

新しい注射麻酔薬 ～三種混合麻酔薬の特性～

国立国際医療研究センター研究所 動物実験施設 岡村 匡史

1. はじめに

三種混合麻酔薬は、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬であるメデトミジン、GABA_A受容体作動薬であるミダゾラムおよびオピオイド κ 受容体作動薬であるブトルファノールを混合することで、マウスに40分程度の麻酔効果がある麻酔薬である¹。オピオイドであるブトルファノールは、作用時間が1～4時間であるため、術後鎮痛も期待される。作用点が異なる3種類の鎮静薬、鎮痛薬を併用し、可逆的に鎮痛、筋弛緩および意識の喪失ならびに自律神経反射を喪失した状態にする。

三種混合麻酔薬は、ケタミンが麻薬に指定されたことから、麻薬以外の簡易な麻酔薬として開発され¹、最大の利点は、拮抗剤の投与により速やかに覚醒させられることにある。注射麻酔薬は、投与後の麻酔深度調整が難しいとされてきたが、拮抗剤を使用することにより、術後管理がより容易になった。さらに、三種混合麻酔薬は内視鏡技術を用いた、マウスへの気管チューブ挿管時の導入麻酔としての有用性も示されている²。

ペントバルビタールは、これま

で広く実験動物の外科麻酔に使用されてきたが、鎮痛作用がほとんどなく、適切な麻酔深度に達しないため¹、単独投与による全身麻酔は適切ではない³。また、トリプロモエタノールは、麻酔時間が比較的短時間であるため、受精卵移植手術などに使われてきたが、非医薬品グレードの化合物であるため、その使用が制限されている⁴。三種混合麻酔薬はこれらの麻酔薬に代わる、新たな注射麻酔薬として期待されており、その特性について概説したい。

三種混合麻酔薬麻酔効果の安定性

三種混合麻酔薬は、それぞれ単独では十分な麻酔効果を有していない、作用機序が異なる3つの鎮静・鎮痛薬を混合することで麻酔効果を発揮する。そのため、使用時に必要量を混合しなければならない。調整した三種混合麻酔薬が、どれくらいの期間安定した麻酔効果があるのかを確かめるため、室温で4

および8週間保管した麻酔薬と、当日調整した麻酔薬を比較し、その効果を麻酔スコアを用いて判定した(表1)。三種混合麻酔薬を皮下に投与し、正向反射消失時間、外科的麻酔開始時間および外科的麻酔終了時間を測定した結果、当日、4週間および8週間保管した麻酔薬の間で、麻酔効果に有意な差は見られ

なかった。外科的麻酔時間においても、同様であった。これらの結果から、三種混合麻酔薬は調整後、少なくとも8週間は麻酔効果の低下は見られないことがわかった。動物に投与することを考えると、麻酔薬の調整は無菌的に行うべきであり、コンタミネーションには十分に注意しなければならない。

表1. 室温で保存した三種混合麻酔薬の麻酔効果

麻酔調整後の経過時間	正向反射消失時間 (分)	外科的麻酔開始時間 (分)	外科的麻酔終了時間 (分)	外科的麻酔時間 (分)
当日	3.6 ± 1.3	5.4 ± 1.1	67.6 ± 29.5	62.3 ± 30.2
4週間	4.3 ± 0.3	6.8 ± 0.7	77.0 ± 2.9	70.3 ± 2.3
8週間	4.1 ± 0.3	6.2 ± 1.0	62.8 ± 4.6	56.6 ± 5.4

・外科的麻酔時間は、Kawaiら(2011)の方法に従い、前肢引き込み反射、後肢引き込み反射、尾根部反射、角膜反射および正向反射を用いた麻酔スコアにより判定した。

・C57BL/6NCr(雄、10～12週齢)を各群4匹使用した。

三種混合麻酔薬処方量の検討

安全域が狭いペントバルビタールとは異なり、三種混合麻酔薬は使用している薬剤の安全域が広いこと、手術の侵襲度や術者の技量などに応じて、処方量を増やせることが利点の一つである。我々が行っている手術の中で、最も頻度が高いマウス受精卵移植手術において、三種混合麻酔薬(M/M/B)の有用性を検討した。三種混合麻酔薬を偽妊娠ICR雌マウスの腹腔内(i.p.)あるいは皮下(s.c.)に投与し、5～10分後に後肢引き込み反射消失を確認した後、常法に従い背部の皮膚を1cm切開し、皮下を剥離後、腹壁2カ所を1cm程度切開した。その後、卵巣および卵管を体外に露出した後、卵管を切開しガラスキャピラリーを用いて、受精卵を移植した。露出した組織を体内に戻し、腹壁および皮膚を縫合した(図1)。手術時間は1匹あたり10分程度であり、比較的軽度の侵襲を伴う手術と考えられる。

まず、M/M/B:0.3/4/5 mg/kg(以下0.3M/M/Bとする)を腹腔内および皮下に投与した個体では、それぞれ2匹中0匹、および8匹中6匹で、手術時の疼痛刺激による反射が消失した。この濃度では不十分であると考え、拮抗剤があるメドミジンのみを増量した結果、0.375M/M/B、0.45M/M/Bおよび0.6M/M/B、いずれにおいても完全に疼痛反射を消失させることはできなかった。さらに、0.75M/M/Bに増量したところ、腹腔および皮下投与と共に、すべての個体で手術による疼痛反射が消失した(表2)。以上の結果から、0.75M/M/Bを推奨濃度として、以後の実験に使用し、ラットは、マウスの半量のM/M/B:0.375/2/2.5 mg/kgとした⁵。

三種混合麻酔薬は、いくつかの処方量が報告されている。0.3M/M/BをICRマウスの腹腔内に投与する

と、外科的麻酔時間は約40分であり¹、C57BL/6およびBALB/cマウスの外科的麻酔時間は約50分であった⁶。いずれも、前後肢の引き込み反射、尾根部の反射、角膜反射の反応をスコア化した麻酔スコアにより、外科的麻酔時間を算出している。一方、Ochiaiらは、3剤を1.5倍量にしたM/M/B:0.45/6/7.5 mg/kgが外科手術のできる最低限の麻酔濃度であり、3倍量にしたM/M/B:0.9/12/15 mg/kgが、マウスを死に至らしめない最大量と報告している⁷。我々は、5～10分後に後肢引き込み反射消失を

確認し手術を開始した(図1)。0.3M/M/Bは外科的麻酔時間に達するまでに、10～15分かかるため⁶、麻酔導入時間を十分に取り、あるいは疼痛刺激が強い皮膚切開および皮下剥離の際に、吸入麻酔を併用することで、麻酔薬を増量することなく、手術時の疼痛反射を消失させることも可能であるかもしれない。また、三種混合麻酔薬は、腹腔投与および皮下投与いずれでも麻酔効果は変わらないことから、皮下投与の方がより安定して麻酔効果が得られる場合もある。

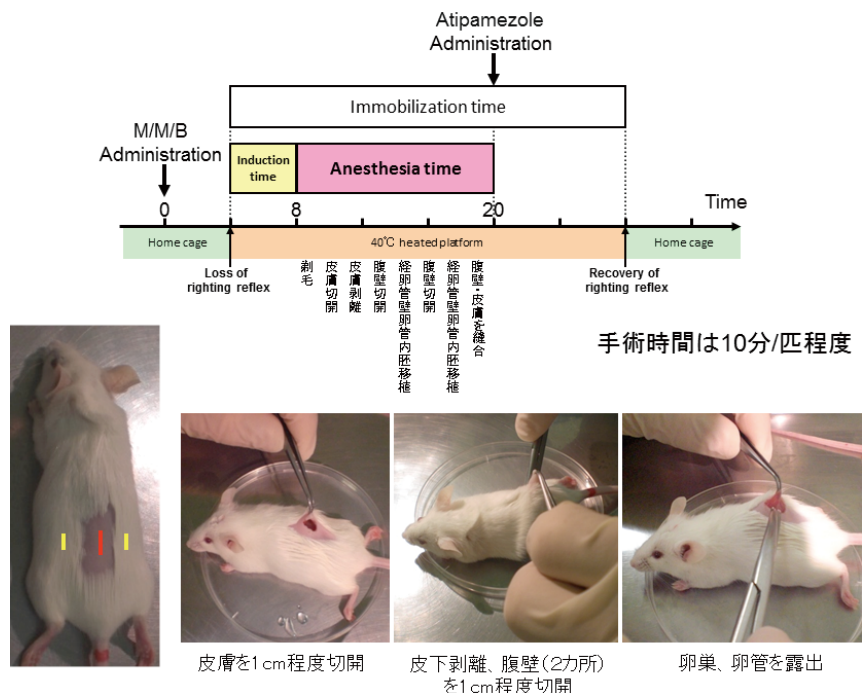


図1. マウス受精卵移植のタイムコース
(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)

表2. 三種混合麻酔薬下における受精卵移植手術時の反射消失個体数

M/M/B (mg/kg)	系統 ^a	体重 (g)	投与部位 ^b	反射消失個体数/使用個体数 ^c
0.3/4/5	ICR	28.6 ± 0.5	i.p.	0/2
0.3/4/5	ICR	28.4 ± 0.4	s.c.	6/8
0.375/4/5	ICR	—	i.p.	0/2
0.45/4/5	ICR	—	i.p.	2/4
0.6/4/5	ICR	—	i.p.	6/10
0.75/4/5	ICR	31.1 ± 0.3	i.p.	13/13
0.75/4/5	ICR	28.3 ± 0.4	s.c.	6/6

a: 8-12週齢の雌、ICRマウス

b: i.p.; intraperitoneal, s.c.; subcutaneous

c: 疼痛反射が消失していない個体は一旦手術を中止し、イソフルラン麻酔による追加麻酔後に手術を継続した。

マウス受精卵移植における三種混合麻酔薬の有用性

イソフルランは、血液/ガス分配係数が比較的小さく、麻酔の導入・覚醒が早いこと、優れた吸入麻酔薬として、実験動物の麻酔に広く用いられている。特有の刺激臭があるため、麻酔導入時に息こらえなどが見られる場合があるが、ジェネリック医薬品(エスカイン、マイラン製薬)を用いると比較的安価に使用できる。吸入麻酔薬は、麻酔深度の調節性に優れており、小型げっ歯類用の気化器の開発により、より安全に麻酔を行うことができるようになった。一方、吸入麻酔はチューブの方向に依存して、動物がほぼ固定されるため、受精卵移植手術などマウスの体位を変え

ながら行う手術では、作業効率が悪くなる場合がある。また、一度に多くの個体に手術する場合は、相応数の気化器を用意しなければならない。

注射麻酔は、専用の機器が必要なく簡便に麻酔ができ、術中にマウスの体位を自由に変更できることから、受精卵移植をする際には有用な麻酔法である。これまで使用されていた注射麻酔薬は、一度麻酔薬を投与すると投与後に麻酔深度を調整することができないという欠点があった。しかしながら、三種混合麻酔薬麻酔下では、メドミジンの拮抗阻害薬であるアチパメゾールを投与することで、速やかに覚醒させることがで

きる⁸。速やかに覚醒させることは、動物の術後負担を軽減し、さらに、実験者の作業効率を大きく改善することから、マウス受精卵移植手術に三種混合麻酔薬を導入する利点は大きい。

そこで、偽妊娠ICRマウスをイソフルランおよび0.75M/M/Bで麻酔し、C57BL/6NCrマウス受精卵移植をした際の産子率を検討した。その結果、イソフルラン麻酔群および0.75M/M/B群で、着床率および産子率共に有意な差はなく、三種混合麻酔薬がマウス受精卵移植成績に有害な影響を与えることはなかった(表3)。

表3. 受精卵移植手術時に使用した麻酔薬による移植成績の比較

麻酔薬	移植した2細胞期胚数*	偽妊娠マウス数	着床率 (%)	産子数 (%)
0.75M/M/B	166	10	71.3 ± 14.4	44.6 ± 14.7
イソフルラン	182	10	68.8 ± 20.2	42.3 ± 13.8

*C57BL/6NCr マウス由来

麻酔覚醒後体温変化

マウスは体が小さいため、全身麻酔中に体温降下が起こりやすい。そこで、三種混合麻酔薬で麻酔し、アチパメゾール投与により覚醒させた後の体温変化を経時的に測定した。受精卵移植によく用いられるICRマウス(日本SLC、雌7週齢、n = 4)を用いて、イソフルランおよび三種混合麻酔薬で麻酔し、覚醒後にケージに戻し、10分ごとに体温を測定した(図2A)。三種混合麻酔薬群では、覚醒120分後に約43℃体温が低下し、約300分後に元の体温に戻った。覚醒後30分加温板で加温しても、ケージに戻した後の体温低下は、覚醒直後に戻した場合と同等であった。一方、イソフルラン麻酔群は、覚醒後約20分で約0.8℃度体温が下がったが、その後回復し約40分で元の体温に戻った(図2B)。覚醒後の体温低下は、マウス受精卵

移植成績には影響を与えないものの、三種混合麻酔薬に比べ、イソフルラン麻酔の方が覚醒後の負担が少ないと考えられた。

一方、術中および術後に加温しないと、受精卵移植後の産子率が著しく減少するため(表4)、術中・術後の加温は必須である。

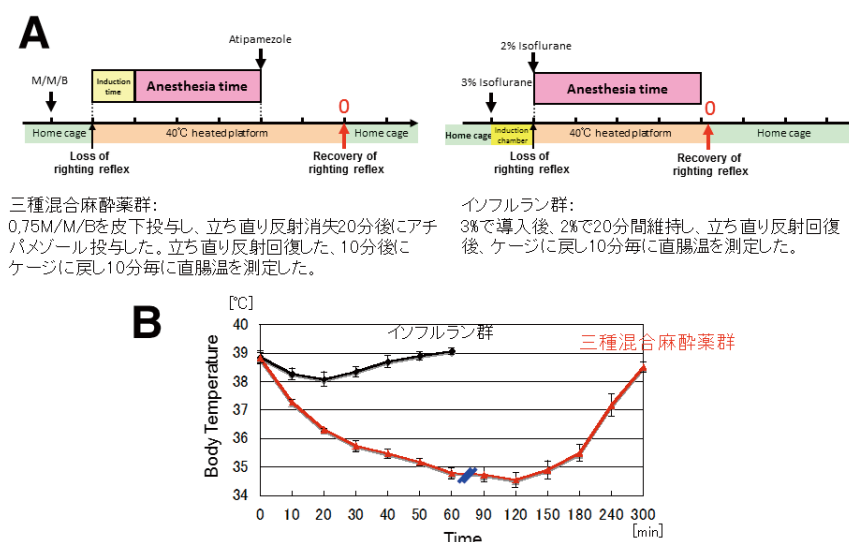


図2. 三種混合麻酔薬およびイソフルランで麻酔したマウスの麻酔覚醒後の体温変化。ICRマウス(雌、7週齢)を各群4匹使用した。(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

表4. トリブロモエタノール麻酔時の術中および術後加温の有無による移植成績の比較

加温 (40℃)	移植した2細胞期胚数 ^a	産子数	産子率 (%)
—	266	104	38.8 ± 3.0
+	306	162	53.3 ± 4.6 ^b

a: C57BL/6NCrマウス由来受精卵

b: $P < 0.05$, 平均値 ± 標準誤差

三種混合麻酔薬の血糖値への影響

$\alpha 2$ アドレナリン受容体は、中枢神経系に広く分布しているが、膵 β 細胞にも分布するため、その作動薬は膵 β 細胞からのインスリン分泌を抑制することが知られている⁹。実験用ブタにメデトミジンを投与すると、インスリン分泌抑制により著しく血糖値が上昇する¹⁰。そのため、各麻酔薬の血糖値への影響を検討した。C57BL/6NCr (日本SLC、雌8週齢、 $n = 4$) を、イソフルラン、三種混合麻酔薬 (0.3M/M/B および 0.75M/M/B) およびペントバルビタール (60mg/kg) で麻酔後、経時的に尾静脈から採血し、血中グルコース濃度を測定した (図3)。三種混合麻酔薬で麻酔した、0.3M/M/B および 0.75M/M/B 共に、急激に血糖値が上昇し、15分後の血糖値はそれぞれ、 $275.5 \pm 12\text{mg/dl}$ および $326.5 \pm 31.5\text{mg/dl}$ であった。メデトミジンを増量した 0.75M/M/B の血糖値が高い傾向はあったが、有意ではなかった ($P = 0.18$)。その後、血糖値は 300mg/dl 程度で推移し、麻酔45分後にアチパメゾール (0.75mg/kg) を投与することで、速やかに下降した。メデトミジンの2.5倍量アチパメゾールを投与された 0.3M/M/B は、等量の 0.75M/M/B に比べ、より速やかに血糖値が下降した。イソフルラン麻酔群の

15分後の血糖値は、 $204.5 \pm 22.7\text{mg/dl}$ で軽度血糖値が上昇した。麻酔45分後に覚醒させたがその後の血糖値の下降は緩やかであった。一方、ペントバルビタールで麻酔した群の血糖値は、麻酔後の血糖上昇は観察されなかった (図3)。

三種混合麻酔薬およびケタミン/キシラジン混合麻酔薬の顕著な血糖値上昇効果は、麻酔後24時間以内に

消失するため⁷、一過性であるが、実験データに影響を与える可能性があり、実験によっては注意が必要である。また、吸入麻酔薬は GABA_A 受容体に作用すると言われているが、作用点についてはすべてが解明されているわけではなく、非絶食下のラットをイソフルランで麻酔すると、20分以内に高血糖を呈する¹¹。

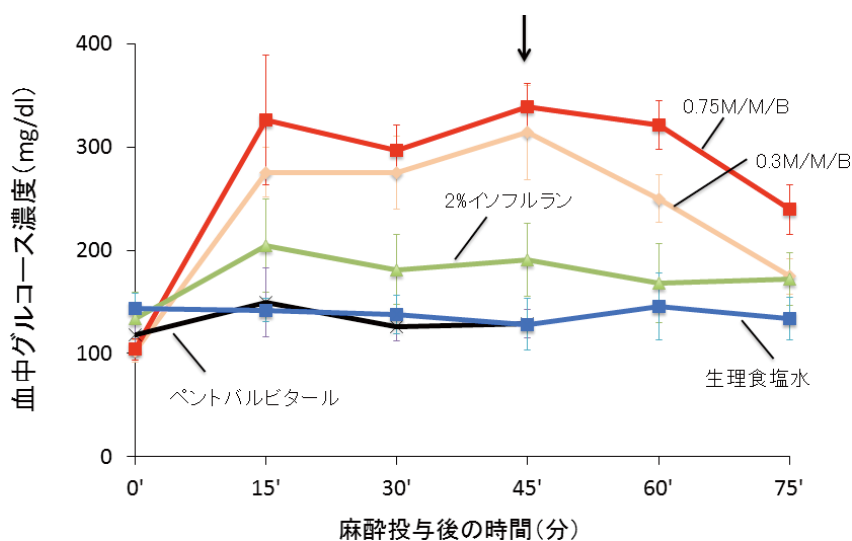


図3. 各麻酔薬が血糖値に与える影響。麻酔投与後、経時的に尾静脈から血糖値を測定した。三種混合麻酔薬群 (0.3M/M/B および 0.75M/M/B) は、45分後に 0.75mg/kg のアチパメゾールを投与した (矢印)。イソフルラン吸入麻酔群は、2% イソフルランで吸入麻酔し、45分後に吸入麻酔マスクを外した (矢印)。ペントバルビタール群は、ソムノペンチル (60mg/kg) を腹腔内投与した。すべての麻酔群のマウスは、覚醒するまで加温板で加温した。各群共に、8週齢の C57BL/6NCr 雌マウスを 4 匹使用した。
(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)

三種混合麻酔薬の眼球への作用

ケタミン/キシラジン混合液でマウス及びラットを麻酔すると、 $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬であるキシラジンの作用により、眼球突出および急性可逆性白内障を呈することが

知られている¹²。メデトミジンを含む三種混合麻酔薬でも同様の効果があることが予想されたため、眼球への作用を検討した。8~12週齢、雌の ICR マウス (日本クレア) 65 匹に、三

種混合麻酔薬を皮下投与した結果、2~3分後にすべての個体で眼球が突出した (図4A)。さらに、麻酔投与20~50分 (平均35.8分) 後、65匹中22匹 (33.8%) の個体で水晶体の白濁が観

察された(図4B)。麻酔投与50～60分後に、0.75mg/kgのアチパメゾールを皮下投与したところ、眼球突出は5分以内に、水晶体の白濁は5～30分(平均14.6分)後に全例回復した。眼球突出および水晶体の白濁は、メドトミジンの拮抗薬であるアチパメゾールで速やかに回復することから、ケタミン/キシラジン混合液と同様、三種混合麻酔薬においても、メドトミジンが眼球へ作用することが考えられた。

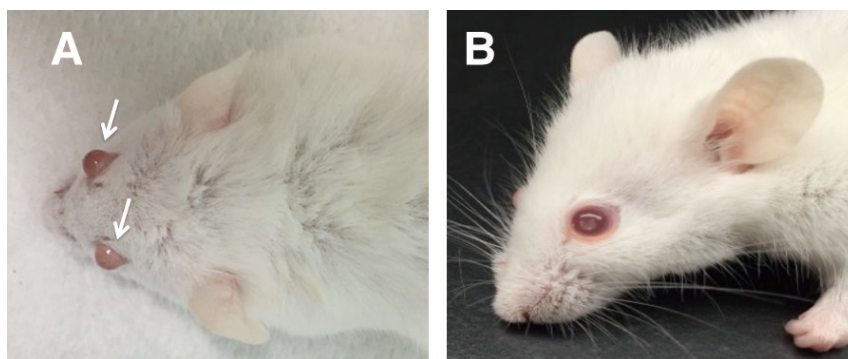


図4. (A.) 三種混合麻酔薬 (0.75M/M/B) の眼球への作用。(A) 全例で眼球突出が観察された (投与5分後、矢印)。(B) 三種混合麻酔薬投与後に見られる急性可逆性白内障。眼球突出および白内障は共に拮抗薬投与後に全例回復した。(日動協ホームページ、LABIO21 カラーの資料の欄を参照)

おわりに

本稿では、三種混合麻酔薬のマウス受精卵移植への有用性と、血糖値、覚醒後体温および眼球への影響について、主に $\alpha 2$ アドレナリン受容体作動薬の作用を中心に紹介した。作用点の異なる鎮静・鎮痛剤を混合することで、それぞれが相加・相乗的に作用する一方で、単剤に比べその影響が広範囲に及ぶこともある。特に、実験動物への麻酔は、苦痛の軽減のみでなく実験データへの影響も考慮しなければならない。生体にとって安全でかつ全く有害作用を示さない理想的な麻酔薬は存在せず、さらに

麻酔薬は少なからず実験データに影響を与えることから、実験者は実験目的、手術の侵襲度を考慮し、適切な麻酔薬を選択しなければならない。三種混合麻酔薬は、侵襲度の高い手術には用いるべきではないし、1時間を超えるような手術にも推奨しない。これらの手術には、吸入麻酔薬を使用すべきである。さらに、麻酔薬を増量することで、副作用も増えることから、安易に麻酔薬を増量するべきではなく、実験手技の洗練および実験器具の改善等による苦痛の軽減も必要不可欠である。三種混合麻酔

薬は、2011年にマウスへの有用性が報告された新しい麻酔薬であるため、古くから使われている麻酔薬に比べ、十分な基礎データが揃っていない。しかし、安全域が広く使いやすい麻酔薬であるため、これまで使用されてきた注射麻酔薬に代わる選択肢として、十分検討する価値がある麻酔薬である。

最後に、本稿を執筆するにあたり、日本実験動物医学専門医協会の先生方から大変貴重な御助言・御指導を頂いた。この場をお借りして、心より御礼申し上げます。

引用文献

- Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S. and Kurosawa, T. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* 60: 481-487, 2011.
- Konno, K., Itano, N., Ogawa, T., Hatakeyama, M., Shioya, K. and Kasai, N. New visible endotracheal intubation method using the endoscope system for mice inhalational anesthesia. *J. Vet. Med. Sci.*, 76:863-868, 2014.
- Flecknell, P. Laboratory Animal Anaesthesia 3rd ed., Academic Press, London, 2010.
- National Research Council (NRC) of the National Academy Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. The National Academy Press Washington D.C. 2010.
- 国際医療研究センター研究所動物実験施設ホームページ <http://www.rincgm.jp/department/lab/08/pdf/mouse.pdf>
- Kirihara, Y., Takechi, M., Kurosaki, K., Kobayashi, Y. and Kurosawa, T. Anesthetic effects of a mixture of medetomidine, midazolam and butorphanol in two strains of mice. *Exp. Anim.* 62: 173-180, 2013.
- Ochiai, Y., Iwano, H., Sakamoto, T., Hirabayashi, M., Kaneko, E., Watanabe, T., Yamashita, K. and Yokota, H. Blood biochemical changes in mice after administration of a mixture of three anesthetic agents. *J. Vet. Med. Sci.* 78: 951-956, 2016.
- Kirihara, Y., Takechi, M., Kurosaki, K., Kobayashi, Y., Saito Y. and Takeuchi, T. Anesthetic effects of a three-drugs mixture-comparison of administrative routes and antagonistic effects of atipamezole in mice-. *Exp. Anim.* 64: 39-47, 2015.
- Giovannitti JA Jr, Thoms SM, Crawford JJ. Alpha-2 Adrenergic Receptor Agonists: A Review of Current Clinical Applications. *Anesth. Prog.* 62: 31-38, 2015.
- Nishimura, R., Kim, H. Y., Matsunaga, S., Hayashi, K., Tamura, H., Sasaki, N. and Takeuchi, A. Effects of medetomidine- midazolam on plasma glucose and insulin concentrations in laboratory pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 56: 559-561, 1994.
- Saha, J. K., Xia, J., Grondin, J. M., Engle, S. K. and Jakubowski, J. A. Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: mechanisms and implications for preclinical models. *Exp. Biol. Med. (Maywood)* 230: 777-784, 2005.
- Lalderone, L., Grimes, P. and Shalev, M. Acute reversible cataract induced by xylazine and by ketamine-xylazine anesthesia in rats and mice. *Exp. eye Res.*, 42, 331-337, 1986.