

---

# 総 説

---

## 研究施設の中の動物たちとリファインメント

奈良県立医科大学動物実験施設

久 保 薫

### REFINEMENT FOR ANIMALS KEPT IN RESEARCH INSTITUTION

KAORU KUBO

Laboratory Animal Research Center, Nara Medical University

Received December 15, 2010

*Abstract*: 動物実験の基本理念として、Russell & Burch は「人道的実験技術の原則(The Principles of Humane Experimental Technique)」(1959年)の中で「3R」を提唱した。すなわち、実験者は代替法の利用(Replacement)、使用動物数の削減(Reduction)、苦痛の軽減(Refinement)について可能な限り実践することが、倫理的な動物実験の基本理念である。この理念は、2005年の「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正において明文化された。本稿では、Refinementに含まれている「適正な飼育環境と衛生管理」、「動物実験における苦痛の程度予想と人道的エンドポイントの実施」、「苦痛軽減のための麻酔」を取り上げ、Refinementを理解し、動物実験計画の立案、実験計画に基づく実験処置、実験結果の分析、評価、検証に実践されるようにまとめた。

**Key words** : 3R, refinement, microbiological monitoring, humane endpoint, anesthesia

### はじめに

「メンデルの法則」が、動物にも適用できるとして再評価され、20世紀初頭から動物の遺伝学ならびに育種学が急速に展開した。1903年にCastleが、マウスのアルビノ形質が劣性であることを示した<sup>1)</sup>。さらに、1909年にはジャクソン研究所のLittleとウイスター研究所のKingによって、それぞれ、マウスとラットの近交系の作製が開始された<sup>2),3)</sup>。日本では、1963年と1974年にSHRとNODマウスが樹立されている。近交系の作製は、遺伝的に均一な動物の作製とそれを病態モデルとして利用するという、明確な育種目標をもってなされた<sup>4)</sup>。1981年には、最初のトランスジェニックマウスが発表され<sup>5)</sup>、1989年には、ノックアウトマウス(標的遺伝子欠損マウス)が開発された<sup>6)</sup>。1990年代以降、遺伝・育種学分野はゲノムサイエンスのもとに進展していった。このように、

初期の実験動物は愛玩用や家畜として飼育されていた動物や野生動物が、研究施設に持ち込まれ、次第に系統化され、自然発症あるいは育種改良された動物モデル、また特定の標的遺伝子を改変された動物モデルとなった。そしてそれらを用いた動物実験によって疾患を含む複雑な生命現象の解析、医薬品や化学物質の開発や医療技術の進展など、人類の健康や福祉の向上に貢献してきた。

一方、実験動物および動物実験を動物福祉と倫理的側面からみると、欧州諸国では、イギリスの「動物虐待防止法(1876年)」、[「EC動物実験指針(1986年)」]により実験動物および動物実験は国家の管理下に置かれている。これに対して米国では、「実験動物の管理と使用に関する指針」に基づいて、各研究機関が実験動物および動物実験を科学的・倫理的に自主管理している。わが国においても、「動物の愛護および管理に関する法律」(2005年改正)<sup>7)</sup>「実験動物の飼養および保管ならびに苦痛軽減に関する

基準」(環境省)<sup>9)</sup>、「研究機関等における動物実験に関する基本指針」(文科省, 厚労省, 農水省)<sup>9)</sup>と「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)<sup>10)</sup>に基づき自主管理体制がとられ, その要は, 法律に明文化された3R (Replacement: 代替法の利用, Reduction: 使用動物数の削減, Refinement: 苦痛の軽減)の理念である。

3Rは1959年にイギリスの動物学者Russellと微生物学者Burchが著した「人道的実験技術の原則(The Principles of Humane Experimental Technique)」<sup>11)</sup>の中で提唱され, 近代の実験動物・動物実験の思想の基盤となった。3Rの中でも, 動物福祉と倫理に関するRefinement

は, 今日, その考え方が拡張されている(図1)。

本稿では, 動物実験を自主管理のもとで遂行する上で重要であるRefinementを理解し, 実践するために, 「適正な飼育環境と衛生管理」, 「苦痛の程度の予想と人道的エンドポイントの実施」, 「苦痛軽減のための麻酔」を取り上げてまとめた。

1. 適正な飼育環境と衛生管理

Russell & Burchは, 科学的に適正な動物実験を行うためには, 再現性の確保が重要であることから, 演出型の決定という概念を示した(図2)。動物は両親から受け継いだ多数の遺伝子からなる遺伝子型(Genotype)を持ち,

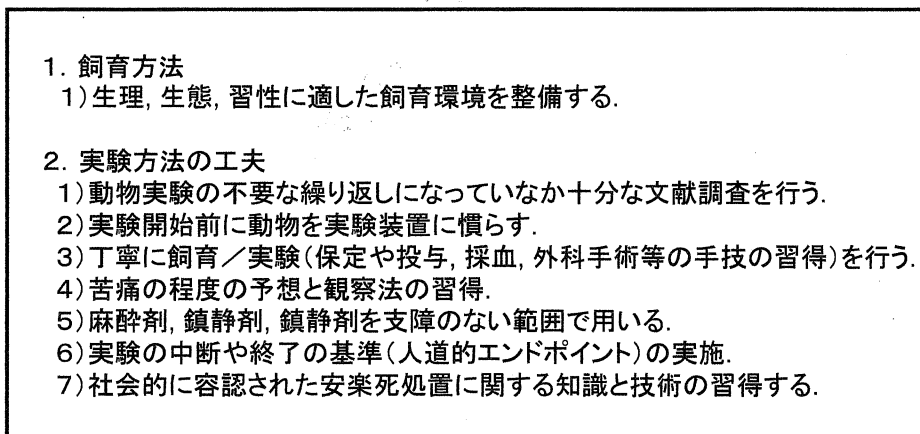


図1. 実験動物のRefinementに関する飼育方法と実験方法の工夫

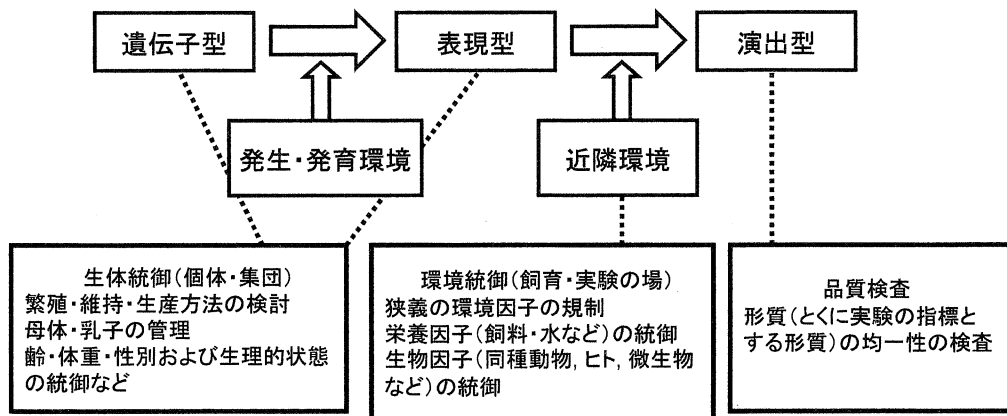


図2. 演出型の決定(Russell & Burch)と適正な実験動物を得るための統御

「実験動物の技術と応用」社団法人日本実験動物協会 編, アドスリー, 2005年

これに発生・発育環境が影響して表現型(Phenotype)が形成され、さらにその表現型に近隣環境が影響して演出型(Dramatype)が形成される。品質検査の目的は、特に実験の指標とする形質の均一性あるいは不変性の確認であり、遺伝的モニタリングや微生物モニタリングは基本的かつ代表的な品質検査である。以下、演出型を決定する因子の中の「気候因子および物理化学的環境」、「衛生管理 — 感染症予防対策 —」と「微生物モニタリング」について記載する。

1) 気候因子および物理化学的環境

実験動物を取り巻く環境は、マクロの環境(飼育室内環境)とミクロの環境(ケージ内環境)に分けられる。わが国では「ガイドライン—実験動物施設の建築および設備—昭和58年版」(1983)に掲載されているガイドラインを環境基準値としている(表1)。各要因はそれぞれ単一要因として作用するものではなく、多くの要因が複合した状態で作用する。したがって、実験動物の飼育環境については、常に環境複合状態のもとで考える必要がある。環境統御は、ハード的な建築、設備とソフト的な管理運営が調和されて、初めて理想的なコントロールができる。近年、実験動物の安寧(Animal Well-being: できる限り平穏に過ごせるような住居環境への配慮)や環境エンリッチメント(Enviromental Enrichment: 実験動物に固有

の生理、生態、習性に配慮した環境の改善)の考え方から、動物に玩具、巣箱、巣材などを与えることもある。これらは動物福祉の具体策として評価できるが、動物実験成績の安定性・再現性の面から検討し、科学的根拠に基づくエンリッチメント効果の実証、制御法および器材開発などを踏まえて実践することが望ましいとされている。

2) 衛生管理 — 感染症予防対策 —

感染症予防対策の基本として主に、①飼育管理者や実験者に対する予防対策、②動物実験施設の建物や飼育器材に対する予防対策、③実験動物に対する予防対策に分けられる。

飼育管理者や実験者に対しては、実験動物の感染症および人獣共通感染症などについて教育を行うとともに、必要に応じて情報を提供し、施設の適切な利用のための講習会を開催する必要がある。定期的な健康診断を実施するとともに、感染事故が発生したときの備えとして動物実験を始める前に、あらかじめ血清を採取し、保存しておくことが望ましい。建物については、ヒト、動物、器材などの動線を考え、クリーンエリアとダーティーエリアを区別し、清潔なものと汚染されたものの動きが交わらないよう配慮する必要がある。また、飼育器材などは適切な方法での滅菌あるいは消毒をしなければならない。実験動物については、感染している動物がすべて何

表1. 昭和58年版ガイドラインにおける環境条件の基準値

動物種 環境要因	マウス	ラット	ハムスター類	モルモット	ウサギ	イヌ	ネコ	サル類
温度	20~26℃				18~28℃			
湿度	40%~60%(30%以下70%以上になってはならない)							
換気回数	10~15回/時							
気流速度	13~18cm/秒							
気圧	静圧差で5mmH <sub>2</sub> O 高くする (SPF/バリア区域) 静圧差で15mmH <sub>2</sub> O 高くする (アインレーター)							
粉塵	クラス10,000 * (動物を飼育していないバリア区域)							
落下細菌	3個以下 ** (動物を飼育していないバリア区域) 30個以下 ** (動物を飼育していない通常の区域)							
臭気	アンモニア濃度で20ppmを超えない							
照明	150~300ルクス(床上40~85cm)							
騒音	60ホンを超えない							

注) \* 米国航空宇宙局の分類によるクラス分け

\*\* 9cmシャーレ30分開放(血液寒天培地48時間培養)

らかの臨床症状を発現しているとは限らないため、検収、検疫および微生物モニタリングが重要となる。

検収は、伝票や送り状に記載された動物の種類、系統、体重、性別、齢などと搬入された動物を照合する作業のみならず、動物に対して臨床症状の観察のポイントを踏まえた望診(視診)と触診を行い、異常動物を早期発見することが重要である。検疫は所定の検疫室あるいはアイソレータにおいて他の動物から隔離した状態で飼育し、臨床症状の観察を継続するとともに、細菌およびウイルスなどの証明、血清反応、アレルギー反応、寄生虫および原虫の検出などにより、病因学的診断ができる程度の検査も合わせて行われる。SPF(Specific Pathogen Free)動物の微生物学的品質の保証は、繁殖・生産施設で定期的に実施されている微生物モニタリングの成績の審査だ

けで済ませることもある。検疫期間中は、動物を人や施設の飼育環境に適応するように馴化していくことも同時に行う。なお、馴化に要する期間は動物種によって異なるが、少なくとも1週間程度は必要である。

### 3)微生物モニタリング

検疫により病原微生物が検出されなかったSPF動物でも、飼育中に実験実施者や飼養者をはじめとするヒト、飼育器材、飼料、飲料水などさまざまなものから微生物汚染が発生する危険性は否定できない。そこで、特定の施設を対象に、特定の検査項目を一定の間隔で繰り返し検査を行い、繁殖の場では累代、実験の場では動物導入から実験終了時まで、動物の微生物学的品質が一定に維持されている(いた)ことを証明する微生物モニタリング

表2. 微生物カテゴリー分けと検査方法

微生物カテゴリー分け	マウス	ラット	検査方法			
			培養	血清反応	鏡検	PCR
<b>A. 人畜共通伝染病</b>						
Hantavirus (腎症候性出血熱ウイルス)		●		●		
Lymphocytic choriomeningitis virus (リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス)	●			●		
Salmonella spp. (サルモネラ)	●	●	●	●		
Dermatophytes (皮膚糸状菌)	●	●	●			
<b>B. 伝染力が強く動物を致死させる恐れがある微生物</b>						
Citrobacter rodentium (E. coli O-115) (病原性大腸菌)	●		●			
Ectromelia virus (エクトロメリアウイルス)	●			●		
Mouse hepatitis virus (マウス肝炎ウイルス)	●			●		●
Mycoplasma pulmonis (肺マイコプラズマ)	●		●	●		
Pneumocystis carinii (ニューモシステス カリニ)					●	
Sendai virus	●	●		●		
<b>C. 致死させることはないが、発病あるいは不顕性感染を起こす微生物</b>						
Bordetella bronchiseptica (気管支敗血症菌)		●	●			
Cilia-associated respiratory (CAR) bacillus (カーパチルス)	●	●		●		●
Clostridium piliformis (テイザー菌)	●	●		●		●
Corynebacterium kutscheri (ネズミコリネ菌)	●	●	●	●		
H-1 virus (H-1ウイルス)	●	●		●		
Helicobacter hepaticus (ヘリコバクター ヘパテイカス)	●					●
Helicobacter bilis (ヘリコバクター ビリス)	●					●
Kilham rat virus (キルハムラットウイルス)		●		●		
Lactic dehydrogenase elevating virus (乳酸脱水素酵素上昇ウイルス)	●					●
Mouse minute virus (マウス微小ウイルス)	●	●		●		
Mouse adenovirus (マウスアデノウイルス)	●	●		●		
Mouse cytomegalovirus (マウスサイトメガロウイルス)	●			●		
Mouse encephalomyelitis virus (マウス脳脊髄炎ウイルス)	●	●		●		
Mouse rotavirus (マウスロタウイルス)	●			●		
Pasteurella pneumotropica (肺パストツレラ)	●	●	●			
Pneumonia virus of mice (マウス肺炎ウイルス)	●	●		●		
Reovirus Type 3 (レオ-3ウイルス)	●	●		●		
Sialodacryoadenitis virus (ラット唾液腺腺炎ウイルス)		●		●		
Streptococcus pneumoniae (肺炎球菌)		●	●			
<b>D. 日和見病原体</b>						
Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)	●	●	●			
Staphylococcus aureus (黄色ブドウ球菌)	●	●	●			
<b>E. 通常は病原性はないが、飼育環境の指標になる。</b>						
外部寄生虫	●	●				●
蟻虫	●	●				●
消化管原虫	●	●				●

を実施する。

#### (1)検査対象微生物の選択

検査となる病原微生物は単に病原性が強く、顕性感染を起こす微生物のみではなく、感染して発病しない不顕性感染にて推移する微生物も、実験の目的に応じて検査対象微生物として選択する必要がある。その理由は、不顕性感染であっても感染により動物の生理機能が変化することがあり、またそれが感染源になるおそれがあるからである。このような危険性を考慮すると、この不顕性感染の摘発こそがモニタリングの目的といえる。実験成績へ影響する検査対象微生物の選択については、(財)実験動物中央研究所 ICLAS (International Council for Laboratory Animal Science) モニタリングセンターで作成したマウス・ラットの検査対象微生物の選択基準が一般的に参考にされている(表2)。

#### (2)検査頻度

感染動物は死亡、治癒、治癒後持続感染のいずれかの経過をたどることになるが、生存した場合は、通常は感染後7~10日頃からその微生物に対する抗体が検出され始め、2~3週目以降に最大の抗体価に達するとされている。したがって、病原体の感染動物体内での増殖ならびに抗体産生の経過を考慮すると、2~3ヶ月ごとの検査頻度が適当である。それより低頻度の検査はある時点での状態を示すスポット検査に位置づけされる。このようにモニタリングは長期間にわたって適正間隔で継続実施されることが何よりも重要である。

#### (3)検体

微生物モニタリングに適した検体は、対象とする微生物、検査項目によりまるごと動物、血清、糞便、植毛などから選択する。血清反応には感染から抗体産生までに要する期間を考慮して、そのコロニーで4週間以上飼育された個体由来の血清を供する必要がある。加えて抗体産生能力が完成した8週齢以上の動物を検査に充てる。繁殖コロニーの場合は、退役種雌動物が抗体検査に適している。それは、母動物は感染症に感受性の高い幼若動物を哺育するため、哺育仔を介して病原微生物に暴露されやすいからである。なお、ヌードマウス、スキッド(SCID)マウス、ヌードラットなど免疫不全のミュータント系動物については、ヘテロ動物を検査に供する。また、自己免疫疾患マウスなどの病態モデル動物や、トランスジェニックならびにノックアウト動物では、予知できない反応阻害因子が血清中に存在することも考えられるの

で、おとり動物の使用が望ましいとされている。培養・寄生虫検査に適した検体は、一般に(成熟動物よりは)離乳後3週間以内の幼若動物が検査に適している。それは、成熟動物に対する検査も無意味ではないが、病原微生物に高感受性であるからである。また研究施設の場合、免疫抑制剤投与や腫瘍移植などの実験処置による免疫抑制動物については、コントロール群の動物を検査に供することが適切である。しかし、実験目的によっては本来必要とする情報を得るための試料採取を優先させなければならず、モニタリングに供することが不可能な場合もあり、おとり動物を配して検査する方法がとられる。

#### (4)おとり(モニター)動物検査法

モニタリングとは抽出試験であり、検査対象病原体の病原性や伝播力を元にして、統計学を基礎に、飼育規模に対してどれだけの数の動物を検査すればよいかを感染率と感染検出確率で構成された対照表から算出する。しかし、この検出方法は母集団として同一コロニーを想定している。実際は、同じマウス飼育室に種々の系統のマウス・ラットが飼育されていることも多い。さらに、現在主流となりつつある個別換気式ケージに、このモニタリング理論は使えない。また、前述したように、実験目的から試料採取が不可能な場合や、何らかの原因で免疫機能が不完全な動物について抗体検査でしか調べられない微生物をモニタリングしたい場合にも抽出試験は使えない。そこで、代理の検査動物、おとり動物(モニター動物)を用いる。

そのほか、おとり動物検査法の利点として系統を自由に選べることとおとり動物のケージを自由に配置できることである。マウスでは抗体産生能力に著しい系統差があることが知られている。たとえば、マウス肝炎ウイルス抗体を補体結合反応で調べると、C57BL/6はBALB/c、C3H/He、DBA/2、ICR、ddYと比べて、有意に高い陽性率と抗体価を示すので、同じ検体数でも、より正しい結果が得られる可能性がある。このような差は補体結合反応のかわりに、より高感度の酵素抗体法を用いることによって改善される。ケージ配置については、飼育棚の最下段、陽圧ラミナーフローラックの場合は飼育室の排気ダクト付近に位置させ、モニタリング対象微生物の検出効果を意図的に高める。ただし、陰圧ラミナーフローラックでは排気が外部に出ないため、汚染床敷方式(おとり動物の使用のケージに汚れ床敷を集め、おとり動物を定期的に検査する方法)が望ましいとされている。

## 2. 苦痛の程度の予想と人道的エンドポイントの実施

動物実験における動物福祉の考え方として、動物実験計画の立案、実験計画に基づく実験処置、実験結果の分析、評価、検証というプロセスで進行される動物実験の各段階において3Rや5F(Five Freedoms: 福祉の原則: 飢えと渇きからの解放, 肉体的苦痛と不快感からの解放, 傷害や疾病からの解放, 恐れと不安からの解放, 基本的な行動様式に従う自由)に関する配慮が求められている。したがって、実験責任者は①動物の生態・習性に配慮した飼育環境の整備, ②心を込めて飼育すること, ③丁寧に実験処置を行うこと, ④鎮痛剤や麻酔薬の処方, ⑤前もって動物を実験装置に慣らすこと, ⑥苦痛度の高い実験には人道的エンドポイントを適用すること, ⑦国際的に容認された安楽死の方法を選択すること, や実験動物を専門とする獣医師や実験動物技術者の意見等を踏まえて実験計画をキッチリ立案しなければならない。さらに、重要なことは、一連の実験が終了したあとで実験結果の検証や分析の結果を次の動物実験計画に活かして3Rの改善に役立てることである。

動物実験計画は、「研究機関等の長は、動物実験委員会の設置のために必要な措置を講じること」(文部科学省の基本指針 第2.1)と「動物実験委員会は、動物実験計画の審査を実施すること」(同指針 第3.2)に準じて動物実験

委員会により審査される。この際に考慮すべきは、Cost-Benefit分析(Cost-Benefit Analysis: CBA)のバランスに基づく審査の実施である<sup>12)</sup>。CBAにおけるCost(費用)とは、実験動物が被る負担(苦痛)、Benefit(利益)とは、動物実験の結果で得られる利益を意味する。Benefitがいかに大きな実験であっても、動物が被る苦痛(Cost)が著しく大きい場合、あるいはCostが大きいにもかかわらず動物実験の結果得られる利益(Benefit)が小さい場合には、当該動物実験計画の再考が求められる。したがって、CBAにおいては、研究の目的を勘案しながらも、実験動物が被る負担(苦痛)を正しく理解し、苦痛の軽減に努めることが、研究者ならびに動物実験委員会に求められる。

1) 苦痛の程度の予想

動物実験の苦痛評価基準に関しては、米国では、1986年にSCAW(Scientists Center for Animal Welfare)<sup>13),14)</sup>が動物実験の倫理的カテゴリーを示し、動物の苦痛の程度を推測する参考資料として機関内委員会での審査あるいは研究者自身の自己評価に利用することを推奨している。わが国の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」(日本学術会議)には、実験動物が被る苦痛の程度を

表3. 苦痛度検索

分類	苦痛度	処置
個体識別	B	色素塗布, 毛刈り, 耳バンチ/耳カット/イヤリング, 耳タグ, 入れ墨, マイクロチップ(ICチップ)
	B	用手
保定	C	筒状マウスセット保定器, ボールマスケージ, モンキーチェアー
	C	給餌(半日以上1日以内), 給水(2時間以上半日以内)
制限	D	給餌(1日以上), 給水(半日以上), *但し, 2~3日で体重が20%以上減少すれば直ちに中止
	B	体重・体格測定, 体温測定, 握力測定, 運動量測定(強制せず), 行動観察, 脳波測定, 超音波エコー
身体測定 (無麻酔)	B	体重・体格測定, 体温測定, 握力測定, 運動量測定(強制せず), 行動観察, 脳波測定, 超音波エコー
	B	血圧測定, 心電図測定, MRI, CT, PET, 超音波エコー
採血・採材 (無麻酔)	B	静脈(単回), 動脈(単回), 腹水, 採尿, 採糞, 被毛, 毛根, 皮膚バイオプシー, 精液
	C	静脈(経時的), 眼窩静脈叢, テールカット
(麻酔下)	B	静脈(単回), 留置カテーテル, 採尿, テールカット, 眼窩静脈叢
	C	心臓
投与 (無麻酔)	B	吸入, 点鼻, 経口, 経口(胃ゾンデ/カテーテル), 経皮(パッチ)/粘膜, 皮内, 皮下, 筋肉内, 静脈内, 動脈内, 腹腔内, 直腸内, 混餌, 飲水溶解/懸濁液
	C	フットパッド内
(麻酔下)	B	点鼻・経鼻, 気管内, 静脈内
	C	眼球内, 脳または脊髄内, 脳室内, 門脈内, 消化管内
最終処分 (無麻酔)	B	頸椎脱臼(要トレーニング), 断頭(保定と切れるブレード), 炭酸ガス(ペンベより), 安楽死処置として認められたその他のガス, 麻酔薬の過剰投
	B	放血, 全採血, 断頭
(麻酔下)	B	放血, 全採血, 断頭
	B	気管内挿管, 皮下移植, 静脈内移植, 腹腔内移植, 電気刺激, 新生仔蘇生, 人工保育/里親
手術移植	C	カテーテル/ポンプ留置, 静脈内カニューレション, 脳内カニューレション, バルーンカテーテル, 動脈結紮(深部), 静脈結紮(深部), 卵管結紮, 採卵, 胚移植, 卵巣移植, 精巣内細胞移植, 臓器内移植
	D	X線照射(免疫抑制), テレメトリー埋め込み, 電極埋め込み, 帝王切開, 精管結紮
疾患モデル	D	臓器移植, X線照射(骨髄の機能破壊)
	C	認知症, 肥満, 嘔吐
薬理毒性	D	心筋梗塞・虚血, 脳梗塞・虚血, 脊髄損傷, 末梢神経損傷, 末梢神経変性, パーキンソン病, 自己免疫疾患, 糖尿病, 高血圧(脳卒中モデルを含む), 筋ジストロフィー, 担がん, プリオン病
	C	テールフリッキング, ホットプレート, 生殖発生毒性
腫瘍	D	単回投与毒性, 反復投与毒性, がん原性
	B/C	薬剤投与(副作用により苦痛度が異なる)
感染寄生	D	発癌
	C	不顕性, 抗体作製(アナフィラキシーショックを回避)
	D	顕性(致死を含む)

注) 苦痛度B: 脊椎動物を用いた研究で、動物に対してほとんど、あるいはまったく不快感を与えないと思われる実験操作。  
 苦痛度C: 脊椎動物を用いた研究で、動物に対して軽微なストレスあるいは痛み(短時間持続する痛み)を伴う実験。  
 苦痛度D: 脊椎動物を用いた研究で、避けることのできない重度のストレスや痛みを伴う実験。

「苦痛度検索」(実験動物中央研究所)より一部改変

判定する際には、SCAW が作成した「苦痛分類」を参照すべきであると記されている。また、実験動物中央研究所では「苦痛の分類」に基づいて、具体的に動物実験の苦痛度を分類している(表3)。

さらに、実験動物、とくに遺伝子改変マウスの爆発的増加とその使用、ならびに遺伝子改変マウスおよび遺伝子改変マウス作出において使われるマウスの福祉に関して、英国獣医学会動物福祉基金、医学実験における動物代替基金、王立動物虐待防止協会、および動物福祉のための大学連合による福祉に関する合同ワーキンググループより「遺伝子改変マウス作出における洗練および削減」<sup>15), 16)</sup>が提案されている。そのなかには、①機能が未知の遺伝子を導入あるいは破壊した場合は、当該遺伝子改変動物がどのような動物福祉上の影響を受けるかを予測することはむずかしく、したがって、子孫動物を何世代にもわたって継続的に日常の注意深い管理、観察等が必要であること、②すでに特性が十分に解明されている遺伝子改変動物を使用する実験においては、実験実施者は、実験動物が被る苦痛の程度を予測できるので、軽減処置を行うこと、③遺伝子改変の結果、胎生致死となったり、あるいは出生後に致死的な表現型(たとえば、発癌など)を示したりする場合、誘導可能なプロモーターや条件的

(コンディショナル)な遺伝子変異技術を利用したり、あるいは適切なエンドポイントを定めたりすることなどによって遺伝子改変が動物福祉に及ぼす悪影響を最小限にすること、が提案されている。

2) 人道的エンドポイントの実施

人道的エンドポイント(humane endpoint)とは、実験動物が死ぬまで実験を続ける(death as endpoint)のではなく、動物が避けることのできない耐え難い苦痛を被っている状態や瀕死状態をもとに安楽死処置を施して実験を終了させる時期のことである<sup>17)</sup>。とくに、発癌実験、感染実験、急性毒性実験、あるいは遺伝子改変動物を用いた実験などにおいては、科学的妥当性にもとづいた適切な人道的エンドポイントの設定はきわめて重要なである。

人道的エンドポイントの判断基準には、「死亡に替わる人道的エンドポイントの例」(表4)が目安として参考となる。また、瀕死状態の定義は実験系や動物種ごとに異なる可能性があるが、NCI Animal Care and Use Committeeのガイドラインでは瀕死状態の判定基準(例)として、①歩行障害-摂餌・摂水が困難となるもの、②外部刺激(指先の刺激、ケージを叩くなど)に対して無反応、

表4. 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	皮下の腫瘍
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	代謝異常を伴う疾患 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 消化器: 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
進行性低体温	正常体温より10%以上低下 げっ歯類では4-6°C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る場合は安楽死させる.	各種

「人道的エンドポイントの設定に向けてのアプローチ」中井伸子, 実験動物技術 第43巻2号 (2008)より引用

③重症骨折で回復不可能，痛みをコントロールできない，  
④大きな腫傷，腹水もしくは感染等で正常な身体機能を保てない状態（摂餌不能，摂水不能，正常な体位や行動を保てない，排尿障害，排便障害など），⑤感染，炎症，痛みで摂餌ができない状態，実験計画上，治療や処置ができない場合，⑥組織の壊死や組織液の溶出があり，実験計画上治療できない，⑦雌動物が難産（分娩障害）で，分娩の進行が無い場合，⑧極端な低体温もしくは高体温で制御できない状態，を提示している。

人道的エンドポイントを実行するには，一般状態の変化や死の徴候などの発見には，研究者のみならず，動物管理を担当する職員などすべての関係者が十分な頻度で，各担当業務の専門知識と経験に基づき，動物を観察することが重要である。

### 3. 苦痛軽減のための麻酔

動物実験で適正な鎮静，鎮痛ならびに麻酔を行うことは実験動物福祉において必要不可欠な重要事項である。麻酔は，局所麻酔（表面麻酔，浸潤麻酔，伝達麻酔，脊椎麻酔）と全身麻酔（静脈麻酔，吸入麻酔）に分けられる。本稿ではマウス，ラット，モルモットとウサギの全身麻酔とその注意点を記載する。よく用いられるマウス，ラッ

トとウサギの吸入麻酔薬と注射用麻酔薬，とその用量については表5に示した。

ジエチルエーテルは，1840年代からの吸入麻酔の始まりとともに用いられたが，引火性があること，気道刺激とそれにとまなう気道分泌物過剰および喉頭痙攣などの副作用が報告されている。特にモルモットは気管分泌物の増加で気道狭窄を起こしやすいので避けるべきである。欧米の最近の専門教科書では，本剤による吸入麻酔として不適切であると評価している<sup>19)</sup>。また，本剤は麻酔薬としては既に市販されておらず，試薬，工業用薬品であることから，労働安全衛生法，消防法（第4種危険物の特殊引火物（引火点45度，静電気により引火の危険性あり，防爆冷蔵庫保管）などにより規制されている。

ペンドバルビタールはよく使われる麻酔薬であるが，本剤には鎮痛作用はほとんどなく，麻酔効果は不安定であり，その強力な催眠作用により，意識喪失の状態下で外科麻酔がなされてきた。この意識喪失の状態を得る用量は致死量に極めて近く，さらに本剤の呼吸抑制作用のため，外科麻酔に必要とする投与量では死亡事故が多発することが知られている。とくに欧米の最近の専門教科書では本剤の単独投与による全身麻酔は不適切であると明言されている<sup>19)</sup>。なお，本剤はその薬理作用から動物

表5. マウス・ラット・ウサギに用いる主な麻酔薬とその用量

動物種	麻酔法	麻酔薬	投与経路	用量
マウス	吸入	セボフルラン	吸入	導入濃度：5% 維持濃度：2.5-4%
		イソフルラン		導入濃度：4-5% 維持濃度：2-3%
		ハロセン		導入濃度：4-5% 維持濃度：1.5-2%
	注射 三種混合	メedetミジン(ドミトール)	腹腔内	0.3 mg/kg
		ミタゾラン(ドルミカム)		4.0 mg/kg
		ブトルファノール(ベトルファール)		5.0 mg/kg
	注射	プロポフォール(ラピノベット)	静脈内	26 mg/kg
		チオペンタールナトリウム(ラボナール)	静脈内	30-40 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+キシラジン(セラクター)	腹腔内/静脈内	80-100 mg/kg + 10 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+メedetミジン(ドミトール)	腹腔内/静脈内	75 mg/kg + 1.0 mg/kg
セボフルラン		吸入	導入濃度：5% 維持濃度：2.5-4%	
ラット	吸入	イソフルラン	吸入	導入濃度：4-5% 維持濃度：2-3%
		ハロセン		導入濃度：4-5% 維持濃度：1.5-2%
		セボフルラン		導入濃度：5% 維持濃度：2.5-4%
	注射 三種混合	メedetミジン(ドミトール)	腹腔内	0.15 mg/kg
		ミタゾラン(ドルミカム)		2.0 mg/kg
		ブトルファノール(ベトルファール)		5.0 mg/kg (2.5 mg/kg)
	注射	プロポフォール(ラピノベット)	静脈内	10 mg/kg
		チオペンタールナトリウム(ラボナール)	静脈内	40 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+キシラジン(セラクター)	腹腔内/静脈内	75-100 mg/kg + 10 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+メedetミジン(ドミトール)	腹腔内/静脈内	75 mg/kg + 0.5 mg/kg
ウレタン		腹腔内	1,000 mg/kg	
α-クロラロース		腹腔内	55-65 mg/kg	
ウサギ	吸入	セボフルラン	吸入	導入濃度：5% 維持濃度：3-4%
		イソフルラン		導入濃度：3-5% 維持濃度：3-4%
		ハロセン		導入濃度：2-4% 維持濃度：2-3%
	注射	プロポフォール(ラピノベット)	静脈内	10 mg/kg
		チオペンタールナトリウム(ラボナール)	静脈内	30 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+キシラジン(セラクター)	腹腔内/静脈内	10 mg/kg + 3 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+キシラジン(セラクター)	筋肉内	35 mg/kg + 5 mg/kg
		ケタミン(ケタラール)+メedetミジン(ドミトール)	筋肉内	25 mg/kg + 0.5 mg/kg

文献 19), 21)より引用



の安楽死薬としては推奨されている<sup>20)</sup>。

### 1) マウス・ラット

げっ歯類では、研究目的で絶食が必要となる場合を除き、麻酔前の絶食はとくに必要としない。マウスやラットは、薬剤の連続的投与のための静脈ラインの確保が困難なため、注射用麻酔薬の腹腔内投与や筋肉内投与により全身麻酔を行う。この場合、麻酔状態をみながら投与量の調節を行うことは不可能で、あらかじめ計算された用量を一気に注射することから、安全域の広い混合注射が推奨されている。一般に麻酔前投与薬は、とくに必要としない。ケタミンとキシラジンの混合麻酔は同一の注射器内で混合して使用でき、系統などによって十分な外科麻酔が得られない場合には、ケタミンの量を増量することもできる。術中の覚醒時には初期投与量の4分の1から3分の1を追加して麻酔を延長することができる。ケタミンとメドミジンの混合麻酔も同様な使い方ができ、覚醒を早めたい場合はアチパメゾール(1 mg/kg, s. c.)による拮抗が可能である。最近、メドミジン、ミタゾラン、ブトルファノールの三種混合薬により約60分程度の深麻酔が得られ、アチパメゾール(0.3 mg/kg, i. p.)による速やかな覚醒が報告されている<sup>21)</sup>。

$\alpha$ -クロラロースやウレタンは循環器系や呼吸器系への抑制作用は少なく長時間の安定した麻酔が得られることから、ラットの外科手術等によく使用される。一般に非覚醒実験に使用され、とくにウレタンは発癌性を持つことに注意しなければならない。

吸入麻酔薬には、ハロタン、イソフルラン、セボフルランなどがある。簡易な麻酔法は麻酔瓶の使用である。透明な麻酔瓶に十分量の麻酔薬をしみこませた脱脂綿などをあらかじめ入れておき、十分揮発し、瓶内に充満したのちに動物を入れ、蓋を閉める。この場合、呼吸の状態を観察しながら麻酔深度を調整することが重要である。揮発性麻酔薬は温度の上昇により濃度が上昇する、例えば、ハロタンは20℃で32%になる。連続して麻酔するときには、麻酔瓶内の温度上昇に注意する。また連続使用では、動物の呼気による二酸化炭素濃度の上昇を考慮する必要がある。麻酔瓶を用いた方法および麻酔気化器を用いた場合、周囲に麻酔ガスが漏出することは避けられず、排気チャンバー内で行うか、余剰麻酔ガスの回収装置を設置するか、十分な換気が必要となる。

### 2) モルモット

モルモットでは食餌が口腔内に残りこれが気道を閉鎖することがあるので、短時間の絶食が必要となる。モル

モットも麻酔薬の静脈内投与は難しく、腹腔内、筋肉内、皮下投与により行う。ペンドバルビタールの単独使用は麻酔死の危険性があり、どうしても使用する場合はペントバルビタール(25 mg/kg, i. p.)を鎮静に用い、不動化ののち、メトキシフルランで補助麻酔する。モルモットは臆病な動物であるので、円滑な麻酔導入のために、とくに静かに優しく扱うことも重要である。また、麻酔処置後は、呼吸器感染、胃腸障害、意気消沈、食欲欠乏がしばしばみられる。吸入麻酔には、メトキシフルランなどがあり、麻酔瓶または顔面マスクを利用する。

### 3) ウサギ

ウサギではとくに麻酔前の絶食は不要とされている。ウサギは術前の未熟な取扱いや手術室への移動で容易にストレスを受ける。このため、麻酔前投与薬による鎮静が有効である。前投与薬として、キシラジン(2.5 mg/kg, i. m.)は強い鎮静効果とわずかな鎮痛効果を示し、アチパメゾール(1.0 mg/kg, i. m.)により覚醒される、アセプロマジン(1 mg/kg, i. m.)は中程度の鎮静効果を示すが、鎮痛効果はない、メドミジン(0.25 mg/kg, i. m.)は安全で効果的な鎮静効果をし、0.5 mg/kg(i. m.)で、光反射を消失し、アチパメゾール(1.0 mg/kg, i. m.)またはヨヒンピン(0.2 mg/kg, i. v.)により覚醒される。

吸入麻酔薬の使用だけで麻酔導入が可能であるが、ウサギが忌避とするハロタン、イソフルランなどでは息をこらえるような状態となり、麻酔導入には危険を伴うとされる。これを防ぐためには、ウサギが忌避しないセボフルランの使用が適切である。

気管内挿管は3~4mmの気管チューブで種々の方法を用いて行われる。気管を触診し、適切な口径のチューブを選ぶ。口腔が狭く下顎の緊張が取れにくいので、十分な導入麻酔を行わないと挿入は困難である。顔面マスクあるいは麻酔チャンバーを用いて十分な深度の麻酔が得られたら適当な姿勢に保定し、湾曲したブレードを持つ咽頭鏡を用いて挿管する。ウサギにおいて最もよく用いられる麻酔回路はAyreのTピースである。

## おわりに

1959年に、イギリスの動物学者Russellと微生物学者Burchが「人道的実験技術の原則」(The Principles of Humane Experimental Technique)を著し、その中で3Rの理念を謳ったのは、当時の動物実験反対運動に対する科学者側からの実験動物福祉に対する提案であった。その後、この考え方は現在の動物実験代替法概念の中核となり、この書に盛られたRussell & Burchの思想は、

近代的実験動物・動物実験の基盤となった。わが国においては、2005年に「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正で、3Rの理念が初めて法令に明文化され、この理念の理解と実践が求められている。実践は、動物実験の適正化の推進力となり、3Rの理念が生かされる。研究機関においては、機関の長、動物実験委員会、研究者、実験動物科学者、実験動物技術者、獣医師が一体となって取組む必要がある。

## 文 献

- 1) **Castle, W. E.** : Mendel's law of heredity. *Science* **18**: 396-406, 1903.
- 2) **Heston, W. E.** : Obituary. Clarence Cook Little. *Cancer Res.* **32**: 1355-1356, 1972.
- 3) **King, D. H.** : Studies on inbreeding. The Wistar Institute. *J. Exp. Zool.* **26**: 1-54, 1918.
- 4) **Foster, H. L., Fox, J. G. and Small, J. D.**: The mouse in biomedical research. New York Academic Press, 1981.
- 5) **Gordon, J. W. and Ruddle, F. H.** : Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214**: 1244-1246, 1981.
- 6) **Capecchi, M. R.** : The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* **5**: 70-76, 1989.
- 7) 動物の愛護及び管理に関する法律 : <http://law.e-gov.go.jp/htmldata/S48/S48HO105.html>
- 8) 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 [http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2\\_data/nt\\_h180428\\_88.html](http://www.env.go.jp/nature/dobutsu/aigo/2_data/nt_h180428_88.html)
- 9) 動物実験に関する基本指針(文科省, 厚労省, 農水省) [http://www.mext.go.jp/b\\_menu/hakusho/nc/06060904.htm](http://www.mext.go.jp/b_menu/hakusho/nc/06060904.htm)  
<http://www.mhlw.go.jp/general/seido/kousei/i-kenkyu/dobutsu/0606sisin.html>  
[http://www.s.affrc.go.jp/docs/pdf/press\\_060601.pdf](http://www.s.affrc.go.jp/docs/pdf/press_060601.pdf)
- 10) 動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(日本学術会議)<http://www.scj.go.jp/ja/info/kohyo/pdf/kohyo-20-k16-2.pdf>
- 11) **Russell, W. M. and Burch, R. L.** : *The Principles of Humane Experimental Technique*. London : Methuen (also Special Edition published by Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar. 1992.
- 12) The Animal Procedures Committee, U.K. : "Review of Cost-Benefit Assessment in the Use of animals in Research". 2003.
- 13) Anonymous: *Laboratory Animal Science*. Special Issue, 11-13, 1987.
- 14) 久原孝俊 : 実験動物海外技術情報. No.7(1月20日号). 14-17, 1988.
- 15) **Robinson, V. and Jennings, M.** : "Refinement and Reduction in Production of Genetically Modified Mice". *Laboratory Animals* **37**: Supplement 1, 2003 whole volume.
- 16) 久原孝俊, 久原美智子 : "遺伝子改変マウス作成における洗練 (refinement) および削減 (reduction)" アドスリー, 2006.
- 17) 中井伸子 : "動物実験における人道的エンドポイント" (原著 : *I L A R* ジャーナル 41(2)), アドスリー, 2006.
- 18) 中井伸子 : "人道的エンドポイント設定にむけてのアプローチ" *実験動物技術* **43**: 115-122, 2008.
- 19) **Flecknell, P.** : *Laboratory Animal Anaesthesia*, 3rd ed., Academic Press, p57-66, 2010.
- 20) AVMA Guidelines On Euthanasia 2007 URL : <http://www.avma.org/issues/animal-welfare/euthanasia.pdf>
- 21) **Pang, H., Kawai, S., Shioya, K., Katahira, K., Yabuuchi, K., Tajima, M., Kurosawa, M. T.** : Short anesthesia with a combination of three injectable anesthetics in rat. *Exp. Animal* **59**: p370, 2010.