

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

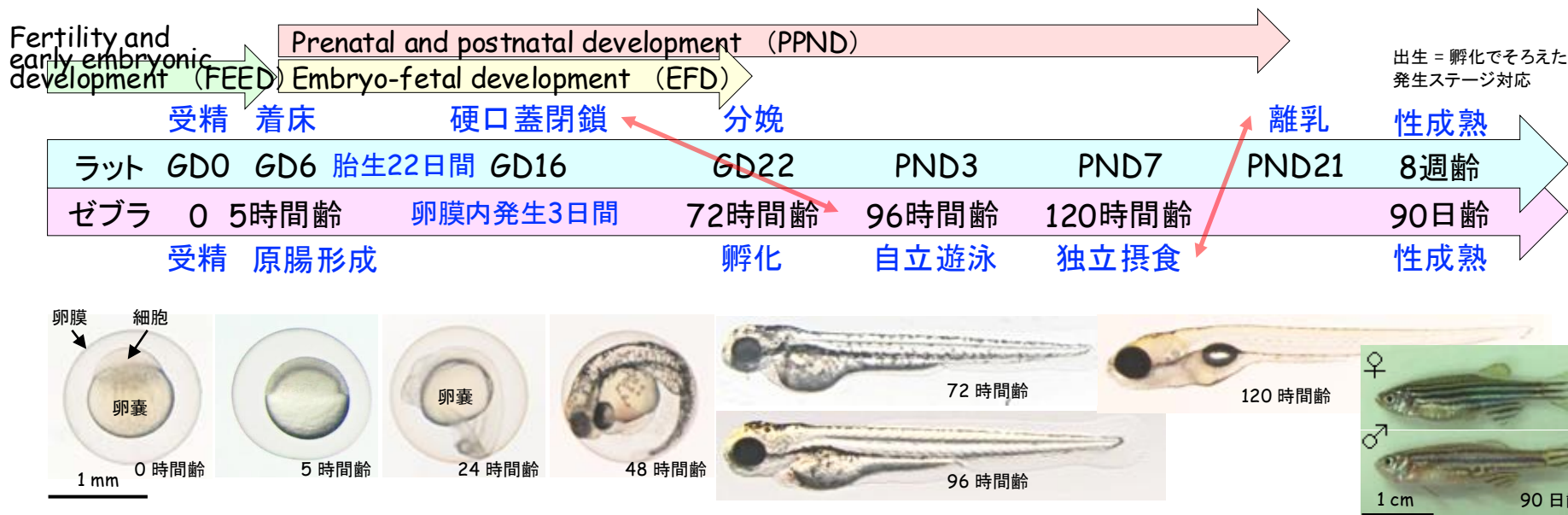
青山学院大学
平田普三
田谷千歳
東邦大学
鹿島誠
花王株式会社
田崎純一
劉舒捷

日化協LRI研究報告会
2026年8月28日

NAMs としてのゼブラフィッシュへの期待

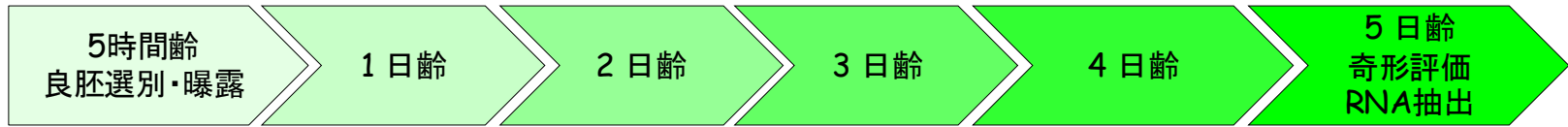
NAMs = New Approach Methodologies

- 2010年 欧州: 実験動物の保護に関する指令 (2010/63/EU)
 保護対象はヒト以外の全ての脊椎動物(以下を除く)と頭足類(タコ・イカ)
 ・ 哺乳類の胎生期 2/3 までの胎児(しかし母体は保護対象で実質不可能...)
 ・ 鳥類・爬虫類・両生類・魚類の独立摂食するまでの若齢個体
- 2013年 欧州: 化粧品規制指令 (2003/15/EC) 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 120 時間齢までは規制の対象外 → 生殖発生毒性を全身で試験可能
 課題: 試験法, 系統問題, 施設間差, ヒト外挿性, AOP

ゼブラフィッシュを用いた催奇形性の試験法

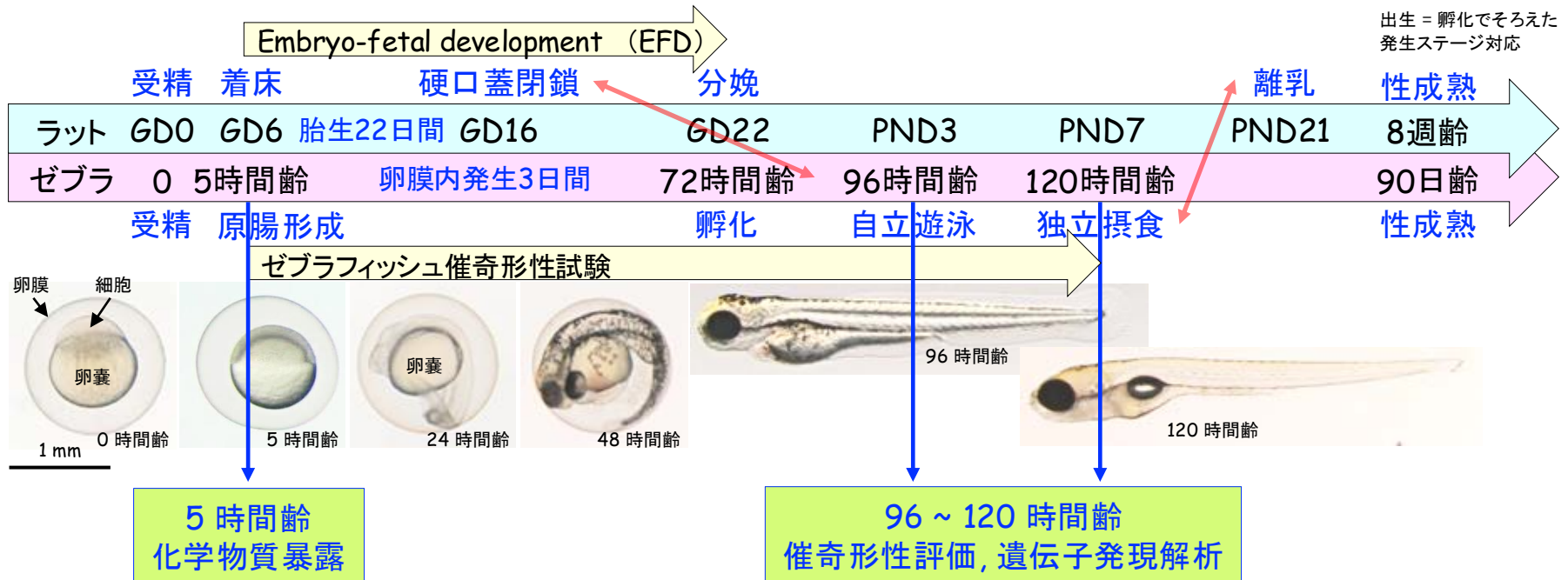


・優良成魚の維持

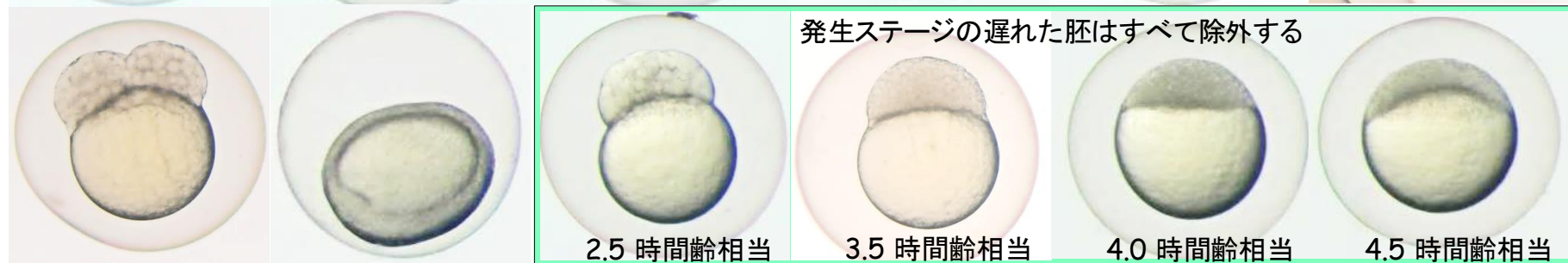
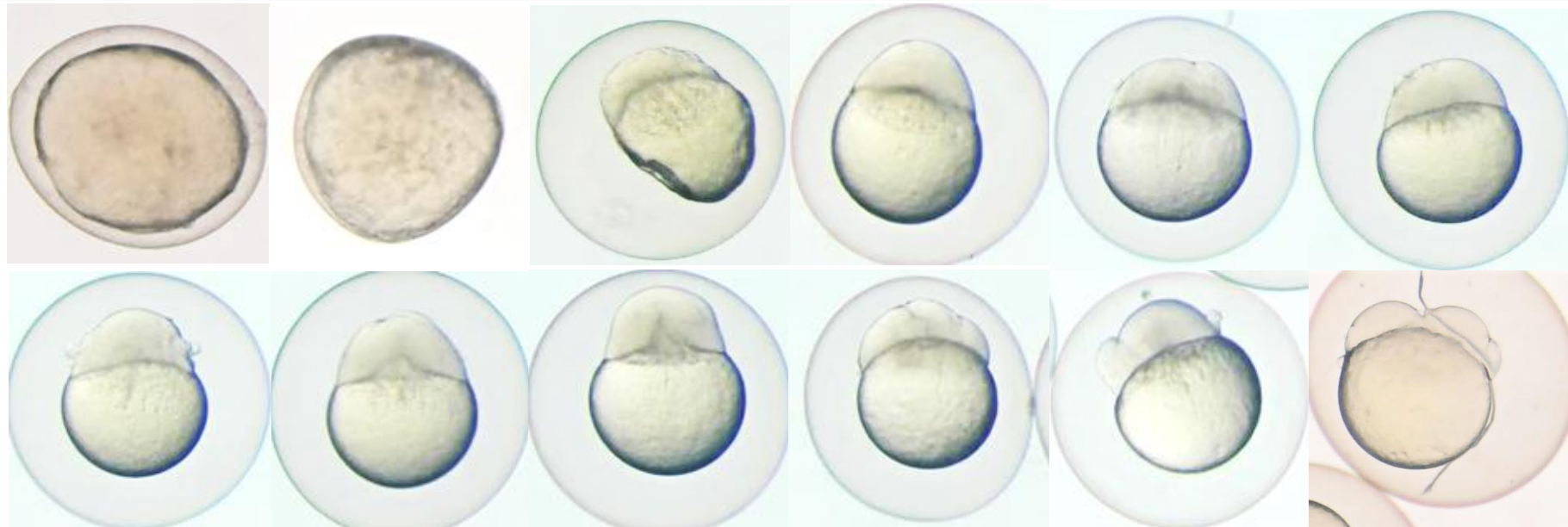
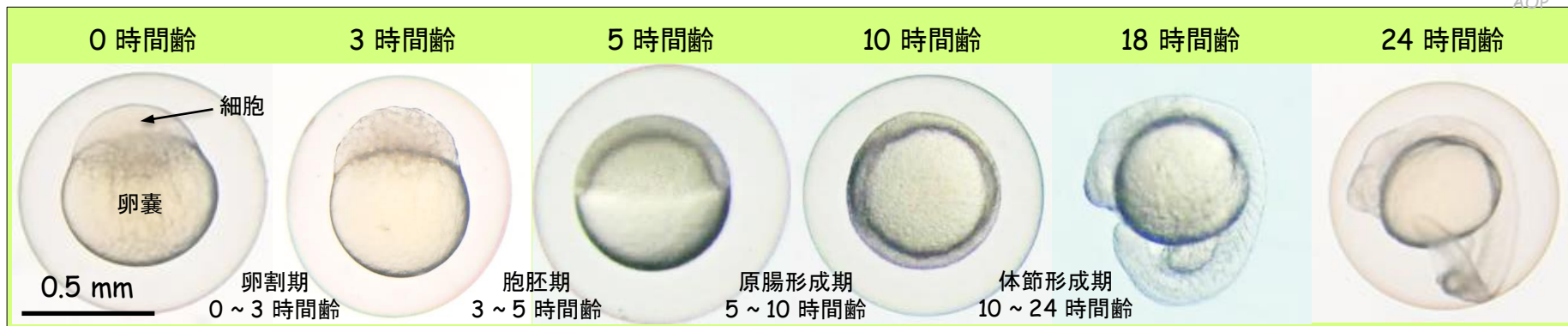
- 前週産んだ ♀ と ♂ を ♀ 一軍水槽と ♂ 一軍水槽で隔離し、本番の交配に使う
- 産卵率は 7 割 (7ペア/10ペア, 1 ペアあたり 100個)

・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



5 時間齢での良胚選別



ゼブラフィッシュの催奇形性

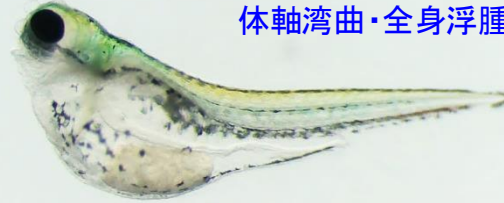
120 時間齢

Control



1% Ethanol

下顎低形成・小頭
体軸湾曲・全身浮腫



10 μ M Valproic acid



下顎低形成・心嚢浮腫・小頭

1 mM Caffeine

下顎低形成
胸部短縮



5 mM Hydroxyurea



下顎低形成・小頭

200 μ M Methoxyacetic acid



50 μ M Methotrexate



下顎低形成・小頭

1 mM Lithium chloride



下顎低形成・体軸湾曲

2 μ M Ibuprofen



小頭

10 mM Folic acid

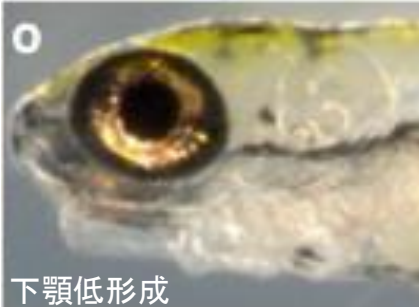


下顎低形成

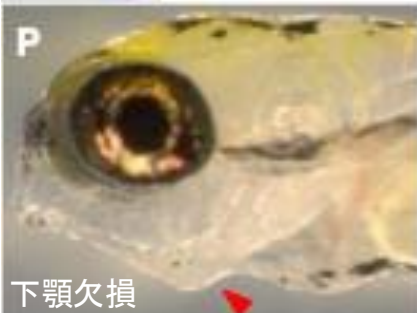
下顎異常はもっとも
出やすい催奇形性



Control



下顎低形成



下顎欠損

系統問題：どの系統を使用すればいいか？

催奇形性試験で使用するべき系統は定まっていない

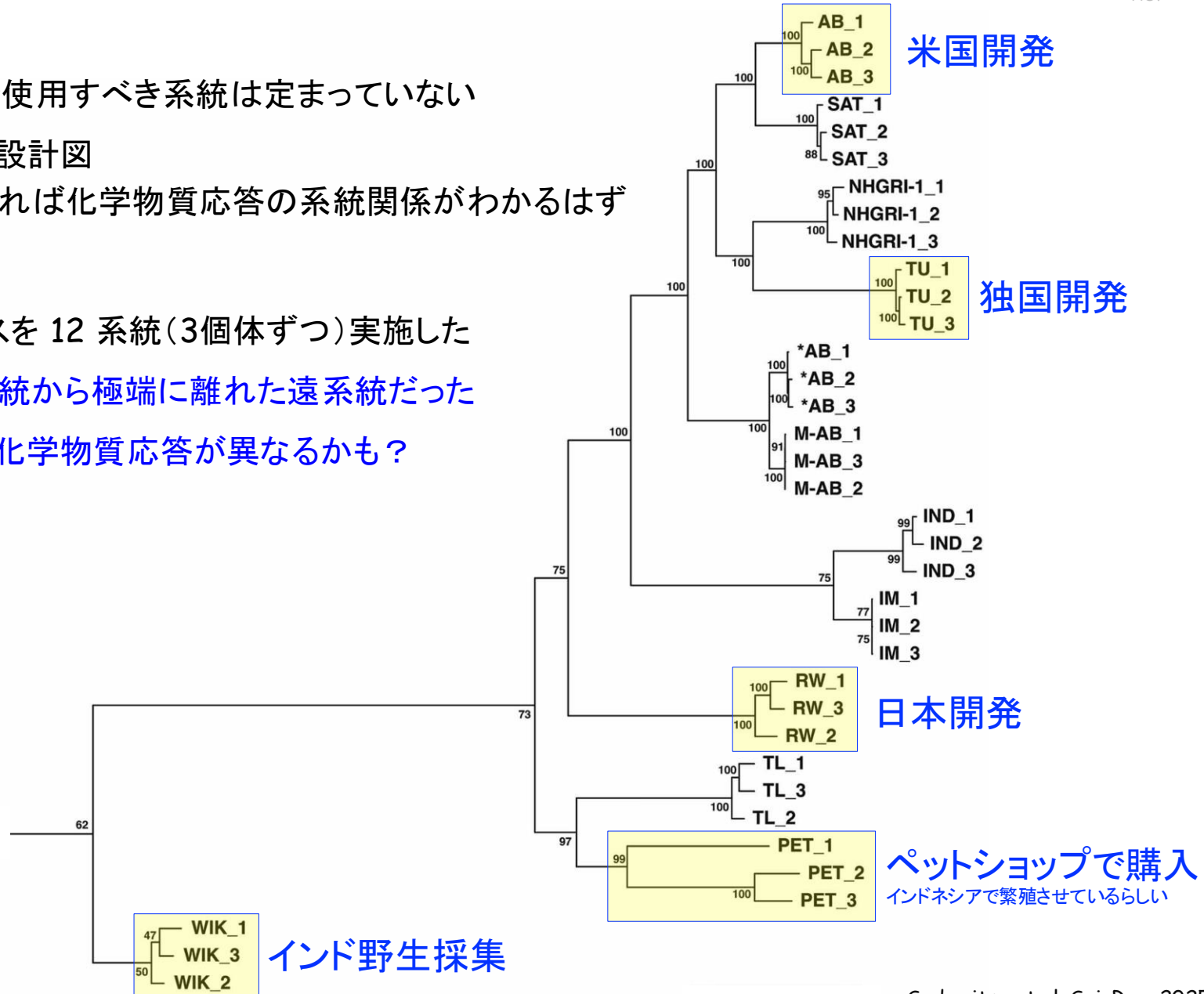
ゲノムは生物の設計図

→ ゲノムを調べれば化学物質応答の系統関係がわかるはず

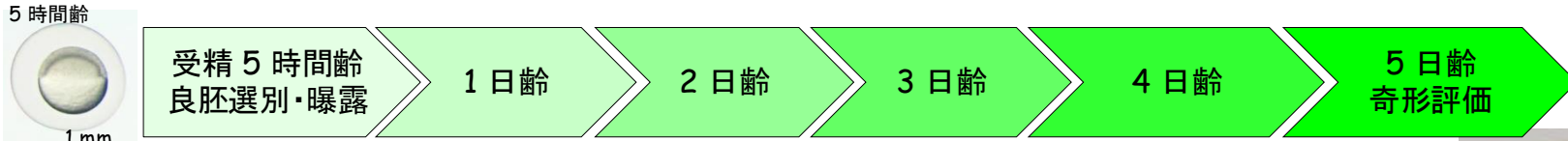
ゲノムシーケンスを 12 系統(3個体ずつ)実施した

→ WIK は他系統から極端に離れた遠系統だった

→ WIK だけが化学物質応答が異なるかも？

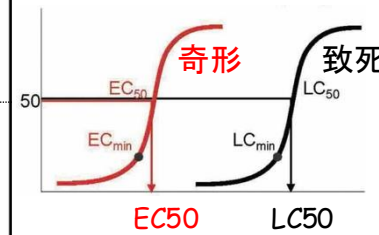
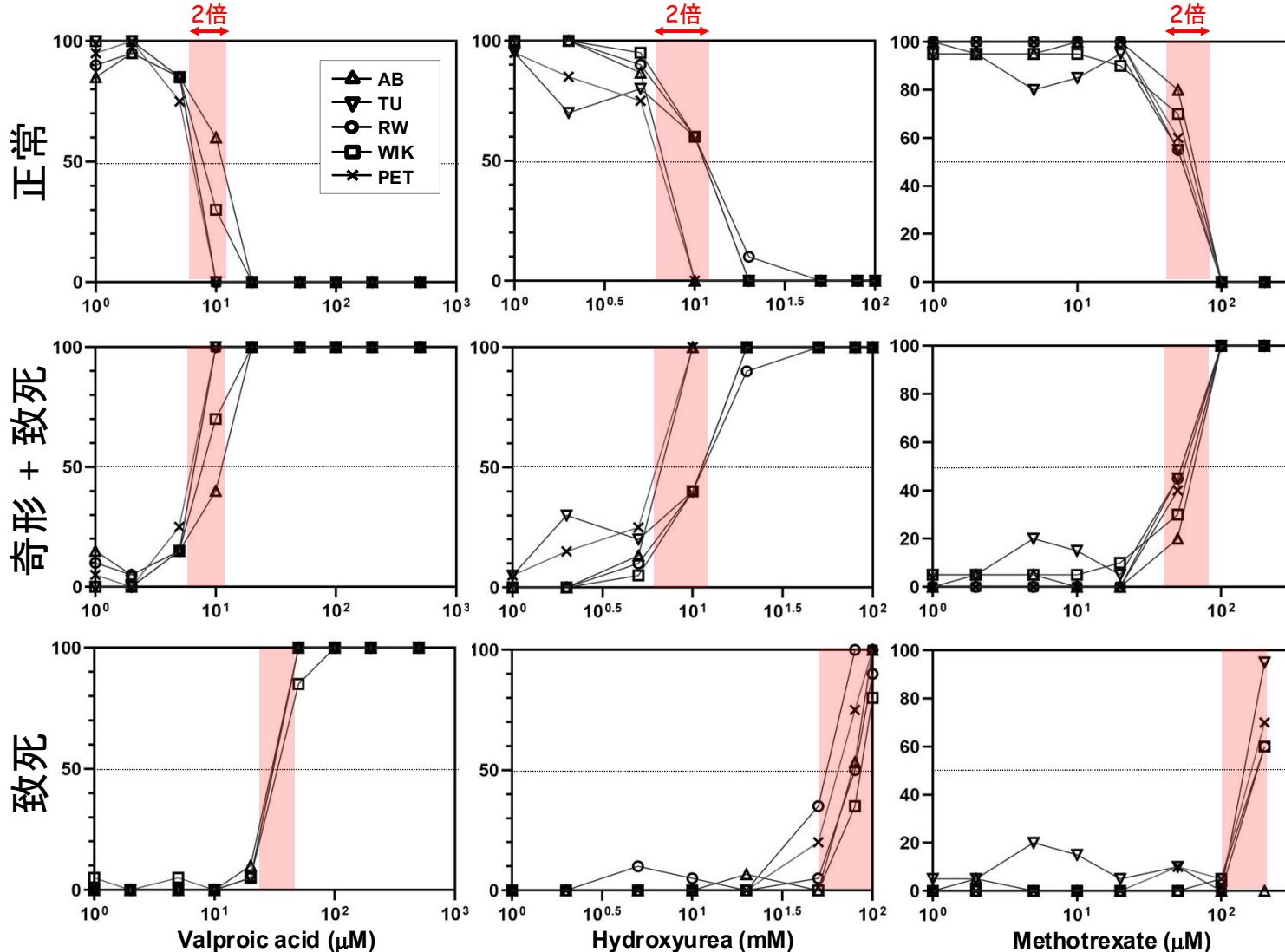


催奇形性の系統差は濃度 2 倍以内



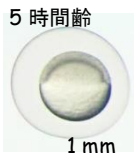
5 日齢

高濃度：奇形濃度・致死濃度の系統差比較



化学物質応答は
WIK を含め
互いに近かった

催奇形性の系統差は濃度 2 倍以内



受精 5 時間齢
良胚選別・曝露

1 日 齢

2 日 齢

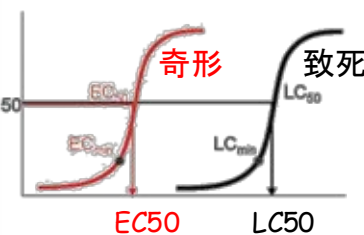
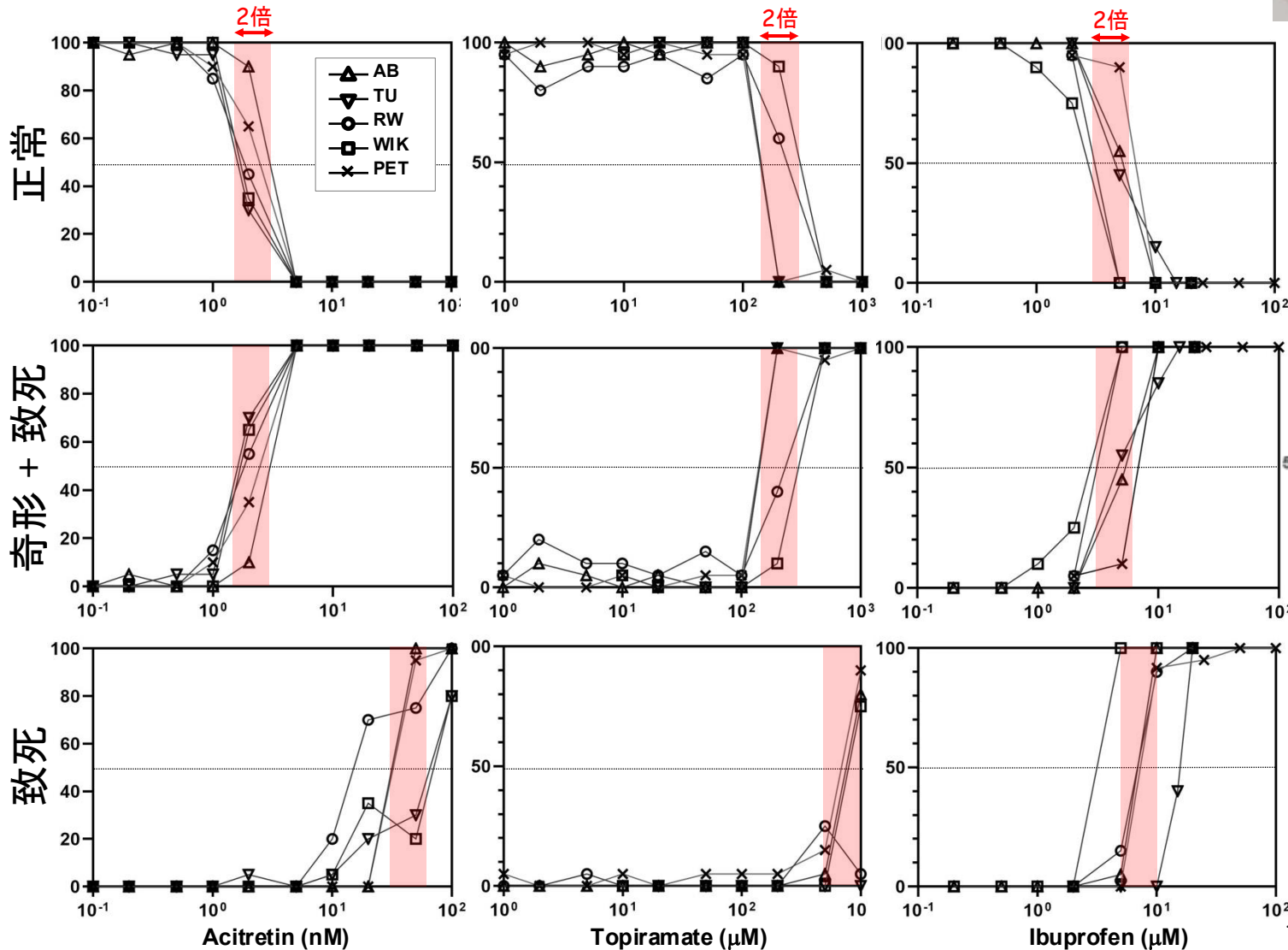
3 日 齢

4 日 齢

5 日 齢
奇形評価

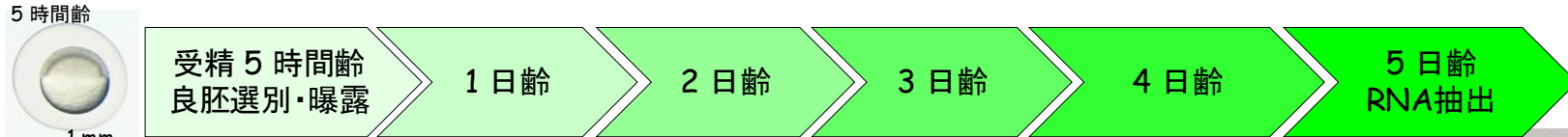
5 日 齢

高濃度: 奇形濃度・致死濃度の系統差比較



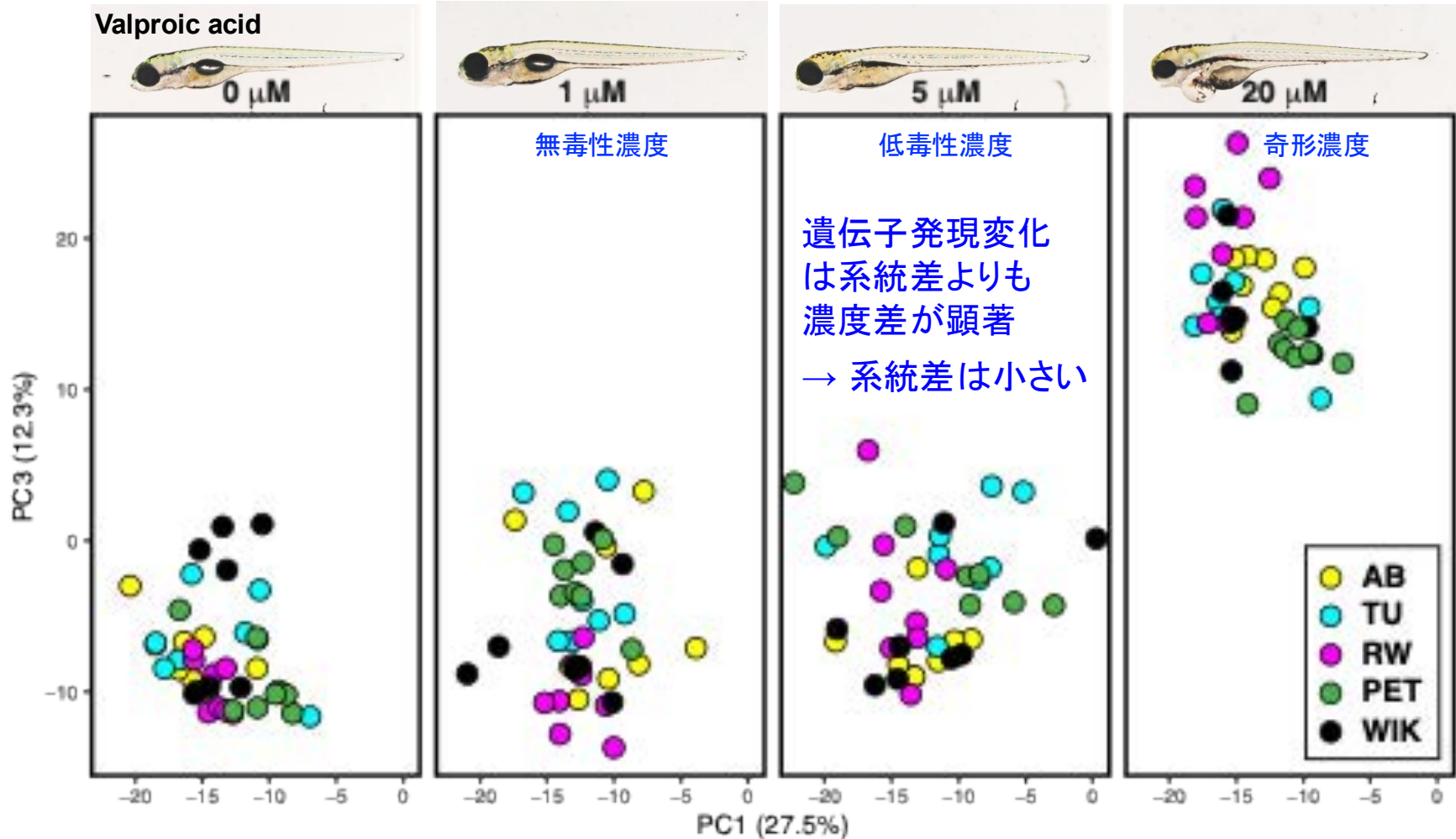
化学物質応答は
WIK を含め
互いに近かった

遺伝子発現変動の系統差は小さい

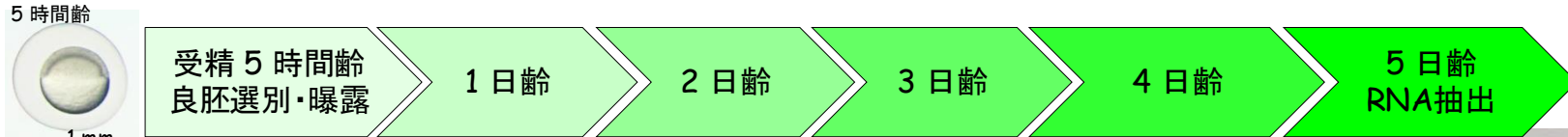


5 日齢

低濃度・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 → 1 個体 RNA-Seq → 主成分分析 → 遺伝子発現の類似性描画

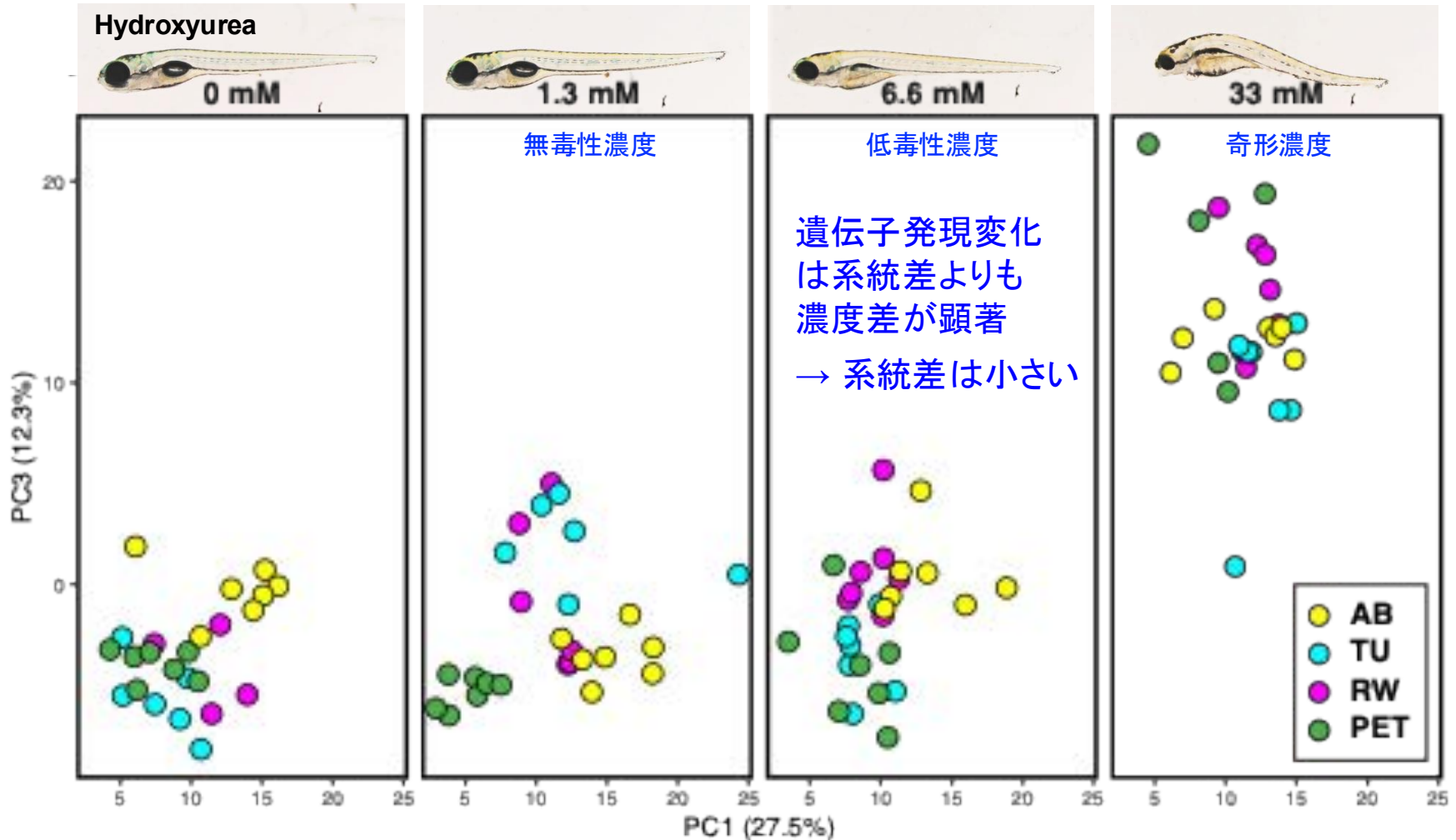


遺伝子発現変動の系統差は小さい



5 日齢

低濃度: 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 → 1 個体 RNA-Seq → 主成分分析 → 遺伝子発現の類似性描画



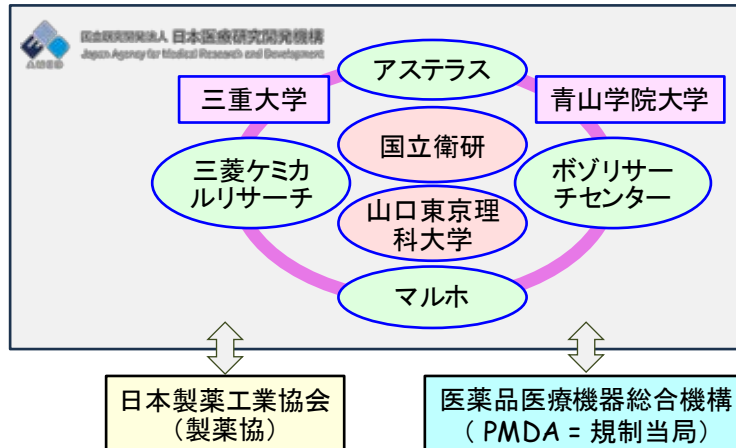
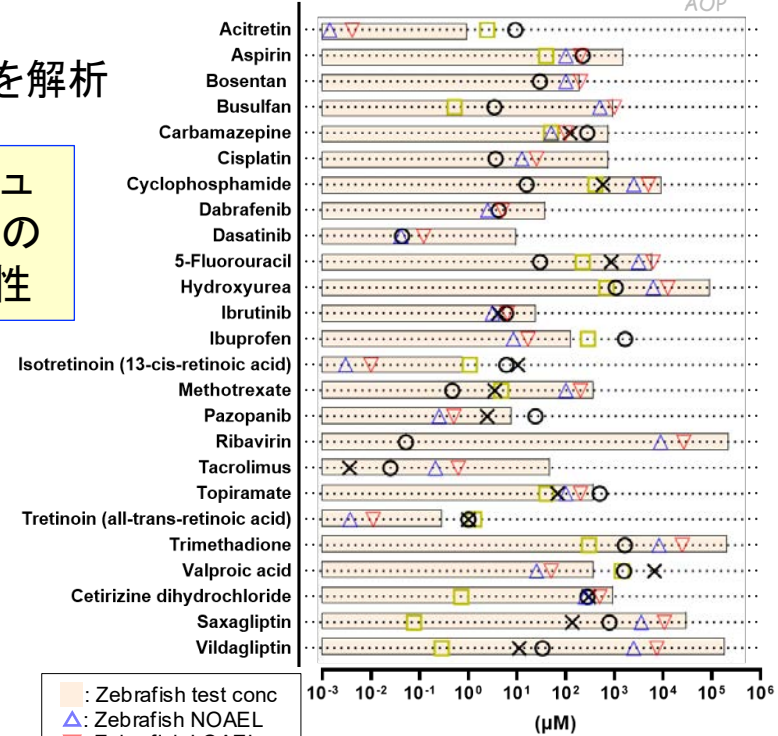
施設間差・ヒト外挿性

AMED-RS 足利班のプロジェクトで医薬品による催奇形性を解析

- 施設間差は小さく、再現性は高い
- 奇形の定義と種間対応
- 濃度相関(ヒト・ラット・ウサギ・ゼブラ)

ゼブラフィッシュ
催奇形性試験の
信頼性・外挿性

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		Body axis, bent

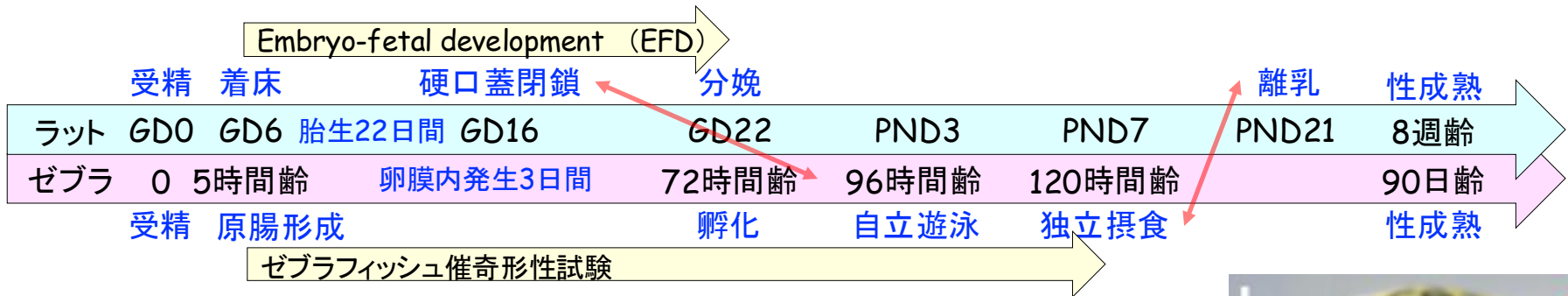


研究代表 国立医薬品食品衛生研究所 足利 太可雄
山口東京理科大学 小島 肇

研究分担 青山学院大学 平田 普三
三重大学 田中 利男

協力機関 アステラス製薬株式会社 森 華奈子
株式会社三菱ケミカルリサーチ 小野 美都穂
株式会社ボゾリサーチセンター 江畑 知憲
マルホ株式会社 杉本 航

ゼブラフィッシュを用いた催奇形性評価の代替法開発



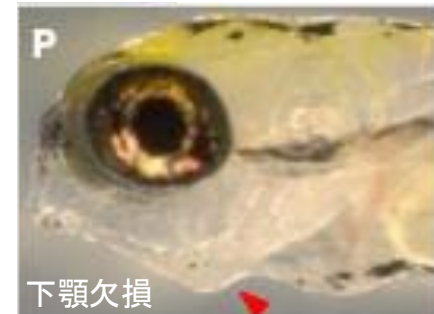
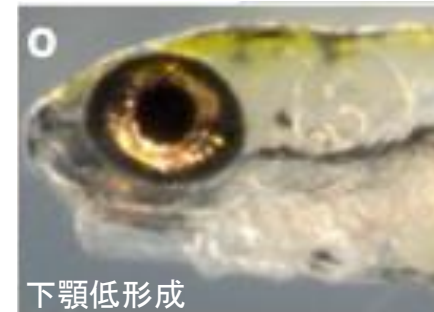
日化協 LRI 第 11~13 期

- ・ 試験法 ゼブラ催奇形性基盤を確立
- ・ 系統問題 どの系統を使ってもよい
- ・ 施設間差 再現性が高い
- ・ ヒト外挿性 催奇形性の種間類似がある
- ・ AOP 1 個体 RNA-Seq 基盤 → 初期応答遺伝子探索

日化協 LRI 第 14 期

- ・ 神経堤細胞 NAM 確立
- ・ 顎口 AOP 提唱
- ・ 催奇形性 IATA 提示

顎口異常(口唇口蓋裂)
に焦点を当てた
催奇形性評価



謝辞

Aoyama Gakuin University

Chitose Taya
Seiji Wada
Kota Ujibe
Kenichiro Sadamitsu
Aoto Sakamoto
Shinnosuke Shimodaira

Toho University

Makoto Kashima

Keio University

Minoru Shinya

National Institute of Genetics

Noriyoshi Sakai
Koichi Kawakami

RIKEN

Hitoshi Okamoto
Akiko Ishioka
Satomi Nakayama
Ryoko Nakayama

Mie University

Toshio Tanaka
Yuhei Nishimura

Tokyo Univ. of Science, Yamaguchi

Hajime Kojima
Tsutomu Kumazawa

National Institute of Health Sciences

Takao Ashikaga

Kao Corporation

Junichi Tasaki
Shujie Liu

Astellas Pharma Inc.

Kanako Mori
Yoshinobu Aoki

Mitsubishi Chemical Research Corp.

Mitsuho Ono
Saaya Umekita
Tatsuhiro Niino

Maruho Co., Ltd.

Wataru Sugimoto
Mai Hayashi

BoZo Research Center Inc.

Tomonori Ebata

M Odyssey LLC

Michio Fujiwara

Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.

Yuki Inoue

Kyowa Kirin Co., Ltd.

Mutsumi Suzuki

Bristol Myers Squibb K.K.

Takashi Tanaharu

Nikon Corporation

Taijiro Kiyota
Junko Sakagami
Wakana Uchida
Takayuki Uozumi

Pharmaceuticals & Medical Devices

Agency (PMDA)

Kazushige Maki
Fumito Mikashima
Yukiko Hoshino

Japan Agency for Medical Research & Development (AMED)

Takao Yamori
Takehiko Matsuda
Yukiko Oura



国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development



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