

神経堤細胞に着目した発生毒性AOPの確立と 国際標準化に資するNAMs開発とIATA構築



平田 普三

青山学院大学

日化協LRI研究報告会
2026年8月28日

日化協 LRI 第14期

研究表題: 神経堤細胞に着目した発生毒性 AOP の確立と
国際標準化に資するNAMs開発 とIATA構築

研究期間: 2026年3月 ~ 2029年2月

研究組織: 平田 普三 (青山学院大学) 田谷 千歳 (青山学院大学)
田崎 純一 (花王株式会社) 劉 舒捷 (花王株式会社)
鹿島 誠 (東邦大学)

第11期で確立したゼブラ催奇形性基盤(平田)
独自の1個体 RNA-Sequence 基盤(鹿島)

+

神経堤細胞の催奇形性評価系
(田崎・劉) Liu et al. Toxicol Sci. 2023 など

第14期実施内容

成功モデルを参照

AOP提唱 + バリデーション
+ IATA提示で採択された
OECD TG444A (In vitro
免疫毒性)をモデルとし、統
合的代替評価戦略の構築
を目指す

NAM確立

神経堤細胞を
中核とする評価系

顎口AOP提唱

AOP-Wikiへの
登録を目指す

IATA提示

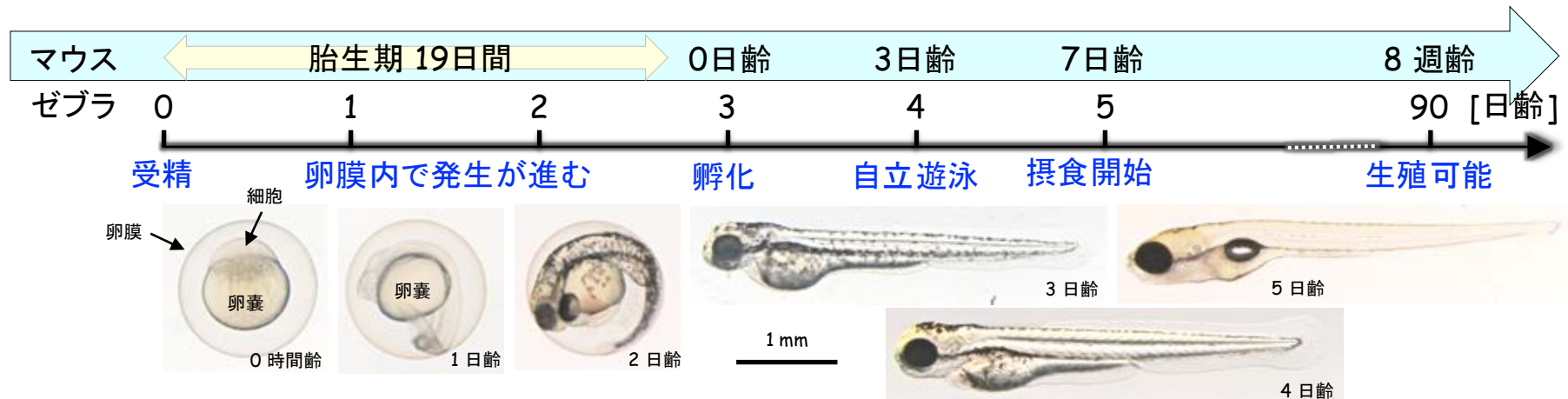
化学品評価の
応用事例を提示

将来的には OECD テストガイドライン提案を検討したい

NAMs としてのゼブラフィッシュへの期待

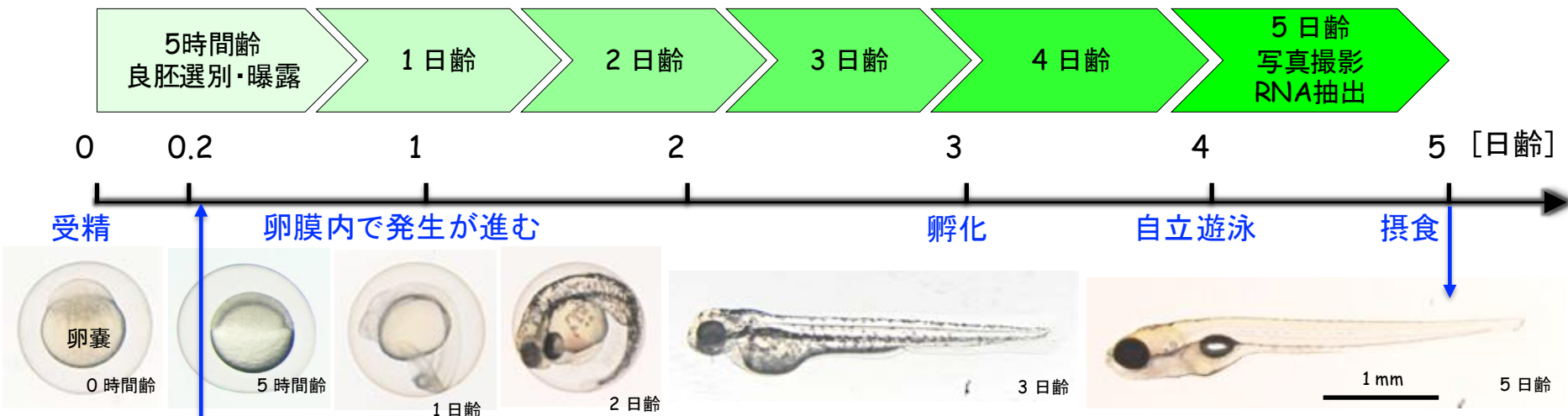
NAMs = New Approach Methodologies

- 2010年 欧州: 実験動物の保護に関する指令 (2010/63/EU)
 保護対象はすべての脊椎動物(以下を除く)と頭足類(タコ・イカ)
 ・ ヒト以外の哺乳類で発生期 2/3 までの胚(しかし母体は保護対象...)
 ・ 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

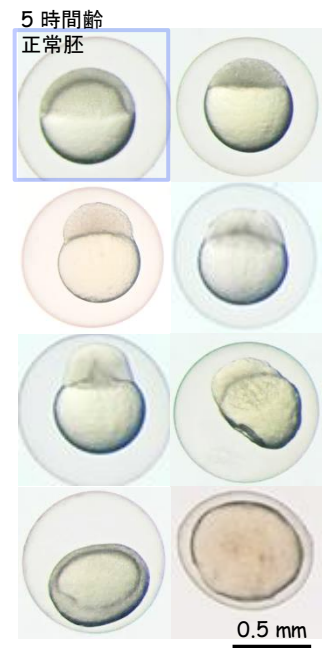
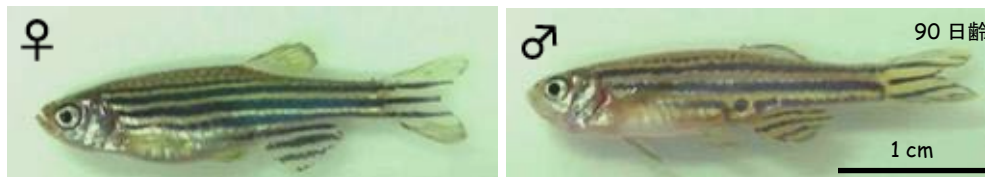


ゼブラフィッシュは 5 日齢までは規制の対象外 → 生殖発生毒性を全身で試験可能
 課題: 試験プロトコル, 系統問題, 再現性(施設間差), ヒト外挿性(催奇形性の類似性, AOP)

催奇形性の試験法



5 ~ 6 時間齢 (原腸形成)
化合物暴露



・優良成魚の維持

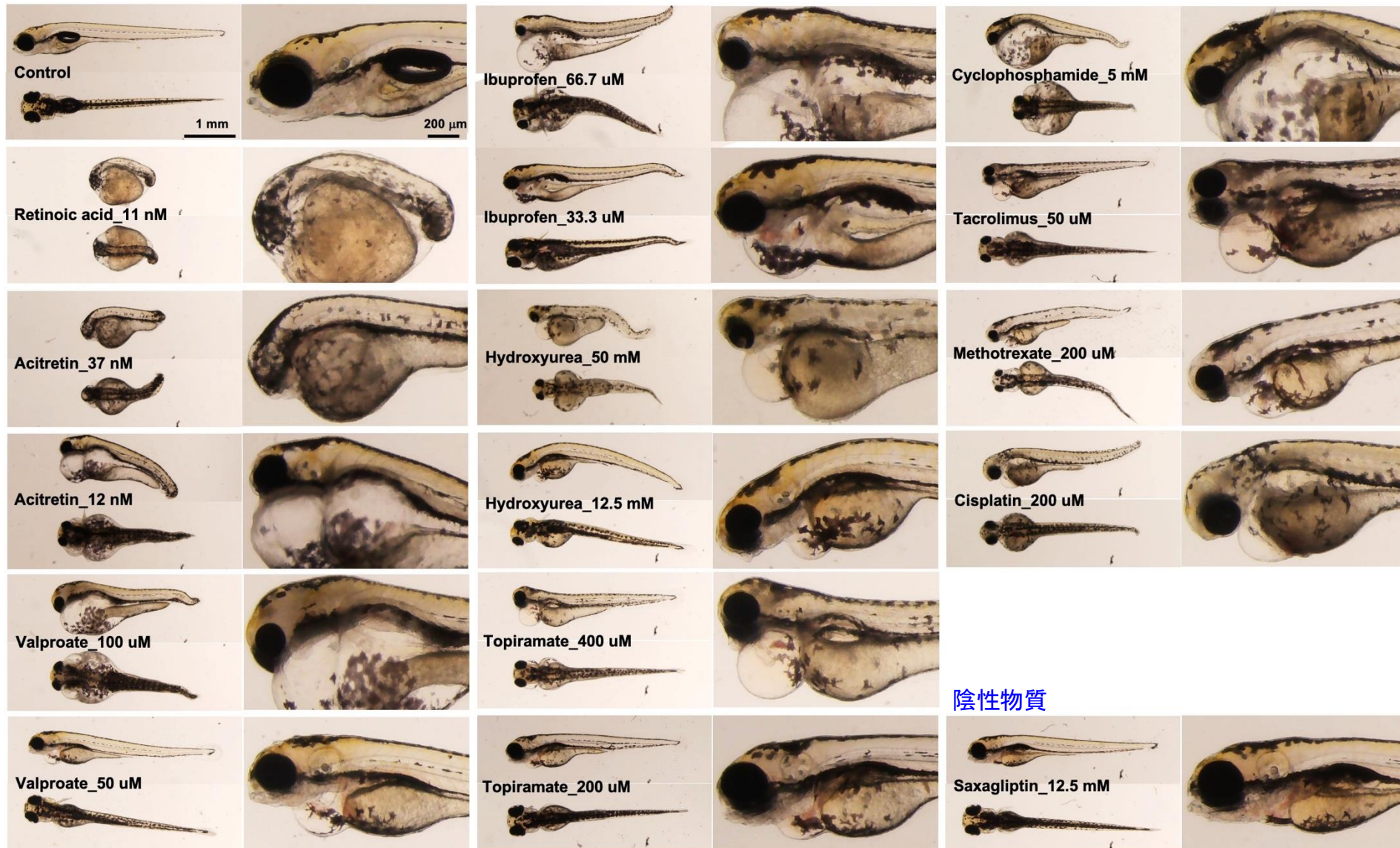
- 先週産んだ ♀ と ♂ を ♀ 一軍水槽と ♂ 一軍水槽で隔離し、本番使用
- 産卵率は 7 割 (7ペア/10ペア, 1 ペアあたり 100個)

・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

本番実験以前のコツがけっこう大事 → 催奇形性試験の試験法確立

ゼブラフィッシュの催奇形性(高濃度暴露) 5日齢

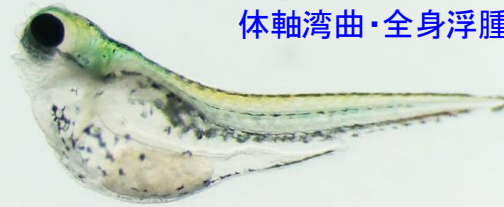


ゼブラフィッシュの催奇形性(低濃度暴露) 5日齢

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
胴部短縮

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

5 mM Folic acid



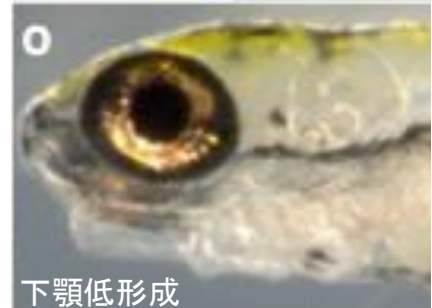
下顎低形成・

下顎異常はもっとも
出やすい催奇形性

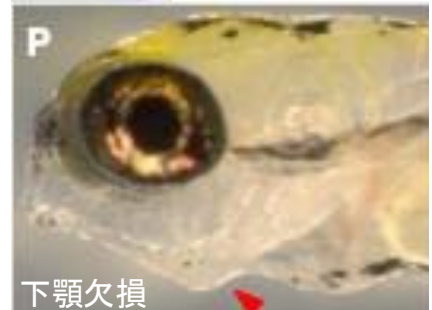
Control



下顎低形成



下顎欠損

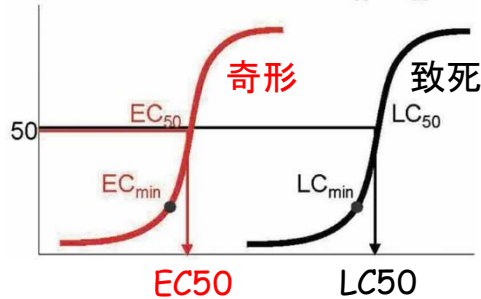


哺乳動物 vs ゼブラ（催奇形性）

AMED-RS 足利班
医薬品等の安全性評価に用いる
動物試験代替法の開発、評価及
び標準化に関する研究

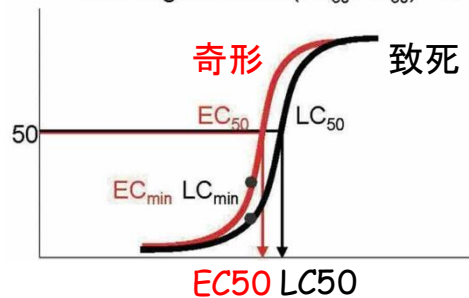
Teratogenic

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



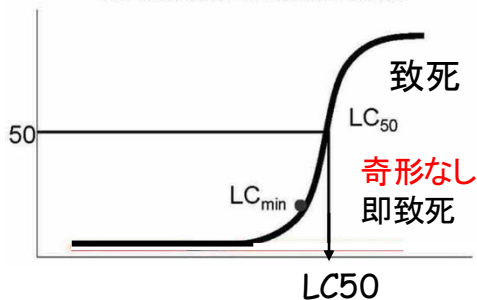
Equivocal

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



Lethal

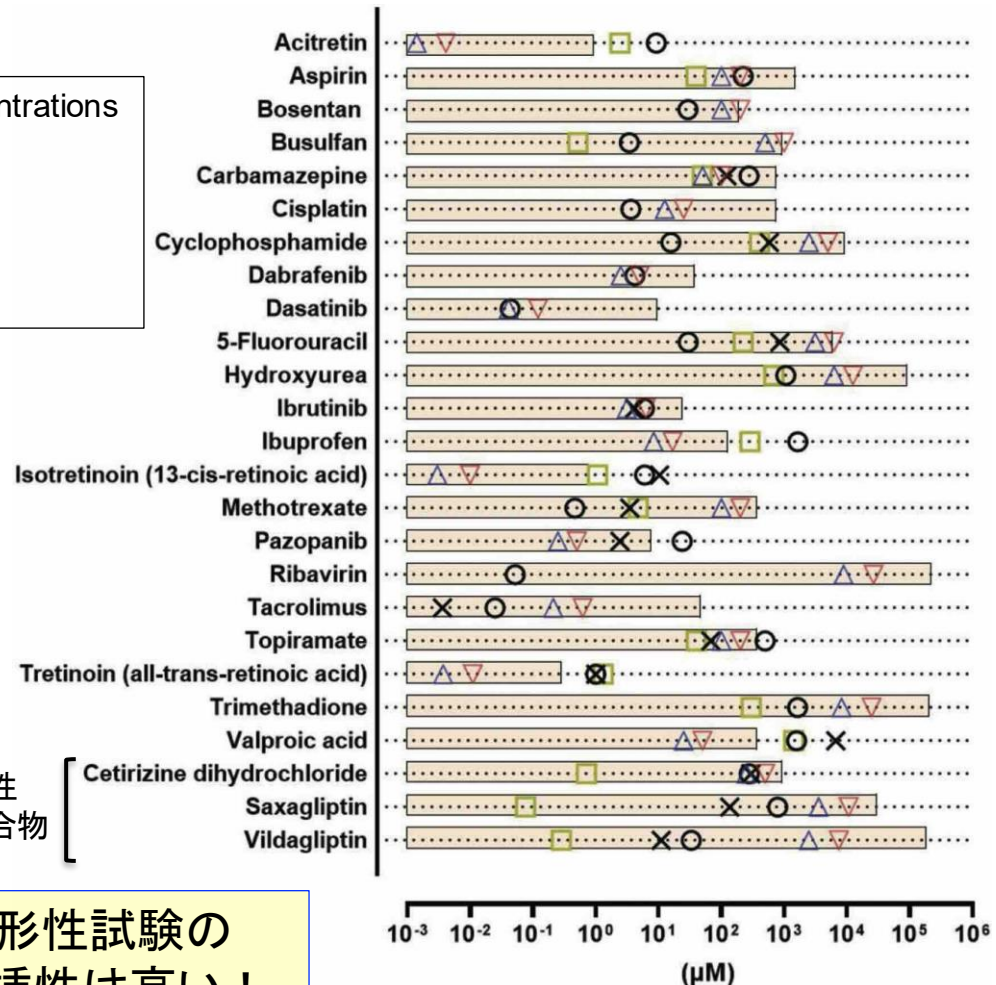
No increase in malformation



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
スペインの企業 Biobide、中国のグループも同様の論文

はすべて

- : Zebrafish test concentrations
- △: Zebrafish NOAEL
- ▽: Zebrafish LOAEL
- : Rat C_{max} LOAEL
- ×: Rabbit C_{max} LOAEL
- : Human dose C_{max}



陰性
化合物

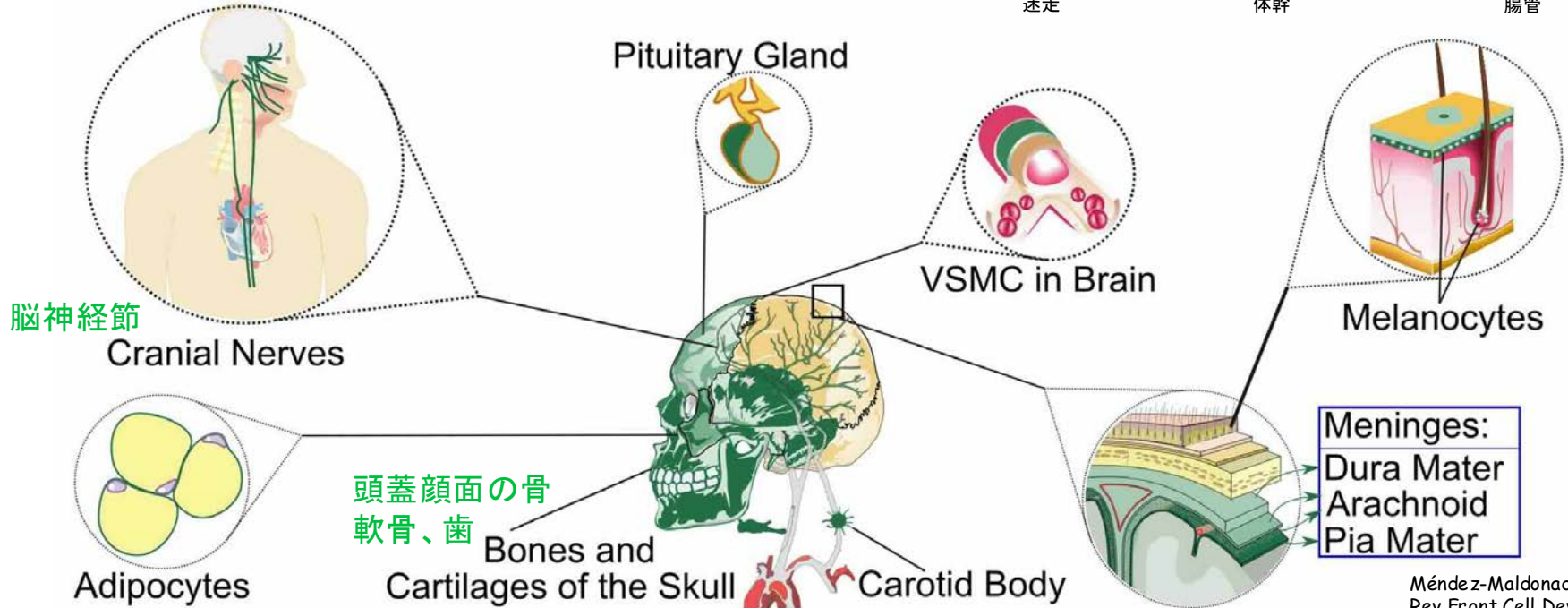
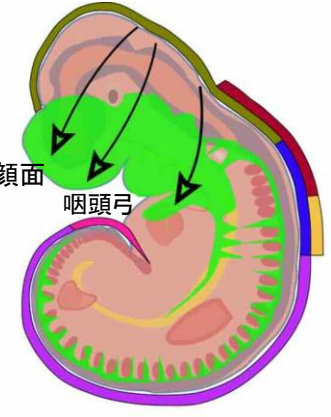
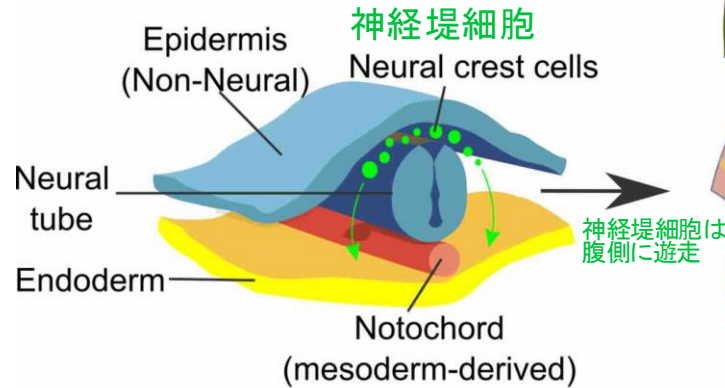
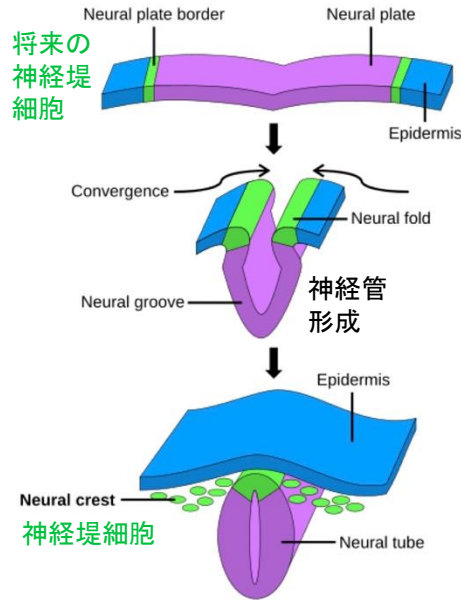
ゼブラ催奇形性試験の
再現性・外挿性は高い！

顎口AOP(頭蓋神経堤NAM)

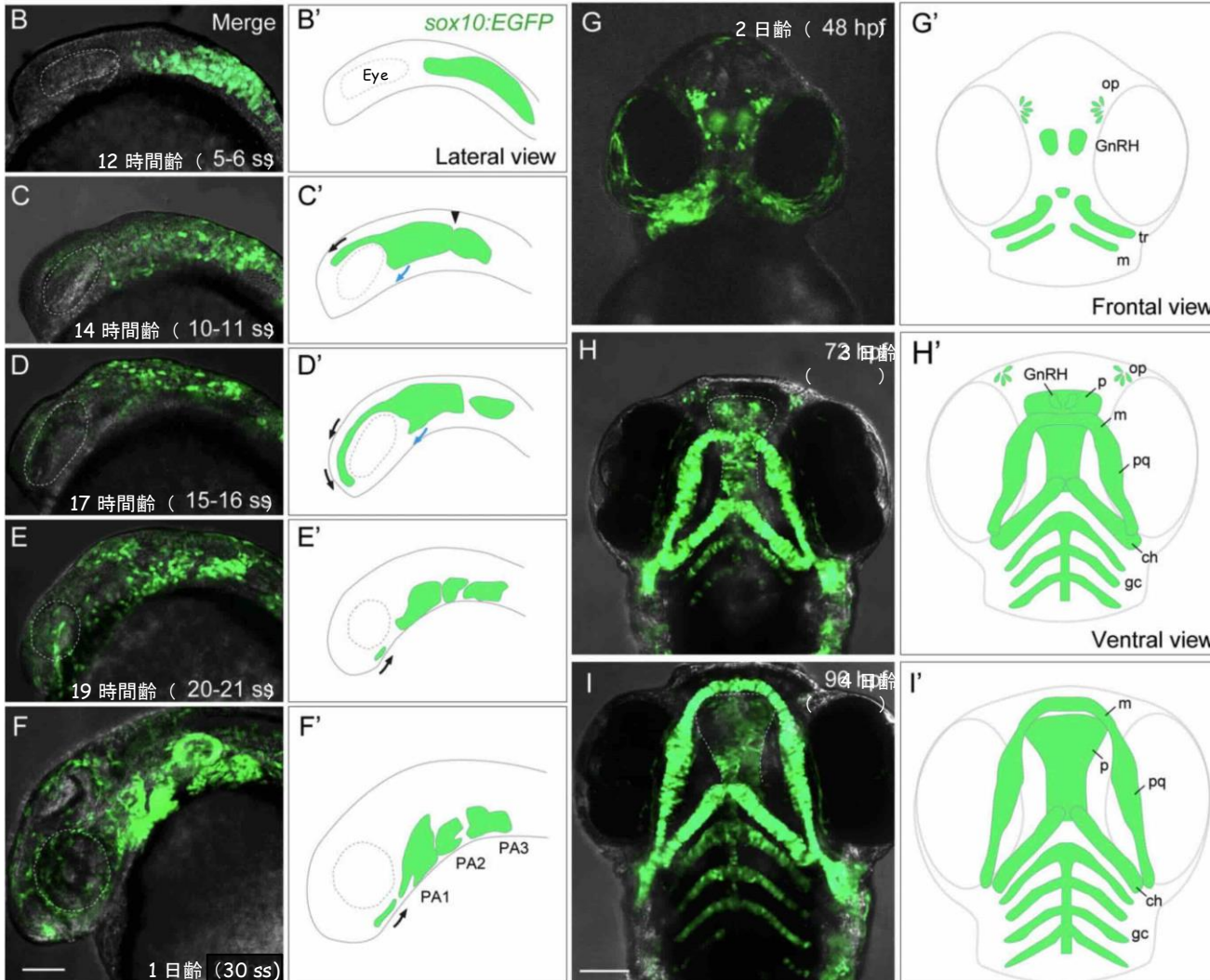
神経堤細胞は魚類からヒトまで保存され、その異常は口唇口蓋裂を引き起こす。
分子から個体までを連続的に評価する因果経路 AOP として提案する。



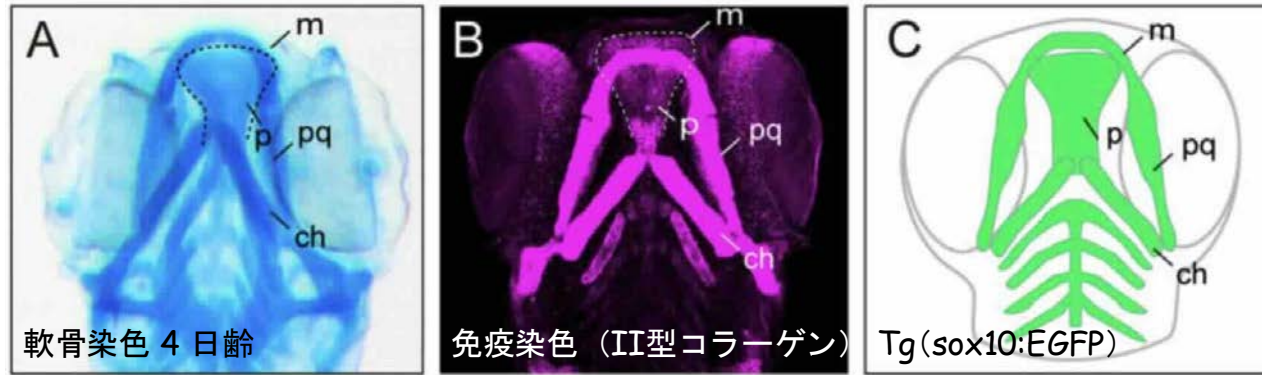
神経堤細胞 (Neural crest cell)



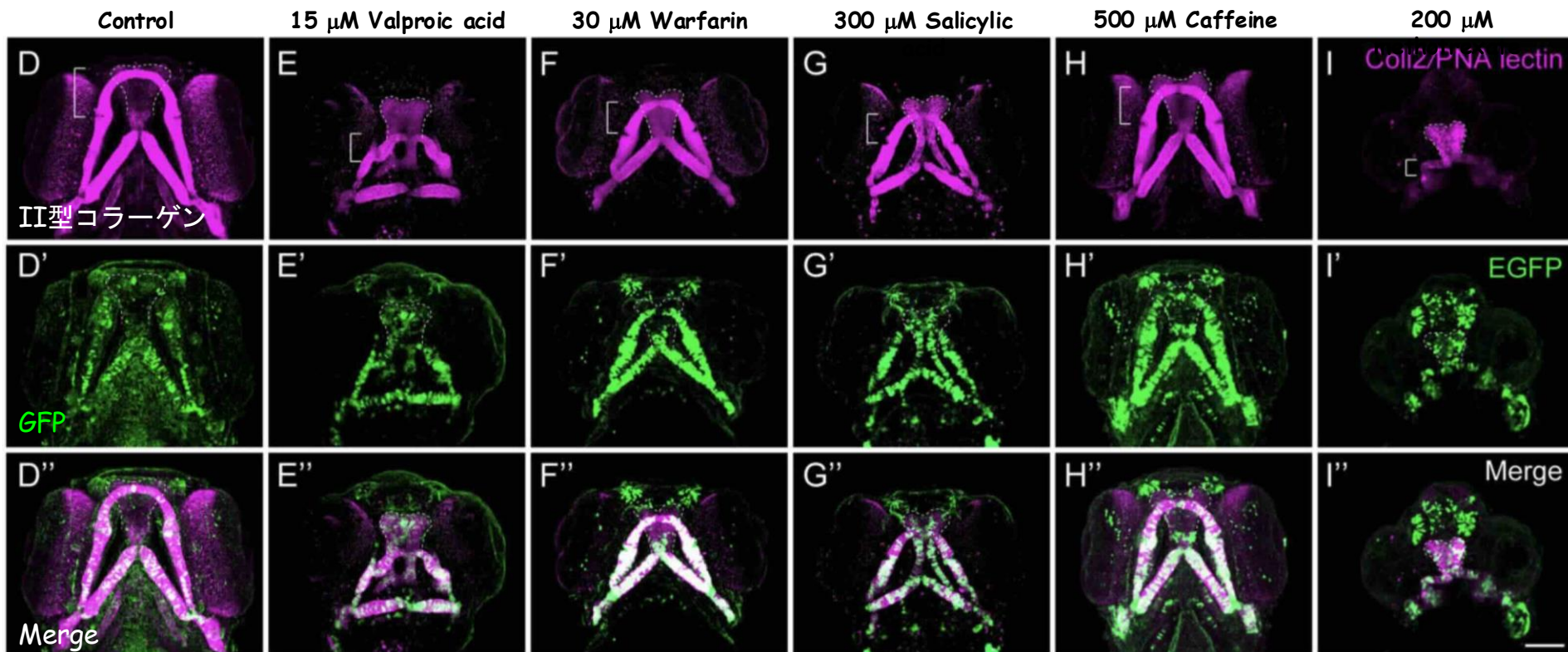
Tg(sox10:EGFP)で神経堤細胞の分化・遊走を可視化



頭蓋の神経堤細胞は顎口軟骨に分化する



m (Meckel's cartilage): メッケル軟骨
 p (Palate): 口蓋
 pq (Palatoquadrate): 口蓋方形軟骨 (上顎)
 ch (Ceratomyel): 角舌骨



Tg(sox10:EGFP)の経時観察と催奇形性(再現)

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



Control

5 μ M Valproic acid

20 mM Hydroxyurea

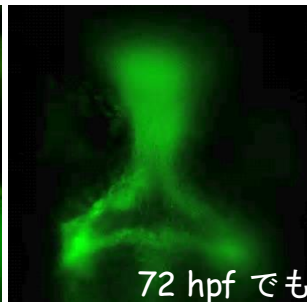
5 μ M Ibuprofen

1% EtOH

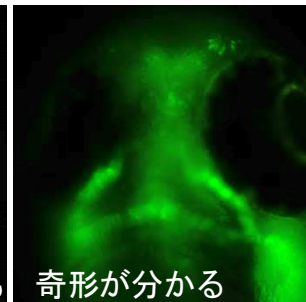
500 μ M Caffeine



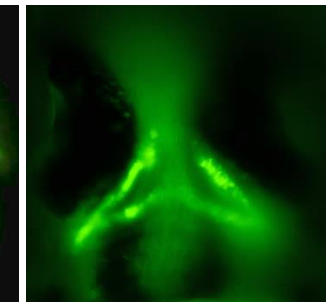
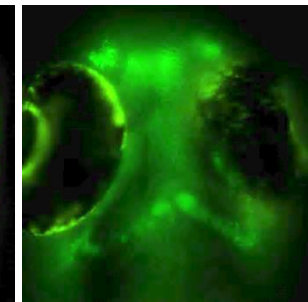
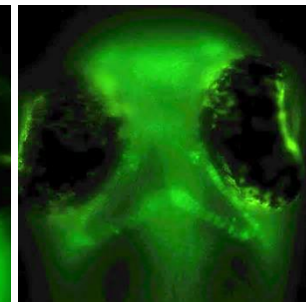
3 日 齢



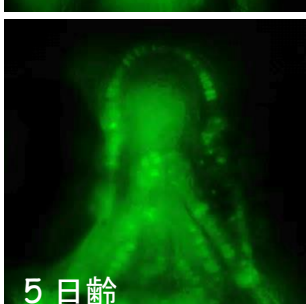
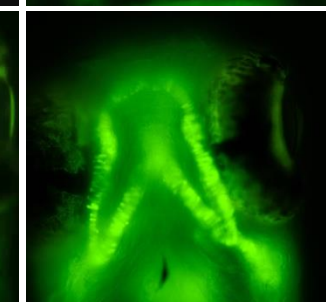
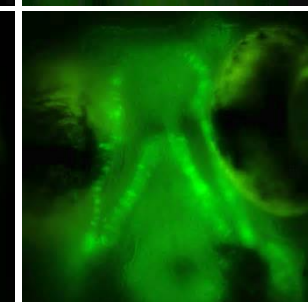
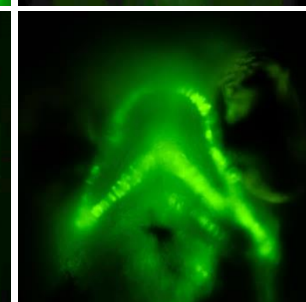
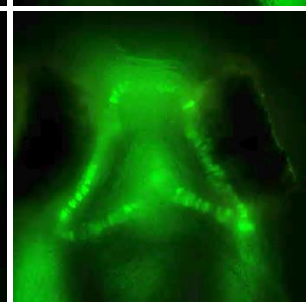
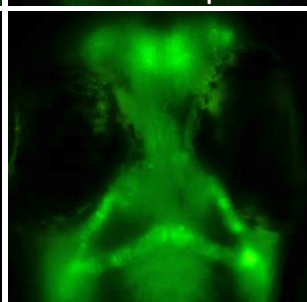
72 hpf でも



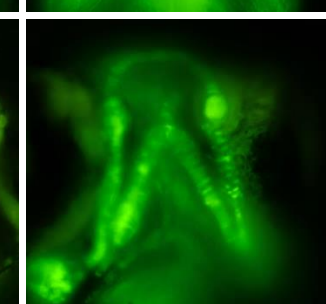
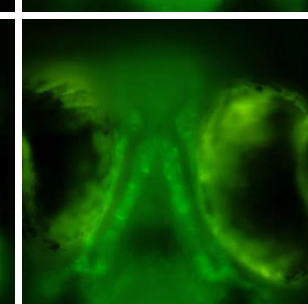
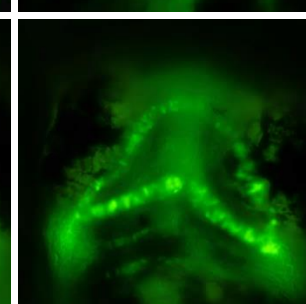
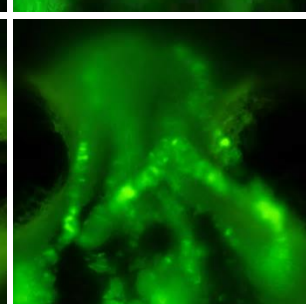
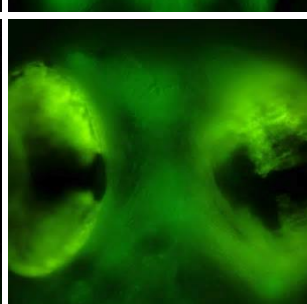
奇形が分かる



4 日 齢



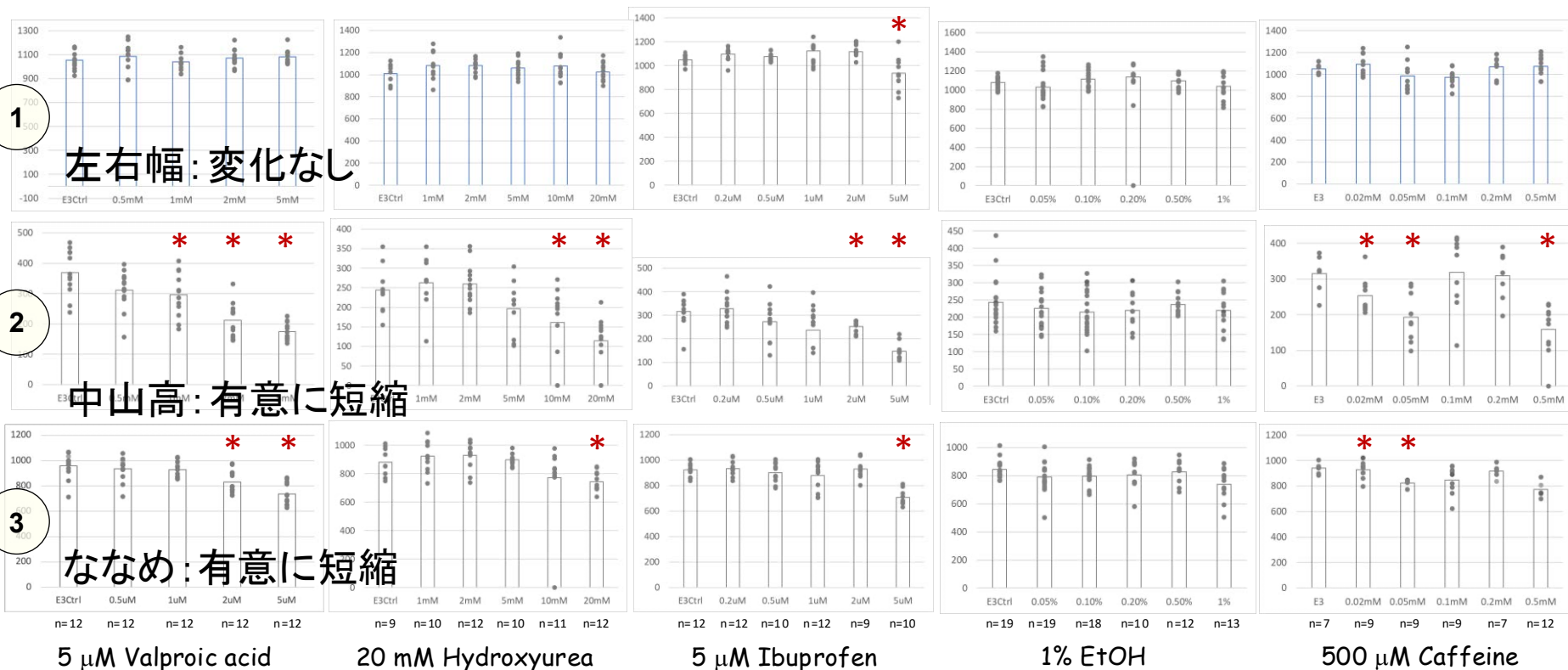
5 日 齢



Tg(sox10:EGFP)の催奇形性の定量評価



顎口 AOP の KE3～AO
の定量指標として実装可能



日化協 LRI 第14期

計画目標	2026年度	2027年度	2028年度
NAM確立 頭蓋神経堤細胞を 中核とする評価系	Tg(sox10:EGFP)によるKE定量評価。 下顎軟骨・GFP定量を標準化。 再現性検証と操作手順書。		
AOP提唱 AOP-Wikiへの 登録を目指す	24 時間齢 1 個体 RNA-Seq で MIE→KE1 を解析。 共通変動遺伝子を同定。 暫定 AOP モデルと IATA を構築。		
IATA提示 化学品評価の 応用事例を提示	AOP-Wiki データセットを完成・登録申請。 陰性化学品へ応用し IATA 事例を評価。		

脊椎動物の普遍的な発生現象に基づくデータ

Tg(sox10:EGFP) で下顎軟骨を簡便・定量評価し、多くの化合物で有意な短縮を検出。

分子機序に基づく NAM・AOP の確立

レドックスを起点に、神経堤細胞を中核 KE とする顎口 AOP を体系化。

国際標準化への出口

AOP-Wiki 登録と IATA 応用を経て、将来の OECD テストガイドライン提案を見据える。