



動物実験の実践倫理 Part 2. 実験計画の立案と審査

著作： 北海道大学大学院獣医学研究科
鍵山 直子、伊藤茂男
協力： 動物実験関係者連絡協議会



学習の目標

- 1) 動物実験計画書作成の要点を理解する。
- 2) 動物実験の苦痛カテゴリー、実験処置の苦痛度および苦痛軽減措置について説明できる。
- 3) 動物実験計画の審査における苦痛対効果の分析について説明できる。



目 次

動物実験計画書の作成

- 実験の目的と意義
- 使用動物数と算出根拠
- 動物の苦痛と軽減

動物の苦痛 (cost) 対実験の効果 (benefit)

動物実験計画審査の実際



動物実験計画書の作成

1. 実験の目的、意義、予想される成果

簡潔明瞭な記述

公正に行われる

成果の予測は実験責任者の感性と経験に負うところもあるので、自らの考えを丁寧に説明する姿勢が必要である。代替法が存在しない、または代替法では実験の目的を達成できないことを説明する。選択された方法の科学的合理性について丁寧に記述する。

できるだけ平易な用語で表現する。



動物実験計画書の作成

2. 使用動物数と算出根拠

実験データを正しく解析するために必要な最少数でなければならない。その数は、予想されるデータの標準偏差や群間の差によって異なるが、通常は、精度の高い実験ほど1群の数が少ない。



生物統計学(推計学)に基づいて
実験をデザインする。

3-1 動物の苦痛: ヒトに動物の苦痛が分かるか

痛みのシグナルは定量可能

動物の苦痛は測定できない



国際医学団体協議会(CIOMS: Council for International Organization for Medical Science)は
“International guiding principles for biomedical research involving animals(1985)”のなかで、
「動物が感じる苦痛の程度はヒトが感じるそれと同等と考える」と表明した。

動物の苦痛カテゴリー（SCAWの区分）

A

・ 生物個体を用いない実験；植物、細菌、原虫または無脊椎動物を用いた実験

B

・ 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

C

・ 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

D

・ 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

E

・ 麻酔していない意識のある動物を用いて、動物が耐えることのできる最大の痛み、あるいはそれ以上の痛みを与えるような処置

SCAW: Scientists Center for Animal Welfare 動物福祉のための科学者センター。
国立大学法人動物実験施設協議会「動物実験処置の苦痛分類に関する解説」（2004年）より。

実験処置の苦痛度検索

実験の流れに沿って実験処置や実験手技を洗い出し、
処置のひとつひとつに苦痛度をあてはめる。

洗い出された処置あるいは手技を仕分ける。

①保定、②拘束、③個体識別、④身体検査、⑤給餌・給水制限、⑥行動観察、⑦材料採取、⑧投与・接種、⑨移植、⑩処置、⑪手術、⑫病態／疾患モデル作製、⑬薬理・毒性実験、⑭発がん実験、⑮感染実験など

苦痛度： **severity of pain and/or distress**

苦痛度検索表の例

分類	手技/処置	苦痛度	備 考
保定	用手保定	B	無麻酔・無鎮静下での数分間の姿勢制御
	マウス・ラット尾静脈採血用保定器の使用	B	
	ウサギ耳翼辺縁静脈採血用保定器の使用	B	
拘束	ラット用ボールマンケージ	C	無麻酔・無鎮静下での数時間にわたる姿勢もしくは生理・生態・習性の制御
	マカク属サル用モンキーチェア	C	

個体識別	色素塗付、毛刈、入墨、耳パンチ、耳標、脚帯、マイクロチップ(IC)など	B	耳パンチと耳介のバイオプシーを峻別
身体検査	体重測定	B	不動化のために麻酔することがある。
	体温測定	B	
	脳波測定	B	
	心電図測定	B	
	超音波画像測定	B	
	放射線画像撮影(X線、MRI、CT、PETなど)	B	
	移植腫瘍サイズ計測	B	
制限	絶食・絶水	B C D	持続時間と動物種により異なる。

行動観察	摂餌・摂水量、行動量の測定、レバー押し、発情行動の観察、オープンフィールド試験	B		自発行動の観察
	強制運動、生態・習性の制限、ストレス環境への暴露	C	D	
材料採取	無麻酔で行う採血（注射器又は表皮薄切による末梢静脈採血など）	B		遺伝子型判別のためのマウス・ラットのテールカット（tail clipping）は3～4週齢で実施する。
	腹水採取	B		
	スワブ採取（鼻腔、口腔、クローアカ）	B		
	カテーテルによる採尿/導尿（麻酔薬塗付）	B		
	麻酔下の採血（動脈、眼底静脈叢、体腔内血管）	C		
	麻酔下のバイオプシー（テールカット、耳介、皮膚、皮下脂肪、骨髓、腎臓、肝臓、消化管粘膜など）	C		

投与・接種	静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下(硬膜外を含む)、皮内、経皮/経粘膜、経口(カテーテルを使用を含む)、混餌、飲水溶解/懸濁、経気道/吸入(気管内挿管を含む)、経鼻/点鼻	B	
	脳(室)内、脊髄内、鞘内、眼球内、足底部、動脈内、体表リンパ節、内臓血管、腸内(以上、麻酔下)	C	無麻酔で行う場合は理由を明記する。
	アジュバント乳化抗原 フロイント不完全 フロイント完全	C	できるだけ不完全アジュバントを使用し、足底部は避ける。
D			
移植	皮下、静脈内、腹腔内	B	足底部は選択した理由を明記
	足底部/フットパッド(麻酔下)	C	
	臓器内(麻酔下)	C	
	臓器移植(麻酔下)	D	

処置	気管内挿管(局所麻酔下)	B	放射線照射は 線量と照射部 位により苦痛度 が異なる。
	内視鏡スコープ挿入(麻酔下)	B	
	浸透圧ポンプ埋め込み	C	
	バルーンカテーテル挿入	C	
	脳内、筋肉内電極挿入(麻酔下)	C	
	脳室内カニューレ挿入(麻酔下)	C	
	留置針の設置 生態、習性を妨げない場合 生態、習性を妨げる場合	B	
		C	
	放射線照射	B C D	

手術	覚醒させず安楽死させる手術の実習	B	すべて麻酔下 で実施する。 精管結紮、胚 移植には開腹 手術を伴う。
	テレメトリー埋め込み	C	
	帝王切開	C	
	新生子蘇生	B	
	人工哺育/里子	B	
	頭蓋穿孔術	C	
	精管結紮	C	
	胚移植	C	

疾患/病態 モデル作製	食餌性肥満(機能障害を伴わない)	B	最大限の病態発現 を前提に苦痛度を 選択する。 重篤に至る前に安 楽死処置する場合 は、その旨を明記 し適切な苦痛度を 選択する。
	高脂血症	C	
	糖尿病	D	
	高血圧症(脳卒中モデルを含む)	D	
	腎不全(ネフローゼを含む)	D	
	心筋梗塞/虚血	D	
	脊髄損傷	D	
	末梢神経損傷/変性	D	
	パーキンソン病	D	
	認知症	C	
	筋ジストロフィー	D	
	自己免疫疾患	D	

薬理・毒性 実験	電気刺激	B	
	テールフリック	B	
	ホットプレート	B	
	酢酸ライジング	C	
	単回投与毒性試験	D	
	反復投与毒性試験	D	
	生殖発生毒性試験	C	
	がん原性試験	D	
発がん実験	がん細胞移植	D	最大の病 態発現を 前提に苦 痛度を選 択する。
	化学発がん	D	
感染実験	顕性(致死を含む)	D	
	不顕性	C	

実験計画書の作成

3-2 動物の苦痛: 苦痛軽減

- 麻酔薬・鎮痛薬を研究に支障ない範囲で使用する。
- 手術後のケアと疼痛管理をしっかり行う。
- 苦痛カテゴリーDの実験は、人道的エンドポイントの適用を検討する。
- 実験を終了した動物は安楽死処置(安楽殺)する。
- 実験開始前に動物を実験装置に慣らす。
- 心を込めて飼育し、丁寧に実験処置する。
- 生理・生態・習性に配慮して飼育環境を整備する。
- 感染症コントロールには細心の注意を払う。



人道的エンドポイントとは

生存終末点まで実験を続けず(**death as endpoint**)、予期された症状等をもとに安楽死させる時期を予め定め、その実行によって実験動物を耐えがたい苦痛から解放すること(**humane endpoint**)。実験装置から開放することもある。

人道的エンドポイント適用の目安

- ・ 摂餌・摂水困難
- ・ 苦悶の症状(自傷、異常姿勢、呼吸障害、発声)
- ・ 回復しない外見異常(下痢、出血、外陰部の汚れ)
- ・ 急激で回復しない体重減少(数日間で20%以上)
- ・ 腫瘍サイズの著しい増大(体重の10%以上)



実験計画の審査

苦痛対効果の分析 (cost-benefit analysis)

Cost

実験動物にとって負担となる苦痛
＝予想されるが望まれていない帰結

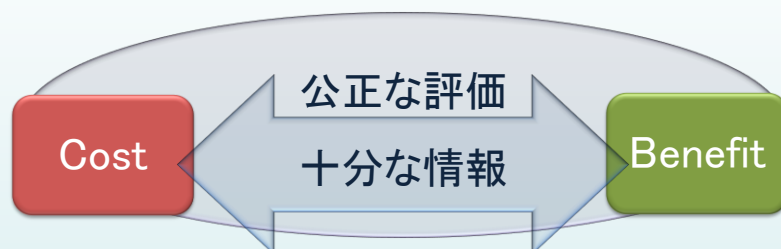
Benefit

研究成果、意義、恩恵
＝期待される帰結



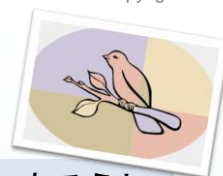
Cost-benefit analysisとは

苦痛 対 効果の分析に基づく
動物実験計画の適正性評価



イギリスは、Animals[Scientific Procedures]Actでこのような方法による動物実験計画の審査を規定している。

Jeremy Bentham (1748–1832)



苦痛は道德の最大の敵である。道德的であろうとするなら、痛みを感じる存在に対して痛みを与えてはならない。



1876年に、イギリスにおける動物虐待防止法（Cruelty to Animals Act）の制定を導いた。彼の功（公）利主義は、動物実験計画審査時の基本的考え方である苦痛対効果による相対評価（cost-benefit analysis）の基礎になっている。

実験計画の審査

ここは蝦夷大学研究開発センターの会議室です。

動物実験委員会のメンバーが着席しました。
今日は3つの動物実験計画について審査が行われます。

1. 血管再生治療実験
2. 疲労モデルの作製と行動観察
3. 酢酸ライジング法を用いた薬効試験



実験計画の苦痛カテゴリーに関する、動物実験責任者のヒアリングが始まりました。

苦痛度 : Severity of pain and/or distress of each experimental procedure

苦痛カテゴリー : Final pain category of the experiment

実験方法は、要点のみをスライドに示しました。

1. 血管再生治療実験

＜実験方法＞（原案）



マウスを全身麻酔し（苦痛度B）、皮膚を切開して大腿動脈を結紮したのち、手術部位を縫合する（C）。作製した下肢虚血モデルの虚血部位に、血管内皮細胞増殖因子の遺伝子を挿入した遺伝子治療用ウイルスベクターを注射する（B）。

その後、4週間のエコー検査と血流測定（B）により虚血の改善効果を解析したのち安楽死させ（B）、病理組織学的検査材料を採取する。

したがって、本実験の苦痛カテゴリーをCで申請する。

Q. 動物実験委員会の質問



① 苦痛カテゴリーについて：

虚血モデルには持続する痛みがあるはずだ。特に、非治療個体（対象群）が問題だ。逃れられない激しい苦痛が想定されるなら、本実験の苦痛カテゴリーはDとすべきではないか。

② 苦痛の緩和について：

鎮痛剤を投与すべきだ。鎮痛処置が実験の目的を損なうのであれば、その旨を科学的に記述すべきである。

A. 動物実験責任者の回答



① 苦痛カテゴリーについて:

手術の痛みに気をとられ、目的とする虚血モデルの痛みや機能障害を見落とした。苦痛カテゴリーをCからDに修正する。

② 苦痛の緩和について:

鎮痛剤の投与はデータ解析の障害になるので実施しない。ただし、激痛による自傷行為、足を引きずる症状、20%以上の急激な体重減少を呈した個体には人道的エンドポイントを適用して安楽死処置を施すこととし、実験計画を修正する。

問: あなたなら、実験方法をどのように修正しますか。

<実験方法> (修正版)

マウスを全身麻酔し(苦痛度B)、皮膚を切開して大腿動脈を結紮したのち、手術部位を縫合する(C)。こうして作製した下肢虚血モデル(D)の虚血部位に、血管内皮細胞増殖因子の遺伝子を挿入した遺伝子治療用ウイルスベクターを注射する(B)。その後4週間のエコー検査と血流測定(B)により虚血の改善効果を解析したのち安楽死させ(B)、病理組織学的検査材料を採取する。

鎮痛剤の投与はデータ解析の障害になるので実施しない。ただし、激痛による自傷行為、足を引きずる症状、20%以上の急激な体重減少を呈した個体には人道的エンドポイントを適用して安楽死処置を施す。

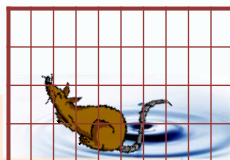
したがって、本実験の苦痛カテゴリーをDで申請する。

委員会は審査の経過を議事録に残し、結果を学長に報告した。実験計画は学長によって承認された。



2. 疲労モデルの作製と行動観察

<実験方法> (原案)



床から1.5cmの深さに水を張ったケージでラットを5日間飼育し、環境ストレスや断眠負荷を与える(苦痛度D)。
疲労度を評価するため、ラットの尾におもりを取り付け、水泳時間を測定する。

Q. 動物実験委員会の質問



① 実験方法の科学的合理性:

意図的にストレスを負荷した飼育は、みだりに動物を苦しめる行為と見なされる恐れがある。科学的に合理性のある実験処置であることを証明できるか。

前者であれば、動物愛護管理法第2条に抵触する。
実験処置であれば、その科学的合理性を記述すべき。

② 苦痛の緩和:

それぞれの処置に対して、どのような方法で苦痛を緩和させるのか。

A. 動物実験責任者の回答



① 実験方法の科学的合理性:

慢性疲労症候群の診断と治療法の開発に分子神経メカニズムの解明は重要である。この目的に適したモデルの作製方法を選択した。

② 苦痛の緩和:

水浸モデルは毎日体重・体温を測定し、20%以上の体重減少や正常範囲から体温逸脱を指標にエンドポイント(実験打ち切り)を設定する。水泳時間は10秒間沈んだ時点でレスキューする。レスキューすることを前提に、強制水泳の苦痛度をCに設定する。以上を実験計画に追記する。

問: あなたなら、実験方法をどのように修正しますか。

<実験方法> (修正版)

床から1.5cmの深さに水を張ったケージでラットを5日間飼育し、環境ストレスや断眠負荷を与える(苦痛度D)。

水浸モデルは毎日体重・体温を測定し、20%以上の体重減少や正常範囲から体温逸脱を指標にエンドポイント(実験打ち切り)を設定する。

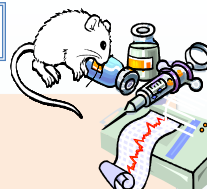
疲労度を評価するため、ラットの尾におもり(体重の4%)を取り付け、水泳時間を測定する。この間、ラットから目を離さず、10秒間沈んだ時点でレスキューし、実験を終了する(C)。

したがって、本実験の苦痛カテゴリーをDで申請する

委員会は審査の経過を議事録に残し、結果を学長に報告した。実験計画は学長によって承認された。



3. 酢酸ライジング法を用いた薬効試験



<実験方法> (原案)

化合物Aの痛覚に及ぼす薬理作用(鎮痛作用)を、マウスを用いた酢酸ライジング法で調べる(苦痛度C)。

酢酸ライジング法:

0.7%酢酸をマウスの腹腔内に注射すると、マウスはwrithing(腹部をよじる)あるいはstretching(腹部を延ばす)反応を示す。この反応の抑制率をもとに被検化合物の鎮痛作用を推定する試験方法。

Q. 動物実験委員会の質問



① 試験方法の合理性:

酢酸ライジング法を選択した理由は何か。マウスが自ら痛みから逃れることのできるテイルフリック法(苦痛度B)に置き換えることはできないのか。

テイルフリック法:

マウスの尾部に投射熱刺激を与えると、マウスは逃避行動を示す。反応が現れるまでの潜時の遅延をもとに化合物の鎮痛作用を推定する試験方法。

A. 動物実験責任者の回答



① 試験方法の合理性:

発痛には種々あり、内臓痛と末梢痛ではメカニズムが異なる。内臓痛に対する鎮痛作用を調べるには、酢酸ライジング法が適している。

動物数については、 $n=10$ 、3 doseでED50を求める。

対象群のライジング症状の発現(潜時)をもとに観察時間を定める。観察終了後、直ちにマウスを安楽死させるように実験計画を見直す。

問: あなたなら、実験方法をどのように修正しますか。

<実験方法>(修正版)

化合物Aの痛覚に及ぼす薬理作用を、マウスを用いた酢酸ライジング法で調べる(苦痛度C)。

対象群のライジング症状の発現(潜時)をもとに観察時間を酢酸投与後10分と定める。観察終了後、直ちにマウスを安楽死させる。

したがって、本実験の苦痛カテゴリーをCで申請する。

委員会は審査の経過を議事録に残し、結果を学長に報告した。実験計画は学長によって承認された。



実験方法の記述に関するヒント



実験の流れに沿って実験処置を書き出し、処置ごとに苦痛度を当てはめる。
最大の苦痛度をもって当該実験の苦痛カテゴリーとする。

例：脊髄損傷モデル

保定(B)→導入麻酔(B)→体重測定(B)→麻酔薬・鎮痛薬を注射(B)→気管内挿管(B)→吸入麻酔(B)→脊髄手術(C)→脊髄損傷モデル(D)→神経細胞注射(B)→再生の画像診断(B)→部分採血(B)→深麻酔(B)→全採血・灌流固定(B)→病理組織学的検査材料採取

したがって、本実験の苦痛カテゴリーはD