

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 落 合 雄 一 郎

学 位 の 種 類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

審 査 委 員

主査 教授 岩野 英知（獣医生化学）

副査 教授 北澤 多喜（獣医薬理学雄）

副査 教授 山下 和人（獣医麻酔学）

副査 教授 横田 博（獣医生化学）

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

審査は、1)体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2)科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

論文の概要について

新たな実験動物用注射麻酔である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）のラットとマウス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。以上の検討により、ラットとマウスにおけるMMB投与後の生体への影響と、実験に適した最適投与用量が確認された。

研究の背景と目的

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。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。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。実験用げっ歯類動物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。

注射麻酔は、吸入麻酔のように専用機器を必要としないが、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。また、実験用げっ歯類動物の注射麻酔としてよく利用され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。また、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ため、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。

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。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。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パー

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、MMB のげっ歯類における投与後の影響を評価した。

研究の成果

第1章では、マウスに対し MMB 0.45/6/7.5 mg/kg 及び 0.9/12/15 mg/kg を皮下 (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、血糖、クレアチンキナーゼ、無機リン、カリウム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 投与用量を腹腔内 (i.p.) 投与と s.c.投与

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、血糖、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度の一過性の上昇と、総蛋白と白血球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(白血球、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度)と血液生化学的検査値(血糖、総蛋白)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、アチパメゾール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 0.45/6/7.5 mg/kg 及び 0.9/12/15 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える。

研究の評価

本研究は、新しい麻酔薬である MMB が生体へ与える影響を血液生化学的検査値や血液学的検査値、体重、摂餌量といった実験データとして採用することの多い項目を指標に検証し、実験動物学の基礎情報として有用な情報を提供した。

治療を目的とした臨床での麻酔利用と異なり、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。本研究は、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た有用な研究であった。

上記内容は以下の論文雑誌に投稿された。

The Journal of Veterinary Medical. Science. 78(6):951-6 (2016).

以上のことから、落合雄一郎氏は博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員4名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2017年 2月15日

審査委員

主査	教授	岩野 英知
副査	教授	北澤多喜雄
副査	教授	山下 和人
副査	教授	横田 博

学位論文要旨

獣医学研究科博士課程 獣医生化学ユニット

学籍番号:21341004 落合雄一郎

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。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。

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。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。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。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。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。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、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排気ガスの拡散を防ぐ排除装置が附属している。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。

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、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。