

機関番号：21601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20500375

研究課題名 (和文) 動物実験の人的エンドポイント構築のためのテレメトリー法によるエビデンス集積

研究課題名 (英文) Evidence of humane endpoints for laboratory animals using bio-telemetry method

## 研究代表者

片平 清昭 (KATAHIRA KIYOAKI)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90045774

## 研究成果の概要 (和文)：

テレメトリー法を活用して、マウスやラットにおける各種生理指標（血圧や心電図、体温、自発活動量）の取得を行い、動物実験における人的エンドポイント設定のためのエビデンス集積に努めた。送信器装着自体による生体への負担、麻酔法の比較や環境要因による動物への影響等について検討した。動物実験計画書に反映させるために、取得データからの知見に加えて国内外の関係論文や文献を収集し、苦痛度分類コード表の作製・改善を図った。

## 研究成果の概要 (英文)：

Using a telemetry technique for setting a humane endpoint in animal experiments, we tried to obtain physiological evidence data (blood pressure, ECG, body temperature and spontaneous activity) in mice and rats. Furthermore, related papers and references were collected, advancing the classification of the pain evidence for planning experimentation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：実験動物福祉、人的エンドポイント、苦痛度、ストレス、生理指標

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 適切な動物実験実施に向けて社会的環境が整備された。平成17年に改正された「動物の愛護及び管理に関する法律」では、動物実験に関する国際的倫理原則である3R (Replacement, Reduction, Refinement) の理念が盛り込まれ、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省) が告示された。「研究機関等における動物実

験等の実施に関する基本指針」(文部科学省, 平成18年6月1日告示) により、大学や研究機関では機関の長の責任で機関内規程の策定や委員会の設置等を行うこととなり、Refinement (苦痛の軽減) への具体的な取り組みが必須となった。

(2) 動物に無用の苦痛を与えることを回避し、科学的妥当性をもって実験を中止し終了させる判断基準、すなわち人的エンドポイ

ント (humane endpoint) が必要となる。しかしながら、人道的エンドポイント確立の前提となる実験動物における苦痛の評価方法が困難であることから、実験計画立案に際し必ずしも周知徹底されていない。実験処置によって動物が受ける様々な痛みや苦痛に関して生理学や行動学面からの研究がなされ、北米科学者連盟による苦痛の分類基準 (SCAW の分類) が提示された (Categories of biomedical experiments based on increasing ethical concerns for non-human species. The American Association for Laboratory Animal Science: Consensus recommendations on effective institutional animal care and use committees. Laboratory Animal Science, Special Issue: Effective Animal Care and Use Committees, January, 11-13, 1987)。

(3) 米国をはじめ、我が国の大学を含めた多くの研究機関では、動物に与える苦痛の判断は、この苦痛の分類基準に沿って行われている。しかしながら、個別の実験処置をこの基準に該当させたとしても、人道的エンドポイントの設定となると必ずしも多くの実験者に周知されていない状況にある。

(4) さらに、同じ実験処置が研究機関間で異なる判断のもとに承認され、実施されるような状況は、動物実験に対する社会的信頼を低下させる恐れもある。

## 2. 研究の目的

(1) 人道的エンドポイントの設定に際し具体的かつ客観的根拠が乏しいために、研究者自身によるエンドポイントの設定が困難である。研究機関における動物実験委員会での実験計画書審議過程においても混乱が生じる場合が多い。

(2) 本研究の目的は、適正な動物実験の推進を図る上で実験計画立案者自身が設定する人道的エンドポイントの構築・確立をめざし、マウスならびにラットの各種実験処置に関わる苦痛や瀕死状態の客観的評価根拠 (科学的エビデンス) を追加集積することである。

(3) そのために、無麻酔、無拘束状態における血圧や心拍数を正確に観察測定可能なテレメトリー法 (無線測定法) を活用して、動物の取扱い (ハンドリング) を含めた麻酔や実験処置過程における血圧や心拍数、体温などの生理的指標を測定した。

## 3. 研究の方法

(1) テレメトリーシステムを用いて、マウスおよびラットを対象とする各種実験的知見 (生理的指標) を集積した。使用したテレメトリー測定システムは、Dataquest LabPRO、または Dataquest ART Gold Ver. 4. 2 である。

(2) マウスやラットへの送信器 (表 1) の装着はいずれも所定の注射麻酔やイソフルレン吸入麻酔下で無菌的に行った。

表 1 送信器の規格および特徴

規格・重量(g)	測定指標	対象動物
TA10TA-F20・3.8	体温	ラット (マウス)
TA10TA-F10・1.6	体温	マウス
TA10ETA-F20・3.9	心電図 体温	ラット (マウス)
TA11PA-C10・1.4	血圧	マウス ラット
TA11PA-C40・8.0	血圧	ラット

\*対象動物の ( ) は適用可能な動物種

\*すべての機種で自発活動量も同時取得可能

(3) 腹腔内注射麻酔として、トランキライザー・鎮痛剤の併用によるペントバルビタール麻酔法か、メドトミジン・ミダゾラム・ブトルファノールの 3 種混合注射麻酔法を使用した。吸入麻酔には麻酔器によるイソフルレン吸入麻酔法を用いた。

(4) マウス、ラットのいずれにおいても体温および心電図測定のための送信器は腹腔内に装着した。心電図測定では電極を頸背部と腹部剣状突起部皮下に縫合し、送信器本体を腹腔内 (マウス、ラット) または皮下 (ラット) に装着した。

(5) 血圧測定の場合、マウスでは左頸動脈にカテーテルを挿入し、送信器本体を左側腹部皮下に装着した。ラットでは腹部大動脈にカテーテルを挿入し、送信器本体は腹腔内に装着した。

血圧のデータは、テレメトリー測定システムで 5 分ごとに血圧波形データを取得し、収縮期血圧 (SBP)、拡張期血圧 (DBP)、平均血圧 (MBP)、心拍数 (HR) および自発活動量 (MA) を自動的に記録した。心拍数は心電図からも算出した。

(6) 実験処置前後に対象動物の体重を測定して処置による体重減少率も検討した。

(7) マウスおよびラットでの実験結果について概要を整理した。併せて、文献等からも関連知見を収集し、実験系ごとに類別化して苦痛度の面からスコアシート (分類コード表) の作成・改訂を行った。

## 4. 研究成果

(1) 送信器装着による生体への負担

体温用送信器 (TA10TA-F20) の重量は 3.8g であり、体重が 30g 以下の C57BL/6 系マウスには重量面で負担が大きいかとも考えられる。術前から術後にかけて体重を測定し、その減少率からマウスへの負担の程度を類推した。

ペントバルビタール腹腔内注射麻酔法に

よって送信器の装着を行った場合、術後6日に体重の減少率が最大であった。すなわち、術前時の体重が38.7gと38.6gのICR系(16週齢オス)では体重減少率は-10%と-12.4%であった。また、体重が33.3gと31.1gのC57BL/6系(16週齢オス)の体重の減少率は-23.2%と-21.8%であった。いずれも術前の水準まで回復するまでに3~4週を要した。

同様の処置をイソフルレン吸入麻酔下で行った場合、体重の減少率および回復傾向は注射麻酔の場合よりも著しく改善された。

いずれの麻酔でも4週以上の経過後における体温・自発活動量の明暗リズムパターンには顕著な相違がみられなかったことから、送信器自体による負担よりは、麻酔法によるストレスが大きく作用した結果によるものと考えた。よって、送信器装着処置は苦痛度C相当と考えた。

## (2) 長期間記録の実証と明暗リズム

オスマウスの体温の基本的な日内変動をICR系とC57BL/6J系(各4例)で比較した。体温はすべて明期に低く、暗期に高い明瞭な周期性を示した。ICRは暗期で平均37.3°C、明期で36.1°Cであり、C57BL/6J系では暗期で36.8°C、明期35.7°Cであった。ICRと比較してC57BL/6J系の体温はやや低い傾向にあり、暗期と明期の差はICRでは1.2°C、C57BL/6Jで1.1°Cであった。

体温用送信器を装着したオス(ICRとC57BL/6J、各2例)にメスを同居させると、直後から共に自発活動量が増加し、体温も上昇して日内変動に乱れが生じた。特に、暗期から明期への移行時附近での体温上昇が顕著であった。このような傾向はICR、C57BL/6Jいずれにもみられ、同居後9日経過時点においても個別飼育時の基本リズムと一致するまでには至らなかった。

ラット(Wistar, SD, WKYおよびSHR)の血圧測定の結果、いずれの系統においても、SBPやDBP、HRおよびMAは明期に低下し、暗期に上昇する明暗リズムが観察され、中でも、HRとMAのリズム性が明瞭であった。オスのSHR、WKYおよびSDラット(各4例)における明暗リズムについても検討した。SHR(高血圧自然発症ラット)の血圧は明期および暗期を通じてWKYやSDラットよりも高いレベルで維持されていた。

HRはWKYやSDラットのほうがSHRよりも高いレベルで推移していた。暗期と明期との差は、HRの場合、WKYとSDラットのほうがSHRよりも顕著であった。

コットンラット(オス8例)の体温についても、暗期に高く明期に低い周期性がみられた。明期から暗期への移行時期に体温が急激に上昇する特徴があった。体温変動の特徴

は、連続照明条件下では消失した。30日に及ぶ連続照明期間後、再度24時間周期の照明条件に戻すと直ちに暗期移行時の体温上昇の特徴が観察された。

## (3) 暑熱暴露時の高血圧ラットの血圧と心拍数

4例のSHR(オス、14週齢)を用いてテレメトリー法による腹部大動脈の血圧を測定し、暑熱負荷時における血圧や心拍数の変動を観察した。室内の温度は25°Cの状態から約2時間の加温によって36°Cにまで上昇させた。加温を停止して約12時間の経過を観察した。

SHRの血圧は、室温の急激な上昇に伴って、SBPとDBPともに上昇し、同時にHRの顕著な増加がみられた。36°Cになると脈圧も増大した。加温停止後もHRは数時間にわたり変動していた。比較的短時間の暑熱暴露によってもラットの循環動態は大きな影響を受けること、暑熱環境は高血圧ラットにとっては正常血圧ラットよりも大きな生体負担(ストレス)となることが示唆された。

## (4) ケージ交換に伴うマウスの血圧・心拍数の変動

10~16週齢のC57BL/6J系オスマウス3匹を用いた。取得後のデータは、ケージ交換前後それぞれ1時間における平均値を求めて比較した。代表する1例での測定値を示すと、ケージ交換前のSBPの平均値は109.6mmHg、HRの平均値は428.0bpmであった。ケージ交換後にはSBPの平均値は128.4mmHg、HRの平均値は602.9bpmと上昇していた。

MAもケージ交換によって7倍程度増加した。マウスに触れないで給水瓶のみを交換した場合にはSBP、HRともに著しい上昇はみられなかった。

## (5) ケージ交換に伴うマウスの体温・自発活動量の変動(図1)

体温および自発活動量は、ケージ交換前後それぞれ1時間における取得データの平均値を求めて比較した。生後10~16週齢のICR系とC57BL/6J系のオスそれぞれ4匹を用い、滅菌済み木質系床敷を入れたマウス用プラスチックケージで個別飼育した。

ICRとC57BL/6Jでは共にケージ交換によって体温が平均1.4°C上昇し、MAは約9倍以上の増加がみられた。体温の上昇分はICRとC57BL/6Jいずれも平均1.7°Cであり、自発活動量は10~14倍以上増加した。

ケージ交換をせずに、給水瓶のみを交換した場合にはICRでの体温の上昇は平均0.2°C、C57BL/6Jで平均0.9°C程度であり、MAの増加も3倍に満たなかった。

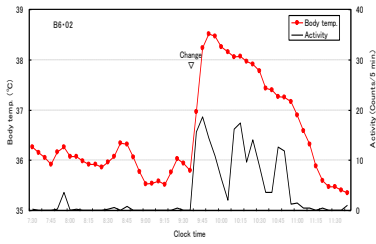


図1 マウス (C57BL/6J) におけるケージ交換前後の体温と自発活動量の1例

(6) ケージ交換に伴うラットの体温・自発活動量の変動

マウスの場合と同じようにラット (オスのWKY と SHR、各4例) でのケージ交換時の影響を観察した。

ラットの場合、8~9 週齢時点でのケージ交換によって体温は約 1 °C 程度の上昇がみられた。すなわち、WKY の場合、ケージ交換前 1 時間の体温の平均値と標準偏差は  $36.7 \pm 0.3$  °C であり、ケージ交換後には  $37.7 \pm 0.6$  °C と上昇していた。同様に、SHR ではケージ交換前には  $37.8 \pm 0.7$  °C であったものがケージ交換後には  $38.7 \pm 1.2$  °C であった。ケージ交換後におけるラットの行動を観察していると、ケージ内を動き回る行動が顕著に増加し、同時に測定した自発活動量の結果とも相関性が認められた。給水瓶のみの交換ではラットの体温の上昇分は平均 0.2 °C 程度であった。

ケージ交換による体温の上昇は、同時に測定した自発活動量とも相関性が認められたことから、自発活動や交感神経活動の亢進によるものと考えられた。血圧や心拍数、呼吸数などの生理指標を観察する際にはラットの取り扱い方についても配慮する必要があると思われた。

(7) 水迷路実験を想定したマウスの体温

テレメトリー法を活用して、モリス型水迷路実験を想定して、マウスの水泳中の体温を測定しその低下傾向を観察した。

生後 10~16 週齢の C57BL/6J の雌雄各 4 匹計 8 匹を用い、体温用送信器 (TA10TA-F20) を腹腔内に予め埋め込んでおいた。データ取得解析装置 (ART/Go!d 4.2) を用いて体温と自発活動量を 1 分ごとに測定した。プールは角形ポリペール容器 (24x24x24cm) を用い水深 12cm とした。水温 20°C、25°C、29°C、34°C の 4 条件につて、マウスを 10 分間泳がせたときの体温と自発活動量を 1 分ごとに記録した。

水温 20°C における結果を図 2 に示す。マウスは水温が低いほど体温の低下が著しく、水温 25°C では体温が 28°C 以下となった。マウスはプールへ入れた直後には激しく泳いでいたが、数分後には泳ぎを休止して浮いてい

る状態も観察された。プールから取り出して飼育ケージに移した直後には毛繕い行動が顕著であった。保温により体温の回復が早まることも確認できた。また、ICR と比較して C57BL/6J 系マウスでは体温低下が顕著であった。水迷路は、空間認識の記憶学習を測定する方法としてラットを対象とした実験手法として考案されたものである。最近、マウスに適用する事例が多いが、プールサイズもまちまちであり、その上、水温が 25°C 前後による報告が多い。前述の結果から、B6 系マウスの場合 25°C の水温では低体温状態に陥る恐れがあり、苦痛度も高く設定する必要があること、試行後の保温にも留意すべきであることを知り得た。

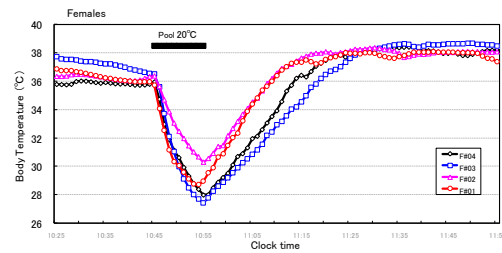


図2 水温 20°C の場合のマウスの体温の変化

(8) テレメトリー法による注射麻酔と吸入麻酔の比較

ペントバルビタール注射麻酔では体温の低下が著しく、室温では 30 °C 以下となった。保温により 33 °C 程度に維持されたことから、麻酔下での保温は必須である。

ケタミンが麻薬指定後に比較的安全性が高い注射麻酔として、最近実験動物医学領域 (黒澤努ら: 動物福祉に立脚した実験動物の麻酔法. Surgery Frontier, 17(3), 83-90, 2010.) で推奨されている 3 種混合注射麻酔 (マウス用量: メドトミジン 0.3mg, ミダゾラム 4mg, ブトルファノール 5mg, 体重比) の場合でも、SBP が 120 mmHg から 80 mmHg へ心拍数は 600 bpm から 150bpm 程度急激に減少し、覚醒まで 6 時間以上を要した。ラットの 3 種混合注射麻酔の用量はメドトミジン 0.15 mg, ミダゾラム 2 mg, ブトルファノール 2.5 mg, 体重比) とマウスの用量を半減させても深麻酔効果が得られた。

イソフルレン吸入麻酔をマウスに用いた場合には術後直ちに覚醒した。SBP が 100 mmHg 程度に維持され、心拍数も 300 bpm 以下に減少することはなく、体温低下も少なく、注射麻酔と比較し安全性が著しく高いことが確認しえた。術後鎮静も比較的短時間で約 10 分後には自発活動量も術前の状態へ回復し始めた。メドトミジン・ミダゾラム・ブトルファノールの 3 種混合麻酔注射酔やイソフ

ルレン吸入麻酔の使用は、マウスへの苦痛度の軽減が期待できるものと考えられた。

#### (9) スコアシート（苦痛度コード表）の作成

スコアシート（苦痛度コード表）は財団法人実験動物中央研究所動物実験委員会が先行して作成している（鍵山直子：動物実験の倫理指針と運用の実際．日薬理誌, 131, 187-193, 2008）。実験動物中央研究所の実験処置コード表（16分類・129項目）を参考に、研究代表者が所属する医科大学における過去5年間において承認された動物実験計画書について、動物への処置内容を照合確認し、必要な実験処置を追加した。本研究開始後、前述したテレメトリー実験結果や関連文献の収集等の科学的エビデンスデータによる改訂作業を行った。その結果、平成23年度用として17分類・142項目の実験処置コード表を動物実験委員会へ提案し承認されている。

#### (10) 人道的エンドポイントの考察

動物実験における人道的エンドポイント（Humane endpoint）は、実験動物を耐え難い苦痛から解放するための措置として提案された。実験動物が死亡するまで実験を続ける（death as endpoint）のではなく、異常状態をもとに実験を中断し安楽死させる時期を実験計画時に設定しておくことが重要である。

苦痛に対する客観的測定指標がない限り、ヒトと動物は同じであるとする考え（IRAC 1985）は妥当であろう。急性の痛みは通常、有害刺激の存在を警告する意味からその閾値が低い。末梢への侵害刺激は、四肢を引っ込める定型的な防御反応（四肢引っ込め反射）を引き起こす。このような場合、刺激部位への傾注、脱走、攻撃、震え、こすりつけ、ひっかき、刺激された部位を噛んだりなめたりするような反応、血圧亢進や心拍数増加等の自律神経系の反応、神経系の反応、起毛、毛細血管の拡張など、他の侵害反応を伴うことが多い。

刺激による四肢引っ込め反射のような単純な侵害防御反応は、動物、ヒトともに同様の機序で起こり、反応の大きさは刺激の強さに比例して大きくなると考えられている。外科手術、偶発的な外傷など創傷周辺組織では痛みに対する感度が増大することもある（痛覚過敏）。痛みが時間経過とともに増大し、持続する慢性の痛みは適応困難であり、苦痛の主要な要因となる。

痛みと苦しみを評価するための最も一般的な観察項目は、体重変化、外観所見、臨床症状、自発行動の変化および外部刺激に対する反応などである（Morton DB & Griffiths

PHM; Guidelines on the recognition of pain and discomfort in experimental animals and a hypothesis for assessment. Vet Rec 116: 431-436, 1985)。

以上のような考えから、人道的エンドポイント適用の目安として、摂餌・摂水困難、苦悶の兆候（自虐、異常姿勢、呼吸障害、発声など）、下痢、出血、外因部の汚れ、顕著な体重減少（20%以上）、腫瘍サイズの増大（体重の10%以上）を指摘できる（Canadian Council on Animal Care (CCAC). Guidelines on choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. CCAC Ottawa; 1998.）。これらの所見から苦痛度を明確に分類することが重要であり、各種関連エビデンスの相互対応についての検討も必要である。

毒性試験やがん研究における人道的エンドポイント等についても欧米の創薬領域において導入され始めているが、必ずしもエビデンスが十分とはいえない（OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; 2000）。人道的エンドポイントが確立されている実験系はまだまだ少なく、種々課題も多い現状であり、さらなる議論の展開が必要である。

#### (11) まとめ

動物実験の人道的エンドポイント構築のためには、広範な領域にわたる具体的な実験処置のエビデンスを集積する必要がある。3カ年にわたる本研究結果は、必ずしも研究目的をすべて達成したものとはいえない。苦痛度分類を重視し、実験設定が網羅的となった懸念がある。さらに、テレメトリーによる取得データが膨大であることから未解析の部分も残る。同様の手法を用いて、毒性試験や遺伝子組換え動物における人道的エンドポイントのためのエビデンスについても検討する必要がある。

この種の課題はできる限り多くの分野からの分担者による研究組織の必要性も痛感した。取得データも含め、それらのデータベース化に向けて継続発展させたい。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計6件）

- ① 片平 清昭、ケージ交換に伴うマウスの血圧および心拍数の変動、実験動物と環境、査読無、18巻1号、2010、114~116ページ、
- ② 片平 清昭、適切な動物実験の実施を行うためのポイント、Surgery Frontier、査読無、

- 17 卷 3 号、2010、78～82 ページ、
- ③片平 清昭、マウスおよびラットのケージ交換に伴う体温上昇、実験動物と環境、査読無、17 卷 1 号、2009、74～77 ページ、
- ④遊佐 寿恵、片平 清昭、金澤 優子、杉原 充、ラットの血液生化学検査における信頼性向上—機種間測定誤差の検討—、実験動物技術、査読有り、44 卷 2 号、2009、49～54 ページ、
- ⑤Waki, H.、Katahira, K.、Yamasaki, M.、Katsuda, S.、Shimizu, T.、and Maeda, M.、Cardiovascular regulation during upright standing behavior in conscious rats、Neurosci. Lett.、査読有り、449 卷、2009/1、10～14 ページ、
- ⑥Waki, H.、Katahira, K.、Yamasaki, M.、Katsuda, S.、Shimizu, T.、and Maeda, M.、Chronic inhibition of standing behaviour alters baroreceptor reflex function in rats、Act. Physiol.、査読有り、195 卷 3 号、2009/03、349～355 ページ、

〔学会発表〕(計 19 件)

- ①片平 清昭、C57BL/6系マウスは低体温状態に陥りやすい？、第45回日本実験動物環境研究会総会、平成22年12月5日、東京
- ②片平 清昭、水漏れ事故を想定したマウスの生理指標の検討、第57回日本実験動物学会総会、平成22年5月12日、京都
- ③片平 清昭、ケージ交換に伴うマウスの血圧および心拍数の変動、第43回日本実験動物環境研究会総会、平成21年12月5日、東京
- ④片平 清昭、遊佐 寿恵、河合 澄子、黒澤 努、麻酔回復過程におけるマウスの体温および血圧の観察、第43回日本実験動物技術者協会総会、平成21年10月9日、新潟
- ⑤片平 清昭、勝田新一郎、メスマウス同居によるオスマウス体温の日内変動、第56回日本実験動物学会総会、平成21年5月15日、大宮

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/cms/eac/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

片平 清昭 (KATAHIRA KIYOAKI)  
福島県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：90045774

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし