

母動物へのペントバルビタール投与による 胎児の麻酔状態に関する検討

瀬沼美華¹, 吉田由香¹, 三枝克彦², 高島宏昌¹

Fetal anesthetization by maternal pentobarbital sodium treatment

Mika SENUMA¹, Yuka YOSHIDA¹, Katsuhiko SAEGUSA², Hiromasa TAKASHIMA¹

緒言

近年、げっ歯類の胎児や新生児を動物実験に用いる場合には、成獣と同様に鎮痛・麻酔等の処置や、完全に意識を消失した状態で安楽死を施す等の人道的な取り扱いを考慮する必要があるとの声が高まり、動物実験における胎児や新生児の麻酔法あるいは安楽死法が見直されている。2007年には、National Institute of Health (NIH), Animal Research Advisory Committee (ARAC) の“Guidelines for the Euthanasia of Rodent Feti and Neonates”が改正され^{1,2)}、この中で「卵巣あるいは子宮摘出操作を行う際には、胎児は母体から摘出後、速やかに安楽死させるべきである」と記載されている。

以前は、催奇形性試験等ではジエチルエーテルを用いて、母動物に麻酔を行ってきた。しかし、ジエチルエーテルには呼吸器刺激性があり母動物に影響があること、労働安全衛生上の問題があることから近年では使用されていない³⁾。その後、ジエチルエーテルに代わる吸入麻酔薬としてセボフルランを使用してきたが、一般的に吸入麻酔薬は胎盤を通過しないことから⁴⁾、胎児への麻酔はほとんど期待できない。実際に催奇形性試験等においても室温に胎児を保ただけでは胎児の体重測定や外表観察後、標本固定操作時に、疼痛に対する反応は明瞭ではないものの、生存している胎児が散見される。また、胎児観察中に室温に放置された胎児が観察終了時には死亡していたとしても、凍死、失血死あるいは呼吸困難等の原因で死亡す

るまでの間、人道的処置を施さずに胎児を放置しておくことは非人道的であると考えられている⁵⁾。

現在、げっ歯類の胎児や新生児に対する鎮痛・麻酔および安楽死の手段としては以下の4つが考えられている^{6,7)}。

- ①ペントバルビタール等の腹腔内・胸腔内への過量投与
- ②深麻酔下での塩化カリウムの心臓内投与
- ③深麻酔下での液体窒素や固定液への浸漬
- ④麻酔下での頸椎脱臼、断頭、放血等の物理的手段

これらの手段はいずれも、各胎児に直接処置を行わなければならない、リスク評価における催奇形性試験において膨大な数の胎児を扱うことを考えると作業者の負担が大きい。また、胎児および新生児へのペントバルビタールの腹腔内あるいは皮下投与では、皮膚の真皮が薄いことから投与後に皮膚からの麻酔薬の漏出によって、投与量が不均一になることがあり、児によっては麻酔が不十分となる可能性も考えられる。

今回われわれは、バルビツール系麻酔薬の胎盤透過性が良い⁸⁾ことに注目し、ペントバルビタールを経胎盤的に胎児に投与することにより、一腹の全胎児を深麻酔状態とすることを目的に検討を実施した。さらに、主に麻酔、鎮痛の目的で利用される合成麻薬であるフェンタニルにより、痛みが軽減される⁹⁾ことを目的に、マウスではペントバルビタールと併用投与する検討を実施した。

材料および方法

投与には、ペントバルビタールナトリウム (ソ

1 毒性学第1研究室

2 試験業務管理室

表 1-1 投与物質および投与量 (マウス)

ペントバルビタール (静脈内; mg/kg)	セボフルラン (吸入)	フェンタニル (静脈内; 5 µg/kg)
0	あり	なし
20	あり	なし
30	あり	なし
50	なし	なし
10	あり	あり
20	あり	あり
30	あり	あり

表 1-2 投与物質および投与量(ラット)

ペントバルビタール (静脈内; mg/kg)	セボフルラン (吸入)
0	あり
5	あり
10	あり
30	あり
50	なし

表 2 評点

子宮壁を通じての観察 (帝王切開時, 開腹直後に観察)

胎児の動作

- 5. 胎児の動きに合わせて子宮壁の局所が持ち上がる
- 0. 暗紫色で生体反応に乏しい

摘出後の胎児の観察 (色調および痛覚刺激に対する反応)

色調	頭部の動作
5. ピンク色, 明るい赤色	5. 上下あるいは左右に絶え間なく動かす
3. 赤紫色	3. 自発的に頭部を動かすことがある
1. 青紫色	1. 刺激を与えた時のみ反応がある
0. 蒼白	0. 刺激を与えても反応がない
発鳴	四肢あるいは尾の動作
5. 明瞭な声で, 刺激を与えなくても頻繁に鳴く	5. 四肢あるいは尾を絶え間なく動かす
3. 間隔を空けて, 自発的に鳴くことがある	3. 四肢あるいは尾を動かすことがある
1. 刺激を与えた時のみ鳴く	1. 刺激を与えた時のみ反応がある
0. 刺激を与えても鳴かない	0. 刺激を与えても反応がない
呼吸	ツイストあるいはローリングの動作
5. 通常の呼吸 (反復して開口呼吸する)	5. 絶え間なく動いている
3. 間隔を空けて, 呼吸することがある	3. 自発的にツイストあるいはローリングすることがある
1. 刺激を与えた時のみ明瞭な呼吸をする	1. 刺激を与えた時のみ反応がある
0. 呼吸が抑制されている	0. 刺激を与えても反応がない

ムノベンチル, 以下ペントバルビタールとする, 共立製薬, 東京), 吸入麻酔薬としてセボフルラン吸入麻酔液 (マイラン製薬, 大阪) を用いた。また, 一部のマウスではフェンタニル注射液 0.1 mg (第一三共, 東京) を併用した。

動物は, CrI:CD (SD) 系妊娠雌ラットおよび Crj:CD-1 (ICR) 系妊娠雌マウスを使用した。温度 21 ~ 25℃, 湿度 40 ~ 75%, 換気設定約 15 回/時間, 明暗サイクル 12 時間 (点灯時間 7 ~ 19 時) に設定された飼育室内で, マウスは床敷を入れたプラスチック製ケージ, ラットは金属製

金網床ケージに個別に収容し, 固型飼料 (CE-2, 日本クレア) および水道水 (秦野市水道局給水) を自由摂取させて飼育した。

妊娠動物を得るために雌雄動物を 1 対 1 で終夜同居させ, 翌朝, 膣垢内に精子あるいは膣栓が認められた動物を交尾成立として, この交尾確認日を妊娠 0 日とした。ラットは妊娠 21 日, マウスは妊娠 18 日をそれぞれ帝王切開日とした。投与当日の体重を基準にペントバルビタール 5, 10, 20, 30 あるいは 50 mg/kg を静脈内投与し, 20 分経過した後, 放血により安楽死させ, 帝王切開し

た。さらに、マウスでは、フェンタニル 5 µg/kg を静脈内投与後、ペントバルビタール 10, 20 あるいは 30 mg/kg を静脈内投与する群を設けた(表 1)。対照群は、セボフルランによる吸入麻酔で母動物を麻酔状態とした。母動物の麻酔状態が十分でない可能性がある 30 mg/kg 以下の投与群では、セボフルラン吸入による麻酔を補助的に実施した後、放血により安楽死させ帝王切開した。50 mg/kg 投与群では、セボフルランの併用麻酔は行わず、放血により安楽死させ帝王切開した。

開腹後最初に、操作を行わない状態で子宮壁を通して胎児の動作を観察した(表 2)。その後、右子宮角卵巣側から膈側、続いて左子宮角卵巣側から膈側の順に胎児を摘出し、生死を確認後、最初に取り出された外表奇形の認められない 6 匹の生存胎児について、保温条件下で 1 時間にわたり 10 分おきに、クリッピングによる痛覚刺激を尾根部に与え、胎児の刺激に対する反応を観察した。その際、独自に作成したスコア(表 2)を用いて、胎児摘出後の胎児の色調、発鳴、呼吸、頭部の動作、四肢あるいは尾の動作、全身動作(ツイストあるいはローリング)を評点化した。痛覚刺激に対する行動を観察した児以外の胎児についても、帝王切開後 1 時間保温した。胎盤重量を測定し、帝王切開 1 時間経過後に全胎児の体重を測定した後、開胸して心拍動の有無で生死を判断した。

帝王切開所見は一腹単位に集計し、各群の平均値を求めた。対照群とペントバルビタール群を比較し、多重比較検定を実施した(有意水準 5%)。スコアに関しては、Steel-Dwass の多重比較検定(両側検定)を実施した。

なお、全ての実験操作は、「財団法人食品薬品安全センター秦野研究所動物実験に関する指針」に基づいて実施した。

結果および考察

1. 胎児生存率

帝王切開直後の胎児の生存率では、マウス、ラットともいずれの投与群においても対照群との差が認められなかったことから、この実験の条件下では経胎盤にて投与したペントバルビタールの影響により、子宮内で胎児が死亡する可能性はなく、

催奇形性試験等で使用しても胎児生存率を見誤ることはないと考えられた。

マウスの帝王切開 1 時間後の胎児の生存率は、フェンタニル投与に関係なく、ペントバルビタール 30 mg/kg 以上の投与群において有意に低下した(表 3)。

ラットの帝王切開 1 時間後の胎児の生存率は、10 mg/kg 投与群で有意に低下したが、30 mg/kg 以上の投与群では、低下傾向が認められたものの有意差は認められなかった(表 4)。

2. 麻酔状態および観察スコアの推移(図 1, 2)

帝王切開直後の胎児の動作について子宮壁を通じて観察したところ、対照群では胎児の動きに合わせて子宮壁の局所が持ち上がるのに対し、ペントバルビタール 30 mg/kg 以上の投与群では胎児の動作は確認できなかった。ラットでは 5 および 10 mg/kg 投与群、マウスでは 10 および 20 mg/kg 投与群で、胎児のわずかな動きが観察された。

胎児の色調について観察したところ、対照群では呼吸が明瞭に認められるとともに摘出後 10 分以降より時間の経過に伴ってほぼ全例でピンク色あるいは赤色になる胎児が観察された。マウスの 30 mg/kg 以上、ラットの 10 mg/kg 以上の投与群では、時間の経過とともに青紫色になる胎児が観察された。観察 1 時間経過後の心拍の確認によれば、青紫色を呈した胎児は死亡している児であることが多かったことから、これらの児では観察時間中に徐々に死亡したものと考えられる。マウスの 10 および 20 mg/kg 投与群、ラットの 5 mg/kg 投与群では、麻酔の覚醒とともに呼吸が明瞭に認められ、ピンクあるいは赤色になる胎児が観察された。

帝王切開直後の胎児の痛覚刺激に対する反応は、マウス、ラットともに対照群とペントバルビタール各投与群との間では有意差が認められた。対照群では、帝王切開直後から刺激に対して反応がみられ、時間の経過とともに刺激に対する反応が強くみられた。対照群で帝王切開直後の痛覚刺激に対する反応が低下していることは以下の理由が考えられる。ヒト胎児においては、20 ~ 32 週齢の早産児に比較して満期産児では疼痛に鈍感になっており、これは大脳におけるエンドルフィンやセロトニンの作用によるとされている¹⁰⁾。ま

表 3. 帝王切開の結果 (マウス, 妊娠 18 日)

群 (mg/kg)	母動物数	着床数		子宮内 死亡数	外表奇形数		胎児体重 (g; Mean ± S.D.)		胎盤重量 (g; Mean ± S.D.)	
		Total	Mean ± S.D.		Total	(%)	雄	雌	雄	雌
ベントバルビタール単独投与群										
0 ^{a)}	4	57	14.3 ± 1.3 ^{b)}	7	0	0.0	1.44 ± 0.07 ^{b)}	1.40 ± 0.09 ^{b)}	0.10 ± 0.02 ^{b)}	0.09 ± 0.01 ^{b)}
20	5	73	14.6 ± 1.5	2	0	0.0	1.41 ± 0.09	1.40 ± 0.06	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
30	6	93	15.5 ± 2.3	5	0	0.0	1.42 ± 0.09	1.40 ± 0.12	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01
50	5	74	14.8 ± 2.2	9	1	1.4	1.41 ± 0.11	1.35 ± 0.12	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01
フェンタニル併用群										
10 + f5	5	72	14.4 ± 0.9	7	1	1.4	1.42 ± 0.08	1.36 ± 0.03	0.10 ± 0.02	0.09 ± 0.02
20 + f5	5	74	14.8 ± 2.9	0	0	0.0	1.49 ± 0.09	1.46 ± 0.08	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01
30 + f5	5	86	17.2 ± 3.1	5	0	0.0	1.37 ± 0.03	1.32 ± 0.05	0.10 ± 0.00	0.09 ± 0.01

群 (mg/kg)	母動物数	生存胎児数 (0hr)			生存率 (0hr) ^{c)}		生存胎児数 (1hr)			生存率 (1hr) ^{d)}	
		Total	雄 / 雌	Mean ± S.D.	(%)		Total	雄 / 雌	Mean ± S.D.	(%)	
ベントバルビタール単独投与群											
0 ^{a)}	4	50	31 / 19	12.5 ± 2.5 ^{b)}	87.1 ± 9.6 ^{b)}	50	31 / 19	12.5 ± 2.5 ^{b)}	100.0 ± 0.0 ^{b)}		
20	5	71	45 / 26	14.2 ± 1.9	97.1 ± 6.4	60	38 / 22	12.0 ± 3.8	83.6 ± 20.9		
30	6	88	49 / 39	14.7 ± 2.9	93.9 ± 6.6	39	18 / 21	6.5 ± 4.8	41.8 ± 28.6 *		
50	5	65	38 / 27	13.0 ± 2.7	87.5 ± 11.8	6	5 / 1	1.2 ± 0.8	9.1 ± 6.0**		
フェンタニル併用群											
10 + f5	5	65	35 / 30	13.0 ± 0.7	90.4 ± 3.4	47	25 / 22	9.4 ± 3.4	72.3 ± 25.3		
20 + f5	5	74	40 / 34	14.8 ± 2.9	100.0 ± 0.0	37	20 / 17	7.4 ± 3.4	50.0 ± 22.2		
30 + f5	5	81	32 / 49	16.2 ± 3.6	93.7 ± 4.5	33	14 / 19	6.6 ± 3.3	40.0 ± 14.8 *		

f5: フェンタニル (5 μg/kg) を併用

a) 対照群

b) 一腹平均

c) 帝王切開直後の生存率 [(生存胎児数/着床数) × 100]

d) 帝王切開1hr後の生存率 [(1hr後の生存胎児数/0hrの生存胎児数) × 100]

*: 対照群と比較して有意に低下 (p<0.05)

** : 対照群と比較して有意に低下 (p<0.01)

表 4. 帝王切開の結果 (ラット, 妊娠 21 日)

群 (mg/kg)	母動物数	着床数		子宮内 死亡数	外表奇形数		胎児体重 (g; Mean ± S.D.)		胎盤重量 (g; Mean ± S.D.)	
		Total	Mean ± S.D.		Total	(%)	雄	雌	雄	雌
0 ^{a)}	4	55	13.8 ± 2.1 ^{b)}	1	0	0.0	5.75 ± 0.25 ^{b)}	5.44 ± 0.15 ^{b)}	0.46 ± 0.02 ^{b)}	0.46 ± 0.03 ^{b)}
5	3	40	13.3 ± 1.5	3	0	0.0	5.95 ± 0.59	5.98 ± 0.39	0.51 ± 0.06	0.50 ± 0.07
10	7	92	13.1 ± 3.7	5	1	14.3	5.63 ± 0.49	5.31 ± 0.43	0.46 ± 0.04	0.43 ± 0.04
30	8	127	15.9 ± 1.8	8	1	12.5	5.35 ± 0.20	5.09 ± 0.36	0.49 ± 0.14	0.45 ± 0.09
50	5	73	14.6 ± 2.7	1	0	0.0	5.58 ± 0.26	5.35 ± 0.18	0.51 ± 0.04	0.51 ± 0.06

群 (mg/kg)	母動物数	生存胎児数 (0hr)			生存率 (0hr) ^{c)}		生存胎児数 (1hr)			生存率 (1hr) ^{d)}	
		Total	雄 / 雌	Mean ± S.D.	(%)		Total	雄 / 雌	Mean ± S.D.	(%)	
0 ^{a)}	4	54	22 / 32	13.5 ± 1.9 ^{b)}	98.3 ± 3.3 ^{b)}	54	22 / 32	13.5 ± 1.9 ^{b)}	100.0 ± 0.0 ^{b)}		
5	3	37	20 / 17	12.3 ± 3.1	91.7 ± 14.4	34	18 / 16	11.3 ± 4.7	88.9 ± 19.2		
10	7	87	40 / 47	12.4 ± 3.6	94.8 ± 5.5	59	29 / 30	8.4 ± 3.0	68.4 ± 21.0 *		
30	8	119	57 / 62	14.9 ± 2.0	93.8 ± 8.6	94	43 / 51	11.8 ± 3.2	78.0 ± 12.8		
50	5	72	41 / 31	14.4 ± 2.7	98.7 ± 3.0	54	32 / 22	10.8 ± 3.1	75.9 ± 19.0		

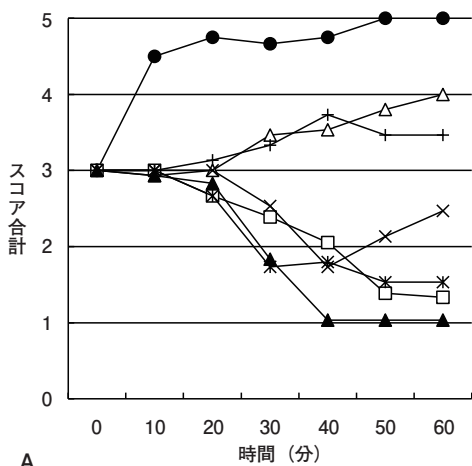
a) 対照群

b) 一腹平均

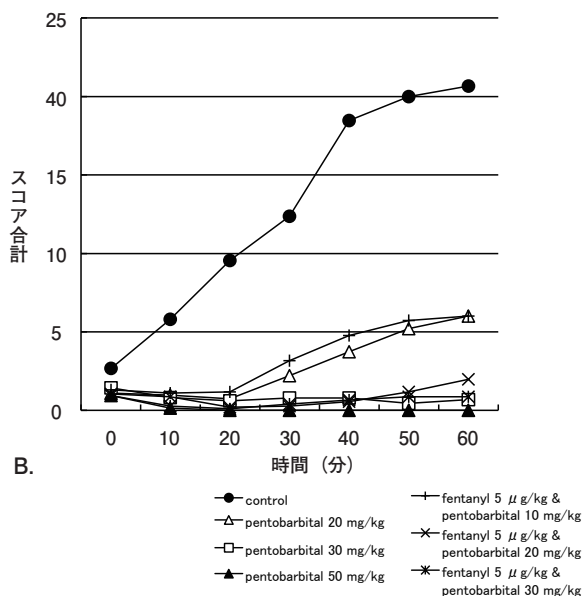
c) 帝王切開直後の生存率 [(生存胎児数/着床数) × 100]

d) 帝王切開1hr後の生存率 [(1hr後の生存胎児数/0hrの生存胎児数) × 100]

*: 対照群と比較して有意に低下 (p<0.05)



A.



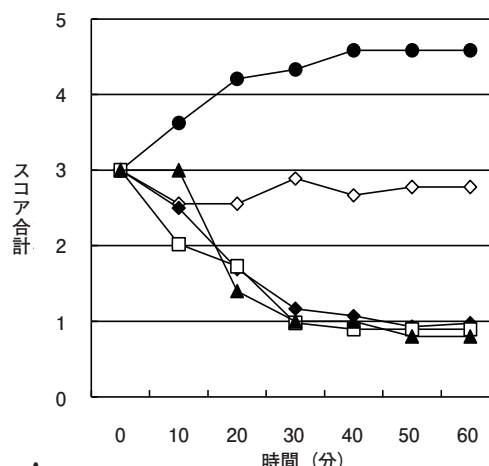
B.

● control
 △ pentobarbital 20 mg/kg
 □ pentobarbital 30 mg/kg
 ▲ pentobarbital 50 mg/kg
 + fentanyl 5 μg/kg & pentobarbital 10 mg/kg
 × fentanyl 5 μg/kg & pentobarbital 20 mg/kg
 * fentanyl 5 μg/kg & pentobarbital 30 mg/kg

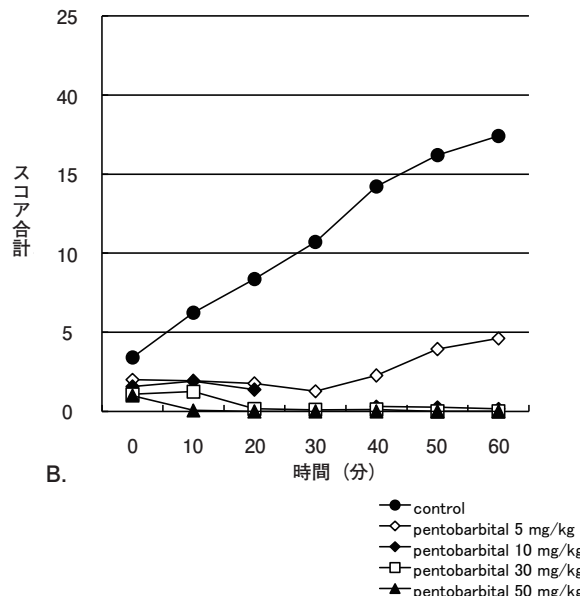
図1. 胎児の色調 (A) および痛覚刺激に対する反応 (B) のスコア平均値の推移 (マウス)

Aは、一腹6匹の胎児の色調を評点化 (0, 1, 3および5点) した平均値の推移を示している。Bは、一腹6匹の発鳴, 呼吸, 頭部の動作, 四肢あるいは尾の動作, 全身動作を評点化 (各項目0, 1, 3および5点) し, 合計値の平均値の推移を示している。

た, Mellor らは, 草食動物では出生時前後の児が深い睡眠状態にあると報告している¹¹⁾。本検討の結果は, げっ歯類においても帝王切開直後の胎児は無麻酔状態で外来の痛覚刺激に対して低反応であることを示唆するものと考えられる。ペントバルビタール投与群 (マウスで 10 mg/kg 以上, ラットで 5 mg/kg 以上) では, 帝王切開直後から 20 分以上痛覚刺激に対して反応がみられないことから, 十分な鎮痛, 麻酔効果が得られている



A.



B.

● control
 ◇ pentobarbital 5 mg/kg
 ● pentobarbital 10 mg/kg
 □ pentobarbital 20 mg/kg
 ▲ pentobarbital 30 mg/kg
 ▲ pentobarbital 50 mg/kg

図2. 胎児の色調 (A) および痛覚刺激に対する反応 (B) のスコア平均値の推移 (ラット)

Aは、一腹6匹の胎児の色調を評点化 (0, 1, 3および5点) した平均値の推移を示している。Bは、一腹6匹の発鳴, 呼吸, 頭部の動作, 四肢あるいは尾の動作, 全身動作を評点化 (各項目0, 1, 3および5点) し, 合計値の平均値の推移を示している。

ものと判断した。

マウスのフェンタニル併用投与群の痛覚刺激に対する反応は, ペントバルビタール単独投与群と比較して, 顕著な差がみられなかった。

マウスでは, ペントバルビタール 30 および 50 mg/kg 投与群の全例において, 帝王切開直後から胎児の活動性が低下し, 麻酔状態が 1 時間継続した。ペントバルビタール 10 および 20 mg/kg 投与群においても, 帝王切開直後から胎児の活動

性は全例で低下したが，摘出後 20 分（投与後 40 分）で，刺激に対して反応を示す胎児が約 10% 認められた．摘出後 20 分以降は徐々に覚醒する胎児が増加し，摘出後 60 分には 10 mg/kg 投与群では約 25%，20 mg/kg 投与群では約 30% の胎児が刺激に対して反応を示した．

ラットでは，10，30 および 50 mg/kg 投与群において，帝王切開直後から胎児の活動性は全例で低下し，麻酔状態が 1 時間継続した．5 mg/kg 投与群においても，帝王切開直後から胎児の活動性は全例で低下したが，摘出後 20 分（投与後 40 分）で，刺激に対して反応を示す胎児が約 12% 認められ，摘出後 20 分以降は徐々に覚醒する胎児が増加し，摘出後 60 分には約 30% の胎児が刺激に対して反応を示した．

本実験により，母動物へのペントバルビタール静脈内投与は胎児を麻酔状態とすることが可能であり，催奇形性試験等での胎児の麻酔法として有効であることが示唆された．母動物への単回投与により一腹の全胎児を胎児摘出後 20 分以上（投与後 40 分以上），麻酔状態とすることが可能と考えられるペントバルビタールの用量は，マウスでは 10～50 mg/kg，ラットでは 5～50 mg/kg であった．しかし，実務での催奇形性試験等を考慮すると，より適切な麻酔薬の用量を見つけ出すこと，麻酔薬投与から帝王切開するまでの時間の短縮が求められることから，さらにこれらについて検討する必要があると考えられる．

文献

- 1) Guidelines for the Euthanasia of Rodent Feti and Neonates, ARAC Guidelines, 2007
- 2) AVMA Guidelines on Euthanasia (Formerly Report of the AVMA Panal on Euthanasia) , 2007
- 3) Close B, Banister K, Baumans V, et al.: Working party report: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. *Laboratory Animals* 1996; **30**: 293-316
- 4) Close B, Banister K, Baumans V, et al.: Working party report: Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals* 1996; **31**: 1-32
- 5) 篠内かおり, 高木康博, 黒澤努: げっ歯動物の安楽殺処分施行ガイドライン. 日本獣医師会雑誌, 2009; **62**: 17-20
- 6) ACLAM task force, Public Statements: Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia. 2005
- 7) 日本実験動物医学会: げっ歯類の胎児・新生児の鎮痛・麻酔および安楽死に関する声明, 2009
- 8) Mork D, Kessler W, Shaw S: Placental Transfer of Pentobarbital in the Rat. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1970; **59**: 803-805
- 9) MRC: Report of the MRC Expert Group on Fetal Pain. 2001
- 10) Arthur J: Fetal pain: A red herring in the abortion debate. *Free Inquiry magazine*. 2005; 44-47
- 11) Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes, Australian Government National Health and Medical Reserch Council, 2007