

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や国際整合化を目指すための研究

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
	滝本 一広	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苦痛の軽減を目的として、体温低下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。これまでの研究で、致死性動物試験の一つであるボツリヌス抗毒素力価試験では、死亡前日の顕著な体温低下による「日単位」の死亡予測により、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定が有効であることが示唆されている。本研究では、昨年度同様にヒト用赤外線体温計を用いた「時間単位」での死亡予測により苦痛軽減（苦痛を与える時間の短縮）が可能かどうかを検討した。その結果、接種 2.5 時間後から接種 5 時間後までの間に死亡したマウスでは、接種 5 時間後の観察時に生存していたマウス比べて、観察の 2.5 時間前（接種 2.5 時間後）に平均で 4.6℃低い体温を示していた。同様に、接種 5 時間後から翌日の観察時まで死亡したマウスでは、観察時に生存していたマウスに比べて、観察の 13 時間前（接種 5 時間後）に平均で 3.0℃低い体温を示していた。これらのことから、死亡に先立ち体温の顕著な低下が見られることが明らかとなり、「時間単位」でも死亡予測が可能であることが示唆され、苦痛軽減につながると考えられた。

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、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、ヒト用非接触赤外線体温計による簡便なマウスの体温測定法について検討したところ、測温範囲の広い物体温度測定モードで測定した温度はヒト体温測定モードに比べてマウス体温を非常に良く反映すること、肛門周囲、腹部表面の温度により直腸温度を推定できることが確認された。両部位ともに剃毛が不要であり、特に腹部は測定部位の範囲が広いこと、実用性が高いと考えられる。このヒト用非接触赤外線体温計による体温測定法を用い、3つの致死性動物試験で体温変化が死の前兆として認められるか検討したところ、ボツリヌス抗毒素力価試験において、死の前日に顕著な体温低下が認められ、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定が有効であることが示唆された。そこで本研究では、ボツリヌス抗毒素力価試験において、昨年度の「日単位」の死亡予測に引き続き、腹部表面温度の変化による「時間単位」の死亡予測について検討し、苦痛軽減（苦痛を与える時間の短縮）の可否について検討を行った。

B. 研究方法

致死性動物試験

村山庁舎動物管理区において、ボツリヌス抗毒素力価試験の生物学的製剤基準に従って実施した。

さまざまな量の A、B、E、F 型ボツリヌス毒素を含むボツリヌス菌培養液（濾過滅菌したもの）またはさまざまな程度に抗毒素で中和されたそれらの濾液を ddY マウス（4 週齢，♀；80 匹）に腹腔内接種（0.5mL/マウス）した。接種直後、接種 2.5 時間後、接種 5 時間後、接種翌日（18 時間後）に動物を観察して症状と生死を記録するとともに、それ

ぞれの観察時に生存しているマウスについては腹部表面温度を非接触赤外線体温計 FS-700 で測定して記録した。

（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：120046-II）。

C. 研究結果

致死性動物試験における動物の体温推移

ボツリヌス毒素で攻撃したマウスは、図 1 に示すように脇腹の著しい凹みが観察される。さらに症状が進むと死に至る。



図 1. ボツリヌス毒素を接種されたマウス

マウスにボツリヌス毒素を含む検体を接種したのち、経時的に症状と生死を観察すると、早いものでは接種後 2.5 時間の観察で死亡した個体がみられ、その後時間を追うに従ってさらに多くの個体が死亡してゆく。

昨年度は、体温を指標として将来の死亡が予測可能かどうかを、日単位のタイムスケールで検討したが、今年度は時間単位での予測が可能かどうかについて検討した。実験の概要を図 2 に示す。

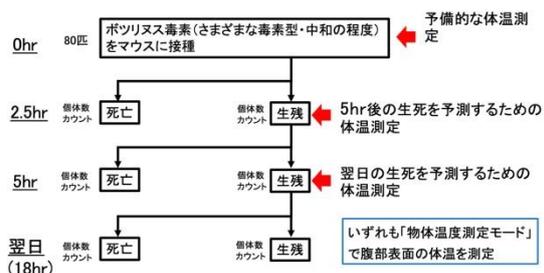


図2. 実験の概要

接種 2.5 時間後の体温と 5 時間後の生死の関係、および接種 5 時間後の体温と翌日の生死の関係を図3に示す。

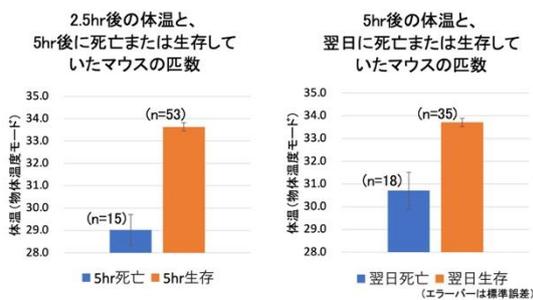


図3. 死亡に先立ってみられた体温の低下

接種 2.5 時間後から接種 5 時間後までの間に死亡したマウスと、接種 5 時間後の観察時に生存していたマウスを比較すると、死亡したマウスは、生存したマウスに比べて、観察の 2.5 時間前（接種 2.5 時間後）に平均で 4.6°C 低い体温を示していた。

同様に、接種 5 時間後から翌日の観察時までの間に死亡したマウスと、観察時に生存していたマウスを比較すると、死亡したマウスは、生存したマウスに比べて、観察の 13 時間前（接種 5 時間後）に平均で 3.0°C 低い体温を示していた。

これらのことから、死亡に先立ち体温の顕著な低下が見られることが明らかになった。

D. 考察

本研究では、ボツリヌス毒素による致死試験における人道的エンドポイントの設定について検討した。昨年度（R2 年度）の「日単位」の死亡予測に引き続き、本年度（R3 年度）は「時間単位」の死亡予測を検討した。80 匹のマウスにさまざまな毒素型・量・中和の程度の毒素を接種して、死亡に先立つ体温の低下について検討したところ、死亡に先立ち明らかな体温の低下が認められた。この結果から「時間単位」でも死亡予測が可能であることが示唆され、苦痛を与える時間の短縮につながると考えられた。

一方で、体温が低下しても死亡しないマウス、体温が低下しないが死亡したマウスが少数ながら存在した。体温低下を指標として、人道的エンドポイントによる安楽死処置を実行した場合、上記のマウスの存在は、実験誤差につながる可能性がある。そのようなマウスの存在が、実験結果に影響するかどうかを今後統計的に検証する必要があると考えられる。

将来的には、メーカーとの共同研究を視野に、体温低下を人道的エンドポイントとした安楽死処置の実用性について考慮してゆく予定である。

E. 結論

死亡前日の顕著な体温低下による「日単位」の死亡予測により、体温を指標とした人道的エンドポイントの設定が有効であることが示唆されたボツリヌス抗毒素力価試験において、「時間単位」での死亡予測が可能かどうか検討した。その結果、死亡に先立って明らかな体温の低下が認められ、「時間単位」でも死亡予測が可能であることが

示唆され、苦痛軽減（苦痛を与える時間の短縮）につながると考えられた。一方で、体温が低下しても死亡しないマウス、体温が低下しないが死亡したマウスが少数ながら存在し、顕著な体温変化が必ずしも死の予兆とはならなかった。体温低下を指標とした人道的エンドポイントによる安楽殺死

処置の実用化には、これらのマウスの存在が試験結果に与える影響の検証等、さらなる検討が必要である。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし