

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	国立感染症研究所	安全管理研究センター
研究協力者	岩城 正昭	国立感染症研究所	安全管理研究センター・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	安全管理研究センター
	田原口 元子	国立感染症研究所	安全管理研究センター
	滝本 一広	国立感染症研究所	安全管理研究センター
	村方 好子	国立感染症研究所	安全管理研究センター

研究要旨：動物実験における国際的倫理原則 3Rs のうち、致死性実験では 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。従来のボツリヌス毒素試験では、マウスの死亡をエンドポイントとしていたため、動物福祉の向上を図るにはより早期の人道的エンドポイントの設定が求められていた。本研究では、ddY マウスにボツリヌス毒素を接種し、体温推移と症状の進行の関係に着目し体温、運動量、及び症状の程度を経時的に測定することで、人道的エンドポイントとしての適用可能性を検討した。接種後の生存期間に基づき、マウスを「早期死亡群（接種 24 時間以内に死亡）」「後期死亡群（接種 48 – 72 時間の観察時に死亡）」「生存群（観察期間中生存）」の 3 群に分類し、各群の体温推移および症状変化を解析した。早期死亡群は接種 3 – 6 時間後に急激な体温低下が認められ、接種 9 – 21 時間後に死亡していた。後期死亡群では接種 10 – 12 時間後から緩やかな体温の低下が認められた。生存群では、接種 12 時間後までは体温が 35℃以下にならず、接種 30 時間まで 34℃以下に低下しなかった。臨床症状の観察において、死亡したマウスの 58.8%は、接種 4 時間後の時点で「弱い」から「やや強い」症状が観察され、後期死亡群では接種 24 時間後に「やや強い」から「強い」に症状が増強した。また、生存群の 90.9%は、接種 4 時間後の時点では症状が認められず、接種 24 時間後から症状が出現していた。早期死亡群の人道的エンドポイントとして体温 34℃を閾値とし、接種 4 時間後の症状評価を併用しつつ、6 – 7.5 時間後、および、11.5 – 13 時間後で体温測定を行うことが適切であると示された。一方、後期死亡群では体温 34℃、34.5℃を閾値とし、接種 4 時間後およびその後の症状評価を併用しつつ接種 19.5 時間後および、接種 24 時間後に体温測定を実施することで、生存群の誤処分リスクを抑えながら対象個体を適切に識別できる可能性が示唆された。体温推移と症状が死亡時期と関連し特定の閾値を設定することで動物の苦痛を軽減しつつ適切な評価が可能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「3Rs」

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されている。一方、動物実験技術の洗練・苦痛の軽減（Refinement）は義務事項として規定されている。そのため、致死性の動物実験においては、Refinement の観点から動物を苦痛から早期に解放すること（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としては、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・破傷風トキソイド力価試験・ジフテリア抗毒素力価試験などの致死性試験では、現行の観察方法では動物の死を予測することが難しく、急激な病状の悪化により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。

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、複数のボツリヌス毒素濃度を設定してマウスに接種し、死亡までの体温の推移をデータロガー（“nano tag”、キッセイコムテック社）で測定することにより、死亡までの経過時間によって体温低下の推移が異なることが示され、「毒素接種 22 時間後までに死亡する群」と「接種 48 時間後までに死亡する群」に分類することで、それぞれの人道的エンドポイントを設定できる可能性が示唆された。さらに、複数回の体温測定により、人道的エンドポイントを適用できることがほぼ確認された。しかし、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、対象外のマウスへの「誤適用」というリスクは完全には排除できていなか

った。

そこで、本研究では、これまでに設定した条件の検証、サンプル数の増加、複数の段階的な毒素量の接種を行うことで、人道的エンドポイントの見落としや誤適用のリスクを軽減し、より正確な人道的エンドポイントの設定を検討した。

B. 研究方法

ボツリヌス毒素接種後の経時的な体温・運動量測定と症状の観察

本研究では、ddY マウス 計 61 匹（4 週齢，♀，n = 2-10）を用いて実験を行った。

1. nano tag の埋め込み

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+酒石酸ブトルファノールの混合液、1 匹あたり 0.1mL/体重 10g、腹腔内投与）による麻酔下で実施した。マウスの背面の皮膚を約 1cm 切開し、nano tag のアンテナ部分が外側になるように皮下に埋め込み、クリップで縫合した（図 1）。埋め込み後、nano tag により 5 分間隔で経時的な体温および運動量の記録を開始した。

2. ボツリヌス毒素の接種および観察

nano tag 埋め込み 3 日目に、以下の 13 段階に希釈した A 型ボツリヌス毒素を腹腔内投与（0.5 mL/ マウス）した。接種後、死亡するまで、または最大 7 日間観察した。接種毒素量（LD₅₀）：0.03125, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.375, 0.5, 0.625, 0.75, 0.875, 1, 2, 4, 10LD₅₀

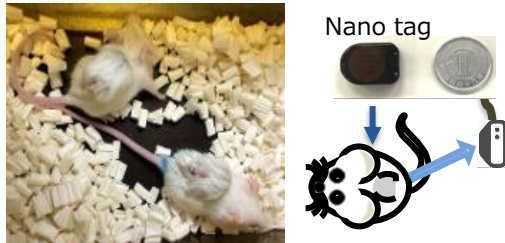


図 1. Nano tag を背部皮下に埋め込んだマウス (4 週齢, ♀)

3. 症状の評価

死亡に至るまでの症状を、以下の 4 段階に分類し記録した。

症状レベル	症状の定義
[-]	症状なし (腹部を両側から押すと強い反発あり)
[+]	弱い症状 (腹部を両側から押すと反発が弱い)
[++]	やや強い症状 (腹部を押したときの反発なし、上から見ると腹部の陥凹が観察される)
[+++]	強い症状 (マウスが動けない) (図 2)

これらの症状記録と体温の変化を照合し、体温低下と症状進行・死亡の関係を解析した。

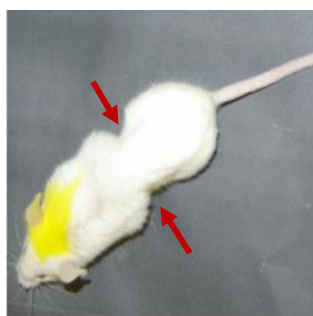


図 2. ボツリヌス毒素攻撃による攻腹部の著しい凹みが観察されたマウス (症状の程度: [+++])。

(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 122177-III)。

C. 研究結果

ボツリヌス毒素接種試験における動物の体温推移と症状の進行

ボツリヌス毒素接種後のマウスの運動量および体温の変化、症状の程度を図 3A-3C 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、接種 24 時間後の観察時には、61 匹中 0.375 – 10 LD₅₀ の毒素を接種したマウス 23 匹が死亡していた (図 3A)。これらのマウスでは、接種 4 時間後に「弱い」から「やや強い」症状が観察され、接種 3 – 6 時間後から急激な体温および運動量の低下が認められ、接種 9 – 21 時間後に死亡したと推測された。接種 48 時間後・接種 72 時間後の観察では、61 匹中 0.25 – 1 LD₅₀ の毒素を接種したマウス 9 匹が死亡していた (図 3B)。これらのマウスでは、接種 10 – 12 時間後から緩やかな体温および運動量の低下が認められ、接種 30 – 60 時間後に死亡したと推測された。また、接種 4 時間後では症状は認められなかったが、接種 24 時間後には「やや強い」または「強い」へと症状が出現していた。接種 7 日後に生存していたマウスの 90.9% が接種 4 時間後の観察時には症状が認められず、接種 24 時間後から「弱い」から「やや強い」症状が出現していた (図 3C、図 4)。これらのマウスでは、接種 24 時間後から緩やかに体温および運動量が低下し、接種 3 日後までは症状が増強した個体も観察されたが、4 日後以降から症状の軽減が認め

られた。接種 3 日後までに生存していたマウスは、その後、症状の回復が認められ観察最終日まで 29 匹が生存した。これらの結果は、接種 4 時間後の時点で症状がなかったマウスの大半が生存していたことを示しており、接種 4 時間後の症状がその後の生存の可能性の予測指標になりうる可能性があることが推測された。

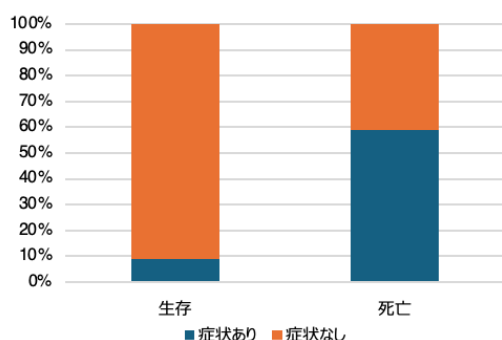


図 4. ボツリヌス毒素接種 4 時間後の症状の有無とその後の生死

平均体温の推移に基づく人道的エンドポイントの設定

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。毒素接種 24 時間後の観察時に死亡していたマウスを「早期死亡群」、接種 48 時間後、接種 72 時間後の観察時に死亡していたマウスを「後期死亡群」、観察期間終了まで生存していたマウスを「生存群」として分類した。各群の平均体温の推移を分析し、人道的エンドポイントとして適切な体温の閾値を推定した。早期死亡群では、接種約 6 時間後で平均体温が 35℃ 以下になると、その後も下がり続け急速に低下していた (図 5: 青)。後期死亡群においては、接種約 9 時間後以降で平均体温が 35℃

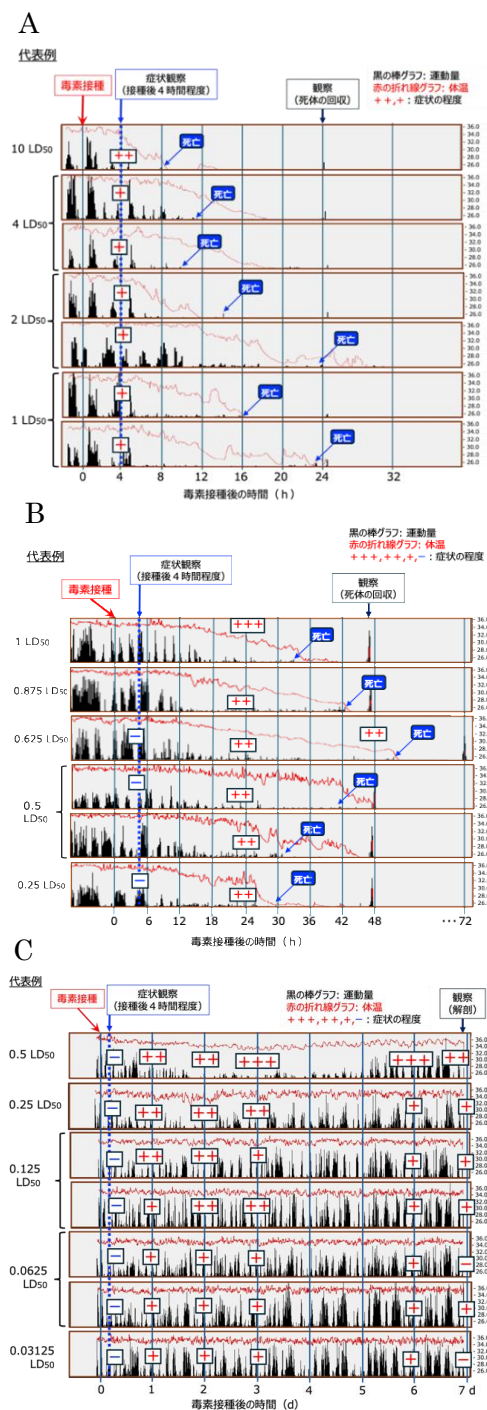


図 3. ボツリヌス毒素接種試験における動物の体温推移 (各群とも代表的なグラフのみを示す)

(A) 接種 24 時間後までに死亡したボツリヌス毒素接種後の体温および運動量の推移と症状、(B) 接種 48 時間後および接種 72 時間後に死亡したボツリヌス毒素接種後の体温および運動量の推移と症状、(C) 接種 7 日目に生存していたボツリヌス毒素接種後の体温および運動量の推移と症状。

以下になり、その後も下がり続ける傾向が認められ、34.5℃以下のなるとその傾向がより増強された(図5:赤)。生存群の平均体温は緩やかに低下したが、接種16時間後までは35℃以下には低下せず、接種25時間後までは34.5℃を下回らず、接種30時間後までは34℃以下には低下しなかった(図5:黒)。各群の平均体温の傾向から、35℃、34.5℃、34℃を体温の閾値として人道的エンドポイントに設定することが可能であると推測された。

体温を測定するタイミングの検証

各群で体温閾値以下になるタイミング(接種後の経過時間)に違いがみられたため、体温が35℃、34.5℃、34℃の閾値を下回る個体数を時間ごとにカウントし、各群(早期死亡群・後期死亡群・生存群)ごとの割合を算出した。この解析により、体温測定の適切なタイミングを検討した。体温閾値を35℃に設定した場合、各群では以下のような傾向がみられた。早期死亡群では接種9時間後以降で95.5 - 100%のマウスが閾値以下となった。接種9 - 13時間後では、後期死亡群では33.3 - 88.9%、生存群では17.2 - 37.9%が該当した(図6A [本報告書末尾])。この結果から、35℃を人道的エンドポイントとする場合、対象外のマウスを不要に処分する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、各群では以下の傾向がみられた。早期死亡群は、接種11.5時間後まででは34.8 - 95.5%が該当し、接種11.5時間後以降では95.5 - 100%のマウスが閾値以下となり、接種24時間後までに死亡していた。後期死亡群では、接種

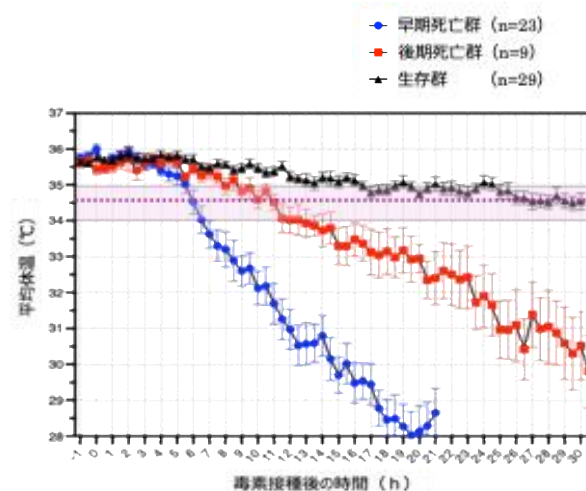


図5. 毒素接種後の早期死亡群(接種24時間後の観察時に死亡したマウス)・後期死亡群(接種48, 72時間後の観察時に死亡したマウス)・生存群(接種後7日生存したマウス)別の体温推移

11.5時間後まででは11.1 - 55.6%、接種11.5 - 19時間後までは55.6 - 88.9%が該当し、接種19.5 - 24時間後までには88.9 - 100%のマウスが閾値以下となった。対象外のマウスを処分するリスクは残された。生存群においては、閾値以下のマウスが接種12時間後までは3.4 - 10.3%であり生存群については対象外のマウスを処分するリスクは低く抑えられていた(図6B)。体温閾値を34℃に設定した場合、各群で以下の傾向がみられた。早期死亡群では、接種11.5時間後に閾値以下のマウスは90%を超え、90.9 - 100%の範囲で推移し、接種20.5時間後以降で100%のマウスが閾値以下を示した。後期死亡群では、接種7時間後までは閾値以下を示したマウスはいなかった。後期死亡群では、接種8 - 13時間後で11.1 - 33.3%、接種14 - 19.5時間後で55.6 - 77.8%、接種23.5時間以降で88.9%のマウスが閾値以下を示した。生存群では、接種16.5時間後までで閾値以下を示したマウスは3 - 10%、接種24時間後までは20%以下であった。この結果から

34℃を人道的エンドポイントとする場合、後期死亡群に対して適応すべきマウスを見落とすリスクはあるが、生存群において不要に処分されるリスクが最小限に抑えられると考えられた（図 6C）。いずれの体温閾値においても、後期死亡群においては、生存群のマウスを除外するために、接種 4 時間後時点の症状、および、その後の症状の出現を確認し、「症状がない」マウスを除外することにより「誤処分」のリスクを減らすことができると考えられた。

R5 年度に報告書で提案した人道的エンドポイントの検証と適応

これまでの研究では、0.5～4 LD₅₀ の毒素量を接種したマウスにおいて、以下のように人道的エンドポイント（体温の閾値）を設定していた。

[R5 年度の基準]

- I. 「毒素接種 22 時間後までに死亡する群」
 - ① 接種 8～9.5 時間後の体温が 34℃以下
 - ② 接種 8～9.5 時間後の体温が 34.5℃以下
- II. 「接種 48 時間後までに死亡する群」
 - ③ 接種後 11 時間以降の体温が 35℃以下

しかし、これらの基準には「対象とするマウスの見落とし」や「対象外のマウスの誤適用」といったリスクが残されていた。そこで、本研究では、より広範な毒素量（0.03125 - 10 LD₅₀）の 13 段階で毒素を接種したマウス 61 匹のデータを、R5 年度の人道的エンドポイントに当てはめて検証した。検証結果を本報告書末尾の図 7 に示した。各グラフ（図 7A-D）では、「R5 年度の基準」を濃い棒グラフで表示している。

I-① の設定では 52.2 - 72.7%（図 7A）、I-② の設定では 60.9 - 90.9%（図 7B）、II-③の設定で接種 24 時間後・接種 48 時間後の観察時に死亡したマウス（II-③-1）では、接種 11 - 18 時間後で 83.3～100%、接種 18 時間以降で 100%（図 7C）、II-③の設定で接種 48 時間後・接種 72 時間後の観察時に死亡したマウス（II-③-2）では、接種 11 - 12 時間後では 66.7%、接種 12.5 時間以降では 66.7-100%（図 7D）であった。生存群においては、I-①では 0-3.4%、I-②では 6.9 - 10.3%、II-③-1 では接種 11 - 16.5 時間後では 24.1 - 44.8%、接種 17 - 21 時間後では 44.8 - 72.4%、II-③-2 では接種 11 - 16.5 時間後では 24.1 - 44.8%、接種 17 - 18.5 時間後では 55.2 - 62.0%を示した。早期死亡群の I-①、I-②の設定では、対象外のマウスを処分する可能性は低い対象となるマウスを見落とすリスクが高かった。反対に、後期死亡群の II-③-1、II-③-2 の設定では、対象となるマウスを見落とすリスクは低い対象外のマウスを処分するリスクが高いことがわかった。

D. 考察

本研究では、ボツリヌス毒素試験における人道的エンドポイントの最適な設定を目的とし、「体温閾値と体温を測定するタイミングの検証」、「R5 年度提案の人道的エンドポイントの検証と適応」、「体温と症状の進行の関係」という 3 つの観点から解析を行った。その結果、「早期死亡群」と「後期死亡群」それぞれに適した体温閾値と測定時間の設定が可能と考えられた。

まず、体温測定のタイミングの検証では今

回の解析で、早期死亡群では、接種 12 時間後以降で 100%のマウスが 34.5℃以下となり（図 6A）、一部のマウスでは接種 3-6 時間後から急激な体温低下し 34℃以下に達することが確認された（図 6C, 7A）。一方、後期死亡群では接種 12 時間前後に 34.5℃以下となる個体が増え、接種 19.5 時間以降で 90-100%の個体が 34.5℃以下に達する傾向が認められた（図 6B）。このことから、早期死亡群では接種 12 時間以内の測定、後期死亡群では接種 12 時間以降の測定が適切であることが示唆された。

次に、R5 年度に提案した人道的エンドポイントの基準をより広範な毒素量で適応し検証したところ、「R5 年度に提案した前期死亡群の基準」では対象となるマウスを見落とすリスクが高く（図 7A, 7B）、「R5 年度に提案した後期死亡群の基準」では生存群の誤処分リスクが高いことが判明した（図 7C, 7D）。特に、「R5 年度の後期死亡群の基準」を適用すると生存群の 55.2-62.0%が処分されるリスクがあることが示され、基準の見直しが必要であることが明らかになった。この結果から、早期死亡群には 34℃の体温閾値の設定が求められ、後期死亡群にはタイミングにより、34.5℃と 34℃を閾値とすることで、生存個体を過剰に処分するリスクを抑えられる可能性が示された。

さらに、体温と症状の進行の関係を分析した結果、接種 4 時間後時点の症状の有無がその後の生存可能性を予測する指標となる可能性が示唆された。早期死亡群では接種後 4 時間の時点で「弱い」から「やや強い」症状が出現し、症状がやや強かったマウス[++]は、接種 3-6 時間後から急激な体温低下が見られ接種 12 時間以内に死亡した（図 3A）。一

方、7 日間生存していたマウスの 90%は接種後 4 時間の時点で症状が見られず、接種 24 時間後に「弱い」から「やや強い」症状が出現していた（図 3C, 4）。このことから、早期死亡群では接種 4 時間時点の症状評価が重要であり、体温測定と組み合わせることで、より正確な人道的エンドポイントの設定が可能であると考えられる。また、後期死亡群では体温低下の進行が緩やかであるため、接種 12 時間以降の測定が適切であることが示された。さらに、後期死亡群においても生存群のマウスを除外するために、接種 4 時間後時点の症状、および、その後の症状の出現を確認し、「症状がない」マウスを除外することにより「誤処分」のリスクを減らすことができると考えられた。

以上の結果を踏まえ、本年度の解析で得られた新たな人道的エンドポイントの基準として、「早期死亡群」においては、体温 34℃を閾値とし、接種 4 時間後の症状評価を組み合わせることで、「接種 6 - 7.5 時間後」および、「接種 11.5 - 13 時間後」での体温測定を行うことが適切であると考えられる。一方、「後期死亡群」においては、34.5℃、34℃を閾値とし、接種 4 時間後、および、その後の症状評価を組み合わせることで、34.5℃では「接種 19.5 時間後」「接種 24 時間後」、34℃では「接種 24 時間後」での体温測定を行うことで、対象となるマウスの見落としを防ぎながら、生存群の誤処分リスクを最小限に抑えることが可能となると考えられた。

E. 結論

本研究では、ボツリヌス毒素接種試験におけるマウスの体温変化を詳細に分析し、人道的エンドポイントの設定を試みた。本研究の

結果から、「早期死亡群」においては「接種 6 – 7.5 時間後 34℃以下」および、「11.5 – 13 時間後 34℃以下」に対して「接種後 4 時間の症状評価」を組み合わせることが適切であると示された。一方、「後期死亡群」においては「接種 19.5 時間後 34.5℃以下」「接種 24 時間後 34℃以下、または 34.5℃以下」に対して「接種 4 時間後時点、および、その後の症状評価」を組み合わせることで、対象となるマウスの見落としを防ぎながら、生存群の誤処分リスクを最小限に抑えることが可能となると考えられた。体温推移と症状が死亡時期と関連し特定の閾値を設定することで動物の苦痛を軽減しつつ適切な評価が可能であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
 2. 学会発表
- 1) Murakata Y, Iwaki M, Senoh M, Taharaguchi M, Ami Y, Yonemitsu Y, Takimoto K, Hanaki K. “Approach to Humane Endpoint Setting in Potency Testing of Botulinum Antitoxins.” 60th Interagency Botulism Research Coordinating Committee (IBRCC) Meeting, Atlanta, GA, 17th - 20th November 2024. (Poster session)

G. 知的財産権の出願・登録状況 なし

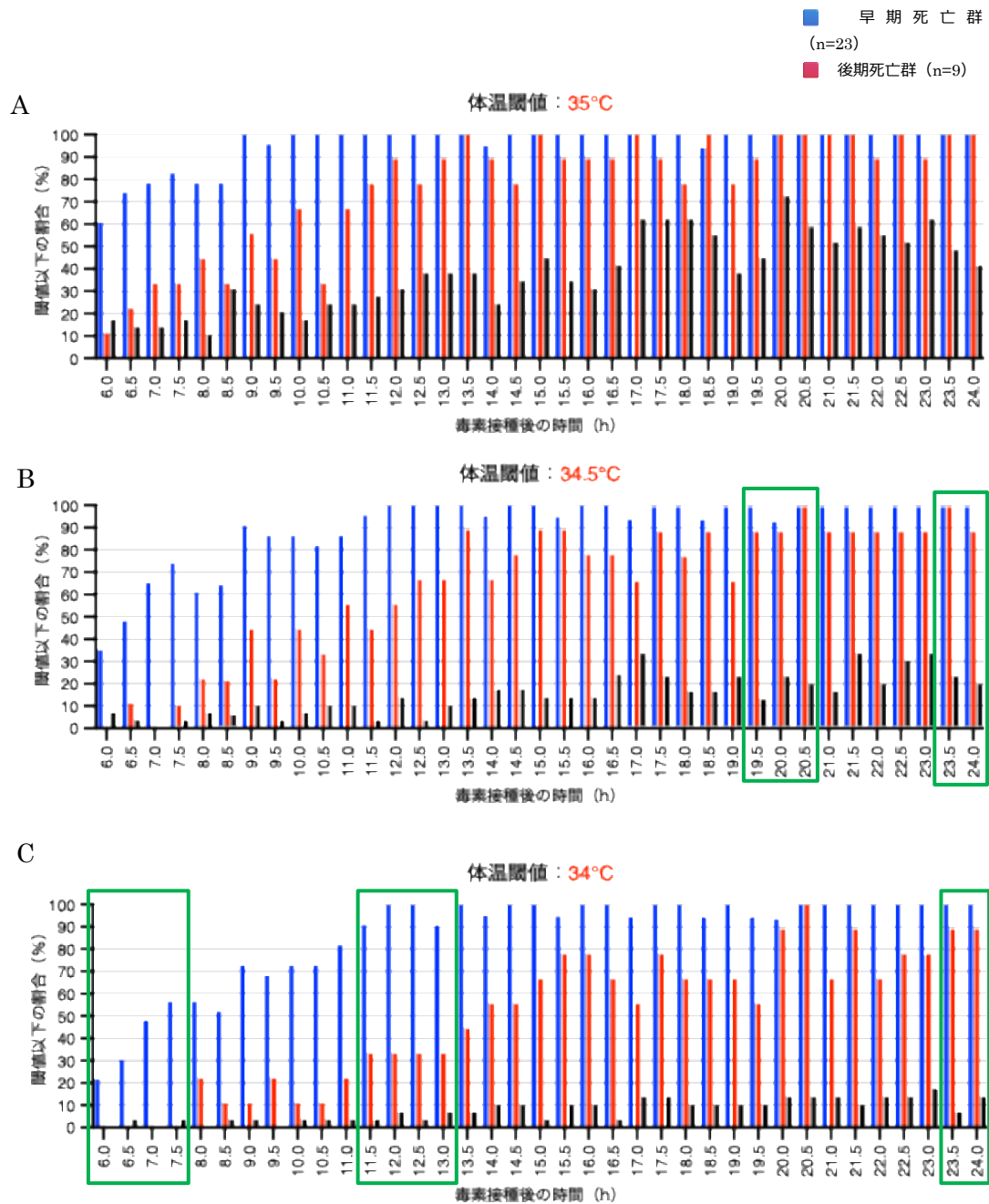
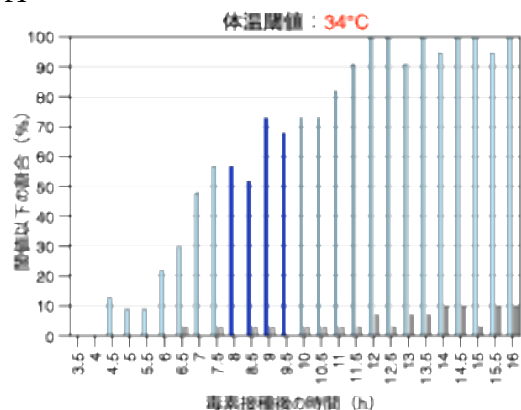


図 6. 各群別ボツリヌス毒素接種後の時間における体温閾値以下に達したマウスの割合 (A) 体温閾値 35°C以下に達したマウスの割合 (B) 体温閾値 34.5°C以下に達したマウスの割合 (C) 体温閾値 34°C以下に達したマウスの割合

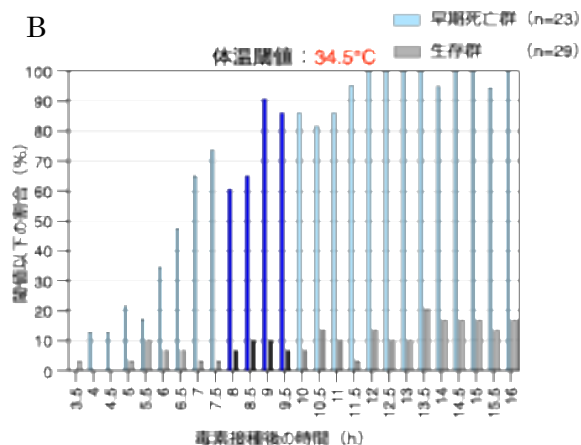
I. 「毒素接種 22 時間後までに死亡する群」
① 接種 8～9.5 時間後の体温が 34℃以下

A



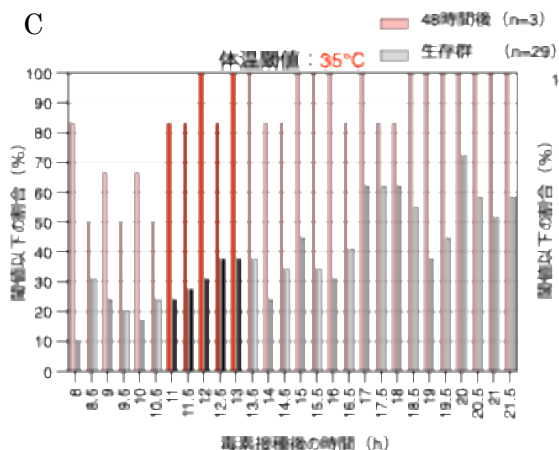
I. 「毒素接種 22 時間後までに死亡する群」
② 接種 8～9.5 時間後の体温が 34.5℃以下

B



II. 「48 時間後までに死亡する群」③ 接種後 11 時間以降の体温が 35℃以下

C



D

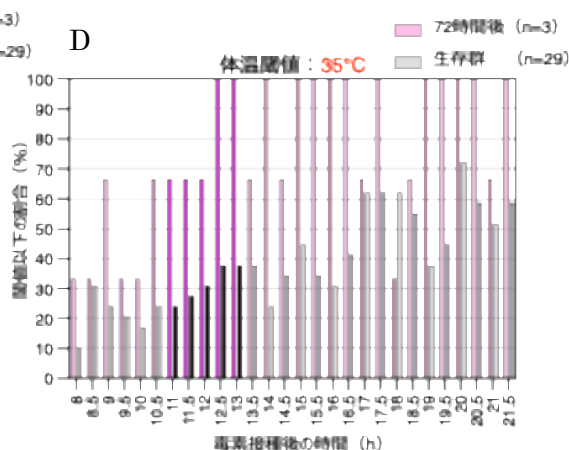


図 7. R5 年度の人的エンドポイント（体温閾値+測定のタイミング）の検証 (A) R6 年度の接種 24 時間後までに死亡した早期死亡群と生存群に対する検証 (B) R6 年度の接種 24 時間後までに死亡した早期死亡群と生存群に対する検証 (C) R6 年度の接種 24 時間後から 48 時間後までに死亡した後期死亡群と生存群に対する検証 (D) R6 年度の接種 48 時間後から 72 時間後までに死亡した後期死亡群と生存群に対する検証（「R5 年度の基準」を濃い棒グラフで表示）