

厚生労働科学研究費補助金
医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業
ワクチン等の品質確保を目的とした新たな国家検定システムの構築のための研究

分担研究報告書

動物代替試験の検討に関する研究

研究分担者 花木 賢一 国立感染症研究所 動物管理室

研究要旨：動物実験における国際的倫理原則 3R の内、「動物の愛護及び管理に関する法律」で唯一義務と規定されている **Refinement**（苦痛の軽減）に関する事項として、人道的エンドポイントの設定と炭酸ガスによる安楽死法の改良について文献調査に基づき検討を行った。その結果、人道的エンドポイントは、瀕死または前瀕死状態をエンドポイントの判断基準とするより、体温低下の度合いを判断基準とすることで動物が苦痛を被る時間を短縮できると考えられた。また、炭酸ガスによる安楽死法は、炭酸ガスの粘膜刺激により動物が苦痛を感じることから、刺激の小さい吸入麻酔薬による前麻酔を行うことで苦痛の軽減を実現できると考えられた。

A. 研究目的

わが国において動物実験を規制する最上位の法規は「動物の愛護及び管理に関する法律」であり、第 41 条（動物を科学上の利用に供する場合の方法、事後措置等）において、「動物を教育、試験研究又は生物学的製剤の製造の用その他の科学上の利用に供する場合には、科学上の利用の目的を達することができる範囲において、できる限り動物を供する方法に代わり得るものを利用すること、できる限りその利用に供される動物の数を少なくすること等により動物を適切に利用することに配慮するものとする。」「動物を科学上の利用に供する場合には、その利用に必要な限度において、できる限りその動物に苦痛を与えない方法によつてしなければならない。」と規定している。そして、この二項をもって動物実験における国際的倫理原則 3R

(Replacement, Reduction, Refinement)

が明示されている。本研究の目的は、試験精度の向上を目指した試験の改良の一つとして動物代替試験 (**Replacement**) を検討することであるが、他の分担研究者が動物代替試験の開発について取り組んでいることから、3R の中でも唯一法律で義務とされている **Refinement** の改良を目的として検討を行う。具体的には、動物を無用な苦痛から解放するために設定する人道的エンドポイント (**humane endpoint**) 設定の改良、試験終了時に炭酸ガスによって小型げっ歯類を安楽死させる方法の改良について、文献調査によって検討する。

B. 研究方法

動物実験手技に関して基本事項を定めた公的あるいはそれに準ずる文書あるいは動物実験に際して国際的に引用されて

いる文書として、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(2006年)、環境省自然環境局総務課動物愛護管理室編集「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準の解説」(2017年)、The Institute for Laboratory Animal Research (ILAR) of the National Research Council in the USA, The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: 8th Edition (2011)、ARENA-OLAW, Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook: 2nd Edition (2002)、Canadian Council on Animal Care (CCAC), Guidelines on: Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing (1998)、OECD Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (2000)、American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition があり、それらを参照した。また、Office of Animal Care and Use (OACU), NIH Training Resources をはじめ、実験動物福祉に積極的な欧米の大学等研究機関の動物実験に関する標準作業手順書 (SOP) 並びに教育資料、さらに学術文献を検索して検討を行った。

(倫理面への配慮) 文献に基づく調査研究のみ実施しており、倫理面の問題は発生しない。

C. 研究結果

1. 人道的エンドポイントの検討

人道的エンドポイントについて、日本学術会議のガイドラインでは「摂餌・摂水困難、苦悶の症状(自傷行動、異常な姿勢、呼吸障害、鳴き声など)、回復の兆しが見られない長期の外見異常(下痢、出血、外陰部の汚れなど)、急激な体重減少(数日間で20%以上)」を例示している。また、人道的エンドポイントの説明において、しばしば引用される ARENA-OLAW の Guidebook では表1(一部改変)を例示している。

表1. 人道的エンドポイントの例

エンドポイント	判断基準	例
腫瘍の成長 ／その影響	腫瘍が体重の10%以上になる。 壊死、感染、潰瘍などの形成。 移動の困難あるいは採餌・飲水の困難	腫瘍やハイブリドーマの皮下・腹腔内移植
持続的食欲不振 ／悪液質	急速な体重減少(正常より20%以上減)	転移性疾患 慢性感染症
移動不能	持続する横臥	多数
全身 ／臓器不全	呼吸器: 頻呼吸、呼吸困難、咳、ラッセル音 心血管系: ショック、出血、アナフィラキシー 消化器: 重度の下痢、嘔吐 末梢神経系: 弛緩性および痙攣性麻痺 中枢神経系: 回転、盲目、痴呆、痙攣	毒性試験 全身性疾患
進行性低体温	げっ歯類で4~6℃の体温低下	感染症 ワクチン力価試験
瀕死 ／前瀕死状態	臨床状態で判断	多数

生物学的製剤基準に記載された致死性の動物試験項目の内、平成26年度以降に動物実験計画書の申請があるものは、沈降精製百日せきワクチン(マウス脳内攻撃法)、乾燥組織培養不活化狂犬病ワクチン(マウ

ス脳内攻撃法)、破傷風トキソイド (マウス毒素攻撃法) の力価試験である。それら動物実験計画書に記載された人道的エンドポイントは、麻痺や硬直性痙攣の認知であり、表1の瀕死または前瀕死状態に該当する。これに代わるもので、視覚的かつ客観的に評価できるものとして進行性低体温がある。動物の体温は直腸温度の測定によって行われており、動物用体温計には動物種毎にプローブが用意されている。一方、ヒトでは腋下、舌下、直腸における体温計による測定が一般的であるが、額、こめかみ、耳内を測定部位として非接触で瞬時に体温を測定することができる赤外線体温計が普及しつつある。小型げっ歯類においても赤外線体温計を使用することで、体温の低下を人道的エンドポイントに設定することが容易になると期待される。そこで、赤外線体温計によるげっ歯類の体温測定に関する文献を検索すると、以下の論文が確認された。

- ① Mei J, *et al.* Body temperature measurement in mice during acute illness: implantable temperature transponder versus surface infrared thermometry. *Sci Rep.* 8: 3526, 2018.
- ② Kawakami Y, *et al.* Mouse Body temperature measurement using infrared thermometer during passive systemic anaphylaxis and food allergy evaluation. *J Vis Exp.* 2018. doi: 10.3791/58391.
- ③ Warn PA, *et al.* Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in

experimental fungal infections. *Lab Anim.* 37: 126–31, 2003.

- ④ Saegusa Y and Tabata H. Usefulness of infrared thermometry in determining body temperature in mice. *J Vet Med Sci.* 65: 1365–7, 2003.

何れの論文も体表体温測定が病態予測あるいは死をエンドポイントとする苦痛の軽減方法に代わり得ることを示唆していた。特に、文献④では直腸温度の経時的推移と耳、背部皮膚、尾部、足底部の温度の経時的推移を比較して、耳と背部皮膚の温度が直腸温度とよく相関することを報告している。

ARENA-OLAWのGuidebookでは体温に基づく人道的エンドポイントについて、げっ歯類で4~6℃の体温低下を例示している。そこで、原著 (Olfert ED and Godson DL. *Humane endpoints for infectious disease animal models.* *ILAR J.* 41: 99–104, 2000.)を確認すると、表2のように病原体毎に人道的エンドポイントの目安体温が異なることが示されていた。

表2. 感染動物実験におけるエンドポイントの目安体温

病原体	エンドポイントの目安体温
緑膿菌	34℃ (正常より約 4.5℃低い)
黄色ブドウ球菌	
表皮ブドウ球菌	
カンジダ・アルビカンス	正常より 4℃以上低下 (34.5℃以下)
インフルエンザウイルス	32℃より下 (正常より約 6.5℃低い)
クレブシエラ肺炎桿菌	36℃より下

2. 炭酸ガスによる安楽死法の検討

国家検定に用いる小型げっ歯類の安楽死処置には炭酸ガスが用いられている。炭酸ガスは安価で安全に取り扱うことができることから、多くの動物種の安楽死法として汎用されている。炭酸ガスは高濃度で麻酔作用を有するため、動物ははじめに意識を消失し、次いで無意識下で低酸素症により死に至る。今日の炭酸ガスを用いた標準的な安楽死法は、小型げっ歯類を入れた容器の内容積に対して1分間に10～30%容を炭酸ガスで置換する流量で注入し、死亡が確認された後も最低1分間は炭酸ガスを注入し続ける方法である(環境省飼養保管基準解説、NIH Training Resources、他)。また、炭酸ガスによる安楽死処置条件についてはAVMAとCACCのGuidelinesに詳細な解説がある。そこで、両者の解説を表3にまとめた。

表3. 炭酸ガスによる安楽死処置条件の評価比較

方法	評価
① 液化炭酸ガス以外(ドライアイス)を供給源とする。	AVMA: × CACC: ×
② 予め炭酸ガスを充填した容器に動物を入れる。	AVMA: × CACC: ×
③ 動物を入れた容器に炭酸ガスを10～30%容/分で注入する。	AVMA: ○ CACC: △
④ 予め麻酔処置を行い、次いで炭酸ガスで安楽死させる。	AVMA: – CACC: ○

方法①は炭酸ガスの適正な濃度を制御できないため、方法②は粘膜刺激が強く著しい息苦しさを招くために不適切としている。方法③はAVMA Guidelinesでは粘膜刺激が緩和されるとしているが、CACC Guidelinesでは12～18%の濃度で忌避行動がみられるとし、評価が若干異なる。方法④は吸入麻酔薬であるイソフルランが炭酸ガスに比べて忌避行動がみられない

ことから、CCAC Guidelinesでは推奨している。

D. 考察

当初の研究目的である国家検定における3RのReplacementについて検討する代わりに、Refinementに関わる2つの事項について文献調査に基づく検討を行った。

1. 人道的エンドポイントの検討

赤外線体温計による体温測定に基づく人道的エンドポイントの設定は、瀕死または前瀕死状態に至る前に安楽死を施すことが可能になると期待される。ただし、海外では小型げっ歯類用の赤外線温度計が市販されているが、国内では市販されていない。そこで、ヒト用赤外線体温計の転用を検討する必要があるが、ヒト用製品の中には無生物の温度を測定するモードを有するものがある。そのため、ヒトの体温は赤外線温度計の測定結果に補正係数を加味して算出していると思われ、小型げっ歯類についても動物種または系統毎に補正係数を決定する必要がある。また、体表温度を測定して評価することの留意点として、動物の飼育及び試験環境、特に環境温度によりその値が振れることである。ただし、小型げっ歯類または系統毎の補正係数と環境温度の考慮は、試験中に無処置対照群の正常体表温度を測定して比較することで不要にできると考える。一方、人道的エンドポイントに設定する低体温の度合いは、表2に示す通り病原体毎に異なるため、動物試験毎にその値を決定する必要があると考える。

2. 炭酸ガスによる安楽死法の検討

国家検定における動物試験では多数の小型げっ歯類を使用しているため、推奨されている炭酸ガスによる安楽死法では検定従事者を試験終了後も長時間拘束することになる。そこで、それに代わる方法としてイソフルランで前麻酔を行い、深麻酔下で動物を高濃度の炭酸ガスに曝露させて致死させる方法は実践的と考える。ただし、イソフルランに一度曝露したラットはイソフルランを忌避するという報告（Wong D *et al.* Rat aversion to isoflurane versus carbon dioxide. *Biol Lett.* 9: 20121000, 2013.）があること。イソフルラン前麻酔を組み合わせた方法は、1分間に20%容の炭酸ガスを注入する通常の方法よりもマウスにストレスを与えるという報告（Valentine H, *et al.* Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO₂ does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 51: 50–7, 2012.）があることには留意する必要がある。そして、今後も国

内外の安楽死法に関する情報を収集し、より動物に苦痛を与えない方法を導入していく必要がある。

E. 結論

人道的エンドポイントの設定は、現行の瀕死または前瀕死状態に至るまで観察を続ける代わりに体温測定に基づく方法を採用する。小型げっ歯類の炭酸ガスによる安楽死法は、現行の炭酸ガス単独による方法に代えてイソフルラン前麻酔を行った後に高濃度炭酸ガスに曝露させる方法を採用する。これらの改良により、国家検定の動物試験で用いる実験動物の苦痛の軽減（Refinement）を一層図ることができると思う。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし