

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：32701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18388

研究課題名(和文)「ラットの麻酔法に関する基盤研究：周術期免疫応答、組織修復過程に対する作用特性」

研究課題名(英文) Basic studies of rat anesthesia -Pharmacological properties of anesthesia on immune reaction and wound healing process during perioperative period-

研究代表者

塚本 篤士 (Tsukamoto, Atsushi)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号：00647175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：動物実験における適正な麻酔・周術期管理は、実験動物福祉の理念を遵守するうえで極めて重要であり、さらに実験成績の信頼性や再現性を確保するうえで不可欠となる。本研究では、周術期におけるラットの各種麻酔法の作用特性を比較検討した。手術侵襲下における麻酔深度やバイタルサイン、さらに術後の疼痛レベルや炎症性サイトカイン発現、組織修復過程に関して、各麻酔法の薬理学的特性を明らかにした。本研究で得られた知見は、ラットの手術麻酔の標準化に向けた基盤情報を提供するとともに、周術期管理の向上に寄与するものとして有用であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The appropriate anesthesia is essential part of animal experimentation, in terms of laboratory animal welfare and reliability of experimental data. In the present study, we assessed the pharmacological properties of various anesthetic protocols during perioperative period in rat. Each anesthesia showed different properties during operative period. In addition, selection of anesthesia influenced the post-surgical pain level, inflammatory cytokines expressions, and wound healing process. Present findings provide the basic information for the standardization of surgical anesthesia, and contribute to the improvement of perioperative care in rat.

研究分野：実験動物学(麻酔・鎮痛)

キーワード：麻酔 周術期管理 ラット 実験動物福祉 Refinement

1. 研究開始当初の背景

動物実験における適正な麻酔・周術期管理は、3Rsの理念を遵守するうえで極めて重要であり、さらに実験成績の信頼性や再現性を確保するうえで不可欠となる。近年の実験動物福祉に対する関心の高まりや、動物管理施設における第三者認証の普及により、麻酔・周術期管理の適正化に対するニーズは近年高まっている。特に、

マウスやラットなどの小型齧歯類の麻酔・周術期管理については不明な点が多く、更なるエビデンスの蓄積が求められている。

適正な麻酔法には十分な麻酔深度があること、すなわち十分な鎮静催眠作用、鎮痛作用、筋弛緩作用があることが必要条件となる。また麻酔は、循環器系、呼吸器系、神経系、代謝系など全身臓器に影響を及ぼすことから、安全性が担保されている必要がある。齧歯類における代表的な麻酔法にはケタミン・キシラジン混合麻酔 (K/X)、メドトミジン、ミダゾラム、プトルファノールの三種混合麻酔 (M/M/B) や、イソフルラン吸入麻酔、セボフルラン吸入麻酔などがある。適正に麻酔を実施するうえでは各種麻酔法の薬理学的特性を十分に理解し、用途に応じて使い分けることが重要となる。

手術を実施する動物実験においては、術中に適切な麻酔を実施するとともに、手術侵襲を加味した周術期管理を実施することも重要となる。術創の切開や組織切除による手術侵襲は、術中のバイタルサインに影響を及ぼすと同時に、TNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカインの産生を促し、術後の急性炎症を誘導する。炎症性サイトカインの産生に始まる炎症反応・免疫応答は、神経内分泌系、循環器系、代謝系と互いに影響を与え合い、術後の疼痛や組織修復過程に関連する。近年の報告で、麻酔薬の作用機序に関わるGABA受容体やNMDA受容体などが、自然免疫系や組織修復過程に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究は、ラットの麻酔・周術期管理を向上させるための基盤情報を得ることを目的とし、齧歯類における代表的な麻酔法について、術中の麻酔効果ならびにバイタルサイン、術後の疼痛レベル、炎症反応、組織修復過程に対する作用特性を検討した。

3. 研究の方法

本研究では、雄ラット(WistarならびにSD)において、以下の麻酔法の作用特性を評価した。

- ・ K/X
- ・ M/M/B
- ・ イソフルラン吸入麻酔
- ・ セボフルラン吸入麻酔

(1) 麻酔効果ならびにバイタルサイン

各麻酔下において精巣摘出術を実施し、術中における麻酔深度を評価するとともに、導入時間、不動化時間、麻酔時間、覚醒時間を測定した。さらに、術中のバイタルサイン(直腸温度、心拍数、呼吸数、 SpO_2)を測定した。K/Xについては、標準用量(80/8 mg/kg)と高用量(100/10 mg/kg)の2用量を評価した。M/M/Bについても、標準用量(0.15/2/2.5 mg/kg)と、その1.5倍量(0.225/3/3.75 mg/kg)の2用量を評価した。吸入麻酔の維持濃度は、最小肺胞内濃度 $\times 1.5$ とした。また、10日齢の新生仔ラットについても、各種麻酔法の麻酔深度とバイタルサインを評価した。

(2) 術後疼痛に対する作用特性

術後の疼痛レベルをRat grimace scale (RGS)によって評価した。各麻酔下で開腹手術を行った後、術後1, 2, 4, 8, 12, 24, 48時間におけるラットの表情をデジタルビデオカメラにて撮影した。得られた動画をPCに取り込み、そこから静止画を抽出し、各計測ポイントにおけるRGSを算出した。また、術後24時間における血中コルチコステロン濃度をELISAにより評価した。

(3) 炎症性サイトカイン発現に対する作用特性

開腹手術を各麻酔下で行い、術後4時間において術創組織を採材した。Real time PCRにより、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1、IL-6)のmRNA発現量を定量した。血清中の炎症性サイトカインの濃度についても、ELISAにより測定した。

(4) 組織修復過程に対する作用特性

・ 組織修復過程の肉眼評価

麻酔下で生検パンチにより頸背部の皮膚を切除し、傷口のサイズを経時的に評価した。皮膚を切除した日を0日とし、1、4、7、14日における傷口のサイズを計測し、各種麻酔法における治癒過程を比較した。

・ 組織修復関連因子の定量

各麻酔下において開腹手術を実施し、術創組織における組織修復関連因子(TGF- β 、Collagen、Collagen、EGF)のmRNA発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 麻酔深度ならびにバイタルサイン

・ 精巣摘出術下における作用特性

K/Xについては、いずれの用量でも十分な外科麻酔深度が得られ、さらにアチパメゾール投与により早期に覚醒が得られた。しかしながら、100/10 mg/kgの用量では除脈が比較的強く発現することから、精巣摘出術では標準用量が推奨されると考えられた。M/M/Bについては、概ね良好な麻酔深度が得られたが、麻酔感受性差が比較的大きく、深麻酔が得ら

れない個体や覚醒不良個体が僅かに認められた。イソフルランとセボフルランは類似した特性を示し、十分な麻酔深度が得られ、さらに循環器抑制や、呼吸抑制が軽度であった。両吸入麻酔ともに速やかな導入、覚醒が得られた。以上のことから、精巣摘出術においてはいずれの麻酔も適応可能であると考えられるが、安全性の高さや、麻酔深度の調節が容易であることを考慮すると、吸入麻酔が推奨されると考えられた。

● Isoflurane ● Sevoflurane ● MMB × 1 ● M/M/B × 1.5
 ● K/X80/10 ● K/X 100/10 n=6. *P < 0.05.

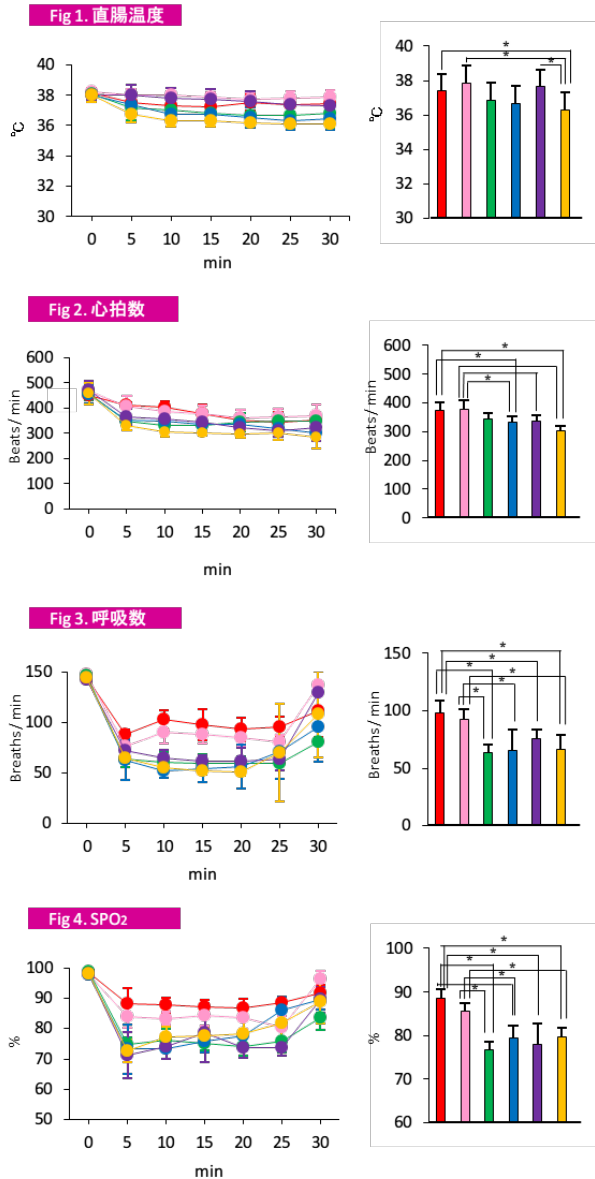


図1. 精巣摘出術下における各麻酔群のバイタルサイン。
 *P < 0.05.

・新生仔ラットにおける作用特性

10日齢の新生仔ラットにおける麻酔法の特性を評価した。その結果、K/Xは安全域が極めて狭く、新生仔麻酔として不適切であると考えられた。M/M/Bについては、成熟ラットの用量(0.15/2/2.5mg/kg)で十分な麻酔深

度が得られなかった。これに対して、マウスの用量(0.3/4/5mg/kg)では、十分な麻酔効果が得られ、バイタルサインの変動も許容範囲内であった。イソフルランは十分な麻酔深度が得られたが、他剤と比較して麻酔導入に時間を要した。さらに呼吸抑制が強く、25%の個体で死亡を認めた。これに対してセボフルランは、死亡個体を認めず、速やかな麻酔導入と十分な麻酔深度が得られた。以上のことから、10日齢におけるラットに対しては、セボフルランならびにマウス用量のM/M/Bが推奨されると考えられた。新生仔における両麻酔法の感受性は低く、成熟ラットよりも高用量を要求することが明らかとなった。

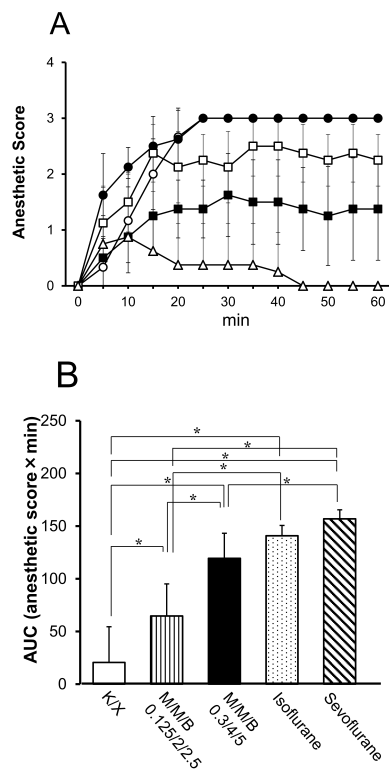


図2. 10日齢の新生仔ラットにおける各種麻酔法の麻酔深度の推移(A)ならびにAUC(麻酔スコア×時間: B).
 :K/X 60/6 mg/kg、 :M/M/B 0.15/2/2.5 mg/kg、
 :M/M/B:0.3/4/5 mg/kg、 :Isoflurane、 : Sevoflurane.

	死亡率	外科麻酔深度到達率
K/X (40/4)	0	0
K/X (60/6)	100	-
M/M/B (0.15/2/2.5)	0	50
M/M/B (0.3/4/5)	0	100
Isoflurane	25	75
Sevoflurane	0	100

表1. 新生仔ラットにおける各種麻酔法の死亡率ならびに外科麻酔深度到達率 (%).

(2)術後疼痛に対する作用特性

各麻酔群における開腹手術後の疼痛レベルを評価検討したところ、以下の知見が得られた。

・過去の報告では、開腹手術後 12 時間に、RGS が正常レベルにまで低下するとされているが、本研究ではすべての群において術後 12-24 時間まで RGS の上昇が持続した。この相違は、切開創の長さの違い、すなわち手術侵襲レベルが異なることに起因すると考えられる。以上より、ラットにおける術後の疼痛管理は、手術当日は必須であり、手術侵襲の程度によっては、翌日も必要であると考えられた。なお、24 時間後における麻酔群間のコルチコステロン濃度には有意差を認めなかった。

・M/M/B では、他の麻酔法に比べて RGS スコアの上昇が軽度であり、そのピークは術後 4 時間であった。K/X については、他剤と比較して RGS スコアのピークが遅く、術後初期における RGS スコアが低かった。術後初期における RGS スコアの低下には、解離性麻酔薬であるケタミンの投与に起因する行動異常が関与していると考えられ、K/X における RGS スコアの低下と疼痛レベルの関連性については、さらなる検討が必要であると考えられた。

・今回検討した麻酔法の中で、イソフルランが最も高い RGS スコアを示し、疼痛が比較的強く発現することが明らかとなった。イソフルランは体内消失が早いことから、鎮痛効果の早期消失が関連していると考えられた。しかしながら、メロキシカムを併用することで、注射麻酔群と同レベルまで RGS スコアが低下した。以上のことから、イソフルラン吸入麻酔を実施する際には、メロキシカムなどの非ステロイド系鎮痛薬を前投与することが必要であると考えられた。

(3) 炎症性サイトカイン発現に対する作用特性

開腹手術実施後における血中の炎症性サイトカイン濃度には有意差を認めなかったが、術創組織における TNF- α ならびに IL-6 の mRNA 発現量はイソフルラン吸入麻酔で有意に高かった。本研究の結果より、麻酔法の選択によって術後の炎症性サイトカインの動態が変化し、特にイソフルランは急性炎症の誘導を助長する可能性が示唆された。

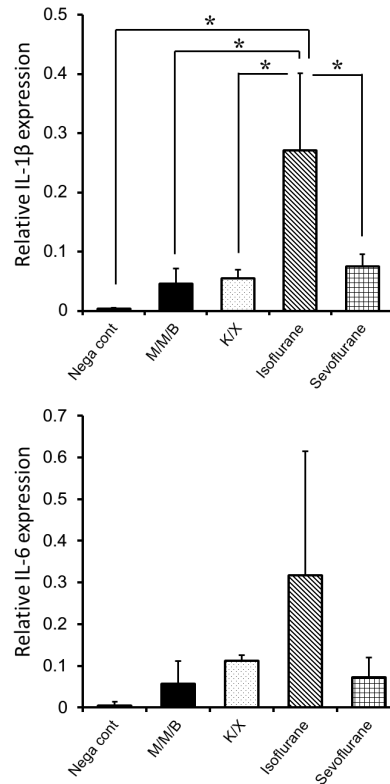
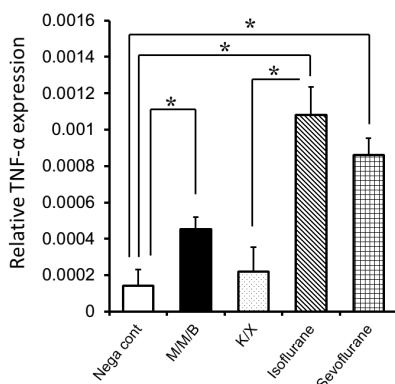


図 3. 炎症性サイトカインの mRNA 発現量。*P < 0.05.

(4) 組織修復過程に対する作用特性

各麻酔下で生検パンチを用いて皮膚を切除し、その後の組織修復過程を 14 日目まで評価した。処置後 7 日目では M/M/B と比較してセボフルランで傷のサイズの縮小を認められたものの、その差は軽度であり、処置後 14 日目では麻酔間では有意なサイズ差を認めなかった。

また、開腹手術後の術創における組織修復関連因子 (TGF- β , Collagen Collagen, EGF) の mRNA 発現量についても、麻酔群間での有意差を認めなかった。

本研究では麻酔法と術後の組織修復に関して際立った変化を認めなかったが、反復投与や長時間麻酔における影響についてはさらなる検討が必要と考えられた。

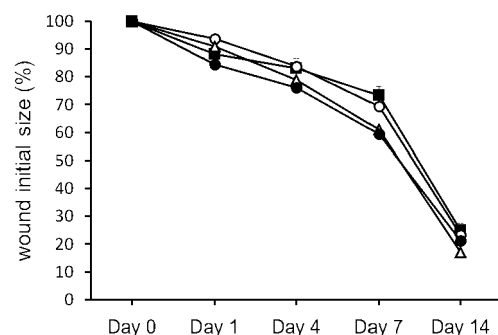


図 4. 各麻酔群における組織修復過程の推移。:K/X 60/6 mg/kg、:M/M/B 0.125/2/2.5 mg/kg、:M/M/B:0.3/4/5 mg/kg、:Isoflurane、:Sevoflurane.

以上のように、本研究ではラットの周術期における麻酔薬の影響について、様々な角度から比較検討し、その特性を明らかにした。本研究で得られた知見は、ラットの麻酔管理の標準化ならびに、周術期管理の向上に寄与するものとして有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計3件)

塚本篤土. げっ歯類における麻酔法の過去・現在・未来 -動物実験における適正な麻酔・鎮痛の実施- 実験動物技術. 2016. (50):21-35.

坂本瑞歩、塚本篤土、猪股智夫. 術後の炎症性サイトカイン発現に対する各種麻酔法の作用特性. 実験動物技術. 2017(in press).

Tsukamoto A, Konishi Y, Kawakami T, Koibuchi C, Sato R, Kanai E, and Inomata T. Pharmacological properties of various anesthetic protocols in 10-day-old neonatal rats. *Experimental Animals*. 2017 (in press).

〔学会発表〕(計6件)

塚本篤土、内田佳歩、前里静香、猪股智夫. ラットのイソフルラン吸入麻酔におけるミダゾラム・ブトルファノールの併用効果. 第62回実験動物学会総会. 2015.

塚本篤土. げっ歯類の麻酔法. 実験技術者協会関東支部懇話会. 2016 (招待講演).

塚本篤土、小西優以、猪股智夫. 新生仔ラットにおける各種麻酔法の作用特性. 第63回実験動物学会. 2016.

塚本篤土、川上貴子、坂本瑞歩、猪股智夫. デクスメデトミジンをベースとしたマウスにおける新規バランス麻酔の確立. 第50回実験動物技術者協会総会. 2016.

坂本瑞歩、鯉淵千春、塚本篤土、猪股智夫. 老齢マウスにおける各種麻酔法の作用特性. 第50回実験動物技術者協会総会. 2016.

塚本篤土、新野夏子、猪股智夫. 手術侵襲下における各種麻酔法の作用特性. 第64回実験動物学会総会. 2017.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

研究代表者

塚本篤土 (Atsushi TSUKAMOTO)

麻布大学・獣医学部・講師

研究者番号: 00647175