

雞胚蛋模型於實驗動物替代技術之應用探討

江俊儀*

農業部獸醫研究所

摘要 雞胚蛋近年來已逐漸被視為生物醫學與獸醫研究中具潛力的實驗動物替代模型。由於其成本較低廉、操作簡便、發育快速，雞胚蛋已被開發應用於毒理學測試、腫瘤異種移植、血管新生及傳染性疾病研究等。對照哺乳類實驗動物模型，雞胚蛋提供一個未成熟免疫環境和便於觀察的體內平臺，惟其生理結構與哺乳類動物存在之差異，仍造成其應用限制。整體而言，雞胚蛋模型有助於落實動物實驗 3R（替代、減量、精緻化）原則，同時強化研究效能。本文綜合說明雞胚蛋模型於實驗動物替代技術上之應用機會與挑戰，展望未來結合基因編輯、高階影像技術與人工智慧分析之應用潛力。

關鍵詞：雞胚蛋、3R 原則、實驗動物替代模型

緒言

在生物醫學研究領域實驗動物如小鼠和大鼠等實驗動物常被用於評估藥物效應與疾病機制。然而傳統哺乳類模型的使用伴隨著高昂的成本、時間投入以及動物痛苦與倫理爭議 [27]，基於動物實驗「3R」原則（替代、減量、精緻化），科學界積極尋求能替代哺乳動物的模型系統，以同時兼顧研究品質並降低實驗動物使用量 [27, 42]。雞胚蛋模型正是在此背景下重新受到重視的一種經典實驗模型，由於雞胚胎在蛋殼內自主發育，研究人員無需依賴母體即可直接觀察和操作胚胎，且孵化環境簡易無需昂貴設備，雞胚胎發育快速，孵化週期僅 21 天 [22]，胚胎自身具備完整的營養供給，使其成為價格低廉、來源充足且易於維持的體內研究平臺。本文將闡述雞胚蛋模型應用相關主要結構與發育時程特徵，並重點討論其在各生物醫學領域中的應用價值與最新進展。同時也將比較雞胚胎模型與傳統哺乳類實驗動物模型在倫理、效率和生理相關性方面的差異，最後展望該模型結合基因編輯、先進成像與人工智慧分析等新興技術所帶來的未來發展趨勢。

雞胚蛋模型結構與發育階段

雞胚蛋內部結構是一個巧妙的生物系統，其各組成部分共同協調，為胚胎的生長發育提供支持，並為生物醫學研究提供了多樣化的模型應用。雞胚蛋模型與斑馬魚和線蟲等其他替代模型相比，在中樞神經系統、心血管系統以及呼吸系統發育上更接近哺乳動物，孵化環境簡易無需昂貴的設施或設備 [22]。雞胚蛋內胚胎發育日程共 21 天。發育階段可分為早期（胚胎發育第 7 日前）、中期（胚胎發育第 8 至 14 日）和晚期（胚胎發育第 15 至 21 日）[35]。胚胎發育 23 至 24 小時後，胚外血管已開始形成並可於卵黃囊中觀察到。胚胎發育 33 至 38 小時，可檢測到心跳，約 51 至 56 小時可觀察血管穩定循環；胚胎發育後 9 天，雞胚胎呈現雛鳥型態；胚胎發育後 12 天，下視丘—腦下垂體軸發育加快，開始出現幾根羽毛。神經科學研究中最重要元素之一——血腦障蔽從胚胎發育後 14 天開始成熟 [52]；主動免疫大約於胚胎發育後 15 天開始產生反應 [50]；胚胎發育後 18 天，胚胎的生長幾乎完成，卵黃囊仍在胚胎外部；胚胎發育後 19 天，卵黃囊縮回體腔，胚胎佔據卵子

* 抽印本索取作者
農業部獸醫研究所

內的大部分空間。雞胚胎在發育最後三分之一階段的傷害感受 (nociception) 可透過腦電圖 (electroencephalogram) 被監測到 [57]。

1. 絨毛尿囊膜 (Chorioallantoic Membrane, CAM):

絨毛尿囊膜是一種高度血管化的胚外結構，起源於尿囊中胚層與絨毛膜中胚層融合，形成豐富血管網絡的雙層結構，透過兩條尿囊動脈和一條尿囊靜脈與胚胎相連 [32]，在胚胎發育的整個時期，參與氣體和營養物質交換，並調控蛋殼鈣質，促進胚胎骨骼礦化 [40]。絨毛尿囊膜大約在胚胎發育第 3 天開始形成，並在第 9 天左右完成 [11]，主要優點包括成本低、可作為天然生物培養基、高實驗可重複性和可靠性及具天然免疫缺陷特性。另一方面也存在一些缺點，如：細胞遷移時間短、現有血管和新生成的血管相似、易遭真菌和細菌污染、與人類的代謝不同等 [42]。絨毛尿囊膜應用相當廣泛，可用於測試促/抗血管生成潛力、癌症研究 (血管生成、侵襲、轉移形成和癌細胞擴散) [8, 34, 46]、再生醫學 [36]、器官型培養 (organotypic culture) [36]、測試材料 [6]及測試藥物作用 [29]。

2. 尿囊 (Allantoic):

尿囊是胚胎早期發育過程中胚外膜的一部分，在原腸胚形成期間產生，由內胚層和中胚層的細胞形成囊狀結構，最初位於胚外體腔內。尿囊在雞胚發育過程中承擔廢物儲存、氣體交換、營養運輸關鍵生理功能，是胚胎的呼吸和排泄器官 [10]。尿囊在孵化第 3 天開始發育 [27]，尿囊腔充滿可採集的尿囊液，富含胚胎代謝產物與病毒複製所需因子，另因尿囊表面血管密集，是理想的病毒學與疫苗製備 [20]、病毒致病機制與抗病毒評估 [23]、代謝體學與胚胎生理指標平臺 [43]、取樣與活體觀測窗口。

3. 卵黃 (Yolk):

卵黃囊是胚胎發育早期最早形成的胚外器官之一，其結構動態且複雜，包含透明區、血管區及卵黃區 [23]。卵黃囊在胚胎發育過程中扮演著多重角色，

可用於血球合成、消化和運輸營養物質、合成血漿載體蛋白和進行碳水化合物交換、代謝調節和傳遞母雞抗體 [37]。鑑於其多重功能卵黃囊已於血管新生與抗血管新生評估 [51]、血液生成與內皮發育 [45]、營養代謝與環境條件 [68]、藥物毒理與奈米載體 [64]作為研究模型。

雞胚蛋模型之研究應用

1. 致畸性研究應用:

發育毒理學領域長期以實驗動物評估化學物質或藥物的致畸風險，要證明一個因子具有致畸性需結合流行病學研究及利用動物模型進行實驗畸形學證據，由於雞胚胎模型可讓研究人員直接觀察胚胎發育過程、快速發育與孵化、成本低廉且易於操作與觀察的優勢，使雞胚胎廣泛被應用於致畸性評估以及致畸機制研究 [62]。相較哺乳類胎盤動物，雞胚蛋模型為無胎盤、受精卵自主發育，這個特性使試驗物質可直接透過注射或滲透進入胚胎，評估其對發育的影響而不會被母體代謝干擾。雞胚胎模型可用於評估致畸原的風險，觀察其對發育的影響，且易於不同時間點和濃度下投與化學物質、化合物和外部因子以追蹤活體內發育過程 [12]。此外可進行劑量反應分析，並觀察暴露時間變化對發育的影響，以確定每種致畸原最敏感的發育時期，如：用於模仿茲卡病毒 (Zika virus) 感染後在人類中觀察到的小頭畸形 (microcephaly) 表現型 [63]。雞胚蛋模型對致畸劑導致畸形的機制研究至關重要，目前已解開酒精作用於胚胎發育的機制，包括 G 蛋白和鈣依賴性細胞凋亡機制，並在腦部和神經管中觀察到相關影響 [18]。此外在了解沙利竇邁 (thalidomide) 對人類胚胎造成嚴重損害的機制，雞胚胎模型也扮演了重要角色證明了沙利竇邁的抗血管生成潛力 (antiangiogenic potential) 是導致肢體畸形的原因之一 [12, 59, 60]。此外，它還用於研究致畸劑在兒童期和成年期引起的晚發性效應 (late-onset effects)，如：例如產前暴露於乙醇、嗎啡、缺氧、營養不良等因素後而後引起的行為和記憶障礙 [15, 56]。

2. 藥物篩選和開發：

雞胚蛋模型在藥物篩選中和開發的核心價值在於其高通量、低成本的特性，使其成為藥物開發早期階段的理想預篩選平臺。傳統藥物篩選通常需要大量哺乳動物且成本高昂、耗時漫長，利用雞胚蛋模型進行研究可以預示有害影響避免進一步使用啮齒動物測試，進而減少啮齒動物使用數量 [4, 12]。雞胚胎模型在藥物篩選方面展現了多項應用重點與優勢，包含作為新藥和化合物的臨床前篩選工具、篩選特定藥物和化合物、作用機制與安全性評估及研究預防致畸劑引起先天性異常的治療方法等 [62]。雞胚胎已被證明可用於進行因藥物引起發育問題及致畸劑作用機制的相關研究，被用作臨床前篩選，以確定新藥的潛在作用/副作用。藉由本模型進行研究的藥物包括沙利竇邁及其類似物，如具有抗癌特性的鉑美特 (pomalidomide) [4, 33, 59]、抗癲癇藥物—優閒 (levetiracetam) [58]、帝拔癲 (sodium valproate) [67] 以及抗血管生成抗癌化合物 [3] 等。另發育中的胎兒和新生兒用藥安全日益被重視，雞胚和胎兒的特性相似使其成為非臨床安全性研究的便捷動物模型，用以測試其對所有這些器官系統的影響。孵化雞胚蛋價格低廉、易於獲取，且營養自給自足，孵化時間短，是藥物篩選的理想選擇 [5]。

3. 腫瘤學與腫瘤細胞轉移研究：

雞胚蛋絨毛尿囊膜因富含毛細血管且免疫屏障低，為腫瘤學研究提供了一個體內試驗平臺。在孵化第 18 天前，雞胚的免疫系統尚未完全發育，人類腫瘤只需要 3–7 天即可於這種免疫缺陷、血管豐富且氧氣充足的環境中建立 [16]，形成腫瘤球或腫瘤塊，誘導雞胚血管長入腫瘤（即血管新生作用），模擬腫瘤在體內的養分供應情形。研究人員常將人類腫瘤細胞或腫瘤組織塊移植到雞胚絨毛尿囊膜表面，以觀察腫瘤生長 [49]、血管新生 [65] 和腫瘤細胞轉移 [9]，因此在腫瘤學與腫瘤轉移研究中，雞胚蛋絨毛尿囊膜系統已成為一個重要的研究模型 [55]。雞胚蛋絨毛尿囊膜系統已成功支持多種人源與鼠源腫瘤細胞株的異種移植與立體腫瘤形成 [26]。人源腫瘤包含頭頸鱗狀上皮癌 (HEp3)、纖維肉瘤 (HT1080) [70]、攝護

腺癌 (PC-3) [13]、乳癌 (MDA 與 MB-231)、子宮頸癌 (HeLa)、黑色素瘤 (BLM) 以及結直腸癌 (SW480) [26] 等細胞株，這些腫瘤不僅能在短短數日內於絨毛尿囊膜表面形成血管化腫瘤塊，還能保持原有的侵襲與轉移特性，並可透過搭配 Alu-PCR 檢測擴散性細胞以研究腫瘤轉移情況 [41]。鼠源腫瘤亦表現出良好相容性，例如乳腺癌 (PyV-mT 與 4T1)、黑色素瘤 (B16) 以及肺癌 (LLC/3LL) 等細胞株 [26]。上述結果顯示，不論來源於人或鼠，實體癌與肉瘤等多種類型腫瘤皆可利用雞胚蛋絨毛尿囊膜系統快速建立異種移植模型，成為評估腫瘤生長、血管新生與轉移潛能的重要工具。近年更有研究利用雞胚蛋絨毛尿囊膜模型結合正子斷層掃描 (positron emission tomography, PET) 和單光子放射斷層掃描 (single-photon emission computed tomography, SPECT) 影像系統進行癌症研究，使卵內動態正子斷層掃描影像成為具有成本效益和高通量可用於臨床前癌症影像研究的替代方案，以取代傳統小鼠模型 [55]。

4. 體內血管新生研究：

研究體內血管新生的典型動物試驗包括兔子耳腔、小鼠背部皮膚和氣囊、雞胚蛋絨毛尿囊膜、啮齒動物眼睛的虹膜和無血管角膜以及斑馬魚 [38]。體內血管新生試驗的方法選擇主要考量為成本、可重複性和可靠性。由於雞胚蛋絨毛尿囊膜血管分佈廣泛且易於操作，它已被用於研究體內血管生成過程的形態功能、促血管生成和抗血管生成分子的功效和作用機制 [48]，並可選擇卵內或卵外無殼培養。局部投予測試和對照物質是最常用的方法，這種方法快速、半定量、經濟，並且適用於篩選許多新穎物質 [47]。應用雞胚蛋絨毛尿囊膜模型進行血管新生試驗的典型步驟是在發育一定天數（通常孵化第 7 天至第 10 天）的蛋殼上開窗，將待測樣品（如：生長因子、藥物、萃取物或生物材料等）置於絨毛尿囊膜表面，經一定時間持續孵化後，透過立體顯微鏡觀察樣品周圍血管網的變化 [42]。若樣品具有促血管新生活性，則可見絨毛尿囊膜原有血管向樣品方向生長、分支增多；反之若為抗血管新生物，則樣品周邊新生血管減少甚至出現毛細血管萎縮、扭曲。絨毛尿囊膜模型在血管新生研究中

頗具優勢：其一，操作直觀且結果肉眼可見，無需複雜設備即可得到趨勢明確的結果；其二，靈敏度高，尤其對強效促/抑血管因子往往少量即可誘導明顯反應；其三，成本低，每個胚蛋即是一個獨立實驗樣本，可大規模平行測試多種物質。相比之下，小鼠角膜植入或兔眼虹膜等體內血管新生模型需要較長時間並涉及較高的動物倫理成本。反之，絨毛尿囊膜也存在一些缺點，主要是本身具發達血管網絡，操作後出現的血管擴張可能難以與測試物質作用區分，另一個限制是植入物的非特異性發炎反應，可採絨毛尿囊膜發展初期植入，降低非特異性發炎反應發生率 [47]。

5. 感染與免疫學模型：

雞胚胎模型被廣為熟知即用於病毒培養（例如流感疫苗生產），顯示其在感染性疾病研究中的潛力。病毒感染應用雞胚胎模型歷史悠久，該模型最初用於評估病原體的毒力，例如雞沙門氏菌株，隨後其應用範圍擴展到評估針對 A 型流感病毒的抗病毒活性以及禽流感病毒對抗病毒藥物的敏感性，透過卵黃囊或尿囊腔接種，觀察病毒對胚胎的致死性和組織病變，這些試驗也奠定了禽流感毒力分級方法。雞胚蛋模型被用於進行多種病毒初代分離和繁殖，包括傳染性支氣管炎病毒 [24]、火雞冠狀病毒和雉雞冠狀病毒 [21]。除已被廣泛用於繁殖病毒研究目的，雞胚蛋也用於疫苗的商業化生產。目前已有研究指出由於雞胚在孵化前已具有免疫能力，可藉由雞胚蛋對新城病病毒感染的轉錄反應評估雞對感染的免疫反應，因此雞胚蛋模型已成為研究禽類對新城病病毒及相關病原體感染的先天免疫反應模式和變異來源的潛力模型 [53]。運用雞胚蛋模型進行免疫相關研究時考量雞胚免疫系統發育階段的變化，多半採用胚胎發育 10 天後階段 [54]，選擇合適的時間點至關重要。雞胚模型相較於啮齒類等其他經典模型除可部分解決倫理問題且更易於維護，以更低的成本更快地獲得結果，並可用於篩選大量分子和生物療法。然而由於禽類免疫系統與人類仍有部分不同，因此在使用本模型時應考慮免疫反應的所有差異。儘管存在這些差異，本模型仍常用於免疫學和發炎研究，並可成為驗證各種分子範圍的最佳解決方案 [69]。

雞胚胎模型與哺乳動物模型比較

綜合以上各領域應用，可發現雞胚胎模型在許多方面展現了與哺乳動物模型不同的優勢。然而，作為非哺乳類的替代模型，其局限性亦需要客觀看待。以下將從動物福利與倫理、成本與效率、可視化和生理可比性等角度，對雞胚胎模型與傳統哺乳類模型進行比較。

1. 符合 3R 原則的倫理優勢：

倫理優勢是雞胚蛋模型日益受到青睞的決定性因素之一，雞胚蛋模型為更永續、更符合倫理和更支持動物福利的研究提供了新的途徑。根據美國國立衛生研究院及美國獸醫醫學協會 [2, 39] 文件指出，雞胚直到胚胎發育第 13 天才開始表現出痛覺，此外，由於中樞神經系統負責痛覺感知的部分尚未成熟，因此痛覺在胚胎發育第 15 天之前不會完全出現 [42]，美國國立衛生研究院僅將孵化後之雞胚被列為活脊椎動物，孵化前不受法規約束 [39]。根據歐盟指令 2010/63/EU，雞胚胎直到孵化第 14 天才被認為受保護物種。多數國家實驗動物法規並不將孵化 14 天內（或未孵化）的禽蛋列為實驗動物，實驗使用無需審查或僅需簡化審查，因此採用雞胚蛋模型被認為符合了 3R 原則 [55]。

2. 具成本效益及效率：

傳統實驗動物模型以啮齒類動物廣泛被使用，飼養實驗鼠需要專門設施及較長的繁殖週期（小鼠妊娠約 3 週，成熟需數週），部分實驗耗時長達數週至數月。而雞胚蛋模型使用之雞受精蛋價格較低廉且易大量取得，一臺小型孵蛋箱即可同時孵化數十至數百枚胚蛋，且雞胚胎發育快速，通常幾天至幾週內即可完成實驗。在腫瘤相關研究方面顯示腫瘤在組織學上與原發性癌相似，並表現出原始腫瘤的形態特徵，這比培養的腫瘤細胞具有更大優勢，可以進行活體成像，從而追蹤腫瘤的發展、轉移和細胞外基質的重塑 [14, 30]。此外於雞胚蛋模型腫瘤發展迅速。只需幾天即可觀察到幾毫克的腫瘤，在小鼠則需要數週時間，成本高昂且成功率有限 [17]。而在藥物研究方面，雞胚蛋為一個封閉的系統藥物不會排泄，進而使單次用藥後

藥物暴露時間延長，減少了多次用藥的需求 [5]。

3. 直接觀察與操作的便利性：

雞胚胎因於體外孵化，可直接觀察和操作活體胚胎。通過蛋殼開窗，可以拍攝胚胎發育影像、進行顯微手術或局部給藥，容易觀察早期發育、器官發生、動態生物過程（如：血管生成、細胞遷移），並且便於操作，這在哺乳動物模型中難以實現。鼠胚胎在子宮內發育，不易在不影響母體的情況下觀測，往往需要解剖取材後分析，無法連續追蹤同一個體發育。雞胚胎則可輕易地實現活體連續成像，這對發育學及病理過程動態研究相當有利 [62]。

4. 研究適用性：

雞胚胎與人類以及哺乳動物在形態學、生化學和遺傳學上具有相似性，這使雞胚蛋模型成為致畸劑及篩選藥物安全性的理想選擇。儘管新藥臨床前試驗主要利用啮齒動物和兔子進行，但雞胚胎已被用於篩選新化合物或對已知致畸劑的類似物進行測試，並研究某些藥物如何導致先天性畸形。因此雞胚蛋模型於先天性異常與致畸劑關係之研究具有極高價值 [62]。此外，於感染及免疫相關研究方面，透過活體雞攻毒來評估雞的免疫反應和疾病易感性，成本高昂且存在許多其他因素，包括年齡、自然接觸感染源、正常菌群、透過自然接觸途徑給藥的動物個體差異、營養狀況以及其他環境壓力源的暴露等。相較之下，雞胚蛋被包裹在蛋殼的保護性環境中，不僅成本低且不易受到環境因素干擾而影響研究結果 [53]。

5. 局限性與挑戰：

儘管雞胚蛋模型在生物醫學研究中具有諸多優勢，但其應用也伴隨著一些不可忽視的局限性與挑戰。

- (1) 因觀察期較短，腫瘤治療測試無法研究腫瘤緩解情況及潛在復發可能，但這可在小鼠模型中實現。
- (2) 在藥物相關研究上，雞胚模型無法口服給藥且所有測試物質必須在注射前溶解 [17]。
- (3) 難以模擬天然組織結構和功能（例如人類幹細胞）[5]等。

未來發展與整合技術：雞胚胎模型與新興技術的結合

使用雞胚蛋作為模型系統的研究數量不斷增加，過去 5 年已新增研究超過 700 項 [27]。雞胚蛋模型在未來研究中具有強大的潛力，將與多種先進技術深度整合，以擴展其應用範圍並顯著提高實驗的精確度與轉化相關性。

1. 基因編輯（CRISPR 等）：

雞胚胎是進行基因功能分析一個極具價值的模型系統，主要歸因於在雞胚胎早期發育階段可進行實驗性擾動（experimental perturbations），這對於觀察基因功能缺失或過表達對胚胎發育影響至關重要，另則為雞胚胎與人類發育存在高度的同源性 [28]。結合基因編輯技術，為進一步禽類基因操作的推進研究打開了大門。目前已有研究成功將雞細胞株之 HIRA、TYRP1、DICER、MBD3、EZH2 和其他 6 個基因剔除，且未檢測到脫靶效應，並藉由體內電穿孔將 NHEJ 突變引入雞胚胎，用於雞胚胎特定位點基因剔除或編輯 [1]，亦有研究利用 CRISPR/Cas9 於雞胚體內修飾 Pax7 基因 [61, 66]。

2. 人工智慧成像與分析：

由於雞胚胎實驗較易產生與收集大量影像數據，可透過人工智慧深度學習模型進行訓練開發出影像辨識工具。深度卷積網路（deep convolutional nets）目前已可用於影像識別及影像分類 [31]，於胚胎發育分期研究領域已被用於進行斑馬魚胚胎分期 [44] 和雞胚胎大腦發育分期研究，大腦發育分期分辨成功率已可達 87.1% [19]。近期研究顯示透過深度學習進行雞胚胎血管影像識別，可於孵化第 3 至 5 天判斷蛋內胚胎性別，準確率可達近 90% [25]。另有研究開發多尺度特徵融合卷積神經網路（multiscale-feature fusion convolution neural network），可在第 9–15 胚齡日精準區分活胚、死胚與弱胚，弱胚檢出準確率達 99.35%，並能連續監測胚胎活力 [7]。這些研究顯示人工智慧成像結合雞胚胎影像對動物福利落實於蛋雞產業之潛力，未來透過人工智慧成像與分析，雞胚胎模型試驗的定量化和高通量分析將更上一層樓，減

少人工偏差並提升再現性。

結論

雞胚蛋模型作為哺乳類實驗動物的替代方案，已在多個領域證明其獨特價值。它提供了一個體外孵化但同時可模擬體內發育的試驗平臺，使研究者能夠以較低成本和更快週期獲取與其他實驗模型相近的生理數據。同時，該模型符合動物實驗 3R 原則，在不犧牲研究品質的前提下減少了哺乳動物的使用，呼應並落實動物福利。儘管雞胚胎模型本身仍有其侷限性，

然而整體而言雞胚蛋模型的優勢遠大於其不足，透過適當的實驗設計與數據解讀，它依然是生物醫學研究中一個高效可靠且具倫理優勢的活體模型系統。展望未來，雞胚蛋模型有望透過基因編輯、先進成像和人工智慧技術分析等新技術的結合應用，提升複雜的生理和疾病狀態之模擬，在更廣泛的研究情境中發揮作用，成為連結體外試驗與哺乳類體內研究的橋樑，為科學界提供一個兼具效率、倫理與創新性的研究平臺，持續推動生物醫學領域的發現與突破。

表 1、雞胚蛋主要胚外結構生理功能與研究應用。

結構	主要生理功能	生物醫學研究應用
絨毛尿囊膜	在胚胎發育全過程中承擔氣體交換和營養輸送功能，調節蛋殼鈣質釋放以促進胚胎骨骼礦化 [40]。	1. 評估藥物促進或抑制血管新生能力 [47, 48]。 2. 建立腫瘤異種移植模型，研究腫瘤血管生成、侵襲和轉移 [8, 34, 46]。 3. 再生醫學、類器官培養、生物材料生物相容性測試和藥物作用評估 [6, 29, 36]。
尿囊	胚胎臨時呼吸與排泄器官，負責儲存胚胎代謝廢物，同時進行氣體交換和營養運輸 [10]。	1. 病毒學與疫苗研發，並用於病毒致病機制研究與抗病毒藥物評估 [20, 21]。 2. 代謝體學分析，監測胚胎生理指標重要平臺 [43]。 3. 活體觀測與取樣窗口。
卵黃囊	參與胚胎早期造血作用，消化並輸送卵黃營養至胚胎，合成血漿載體蛋白，調節碳水化合物代謝，以及將母體抗體傳遞給胚胎，提供免疫保護 [23, 37]。	1. 血管新生與抗血管新生效應評估 [51]。 2. 胚胎造血與血管內皮發育模型，觀察血液細胞和血管早期生成過程 [45]。 3. 探討營養代謝及環境條件對胚胎發育影響 [68]。 4. 藥物毒理與奈米載體輸送試驗評估 [64]。

參考文獻

1. Abu-Bonsrah KD, Zhang D, Newgreen DF. CRISPR/Cas9 Targets chicken embryonic somatic cells in vitro and in vivo and generates phenotypic abnormalities. *Sci Rep*, 6:34524, 2016.
2. American Veterinary Medical Association (AVMA). AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition. Schaumburg (IL), AVMA, 2020.
3. Beedie SL, Mahony C, Walker HM, Chau CH, Figg WD, Vargesson N. Shared mechanism of teratogenicity of anti-angiogenic drugs identified in the chicken embryo model. *Sci Rep*, 6:30038, 2016.
4. Beedie SL, Peer CJ, Pisle S, Gardner ER, Mahony C, Barnett S, et al. Anticancer properties of a novel class of tetrafluorinated thalidomide analogues. *Mol Cancer Ther*, 14:2228-2237, 2015.
5. Bjørnstad S, Austdal LPE, Roald B, Glover JC, Paulsen RE. Cracking the Egg: Potential of the developing chicken as a model system for nonclinical safety studies of pharmaceuticals. *J Pharmacol Exp Ther*, 355:386-396, 2015.
6. Checchi M, Bertacchini J, Cavani F, Magarò MS, Bonetti LR, Pugliese GR, et al. Scleral Ossicles: Angiogenic scaffolds, a novel biomaterial for regenerative medicine applications. *Biomater Sci*, 8:413-425, 2020.
7. Chen L, Zhu Y, Wang Y, Zhang Y, Luo Y. An innovative algorithm to process imaging data for detection of weak chick embryos in vaccine production. In: 2020 5th International Conference on Universal Village (UV). Boston, MA, USA, IEEE, 1-8, 2020.
8. Chu PY, Koh APF, Antony J, Huang RYJ. Applications of the chick chorioallantoic membrane as an alternative model for cancer studies. *Cells Tissues Organs*, 211: 222-237, 2022.
9. Cimpean AM, Ribatti D, Raica M. The chick embryo chorioallantoic membrane as a model to study tumor metastasis. *Angiogenesis*, 11:311-319, 2008.
10. Corbel R. Allantois: A significant embryonic structure with multiple functions. *Res J Zool*, 5:2, 2023.
11. Crespo P, Casar B. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo model to study metastasis. *Bio-Protoc*, 6:e1962, 2016.
12. Davey MG, Towers M, Vargesson N, Tickle C. The chick limb: Embryology, genetics and teratology. *Int J Dev Biol*, 62:85-95, 2018.
13. Deryugina EI, Conn EM, Wortmann A, Partridge JJ, Kupriyanova TA, Ardi VC, et al. Functional role of cell surface CUB domain-containing protein 1 in tumor cell dissemination. *Mol Cancer Res MCR*, 7: 1197-1211, 2009.
14. Deryugina EI, Quigley JP. Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol*, 130:1119-1130, 2008.
15. Dose JM, Caton IB, Zolman JF. Physiological and behavioral effects of early embryonic exposure to ethanol and cocaine in the young chick. *Neurotoxicol Teratol*, 17:49-55, 1995.
16. Durupt F, Koppers-Lalic D, Balme B, Budel L, Terrier O, Lina B, et al. The chicken chorioallantoic membrane tumor assay as model for qualitative testing of oncolytic adenoviruses. *Cancer Gene Ther*, 19:58-68, 2012.

17. Fischer D, Fluegen G, Garcia P, Ghaffari-Tabrizi-Wizsy N, Gribaldo L, Huang RYJ, et al. The CAM model-Q&A with experts. *Cancers*, 15:191, 2022.
18. Flentke GR, Garic A, Hernandez M, Smith SM. CaMKII represses transcriptionally active β -catenin to mediate acute ethanol neurodegeneration and can phosphorylate β -catenin. *J Neurochem*, 128:523-535, 2014.
19. Groves I, Holmshaw J, Furley D, Manning E, Chinnaiya K, Towers M, et al. Accurate staging of chick embryonic tissues via deep learning of salient features. *Development*, 150:dev202068, 2023.
20. Guan L, Ping J, Lopes TJS, Fan S, Presler R, Neumann G, et al. Development of an enhanced high-yield influenza vaccine backbone in embryonated chicken eggs. *Vaccines*, 11:1364, 2023.
21. Guy JS. Isolation and propagation of *coronaviruses* in embryonated eggs. *Methods Mol Biol*, 454:109-17, 2008.
22. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol*, 88:49-92, 1951.
23. Helal M, Makihara N, Iwasawa A. A concise review of factors limiting yolk sac nutrient utilization in chicken embryos. *Rev Agric Sci*, 13:20-31, 2025.
24. Jackwood MW, Jordan BJ. Molecular evolution of infectious bronchitis virus and the emergence of variant viruses circulating in the United States. *Avian Dis*, 65:631-636, 2021.
25. Jia N, Li B, Zhao Y, Fan S, Zhu J, Wang H, et al. Exploratory study of sex identification for chicken embryos based on blood vessel images and deep learning. *Agriculture*, 13:1480, 2023.
26. Kain KH, Miller JWI, Jones-Paris CR, Thomason RT, Lewis JD, Bader DM, et al. The chick embryo as an expanding experimental model for cancer and cardiovascular research. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*, 243:216-228, 2014.
27. Kaplan-Arabaci O, Dančišinová Z, Paulsen RE. The chicken embryo: An alternative animal model in development, disease and pharmacological treatment. *Pharmacol Res Perspect*, 13:e70086, 2025.
28. Kim M, Hutchins EJ. CRISPR-Cas13d as a molecular tool to achieve targeted gene expression knockdown in chick embryos. *Dev Biol*, 519:5-12, 2025.
29. Komatsu A, Matsumoto K, Saito T, Muto M, Tamanoi F. Patient derived chicken egg tumor model (PDcE model): Current status and critical issues. *Cells*, 8:440, 2019.
30. Kunze P, Kreiss L, Novosadová V, Roehe AV, Steinmann S, Prochazka J, et al. Multiphoton microscopy reveals DAPK1-dependent extracellular matrix remodeling in a chorioallantoic membrane (CAM) model. *Cancers*, 14:2364, 2022.
31. LeCun Y, Bengio Y, Hinton G. Deep learning. *Nature*, 521:436-444, 2015.
32. Maibier M, Reglin B, Nitzsche B, Xiang W, Rong WW, Hoffmann B, et al. Structure and hemodynamics of vascular networks in the chorioallantoic membrane of the chicken. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*, 311:H913-926, 2016.
33. Mahony C, Erskine L, Niven J, Greig NH, Figg WD, Vargesson N. Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110:12703-12708, 2013.
34. Miebach L, Berner J, Bekeschus S. In ovo

- model in cancer research and tumor immunology. *Front Immunol*, 13:1006064, 2022.
35. Moran ET. Nutrition of the Developing embryo and hatchling. *Poult Sci*, 86:1043-1049, 2007.
 36. Moreno-Jiménez I, Hulsart-Billstrom G, Lanham SA, Janeczek AA, Kontouli N, Kanczler JM, et al. The chorioallantoic membrane (CAM) assay for the study of human bone regeneration: A refinement animal model for Tissue Engineering. *Sci Rep*, 6:32168, 2016.
 37. Nangsuay A, Meijerhof R, Ruangpanit Y, Kemp B, van den Brand H. Energy utilization and heat production of embryos from eggs originating from young and old broiler breeder flocks. *Poult Sci*, 92:474-482, 2013.
 38. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*, 10:588-612, 2006.
 39. Office of Laboratory Animal Welfare (OLAW). The Public Health Service Responds to Commonly Asked Questions. *ILAR News*, 33:68-70, 1991. Available from: <https://olaw.nih.gov/guidance/articles/ilar91.htm>
 40. Packard MJ. Mobilization of shell calcium by the chick chorioallantoic membrane in vitro. *J Exp Biol*, 190:141-153, 1994.
 41. Palmer TD, Lewis J, Zijlstra A. Quantitative analysis of cancer metastasis using an avian embryo model. *J Vis Exp JoVE*, 51:2815, 2011.
 42. Palumbo C, Sisi F, Checchi M. CAM model: intriguing natural bioreactor for sustainable research and reliable/versatile testing. *Biology*, 12:1219, 2023.
 43. Petit A, Tesseraud S, Beauclercq S, Nadal-Desbarats L, Cailleau-Audouin E, Réhault-Godbert S, et al. Allantoic fluid metabolome reveals specific metabolic signatures in chicken lines different for their muscle glycogen content. *Sci Rep*, 13:8867, 2023.
 44. Pond AJR, Hwang S, Verd B, Steventon B. A Deep learning approach for staging embryonic tissue isolates with small data. *PLoS One*, 16:e0244151, 2021.
 45. Pouncey L, Mok GF. Unravelling early hematoendothelial development through the chick model: insights and future perspectives. *Dev Biol*, 523:20-31, 2025.
 46. Ranjan RA, Muenzner JK, Kunze P, Geppert CI, Ruebner M, Huebner H, et al. The chorioallantoic membrane xenograft assay as a reliable model for investigating the biology of breast cancer. *Cancers*, 15:1704, 2023.
 47. Ribatti D. Chick embryo chorioallantoic membrane as a useful tool to study angiogenesis. *Int Rev Cell Mol Biol*, 270:181-224, 2008.
 48. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane as an in vivo assay to study antiangiogenesis. *Pharm Basel Switz*, 3:482-513, 2010.
 49. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic Membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev*, 141:70-77, 2016.
 50. Ribatti D. The chick embryo chorioallantoic membrane in the study of tumor angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, 49:131-135, 2008.
 51. Ribatti D, Benagiano V. Chick embryo area vasculosa as an in vivo assay for the screening of angiogenic and anti-angiogenic molecules. *Pathol Res Pract*, 244:154419, 2023.
 52. Ribatti D, Nico B, Bertossi M. The development of the blood-brain barrier in the chick. studies with evans blue and horseradish peroxidase. *Ann Anat Anat Anz Off Organ Anat Ges*, 175:85-88, 1993.

53. Schilling MA, Katani R, Memari S, Cavanaugh M, Buza J, Radzio-Basu J, et al. Transcriptional innate immune response of the developing chicken embryo to Newcastle disease virus infection. *Front Genet*, 9:61, 2018.
54. Sinn PL, McCray PB Jr. Compositions and Methods for Treating or Preventing Viral Infections. WO2020089561A1. Published May 7, 2020. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2020089561>
55. Smith LM, Greenwood HE, Tyrrell WE, Edwards RS, de Santis V, Baark F, et al. The chicken chorioallantoic membrane as a low-cost, high-throughput model for cancer imaging. *Npj Imaging*, 1:1, 2023.
56. Smith SM, Flentke GR, Kragtorp KA, Tessmer L. Ethanol exposure during the early first trimester equivalent impairs reflexive motor activity and heightens fearfulness in an avian model. *Alcohol*, 45:57-63, 2011.
57. Süß SC, Werner J, Saller AM, Weiss L, Reiser J, Ondracek JM, et al. Nociception in chicken embryos, part III: Analysis of movements before and after application of a noxious stimulus. *Anim Open Access J MDPI*, 13:2859, 2023.
58. Tureci E, Asan Z, Eser M, Tanriverdi T, Alkan F, Erdinler P. The effects of valproic acid and Levetiracetam on Chicken Embryos. *J Clin Neurosci*, 18:816-820, 2011.
59. Vargesson N. The teratogenic effects of thalidomide on limbs. *J Hand Surg Eur Vol*, 44:88-95, 2019.
60. Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev*, 105:140-156, 2015.
61. Véron N, Qu Z, Kipen PAS, Hirst CE, Marcelle C. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol*, 407:68-74, 2015.
62. Wachholz GE, Rengel BD, Vargesson N, Fraga LR. From the farm to the lab: How chicken embryos contribute to the field of teratology. *Front Genet*, 12:666726, 2021.
63. Wachholz GE, Varela APM, Teixeira TF, de Matos SMS, Rigon da Luz Soster P, Vianna FSL, et al. Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos. *Birth Defects Res*, 113:22-31, 2021.
64. Wang M, Chen S, Cheng S, Nederstigt TAP, Poelmann RE, DeRuiter MC, et al. The biodistribution of polystyrene nanoparticles administered intravenously in the chicken embryo. *Environ Int*, 188:108723, 2024.
65. Warnock G, Turtoi A, Blomme A, Bretin F, Bahri MA, Lemaire C, et al. In vivo PET/CT in a human glioblastoma chicken chorioallantoic membrane model: A new tool for oncology and radiotracer development. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med*, 54:1782-1788, 2013.
66. Wessels HH, Méndez-Mancilla A, Guo X, Legut M, Daniloski Z, Sanjana NE. Massively parallel Cas13 screens reveal principles for guide RNA design. *Nat Biotechnol*, 38:722-727, 2020.
67. Whitsel AI, Johnson CB, Forehand CJ. An in ovo chicken model to study the systemic and localized teratogenic effects of valproic acid. *Teratology*, 66:153-163, 2002.
68. Wong EA, Uni Z. Centennial review: The chicken yolk sac is a multifunctional organ. *Poult Sci*, 100:100821, 2020.
69. Zhang Y, Luo Q, Gao L, Li S, Zhang Y, Gao M, et al. Chicken innate immune responses to viral infection and vaccination. *Front Immunol*, 12:791081, 2021.

70. Zijlstra A, Mellor R, Panzarella G, Aimes RT, Hooper JD, Marchenko ND, et al. A quantitative analysis of rate-limiting steps in the metastatic cascade using human-specific real-time polymerase chain reaction. *Cancer Res*, 62:7083-7092, 2002.

Exploring the application of the chicken embryonated egg model as an alternative to experimental animals

CY Chiang*

Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture

Abstract The chicken embryonated eggs have increasingly been recognized as a promising alternative model to traditional laboratory animals in both biomedical and veterinary research in recent year. Owing to its low cost, technical accessibility, and rapid embryonic development, the chicken embryonated egg model has been successfully employed in toxicological assessment, tumor xenografting, angiogenesis studies, and infectious disease research. Compared to mammalian experimental models, chicken embryonated eggs offer an immunologically immature environment and a vivo platform conducive to real-time observation. However, anatomical and physiological differences between chicken embryos and mammalian species continue to impose limitations on their experimental applicability. Overall, the chicken embryonated egg model supports the implementation of the 3Rs [Replacement, Reduction, and Refinement] principles in animal experimentation while enhancing experimental efficiency. This article provides a comprehensive overview of advantages, and constraints associated with chicken embryo-based methodologies as alternative testing systems, and further explores its future potential when integrated with genome editing technologies, high-resolution live imaging, and artificial intelligence-driven analytical approaches.

Keywords: *Chicken embryonated egg, 3Rs principles, Alternative experimental model*

* Corresponding Author
Veterinary Research Institute, Ministry of Agriculture