

「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システムの開発」

財団法人化学物質評価研究機構
化学物質安全センター管理部業務課副主査
川原 和三



財団法人化学物質評価研究機構の川原といいます。

本日は「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システムの開発」ということで、5年計画のうちの4年のほぼ終わりに来ておりますが、この内容につきまして簡単に説明させていただきます。（資料：1）

「高精度・簡易有害性（ハザード）評価システムの開発」は「化学物質総合評価管理プログラム」と呼ばれる新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）のプロジェクト、通称、私どもで3プロと呼んでおりますものに相当いたします。（資料：2）

先ほどの安井先生のお話にもありました4分野では、この研究は有害性の評価ということに相当するかと思います。

プロジェクトの目的、背景から説明をさせていただきますが、私どもでは遺伝子発現による発がん性の予測、もしくは発がん性の評価を研究の主目的として行っております。

発がん性に関しまして、私は専門家ではありませんが5つほど考えられる大きな問題点があります。（資料：3）

まず、化学物質の有害性を評価する上において、発がんというものは非常に大きな一つのエンドポイント、究極のエンドポイントの一つかもしれませんが、現行の標準の試験法では、約2年間の長期の試験が標準試験という形で設定されております。それに伴いまして、非常にたくさんの動物を使うということ。世界的な流れとしまして、アニマルウェルフェアにもあまりよろしくないということがあります。

2番目に、がんが出るかどうかということ調べるわけですから、日常的な用途では考えられないような非常に高い濃度での非現実的な高い濃度で試験をやるということ。

それから、動物の数もそうですが、試験期間が2年ということで非常に費用がかかるということ。

それから、2年間にわたる動物試験を行うために、専門の施設、専門家、知識、スタッフが必要になり、世界中でもこのような試験を実施できる場所はそれほどたくさんはないということ。

それから、あくまでも現行の発がん性試験では、発がんというものを病理学的に判断するため、そのメカニズムが欠如しており、げっ歯類を使った試験結果からヒトへの発がん性を外挿する際にはいろいろな問題が生じます。結果として、げっ歯類では発がん性あり、

ヒトでは疑わしいというような何だかよくわからない結果が出ることもあります。

このような背景がありまして、化学物質の有害性を評価するとともに、その評価を更に加速させていく上で、簡便で高精度な短期間の試験法の確立が必要であろうという観点から研究が始まっております。

今、申しましたようなこと、それから背景といたしましては、更に有害性のデータをできるだけ蓄積しようという中において、発がん性に着目しますと、遺伝毒性試験もしくは染色体異常試験等が基本的には変異原性がある発がん物質をスクリーニングすることを目的としております。一方、非変異原性の発がん性物質に関していうと、必ずしも十分なスクリーニングとはなっていないという背景があります。(資料：4)

更に、発がん性を確かめるための試験をやるには非常にコストと時間がかかります。

更に、そういった背景から、発がん性があるのか、ないのかというのがはっきりしている化学物質の数が非常に少ないということもあります。

更に、私どものプロジェクトで用いる新技術として、遺伝子解析もしくはタンパク質による解析技術の進歩、それからヒトゲノムの解析が終わっているということ。そういった技術的な進歩があります。

こういったことを踏まえて、高精度で、低コストで、かつ短期間の有害性、ここでは発がん性ですけれども、評価手法を開発しようというようなことを考えております。

具体的には、日本では化審法で化学物質の事前審査を行っておりますが、そこで日常的に行われている反復投与試験というものがあります。これは通常4週間の暴露をやるわけですが、これと組み合わせたような形で、一つのルーチ的な試験の中に、更に発がん性という新たなエンドポイントを予測できないかというような考えも盛り込んでおります。

「研究開発体制」ですが、このプロジェクトはコンソーシアムを組んでおります。(資料：5)

真ん中に化学物質評価研究機構(CERI)がありますけれども、このプロジェクトのプロジェクトリーダーとしましては、名古屋市立大学の白井教授にお願いしております。

コンソーシアムのメンバーとしては、CERI以外に住友化学工業、三菱化学安全科学研究所、この3者が中心となって実験、データの解析、マネジメントを行っております。

更に、基礎研究として、このコンソーシアム以外に東京大学、早稲田大学、名古屋市立大学とも協力をして研究を進めております。

コンソーシアム、それから基礎研究を行うそれぞれの役割ですけれども、住友化学工業では動物実験プロトコルの最適化、それから、三菱化学安全科学研究所はDNAマイクロアレイの設計と作製を分担しています。(資料：6)

それから、3者で協力して、動物実験を行った後にアレイ実験を実施しています。

更に、私どもCERIの方ではバイオインフォマティクスを用いたデータベースの構築、解析アルゴリズムの整備、更には予測法の開発を担当しております。

「研究開発スケジュール」については、このプロジェクトは平成13年度から開始して、

5年計画で進んでおります。(資料:7)

まず、「I 動物実験・プロトコル検討」において現在までのところ85の発がん性の有無がはっきりしている化合物を使った動物実験、それからマイクロアレイによるデータの取得を行ない、もう既に終了しております。

更に「マイクロアレイの作製」では、プロジェクトを13年度から開始いたしまして、今までに2回ほど大きな仕様の変更を行っております。

最初に、「NEDO-ToxArray」と呼ぶアレイをつくり、その次に搭載する遺伝子を改良した「NEDO-ToxArray」を作製しました。平成16年度からは「NEDO-ToxArray」と言われている、化学合成オリゴヌクレオチドを搭載したアレイの開発を進め、更には、搭載遺伝子も若干変更しております。それから、このプロジェクトで一番難航しているところですが、「バイオインフォマティクス」では、データベースを構築するために、莫大なマイクロアレイの発現データをまずデータベースに収録することを試みています。

また、さまざまな解析ツールを用いて発がん性に関連する遺伝子の抽出を行っております。

それから、私どもは「データ・マイニング」と呼んでおりますけれども、得られた発現データを用いて、それをさまざまなアルゴリズムで解析をすることによって発がん性の予測に使えるような遺伝子のセットを明らかにし、更には、遺伝子の発がん性の予測式を開発しようと試みています。

主に住友化学工業が担当しております「動物実験プロトコル策定の概要」については、先ほど申しましたように、化審法でルーチン的に行われている28日間反復投与試験とのリンクを利用しようと考えております。(資料:8)

動物実験プロトコルの策定に関しては、当初、市販のマイクロアレイチップを使った実験条件の検討を行っております。現在、世界中で数社が市販のチップを販売しておりますが、それを用いて、果たしてどのような条件で組織を採取し、RNAを抽出した後、DNAに逆転写してマイクロアレイにかければいいのかというようなことです。具体的には、動物のと殺の方法とか、取り出した組織の保存方法とか、そういったことを検討しております。

現在までのところ、28日間の反復投与の期間中、3点もしくは4点の採取ポイントを設けてマイクロアレイにかければ、安定したデータが得られるのではないかという結論が得られております。

これまで検討した実験プロトコルでは、化学物質を28日間ラットに投与する途中で、1、3、7、14、28日後に臓器、この場合は肝臓を取り出して、そこからメッセンジャーRNAを取り出します。(資料:9)

更には、遺伝子の解析だけではなくて、タンパク質の解析、病理組織学的な検査、血液生化学的な検査も併せて行っております。

DNAマイクロアレイは、御存じの方もおられると思いますが、非常に高密度にスライドガラス上に多数の遺伝子を載せております。(資料：10)

私どもでは、カスタマイズしたインハウスのアレイをつくっていますが、今のところ、約8千から1万の遺伝子をスライドガラス上に1セット、もしくは2セット載せたアレイを使っております。(資料：10)

私どもの方で使っているDNAマイクロアレイには、当然ですがさまざまな遺伝子を載せております。具体的には代謝に関する遺伝子、細胞周期に関するもの、ヒートショックに関わる遺伝子、さまざまなものをほぼ網羅的に載せているということです。今後、更に改良を進めていきたいと思っております。(資料：11)、(資料：12)

実験を行なった85の化学物質に関しましては、発がん性がわかっているもの、そうではないものについてデータの取得を行っております。(資料：13)

遺伝子発現解析では、通常の動物実験で28日間の反復投与を行った後、RNAを抽出して、マイクロアレイ上のプローブとハイブリダイゼーションを行ない、2色法で色の変化によって発現量の増減を検出します。それをアレイデータとしてコンピュータに取り込みます。(資料：14)

データ解析に関しては、得られた発現データをさまざまなノイズの処理等を行った後、SVMもしくは決定木と言われる方法で予測を行います。(資料：15)

一例として横軸に化学物質、縦軸に遺伝子をマッピングして、発現が上がったものを赤く、下がったものを緑にして、このようなカテゴリー分けができるような形のデータが得られております。(資料：16)

現在までのところ、カテゴリーごとに予測を行いまして、正しい予測結果が得られた物質数を調べたところ、例えば発がんがわかっているもののうち、30物質のうち29物質が予測できたというデータが得られました。それから、カテゴリーによっては若干予測の精度が悪くなるということがわかりました。(資料：17)

決定木による方法では、試験を行ったうち4つはだめだったけれども、それ以外は予測ができましたという結果が得られております。(資料：18)

結論として、28日間の短期間の投与で遺伝子解析を行うことによって発がん性の予測ができそうだということが明らかになっております。(資料：19)

更に、SVMによりますと、87.5%程度の一致率。それから、決定木によりますと、判別可能だったものが69で、判別できなかったものが4でした。

今後の課題としては、標準化を視野に入れたさまざまなバリデーションを平成17年度に行い、使えるものとして皆様方に有効利用していただければ非常に幸いだと考えております。(資料：20)

資料 : 1

CERI

高精度・簡易有害性(ハザード) 評価システムの開発

(財) 化学物質評価研究機構
川原 和三

1

資料 : 2

CERI

化学物質総合評価管理プログラム

経済産業省

↓

新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO)

プロジェクト1: 化学物質リスク評価及びリスク評価手法の開発
プロジェクト2: 既存化学物質安全性点検事業の加速化
プロジェクト3: **高精度・簡易有害性評価システムの開発**
プロジェクト4: 化学物質総合リスク評価管理システムの開発

2

資料 : 3

CERI

現行の発がん性試験の問題点

- 1. 長期(2年) / SPF / 飼育 / 多数の動物実験
動物愛護
- 2. 最大耐量を基本とした高濃度(高用量)投与
多量の試験物質が必要
- 3. 多額の費用
試験実施件数増が困難
- 4. 動物飼育とケアおよび病変を診断する専門スタッフが必要
試験実施可能施設の制限
- 5. 発がん性のメカニズムの欠如
ヒトへの外そうが困難

↓

簡便で高精度な短期試験法の確立の必要性

3

資料 : 4

CERI

高精度・簡易有害性評価システム開発

背景

- ・化学物質管理における有害性データの必要性
- ・長期毒性試験にかかるコスト、期間
- ・社会基盤を維持する長期毒性未知物質の存在
- ・新技術(ゲノム、プロテオーム解析)の進歩

目的

- ・高精度、低コストかつ短期間の有害性(発がん性) 評価手法の開発

4

資料 : 5

CERI

研究開発体制

開発推進委員会
プロジェクトリーダー
白井教授(名市大)

住友化学工業(株)

(財)化学物質
評価研究機構
(CERI)

(株)三菱化学
安全科学研究所

↓

基礎研究: 東京大学先端科学技術研究センター
早稲田大学理工学部化学科
名古屋市立大学大学院医学研究科

5

資料 : 6

CERI

動物実験プロトコ
ールの最適化
住友

DNAマイクロアレイ
の設計・作製
三菱

↓

動物実験

アレイ実験

住友、三菱、CERI

↓

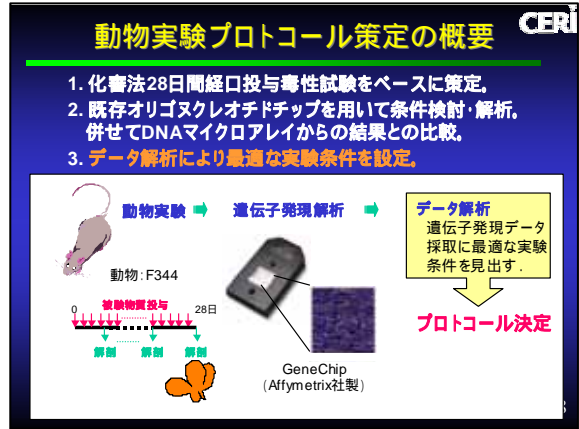
バイオインフォマティクス
データベースの構築、解析アルゴ
リズムの整備
CERI

6

資料 : 7



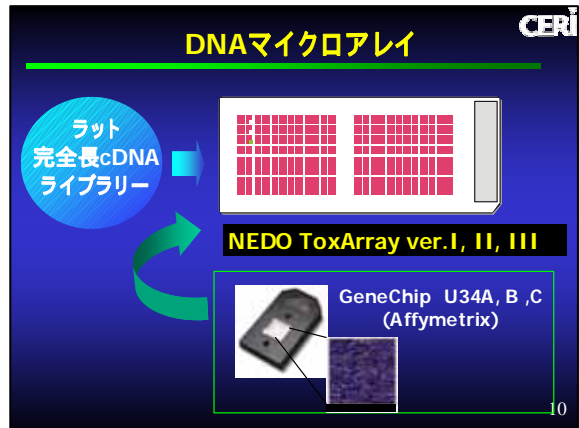
資料 : 8



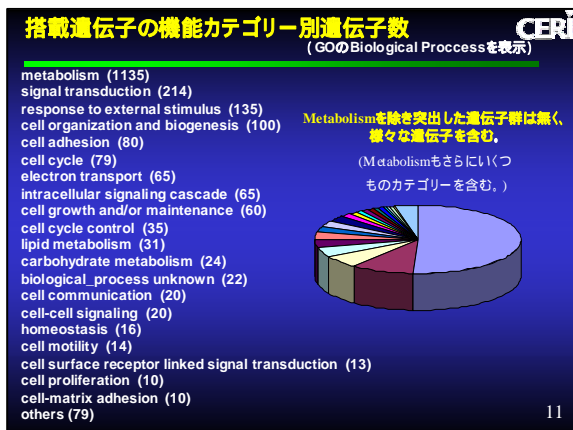
資料 : 9



資料 : 10



資料 : 11



資料 : 12

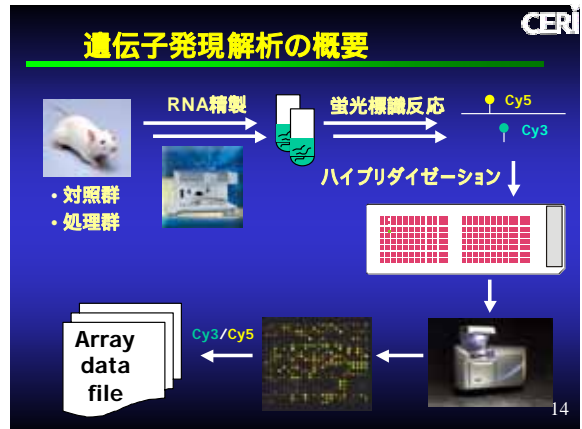


資料 : 13

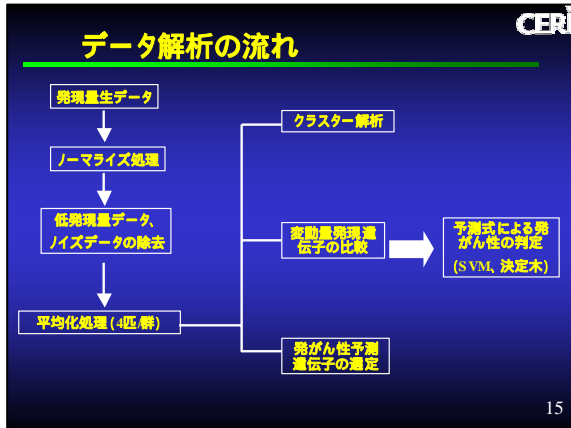
試験物質の毒性分類 (85化合物)

変異原性	カテゴリー	発がん性物質(85)			非発がん性物質(30)
		肝(44)		肝以外(11)	
		ラット/マウス	ラット		
+	ニトロソ化合物	5	5	中枢神経系:1	16
	ニトロ化合物	2	1	乳腺:1 皮膚:1	
	ヘテロサイクリックアミン	2	2	乳腺:1	
	アゾ化合物	3	3	0	
	多環芳香族炭化水素	0	0	乳腺:2 皮膚:1 肺:1	
	その他	2	2	0	
-	ペルオキシソーム増殖	3	2	0	14
	Cytotoxicant	16	12	腎:1 胃:2	
	酵素誘導剤	2	1	0	
	合成エストロゲン	2	1	0	
	有機塩素系化合物	6	3	0	
	その他	1	1	0	

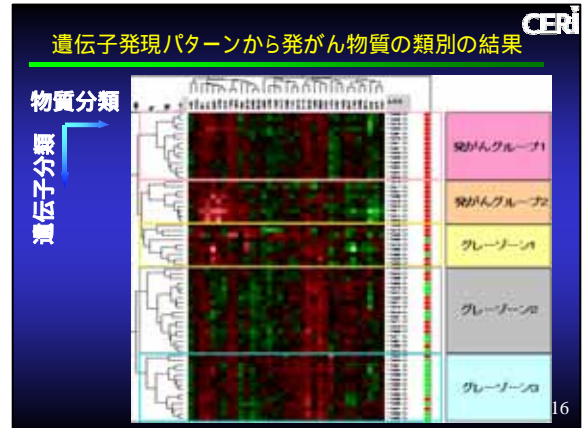
資料 : 14



資料 : 15



資料 : 16



資料 : 17

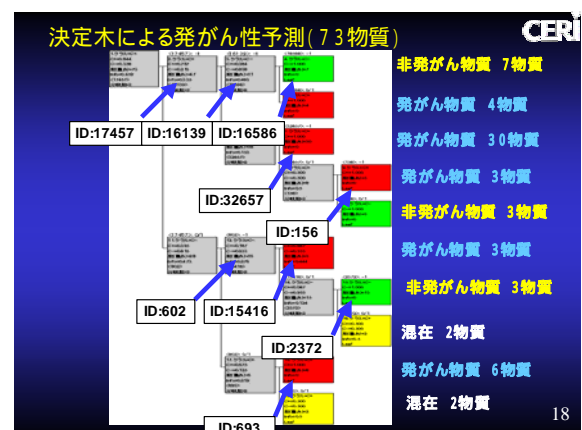
分類された物質グループ毎の発がん性予測の結果

各グループの発がん物質及び非発がん物質のSVM予測式による発がん予測率

グループ名	特徴遺伝子数	各グループ発がん物質		非発がん物質		SVM 予測式番号
		物質数	予測正解	物質数	予測正解	
発がんグループ 1+2+グレーゾーン1	35	30	29/30	2	2/2	
グレーゾーン2	94	9	8/9	9	7/9	
グレーゾーン3	82	3	3/3	11	7/11	

グレーゾーン3については、決定木等他の手法で予測することを検討

資料 : 18



CERI

結論

1. 確立した実験プロトコル、マイクロアレイ、データ解析により短期間(28日以内)での高精度発がん性予測(スクリーニング)が可能であることが明らかとなった
2. SVM、決定木による発がん性予測結果は下記の通りであった
SVMによる予測: $56/64 = 87.5\%$ (一致率)
決定木による予測: 判別可能 / 判別不可 = 69/73物質

19

CERI

今後の課題

1. 標準化を視野に入れた実験条件とマイクロアレイ仕様の最適化
2. 発がん物質毎に固有の発がんメカニズムに応じた予測手法(式)の開発
3. 予測式の確立に未使用の物質による外部データによるValidation
4. 覆面化合物でのブラインド試験によるValidation
5. 予測に使用する遺伝子の生物学的意味付けと発がんPathway上での機能解明

20