

げっ歯類における 3 種混合麻酔
投与による血液生化学的検査値
への影響

落合 雄一郎

げっ歯類における3種混合麻酔投与
による血液生化学的検査値への影響

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

落合 雄一郎

獣医生化学
指導教員 教授 岩野英知

2016年度

凡例

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ：AST

アラニンアミノトランスフェラーゼ：ALT

アルカリフォスファターゼ：ALP

乳酸脱水素酵素：LD

クレアチンキナーゼ：CK

総コレステロール：TCHO

中性脂肪：TG

総ビリルビン：TBIL

尿素窒素：BUN

クレアチニン：CRE

血糖：GLUC

総蛋白：TP

アルブミン：ALB

無機リン：IP

カルシウム：Ca

ナトリウム：Na

カリウム：K

クロール：Cl

白血球：WBC

赤血球：RBC

ヘモグロビン：HGB

ヘマトクリット：HCV

平均赤血球容積：MCV

平均赤血球ヘモグロビン量：MCH

平均赤血球ヘモグロビン濃度：MCHC

血小板：PLT

好中球：NEUT

リンパ球：LYMP

単球：MONO

好酸球：EO

好塩基球：BASO

網状赤血球：RET

目次

	頁
緒言	1
第1章 マウスにおける3種混合麻酔投与による血液生化学的検査値への影響	
I. 小 緒	3
II. 材料と方法	3
1. 使用薬剤	3
2. 調製方法	4
3. 使用動物	5
4. 飼育環境	5
5. 実験群構成	5
6. 実験概要	5
7. 麻酔深度評価	6
8. 血液生化学的検査値測定	6
9. 血中インスリン濃度測定	7
10. 統計学的分析	7
III. 成 績	7
1. 実験1 : MMB 投与後の血液生化学的検査値への影響	7
A) 実験開始1時間後の血液生化学的検査値の変化	7
B) 実験開始1時間後のCK isozyme の変化	9
C) MMB 投与後の血液生化学的検査値変化の推移	11
2. 実験2 : MMB 投与による血中インスリン濃度の影響	14
IV. 考 察	16
V. 小 括	18
第2章 ラットにおける3種混合麻酔投与による血液学的検査値及び血液生化学的検査値への影響	
I. 小 緒	19
II. 材料と方法	19

1.	使用薬剤	19
2.	調製方法	19
3.	使用動物	21
4.	飼育環境	21
5.	実験群構成	22
6.	実験概要	22
7.	麻酔深度評価	22
8.	血液学的検査及び生化学的検査値測定	23
9.	血中インスリン濃度測定	23
10.	病理組織学的検査	23
11.	統計学的分析	23
III.	成績	23
1.	実験1:3種混合麻酔投与ルートと麻酔導入/持続時間と動物の状態への影響	23
2.	実験2:3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの変化	24
A)	3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの動物の状態, 体重と摂餌への影響	26
B)	3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血液生化学的検査値の変化	30
C)	3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血液学的検査値の変化	32
D)	3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血中インスリン濃度変化	35
IV.	考察	37
V.	小括	39
VI.	総括	40
	謝辞	41
	引用文献	41

緒言

今日、我々が医学研究に実験動物を使用する際には、国が定めた法令（動物愛護法管理法、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など）及び、動物福祉の観点から動物が苦痛を受けないよう配慮する必要がある。中外製薬株式会社は、国際実験動物ケア評価認証協会(AAALAC)認証施設であり、「実験動物の管理と使用に関する指針 (ILAR guide) に従い、実験動物への適切な鎮痛、鎮静、麻酔処置などにより苦痛軽減に配慮している。苦痛軽減は、適切な麻酔薬や鎮痛剤を使用することで達成できる[25]。全身麻酔には、注射麻酔と吸入麻酔の2種類の方法がある。実験動物用マウスへの注射麻酔の方法としては、腹腔内投与か皮下投与が一般的に選ばれる[1, 6, 44]。

注射麻酔は、麻酔時間の延長や深度調節を吸入麻酔のように細かく調整することが出来ないため、麻酔深度調節が困難である [12, 18, 26, 29, 50]。また、事前に投薬用量設定を行っても、麻酔効果に個体差があるため一部の個体にとって過量や不十分な用量になる場合がある[1, 6, 49]。中外製薬株式会社の「実験動物の飼育と使用に関する委員会（以下、IACUC）」推奨の注射麻酔薬であるペントバルビタールとケタミン/キシラジン混合麻酔薬の特徴について、以下に述べる。ペントバルビタールは、外科処置可能な麻酔深度において血圧低下、呼吸の抑制・停止を引き起こす可能性が高く、実験中に死亡する危険性がある[16, 34, 42]。また、主に肝臓で代謝されるため血中の肝臓代謝酵素の変動を引き起こすことが報告されている[46]。ケタミン/キシラジンは、2007年の麻薬及び向精神薬取締法改正によりケタミンが麻薬と定められた。そのため、ケタミンを利用する場合は施設に麻薬研究者や麻薬施用者といった有資格者を置くことが義務となり、使用にあたっての制約が大きくなった。このように、当施設で使用する注射麻酔薬には、それぞれ使用にあたってのデメリットが存在している。

実験用げっ歯類動物に使用する最も一般的な吸入麻酔薬は、イソフルランである[35]。イソフルランなどの吸入麻酔は、専用の気化器を用いキャリアガスと共に気道を介して動物に供給される。これらの吸入麻酔薬は、迅速に麻酔導入しほとんどが呼吸により短時間に生体から除去される。また、麻酔濃度を動物毎に簡単に調整することができる。そのため、動物のバイタルサインと麻酔深度が適切に維持されている限り、死亡する危険性は低い。現在では、実験用げっ歯類のための吸入麻酔装置が開発されており[35, 43]、簡便に使用できる環境である。また、最近の吸入麻酔装置には、実験者を保護するために[25, 39-41]排気ガスの拡散を防ぐ排除装置が附属している[14, 15, 19]。しかし、吸入麻酔装置の性能上、麻酔装置1台に対して数匹の麻酔維持が限界のため、実験動物の使用個体数が制限される。そのため、イソフルラン麻酔を用いた大規模実験は、吸入麻酔装置の台数やスペースの課題を解決する必要がある。また、イソフルランの血液生化学的検査値への影響として、一過性にGLUCを上昇さ

せることが報告されている[11, 15, 51, 52]。

以上のことから、吸入麻酔装置の台数によって使用個体数を制限される吸入麻酔の他に、使用にあたっての制限が低く、かつ、拮抗薬投与により麻酔深度を調節することが可能な新しい注射麻酔薬が求められている。

本研究は、新たな実験動物用注射麻酔として注目されている3種混合麻酔薬（メデトミジン/ミダゾラム/ブトルファノール：MMB）[17, 22, 24]のげっ歯類における投与後の影響を評価した。第1章では、マウスに対しMMB投与後1、4、24時間で剖検を実施し、各ポイントでの血液生化学的検査値を調べた。また、MMB投与群の血液生化学的検査値の変化を、イソフルラン群、及び他の注射麻酔群（ペントバルビタール、ケタミン/キシラジン）と比較した。第2章では、ラットに対しMMB投与後1、4、24時間で採血を実施し、経過時間毎の血液学的検査値、及び血液生化学的検査値の推移を確認した。

第1章 マウスにおける3種混合麻酔投与による血液生化学値への影響

I. 小 緒

今日、我々が苦痛を伴う動物実験を行う場合、動物福祉の観点から麻酔・鎮痛処置を行う必要がある。麻酔薬の中には、血液生化学的検査値へ影響するものがあるとの報告がある[11, 15, 51, 52]。実験者にとって、使用する麻酔薬が動物に対してどのような影響を及ぼすか把握しておくことは、データ解析において重要な情報となる。

中外製薬株式会社の IACUC で使用実績のある注射麻酔薬のペントバルビタールと、ケタミン/キシラジン混合麻酔薬の特徴について以下に述べる。ペントバルビタールは、外科処置可能な麻酔深度において血圧低下、呼吸の抑制・停止を引き起こす可能性が高く、実験中に死亡する危険性がある[16, 34, 42]。また、主に肝臓で代謝されるため血中の肝臓代謝酵素の変動を引き起こすことが報告されている[46]。ケタミン/キシラジンは、2007年の法改正によりケタミンを利用する場合の制約が大きくなった。このように、当施設で使用する注射麻酔薬には、それぞれ使用にあたってのデメリットが存在している。一方、イソフルランなどの吸入麻酔は、迅速に麻酔導入ができ、ほとんどが呼吸により短時間に生体から除去される。よって、麻酔濃度を動物毎に簡単に調整することができる。そのため、動物のバイタルサインと麻酔深度が適切に維持されている限り、死亡する危険性は低い。現在では、実験用げっ歯類のための吸入麻酔装置が開発されており[35, 43]、簡便に使用できる環境である。しかし、吸入麻酔装置の性能上、麻酔装置1台に対して数匹の麻酔維持が限界のため、実験動物の使用个体数が制限される。そのため、イソフルラン麻酔を用いた大規模実験は、吸入麻酔装置の台数やスペースの課題を解決する必要がある。以上のことから、吸入麻酔装置の台数によって使用个体数を制限される吸入麻酔の他に、使用にあたっての制限が低く、かつ、拮抗薬投与により麻酔深度を調節することが可能な新しい注射麻酔薬が求められている。

本研究は、近年、新たな実験動物用注射麻酔として注目されている、MMB[17, 22, 24]のマウスにおける投与後の血液生化学的検査値の変化を調べた。また、MMB 投与群の血液生化学的検査値の変化を、イソフルラン群、及び他の注射麻酔群（ペントバルビタール、ケタミン/キシラジン）と比較した。

II. 材料と方法

1. 使用薬剤

実験には、以下の薬剤を用いた。3種混合麻酔薬としてメデトミジン（ドミツール、Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd. Fukushima, Japan）、ミダゾラム（ドルミカム、Astellas Pharma Inc. Tokyo, Japan）、ブトルファノール（ベトルファール、Meiji Seika Pharma Co.

Ltd. Tokyo, Japan) を使用した。メデトミジンの拮抗薬であるアチパメゾール (アンチセダン、Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd.) を使用した。その他の麻酔薬として、イソフルラン (エスカイン、Mylan Co. Ltd. Tokyo, Japan)、ペントバルビタールナトリウム (ソムノペンチル、Kyouritu Co. Ltd. Tokyo, Japan)、ケタミン (ケタラール、Daiichi Sankyou Co. Ltd. Tokyo, Japan) とキシラジン (セラクター、Bayer Yakuhin Co. Ltd. Osaka, Japan) の混合液を使用した。薬剤の希釈及び対照物質として、生理食塩液 (大塚生食注, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Tokushima, Japan) を使用した。全ての薬剤は、室温で保管した。

2. 調製方法

全ての薬剤は、Table 1 に従って調製した。希釈には生理食塩液を用いた。MMB の調製は、文献報告を参照にした[5, 16, 23, 48]。MMB Low 群は、予備検討の結果から、外科処置可能な最低用量、MMB High 群は単回投与で死亡例が出なかった最高用量とした。その他の薬剤の投与用量は、IACUC の定めたガイドラインに従った。

Table 1. Experimental groups and agent dose.

Group Name	Drug	Product concentration	Agent dose	Administration route
Control	Saline	-	-	subcutaneous
	Saline	-	-	subcutaneous
Iso sa (+)	Isoflurane	2%	4 l / min	inhalation
	Atipamezole*	5.0 mg / ml	1.8 mg / kg	subcutaneous
Iso sa (-)	Isoflurane	2%	4 l / min	inhalation
MMB Low	Medetomidine	1.0 mg / ml	0.45 mg / kg	subcutaneous
	Midazolam	5.0 mg / ml	6.0 mg / kg	
	Butorphanol	5.0 mg / ml	7.5 mg / kg	
	Atipamezole*	5.0 mg / ml	0.9 mg / kg	
MMB High	Medetomidine	1.0 mg / ml	0.9 mg / kg	subcutaneous
	Midazolam	5.0 mg / ml	12.0 mg / kg	
	Butorphanol	5.0 mg / ml	15.0 mg / kg	
	Atipamezole*	5.0 mg / ml	1.8 mg / kg	
Pent	Pentobarbital sodium	64.8 mg / ml	48.6 mg / kg	intraperitoneal
K / X	Ketamine	50 mg / ml	75 mg / kg	intraperitoneal
	Xylazine	20 mg / ml	10 mg / kg	
Med	Medetomidine	1.0 mg / ml	0.9 mg / kg	
Mid	Midazolam	5.0 mg / ml	12.0 mg / kg	subcutaneous
But	Butorphanol	5.0 mg / ml	15.0 mg / kg	

*Atipamezole is only administrated in Experiment 3.

3. 使用動物

動物は 8 週齢の雄性、雌性 C57BL/6J マウス (日本 CLEA 社) を使用した。動物は、

7 日間の順化期間終了後に実験に用いた。マウスの系統、使用数は、中外製薬の実験動物倫理委員会により審査・承認された試験計画書(IACUC 13-261:2013 年 10 月承認, IACUC 15-15-133:2015 年 5 月承認)に記載したものを使用した。

4. 飼育環境

動物はオートクレーブ処理された床敷（アスペンチップ、TAPVEI 社 Kortelainen、フィンランド）を入れたポリカーボネートケージで、1 ケージ 3 匹から 4 匹で群飼育した。飲水は、ポリカーボネート容器に水道水を入れた。動物には、殺菌済みの飼料（CE-2: 日本 CLEA 社）を与えた。室温は中央温度管理システムで管理し、20 から 26°C に維持した。湿度も同様に 30 から 70% で維持した。動物室は、12 : 12 時間の明暗サイクルで維持した（午前 7 時から午後 7 時まで明期）。全ての実験は、中外製薬株式会社の IACUC の定めたガイドライン(VET-300 (2014), VET-700 (2014) and CAR-100 (2014))に従って実施した。

5. 実験群構成

実験群として、イソフルラン (Iso)群、MMB Low 群、MMB High 群、ペントバルビタール(Pent)群、ケタミン/キシラジン (K/X)群、メデトミジン (Med)群、ミダゾラム (Mid)群、ブトルファノール (But)群を設定した (Table 1)。なお、Iso 群は皮下 (s.c.) 投与による血液生化学的検査値への影響の程度を確認するため、生理食塩液 10 mg/mL を s.c.投与した Iso saline (sa) (+)群と、投与しなかった Iso sa (-)群に分けた。Control 群は、生理食塩液を s.c.投与した。全ての群は、イソフルラン麻酔下で剖検した。

6. 実験概要

実験 1 : MMB 投与後の血液生化学的検査値への影響

A) 実験開始 1 時間後の血液生化学的検査値の変化

MMB が、既存の注射麻酔薬と比べ、どの程度血液生化学的検査値に影響するかを確認した。実験開始後 1 時間で全個体を剖検し、Control 群 (N = 3)、Iso sa (+)群 (N = 6)、Iso sa (-)群 (N = 6)、Pent 群 (N = 6)、K/X 群 (N = 6)、MMB Low 群 (N = 7)、MMB High 群 (N = 19)の全個体の血液生化学的検査値を比較した。

B) 実験開始 1 時間後の CK isozyme の変化 :

実験 1 で確認された血液生化学的検査値の変化が、MMB 構成薬剤のどれによるものかと、既存の注射麻酔薬と比較してどの程度であるかを確認した。実験開始後 1 時間で全個体を剖検し、Control 群 (N = 3)、Iso sa (-)群 (N = 6)、MMB High 群 (N = 12)、Pent 群 (N = 6)、K/X 群 (N = 6)、Med 群 (N = 6)、Mid 群 (N = 6)、But 群 (N = 6)の血液生化学的検査値とクレアチンキナーゼアイソザイム (CK isozyme)を比較した。

C) MMB 投与後の血液生化学的検査値変化の推移

MMB 投与後の血液生化学的検査値の変化が、いつまで持続するかを確認した。麻酔後の Iso sa (+)群 (N = 18)、MMB Low 群 (N = 19)、MMB High 群 (N = 27)の血液生化学的検査値の変化を経過時間ごとに比較した。各群は、麻酔後 1 時間、4 時間、24 時間後に 6 から 7 匹ずつ剖検した。なお、4、24 時間の剖検群は、麻酔開始後 1 時間維持した後でアチパメゾールを投与し、一旦覚醒させた。アチパメゾールは、Iso(+) 群、MMB Low 群、及び MMB High 群に対し、各群のメデトミジン投与用量の 2 倍を投与した。

実験 2 : MMB 投与による血中インスリン濃度の影響

MMB 投与後の GLUC 上昇がインスリン分泌抑制によるものか、また、アチパメゾール投与用量を増やすことで、MMB 投与後 4 時間での GLUC が基準範囲内に入るかを確認した。MMB 投与用量は、MMB High 群と等量とした。実験群は、アチパメゾールをメデトミジン投与用量の 2 倍量投与した MMB-Ati Low 群 (N = 7)と、4 倍量投与した MMB-Ati High 群 (N = 7)、対照群として、Control 群 (N = 8)とアチパメゾールのみ投与する Ati 群 (N = 7)を設定した。実験開始後、各群に対し麻酔後 1、4 時間後に頸静脈採血を実施し、血中インスリン濃度を測定した。MMB-Ati Low 群、MMB-Ati High 群、Ati 群は、実験開始後 1 時間の採血後にアチパメゾールを投与し、覚醒させた。

7. 麻酔深度評価

麻酔深度は正向反射、後肢引込み反射、腹部皮膚の疼痛反射の 3 つで評価した。正向反射の回復は、動物が起きて動き出した時と定義した。後肢引込み反射は、後肢の指間を無鉤鉗子でつまみ、ゆっくり引くことで確認した[21, 23]。腹部皮膚の疼痛反射は、腹部皮膚の 1 cm の幅を、有鉤鉗子で挟むことで確認した。全ての反射消失をもって、外科処置可能な麻酔深度とした。麻酔深度の確認は、麻酔後 10 分、30 分、及び 60 分の時点で実施した。また、全ての実験の麻酔深度評価は、同じ実験者が実施した。

8. 血液生化学的検査値の測定

採血後に、血液をヘパリンリチウム入りチューブに入れて 1,900 x g、15°C、10 分の条件にて遠心分離し、血漿を採取した。血漿を臨床化学自動分析装置 TBA-120FR (東芝メディカルシステムズ)にて血液生化学的検査値を測定した。CK isozyme は、CK isozyme キット : タイタンジェル CK (QG)を用いて全自動電気泳動装置 Epalyzer 2 (ヘレナ研究所)にて測定した。

9. 血中インスリン濃度測定

採血後に、血液をヘパリンリチウム入りチューブに入れて 1,900 x g、15 °C、10 分の条件にて遠心分離し、血漿を採取した。血漿を超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所）にて測定した。

10. 統計学的分析

測定結果は、平均値 均値標準偏差で示した。全ての測定値は、SAS ソフトウェア ver.5.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いてパラメトリック Dunnett 多重比較検定により解析した。

III. 成績

全ての実験において、Iso sa (+) 群、Iso sa (-) 群、MMB High 群の麻酔深度は、外科処置可能な状態で維持された。MMB Low 群は、10 min、60 min のポイントにおいて、50%の個体が外科処置可能な麻酔深度であった。Pent 群、K/X 群は、投与後 1 時間以内に、全個体が覚醒した。Med 群、Mid 群、But 群は、外科処置可能な麻酔深度には、至らなかった。そのため、イソフルラン麻酔後にこれらの群を剖検した。なお、実験中に死亡した個体、及び 剖検時に異常所見がみられた個体は発生しなかった。

実験 1. MMB 投与後の血液生化学的検査値への影響

A) 実験開始 1 時間後の血液生化学的検査値の変化：

実験 1-A)の結果、実験開始後 1 時間で K/X 群($p < 0.0001$)、MMB Low 群($p < 0.0001$)、MMB High 群($p < 0.0001$)で GLUC、IP と K が、基準範囲をこえて高値を示した[9]。また、CK が MMB High 群 ($p < 0.0058$)で高値を示した。一方、LD には変化はみられなかった[9]。Iso (+)群と Iso (-)群、Pent 群には大きな変化はなく、基準範囲内であった (Table 2) [9]。

Table. 2 Blood biochemistry level 1 hr after the experiment start in male mice.

Item	Control (N=3)	Iso sa (+) (N=6)	Iso sa (-) (N=6)	Pent (N=6)	K/X (N=6)	MMB Low (N=7)	MMB High (N=19)
GLUC (mg/dL)	276.3 ± 14.8	289.8 ± 22.5	356.0 ± 55.5	251.8 ± 31.2	653.5 ± 47.1**	721.4 ± 55.2**	714.8 ± 65.4**
IP (mg/dL)	6.9 ± 0.3	5.1 ± 0.4*	7.8 ± 1.1	8.1 ± 0.6	10.4 ± 0.7**	10.5 ± 0.4**	10.5 ± 0.5**
Ca (mg/dL)	9.1 ± 0.3	9.6 ± 0.2**	9.6 ± 0.1**	9.4 ± 0.3	9.0 ± 0.1	9.1 ± 0.2	9.1 ± 0.2
LD (U/L)	228.7 ± 18.9	252.8 ± 83.4	187.3 ± 58.8	214.8 ± 62.9	203.2 ± 50.3	268.3 ± 82.5	278.6 ± 108.4
CK (U/L)	271.0 ± 81.7	197.5 ± 34.5	68.5 ± 15.7	224.0 ± 63.2	188.3 ± 44.1	348.6 ± 63.8	604.4 ± 150.7**
Na (mmol/L)	147.7 ± 0.6	145.0 ± 0.9	145.3 ± 1.0	150.3 ± 1.2	144.8 ± 1.3	144.1 ± 1.3*	145.7 ± 2.2
K (mmol/L)	4.4 ± 0.2	4.6 ± 0.2	5.5 ± 0.8**	5.4 ± 0.2*	6.1 ± 0.4**	6.6 ± 0.4**	6.5 ± 0.6**
Cl (mmol/L)	116.3 ± 1.5	113.0 ± 1.5*	110.2 ± 0.8**	115.5 ± 1.4	110.3 ± 3.1**	109.3 ± 1.8**	109.8 ± 1.9**

The value is mean r standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.*: $p < 0.05$ vs. Contro, ** : $p < 0.01$ vs. Control.

B) 実験開始 1 時間後の CK isoenzyme の変化 :

実験 1-B)の結果、実験開始後 1 時間で MMB High 群($p = 0.0036$)と Mid 群($p = 0.0270$)の CK が高値を示した。また、Med 群($p = 0.0503$)も高値傾向であった(Table 3) (Table 4)。この時、MMB High 群の骨格筋型 CK isoenzyme (CK-MM) ($p = 0.0993$)も高値傾向であった。さらに、Med 群の脳型 CK isoenzyme (CK-BB) ($p = 0.0003$)と、Mid 群の CK-MM ($p = 0.0184$)が高値を示した。また、Control 群と MMB High 群、But 群との間で CK isoenzyme 構成比に大きな違いはなかった。一方、Pent 群、K/X 群は Control 群と異なる CK isoenzyme 構成比であった(Table 3)。

Table 3. CK and CK isoenzyme levels in plasma at 1 hr after anesthetic drug administration in male mice.

Item	Control (N=3)	Iso sa (-) (N=6)	MMB High (N= 12)	Pent (N=6)	K / X (N=6)	Med (N=6)	Mid (N=6)	But (N=6)
CK (U/l)	271.0 ± 81.7	68.5 ± 15.7	572.9 ± 138.3*	224.0 ± 63.2	188.3 ± 44.1	584.7 ± 296.9	616.0 ± 297.3*	240.2 ± 134.0
CK – MM (U/l)	190.0 ± 71.0	28.0 ± 14.5	394.2 ± 111.2	114.6 ± 39.0	84.8 ± 25.2	306.0 ± 243.8	484.1 ± 232.9*	149.6 ± 124.8
CK – BB (U/l)	77.1 ± 9.0	37.3 ± 10.5	157.9 ± 45.2	106.1 ± 27.9	92.4 ± 19.9	259.0 ± 130.3**	125.2 ± 68.0	86.0 ± 22.3
CK – MB (U/l)	3.9 ± 2.0	3.2 ± 1.1	20.8 ± 16.0	3.3 ± 0.9	11.2 ± 5.6	19.8 ± 19.2	6.8 ± 3.1	4.6 ± 2.0

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : $p < 0.05$ vs. Control, ** : $p < 0.01$ vs. Control. CK-MM : Skeletal muscle type isoenzyme of CK, CK-BB : Brain type isoenzyme of CK, CK-MB : Myocardial type isoenzyme of CK.

Table 4. Changes in blood biochemical parameters after administration of the combination of medetomidine, midazolam and butorphanol (MMB) in male mice.

Item	Control (N=3)	Iso sa (-) (N=6)	MMB High (N=19)	Med (N=6)	Mid (N=6)	But (N=6)
AST (U/l)	48.3 ± 8.1	30.2 ± 2.9	46.9 ± 14.9	63.3 ± 43.0	49.0 ± 12.8	41.3 ± 7.7
ALT (U/l)	27.3 ± 7.0	17.3 ± 2.3	27.1 ± 17.0	19.8 ± 4.2	20.7 ± 3.9	22.8 ± 11.5
GLUC (mg/d l)	276.3 ± 14.8	356.0 ± 55.5	714.8 ± 65.4**	539.2 ± 46.1**	274.2 ± 52.0	263.7 ± 11.7
UN (mg/d l)	25.7 ± 4.4	31.2 ± 2.1*	28.1 ± 2.2	23.9 ± 2.0	26.5 ± 3.5	24.6 ± 1.4
IP (mg/d l)	6.9 ± 0.3	7.8 ± 1.1	10.5 ± 0.5**	9.3 ± 1.5**	7.7 ± 1.2	6.8 ± 0.6
Ca (mg/d l)	9.1 ± 0.3	9.6 ± 0.1**	9.1 ± 0.2	9.3 ± 0.3	9.0 ± 0.2	9.3 ± 0.2
LD (U/l)	228.7 ± 18.9	187.3 ± 58.8	278.6 ± 108.4	285.2 ± 87.3	275.2 ± 65.3	273.3 ± 111.5
CK (U/l)	271.0 ± 81.7	68.5 ± 15.7	604.4 ± 150.7**	584.7 ± 296.9*	616.0 ± 297.3*	240.2 ± 134.0
Na (mmol/l)	147.7 ± 0.6	145.3 ± 1.0	145.7 ± 2.2	144.3 ± 1.5*	149.2 ± 1.6	150.8 ± 1.0*
K (mmol/l)	4.4 ± 0.2	5.5 ± 0.8**	6.5 ± 0.6**	5.4 ± 0.3*	5.1 ± 0.2	4.6 ± 0.3
Cl (mmol/l)	116.3 ± 1.5	110.2 ± 0.8**	109.8 ± 1.9**	111.0 ± 1.1**	116.7 ± 0.8	116.8 ± 0.4

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : $p < 0.05$ vs. Control, ** : $p < 0.01$ vs. Control.

C) MMB 投与後の血液生化学的検査値変化の推移：

実験 1-C)の結果、実験 1-A)で確認された血液生化学的検査値の変化は、投与後 24 時間の時点で Iso (+)群と同程度の値となった(Table 5)。MMB 投与後 1 時間で、MMB Low 群 ($p < 0.0001$)、MMB High 群($p < 0.0001$)の GLUC、IP、K が高値を示した。CK は、MMB High 群($p < 0.0001$)のみ高値を示した。MMB 投与後 4 時間の時点で、GLUC 以外の血液生化学的検査値の変化は、Iso (+)群と同程度の値となった。その他の血液生化学的検査値の項目(ALP、TCHO、TG、TP、UN、Ca、Na、Cl)にも、統計学上の有意差が散見された。しかし、基準範囲内や[9]、投与用量や時間変化と無関係であったため意義ある変化ではないとした (Table 5)。さらに、追加実験の結果から MMB の血液生化学的検査値への影響には、性差がないことがわかった(Table 6, 7)。

Table 5. Changes in blood biochemical parameters 1, 4 and 24 hr after anesthetic administration in male mice.

Item	Iso sa (+)			MMB Low			MMB High		
	1 hr (N=6)	4 hr (N=6)	24 hr (N=6)	1 hr (N=7)	4 hr (N=6)	24 hr (N=6)	1 hr (N=13)	4 hr (N=7)	24 hr (N=7)
AST (U/l)	38.0 ± 4.0	56.7 ± 8.5	39.7 ± 13.3	38.3 ± 4.2	50.7 ± 6.7	43.2 ± 6.7	42.2 ± 10.0	56.7 ± 11.4	39.1 ± 6.0
ALT (U/l)	22.5 ± 3.2	27.3 ± 3.6	24.0 ± 9.1	23.1 ± 3.7	30.2 ± 4.8	30.0 ± 9.7	21.8 ± 4.0	23.3 ± 4.2	26.4 ± 5.6
ALP (U/l)	507.5 ± 29.2	440.3 ± 28.1	461.0 ± 72.7	512.6 ± 49.1	505.2 ± 54.3*	459.5 ± 44.8	512.8 ± 35.3	421.9 ± 41.1	516.4 ± 67.4
TCHO (mg/d l)	72.2 ± 5.9	74.0 ± 4.7	84.2 ± 6.5	73.4 ± 5.1	76.3 ± 5.8	75.0 ± 5.2*	78.6 ± 6.2	75.7 ± 6.1	77.4 ± 3.8
TG (mg/d l)	72.0 ± 15.6	51.5 ± 10.1	59.2 ± 16.3	91.0 ± 20.9	66.5 ± 27.1	57.0 ± 13.5	64.1 ± 20.4	91.7 ± 23.0**	67.0 ± 20.7
TP (mg/d l)	4.6 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.8 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.6 ± 0.1*	4.7 ± 0.2	4.6 ± 0.2	4.6 ± 0.2*
ALB (mg/d l)	3.0 ± 0.1	3.2 ± 0.1	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1	3.2 ± 0.2	2.9 ± 0.1	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1	2.9 ± 0.1
GLUC (mg/d l)	289.8 ± 22.5	258.3 ± 30.0	290.2 ± 27.9	721.4 ± 55.2**	473.8 ± 66.2**	284.3 ± 28.7	724.9 ± 74.1**	453.4 ± 91.6**	214.3 ± 33.3**
UN (mg/d l)	34.7 ± 2.9	22.3 ± 2.0	24.6 ± 2.4	32.1 ± 2.1	24.9 ± 2.4	23.3 ± 2.2	28.5 ± 2.5**	23.8 ± 2.4	23.4 ± 2.3
CRE (mg/d l)	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.1 ± 0.0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.1 ± 0.0	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.1 ± 0.0
IP (mg/d l)	5.1 ± 0.4	7.8 ± 1.6	8.1 ± 0.4	10.5 ± 0.4**	8.4 ± 0.9	7.3 ± 0.5	10.5 ± 0.5**	8.6 ± 1.0	7.9 ± 0.8
Ca (mg/d l)	9.6 ± 0.2	9.4 ± 0.1	9.8 ± 0.3	9.1 ± 0.2**	9.4 ± 0.2	9.5 ± 0.2	9.1 ± 0.2**	9.4 ± 0.2	9.5 ± 0.1
LD (U/l)	252.8 ± 83.4	327.8 ± 54.8	194.5 ± 92.2	268.3 ± 82.5	340.7 ± 94.7	140.5 ± 20.4	269.7 ± 128.4	346.7 ± 74.2	136.9 ± 43.0
CK (U/l)	197.5 ± 34.5	364.2 ± 209.3	145.0 ± 136.0	348.6 ± 63.8	437.7 ± 59.7	78.0 ± 27.3	577.7 ± 170.9**	826.7 ± 206.0**	130.4 ± 128.5
Na (mmol/l)	145.0 ± 0.9	149.3 ± 1.0	147.3 ± 0.8	144.1 ± 1.3	145.5 ± 2.4*	148.5 ± 0.5*	145.7 ± 2.5	148.9 ± 2.6	150.3 ± 1.0**
K (mmol/l)	4.6 ± 0.2	3.8 ± 0.2	3.6 ± 0.4	6.6 ± 0.4**	4.4 ± 0.2**	3.4 ± 0.2	6.6 ± 0.6**	4.2 ± 0.3*	3.9 ± 0.3
Cl (mmol/l)	113.0 ± 1.5	115.7 ± 1.6	112.8 ± 1.5	109.3 ± 1.8**	110.8 ± 3.8*	115.2 ± 1.5*	110.2 ± 2.1*	114.6 ± 2.4	116.7 ± 1.7**

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : $p < 0.05$ vs.

Iso sa (+), ** : $p < 0.01$ vs. Iso sa (+).

Table 6. Changes in levels of blood biochemical parameters after anesthetic administration in female mice administration in female mice.

Item	Iso sa (+)			MMB Low			MMB High		
	1 hr (N=6)	4 hr (N=6)	24 hr (N=6)	1 hr (N=6)	4 hr (N=4)	24 hr (N=6)	1 hr (N=6)	4 hr (N=6)	24 hr (N=5)
AST (U/l)	42.0 ± 3.0	86.3 ± 12.0	37.7 ± 2.7	79.2 ± 33.5	84.3 ± 29.2	40.5 ± 1.2	85.0 ± 69.6	90.8 ± 29.6	45.6 ± 4.3**
ALT (U/l)	19.3 ± 2.2	36.0 ± 8.9	16.3 ± 3.3	26.8 ± 5.0**	35.3 ± 6.7	17.7 ± 1.8	23.8 ± 2.5	31.7 ± 3.9	25.0 ± 3.2**
GLUC (mg/d l)	215.5 ± 43.9	249.2 ± 24.6	286.8 ± 26.4	596.8 ± 15.1**	383.3 ± 33.1**	292.2 ± 32.7	601.0 ± 23.1**	335.7 ± 33.0**	276.4 ± 22.9
UN (mg/d l)	33.8 ± 2.8	22.6 ± 3.4	18.8 ± 3.3	25.1 ± 2.8**	22.9 ± 4.1	18.7 ± 1.7	23.1 ± 1.8**	24.8 ± 4.4	17.3 ± 1.6
IP (mg/d l)	7.4 ± 0.7	6.8 ± 0.3	7.4 ± 1.0	11.5 ± 0.7**	7.9 ± 1.1	7.1 ± 0.5	10.8 ± 0.6**	10.0 ± 1.1**	6.7 ± 0.7
Ca (mg/d l)	8.9 ± 0.2	8.7 ± 0.2	9.1 ± 0.2	9.0 ± 0.1	9.2 ± 0.3**	9.1 ± 0.2	9.0 ± 0.3	9.0 ± 0.2	9.1 ± 0.1
LD (U/l)	184.5 ± 32.0	264.3 ± 36.3	146.5 ± 29.7	265.7 ± 65.4	332.5 ± 51.9	172.8 ± 38.2	308.3 ± 134.4	460.0 ± 96.5**	175.8 ± 44.0
CK (U/l)	325.2 ± 195.7	123.7 ± 28.2	59.2 ± 16.9	946.7 ± 467.6*	679.3 ± 288.6*	61.3 ± 6.8	761.0 ± 388.9	950.7 ± 355.6**	62.0 ± 10.3
Na (mmol/l)	144.8 ± 1.5	147.2 ± 0.8	146.3 ± 1.0	148.0 ± 1.3**	148.3 ± 4.0	147.8 ± 0.4**	147.5 ± 1.0**	149.0 ± 1.3	148.6 ± 0.5**
K (mmol/l)	4.7 ± 0.1	4.2 ± 0.1	3.7 ± 0.3	6.5 ± 0.4**	4.2 ± 0.3	3.6 ± 0.3	6.2 ± 0.2**	5.0 ± 0.5**	3.7 ± 0.1
Cl (mmol/l)	116.2 ± 1.3	115.3 ± 1.6	114.0 ± 1.5	113.8 ± 1.5*	111.5 ± 2.6**	117.2 ± 1.0**	114.3 ± 1.5	116.3 ± 1.0	118.4 ± 1.1**

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : p < 0.05 vs. Iso sa (+), ** : p < 0.01 vs. Iso sa (+).Dunnett's multiple comparison tests.* : p < 0.05 vs. Iso sa (+), ** : p < 0.01 vs. Iso sa (+).

Table 7. CK and CK isoenzyme levels in plasma 1 hr after the drug administration in female mice.

Item	Iso sa (+)	MMB Low	MMB High
CK (U/l)	325.2 ± 195.7	946.7 ± 467.6*	761.0 ± 388.9
CK-MM(U/l)	90.1 ± 35.9	138.0 ± 26.6*	140.0 ± 29.3
CK-BB(U/l)	19.6 ± 14.1	47.2 ± 12.8*	42.8 ± 29.1*
CK-MB(U/l)	215.4 ± 151.2	761.5 ± 461.2	578.3 ± 348.8

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : p < 0.05 vs. Iso sa (+), ** : p < 0.01 vs. Iso sa (+).CK-MM : Skeletal muscle type isoenzyme of CK, CK-BB : Brain type isoenzyme of CK, CK-MB : Myocardial type isoenzyme of CK.

2. 実験 2 : MMB 投与による血中インスリン濃度の影響

実験2の結果、血中インスリン濃度は、Control 群と比較して MMB 投与後1時間で MMB-Ati Low 群($p < 0.0001$)、MMB-Ati High 群($p < 0.0001$)とも低値を示した。その後、アチパメゾールを投与し、MMB 投与後4時間の時点では、Control 群と同程度の値となった(Table 8)。GLUC は、Control 群と比較して MMB 投与後1時間で MMB-Ati Low 群($p < 0.0001$)、MMB-Ati High 群($p < 0.0001$)とも高値を示した。その後、アチパメゾールを投与し、MMB 投与後4時間の時点では、MMB-Ati High 群のみ Control 群と同程度の値($p = 0.3850$)となった。MMB-Ati Low 群の GLUC は、MMB 投与後4時間の時点で Control 群よりも高値($p = 0.0130$)であったが、MMB 投与後1時間と比べ低下していた(Table 8)。

Table 8. Changes in Insulin and GLUC levels of each atipamezole dose 1 and 4 hr after MMB administration in male mice.

Group Name	Drug	mg/kg	Insulin (ng/mL)						GLUC (mg/dL)					
			1 hr			4 hr			1 hr			4 hr		
Control (N = 8)	Saline	-	0.8	±	0.3	1.2	±	0.3	186.3	±	25.0	199.4	±	20.9
MMB-Ati Low (N = 7)	MMB Atipamezole	0.9 / 12 / 15 1.8	0.2	±	0.2**	1	±	0.3	474.3	±	111.1**	286.4	±	99.1*
MMB-Ati High (N = 7)	MMB Atipamezole	0.9 / 12 / 15 3.6	0.2	±	0.1**	0.8	±	0.3	579.3	±	47.2**	238.6	±	33.9
Ati (N = 7)	Atipamezole	3.6	0.7	±	0.1	2.5	±	2.7	179.3	±	34.8	134.3	±	26.7

The value is mean ± standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.*: $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ vs. Control.

IV. 考察

本章では、新しい実験動物用注射麻酔薬である MMB について、マウスにおける外科処置可能となる最適投与用量と、血液生化学的検査値を指標に生体へ与える影響を確認した。実験1では、血液生化学的検査値の変化が、MMB と既存の注射麻酔薬と比較してどの程度異なるか確認した。実験1-B)では、実験1-A)で確認された血液生化学的検査値の変化が、MMB 構成薬剤のいずれによるものかを確認した。実験1-C)では、MMB 投与後の血液生化学的検査値の変化がどの程度持続するかを確認した。実験2では、MMB 投与後の GLUC 上昇が、インスリン分泌抑制によるものであることを確認した。以上の実験により、外科処置可能な MMB 投与用量と、MMB 投与による血液生化学的検査値の変化項目、変化の持続期間を明確にした。

麻酔の対照群には、注射麻酔薬より安全でコントロールしやすいため外科処置時によく利用されている、イソフルランを用いた[47]。Control 群、Iso sa (+)群、Iso sa (-)群の GLUC は、非麻酔下の GLUC よりも高値となっていた(Table 2)。これは、イソフルランのインスリン分泌抑制による GLUC 上昇させるとの報告と一致する結果であった[11, 15, 51, 52]。一方、外科処置そのものの刺激により高血糖となることも報告されており、Control 群、Iso sa (+)群、Iso sa (-)群の GLUC 高値は、剖検時の刺激の影響も考えられる[13]。MMB Low 群、High 群、K/X 群で GLUC と K が高値であったのは(Table 2)、構成薬剤の中にある $\alpha 2$ 受容体作動薬（メデトミジン、キシラジン）のインスリン分泌抑制作用と細胞膜の ATP 感受性カリウムイオンチャネルの閉鎖抑制作用によるためである[3, 5, 6, 10 15, 17, 23, 30, 47, 52]。ペントバルビタールは、インスリン分泌に影響しないため血糖は変化しないとされている [9, 21, 36, 51]。今回の検討結果も、報告と一致する結果となった (Table 2)。また、 $\alpha 2$ 受容体作動薬の作用は、アチパメゾール投与により解除されるとの報告がある[33]。ただし、MMB 投与後の MMB High 群の血液生化学的検査値の GLUC と CK は、アチパメゾール投与後3時間経過した後も、Iso sa (+)群より高値を維持していた(Table 5)。メデトミジンに対してアチパメゾールの投与用量が不十分な場合、アチパメゾール投与後も GLUC が高い値で推移したとの報告がある[36]。よって、今回の検討でのアチパメゾール投与用量は、メデトミジン作用を拮抗するのに十分量ではなかった可能性が考えられた。最終的に、全ての血液生化学的検査値は、投与後24時間の時点で基準範囲内となった(Table 5)。K/X 群は、メデトミジンと同じ $\alpha 2$ 受容体作動薬であるキシラジンを含むため、MMB 投与群と同様 GLUC、IP、K の上昇がみられた(Table 2)。しかし、CK は、MMB 投与群ほど上昇しなかった。また、MMB 投与群の CK は、Control 群と Iso sa (+)群以上であることから、s.c.投与の影響以上に MMB の影響

があったと考えられる。

MMB High 群でみられた、アチパメゾール投与後3時間の時点での GLUC と CK の高値について考察した。GLUC の高値については、実験4において MMB 投与後に血中のインスリン濃度が低下し、アチパメゾール投与後に Control 群と同程度に回復していたことから、MMB に含まれるメデトミジンによるインスリン分泌抑制が起こったと考えられた(Table 8)。アチパメゾール投与後3時間の時点で、GLUC が高値を維持していた理由は不明であるが、アチパメゾール投与用量をメデトミジンの6倍量にした場合は、Control 群と同程度の値になることが確認できた(Table 8)。また、 $\alpha 2$ 受容体作動薬には、副作用として筋肉痙攣を起こすことが知られている。また、筋肉の痙攣は、 $\alpha 2$ 受容体作動薬の投与経路によって程度が異なるとの報告がある[37]。そのため、MMB 投与群と K/X 群の CK の違いは、投与方法の違いに関係している可能性がある。また、MMB 構成薬剤では、Med 群と Mid 群の CK が高値であった。そのため、メデトミジンとミダゾラムの相加作用により、K/X 群よりも MMB 投与群の CK が高くなった可能性がある(Table 3)。MMB 構成薬剤のどれが CK 高値を引き起こすか確認するため、Iso sa (-)群、Pent 群、K/X 群、Med 群、Mid 群、But 群の血液生化学値と CK アイソザイムを比較した。その結果、MMB High 群、Med 群、Mid 群で CK の高値がみられた(Table 3)。Mid 群の CK-MM は、MMB High 群と同様に高値を示した。また、Med 群の CK-BB は、Control 群と比較して明らかに高値であった(Table 3)。この結果から、MMB High 群における CK の高値は、メデトミジンとミダゾラム両方の影響によるものと思われた。また、CK 以外の血液生化学的検査値の変化には、主にメデトミジンが関わっていると思われた(Table 4)。

今回の検討で、マウスへの MMB 投与は、一過性に一部の血液生化学的検査値の上昇を引き起こすが、変化が可逆的であり剖検時に異常所見がみられなかったことから、生体への影響は小さいと考察した。MMB を実験に用いる際には、今回確認された血液生化学的検査値への影響を踏まえたデータ解析が必要となる。また、GLUC が大きく上昇することから、糖尿病病態モデル動物への MMB 使用は注意が必要である。

治療を目的とした臨床での麻酔利用とは異なり実験動物における麻酔利用は、実験データへどのような影響があるかを把握しておくことが重要となる。今回の検討は、我々が日常、実験に用いている麻酔薬や鎮痛薬が、実験データとしてよく用いられる血液生化学的検査値の変動を引き起こす可能性があることを示唆している。動物実験を行う際には、使用する麻酔薬の特性を事前に確認しておくことが重要である。

V. 小 括

今回、新しい実験動物用注射麻酔として3種混合麻酔薬（メドミジン/ミダゾラム/ブトルファノール：MMB）の有用性を評価した。マウスに対し MMB 0.45/6.0/7.5 mg/kg、及び 0.9/12.0/15.0 mg/kg を投与し、外科処置可能な麻酔深度に達したことを確認した。マウスは、MMB 投与後1時間経過した時点で拮抗薬（アチパメゾール）を投与し覚醒させた。投与後1、4、24時間後の血液生化学的検査値を測定した結果、GLUC、CK、IP、K、の一過性の上昇が確認された。これらの血液生化学的検査値の変化は、投与後24時間後で基準範囲内に戻った。

MMB は、マウスの一部の血液生化学的検査値に影響するが可逆的な変化であり、剖検時にも異常所見がみられないことから、生体への影響は小さいと考察した。本実験で確認された MMB による血液生化学的検査値の変化は、実験データの解釈に影響する可能性がある。実験動物に適用する麻酔薬は、その薬理学的特徴を把握したうえで使用することを推奨する。

第2章 ラットにおける3種混合麻酔投与による血液学的検査値及び血液生化学的検査値への影響

I. 小 緒

今日、我々が医学研究に実験動物を使用する際には、動物福祉の観点から動物が苦痛を受けないよう配慮する必要がある。苦痛軽減は、適切な麻酔薬や鎮痛剤を使用することで達成できる[35]。全身麻酔には、注射麻酔と吸入麻酔の2種類の方法がある。実験動物用げっ歯類への注射麻酔の方法としては、腹腔内投与か皮下投与が一般的に選ばれる[1, 6, 44]。

注射麻酔の特徴としては、麻酔時間の延長や深度調節を吸入麻酔のように微調整が出来ないため、麻酔深度調節が困難であることが挙げられる [12, 18, 25, 26, 50]。また、事前に投薬用量設定を行っても、麻酔効果に個体差があるため、一部の個体にとって過量や不十分な用量になる場合がある[1, 6, 49]。

本研究は、近年、新たな実験動物用注射麻酔として注目されている MMB [17, 21]のラットにおける投与後の経過時間毎の血液生化学的検査値、及び血液学的検査値の変化を調べた。

II. 材料と方法

1. 使用薬剤

実験には、以下の薬剤を用いた。3種混合麻酔薬としてメデトミジン (ドミトール、Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd. Fukushima, Japan)、ミダゾラム (ドルミカム、Astellas Pharma Inc. Tokyo, Japan)、ブトルファノール (ベトルファール、Meiji Seika Pharma Co. Ltd. Tokyo, Japan) を使用した。メデトミジンの拮抗薬であるアチパメゾール (アンチセダン、Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd.) を使用した。薬剤の希釈には、生理食塩液 (大塚生食注, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc. Tokushima, Japan) を使用した。全ての薬剤は、室温で保管した。

2. 調製方法

全ての薬剤は、Table 9-1、または Table 9-2に示したとおりに調製した。希釈には、生理食塩液を用いた。MMB とアチパメゾールは、文献報告[5, 16, 22, 48]を参照に調製した。投与容量は、MMB を5 mL/kg、アチパメゾールを1 mL/kg とした。また、投与用量は、文献報告の中の最低用量を MMB Low 群とし、等量を追加投与した場合を想定し、公比2で MMB Mid 群と MMB High 群を設定した。

Table 9-1. Group structure of experiment 1.

Group Name	Drug	Agent dose	Administration volume
MMB Low	Medetomidine	0.15 mg / kg	
	Midazolam	2.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	2.5 mg / kg	
	Atipamezole	0.3 mg / kg	1.0 m l / kg
MMB Mid	Medetomidine	0.3 mg / kg	
	Midazolam	4.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	5.0 mg / kg	
	Atipamezole	0.6 mg / kg	1.0 m l / kg
MMB High	Medetomidine	0.6 mg / kg	
	Midazolam	8.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	10.0 mg / kg	
	Atipamezole	1.2 mg / kg	1.0 m l / kg

Administration route was separated both subcutaneous (s.c.) and intraperitoneal (i.p.) in each groups.

Table 9-2. Group structure of experiment 2.

Group Name	Drug	Agent dose	Administration volume
Intact		No administration	
MMB Low	Medetomidine	0.15 mg / kg	
	Midazolam	2.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	2.5 mg / kg	
	Atipamezole	0.3 mg / kg	1.0 m l / kg
MMB Mid	Medetomidine	0.3 mg / kg	
	Midazolam	4.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	5.0 mg / kg	
	Atipamezole	0.6 mg / kg	1.0 m l / kg
MMB High	Medetomidine	0.6 mg / kg	
	Midazolam	8.0 mg / kg	5.0 m l / kg
	Butorphanol	10.0 mg / kg	
	Atipamezole	1.2 mg / kg	1.0 m l / kg
Ati	Saline	-	5.0 m l / kg
	Atipamezole	1.2 mg / kg	1.0 m l / kg

Administration route was subcutaneous (s.c.) in all groups. Intact group was only done the blood sampling

3. 使用動物

動物は、8週齢の雄性 RccHanTM:WIST ラットを使用した。動物は、7日間の順化期間終了後に実験に用いた。ラットの使用数は、中外製薬株式会社の IACUC により審査・承認された試験計画書(IACUC 16-090:2016年4月承認)に記載したものを使用した。

4. 飼育環境

動物は、オートクレーブ処理された床敷（アスペンチップ、TAPVEI 社 Kortelainen, フィンランド）を入れたポリカーボネートケージで、1ケージ2匹で群飼育した。飲水は、ポリカーボネート容器に水道水を入れた。動物には、殺菌済みの飼料（CE-2: 日本 CLEA 社）を与えた。室温は中央温度管理システムで管理し、20から26℃に維持した。湿度も同様に30から70%で維持した。動物室は、12：12時間の明暗サイクルで維持した（午前7時から午後7時まで明期）。全ての実験は、中外製薬の実験動物倫理委員会の定めたガイドライン(VETE-301 (2015)、EXPE-102 (2016) 、CARE-001 (2015))に従って実施した。

5. 実験群構成

実験群として Intact 群、MMB Low 群、MMB Mid 群、MMB High 群、アチパメゾール(Ati)群を設定した (Table 9-1、または Table 9-2)。なお、Intact 群は採血による血液生化学的検査値へ影響の程度を確認するため、他の実験群と同様のタイミングで計4回の頸静脈採血を実施した。全ての群は、イソフルラン麻酔下で剖検した。

6. 実験概要

実験1：3種混合麻酔投与ルートと麻酔導入/持続時間と動物の状態への影響

投与ルートの違いにより、MMB の麻酔導入時間や麻酔持続時間、血液生化学的検査値、及び血液学的検査値に違いが無いか確認するため MMB Low 群 (n = 3)、MMB Mid 群 (n = 3)、MMB High 群 (n = 3)を設定し、皮下(s.c.)投与ルートと腹腔内(i.p.)投与ルートとで比較した。

麻酔導入時間と麻酔持続時間を確認するために、麻酔後5分、10分、15分、30分、45分、及び60分の時点で麻酔深度評価を実施した。また、全ての実験の麻酔深度評価は、同じ実験者が実施した。麻酔開始後1時間維持した後で、アチパメゾールを投与し、一旦覚醒させ、24時間後に全採血と剖検を実施した。

実験2：3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの変化

MMB 投与後の経過時間ごとの血液生化学的検査値、及び血液学的検査値の変化を確認した。投与ルートは、s.c.を選択した。実験群は、Intact 群(n = 8)、MMB Low 群 (n = 8)、MMB Mid 群 (n = 8)、MMB High 群 (n = 8)と Ati 群(n = 8)を設定した。麻酔導入時間と麻酔持続時間を確認するために、麻酔後10分、30分、45分、及び60分の時点で麻酔深度評価を実施した。各群は、MMB 投与前、MMB 投与後1時間、4時間、24時間後に、頸静脈より0.3 mL / 頭で採血した。MMB 投与後1時間の採血は、アチパメゾール投与前に実施した。MMB 投与後24時間で剖検を実施した。また、MMB 投与後2時間、4時間、6時間と24時間で、動物の状態観察と体重・摂餌量の測定を実施した。摂餌量は、餌重量の減少量を基にした。

7. 麻酔深度評価

麻酔深度は、正向反射、後肢引込み反射、腹部皮膚の疼痛反射の3つで評価した。正向反射の回復は、動物が起きて動き出した時と定義した。後肢引込み反射は、後肢の指間を無鉤鉗子でつまみ、ゆっくり引くことで確認した[21, 23, 32]。腹部皮膚の疼痛反射は、腹部皮膚の1 cm の幅を有鉤鉗子で挟むことで確認した。

全ての反射消失をもって、外科処置可能な麻酔深度とした。

8. 血液学的検査及び血液生化学的検査値測定

採血後に、血液をヘパリンリチウム入りチューブに入れて1,900 x g、4℃、10分の条件にて遠心分離し、血漿を採取した。血漿を自動分析装置 TBA-120FR (東芝メディカルシステムズ)にて血液生化学的検査を実施した。血液学的検査は、EDTA-3K 処理血液を用いて、XT-2000iV (シスメックス (株))にて測定した。

9. 血中インスリン濃度測定

採血後に、血液をヘパリンリチウム入りチューブに入れて1,900 x g、4℃、10 min の条件にて遠心分離し、血漿を採取した。インスリンを超高感度ラットインスリン測定キット (森永生科学研究所) にて測定した。

10. 病理組織学的検査

MMB 投与後の肺の病理組織学検査を行うため、ヘマトキシリン・エオジン (HE)染色を実施した。肺組織を10%中性緩衝ホルマリン液にて固定し、パラフィン包埋後、3 μm に薄切しスライドグラス上にて HE 染色した。

11. 統計学的分析

測定結果は、平均値 ± 標準偏差で示した。全ての測定値は、Win8.1_JMP 11.2.1 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) を用いて、パラメトリック Dunnett 多重比較検定により解析した。

III. 成績

実験1：3種混合麻酔投与ルートと麻酔導入/持続時間と動物の状態への影響

実験1として、i.p.と s.c.投与ルートの麻酔導入と持続時間を比較した。i.p.では、投与用量によらず、麻酔導入時間が5～10分の間でばらついた。また、MMB Low 群において1匹、麻酔導入しなかった個体を確認した。麻酔導入した個体の麻酔持続時間は、60分であった(Table 2)。一方、s.c.では、MMB Low 群のみ麻酔導入時間が5～10 min の間でばらついたが、MMB Mid 群と MMB High 群では、5分で全個体が麻酔導入した。また、全個体の麻酔持続時間は、60分であった(Table 10)。麻酔維持中の動物は、i.p.と s.c.両ルートとも、MMB 投与した全個体に持続的な排尿がみられた(Table 10)。また、MMB High 群の全個体で呼吸速迫や呼吸不整、血色の悪さが確認された。

剖検所見については、s.c.では、MMB High 群で1匹、死亡例が確認された。ま

た、別の MMB High 群で1匹、肺に暗赤色点を確認した(Table 10)。i.p.では、MMB Mid 群で1匹のみ呼吸速迫が確認された。なお、MMB Low 群で1匹、自然発生の水腎症が確認された(Table 10)。

Table 10. Influence of MMB on rats in i.p. and the s.c. route.

Administration Route	Group	No.	Under anesthesia		clinical observation*	necropsy observation
			Introduction point (heads / Group)	End point (heads / Group)		
i.p.	MMB Low	1	10 min	60 min	Reacted in Ati administration	Hydronephrosis of the left kidney
		2	No introduction		noparticular	noparticular
		3	10 min	60 min	noparticular	noparticular
	MMB Mid	4	5 min	60 min	noparticular	noparticular
		5	10 min	60 min	Rapid breathing	noparticular
		6	10 min	60 min	noparticular	noparticular
	MMB High	7	5 min	60 min	<ul style="list-style-type: none"> • rapid breathing • Irregular respiration • Dark skin 	noparticular
		8	10 min	60 min	Dark skin	noparticular
		9	5 min	60 min	<ul style="list-style-type: none"> • piloerection • Irregular respiration • Dark skin 	noparticular
s.c.	MMB Low	1	10 min	60 min	noparticular	noparticular
		2	10 min	60 min	noparticular	noparticular
		3	5 min	60 min	noparticular	noparticular
	MMB Mid	4	5 min	60 min	noparticular	noparticular
		5	5 min	60 min	noparticular	noparticular
		6	5 min	60 min	noparticular	noparticular
	MMB High	7	5 min	60 min	• Dark skin and white ear	noparticular
		8	5 min	60 min	<ul style="list-style-type: none"> • rapid breathing • Dark skin 	Dead body discovery in 24 hr
		9	5 min	60 min	<ul style="list-style-type: none"> • rapid breathing • Dark skin 	A dark red point lies scattered in the pulmonary whole

*Sustained urination was seen in all MMB administration rats.

MMB 投与後24時間時点での血液生化学的検査値は、i.p.と比べ s.c.で、AST が MMB Mid 群 (p = 0.0225)と High 群 (p = 0.0061)で高値を示した。また、ALT においても i.p.と比べ s.c.で MMB High 群(p = 0.0030)で高値を示した (Table 11)。血液学的検査値では、顕著な変化はみられなかった(Table 12)。その他の測定項目 (TG, TBIL, GLUC, K, RET) の一部にも統計学上の有意差が散見されたが、MMB 投与用量と関連性がみられなかったため、意義ある変化ではないと判断した。

Table 11. Changes of the blood biochemical parameters 24 hr after the MMB administration by i.p. and s.c. in rats.

Item	i.p.			s.c.		
	MMB Low (n = 3)	MMB Mid (n = 3)	MMB High (n = 3)	MMB Low (n = 3)	MMB Mid (n = 3)	MMB High (n = 2)
AST (U/l)	58.3 ± 10.4	57.0 ± 6.1	61.7 ± 6.4	64.3 ± 3.2	74.0 ± 5.3*	100.0 ± 1.4**
ALT (U/l)	24.7 ± 2.1	29.3 ± 2.1	29.0 ± 2.0	29.3 ± 2.1	39.3 ± 14.0	42.5 ± 0.7**
ALP (U/l)	748.0 ± 232.3	893.3 ± 88.0	858.3 ± 62.2	850.3 ± 228.3	778.3 ± 132.1	808.5 ± 198.7
LD (U/l)	209.7 ± 191.1	115.0 ± 57.5	154.0 ± 28.2	152.3 ± 71.6	264.3 ± 215.1	227.0 ± 144.2
CK (U/l)	295.0 ± 127.6	228.7 ± 78.5	258.3 ± 59.1	178.0 ± 47.3	242.7 ± 87.5	255.0 ± 134.4
TCHO (mg/dl)	74.7 ± 16.5	76.7 ± 11.7	66.7 ± 6.7	82.7 ± 7.1	65.0 ± 6.6	66.5 ± 13.4
TG (mg/dl)	119.7 ± 35.8	138.0 ± 16.1	61.3 ± 7.6	68.0 ± 18.2	51.3 ± 19.3**	72.0 ± 21.2
TBIL (mg/dl)	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.06 ± 0.01*	0.07 ± 0.01
BUN (mg/dl)	21.4 ± 5.2	19.7 ± 1.0	18.8 ± 0.8	20.5 ± 3.1	22.3 ± 6.0	17.2 ± 1.6
CRE (mg/dl)	0.26 ± 0.05	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.25 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.24 ± 0.04
GLUC (mg/dl)	164.7 ± 16.2	210.3 ± 13.7	200.7 ± 14.2	173.3 ± 7.6	158.7 ± 7.8**	174.0 ± 5.7
TP (mg/dl)	5.4 ± 0.1	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.1	5.6 ± 0.1	5.4 ± 0.2	5.4 ± 0.1
ALB (mg/dl)	3.9 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.9 ± 0.2	3.7 ± 0.0
IP (mg/dl)	7.8 ± 0.7	7.9 ± 0.3	7.9 ± 0.5	7.6 ± 0.6	7.8 ± 0.8	7.2 ± 0.1
Ca (mg/dl)	11.0 ± 0.1	10.7 ± 0.2	10.7 ± 0.1	10.9 ± 0.3	10.6 ± 0.4	10.5 ± 0.3
Na (mmol/l)	137.3 ± 0.6	137.0 ± 1.0	138.0 ± 0.0	138.3 ± 0.6	138.3 ± 1.5	138.0 ± 1.4
K (mmol/l)	4.7 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.2*	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.0
Cl (mmol/l)	101.3 ± 1.5	100.0 ± 1.0	102.0 ± 1.0	102.0 ± 1.7	103.0 ± 1.7*	103.5 ± 0.7

The value is mean MB administration by i.p. and s.c. in rats. ntact group was only done
the b : $p < 0.05$ vs. i.p. same dose. ** : $p < 0.01$ vs. i.p. same dose.

Table 12. Changes of the hematology parameters 24 hr after the MMB administration

by i.p. and s.c. in rats.

Item	i.p.			s.c.		
	MMB Low (n=3)	MMB Mid (n=3)	MMB High (n=3)	MMB Low (n=3)	MMB Mid (n=3)	MMB High (n=2)
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	5.8 ± 1.1	4.6 ± 0.5	4.6 ± 0.6	4.9 ± 0.8	4.4 ± 1.1	5.1 ± 0.8
RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	6.8 ± 0.1	6.7 ± 0.2	6.9 ± 0.4	6.6 ± 0.4	6.5 ± 0.0	6.6 ± 0.3
HGB (g/dl)	13.6 ± 0.7	13.3 ± 0.3	13.6 ± 0.5	13.8 ± 0.1	13.2 ± 0.1	13.1 ± 0.3
HCT (%)	39.5 ± 1.4	39.1 ± 0.7	39.7 ± 1.6	39.6 ± 0.2	38.8 ± 0.4	38.1 ± 0.0
MCV (fl)	58.4 ± 1.1	58.3 ± 1.0	57.7 ± 1.4	59.9 ± 3.2	59.3 ± 0.4	57.5 ± 2.5
MCH (pg)	20.1 ± 0.7	19.9 ± 0.3	19.7 ± 0.5	20.8 ± 1.1	20.2 ± 0.0	19.8 ± 0.5
MCHC (g/dl)	34.3 ± 0.6	34.1 ± 0.2	34.2 ± 0.1	34.8 ± 0.1	34.0 ± 0.3	34.4 ± 0.7
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	972 ± 60	999 ± 55	985 ± 51	1050 ± 109	1033 ± 13	1049 ± 101
NEUT (%)	11.4 ± 1.3	8.7 ± 2.2	10.9 ± 2.5	11.6 ± 1.0	17.9 ± 6.8	14.2 ± 8.3
LYMP (%)	85.5 ± 1.5	88.6 ± 2.7	87.1 ± 2.5	85.6 ± 1.1	79.5 ± 7.7	83.8 ± 8.3
MONO (%)	2.4 ± 0.2	2.1 ± 0.5	1.8 ± 0.3	2.3 ± 0.3	2.1 ± 0.7	1.4 ± 0.4
EO (%)	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.5 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.4
BASO (%)	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
NEUT($10^3/\mu\text{l}$)	0.66 ± 0.11	0.41 ± 0.15	0.50 ± 0.15	0.57 ± 0.12	0.78 ± 0.30	0.70 ± 0.31
LYMP ($10^3/\mu\text{l}$)	4.99 ± 0.98	4.09 ± 0.34	4.00 ± 0.52	4.18 ± 0.67	3.53 ± 1.05	4.34 ± 1.11
MONO ($10^3/\mu\text{l}$)	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.04	0.07 ± 0.03
EO ($10^3/\mu\text{l}$)	0.04 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.01
BASO ($10^3/\mu\text{l}$)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
RET (%)	7.92 ± 0.38	7.12 ± 1.14	7.44 ± 0.05	7.08 ± 0.15	7.57 ± 0.34	7.46 ± 0.80
RET($10^3/\mu\text{l}$)	536.0 ± 22.1	475.7 ± 62.7	511.7 ± 33.7	468.8 ± 16.1*	495.1 ± 21.5	493.5 ± 31.4

The value is mean B administration by i.p. and s.c. in rats. nontact group was only
 dontests.* : $p < 0.05$ vs. MMB same dose. ** : $P < 0.01$ vs. MMB same dose.

実験2：3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの変化

A) 3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの動物の状態、体重と摂餌への影響

実験1の結果より、安定して麻酔導入が可能な s.c.を選択し実験を実施した。麻酔は、全個体とも全ての観察ポイントで外科処置可能な麻酔深度であった。麻酔維持中の動物は、実験1と同様に MMB High 群で呼吸速迫や呼吸不整と血色の悪さが確認された(Table 13)。アチパメゾール投与後の動物の状態は、MMB Low 群では、MMB 投与後2時間の時点で異常はみられなかった。一方、MMB 投与後6時間の時点において、MMB Mid 群で2/8匹、MMB High 群で6/8匹に活動低下がみられた(Table 13)。

Table 13. Clinical observation of rats in each point after MMB administration.

	Intact (n = 8)	MMB Low (n = 8)	MMB Mid (n = 8)	MMB High (n = 8)	Ati (n = 8)
0 - 1 hr (Under anesthesia)*					
No abnormality	8	8	8	2	8
Rapid breathing	0	0	0	6	0
Irregular respiration	0	0	0	3	0
Deep respiration,	0	0	0	2	0
Dark skin	0	0	0	2	0
Piloerection	0	0	0	3	0
2 hr					
No abnormality	8	8	0	0	8
Lying down but normal activity	0	0	4	7	0
Low activity	0	0	4	1	0
4 hr					
No abnormality	8	8	0	0	8
Lying down but normal activity	0	0	8	1	0
Low activity	0	0	0	3	0
Lying down and immobility	0	0	0	4	0
Abnormal vocalization	0	0	0	1	0
6 hr					
No abnormality	8	8	3	0	8
Low activity	0	0	2	6	0
Abnormal vocalization	0	0	0	2	0
Low temperature	0	0	4	5	0
24 hr					
No abnormality	8	8	8	8	8
Necropsy					
Noparticular	8	8	8	6	8
A dark red point lies scattered in the pulmonary whole	0	0	0	2	0

*Sustained urination was seen in all MMB administration rats.

体重増加率の推移は、MMB 投与用量が高いほど、MMB 投与後24時間の時点で Ati 群と比べ低くなる傾向がみられた (Table 14)。MMB 投与後24時間で、Ati 群と比較して MMB Low 群 ($p = 0.0254$)、MMB Mid 群 ($p < 0.0001$)、MMB High 群 ($p < 0.0001$)で明らかな低値を示した(Fig. 1)。

Table 6. Changes of body weight levels of the MMB administration in rats.

Group	Intact (n = 8)	MMB Low (n = 8)	MMB Mid (n = 8)	MMB High (n = 8)	Ati (n = 8)
0 hr (g)	254.4 ± 11.1	257.3 ± 12.0	253.1 ± 12.6	256.7 ± 11.3	257.2 ± 9.8
2 hr (g)	246.7 ± 10.0	249.2 ± 10.9	244.8 ± 12.0	248.5 ± 10.9	250.5 ± 10.2
4 hr (g)	246.4 ± 10.7	245.5 ± 10.1	238.9 ± 12.3	244.1 ± 10.2	249.1 ± 9.3
6 hr (g)	244.6 ± 10.2	250.9 ± 11.9	237.9 ± 13.6	240.3 ± 10.4	247.5 ± 9.5
24 hr (g)	255.4 ± 10.9	254.3 ± 10.9	246.0 ± 11.8	248.9 ± 10.5	258.1 ± 8.8

The value is mean ± standard deviation.

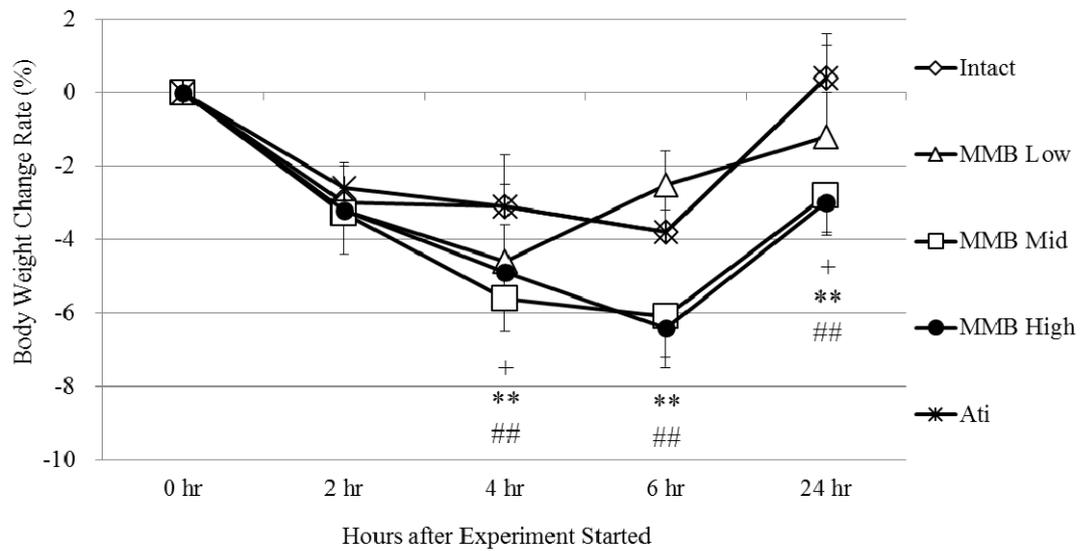


Fig. 1. The change rate of the body weight after the MMB administration. The value is mean one the blood sampling comparison tests. +: $p < 0.05$ MMB Low vs. Ati, **: $p < 0.01$ MMB Mid vs. Ati, ##: $p < 0.01$ MMB High vs. Ati.

また、摂餌量を確認したところ、MMB 投与後24時間で Ati 群と比較して MMB Low 群 ($p = 0.0337$)、MMB Mid 群 ($p < 0.0001$)と MMB High 群 ($p < 0.0001$)で、明らかな低値を示した(Fig. 2)。

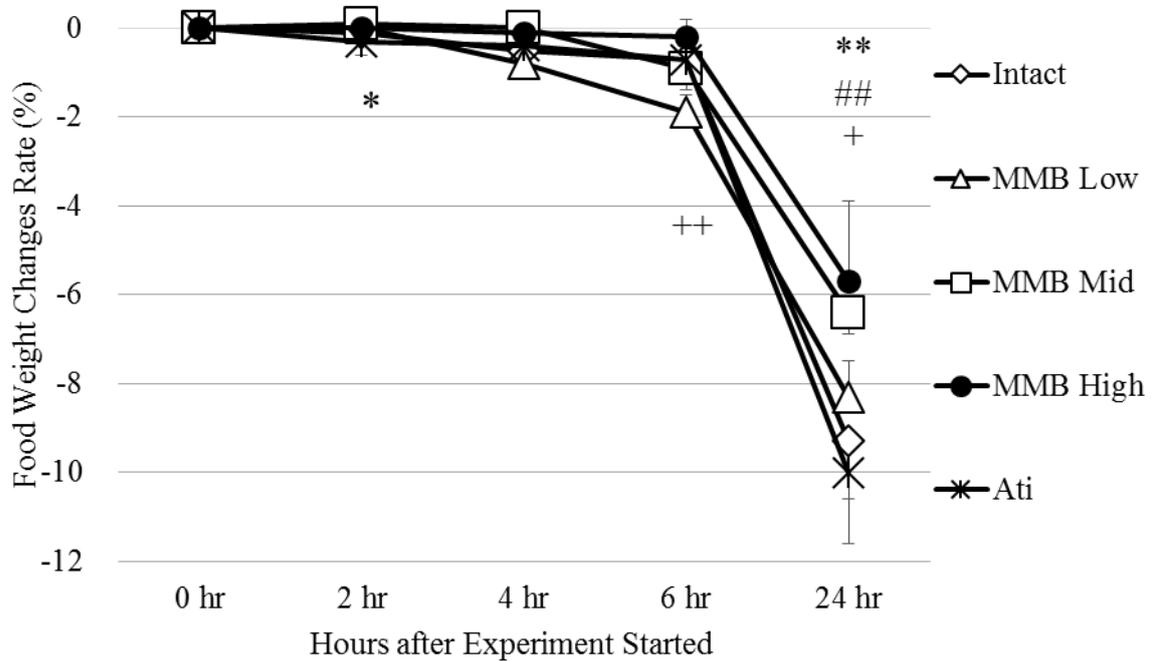


Fig. 2. The change rate of the food weight after the MMB administration. The value is mean one standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests. + : $p < 0.05$ MMB Low vs. Ati, ++: $p < 0.01$ MMB Low vs. Ati, *: $p < 0.05$ MMB Mid vs. Ati, **: $p < 0.01$ MMB Mid vs. Ati, ##: $p < 0.01$ MMB High vs. Ati.

剖検の結果、MMB High 群で2/8匹に肺左右両葉の暗赤色点の散在がみられた (Table 13)。肺に暗赤色点が見られた個体について病理組織学検査を実施した。その結果、肺の血管周囲に限局性の炎症細胞浸潤がみられた。また、限局性の肺胞空内への炎症性細胞の脱落がみられた (Fig. 3)。

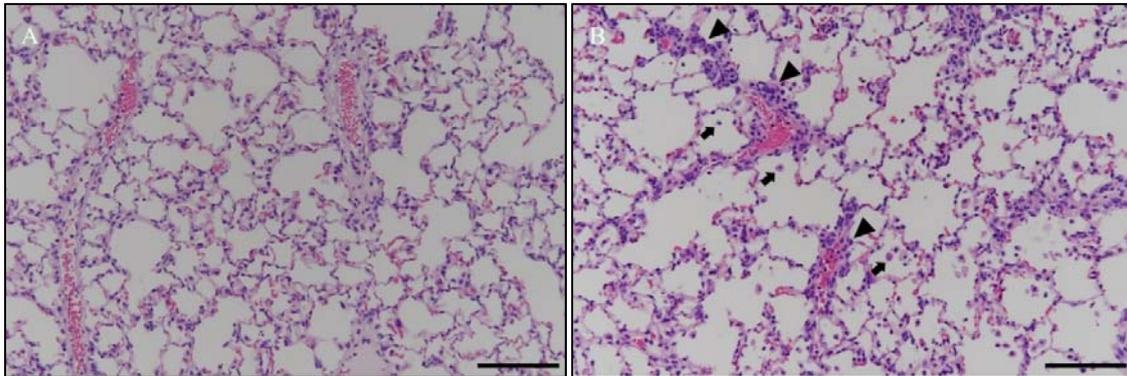


Fig.3. The pulmonary HE stain image of Ati group (A) and MMB High group (B), that was observed the dark red point lies scattered in the pulmonary whole. The focal inflammatory cells invasion around the blood vessels (arrowhead) and dropout into the alveo (arrow) in MMB High group. Bar, 10 μ m.

B) 3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血液生化学的検査値の変化

実験2の結果、MMB Low 群は、MMB 投与後1時間で GLUC の高値($p < 0.0001$)と BUN の高値 ($p = 0.0406$)を示した(Table 15)。また、MMB 投与後4時間で GLUC の高値($p < 0.0001$) を示した(Table 15)。

MMB Mid 群は、MMB 投与後1時間で、GLUC の高値($p < 0.0001$)と TP の低値 ($p = 0.0035$)を示した。また、MMB 投与後4時間で、GLUC の高値($p < 0.0001$) を示した(Table 15)。その他、MMB 投与後24時間で、AST の高値($p = 0.0083$) を示した(Table 15)。

MMB High 群は、MMB 投与後1時間で、GLUC の高値($p < 0.0001$)、BUN の高値 ($p = 0.0005$)と Cl の高値($p < 0.0001$)、TP の低値($p = 0.0035$)と ALB の低値傾向 ($p = 0.0627$)を示した(Table 7)。また、MMB 投与後4時間で、GLUC の高値($p < 0.0001$)と BUN の高値($p < 0.0001$) を示した(Table 15)。その他、MMB 投与後24時間で、AST の高値($p < 0.0001$)と ALT の高値($p = 0.0003$) を示した(Table 15)。

その他の測定項目 (TBIL、IP、Ca、TG、K、Cl) の一部にも統計学上の有意差が散見されたが、MMB 投与用量や時間変化と関連性がみられなかったため、意義ある変化ではないと判断した。

Table 15. Changes of blood biochemical parameters after the anesthetic administration in rats.

Item	Intact				MMB Low				MMB Mid			
	-24 hr (n=8)	1 hr (n=8)	4 hr (n=8)	24 hr (n=8)	-24 hr (n=8)	1 hr (n=8)	4 hr (n=8)	24 hr (n=8)	-24 hr (n=8)	1 hr (n=8)	4 hr (n=8)	24 hr (n=8)
AST (U/l)	80.3 ± 20.4	75.8 ± 16.6	86.5 ± 21.3	78.5 ± 20.5	70.3 ± 11.7	61.3 ± 12.6	73.1 ± 12.3	72.8 ± 15.6	71.8 ± 14.9	64.3 ± 12.8	76.5 ± 10.1	89.0 ± 17.4**
ALT (U/l)	34.3 ± 2.7	31.0 ± 3.7	35.5 ± 8.7	34.8 ± 4.9	31.5 ± 2.1	28.5 ± 3.7	29.6 ± 5.2	30.8 ± 3.4	32.0 ± 4.8	27.3 ± 4.9	29.3 ± 4.3	34.8 ± 4.7
ALP (U/l)	993.0 ± 191.1	931.8 ± 155.0	865.3 ± 162.6	882.5 ± 146.5	960.8 ± 205.2	902.3 ± 182.4	770.0 ± 189.9	876.0 ± 192.1	937.0 ± 183.9	864.8 ± 160.3	730.8 ± 133.3	786.5 ± 164.7
LD (U/l)	306.3 ± 141.5	287.5 ± 54.0**	211.0 ± 37.2	251.0 ± 152.7	303.0 ± 63.5	217.8 ± 60.5	387.0 ± 175.9	336.8 ± 187.1	246.8 ± 71.8	239.0 ± 43.7	321.0 ± 163.7	261.0 ± 162.7
CK (U/l)	455.5 ± 369.6	945.0 ± 862.4	593.8 ± 563.0	504.5 ± 318.7	398.8 ± 222.7	448.0 ± 149.8	545.3 ± 364.1	343.3 ± 251.0	253.0 ± 63.8	446.5 ± 174.8	625.8 ± 242.2	235.0 ± 37.0
TCHO (mg/dl)	68.3 ± 5.7	65.5 ± 7.2	61.8 ± 7.3	67.3 ± 6.4	75.0 ± 10.0	72.0 ± 8.7	73.3 ± 7.9	71.8 ± 8.8	69.3 ± 9.4	63.3 ± 10.0	67.8 ± 10.9	68.5 ± 10.9
TG (mg/dl)	143.0 ± 54.3	138.0 ± 56.1	134.0 ± 52.5	113.3 ± 48.9	172.5 ± 49.4	112.3 ± 33.7	148.0 ± 55.2	126.8 ± 29.6	141.3 ± 45.6	76.8 ± 27.9	120.0 ± 42.6	79.3 ± 28.0
TBIL (mg/dl)	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.07 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.06 ± 0.02	0.10 ± 0.04	0.09 ± 0.02**	0.10 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.02*
BUN (mg/dl)	19.2 ± 1.7	17.5 ± 1.9	15.3 ± 2.0	17.8 ± 1.7	19.1 ± 1.1	19.3 ± 1.8*	14.9 ± 1.8	19.2 ± 1.0	18.6 ± 2.6	18.0 ± 2.0	13.3 ± 2.4	17.9 ± 2.9
CRE (mg/dl)	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.23 ± 0.02	0.29 ± 0.01
GLUC (mg/dl)	149.8 ± 7.0	140.5 ± 16.9	138.5 ± 13.7	140.3 ± 17.2	148.0 ± 12.0	347.5 ± 20.7**	186.6 ± 15.9**	133.3 ± 7.1	143.3 ± 8.9	358.3 ± 21.3**	184.0 ± 13.0**	127.3 ± 8.3
TP (mg/dl)	6.1 ± 0.2	6.0 ± 0.2	5.8 ± 0.3	6.1 ± 0.1	6.1 ± 0.4	5.8 ± 0.2	5.9 ± 0.3	5.9 ± 0.2	6.0 ± 0.3	5.5 ± 0.21**	5.8 ± 0.3	5.8 ± 0.2
ALB (mg/dl)	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2	4.1 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.4 ± 0.3	4.1 ± 0.1	4.2 ± 0.2	4.3 ± 0.1	4.3 ± 0.3	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.1 ± 0.2
IP (mg/dl)	8.2 ± 0.5	7.9 ± 0.2	7.8 ± 0.3**	7.8 ± 0.5	8.2 ± 0.3	8.5 ± 0.26**	7.4 ± 0.3**	7.9 ± 0.5	7.8 ± 0.26*	8.0 ± 0.4	7.5 ± 0.5**	7.4 ± 0.4
Ca (mg/dl)	10.7 ± 0.3	10.4 ± 0.3	10.1 ± 0.4	10.4 ± 0.3	10.7 ± 0.5	10.4 ± 0.3	10.0 ± 0.4	10.4 ± 0.2	10.6 ± 0.3	10.0 ± 0.3*	10.3 ± 0.3	10.1 ± 0.2*
Na (mmol/l)	133.8 ± 2.7	134.3 ± 5.5	134.8 ± 4.5	133.8 ± 4.9	137.8 ± 2.9	133.3 ± 6.3	134.0 ± 6.8	136.3 ± 4.1	136.8 ± 3.0	130.3 ± 6.0	139.0 ± 3.5	134.8 ± 6.9
K (mmol/l)	5.7 ± 0.3**	5.8 ± 0.4**	5.2 ± 0.4	5.7 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.7 ± 0.3*	5.3 ± 0.5	5.8 ± 0.4	5.4 ± 0.2	5.5 ± 0.3	5.1 ± 0.2	5.5 ± 0.4
Cl (mmol/l)	99.8 ± 1.3*	99.3 ± 2.1	98.5 ± 3.0	98.8 ± 2.1	100.5 ± 0.9	98.5 ± 1.8	97.0 ± 4.4	100.8 ± 1.5	101.5 ± 1.8	94.8 ± 2.8**	100.0 ± 1.9	100.8 ± 1.8

Item	MMB High				Ati			
	-24 hr (n=8)	1 hr (n=8)	4 hr (n=8)	24 hr (n=8)	-24 hr (n=8)	1 hr (n=8)	4 hr (n=8)	24 hr (n=8)
AST (U/l)	72.5 ± 17.1	62.3 ± 5.9	84.4 ± 14.3	112.0 ± 6.7**	70.8 ± 7.3	67.8 ± 6.7	81.0 ± 8.5	65.0 ± 7.4
ALT (U/l)	30.5 ± 3.7	28.0 ± 4.1	38.4 ± 22.9	39.5 ± 5.0**	32.8 ± 4.9	30.3 ± 4.2	30.4 ± 3.8	29.5 ± 4.0
ALP (U/l)	1229.0 ± 209.3	1153.5 ± 222.2	918.4 ± 173.4	903.3 ± 92.2	1044.5 ± 230.6	988.5 ± 203.1	904.5 ± 188.0	944.0 ± 184.8
LD (U/l)	326.5 ± 284.1	236.5 ± 58.4	349.6 ± 189.4	344.5 ± 264.7	238.8 ± 93.7	189.5 ± 32.6	309.5 ± 108.8	228.8 ± 118.3
CK (U/l)	390.5 ± 228.3	576.3 ± 228.3	650.8 ± 228.5	466.3 ± 328.2	269.8 ± 119.8	446.3 ± 303.2	380.9 ± 149.0	462.8 ± 358.4
TCHO (mg/dl)	69.5 ± 14.3	63.5 ± 10.7	67.3 ± 13.2	68.0 ± 13.8	76.5 ± 10.2	71.0 ± 6.6	68.8 ± 7.8	73.0 ± 9.7
TG (mg/dl)	143.3 ± 49.3	79.0 ± 19.4	156.1 ± 59.2*	101.0 ± 47.5	136.8 ± 33.1	111.8 ± 28.2	88.8 ± 22.1	114.0 ± 20.5
TBIL (mg/dl)	0.11 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.02**	0.11 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.10 ± 0.04	0.07 ± 0.01
BUN (mg/dl)	20.0 ± 1.5	20.9 ± 1.2**	20.0 ± 4.5**	17.8 ± 2.1	18.6 ± 2.1	16.6 ± 2.9	13.3 ± 2.0	18.4 ± 2.3
CRE (mg/dl)	0.28 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.26 ± 0.01
GLUC (mg/dl)	142.5 ± 8.7	399.8 ± 13.8**	178.4 ± 10.6**	130.3 ± 7.5	138.8 ± 10.3	139.5 ± 5.8	126.0 ± 4.7	137.5 ± 5.8
TP (mg/dl)	6.1 ± 0.3	5.5 ± 0.34**	5.7 ± 0.1	5.7 ± 0.2	6.2 ± 0.3	5.9 ± 0.2	5.7 ± 0.2	5.9 ± 0.3
ALB (mg/dl)	4.4 ± 0.2	3.9 ± 0.3	4.0 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.2 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.2 ± 0.2
IP (mg/dl)	7.9 ± 0.6	8.6 ± 0.38**	7.9 ± 0.68*	7.0 ± 0.47**	8.3 ± 0.3	7.6 ± 0.5	8.6 ± 0.5	7.9 ± 0.3
Ca (mg/dl)	10.6 ± 0.3	10.2 ± 0.4	10.3 ± 0.2	10.0 ± 0.3**	10.8 ± 0.3	10.4 ± 0.3	10.1 ± 0.4	10.5 ± 0.4
Na (mmol/l)	136.3 ± 3.5	131.8 ± 4.8	141.0 ± 3.4	136.5 ± 4.2	136.8 ± 4.9	133.5 ± 4.9	135.6 ± 6.5	136.8 ± 4.3
K (mmol/l)	5.3 ± 0.2	5.7 ± 0.3*	5.2 ± 0.3	5.7 ± 0.3	5.2 ± 0.3	5.3 ± 0.4	5.1 ± 0.3	5.9 ± 0.4
Cl (mmol/l)	100.8 ± 1.8	95.8 ± 2.0**	99.6 ± 1.7	101.5 ± 0.9	102.0 ± 1.9	100.8 ± 1.0	100.1 ± 1.4	100.0 ± 1.5

The value is mean tic administration in rat A) and MMB High group (B), that was observed the dark red point lies scattered in : $p < 0.05$ vs. Ati, ** : $p < 0.01$ vs. Ati.

C) 3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血液学的検査値の変化

実験2の結果、MMB Low 群は、MMB 投与後4時間で WBC の低値($p = 0.0022$)、LYMP 実数の低値($p = 0.0001$) と HCT の高値($p = 0.0286$)を示した(Table 16-1、16-2)。

MMB Mid 群は、MMB 投与後1時間で HCT の高値($p < 0.0001$)、HGB の高値($p = 0.0039$) を示した(Table 16-1、16-2)。また、MMB 投与後4時間で WBC の低値($p = 0.0002$)、LYMP 実数の低値($p < 0.0001$)、HCT の高値($p = 0.0059$)と HGB の高値($p = 0.0184$) を示した(Table 16-1、16-2)。

MMB High 群は、MMB 投与後1時間で HCT の高値($p < 0.0001$)、HGB の高値($p < 0.0001$) を示した(Table 16-1、16-2)。また、MMB 投与後4時間で WBC の低値($p = 0.0001$)、LYMP 実数の低値($p < 0.0001$)、HCT の高値($p < 0.0001$)と HGB の高値($p < 0.0001$)を示した(Table 16-1、16-2)。

その他の項目(EO、MONO、MCHC)にも統計学上の有意差が散見されたが、投与用量や時間変化との関連性がみられなかったため、意義ある変化ではないと判断した。

Table 16-1. Changes of the hematology parameters after the anesthetic administration in rats.

Item	Intact				MMB Low				MMB Mid			
	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr
WBC (10 ⁹ /μL)	7.3 ± 0.9	7.2 ± 1.5	7.7 ± 1.4	7.5 ± 2.0	8.6 ± 0.9	6.8 ± 0.7	5.3 ± 1.3**	8.3 ± 1.2	7.9 ± 1.8	6.5 ± 1.8	4.8 ± 1.6**	8.0 ± 1.5
RBC (10 ⁹ /μL)	7.4 ± 0.6	7.3 ± 0.4*	7.0 ± 0.4	6.8 ± 0.2	7.0 ± 0.3	6.9 ± 0.2	7.2 ± 0.2	6.6 ± 0.2	7.3 ± 0.6	7.3 ± 0.3*	7.3 ± 0.2*	6.8 ± 0.2
HGB (g/dL)	14.4 ± 0.9	14.2 ± 0.4*	13.8 ± 0.5	13.4 ± 0.4	14.0 ± 0.8	13.8 ± 0.4	14.3 ± 0.4	13.1 ± 0.3	14.4 ± 1.1	14.4 ± 0.3**	14.4 ± 0.6*	13.5 ± 0.3
HCT (%)	41.7 ± 2.4	41.4 ± 1.3	40.2 ± 1.5	39.6 ± 1.2	40.9 ± 2.1	41.3 ± 1.3	42.3 ± 1.6*	38.9 ± 0.9	42.0 ± 2.7	43.5 ± 0.8**	42.7 ± 1.4**	39.8 ± 1.1
MCV (fL)	56.2 ± 2.0	56.9 ± 2.1	57.1 ± 2.5	57.9 ± 2.5	58.6 ± 1.3	59.6 ± 2.1	58.6 ± 1.9	58.8 ± 1.8	58.0 ± 2.7	59.5 ± 2.7	58.5 ± 2.5	58.4 ± 2.5
MCH (pg)	19.3 ± 0.6	19.6 ± 0.6	19.6 ± 0.7	19.6 ± 0.7	20.0 ± 0.5	19.9 ± 0.6	19.8 ± 0.6	19.9 ± 0.6	19.8 ± 0.7	19.7 ± 0.8	19.7 ± 0.7	19.7 ± 0.7
MCHC (g/dL)	34.4 ± 0.5	34.4 ± 0.4	34.3 ± 0.4	33.8 ± 0.6	34.2 ± 0.4	33.4 ± 0.4**	33.8 ± 0.3	33.8 ± 0.3	34.1 ± 0.7	33.1 ± 0.3**	33.7 ± 0.4	33.8 ± 0.4
PLT (10 ⁹ /μL)	1102 ± 96	1128 ± 214	1127 ± 181	1166 ± 176	1071 ± 82	1122 ± 83	1215 ± 94	1165 ± 100	949 ± 128	990 ± 129	1089 ± 118	1022 ± 138
NEUT (%)	16.0 ± 4.0	14.9 ± 5.8	17.3 ± 5.3	18.0 ± 5.2	17.0 ± 7.2	16.4 ± 9.6	24.9 ± 10.1	16.9 ± 8.4	14.6 ± 4.7	17.9 ± 10.0	31.3 ± 9.6*	18.0 ± 7.0
LYMP (%)	80.3 ± 4.8	82.0 ± 6.4	79.0 ± 5.8	78.7 ± 5.8	79.9 ± 7.3	80.7 ± 9.7	72.0 ± 9.9	80.0 ± 8.6	82.3 ± 5.3	79.7 ± 10.2	64.6 ± 9.4*	79.0 ± 7.5
MONO (%)	2.9 ± 0.9	2.5 ± 0.7	3.2 ± 1.2	2.5 ± 0.9	2.6 ± 0.5	2.4 ± 0.5	2.8 ± 0.6*	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.8	2.0 ± 0.4	3.6 ± 0.8	2.5 ± 0.6
EO (%)	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.4 ± 0.4	0.5 ± 0.2	0.2 ± 0.1**	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.4 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.2
BASO (%)	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1
NEUT(10 ⁹ /μL)	1.15 ± 0.24	1.02 ± 0.26	1.30 ± 0.27	1.29 ± 0.30	1.49 ± 0.73	1.15 ± 0.79	1.40 ± 0.97	1.43 ± 0.87	1.12 ± 0.33	1.26 ± 1.11	1.56 ± 1.02	1.47 ± 0.81
LYMP (10 ⁹ /μL)	5.89 ± 0.98	5.95 ± 1.55	6.15 ± 1.40	5.99 ± 2.02	6.84 ± 0.74	5.41 ± 0.47	3.69 ± 0.45**	6.56 ± 0.88	6.54 ± 1.70	5.13 ± 1.14	3.00 ± 0.73**	6.27 ± 1.09
MONO (10 ⁹ /μL)	0.21 ± 0.06	0.17 ± 0.04	0.24 ± 0.08	0.18 ± 0.05	0.22 ± 0.06	0.16 ± 0.04	0.15 ± 0.05*	0.22 ± 0.05	0.20 ± 0.07	0.13 ± 0.04	0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.07
EO (10 ⁹ /μL)	0.06 ± 0.03	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.04 ± 0.03	0.03 ± 0.02	0.01 ± 0.00**	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02
BASO (10 ⁹ /μL)	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
RET (%)	9.11 ± 0.72	8.90 ± 0.96	8.76 ± 0.93	9.42 ± 0.85	9.37 ± 0.67	8.76 ± 0.55	9.07 ± 0.60	9.81 ± 0.80	9.01 ± 1.37	8.39 ± 1.65	8.58 ± 1.52	9.01 ± 1.45
RET (10 ⁹ /μL)	676.6 ± 69.7	647.4 ± 66.2	616.4 ± 62.2	643.4 ± 48.5	654.6 ± 68.9	607.4 ± 29.9	654.3 ± 44.0	648.0 ± 50.7	652.2 ± 102.8	612.3 ± 106.5	624.5 ± 94.1	613.3 ± 84.5

The value is mean ic administration in rattA) and MMB High group (B), that was observed the dark red point lies scattered i : $p < 0.05$ vs. Ati, ** : $p < 0.01$ vs. Ati. All piont of items were basically $n = 8$ because all group had 8 rats. But some of samples were no data because of the fault of sampling. So PLT at - 24 hr point of all groups was $n = 4$. And all items of Intact group were $n = 7$, besides PLT. All items of MMB Low group were $n = 6$, besides PLT.

Table 16-2. Changes of the hematology level parameters after the anesthetic administration in rats.

Item	MMB High				Ati			
	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr
WBC (10 ³ /μL)	7.4 ± 1.7	5.8 ± 1.1	4.6 ± 1.0**	7.7 ± 1.4	8.4 ± 1.8	6.2 ± 1.3	7.7 ± 1.2	7.4 ± 1.4
RBC (10 ⁶ /μL)	7.4 ± 0.4	7.5 ± 0.2**	7.8 ± 0.2**	6.7 ± 0.2	7.2 ± 0.4	6.9 ± 0.2	7.0 ± 0.1	6.6 ± 0.4
HGB (g/dL)	14.6 ± 0.6	14.8 ± 0.5**	15.2 ± 0.6**	13.2 ± 0.4	14.2 ± 0.6	13.7 ± 0.5	13.7 ± 0.3	13.2 ± 0.6
HCT (%)	42.6 ± 1.6	45.0 ± 1.4**	45.6 ± 2.1**	39.2 ± 1.4	41.3 ± 1.6	40.1 ± 1.1	40.1 ± 0.8	39.0 ± 2.0
MCV (fL)	57.7 ± 1.9	59.7 ± 1.5	58.5 ± 1.7	58.4 ± 1.7	57.5 ± 1.7	57.9 ± 1.7	57.6 ± 1.5	58.8 ± 1.9
MCH (pg)	19.8 ± 0.6	19.6 ± 0.6	19.5 ± 0.5	19.7 ± 0.6	19.7 ± 0.5	19.8 ± 0.6	19.6 ± 0.5	19.8 ± 0.6
MCHC (g/dL)	34.2 ± 0.3	32.9 ± 0.3**	33.4 ± 0.4**	33.7 ± 0.5	34.3 ± 0.3	34.1 ± 0.4	34.1 ± 0.3	33.8 ± 0.5
PLT (10 ³ /μL)	978 ± 101	1074 ± 169	1125 ± 168	1094 ± 193	1089 ± 80	1097 ± 71	1132 ± 66	1159 ± 75
NEUT (%)	13.0 ± 3.2	12.3 ± 2.9	29.4 ± 10.6*	20.9 ± 4.1	16.7 ± 4.4	18.3 ± 4.9	18.7 ± 4.0	17.2 ± 4.3
LYMP (%)	83.7 ± 3.6	85.4 ± 2.9	66.0 ± 11.1*	76.2 ± 4.3	80.2 ± 5.0	78.9 ± 5.2	77.7 ± 4.0	79.5 ± 5.0
MONO (%)	2.7 ± 0.8	1.7 ± 0.5	4.2 ± 1.2	2.3 ± 0.5	2.4 ± 0.4	2.1 ± 0.7	3.1 ± 0.6	2.6 ± 0.6
EO (%)	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.4 ± 0.1**	0.6 ± 0.2	0.7 ± 0.4	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	0.7 ± 0.3
BASO (%)	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.1	0.0 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1
NEUT (10 ³ /μL)	0.96 ± 0.28	0.73 ± 0.25	1.32 ± 0.51	1.58 ± 0.38	1.41 ± 0.51	1.18 ± 0.54	1.46 ± 0.47	1.28 ± 0.38
LYMP (10 ³ /μL)	6.24 ± 1.59	4.98 ± 0.90	3.08 ± 1.09**	5.84 ± 1.19	6.74 ± 1.45	4.89 ± 0.84	5.96 ± 0.82	5.85 ± 1.19
MONO (10 ³ /μL)	0.19 ± 0.03	0.10 ± 0.03	0.20 ± 0.07	0.18 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.13 ± 0.06	0.24 ± 0.03	0.19 ± 0.05
EO (10 ³ /μL)	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01**	0.05 ± 0.01	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.04 ± 0.02	0.05 ± 0.02
BASO (10 ³ /μL)	0.00 ± 0.01	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.01
RET (%)	9.04 ± 1.54	8.56 ± 0.83	8.75 ± 1.07	9.16 ± 1.26	9.09 ± 0.76	8.99 ± 0.72	8.99 ± 0.78	9.27 ± 0.92
RET (10 ⁹ /μL)	671.0 ± 141.8	644.8 ± 57.9	681.0 ± 83.3	615.2 ± 83.1	654.2 ± 69.1	621.5 ± 41.1	625.9 ± 47.7	614.3 ± 62.9

The value is mean a standard deviation. The statistics processing uses the parametric Dunnett's multiple comparison tests.* : $p < 0.05$ vs. Ati, ** : $p < 0.01$ vs. Ati. All piont of items were basically $n = 8$ because all group had 8 rats. But some of samples were no data because of the fault of sampling. So PLT at - 24 hr point of all groups was $n = 4$. And all items of Intact group were $n = 7$, besides PLT. All items of MMB Low group were $n = 6$, besides PLT.

D) 3種混合麻酔皮下投与後の経過時間ごとの血中インスリン濃度変化

実験2の結果、MMB Low 群は、MMB 投与後1時間で低値 ($p = 0.0003$)となり、MMB 投与後4時間で高値($p = 0.0089$)を示した(Table 17)。MMB Mid 群と MMB High 群は、MMB 投与後1時間で低値($p < 0.0001$)を示した(Table 17)。MMB 投与後24 hr の時点では、全群とも A1c 群と同程度の値であった(Table 17)。

Table 17. Changes in insulin and GLUC levels 1, 4, 24 hr after MMB administration in rats.

Item	Intact				MMB Low			
	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr
GLUC (mg/dl)	149.8 ± 7.0	140.5 ± 16.9	138.5 ± 13.7	140.3 ± 17.2	148.0 ± 12.0	347.5 ± 20.7**	186.6 ± 15.9**	133.3 ± 7.1
Insuline (ng / ml)	1.7 ± 0.4	1.8 ± 0.7	1.6 ± 0.3	2.0 ± 0.9	1.6 ± 0.6	0.8 ± 0.3**	2.5 ± 0.9**	1.8 ± 0.7
Item	MMB Mid				MMB High			
	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr
GLUC (mg/dl)	143.3 ± 8.9	358.3 ± 21.3**	184.0 ± 13.0**	127.3 ± 8.3	142.5 ± 8.7	399.8 ± 13.8**	178.4 ± 10.6**	130.3 ± 7.5
Insuline (ng / ml)	1.6 ± 0.7	0.7 ± 0.2**	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.4	1.4 ± 0.6	0.7 ± 0.2**	1.8 ± 0.5	1.4 ± 0.2
Item	Ati							
	-24 hr	1 hr	4 hr	24 hr				
GLUC (mg/dl)	138.8 ± 10.3	139.5 ± 5.8	126.0 ± 4.7	137.5 ± 5.8				
Insuline (ng / ml)	1.3 ± 0.3	2.0 ± 0.6	1.5 ± 0.5	1.7 ± 0.7				

The value is mean trationUC levels 1, 4, 24 hrally n = 8 because all group had 8 rats. But some of samples were no data bec : p < 0.05 vs. Ati, ** : p < 0.01 vs. Ati. All point of items were basically n = 8 because all group had 8 rats. But some of samples were no data because of the fault of sampling. So insulin of MMB Low, Mid, High and Ati group was n = 7.

IV. 考察

本章では、ラットにおける外科処置可能な最適用量と、投与後の経過時間毎の血液生化学的検査値、及び血液学的検査値を確認した。実験1は、MMB投与ルートと麻酔導入/持続時間とラットの状態変化の確認を実施した。実験2-A)では、s.c.投与後の経過時間ごとのラットの体重と摂餌への影響を確認した。実験2-B)では、MMB投与後の経過時間ごとの血液生化学的検査値の変化を確認した。また、実験2-C)では、MMB投与後の経過時間ごとの血液学的検査値の変化を確認した。最後に、実験2-D)では、MMB投与後の経過時間ごとの血中インスリン濃度変化を確認した。以上の実験により、ラットにおける外科処置可能なMMB投与用量と、MMB投与による体重・摂餌量と血液生化学的検査値、血液学的検査値の変化項目と、変化の持続期間を明確にした。

実験1の結果から、s.c.と比較してi.p.は全投与用量において麻酔導入時間が5~10分の間でばらついた。また、MMB Low群で1匹、麻酔導入しなかった個体や、投与後1時間の時点でアチパメゾールを投与した際、疼痛反応を示した個体が確認された。以上の結果から、i.p.と比較してs.c.の方が安定した麻酔導入を得られると考えた。

麻酔維持中の動物の状態については、MMB High群でi.p.とs.c.双方で呼吸速迫や血色の悪さが確認された。また、i.p.ではMMB Mid群でも1匹、呼吸速迫を示した個体を確認した。剖検所見では、i.p.では異常が見られなかったが、s.c.でMMB High群で1匹死亡し、別の個体で1匹の肺に暗赤色点を確認された。以上のことからMMB High群はi.p.とs.c.どちらにおいても過剰量であると考えられた。i.p.とs.c.のMMB投与後24時間の血液生化学的検査値と血液学的検査値の結果を比較したところ、s.c.のASTとALTがやや高値を示したが、剖検所見では肝臓に所見は見られなかった。麻酔導入の安定性とMMB Low群とMMB Mid群での麻酔維持中の安定した状態から、s.c.を実験2の投与ルートに選択した。

実験2の結果、MMB投与後、MMB Mid群とMMB High群で継続的な体重低下傾向が見られた(Table 14)。また、体重増加率で見た場合、MMB投与用量に応じた体重増加抑制がMMB Low群、MMB Mid群とMMB High群で見られた(Fig. 1)。この原因は、観察所見と摂餌量から、覚醒後の活動性の回復時期の差と考えられた(Table 13, Fig. 2)。

観察所見ではMMB Low群は、MMB投与後2時間の時点で全頭の活動性に異常はない。しかし、MMB Mid群はMMB投与後6時間の時点で2/8匹、MMB High群は6/8匹に活動低下が見られている(Table 13)。ミダゾラムの投与用量と活動低下の持続時期が相関していることから、覚醒後の活動低下は、アチパメゾールにより拮抗されないミダゾラムの作用によるものと考えられた。また、活動性の回復後に摂餌を開始したため、MMB投与後24時間時点での各群の摂餌量に差が生じていたと思われる。この摂餌量の差が、体重増加率の違いを引き起こしたと考える。

覚醒後の活動低下により摂餌が出来なかったため、その間は絶食状態であったと考

えられる。また、絶食は、飲水行動を抑制し脱水を引き起こすことが報告されている[20, 27, 28, 38]。この絶食と脱水が、血液生化学的検査値と血液学的検査値に影響を及ぼしたと思われた。ミダゾラムによる活動低下が引き起こした絶食と脱水の影響は、WBCの低値とHCTとHGBの高値を引き起こしたと思われた[4, 20, 27, 28, 38, 45]。今回のWBCの減少は、MMB Low群からHigh群まで同程度の値まで一律に低下したことから、MMBの薬理作用によるものと考えられた。また、MMB薬理作用が原因とする根拠の一つとして、牛に対してミダゾラムに投与により、一過性にWBCが減少したことが報告されている[31]。今回の結果と過去の報告から、ミダゾラムあるいは、MMB投与によりWBCが低下した可能性が考えられる。また、検討結果では、主にLYMP実数の減少が確認されたが、その理由は不明である。TPとALBの低値と、BUNの高値は、絶食の影響によるものと考えられた[7, 20, 27]。MMB投与後24時間におけるMMB High群のASTとALTの高値は不明であるが、剖検所見で肝臓には、異常は見られなかった。また、MMB Mid群もASTの高値が見られたが、原因は不明である。

MMB High群のみで確認された肺の暗赤色点は、麻酔中の所見から、体循環と呼吸への影響によるものと思われた。病理組織検査で確認された、肺における炎症性細胞の血管周囲への浸潤と肺胞内への脱落病変が限局性であることから、投与薬剤による血行を介した全身的な薬理作用による変化ではないと考えられた。また、麻酔維持中にMMB High群において呼吸異常の所見がみられていることから、呼吸異常を原因とした障害の可能性があると考えた(Fig. 3)。MMBは、ラットにおいて心拍数と血中の酸素飽和度を減少させることが報告されている[23]。今回、MMB High群で確認された呼吸異常や肺の暗赤色点は、MMB投与用量が過剰であった結果と考えられた。

MMB投与全個体において、MMB投与後1時間と4時間の時点でGLUCの高値を確認した。これは、構成薬剤の中にある $\alpha 2$ 受容体作動薬（メデトミジン）のインスリン分泌抑制作用と細胞膜のATP感受性カリウムイオンチャネルの閉鎖抑制作用によるためであり、マウスの検討においても、同様の結果を得ている[5, 6, 15, 17, 22, 32, 52]。 $\alpha 2$ 受容体作用薬は、膵臓 β 細胞の $\alpha 2$ 受容体を刺激し、インスリン分泌を抑制する[3]。また、 $\alpha 2$ 受容体作動薬の作用は、アチパメゾール投与により解除されるとの報告がある[2, 34]。実際、血中インスリン濃度は、MMB投与後1時間の時点でMMB投与個体全個体が低値を示したが、MMB投与後4時間の時点では、MMB Low群がAti群より高値であり、MMB Mid群とHigh群は、Ati群と同程度の値となっていた (Table 17)。アチパメゾールは、投与用量が多いほど、速やかに血中インスリン濃度が上昇することが報告されている[2]。報告によると、血中インスリン濃度の上昇は最大でもメデトミジン投与前の1.5倍程度である。また、数時間でメデトミジン投与前と同程度の値となることから、急激なインスリン上昇による低血糖のリスクはないと考えられた[2]。

今回の検討で、MMB Mid群とMMB Low群は、一過性に一部の血液生化学的検査値

と血液学的検査値の変化を引き起こすが、MMB 投与後24時間の時点では改善している。また、体重増加に影響が出たが、MMB 投与後24時間時点での観察所見、及び剖検所見に異常がないことから、生体への影響は小さいと考察した。MMB High 群は、麻酔維持中の観察所見と剖検時に肺に異常がみられたことから、過剰量と考えられた。以上のことから、ラットへの MMB 推奨投与用量は、MMB Low: 0.15/2.0/2.5 mg/kg であり、投与限界量は MMB Mid: 0.3/4.0/5.0 mg/kg であると思われた。マウスよりも推奨投与用量が少ない理由は本実験でははっきりしなかったが、他のバランス麻酔薬であるケタミン/キシラジンの推奨投与用量が、ラット: 75/0.5 mg/kg でありマウス: 75/1.0 mg/kg であることから、少なくとも $\alpha 2$ 受容体作動薬に対する感受性は、ラットの方がマウスよりも高いことが関係していると考えられた[16]。

治療を目的とした臨床での麻酔利用とは異なり、実験動物における麻酔利用は、実験データにどのような影響があるかを把握しておくことが重要となる。今回の検討は、我々が日常、実験に用いている麻酔薬や鎮痛薬が実験データとしてよく用いられる体重、摂餌、血液生化学的検査値と血液学的検査値の変動を引き起こす可能性があることを示唆している。動物実験を行う際には、使用する麻酔薬の特性を事前に確認しておくことが重要である。

V. 小 括

今回、新しい実験動物用注射麻酔として、3 種混合麻酔薬 (MMB) の有用性を評価した。まず、ラットに対し MMB を 0.15/2.0/2.5 mg/kg、0.3/4.0/5.0 mg/kg と 0.6/8.0/10.0 mg/kg の3投与用量を腹腔内と皮下の2つの投与ルートに分け、麻酔導入時間と血液学的検査値及び血液生化学的検査値への影響を比較した。その結果、皮下投与の方が、腹腔内投与と比べ、安定した麻酔導入を得られた。そこで、投与ルートを皮下投与にし、実験2を実施した。実験2は、MMB を投与後、1時間で Ati 投与し覚醒させ、投与後1、4、24時間の血液学的検査値と血液生化学的検査値を測定した。また、体重、摂餌量と状態観察を MMB 投与後0、2、4、6、24時間のタイミングで実施した。その結果、MMB 投与用量依存的に、GLUC、HCT、HGB の一過性の上昇を確認した。また、TP と WBC の一過性の減少を確認した。その他、体重と摂餌量の低下がみられました。結論として、MMB 0.3/4.0/5.0 mg/kg と 0.6/8.0/10.0 mg/kg は、一部の血液学的検査値と血液生化学的検査値に大きな変化を引き起こし、体重と摂餌量は、投与後24時間の時点でも低値を確認できた。一方、MMB 0.15/2.0/2.5 mg/kg は、体重のみ投与後24時間で低値を示したが、その他の項目は、Ati 群と同程度にまで回復しており、剖検時にも異常所見がみられないことから、生体への影響は、小さいと考察した。本実験で確認された MMB による血液生化学値の変化は、動物実験の血液生化学値の解釈に影響する可能性がある。実験動物に適用する麻酔薬は、その薬理学的特徴を把握したうえで使用することを推奨する

総括

今日、我々が医学研究に実験動物を使用する際には、動物福祉の観点から動物が苦痛を受けないよう、麻酔薬や鎮痛剤を使用することが必要とされる。全身麻酔には、注射麻酔と吸入麻酔の2種類の方法がある。注射麻酔は、吸入麻酔のような専用の装置を必要とせず、実験室スペースや機器の台数に制限されず、麻酔実施が可能である。しかし、麻酔時間の延長や深度調節を吸入麻酔のように細かく調整することが出来ないことや、麻酔効果に個体差があるため一部の個体にとって過量や不十分な用量になる可能性がある。吸入麻酔は、専用の気化器を用いキャリアガスと共に気道を介して動物に供給され、迅速に麻酔導入しほとんどが呼吸により短時間に生体から除去される。また、麻酔濃度を動物毎に簡単に調整することができる。そのため、動物のバイタルサインと麻酔深度が適切に維持されている限り、死亡する危険性は低い。しかし、吸入麻酔装置の性能上、麻酔装置1台に対して数匹の麻酔維持が限界のため、実験動物の使用個体数が制限される。そのため、イソフルラン麻酔を用いた大規模実験は、吸入麻酔装置の台数や実験室スペースによる制限を受ける。以上のことから、使用にあたっての制限が低く、かつ、拮抗薬投与により麻酔深度を調節することが可能な新しい注射麻酔薬が求められている。本研究は、新たな実験動物用注射麻酔として注目されている、MMBのげっ歯類における投与後の影響を評価した。

第1章では、マウスに対しMMB投与後1、4、24時間で剖検を実施し、各ポイントでの血液生化学的検査値を調べた。また、MMB投与群の血液生化学的検査値の変化を、イソフルラン群、及び他の注射麻酔群（ペントバルビタール、ケタミン/キシラジン）と比較した。

マウスに対しMMB 0.45/6.0/7.5 mg/kg 及び 0.9/12.0/15.0 mg/kg を s.c.投与し、外科処置可能な麻酔深度に達したことを確認した。マウスは、MMB投与後1時間経過した時点でアチパメゾールを投与し覚醒させた。MMB投与後1、4、24時間後の血液生化学的検査値を測定した結果、GLUC、CK、IP、K、の一過性の上昇が確認された。これらの血液生化学的検査値の変化は、投与後24時間後で基準範囲内に戻った。MMBは、マウスの一部の血液生化学的検査値に影響するが可逆的な変化であり、剖検時にも異常所見がみられないことから、生体への影響は小さいと考察した。

第2章では、ラットに対しMMB投与後1、4、24時間で採血を実施し、経過時間毎の血液学的検査値、及び血液生化学的検査値の推移を確認した。ラットに対しMMBを0.15/2.0/2.5 mg/kg、0.3/4.0/5.0 mg/kg と0.6/8.0/10.0 mg/kgの3投与用量をi.p.とs.c.の2つの投与ルートに分け、麻酔導入時間と血液学的検査値及び血液生化学的検査値への影響を比較した。その結果、s.c.投与の方がi.p.投与と比較し、安定した麻酔導入を得られた。そこで、投与ルートをs.c.投与に決定し、実験2を実施した。実験2は、MMB投与後1時間経過後にアチパメゾール投与し覚醒させ、投与後1、4、24時間の血液学的検査値と血液生化学的検査値を測定した。また、体重、摂餌量と状態観察を

MMB 投与後 0、2、4、6、24 時間のタイミングで実施した。その結果、MMB 投与用量依存的に、GLUC、HCT、HGB の一過性の上昇し、TP と WBC の一過性の減少を確認した。その他、体重と摂餌量の低下がみられた。結論として、MMB 0.3/4.0/5.0 mg/kg と 0.6/8.0/10.0 mg/kg は、一部の血液学的検査値(WBC、HCT、HGB)と血液生化学的検査値(GLUC、TP)に大きな変化を引き起こし、体重と摂餌量が投与後 24 時間の時点でも低値のままであった。一方、MMB 0.15/2.0/2.5 mg/kg は、今回検討した MMB 投与用量の中で最も変化が小さく、体重のみ投与後 24 時間で低値を示したが、その他の項目は、Ati 群と同程度にまで回復しており、剖検時にも異常所見がみられないため生体への影響が小さいと考察した。

以上の結果から、マウスは MMB 0.45/6.0/7.5 mg/kg 及び 0.9/12.0/15.0 mg/kg、ラットは 0.15/2.0/2.5 mg/kg を s.c.投与し、アチパメゾール投与により 1 時間で覚醒させる条件においては、一部の血液生化的検査値と、血液学的検査値や体重に一過性に影響するが、生体への影響が小さく、実験に適した投与用量であると考えられる。

謝辞

本研究の遂行と本論文の作成にあたり、終始ご指導及びご校閲を賜りました酪農学園大学 獣医学研究科 基礎獣医学 生体機能学 獣医生化学研究室 横田博教授と岩野英知教授、酪農学園大学 獣医学研究科 臨床獣医学 伴侶動物医療学 獣医麻酔学研究室 山下和人教授、酪農学園大学 獣医学研究科 基礎獣医学 生体機能学 獣医薬理学研究室 北澤多喜雄教授に深く感謝いたします。また、実験実施にご協力いただき、議論を通じて多くの知識や示唆をいただいた中外製薬株式会社及び、株式会社中外医科学研究所の皆様には感謝いたします。

引用文献

1. Alves, H. C., Valentim, A. M., Olsson, I. A. and Antunes, L. M. 2007. Intraperitoneal propofol and propofol fentanyl, sufentanil and remifentanil combinations for mouse anesthesia. *Lab. Anim.* **41**: 329-336.
2. Ambrisko, T. D. and Hikasa, Y. 2003. The antagonistic effects of atipamezole and yohimbine on stress-related neurohormonal and metabolic responses induced by medetomidine in dogs. *Can. J. Vet. Res.* **67**: 64-67.
3. Angel, I., Bidet, S. and Langer, S. Z. 1988. Pharmacological characterization of the hyperglycemia induced by alpha-2 adrenoceptor agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **246**: 1098-1103.
4. Apostolou, A., Saidt, L. and Brown, WR. 1976. Effect of overnight fasting of young rats

- on water consumption, body weight, blood sampling, and blood composition. *Lab. Anim. Sci.* **26**:959-960.
5. Arakawa, H., Matumoto, H. and Katou, T. 2012. Neuroleptoanalgesia using a drug combination of medetomidine, midazolam, and butorphanol in mice. *J. Exp. Anim. Tech.* **47**: 65-72.
 6. Arras, M., Autenried, P., Rettich, A., Spaeni, D. and Rulicke, T. 2001. Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp. Med.* **51**: 443-456.
 7. Asakawa, K., Hizuka, N., Takano, K., Horikawa, R., Sukegawa, I., Demura, H. and Shizume, K. 1992. Effects of insulin-like growth factor I or human growth hormone in fasted rats. *Growth Regul.* **2**: 40-44.
 8. Bekkevold, CM., Robertson, KL., Reinhard, MK., Battles, AH. and Rowland, NE. 2013. Dehydration parameters and standards for laboratory mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* **52**: 233-239.
 9. Boehm, O., Zur, B., Koch, A., Tran, N., Freyenhagen, R., Hartmann, M. and Zacharowski, K. 2007. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol. Chem.* **388**: 547-554.
 10. Burton, S. A., Lemke, K. A., Ihle, S. L. and Mackenzie, A. L. 1997. Effects of medetomidine on serum insulin and plasma glucose concentrations in clinically normal dogs. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 1440-1442.
 11. Constantinides, C., Mean R. and Janssen, B. J. 2011. Effects of Isoflurane Anesthesia on the Cardiovascular Function of the C57BL/6 Mouse. *ILAR. J.* **52**: e21-e31.
 12. Cruz, J. I., Loste, J. M. and Burzaco, O. H. 1998. Observations on the use of medetomidine/ketamine and its reversal with atipamezole for chemical restraint in the mouse. *Lab. Anim.* **32**: 18-22.
 13. Cuneyt, N., 2012. Perioperative Considerations in Cardiac Surgery., InTech, Rijeka.
 14. Diven, K. 2003. Inhalation anesthetics in rodents. *Lab. Anim.* **32**: 44-47.
 15. Dubin, S. 1999. Uses of a biocompatible adhesive paste to improve the performance of

- rodent anesthesia face masks. *Lab. Anim.* **28**: 50-51.
16. Flecknell, P. 2010. *Laboratory Animal Anaesthesia* 3rd ed., Academic Press, London.
 17. Hayashi, K., Nishimura, R. and Yamaki, A. 1994. Comparison of sedative effects induced by medetomidine, medetomidine-midazolam and medetomidine-butorphanol in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 951-956.
 18. Homanics, G. E., Quinlan, J. J. and Firestone, L. L. 1999. Pharmacologic and behavioral responses of inbred C57BL/6J and strain 129/SvJ mouse lines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **63**: 21-26.
 19. Horne, D., Ogden, B., Houts, J. and Hall, A. 1998. A nonrebreathing anesthetic delivery system for mice. *Lab. Anim.* **27**: 32-34.
 20. Kale, VP., Joshi, GS., Gohil, PB. and Jain, MR. 2009. Effect of fasting duration on clinical pathology results in Wistar rats. *Vet. Clin. Pathol.* **38**: 361-366
 21. Kawai, S., Takagi, Y. and Kurosawa, T. 2011. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* **60**: 481-487.
 22. Kazunori, K., Shinji, H., Koji, I., Hironori, M., Hirokazu, F., Mami, F. and Hiromasa, T. 2012. Evaluation of the combination of three anesthetics in rats and rabbits. *Annual Report of Hatano Research Institute.* **35**: 53-59.
 23. Kirihara, Y., Takechi, M., Kurosaki, K. and Kobayashi, Y. 2013. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp. Anim.* **62**: 173-180.
 24. Klein, R. C. 2008. Fire safety recommendations for administration of isoflurane anesthesia in oxygen. *Lab. Anim.* **37**: 223-224.
 25. Lovell, D. P. 1986. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 2. Variables affecting test results. *Lab. Anim.* **20**: 91-96.
 26. Lovell, D. P. 1986. Variation in pentobarbitone sleeping time in mice. 1. Strain and sex differences. *Lab. Anim.* **20**: 85-90.
 27. Maejima, K. and Nagase, S. 1991. Effect of starvation and refeeding on the circadian

- rhythms of hematological and clinico-biochemical values, and water intake of rats. *Jikken Dobutsu*. **40**: 389-393.
28. Matsuzawa, T. and Sakazume, M. 1994. Effects of fasting on haematology and clinical chemistry values in the rat and dog. *Comp. Haem. Inter.* **4**: 152-156.
 29. Melissa, D. S. 2003. A review of the physiological effects of $\alpha 2$ -agonists related to the clinical use of medetomidine in small animal practice. *Can. Vet. J.* **44**: 885-897.
 30. Nishimura, R., Kim, H. Y., Matsunaga, S., Hayashi, K., Tamura, H., Sasaki, N. and Takeuchi, A. 1994. Effects of medetomidine-midazolam on plasma glucose and insulin concentrations in laboratory pigs. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 559-561.
 31. Nuh, K. 2008. Cardiopulmonary, biochemical, and haematological changes after detomidine-midazolam-ketamine anaesthesia in calves. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* **52**: 453-456.
 32. Ochiai ,Y., Iwano, H., Sakamoto, T., Hirabayashi, M., Kaneko, E., Watanabe, T., Yamashita, K. and Yokota, H. 2016. Blood biochemical changes in mice after administration of a mixture of three anesthetic agents. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 951-956
 33. Oddmund , J., Stein, V., Rolf, J. and Olav, R. 1994. Increased plasma glucose levels after Hypnorm anaesthesia, but not after Pentobarbital anaesthesia in rats. *Lab. Anim.* **28**: 244-248.
 34. Ranheim, B., Horsberg, T. E., SØli, N. E., Ryeng, K. A. and Arnemo, J. M. 2000. The effects of medetomidine and its reversal with atipamezole on plasma glucose, cortisol and noradrenaline in cattle and sheep. *J. Vet. Pharmacol. Ther.***23**: 379-387.
 35. Richard, E. F., Marilyn, J. B., Peggy, J. D. and Alicia, Z. K. 2008. Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals 2nd ed., Academic Press, London.
 36. Richardson, C. A. and Flecknell, P. A. 2005. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? *Altern. Lab. Anim.* **33**: 119-127.
 37. Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K. and Jakubowski, J. A. 2005. Acute hyperglycemia induced by ketamine / xylazine anesthesia in rats: mechanisms and

- implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med.* **230**: 777-784.
38. Sherif, M. S., Anis, M. Z., Sahar, H. O., Khaled, M. S. and Wafaa, A H., 2015. Effect of Intermittent Fasting on Brain Neurotransmitters, Neutrophils Phagocytic Activity, and Histopathological Finding in Some Organs in Rats. *Inter. J. Res. Stu. Bio.* **3**: 38-45.
 39. Smith, J. C. and Bolon, B. 2002. Atmospheric waste isoflurane concentrations using conventional equipment and rat anesthesia protocols. *Contemp. Top. Lab. Anim Sci.* **41**: 10-17.
 40. Smith, J. C. and Bolon, B. 2003. Comparison of three commercially available activated charcoal canisters for passive scavenging of waste isoflurane during conventional rodent anesthesia. *Comp. Med.* **42**: 10-15.
 41. Smith, J. C. and Bolon, B. 2006. Isoflurane leakage from non-rebreathing rodent anaesthesia circuits: comparison of emissions from conventional and modified ports. *Lab. Anim.* **40**: 200-209.
 42. Stephen, A. G. 2002. *Veterinary Anesthesia and Pain Management Secrets*. Hanley & Belfus. Philadelphia.
 43. Szczesny, G., Veihelmann, A., Massberg, S., Nolte, D. and Messmer, K. 2004. Long-term anesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the hemodynamic effects. *Lab. Anim.* **38**: 64-69.
 44. Thal, S. C. and Plesnila, N. 2007. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods* **159**: 261-267.
 45. Thompson , C. S., Mikhailidis, D. P., Jeremy, J. Y., Bell, J. L. and Dandona, P. 1987. Effect of starvation on biochemical indices of renal function in the rat. *Br .J. Exp. Pathol.* **68**: 767-775.
 46. Thompson, J. S., Brown, S. A., Khurdayan, V., Zeynalzadedan, A., Sullivan, P. G.. and Scheff, S. W. 2002. Early effects of tribromoethanol, ketamine / xylazine, pentobarbitol, and isoflurane anesthesia on hepatic and lymphoid tissue in ICR mice. *Comp. Med.* **52**: 63-67.

47. Venn, R. M., Bryant, A., Hall, G. M. and Grounds, R. M. 2001. Effects of dexmedetomidine on adrenocortical function, and the cardiovascular, endocrine and inflammatory responses in post-operative patients needing sedation in the intensive care unit. *Br. J. Anaesth.* **86**: 650-656.
48. Verstegen, J. and Petcho, A. 1993. Medetomidine-butorphanol-midazolam for anaesthesia in dogs and its reversal by atipamezole. *Vet. Rec.* **132**: 353-357.
49. Woodward, W. R., Choi, D. and Grose, J. 2007. Isoflurane is an effective alternative to ketamine / xylazine / acepromazine as an anesthetic agent for the mouse electroretinogram. *Doc. Ophthalmol.* **115**: 187-201.
50. Zuurbier, C. J., Emons, V. M. and Ince, C. 2002. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **282**: 2099-2105.
51. Zuurbier, C. J., Keijzers, P. J., Koeman, A., Van Wezel, H. B. and Hollmann, M. W. 2008. Anesthesia's effects on plasma glucose and insulin and cardiac hexokinase at similar hemodynamics and without major surgical stress in fed rats. *Anesth. Analg.* **106**: 135-142.
52. Zuurbier, C. J., Koeman, A., Houten, S. M., Hollmann, M. W. and Florijn, W. F. 2014. Optimizing anesthetic regimen for surgery in mice through minimization of hemodynamic, metabolic, and inflammatory perturbations. *Exp. Biol. Med.* **239**: 737-746.