

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国家検定の最適化と国際整合化のための研究

分担研究報告書

動物試験に係る 3Rs の検討

研究分担者

花木 賢一 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

研究協力者

村方 好子 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

田原口 元子 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

網 康至 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

米満 研三 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

岡村 智崇 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

滝本 一広 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 安全管理研究センター

岩城 正昭 国立健康危機管理研究機構 検定部

妹尾 充敏 国立健康危機管理研究機構 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨：ボツリヌス抗毒素力価試験においては、長年にわたり死亡を指標とした評価が用いられてきた。しかし、動物福祉の観点から、客観性および再現性に優れた人道的エンドポイントの設定が求められている。本研究では、ボツリヌス毒素を接種したマウスにおける体温変化に着目し、その後の生存転帰をどの程度予測できるか、ならびに人道的エンドポイントとしての妥当性について検討した。R6 年度に実施したボツリヌス毒素接種マウスの体温データを用い、接種後の各時点において ROC 解析を行った。その結果、体温による判別能は接種後 6 時間以降に顕著に向上し、特に 12～15 時間において高い予測精度が認められた。これに基づき、測定時点ごとに最適な体温閾値を算出した。さらに、接種初期における臨床症状スコアを評価した結果、接種後 3 時間時点での症状出現の有無が、その後の生存転帰と関連することが示された。この所見は、体温指標による判定を補完する情報として有用であると考えられた。これらの結果を統合し、評価時点と体温閾値を明確化した、時間経過に応じたモニタリングプロトコルを構築した。また、体温測定手法の妥当性を検証するため、ddY マウスおよび ICR マウスを用いて、非接触赤外線体温計、直腸体温計およびデータロガーによる測定値を比較した。その結果、マウスの系統および性別によらず、各測定手法間で体温の時間的推移は概ね一致し、高い相関が認められた。以上より、体温および臨床症状を組み合わせ、時間経過に応じて評価するモニタリング手法は、ボツリヌス毒素検定検査における客観的な人道的エンドポイントとして適用可能であり、動物福祉の向上と試験の信頼性確保を両立し得ることが示された。

A. 研究目的

動物実験における国際的倫理原則である

「3Rs (Replacement, Reduction, Refinement)」のうち、代替法の利用

(Replacement) および使用動物数の削減 (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位置づけられている。一方、動物実験技術の洗練および動物の苦痛軽減 (Refinement) は義務事項として規定されている。そのため、致死性を伴う動物実験においては、Refinement の観点から、動物を苦痛から可能な限り早期に解放すること、すなわち人道的エンドポイントの設定が求められている。

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%以上の体重減少が認められた場合や、持続的な横臥姿勢またはうずくまり行動が観察された場合などが挙げられる(中井伸子. LABIO 21, 26-31, 2007)。しかし、ボツリヌス抗毒素力価試験、破傷風トキシイド力価試験、ジフテリア抗毒素力価試験などの致死性試験においては、現行の観察方法では動物の死亡を事前に予測することが困難であり、病状が急激に悪化することから、これらの一般的な人道的エンドポイント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の指標として例示されている「体温」に着目した (Olfert and Godson. ILAR J. 41:99-104, 2000)。R7 年度 (2025 年度) は、体温測定を用いた評価手法の確立を目的として、主に以下の 2 点について検討を行った。

1. 「安楽死処分の対象となるマウスを見落とすリスク」および「対象外のマウスを処分するリスク」の低減に向けた検討

体温を指標として人道的エンドポイントを設定する場合、安楽死処分の対象とすべき個体を「見落とすリスク」と、本来処分の対

象ではない個体を「誤って処分するリスク」の両者を最小限に抑えることが重要である。これら相反するリスクの更なる低減の可能性について検討するため、前年度までとは異なる解析手法を用いて体温閾値の再評価を行った。具体的には、ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を用い、各時点における体温データから AUC (Area Under the Curve) を算出した。AUC を指標として体温の判別能を評価し、最適な体温閾値を算出することで、介入判断の精度向上が可能かどうかを検討した。

2. マウスの系統および性別による体温差の検討

体温を用いた評価手法を汎用的に適用するためには、マウスの系統および性別による体温差の有無を明らかにしておく必要がある。そこで、ddY マウスおよび ICR マウスの雄および雌を対象として、背部皮下に埋設するデータロガーを用いた連続的な体温測定を実施した。得られた皮下体温データについて、非接触赤外線体温計による表皮体温測定値および直腸温計による深部体温測定値との関係を比較・検討し、測定手法間の相関性ならびに系統および性別による体温特性の違いについて評価した。

B. 研究方法

1. 「安楽死処分の対象となるマウスを見落とすリスク」および「対象外のマウスを処分するリスク」の低減に向けた検討

R7 年度には、R6 年度に実施したボツリヌス毒素接種試験で取得したデータを用い、データロガーによる連続的な体温測定値および臨床症状の推移を対象として、新たに ROC

解析および AUC 評価を導入し、「対象となるマウスを見落とすリスク」および「対象外のマウスを処分するリスク」の低減に向けた検討を行った。当該データは、4 週齢の雌 ddY マウスを用い、A 型ボツリヌス毒素を 0.03125–10 LD₅₀/0.5 mL の範囲で 13 段階に希釈し、各用量につき 3–5 匹を用いて行った、合計 61 匹の実験から得られたものである。本解析では、R6 年度に設定した体温基準を再評価し、より適切な体温閾値の算出を目的とした。

1) データロガーの埋込みおよび測定スケジュール

毒素接種の 3 日前 (D-3) に、マウス背部皮下ヘデータロガー「nano tag® (キッセイコムテック)」を麻酔下で埋め込み、皮下体温および運動量の記録を開始した。測定間隔は 5 分とし、毒素接種前から接種後最大 7 日間 (D7) まで連続的にデータを取得した。ボツリヌス毒素は D0 に接種し、以降 D1、D2、D3…と経時的に皮下体温および行動変化を追跡した。

2) 症状のスコア化

体温データと並行して、マウスの臨床症状を以下の基準に基づきスコア化した。

スコア	症状レベル	症状の定義
0	–	症状なし (腹部を両側から押した時に強い反発がある)
1	+	弱い症状 (腹部を両側から押した時の反発が弱い)
2	++	やや強い症状 (腹部を両側から押した時に反発がなく、マウスを上から見たときに腹部の陥凹がみられる)
3	+++	強い症状 (マウスが動けな

		い)
4		死亡

これらの症状スコアを体温変化と対応づけて解析を行い、後の介入判断基準および ROC 解析に用いる基礎データとして位置づけた。

体温データを用いた介入判断基準の再評価として、R6 年度に nano tag®により取得した各時点の皮下体温データについて ROC (Receiver Operating Characteristic) 解析を実施した。アウトカムは最終的な生死とし、各時点における体温の判別能を AUC (Area Under the Curve) により評価した。体温の閾値は、感度および特異度のバランスを考慮し、Youden index が最大となる点を基準として算出した。

2. マウスの系統および性別による体温差の検討 “nano tag®と非接触赤外線体温計による測定値の比較”

本実験では、nano tag®を用いて測定した体温と、非接触赤外線体温計および直腸体温計による測定値との関係を明らかにすることを目的とした。系統および性別ごとに、両測定法による体温の相関性を評価するとともに、測定値間に生じる温度差の程度について検討した。

1) 測定条件

ddY マウスおよび ICR マウスを用い、各系統について雄および雌を対象として、以下の 3 条件下で体温測定を実施した。

1. 無処置群

特別な処置を行わず、通常飼育下における体温を測定した。

2. 加温生理食塩水接種群

37℃に加温した生理食塩水を、体重 30 g 当たり 0.75 mL の用量で、無麻酔下に腹腔内接種した。

3. エタノール接種群（体温低下誘発条件）
生理食塩水中 20%（w/v）に調製したエタノール溶液を用い、エタノール量として 4 g/kg（0.75 mL/30 g）を、無麻酔下に腹腔内接種した。

2) 体温測定方法

体温測定は以下の 3 手法により実施した。

1. 直腸温測定
実験動物用電子直腸体温計（直腸体温計）を用いて、無麻酔下で直腸温を測定し、深部体温の指標とした。
2. 非接触赤外線体温計による腹部表皮温測定
非接触型赤外線体温計を用い、無麻酔下で剃毛せずに腹部表皮温を物体温度測定モードで測定した。
3. nano tag® による皮下体温測定
nano tag® を背部皮下に埋め込み、5 分間隔で皮下体温を連続的に測定した。

直腸体温計および非接触赤外線体温計による測定は、投与後 90 分までは 10 分間隔で実施し、以降は投与の 2、3、4、5、6 および 7 時間後に測定を行った。

（倫理面への配慮）

本実験は国立感染症研究所動物実験委員会による審査および所長の承認を得て行った（承認番号 122177-III, 承認番号 125135）。

C. 研究結果

1. 「対象となるマウスを見落とすリスク」

および「対象外のマウスを処分するリスク」の低減に向けた検討

- 1) ROC 解析による体温の判別能評価および最適閾値の算出

R6 年度に nano tag®を用いて取得したボツリヌス毒素接種マウス（n=61）の皮下体温データを用い、接種後各時点（0、3、6、9、12、15、18、21、24 時間）において ROC 解析を行った（図 1、（接種後 3 時間は不掲載）。観察期間中に死亡した個体（「前期死亡：接種後 24 時間以内に死亡」）および「後期死亡：接種後 24～72 時間に死亡」）と最終的に生存した個体を二値分類し、体温による判別能を AUC を指標として評価した。その結果、接種後 0 時間および 3 時間では AUC はそれぞれ 0.48、0.55 と低く、体温による判別能は限定的であった。一方、接種後 6 時間以降では AUC が大きく上昇し、特に 9 時間（AUC=0.92）、12 時間（AUC=0.95）、15 時間（AUC=0.97）では極めて高い判別能が認められた（表 1）。この傾向は 18～24 時間においても維持され、AUC はいずれも 0.93 以上であった。Youden index（感度＋特異度-1）を最大化する点を最適閾値として算出したところ、接種後 12 時間では 33.7℃、15 時間では 34.1℃、18 時間および 21 時間では 33.3℃、24 時間では 33.9℃が最適な体温閾値として得られた（表 1）。特に接種後 15 時間においては、感度 0.96、特異度 0.96、Youden index 0.92 と、最もバランスの取れた判別性能を示した。図 2 に示すように、AUC は接種後 6 時間以降に急速に上昇し、12～24 時間にかけて高値で安定した。一方、最適体温閾値は時間経過とともに徐々に低下し、概ね 33～34℃付近に収束する傾向が認められた。

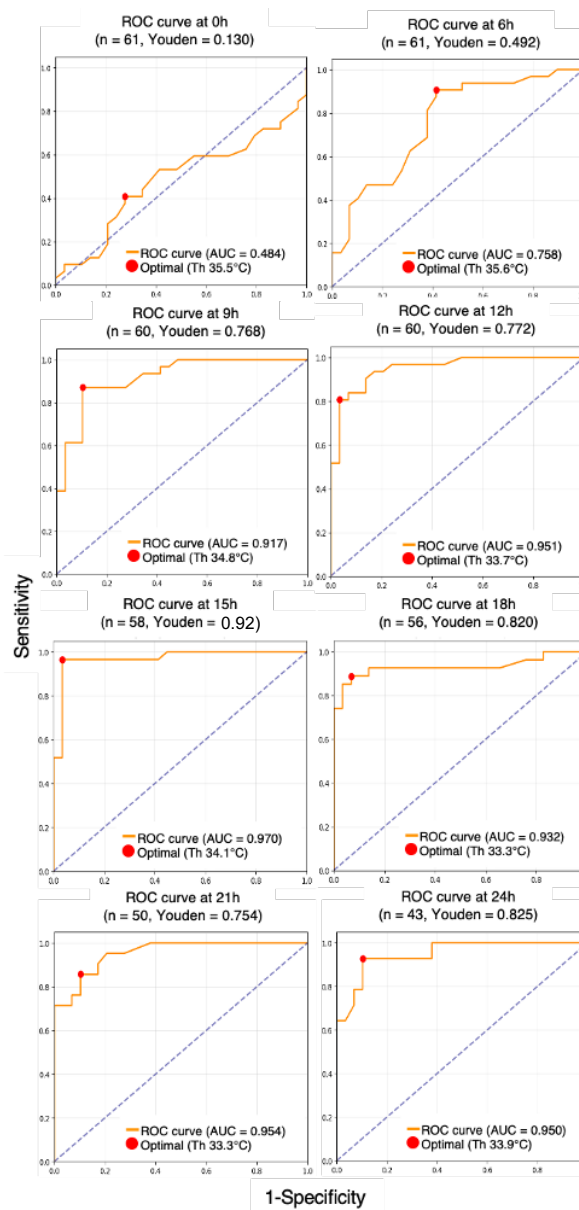


図 1. ROC 解析による体温の時間経過に応じた死亡予測能の評価

Time (h)	AUC	Youden Index	Sensitivity	Specificity	Optimal Cutoff Temp (°C)	p - value
0	0.48	0.13	0.70	0.93	35.5	
3	0.55	0.18	0.22	0.97	35.2	
6	0.76	0.49	0.90	0.55	35.6	< 0.001
9	0.92	0.77	0.84	0.9	34.8	< 0.001
12	0.95	0.77	0.96	0.96	33.7	< 0.001
15	0.97	0.92	0.96	0.96	34.1	< 0.001
18	0.93	0.82	0.90	0.93	33.3	< 0.001
21	0.95	0.75	0.87	0.90	33.3	< 0.001
24	0.95	0.83	0.94	0.91	33.9	< 0.001

表 1. ボツリヌス毒素接種マウスにおける死亡予測のための体温の時間経過に応じた ROC 解

析

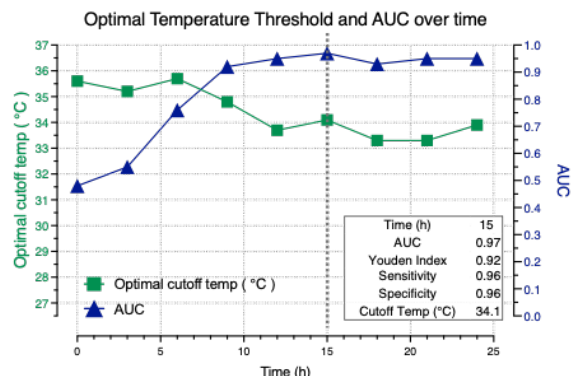


図 2. 最適体温閾値および対応する AUC 値の経時的推移

2) 最適体温閾値に基づく個体分布の可視化

算出された最適体温閾値を用いて、各時点における体温分布と転帰（前期死亡、後期死亡、生存）との関係を可視化した（図 3、接種後 9 時間および 21 時間は不掲載）。接種後 3 時間および 6 時間では、体温分布の重なりが大きく、閾値による明確な分離は困難であった。一方、12 時間以降では、生存個体の体温は高値側に集中し、死亡に至った個体は低体温側に分布する傾向が明瞭となった。特に接種後 15 時間では、最適体温閾値（34.1°C）を境として、生存群と死亡群の分布が比較的明確に分離されており、体温を指標とした介入判断の妥当性が視覚的にも裏付けられた。

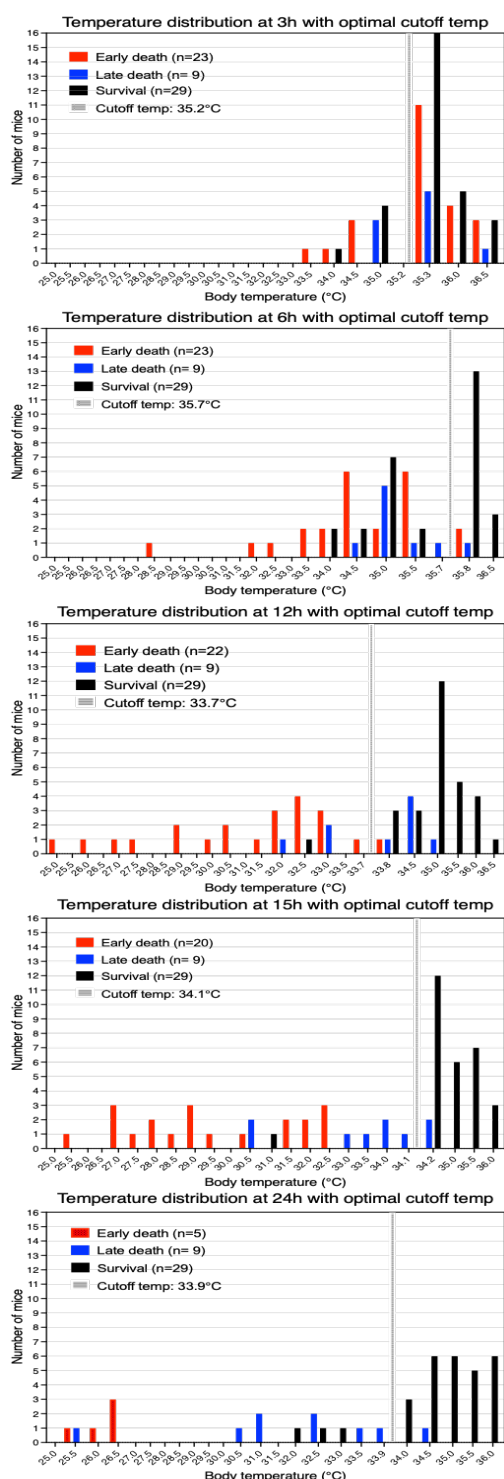


図3. ボツリヌス毒素接種マウスにおける生存転帰に対する体温の時点別予測性能

3) 臨床症状スコアによる転帰予測能の評価

体温閾値による判定において見逃しが生じる可能性を補完する目的で、ボツリヌス毒素接種後の臨床症状についても評価を行った。図4は、臨床症状を5段階スコアとして経時的に評価した結果を示している。毒素接種後3時間の時点で、前期死亡群では腹部触診に対する抵抗低下を特徴とする軽度の症状がすでに認められ、その後、症状は急速に進行し、重度の症状または死亡に至った。一方、同時点において、後期死亡群および生存群では明確な臨床症状は認められなかった。後期死亡群ではその後、時間経過とともに症状が徐々に進行したのに対し、生存群では観察期間を通じて症状の出現はほとんど認められなかった。次に、最終転帰に基づいて生存群または死亡群に再分類し、接種後3時間時点における臨床症状の有無の割合を比較した(図5)。その結果、3時間時点で臨床症状が認められなかった個体の約90%が最終的に生存しており、早期の症状出現はその後の転帰と強く関連していた。これらの結果から、接種後3時間における臨床症状の評価は、予後予測に有用な指標となり得ることが示された。

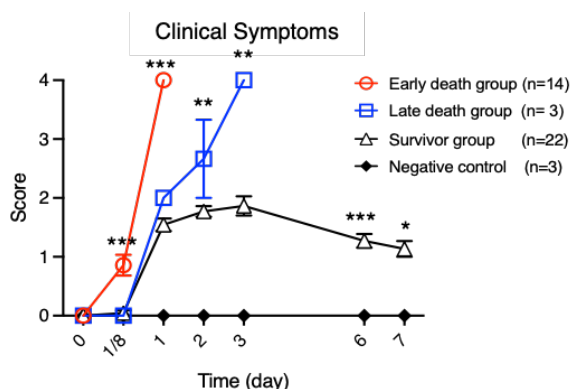


図 4. 5 段階臨床スコアを用いて評価したボツリヌス毒素接種後の症状重症度の経時変化（結果は mean±SEM で示した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ ）

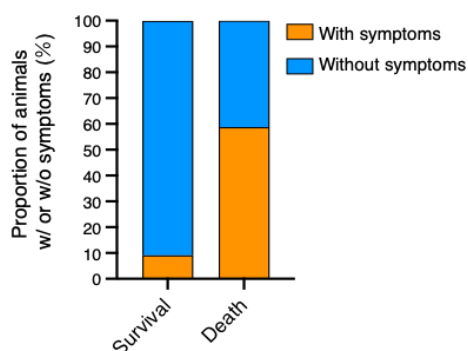


図 5. 接種後 3 時間時点における臨床症状出現個体の割合（生存群・死亡群別）

4) 体温閾値に基づく人道的エンドポイント判定プロトコルの構築

前述の ROC 解析および体温分布解析の結果を統合し、時間経過に応じた体温閾値を用いた人道的エンドポイント判定プロトコルを作成した（図 6）。本プロトコルでは、接種後 6、12、15 および 24 時間を主要な評価時点とし、それぞれに対応する最適体温閾値を設定した。具体的には、接種後 6 時間ではその後の重篤化リスクを示唆する注意基準値として 35.7℃を設定し、12 時間では 33.7℃

を人道的エンドポイントの判断基準とした。さらに、15 時間（34.1℃）および 24 時間（33.9℃）では、後期死亡群を対象とした追加の判定時点として位置づけた。この時間段階的な評価により、従来 72 時間を要していた観察期間を 12～15 時間、あるいは最大 24 時間まで短縮することが可能となった。また、体温という客観的かつ再現性の高い指標に基づくことで、観察者の主観的判断に依存しないエンドポイント設定が可能となった。



図 6. 体温閾値に基づく人道的エンドポイント判定プロトコル

2. マウスの系統および性別の違いを考慮した体温測定手法間の相関評価

1) ddY マウスにおける nano tag®、非接触赤外線体温計および直腸体温計による体温測定値の比較

人道的エンドポイント判定に用いる体温測定手法の妥当性を検証するため、ddY マウスを用いて nano tag® による体温測定値と非接触赤外線体温計による腹部表皮温測定値および直腸体温計による深部体温測定値を比較した。無処置条件、加温生食接種後、

およびエタノール接種による低体温誘発条件の3条件下で体温推移を評価した(図7)。無処置条件下では、いずれの測定手法においても体温は安定して推移し、測定手法の違いによる顕著な体温変動は認められなかった(図7-①)。加温生食接種後においても、体温の時間的推移は各測定手法間で同様の傾向を示した(図7-②)。エタノール接種による低体温誘発条件では、接種後速やかな体温低下およびその後の回復過程が観察され、nano tag® および非接触赤外線体温計による測定値はいずれも直腸体温と同様の時間的推移を示した(図7-③)。定量的には、無処置条件および加温生食接種後の条件において、nano tag® による体温は非接触赤外線体温計による腹部表皮温よりも約0.4~0.6℃高値を示した。一方、両測定値の間には高い相関が認められた(メス： $R^2=0.887$ 、オス： $R^2=0.771$)。

2) ICR マウスにおける nano tag®、非接触赤外線体温計および直腸体温計による体温測定値の比較

ddY マウスで得られた体温測定結果の系統間での再現性を検証するため、ICR マウスを用いて同様の実験を実施した。nano tag® による体温測定値と非接触赤外線体温計による腹部表皮温測定値および直腸体温計による深部体温測定値を、無処置条件、加温生食接種後、およびエタノール接種による低体温誘発条件下で比較した(図8)。ICR マウスにおいても、無処置条件および加温生食接種後の体温は安定して推移し、測定手法の違いによる顕著な体温変動は認められなかった(図8-①, ②)。また、エタノール接種後には速やかな体温低下およびその後の回復

過程が観察され、各測定手法において同様の時間的推移が確認された(図8-③)。定量的には、無処置条件および加温生食接種後の条件において、nano tag® による体温は非接触赤外線体温計による腹部表皮温よりも約1℃高値を示し、両測定値の間には高い相関が確認された(メス： $R^2=0.887$ 、オス： $R^2=0.736$)。これらの傾向は、ddY マウスにおいて観察された結果と一致していた。

3) 手法(nano tag®, 非接触赤外線体温計および直腸体温計)による体温測定値の総合的比較

ddY マウスおよびICR マウスを用いた一連の実験結果を総合すると、直腸体温計、nano tag®, および非接触赤外線体温計による体温測定値は、いずれの測定条件においても概ね同様の時間的推移を示した(図7, 8)。直腸体温計による体温は最も高値で推移した一方、nano tag® および非接触赤外線体温計による測定値も、直腸体温の変動に追従する傾向が認められた。定量的解析の結果、3 手法による体温測定値の間には高い相関が確認され、この相関関係はマウスの系統(ddY, ICR) および性別によらず概ね一貫していた。特に、非接触赤外線体温計により測定した腹部表皮温は、従来検定検査で用いられてきた直腸体温計による測定値と、nano tag® による体温測定値の双方と整合性を有する指標であることが示された。

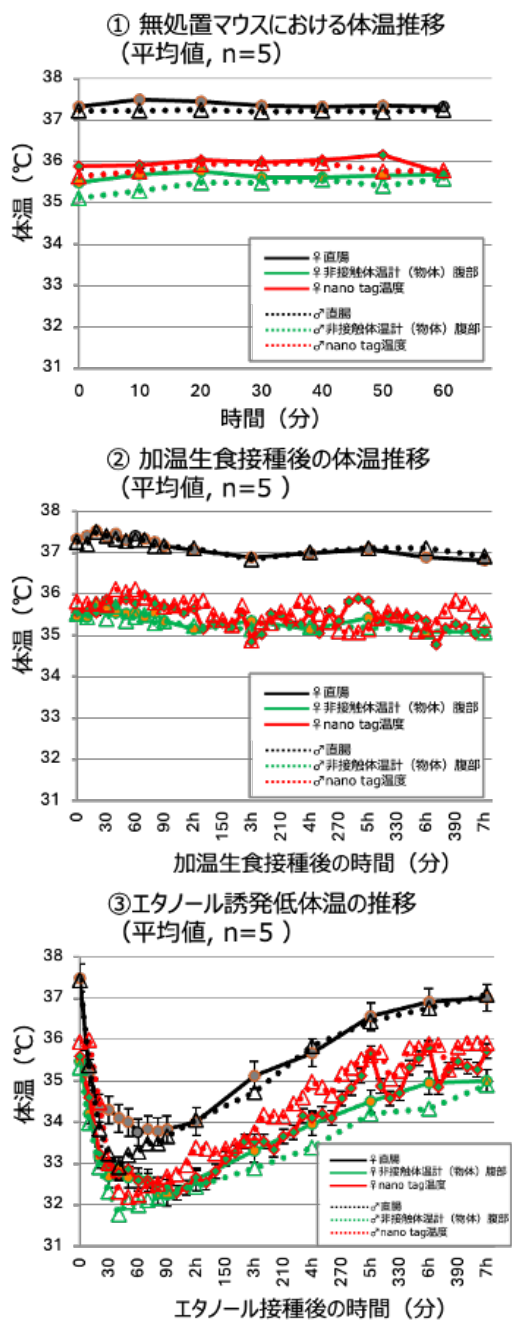


図 7. ddY マウスにおける nano tag®、非接触赤外線体温計および直腸体温計による体温測定値の比較

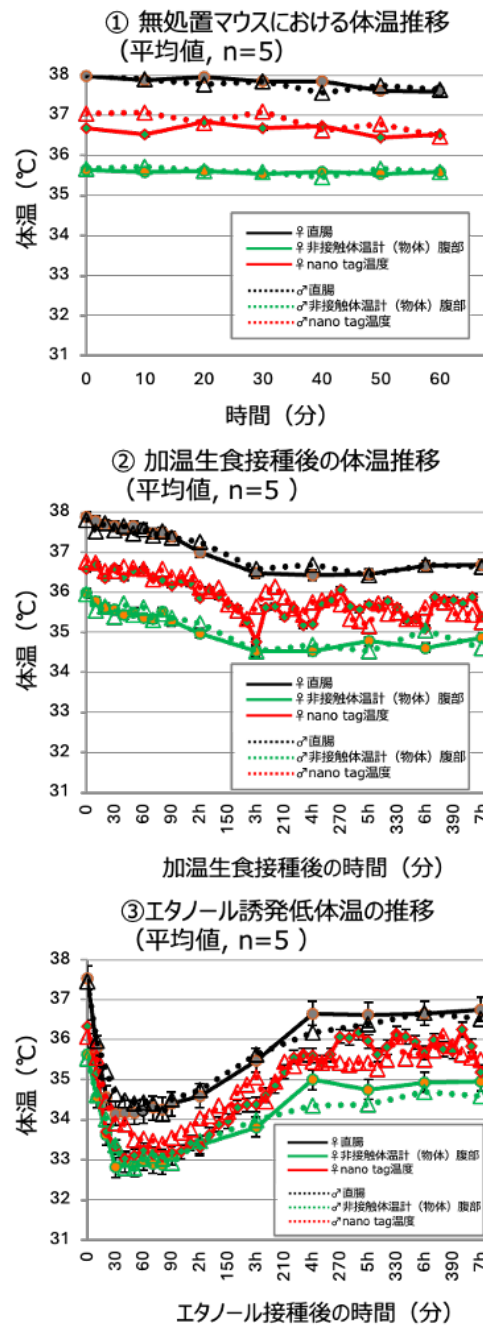


図 8. ICR マウスにおける nano tag®、非接触赤外線体温計および直腸体温計による体温測定値の比較

D. 考察

本研究では、ボツリヌス毒素接種マウスにおける体温変化を指標として、転帰予測および人道的エンドポイント設定の妥当性について検討した。その結果、体温は接種後早期には予測指標としての有用性が限定的である一方、接種後 6 時間以降に判別能が顕著に向上し、特に 12～15 時間において高い予測精度を示すことが明らかとなった。これは、毒素作用の進行に伴い、生理機能低下が一定の時間経過を経て体温変化として顕在化することを示唆しており、体温を用いた客観的評価が有効となる時間帯が存在することを示している。

一方、臨床症状スコアの評価から、接種後 3 時間時点における軽度の症状出現がその後の転帰と関連することが示された。体温閾値による判定は高い精度を示したものの、接種後早期の時間帯では、体温のみを指標とした場合に一部の個体を見逃す可能性を完全に排除することは困難である。この点において、臨床症状の観察を併用することで早期段階における補完的な判断情報が得られ、転帰予測の安全域を拡張できることが示された。

これらの結果を統合し、本研究では、体温閾値および評価時点を明確化した時間経過に応じたモニタリングプロトコルを構築した。本プロトコルは、接種後早期には臨床症状の有無を確認し、その後の時間帯では体温変化を主要な判断指標とする段階的な意思決定の枠組みであり、従来の長時間観察を前提とした評価方法と比較して、より早期かつ客観的な人道的エンドポイント判定を可能とする点に特長がある。

さらに、体温測定手法の妥当性について、ddY マウスおよび ICR マウス、雌雄の別を

含めて検討した結果、非接触赤外線体温計、直腸体温計、および nano tag® による測定値の間に一貫した相関が認められた。特に非接触赤外線体温計は、測定値の絶対差は存在するものの、体温低下および回復過程を適切に反映しており、系統および性別に依存せず体温変動を捉えられることが示された。このことは、非侵襲的かつ簡便な体温測定手法が、従来法と同等の情報を提供し得ることを示唆している。

これらの知見は、体温変化の生理学的理解にとどまらず、検定検査という規制環境下において実際に運用可能な人道的エンドポイントの具体的な枠組みを提示するものである。すなわち、時間経過に応じた体温評価に臨床症状観察を組み合わせることで、早期段階での見逃しリスクを低減しつつ、不要な苦痛を回避する判断体系が成立することを示した点に、本研究の重要な意義があると考えられる。

E. 結論

本研究では、致死動物試験における人道的エンドポイント設定を目的として、ボツリヌス毒素を接種したマウスにおける体温変化および臨床症状について、生存・死亡をどの程度予測できるかを段階的に評価した。その結果、体温は接種後 6 時間以降に高い判別能を示し、特に 12～15 時間において予測精度が最大となることが明らかとなった。一方、接種後 3 時間時点では体温単独での予測には限界があるものの、臨床症状の評価を併用することで、早期段階における補完的な判断が可能であることが示された。また、ddY マウスおよび ICR マウスを用い、雌雄差を含めて検討した結果、非接触赤外線体温計、直

腸体温計、および nano tag® の 3 手法間に一貫した相関が認められた。これにより、非接触赤外線体温計は、簡便かつ低侵襲な体温測定手法として実用的であることが示された。以上より、本研究で提案した体温を指標とした時間経過に応じた人道的エンドポイント判定プロトコルは、試験の科学的妥当性を損なうことなく、動物の苦痛を低減できる実装可能な手法であると結論づけられる。本手法は、検定検査における動物福祉の向上（Refinement）に資する有用なアプローチであり、現行試験への段階的導入や将来的な標準化に向けた基盤となることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表
 - 1) 村方好子，岩城正昭，田原口元子，妹尾充敏，網康至，米満研三，岡村智崇，滝本一広，花木賢一．”ボツリヌス抗毒素力価試験における人道的エンドポイント設定へのアプローチ” 第 168 回日本獣医学会学術集会，宮崎，2025 年 9 月 3 日～9 月 6 日（口頭発表）

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし