

動物実験における人道的エンドポイント

日本新薬(株) 研究開発企画センター 中井 伸子

はじめに

動物実験および実験動物における福祉の理念として、Russell and Burch (1954) により提唱された3Rの原則 (Replacement: 代替法の利用、Reduction: 必要最小数の利用、Refinement: 苦痛の軽減) が広く国際的に普及し定着している。

実験に用いられる動物は、誘発された疾病や実験処置などにより苦痛を被ることが多い。実験動物が被る苦痛は、人道的観点から、科学的な目的達成のために避けられない最低限の内容および時間に限定すべきであり、緩和でき

ない重度の苦痛を伴う場合は、実験処置の途中であっても、激しい苦痛から解放するため実験を打ち切り苦痛のない方法で安楽死させるべきである。その科学的な一手段として、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早期に実験を中止し終了させる判断基準、すなわち人道的エンドポイント (humane endpoint) が設定される。実験動物の死をもってエンドポイントとする実験計画 (death as endpoint) や重度の苦痛を伴う実験系では、人道的エンドポイントを組み込む配慮が必要である。

今回は、はじめに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について解説し、次に既に採用されている人道的エンドポイントを毒性試験、がん研究、および遺伝子組換え動物を例に概説する。更に、瀕死状態を人道的エンドポイントの指標とする考え方、および客観的に実験動物の死を予測する戦略としてのスコアリングシステムについて紹介する。

実験動物における苦痛の評価

人道的エンドポイントを確立するには、言語表現力のない実験動物が苦痛を被っているかどうかを判断し、その程度を適切に評価する必要がある。

外観や行動の変化を常に注意深

表1 実験動物における痛みの指標*

動物種		外観	生理機能
マウス ラット モルモット	活動性低下、摂水量の低下、食欲低下、舐める、四肢を庇う、自傷行為、攻撃性の増大、発声、グループからの別離、ヒゲの動きが増す(マウス)、ハンドリング時に鳴くようになる(モルモット)、鳴き声の減少(モルモット)	被毛の汚れ、起毛、異常姿勢、うずくまり姿勢(ヤマネのような姿勢)、赤涙(ラット)、まぶたが部分的に閉じる、毛細血管拡張、鼻汁、横臥	睡眠障害、低体温、浅速呼吸、努力呼吸
ウサギ	不穏、隠れる、鳴く、攻撃的、引っ掻く、噛む、食欲低下、食殺、動かなくなる	明確な変化が認められない場合もある	流涎、浅速呼吸
イヌ	噛む、引っ掻く、防御的、喘ぎ、唸り声、鳴かなくなる、ハンドリングに対して抵抗しなくなるか攻撃的になる	硬直姿勢、動きの減少、横たわり、卑屈な外貌、尾を股間にはさむ姿勢	振戦、パンティング、あえぎ、排尿
ネコ	沈静、さかんに吠く・唸る、隠れる、しきりに舐める、四肢を引く、硬直した足取り、食欲低下、ハンドリングからの逃避	不穏な表情、四肢を隠す、頭部下垂、被毛の汚れ、耳を扁平にねかせる、うずくまる	
サル類	高い鋭い叫び声、うめき声、摂餌摂水量の低下、攻撃性	うずくまり、悲しそうな表情、毛づくろいをやめる	

*: 文献1より引用

く観察することが痛みの兆候を把握するための一助となり、動物に施された処置に関する情報もその参考となる。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は、動物が被る苦痛を評価するための最も一般的な観察項目である(表1)。局所的な外科処置などによる急性の痛みを被っている動物では、処置を施した局所において、痛み、痛覚過敏、もしくはアロデニアの兆候が見られる。一方、病理学的変化に基づく慢性の痛みについては、時間をかけて進行するためその兆候の発見は困難を伴うが、グルーミング頻度の低下、体重や活動量の減少などがよい指標となる。うずくまりのような姿勢や外観の変化が指標となることもある。動物は自発的にもしくは触れると発声する場合もあるが、これは必ずしも痛みを示すものではなく、また痛みがある動物が必ず発声するわけでもない。従って、動物の苦痛を評価するには、各々の動物種特有の行動パターンに関する知識が重要となる。

痛みはストレスの要因であり、また、環境・心理学的ストレスの多くは、痛みに対する感度を変化させることも知られている。そのため動物の痛みを評価する場合、痛みのレベルは他のストレス要因により影響されることも認識しておく必要がある。

各種動物実験における人道的エンドポイント

ガイドライン等で引用され、国際的にも広く採用されている人道的エンドポイントの適用例を表2に示す。

実験目的、実験モデルの種類、動物種や系統、その他の実験条件によって人道的エンドポイントとしての安楽死の判定基準が異なるので、エンドポイント設定の際は細心の注意が必要である。例えば、進行性の体温低下は、ワクチンの効力試験などの感染実験における人道的エンドポイントとして知られているが、体温には以下の変動要因があるのでこれらも考慮すべきである。①温湿度、床敷きの種類、ケージ内飼育密度などの環境

要因の影響を受けること。②実験動物の系統または種によって、実験処置に対する反応が異なること。③実験処置の種類によってエンドポイントとなる体温が異なること。④体温測定方法により値に影響があること。

また、知見が蓄積するにつれエンドポイントが改良される例もある。骨髄腫細胞株接種マウスにおいて、死に至る2~7日前に転移性脊椎圧迫の徴候としての後肢麻痺が発現することが判明し、その後は「死」もしくは瀕死状態に代わり、後肢麻痺が早期安楽死の指標として採用された。即ち、経験を積みデータを蓄積し解析することにより、エンドポイントを改良することが重要である。

毒性試験における人道的エンドポイント

ガイドライン等による薬事規制上の試験として実施される毒性試験の多くは「死」をエンドポイントとしている。しかし、過去数年間に多くの人道的エンドポイントに関係する新しいガイドライン、手順およびモデルが提案され採用

表2 死亡に替わる人道的エンドポイントの例*

人道的エンドポイント	兆候 (安楽死指標)	適用
腫瘍の成長、影響	腫瘍の重量が体重の10%を超える場合、腫瘍径が20mm (マウス) もしくは40mm (ラット) 以上、腫瘍の潰瘍化・壊死・感染、歩行障害、摂水・摂餌障害	皮下の腫瘍 腹水型腫瘍 ハイブリドーマ
摂餌不良、悪液質	コントロールと比較して20%以上の低体重、7日間に25%以上の体重減少、悪液質	代謝異常を伴う疾病、慢性的な感染
移動障害	持続的な横たわり、うずくまり	各種
臓器、組織障害の兆候	呼吸器：呼吸速迫、努力呼吸、咳、喘ぎ 循環器：ショック、出血、アナフィラキシー 消化管：重症の下痢もしくは嘔吐 末梢神経：弛緩性もしくは痙攣性麻痺 中枢系：旋回、盲目、認知症、痙攣	毒性試験 全身性の疾患
進行性の低体温	正常体温より10%以上低下 齧歯類では4-6℃の体温低下	感染実験、 ワクチンの効力試験
瀕死状態、前瀕死状態	予め、特定の臨床症状を定義し、この症状が認められた場合は安楽死させる	各種

*：参考文献3,4より一部改変し引用

されるようになってきた。

急性致死毒性試験の目的は、被験物質を単回投与した後に動物の半数が死亡すると予測される用量 (LD₅₀) を推定することであった。標準的には3群のラットに3用量の被験物質を投与し、被験動物を14日間観察して致死率を求めるものであったが、最新の試験ガイドラインでは、瀕死動物の人道的な安楽死処置も自然死と同一と考えるべきとされ (EPA 1998; OECD 1987)、人道的エンドポイントの指標も示されている (OECD 2000)。例えば、急性経口毒性を検討する fixed dose procedure では、明らかな毒性徴候が認められた時点で被験動物を人道的に安楽死処置することが求められており、明らかな毒性を示す一般状態が、死亡する前もしくは瀕死状態になる前の人道的エンドポイントとされている。

慢性毒性試験やがん原性試験などの長期試験では、様々な疾患を発症し、多くは痛みや苦痛を伴う。しかし、これらの試験においても一般状態が初期段階の人道的エンドポイントとなりうる。例えば、著しい体重減少は回復不可能な重度の肝障害や腎障害などの臓器障害、あるいは腫瘍等による二次作用の徴候である可能性が高い。これらの重症疾患あるいはがんの転移等の検出率を高めるため、体重の測定回数を試験開始後12カ月以降は週1回に増やすことが推奨されている。また、血液生化学的検査も、重大な臓器不全や差し迫った死を特定する場合に有用である。

規制上の試験では代替法の開発も進んでおり、代替法を取り入れることにより初期段階で人道的エンドポイントを採用することができる。例えば、皮膚腐食性試験では、細胞培養系やラット経皮電気抵抗試験などの代替法が普及している。これらの代替法で皮膚腐食性陽性と判定された場合は、以後は動物を用いた試験を実施する必要はない。また、in vitro の細胞毒性試験結果から in vivo の50%致死量を推定し、この結果をもとに in vivo 試験の開始用量を設定することにより、無用な苦痛を被る動物を減らすことが可能である。更に、従来のもルモットを用いた皮膚感作性試験の代わりに、マウス局所リンパ節増殖試験 (LLNA) を用いると、比較的苦痛の少ない感作誘導期に評価できるため、紅斑、腫脹、そう痒など苦痛を伴う症状が誘発される誘発期に評価を行う従来法に比べて、早期の人道的エンドポイントが実現できる。

がん研究における 人道的エンドポイント

治療法の開発やがん原性の評価などにおいて、多数の実験動物が、誘発されたがんや治療処置により重度の苦痛を経験する。従って、実験動物の死亡または著しい苦痛の所見を実験のエンドポイントとして用いることは避けるべきである。腫瘍を体内で増殖させる実験では、腫瘍自身による負荷と腫瘍に関連した症状の強さの両要素を含め、効果的なモニタリングシステムを確立してエンドポイントを判定する必要がある。このよ

うな場合は、一般状態より生理学的、生化学的なバイオマーカーの方が、客観的でかつ再現性が高いエンドポイントの判定につながるケースが多い。

実験の目的を明確に定めることも、科学的エンドポイントだけでなく人道的エンドポイントを設定する上でも重要である。例えば、実験の目的が腫瘍の継代もしくは株化細胞の腫瘍形成能を見極める等の場合、予め定めた大きさの腫瘍の発現が科学のおよび人道的エンドポイントになる。腫瘍に対する治療効果を検討する場合には、治療による副作用が加わる可能性があるため、早期に安楽死処置を判定できる人道的エンドポイントを含んだ試験方法の開発が必要となる。

腫瘍の増殖や治療法に関する試験では、in situ または摘出腫瘍を用いた試験系により、腫瘍増殖パターンや細胞生存パターンの変化が明らかにされることも多い。固形腫瘍の増殖を評価する場合、腫瘍増殖の遅延、腫瘍倍加時間、腫瘍の退縮を科学的エンドポイントとする方法もある。

内部臓器の腫瘍についてその経過を観察する方法として、動物の経時的安楽死処分、試験的的外科手術、医学的画像診断法、または臓器肥大もしくは腫瘍発生に対する触診法などが挙げられる。死に至る試験内容の代替法として、持続的な体重減少や行動学的・神経学的変化などの代用マーカーが使用されることもある。また、蛍光タンパク質 GFP (green fluorescent protein) やホタル由来の発色タ

ンパク質 (ruciferase) などで、腫瘍細胞を標識することにより、腫瘍細胞の検出精度を上げ、微小転移巣を確認することも可能である。更に、顕微撮影により生きた動物において標識された微小転移巣を発見することもできる。

遺伝子組換え動物における人道的エンドポイント

遺伝子組換え動物を用いた研究は、疾病の研究において重要となってきた手段であるが、これらの研究の多くは結果の予測が難しい。従って、同モデルに予測される有害な転帰と予測できない有害な転帰の両方に対応できる計画を盛り込むべきである。

遺伝子組換え動物は継代を重ねるにつれ、表現形質が変化する例や、遺伝子がホモ接合でないことと明確にならない形質もあることから、子孫何代にもわたって継続的にモニタリングする必要がある。

遺伝子組み換え動物に生じた障害を解決もしくは軽減できる新しい解決方法も報告されている。例えば、バックグラウンドとなる系統の変更やプロモーターや制御配列の変更により問題となる表現形質を制御する方法、ターゲット遺伝子の不活化により欠損した蛋白質や酵素を投与することにより治療し、問題となる症状を回避しながら研究を継続する方法も報告されている。

遺伝子組換え動物の使用にあたっては、試験の経過を継続的に調査し、問題発生時はその都度それを確認し、適切な人道的エンドポイントを確立していくことが重要である。

人道的エンドポイントとしての瀕死状態

各種動物実験において瀕死とみなされる状態は早期安楽死を選択する指標となり、人道的エンドポイントとして採用することができる。瀕死状態の動物を安楽死させることにより末期の苦痛を軽減できると考えられるため、死亡よりも瀕死状態をエンドポイントとする方が好ましい。しかし、そのためには瀕死状態の明確な定義と、死を科学的に予測する方法が必要となる。

死に先行して変化が認められる評価項目を特定することにより、瀕死状態を定義でき、早期安楽死の指標とすることが可能となる。これらの評価項目は各実験系に適したものであり、同時に通常のデータ収集の一環として評価できるものである必要がある。死亡に至った動物のデータと死亡しなかった動物のデータを比較することにより、死亡や瀕死の予測因子となりうる評価項目が明らかになる。観察項目や測定回数、病状が変化した時間、および死亡した時間などの情報も重要である。この種の評価・検討は多くの場合、初期の予備実験やパイロット実験期間中に実施できるものであるが、その動物モデルの特性を熟知することが、瀕死状態を科学的に把握することに繋がる。個々の動物の死を予測できる評価項目を特定し、統計学的バリデーションを行うことにより、同一モデルにおける試験で適用可能な評価指標を確立することが可能となる。評価項目とし

ては客観的もしくは定量可能な変数を用いる事が好ましい。

瀕死状態の徴候となる一般状態および行動の変化として、次のような項目が含まれることが多い。

- ・歩行障害 - 摂餌・摂水が困難となるもの
- ・過度の体重減少および極度の衰弱
- ・身体的もしくは精神的な覚醒不十分 (意識障害、昏睡)
- ・努力性呼吸困難
- ・長時間にわたる起立不能

しかし、これらの一般状態のみでは死を適切に予測できないケースもあり、瀕死状態をより客観的に定義するには、疾病、痛み、および苦しみのうち、何が原因で瀕死状態にあるのかを区別することが推奨される。複数の行動異常や生理的な異常に基づくスコアリングシステム (スコアシートを用いた評価方法) を利用することにより、瀕死状態を客観的に評価する上でより有用な判断基準が得られるものと考えられる。

スコアシートを利用すれば、死や重度の痛みの予兆も適切に把握することが可能となる。スコアシートによる評価方法は、すべての動物に適用でき、施設が異なっても適用できることが理想である。しかし、あらゆる実験において、発現すると考えられるすべての一般状態のリストを作成することは不可能であるため、スコアシートは各実験系に特有なものになる。また、一般状態は動物種間や系統

間で異なる場合があるため、スコアシートは各々の背景因子（実験内容、種、および系統）に特有なものとなる。

スコアシートの作成手順

動物に新規の処置を行う場合、まず少数に処置を施したのち詳細に観察し、一般状態リストを作成する。同リストを更に経験に基づき修正し、当該実験期間中に実験動物の多くに発現し、かつ苦痛や瀕死状態を評価する上で重要な症状が確認できるまでこの作業を繰り返す必要がある。スコアシートにはこれらの主要な一般状態を日付・時刻と対比させて配置し、観察者による判定のばらつきを避け

る工夫を施して記録する。特に、苦痛が発生する可能性が高い時期（手術直後、腫瘍の増殖や移植臓器の拒絶が予測される時期など）に症状のスコアを適切に判定できるようにすることが望ましい。スコアシートには飼育管理上の注意、獣医学的処置、一般状態の記録方法、人道的エンドポイントの実施基準などのガイド、安楽死させる場合に講じるべき措置に関する指示なども併記しておく。

スコアシートを用いた人道的エンドポイントの例

ストレプトゾトシン誘発糖尿病ラットの一般状態を記録する目的で作成されたスコアシートの例を表3に示す。

本例では、4日目には被毛が逆立った状態で、体温が低下し、呼吸は速まり苦しそうな状態となった。5日目には体重の著しい減少（22%）も認められ、歩行異常から腹痛も示唆された。他の一般状態も含め、この個体は生理学的に高度の障害を受けており、すでに当該動物実験の科学的目的を満たす適切な状態ではないと考えられた。体温が32℃に下がり極めて体調不良である徴候を示したため、輸液するとともに暖かい環境で3時間観察したが、その効果はなく、夜間の死亡が予測されたため、人道的および科学的見地から安楽死を決定した。

表3 Wistar系ラットにおけるストレプトゾトシン誘発糖尿病*

	動物番号：	処置実施日：	試験NO.：	試験開始時体重：214g		
日付	5/10	5/11	5/12	5/13	5/14	5/14
経過日数	0	1	2	3	4	4
時刻	8:40	9:00	8:50	8:55	8:05	11:00
距離を置いた観察所見						
飼料マッシュ/ゼリー/穀類	Y	Y	Y	Y	Y	Y
活動性低下		—	—	—	—	+
孤立		—	—	—	—	—
〈観察項目9項目を省略した〉						
軽く触れただけで発声		—	—	—	—	—
摂水量（1ケージ平均値）(mL)		50	113	133	140av	0
体重 (g)	204	209	203	192	170	168
処置開始前からの変化率 (%)	7	5	7	12	22	
体温 (°C)		37.5	37.4	37.6	32.4	34.7
〈観察項目8項目を省略した〉						
その他	Day 0 ストレプトゾトシン65mg/kg投与					安楽死
署名		KL	KL	KL	KL	

飼育時の注意：糖尿病誘発の2～3日前に放射線滅菌飼料を給餌し、飼料に順応させる。2日に1回は動物の飼育設備を洗浄。紫外線殺菌水の入ったボトルを1ケージあたり2本準備し1日に2回満タンにする。

スコア詳細：省略

人道的エンドポイントおよび人道的措置

1. 試験開始後24～48時間以内に昏睡が認められた場合、当該動物を安楽死させる。
2. 動物の体重が試験開始時より7日後に体重減少率が20%を超えた場合にはその時点で安楽死。
3. 爪先歩行または歩行異常が認められた場合は、当該動物を安楽死させる。
4. 複数の症状が発現した場合には、獣医師および実験責任者にその旨を通知する。
5. 科学的措置：保存すべき組織 - 10%ホルマリンと生理食塩液の混液に腎臓を浸漬して保存する。

*：文献1より一部省略して引用

おわりに

人道的エンドポイントが確立している実験系は少なく課題も多いのが現状である。しかし、人道的エンドポイント設定に関する知識があれば、実験方法を検討する際に人道的エンドポイントを取り入れる工夫が可能となる。ここでは、すでに採用されている人道的エンドポイントの例や人道的エンドポイント設定のための戦略について紹介した。

いずれの動物実験においても、適切なタイミングで実験動物を人道的に安楽死（人道的エンドポイントを実現）するには、死の徴候を発見するのに十分な回数、動物

を観察することが必要である。更に、研究者だけではなく、動物管理業務を担当するすべての者が、実験動物の日常の状態を把握し、当該モデルの特性、施された処置、予測される一般状態に関する情報などを共有し、時宜を得た対処ができるよう一致協力することが重要である。

本稿が動物実験における人道的エンドポイントの開発と普及に少しでも参考になり、生命科学の発展の中で、動物福祉も向上し続けられることを願っている。

参考文献等

1. 中井伸子翻訳 動物実験における人道的エンドポイント (原著: ILAR ジャーナル 41(2)) (株)アドスリー. (2006)
2. 動物実験の適正な実施にむけたガイドライン, 日本学会会議.(2006)
3. ARENA/OLAW Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook 2nd ed. (2002)
4. OECD Guidance Document on the Recognition, Assessment, and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. (2000)

ノーサンのバイオ技術

Nosan Corporation

ノーサンが永年培った動物栄養の技術は、実験動物用飼料、昆虫用飼料に活かされ、さらにトランスジェニック動物、薬物代謝、遺伝子発現と進化しています。

研究に携わる皆様のご要望を直接うかがい、満足して頂ける商品とサービスをご提供する事が、ノーサンのモットーです。

■ NOSANの実験動物飼料

マウス・ラット・ハムスター用
ウサギ用・モルモット用
イヌ用・ネコ用・サル用

■ 疾患モデル動物用飼料

■ 放射線照射滅菌飼料

■ 精製・添加飼料

■ 昆虫用飼料

■ NOSANの薬物代謝業務

ブルド肝マイクロソーム・凍結肝細胞
ヒトP450分子種発現系・抗体
薬物代謝・酵素阻害・誘導試験受託

■ NOSANの遺伝子発現業務

昆虫細胞を用いたタンパク質生産
Tg動物を用いた医薬品開発業務

NOSAN

■ NOSANの実験動物

Cleanビーグル犬【Nosan:Beagle】販売
NIBS系ミニブタ 販売
SPFベビー豚 販売
ビーグル犬の血漿・血清 販売

■ NOSANの受託業務

実験動物のSPF化
実験動物の受託飼育(コンベンショナル・SPF)
動物飼育室の貸出
各種動物受託試験

■ 遺伝子改変マウス作製業務

トランスジェニックマウス作製
ノックアウトマウス作製
遺伝子解析

NOSAN

日本農産工業株式会社

〒220-8146 横浜市西区みなとみらい2-2-1 横浜ランドマークタワー46階 TEL 045(224)3713 FAX 045(224)3737
http://bio.nosan.co.jp