

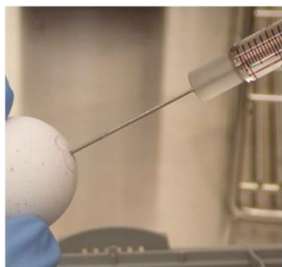
ウズラ受精卵(胚)を卵殻無しで 複数同時に培養する方法

国立研究開発法人国立環境研究所
環境リスク・健康領域
環境リスク科学研究推進室
主幹研究員 川嶋貴治

2026年1月15日

環境研究総合推進費(2022~2024年度)

化学物質の鳥類卵内投与による性分化異常評価手法の開発 とテストガイドライン化に向けた提案



ウズラ胚における性分化の過程を把握するとともに、生殖発生毒性評価に適用可能なエンドポイント候補を検証する。

適格性が確認
できた
エンドポイント

- 1) **生殖器** → 卵巣、卵管、産卵（卵殻形成）、精巣、精管、クロアカ腺、性ホルモン分泌
- 2) **生殖細胞** → 始原生殖細胞分化、精子形成、卵子形成
- 3) **脳** → 視床下部-下垂体-性腺軸（HPG軸）、交尾行動

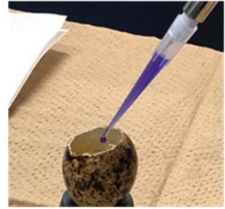
提案

内分泌かく乱物質による鳥類
性分化異常検出のテストガイドライン

OECD

Organisation for Economic Co-operation and Development

環境研究総合推進費(2022~2024年度)



成鳥における異常

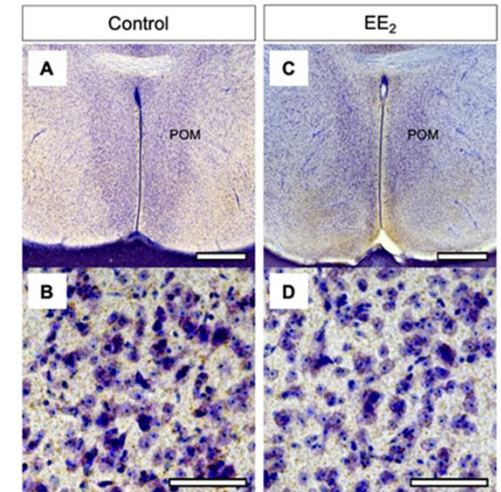
胚期のエストロゲン様化学物質の
曝露により脱雄化した

エストロゲン様化学
物質の卵内投与

不可逆的影響
(発生の臨界期)



脳における性分化異常

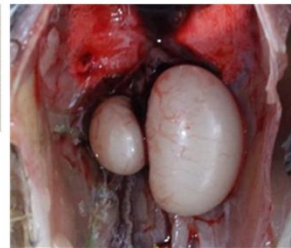


脳切片にバソトシン免疫染色(茶色)とニッスル染色(青色)を施した

生殖器における性分化異常

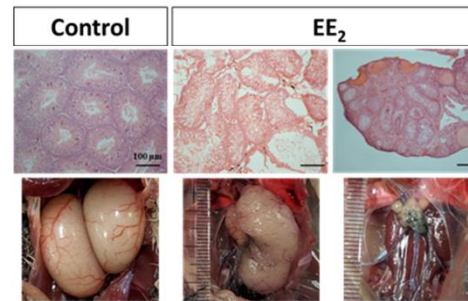


- ・卵管の形態異常
- ・卵殻の形成不全(軟卵)
- ・産卵率の低下



- ・右精巢の萎縮
- ・卵精巢の出現

生殖細胞における性分化異常



成熟雄の精巢のHE染色像

- ・精子の形成異常
- ・精巢内に卵胞様組織の形成

- ・雄性行動の制御中枢であるPOM(内側視索前核)でのバソトシン神経の減少
- ・クロアカ腺の発達障害
- ・性行動の障害

環境研究総合推進費(2022~2024年度)

胚から成鳥の繁殖影響
(性分化異常)を予測

生殖機能

- ①生殖器
- ②生殖細胞
- ③脳

卵内投与試験

従来の「親鳥から卵への影響評価」
を「卵から親鳥への影響評価」に
パラダイムシフト

AOP (Adverse Outcome
Pathways : 有害性発現経路)
を明らかにする

適用範囲と適用限界を見定める



毒性評価指標
(エンドポイント)

精緻化・高度化

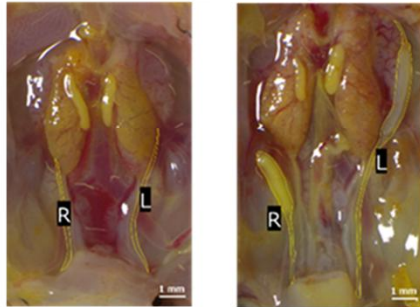
性分化異常を迅速かつ効率的に検出するための卵内投与試験と
再現性・信頼性のある毒性評価指標 (エンドポイント) の提示

性分化異常検出のエンドポイント

エストロゲン様作用検出エンドポイント

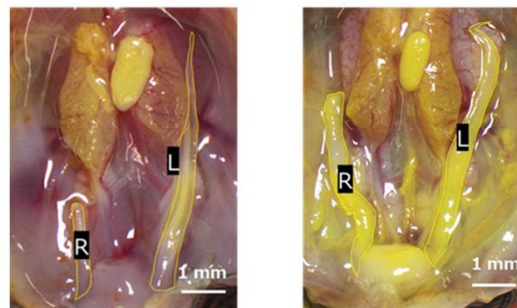
1) オス左右ミューラー管サイズ

対照群 エストロゲン曝露



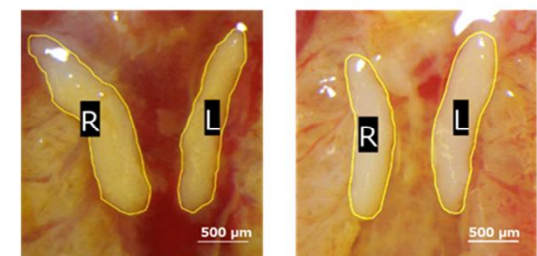
2) メス右ミューラー管サイズ

対照群 エストロゲン曝露



3) 左右精巣のサイズ比

対照群 エストロゲン曝露

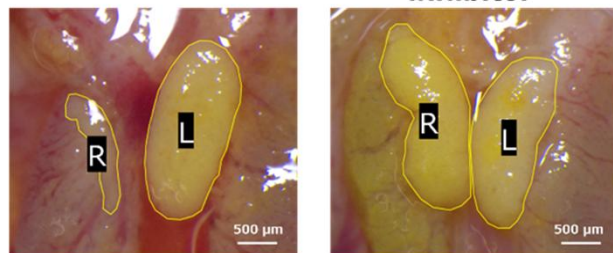


→右精巣サイズへの変更を検討中

抗エストロゲン作用検出エンドポイント

メス右卵巣のサイズ

対照群 アロマトラーゼ阻害



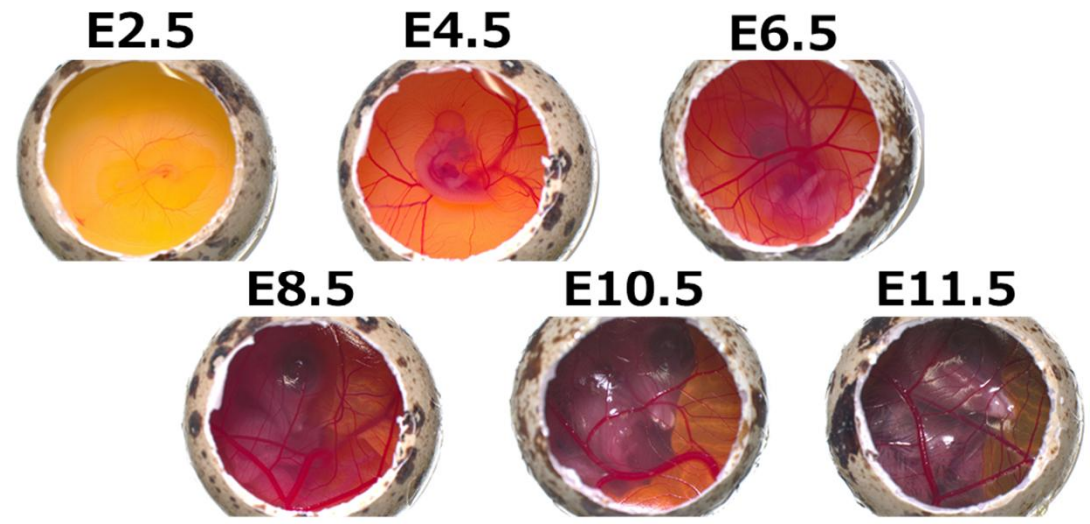
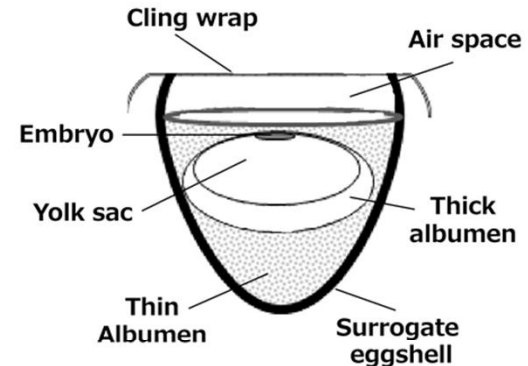
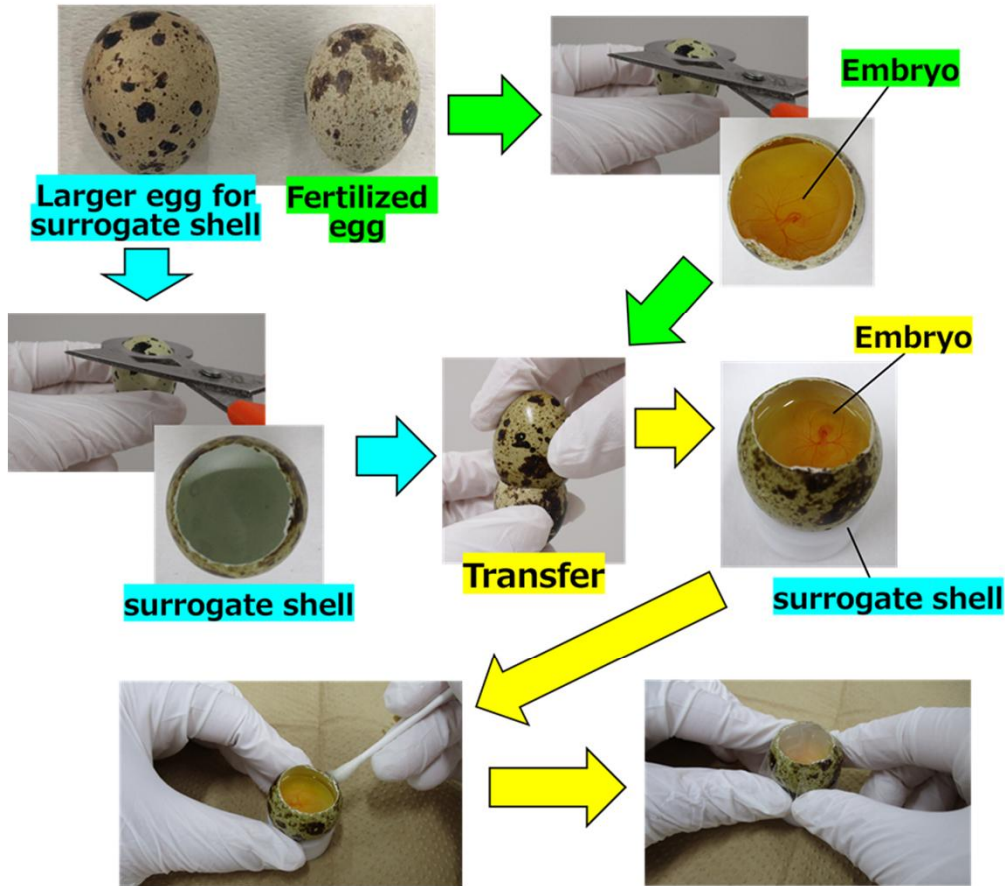
エストロゲン作用検出エンドポイント:

- 1) オス左右ミューラー管のサイズ
- 2) メス右ミューラー管サイズ
- 3) 左右精巣のサイズ比 (左優位性の上昇)

抗エストロゲン作用検出エンドポイント:

- メス右卵巣サイズ

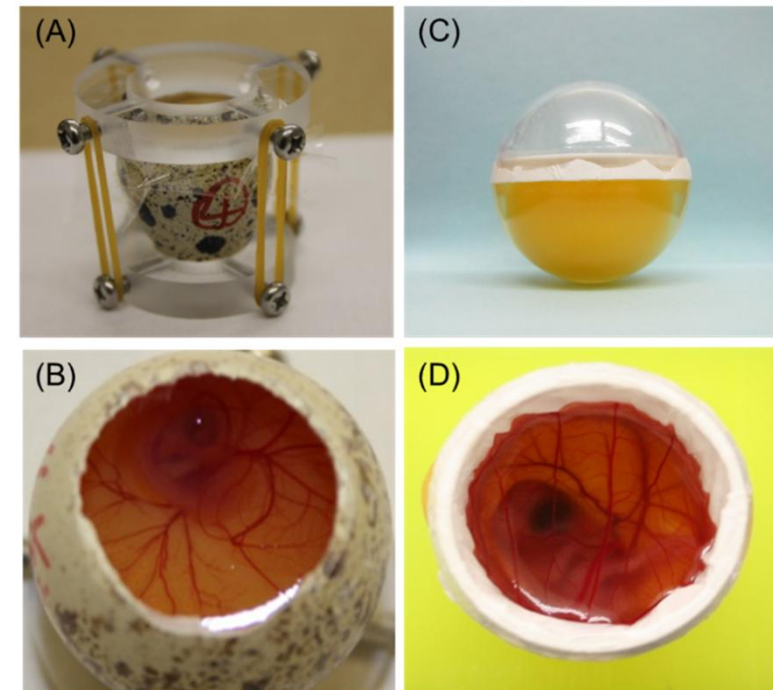
代理卵殻を用いたウズラ胚培養技術



(Method modified from Perry, *Nature*, 1988)

従来技術とその問題点

- **器官形成初期**の胚操作は煩雑であるため、多くの化学物質で形態異常を生じるリスクが高い時期（**臨界期**）での被験物質の投与や観察が困難である。
- ウズラ受精卵（胚）を一つ一つ個別に培養していたため、迅速かつ効率的に、多数の試験を行うことができない。



Kawashima et al. (2016) Frontiers.
Kawashima et al. (2005) Zoo Biol.

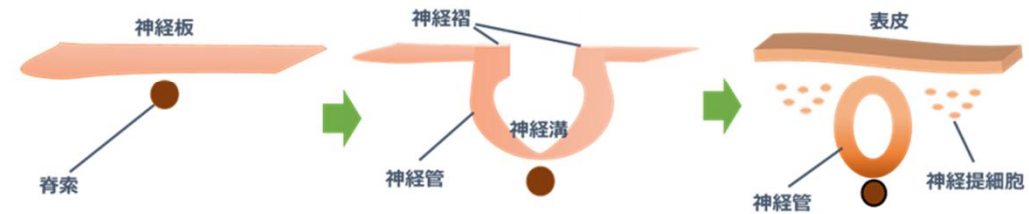
鳥類胚の特徴

鳥類胚の利点

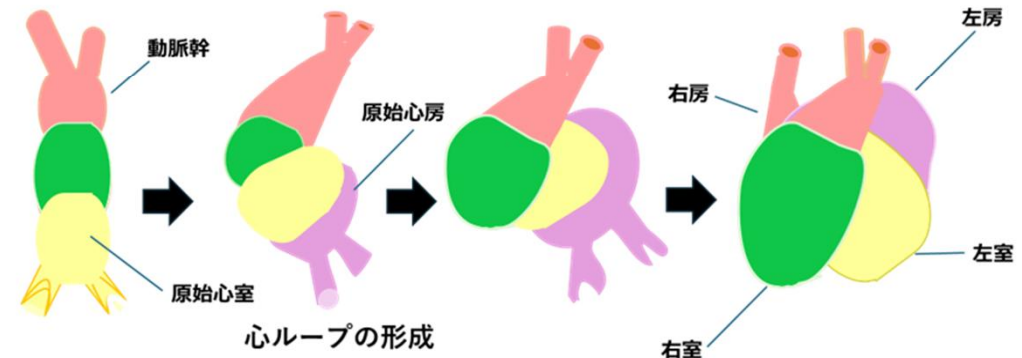
- 材料が安い
- 無菌操作が容易
- 胚発生が早い
- 母体からの影響を無視できる
- いつでも観察ができる
- 被験物質を胚に直接曝露できる
- 被験物質が少量ですむ
- 無精卵を事前に除外できる
- 母鳥を犠牲にしない
- 発育卵は動物実験の対象外

鳥類の神経管と心臓の形成

◎ 神経管の形成



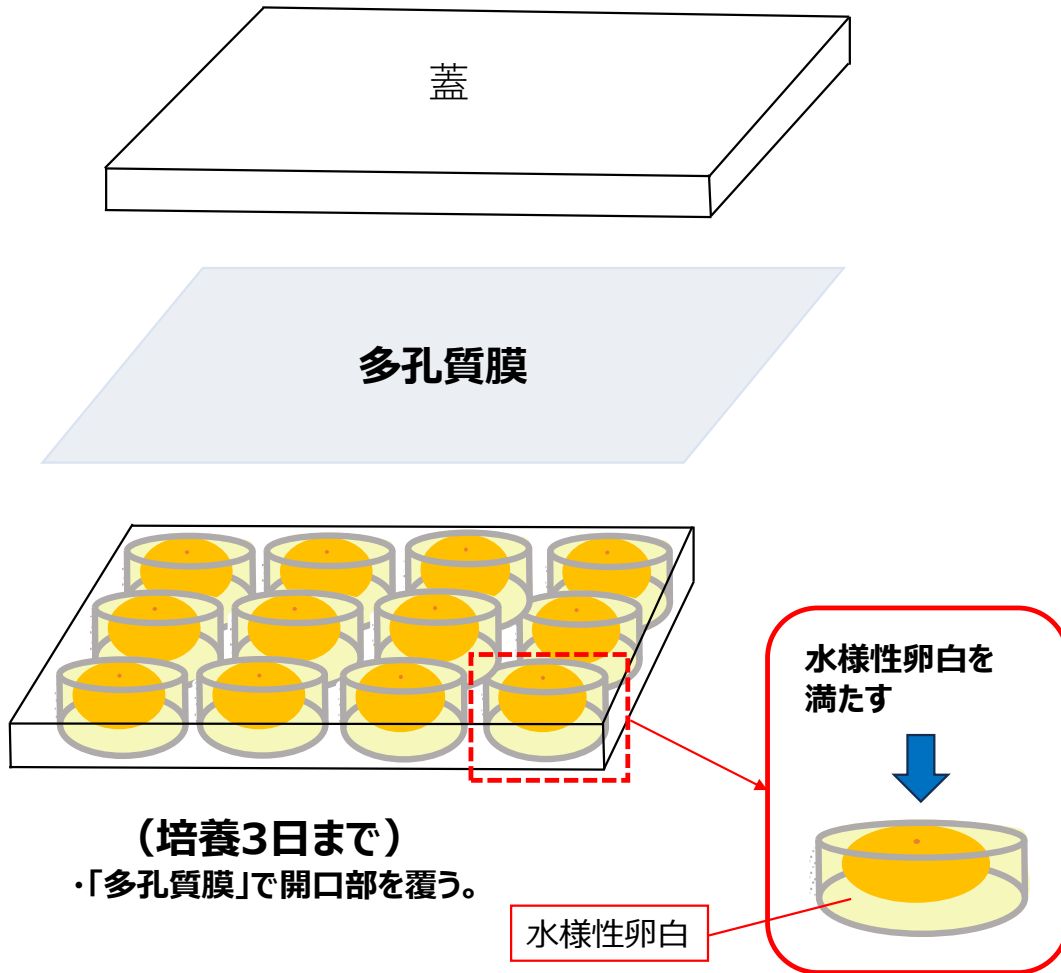
◎ 心臓（2心房2心室）の形成



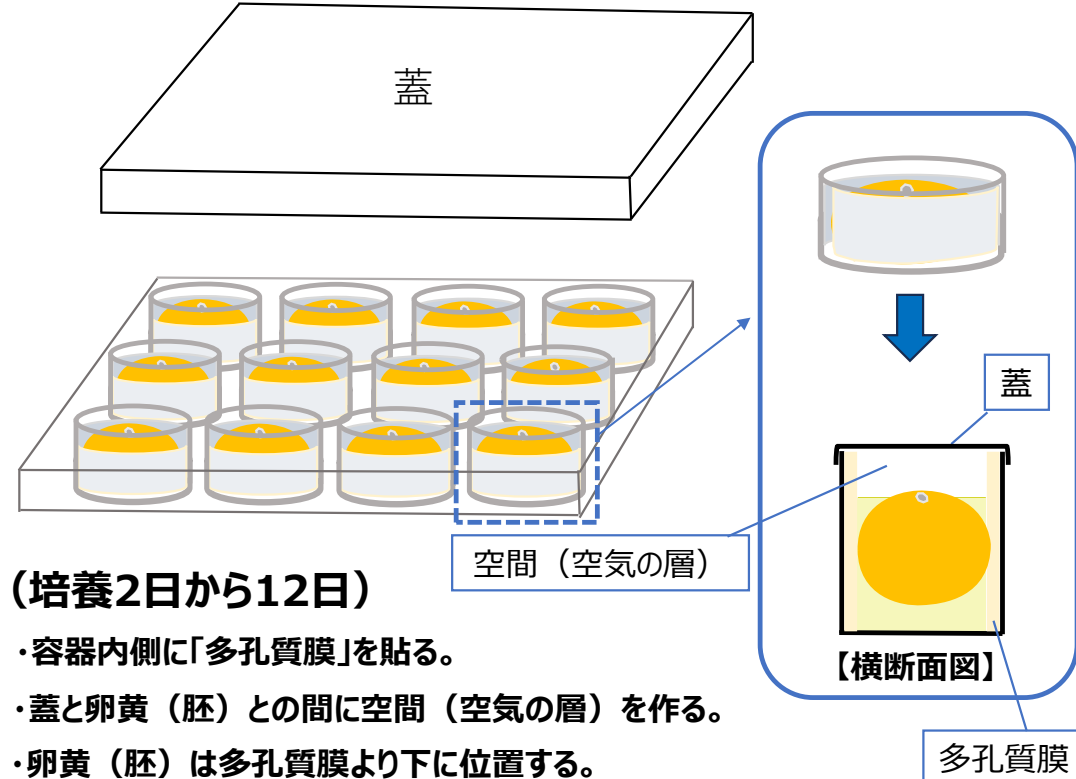
ウズラ受精卵（胚）を化学物質の発生毒性評価に利用できるか？

本技術の概要

プレート A



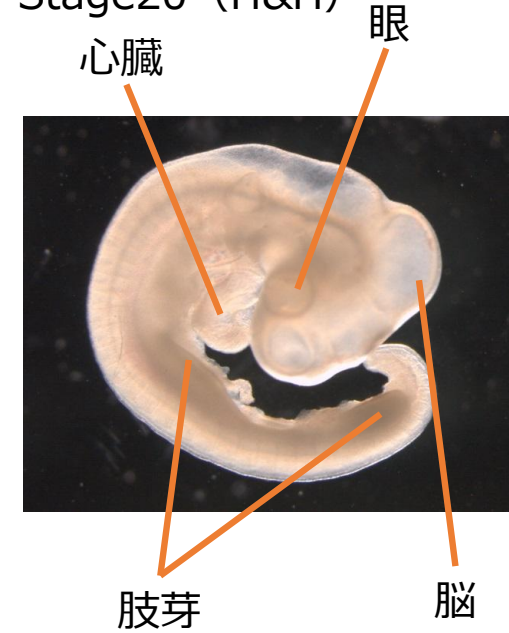
プレート B



プレート A (培養3日)



Stage20 (H&H)



- 高い生存率
- 正常な形態形成
- 主な器官形成は完了
- 無操作胚とほぼ同じ発生速度

器官形成の重要な時期とイベント

St.8



【4体節期】
・神経褶は中脳の位置で会合している。

St.9



【7体節期】
・一次眼胞がある。

St.10



【10体節期】
・3つの一次脳胞が観察される。
・前部の神経孔が閉じつつある。

St.11



【13体節期】
・後脳に5つの神経分節が明らかとなる。
・眼胞の基部がくびれている。

St.12



【16体節期】
・頭は左側に傾き始める。
・心臓は拍動している。
・羊膜が覆いはじめる。

St.13



【19体節期】
・頭はゆるやかな曲線を描いて、横転する。
・血液循環が観察される。

St.14



【22体節期】
・前脳と後脳の軸がほぼ直角となる。
・体幹がややねじれ、屈曲を始める。

これ以降の発生段階においては、体節数を正確に数えることは次第に困難となる。また、全身が羊膜で覆われ、頭部と体幹部の屈曲が著しくなる。

St.15



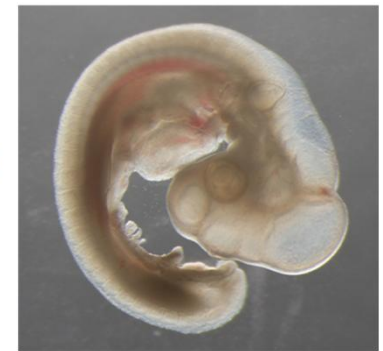
St.18



St.20

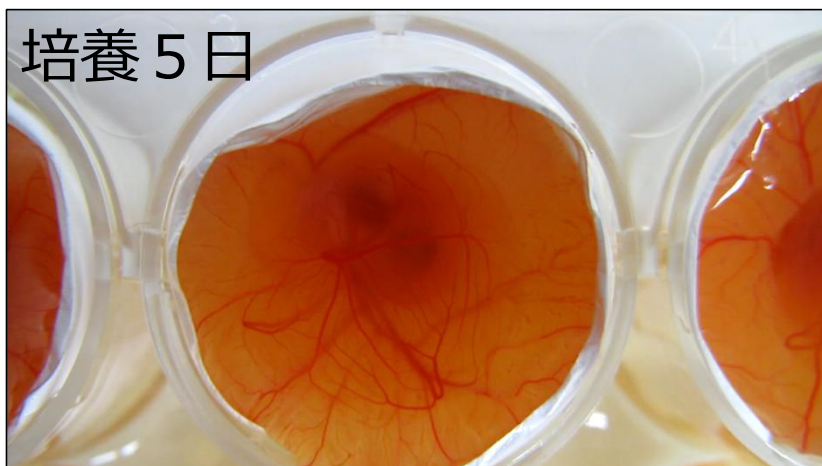
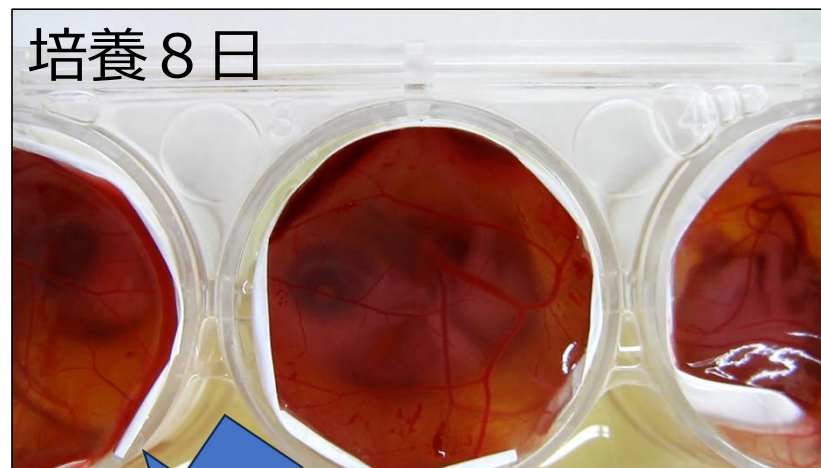


St.21



St. : H&H発生ステージ表による分類

プレート B (培養2~12日)



培養 8 日 (St.35)



- ・指の分離
- ・性の判別

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の代理卵殻胚培養技術では、均質な代理卵殻を揃える必要があり、**殺菌処理**も必要で、胚操作が煩雑という問題があった。この新技術により、**鳥類胚操作における一貫性と再現性**を確保し、より**簡便かつ効率的な作業**が可能となった。
- シンプルな操作性のため、短時間で多数のサンプルを検査することが可能で、**スループットの向上**が見込める。

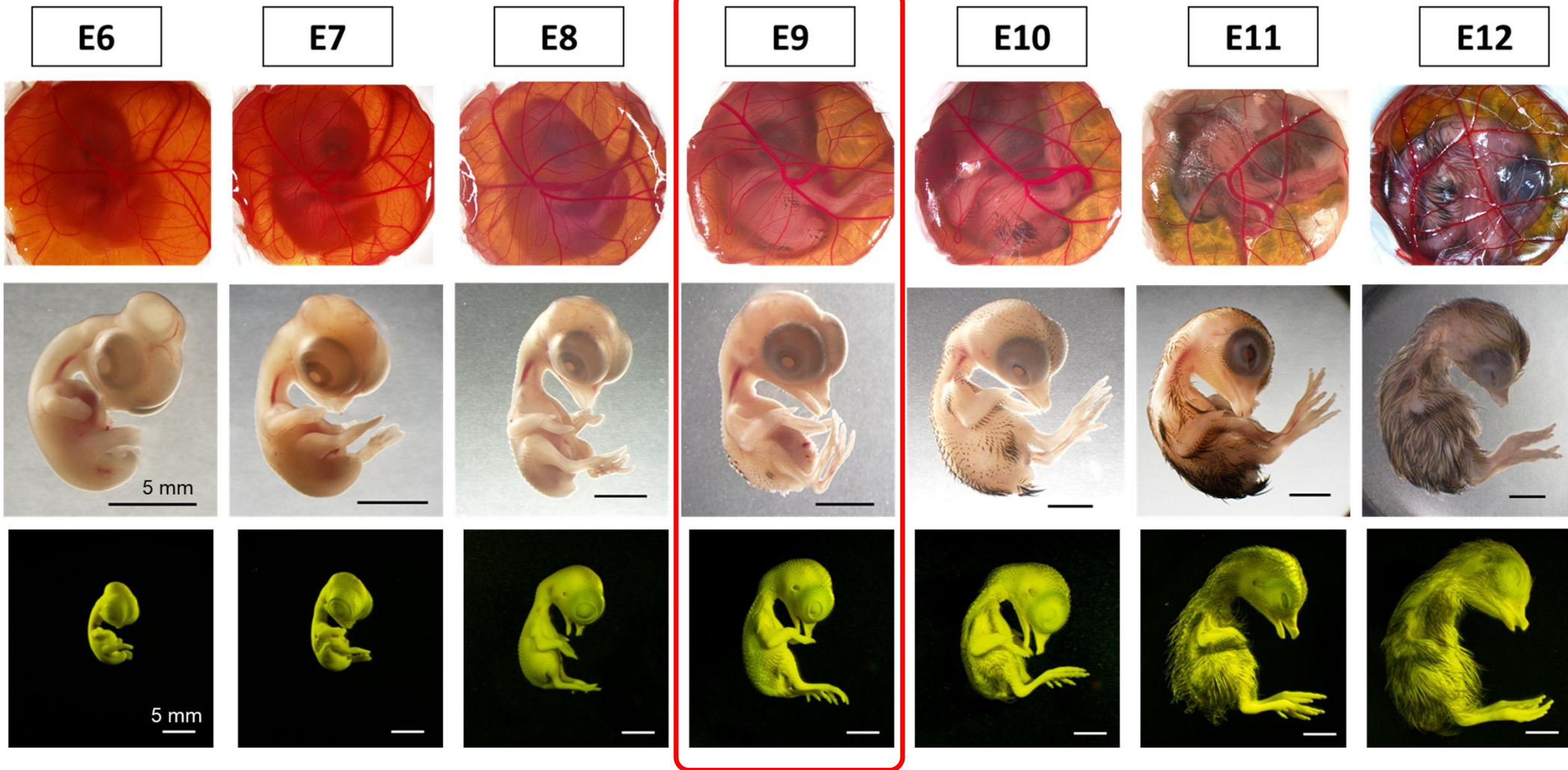
想定される用途

- 動物実験代替法として、鳥類胚を用いた化学物質の新たな発生毒性スクリーニング評価法への適用が想定される。
- 胚自体へのアクセスが容易になることで、これまで鳥類では困難とされてきた遺伝子機能解析実験が可能となる。
- 発生過程を経時的に生きたまま観察することができるため、脊椎動物の形づくりの過程を理解するための学習教材として普及する可能性もある。

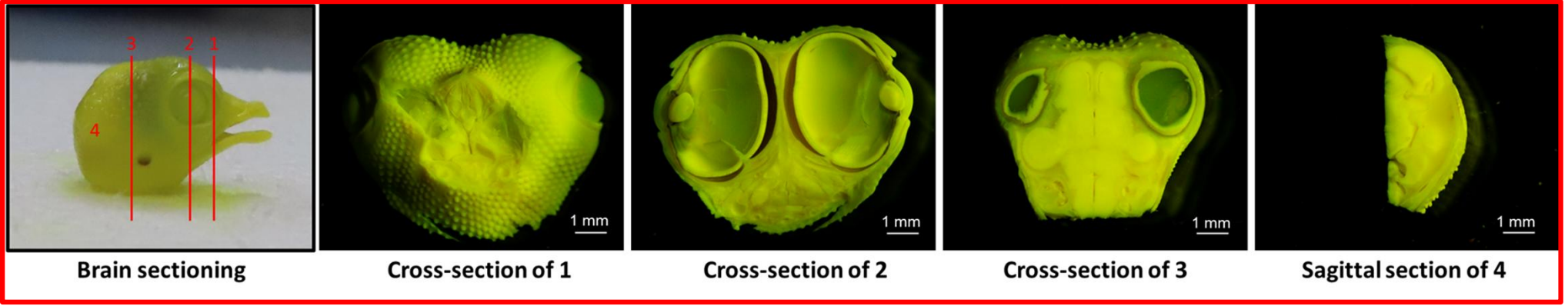
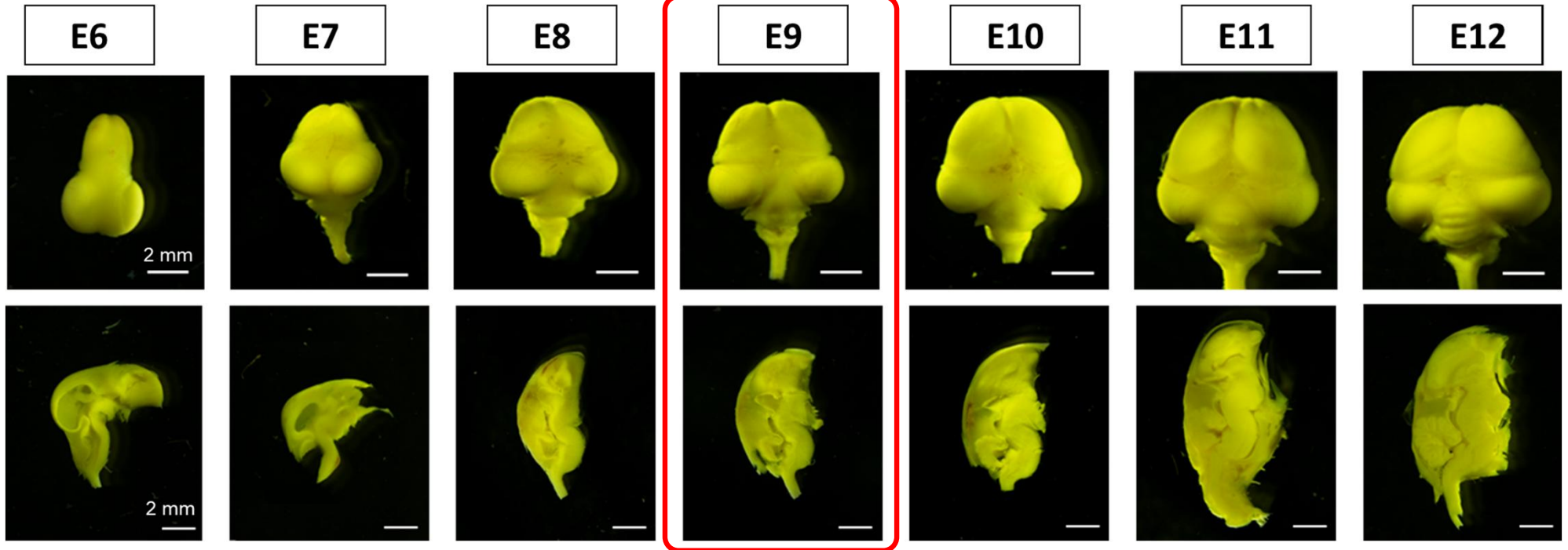
本技術を用いた発生毒性評価に向けて

- 現行の発生毒性試験で通常行っている哺乳類胎児と同様の外表、内臓、骨格における検査手法がウズラ胚において適用可能か？
- 特に、哺乳類と発生過程が類似している脳、心臓、脊椎および指肢等の形態形成異常を検出できるか？

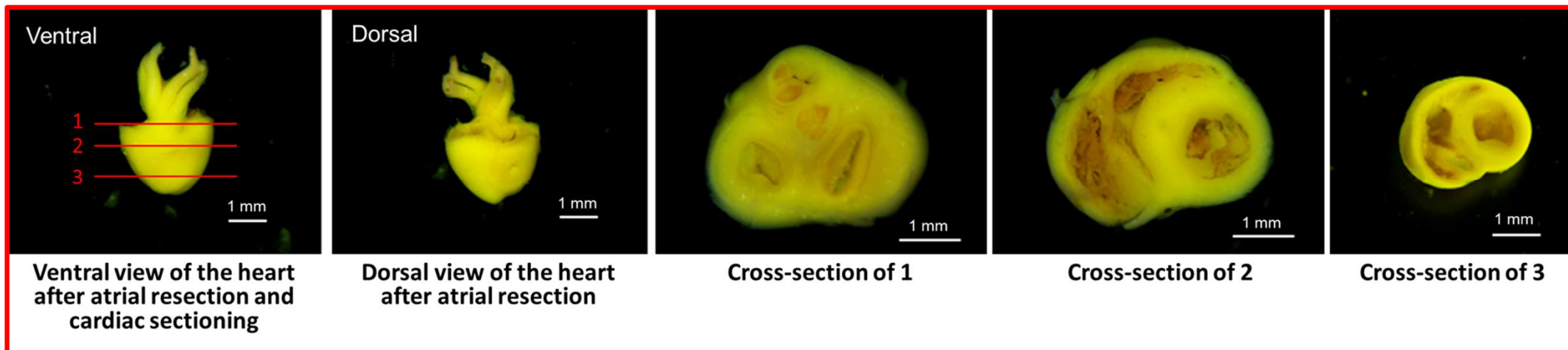
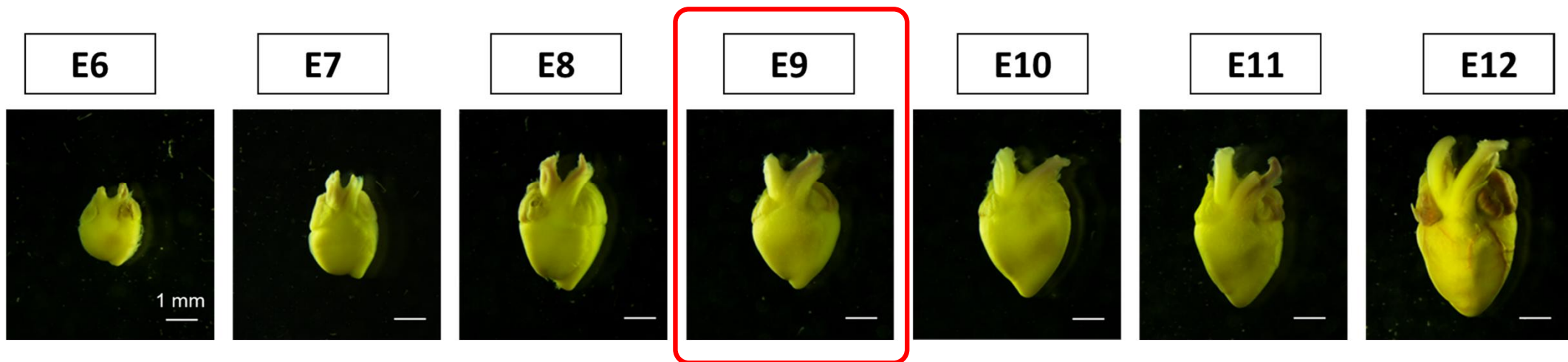
外表検査



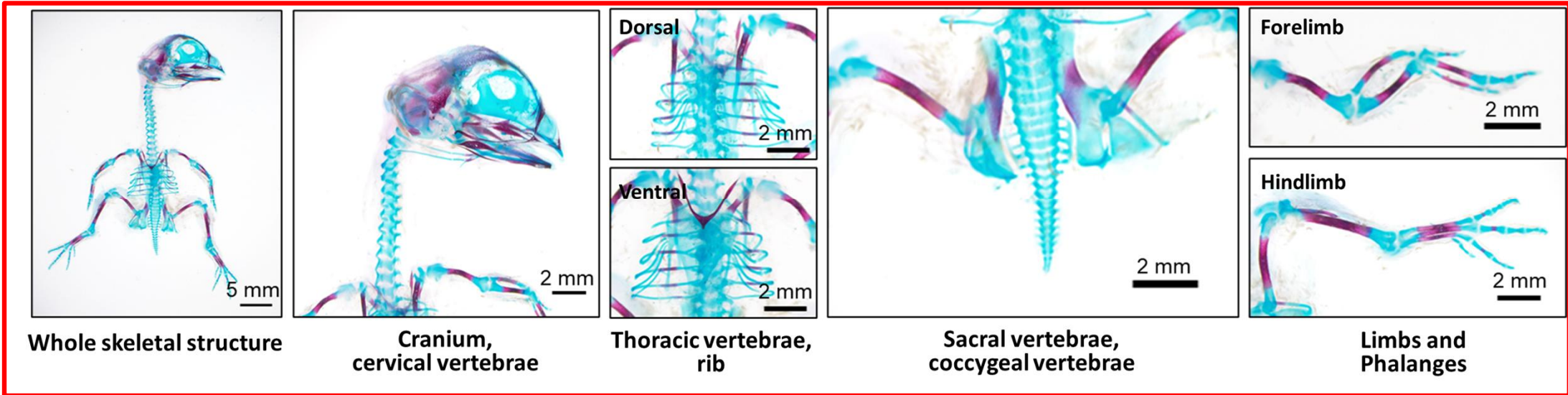
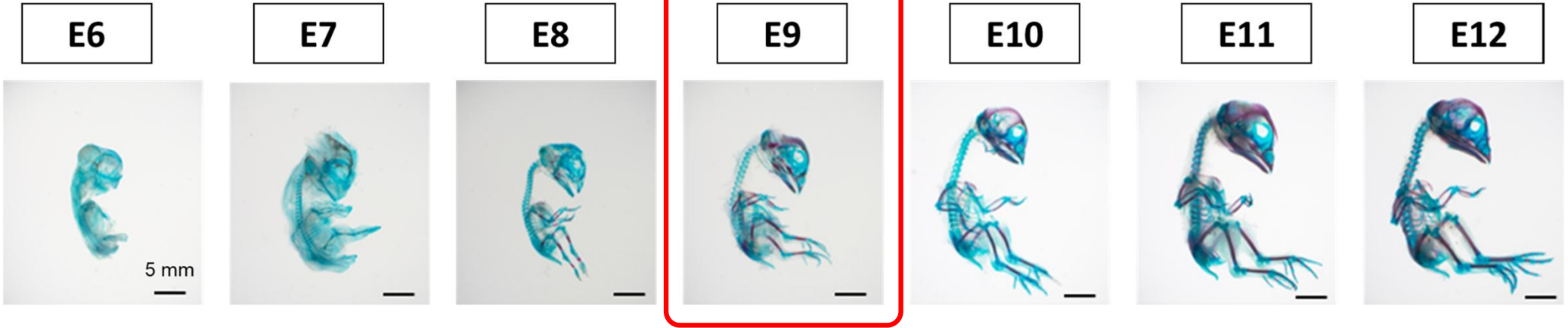
内蔵検査(脳)



内蔵検査(心臓)



骨格検査



実用化に向けた課題

- 本技術を用いて培養したウズラ胚の生存率を向上させるために、培養条件を検討する。
- 水溶性・脂溶性の陽性対照物質を用いて、哺乳動物実験と同等の精度で発生毒性（催奇形性）を評価できるか、動物種間の相同性と相違性を調べ、化学物質への感受性を検証する。

社会実装への道筋

時期	取り組む課題や明らかにしたい原理等	社会実装へ取り組みについて記載
基礎研究	・「ウズラ受精卵の多検体・無卵殻培養技術」の概念構築 (<u>基本となるデータの取得</u>)	
現在	・ウズラ胚を複数同時にマルチウェルプレート上で正常に発生させることに成功 (<u>特許出願を実現</u>)	デモンストレーションの実施
1年後	・「ウズラ受精卵の多検体・無卵殻培養技術」の安定性の確保 (<u>培養9日目までの生存率が80%に達する培養条件を決定</u>) ・「ウズラ受精卵の多検体・無卵殻培養技術」の利便性の向上 (<u>人工容器と人工膜の材質や形状等を比較・検証</u>)	JSTのA-STEP事業等へ応募し、研究資金の獲得
3年後	・「ウズラ受精卵の多検体・無卵殻培養技術」を用いた発生毒性評価の信頼性保証 (<u>水溶性あるいは脂溶性の陽性対照物質を曝露し、異常を評価するためのエンドポイントの信頼性を検証</u>)	評価基礎データの提供
5年後	・「ウズラ受精卵の多検体・無卵殻培養技術」を用いた発生毒性試験法の実用化 (<u>本技術を用いた新たな発生毒性評価プラットフォームを実現</u>)	技術移転とともに産官学連携による受託試験サービス等の新規事業の創出

企業への期待

- 農薬や医薬品等の発生毒性評価に、当該技術シーズを化学物質の新たな安全性試験に活用したい企業との共同研究を期待します。
- 新アプローチ方法論 (New Approach Methodologies: NAMs) を開発中の企業、動物実験代替法への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。
- 技術移転とともに産官学連携による受託試験サービス等の新規事業の創出を目指したい。JST (例えば、A-STEP) 等の競争的資金への共同提案を希望します。

企業への貢献、PRポイント

- 母体の代謝影響や胎盤機能を遮断できるという鳥類胚の特徴を利用することで、従来の哺乳類動物試験では検出できなかったターゲットとなる化学物質の胚（胎児）自体の感受性を評価できる可能性があり、**企業の製品開発競争力の強化**に貢献する。
- 本技術は非動物実験でありながら、形態異常を指標とする発生毒性（催奇形性）評価が可能となるため、動物福祉と化学物質の安全性確保を両立させる**企業ブランドの向上**に貢献する。
- 本格導入にあたっての**ノウハウも含めた技術指導**等をさせていただきます。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 卵殻外での鳥類胚の培養方法
- 出願番号 : 特願2024-204799
- 出願人 : 国立研究開発法人国立環境研究所
- 発明者 : 川嶋貴治、渡辺恭子

お問い合わせ先

国立研究開発法人国立環境研究所
連携推進部 研究連携・支援室

T E L : 029-850-2956

e-mail: kikaku-ip@nies.go.jp

URL: <https://www.nies.go.jp/sangaku/>