

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 桐原 由美子

題 目 : Studies on the Anesthetic Effects of a Mixture of Medetomidine, Midazolam and Butorphanol, and Antagonism by Atipamezole in Small Rodents

論文要旨 : The combination of ketamine (KET) and xylazine (XYL) has long been a popular combination as an injectable anesthetic for laboratory animals. However, in Japan, ketamine has been designated as a narcotic drug due to an abuse problem in 2007. Therefore, using KET for animal experiments has become burdensome because users have to register to get a license as a researcher of narcotic drugs. Pentobarbital (PENT) has been most widely used as an injectable anesthetic for laboratory animals for several decades in Japan. However, PENT causes severe cardiovascular and respiratory depression and has poor analgesic activity. Therefore, KET and PENT have been thought to be substituted for another drugs. Instead of KET or PENT, Kawai *et al.* reported a new injectable anesthetic of a mixture of medetomidine (MED), midazolam (MID), and butorphanol (BUT) with an effect in ICR mice equivalent to the combination of KET and XYL. This anesthetic mixture has been used as an anesthesia for dogs or monkeys for more than 10 years. After Kawai's study was published in 2011, many researchers started to use this anesthetic mixture. However, there was no information for anesthetic effects of the anesthetic mixture in other strains or different injection routes in small rodents. Then, we decided to study this new anesthetic mixture in detail using mice and rats. The results could offer a useful information of this new anesthetic for laboratory animals.

In the first study, we examined the anesthetic effects of the mixture in both male and female BALB/c and C57BL/6J strain mice. In addition, we examined the effective period of the mixture after mixing and refrigeration. We used an anesthetic score to assess the anesthetic effects of the mixture. The total anesthetic score was graded from 0 to 5. The duration for which a mouse showed a score of 4 or 5 was decided to be the anesthetic duration. When we compared the anesthetic duration of ICR mice, the data of the BALB/c and C57BL/6J strains were very similar. However, the anesthetic duration was about 10 min longer than ICR mice. Inbred mice might be more sensitive to the anesthetic mixture. We showed that there were no significant differences in anesthetic duration between strains and sexes in BALB/c and C57BL/6J mice. However, C57BL/6J mice showed a tendency for a longer anesthetic duration compared with BALB/c mice. We also found that there were no significant differences for anesthetic duration from 8 to 20 weeks of age in males and females of both strains. The stability of the anesthetic effects of the mixture is important. Our data

indicated that the mixture of three drugs showed the same efficacy for at least 8 weeks after mixing.

In the second study, we assessed the anesthetic effects of the anesthetic mixture administered by subcutaneous (SC) and intravenous (IV) injection compared to intraperitoneal (IP) administration. Atipamezole (ATI) is a strong antagonist of MED. After administration of the anesthetic mixture, injection of ATI causes mice a rapid recovery from anesthesia. However, neither an appropriate dosage nor an optimum injection timing of ATI after administration of the anesthetic mixture are clear. Then, we examined how the timing of injection and a dosage of ATI affected recovery from anesthesia in mice after administration of the anesthetic mixture. We used a pulse oximeter to measure vital signs such as O<sub>2</sub> saturation, heart rate, and respiratory rate of mice during the experiment. We indicated that there were no significant differences of anesthetic duration among the three different injection routes, although the IV injection showed a quick increase and decrease of anesthetic scores after injection. At the same time, IV injection showed a quick decrease and increase of O<sub>2</sub> saturation. A quick decrease of O<sub>2</sub> saturation sometimes causes death. SC injection showed a tendency to produce longer anesthetic duration compared to IP injection. Compared to IP injection, inspectional failures are easily detected with SC and IV injection. Then, we recommend SC injection of the anesthetic mixture compared to IP and IV injection, although there are no significant differences of anesthetic duration among the 3 injection routes. At 30 min after administration of the anesthetic mixture, injection of ATI at 0.3 mg/kg and 1.5 mg/kg had almost the same rapid recovery time from anesthesia. At 10 min after the anesthetic mixture, injection of ATI (0.3 mg/kg) needed more time to recover from anesthesia compared with ATI (1.5 mg/kg).

In the third study, we examined effects of the anesthetic mixture using Wistar (WST), Sprague-Dawley (SD), and Fischer 344 (F344) rat strains. We examined how the timing of injection and a dosage of ATI affected recovery from anesthesia. We found that there were no significant differences in anesthetic duration after administration of the anesthetic mixture among the 3 rat strains, although the WST had a tendency for a longer anesthetic duration compared with the other 2 strains. WST showed lower O<sub>2</sub> saturation compared with the other 2 strains during the experiment. After injection of ATI (0.75 mg/kg), we observed rats' quick recovery from anesthesia. Therefore, we suggest that 0.75 mg/kg is a safe and proper dosage of ATI for helping rats quickly recover from anesthesia at both 10 and 30 min after administration of the anesthetic mixture.

In conclusion, the anesthetic mixture of MED, MID, and BUT is a safe and useful drug to have as a MED antagonist; ATI which helps mice and rats quickly recover from anesthesia. These results may contribute to the welfare of laboratory animals.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	桐原 由美子
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副 査：鳥取大学 教授 日笠 喜朗
	副 査：鹿児島大学 教授 浅野 淳
	副 査：鳥取大学 教授 竹内 崇師
	副 査：鳥取大学 准教授 大崎 智弘
題 目	<b>Studies on the Anesthetic Effects of a Mixture of Medetomidine, Midazolam and Butorphanol, and Antagonism by Atipamezole in Small Rodents</b> (マウス・ラットにおけるメデトミジン、ミダゾラム、ブトルファノールの三種混合麻酔薬の麻酔効果とアチパメゾールによる拮抗作用に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>2005 年に動物の愛護および管理に関する法律が改正され、動物実験を取り巻く環境は規制が厳しくなっている。2006 年には、実験動物の飼養および保管等に関する基準が、実験動物の飼養および保管並びに苦痛の軽減に関する基準と改正され、動物実験に関する 3Rs のうち、refinement(苦痛の軽減)が明記された。また、2007 年 1 月にケタミンが麻酔指定されたことにより、従来、実験動物に汎用されてきたケタミンとキシラジンの混合麻酔薬が使われなくなっている。また、以前より使用されているペントバルビタールナトリウムは麻酔効果発現量と致死量が近いこと、ジエチルエーテルは医薬品グレードの製造が中止され、さらに気道への刺激性、引火性、労働安全衛生上の問題も加わり、使用禁止への流れが加速している。このような現状から、実験動物福祉に配慮し、かつ簡便で有効な麻酔薬の確立が望まれる。そこで本研究では、マウスおよびラットに対する適切な麻酔法の確立を目的とし、メデトミジン(MED)、ミダゾラム(MID)およびブトルファノール(BUT)の三種混合麻酔薬を用いた基礎的検討を行った。</p> <p>第 1 章では、マウスの系統、性差、週齢による三種混合麻酔薬の麻酔効果の相違、さらに麻酔薬調製後の麻酔効果安定性について検討した。実験には BALB/c マウスおよび C57BL/6J マウスの 8, 12, 16 および 20 週齢個体を使用し、麻酔持続時間、呼吸数および 5 つの反射行動を指標とした麻酔スコアにより、麻酔効果の判定を行った。三種混合麻酔薬 (MED 0.3 mg/kg + MID 4 mg/kg + BUT 5 mg/kg) の腹腔内投与後、両系統のマウスはともに 10 分で麻酔期 (麻酔スコア 4) に達し、40 分間にわたって安定した麻酔が維持された後、120 分で完全に覚醒した。BALB/c と C57BL/6J では系統間に有意差は認められず、</p>	

また性差および週齢の違いによる有意差もみられなかった。したがって、これら系統のマウスにおいては三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって安定した麻酔が得られることが示唆された。三種混合麻酔薬の保存期間と麻酔作用の有効性については、麻酔薬作成後 4℃に保存した場合、少なくとも 8 週間は安定した麻酔効果を得られることが示唆された。

第 2 章では、マウス三種混合麻酔薬の投与経路による麻酔効果の違いを検討する目的で、7～9 週齢の ICR 系マウスの雄を使用し、腹腔内、皮下および静脈内投与を行い、麻酔時間、麻酔スコアならびに麻酔からの覚醒時間により評価した。さらに、マウスの頸動脈に設置したパルスオキシメーターによる動脈血酸素飽和度、心拍数および呼吸数の解析を行った。その結果、麻酔時間、麻酔からの回復時間ともに、投与経路による有意差は認められず、皮下投与によっても安定した麻酔を得られることが示唆された。

メデトミジンの拮抗薬であるアチパメゾール(ATI)の拮抗作用について、最適な投与量および投与時期を検討した。三種混合麻酔薬投与後 10 分または 30 分で ATI (0.3 mg/kg, 1.5 mg/kg) を投与すると、10 分後の ATI 0.3 mg/kg 投与では ATI 1.5 mg/kg 投与よりも回復時間が有意に延長したが、30 分後の ATI 投与では約 3 分で麻酔からの回復が得られ、麻酔からの回復が必要な場合は、ATI 投与によって速やかに覚醒可能であることが示唆された。

第 3 章では、ラットの系統の違いによる三種混合麻酔薬の麻酔効果の相違を明らかにするとともに、ATI の拮抗作用について、適切な投与量および投与時期を検討した。実験には 7～9 週齢の Wistar (WST)、Sprague-Dawley (SD) および Fischer 344 (F344) 系ラットを用い、三種混合麻酔薬 (MED 0.15 mg + MID 2 mg + BUT 2.5 mg/kg) を腹腔内投与した。その結果、WST 系ラットは麻酔持続時間がやや延長する傾向を示し、SD 系は他の系統と比較して、麻酔からの回復時間が有意に延長することが確認された。F344 系ラットでは、投与後 40 分以降に速やかな麻酔スコアの低下を示し、SD 系との間に有意差が認められた。WST 系ラットの酸素飽和度は、F344 系および SD 系に比べて有意な低下を示した。このように、ラットでは、系統によって麻酔効果に多少の差異が認められるものの、いずれの系統においても良好な麻酔処置が可能であることが示唆された。

また、WST 系ラットを用いて ATI による麻酔からの回復時間を検討したところ、三種混合麻酔薬投与 10 分後では、ATI 0.15mg/kg 投与は ATI 0.75 mg/kg 投与に比べて回復時間の有意な延長を示したが、30 分後での ATI 投与により、ともに 6 分以内に覚醒が得られた。

以上のように、MED、MID および BUT の三種混合麻酔薬は、マウスおよびラットにおいて十分な鎮痛効果を有し、また拮抗薬によって速やかな回復が得られたことから、従来使用されてきたケタミン、ペントバルビタールナトリウムに代わる注射麻酔薬として有効であることが示唆された。

今回、三種混合麻酔薬をマウスおよびラットに適用することによって明らかにされた研究成果は、実験動物の愛護と福祉に大きく貢献するものと考えられる。以上より、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があるものと考えられた。