

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
分担研究報告書

「使用動物数の削減」のための考え方の整理、提案

研究分担者 小木曾昇 国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 室長
研究代表者 山海 直 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 研究員

研究要旨

2019年に「動物の愛護および管理に関する法律」の一部改正が行われ、動物の適正飼養のための規制等が強化された。同法の附則において、第9条3項には動物が科学上の利用に供される場合における「動物を供する方法に代わり得るもの利用すること（代替法の利用,Replacement)」、「その利用に供される動物の数を少なくすること（使用動物数の削減,Reduction)」等による動物の適切な利用のあり方について検討を加えることとされている。

適正な動物実験の実施をさらに推進する上において、厚生労働省の基本指針に基づき、「代替法の利用」および「使用動物数の削減」について、国内外の状況を把握し、具体的な対策や対応が必要不可欠である。

動物実験における「使用動物数の削減」とは、2R（「苦痛の軽減（Refinement）」および「代替法の利用（Replacement）」）が進められる中に結果的につながるものである。「使用動物数の削減」に繋げるための、ARRIVEやPREPAREのガイドラインをはじめとして、国内外の学術集会や論文検索により、「使用動物数の削減」を行うための考え方、使用動物数を決定するまでの研究計画の立案するための論文検索等の情報収集、統計処理を行うための必要なデータ数の算出方法等の調査を行った。

動物実験実施までの情報収集、実験計画の立案、結果の評価が適正であること、すなわち動物実験の質が高いほど「使用動物数の削減」の効果が得られると考えられる。

A. 研究目的

動物の愛護および管理に関する法律の第41条には、RusselとBurchにより提唱された「3Rの原則」に基づいて動物実験が実施される。

動物実験における2R（「苦痛の軽減（Refinement）」および「代替法の利用（Replacement）」）から「使用動物数の削減」に繋げるためのPREPAREからARRIVE

への新たなガイドラインの考え方、動物実験を立案するための情報の検索や収集方法、使用動物数の算出方法や統計処理、具体的な実験操作方法（例. 同じ動物を使用したサンプリング、画像処理機器の活用）について考察する他、「苦痛の軽減（Refinement）」の実践方法を紹介する。

また、「使用動物数の削減」に関する国内外の動向を学術集会や論文等で実施状況の

情報を合わせて紹介する。

B. 研究方法

動物実験を立案する段階から実施するまでの流れの中で、「使用動物数の削減」に繋がる方法について情報の検索を行う。具体的には、動物実験計画を立案（デザイン）する際の「使用動物数の削減」を行うための情報の検索や収集とその考え方、使用動物数を決定するまでの統計処理に必要なデータ数の算出方法、動物実験の実施に向けた日常の飼育管理を含めた実験操作方法等を調査した結果を考察した。

動物実験の立案の際の「使用動物数の削減」に関する、国内外で開催された学術集会や研究会等の講演発表や、インターネットによる論文等の情報検索し、それらの資料をもとに比較考察した。

また、動物実験を実施する際の「使用動物数の削減」に繋がる「苦痛の軽減（Refinement）」に関する環境エンリッチメントの実践とその効果について検討した。

C. 研究結果

1. 「使用動物数の削減」の定義と原則

1950年にRusselとBurchにより「3Rの原則」が提唱され、1978年にSmyth¹⁾により定義された。その定義には、人や他の動物の要求を満たす動物実験の全ての操作手順を見直すことが使用動物数の削減に繋がる。また、Festingらは実験動物の使用数を最小限にすることが実験目的を達成するために必要であると述べた²⁾。イギリス医学研究評議会（The UK Medical Research Council）では、実験に使用する動物数が具体的に説明できるように、統計学的に十分な必要最

小限数にすることと定義した。一方、米国政府では、「手順のために選択される動物は、適切な種と品質、および有効な結果を得るのに必要な最小数でなければならない」と原則で述べた。ほとんどの定義は、実験または研究プロジェクト段階での使用動物数削減に焦点を当てた。

2. 「使用動物数の削減」の考え方

「使用動物数の削減」の実現には、動物実験の立案から、「代替法の利用」に関すること、実験動物種、系統、性別、週齢（または月齢、年齢）、実験に使用する匹数、動物実験計画における安楽死までを考慮した「苦痛の軽減」、さらに実際の動物実験を行う上に置ける実験動物福祉に配慮した実験動物の処置、飼養保管（例. 環境エンリッチメント、ハンドリング）等々が、いろいろなレベルにおいて検討を行うことが、削減に向けた直接的な効果または相補的な効果が得られた³⁾。

3. 動物実験の立案

動物を使用した研究の発表・報告に関するガイドラインは20年ほど前から存在するが、発表された科学論文に十分な内容が記載されているとは言えない状況の中で、動物を使用した研究の計画、解析および報告を改善するために、英国3Rsセンター（NC3Rs）の活動としてARRIVE guidelinesが2010年に作成された（資料E-1）。2020年7月には従来のガイドラインの項目を2つに分け、最小要件「ARRIVE Essential 10」と、それを補足する「Recommended Set」とすることで、ジャーナルへの投稿の際に記載内容が段階的に改善されるように配慮されたARRIVE guidelines 2.0が発行された⁴⁾（資料E-2）。

昨今の動物福祉、実験の質、動物実験の再現性が強化される中で、ARRIVE guidelines 2.0 のような 3Rs について具体的に記載されていないガイドラインを補完するための PREPARE guidelines (norecopa) が作成された。PREPARE guidelines は、実験計画のためのガイドラインであり、動物実験の質を決定づける、①動物実験の設計、②動物実験実施者と飼育施設間での協議、③動物実験の品質管理等、3Rs の原則をはじめとする倫理的配慮、苦痛度と成果のバランス、人道的ポイント、動物飼育施設の評価、教育訓練、リスクアセスメント、検疫と微生物モニタリング、安楽死処置、苦痛からの解放、実験動物の再使用または譲渡等が具体的に記載されていた^{5) 6)} (資料 E-3)。

4. 実験動物のデータベースやリソースの活用

研究グループや組織間でデータやリソース(動物、組織、機器など)を共有することが「使用数の削減」に貢献することが可能であった。主な検索先を以下に示す。

① IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium) :

国際標準化されたプロトコールで遺伝子改変マウスの網羅的な表現型解析を行う国際共同研究プロジェクトで、哺乳類の全ての遺伝子機能を解明、カタログ化を行うとともに、詳細な表現型データを伴った疾患モデルマウスを研究者に提供する。

(<https://www.mousephenotype.org/>)

②NBR ; ナショナルバイオリソースプロジェクト

ライフサイエンス研究の基礎・基盤となるバイオリソース(動物、植物、微生物等)

について収集・保存・提供を行う。

(<https://nbrp.jp/about/>)

③MBRDB; メディカル・バイオリソース・データベース

疾患研究のための実験動物、ヒト由来生物資源、疫学研究の所在情報等をデータベース化するとともに、ヒト由来生物資源の政策・倫理に関する情報を公開している。ヒト由来生物資源の利用に関する統合的な情報基盤として、創薬支援研究に資することを目的としていた。

(<https://mbrdb.nibiohn.go.jp/cgi-bin/index.cgi>)

④NCBI (National Center for Biotechnology Information)

米国立生物工学情報センター(NCBI)が公開している解析ツールやデータベースの実践的な使用方法を紹介しているサイト。

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

5. 実験データの情報を最大化する方法

5-1) 実験動物の同一個体の繰り返しサンプリング

動物実験は特定の時点で動物のコホートを淘汰することが多い。実験系によって同じ動物の縦方向の測定を可能にするいくつかの画像診断法の使用、少量で同じ動物の繰り返しサンプリングを可能にする血液のマイクロサンプリング法⁷⁾を紹介した。これらの方法を利用することにより使用する動物数を減らすことは可能になるが、繰り返し使用することによって引き起こされる可能性のある追加の苦痛とのバランスを取る必要があった。

5-2) 画像診断装置

生体を対象にした非侵襲的可視化(イメージング)技術が飛躍的に発展し、マクロからマイクロレベルの測定機器が開発された。マウスやラット等の小動物の生体内構造を非侵襲かつ経時的な変化を捉えることから、解剖学的な画像情報はもとより、機能的にも定量的な評価が可能であるため、「使用動物数の削減 (Reduction)」、「代替法の利用 (Replacement)」、「苦痛の軽減 (Refinement)」といった 3Rs の強力な手法となった。

測定機器には、核磁気共鳴装置 (MRI)、マイクロ X 線 CT、in vivo 蛍光イメージング装置等が一般的に使用されていた。

5-3) マイクロサンプリング法

マイクロサンプリングは、通常、薬物やその代謝物の濃度を測定し、その後、適切なトキシコキネティクス (TK) パラメーターを算出するために、ごく微量の血液(一般的には 50 μL 以下)を採取する手法である。

非臨床試験における TK 試験では、従来、多くの採血量が必要なため、げっ歯類ではサテライト動物の使用が必要であった。しかし、昨今の分析装置の微量サンプルでの測定や感度の上昇により、本手法での評価が可能となってきた。マイクロサンプリングは、主試験群動物での TK 評価が可能となるため、毒性評価値と曝露量を個体ごとに評価できること、また「使用動物数の削減」につながり、動物福祉への貢献 (3Rs) が期待された。

6. 使用動物数の算出(サンプルサイズ)の考え方

実験の多様性から検定方法により計算方法も異なることを想定すると、実際のサン

プルサイズを計算するにはかなり大変であり、手計算やプログラムを組むのは時間と労力を要する。研究計画の立案段階で、統計の専門家に相談することや統計ソフトに頼ることが早道である。

サンプルサイズを決定するには、信頼性の高い実験を行うために実験の前後で分析を行う「検出力分析」が良く使用されていた。「有意水準」、「検出力」、「サンプルサイズ」や「効果量」はサンプルサイズの設計や検出力分析を行うための 4 大因子で、このうち 3 つの因子の値が決まると、残りの 1 つの因子の値が決まる (資料 E-4)。

統計的有意性と生物学的有意性は同じものではない。ただし、統計的および生物学的有意性は、統計的検出力分析を使用して関連付けることができる。テストの統計的検出力は、帰無仮説^(※)が偽である場合に、統計的に有意な結果が得られる確率である。検出力は、サンプルサイズ、有意水準、および効果サイズに比例し、母集団の分散に反比例する。効果量は生物学的有意性の尺度である。これは、帰無仮説によって予測された結果と、テストされている母集団の実際の状態との差である。検出力分析を使用して、母集団に生物学的に有意な差が存在する場合に、実験が統計的に有意な結果を生成する可能性が高いかどうかを判断できる。

サンプルサイズの設計には「有意水準」、「検出力」、「効果量」の値が必要である。有意水準は 0.05 もしくは 0.01 が用いられることが多く、検出力は通常 0.8 に設定される。そのため、実際に算出する必要があるのは効果量だけになる。効果量は過去のデータや予備実験のデータ等から求めておく。同じ検出力を得る場合、効果量が大きい場

合には標本サイズは小さくてよく、一方で効果量が小さい場合には標本サイズは大きくなければならない。

実験後は、その実験によってどの程度 of 効果があったのかを知るために検出力分析を行う。検出力分析には「有意水準」、「効果量」、「サンプルサイズ」の値が必要である。これにより P 値が真に効果があったためのものなのか否かという本来のもつ意味を知ることができる。また、追加実験を行う際の参考にもなる。

(※) 帰無仮説とは、通常検定を行うときに立てる仮説で、比較する母集団の間には差はなく、観察された差は偶然にすぎないという仮説。

7. 「苦痛の軽減」に配慮した「使用動物数の削減」をめざした実践

7-1) 実験動物における痛みの判定方法

ヒトの痛みは主観的な感覚であり、実験動物と比較すると痛みの定義は難しい。哺乳動物における痛みは、普遍的なものであると考えられており、闘争を避けるためのメカニズムの一つとして考えられていた。実験動物の痛みの程度を臨床的に判定するためには、動物の動作を観察すればわかりやすいが、マウスやラットの表情から痛みの程度を読み取る尺度「グリマス・スケール (Grimace Scale)」が Mogil らにより開発された⁸⁾。

開発された尺度は、目の細め方、鼻の膨らみ、ほおの膨らみ、目の動き、ひげの動きの 5 つの要素に着目している (資料 E-5)。

7-2) 「苦痛の軽減」のための具体的な評価 (ストレス性ホルモン)

ストレスの生理的な評価方法として、副

腎皮質から分泌される糖質コルチコイドはストレスの指標とされていた。しかし、採血によるストレスを排除することは難しく、ホルモンの血中濃度の変動をストレスの指標にすることは困難であった。そこで、血液試料以外に尿や糞便、毛髪からコルチコステロン (CORT) の測定が可能になった。

ELISA キットの紹介 :

1. ANG 社

商品名 : Corticosterone ELISA Kit

商品コード : EC3001-1

2. ENZ (Enzo life Sciences, Inc)

商品名 : Corticosterone ELISA Kit

品番 : ADI-900-097

ELISA キットを用いて、マウスの搬入時から環境の馴化まで期間の尿中 CORT 濃度について測定した結果、搬入から 7 日目まで CORT 濃度が徐々に減少し、ストレスの軽減が明らかとなった。(資料 E-6)。

7-3) 「苦痛の軽減」に配慮したデバイスの紹介

動物実験で最も多く用いられているマウスは、系統や週齢 (月齢)、雌雄により飼育ケージ内においてファイティング (闘争) を起こすことがある。また、神経質な系統や雌個体により、妊娠しない、出産しても食殺や育子放棄する例も少なくない。何れの問題を回避するために「苦痛の軽減 (Refinement)」を目的としたエンリッチメントが使用された報告例⁹⁾もあり、「使用動物数の削減」に繋がった。

齧歯類からブタ、サル類にかけて環境エンリッチメントが市販されていた。そこで齧歯類によく使用されるエンリッチメント、

床敷き材(巣作り材)、飼料(形状の異なる)を示した。また、実際に実験動物にエンリッチメントを使用した実験動物施設での実践を報告した(資料 E-7)。なお、エンリッチメント導入時には、動物にとって新規なものとなり、導入することがストレスとなることもあるため注意が必要である。

8. 実験動物のリユース

実験動物により主としてビーグル犬では、プロトコルや実験処置により、リユース(再利用または再活用(**Reutilize**))することが可能であり、実験動物福祉の評価ガイドラインに基づいて実施される。実際に使用する際には、①実験に使用されていない健康な動物、②簡単な実験手技によって使用された動物(例. 血液サンプル)、③適切な理由により、非侵襲的な処置を受けた動物等の何れの条件に満たしたものであった¹⁰⁻¹²⁾。飼育動物の福祉評価ガイドライン:

A guide to defining and implementing protocols for the welfare assessment of laboratory animals: eleventh report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement

<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1258/la.2010.010031>

一方、リユースの中のリフォーミング(**Re-homing**)は海外を中心とした新しい動きであり、動物実験の最後に健康な動物を安楽死させる代替りの方法である。「リフォーミング」または「リトリート」は、動物実験を制限することを目的とした**3Rs**の原則に続くものであった。

D. 考察

動物実験計画を立てる前には、研究目的にあった公開されている学術論文について、実験のサイズや実験方法、実験動物使用数、統計処理を含めた結果について精査する必要があると考えられた。再現性のない学術論文は適正ではない。

「使用動物数の削減」の実現には、**ARRIVE guideline2.0** や **PREPARE guidelines** を参考にして、動物実験の立案から、「代替法の利用」に関する検討、実験動物種、系統、性別、週齢(または月齢、年齢)、実験に使用する匹数、実験データを最大化できるような方法(例. 画像診断装置の使用、マイクロサンプリング法の導入)の検討、動物実験計画における安楽死までを考慮した「苦痛の軽減」の検討、さらに実際の動物実験を行う上に置ける実験動物福祉に配慮した実験動物の処置、飼養保管(例. 環境エンリッチメント、ハンドリング)等々が、いろいろなレベルにおいて削減に向けた直接的な効果または相補的な効果が得られると示唆された。

エンリッチメントによっては、動物種に合わせたデバイスはもとより、系統、性別、年齢(週齢、月齢)により嗜好性が異なること、飼育ケージのサイズ(特に床面積)や形状によりエンリッチメントが障害となる可能性もあること、行動実験に影響することなどの理由から、動物実験に影響することがあるため、「苦痛の軽減」だけでなく「使用動物数の削減」に繋がるため、使用する際には十分に検討が必要であると考えられた。

E. 結論

動物実験には再現性が重要である。

動物実験の実施までには、学術論文や動

物実験に関わるガイドライン等の情報を収集し、実験計画の立案では 3Rs の中の 2Rs（「苦痛の軽減 (Refinement)」および「代替法の利用 (Replacement)」) について検討する。実験の実施の際には、飼養保管を含めて「苦痛の軽減 (Refinement)」に配慮する。以上の動物実験の立案から実施するまで適正に行われれば「使用動物数の削減」に効果が得られると考えられる。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表
1. 論文発表
該当なし

2. 学会発表
該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

参考文献・資料：

- 1) Smyth, D.H. Alternatives to animal experiments. 218p. London : Scolar Press, 1978
- 2) Festing, M.F.W., Lovell, D.P. Reducing the Use of Laboratory Animals in Toxicological Research and Testing by Better Experimental Design. Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological) 1996; 58(1):127-140. <http://www.jstor.org/stable/2346169>.
- 3) de Boo, J., Hendriksen, C. Reduction strategies in animal research: a review of scientific approaches at the intra-experimental,

supra-experimental and extra-experimental levels, Altern Lab Anim. 2005 Aug;33(4):369-77. doi: 10.1177/026119290503300404.

4)ARRIVE guidelines HP;

<https://arriveguidelines.org/>

5)PREPARE guidelines HP;

<https://norecopa.no/PREPARE>

6) Smith, A.J. et al. PREPARE: guidelines for planning animal research and testing, Lab Anim.2018 Apr;52(2):135-141. doi:

10.1177/0023677217724823. Epub 2017 Aug 3.

7)斎藤嘉朗、齊藤公亮,ICH S3A マイクロサンプリングに関する Q&A と関連情報,RSMP Vol.10 No.1, 5-10,(2020)

8) Langford, D., Bailey, A., Chanda, M. et al.

Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. Nat Methods. 2010

Jun;7(6):447-9. doi: 10.1038/nmeth.1455. Epub 2010 May 9.

9) Kaliste, E.K., Mering, S.M., Huuskonen, H.K.

Environmental modification and agonistic behavior in NIH/S male mice: nesting material enhances fighting but shelters prevent it. Comp Med. 2006 Jun;56(3):202-8. PMID: 16774129.

10) Kovalcsik, R. et al. Animal reuse: balancing scientific integrity and animal welfare. Lab Anim (NY). 2006 Oct;35(9):49-53. doi:

10.1038/labani1006-49.

11) Guidelines and Policy for Animal Reuse, Marquette University Institutional Animal Care & Use Committee – IACUC(2017)

https://www.marquette.edu/research-compliance/documents/animal/animal_reuse.pdf

12) Animal Care and Use Committee Policy - Reuse of Research Animals, Florida State University (2014)

項目	推奨
標題	1 論文の内容をできるかぎり正確かつ簡潔に記載すること。
要旨	2 背景、研究の目的(使用した動物種および系統の詳細を含む)、主たる方法、主要な知見、ならびに研究の結論を正確に要約すること。
結言	
背景	3 a. 研究の動機および状況が理解できるように、十分な科学的背景(先行研究に関連する参考文献を含む)を含めること、かつ実験の方法および実験の論理的根拠を説明すること。 b. 使用する動物種および動物モデルがなぜ、どのようにして科学的目的を達成することができるのか、また必要に応じて、当該研究とヒトとの関連について説明すること。
目的	4 当該研究の主目的および副次的目的、ならびに検証しようとする仮説について明確に記載すること。
方法	
倫理的陳述	5 当該研究にかかわる、倫理的審査に関する許可の種類、関連する免許(例:動物(科学実験)法(1986)、および動物のケアと使用に関する国または機関のガイドライン)を明示すること。
研究計画	6 それぞれの実験について、次の項目を含む研究計画の詳細を簡潔に記載すること。 a. 実験群および対照群の数 b. 動物に処置を割り振る際(例:無作為な群分け)および結果を評価する際(例:盲検を実施した場合は、誰がいつ盲検を実施したか)に就かれた、主観的な先入観による影響を最小限にするための措置 c. 実験単位(例:1匹の動物、1群の動物、または1ケージ内のすべての動物) どのようにして複雑な研究計画を実施したかを示すためには、時系列表またはフローチャートが有用であろう。
実験処置	7 実験および実験群(対照を含む)に関して、実施したすべての処置について正確かつ詳細に記載すること。 たとえば、 a. どのように(例:薬剤の処方と用量、投与の部位と経路、使用した麻酔薬および鎮痛薬(薬物の効果を確認する方法を含む)、外科処置、安楽死法)使用した特別な機器の詳細情報(供給業者を含む)を記載すること。 b. いつ(例:時刻) c. どこで(例:ホームケージ、実験室、水浴槽) d. なぜ(例:使用した麻酔薬、投与経路、薬剤の用量などを選択した根拠)
実験動物	8 a. 使用した動物の詳細情報(種、系統、性別、発育段階(例:胎の平均値または中央値および胎の幅)、および体重(例:体重の平均値または中央値および体重の幅)を含む)を記載すること。 b. 関連情報を記載すること。たとえば、動物の供給元、国際的系統名、遺伝子改変の状態(例:ノックアウトまたはトランスジェニック)、遺伝子型、健康および免疫状態、投薬を受けていないことまたは実験に使われていないこと、以前に行われた処置等。

住居および飼養	9 次の項目に関する詳細情報を記載すること。 a. 住居(施設の種類、例:特定病原体フリー(SPF));ケージまたは住居のタイプ;床敷の材料;同一ケージ内の動物数;魚類用水槽の形状および材質等) b. 飼養条件(例:繁殖プログラム、明暗サイクル、温度、魚類のための水質等、飼料のタイプ、給餌・給水方法、環境エンリッチメント) c. 実験前、実験中、または実験後に実施された、福祉に関連する評価および介入
サンプルサイズ	10 a. 実験において使用した動物の総数、および実験群における動物の数を明確に記載すること。 b. サンプルサイズを算出するための詳細情報を含め、どのようにして動物数を決定したか説明すること。 c. 該当する場合は、実験を何回に分けて実施したか明示すること。

実験群への動物の振り分け	11 a. どのようにして動物を実験群に振り分けたか詳細に記載すること(該当する場合は、無作為な群分けまたは群のマッチングを含む)。 b. 異なる実験群の動物の処置や評価を実施した順序を記載すること。
--------------	---

実験の帰結	12 評価した主たる実験の帰結および副次的な実験の帰結(例:細胞死、分子カー、行動の変化)を明確に示すこと。
統計学的方法	13 a. 解析に利用した統計学的方法を詳細に記載すること。 b. 統計処理したデータセットに関して、解析単位を明確に記載すること(例:1匹の動物、1群の動物、1個の神経細胞)。

結果	c. データが統計学的手法の前提を満たしているか否かを評価するために利用した方法を記載すること。
----	--

基本データ	14 実験群に関して、処置または実験の前の、関連する動物の特性および健康状態を報告すること(例:体重、微生物学的状態、ならびに投薬を受けていないことまたは実験に使われていないこと)。(これらの情報は、多くの場合、表にすることができると。)
解析した数	15 a. 解析に使用した各群における動物の数を報告すること。絶対数を報告すること。(例:10/20;50%は不可?) b. 解析に含まれていない動物またはデータが存在する場合には、その理由を説明すること。

結果および評価	16 実施した解析の結果を精度とともに報告すること(例:標準誤差または信頼区間)。
有害な事象	17 a. 重要な有害事象について詳細に記載すること。 b. 有害事象を減少させるためになされた実験プロトコルの修正について記載すること。

考察	
解析/科学的含意	18 a. 研究の目的および仮説、最新の理論ならびに関連する研究成果(文献)を考慮に入れたから結果を解釈すること。 b. 研究の限界(可能性のある先入観の原因、動物モデルの限界、および結果に関連する不正確さを含む)について意見を記述すること。 c. 研究における動物を用いない代替法への置換、動物に対する苦痛の軽減、もしくは動物数の削減(3Rs)に関して、当該実験方法または実験結果の意味するところについて記載すること。

一般化の可能性/外挿	19 ヒトとの関連性を含めて、当該研究の知見を他の動物種または他の器官・器官系に外挿することができるか、およびどのようにして外挿することができるとかについて意見を記述すること。
資金調達	20 当該研究におけるすべての資金源(助成金番号を含む)を列挙し、すべての資金提供者の役割を記載すること。

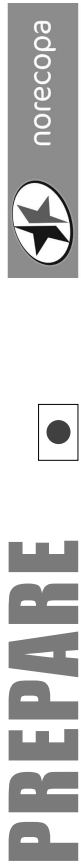
The ARRIVE Essential 10		The Recommended Set	
1	Study design	11	Abstract
2	Sample size	12	Background
3	Inclusion and exclusion criteria	13	Objectives
4	Randomisation	14	Ethical statement
5	Blinding	15	Housing and husbandry
6	Outcome measures	16	Animal care and monitoring
7	Statistical methods	17	Interpretation/scientific implications
8	Experimental animals	18	Generalisability/translation
9	Experimental procedures	19	Protocol registration
10	Results	20	Data access
NC		21	Declaration of interest

• 「ARRIVE Essential 10」 と 「Recommended Set」

The ARRIVE Essential 10

These items are the basic minimum to include in a manuscript. Without this information, readers and reviewers cannot assess the reliability of the findings.

Study design	1	For each experiment, provide brief details of study design including: <ol style="list-style-type: none"> The groups being compared, including control groups. If no control group has been used, the rationale should be stated. The experimental unit (e.g. a single animal, litter, or cage of animals).
Sample size	2	<ol style="list-style-type: none"> Specify the exact number of experimental units allocated to each group, and the total number in each experiment. Also indicate the total number of animals used. Explain how the sample size was decided. Provide details of any <i>a priori</i> sample size calculation, if done.
Inclusion and exclusion criteria	3	<ol style="list-style-type: none"> Describe any criteria used for including and excluding animals (or experimental units) during the experiment, and data points during the analysis. Specify if these criteria were established <i>a priori</i>. If no criteria were set, state this explicitly. For each experimental group, report any animals, experimental units or data points not included in the analysis and explain why. If there were no exclusions, state so. For each analysis, report the exact value of <i>n</i> in each experimental group.
Randomisation	4	<ol style="list-style-type: none"> State whether randomisation was used to allocate experimental units to control and treatment groups. If done, provide the method used to generate the randomisation sequence. Describe the strategy used to minimise potential confounders such as the order of treatments and measurements, or animal/cage location. If confounders were not controlled, state this explicitly.
Blinding	5	Describe who was aware of the group allocation at the different stages of the experiment (during the allocation, the conduct of the experiment, the outcome assessment, and the data analysis).



The PREPARE Guidelines Checklist

Planning Research and Experimental Procedures on Animals: Recommendations for Excellence

Adrian J. Smith¹, R. Eddie Clutton², Elliot Lilley³, Kristine E. Aa. Hansen⁴ & Trond Brattelid⁵

¹Norecopa, c/o Norwegian Veterinary Institute, P.O. Box 750 Sentrum, 0106 Oslo, Norway; ²Royal (Dick) School of Veterinary Studies, Easter Bush, Midlothian, EH25 9RG, UK.; ³Research Animals Department, RSPCA, Wilberforce Way, Horsham, West Sussex, RH13 9RS, UK.; ⁴Section of Experimental Biomedicine, Department of Production Animal Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Norwegian University of Life Sciences, P.O. Box 8146 Dep., 00330 Sjø, Norway; ⁵Division for Research Management and External Funding, Western Norway University of Applied Sciences, 5020 Bergen, Norway.

Translated by Shinya Ayabe⁶ & Satoshi Kunita⁷

⁶Experimental Animal Division, RIKEN BioResource Research Center, Tsukuba, Ibaraki 305-0074, Japan

⁷Center for Experimental Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Tochigi 329-0498, Japan

PREPAREガイドラインは実験計画のためのガイドラインであり、ARRIVEガイドラインに代表される報告のためのガイドラインを補充するものです。

PREPAREガイドラインは大きく3つに分かれており、それぞれが動物実験計画の質を決定づけるものです：

1. 動物実験の設計
2. 動物実験実施者と飼育施設間での協議
3. 動物実験の品質管理

項目によっては、下記に示した順とは異なる順序で取り組んだほうがよい場合があります。また一部の項目は、この3つの要素の複数を満たさなければならない。PREPAREガイドラインのチェックリストは、野外試験といった特殊な実験計画にも対応しています。また、各機関の動物飼育施設で実験を行う場合は施設のカオリチが実験を左右することから、PREPAREガイドラインには飼育施設管理に関する助言内容も含まれています。PREPAREガイドラインの完全版はNorecopaのウェブサイトでご覧下さい。リンクをたどることで世界中の情報にアクセスすることができます。 <https://norecopa.no/PREPARE>

PREPAREガイドラインは、特定の動物種や実験環境に特化した新たなガイドラインや、実験動物科学分野の進展がもたらす最適な手法の導入に対応して、常に最新のガイドラインに更新されます。

項目	推奨される内容
1. 文献検索	<ul style="list-style-type: none"> □ 明確な仮説を立て、得られる主要な結果および副次的な結果について推定する □ システムaticレビュー(体系的な文献検索・分析法)を用いることを検討する □ 利用するデータベースと相対するインフォーマティクスを決め、検索用語のリストを作る □ 使用動物に関して、動物種が妥当であるか、その生物学的特性、最小限の苦痛度を含む実験で科学的疑問を明らかにすることができると、動物福祉の観点から留意すべきこと、を評価する □ 実験計画の再現性と臨床的妥当性を評価する
2. 関係法令の遵守	<ul style="list-style-type: none"> □ 研究を実施する上で遵守すべき動物実験分野や動物輸送、労働安全衛生といった関連する分野の法令、基準、指針などを列挙し、対応方法を検討する。 □ 関係するガイダンス(手引き等)を探し、その内容を認める(プロジェクト評価に関するEUガイダンスなど)
3. 倫理的配慮、苦痛度と成果のパラメータ、および人道的エンドポイント	<ul style="list-style-type: none"> □ 一般向けのサマリー(実験概要)を用意する □ 倫理委員会との協議の中で、このタイプの研究についての審議記録が作成されたことがあるかを確認する □ 3R原則(代替法の利用、使用動物数の削減、実験動物の苦痛軽減)および3S(優れた科学(Good Science)、優れた良識(Good Sense)、優れた判断を下す感性(Good Sensibilities))に取り組み □ 研究計画の事前登録(Pre-registration)やネガティブデータの論文発表について検討する □ 研究を通して実験動物が感じる苦痛や痛みと得られる成果のバランスを検討し、想定しているすべての苦痛や痛みが妥当なものであることを示す □ 教育や研修を目的とした動物実験である場合は、学習・研修目的について議論する □ 実験計画において動物が受ける苦痛度を分類評価する □ 客観的かつ容易に測定可能で明確な人道的エンドポイントを設定する □ 動物の死亡をエンドポイントとする場合は、その妥当性について議論する
4. 実験計画と統計解析	<ul style="list-style-type: none"> □ バイロット実験の実施、検定力の分析、有意水準の設定について検討する □ 実験単位を規定し、使用動物数を設定する □ 無作為化の方法を選択する、観察者バイアスを防止する、データの選択基準や除外基準を設定する

推奨される内容

(B) 動物実験実施者と飼育施設間での協議

5. 実験目的、実験期間、研究資金、役割分担	<ul style="list-style-type: none"> □ 実験を計画する早期の段階で、関係するすべてのスタッフとの打ち合わせを行う □ おおまかな実験期間を提示して、実験準備、動物の飼育、実験手順と廃棄物処理・汚染除去に関する支援の必要性について情報を共有する □ 予想される費用、およびかかる可能性のある費用について提示し、協議する □ 実験計画のすべての段階について、役割と費用の分担に関する詳細な計画を立てる
6. 動物飼育施設の評価	<ul style="list-style-type: none"> □ 飼育施設の実地調査を行い、建物や機材が必要十分なものであるかどうか評価する □ 想定外の事態や非常事態の際の人員計画について打ち合わせを行う
7. 教育訓練	<ul style="list-style-type: none"> □ スタッフの技術や能力を調査し、実験に先立って追加で教育訓練や研修が必要であるか評価を行う
8. 健康リスク評価、廃棄物処理、汚染除去	<ul style="list-style-type: none"> □ 実験を通して直接的または間接的に影響を受ける全ての関係者と動物について、飼育施設と協力してリスクアセスメントを実施する □ 実験計画のすべての段階についてマニュアルやプロトコールが適切なものであるか評価し、必要に応じて新たに作成する □ 実験を通して排出される廃棄物や汚物の保管・汚染除去・廃棄方法について打ち合わせを行う
(C) 動物実験の品質管理	
9. 被験物質と実験手順	<ul style="list-style-type: none"> □ 被験物質についてできる限り多くの情報を提供する □ 実験手順の実施可能性と妥当性、およびそれを実施するのに必要な実験スキルについて検討する
10. 実験動物	<ul style="list-style-type: none"> □ 動物実験の実施ならびに論文作成に必要な使用動物の特性を明確にする □ できる限り余剰動物が出ないようにする
11. 検査と衛生物モニタリング	<ul style="list-style-type: none"> □ 使用動物に関して、推定される健康状態、輸送の際に考慮すべきこと、施設導入時の検査および隔離、微生物モニタリングやその結果が人員計画に影響を及ぼすかどうかについて打ち合わせを行う
12. 飼育環境と飼育管理	<ul style="list-style-type: none"> □ 動物飼育の専門スタッフと協力して、使用動物に特有の習性や必要な配慮などに注意を払う □ 使用動物の順化、最適な飼育条件と飼育方法、環境要因や、それらが実験上の制約を及ぼすかどうか(絶食や単飼育など)について話し合う。
13. 実験手順	<ul style="list-style-type: none"> □ 使用動物の捕獲方法、保定や個体識別方法、実験終了後の措置(本来の生息地に戻す、あるいは新たな飼いで譲渡する)について洗練された手順を確立する □ 被験物質の投与、サンプリング、鎮静・麻酔、外科手術などの実験手法について洗練された手技を習得する
14. 安楽死処置、苦痛からの解放、実験動物の苦痛用または鎮静	<ul style="list-style-type: none"> □ 実験に先立つ早い時期に、法令、基準、指針などの関係法令について助言を求める □ 実験計画および緊急時の安楽死処分方法を設定する □ 安楽死処分を行う可能性のあるスタッフの習熟度を評価する
15. 解剖	<ul style="list-style-type: none"> □ 実施場所や動物・組織サンプルの識別方法を含めた解剖の各手順について詳細な計画を立てる

参考文献

1. Smith AJ, Clutton RE, Lilley E, Hansen KEA & Brattelid T. PREPARE Guidelines for Planning Animal Research and Testing. Laboratory Animals, 2017. DOI: 10.1177/0023567717724823.
2. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. PLoS Biology, 2010; DOI: 10.1371/journal.pbio.1000412.

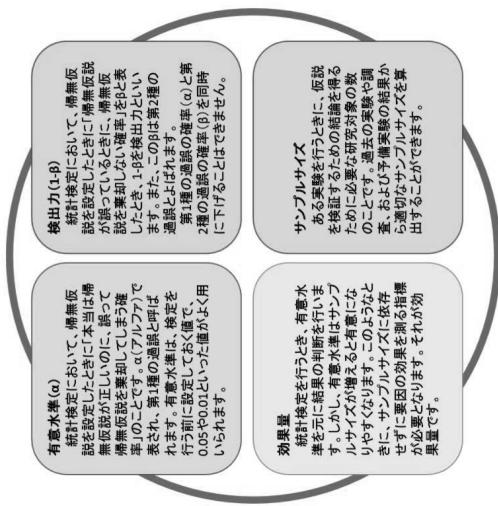
謝辞

本稿日本語へ翻訳した藤部信博博士(理化学研究所ハイオゾン研究センター・実験動物開発室)および園田智博士(自治医科大学・実験医学センター)に感謝する

その他の情報

<https://norecopa.no/PREPARE> | post@norecopa.no | @norecopa

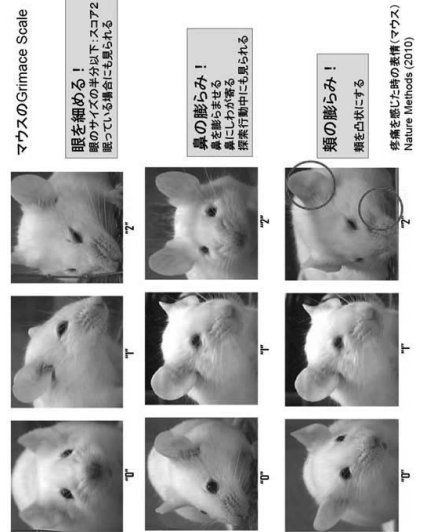
資料E-4 サンプルサイズの設計と検出力分析



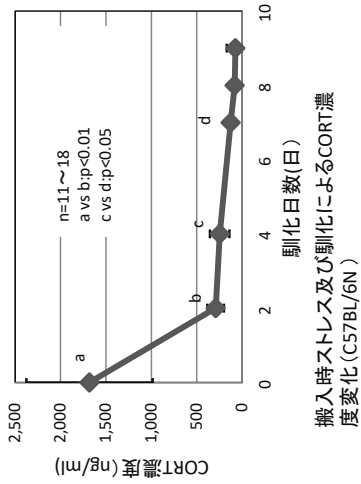
(BellCurve 統計 WEB より引用)

資料E-5 齧歯類の Grimace Scale

<https://www.nc3rs.org.uk/grimacescales>



資料E-6



資料E-7

げっ歯類のエンリッチメント用品例 (市販品)



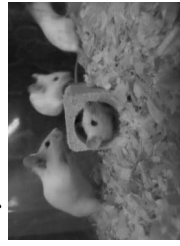
集材例 (市販品)



特殊飼料例 (市販品)



マウス



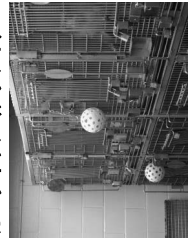
ラット



ウサギ



カニクイザル (アダルト)



カニクイザル (育成個体)



ブタ

