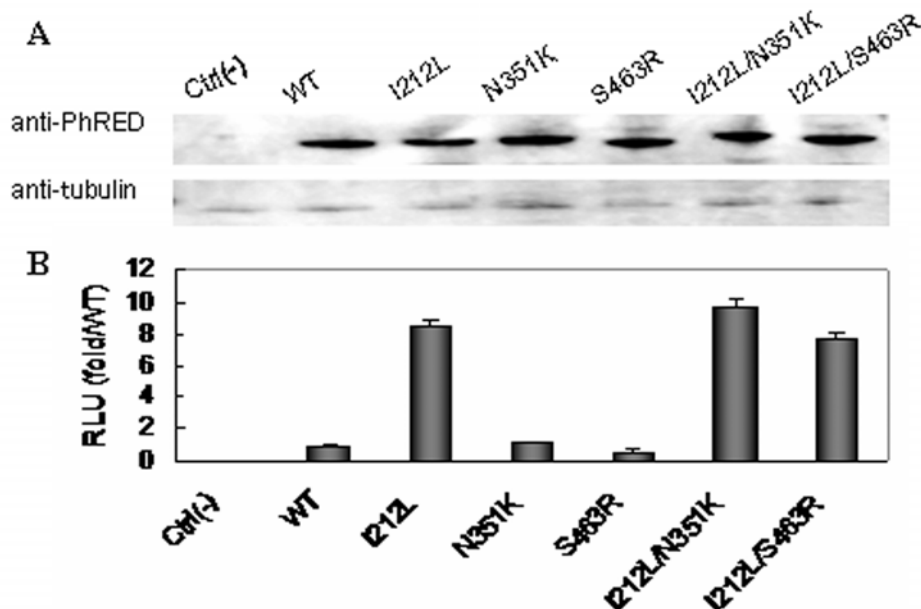
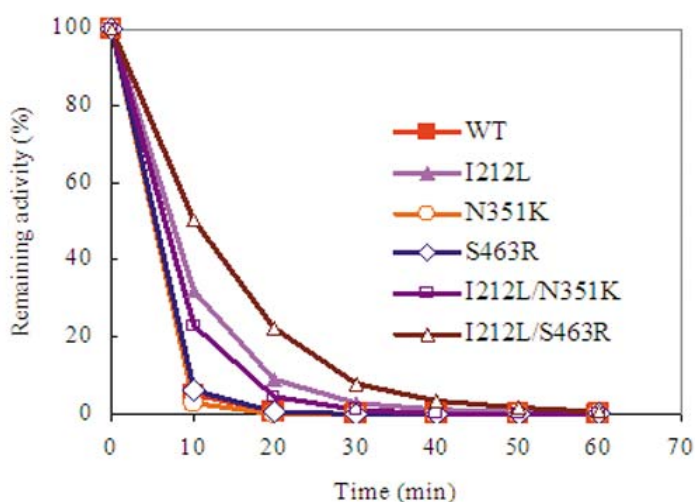


図 III. 2. 5-10 NIH3T3 細胞における SLR 変異体のタンパク質発現量 (A) および細胞破碎液中の発光強度 (B)

Luciferase Assay Reagent II (Promega, LARII) を発光基質に用い測定した。その結果、I212L、I212L/N351K、I212L/S463R の3種の変異体の細胞液中の発光強度が野生型のそれに比べ、8から10倍増加することが明らかとなった。なお、細胞破碎液中の各々の発光キネティクスは野生型と同じであることは確認している (いずれのキネティクスデータも同一のためデータ掲載は省略)。続いて各変異体の熱安定性について検討した。各変異体のタンパク質を発現させた NIH3T3 細胞の破碎液を37℃で60分間インキュベートし、10分毎に各々の残存活性を測定したところ、I212L、I212L/N351K、I212L/S463R の3種の変異体では野生型と比べ、優位に熱安定性が向上していることが判明した (図 III. 2. 5-11)。表 III. 2. 5-4 で認められた細胞破碎液中での発光強度の増加が熱安定性の向上に起因することが示唆された。

次に、上記5種の変異体の発光スペクトルを測定した。発光スペクトルは、各変異体を発現させた NIH3T3 細胞の破碎液に Luciferase Assay Reagent II (Promega, LARII) を添加、微弱発光スペクトロメーターを用い1分間発光を露光することにより測定した。I212L、S463R、I212L/S463R の3種の発光スペクトルは野生型と同様に 630 nm に最大発光波長を示したが、N351K、I212L/N351K は 10 nm 短波長側にシフトし、最大発光波長 620 nm の発光スペクトルを示すことが明らかとなった (表 III. 2. 5-4)。



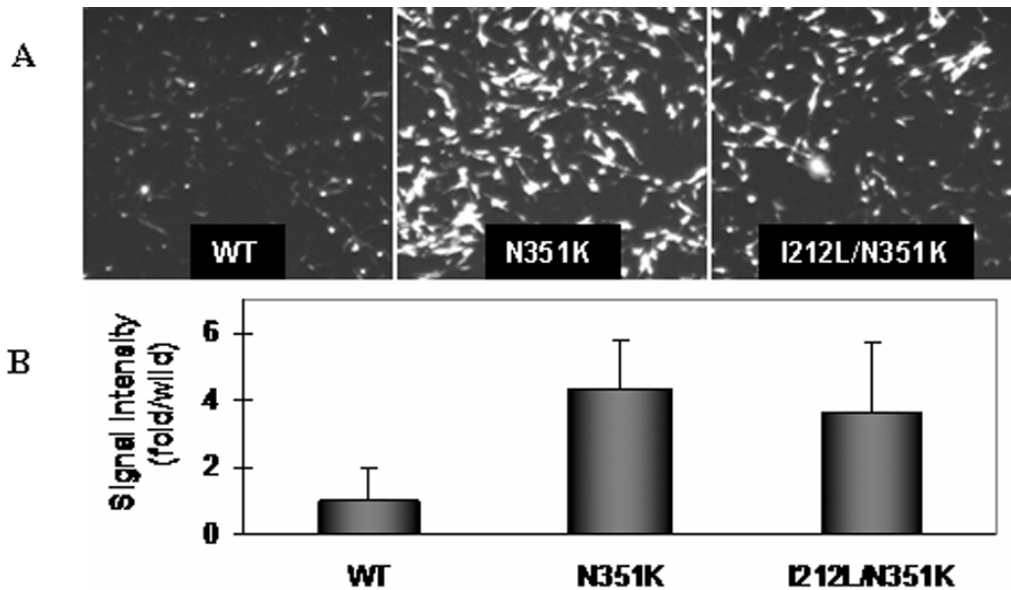
図Ⅲ. 2. 5-1 1 SLR 変異体の 37°Cにおける熱安定性

さらに細胞内安定性の向上が認められた N351K、I212L/N351K の 2 種の変異体を用い、シングルセル発光イメージングを行った (図Ⅲ. 2. 5-1 2A)。イメージング測定は、各レポーターベクターを NIH3T3 細胞に一過的に導入し一晚培養、D-ルシフェリンおよび血清を含む DMEM 培地に交換した後、発光イメージング装置 CellGraph (ATTO) を用い、3 分間の発光露光により可視化した。得られた発光像における 100 細胞の発光強度を定量し、野生型の強度と比較したところ、N351K、I212L/N351K の 2 種の変異体の発光強度は約 4 倍向上していることが明らかとなった (図Ⅲ. 2. 5-1 2B)。

このように、赤色発光プローブ SLR への部位特異的変異導入により、細胞破碎液中の熱 (37°C) 安定性および発光強度を向上させた変異体 (I212L、I212L/N351K、I212L/S463R) を 3 種、また細胞内の安定性と発光強度を向上させた変異体 2 種 (N351K、I212L/N351K) を創出することに成功した。以上の成果は Protein Science (Li et al., 19, 26-33, 2010) で誌上发表、また東洋紡績との共願により特許出願した (特願 2009-199503、安定化赤色ルシフェラーゼ変異体。特願 2009-199543、バイオイメージングに特化した変異型赤色ルシフェラーゼ)。

表Ⅲ. 2. 5-4. SLR 変異体の最大発光波長、熱安定性、細胞破碎及び細胞内での発光強度

Luciferases	λ_{max} (nm)	Remaining activity (%)		Extract-based activity	Cell-based activity	BLI
		10 min	20 min			
WT	630 ± 1	5.2	0.5	1.0	1.0	1.0
I212L	630 ± 1	31.8	9.1	8.4	0.9	un
N351K	621 ± 1	3.0	0.3	1.2	3.4	4.3
S463R	631 ± 2	6.2	0.5	0.6	0.7	un
I212L/N351K	619 ± 1	23.0	4.2	9.8	3.6	3.6
I212L/S463R	631 ± 1	50.0	22.1	7.8	0.7	un



図Ⅲ. 2. 5-1 2 SLR 変異体 (N351K、I212L/N351K) を用いたシングルセルイメージング

① - 2 - 1 免疫毒性評価細胞の樹立

東北大にて遺伝子発現解析、文献情報などを元に選定される免疫毒性評価マーカー候補遺伝子について、プロモーター領域をクローニングし、本プロジェクトで毒性評価細胞樹立用に開発した薬剤耐性遺伝子を搭載した発光プローブベクターに組み込んだ。

免疫毒性評価用遺伝子として、具体的には、T細胞系の Jurkat 細胞においては IFN γ 遺伝子、IL4 遺伝子、IL2 遺伝子がマーカーとなる可能性がある。樹状細胞系の U937 細胞、THP-1 細胞においては、IL8 遺伝子、IL1 β 遺伝子などがマーカーとなる可能性がある。

マーカー遺伝子候補のプロモーターのクローニングは、転写開始点データベース DBTSS (<http://dbtss.hgc.jp/>) を用いて、各遺伝子の mRNA の Reference Sequence の 5' 末端を転写開始点として想定し、この塩基を起点に上流 5 kbp、下流 100~200 bp を基本に塩基配列を抽出し、この配列情報をもとにプライマーを設計し、ヒトゲノム DNA を鋳型にして PCR を行うことによって取得した。取得するプロモーター長については、IFN γ 遺伝子において、0.5kbp、1kbp、5kbp の配列を用いて PMA/Ionomycin による T 細胞活性化刺激に対する応答性を評価したところ、より長鎖の 5kbp の応答性が高かったことから、上流 5kbp を目安とした。

取得したプロモーター配列は、pSLG-test (Hyg) ないし pSLO-test (Neo) のルシフェラーゼ遺伝子上流のマルチクローニングサイトに組み込んだ。なお、クローニングしたプロモーターの basal 活性や薬剤応答性については、作製した発光ベクターを目的とする細胞に一過的に導入し、薬剤処理後、Tripluc Luciferase Assay Reagent で発光の変動を測定することによって確認した。その後、それぞれ対象とする細胞に安定導入した。

免疫毒性評価用の多色発光細胞として、Jurkat 細胞については、pG3PDH-SLR (Pur)、pIFN γ -SLO (Neo) を順に導入して 2 色細胞 Jurkat : IFN γ -SLO/G3PDH-SLR #2B12 株を樹立し、さらに pIL4-SLG (Hyg) ないし pIL2-SLG (Hyg) を導入した 3 色細胞 Jurkat : IL4-SLG/IFN γ -SLO/G3PDH-SLR #10C6 株を、Jurkat : IL2-SLG/IFN γ -SLO/G3PDH-SLR #2H4 株

を樹立した。U937 細胞については、pG3PDH-SLR 及び pIL1 β -SLG ないし pIL8-SLO を導入した 2 色細胞に加え、さらに 3 色細胞 U937 : IL1 β -SLG/IL8-SLO/G3PDH-SLR#6C12 株を樹立した。THP-1 細胞については、東北大学が担当し、2 色細胞、3 色細胞を樹立した。これらの結果をまとめたものが図Ⅲ. 2. 5-13 である。

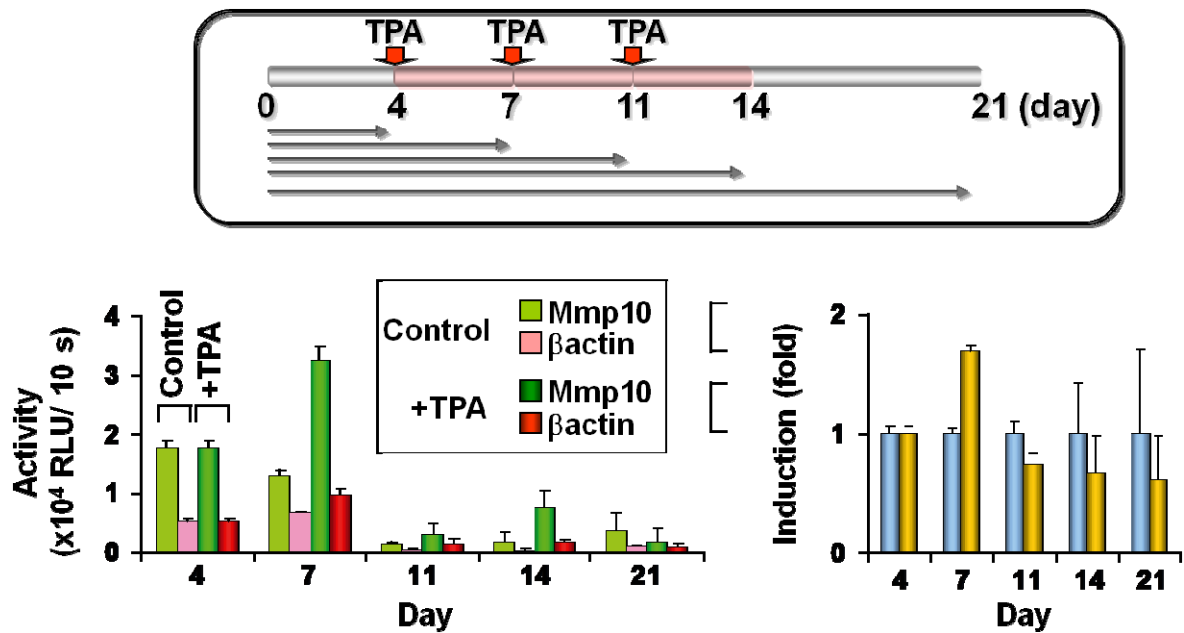
なお、これら細胞を用いた免疫毒性評価システムに関しては、産総研、東北大学、東洋紡が共同で、特願 2010-151362 として特許出願中である。

細胞種	T細胞	樹状細胞	
宿主細胞	Jurkat	U937	THP-1
-SLG(Hyg)	IL2	IL1 β	IL1 β
-SLO(Neo)	IFN γ	IL8	IL8
安定発現株			
免疫毒性	<ul style="list-style-type: none"> • アレルギー誘発作用 (Th1/Th2バランス) • 自己免疫誘発作用 • 免疫抑制作用 	<ul style="list-style-type: none"> • 活性酸素ストレス • 免疫賦活作用 • 自己免疫誘発作用 • 免疫抑制作用 	<ul style="list-style-type: none"> • 活性酸素ストレス • 免疫賦活作用 • 自己免疫誘発作用 • 免疫抑制作用
作製状況	作製済み	作製済み	作成済み

図Ⅲ. 2. 5-13 樹立した免疫毒性評価細胞群

① - 2 - 2 発がん性評価細胞の樹立

食薬センターでは、発がん性の予測法として、Balb/c 3T3 細胞に v-Ha-ras 遺伝子を導入した Bhas 42 細胞を用いるプロモーターおよびイニシエーター検出法 (Bhas assay) を開発した。我々は Bhas42 細胞を用いた形質転換試験の短縮化を目的に、形質転換マーカー遺伝子およびインターナルコントロール遺伝子を多色発光系で追跡可能な多色 Bhas42 発光細胞の樹立を行った。短期間形質転換評価手法の開発にあたり、東大理学系黒田教授および食薬センターでは、Bhas42 細胞の形質転換に伴って発現量が変動する遺伝子群を DNA マイクロアレイと情報科学的手法を用いて、形質転換に強く関与する遺伝子群を特定した。それらの結果を参考に多色 Bhas42 発光細胞の樹立にあたり、形質転換処理 1 週間後に発現が上昇する matrix metalloproteinase 10 (Mmp10) を形質転換マーカープロモーターとして用いることにした。



図Ⅲ. 2. 5-14 Mmp10-SLG;β-actin-SLR/Bhas42 安定株の TPA 応答

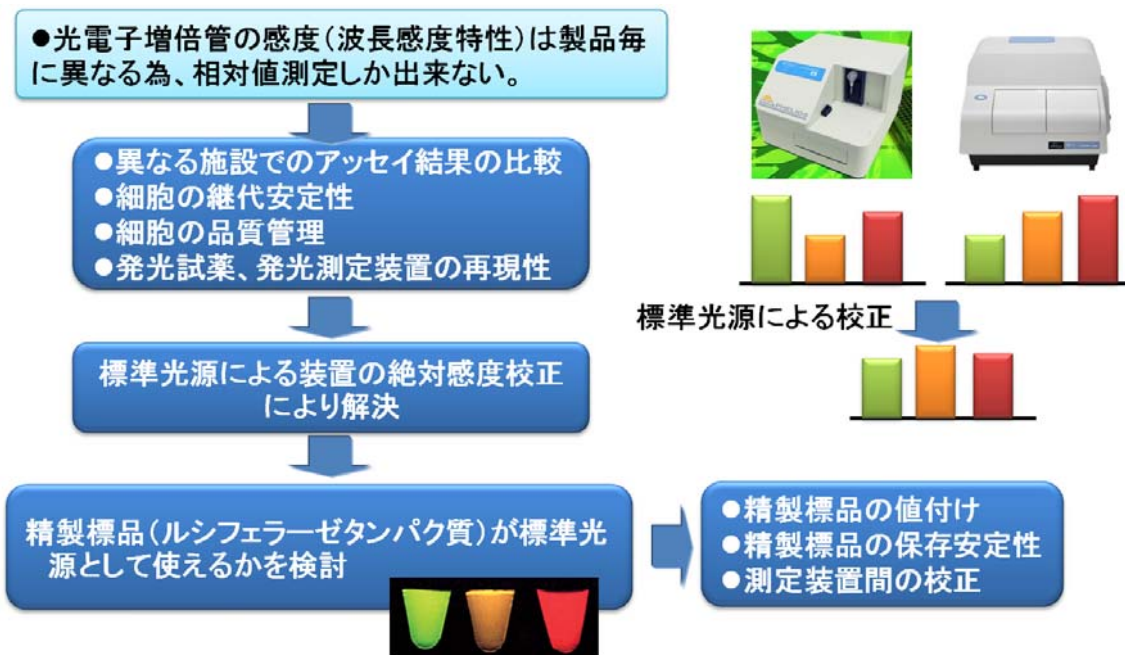
そこで細胞樹立に用いるプロモーター領域を最適化するため、Mmp10 遺伝子が保持されているマウス BAC クローン RP23-14P22 を鋳型に、転写開始点上流 5.0 kbp (-5059~+138 (+1 は転写開始点を示す)) および 2.5 kbp (-2420~+138) を PCR により増幅し、各々の増幅断片を Hygromycin 耐性遺伝子が挿入された SLG-test ベクターに導入した。また、多色 Bhas42 多色発光細胞を用いた in vitro 形質転換試験では、形質転換試験中の細胞数の大きな変動や、内因性の転写活性可能な変化が生じることが想定されることから、上記で選定した Mmp10 プロモーター由来の発光を指標に化合物の発がん性を評価するには、インターナルコントロール由来の発光による補正が必須である。そこで DNA チップ解析でのインターナルコントロールとしても用いた β-Actin プロモーターをインターナルコントロール用プロモーターとして使用することとし、発光細胞樹立には東洋紡で保有しているヒト β-actin プロモーターが挿入された SLR ベクター (β-actin-SLR) を用いた。Bhas42 細胞に上記で作製した Mmp10 (-2420~+138)-SLG (Hyg) およびヒト β-actin-SLR を Lipofectamine Plus を用いコトランスフェクションし、50 μg/ml のハイグロマイシンを含む DMEM 血清培地中で選択培養を行った。コロニー形成した細胞を 96 ウェルマルチプレートにクローニングし、数日間培養後、コンフルエント直前で Tripluc Luciferase Assay Reagent により細胞を破碎、細胞破碎液中の発光活性を測定し、SLG および SLR の 2 種の発光活性を示すクローンを選抜した。また同時にこの試料の発光スペクトルについても測定した。約 60 クローンを発光活性による一次スクリーニングを行ったところ、SLG および SLR の発光活性を有する No. 3、4、8、15、20、40 の 6 クローンを得ることができた。樹立した発光細胞が実際に発がん性評価に使用できるかを、食薬センターで実施している TPA によるプロモーション試験により予備実験的に検討した。Mmp10 (-2420~+138)-SLG およびヒト β-actin-SLR を導入した Bhas42 細胞 (ライン 40) を 48 well plate に 1.6×10^3 /well 播種し (day = 0)、4、7、11 日後に 50 ng/ml の TPA

を含む培養液に交換し、4、7、11、14、21日に Tripluc Luciferase Assay Reagent により細胞を破碎、細胞破碎液中の SLG および SLR 活性を測定した (図Ⅲ. 2. 5-14)。下左図には発光値を、下右図には、Mmp10-SLG の発光値を β -actin-SLR の発光値で補正、さらに4日後の補正值を1とした結果を示す。その結果、培養開始11日後以降、Mmp10-SLG および β -actin-SLR の発光値の顕著な低下が認められ、TPA 処理による細胞数や細胞活性の減少が観察できることが示唆された。一方、各々の発光値を補正し、TPA の連続処理による Mmp10 プロモーターの変動を評価すると、7日後に TPA 無処理細胞と比較して約2倍の発現誘導が認められた。この結果は、同処理による Mmp10 の発現量を RT-PCR により定量した結果と相関していることから、本研究において樹立した多色 Bhas42 発光細胞が、in vitro 発がん性評価に使用できることが示唆された。

② 多色発光システムの測定法の標準化

毒性評価用発光細胞の発光測定では、細胞由来の発光を全て光電子増倍管が搭載されたルミノメーターを用いて計測している。光電子増倍管で検出された光は電気信号に変換されるため、測定結果として表示される数字はその電気信号の相対的な値であることから、数字そのものに意味はない。光電子増倍管はバックグラウンドが低く、非常に広いリニアレンジ (7~8桁) を持つ検出系であるため、本研究で実施しているような微弱な光を感度良く、且つ定量的に測定できるという利点を持つ。しかしながら一方で低波長領域 (青色) と長波長領域 (赤色) では波長感度特性 (各波長に対する光電子増倍管の量子収率) が著しく異なり、特に長波長領域の量子収率は短波長領域のそれに比べて数パーセントにも満たない。また光電子増倍管の製造ロットによっても、波長感度特性が異なる場合が多い。そのため、製造ロットあるいは販売メーカーの異なるルミノメーターを用いて3色の発光を測定した場合、例え同じ試料を測定したとしても、光電子増倍管の波長感度特性の違いにより緑、橙、赤の各々の発光強度比が異なる可能性がある。従って、厳密には異なる施設で実施した発光測定の結果を直接比較することは不正確であり、正確に比較検討するためには、測定結果の何らかの校正が必要となる。

この問題は、原理的にはルミノメーターで出力される値を絶対値 (光子数) に変換できれば解決される。例えば、浜松フォトニクス社から市販されているペン型安定化 LED は長期間に渡り一定の強度の光を放ち続ける、非常に安定な光源である。この安定化 LED から放たれる光量を予め光子数に校正、試料フォルダーに挿入できる ATTO 社製チューブ型ルミノメーター AB2250 では、LED を使用して容易にルミノメーターの1カウント当たりの光子数が算出できる。このように標準光源となる LED などを使用し、簡便にルミノメーターの校正 (絶対感度校正) ができれば、他社製のルミノメーター間の測定結果の直接比較が可能となる。しかし、本研究で使用しているマルチプレートウェル型ルミノメーターに対応した標準光源 (安定化 LED) はまだ市販化されていない。そのため、我々は3色のリコンビナントルシフェラーゼタンパク質の精製標品を標準光源とし、ルミノメーターの絶対感度校正が可能であると考え、発光測定の標準化を検討した。発光測定の現状と標準化のポイントを図Ⅲ. 2. 5-15にまとめた。

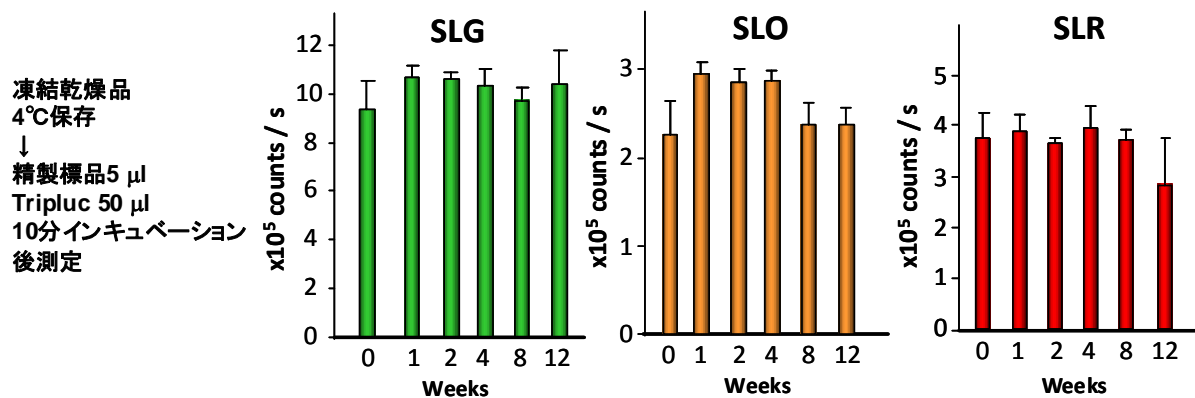


図Ⅲ. 2. 5-15 発光測定の現状と標準化のポイント

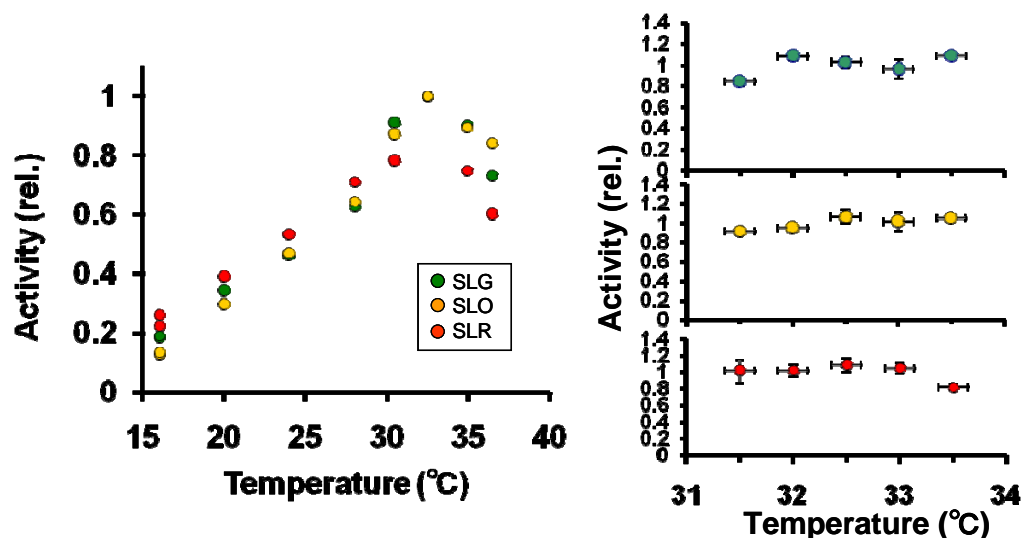
②-1 ルシフェラーゼ標品の調整と長期保存安定条件の検討

ルシフェラーゼタンパク質を標準光源として発光測定装置の絶対感度校正に利用、併せて外部機関等への供給も想定し、安価に大量のルシフェラーゼタンパク質を生産し、長期にわたり安定な発光活性を保持した標品を提供する方法を検討した。始めに SLG、SL0、SLR の発現の宿主として大腸菌を使用した。T7 プロモーター等の強力なプロモーターを用い、37℃で発現誘導した場合、ほぼ全てのルシフェラーゼタンパク質は不溶性画分に移行してしまうため、ルシフェラーゼの発現には低温(16℃)で発現誘導が可能な pCold ベクター(タカラバイオ)を使用した。なお、各ルシフェラーゼの N 末端には精製用のヒスチジンタグを融合させた。大腸菌 BL21 株にルシフェラーゼが挿入された発現ベクターを形質転換し、IPTG 存在下、16℃で1晩培養後、菌体を超音波破碎機で破碎、上澄み液をニッケルカラム(キアゲン社)にアプライし、イミダゾールにより溶出することでルシフェラーゼを精製した。

精製したルシフェラーゼタンパク質は-80℃での低温保存でも時間の経過と共に失活するため、凍結乾燥保存溶液の組成を検討することで保存法を最適化した。その結果、特定のグッドバッファーに安定性を劇的向上させる効果があることが判明、さらに BSA 添加により凍結乾燥に対する安定性が向上することが判明した。この保存溶液の組成については現在特許出願準備中である。図Ⅲ. 2. 5-16 に示すように、最適な濃度に調製した SLG、SL0、SLR (各 10 μg/ml) は4℃においても10週間以上に渡り発光活性が保持され、-80℃での保存ではさらに長期間安定に保存可能であることが示唆された。



図Ⅲ. 2. 5-16 精製したルシフェラーゼの活性測定法と長期間保存後の活性



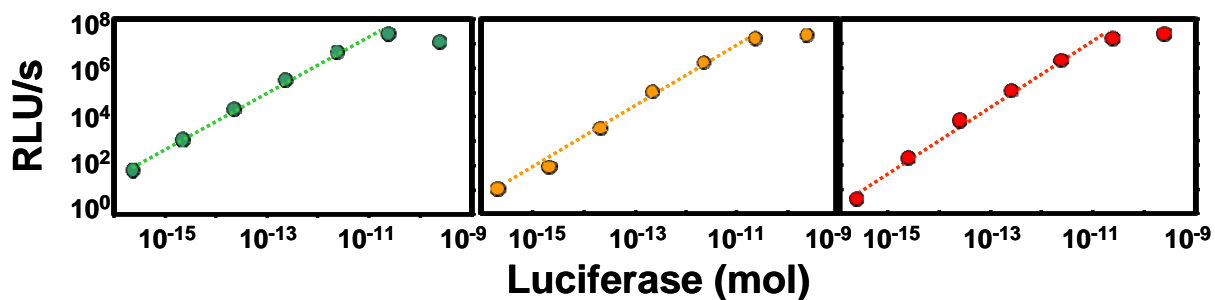
図Ⅲ. 2. 5-17 ルシフェラーゼ標品を用いた発光活性の温度依存性

作製した各精製ルシフェラーゼを用い、SLG、SLO、SLR の発光活性に対する温度依存性を検証した (図Ⅲ. 2. 5-17)。各ルシフェラーゼの発光活性は、温度の増加とともに増大し、約30℃付近で最大となり、更に高温では急激に低下した。このように、SLG、SLO、SLR の発光活性は強く温度に依存するものの、いずれのルシフェラーゼも同一の温度依存性を示すことが判明した。またいずれの場合も至適温度は32℃付近であり、前後1℃では発光活性は変化しないことも明らかとなった。報告されているホタルルシフェラーゼの至適温度は約25℃であることから、SLG、SLO、SLR の至適温度はホタルと比較し7℃程度高い。

② -2 ルシフェラーゼ標品を用いた装置間感度校正

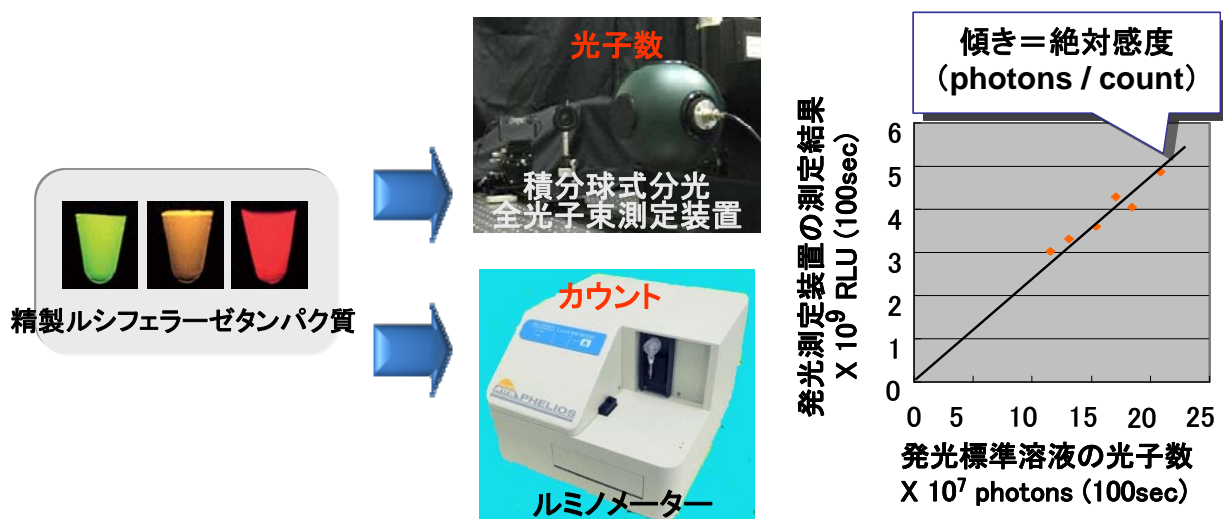
精製ルシフェラーゼを用いたルミノメーターの絶対感度校正を検討した。通常、校正はルミノメーターの直線性の範囲内で行う必要があるため、最初にルシフェラーゼタンパク質を用い、ATTO社製 Phelios の測定値の直線性を調べた。ルシフェラーゼの希釈系列を作製し、発光試薬 Tripluc Luciferase Assay Reagent を発光基質として発光を測定したところ、図Ⅲ. 2. 5-18に示すようにいずれのルシフェラーゼにおいても、10⁷/sec 以上で直線性から外れることが判明した。この結果は、Phelios に搭載されている光電子増

倍管のカタログ値と一致する。そこで絶対感度校正には最大 $10^6/\text{sec}$ の発光値を示すルシフェラーゼ希釈液を使用することにした。



図Ⅲ. 2. 5-1 8 精製ルシフェラーゼタンパク質を用いたルミノメーターのリニアレンジ測定

図Ⅲ. 2. 5-1 9に精製ルシフェラーゼタンパク質を用いたルミノメーターの絶対感度校正法を示す。校正には、つくば産総研計測標準部門で所有している光源の光子数測定が可能な積分球式全光子束測定装置（以下積分球）を用いた。ルシフェラーゼタンパク質の希釈液を Tripluc Luciferase Assay Reagent と混合、それを2本のチューブに分注後、一方はルミノメーター、もう一方は積分球で直ちに発光を同時に測定する。ルシフェラーゼの希釈系列を作製、この測定を繰り返す、積分球で算出される光子数とルミノメーターで計測されるカウント値の相関をプロットし、その傾きからルミノメーターの1カウント当たりの光子数（photons/count）を算出した。この測定により、産総研で所有する Phelios の絶対感度校正を行ったところ、表Ⅲ. 2. 5-5に示すように、SLG は 1508 photons/count、SLO は 1909 photons/count、そして SLR は 3872 photons/count として算出された。



図Ⅲ. 2. 5-1 9 精製ルシフェラーゼタンパク質を用いたルミノメーターの絶対感度校正方法スキーム

校正したルミノメーターにより、各精製ルシフェラーゼの単位重量・時間あたりに放たれる光子数を算出し、各ルシフェラーゼの値付けを行った（表Ⅲ. 2. 5-6）。

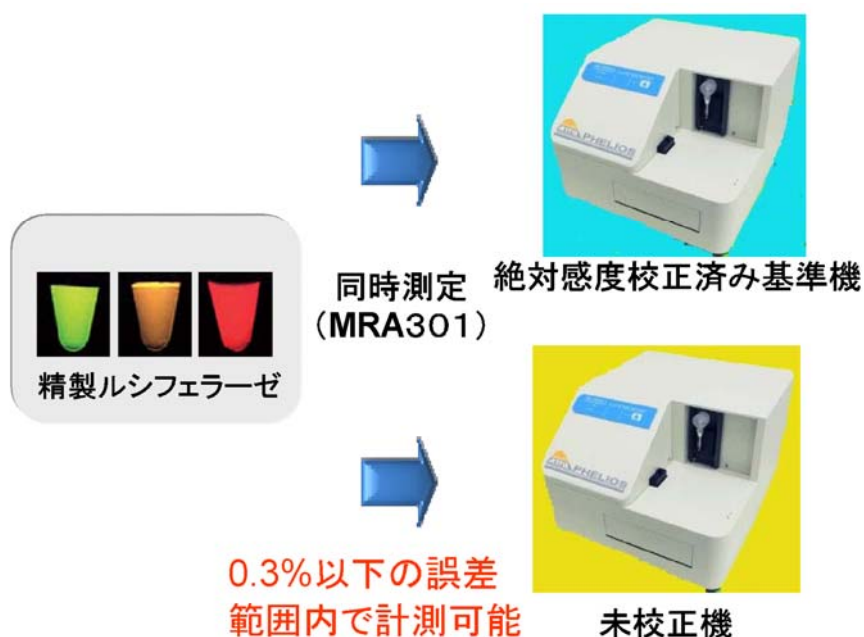
表Ⅲ. 2. 5-5 ルミノメーターの絶対感度校正

Luciferase	Photons/count
SLG	1508 ± 65
SLO	1909 ± 131
SLR	3872 ± 430

Ⅲ. 2. 5-6 精製ルシフェラーゼタンパク質の値付け

Luciferase	Photons/sec/ng protein
SLG	6 x10⁷
SLO	2 x10⁷
SLR	6 x10⁷

当初、積分球とルミノメーターの同時測定により、ルミノメーターの絶対感度校正を実施したが、積分球を使用しなくても、正しく校正されたルミノメーターを基準機として、他の装置の絶対感度校正を行うことは原理的には可能である。そこで、前述の装置を基準機とし、産総研で所有する他のルミノメーターPhelios（未校正機）の校正を試みた。図Ⅲ. 2. 5-20に示すように、前述と同様、精製ルシフェラーゼタンパク質の希釈系列を作製、それらと Tripluc Luciferase Assay Reagent を混合した溶液を2つに分注し、基準機と未校正機で同時に発光値を測定した。その結果、表Ⅲ. 2. 5-7に示すように基準機を使用した未校正機の絶対感度校正を行えることが明らかとなった。また、この校正作業による誤差は 0.3%以下であり、極めて正確に未校正機の値付けが可能であることも判明した。



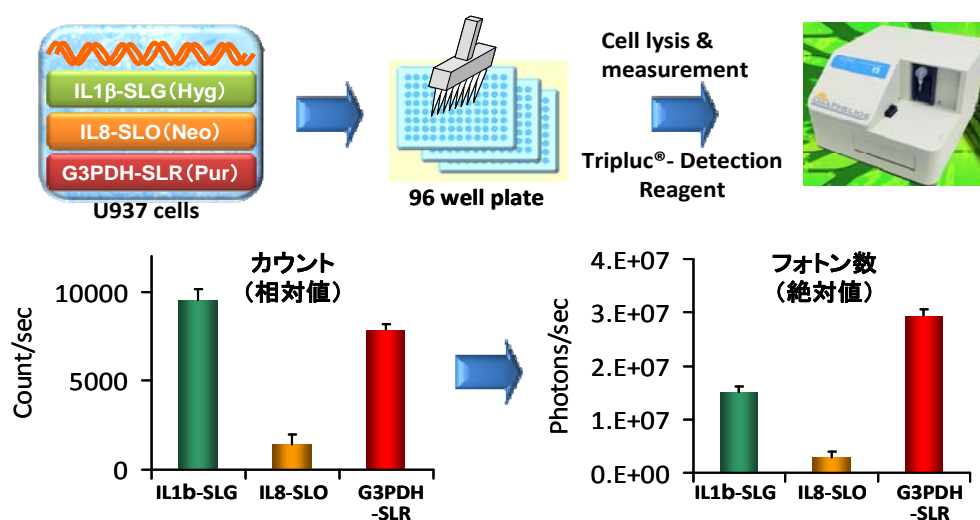
図Ⅲ. 2. 5-20 絶対感度校正済みの基準機を用いた絶対感度校正のスキーム

表Ⅲ. 2. 5-7. 基準機を用いた未校正機の絶対感度校正

Luciferase	Photons/count	
	基準機	未校正機
SLG	1508	1583
SLO	1909	2004
SLR	3872	3756

②-3 ルシフェラーゼ標品を用いた3色発光細胞の測定校正

校正したルミノメーターを用い、実際に多色発光細胞の発光測定結果を光子数に換算できるかを検証した。細胞は樹立された免疫毒性評価細胞 (U937 細胞に IL1β-SLG、IL8-SLO、G3PDH-SLR を導入した安定発現株) を用いた。細胞を 96 マルチウェルプレートに播種し、1日培養後 Tripluc Luciferase Assay Reagent により細胞を破砕、発光活性を校正済みの Phelios により測定した。図Ⅲ. 2. 5-21 に示すように、SLG、SLO、SLR のカウント値の比は約 1.0 : 0.2 : 0.8 であったが、これらのカウント値を光子数に換算すると、各々の比は 0.5 : 0.2 : 1.0 となった。光子数換算後の比の変化は、先に記載したように、光電子増倍管の赤色領域の感度が低いために、見かけ上カウント値は低く表示されることに起因する。このように、ルシフェラーゼ標品を標準光源の代替としてルミノメーターの絶対感度校正を行い、その装置で測定した細胞の発光値が絶対値である光子数に換算することが可能となった。よって、我々が開発した精製されたルシフェラーゼタンパク質の標品を元にした標準化法は異なるメーカーのルミノメーターより算出された発光値であっても絶対値に換算することで同等に取り扱う事が可能になる。



図Ⅲ. 2. 5-21 多色発光 U937 細胞のアッセイ結果の光子数への換算

③ ヒト人工染色体ベクターを用いたモニター遺伝子導入システムの開発

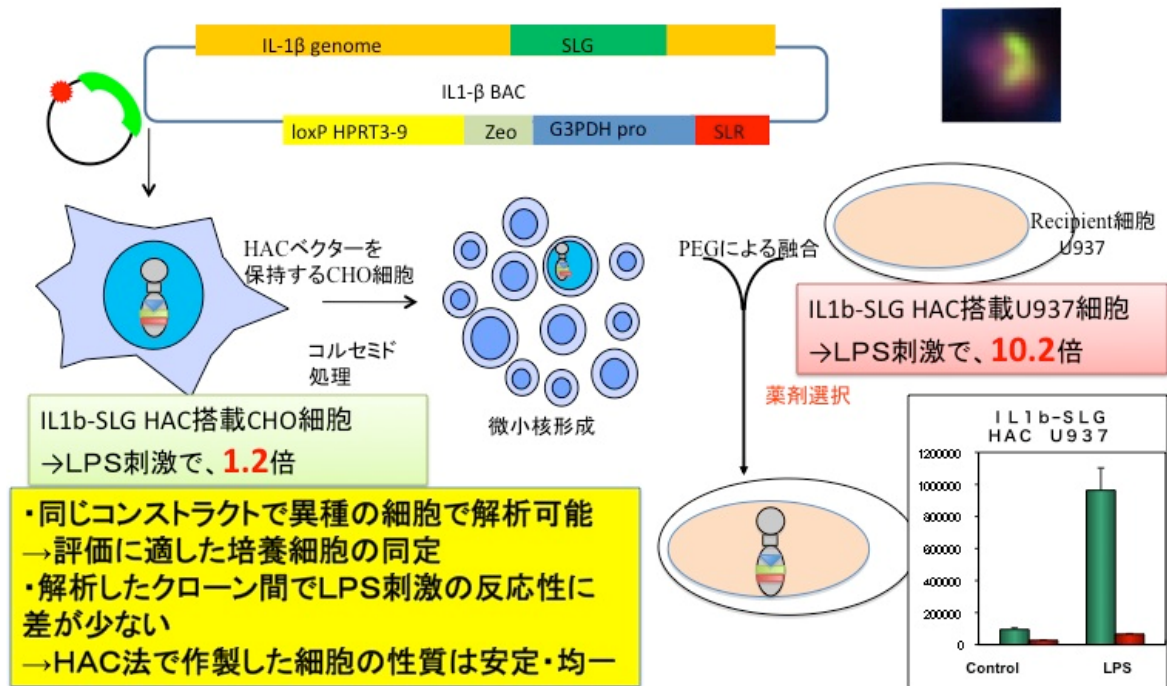
③-1 ヒト人工染色体ベクターを用いた免疫毒性評価細胞の樹立

HACベクターを用いて、免疫毒性用の細胞の樹立を行った。対象となるマーカー遺伝子としてIL1 β 遺伝子を選択した(図Ⅲ.2.5-22)。

まずは、ヒトIL1 β 遺伝子を含むBACクローン(RP11-67L14)をRed/ETBAC組み換えシステムを活用し改変した。目的の免疫毒性評価用モニターBACベクター作製のために2つのmodificationベクターを構築した。1つめは目的の遺伝子の発現をSLGでモニターするためのmodificationベクターであり、2つめはGAPDH/SLRとHACベクターのloxPサイトに導入するためのシステムをBACクローンの共通領域に組み込むためのmodificationベクターである。2つめのmodificationベクター構築のためには、マルチサイトゲートウェイシステム(Invitrogene)を用いた。また、今回確立したIL1 β 遺伝子のモニターシステムのためのBACベクター構築のプロトコールは今後、他の毒性評価用の遺伝子のモニターシステム構築にも有効活用できるため、一連の詳細はプロトコールを論文化した(Yamaguchi et al., Yonago Acta Medica., 54, 21-31, 2011)。

構築したmodificationベクターを大腸菌内で組み換えて、免疫毒性評価用モニターBACベクターを構築した。構築した免疫毒性評価用モニターBACベクターはCre発現ベクターとともに、Cre/LoxP型HACベクター(21HAC1)を有しているCHO細胞にトランスフェクションし、薬剤選択をして耐性クローンをピックアップした後、PCRで目的の組み換えを起こしているクローンを同定した。さらに、U937細胞に免疫毒性評価用HACベクターを、微小核融合法にて移入して、100以上の薬剤耐性クローンを得ることができた。

得られたU937細胞のうちの4クローンについてLPS投与による毒性モニターリングの検証を行った。その結果、U937細胞では、LPS投与前後で10倍程度の発光の上昇が観察された。また、解析した4クローンのすべてにおいて、同程度の応答性を示した。



図Ⅲ. 2. 5-2 2 HACベクターシステムを用いた免疫毒性モニター細胞

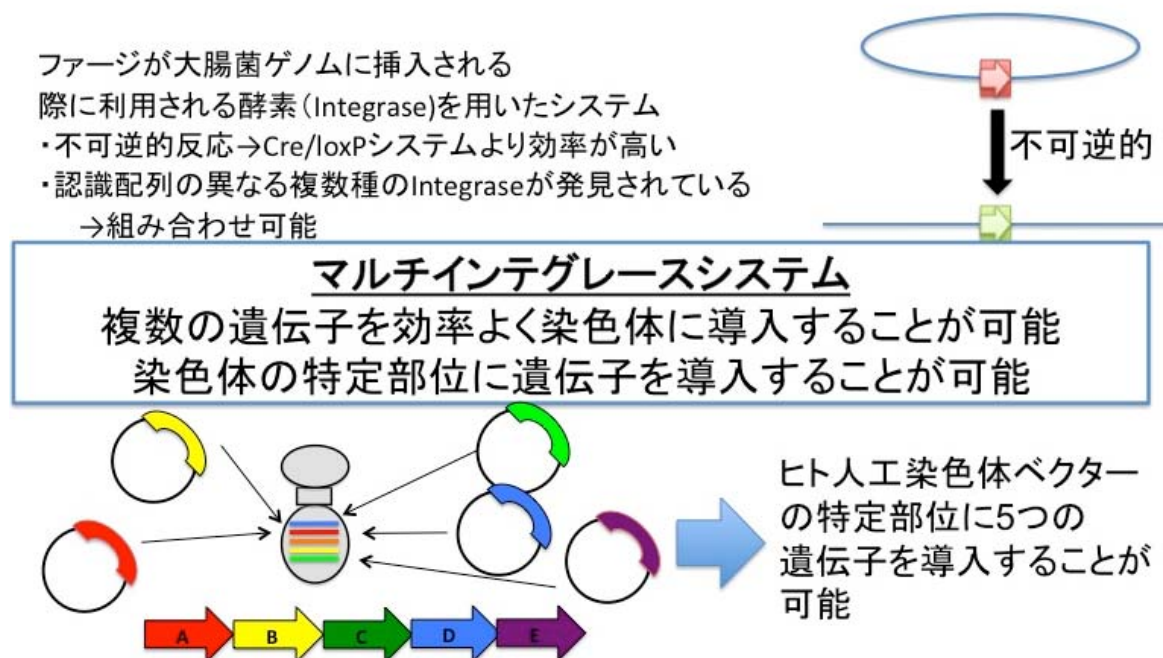
これらの結果は HAC ベクターを用いて樹立した細胞を用いて毒性評価モニターリングが可能であること、さらにはこの技術で構築した場合にはクローナルバリエーションがきわめて少ないことを明らかにした。よって、HAC ベクターを用いた発光細胞樹立法が従来法より大きな優位性があることが示唆された。

③-2 ヒト人工染色体ベクターに複数遺伝子を導入するシステムの開発

複数の発光遺伝子を発現する細胞を効率よく作製することは、今回のプロジェクト遂行には重要な技術課題である。現在、目的の遺伝子を発現する細胞を取得する方法として、遺伝子の染色体への random integration を利用した方法が広く用いられている。しかしながら、挿入部位による染色体の位置効果の影響や、挿入コピー数の違いにより、細胞クローン間で遺伝子の発現レベルに大きなバラつきが生じる。その結果、目的の遺伝子を発現する細胞をスクリーニングするために、多くの労力と時間が必要となる。そこで、より早く、より効率的に目的の遺伝子発現細胞を得る方法が考案されてきた。それらの代表的なものが、Cre、FLP、phage integrase などの部位特異的組換え酵素を利用した方法である。これらの酵素を利用し、in vitro 及び in vivo で、染色体上の特定部位への遺伝子導入が可能となった。近年では、ΦC31 integrase に代表される phage integrase が複数種発見され、従来の Cre や FLP と違い、組換え反応が一方向性であることから、より高い効率で部位特異的組換えが起こることが期待されている。

HAC ベクターは、従来の遺伝子導入システムと比較して、遺伝子が宿主染色体上に挿入されないため、挿入部位の位置効果を避けられるなどの優れた特徴を持っている。今回、

複数種の integrase と HAC ベクターを組み合わせることで、マルチインテグレーションシステムを構築した。この新規のベクターを用いて、複数種のインテグレーションの部位特異的組換え効率を比較するとともに、遺伝子導入細胞の作製についても検討を行った。システムの概要を図Ⅲ. 2. 5-2 3 に示す。



図Ⅲ. 2. 5-2 3 マルチインテグレーションシステムの概要

Multiple Gateway system を用いて、4 つの integrase の認識配列と 1 つの FRT 配列をもった multi-integrase platform を構築した。それを HAC ベクター上に Cre/loxP system により搭載し、MI-HAC ベクターを作製した。このベクターを保持する chinese hamster ovary (CHO) 細胞内で、各酵素の認識配列と Neo-resistance gene を持つ plasmid を integrase 発現ベクターと co-transfection し、システムの効率を検証した。各 integrase 依存的な薬剤耐性コロニーの取得率は、FLPe を用いたときと比べて約 6~25 倍高い取得率を示した (図Ⅲ. 2. 5-2 4 A & B)。また、得られたクローンの約 40~94% で MI-HAC ベクター上で部位特異的組換えが起きていることを確認した。この組換え効率は FLPe (約 17%) と比較して高かった (図Ⅲ. 2. 5-2 4 C & D)。薬剤耐性クローンを得ることで、システムが有効に機能していることを明らかにした。

次に MI-HAC ベクターを用いて GFP 発現細胞を取得し、解析したところ、各 integrase による GFP 陽性細胞取得率は約 71~90% であり、random integration による方法 (約 60%) と比較し、大きな差はなかった (図Ⅲ. 2. 5-2 5 A & B)。しかし、蛍光顕微鏡による解析の結果、random integration で得られたコロニーの約 90% で GFP の発現が減少あるいは消失している等のヘテロな状態であった。一方、MI-HAC ベクターを用いた場合は、約 77~88% のコロニーが得られ、かつ従来と比較して均質な GFP 発現を示した (図Ⅲ. 2. 5-2 5 C)。MMCT により、MI-HAC ベクターをマウス A9 細胞に移入し、8 つの hygromycin 耐性クローンを得た。これらのクローンについて、PCR 解析及び FISH 解析を行い、

すべてのクローンで MI-HAC ベクターを保持していることを確認した。MI-HAC ベクターを保持する A9 細胞において、 Φ C31 integrase の活性を検証した。その結果、CHO 細胞の時と同程度の GFP 陽性細胞を取得できた (約 93%)。

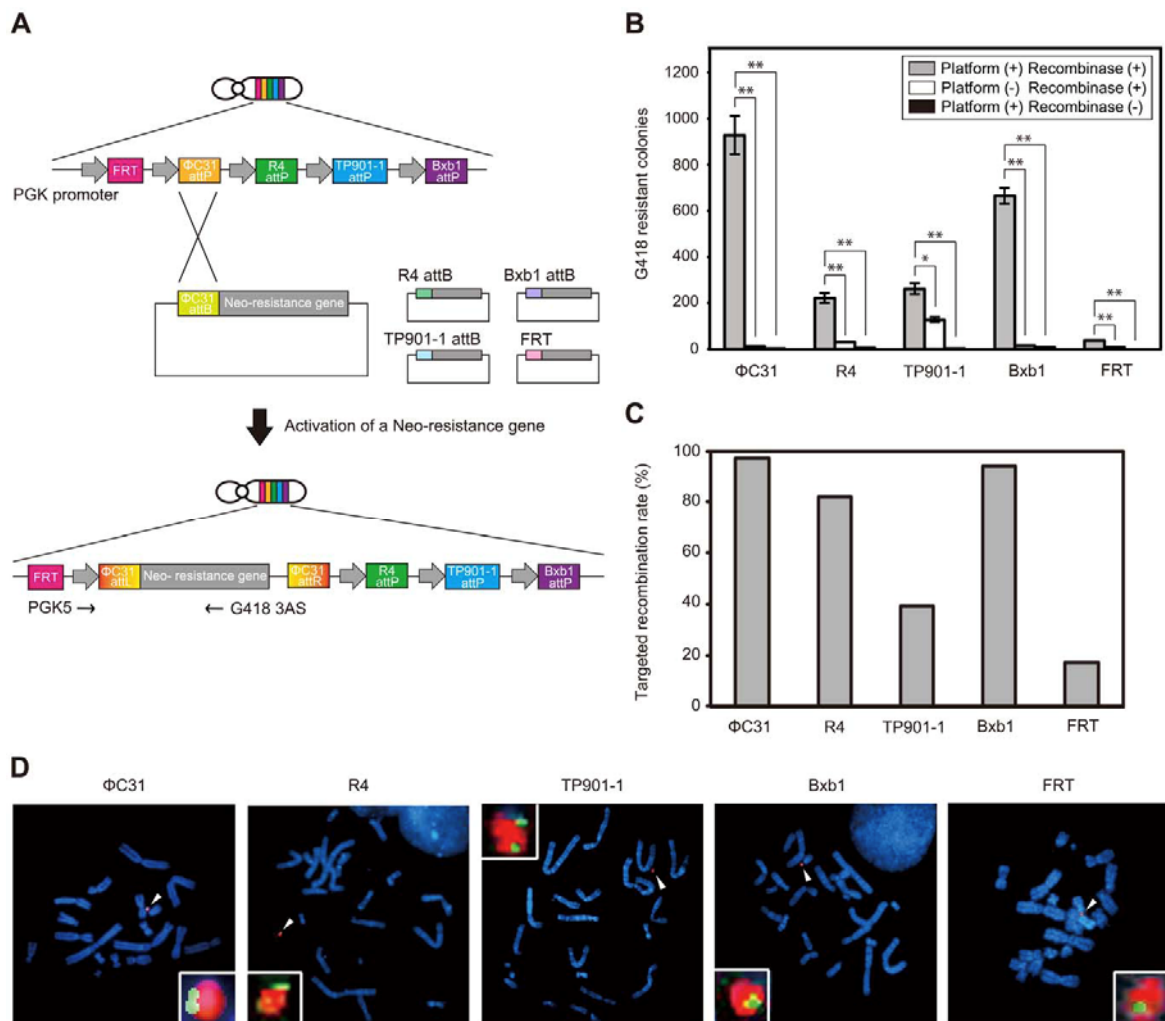
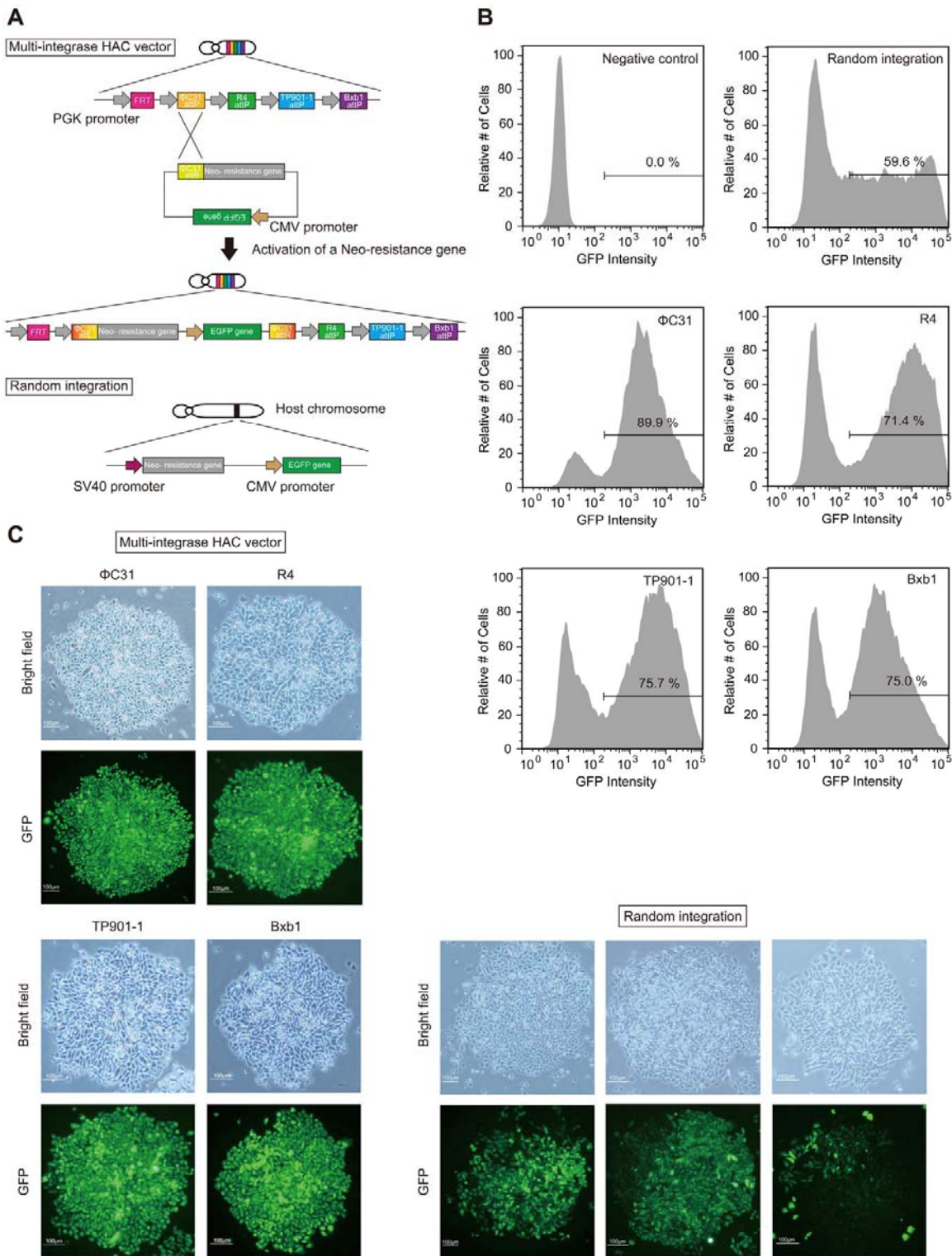


図 III. 2. 5-2 4 マルチインテグラーゼシステムの遺伝子導入効率の確認



図Ⅲ. 2. 5-25 マルチインテグレースシステムで導入した遺伝子の発現効率の確認

2. 5. 4 今後の展望

① 多色発光システムの国際標準化への展開

これまでに多色シフェラーゼによるマルチ遺伝子発現解析技術をベースに免疫毒性評価細胞や発がん性評価細胞を樹立した。今後の問題は樹立された細胞群を利用したバリデーションを経た OECD のガイドライン化にある。しかしながら、多色発光システムは日本発のオリジナル技術であるため、測定法を含めた多色発光システムの周知、普及させること

が重要となる。ガイドライン化を進めるためには、本技術が動物実験代替法による毒性評価方法開発を推進する上で優れた手法であり、化学物質リスク管理に有益であるということを経験的に認識させることが必要である。そのためには、①多色発光法という要素技術の標準文書策定、②毒性評価用発光細胞という応用技術の認証、の二つの標準化の推進が重要となる。①については、フォーラム標準として OECD テクニカルレポート (TR) を公開する。②については、多色発光培養細胞による毒性評価方法を国際的に認証させ、OECD 化学物質リスク評価ガイドラインに記載させる。などの活動が今後のポイントとなる。このような視点のもと、2011 年 1 月にはヨーロッパ実験動物代替法バリデーション組織 (ECVAM) 及びドイツ実験動物代替法研究所 (ZEBET) にて多色発光システムについて講演、化学物質毒性評価における本技術の有用性について説明した。このような活動を世界規模で実践することで、多色発光システムによる化学物質毒性評価を周知させる国際標準化を進め、さらには共同研究に発展させることで世界各地の毒性評価法に取り入れられるための活動が極めて重要である。

② ヒト人工染色体ベクターを用いたモニター遺伝子導入システムの今後の展開

MI-HAC ベクターの構築とその機能について検証した結果、今回開発した技術は、従来の遺伝子導入細胞作製技術より効率や品質の面から優れていることを明らかになった。特に、部位特異的組換え効率は、広く使用されている Cre、FLPe と比較して高かったことから、本研究で使用した integrase は遺伝子の導入に適していると考えられる。また、遺伝子発現細胞の取得に関して、random integration により得られたクローンでは、遺伝子発現がヘテロになる傾向にあったが、MI-HAC ベクター上に EGFP 遺伝子を導入した場合は、その傾向は低くなった。このことは、MI-HAC ベクター上の意図した場所に遺伝子が導入され、染色体の位置効果などの影響を受けにくいためではないかと考えられる。また、MI-HAC ベクターがマウス A9 細胞に移入可能であり、A9 細胞内においても CHO 細胞と同様に Φ C31 integrase が機能したことは、様々な細胞において MI-HAC system が使用できることを示唆している。これらのことから、MI-HAC ベクターを用いた遺伝子発現細胞作製法は、既存の技術に比べ、様々な細胞環境で高い効率で部位特異的組換えが起き、かつ質の良い遺伝子導入細胞を容易に取得できる方法であることが示唆された。

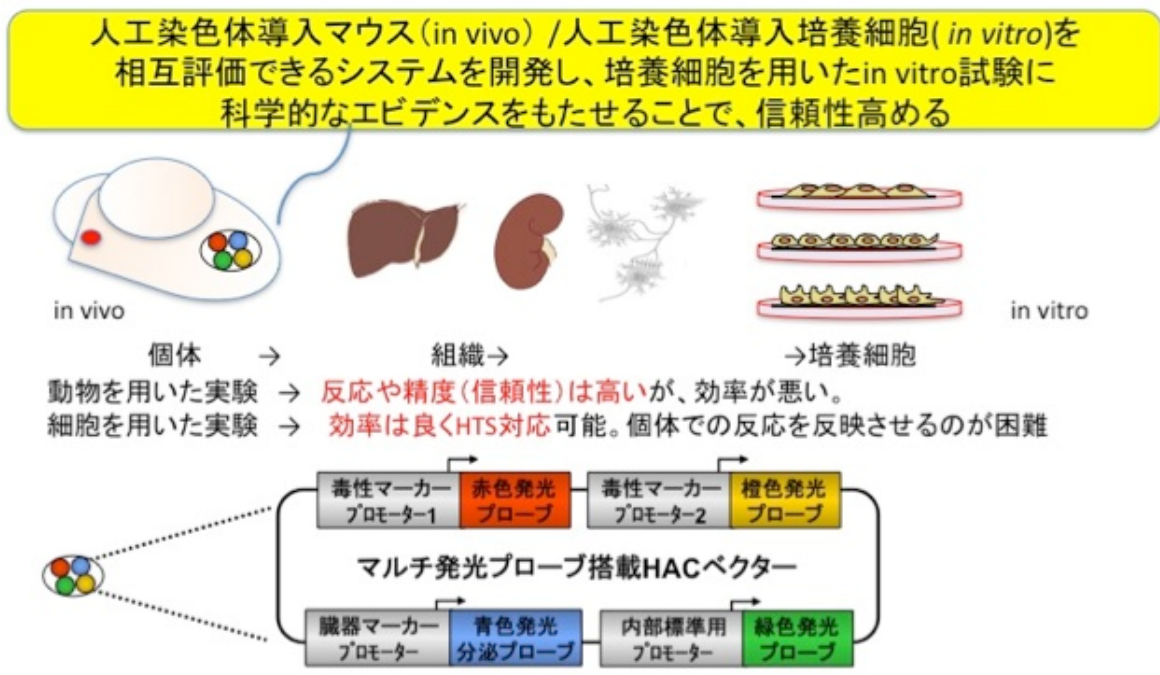
今回、phage integrase による部位特異的組換え技術と HAC ベクターを組み合わせることで、哺乳類細胞において効率良く、かつ正確に組換えを起こし、均質な遺伝子発現を行う細胞を取得できることを示した。今後、この方法が、複数の多色発光遺伝子を導入した毒性評価用細胞の作成に有用な技術になると考えられる。

培養細胞を用いた代替法開発に必要な課題に対してヒト人工染色体ベクターが果たすべき次なる課題としては、細胞を用いた試験法に科学的なエビデンスを持たせることで、信頼性を高めることである。ヒト人工染色体ベクターをマウス ES 細胞に移入することで、遺伝子導入した培養細胞と同じシステムを持つ遺伝子導入マウス (人工染色体導入マウス) を作製することが可能になる。この遺伝子導入マウスから、組織を抽出し、さらに細胞を樹立することで、in vivo 試験と in vitro 試験を相互評価することが可能になる。さらに今後は分泌型ルシフェラーゼを用いたシステムを加えることで、より多色の解析が可能になる。今回開発したシステムをより洗練化し実績を作ることで、より効率の良い安全

性評価試験に適した遺伝子導入培養細胞を作製することが可能になる。図Ⅲ. 2. 5-2 6
 で今後の展望をまとめてみる。

今後の展開

培養細胞を用いた代替法開発に必要な課題に対して
 ヒト人工染色体ベクターが果たすべき次なる課題



図Ⅲ. 2. 5-2 6 ヒト人工染色体を用いた化学物質毒性評価法の今後の展望

3. 「28日間反復投与試験と相関する遺伝子発現データセットの開発」の成果

3. 1 背景と目標

我が国では、環境と調和した健全な産業活動及び安心・安全な国民生活の実現を目指した化学物質リスク評価・管理システムの構築へ向け、公的な化学物質総合評価管理プログラムが進められている。

これまでの化学物質のリスク評価は、細菌等を用いた単純で簡便な試験、及び、ラット等の実験動物を用いた長期毒性試験によって取得・蓄積されてきた知見を、その基盤としてきた。これらの従来の毒性学的な手法によって獲得される生物学的情報は知見の種類が限られること、並びに、長期毒性試験では費用と効率等の面で問題があることから、これらの課題を解決できる新規の手法の確立が必要である。

このような流れの中、このところ急速な発展を見せるゲノム学的なアプローチが、薬剤の有効性評価（ファーマコゲノミクス）、食物の生体への影響評価（ニュートリゲノミクス）等と同様に、化学物質の生物学的活性（特にその有害性）の評価にも応用され始めた（トキシコゲノミクス）。これらのゲノム学的手法は、全遺伝子を個々のパラメータとして活用できるという、従来の手法では得られない膨大かつ多様な観点による生物学的現象の評価を可能にした。そのため、今後のさらなる展開により、従来の各種評価システムを補完し、かつ、より精度の高い情報を付加できる新たな化学物質評価システムの構築が期待できる。

本プロジェクトは、遺伝子発現解析技術を中心としたトキシコゲノミクス的方法論をラットへの短期投与試験に適用し、化学物質のリスク評価の効率的な実施に資することを目的とした。また、本プロジェクトでは、これまでに蓄積されてきた各種28日間反復投与試験の結果に、それと相関する遺伝子発現データを付加することにより、従来の毒性学的知見とトキシコゲノミクス的新規知見の融合を図り、化学物質の有害性評価に新たな展開を試みた。

本プロジェクトのコンセプトは図III.3-1のようにして表すことができる。すなわち、これまでの毒性学的知見を山の形に例えた場合、毒性学の様々なアプローチを色で表わすと様々な色になる。トキシコゲノミクスの知見は、それらの毒性学的知見に異なった色を加えて結ぶものである。さらに、別の見方をすると、トキシコゲノミクスの手法は毒性学的な様々なアプローチに「横串を刺す」と例えることができる。例えば、毒性学的なアプローチとして、血液学、生理学などの方法論があるが、それらの手法はそれぞれ得意とする分野が異なっており、それらの方法論により得られたデータを横並びに比較することが容易ではない。また、これまでの毒性学的知見は化学物質ごと、または、臓器ごとに詳細にまとめられているものの、それらを横並びに比較することが容易ではない。トキシコゲノミクスはそれらの方法論、化学物質、臓器などを横並びにして遺伝子発現変動という一つの指標で比較することを可能とする（図III.3-2）。

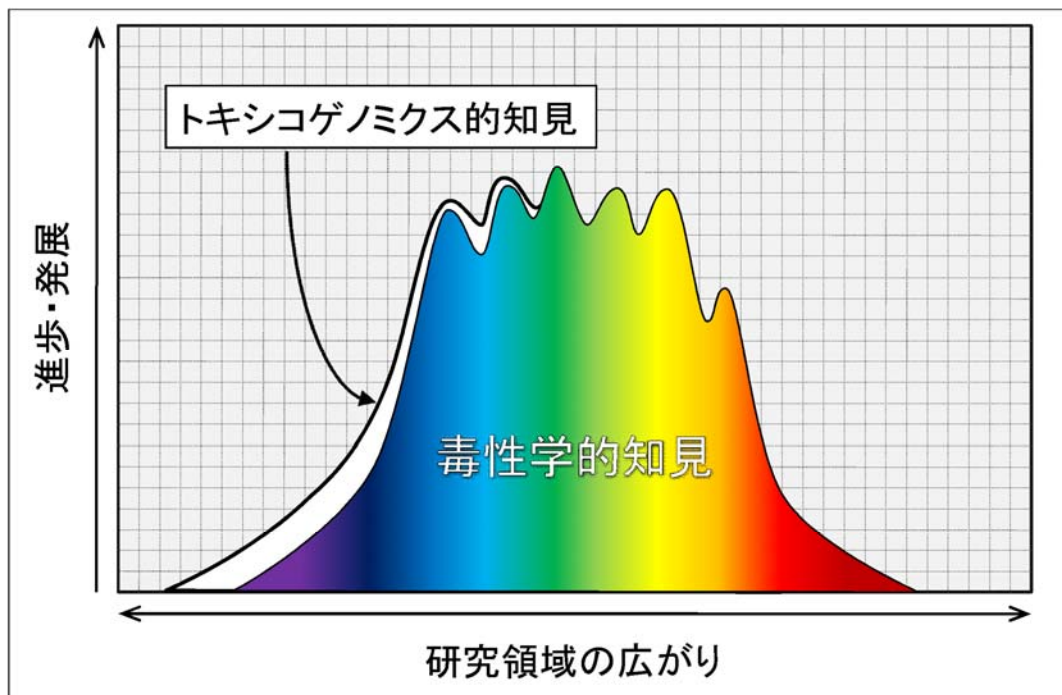


図 III.3-1 プロジェクトのコンセプトと意義

プロジェクトのコンセプトを示す。これまでに蓄積されてきた毒性的知見に新たにゲノム学的な知見を付け加えることにより新たな展開を探る。特に、毒性学の各分野の知見を横断的に連結させ、そこからの新たな解釈・結論の創出を期待できるところに意義がある。

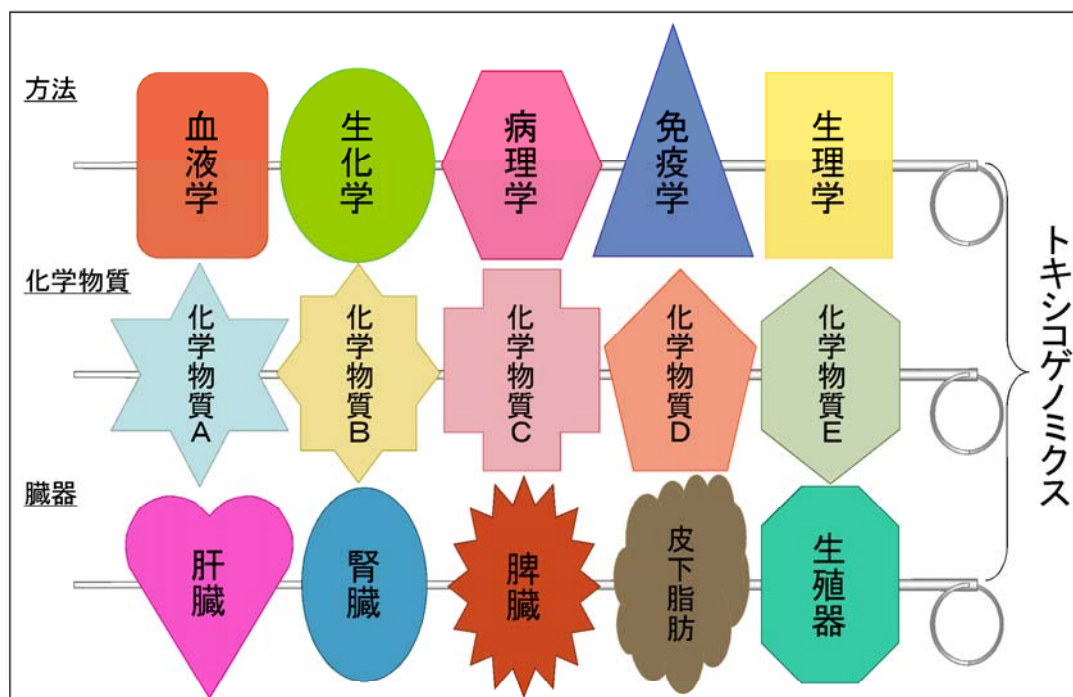


図 III.3-2 プロジェクトのコンセプト

プロジェクトのコンセプトを示す。これまでの毒性学的知見（方法論、化学物質、臓器）に対してトキシゲノミクスは横串を刺して横並びの比較を可能とする。

まず、各種の毒性関連データベース（例えば、「既存化学物質毒性データベース」〔国立医薬品食品衛生研究所〕）で公開されている既存化学物質について、その中で開示されている方法に準拠してラットへの28日間反復投与実験を行った。次に、それらのラットから主要臓器・組織をすべて採取し、それらの遺伝子発現プロファイルを取得・解析した。このとき活用する遺伝子発現解析技術は過去のNEDOプロジェクトである「タンパク質機能解析・活用プロジェクト」（平成12～17年度）の「発現頻度Iテーマ」（テーマ責任者：渡辺 慎哉）で開発し、すでに確立されているものである（図III.3-3）。本プロジェクトで取得した遺伝子発現プロファイルの全生データは、順次、国立遺伝学研究所のデータベースであるCIBEX（Center for Information Biology gene EXpression database）に登録し、公開することを目標とした。さらに、複数の化学物質の機能や構造上の共通点に相関する、又は各種の毒性学的所見に関連する遺伝子発現データセットの抽出を行い、化学物質の有害性評価に有用な情報を編纂し公開することも目指した。

さらに、膨大な全データから一般の研究者にも十分利用可能な有用情報のみを編纂・体系化し、新規化学物質の生物学的活性を評価するための基盤的参照データベース（ラット28日間反復投与試験・遺伝子発現情報統合データベース〔仮称〕）として政府機関及び民間が利用可能なシステムを構築することを目指した（図III.3-4）。

- **80塩基からなる合成DNA(約11,000種類)をスライドガラス上に配列(特許取得)**
 - 特異性の高いプローブ領域選定が可能
 - マイクロアレイ作製の高い「歩留り」を達成
- **マイクロアレイ表面に特殊化学処理(特許取得)**
 - マイクロアレイ化後のガラス表面劣化を防止
 - ハイブリダイゼーション条件の安定性を確保
- **ランダム・プライミング法による第1鎖cDNA合成で蛍光標識**
 - mRNA全長にわたって自由自在にプローブ領域設計が可能
 - プローブ塩基配列の特異性が向上
 - スプライシング・バリエーション解析への応用が可能
- **特殊な器具(特許出願)を使ったハイブリダイゼーション**
 - 均一なハイブリダイゼーション条件が成立
- **mRNAの増幅を行わない**
 - コントロールしにくい酵素反応行程を最低限にとどめて高い再現性を獲得
- **2色法(1枚のマイクロアレイ上で、赤と緑の蛍光色素で標識した2種類のサンプルを混合して競合的にハイブリダイズさせる)を採用**
 - マイクロアレイのスポット上のDNA量の変化によって影響を受けないデータ取得が可能
- **共通レファレンスRNAを採用**
 - 多数のサンプルのバーチャルな並行解析が可能
- **独自の実験プロトコル(数千回の条件検討実験により決定したもの)を採用**
 - 高い再現性を獲得

図 III.3-3 独自開発の合成 DNA マイクロアレイシステム

本プロジェクトで採用したDNAマイクロアレイシステムの主な特徴を示す。

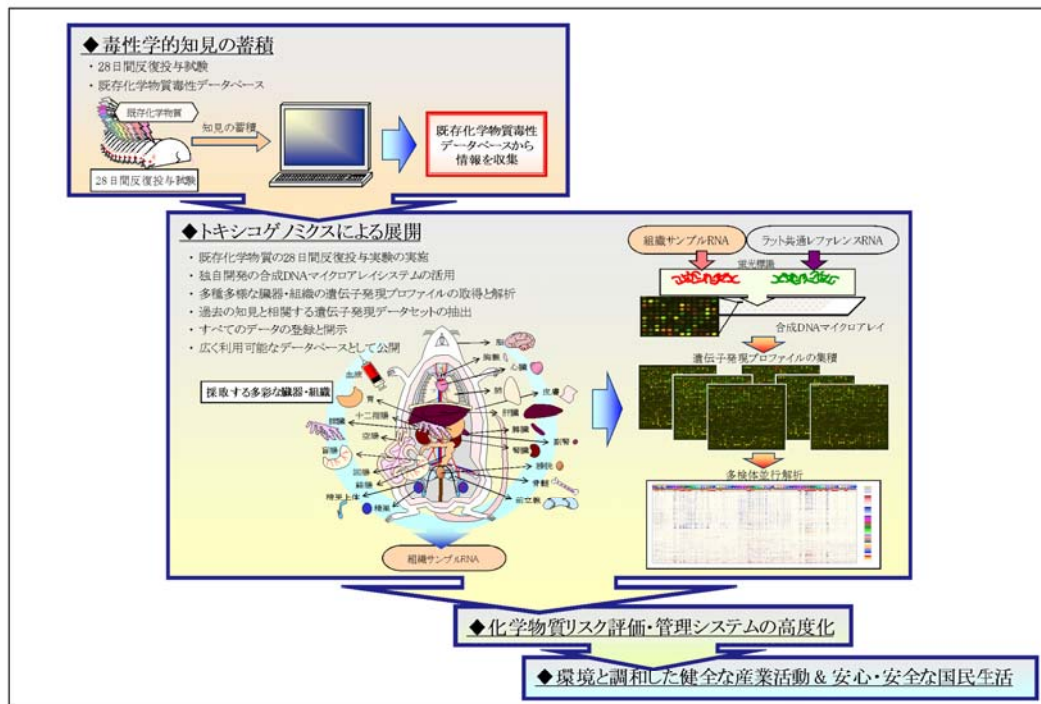


図 III.3-4 研究開発の流れ

国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」の中から、28日間反復投与試験の情報を網羅的に収集し、該データベースに登録されている化学物質の中から40種類の化学物質を選択した。該データベースに記載の実験方法に準拠して28日間反復投与実験を行い、多種多様な臓器・組織を採材した。独自開発のDNAマイクロアレイシステムを活用して遺伝子発現プロファイルを取得して解析することにより、過去の毒性知見と相関する遺伝子発現データセットを抽出した。それらの有用なデータセットは知的財産権を確保した後、速やかに公開している。本プロジェクトは、従来の毒性評価手法に上記ゲノム学的手法を加えることにより、より高度な化学物質のリスク評価・管理システムの構築が可能となり、環境と調和した健全な産業活動および安心・安全な国民生活に寄与することを目的としている。

プロジェクト基本計画に定められた目標は、以下のとおりである。

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発現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。
--------------	--

さらに、実施計画書に掲げたより具体的な目標は、次のとおりである。

研究開発テーマ	目標（実施計画書に記載）
①既存化学物質の28日間反復投与実験	合計40種類程度の化学物質を対象として28日間反復投与実験を実施し、約2,200種類のラット臓器・組織サンプルを取得・保存する。
②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析	研究開発テーマ①で取得・保存したサンプルから厳選し、1,000～1,100種類の遺伝子発現プロファイルを取得・解析を行う。
③遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化	取得・解析した遺伝子発現プロファイル（必要に応じ知的財産権を確保した後）を登録・開示する。また、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プロトタイプを構築し公開する。

3. 2 最終目標に対する達成度

最終目標の達成度

研究開発項目	最終目標	研究開発成果	達成度
28日間反復投与試験と関連する遺伝子発現データセットの開発	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発現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。	40種類の化学物質を反復投与し、最大26臓器で1,028種類の遺伝子発現プロファイルを取得・解析し、78種類の生体応答遺伝子発現データセットを同定した。また、新規に「遺伝子発現情報データベース」のプロトタイプを構築した。	◎

その詳細を以下に記述する。

平成20年2月に第1回目の28日間反復投与実験（1回あたり5物質）を開始し、平成22年度末で合計8回の28日間反復投与実験（計40化学物質）を完了した。さらに、平成22年度には、それまでに蓄積したデータの補完を図る目的で、すでに実験済みの化学物質を1つ選択し、短期間（1、4、7、14日間）の反復投与実験を行った。これらの実験で化学物質を投与したラットから総計3,611種類の組織サンプルを採材し、それらのすべての組織サンプルからtotal RNAを抽出し、エタノール沈殿の形で保存した。

なお、プロジェクト期間中にラットの解剖手順の効率化を目指したプロトコルの改良を行い、遺伝子発現解析用28日間反復投与実験のプロトコルを確立した。

次に、取得・保存したtotal RNAの中から1,028種類を厳選し、poly A+ RNAの精製とマイクロアレイにハイブリダイゼーションにより遺伝子発現プロファイルを取得し、遺伝子発現変動解析を行った。その結果、化学物質の有害性評価に有用であると考えられる生体応答遺伝子発現データセット、毒性マーカー遺伝子候補等の取得に成功し、その中の一部は特許出願を行った（平成22年度までに10件出願、平成23年8月17日現在で10件追加出願）。

さらに、取得した遺伝子発現プロファイルは知的財産権の確保の後に国立遺伝学研究所の遺伝子発現データベースであるCIBEX（Center for Information Biology gene EXpression database）への登録を順次行っており、すべての生データ（1,025プロファイル）を公開した。ただし、3サンプルは化学物質の反復投与による影響とは無関係と考えられる異常部位を参考として採材したものであったため、あえて登録・公開を行わなかった。また、遺伝子発現情報統合データベースの公開へ向けた加工・編集作業を行っている。

テーマ毎の達成度

研究開発テーマ	最終目標	研究開発成果	達成度
①既存化学物質の 28日間反復投与 実験	合計40種類程度の化学物質 を対象として28日間反復投 与実験を実施し、約2,200 種類のラット臓器・組織サン プルを取得・保存する。	[化学物質投与] 40種類 の化学物質の投与実験が完 了している。 [臓器・組織サンプル] 3, 611種類の臓器・組織サ ンプルの取得・保存が完了 している。	◎
②既存化学物質投 与ラット組織の遺 伝子発現解析	研究開発テーマ①で取得・保 存したサンプルから厳選し、 1,000～1,100種類の 遺伝子発現プロファイルを取 得・解析を行う。	[遺伝子発現プロファイル の取得・解析] 1,028種 類の遺伝子発現プロファイ ルを取得し解析が完了して いる。 [生体応答遺伝子発現デー タセット] 合計78種類の 生体応答遺伝子発現デー タセットを取得している（一 部は特許出願済み）。	◎
③遺伝子発現情報 の登録・開示とデ ータベース化	取得・解析した遺伝子発現プ ロファイル（必要に応じ知的 財産権を確保した後）を登 録・開示する。また、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 のプロトタイプを構築し公開 する。	[遺伝子発現プロファイル の登録・公開] データ集合 体への編纂作業が完了し、 知的財産権の確保の後、速 やかに登録・公開を行って いる（特許出願10件[但 しH23年度10件追加]、 登録・公開97件[1,02 5プロファイル]が完了）。	○

3. 3 進捗状況と成果

3. 3. 1 既存化学物質の28日間反復投与実験

(1) 化学物質の選択

まず、国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」(http://dra4.nihs.go.jp/mhlw_data/jsp/SearchPage.jsp)に掲載されている化学物質の中から40種類を選択した(図III.3-5)。本プロジェクトで選択した化学物質の毒性の主な標的臓器は肝臓、腎臓、脾臓、神経であった。また、毒性の報告がなされていない化学物質を9種類選択した。

化学物質名称	化学物質名略	Dose(mg/kg)	GAS No.	肝臓	腎臓	脾臓	神経	胃	毒性なし
2-ブタノンオキシム	2bo	100	96-29-7						
m-キシレンジアミン	mxa	400	1477-55-0						
3-シアノピリジン	3cp	180	100-54-9						
2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール	2ae	1,000	111-41-1						
チトラヒドロフルアルアルコール	thf	600	97-99-4						
メタクリルアミド	mca	150	79-39-0						
スルホラン	suf	700	126-33-0						
2-イソプロピルキシエタノール	2ip	500	109-59-1						
ヒドラジシン一水和物	hnh	30	7803-57-8						
4-エチルモルホリン	4em	500	100-74-3						
メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド	mta	1,000	5039-78-1						
塩化ベンジルトリメチルアンモニウム	bac	120	56-93-9						
m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム	mns	1,000	127-68-4						
1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物	nat	1,000	130-13-2						
3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール	mmb	1,000	56539-66-3						
o-ジクロロベンゼン	deb	500	95-50-1						
1,4-キシリジン	34x	250	95-64-7						
N-メチルアニリン	nma	125	100-61-8						
トリレンジイソシアナート	tth	300	26471-62-5						
2-(ジブチルアミノ)エタノール	2de	250	102-81-8						
p-クミルフェノール	pcp	700	599-64-4						
m-クレゾール	mcs	1,000	108-39-4						
2,3-ジメチルアニリン	23d	200	87-59-2						
NN-ジシクロヘキシルカルボジイミド	dhc	300	538-75-0						
フタル酸ジヘフチル	dhp	1,000	3648-21-3						
テトラプロモエタン	tbe	200	79-27-6						
アジピン酸ジブチル	dba	1,000	105-99-7						
p-エチルフェノール	pep	1,000	123-07-9						
o-tert-ブチルフェノール	tbp	500	88-18-6						
p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール	tmpp	300	140-64-9						
2,4-dietert-ブチルフェノール	24b	300	96-76-4						
3,5-キシリジン	35x	200	108-69-0						
NN-ジメチルベンジルアミン	nda	200	103-83-3						
1,3-ジプロモプロパン	13d	250	109-64-8						
o-ヘキサチカン	nhd	1,000	544-76-3						
1-プロモシクロプロパン	bcp	300	109-70-6						
ブノイドクエン	tmb	1,000	95-63-6						
ジシクロヘキシルアミン	dha	70	101-83-7						
1,4-ジプロモベンゼン	14d	300	106-37-6						
2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸	ams	1,000	88-44-8						
計				20	18	12	5	1	9

主な標的臓器

- 肝臓 : 20
- 腎臓 : 18
- 脾臓 : 12
- 神経 : 5
- 胃 : 1
- 毒性なし : 9

※「既存化学物質毒性データベース」より

(注)主な標的臓器として判断されていない臓器において、病理変化が生じる場合はある

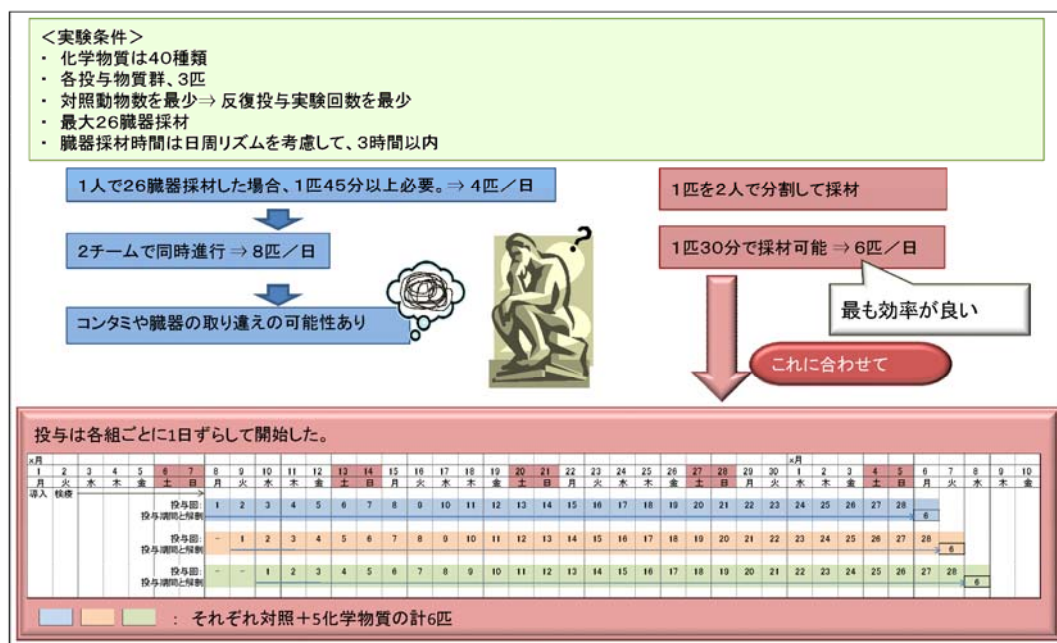
図III.3-5 本プロジェクトで扱った40種類の化学物質とその標的臓器

本プロジェクトで扱った化学物質の一覧表を示す。また、それぞれの化学物質の標的臓器を色を付けて示す。

(2) 臓器採材方法の検討

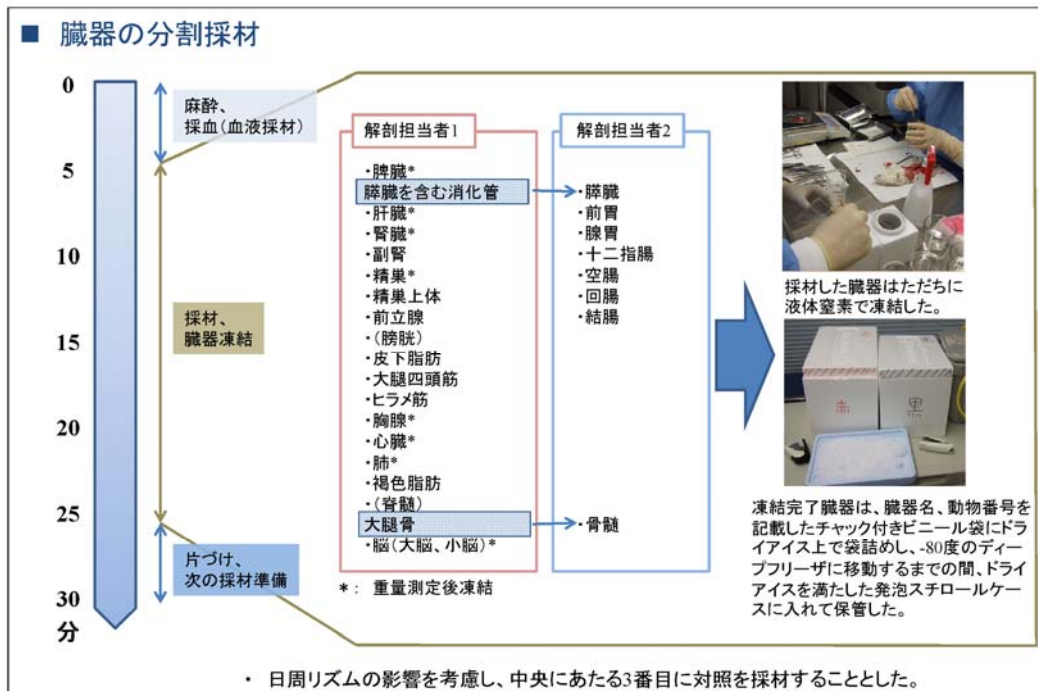
本プロジェクトでは、限られた資金、期間、人員、およびスペースなどを考慮して効率のよい実験設計をする必要があった。実験条件として、40種類の化学物質を投与して最大26臓器を採材し、統計処理をするために必要最小限の動物数（1群3匹）を確保し、対照群の動物数を最小限にすることを考えた。しかし、日リズムにより発現変動する遺伝子群の存在が知られており、それらの遺伝子群の影響を最小限に抑える必要があったため、臓器採材時間を3時間以内とした（図III.3-6）。

解剖者1人で26臓器を採材した場合、1匹あたり45分以上要したため1日当たり4匹、解剖者2人で1日当たり8匹の採材が可能であった。しかし、2匹の動物を同時並行して採材した場合、コンタミネーションや臓器の取り違いの可能性があった。そこで、1匹を解剖者2人で分担して採材することを考え、採材臓器の分担方法や作業の効率化を検討した結果、1個体30分以内で迅速に処理するための標準プロトコルを確立した（図III.3-7）。この方法を用いると、1日当たり6匹の採材ができることとなった。この方法が様々な条件および制限を考慮した場合に最も効率の良い方法であると判断し、本プロジェクトではこの臓器採材方法を採用した（図III.3-8）。さらに、1群3匹を使用するために、28日間反復投与実験の1クールではラット6匹からなる1群を1セットとしてそれを3セット準備した。各群は開始日及び終了日を1日ずつずらして処理（化学物質の強制経口投与）することとした（図III.3-6）。



図III.3-6 28日間反復投与実験の設計

本プロジェクトの28日間反復投与実験の実験条件、課題、実験設計を示す。



図III.3-7 臓器の分割採材方法の検討

解剖者2人で分担して採材を行う方法を示す。実質採材時間は約20分であり、その前後5分ずつは解剖準備または片づけの時間に充てる。採血をした後、解剖担当者1が膵臓を含めた消化管部分を切除して解剖者2に渡す。解剖者2は消化管部分から膵臓、前胃、腺胃、十二指腸、空腸、回腸、結腸を採材した。一方、解剖担当者1は消化管以外の臓器の採材を行い、肝臓、腎臓、副腎、精巣、精巣上部、前立腺、膀胱、皮下脂肪、大腿四頭筋、ヒラメ筋、胸腺、心臓、肺、褐色脂肪、脊髄、脳(大脳、小脳)を採材した。また、大腿骨を切除した後に解剖担当者2に渡し、解剖担当者2は大腿骨から骨髄を採材した。

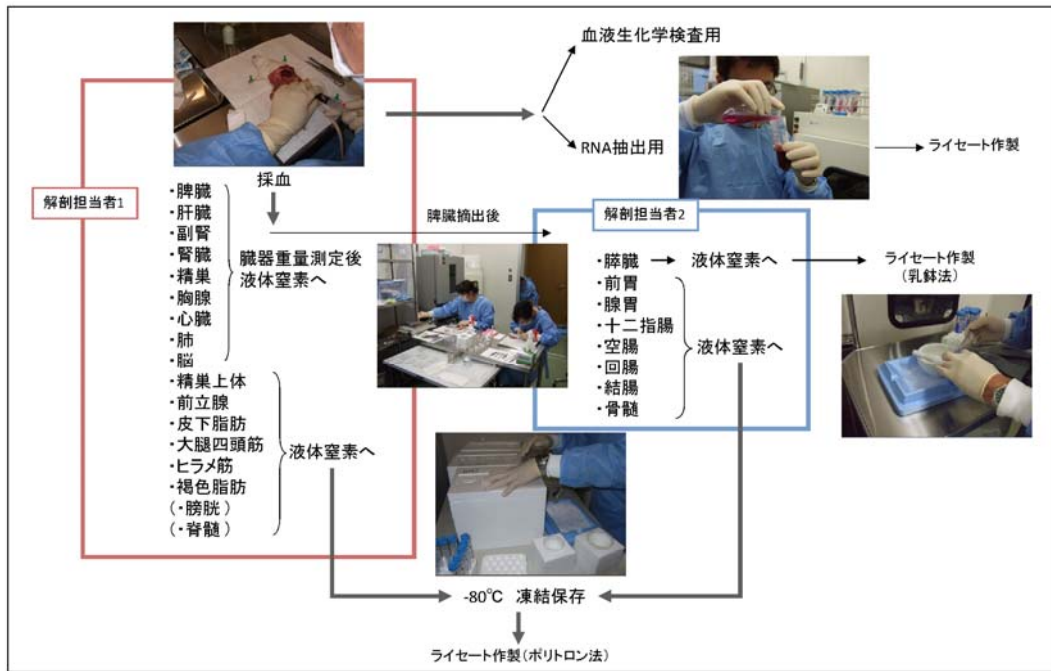


図 III.3-8 解剖の流れ

実験動物の解剖の流れを示す。採血後、2人の担当者が分担して臓器の摘出を行った。採材した臓器はすぐに液体窒素で凍結したのち、 -80°C で凍結保存した。なお、脾臓については液体窒素で凍結した後すぐに乳鉢で組織をすり潰し、ISOGENへ入れて激しく上下に振りライセートとした。

(3) 28日間反復投与実験

本プロジェクトで選択した化学物質をラットCrI:CD (SD) 雄(入荷時5週齢、試験開始時6週齢)に胃ゾンデを用いて強制経口投与した(図III.3-9)。化学物質の投与用量は、国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」から得られた致死例のない最大用量に関する情報に従って設定した。なお、各物質の溶媒も原則として、同データベースの記載に従った。28日間反復投与実験期間中の観察項目は、一般状態を毎日2回(午前・午後)、体重測定を週2回(投与1、4、8、11、15、18、22、25、28日目および解剖当日)、摂餌量測定を週1回(投与1、8、15、22日目に給餌量、その約24時間後に残餌量を測定)を行い、採血した血液の一部を用いて血液生化学検査を行い、解剖当日には採材臓器の一部(脾臓、肝臓、腎臓、精巣、胸腺、心臓、肺、脳)の重量を測定した。なお、遺伝子の中には化学物質の曝露等の外的な刺激とは関係なく日周リズムにより発現変動するサーカディアン遺伝子が多数存在しており、これらの影響を最小限に抑えるために、化学物質の投与時刻およびラットの解剖時刻を一定にした。

また、本プロジェクトでは、3~4か月を1つのクールとして28日間反復投与実験を行った。1群のラットには、陰性対照と5種類の化学物質を1匹ずつ独立に投与した。すなわち、同一条件の個体の数が3となるようにした。28日間反復投与終了後1日経過したところでラットを解剖し、各個体から24~26種類の臓器・組織を採取し、ただちに液体窒素で凍結した。凍結した臓器・組織を組織融解変性液によって処理(ライセート調製)し、total RNAとした。28日間反復投与の前2週間を実験準備期間とし、投与後の10週間をサンプル処理(ライセート調製からRNAの抽出・精製まで)期間とした。株式会社メディクローム横浜研究所内に、本プロジェクト専用の実験動物施設及び遺伝子発現解析施設を新規に設置し、平成20年2月から本格稼働を開始した(図III.3-10)。

各クールにおける各化学物質の投与用量および溶媒は以下のとおりである。

<第1回>(溶媒はすべて注射用水[大塚製薬株式会社製]を使用)

- ・ 2-ブタノンオキシム / エチルメチルケトキシム(「2bo」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 96-29-7] (100 mg/kg/day)
- ・ m-キシリレンジアミン / 1,3-ビス(アミノメチル)ベンゼン(「mxa」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 1477-55-0] (400 mg/kg/day)
- ・ 3-シアノピリジン(「3cp」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 100-54-9] (180 mg/kg/day)
- ・ 2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール / N-(アミノエチル)エタノールアミン(「2ae」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 111-41-1] (1,000 mg/kg/day)
- ・ テトラヒドロフルフリルアルコール(「thf」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 97-99-4] (600 mg/kg/day)

<第2回>(溶媒はすべて注射用水[大塚製薬株式会社製]を使用)

- ・ メタクリルアミド / 1-メチル-2-プロペンアミド(「mca」で表す。以下同じ。)[CAS登録番号 79-39-0] (150 mg/kg/day)

- ・ スルホラン / テトラヒドロチオフェン-1,1-ジオキシド (「suf」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 126-33-0] (700 mg/kg/day)
 - ・ 2-イソプロポキシエタノール / 2- (1-メチルエトキシ) エタノール (「2ip」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 109-59-1] (500 mg/kg/day)
 - ・ ヒドラジン一水和物 (「hnh」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 7803-57-8] (30 mg/kg/day)
 - ・ 4-エチルモルホリン / N-エチルモルホリン (「4em」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 100-74-3] (500 mg/kg/day)
- <第3回> (溶媒はすべて注射用水 [大塚製薬株式会社製] を使用)
- ・ メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド / (メタクリロイルオキシエチル) トリメチルアンモニウムクロリド (「mta」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 5039-78-1] (1,000 mg/kg/day)
 - ・ 塩化ベンジルトリメチルアンモニウム / ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド (「bac」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 56-93-9] (120 mg/kg/day)
 - ・ m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム / 3-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム (「mns」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 127-68-4] (1,000 mg/kg/day)
 - ・ 1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物 / 4-アミノ-1-ナフタレンスルホン酸ナトリウム (「nat」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 130-13-2] (1,000 mg/kg/day)
 - ・ 3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール (「mmb」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 56539-66-3] (1,000 mg/kg/day)
- <第4回> (溶媒はすべてオリブ油 [小塚製薬株式会社製] を使用)
- ・ o-ジクロロベンゼン (「dcb」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 95-50-1] (500 mg/kg/day)
 - ・ 3,4-キシリジン / 3,4-ジメチルアニリン (「34x」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 95-64-7] (250 mg/kg/day)
 - ・ N-メチルアニリン (「nma」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 100-61-8] (125 mg/kg/day)
 - ・ トリレンジイソシアナート (「tdn」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 26471-62-5] (300 mg/kg/day)
 - ・ 2- (ジブチルアミノ) エタノール / 2- (ジ-n-ブチルアミノ) エタノール (「2de」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 102-81-8] (250 mg/kg/day)
- <第5回> (溶媒はすべてオリブ油 [小塚製薬株式会社製] を使用)
- ・ p-クミルフェノール / 4- (1-メチル-1-フェニルエチル) フェノール (「pcp」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 599-64-4] (700 mg/kg/day)
 - ・ m-クレゾール / 3-メチルフェノール (「mcs」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 108-39-4] (1,000 mg/kg/day)
 - ・ 2,3-ジメチルアニリン (「23d」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 87-59-2] (200 mg/kg/day)
 - ・ N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド / ジシクロヘキシルカルボジイミド (「dhc」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 538-75-0] (300 mg/kg/day)

・ フタル酸ジヘプチル / フタル酸ジヘプチルヘステル (「dhp」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 3648-21-3] (1,000 mg/kg/day)

<第6回> (溶媒はすべてオリブ油 [小塚製薬株式会社製] を使用)

・ テトラブロモエタン / 四臭化エタン (「tbe」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 79-27-6] (200 mg/kg/day)

・ アジピン酸ジブチル (「dba」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 105-99-7] (1,000 mg/kg/day)

・ p-エチルフェノール / 4-エチルフェノール (「pep」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 123-07-9] (1,000 mg/kg/day)

・ o-t-ブチルフェノール / 2-tert-ブチルフェノール (「tbp」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 88-18-6] (500 mg/kg/day)

・ p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール / p-tert-オクチルフェノール (「tmp」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 140-66-9] (300 mg/kg/day)

<第7回> (溶媒はすべてオリブ油 [小塚製薬株式会社製] を使用)

・ 2,4-ジ-tert-ブチルフェノール (「24b」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 96-76-4] (300 mg/kg/day)

・ 3,5-キシリジン / 3,5-ジメチルアニリン (「35x」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 108-69-0] (200 mg/kg/day)

・ N,N-ジメチルベンジルアミン (「nda」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 103-83-3] (200 mg/kg/day)

・ 1,3-ジブロモプロパン (「13d」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 109-64-8] (250 mg/kg/day)

・ ヘキサデカン / n-ヘキサデカン (「nhd」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 544-76-3] (1,000 mg/kg/day)

<第8回> (溶媒はすべてゴマ油 [小塚製薬株式会社製] を使用)

・ 1-ブロモ-3-クロロプロパン (「bcp」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 109-70-6] (300 mg/kg/day)

・ プソイドクメン / 1,2,4-トリメチルベンゼン (「tmb」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 95-63-6] (1,000 mg/kg/day)

・ ジシクロヘキシルアミン (「dha」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 101-83-7] (70 mg/kg/day)

・ 1,4-ジブロモベンゼン (「14d」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号106-37-6] (300 mg/kg/day)

・ 2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸 (「ams」で表す。以下同じ。) [CAS登録番号 88-44-8] (1,000 mg/kg/day)

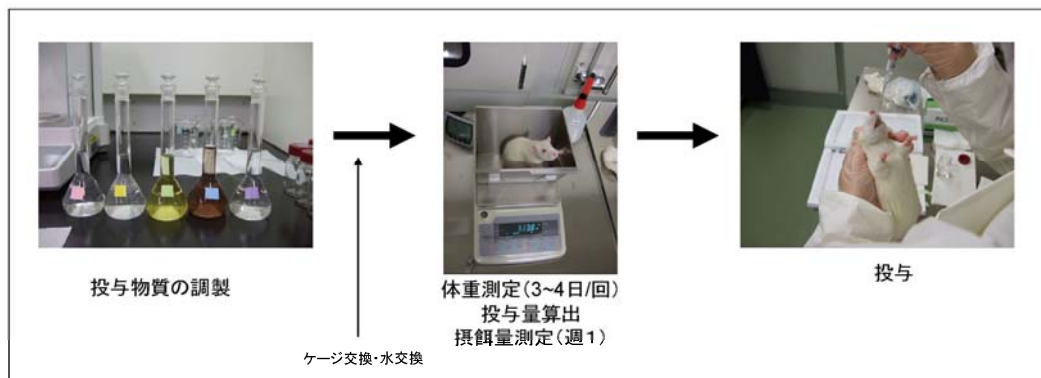


図 III.3-9 投与作業

投与作業の流れを示す。3～4日おきに体重測定を行い、調製した化学物質の投与量を算出した。

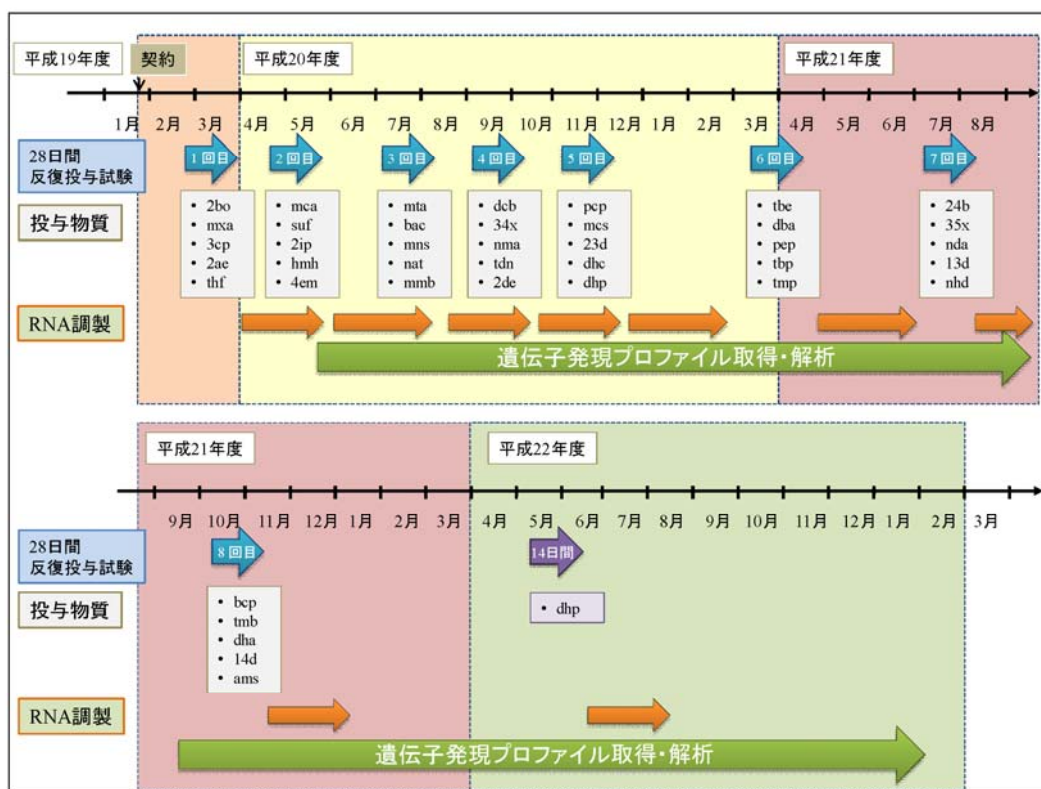


図 III.3-10 プロジェクトの経過図

プロジェクト全体のスケジュールを示す。「28日間反復投与試験」の欄には28日間反復投与試験（1回目から8回目まで）および14日間反復投与試験のスケジュールを、「投与物質」の欄には投与物質の略号を、「RNA調製」の欄にはRNA調製のスケジュールを、その下の欄には遺伝子発現プロファイル取得のスケジュールを示している。

また、第1～8回の反復投与実験で採取した臓器・組織は次のとおりであった。すべてのサンプルからtotal RNAを抽出し、エタノール沈殿の形で保存した。

<第1回> 総計26種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液・膵臓・膀胱

<第2回> 総計26種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液・膵臓・脊髄

<第3回> 総計25種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液・膵臓

<第4回> 総計25種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液・膵臓

<第5回> 総計24種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液

<第6回> 総計24種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液

<第7回> 総計24種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液

<第8回> 総計24種類

大脳・小脳・胸腺・肺・心臓・肝臓・腎臓・副腎・脾臓・前立腺・精巣・精巣上部・前胃・腺胃・十二指腸・空腸・回腸・結腸・ヒラメ筋・大腿四頭筋・骨髄・褐色脂肪・皮下脂肪・血液

28日間反復投与期間中は、常法に従い、動物の観察と体重・摂餌量の記録を行った（図III.3-11～18）。また、投与後の解剖時には肉眼病理学的検討を行い、剖検所見及び採取臓器重量を記録した（表III.3-1～8）。さらに、遺伝子発現解析用に取得した血液の一部を用いて血液生化学的検査を行った（専門施設へ外注）（表III.3-9～16）。

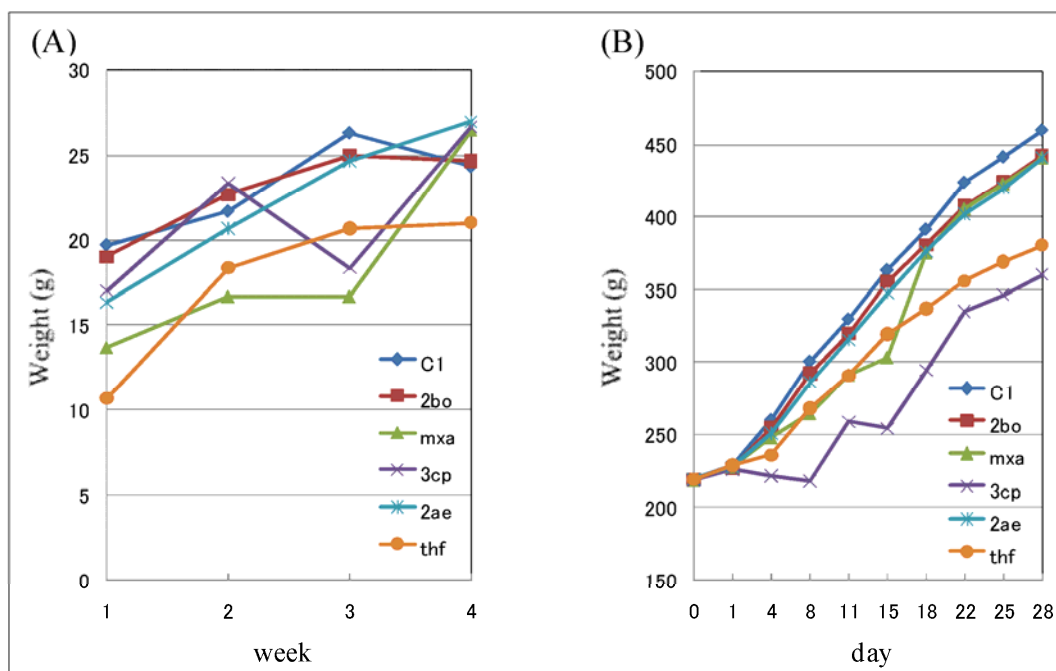


図 III.3-11 28日間反復投与試験（第1回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C1」は「注射用水投与群」を、「2bo」は「2-ブタノンオキシム投与群」を、「mx」は「m-キシリレンジアミン投与群」を、「3cp」は「3-シアノピリジン投与群」を、「2ae」は「2-(2-アミノエチルアミノ)エタノール投与群」を、「thf」は「テトラヒドロフルフリルアルコール投与群」を表している。

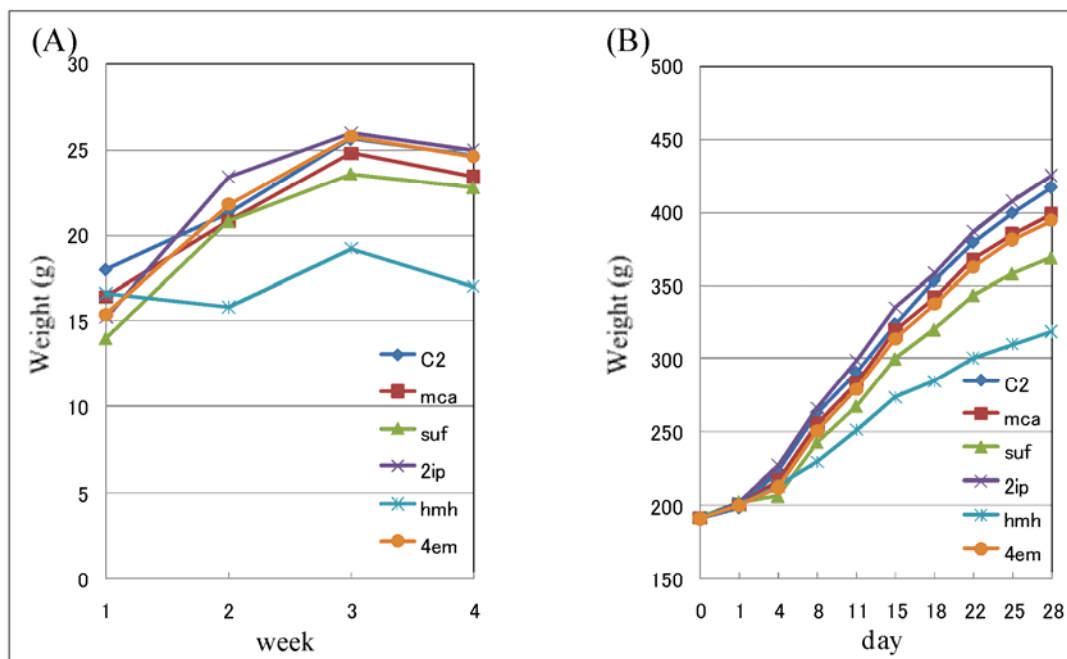


図 III.3-12 28日間反復投与試験（第2回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C2」は「注射用水投与群」を、「mca」は「メタクリルアミド投与群」を、「suf」は「スルホラン投与群」を、「2ip」は「2-イソプロポキシエタノール投与群」を、「hmh」は「ヒドラジン-水和物投与群」を、「4em」は「4-エチルモルホリン投与群」を表している。

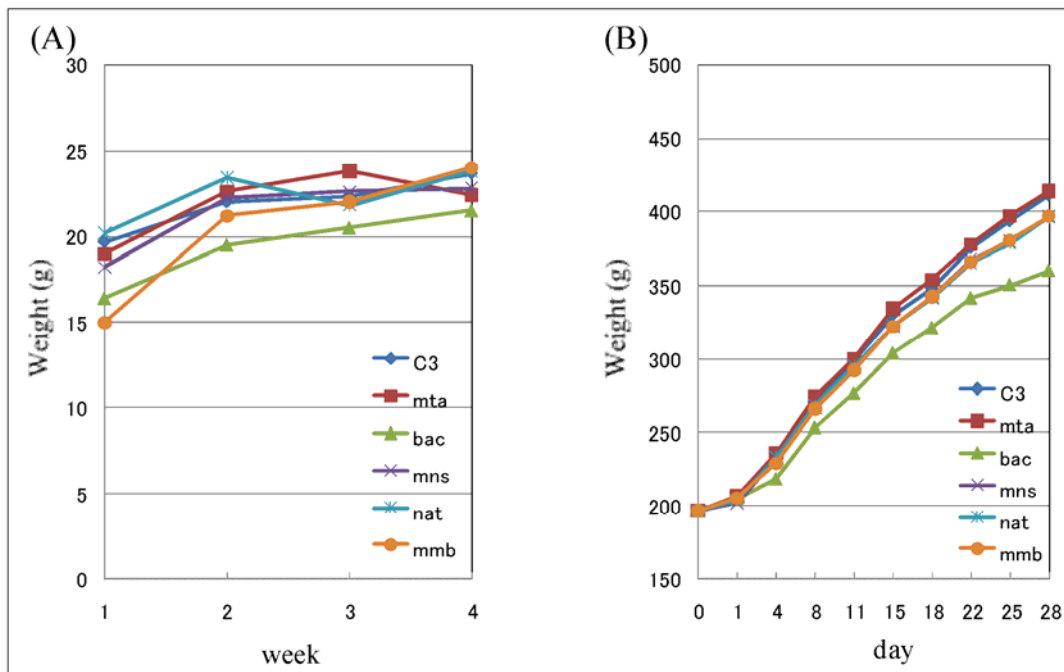


図 III.3-13 28日間反復投与試験（第3回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C3」は「注射用水投与群」を、「mta」は「メタクリル酸エチルトリメチルアンモニウムクロリド投与群」を、「bac」は「塩化ベンジルトリメチルアンモニウム投与群」を、「mns」は「m-ニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム投与群」を、「nat」は「1-ナフチルアミン-4-スルホン酸ナトリウム四水和物投与群」を、「mmb」は「3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群」を表している。

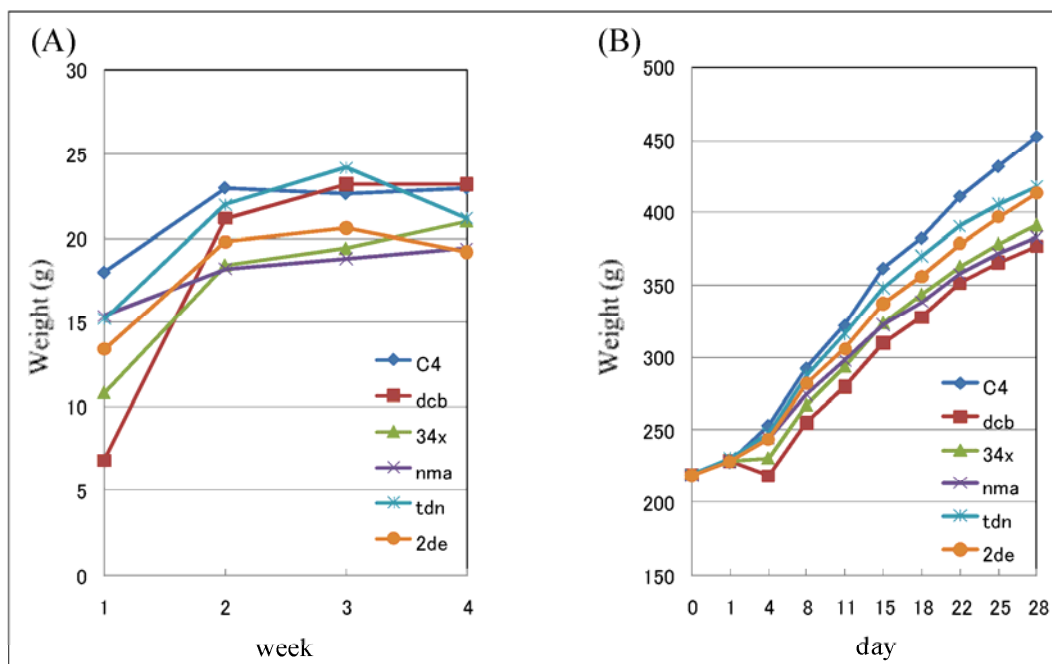


図 III.3-14 28日間反復投与試験（第4回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C4」は「オリーブ油投与群」を、「dcb」は「o-ジクロロベンゼン投与群」を、「34x」は「3,4-キシリジン投与群」を、「nma」は「N-メチルアニリン投与群」を、「tdn」は「トリレンジイソシアナート投与群」を、「2de」は「2-（ジブチルアミノ）エタノール投与群」を表している。

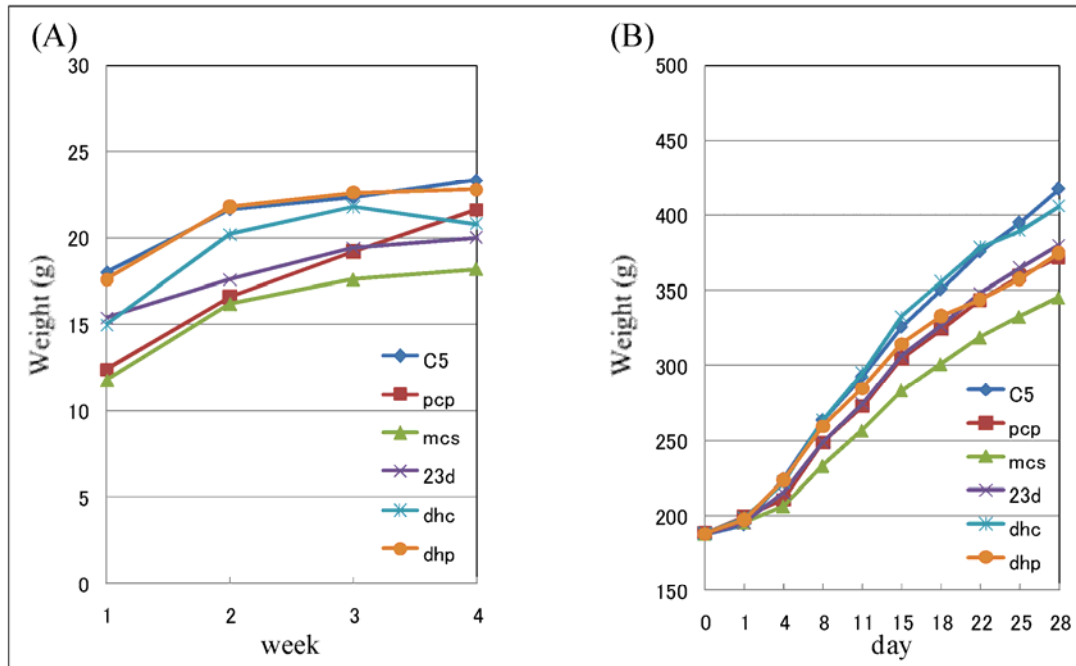


図 III.3-15 28日間反復投与試験（第5回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C5」は「オリブ油投与群」を、「pcp」は「p-クミルフェノール投与群」を、「mcs」は「m-クレゾール投与群」を、「23d」は「2,3-ジメチルアニリン投与群」を、「dhc」は「N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド投与群」を、「dhp」は「フタル酸ジヘプチル投与群」を表している。

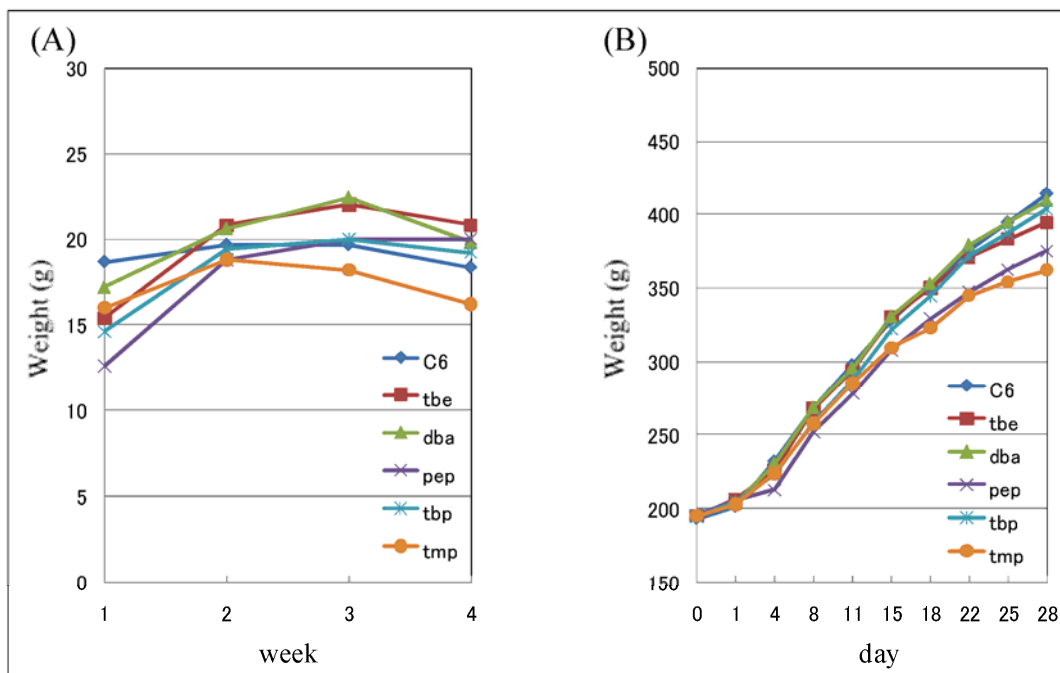


図 III.3-16 28日間反復投与試験（第6回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C6」は「オリブ油投与群」を、「tbe」は「テトラブロモエタン投与群」を、「dba」は「アジピン酸ジブチル投与群」を、「pep」は「P-エチルフェノール投与群」を、「tbp」は「o-t-ブチルフェノール投与群」を、「tmp」は「p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群」を表している。

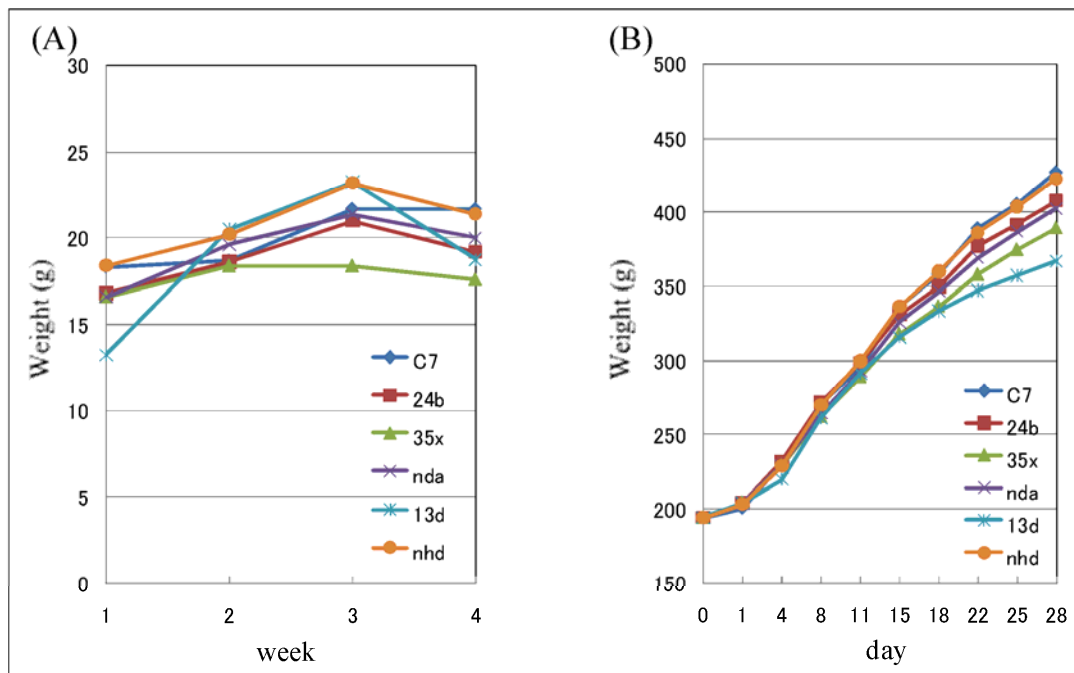


図 III.3-17 28日間反復投与試験（第7回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量 (A) を、3日から4日おきに体重 (B) を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C7」は「オリーブ油投与群」を、「24b」は「2,4-ジ-tert-ブチルフェノール投与群」を、「35x」は「3,5-キシリジン投与群」を、「nda」は「N,N-ジメチルベンジルアミン投与群」を、「13d」は「1,3-ジブロモプロパン投与群」を、「nhd」は「n-ヘキサデカン投与群」を表している。

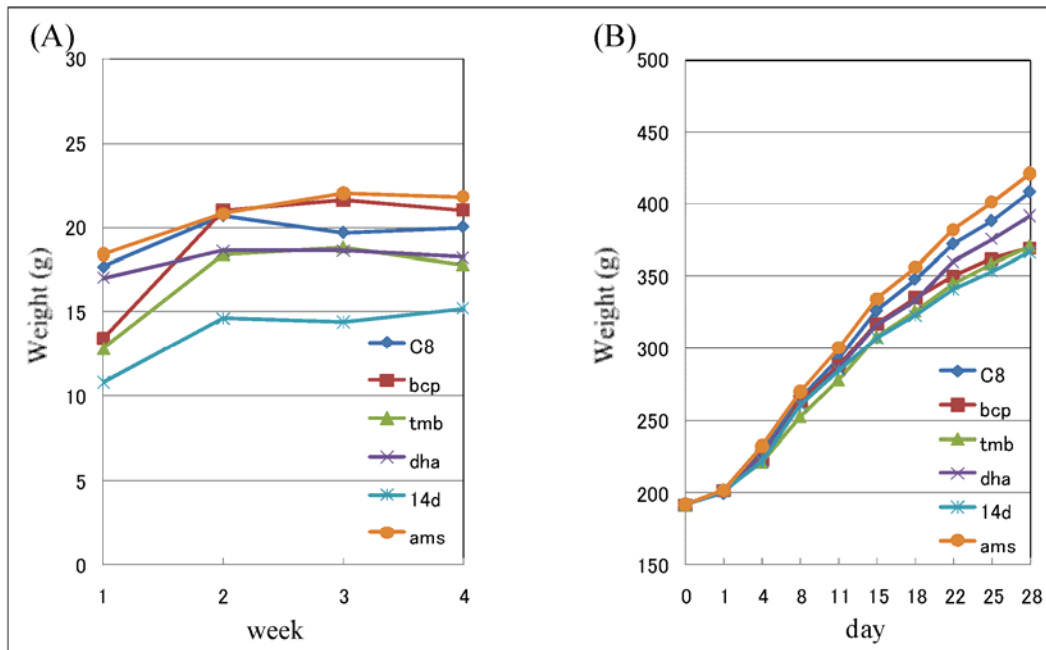


図 III.3-18 28日間反復投与試験（第8回）中の摂餌量及び体重の変動

1週間おきに摂餌量（A）を、3日から4日おきに体重（B）を測定し、群ごとに平均値をグラフに表した。なお、図中、「C8」は「ゴマ油投与群」を、「bcp」は「1-ブromo-3-クロロプロパン投与群」を、「tmb」は「プソイドクメン投与群」を、「dha」は「ジシクロヘキシルアミン投与群」を、「14d」は「1,4-ジブromoベンゼン投与群」を、「ams」は「2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸投与群」を表している。

表III.3-1 臓器重量（第1回）

群	動物番号	絶対重量 (g)										相対重量 (g%)									
		脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣				
C(注射用水)	1	447.4	2.20	0.45	1.35	1.29	0.74	13.19	3.08	3.25	0.49	0.10	0.30	0.29	0.17	2.95	0.69	0.73			
	2	435.3	2.19	0.66	1.33	1.49	1.02	13.20	3.03	3.14	0.50	0.15	0.31	0.34	0.23	3.03	0.70	0.72			
	3	419.1	2.15	0.80	1.25	1.35	0.61	13.65	2.69	3.38	0.51	0.19	0.30	0.32	0.15	3.26	0.64	0.81			
	平均	433.9	2.18	0.64	1.31	1.38	0.79	13.35	2.93	3.26	0.50	0.15	0.30	0.32	0.18	3.08	0.68	0.75			
2bo	4	439.4	2.01	1.03	1.46	1.37	2.77	14.92	3.18	3.36	0.46	0.23	0.33	0.31	0.63	3.40	0.72	0.76			
	5	427.3	2.10	0.58	1.45	1.52	2.63	14.00	3.04	3.60	0.49	0.14	0.34	0.36	0.62	3.28	0.71	0.84			
	6	388.8	1.89	0.57	1.07	1.28	1.76	12.27	2.63	3.27	0.49	0.15	0.28	0.33	0.45	3.16	0.68	0.84			
	平均	418.5	2.00	0.73	1.33	1.39	2.39	13.73	2.95	3.41	0.48	0.17	0.32	0.33	0.57	3.28	0.70	0.82			
mxa	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	8	396.2	2.00	0.48	1.34	1.42	0.73	11.25	2.54	3.48	0.50	0.12	0.34	0.36	0.18	2.84	0.64	0.88			
	9	420.5	2.05	0.53	1.05	1.27	0.56	12.48	2.93	3.53	0.49	0.13	0.25	0.30	0.13	2.97	0.70	0.84			
平均	408.4	2.03	0.51	1.20	1.35	0.65	11.87	2.74	3.51	0.50	0.12	0.29	0.33	0.16	2.90	0.67	0.86				
3cp	10	332.4	1.80	0.41	1.10	1.05	0.78	14.00	2.58	3.13	0.54	0.12	0.33	0.32	0.23	4.21	0.78	0.94			
	11	303.2	1.82	0.45	0.92	1.03	0.42	12.55	2.65	3.59	0.60	0.15	0.30	0.34	0.14	4.14	0.87	1.18			
	12	363.6	1.95	0.65	1.32	1.31	0.65	14.66	2.70	3.40	0.54	0.18	0.36	0.36	0.18	4.03	0.74	0.94			
	平均	333.1	1.86	0.50	1.11	1.13	0.62	13.74	2.64	3.37	0.56	0.15	0.33	0.34	0.18	4.13	0.80	1.02			
2ae	13	421.2	2.20	0.66	1.34	1.31	0.79	13.21	3.11	3.69	0.52	0.16	0.32	0.31	0.19	3.14	0.74	0.88			
	14	424.1	2.06	0.70	1.30	1.26	0.74	11.79	3.11	3.46	0.49	0.17	0.31	0.30	0.17	2.78	0.73	0.82			
	15	400.7	2.13	0.57	1.15	1.16	0.66	11.55	3.04	3.66	0.53	0.14	0.29	0.29	0.16	2.88	0.76	0.91			
	平均	415.3	2.13	0.64	1.26	1.24	0.73	12.18	3.09	3.60	0.51	0.15	0.30	0.30	0.18	2.93	0.74	0.87			
thf	16	390.8	1.96	0.37	1.26	1.17	0.75	11.35	3.04	2.46	0.50	0.09	0.32	0.30	0.19	2.90	0.78	0.63			
	17	349.2	1.94	0.23	1.29	1.20	0.71	9.73	2.25	2.19	0.56	0.07	0.37	0.34	0.20	2.79	0.64	0.63			
	18	346.7	2.05	0.40	1.16	1.16	0.64	9.12	2.69	3.05	0.59	0.12	0.33	0.33	0.18	2.63	0.78	0.88			
	平均	362.2	1.98	0.33	1.24	1.18	0.70	10.07	2.66	2.57	0.55	0.09	0.34	0.33	0.19	2.77	0.73	0.71			

動物番号 7: 投与16日目に死亡

表III.3-2 臟器重量 (第2回)

群	動物番号	体重	絶対重量 (g)							相対重量 (g%)								
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣
C2(注射用水)	1	428.1	2.05	0.94	1.40	1.17	0.79	14.10	2.90	3.38	0.48	0.22	0.33	0.27	0.18	3.29	0.68	0.79
	2	362.6	2.01	0.50	1.24	1.00	0.67	10.31	2.37	3.40	0.55	0.14	0.34	0.28	0.18	2.84	0.65	0.94
	3	386.5	2.02	0.58	1.15	1.17	0.66	10.77	2.68	3.43	0.52	0.15	0.30	0.30	0.17	2.79	0.69	0.89
	平均	392.4	2.03	0.67	1.26	1.11	0.70	11.72	2.65	3.40	0.52	0.17	0.32	0.28	0.18	2.97	0.67	0.87
mca	4	377.2	1.97	0.63	1.26	1.14	0.62	12.33	2.74	3.65	0.52	0.17	0.33	0.30	0.16	3.27	0.73	0.97
	5	389.5	2.05	0.58	1.49	1.08	0.74	13.46	2.63	2.89	0.53	0.15	0.38	0.28	0.19	3.45	0.68	0.74
	6	377.9	2.03	0.55	1.43	1.10	0.71	11.79	2.86	3.04	0.54	0.15	0.38	0.29	0.19	3.12	0.76	0.80
	平均	381.5	2.01	0.59	1.39	1.11	0.69	12.52	2.74	3.19	0.53	0.15	0.36	0.29	0.18	3.28	0.72	0.84
suf	9	327.5	1.96	0.57	1.23	1.06	0.54	10.70	2.71	3.23	0.60	0.17	0.38	0.32	0.16	3.27	0.83	0.98
	10	340.0	2.00	0.53	1.22	1.12	0.49	10.30	2.70	2.89	0.59	0.15	0.36	0.33	0.15	3.03	0.79	0.85
	11	361.3	2.03	0.40	1.19	1.09	0.50	13.15	3.05	2.92	0.56	0.11	0.33	0.30	0.14	3.64	0.84	0.81
	平均	350.7	2.01	0.46	1.21	1.10	0.49	11.73	2.87	2.90	0.57	0.13	0.34	0.31	0.14	3.33	0.82	0.83
2ip	14	378.1	1.99	0.75	1.41	1.14	1.65	10.84	3.42	3.17	0.53	0.20	0.37	0.30	0.44	2.67	0.90	0.84
	15	424.9	2.06	0.76	1.22	1.11	1.85	12.70	2.83	3.11	0.48	0.18	0.29	0.26	0.43	2.99	0.67	0.73
	16	407.6	1.97	0.52	1.33	1.29	1.57	11.90	2.73	3.27	0.48	0.13	0.33	0.32	0.39	2.92	0.67	0.80
	平均	403.5	2.01	0.67	1.32	1.18	1.69	11.82	2.99	3.18	0.50	0.17	0.33	0.29	0.42	2.93	0.75	0.79
hmh	19	282.5	1.92	0.37	1.74	1.65	0.79	12.78	2.58	2.98	0.68	0.13	0.62	0.58	0.28	4.52	0.91	1.06
	20	265.1	1.90	0.26	1.06	1.11	0.73	10.29	2.45	3.09	0.72	0.10	0.40	0.42	0.28	3.88	0.92	1.16
	21	300.8	1.90	0.33	1.02	1.11	0.79	13.13	3.31	2.88	0.63	0.11	0.34	0.37	0.26	4.37	1.10	0.96
	平均	282.8	1.91	0.32	1.27	1.29	0.77	12.07	2.78	2.98	0.68	0.11	0.45	0.46	0.27	4.26	0.98	1.06
4em	24	388.4	2.05	0.80	1.46	1.11	0.89	11.42	2.98	3.82	0.53	0.21	0.38	0.28	0.23	2.94	0.77	0.98
	25	371.1	1.99	0.66	1.34	1.07	0.80	11.73	3.03	3.41	0.54	0.18	0.36	0.29	0.21	3.16	0.82	0.92
	26	355.1	1.89	0.71	1.35	1.06	0.65	11.14	3.23	3.41	0.53	0.20	0.38	0.30	0.18	3.14	0.91	0.96
	平均	371.5	1.98	0.72	1.38	1.08	0.78	11.43	3.08	3.55	0.53	0.19	0.37	0.29	0.21	3.08	0.83	0.95

表III.3-3 臟器重量 (第3回)

群	動物番号	体重	絶対重量 (g)							相対重量 (g%)								
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣
C3(注射用水)	1	411.3	2.03	0.59	1.36	1.37	0.76	12.45	2.87	3.41	0.49	0.14	0.33	0.33	0.18	3.03	0.70	0.83
	2	393.8	1.96	0.50	1.24	1.09	0.59	11.62	2.52	3.44	0.50	0.13	0.31	0.28	0.15	2.95	0.64	0.87
	3	358.6	1.97	0.57	1.12	1.11	0.62	11.10	2.08	3.21	0.55	0.16	0.31	0.31	0.17	3.10	0.58	0.90
	平均	387.9	1.99	0.55	1.24	1.19	0.66	11.72	2.49	3.35	0.51	0.14	0.32	0.31	0.17	3.02	0.64	0.87
mta	4	361.7	1.99	0.48	1.13	1.08	0.46	9.56	2.31	3.16	0.55	0.13	0.31	0.30	0.13	2.64	0.64	0.87
	5	408.6	1.98	0.79	1.17	1.23	0.72	13.96	2.89	3.22	0.48	0.19	0.29	0.30	0.18	3.42	0.71	0.79
	6	379.5	1.93	0.70	1.22	1.17	0.62	10.13	2.46	3.40	0.51	0.18	0.32	0.31	0.16	2.67	0.65	0.90
	平均	383.3	1.97	0.66	1.17	1.16	0.60	11.22	2.55	3.26	0.51	0.17	0.31	0.30	0.16	2.91	0.66	0.85
bac	9	318.3	1.97	0.44	1.15	1.09	0.59	10.36	2.33	3.68	0.62	0.14	0.36	0.34	0.19	3.25	0.73	1.16
	10	336.6	2.00	0.50	1.10	1.13	0.47	9.41	2.28	2.66	0.59	0.15	0.33	0.34	0.14	2.80	0.68	0.79
	11	309.4	1.90	0.51	1.02	1.01	0.45	9.85	2.36	3.23	0.61	0.16	0.33	0.33	0.15	3.18	0.76	1.04
	平均	321.4	1.96	0.48	1.09	1.08	0.50	9.87	2.32	3.19	0.61	0.15	0.34	0.33	0.16	3.08	0.72	1.00
mns	14	349.1	1.96	0.59	1.20	1.21	0.69	9.50	2.32	3.30	0.56	0.17	0.34	0.35	0.20	2.72	0.66	0.95
	15	363.5	2.01	0.44	1.09	1.02	0.55	10.95	2.55	3.21	0.55	0.12	0.30	0.28	0.15	3.01	0.70	0.88
	16	364.5	1.96	0.65	1.09	1.16	0.74	10.75	2.31	3.43	0.54	0.18	0.30	0.32	0.20	2.95	0.63	0.94
	平均	359.0	1.98	0.56	1.13	1.13	0.66	10.40	2.39	3.31	0.55	0.16	0.31	0.32	0.18	2.89	0.67	0.92
nat	19	368.0	2.00	0.50	1.30	1.29	0.55	11.52	2.80	3.24	0.52	0.13	0.34	0.33	0.14	2.97	0.72	0.84
	20	403.0	1.97	0.54	1.27	1.24	0.66	11.34	2.68	3.18	0.49	0.13	0.32	0.31	0.16	2.81	0.67	0.79
	21	344.8	1.97	0.62	1.07	1.23	0.66	9.34	2.16	2.95	0.57	0.18	0.31	0.36	0.19	2.71	0.63	0.86
	平均	378.6	1.98	0.55	1.21	1.25	0.62	10.73	2.55	3.12	0.53	0.15	0.32	0.33	0.17	2.83	0.67	0.83
mmb	24	379.1	1.85	0.54	1.22	1.05	0.64	13.67	3.08	3.07	0.49	0.14	0.32	0.28	0.17	3.61	0.81	0.81
	25	384.1	1.95	0.61	1.41	1.17	0.53	12.22	2.92	3.22	0.51	0.16	0.37	0.30	0.14	3.18	0.76	0.84
	26	360.3	1.89	0.60	1.22	1.04	0.70	12.36	2.72	3.17	0.52	0.17	0.34	0.29	0.19	3.43	0.75	0.88
	平均	374.5	1.90	0.58	1.28	1.09	0.62	12.75	2.91	3.15	0.51	0.16	0.34	0.29	0.17	3.41	0.78	0.84

表III.3-4 臓器重量 (第4回)

群	動物 番号	体重	絶対重量 (g)									相対重量 (g%)								
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣		
C4(オリーブ油)	1	438.2	2.02	0.59	1.31	1.46	0.95	13.24	3.11	2.92	0.46	0.13	0.30	0.33	0.22	3.02	0.71	0.67		
	2	414.1	2.08	0.55	1.33	1.24	0.82	13.12	2.74	3.44	0.50	0.13	0.32	0.30	0.20	3.17	0.66	0.83		
	3	448.0	2.05	0.59	1.42	1.21	0.55	14.36	2.68	2.58	0.46	0.13	0.32	0.27	0.12	3.21	0.60	0.58		
	平均	433.4	2.05	0.58	1.35	1.30	0.77	13.57	2.84	2.98	0.47	0.13	0.31	0.30	0.18	3.13	0.66	0.69		
dcb	4	365.8	1.98	0.70	1.29	1.19	0.64	16.93	3.07	3.45	0.54	0.19	0.35	0.33	0.17	4.63	0.84	0.94		
	5	373.4	1.97	0.43	1.20	1.02	0.51	18.21	2.90	3.49	0.53	0.12	0.32	0.27	0.14	4.88	0.78	0.93		
	6	349.0	1.96	0.52	1.20	0.93	0.50	14.54	2.60	3.32	0.56	0.15	0.34	0.27	0.14	4.17	0.74	0.95		
	平均	362.7	1.97	0.55	1.23	1.05	0.55	16.56	2.86	3.42	0.54	0.15	0.34	0.29	0.15	4.56	0.79	0.94		
34x	9	360.1	2.04	0.53	1.19	1.05	2.00	18.15	3.31	2.32*	0.57	0.15	0.33	0.29	0.56	5.04	0.92	-		
	10	385.6	2.06	0.54	1.20	1.15	1.72	18.95	3.16	3.43	0.53	0.14	0.31	0.30	0.45	4.91	0.82	0.89		
	11	368.2	2.00	0.68	1.08	1.10	2.13	19.31	2.59	3.02	0.54	0.18	0.29	0.30	0.58	5.24	0.70	0.82		
	平均	371.3	2.03	0.58	1.16	1.10	1.95	18.80	3.02	3.23	0.55	0.16	0.31	0.30	0.53	5.07	0.81	0.85		
nma	14	352.4	2.06	0.45	1.32	1.37	7.50	10.93	2.73	3.53	0.58	0.13	0.37	0.39	2.13	3.10	0.77	1.00		
	15	360.6	2.13	0.36	1.30	1.13	4.29	11.88	2.59	3.08	0.59	0.10	0.36	0.31	1.19	3.29	0.72	0.85		
	16	357.2	2.02	0.62	1.35	1.18	5.57	11.89	2.54	4.12	0.57	0.17	0.38	0.33	1.56	3.33	0.71	1.15		
	平均	356.7	2.07	0.48	1.32	1.23	5.79	11.57	2.62	3.58	0.58	0.13	0.37	0.34	1.63	3.24	0.73	1.00		
tdn	19	393.0	2.15	0.54	1.25	1.14	0.66	13.56	2.63	3.24	0.55	0.14	0.32	0.29	0.17	3.45	0.67	0.82		
	20	396.2	1.97	0.69	1.37	1.07	0.72	13.40	2.53	3.83	0.50	0.17	0.35	0.27	0.18	3.38	0.64	0.97		
	21	401.1	2.13	0.47	1.38	1.27	0.79	12.12	2.62	3.10	0.53	0.12	0.34	0.32	0.20	3.02	0.65	0.77		
	平均	396.8	2.08	0.57	1.33	1.16	0.72	13.03	2.59	3.39	0.53	0.14	0.34	0.29	0.18	3.28	0.65	0.85		
2de	24	426.7	2.04	0.65	1.45	1.32	0.73	14.35	2.45	3.07	0.48	0.15	0.34	0.31	0.17	3.36	0.57	0.72		
	25	386.0	1.96	0.58	1.22	1.24	0.63	11.36	3.07	3.33	0.51	0.15	0.32	0.32	0.16	2.94	0.80	0.86		
	26	403.9	2.06	0.50	1.30	1.23	0.55	12.76	3.00	3.31	0.51	0.12	0.32	0.30	0.14	3.16	0.74	0.82		
	平均	405.5	2.02	0.58	1.32	1.26	0.64	12.82	2.84	3.24	0.50	0.14	0.33	0.31	0.16	3.16	0.70	0.80		

*: 左側欠損のため右側のみの重量(平均は、動物番号10、11の平均値)

表III.3-5 臓器重量 (第5回)

群	動物 番号	体重	絶対重量 (g)									相対重量 (g%)								
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣		
C5(オリーブ油)	1	400.1	2.00	0.78	1.36	1.11	0.95	14.08	2.53	3.24	0.50	0.19	0.34	0.28	0.24	3.52	0.63	0.81		
	2	396.6	2.00	0.62	1.35	1.23	0.81	11.60	2.83	3.53	0.50	0.16	0.34	0.31	0.15	2.92	0.71	0.89		
	3	374.2	2.03	0.78	1.39	1.27	0.83	12.72	2.58	3.34	0.54	0.21	0.37	0.34	0.17	3.40	0.69	0.89		
	平均	390.3	2.01	0.73	1.37	1.20	0.73	12.80	2.65	3.37	0.52	0.19	0.35	0.31	0.19	3.28	0.68	0.86		
pcp	4	352.4	1.90	0.38	1.16	0.91	0.60	15.03	3.79	3.25	0.54	0.11	0.33	0.26	0.17	4.27	1.08	0.92		
	5	343.6	2.08	0.42	1.30	1.14	0.53	12.82	3.47	3.40	0.61	0.12	0.38	0.33	0.15	3.73	1.01	0.99		
	6	338.6	1.85	0.45	1.20	0.86	0.67	14.22	3.82	3.14	0.55	0.13	0.35	0.25	0.20	4.20	1.13	0.93		
	平均	344.9	1.94	0.42	1.22	0.97	0.60	14.02	3.69	3.26	0.56	0.12	0.35	0.28	0.17	4.07	1.07	0.95		
mcs	9	339.1	2.02	0.54	1.22	1.03	0.38	12.88	2.68	3.13	0.60	0.16	0.36	0.30	0.11	3.80	0.79	0.92		
	10	331.8	2.03	0.61	1.16	0.91	0.54	13.63	2.53	3.21	0.61	0.18	0.35	0.27	0.16	4.11	0.76	0.97		
	11	301.9	1.92	0.40	1.22	0.98	0.53	11.79	2.38	3.18	0.64	0.13	0.40	0.32	0.18	3.91	0.79	1.05		
	平均	324.3	1.99	0.52	1.20	0.97	0.48	12.77	2.53	3.20	0.61	0.16	0.37	0.30	0.15	3.94	0.78	1.01		
23d	14	338.8	2.12	0.54	1.30	1.21	1.54	11.87	2.79	3.04	0.63	0.16	0.38	0.36	0.45	3.50	0.62	0.90		
	15	359.1	1.98	0.57	1.16	1.05	0.99	12.83	2.54	3.18	0.55	0.16	0.32	0.29	0.28	3.57	0.71	0.89		
	16	337.9	2.02	0.71	1.21	1.00	1.00	11.40	2.30	3.19	0.60	0.21	0.36	0.30	0.30	3.37	0.68	0.94		
	平均	345.3	2.04	0.61	1.22	1.09	1.18	12.03	2.54	3.14	0.59	0.18	0.35	0.32	0.34	3.48	0.74	0.91		
dhc	19	387.2	1.99	0.95	1.38	1.04	0.80	12.60	2.70	3.35	0.51	0.25	0.36	0.27	0.21	3.25	0.70	0.87		
	20	414.4	1.90	0.62	1.36	1.12	0.94	14.28	2.80	2.99	0.46	0.15	0.33	0.27	0.23	3.45	0.68	0.72		
	21	354.6	1.97	0.71	1.10	1.02	0.57	12.62	2.18	3.24	0.56	0.20	0.31	0.29	0.16	3.56	0.61	0.91		
	平均	385.4	1.95	0.76	1.28	1.06	0.77	13.17	2.56	3.19	0.51	0.20	0.33	0.28	0.20	3.42	0.66	0.83		
dhp	24	350.9	2.01	0.66	1.23	1.05	0.66	17.48	2.49	2.70	0.57	0.19	0.35	0.30	0.19	4.98	0.71	0.77		
	25	333.5	1.83	0.47	1.09	0.94	0.56	13.94	2.64	3.11	0.55	0.14	0.33	0.28	0.17	4.18	0.79	0.93		
	26	363.3	2.06	0.41	1.11	0.98	0.51	15.50	2.76	2.92	0.57	0.11	0.31	0.27	0.14	4.27	0.76	0.80		
	平均	349.2	1.97	0.51	1.14	0.99	0.58	15.64	2.63	2.91	0.56	0.15	0.33	0.28	0.17	4.48	0.75	0.84		

表III.3-6 臓器重量 (第6回)

群	動物 番号	体重	絶対重量 (g)										相対重量 (g%)							
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣		
C6(オリーブ油)	1	372.5	2.15	0.56	1.26	1.28	0.77	10.15	2.70	2.64	0.58	0.15	0.34	0.34	0.21	2.72	0.72	0.71		
	2	386.5	2.14	0.58	1.33	1.23	0.68	11.81	2.64	2.95	0.55	0.15	0.34	0.32	0.18	3.06	0.68	0.76		
	3	412.7	2.00	0.86	1.36	1.33	0.53	12.47	2.73	3.30	0.48	0.21	0.33	0.32	0.13	3.02	0.66	0.80		
	平均	390.6	2.10	0.67	1.32	1.28	0.66	11.48	2.69	2.96	0.54	0.17	0.34	0.33	0.17	2.93	0.69	0.76		
tbe	4	390.0	2.00	0.63	1.19	1.08	0.66	17.83	3.06	3.31	0.51	0.16	0.31	0.28	0.17	4.57	0.78	0.85		
	5	369.2	1.93	0.57	1.24	0.99	0.70	17.75	3.00	3.06	0.52	0.15	0.34	0.27	0.19	4.81	0.81	0.83		
	6	348.4	1.73	0.59	1.01	1.00	0.52	15.36	2.70	3.05	0.50	0.17	0.29	0.29	0.15	4.41	0.77	0.88		
	平均	369.2	1.89	0.60	1.15	1.02	0.63	16.98	2.92	3.14	0.51	0.16	0.31	0.28	0.17	4.60	0.79	0.85		
dba	9	408.4	2.04	0.79	1.38	1.15	0.68	12.61	2.76	2.97	0.50	0.19	0.34	0.28	0.17	3.09	0.68	0.73		
	10	342.7	2.08	0.92	1.17	1.17	0.62	10.76	2.29	2.98	0.61	0.27	0.34	0.34	0.18	3.14	0.67	0.87		
	11	409.4	2.05	0.69	1.32	1.04	0.64	15.49	2.58	3.24	0.50	0.17	0.32	0.25	0.16	3.78	0.63	0.79		
	平均	386.8	2.06	0.80	1.29	1.12	0.65	12.95	2.54	3.11	0.54	0.21	0.33	0.29	0.17	3.34	0.66	0.83		
pep	14	335.8	1.94	0.50	1.19	1.03	0.44	11.82	2.07	3.99	0.58	0.15	0.35	0.31	0.13	3.52	0.62	1.19		
	15	373.9	2.15	0.72	1.24	1.10	0.80	12.95	2.64	3.02	0.58	0.19	0.33	0.29	0.21	3.46	0.71	0.81		
	16	326.6	1.95	0.56	1.22	0.94	0.55	11.71	2.38	3.52	0.60	0.17	0.37	0.29	0.17	3.59	0.73	1.08		
	平均	345.4	2.01	0.59	1.22	1.02	0.60	12.16	2.36	3.51	0.58	0.17	0.35	0.30	0.17	3.52	0.68	1.02		
tbp	19	378.9	2.01	0.79	1.52	1.11	1.58	13.88	2.66	3.30	0.53	0.21	0.40	0.29	0.42	3.66	0.70	0.87		
	20	359.4	2.03	0.67	1.25	0.99	0.54	12.55	2.80	3.23	0.56	0.19	0.35	0.28	0.15	3.49	0.78	0.90		
	21	371.9	2.05	0.62	1.31	1.14	0.70	13.29	2.50	3.24	0.55	0.17	0.35	0.31	0.19	3.57	0.67	0.87		
	平均	370.1	2.03	0.69	1.36	1.08	0.94	13.24	2.65	3.26	0.55	0.19	0.37	0.29	0.25	3.58	0.72	0.88		
tmp	24	326.5	1.92	0.57	1.28	0.96	0.77	11.64	11.25	3.14	0.59	0.17	0.39	0.29	0.24	3.57	3.45	0.96		
	25	344.5	2.08	0.57	1.11	0.94	0.61	11.89	2.94	2.92	0.60	0.17	0.32	0.27	0.18	3.45	0.85	0.85		
	26	331.8	2.09	0.39	1.22	1.04	0.60	12.06	3.87	2.93	0.63	0.12	0.37	0.31	0.18	3.63	1.17	0.88		
	平均	334.3	2.03	0.51	1.20	0.98	0.66	11.86	6.02	3.00	0.61	0.15	0.36	0.29	0.20	3.55	1.82	0.90		

表III.3-7 臓器重量 (第7回)

群	動物 番号	体重	絶対重量 (g)										相対重量 (g%)							
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣		
C7(オリーブ油)	1	420.7	2.01	0.61	1.21	1.15	0.63	13.56	2.75	3.28	0.48	0.14	0.29	0.27	0.15	3.22	0.65	0.78		
	2	395.4	2.08	0.55	1.38	1.14	0.59	12.80	2.50	3.41	0.53	0.14	0.35	0.29	0.15	3.24	0.63	0.86		
	3	396.6	2.06	0.77	1.24	1.23	0.70	12.37	2.77	3.25	0.52	0.19	0.31	0.31	0.18	3.12	0.70	0.82		
	平均	404.2	2.05	0.64	1.28	1.17	0.64	12.91	2.67	3.31	0.51	0.16	0.32	0.29	0.16	3.19	0.66	0.82		
24b	4	396.4	2.04	0.57	1.31	0.98	0.68	17.26	2.66	3.58	0.51	0.14	0.33	0.25	0.17	4.35	0.67	0.90		
	5	422.2	2.07	0.50	1.24	1.31	0.89	16.47	2.89	3.68	0.49	0.12	0.29	0.31	0.21	3.90	0.68	0.87		
	6	368.5	2.08	0.50	1.31	0.97	0.60	17.45	2.33	3.40	0.56	0.14	0.36	0.26	0.16	4.74	0.63	0.92		
	平均	395.7	2.06	0.52	1.29	1.09	0.72	17.06	2.63	3.55	0.52	0.13	0.33	0.27	0.18	4.33	0.66	0.90		
35x	9	363.8	2.08	0.58	1.18	0.99	2.69	14.02	2.43	3.33	0.57	0.16	0.32	0.27	0.74	3.85	0.67	0.92		
	10	368.2	2.13	0.44	1.39	1.21	3.89	14.31	2.64	3.57	0.58	0.12	0.38	0.33	1.06	3.89	0.72	0.97		
	11	359.4	1.97	0.55	1.27	1.18	3.45	12.79	2.45	3.28	0.55	0.15	0.35	0.33	0.96	3.56	0.68	0.91		
	平均	363.8	2.06	0.52	1.28	1.13	3.34	13.71	2.51	3.39	0.57	0.14	0.35	0.31	0.92	3.77	0.69	0.93		
nda	14	408.9	1.89	0.67	1.34	1.22	0.81	13.32	2.93	2.78	0.46	0.16	0.33	0.30	0.20	3.26	0.72	0.68		
	15	372.9	2.08	0.60	1.22	1.10	0.64	11.20	2.85	2.31	0.56	0.16	0.33	0.29	0.17	3.00	0.76	0.62		
	16	354.5	2.05	0.52	1.18	1.07	0.63	11.45	2.62	3.35	0.58	0.15	0.33	0.30	0.18	3.23	0.74	0.94		
	平均	378.8	2.01	0.60	1.25	1.13	0.69	11.99	2.80	2.81	0.53	0.16	0.33	0.30	0.18	3.16	0.74	0.75		
13d	20	336.0	1.91	0.49	1.32	1.07	0.62	14.47	2.58	2.86	0.57	0.15	0.39	0.32	0.18	4.31	0.77	0.85		
	21	347.0	1.94	0.63	1.24	1.04	0.67	15.93	2.76	3.06	0.56	0.18	0.36	0.30	0.19	4.59	0.80	0.88		
	23	355.0	2.03	0.53	1.31	1.11	0.68	15.25	2.76	2.95	0.57	0.15	0.37	0.31	0.19	4.30	0.78	0.83		
	平均	346.0	1.96	0.55	1.29	1.07	0.66	15.22	2.70	2.96	0.57	0.16	0.37	0.31	0.19	4.40	0.78	0.85		
nhd	24	382.1	2.01	0.59	1.25	1.15	0.79	11.14	2.64	3.37	0.53	0.15	0.33	0.30	0.21	2.92	0.69	0.88		
	25	406.9	2.07	0.59	1.23	1.15	0.71	13.38	2.63	3.14	0.51	0.14	0.30	0.28	0.17	3.29	0.65	0.77		
	26	451.4	2.05	0.69	1.50	1.23	0.76	15.89	2.81	3.57	0.45	0.15	0.33	0.27	0.17	3.52	0.62	0.79		
	平均	413.5	2.04	0.62	1.33	1.18	0.75	13.47	2.69	3.36	0.50	0.15	0.32	0.29	0.18	3.24	0.65	0.81		

表III.3-8 臓器重量 (第8回)

群	動物番号	体重	絶対重量 (g)							相対重量 (g%)								
			脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣	脳	胸腺	肺	心臓	脾臓	肝臓	腎臓	精巣
C8(ゴマ油)	1	374.6	1.98	0.68	1.21	1.16	0.60	11.02	2.44	3.34	0.53	0.18	0.32	0.31	0.16	2.94	0.65	0.89
	2	390.8	2.05	0.63	1.32	1.11	0.70	12.73	2.60	3.04	0.52	0.16	0.34	0.28	0.18	3.26	0.67	0.78
	3	400.4	1.95	0.67	1.39	1.13	0.63	12.28	2.68	2.85	0.49	0.17	0.35	0.28	0.16	3.07	0.67	0.71
	平均	388.6	1.99	0.66	1.31	1.13	0.64	12.01	2.57	3.08	0.51	0.17	0.34	0.29	0.17	3.09	0.66	0.79
bcp	4	356.6	1.90	0.51	1.17	1.10	0.62	16.37	2.85	2.98	0.53	0.14	0.33	0.31	0.17	4.59	0.80	0.84
	5	334.6	1.91	0.42	1.17	1.01	0.56	14.27	3.07	3.14	0.57	0.13	0.35	0.30	0.17	4.26	0.92	0.94
	6	329.9	1.87	0.49	1.31	0.96	0.52	15.26	2.74	3.02	0.57	0.15	0.40	0.29	0.16	4.63	0.83	0.92
	平均	340.4	1.89	0.47	1.22	1.02	0.57	15.30	2.89	3.05	0.56	0.14	0.36	0.30	0.17	4.49	0.85	0.90
tmb	9	368.0	1.95	0.46	1.26	1.11	0.51	13.75	2.41	3.47	0.53	0.13	0.34	0.30	0.14	3.74	0.65	0.94
	10	348.2	1.97	0.43	1.17	0.95	0.50	12.18	2.39	2.92	0.57	0.12	0.34	0.27	0.14	3.50	0.69	0.84
	11	317.5	1.81	0.44	0.98	0.83	0.50	13.27	2.31	3.02	0.57	0.14	0.31	0.26	0.16	4.18	0.73	0.95
	平均	344.6	1.91	0.44	1.14	0.96	0.50	13.07	2.37	3.14	0.56	0.13	0.33	0.28	0.15	3.80	0.69	0.91
dha	14	373.9	2.03	0.61	1.16	1.07	0.59	12.40	2.29	3.47	0.54	0.16	0.31	0.29	0.16	3.32	0.61	0.93
	15	376.6	2.13	0.59	1.30	1.03	0.75	11.79	2.55	3.28	0.57	0.16	0.35	0.27	0.20	3.13	0.68	0.87
	16	384.7	2.06	0.57	1.30	1.16	0.58	13.18	2.81	3.15	0.54	0.15	0.34	0.30	0.15	3.43	0.73	0.82
	平均	378.4	2.07	0.59	1.25	1.09	0.64	12.46	2.55	3.30	0.55	0.16	0.33	0.29	0.17	3.29	0.67	0.87
14d	19	340.8	2.06	0.55	1.24	0.94	0.59	20.21	3.29	3.01	0.60	0.16	0.36	0.28	0.17	5.93	0.97	0.88
	20	325.2	1.91	0.56	1.12	0.90	0.58	17.95	3.04	3.05	0.59	0.17	0.34	0.28	0.18	5.52	0.93	0.94
	21	336.4	2.05	0.45	1.25	1.05	0.55	20.63	3.15	3.05	0.61	0.13	0.37	0.31	0.16	6.13	0.94	0.91
	平均	334.1	2.01	0.52	1.20	0.96	0.57	19.60	3.16	3.04	0.60	0.16	0.36	0.29	0.17	5.86	0.95	0.91
ams	24	386.5	1.98	0.66	1.41	0.97	0.62	12.50	2.37	3.26	0.51	0.17	0.36	0.25	0.16	3.23	0.61	0.84
	25	403.8	2.10	0.65	1.33	1.12	0.69	12.76	2.62	2.90	0.52	0.16	0.33	0.28	0.17	3.16	0.65	0.72
	26	379.8	2.13	0.53	1.25	1.10	0.60	11.71	2.48	2.83	0.56	0.14	0.33	0.29	0.16	3.08	0.65	0.75
	平均	390.0	2.07	0.61	1.33	1.06	0.64	12.32	2.49	3.00	0.53	0.16	0.34	0.27	0.16	3.16	0.64	0.77

表III.3-9 血液生化学検査結果 (第1回)

群	動物番号	LDH IU/L	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	TG mg/dL	T-CHO mg/dL	TP g/dL	BUN mg/dL	CRE mg/dL	GLU mg/dL	TB mg/dL	備考
C(注射用水)	1	749	71	28	533	78	45	5.89	15.9	0.32	163	0.34	
	2	640	69	30	567	45	56	5.89	15.0	0.31	172	0.29	
	3	803	69	43	693	81	57	6.23	26.0	0.39	173	0.32	
2bo	4	966	73	31	560	69	45	5.96	16.0	0.34	166	0.32	
	5	643	67	25	628	107	51	5.82	20.6	0.30	163	0.27	
	6	780	71	31	584	76	59	5.96	21.0	0.30	198	0.24	
mxa	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	8	990	93	28	554	67	54	5.06	13.3	0.32	157	0.25	溶血+
	9	1234	90	36	517	74	85	5.38	12.0	0.23	165	0.26	
3cp	10	256	66	31	517	42	105	6.24	12.6	0.56	167	0.36	
	11	264	64	37	677	29	101	6.39	13.5	0.24	172	0.27	
	12	445	113	83	583	116	100	6.20	14.5	0.27	138	0.26	
2ae	13	326	67	39	628	63	39	5.96	10.4	0.51	190	0.25	
	14	1026	98	38	685	62	57	5.38	27.3	0.38	150	0.28	
	15	760	100	51	646	67	71	5.67	20.1	0.30	167	0.31	
thf	16	314	63	35	377	67	64	5.22	16.1	0.31	176	0.31	
	17	312	59	24	254	78	59	5.08	16.8	0.32	187	0.33	
	18	499	64	27	437	57	51	5.23	12.7	0.28	168	0.26	溶血+

動物番号 7: 投与16日目に死亡

表III.3-10 血液生化学検査結果（第2回）

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	TG	T-CHO	TP	BUN	CRE	GLU	TB	備考
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	
C2(注射用水)	1	560	68	31	390	105	50	5.77	20.4	0.35	216	0.28	
	2	1348	85	38	589	62	51	6.20	24.9	0.26	165	0.48	溶血++
	3	621	73	51	575	48	36	4.77	20.8	0.32	157	0.31	
mca	4	294	68	40	593	34	49	6.09	19.3	0.33	145	0.34	
	5	1518	83	41	934	100	56	6.96	18.1	0.36	182	0.49	溶血++
	6	774	84	32	747	46	43	6.24	17.6	0.27	160	0.28	溶血++
suf	9	304	72	43	538	59	87	6.32	25.2	0.39	171	0.31	
	10	310	61	40	491	46	61	6.27	25.5	0.31	155	0.38	
	11	227	65	39	581	53	68	6.37	20.0	0.36	200	0.34	
2ip	14	3075	146	32	560	42	33	6.79	13.4	0.31	140	0.64	溶血++
	15	531	62	37	673	119	66	6.05	22.9	0.36	205	0.50	
	16	1893	145	47	596	60	38	6.17	25.2	0.47	175	0.62	溶血++
hnh	19	711	43	29	391	61	34	5.13	37.1	0.31	146	0.31	溶血+
	20	863	45	27	449	82	38	5.31	29.9	0.53	158	0.27	溶血+
	21	2105	68	7	485	31	32	5.22	24.9	0.42	178	0.43	溶血++
4em	24	603	67	42	465	55	63	5.23	19.9	0.40	162	0.30	
	25	340	65	33	393	128	85	5.69	23.2	0.36	182	0.28	
	26	534	73	41	439	61	47	6.09	29.4	0.32	170	0.27	溶血+

表III.3-11 血液生化学検査結果（第3回）

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	TG	T-CHO	TP	BUN	CRE	GLU	TB
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL
C3(注射用水)	1	447	71	50	569	73	71	6.10	17.0	0.34	161	0.24
	2	233	70	31	788	42	39	5.61	18.2	0.39	180	0.26
	3	165	57	27	753	96	64	6.21	22.0	0.41	223	0.23
mta	4	189	63	35	581	55	56	5.51	18.4	0.36	161	0.24
	5	252	67	41	564	108	56	6.11	16.5	0.34	185	0.27
	6	441	61	38	778	73	37	5.48	17.0	0.38	171	0.24
bac	9	271	76	34	588	66	65	5.72	17.0	0.32	158	0.26
	10	292	62	39	806	28	69	5.93	23.0	0.42	164	0.24
	11	147	63	44	672	71	50	6.05	20.3	0.35	199	0.30
mns	14	378	65	34	879	43	59	6.32	15.8	0.33	146	0.30
	15	230	59	37	434	70	45	6.09	15.8	0.36	229	0.25
	16	319	64	34	542	54	50	5.84	18.7	0.39	201	0.26
nat	19	194	71	36	733	62	30	5.82	19.5	0.36	203	0.23
	20	209	69	35	885	77	38	6.12	19.4	0.37	188	0.24
	21	255	73	40	876	50	60	6.04	17.0	0.37	180	0.26
mmb	24	211	61	32	501	40	56	5.44	24.1	0.31	172	0.24
	25	324	76	40	819	47	34	5.66	24.1	0.37	171	0.26
	26	197	67	31	909	30	64	5.91	24.9	0.36	192	0.24

表III.3-12 血液生化学検査結果（第4回）

群	動物 番号	LDH IU/L	GOT IU/L	GPT IU/L	ALP IU/L	γ-GTP IU/L	TG mg/dL	T-CHO mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	A/G
C4(オリーブ油)	1	346	60	43	632	0.46	58	63	5.12	2.71	1.12
	2	454	75	48	710	0.53	75	58	5.59	3.02	1.18
	3	293	47	31	648	0.39	113	54	5.65	3.03	1.16
dcb	4	339	75	38	971	1.39	71	81	5.05	2.50	0.98
	5	383	77	41	748	1.11	55	57	5.08	2.59	1.04
	6	416	78	47	863	1.40	56	75	5.39	2.73	1.03
34x	9	310	71	60	590	0.97	85	101	5.24	2.75	1.10
	10	445	70	64	867	0.69	137	84	5.69	3.14	1.23
	11	409	68	79	413	1.10	166	89	5.47	2.99	1.21
nma	14	677	138	40	409	1.13	70	39	5.11	3.05	1.48
	15	372	69	30	378	1.02	76	49	5.38	3.14	1.40
	16	318	72	38	338	0.80	60	49	5.00	2.95	1.44
tdh	19	389	87	55	753	1.76	73	129	5.35	2.79	1.09
	20	383	61	30	951	0.94	111	97	5.46	2.78	1.04
	21	708	165	125	998	1.10	153	111	5.30	2.74	1.07
2de	24	367	67	54	442	1.03	106	78	5.58	2.85	1.04
	25	253	45	46	372	0.97	92	69	5.61	2.83	1.02
	26	295	59	46	618	1.12	108	69	5.68	2.81	0.98
群	動物 番号	BUN mg/dL	CRE mg/dL	GLU mg/dL	Ca mg/dL	IP mg/dL	TB mg/dL	Na mEq/L	K mEq/L	Cl mEq/L	備考
C4(オリーブ油)	1	17.5	0.39	187	10.4	7.9	0.19	148	4.72	109	溶血+
	2	16.2	0.44	196	11.3	9.1	0.22	146	5.15	106	
	3	16.0	0.40	205	11.5	8.2	0.19	144	4.07	107	溶血+
dcb	4	20.7	0.39	166	10.7	10.1	0.32	147	4.25	108	
	5	15.6	0.38	150	11.4	10.6	0.26	147	4.21	108	
	6	19.8	0.38	129	10.1	9.7	0.43	145	4.35	108	
34x	9	18.7	0.52	152	10.0	9.5	0.40	145	4.98	107	
	10	20.7	0.40	162	10.7	9.2	0.28	145	5.41	105	
	11	19.9	0.39	141	10.3	8.1	0.43	146	5.63	108	
nma	14	15.6	0.34	140	9.6	8.1	0.37	143	8.67	108	溶血+
	15	18.3	0.34	167	10.1	8.4	0.44	145	6.78	107	
	16	15.0	0.38	145	10.0	9.0	0.34	145	7.30	108	
tdh	19	12.4	0.32	171	10.6	9.3	0.25	145	5.02	105	
	20	11.5	0.33	160	10.4	9.2	0.22	145	4.96	107	
	21	16.5	0.37	175	10.5	9.0	0.22	146	4.44	107	
2de	24	8.4	0.40	195	10.7	9.7	0.19	148	4.89	105	
	25	12.2	0.41	197	10.2	8.6	0.25	145	5.05	103	
	26	17.0	0.46	176	10.7	8.7	0.20	149	4.35	106	

表III.3-13 血液生化学検査結果 (第5回)

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	γ -GTP	TG	T-CHO	TP	ALB	A/G
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
C5(オリーブ油)	1	558	64	35	583	0.84	87	70	5.54	2.94	1.13
	2	374	65	36	620	0.77	58	55	5.09	2.80	1.22
	3	421	52	31	922	1.34	84	65	5.97	3.20	1.16
pcp	4	476	60	71	678	0.74	48	81	6.20	3.44	1.25
	5	401	54	56	508	0.81	33	86	5.61	2.97	1.13
	6	482	51	75	717	1.23	56	91	5.81	3.25	1.27
mcs	9	452	53	56	960	0.63	42	68	5.57	3.08	1.24
	10	469	54	52	752	0.85	54	85	5.65	2.96	1.10
	11	442	49	36	912	0.49	41	62	5.46	3.08	1.29
23d	14	483	67	32	759	0.55	47	59	5.24	2.79	1.14
	15	399	66	52	537	0.97	81	74	5.42	2.85	1.11
	16	440	59	36	587	0.58	75	62	4.88	2.50	1.05
dhc	19	444	63	34	631	0.45	31	53	5.23	2.79	1.14
	20	473	67	41	717	0.64	92	81	4.99	2.70	1.18
	21	475	56	25	407	0.58	68	70	5.40	2.97	1.22
dhp	24	585	331	116	1038	5.64	28	35	5.26	3.08	1.41
	25	646	509	182	1047	5.82	31	71	5.18	3.07	1.45
	26	454	189	96	1471	4.69	29	38	5.49	3.07	1.27
群	動物 番号	BUN	CRE	GLU	Ca	IP	TB	Na	K	Cl	
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L	
C5(オリーブ油)	1	18.5	0.42	141	10.8	9.2	0.25	145	4.61	104	
	2	15.9	0.36	158	10.6	8.3	0.29	146	4.23	106	
	3	17.0	0.37	188	10.8	9.1	0.25	146	4.72	106	
pcp	4	13.3	0.55	157	10.2	9.7	0.29	146	4.43	105	
	5	17.4	0.53	136	10.2	10.0	0.22	145	4.62	105	
	6	23.2	0.61	132	10.3	9.7	0.26	141	4.23	102	
mcs	9	10.7	0.33	181	10.6	8.2	0.25	146	4.57	107	
	10	13.2	0.33	189	10.8	7.3	0.27	144	4.32	105	
	11	17.0	0.38	203	10.8	7.5	0.25	146	4.39	108	
23d	14	19.7	0.41	180	10.0	8.7	0.25	147	5.03	107	
	15	16.1	0.38	193	10.7	8.1	0.25	147	4.63	108	
	16	16.0	0.44	195	10.6	9.3	0.26	146	5.56	106	
dhc	19	12.9	0.46	173	10.6	9.4	0.27	145	4.79	105	
	20	19.6	0.43	173	10.2	8.4	0.29	147	4.80	108	
	21	20.9	0.52	190	10.6	8.2	0.26	146	4.91	107	
dhp	24	16.9	0.41	150	9.9	9.2	0.25	145	4.73	106	
	25	19.8	0.39	135	10.8	9.1	0.28	143	4.47	105	
	26	20.9	0.40	156	10.2	9.7	0.26	147	4.72	107	

表III.3-14 血液生化学検査結果（第6回）

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	γ -GTP	TG	T-CHO	TP	ALB	A/G
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
C6(オリーブ油)	1	466	52	32	587	0.51	58	41	5.69	2.78	0.96
	2	493	58	46	622	0.41	77	55	5.47	2.76	1.02
	3	492	61	39	902	0.52	91	58	5.28	2.86	1.18
tbe	4	452	72	50	570	1.06	66	98	6.03	3.33	1.23
	5	492	89	67	1223	1.15	95	76	5.43	2.84	1.10
	6	424	52	20	598	0.91	81	95	5.69	3.12	1.21
dba	9	414	48	37	774	0.59	101	74	5.36	2.84	1.13
	10	436	54	34	682	0.64	53	67	5.49	3.06	1.26
	11	466	58	41	689	0.73	178	74	5.23	2.79	1.14
pep	14	467	51	44	598	0.63	83	67	5.26	2.77	1.11
	15	587	50	36	575	0.39	70	52	5.40	2.88	1.14
	16	406	53	40	610	0.75	85	80	5.18	2.75	1.13
tbp	19	577	88	53	798	0.68	109	70	5.32	2.89	1.19
	20	415	47	27	816	1.03	118	86	5.42	3.17	1.41
	21	421	54	39	504	0.59	74	72	5.63	3.14	1.26
tmp	24	421	52	55	561	57.30	148	102	5.49	2.39	0.77
	25	419	61	46	617	2.84	87	90	5.60	2.87	1.05
	26	417	54	54	608	7.29	89	110	5.60	2.83	1.02
群	動物 番号	BUN	CRE	GLU	Ca	IP	TB	Na	K	Cl	
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L	
C6(オリーブ油)	1	12.7	0.41	162	10.6	7.3	0.22	146	4.73	107	
	2	14.0	0.42	164	10.0	6.5	0.25	144	4.52	105	
	3	14.9	0.39	175	10.2	6.8	0.25	144	4.61	105	
tbe	4	15.2	0.41	152	10.6	8.0	0.26	145	4.29	184	
	5	14.2	0.38	150	10.3	8.0	0.23	144	4.71	205	
	6	10.3	0.36	152	10.5	7.6	0.28	146	4.08	246	
dba	9	12.8	0.42	177	10.5	7.2	0.24	144	4.54	108	
	10	12.6	0.43	188	10.2	6.7	0.24	143	4.43	105	
	11	15.9	0.46	182	10.3	6.8	0.22	145	4.83	105	
pep	14	12.9	0.46	203	10.1	7.2	0.24	143	4.12	106	
	15	13.3	0.37	215	10.3	7.5	0.25	144	4.61	105	
	16	12.4	0.36	190	10.1	7.2	0.26	144	4.63	105	
tbp	19	12.1	0.42	159	10.4	7.4	0.25	145	4.41	106	
	20	14.0	0.42	193	10.0	7.0	0.22	146	4.28	104	
	21	13.9	0.40	194	10.2	7.2	0.26	145	4.38	101	
tmp	24	69.8	1.58	162	10.2	8.1	0.24	144	5.06	99	
	25	18.5	0.53	166	10.4	7.2	0.26	145	4.37	105	
	26	39.3	0.81	166	10.5	7.3	0.23	144	4.33	103	

表III.3-15 血液生化学検査結果（第7回）

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	γ -GTP	TG	T-CHO	TP	ALB	A/G
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
C7(オリーブ油)	1	322	59	35	970	0.41	104	55	5.47	2.84	1.08
	2	415	60	33	500	0.57	74	62	5.81	3.04	1.10
	3	343	55	28	522	0.65	59	50	5.47	2.72	0.99
24b	4	284	52	31	541	0.74	139	65	4.82	2.09	0.77
	5	285	56	44	694	0.59	79	105	6.01	3.14	1.09
	6	296	65	53	634	0.56	103	86	5.93	3.24	1.20
35x	9	324	65	40	746	1.00	50	73	5.54	2.98	1.16
	10	370	66	38	438	0.96	61	46	5.29	2.75	1.08
	11	374	63	28	490	0.77	102	62	5.48	3.17	1.37
nda	14	349	56	38	609	0.49	76	70	5.47	2.80	1.05
	15	339	50	43	692	0.54	55	50	5.63	2.91	1.07
	16	352	69	57	674	0.44	57	77	5.78	3.18	1.22
13d	20	386	64	36	600	1.01	58	47	6.15	3.30	1.16
	21	325	54	23	945	0.54	86	56	5.71	3.24	1.31
	23	290	61	32	550	0.71	46	59	5.92	3.09	1.09
nhd	24	451	55	35	461	0.45	76	52	5.65	3.05	1.17
	25	319	57	67	458	0.61	109	67	5.53	2.88	1.09
	26	334	51	39	397	1.02	100	67	5.67	2.94	1.08
群	動物 番号	BUN	CRE	GLU	Ca	IP	TB	Na	K	Cl	
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L	
C7(オリーブ油)	1	15.4	0.43	182	11.7	9.8	0.23	148	4.85	110	
	2	15.9	0.46	223	10.4	8.5	0.25	145	4.74	106	
	3	12.5	0.38	197	10.4	7.8	0.26	144	4.37	105	
24b	4	10.3	0.43	153	8.3	6.1	0.24	143	4.35	104	
	5	23.2	0.60	206	10.3	7.4	0.23	140	4.57	102	
	6	17.9	0.50	206	10.1	8.0	0.26	140	4.03	108	
35x	9	20.5	0.49	184	9.5	7.4	0.23	140	6.03	104	
	10	15.5	0.52	178	9.3	7.9	0.23	145	5.79	106	
	11	17.0	0.48	170	10.0	8.0	0.26	146	6.00	110	
nda	14	9.0	0.34	165	10.3	7.8	0.24	147	4.55	106	
	15	14.0	0.41	187	10.6	8.3	0.22	146	4.84	106	
	16	17.6	0.44	219	11.1	9.0	0.26	145	5.18	108	
13d	20	11.3	0.36	185	10.9	8.5	0.26	142	4.53	200	
	21	8.2	0.36	181	11.0	8.9	0.21	146	4.28	205	
	23	11.6	0.45	176	10.4	8.3	0.24	145	4.81	227	
nhd	24	12.2	0.36	171	10.1	8.3	0.23	145	4.78	108	
	25	14.4	0.40	225	11.0	9.2	0.26	145	4.78	106	
	26	15.5	0.40	212	10.6	8.7	0.22	145	4.84	106	

表III.3-16 血液生化学検査結果（第8回）

群	動物 番号	LDH	GOT	GPT	ALP	γ -GTP	TG	T-CHO	TP	ALB	A/G
		IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	IU/L	mg/dL	mg/dL	g/dL	g/dL	
C8(ゴマ油)	1	362	50	37	908	0.60	62	55	5.50	3.06	1.25
	2	387	57	38	771	0.52	40	53	5.31	2.71	1.04
	3	405	60	37	427	0.45	60	50	5.48	2.75	1.01
bcp	4	435	49	27	368	0.69	68	58	6.15	3.30	1.16
	5	394	59	35	560	0.55	30	50	5.87	3.23	1.22
	6	341	61	42	546	0.67	44	64	5.56	2.96	1.14
tmb	9	437	58	46	785	0.48	56	51	5.55	3.11	1.27
	10	353	53	40	469	0.41	28	62	5.53	2.90	1.10
	11	414	51	43	779	0.45	76	54	4.97	2.34	0.89
dha	14	382	57	27	695	0.45	89	57	5.82	3.27	1.28
	15	426	60	44	675	0.61	54	58	5.42	2.53	0.88
	16	405	49	24	449	0.36	70	50	5.35	2.66	0.99
14d	19	528	119	98	349	1.40	117	118	6.04	3.33	1.23
	20	464	73	57	447	3.14	72	184	5.87	3.27	1.26
	21	423	100	121	428	6.10	82	186	6.30	3.72	1.44
ams	24	446	46	19	588	0.34	134	50	5.48	2.81	1.05
	25	379	54	26	579	0.99	38	51	5.72	2.96	1.07
	26	451	63	33	442	0.54	94	57	5.61	2.81	1.00

群	動物 番号	BUN	CRE	GLU	Ca	IP	TB	Na	K	Cl
		mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mg/dL	mEq/L	mEq/L	mEq/L
C8(ゴマ油)	1	18.0	0.41	182	9.9	8.2	0.27	148	4.73	108
	2	15.3	0.44	202	10.6	8.3	0.23	145	4.47	103
	3	13.9	0.38	186	9.9	8.1	0.25	147	4.12	103
bcp	4	20.5	0.39	187	10.1	8.4	0.24	147	4.86	233
	5	17.2	0.35	181	10.0	8.6	0.29	146	4.37	255
	6	17.0	0.41	197	9.7	8.4	0.24	147	4.24	259
tmb	9	18.0	0.48	195	9.9	8.5	0.26	146	4.72	104
	10	12.8	0.44	188	9.5	7.6	0.24	146	4.73	104
	11	21.7	0.47	239	9.4	8.1	0.22	147	4.63	106
dha	14	18.5	0.46	189	10.2	8.7	0.28	148	4.55	104
	15	13.7	0.38	213	10.0	8.7	0.26	145	5.00	103
	16	13.6	0.46	192	10.0	8.4	0.27	146	4.67	103
14d	19	19.8	0.39	100	10.5	9.7	0.23	148	4.14	113
	20	22.4	0.44	84	10.6	9.4	0.27	148	4.02	112
	21	17.6	0.44	99	10.5	9.0	0.23	146	4.79	110
ams	24	11.9	0.40	183	10.0	8.3	0.27	147	4.57	103
	25	15.0	0.45	194	10.0	8.6	0.25	148	4.55	105
	26	13.1	0.46	185	9.6	8.2	0.23	146	4.83	104

(4) まとめ

資金、期間、スペース、人員などの制限のもと、本プロジェクトの実験条件を満たし、かつ、課題を解決する遺伝子発現変動解析用の動物実験標準プロトコルを確立した。また、動物実験により取得したサンプル数は3,611サンプルとなり、最終目標である2,200サンプルを大きく超えた。

3. 3. 2 既存化学物質反復投与ラット組織の遺伝子発現変動解析

<成果の概要>

取得した全サンプル（3,611サンプル）の中から厳選して抽出した1,028種類のpolyA+ RNAをcyanine 5-dUTP（赤の蛍光色素）存在下で、ラット共通レファレンスRNA（マイクロダイアグノスティック社製）をcyanine 3-dUTP（緑の蛍光色素）存在下でそれぞれ逆転写反応させ蛍光標識した。サンプル由来の標識物とラット共通レファレンス由来の標識物を混合し、約11,000種類の転写産物に対する80塩基からなるプローブを搭載したマイクロアレイにハイブリダイズさせた。そのマイクロアレイから赤と緑の2つの波長の蛍光強度をスキヤナで測定し、データ化した。各遺伝子の発現レベルは、ラット共通レファレンスの緑の蛍光強度に対するサンプルの赤の蛍光強度の「対比」の「底を2とする対数値」（「発現対数比」と呼ぶ。以下同じ。）で表示した。各サンプルの発現対数比の相対をそのサンプルの「遺伝子発現プロファイル」と呼ぶ。

取得した1,028種類の遺伝子発現プロファイルの内訳は、肝臓が168プロファイル、脾臓が95プロファイル、前立腺が67プロファイル、皮下脂肪が62プロファイル、腎臓が143プロファイル、肺が53プロファイル、大脳が53プロファイル、精巣上体が41プロファイル、小脳が54プロファイル、血液が33プロファイル、十二指腸が30プロファイル、胸腺が20プロファイル、副腎が20プロファイル、褐色脂肪が20プロファイル、直筋が20プロファイル、回腸が19プロファイル、心臓が18プロファイル、精巣が18プロファイル、ヒラメ筋が18プロファイル、骨髄が16プロファイル、前胃が12プロファイル、膵臓が12プロファイル、空腸が7プロファイル、結腸が6プロファイル、および脊髄が9プロファイルであった（図III.3-19）。

取得したすべてのサンプルの遺伝子発現プロファイルを行列として編集した。図III.3-20に、1,028サンプルの遺伝子発現プロファイル行列の全体像を示す。この図では、遺伝子発現プロファイル行列を、サンプル間（column方向）と遺伝子間（row方向）の2次元クラスタ分析を行った結果に従って描出している。サンプル間のクラスタ分析では、各サンプルはすべて組織ごとのクラスタを形成した。この結果は、投与した各種化学物質のラット臓器・組織に与える影響は、遺伝子発現レベルでみた場合、臓器・組織の違いに比べてはるかに小さいことを示している。また、動物の個体差及び遺伝子発現解析に至るまでのすべての段階の実験誤差の総和は、遺伝子発現レベルでみた場合、臓器・組織の違いに比べてはるかに小さいことも示している。

また、取得した遺伝子発現プロファイルを解析し、化学物質の有害性評価に有用であると考えられるデータセット（「生体応答遺伝子発現データセット」と呼ぶ。以下同じ。）を78セット特定した。さらに、その中から特に有用性があると考えられる生体応答遺伝子セットおよび有害性評価マーカー遺伝子に関する発明について20件の特許出願を完了している（そのうち、10件はプロジェクト終了後に出願）。本プロジェクトで取得したデータは国立遺伝学研究所が運営する遺伝子発現データベースであるCIBEX（Center for

Information Biology gene Expression database) にすべて登録を完了し、すでに公開されている (図III.3-21、22)。なお、本プロジェクト開始当初は、知的財産権の確保を行わずに、すべてのデータを公開することをもってプロジェクトの成果とすることとしていたが、中間評価の指摘を受け、知的財産権の確保を優先させることにプロジェクトの方針を転換させた。そのため、成果の現れ方としては、まず特許出願が先行して出願が完了したものから順次データの登録・公開を行い、最後に論文等の発表という順となる。したがって、平成20年度に特許出願が、次いで平成21年度からデータ登録・公開が始まり、最後に平成22年度から論文・研究発表などを行っている (図III.3-22)。

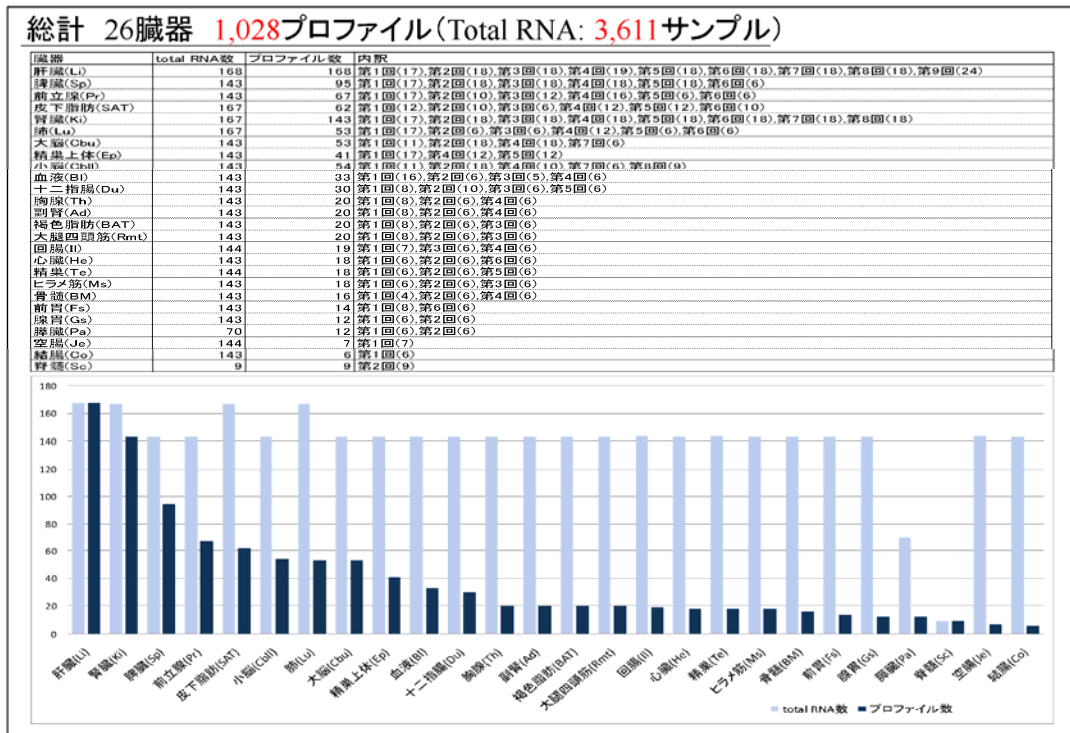


図 III.3-19 総プロファイル数とその内訳

図上には本プロジェクトで取得した total RNA 数および遺伝子発現プロファイル数を一覧表にして、図下にはそれらをグラフにして示す。

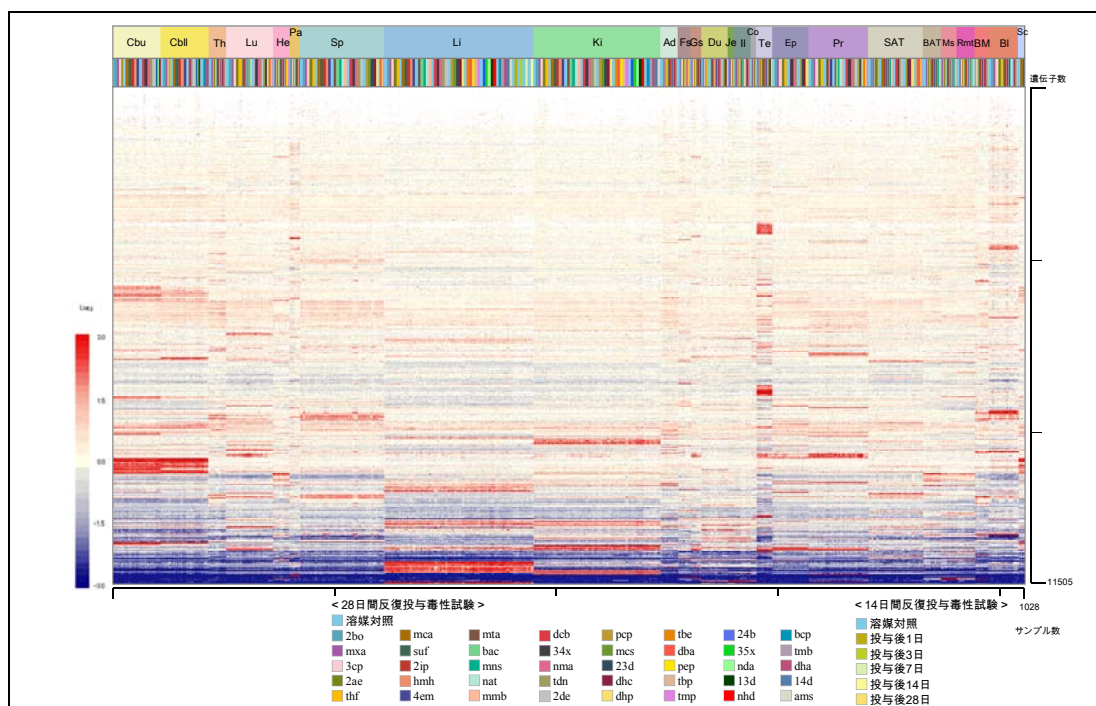


図 III.3-20 全遺伝子発現プロファイル (1,028 サンプル) (平成23年7月現在)

全てのサンプルについての遺伝子発現プロファイルデータを基に遺伝子方向のクラスタ分析の結果を示す。図中、「Cbu」は「大脳」を、「Cbil」は「小脳」を、「Th」は胸腺を、「Lu」は「肺」を、「He」は「心臓」を、「Pa」は「膵臓」を、「Sp」は「脾臓」を、「Li」は「肝臓」を、「Ki」は「腎臓」を、「Ad」は「副腎」を、「Fs」は「前胃」を、「Gs」は「腺胃」を、「Du」は「十二指腸」を、「Je」は「空腸」を、「Il」は「回腸」を、「Co」は「結腸」を、「Te」は「精巣」を、「Ep」は「精巣上体」を、「Pr」は「前立腺」を、「SAT」は「皮下脂肪」を、「BAT」は「褐色脂肪」を、「Ms」は「ヒラメ筋」を、「Rmt」は「直筋」を、「BM」は「骨髄」を、「BI」は「血液」を、「Sc」は「脊髄」を表す。赤が対照群に比べて発現レベルが上昇、青が対照群に比べて発現レベルが低下したことを表している。

■ 取得データ概要

化学物質数	40種類
供試動物数	238匹 (No.1: 18匹、No.2~8: 28匹、タイムコース: 24匹)
採材臓器数	No.1: 各26臓器、No.2~4: 各25臓器 (No.2はC2, mca, 4emのみ26臓器)、No.5~8: 各24臓器、 タイムコース: 各4臓器
RNA取得数	3,611 サンプル
取得プロファイル数	1,028 プロファイル
遺伝子発現データポイント数	11,827,140 ポイント

■ 成果物

生体応答遺伝子発現データセット	78セット (肝臓: 49、腎臓: 24、脾臓: 2、皮下脂肪: 2、小脳: 1)
遺伝子発現プロファイル公開 (CIBEX)	97件 (1,025プロファイル) ※3サンプルは化学物質投与とは関係のない病変部位を参考として採取したものであるため、あえて登録していない。
特許出願	10件 (但しH23年度に10件追加)

※ 平成23年8月17日現在

図 III.3-21 成果の概要

本プロジェクトで取得したデータおよび成果物を一覧にして示す。

	H19	H20	H21	H22	計
特許出願	0	1	4	5	10件 (但しH23年度に10件追加)
論文(査読付き)	0	0	0	1	1件
研究発表・講演	0	0	0	1	1件
新聞・雑誌等への掲載	0	0	0	1	1件
データ登録・公開件数 (公開プロファイル数)	0 (0)	0 (0)	11 (113)	86 (912)	97件 (1,025)

図 III.3-22 知的財産、成果の普及など

本プロジェクトの成果について、特許出願、論文、研究発表、データ登録などの件数を示す。なお、特許出願の20件のうち10件、データ登録・公開件数の97件(1,025プロファイル)のうち86件(912プロファイル)はプロジェクト終了後(平成23年度)に行ったものである。

<特定の化学物質における複数臓器間の横並び比較>

(1) はじめに

従来の毒性試験法では、病理組織学的知見や血液生化学的知見などを主な指標としているため、得られる知見が限られていた。そのため、主要臓器以外の（当初予期していなかった）臓器毒性の検出や、異なる臓器間の毒性の程度を比較することは容易ではなかった。しかしながら、網羅的遺伝子発現解析を主としたゲノム学的手法は、複雑な生体変化（の一部）を遺伝子発現レベルという一つの指標で、かつ、10,000以上の遺伝子の発現変動という多数のパラメータで表すことにより、前記の課題を解決できる可能性があった。そこで、われわれはそれらの課題を解決するため、複数臓器間の横並び比較の検証を行った。一定程度のサンプル数が揃っている化学物質を例にして、その結果を示していく。

(2) 3,4-キシリジン

3,4-キシリジンを28日間反復投与した後、複数の臓器の遺伝子発現プロファイルを取得した。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群（1,009プローブ）を抽出した。それらの1,009プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、他の臓器に比べて脾臓（「Sp」で表す。）における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した（図III.3-23）。また、肝臓（「Li」で表す。）においても遺伝子発現レベルの変動が大きかったが、発現変動している遺伝子群が脾臓とは大きく異なることが判明した（図III.3-23）。3,4-キシリジンを28日間反復投与すると、脾臓における充血、造血亢進、色素沈着や、肝臓における肝細胞腫脹、単細胞壊死、髄外造血、クッパー細胞の色素沈着が観察されており、主なターゲット臓器が脾臓と肝臓であることが知られていた。

この結果は、遺伝子発現変動解析による複数臓器の横並び比較は、従来の毒性試験の結果と相関しており、ゲノム学的手法が従来の毒性試験法を補完できる可能性があることを示している。

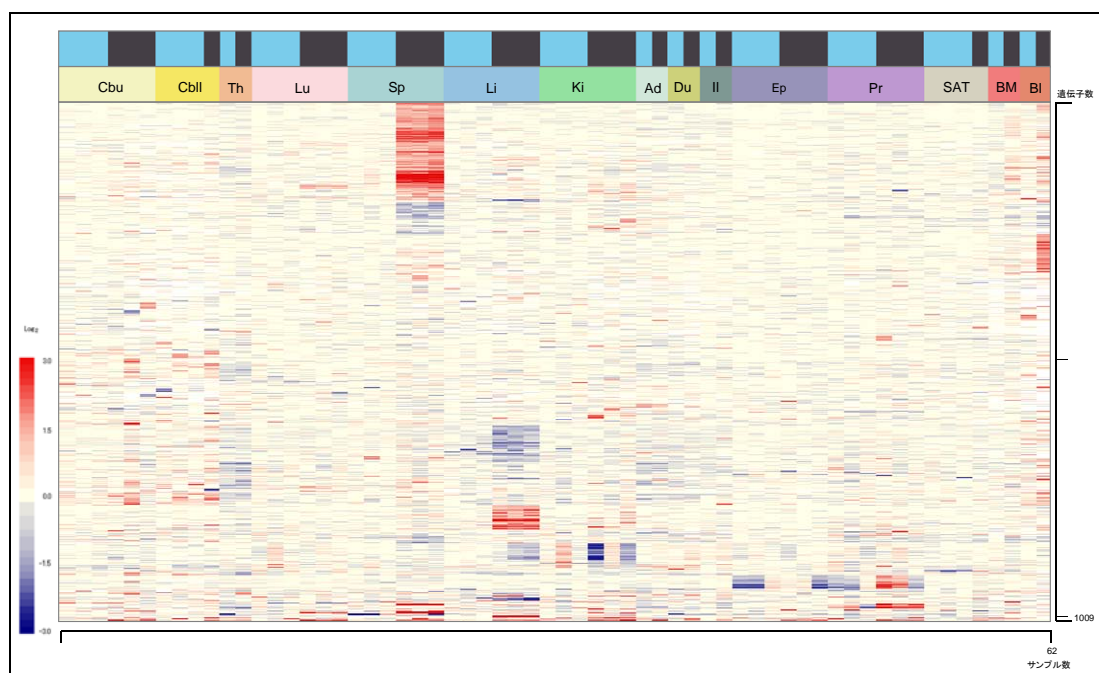


図 III.3-23 3,4-キシリジン投与による複数臓器の横並び比較

3,4-キシリジンを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(1,009プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、紺色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図 III.3-20 と同様に表している。

(3) フタル酸ジヘプチル

フタル酸ジヘプチルについて3,4-キシリジンと同様の解析を行い、対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群を抽出した(631プローブ)。それら631プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、肝臓(「Li」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-24)。さらに、脾臓(「Sp」で表す。)で3個体中1個体に、精巣(「Te」で表す。)では1個体中1個体に、精巣上体(「Ep」で表す。)では3個体中1個体に発現レベルの変動が認められた。既存化学物質毒性データベースでは、フタル酸ジヘプチルの28日間反復投与により、肝臓重量の増加、小葉中心性肝細胞肥大、小葉中心性肝細胞脂肪化等の幹細胞への影響が、さらに、精子形成細胞の消失、管内精子減少、剥離性精子形成細胞の出現など精巣や精巣上体への影響が報告されている。これらのことは、遺伝子発現変動解析の結果と病理組織学的知見を主とした従来の毒性試験の結果が相関していることを示している。また、動物実験を行った場合、化学物質に対する感受性が個体間で差が出ることは良く知られており、国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」においても、毒性影響の個体差はそれぞれの

化学物質で出現している。

一方、皮下脂肪（「SAT」で表す。）においても3個体中3個体で一群の遺伝子の発現レベルの変動を認めた（図III.3-24）。しかしながら、「既存化学物質毒性データベース」や他の文献などには、調べた限りにおいてフタル酸ジヘプチルの反復投与による皮下脂肪への影響についての報告は存在しなかった。このことは、多種多様な臓器・組織の遺伝子発現プロファイルを取得し、他の臓器と横並びに比較・解析することによって、従来の毒性試験では予測ができない臓器・組織における生体の変化を検出できる可能性を示唆している。

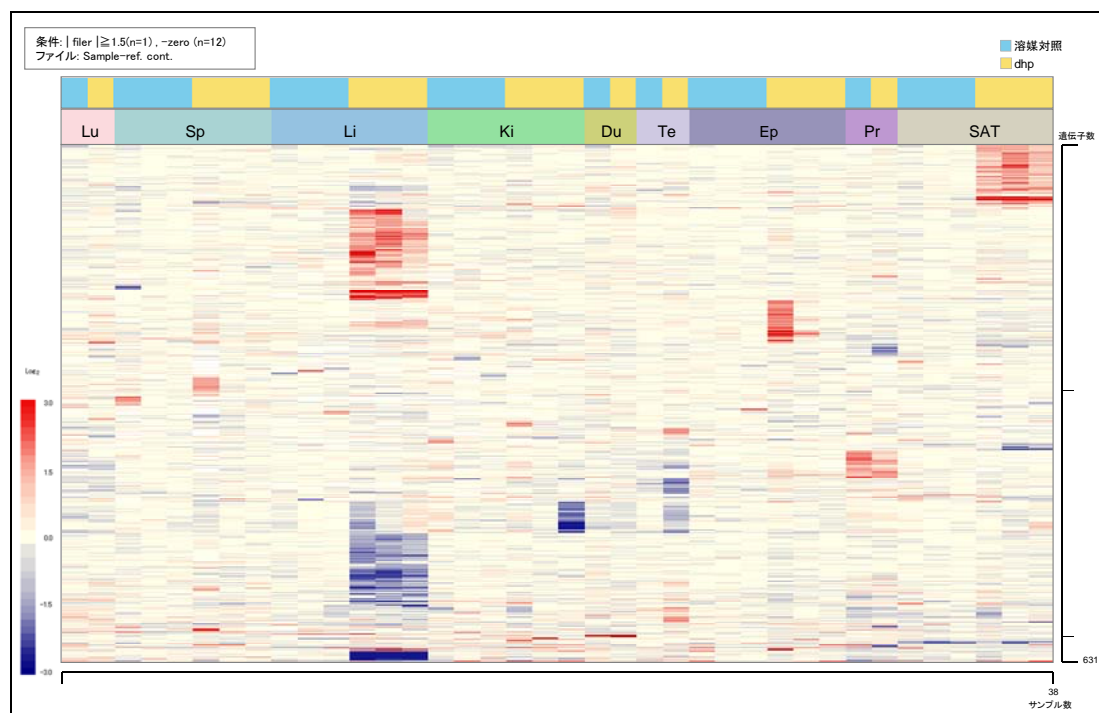


図 III.3-24 フタル酸ジヘプチル投与による複数臓器の横並び比較

フタル酸ジヘプチルを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した（631プローブ）。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、黄色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図III.3-20と同様に表している。

(4) o-ジクロロベンゼン

o-ジクロロベンゼンについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群は792プローブ存在した（図III.3-25）。それら792プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、肝臓（「Li」で表す。）における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した（図III.3-25）。「既存化学物質毒性データベー

ス」(国立医薬品食品衛生研究所)では、*o*-ジクロロベンゼンを反復投与することによって、肝臓の暗色化・大型化、肝臓重量の増加などが認められ、また、肝臓の小葉中心性の肝細胞肥大や小葉中心性の単細胞壊死が起きており、肝臓に対して毒性影響があるとの報告がなされており、遺伝子発現変動解析結果と相関していた。また、血液(「BI」で表す。)においても遺伝子発現レベルの変動が認められた。既存化学物質毒性データベース(国立医薬品食品衛生研究所)では総コレステロール・ γ -GTP活性の有意な上昇や尿素窒素・無機リン・GOT活性の有意な上昇とA/G日およびナトリウム濃度の有意な低下が認められ、遺伝子発現変動解析結果と相関していた。さらに、皮下脂肪(「SAT」で表す。)でも3個体中1個体で遺伝子発現レベルの変動が認められたが、皮下脂肪に関する報告はなく、新たな知見である。

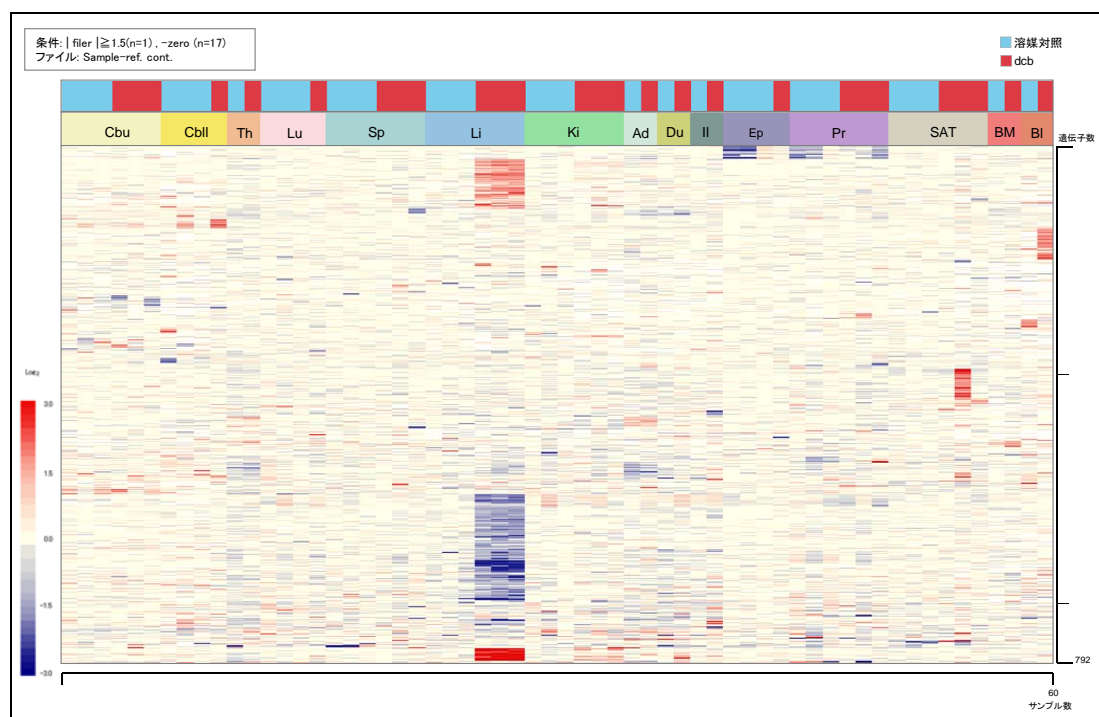


図 III.3-25 *o*-ジクロロベンゼン投与による複数臓器の横並び比較

o-ジクロロベンゼンを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(792プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、赤色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図 III.3-20 と同様に表している。

(5) N-メチルアニリン

N-メチルアニリンについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあ

った遺伝子群は1,389プローブ存在した(図III.3-26)。それら1,389プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、脾臓(「Sp」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-26)。「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、N-メチルアニリンを反復投与することによって、脾臓の黒色化および肥大、脾臓重量の増加、脾臓の充血・造血亢進・色素沈着が認められると報告がなされており、遺伝子発現変動解析結果と関連していた。また、肝臓(「Li」で表す。)および肺(「Lu」で表す。)においては両者で同じような発現変動パターンが認められたが、「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)でも肝臓の黒色化や肝臓における髄外造血が引き起こされていることが報告されており、肝臓については遺伝子発現変動解析と関連していた。さらに、血液(「BI」で表す。)においては、ヘマトクリット値・ヘモグロビン量・赤血球数が低下し、網赤血球率が高値になることが報告されており、また、骨髄(「BM」で表す。)においては造血亢進が報告されていることから、遺伝子発現変動解析結果と関連していた。

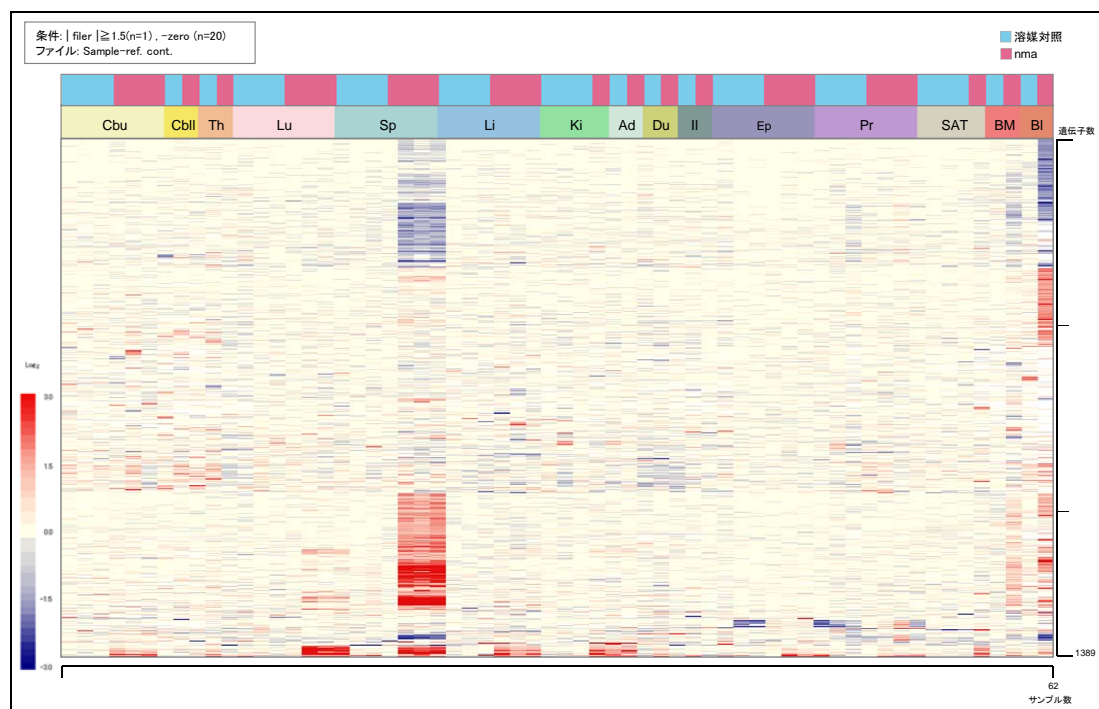


図 III.3-26 N-メチルアニリン投与による複数臓器の横並び比較

N-メチルアニリンを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(1,389プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、ピンク色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図III.3-20と同様に表している。

(6) p-クミルフェノール

次に、p-クミルフェノールについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群は359プローブ存在した(図III.3-27)。それら359プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、肝臓(「Li」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-27)。「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、p-クミルフェノールを反復投与することによって、肝臓の重量増加が認められると報告されており、遺伝子発現変動解析結果と関連していた。さらに、腎臓(「Ki」で表す。)においても発現変動していた遺伝子群が存在していたが、「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、腎臓の褪色および微細白色斑、腎臓重量の増加、尿細管拡張、顆粒円柱・皮質へのリンパ球浸潤、腎乳頭に好中球浸潤などが認められるとの報告がなされており、これらと関連していた。

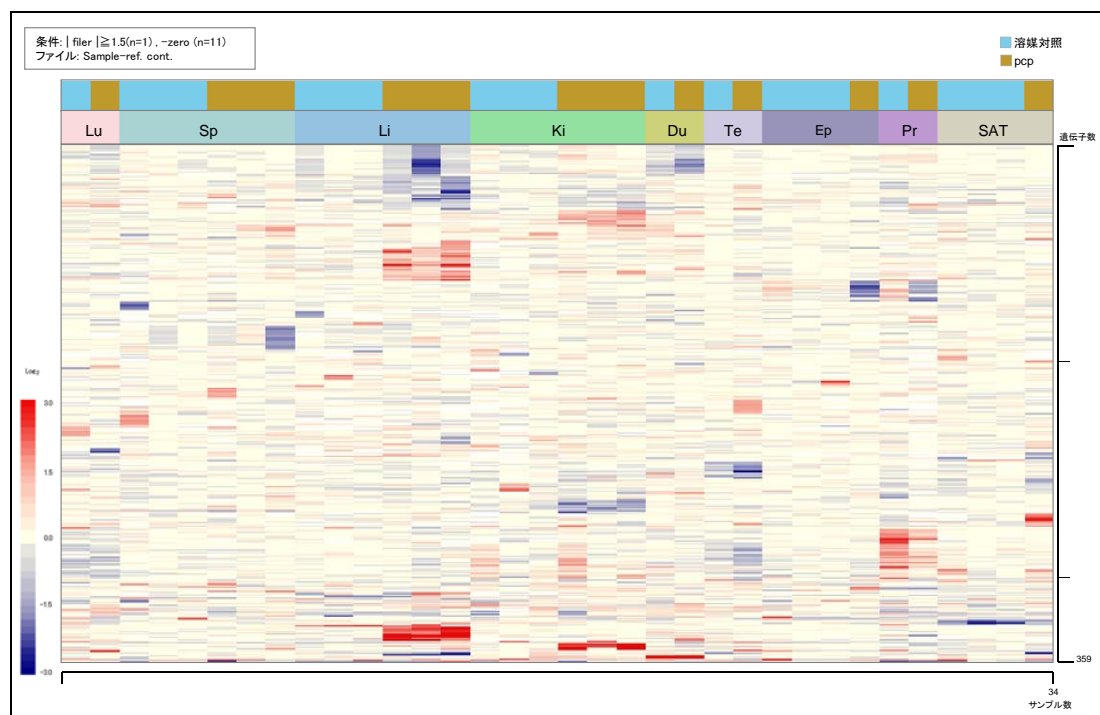


図 III.3-27 p-クミルフェノール投与による複数臓器の横並び比較

p-クミルフェノールを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(359プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、黄土色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図III.3-20と同様に表している。

(7) 2,3-ジメチルアニリン

次に、2,3-ジメチルアニリンについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群は493プローブ存在した(図III.3-28)。それら493プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、脾臓(「Sp」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-28)。「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、2,3-ジメチルアニリンを反復投与することによって、脾臓の腫大や脾臓重量の増加、さらに、脾臓の赤脾髄のヘモジデリン沈着、髄外造血の亢進などが認められると報告されており、遺伝子発現変動解析結果と関連していた。この結果は、2,3-ジメチルアニリンは脾臓に特異的に影響を及ぼす傾向にあることを示している。

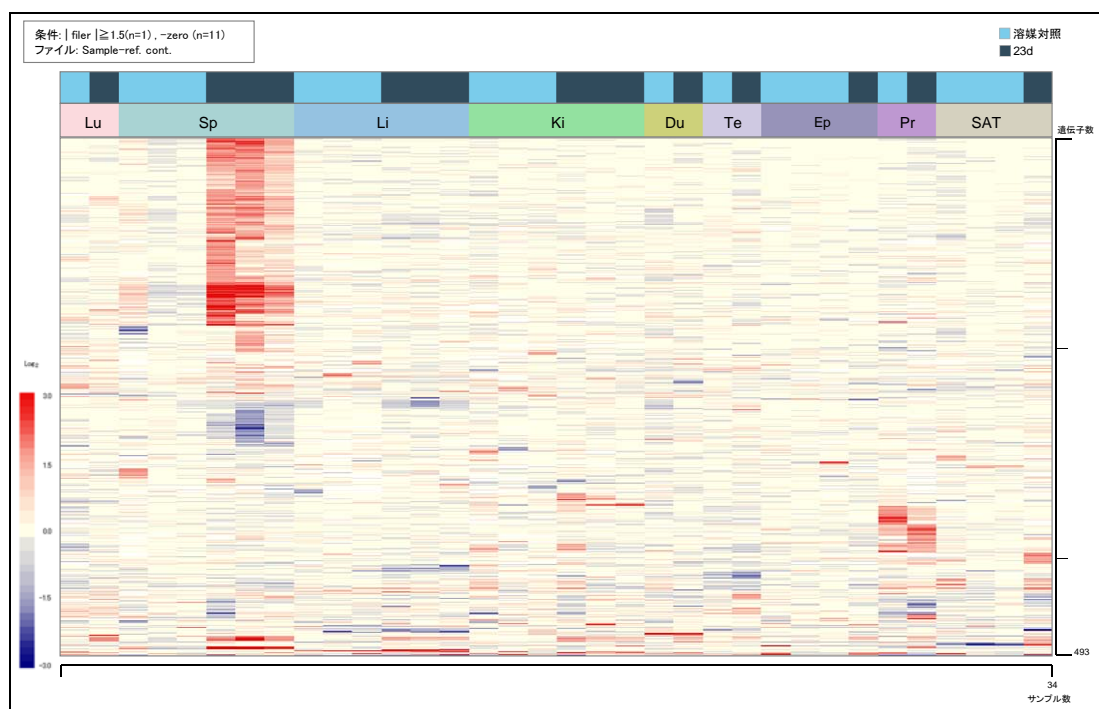


図 III.3-281 2,3-ジメチルアニリン投与による複数臓器の横並び比較

2,3-ジメチルアニリンを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(493プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、紺色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図III.3-20と同様に表している。

(8) テトラプロモエタン

次に、テトラプロモエタンについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群は356プローブ存在した(図III.3-29)。それら356プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、肝臓(「Li」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-29)。「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、テトラプロモエタンを反復投与することによって、肝臓の大型化、肝臓重量の増加、肝臓の小葉中心性の幹細胞肥大、巣状壊死などが認められると報告されており、遺伝子発現変動解析結果と相関していた。

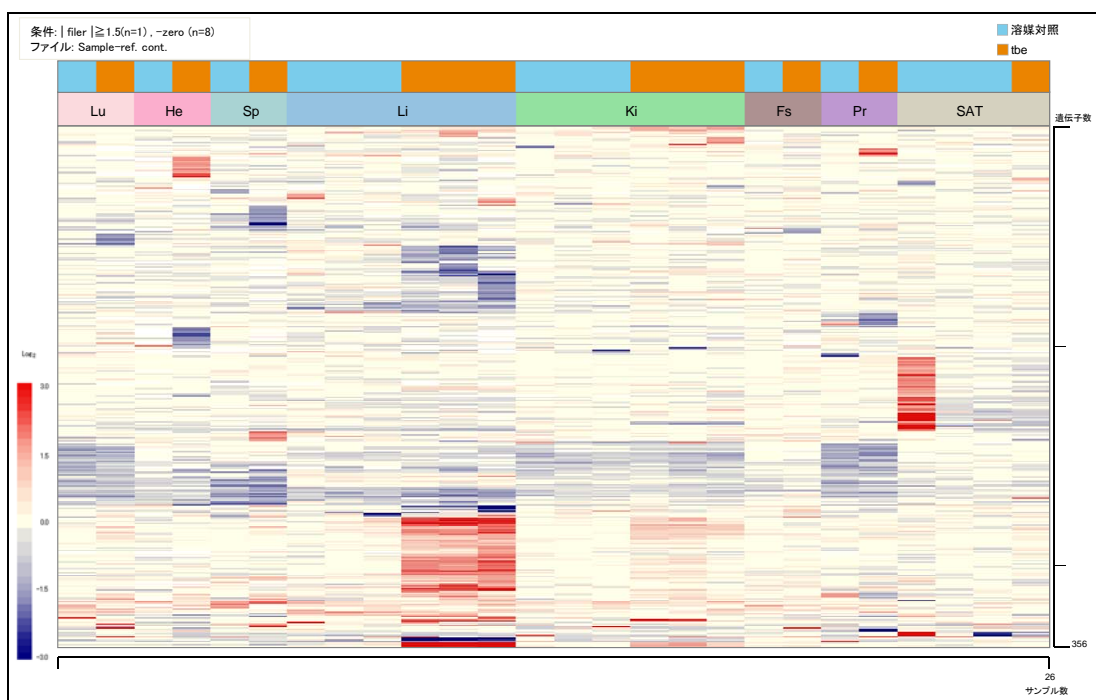


図 III.3-29 テトラプロモエタン投与による複数臓器の横並び比較

テトラプロモエタンを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(356プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、オレンジ色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図III.3-20と同様に表している。

(9) p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール

次に、p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノールについて同様の解析結果を示す。対照群と比較して発現レベルに差のあった遺伝子群は660プローブ存在した(図III.3-30)。それら660プローブの発現変動パターンを臓器間で横並びに比較した結果、腎臓(「Ki」で表す。)における遺伝子発現レベルの変動が最も大きいことが判明した(図III.3-30)。ただし、3個体とも遺伝子の発現変動は認められたものの、その程度には個体差が存在していた。「既存化学物質毒性データベース」(国立医薬品食品衛生研究所)では、p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノールを反復投与することによって、腎臓重量の増加、尿細管の再生像などが認められると報告されており、遺伝子発現変動解析結果と相関していた。また、肝臓(「Li」で表す。)でも個体差があるが、遺伝子発現変動が認められた。しかしながら、「既存化学物質毒性データベース」では肝臓への影響については報告されておらず、新たな知見である可能性がある。

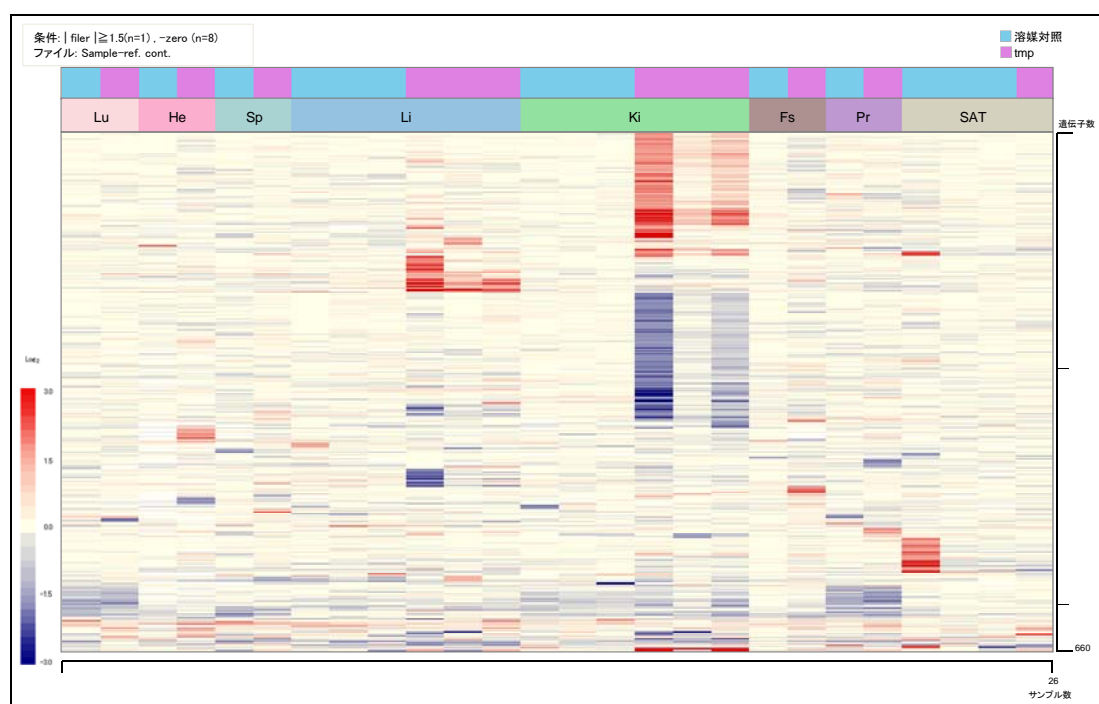


図 III.3-30 p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール投与による複数臓器の横並び比較
p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノールを28日間反復投与した後、遺伝子発現プロファイルを取得し、各臓器において対照群と比較して遺伝子発現レベルに差のあった遺伝子を抽出し、その発現パターンを臓器間で比較した(660プローブ)。なお、発現レベルの表示は、対照群に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。最も上のカラムは、水色が対照群を、ピンク色が化学物質投与群を表している。また、臓器の略号は、図 III.3-20 と同様に表している。

(10) まとめ

ゲノム学的手法を用いたトキシコゲノミクスは、遺伝子発現レベルの変動を共通の指標として複数臓器を横並びに表示することによって、どの臓器にどの程度の影響が出ているかを視覚的に明確に認識できる。また、従来の毒性試験で病理組織学的・血液生化学的に変化が現れている臓器では、ほぼ遺伝子発現レベルの変動も認められ、トキシコゲノミクスの知見と従来の毒性学的知見の結果が相関していた。一方、従来の毒性試験では調べられていない、または、検出されていない臓器（例えば、皮下脂肪）において、遺伝子発現レベルの変動が認められる例が存在した。

これらのことは、遺伝子発現変動解析による複数臓器の横並び比較は、従来の毒性試験結果を補完する役割を果たし、かつ、従来の毒性試験では検出しにくい影響（例えば、主要臓器以外の影響）も検出できる可能性を有していることを示唆する。

＜既存化学物質毒性データベースの病理所見からみた化学物質の分類＞

(1) はじめに

既存の化学物質の毒性データベースに掲載されている報告書は個々の化学物質の毒性等の情報が詳細に記載されており、企業や一般の研究者が個々の化学物質の特性を知るためには有用である。しかしながら、これらの情報はほとんどが文書データになっているため、化学物質間相互の比較が容易ではない。また、それらのデータは複数の研究機関、複数の研究者らが化学物質を手分けして取得し報告書をまとめたものであるため、主観に頼らざるを得ない判断基準が存在する場合やその中で使用している表現（表記）が異なっている場合が散見される。さらに、それぞれの報告書のフォーマットも統一されていないため、それらの報告書を見た研究者が化学物質の毒性を客観的に比較することが難しいという問題点を含んでいた。したがって、現在、毒性または生体に対する影響という観点から化学物質の類似性・相違性を判断することが容易ではなく、それらを判断するためのマーカー等が不足していることが、化学物質の有害性評価を行う上で一つの課題であった。

(2) 病理所見のスコア化

現在、福島県立医科大学が主導して行っているNEDOのTRプロジェクト「遺伝子発現解析技術を活用した個別がん医療の実現と抗がん剤開発の加速」の中で、病院の電子カルテに記載している乳がんの予後に関連する7つの因子をスコア化し、それらのスコアによるクラスタ分析で患者を分類することにより、乳がんの予後予測因子を特定している。われわれは、このTRプロジェクトで採用した方法論を「既存化学物質毒性データベース」（国立医薬品食品衛生研究所）の情報に応用することで、各種化学物質を数学的に分類できるのではないかと考えた。すなわち、既存化学物質毒性データベースにある各化学物質の報告書を電子カルテに見立て、必要な情報を抽出してスコア化を行い、クラスタ分析を行うことで化学物質を分類しようとする試みである（図III.3-31）。具体的には、既存化学物質毒性データベースから本プロジェクトで使用した化学物質の報告書をダウンロードし、報告書を読み込んで必要な情報（まず、各化学物質の報告書の中から肝臓または脾臓における病理所見の情報）のみを抽出した。肝臓において抽出した項目（キーワード）は、「肝細胞腫大」、「小葉中心性幹細胞肥大」、「ヘモジデリン貪食を伴うクッパー細胞の肥大」、「グリソン鞘周囲の肝細胞腫大」、「髄外造血」、「色素沈着」、「クッパー細胞のヘモジデリン沈着」、「肝細胞の脂肪化」、「小葉中心性幹細胞脂肪化」、「門脈周囲脂肪化」、「小葉中心性単細胞壊死」、「単細胞壊死」、「脈管増殖」、「巣状壊死」、「グリソン鞘周囲の肝細胞質好酸性化」、「小肉芽腫」、「肉芽」、「肝横隔膜面結節」、「リンパ球浸潤」の19項目とした。また、脾臓において抽出した項目（キーワード）は、「うっ血」、「髄外造血」、「ヘモジデリン顆粒増加」、「ヘモジデリン沈着」、「（褐色）色素沈着」、「皮膜の一部に細胞浸潤、線維化等を伴う炎症」、「ベルリン青染色：陽性顆粒の増加」の7項目とした。化学物質ごとにこれらの各項目について3段階のスコア（「-」を「0」、「±」を「1」、「+~+++」を「3」とした）を付した（図III.3-32~34）。

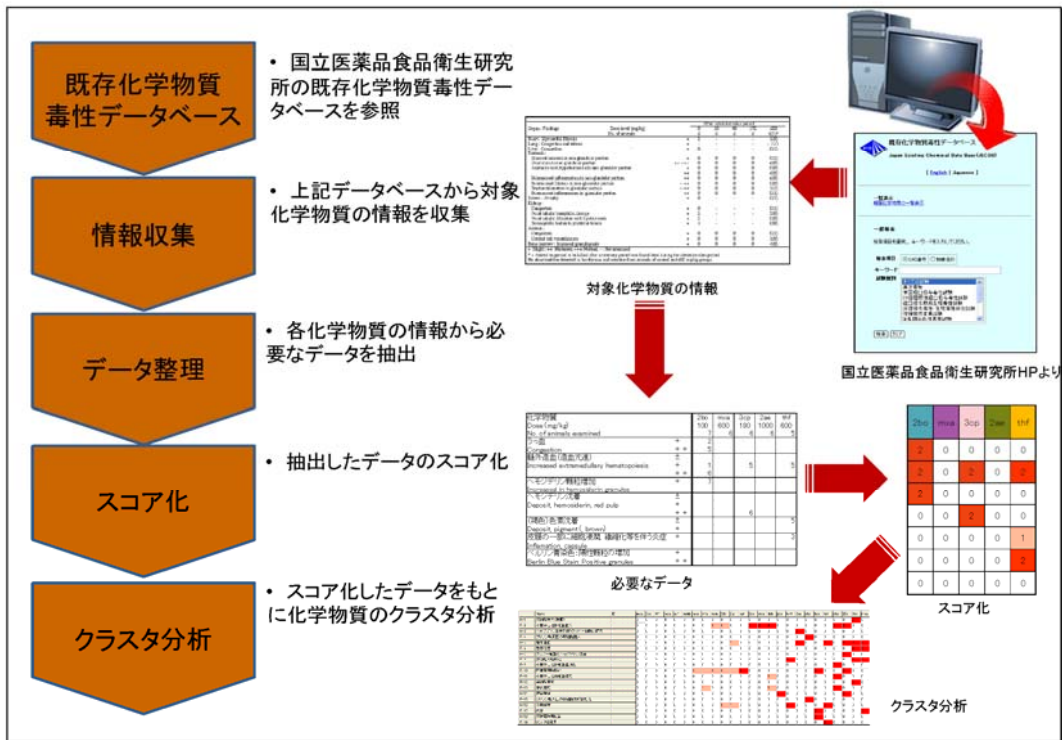


図 III.3-31 既存化学物質毒性データベースの情報を用いた相互比較

既存化学物質毒性データベース（国立医薬品食品衛生研究所）の情報をもとにした化学物質の比較のストラテジーを模式的に示す。該データベースに掲載している報告書から各化学物質の情報を抽出し、各項目についてスコア化する。その後、スコア化した数値をもとにしてクラスタ分析を行う。

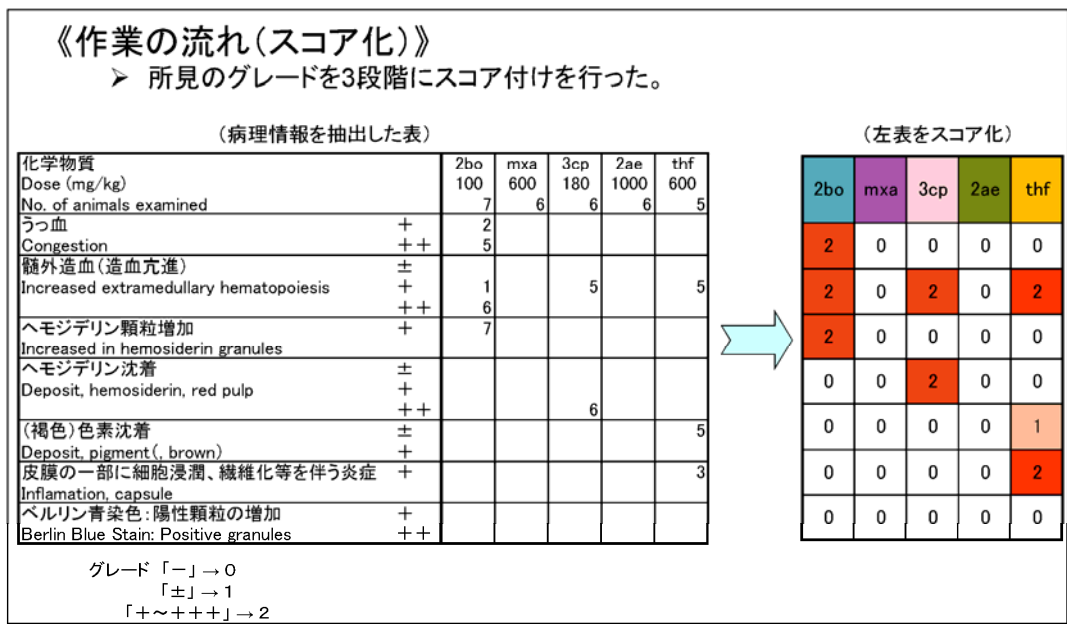


図 III.3-32 既存化学物質毒性データベースの情報を用いた相互比較 (スコア化)

既存化学物質毒性データベース (国立医薬品食品衛生研究所) の情報を用いたスコア化のストラテジーを示す。既存化学物質毒性データベースの報告書に記載されている文章の中からキーワードを抽出し、各化学物質を28日間反復投与した際に各項目における異常の程度をもとにして単純なスコア (0~2) を付けた。

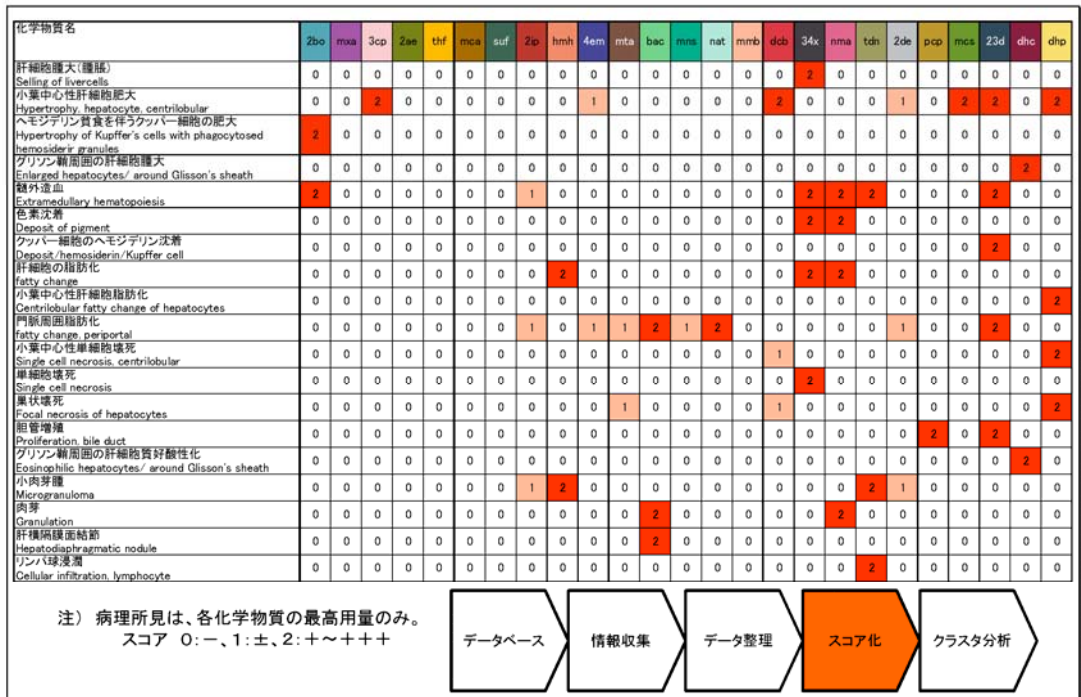


図 III.3-33 既存化学物質毒性データベースの病理所見のスコア化 (肝臓)
 既存化学物質毒性データベース (国立医薬品食品衛生研究所) の報告書に記載されている文章の中から肝毒性に関するキーワードを抽出し、図 III-3-32 の方法でスコア化した結果を示す。

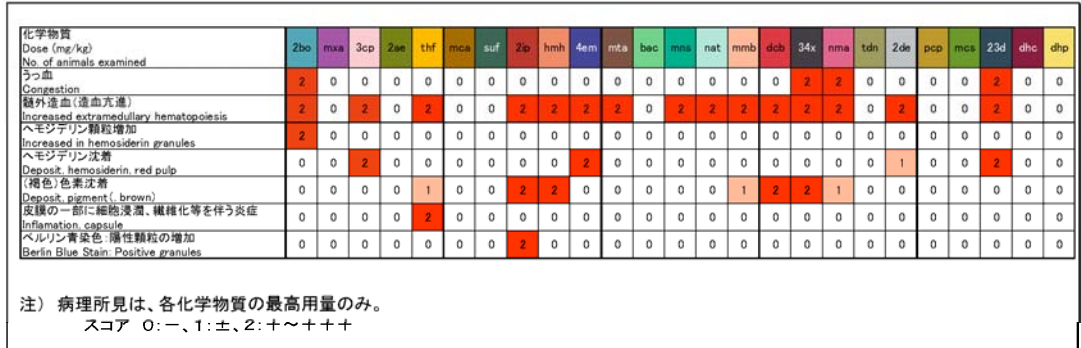


図 III.3-34 既存化学物質毒性データベースの病理所見のスコア化 (脾臓)
 既存化学物質毒性データベース (国立医薬品食品衛生研究所) の報告書に記載されている文章の中から脾臓毒性に関するキーワードを抽出し、図 III.3-32 の方法でスコア化した結果を示す。

(3) スコアをもとにしたクラスタ分析

TRプロジェクトでは臨床情報と遺伝子発現情報を照合解析する際に、このようなスコアをもとにクラスタ分析をすることで、臨床所見の相違に対して遺伝子発現変動解析レベルで解釈を付けられるケースがあった。そこで、化学物質の毒性評価でも同様の方法が適用できるか否かを検証するため、上記のスコアをもとにクラスタ分析を行った。その結果、肝臓においては明確な房が形成されていなかった(図III.3-35)。このことは、これらの病理所見のパラメータは独立であって共通項が存在せず、それらのパラメータでは化学物質を区別することができないことを意味する。一方、脾臓においては、パラメータは少ないが、房を形成していた(図III.3-36)。

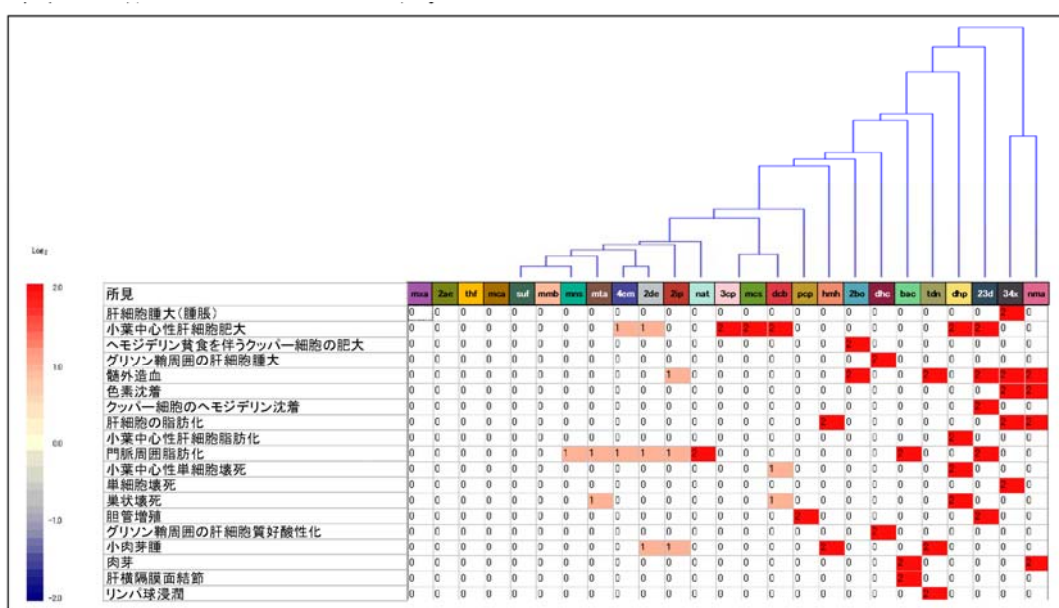


図 III.3-35 既存化学物質毒性データベースの情報(スコア)によるクラスタ分析(肝臓)

図 III.3-33 のスコアをもとにしたクラスタ分析の結果を示す。

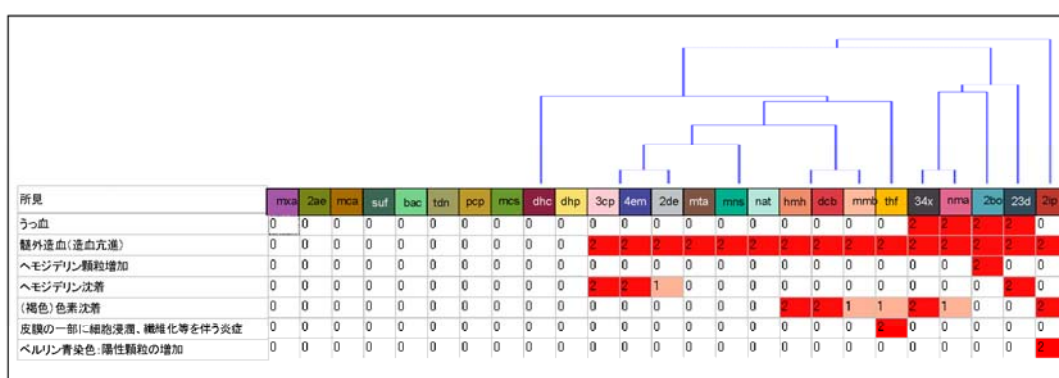


図 III.3-36 既存化学物質毒性データベースの情報(スコア)によるクラスタ分析(脾臓)

図 III.3-34 のスコアをもとにしたクラスタ分析の結果を示す。

次に、これらのクラスタ分析の結果と遺伝子発現情報をもとにしたクラスタ分析の結果を比較してみた。肝臓においては、遺伝子発現情報をもとにしたクラスタ分析ではo-ジクロロベンゼン投与群 (dcb)、3,4-キシリジン投与群 (34x)、およびフタル酸ジヘプチル投与群 (dhp) の発現変動パターンが類似していたにもかかわらず (図III.3-37 (B))、病理変化のスコアによるクラスタ分析ではそれらは類似していなかった (図III.3-37 (A))。また、脾臓においては、病理変化のスコアによるクラスタ分析では、3,4-キシリジン投与群 (34x)、N-メチルアニリン投与群 (nma)、2-ブタノンオキシム投与群 (2bo)、2,3-ジメチルアニリン投与群 (23d) がの発現変動パターンが類似していたのに対して (図III.3-38 (A))、遺伝子発現情報をもとにしたクラスタ分析では、それら4種類の化学物質の曝露による遺伝子発現変動パターンが類似していた点で一致したが、3-シアノピリジン投与群 (3cp) および2-イソプロポキシエタノール投与群 (2ip) も同じ房に入っており、完全には一致していなかった (図III.3-38 (B))。

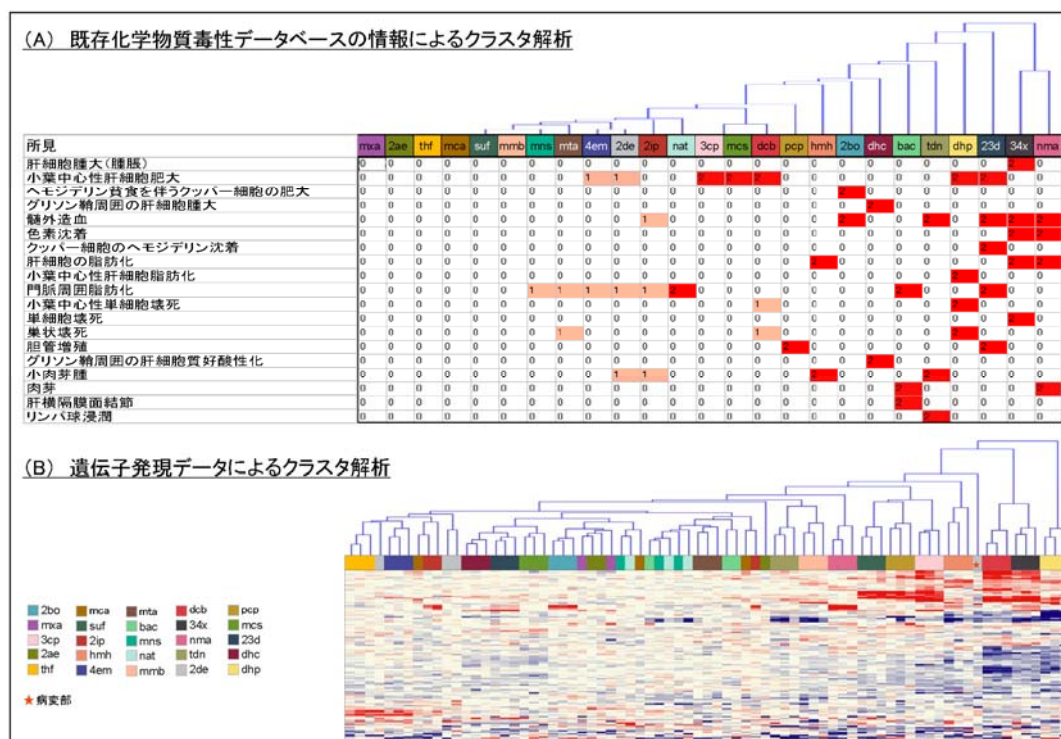


図 III.3-37 既存化学物質毒性データベースの情報と遺伝子発現データとの比較 (肝臓)
 既存化学物質毒性データベース (国立医薬品食品衛生研究所) の情報をスコア化したものをもとにしたクラスタ分析の結果 (A) と遺伝子発現変動データをもとにしたクラスタ分析の結果 (B) を示す。

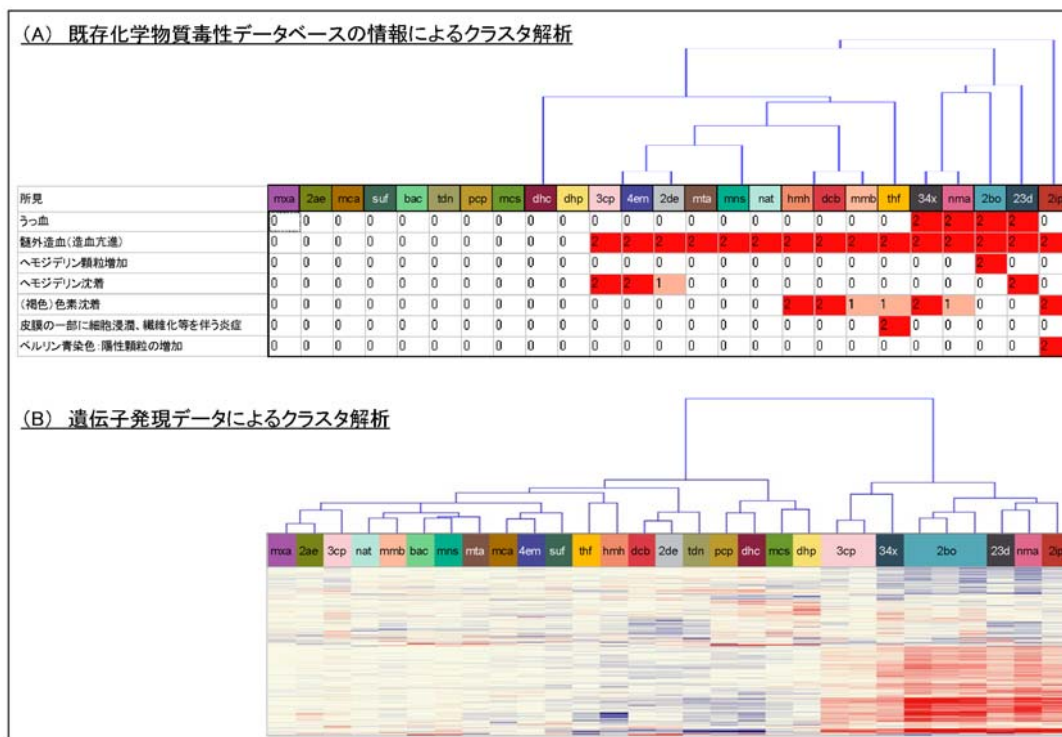


図 III.3-38 既存化学物質毒性データベースの情報と遺伝子発現データとの比較（脾臓）
 既存化学物質毒性データベース（国立医薬品食品衛生研究所）の情報をスコア化したものをもとにしたクラスタ分析の結果（A）と遺伝子発現変動データをもとにしたクラスタ分析の結果（B）を示す。

(4) まとめ

化学物質の投与により病理組織学的に現れる変化は多種多様である。したがって、そのような変化を文章データで記載するには限界があり、その文章データをもとにしたスコアで化学物質を分類することは容易ではないことが明らかとなった。これらの結果は、このままでは遺伝子発現情報と既存化学物質毒性データベースの情報を単純に比較することが難しいことを意味する。

<化学物質から見た遺伝子発現変動解析>

(1) 化学物質の構造に着目したスコア化

化学物質の構造はその化学物質の特徴を表しているものであり、構造が類似している化学物質どうしは生体に与える影響も類似する可能性がある。そこで、第1回目～第5回目までの実験で用いた25種類の化学物質にかかる結果を用いて、化学物質の構造とそれらの化学物質が生体に与える影響について検証した。

はじめに、これら25種類の化学物質の構造の母核および官能基(図III.3-39、40)に着目してスコア化し、そのスコアに基づいてクラスタ分析を行った。その結果、構造の類似した化学物質が房を形成する傾向にあった(図III.3-41)。

略称	27c	27b	27d	27e	27f	27g	27h
CAS番号	89-09-7	1477-55-0	100-54-9	111-81-1	97-98-4	79-28-0	129-03-0
学名	2-butanone	2-(2-oxoethyl)pyridine	pyridine	2-(2-oxoethyl)pyridine	2-pyridone	2-methylpyridine	2-methylpyridine
物質名	ブタン-2-オン	2-ピリジン-2-イルエチル	ピリジン	2-ピリジン-2-イルエチル	2-ピリドン	2-メチルピリジン	2-メチルピリジン
分子式	C ₄ H ₈ O	C ₈ H ₈ N ₂ O	C ₅ H ₅ N	C ₈ H ₈ N ₂ O	C ₅ H ₅ NO	C ₆ H ₇ N	C ₆ H ₇ N
SMILES	CCC(=O)C	NC1=CC=CC=C1CC=O	C1=CC=NC=C1	NC1=CC=CC=C1CC=O	O=C1NC=CC=C1	CN1C=CC=C1	CN1C=CC=C1
構造式							
骨格(母核)	直鎖炭素鎖(飽和)	芳香族(単環)	環状(不飽和)	直鎖炭素鎖(飽和)	環状(飽和)	直鎖炭素鎖(不飽和)	環状(飽和)
官能基	ヒドロキシ基	アミノ基	シアノ(ニトリル)基	ヒドロキシ基 アミノ基	ヒドロキシ基 エーテル結合	アミノ基 カルボニル基 アジ結合	スルホニル基

略称	27c	27b	27d	27e	27f	27g
CAS番号	108-98-4	7800-57-8	100-74-0	5028-79-1	56-93-9	127-09-4
学名	2-propanone	hydroxide	4-methylpyridine	2-methyl-2-(2-methylprop-2-ynyl)pyridine	2-methylpyridine	2-methylpyridine
物質名	インプロピルケトン	水酸化物	4-メチルピリジン	メチルピリジン-2-イルメチル	2-メチルピリジン	2-メチルピリジン
分子式	C ₃ H ₆ O	H ₂ O	C ₅ H ₇ N	C ₈ H ₉ N	C ₆ H ₇ N	C ₆ H ₇ N
SMILES	CC(=O)C	[OH-]	CN1C=CC=C1C	CN1C=CC=C1C#CC	CN1C=CC=C1	CN1C=CC=C1
構造式						
骨格(母核)	直鎖炭素鎖(飽和)	無機化合物	環状(飽和)	直鎖炭素鎖(飽和)	芳香族(単環)	芳香族(単環)
官能基	ヒドロキシ基 エーテル結合	アミノ基	アルキル基(飽和) エーテル結合	カルボニル基 エーテル結合	スルホニル基 トリブ	スルホニル基 トリブ

図 III.3-39 28 日間反復投与毒性実験(第1～5回)に用いた化学物質の構造～骨格(母核)と官能基～

本プロジェクトで使用した化学物質の構造式とその特徴を示す。

略称	msf	mmb	dcb	34x	mms	dbn
CAS番号	130-13-2	5559-46-3	95-50-1	95-84-7	100-81-8	26471-92-8
SMILES	CC1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)N	CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N	C1=CC=C(C=C1)Cl	C1=CC=C(C=C1)N	C1=CC=C(C=C1)N	C1=CC=C(C=C1)N
物質名	ナフチル-2-チオウリウム	3-メチル-2-メチルキシアゾール	o-ジクロロベンゼン	3,4-キノリン	N-メチルアミン	トリレンジンジアミン
分子式	C10H8N2O2S	C8H10N2	C6H4Cl2	C8H7N	C7H9N	C8H8N2O2
SMILES	C1=CC=C(C=C1)S(=O)(=O)N	CC1=CC=C(C=C1)C(=O)N	C1=CC=C(C=C1)Cl	C1=CC=C(C=C1)N	CN	C1=CC=C(C=C1)N
構造式						
骨格(母核)	芳香族(多環)	環状炭素鎖(飽和)	芳香族(単環)	芳香族(単環)	芳香族(単環)	芳香族(単環)
官能基	スルホ基 アミノ基	ヒドロキシ基 エーテル結合	塩素	アミノ基	メチルアミノ基	カルボニル基

略称	zbo	zop	mcs	zsd	zpc	zhp
CAS番号	100-81-8	599-64-4	910-28-4	97-59-2	239-75-0	3348-21-3
SMILES	CC1=CC=C(C=C1)N	CC1=CC=C(C=C1)O	CC1=CC=C(C=C1)N	CC1=CC=C(C=C1)N	CC1=CC=C(C=C1)N	CC1=CC=C(C=C1)N
物質名	N,N-ジメチルエタノールアミン	4-(2,6-ジメチルフェニル)フェノール	m-クレゾール	2,3-キノリン	N,N'-ジシクロヘキシル-カルバジイド	2,2,2-トリフルオロエタノール
分子式	C10H16N2	C15H14O	C7H8O	C8H7N	C12H18N2	C2H2F3O
SMILES	CN(C)CCO	CC1=CC=C(C=C1)O	CC1=CC=C(C=C1)O	C1=CC=C(C=C1)N	C1=CC=C(C=C1)N	CC(F)(F)F
構造式						
骨格(母核)	環状炭素鎖(飽和)	芳香族(単環)	芳香族(単環)	芳香族(単環)	環状炭素鎖(不飽和)	芳香族(単環)
官能基	ヒドロキシ基	ヒドロキシ基	ヒドロキシ基	アミノ基		カルボニル基 エステル結合

図 III.3-40 28日間反復投与毒性実験(第1~5回)に用いた化学物質の構造~骨格(母核)と官能基~

本プロジェクトで使用した化学物質の構造式とその特徴を示す。

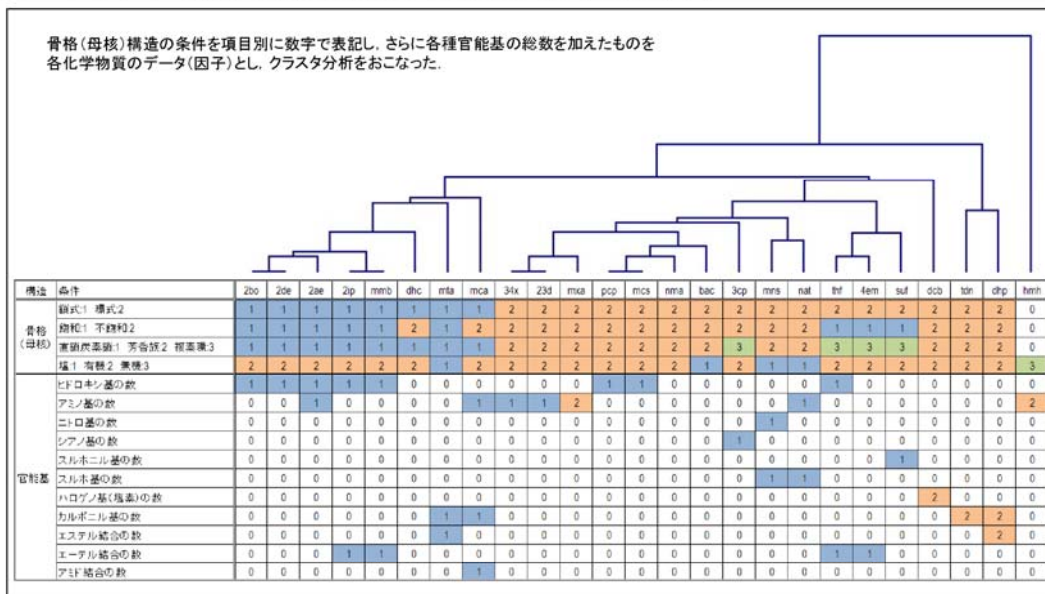


図 III.3-41 28日間反復投与毒性実験(第1~5回)に用いた化学物質の構造をもとにしたスコア化およびクラスタ分析

化学物質の構造式(母核および官能基)をスコア化しクラスタ分析を行った結果を示す。

(2) 脾臓の遺伝子発現変動パターンに基づくクラスタ分析

次に、脾臓における遺伝子発現変動パターンに基づくクラスタ分析を行ったところ、遺伝子発現変動が大きく、同じ房に入った化学物質が6種類存在した。その中には、アニリン骨格を有している化学物質(3,4-キシリジン[34x]、2,3-ジメチルアニリン[23d]、N-メチルアニリン[nma])が全て含まれていた(図III.3-42)。アニリン骨格を有する化学物質は、アニリンの代謝経路において、代謝物が酸化されるのに伴ってヘモグロビンの Fe^{2+} が酸化され、メトヘモグロビンが生成されることが知られている(図III.3-43)。さらに、アニリン骨格を有さない3-シアノピリジン(3cp)も同じ房に含まれていたが、この化学物質はシアニ化合物の一種であり、体内でシアニオンを遊離することで毒性を発現することが知られている。シアニオンの有害作用は Fe^{3+} との強い親和性からシトクロム酸化酵素と可逆的に結合して酵素活性を阻害するため、細胞の分子酸素の利用が阻止されて組織が酸素欠乏となる。また、シアニオンはメトヘモグロビンの Fe^{3+} に対しても強い親和性を有し、シアノメトヘモグロビンを生成することが知られている。メトヘモグロビンが生体内で生成されると、動脈血の酸素分圧が高いのにチアノーゼが出るメトヘモグロビン血症と呼ばれる中毒症状が現れる。この結果は、生体内において同じような現象により何らかの症状が出現する場合には、遺伝子発現の変動パターンとある程度の相関があることを意味する。

一方、アニリン骨格を有さず、かつ、その代謝経路によってもメトヘモグロビンの生成が起こらないと考えられる2種類の化学物質(2-ブタノンオキシム[2bo]、2-イソプロポキシエタノール[2ip])が同じ房に含まれていた(図III.3-44)。2-ブタノンオキシム(2bo)は肝臓ミクロソーム由来のシトクロムP450により酸化されることが知られており、2-イソプロポキシエタノール(2ip)については、この化学物質と類似した構造を持つエチレングリコールアルキルエーテル(EGAE)類は酸化されて生成する代謝物が原因となり、毒性を発現することが知られている。これらの化学物質をラットに投与した場合の脾臓の遺伝子発現変動パターンは、メトヘモグロビン血症を引き起こす化学物質のパターンと類似していたため、ヘモグロビンの酸化還元状態に何らかの関与をしている可能性を推察することができる。このことは、毒性発現の原因やメカニズムが既に分かっている化学物質を反復投与させた場合の遺伝子発現変動パターンを取得しておくことによって、毒性が未知の化学物質の生体に対する影響を推測できる可能性があることを示唆する。

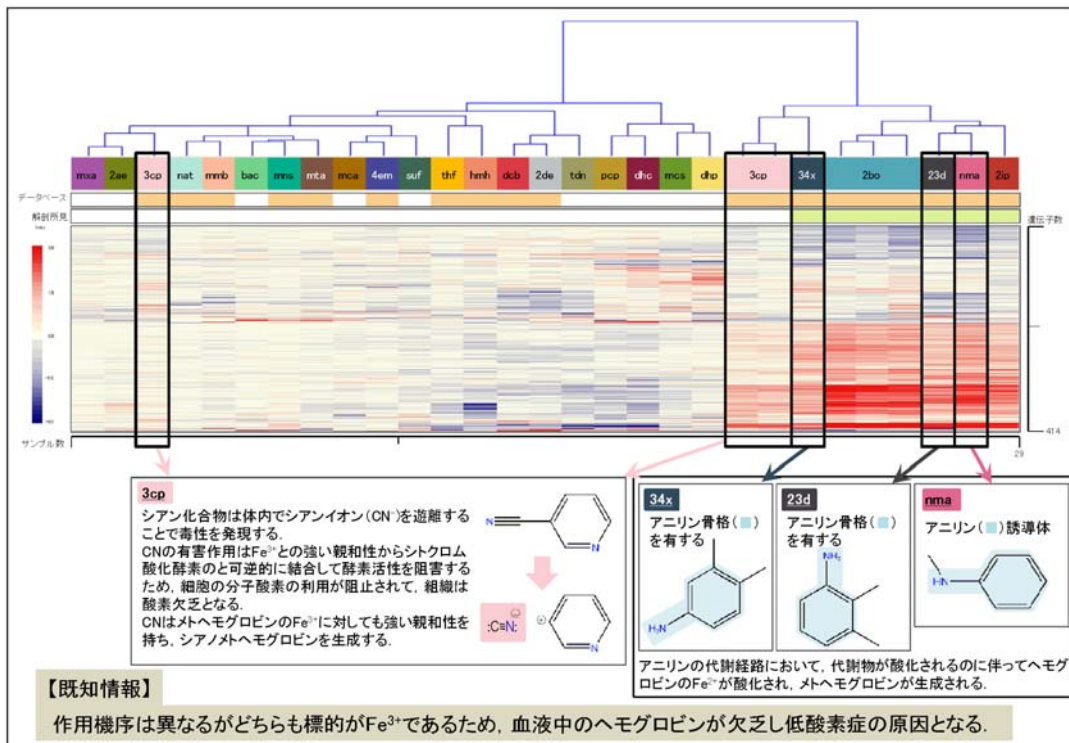


図 III.3-42 脾臓における遺伝子発現変動と投与化学物質との関係 (1)

脾臓における遺伝子発現変動パターンに基づくクラスタ分析の結果を示す。また、クラスタ分析の結果、同じ房に入っていた化学物質の特徴を示す。

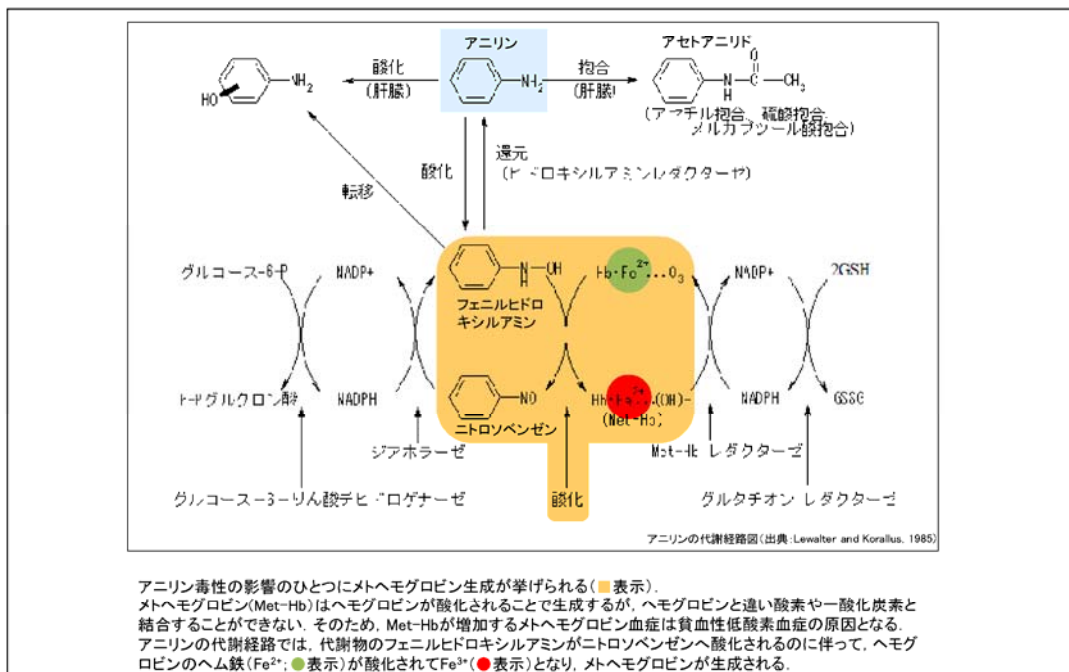


図 III.3-43 アニリンの代謝経路およびメトヘモグロビン生産の機構

アニリンの代謝経路とメトヘモグロビンの生成機構を模式的に示す。

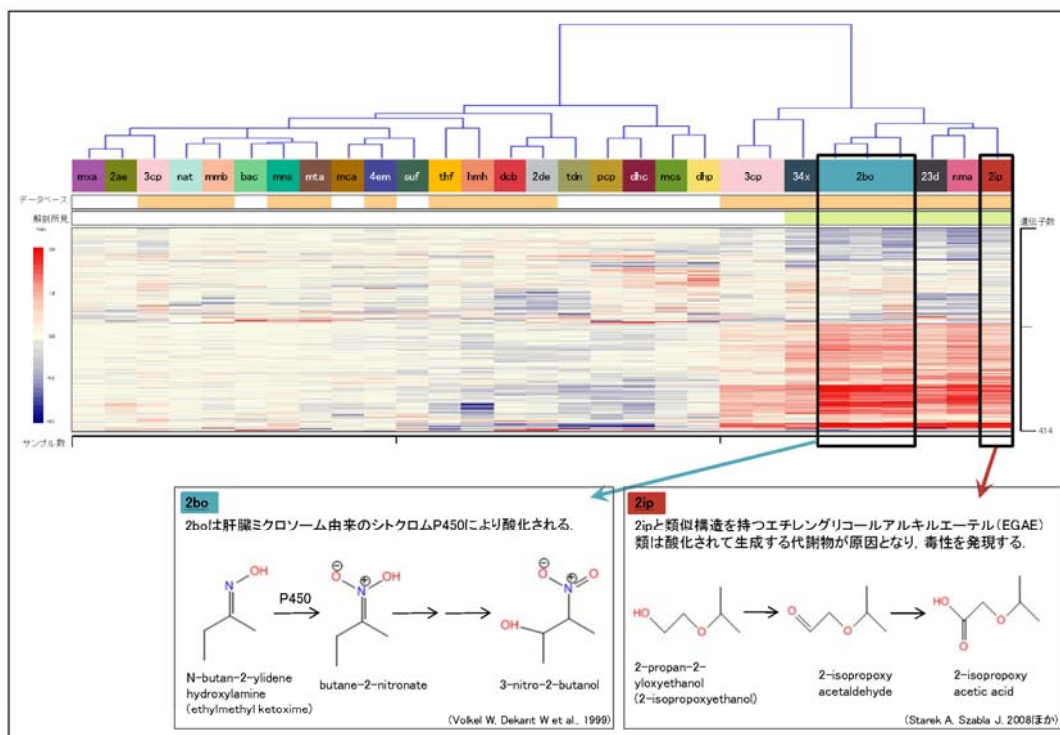


図 III.3-44 脾臓における遺伝子発現変動と投与化学物質との関係（2）

脾臓における遺伝子発現変動パターンに基づくクラスタ分析の結果を示す。また、クラスタ分析の結果、同じ房に入っていた化学物質の特徴を示す。

（3）まとめ

今回試みた結果から、単純に化学物質の構造のみに着目した場合のクラスタ分析の結果と、化学物質に曝露された生体の実際の応答（遺伝子発現変動）によるクラスタ分析の結果とは一部は一致していたものの、完全には一致していないことが判明した。このことは、化学物質が経口投与されて生体内に入った場合、その化学物質の構造的特徴が直接生体に影響を及ぼす場合もあると考えられるが、例えばその化学物質の代謝物や生体内の動態のように、化学物質の単純な構造とは関連が少ない場合もあり、一義的に化学物質の構造と生体応答が相関関係にはないことを示唆する。

＜生体応答遺伝子発現データセットの探索＞

前述のように、化学物質が生体に与える影響について複数の化学物質を相互に比較することは容易ではないことが、化学物質の有害性評価の課題の一つであった。一方、ゲノム学的手法を取り入れた網羅的遺伝子発現解析では、遺伝子発現レベルの変動という同一の指標を用い、かつ、10,000遺伝子以上の数値データを比較することができるため、実験者の主観等に左右されずに複数の化学物質間を比較できる可能性があった。そこで、われわれは、化学物質を28日間反復投与することにより生体内で発現変動した遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群で化学物質を分類できるか否かを検証した。

1. 脾臓における生体応答遺伝子発現データセット

(1) 脾臓において発現変動した遺伝子群の抽出

28日間反復投与実験後の剖検所見により脾腫が確認され、脾臓重量が対照群に比べて増加していた化学物質が複数存在した(図III.3-45)。特に2-ブタノンオキシム(2bo)、2-イソプロポキシエタノール(2ip)、ヒドラジーン水和物(hmh)、3,4-キシリジン(34x)、N-メチルアニリン(nma)、2,3-ジメチルアニリン(23d)、o-t-ブチルフェノール(tbp)の7種類(赤で囲んだもの)の化学物質を28日間反復投与したところ、他の化学物質(対照群を含む)に比べて脾臓相対重量が増加していた。そこで、脾臓においてそれぞれの化学物質と対照群との間でt検定を行い、発現レベルに有意な差(P値<0.01)があったもの、かつ、各群の平均値を算出し対照群との平均値の差が2倍以上の遺伝子(生体応答遺伝子)を抽出したところ、脾臓重量が増加していた7種類の化学物質のうち6種類の化学物質で遺伝子が抽出できた。なお、o-t-ブチルフェノール投与群(tbp)は1個体のみしか遺伝子発現プロファイルを取得していなかったため、t検定の対象とはしなかった。したがって、実質的には6種類のうち6種類(100%)の化学物質で生体応答遺伝子を抽出することができた。これらの生体応答遺伝子を統合したところ脾臓における生体応答遺伝子は553プローブ存在した(図III.3-46)。さらに、それぞれの化学物質を28日間反復投与したことにより発現変動した生体応答遺伝子の数と脾臓重量との関連性を調べたところ、それらはほぼ相関関係にあることが判明した(図III.3-47)。また、それらの生体応答遺伝子の発現変動パターン(生体応答遺伝子発現データセット)に基づいてクラスタ分析を行ったところ、28日間反復投与することによって脾臓重量が増大した化学物質について、それらの化学物質の投与による遺伝子発現変動パターンがそれぞれ類似しており、ほとんどのサンプルが同じ房を形成した(図III.3-48)。

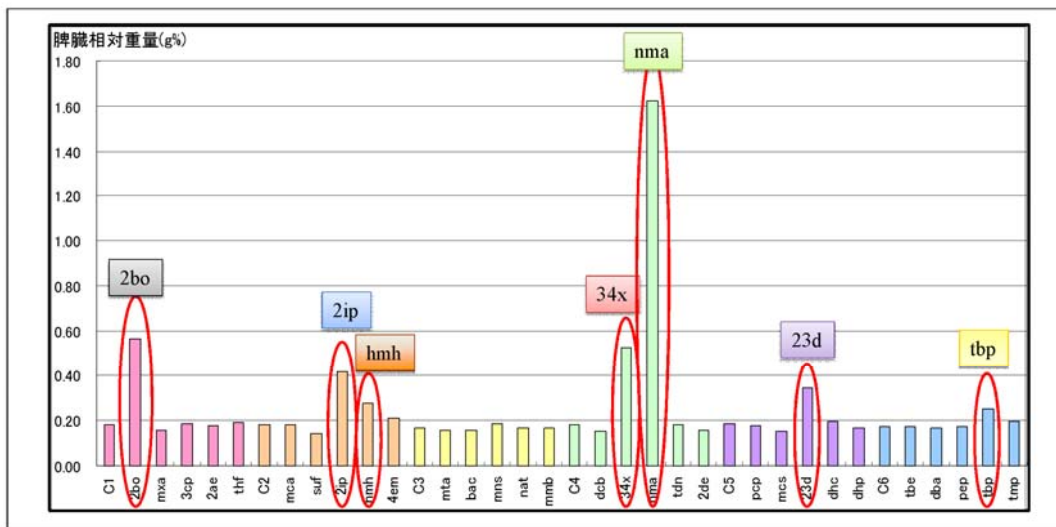


図 III.3-45 化学物質投与による脾臓重量の増加

各種化学物質を28日間反復投与した後の脾臓の重量(相対重量)をグラフに表す。横軸には化学物質を、縦軸には脾臓の相対重量の平均値を表している。また、赤で囲った部分は28日間反復投与により対照群に比べて脾臓の相対重量が著しく増加していた化学物質を示す。

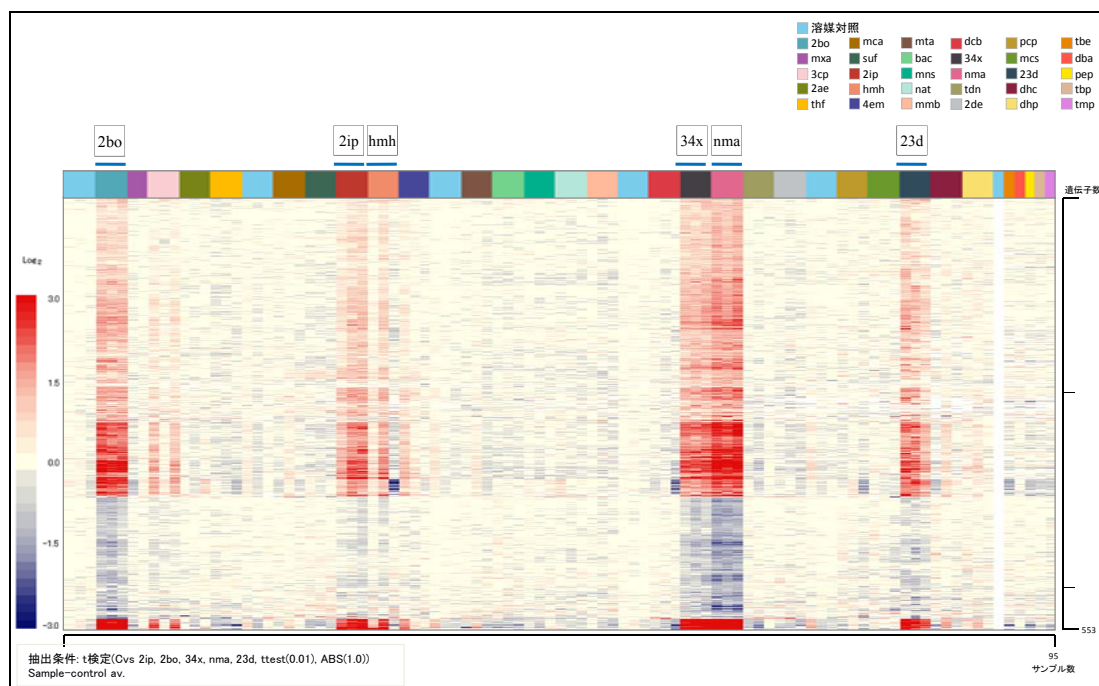


図 III.3-46 脾臓において発現変動した遺伝子群 (553プローブ)

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値<0.01) な差があり、かつ、対照群と化学物質投与群の平均値の差が 2 倍以上あった遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群を合わせて遺伝子方向のクラスタ分析をした結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

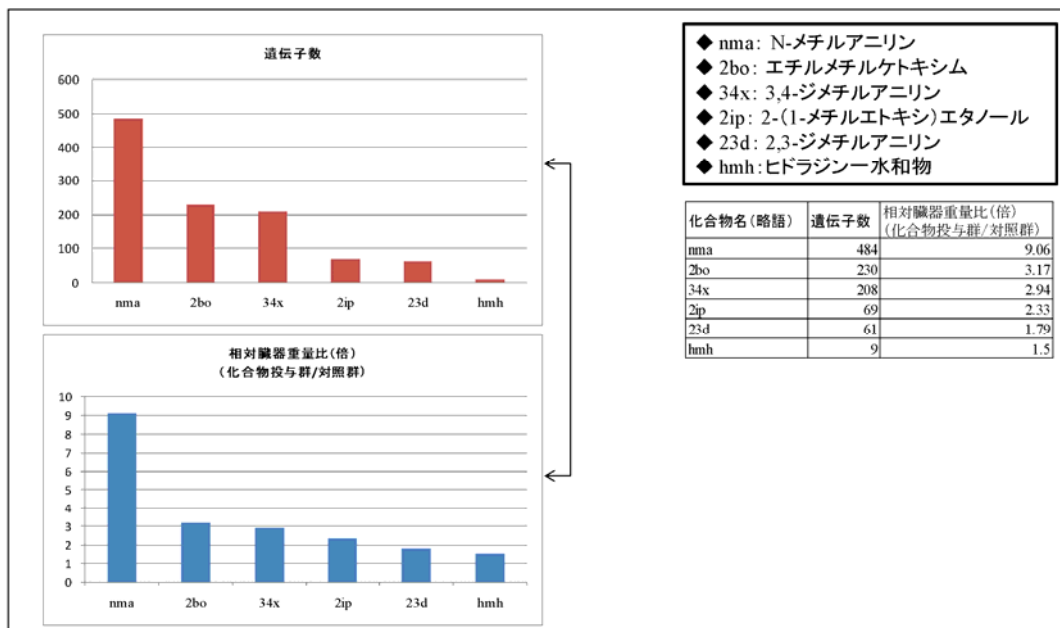


図 III.3-47 遺伝子発現レベルの変動と脾臓重量の関係

化学物質を28日間反復投与した後の脾臓重量と発現レベルが変動した遺伝子数とを比較した結果を示す。左上の棒グラフは化学物質を28日間反復投与したことにより発現レベルが著しく変動した化学物質において発現変動した遺伝子数を示しており、左下の棒グラフは化学物質を28日間反復投与したことにより脾臓の相対重量が著しく増加した化学物質において該脾臓の重量比(化学物質投与群/対照群)を示している。右上には、化学物質名およびその略号を記載し、右の表には化学物質を28日間反復投与したことにより発現レベルが著しく変動した化学物質において発現変動した遺伝子数および臓器重量の測定値を記載している。

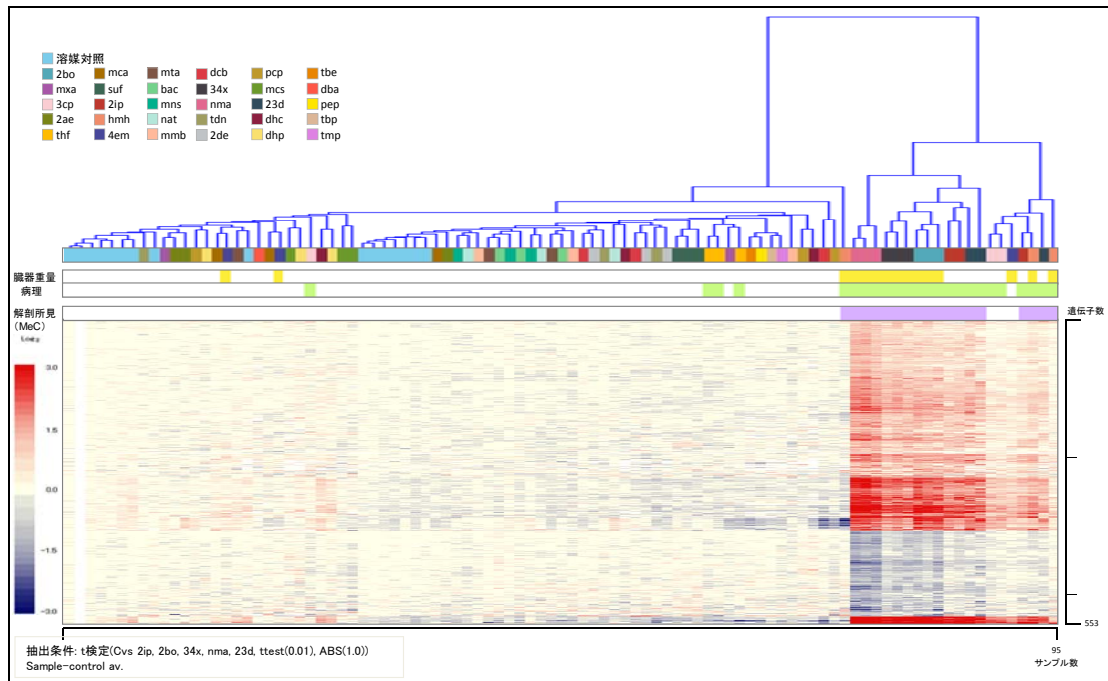


図 III.3-48 脾臓において発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

化学物質を28日間反復投与したことにより脾臓で発現変動した遺伝子群(553プローブ)によるクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。一番上のカラーバーは化学物質の別を示しており、その下のカラーバーは28日間反復投与により脾臓重量が著しく増加した化学物質を黄色で示しており、その下のカラーバーは28日間反復投与により病理組織学的に何らかの異常が認められたという報告のあった化学物質を緑で示しており、その下のカラーバーは本プロジェクトの28日間反復投与実験において解剖所見に何らかの異常があった化学物質を紫で示している。

(2) 脾臓における化学物質の有害性評価マーカー遺伝子の探索

前記(1)の結果のように、複数の化学物質において、28日間反復投与することにより類似する遺伝子発現変動が生じていたことから、これら複数の化学物質の28日間反復投与で共通して発現変動している遺伝子は脾臓毒性を評価する上で、有用なマーカーになり得ると考えた。そこで、前記553プローブの中から4つ以上の化学物質の28日間反復投与で共通して発現変動している遺伝子を抽出したところ、59プローブ存在した。この59プローブの発現変動パターンをもとにしてクラスタ分析を行ったところ、発現変動のある化学物質と発現変動のない化学物質をより明確に区別することが可能となった(図III.3-49)。

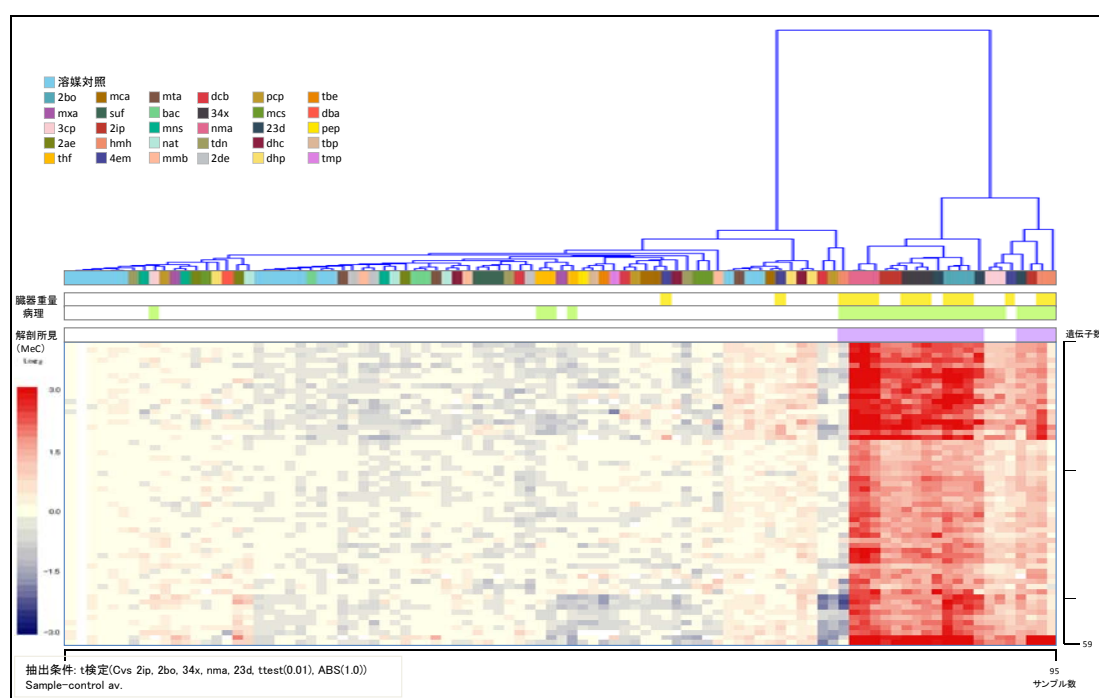


図 III.3-49 生体応答遺伝子発現データセット Sp-1 (59プローブ) によるクラスタ分析

図 III.3-48 の遺伝子群 (553プローブ) の中から4種類以上の化学物質の28日間反復投与により共通して発現変動している遺伝子群を抽出し (59プローブ)、それらをもとにしたクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(3) 遺伝子発現変動に個体差がある場合

前記553プローブに該当する遺伝子群の発現変動パターンを見ると、3個体中1個体だけ、あるいは3個体中2個体に発現変動していた化学物質が存在した。例えば、ヒドラジン-水和物投与群 (hmh) は3個体中1個体で発現レベルが変動していた。この個体について他の項目について比較してみたところ、脾臓重量は他の個体と差はなかったが (図 III.3-50)、体重増加割合が最も小さかった個体であった (図 III.3-51)。

さらに、3個体中2個体で発現レベルが変動していた例として、3-シアノピリジン投与群 (3cp) が存在した。これらの個体の脾臓重量は対照群と差がなかったが (図 III.3-52)、これらの個体は他の臓器 (回腸) で出血痕などの異常が確認された個体と一致した。

化学物質を反復投与した場合、化学物質に対する感受性は個体間によって異なることはよく知られており、既存化学物質毒性データベースでも個体差のあることは報告されている。これらの結果は、ゲノム学的手法を用いた遺伝子発現変動解析は化学物質の感受性に個体差があるものも検出できる可能性があることを示している。

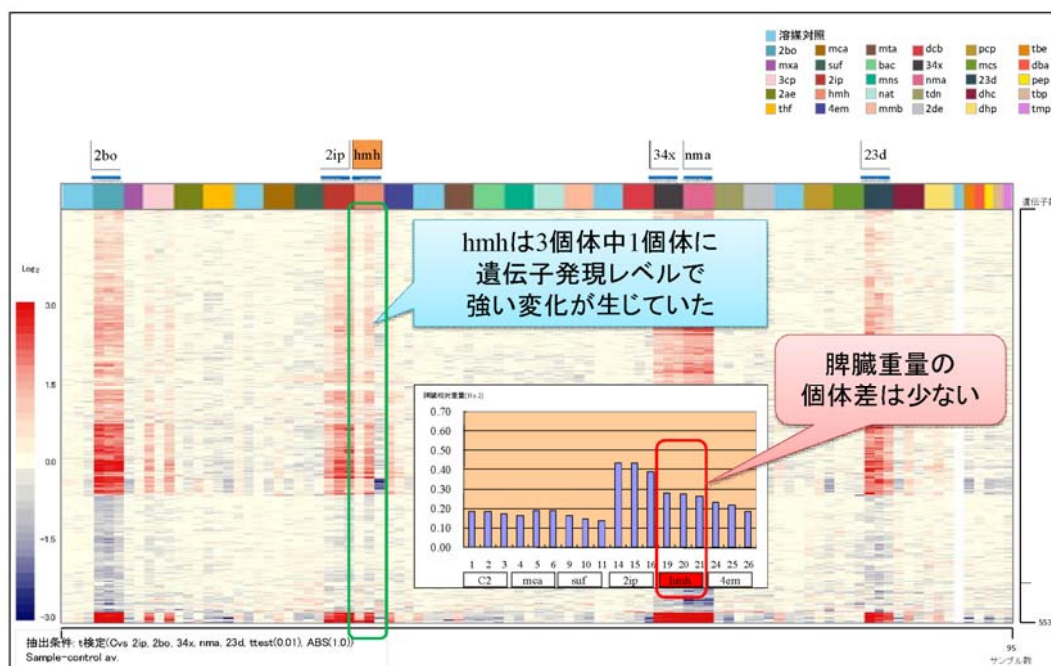


図 III.3-50 遺伝子発現レベルで個体差が大きなサンプル (hmh) の脾臓重量

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値 < 0.01) な差のあった遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群を合わせて遺伝子方向のクラスタ分析をした結果を示す。そのなかで個体差が大きなサンプルが存在した (例: ヒドラジン-水和物投与群 [hmh])。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

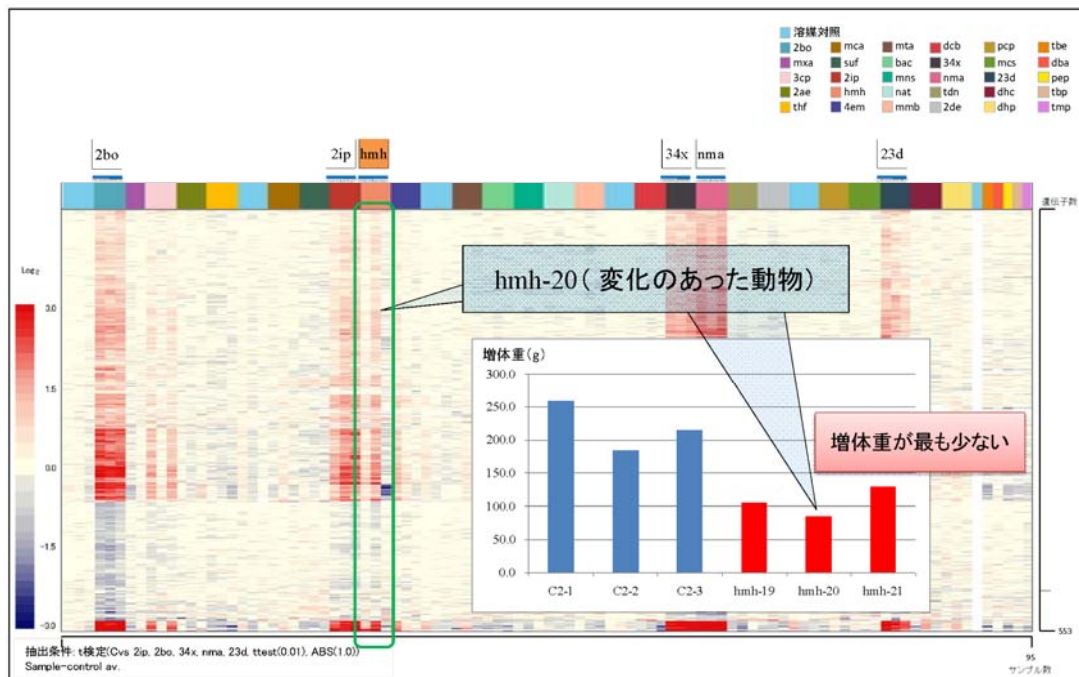


図 III.3-51 遺伝子発現レベルで個体差が大きなサンプル (hmh) の体重変動

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値 < 0.01) な差のあった遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群を合わせて遺伝子方向のクラスタ分析をした結果を示す。また、ヒドラジン-水和物投与群 (hmh) の 3 個体の体重増加の測定値と比較した。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

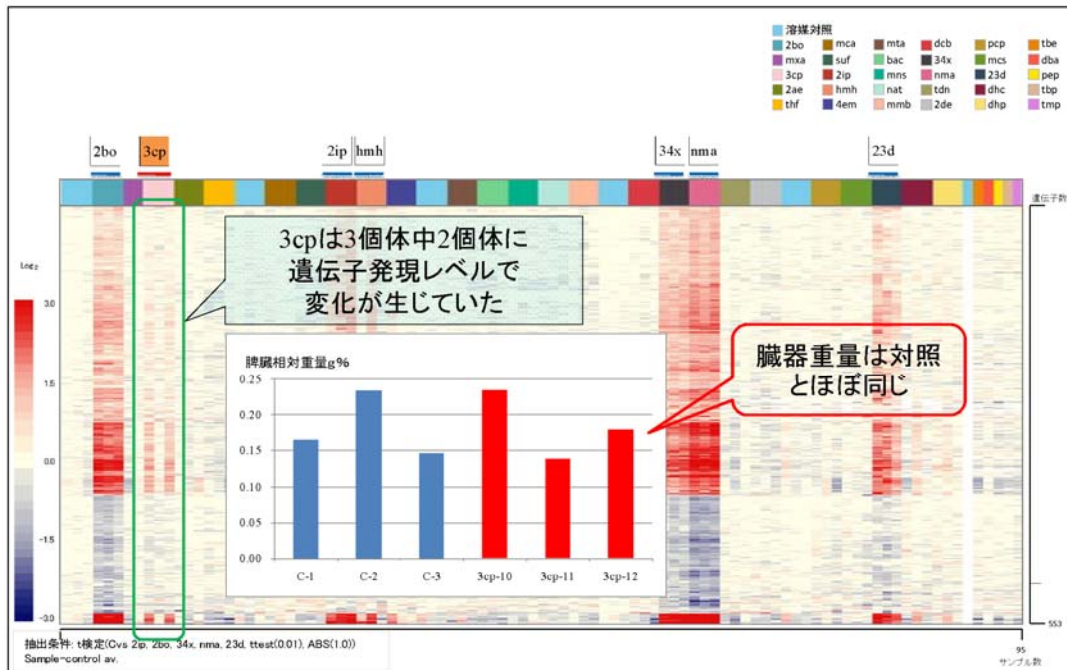


図 III.3-52 遺伝子発現レベルで個体差が大きなサンプル (3cp) の臓器重量

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値<0.01) な差のあった遺伝子群を抽出し、それらの遺伝子群を合わせて遺伝子方向のクラスタ分析をした結果を示す。また、3-シアノピリジン投与群 (3cp) の 3 個体の体重増加の測定値と比較した。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(4) 従来の毒性試験結果をもとにした遺伝子発現解析

遺伝子発現変動解析の結果と既存化学物質毒性データベースで報告されている結果との比較を行ったところ、データベース上で病理組織学的に何らかの異常が生じていた化学物質投与群と遺伝子発現変動が生じていた化学物質投与群がほぼ一致した (図 III.3-53)。しかし、テトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) は既存化学物質毒性データベースでは病理で「異常あり」という結論であったが、少なくとも本プロジェクトで特定した 5 5 3 プローブでは発現変動は明確ではなかった。このことから、テトラヒドロフルフリルアルコール (thf) は他の化学物質とは異なる影響を及ぼしている可能性があると考えた。そこで、テトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) のみに着目して発現レベルが変動している遺伝子群を抽出したところ、3 個体中 2 個体で発現レベルが変動している 4 6 プローブ (生体応答遺伝子発現データセット Sp-2) を特定することに成功した (図 III.3-54)。この生体応答遺伝子発現データセット Sp-2 はテトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) の 2 個体と他を区別することができるものである。この結果は、テトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) に個体差が生じていることを意味し、また、テトラヒドロ

フルフリルアルコール (thf) が他の化学物質と性質が異なるため遺伝子発現レベルの影響も異なっている可能性を示唆する。

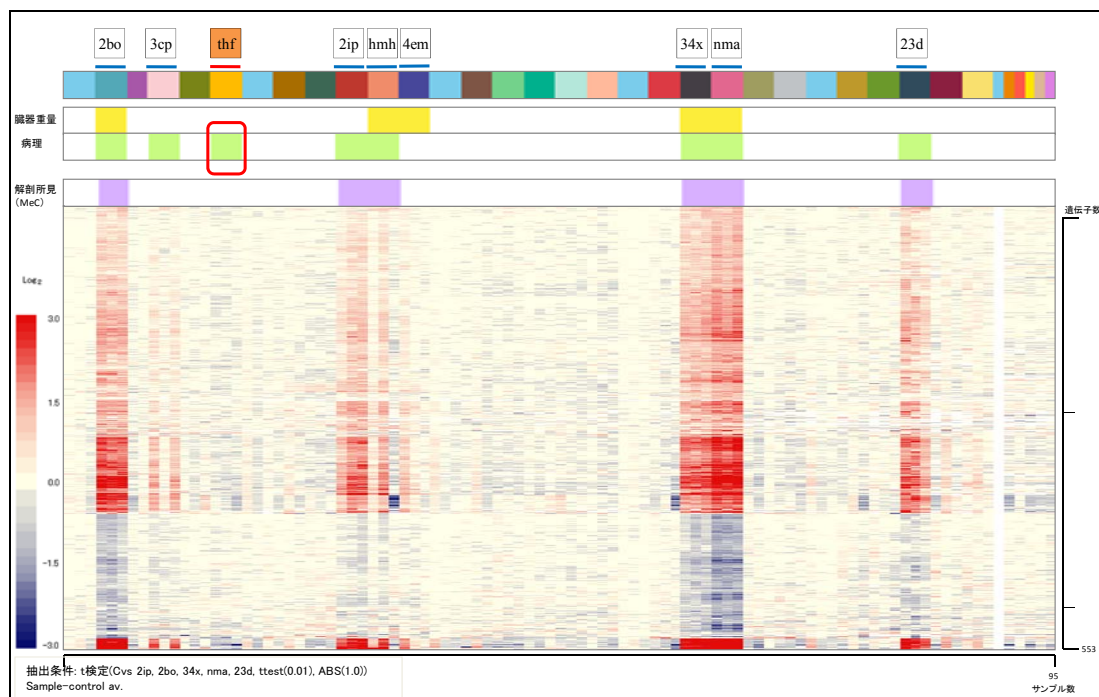


図 III.3-53 既存化学物質毒性データベースで報告された所見との比較

一番上のカラーバーは化学物質の別を表しており、その下のカラーバーは脾臓重量が対照群と比較して増加していたサンプルを黄色で表しており、その下のカラーバーは既存化学物質毒性データベース（国立医薬品食品衛生研究所）で病理学的に何らかの異常が認められたサンプルを緑色で表しており、その下のカラーバーは本プロジェクトで行った解剖時の所見で脾臓に何らかの異常を認めたものを紫色で表している。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

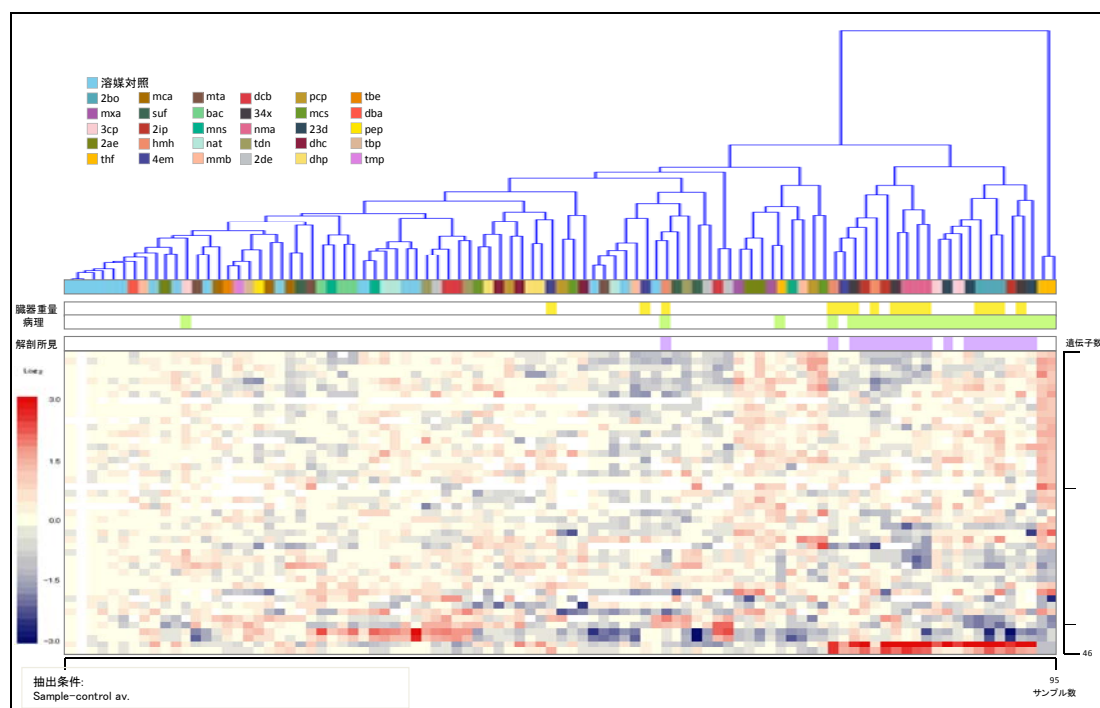


図 III.3-54 生体応答遺伝子発現データセット Sp-2 (46プローブ) によるクラスタ分析
 テトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) の2個体で発現レベルが変動していた遺伝子群 (46プローブ) によるクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(5) まとめ

脾臓において、化学物質を28日間反復投与により複数の化学物質投与群で類似した遺伝子発現変動したことは、本プロジェクトで扱った化学物質が脾臓に与える遺伝子発現変動への影響には多様性が低く、それらの影響を与える化学物質は類似した性質を有していることを意味する。また、動物実験は個体差が生じることは良く知られているため、遺伝子発現変動解析を行う場合、個体差が生じた場合の対処法も重要であることを認識した。さらに、これらの結果は、本プロジェクトで抽出した生体応答遺伝子発現データセットを指標とすることで、化学物質が脾臓に対して与える影響を検出できる可能性があることを示唆している。

2. 肝臓における生体応答遺伝子発現データセット

(1) はじめに

本プロジェクトで使用した化学物質を28日間反復投与することによる脾臓への影響は類似したものが多く、変化の多様性が必ずしも高くなかった。一方、遺伝子発現変動解析の結果、肝臓は脾臓に比べて遺伝子発現変動パターンが相互に相違している例が多かった(図 III.3-55)。この結果は、肝臓は脾臓に比べて、化学物質の反復投与による生体応答の多様性が高いことを示している。そこで、我々は、いくつかの方法を用いて肝臓における生体応答遺伝子発現データセットの探索を行った。

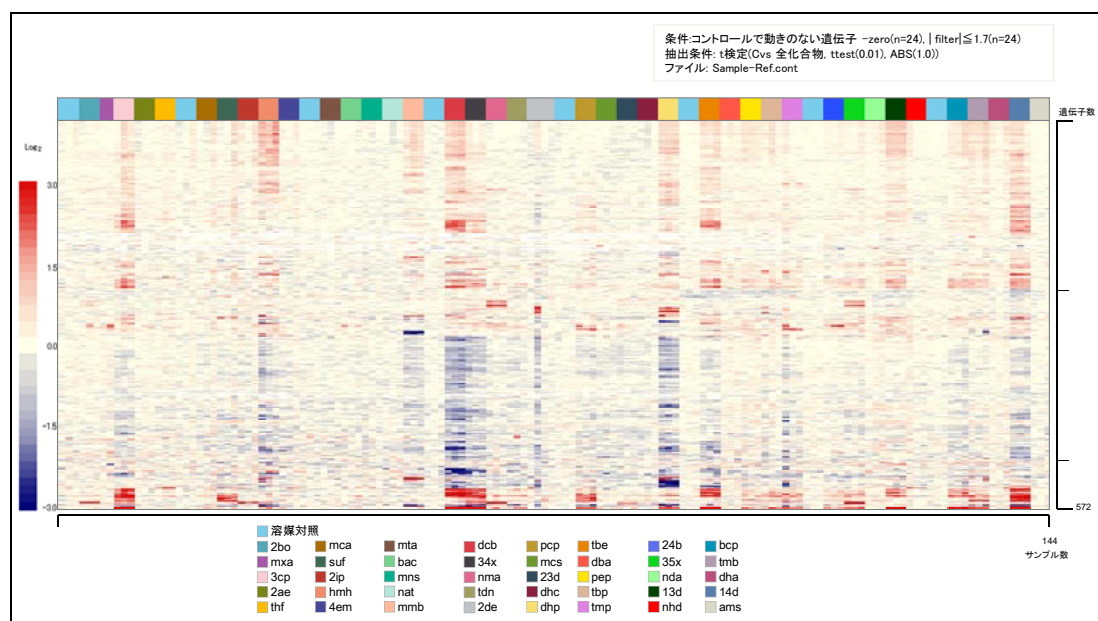


図 III.3-55 肝臓における化学物質投与群の横並び比較

対照群と比較して発現レベルが変動した遺伝子群(572プローブ)の発現変動パターンを用いて遺伝子方向にクラスタ分析した結果を示す。上のカラーバーは化学物質の別を示している。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(2) 生体応答遺伝子発現データセットの探索(t検定)

化学物質の毒性を評価する上で最もよく研究されている臓器は肝臓である。我々は、それぞれの化学物質と対照群との間でt検定を行い、発現レベルに有意な差(P値<0.01)があったもの、かつ、各群の平均値を算出し両者の平均値の差が2倍以上の遺伝子(生体応答遺伝子)を抽出した。その結果、化学物質ごとに抽出されてくる遺伝子数にはばらつきがあり、最も多いo-ジクロロベンゼン投与群で212プローブ、少ないものでは0プローブであった(図 III.3-56)。また、抽出された遺伝子数は、既存化学物質毒性データベースの所見と相関があり、所見があるものは遺伝子数が多く、所見がないものは少ない傾向にあった。

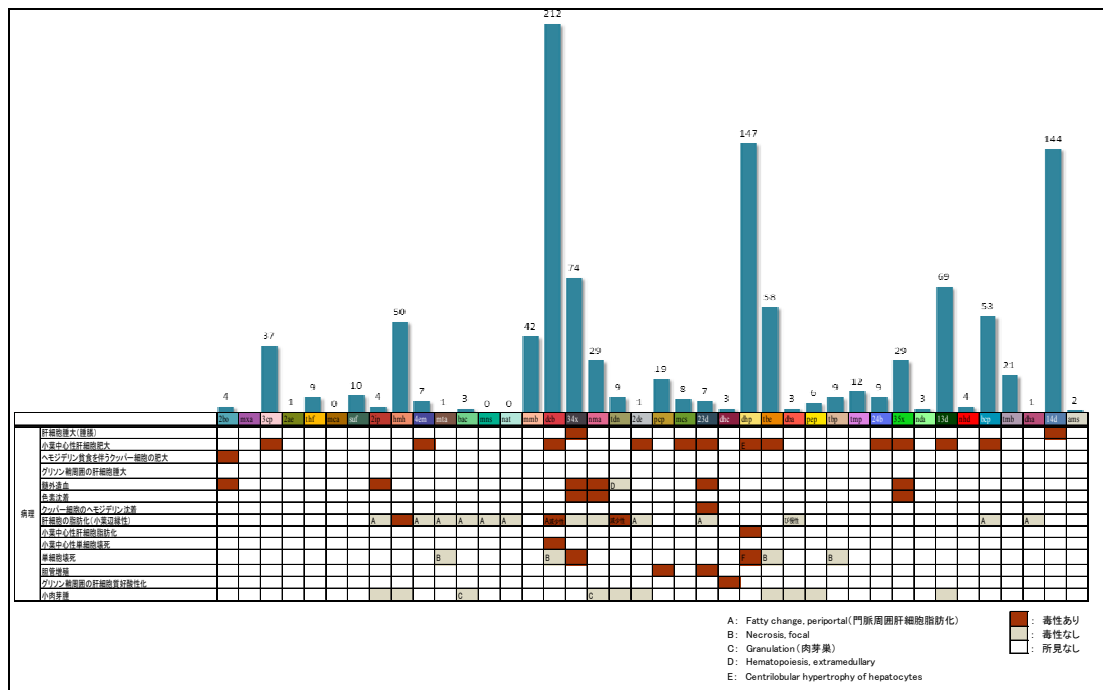


図 III.3-56 t 検定による 2 群比較により抽出した遺伝子数と従来の毒性試験法による結果との比較

それぞれの化学物質と対照群との間で t 検定を行い、発現レベルに有意な差 (P 値 < 0.01) があつたもの、かつ、各群の平均値を算出し両者の平均値の差が 2 倍以上の遺伝子を抽出し、その数を棒グラフにして示す。また、その下の表は、それぞれの化学物質に関して、既存化学物質毒性データベースに記載している臓器毒性に関するキーワードを抽出し、対象臓器に何らかの変化が生じている場合には、該当項目を色を付けて表している。

それぞれの化学物質の 28 日間反復投与により発現変動のあつた前記遺伝子群の発現データに基づきクラスタ分析を行うことにより、我々は、化学物質の分類ができる 24 種類の生体応答遺伝子発現データセットを取得した。以下に、これらの生体応答遺伝子発現データセットに基づいてクラスタ分析を行った結果を示す (図 III.3-57~80)。これらのクラスタ分析の結果、生体応答遺伝子群の発現変動パターンの類似性によって、化学物質投与群がいくつかの房を形成した。また、対象となった化学物質投与群と同じ房を形成する他の化学物質投与群が存在するケースが多かつた。

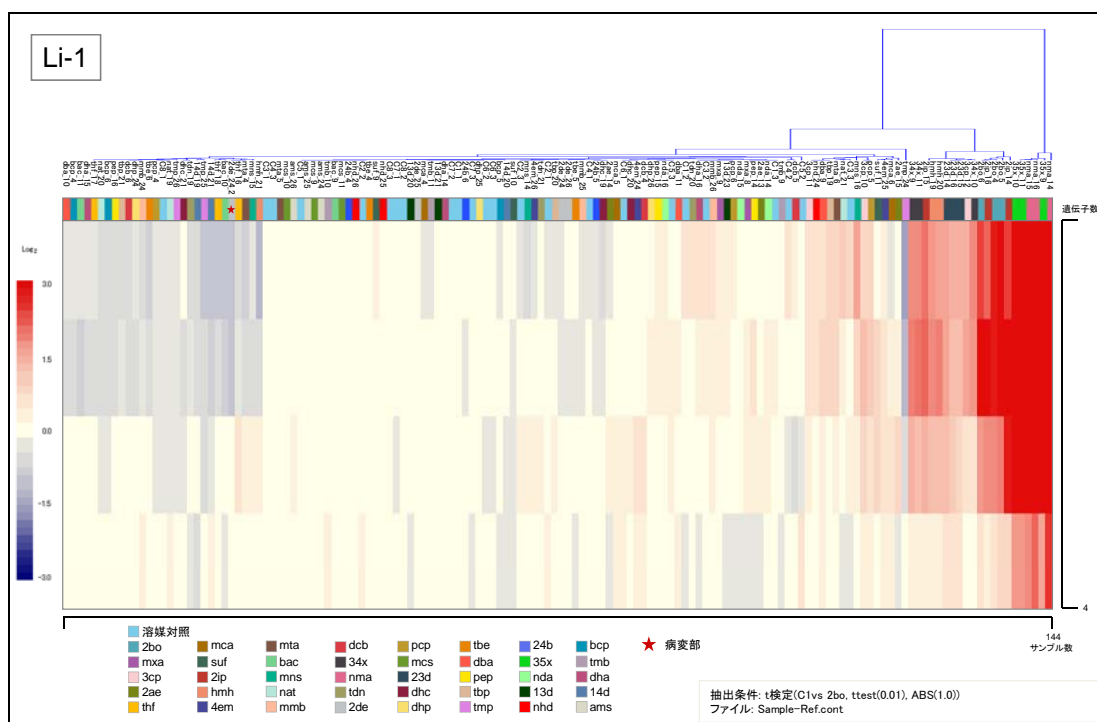


図 III.3-57 2-ブタノンオキシム投与群 (2bo) で発現変動した遺伝子群 Li-1 (4プローブ)

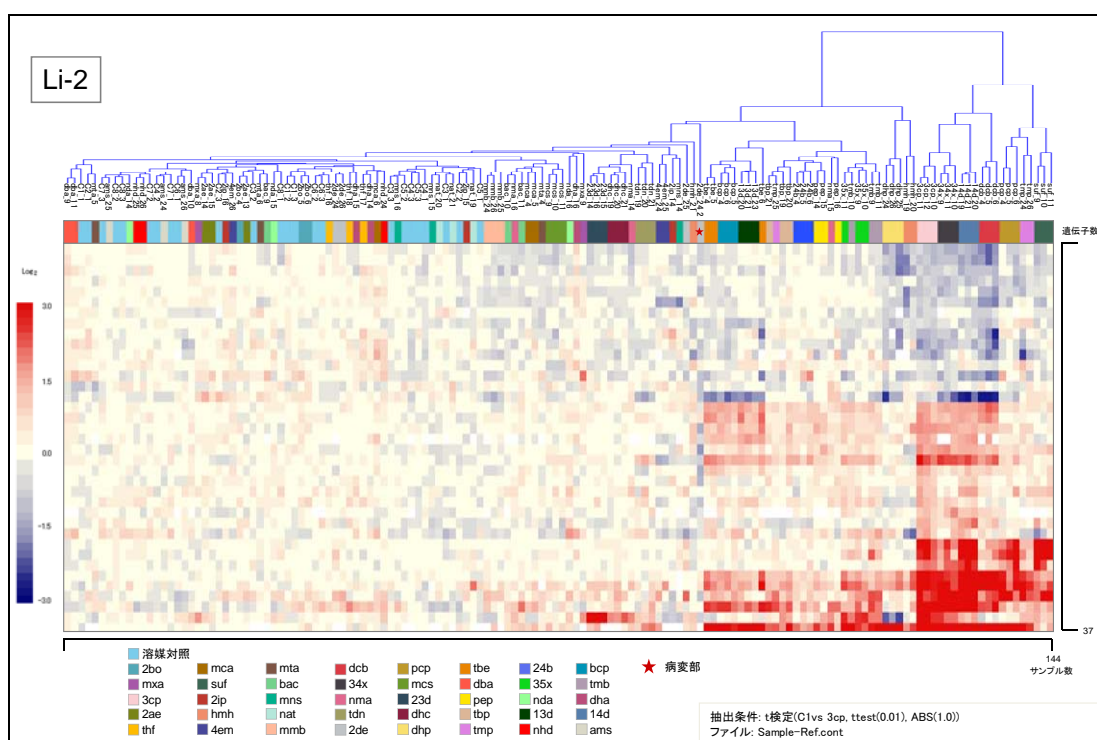


図 III.3-58 3-シアノピリジン投与群 (3cp) で発現変動した遺伝子群 Li-2 (37プローブ)

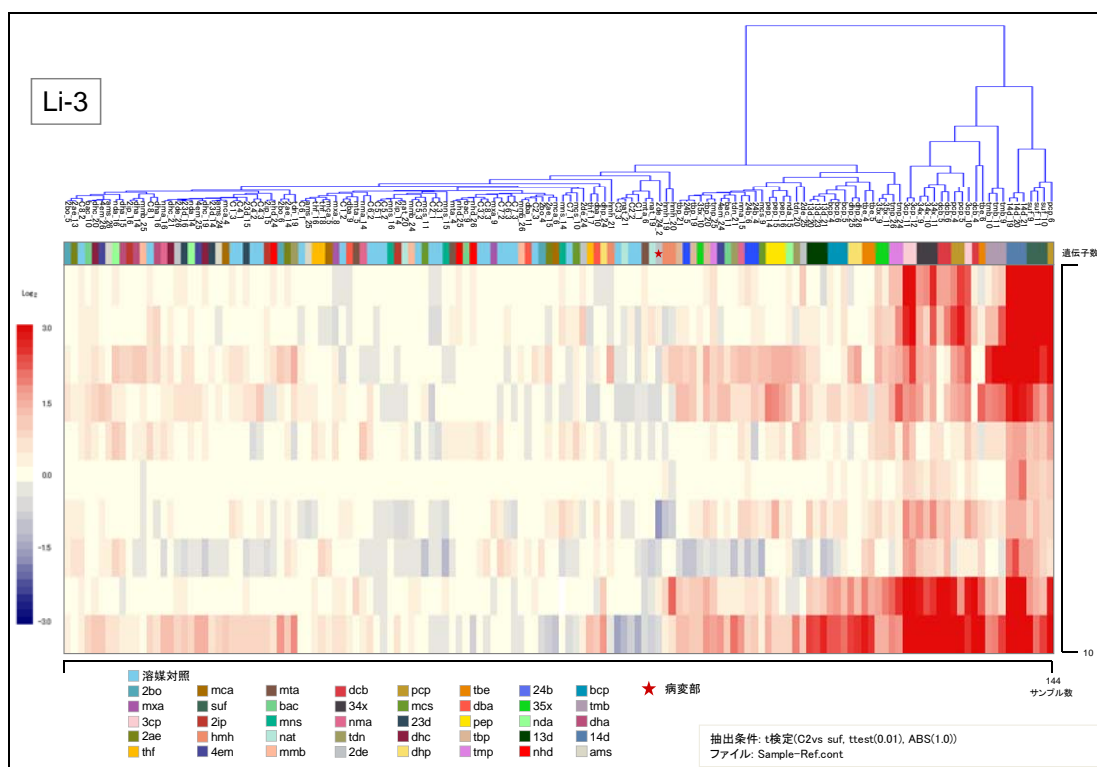


図 III.3-59 スルホラン投与群 (suf) で発現変動した遺伝子群 Li-3 (10プローブ)

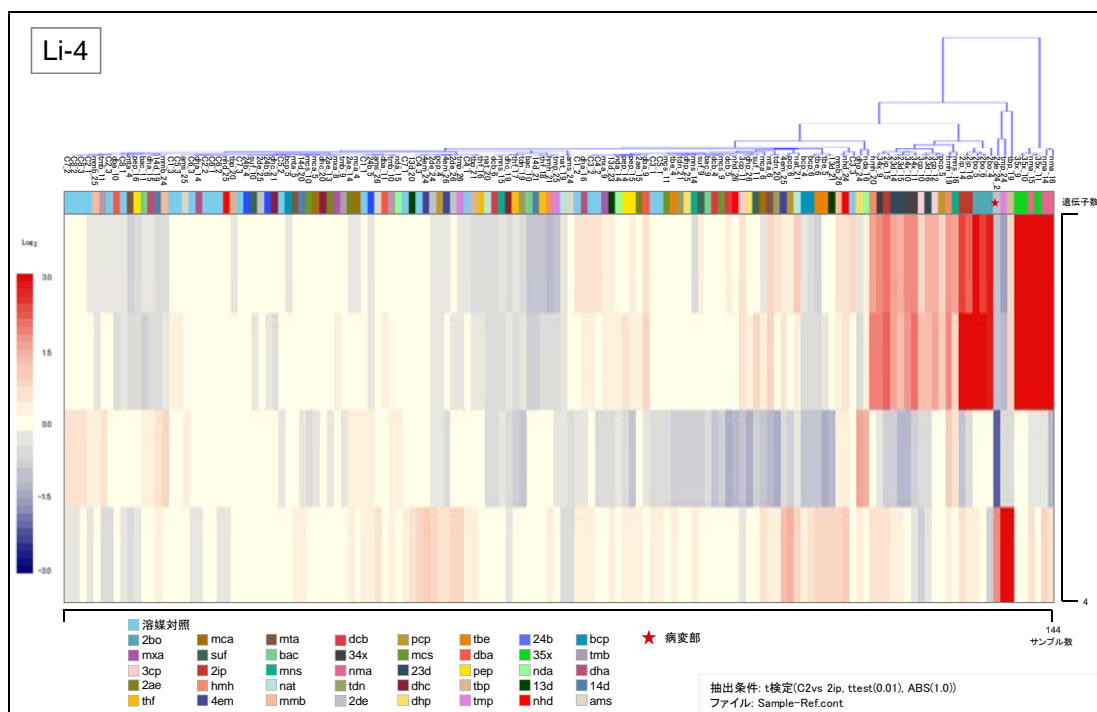


図 III.3-60 2-イソプロポキシエタノール投与群 (2ip) で発現変動した遺伝子群 Li-4 (4プローブ)

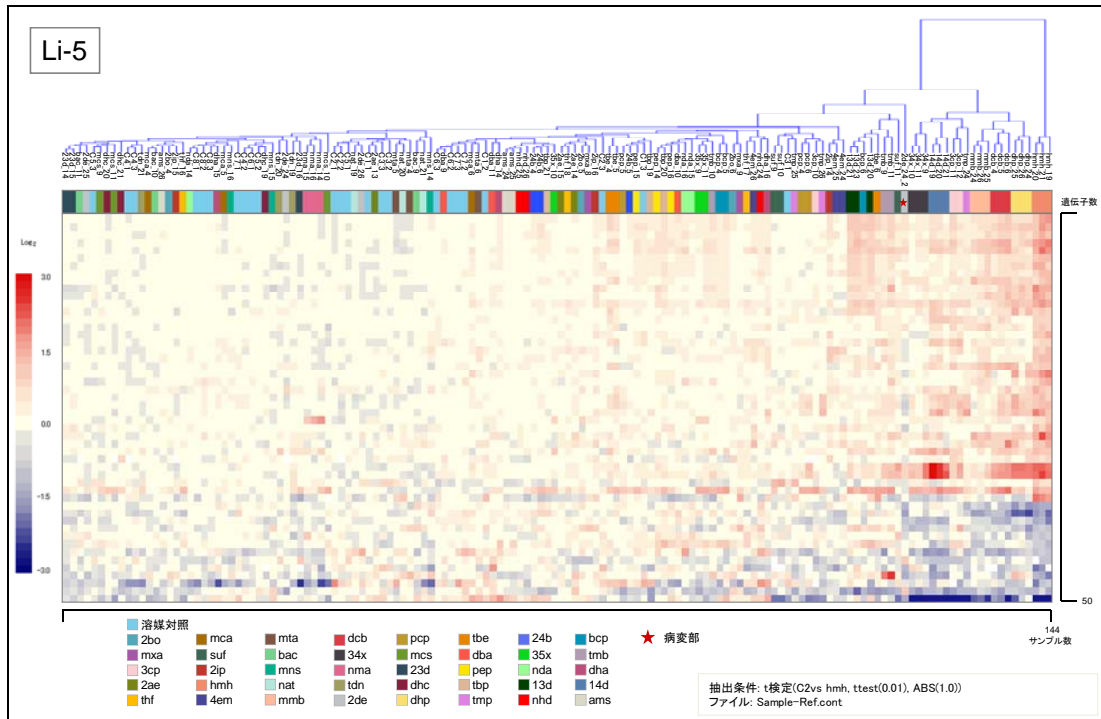


図 III.3-61 ヒドラジンー水和物投与群 (hmh) で発現変動した遺伝子群 Li-5 (50プローブ)

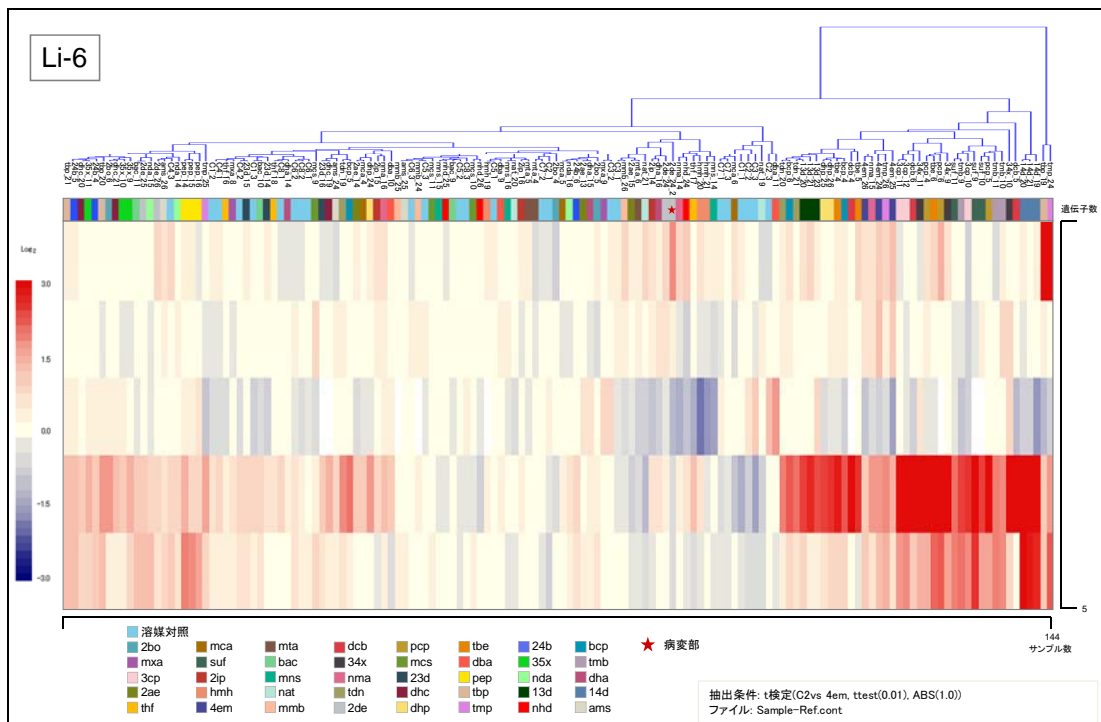


図 III.3-62 4-エチルモルホリン投与群 (4em) で発現変動した遺伝子群 Li-6 (5プローブ)

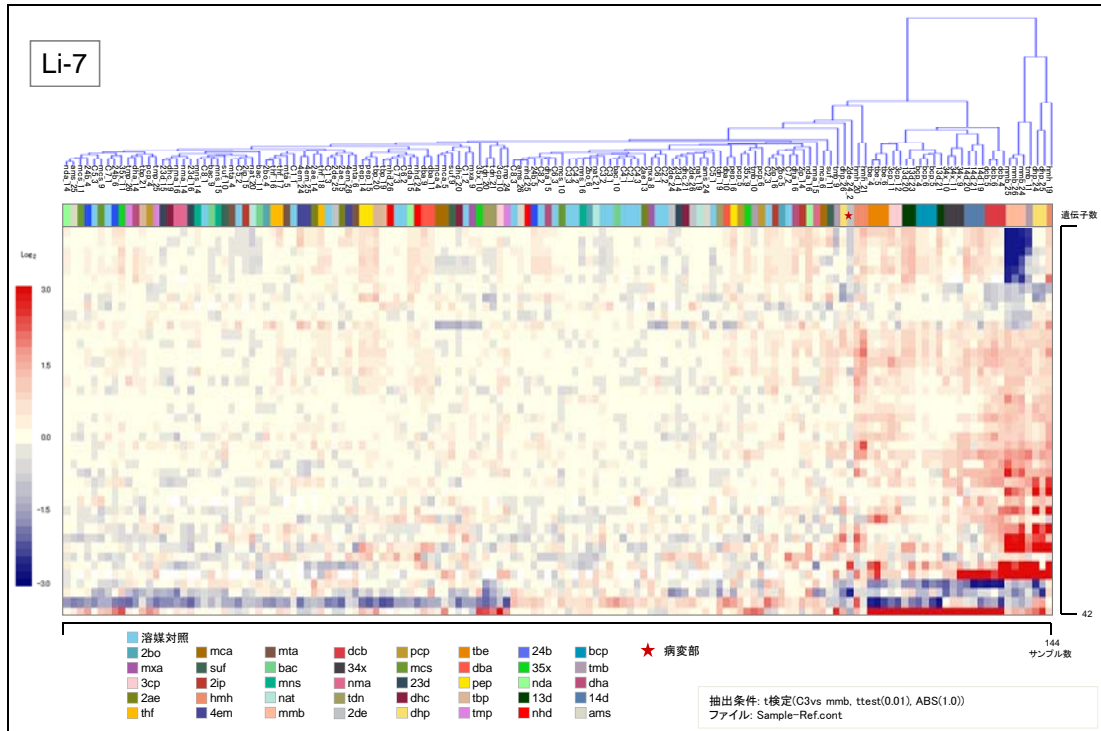


図 III.3-63 3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群 (mmb) で発現変動した遺伝子群 Li-7 (42プローブ)

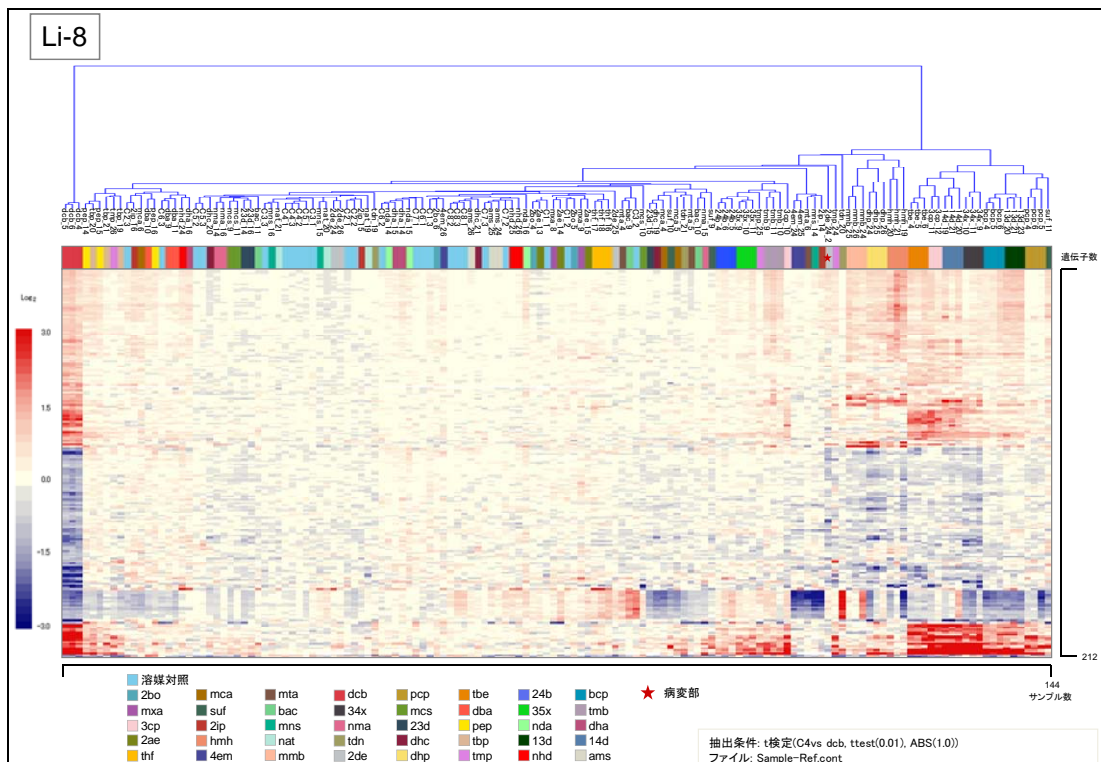


図 III.3-64 o-ジクロロベンゼン投与群 (dcb) で発現変動した遺伝子群 Li-8 (212プローブ)

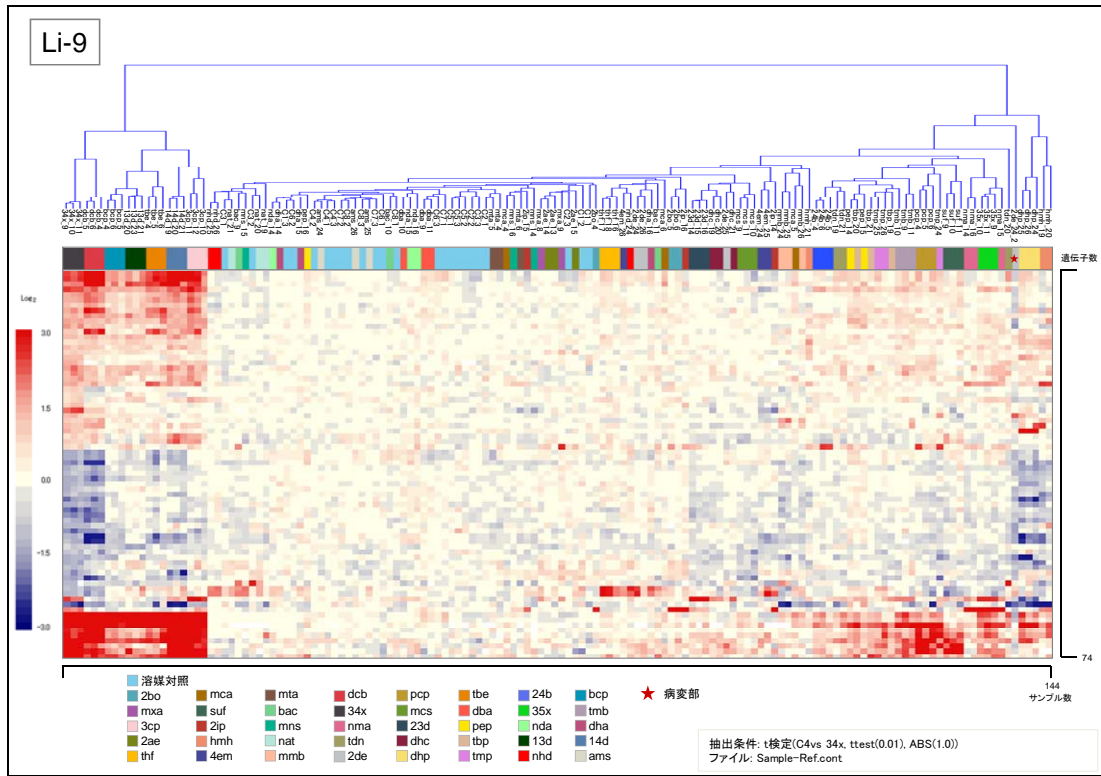


図 III.3-65 3,4-キシリジン投与群 (34x) で発現変動した遺伝子群 Li-9 (74プローブ)

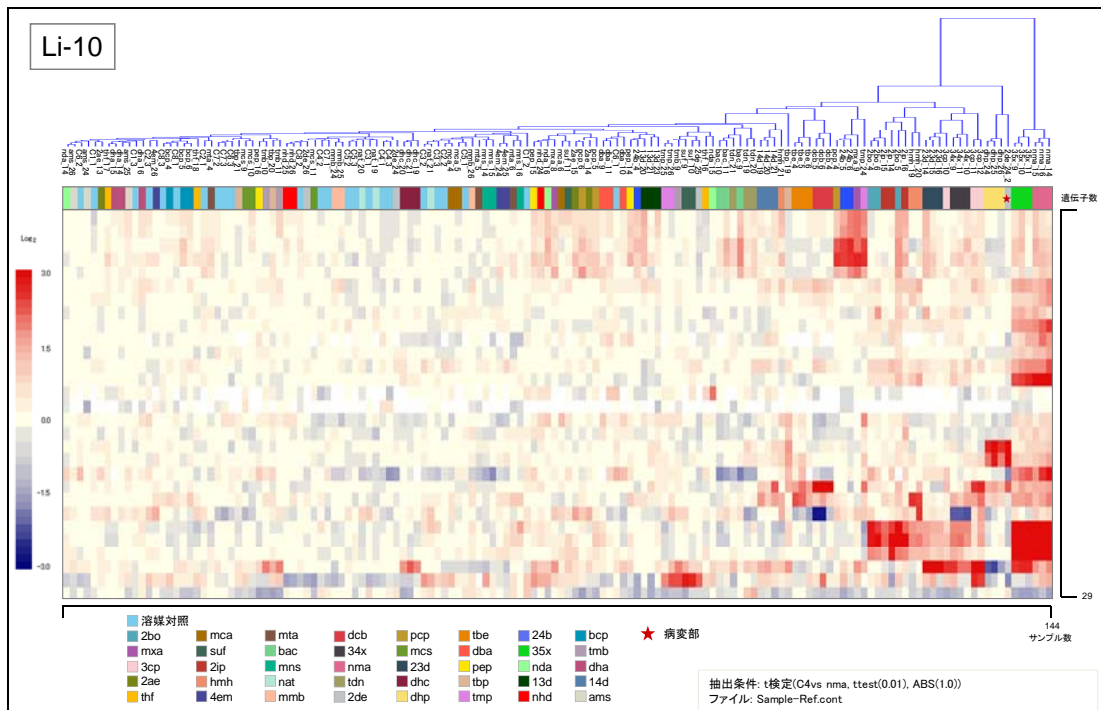


図 III.3-66 N-メチルアニリン投与群 (nma) で発現変動した遺伝子群 Li-10 (29プローブ)

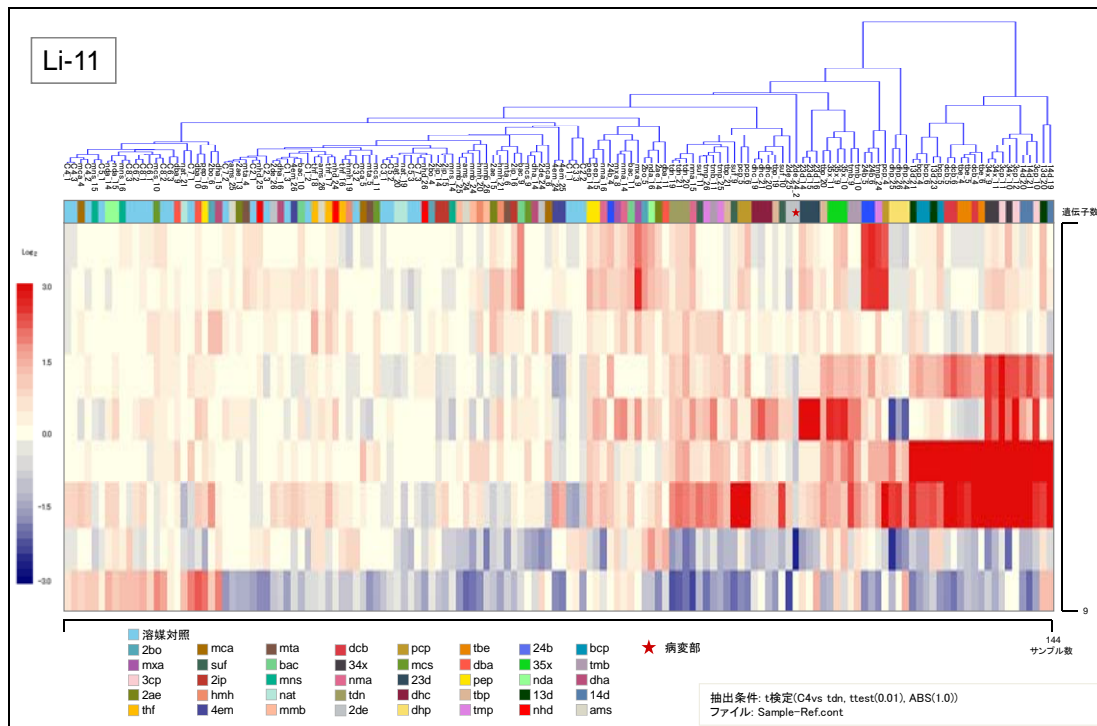


図 III.3-67 トリレンジイソシアナート投与群 (tdn) で発現変動した遺伝子群 Li-11 (9プローブ)

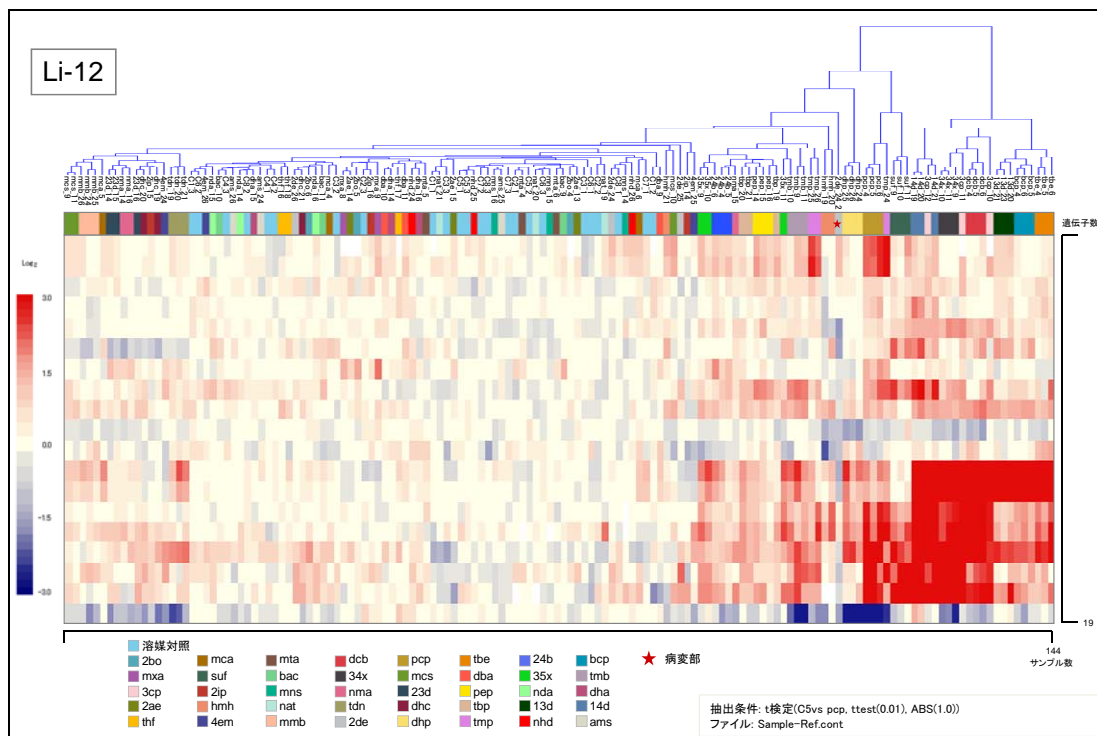


図 III.3-68 p-クミルフェノール投与群 (pcg) で発現変動した遺伝子群 Li-12 (19プローブ)

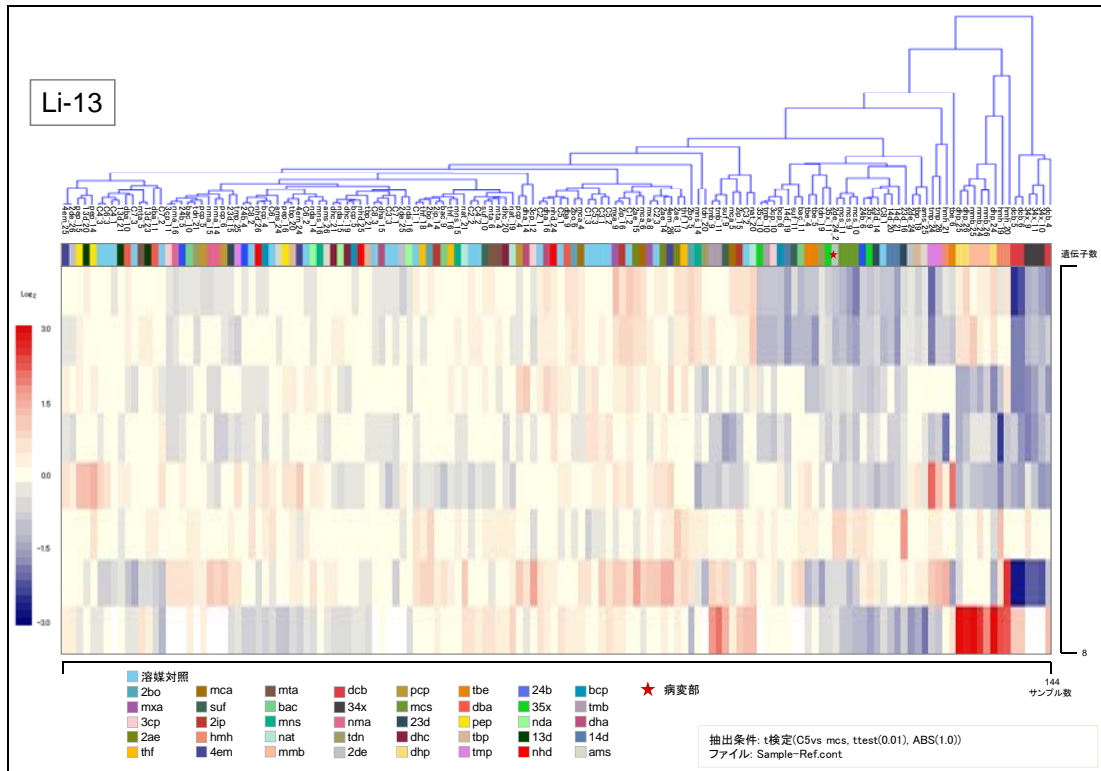


図 III.3-69 m-クレゾール投与群 (mcs) で発現変動した遺伝子群 Li-13 (8プローブ)

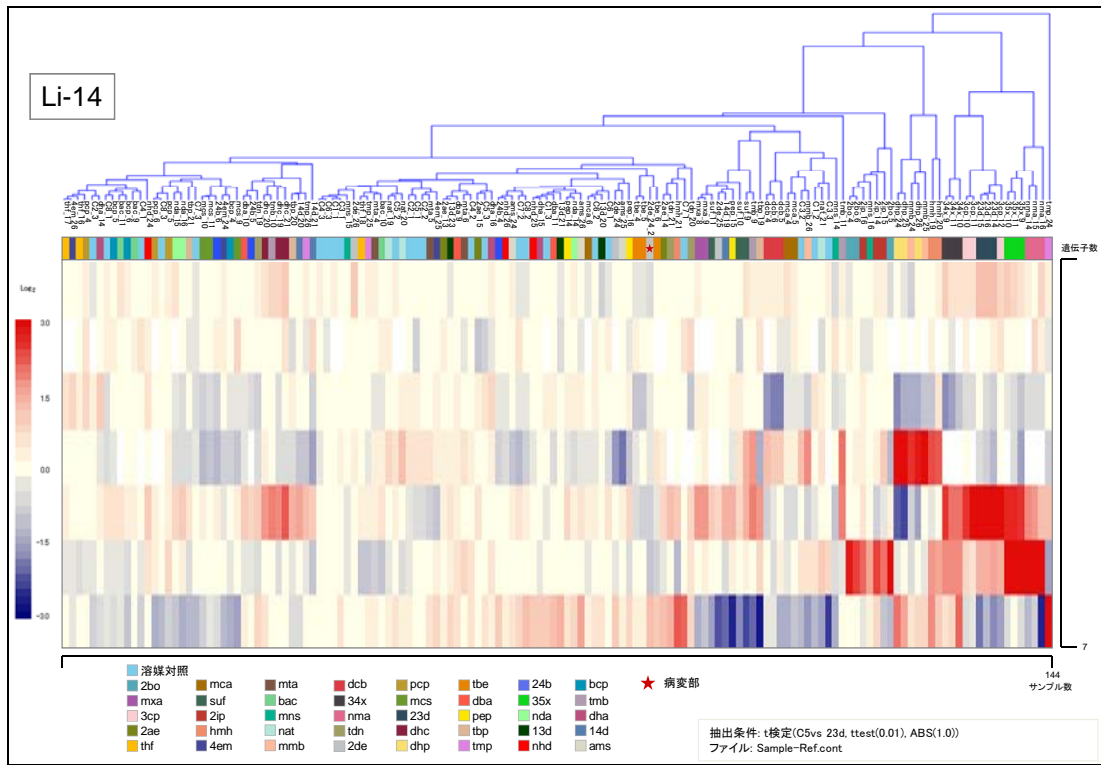


図 III.3-70 2,3-ジメチルアニリン投与群 (23d) で発現変動した遺伝子群 Li-14 (7プローブ)

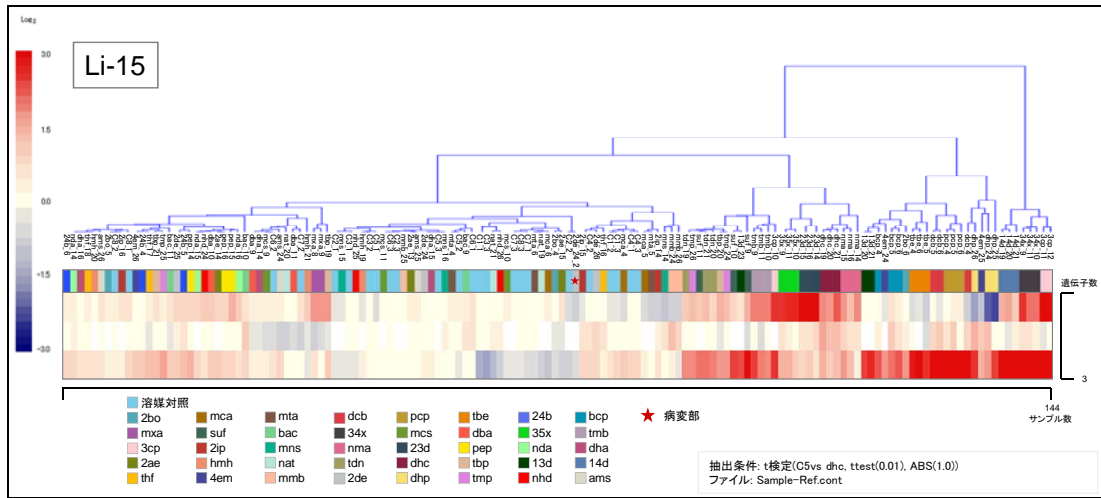


図 III.3-71 N,N'-ジシクロロヘキシルカルボジイミド投与群 (dhc) で発現変動した遺伝子群 Li-15 (3プローブ)

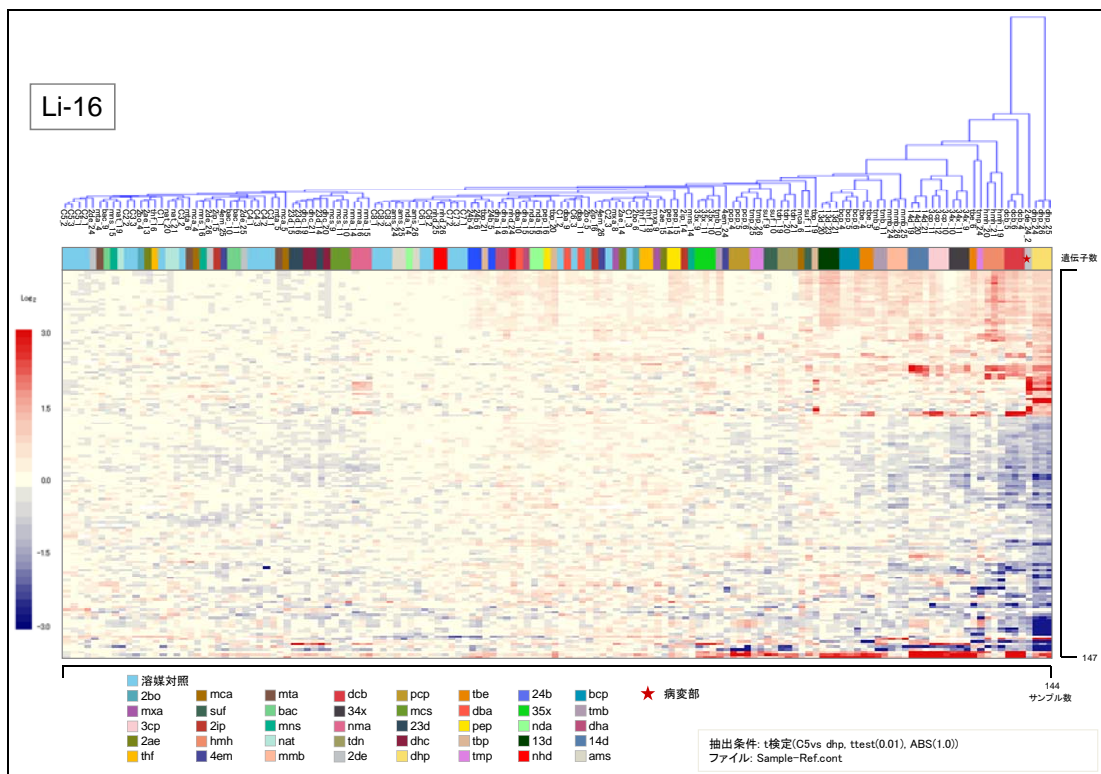


図 III.3-72 フタル酸ジヘプチル投与群 (dhp) で発現変動した遺伝子群 Li-16 (147プローブ)

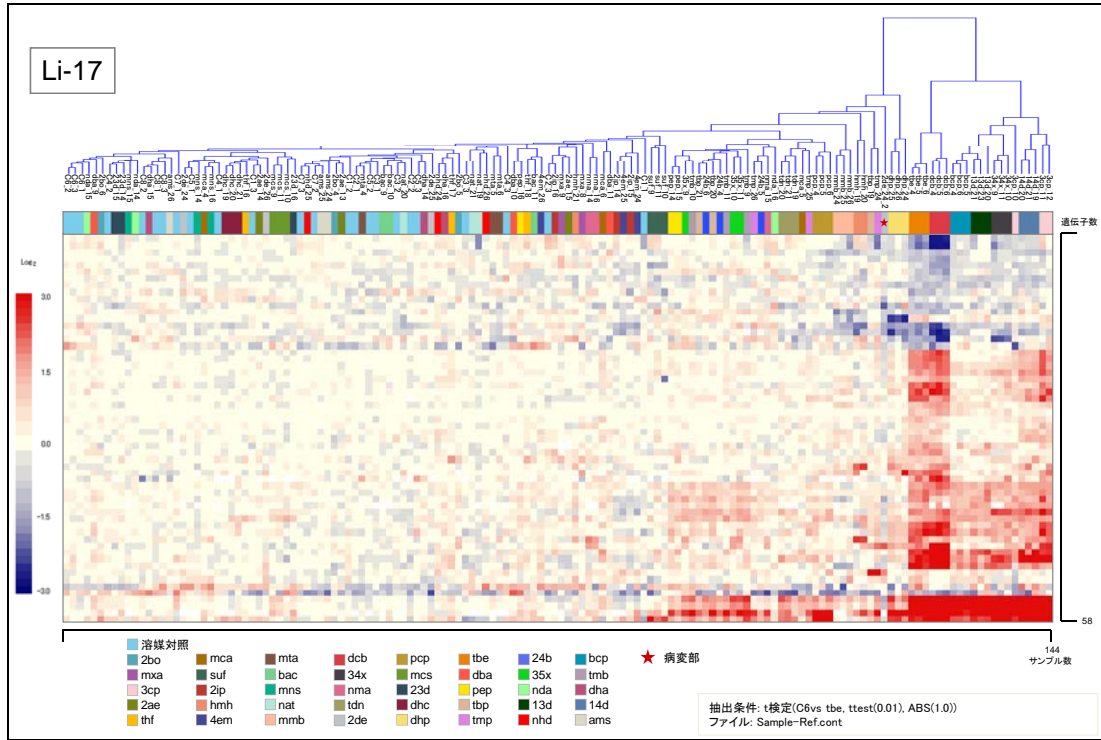


図 III.3-73 テトラプロモエタン投与群 (tbe) で発現変動した遺伝子群 Li-17 (58プロ
ブ)

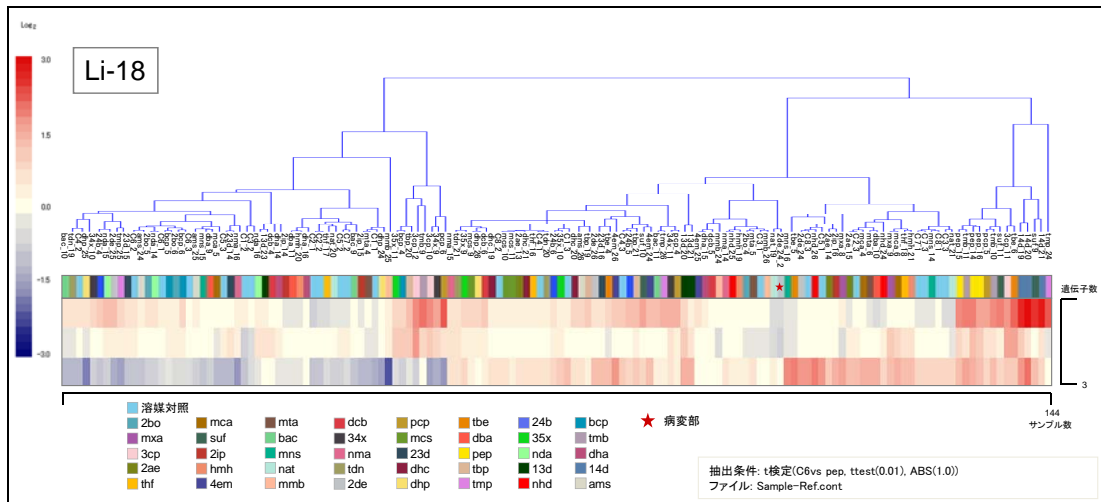


図 III.3-74 p-エチルフェノール投与群 (pep) で発現変動のあった遺伝子群 Li-18 (3プロ
ーブ)

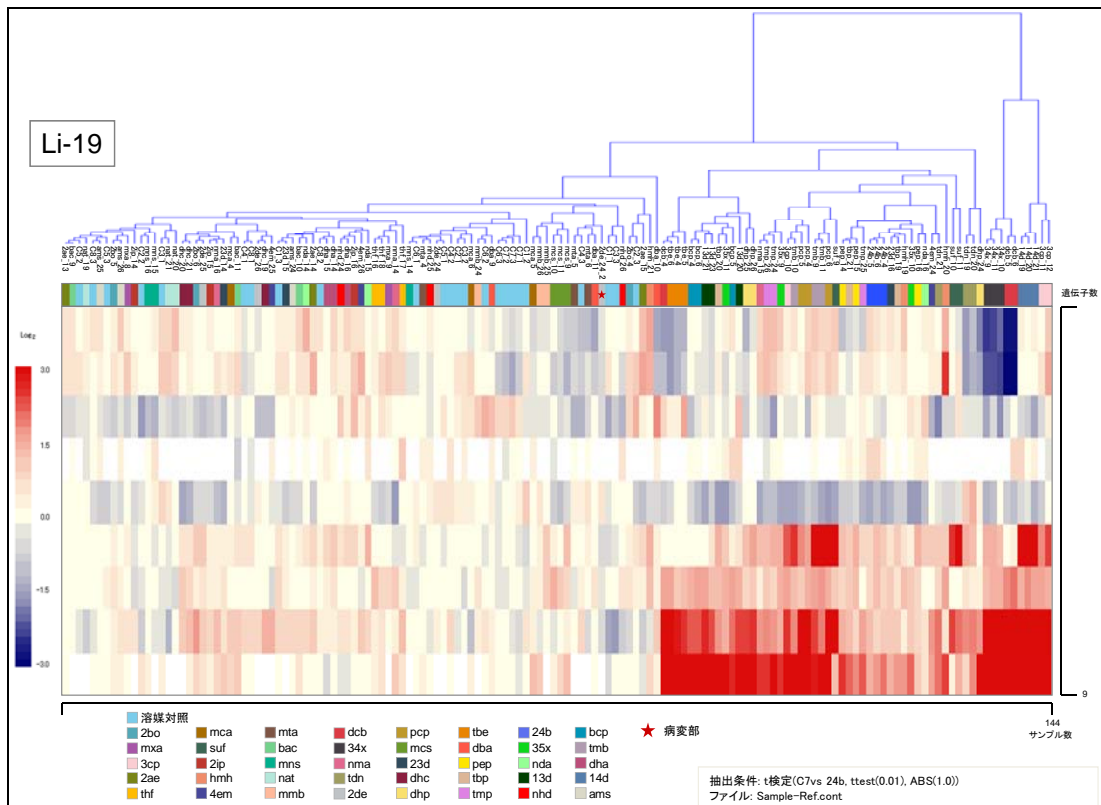


図 III.3-75 2,4-ジ-tert-ブチルフェノール投与群 (24b) で発現変動した遺伝子群 Li-19 (9プローブ)

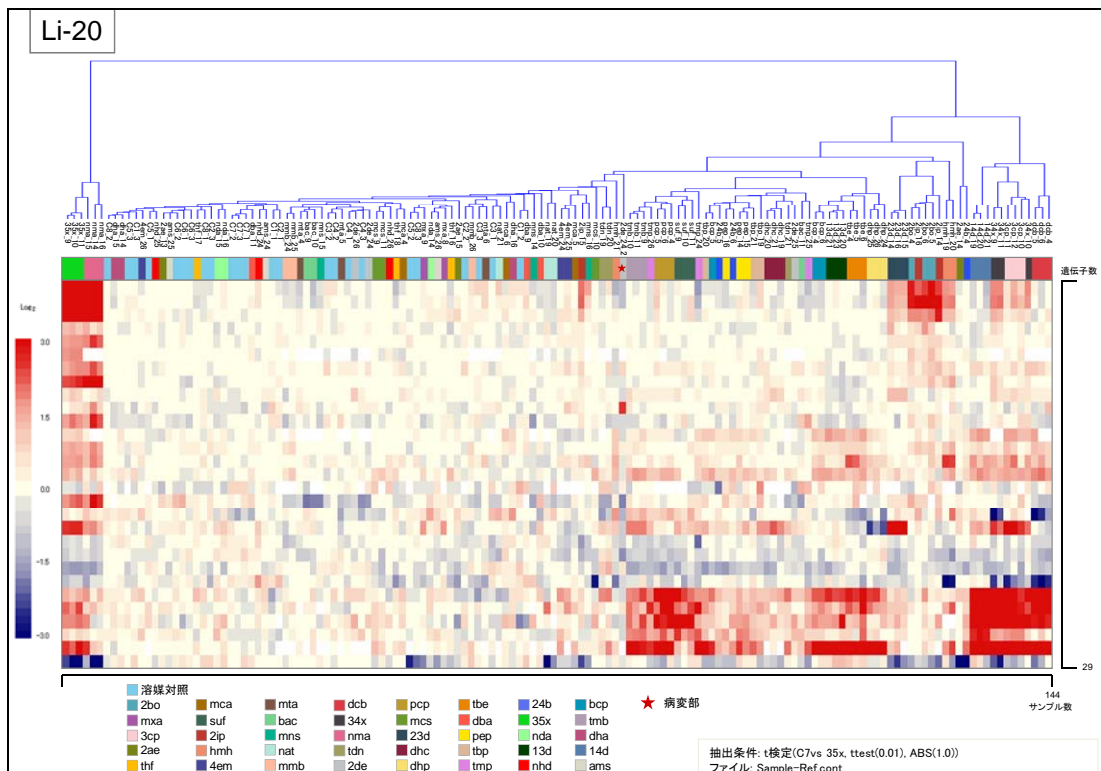


図 III.3-76 3,5-キシリジン投与群 (35x) で発現変動した遺伝子群 Li-20 (29プローブ)

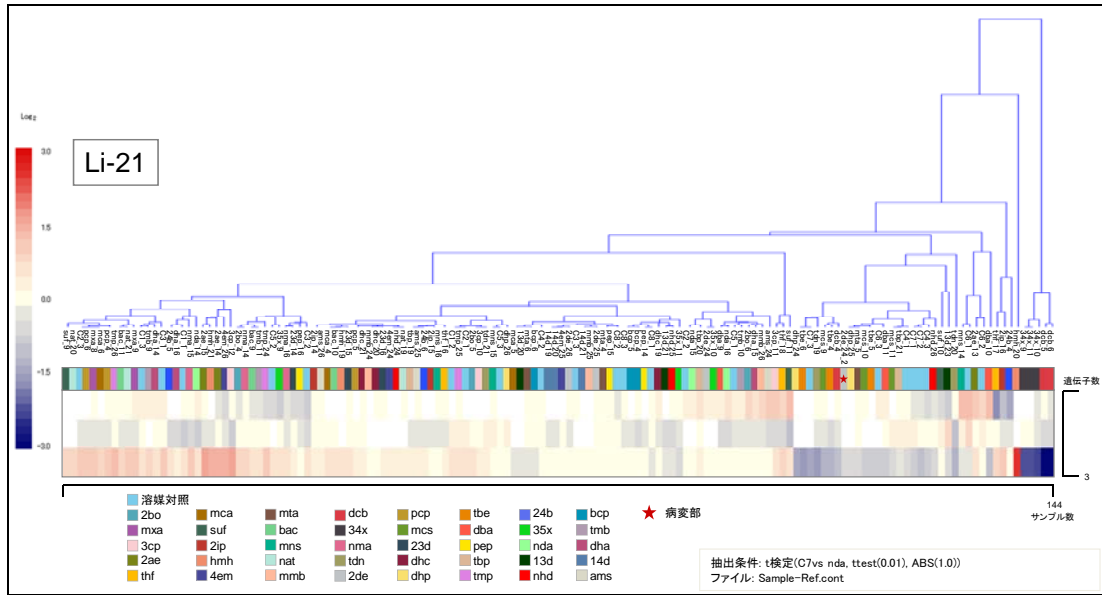


図 III.3-77 N,N-ジメチルベンジルアミン投与群 (nda) で発現変動した遺伝子群 Li-21 (3 プローブ)

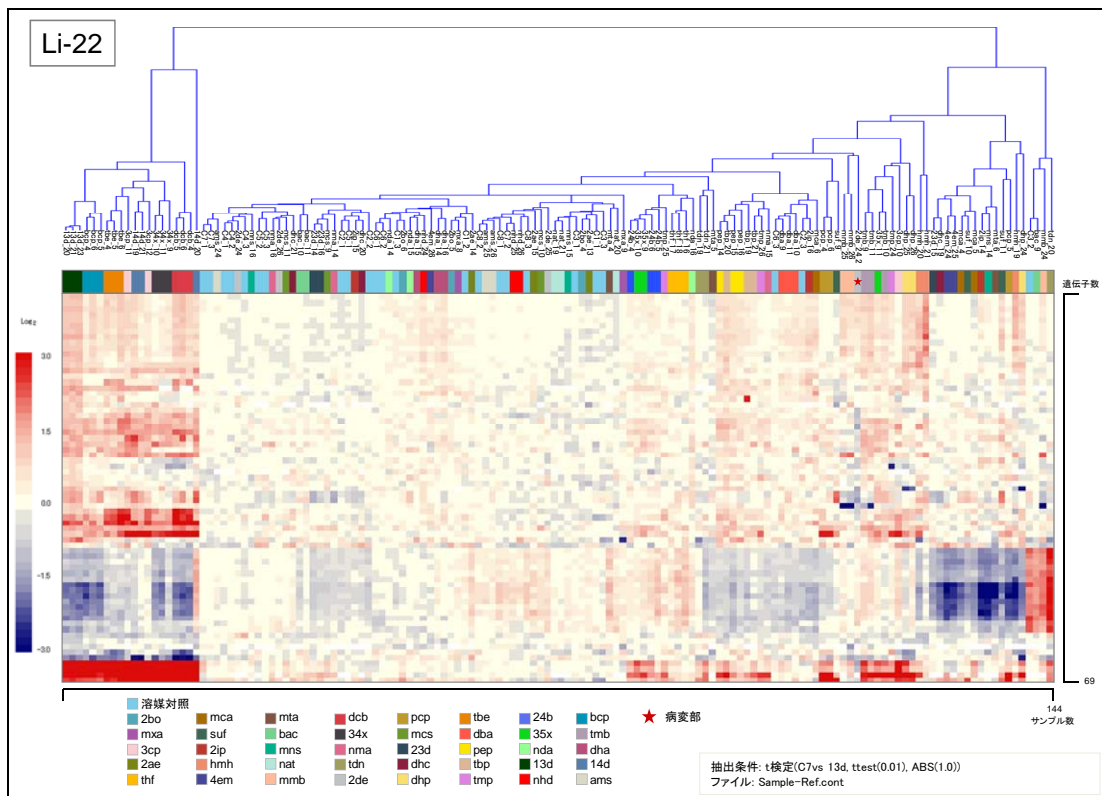


図 III.3-78 1,3-ジブロモプロパン投与群 (13d) で発現変動した遺伝子群 Li-22 (69 プローブ)

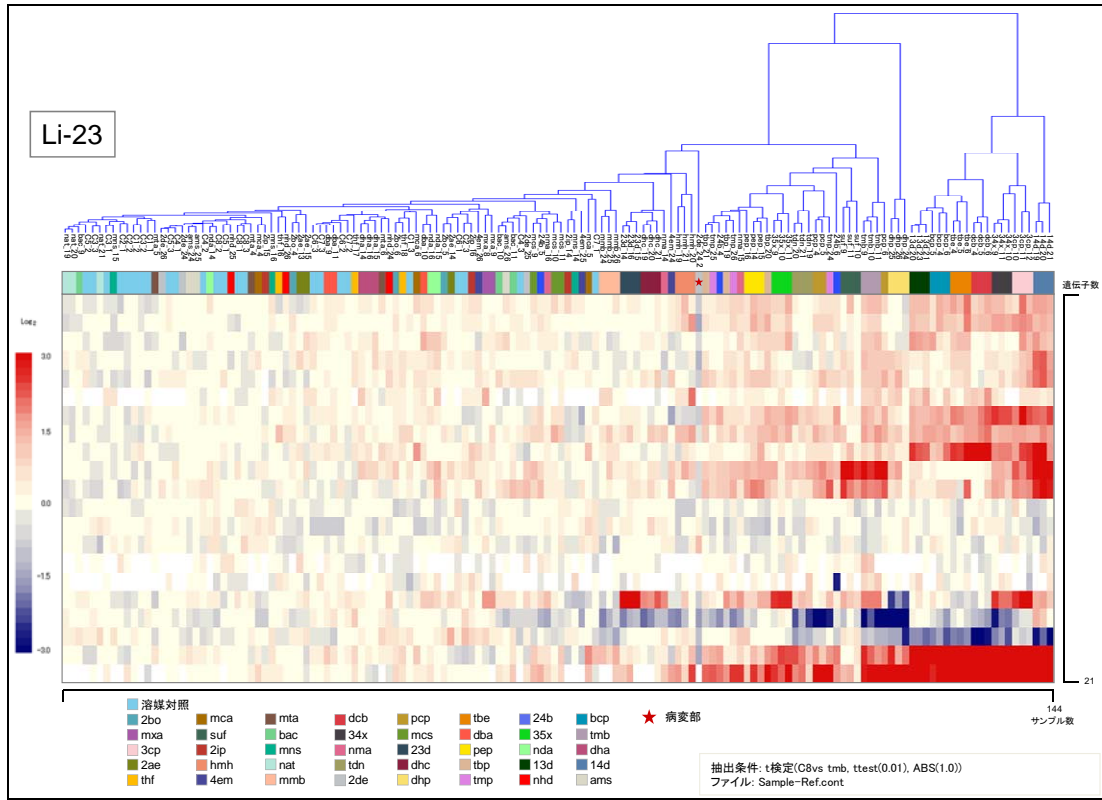


図 III.3-79 プソイドクメン投与群 (tmb) で発現変動した遺伝子群 Li-23 (21プローブ)

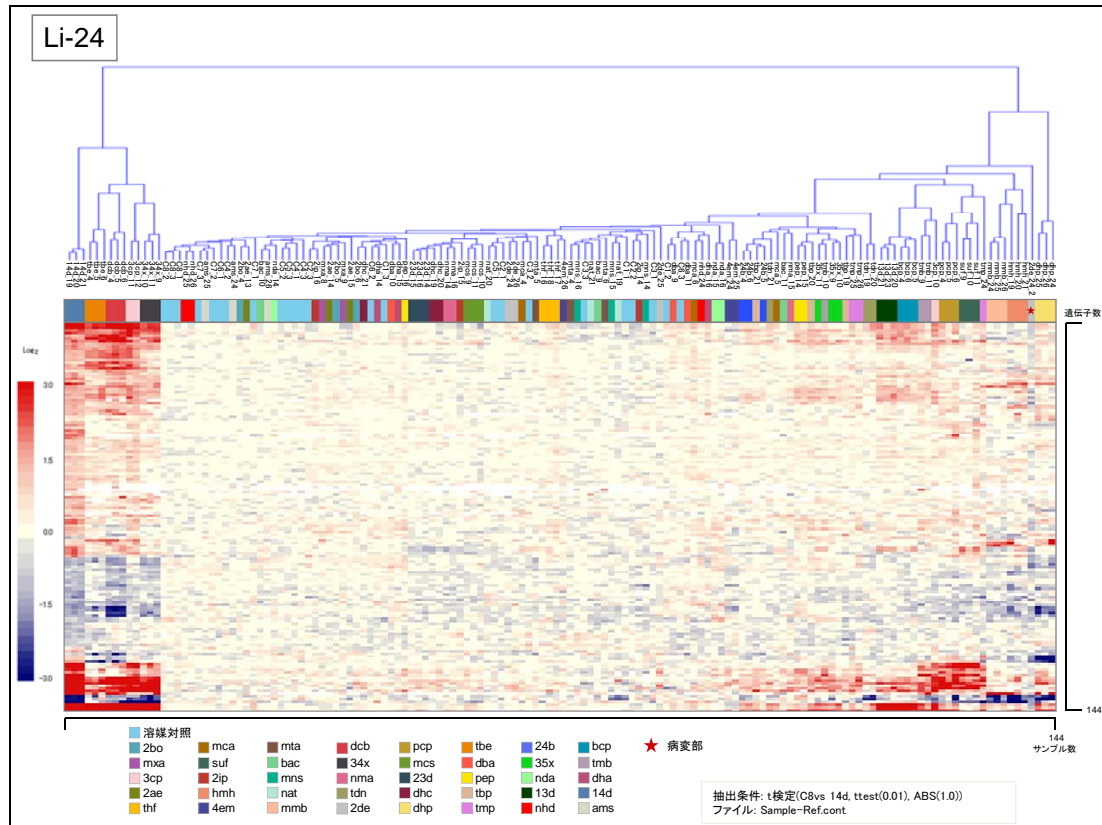


図 III.3-80 1,4-ジブロモベンゼン投与群 (14d) で発現変動した遺伝子群 Li-24 (144プローブ)

さらに、それぞれの化学物質曝露により抽出された生体応答遺伝子を統合したところ、572プローブ存在した(図 III.3-81)。これら572プローブの発現パターンを用いてクラスタ分析を行ったところ、発現パターンの類似性・相違性により複数の房を形成した(図 III.3-82)。この結果は、肝臓においては、化学物質を28日間反復投与することによる生体応答遺伝子の発現パターンに多様性があることを意味し、脾臓に比べて本プロジェクトで扱った化学物質が肝臓に与える影響の多様性が高いことを示唆する。さらに、これらの結果は、遺伝子発現レベルの変動を指標とすることで化学物質が生体に与える影響の類似性を分類できる可能性を示唆している。

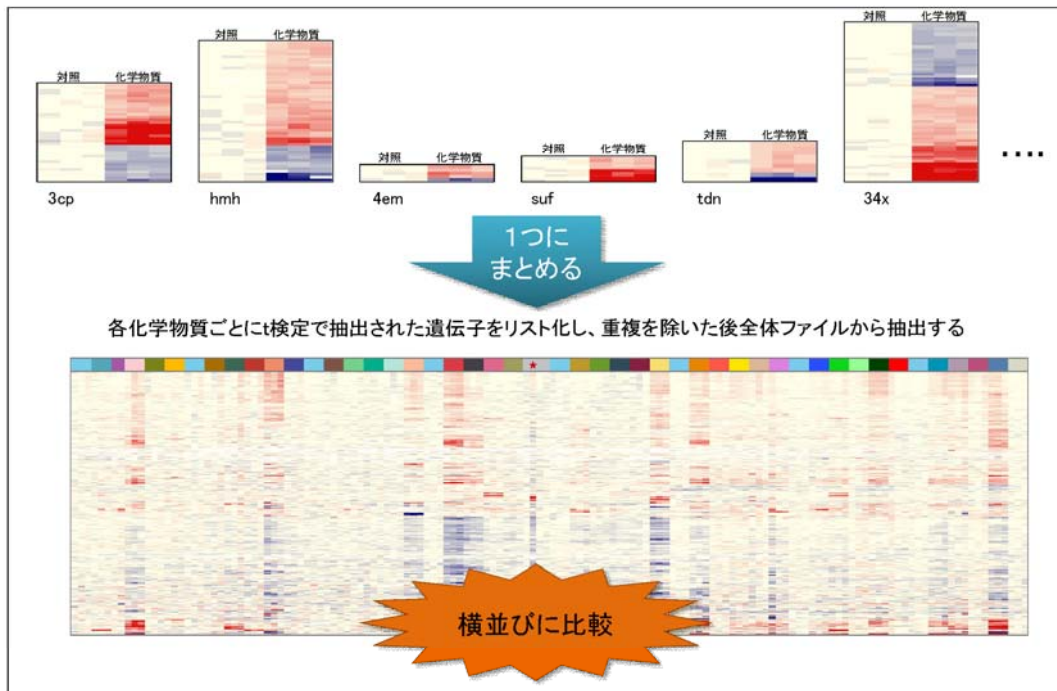


図 III.3-81 40種類の化学物質曝露で発現変動した遺伝子群 (572プローブ)

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値 < 0.01) な差があり、かつ、各群の平均値を算出し対照群との平均値の差が 2 倍以上の遺伝子群 (生体応答遺伝子群) を抽出し、それらの遺伝子群を合わせて遺伝子方向のクラスタ分析をした結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

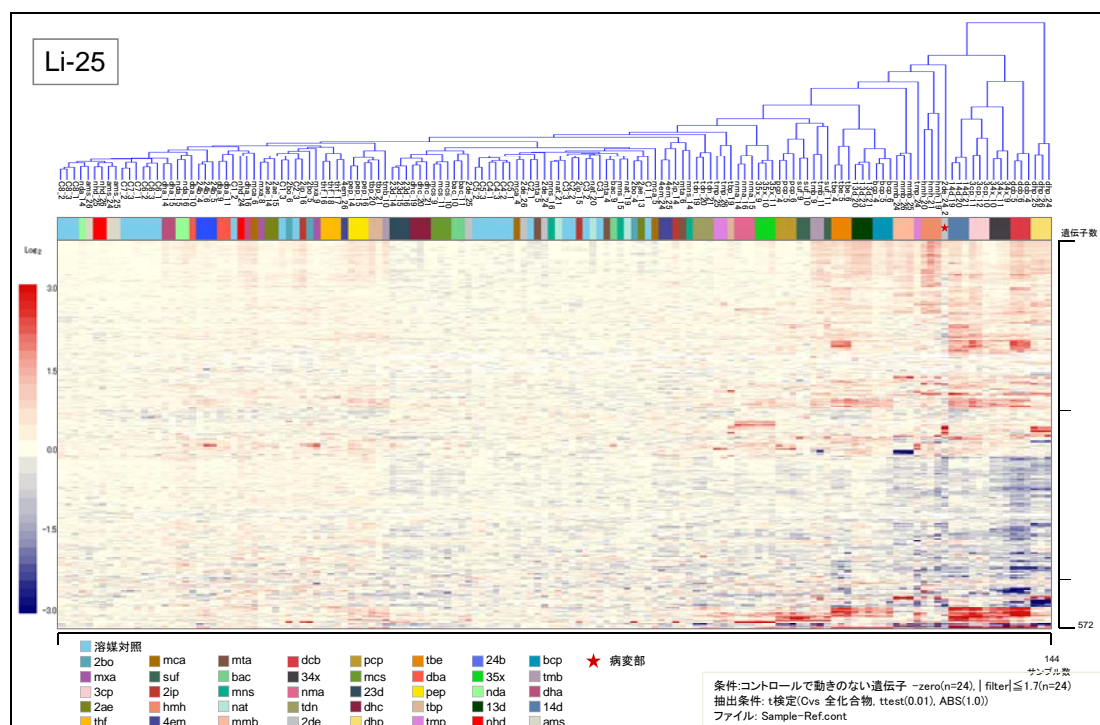


図 III.3-82 1以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-25 (572プローブ)

化学物質ごとに t 検定を用いて対照群と比較して有意 (P 値 < 0.01) な差があり、かつ、各群の平均値を算出し対照群との平均値の差が 2 倍以上の遺伝子群 (生体応答遺伝子群) を抽出し、それらの遺伝子群を合わせ、それらの遺伝子群の発現変動パターンに基づいてクラスタ分析をした結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(3) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (複数の化学物質曝露で共通して発現変動する遺伝子群)

複数の化学物質投与群に共通した発現変動パターンを示す遺伝子群は、化学物質が標的臓器に与える有害性の評価を行う上で有用であると考えられる。そこで、われわれは前記572プローブの中から、複数の化学物質曝露により発現変動した遺伝子群の抽出を試みた (図 III.3-83~91)。

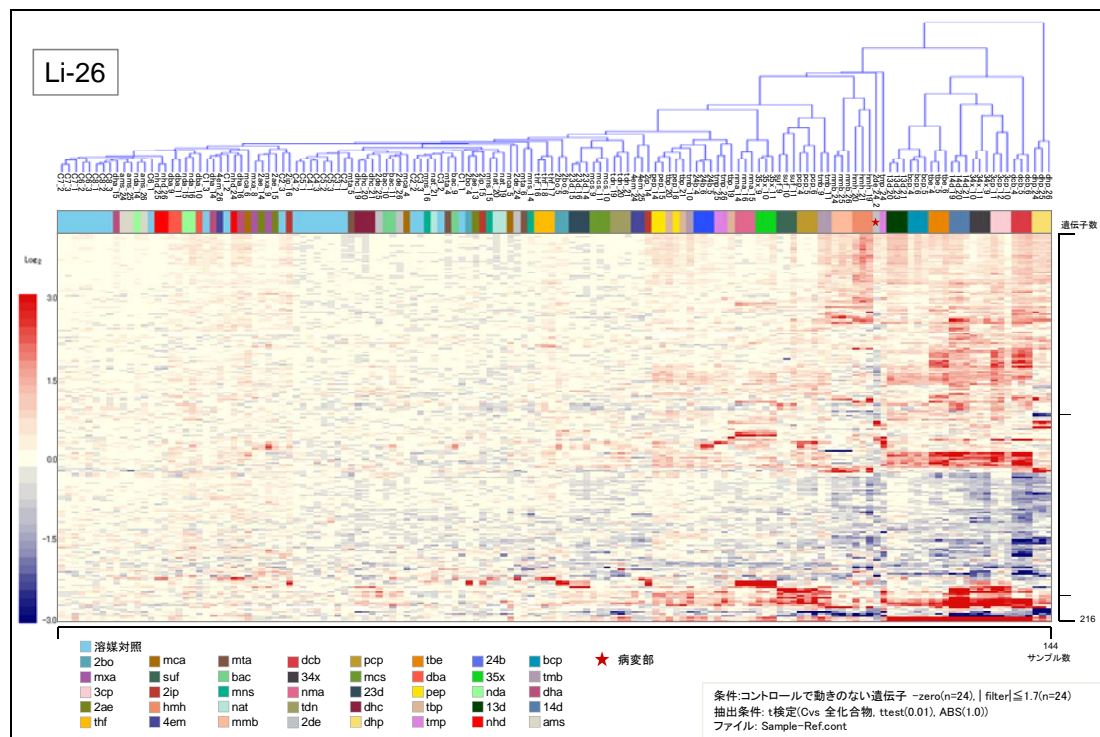


図 III.3-83 2以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-26 (216プローブ)

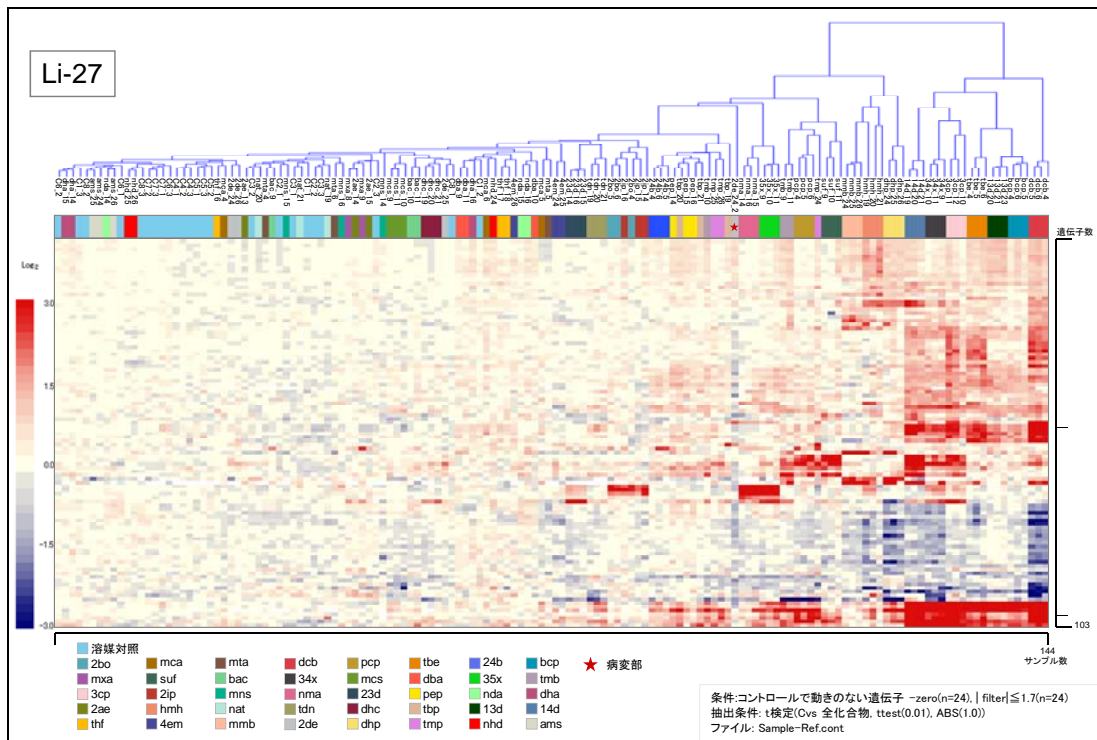


図 III.3-84 3以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-27 (103プローブ)

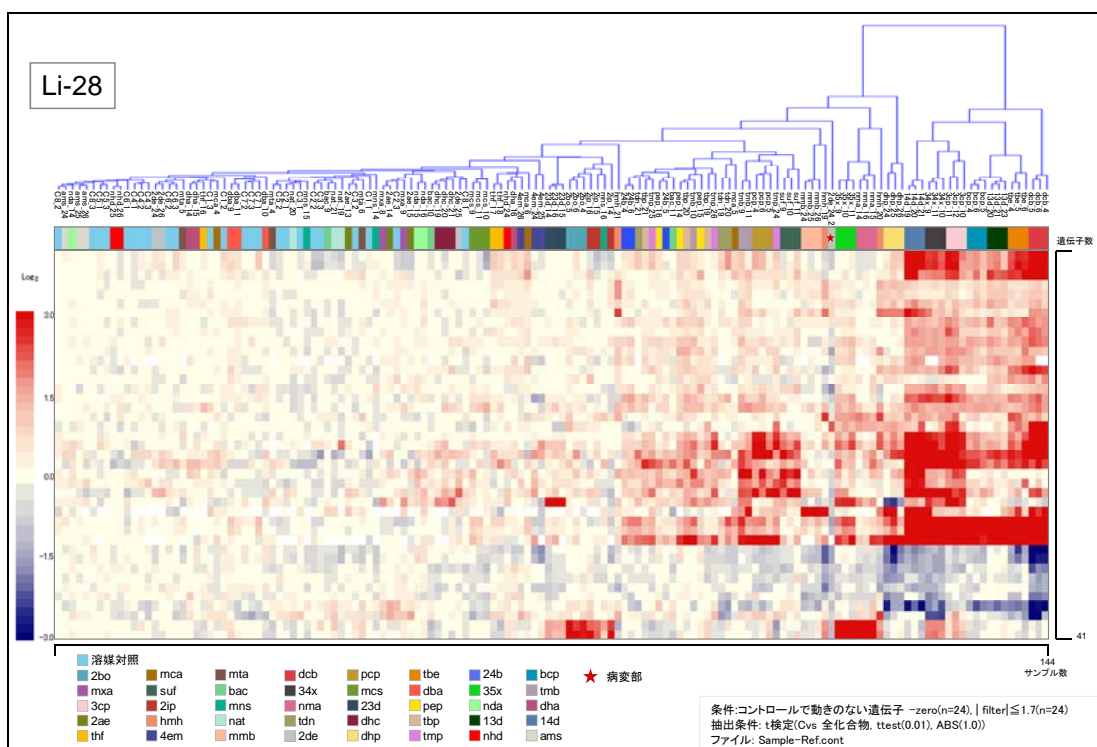


図 III.3-85 4以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-28 (41プローブ)

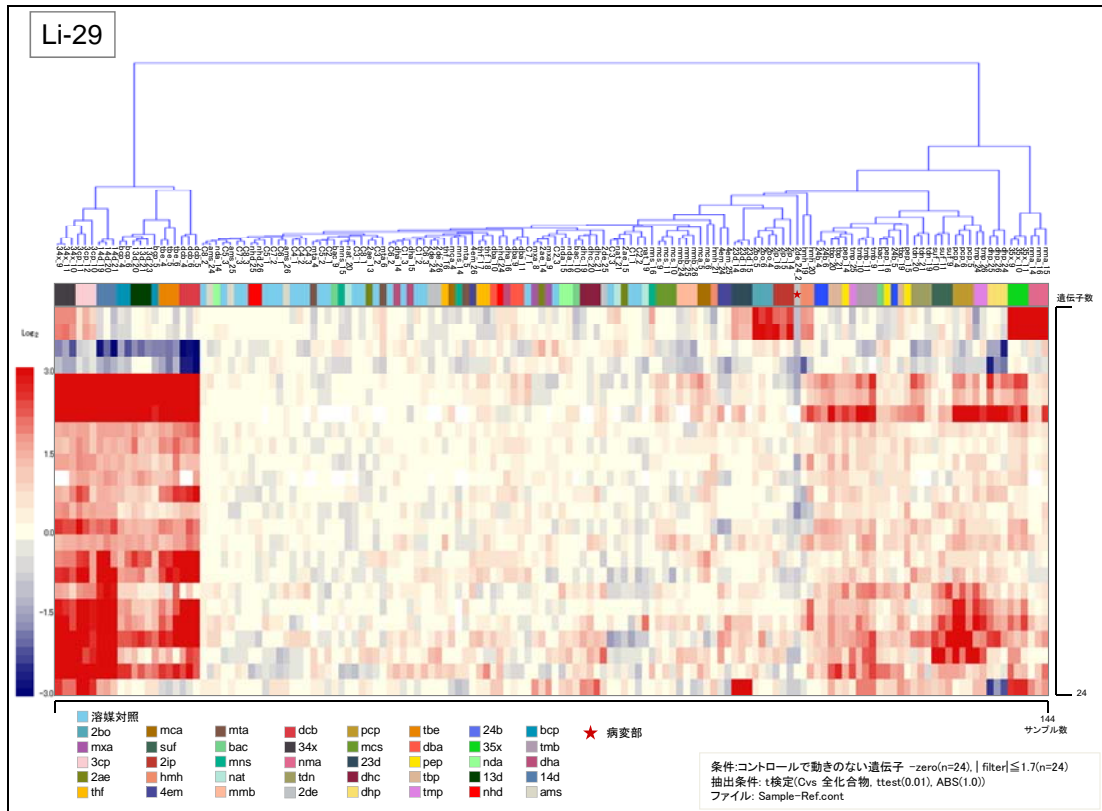


図 III.3-86 5以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-29 (24プローブ)

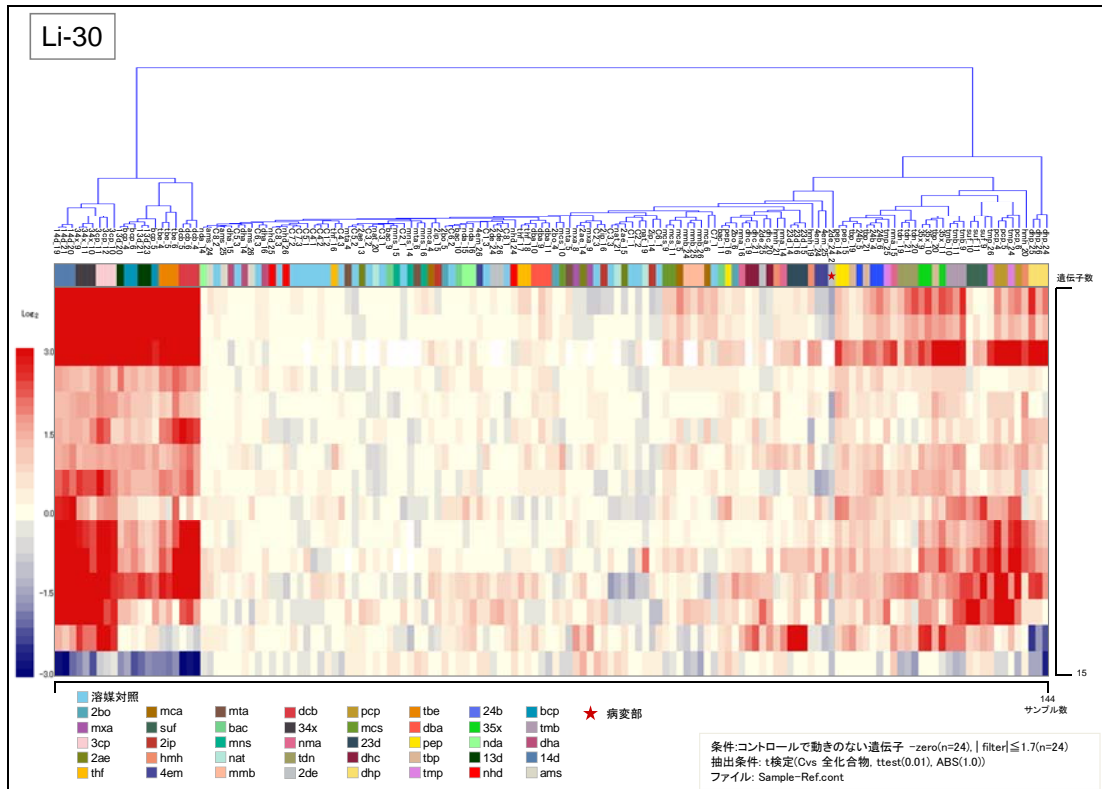


図 III.3-87 6以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-30 (15プローブ)

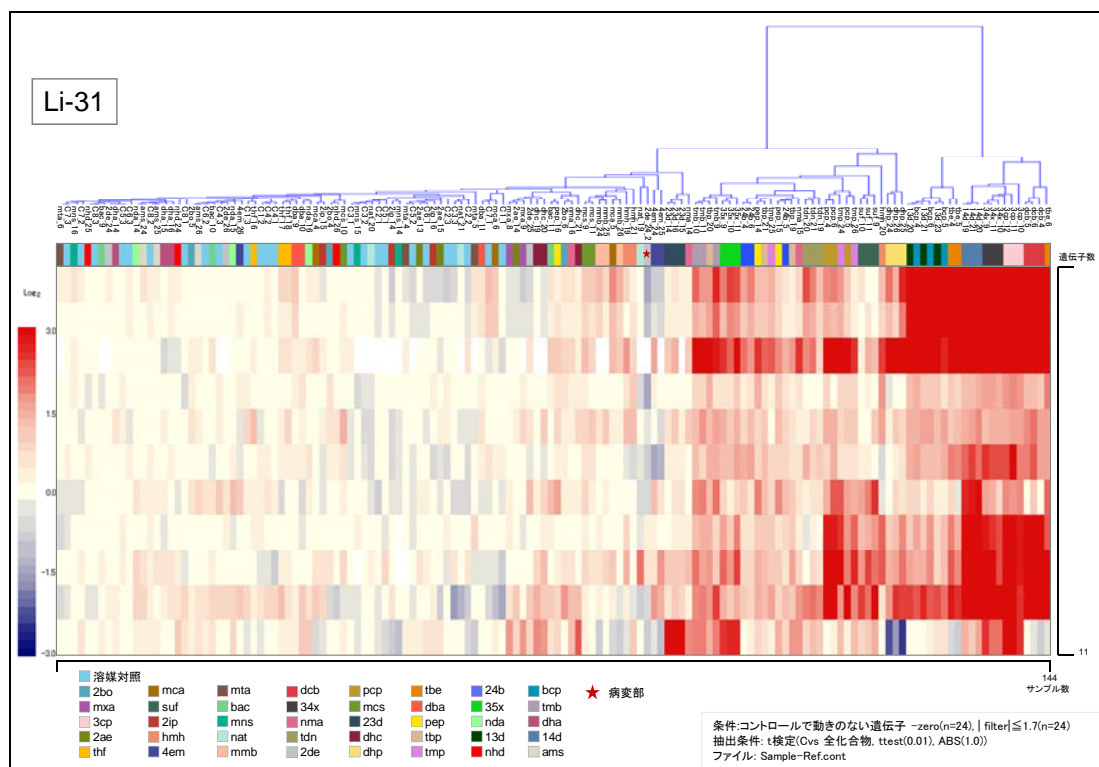


図 III.3-88 7以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-31 (11プローブ)

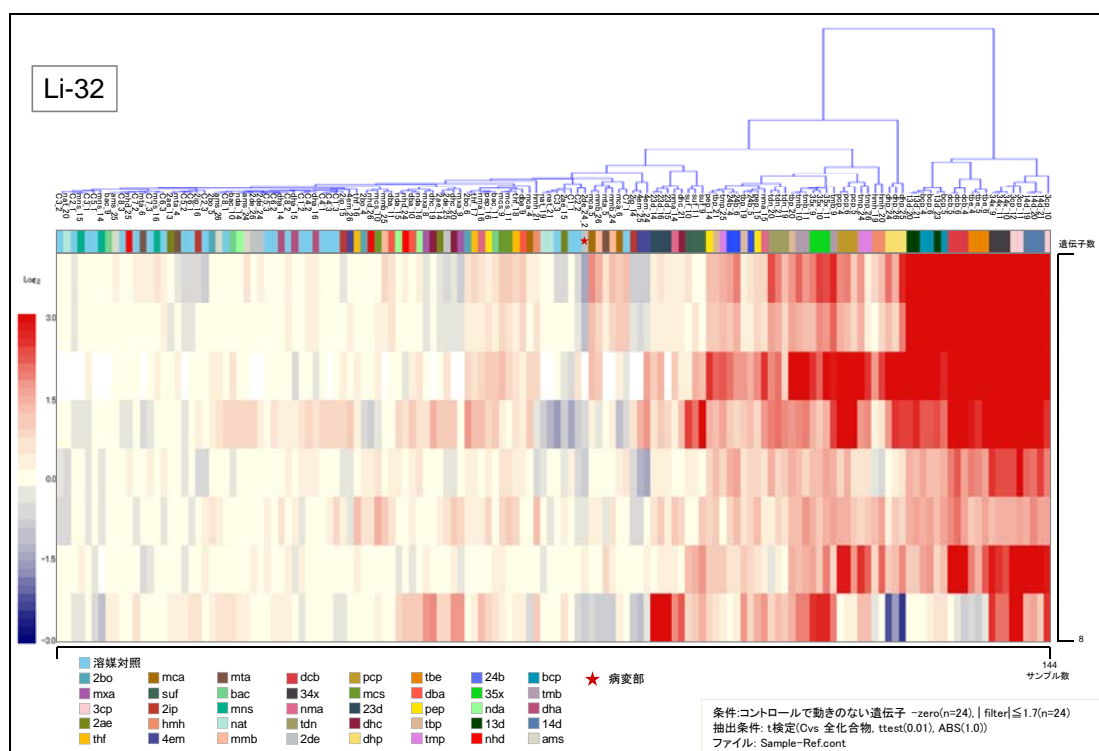


図 III.3-89 8以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-32 (8プローブ)

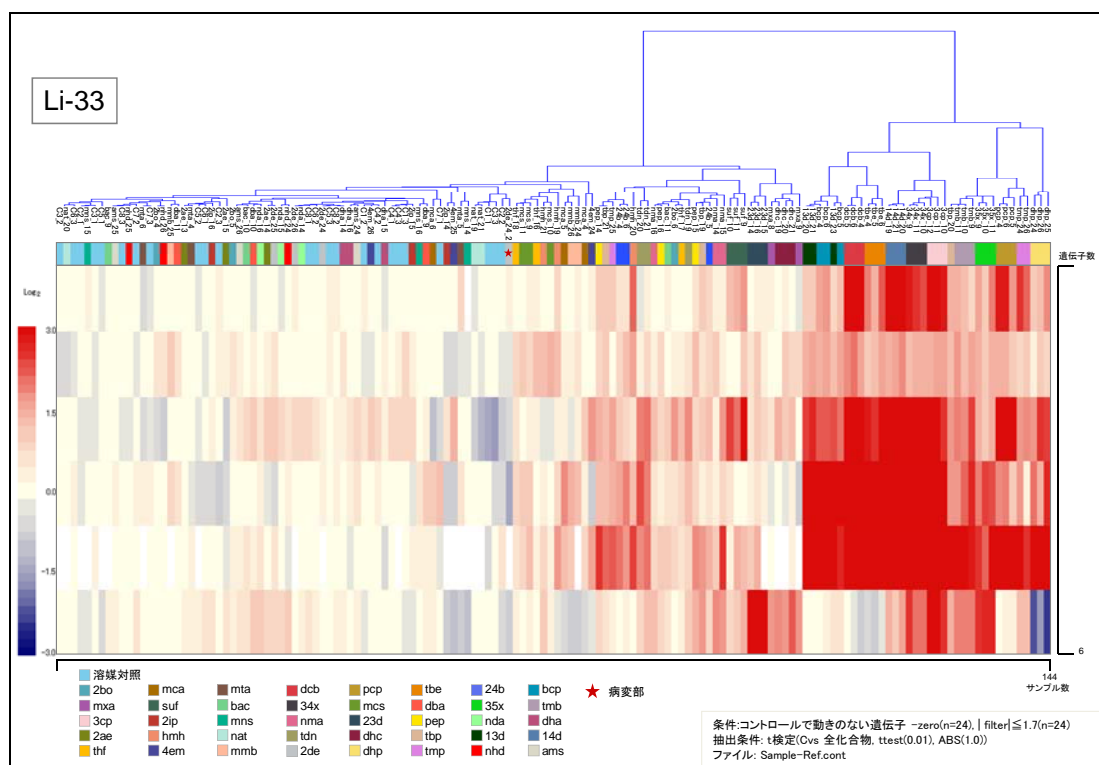


図 III.3-90 9以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-33 (6プロブ)

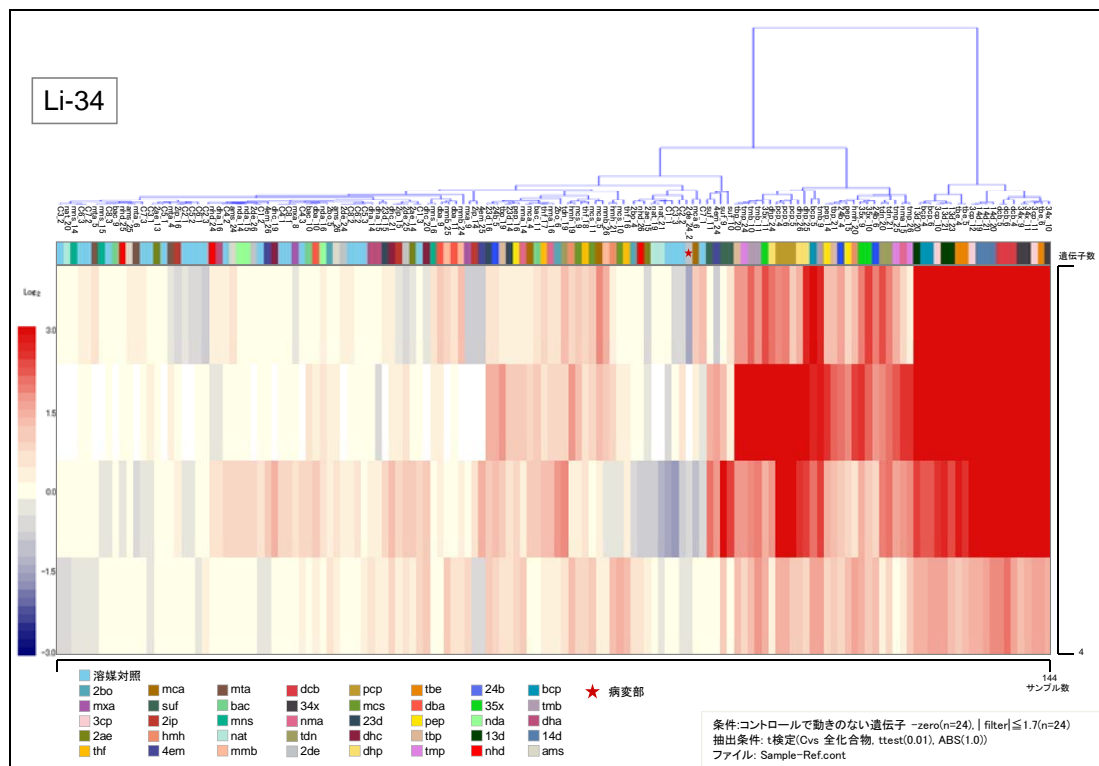


図 III.3-91 10以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Li-34 (4プロブ)

(4) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (サンプル方向の切り分け)

多様性のある生体応答を区別していくためには、様々な角度から遺伝子群を切り分けていくことが有用であると考えた。そこで、上記572プローブによるクラスタ分析の結果 (図 III.3-92) をもとにして、その房を分けることのできる遺伝子セットを探索していくこととした。その結果、様々な組合せで化学物質を区別できる生体応答遺伝子発現データセットを新たに9セット特定した (図 III.3-93~101)。

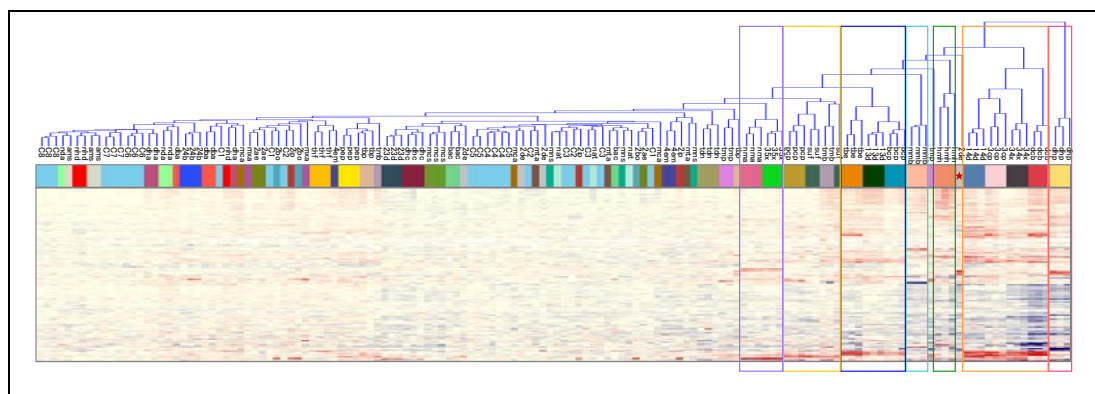


図 III.3-92 40種類の化学物質において発現レベルが変動した遺伝子群 (572プローブ) によるクラスタ分析に基づいた、サンプル方向の切り分け

40種類の化学物質において発現レベルが変動していた遺伝子群 (572プローブ) によるクラスタ分析の結果をもとにして、四角で囲んだクラスタを分ける遺伝子発現データセットを探索した。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

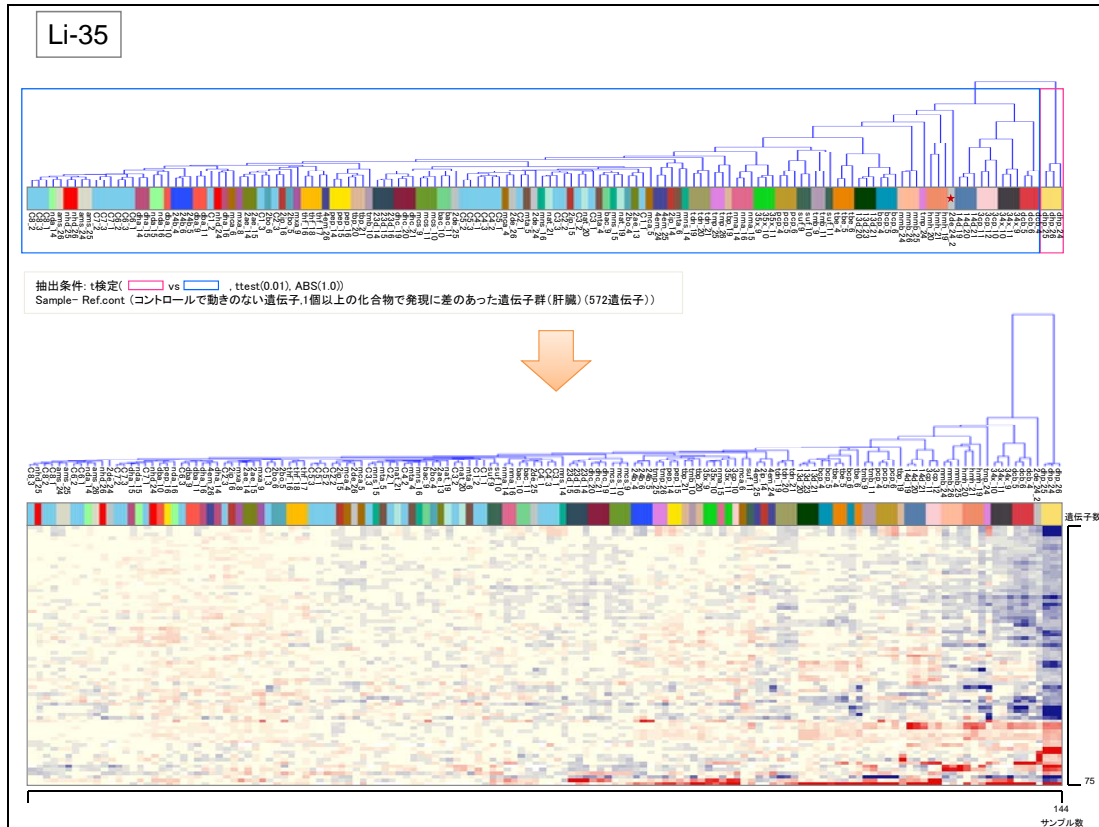


図 III.3-93 生体応答遺伝子発現データセット Li-35 (75プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

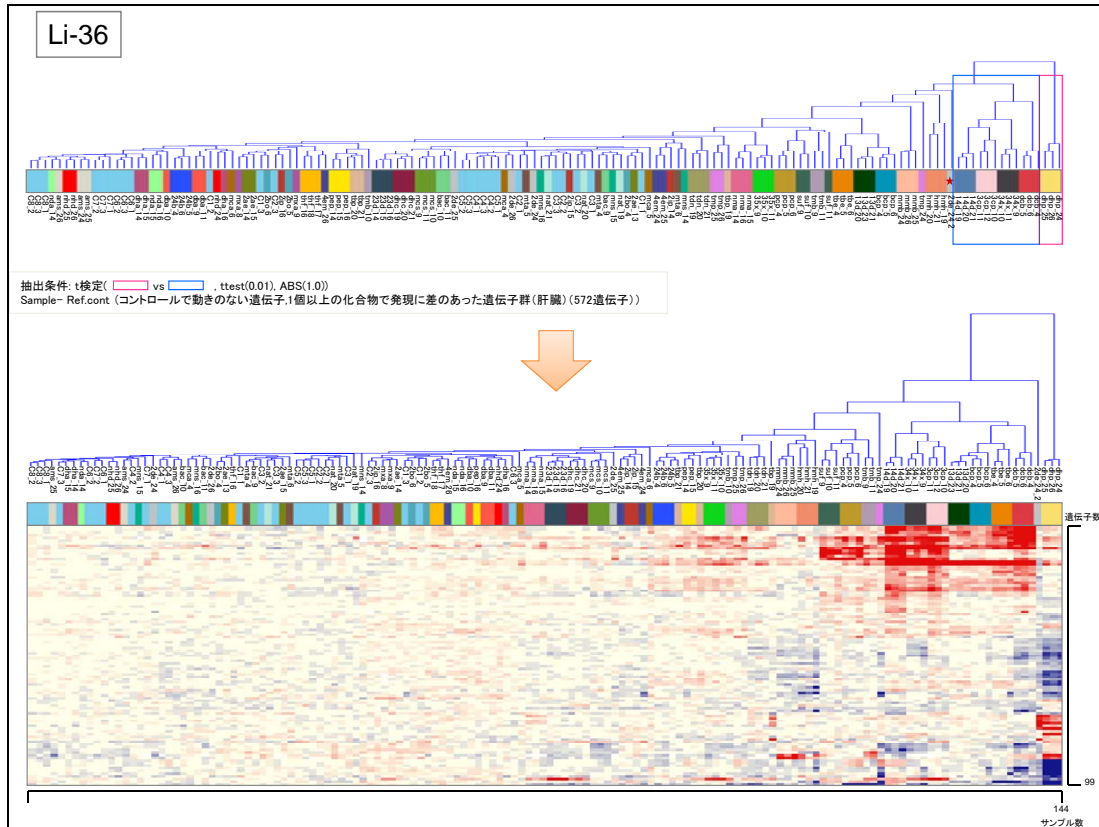


図 III.3-94 生体応答遺伝子発現データセット Li-36 (99プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 <0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

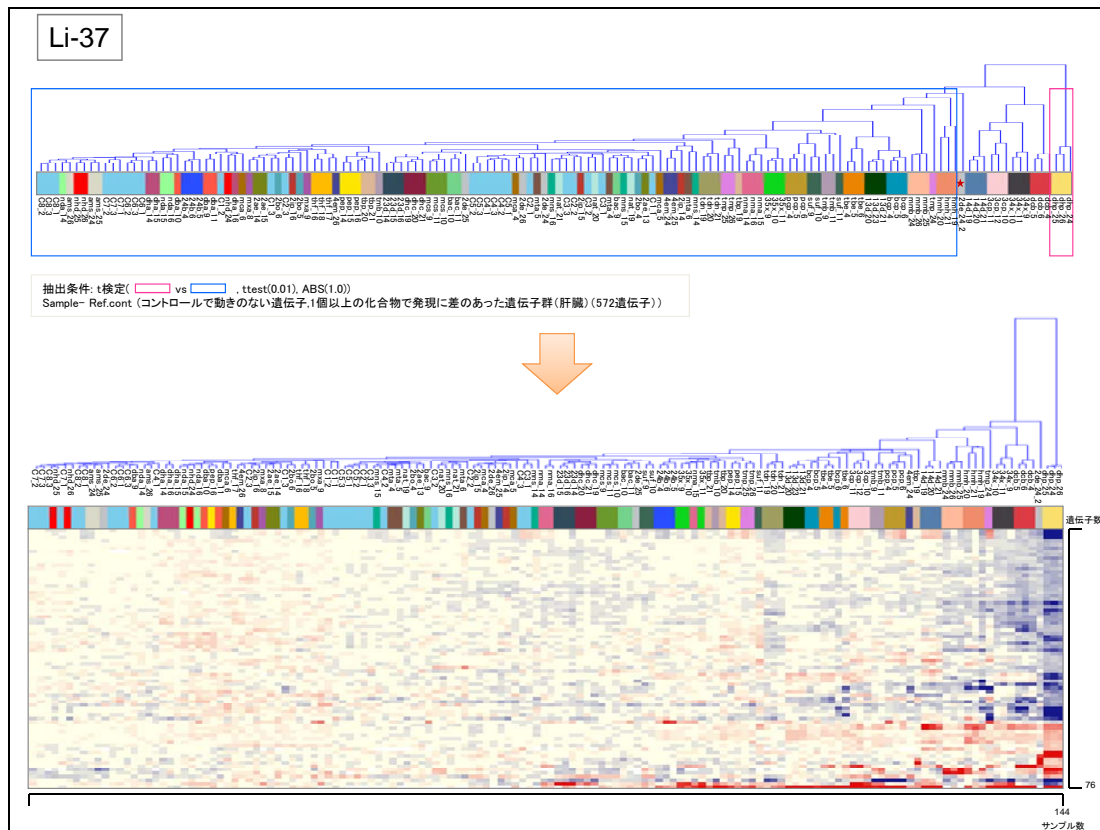


図 III.3-95 生体応答遺伝子発現データセット Li-37 (76プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

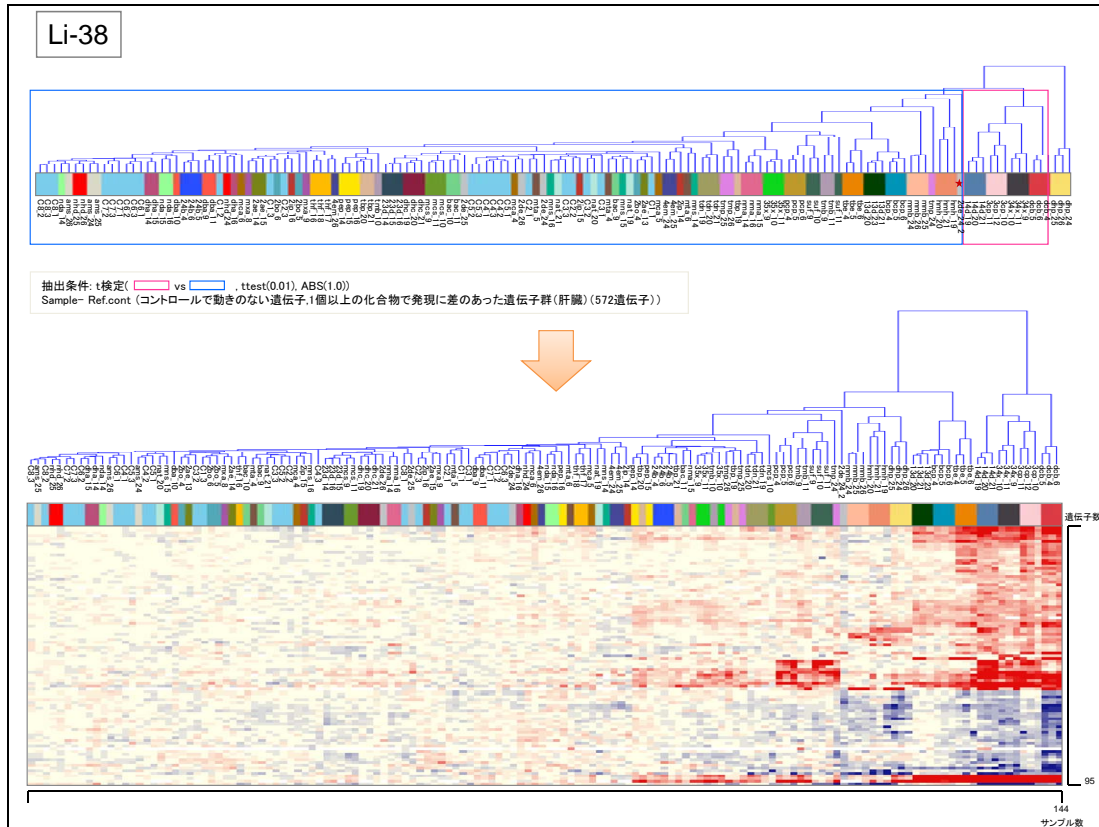


図 III.3-96 生体応答遺伝子発現データセット Li-38 (95プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

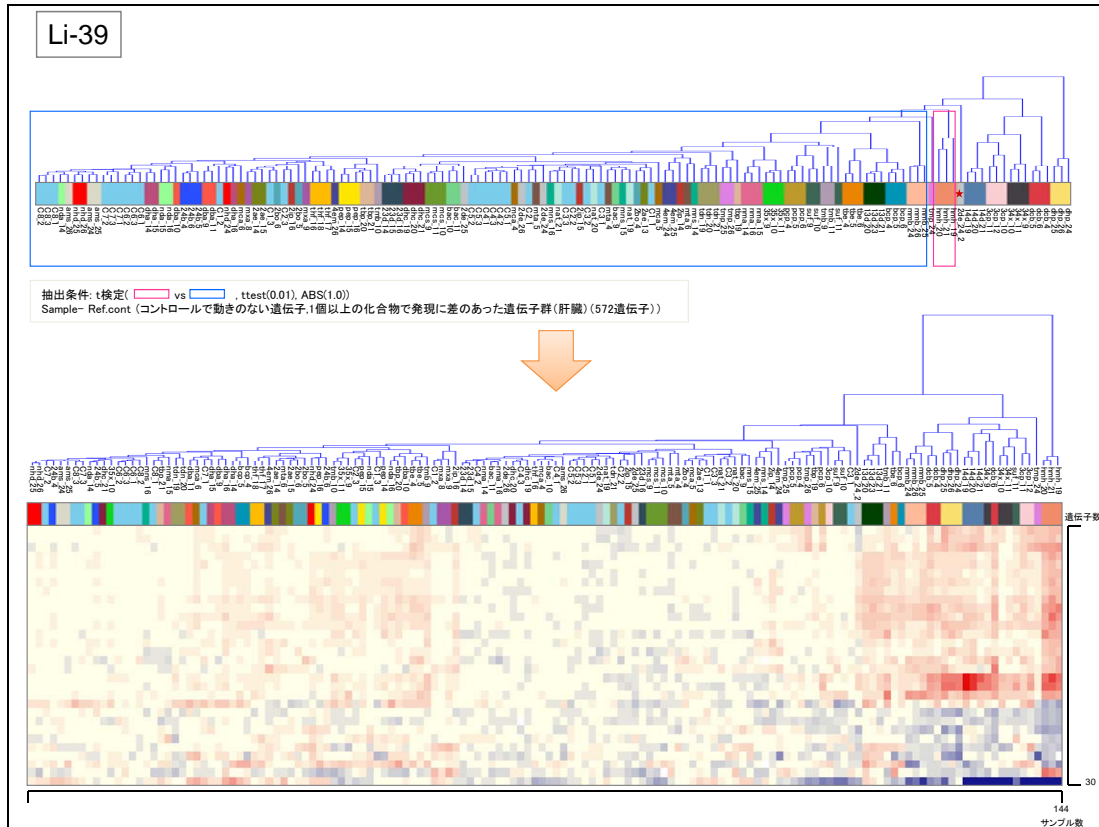


図 III.3-97 生体応答遺伝子セット Li-39 (30プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

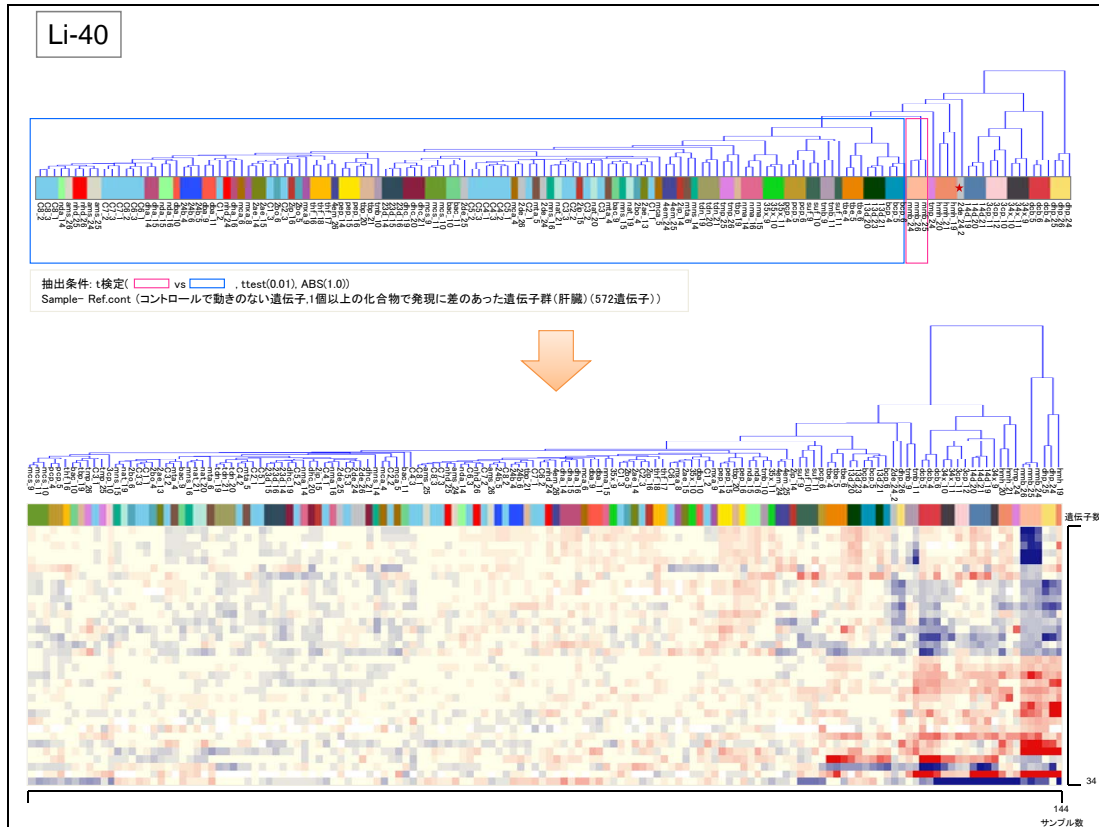


図 III.3-98 生体応答遺伝子セット Li-40 (34プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

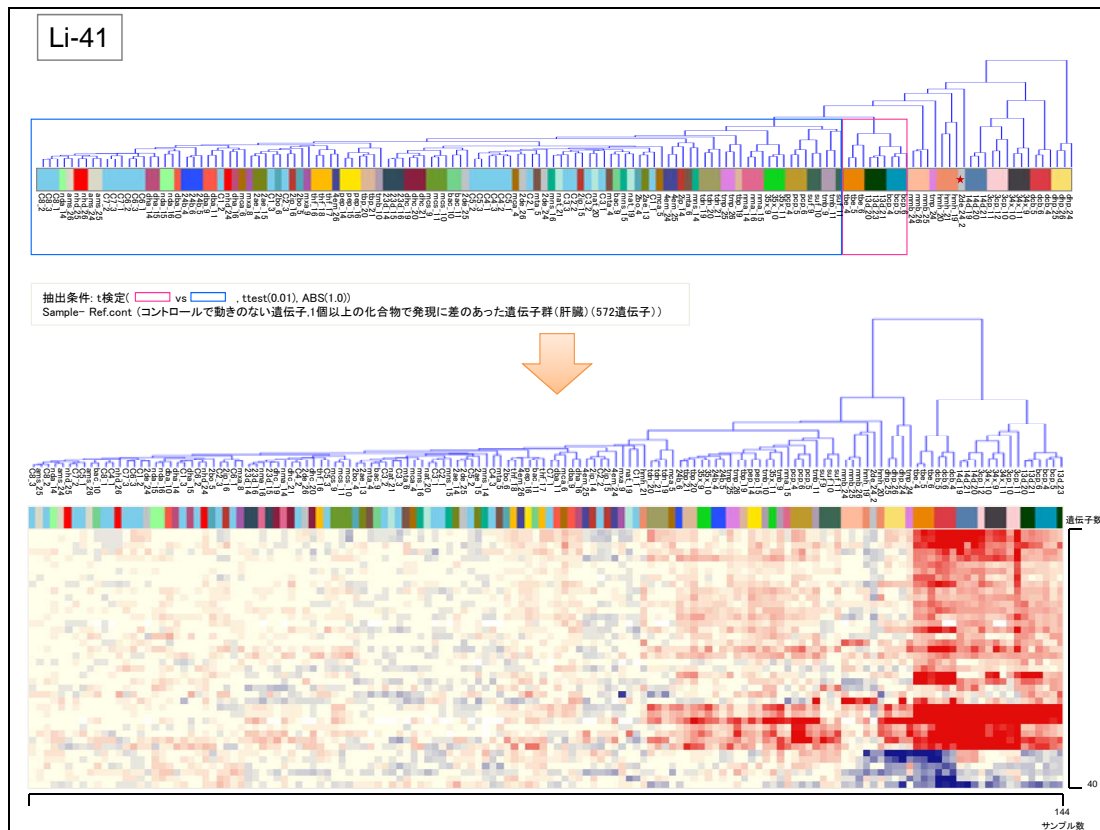


図 III.3-99 生体応答遺伝子セット Li-41 (40プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

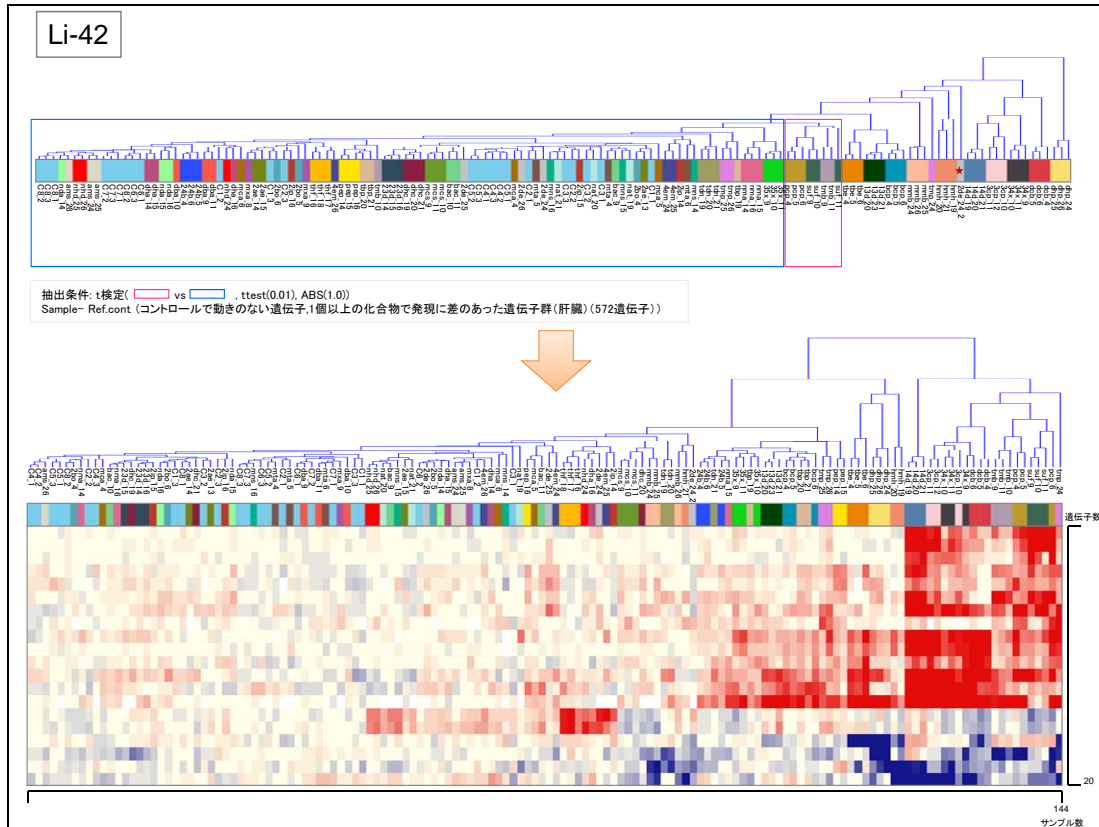


図 III.3-100 生体応答遺伝子セット Li-42 (20プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 < 0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す(下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

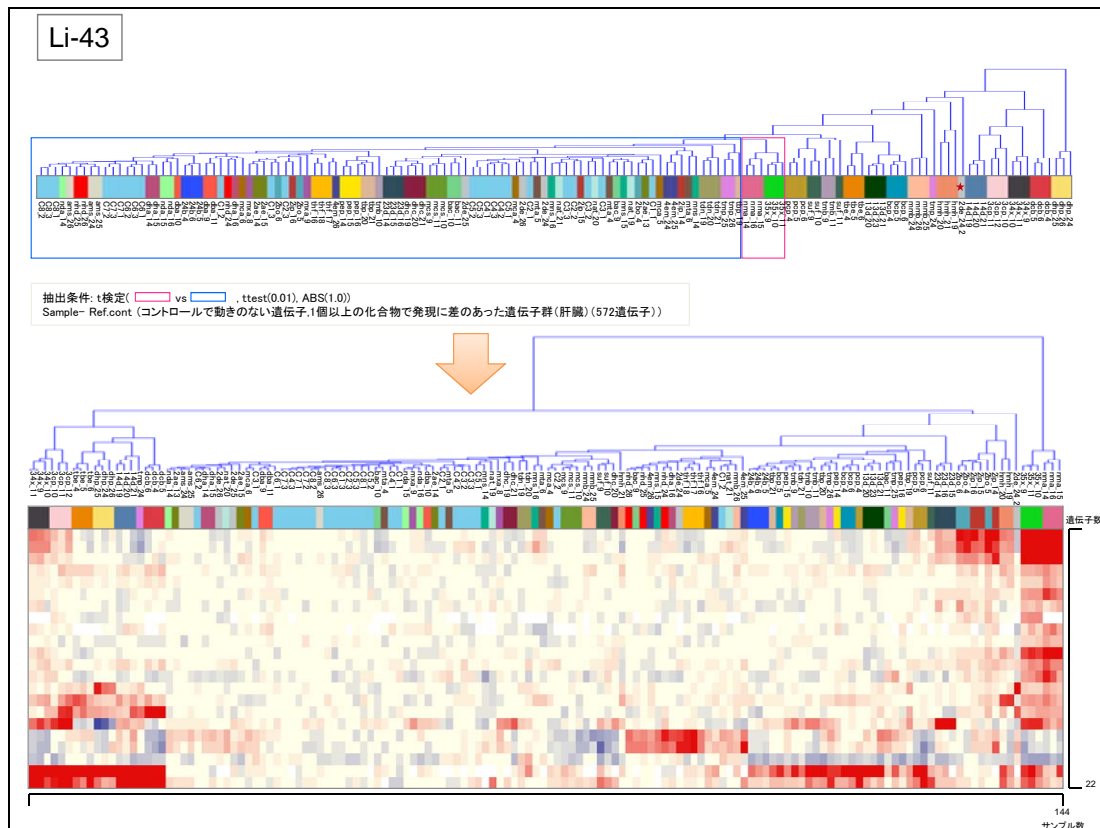


図 III.3-101 生体応答遺伝子セット Li-43 (2 2プローブ)

図 III.3-92 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためて t 検定を行い、発現レベルが有意 (P 値 <0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す (下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(5) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (遺伝子方向の切り分け)

次に、クラスタ分析の見方を変えて、遺伝子方向の房を根拠にして切り分けた (図 III.3-102)。その結果、様々な生体応答遺伝子発現データセットを新たに6セット特定した (図 III.3-103~108)。このような方法論を取ることによって、様々な組合せで化学物質を分類することが可能となることが判明した。

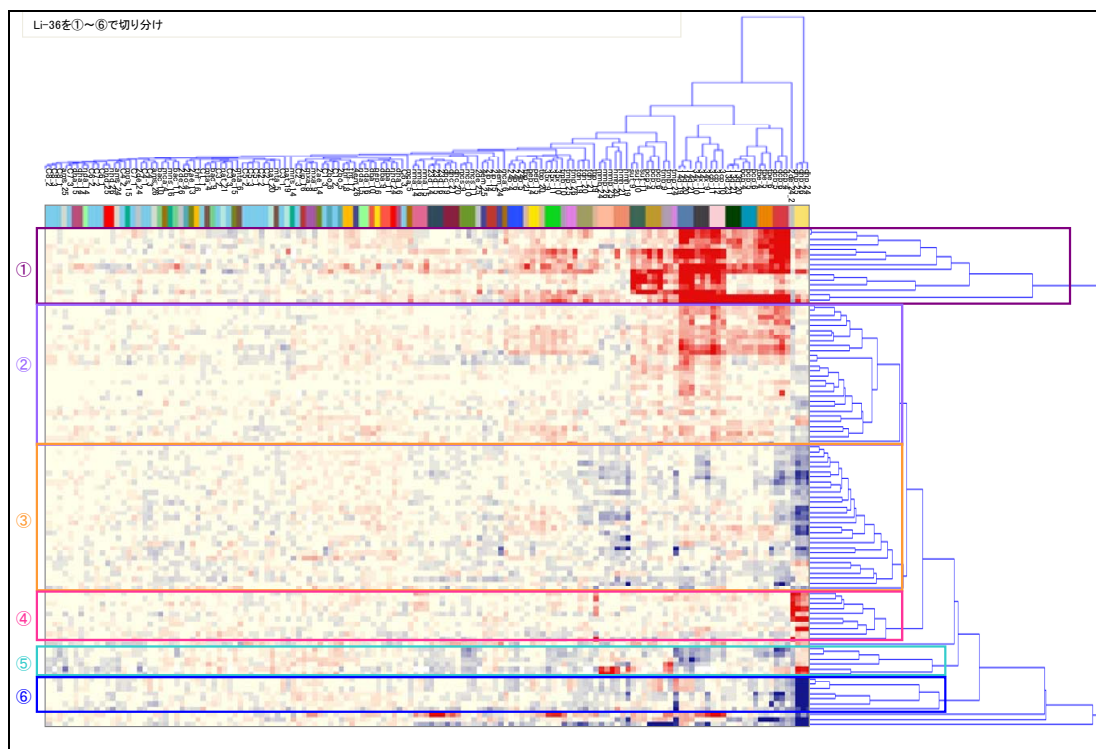


図 III.3-102 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (遺伝子方向の切り分け)

生体応答遺伝子セット Li-36 のクラスタ分析の結果をもとにして遺伝子方向のクラスタを6つ (①~⑥) に分けた。

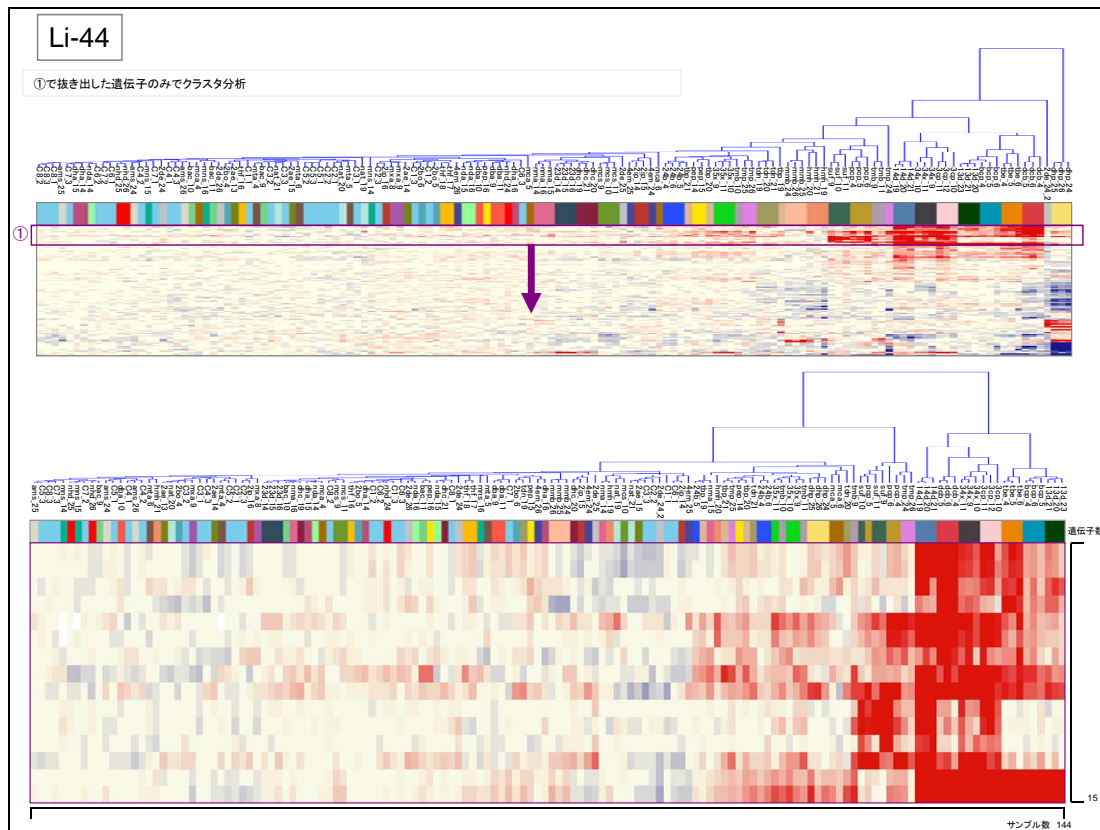


図 III.3-103 生体応答遺伝子発現データセット Li-44 (15 プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (15 プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

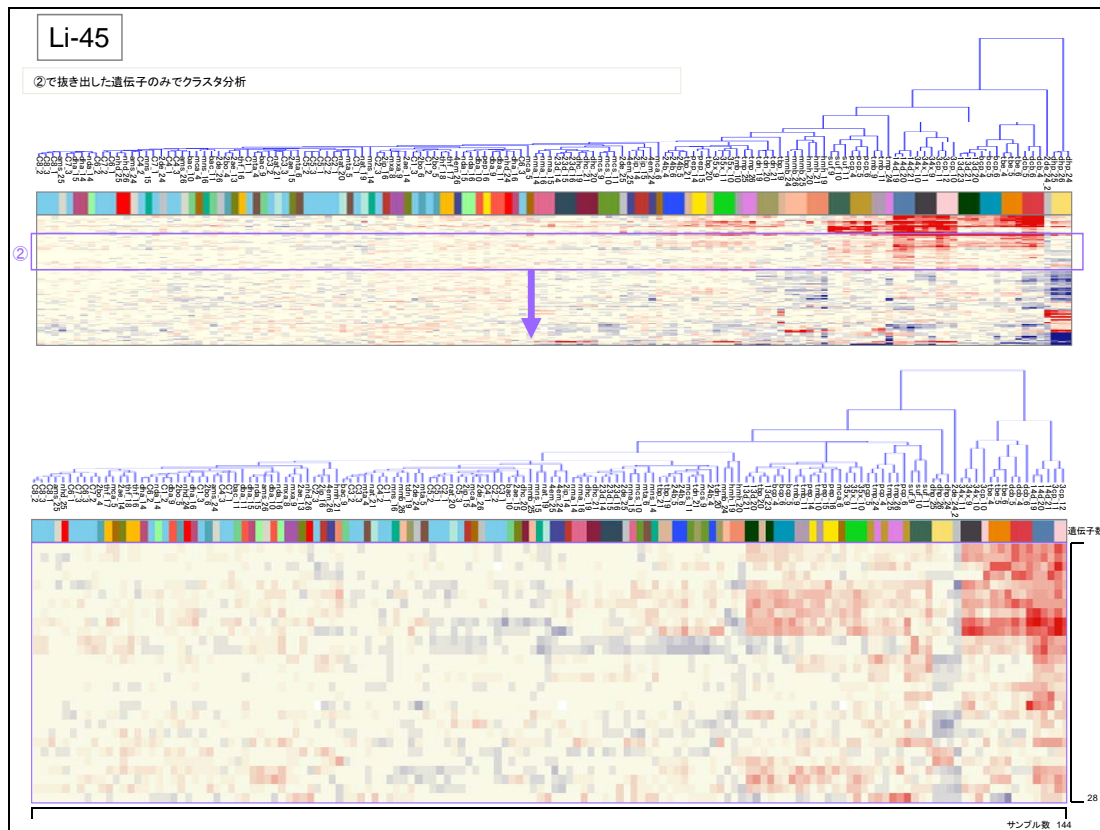


図 III.3-104 生体応答遺伝子発現データセット Li-45 (28プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (28プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

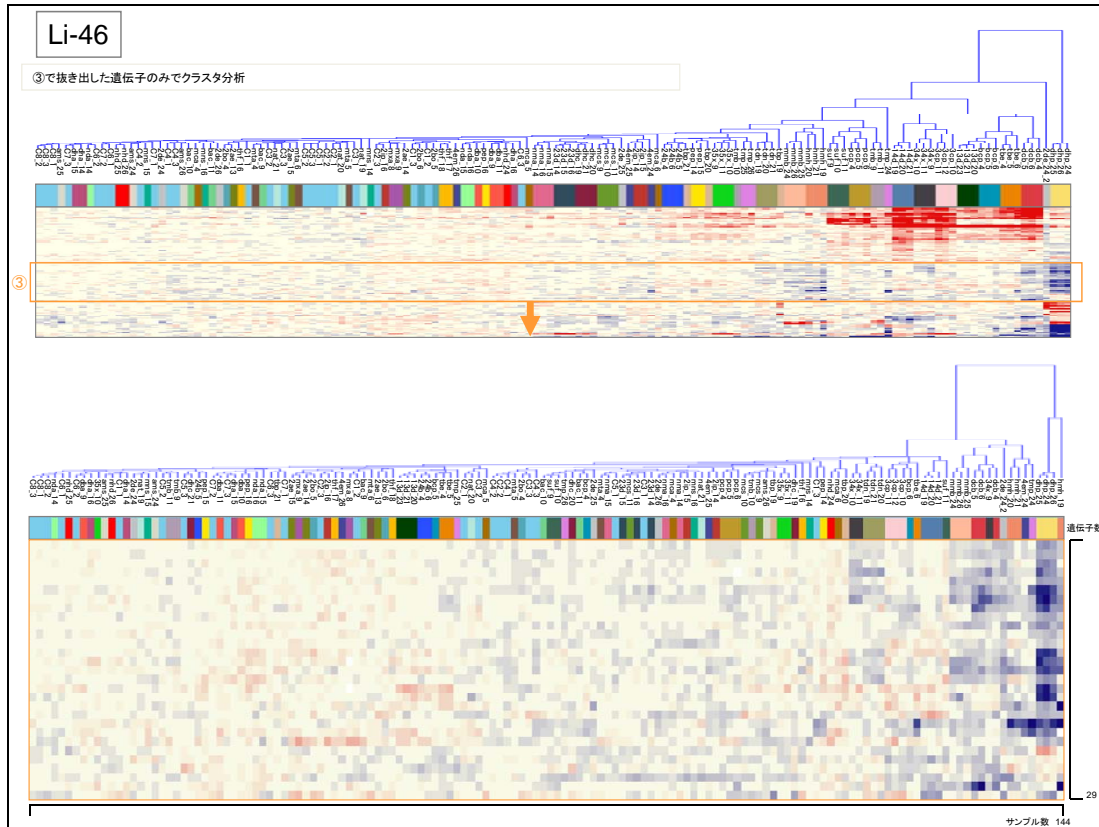


図 III.3-105 生体応答遺伝子発現データセット Li-46 (29プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (29プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表示しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

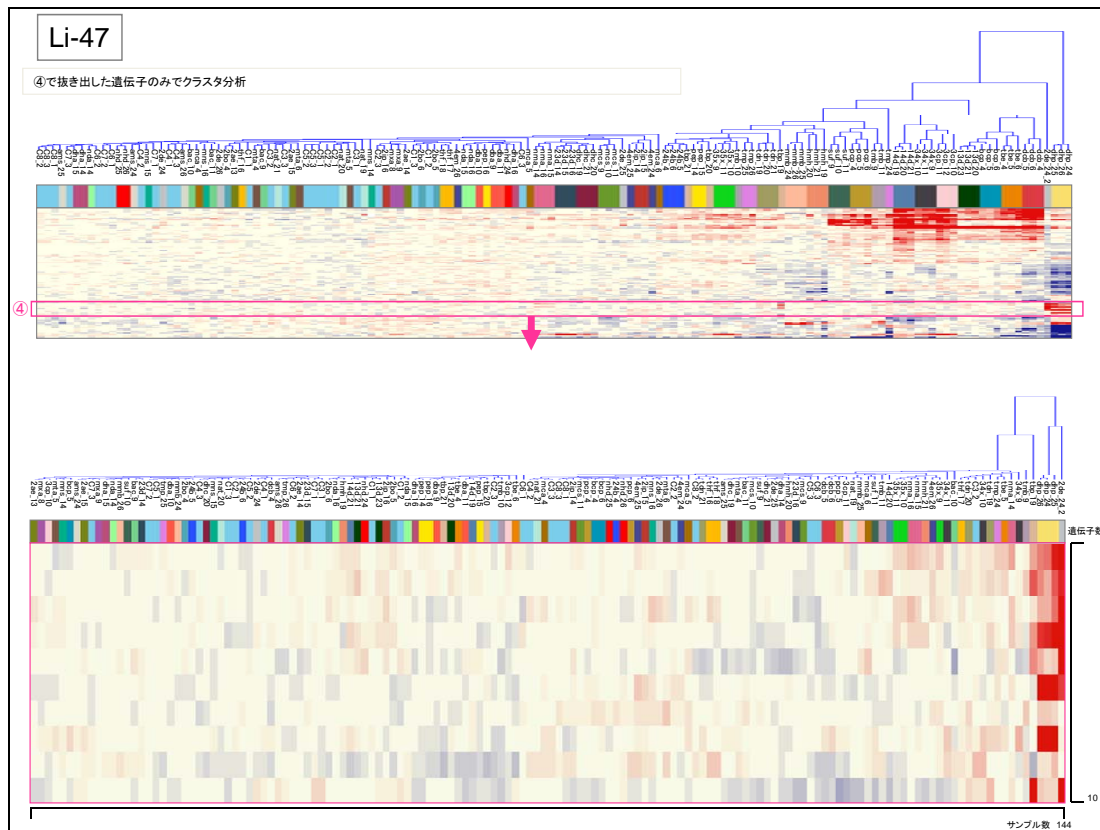


図 III.3-106 生体応答遺伝子発現データセット Li-47 (10プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (10プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

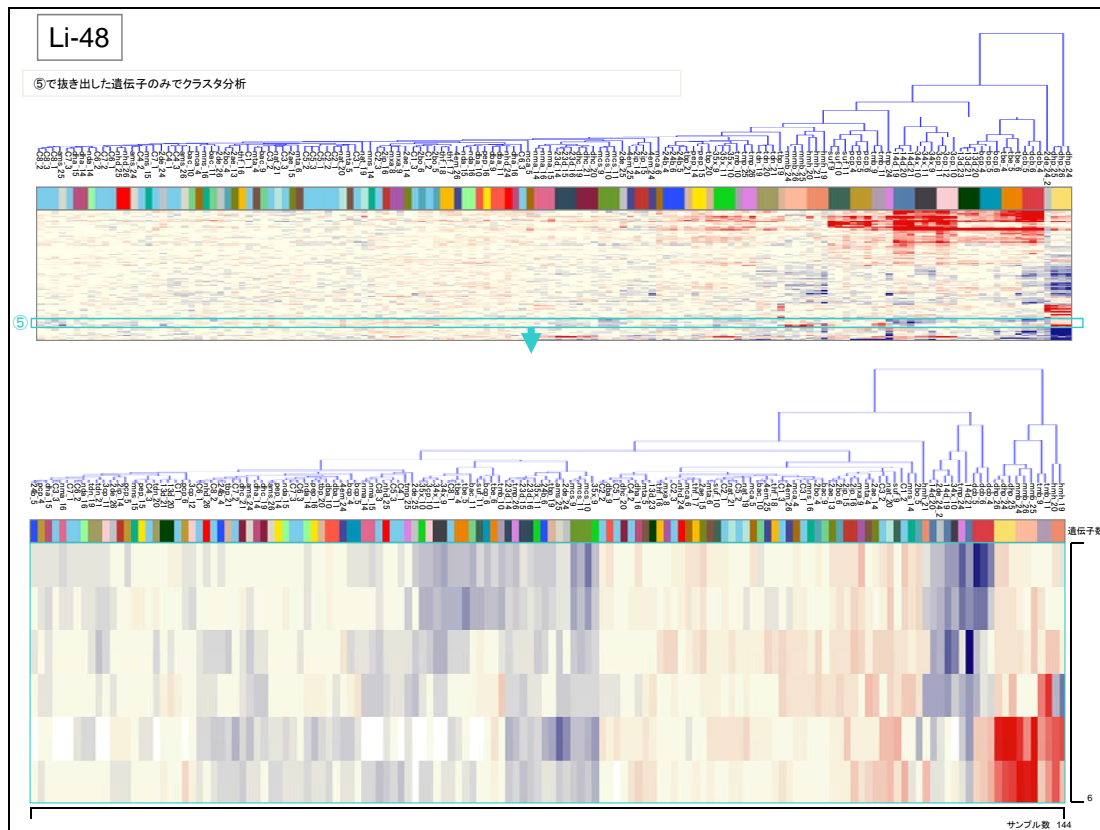


図 III.3-107 生体応答遺伝子発現データセット Li-48 (6プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (6プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

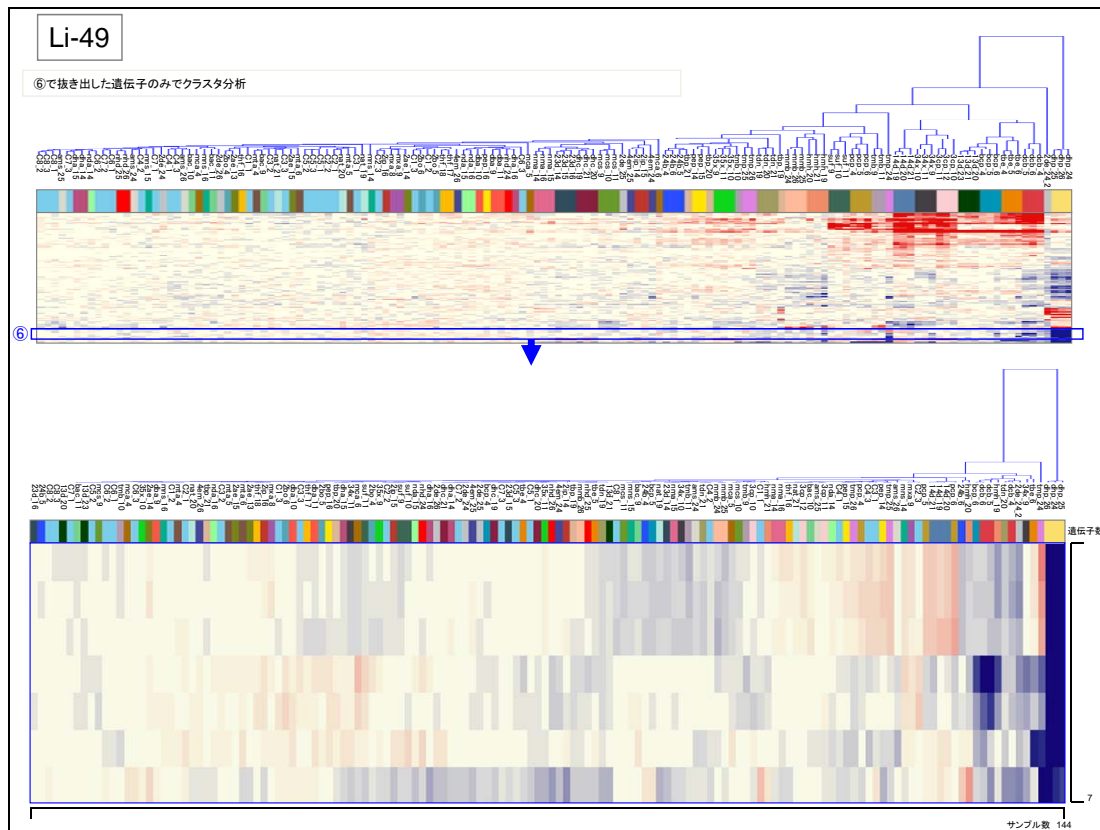


図 III.3-108 生体応答遺伝子発現データセット Li-49 (7プローブ)

図 III.3-102 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し (7プローブ)、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(6) まとめ

化学物質を28日間反復投与することにより肝臓において何らかの病理変化が生じた化学物質に発現変動した遺伝子数が多かったことは、遺伝子発現変動解析は従来の毒性試験の結果と相関していることを意味している。一方、各種生体応答遺伝子発現データセットによりクラスタ分析を行った結果、複数の化学物質投与群がいくつかの房を形成したことは、それぞれの生体応答遺伝子の発現パターンが類似した化学物質投与群が複数存在していることを意味し、それらの化学物質を28日間反復投与することにより生体に与える影響の一部は類似していることを示唆する。また、本プロジェクトで取得した生体応答遺伝子発現データセットを用いることにより、他の化学物質が生体 (遺伝子発現レベル) に与える影響を推測できる可能性があることを示唆する。

3. 腎臓における生体応答遺伝子発現データセット

肝臓において、化学物質の有害性評価にとって有用と考えられる多数の生体応答遺伝子発現データセットを取得することができたことから、次に、われわれは腎臓においても生体応答遺伝子発現データセットを取得することを考えた。以下に、いくつかの方法によって取得した生体応答遺伝子発現データセットを示していく。

(1) p-1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) を投与した場合の遺伝子発現変動

p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) を 28 日間反復投与したところ、解剖時の肉眼的所見に大きな個体差があることを確認した (図 III.3-109)。すなわち、3 個体中 1 個体 (tmp-1) は最も影響が大きく、腎臓肥大と多数の灰白色斑が認められた。次に影響が大きかった個体が tmp-3 であり、灰白色斑が認められた。さらに、tmp-2 は見た目ではほとんど対照群と区別ができない状態であった。また、腎臓の重量の測定および血液生化学検査によるクレアチニン (CRE) を測定した結果、剖検所見と相関して tmp-1 の変化が最も大きく、tmp-2 の変化が最も小さかった (図 III.3-110)。そこで、剖検所見の認められた 2 個体 (tmp-1 および tmp-3) のみに着目して発現レベルが変動していた遺伝子群の抽出を試みた。対照群 3 個体の標準偏差を算出し、その標準偏差が 0.5 以上の値を有する遺伝子群を除外した。次に、対照群の平均値を算出し、その平均値に対して化学物質投与群の 3 個体中 2 個体以上で遺伝子発現レベルが 2 倍以上または 2 分の 1 以下の値を有する遺伝子群を抽出した。その結果、271 プローブ (生体応答遺伝子発現データセット Ki-23) を特定した (図 III.3-111)。その 271 プローブに該当する遺伝子群の遺伝子発現変動パターンを比較したところ、変化の度合いが小さかった個体 (tmp-2) でも発現レベルが変動していた (図 III.3-111)。また、各投与群の血液生化学検査および腎臓の重量を測定したところ、個体間の発現変動の度合いは血液生化学や腎臓の重量の変化と相関していた。

上記で特定したプローブ (遺伝子) の中には、既知の腎毒性マーカーである kidney injury molecule-1 (KIM-1) や clusterin も含まれており、それらの発現レベルの変動の程度は血液生化学検査の結果 (CRE など) や腎臓の重量の変動と相関していた (図 III.3-112)。このことは、上記のようにして特定した生体応答遺伝子発現データセットを構成する遺伝子は既知の腎毒性マーカーと同じような発現変動をするものが多いことを示しており、この中には新規腎毒性マーカーになり得る遺伝子が含まれていることを意味する。

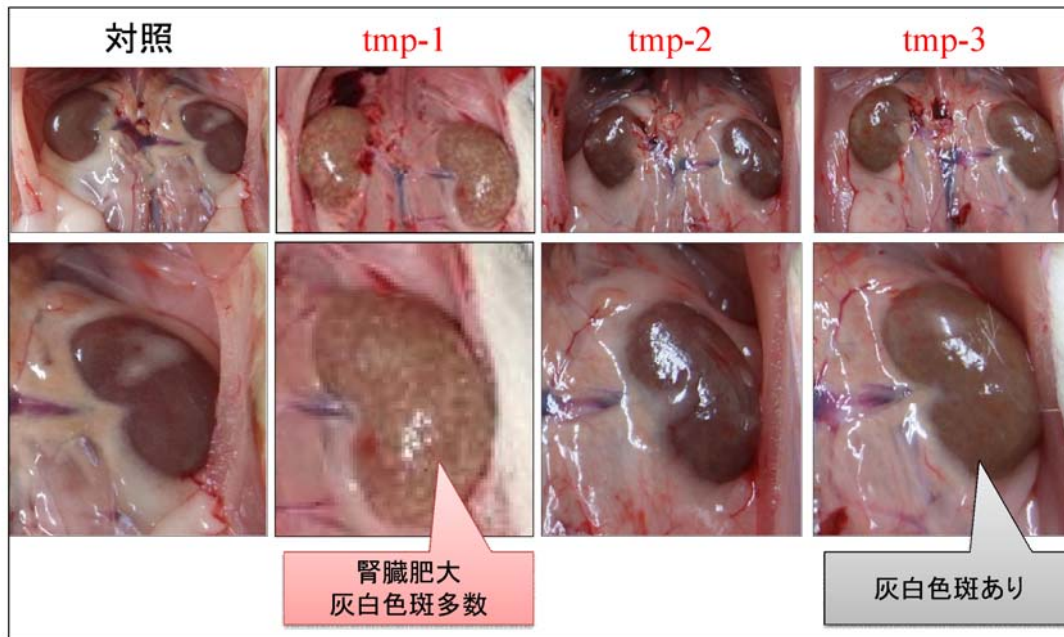


図 III.3-109 p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) 投与による腎臓の剖検観察
 p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) を 28 日間反復投与した後の腎臓の写真を示す。上段は各個体の腎臓の様子を示し、下段は片側の腎臓を拡大した写真を示す。また、一番左の列は対照群の腎臓、左から 2 番目から 4 番目の列はそれぞれ p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群 (tmp) の腎臓である。

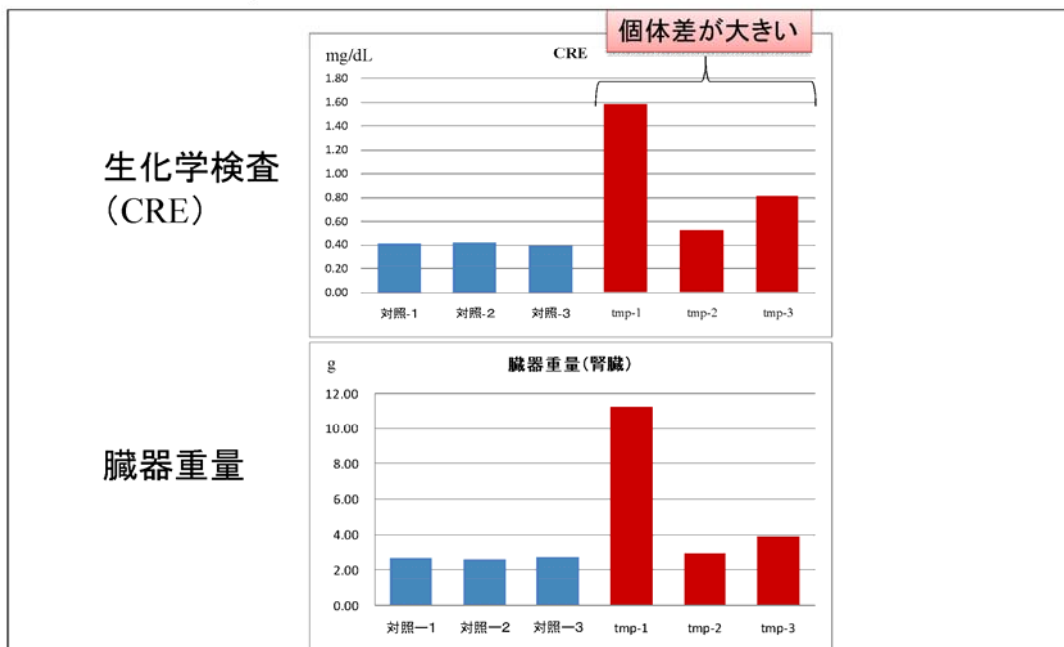


図 III.3-110 p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与の影響の個体差
 p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを 28 日間反復投与した後の各個体の血中クレアチニン量 (CRE) および腎臓重量の値をグラフで示す。

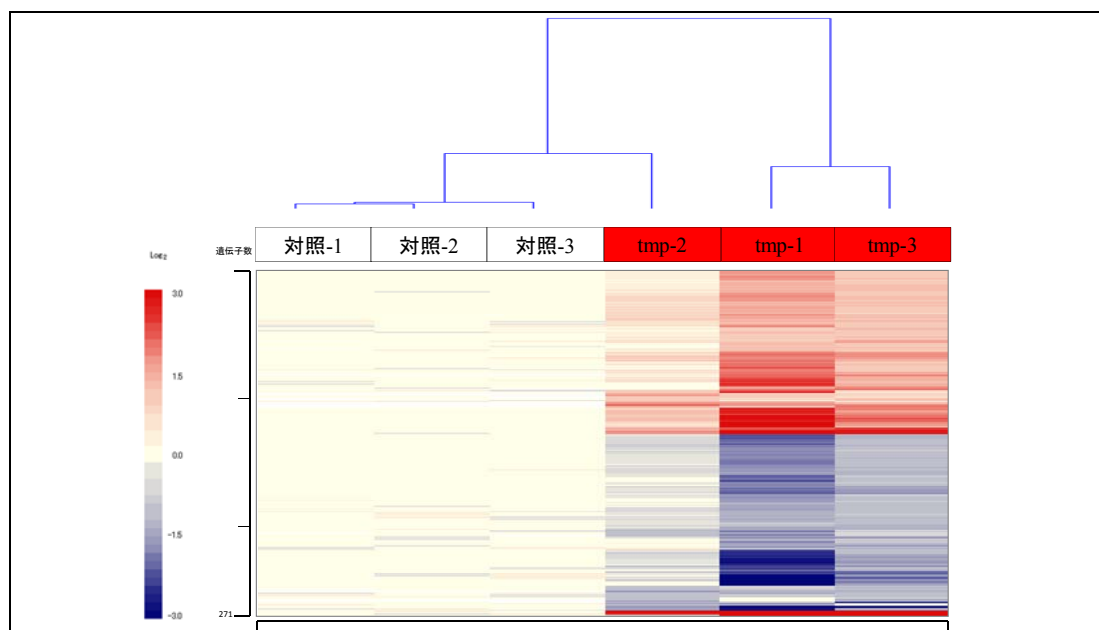


図 III.3-111 生体応答遺伝子セット Ki-23 によるクラスタ分析

p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールにより発現変動した遺伝子群 (271プローブ) を用いたクラスタ分析した結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

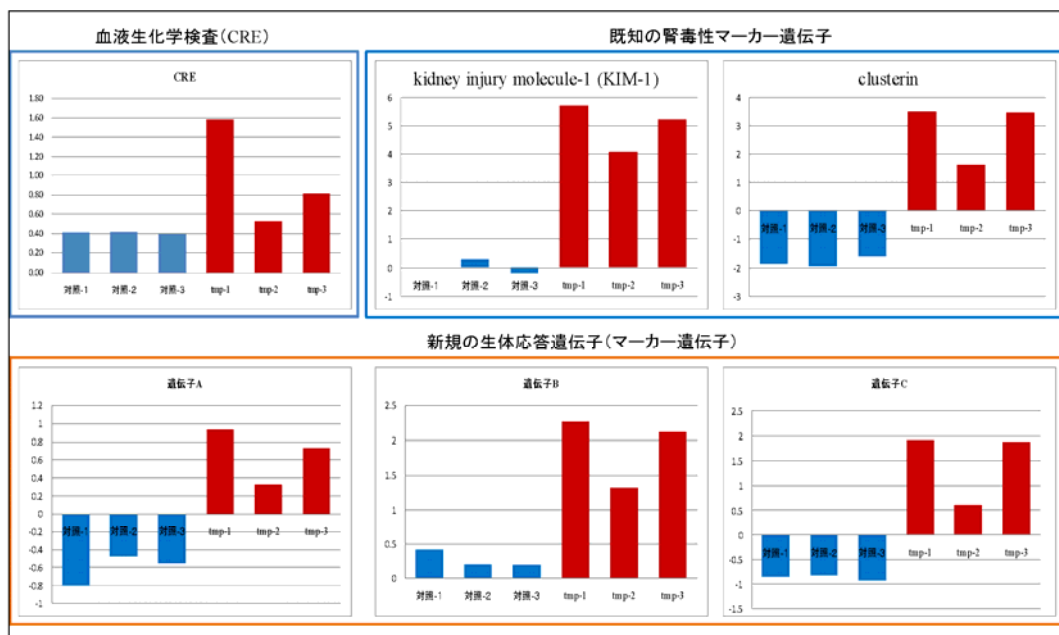


図 III.3-112 既知の腎毒性マーカーの発現変動

p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノールを28日間反復投与した後の血中クレアチニンの測定値(左上)と既知腎毒性マーカー遺伝子である kidney injury molecule-1 (KIM-1) (中央上) および clusterin (右上) の発現比をグラフで示す。また、生体応答遺伝子セット Ki-23 に含まれている遺伝子で代表的なものの発現比をグラフで示す(右下、中央下、左下)。

(2) p-クミルフェノール (pcp) を投与した場合の遺伝子発現変動

次に、生体応答遺伝子発現データセット Ki-23 を用いてクラスタ分析を行ったところ、2つの大きな房が形成され、さらに、左の房はいくつかの小さな房を形成していた(図 III.3-113)。遺伝子の発現変動の程度に着目したところ、一番右の房に含まれる p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群の2個体が最も大きな変動をしていた。また、その左隣の房には p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群の1個体 (tmp-2) と共に p-クミルフェノール投与群 (pcp) の3個体が含まれていた。このことは、p-クミルフェノール (pcp) を28日間反復投与による腎臓への影響が p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) を28日間反復投与による腎臓への影響と類似する可能性があることを意味している。そこで、クレアチニン (CRE) の値を比較したところ、p-クミルフェノール投与群 (pcp) 3個体の値は p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群のうち最も影響が小さかった個体 (tmp-2) と同レベルであった(図 III.3-114)。クレアチニンの測定値は生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析の結果と相関していた。

そこで、われわれは p-クミルフェノール投与群 (pcp) で発現変動している遺伝子群を抽出した。その結果、74プローブ(生体応答遺伝子発現データセット Ki-24)が抽出された(図 III.3-115)。この遺伝子発現データセットを用いて他の化学物質を含めたクラスタ分析

を行ったところ、大きく2つの房を形成し、p-クミルフェノール投与群 (pcp) の3個体とp-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群の2個体が同じ房を形成していた (図 III.3-116)。生体応答遺伝子発現データセット Ki-24 の遺伝子発現変動パターンを比較したところ、p-クミルフェノール投与群 (pcp) と p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群は一部類似していたが、一部は異なっている部分も存在した。

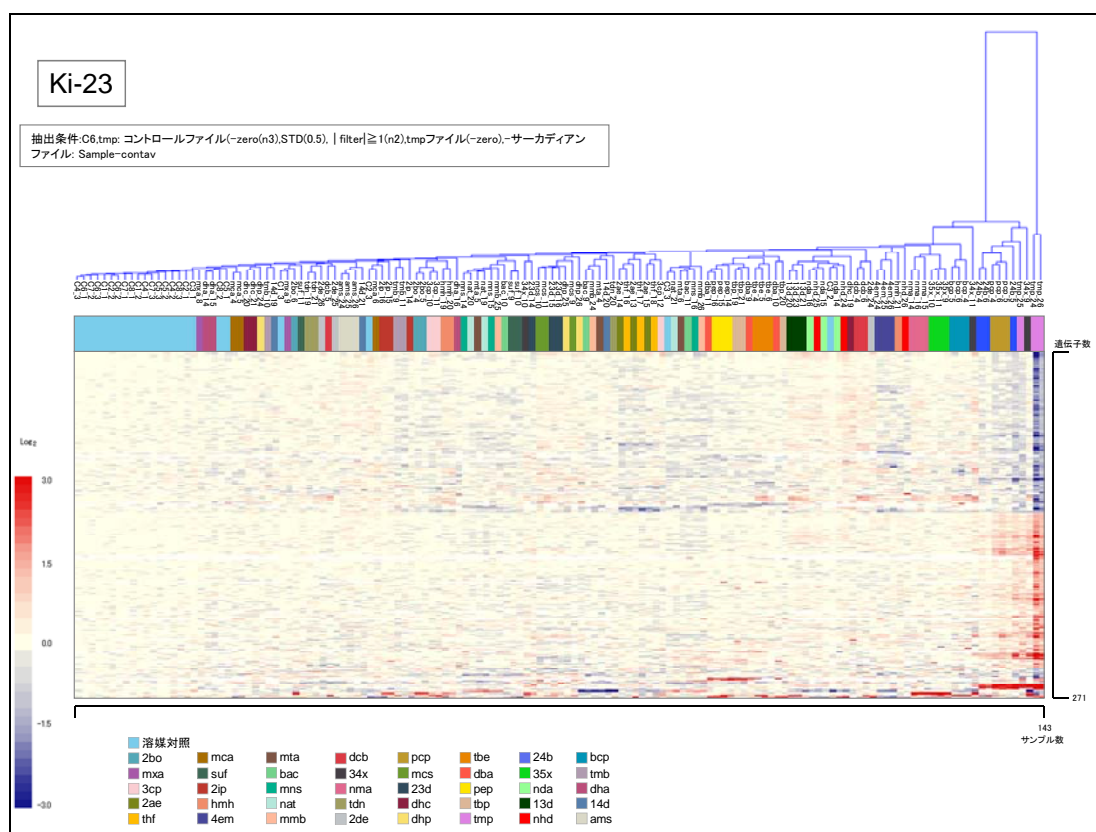


図 III.3-113 生体応答遺伝子発現データセット Ki-23 によるクラスタ分析

生体応答遺伝子発現データセット Ki-23 (271プローブ) を用いてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

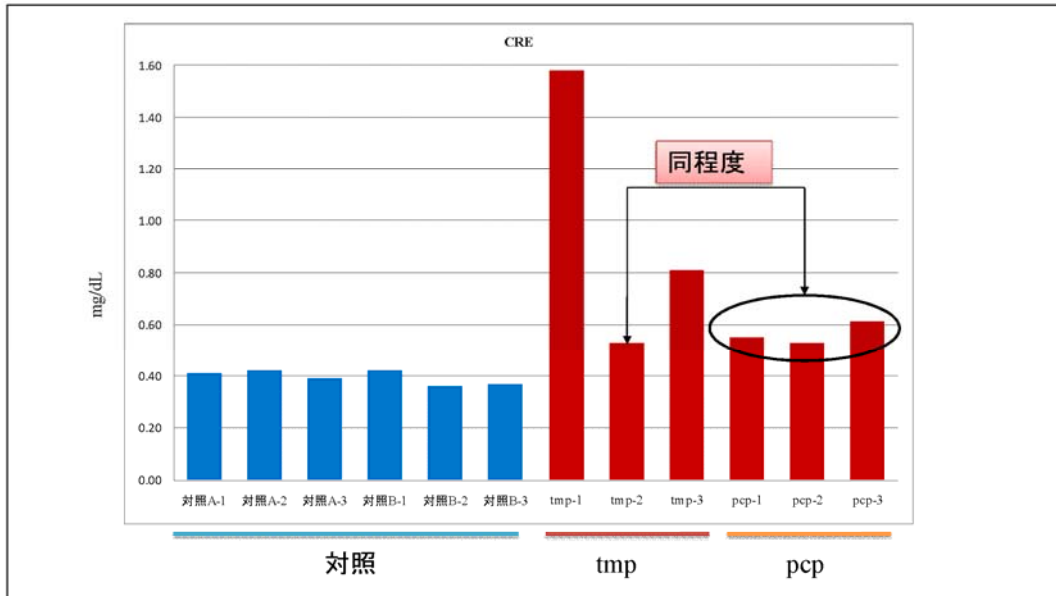


図 III.3-114 p-クミルフェノール投与群 (pcp) のクレアチニン (CRE) の変動
p-クミルフェノール投与群、p-(1,1,3,3-テトラメチルプチル)フェノール投与群、またはそれぞれの対照を28日間反復投与した後の血中クレアチニンの濃度をグラフに示す。

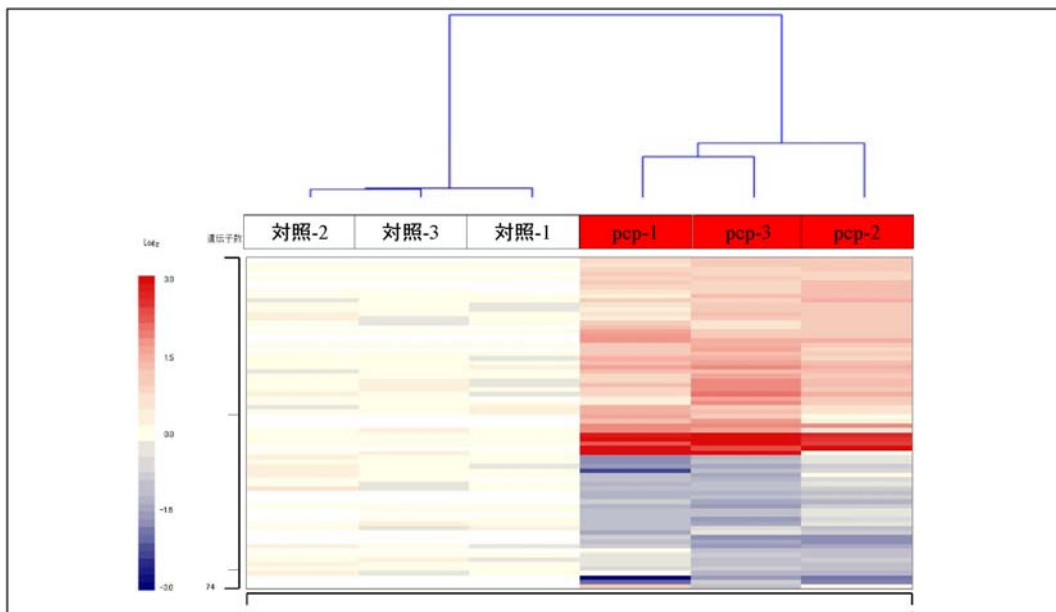


図 III.3-115 生体応答遺伝子発現データセット Ki-24 (74プローブ)
p-クミルフェノール投与により発現変動した遺伝子群 (271プローブ) を用いたクラスタ分析した結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表示しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

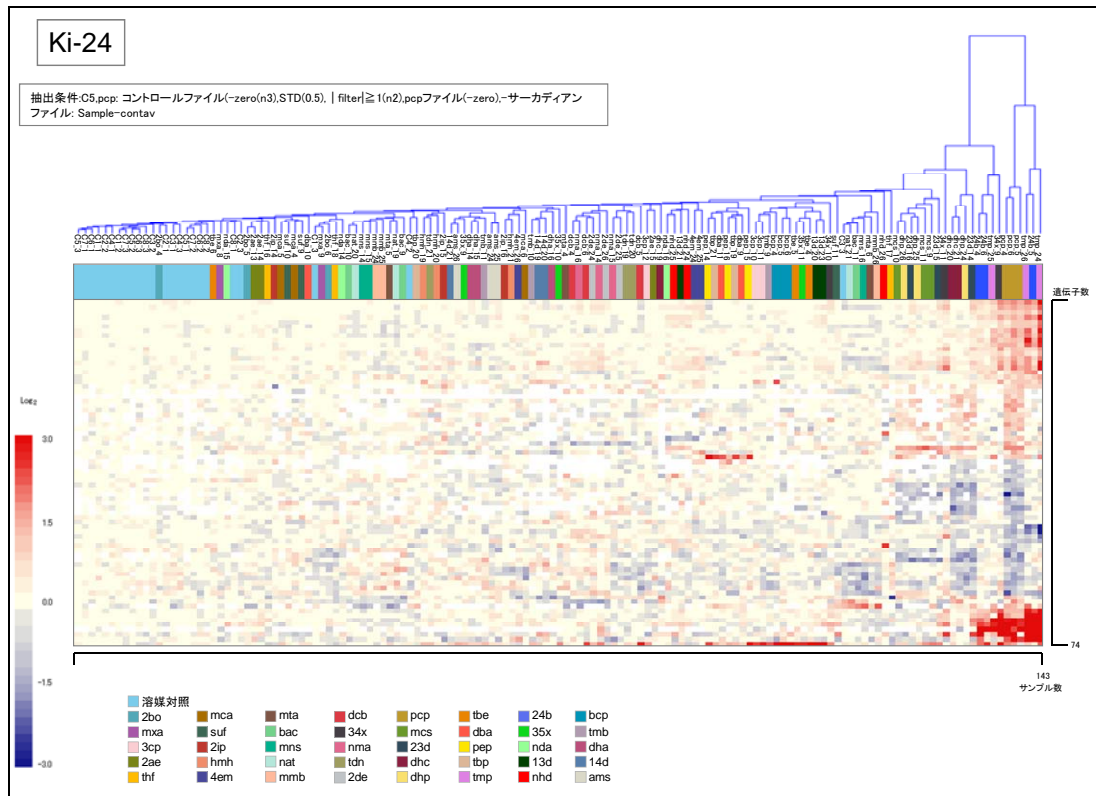


図 III.3-116 生体応答遺伝子発現データセット Ki-24 によるクラスタ分析

生体応答遺伝子発現データセット Ki-24 (74プローブ) を用いてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(3) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (t 検定)

我々は、肝臓の場合と同様にして、それぞれの化学物質と対照群との間で t 検定を行い、腎臓において発現レベルに有意な差 (P 値<0.01) があつたもの、かつ、各群の平均値を算出し両者の平均値の差が 2 倍以上の遺伝子 (生体応答遺伝子) を抽出し、13 種類の生体応答遺伝子発現データセットを取得した (図 III.3-117~129)。

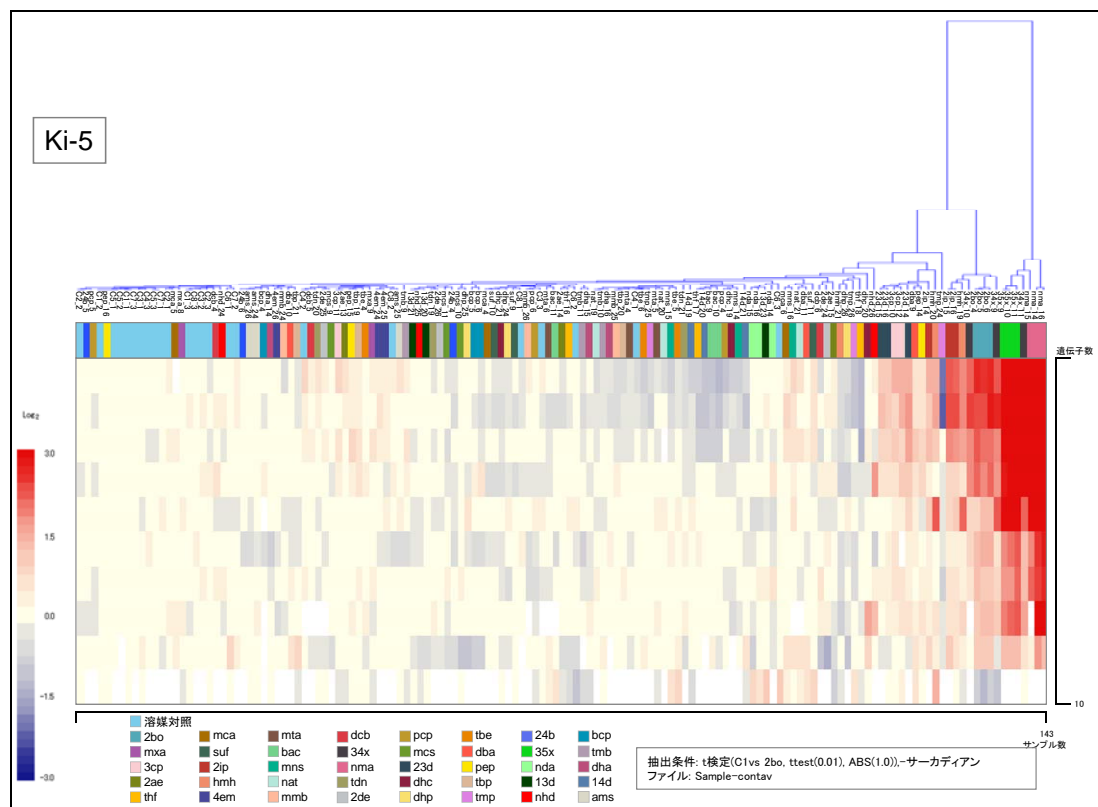


図 III.3-117 2-ブタノンオキシム投与群 (2bo) で発現変動した遺伝子群 Ki-5 (10プローブ)

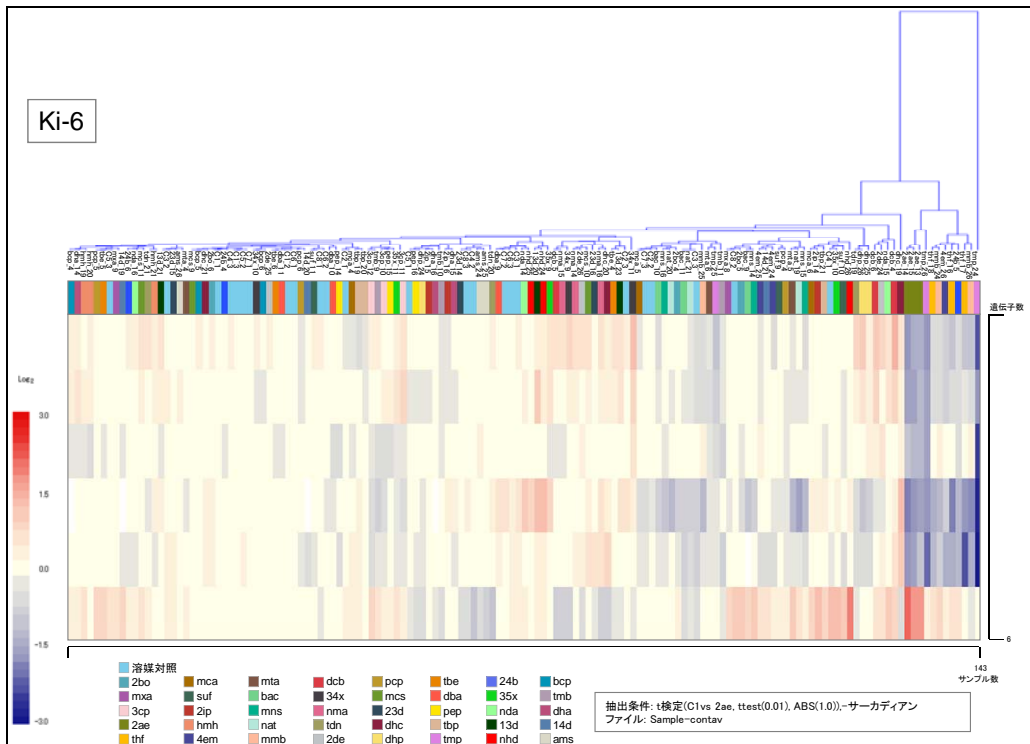


図 III.3-118 2-(2-アミノエチルアミノ) エタノール投与群 (2ae) で発現変動した遺伝子群 Ki-6 (6プローブ)

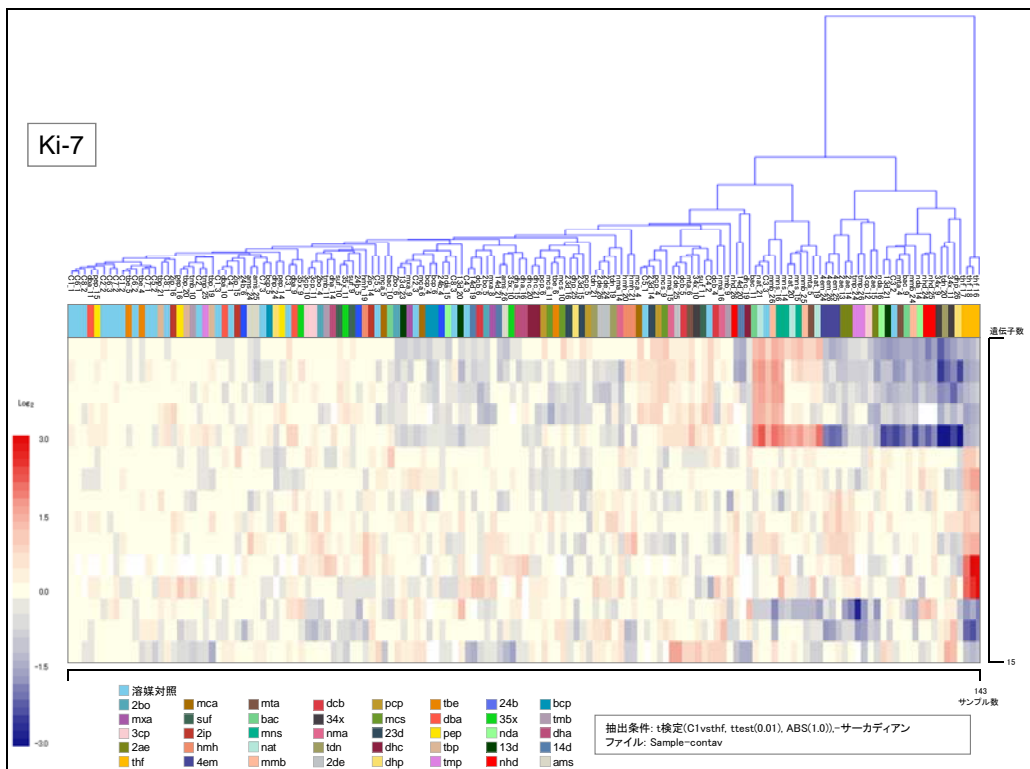


図 III.3-119 テトラヒドロフルフリルアルコール投与群 (thf) で発現変動した遺伝子群 Ki-7 (15プローブ)

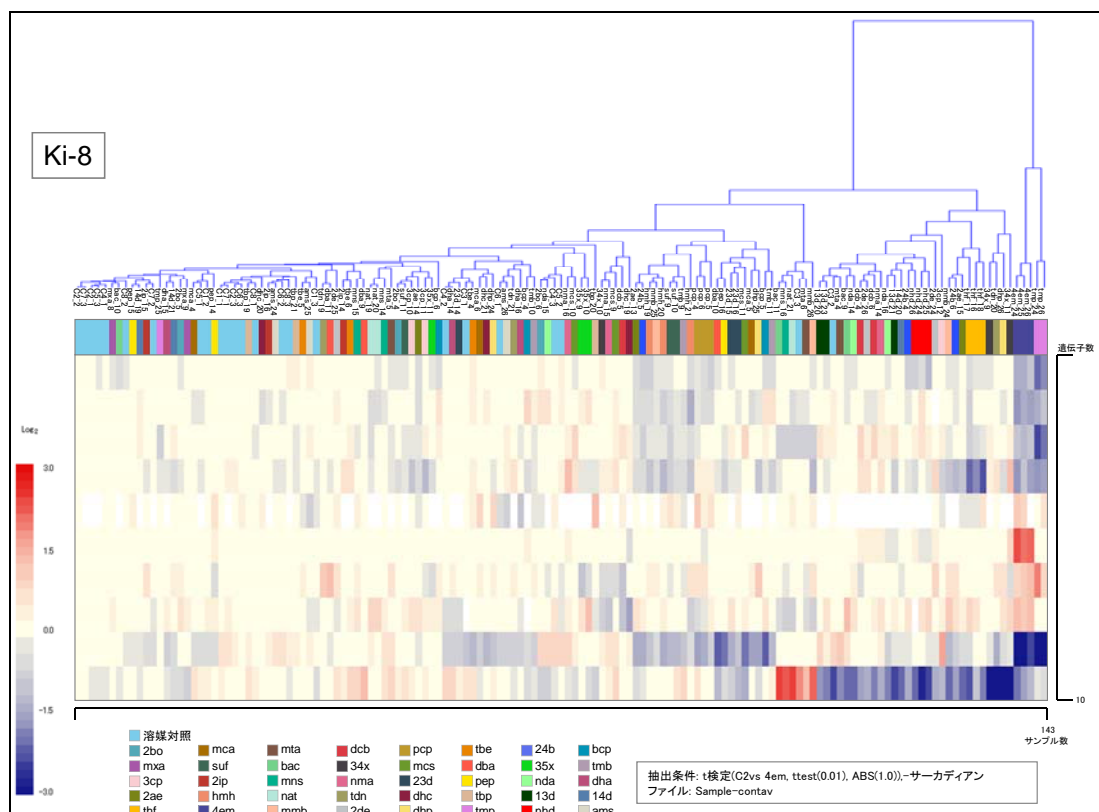


図 III.3-120 4-エチルモルホリン投与群 (4em) で発現変動した遺伝子群 Ki-8 (10プローブ)

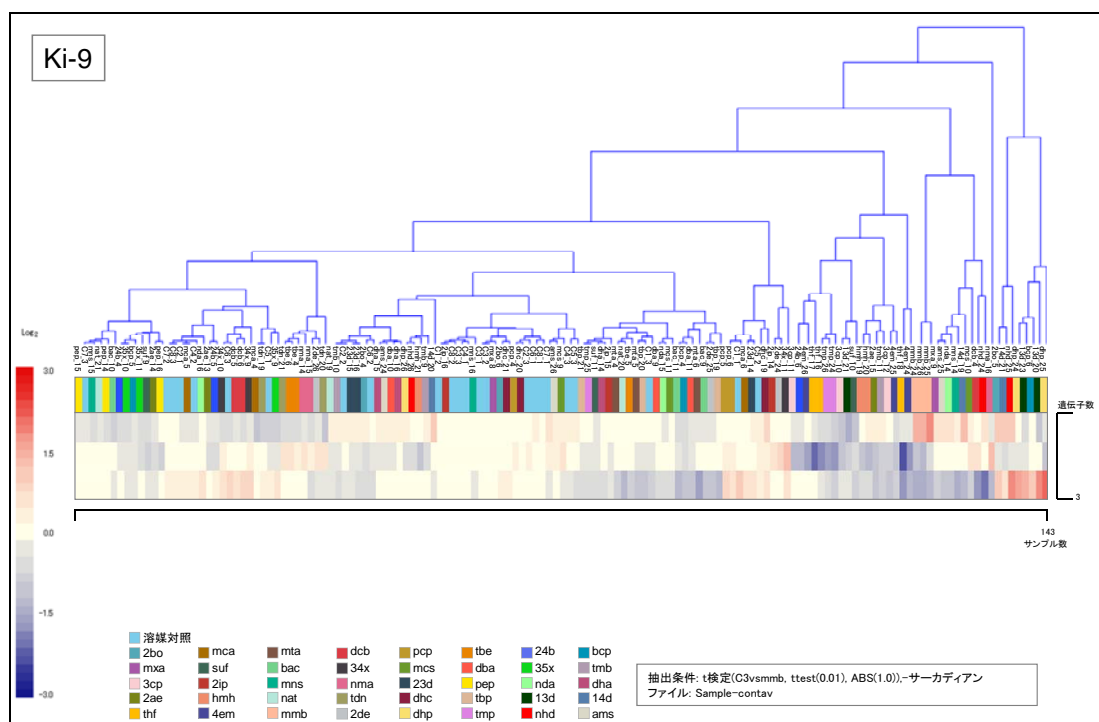


図 III.3-121 3-メトキシ-3-メチル-1-ブタノール投与群 (mmb) で発現変動した遺伝子群 Ki-9 (3プローブ)

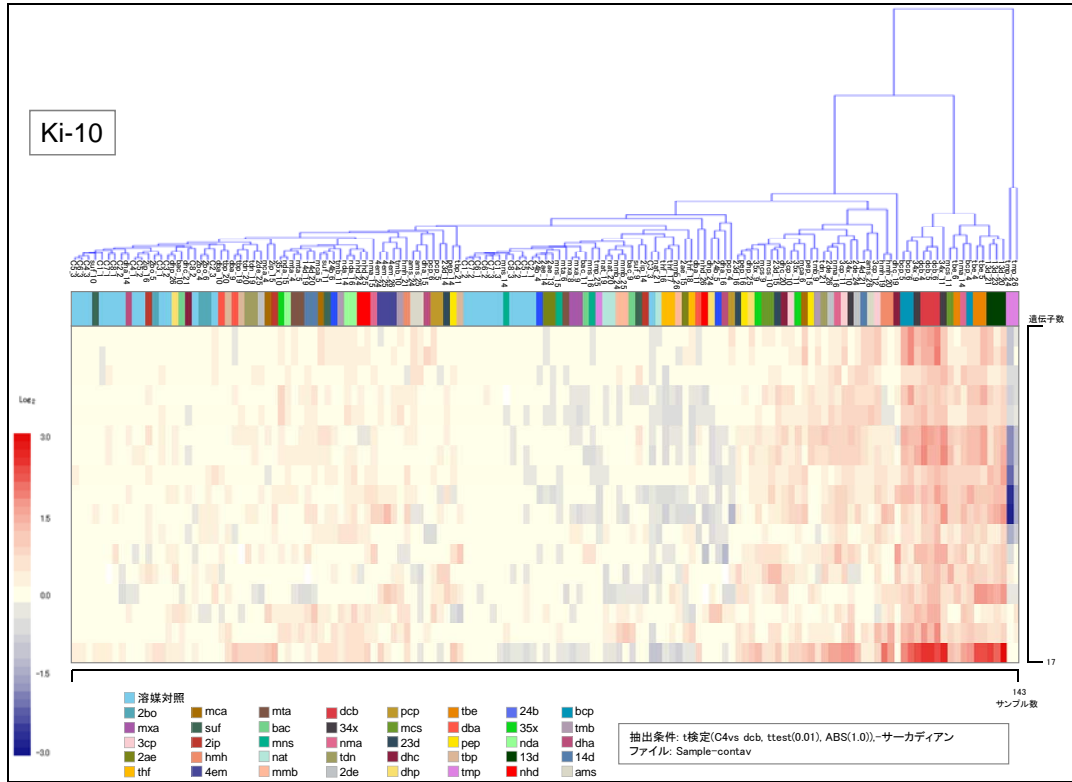


図 III.3-122 o-ジクロロベンゼン投与群 (dcb) で発現変動した遺伝子群 Ki-10 (17プローブ)

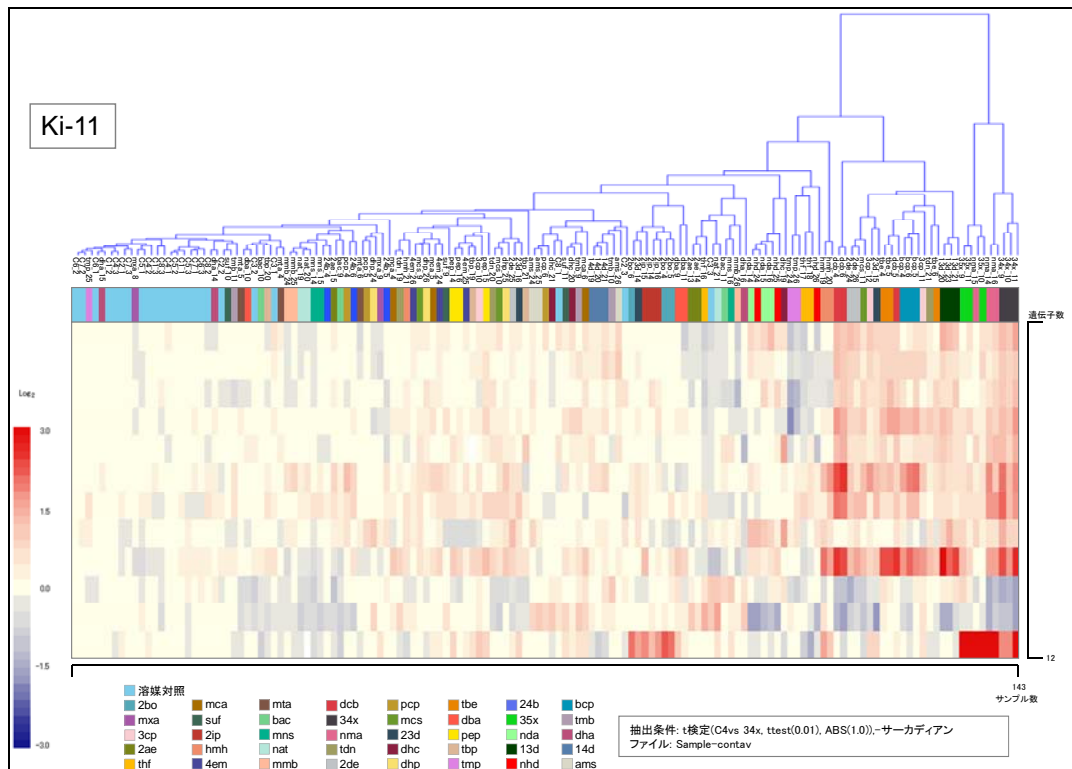


図 III.3-123 3,4-キシリジン投与群 (34x) で発現変動した遺伝子群 Ki-11 (12プローブ)

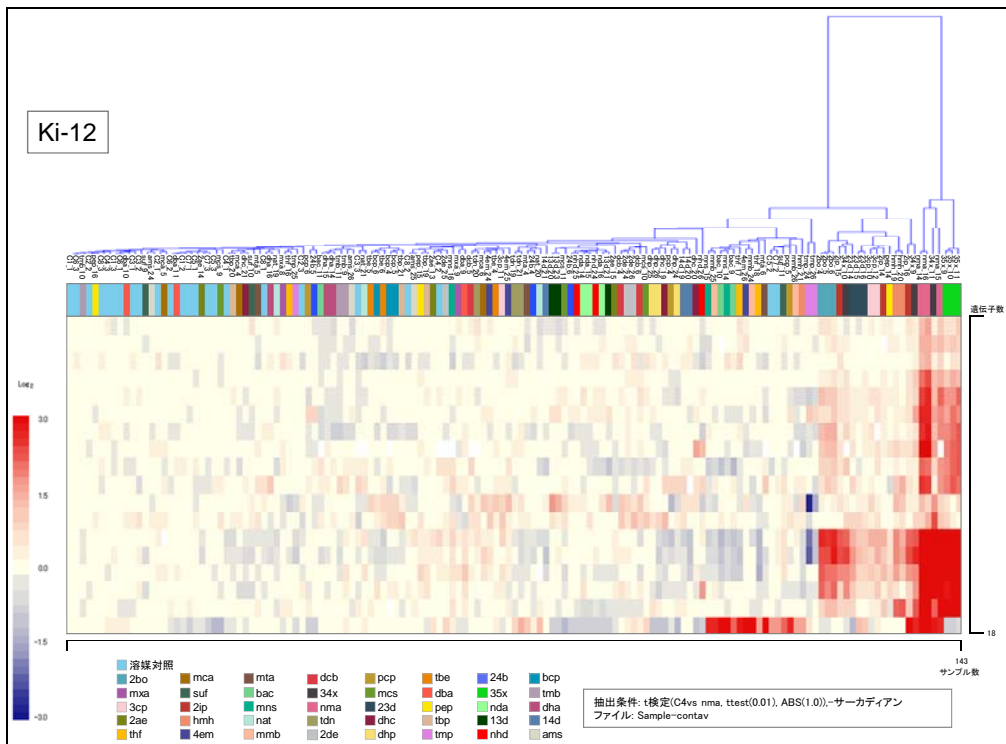


図 III.3-124 N-メチルアニリン投与群 (nma) で発現変動した遺伝子群 Ki-12 (18プロ
 プ)

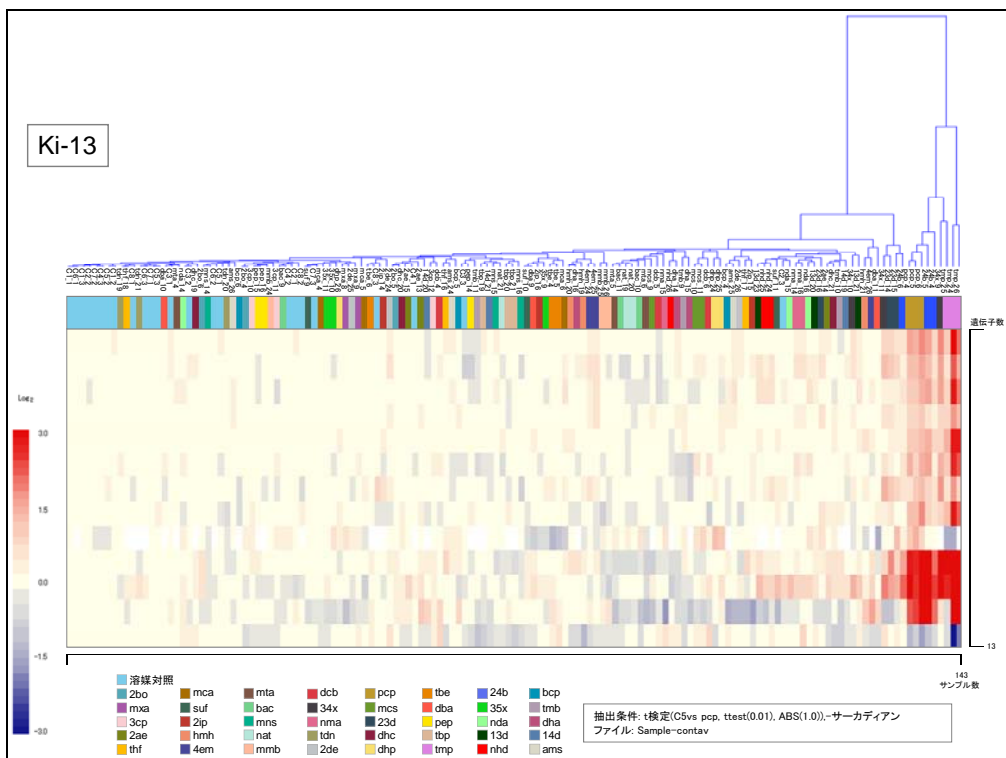


図 III.3-125 p-クミルフェノール投与群 (pcp) で発現変動した遺伝子群 Ki-13 (13プロ
 ープ)

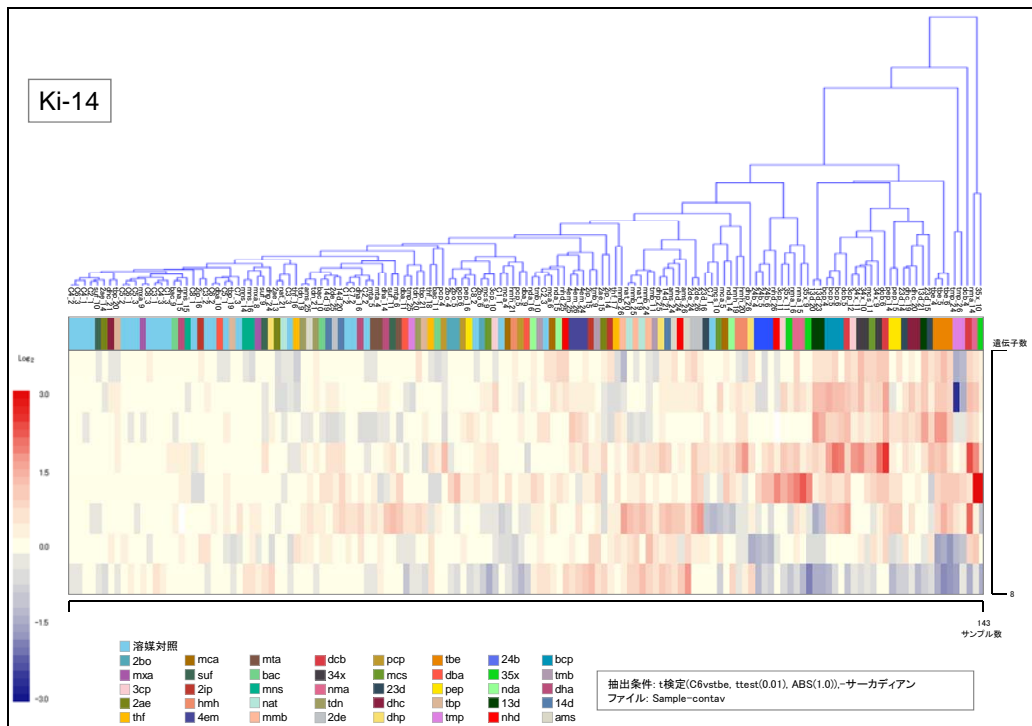


図 III.3-126 テトラプロモエタン投与群 (tbe) で発現変動した遺伝子群 Ki-14 (8プローブ)

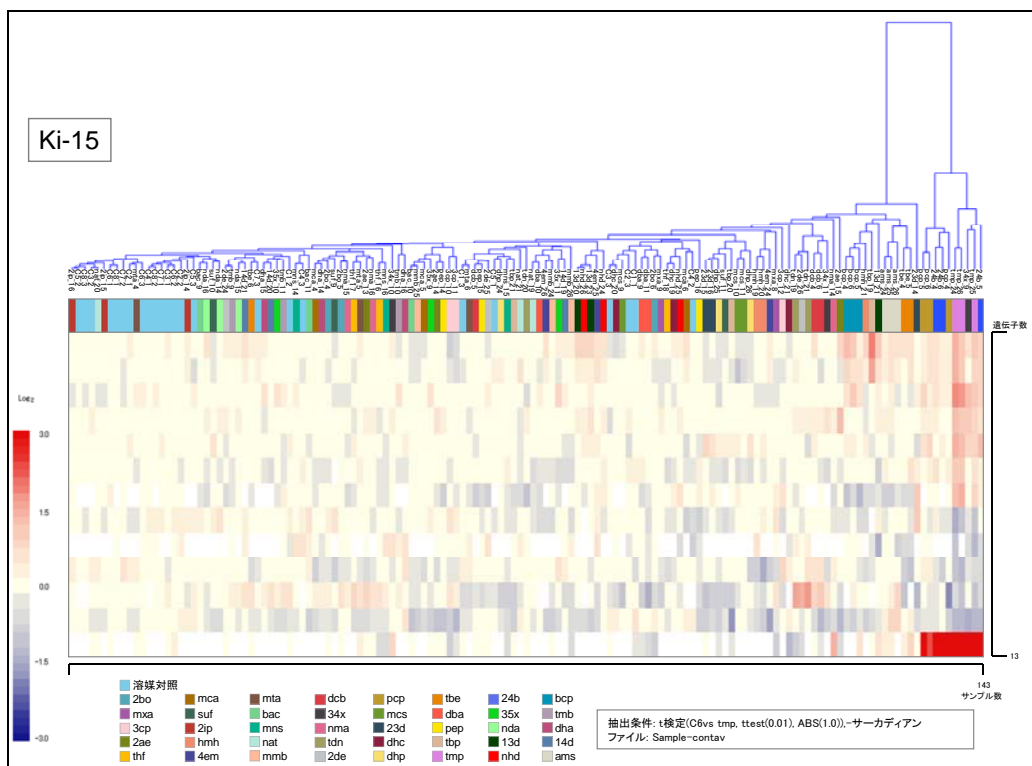


図 III.3-127 p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール投与群 (tmp) で発現変動した遺伝子群 Ki-15 (13プローブ)

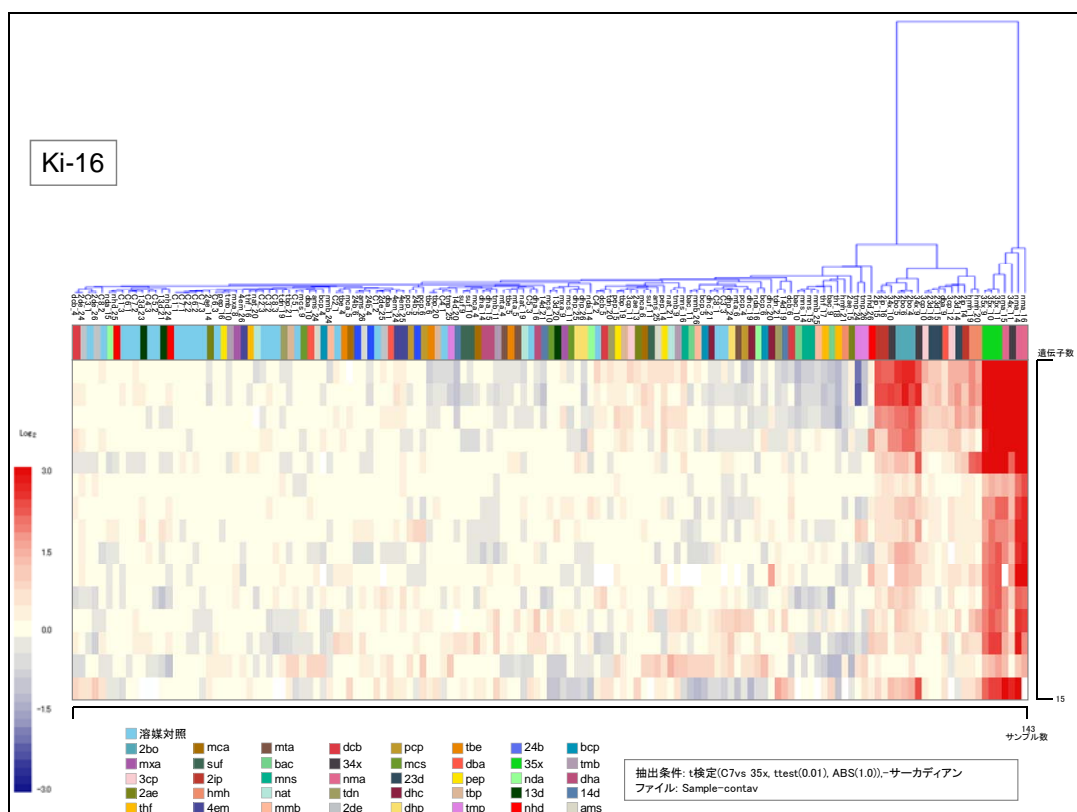


図 III.3-128 3,5-キシリジン投与群 (35x) で発現変動した遺伝子群 Ki-16 (15プローブ)

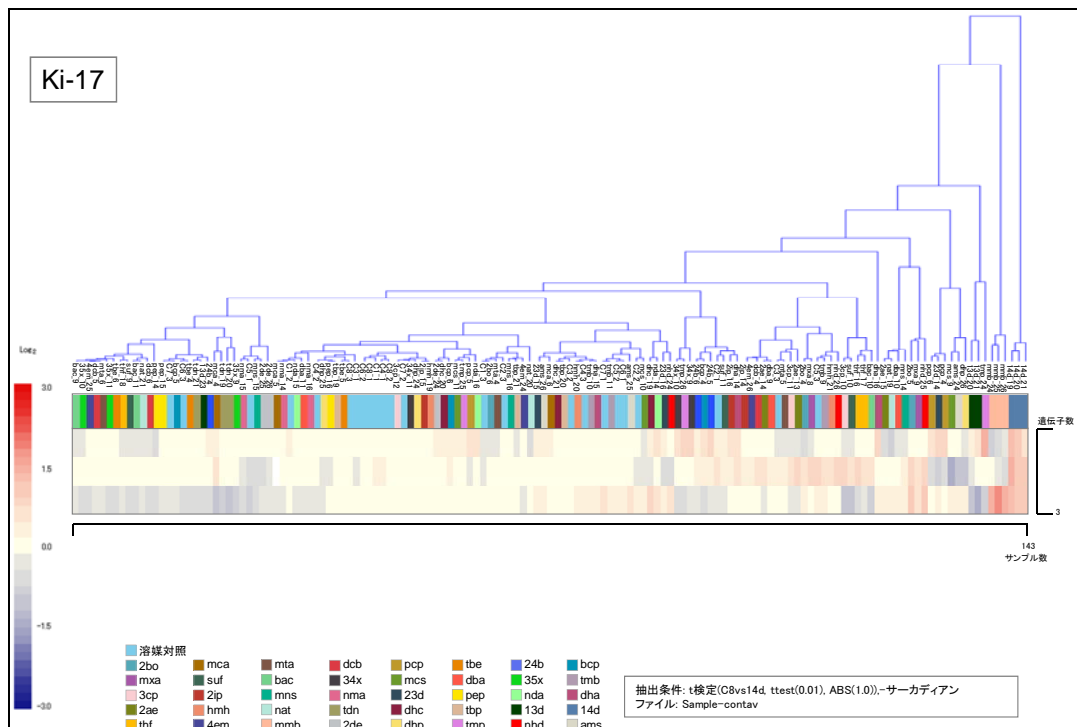


図 III.3-129 1,4-ジプロモベンゼン投与群 (14d) で発現変動した遺伝子群 Ki-17 (3プローブ)

(4) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (複数の化学物質曝露で共通して発現変動する遺伝子群)

肝臓で検討したのと同様に、複数の化学物質投与群に共通した発現変動パターンを示す遺伝子群は、化学物質が標的臓器に与える有害性の評価を行う上で有用であると考えられる。そこで、各群の標準偏差および対照群と化学物質投与群との発現レベルの差を考慮して、3個体中2個体以上で発現レベルが対照群の平均値と比較して2倍以上または2分の1以下となる遺伝子群を抽出し、これらを統合したところ228プローブ存在した (図 III.3-130)。これら228プローブの中から、化学物質を28日間反復投与したことにより複数の化学物質投与群で共通して発現変動した遺伝子群の抽出を試みた (図 III.3-131~133)。

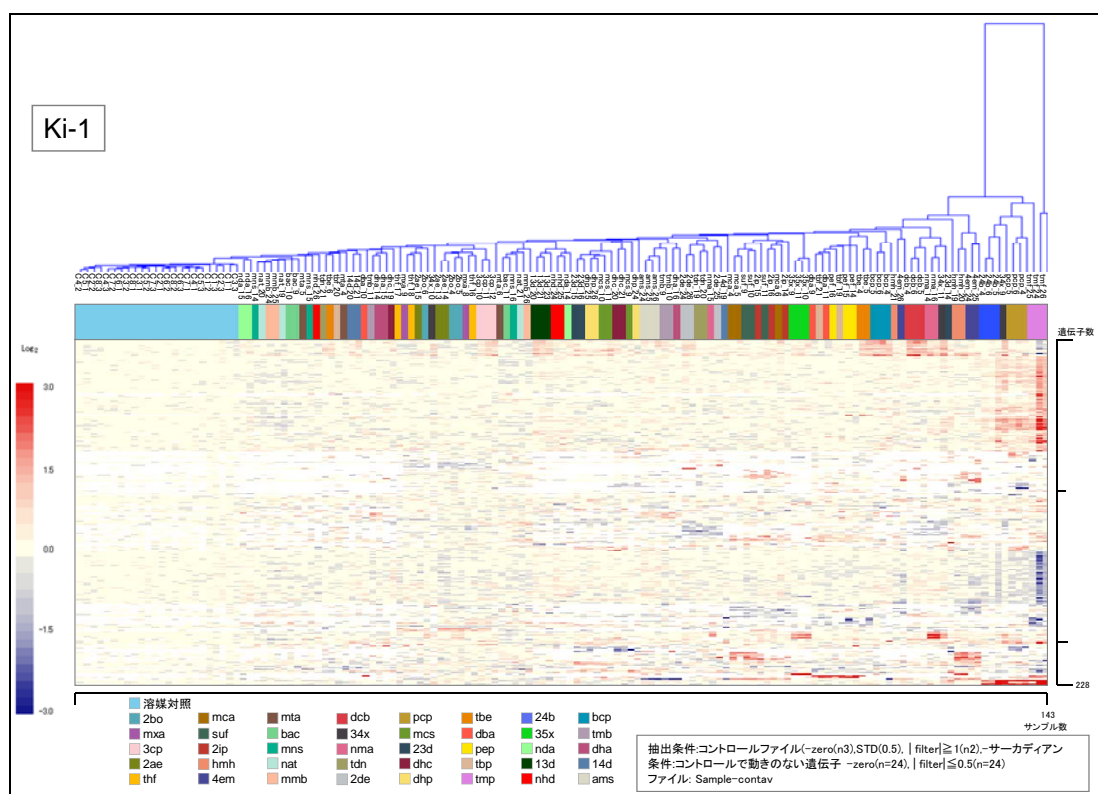


図 III.3-130 1以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Ki-1 (228プローブ)

それぞれの対照群において標準偏差を算出し、標準偏差値が0.5未満の遺伝子を抽出した。その中から、それぞれの化学物質投与群において2個体以上で対照群の平均値に対して発現レベルが2倍以上または2分の1以下の遺伝子を抽出した。化学物質ごとに抽出した遺伝子群を統合してクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

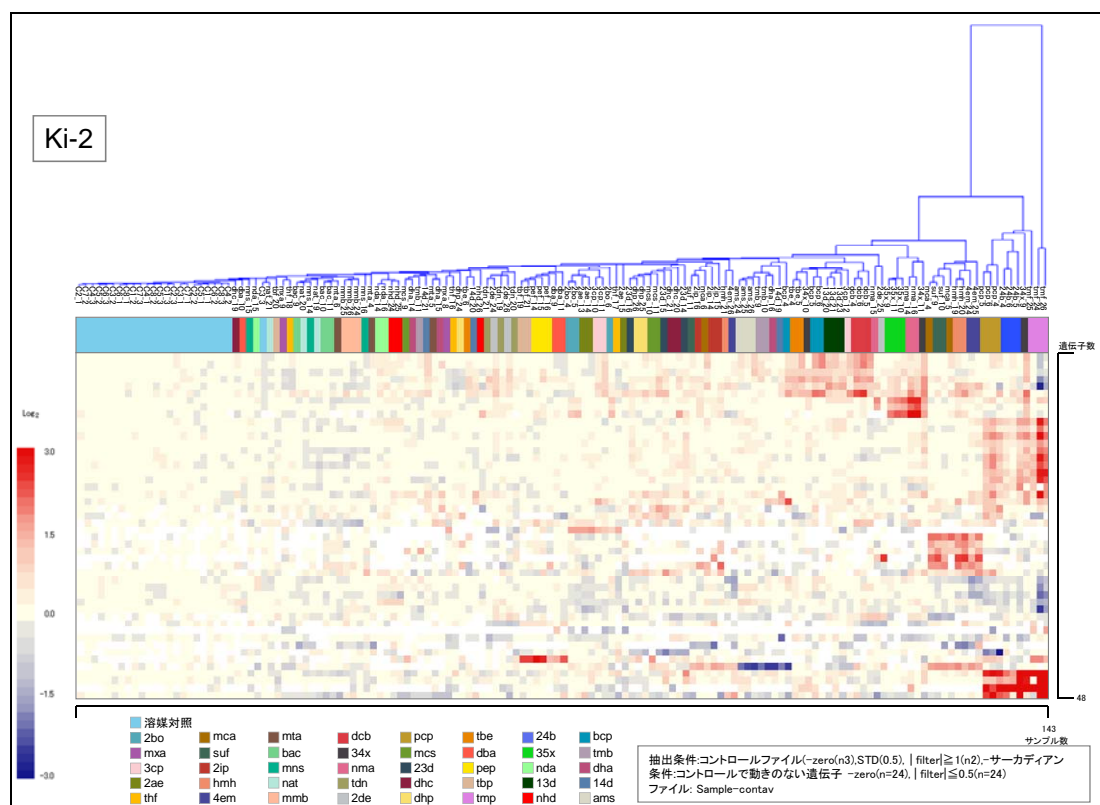


図 III.3-131 2以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Ki-2 (48プローブ)

図 III.3-130 の 228 プローブの中から、2以上の化学物質投与群で図 III.3-130 の抽出条件を満たす遺伝子群を抽出してクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

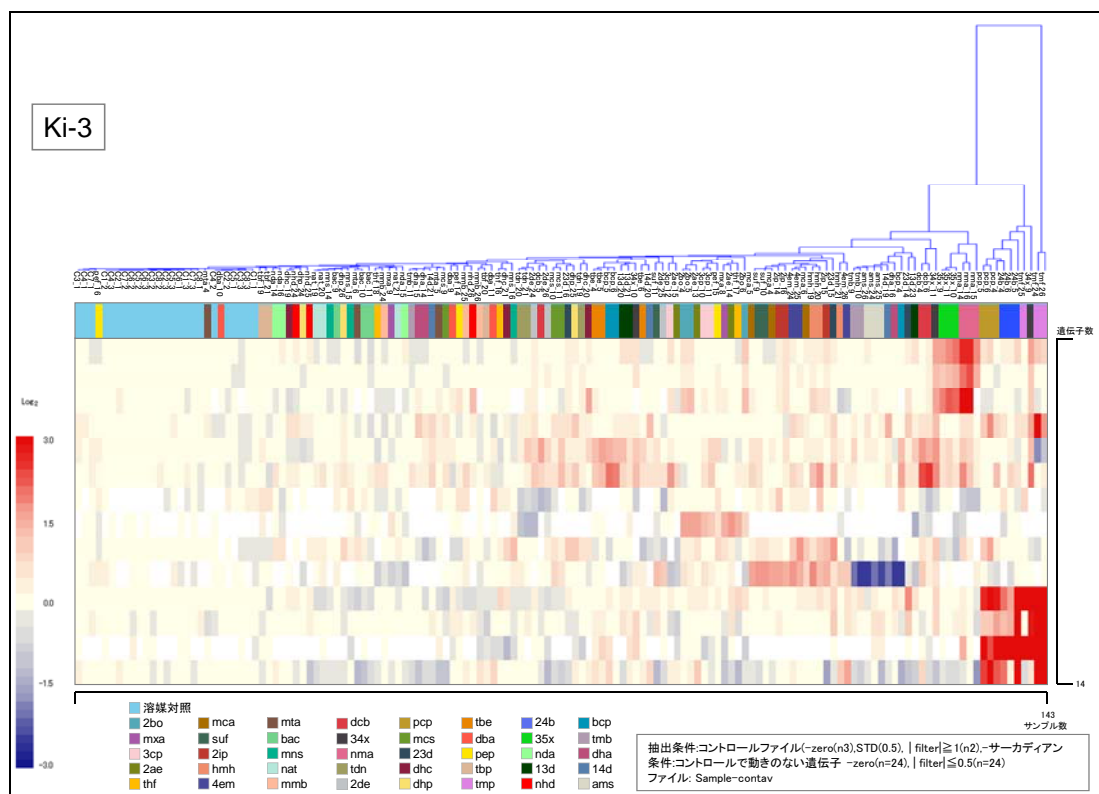


図 III.3-132 3以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Ki-3 (14プローブ)

図 III.3-130 の 228プローブの中から、3以上の化学物質で抽出条件を満たした遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

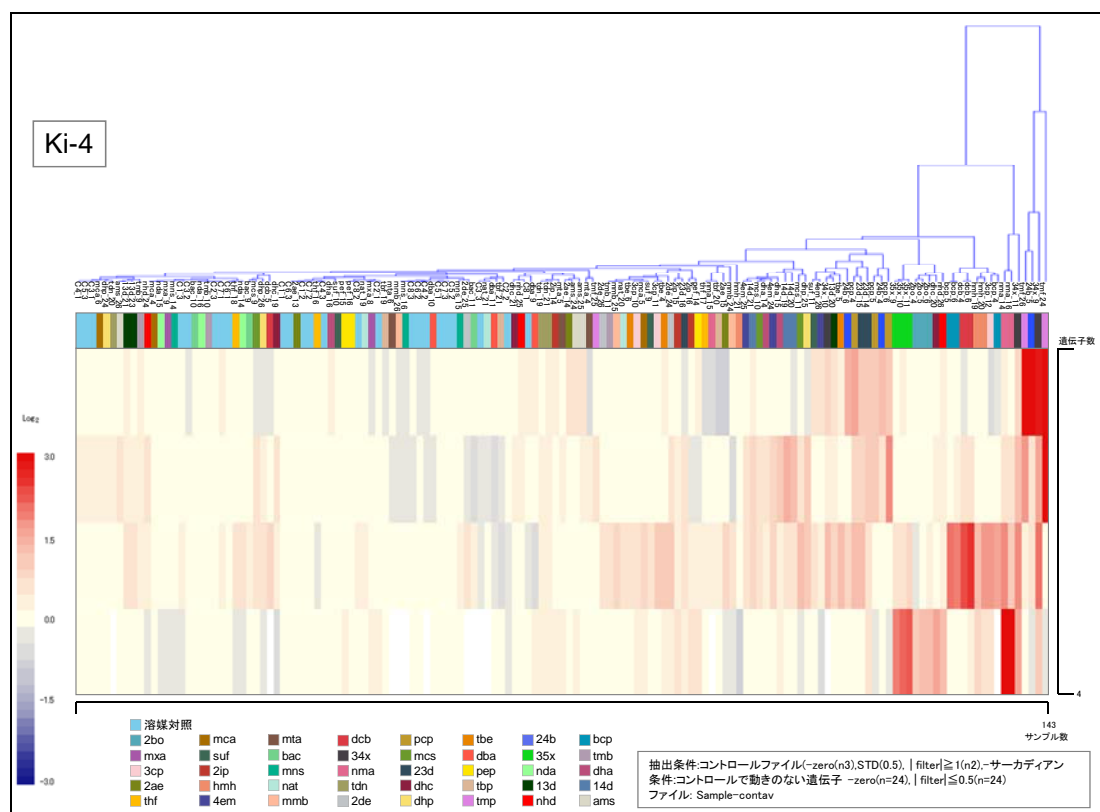


図 III.3-133 4以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群 Ki-4 (4プローブ)

図 III.3-130 の 228 プローブの中から、4以上の化学物質で抽出条件を満たした遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(5) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (サンプル方向の切り分け)

肝臓で行った方法と同様にして、クラスタ分析によって生じたそれぞれの房を分ける遺伝子発現データセットの探索を試みた。生体応答遺伝子発現データセット Ki-1 のクラスタ分析の結果をもとにして、房を切り分けた (図 III.3-134、135)。

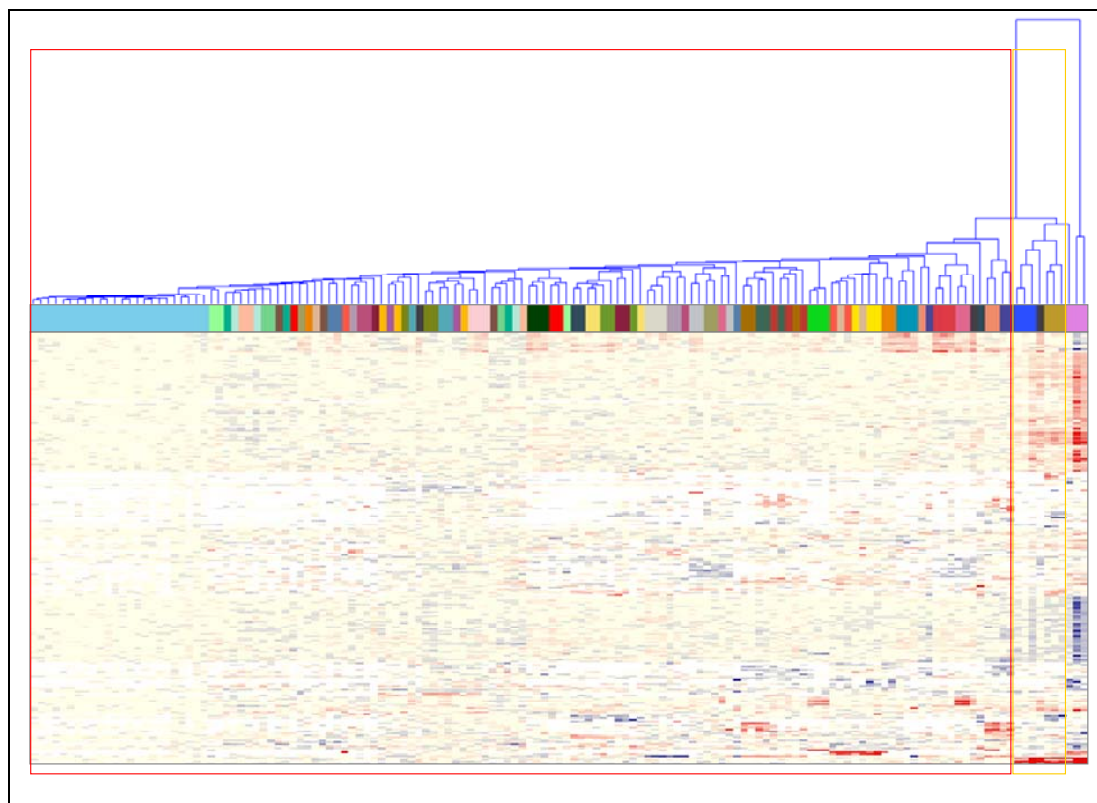


図 III.3-134 40種類の化学物質において発現変動した遺伝子群 (228プローブ) によるクラスタ分析に基づいた、サンプル方向の切り分け

生体応答遺伝子発現データセット Ki-1 (228プローブ) によるクラスタ分析の結果をもとにして、四角で囲んだクラスタを分ける遺伝子発現データセットを探索した。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

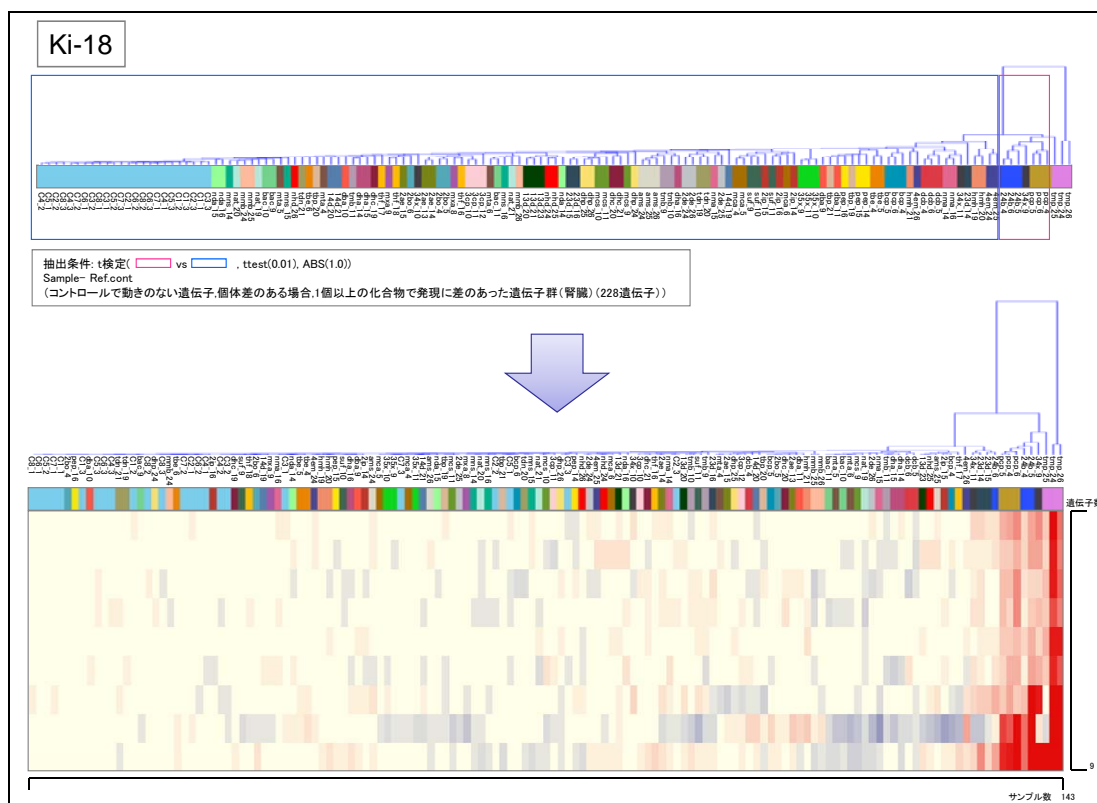


図 III.3-135 生体応答遺伝子発現データセット Ki-18 (9プローブ)

図 III.3-134 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った2つの房の間であらためてt検定を行い、発現レベルが有意 (P値<0.01) に変動している遺伝子群を抽出しクラスタ分析を行った結果を示す(下図)。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(6) 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (遺伝子方向の切り分け)

図 III.3-136 のようにして遺伝子方向の房をいくつかに分けた場合、全体で見ると一番右の房に含まれる 2 サンプルが他と大きく異なることがわかるが、例えば、②の部分を見ると、別のサンプルでも類似した遺伝子発現変動パターンを示していることがわかる。したがって、そのパターンを規定している遺伝子のセットが存在するはずである。このことから、サンプル方向ではなく、遺伝子方向の房を切り分けることによってさらに別の生体応答遺伝子セットを特的できる可能性があると考え同様の解析を試みた。その結果、さらに新たな生体応答遺伝子発現データセットを特定できた (図 III.3-137-140)。

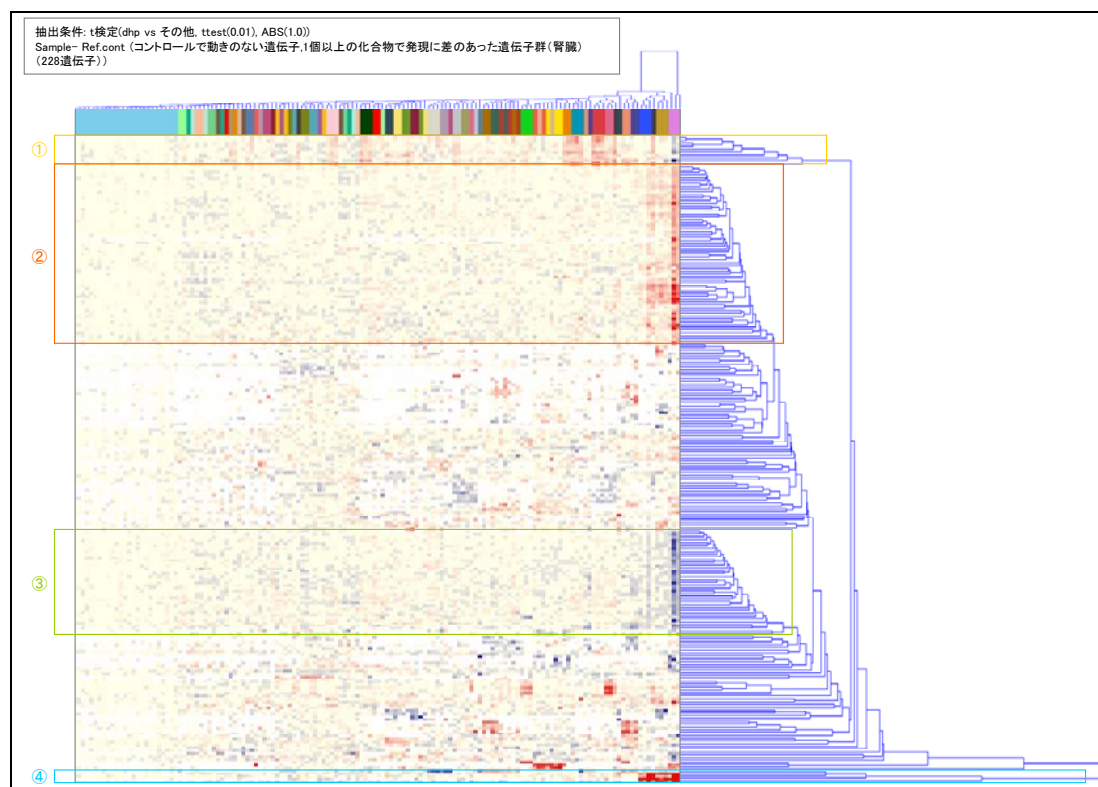


図 III.3-136 生体応答遺伝子発現データセットの探索 (遺伝子方向の切り分け)

生体応答遺伝子発現データセット Ki-1 のクラスタ分析の結果をもとにして遺伝子方向のクラスタを4つに分けた。



図 III.3-137 生体応答遺伝子発現データセット Ki-19 (10プローブ)

図 III.3-136 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。



図 III.3-138 生体応答遺伝子発現データセット Ki-20 (63プローブ)

図 III.3-136 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

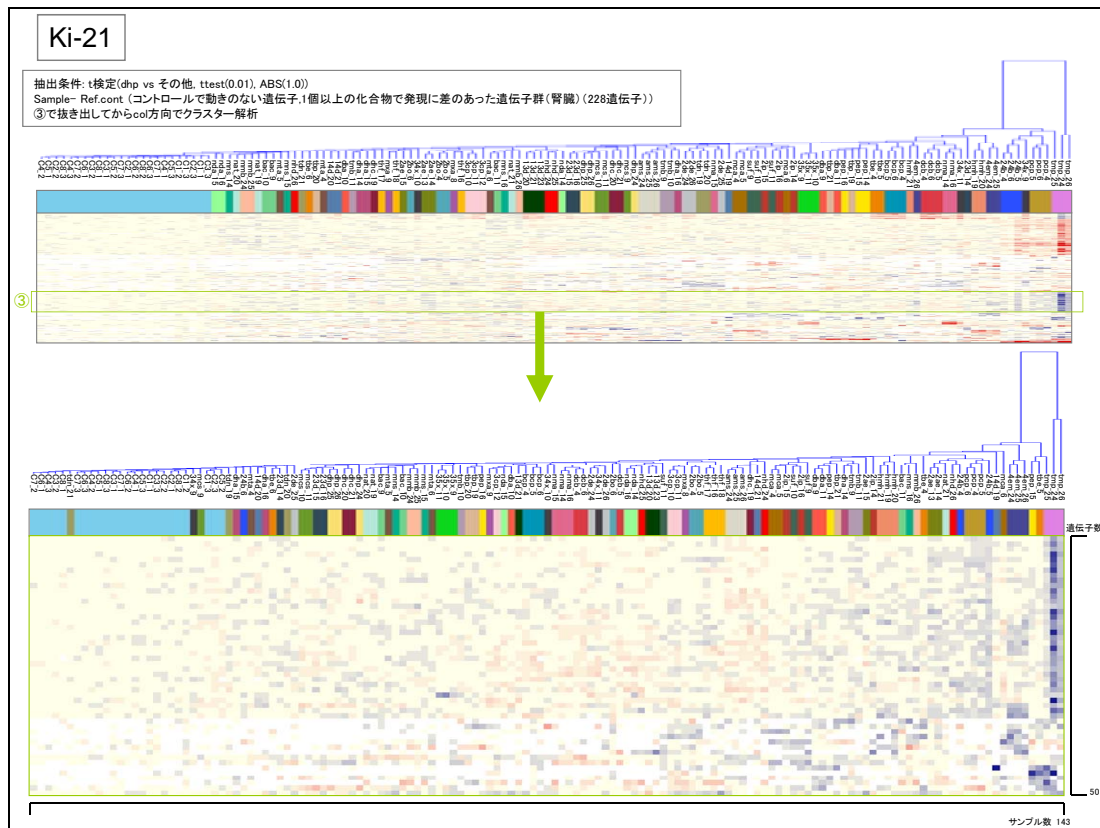


図 III.3-139 生体応答遺伝子発現データセット Ki-21 (50プローブ)

図 III.3-136 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。



図 III.3-140 生体応答遺伝子発現データセット Ki-22 (4プローブ)

図 III.3-136 のクラスタ分析の結果をもとにして上図で囲った部分の遺伝子群のみあらためて抽出し、それらの遺伝子群のみでクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群平均値に対する相対比(二次比)で表示しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(7) まとめ

p-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール (tmp) や p-クミルフェノール (pcp) の解析結果のように、臓器組織の変化に個体差が生じるような場合であっても、遺伝子発現変動はそれと相関して生じている可能性がある。このことは、ゲノム学的手法を取り入れた遺伝子発現変動解析は、臓器組織に何らかの変化が現れるような化学物質の有害性(生体への影響)を検出できる可能性がある手法であることを示唆する。また、肝臓の場合と同様の手法を用いて生体応答遺伝子発現データセットを特定できたことは、腎臓における化学物質の影響を検出できる可能性があるとともに、他の臓器においても同様のことを行うことで臓器毒性の評価をすることができることを意味する。

<主要臓器以外の臓器における遺伝子発現変動解析>

化学物質が生体に与える影響は、肝臓や腎臓などの主要臓器に出現することが多い。しかしながら、毒性が未知の化学物質が生体に与える影響は主要臓器ばかりとは限らず、従来の毒性試験では検査の対象となっていない臓器を標的とする化学物質も存在する可能性がある。このような場合、従来の毒性試験ではその毒性を見逃してしまう可能性がある。また、検査対象の臓器であっても肝臓や腎臓などの毒性マーカーがよく研究されている臓器ばかりではなく、毒性マーカーが不足している臓器に影響が出現した場合には、その毒性を見逃してしまう可能性があり、従来の毒性試験の課題の一つであった。

ここで、ゲノム学的手法を取り入れた網羅的遺伝子発現変動解析は遺伝子発現レベルという同一の指標で、かつ、数万種類のデータポイントで、あらゆるサンプルを比較できるのが特徴である。したがって、1回の28日間反復投与試験を行った場合に、あらゆる臓器の遺伝子発現プロファイルを取得して遺伝子発現変動解析を行うことにより、主要臓器以外について化学物質の有害性評価を行うことができる可能性がある。そこで、われわれは、主要臓器以外の臓器について遺伝子発現プロファイルを取得し、遺伝子発現変動解析を行った。その中で、遺伝子発現レベルが変動した例を示す。

1. 皮下脂肪

(1) フタル酸ジヘプチル

その中でフタル酸ジヘプチル (dhp) を28日間反復投与したラットの皮下脂肪において、フタル酸ジヘプチル投与群と対照群との間でt検定を行い、発現レベルに有意な差 (P値 < 0.01) があったもの、かつ、各群の平均値を算出し両者の平均値の差が約1.7倍以上の遺伝子 (生体応答遺伝子) を抽出したところ、80プローブ存在した (生体応答遺伝子発現データセット SAT-1)。さらに、これら80プローブの発現パターンを用いてクラスタ分析を行ったところ、フタル酸ジヘプチル投与群 (dhp) の3個体、メタクリルアミド投与群 (mca) の1個体、m-キシリレンジアミン投与群 (mxa) の1個体から構成される房と、対照群を含むそれ以外の房に大きく2つに分かれた (図 III.3-141)。この結果は、フタル酸ジヘプチル (dhp) を28日反復投与することによって皮下脂肪に影響を及ぼす可能性があることを示す。また、メタクリルアミド (mca) および m-キシリレンジアミンについても、個体差はあるものの皮下脂肪に影響を及ぼす可能性があることを意味する。

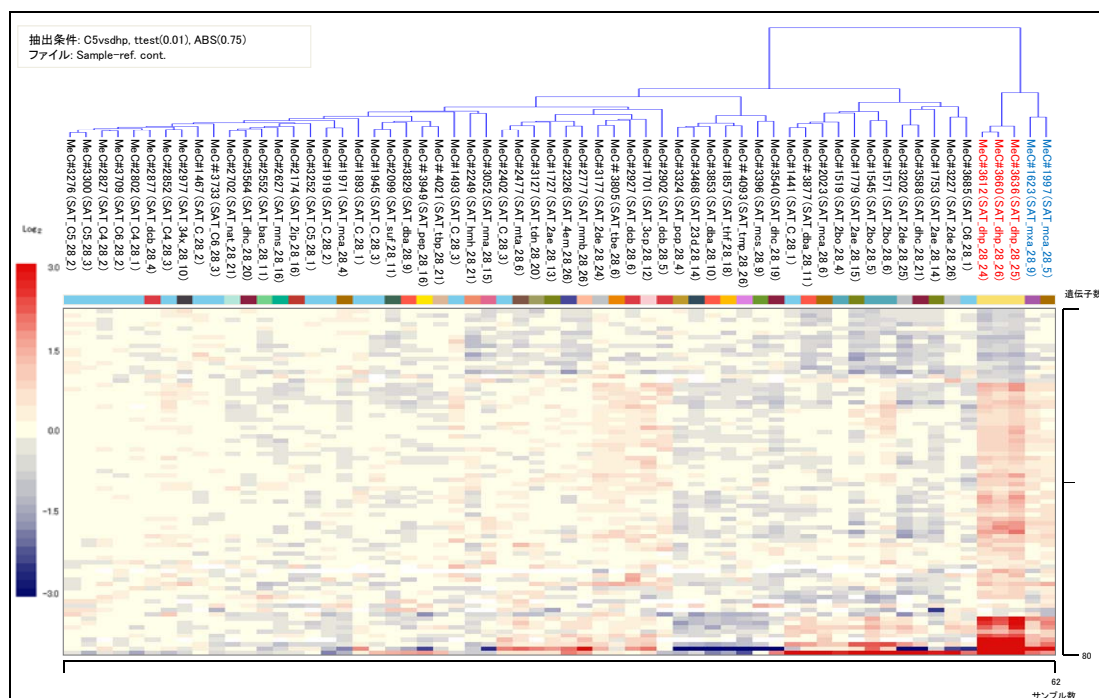


図 III.3-141 生体応答遺伝子発現データセット SAT-1 によるクラスタ分析

皮下脂肪における生体応答遺伝子発現データセット SAT-1 によるクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(2) 2- (2-アミノエチルアミノ) エタノール

2- (2-アミノエチルアミノ) エタノール (2ae) については、3 個体中 2 個体で発現レベルが有意に変動している遺伝子を抽出したところ 57 プローブ存在した (生体応答遺伝子発現データセット SAT-2)。これら 57 プローブの発現パターンによりクラスタ分析を行ったところ、2- (2-アミノエチルアミノ) エタノール投与群 (2ae) の 2 個体、アジピン酸ジブチル投与群 (dba) の 1 個体、2- (ジブチルアミノ) エタノール投与群 (2de) の 1 個体、メタクリルアミド投与群 (mca) の 1 個体、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド投与群 (dhc) の 1 個体、2-ブタノンオキシム投与群 (2bo) の 1 個体を含む 7 サンプルの房と、対照群を含むそれ以外の房に大きく 2 つに分かれた (図 III.3-142)。この結果は、2- (2-アミノエチルアミノ) エタノール (dhp) を 28 日反復投与することによって皮下脂肪に影響を及ぼす可能性があることを示す。また、メ 2- (2-アミノエチルアミノ) エタノール (2ae)、アジピン酸ジブチル (dba)、2- (ジブチルアミノ) エタノール (2de)、メタクリルアミド (mca)、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (dhc)、2-ブタノンオキシム (2bo) についても個体差はあるものの皮下脂肪に影響を及ぼす可能性があることを意味する。

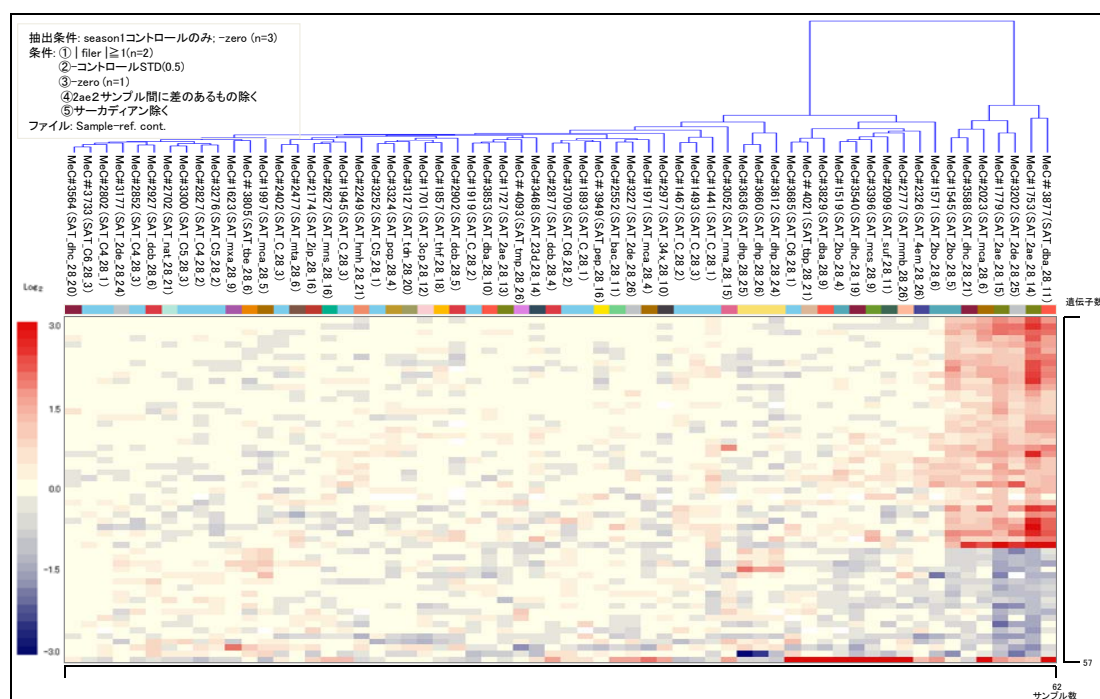


図 III.3-142 生体応答遺伝子発現データセット SAT-2 によるクラスタ分析

皮下脂肪における生体応答遺伝子発現データセット SAT-2 によるクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(3) 生体応答遺伝子の機能の推定

フタル酸ジヘプチル (dhp) で発現変動していた 80 プローブの中には、cytosolic malate dehydrogenase (リンゴ酸脱水素酵素)、transaldolase 1 (トランスアルドラーゼ)、pyruvate carboxylase (ピルビン酸カルボキシラーゼ)、acetyl-coenzyme A carboxylase (アセチル CoA カルボキシラーゼ)、malic enzyme 1 (リンゴ酸酵素) が含まれていた。これらの遺伝子は糖新生、TCA 回路や脂質合成に係わる酵素をコードする遺伝子であることが分かっている (図 III.3-143)。この結果は、フタル酸ジヘプチル (dhp) を 28 日間反復投与したことにより、生体内では糖新生、TCA 回路または脂質合成の機能亢進が起こっている可能性を示唆する。

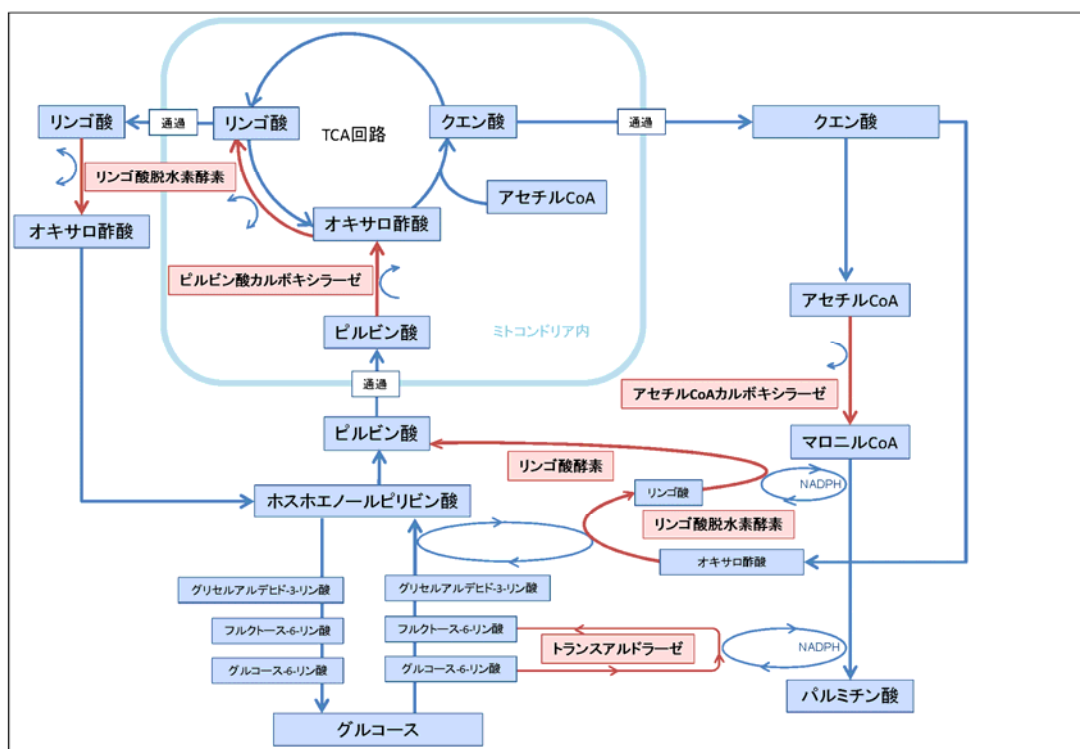


図 III.3-143 生体応答遺伝子発現データセット SAT-1 に含まれる遺伝子の役割

生体応答遺伝子発現データセット SAT-1 に含まれる一部の遺伝子の役割を模式的に示す。

(4) まとめ

本プロジェクトではゲノム学的手法を用い、多種類の臓器組織を網羅的に横並び比較することに特徴がある。そのため、従来では予期していなかった皮下脂肪への影響を検出できた例が出てきた。この結果は、従来の毒性試験では見逃されてしまう生体の変化を、ゲノム学的手法による多種臓器の網羅的遺伝子発現解析により検出できる可能性を示唆する。

また、発現変動した遺伝子は代謝経路の一部で重要な役割を果たすと考えられているのであり、これらの結果は、本プロジェクトで特定した生体応答遺伝子群について研究をさらに進めることにより、毒性発現メカニズムの解明に貢献できる可能性があることを示唆している。

2. 小脳

(1) はじめに

本プロジェクトが始まった当初は神経毒性を遺伝子発現変動解析で評価することは難しいと考えていた。その理由は、①神経毒性には神経伝達物質の遊離阻害など、一般状態では異常を検出できるが病理では検出できない例があり、形態学的変化を伴わない機能障害を遺伝子発現変動解析で捉えることが難しいと考えられていること、②神経組織は、通常の病理組織標本ではアーティファクトが生じやすいため、灌流固定や特殊な染色法を用いることが望ましく、神経毒性の有無の評価が難しいこと、③遺伝子の発現変動が起こっている部位が局部に限られている可能性があり、遺伝子発現レベルの変動が相対的に小さくなってしまふこと、などがあつた。そのため、遺伝子発現変動解析で神経毒性を評価できるか否かについては、トキシコゲノミクスを用いた手法の課題の一つであつた。しかしながら、本プロジェクトでは神経毒性と相関して発現変動した遺伝子発現データセットを取得したため、それを示す。

(2) 神経毒性を有することが知られている化学物質を28日間反復投与することによる遺伝子発現変動解析

本プロジェクトの被験化学物質(40種類)には、「既存化学物質毒性データベース」で神経毒性を有すると記載のあつた化学物質が5種類(メタクリルアミド、4-エチルモルホリン、2-(ジブチルアミノ)エタノール、1-ブロモ-3-クロロプロパン、ジシクロヘキシルアミン)含まれていた。われわれは、神経毒性と相関して発現変動する遺伝子発現データセットを取得するため、それらの化学物質を28日間反復投与した後に小脳の遺伝子発現プロファイルを取得し、遺伝子発現レベルでそれらの化学物質の影響を検出できるか否かを検討した。その結果、5種類の化学物質のうちメタクリルアミド投与群(mca)のみ対照群と比較して発現レベルが変動した遺伝子群(41プローブ)が存在した。それらの41プローブの発現パターンをもとにして他の化学物質を含めてクラスタ分析を行ったところ、メタクリルアミド投与群(mca)と対照群を明確に分類できた(図 III.3-144)。さらに、メタクリルアミド投与群(mca)と同じクラスタにヒドラジン-水和物投与群(hmh)が分類された(図 III.3-144)。ヒドラジン-水和物(hmh)はラットでは神経毒性に関する所見が報告されていないが、ヒトに対する単回曝露では、「急性曝露によって中枢神経系に影響を及ぼすことが知られている」(環境リスク評価第1巻 [2002])という記述あること、反復曝露では、「神経症状がみられた」(CERI・NITE 有害性評価書 No.78 [2004])という記述、「振戦、嗜眠、言語の一貫性喪失」(IARC [1987])という記述などがあることから、ヒドラジン-水和物の標的臓器の一つは神経系であるとされていた。この結果は、メタクリルアミド(mca)が小脳に与える影響を遺伝子発現変動解析で検出できる可能性があることを示す。また、この結果は、ヒドラジン-水和物は28日間反復投与することによって、メタクリルアミド(mca)と類似した影響を小脳に与える可能性があることを意味する。

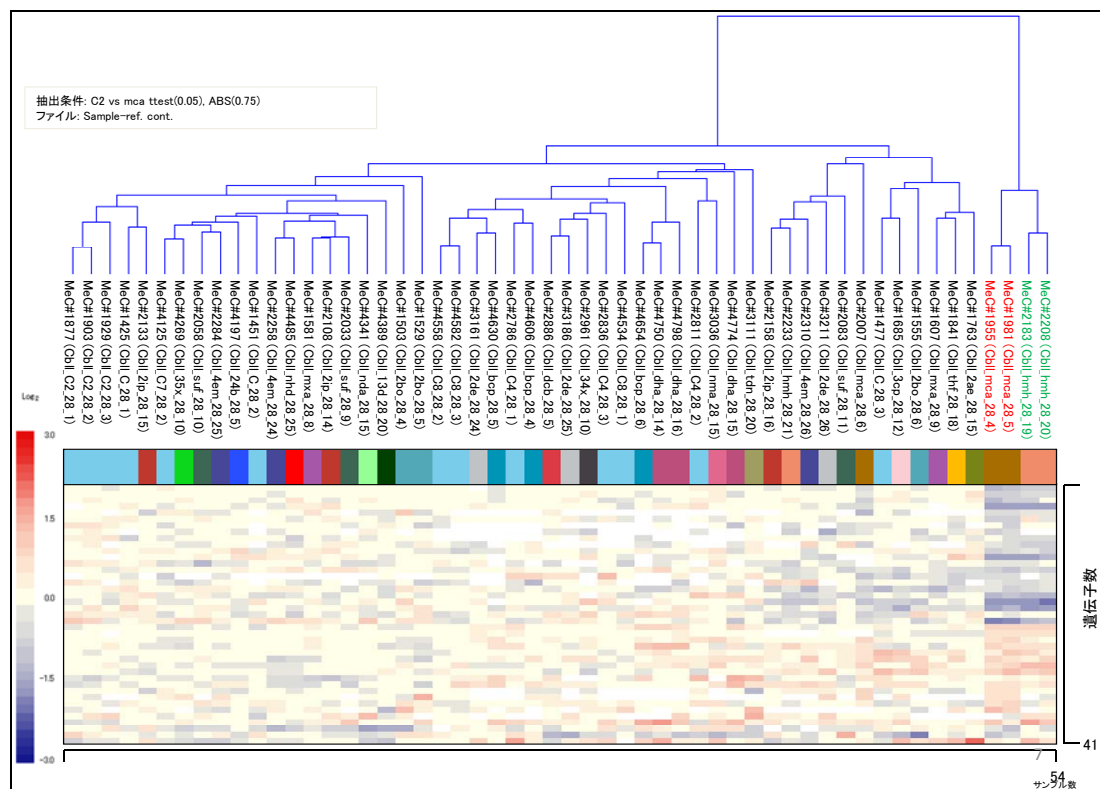


図 III.3-144 メタクリルアミド投与群で発現変動した遺伝子群（41プローブ）によるクラスタ分析

小脳において、対照群とメタクリルアミド投与群 (mca) の間で t 検定を行い、有意 (P 値 < 0.05) な差があり、かつ、各群の平均値を算出し対照群との平均値の差が約 1.7 倍以上の遺伝子群 (生体応答遺伝子群) を抽出した (41 プローブ)。それらの発現変動した遺伝子群を用いてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

そこで、ヒドラジン一水和物投与群 (hmh) に着目して対照群と比較して発現レベルが変動している遺伝子群の抽出を試みたところ、37プローブ存在した。その37プローブの発現変動パターンをもとにして他の化学物質を含めたクラスタ分析を行ったところ、メタクリルアミド投与群 (mca) で発現変動があった2個体がヒドラジン一水和物投与群 (hmh) と同じ房を形成した (図 III.3-145)。この結果は、ヒドラジン一水和物を28日間反復投与することによって、小脳に影響を与える可能性があることを意味する。

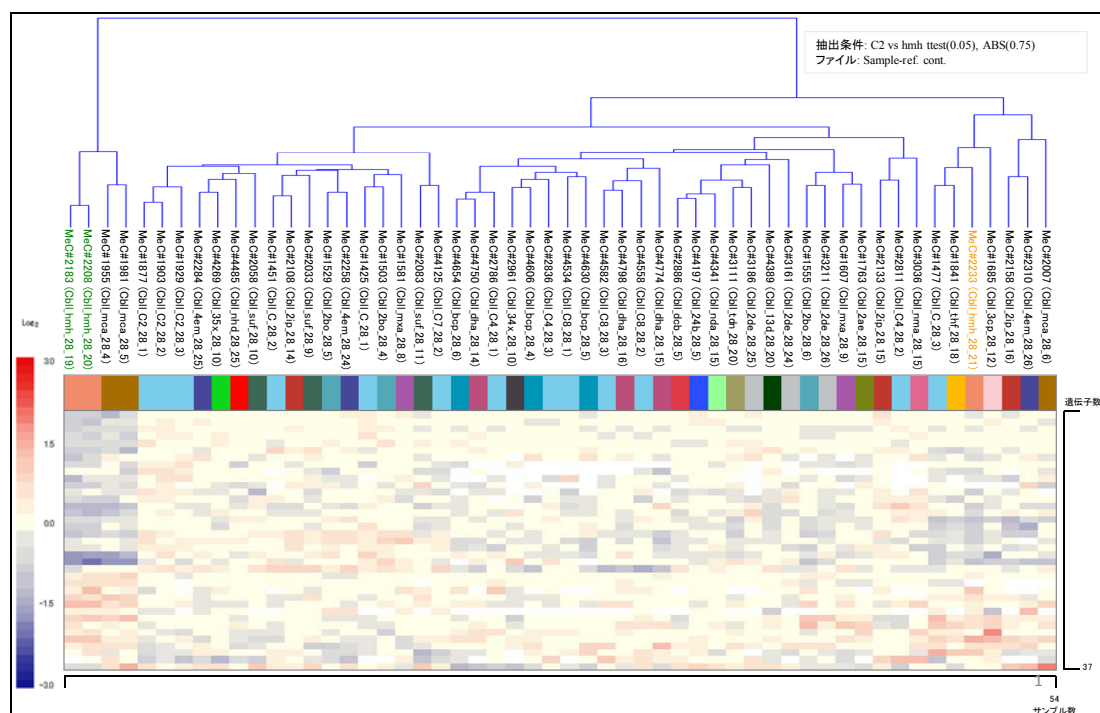


図 III.3-145 ヒドラジン一水和物投与群で発現変動した遺伝子群 (37プローブ) によるクラスタ分析

小脳において、対照群とヒドラジン一水和物投与群 (hmh) で t 検定を行い、有意 (P 値 < 0.05) な差があり、かつ、各群の平均値を算出し対照群との平均値の差が約 1.7 倍以上の遺伝子群 (生体応答遺伝子群) を抽出した (37プローブ)。それらの発現変動した遺伝子群を用いてクラスタ分析を行った。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表示しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

メタクリルアミド投与群 (mca) で発現変動した 4 1 プローブとヒドラジンー水和物投与群 (hnh) で発現変動した 3 1 プローブを合わせたところ、6 7 プローブとなり (生体応答遺伝子発現データセット Cbll-1)、これらの発現変動パターンをもとにしてクラスタ分析を行ったところ、メタクリルアミド投与群 (mca) とヒドラジンー水和物投与群 (hnh) で発現変動のあった個体が同じ房を形成した (図 III.3-146)。

これらの結果は、ヒドラジンー水和物はメタクリルアミドを 2 8 日間反復投与した場合と類似の生体反応を起こす可能性があり、かつ、従来の毒性試験では見逃されていた変化を遺伝子発現変動解析で検出できた可能性を示唆するものである。

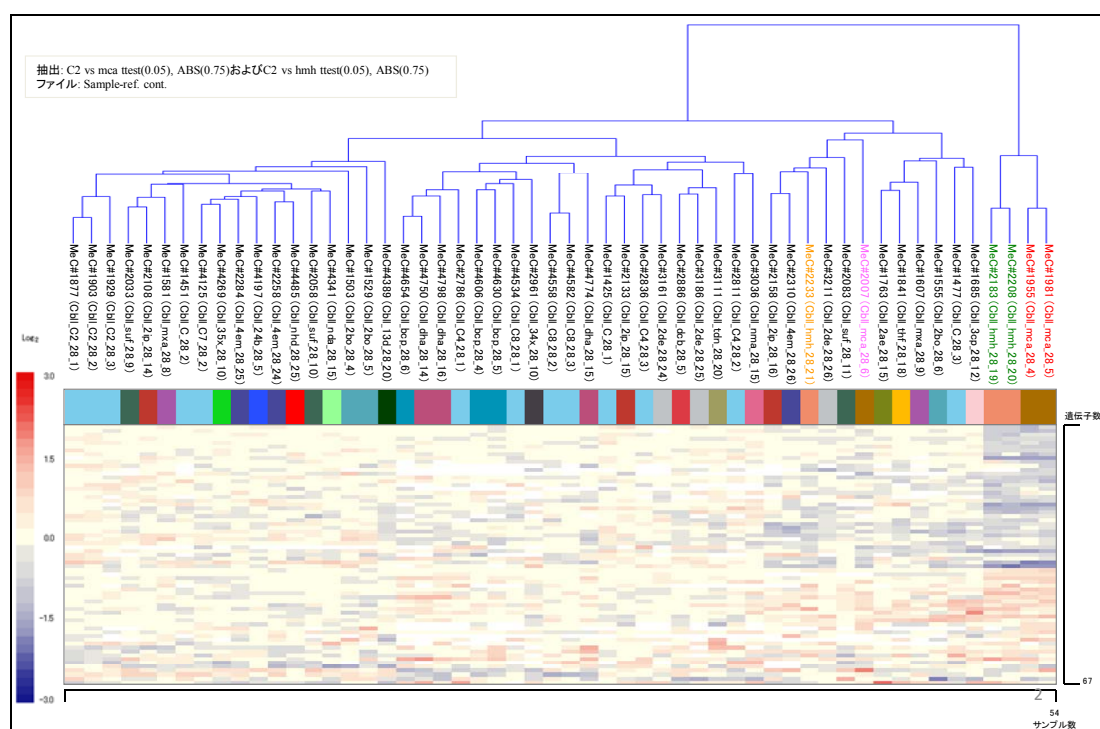


図 III.3-146 メタクリルアミドまたはヒドラジンー水和物投与群で発現変動した遺伝子群 (6 7 プローブ) によるクラスタ分析

小脳においてメタクリルアミドまたはヒドラジンー水和物投与群で発現変動した遺伝子群を用いてクラスタ分析を行った。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比 (二次比) で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

(3) 生体応答遺伝子の新規性調査

われわれの研究室で開発した論文検索プログラムにより、メタクリルアミドまたはヒドラジーン水和物投与群で発現変動した前記67プローブに含まれている遺伝子の新規性を調査した。その結果、われわれの調査した範囲内において、報告0報が33プローブ(49%)、1~9報が12プローブ(18%)、10報以上が7プローブ(11%)であった。さらに、NCBIのデータベース上、すでにアクセッション番号が削除されていたものが15プローブ(22%)であった(図III.3-147)。cDNAデータベースやゲノムデータベースなどは次々と更新されており、プローブを作製した当初はアクセッション番号が付与されていたものが削除されていることは良くあることである(その逆の場合もあり得る)。ただし、我々のマイクロアレイシステムに搭載している80merの合成オリゴDNAの配列に対して何かしらの転写産物が検出できていることは間違いがないと考えている。そのような遺伝子は、PCRなどで検出できる場合が多いことから、実は、新規の遺伝子である可能性がある。

神経毒性との関連性が推測される遺伝子群の中で、新規性を有する可能性がある遺伝子群が複数特定できた。これらの遺伝子は新規神経毒性マーカーになり得ると考えている。

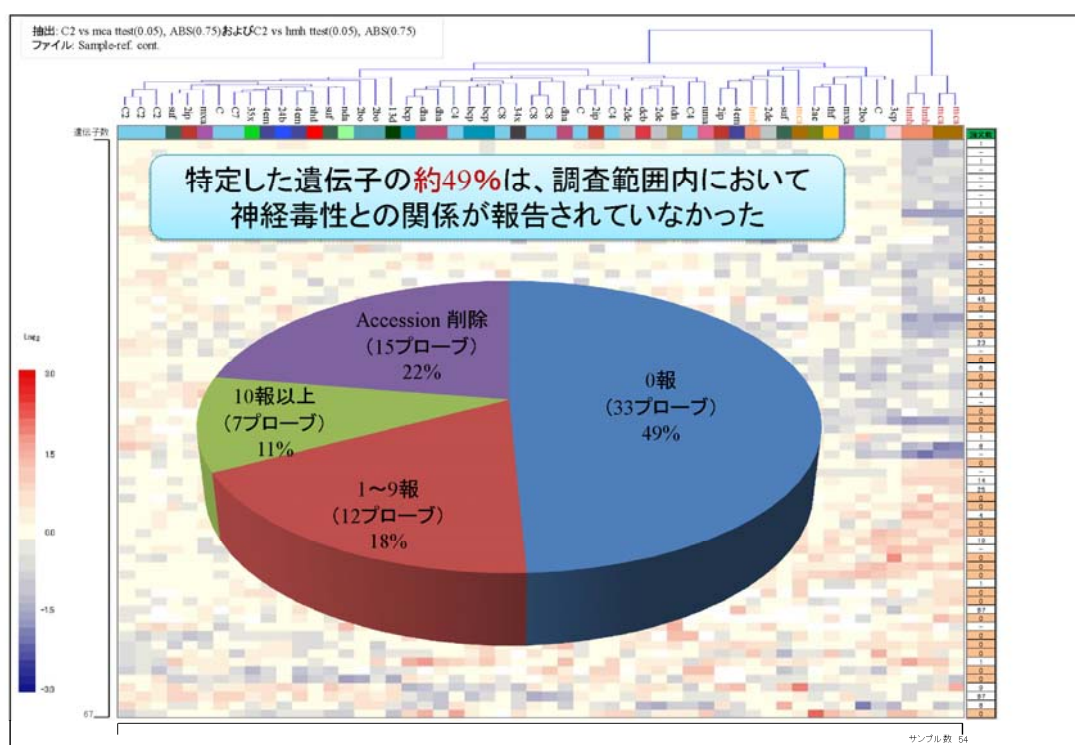


図 III.3-147 生体応答遺伝子の神経毒性関連の論文検索

各遺伝子に関して神経毒性との関連性を示唆する論文をキーワードにより検索した結果を示す。

(4) まとめ

これまで、検出が困難であると考えられてきた神経毒性について、神経毒性を有する化学物質を28日間反復投与することにより引き起こされた小脳の遺伝子発現変動を検出できたことは、遺伝子発現変動解析によって、神経毒性の一部を評価できる可能性があることを示唆する。また、ラットでは神経毒性の報告がなくヒトでは神経毒性の報告があった化学物質について、ラットの28日間反復投与試験後の遺伝子発現変動解析で遺伝子の発現変動を検出でき、その変動パターンが神経毒性を有する化学物質と類似していたことは、その化学物質の神経毒性が従来毒性試験法では見逃されていた可能性があることを意味し、遺伝子発現変動解析を用いることでその毒性を評価できる可能性を示唆する。

<従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果との比較>

(1) はじめに

生体応答遺伝子発現データセットを用いてクラスタ分析を行った場合に、一定の化学物質が対照群のクラスタと別のクラスタを形成する、すなわち、対照群と特定の化学物質を生体応答遺伝子群の発現パターンによって分けることができる。本プロジェクトで取得した生体応答遺伝子発現データセットが従来の毒性試験の結果と相関しているか否かを検証するために、これらの遺伝子発現変動解析結果と従来の毒性試験の結果（「既存化学物質毒性データベース」参照）の照合を試みた。

(2) 脾臓

脾臓は前述したように、遺伝子発現変動の観点からは多様性が高くなかったこと、および、予算と期間の制限の関係により、遺伝子発現プロファイルを取得したものは30種類の化学物質投与群のみであった。脾臓については、これら30種類の化学物質のうち9種類について毒性所見が報告されていた。本プロジェクトでは、これまでに脾臓においては2種類の生体応答遺伝子発現データセットを取得しているが、これらの生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析の結果、前記9種類の化学物質のうち8種類（約89%）の化学物質を対照群と区別することができた（図 III.3-148）。一方、毒性所見が報告されていない21種類の化学物質を対照群と分けることができる生体応答遺伝子セットは存在しなかった（図 III.3-148）。この結果は、脾臓毒性に関しては遺伝子発現変動解析の結果は、従来の毒性試験の結果とほぼ相関しており、従来の毒性試験法を補完する役割を果たせる可能性があることを意味する。

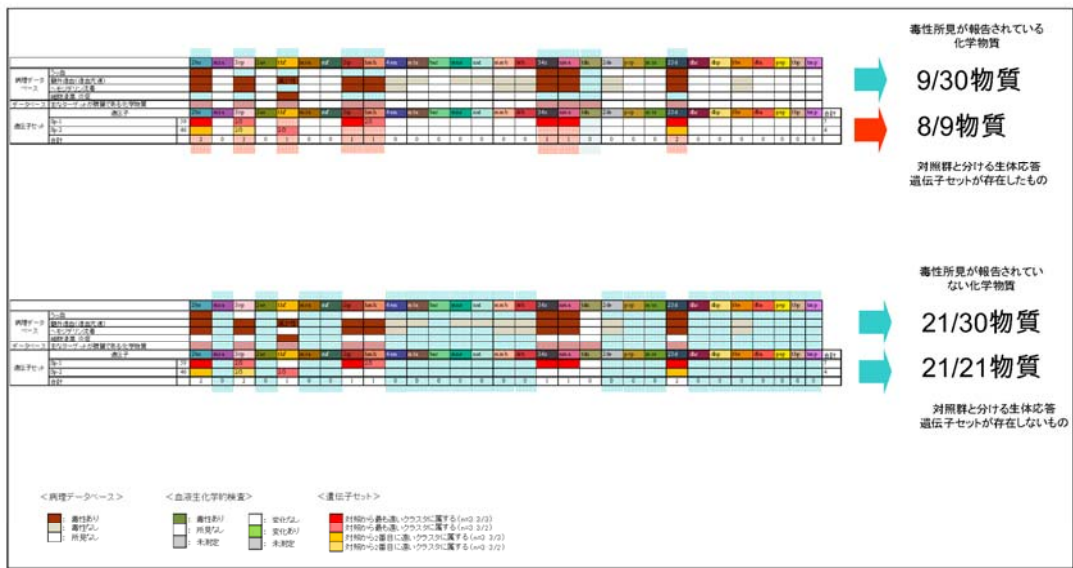


図 III.3-148 脾臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。また、「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に脾臓が標的臓器であると判断したものを桃色で示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

(3) 腎臓

前記脾臓と同様にして検証を行った。従来の毒性試験の結果、腎臓では本プロジェクトで扱った40種類の化学物質のうち21種類について毒性所見が報告されていた。本プロジェクトでは、腎臓において生体応答遺伝子発現データセットを24種類取得しているが、これらの生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析の結果、前記21種類の化学物質のうち20種類（約95%）の化学物質を対照群と区別することができた（図 III.3-149）。一方、毒性所見の報告がない19種類の化学物質のうち12種類は対照群と分けることができる生体応答遺伝子発現データセットは存在せず（図 III.3-150）、残りの7種類は対照群と分ける生体応答遺伝子発現データセットが存在した（図 III.3-151）。このことは、腎臓において従来の毒性試験で毒性所見の報告があったものは、遺伝子発現変動解析でもほぼ検出できているとともに、従来の毒性試験では見逃されていた生体内の変化を遺伝子発現変動解析では検出できている可能性を示唆する。



図 III.3-149 腎臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合（毒性所見が報告している化学物質）

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に腎臓が標的臓器であると判断した化学物質に色を付けて示している。「血液生化学的検査（データベース）」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。「血液生化学的検査」の欄には本プロジェクトで行った血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

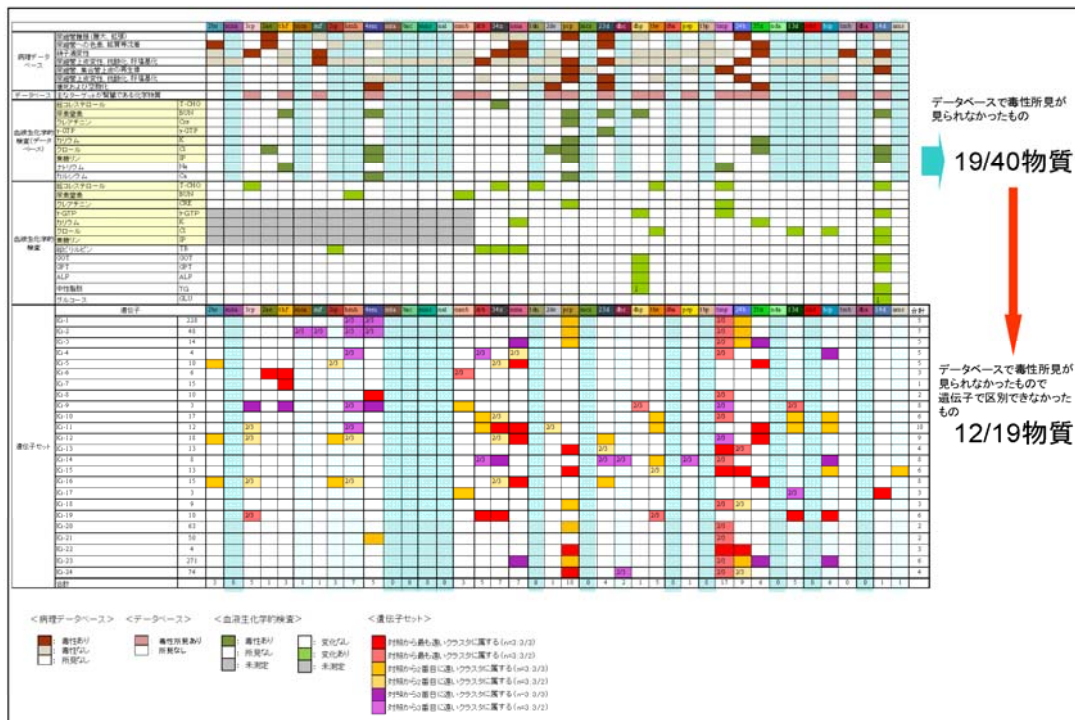


図 III.3-150 腎臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合（毒性所見が報告されていない化学物質）

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に腎臓が標的臓器であると判断した化学物質に色を付けて示している。「血液生化学的検査（データベース）」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。「血液生化学的検査」の欄には本プロジェクトで行った血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

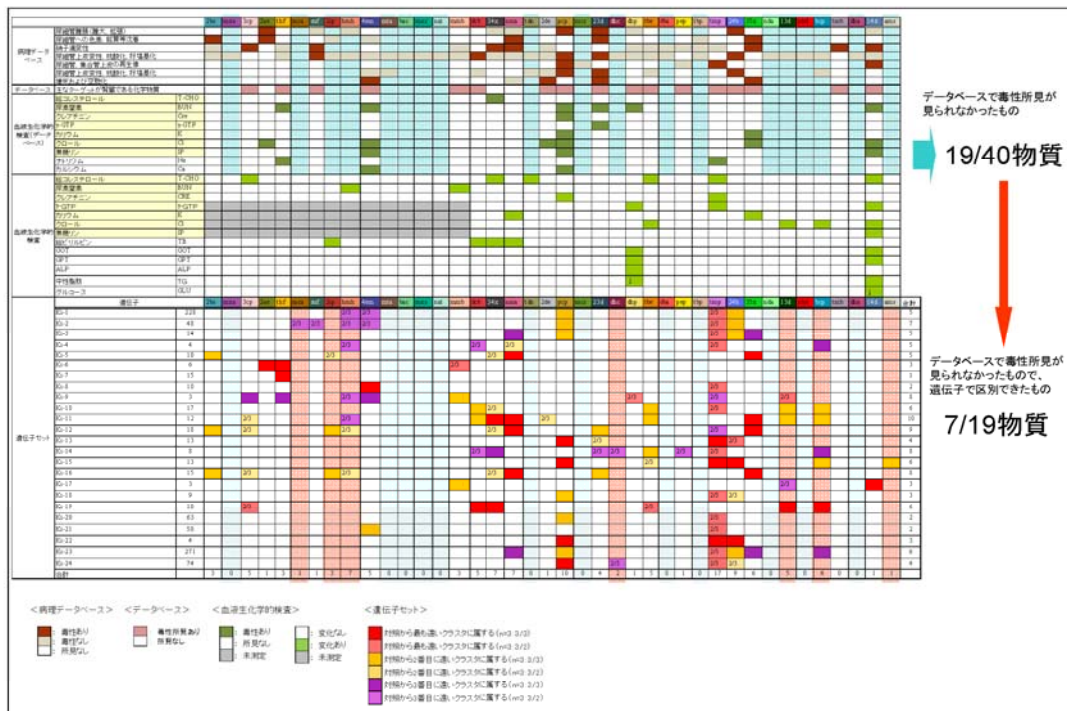


図 III.3-151 腎臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合（毒性所見が報告されていない化学物質）

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に腎臓が標的臓器であると判断した化学物質に色を付けて示している。「血液生化学的検査（データベース）」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。「血液生化学的検査」の欄には本プロジェクトで行った血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

（４）肝臓

前記脾臓・腎臓と同様にして検証を行った。従来の毒性試験の結果、肝臓では40種類の化学物質のうち25種類について毒性所見が報告されていた。本プロジェクトでは、肝臓において生体応答遺伝子発現データセットを49種類取得しているが、これらの生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析の結果、前記25種類の化学物質のうち24種類（96%）の化学物質を対照群と区別することができた（図 III.3-152）。一方、毒性所見の報告がない15種類の化学物質のうち12種類は対照群と分けることができる生体応答遺伝子セットは存在せず（図 III.3-153）、残りの3種類は対照群と分けることができた（図 III.3-154）。このことは、肝臓において従来の毒性試験で毒性所見の報告のあったもの

は、遺伝子発現変動解析でもほぼ検出できているとともに、従来の毒性試験では見逃されていた生体内の変化を遺伝子発現変動解析では検出できている可能性を示唆する。

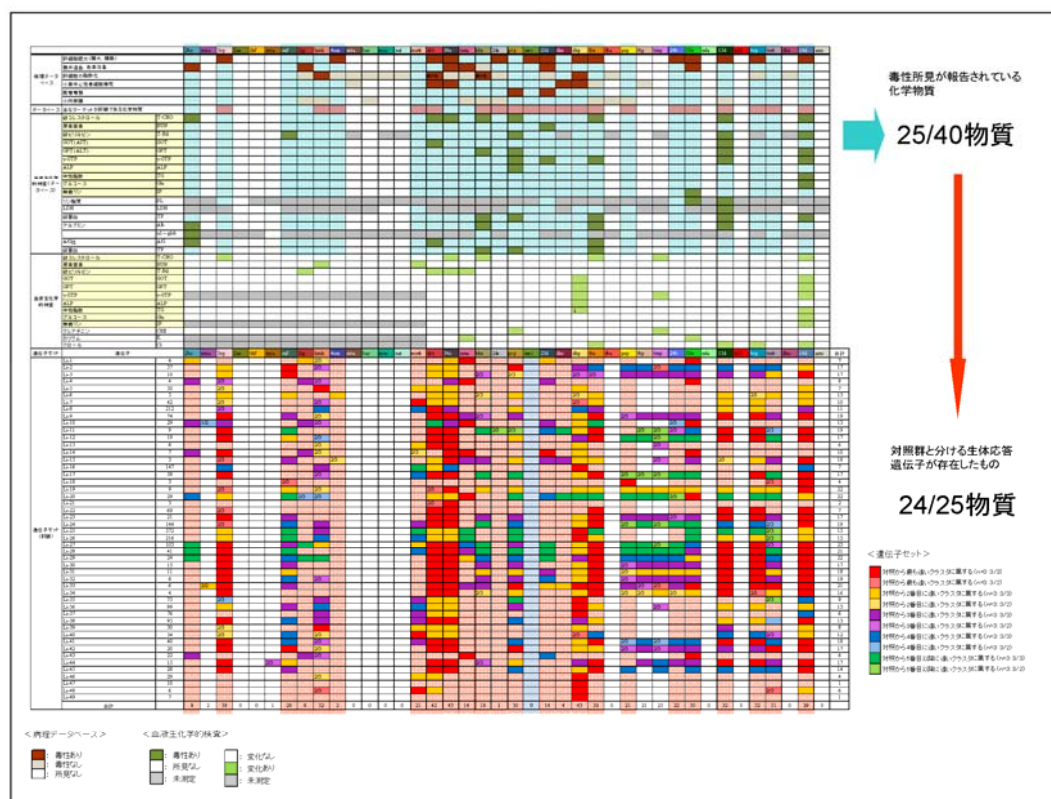


図 III.3-152 肝臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合（毒性所見が報告されている化学物質）

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に肝臓が標的臓器であると判断した化学物質に色を付けて示している。「血液生化学的検査（データベース）」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。「血液生化学的検査」の欄には本プロジェクトで行った血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

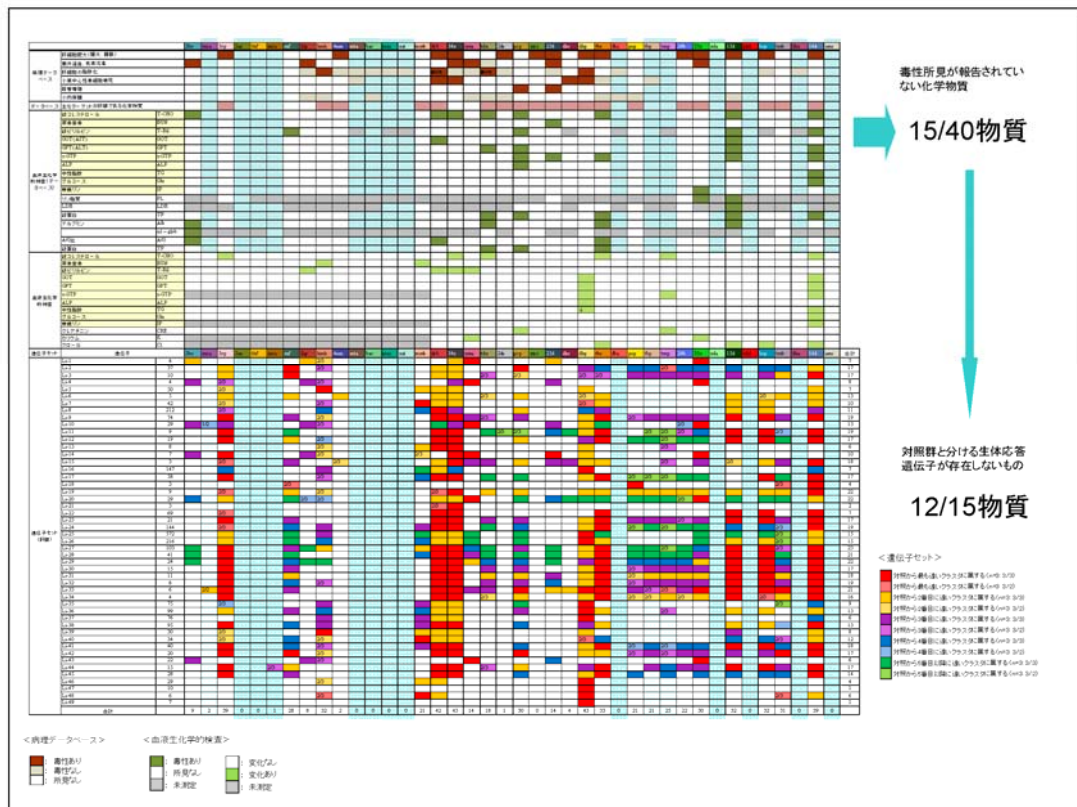


図 III.3-153 肝臓における従来の毒性試験結果と遺伝子発現変動解析結果の照合（毒性所見が報告されていない化学物質）

図中「病理データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている病理学的変化を列挙し、変化のあったものを茶色で示している。「データベース」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」の報告書で総合的に肝臓が標的臓器であると判断した化学物質に色を付けて示している。「血液生化学的検査（データベース）」の欄には、「既存化学物質毒性データベース」で報告されている血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。「血液生化学的検査」の欄には本プロジェクトで行った血液生化学的検査の結果、何らかの異常値があったものに色を付けて示している。さらに、「遺伝子セット」の欄には各生体応答遺伝子セットで対照群と分けることができた化学物質に色を付けて示している。

を示唆する。したがって、これらの遺伝子発現変動解析の結果は従来の毒性試験結果を裏付ける科学的根拠の一つになり得るとともに、従来の毒性試験法を補完できる可能性があることを示唆する。

また、本プロジェクトでこれまでに抽出した生体応答遺伝子発現データセットは、肝臓で49セット、腎臓で24セット、脾臓で2セット、皮下脂肪で2セット、小脳で1セットであった。このことは、化学物質を28日間反復投与によって起こる生体内の遺伝子発現変動パターンには多様性が存在するが、その多様性は臓器の種類によって異なっており（肝臓>>腎臓>>脾臓≒皮下脂肪>小脳）、毒作用発現の多様な（複雑な）メカニズムが存在していることを示唆する。

<有害性評価マーカー遺伝子の探索>

(1) はじめに

化学物質が生体に与える影響は多様であり、その有害性を評価することは容易ではない。したがって、化学物質の有害性を評価するためのバイオマーカーを同定することは、化学物質の有害性評価をする上で有用である。

毒性を有する複数の化学物質の曝露に対して共通した遺伝子発現変動が存在した場合、それは化学物質の有害性を評価するために幅広く利用できるバイオマーカーになり得る。その一例として、肝臓または腎臓における有害性評価マーカー遺伝子の探索結果を示す。

(2) 肝毒性マーカー遺伝子の探索

肝臓で特定した前記生体応答遺伝子群（572プローブ）の中から複数の化学物質で共通に発現レベルが変動した遺伝子群を抽出したところ、3種類以上の化学物質で共通したものが103プローブ、5種類以上の化学物質で共通したものが24プローブ、9種類以上の化学物質で共通したものが6プローブであった（図 III.3-155）。この6プローブの発現変動パターンによりクラスタ分析を行った結果、発現変動が大きなクラスタ（赤で囲ったクラスタ）と発現変動が小さなクラスタ（青で囲ったクラスタ）および対照群を含むクラスタ（その他）に分類された（図 III.3-156）。被験対象とした40種類の化学物質のうち22種類の化学物質に肝毒性を有することが報告されているが、発現変動があったクラスタにはその中の18種類の化学物質が含まれており、対照群と区別することができた。これらの結果、少なくとも肝毒性を有している22種類の化学物質のうち18種類の化学物質には何らかの共通点が存在し、該6プローブの発現レベルの変動はそれを反映している可能性があることを示している。また、これらの結果は、該6プローブを使用することにより、これら18種類の化学物質と類似の性質を有する化学物質の有害性を評価できる可能性を示している。

さらに、肝毒性を有すると報告されている化学物質のうち、該6プローブでは区別できなかった化学物質も存在したが、それらを区別できる別の生体応答遺伝子セットも特定ができている。これらの結果は、肝毒性を有する化学物質を対照群と区別するための生体応答遺伝子セットは一組だけでは足りず、複数の生体応答遺伝子セットを組み合わせ用いることが重要であることを示している。

次に、5種類以上の化学物質で発現変動した遺伝子群（24プローブ）について、肝毒性との関連性について文献検索による新規性調査を行った（図 III.3-157）。その結果、24プローブには、肝毒性との関連性が報告されている遺伝子である、Epoxide hydrolase 1 (Ephx1)、ATP-binding cassette sub-family C (Abcc3)、cytochrome P-450b、cytochrome P-450, family 1 (Cyp1a2) などが含まれていた。一方、論文検索では肝毒性との報告が少なく、新規性を有する可能性がある遺伝子も存在した。

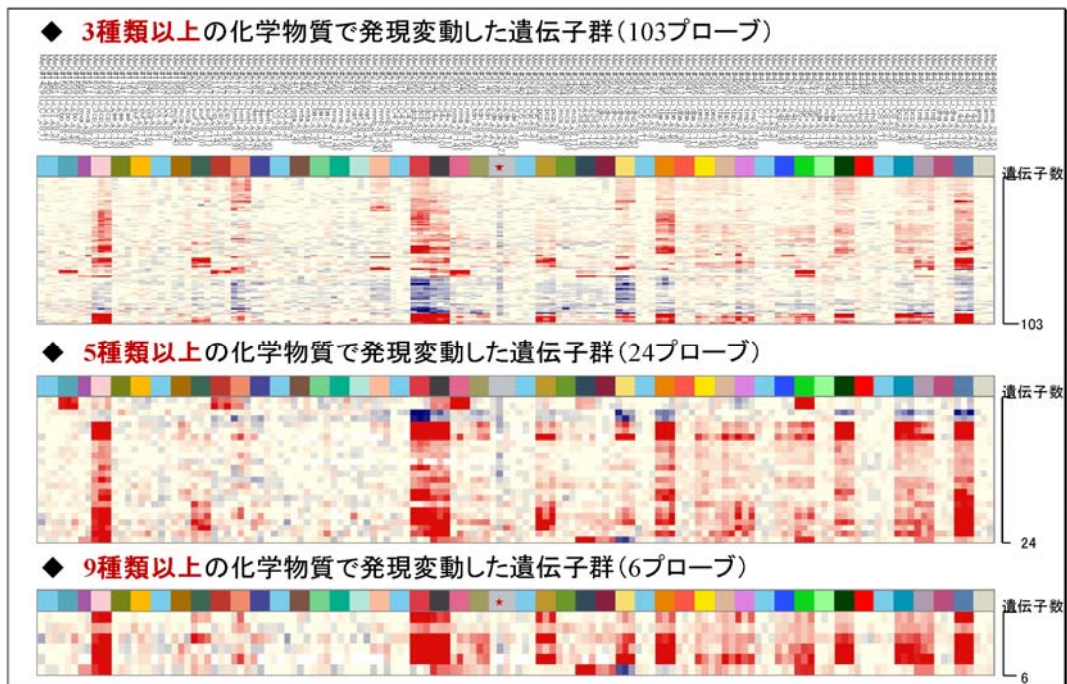


図 III.3-155 複数の化学物質の曝露で共通に発現変動している遺伝子群の絞り込み
 肝臓において発現変動した遺伝子群（572プローブ）の中から、3種類以上、5種類以上、および9種類以上の化学物質の曝露で共通して発現変動した遺伝子群を抽出した。赤が対照群に比べて発現レベルが上昇、青が対照群に比べて発現レベルが低下したことを表している。

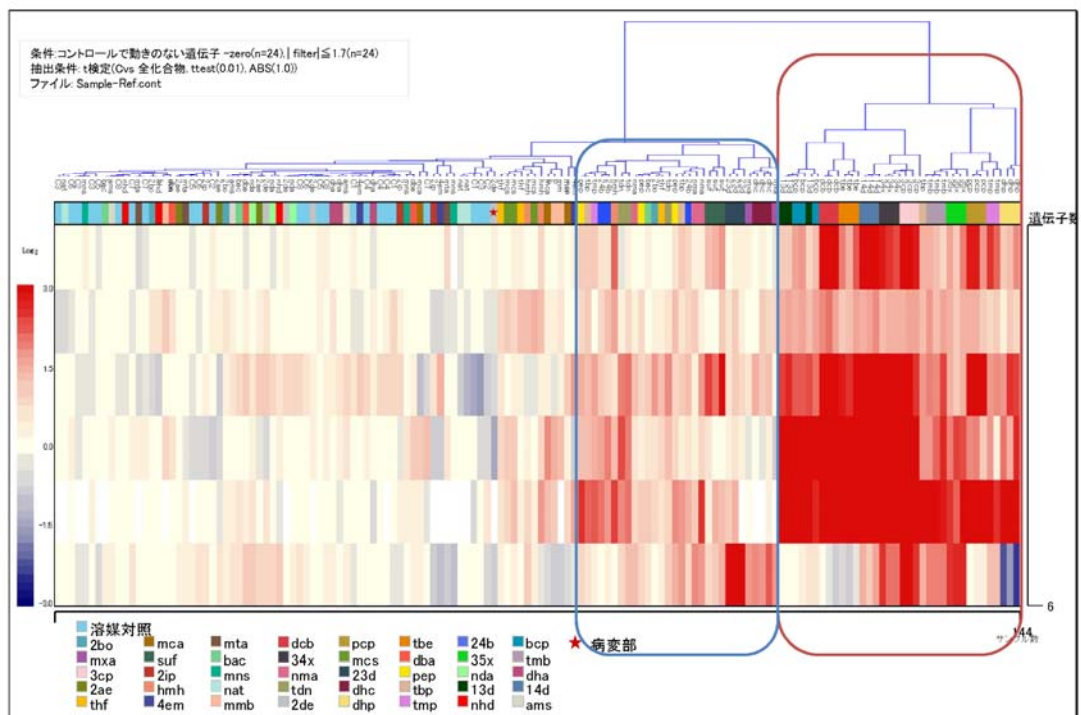


図 III.3-156 9種類以上の化学物質の曝露により共通して発現変動した遺伝子群（6グループ）によるクラスタ分析

赤が対照群に比べて発現レベルが上昇、青が対照群に比べて発現レベルが低下したことを表している。

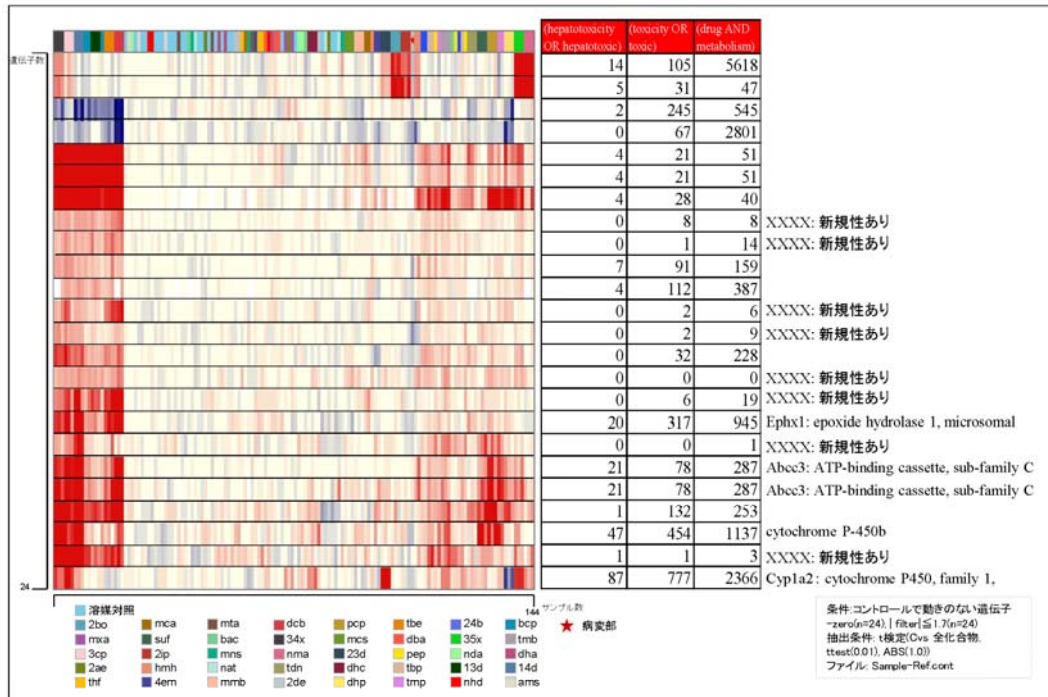


図 III.3-157 5種類以上の化学物質により共通して発現変動した遺伝子の文献検索
 各遺伝子に関して肝毒性との関連性を示唆する論文をキーワードにより検索した結果を示す。

(3) 腎毒性マーカー遺伝子の探索

様々な毒性の主要な標的になり得る臓器として腎臓が知られている。本プロジェクトでは腎毒性に関するマーカー遺伝子の探索を行った。

まず、1つ以上の化学物質投与群で発現変動のあった遺伝子をすべて抽出してくると、228プローブ存在した(図 III.3-158)。複数の化学物質で共通して発現変動する遺伝子は広く使用できる毒性の評価マーカーとして利用できる可能性がある。そこで、そのような条件を満たす遺伝子群の抽出を試みた。2つ以上の化学物質で発現変動のあった遺伝子は48プローブ(図 III.3-159)、3つ以上の化学物質で発現変動のあった遺伝子は14プローブ(図 III.3-160)、4つ以上の化学物質で発現変動のあった遺伝子は4プローブ存在した(図 III.3-161)。

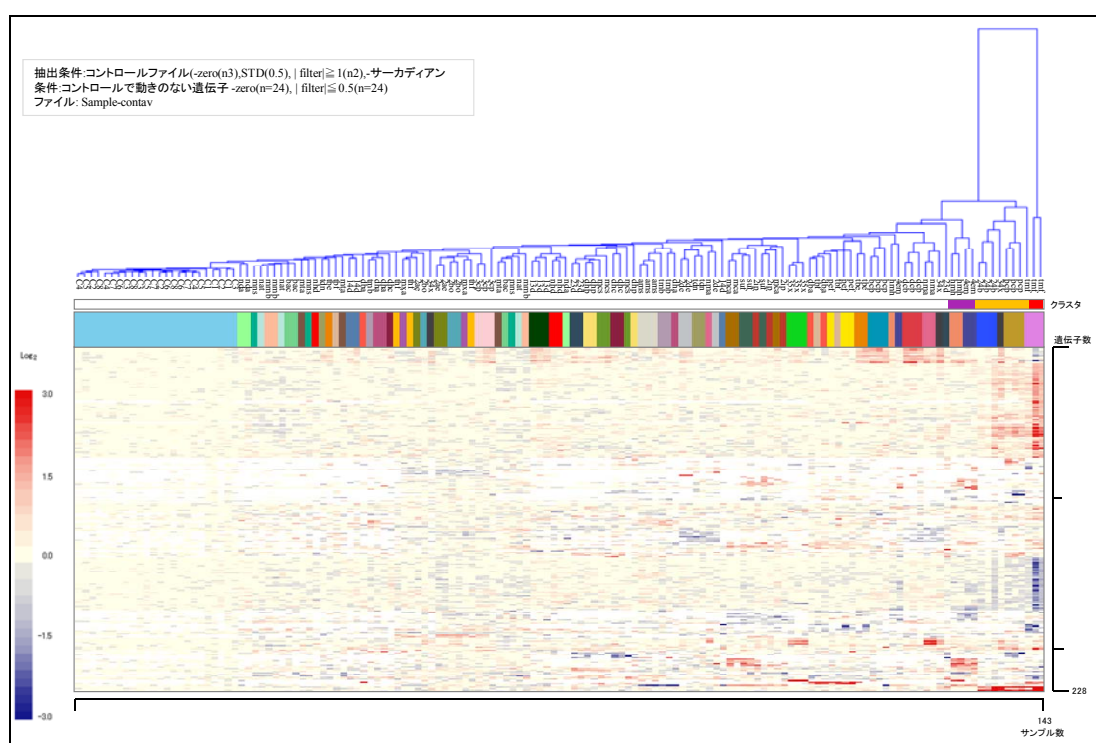


図 III.3-158 化学物質投与により発現変動した遺伝子群によるクラスタ分析

化学物質を28日間反復投与したことにより腎臓で発現変動した遺伝子群(228プローブ)によるクラスタ分析の結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する対数比(二次比)で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

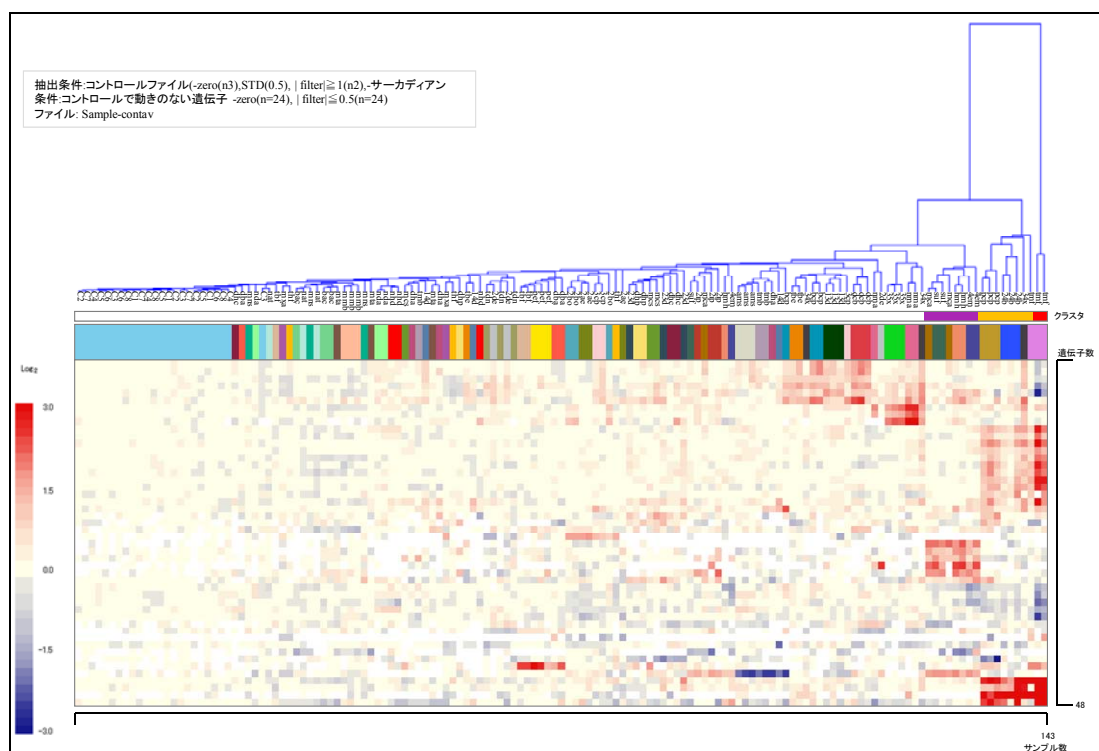


図 III.3-159 2以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群（48プローブ）によるクラスタ分析

図 III.3-158 の遺伝子群の中から2以上の化学物質で発現変動した遺伝子群を抽出し、あらためてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

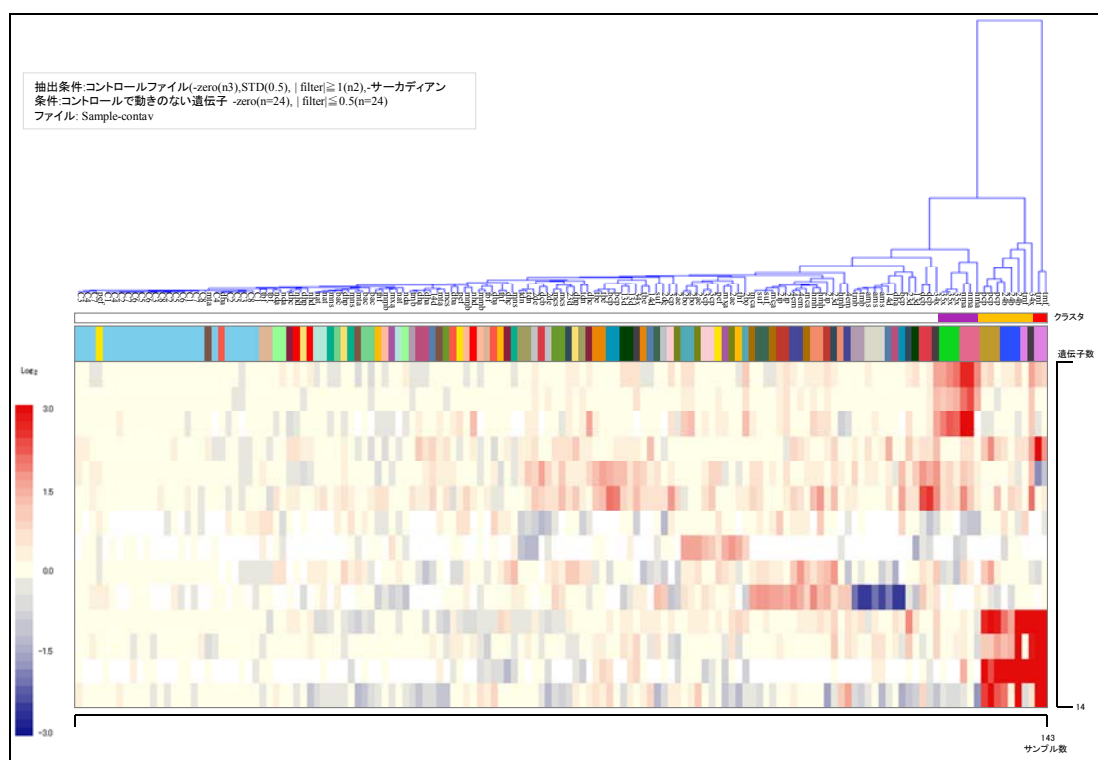


図 III.3-160 3以上の化学物質投与群で発現変動した遺伝子群（14プローブ）によるクラスタ分析

図 III.3-158 の遺伝子群の中から3以上の化学物質で発現変動した遺伝子群を抽出し、あらためてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群の平均値に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

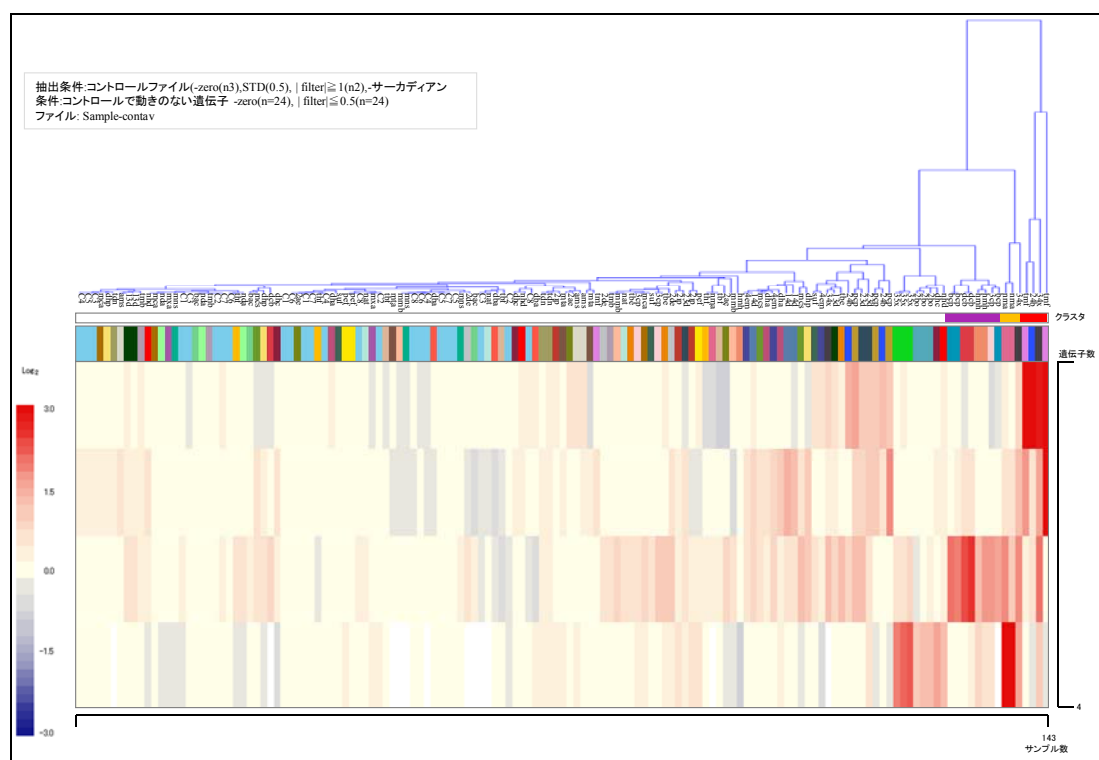


図 III.3-161 4以上の化学物質で発現変動した遺伝子群（4プローブ）によるクラスタ分析

図 III.3-158 の遺伝子群の中から4以上の化学物質で発現変動した遺伝子群を抽出し、あらためてクラスタ分析を行った結果を示す。なお、発現レベルの表示は、対照群に対する相対比（二次比）で表しており、赤が対照群と比較して発現レベルが上昇、青が対照群と比較して発現レベルが低下したことを表している。

公知の腎毒性マーカー遺伝子（公開特許公報 特開 2009-77701、特開 2009-232842、「ラット腎毒性マーカーパネル」（日本チャールズリバー社）参照）、すなわち、glioma-derived vascular endothelial cell growth factor、vascular endothelial growth factor A、liver aldolase B、aldolase A、fructose-bisphosphate、cystatin C、beta-2 microglobulin、calbindin D28、glutathione S-transferase mu 1、aldolase A、glutathione S-transferase Yb subunit、epidermal growth factor receptor、CYR61、cysteine-rich, angiogenic inducer, 61、secreted phosphoprotein 1、podocin、glutathione S-transferase Yc2 subunit、nephrosis 2 homolog、kidney specific organic anion transporter、calbindin 1、TIMP metalloproteinase inhibitor 1、lipocalin 2、clusterin、kidney injury molecule-1 の遺伝子発現パターンを調べたところ、ほとんどの遺伝子は本プロジェクトで使用した40種類の化学物質を28日間反復投与しても発現変動が少なく、これらの遺伝子発現パターンによるクラスタ分析で対照群と分けることができる化学物質は p- (1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール投与群 (tmp)、3,4-キシリジン投与群 (34x)、2,4-ジ-tert-ブチルフェノール (24b)、p-クミルフェノール (pcp) のわずかに4種類に限られていた (図 III.3-162)。

さらに、本プロジェクトで抽出した生体応答遺伝子には公知の腎毒性マーカーは ipocalin 2、clusterin、kidney injury molecule-1 の3遺伝子しか含まれていなかった (図 III.3-163)。

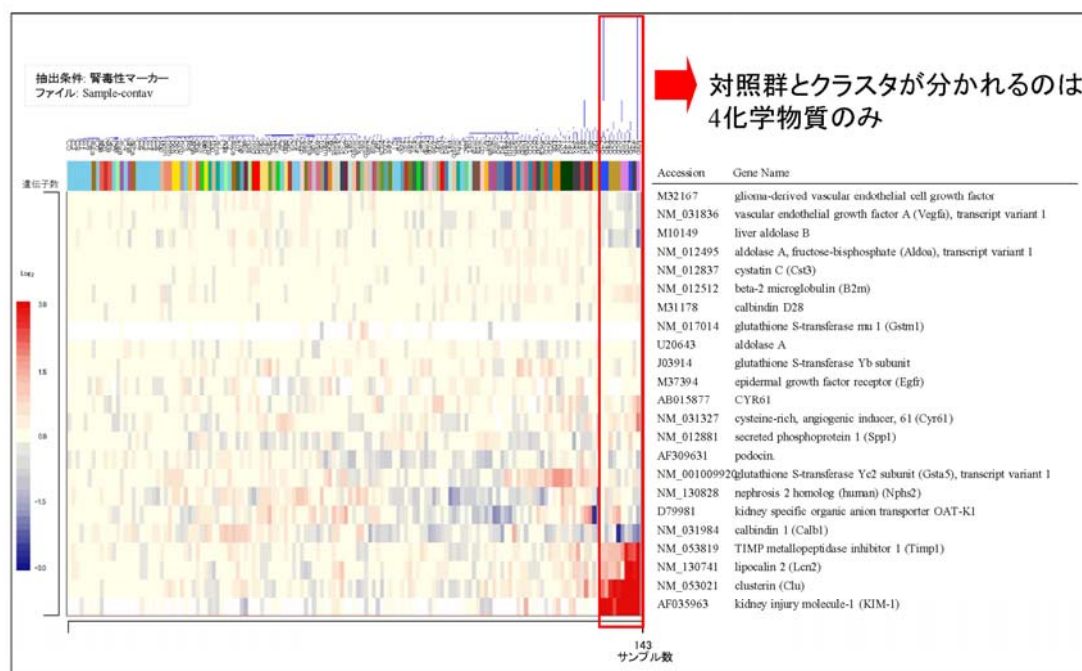


図 III.3-162 既知腎毒性マーカー

既知腎毒性マーカーの遺伝子発現変動パターンによるクラスタ分析を示す。

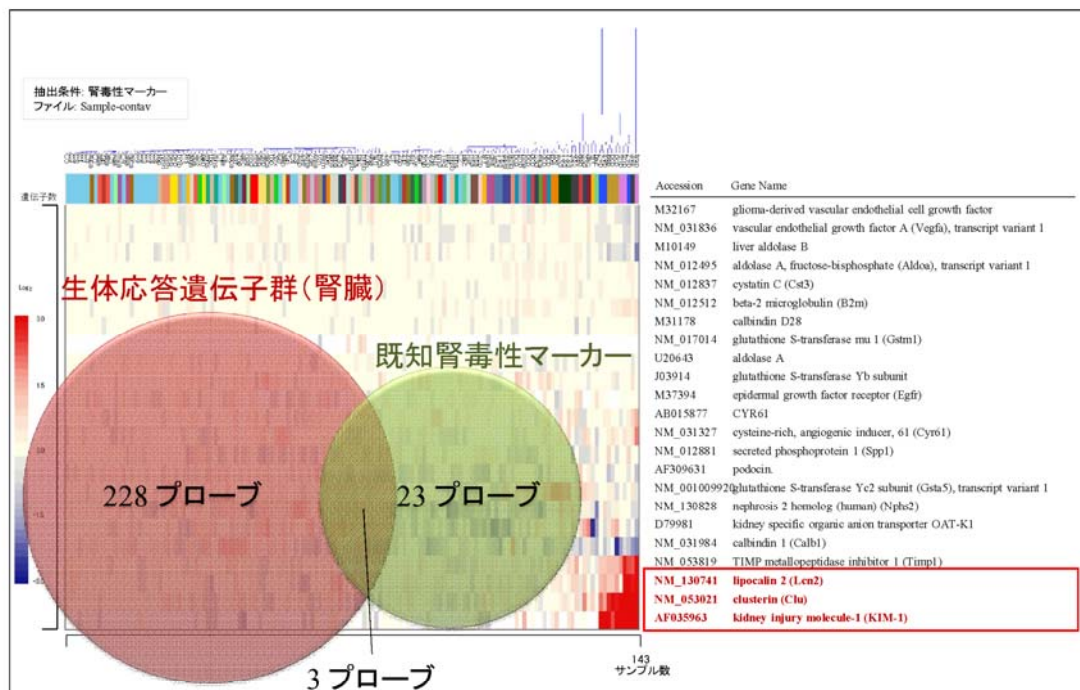


図 III.3-163 生体応答遺伝子群と既知腎毒性マーカーとの比較

本プロジェクトで抽出した生体応答遺伝子群と既知腎毒性マーカーが重複している遺伝子を示す。

さらに、われわれの研究室で開発した論文検索プログラムにより、生体応答遺伝子発現データセット Ki-2 (48 プローブ) に含まれている遺伝子の新規性を調査した。その結果、われわれの調査した範囲内において、報告0報が20 プローブ (42%)、1~9報が14 プローブ (29%)、10報以上が7 プローブ (14%) であった。さらに、NCBI のデータベース上、すでにアクセッション番号が削除されていたものが7 プローブ (15%) であった (図 III.3-164)。さらに、生体応答遺伝子群 (228 プローブ) の中には調査した範囲内では既知腎毒性マーカーが3つしか含まれていなかったことから、抽出した生体応答遺伝子群には新規腎毒性マーカーになり得る遺伝子が含まれている可能性がある。また、論文検索の結果、腎毒性との関連性が報告されていない遺伝子が多数特定できていることから、新規腎毒性マーカーを取得できている可能性がある。

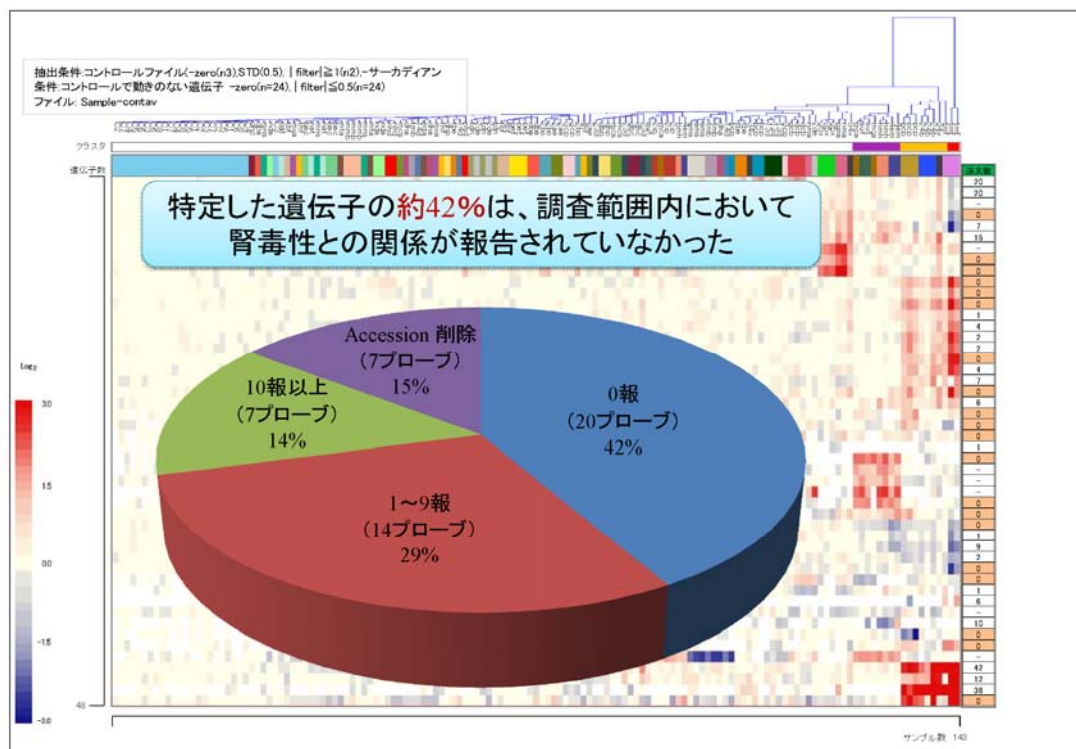


図 III.3-164 既知腎毒性マーカー候補遺伝子の新規性調査

2以上の化学物質で発現変動した遺伝子について腎毒性との関連性を示唆する論文をキーワードにより検索した結果を示す。

(4) まとめ

肝臓および腎臓において、複数の化学物質で共通に発現変動した遺伝子が複数存在した。また、これらの遺伝子群のうち新規性を有する可能性のあるものも複数存在した。このことは、複数の化学物質を曝露した後の遺伝子発現プロファイルを取得し解析することによって、各種臓器毒性のマーカーを取得できる可能性を示唆する。

一方、既知の毒性マーカー遺伝子は本プロジェクトで使用した40化学物質の反復投与では必ずしも変化したものばかりではなかった。このことは、本プロジェクトで使用した40種類の被験化学物質では一般的な毒性を網羅できていない可能性がある。

さらに、既知毒性マーカーで検出できない毒性物質が40物質に含まれていたことは、一般的な毒性を網羅的に検出するためには、既知の毒性マーカーだけでは不足している可能性があることを意味している。

<化学物質の有害性予測>

(1) はじめに

新規化学物質の有害性を評価する上で、毒性情報が豊富な既存の化学物質と比較することは重要である。すなわち、既存の化学物質との類似点・相違点の情報を取得できれば、新規化学物質の有害性を予測することができる可能性がある。

そこで、クラスタ分析による化学物質の有害性予測の可能性を検証した。

(2) クラスタ分析による化学物質の有害性予測

肝臓の3,4-キシリジン投与群(34x)と対照群との間で発現レベルに有意差があった遺伝子群(生体応答遺伝子群の一つ)を用いて例を示す。

この生体応答遺伝子群の抽出過程においては、3,4-キシリジン投与群とその対照群のみがその根拠となっており、残りの化学物質投与群のサンプル(データ)は一切その過程から除外されている。そこで、残り39種類の化学物質投与群をテスターとして使用し、これらの生体応答遺伝子群の発現パターンに基づいてクラスタ分析を行った。その結果、3,4-キシリジン投与群(34x)と対照群とを分ける生体応答遺伝子発現データセットであるにもかかわらず、肝毒性を有することが知られているo-ジクロロベンゼン投与群(dcb)、1-ブロモ-3-クロロプロパン投与群(bcp)、1,3-ジブロモプロパン投与群(13d)、テトラブロモエタン投与群(tbe)、1,4-ジブロモベンゼン投与群(14d)、3-シアノピリジン投与群(3cp)の6種類の化学物質が3,4-キシリジン投与群(34x)と同じクラスタを形成し、これらの化学物質も対照群と区別することができた(図 III.3-165)。したがって、この生体応答遺伝子群の発現パターンを指標とする限り、3,4-キシリジン投与群(34x)とo-ジクロロベンゼン投与群(dcb)が最も類似し、他の1-ブロモ-3-クロロプロパン投与群(bcp)、1,3-ジブロモプロパン投与群(13d)、テトラブロモエタン投与群(tbe)、1,4-ジブロモベンゼン投与群(14d)、3-シアノピリジン投与群(3cp)も比較的類似していることが判明した(図 III.3-165)。例えばこれら6種類の化学物質が毒性未知の化学物質であった場合、この生体応答遺伝子セットの発現パターンを調べるだけで、肝毒性をある程度予測できる可能性がある。

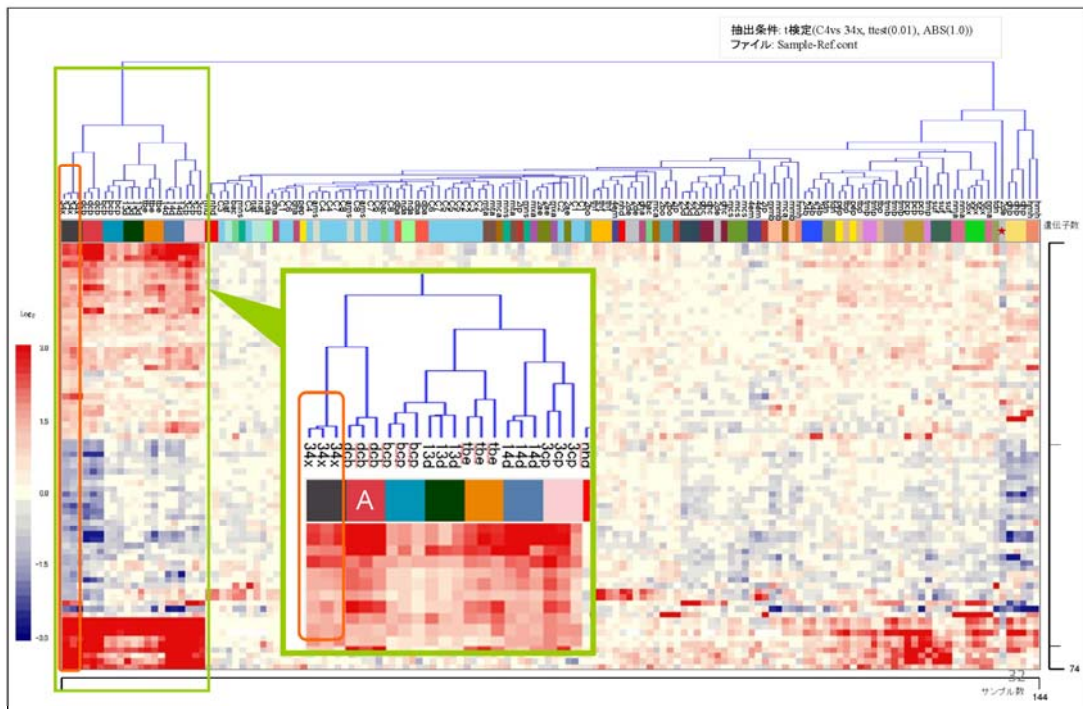


図 III.3-165 生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析

3,4-キシリジン投与群 (34x) と対照群との間で発現レベルに有意差があった遺伝子群 (生体応答遺伝子群の一つ) を用いたクラスタ分析の結果を示す。

(3) まとめ

本プロジェクトで取得した生体応答遺伝子発現データセットによるクラスタ分析で、遺伝子発現変動パターンによって複数の化学物質が房を形成していた。このことは、新規化学物質が本プロジェクトで使用した化学物質の1つ (または複数) と同一または類似した毒性を有していた場合に、生体応答遺伝子発現データセットを利用することで新規化学物質の毒性を予測できる可能性があること意味している。

<反復投与毒性試験期間の短縮化>

(1) はじめに

化学物質の有害性評価は、細菌や培養細胞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行われているが、簡易試験で得られる情報の種類は限られており、長期毒性試験はその費用や効率が課題として指摘されていた。したがって、動物を用いた長期毒性試験の期間を短縮できれば、コスト面および効率面で有用である。

そこで、遺伝子発現変動解析手法を用いることにより、28日間反復投与試験の期間を短縮できる可能性を検証した。

(2) 経時的発現変動パターン

化学物質の曝露期間の経過に相関して発現レベルが変動する遺伝子は、その化学物質が生体に与える影響を評価するバイオマーカーになり得る。そのような観点から、化学物質の有害性評価に利用できるマーカーを探索する一例としてフタル酸ジヘプチルを用いて検証した。投与開始1日、3日、7日、14日、および28日後の肝臓の遺伝子発現プロファイルを取得して、t検定により対照群に対して発現レベルが有意 (P 値 <0.01) に変動しており、かつ、対照群と投与群との平均値の差が約1.7倍以上の遺伝子群 (372プローブ) を特定した。この遺伝子群の発現変動パターンを経時的に横並びに比較したところ、これらの遺伝子群の多くは、時間経過とともに変動の割合が大きくなる傾向にあった (図 III.3-166)。

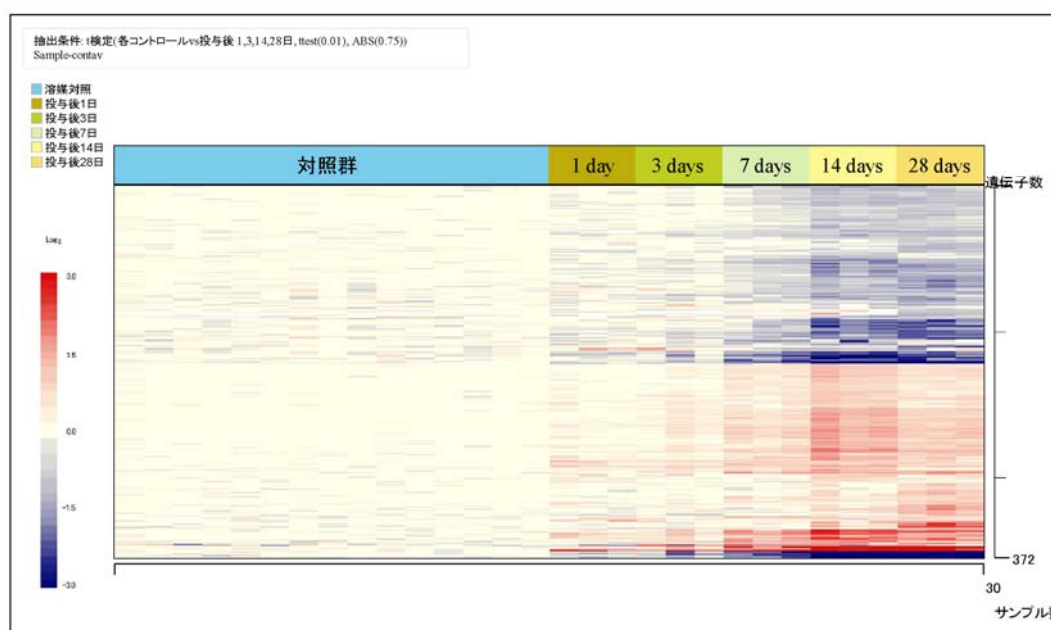


図 III.3-166 タイムコース試験

フタル酸ジヘプチル (dhp) を1、3、7、14、および28日間反復投与した後に肝臓を取得し、遺伝子発現プロファイルを取得した。その中から、各ポイントにおいて対照群の平均値と比較して有意に発現レベルが変動した遺伝子を抽出した (372プローブ)。赤が対照群に比べて発現レベルが上昇、青が対照群に比べて発現レベルが低下したことを表している。

(2) 投与期間と遺伝子発現変動との関係

次に、フタル酸ジヘプチルを1、3、7、14、または28日間反復投与した時点でのみ有意に発現変動した遺伝子群を抽出した。各タイムポイントにおいて、t検定により対照群に対して発現レベルが有意 (P 値<0.01) に変動しており、かつ、対照群と投与群との平均値の差が約 1.7 倍以上の遺伝子群を抽出したところ、投与期間1日では4プローブ、3日では2プローブ、7日では10プローブ、14日では118プローブ、28日では118プローブ存在した (図 III.3-167)。これらの遺伝子は各時点で発現変動のピークがあり、その後変動が消失していくものであった。このような発現変動パターンを有する遺伝子は投与開始期間とともに増加し、14日および28日間反復投与時が最も多かった。

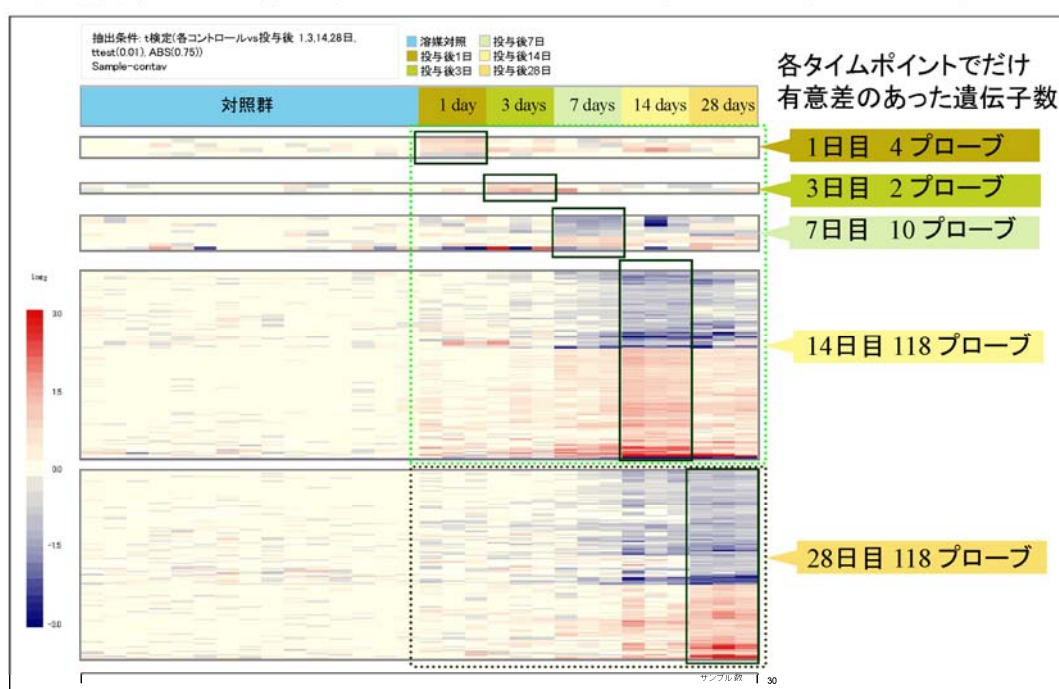


図 III.3-167 各タイムポイントで発現変動した遺伝子群

各タイムポイントでのみ、対照群と比較して t 検定で P 値が 0.01 未満、かつ、平均値の差が約 1.7 倍以上の条件を満たす遺伝子群を抽出した結果を示す。

次に、28日間反復投与試験で発現変動していた遺伝子群がどの時点から変化が生じていたかを検証した。その結果、1日目から変動していたプローブは存在しなかったものの、3日目から変動したものが1プローブ、7日目から変動したものが36プローブ、14日目から変動してもものが66プローブ、28日目からしか変動しないものが118プローブであった (図 III.3-168)。この結果は、28日目からしか変動しない遺伝子の割合が多かったものの、一部の遺伝子については28日より以前の段階でも検出可能であることを意味する。

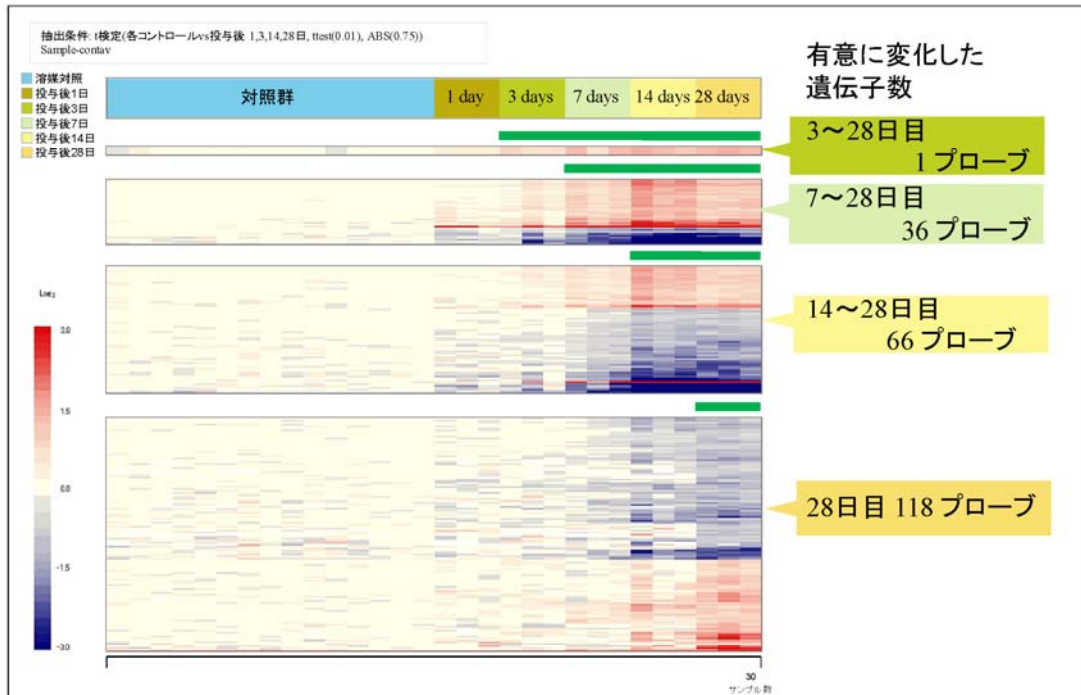


図 III.3-168 28日以前から発現変動した遺伝子群

発現レベルが変動した時点ごとに分類して発現変動パターンを示す。

タイムコース試験の結果、各タイムポイントで発現変動した遺伝子群について、投与期間に伴いどのような発現変動パターンをしていたかを、見方を変えて検討した。各遺伝子の経時的な発現変動パターンに従って、(A) 投与期間に伴い発現上昇した遺伝子群 (B) 14日目に発現上昇のピークがあった遺伝子群 (C) 投与期間に伴い発現低下した遺伝子群 (D) 14日目に発現低下のピークがあった遺伝子群 (E) 投与期間と発現変動パターンに相関性がなかった遺伝子群の5種類に分類した (図 III.3-169)。これらの遺伝子群の中で、投与期間が14日以前でも変化が検出できる遺伝子群が存在した (図 III.3-170)。さらにその中では、投与期間が28日間では変化が消失してしまう遺伝子群も存在した (図 III.3-171)。一方、28日間経過して初めて変化が検出できた遺伝子群も存在した (図 III.3-172)。

さらに、肝臓において9種類の化学物質で共通して発現変動した遺伝子群の経時的变化を検討したところ、14日目がピークの遺伝子もあったが、投与期間の経過とともに発現が変動していた (図 III.3-173)。

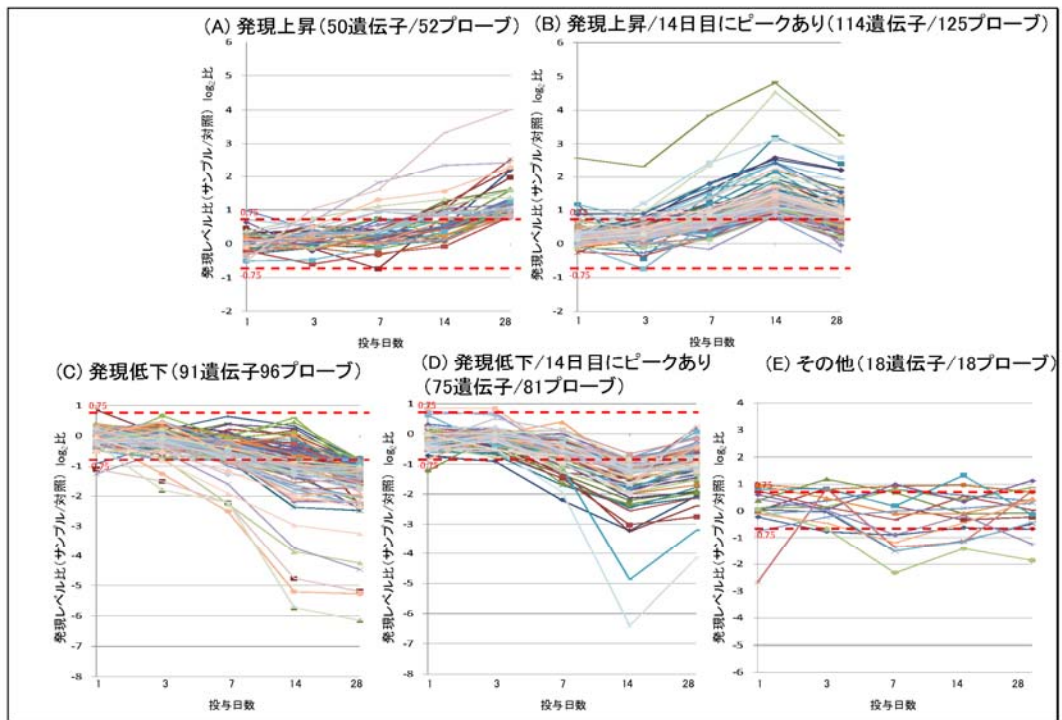


図 III.3-169 経時的变化に伴う発現変動パターンによる分類 (1)

(A) 投与期間に伴い発現上昇した遺伝子群 (B) 14日目に発現上昇のピークがあった遺伝子群 (C) 投与期間に伴い発現低下した遺伝子群 (D) 14日目に発現低下のピークがあった遺伝子群 (E) 投与期間と発現変動パターンに相関性がなかった遺伝子群

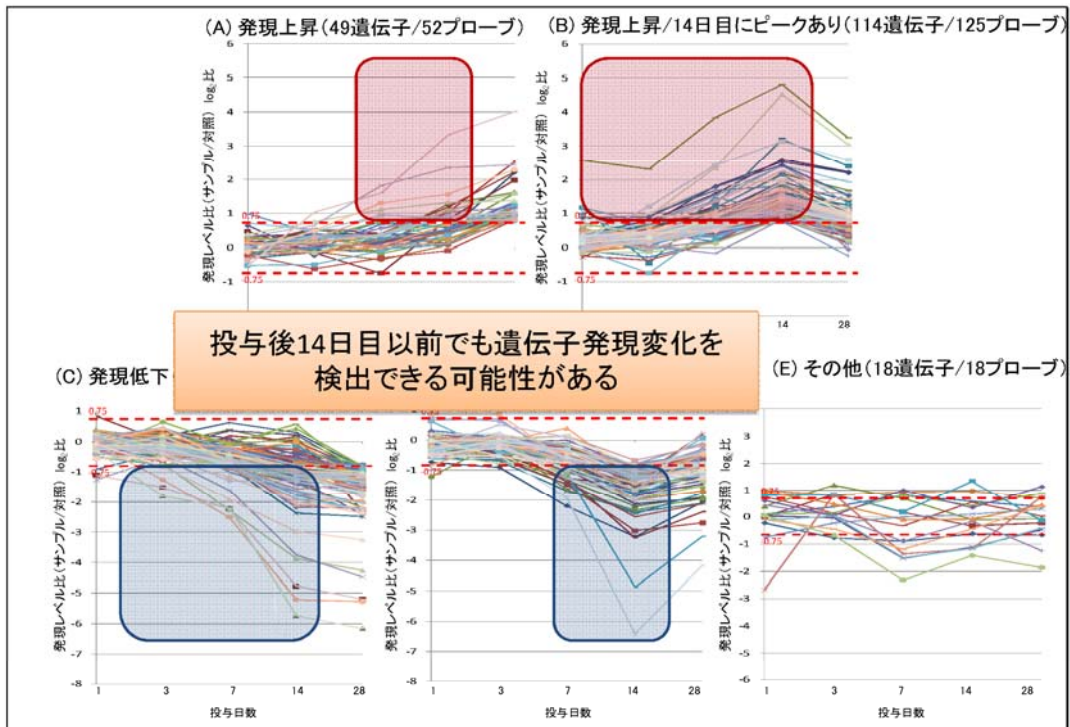


図 III.3-170 経時的变化に伴う発現変動パターンによる分類 (2)

投与期間が14日以前でも変化が検出できた遺伝子群を示す。

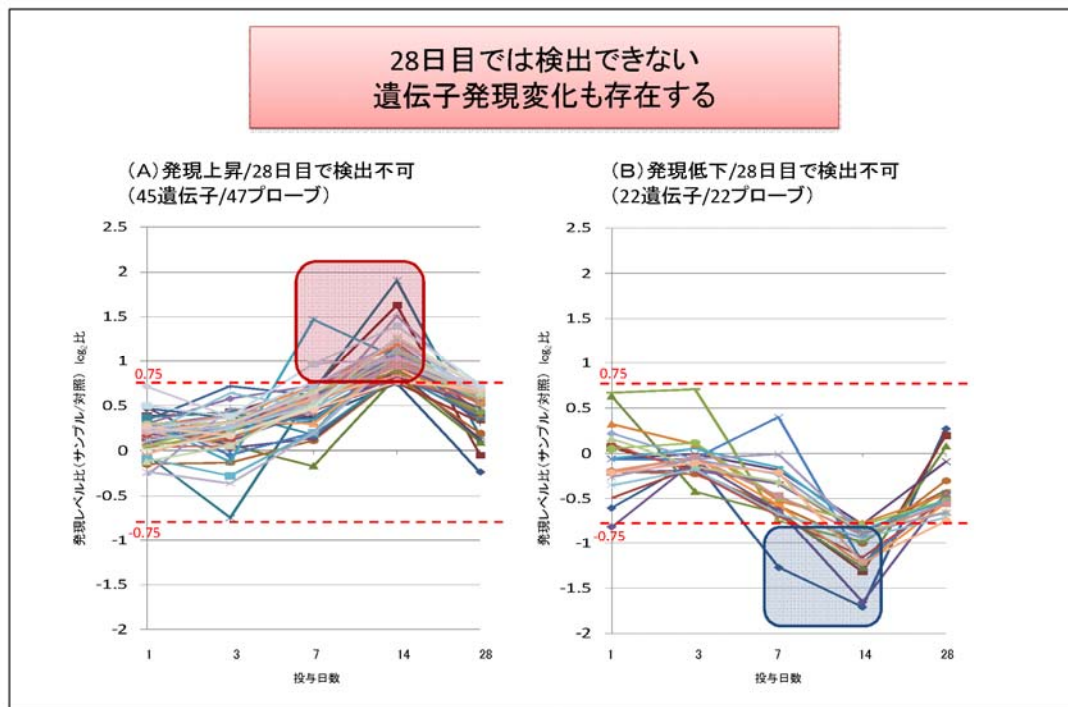


図 III.3-171 経時的变化に伴う発現変動パターンによる分類 (3)

投与期間が14日以前で変化が検出できた遺伝子群の軟化で28日間では変化が消失してしまった遺伝子群を示す。

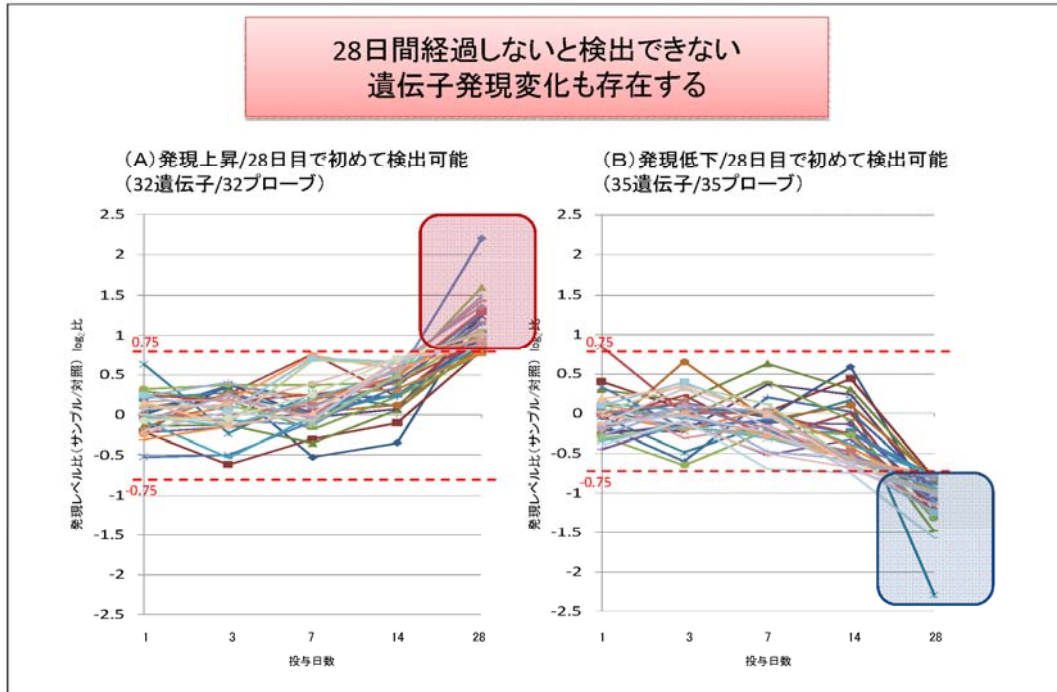


図 III.3-172 経時的变化に伴う発現変動パターンによる分類 (4)

投与期間が28日間経過しなければ変化が検出できなかった遺伝子群を示す。

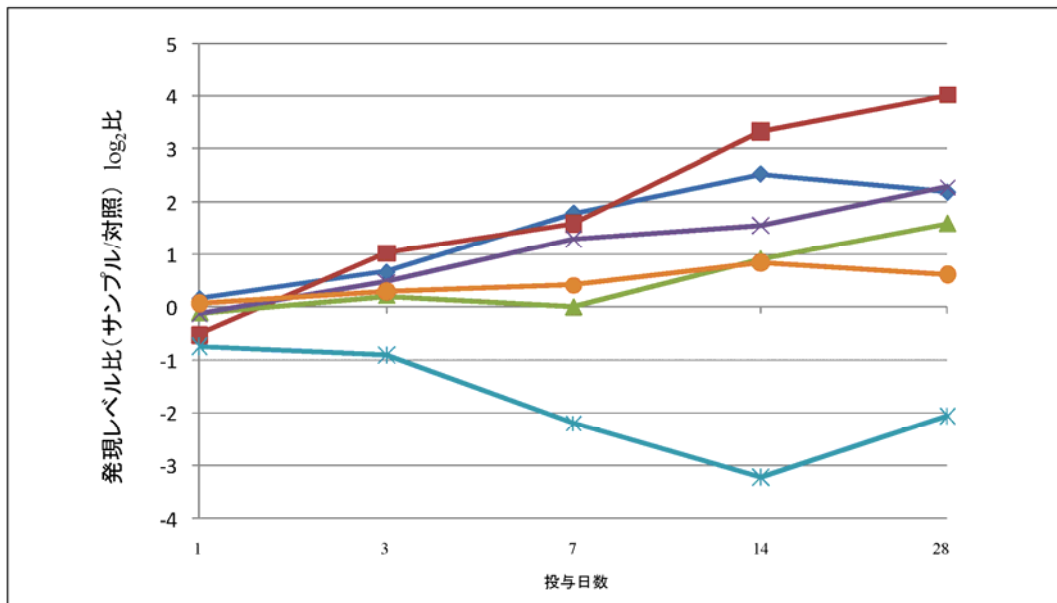


図 III.3-173 有害性バイオマーカー候補遺伝子の経時的变化

肝臓において複数の化学物質で共通して発現変動した6遺伝子についての発現変動パターンを経時的に示す。

(3) まとめ

1～14日でのみ発現変動している遺伝子群（28日間の投与期間では変化が消失している遺伝子群）も多数存在した。このことは、従来の28日間反復投与試験では検出できない変化も存在することを意味する。一方、28日間の投与期間で初めて発現変動している遺伝子群も多数存在した。このことは、28日間反復投与試験でしか検出できない変化も存在することを意味する。したがって、これらの結果は、検出すべき遺伝子を選定すれば28日以前であっても遺伝子発現レベルの変動を検出できる可能性があることを意味しており、化学物質の毒性評価期間を短縮できる可能性があることを示唆している。ただし、化学物質が生体に与える影響を検出するタイミング（期間）は化学物質の有害性を評価する上で重要な項目であり、データを蓄積して検討する必要があることを示唆する。

また、化学物質の投与期間に依存的に発現が変動する遺伝子群は、化学物質の影響を表している可能性が高く、これらの遺伝子群は化学物質が生体に与える影響を検出するためのマーカー遺伝子になり得ることを示している。

<他の肝障害モデルとの比較>

本プロジェクトで扱った化学物質による生体応答が、他の肝障害モデルでどの程度共通点があるのかを検証した。例として、本プロジェクトにおいて肝臓で5種類以上の化学物質で共通して発現変動していた24プローブの発現変動情報を、他のプロジェクト等で実験した肝障害モデル等の遺伝子発現プロファイルから抽出し、本プロジェクトのデータと横並びに比較した。

百日咳ワクチン・日本脳炎ワクチンなどの毒性試験で取得した結果とは相関がなかったが、吸入麻酔試験・漢方薬効試験（コリン欠乏モデルを使用）とは発現変動パターンが類似している遺伝子が存在した。また、複数の製薬企業が開発し、臨床試験で毒性が出現したためにドロップした抗がん剤候補薬剤の副作用試験で取得した結果（「その他の試験」で表わしている）とは、発現変動パターンがかなりの部分相関（類似）した（図 III.3-174）。当然、各製薬企業においても動物を用いた反復投与試験で様々な指標を取得しているはずであるが、その段階では副作用（毒性）は検出されなかった。しかしながら、これらの24プローブで遺伝子発現変動解析を行うことによって、少なくとも本プロジェクトで複数の化学物質の反復投与の影響として発現変動した遺伝子が変化していたという事実は検出できたはずである。仮に、臨床試験に行く前にこれらのデータを取得できていれば、製薬企業ではそれなりの対応ができた可能性がある。

一方、吸入麻酔試験においては、一部は発現変動パターンが類似していたものの、大部分は類似していなかった。ところが、吸入麻酔試験を行った場合、肝臓においてはさらに多数の遺伝子の発現が変動していることが分かっているが（Sakamoto et al., *Gene*, 2005）、本プロジェクトで特定した24プローブとは重なりが少なかった。このことは、本プロジェクトで扱った40種類の化学物質は偏りがあり、一般的な肝毒性を評価するためには、さらに多様性に富んだ化学物質の28日間反復投与試験の遺伝子発現プロファイルを取得する必要があると考えている。

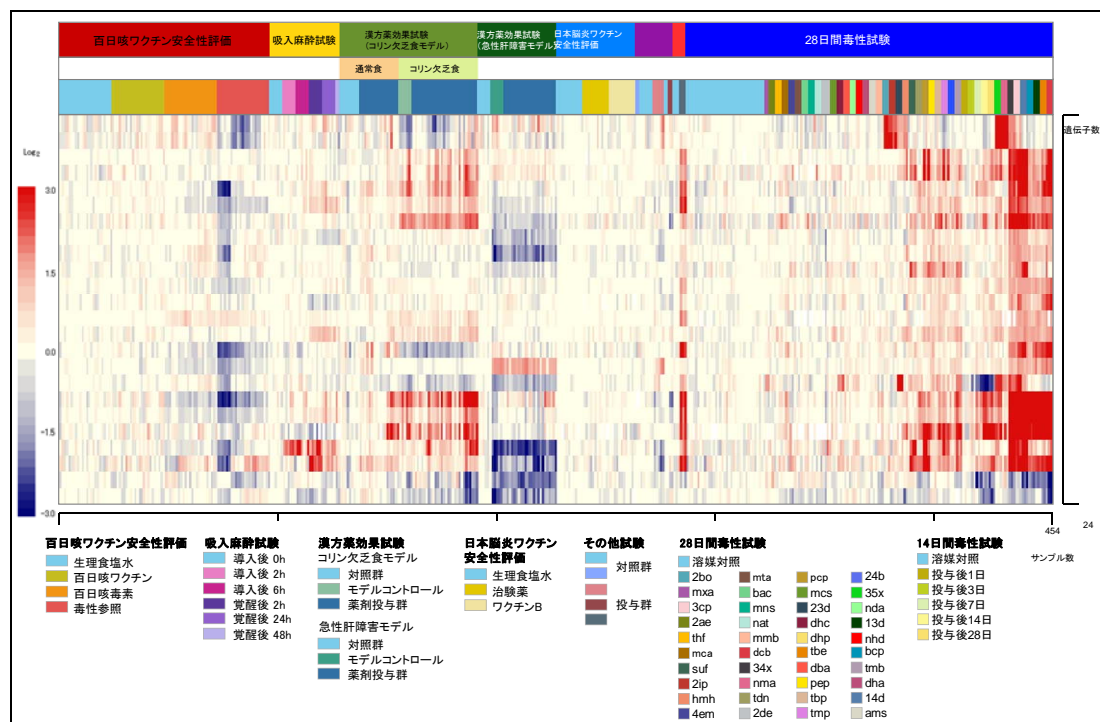


図 III.3-174 他の肝障害モデル等との比較

肝臓において5種類以上の化学物質で共通して発現変動した遺伝子 (24プローブ)

3. 3. 3 遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化

本プロジェクトで取得した全ての生データ(1,025プロファイル)は国際基準(MIAME format)に適合するように整えて、国立遺伝学研究所が運営する遺伝子発現データベースである CIBEX (Center for Information Biology gene Expression database) に登録し公開した。

しかし、ゲノムの専門分野以外の研究者にはこれらのデータをそのまま利用することが難しい。そこで、産業界、大学などの一般の研究者に利用容易なデータに編纂・加工し、新たなデータベース(「ラット28日間反復投与試験・遺伝子発現情報統合データベース」(仮称))を構築し、公開する予定である。本データベースの基本的なコンテンツは、(a) 全サンプルの遺伝子発現プロファイル、(b) 臓器別遺伝子発現解析結果(化学物質を横並びに比較)、(c) 化学物質別遺伝子発現解析結果(臓器を横並びに比較)、(d) 生体応答遺伝子発現データセット、(e) 動物情報(実験条件、血液生化学的検査結果、体重変化、臓器重量など)、(f) 化学物質情報(実験に使用した化学物質の分子式・構造などの一般情報)、である(図 III.3-175)。さらに、データベースは、将来的には国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」、国立遺伝学研究所の CIBEX、産業技術総合研究所の H-Inv DB (H-Invitational Database) 等とのリンクを貼り(図 III.3-176)、より利用者に使いやすい形にしていく予定である(図 III.3-177)。なお、国立医薬品食品衛生研究所の「既存化学物質毒性データベース」の言語は原則として日本語を(各報告書の要約のみ英語版も存在する)、国立遺伝学研究所の CIBEX の言語は原則として英語を、産業技術総合研究所の H-Inv DB (H-Invitational Database) の言語は原則として日本語および英語を使用している。「ラット28日間反復投与試験・遺伝子発現情報統合データベース」(仮称)は当面のところ、言語は日本語を使用するが、将来的には英語版を作成して国際化に対応した形にしていく予定である。

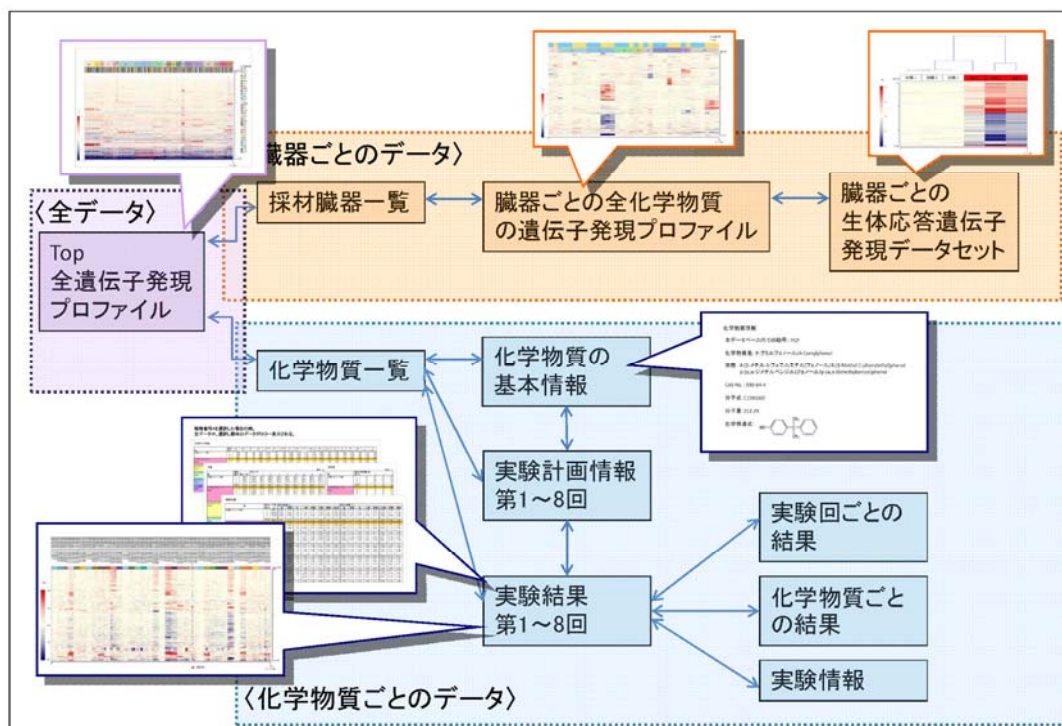


図 III.3-175 データベースのフローチャート

(株) メディクロームが構築中のデータベースのフローチャートを示す。

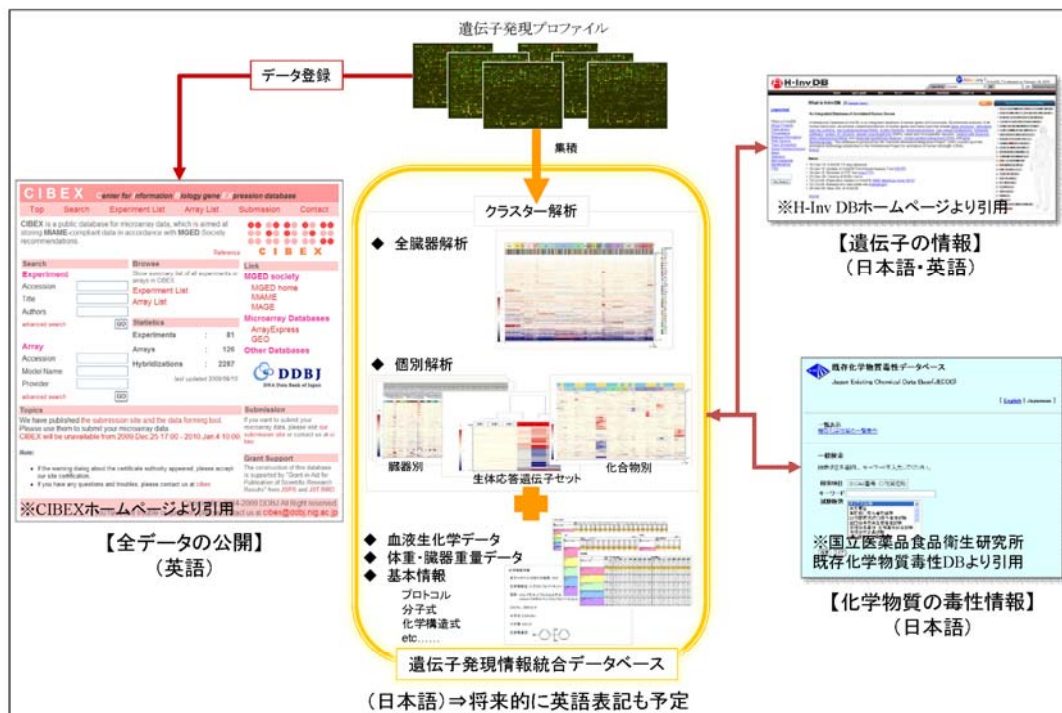


図 III.3-176 データベースのリンク先

データベースの間のリンク先を示す。

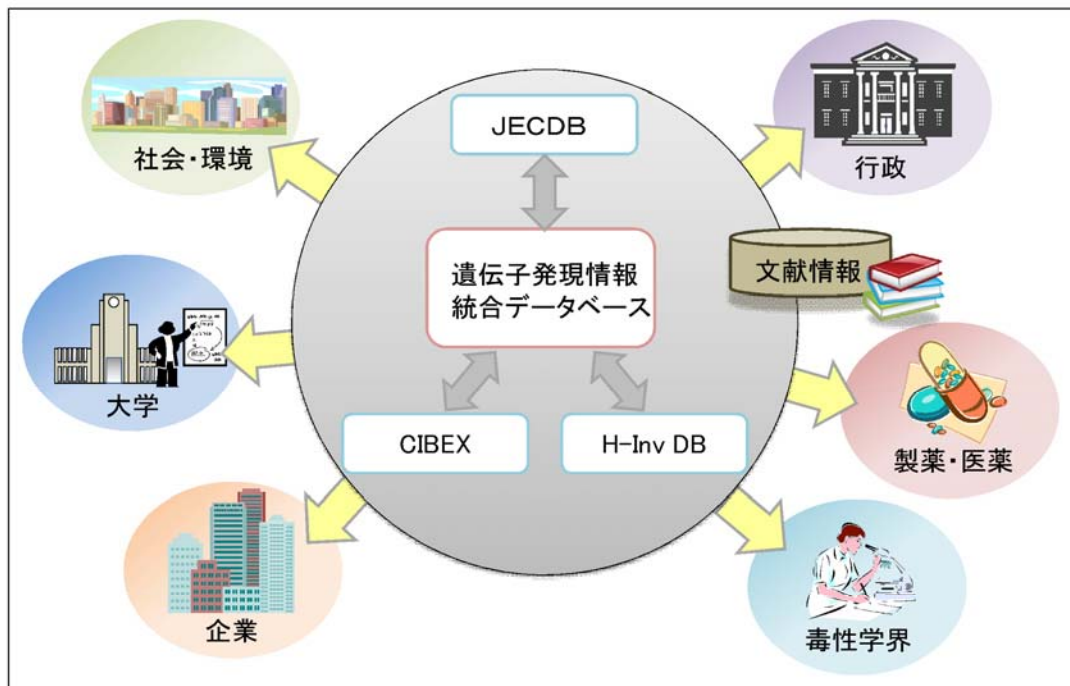


図 III.3-177 データベースの利用
データベースの産業界への利用の概念を示す。

IV. 実用化の見通し

1. 概要

●研究開発項目 A 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

本事業は、知的基盤・標準整備等の研究開発として位置付けられる。

「環境安心イノベーションプログラム」の中で、「2014年度を目途に有害性評価手法等を経済協力開発機構（OECD）にテストガイドラインとして提案することを検討し、国際標準化を推進する。」と規定されている。このため、研究開発項目 A 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発」のうち、発がん性予測のための Bhas 42 細胞による形質転換試験については、プレバリデーションを平成 18 年度から実施しており（6 ウェル法）、平成 21 年度には本格的なバリデーションを実施して（96 ウェル法）OECD テストガイドライン提案に値する評価結果を得た上で、Bhas 42 細胞を用いた形質転換試験法の提案書を平成 22 年 1 月末に OECD に提出し、3 月の OECD-WNT 会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。

一方、発光細胞による催奇形性・免疫毒性予測法についても、マーカー遺伝子の選択、評価用発光細胞の樹立、標準的な試験プロトコール作成を終了し、施設間プレバリデーションを実施した。平成 23 年以降は、催奇形性・免疫毒性については、OECD テストガイドライン提案に向けてバリデーションを開始する予定である。

●研究開発項目 B-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

開発された遺伝子発現データセットにより、既存化学物質の 28 日間反復投与試験に係わる既存の膨大な「言語による記述的要素」のやや多い毒性学的情報に、「計算可能な数値的要素」からなるトキシコゲノミクス的情報を関連づけられることが可能となり、新たな視点からの有害性評価手法開発のための知的基盤を提供し得るものと考えている。そのため、化学物質の有害性評価に特に有用であると考えられる遺伝子セットについて特許出願により知的財産権の確保を行った後、順次、本事業で得られたすべての遺伝子発現データを国立遺伝学研究所のデータベースで公開することとしている。さらに、本事業で取得したデータを広く社会で使えるようなシステムとして編集・編纂した本事業の成果データベース「遺伝子発現情報統合データベース（仮称）」を別途構築し、「既存化学物質毒性評価データベース」（国立医薬品食品衛生研究所）、「CIBEX（Center for Information Biology gene EXpression database）」（国立遺伝学研究所）、および「H-Inv DB（Annotated Human Gene Database）」（産業技術総合研究所）とインターネット上の直接リンクの構築を依頼する予定である。これにより、膨大な従来の毒性学的知見と本事業で取得・開発するトキシコゲノミクスの知見の融合と相互の円滑な連携的發展が図れることとなる。

さらに、本事業で同定した各種臓器における毒性バイオマーカーまたは有害性評価用遺伝子セット（生体応答遺伝子セット）に関しては、キット化または受託解析ビジネスへの展開が期待できる。

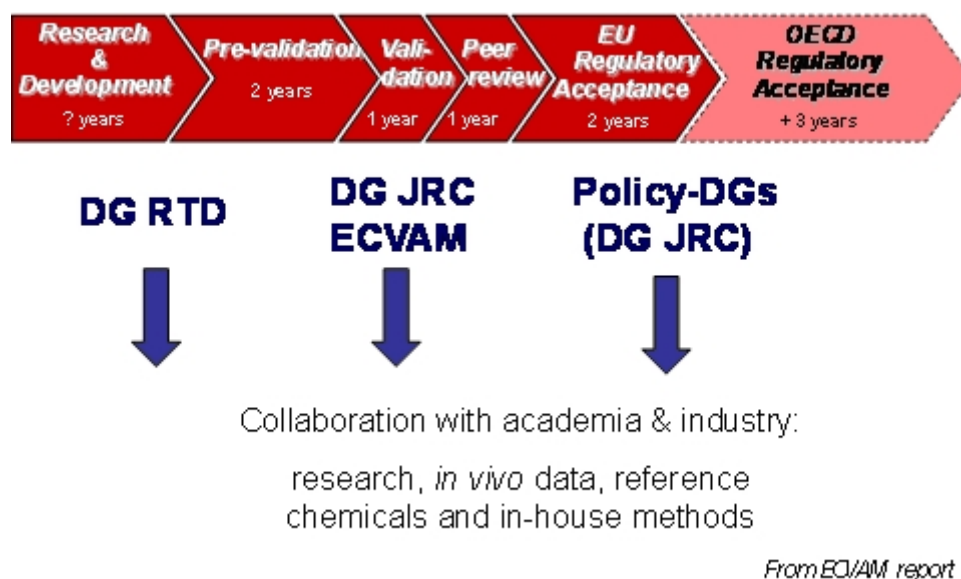
2. 詳細内容

2. 1 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

2. 1. 1 研究開発成果の「実用化の見通し」について

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、環境安心イノベーションプログラム基本計画において、OECD-TG化に向けた国際提案を行うことを目標に掲げている。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。プロジェクト基本計画に規定された最終目標の達成に向けて、着実に進展し、「OECD-TG化に向けた国際提案」についても、発がん性、免疫毒性、催奇形性の3予測試験法のうち、発がん性予測試験法として、Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の提案書を平成22年1月末にOECDに提出し、3月のOECD-WNT会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。現在、本格的なOECDでの審議に向け、準備を進めている。

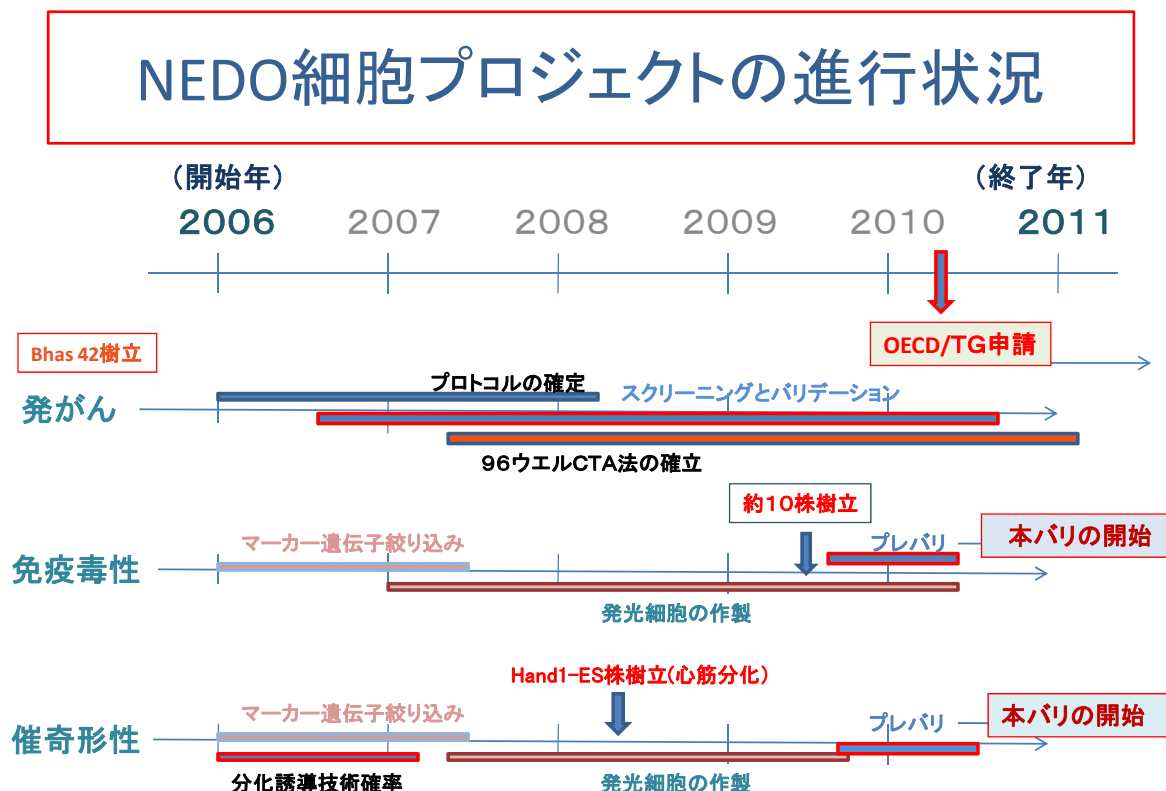
OECD-TG化を図る上で考慮しなければならない点は、新規の手法開発からバリデーションを経てOECDの承認を得るまでの必要期間である。これまでの例では、新規TG開発事業としてOECDに登録してから新規TGとして承認されるまでに10年近い期間が必要となっている。図IV-1は、欧州代替法バリデーションセンター(ECVAM)の科学諮問委員会が示した、OECD-TG化までの道のりである。



図IV-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核、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(図IV-2)。発がん性予測試験法については現在OECDでの審議が開始されたところであるが、免疫毒性、催奇形性予測試験法についても、平成23年度及び平成24年度からそれぞれバリデーションを実施するよう、現在準備を

進めている。



図IV-2 本事業の試験法開発からガイドライン化まで

本事業のうち「発がん性予測試験法」については、いち早く実用化への見通しを得つつある。すなわち、国内バリデーションを平成18年度から開始し、平成20年度はICCVAMとECVAMの協力を得ながらバリデーションを進めており、平成21年度までには最終プロトコールでのバリデーションを終了し、Bhas 42細胞を用いた形質転換試験法の提案書を平成22年1月末にOECDに提出し、3月のOECD-WNT会議において説明し、ガイドライン化に向けて作業を進めることが了承された。

「免疫毒性予測試験法」については、マーカー遺伝子を選択し、発光細胞の樹立が進み、代表的な免疫毒性物質を用いた施設内バリデーションの段階が終了した。最終的には、免疫毒性マーカーのいくつかのセットごとの評価細胞(表IV-1)を樹立し、平成22年度にはいくつかの発光レポータ細胞について、施設間での技術移転の為の共同研究を実施した。今後、本格的なバリデーションを進めるためのプレバリデーションを実施し、平成23年度に本格的なバリデーションを進めるため、本事業のフォローアップ研究として推進していく。

表IV-1 免疫毒性予測試験法用に樹立された発光レポーター細胞

親細胞		導入遺伝子			作製主担当	備考
		赤	緑	橙		
Jurkat細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	TOYOBO、東北大	#14D1
	2色細胞	G3PDH	IL4	-	TOYOBO、東北大	#4A4
		G3PDH	-	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12
	3色細胞	G3PDH	IL4	IFN γ	TOYOBO、東北大	#10C6
G3PDH		IL2	IFN γ	TOYOBO、東北大	#2B12、#2F12、#2H4、#2A12、#2A5、#7C2、#8D5	
U937細胞	1色細胞	G3PDH			TOYOBO、AIST	#UGA12、#9A6
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	TOYOBO、AIST	#4D5、#6C12、#7A9
THP-1細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	AIST、東北大	#TGC17

HaCaT細胞	1色細胞	TK	-	-	東北大	
	2色細胞	TK	HO-1	-	東北大	#HR38H6
U937細胞	1色細胞	TK	-	-	東北大	#UR2
	2色細胞	TK	HO-1	-	東北大	#UR2H4117
THP-1細胞	1色細胞	G3PDH	-	-	東北大	#TGC17
	2色細胞	G3PDH	IL1 β		東北大	#TGC17bA16.19
	2色細胞	G3PDH		IL8	東北大	#TGC17EA01
	3色細胞	G3PDH	IL1 β	IL8	東北大	#TGC17bA16EA26

「催奇形性予測試験法」についても、「免疫毒性予測試験法」と同様に、マーカー遺伝子を選択し、数種の発光レポーター細胞を作製し、平成22年度にはプロトコルの詰めを行っている。平成23年度にはプレバリデーションを、平成24～25年には本格的なバリデーションを進める。

また、並行して研究開発している全胚培養（WEC）による代謝活性化試験法については、代謝活性化試験と血清少量化に成功している。したがって、発光細胞法でスクリーニングされた化学物質について、その催奇形性の可能性の確認のため、改良されたWEC試験を適用する。

上述のとおり、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、「免疫毒性予測試験法」及び「催奇形性予測試験法」については、OECD-TG提案は本事業終了後となる見通しであるため、OECD-TG化に向けて着実なプロセスの展開を図るためには、バリデーションの継続などが必要である。

2. 1. 2 研究開発成果の応用分野について

本事業により得られる新規試験法は、簡易で高感受性であり、また、試験対象検体数の拡大や省力化、コスト削減などでも大きなメリットがあることから、企業での自主的な化学物質管理や試験受託機関で有効に利用されるものと期待される。

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、経済的及び社会的な波及効果を大いに導くとともに、多様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。このため、得られた成果を基盤にレポーターアッセイ系の応用、その試薬の市販化など、数多くの実用化に向けた計画も進行しつつある。

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

2. 2. 1 研究開発成果の「実用化の見通し」について

本研究開発項目の狙いは、既存化学物質の28日間反復投与試験に係わる既存の膨大な毒性学的情報と関連付けられる遺伝子発現データセットを作り上げること、即ち、知的基盤情報を取得（開発）することにある。従来の「言語による記述的要素」のやや多い毒性学的情報に、「計算可能な数値的要素」からなるトキシコゲノミクスの情報を関連付けることにより、膨大な情報間を相互に比較可能とならしめ、これまで見出すことができなかった潜在的な関連性を顕在化することが可能となり、新たな視点からの有害性評価手法開発の基盤となる。

したがって、本研究開発項目の「実用化」とは、開発された遺伝子発現データセットが、広く社会において（特に、有害性評価やその手法開発に従事している専門家及び規制行政担当者に）利用されることを意味する。そのためには、化学物質の有害性評価に特に有用であると考えられる遺伝子発現データセットについて知的財産権の確保を行った後に、順次、すべての生データおよび遺伝子発現データセットの公開を行った（1,025プロファイル）。

本プロジェクトで得られたすべての遺伝子発現プロファイルは国立遺伝学研究所が運営する遺伝子発現データベースであるCIBEX（Center for Information Biology gene Expression database）に登録し公開する。遺伝子発現データセットは、まず広く社会で使えるようなシステムとして編集・編纂し、株式会社メディクロムのホームページ上で公開する。さらに、本プロジェクトにおいて基礎情報を活用した既存化学物質の毒性評価データベース（国立医薬品食品衛生研究所）、H-Inv DB（H-Invitational Database）（産業技術総合研究所）、及びCIBEX（Center for Information Biology gene Expression database）（国立遺伝学研究所）で公開する本プロジェクトの成果データベースとのインターネット上の直接リンクの構築を依頼する予定である。これにより、膨大な従来の毒性学的知見と本プロジェクトで取得・開発するトキシコゲノミクスの知見の融合と相互の円滑な連携的發展が図られることとなる（図IV-3）。

<遺伝子発現データセットの概要>

化学物質数： 40種類

採材臓器数： 24～26臓器

RNA取得数： 3,611サンプル

遺伝子発現プロファイル数： 1,028プロファイル

生体応答遺伝子発現データセット： 78セット

特許出願： 10件（但しH23年度に10件追加）

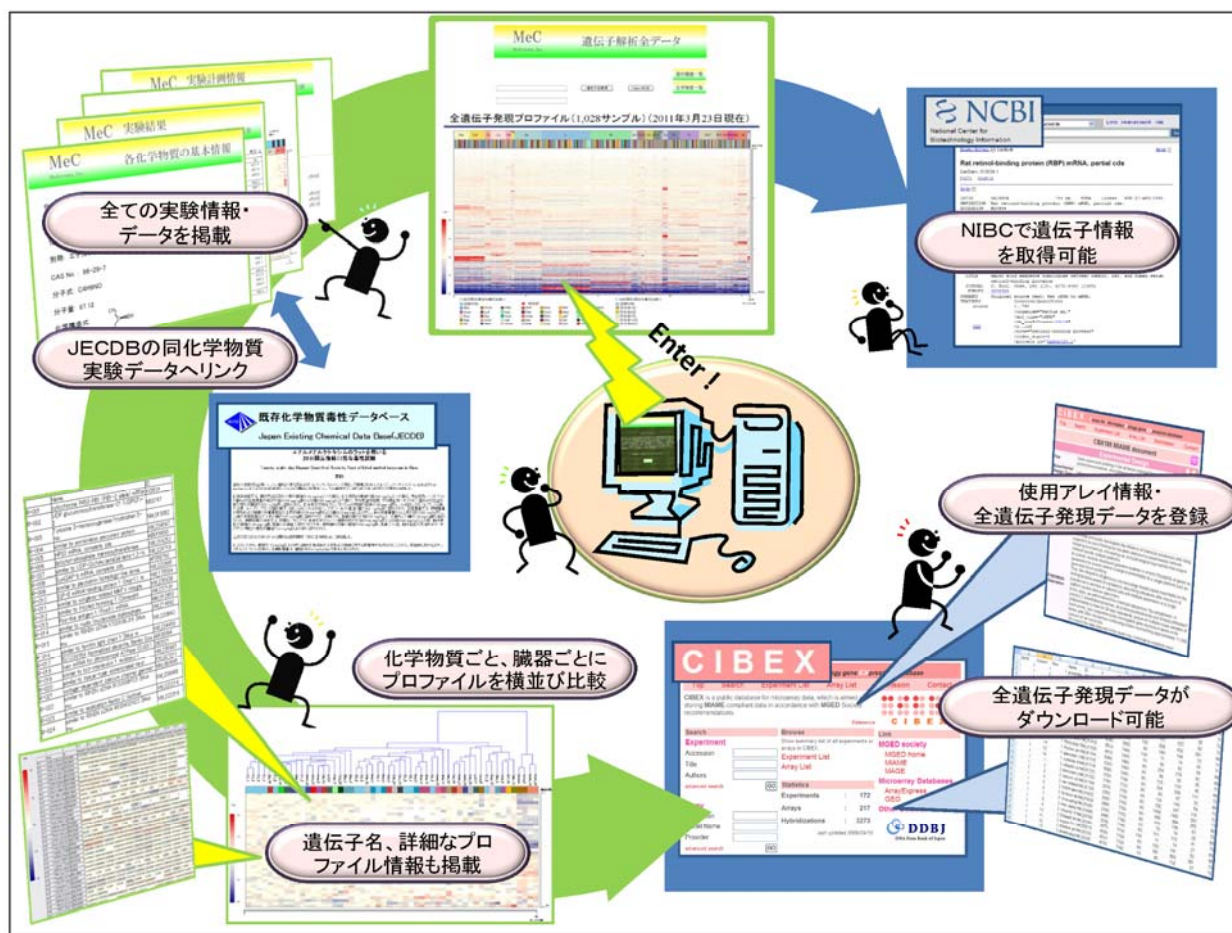


図 IV-3 本プロジェクトの成果開示

本プロジェクトで取得したデータの開示および利用方法の概略を示す。株式会社メディクロームが運営するデータベース上において本プロジェクトで取得した成果を自由に閲覧することができる。当該データベースには遺伝子発現変動解析データや動物実験データなど様々なデータを閲覧できる。当該データベースには「既存化学物質毒性データベース（国立医薬品食品衛生研究所）」、「CIBEX（Center for Information Biology gene Expression database）[国立遺伝学研究所]」などの外部データベースとリンクを貼る予定であり、相互に利用可能になる。

本プロジェクトの研究開発テーマとして、①既存化学物質の28日間反復投与実験、②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析、③遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化、を設定した（図 IV-4）。

①のテーマの課題は「遺伝子発現変動解析用の28日間反復投与実験のプロトコルの確立」であり、本プロジェクトでこのプロトコルを確立した。このプロトコルはCIBEXで既に公開済みであり、また、現在構築中のデータベースでより詳細な実験条件等のプロトコルを公開することにより一般に広く利用可能となり、実用化がなされる。

②のテーマの課題の一つは、「生体応答遺伝子発現データセットの開発」であり、本プロジェクトでは78セット取得した。これらの78セットのうち、化学物質の有害性評価に特に有用であると考えられるセットについて特許出願を行い、知的財産権を確保しており、これらの知的財産権の実施権設定やキット化・商品化等で実用化を図れる可能性がある。

る。もう一つの課題は、「毒性バイオマーカー遺伝子による有害性評価技術の開発」であり、本プロジェクトでは生体応答遺伝子群の中で毒性バイオマーカーになり得る遺伝子も検討している。これらのバイオマーカー候補遺伝子群を用いた定量系解析技術の開発を行い、より簡易的かつ定量的な有害性評価技術を確立し、遺伝子発現解析受託会社である（株）メディクロームによる化学物質有害性評価にかかる解析受託ビジネスの再開として事業化を図る。

③のテーマの課題は「有害性評価情報の統合」と「新規データベースの構築」である。本プロジェクトで取得したすべての生データを CIBEX に登録し既に公開しており一般利用可能であるとともに、現在構築中（平成23年8月に公開予定）の新規データベースの中でもより利用しやすい形に編纂したデータセットとして利用可能となる予定であり、実用化が図れる。

■ 成果の実用化可能性		
研究開発テーマ	課題	実用化
①既存化学物質の28日間反復投与実験	遺伝子発現変動解析用の28日間反復投与実験のprotocolsの確立	実験protocolsの公開により一般利用可能
②既存化学物質投与ラット組織の遺伝子発現解析	生体応答遺伝子発現データセットの開発	知的財産権の活用(実施権等)キットの商品化
	毒性バイオマーカー遺伝子による有害性評価技術の開発	受託解析による事業化
③遺伝子発現情報の登録・開示とデータベース化	有害性評価情報の統合	一般利用可能
	新規データベースの構築	一般利用可能

図 IV-4 本プロジェクトの成果の実用化の可能性

本プロジェクトの課題と本プロジェクトで得られた成果の実用化の可能性を示す。

実用化までの簡単なロードマップを示す（図 IV-5）。「有害性評価情報統合・新規データベースの構築」は、（株）メディクロームが行っており、現時点ですべての生データを CIBEX で公開済みであり一般利用可能であるとともに、平成23年8月までに新規データベースの公開を行う予定である。それにより、本プロジェクトで取得したデータは広く一般に利用可能となり、実用化が図れる。

「キット・受託ビジネスの展開」は（株）メディクロームおよびその他試薬・検査薬メーカーなどが行う予定である。特に、（株）メディクロームはもともと遺伝子発現解析受託会社であるため、本プロジェクトで取得した成果および知的財産権をもとに、平成2

3年度中に受託事業を再開して事業化を図る予定である。また、本プロジェクトで取得した78セットの生体応答遺伝子発現データセットをもとにして、網羅的遺伝子発現解析から定量系に移行して、より簡便かつ正確な化学物質の有害性評価技術を確立しキット化・商品化を目指すべく、試薬・検査薬メーカーと交渉中である。現在、市場調査や遺伝子発現解析の定量化に必須の標準物質（例えば、標準RNA）の選定などを行っている。

「研究開発促進・公的な有害性評価試験法認定」については、より多くの検証と様々な手続きが必要となる可能性がある。そのため、より長期的な観点で進めていく必要がある。

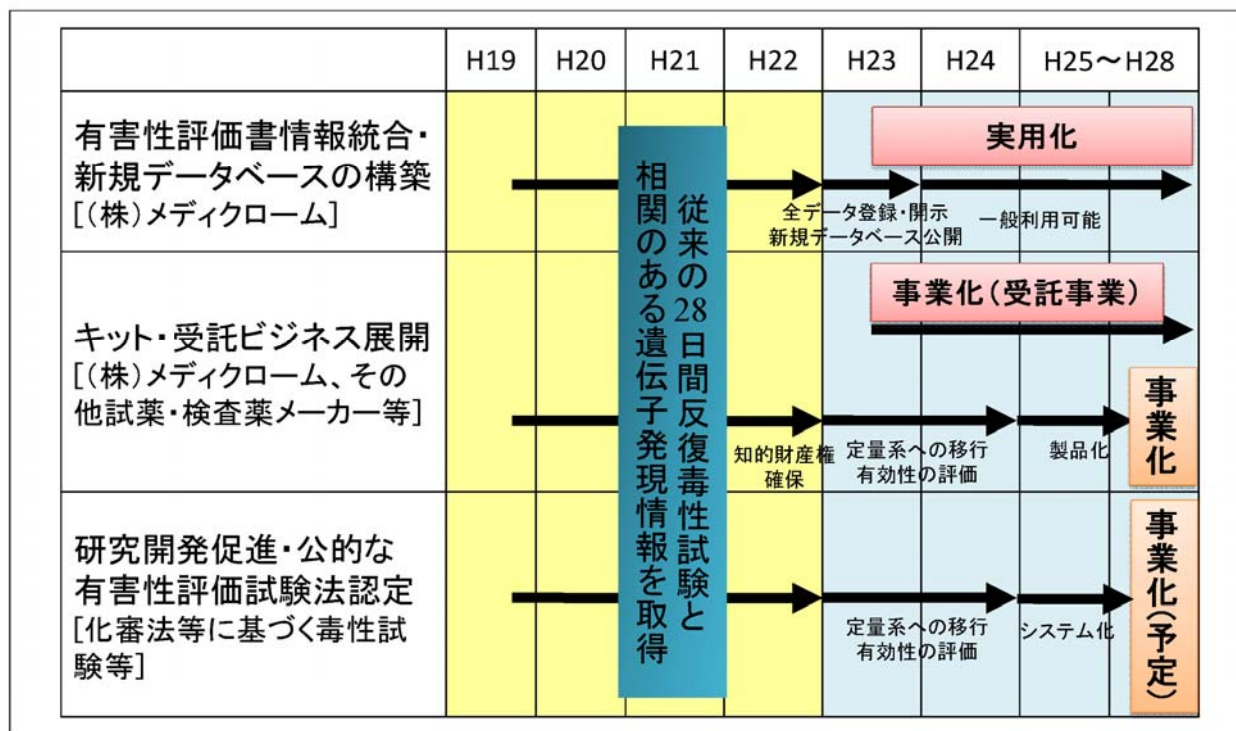


図 IV-5 実用化までのシナリオ

本プロジェクトの成果の実用化までのロードマップを示す。

本プロジェクトで得られた成果の応用分野とその波及効果を示す（図 IV-6）。「化学物質リスク管理分野」では毒性マーカーを同定し、遺伝子発現変動解析の定量化（キット化）を行うことで、どの機関でも簡便かつ正確に化学物質の有害性を評価することができる可能性がある。「製薬分野」では、製薬企業が開発した薬剤の臓器毒性予測や副作用予測ができる可能性がある。「その他の分野」には試薬・検査薬の分野が含まれ、本プロジェクトで取得した生体応答遺伝子発現データセットや有害性評価マーカー遺伝子を用いた検査キットの開発と商品化という波及効果が期待できる。

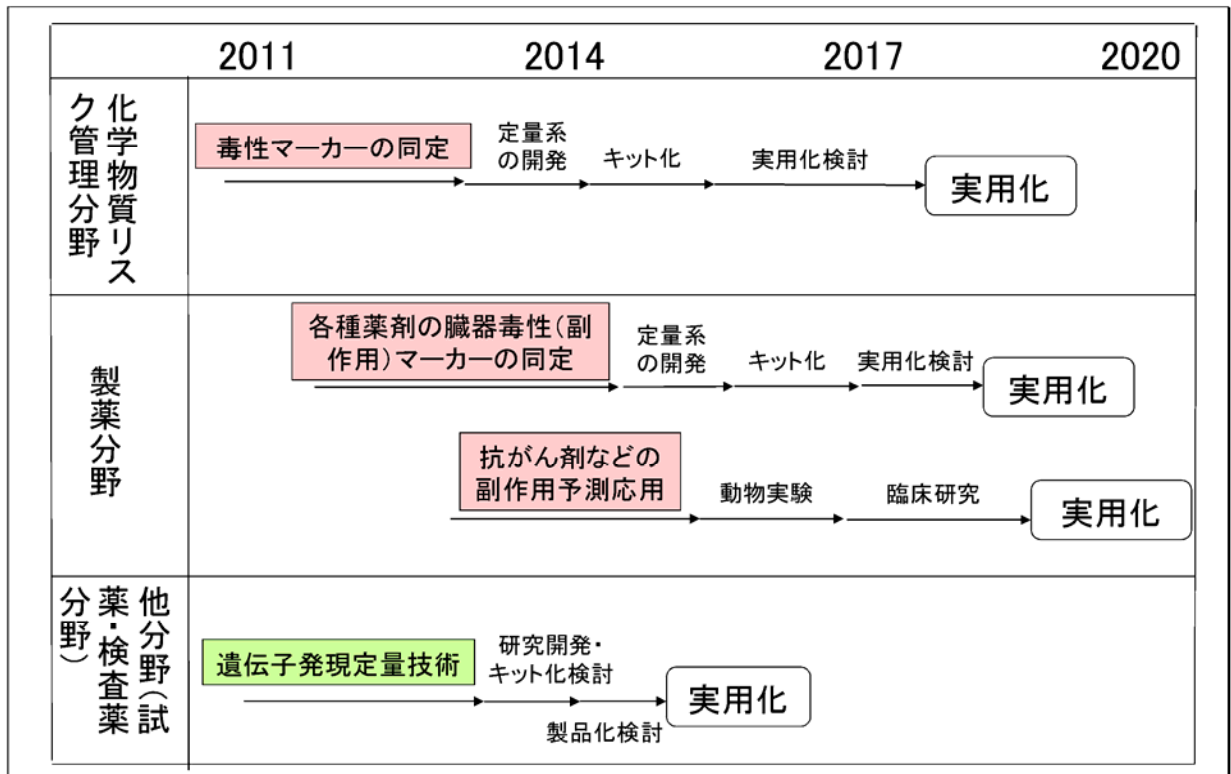


図 IV-6 研究開発成果の応用分野

本プロジェクトの成果を利用できる応用分野およびその応用分野における実用化のロードマップを示す。

2. 2. 2 研究開発成果の応用分野について

本プロジェクトで構築する、既存化学物質の毒性試験とリンクする遺伝子発現データセットの応用分野について、可能性段階のものも含めて以下に列記する。

(1) 有害性評価書情報の統合・新規データベースの構築

本プロジェクトで基本情報として参照した既存化学物質の毒性評価データベースは、基本的には、物質ごとに文書化された「有害性評価書」の集合体である（いわばアナログ情報）。この情報は単一の物質についてその有害性を深く掘り下げるためには有用であるものの、異なる物質間（特に多数の物質間）での比較を行おうとする場合、そのままの形ではなかなか容易には使いこなせない。このとき、本プロジェクトで構築する遺伝子発現データセット（いわばデジタル情報）中に、調査対象とする化学物質が含まれていれば、それらの物質の生物学的活性について遺伝子発現レベルを指標として容易にコンピュータ上で比較可能である。遺伝子発現情報からなんらかの類似性又は相違性を見いだしたのち、それぞれの有害性評価書へ立ち返って毒性学的知見を調べることで遺伝子発現以外の類似性・相違性指標の特定も可能となろう（図 IV-7）。

本プロジェクトで開発した生体応答遺伝子発現データセットを一産業界、大学などの一般の研究者等に利用しやすいように編纂して、新たなデータベースを構築し、(株)メディクロームのホームページにて利用できるようにする予定である（図 IV-8）。ただし、本データベースの情報を利用する際には一定のアクセス制限を設け、本情報の利用により得られた成果（論文、特許、商品化など）をフィードバックしてもらい仕組みを考えている。

以上のように、遺伝子発現レベルを指標として、これまでに集積されてきた有害評価書に記載される情報が統合され始めれば、当該学界及び規制行政当局にとって既存情報の再活用化という新たな展開が期待できると予想される。

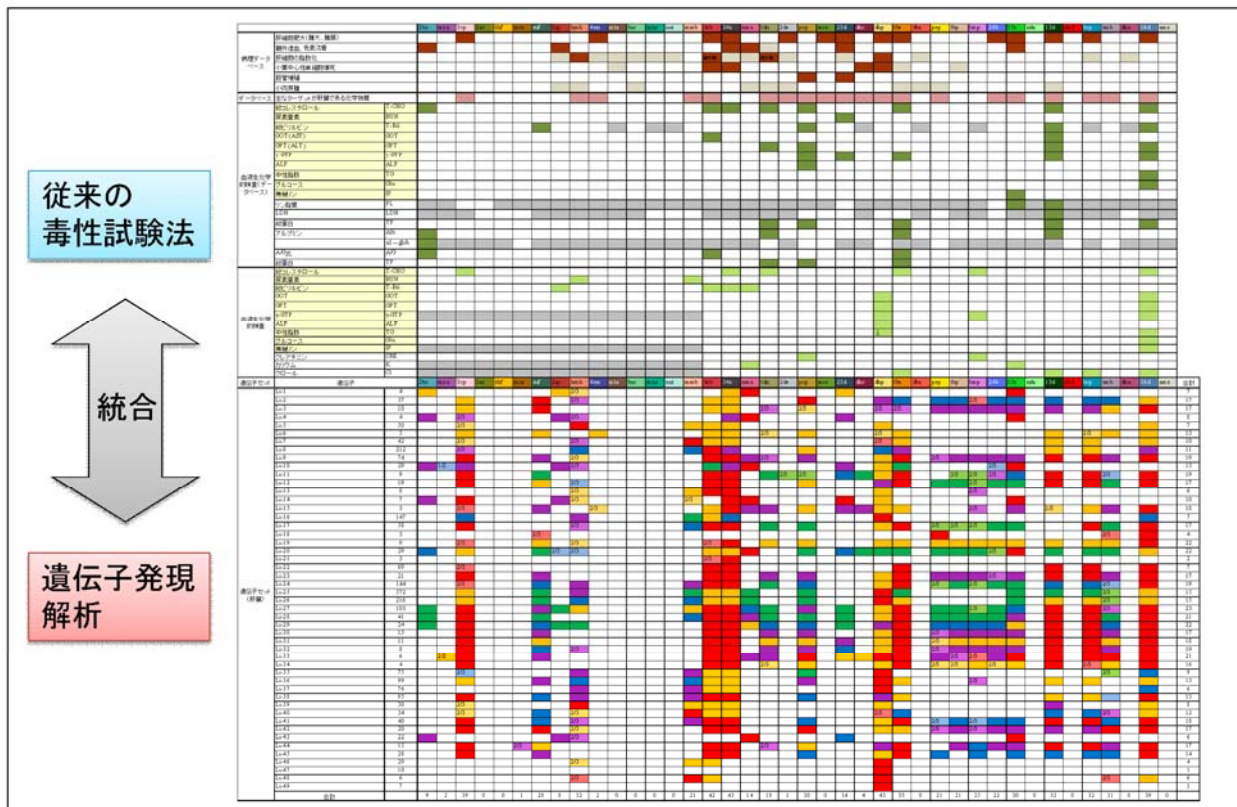


図 IV-7 従来毒性試験法のデータと遺伝子発現変動解析データの統合

従来の試験法で取得されたデータと本プロジェクトで取得されたデータの統合の概念を示す。

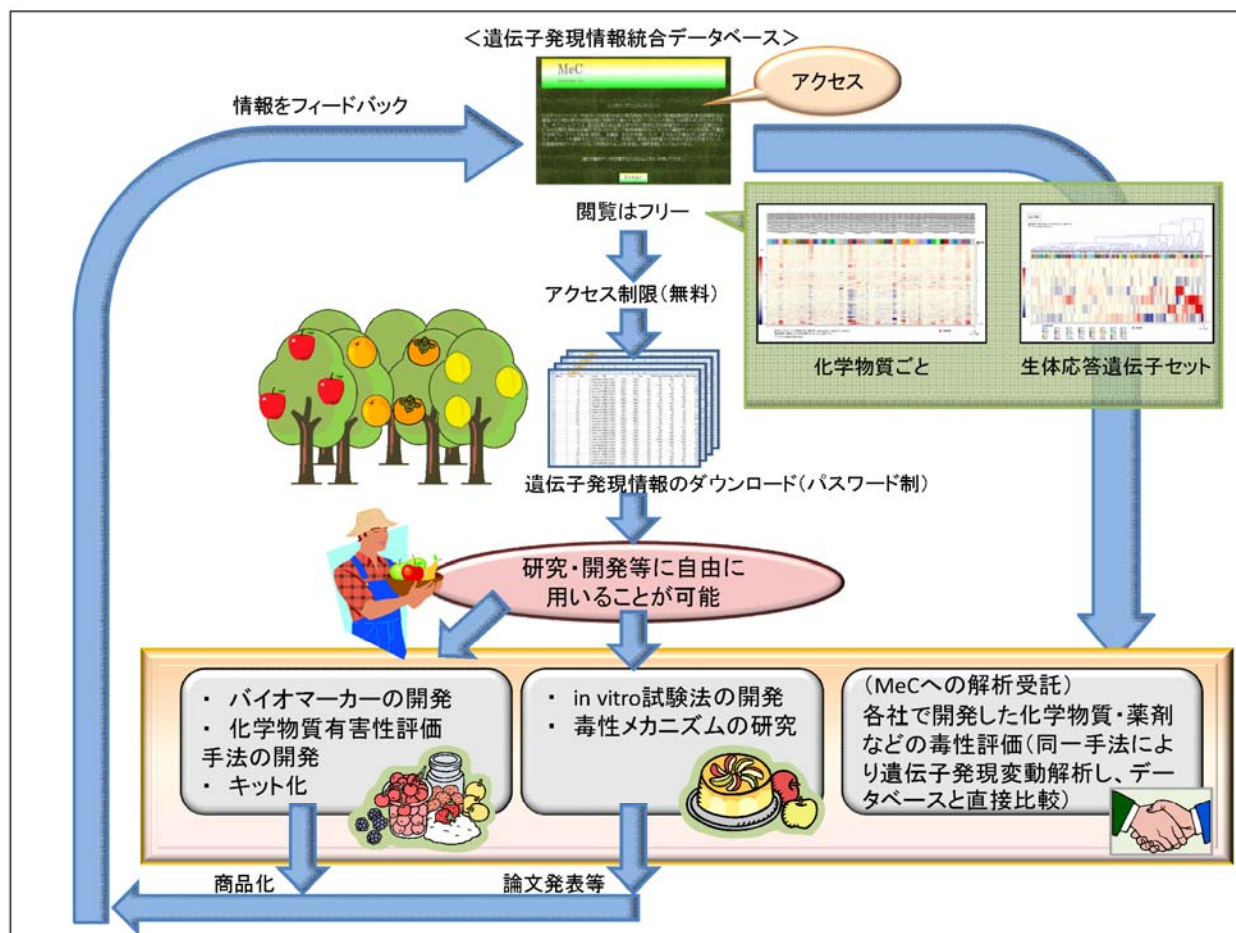


図 IV-8 データベースの活用方法

(株)メディクロームで構築するデータベースの活用方法を模式的に示す。当該データベースには原則として自由に閲覧可能である。ただし、生体応答遺伝子発現データセットなどの遺伝子発現情報（データ）をダウンロードするには原則無料であるが、一定のアクセス制限を設けて利用者に登録してもらい、本プロジェクトの成果の情報をもとにして、論文・特許・商品化など新たな成果（知見）を得られた場合にはその旨をフィードバックしてもらう仕組みを考えている。

(2) 本プロジェクトの成果の実用化（キット化）

従来の手法では、生体での有害性評価の対象となるのは、まず肝臓であり、次は腎臓であった。解析対象臓器・組織が変われば、それぞれの臓器・組織に特異的な評価方法が必要である。しかし、マイナーな臓器・組織では、病理組織学的検査以外には特異的検査方法が存在しないものもある。本プロジェクトで構築するデータセットは、唯一の指標として遺伝子発現レベルを採用している。遺伝子発現を指標とするということは、あらゆる臓器・組織をたった1つの指標ですべて比較解析できることを意味する。なお、このとき、すべての生物学的現象が遺伝子発現レベルのみで記述できるわけではないことを大前提とすることが重要である。

したがって、本プロジェクトにより、各種化学物質の有害性を含む重要な生物学的活性がこれまでの手法では解析できなかった臓器・組織に遺伝子発現レベルの変化として見いだされた場合、その遺伝子（群）がその生物学的活性の新たな指標（バイオマーカー）となりうる。新たな指標が決まれば、その指標と対応する生物学的現象の存在を調べるためには、もはや1万遺伝子についての発現プロファイルを取得・解析する必要はなく、定量PCR等により、より微量のサンプルからより正確な情報を得ることができるようになる。バイオマーカー遺伝子の定量系の開発については、試薬メーカー・検査薬メーカーなどと共同研究を行っていくことが重要である。

以上のような新規バイオマーカーが見つかった場合、本プロジェクトでは知的財産権の確保を行った後、データベースまたは論文としてできるだけ早期に公開する。公開された遺伝子（群）について、定量PCR等の手法を適用することは容易に可能である。したがって、新規化学物質が世に出る場合、多くの実験施設においてこれらの簡便な方法であらかじめ有害性を評価することができるようになる可能性がある。これはまさに、トキシコゲノミクスによる成果を、規制の一つの手段として導入すべきかどうかという議論に対して、判断の根拠となる実験結果を提供することに通じる。

本プロジェクトは、プロジェクト終了後に成果物の実用化として、毒性評価のためのキット化（製品化）を視野に入れて進められてきた。すなわち、本プロジェクトで特定した生体応答遺伝子セットの発現レベルの測定を Real-Time PCR 等の定量系へ移行し、簡易、迅速、安価な毒性評価キットの開発を進める。このキットの開発には、遺伝子発現の定量化の基準となる標準物質（例えば、標準 RNA 等）を準備する必要があり、現在、複数の試薬メーカー・検査メーカーと共同開発を打診中であり、市場調査等を開始しているところである（図 IV-9）。

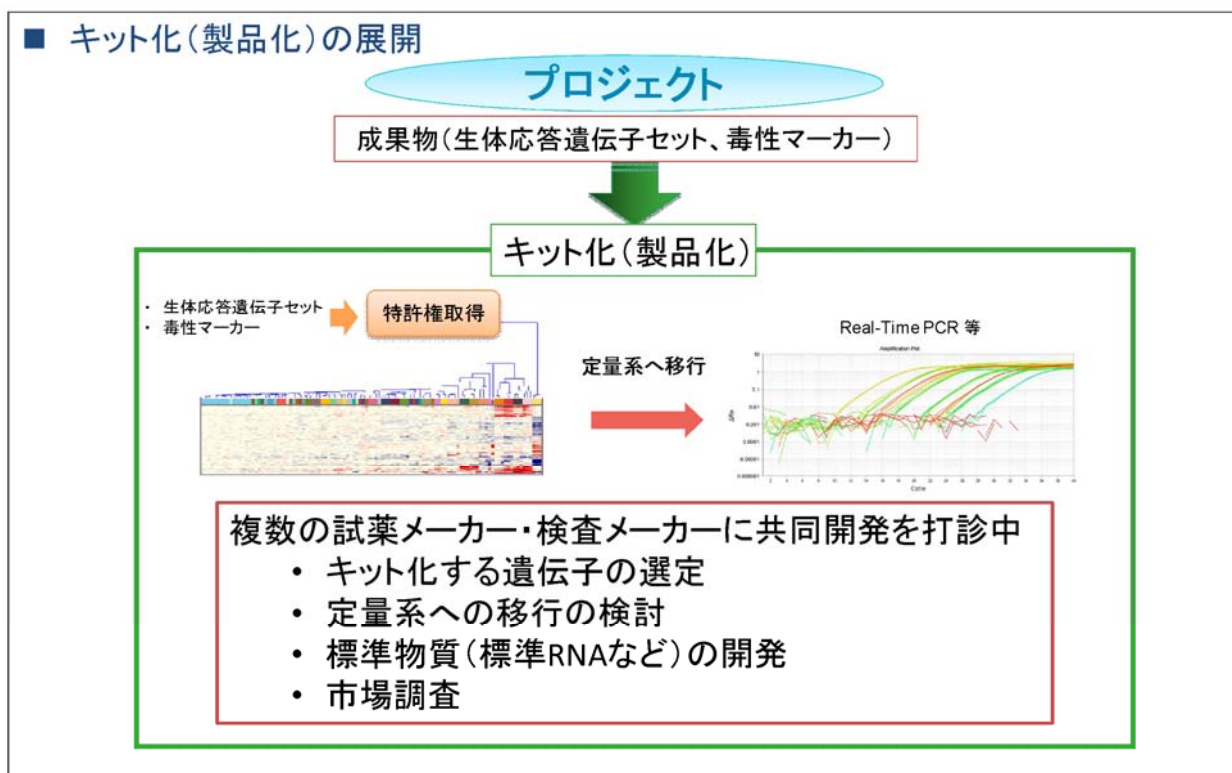


図 IV-9 本プロジェクトの成果の活用方法 (キット化)

本プロジェクトで取得した成果の商品化への活用方法を模式的に示す。

(3) 本プロジェクトの成果の実用化 (遺伝子発現変動解析受託ビジネス)

次に、本プロジェクトで特定した化学物質の28日間反復投与試験と関連する遺伝子発現データセットの中で、化学物質の有害性評価に特に有用であると考えられるものは知的財産権の確保のために特許出願を優先し、その後、公開することとしている。化学物質管理が企業の自主管理に委ねられていることや、REACH規制への対応などから、公開されたデータ集合体は、基本毒性参照データベースとして、化学メーカー、製薬企業などで開発される新規化学物質の有害性評価に活用することが可能である。

具体的なビジネスモデルとして、次の2つのパターンを想定している。1つ目は、化学メーカーや製薬企業で開発される新規の化学物質 (または薬剤候補物質) について、本プロジェクトと全く同様のシステムを用いて、ラットへの28日間反復投与実験を行い、次に本プロジェクトで開発・確立した実験プロトコルに基づいて、投与したラットの臓器・組織の遺伝子発現プロファイルを取得・解析し、最後にその取得プロファイルを開発されるデータベースと照合解析することにより、既存化学物質の遺伝子発現変化と関連する情報が得られる (ビジネスモデルA)。2つ目は、化学メーカーや製薬企業で開発される新規の化学物質 (または薬剤候補物質) を自社ですでに所有している (または既に上市されている) 物質と比較するモデルである。すなわち、それぞれの企業ですでに参照物質 (レファレンス) を把握している場合がこれに該当する。この場合には、対象の物質と参照物質を本プロジェクトで開発・確立した実験プロトコルに基づいて、投与したラットの臓器・組織の遺伝子発現プロファイルを取得・解析し、対照物質と参照物質 (レファレン

ス)を比較し、それぞれの企業にとって有用な情報が得られる(ビジネスモデルB)。いずれにしろ、28日間反復投与試験により得られる従来の毒性学的な情報に、新規な遺伝子発現変化(すなわち、従来の手法では検出できなかった情報)が付け加えられた、化学メーカー又は製薬企業に有用な全データを得ることが可能となる。ただし、本プロジェクトで採用した遺伝子発現変動解析技術は、各実験ステップを厳密にコントロールし、熟練技術者が実験することで正確に横並び比較を可能としているため、他の複数の機関で同様の比較を行うのが容易ではない。そこで、本プロジェクトの委託先である(株)メディクロームは、遺伝子発現変動解析の受託会社であるため、本プロジェクトで開発したこれらの毒性マーカーや生体応答遺伝子発現データセットを用いた遺伝子発現変動解析の受託サービスを再開する予定である(図IV-10)。

さらに、(株)メディクロームが本プロジェクトで取得した知的財産権を活用(権利譲渡または実施権の設定・許諾など)して、化学メーカー又は製薬企業自らが独自の技術を用いた有害性評価手法を開発し、新規化学物質の有害性評価に利用することも可能であり、遺伝子発現解析の受託研究サービスをプロジェクトとする実施者はじめ同分野をプロジェクト領域とする機関・企業が、このような有害性評価をビジネスとすることも可能であるといえる。

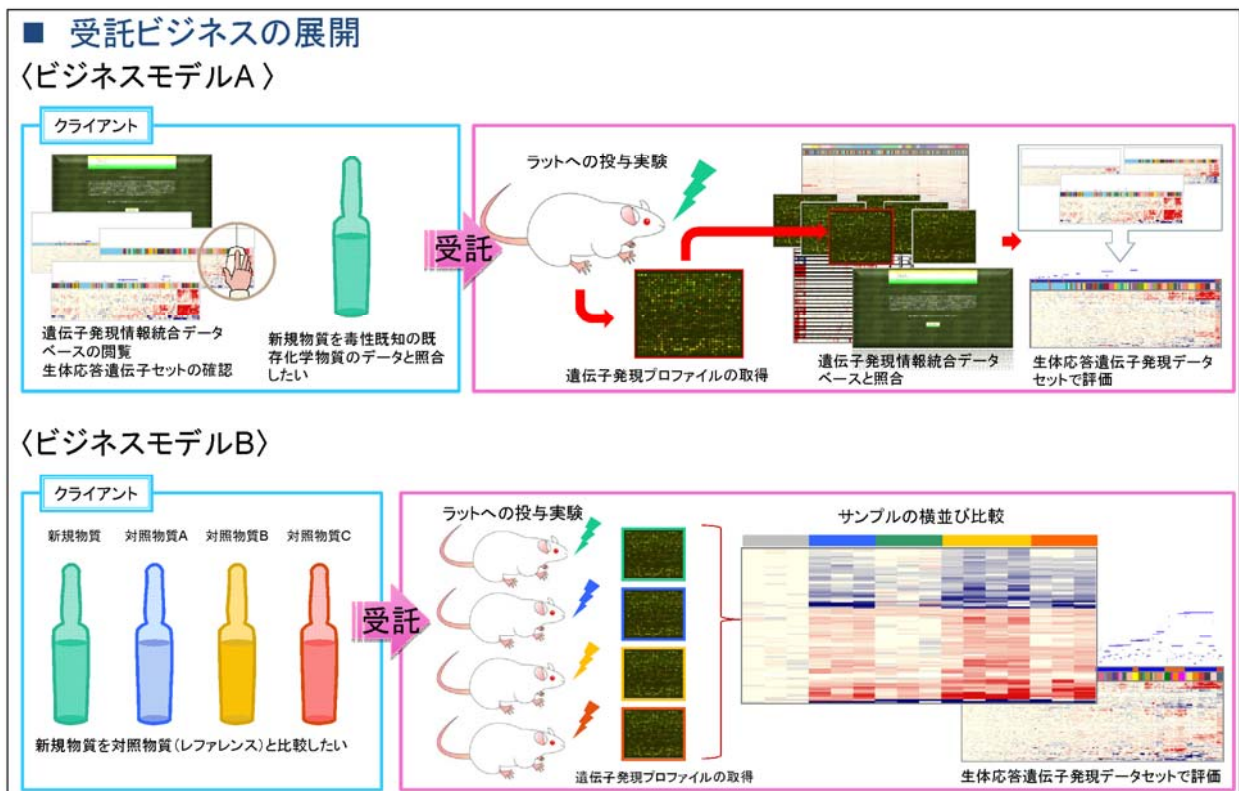


図 IV-10 本プロジェクトの成果の活用方法(ビジネスモデル)

本プロジェクトで取得した成果のビジネスへの活用方法を模式的に示す。

(4) 本プロジェクトの成果の活用方法の具体例（薬剤候補物質の副作用予測）

薬剤は、基礎研究から開発された薬剤候補について動物実験等による非（前）臨床試験を行い毒性などが検出されなかったものについて初めて臨床試験に移行し、臨床試験の結果をもとに承認を受けなければ、市場で販売されることはない。ところが、動物実験等の非（前）臨床試験では毒性などの変化が検出されないが、ヒトの臨床試験で重篤な副作用が検出されるために開発中止になる薬剤候補物質が存在する。臨床試験には莫大な費用がかかるため、臨床試験段階で開発中止に追い込まれた場合、莫大な損失となる。したがって、いかに非（前）臨床試験段階で副作用を示唆するような変化を検出できるかが、製薬企業にとって大きな課題である。そこで、本プロジェクトの成果の活用方法の一つとして、本プロジェクトと同じ方法を用いて何らかの変化が検出できるか否かについて検討した結果を例示的に示す（ただし、企業秘密が含まれるため、限定的な情報のみ記載する）。これらは、現実に複数の製薬企業に依頼されて行った研究であり、既になされている実用化の例である。

①事例1： X社の場合（ビジネスモデルAの場合）

非（前）臨床試験段階では毒性が検出されなかったが、臨床試験段階で重篤な副作用が検出されたために開発中止に追い込まれたX社の薬剤を28日間反復投与し、多臓器について遺伝子発現プロファイルを取得した。解析の結果、4種類の臓器において発現レベルが変動している遺伝子群が存在した。すなわち、臓器イでは91プローブ、臓器ロでは55プローブ、臓器ハでは201プローブ、臓器ニは71プローブの発現レベルが変動した（図 IV-11）。また、この臓器の中には、現実に臨床試験で副作用が生じた臓器が含まれていた。

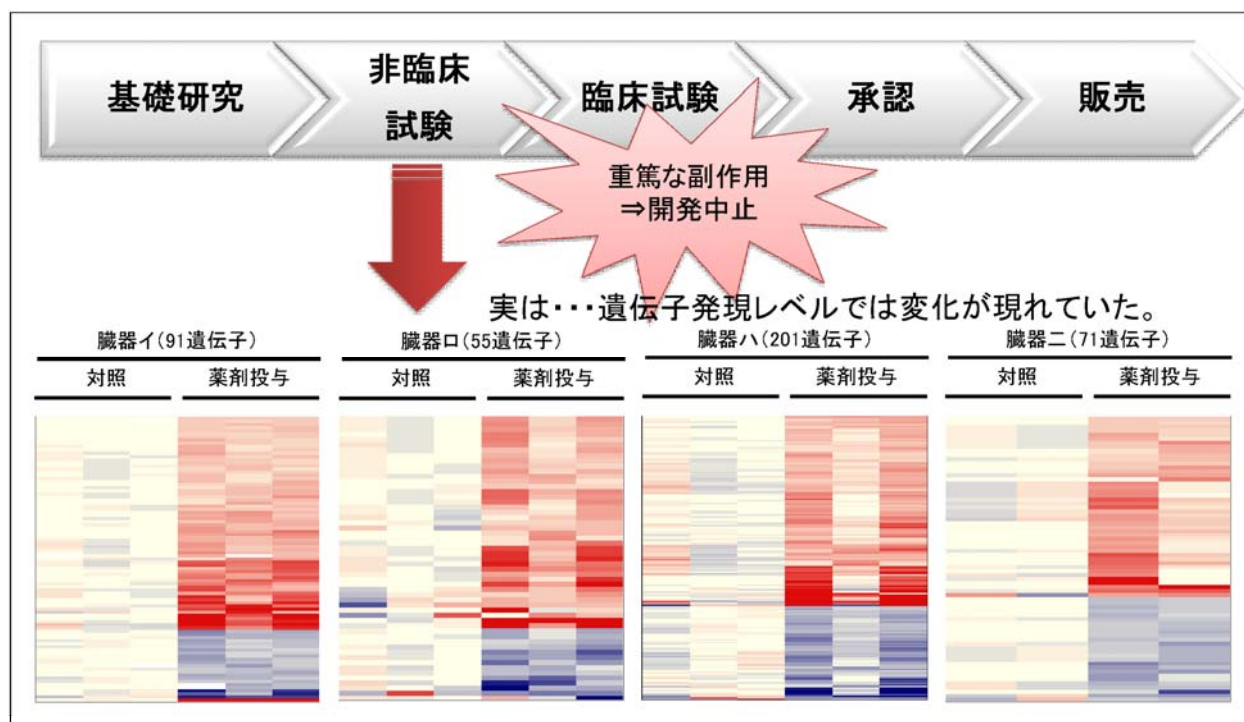
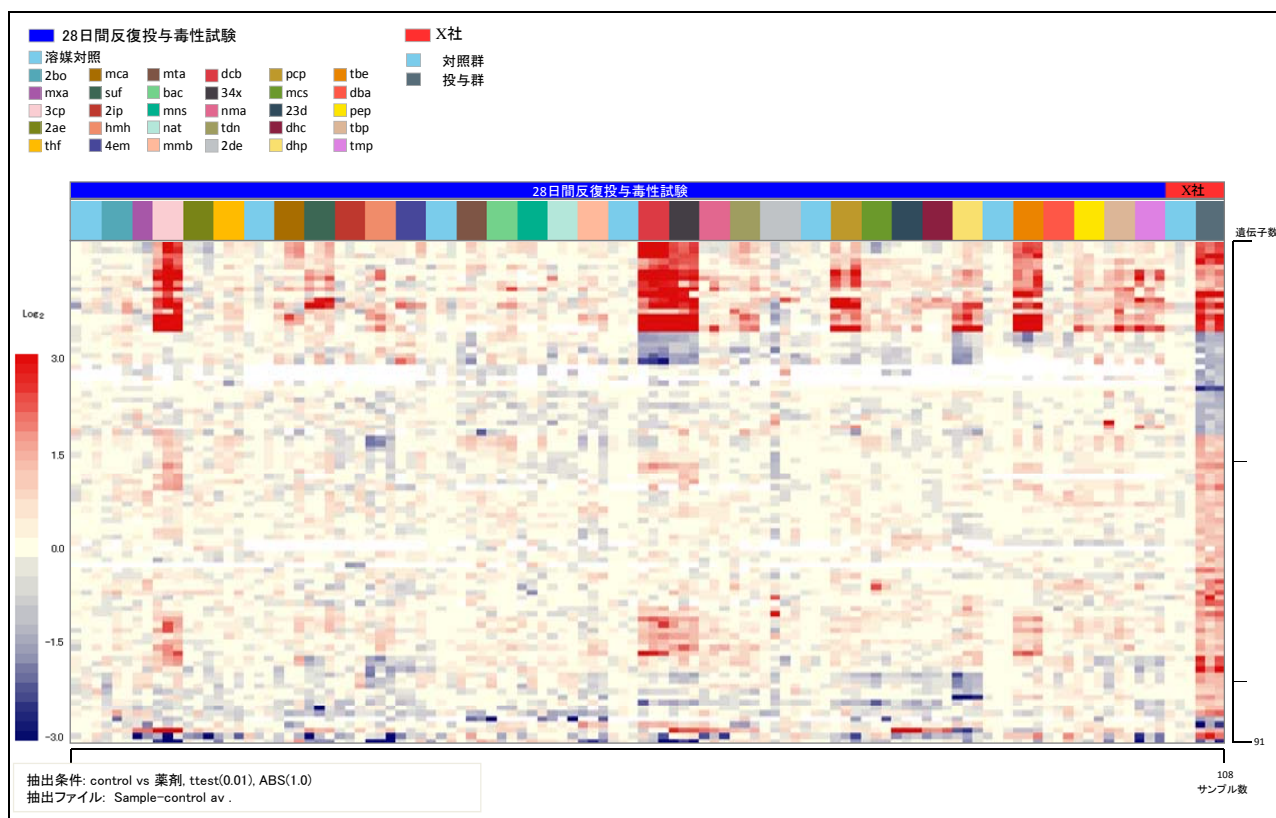


図 IV-11 X社の薬剤候補物質の28日間反復投与実験により発現変動した遺伝子群

図上には薬剤の開発の流れを示し、図下には発現変動した遺伝子の発現パターンと対象臓器を示す。

X社の薬剤候補物質を28日間反復投与して遺伝子の発現変動のあった臓器の1つについて、その遺伝子発現変動パターンを本プロジェクトで取得したデータと比較した。その結果、X社の薬剤候補物質投与による発現変動パターンと、本プロジェクトで使った化学物質投与による発現変動パターンとが一部類似していた(図IV-12)。これらの発現変動パターンに基づいてクラスタ分析を行ったところ、X社の薬剤候補物質は3-シアノピリジン投与群(3cp)、3,4-キシリジン投与群(34x)、o-ジクロロベンゼン投与群(dcb)、テトラブロモエタン投与群(tbe)と同じ房を形成した(図IV-13)。また、これらの4種類の化学物質は該臓器において毒性を有することが知られている化学物質であった。この結果は、前記化学物質が生体に与える影響とX社の薬剤候補物質が生体に与える影響が類似していることを意味し、本プロジェクトの手法を用いることによって、非(前)臨床試験段階でも臓器毒性を予測することができた可能性があることを意味する。



図IV-12 X社の薬剤候補物質の投与により発現変動した遺伝子群

X社の薬剤候補物質を28日間反復投与した後にある臓器について発現変動のあった遺伝子群の発現パターンと本プロジェクトの結果を比較した。

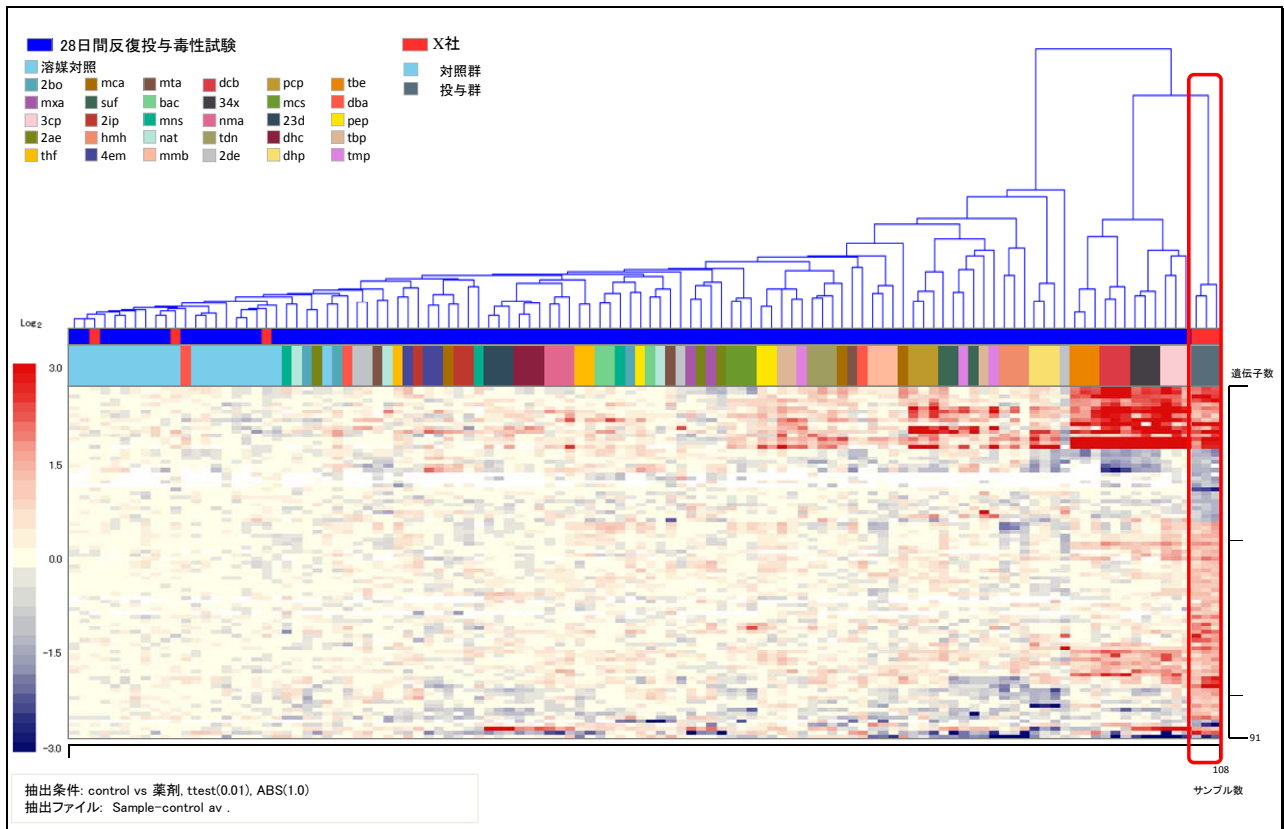


図 IV-13 X 社の薬剤候補物質と本プロジェクトの化学物質との比較

X 社の薬剤候補物質を 28 日間反復投与した結果発現変動した遺伝子群の発現変動パターンをもとにしてクラスタ分析を行った。

②事例 2 : Y 社の場合 (ビジネスモデル B の場合)

非 (前) 臨床試験段階では毒性が検出されなかったが、臨床試験段階で重篤な副作用が検出されたために開発中止に追い込まれた Y 社の薬剤 (薬剤 C)、薬剤 C の代替候補物質である薬剤 (薬剤 D)、薬剤 C の類縁体で他社から上市されている薬剤であり、重篤な副作用が報告されていない薬剤 (薬剤 B)、薬剤 C の類縁体である他の薬剤 (薬剤 A) について 13 日間反復投与実験を行い、多臓器について遺伝子発現プロファイルを取得した。解析の結果、発現変動した遺伝子が存在した臓器が複数存在した。その中の 2 種類の臓器の例を示す (図 IV-14、15)。

対照群 (溶媒を投与した群) と比較して、t 検定により P 値が 0.05 未満、かつ、平均値の差が 2 倍以上の条件を各種薬剤投与群の 1 つ以上の群で満たした遺伝子が臓器ホでは 86 プローブ (図 IV-14)、臓器へでは 18 プローブ (図 IV-15) 存在した。それらのプローブの発現変動パターンを比較したところ、両臓器とも 4 種類の薬剤を投与したことによる遺伝子発現変動パターンは酷似していたが、上市品であり副作用の報告がなされていない薬剤 (薬剤 B) を投与した群の変化が最も小さかった。また、臓器ホについては臨床試験で重篤な副作用により開発中止に追い込まれた薬剤 (薬剤 C) を投与した群の変化が最も大きかった。

次に、臓器ホにおいて X 社および Y 社の薬剤候補物質投与により発現変動した遺伝子

群の発現変動パターンを本プロジェクトで使用した化学物質投与による遺伝子発現変動パターンを比較した。その結果、Y社の薬剤候補物質を投与した場合に発現変動した遺伝子群の発現変動パターンの一部は、本プロジェクトの化学物質投与による場合と類似する部分・相違する部分が存在した（図 IV-16）。

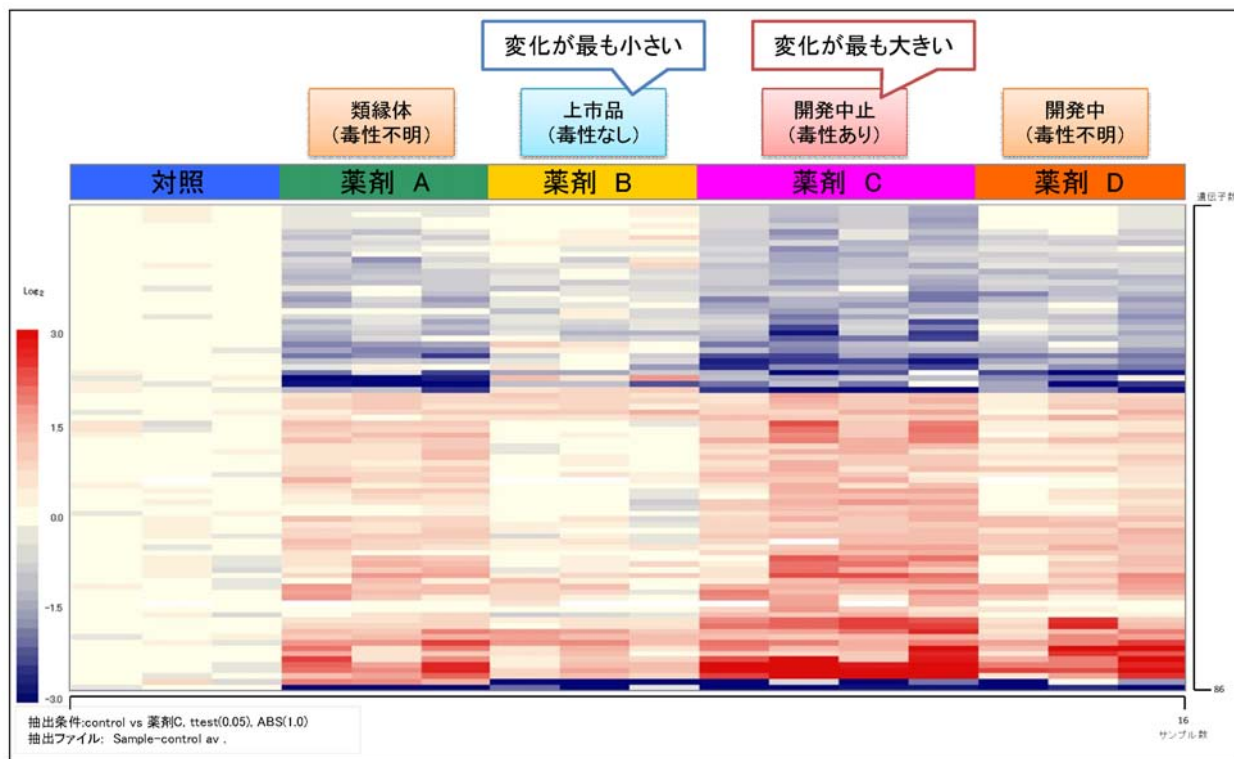


図 IV-14 Y社の薬剤候補物質の13日間反復投与実験により発現変動した遺伝子群（臓器ホ）

各薬剤を反復投与した場合の発現変動した遺伝子群の発現変動パターンを示す。

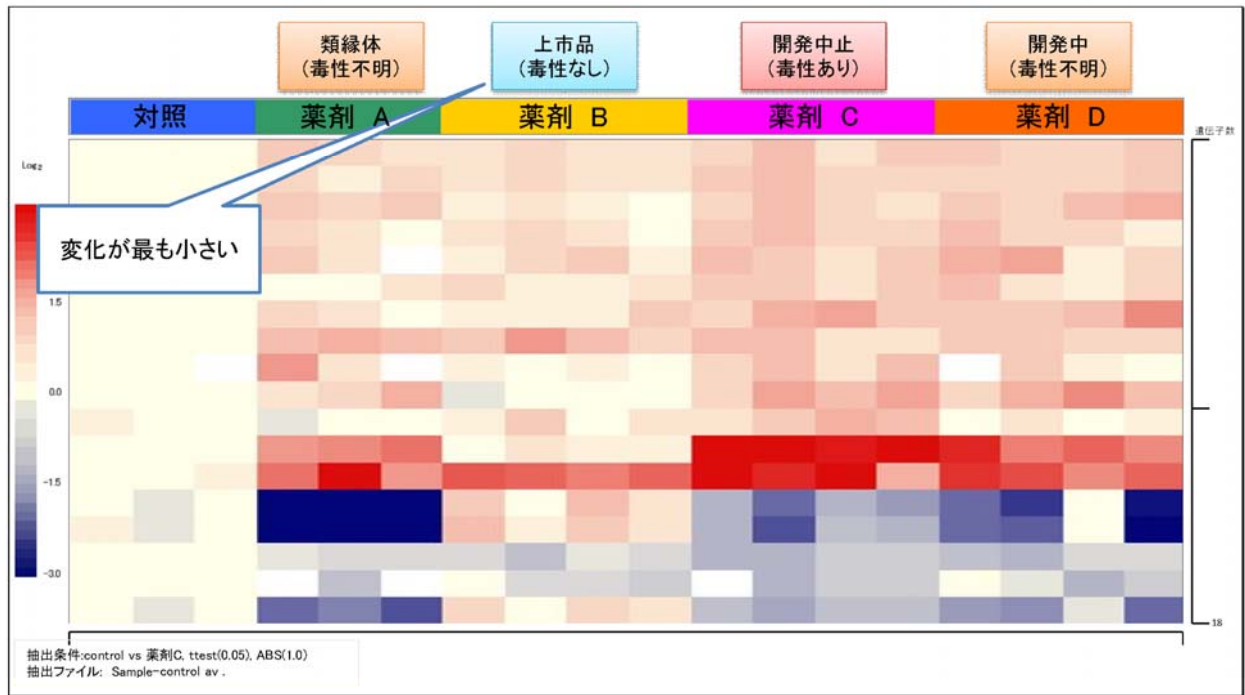


図 IV-15 Y社の薬剤候補物質の13日間反復投与実験により発現変動した遺伝子群（臓器へ）

各薬剤を反復投与した場合の発現変動した遺伝子群の発現変動パターンを示す。

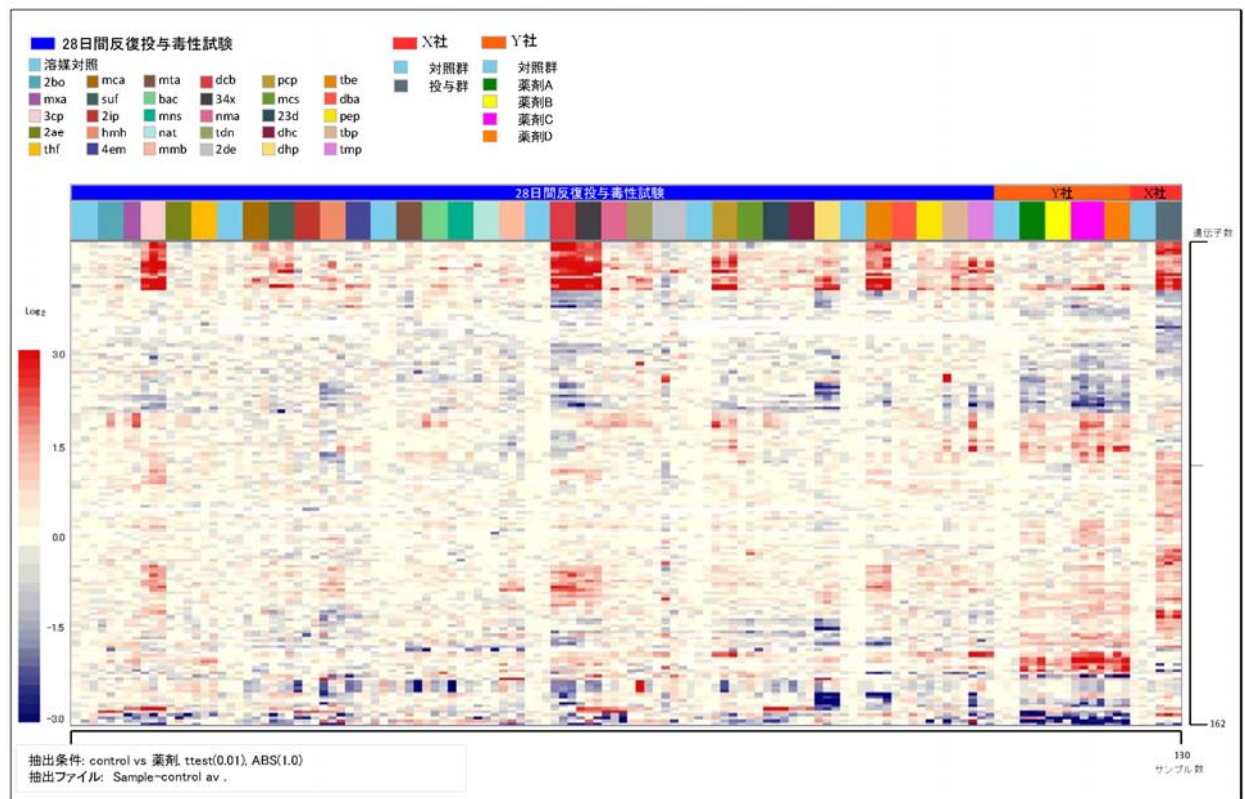


図 IV-16 X社およびY社の薬剤候補物質の投与により発現変動した遺伝子群

X社の薬剤候補物質を28日間反復投与、Y社の薬剤候補物質を13日間反復投与した後に、ある臓器について発現変動のあった遺伝子群の発現パターンと本プロジェクトの結果を比較した。

③クラスタ分析

本プロジェクトで取得したデータと、X社およびY社の結果をもとにしてクラスタ分析を行った。その結果、上市品で毒性の報告がない薬剤（薬剤B）投与群は、本プロジェクトの対照群と同じ房を形成した。また、臨床試験で毒性が報告されたX社の薬剤は 3-シアノピリジン（3cp）、3,4-キシリジン（34x）、o-ジクロロベンゼン（dcb）、テトラブロモエタン（tbe）と同じ房を形成し、Y社の他の薬剤（薬剤A、C、およびD）は1つの独立した房を形成したが、対照群を含む房とは異なっていた（図 IV-17）。この結果は、X社およびY社の薬剤候補物質に関しては、本プロジェクトの手法を用いることによって、非（前）臨床試験段階でも臓器毒性を予測することができた可能性があることを意味する。

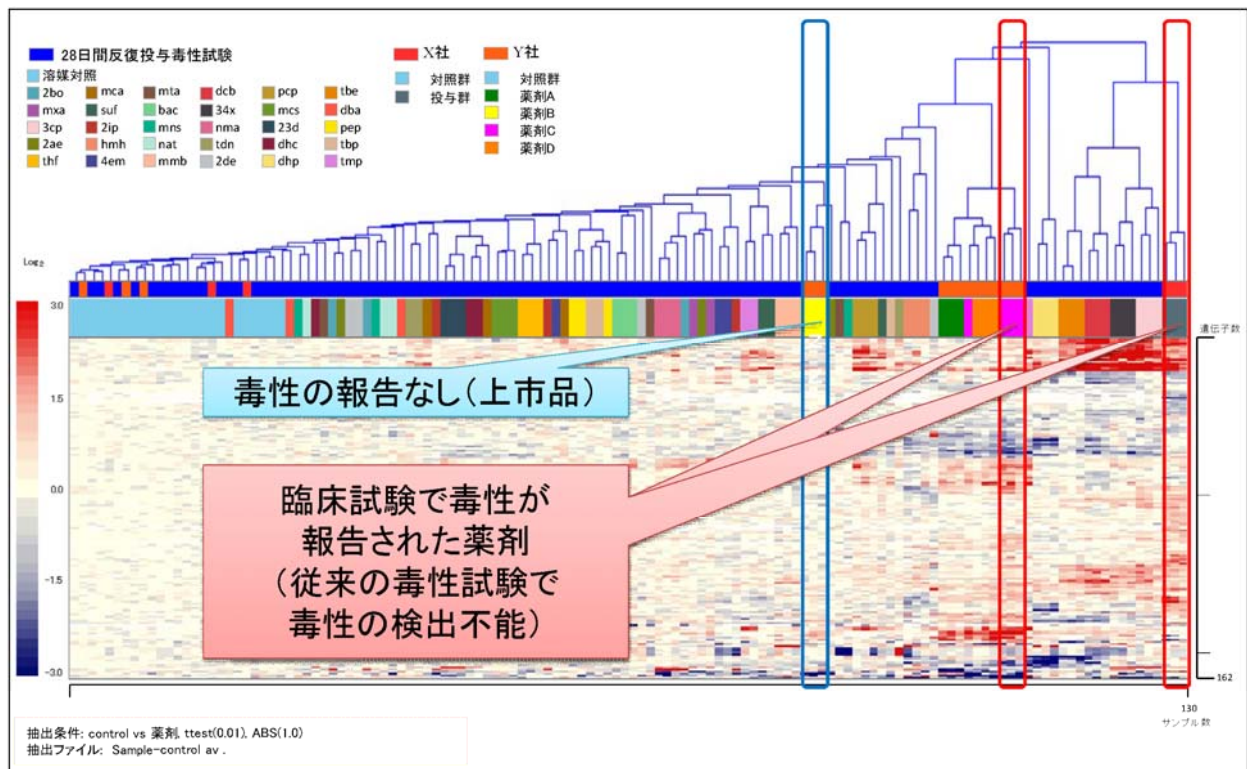


図 IV-17 X社およびY社の薬剤投与群と本プロジェクトで使用した化学物質投与群の発現変動パターンの比較

X社およびY社の薬剤を投与した際に発現変動した遺伝子群を抽出し、本プロジェクトの発現解析データとクラスタ分析により比較した。

(5) 研究開発促進・公的な有害性評価試験法認定

本プロジェクトで特定してきた生体応答遺伝子は化学物質の毒性発現のメカニズムを解析するためのツールとしても利用可能である。特定の化学物質の曝露に対して発現変動したこれらの遺伝子のパスウェイ解析等を行うことにより、化学物質の毒性発現と生体の応答のメカニズムの解明の手掛かりを得ることができる可能性がある。

さらに、これらの遺伝子が *in vitro* の毒性試験に利用可能になれば、毒性評価手法の新たな展開が期待でき、ハイスループット化が実現する可能性がある (図 IV-18)。ただし、本プロジェクトで特定している生体応答遺伝子は、あくまでも動物の体内 (*in vivo*) で起こっている変動であるため、そのまま *in vitro* 試験の培養細胞系で必ずしも同じように変動するとは限らない点に十分留意する必要がある。

化審法に基づいた従来の毒性試験では必ず28日間反復投与試験を行わなければならない、そこで取得するサンプルの一部を、本プロジェクトで同定した生体応答遺伝子発現データセットを用いた遺伝子発現解析にまわすことで、従来の毒性試験の指標に遺伝子発現解析という指標が加わり、より精度の高い毒性評価法を確立できる可能性がある。また、遺伝子発現変動解析では、より短期間の試験でも変化を検出できる可能性があるため、従来よりも短期間かつ高い精度で化学物質の毒性評価ができる可能性がある (図 IV-19)。ただし、公的な有害性評価試験法に認定されるには、さらなる様々な検証と手続が必要となるため、長期的展望として考えていかなければならないであろう。

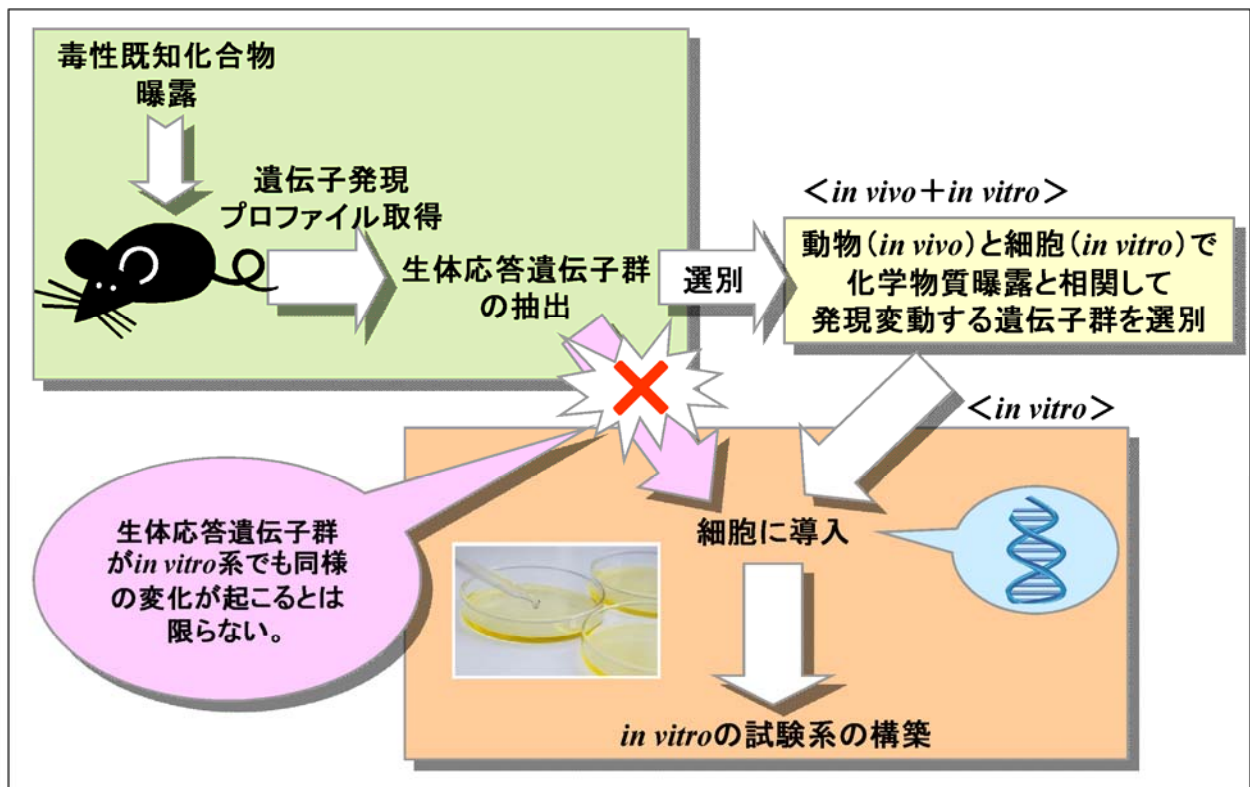


図 IV-18 本プロジェクトの成果の活用方法 (研究開発)

本プロジェクトで取得した成果の研究開発への活用方法を模式的に示す。

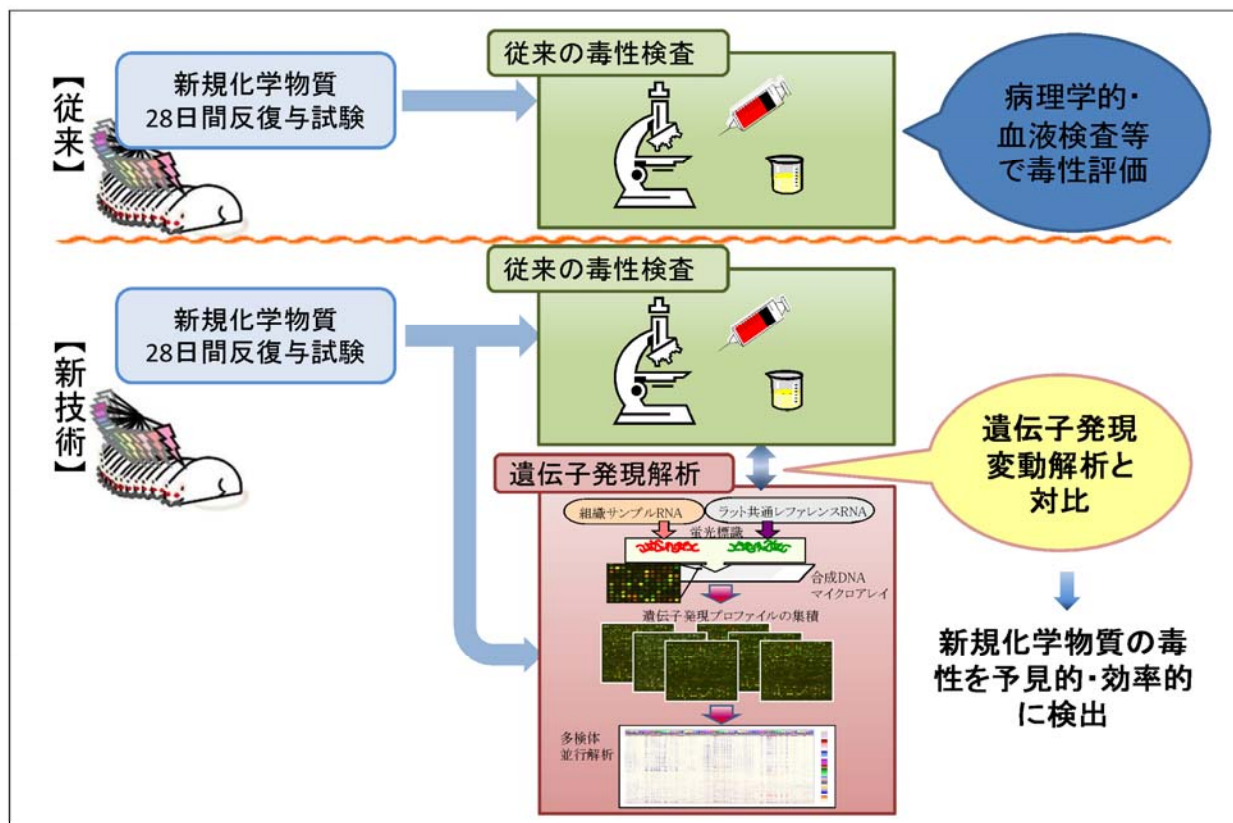


図 IV-19 本プロジェクトの成果の活用方法（公的な有害性評価試験法認定）

本プロジェクトで取得した成果の公的な有害性評価試験への活用方

－添付資料－

①分野別推進戦略

- 1) 平成18年度 分野別推進戦略（環境分野、エネルギー分野）
- 2) 平成18年度 分野別推進戦略、別紙（環境分野、エネルギー分野）

②イノベーションプログラム

- 1) 平成21年度 エネルギー、環境安心イノベーションプログラム

③プロジェクト基本計画

- 1) 平成18年 プロジェクト開始
- 2) 平成19年 プロジェクトB-2開始
- 3) 平成22年 最新版

④技術戦略マップ

- 1) 平成22年度 技術戦略マップ（化学物質総合評価管理分野）

⑤事前評価関連資料

- 1) 平成17年 事前評価書
- 2) 平成18年 NEDO POST 3
- 3) 平成18年 パブリックコメント募集結果

⑥特許、論文、外部発表等のリスト

- 1) -1 査読付き論文
- 1) -2 総説、解説、著書
- 2) 特許
- 3) 報道、受賞
- 4) 講演、学会発表

⑦B-1プロジェクト報告書

- 1) 平成18年度～19年度 成果報告書(要約版)

分野別推進戦略

平成18年3月28日

総合科学技術会議

分野別推進戦略

目次

はじめに	1
第3期科学技術基本計画の政策目標の体系	3
Ⅰ ライフサイエンス分野	5
1. 状況認識	7
2. 重要な研究開発課題	9
3. 戦略重点科学技術	12
4. 推進方策	19
別紙Ⅰ－1 重要な研究開発課題の体系	27
別紙Ⅰ－2 重要な研究開発課題の概要及び目標	28
別紙Ⅰ－3 戦略重点科学技術の体系	46
Ⅱ 情報通信分野	47
1. 状況認識	49
2. 重要な研究開発課題	54
3. 戦略重点科学技術	64
4. 推進方策	73
別紙Ⅱ－1 重要な研究開発課題の体系	94
別紙Ⅱ－2 重要な研究開発課題の概要及び目標	95
別紙Ⅱ－3 戦略重点科学技術の体系	112
Ⅲ 環境分野	113
1. 状況認識	115
2. 重要な研究開発課題	118
3. 戦略重点科学技術	140
4. 推進方策	145
別紙Ⅲ－1 重要な研究開発課題の体系	149
別紙Ⅲ－2 重要な研究開発課題の概要及び目標	150
別紙Ⅲ－3 戦略重点科学技術の体系	173
Ⅳ ナノテクノロジー・材料分野	175
1. 状況認識	177
2. 重要な研究開発課題	179
3. 戦略重点科学技術	188
4. 推進方策	192
別紙Ⅳ－1 重要な研究開発課題の体系	197
別紙Ⅳ－2 重要な研究開発課題の概要及び目標	198
別紙Ⅳ－3 戦略重点科学技術の体系	208

V エネルギー分野	209
1. 状況認識	211
2. 重要な研究開発課題	214
3. 戦略重点科学技術	230
4. 推進方策	236
別紙V-1 重要な研究開発課題の体系	240
別紙V-2 重要な研究開発課題の概要及び目標	241
別紙V-3 戦略重点科学技術の体系	251
VI ものづくり技術分野	253
1. 状況認識	255
2. 重要な研究開発課題	257
3. 戦略重点科学技術	262
4. 推進方策	264
別紙VI-1 重要な研究開発課題の体系	269
別紙VI-2 重要な研究開発課題の概要及び目標	270
別紙VI-3 戦略重点科学技術の体系	276
VII 社会基盤分野	277
1. 状況認識	279
2. 重要な研究開発課題	282
3. 戦略重点科学技術	286
4. 推進方策	290
別紙VII-1 重要な研究開発課題の体系	293
別紙VII-2 重要な研究開発課題の概要及び目標	294
別紙VII-3 戦略重点科学技術の体系	310
VIII フロンティア分野	311
1. 状況認識	313
2. 重要な研究開発課題	316
3. 戦略重点科学技術	318
4. 推進方策	322
別紙VIII-1 重要な研究開発課題の体系	324
別紙VIII-2 重要な研究開発課題の概要及び目標	325
別紙VIII-3 戦略重点科学技術の体系	332

Ⅲ 環境分野

1. 状況認識

(1) 環境研究を取り巻く状況

人間の活動が拡大の一途をたどった20世紀の後半になり、人間活動の影響が地球あるいは地域の環境容量を上回るような状態になることで深刻な環境問題が生じた。20世紀における科学技術は、人類に対して圧倒的な便益の拡大をもたらしたものの、環境汚染物質の排出や人間の活動範囲の拡大で、地球と地域の環境に対して負の影響も及ぼしてきた。

2002年9月の持続可能な開発に関する世界首脳会議（ヨハネスブルク・サミット）において、ヨハネスブルク宣言が採択された。そこでは、「貧困削減、生産・消費形態の変更及び経済・社会開発のための天然資源の基盤の保護・管理が持続可能な開発の全般的な目的であり、かつ、不可欠な要件であること」が認められ、「清浄な水、衛生、適切な住居、エネルギー、保健医療、食料安全保障及び生物多様性の保全といった基本的な要件へのアクセスを急速に増加させる」決意が表明され、「世界が、地球を救い人間の開発を促進し世界の繁栄と平和を達成するという共通の決意により団結し、共同で行動すること」が約束された。

先進8カ国は、ヨハネスブルグでの目標の実施に焦点をあわせ、2003年7月のG8サミット（エビアン）において、持続可能な開発のための科学技術の役割を確認した。そこでは、いかにすれば最も良く持続可能な開発のために科学技術を使うことができるかについて、3つの分野に焦点を当てた「持続可能な開発のための科学技術G8行動計画」が採択された。行動計画は「全球観測についての国際協力の強化、エネルギー技術の研究・開発及び普及の加速化、そして農業及び生物多様性の持続可能な利用の促進」からなる。

続く、2004年6月のG8サミット（シーアイランド）では、先の行動計画実施状況が確認されるとともに、「3Rイニシアティブ」の開始が提案された。2005年7月のG8サミット（グレンイーグルズ）では、「気候変動、クリーンエネルギー、持続可能な開発」が、新たに行動計画として採択された。このように、世界各国が共通の問題であるという認識のもとで、環境問題の解決に向けて歩みを進めたのが、第2期基本計画期間であった。上記G8サミット（エビアン）での行動計画を受けて、地球観測サミットが2003年から2005年にかけて3回開催され、全球地球観測システム(GEOSS)10年実施計画が承認された。実施計画では、「世界全域を対象とし、既存及び将来の人工衛星や地上観測など多様な観測システムが連携した包括的なシステムを今後10年間で構築すること、政策決定者や市民など利用者が必要とする情報を重点的に提供すること」が、方針として示された。地球観測システムにおいては、「災害、健康、エネルギー、気候、水、気象、生態系、農業、生物多様性の9分野で達成目標を明確にしながら実際の実施にあたる国際調整メカニズム」として地球観測グループ(GEO)が設立された。

3Rイニシアティブは、G8サミット（シーアイランド）での我が国の提案に基づくものであり、2005年4月に東京での閣僚級会合をもって開始された。これは、「資源及び物資のより効率的な使用を奨励するために、発生抑制、再使用、再生利用（3R）を推進する

国際的取組」であり、「我が国は国内における循環型社会の構築に向けた取組を進めると共に、自らが有する経験や技術などの世界への発信、開発途上国の能力向上のための支援や、国境を越えた地域レベル・地球レベルでの国際協調を通じて、3Rを通じた循環型社会の構築のための国際的な取組の推進に主導的な役割を果たしていくこと」を宣言した。

一方、毒性、難分解性、生物蓄積性、長距離移動性を有する化学物質（POPs（Persistent Organic Pollutants）残留性有機汚染物質）による地球環境汚染の防止に世界が取り組むストックホルム条約が、2004年5月に発効した。この条約では、「12種類の物質について、国際協調のもと、製造・使用等の規制、非意図的生成の削減、適正管理と処理等の取組を進めること」とされており、締約国に国内実施計画を策定することを義務づけている。また、ヨハネスブルグ・サミットで定められた実施計画のための行動の一つとして、2006年2月国際化学物質管理会議（ICCM）において、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、2020年までに化学物質が健康や環境への影響を最小とする方法で生産・使用されるようにすることに向けた、30項目からなるドバイ宣言などが採択された。

2003年3月には、第3回世界水フォーラムが我が国で開催され、閣僚級会議では、「ヨハネスブルク宣言や国連ミレニアム開発目標など、国際的に合意された目標や目的を達成する共通の決意」が表明された。「水は、持続可能な開発、貧困及び飢餓の撲滅の原動力であり、人の健康や福祉にとって不可欠なものであり、水問題を優先課題とすることが、世界的に喫緊の必要条件であること」が確認された。

生物多様性の保全については、1992年6月の国連環境開発会議で採択され、翌年発効した生物多様性条約のもとで、我が国は「生物多様性国家戦略」を策定し、2002年に見直しにより新たな戦略となった。戦略では、「保全の強化、自然再生、持続可能な利用」の3つの観点に立ち、「地球環境の視点から我が国が世界の生物多様性の保全と持続可能な利用に対する責務を有しており、国内対策の展開とあわせ国際的貢献を進めること」が示された。

2005年2月には、採択から7年の年月を要したものの京都議定書が発効し、2008年から2012年の第一約束期間において、我が国は基準年比6%減の温室効果ガス削減義務を負うことになった。我が国は、2005年4月に「京都議定書目標達成計画」を策定し、国をあげてこの困難な目標に取り組んでいる。加えて、第一約束期間以降の枠組に関する国際議論も開始され、温暖化に対する対応には猶予がない状況となった。

我が国においては、高齢化社会が確実に進行し、人口減少社会が予想より早く訪れることになった。このことにより、これまでの人口増大社会とは異なる社会システムに対する考え方が必要となり、環境問題への対応にも新たな視点で臨むべき状況となった。例えば、都市と農村のあり方、国民の生活スタイル、食料とエネルギーの供給及びその自給に関する考え方などに、今後の社会システムを見据えた視点が必要となっている。これらの国内外の状況を踏まえ、環境分野の研究開発では、「持続可能な社会」の実現への具体的貢献

を目指しながら、個別のプロセス研究、現象解明、影響評価、対策技術開発と社会への実践的な適用性評価を行う一貫性のある総合的な展開が求められている。人類にとって環境の持つ価値の認識が高まり、その維持が人類共通の課題となった今日、社会科学・人文科学系と自然科学系が融合し、旧来の枠を超えた世界に貢献する研究開発を進めることが必要である。

(2) 研究開発における諸問題

第2期基本計画の分野別推進戦略では、環境分野の研究開発において改善を要する問題点が5つあげられた。

- ①各省において縦割りの個別研究が実施される傾向が強く、政府としての取組が不明瞭。重点課題については、省際的に組織された統合的研究体制で実施するイニシアティブを創設し、推進していくことが必要。
- ②長期継続的環境観測等基盤的研究の推進や知的研究基盤の整備が不十分。研究資源の計画的・継続的投資を行うことが必要。
- ③環境政策学、環境経済学、環境倫理学等の社会科学・人文科学系の環境研究が不十分。社会科学・人文科学系研究を強化し、さらに自然科学系研究との連携を強化することが必要。
- ④時々の環境問題に対応した必要な人材のタイムリーな供給が不足。大学院等における専門的環境教育を強化するとともに人材の流動化を促進することが必要。
- ⑤国際的な取組に対する我が国の対応が不十分。国際社会において研究のリーダーシップをとれるような人材を養成することが必要。

第2期基本計画期間においては、これらの諸問題の解決を目指し、「イニシアティブ体制」によって、省際的な統合的研究体制づくりを行った。イニシアティブにおいては、研究領域における各省の研究の取組状況を横断的に整理し、今後の研究の方向性を明らかにして、各省の研究連携を促進した。また、長期継続的に実施する基盤的研究の充実を目指す観点から総合科学技術会議は、「地球観測の推進戦略」（平成16年12月）の策定により、特に気候変動、地球規模水循環、生態系の研究などの研究基盤となる地球観測の充実に関する10年程度の我が国の戦略的取組として具体的な方策等を取りまとめた。「地球観測の推進戦略」は、国内機関の地球観測における連携を通して、地球観測サミットによって創設された国際枠組である全球地球観測システム（GEOSS）10年実施計画への貢献をも目指すものである。生物多様性の保全と生物資源の持続可能な利用については、それらを進める国際動向を受けて、総合科学技術会議重点分野推進戦略専門調査会環境研究開発推進プロジェクトチームは、「必然性としての生物多様性—その保全と持続可能な利用—」（平成16年7月）を取りまとめた。宇宙開発のあり方は、総合科学技術会議による「我が国における宇宙開発利用の推進戦略」（平成16年9月）で示され、地球環境観測衛星の開発利用において実用及び科学研究のニーズを踏まえた戦略的推進が必要であると指摘された。これは、「地球観測の推進戦略」で示された利用ニーズ主導の統合された地球観測シ

システムの構築の考え方と整合的である。共通的な大型研究基盤としては、例えば「地球シミュレータ」が整備され、その活用の成果として、我が国の気候予測研究が世界をリードするまでになった。しかしながら、第2期基本計画の分野別推進戦略において重点化の考え方として示された、社会科学・人文科学系と自然科学系の連携強化、環境分野の研究人材不足の解消が解決されたとはいえない。また、上記取組で解決を図った問題においても、より一層の省際研究連携、基盤的研究の推進や研究基盤の整備、国際リーダーシップの確保を促進することが今後の課題である。

2. 重要な研究開発課題

(1) 重要な研究開発課題選定の考え方

第3期基本計画においては、誰もが共有でき普遍性の高い3つの理念の実現のために必要な政府の開発投資について、国民に科学技術の成果を還元するという視点に立った具体的な施策展開を示す分野別の推進戦略策定が求められている。環境分野においては、環境と経済の両立 - 環境と経済を両立し持続可能な発展を実現

- ・地球温暖化・エネルギー問題の克服
- ・環境と調和する循環型社会の実現

という政策目標の達成のために、関係府省が連携して研究推進する枠組が必要である。国民の暮らしを守る観点に立つと、短期的な問題解決型研究と中長期的で予見的な環境問題への対応研究にわたる広い範囲の研究を視野に入れることが必要であるが、その中でも選択と集中を行う必要がある。このため、研究領域とその枠組みの設定には、環境分野を俯瞰したデルファイ調査結果と第2期の研究推進状況などを踏まえる事とした。

環境分野では、第3期基本計画の政策目標に対応して実現すべき個別政策目標として、③-1 世界で地球観測に取り組み、正確な気候変動予測及び影響評価を実現する。

③-11 健全な水循環と持続可能な水利用を実現する。

③-10 持続可能な生態系の保全と利用を実現する。

③-9 環境と経済の好循環に貢献する化学物質のリスク・安全管理を実現する。

③-8 3R（発生抑制・再利用・リサイクル）や希少資源代替技術により資源の有効利用や廃棄物の削減を実現する。

③-7 我が国発のバイオマス利活用技術により生物資源の有効利用を実現する。

があげられる。これに対応して、第2期の5つの重点課題の解決を目指したイニシアティブ体制を基本としつつ、第2期の成果を基に再編し、次の6つの研究領域を設定した。

- ・気候変動研究領域
- ・水・物質循環と流域圏研究領域
- ・生態系管理研究領域
- ・化学物質リスク・安全管理研究領域
- ・3R技術研究領域
- ・バイオマス利活用研究領域

これらは、総合科学技術会議のリーダーシップにより、その達成を目指す体制である。重要な研究開発課題は、これら研究領域毎に精査して選定した。選定の考え方は、

- ①緊急性・重大性の高い環境問題の解決に寄与するもの
- ②持続的発展を可能とする社会の構築に資するもの
- ③国民生活の質の向上や産業経済の活性化に強いインパクトをもつもの

という第2期基本計画の分野別推進戦略の考え方を踏襲したものである。また、第3期基本計画においては、安全に資する科学技術推進の考え方を踏まえて関係分野の推進戦略策定が行なわれたが、環境分野においては、汚染物質の広がりや自然環境の荒廃など現在の問題を解決することにとどまらず、将来にわたって地球及び地域の環境を保全し持続可能な社会を実現することが、安全・安心な社会の構築における重要な観点であると考え、重要な研究開発課題の選定において考慮した。

イニシアティブの体制は、政府全体として同じ政策目標を実現するための省際的、学際的、総合的研究体制である。各省により取り組まれている個別研究の整合的連携を図ると共に、わが国の研究ポテンシャルを重要な課題に結集する求心力を発揮する必要がある。

V エネルギー分野

1. 状況認識

(1) 近年のエネルギー情勢

我が国は石油等のエネルギー資源に乏しく、全エネルギーの約96%（ただし核燃料は輸入扱い、2002年度、エネルギー換算基準）を海外に依存しており、世界的なエネルギー需給動向によって社会・経済が大きな影響を受ける。世界のエネルギー需要量は、近年増加しており、その傾向は中国やインド等経済成長の著しい国での増加を含めて今後も続くものと見込まれている（国際エネルギー機関の「世界エネルギー見通し2004」では2030年/2002年比で1.6倍と予想）。このようなエネルギー需要の顕著な増加といった長期的な要因に加え2005年秋のハリケーンによる米国の原油精製能力の減退などの短期的な要因もあって、近年の原油価格は高水準で推移してきた。市場変動の主役が先進工業国から巨大な人口を抱え経済成長の著しいアジア等の途上国へと移ることで、世界のエネルギー市場は劇的に変化している。

また、地球環境問題への取組が重要となる中で、温室効果ガスの国際的な排出量削減義務が課せられていないこれらの国がエネルギー市場で台頭する一方で、化石燃料の需給逼迫が懸念される状況も少なからず発生している。そのため、これらの国々のエネルギー利用効率化の促進、安定的なエネルギー源の確保が我が国のエネルギー安全保障の観点からも、地球温暖化対策の観点からも重要な課題であることが共通認識となりつつある。

こうした事情を背景として、近年世界の主要国・地域は新しいエネルギー政策を打ち出し、安定供給の確保や環境問題への対応に向けた対策を強化しようとしている。

エネルギー産出国でありかつエネルギー多消費国である米国は、2006年1月の大統領一般教書演説で、「石油中毒」を克服するために技術的なブレークスルーを必要とし、クリーンエネルギーの研究費を増額する「先進的エネルギー・イニシアティブ」を提案、エネルギー安定供給確保を前面に打ち出した政策を展開している。EUでは、2000年11月に「グリーンペーパー」を発表し、省エネルギーや再生可能エネルギーの導入促進によるエネルギー需要抑制・地球温暖化問題への対応を根幹としたエネルギー政策を打ちだしている。エネルギー輸出国でもあるロシアではエネルギー生産力の強化に向け、2003年5月には、「2020年までのロシア・エネルギー戦略」が閣議で承認され、エネルギー輸送の高度化、電力供給源の多様化などの方針が示されている。また、中国やインドでは、それぞれの国家戦略において、省エネルギーや環境負荷低減に配慮したエネルギー利用を掲げるものの、基本的には大規模エネルギー開発あるいはエネルギー輸入の確保に重点を置いている。

このような世界情勢の下、エネルギーの安定供給と二酸化炭素排出削減を実現し得る具体的なエネルギー技術として、省エネルギーや再生可能エネルギーと共に、原子力及び二酸化炭素回収貯留などの技術が最近注目を集めている。

我が国では、1970年代の石油ショック以降、石油代替エネルギーの導入促進及びエネルギー利用効率向上に向け不断の努力を続けており、その結果、一次供給エネルギーにお

ける石油依存度を約5割にまで低減し、また、GDP当たりのエネルギー消費原単位を先進国の中でトップの水準まで引き上げた。しかしながら、近年エネルギー消費は増加傾向にあり、1995年以降、経済成長率は微増あるいはマイナス成長であったものの、2000年前後における一時期を除いて、エネルギー消費量及びエネルギー起源の二酸化炭素排出量は増加を続けており、中でも民生・運輸部門の増加が著しい。また、石油の大半は中東からの輸入に依存しており、運輸部門においては依然としてそのほとんどを石油に依存しているなど多くの課題を抱えている。

(2) 我が国のエネルギー政策動向

我が国においては、2002年6月にエネルギー政策基本法を制定し、その下で2003年10月にエネルギー基本計画を閣議決定し、エネルギーの「安定供給の確保」、「環境への適合」、これらを十分に考慮した上での「市場原理の活用」という3つの基本方針に基づいて、各般の施策を総合的に展開している。具体的には、エネルギーの安定供給の確保のために、①省エネルギーの推進、②輸入エネルギー供給源の多角化、③原子力や再生可能エネルギー（太陽光発電、風力発電等）などを活用したエネルギー源の多様化等を目指し、環境負荷の低減のためには、①省エネルギーの推進、②原子力や太陽光等の非化石エネルギーの利用の推進、③化石エネルギーの中でも二酸化炭素排出量のより少ないガス体エネルギーへの転換、④石油や石炭等の化石燃料の燃料自体の更なるクリーン化・利用の高効率化等を目指し、対策を講じている。以下、科学技術に関連する取組の概要を示す。省エネについては、先述のように世界トップレベルを既に達成しているが、エネルギー安定供給の確保及び温室効果ガス排出量の削減に資することから、2030年までに原油換算で総計5千万k1程度（2030年のエネルギー需給展望、2004年10月総合資源エネルギー調査会需給部会）の省エネルギーの実現が期待できるものとして、省エネ技術の開発・普及に取り組んでいる。

原子力エネルギーについては、エネルギーの安定供給と地球温暖化対策に貢献するものとして期待されており、原子力政策大綱（2005年10月に原子力政策の基本方針として尊重することを閣議決定）に基づき、長期的な視点に立ち計画的に研究開発及び導入を進めることとしている。当面は、既存の軽水炉の高度利用技術開発を行うとともに、2030年前後からの既設軽水炉の代替に対応する次世代軽水炉の開発や、軽水炉サイクルの確立に向けたウラン濃縮・MOX燃料技術、放射性廃棄物処理処分技術等の開発を進め、中長期的には2050年頃からの高速増殖炉を中心とした核燃料サイクルへの移行を目指している。

再生可能エネルギーに関して、太陽光発電については、研究開発及び導入支援を積極的に進めており、世界最高の導入実績と世界トップの製造技術力・生産力を有するようになったほか、風力発電等についても開発・利用を積極的に進めている。また、再生可能エネルギー等の分散型電源を有効に利用しその導入規模を拡大するため、電力貯蔵など電力系統に連系するための対策を進めている。

化石エネルギーのうち、天然ガスについては、中東以外の地域にも存在する環境負荷が小さいエネルギーであるため、より一層の高効率化など新たな利用技術の開発等を推進している。LPガスについては、環境負荷が小さいため、幅広い利用を促進している。石炭については、高効率の燃焼技術等、環境に適合した利用技術（クリーン・コール・テクノロジー）の開発・普及を行うとともに、環境面で優れた利用技術のアジア諸国等への普及を図っているほか、石油については、環境負荷低減や効率的な利用を進めるためクリーンな燃料への転換技術や重質油等の処理技術等の開発を進めている。

なお、2005年4月に決定した『京都議定書目標達成計画』では、「このため現段階で導入可能な対策・施策を直ちに実施することにより、確実な削減を図る」とともに、「更なる長期的・継続的な排出削減へと導く」ことが示されており、エネルギー分野では、こうした方針にも従い、2012年までの目標達成に貢献する実用に近い技術の研究開発とその普及を進めるとともに、中長期的な視点からの研究開発も進めている。

2. 重要な研究開発課題

(1) 重要な研究開発課題選定の考え方

エネルギーは市民生活や経済活動を支える必須のものであり、今後深刻化が予想される資源制約や環境制約を克服して持続可能な社会を構築していくため、エネルギー研究開発は国をあげて取り組むべき最重要課題である。

上記のようにエネルギー分野は、ニーズ指向で取り組むべき科学技術分野であり、かつ、エネルギー技術は材料からシステム応用技術まで様々な研究領域の要素技術が組み合わされて完成される総合技術である。こうした特徴を有するエネルギー分野の重要な研究開発課題の選定は、シーズ指向で進めるよりも、科学技術基本計画に掲げる政策目標やエネルギー政策における目標の達成への貢献度という視点から行うことが適当である。第2期基本計画中においてもエネルギー分野は、3E（エネルギーの安定供給（Energy Security）、環境保全（Environmental Conservation）、経済成長（Economic Growth））を同時に達成するというエネルギー政策上の目標達成に主眼をおき、①エネルギー源の多様化、②エネルギーシステムの脱炭素化、③エネルギーシステム全体の効率化、④基盤科学技術の充実といった4つの視点にもとづき重点領域を定めた。

エネルギー価格の高値安定や世界的なエネルギー需要の増大といった昨今のエネルギー情勢や地球環境問題への対応の必要性を勘案すると、第3期基本計画においても、第2期同様、まずはエネルギー政策上の二大命題である「エネルギー安定供給の確保」及び「環境への適合」の両方を同時達成するために有効な研究開発課題を選定することが必要である。

こうした考え方は、科学技術政策上の大目標「環境と経済の両立」やその下にある中目標「地球温暖化・エネルギー問題の克服」の達成にも貢献するものである。

加えて、省エネ技術に代表されるように、エネルギー分野の科学技術は、その成果が国際競争力の源泉となる。こうした性格を有する研究開発課題は、科学技術政策上の大目標「イノベーション日本ー革新を続ける強靱な経済・産業の実現」及びその下にある中目標「科学

技術により世界を勝ち抜く産業競争力の強化」の達成に貢献するものであり、かつエネルギー基本計画上のエネルギー技術開発の意義「経済の活性化及び国際競争力強化」にも合致する。こうした視点から重要な研究開発課題を選定することも必要である。

エネルギー技術が総合技術であるという性格上、新規の技術開発には長期間を要し、実用化した技術が普及して効果を上げるまでには、社会システム変更に伴うコストが大きいいため更に長い時間がかかる場合が多い。こうした特性を踏まえると、エネルギー分野の研究開発については、短期的なニーズに対応した取組だけではなく、中長期的な視点から様々な制約条件や将来の社会ニーズを的確に把握した上で、これに対応した取組を継続して進めるべきである。したがって、短期的に成果が見込まれるものだけではなく、中長期的に成果が見込まれる研究開発課題も含め、バランスよく重要な研究開発課題を選定する必要がある。

また、重要な研究開発課題を選定する場合、ひとつの技術を選定し、他の選択肢となる技術を捨てるといった一点集中的な研究投資は、リスクが高く適切ではない。また、エネルギー消費が国民生活や経済活動に与える効用を維持向上させるためには、エネルギーの需要と供給両面での研究開発をバランスして推進することが必要である。

したがって、様々な技術シーズから実現可能性のある有望な研究開発課題を選択しつつも、エネルギー政策及び科学技術政策の目標達成に資する多様な研究開発課題を重要な研究開発課題として選定し、それらを並行して協調的かつ競争的に推進することが重要である。さらに、民間での実施が困難な課題を選定するといった官民の役割分担、研究開発に要する費用と成果が社会に普及した場合の効果を相対比較する費用対効果、欧米やアジア等の諸外国の動向、及び、我が国の技術蓄積や産業競争力についても考慮する必要がある。

このような考え方に沿って、エネルギー分野の重要な研究開発課題を選定した。

なお、バイオマス・廃棄物エネルギー利用技術については、エネルギーの安定供給や地球環境問題へ対応するため、カーボンニュートラルなバイオマスや未利用エネルギーとして有望な廃棄物をエネルギー資源として利用する観点から、エネルギー分野においても重要な研究開発課題ではあるが、資源循環利用、廃棄物の最小化等も含めた複合的な観点に立ち、環境分野推進戦略における「バイオマス利活用研究領域」及び「3R技術研究領域」において詳述している。

別紙Ⅲ－２

重要な研究開発課題の概要及び目標（環境分野）

化学物質リスク・安全管理研究領域

プログラム1:化学物質の有害性評価・暴露評価・環境動態解析				
重要な研究開発課題	重要な研究開発課題の概要	研究開発目標（○計画期間中の研究開発目標、◇最終的な研究開発目標）	成果目標	
32	多様な有害性の迅速な評価技術 ③-9	<p>正確で迅速な有害性評価を可能にする</p> <p>とともに、長期の体内蓄積や発現まで長時間を有する影響、複合影響などの新たな有害性について予見的に評価する新技術・新手法を開発する。</p>	<p>○2010年度までに、化学物質の有害性を評価するためのトキシコゲノミクスやQSARを用いた迅速かつ高精度な手法について、基盤となるデータを取得する。【厚生労働省、環境省】</p> <p>◇2015年までに、化学物質の有害性を評価するためのトキシコゲノミクスやQSARを用いた迅速かつ高精度な手法を実用化する。【厚生労働省、環境省】</p> <p>○2010年度までに、作物・土壌中の有機塩素系農薬等極微量汚染物質モニタリングのための簡易・高精度測定手法を開発する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までに、作物・土壌中の有機塩素系農薬等極微量汚染物質の簡易抽出法を開発し、作物・土壌等の分析マニュアルを策定する。【農林水産省】</p> <p>○2010年度までに、従来の手法に比べ、簡易かつ高精度なin vitro試験手法やトキシコゲノミクス手法、シミュレーション手法を活用した有害性評価手法を開発する。【経済産業省】</p> <p>○2010年度までに、トキシコゲノミクスの環境分野における基盤として、生態影響評価のための指標生物に関する遺伝情報を整備する。【環境省】</p>	<p>◆2020年までに化学物質によるヒト健康や環境への影響に関するリスクの最小化を図る。【厚生労働省、農林水産省、環境省】</p> <p>◆適切な優先順位付けに基づく効率的な既存化学物質の安全性点検の実施、また、有害性試験コスト低減及び製品開発促進を図る。【経済産業省】</p>
33	生態系影響の予見的評価手法【生態系管理研究領域の「土地改変及び環境汚染による生物多様性・生態系サービスへの影響評価」と連携して行う】 ③-9	<p>化学物質の生態系への影響を継続的に調査し評価するとともに、生態系の機能や構造変化等に着目した新たな影響評価手法の開発により、将来にわたる影響を予測する。</p>	<p>○2010年度までに、農薬等の各種化学物質が水域生態系、陸域生態系に及ぼす影響を評価するため、新たな指標生物を選定するとともに、作用機構に基づく生態系影響評価法を開発する。【農林水産省、国土交通省、環境省】</p> <p>◇2015年度までに、指標生物等に基づく農薬等の各種化学物質の生態系影響を評価、トータルリスク評価指標を策定する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までに、都市排水等に含まれる微量化学物質が水域生態系に与えるリスクを評価するシステムを構築する。【国土交通省】</p> <p>◇野生生物（生物個体（群））の継続的観察等により、生態系影響の早期発見、適切な評価に資する知見を集積する。【環境省】</p> <p>◇水域及び陸域の生態系や個々の個体群への影響をよりの確に捉えるための新たな有害性・リスク評価法を開発し、実用化する。【環境省】</p> <p>○2010年度までに、トキシコゲノミクスの環境分野における基盤として、生態影響評価のための指標生物に関する遺伝情報を整備する。【環境省】</p>	<p>◆化学物質による生態リスクの最小化に寄与する。【農林水産省、国土交通省、環境省】</p>
34	環境動態解析と長期暴露影響予測手法 ③-9	<p>残留性物質や過去からの負の遺産のヒト及び生態系への影響評価とそれらの長期予測を行うため、発生源や暴露経路、</p>	<p>○2010年度までに、耕地土壌におけるヒ素の形態別分布及び鉛等の全国的分布実態を解明する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までに、耕地におけるヒ素・鉛等の有害微量元素の形態変化を解明し、作物吸収予測モデルを開発する。【農林水産省】</p> <p>○2010年度までに、農薬等化学物質、窒素・リン等水質汚濁物質、懸濁物質等環境負荷物質の公共水域への流出の動態を解明する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までに、環境負荷物質のモデル流域における流出予測モデル及び流域水質評価法を開発し、農業生産に伴う面源負荷及びその対策技術を評価する。【農林水産省】</p>	<p>◆製造、使用（含有製品の使用を含む）及び廃棄の各段階からの排出量を用いた精緻なリスク評価に基づく、適切なリスク管理・削減対策を提言する。【経済産業省】</p> <p>◆精緻な暴露評価・リスク評価に基</p>

		<p>暴露量などを推定可能な高度環境動態モデルを開発する。</p>	<p>○2010年度までに、対象品目の拡充による窒素収支算定システムを高度化、酸性化物質の動態モデル及び窒素フローの予測手法を開発する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までに、流域、全国、東アジア等スケールの異なる窒素及び酸性化物質の循環モデルの統合化手法を開発する。【農林水産省】</p> <p>○2010年度までに、ESD(Emission Scenario Document)ベースの精緻な排出量推計手法を開発する。【経済産業省】</p> <p>○2010年度までに、製品からの直接暴露に対応する暴露評価手法・リスク評価手法を開発する。【経済産業省】</p> <p>○2010年度までに、地域レベルから広域レベルまで地域スケールに応じた環境動態モデルを開発する。【経済産業省】</p> <p>○2010年度までに、国内及び東アジアにおけるPOPsのモニタリング体制を整備し、POPsによる汚染実態を把握する。【環境省】</p> <p>○2010年度までに、ナノテクノロジー・バイオテクノロジー等先端技術の活用により環境計測・分析技術を高速化、高機能化、実用化し、普及させる。【環境省】</p> <p>◇環境中の化学物質の残留実態を継続的に把握し、情報を蓄積するシステムの構築と、環境動態モデルを活用したリスク管理・対策支援を行う。【環境省】</p> <p>◇2015年度までに、国内及び東アジアにおける環境中化学物質の環境動態を精緻に予測する手法を確立する。【環境省】</p> <p>○2010年までに、ライフサイクルを通じた化学物質の環境影響評価手法を開発する。【環境省】</p>	<p>づく、適切なリスク管理・削減対策を提言する。【農林水産省、経済産業省】</p> <p>◆ヒトへの直接暴露によるヒト健康への精緻なリスク評価を可能とし、適切なリスク管理・削減対策を提言する。【経済産業省】</p> <p>◆環境中化学物質の継続的な実測データと精緻な環境動態モデルからの長期暴露影響評価により予防的なリスク対策を行う。【農林水産省、環境省】</p> <p>◆簡易測定法の実用化・普及に伴い、汚染調査の迅速化および経済的負担を軽減する。【環境省】</p>
35	<p>環境アーカイブシステム利用技術 ③-9</p>	<p>環境問題の特性・環境科学における不確実性を考慮し、環境試料を経時的に保存することが可能なアーカイブシステムの構築を行い、将来、新たな事実が判明した際に参照可能とする。</p>	<p>○2010年までに、疫学的手法を利用して、化学物質の暴露と次世代の健康影響(又は発ガン)等との因果関係について検討し、知見を蓄積する。【厚生労働省】</p> <p>◇2015年度までに、職業性喘息など化学物質への曝露に起因する主要な作業関連疾患について、サーベイランスの基盤を確立する。【厚生労働省】</p> <p>○2010年までに、既存の環境試料タイムカプセル棟を活用しつつ、各種汚染物質のより高度な選別的分析のための採取、保存法を確立する。【環境省】</p> <p>◇2015年度までに、既存の環境試料タイムカプセル棟を活用しつつ、より高度な暴露評価、リスク評価の選別の実施のための採取、保存方法を確立する。【環境省】</p> <p>◇将来、新たな事実が判明した場合や、画期的な新規分析技術の開発がなされた場合に対応して、適宜、保存試料の分析を行い、当時の分析法及び分析結果の検証を行う。【環境省】</p>	<p>◆2020年までに化学物質によるヒト健康や環境への影響に関するリスクの最小化を図る。【厚生労働省】</p> <p>◆新事実や新技術に対応した環境試料の選別的分析を行う体制を構築・運用し、環境残留実態の推移を的確に把握することにより、環境リスク対策を支援する。【環境省】</p>
<p>プログラム2: 化学物質のリスク評価管理・対策技術</p>				
<p>重要な研究開発課題</p>		<p>重要な研究開発課題の概要</p>	<p>研究開発目標(○計画期間中の研究開発目標、◇最終的な研究開発目標)</p>	<p>成果目標</p>
36	<p>新規の物質・技術に対する予見的リスク評価管理 ③-9</p>	<p>ナノテクノロジーなどの新技術によって生成される物質や新規に開発される物質等による新たなリスクを予見的に評価し、管理する手法を開発する。</p>	<p>○2010年までに、トキシコゲノミクスやQSARを用いた、新たなリスクを予見的に評価する手法について、基盤となるデータを取得する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>◇2015年までに、トキシコゲノミクスやQSARを用いた、化学物質の新たなリスクを予見的に評価する手法を実用化する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、生体内計測法を含め、ナノマテリアル等ナノテクノロジーによる材料のヒト健康影響の評価となる体内動態や影響臓器などの知見を得る。【厚生労働省、環境省】</p> <p>○2010年までに、ナノ粒子の特性解明、計測技術の開発とともに、科学的知見に基づくナノ粒子のリスク評価手法を開発する。【経済産業省】</p> <p>◇2015年までに、ナノ粒子やナノマテリアルについて、健康影響の評価方法を開発する。【厚生労働省、環境省】</p> <p>○2010年までに、同質の化学物質群ごとのリスク評価手法を開発する。【経済産業省】</p> <p>○2010年までに、船舶用有機スズ系塗料(TBT塗料)の禁止に伴い、普及が進む非TBT代替塗料の海洋生態影響のリスク評価技術を開発する。【国土交通省、農林水産省】</p>	<p>◆2020年までに化学物質によるヒト健康影響に関するリスクの最小化を図る。【厚生労働省】</p> <p>◆ナノ粒子の測定方法、リスク評価指針、ナノ材料管理指針等を国際的な枠組みに反映させる。【経済産業省】</p> <p>◆リスク評価の効率化を図るとともに、リスクが相対的に小さい代替物選択、製品開発の促進により国際競争力強化を図る。【経済産業省】</p> <p>◆海洋生態系への新たな悪影響を防止する。【国土交通省、農林水産省】</p> <p>◆予防的な環境リスクの管理体制を構築し、環境リスクを最小化する。【環境省】</p>

37	高感受性集団の先駆的リスク評価管理 ③-9	最先端の分子生命科学の成果などを活用し、小児など化学物質暴露に対して脆弱な集団に配慮した先駆的なリスク評価管理手法を開発する。	<p>○2010年までに、妊婦や胎児・新生児等の感受性の高い集団に特有な障害等に関する知見を蓄積する。【厚生労働省、環境省】</p> <p>◇化学物質の妊婦や子供への影響について、2015年までに基礎的な知的基盤を整備するとともに、影響評価法を完成する。【厚生労働省、環境省】</p> <p>○2010年までに、トキシコゲノミクスやQSARを用いた、高感受性集団に対して効果的なリスク評価手法について、基盤となるデータを取得する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>◇2015年頃までに、トキシコゲノミクスやQSARを用いた、高感受性集団に対して効果的なリスク評価手法を実用化する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、化学物質の免疫、及び、神経かく乱作用に関する評価手法の知見を集積する。【環境省】</p> <p>◇2015年頃までに化学物質の免疫、及び、神経かく乱作用に関する評価手法を完成する。【環境省】</p>	◆2020年までに化学物質によるヒト健康影響に関するリスクの最小化を図る。【厚生労働省、環境省】
38	国際間協力の枠組みに対応するリスク評価管理【資源循環技術研究領域の「国際3Rに対応した有用物質利用・有害物質管理技術」と連携して行う】 ③-9	国際的規制など国際間協力の枠組みに対応し、国際貢献とともに世界を先導する、ライフサイクル的思考を基礎とするリスク評価・管理スキームを構築する。	<p>○2010年までに、化学物質の有害性を評価するためのトキシコゲノミクスやQSARを用いた迅速かつ高精度な手法について、基盤となるデータを取得する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>◇2015年頃までに、トキシコゲノミクスやQSARを用いた、化学物質の有害性を検出するための迅速かつ高精度な手法について実用化する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、生体内計測法を含め、ナノマテリアル等ナノテクノロジーによる材料のヒト健康影響の評価となる体内動態や影響臓器などの知見を得る。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>◇2015年頃までに、生体内計測法を含め、ナノマテリアル等ナノテクノロジーによる材料のヒト健康影響の評価方法を開発する。【厚生労働省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、CODEX基準に対応したイネのカドミウム吸収・蓄積を抑制する技術及び水田からのカドミウム汚染除去技術を実用化し、普及する。【農林水産省】</p> <p>◇2015年度までにCODEX基準に対応した主要農作物のカドミウム対策に関する普及技術を確立する。【農林水産省】</p> <p>○2010年までに、大気等環境媒体移動を含めた農業等のリスクをライフサイクル的アプローチにより評価するための基盤技術を開発する。【農林水産省】</p> <p>◇大気中における農業のリスク評価を行い効果的な管理技術を開発、実用化し、化学物質過敏症等への対策法を提示する。【農林水産省】</p> <p>○2010年までに、ナノ粒子の特性解明、計測技術の開発とともに、科学的知見に基づくナノ粒子のリスク評価手法を開発する。【経済産業省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、国際的動向を踏まえつつGHS分類に関する情報や有害性に関する情報、リスク評価情報などを整備する。【経済産業省、環境省】</p> <p>○2010年までに、ライフサイクルに応じた、ESD (Emission Scenario Document) ベースの精緻な排出量推計手法や製品からの直接暴露に対応する暴露評価手法・リスク評価手法を開発する。【経済産業省】(再掲)</p> <p>○2010年までに、POPs条約に基づく国内及び東アジアにおける大気移行性モデルを含むPOPs等のモニタリング体制を主導的に整備するとともに、対策技術を開発する。【環境省、農林水産省】(一部再掲)</p> <p>◇POPs条約対象物質の拡大等の国際動向に適宜対応しつつ、国内及び東アジアにおけるPOPs等のモニタリングと対策体制の効率化と高度化を図る。【環境省】</p> <p>○2010年までに、UNEPにおける国際的な有害金属対策の検討に主導的に対応するため、国際的観点からの有害金属対策戦略を策定する。【環境省】</p>	<p>◆2020年頃までに、化学物質によるヒト健康影響に関するリスクの最小化を図る。【厚生労働省】</p> <p>◆国民に安全な農産物を提供するとともに、我が国農地の重金属汚染、POPs汚染リスクを低減する。さらに開発されたリスク低減技術を諸外国に技術移転することにより国際貢献する。【農林水産省】</p> <p>◆ナノ粒子の測定方法等のISOでの議論への反映とともに、ナノ粒子リスク評価指針、ナノ材料管理指針等OECDでのナノ材料の管理のあり方に係る議論へ反映させる。【経済産業省】</p> <p>◆製造、使用(含有製品の使用を含む)及び廃棄の各段階からの排出量を用いた精緻なリスク評価に基づく、適切なリスク管理・削減対策を提言する。【経済産業省】</p> <p>◆東アジア地域におけるPOPsの汚染実態把握や新規POPsの検討等、POPs条約に適切に対応し、POPsの削減・廃絶に貢献する。【環境省】</p> <p>◆UNEPにおける国際的な有害金属対策の検討や「大気の大気質」の問題に主導的に対応し、環境汚染の未然防止に寄与するなど国際的規制や協力に向けて貢献する。【環境省、農林水産省】</p>
39	共用・活用が可能な化学物質情報基盤 ③-9	リスクを低減するために必要不可欠な情報へ一元的にアクセスで	○2010年度までに、国内で年間100 t以上製造・輸入されている化学物質の化学物質管理情報を整備すると共に、国際的動向を踏まえつつGHS分類に関する情報や有害性に関する情報、リスク評価情報などを整備する。【経済産業省、環境省】(一部再掲)	◆事業者による自主管理が推進され、自治体における化学物質管理、国民における化学物質の安全性に関する理解が深まる。【経済産業省】

		き、国民が活用できるデータベースを産学官協調体制のもとに構築する。		◆化学物質の有害性情報等を的確に提供することにより、利便性を高め、各主体(国、地方公共団体、事業者、市民)による環境リスク最小化のための行動を促進する。【環境省】
40	リスク管理に関わる人文社会科学 ③-9	リスク管理の優先順位と手法を選択する際に重要となるリスク受益分析、より効果的なリスクコミュニケーション手法、より満足度の高い合意形成の手法など、広く人文社会科学的な見地から開発する。	○2010年度までに、マルチプルリスク社会におけるリスクトレードオフに対応した社会経済分析手法を開発する。【経済産業省】 ○2010年度までに、化学物質の環境リスクの概念の理解と普及を促進するため、理解の現状や各主体(国、地方公共団体、事業者、市民)によるリスクコミュニケーションの実態を調査し、今後各主体が取り組むべき方策を提言する。【環境省、文部科学省】 ◇提言された方策について、モデル的な取組を通じて効果を検証し、効果的なリスクコミュニケーション方策を確立する【環境省】	◆リスク管理に関して、人文社会科学的な見地から問題解決に資する。【文部科学省】 ◆健康改善効果等の費用便益分析による異種のリスクの比較を行い、リスク受容に係る社会を醸成する。【経済産業省】 ◆環境リスクに基づく各主体の適切な判断と行動を促進する。【環境省】
41	リスク抑制技術・無害化技術 ③-9	化学物質によるリスクを低減する技術、例えば、排出量削減技術、無害化技術、代替品・代替手法などを開発する。	○2010年度までに、廃棄物処理における有害化学物質等に関する、バイオ技術の活用による簡便な安全性評価、環境リスク管理の技術開発を行う。【文部科学省】 ○2010年度までに、残留性有機化学物質の吸収抑制技術と、ファイトレメディエーションを用いたカドミウム等の除去技術を開発する。【農林水産省】 ◇2015年度までに、稲・大豆等の作物における低吸収性品種の利用等によるヒ素・鉛等重金属の吸収抑制技術を体系化し、土壌管理指針を策定する。【農林水産省】 ○2010年度までに、難分解性有機物・重金属等のバイオレメディエーション技術、浄化資材による汚染土壌洗浄技術、農地からの有害物質の拡散防止技術を開発する。【農林水産省】 ○2010年度までに、揮発性有機化合物排出量の3割削減(2000年度比)に資する、代替物質及び代替プロセス技術並びに排出抑制対策技術等を開発する。【経済産業省】 ○2010年度までに、国際的な規制を先取りできる揮発性有機化合物を放出しないアウトガスゼロプラスチックを開発する。【経済産業省】 ○2010年度までに、ハロゲン、リン、アンチモンなどを使用しない機能性難燃性樹脂を開発する。【経済産業省】 ○2010年度までに、自動車、船舶の生産、利用過程用で窒素酸化物、揮発性有機化合物等の排出低減技術を開発する。【国土交通省】 ○2010年度までに、油・有害液体物質の排出・流出による海洋汚染防止対策技術(流出拡散モニタリング、環境リスク評価、新たな油回収装置など)を開発する。【国土交通省】 ○2010年度までに、PCB廃棄物の適正処理のための体制を整備するとともに、ダイオキシン類等非意図的のPOPs汚染を適切に処理する。【環境省】 ◇2015年度までに製品の全ライフサイクルを通じた化学物質環境リスク低減方策を確立する。【環境省】	◆廃棄物・バイオマスの処理に関する安全評価、管理技術を確立し、バイオマス利用の安全性向上に貢献する。【文部科学省】 ◆有害化学物質の分解無毒化技術、土壌から農作物への吸収抑制技術等の開発を通じて、リスク低減化対策に貢献する。【農林水産省】 ◆2030年度までに、工場等の固定発生源からの揮発性有機化合物の排出を2000年度比で5割削減する。【国土交通省】 ◆2010年度までに、揮発性有機化合物の排出量を2000年度比で3割削減に資する。【経済産業省】 ◆2020年頃までに、難燃性樹脂のハロゲン・リン・アンチモンフリー化による火災時の有毒ガス発生抑制及びリサイクル性の向上を実現する。【経済産業省】 ◆窒素酸化物及び粒子状物質の排出削減により大気環境基準を確実に達成する。【国土交通省】 ◆有害物質事故対策のためのOPRC条約議定書に的確に対応した油・有害液体物質による海洋汚染防止対策を実行する。【国土交通省】 ◆POPsの環境中への放出による人の健康や環境に対する悪影響を最小化する。【環境省】

別紙V-2 重要な研究開発課題の概要及び目標（エネルギー分野）

大分類：エネルギー源の多様化

中分類：化石燃料の開発利用の推進				
重要な研究開発課題	重要な研究開発課題の概要	研究開発目標（○計画期間中の研究開発目標、◇最終的な研究開発目標）	成果目標	
15	エネルギー資源探査技術 ③-6	石油等資源の探鉱開発能力の向上のため、衛星データの取得、処理・解析等による概査から試掘、分析等に至る探査技術の開発等を行うことにより、石油等資源の安定供給を図る。	○2010年度までに、資源探査等に資する地球観測データの処理・解析技術の向上（100万シーン以上のデータを処理し、5万シーン以上をユーザに提供）を図る。また、大深度地下等の化石燃料の探査に関わる技術の高度化を図るとともに、2008年度までに油兆探査を支援する小型で高性能な質量分析装置を開発する。【経済産業省】	◆世界水準の探鉱開発能力を活用した石油・天然ガスの自主開発の拡大を図ることで、我が国のエネルギーセキュリティに貢献する。【経済産業省】
16	化石燃料採掘技術 ③-6	我が国の一次エネルギー供給の大半を占める化石燃料の安定供給を図るため、原油の回収・生産効率向上のための技術、非在来型資源の商業的産出・利用技術の開発を行う。	○2010年度までに、化石燃料の生産技術石油・天然ガス等の化石燃料の生産・利用を拡大するため、CO2を用いたEOR技術（増進回収法）、大水深油ガス田開生産技術、ERD（大偏距掘削）を用いた低コスト掘削技術等を開発する。【経済産業省】 ○2008年度までに陸域での産出試験を実施し、我が国周辺地域に賦存するメタンハイドレートに適用する生産手法の検証を行い、メタンハイドレートの産出技術日本周辺海域でのメタンハイドレート賦存有量地域を選定する。【経済産業省】 ◇2016年度までに日本周辺海域のメタンハイドレートの商業的産出のための技術を確立する。【経済産業省】	◆非在来型油ガス田開発の推進、既存油ガス田の成功率・回収率向上、生産・利用コストの削減等を通じ、エネルギー資源の安定供給を確保する。【経済産業省】 ◆我が国にとって貴重な国産エネルギー資源として期待されるメタンハイドレートを利用可能とし、長期的に安定かつ効率的なエネルギー需給構造の構築に資することを旨とする。以上のことで我が国のエネルギー獲得・確保に貢献する。【経済産業省】
17	石油精製・利用技術 ③-6	石油の有効活用等に資する高度な重質油処理等の精製技術、重質残油のクリーン燃料への転換技術等の開発、燃料油・潤滑油の更なるクリーン化等に関する技術開発等を行う。また、石油の精製・利用に際して生成する環境負荷物質を処理する技術、多様化する石油精製物質等に対応して、簡易で迅速に有害性（発ガン性等）を評価可能な技術等を開発する。	○2010年度までに重質残油をクリーン燃料に転換する技術、重質油（脱澱油）水素化分解の高分解触媒技術、流動接触分解装置低位熱回収技術等を確立する。【経済産業省】 ○2010年度までに、石油精製物質等に係る簡易で迅速な有害性評価技術を確立する。【経済産業省】 ◇石油の精製・利用の際に生じる大気・水質・土壌等への環境負荷物質の削減・処理技術を開発する。【経済産業省】	◆原油の重質化や需要の白油化等に対応した石油製品の安全、安定かつ効率的な供給を確保する。【経済産業省】
18	クリーン石炭利用技術 ③-6	石炭のクリーンな利用等に資する石炭ガス化発電等による発電効率向上（IGCC、IGFC等）、石炭液化技術、低品位炭の有効利用技術、石炭からの水素製造、石炭灰の有効利用技術、石炭の無灰化技術等の研究開発・実証を行う。	○2009年度までに低品位炭の有効利用技術を確立する。【経済産業省】 ○2010年度までにインドネシアにおいて1t/dの石炭液化技術の実証プラントを建設する。【経済産業省】 ○2007年度までにハイパーコール利用高効率燃焼技術については、0.1t/dベンチプラントでの製造技術を確立する。【経済産業省】 ○2006年度までに燃料電池用石炭ガス製造技術については、150t/dパイロットプラントで石炭ガス化技術を確立する。【経済産業省】 ○2009年度までに、石炭ガス化複合発電（IGCC）については、実証機において送電端効率40.5%（商用機46～48%相当、数値は全て（HHV）高位発熱量ベース）を達成する技術を確立する。【経済産業省】 ○2010年までに、超々臨界圧発電については、主蒸気温度700℃級（送電効率46%、HHV）の成立可能性を検討する。【経済産業省】	◆石炭ガス化による効率向上に資する技術、石炭からの水素ガス製造技術等、クリーン・コール・テクノロジーの開発等を行い、環境適合的な石炭利用の拡大を図ることによって、エネルギー安定供給の確保、環境問題への対応（CO2、NOx、PM排出量の削減等）を図る。【経済産業省】

			<p>◇2015年度までに石炭液化技術については、商用化技術を確立する。【経済産業省】</p> <p>◇2012年度までにハイパーコール利用高効率燃焼技術については、石炭無灰化の商用化技術を確立する。【経済産業省】</p> <p>◇2030年を目処に、超々臨界圧発電については、主蒸気温度800℃級（送電端効率48%以上、HHV）の実用化を実現する。【経済産業省】</p>	
19	化石系新液体燃料製造技術 ③-6	ガスエネルギーの導入等に資するGTL（ガス・ツー・リキッド、ナフサ、灯油、軽油等石油代替用として天然ガス等を原料として製造される合成油）、DME（ジメチル・エーテル、天然ガス、石炭等を原料とする新燃料）の製造コストの低減、利用機器の開発等を行う。	<p>◇2010年度までに商業規模でのGTL製造技術、DMEの直接合成技術、DME燃料利用機器技術を確立する。【経済産業省】</p>	<p>◆GTL、DMEの普及により、一次エネルギーにおける石油及びLPGの依存度を低減させ、我が国のエネルギー安定供給に資する。【経済産業省】</p> <p>※LPG：リキユファイド・ペトロリアム・ガスの略。液化石油ガス。炭素数3のプロパンと、炭素数4のブタンの2種類がある。</p>
20	高効率天然ガス発電技術 ③-2	天然ガスを利用した高効率火力発電技術の研究開発で、高効率ガスタービン発電等の技術開発を行う。	<p>◇2007年までに1700℃級及び高温分空気利用ガスタービンの技術を開発し、商用機において、それぞれ送電端効率56%以上及び51%以上（共に高位発熱量ベース）を実現する。【経済産業省】</p> <p>◇2010年までに高温・高腐食環境下において優れた特性を示す超高純度Cr-Fe系材料の量産化のための基礎技術を確立する。【経済産業省】</p> <p>◇2015年までに、高効率ガスタービンの実用化に向け、既存技術と同等以上の耐久性・経済性等を実現する。【経済産業省】</p> <p>◇2020年までに、高耐熱・高耐食・高強度特性を有した材料を開発し、天然ガス発電の更なる高信頼性・高効率化を図る。【経済産業省】</p>	<p>◆火力発電の高効率化により、エネルギーの有効利用を図り、我が国の電力安定供給を確保するとともに、地球温暖化問題に貢献する。【経済産業省】</p>
21	高効率ガスエンジン技術 ③-2	ガスエンジンの高効率化、排熱有効利用技術等の研究開発及び小規模発電等に係る技術開発を行う。	<p>◇2007年度までに、天然ガスを燃料とした、新燃焼方式による8MWクラス高効率ガスエンジンを開発する。あわせて、それを利用した高出力コンバインドシステムを開発する。【経済産業省】</p>	<p>◆分散エネルギーシステムを構築し、民生部門の省エネルギーに有効な都市部での電気・熱の面的融通を促進し、二酸化炭素の排出削減を図り、もって地球温暖化の抑制に貢献する。【経済産業省】</p>
22	二酸化炭素回収・貯留技術 ③-12	火力発電所等の大規模固定発生源から二酸化炭素を従来技術に比較して低コスト・低投入エネルギーで分離回収可能な吸収液、分離膜等の技術およびそれを利用したシステムを開発する。また、分離回収した二酸化炭素を、地中帯水層・炭層や海洋へ貯留・隔離する技術を開発する。	<p>◇2008年度までに、二酸化炭素を分離・回収するコストを現状の半分程度とするような吸収液、回収システムを開発する。【経済産業省】</p> <p>◇2020年頃までに、二酸化炭素を分離・回収するコストを1000円/tCO2程度とするような吸収液、回収システムの開発及び、圧力を有するガスから二酸化炭素を効率的に分離する分離膜を開発する。【経済産業省】</p> <p>◇2015年からの国内での地中帯水層貯留の実適用を実現するため、2012年までに①地中貯留の要素技術とトータルシステムの確立、②CO2地中挙動の理解と安全評価手法・基準の整備、③貯留層賦存量の調査・評価による国内地質データのデータベース化、④社会受容の獲得と社会システムの整備に必要な技術を開発する。また、京都議定書第1約束期間中においてCDMプロジェクトとして実現するために必要な技術を開発する。【経済産業省】</p> <p>◇2015年頃までに、二酸化炭素を地中帯水層、炭層や海洋へ長期安定的に貯留・隔離する技術を開発する。【経済産業省】</p>	<p>◆CO2を排ガスから回収するコストを2020年代に1000円/tCO2（100万t/年規模）程度とする。【経済産業省】</p> <p>◆2015年頃に国内での地中帯水層貯留（100万t/年規模）の実現に必要な技術を開発する。また、海外でもCDMプロジェクトとして実現し、我が国の二酸化炭素排出削減目標の達成に寄与する。【経済産業省】</p>

イノベーションプログラムについて

平成21年4月27日
 経済産業省
 研究開発課

イノベーションプログラムの概要

1. 「イノベーションプログラム」の中での体系的推進 (**Inside Management & Accountability**)
 - 経済産業省の全ての研究開発プロジェクトは、政策目標毎に7つの「イノベーションプログラム」の下で体系的に推進。
 - 各プログラムの中で、政策目標に向けたプロジェクトの位置付けと目標の明確化、市場化に必要な関連施策(規制改革、標準化等)との一体化を図り、イノベーション実現に向け各プロジェクトを効果的に推進。
2. 「技術戦略マップ」に基づく戦略的企画立案 (**Outside Communication & Networking**)
 - 先端産業技術動向を把握し、国が取り組むべき技術課題とイノベーションの道筋を明確化するため、産学官で協働するロードマッピング手法を導入(『技術戦略マップ 2005/2006/2007/2008』)。
 - 研究開発プロジェクトの選定に当たっては、イノベーションプログラムにおける政策目標を基に技術戦略マップに位置付けられた重要技術課題を抽出し戦略的に企画立案。

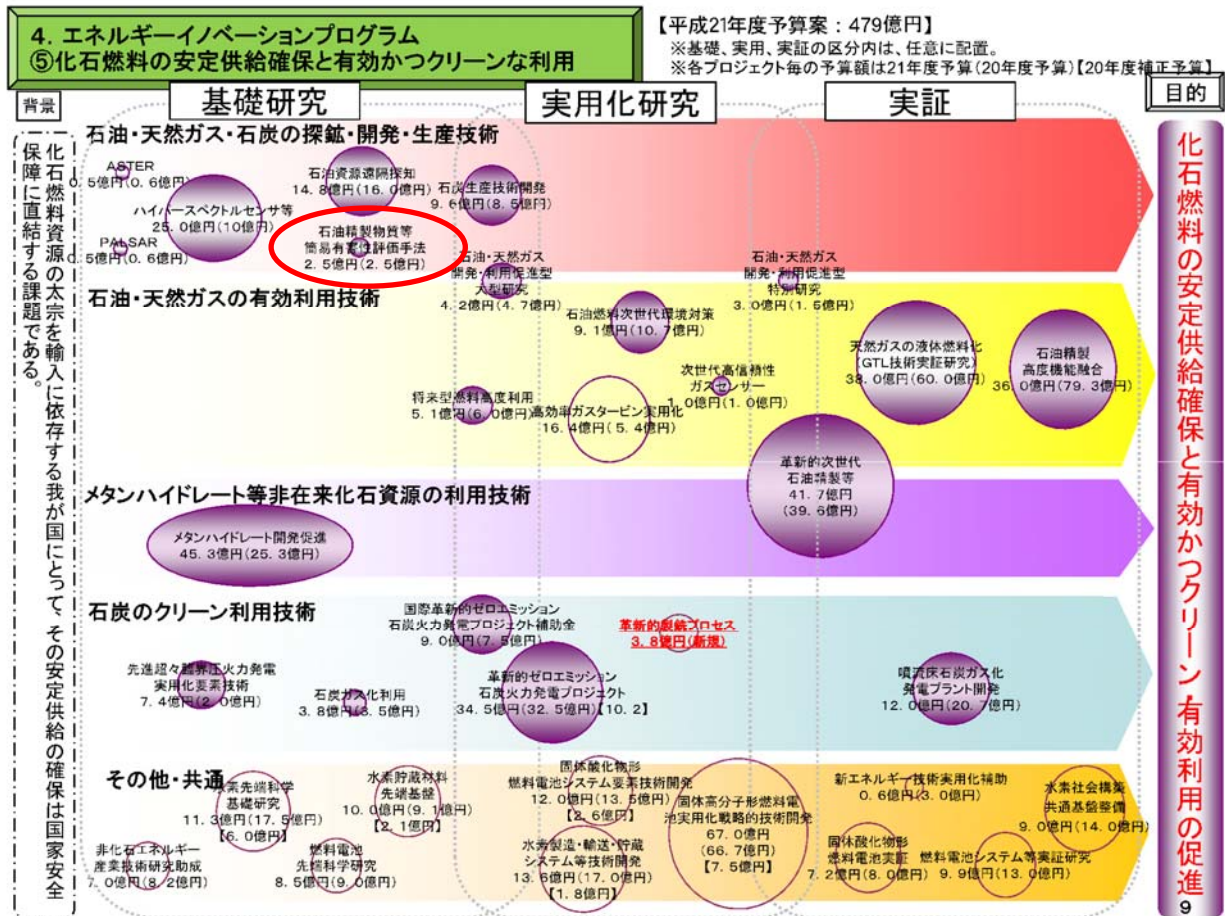
イノベーションプログラム(IPG)の21年度予算額 (総額: 1,966億円※1)

<p>IT IPG</p> <p>①ITコア技術の革新 94億円 ②省エネ革新 42億円 ③情報爆発への対応 44億円 ④情報システムの安全性等 63億円</p> <p>21年度予算 244億円</p>	<p>ナノテク・部材 IPG</p> <p>①ナノテク加速化領域 36億円 ②情報通信領域 28億円 ③ライフサイエンス・健康 ・医療領域 16億円 ・エネルギー・資源・環境領域 78億円 ④材料・部材領域 27億円 ⑤共通領域 4億円</p> <p>21年度予算案 188億円</p>	<p>ロボット・新機械 IPG</p> <p>①ロボット関連技術開発 38億円 ②MEMS関連技術開発 12億円</p> <p>21年度予算 50億円</p>	<p>健康安心 IPG</p> <p>①創薬・診断技術開発 102億円 ②診断・治療機器・再生医療等の技術開発 28億円</p> <p>21年度予算 130億円</p>
<p>エネルギー IPG</p> <p>①総合エネルギー効率の向上 707億円 ②運輸部門の燃料多様化 278億円 ③新エネルギー等の開発・導入促進 369億円 ④原子力等利用の推進とその本前提となる安全の確保 268億円 ⑤化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用 479億円</p> <p>21年度予算 1,281億円※2</p>	<p>環境安心 IPG</p> <p>①地球温暖化防止新技術 60億円 ②3R 33億円 ③環境調和産業バイオ 57億円 ④化学物質総合評価 11億円 ⑤共通領域 4億円</p> <p>21年度予算案 165億円</p>	<p>航空機・宇宙産業 IPG</p> <p>①航空機産業の基盤技術力の維持・向上 233億円 ②宇宙産業の国際競争力強化 87億円</p> <p>21年度予算案 320億円</p>	

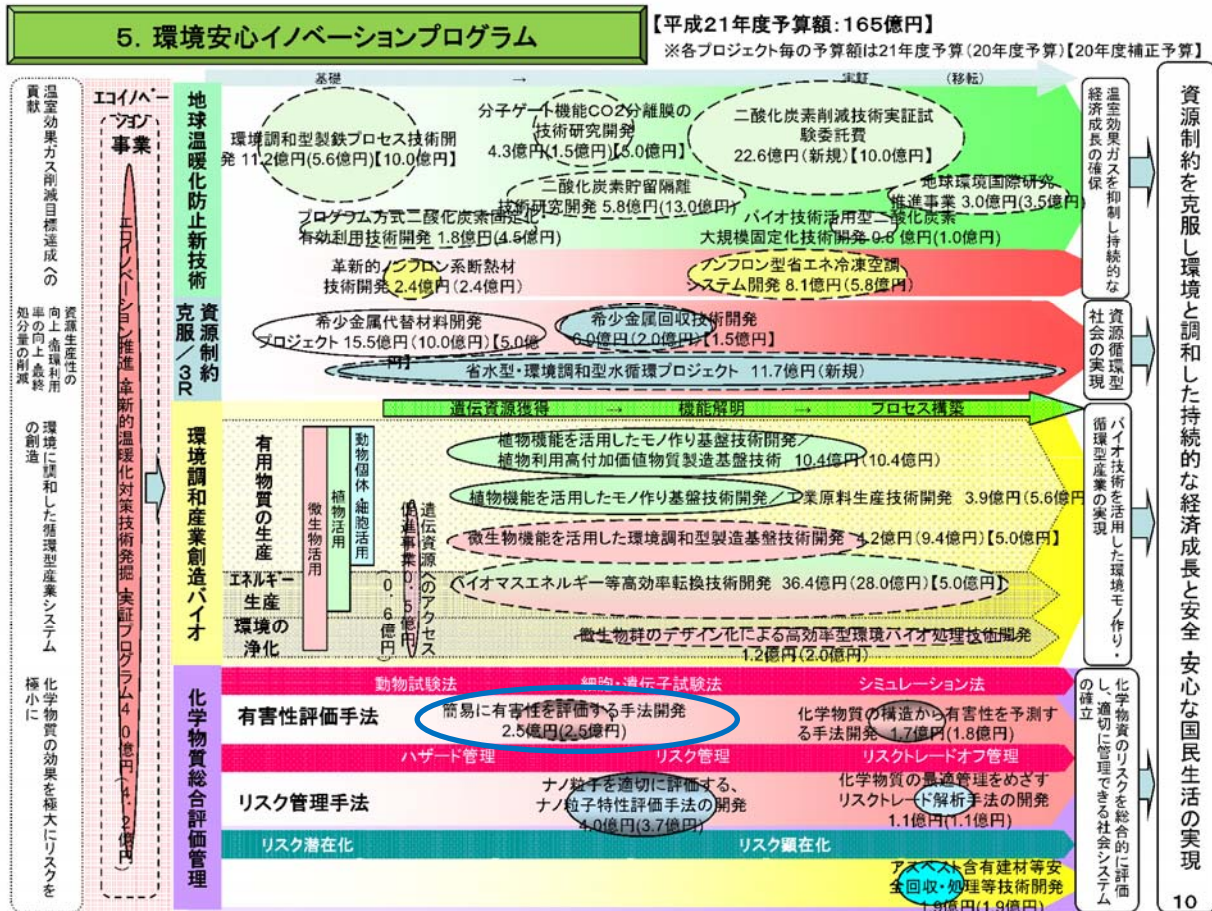
※1 各イノベーションプログラムにおけるプロジェクトの重複を排除した額 ※2 各サブプログラムで重複があるため小計と一致しない

4. エネルギーイノベーションプログラム (H21年度)

⑤化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用



5. 環境安心イノベーションプログラム (H21年度)



(化学物質総合評価管理プログラム／石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

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ラット肝臓の発がん性を予測する手法で著しい進歩が見られており、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。

(2) 研究開発の目標

最終目標（平成22年度）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、試験期間1ヶ月程度で腎臓等における発がん性を精度90%以上で予測する手法を開発し、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。

中間目標（平成20年度末）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

発がん性化学物質と非発がん性化学物質を用いた短期動物実験を行って、ラット腎臓から RNA を抽出・精製する手法を確立するとともに、遺伝子発現情報の収集・解析を行い、発がん性予測に有効な遺伝子情報を整備する。また、評価システムに必要な DNA マイクロアレイの仕様とそれを用いた試験手法を策定する。

(3) 研究開発の内容

上記の目標を達成するために、以下の項目について別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

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」

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」

2. 研究開発の実施方式

(1) 研究開発実施体制

本研究開発は、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。）が、単独ないし複数の、原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、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場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

共同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することにより効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体には NEDO 技術開発機構が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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、経済産業省及び研究開発責任者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、必要に応じて、技術検討委員会等を活用して、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度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 18 年度から平成 22 年度までの 5 年間とする。

4. 評価に関する事項

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、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年度に、事後評価を平成23年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。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に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発の成果のうち、共通基盤技術に係るものについては、学術論文、公開技術報告書等として取りまとめ、NEDO 技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

② 知的基盤整備及び標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 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、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー業務方法書」第26条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

(2) 国際協調及び国際貢献

研究開発の推進に当たっては、OECD 等における議論を踏まえつつ可能な限り国際的に協調しながら推進するものとし、本研究開発の成果（中間段階の成果を含む）をもって国際的に適宜貢献していくこととする。

(3) 基本計画の変更

NEDO 技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、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、研究開発体制等について基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(4) プロジェクトの根拠法

本プロジェクトは、独立行政法人新エネルギー・産業技術開発機構法第15条第1項第1号ハに基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年3月 制定

(別紙) 研究開発計画

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」

1. 研究開発の必要性

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。本研究開発項目は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の技術を培養細胞に活用し、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。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 発がん性予測試験法の開発

Bhas42 細胞等を用いて、100 物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また施設間評価試験を実施して1ヶ月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法を開発を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECD テストガイドライン（以下、OECD-TG）化に向けた国際提案の原案を作成する。

(2) 催奇形性予測試験法の開発

マウス ES 細胞が心筋、神経、筋・骨格系の各々へ分化する試験手順を開発し、10 物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後 20 物質程度を用いて、催奇形性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験法を開発し、50 物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。更に化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験法を開発する。また OECD-TG 提案に向けた計画を策定する。

(3) 免疫毒性予測試験法の開発

免疫反応（化学物質で受けるストレスに対する生体防御反応）で重要な役割を担う、数種類の細胞（マクロファージ（異物を捕らえリンパ球に信号を出す）、リンパ球（異物

の攻撃をつかさどる)、上皮細胞(化学物質の侵入の入口・免疫反応の場)等)について、免疫毒性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現や産生されるタンパク質との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で免疫毒性を検出する試験法を開発し、30物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。また OECD-TG 提案に向けた計画を策定する。

3. 達成目標

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。

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、安定性等を含めた試験を行い、その有効性を確認するとともに課題を抽出する。

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」

1. 研究開発の必要性

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。

こうした中、短期動物実験から遺伝子発現解析によってラット肝臓の発がん性を予測する手法で著しい進歩が見られており、その応用の拡大も期待されている。

本研究開発項目は、遺伝子発現等の技術を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。

2. 研究開発の具体的内容

ラット腎臓からの RNA 抽出・精製法を開発し、また、腎臓に関する発がん性予測用マイクロアレイを開発する。開発した手法とマイクロアレイを用いて得られた遺伝子発現測定結果を基にして、腎臓における発がん性を予測する手法を開発する。併せて、開発を推進する過程で得られる遺伝子発現情報、毒性学的データを始めとする、文献および公開データベース情報等を含めた、リレーショナルデータベースを構築する。

3. 達成目標

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、試験期間1ヶ月程度で腎臓等における発がん性を精度90%以上で予測する手法を開発し、標準的な試験プロトコルを取りまとめる。

中間目標（平成20年度末）

発がん性化学物質と非発がん性化学物質を用いた短期動物実験を行って、ラット腎臓から RNA を抽出・精製する手法を確立するとともに、遺伝子発現情報の収集・解析を行い、発がん性予測に有効な遺伝子情報を整備する。また、評価システムに必要な DNA マイクロアレイの仕様とそれを用いた試験手法を策定する。

(化学物質総合評価管理プログラム／石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)

「高機能簡易型有害性評価手法の開発」基本計画

バイオテクノロジー・医療技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

(1) 研究開発の目的

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。

(2) 研究開発の目標

中間目標（平成20年度末）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

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）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

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。

(3) 研究開発の内容

上記の目標を達成するために、以下の項目について別紙の研究開発計画に基づき研究開発を実施する。

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」

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」

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、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。）が、単独ないし複数の、原則、本邦の企業、研究組合、公益法人等の研究機関（原則、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場合はこの限りではない。）から公募によって研究開発実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を構築し、委託して実施する。

共同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することにより効率的な研究開発の推進を図る観点から、研究体には NEDO 技術開発機構が委託先決定後に指名する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究者を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施する。

(2) 研究開発の運営管理

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、経済産業省及び研究開発責任者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、必要に応じて、技術検討委員会等を活用して、外部有識者の意見を運営管理に反映させる他、四半期に一回程度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18年度から平成22年度までの5年間とする。

4. 評価に関する事項

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、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年度に、事後評価を平成23年度に実施する。また、中間評価結果を踏まえ必要に応じプロジェクトの加速・縮小・中止等見直しを迅速に行う。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に応じて、前倒しする等、適宜見直すものとする。

5. その他重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

① 共通基盤技術の形成に資する成果の普及

得られた研究開発の成果のうち、共通基盤技術に係るものについては、学術論文、公開技術報告書等として取りまとめ、NEDO 技術開発機構、実施者とも普及に努めるものとする。

② 知的基盤整備及び標準化等との連携

得られた研究開発の成果については、知的基盤整備または標準化との連携を図るため、データベースへのデータの提供、標準情報（TR）制度への提案等を積極的に行う。

③ 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、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー業務方法書」第27条の規定等に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させることとする。

(2) 国際協調及び国際貢献

研究開発の推進に当たっては、OECD 等における議論を踏まえつつ可能な限り国際的に協調しながら推進するものとし、本研究開発の成果（中間段階の成果を含む）をもって国際的に適宜貢献していくこととする。

(3) 基本計画の変更

NEDO 技術開発機構は、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、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、研究開発体制等について基本計画の見直しを弾力的に行うものとする。

(4) プロジェクトの根拠法

本プロジェクトは、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号ハに基づき実施する。

6. 基本計画の改訂履歴

(1) 平成18年3月 制定

(2) 平成19年10月 改訂 「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」評価

分科会の評価結果を踏まえ、「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」プロジェクト関連の内容を改訂

(別紙) 研究開発計画

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」

1. 研究開発の必要性

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。本研究開発項目は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の技術を培養細胞に活用し、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。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 発がん性予測試験法の開発

Bhas42 細胞等を用いて、100 物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また施設間評価試験を実施して1ヶ月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法の開発を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECD テストガイドライン（以下、OECD-TG）化に向けた国際提案の原案を作成する。

(2) 催奇形性予測試験法の開発

マウス ES 細胞が心筋、神経、筋・骨格系の各々へ分化する試験手順を開発し、10 物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後 20 物質程度を用いて、催奇形性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験法を開発し、50 物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。更に化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験法を開発する。また OECD-TG 提案に向けた計画を策定する。

(3) 免疫毒性予測試験法の開発

免疫反応（化学物質で受けるストレスに対する生体防御反応）で重要な役割を担う、数種類の細胞（マクロファージ（異物を捕らえリンパ球に信号を出す）、リンパ球（異物

の攻撃をつかさどる)、上皮細胞(化学物質の侵入の入口・免疫反応の場)等)について、免疫毒性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現や産生されるタンパク質との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1ヶ月以内の試験期間で免疫毒性を検出する試験法を開発し、30物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。また OECD-TG 提案に向けた計画を策定する。

3. 達成目標

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、安定性等を含めた試験を行い、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関連する遺伝子発現データセットの開発」

1. 研究開発の必要性

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。

こうした中、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。

本研究開発項目は、遺伝子発現等の技術を動物に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。

2. 研究開発の具体的内容

28日間反復投与試験の結果が出ている40種類程度の化学物質を用いた短期動物実験を行って、5～10種類の各臓器の遺伝子発現状況をマイクロアレイにより解析する。この解析結果を基に、化学物質の構造別、あるいは臓器等の毒性別などに特有な、遺伝子発現情報データセットを検討する。また、得られたデータについては、順次公開し、政府及び民間等が活用可能な状況とする。

3. 達成目標

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ールを取りまとめる。

P 0 7 0 3 4

P 0 7 0 3 3

P 0 6 0 4 0

P 0 6 0 4 1

(環境安心イノベーションプログラム／化学物質総合評価管理・
エネルギーイノベーションプログラム／化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用・
ナノテク・部材イノベーションプログラム／共通基盤領域)

「化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第2期）」基本計画

環境技術開発部

1. 研究開発の目的・目標・内容

本プロジェクトは、「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の構築を推進する」ことを目的とした環境安心イノベーションプログラム（化学物質総合評価管理）の一環として実施し、「化学物質のリスクの総合的な評価を行いつつ、化学物質のリスクを評価管理するための技術体系を構築するため、化学物質のリスクに係る国民の理解増進の基盤、事業者自らリスクを判断する手段及び国が規制等の施策を講ずる際の手段として、化学物質のライフサイクルにわたるリスクの総合的な評価管理を行うための手法を確立する」という同プログラムの目標を達成しようとするものである。

なお、表2に示す事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」は、「石油・天然ガス等の安定供給確保を目指し、その有効かつクリーンな利用を図る」ことを目的としたエネルギーイノベーションプログラム（化石燃料の安定供給確保と有効かつクリーンな利用）の一環として、また、同じく事業項目「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」は、「情報通信、ライフサイエンス、環境、エネルギーなど、あらゆる分野に対して高度化あるいは不連続な革新（ジャンプアップ）をもたらすナノテクノロジーの実用化や市場化を促進することで、我が国産業の国際競争力の維持・強化や解決困難な社会的課題の克服等を可能とすること」を目的としたナノテク・部材イノベーションプログラム（共通基盤領域）の一環としても位置付けられる。

独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）は、平成12年度から平成18年度にわたり、当時の化学物質総合評価管理プログラムに基づき、表1に示す四つのプロジェクトによって化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第1期）に取り組んだ。その成果は、我が国の化学物質管理政策の科学技術面での基盤となっており、また、経済協力開発機構（OECD）の環境健康安全（EHS）プログラムにおいても注目された。

近年、国連、OECD、欧米等の主要国における化学物質管理政策は、1) 有害性に基づく管理からライフサイクル全般にわたるリスクに基づく管理への移行、2) 有害性情報収集の主体の国から企業への移行、3) 有害性情報の収集における動物実験の3R精神（Replacement：代替、Reduction：削減、Refinement：改善）の尊重、4) ナノテクノロジー産業の発展の基盤としてのリスク評価管理の重視、といった大きな変化の途上にある。特

に、有害性情報の収集については、対象となる化学物質の数が数万にのぼることから、より迅速で安価な手法の開発が要請されており、また、動物実験の3R精神の拡張として、種差等の問題をはらむ動物実験に依存してきた観測科学としての毒性学から、毒性経路（toxicity pathway）に基づく予測毒性学への転換の兆しも見られる。我が国としても、この世界的潮流に対応した新しいリスク評価管理手法の研究開発に取り組む必要がある。

このため、NEDOは、第2期に当たる本プロジェクトにおいて、第1期において達成した研究開発成果、育成された人材、構築されたOECD-EHSプログラムとの協力関係等を活用しながら、表2に示す四つの事業項目によって化学物質リスク評価管理技術体系の構築に取り組む（参考図参照）。本プロジェクトは、研究開発成果として、評価手法、データベース等の知的基盤を提供するものであり、国民経済的には大きな便益がありながらも民間企業の研究開発投資に見合うものが見込めない「公共財の研究開発」であるため、委託事業として実施する。

各事業項目の目的・目標・内容は、別添1から別添4に示すとおりとする。

表1 化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第1期）の概要

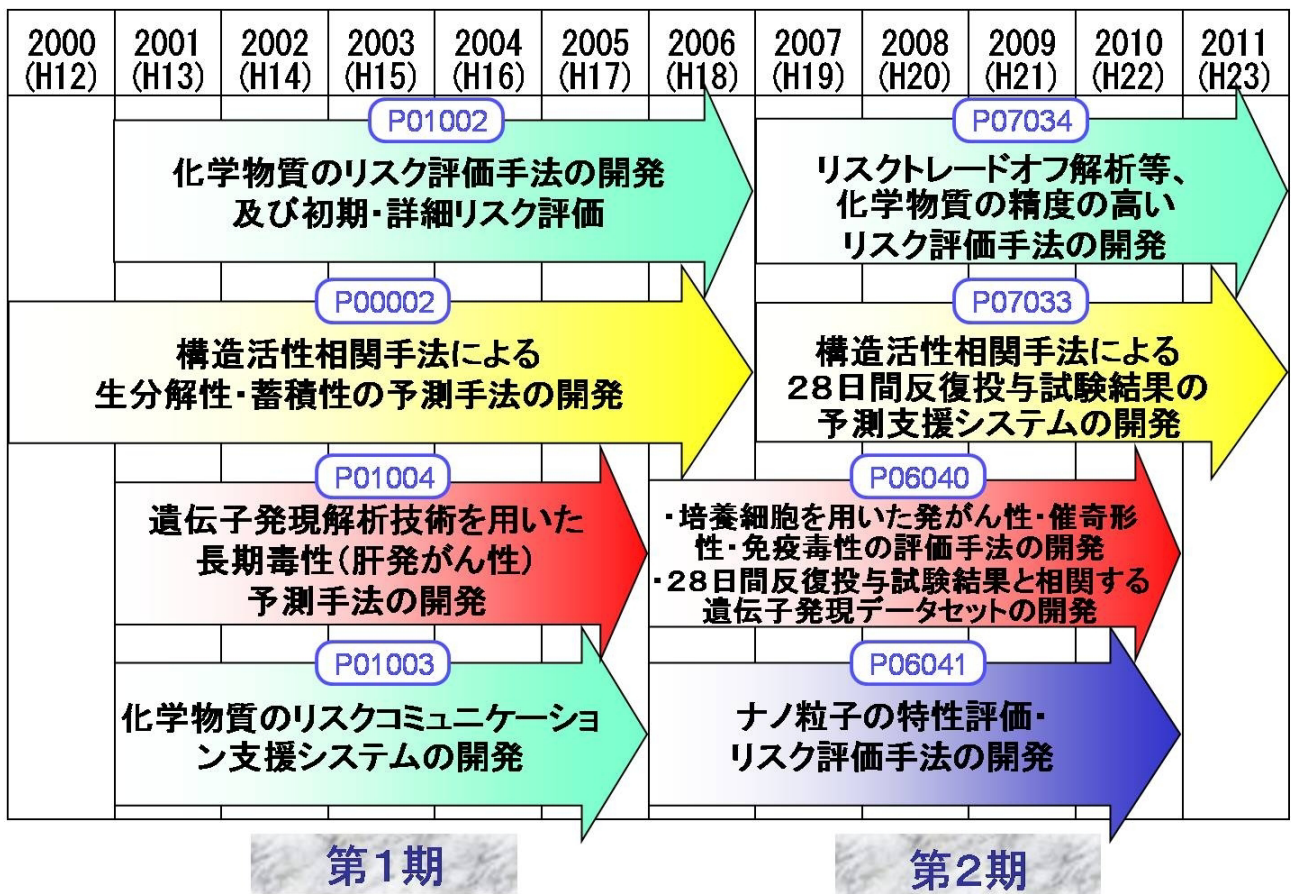
プロジェクト番号	プロジェクト名	実施期間	プロジェクトリーダー
P01002	化学物質のリスク評価及びリスク評価手法の開発	平成13年度～18年度（6年間）	中西準子氏（AIST化学物質リスク管理研究センター長）
P00002	既存化学物質安全性点検事業の加速化	平成12年度～18年度（7年間）	西原力氏（大阪大学大学院特任教授）
P01004	高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発	平成13年度～17年度（5年間）	白井智之氏（名古屋市立大学教授）
P01003	化学物質総合リスク評価管理システムの開発	平成13年度～17年度（5年間）	茂木保一氏（独立行政法人製品評価技術基盤機構理事）

AIST：独立行政法人産業技術総合研究所

表2 化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第2期）の概要

プロジェクト番号	事業項目名	実施期間	プロジェクトリーダー
P07034	化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発	平成19年度～23年度（5年間）	吉田喜久雄氏（AIST安全科学研究部門主幹研究員）
P07033	構造活性相関手法による有害性評価手法開発	平成19年度～23年度（5年間）	林真氏（財団法人食品農医薬品安全性評価センターセンター長）
P06040	高機能簡易型有害性評価手法の開発	平成18年度～22年度（5年間）	田中憲穂氏（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）、渡邊慎哉氏（福島県立医科大学教授）
P06041	ナノ粒子特性評価手法の研究開発	平成18年度～22年度（5年間）	中西準子氏（AIST安全科学研究部門長）

プロジェクトリーダーは、平成22年3月現在のものである。



参考図 化学物質リスク評価管理技術体系の構築

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、NEDOが公募によって実施者を選定後、共同研究契約等を締結する研究体を形成し、委託して実施する。

共同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、各研究体にはNEDOが委嘱する研究開発責任者（プロジェクトリーダー）を置き、その下に研究を可能な限り結集して効率的な研究開発を実施する。平成22年3月現在のプロジェクトリーダーを表2に示す。

(2) 研究開発の運営管理

研究開発全体の管理・執行に責任を有するNEDOは、経済産業省及びプロジェクトリーダーと密接な連携を維持しながら、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、各研究体に設置する開発推進委員会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、四半期に一回程度、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

研究開発の実施期間は、平成18年度から平成23年度までの6年間とする。事業項目の実施期間は、表2に示すとおりとする。

4. 評価に関する事項

NEDO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、将来の産業への波及効果等について、事業項目ごとに、外部有識者による中間評価及び事後評価を実施する。具体的には、事業項目「化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発」について平成21年度及び平成24年度、事業項目「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」について平成21年度及び平成24年度、事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」について平成20年度及び平成23年度、事業項目「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」について平成20年度及び平成23年度、それぞれ中間評価を実施済みであり、及び事後評価を実施する計画である。

なお、事後評価の時期については、当該事業項目に係る技術動向、政策動向や当該プロジェクトの進捗状況等に応じて、前倒しする等、適宜見直す。

5. その他の重要事項

(1) 研究開発成果の取扱い

①成果の知的基盤の普及

本研究開発の成果である評価手法、データベース等の知的基盤について、NEDO、研究開発実施者とも普及に努める。特に、研究開発実施者は、成果の産業面での活用を図るため、本研究開発の終了後に実施すべき取組を立案し、必要な見直しを行い、本研究開発終了後、実行に移す。

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、「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定に基づき、原則として、すべて委託先に帰属させる。

(2) 国際協調・調和及び国際貢献

本研究開発の推進に当たっては、OECDのEHSプログラム等における議論を踏まえて可能な限り国際協調・調和を図り、「持続可能な開発に関する世界首脳会議」

(WSSD、ヨハネスブルグ・サミット)が採択した「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」という国際合意(いわゆるWSSD目標)の達成に本研究開発の成果(中間段階で得られる知見を含む。)をもって貢献していく。

事業項目「化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発」については、OECDの暴露評価プログラムに積極的に参画し、排出シナリオ文書の開発等に貢献する。事業項目「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」については、OECDの「(Q)SAR Application Toolbox」に係る活動に積極的に参画し、当該Toolbox

の整備に貢献する。事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」については、開発した有害性評価手法の国際バリデーションに可能な限り取り組み、OECDテストガイドライン化を目指す。事業項目「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」については、OECDの工業ナノ材料試験スポンサーシップ・プログラムに積極的に協力し、国際標準化機構（ISO）における議論をも踏まえて、可能な限り国際協調・調和を図る。

（3）基本計画の変更

NEDOは、研究開発内容の妥当性を確保するため、社会・経済的状況、内外の研究開発動向、化学物質管理政策の動向、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、研究開発体制等について基本計画の見直しを弾力的に行う。

（4）根拠法

事業項目「化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発」、事業項目「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」及び事業項目「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」は、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2号に基づき実施し、事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」は、同項第1号ハに基づき実施する。

6. 基本計画の改定履歴

平成22年3月、「化学物質の最適管理をめざすリスクトレードオフ解析手法の開発」基本計画、「構造活性相関手法による有害性評価手法開発」基本計画、「高機能簡易型有害性評価手法の開発」基本計画及び「ナノ粒子特性評価手法の研究開発」基本計画を統合して制定。

別添3 事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」の目的・目標・内容

1. 目的

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。

本研究開発は、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。

2. 目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

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ルを取りまとめる。

(2) 中間目標（平成20年度末）

①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

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。

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

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。

3. 内容

上記の目標を達成するため、以下の項目について、別紙の研究開発計画に基づく研究開発を実施する。

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」

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」

備考：旧基本計画の改定履歴

(1) 平成18年3月、制定。

(2) 平成19年10月、改定。

(3) 平成20年7月、イノベーションプログラム基本計画の制定により、「(1) 研究開発の目的」の記載を改定。

(4) 平成22年3月、「化学物質リスク評価管理技術体系の構築（第2期）」基本計画に統合。

別紙 事業項目「高機能簡易型有害性評価手法の開発」研究開発計画

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」

1. 研究開発の必要性

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。

本研究開発項目は、遺伝子導入、幹細胞分化誘導、遺伝子発現等の技術を培養細胞に活用し、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。

2. 研究開発の具体的内容

(1) 発がん性予測試験法の開発

Bhas42 細胞等を用いて、100物質程度の発がん・非発がん物質に対する挙動を明らかにし、また、施設間評価試験を実施して1か月程度の試験期間で発がん性を検出する再現性に優れた試験法を開発を行う。また、発がんに至る過程に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子の働きとの関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで、より短い試験期間で発がん性を検出する細胞を開発する。開発した試験手法については、OECDテストガイドライン（以下「OECD-TG」という。）化に向けた国際提案の原案を作成する。

(2) 催奇形性予測試験法の開発

マウスES細胞が心筋、神経、筋・骨格系のそれぞれへ分化する試験手順を開発し、10物質程度の催奇形性物質を用いて被験物質の投与を含めた試験方法を開発する。その後20物質程度を用いて、催奇形性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1か月以内の試験期間で催奇形性を検出する試験法を開発し、50物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。さらに、化学物質の代謝酵素を共存させて、代謝による被験物質の変化を考慮できる試験法を開発する。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。

(3) 免疫毒性予測試験法の開発

免疫反応（化学物質で受けるストレスに対する生体防御反応）で重要な役割を担う、数種類の細胞（マクロファージ（異物を捕らえリンパ球に信号を出す）、リンパ球（異物の攻撃を司る）、上皮細胞（化学物質の侵入の入口・免疫反応の場）等）について、

免疫毒性に関与している遺伝子を、細胞の変化と遺伝子発現や産生されるタンパク質との関係を時系列的に測定し解析して、同定する。同定した遺伝子に発光する機能を組み込んで1か月以内の試験期間で免疫毒性を検出する試験法を開発し、30物質程度で精度や再現性の確認試験を行う。また、OECD-TG提案に向けた計画を策定する。

3. 達成目標

(1) 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法を開発し、標準的な試験プロトコールを取りまとめる。

(2) 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、安定性等を含めた試験を行い、その有効性を確認するとともに、課題を抽出する。

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」

1. 研究開発の必要性

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。

こうした中、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。

本研究開発項目は、遺伝子発現等の技術を動物に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。

2. 研究開発の具体的内容

28日間反復投与試験の結果が出ている40種類程度の化学物質を用いた短期動物実験を行って、5～10種類の各臓器の遺伝子発現状況をマイクロアレイにより解析する。この解析結果をもとに、化学物質の構造別、臓器等の毒性別などに特有な、遺伝子発現情報データセットを検討する。また、得られたデータについては、順次公開し、政府及び民間等が活用可能な状況とする。

3. 達成目標

(1) 最終目標（平成22年度末）

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ールを取りまとめる。

(2) 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。

技術戦略マップの概要

1. 背景

我が国産業が世界に先駆けてイノベーションを創出しそれが持続的・自律的に達成されるようにするためには、一層明確に出口を意識して、すなわち、事業化を見据えた研究開発・導入シナリオに基づき、戦略分野への重点化を図るとともに、規制改革、標準化等の関連施策と研究開発施策との一体的な取組を一層強化することが必要です（「新産業創造戦略」（2004年5月経済産業省））。

経済産業省では、市場のニーズに応じて、科学に遡った研究開発や異分野の融合、顧客との一体的な垂直統合を進めたり、研究開発プロジェクトに拠点形成・制度改革・省庁間連携・国際標準化をビルトインするなどの施策を展開し、研究開発成果を素早く市場化に繋げる仕組みを構築していこうとしています。これを着実に実現するためには、ナショナル・イノベーション・システムを構成する各主体である政府、産業界、学界等の研究者が政府研究開発投資の判断の基盤となる戦略やシナリオを共有し、関係機関が連携をしながら、研究開発を効果的に展開することが必要となります。そのような観点から当省では（独）新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）等と協力し、産学官の専門家による技術ロードマッピングを研究開発マネジメント・ツールの方法論として取り入れ、その成果物を広く公開し活用いただいています。

2. 目的

技術戦略マップ及びその策定プロセスを通じて、以下の3点を実現することを主な目標としています。

（1）産業技術政策の研究開発マネジメント・ツール整備

主要産業技術分野にかかる技術動向、市場動向等を把握するとともに、国または民間において取り組まれるべき重要度が高いと考えられる技術（重要技術）の絞り込み等を行い、当省が研究開発プロジェクトを企画立案するための政策インフラを整備すること。

（2）産学官における知の共有と総合力の結集

専門化する技術、多様化する市場ニーズ・社会ニーズに対応するため、異分野・異業種の連携、技術の融合、関連施策の一体的実施を促進するとともに、産学官の総合力を結集すること。

（3）国民理解の増進

技術戦略マップを活用して、適時に適切なプロジェクトを立案するとともに

に、実施中のプロジェクトについて不断の検証を行い、当省の研究開発投資の考え方、内容、成果等に関して、国民の理解を増進すること。

3. 構成

技術戦略マップは、(1) 導入シナリオ、(2) 技術マップ、及び(3) 技術ロードマップの3部構成とし、これらを作成するに際しての考え方やポイントを示した要旨及び参考資料を添付した。なお、当然のことながら、策定する分野の特性に応じて、導入シナリオの構成、技術マップの様式、重要技術の考え方等は異なっています。

(1) 導入シナリオ

研究開発とともにその成果を製品、サービス等として社会、国民に提供していくために取り組むべき関連施策を含めて記載しており、次のような目的があります。

- 将来のあるべき社会や革新技术が切り拓く市場を見据え、そこに至るまでの主要な研究開発への取組を体系化することで、将来像・最終目標(National Goal)を明確化した研究開発を立案・遂行する。
- 制度改革・標準化等、イノベーション実現に不可欠な関連施策を整理・明確化し、必要な施策を一体的に位置づける。
- 関係者・関係機関が時間軸上でNational Goalを共有することで、産学官の研究開発の立案・実施を効率化する。

(2) 技術マップ

市場ニーズ・社会ニーズを実現するために必要な技術的課題、要素技術、求められる機能等を俯瞰するとともに、その中で重要技術を選定しており、次のような目的があります。

- 実現すべき技術を俯瞰し体系化することで、目標(イノベーション)実現に必要な技術を俯瞰して整合性・一貫性ある研究開発を推進したり、専門家以外にも理解しやすい技術俯瞰図を提供することによって異分野からの参入障壁を軽減する。
- 構成技術の体系的比較の中で国が行うべき観点から時間展開すべき重要技術(キーテクノロジー)を提示する。

(3) 技術ロードマップ

研究開発への取り組みによる要素技術、求められる機能等の進展の道筋を時間軸上にマイルストーンとして記載しており、次のような目的があります。

- 研究開発の中で達成すべき技術的目標を時間軸上で明確化することで、研究開発の進捗状況の評価を容易にしたり、同時並行で展開される関連技術・競合技術開発との整合性をチェックできるようにする。
- 産学官の全ての関係者が研究開発の設定目標・道筋を共有することで、各々の研究開発の位置づけや相互関係を理解しやすくするとともに、異分野からの参入による連携・融合を容易にする。

<<技術戦略マップの構成>>

(1) 導入シナリオ

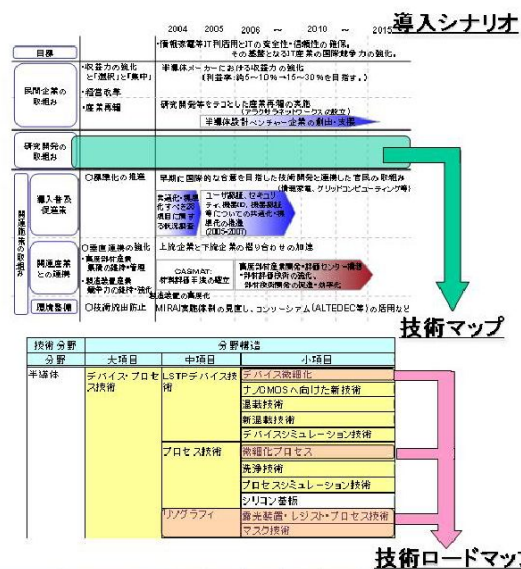
研究開発成果が製品、サービス等として社会、国民に提供されていく道筋と、そのために取り組むべき関連施策を記載したもの。

(2) 技術マップ

技術の体系図。技術的課題、要素技術を俯瞰するとともに、その中で重要技術を選定して記載したもの。

(3) 技術ロードマップ

研究開発への取り組みによる要素技術・求められる機能等の向上・進展を時間軸上にマイルストーンとして記載したもの。



技術分野	分野構造		ロードマップ											
	大項目	中項目	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014		
半導体	デバイス・プロセス技術	LSI/デバイス技術	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
		LSI/デバイス技術	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
	プロセス技術	半導体製造技術	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
		半導体製造技術	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100		
リソグラフィ	リソグラフィ	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100			

4. 対象領域

「技術戦略マップ2010」で対象とした技術は、以下の8領域・31分野です。

(英語表記)

【1. 情報通信】 (1) 半導体 (2) ストレージ・メモリ (3) コンピュータ (4) ネットワーク (5) ユーザビリティ (6) ソフトウェア	Information and Communications Semi-conductors Storage and non-volatile memory Computers Networks Usability Software
【2. ナノテクノロジー・部材】 (7) ナノテクノロジー (8) 部材 (9) ファイバー (10) グリーン・サステイナブルケミストリー	Nanotechnology and Components Nanotechnology Materials and components Fiber technology Green sustainable chemistry
【3. システム・新製造】 (11) ロボット (12) MEMS (13) 設計・製造・加工 (14) 航空機 (15) 宇宙	Integrated System and New-Manufacturing Robots Micro-electro mechanical system Design and production Aircrafts Space
【4. バイオテクノロジー】 (16) 創薬・診断 (17) 医療機器 (18) 再生医療 (19) 生物機能活用技術	Biotechnology Drug discovery Diagnostic and treatment equipment Regenerative medicine Industrial bio
【5. 環境】 (20) CO ₂ 固定化・有効利用 (21) 脱フロン対策 (22) 3R (23) 化学物質総合評価管理	Environment CO ₂ capture and storage Reduction of fluorocarbon and development of fluorocarbon substitutes Reduce, reuse and recycle Comprehensive control of chemical substances
【6. エネルギー】 (24) エネルギー (25) 超電導技術 (26) 二次電池 ^{※1}	Energy Energy Superconducting technology Secondary battery
【7. ソフト】 (27) 人間生活技術 (28) サービス工学 (29) コンテンツ	Soft Power Human life technology Services Contents
【8. 融合戦略領域】 (30) 持続可能なものづくり技術 (31) 計量・計測システム	Strategic Crossover Sustainable monodzukuri technology Metrology and measurement system

(※1) 技術戦略マップ2010から新たに追加した分野

各分野は、それぞれの技術領域に対応した政策目的に沿った技術の俯瞰や重点技術の絞り込みを行っています。そのため、同様の要素技術が、複数の技術分野のマップの中に重複して記載されているものもあります。これらは、異なる政策的目的から位置づけられていますので、重要技術の絞り込みの観点からは、必ずしも相互に整合性がとられてはいない場合もあります。分野特性や政策的な位置づけに応じた自由な議論や新たな可能性の模索を奨励するため、「技術戦略マップ」ではこのような分野間の重要技術に関する扱いや考え方の違いを許容しています。

5. 策定プロセス

原則として、各分野の冒頭文章及び導入シナリオは経済産業省、NEDO等で作成し、技術マップ及び技術ロードマップについては、例年と同様、分野毎にNEDO等に設置したタスクフォース²等において検討を行い、作成しました。検討に当たっては、タスクフォースに大学、企業（製品、部品、材料、装置メーカー等）、経済産業省（各分野を所管する担当局・担当課及び産業技術環境局）、NEDO、産総研等が参画し、産学官の知見を結集しました。

また、技術戦略マップの全体的な方針については、産業構造審議会産業技術分科会研究開発小委員会³の委員から助言を得ています。

6. ローリング（改訂）

技術戦略マップには、①成果物としてのマップに含まれる技術情報のみならず、②マップ策定のプロセスから得られる政策当局と産業界、学協会とのコミュニケーション・ツールとしての意義があります。①の観点からは、技術は日々進歩しておりマップの内容が陳腐化することのないようなフォローアップが必要であり、また②の観点からは構築された人的ネットワークを活用してコミュニケーションを継続的に維持することが重要となります。

このようなローリングの重要性を踏まえて、2005年3月に第1版として「技術戦略マップ2005」を策定・公表して以来、毎年「技術戦略マップ」を改訂・公表してきました。経済産業省においては、研究開発マネジメントの政策インフラとして、「技術戦略マップ」を当省の研究開発の企画立案、資源配分、評価等の各プロセスで適切に活用していくローリングサイクルを定着させることとしています。

「技術戦略マップ2010」を策定するにあたっては、基本方針として、①技術の進展や社会環境の変化に応じた各分野の改訂及び拡充、②導入シナリオの充

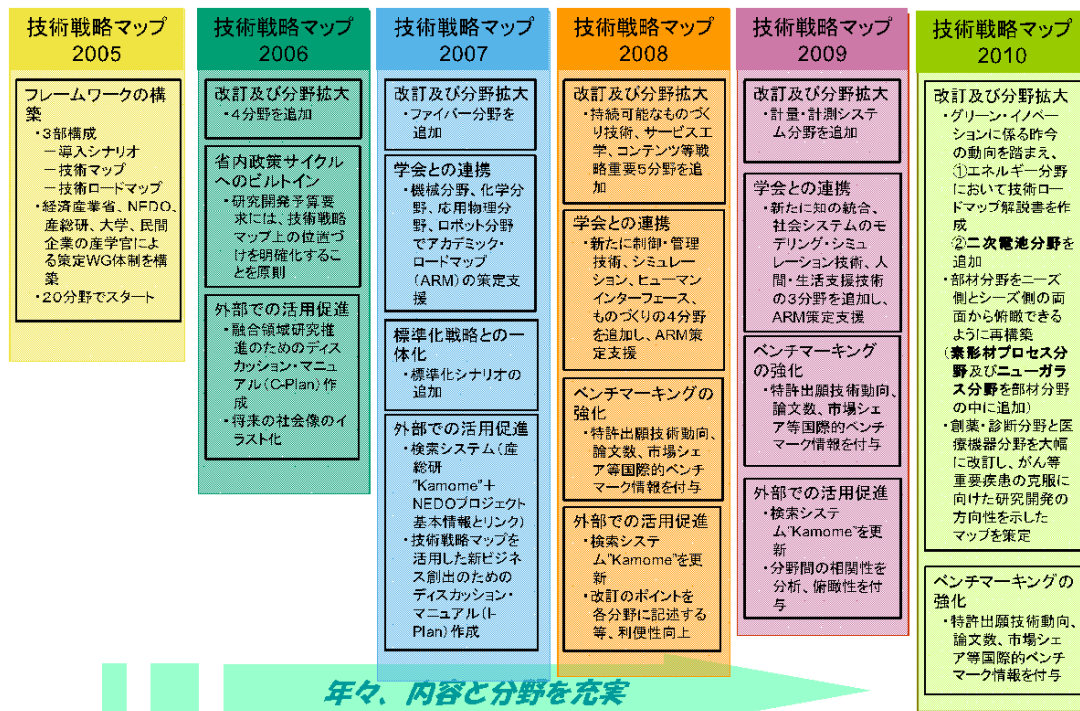
² タスクフォースのメンバーリストは巻末に添付

³ 研究開発小委員会委員名簿は巻末に添付

実、③エネルギー分野の再構築、④部材分野の再構築に向けた検討、⑤アカデミアからの提言への対応、⑥ベンチマーキング及び標準化戦略の一層の推進の6つを掲げ、ローリングを行いました。

また、各方面からの意見も踏まえ、編集に当たっては関連領域ごとに分冊化するとともに、可読性を十分に確保するように配慮しました。

<<技術戦略マップの変遷>>



化学物質総合評価管理分野

現在、世界中で数万種類を超える化学物質が製造され、幅広い産業で様々な用途に使用されて、快適な生活の実現に大きく貢献している。

しかしながら、それぞれの化学物質には固有の性質として何らかの有害性（ハザード）があり、人や生物が空気、水、食物等を通してこれにさらされると（暴露）、悪影響を及ぼす可能性（リスク）がある。化学物質の有用性をいかすためには、化学物質のリスクを適切に管理していく必要がある。

化学物質のリスク管理には、リスクの科学的な評価技術と削減技術が必要である。本分野は二つの技術体系に分けられる。一つは「化学物質リスク評価・管理技術開発」で、数万に及ぶ化学物質のリスクを正確に把握し、必要な対策を適時適切に行うため、有害性（分解性、蓄積性等を含む）、暴露、リスク等の各種評価手法の開発と基盤情報の収集を行うことである。もう一つは、「化学物質リスク削減技術開発」であり、化学物質の製造・利用に伴う環境負荷の低減、省資源及び省エネルギーを図るため、製造工程において有害化学物質を使用しない、使用量を削減する、又は使用による排出を削減する等のプロセスを開発することである。

化学物質総合評価管理分野の研究開発では、化学物質のリスクに係る国民の理解増進のための基盤、事業者が自らリスクを判断する手段及び国が規制等の施策を講ずる際の手段として、化学物質のライフサイクルにわたるリスクの総合的な評価管理を行うための手法を確立するとともに、リスクの削減に資するプロセス、手法の開発、さらには知的基盤を整備する。

これにより、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を構築する。

化学物質総合評価管理分野の技術戦略マップ

I. 導入シナリオ

(1) 化学物質総合評価管理分野の目標と将来実現する社会像

経済産業活動を環境と調和させ安全・安心な国民生活を実現するために、以下のことを目標とする。【添付資料1：化学物質総合評価管理の背景と目指す社会像】

・行政、企業等による化学物質の科学的なリスク評価とその評価結果を踏まえた化学物質の使用

・行政、企業、国民等間のリスクコミュニケーションを通じた化学物質管理についての理解促進

・化学物質の排出削減が進むことによる、環境負荷の低減への寄与、国民の健康の保護と生活環境の保全

・日本の産業の国際競争力の強化

これらの目標を達成するためには、研究開発のみならず、実用化するための導入普及促進策、標準化等の関連施策を一体的に推進する必要がある。

(2) 研究開発の取組

2002年の「持続可能な開発に関する世界首脳会議（WSSD）」において、ヨハネスブルグ宣言と共に採択された実施計画の第22項では、「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。我が国としても、まずはWSSD目標の達成のため、SAICMを参照しつつ、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。

リスク評価については、有害性や暴露量の情報がある物質はリスク評価が可能である一方、異なる物質間におけるリスク比較が困難なために、有害性等のデータが少ない物質への安易な転換が行われる例も出てきている。この状況を解消するために、不足するデータを類推し、リスクを比較する手法の開発が必要とされている。また、リスク評価を実施する上で必要となる有害性評価についても、膨大な数の化学物質について信頼に足るデータが不足しているが、すべての物質に時間と費用をかけ動物実験による有害性評価を行うのは現実的でない。そのため、動物試験によらない、遺伝子組換え技術や遺伝子発現解析技術を活用した有害性評価手法、化学物質の構造情報等から計算機を用いて有害性を予測評価する手法等の開発が求められている。さらに、科学的に未解明なゆえに有害性の不安が

生じている工業用ナノ粒子について、リスク評価技術を開発し、リスク管理を行う体制を整備する必要がある。これらは、比較的緊急性の高い課題である。より長期的な視点に立てば、種差や個人差、複合暴露の影響を定量的に評価できる高精度な有害性評価技術や毒性経路やメカニズムに基づく有害性予測技術、実環境中でのモニタリングとそれをフィードバックして高精度化した暴露推定モデルが必要とされる。

一方、化学物質のリスクを管理する一つの方法として不可欠なのが、化学物質のリスクを削減する技術であり、工場から最終的に排出される段階での回収・分解、有害性の高い物質を用いないプロセスへの転換、又はよりリスクの低い物質への代替転換といったものがある。また、過去に環境中に排出された化学物質の回収・無害化といった技術もリスク削減技術として位置付けられている。短期的には、排気施設や排水施設等の最終段階で有害性の高い物質を回収、分解する技術や土壌等の環境中に存在する有害化学物質を効率的かつ安価に処理する技術の開発が求められ、より長期的には、製造・使用段階においてリスクの少ない化学物質への代替化技術が中心となっていくべきと考えられる。さらに、リスク評価・管理に係る手法の確立とともに、リスク削減技術の先駆的な開発をもって産業の競争力向上に資するものとする。【添付資料 2：化学物質総合評価管理技術の考え方】

(3) 関連施策の取組

〔導入補助・支援〕

- ・化学物質の有害性評価、暴露分析、リスク評価等のデータベースの構築を図る。
- ・化学物質の有害性評価、暴露分析、リスク評価等の手法の各種活動（事業者の自主管理活動、事業者、地方自治体等が国民とリスクコミュニケーションを図る活動等）等への導入を図る。
- ・公害防止設備に対する優遇税制等の支援を行う。

〔基準・標準化〕

- ・各プロジェクトで得られた成果のうち、標準化すべきものについては、適切な標準化活動（経済協力開発機構（OECD）、国際規格（ISO/IEC）、日本工業規格（JIS）、その他国際的に認知された標準の提案等）を実施する。
- ・具体的には、高機能簡易型有害性評価手法の開発について、開発された簡易有害性評価手法を OECD にテストガイドラインとして提案し、国際標準化を推進している。

〔知的基盤整備〕

- ・独立行政法人製品評価技術基盤機構の化学物質管理センターにて事業者・国民・公的機関の化学物質管理に関する冷静な対話（科学的知見の共有）を促進するための知的情報基盤整備を図る。

(4) 民間での取組

民間企業の取組としては、有害化学物質の排出によるリスクを低減するため、化学物質関係法令の遵守にとどまらず、化学物質の自主的な管理を推進する。具体的には、化学物

質審査規制法（化審法）及び化学物質排出把握管理促進法（化管法）に対して適切な対応がなされており、また、2010年までにVOC排出削減に対しての自主的な取組が推進されている。さらに、必要な研究開発を通じて、有害化学物質の自主的な管理を高度化していく。【参考資料1：化学物質総合管理関係法令】

（5）改訂のポイント

➤ 導入シナリオの修正

化学物質総合評価管理に関する国内外の動きをより詳細に示すとともに、リスク評価管理とリスク削減の共通基盤、ほかの技術戦略マップとの関係等について簡潔にまとめた。

➤ 添付資料1「化学物質総合評価管理の背景と目指す社会像」の修正

化学物質総合評価管理の背景と目指す社会像を明確に示すため、技術戦略マップ2009の添付資料をより分かりやすく修正した。

Ⅱ. 技術マップ

（1）技術マップ

（A）化学物質リスク評価・管理技術開発

化学物質リスク評価・管理技術が目的指向型であり、問題解決のために有害性評価、暴露評価等の個々の技術を組み合わせていくものであることを踏まえ、リスクの解決すべき課題や評価・管理する対象を明らかにし、これらに基づいて、「リスク管理のあり方のフレームワーク（方針と選択方法）の提示」、「リスク管理のあり方のより具体的な提示」、「現象の解析・分析技術」に大分類した。

また、行政や企業の直面するリスク評価・管理の課題（ニーズ）と、それを解決する技術（シーズ）を調査により抽出し、技術課題を整理した。

（B）化学物質リスク削減技術開発

まず、技術が役立つ場を「産業」、「広域」、「生活」に分類し、それぞれに影響を及ぼす環境を「大気」、「水域」、「土壌」、「廃棄物」と分類した。次に、それぞれについて削減すべき化学物質を抽出し物質群としてまとめ、「プロセス転換技術」、「分解技術」、「原料転換技術」等の技術分類を行い、その削減に有効な技術開発課題を整理した。

（2）重要技術の考え方

化学物質リスク評価・管理技術に関する委員会と化学物質リスク削減技術に関する委員会において重要技術の考え方を整理し、それぞれの分野に応じた評価指標を抽出し、それに基づいて重要技術課題の選定を行った。化学物質リスク評価・管理技術開発は、重要技術課題を◎で示し、化学物質リスク削減技術開発は、重要技術と一般技術に分けて記載した。

（A）化学物質リスク評価・管理技術開発

重要技術の選定に当たっては、次の四つの評価指標を設定し、それぞれの指標を3段階で評価した。

- ① ニーズ（必要性）
 - a. 社会の安全・安心、適正管理の実現
 - b. 産業競争力強化
- ② シーズ（技術の波及効果）
- ③ 国際競争力（世界トップレベルにあり、今後伸ばしていくべき技術）

上記の①～③の評価指標に基づく評価の結果、特に上位の技術を◎、上位の技術を○で示した。

(B) 化学物質リスク削減技術開発

重要技術の選定に当たっては、次の三つの評価指標を設定し、それぞれ3段階で評価した。

- ① リスク削減効果
 - a. ハザードや排出削減量から見たリスク削減ポテンシャル
 - b. コスト

② 産業競争力強化

上記の指標のうち①の指標については a、b の二つの指標に分けられ、そのうちどちらかが◎評価を得られたもの、又は両方○以上の評価を得られたものであって、かつ②の指標についても○以上の評価を満たすものについて重要技術として選定した。

(3) 改訂のポイント

➤ 2つの技術開発について、以下のように改訂した。

(A) 化学物質リスク評価・管理技術開発

化審法の改正（2009年）に伴い、最近の社会、政策的なニーズから技術課題を抽出した。また、米国で提唱された toxicity pathway に基づく毒性評価等、これまでのリスク評価を抜本的に変える可能性のあるシーズからも技術課題を抽出した。さらに、リスク評価管理の対象と技術の体系や、各技術の重要度が総覧できる技術マップを構築した。

また、分類の見直しを行うとともに、補足欄には技術の説明を記載した。【参考資料 2-1～2-4】

(B) 化学物質リスク削減技術開発

土壌汚染対策法の改正を受けて土壌分野の技術シーズを新たに抽出した。

Ⅲ. 技術ロードマップ

(1) 技術ロードマップ

(A) 化学物質リスク評価・管理技術開発

2010年頃までを化学物質管理の第2世代と位置付け、化学物質管理関係法令等による規制と企業の自主管理のベストミックスの下、物質ごとにリスクを減らすことを目標にし、開発すべき概略の時期を示した。その後2020年頃までを化学物質管理の第3世

代と位置付け、複数物質間のリスクとベネフィットとのバランスを考慮し、リスクコミュニケーションを通じてリスクと向き合う社会を構築することを目標にし、開発すべき概略の時期を示した。将来的には、化学物質のリスクとそれ以外のリスク（地球温暖化等）を比較したり、感受性の個人差や多様なライフスタイルにも留意したりして、科学的知見に基づく高度な技術により、全体としてのリスクを低減させるような管理（化学物質管理の第4世代）を目指すべきである。

技術分類の大分類ごとに 2030 年までの開発時期を概観したロードマップと、重要技術課題と技術課題のつながりを分かりやすく示した詳細ロードマップを作成した。さらに、社会的関心の観点から四つ（①長距離輸送による汚染、②ストック汚染・複合汚染、③シックハウス症候群・化学物質過敏症、④ナノ材料の安全性）のロードマップを作成した。

(B) 化学物質リスク削減技術開発

国際競争力のある技術で化学物質によるリスクを抑えて快適な生活を実現するために、2010 年の VOC 排出量を 2000 年比で 30%削減することや、2020 年に WSSD 目標である化学物質の人への健康と環境にもたらす影響を最小化にするための技術目標を示すとともに、さらに長期的な視点に立ち 2030 年までリスク削減をするための技術開発をロードマップ上に展開した。また、削減対象物質の存在領域及び主な削減技術を示すため、俯瞰図を作成した。【参考資料 3：リスク削減対象物質群と代表的削減技術の俯瞰図】

(2) 改訂のポイント

➤ 2 つの技術開発について、以下のように改訂した。

(A) 化学物質リスク評価・管理技術開発

社会的関心の観点から、ロードマップ及び詳細ロードマップを大幅に修正した。

(B) 化学物質リスク削減技術開発

技術戦略マップ 2009 の参考資料 6 を一部修正した。【参考資料 3：リスク削減対象物質群と代表的削減技術の俯瞰図】また、削減技術が多様かつ重要技術の割合が高い物質群のうち「微小粒子物質」、「VOC（大気）」、「VOC（有機塩素系化合物、ベンゼン等）（土壌）」、「重金属類」の 4 物質群について、発生源や削減技術内容等に関する参考資料を作成した。【参考資料 4-1～4-4】

IV. その他の改訂のポイント

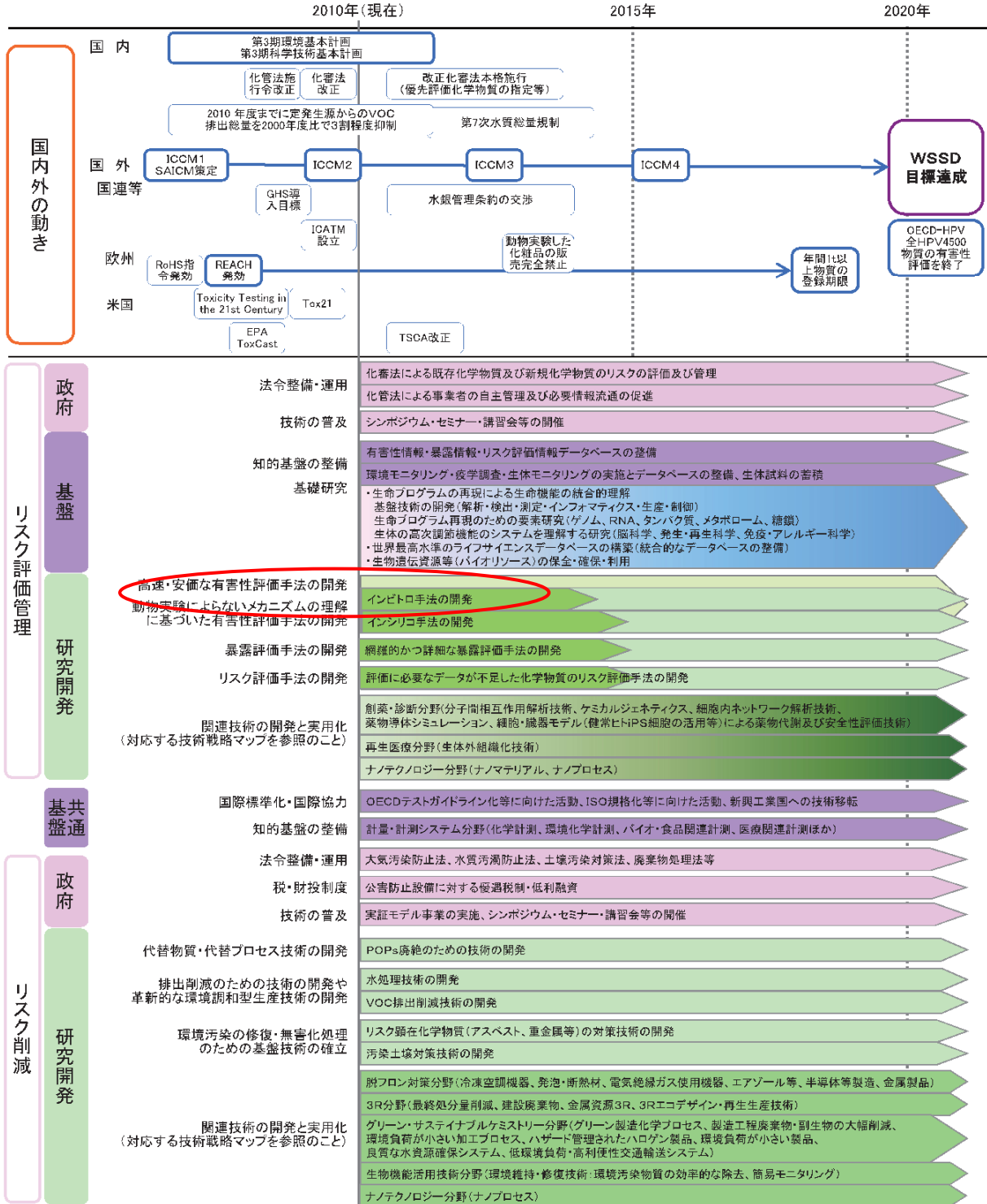
○国際競争ポジション（ベンチマーキング）

➤ 技術戦略マップ 2009 のデータを更新した。【化学物質総合評価管理分野の国際競争ポジション】

化学物質総合評価管理分野の導入シナリオ

目標

- 行政、企業等による化学物質の科学的なリスク評価とその評価結果を踏まえた化学物質の使用
- 行政、企業、国民等間のリスクコミュニケーションを通じた化学物質管理についての理解促進
- 化学物質の排出削減が進むことによる、環境負荷の低減への寄与、国民の健康の保護と生活環境の保全
- 日本の産業の国際競争力の強化



化学物質総合評価管理分野の技術マップ(1/36)

リスク評価管理(1/18)

リスク評価管理の技術が目的指向型であり、問題解決のために有害性評価や暴露評価等の個々の技術を組合せていくものであることを踏まえ、リスクの解決すべき課題や評価管理する対象を明らかにし、これらに基づいた分類を体系化した。

化学物質総合評価管理分野の技術マップ(8/36)

リスク評価管理(8/18)

分類	技術課題が「リスク管理、リスク評価、暴露評価、有害性評価」のどれに該当するか。	No	技術課題	補足	技術課題の評価結果	
大分類	中分類	小分類	細分類			
(3) 現象の解析・分析技術(有害性や暴露に関する解析・分析技術)	物質の挙動の解析・分析技術	生体外環境での運命	リスク管理 暴露評価 モニタリング	52 自然エネルギーを用いた常時環境モニタリング技術	結晶性エネルギー(化石エネルギー)ではなく自然エネルギーを使って、持続的に連続して環境モニタリングを行う技術。	<p>技術課題の評価は、次の観点から行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ニーズ(社会の安全安心と適正管理の実現からのニーズ、産業競争力からのニーズ) ・シーズ(技術の波及効果) <p>また、日本の技術が世界で優位であり、今後日本で伸ばしていくべき技術であるかについても考慮した。</p>
			53 リモートセンシングを用いた環境モニタリング技術	広範囲・リアルタイムの環境モニタリングを可能とするため、リモートセンシングを活用するもの。		
			54 分解や反応生成(生体中を含む)を考慮した環境中運命モデル	大気では、揮発性有機化合物、窒素化合物、オゾナル等が分解や光化学反応を起こし、イオンや二次粒子を生成している。また、金属も反応し、態が変化している。水域では、金属の存在形態(懸濁態、溶解態、有機懸濁態等)がイオン等の影響により変化している。		
			55 分解性・持続性のQSAR(新薬物質の試験結果活用等による適用性拡大)	これまで開発してきた分解性・持続性のQSARの適用範囲を広げたり、精度を上げたりしたため、新薬物質の試験結果等を活用していくもの。		
			56 高毒性のin vitro試験法	毒性を魚類等の生体を使わず、魚類細胞等を使って試験するもの。		
			57 未知の形態に反応	人が食物、飲料水、呼吸、皮膚等を通して、化学物質を摂取する量の算定。		
			58 ミクロ(分子レベル)からマクロ(生体)までのメカニズムを反映した「連」のリスク評価体系	分子生物学、遺伝子解析、計算機科学等の進展を基盤として、毒理学の「多量の科学」への発展を促したリスク評価の新しい視座。		
			59 網羅的解析技術を用いた暴露のバイオマーカーの探索手法	分子から生体までのメカニズムを反映したリスク評価体系では、暴露のモニタリングとして、環境中濃度だけでなく、体内の組織や細胞での濃度のミクロの現象も把握していく必要がある。そのためのバイオマーカーが必要となる。		
			60 がん・生殖系の暴露検出のためのバイオマーカー迅速検出センサー(再掲)	バイオマーカーとしては、環境経路の暴露が低用量であり、また複数物質によるものなので、高感度かつ物質特異性の高いマーカーが必要となる。		
			61 試験戦略(試験バックグランドや改良的試験)	各試験法は、そのメリット・デメリットを踏まえ、試験目的等に応じて、複数の方法を組合せて判断していくことが重要である。例えば、in vitro試験はフォールス・ポジティブが多くなる傾向があるが、これを補うには、複数のin vitro試験で判定することが有効である。		
62 in silico(人体モデル化)	in silico(分子・細胞-組織-全身を全てつないだモデル)	ミクロ(分子)からマクロ(生体)までの階層構造における暴露を表現したモデル。下の技術課題「詳細なPBTK/TDモデル」を統合したもの(現状では、細胞、組織、臓器等の各レベルで、別々に研究がされている)。				
63 詳細なPBTK/TDモデル(細胞応答、臓器応答、組織応答のシミュレーション)	PBTK(physiologically-based toxicokinetics)モデルは、物質の体内での動態(吸収・分配・代謝・排泄)とその結果としての標的組織での濃度変化を表現するモデル。PBTK/TD(PBTK/toxicodynamics)モデルは、PBTKに加え、細胞、組織、臓器等での暴露を表現したモデル。					
64 包括的なPBTK/TDモデル(in vitro等の試験結果を適用して改良)	モデルに個人差を反映し、不確実性を低減させるため、in vitro試験や動物実験に基づき、TKとTDに分布を持たせる等するもの。					

化学物質総合評価管理分野の技術マップ(9/36)

リスク評価管理(9/18)

分類	技術課題が「リスク管理、リスク評価、暴露評価、有害性評価」のどれに該当するか。	No	技術課題	補足	技術課題の評価結果	
大分類	中分類	小分類	細分類			
(3) 現象の解析・分析技術(有害性や暴露に関する解析・分析技術)	物質の挙動の解析・分析技術	人:生体内環境での運命 人:応答	リスク管理 暴露評価 有害性評価	59 網羅的解析技術を用いた暴露のバイオマーカーの探索手法	分子から生体までのメカニズムを反映したリスク評価体系では、暴露のモニタリングとして、環境中濃度だけでなく、体内の組織や細胞での濃度のミクロの現象も把握していく必要がある。そのためのバイオマーカーが必要となる。	<p>技術課題の評価は、次の観点から行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ニーズ(社会の安全安心と適正管理の実現からのニーズ、産業競争力からのニーズ) ・シーズ(技術の波及効果) <p>また、日本の技術が世界で優位であり、今後日本で伸ばしていくべき技術であるかについても考慮した。</p>
			60 がん・生殖系の暴露検出のためのバイオマーカー迅速検出センサー(再掲)	バイオマーカーとしては、環境経路の暴露が低用量であり、また複数物質によるものなので、高感度かつ物質特異性の高いマーカーが必要となる。		
			61 試験戦略(試験バックグランドや改良的試験)	各試験法は、そのメリット・デメリットを踏まえ、試験目的等に応じて、複数の方法を組合せて判断していくことが重要である。例えば、in vitro試験はフォールス・ポジティブが多くなる傾向があるが、これを補うには、複数のin vitro試験で判定することが有効である。		
			62 in silico(人体モデル化)	in silico(分子・細胞-組織-全身を全てつないだモデル)	ミクロ(分子)からマクロ(生体)までの階層構造における暴露を表現したモデル。下の技術課題「詳細なPBTK/TDモデル」を統合したもの(現状では、細胞、組織、臓器等の各レベルで、別々に研究がされている)。	
			63 詳細なPBTK/TDモデル(細胞応答、臓器応答、組織応答のシミュレーション)	PBTK(physiologically-based toxicokinetics)モデルは、物質の体内での動態(吸収・分配・代謝・排泄)とその結果としての標的組織での濃度変化を表現するモデル。PBTK/TD(PBTK/toxicodynamics)モデルは、PBTKに加え、細胞、組織、臓器等での暴露を表現したモデル。		
			64 包括的なPBTK/TDモデル(in vitro等の試験結果を適用して改良)	モデルに個人差を反映し、不確実性を低減させるため、in vitro試験や動物実験に基づき、TKとTDに分布を持たせる等するもの。		

分類	大分類	中分類	小分類	細分類	技術課題が「リスク管理、リスク評価、暴露評価、有害性評価」のどれに該当するか。	No.	技術課題	補足	技術課題の評価結果
<p>(3) 現象の解析・分析技術(有害性や毒害に関する解析・分析技術)</p>	物質の暴露の解析・分析技術			人、皮膚	<p>リスク管理</p> <p>リスク評価</p> <p>暴露評価</p> <p>有害性評価</p>	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へたんぱく質へ代謝産物の網羅的解析の統合的解析	網羅的解析には、ゲノミクス(化学物質曝露後の遺伝子の発現量をmRNAにより解析)、プロテオミクス(1H/2D NMRに基づいて作られるたんぱく質の発現量を解析)、メタボロミクス(代謝によって作られる物質の発現量を解析)等がある。生物システム複雑性(非線形性、シグナルのネットワーク)を扱おうとするとき(システムバイオロジーの知見)、遺伝子発現動態だけでは不十分である。すなわち、遺伝子発現動態は、化学物質投与への生体応答の指標としては高感度であるが、毒性発現のメカニズムの把握には十分ではない。このため、タンパク質レベルでの変化(受容体の活性化等)や表現型の変化(毒性前後の発現)まで追っていく、生命現象全体を把握する必要がある。そして、複数の網羅的解析技術から得られる情報を統合していくもの。例えば、ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスの情報を統合する。また、遺伝子やたんぱく質間の相互作用も分析(インタラクトーム等)していく。さらに、遺伝子発現動態も含めたin vivo試験の情報も合わせていく。	○
						81	網羅的解析技術を用いた種差による感受性差の評価手法	種間外挿の精度向上のため、網羅的解析により、オーソロガス(異なる種で同じ機能を果たしている)の遺伝子やたんぱく質を特定し、これをもとに外挿していくもの。	◎
						82	網羅的解析技術を用いた個人による感受性差の評価手法	遺伝子などが感受性の差に影響するメカニズムは特定である。これを解明するため、遺伝子による効果、年齢や性別による影響、遺伝子間の相互影響等について、把握していくもの。また、遺伝子だけでなくエピジェネティックな要因も感受性差に影響するので、双方の情報を統合していくことが必要。以上のような技術開発を可能とするには、通常の試験動物よりも多様性の高いサンプルが必要である。このため、多様性のある(多様性の安定している)試験動物を使ったり、疫学に網羅的解析を組み込んでいくことが有益。	○
						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	毒性発現のメカニズムの解明のため、また有害性のスクリーニングのため、網羅的解析により、毒性を早期に警告マーカーを探索するもの。網羅的解析では、発現はわからないもののtrueだけでなくfalseのエンドポイントも多数検出してしまいが、事後バイオマーカーとしてのバリデーションが進展すれば、短期間でtrueのエンドポイントを導出できる可能性がある。以上のようなマーカーを探索するには、毒性試験で、網羅的解析も行っていく必要がある。エンドポイントとしては、例えば、反復投与毒性、発癌毒性、免疫毒性、発がん性等で研究されている。	◎
						84	生態系の暴露評価手法	生態系を構成する代表的生物について暴露量を評価するもの。そのために、様々な種数や個体単位等が必要。	
	生態系、生体外から生体内環境への移行				<p>リスク管理</p> <p>リスク評価</p> <p>暴露評価</p> <p>有害性評価</p>	85	生態系食物網動態解析手法	生物は、食物連鎖に沿ってより高次の生物に捕食され、その過程で、体内での化学物質濃度が高くなっていくことがある。また、生物によっては、物質の代謝酵素が欠けており蓄積しやすいことがある。以上のような食物網の構造とそれを通じた濃縮をモデル化するもの。	

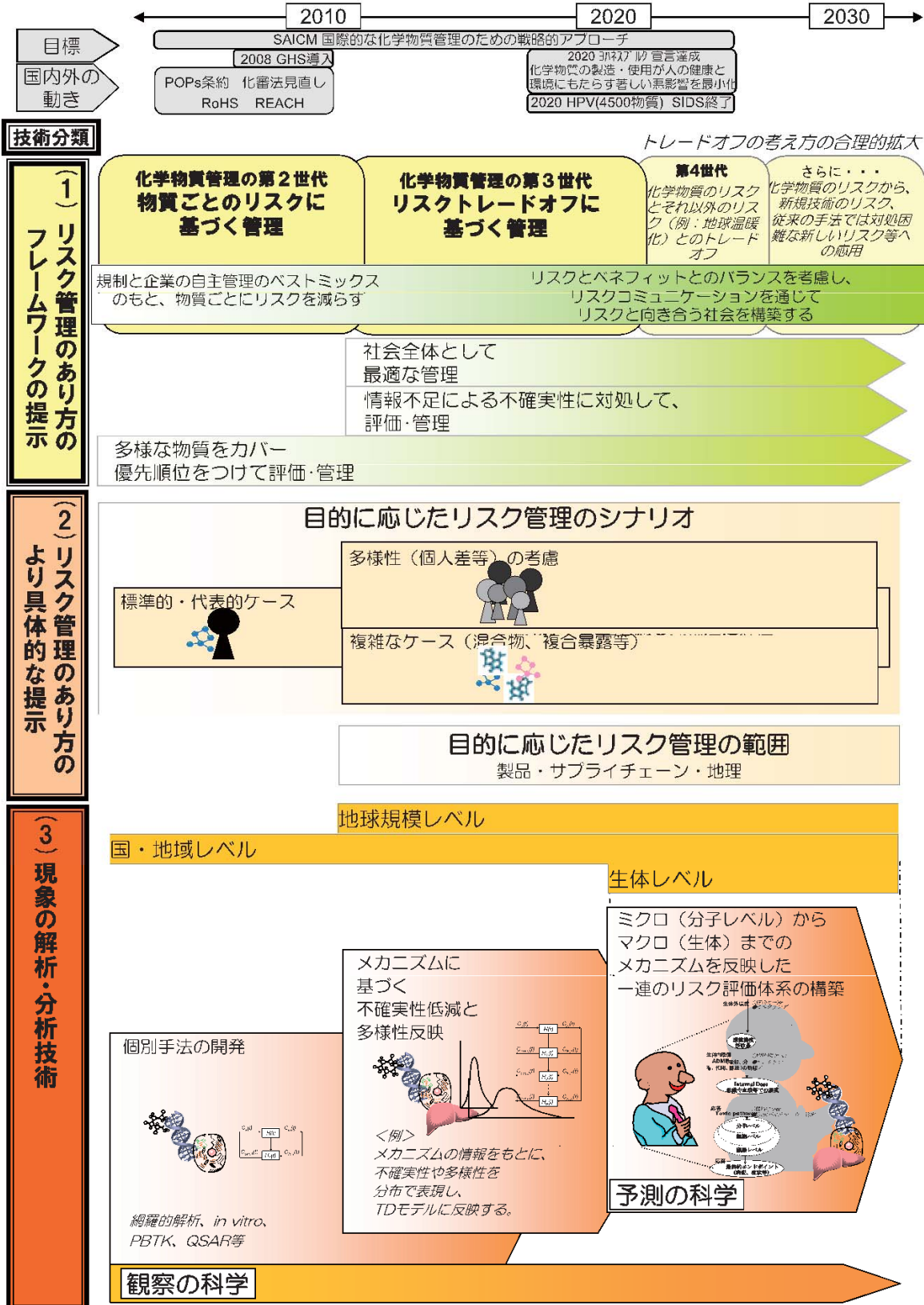
技術課題の評価は、次の観点から行った。
 ・ニーズ(社会の安全安心と適正管理の実現からのニーズ、企業競争力からのニーズ)
 ・シーズ(技術の波及効果)
 また、日本の技術が世界で優位であり、今後日本で伸ばしていくべき技術であるかについても考慮した。

化学物質総合評価管理分野の技術ロードマップ(1/14)

リスク評価管理(1/13)

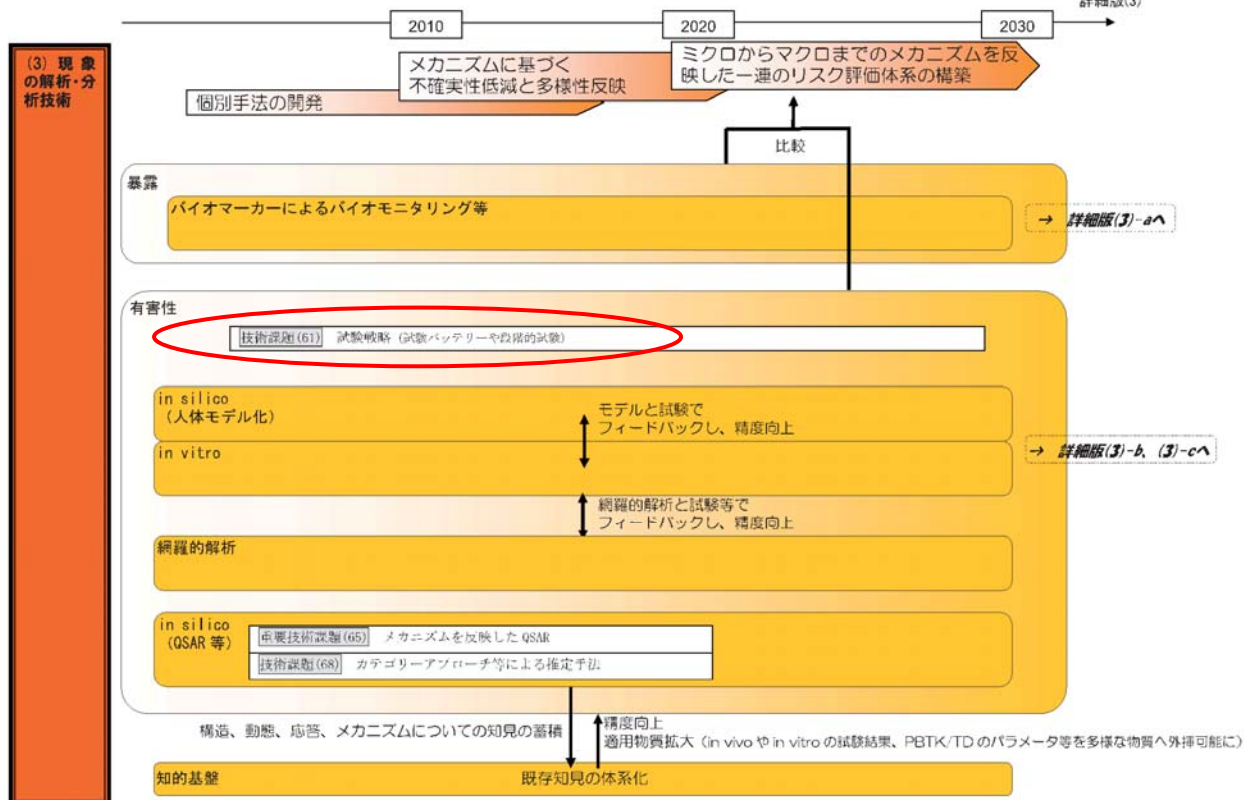
化学物質総合評価管理分野の技術ロードマップ(2/14)

リスク評価管理(2/13)



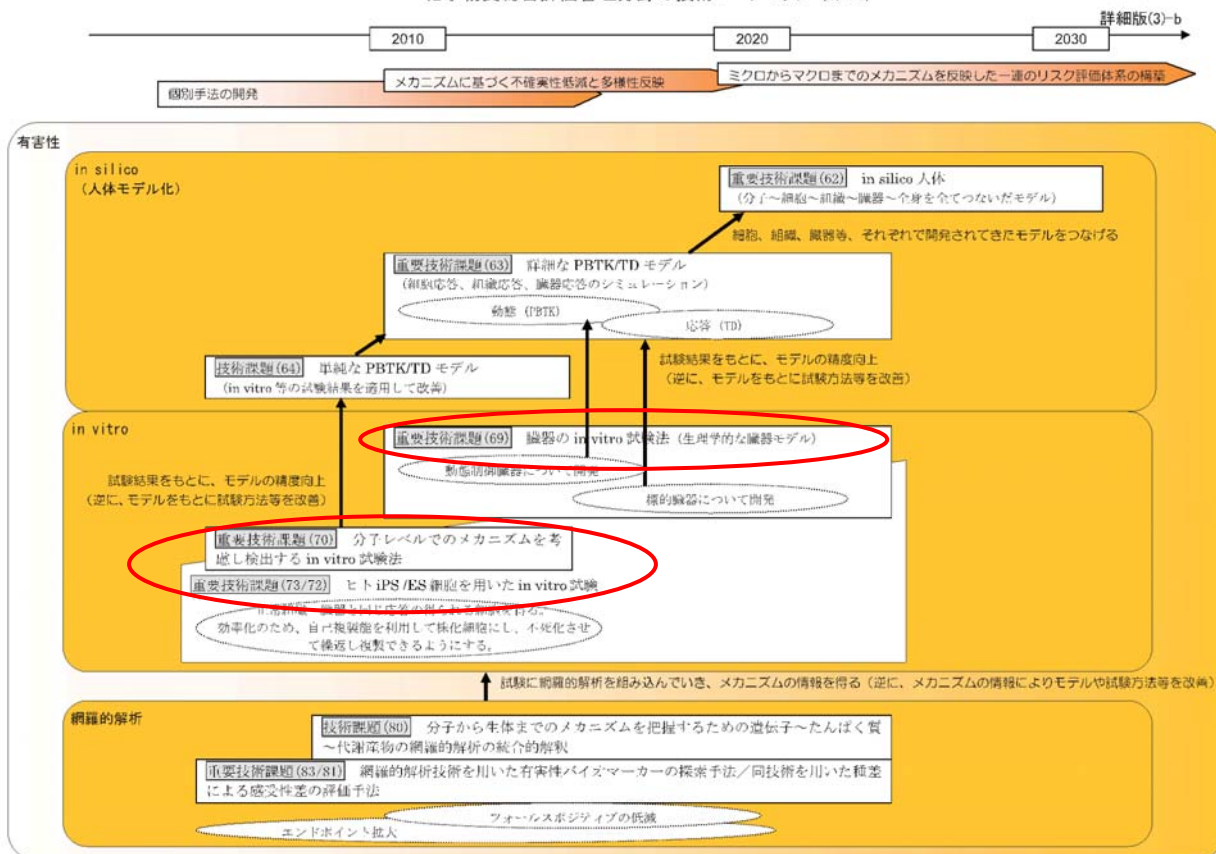
化学物質総合評価管理分野の技術ロードマップ (6/14)

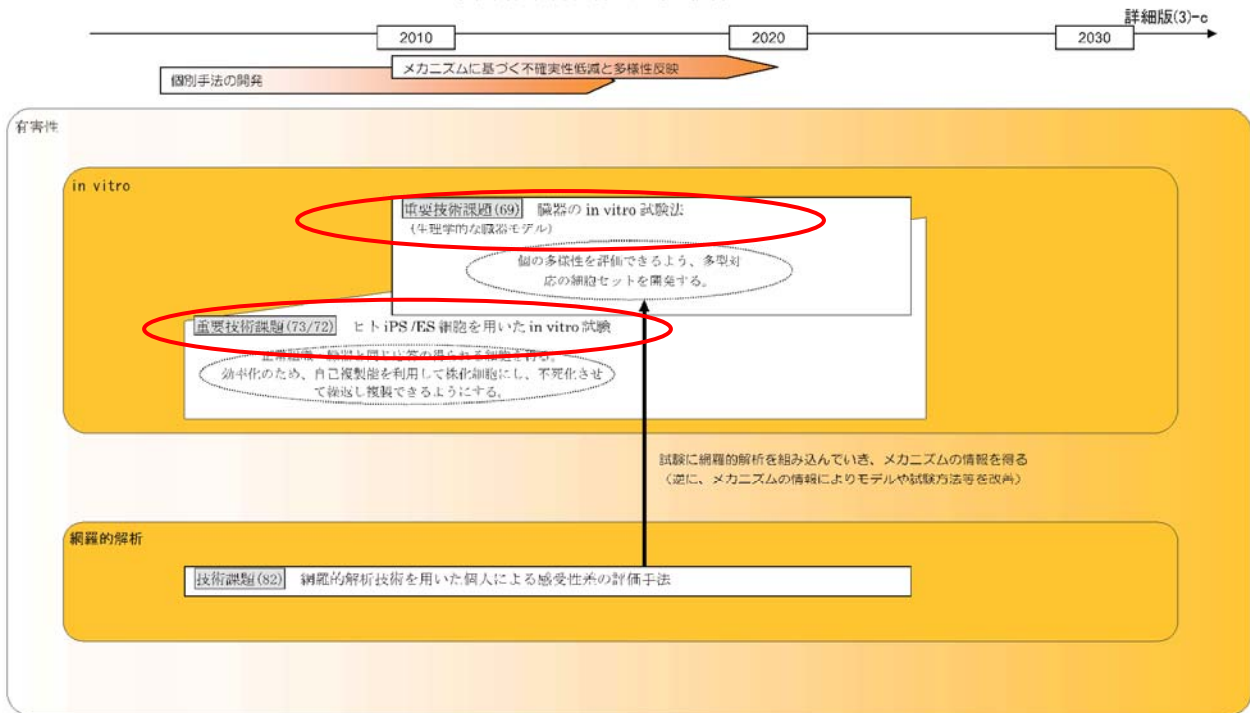
リスク評価管理(6/13)



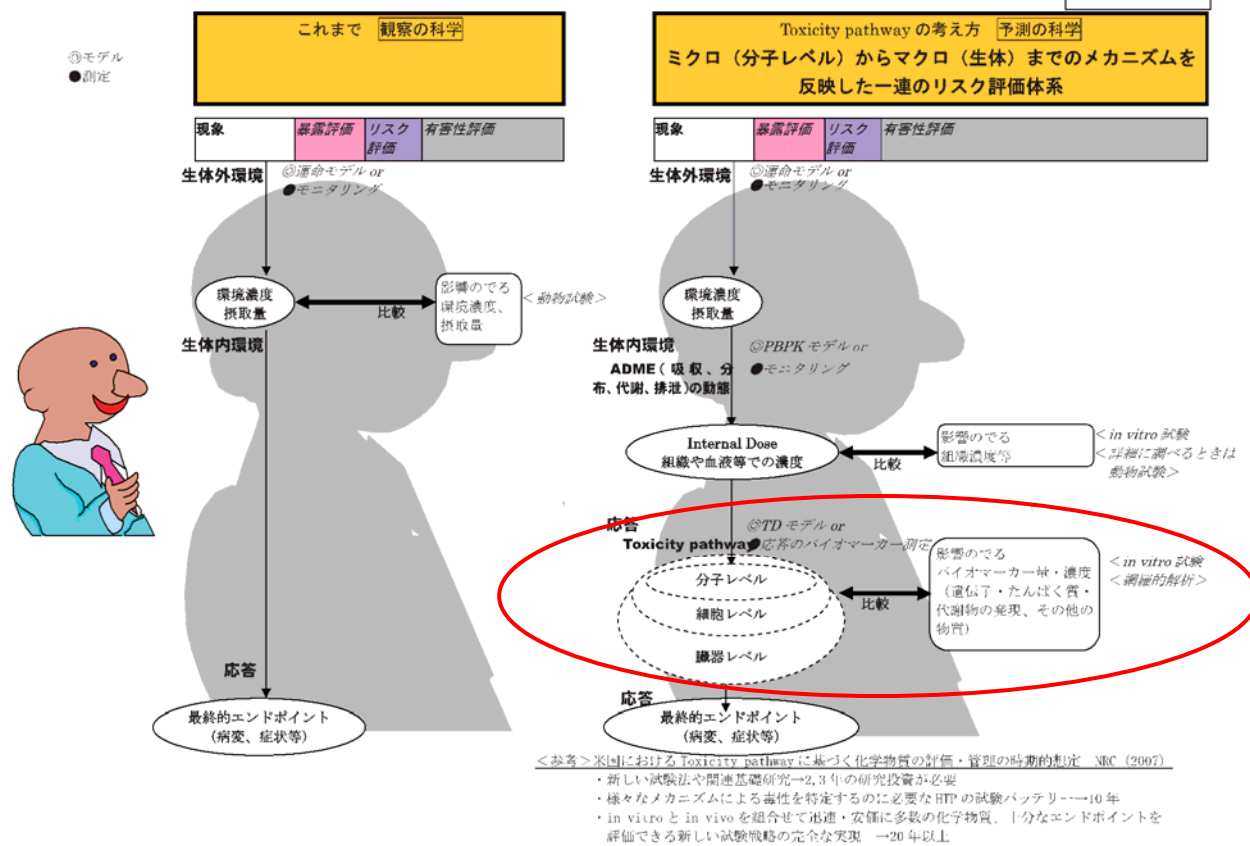
化学物質総合評価管理分野の技術ロードマップ (8/14)

リスク評価管理(8/13)





参考資料 2-4



化学物質総合評価管理分野の国際競争ポジション(貢献度)

指標1: テストガイドライン策定への貢献

OECDでは、化学物質の有害性評価のための試験の品質を確保するには国際的なガイドラインが有用であること、一国で得られた情報の他国への受入方法の改善が必要なこと、非関税障壁を防ぐ必要があること等から、テストガイドラインプログラムの下、テストガイドライン(TG)を策定している。

シリーズ	分野	TGプログラムでの現在のプロジェクト総数	うち、日本がリード国のもの(他国との共同提案を含む)
TG100	物理化学的性状	1	0
TG200	生物系への影響	23	4
TG300	分解性・蓄積性	7	0
TG400	健康への影響	31	7
TG500	その他	7	1
—	一般的事項	5	0
合計		74	12

指標2: ナノマテリアルスポンサーシッププログラムにおける情報収集への貢献

ナノマテリアルの安全性評価のため、OECDをベースに工業ナノ材料のヒト健康及び環境の安全性に関する国際協力が進められている。このひとつとして、各国が自主的に特定のナノマテリアルのスポンサーとなり、情報の収集や試験計画を策定するプログラムが開始されている。我が国は、代表的な以下の14のナノマテリアルのうち、3物質を担当している。

ナノマテリアルスポンサーシッププログラムの対象物質とスポンサー国

物質名	リードスポンサー
フラーレン(C60)	★日本 アメリカ
単層カーボンナノチューブ(SWCNTs)	★日本 アメリカ
複層カーボンナノチューブ(MWCNTs)	★日本 アメリカ
銀ナノ粒子	韓国 アメリカ
鉄ナノ粒子	BIAC/中国
カーボンブラック	
二酸化チタン	フランス ドイツ
酸化アルミニウム	
酸化セリウム	アメリカ イギリス/BIAC(NIA)*1
酸化亜鉛	イギリス/BIAC(NIA)
二酸化ケイ素	フランス FC
ポリステレン	
デンドリマー	
ナノクレイ	

(2009年8月25日現在)

*イギリス政府及びOECD経済産業諮問委員会(Business and Industry Advisory Committee)メンバーであるイギリスナノテクノロジー工業協会(Nanotechnology Industries Association)
(出典:OECDホームページ)

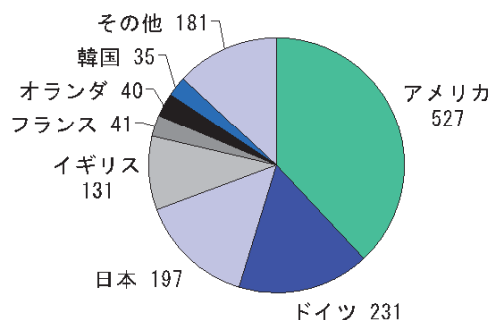
指標3: HPV(高生産量)化学物質点検プログラムにおける情報収集への貢献

OECDでは、いずれかの加盟国で年間1,000トン以上製造・輸入されている化学物質の有害性の初期評価を行うために必要と考えられるデータを加盟国が分担して収集し、評価を行っている。

2008年3月13日時点において、1,307物質にスポンサーがついており、544物質につき評価文書が公表されている。

我が国は、1992年の本プログラム発足当初から一貫して協力しており、これまでに197物質を担当し、約180物質の評価に貢献してきた。

HPV安全性点検プログラムにおける各国の担当物質数(2009年1月20日現在)



また2010年までに1,000物質についてデータを収集することを目標にした新たな計画において、日本は96物質を担当することとなっている。

指標4: 我が国および海外諸国のリスク評価書の作成実績

化学物質のリスク評価の目的は各国の状況を反映して異なる。ここでは、数や評価内容の詳細さのレベル(初期リスク評価レベル、詳細リスク評価レベル※)を比較する。

各国のリスク評価書のレベルごとの作成・公開数

国・地域	初期リスク評価レベル※	詳細リスク評価レベル※	備考
日本	150 (NEDO) 137(環境省、2008年2月時点)	23 (NEDO, AIST)	NEDOプロジェクト、環境省によってリスク評価書が作成され、公開。うち詳細リスク評価は産総研がNEDOプロジェクトを受託、産業実態を踏まえて排出量等を推定し、物質に応じたモデル(メッシュモデルも含む)で濃度を予測。
米国	45 (HPV Challenge Program, OPPT(農業・有害物質汚染防止局))	50程度 (EPA内各プログラム)	EPA内の各部署の個別プログラムごとに評価を実施。関連する制度として、OPPTの既存化学物質プログラムでは1993年～1996年にRisk Management (RM1)で2000以上の物質についてスクリーニング評価を実施。今後Risk Management 2(RM2)、Post-RM2等の段階へ進み詳細なリスク評価が行われるとされる(詳細は非公開)。
EU	97 (EURAR)	—	既存化学物質のうち優先141物質について評価。濃度予測には、ボックスモデル(EUSES)を適用。
カナダ	69 (優先物質リスト)	—	既存化学物質のうち優先物質リスト(Priority Substance List 1および2)の69物質(または製品)について、評価を実施し規制等の必要性を検討。
オーストラリア	32 (優先既存化学物質)	—	他にPBD等の14の物質について、既存モニタリングデータに基づく初期リスク評価レベルの評価書が公開。

(特に表記のないものは2009年1月時点)

※初期リスク評価レベル、詳細リスク評価レベルの区分けは、「化学物質のリスク評価およびリスク評価手法の開発」研究成果報告会 講演資料(中西孝子, 2007)を参考とした。

事前評価書

	作成日	平成17年10月31日
1. 事業名称	「高機能簡易型有害性評価手法の開発（石油精製物質等簡易有害性評価手法開発）」	
2. 推進部署名	バイオテクノロジー・医療技術開発部	
3. 事業概要	<p>(1) 概要：</p> <p>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得られる物質（石油精製物質）には、消費者の身近で使用される製品も多いが、有害性評価を簡易に、迅速に行うための知見が不足している。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。</p> <p>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ラット肝臓の発癌性を予測する手法で著しい進歩が見られており、その応用の拡大も期待されている。</p> <p>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。</p> <p>特に2003年10月には欧州で新たな化学物質規制案（REACH）が採択される等、新規物質の上市には有害性（発がん性、変異原性、生殖毒性）の評価が必要となっており、また欧州での化粧品に関する規制の動き（皮膚アレルギー等安全性試験の非動物実験化）等、有害性評価に代替法を求める流れもある。このため培養細胞を用いた有害性評価手法ならびに遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法を開発する。</p> <p>(2) 平成18年度予算額：500.0（百万円）</p> <p>(3) 事業期間：平成18年度～平成22年度（5年間）</p>	

4. 評価の検討状況

(1) 事業の位置付け・必要性

①事業の位置づけ

本プロジェクトは、化学物質総合評価管理プログラムの一環として実施されるものである。プロジェクトの目標である「環境と調和した健全な経済産業活動と安全・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」に向け、達成すべき重要な課題の1つとして、「化学物質のリスク評価・管理を実現するための基盤情報の整備、手法の構築と体系化」が記されており、本プロジェクトでは、化学物質の有害性を評価する手法の構築を行うものである。

化学物質のリスクを評価・管理する技術体系は、化学物質のリスクにかかわる国民の理解増進のための基盤、事業者が自ら化学物質管理を行うための基盤及び国が規制等の施策を講ずる際の手段となることから、国が中心となって実施することが必要である。

なお、本プロジェクトは、化学物質総合管理分野ロードマップの、「リスク評価・管理技術開発」のうち、「科学的かつ合理的な有害性評価「体系」の構築」－「簡易有害性評価の開発」に位置付けられる。

②事業の必要性

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ラット肝臓の発癌性を予測する手法で著しい進歩が見られており、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。

(2) 研究開発目標の妥当性

<目標>

①目標値

- ・培養細胞を用いた有害性評価手法の開発：試験期間1ヶ月程度。国際標準化に対応できる試験法
- ・遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発：試験期間1ヶ月程度。予測精度90%以上

<妥当性>

NEDO POST3やワークショップ等で意見聴取し、妥当性について更なる検討を行う。

<p>(3) 研究開発マネジメント</p> <p>公募を行い、最適な研究開発体制を構築する。研究開発の実施にあたってはプロジェクトリーダーを選定し、プロジェクトリーダーと協議して研究の管理を行う。また、推進委員会を年2～3回開催し、体制内での連携強化、進捗状況を踏まえた予算配分・事業計画の策定を行う。</p> <p>なお、NEDO は別途定められた技術評価に係わる指針及び技術評価実施要領に基づき、技術的及び産業技術政策的観点から、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中間評価を平成20年度、事後評価を平成23年度に実施する。なお、評価の時期については、当該研究開発に係わる技術動向、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。</p>
<p>(4) 研究開発成果</p> <p>①培養細胞を用いた有害性評価手法の開発</p> <p>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ヶ月程度で発癌性、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ルを取り纏める。</p> <p>②遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発</p> <p>遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、試験期間1ヶ月程度でラット腎臓等における発癌性を予測する手法を開発し、標準的な試験プロトコルを取り纏める。</p>
<p>(5) 実用化・事業化の見込み</p> <p>本事業の成果を適用することによって、産業のあらゆる分野における、石油精製物質等の利用に関わるリスク管理の基盤となる有害性評価を迅速かつ高精度に行うことを促進するとともに、新規物質の開発における投資リスクの低減による開発促進・スピードアップを図ることができ、産業の国際競争力の確保が期待できる。</p>
<p>(6) その他特記事項</p>
<p>5. 総合評価</p> <p>石油精製物質等の有害性を簡易に評価する手法は、石油産業のみならず、広く化学物質の健康影響評価あるいは基準・規制の立案に資する点からも実現が望まれる技術である。これまでの手法に比べて高精度かつ簡易な手法を確立し、あわせて検査コストの削減に資する本プロジェクトは、NEDO の実施する事業として適切であると判断する。</p>



高機能簡易型有害性評価手法の開発(石油精製物質等簡易有害性評価手法開発)

目的

背景、目的、必要性

- ①背景：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得られる物質(石油精製物質)には、消費者の身近で使用される製品も多く、安全・安心な市民生活を確保するため、その有害性評価を簡易かつ迅速に行うための手法が求められている。
- ②市場ニーズ(目的)：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。
- ③技術ニーズ：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ラット肝臓の発癌性を予測する手法で著しい進歩が見られており、その応用の拡大も期待されている。

添付資料⑤-4

規模

事業費と研究開発期間：18年度事業費想定約5億円，研究開発期間5年

内容

研究開発課題

培養細胞を用いた有害性評価手法の開発
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ヶ月程度で発癌性、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ルを取り纏める。

- ②遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発
遺伝子発現解析技術を短期動物試験に適用し、試験期間1ヶ月程度でラット腎臓等における発癌性を予測する手法を開発し、標準的な試験プロトコルを取り纏める。

○キーテクノロジー、ブレークスルーのポイント、オリジナリティ

- ①細胞、幹細胞分化誘導技術、生物発光技術、遺伝子発現時系列解析技術
- ②腎臓等の臓器の発がん性試験予測手法開発に対応できるトキシコゲノミクス技術

○目標値(技術水準)とその条件および設定理由(根拠)

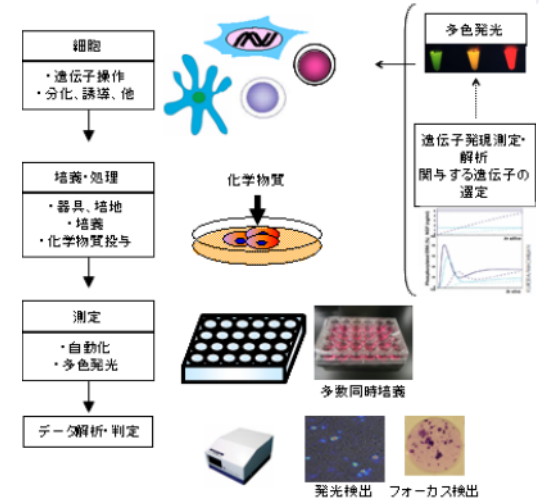
- ①目標値
 - ・培養細胞を用いた有害性評価手法の開発：試験期間1ヶ月程度。国際標準化に対応できる試験法
 - ・遺伝子発現解析技術を用いた発癌性予測手法の開発：試験期間1ヶ月程度。予測精度90%以上
- ②設定根拠
培養細胞を用いた研究例から現実的な目標値として設定。遺伝子発現技術を用いた方法については目標値レベルの進展がみられると認識し設定。

技術戦略マップ上の位置付け

化学物質総合管理分野ロードマップの、「リスク評価・管理技術開発」のうち、「科学的かつ合理的な有害性評価「体系」の構築」-「簡易有害性評価の開発」に位置付けられる。

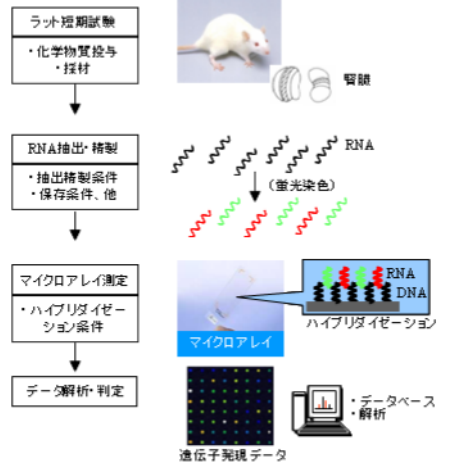
その他関連図表

培養細胞を用いた有害性評価手法の開発



細胞の観察で、発がん性、催奇形性、免疫毒性を予測

遺伝子発現解析技術を用いた発がん性予測試験手法の開発



マイクロアレイの遺伝子発現パターンからラット発がん性を予測

添付資料⑤-2

「高機能簡易型有害性評価手法の開発基本計画（案）」に対するパブリックコメント募集の結果について

平成18年2月17日
NEDO技術開発機構
バイオテクノロジー・医療技術開発部

NEDO POST 3において標記基本計画（案）に対するパブリックコメントの募集を行いました結果をご報告いたします。
お寄せいただきましたご意見を検討し、別添の基本計画に反映させていただきました。
みなさまからのご協力を頂き、ありがとうございました。

1. パブリックコメント募集期間
平成18年2月3日～平成18年2月16日
2. パブリックコメント投稿数＜有効のもの＞
計1件
3. パブリックコメントの内容とそれに対する考え方

ご意見の概要	ご意見に対する考え方	基本計画への反映
1. 研究開発の実施方式		
(2) 研究開発の運営管理 できあがった方法からバリデーションしていかないと5年ではOECDガイドラインへの提案にたどり着けません。特にOECDを意識するなら、国際的なバリデーションが必要であり、大変な時間がかかります。一方、バリデーションが済んでいない方法でデータを溜めても、欠点が後から見つかった場合、すべてのデータが無になる場合も考えられます。 20-40物質を用いて1-2年で試験法プロトコルを開発して頂き、バリデーションをしながら、試験法をもんで行く手法をお勧めします。バリデーションや評価には動物実験代替法学会やJaCVAMをご利用して頂ければ幸いです。	ご指摘のと通りの課題認識をし、計画を具体化する所存であります。本研究開発は、国内・国際でのバリデーション（施設間評価試験）を行いながら進める考えであり、これを通じて課題を抽出し解決しながら開発を進める考えです。また、バリデーションは動物実験代替法学会殿やJaCVAM殿に参画・関与しておられる企業・研究機関殿、特にGLP（Good Laboratory Practice）機関殿のご助力を頂きながら行うことになろうと予想致しております。	特になし。 （現状で反映済み）

1. 論文

(1) 査読のある原著論文

●研究開発項目A：培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

<平成18年度(2006)>

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

1. Morihiko Hirota, Masato Kitagaki, Hiroshi Itagaki and Setsuya Aiba
Quantitative measurement of spliced XBP1 mRNA as an indicator of endoplasmic reticulum stress.
J Toxicol Sci., 31, 149-156, 2006

<平成19年度(2007)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. Ayako Sakai, Chihiro Suzuki, Yasuhiko Masui, Kousuke Takatori and Noriho Tanaka
The activities of Mycotoxins delivered from *Fusarium* and related substances in a short-term transformation assay using v-Ha-ras-transfected BALB/c3T3(Bhas 42 cells). *Mutation Res.*, 630: 103-111, 2007
2. Takumi Hara, Takashi Nishihara, Hajime Sui, Kumiko Kawakami, Hirotaka Matsumoto and Noriho Tanaka
In vivo photo skin micronucleus test using a sunlight simulator: Detection of 8-MOP and benzo(a)pyrene.
Mutation Res., 631: 1-8, 2007
3. Kumiko Hayashi, Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Toshiyuki Tsuchiya, Noriho Tanaka, Makoto Umeda
Detection of initiating and promoting activities of chemicals by two-stage model of Balb/c 3T3 cell transformation assay with optimized protocol. *Submitted to ATLA*, 2007

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

4. Okuyama R., Ogawa E., Nagoshi H., Yabuki M., Kurihara A., Terui T., Aiba S., Obinata M., Tagami H., and Ikawa S.
p53 homologue, p51/p63, maintains the immaturity of keratinocyte stem cells by inhibiting Notch1 activity.
Oncogene, 26:4478-4488, 2007
5. Memezawa A., Takada I., Takeyama K., Igarashi M., Ito S., Aiba S., Kato S. and Kouzmenko AP.
Id2 gene-targeted crosstalk between Wnt and retinoid signaling regulates proliferation in human keratinocytes. *Oncogene*, 26: 5038-5045 2007

(d) 基盤技術

6. 呉純, 鈴木智恵, 近江谷克裕
A dual-reporter assay using two secreted luciferase genes. *Biotechniques*, 42: 290-292 2007
7. Noguchi, T., Ikeda, M., Ohmiya, Y. and Nakajima, Y.
Simultaneous monitoring of independent gene expression patterns in two types of cocultured fibroblasts with different color-emitting luciferases. *BMC Biotechnol.*, 8, 40
8. M. Nishikawa, N. Kojima, K. Komori, T. Yamamoto, T. Fujii, and Y. Sakai
Enhanced Maintenance and Functions of Rat Hepatocytes Induced by Combination of On-Site Oxygenation and Coculture with Fibroblasts. *J. Biotechnol.*, 133: 253-260 2008
9. M. Nishikawa, T. Yamamoto, N. Kojima, K. Komori, T. Fujii, and Y. Sakai
Stable immobilization of rat hepatocytes as hemispheroids onto collagen-conjugated poly-dimethylsiloxane (PDMS) surfaces: importance of direct oxygenation through PDMS for both formation and function.
Biotechnol. Bioeng., 99: 1472-1481 2008
10. Nagahama Y, Ishimaru M, Osaki M, Inoue T, Maeda A, Nakada C, Moriyama M, Sato K, Oshimura M, Ito H.
Apoptotic pathway induced by transduction of RUNX3 in the human gastric carcinoma cell line MKN-1.
Cancer Sci., 99(1):23-30 2008

<平成20年度(2008)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. Noriho Tanaka, Kiyoshi Sasaki, Kumiko Hayashi, Ayako Sakai, Shin Asada¹, Dai Muramatsu, Sachiko Kuroda, Fukutaro Mizuhashi, Miho Nagai, Hiroshi Suzuki, Tadashi Imamura, Masumi Asakura, Hidetaka Satoh, Akiko Sakamoto, Ryosuke Nakao, Hideki Hirose, Nana Ishii, Makoto Umeda
An interlaboratory collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells.
AATEX 14(1), 831-848, 2009
2. Dai Muramatsu, Kiyoshi Sasaki, Sachiko Kuroda, Kumiko Hayashi, Noriho Tanaka, Ayako Sakai
Comparison of sensitivity to arsenic compounds between a Bhas 42 cell transformation assay and a BALB/c 3T3 cell transformation assay. *Mutat Res.*, 675:66-70, 2009

(b) 催奇形性予測試験法の開発

3. Masaharu Akita
Current Status and Future Progress of Reproductive/Developmental Toxicity Tests.
YAKUGAKU ZASSHI, 128(5): 2008

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

4. Taku Fujimura, Ryuhei Okuyama, Yumiko Ito and Setsuya Aiba
Profiles of FOXP3 regulatory T-cells (Tregs) in eczematous dermatitis, psoriasis vulgaris and mycosis fungoides. *Br J Dermatol*, 158:1256-63, 2008
5. Ogawa E., Okuyama R., Ikawa S., Nagoshi H., Egawa T., Kurihara A., Yabuki M., Tagami H., Obinata M., Aiba S.
p51/p63 inhibits ultraviolet B-induced apoptosis via Akt activation. *Oncogene*, 27:848-56, 2008
6. Eisaku Ogawa, Ryuhei Okuyama, Teie Egawa, Hirokazu Nagoshi, Masuo Obinata, Hachiro Tagami¹, Shuntaro Ikawa, and Setsuya Aiba,
p63-Induced Onset of Keratinocyte Differentiation via the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway Is Counteracted by Keratinocyte Growth Factor. *J Biol Chem*, 283(49):34241-9, 2008
7. Tomoyuki Ohtani, Ai Memezawa, Ryuhei Okuyama, Tetsuya Sayo, Yoshinori Sugiyama, Yoshinori, Shintaro Inoue, Setsuya Aiba,
Increased hyaluronan production and decreased E-cadherin expression by cytokine-stimulated keratinocytes lead to spongiosis formation. *J Invest Dermatol*, 129(6):1412-20, 2009
8. Sasaki Y., Ohtani T., Ito Y., Mizuashi M., Nakagawa S., Furukawa T., Horii A., Aiba S.
Molecular events in human T cells treated with diesel exhaust particles or formaldehyde that underlie their diminished interferon-gamma and interleukin-10 production.
Int Arch Allergy Immunol, 148(3):239-50, 2009
9. Ohtani T., Mizuashi M., Nakagawa S., Sasaki Y., Fujimura T., Okuyama R., Aiba S.
TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation. *Immunology*, 126(4):485-99, 2009

(d) 基盤技術

10. Shibui T, Higo Y, Tsutsui TW, Uchida M, Oshimura M, Barrett JC, Tsutsui T.
Changes in expression of imprinted genes following treatment of human cancer cell lines with non-mutagenic or mutagenic carcinogens. *Int J Oncol.*, 33(2):351-60, 2008
11. Nguyen P, Cui H, Bisht KS, Sun L, Patel K, Lee RS, Kugoh H, Oshimura M, Feinberg AP, Gius D.
CTCF/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res.*, 68(14):5546-51, 2008
12. Shitara S, Kakeda M, Nagata K, Hiratsuka M, Sano A, Osawa K, Okazaki A, Katoh M, Kazuki Y, Oshimura M, Tomizuka K.

- Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector. *Biochem Biophys Res Commun.*, 369(3):807-11, 2008
13. Yamada H, Li YC, Nishikawa M, Oshimura M, Inoue T.
Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell-type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion.
J Hum Genet., 53(5):447-53, 2008
 14. Kazuki Y, Hoshiya H, Kai Y, Abe S, Takiguchi M, Osaki M, Kawazoe S, Katoh M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Kajitani N, Yoshino T, Shirayoshi Y, Ogura A, Shinohara T, Barrett JC, Oshimura M.
Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome.
Gene Ther., 15(8):617-24, 2008
 15. Miyano M, Horike SI, Cai S, Oshimura M, Kohwi-Shigematsu T.
DLX5 Expression is Monoallelic and Dlx5 is Upregulated in the Mecp2-null Frontal Cortex.
J Cell Mol Med., in press 2008

<平成21年度(2009)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. Shoko Arai, Noriho Tanaka, Kiyoshi Sasaki, Ayako Sakai
A Study on the Dose Setting of the Promotion Assay in Bhas 42 Cell Transformation Assay
*AATEX*15(1), 6-13, 2010

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

2. Ohtani T., Memezawa A., Okuyama R., Sayo T., Sugiyama Y., Inoue S., Aiba S.
Increased Hyaluronan Production and Decreased E-Cadherin Expression by Cytokine-Stimulated Keratinocytes Lead to Spongiosis Formation. *J Invest Dermatol*, 129:1412-20, 2009
3. Hoya M., Hirota M., Suzuki M., Hagino S., Itagaki H., Aiba S.
Development of an in vitro photosensitization assay using human monocyte-derived cells.
Toxicol in vitro, 23(5):911-8, 2009
4. Hirota M., Suzuki M., Hagino S., Kagatani S., Sasaki Y., Aiba S., Itagaki H.
Modification of cell-surface thiols elicits activation of human monocytic cell line THP-1: possible involvement in effect of haptens 2,4-dinitrochlorobenzene and nickel sulfate.
J Toxicol Sci, 34(2):139-50, 2009
5. Suzuki M., Hirota M., Hagino S., Itagaki H., Aiba S.
Evaluation of changes of cell-surface thiols as a new biomarker for in vitro sensitization test.
Toxicol in vitro, 23:687-696, 2009
6. Numata I., Okuyama R., Memezawa A., Ito Y., Takeda K., Furuyama K., Shibahara S., Aiba S.
Functional expression of heme oxygenase-1 in human differentiated epidermis and its regulation by cytokines.
J Invest Dermatol, 129:2594-603, 2009
7. Kagatani S., Sasaki Y., Hirota M., Mizuashi M., Suzuki M., Ohtani T., Itagaki H., Aiba S.
Oxidation of cell surface thiol groups by contact sensitizers triggers the maturation of dendritic cells.
J Invest Dermatol, 130:175-83, 2009
8. Ohara H., Saito R., Hirakawa S., Shimada M., Mano N., Okuyama R., Aiba S.
Gene expression profiling defines the role of ATP-exposed keratinocytes in skin inflammation.

J Dermatol Sci, 58:143-51, 2010

(d) 基盤技術

9. Li, X., Nakajima, Y., Niwa, K., Viviani, V.R. and Ohymiya
Enhanced red-emitting railroad worm luciferase for bioassays and bioimaging. *Protein Science*, 19:26-33, 2010
10. Niwa, K., Ichino, Y. and Ohmiya
Quantum yield measurements of firefly bioluminescence reactions using a commercial luminometer. *Chem.lett.*, 39:291-293, 2010

<平成22年度(2010)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. Ayako Sakai, Kiyoshi Sasaki, Dai Muramatsu, Shoko Arai, Nobuko Endo, Sachiko Kuroda, Kumiko Hayashi, Yeon-mi Lim, Shojiro Yamazaki, Makoto Umeda and Norihiro Tanaka
A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. Submitted to *Mutat Res.*, 702:100-122, 2010

(b) 催奇形性予測試験法の開発

2. Noriyuki Suzuki, Satoshi Ando, Nobuyuki Horie, Kayo Sumida and Koichi Saito
Analysis of altered gene expression specific to embryotoxic chemical treatment during embryonic stem cell differentiation into myocardial and neural cells. Submitted to *The Journal of Toxicological Sciences*.
3. Noriyuki Suzuki, Satoshi Ando, Nobuyuki Horie and Koichi Saito
Evaluation of novel high throughput embryonic stem cell tests with new molecular markers for screening embryotoxic chemicals in vitro. Submitted to *Toxicological Sciences*.

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

4. Okada S., Muto A., Ogawa E., Nakanome A., Katoh Y., Ikawa S., Aiba S., Igarashi K., Okuyama R.
Bach1-dependent and -independent regulation of heme oxygenase-1 in keratinocytes.
J Biol Chem, 285:23581-9, 2010
5. Hirota M., Motoyama A., Suzuki M., Yanagi M., Kigagaki M., Kouzuki H., Hagino S., Itagaki H., Sasa H., Kagatani S., Aiba S
Changes of cell-surface thiols and intracellular signaling in human monocytic cell line THP-1 treated with diphenylcyclopropanone. *J Toxicol Sci*, 35:871-9, 2010
6. Ogawa E., Owada Y., Ikawa S., Adachi Y., Egawa T., Nemoto K., Suzuki K., Hishinuma T., Kawashima H., Kondo H., Muto M., Aiba S., Okuyama R.
Epidermal FABP (FABP5) regulates keratinocyte differentiation by 13(S)-HODE-mediated activation of the NF- κ B signaling pathway. *J Invest Dermatol*, 131:604-12, 2010
7. Hirakawa S., Saito R., Ohara H., Okuyama R., Aiba S.
Dual Oxidase 1 (DUOX1) induced by Th2 cytokines promotes STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of PTP1B in human epidermal keratinocytes. *J Immunol*, 186:4762-70, 2011
8. Saito R., Hirakawa S., Ohara H., Yasuda M., Yamazaki T., Nishii S., Aiba S.
Nickel differentially regulates NFAT and NF- κ B activation in T cell signaling.
Toxicology and Applied Pharmacology, In press

9. Takahashi T., Kimura Y., Saito R., Nakajima Y., Ohmiya Y., Yamasaki K., Aiba S.
An in vitro Test to Screen Skin Sensitizers Using a Stable THP-1-derived IL-8 Reporter Cell Line, THP-G8. *Toxicol Sci*, In submission

(d) 基盤技術

10. Niwa, K., Ichino, Y., Kumata, S., Nakajima, Y., Hiraishi, Y., Kato D., Viviani, V. R. and Ohmiya, Y.
Quantum yields and kinetics of the firefly bioluminescence reaction of beetle luciferase.
Photochem. Photobiol. 86, 1046-1049.
11. Nakajima, Y. , Yamazaki, T., Nishii, S., Noguchi, T., Hoshino, H., Niwa, K., Viviani, V.R.and Ohmiya, Y.
Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS ONE*. 5, e10011, 2010
12. Nakajima, Y. and Ohmiya, Y.
Bioluminescence Assays –Multicolor luciferase assay, Secreted luciferase assay, and Imaging luciferase Assay. *Expert Opin. Drug Discover.* 5, 835-849, 2010
13. Noguchi, T., Michihata, T. Nakamura, W., Takumi, T., Shimizu, R., Yamamoto, M., Ikeda, M., Ohmiya, Y. and Nakajima, Y.
Dual-color luciferase mouse directly demonstrates coupled expression of two clock genes.
Biochemistry 49, 8053-8061, 2010
14. N. Yamamoto, K. Komori, K Montagne, H. Matsui, H. Nakayama, S. Takeuchi, Y. Sakai
Cytotoxicity evaluation of reactive metabolites using rat liver homogenate microsome-encapsulated alginate gel microbeads. *J. Biosci. Bioeng.*, 2011

●研究開発項目B-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
<平成22年度(2010)>

1. Katao K., Honma R., Kato S., Watanabe S., Imai J.
Influence of platinum nanoparticles orally administered to rats evaluated by systemic gene expression profiling. *Exp. Anim.* 60, 33-45, 2011

(2)総説、解説、著書**●研究開発項目A 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発****<平成18年度(2006)>****(c) 免疫毒性予測試験法の開発**

1. 相場節也(東北大)
接触皮膚炎2006 メカニズムから治療と予防を考える 接触皮膚炎の新しい病因論
日本皮膚科学会雑誌, 116, 1865-1869, 2006
2. 相場節也(東北大)
アトピー性皮膚炎の難治と免疫・アレルギー機序に関する問題 アトピー性皮膚炎の治療と免疫・アレルギー機序に関する問題 T細胞とアトピー性皮膚炎(環境汚染物質による免疫変調作用)
皮膚の科学, 5, 5-10, 2006
3. 相場節也(東北大)
樹状細胞に及ぼす化学物質、金属、環境汚染物質の影響
皮膚アレルギーフロンティア, 4, 149-155, 2006

<平成19年度(2007)>**(a) 発がん性予測試験法の開発**

1. Ayako Sakai(食薬センター)
BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity.
AATEX 14, Special Issue, 367-373, 2008

(b) 催奇形性予測試験法の開発

2. 堀江宣行、樋口敏浩、川村 聡、斎藤幸一、鈴木紀之(住友化学)
胚性幹細胞(ES細胞)を利用した安全性評価研究
住友化学誌, 2007-I, p49-55, (H19年5月31日発刊), 2007
3. 秋田正治(鎌倉女子大)
最新 動物実験代替法 ～日米欧関連法規への対応/各種試験の手順～
第12章 生殖発生毒性について(技術情報協会) p251-263, 2007

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

4. 大谷朋之、相場節也(東北大)
ディーゼル排気微粒子とアレルギー
アレルギーの臨床, 366, 52-55, 2007
5. 廣田衛彦、板垣宏、相場節也(東北大他)
細胞表面-SH 基を利用した感作性試験代替法(SH test)
Fragrance Journal, 35, 49-54, 2007
6. Okuyama R., Tagami H. and Aiba S. (Tohoku U.)
Notch signaling: Its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases.
J Dermatol Sci., 49:187-94, 2007
7. Yoshinori Sasaki and Setsuya Aiba (Tohoku U.)
Dendritic cells and contact dermatitis. *Clin Rev Allerg Immunol*, 33: 27-34, 2007
8. 相場節也(東北大)
ディーゼル排気微粒子 皮膚科診療プラクティス, 20 環境・職業からみた皮膚疾患, 235-237, 2007
9. 佐々木喜教、大谷朋之、相場節也(東北大)
ディーゼル排気微粒子とアレルギー 目で見えるアレルギー性皮膚疾患、環境とアレルギー, 354-364, 2007
10. Setsuya Aiba(東北大)
Dendritic cells. Importance in allergy. *Allergol Int.*, 56: 201-208, 2007

(d) 基盤技術

11. 浅井友実、西井重明、近江谷克裕(東洋紡、産総研)
甲虫ルシフェラーゼを利用したリアルタイム・マルチカラー遺伝子発現計測
動物実験代替のためバイオマテリアル・デバイス, 235-243(2007)シーエムシー出版, 2007
12. 呉 純、近江谷 克裕(産総研)
発光プローブの基本 蛍光・発光試薬の選び方と使い方, 羊土社, 2007
13. 野口貴子、中島芳浩、近江谷克裕(産総研)
ルシフェラーゼプローブによる細胞機能の解析 蛍光・発光試薬の選び方と使い方, 羊土社, 2007
14. 酒井康行・民谷栄一(東京大)
動物実験代替のためのバイオマテリアル・デバイス 編集, CMC 出版, 2007
15. 小森喜久夫、名田 順、宮島翔太郎、小野芳朗、立間 徹、酒井康行(東京大)
体内動態を考慮する新たな毒性評価系の開発 薬学雑誌, 128(1), 29-3, 2008
16. 西川昌輝、中山秀謹、木村啓志、山本貴富喜、藤井輝夫、酒井康行(東京大)
化学物質の体内動態を再現する複合細胞培養系の開発
バイオインダストリー(CMC 出版), 25(1), 17-25, 2008
17. Oshimura M, Katoh M. (鳥取大)
Transfer of human artificial chromosome vectors into stem cells.
Reprod Biomed Online., 16(1):57-69, 2008

<平成20年度(2008)>

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

1. 加賀谷早織、相場節也(東北大)
樹状細胞とは 皮膚アレルギーフロンティア, 6:153-159, 2008

(d) 基盤技術

2. 酒井康行、藤井輝夫(東京大)
ヒト体内動態予測を目指した新規 in vitro 培養系 ファルマシア, 44巻9号, 印刷中, 2008
3. 香月康宏、松岡隆之、押村光雄(鳥取大)
ヒト人工染色体を用いた iPS 細胞の作製と遺伝子・再生医療へ向けて
再生医療 Vol.7, No3., p30-35, 2008

<平成21年度(2009)>

(d) 基盤技術

1. 香月康宏、押村光雄(鳥取大)
ヒト人工染色体ベクターの開発 ゲノム医学, 2009.10.1

<平成22年度(2010)>

(d) 基盤技術

1. 酒井康行(東京大)
ヒトハザード評価における新しい流れと培養組織モデル
化学工学, 74(6), 288-291 (2010)

●研究開発項目B-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

<平成22年度(2010)>

1. 反復投与毒性試験の実験手法 動物実験代替法の技法ノウハウ 第8章, 出版予定

2. 特許

●研究開発項目A 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

<平成19年度(2007)>

(d) 基盤技術

1. 発明者:近江谷克裕、中島芳浩、西井重明、浅井友美
発明などの名称:タンパク質短寿命化ペプチドをコードする遺伝子及びその使用方法
出願日:平成19年12月14日
出願番号:特願2007-312466
出願人:産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社

<平成20年度(2008)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 発明者:佐々木澄志
発明などの名称:哺乳動物形質転換細胞の選択方法
出願日:平成20年9月10日
出願番号:特願2008-231694
出願人:財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

(b) 催奇形性予測試験法の開発

2. 発明者:鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行
発明などの名称:化学物質が有する発生毒性の予測方法
出願日:平成20年6月3日
出願番号:特願2008-145433
出願人:住友化学株式会社

<平成21年度(2009)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 発明者:佐々木澄志
発明などの名称:哺乳動物形質転換細胞の選択方法
出願日:平成21年9月4日
出願番号:12/554,133(米国特許出願)
出願人:財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

2. 発明者:佐々木澄志
発明などの名称:哺乳動物形質転換細胞の選択方法
出願日:平成21年9月7日
出願番号:09 169 631.0(欧州特許出願)
出願人:財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

3. 発明者:佐々木澄志
発明などの名称:哺乳動物形質転換細胞の選択方法
出願日:平成21年9月8日
出願番号:特願2009-206686(国内優先権主張)
出願人:財団法人食品薬品安全センター秦野研究所

(b) 催奇形性予測試験法の開発

4. 発明者:鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行
発明などの名称:化学物質が有する発生毒性の予測方法
出願日:平成21年5月25日
出願番号:特願2009-125077
出願人:住友化学株式会社
5. 発明者:鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行

発明などの名称:化学物質が有する発生毒性の予測方法

出願日:平成21年6月2日

出願番号:PCT/JP2009/060410

出願人:住友化学株式会社

(d) 基盤技術

6. 発明者:近江谷克裕、中島芳浩、李学燕、西井重明、山崎友美

発明などの名称: バイオイメージングに特化した赤色発光ルシフェラーゼ変異体

出願日:平成21年8月31日

出願番号:特願2009-199543

出願人:産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社

7. 発明者:近江谷克裕、中島芳浩、李学燕、西井重明、山崎友美

発明などの名称:安定化赤色発光ルシフェラーゼ変異体

出願日:平成21年8月31日

出願番号:特願2009-199503

出願人:産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社

<平成22年度(2010)>

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

1. 発明者:相場節也、斉藤るみ子、近江谷克裕、中島芳浩、西井重明、山崎友実、安田真琴

発明などの名称:多色発光細胞を用いた免疫毒性評価システム

出願日:平成22年7月1日

出願番号:特願2010-151362

出願人:国立大学法人東北大学、独立行政法人産業技術総合研究所、東洋紡績株式会社

●研究開発項目B-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

<平成20年度(2008)>

1. 発明者:河村未佳

発明などの名称:化学物質が生体に与える影響の予測方法、これに用いるプローブセット及び検出又は定量キット

出願日:平成21年3月27日

出願番号:特願2009-080651

出願人:株式会社メディクローム

<平成21年度(2009)>

1. 発明者:河村未佳

発明などの名称:遺伝子発現レベルを指標とした化学物質の生体に対する影響の検出・予測方法

出願日:平成21年12月25日

出願番号:2009-296232

出願人:株式会社メディクローム

2. 発明者:渡邊慎哉、河村未佳

発明などの名称:化学物質が生体に与える影響の予測方法、これに用いるプローブキット及び検出又は定量キット

出願日:平成22年3月3日

出願番号:2010-046952

出願人:株式会社メディクローム

3. 発明者: 渡邊慎哉、河村未佳
発明などの名称: 化学物質が生体に与える影響を検出・予測する方法
出願日: 平成22年3月3日
出願番号: 2010-046953
出願人: 株式会社メディクローム
4. 発明者: 渡邊慎哉、河村未佳
発明などの名称: 化学物質の生体毒性の検出方法
出願日: 平成22年3月3日
出願番号: 2010-046954
出願人: 株式会社メディクローム

<平成22年度(2010)>

1. 発明者: 渡邊慎哉、今井順一、河村未佳
発明などの名称: 化学物質の生体に与える影響を検出する検出方法
出願日: 平成23年3月18日
出願番号: 2011-61650
出願人: 株式会社メディクローム
2. 発明者: 渡邊慎哉、今井順一、河村未佳
発明などの名称: 化学物質の生体影響の予測方法
出願日: 平成23年3月18日
出願番号: 2011-61651
出願人: 株式会社メディクローム
3. 発明者: 渡邊慎哉、今井順一、河村未佳
発明などの名称: 遺伝子セットを用いた化学物質の生体影響の検出方法
出願日: 平成23年3月18日
出願番号: 2011-61652
出願人: 株式会社メディクローム
4. 発明者: 渡邊慎哉、今井順一、河村未佳
発明などの名称: 化学物質曝露による生体への影響の予測方法
出願日: 平成23年3月18日
出願番号: 2011-61653
出願人: 株式会社メディクローム
5. 発明者: 渡邊慎哉、今井順一、河村未佳
発明などの名称: 化学物質曝露による化学物質の生体影響の検出・予測方法
出願日: 平成23年3月18日
出願番号: 2011-61654
出願人: 株式会社メディクローム

3-1. 報道

●研究開発項目A: 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

<平成18年度(2006)>

1. 2007年2月: 日本経済新聞:2007.2.15
「動物実験代替法 細胞など使い期間短縮 国産技術の確立をめざす」
2. 2007年2月: 情報ファイル Medical & Biotechnology News:2007.2.17
「動物実験代替法の世界の動き <動物実験代替法:細胞など使い期間短縮>」

<平成19年度(2007)>

1. 2007年8月: 日経産業新聞:2007.8.20
「化学物質の発がん性 ー培養細胞で検出ー食品薬品安全センター」
2. 2007年8月: 東京新聞・中日新聞 (社説):2007.8.23
「動物実験 ーもっと減らす工夫をー」
3. 2007年12月: NHK教育テレビ: 2007.12.1(産総研・近江谷)
「サイエンスゼロ・光る生物の力を生かせ」

<平成21年度(2009)>

1. 2009年4月: 科学新聞:2009.4.17(住友化学・斎藤幸一)
「動物実験代替法における培養細胞の利用」
2. 2009年12月: 日本経済新聞:2009.12.21
「国内の大学・企業、万能細胞使う創薬研究活発(住友化学 毒性評価系技術を開発)」

3-2. 受賞

●研究開発項目A: 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

<平成21年度(2009)>

1. 2009年11月14日: 第22回日本動物実験代替法学会総会・学術大会 優秀演題賞
「ES細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討」
鈴木紀之、斎藤幸一、安藤寛、堀江宣行(住友化学)

4. 講演・学会発表

●研究開発項目A: 培養細胞を用いた有害性評価手法の開発

<平成18年度(2006)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 日本環境変異原学会第35回大会NGCS研究会
「NEDOプロジェクトにおける発がん性評価法の開発」 田中憲穂(食薬センター)、2006/11/19
2. 日本環境変異原学会第35回大会NGCS研究会
「OECDのcell transformationに関するワシントン会議報告」 田中憲穂、梅田誠(食薬センター)、2006/11/19
3. 日本環境変異原学会第35回大会
「Bhas 形質転換試験共同研究報告」 浅田晋、林久実子、佐々木澄志(食薬センター)、2006/11/20
4. 日本環境変異原学会第35回大会
「v-Ha-ras 導入 BALB/c3T3(Bhas42)細胞を用いる形質転換試験における Fusarium 由来マイコトキシンおよび関連物質の活性」
酒井綾子、鈴木千尋、増井康子、高鳥康介、吉川邦衛、田中憲穂(食薬センター)、2006/11/20
5. 日本環境変異原学会第35回大会
「Bhas42細胞を用いた形質転換試験における狭小濃度域でのMMSの反応」
浅田晋、林久実子、佐々木澄志、山影康次、田中憲穂、梅田誠(食薬センター)、2006/11/20

(b) 催奇形性予測試験法の開発

6. 第53回日本実験動物学会総会
「ポリ塩化ビフェニールのラット培養胎児におよぼす影響」 秋田正治(鎌倉女子大)、2006/5/18
7. 第33回日本トキシコロジー学会学術年会
「発生毒性試験代替法(胎児培養, EUで認められた試験法を含む)」秋田政治(鎌倉女子大)、2006/7/4
8. 第27回 in vitro 発生毒性研究会
「マウスES細胞を用いた in vitro 発生毒性試験(EST)の現状と今後の方向性について」
堀江宣行(住友化学)、2006/9/2
9. 第20回日本動物実験代替法学会
「胎児培養法を用いたトリコエノールのラット胎児に対する影響について」
秋田政治(鎌倉女子大)、2006/12/8
10. 第80回日本薬理学会年会
「Effects of Effects of Devils' Claw on Cultured Rat Embryos」 秋田政治(鎌倉女子大)、2007/3/14
11. 日本薬学会 第127年会
「生殖・発生毒性試験の現状と近未来」 秋田政治(鎌倉女子大)、2007/3/30

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

12. 第105回日本皮膚科学会総会
「接触皮膚炎の病因論—最近の進歩」相場節也(東北大)、2006/6/2~4
13. 第20回日本動物実験代替法学会
「細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法(SH-Test)の開発(IV); 試験条件検討」
廣田衛彦、他(東北大)、2006/12/8~9
14. 第20回日本動物実験代替法学会
「細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法(SH-Test)の開発(V); 試験判断基準の構築化」
鈴木美絵、他(東北大)、2006/12/8~9
15. 26th Annual Meeting of Society of Toxicology
“Role of Cell-surface thiols in activation of hapten-treated THP-1 cells and evaluation as a biomarker for in vitro sensitization test” M Hirota, et al (Tohoku U.)、2007/3/26~29

(d) 基盤技術

16. 国際シンポジウム:Hokkaido International Crosscutting Symposium
“Imaging of cell functions using by bioluminescence probes(生物発光プローブを利用した細胞機

- 能イメージング)” 近江谷克裕(産総研)、2006/7/15
17. 国際シンポジウム:International Symposium of Luminescence Spectrograph, Spain
“Basic and application for color tuning of bioluminescence system(生物発光の色変調の仕組みと応用)” 近江谷克裕(産総研)、2006/7/20
 18. 19th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Culture, September (2006), Kyoto, Japan
“New Cytotoxicity Tests Using Multi-Compartmental Cell Culture and Miniaturization Technologies” Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii (Tokyo U.)、2006/9/28
 19. 第7回次世代医療システム産業化フォーラム、大阪商工会議所
「Advanced in vitro cell-based cytotoxicity tests (in vitro 培養細胞を用いる毒性試験の高度化)」 酒井康行(東大)、2006/10/17
 20. 日本分子生物学会 2006 フォーラム「分子生物学の未来」名古屋
「Imaging of cell functions using by bioluminescence probes(生物発光プローブを利用した細胞機能イメージング)」 近江谷克裕(産総研)、2006/12/6
 21. 国際シンポジウム:The 8th RIES-Hokudai International Symposium on ”微“札幌市
「Imaging of cell functions using by bioluminescence probes(生物発光プローブを利用した細胞機能イメージング)」 近江谷克裕(産総研)、2006/12/8
 22. 国際シンポジウム:International Toki Conference、土岐市
「Imaging of cell functions using by bioluminescence probes(生物発光プローブを利用した細胞機能イメージング)」 近江谷克裕(産総研)、2006/12/8
 23. 第20回日本動物実験代替法学会
「ラット正常肝細胞培養のための新規 PDMS 表面改質」
西川昌輝、小島伸彦、山本貴富喜、藤井輝夫、酒井康行(東大)、2006/12/8
 24. 日本薬学会第127回大会、シンポジウム「組織再生の先端技術とその創薬研究への応用」
「Multi-compartment cell culture systems for toxicokinetic analyses and its applications (物質の体内動態を考慮する複合培養系とその利用)」 酒井康行(東大)、2007/3/30
- (e) プロジェクト全体
25. 第20回日本動物実験代替法学会
「NEDOプロジェクトにおける代替試験法の開発」 田中憲穂(食薬センター)、2006/12/8

<平成19年度(2007)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 日本組織培養学会 第80回大会
「Bhas42 細胞(v-H-ras 導入 Balb/c 3T3 細胞)を用いる形質転換試験法と in vivo 発がん性試験法並びに他の短期遺伝毒性試験法との比較」
佐々木澄志、林久実子、村松大、黒田幸子、遠藤伸子、浅田晋、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2007/5/15
2. WC6 Seoul Satellite Symposium
“Establishment of in vitro alternative assay for carcinogenicity test” Noriho Tanaka(FDSC)、2007/8/20
3. 第6回代替法国際会議
“How to avoid false negatives in Bhas 42 cell transformation assay”
Aug. 23, Kumiko Hayashi, Kiyoshi Sasaki, Dai Muramatsu, Sachiko Kuroda, Nobuko Endoh, Shin Asada, Noriho Tanaka and Makoto Umeda(FDSC)、2007/8/23
4. 第6回代替法国際会議
“Balb/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity”
Ayako Sakai(FDSC)、2007/8/23
5. 第6回代替法国際会議
“Performance of Bhas 42 cell transformation assay as an alternative for the assessment of chemical carcinogenicity” Kiyoshi Sasaki(FDSC)、2007/8/23
6. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens / 36th JEMS
“Comparison of transformation activities of arsenic compounds in Bhas42 cells with those in BALB/c 3T3

cells”

Dai Muramatsu, Ayako Sakai, Kixyoshi Sasaki, Sachiko Kuroda, Kumiko Hayashi, Nobuko Endoh, Makoto Umeda, Noriho Tanaka(FDSC)、2007/11/28

7. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens / 36th JEMS
“Application of 96-well plates in carcinogen screening by Bhas 42 cell transformation assay for high-throughput”
Kumiko Hayashi, Nobuko Endoh, Dai Muramatsu, Ayako Sakai, Kiyoshi Sasaki, Makoto Umeda, Noriho Tanaka(FDSC)、2007/11/28
8. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens / 36th JEMS
“Introduction of metabolic activation system to Bhas 42 cell transformation assay”
Kiyoshi Sasaki, Dai Muramatsu, Sachiko Kuroda, Kumiko Hayashi, Shin Asada, Ayako Sakai, Makoto Umeda, Noriho Tanaka(FDSC)、2007/11/28
9. 化学工学会第73年会
「肝代謝酵素群存在下 Bhas42 細胞を用いた毒性試験系の構築」
山本尚子、中山秀謹、小森喜久夫、佐々木 澄志、田中憲穂、酒井康行(東大、他)、2008/3/17
- (b) 催奇形性予測試験法の開発
10. 第19回関西生殖発生毒性フォーラム
「マウスES細胞を用いたin vitro発生毒性試験(EST)の現状と今後の方向性について」
堀江宣行(住友化学)、2007/4/14
11. 第80回日本組織培養学会大会
「胎児培養法におけるラット肝 S-9mix を用いた化学物質の作用の検討」
秋田政治(鎌倉女子大)、2007/5/15
12. 第47回 日本先天異常学会学術集会
「生殖発生毒性試験法の代替法開発(胎児培養法の検討)」 秋田政治(鎌倉女子大)、2007/6/28
13. 第6回代替法国際会議
“The effect of S-9mix on rat whole embryos in culture” 秋田政治(鎌倉女子大)、2007/8/22
- (c) 免疫毒性予測試験法の開発
14. 第106回日本皮膚科学会総会 教育講演
「樹状細胞と環境因子」 相場節也(東北大)、2007/4/22
15. The 15th Korea-Japan Joint Meeting of Dermatology
“Dendritic cells as a biosensor” Aiba S.(Tohoku U.)、2007/6/2~3
16. 第34回日本トキシコロジー学会学術年会
「細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法(SH test)の開発(1)-試験条件の確立-」
鈴木美絵、他 (東北大)、2007/6/27~29
17. 第34回日本トキシコロジー学会学術年会
「細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法(SH test)の開発(1)-感作性物質処理したTHP-1 細胞の活性化における細胞表面-SH 基の役割-」 廣田衛彦、他 (東北大)、2007/6/27~29
18. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
“The molecular basis of skin sensitization How do haptens stimulate immune system?”
Aiba S.(Tohoku U.)、2007/8/21~25
19. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
“Role of cell-surface thiols in activation of hapten-treated dendritic cells”
Saori Kagatani, et al(Tohoku U.)、2007/8/21~25
20. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
“Construction of decision tree of in vitro sensitization assay using changes of cell surface thiols as a biomarker (SH test)” Mie Suzuki, et al (Tohoku U.)、2007/8/21~25
21. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences

“Role of cell-surface thiols in activation of haptene-treated THP-1 cells”

Morihiko Hirota, et al (Tohoku U.)、2007/8/21～25

22. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会 合同大会
「網羅的遺伝子発現解析による化学物質免疫毒性評価のための分子マーカーの探索」
斉藤るみ子、他(東北大)、2007/12/11～15
23. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
「環境化学物質と皮膚の免疫応答」 相場節也(東北大)、2007/12/14～16
24. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
「化学物質免疫毒性評価のためのバイオマーカー探索」 斉藤るみ子、他(東北大)、2007/12/14～16
25. 第37回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
「化学物質による表皮ヘムオキシゲナーゼ1の発現解析」 沼田郁子、他(東北大)、2007/12/14～16

(d) 基盤技術

26. 2007 EPA International Science Forum on Computational Toxicology, USA
“Temporal coding of ERK signaling network” Shinya Kuroda(Tokyo U.)、2007/5/21
27. 第6回代替法国際会議
“Rat hepatocytes functional enhancement and continuous double-layered coculture with fibroblasts achieved by on-site oxygenation through collagen-conjugated poly-dimethylsiloxane (PDMS) surfaces,”
M. Nishikawa, N. Kojima, K. Komori, T. Yamamoto, T. Fujii, and Y. Sakai(Tokyo U.) 2007/8/23
28. 12th Congress of the European Society for Photobiology, University of Bath (Bath BA2 7AY, UK).
“Basis and application of ostracod bioluminescence” 近江谷克裕(産総研)、2007/9/2
29. 酵素工学研究会 第58回講演会
「先端医療に貢献する発光酵素」 近江谷克裕(産総研)、2007/10/12
30. 生体分子イメージングの新たな技術開発に関する研究会
「発光イメージングの基礎と応用」 近江谷克裕(産総研)、2007/10/23
31. 視る生物学2 —イメージングの現在と未来—(奈良先端科学技術大学)
「生物発光プローブで探る生体情報」 近江谷克裕(産総研)、2007/11/22
32. 日本光学会年次学術講演会 OPJ 2007
「先端医療で貢献する生物発光技術」 近江谷克裕(産総研)、2007/11/26
33. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会
「ERK経路のシステム生物学」 黒田真也、尾崎裕一(東大)、2007/12/11
34. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会
「自動化免疫染色法を用いたERK経路のシステム解析」 尾崎裕一、黒田真也(東大)、2007/12/11
35. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会
「細胞成長を制御するシグナル伝達機構の定量的解析」 藤田一広、黒田真也(東大)、2007/12/11
36. 第30回日本分子生物学会年会 第80回日本生化学会大会 合同大会
「生物発光プローブによる細胞機能のイメージング」 近江谷克裕(産総研)、2007/12/13
37. 第10回次世代医療システム産業化フォーラム2007
「光イメージングによる医療イノベーション」 近江谷克裕(産総研)、2008/1/29
38. International Workshop on Future Challenges for Systems Biology, Japan
“Temporal coding of ERK signaling networks” Shinya Kuroda(Tokyo U.)、2008/2/6
39. Japan-Taiwan Young Researchers Conference on Computational and Systems Biology, Taiwan
“Systems biology of ERK signaling networks” Shinya Kuroda(Tokyo U.)、2008/3/9

(e) プロジェクト全体

40. ケミカルリスク研究会
「動物実験代替法の進展と現状日化協・化学団体会議室にて13:30-16:25
化管法見直しの検討状況 経済産業省化学物質管理課飛驒俊秀氏藤沢久氏
田中憲穂(食薬センター)、2007/7/20

<平成20年度(2008)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会
「発がん性物質検出のための Bhas42 細胞形質転換試験の多施設バリデーションスタディー」
田中憲穂、村松大、朝倉眞澄、林久実子、弘瀬秀樹、水橋福太郎、酒井綾子、坂本晃子、佐々木澄志、鈴木洋、梅田誠(食薬センター)、2008/6/28
2. 2008 Summer Conference of Korean Society for Alternative to Animal Experiments
“Role of Cytotoxic Endpoints on Alternative Research” Noriho Tanaka(FDSC)、2008/8/22
3. 日本環境変異原学会第 37 回大会
「マイクロアレイ解析による形質転換関連遺伝子の検索」
浅田晋、村松大、佐々木澄志、酒井綾子、梅田誠、黒田信也、田中憲穂(食薬センター、東京大)、2008/12/4
4. 日本環境変異原学会第 37 回大会
「Bhas 42 細胞を用いた細胞形質転換試験における用量設定方法の検討」
新井晶子、佐々木澄志、酒井綾子、村松大、山崎晶次郎、田中憲穂(食薬センター)、2008/12/4
5. 日本環境変異原学会第 37 回大会
「多検体スクリーニングによる Bhas42 細胞形質転換試験の評価」
村松大、酒井綾子、佐々木澄志、新井晶子、山崎晶次郎、遠藤伸子、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2008/12/4
6. 日本環境変異原学会第 37 回大会
「ハイスループット自動機器の開発」
佐々木澄志、酒井綾子、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2008/12/4
7. 日本歯科大学・大学院セミナー
「医薬品-医療機器などの安全性試験」
田中憲穂(食薬センター)、2008/12/10
8. 京都大学原研放射性生命化学研究部門セミナー
「Bhas 42 細胞形質転換試験の開発とバリデーション研究」
酒井綾子(食薬センター)、2009/2/3
9. 北海道大学医学部第1 回TR セミナー
「医薬品・医療機器の安全性試験(前臨床試験)についての現状」
田中憲穂(食薬センター)、2009/2/6
10. 城西大学生命科学研究セミナー講演会
「食品・薬品・化粧品などの細胞/動物を用いる安全性試験」
田中憲穂(食薬センター)、2009/3/4
- (b) 催奇形性予測試験法の開発
11. 第 55 回日本実験動物学会総会
「代謝機能を取り入れた胎児培養法の検討」 秋田政治(鎌倉女子大)、2008/5/15
12. 第 81 回日本組織培養学会大会
「使用血清を少なくした新しい胎児培養装置の開発」 秋田政治(鎌倉女子大)、2008/5/19
13. 7th World congress on alternatives & animal use in the life sciences
“Development of novel short-term tests for reproductive and developmental toxicity”
Masaharu Akita, Noriyuki Suzuki, Nobuyuki Horie, Satoshi Ando, Koichi Saito (Kamakura Womens U., Sumitomo Chemical), 2008/8/30
14. 日本動物実験代替法学会 21 回大会
「ES 細胞を利用した発生毒性(催奇形性)に関与する遺伝子の解析」
鈴木紀之、堀江宣行、安藤 寛、斎藤幸一(住友化学)、2008/11/13

15. 第82 回日本薬理学会年会
 “The effect of imipramine on cultured rat embryos in the medium containing S-9mix”
 秋田政治(鎌倉女子大)、2009/3/19
- (c) 免疫毒性予測試験法の開発
16. 第107 回日本皮膚科学会総会 教育講演
 「病態から見たアトピー性皮膚炎のマネージメント、環境アレルゲンへの対応」
 相場節也(東北大)、2008/4/18～20
17. International Investigative Dermatology
 “The functional expression of Heme Oxygenase-1 in normal human epidermis”
 Numata I. et al(Tohoku U.)、2008/5/14～17
18. International Investigative Dermatology
 “The decrease of cell-surface thiols in dendritic cells treated by chemicals augments their CD86 expression, a possible role in DC maturation by haptens”
 Kagatani S. et al(Tohoku U.)、2008/5/14～17
19. International Investigative Dermatology
 “Profiles of Foxp3+regulatory T cells (Tregs) in Bowen’s disease and squamous cell carcinoma”
 Fujimura T. et al(Tohoku U.)、2008/5/14～17
20. International Investigative Dermatology
 “Search for biomarkers to evaluate immunotoxicity of chemicals by gene expression analysis”
 Saito R. et al(Tohoku U.)、2008/5/14～17
21. 第38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
 「アトピー性皮膚炎の病態に関する最近の話題」 相場節也(東北大)、2008/11/7～9
22. 第38 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会学術大会
 「表皮におけるヒアルロン酸合成とE-cadherin 発現の制御—海綿状態皮膚ではヒアルロン酸合成が増強しE-cadherin 発現が低下する」 大谷朋之、水芦政人、奥山隆平、相場節也(東北大)、2008/11/7～9
23. 第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会
 「Normal human epidermal keratinocyte (NHEK)における細胞外ATP 誘導性免疫応答因子の探索」
 大原広司、齋藤るみ子、相場節也(東北大)、2008/12/9～12
- (d) 基盤技術
24. 第6 回幹細胞シンポジウム
 「新規ヒト人工染色体ベクターの構築:サブテロメアを用いた高発現ベクター系」
 掛田 実、永田恵子、佐野暁子、大澤加奈子、岡崎晃代、設楽真吾、香月康宏、押村光雄、富塚一磨(鳥取大)、2008/5/16
25. 第3 回ケミカルバイオロジー研究会シンポジウム
 「ポストゲノム時代における発光イメージングの可能性」 近江谷克裕(北大/産総研)、2008/5/20
26. ASGT 11th annual meeting(2008 May U.S.A.)
 “Human FVIII Expression Using a HAC Vector Toward Gene Therapy for Hemophilia A”
 Kurosaki H., Hiratsuka M., Kazuki Y., Ishihara C., Takeya H., Inoue T., Oshimura M.
 (Tottori U.)、2008/5/28
27. ASGT 11th annual meeting(2008 May U.S.A.)
 “A human artificial chromosome (HAC) vector with about 2.4 Mb-human Dystrophin genome including native expression control elements ”
 Hoshiya H., Kazuki Y., Abe S., Kai Y., Takiguchi M., Iida Y., Watanabe Y., Osaki M., Kajitani N., Yoshino T., Shirayoshi Y. and Oshimura M.(Tottori U.)、2008/5/28

28. ASGT 11th annual meeting(2008 May U.S.A.)
 “A novel human artificial chromosome (HAC) for gene therapy and animal transgenesis ”
 Kazuki Y., Hoshiya H., Abe S., Takiguchi M., Iida Y., Watanabe Y., Osaki M., Katoh M., Kajitani N.,
 Yoshino T., Shirayoshi Y., Hiratsuka M., Kurimasa K., and Oshimura M.(Tottori U.) , 2008/5/28
29. バイオジャパン2008、セミナー
 「培養細胞を用いた有害性評価手法の開発における発光細胞技術」
 近江谷克裕(北大/産総研)、2008/10/15
30. 第31回日本分子生物学会大会、第81回日本生化学大会 合同大会
 「ヒト人工染色体(HAC)ベクターを用いた多色発光バイオイメージング細胞の確立」
 山口繁幸、大林徹也、近江谷克裕、西井重明、相場節也、星野英人、浅井友美、斎藤るみ子、
 香月康弘、押村光雄(鳥取大他)、2008/12/11

(e) プロジェクト全体

31. バイオジャパン2008、セミナー
 「培養細胞を用いた有害性評価手法－発がん性、催奇形性、免疫毒性」
 田中憲穂(食薬センター)、2008/10/15
32. 日本動物実験代替法学会 21 回大会
 「NEDOプロジェクト:培養細胞を用いた有害性評価手法の開発-発がん性、催奇形性、免疫毒性-」
 山崎晶次郎、田中憲穂、佐々木澄志、近江谷克裕、斎藤幸一、秋田政治、相場節也、西井重明、
 黒田真也、押村光雄、大林徹也(食薬センター、他)、2008/11/13

<平成21年度(2009)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. JaCVAM第2回ワークショップ
 「形質転換試験のバリデーション研究」
 酒井綾子(食薬センター)、2009/4/17
2. JaCVAMシンポジウム
 「In vitro代替試験法開発の概要-発がん、免疫毒性、催奇形性-」
 田中憲穂(食薬センター)、2009/5/13
3. 10th International Conference on Environmental Mutagens
 “Characteristics and Performance of a Bhas 42 Cell Transformation Assay for Prediction of Chemical
 Carcinogenicity”
 Ayako Sakai, Kiyoshi Sasaki, Dai Muramatsu, Shoko Arai, Nobuko Endo, Sachiko Kuroda, Kumiko Hayashi,
 Yeon-Mi Lim, Shojiro Yamazaki, Makoto Umeda, Noriho Tanaka (FDSC)、2009/5/13
4. Genomics in Cancer Risk Assessment
 “Strategies for High-Throughput Screening Carcinogens Based on Bhas 42 Cell Transformation Assay”
 Kiyoshi Sasaki, Shin Asada, Shinsuke Uda, Dai Muramatsu, Shoko Arai, Nobuko Endou, Yeon-Mi Lim,
 Shojiro Yamazaki, Ayako Sakai, Shinya Kuroda, Makoto Umeda, Noriho Tanaka (FDSC)、2009/8/27
5. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
 “Bhas 42 Cell Transformation Assay to Detect Carcinogens Using 96-Well Plates and a Robotic System for
 High-Throughput Screening”
 Kiyoshi Sasaki, Masanori Wada, Nobuko Endou, Dai Muramatsu, Shoko Arai, Ayako Sakai, Shojiro
 Yamazaki, Makoto Umeda, Noriho Tanaka (FDSC)、2009/8/30

6. 日本動物実験代替法学会第22回大会
「Bhas 42細胞形質転換試験のガイドライン化を目指して」
佐々木澄志、村松 大、新井晶子、遠藤伸子、黒田幸子、林 久実子、酒井綾子、山崎晶次郎、Lim Yeon-mi、梅田 誠、和田昌憲、田中憲穂(食薬センター、他)、2009/11/13
 7. 日本動物実験代替法学会第22回大会
「Bhas 42細胞形質転換試験の特性と化学物質の発がん性に関する予測能」
酒井綾子、佐々木澄志、村松大、新井晶子、遠藤伸子、黒田幸子、林久実子、Lim Yeon-mi、山崎晶次郎、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2009/11/13
 8. 日本動物実験代替法学会第22回大会
「Bhas 42細胞形質転換試験における6ウェル法と96ウェル法の一致」
新井晶子、佐々木澄志、酒井綾子、村松大、遠藤伸子、山崎晶次郎、Lim Yeon-mi、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2009/11/13
 9. 日本環境変異原学会第38回大会
「リアルタイムPCRを用いた発がんプロモーター処理細胞における遺伝子の発現評価」
浅田晋、村松大、宇田新介、佐々木澄志、酒井綾子、梅田誠、黒田信也、田中憲穂(食薬センター、他)、2009/11/26
 10. 日本環境変異原学会第38回大会
「Bhas 42細胞におけるv-Ha-ras遺伝子の安定性について」
村松大、浅田晋、佐々木澄志、酒井綾子、Lim Yeon-Mi、新井晶子、遠藤伸子、山崎晶次郎、梅田誠、田中憲穂(食薬センター)、2009/11/26
 11. 日本環境変異原学会第38回大会
「形質転換Bhas 42細胞と導入v-Ha-ras遺伝子との関連性について」
Lim Yeon-Mi、佐々木澄志、酒井綾子、村松大、新井晶子、遠藤伸子、山崎晶次郎、田中憲穂(食薬センター)、2009/11/26
- (b) 催奇形性予測試験法の開発**
12. 第56 回日本実験動物学会総会
「代謝機能を取り入れた胎児培養法の検討(2)-培養胎児におけるイミプラミンの影響-」
秋田政治(鎌倉女子大)、2009/5/14
 13. 第36 回日本トキシコロジー学会学術年会
「ES 細胞のトキシコロジーへの応用(2) 発生毒性分野への応用」斎藤幸一(住友化学)、2009/7/6~8
 14. 7th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences
“The effect of S-9mix on rat whole embryos in culture “
Masaharu Akita (Kamakura Womens U.)、2009/8/30
 15. 7th World congress on alternatives & animal use in the life sciences
“Development of novel short-term tests for reproductive and developmental toxicity”
Masaharu Akita (Kamakura Womens U.)、Noriyuki Suzuki、Nobuyuki Horie、Satoshi Ando、Koichi Saito (Sumitomo Chemical)、2009/8/30
 16. 第17 回生殖・発生毒性学東京セミナー
「ES 細胞を用いた催奇形性予測試験法の開発」斎藤幸一(住友化学)、2009/10/2

17. 第22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「全胚培養法の改良」 秋田政治(鎌倉女子大)、2009/11/13
 18. 第2 2回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「発生毒性試験の代替法開発: 1) ES 細胞を用いたレポータージーンアッセイの開発」
斎藤幸一、鈴木紀之、安藤 覚、堀江宣行(住友化学)、2009/11/14
 19. 第2 2 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「ES 細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討」
鈴木紀之、堀江宣行、安藤 覚、斎藤幸一(住友化学)、2009/11/14
 20. 第22 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「ES 細胞を利用した神経分化過程における発生毒性に関する遺伝子の解析」
鈴木紀之、安藤 覚、堀江宣行、斎藤幸一(住友化学)、2009/11/14
 21. 第83回日本薬理学会年会
“The effect of Sodium Valproate on Cultured Rat Embryos in S- 9mix”
秋田正治、石塚典子、横山篤(鎌倉女子大)、2010/3/16
- (c) 免疫毒性予測試験法の開発**
22. 第34回日本トキシコロジー学会 学術年会
「細胞表面-SH基を指標とした感作性試験代替法 (SHtest)の開発(1)感作性物質処理したTHP-1 細胞の活性化における細胞表面-SH 基の役割」
廣田衛彦、相場節也、他(東北大)、2009/10/17~18
 23. VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Science
“Search for biomarkers to evaluate immunotoxicity of chemicals and to develop cell-based screening methods”
S. Aiba (Tohoku U.)、2009/8/30~9/3
 24. The 61st Annual Autumn Meeting of the Korean Dermatological Association
“Contact dermatitis(spongiosis); what it means and how it develops”
S. Aiba (Tohoku U.)、2009/10/17~18
 25. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium
“Contact dermatitis: what it means and how it develops”
S. Aiba (Tohoku U.)、2009/11/5~8
 26. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium
“Search for biomarkers to evaluate the sensitizing potential of chemicals”
Saito R., Ohara H., Hirakawa S., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/11/5~8
 27. The 17th International Contact Dermatitis Symposium and Asia-Pacific Environmental and Occupational Dermatology Symposium
“Evaluation of the sensitizing potential of chemicals by cell-based reporter assay”
Kimura Y., Takahashi T., Rumiko S., Numata I., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/11/5~8

28. 第39 回日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会総会
「痒疹の病態形成機序の解析」 渋谷佐和子、相場節也(東北大)、2009/11/6～8
29. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“The pathogenesis of prurigo revealed by the cytokine signature”
Shibuya S., Ohtani T., Ito Y., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/12/4～5
30. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“p63 prevents growth arrest via sonic hedgehog induction”
Ogawa R., Okuyama R., Okada S., Ikawa A., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/12/4～5
31. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“The role of ATP-stimulate normal human epidermal keratinocytes in skin inflammation revealed by DNA microarray analysis”
Ohara H., Saito R., Hirakawa S., Ito Y., Shimad M., Manoa N., Hishinuma T., Aiba S. (Tohoku U.)、
2009/12/4～5
32. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“Notch2 down-regulation in wound healing is contributed to acceleration of cell motility”
R. Okuyama, R. Saito, E. Ogawa, S. Ikawa, S. Aiba (Tohoku U.)、2009/12/4～5
33. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“The immunosuppressive effects of nickel on T cell response”
Saito R., Ohara H., Hirakawa S., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/12/4～5
34. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“The self-augmentation of STAT6 phosphorylation by Dual Oxidase 1 induced by IL-4/IL-13-stimulated human epiderma keratinocytes”
Hirakawa S., Saito R., Ohara H., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/12/4～5
35. 第34 回日本研究皮膚科学会総会
“Development of the millimeter wave radiometer to noninvasively measure the thickness of epidermis”
Kagatani S., Shibuya S., Mizuno K., Aiba S. (Tohoku U.)、2009/12/4～5
- (d) 基盤技術**
36. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences
“Development of multicolor luciferase assay system using different color emitting luciferases for monitoring multiple gene expressions”
中島芳浩(産総研)、2009/8/1
37. VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Science
“Development of high-performed prediction system for chemical toxicity in the cell using tricolor bioluminescence probes”
近江谷克裕、中島芳浩(産総研)、山崎友美、西井重明(東洋紡績)、2009/9/3
38. Okazaki Congress for Molecular Imaging for System Biology
“Application of luciferases for in vivo bioluminescence imaging”
近江谷克裕(産総研／北大／鳥取大)、2009/11/6
39. 鳥取大学イブニング・セミナー

「人工染色体ベクターの産業への応用」

押村光雄、大林徹也、香月康宏(鳥取大)、2009/10/16

40. 第60回染色体学会60周年記念公開講座

「染色体研究の歩みと今後の展望」

押村光雄(鳥取大)、2009/11/12

41. 第12回北海道バイテク交流会生物発光の基礎と応用

「こんなに利用されている生物の光」

近江谷克裕(産総研／北大／鳥取大)、2009/11/19

<平成22年度(2010)>

(a) 発がん性予測試験法の開発

1. 101st Association of American Cancer research(AACR)

「A Bhas 42 cell transformation assay sensitive to Ames-negative and Ames-discordant carcinogens: its performance for the prediction of chemical carcinogenicity」

A. Sakai, K. Sasaki, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endo, S. Kuroda, K. Hayashi, Yeonmi Lim, S. Yamazaki, M. Umeda and N. Tanaka. (Hatano Res. Inst., Food & Drug Safety Center)2010/4/15, Washington D.C., USA

2. Cell Transformation Assay workshop: States of the Science, Future Research Needs and Potential Role in Risk Assessment

「Validation Work with Bhas 42 Cell transformation Assay」

K. Sasaki, A. Sakai, M. Umeda. N. Tanaka (Hatano Res. Inst., Food & Drug Safety Center) 2010/11/9, London

3. 日本変異原学会第39回大会

「96 ウェル培養プレートを用いたBhas 42 細胞形質転換試験の国際バリデーション研究(第I相)に関する報告」

新井晶子、佐々木澄志、酒井綾子、村松 大、遠藤伸子、水橋福太郎、永井美穂、浅倉眞澄、田代信彦、石井奈々、鈴木雅也、田中憲穂(食薬センター、安評センター、日本バイオアッセイ、三菱化学メディアエンス)、2010/11/16-17

4. 日本動物実験代替法学会第23 回大会

「化学物質の発がん性予測のための6-ウェルプレートを用いるBhas 42 細胞形質転換試験の国際バリデーション研究」

酒井綾子、佐々木澄志、林 久実子、村松 大、新井晶子、遠藤伸子、黒田幸子、水橋福太郎、笠本佐和子、永井美穂、浅倉眞澄、弘瀬秀樹、石井奈々、Kamala Pant、Shannon W. Bruce、Jamie E. Sly、Albrecht Poth、Susanne Bohnenberger、Thorsten Kunkelmann、山崎晶次郎、梅田 誠、田中憲穂(食薬センター、安評センター、日本バイオアッセイ、三菱化学メディアエンス、BioReliance Corporation、Harlan Cytotest Cell Research GmbH) 2010/12/4-5

5. 2nd Acian Conference on Environmental Mutagens (ACEM)

「A international validation study on a Bhas 42 cell transformation assay using 6 well plates for the prediction of chemical carcinogenicity」

A. Sakai, K. Sasaki, K. Hayashi, D. Muramatsu, S. Arai, N. Endou, S. Kuroda, F. Mizuhashi, M. Asakura, H. Hirose, N. Ishii, K. Pant, A. Poth, S. Bohnenberger, T. Kunkelmann, S. Yamazaki, M. Umeda, N. Tanaka(食薬センター、安評センター、日本バイオアッセイ、三菱化学メディアエンス、BioReliance Corporation、Harlan Cytotest Cell Research GmbH) 2010/12/15-18 Pataya, Thailand

(b) 催奇形性予測試験法の開発

6. 第57 回日本実験動物学総会
「ラットS-9mix を加えた培養胎児に及ぼすバルプロ酸の影響」 秋田正治(鎌倉女子大学)、2010/5/12
7. 第37 回日本トキシコロジー学会学術年会
「マウスES 細胞を用いた新規発生毒性代替法試験の検討」
鈴木 紀之、堀江 宣行、安藤 覚、斎藤 幸一(住友化学)、2010/6/16
8. 第37 回日本トキシコロジー学会学術年会
「マウスES 細胞を利用した神経分化過程における発生毒性に関与する遺伝子の解析」
鈴木 紀之、堀江 宣行、安藤 覚、斎藤 幸一(住友化学)、2010/6/16
9. 第37 回日本トキシコロジー学会学術年会
「ヒトES/iPS 細胞を用いた新規発生毒性試験代替法の検討」
安藤 覚、鈴木 紀之、斎藤 幸一(住友化学)、2010/6/16
10. 第50 回日本先天異常学会学術集会
「代謝機能を取り入れた胎児培養法の検討ーバルプロ酸における影響ー」
秋田正治(鎌倉女子大学)、2010/7/8
11. 第23 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「発生毒性の代替試験法開発ーマウスES 細胞を用いたレポータージーンアッセイ系の開発とラット胎児培養法の改良ー」 鈴木紀之、斎藤幸一、秋田正治(住友化学、鎌倉女子大学)、2010/12/4
12. 第23 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「ES細胞の神経分化過程を利用した新規発生毒性代替法試験の検討」、2010/12/4
13. 第23 回日本動物実験代替法学会総会・学術大会
「ラットS-9mix 存在下における培養ラット胎児への化学物質の影響(バルプロ酸処理の場合)」
秋田正治(鎌倉女子大学)、2010/12/4

(c) 免疫毒性予測試験法の開発

14. The 70th SID Annual meeting
“Th2 cytokines-induced Dual oxidase 1 in human epidermal keratinocytes makes a positive feedback loop for IL-4/IL-13 signaling by augmenting STAT6 phosphorylation via oxidative inactivation of protein tyrosine phosphatase 1B” Hirakawa S., Saito R., Aiba S. (Tohoku U.), 2010/5/5~8
15. 40th Annual ESDR meeting
“Nickel differentially regulates NFAT and NF-κB activation in T cell signaling”
Saito R., Hirakawa S., Yamasaki K., Aiba S. (Tohoku U.), 2010/9/8~11
16. 第74 回日本皮膚科学会東部支部学術大会
「接触皮膚炎における化学物質ストレス」 相場節也(東北大学)、2010/11/20~21
17. 第60 回日本アレルギー学会秋季学術大会

「ワークショップ1.金属アレルギーの発症メカニズムと対策:金属によるimmunomodulation」

相場節也(東北大学)、2010/11/25～27

18. 第35 回日本研究皮膚科学会総会

“A high-throughput luciferase assay system to evaluate immunological effects of chemicals”

Kimura Y., Saito R., Takahashi T., Nishii S., Ohmiya Y., Aiba S. (Tohoku U., et al)、2010/12/3～5

19. 第35 回日本研究皮膚科学会総会

“Nickel and divalent ions suppress NFAT and cytokine induction via CRAC channel inhibition”

Saito R., Hirakawa S., Ohara H., Yasuda M., Yamazaki T., Nishii S., Aiba S. (Tohoku U., et al)、2010/12/3～5

20. 第23 回日本動物実験代替法学会

「シンポジウム5. 化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発－発癌性、発生毒性、免疫毒性－免疫毒性評価用細胞、並びに免疫評価システムの開発」

相場節也、齋藤るみ子、木村裕、沼田郁子、高橋隼也(東北大学)、2010/12/3～5

21. 第35 回日本研究皮膚科学会総会

“Dendritic cells induce IL-8 by contact allergens through intracellular oxidation, which is suppressed by N-acetyl-Lcysteine”

Takahashi T., Kimura Y., Saito R., Hakajima Y., Ohmiya Y., Aiba S. (Tohoku U., et al)、2010/12/3～5

(d) 基盤技術

22. 日本動物実験代替法学会 第23回大会

「ヒト人工染色体(HAC)ベクターを用いた高機能で簡易な有害性評価代替法の開発」

山口繁幸、大林徹也、近江谷克裕、西井重明、浅井友美、香月康弘、押村光雄(鳥取大他)、2010/12/4

23. 日本動物実験代替法学会 第23 回大会

「3色発光技術を用いたレポータージーンアッセイ系の開発」

中島芳浩、西井重明、近江谷克裕(産総研他)、2010/12/5

(e) プロジェクト全体

24. 日本トキシコロジー学会第37 回学術年会

「NEDO で開発した代替試験法とその行政的な受け入れ」 田中憲穂(食薬センター)、2010/6/18

25. 日本動物実験代替法学会第23 回大会

「化学物質の有害性評価に関する代替試験法開発－発がん、発生毒性、免疫毒性－」

田中憲穂(食薬センター)、2010/12/5

26. 日本薬理学会第84 回年会

「NEDO プロジェクトによる化学物質の短期in vitro 試験法の開発」

田中憲穂(食薬センター)、2011/3/28

●研究開発項目B-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
<平成22年度(2010)>

1. 日本トキシコロジー学会第38回学術年会

「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」

今井順一、加藤史子、河村未佳、渡辺慎哉(福島県立医科大学、メディクローム)、2011/7/13(予定)

開発項目「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」

平成18年度～平成19年度報告書

平成19年8月

新エネルギー・産業技術総合開発機構

委託先 財団法人化学物質評価研究機構

1. 研究開発の成果と達成状況

(1) 研究開発の成果

要約 (和文／英文)

近年急速に発展してきた遺伝子解析手法を短期動物試験に活用し、従来法ではその評価に多額の費用と長期間を要する発がん性に関して、高精度に予測できる高機能かつ簡易な有害性評価手法を開発することを目的とした。平成18年度～19年度では以下の各課題を実施した。

(1) ラット腎臓からの RNA 抽出・精製法の開発

ラットの腎臓採取部位の違いによる発現遺伝子の構成及び変動量の差異を確認し、適切な採材方法を確立した。また、マイクロアレイ実験に十分な量の RNA が得られる腎臓の採材量を求めるとともに、RNA 精製方法及び保存方法を確立した。

(2) ラット毒性試験の実施とマイクロアレイによる発現変動遺伝子の測定

ラットに対する腎発がん性物質4種類及び非発がん性物質2種類を選定し、NEDO終了プロジェクト「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システム開発」で構築されたプロトコールに従い、F344系雄性ラットを用いた28日間反復投与試験を実施した。投与期間中14日目及び28日目に腎臓及び肝臓を摘出し、NEDO終了プロジェクトで開発された NEDO-ToxArrayIII 及び市販マイクロアレイを用いて遺伝子発現データを収集した。

(3) マイクロアレイの開発

(2)項の測定結果に基づき、NEDO-ToxArrayIII の腎発がん性物質の予測に対する適用性を評価した。その結果、腎発がん性物質の予測には新たな遺伝子セットが必要であることが明らかとなった。そこで、NEDO-ToxArrayIII に搭載されていないがラット腎発がん性の判定に有効な遺伝子の候補を331種類選定した。

(4) 遺伝子発現測定結果を基にした腎臓における発がん性予測手法の開発

腎発がん性物質に対する予測式を作成するために、NEDO終了プロジェクトにて確立した手順に従い、まずウェルチの t 値に基づき特徴的な発現変動遺伝子群を選定した。次いで、選定した遺伝子群の発現パターンから Support Vector Machine 法を用いて発がん性の予測式を作成した。その結果、ラット腎発がん性物質(4物質)をほぼ予測することができた。

(5) 遺伝子情報、ラット毒性データ及び公開データを含めた統合データベースの構築

NEDO終了プロジェクトの統合データベースシステムに新たに必要となる機能と収載する情報を明確化し、データベースの仕様を策定した。そして、臓器間の遺伝子発現データを解析する機能の追加、がん組織の遺伝子発現データの統合化、予測式の検証速度向上のための改良に着手した。また、(2)項の試験データをデータベースに収載した。遺伝子機能情報に関しては、定期的に最新のものを取得した。

(6) 腎発がん性予測のための *in vitro* 検索系の開発

In vitro 試験による簡便な腎発がん性予測法を開発するために、発がん性が既知の化合物10種類を選定し、ラット腎癌細胞株 BC36B、ラット肝癌細胞株 MH1C1 及びヒト腎癌細胞株 Caki-1 を用いた暴露実験を行った。そして、市販のマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った結果、発がん性物質の暴露で特異的に発現変動する遺伝子が見出され、がん細胞株を用いて腎発がん物質を同定できる可能性が示唆された。

(7) 発がん性予測に用いるマーカー遺伝子探索のためのデータ解析手法の開発並びに新規バイオマーカーの探索

NEDO終了プロジェクトにて取得した28日間投与のラット肝臓のマイクロアレイデータについて、各プローブの特異的結合と非特異的結合のシグナル値を基に、発現変動しないプローブを選定するための数理モデルを構築した。そして、発現変動しない遺伝子候補を約4,000種類選定した。また、単変量解析を行うため、発がん物質、非発がん物質各1物質のアレイデータを数理モデルに基づき比較解析し、発がん物質または非発がん物質の投与で共通して発現変動しない遺伝子を確認した。