

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 安全実験管理部
研究協力者 岩城 正昭 国立感染症研究所 安全実験管理部・細菌第二部
妹尾 充敏 国立感染症研究所 細菌第二部
田原口元子 国立感染症研究所 安全実験管理部

研究要旨：致死性動物試験における動物福祉の向上を目的として、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定を試みた。そのために、はじめにマウスの体温測定部位の見直しを行い、次に、3つの致死性動物試験（ボツリヌス抗毒素力価試験、破傷風トキソイド力価試験、ジフテリア抗毒素力価試験）において体温変化が死の前兆として認められるか検討した。体温測定部位は直腸温度との相関性から評価し、剃毛が不要な肛門周囲の温度（ $R^2=0.96$ ）と被毛の薄い腹部の温度（ $R^2=0.94$ ）が、昨年度報告した剃毛した体幹背部温度よりも強い正の相関を認めた。そこで、3つの致死性動物試験において、毎日肛門周囲温度の測定と生死の確認を行った結果、ボツリヌス抗毒素力価試験のみマウスが死亡する前日に肛門周囲温度の顕著な低下を認めた。以上のことから、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定は、ボツリヌス抗毒素力価試験において有効であることが示唆された。

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、致死性の動物実験では 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の設定が義務づけられている。一般的な人道的エンドポイントの例は、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等が挙げられる（中井伸子、

LABIO 21. 26-31, 2007）。しかし、急激な病状の悪化では一般的な人道的エンドポイントの指標を適用できない場合がある。そこで、本研究では感染動物実験における人道的エンドポイントとして例示されている体温に注目した（Olfert and Godson. ILAR J. 41:99-104, 2000）。

動物の体温は直腸を測定部位とするが、直腸温度測定には 30 秒前後の時間を要し、多数の動物を使用して実施する動物試験では実効性に乏しい。そこで、昨年度はヒト用赤外線体温計を用い、剃毛した体幹背部温度が直腸温度と高い相関性を示すことを明らかにした。しかし、剃毛作業は一度限りとはいえ時間を要する作業であることか

ら、体温測定法の改良が必要であった。そこで、本研究ではヒト用赤外線体温計を用いた動物の体温測定部位のさらなる検討と致死性動物試験において体温が人道的エンドポイントの指標になり得るかについて、ボツリヌス抗毒素力価試験、破傷風トキソイド力価試験、ジフテリア抗毒素力価試験を対象として検討を行った。

B. 研究方法

体温測定部位の検討

体温計はヒト用非接触赤外線体温計 FS-700 (HuBDIC) と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) を用いた。マウスは国家検定の動物試験で用いられる ddY (6 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。エタノール誘発性低体温実験は先行論文 (Saegusa and Tabata. *J Vet Med Sci.* 65:1365-1367, 2003) に従い、被験群には 4g/kg のエタノール (20w/v% エタノールを 0.75ml/30g 体重)、対照群には 0.75ml の生理食塩水を腹腔に投与して 10 分毎に肛門周囲温度、腹部温度、直腸温度を測定した。

致死性動物試験

ボツリヌス抗毒素力価試験、破傷風トキソイド力価試験、ジフテリア抗毒素力価試験は村山庁舎動物管理区において、生物学的製剤基準に従って実施した。

・ボツリヌス抗毒素力価試験

ボツリヌス毒素とボツリヌス抗毒素を混合して ddY マウス (4 週齢, ♀ ; N=5 また

は 10) に接種し、4 日間の観察期間中、毎日、肛門周囲温度を FS-700 で測定し、生死と共に記録した。

・破傷風トキソイド力価試験

破傷風トキソイドで ddY マウス (5 週齢, ♀ ; N=10) に免疫し、4 週間後にマウスを毒素で攻撃した。4 日間の観察期間中、毎日、肛門周囲温度を FS-700 で測定し、生死と共に記録した。

・ジフテリア抗毒素力価試験

ジフテリア毒素とジフテリア抗毒素を混合してモルモット (Hartley; 225-275g, ♀ ; N=2) に接種し、4 日間の観察期間中、毎日、肛門周囲と耳介表面の温度を FS-700 で測定し、生死と共に記録した。

(倫理面への配慮)

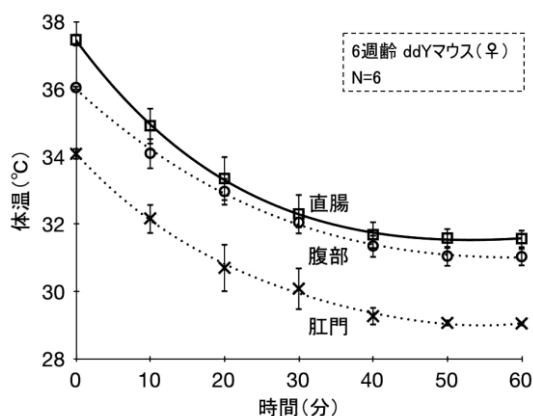
本動物実験は国立感染症研究所動物実験委員会の審査を経て、所長の承認が得られた後に実施した (承認番号 : 119115-II, 118147-III, 118170-II, 120089)。

C. 研究結果

体温測定部位の検討

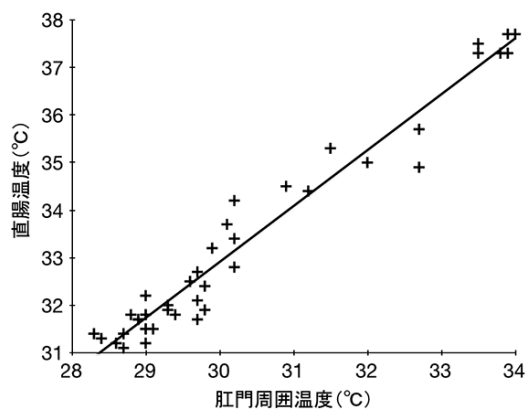
マウスの肛門周囲温度と腹部温度は、FS-700 の物体温度測定モードにより 3 回以上連続測定し、平均的な値を記録した。また、直腸温度は直腸プローブをマウス肛門に挿入して AD-1687 で温度を測定し、温度上昇が停止した時の値を記録した。図 1 は 6 匹のマウスの各測定部位温度の平均値を示し、Y エラーバーは標準偏差を示す。肛門周囲温度と腹部温度は直腸温度と同様の推移を示した。そこで、肛門周囲温度と腹

部温度の何れが直腸温度を推定する上で良好な測定部位であるか明らかにするため、相関係数を Excel (Microsoft) により算出した。



[図1 エタノール誘発性低体温による各測定部位における温度推移]

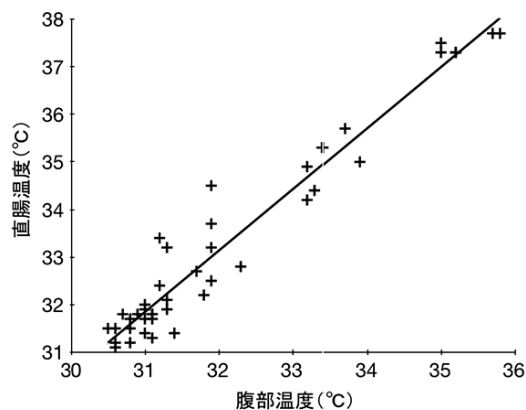
肛門周囲温度と直腸温度をプロットしたグラフ (図2) では、一次式: $y = 1.18x - 2.36$ により肛門周囲温度より直腸温度を推定でき、 $R^2 = 0.96$ と非常に強い正の相関があることが明らかになった。



[図2 肛門周囲温度と直腸温度の相関関係]

同様に、腹部温度と直腸温度をプロットしたグラフ (図3) では、一次式: $y = 1.29x -$

8.05 により腹部温度より直腸温度を推定でき、 $R^2 = 0.94$ と非常に強い正の相関があることも明らかになった。

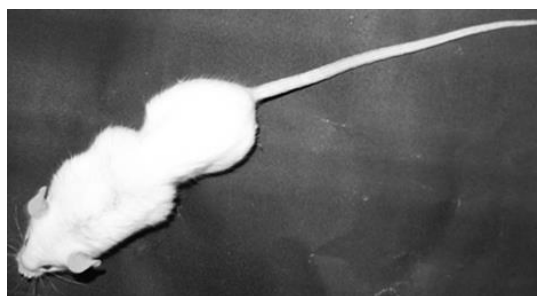


[図3 腹部温度と直腸温度の相関関係]

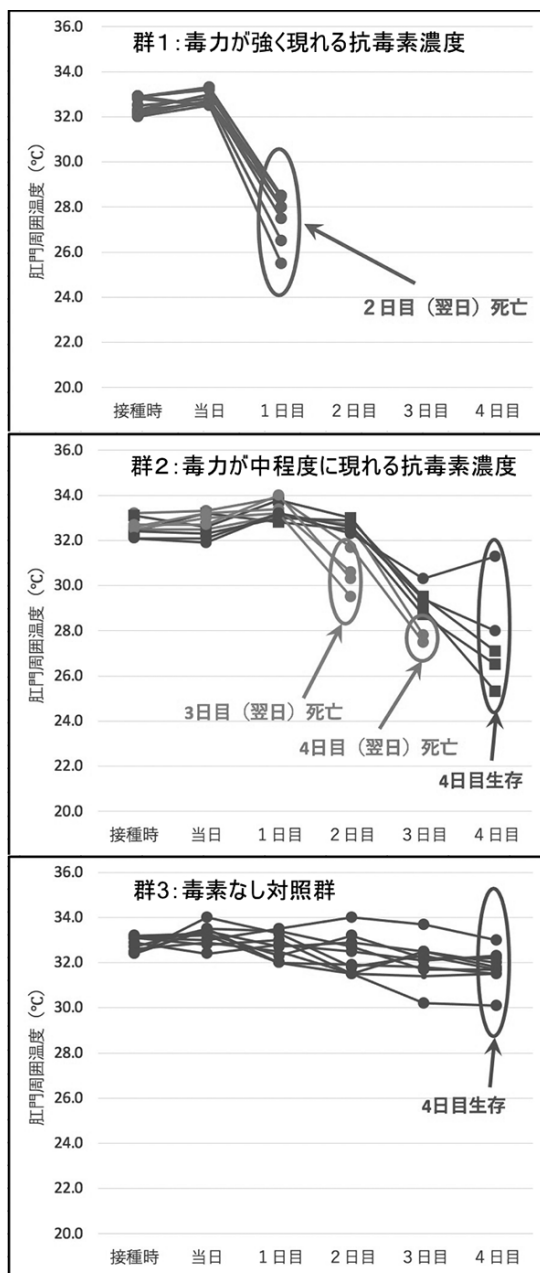
致死性動物試験における動物の体温推移

・ボツリヌス抗毒素力価試験

ボツリヌス毒素で攻撃したマウスは、図4に示すように脇腹の著しい凹みが観察される。試験では毒力が強く現れる抗毒素濃度群、中程度に現れる抗毒素濃度群、毒素を投与していない対照群の3群に分けて肛門周囲温度測定と経過観察を行った。



[図4 ボツリヌス毒素で攻撃したマウス]



[図5 ボツリヌス抗毒素力価試験における肛門周囲温度の推移 (N=5 または 10)]

結果を図5に示す。毒力が強く現れる抗毒素量を投与した群1では、すべての個体で投与翌日に顕著な体温低下を認め、その翌日には全数死亡した。また、毒力が中程度

に現れる抗毒素を投与した群2において、死亡した個体では前日に体温の顕著な低下を認めた。しかし、顕著な体温低下を認めたにもかかわらず生存する個体が半数存在した。

・破傷風トキソイド力価試験

死亡したマウス個体すべてにおいて、死亡前日の肛門周囲温度の変化は認められなかった (データ未収載)。

・ジフテリア抗毒素力価試験

死亡したモルモット個体すべてにおいて、死亡前日の肛門周囲温度の変化は認められなかった (データ未収載)。

D. 考察

致死性動物試験における動物福祉の向上を目的として、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定について検討した。体温測定部位の見直しは、昨年度、先行論文 (Saegusa and Tabata, 2003) で採用されていた剃毛した体幹背部について報告したが、剃毛作業が不評であったために行った。そして、候補として無毛の肛門周囲と毛の薄い腹部を選定した (図1)。ヒト用赤外線体温計の物温測定モードでそれぞれの温度を測定した結果、何れも体幹背部温度と直腸温度の相関 ($R^2=0.85$) よりも高い相関関係 (肛門周囲温度: $R^2=0.96$; 腹部温度: $R^2=0.94$) を示した。従って、肛門周囲または腹部の温度を測定することで、直腸温度を推定することが可能であることが明らかになった。

致死性動物試験はボツリヌス抗毒素力価試験、破傷風トキソイド力価試験、ジフテ

リア抗毒素力価試験を選定して、肛門周囲温度の変化が死の予兆となり人道的エンドポイントの設定に応用できるか検討した。そして、唯一、死の前日に肛門周囲温度の変化を認めたのは、ボツリヌス抗毒素力価試験のマウスで、残る 2 つの試験のマウスまたはモルモットでは肛門周囲温度または耳介温度（モルモットのみ）の変化を認めなかった。このことから、ボツリヌス抗毒素力価試験では肛門周囲温度の測定によって人道的エンドポイントを設定できると考えられた。しかし、文献等を調査したが、体温測定を人道的エンドポイントとして採用した動物試験は確認できなかった。また、毒力が中程度に現れるボツリヌス抗毒素を投与した群では、急激な肛門周囲温度低下が必ずしも死の予兆とはならなかった。そのため、実際にボツリヌス抗毒素力価試験へ体温を指標とする人道的エンドポイントを導入する場合には、その信頼性についてさらに検討が必要である。

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、マウスの体温の簡便な測定方法について検討した。その結果、無

毛の肛門周囲温度と被毛の薄い腹部温度が直腸温度と非常に強い相関を示すことが明らかになった。そこで、3 つの致死性動物試験で肛門周囲温度を指標として人道的エンドポイントを設定することが可能か検証すると、ボツリヌス抗毒素力価試験において、死亡したマウスすべてで前日に著しい体温低下が観られた。従って、ボツリヌス抗毒素力価試験では体温が人道的エンドポイントの指標として機能することが期待された。ただし、体温に基づく動物試験における人道的エンドポイントの設定の先行例は確認できなかったこと、急激な体温低下が必ずしも死の予兆ではなかったことから、その実用化にはさらに検討が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 田原口元子、滝本一広、花木賢一：ヒト用赤外線体温計を用いたマウス体温測定に関する検討. 第 67 回日本実験動物学会総会. 令和 2 年 5 月. 誌上.

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし