

## 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、死亡前日の顕著な体温低下による「日単位」「時間単位」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、複数のボツリヌス毒素濃度を設定してマウスに接種し、死亡までの時間が異なる場合の体温の推移を **nano tag** で測定して、その情報から人道的エンドポイントの設定を試みた。毒素接種後、毒素濃度により死亡するまでの時間により体温低下の推移が異なったが、毒素接種 22 時間後までに死亡する群と 48 時間後までに死亡する群に分けることで各群の人道的エンドポイントを設定することが可能であった。また、複数回の体温測定により人道的エンドポイントをほぼ適切に適用できることが示唆された。ただし、人道的エンドポイントの対象とすべきマウスの見落としや対象外のマウスに対する人道的エンドポイントの誤適用というリスクがあるため、更にサンプル数を増やしてこのようなリスクを軽減できれば、より正確な人道的エンドポイントの設定が可能と思われた。体温を指標とした人道的エンドポイントの適用はヒト用非接触赤外線体温計を用いて実施することが想定されるが、**nano tag** による測定温度は非接触赤外線体温計（物体モード）と非常に高い相関を示し、**nano tag** の測定温度は非接触赤外線体温計の測定温度より 1℃程度高いことが確認されたため、ヒト用非接触赤外線体温計を用いる場合は、人道的エンドポイントの体温閾値を 1℃下げる必要があると考えられた。

#### 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）。

これまでに、ヒト用非接触赤外線体温計（物体温度測定モード）は直腸体温を非常によく反映し、肛門周囲、腹部表面の温度を測定することにより直腸温度を推定できることが確認されている。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、体温測定の間隔を短くすることにより、ボツリヌス抗毒素力価試験における「時間単位」での死亡予測も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、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ところ、10LD<sub>50</sub>の毒素を接種したマウス

において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。そこで本研究では、複数のボツリヌス毒素濃度を設定してマウスに接種し、死亡までの時間が異なる場合の体温の推移を nano tag で測定して、その情報から人道的エンドポイントの設定を試みた。また、nano tag による継続的な温度測定中に直腸体温も測定して比較し、nano tag による測定温度が直腸温を反映しているのかを確認した。更に、体温を指標とした人道的エンドポイントの適用はヒト用非接触赤外線体温計を用いて実施することが想定されるため、nano tag による測定温度とヒト用非接触型体温計による測定温度との相関性および温度差について比較検討した。

## B. 研究方法

### ボツリヌス毒素接種後の経時的な体温・運動量測定

ddY マウス（4 週齢，♀，N=2）を用いて実験を行った。nano tag の背部皮下への埋め込みは、3 種混合麻酔薬（塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルフェノールの混合液、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）。埋め込み後、nano tag により経時的な体温と運動量の記録を開始した。翌日、0.5LD<sub>50</sub>、1 LD<sub>50</sub>、2 LD<sub>50</sub>、3 LD<sub>50</sub>、4 LD<sub>50</sub> の 5 段階に希釈した A 型ボツリヌス毒素を腹腔内投与（0.5mL/マウス）し、死亡するまで、あるいは最大 2 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。



図1. nano tag を皮下に埋め込んだマウス

### 各種条件下における 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

ddY マウス (6 週齢, ♀, N=5) を用いて実験を行った。体温計はヒト用非接触赤外線体温計 DT-8806H (CEM) と小動物用直腸プローブを取り付けた環境ロガー AD-1687 (A&D) を使用した。マウスの剃毛はせず、ヒト用非接触赤外線体温計 (物体温度測定モード) により腹部皮膚の温度を、環境ロガーにより直腸の温度を 3 種 (無処置、37°C 生理食塩水投与による加温、エタノール投与による低体温誘発) の条件下で測定した。nano tag は上記と同様に背部皮下に埋め込み、5 分間隔で継続的な温度測定を行った。

マウスの加温処置は 37°C に加温した生理食塩水を腹腔内投与 (0.75mL/30g 体重) することにより行い、低体温の誘発は 4g/kg の用量でエタノールを腹腔内投与 (生理食塩水中 16%w/v、0.75mL/30g) することにより行った。各処置後 1 時間までは 10 分ごとに測定、以降は 2, 3, 4, 5, 7 時間ごとに測定した。

(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、所長の承認を得て行った (承認番号 122126, 122177)。ボツリヌス接種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。

### C. 研究結果

#### ボツリヌス接種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 および図 3 に示した。マウスは活発な運動と休息を周期的に繰り返し (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。毒素接種 22 時間後の観察時には 2~4 LD<sub>50</sub> の毒素を接種したマウスおよび 1LD<sub>50</sub> の毒素を接種したマウスのうちの 1 匹の計 7 匹が死亡していた。これらのマウスは接種後約 11-17 時間で死亡したと考えられた。死亡に先立ち、接種 5~6 時間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接種後 10 時間後までに平均 5°C 程度の体温低下が観察された (図 2)。

毒素接種 48 時間後の観察時には 0.5 LD<sub>50</sub> の毒素を接種したマウスおよび 1LD<sub>50</sub> の毒素を接種したマウスのうちの 1 匹の計 3 匹が死亡していた。これらのマウスでは、接種 7 時間後頃から緩やかな体温および運動量の低下が認められ、23~40 時間後に死亡したと推測された。また、接種 22 時間後の観察時には中~強程度の症状が認められた (図

3)。

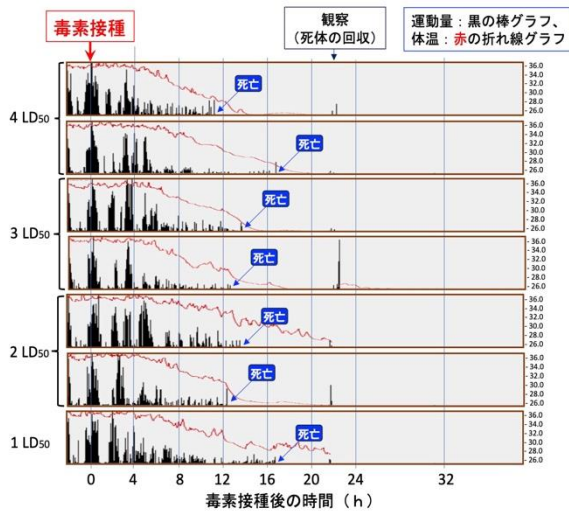


図2. 毒素接種後の体温・運動量の推移 (接種22時間後の観察時に死亡していたマウス)

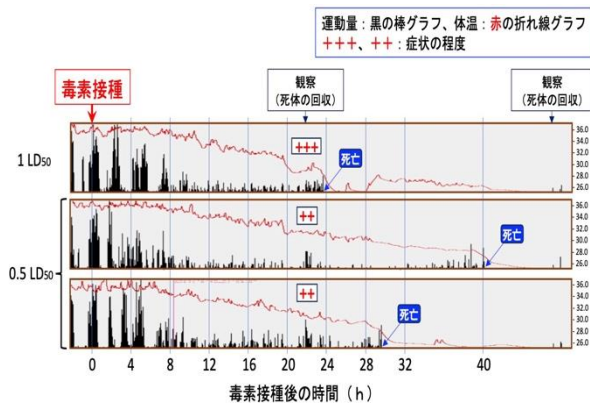


図3. 毒素接種後の体温・運動量の推移 (接種48時間後の観察時に死亡していたマウス)

### 平均体温の推移に基づく人道的エンドポイント設定の試み

今回得られたマウスの体温推移の結果から人道的エンドポイントの設定を試みた。まず接種 22 時間後に死亡していたマウスを「前期死亡群」、接種 48 時間後に死亡していたマウスを「後期死亡群」として各群の平均体温の推移から体温の閾値(人道的エンドポイントの体温)を推測した。両群において、平均体温が 35℃以下になる

と、その後も下がり続ける傾向が認められたが、34.5℃以下になるとその傾向がより強くなったことから 35℃あるいは 34.5℃を体温の閾値として設定可能と推測された(図 4、図 5)。

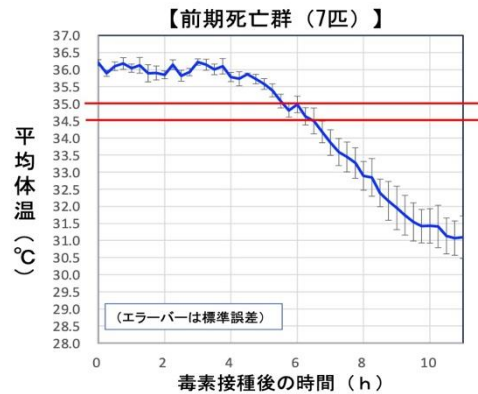


図4. 前期死亡群の毒素接種後の体温推移 (平均値±SE)

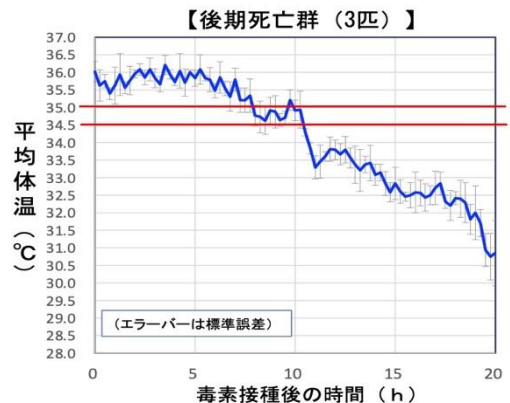


図5. 後期死亡群の毒素接種後の体温推移 (平均値±SE)

体温閾値以下になるタイミング(接種後の時間)が両群で異なっていたため、体温が閾値以下になる各群の匹数を接種後の時間ごとにカウントし、体温を測定するタイミングを検討した。その際、前期死亡群では接種後 11 時間後までに死亡したマウスがいたため、前期死亡群の測定時間は接種後 11 時間以内に設定する必要があることを考慮した。体温閾値を 35℃に設定した場合、前期死亡群は

接種後 8 時間以降では全マウスが閾値以下であったが、後期死亡群でも 11 時間後まででは 1~2 匹が該当し、対象外の多くのマウスを処分してしまうリスクがあると考えられた。体温閾値を 34.5℃に設定した場合、前期死亡群は接種後 8 時間以降では全マウスが閾値以下であったが、後期死亡群でも 11 時間後まででは 1 匹が該当し、対象外のマウスを処分する可能性は残された。体温閾値を 34℃に設定した場合、前期死亡群は接種後時間以降ではほぼすべてのマウスが閾値以下 (8, 9 時間後に各 1 匹が閾値以上) であり、後期死亡群は接種後 10 時間までであれば閾値以下に体温が下がることはほぼなかった (図 6)。

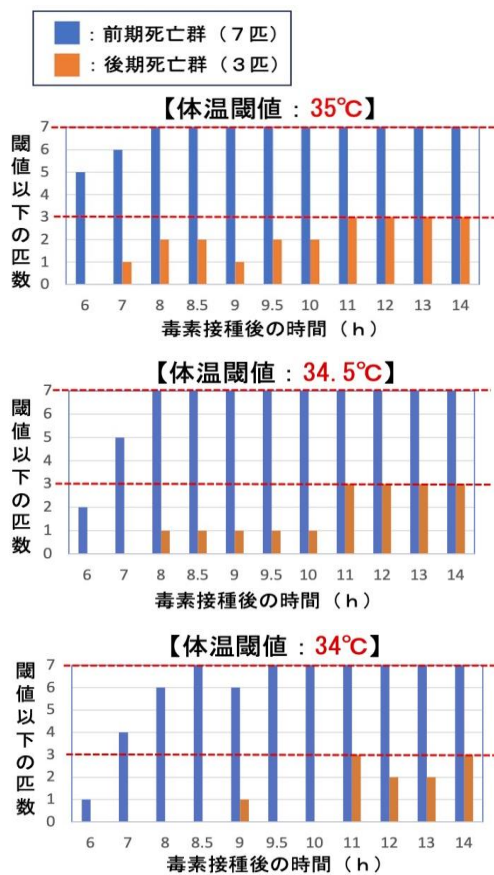


図6. 各毒素接種後の時間における体温閾値以下に達したマウスの匹数

## nano tag、非接触赤外線体温計および直腸体温計による測定温度の比較

各体温計で測定した温度はいずれの条件下でも同様のパターンで推移し、直腸温度、nano tag、非接触体温計の順に温度が高いことが確認された (図 7~9)。

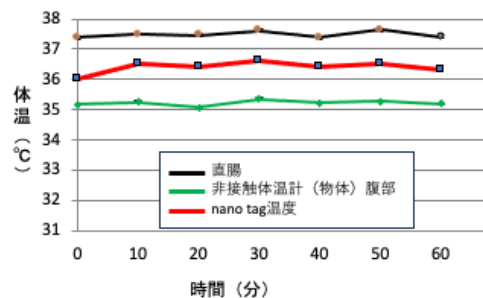


図 7. 無処置マウスの体温推移 (平均値, N=5)

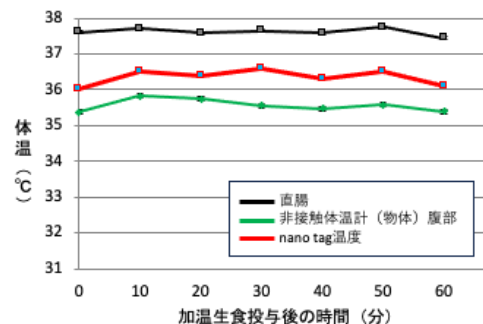


図 8. 加温生理食塩水投与後の体温推移 (平均値, N=5)

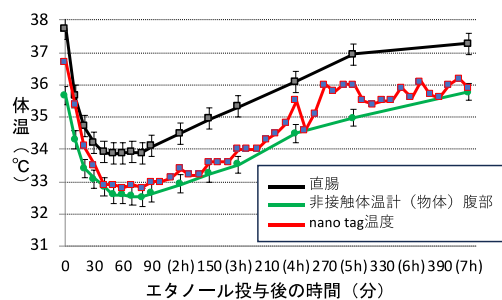


図 9. エタノール誘発低体温の推移 (平均値±SD, N=5)

無処置および加温生理食塩水投与後の温度では、nano tag の温度は非接触体温計の温度より 1℃程度高かった。また、非接触赤外線体温計の温度は、直腸の測定温度より 2



度程度低かった。エタノール誘発低体温 (図 10, 図 11) では、nano tag 温度は、それぞれ直腸温度 ( $R^2=0.94$ ) にも非接触体温計による腹部皮膚温度の物体モード ( $R^2=0.90$ ) にも高い相関を認めた。

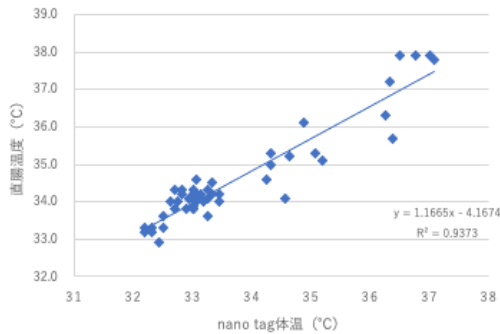


図 10. エタノール投与後の nanotag 温度と直腸温度の相関性 (測定点=50)

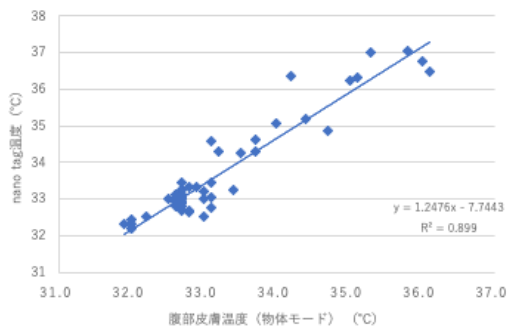


図 11. エタノール投与後の nanotag 温度と腹部皮膚温度の相関性 (測定点=50)

#### D. 考察

本研究では、ボツリヌス毒素による致死的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、体温推移から人道的エンドポイントの設定を試みた。0.5LD<sub>50</sub>、1 LD<sub>50</sub>、2 LD<sub>50</sub>、3 LD<sub>50</sub>、4 LD<sub>50</sub> の毒素を接種したマウスにおいて、接種後 22 時間までに死亡するマウス (前期死亡群) と接種後 48 時間後までに死亡するマウス (後期死亡群) の 2 パターンが認められたため、各群における人道的エンドポイントの設定を試みた。前期死亡群では「接種 8~9.5 時間後の体温が 34°C 以下」または「接種 8~9.5 時間後の体温が 34.5°C 以下」と設定し、後期死亡群では「接種 11 時間以降の体温が 35°C 以下」と設定することができた。しかし、前期死亡群においては人道的エンドポイントの対象とすべきマウスの見落としや対象外のマウスに対する人道的エンドポイントの誤適用というリスクが残された。今後、更にサンプル数を増やしてこのようなリスクを軽減できれば、より正確な人道的エンドポイントの設定が可能と思われる。また、毒素接種後、死亡するまでの時間により体温低下の推移パターンが異なる場合でも、複数回の体温測定を行うことでほぼ適切に人道的エンドポイントを適用できると考えられた。ただし、今回設定した人道的エンドポイントはあくまでも今回得られた体温推移のパターンに限られるものであり、ボツリヌス毒素の種類や濃度によっては今回のパターンに当てはまらない可能性が十分考えられるので、異なる体温推移のパターンについて検証する必要があると思われた。

nano tag による測定温度が直腸温を反映しているのか確認したところ、非常に高い相関を示し、nano tag の測定温度は直腸温より 1°C 程度低いことが確認された。また、nano tag による測定温度は非接触赤外線体

温計（物体モード）とも非常に高い相関を示し、nano tag の測定温度は 1℃程度高いことが確認された。体温を指標とした人道的エンドポイントの適用はヒト用非接触赤外線体温計を用いて実施することが想定される。そのため、nano tag とヒト用非接触赤外線体温計による測定温度に相関性が認められたことは有益な情報であり、ヒト用非接触赤外線体温計を用いる場合でも、体温閾値を 1℃下げることによって nano tag による測定温度に基づいて設定した人道的エンドポイントを適用できると考えられた。

## E. 結論

複数のボツリヌス毒素濃度を設定してマウスに接種し、死亡までの時間が異なる場合の体温の推移を nano tag で測定して、その情報から人道的エンドポイントの設定を試みた。毒素接種後、毒素濃度により死亡するまでの時間により体温低下の推移が異なったが、毒素接種 22 時間後までに死亡する群と 48 時間後までに死亡する群に分けることで各群の人道的エンドポイントを設定することが可能であった。また、複数回の体温測

定により人道的エンドポイントをほぼ適切に適用できることが示唆された。ただし、人道的エンドポイントの対象とすべきマウスの見落としや対象外のマウスに対する人道的エンドポイントの誤適用というリスクがあるため、更にサンプル数を増やしてこのようなリスクを軽減できれば、より正確な人道的エンドポイントの設定が可能と思われた。

体温を指標とした人道的エンドポイントの適用はヒト用非接触赤外線体温計を用いて実施することが想定されるが、nano tag による測定温度は非接触赤外線体温計（物体モード）と非常に高い相関を示し、nano tag の測定温度は非接触赤外線体温計の測定温度より 1℃程度高いことが確認されたため、ヒト用非接触赤外線体温計を用いる場合は、人道的エンドポイントの体温閾値を 1℃下げることが必要だと考えられた。

## F. 研究発表 なし

## G. 知的財産権の出願・登録状況 なし