

ゼブラフィッシュを用いた 催奇形性評価の代替法開発



平田 普三

青山学院大学

青山学院大学
平田 普三
田谷 千歳
貞光 謙一郎
氏部 浩太
東邦大学
鹿島 誠
花王株式会社
田崎 純一
劉 舒捷

日化協LRI研究報告会
Web発表用資料
2025年8月29日

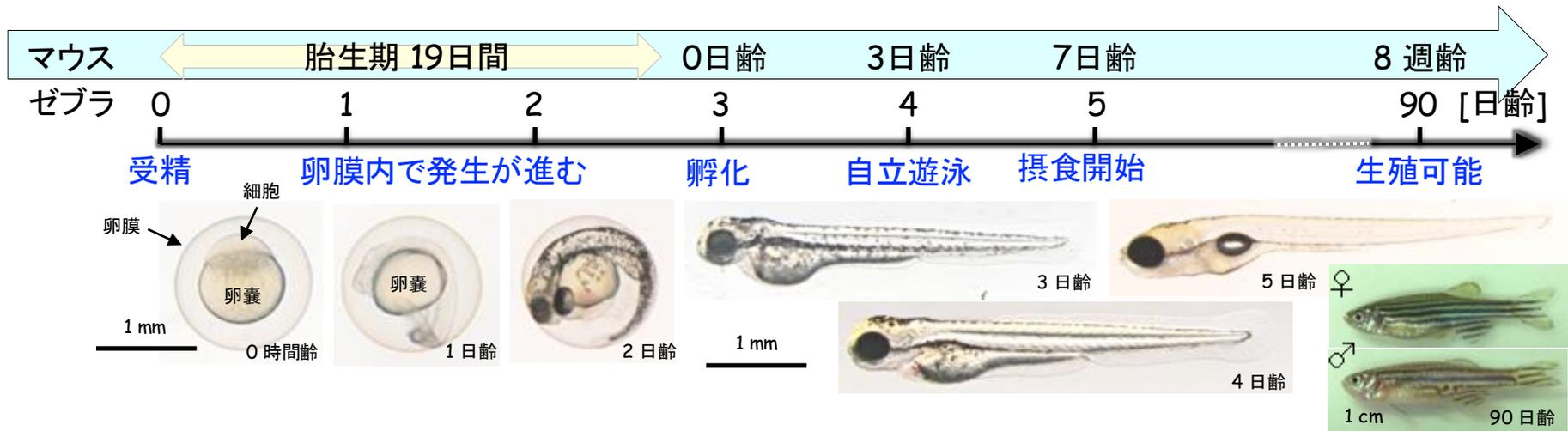
日化協 LRI 研究の進捗

計画目標	2023年度実施	2024年度実施	2025年度実施
生殖発生毒性試験のプロトコル確立	<ul style="list-style-type: none"> ゼブラ生殖発生毒性 11化合物の発生毒性概要 齧歯類試験とのEC50比較 	<ul style="list-style-type: none"> ゼブラ生殖発生毒性 齧歯類試験とのEC50比較 Mori et al. J Tox Sci. 2024. 条件検討 成魚維持, 胚選別 → 97%良卵 暴露容器, 卵膜除去, 薬液交換 	<ul style="list-style-type: none"> ゼブラ生殖発生毒性 奇形の定義と写真アトラス Mori et al. J Tox Sci. In-press.
系統間差	<ul style="list-style-type: none"> 系統のゲノム解析 AB, TU, RW, PET, WIK ... 催奇形性の系統差 バルプロ酸, ヒドロキシウレア 5系統で系統差なし 遺伝子発現の系統差 ヒドロキシウレア 4系統で系統差なし 	<ul style="list-style-type: none"> 系統のゲノム解析 Sadamitsu et al. Sci Rep. 2024. 催奇形性の系統差 メトレキサート, アシトレチン 5系統で系統差なし 遺伝子発現の系統差 バルプロ酸 5系統で系統差なし ワルファリン 4系統で系統差なし 	<ul style="list-style-type: none"> ゼブラの系統樹作成 Sadamitsu et al. Sci Re. 2025. 催奇形性の系統差 トピラマート, イブプロフェン 5系統で系統差なし 遺伝子発現の系統差 系統差なしという結論 → 再現性, 信頼性 Taya et al. Tox Rep. Submitted.
AOP(有害性発現経路)の特定	<ul style="list-style-type: none"> 発現低下遺伝子探索 ヒドロキシウレア ワルファリン 	<ul style="list-style-type: none"> 発現低下遺伝子探索 バルプロ酸 GO解析 → AOP エネルギー産生, 視覚関連 生殖発生毒性マーカー アミラーゼ, エラスターゼなど 	<ul style="list-style-type: none"> 発現低下遺伝子探索 バルプロ酸 → GPX, Hemoglobin GO解析 → AOP 酸化ストレス, 酸素欠乏 AOP → 催奇形性摂動 バルプロ酸 + 化合物 → 催奇形性抑制 イブプロフェン + 化合物 → 催奇形性抑制

NAMs としてのゼブラフィッシュへの期待

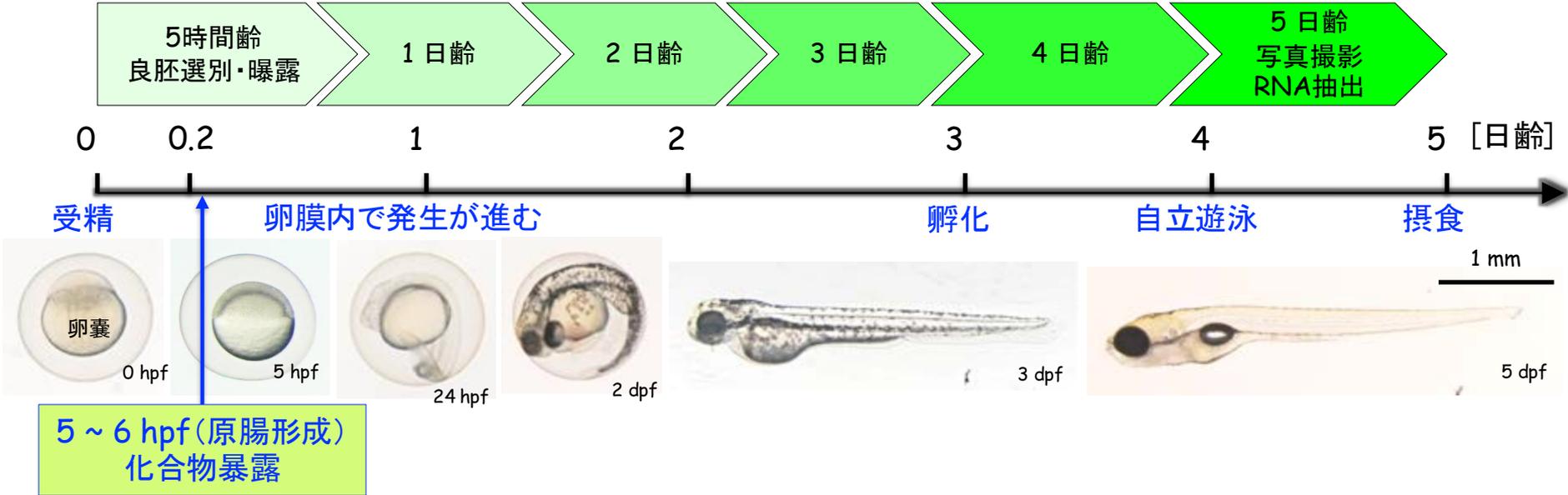
NAMs = New Approach Methodologies

- 2010年 欧州: 実験動物の保護に関する指令 (2010/63/EU)
保護対象は頭足類(タコ・イカ)とすべての脊椎動物(以下を除く)
・ 哺乳類で発生期 2/3 までの胚(母体は保護対象なので実際は保護対象)
・ 鳥類・爬虫類・両生類・魚類で摂食するまでの若齢個体
- 2013年 欧州: 化粧品規制指令 (76/768/EEC) の完全施行
動物実験を行った成分・材料を含む化粧品の販売を全面禁止
- 2019年 日本: 動物愛護管理法の改正
保護対象は今でも哺乳類・鳥類・爬虫類



ゼブラフィッシュは 5 日齢までは規制の対象外 → 化粧品開発にも適用可
生殖発生毒性を全身で試験可能
課題: 試験プロトコル, 系統問題, 再現性(施設間差), ヒト外挿性(催奇形性の類似性, AOP)

試験のprotocolsとコツの確立



・優良成魚の維持

- 先週産んだ ♀ と ♂ を ♀ 水槽と ♂ 水槽で隔離し、本番の交配に使う
- 産卵率は 7 割 (7ペア / 10ペア, 1 ペアあたり 100個)
- 採卵して E3 medium (標準液) にうつし、28 °C でインキュベート

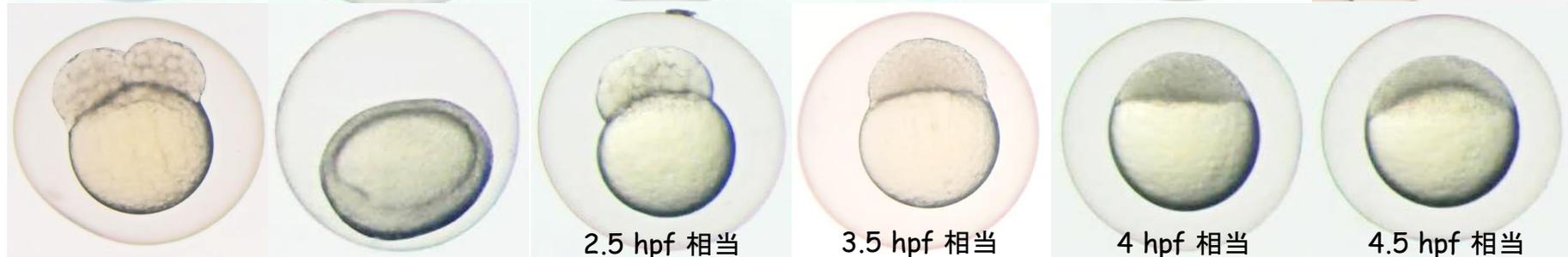
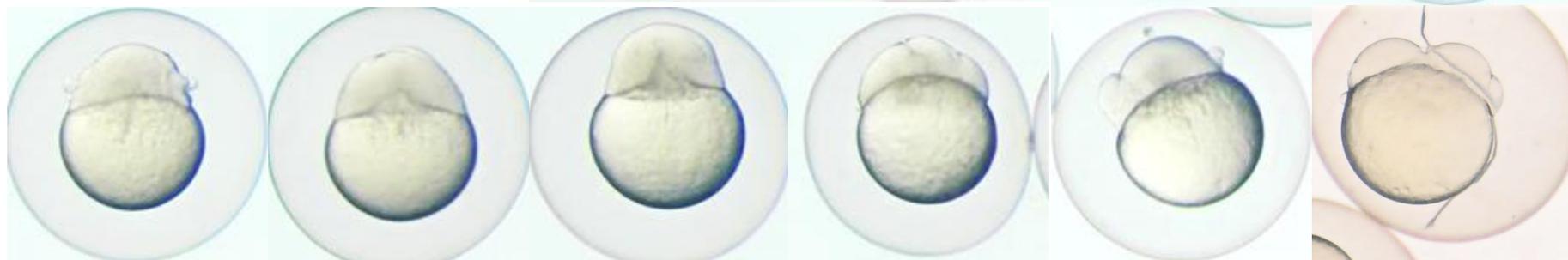
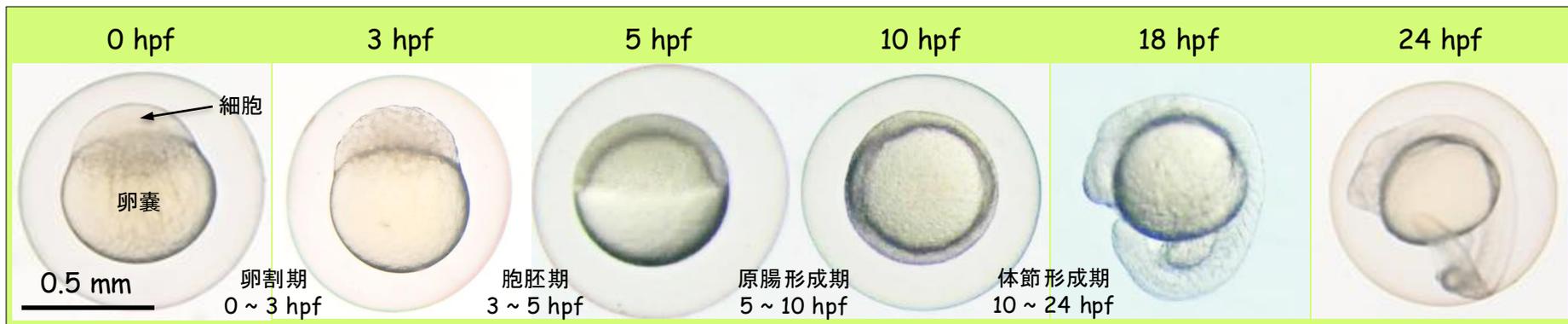
・良質な胚の選別

- 5 時間齢で選別する (除くべきものは 5% だが、厳しくとり 10% を除く)
- 無暴露胚 (Control) の自発的な奇形・死亡は 5 日齢で 3% 程度

生殖発生毒性試験の試験法確立

5 時間齢での良胚選別

hpf: 受精後時間
hours post-fertilization



2.5 hpf 相当

3.5 hpf 相当

4 hpf 相当

4.5 hpf 相当

哺乳動物 vs ゼブラ (生殖発生毒性試験)

ラットでハザードを検出できる化合物の82%はゼブラで検出可能

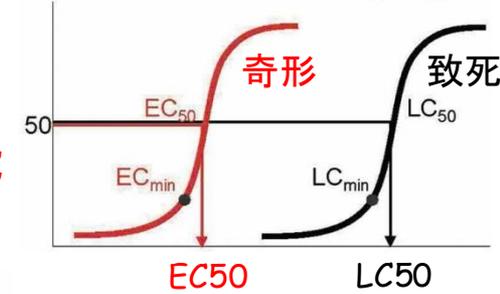
Equivocal を再試験すると Equivocal だった

Non-malformation を再試験すると Equivocal だった

→ ラットでハザードを検出できる化合物はすべてゼブラで検出可能
 スペインの企業 Biobide も同様の論文 (Equivocal を検出可扱い)

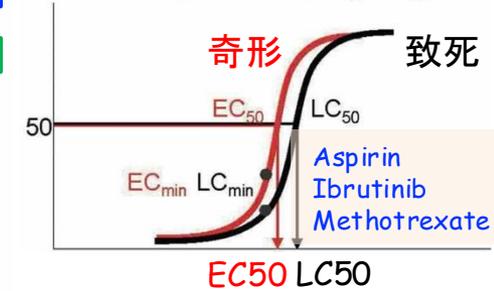
Malformation

$2 \leq \text{Teratogenic index (LC}_{50}/\text{EC}_{50})$



Equivocal

$1 < \text{Teratogenic index (LC}_{50}/\text{EC}_{50}) < 2$



Non-malformation

No increase in malformation

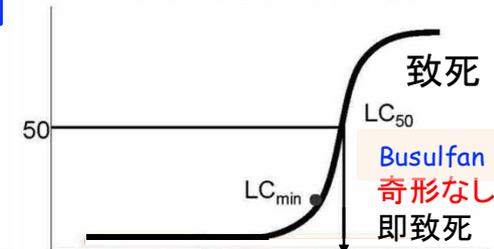


Table 2. Comparison of MEFL of 22 test compounds in rat, rabbit, human and zebrafish.

Test compounds	Rat MEFL	Rabbit MEFL	Human Teratogen	Outcomes in Zebrafish
Acitretin	X	X	X	Yes (Malformation)
Aspirin	X	-	X	Equivocal
Bosentan	X	-	-	Yes (Malformation)
Busulfan	X	X	X	No (Non-malformation)
Carbamazepine	X	X	X	Yes (Malformation)
Cisplatin	X	-	-	Yes (Malformation)
Cyclophosphamide	X	X	X	Yes (Malformation)
Dabrafenib	X	-	-	Yes (Malformation)
Dasatinib	X	-	-	Yes (Malformation)
5-Fluorouracil	X	X	X	Yes (Malformation)
Hydroxyurea	X	X	X	Yes (Malformation)
Ibrutinib	X	X	-	Equivocal
Ibuprofen	X	-	X	Yes (Malformation)
Isotretinoin	X	X	X	Yes (Malformation)
Methotrexate	X	X	X	Equivocal
Pazopanib	X	X	-	Yes (Malformation)
Ribavirin	X	X	-	Yes (Malformation)
Tacrolimus	X	X	-	Yes (Malformation)
Topiramate	X	X	X	Yes (Malformation)
Tretinoin	X	X	X	Yes (Malformation)
Trimethadione	X	-	X	Yes (Malformation)
Valproic acid	X	X	X	Yes (Malformation)

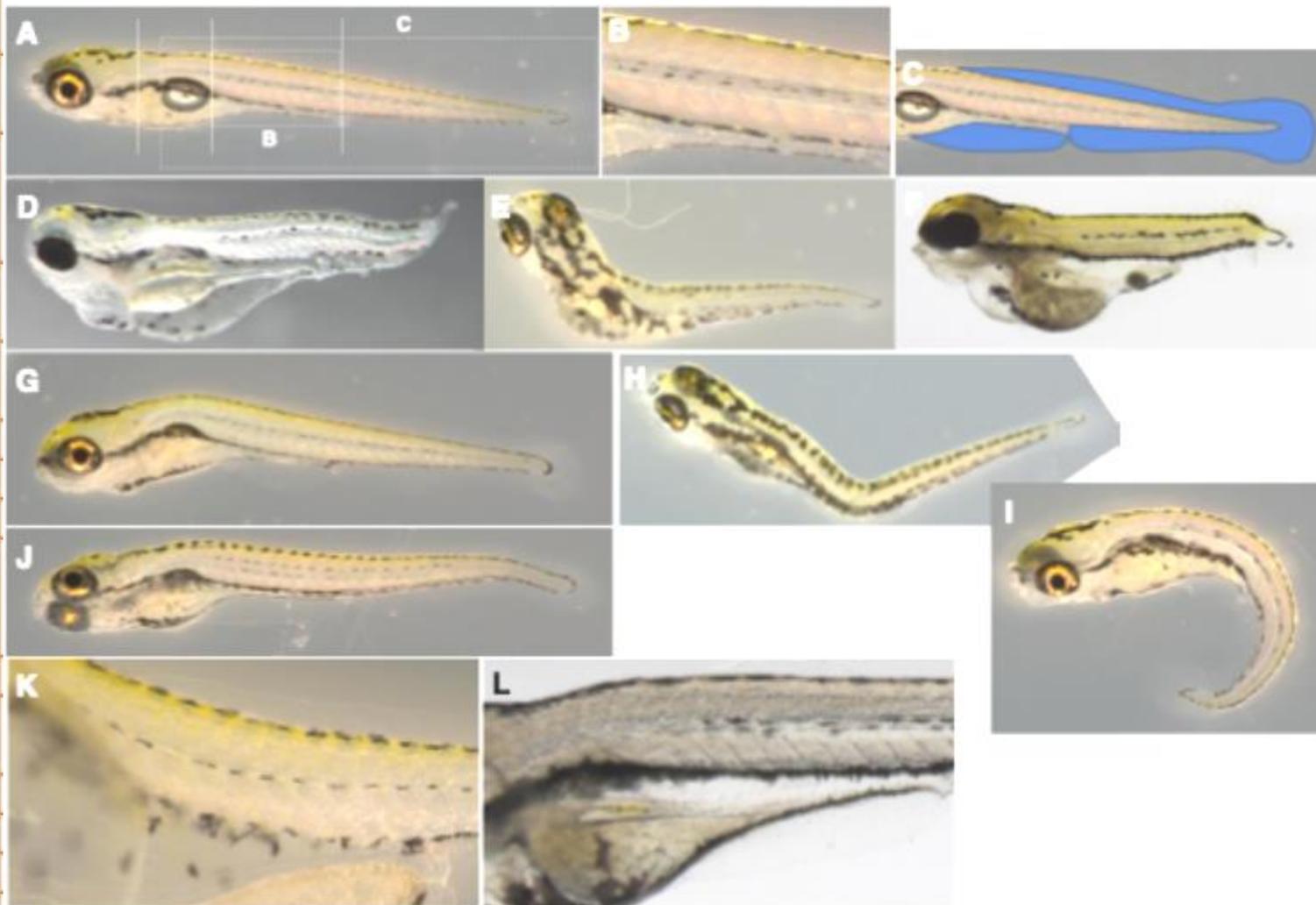
ゼブラフィッシュの生殖発生毒性試験の信頼性・外挿性

代替法論文

Mori K et al. J. Tox. Sci. (2024)

ゼブラフィッシュの奇形パターン

Tissue	Observation
Body axis	Short
Body axis	Bent
Somite	Unclear boundary
Notochord	Bent
Notochord	Unclear structure
Caudal and ventral fin	Absent
Caudal and ventral fin	Hypoplasia
Pectoral fin	Absent
Pectoral fin	Short
Pectoral fin	Bent
Head	Small
Head	Edema
Eye	Absent
Eye	Small
Eye	Edema
Otoliths	Absent
Otoliths	Small
Otoliths	Supplementarily
Lower jaw	Hypoplasia



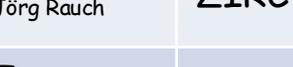
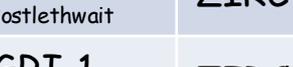
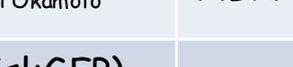
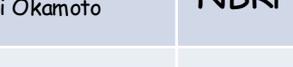
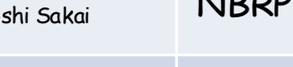
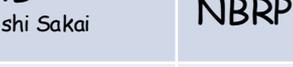
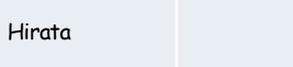
哺乳動物とゼブラフィッシュの催奇形性比較

Cross-species comparison of teratogen-induced malformation

Test compounds	Tissue	Rat	Rabbit	Zebrafish
Acitretin	Body axis/Limb	Humeri, radius, ulna malformations	Ectrodactyly; Tail malformations; Long bones malformations	Body axis, short/bent; Notochord, bent/unclear structure; Pectoral fin, absent/short
	Craniofacial	Cleft palate	Cleft palate; Skull malformations	Head, small/edema; Lower jaw, hypoplasia
	Eye		Open eyelid	Eye, small/edema
	Intestinal organs	Dilated renal pelvis		Abdomen edema
	Others			
	Central nervous system	Exencephaly		Head, small
	Body axis/Limb	Severe defects of vertebral and costal bones; Bent fore and hind paw; Kinked tai;		Body axis, bent
	Craniofacial	Craniorachischisis; Protruding tongue;		Lower jaw, hypoplasia

生殖発生毒性試験の基盤整備完了 → 系統問題に取り組める

ゼブラフィッシュの系統

系統 樹立者	提供	由来	備考
AB George Streisinger 	ZIRC	米国オレゴン州の Petshop	初期に致死性遺伝子を排除。多対多人工授精(Round-robin)で維持。cDNAに基づくヘテロ接合度は24.8% (Guryev et al., 2006)。
TU 	ZIRC	独国チュービンゲンの Petshop	初期に致死性遺伝子を排除。多対多交配で維持。Sangerでのゲノムプロジェクトで使用。cDNAに基づくヘテロ接合度は14.6%。
TL 	ZIRC	独国チュービンゲン	<i>leo^{t1}</i> (スポット模様の劣性変異)と <i>lof^{dt2}</i> (尾ひれが長い優性変異)の二重変異体。cDNAに基づくヘテロ接合度は17.6%。
WIK Gerd-Jörg Rauch 	ZIRC	インドのコルカタで野生採集	特定ペア(WIK11)の子孫を維持。AB や TU に対して SNPs が多い。cDNAに基づくヘテロ接合度は14.1%。
SAT John Postlethwait 	ZIRC	AB × TU	AB と TU を交配させて作製。
NHGRI-1 Shawn Burgess 	ZIRC	AB × TU	AB と TU を交配させて致死性遺伝子を排除。
PET 	(どこでも)	Petshop	ペットショップで購入できる個体の総称。系統不詳。
RW Hitoshi Okamoto 	NBRP	米国ミシガン州の Petshop	初期に致死性遺伝子を排除。多対多交配で維持。John Y. Kuwada (ミシガン大学) がオリジナル購入。Sadamitsu et al., 2025.
Tg(isl:GFP) Hitoshi Okamoto 	NBRP	RW	<i>islet1 promoter</i> (運動ニューロン)で GFP を発現する Tg。多対多交配で20年以上維持。
IM Noriyoshi Sakai 	NBRP	India	兄妹交配で確立した近交系 (Shinya & Sakai, 2011)。50世代までの兄妹交配が進んでいるが、仔魚の生存率が低く、飼育は困難。
M-AB Noriyoshi Sakai 	NBRP	AB* (AB 亜系統)	兄妹交配で確立した近交系。30世代まで兄妹交配が進んでいるが、近交弱性がなく飼育は容易。Sadamitsu et al., 2024.
OK Hiromi Hirata 		沖縄の国頭村で野生採集	沖縄では 1990 年代からゼブラフィッシュが外来魚として野生定着。平田が2021年11月に沖縄北部の池で採集した。論文準備中。

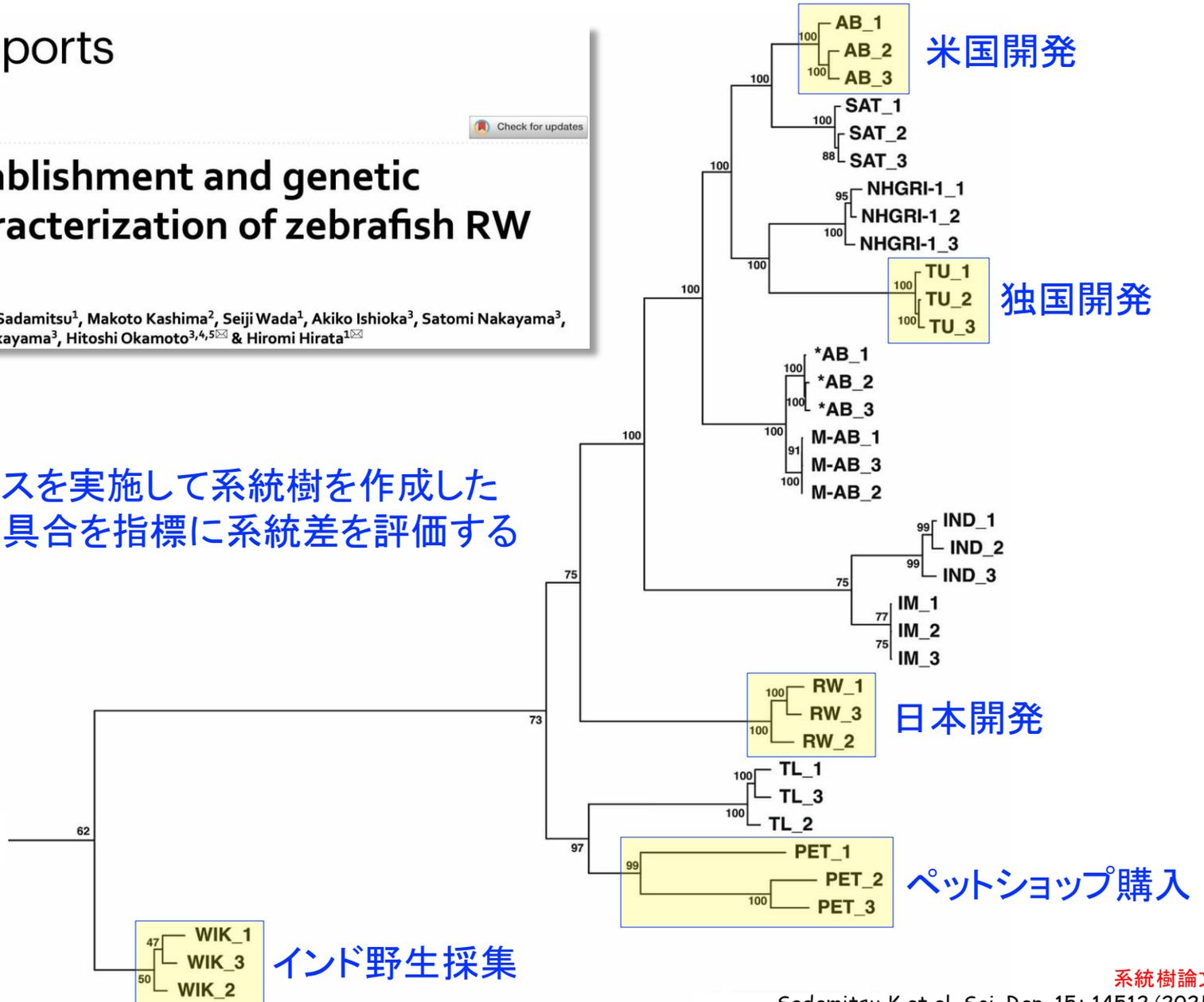
ゼブラフィッシュの系統樹

scientific reports

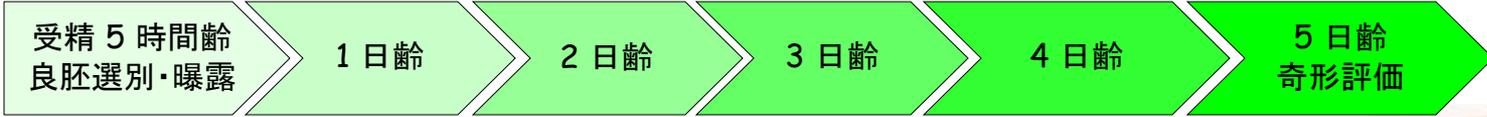
OPEN **Establishment and genetic characterization of zebrafish RW line**

Kenichiro Sadamitsu¹, Makoto Kashima², Seiji Wada¹, Akiko Ishioka³, Satomi Nakayama³, Ryoko Nakayama³, Hitoshi Okamoto^{3,4,5} & Hiromi Hirata¹

ゲノムシーケンスを実施して系統樹を作成した
WIK のハズレ具合を指標に系統差を評価する

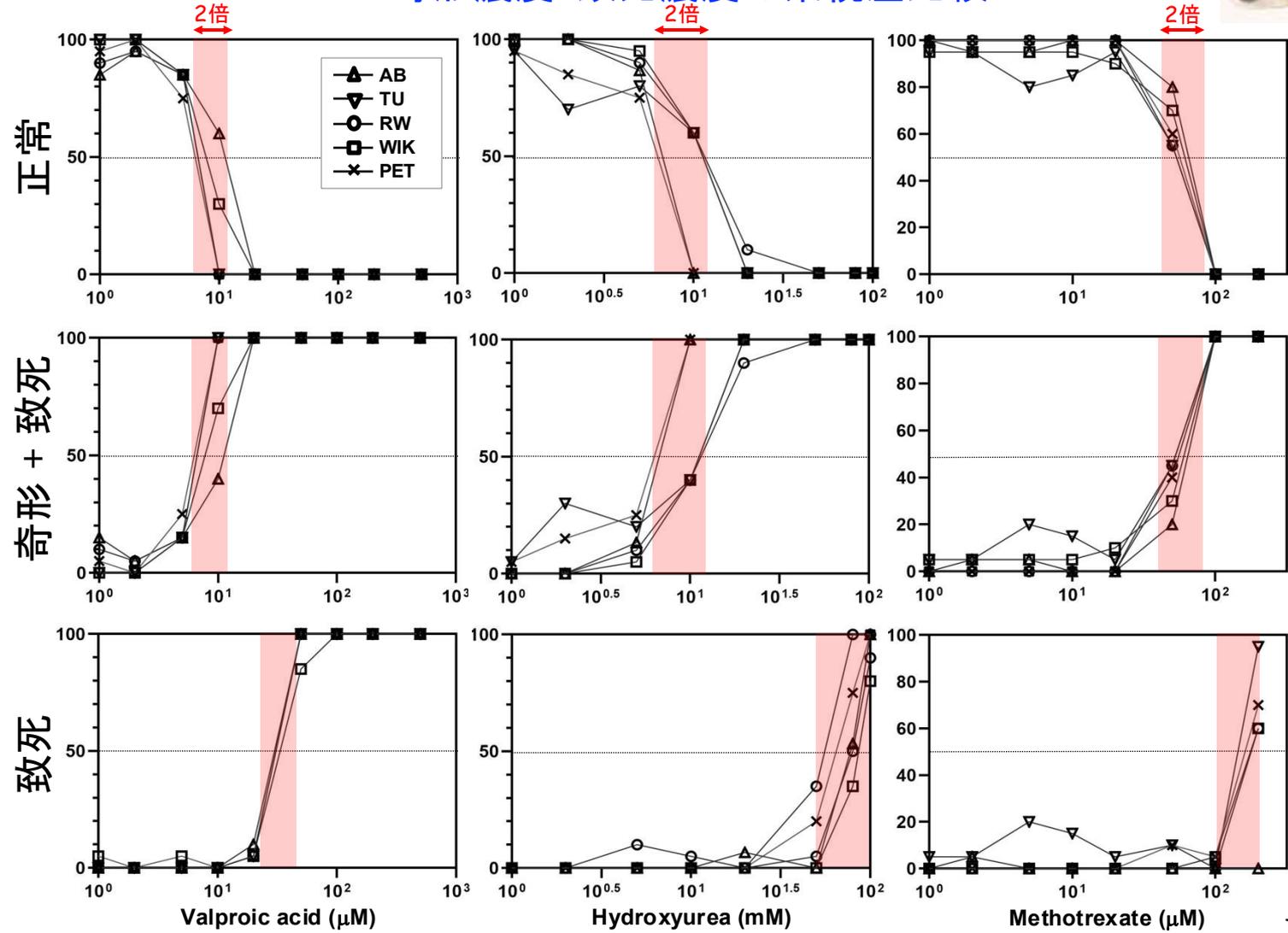


催奇形性の系統差は小さい



5 日 齢

奇形濃度・致死濃度の系統差比較



催奇形性の系統差は小さい



受精 5 時間齢
良胚選別・曝露

1 日 齢

2 日 齢

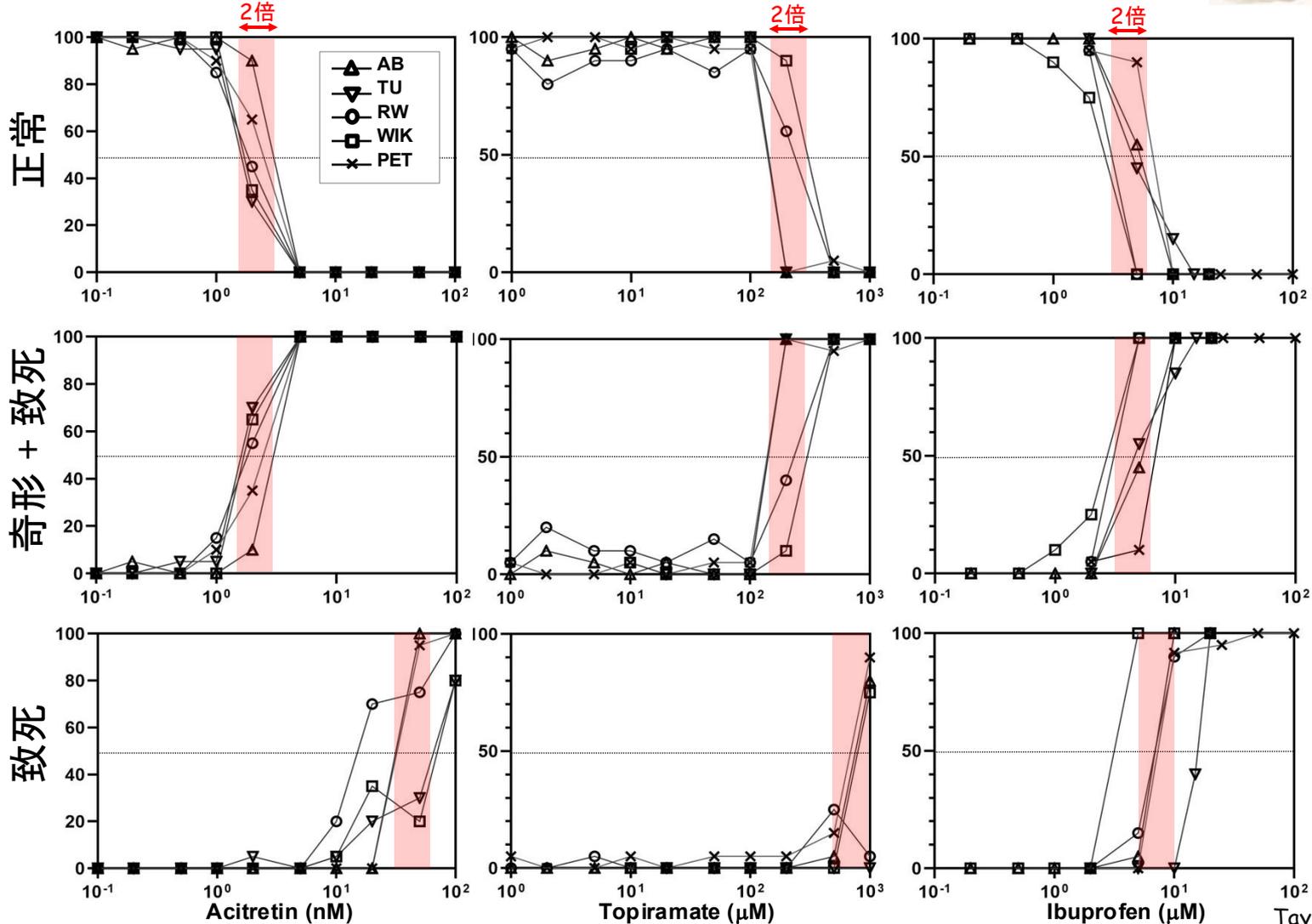
3 日 齢

4 日 齢

5 日 齢
奇形評価

5 日 齢

奇形濃度・致死濃度の系統差比較



遺伝子発現攪乱の系統差は小さい

5 時間齢



受精 5 時間齢
良胚選別・曝露

1 日齢

2 日齢

3 日齢

4 日齢

5 日齢
奇形評価

5 日齢

無毒性濃度・奇形濃度での遺伝子発現の系統差比較
RNA 抽出 → RNA-Seq → 主成分分析 → 遺伝子発現の類似性描画

バルプロ酸



0 μM



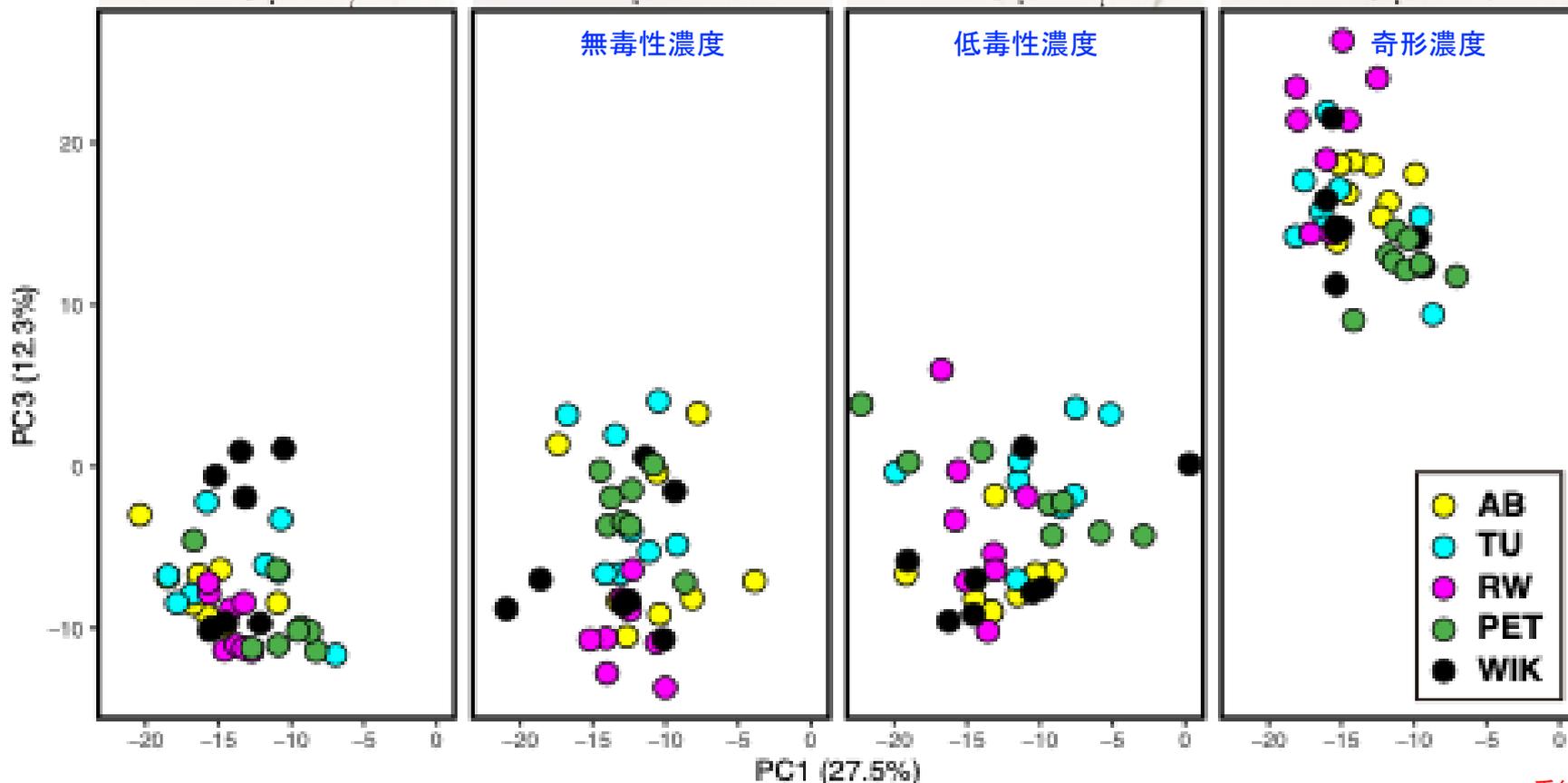
1 μM



5 μM



20 μM



遺伝子発現攪乱の系統差は小さい

5 時間齢



受精 5 時間齢
良胚選別・曝露

1 日齢

2 日齢

3 日齢

4 日齢

5 日齢
奇形評価

5 日齢

無毒性濃度・奇形濃度での遺伝子発現の系統差比較

RNA 抽出 → RNA-Seq → 主成分分析 → 遺伝子発現の類似性描画

ヒドロキシウレア



0 mM



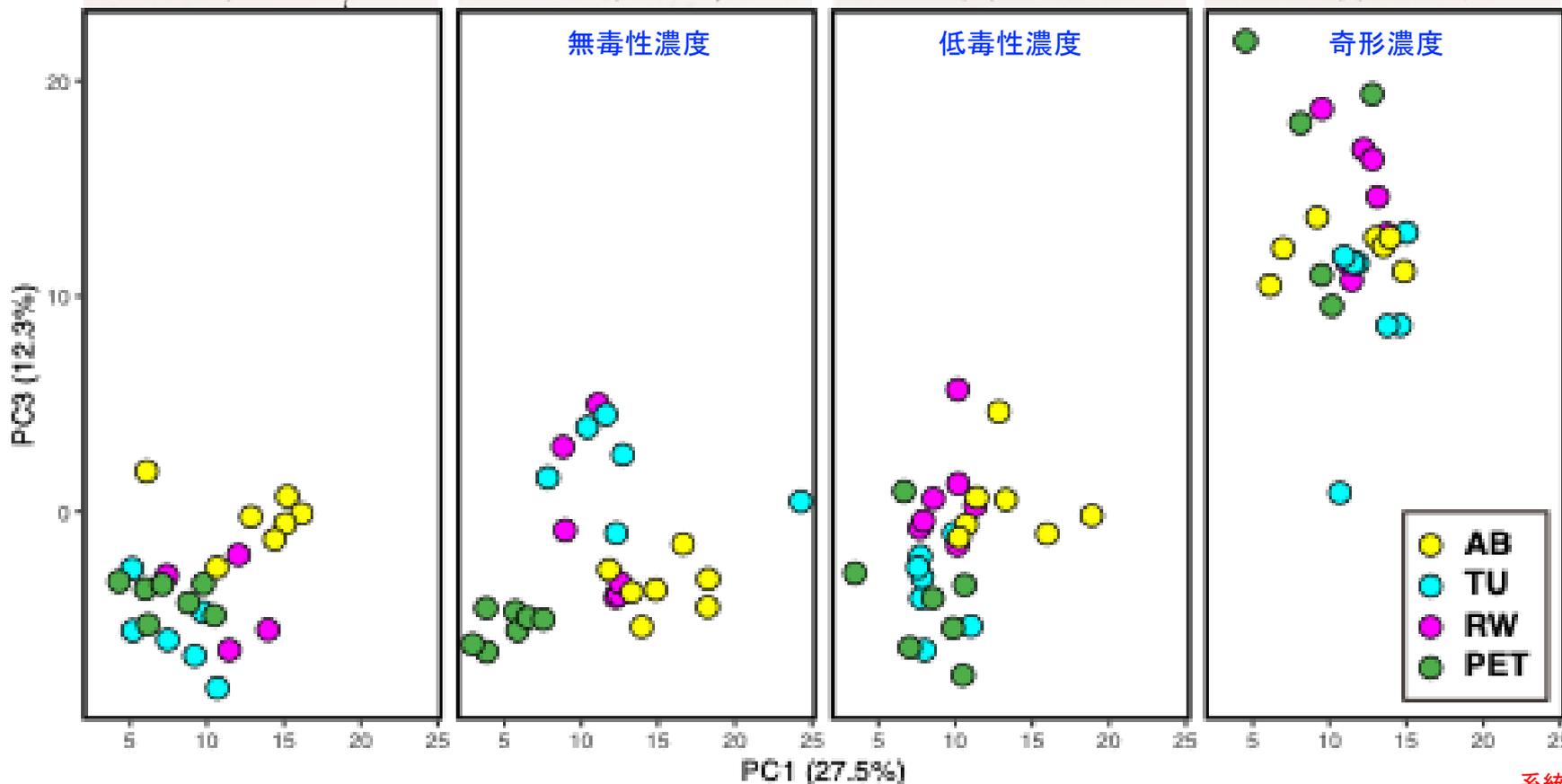
1.3 mM



6.6 mM



33 mM



系統差論文

Taya C et al. Submitted.

遺伝子発現攪乱の系統差は小さい

5 時間齢



受精 5 時間齢
良胚選別・曝露

1 日齢

2 日齢

3 日齢

4 日齢

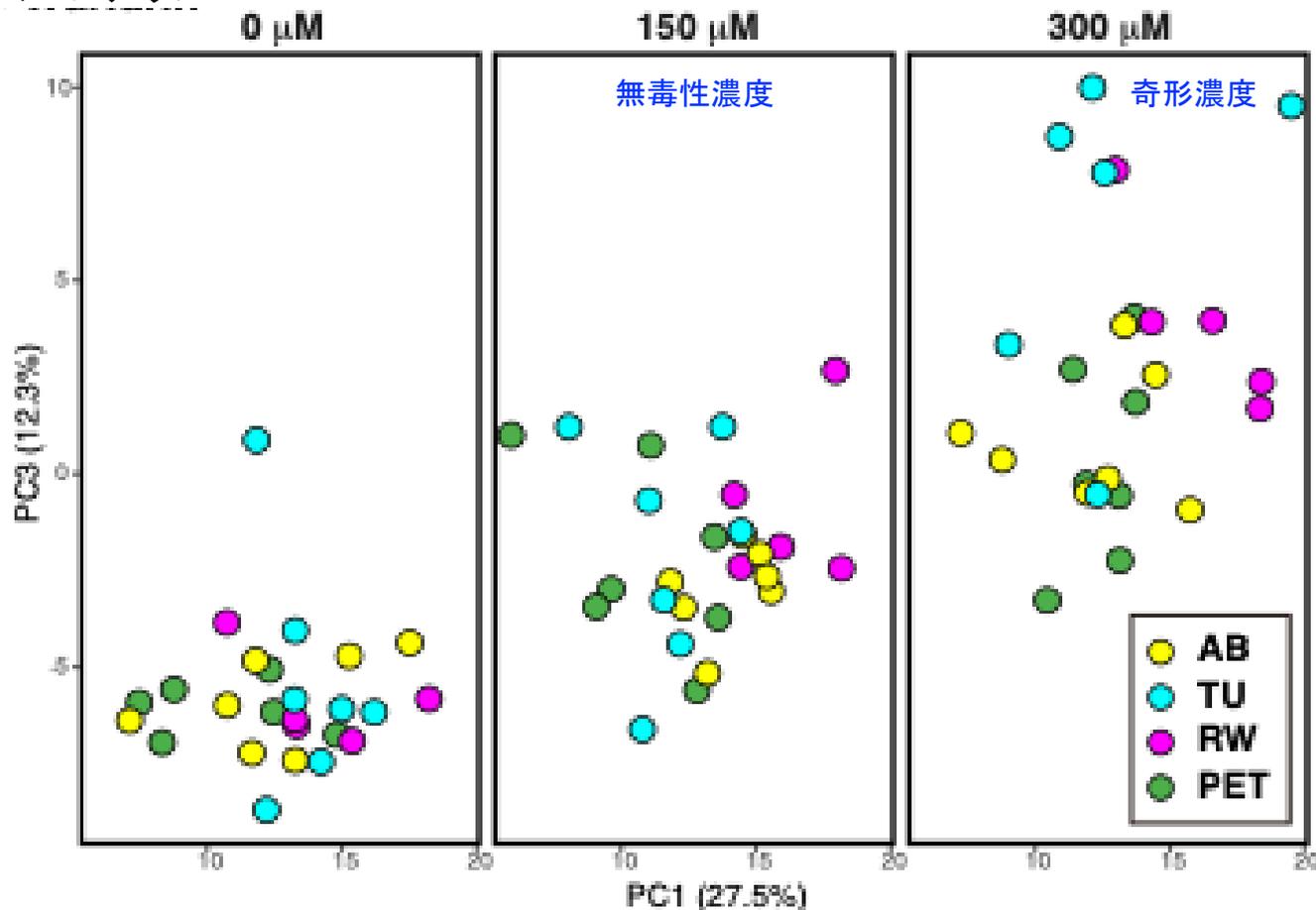
5 日齢
奇形評価

5 日齢

無毒性濃度・奇形濃度での遺伝子発現の系統差比較
RNA 抽出 → RNA-Seq → 主成分分析 → 遺伝子発現の類似性描画



ワルファリン



ゼブラフィッシュの生殖発生毒性試験で系統差はない

The effects of teratogens on malformations, lethality, and gene expression are consistent across various zebrafish strains during embryonic and larval stages

Chitose Taya¹, Kota Ujibe¹, Shinnosuke Shimodaira¹, Aoto Sakamoto¹, Seiji Wada¹, Makoto Kashima² and Hiromi Hirata^{1,*}

¹Department of Chemistry and Biological Science, College of Science and Engineering, Aoyama Gakuin University, Sagamihara 252-5258, Japan.

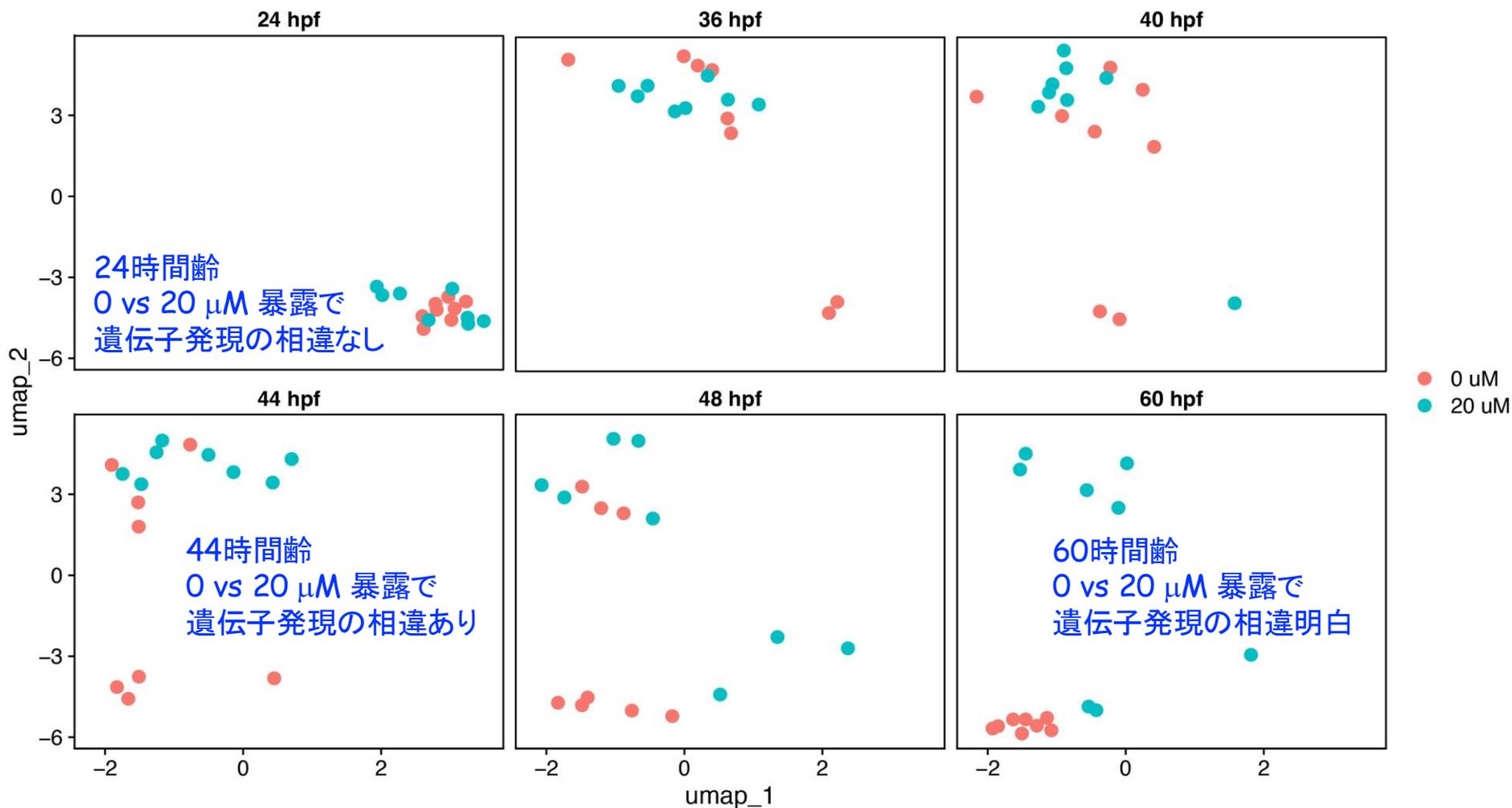
²Faculty of Science, Toho University, Funabashi 274-8510, Japan.

*Correspondence: Hiromi Hirata. Aoyama Gakuin University. 5-10-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagamihara, Kanagawa 252-5258, Japan. Phone: +81-42-7596235. Email: hihirata@chem.aoyama.ac.jp

系統差なし → どの系統で試験してもよい → 信頼性・再現性
1 個体 RNA-Seq で遺伝子発現攪乱の個体間差が見える → AOP 解析に有用

1 個体 RNA-Seq による個体間差の解析

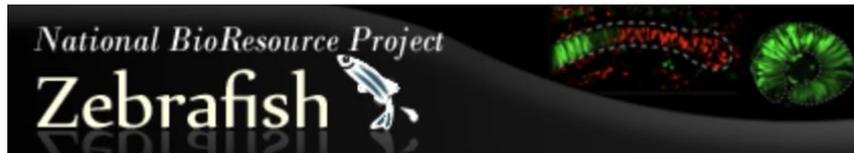
5 時間齢でバルプロ酸暴露 → 24 ~60 時間齢で 1 個体から RNA 抽出 → RNA-Seq
主成分分析でサンプル間の遺伝子発現の相違を比較
奇形が現れる前の遺伝子発現攪乱に注目



謝辞



一般社団法人 日本化学工業協会
Japan Chemical Industry Association



AMED 医薬品等規制調和・評価研究事業

森華奈子・青木嘉信(アステラス製薬)

小野美都穂・梅北さあや・新野竜大(三菱ケミカルリサーチ)

杉本航・林麻衣(マルホ)

江畑知憲(ボゾリサーチセンター)

三ヶ島史人・真木一茂・星野裕紀子(医薬品医療機器総合機構)

藤原道夫(エムオデッセイ)

田中利男(三重大学)

足利太可雄(国立医薬品食品衛生研究所)

小島肇(山口東京理科大学)

ゲノム解析

酒井則良・河崎敏広・今井裕紀子・ Fabien Velilla (国立遺伝学研究所)

新屋みのり(慶應義塾大学)

岡本仁・石岡亜季子・中山里実・中山涼子(理化学研究所脳神経科学研究センター)

和田清二・渡井健太・保坂美朋・下平真之介・坂本蒼透(青山学院大学)