

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

【重点課題】

⑮化学物質等の包括的なリスク評価・管理の推進に係る研究

【行政要請研究テーマ（行政ニーズ）】

（5-15）化学物質に対する鳥類繁殖毒性評価のための新規試験法の開発に関する研究

【研究体制】

（サブテーマ1）生殖器における性分化異常の検出

川嶋 貴治★、Tin Tin Win Shwe、鈴木 武博

（サブテーマ2）生殖細胞における性分化異常の検出

黒岩 麻里、水島 秀成、小川 湧也

（サブテーマ3）脳における性分化異常の検出

塚原 伸治



★研究代表者



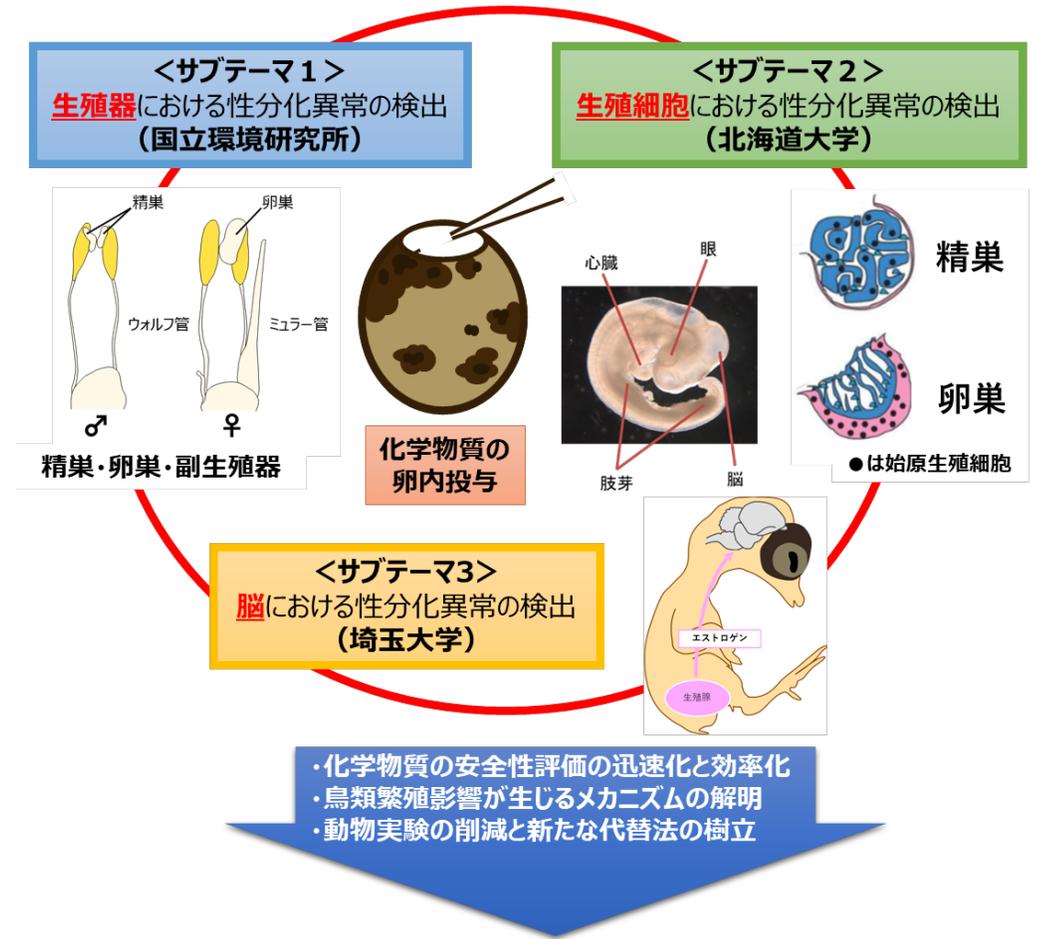
1. 研究背景、研究開発目的及び研究目標

【研究背景】

- ✓ 近年、国内外における野生鳥類種の生物多様性は急速に減少し、農薬を含む化学物質が一因である可能性が示唆されているものの、環境中に残存する化学物質が、鳥類の生存と繁殖に与える影響については依然として不明な点が多い。
- ✓ 我が国では、化審法の下、難分解性・高蓄積性化学物質を第一種特定化学物質に指定する際、鳥類繁殖毒性試験（OECDテストガイドライン206：TG206）に基づく調査が行われている。
- ✓ 第5次環境基本計画（平成30年4月）において、農薬については、「水産動植物以外の生物を対象としたリスク評価手法を確立し、農薬登録制度における生態影響評価の改善を図る」とされた。
- ✓ 令和2年4月1日に改正農薬取締法が施行され、従来の水産動植物から、陸域を含む生活環境動植物に対する農薬の影響評価の対象が拡大された。
- ✓ 化審法及び農薬取締法の改正時の附帯決議として、「動物試験の代替法の開発・活用の促進、並びに動物試験における3R（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）の原則に鑑み、不合理な動物実験の重複を避けること」が盛り込まれた。

【研究開発目的】

ウズラ胚における性分化過程を把握するとともに、生殖発生毒性（性分化異常）評価に適用可能なエンドポイントを探索・確立する。



1. 研究背景、研究開発目的及び研究目標

胚から成鳥の繁殖影響
(性分化異常) を予測

生殖機能

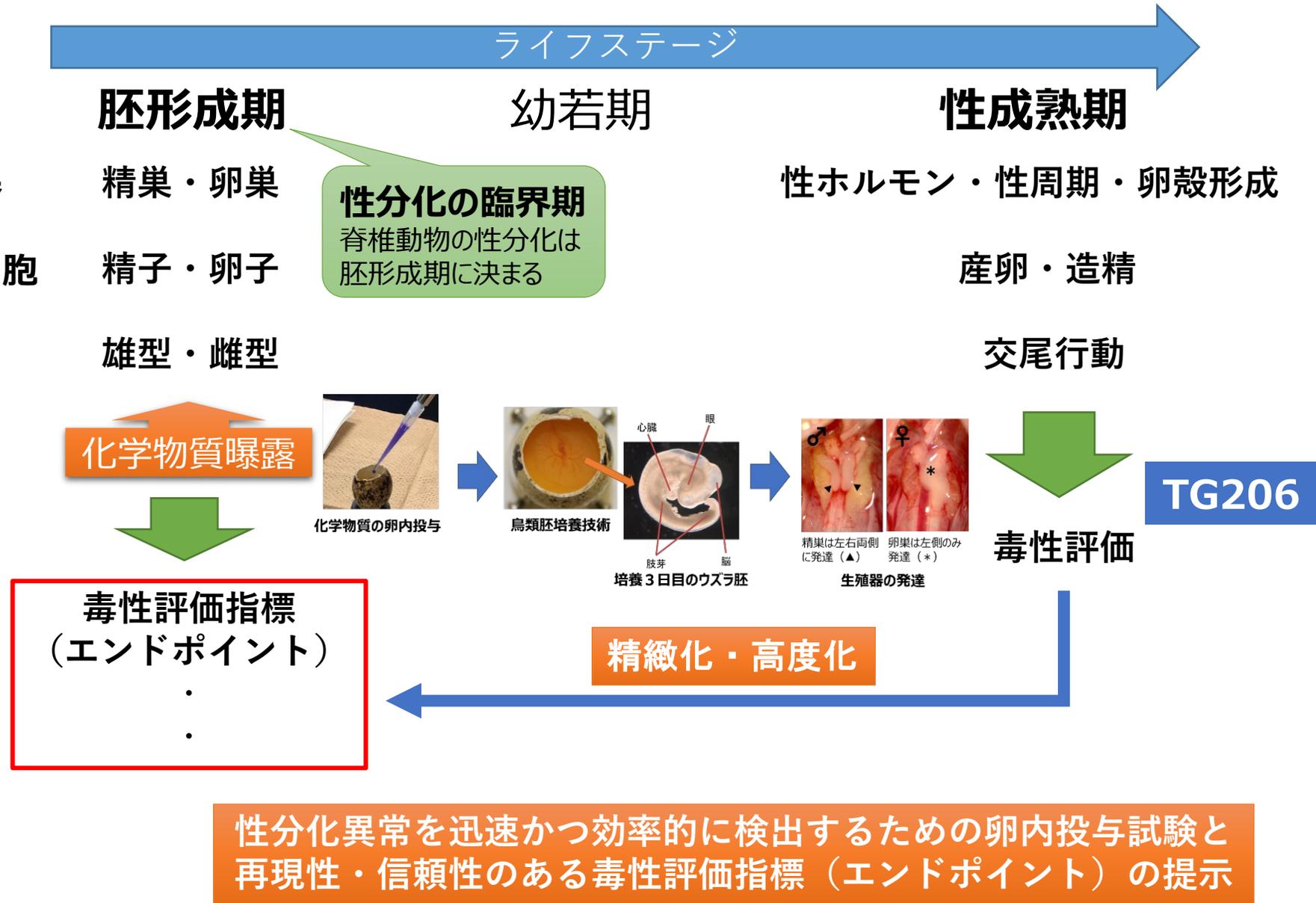
- ①生殖器
- ②生殖細胞
- ③脳

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



1. 研究背景、研究開発目的及び研究目標

【研究目標（全体目標）】

- 鳥類の繁殖特性に関連したエンドポイント候補に対する影響を調べ、開発試験法による試験結果の再現性を検証することで、鳥類繁殖影響評価の新たなテストガイドラインの実用化に向けた道筋を提案する。

【個別目標】

- 鳥類における発生異常（催奇形性）と性分化異常（内分泌かく乱作用）を迅速かつ効率的に検出することが可能な水準にまで鳥類胚培養技術を改良する。
- 鳥類胚から成鳥の繁殖影響を予測することが可能な有害性評価指標（エンドポイント）を提供する。
- 作用機序が明らかになっている3種類以上の陽性対照化学物質（EE2, DES, DDT 等）を用いて、バリデーション試験を行い、開発試験法から得られた有害性データの信頼性を評価する。
- 卵内投与による性分化異常評価手法としての具体的な試験デザインについての構成案をまとめる。

2. 研究目標の進捗状況 (1) 進捗状況に対する自己評価 (サブテーマ1)

サブテーマ1 : 生殖器における性分化異常の検出

【サブテーマ1の研究目標】

鳥類胚培養技術を用いて、ウズラ胚への化学物質曝露による胚形成期での生殖器の性分化異常と性成熟後の有害性との関連を明らかにする実験を実施し、胚での毒性評価を可能にするエンドポイントを探索する。その後、選定されたエンドポイントの精緻化を進め、毒性試験法としての適格性を裏付けるデータを収集し、毒性メカニズムや作用機序の解明とともに、最終的にはOECDテストガイドライン化が可能な水準の試験デザインを構築・提案する。

【令和4年度研究計画】

生殖器と副生殖器の性分化異常を検出するエンドポイントを決定する。

【令和5年度研究計画】

鳥類胚を用いた開発試験法のエンドポイントが成鳥の繁殖影響を予測し得ることを検証する。

【令和6年度研究計画】

卵内投与による性分化異常評価手法としての試験デザインについて、供試材料、投与方法、エンドポイントおよび解析法等の具体的な構成を含めたテストガイドライン案をまとめる。

【自己評価】 計画以上の大きな進展がある

2. 研究目標の進捗状況 (2) 自己評価に対する具体的な理由・根拠と目標達成の見通し (サブテーマ1)

【具体的な理由・根拠】

研究計画通り、性分化異常を検出するためのエンドポイントを探査し、生殖器と副生殖器の性分化に関する基礎データを収集した。胚形成期の異常と性成熟後の有害性との関連を明らかにしたうえで、エストロゲン様化学物質を検出するためのエンドポイントを決定した。加えて、データの信頼性評価とエンドポイントの適格性検証も順調に進行し、当初の計画より早いペースで研究成果が得られている。

サブテーマ①で決定したエンドポイントを科学的根拠として、OECDに提案したところ、令和5年4月に、国際的なワークプランとして正式に採択されたことも踏まえて、【自己評価】を「**計画以上の大きな進展がある**」とした。

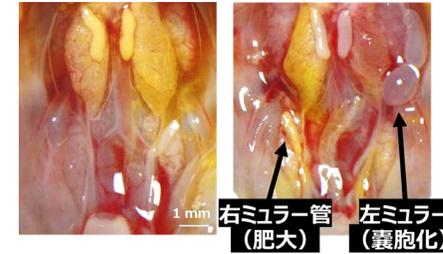
【目標達成の見通し】

当初の計画より早いペースで研究が進んでいること、サブテーマ①で探査したエンドポイントをもとに、既にOECDの国際ワークプランとして正式に採択されたことから、目標達成は十分に可能である。今後は、開発試験法の更なる信頼性評価と適格性検証のための実験を進めていくとともに、毒性メカニズムの解明によるAOPの開発を試みる。

エンドポイントの決定

(a) ミュラー管の残留

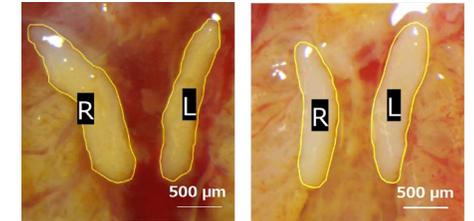
対照胚 エストロゲン曝露胚



♂
(ZZ)

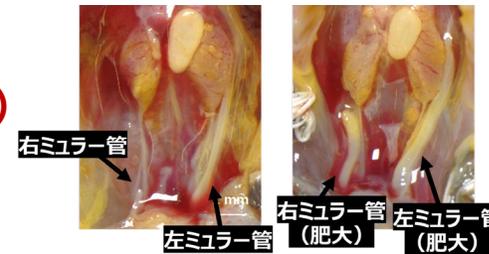
(b) 左右精巣のサイズ比較

対照胚 エストロゲン曝露胚



ミュラー管の形態異常

対照胚 エストロゲン曝露胚



♀
(ZW)

エンドポイントのリスト

- 雄でのミュラー管の残留
- 左右精巣のサイズ比の変化
- 雌でのミュラー管の形態異常など

これまでの成果

- 胚期での性分化異常を検出するエンドポイントの選定
- エンドポイントの精緻化および適格性の評価
- 新規OECDテストガイドラインとしての提案
→ 既にOECDの国際ワークプランとして採択された

2. 研究目標の進捗状況 (1) 進捗状況に対する自己評価 (サブテーマ2)

サブテーマ2：生殖細胞における性分化異常の検出

【サブテーマ2の研究目標】

生殖細胞（PGC、精原細胞、卵原細胞）の検出マーカーの開発と胚期における毒性評価を実施し、性成熟後の成熟分裂に対する分化毒性の不可逆性の検証を行う。最終的に、マーカーと性分化異常の重篤化の相関関係を検証する。

【令和4年度研究計画】

生殖細胞（PGC、精原細胞、卵原細胞）検出及び生理マーカーの開発を行い、被験物質を投与した胚の生殖器定着前後における始原生殖細胞数の変動（細胞死や増殖異常）や局在に対する影響を調査する。

【令和5年度研究計画】

精子形成進行や精子受精能マーカーの開発を行い、それらを指標とした被験物質による孵化個体の生殖細胞の成熟・分裂への不可逆な毒性効果を査定を実施する。

【令和6年度研究計画】

トランスクリプトーム及びプロテオーム技術を駆使して、被検物質によって発現に影響を受ける遺伝子の更なる探索を行い、性分化異常の重篤化と相関する分子マーカーを選定する。

【自己評価】 計画以上の進展がある

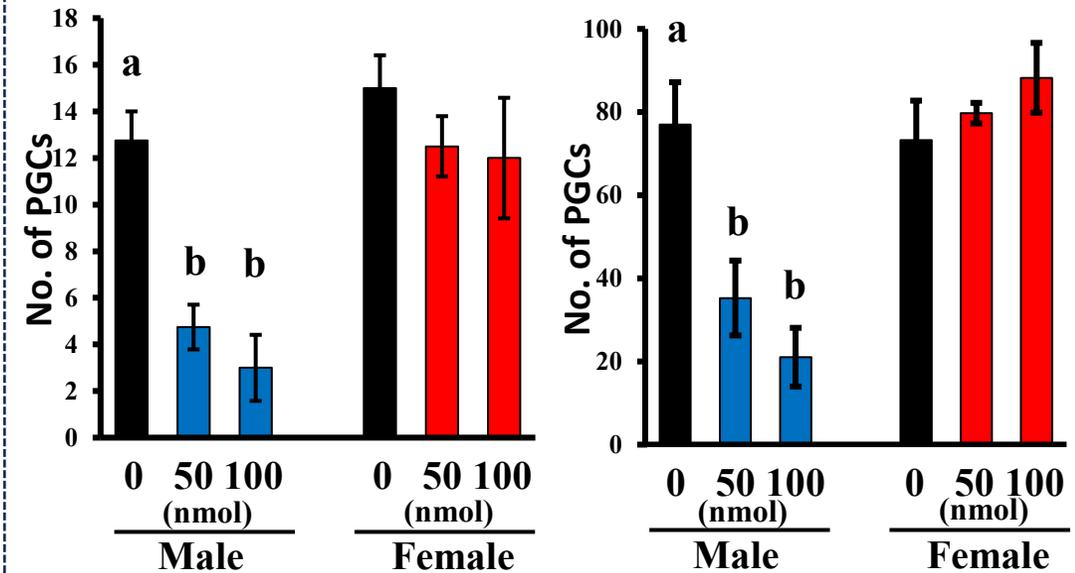
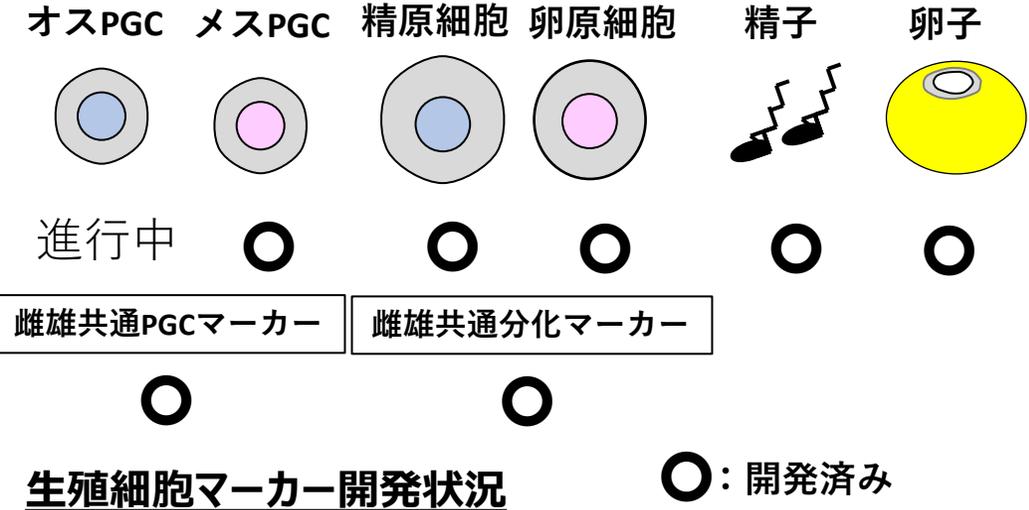
2. 研究目標の進捗状況 (2) 自己評価に対する具体的な理由・根拠と目標達成の見通し (サブテーマ2)

【具体的な理由・根拠】

サブテーマ2遂行の基盤となるPGCマーカー、精原細胞及び卵原細胞マーカーの開発に加え、分裂マーカーの開発にも成功を収めただけでなく、被験物質の投与による評価も開始し、一定以上の成果があった。またメスPGCのみを検出できる分子マーカーの開発にも成功し、当初計画以上の進展が見られている。さらに、本年度に実施予定の配偶子形成マーカーの開発もすでに完了していることも、本選択理由の一つである。

【目標達成の見通し】

当初の計画であるDES及びEE₂投与群の性成熟個体の受精能評価を行う実験は、本年度中に完了予定である。加えて、その他の被験物質であるビスフェノールAや*o,p'*-ジクロロジフェニルトリクロロエタン (*o,p'*-DDT) の投与による評価も順次行う予定であり、アポトーシスマーカーの開発もすでに着手していることから、目標達成は十分に可能である。



2. 研究目標の進捗状況 (1) 進捗状況に対する自己評価 (サブテーマ3)

サブテーマ3：脳における性分化異常の検出

【サブテーマ3の研究目標】

- ① 脳の性分化異常を検出する分子マーカーの探索
- ② 脳の性分化異常を検出する分子マーカーの精緻化
- ③ 開発試験法より得られる試験データの信頼性評価

【令和4年度研究計画】

網羅的遺伝子発現解析によりエスラジオールを曝露した雄ウズラ胚の視床下部を解析し、性差遺伝子と照合して、脳の性分化異常の検出するエンドポイント候補を選出する。

【令和5年度研究計画】

EE₂とo,p'-DDTを曝露したウズラ胚の視床下部を採取し、リアルタイムqPCR法による遺伝子発現解析を実施する。解析データを総合的に評価し、開発試験法に適用するエンドポイントを決定する。

【令和6年度研究計画】

胚期にEE₂とo,p'-DDTを曝露した成熟ウズラを作製し、性分化マーカーを用いた免疫組織学的解析と雄性行動の解析を実施する。データ解析により、エンドポイントへの影響程度が性分化異常の重度を示すことを実証する。

【自己評価】 計画以上の進展がある

2. 研究目標の進捗状況 (2) 自己評価に対する具体的な理由・根拠と目標達成の見通し (サブテーマ3)

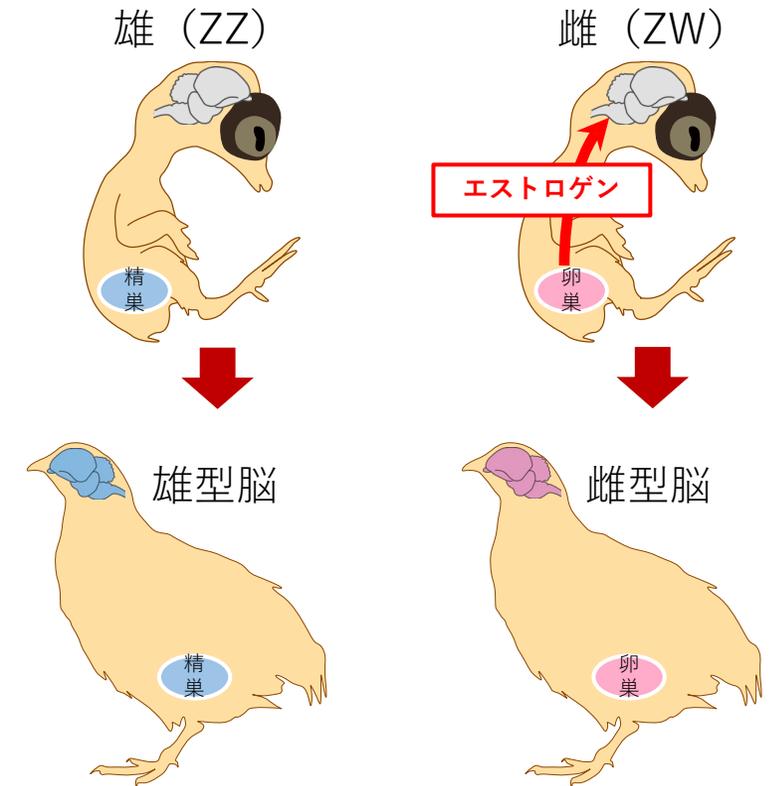
【具体的な理由・根拠】

脳の性分化異常を評価する分子マーカーとして6つの遺伝子 (ZP1、PGR、MTMR12、MALT1、DENND4CおよびZFYVE16) を同定することに成功した。さらに、EE₂とo,p'-DDTの曝露試験から、6つの遺伝子の中でZP1とPGRが、エストロゲン様化学物質の内分泌かく乱による脳の性分化異常を評価する分子マーカーとして有望であることを示すことができた。現在、DESとビスフェノールAの曝露試験を進めている。

当初計画に加えて、成熟ウズラの視床下部に網羅的遺伝子発現解析を実施し、発現量に光周性と性差がある遺伝子群をリストアップした。リストアップされた遺伝子の中には繁殖期に性別特有な生殖機能 (雄性行動、排卵、産卵など) に関わるものが含まれると考えている。現在、生殖関連遺伝子を絞り込むための遺伝子発現解析を進めている。

【目標達成の見通し】

受精卵を用いたDESとビスフェノールAの曝露試験を本年度に完了する予定である。EE₂とo,p'-DDTの曝露試験も含め、試験結果を総合的に検討することで、分子マーカーは計画通り選定できる見込みである。生殖関連遺伝子についても幾つかの候補が見出され、現在進行中の解析により選定できる。次年度の成熟ウズラの実験により、分子マーカーの発現量と性分化異常に起因する繁殖影響との相関性を明らかになれば、研究開発目標は達成される。



これまでの成果

- 脳の性分化異常を検出する分子マーカー (6つの遺伝子) を同定
- 分子マーカーを指標してEE₂とo,p'-DDTの曝露影響を評価
- 成熟期の生殖機能関連分子をリストアップ

3. 研究成果のアウトカム（環境政策等への貢献）

「ウズラ卵を用いた内分泌かく乱物質による性分化異常の検出」

哺乳類にはない体外に卵を産むという鳥類の特性を生かして、ウズラ受精卵（胚）へ直接的に被験物質を曝露する手法（卵内投与試験法）を開発した。エストロゲン様化学物質を検出するために、ウズラ胚の生殖器官の形態異常を主なエンドポイントとして採用した。OECDへ新規テストガイドラインとしてSPSFを提出した結果、令和5年4月に、国際ワークプランとして採択された。

「鳥類繁殖毒性評価法の精緻化・高度化の推進」

鳥類の胚期での性分化過程における異常を迅速かつ正確に検出するとともに、エンドポイントとなる標的器官における化学物質曝露後の不可逆影響や長期的な有害作用等のAdverse Outcome Pathway（AOP）を解析した。従来の試験法では検出できなかった生殖毒性影響・神経発達影響・内分泌影響・奇形等の多様なエンドポイント候補を検証した。

「鳥類受精卵（胚）を用いた毒性試験による非動物実験化の実現」

鳥類卵内投与試験法は、胚（受精卵）から成鳥の繁殖影響（性分化異常）を予測し得る迅速かつ低コストのスクリーニング手法となる。鳥類胚を用いた生殖毒性（性分化異常検出）試験法は、化学物質の安全性の確保と動物試験における3Rs（代替法活用、使用数削減、苦痛軽減）国際原則という両面から、理想的かつ画期的な試験法となり得る。

【行政等が活用することが見込まれる成果】

1. 新規OECDテストガイドラインの提案
2. 鳥類卵内投与試験法の行政活用
3. 動物愛護施策の着実な実施



3. 研究成果のアウトカム（環境政策等への貢献）

【行政等が既に活用した成果】

- 1) 「難分解性・高濃縮性化学物質による高次捕食動物（鳥類）への毒性評価法に係る検討会」及び「令和4年度卵内投与試験法の行政活用のあり方に関する検討会」において、本研究成果である試験法の開発状況と試験結果を提示し、化審法における鳥類に係る有害性評価方法の検討、POPs懸念物質の議論における卵内投与試験活用の可能性の検討及び将来的な化審法における高次捕食動物の有害性評価のあり方の検討に貢献した。
- 2) 第17回OECD Validation Management Group on Ecotoxicity (VMG-Eco) 会議にて、鳥類卵内投与試験法の開発状況について紹介する資料として活用された。
- 3) 日本発の卵内投与試験法を新たな鳥類テストガイドラインとして確立することを目指し、日本とフランスで共同提案した「Avian *In Ovo* Assay for Sex Steroid Hormone Disrupting Properties」と題したStandard Project Submission Form (SPSF) の資料として活用された。
- 4) 第15回U.S. Environmental Protection Agency – Japan Ministry of the Environment Bilateral Meeting on Endocrine Disruption Test Methods Development及び第24回UK-Japan Annual Scientific Workshopにて、卵内投与試験法に関する資料作成に貢献した。
- 5) 第35回OECD Meeting of the Working Party of the National Coordinators of the Test Guidelines Programme (WNT-35) にて、卵内投与試験法に関する資料作成に貢献した。

4. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

1. 論文 (査読あり) : 2件 (予定も含む)

2. その他誌上発表 (査読なし) : 1件 (予定も含む)

(2) 口頭発表 (学会等) : 14件 (予定も含む)

(3) 知的財産権 : 特に記載すべき事項はない。

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施 : 4件 (予定も含む)

(5) マスコミ等への公表・報道等 : 特に記載すべき事項はない。

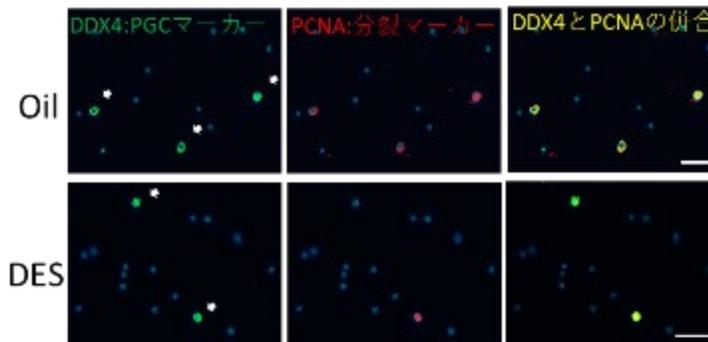
(6) 本研究費の研究成果による受賞 : 特に記載すべき事項はない。

(7) その他の成果発表 : 1件 (予定も含む)

S. MIZUSHIMA and A. KUROIWA: Poultry Science (2023)

Diethylstilbestrol reduces primordial germ cells in male Japanese quail. (in press)

雌雄共通のPGCマーカー及び分裂マーカー開発を行い、DESの卵黄内投与が雄ウズラのPGC特異的に死滅させることを発見した。



血液循環オスPGCの分裂マーカーの減衰

Webサイト「すべてはタマゴから～鳥類を保全する新しい毒性試験法の開発～」の開設

URL : <https://www.avian-toxicology.jp/>



5. 研究の効率性

- 若手・シニア・女性・外国人の研究者を含む研究体制であるため、多面的な議論を活発に行うとともに、若手の人材育成も可能であった。
- Web会議機能等のICT技術を駆使することで、感染性予防への配慮と物理的な距離を克服し、3つの研究分担機関が密に連絡を取り合いながら、研究の進捗管理や情報共有を行うことができた。
- 当初の計画より早く、OECDへSPSFを提出したことに伴い、フランス、スペイン、スウェーデン及び米国等の研究者間の国際ネットワークを構築することができた。
- 行政推薦課題として、行政担当者と緊密に意見交換を行うことで、研究成果をシームレスに政策立案の検討等に繋げることができた。