

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

研究協力者 田原口元子 国立感染症研究所 動物管理室

研究要旨：破傷風トキソイドの力価試験のような致死性の動物試験では、国際的動物実験の倫理原則の一つ **Refinement** の観点から動物を苦痛から早期に解放する人道的エンドポイントを設定している。しかし、設定した人道的エンドポイントが有効に機能しない場合がある。本研究では人道的エンドポイントの新たな指標として体温に着目し、それを可能にする実行容易な体温測定方法について検討した。そして、ヒト用赤外線体温計はマウス背部皮膚を剃毛して皮膚を露出させることで、直腸体温計と同様の体温測定が可能なこと。体温測定モードの測温下限は 34℃であるが、測温範囲の広い物体温度測定モードで測温すると、体温が 34℃未満であっても推定可能であることが明らかになった。以上のことから、ヒト用赤外線体温計を用いてマウス体温測定が簡易に行うことができ、マウスの致死性動物試験において、体温に基づく人道的エンドポイント設定が可能と考えられた。

A. 研究目的

動物実験における国際的倫理原則「3R」の内、代替法の利用 (**Replacement**) と使用動物数の削減 (**Reduction**) は「動物の愛護及び管理に関する法律」第 41 条において配慮事項としている。一方、動物実験技術の洗練・苦痛の軽減 (**Refinement**) は義務事項としている。そのため、破傷風トキソイドの力価試験のような致死性の動物試験では、必ず **Refinement** の観点から動物を苦痛から早期に解放する人道的エンドポイントを設定している。一般的な人道的エンドポイントとしては、対照群と比較して 20%以上の低体重が認められた場合、持続的な横たわりやうずくまりがみられた場合、予め特定の臨床症状を規定してその症状が認められた場合、が挙げられる (中井伸子、

LABIO 21. 26-31, 2007)。しかし、これらの人道的エンドポイントがすべての致死性動物実験に適用できるものではなく、その結果、動物が病死するまでに不要な苦痛を強いることがある。その他の人道的エンドポイントとしては体温が知られており、緑膿菌または黄色ブドウ球菌を感染させたマウスでは 34℃、インフルエンザウイルスを感染させたマウスでは 32℃未満の体温が人道的エンドポイントになることが例示されている (Olfert and Godson. ILAR J. 41:99-104, 2000)。しかし、マウスの体温測定は直腸で行う必要があり、国家検定の動物試験のように多数のマウスを使用する場合には、体温を指標に人道的エンドポイントを設定することは実用的でなかった。

近年、ヒト用赤外線体温計が普及し、身

体に触れることなく、1秒未満で体温を高精度に測定できるようになった。そこで、本研究ではヒト用赤外線体温計を用いてマウス体温測定が可能であるか否か、そのための条件について検討を行った。

B. 研究方法

使用した体温計はヒト用非接触赤外線体温計 FS-700 (HuBDIC)、ヒト用皮膚赤外線体温計 MT-500 (日本精密測器)、小動物用直腸プローブを取り付けた環境ローガ AD-1687 (A&D) である。マウスは国家検定の動物試験で用いられる ddY (4-7 週齢 ♀ ; N=6) を使用し、戸山庁舎動物管理区の飼育環境下 (温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$)、TPX 製ケージで飼育した。実験方法は先行論文 (Saegusa and Tabata. J Vet Med Sci. 65:1365-1367, 2003) を参考にし、測定部位は小動物用電動バリカンで剃毛した背部皮膚 (図 1)、耳、尾の 3ヶ所とし、日内変動、日間変動、エタノール誘発性低体温を調べるための温度測定を行った。各体温測定はマウスをケージから取り出してワイヤー蓋上で保定して行った (図 2)。また、背部皮膚温度測定はケージ内の無保定状態でも行った (図 3)。対照となる直腸温度測定は、用手保定により行った (図 4)。

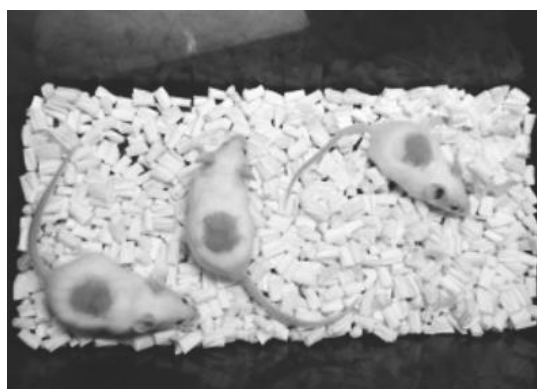
(倫理面への配慮)

本動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て、所長の承認が得られた後に実施した (承認番号 : 119115)。

C. 研究結果

体温は直腸温度を基準として、体表各部

の温度をヒト用赤外線体温計で測定した。実験当初、背部皮膚温度は剃毛せずに測定を行ったが、温度が安定しなかった (データ未掲載)。そこで、図 1-3 のように剃毛して皮膚を露出されて測定を行うと、測定値は安定した。



[図 1 背部の毛を剃毛したマウス]

次に、赤外線体温計の特徴について検討した。FS-700 は仕様書では測定部位から 2-3cm の距離で測定することになっているが、5cm 以上離れた距離でも測定結果は変わらず、測定開始 0.5 秒未満で結果が液晶に表示された (図 2)。



[図 2 ケージトップで牽引保定による背部皮膚温度測定 (FS-700)]

一方、MT-500 は測定部位にセンサー部を接近させていくと測定が開始され、2-3 秒で結果が液晶に表示された (図 3)。



[図 3 ケージ内無保定による背部皮膚温度測定 (MT-500)]

そのため、使用感では FS-700 が優れていた。なお、AD-1687 は直腸プローブを肛門に挿入後、約 30 秒で測定温度が一定となり、その結果を記録した (図 4)。



[図 4 用手保定による直腸温度測定 (AD-1687)]

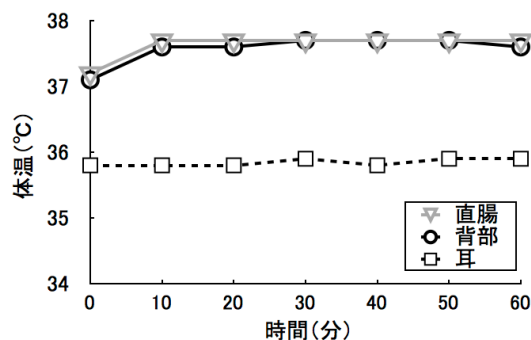
それぞれの温度計で 1 日 7 回、20 日間、計 140 回の測定結果の平均値とその標準偏差を表 1 に示す。赤外線体温計による各部位

の測定結果はほぼ一致し、直腸温度に近似した値を示したのは背部皮膚温度であった。また、保定の有無による背部皮膚温度に顕著な差は認めなかった。なお、尾部では FS-700 が測定不能 (34℃を表示)、MT-500 もまた測定範囲外の値を示した。

測定部位	温度 (°C)	
	FS-700	MT-500
背部 (無保定)	36.9±0.1	36.9±0.1
背部 (保定)	37.1±0.1	37.1±0.1
尾 (保定)	測定不能	32.4±0.2
耳 (保定)	35.9±0.1	35.6±0.1
直腸	37.2±0.1 (AD-1687)	

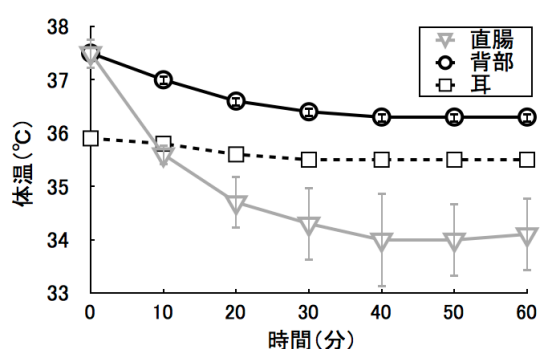
[表 1 マウス各部の温度測定結果]

体温の日内変動と日間変動は、尾部を除く測定部位によって顕著な変動は見られなかった (データ未収載)。そこで、37℃に加温した生理食塩水 (0.75ml/30 g 体重) を腹腔に投与し、10 分ごとにマウスを保定して FS-700 で背部皮膚と耳、AD-1687 で直腸

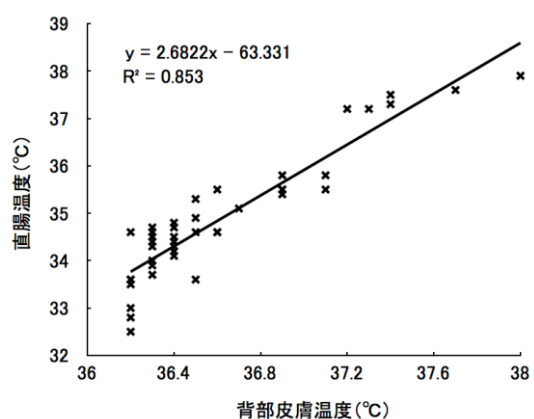


[図 5 生理食塩水腹腔投与後のマウス体温推移 (N=4)]

の温度推移を 60 分間測定した (図 5)。生理食塩水を腹腔投与後 10 分で直腸温度と背部皮膚温度は 0.5℃上昇し、その上昇した体温は投与後 60 分まで維持された。一方、耳温度は生理食塩水投与前後で温度変化は見られなかった。次に、4g/kg のエタノール (20w/v%エタノールを 0.75ml/30g 体重) を腹腔投与して同様の実験を行った (図 6)。



[図 6 エタノール腹腔投与後のマウス体温推移 (N=6)]



[図 7 エタノール腹腔投与後のマウス背部皮膚温度と直腸温度の相関性 (測定点=42)]

直腸温度は投与後 60 分で平均 3.3℃低下したが、背部皮膚温度は平均 1.3℃、耳温度は

平均 0.4℃の低下に止まった。ただし、背部皮膚温度は直腸温度と高い相関 ($R^2=0.85$) を示した (図 7)。

直腸体温計が 34℃より低い温度を測定できるのに対して、ヒト用赤外線体温計は 34℃を測定下限としている。しかし、FS-700 の物体温度 (以下「物温」と略す) 測定モードの測定域は 15-60℃であることから、34℃未満のマウス体温を物温測定モードにより測定できるのではないかと考えた。この検討は動物を用いない代替法として、100ml ポリプロピレンチューブに温水を入れ、温水温度を棒状温度計、チューブ壁温度を FS-700 で測定してその相関性を解析した (表 2)。その結果、棒状温度計の測定結果と FS-700 の物温測定モードの測

温度計 (°C)	物温測定 (°C)
39.0	39.8
38.0	39.0
37.5	38.7
37.0	38.3
36.0	36.9
35.0	36.3
34.0	35.9
33.0	34.8
32.0	33.3
31.0	32.6
30.0	31.1

[表 2 物温測定モードによる水温測定]

定結果には高い相関 ($y=0.941x+3.351$, $R^2=0.99$) を認めた。

D. 考察

人道的エンドポイントの新たな指標として体温に注目し、その簡便な測定方法としてヒト用赤外線体温計のマウス体温測定への応用について検討した。測定部位は先行文献に倣って、直腸温度を基準として背部皮膚、尾、耳で温度測定を行った結果、背部皮膚温度が直腸温度に近い値を示し、生理食塩水 (37°C) の腹腔内投与後の温度もほぼ同じ推移を示した。一方、尾部と耳の温度は直腸温度と乖離しており、体温測定部位としては適さないと判断した。エタノール誘導低体温では、直腸温度は 34°C 未満 (最低温度=32.5°C) に達したが、背部皮膚温度は最低でも 36.2°C に止まった。体内温度の急激な低下に体表温度の変化が追従できていないと思われるが、高い相関性 ($R^2=0.85$) があることが確認された。そのため、背部皮膚温度より直腸温度を推定できると考えた。

ヒト用赤外線体温計 (FS-700) はその測定対象から温度測定範囲を 34-42.5°C (最大許容誤差 $\pm 0.3^\circ\text{C}$) に限定している。しかし、マウスの感染実験による低体温は 34°C 未満になることが報告されており、34°C 未満の温度を測定できるようにする必要があった。ヒト用赤外線体温計の中には物温測定機能を搭載しているものがあり、FS-700 の物温測定範囲は 15-60°C (最大許容誤差 $\pm 1^\circ\text{C}$) で、その内、22-42.5°C では最大許容誤差が $\pm 0.3^\circ\text{C}$ であった。表 2 で示したように、物温測定モードによる外

表面温度測定結果と温度計による容器内水温測定結果の相関係数 (R^2) はほぼ 1 であり、30-40°C の直腸温度は物温測定モードにより得られた背部皮膚温度から推定できると考えられた。なお、背部皮膚を測定部位とする場合には剃毛が必要であり、国家検定の動物試験のように多数のマウスを同時に使用する際には多大な労力となる。そのため、剃毛不要で直腸に近い尾根部や肛門もまた体温測定の好適部位になることが期待される。

E. 結論

人道的エンドポイントの新たな指標として体温に注目し、その簡便な測定方法としてヒト用赤外線体温計のマウス体温測定への応用について検討した。その結果、背部を剃毛して皮膚を露出させて温度を測定すると、直腸温度に近似した測定値が得られ、且つ、高い相関性 ($R^2=0.85$) もあることが明らかになった。また、ヒト用赤外線体温計の物温測定モードにより得られた背部皮膚温度から 30-40°C の直腸温度も推定可能になると考えられた。そのため、体温を指標とする人道的エンドポイント設定は実現可能であることが期待された。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし