

鹿児島大学
動物実験計画書作成の手引き
(鹿児島大学動物実験委員会)

平成 30 年 1 月

平成 30 年 4 月一部改訂

平成 31 年 4 月一部改訂

令和 3 年 11 月一部改訂

動物実験計画書作成の手引き

【目 的】

この動物実験計画書作成手引は、国立大学法人鹿児島大学で実施される動物実験等が、科学的合理性ならびに動物愛護の観点から適正に行われるために必要な動物実験計画の作成法を示したものである。

【計画書作成～承認までの流れ】

※遺伝子改変動物を使用する場合には、遺伝子組換え安全委員会で実験計画が承認された後に動物実験計画書を申請すること

1. 研究協力課 HP にある「動物実験」を開き、計画書をダウンロードする。

HP : <http://hp.kuas.kagoshima-u.ac.jp/jimu/bu03/ka01/post-17.html>



2. 動物実験計画書を作成し、Word 文書にて各学部/研究科の動物実験委員へ提出。
※ 提出先は各学部/研究科により異なるので申請者は確認すること。



3. 動物実験委員会で審査（1次審査、2次審査、最終審査の3段階）

（注意事項）

- 不備があった場合には審査員とやり取りを行います。
- 実験内容によっては、インタビューを行う場合があります。
- 審査には最短で一カ月程度要します。



4. 承認後、事務より承認済み計画書が実験者へ電子ファイルにて送付されます。

【審査の流れ】

○申請された動物実験計画書は以下の流れで審査される。

- 一次審査《各学部/研究科の特性を理解する委員による審査》

申請者からの動物実験計画を最初に審査するもので、動物実験委員会第3号委員（各学部/研究科から選出された審査員）によって行われる。審査期間は1週間以内とし、不明な点等あった場合には一次審査員が申請者に内容確認を行う。問題がないと判断された場合には二次審査員へ審査を依頼する。

- 二次審査《動物福祉の立場から審査》

一次審査員から送られてきた動物実験計画の内容について、倫理的観点から二次審査を行う。実験カテゴリー、苦痛及びストレスの軽減法、人道的エンドポイントの有無、安楽死法等について第4、5号委員の代表が専門的立場から審査する。審査期間は1週間以内とし、問題があった場合には申請者に内容確認を行う。問題がなければ最終審査を依頼する。

（審査効率化のため、10 部程計画書が溜まってから研究支援係へ最終審査を依頼する。）

研究支援係担当者は、事務的な不備、飼養保管施設/実験室の承認状況を確認後、計画書を全学動物実験委員全員に配信、最終審査を依頼する。

- 最終審査（三次審査）

審査期間は1週間以内とし、委員全員の承認が得られた計画書のみ承認される。最終審査員の長期出張等で、委員全員の承認が得られない場合は、委員長（理事）の判断で承認できるものとする。問題があった場合には、一次審査員、二次審査員で協議し、二次審査員が申請者に内容確認を行う。

最終審査で承認された計画書は、その旨委員長（理事）に報告され最終的に学長が承認する。学長承認が得られた動物実験計画書は最終審査承認日が記入された後、PDF化された計画書が事務を通じて申請者に配信される。

動物実験計画書の作成手引きと注意点

【新規申請】：(別紙様式1) 鹿児島大学動物実験計画書（新規）

○1 ページ目

1. 「動物実験の種類」
 - ✓ 該当する項目についてチェックを入れる。
2. 「研究課題名」
 - ✓ 研究課題名について記載する。
3. 「実験目的」
 - ✓ どのような目的で何を解析するのか明確に記載すること。
 - ✓ 動物種・実験手法についても端的に記載すること。
4. 「社会的意義」
 - ✓ 本研究が社会にどのように貢献するかを記載すること。
 - ✓ 専門用語や略語は避け、一般の方でもわかるように記載すること。
5. 「動物実験を必要とする理由」
 - ✓ 該当する項目についてチェックを入れる。
6. 「動物実験責任者」
 - ✓ 教職員（助教、講師、准教授、教授、技術職員）及び特任職員であること。
 - ✓ 大学院生、ポスドクについては、実験責任者は指導教員となる。
 - ✓ 実験責任者は実験実施者に含まれるため、**教育訓練未受講者は責任者になれない。**
7. 「動物実験実施者代表者」
 - ✓ 職名は問わないが、**教育訓練未受講者は実験実施代表者にはなれない。**
 - ✓ **審査でのやりとりは実験実施者代表者で行うことになる。**
8. 「代表者を除く実験実施者全員の氏名」
 - ✓ 実験に参加する全員の氏名を記載すること。
 - ✓ 不足する場合は別紙にて添付しても良い。
 - ✓ 教育訓練未受講者は受講予定日を記載すること。
 - ✓ **教育訓練未受講者は受講終了まで実験に参加できない。**

○2 ページ目

9. 「実験実施期間」

- ✓ 西暦で記載すること
- ✓ 実験開始日は申請時より 6 ヶ月以内を目途とする。
- ✓ 新規計画書では開始予定日から最長 3 年間を実験実施期間とする。

但し、年度単位で計算する

(例：2021.6.1を開始予定日とした場合は2024.3.31まで)。

- ✓ 「変更・追加」の計画書で最長2年間実施期間を延長することができる。
(「新規」+「変更・追加」の計画書で最長5年間とする)

- ✓ 実験は承認された後でなければ実験を開始することができない

10. 「飼養保管施設/実験室」

飼養保管施設：実験動物の恒常的な飼育と実験を実施可能な施設または部屋のこと

実験室：実験動物の飼育はできないが、動物実験は実施可能な施設または部屋のこと

但し、48 時間以内の実験動物の保管は可能である。

- ✓ 飼養保管施設、実験室ともに動物実験委員会に申請を行い、学長により承認を得た部屋を記載すること

11. 「使用動物」

- ✓ 使用する動物の情報について記載
 - ・動物種・・・マウス、ラットなど ・系統・・・ICR、C57BL/6、SD など
 - ・性別・・・雄、雌（♂、♀） ・匹数・・・使用する匹数を記載
 - ・年齢または体重・・・4 週令、200g など
 - ・SPF、Clean、Conventional・・・使用する動物の微生物学的清浄度に合致したものにチェックする（一般の実験動物業者から購入する際は SPF です）
 - ・入手先・・・購入業者、分与を受ける研究機関名など

購入する業者が未定の場合には「動物業者」と記載する。

12. 「実験計画と方法」

- 実験の種類・・・該当する実験種類にチェックをする。
非生存実験：麻酔下（非意識下）で実験処置を実施し、そのまま安楽死を行う実験。
生存実験：意識下で実験処置を行う、もしくは麻酔下（非意識下）で実験処置を実施し、その後は覚醒させる実験。
- 実験の内容・・・該当する実験内容すべてにチェックをする。
- 遺伝子が導入、欠失又は編集された動物や生物材料
 トランスジェニック動物を用いる実験、ベクターを接種することで遺伝形質を

導入する実験、遺伝子操作された細胞、臓器を移植する実験は「使用する」に該当。

- 方法記載欄・・・重要です！！！！

- ・動物種と使用数が上記「使用動物」と合致しているか確認。
- ・使用する動物数の根拠を記載する。
- ・麻酔法（麻酔薬名、投与量、投与経路）と処置内容について詳細に記載する。

麻酔法については参考資料：麻酔/鎮静剤を参照。

- ・被験物質を投与する際には被験物質名、投与量、投与経路を記載する。
 - ・処置後、被験物質投与後に予想される苦痛と対策を記載する。
 - ・外科処置を行った際には必ず鎮痛剤及び抗生剤の使用について記載する。
- 鎮痛剤、抗生剤を使用しない場合にはその理由について明記する。

鎮痛剤については参考資料：鎮痛剤を参照。

- ・投与する試料などを略語で記載している場合、必ず補足説明する。
- ・慢性実験の場合には観察期間を明記する。
- ・臓器、血液等の採取を行う場合、その時期、部位、採取量について明記する。
- ・安楽死の方法および時期を明記する。

安楽死については参考資料：安楽死を参照。

- ・カテゴリーD に該当する実験では人道的エンドポイントを明記する。

人道的エンドポイントについては参考資料：安楽死を参照。

13. 「使用する材料の分類」

- ✓ 使用する材料の分類について、該当するものを全てチェックする。
- ✓ IARC（国際がん研究機関）の発がん性分類については
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>を参照すること。
- ✓ 内分泌攪乱物質の詳細は
http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http1998/html/speed_hyo3.html
を参照すること。
- ✓ 「その他の危険性を有する物質」とは、薬品等に以下のラベルが付されているものである。



- ✓ 使用材料の取り扱いについては本学の「発がん物質を用いた動物実験に関するガイドライン」に基づいて実施すること（本手引き中に掲載）。

14. 「実験区分」

- ✓ 本実験がどれに相当するか、該当するものすべてにチェックを入れる。
- ✓ 承認番号、区分、特定外来生物の使用など、記載漏れが無いか確認する。

※特定外来生物の例：ウシガエル、カニクイザル、アカゲザル、ブラックバス、ブルーギルなど。特定外来生物使用実験の場合も、環境省の承認番号の記載が必要。

3 ページ目

15. 「想定される苦痛のカテゴリー」

- ✓ 該当するカテゴリー全てにチェックを入れる。
- ✓ 参考資料：苦痛度検索表を参照。

16. 「苦痛軽減・排除の方法」

- ✓ 麻酔薬を使用する場合、麻酔法について詳細に記載する。
- ✓ 人道的エンドポイントの導入にチェックが有る場合、「実験計画と方法」に詳細な記載があるかを確認する。

17. 「安楽死の方法」

- ✓ 該当する項目にチェック、麻酔薬を用いる場合は詳細を記載。
- ✓ 適切な安楽死法については参考資料参照。

18. 「死体の処理方法」

- ✓ 該当する項目にチェック。
- ✓ 固定液や固定後の保管場所について記載。

19. 「その他必要又は参考事項」

- ✓ 飼養保管施設の承認状況について記載する。（承認済み、申請中など）
申請中の場合には承認されるまで、最終審査は行わない。
- ✓ 麻薬使用実験では麻薬研究者番号を記載する。

※麻薬研究者免許の有効期限は最長2年であり、期限切れの番号を記載している場合があるので確認する。

(別紙様式1)

鹿児島大学動物実験計画書(新規)

鹿児島大学長 殿

一次審査員が記入するため
申請者は記載しない

※受付年月日

年 月 日

※受付番号

※印欄以外を記入すること

動物実験の種類	☐ 試験・研究 ☐ 教育・訓練 ☐ その他 ()		
研究課題名	課題名を記載。 該当するものにチェックを全て入れる。		
実験目的	- どのような目的で何を解析するのか明確に記載すること。 - 動物種・実験手法についても端的に記載すること。		
社会的意義	- 本研究が社会にどのように貢献するかを記載すること。 - 専門用語は避け、一般の方でもわかるように記載すること。		
動物実験を 必要とする理由 (選択項目を■)	☐ 検討したが、動物実験に替わる手段が無かった ☐ 検討したが、代替手段の精度が不十分だった ☐ その他： 該当する項目 をチェック。		
動物実験責任者 (選択項目を■)	学部等名	- 教職員及び特任職員であること。 - 大学院生、ポスドクの場合、実験責任者は指導教員となる。 - 教育訓練未受講者は実験責任者にはなれない。	
	e-mail	☐ 有 ☐ 無	
実験実施者代表者 (選択項目を■)	学部等名	- 職名は問わない。 - 教育訓練未受講者は実験実施者代表者にはなれない。	
	e-mail	☐ 有 ☐ 無	
代表者を除く実験実施者 全員の氏名 (選択項目を■)	氏 名	学部等名	連絡先 教育訓練受講の有無 ※無の場合 受講予定日
	- 実験に参加する全員の氏名を記載。 - 不足する場合は別紙にて添付。 - 教育訓練未受講者は受講予定日を記載すること - 教育訓練未受講者は受講終了まで実験に参加できない。		
			☐ 有 ☐ 無 (. .)

※「学部等名」欄について、医歯学総合研究科の場合は、医系か歯系かを括弧書きで明記ください。

一次審査員が記入するため
申請者は記載しない

※受付番号：

実験実施期間	開始日（予定）	年	月	日	終了日	年	月	日
--------	---------	---	---	---	-----	---	---	---

- 実験開始日は開始予定日より6ヶ月以内を目途に記載する。
- 新規計画書では申請時から最長3年間を実験実施期間とする。
- 年度単位で計算する。（例：2021.4.1を開始予定日とした場合は2024.3.31まで）

飼養保管施設	実験室
--------	-----

- 学長の承認を受けた飼養保管施設及び実験室を記載する。
- 飼養保管施設：動物を飼育/実験可能な部屋や施設。
- 実験室：動物実験のみを行う部屋や施設（48時間以内の動物保管は可能）。
- 飼養保管施設で実験を行う場合は実験室にもその飼養保管施設名を記載。

使用動物 (選択項目を■)	☐ SPF ☐ Clean ☐ Conventional		入手先：		
	動物種	系統	性別	匹数	年齢又は体重
	☐ S				
	動				又は体重
	☐ SPF ☐ Clean ☐ Conventional				

- 使用する動物の情報を記載する。
- 購入する業者が未定の場合には「動物業者」と記載する。

該当するものにチェックを入れる。

実験計画と方法（動物に加える処置、使用動物数の根拠を具体的に記入す
「耐えられない苦痛が始まる前に実験を終了し、しかも実験目的を損なわないよう」を明記すること。）

実験の種類	☐ 非生存実験：麻酔下（非意識下）で実験処置を実施し、そのまま安楽死を行う実験。
実験内容	☐ 生存実験：意識下で実験処置を行う、もしくは麻酔下（非意識下）で実験処置を実施し、その後は覚醒させる実験。
遺伝子が導入	

※ 代表
旨明記す

- 動物種と使用数が上記「使用動物」と合致しているか確認。
- 使用する動物数の根拠を記載する。
- 麻酔法（麻酔薬名、投与量、投与経路）と処置内容について詳細に記載する。
- 被験物質を投与する際には被験物質名、投与量、投与経路を記載する。
- 処置後、被験物質投与後に予想される苦痛について記載する。
- 外科処置を行った際には必ず鎮痛剤及び抗生剤の使用について記載する。
鎮痛剤、抗生剤を使用しない場合にはその理由について明記する。
- 投与する試料などを略語で記載している場合、必ず補足説明する。
- 慢性実験の場合には観察期間を明記する。
- 臓器、血液等の採取を行う場合、その時期、部位、採取量について明記する。
- 安楽死の方法および時期を明記する。
- カテゴリーDに該当する実験では人道的エンドポイントを明記する。

使用する材料の分類（該当するものがある場合はチェックを入れ、別紙様式2-1を必ず添付すること）

☐ IARC グルー	使用する材料で該当するものがあれば、別紙様式2-1を必ず添付すること。
☐ 有害性重金属	詳細は「発がん物質を用いた動物実験に関するガイドライン」を参照すること。

（発がん物質等危険物質を用いた動物実験に関するガイドライン参照）

実験区分	☐ 感染実験（安全度分類： ☐ BSL1 ☐ BSL2 ☐ BSL3）	☐ 特定外来生物使用実験
（該当項目をすべて■）	☐ 遺伝子組換え実験	☐ 承認

- 該当するものにチェックを全て入れる。
- 遺伝子組換え実験、特定外来生物使用実験では承認番号も記載。

- ・ 該当するカテゴリー全てにチェック。
- ・ 苦痛度検索表を参照。

一次審査員が記入するため
申請者は記載しない

※受付番号：

想定される苦痛 のカテゴリー (選択項目を■)	☐ B. 脊椎動物を用い、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実験 ☐ C. 脊椎動物を用い、動物に対して軽度のストレス又は短時間持続する痛みを伴う実験 ☐ D. 脊椎動物を用い、回避できない重度のストレス又は長時間持続する痛みを伴う実験 ☐ E. 無麻酔下の脊椎動物に、耐える限界に近い又はそれ以上の痛みを与える実験
苦痛軽減・排除 の方法 (該当項目を すべて■)	☐ 1. 短時間の保定・拘束及び注射など、軽微な苦痛の範囲であり、特に処置を講ずる必要はない ☐ 2. 科学上の目的を損なわない苦痛軽減方法は存在せず、処置できない ☐ 3. 麻酔薬・鎮痛薬等を使用する。(具体的薬剤名及びその投与量, 経路, 麻酔時間等を記入) ・ 使用する麻酔薬及び投与量、投与経路、麻酔時間について記載。 ・ 麻酔法については参考資料参照。 ☐ 4. 動物が耐えがたい痛みを伴う場合、適切な時期に安楽死措置をとるなどの人道的エンドポイント を考慮する。(詳細は「実験計画と」) ・ 「計画と方法」に詳細な記載があるか確認。 ・ エンドポイントの指標は参考資料を参照。 ☐ 5. その他 ●具体的に記入：
安楽死の方法 (該当項目を すべて■)	☐ 1. 麻酔薬等の使用 (具体的薬剤名及びその投与量, 経路等を記入) ・ 該当する項目にチェック、麻酔薬を用いる場合は詳細を記載。 ・ 適切な安楽死法については参考資料参照。 ☐ 2. 頸椎脱臼法 ☐ 3. その他 ●方法： ☐ 4. 安楽死させない ●理由：
死体の処理方法 (該当項目を すべて■)	☐ 1. 焼却 ・ 該当する項目にチェック。 ・ 固定液や固定後の保管場所について記載。 ☐ 2. 固定保存 ●方法： ☐ 3. その他 ●方法：
その他 必要又は 参考事項	(飼養保管施設・実験室の承認状況、麻薬を使用する実験では麻薬研究者番号を記載) ・ 飼養保管施設の承認状況について記載する。(承認済み、申請中など) ・ 麻薬使用実験では麻薬研究者番号を記載する。

修正意見等：

※委員会記入欄

審査結果

○一次審査承認日： 年 月 日 ○二次審査承認日： 年 月 日
○三次審査承認日： 年 月 日

※学長承認欄

承認： 年 月 日

実験計画を承認します。

承認番号：第

号

鹿児島大学学長(公印省略)

【変更・追加申請】：(別紙様式2) 鹿児島大学動物実験計画書（変更・追加）

留意点

1. 「新規」、「変更・追加」を問わずこれまで承認された計画書を添付して提出する。
2. 変更・追加申請の条件に合致しているか確認すること。以下の場合には新規で再申請。
 - ✓ 期間延長が承認された新規計画書と合わせ5年（年度単位）を超える場合。
 - ✓ 動物実験責任者、実験実施者代表者が変更になる場合。
 - ✓ 使用する動物種が変更になる場合。
 - ✓ 新たに処置が加わったなど実験内容に変更があった場合。
 - ✓ 被験物質を追加することで苦痛カテゴリーが上がる場合。

○1 ページ目

1. 「継続・変更回数」
 - ✓ これまでに変更を行った回数を記載
2. 「変更ならびに継続内容」
 - ✓ 該当する項目全てにチェックする。
3. 「新規計画書の承認番号」
 - ✓ 「新規」、「変更・追加」を問わずこれまで承認された計画書を全て記載する。
 - ✓ （ ）内に必ず苦痛カテゴリーを記載する。
4. 「研究課題名」
 - ✓ 「新規計画書」と同じ課題名を記載する。
5. 「動物実験責任者」
 - ✓ 「新規計画書」と同じ責任者を記載すること。
 - ✓ 変更する場合は新規計画書で再申請が必要。
6. 「実験実施者代表者」
 - ✓ 「新規計画書」と同じ代表者を記載すること。
 - ✓ 変更する場合は新規計画書で再申請が必要。
7. 「代表者を除く実験実施者全員の氏名」
 - ✓ 変更がある場合のみ記載。
 - ✓ 変更となる実験者について記載。不足する場合は別紙にて添付。
 - ✓ 教育訓練未受講者は受講予定日を記載すること。
 - ✓ 教育訓練未受講者は受講終了まで実験に参加できない。

○2 ページ目

8. 「実験実施期間」

- ✓ 実施期間に変更がなくても必ず記載すること。
- ✓ 新規計画書と合わせて最長 5 年まで（年度単位で計算）
- ✓ 5 年を超える場合には新規計画書にて提出。
- ✓ 西暦で記載すること

9. 「飼養保管施設等の変更」

- ✓ 変更がある場合のみ記載。
- ✓ 承認された飼養保管施設/実験室を記載する。

10. 「使用動物」

- ✓ 変更がある場合のみ記載。
- ✓ 追加する数、追加する系統の情報のみを記載。

11. 「遺伝子改変された動物もしくは生物材料の使用」

- ✓ 遺伝子改変された動物もしくは生物材料（ウイルス、細胞など）を追加して使用する場合はチェックを入れる。また、遺伝子組み換え実験安全委員会の承認を必ず得ること。

12. 「被験物質（薬剤）の追加」

- ✓ 変更がある場合のみ記載。
- ✓ 追加する被験物質の薬剤名、投与経路、投与量について記載すること。
- ✓ 苦痛カテゴリーが上がらない根拠を必ず記載する。
- ✓ 苦痛カテゴリーが上がる場合には新規計画書で提出。

13. 「使用する材料の分類」

- ✓ 使用する材料の分類について、該当するものを全てチェックする。
- ✓ IARC（国際がん研究機関）の発がん性分類については
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>を参照すること。
- ✓ 内分泌攪乱物質の詳細は
http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http1998/html/speed_hyo3.html
を参照すること。

- ✓ 「その他の危険性を有する物質」とは、薬品等に以下のラベルが付されているものである。



- ✓ 使用材料の取り扱いについては本学の「発がん物質を用いた動物実験に関するガイドライン」に基づいて実施すること（本手引き中に掲載）。

14. 「変更・継続理由」

- ✓ 変更理由について記載。
- ✓ 教育訓練未受講者を追加する場合には、受講後に実験に参加させる旨記載する。
- ✓ 使用する数や系統を追加する場合にはその根拠について明確に記載すること。

(別紙様式 2)

鹿児島大学動物実験計画書(変更・追加)

鹿児島大学長 殿

※受付年月日	年 月 日	※受付番号	
--------	-------	-------	--

(注意) 本計画書は下記の項目について変更がある場合にのみ提出して下さい。

- | | |
|---------------|------------------|
| 1. 実験実施者の変更 | 4. 使用する動物の系統の変更 |
| 2. 実験実施期間の変更 | 5. 被検物質 (薬剤) |
| 3. 使用する動物数の追加 | 6. 飼養保管施設・実験室の変更 |

※実験責任者、実施者代表者、実験内容、動物種の変更は本様式ではなく、新規の動物実験計画書にて提出して下さい。

(必須)

変更を行った回数を記載

継続・変更回数	回数		
変更ならびに継続内容 (該当する項目全てに■)	☐ 実験実施者の追加・ ☐ 実験実施者の削除・ ☐ 実験実施期間の変更 ☐ 動物数の追加・ ☐ 使用する動物の系統を変更・ ☐ 被検物質 (薬剤) ☐ 飼養保管施設および実験室の変更		
新規計画書の承認番号	承認番号: () ※カッコ内に苦痛カテゴリーを明記 (本計画に関わる承認済みの計画書は添付して下さい。)		
研究課題名	課題名を記載。		
動物実験責任者 (選択項目を■)	学部等名		
	氏名		内線:
	職名		教育訓練受講の有無
	e-mail		☐ 有 ☐ 無
実験実施者代表者 (選択項目を■)	学部等名		
	氏名		内線:
	職名		教育訓練受講の有無
	e-mail		☐ 有 ☐ 無

(変更がある場合のみ記入)

代表者を除く実験実施者 全員の氏名 (選択項目を■)	氏 名	学部等名	連絡先	教育訓練受講の有無 ※無の場合 受講予定日	追加・削除
					☐ 追・ ☐ 削
					☐ 追・ ☐ 削
					☐ 追・ ☐ 削

※「学部等名」欄について、医歯学総合研究科の場合は、医系か歯系かを括弧書きで明記ください。

- 一次審査員が記入するため
申請者は記載しない

- ・ 変更がある場合のみ記載。
- ・ 承認された飼養保管施設/実験室を記載する。

- 変更がある場合のみ記載。
- 追加する数、追加する系統の情報のみを記載。

実験実施期間（必須）	開始日	承認日以降	終了日	年	月	日
飼養保管施設等の変更	飼養保管施設		実験室			
変更がある場合のみ記載。 承認された飼養保管施設/実験室を記載する。			匹数	年齢又は体重		
使用動物 (選択項目を■)	☐ SPF ☐ Clean ☐ Conventional		入手先：			
※匹数は追加する数を記載	変更がある場合のみ記載。 追加する数、追加する系統の情報のみを記載。			年齢又は体重		
遺伝子改変の有無 (変更ある場合記入)	遺伝子が導入または欠失された動物や生物材料（細胞、ウイルス等）を ☐ 使用する ☐ 使用しない					
(変更がある場合のみ記入) 被検物質(薬剤)の 追加・投与経路変更 ※苦痛カテゴリーのレベル が上がる場合は新規で申請 して下さい。	※被検物質(薬剤)名、投与経路、投与量、有毒・発ガン性、苦痛カテゴリーの レベルが上がらない根拠について記載すること。					
追加する被検物質の分類（該当するものがある場合はチェックを入れ、別紙様式2-1を必ず添付すること）						
☐ IARC グループ 1 ☐ IARC グループ 2 A ☐ IARC グループ 2 B ☐ 有害性重金属 ☐ 内分泌攪乱物質 ☐ その他の危険性を有する物質 （発がん物質等危険物質を用いた動物実験に関するガイドライン参照）						
● 変更・継続理由						
※代表者を除く実験実施者に教育訓練未受講者を追加する場合は、教育訓練受講後に実験に参加させる旨明記すること。						

※委員会記入欄	<u>修正意見等</u> ：	
	審査結果 ○一次審査承認日： 年 月 日・○二次審査承認日： 年 月 日 ○三次審査承認日： 年 月 日	
※学長承認欄	承認： 年 月 日	
	実験計画を承認します。 承認番号：第 号 鹿 児 島 大 学 長 （公印省略）	

発がん物質等危険物質を用いた動物実験に関するガイドライン

(目的)

- 1 このガイドラインは、国立大学法人鹿児島大学における人及び他の動物に危険をもたらすおそれのある発がん物質、環境汚染のおそれのあるヒ素、水銀、鉛、カドミウム等の有害性重金属、内分泌攪乱物質等の危険物質（以下「発がん物質等危険物質」という。）を用いた動物実験において、実験従事者及び他者並びに目的外動物への危険防止並びに環境汚染防止のために必要な事項を定める。

(定義)

- 2 本ガイドラインにおいて、次の各号に掲げる用語の意義は、当該各号の定めるところによる。
 - ① 発がん物質
国際がん研究機関 (IARC) において、発がん性リスクがグループ 1（発がん性がある）、グループ 2 A（おそらく発がん性がある）、グループ 2 B（発がん性があるかもしれない）の化学物質。
参考：IARC（国際がん研究機関）の発がん性分類については
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>を参照すること。
 - ② 有害性重金属
水銀、鉛、カドミウム等の体内に蓄積し、健康を害するもの。
 - ③ 内分泌攪乱物質
内分泌系に影響を及ぼすことにより、生体に障害や有害な影響を引き起こす外因性の化学物質
参考：内分泌攪乱物質の詳細は
http://www.env.go.jp/chemi/kurohon/http1998/html/speed_hyo3.html
を参照すること。
 - ④ その他の危険性を有する物質 「化学品の分類および表示に関する世界調和システム」（GHS）において生殖細胞変異原性、発がん性、生殖毒性及び水生環境有害性等の危険性が報告されている物質

参考：薬品等に以下のラベルが付されているものである。



(申請)

- 3 発がん物質等危険物質を用いた動物実験等（以下「危険物質投与実験」という。）を実施しようとする者は、**動物実験委員会が定める動物実験計画書に加えて別記様式 2・1「発がん物質等危険物質使用実験申請書」**を動物実験委員会に提出しなければならない。

注)新規または変更・追加計画書に別記様式 2・1「発がん物質等危険物質使用実験申請書」を添付して動物実験委員会に提出すること。

(審査)

- 4 動物実験委員会は、危険物質投与実験に関する審査を行うときは、別表「危険物質投与飼養保管施設および実験室の設備及び運用について」に基づき行うものとする。この場合において、動物実験委員会が必要と認めたときは、発がん物質等危険物質に関する専門家の意見を聴取することができる。

(危険物質投与実験の実験室)

- 5 発がん物質等危険物質の使用は、「危険物質投与飼養保管施設および実験室の設備及び運用について」（別表）に基づき、当該飼育室・実験室利用者の労働安全衛生及び他の動物や飼育室及び実験室内の汚染防止について必要な措置を講じなければならない。当該飼育室及び実験室での実験動物の飼育及び管理は、すべて実験責任者の責任において、実験実施者が行う。

(報告)

- 6 危険物質投与実験をする者は、当該実験室の管理に異常があると認めたときは、速やかに飼養保管施設または実験室の管理者及び動物実験委員会に報告しなければならない。

(実験の中止等)

- 7 不適切な危険物質投与実験が実施されている場合は、動物実験委員会の判断により当該実験の中止その他の措置を講ずることができる。

(雑則)

- 8 このガイドラインに定めるもののほか、危険物質投与実験に関し必要な事項は、動物実

験委員会が別に定めることができる。

別表 危険物質投与飼養保管施設および実験室の設備及び運用について

1. 発がん物質等危険物質を取扱う場合及び当該物質を投与された動物を処置する場合は、原則として安全キャビネット等の陰圧装置を使用する。
2. 発がん物質等危険物質を投与された実験動物の飼育は、当該物質を体外に排泄する危険性がある期間は陰圧の飼育装置で行い、原則としてディスポーザブルの飼育ケージ等を使用し、使用後は感染性廃棄物に準じて取扱う。
3. 発がん物質等危険物質に汚染された床敷等は全て回収し、感染性廃棄物に準じて取扱い、焼却等の処理を行う。
4. 当該実験室に由来する当該物質の排水・廃液は、鹿児島市の規制値以下でなければならない。規制値を超えることが予想される場合は、回収して適切に処理しなければならない。
5. 発がん物質等危険物質を投与した実験動物は、当該物質を体外に排出する危険性がある期間内は指定エリア外に持ち出すことを原則として禁止する。
6. 危険物質投与実験室および指定エリアにおける飼養管理は実験実施者が行う。
7. 危険物質投与実験室および指定エリア内の作業従事者は、予め取り扱う動物及び危険物質取扱について習熟していなければならない。

(別紙様式 2 - 1)

発がん物質等危険物質使用実験申請書

鹿児島大学長 殿

※受付年月日	年 月 日	※受付番号	
--------	-------	-------	--

※印欄以外を記入すること

研究課題名			
動物実験責任者 (選択項目を■)	学部等名		
	氏名		内線：
	職名		緊急連絡先
	e-mail		
実験実施者代表者 (選択項目を■)	学部等名		
	氏名		内線：
	職名		緊急連絡先
	e-mail		
代表者を除く実験実施者 全員の氏名 (選択項目を■)	氏 名	学部等名	連絡先

※「学部等名」欄について、医歯学総合研究科の場合は、医系か歯系かを括弧書きで明記ください。

危険物質を使用する飼養保管施設/実験室	
使用物質に関する情報	
物質名称：	
性質、健康、環境への有害性、取扱い上の注意、適切な処理方法を記載（必要に応じてデータシート等を添付）	
IARC による発がん性評価またはその他有害性物質等の分類	
☐ グループ 1 ☐ グループ 2 A ☐ グループ 2 B	
☐ 有害性重金属 ☐ 内分泌攪乱物質 ☐ その他の危険性を有する物質	

※受付番号：

飼育期間	開始日（予定）	年 月 日	終了日（予定）	年 月 日
投与開始期間	開始日（予定）	年 月 日	終了日（予定）	年 月 日
[投与方法・頻度・総投与量]				
[投与した危険物質等の動物体内での代謝・排泄・蓄積など、飼育室・ケージ内での有害物質の蓄積の有無等]				
本実験における安全性・安全対策について [従事者等が、発がん物質等危険物質に暴露した場合の対処方法(具体的に)]				
[飼育室及び実験室の汚染防止策および汚染された場合の対処方法(具体的に)]				

※委員会記入欄	本申請書に対する委員会の見解 1. 承認する 2. 修正して承認する 3. 承認しない 年 月 日
	修正意見または承認しない理由：

(国立大学動物実験施設協議会 HP より抜粋、一部改変)

参考資料：動物実験処置の苦痛分類に関する解説

倫理基準による医学生物学実験処置に関する分類

○ SCAW のカテゴリーA

生物個体を用いない実験あるいは植物、細菌、原虫、又は無脊椎動物を用いた実験。

(解説1) 生化学的研究、植物学的研究、細菌学的研究、微生物学的研究、無脊椎動物を用いた研究、組織培養、剖検により得られた組織を用いた研究、屠場から得られた組織を用いた研究。

動物実験を規制するわが国の法律では、規制対象動物を爬虫類以上としている。そのためこれらの研究に関する実験計画書は動物実験委員会の審査対象外である。しかし、動物福祉の観点からは動物実験に代わる代替法を考慮する必要がある、もし動物を用いずに実験目的を達成できる場合には、これらの方法を考慮すべきである。また、他の研究者が実験に用いた安楽死後の動物の器官や組織を共有することは、動物の使用数を減らすことにつながるので望ましい。

(解説2) 発育鶏卵を用いた研究。

発育鶏卵を使用する場合には、もし孵化が実験に必要なでないならば、卵は孵化の前に破壊されなければならない。孵化させる場合には苦痛のカテゴリーはB以上となる。なお、胎児の実験については SCAW の分類に記されていないが、胎児の苦痛やストレスについては判断の分かれるところである。イギリスの Animals (Scientific Procedures) Act 1986 では妊娠期間の半分以上を越えた場合、動物個体として同等に扱っている。

○ SCAW のカテゴリー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。

(解説3) 実験の目的のために動物をつかんで保定すること。あまり有害でない物質を注射したり、あるいは採血したりするような簡単な処置。動物の体を検査すること。

動物診療所において通常行われる診断・治療処置と同等の処置。例えば、健康診断のため

の最小限度の拘束。薬物の投与などの注射、採血。脳波、心電図、筋電図の測定などがある。

(解説4) 深麻酔下で処置し、覚醒させずに安楽死させる実験。

外科的手術を伴う非存命実験などが該当し、処置中、処置後に意識が回復しない実験。使用する麻酔薬は、動物種に合った適切なもので、現在の医療あるいは獣医療で一般的に使われてるものとする。なお、多くの麻酔薬は要指示薬として、劇薬、毒薬及び向精神薬の指定を受けている物もあり、適切な管理が薬事法により求められていることにも留意する。関連書を参考にして、新しい技術や試薬についての知識を得ることにつとめることが必要である。

(解説5) 短時間（2～3時間）の絶食絶水。

SCAW の分類では2～3時間（a few hours）となっているが、動物種によって代謝時間が異なることから、許容される絶食・絶水時間の長さを一律に定めることはできない。麻酔の前処置あるいは血清生化学検査のための採血等のために10数時間程度までの絶食（水は自由摂取）を行うことは認められる。また、マウス、ラット、ウサギのように麻酔による嘔吐をほとんど無視できる動物では、麻酔の前処置としての絶食は必要がない。なお、長時間の絶水は、絶食以上に動物の生理状態や代謝に影響することから特に注意を要する。

(解説6) 急速に意識を消失させる標準的な安楽死法。例えば、麻酔薬の過剰投与、軽麻酔下あるいは鎮静下での頸椎脱臼や断首など。

深麻酔下での放血やKCl等の投与は、安楽死法として認められる。齧歯類の頸椎脱臼は、熟練者が行う場合は無麻酔でも認められる。

○ SCAW のカテゴリーC

脊椎動物を用いた実験で、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。

(解説7) 麻酔下で血管を露出させること、あるいはカテーテルを長期間留置すること。

これらの処置を行うに当たっては、術後の感染防止に配慮する。処置後に動物の意識を回復させない実験はカテゴリーBに含まれる。麻酔から覚醒後もカテーテルを留置させる場合には、解説11を参照。

(解説 8) 行動学的実験において、意識ある動物に対して短期間ストレスを伴う保定(拘束)を行うこと。

ストレスが生体に及ぼす影響を調べるための実験。例として、拘束ストレス負荷後の血中ホルモン濃度の変化の測定。モンキーチェアやボールマンケージを用いる実験はこれに該当し、拘束器具への馴化、拘束期間中の監視あるいは頻繁な観察、実験の中断や終了時期の判断に特に配慮すべきである。情動的反応が高い霊長類などにおいては特に注意を要する。

(解説 9) フロインドのアジュバントを用いた免疫。

SCAW の分類ではフロインドのアジュバントを使用する実験はカテゴリーC としているが、コンプリートアジュバント (FCA) は動物が被る苦痛が大きいことから最近では CCAC の分類も含めカテゴリーD としているところが多い。FCA のフットパッドへの接種は苦痛が大きいことから避けるべきである。インコンプリートアジュバントを使用する実験はカテゴリーC である。FCA 以外のより苦痛の低いアジュバントの選択も考慮する。

(解説 10) 苦痛を伴うが、それから逃れられる刺激。

これらに該当する実験には麻酔薬や鎮痛薬の効果を調べるためのテイルフリック試験、ホットプレート試験、電気ショックを用いたフリンチジャンプ試験、つまみ試験などが含まれる。このような試験において動物に与える苦痛は効果を判定出来る最小限の苦痛でかつ、必要最小の時間で行うように制限する。例えば、ホットプレート試験では温度を 50 度以上にする必要があるが、動物の足組織の損傷を避けるために上限は 70 度以下とする等が一つの目安と考えられる。この種の実験のポイントは、苦痛を起こす刺激からの回避が可能なことである。実験装置の不具合等により刺激からの回避が不可能になると、実験の目的以外の苦痛を強いるので特に注意が必要である。

(解説 11) 麻酔下における外科的処置で、処置後も多少の不快感を伴うもの。

例として、処置後の苦痛の程度が軽微な開腹手術、開胸手術、開頭手術、整形外科的手術が該当する。術後管理に配慮すべきであり、特にイヌ、ネコ、霊長類等においては、通常の臨床獣医学的な術後管理を目指すべきである。

体内に電極等の器具を埋め込む場合にも、麻酔下で無菌的に行われなければならない。術後の苦痛あるいは感染症を予防するために鎮痛剤や抗生物質の投与が考慮されるべきであ

る。

麻酔薬、鎮痛剤および鎮静剤の選択と投与量は、動物種によって異なるため、その動物種に適したもの、さらに実験の目的に適したものを使用する。同じ処置であっても、動物種、処置部位・程度、術者の経験、術後管理等により動物が被る苦痛は異なり、処置後の不快感の判断についても非常に難しい。そのため行おうとする処置がカテゴリーCに属するかDに属するかは判断の分かれるところであり、各機関の委員会で動物が被る苦痛と研究成果のバランスにもとづいて判断することとなる。

○ SCAW のカテゴリーD

脊椎動物を用いた実験で、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。

(解説 12) 行動面に故意にストレスを加え、その影響を調べること。

行動ストレスとして、強制走行、強制水泳、あるいは運動制限（半重力下の懸垂実験）などが相当し、ストレスの効果として筋肉の解剖学的あるいは生理学的変化をみる実験などが該当する。睡眠行動や食餌行動を変化させ、その効果をみる実験においても、重度のストレスや痛みを伴う実験であれば該当する。動物が被るストレスは実験目的を達成するために必要最小限のものとする。

(解説 13) 麻酔下における外科的処置で、処置後に著しい不快感を伴うもの。苦痛を伴う解剖学的、生理学的欠失あるいは障害を起こすこと。

処置後の苦痛の程度が顕著な開腹手術、開胸手術、開頭手術、整形外科的手術が該当する。解説 11 にも記したが、カテゴリーC の麻酔下における外科的処置で、処置後も多少の不快感を伴うものとの区別がつきにくい。また、同じ個体に対してこのような処置を複数箇所に加えることは慎むべきである。しかし、実験者によってその正当性が説明され、かつ、動物実験委員会がそれを承認すれば、その実施を認めてもよい。

(解説 14) 苦痛を伴う刺激を与える実験で、動物がその刺激から逃れられない場合。

例として、痛みの研究に関する実験があげられる。これに関しては解説 10 及び 12 を参照されたい。また、腫瘍細胞の移植、毒性試験のための化学物質の投与、感染実験、遺伝子改変動物を含む重篤な疾患モデル動物の作出もこの中に含まれる。それらに関しては解説 18 も参照されたい。さらに、環境中の重力の場、照明、騒音、温度、湿度、大気圧、酸素など

を変更する実験もその環境から逃れられないという点でこの中に含まれる。ただし、それにより重度な痛みやストレスが生じなければカテゴリーDに相当しない。

(解説 15) 長時間(数時間あるいはそれ以上)にわたって動物の身体を保定/拘束すること。

例えば、モンキーチェアやボールマンケージを用いる実験はこれに該当する。長期にわたる拘束は避けるべきであるが、動物を長期間にわたり拘束しなければならない場合には、摂餌水、排泄など動物にとって生物学的に必要な行動を可能とさせ、動物種によっては適度な運動を与えるべきである。拘束器具への馴化、拘束期間中の監視あるいは頻繁な観察、実験の中断や終了の時期の判断に特に配慮し、拘束による障害が見られる場合には、動物を拘束器具から解放するか、あるいは拘束方法を改善しなければならない。

(解説 16) 本来の母親の代わりに不適切な代理母を与えること。

マウス、ラット、ウサギ等ではそれらの SPF 化にあたり、代理母を与えることは一般に行われており、カテゴリーDには相当しない。しかし、この処置は、緊密かつ長期間の親子関係を構築する霊長類において、特に配慮が必要である。

(解説 17) 攻撃的な行動をとらせ、自分自身あるいは同種他個体を損傷させること。

動物の中樞神経系を傷害するような研究において、自分自身あるいは同種同居個体を損傷させるような攻撃的行動を取ることが考えられる。そのような実験では、処置後の動物を十分に観察し、飼育方法についても特別な注意を払う必要がある。

(解説 18) 麻酔薬を使用しないで痛みを与えること。例えば、毒性試験等において、動物が耐えることのできる最大の痛みに近い痛みを与えること。つまり動物が激しい苦悶の表情を示す場合。放射線障害をひきおこすこと。ある種の注射、ストレスやショックの研究。

放置すれば死に至るような発癌実験あるいは腫瘍の移植実験、感染実験、重篤な病気の疾患モデル動物（遺伝子改変動物を含む）を用いた実験などもカテゴリーDに含まれる。このような実験においては、できるだけ早い時期をエンドポイントにして、動物が被る苦痛やストレスを最小限に抑えるべきである。頻繁な観察により苦痛の徴候を判断し、実験目的の範囲で苦痛軽減の処置や安楽死を施す。例えば、腫瘍が体重の 10%を超えた場合、2-3 日の間に 20%以上の体重減少あるいは 7 日で 25%以上の体重減少が予想される場合に、安楽死を考慮すべきである。それができない場合には、実験の正当性を実験計画書に詳述する必要

がある。

実験処置により受ける動物の苦痛について、生理学的反応等から動物はヒトに比べて感受性が低いとする考え方がある。一方、動物が感じる苦痛の程度はヒトが感じる苦痛の程度と同程度であるとみなして判断しようとする考え方もある。このため、カテゴリーCまたはDの判断については、実験処置の必要性や代替手段の有無、苦痛軽減のための配慮、研究の社会的意義などについて、研究者は十分な説明を行い、委員会はその妥当性を判断しなければならない。

○ SCAW のカテゴリー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。

(解説 19) 手術する際に麻酔薬を使わず、単に動物を動かなくすることを目的として筋弛緩薬あるいは麻痺性薬剤、例えばサクシニルコリンあるいはその他のクラーレ様作用を持つ薬剤を使うこと。

筋弛緩薬は、全身麻酔などの適切な処置が施されていなければ使用してはならない。筋弛緩薬だけを用いて動物を不動化することは認められない。これらの薬剤が麻酔薬と併用して使用される場合には、麻酔の深度が適切に保たれるように注意しなければならない。

(解説 20) 麻酔していない動物に重度の火傷や外傷をひきおこすこと。

SCAW の分類では麻酔していない動物に重度の火傷や外傷をひきおこすことは禁じられている。しかし、処置中、必要なら処置後に麻酔や鎮痛薬を投与して行うことは許される。ただしその際にも、十分な正当性があり、委員会の承認が必要となる。

(解説 21) 精神病のような行動をおこさせること。

イヌ、ネコ、霊長類などの高度の情動反応を示す動物に対して極度のストレスを加えることにより、精神病のような行動をおこさせる実験は止めるべきである。精神病モデルはラット等を用いることが多いが、イヌ、ネコ、霊長類などを使用しなければならない場合は、実験者によってその正当性が提示され、動物実験委員会が、動物が被る苦痛と研究成果のバランスをもとにその正当性を確認すべきである。

(解説 22) 家庭用の電子レンジあるいはストリキニーネを用いて殺すこと。

小動物の安楽死のために専用の電子レンジが開発されているが、我が国では一般的でない。硝酸ストリキニーネあるいは空気栓塞により動物を殺処分することは、実験動物の飼養及び保管等に関する基準の解説（ぎょうせい、1980）にも記されているように禁止されている。

(解説 23) 避けることのできない重度のストレスを与えること。ストレスを与え殺すこと。

動物を叩いたり、押しつぶしたりして殺すこともこの中に含まれる。動物を殺処分する場合にはわが国で認められている安楽死法を用いる。

(解説 24) カテゴリーE の実験は、それによって得られる結果が重要なものであっても、決して行ってはならない。カテゴリーE に属する大部分の処置は、国の方針によって禁止されており、したがって、これを行った場合は、国からの研究費は没収され、そして（または）その研究施設の農務省への登録は取り消されることがある。

SCAW の分類では、「カテゴリーE の実験は米国の方針で禁止されている」となっているが、SCAW の分類が掲載されている論文（Consensus Recommendation on Effective Institutional Animal Care and Use Committees：資料1 参照）では、カテゴリーE の処置については各研究機関で独自の方針を持つことが望ましいとされ、カテゴリーE の実験であっても研究機関の動物実験委員会が正当性を認めれば実施することも可能であると理解される。実際に、USDA の年次報告にもカテゴリーE の実験が行なわれていることが示されている。

苦痛度検索表

分類	手技／処置	条件	カテゴリー	備 考
保定・拘束	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	
	筒状マーモセット保定器の使用		C	
	ラット用ボールマンケージの使用		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。
個体識別	色素塗付、入墨、耳パンチ、耳カット、耳ピアス、イヤリング、耳標、脚帯、毛刈、マイクロチップ		B	耳パンチと耳介のバイオプシーを峻別する。
身体検査	体重・体格測定		B	不動化のための麻酔をすることがある。
	体温測定		B	
	聴診		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	
	血圧測定		B	
制限	絶食・絶水（別表1）		B～D	（別表1）絶食・絶水は動物種による代謝時間の差を考慮。
行動観察	摂餌・摂水量の測定、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、劣悪環境への暴露、攻撃性試験		C	負荷・制限をかけたときの行動観察。時間制限する。
材料採取	麻酔下で行い、覚醒させず安楽殺する臓器・組織の採取	無覚醒	B	
	スワブ採取（鼻腔、口腔）		B	
	カテーテルによる採尿／導尿	麻酔薬塗付	B	
	採血（注射器又は表皮薄切による末梢静脈採血など）	無麻酔	B／C	眼窩静脈叢からの採血は麻酔下で行う。 静脈採血を10回以上反復実施する場合はC。
	採血（動脈、眼窩静脈叢、体腔内血管）	麻酔下	C	
	バイオプシー（テール、耳介、皮膚、皮下）	麻酔下	C	マウス・ラットのテールカット

	脂肪、骨髓、腎臓、肝臓、消化管粘膜など組織の採取)			(tail clipping) は3～4週齢での採取が原則
	腹水・採糞・被毛・毛根・精液採取		B	
投与・接種	静脈、腹腔、筋肉、皮下（硬膜外を含む）、皮内、経皮（パッチ）／経粘膜、経口（胃ゾンテ／カテーテル使用を含む）、経気道／吸入（気管内挿管を含む）、混餌、飲水溶解／懸濁、経鼻／点鼻、直腸内		B	麻酔薬の投与を含む。 胎齢15日以上のマウス・ラット胎仔は苦痛カテゴリーを適用する。
	脳（室）、脊髄、足底部、動脈、体表リンパ節、内臓血管、眼球内、腸内、門脈内、消化管内	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		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
	フロイント完全		D	
移植	移植部位；皮下、静脈内、腹腔内		B	
	移植部位；足底部／フットパッド	麻酔下	C	足底部は選択した理由を明記
	卵巣移植、精巣内細胞移植、臓器内移植	麻酔下	C	
	臓器移植	麻酔下	D	
処置	麻酔下で行い、 覚醒させず安楽殺する処置	麻酔下	B	灌流固定は安楽死処置後に実施するものとする (別表2) 放射線照射は線量と照射部位を考慮。線量と照射部位により苦痛度が異なる
	気管内挿管	局所 麻酔下	B	
	内視鏡スコープ挿入	麻酔下	B	
	紫外線照射（無拘束による日焼け実験）		B	
	新生仔蘇生		B	
	人口哺育／里子		B	
	浸透圧ポンプ埋め込み		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	
	動脈内カニューレレーション	麻酔下	C	
	静脈内カニューレレーション	麻酔下	C	
	バルーンカテーテル挿入	麻酔下	C	
	電極埋込み	麻酔下	C	
	採卵	麻酔下	C	
	テレメトリー埋込み	麻酔下	C	
	留置針の設置 生態、習性を妨げない場合		B	
	〃 生態、習性を妨げる場合		C	
	刺激毛、紫外線による痛覚反応測定		B	
	放射線照射（別表2）		B～D	
手術	覚醒させず安楽殺する手術の実習	麻酔下	B	精管結紮、胚移植は開腹手術を行う
	帝王切開	麻酔下	C	

	皮膚切開・縫合・2週間後の抜糸	麻酔下	C	
	頭蓋骨穿孔術	麻酔下	C	
	摘脾	麻酔下	C	
	精巣・卵巣摘出術	麻酔下	C	
	精巣の腹膜固定	麻酔下	C	
	動脈・静脈結紮（深部）	麻酔下	C	
	精管結紮（マウス・ラット）	麻酔下	C	
	胚移植（マウス・ラット）	麻酔下	C	
	卵管結紮	麻酔下	C	
病態モデル	食餌性肥満（機能障害なし）		B	原則として最大限の病態が発現することを前提にカテゴリーを選択する。 重篤に至る前に安楽殺する場合は、その旨を明記し、適切なカテゴリーを選択する。
	大腸炎（局所・短時間）		C	
	膀胱炎（局所・短時間）		C	
	炎症性疼痛（局所・短時間）		C	
	甲状腺機能低下症		C	
	自己免疫疾患（重症に至らない）		C	
	高脂血症		C	
	認知症		C	
	嘔吐		C	
	肥満		C	
	腎不全（ネフローゼを含む）		D	
	発がん		D	
	急性膵炎		D	
	アトピー性皮膚炎（長期にわたりストレス大）		D	
	パーキンソン病		D	
	糖尿病		D	
	高血圧症（脳卒中モデルを含む）		D	
	心筋梗塞／虚血		D	
	脳梗塞／虚血		D	
	脊髄損傷		D	
	末梢神経損傷／変性		D	
	筋ジストロフィー		D	
	胆がん		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	

腫瘍／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	
安楽死	化学的方法（麻酔薬の過剰投与、麻酔下のKCl投与、炭酸ガス吸入、安楽死処置として認められたその他のガスの吸入）		B	物理的方法は、事前の軽麻酔処置を推奨する国もある。
	物理的方法（頸椎脱臼、脊髄破壊、断頭、麻酔等で意識喪失した動物の放血・全採血、胎仔の低体温処置）			

別表 1. 絶食・絶水の苦痛カテゴリー

動物種		<カテゴリーB>	<カテゴリーC>	<カテゴリーD>
		ほとんど不快感がない 体重減少は日内変動程度	軽いストレスを与える 体重減少は日内変動を超える	強いストレスを与える 2、3日で体重が20%以上減少したら中止
げっ歯類	絶食	12時間未満	12～24時間	24時間以上
	絶水	2時間未満	2～12時間	12時間以上
イヌ	絶食	24時間未満	24～48時間	48時間以上
	絶水	12時間未満	12～24時間	24時間以上
ネコ	絶食	24時間未満	24～48時間	48時間以上
	絶水	12時間未満	12～24時間	24時間以上

別表 2. げっ歯類における放射線照射の苦痛カテゴリー

(ここでの線量は 200kv、10mA のエネルギーの X 線照射による皮膚表面レベルでの線量)

照射条件	<カテゴリーB>	<カテゴリーC>	<カテゴリーD>
	照射の影響は一時的である	生理機能が一時的に損なわれるが回復する。リンパ球等の一時的減少	生理・生態・習性を損なう障害が残る。骨髄死による致死障害をもたらす
全身あるいは胸腹部の照射	4Gy 以下	4Gy から 8Gy	8Gy 以上

照射条件	<カテゴリーB>	<カテゴリーC>	<カテゴリーD>
	照射の影響は一時的である	生理機能が一時的に損なわれるが回復する。一時的な皮膚の紅斑、剥離や炎症	生理・生態・習性を損なう障害が残る。難治性潰瘍やケロイド等の皮膚障害をもたらす
手足・頭部への局所照射（1回）	8Gy 以下	8Gy から 20Gy	20Gy 以上

参考資料：麻酔/鎮静薬

動物の苦痛軽減のために痛みを伴う処置や外科処置を行う際には、原則として麻酔を使用しなければならない。また、円滑かつ安全な麻酔を実施することにより動物の苦痛軽減のみならず、再現性の高いデータを採取可能となる。

麻酔薬に関する注意事項および動物実験で使用される代表的な麻酔/鎮静薬の使用例について表3に記したので参考にしていただきたい。

○推奨されない麻酔薬

注意：科学的根拠が示されればその使用について許可されることがあるが、Journal によっては reject される可能性があることも考慮していただきたい。

➤ エーテル

エーテルは気道刺激、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あることが報告され、動物に苦痛を与えることから本剤による吸入麻酔は不適切であるとしている。臨床で使用されているセボフルレン、イソフルレンなどを使用すべきである。また、本薬剤による安楽死も推奨されていない。

➤ 抱水クロラル/αクロレース

催眠作用は有しているものの、鎮痛作用がほとんどないことが明らかとなっている。また、抱水クロラルを腹腔内投与すると、消化管に激しい炎症と壊死を生じるだけでなく、溶血、血尿、肝・腎不全、腸閉塞が生じることから、生存実験で抱水クロラルを腹腔内投与することは推奨されない。本薬剤による安楽死も低酸素血症を生じ、動物に苦痛を与えることから推奨されない。

➤ ウレタン

催眠作用、鎮痛作用ともに有しており、麻酔薬としての効果は十分であるが、発癌性を有していることから実験従事者の健康被害を考慮し、推奨されない。

○使用するにあたり注意を要する麻酔薬

➤ ペントバルビタール

本剤には鎮痛作用はほとんどないことが明らかとなっている。開腹手術や開胸手術など侵襲度の高い外科手術を行う際には、他の麻酔薬や鎮痛剤と併用する必要がある。なお、安楽死で使用することは問題ない。

代表的な麻酔薬の使用例（動物種別）

表 3-1 マウスの麻酔

動物種	薬剤名	投与量	投与経路	適 応
注射麻酔	アルファキサロン	10 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	ケタミン+メデトミジン	ケ) 75 mg/kg + メ) 1 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 80～100 mg/kg + キ) 10 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+ミダゾラム	ケ) 100 mg/kg + ミ) 5 mg/kg	腹腔内	不動化
	プロポフォール	26 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	チオペンタール	30～40 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	メデトミジン+ミダゾラム+ブトルファノール	メ) 0.7 mg/kg + ミ) 4 mg/kg + ブ) 5 mg/kg	腹腔内・皮下	中度～外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.7～2.8%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	3～5%	吸入	外科麻酔

表 3-2 ラットの麻酔

注射麻酔	アルファキサロン	10 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	ケタミン+メデトミジン	ケ) 75 mg/kg + メ) 0.5 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 75～100 mg/kg + キ) 10 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+ミダゾラム	ケ) 75 mg/kg + ミ) 5 mg/kg	腹腔内	浅い麻酔
	フェンタニル+メデトミジン	フ) 300 ug/kg + メ) 300 ug/kg	腹腔内	外科麻酔
	プロポフォール	10 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	メデトミジン+ミダゾラム+ブトルファノール	メ) 0.15 mg/kg + ミ) 2 mg/kg + ブ) 2.5 mg/kg	腹腔内・皮下	中度～外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.7～2.7%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	3.2～5%	吸入	外科麻酔

表 3-3 ハムスターの麻酔

動物種	薬剤名	投与量	投与経路	適 応
注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 100 mg/kg + メ) 0.25 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 200 mg/kg + キ) 10 mg/kg	腹腔内	外科麻酔

表 3-4 モルモットの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 40 mg/kg + メ) 0.5 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 40 mg/kg + キ) 5 mg/kg	腹腔内	外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.4～2.3%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	-	-	-

表 3-5 ウサギの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 15 mg/kg + メ) 0.25 mg/kg	皮下	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 10～35 mg/kg + キ) 3～5 mg/kg	静脈内・筋肉内	外科麻酔
	フェンタニル+メデトミジン	フ) 8 ug/kg + メ) 330 ug/kg	静脈内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン+ブトルファノール	ケ) 35 mg/kg + キ) 5 mg/kg + ブ) 0.1 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	プロポフォール	10 mg/kg	静脈内	浅い麻酔
	チオペンタール	30 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	メデトミジン+ミダゾラム+ブトルファノール	メ) 0.15 mg/kg + ミ) 2 mg/kg + ブ) 2.5 mg/kg	腹腔内・皮下	中度～外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	2.4～4%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	4.4～7.4%	吸入	外科麻酔

表 3-6 イヌの麻酔

動物種	薬剤名	投与量	投与経路	適 応
注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 2.5～7.5 mg/kg + メ) 0.04 mg/kg	筋肉内	浅い麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 5 mg/kg + キ) 1～2 mg/kg	静脈内/筋肉内	浅い麻酔
	プロポフォール	5～7.5 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	サイアミラール	10～15 mg/kg	静脈内	外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.5～2.6%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	2.7～4.5%	吸入	外科麻酔

表 3-7 ネコの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 7 mg/kg + メ) 0.08 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 22 mg/kg + キ) 1.1 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	ケタミン+メデトミジン+ブトルファノール	ケ) 5 mg/kg + メ) 0.08 mg/kg + プ) 0.4 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	プロポフォール	5～8 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	サイアミラール	12～18 mg/kg	静脈内	外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	2～3.2%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	4.1～6.8%	吸入	外科麻酔

表 3-8 ヤギ・ヒツジの麻酔

動物種	薬剤名	投与量	投与経路	適 応
注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 1 mg/kg + メ) 0.025 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 4 mg/kg + キ) 0.05 mg/kg (ヤ)、2 mg/kg (ヒ)	静脈内	外科麻酔
	ケタミン+メデトミジン+ミダゾラム	ケ) 5 mg/kg + メ) 0.04 mg/kg + ミ) 0.2 mg/kg	静脈内	外科麻酔
	プロポフォール	4～5 mg/kg	静脈内	浅い麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.9～3.2%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	4～6.6%	吸入	外科麻酔

表 3-9 ブタの麻酔

注射麻酔	ケタミン	10～15 mg/kg	筋肉内	鎮静
	ケタミン+メデトミジン	ケ) 10 mg/kg + メ) 0.08 mg/kg	筋肉内	浅い麻酔
	ケタミン+ミダゾラム	ケ) 10～15 mg/kg + ミ) 0.5～2 mg/kg	筋肉内	浅い麻酔
	ケタミン+メデトミジン+ミダゾラム	ケ) 5 mg/kg + メ) 0.04 mg/kg + ミ) 0.2 mg/kg	筋肉内	浅い麻酔
	プロポフォール	6～8 mg/kg	静脈内	外科麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.7～2.9%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	4.2～7%	吸入	外科麻酔

表 3-10 ウシの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 2～2.5 mg/kg + メ) 0.005～0.01 mg/kg	ケ) 静脈内・メ) 筋肉内	中度～外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 2～2.5 mg/kg + キ) 0.05～0.1 mg/kg	ケ) 静脈内・キ) 筋肉内	中度～外科麻酔
	ケタミン+ミダゾラム	ケ) 2～2.5 mg/kg + ミ) 0.04 mg/kg	静脈内・筋肉内	中程度麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.4～2.3%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	-	-	-

表 3-11 ウマの麻酔

動物種	薬剤名	投与量	投与経路	適 応
注射麻酔	メデトミジン+ブトルファノール	メ) 0.005～0.007 mg/kg + ブ) 0.01～0.03 mg/kg	静脈内	麻酔前投与
	キシラジン+ブトルファノール	キ) 0.5～1 mg/kg + ブ) 0.01～0.03 mg/kg	静脈内	麻酔前投与
	ケタミン+ミダゾラム	ケ) 2～3 mg/kg + ミ) 0.02～0.06 mg/kg	静脈内	麻酔導入
	チオペンタール	5.5～8 mg/kg	静脈内	麻酔導入
吸入麻酔	イソフルラン	1.6～2.6%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	2.8～4.6%	吸入	外科麻酔

表 3-12 サルの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 5 mg/kg + メ) 0.05 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 10 mg/kg + キ) 0.5 mg/kg	筋肉内	外科麻酔
	プロポフォール	7～8 mg/kg	静脈内	浅い麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.5～2.6%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	4.2～7%	吸入	外科麻酔

表 3-13 トリの麻酔

注射麻酔	ケタミン+メデトミジン	ケ) 5～10 mg/kg + メ) 0.05～0.1 mg/kg	筋肉内	浅い～中度麻酔
	ケタミン+キシラジン	ケ) 5～30 mg/kg + キ) 0.2～5 mg/kg	筋肉内	浅い～中度麻酔
	プロポフォール	5～10 mg/kg	静脈内	中程度麻酔
吸入麻酔	イソフルラン	1.5～2.5%	吸入	外科麻酔
	セボフルラン	2.7～4.4%	吸入	外科麻酔

注 1) 吸入麻酔は参考資料に記載された MAC 値より 1.2MAC、1.5MAC を算出し、記載している。

注 2) 本表はあくまでも参考値を示したものであり、動物の健康状態により投与量を加減する必要がある。

注 3) 本表に記載されていない薬剤については動物実験委員会の判断に委ねるものとする。

参考資料

- 1) Laboratory Animal Anaesthesia 4th edition
- 2) Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals 2nd edition
- 3) Veterinary Anesthesia and Analgesia. The fifth edition of Lumb and Jones.

参考資料：安楽死

安楽死とは・・・

実験終了後や人道的エンドポイント※時に動物を可能なかぎり疼痛と苦痛を伴わずに死に至らしめること。

※人道的エンドポイントとは

- 実験動物を耐え難い苦痛から解放するために、たとえ実験途中であっても実験を終了し、安楽死するまたは実験装置からの解放するタイミングのこと。
- カテゴリーDに該当する実験はエンドポイントを設定しなければならない。

代表的な人道的エンドポイントの指標

- ・ 摂餌、摂水困難を認める場合。
- ・ 苦悶の症状（自傷、異常姿勢、呼吸異常、異常発声）を認める場合。
- ・ 回復しない外見異常（下痢、出血）を認める場合。
- ・ 腫瘍重量が体重の10%を超える（マウス：20mm、ラット：40mm以上）場合。
- ・ 著しい体重減少（対照群と比べ20%以上、7日間で25%以上）を認める場合。
- ・ 進行性低体温（正常体温より10%以上、げっ歯類は4～6℃低下）を認める場合。

適切な安楽死法の選択基準

- ・ 痛みや不安を伴わずに意識の消失と死を誘発できること。
- ・ 意識消失と致死までに要する時間が短いこと。
- ・ 確実であり、不可逆的であること。
- ・ 実施者にとって安全で心理的ストレスが少ないこと。
- ・ 目的や必要性に適していること。
- ・ 動物種、年齢、健康状態に対して適切であること。
- ・ 薬物の入手のしやすさと薬物による弊害を考慮すること。

安楽死実施後は必ず動物の死を確認すること！！！！

○安楽死方法の詳細は AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition
(<https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>) を参考にすること。

なお、推奨/条件付き容認されている代表的な安楽法を表4に示した。

表 4

IV：静脈内投与、IP：腹腔内投与、IM：筋肉内投与

動物種	推奨される安楽死法	条件付きで容認される安楽死法
マウス・ラット	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV/IP） ・ケタミン+キシラジン/メデトミジン過剰投与（IV/IP） ・ケタミン+ジアゼパム過剰投与（IV/IP）	・吸入麻酔薬の過剰吸入：<u>覚醒する可能性（長時間観察が必要）</u> ・CO₂吸入：<u>1分間に30～70%の割合でチャンバー内の空気をCO₂へ置換</u> ・頸椎脱臼、断首：<u>麻酔下で実施（無麻酔下で行えるのは熟練者のみ）、ラットでは体重＜200g</u> ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u>
ウサギ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV/IP）	・吸入麻酔薬の過剰吸入：吸入<u>麻酔薬に対して忌避行動をとるため、注射麻酔実施後に行う</u> ・CO₂吸入：<u>鎮静下・麻酔下で実施</u> ・頸椎脱臼：<u>かなり高度な技術を有した人のみ</u> ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u>
イヌ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV） ・ケタミン+キシラジン/メデトミジン過剰投与（IV/IP/IM） ・プロポフォール過剰投与（IV）	・バルビツール系麻酔薬（IV以外）：<u>臓器に注入する際は麻酔下で実施</u> ・吸入麻酔薬の過剰吸入：<u>体重＜7kg、吸入後、覚醒する可能性（長時間観察が必要）</u> ・塩化カリウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与可</u> ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u>
ネコ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV） ・ケタミン+キシラジン/メデトミジン過剰投与（IV/IP/IM） ・プロポフォール過剰投与（IV）	・バルビツール系麻酔薬（IV以外）：<u>臓器に注入する際は麻酔下で実施</u> ・吸入麻酔薬の過剰吸入：<u>体重＜7kg、吸入後、覚醒する可能性（長時間観察が必要）</u> ・塩化カリウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与可</u> ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u>
ヤギ・ヒツジ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV）	・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u> ・家畜銃：<u>熟練者のみ実施可</u> ・塩化カリウム/硫酸マグネシウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与</u>

表 4 つづき

IV：静脈内投与、IP：腹腔内投与、IM：筋肉内投与

動物種	推奨される安楽死法	条件付きで容認される安楽死法
ブタ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV）	・Ar-CO₂/N₂-CO₂ 吸入：成豚より幼若なブタで効果有、家畜豚で体重<32kg ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u> ・家畜銃：<u>熟練者のみ実施可</u> ・塩化カリウム/硫酸マグネシウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与</u> ・電気ショック：<u>熟練者のみ、方法によっては放血などとの併用が必要</u>
ウシ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV）	・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u> ・家畜銃：<u>熟練者のみ実施可</u> ・塩化カリウム/硫酸マグネシウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与</u>
ウマ	・バルビツール系麻酔薬過剰投与（IV）	・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u> ・家畜銃：<u>熟練者のみ実施可</u> ・塩化カリウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与</u>
サル	・バルビツール系麻酔薬（IV） ・麻酔薬過剰投与	・バルビツール系麻酔薬（IV 以外）：<u>臓器に注入する際は麻酔下で実施</u> ・塩化カリウム（IV）：<u>意識消失下、麻酔下でのみ投与可</u> ・放血：<u>意識消失下、麻酔下でのみ実施可</u>
トリ	・麻酔薬過剰投与（IV）	・吸入麻酔薬の過剰吸入：吸入後、覚醒する可能性（長時間観察が必要） ・CO₂ 吸入：>40%CO₂ 濃度で意識消失と麻酔効果が発現。 ・頸椎脱臼・断首：熟練者のみ無麻酔下で実施可 ・電気ショック：<u>放血、頸椎脱臼と併用する必要がある</u>

☆安楽死で推奨されない薬剤：エーテル、抱水クロラル、αクロレス、ウレタン、筋弛緩薬の単独使用

（AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition より一部抜粋）

参考資料：鎮痛剤

外科処置後や動物が痛みを感じている場合には苦痛軽減のため、鎮痛剤の使用が求められる。下に疼痛評価法の例と動物種における鎮痛剤の使用例を表5に示したので参考にしていきたい。

○疼痛評価（げっ歯類、ウサギ）

痛みの評価①

		無痛	中程度の痛み	強い痛み
Orbital Tightening	Mouse Rat			
痛みが強いほど ・ 瞼を閉じる ・ 眼周囲にしわが出現 ・ 目の大きき半分以下 → 強い痛み	Rabbit			

痛みの評価②

		無痛	中程度の痛み	強い痛み
Nose Bulge Nostril Shape	Mouse Rat			
痛みが強いほど マウス ・ 鼻梁が膨らむ ・ 鼻が大きく見える ウサギ ・ 鼻孔がU字→V字 ・ 鼻先端が下方へ	Rabbit			

痛みの評価③

Cheek Bulge Cheek Flattening

痛みが強いほど
マウス
・頬が挙上
・頬が凸凹に見える
ウサギ
・頬の扁平化
・やせこけた顔

Mouse
Rat

Rabbit

無痛

中程度の痛み

強い痛み



痛みの評価④

Whisker Change

痛みが強いほど
マウス
・髭が後、前を向く
・髭がまとまる
ウサギ
・髭が前方を向く
・髭が下を向く
→ 強い痛み

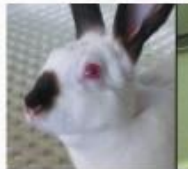
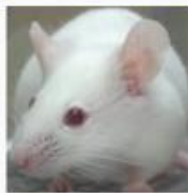
Mouse
Rat

Rabbit

無痛

中程度の痛み

強い痛み



痛みの評価⑤

Ear position

Ear Shape & Position

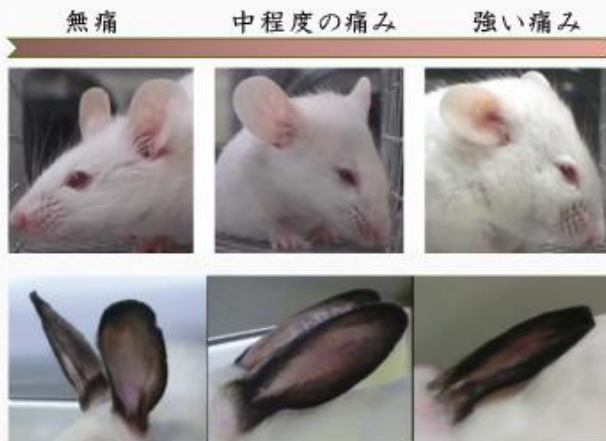
痛みが強いほど
マウス

- ・耳が後ろに傾く
- ・耳が外側を向く

ウサギ

- ・耳が後ろに傾く
- ・耳が丸まる

Mouse
Rat



Rabbit

痛みの評価⑥

•活動性 (Activity)

- ・背湾姿勢
- ・活動性が減少(うずくまっている)



<http://www.human-endpoints.info/arg/rodes>

•外観 (Appearance)

- ・グルーミングの減少による汚れ (目、鼻、口、肛門周囲)

•発声 (Vocalization)

- ・連続的な鳴き声、高い鳴き声



•気質 (Temperament)

- ・攻撃的になる(咬む、ひっかく)
- ・逃避行動をとる

•摂食(水)行動 (Feeding behavior)

- ・摂餌量や摂水量の減少 (尿量、便の量が減少)

積極的な鎮痛剤の利用を！！

(NC3Rs Center HP より一部引用)

表. 5

※ IV：静脈内投与、IP：腹腔内投与、IM：筋肉内投与、PO：経口投与、SID：一日に一回投与、q：投与間隔

	マウス	ラット	モルモット	ウサギ	ブタ	ヤギ・ヒツジ	サル	イヌ	ネコ
カルプロフェン	5 mg/kg	5 mg/kg	4 mg/kg	4 mg/kg	2-4 mg/kg	2-4 mg/kg	3-4 mg/kg	2-4 mg/kg	2-4 mg/kg
	SC	SC	SC	SC	IV or SC	IV or SC	SC	IV or SC	IV or SC
	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID
フルニキシシ	2.5 mg/kg	2.5 mg/kg	2.5 mg/kg	1-2 mg/kg	1-2 mg/kg	2 mg/kg	0.5-2 mg/kg	1 mg/kg	1 mg/kg
	SC	SC	SC	SC	IV or SC	IV or SC	IV or SC	IV or IM	SC
	q 12hr	q 12hr	q 12hr	q 12hr	SID	SID	SID	q 12hr	SID
ケトプロフェン	5 mg/kg	5 mg/kg		3 mg/kg	1-3 mg/kg		2 mg/kg	1-2 mg/kg	1 mg/kg
	SC	SC	-	SC	IV, IM, SC or PO	-	SC	IV, IM, SC or PO	SC
	SID	SID		SID	q 12hr		SID	SID	SID
メロキシカム	5 mg/kg	1 mg/kg	0.1-0.3 mg/kg	0.6-1 mg/kg	0.4 mg/kg	0.5 mg/kg	0.1-0.2 mg/kg	0.1-0.2 mg/kg	0.1-0.2 mg/kg
	SC or PO	SC or PO	SC or PO	SC or PO	SC	SC or PO	SC or PO	SC or PO	SC or PO
	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID	SID
ブプレノルフィン	0.05-0.1 mg/kg	0.01-0.05 mg/kg	0.05 mg/kg	0.01-0.05 mg/kg	0.01-0.05 mg/kg	0.005-0.01 mg/kg	0.005-0.01 mg/kg	0.005-0.02 mg/kg	0.005-0.01 mg/kg
	SC	SC or I.V	SC	SC or IM	IM or IV	IM or IV	IM or IV	IM, SC or IV	SC or IV
	q 12hr	q 8 - 12hr	q 8 - 12hr	q 8 - 12hr	q 6 - 12hr	q 4hr	q 6 - 12hr	q 6 - 12hr	q 8 - 12hr
ブトルファノール	1-2 mg/kg	1-2 mg/kg	1-2 mg/kg	0.1-0.5 mg/kg	0.1-0.3 mg/kg	0.022-0.05 mg/kg	0.01 mg/kg	0.2-0.4 mg/kg	0.4 mg/kg
	SC	SC	SC	IV	IM or IV	IM or IV	IV	IM or SC	SC
	q 4hr	q 4hr	q 4hr	q 4hr	q 4hr	q 2 - 3hr	q 3 - 4hr	q 3 - 4hr	q 3 - 4hr

参考資料：1) Laboratory Animal Anaesthesia 4th edition, 2) Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals 2nd edition,

3) Veterinary Anesthesia and Analgesia. The fifth edition of Lumb and Jones.

(日本実験動物医学会 HP より抜粋)

参考資料：げっ歯類の胎児・新生児の鎮痛・麻酔および安楽死に関する声明

(第2版、2015年)

日本実験動物医学会は、動物実験に用いられるげっ歯類の胎児や新生児の人道的な取り扱い方法や最良の安楽死法について2009年12月に声明を発表した。これは我が国ではげっ歯類の胎児や新生児を用いた多くの研究がなされているが、その人道的な取り扱い方法や安楽死法に関するガイドラインがないため、研究者が動物実験を立案する際、あるいは動物実験委員会が実験計画書を審査する際の基準がなく混乱があったからである。日本実験動物医学会は専門委員会を立ち上げ、最新の知見を調査すると共に、胎児や新生児を利用する試験に関する(各国の)ガイドラインなども併せて調査し、議論・検討を行った結果を公表した。それからほぼ5年間の経過した2014年9月に、日本実験動物医学会は2009年に公表した声明の内容と最新の知見(1, 2, 3)との間に齟齬があることを認識し、再度専門委員会を立ち上げることにした。なお、今回の専門委員会は日本実験動物医学会と日本実験動物医学専門医協会(以下、本学協会)との合同委員会とした。専門委員会は、最新の知見を収集し議論を重ねて、げっ歯類の胎児・新生児の安楽死に用いる方法の留意点について以下の見解に達したので、ここに報告する。

【背景】げっ歯類の胎児や新生児は、新薬の開発過程における生殖発生毒性試験や、*in vitro* 試験に用いる初代培養細胞の供給源などとして実験に用いられる。げっ歯類の胎児や新生児を動物実験に用いる場合には、成獣と同様に鎮痛・麻酔などの処置や意識を消失した状態で安楽死を施すなどの人道的な取り扱いが必要とされる(3)。発生に関する研究から、胎児の発生初期の段階では脳・神経系は疼痛を知覚できるほど十分には発達していないが、妊娠後期の胎児は侵害刺激に対して忌避反応を示すことから、知覚神経系が十分に発達していることが報告されている(4, 5)。しかしながら、哺乳類の胎児・新生児であっても、早熟性の種(モルモット)と晩熟性の種(マウス、ラット、ハムスターなど)では中枢神経系の発達の状態が異なり、マウスやラットなどの胎児・新生児は、侵害刺激には反応しても脳は疼痛や不快を知覚する状態にないことが示されている(6)。この知見は従来の胎児・新生児に対する鎮痛の概念を大きく変更させるものであり、専門委員会はこの知見を基に前回の声明の内容を見直すこととした。

1. 疼痛管理

「人道的な取り扱いを考慮する必要がある」が意味するものは、「動物が苦痛を感じてい

る」、言い換えれば、「個体として苦痛を感じるほど成熟している場合には疼痛管理を必要とする」である。このことに大きく寄与する因子として神経系の発達があることは言うまでもないが、特に、神経系が生理学的に機能していることが重要である (5, 7)。ここでは神経系の発達の程度を鑑み、胎児の発達段階を妊娠前期と妊娠後期に分け、さらに新生児を成獣と異なる一つの段階として、それぞれに疼痛管理の考え方を示す。

1) 妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は神経管の発達が未熟であり、疼痛を知覚するほど成熟していない。また、自身で生命を維持する能力が備わっていないため、母体を安楽死させる、あるいは母体から摘出すること等により、母体からの血流が途絶えると疼痛・不快などを知覚することなく死に至る。従って、神経系が未発達の状態にある妊娠前期の胎児については、鎮痛・麻酔を施すことなく実験に必要な処置を行って良い。また、胎児を安楽死させる方法を考慮する必要はない。

2) 妊娠後期の胎児

子宮内に存在して母体から血液の供給を受けているヤギの胎児は、母体から供給される強力な神経遮断作用、催睡眠作用や麻酔作用を有する物質により持続的に催眠状態にあり、疼痛刺激を知覚することがない状態におかれていることが報告されている (8)。この状態は哺乳類一般に保持されており、母体に対する鎮痛・麻酔処置が十分であれば子宮内の胎児に対して配慮する必要性はない (9)。また、母体が死亡した場合でも、子宮内の胎児は催眠状態のまま母体からの血流の途絶により死に至ることから、胎児を死亡した母体から摘出して安楽死を施す必要はない (3)。

麻酔下の母体から摘出された胎児については、覚醒する個体があることから何らかの処置が必要となる可能性がある。妊娠後期の胎児は、侵害刺激に対して忌避反応を示す。また、母体から摘出した胎児では、摘出後に自発呼吸を開始する個体がみられ、適切な環境が与えられれば生存することも可能である。従って、摘出した胎児を試験に用いる場合には鎮痛・麻酔の処置を行うこと、あるいは意識を消失させて速やかに安楽死させることが必要である。特に、モルモットでは、母体から摘出した胎児は疼痛や不快を知覚するので、妊娠 34 日目以降のモルモット胎児には、摘出後速やかに鎮痛・麻酔を実施すべきである。一方、マウスやラットなどでは、妊娠 15 日目以降の胎児は、侵害刺激に対して忌避反応を示すが、脳が痛覚や不快を認識できるほどには発達していないため、鎮痛・麻酔を実施する必要はない。

3) 新生児

モルモットの新生児は成獣と同様に疼痛や苦痛を知覚することから、実験に際しては、成獣に準じて鎮痛・麻酔を施し、あるいは安楽死法を選択する。一方、マウスやラットなどの新生児は、生後も徐々に脳の機能が発達することから、疼痛や苦痛を知覚するようになるには一定の期間を必要とする。また、新生児のオピオイド受容体の数は成獣に比べて非常に多く、成熟するにつれて成獣の状態に減数すること（10）や、ラットの新生児は疼痛反応が成獣とは異なり、成獣と同様の反応を示すには生後2週間ほどを要することも報告されている（11）。本学協会は、7日齢未満のマウスやラットなどの新生児では、疼痛や苦痛を知覚するほど十分には神経系が発達していないため、実験や安楽死に際して鎮痛・麻酔を施す必要はないが、7日齢以降の新生児に対しては、鎮痛・麻酔などの処置が必要であるとする。特に、生後2週間までは、低酸素状態に抵抗性であることを考慮して鎮痛・麻酔もしくは安楽死法を選択することが重要である。

2. 鎮痛・麻酔

胎児や新生児は成獣と異なり成長の過程にあることに配慮して、鎮痛薬や麻酔薬を選定することが必要である。特に、薬物の代謝・排泄に関わる肝機能や腎機能が十分に発達していないことに配慮して、用量・用法に注意する必要がある。この観点からペントバルビタールは、低用量では効果が不安定で高用量では致死的であるため麻酔薬として使用することを推奨しない（12）。

1）妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は神経系の発達が未熟であることから、実験に必要な処置を施す際に疼痛に対する配慮は必要ない。従って、鎮痛・麻酔の処置を行わなくても良い。

2）妊娠後期の胎児

子宮内にある胎児に何らかの処置を施す場合、母体を十分に麻酔することに配慮すれば、胎児には特別な配慮をする必要はない。また、母体から摘出したマウスやラットの胎児は疼痛や不快を知覚しないことから、同様に、特別な配慮は不要である。しかし、母体から摘出したモルモットの胎児に何らかの処置を施す場合には、疼痛を知覚することに配慮して鎮痛や麻酔などを施す必要がある。マウスやラットなどの胎児に麻酔を施す場合には、イソフルランやセボフルランなどの吸入麻酔薬の使用や体温を低下させる麻酔法などが推奨される。ただし、胎児は低酸素状態に抵抗性であることから、イソフルランなどの吸入麻酔薬を用いた場合には、麻酔に要する時間が延長することに配慮して、詳細に観察する必要がある。なお、早熟性のモルモットでは妊娠34日齢以降の胎児を妊娠後期の胎児とす

る。

本学協会として推奨する麻酔法を以下に示す。

- (i) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬の使用（麻酔期に至るまでに時間を要することに配慮する）
- (ii) 胎児を直接、冷源に触れさせない条件での低体温（13）
- (iii) 胎児に注入可能な薬剤の使用（肝機能が十分に発達していない場合があるので、用量、用法に配慮する）

また、リドカインなどの局所麻酔薬、オピオイド類（ただし、パーシャルアゴニストであるブプレノルフィンは除外する）および非ステロイド性抗炎症薬の使用を推奨する。

3）新生児

モルモットの新生児に何らかの処置を施す場合には、成獣と同様に、疼痛を知覚することに配慮して鎮痛や麻酔などを施す必要がある。マウスやラットなどの新生児に麻酔を施す場合には、イソフルランやセボフルランなどの吸入麻酔薬の使用や体温を低下させる麻酔法などが推奨される。また、マウスやラットなどの新生児は低酸素状態に抵抗性であることから、イソフルランなどの吸入麻酔薬を用いた場合には、麻酔に至る時間が延長することに配慮して詳細な観察が必要である。

本学協会として推奨する麻酔法を以下に示す。

- (i) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬の使用（マウスやラットなどの新生児は麻酔期に至るまでに時間を要することに配慮する）
- (ii) マウスやラットなどの新生児を直接、冷源に触れさせない条件での低体温（13）
- (iii) 注入可能な薬剤の使用（晩熟性の種の新生児は肝機能が十分に発達していない場合があるので、用量、用法に配慮する）

また、リドカインなどの局所麻酔薬、オピオイド類（ただしパーシャルアゴニストであるブプレノルフィンは除外する）および非ステロイド性抗炎症薬の使用を推奨する。

3。安楽死

安楽死を実施する場合、安楽死に関わる作業者が経験する精神的不安、不快感、あるいは苦痛に配慮して科学的研究の目的を損なわない限り、最も心理的負担の少ない方法を選択することが望ましい。従って、頸椎脱臼や断頭などの方法は熟練者が実施することが必然ではあるが、選択する順位としては下位に置き、かつ、深麻酔下で実施することを推奨す

る。なお、安楽死を目的として深麻酔を実施する際には、先に示した麻酔法に加えてペントバルビタールなどの注射麻酔薬を使用することができる。なお、マウスやラットなどの新生児を安楽死する場合には、特に7日齢未満の新生児は疼痛や不快を知覚することがないので、麻酔を施すことなく液体窒素に浸漬する方法や断頭などにより安楽死させることも可能であるが、動物実験委員会によりその科学的必然性が審査されることを推奨する。

マウスやラットなどの胎児や新生児の安楽死法として吸入麻酔薬を用いることは、胎児や新生児は低酸素状態に抵抗性であることから死に至る時間が延長すること、死の確認が容易でないことから、本学協会としては推奨しない。また、極超短波照射による安楽死法も胎児や新生児用の機材が市販されていないことから、推奨する方法から除外した。しかし、本学協会が推奨しない方法であっても、動物実験委員会が科学的研究の目的を果たすために不可欠であるとの研究者の判断を承認すれば、成獣に使用している安楽死法を胎児や新生児に適用することは可能であると考える。

1) 妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は自身で生命を維持する能力が備わっていないため、特に安楽死させる必要はないが、モルモットの子宮から分離された胎児が Vital sign を示す場合には速やかに適切な安楽死の方法を講じ、死に至る時間を延長させてはならない。

2) 妊娠後期の胎児

妊娠後期の胎児を安楽死させる場合には、注射麻酔薬の過量投与や深麻酔下での化学的、あるいは物理的方法を推奨する。ただし、母体とともに安楽死させる場合には、母体を安楽死させた後積極的に胎児を安楽死させるために母体から摘出する必要はない。ただし、母体の死亡後に胎児が死に至るまでには時間を要することに配慮する（麻酔下の母体を放血により安楽死させた場合、出血停止後5分以上胎児を子宮内に留置する（14））。また、マウスやラットなどの胎児は、母体から摘出後であっても疼痛や不快を知覚しないことから、疼痛の軽減に配慮する必要はない。一方、モルモットの胎児は、成獣と同様に、科学的必然性が動物実験委員会で認められない限り、麻酔下に安楽死を実施する。

本学協会として推奨する安楽死法は以下の6種類である。

- (i) ペントバルビタールなどの腹腔内・胸腔内への過量投与
- (ii) 塩化カリウムの心臓内投与（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）
- (iii) 液体窒素への浸漬（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）

(iv) 固定液への浸漬（深麻酔下にて実施）＊

(v) 断頭（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）

(vi) 頸椎脱臼（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）**

＊；晩熟性の種の胎児であっても死に至るまでに時間を要することから、深麻酔下で実施することを推奨する。

**；成獣の頸椎脱臼とは異なるため、頸椎損傷という表現がより適切と思われる。

3）新生児

モルモットの新生児や、疼痛を知覚する日齢以降（生後7日齢）のマウスやラットなどの新生児を安楽死させる場合には、成獣と同様に、注射麻酔薬の過量投与や深麻酔下での化学的、あるいは物理的方法を推奨する。なお、マウスやラットなどの新生児では吸入麻酔薬単独で安楽死させることは、死に至る時間を考慮すると人道的ではない。なお、マウスやラットなどの7日齢未満の新生児は、同種の胎児と同様に疼痛や不快を知覚しないことから、疼痛の軽減に配慮する必要はない。

本学協会として推奨する安楽死法は以下の8種類である。

(i) ペントバルビタールなどの腹腔内・胸腔内への過量投与

(ii) 塩化カリウムの心臓内投与（7日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下にて実施）

(iii) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬（7日齢未満のマウスやラットなどの新生児は除く）

(iv) 二酸化炭素（7日齢未満のマウスやラットなどの新生児は除く）＊

(v) 液体窒素への浸漬（7日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下にて実施）

(vi) 固定液への浸漬（深麻酔下にて実施）

(vii) 断頭（7日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下にて実施）

(viii) 頸椎脱臼

＊；可能な限りホームケージにて二酸化炭素を徐々に置換する方法で実施する。

本声明では吸入麻酔薬の使用法については適宜コメントしたが、二酸化炭素の使用については言及していない。しかし、マウスやラットなどの胎児や新生児は低酸素状態に抵抗性であることから、二酸化炭素を麻酔として用いることはもとより、安楽死法に用いることも適切ではないと判断している。また、鎮痛・麻酔などの処置を必要とする胎児や新生児の日齢（胎齢）については、目安としての数字を示しているが、これらの内容を含めてこ

ここに記載した方法の是非は動物実験委員会で判断すべきと考える。

最後に、ここに記載されている内容は現時点での科学が証明している事象から判断した結果をまとめたものであることから、新しい事象が判明した場合には、本学協会として速やかに新たな見解を取りまとめるよう努力する所存である。

2015 年 8 月 11 日

日本実験動物医学会

日本実験動物医学専門医協会

専門委員会委員

References

1. MLH Campbell et al., DJ Mellor and P Sandoe. How should the welfare of fetal and neurologically immature postnatal animals be protected? *Animal Welfare* (2014) 23, 369-379.
2. DJ Mellor and RG Lentle, Survival implications of the development of behavioural responsiveness and awareness in different groups of mammalian young. *New Zealand Veterinary Journal*. (2015) 63, 131-140.
3. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition
4. Report of the MRC Expert Group on Fetal Pain, 28 August 2001.
5. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2, working party report. *Laboratory Animals* (1997) 31, 1-32.
6. DJ Mellor, Galloping colts, fetal feelings, and reassuring regulations: putting animal welfare science into practice. *J Vet Med Educ* (2010) 100, 37-94.
7. DJ Mellor et al., The importance of 'awareness' for understanding fetal pain. *Brain Res. Review* (2005) 49, 455-471
8. DJ Mellor and TJ Diesch, Onset of Science: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. *Applied Animal Behav. Scien.* (2006) 100, 48-57. <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-02-062.html>
9. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals. Australian Government 2008 <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/ea18syn.htm>
10. AH Dickson and W Rahman, Mechanisms of Chronic Pain and the Development Nervous System in Chronic and Recurrent Pain in Children and Adolescents. In

Progress Research and Management edited by McGrath & GA Finley, IASP Press (1999) 13, 1-34

11. GA Barr, Maturation of the biphasic behavioural and heart rate response in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1998) 60, 329-335
12. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, National Research Council), The National Academies Press, 2003
13. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals. Edited by RE Fish et al., 2nd edition, ACLAM, 2008
14. OIE. Article 7.5.5: Management of fetuses during slaughter of pregnant animals. In: Terrestrial animal health code. 2014
http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_aw_slaughter.htm

(東北大学 HP より引用一部改変)

参考資料

実験動物の被験物質の投与(投与経路、投与容量)及び採血に関する手引き

EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)、 ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)

2000 年 2 月作成 中井伸子訳

序文

本書は EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)と ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)の主導により作成されたものである。本書は、最新設備を備えた安全性評価研究室において研究者が研究計画を立てる際の一助としてデータを使いやすくするだけでなく、実験動物の愛護にも最大限配慮することを目的として作られている。

本書はヨーロッパの製薬業界で働く研究者を対象として作られているが、一連のデータセット及び改良案の基礎となる原則は、研究所や大学、さらには異業種を問わず、動物に対して投与・採血等の技術を用いる全ての人にも同じように利用できるものと考えられる。

被験物質の投与や血液検体の採取を扱った文献は非常に多くあり、また、多くの研究所には長年の習慣や経験に基づいて作成された独自の「内部」指針も存在する。European Union Directive 86/609EEC(EU,1986)の規定により、我々は苦痛を最低限に抑えるための実験法を改良する義務を負った。試験計画を立てたり、レビューする際に有益な予備知識がこの手引き書から得られることを期待している。

本書は可能な限り学術雑誌に掲載された文献に基づいているが、これが不可能な場合には、内部データ及びワーキンググループ(作業部会)での経験(並びに医薬品業界より提出された有用なコメント)を活用して最終意見としている。本書ではまた、被験物質の投与、採血に関連する技術をさらに改良するという継続的な要求も扱っており、それらを行う方法も提案する。動物実験の重複を避けるため、研究所間で積極的にデータを共有すべきであり、同時に、動物愛護に関する経験的な技術及び過量投与等に起因する科学的な問題も共有すべきである。本書に記載する推奨事項は、「正常」動物に関するものであり、例えば、妊娠期や授乳期の動物については特別の配慮が必要である。投与容量を多量にした場合や過剰量の採血を行った場合、特に麻酔薬を投与した場合には、試験結果の解釈に混乱を来すおそれがあると考えられる。

1. 被験物質投与に関する手引き

(1)緒言

実験動物への投与は種々の科学的な研究に必要不可欠であり、規制当局の要求に合致させるためにも不可欠である。特に製薬企業では動物愛護と正当な科学研究を両立できる投与方法の基準が検討されてきた(Hull 1995)。

新薬の前臨床段階における安全性評価では、その医薬品に要求される安全域を確立するため、複数の「有効量」を投与することが一般的である。毒性が低い化学薬品や、通常の処方ではほとんど溶解しない化学薬品について、学術上の要求と規制上の要求の両方を満たすためには、個々の動物に対する投与容量を多量にしなければならないこともある。臨床使用目的もまた一般的な投与容量を上回ることを容認する要因となる。静脈内への適用を目的とした造影剤や血漿増量剤がその例である。

本ワーキンググループの目的は以下の通りである。

- a) 規制当局より求められる毒性試験で用いる通常の実験動物種に対する投与容量について、その指針を提供すること。
- b) 動物愛護と実用性の観点から最良の実施方法であることを説明できるような定型試験における投与量水準について、統一見解を提供すること。
- c) 一般的な試験において上限を提示できる投与量水準の指針を作成すること。なお、この指針は特殊な研究の場合にはあてはまらない。

(2)投与容量

最も頻用されている動物種に一般的に用いられている投与経路で投与する際の投与容量を表 1 に示す。これらの投与容量は、公表文献及び内部指針に基づくコンセンサスの得られた値である。なお、マーモセットとミニブタも、ヨーロッパでは使用が増えていることから、現在では頻用動物種の範疇に含まれると考えられる。

表中の各欄には 2 つの数値が記載されている。各欄の左側の数値は、単回もしくは反復投与時の最適投与容量の基準を示したものである。括弧で括った 2 番目の数値（記載箇所のみ）は、投与可能な最大容量を示している。もし、この容量を超える場合には動物愛護の問題や科学的問題が密接に関係してくるため、信頼できる獣医外科学専門医に照会すべきである。なお、場合により、表中の数値の中には、薬局方の要件を配慮した数値もある。

表 1 推奨投与容量（許容最大投与容量を含む）						
動物種	投与経路と投与容量(mL/kg *は mL/投与部位)					
	経口	皮下	腹腔内	筋肉内	静脈内 (急速)	静脈内 (低速)
マウス	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05* (0.1)*	5	(25)
ラット	10(40)	5(10)	10 (20)	0.1* (0.2)*	5	(20)
ウサギ	10(15)	1 (2)	5 (20)	0.25 (0.5)	2	(10)
イヌ	5(15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)
サル	5(15)	2 (5)	－ (10)	0.25 (0.5)	2	(－)
マーモセット	10 (15)	2 (5)	－ (20)	0.25 (0.5)	2.5	(10)
ミニブタ	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)

表に関連する脚注：

- ・(-)：利用できるデータなし
- ・非水性注射物については吸収時間を考慮の上、再投与すること
- ・筋肉内投与の投与部位は 1 日あたり 2 箇所を超えないこととする
- ・皮下投与の投与部位は 1 日あたり 2～3 箇所までとする
- ・皮下投与の投与部位については Freund のアジュバンドの投与は含まない。

上記に示した最大投与容量の幾つかは最近の文献(Flecknell 1996,Wolfensohn&Lloyd 1994)から引用した値であるが、「最適の」投与容量と比べると高くなっている。特に反復投与を実施する際には、動物愛護に対して注意が必要であり、投与容量が多くなる被験物質の処方にも注意が必要である。投与容量を多くすると、それに対する生理反応が生じるため、試験期間は制限され、科学的妥当性も揺らぎかねない。従って、試験実施計画書の最終版を作成し、それらに基づいて試験を開始する際には、それに先だって、例えば査察機関や倫理審査委員会が倫理的な見地に立ってこれらの事項を熟慮することが必要不可欠といえる。また、科学的な理由のみならず倫理的な理由からも、新処方（新製剤）の大規模試験を行う際には、その前に、物理化学的配合変化に関する試験（in vitro 試験）と小規模な予備試験（少数の動物群を用いた試験）を実施することを強く勧める。投与容量は最低限、投与物質の処方及び投与の正確度に見合ったものでなければならない。

(3)投与経路

・経口投与

時として、投与前に実験動物の摂餌を制限する必要がある。このような要因は吸収に影響を及ぼす可能性がある。投与容量が多い（40mL/kg）と胃に過剰な負荷がかかり、急速に小腸に移行することが確認されている(Hejgaard et al 1999)。絶食期間は、動物種の摂餌のパターン、摂餌制限を始める時点、動物種の生理機能、投与所要時間、摂餌と照明のサイクルによって異なる(Vermeulen et al 1997)。正確な投与を行うため、また投与中の事故を避けるため、投与液は経口ゾンデを用いて投与することを勧める。

・非経口投与

薬物を非経口投与する際に考慮すべき要因は、投与容量、投与前後の処方の安定性、pH、粘度、浸透圧、緩衝能、処方の無菌性や生体適合性といえる。これらの要因は反復投与試験では特に重要となる。これらの要因については Claassen(1994)による一部の詳報に概説されている。投与容量、注射液の粘度、注射速度、及び動物種を考慮して、最も小さいサイズの注射針を使用すべきである。

a. 皮下投与

この投与経路は頻用されている経路である。この投与経路による吸収の速度及び程度は処方（製剤組成）によって異なる。

b. 腹腔内投与

この投与経路は反復投与試験ではほとんど使用されない。その理由は、合併症を生じるおそれがあるためである。さらに、腸管内に注射する危険性や、刺激性物質の場合には腹膜炎を引き起こすおそれもある。薬物を懸濁液として腹腔内投与した場合、腹腔からの薬物吸収は当該薬物粒子の特性と溶媒の性質に左右され、薬物は体循環内と門脈循環内に吸収されるものと思われる。

c. 筋肉内投与

筋肉内注射を行うと、注入物質による筋線維への圧迫が避けられないため、痛みを伴うことがある。投与部位は、神経損傷を最小限に抑えるように選択しなければならない。また、反

復投与試験では投与部位を順番に変える必要がある。親水性の処方（製剤組成）と疎水性の処方（製剤組成）とを区別する必要もある（吸収速度に差があり、疎水性のものでは 24 時間以上にもわたって貯溜する傾向がある）。さらに、反復投与試験では、炎症の発現やその後遺症を考慮する必要もある。

d. 静脈内投与

この投与経路については、急速静注、低速静注、静脈内持続注入に分類される。表 1 に示した値は、急速静注と低速静注に関するものである。

急速静注：静脈内投与経路を用いるほとんどの試験では、被験物質はおよそ 1 分程の短い時間で投与される。このように比較的急速な注入を行う場合、被験物質は血液と適合するものであって、粘性があまり高くないものでなければならない。投与容量を多量にしなければならない場合は、注射液を体温まで温めておくべきである。静脈内投与を行う場合、注入速度は重要な要素であり、ゲッ歯類についていえば、注入速度は 3 ml/min を超えてはならないことが示唆される。、イヌに生理食塩液 6mL/kg を急速静注しても、ヘマトクリット値や心拍数に変化は観察されなかったが、20mL/kg 投与時には 15%の血液希釈と一過性の頻脈(1 分間以上にわたり 46%増加)が発現した(Zeoli et al 1998)。

低速静注：被験物質に期待される臨床適応(症)に応じて、あるいは、溶解性・刺激性といった制限因子が存在するため、低速静注による被験物質の投与を考慮しなければならない場合がある。特徴的なことに、低速静注の際には、被験物質を血管外に投与する恐れを最小限にするため、各種の手法が用いられる。5～10 分間かけて低速静注する際には、標準注射針もしくは翼付き針を使用することもある。また、静注用カニューレを皮静脈にテープで固定するか(短時間の場合)、外科的に留置してから使用する(長時間もしくは反復持続注入の場合)のも良いだろう。

ラットに等張生理食塩液を 1mL/min の流速で最大 80mL/kg まで、4 日間連日静脈内投与しても、苦痛の顕著な兆候も、肺の病変もみられないことが明らかにされている(Morton et al 1997a)。しかし、投与期間を 30 日に延長し、注入速度を 0.25、0.5、1.0mL/min とした場合には、肺病変の発現率が増加し、重症度も悪化した。(Morton et al 1997b)。早期の時点ですでに好ましくない影響（有害作用）が生じていたのではないかとと思われるが、時間が短かったために病変・病状等を発現するまでには至らなかったのかもしれない。

持続注入：溶解度や、臨床適応(症)など低速静注と同様の理由で持続注入を考慮することが必要な時がある。しかし、持続注入を長期にわたって行う場合には特に注意が必要である。投与容量及び投与速度は、投与する被験物質及び輸液療法の実施を考慮して決定する。基準としては、単回投与の場合は循環血液量の 10%未満の容量を 2 時間以上かけて投与する。循環血液量については本書の表 3 にまとめて示した。動物の拘束を最小限にして、ストレスを極力かけないことが長期間の持続注入試験を考える際の重要な要素となってくる。

一回の注入を行う時間も要素の一つである。表 2 に不連続な注入を行う場合(1 日 4 時間)と連続注入を行う場合(24 時間)の注入速度と投与容量の推奨値を示した(この表を完成するためにはもう少しデータが必要である)。

表 2 反復静脈内持続注入－投与容量／投与速度 (許容最大投与量／投与速度を含む)						
一日の投与時間	マウス	ラット	ウサギ*	イヌ	サル	ミニブタ
	一日の総投与液量(mL/kg)					
4 時間	-	20	-	20	-	-
24 時間	96(192)	60(96)	24(72)	24(96)	60	24
	速度(mL/kg/h)					
4 時間	-	5	-	5	-	-
24 時間	4(8)	2.5(4)	1(3)	1(4)	2.5	1

(-)：データなし

*：胎児発生毒性試験(催奇形性試験) データに基づく

非水性注射物に関しては本文を参照

ウサギへの投与容量と投与速度は胎児発生毒性試験(催奇形性試験) データに基づく値であり、これらの試験では、母動物に 2mL/kg/h 以上の速度で投与すると、胎児には影響はないものの、母動物に血管周囲顆粒球浸潤(perivascular granular leukocyte cuffing)や増殖性心内膜炎が生じることが明らかにされている(McKeon et al 1998)。ラットへの注入速度は一般的に 1～4mL/kg/h の範囲である(Cave et al 1995;Barrow&Heritier 1995;Loget et al 1997)が、催奇形性試験を行う際には 2mL/kg/h を超えてはならない。マウス(van Wijik 1997)、イヌ及びサル(Perkin & Stejskal 1994)、及びミニブタ(未公表データ)の値は 1 カ

月反復投与試験の成績に基づいている。

投与容量が多い場合の溶媒の重要性等、その他の制限事項については 4 つの文献 (Cornelius et al 1978; Concannon et al 1992; Manenti et al 1992; Mann&Kinter 1993) で詳しく取り上げられている。これらのデータでは、静脈内に注入する許容最大液量は、使用する溶媒により大きく異なることが示されている。

e. 皮内投与

この部位は一般的に、免疫、炎症、感作反応の評価に用いられる (Leenaars 1997; Leenaars et al 1998)。投与物質はアジュバントとともに処方されることもある。皮膚の厚みに応じて、0.05~0.1 ml の投与容量を投与することができる。

(4) 投与に用いる溶媒

動物を用いるいずれの試験においても、溶媒の選択は重要な問題である。溶媒は被験物質の暴露を最適化するものでなければならないが、研究対象である被験物質の試験結果に影響を与えるものであってはならない。つまり溶媒としての理想は生物学的に不活性であり、被験物質の生物物理学的特性に影響を与えず、動物に全く毒性を示さないものである。もし溶媒の成分が生物学的作用を示すのであれば、投与量を制限して、そのような作用を最小化するか、もしくは無くさなければならない。被験物質の投与に使われる単純な溶媒には等張性水溶液、緩衝液、共溶媒系、懸濁液、油などがある。非水性注射物については、再投与する前に、吸収時間を検討する必要がある。した上で油に溶かした場合の投与容量は表 1 と表 2 の 50% に減らすべきだと考えられている。懸濁液を投与する際には投与液の粘度、pH、及び浸透圧を考慮に入れなければならない。共溶媒系を用いる時には溶媒自体も用量制限毒性 (dose limiting toxicity) を示すということに注意しなければならない。多くの研究施設では実施される動物実験結果と研究対象物質の特性をもとに、最適な溶媒を容易に選択できる方法の開発が盛んに行われている。

2. 採血に関する手引き

(1) 緒言

採血は実験動物に対して行う最も通常の処置の一つである。実験用の哺乳類、鳥類からの採血法は BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement による最初の

レポート(1993)に概説されている。本書は、研究者に使いやすい形で、入手可能な最新情報に基づいた許容採血量に関する基準を提示するとともに、トキシコキネティックス試験（薬物動態試験）及び毒性試験の必要性を述べることも目的としている。各種のげっ歯類からの採血方法として、眼窩静脈叢から採血する方法が未だに一般的に使われているが、この方法による後遺症のことを考えてより好ましい代替法を提案する。

(2)循環血液量

許容採血量（採血量限界）の計算は循環血液量に関するデータが正確かどうかにかかっている。文献を再検討したところ、これらの値にはかなりのばらつきがみられた。これはおそらく使用された手法や、動物の系統、性別などが関係しているものと思われる。最も頻用される測定方法としては、放射標識赤血球法(Smith 1970;Sluiter et al 1984;Fujii et al 1993)、放射標識トランスフェリン(Argent et al 1994)、放射標識血清アルブミン法(Callaham et al 1995;Carvalho 1989;Gillen et al 1994)、標識色素法(Schad et al 1987)、酵素希釈法(Holmes & Weiskopf 1987;Visser et al 1982)、Fibre Optics(Kisch et al 1995)、デキストラン-70(Van Kreel et al 1998)などがある。

安全性評価試験で一般的に使用されている動物種の循環血液量を表 3 に示す。同表には毒性試験で近年使用頻度が増加しているマーマセツトとミニブタのデータも記載している。表示した値は、動物は正常な成熟動物であり、栄養水準も適切であることを前提として、様々な情報源から引用したものである(Altman & Dittmer 1974 ; Swenson 1977 ; Jain 1986; McGuill & Rowan 1989 ; First report of the BVA/FAME/RSPCA/UFAW 1993)。

表 3 実験動物の循環血液量		
動物種	血液量(mL/kg)	
	推奨平均値*	平均値の範囲
マウス	72	63-80
ラット	64	58-70
ウサギ	56	44-70
イヌ(ビーグル)	85	79-90
アカゲザル	56	44-67
カニクイザル	65	55-75

マーモセット	70	-82
ミニブタ	65	61-68

*：推奨平均値は平均値の範囲の中央値

(3)採血量

本書に記載の採血量に関する推奨事項は、公表文献をはじめ、ある特定の問題を本ワーキンググループ（working party；作業部会）に知らせるために実施された最近の研究（現在投稿中の研究）や、「内部」標準操作手順書から得られた情報に基づいている。

採血が限界に近づくにつれて、動物愛護の問題が最も重要となるが、動物の生理反応の持つ科学的な影響も、データの解釈や妥当性に影響を与えることから、考慮しなければならない。動物の一般症状を評価した際に疑わしいと思われる場合には、採血を行う前に責任者もしくは獣医学専門担当者に問い合わせることが望ましい。

Scipioni ら(1997)の研究で、ラットの総血液量の最高 40%を 24 時間かけて採取し、その 2 週間後に同様の採血を繰り返しても、肉眼的に明らかな病的所見は認められないことが確認された。全般的にみて、採血後の動物の状態にとって最も重要な問題、例えば、心拍数、呼吸パターン、各種ホルモン濃度などを調べたデータはほとんどなく、運動やその所要時間など挙動面に関するデータもほとんどない。これらはすべて、過剰な採血を行うと、それに呼応して変化する可能性があるが、そのような変化を検討するにはかなりの努力と財源が必要になるものと思われる。とはいえ、血液学的検査パラメータであれば、容易に測定することができ、小規模なプロジェクト（Nahas らが提案）において各種血液量採取後の赤血球数（RBC）、ヘモグロビン値（HGB）、ヘマトクリット（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、及び赤血球分布幅（RDW）が測定された。具体的には、動態試験を模倣するため、Sprague Dawley 系雌雄ラット（体重約 250 g）より循環血液量の 7.5%、10%、15%、及び 20%容量を 24 時間かけて採取し、その後最長 29 日間、これらのラットの追跡調査（事後観察）が行われた。

その結果、上記パラメータのいずれをみても、採血前の値（ベースライン値）に回復するのに要する期間にはかなりのばらつきがあること（及び、循環血液量の 15%及び 20%容量採血群では採血後 29 日が経過しても一部のパラメータ（MCV、RDW）は採血前の値に回復しないこと）が明らかとなった。従って、反復採血（multiple sampling：複数回採血）時に設ける回復期間は、ある「容量」採血群のすべてのラットが正常（すなわち、各動物毎

にみた採血開始時の値 $\pm 10\%$)に回復するのに要する期間とすることを本書では推奨する。通常の毒性試験で必要とされているように循環血液量の15%を超える血液量を1回に採取すると、非常に緩徐に採血を行わなければ、循環血液量減少性ショックを発現するおそれがあるため、そのような採血は奨められない。少量の採血を反復する場合には、上記のような急性作用は生じないものと思われる。

下記に採血許容量限界及び適切な回復期間についての指針を示すが、これらの指針は反復採血によるストレスはもとより、それ以外の操作手順によるストレスも考慮に入れて、動物に与える全般的な苦痛・過酷さを評価したものである。下表で、単回採血法及び反復採血法について取り上げる。なお、毒性試験では血液学的検査パラメータを批判的な目で評価しなければならないため、そのような毒性試験に用いる動物については、回復期間をさらに延長することを提案する。

表4：採血許容量限界と回復期間			
単回採血（毒性試験等）		反復採血（トキシコキネティクス試験等）	
採血量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間	24時間で採血する量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間
7.5%	1 week	7.5%	1 week
10%	2 weeks	10–15%	2 weeks
15%	4 weeks	20%	3 weeks

トキシコキネティクス試験及び薬物動態試験では通常、少量の採血を反復しなければならず、採血量が多くなる（循環血液量の20%）が、このように大量の血液を採取すると、血行動態に重大な影響が生じ、半減期の算出にも大きく影響することを忘れてはならない。

消失半減期は、動物を致死せしめる前24時間以内に最終の血液検体を採取すれば、算定できるものと思われる。上記表中の数値には、動物を最終的に麻酔で安楽死させる際に採取可能な最終の血液検体は含まれていない。提案の採血量についてはそのような介入処置を行うべきではないとしていることから、血液の補充（blood replacement）は考慮していない。

表 4 の値を用い、動物の正常な生理に著明な障害を与えない採血許容量の基準値 (reference guide) を表 5 に示す。

表 5：各種動物種の総血液量及び推奨最大採血量（表示体重を基準とする）					
動物種(体重)	血液量 (ml)	7.5%(ml)	10%(ml)	15%(ml)	20%(ml)
マウス(25g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
ラット(250g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2
ウサギ(4kg)	224	17	22	34	45
イヌ(10kg)	850	64	85	127	170
アカゲザル(5kg)	280	21	28	42	56
カニクイザル(5kg)	325	24	32	49	65
マーモセット (350g)	25	2.0	2.5	3.5	5
ミニブタ(15kg)	975	73	98	146	195

(4)採血部位

これまでに静脈穿刺部位及び静脈切開部位の検討が行われているのは主にげっ歯類とウサギである（First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993）。この情報について、採血方法の技術的進歩に重点をおいて概説するとともに、各動物種の採血部位の利点と欠点を表 6 に、推奨される反復採血部位を表 7 にそれぞれ示す。

表 6：各種採血法の利点と欠点					
採血経路／静脈	全身麻酔	組織損傷(1)	反復採血の可否	採血量	動物種
頸静脈	不要	軽度	可	+++	ラット、イヌ、ウサギ
橈側皮静脈	不要	軽度	可	+++	マカク属 イヌ
伏在静脈／外側足根静脈	不要	軽度	可	++(+)	マウス、ラット、 マーモセット、マカク属、 イヌ

耳介周囲静脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	++ +	ウサギ ミニブタ
大腿静脈	不要	軽度	可	+++	マーモセット、 マカク属
舌下静脈	必要	軽度	可	+++	ラット
外側尾静脈	不要	軽度	可	++(+) +	ラット マウス、マーモセット
耳介中心動脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	+++	ウサギ
前大静脈	不要	軽度	可	+++	ミニブタ
尾の先切断 (1～3 mm 未満)	必要	中等度	制限あり	+	マウス、ラット
眼窩静脈叢	必要	中等度/高度	可	+++	マウス、ラット
心臓(2)	必要	中等度	不可	+++	マウス、ラッ ト、ウサギ

(1) 組織損傷の可能性は、組織損傷の発現率並びに後遺症（炎症反応、組織学的損傷など）の重症度に基づいている。

(2) 全身麻酔下での屠殺処理としてのみ実施

表 7：推奨される反復採血部位	
動物種	推奨部位
マウス	伏在静脈、外側尾静脈
ラット	伏在静脈、外側尾静脈、舌下静脈
ウサギ	耳介周囲静脈、耳介中心動脈、頸静脈
イヌ	橈側皮静脈、頸静脈、伏在静脈
マカク属サル	橈側皮静脈、伏在静脈、大腿静脈
マーモセット	大腿静脈、伏在静脈
ミニブタ	前大静脈

異なった部位から採血した検体では臨床病理学的検査値に差を生じることがあり、また、データベースと比較する場合もこの点に留意すべきである。

伝統的な採血経路については、標準的文献に採血方法が記載されている。しかし、その他の採血方法については特筆すべき事項があるため、以下に概説した。

・外側足根静脈（伏在静脈）

この方法は、ラット、マウス、ハムスター、スナネズミ、モルモット、フェレット、ミンク(Hem et al 1998)から、これより大型の動物まで、多くの実験動物に適用されており、循環血量の 5%まで採血が可能である。麻酔を行う必要がないため、薬物動態試験のように採血を繰り返し実施しなければならない試験に特に適している。伏在静脈は足根関節の外側にあり、剃毛後、アルコールでその部分を拭くだけで容易に見ることが出来る。動物をプラスチック製の筒のような適当な保定器の中に入れ、後ろ足を伸ばす。関節の上を軽く圧迫すると、静脈を浮き上がらせることができ、一番細い規格の針で静脈穿刺することにより溶血することなく十分速やかに血液を採取することが出来る（例えば、ラットやマウスには 25G～27G の針を使用する）。少量の採血を行う場合には、穿刺部位に単に針を突き刺すことによって血液の滴を形成し、その後、ヘマトクリット測定用微小管を用いて標準量を回収することもできる。採血後、採血部位を圧迫しておけば十分止血できる。また、痂皮を除去すれば、一連の採血が可能となる。

持続性の（微量）出血以外には合併症は報告されていないようであり、また、この方法は麻酔を必要としないという点でも優れている。動物愛護に関わる問題を体重増加や日内リズム（日周リズム）、行動等の点から検討した試験は行われていないが、それでもこの採血経路は動物の健康状態に重大な影響を及ぼすものではないと思われる。

・耳介周囲静脈／耳介中心動脈

ウサギやモルモットでは耳介周囲静脈から採血する方法が一般に用いられている。この採血経路はミニブタに適用されることもあり、その際には静脈内カニューレを併用することが多い。動物を確実に保定することが不可欠であり、採血の 20～30 分前に局所麻酔用クリームを耳介の皮膚に塗布しておく、針が皮膚を貫通する際に動物が頭を振るのを容易に防ぐことができる。また、耳介周囲静脈を被っている皮膚表面にワセリンを塗布した後に静脈穿刺して血液を採血用試験管に採取するという方法もある。大量の採血を行う場合、ウサギの耳介中心動脈より採血することもできるが、採血後は、出血の持続や血腫の形成を防

ぐため、採血部位を2分間以上圧迫しておかなければならない。さらに、採血の5分後及び10分後に、出血が持続していないかどうか、動物をチェックする必要もある。耳介中心動脈にカニユーレを留置すれば反復採血も可能になり、それによって、8時間に及ぶ薬物動態検討用血液検体の採取も容易に行うことができる。

・舌下静脈

この採血方法はラットなどのげっ歯類で容易に実施することができ、また、採血量の制限及び反復麻酔が不可欠であるという制限はあるものの、それ以外の点では大量（0.2～1 ml など）の採血にも適している。改良法（Zeller ら、1998）により、過去に認められた欠点の一部は改善され、反復採血にも適用できるようになっている。この採血方法を具体的に述べると、ラットを麻酔し、採血補助者がラットを仰臥位（仰向け）に保定する。次いで、頸部の弛緩した皮膚をつまみ上げて、頭部から戻る静脈を部分的にうっ血させる。別の採血補助者が綿棒で舌を徐々に引き出し、親指と人差し指でしっかりつかむ。次いで、舌下静脈の一つ（正中線の両側に各1本ずつ走っている）を23～25Gの皮下注射針で穿刺する。その際には、可能な限り舌の先端に近い部位を穿刺する。採血用試験管に血液を滴下できるようにラットを逆さにし、必要量の採血が終了した後は、頸部の圧迫を緩め、ラットを仰臥位（仰向け）にする。舌をもう一度引き伸ばし、乾いた綿棒で止血する。なお、通常、止血薬は不要である。

上記の方法で採血した場合、麻酔を施した未採血コントロールラットと比較して、採血したラットの摂餌・摂水量や体重増加に有意差は全く認められない。さらに、眼窩静脈叢からの採血と比較して、病的変化を認めることも少ないようである（Mahl et al 投稿中）。しかし、この採血法は麻酔が必要であり、このことが依然制約になっているものと思われる。

・外側尾静脈

この採血経路は原理的には外側足根静脈と類似しているが、少量の血液しか採取できない傾向がある（マウスでは0.1～0.15 ml、温めたラットでは最高2 ml まで）。採血は、外側尾静脈より注射針の付いた注射筒を用いて行うか、同尾静脈を穿刺する。麻酔は不要であり、そのため、この採血経路は特に反復採血に適している。出血を促進させるためには血管を拡張させる必要があり、そのような場合には、動物を37℃の状態に5～8分間放置するか、あるいは尾を局部的に温めるとよい。動物の健康状態に影響を及ぼすような不都合なことはほとんど生じないようであるが、加温する場合には苦痛の徴候を示していないかどうか、動

物を綿密にモニターしなければならない。

・前大静脈

ミニブタの場合、吊り網に入れて保定する方法や、あるいは仰向けにして前脚を尾の方向に引っ込めて保定する方法が用いられる。この他の方法として、畜産業で使用されている保定法（鼻先をくくりつける方法、両手両足を縛る方法、後ろ足で吊す方法）が用いられる場合もあるが、これらの方法は動物へのストレスが大きく、また、科学研究に悪影響を及ぼす可能性もあるため、実験動物には不適切である。迷走神経を傷つけないようにするため、頸部の右側から、胸骨柄側方、30～45°の角度で左肩に向かってまっすぐ採血針を挿入する。採血針が静脈に入ると、採血者は針先が急に動くような感覚をおぼえる。この感覚が得られれば、その後は血液を容易に採取することができる。この方法は連続静脈穿刺にも使用することができるが、採血針を抜いた箇所に血腫が形成される。そのため、この方法は、1週間に1回以上の頻度で採血針を抜く操作が必要な採血には適さない（Swindle, 1998）。

・尾先端の切断

この採血方法は、ラット及びマウスで頻繁に使用されており、採血量は0.1～0.2 mlである。切断は適切な場合、尾の先端から0.5～1 mmの部分に限定すべきであるが、経時的に最大5 mmまで切除可能であり、従って、凝血塊（血餅）を除去すれば、短期間の反復採血も可能である。但し、連続的に切断したために尾が著しく短くなる（すなわち、短縮部位が5 mmを超える）ようなことがあってはならない。この方法は成熟しすぎた動物には適さない場合もある。麻酔を施すことが推奨される。

・心臓穿刺

この方法は必ず全身麻酔下で行うべきである。過去においては、代替採血経路がないために小型のげっ歯類で使用され、回復をみている。しかし、現在では別の採血法が適用可能となっており、この方法は苦痛を伴う可能性があり、また、心膜出血や心臓タンポナーデなどの致死的后遺症を生じる可能性もあるため、動物を致死せしめる際の採血時（最終採血時）のみに使用すべきである。

・眼窩静脈叢

眼窩静脈叢を採血経路とする方法は過去に頻用されていたが、その一方で、有害な作用を

引き起こすことが認められた。その結果、このような作用を引き起こし、それらが苦痛を伴う可能性があるという理由で、この方法は問題視されるようになっている。しかし、最近では、科学研究上の要件を満たし、動物愛護の面も向上させるという別の方法が開発されている。とはいえ、Technical Subgroup は、この新しい採血法を考慮に入れた上で、眼窩静脈叢からの採血の利点と欠点の一部を詳細に見直すことは価値があるとの考えを示した。

眼窩静脈叢からの採血はいずれの動物種を用いる場合も必ず全身麻酔下で行う必要があり、一部の国では麻酔の実施が規則で定められている。この方法については数多くの研究者によって詳しく説明されている（Stone 1954; Waynforth & Flechnell 1992; Van Herck 1999）。

この採血法の改良に関する公表文献はほとんどない。具体的には、組織損傷を最小限に抑さえる最適な方法として、結膜を貫通する方法（ラットの眼の側方から、あるいはラットの眼の背側もしくは上部側を経由する方法）が論じられている（First Report of the BVA / FRAME / RSPCA / UFAW 1993）。同一部位での採血については、2 週間の間隔をおけば、大抵の場合、損傷した組織は修復されるはずである（van Herck et al 1992）が、だからといって、完全に治癒する前の初期段階に動物が苦痛を感じていないとは言い切れず、従って、眼窩静脈叢からの反復採血を懸念する声がある。研究の中には、眼窩静脈叢からの反復採血は動物の日内リズムに影響を及ぼさず（Beynen et al 1988; van Herck et al 1997）、長期的にみた眼窩組織の組織病理学的検査所見にも影響を及ぼさない（Krinke et al 1988; van Herck et al 1992）ことを明らかにした研究もあれば（すなわち、両試験とも、組織損傷はすべて治癒することを示している）、その一方で、組織学的変化、一般症状の異常所見、及び苦痛の痕跡が認められ、そのために動物を安楽死せざるを得なくなり、データが得られなかったとする研究（McGee & Maronpot, 1979; Beynen et al 1988 ; Le Net et al 1994; van Herck et al 1998; van Herck et al(a) 投稿中; van Herck et al(b) 印刷中）もある。この他にも、下記に示すような重篤な有害作用（副作用）を生じる可能性がある。

- ・眼球後出血により、血腫が形成され、過度の圧力が眼に加わって、動物にほぼ確実に苦痛を与える。

- ・持続性出血を止めるために圧力を加えたり（例えば眼を押さえるなどして）、血腫の形成によって圧力が加わったりすると、角膜潰瘍、角膜炎、パンヌス形成、眼球破裂、微小眼炎（micro-ophthalmia）を生じることがある。

- ・視神経をはじめとする眼窩内組織が障害されると、視力低下（視野欠損）を生じることがあり、失明の原因にもなる。

- ・マイクロピペットによる脆弱な眼窩内骨の骨折及び神経損傷、並びに硝子体液の消失を伴う眼球貫通。

上記の望ましくない後遺症の多くは眼窩内の深部で起きており、見過ごされている可能性がある。望ましくない副作用の発生率は 1～2%の間であると考えられる（Krinke et al 1988）が、採血者の技量によっては、たとえ経験を積んでいたとしても、さらに高率になる可能性もある（van Herck et al 1998 の Table 1 参照）。

(5)針穿刺の頻度

針穿刺の回数を最小限に押さえることは、優れた科学データを得るのと同様に重要である。同一の穿刺部位を使用すべきではない。すなわち、静脈に沿って部位を変えて穿刺すること。

(6)カニューレ挿入（cannulation）

カニューレ挿入は反復採血を行う際に重要となる手技である。短期間（実験当日のみの使用）であれば、翼付針や套管針などの一時的なカニューレを用いることができるが、一方、長期間使用する場合には、生体適合カニューレの外科的留置が必要となる。このような方法を用いることで、動物の苦痛や不快さを最小限にとどめつつ、反復採血を行うことができる。subcutaneous vein access ports（皮下静脈アクセスポート）の使用も、そのポートを埋め込んだ動物を群から隔離せずに一緒に飼育できるという点で有用といえるが、下記に示すように、取り組まなければならない問題も数多く存在する。

- ・外科的処置（手術）の技量が不可欠であり、長期間にわたり良好な結果を得るため（Popp & Brennan 1981）には、また、感染症などの合併症を避けるためには、外科的処置を無菌的に行わなければならない。血液凝固が頻発し、採血及び物質注入延長の妨げるになるおそれがある。

- ・動物がカニューレを抜いたり、噛み切ったりしないように、動物の拘束や群からの隔離が必要であり、長期間使用する場合に subcutaneous vein access ports（皮下静脈アクセスポート）が好ましいのはこのためである。

- ・長期間カニューレを挿入しておくと、血管を貫通することがあり、また動物が成長しすぎてカニューレを使用できなくなるおそれもある。

(7)麻酔

BVA/FRAME/RSPCA/UFAW の最初の報告 (1993) に、各種麻酔薬が脾臓被膜の筋細胞 (存在する場合) にどのような影響を及ぼすかについて幾つかコメントが示されており、この他に、止血を促進する点についても述べられている。実験用小動物からの採血に関して、注目すべきことに、midazolam (Hypnovel) 併用下もしくは非併用下で fentanyl と flunanison (Hypnorm) を併用すると、いずれの動物種においても著明な末梢血管拡張が生じる。この末梢血管拡張により採血が一層容易になるが、その一方で、採血後の出血も生じやすくなる。そのため、確実に止血するよう、特に注意を払わなければならない。局所麻酔薬の使用を考慮すべきである。

(8) 結論及び推奨事項

現在では、すべての動物種から、特に以前は採血が容易でなかった小型のげっ歯類からも採血できる様々な代替法が存在する。そのうえ、採血法の中には、麻酔薬を必要とする方法や、特に反復採血を行わなければならない場合に動物愛護に重大な影響を及ぼしかねない望ましくない副作用を高率に発現する方法もある。そこで我々は下記事項を推奨する。

- ・すべてのげっ歯類に推奨される採血経路は外側尾静脈、舌下静脈、及び外側足根静脈であり、ウサギについては耳介周囲静脈、耳介中心静脈、及び頸静脈が推奨される。

- ・回復をみながら眼窩静脈叢より採血する方法は、他の経路からの採血が不可能な場合に限り使用する。

- ・心臓採血は全身麻酔下で、動物を致死せしめる最終処置としてのみ実施する。

最後に、動物を用いるすべての実験操作と同様に、組織の損傷を最小限に抑えて確実に採血を行うには実験担当者の熟練と能力がきわめて重要であり、動物の健康と愛護のためにも不可欠である点を強調しておく。

References:

1. Altman P L & Dittmer D S (eds) (1974), Biology Data Book 2nd Edition, Vol 3 Bethesda, Maryland: Federation of American Societies of Experimental Biology
2. Argent N B, Liles J, Rodham D, *et al* (1994), A new method for measuring the blood volume of the rat using ^{113m}Indium as a tracer, *Laboratory Animals*, 28, 172-175
3. Barrow P C & Heritier B (1995), Continuous deep intravenous infusion in rat embryotoxicity studies: the effects of infusion volume and two different infusion fluids on pregnancy, *Toxicology Methods*, 5, 61-67
4. Beynen A C, Baumans V, Haas J W M, *et al* (1988), Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats. In: *New Developments in Biosciences: their*

implications for laboratory animal science. (Beynen A C, Solleveld H A, eds) Dordrecht, NL: Martinus Nijhoff, 431-436

5. Callahan R J, Wilkinson R A, Bogdonov A A Jr (1995), Validation of plasma volume determinations in the rat using an In-111 labeled polymer and I-125 human serum albumin. 42nd Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Minneapolis, Minnesota, USA, June 12-15, 1995, *Nuclear Medicine*, 36, no.5 SUPPL, 157-158
6. Carvalho J S (1989), Heterologous serum albumin as tracer for plasma volume measurements evaluated in conscious nondehydrated and 48-hour water-deprived rats, *Cardiovasc Pharmacol*, 13, 603-607
7. Cave D A, Schoenmakers A C M, van Wijk J H *et al* (1995), Continuous intravenous infusion in the unrestrained rat: procedures and results, *Human & Experimental Toxicology*, 14, 192-200
8. Claassen V (1994), Neglected factors in pharmacology and neuroscience research, *Techniques in the Behavioural and Neural Sciences: Vol 12*, Huston J P (ed), Amsterdam: Elsevier
9. Concannon K T, Haskins S C & Feldman B F (1992), Hemostatic defects associated with two infusion rates of dextran 70 in dogs, *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1369-1375
10. Cornelius L M, Finco D R & Culver D H (1978), Physiologic effects of rapid infusion of Ringer's Lactate solution into dogs, *American Journal of Veterinary Research*, 39, 1185-1190
11. EU (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, *Official Journal of the European Communities*, 29, L358, 1-29
12. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW, Joint working group on refinement (1993), Removal of blood from laboratory mammals and birds, *Laboratory Animals*, 27, 1-22

Flecknell P (1996), *Laboratory Animal Anaesthesia*, Harcourt Brace & Company, 2nd Ed, pp269
13. Fujii A, Yoshikawa K, Iwata T, *et al* (1993), A method for measurement of circulating blood volume with fluorescein isothiocyanate labeled red blood cells, *Japanese Anesthesiology*, 42, 545-551
14. Gillen C M, Takamata A, Mack G W *et al* (1994), Measurement of plasma volume in rats with use of fluorescent-labeled albumin molecules, *Applied Physiology*, 76, 485-489

15. Hejgaard K C, Alban L, Thomsen P, *et al* (1999), Assessing welfare of rats undergoing gavaging with varying volumes. Measurements on open field behaviour, temperature, plasma corticosterone and glucose, *Revista de Ciecia*, 23-24 (Abstract) p16
16. Hem A, Smith A J, Solberg P (1998), Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink, *Laboratory Animals* 32, 364-368
17. Holmes M A, Weiskopf R B, (1987), Determination of plasma volume in swine by the enzyme-dilution method, *Am J Physiol* 252 (5 part 2)
18. Hull R M (1995), Guideline limit volumes for dosing animals in the preclinical stage of safety evaluation, *Human and Experimental Toxicology*, 14, 305-307
19. Jain N (1986), *Schalm's Veterinary Haematology 4th Edition*, Philadelphia: Lea and Febiger
20. Kisch H, Leucht S, Lichtwarck A M (1995), Accuracy and reproductivity of the measurement of actively circulating blood volume with an integrated fiberoptic monitoring system, *Critical Care Medicine*, 23, 885-893
21. Krinke A, Kobel W, Krinke G (1988), Does the repeated orbital sinus puncture alter the occurrence of changes with age in the retina, the lens, or the Harderian gland of laboratory rats ? *Z. Versuchstierkunde*, 31, 111-119
22. Le Net J E L, Abbott D P, Mompon R P *et al* (1994), Repeated orbital sinus puncture in rats induces damages to optic nerve and retina, *Veterinary Pathology*, 31, 621
23. Loget O, Nanuel C, Le Bigot J-F *et al* (1997), Corneal damage following continuous infusion in rats, In: *Advances in Ocular Toxicology*, Green *et al* (eds), Plenum Press: New York, pp 55-62
24. Mahl A, Heining P, Ulrich P *et al* (in press), Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats - retrobulbar plexus versus sublingual vein, *submitted for publication to Laboratory Animals*
25. Manenti A, Botticelli A, Buttazzi A *et al* (1992), Acute pulmonary edema after overinfusion of crystalloids versus plasma: histological observations in the rat, *Pathologica*, 84, 331-334
26. Mann W A, and Kinter L B (1993), Characterisation of maximal intravenous dose volumes in the dog (*canis familiaris*), *Gen Pharmac*, 24, 357-366
27. McGee N & Maronpot R R (1979), Harderian gland dacryoadenitis in rats resulting from orbital bleeding, *Laboratory Animal Science*, 29, 639-641
28. McGuill M W & Rowan A N, (1989), Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques, *ILAR News*, 31, 5-18

29. McKeon M E, Walker M D, Wakefield A E *et al* (1998), Validation of infusion techniques in nonpregnant and pregnant rabbits using a novel harness system, *Toxicol Sci*, 42, 292
30. Morton D, Safron J A, Rice D W *et al* (1997a), Effects of infusion rates in rats receiving repeated large volumes of saline solution intravenously, *Laboratory Animal Science*, 47, 656-659
31. Morton D, Safron J A, Glosson J *et al* (1997b), Histologic lesions associated with intravenous infusions of large volumes of isotonic saline solution in rats for 30 days, *Toxicol Pathol*, 25, 390-394
32. Popp M B & Brennan M F (1981), Long-term vascular access in the rat: importance of asepsis, *American Journal of Physiology*, 241, H606-612
33. Schad H, Haider M, Brechtelsbauer H (1987), Determination of plasma volume with indocyanine green, *Anaesthetist*, 36, 608-614
34. Sluiter W, Oomens L W M, Brand A *et al* (1984), Determination of blood volume in the mouse with chromium-51-labeled erythrocytes, *J Immunol Methods*, 73, 221-225
35. Smith B S W (1970), Comparison of iodine-125 and chromium-51 for measurement of total blood volume and residual blood content of tissue in the rat: evidence for accumulation of 51Cr by tissues, *Clin Chim Acta*, 27, 105-8
36. Swindle M M (1998), Surgery, anaesthesia, & experimental techniques, In: *Swine*, Ames, Iowa State University Press
37. Swenson M J, (ed) (1977), *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 9th ed. Ithaca and London
38. Van Herck H, Baumans V, Brandt C J W M *et al* (1998), Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise, *Laboratory Animals* 32, 377-386
39. Van Herck H, Baumans V, Van der Craats N R *et al* (1992), Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture, *Laboratory Animals*, 26, 53-58
40. Van Herck H, De Boer SF, Hesp APM *et al* (1997), Orbital bleeding in rats while under diethylether anaesthesia does not influence telemetrically determined heart rate, body temperature, locomotor activity and eating activity when compared with anaesthesia alone, *Laboratory Animals*, 31, 271-278
41. Van Herck H, Baumans V, Brandt C J W M, (a)(in press), Comparison of blood sampling from the retro-orbital sinus, the saphenous vein and the tail vein in rats: effects upon selected behaviour and blood variables. Submitted for publication to *Laboratory Animals*

42. Van Herck H, Baumans V, Boere H A G, (b) (in press), Orbital sinus blood sampling in rats: effects upon selected behavioural variables. Submitted for publication to *Laboratory Animals*
43. Van Wijk H (1997), A continuous intraveous infusion technique in the unrestrained mouse, *Anim Technol*, 48, 115-128
44. Van-Kreel B K, van-Beek E, Spaanderman M E A, *et al* (1998), A new method for plasma volume measurements with unlabeled dextran-70 instead of 125I-labeled albumin as an indicator, *Clin Chim Acta*, 275, 71-80
45. Visser M P, Krill M T A, Willems G M, Hermens W T (1982), Plasma volume determination by use of enzyme dilution in the dog, *Laboratory Animals*, 16, 248-255
46. Wolfensohn S & Lloyd M (1998), Procedural data, In: *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, S Wolfensohn, M Lloyd (eds), Oxford: Oxford University Press, p82
47. Zeller W, Weber H, Panoussis B, *et al* (1998), Refinement of blood sampling from the sublingual vein of rats, *Laboratory Animals* 32, 369-376
48. Zeoli A, Donkin H, Crewell C *et al* (1998), A limit rapid intravenous injection volume in dogs, *Toxicol Sci*, 42, 58 (abstract 284)