

新たな実験手技・ラット頸部髄腔内投与方法の有用性の評価

— 麻酔増強作用による行動薬理学的試験での検討 —

村中清志¹⁾・佐加良英治²⁾・倉林 謙³⁾

¹⁾株式会社アニマルケア・²⁾九州歯科大学 動物実験施設・

³⁾岡山大学医学部附属動物実験施設

要約：ラットの硬・クモ膜下腔内への投与方法としては、従来からカテーテル設置による大槽内投与方法が汎用されている。しかし、これらの大槽内投与方法は、投与前に手術などの事前処置や回復の時間が必要なことなどの制約があるため、速やかに投与を開始することや短時間に多数のラットへ投与することなどが困難である。そこで、我々はラットの後頭部から経皮的に頸部髄腔内へ穿針する投与方法である頸部髄腔内投与方法を開発した。今回は、その有用性を麻酔薬や催眠導入剤のスクリーニングに用いられる麻酔増強作用により検討を行った。麻酔増強作用は塩酸ケタミンならびにペントバルビタールナトリウムを用いて、チオペンタールナトリウム麻酔増強作用により行った。その結果、頸部髄腔内投与方法は大槽内投与方法に比べ、ストレス無く投与できること。すでに汎用されている大槽内投与方法と同様の薬理学的評価が得られた事などから、頸部髄腔内投与方法は大槽内投与方法に代わるラットの硬・クモ膜下腔内への投与方法としての可能性が示唆された。

緒言

ラット硬・クモ膜下腔内投与方法として大槽内投与方法が汎用されている。この投与方法は水頭症、髄膜炎などの疾患モデルの作製¹⁾、薬理試験ならびに毒性試験^{2) - 6)}などに用いられ、後頭骨付近の皮膚ならびに筋肉の剥離後に後頭結節と第一頸椎の間膜から穿針⁷⁾またはカテーテルの設置^{8) - 11)}による投与を一般的に行っている。しかし、これらの大槽内投与方法は「投与前に手術などの事前処置が必要なこと。処置には脳定位固定装置などが必要なこと。処置後に回復の時間が必要なこと。」などといった制約があるため、速やかに投与を開始することや短時間に多数のラットへ投与することなどが困難である。このため大槽内投与方法は短時間で多数の動物への投与を必要とする薬効スクリーニングなどの試験には適していないとされており¹²⁾、より効率的で速やかに投与が実施できる硬・クモ膜下腔内投与方法の開発が望まれている。

また、動物福祉の観点からも、できるだけ動物へ負担を与えない投与方法が必要である。

我々は、後頭部より後頭結節と第一頸椎の間膜から経皮的に頸部髄腔内に穿針する投与方法(以下、頸部髄腔内投与方法と省略する)を考案し、その有用性について検討を行っている^{12) - 14)}。これまでの検討において、大槽内投与方法と頸部髄腔内投与方法により色素をクモ膜下腔内に投与し、中枢への色素拡散に投与方法による違いが見られないこと¹²⁾、5日間程度であれば連続投与がストレス無く行えること¹³⁾、ならびに100 μ l以下のリングル液投与において、チオペンタールナトリウム(以下、チオペンタールと省略する)での麻酔時間に投与方法による差がないこと¹⁴⁾を確認している。

今回は、その有用性を麻酔薬や催眠導入剤のスクリーニングに用いられる麻酔増強作用を塩酸ケタミン(以下、ケタミンと省略する)ならびにペントバルビタールナトリウム(以下、ペントバルビタールと省略する)を用いて、チオペンタール麻酔増強作用により評価を行った。その結果、頸部髄腔内投与方法が大槽内投与方法に比べ、ストレス無く行動薬理学的評価が行え、動物福祉の観点からも有用性が示唆されたので報告する。

材料および方法

1. 供試動物

日本クレアより購入した7週齢の雄性SDラット36匹を1週間の予備飼育後、実験に供した。飼育環境は、温度24 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度50 \pm 10%、明暗サイクル12時間(明期8:00~20:00)、換気回数15回/時間に設定された飼育室において、ステンレス製ブラケットケージ(日本ケージ:200W \times 320D \times 200H mm)に、1ケージ当たり1匹を収容して飼育を行った。餌はCE-2(日本クレア)を自由に摂取させ、飲水は水道水を自動給水ノズルから自由に摂取させた。

2. 投与方法

1) 大槽内投与

ペントバルビタール（ソムノペンチル，共立商事）全身麻酔下（25mg/kg i. p. 投与）において、背側頸部の剃毛をバリカンにより行い、剃毛部を70%エチルアルコールで消毒した。次に後頭骨付近の皮膚および筋肉を鈍性剥離し、後頭結節と第一頸椎との間膜を眼科用剪刀により小孔を開け、カテーテル（ポリエチレンチューブ、外径0.965mm、日本ベクトン・ディッキンソン）を3mm挿入した。その後、カテーテルは外科用アロンアルファ（東亜合成化学）で後頭骨に固定し、筋肉ならびに皮膚を縫合した。

実験は術後24時間に行い、投与はマイクロシリンジ（HAMILTON）に接続した注射針を用い、無麻酔下であらかじめ埋め込んであるカテーテルを介して30 μ l/5secの速度で大槽内に投与した（写真1）。

2) 頸部髄腔内投与

ジエチルエーテル（和光純薬工業：以下、エーテルと省略する）麻酔下において、背側頸部の剃毛をバリカンにより行い、剃毛部を70%エチルアルコールで消毒した。次に頭部は体躯に対し90度になるよう保定し、触診で後頭結節と第一頸椎との間膜を確認後、マイクロシリンジ（HAMILTON）に接続した27G 3/4インチの注射針を用いて、後頭頸部表皮より後頭頸椎間の間膜に穿針して30 μ l/5secの速度で投与を行った（写真2）。

3. 実験方法

実験の前日に体重を基に大槽内投与法によりリングル液（大塚製薬）、ケタミン（ケタラール50、三共）ならびにペントバルビタールの投与を行う3群、頸部髄腔内投与法によりリングル液、ケタミンならびにペントバルビタールの投与を行う3群の計6群（n=6）を編成した。群編成後に大槽内投与を行う群のカテーテルの設置手術を行った。

各群の体重測定後、大槽内投与、頸部髄腔内投与それぞれの投与法により、各試験物質を投与した。各試験物質の投与量は、リングル液30 μ l、ケタミン100 μ g/30 μ l、ペントバルビタール100 μ g/30 μ lとした。各試験物質投与後5分にチオペンタール30mg/kgを尾静脈から投与し、側臥姿勢から自発的に復位に戻るまでの麻酔時間を正向反射の消失時間^{3), 5), 6)}として測定を行った。

得られたデータは平均値±標準偏差で表し、臨床統計解析ソフト Fisher（中山書店）を用い、群編成時と実験時の体重との比較をt-testにて、正向反射の消失時間はリングル液投与群と各群との比較、投与法の違いによる各群の比較をDunnett's testにより有意差検定を行った。

4. 倫理審査

本研究は九州歯科大学動物実験委員会での審査ならびに承認（実験許可 No. : 01-063）を得て行った。

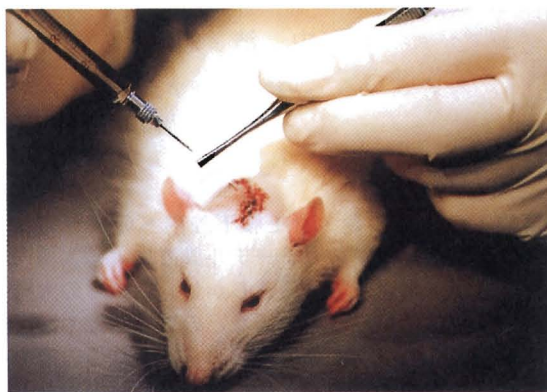


写真1 カテーテル設置による大槽内投与法

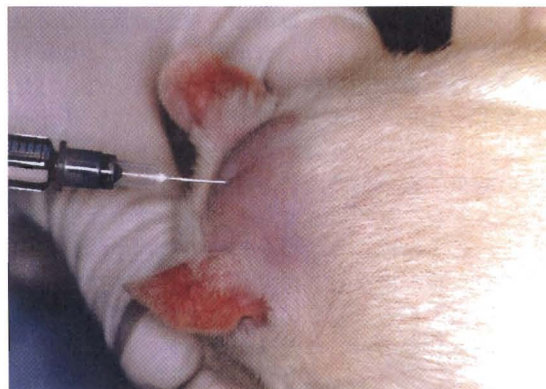


写真2 頸部髄腔内投与法

結果

1. 群編成時と実験時の体重（図1）

大槽内投与各群では群編成時に比べ、実験時（手術処置・投与前）の体重に抑制がみられたが、有意な差は認められなかった。頸部髄腔内投与群では群編成時に比べ実験時（投与前）に有意な体重の増加が認められた。

2. 正向反射の消失時間（図2）

1) リングル液との比較

大槽内投与群ではリングル液投与群との比較においてペントバルビタール投与群に有意（ $p < 0.05$ ）な麻酔時間（正向反射の消失時間）の延長が認められ、頸部髄腔内投与群でもリングル液投与群との比較においてペントバルビタール投

与群に有意 ($p < 0.01$) な麻酔時間の延長が認められた。なお、各投与群ともにケタミン投与群に有意な麻酔時間の延長は認められなかった。

2) 投与方法での比較

麻酔時間はリンゲル液、ケタミンならびにペントバルビタールの何れの群においても有意差は認められなかったが、大槽内投与の方が麻酔時間が長くなる傾向が見られた。

与部位の切開・縫合といった手術が必要⁷⁾であることからカテーテル設置手術と同様のストレスがあると推察される。従って、手術を要しない頸部髄腔内投与法は大槽内投与法に比べ、ストレスなく実験を行える有用な投与手技であると考えられた。大槽内投与法と頸部髄腔内投与法の比較を表1にまとめた。

表1 投与方法の比較

	大槽内投与		頸部髄腔内投与
	大槽内穿針	カテーテル	
事前処置	有り	有り	ほとんど無し
特殊装置の必要性	有り	有り	無し
回復時間の必要性	有り	有り	ほとんど無し
処置によるストレス	有り	有り	ほとんど無し
単回投与	可能	可能	可能
連続投与	困難	可能	可能
複数の動物への投与	困難	可能	可能
投与後短時間での評価	困難	可能	可能
投与の難易度	やさしい	やさしい	やや難しい
手術の難易度	やさしい	やや難しい	無し

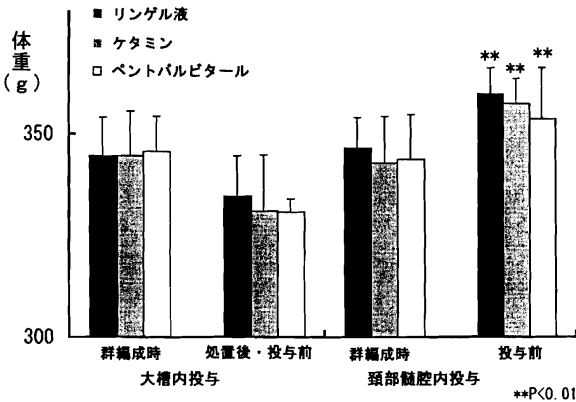


図1 群編成時ならびに投与前の体重の推移

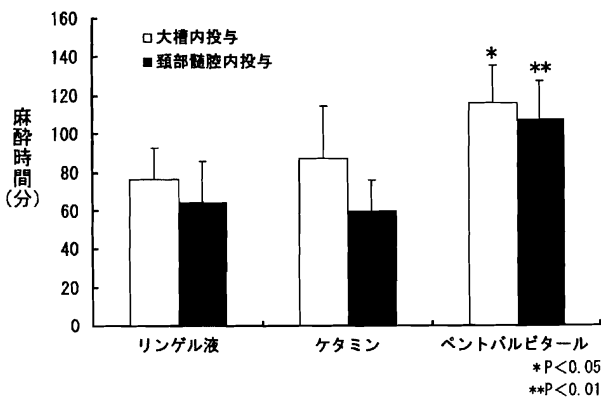


図2 正向反射の消失時間

考 察

1. 投与方法の違いについて

大槽内投与法は後頭骨付近の皮膚ならびに筋肉を剥離して大槽内にカテーテルを設置する方法⁸⁾⁻¹¹⁾と直接穿針する方法⁷⁾がある。本実験ではカテーテル設置による大槽内投与に手術の影響と思われる麻酔時間の延長や体重の抑制がみられた。また、大槽内に直接穿針する投与においても、投

2. 体重の違いについて

頸部髄腔内投与各群においては実験時に有意な体重の増加を認めた(図1)。これは成長に伴う体重の増加によるものと考えられる。他方、大槽内投与各群は体重の抑制が認められたが、これはカテーテル設置手術の影響が現れたと思われる。設置手術の影響としては、手術そのもののストレス、手術時の麻酔薬、手術後の摂餌状態等が考慮されるが、術後の観察などから、おそらく、手術そのもののストレスが大きいと思われる。

このように大槽内投与法では、投与前処置での侵襲が大きいため、動物福祉の観点からも、同等の評価が得られるのであれば、よりストレスの軽い投与方法を用いるべきである。

3. 麻酔増強作用について

マウス、ラット等の小動物に被検薬物を投与しその行動に及ぼす影響を観察する一般一次スクリーニング法において、全身麻酔薬や睡眠薬等のように意識レベルに影響を及ぼす薬物であるか否かを検討する場合には、その指標として正向反射の消失を用いる。この正向反射の消失を指標とする薬物スクリーニング法は、薬物単独投与時のほかに、他の睡眠薬や麻酔薬との協力作用を検討する際にも用いられる。例えば、ベンゾジアゼピン誘導体はエーテル、麻酔薬、バルビツレート等の中枢神経系抑制作用を増強する。このように麻酔増強作用は麻酔薬や睡眠薬の一次スクリーニングに良く用いられる³⁾。麻酔増強作用はベンゾジアゼピン系睡眠薬のスクリーニングに用いられるクロルプロチキセン睡眠増強作用^{3), 5), 6)}とエーテル

やバルビツレート等の麻酔薬に対する麻酔時間延長作用の検討に用いられるチオペンタール麻酔増強作用^{3), 4), 6)}がある。

今回は試験物質としてバルビツレートを用いたので、チオペンタール麻酔増強作用を選択した。

4. 麻酔増強作用の差について

今回の実験では大槽内投与法、頸部髄腔内投与法の両投与群において、リングル液投与群との比較においてペントバルビタール投与群に有意な麻酔時間（正向反射の消失時間）の延長が認められたが、各投与群ともにケタミン投与群に有意な麻酔時間の延長は認められなかった（図 2）。ケタミンはバルビツレートとは異なり、主として脳幹網様体賦活系に作用するのではなく、むしろ皮質および辺縁系に存在する受容体に作用する¹⁵⁾ 解離性麻酔薬¹⁶⁾ であり、おそらくこれがケタミンとペントバルビタール間の麻酔増強作用の差になったものであると推察される。

頸部髄腔内投与では投与時のエーテル麻酔が麻酔増強作用に影響すると思われたが、今回の実験では、一過性の超短時間のエーテル麻酔であったため、その影響を確認することはできなかった。

5. 投与法の違いと麻酔時間について

麻酔時間はリングル液、ケタミンならびにペントバルビタールの何れの群においても有意差は認められなかったが、大槽内投与の方が麻酔時間が長くなる傾向が見られた（図 2）。おそらく、カテーテル設置手術の侵襲によりエネルギーが奪われ（体重の減少に現れている）、肝臓でのチオペンタールの代謝¹⁷⁾ が遅れ、麻酔時間が延長したものと推察される。カテーテル設置手術時のペントバルビタール麻酔の直接の影響は、実験がチオペンタールの排泄半減期 9 時間¹⁷⁾ を超える術後 24 時間後に行われていることなどから、ほとんど無いものと思われる。

6. 頸部髄腔内投与法の評価

大槽内投与法ならびに頸部髄腔内投与法いずれの投与方法においてもペントバルビタール投与群では麻酔時間の有意な延長が認められたが、ケタミン投与群では有意な麻酔時間の延長は認められないという結果が得られた。麻酔時間はリングル液、ケタミンならびにペントバルビタールの何れの群においても大槽内投与の方が麻酔時間が長くなる傾向が見られたが、有意差は認められなかった（図 2）。よって、チオペンタール麻酔増強作用の評価においては頸部髄腔内投与法は大槽内投与法とほぼ同様の評価が可能であると考えられた。また、これまでの考察から頸部髄腔内投与法は大

槽内投与法に比べ、投与前の手術処置による侵襲がほとんど無く、特殊な装置を必要とせず、短時間に多数の動物への様々な投与方法が可能である（表 1）。ただ、投与に関してはトレーニングと習熟を必要としている事、投与時に全身麻酔下におかねばならないことなどが短所として考えられる。よって、手術侵襲が問題となるような投与や多数の動物への短時間で行う連続投与等では大槽内投与法より頸部髄腔内投与法の方が適していると思われる。また、投与時に全身麻酔下におくことが問題なければ、頸部髄腔内投与法は大槽内投与法と同様に薬理的評価に利用可能であると推察される。

動物福祉の観点から、動物実験者は代替法やより苦痛の少ない実験方法を検討する義務を負っている。頸部髄腔内投与法はこの点に関しても、大槽内投与法より有効な投与方法であると思われる。

今後、実験を重ね、投与技術・投与時の全身麻酔の必要性を解決し、投与ストレスの少ないラットの硬・クモ膜下腔内への投与方法として、頸部髄腔内投与法が大槽内投与の代替法となるようデータを揃えていきたい。

謝 辞

本研究は、アニマルケア（九州歯科大学所属）の原田留美、松下祐二、永島 博各氏の協力のもとに行われた。ここに感謝の意を表する。

文 献

- 1) Harvey Carp, Stevon Bailey: The Association Between Meningitis and Dural Puncture in Bacteremic Rat. *Anesthesiology* 76:739-742, 1992.
- 2) 亀井千晃, 杉本幸雄, 竹内智子, 阿部智之, 出雲貴幸, 安倉寿子: X 線造影剤の開発における安全性学的検討—ラット大槽内投与による急性毒性と赤血球に及ぼす影響について—。 *基礎と臨床* 28: 3795-3803, 1994.
- 3) 塩見浩人, 中村明弘, 中枢神経系作用薬の探索: 医薬品の開発, 第 9 巻. 医薬品の探索 I, 齋藤 洋, 野村靖幸 編集. 東京, 廣川書店. 31-50, 1989.
- 4) 酒井 豊: Minor tranquilizer, その上行性, 下行性作用の分離性について—意義と薬剤評価のめやす—. *薬理と治療* 6: 3221-3228, 1978.
- 5) 須加本孝幸, 相川邦彦, 伊藤敏三, 能勢尚志: 7-Chloro-1-cyclopropylmethyl-1, 3-dihydro-5-(2-fluorophenyl)-2H-1, 4-benzodiazepin-2-one (KB-509) の中枢および一

- 般薬理作用. 日薬理誌 76 : 447-468, 1980.
- 6) 山本研一 他: 新しい睡眠導入剤 1H-1, 2, 4-Triazolyl benzophenone 誘導体 450191-S の薬理 (I) 行動薬理学的研究. 日薬理誌 84 : 109-154, 1984.
- 7) 服部 慎: ストレス潰瘍発生に対する Corticotropin-Releasing Factor の中枢効果. 日医大誌 54 : 27-32, 1987.
- 8) Michael J. Iadarola, Christopher M. Flores, Jean Lud Cadet, Richard Suddath, Barbara Illowsky and Karen Faith Berman : Met⁵-Enkephalin-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ immunoreactivity in rat and human cerebrospinal fluid : influence of neuroleptic drugs and electroconvulsive shock. Brain Research 474 : 75-85, 1988.
- 9) 谷内弘道, 布村明彦: Leupeptin のラット大槽内投与によって小脳に出現する dense body の細胞間移動について - 一定量のおよび超微形態的検討 -. 脳神経 50 : 1009-1017, 1998.
- 10) Andrew C. Mancall, G. John DiGregorio, Charles B. Brill and Eileen Ruch : The Effect of Δ-9-Tetrahydrocannabinol on Rat Cerebrospinal Fluid : Arch Neurol 42 : 1069-1071, 1985.
- 11) 真崎義彦: ラットを用いた脊髄くも膜下カテーテル挿入法. 図解・実験動物技術集・日本実験動物技術者協会編. 東京, アドスリー, 52-54, 1998.
- 12) 村中清志, 永島 博, 原田留美, 松下裕二, 佐加良 英治: ラット頸部髄腔内投与に関する実験 1 - 中枢への色素分布による有用性の確認 -. 第 34 回日本実験動物技術者協会総会, 抄録集 69, 2000.
- 13) 村中清志, 永島 博, 原田留美, 松下裕二, 佐加良 英治: ラット頸部髄腔内投与に関する実験 2 - リンゲル液連続投与による実用性の検討 -. 第 34 回日本実験動物技術者協会総会, 抄録集 69, 2000.
- 14) 村中清志, 永島 博, 原田留美, 松下裕二, 佐加良 英治: ラット頸部髄腔内投与に関する実験 3 - チオペンタール麻酔増強作用による行動薬理学的評価への影響 -. 第 20 回日本実験動物技術者協会九州支部研究発表会, 抄録集 14, 2000.
- 15) Reich, D. L. and Silvey, G. : Ketamine ; an update on the first twenty-five years of clinical experience : Can. J. Anaesth 36 : 186-197, 1989.
- 16) 森 秀麿 編: 麻酔科学 第 10 版. 京都, 金芳堂. 220-223, 2001.
- 17) 藤原元始他 監訳: グッドマン・ギルマン薬理書 (上) 薬物治療の基礎と臨床第 8 版. 東京, 廣川書店. 355-358, 1992.