

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
	網 康至	国立感染症研究所	安全実験管理部
	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、死亡前日に顕著な体温低下がみられることから、体温を指標とした「日単位」の人道的エンドポイントの設定が可能であることが示唆されている。また、昨年度の研究ではヒト用赤外線体温計を用いた「時間単位」での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。本研究では、毒素接種後の体温変化についてより正確な情報を得るために、データロガー（“nano tag”、キッセイコムテック社）を用いて毒素接種後の体温・運動量の推移を継続的に測定した。その結果、10LD₅₀ のボツリヌス毒素を接種したマウスでは接種 5 時間後頃から体温および運動量の著しい低下が認められ、運動量の推移から接種 10～11 時間後に死亡したことが推測された。一方、0.01～1LD₅₀ の毒素を接種したマウスでは症状の有無に関わらず、体温・運動量に顕著な変化はなく、接種 7 日目まで生存した。今回の実験では、nano tag により 10LD₅₀ の毒素を接種したマウスでのみ体温低下から死亡までの急速な体温の推移が観察されたが、今後、接種から死亡までの時間が異なる様々な接種濃度における体温変化について情報を得ることで、より正確な人道的エンドポイントの設定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「3Rs」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。また、ボツリヌス抗毒素力価試験において、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たところ、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前兆とはならなかった。そこで本研究では、毒素接種後の体温変化についてより正確な情報を得ることを目的として、データロガー

(“nano tag”、キッセイコムテック社) をマウスの背部皮下に埋め込み、毒素接種後の体温および運動量の推移について継続的な測定を行った。

B. 研究方法

ddY (5-6 週齢♀) マウスを用いて実験を行った。nano tag の体内への埋め込み固定は、3 種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファノールの混合液、1 匹あたり 0.1mL/体重 10 g、腹腔内投与) による麻酔下で行った。マウスの背面の皮膚を切開 (1cm 程度) し、nano tag のアンテナ部分が外側になるように皮下に埋め込んだのちクリップで縫合した (図 1)。装着 2-3 日後、0.01LD₅₀ から 10LD₅₀ の間の 4 段階に希釈した A 型ボツリヌス毒素を腹腔内投与 (2 匹/群、0.5mL/マウス) し、投与直後よりデータロガーにより経時的に体温と運動量を記録し、死亡するまで、あるいは最大 7 日間観察を続けた。死亡に至るまでの症状の変化を記録し、体温の変化と照合することにより、体温低下と症状進行・死亡の関係を解析した。

(倫理面への配慮)

本実験は人道的エンドポイント設定のための知見を得る実験のため、あらかじめ人道的エンドポイントを設定することはできなかった。本実験は国立感染症研究所動物実験委員会による審査、所長の承認を得て行った (承認番号 122177)。

C. 研究結果

致死性動物試験における動物の体温推移

毒素接種後のマウスの運動量と体温の変化を図 2 に示した。10LD₅₀ の毒素を接種した

マウスについては2匹、その他の毒素量を接種したマウスと陰性対照マウスのデータは、それぞれの群より1匹のデータを示した。マウスは活発な運動と休息を周期的に繰り返し（図2の黒縦棒グラフ）、そのパターンは接種した毒素量と関係なくどのマウスでもほぼ類似していた。

10LD₅₀の毒素を接種したマウスは接種後約10-11時間で死亡したと考えられた。死亡に先立ち、接種後5時間前後から著しい運動量の減少が認められた。ボツリヌス毒素による弛緩性の麻痺が運動量の計測値に反映されたと考えられる。運動量の低下とともに6℃以上の急速な体温低下が観察された（図3）。



図1. nano tag を皮下に埋め込んだマウス

一方で、それ以外の毒素量を投与されたマウスは、観察期間を通して生存した。1 LD₅₀の毒素を投与したマウスは中程度の症状を示したが、運動量が大きく損なわれることなく、体温の低下もみられなかった。0.1 LD₅₀、0.01 LD₅₀を投与したマウスは症状をほぼ示さず、運動量、体温とも対照マウスと同様であった。

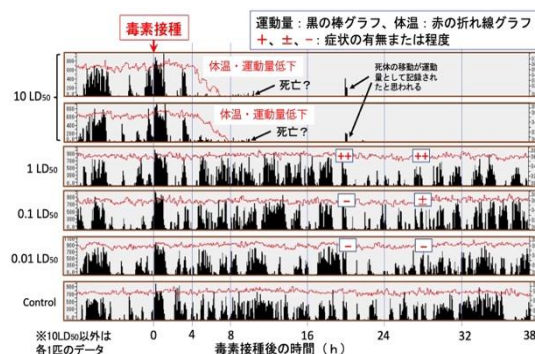


図2.毒素接種後の体温・運動量の推移

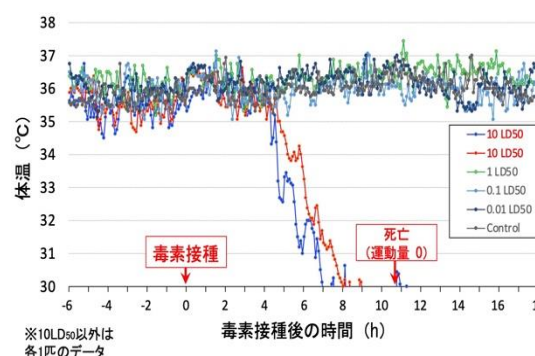


図3.毒素接種後の体温の推移

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。これまでに、「日単位」「時間単位」での死亡予測を検討したが、より正確な死亡予測のためには時間間隔をおいた定点での体温測定では情報が不十分なため、nano tag をマウスの背部皮下に埋め込み、毒素接種後の体温および運動量の推移について継続的に測定した。

10LD₅₀のボツリヌス毒素を接種したマウスでは体温低下から死亡までの急速な体温の推移を観察することができた。一方、0.01～1LD₅₀の毒素を接種したマウスでは症状が認められても死亡しない場合は、体温低下

は観察されなかった。今回の実験では、nano tag により 10LD₅₀ の毒素を接種したマウスでのみ体温低下から死亡までの急速な体温の推移が観察されたが、今後、毒素濃度を変更し、より急速に死亡する場合あるいは死亡までの時間が長い場合の体温変化を測定することで、より正確な死亡予測が可能と考えられた。

また、前年度までの実験において少数存在した「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」は、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、実験誤差につながる可能性がある。そのようなマウスの体温推移を nano tag を用いて観察することができれば、不要な安楽死処置を回避できるような人道的エンドポイントの設定に繋がると思われた。

体温低下を指標として人道的エンドポイントを設定する場合、その体温測定は直腸温度との間に高い相関が認められている非接触型体温計を用いるのが実用的であるため、nano tag により測定された体温と非接触型体温計により測定された体温との相関を調べ、どの程度の温度差が生じているかについても確認する必要がある。

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

これまでに、ボツリヌス毒素による致死試験において「日単位」「時間単位」での死亡予測を検討したが、より正確な死亡予測のためには時間間隔をおいた定点での体温測定では情報が不十分なため、nano tag をマウスの背部皮下に埋め込み、毒素接種後の体温および運動量の推移について継続的に測定した。10LD₅₀ のボツリヌス毒素を接種したマウスでは体温低下から死亡までの急速な体温の推移を観察することができた。一方、0.01～1LD₅₀ の毒素を接種したマウスでは症状が認められても死亡しない場合は、体温低下は観察されなかった。今回の実験では、nano tag により 10LD₅₀ の毒素を接種したマウスでのみ体温低下から死亡までの急速な体温の推移が観察されたが、今後、接種から死亡までの時間が異なる様々な接種濃度における体温変化について情報を得ることで、より正確な人道的エンドポイントの設定につながると思われた。

F. 研究発表 なし

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし