

資料 1

苦痛カテゴリ検索表

分類	手技/処置	カテゴリ	備考
個体識別	色素塗付、毛刈り、入墨、耳パンチ、耳カット、マイクロチップなど	B	
保定/拘束	用手保定	B	無麻酔・無鎮静下での数分間の姿勢制御。
	採血用保定器使用（マウス、ラット、ウサギ）	B	
	筒状マーマセット保定器	C	
	ラット用ボールマンケージ	C	無麻酔・無鎮静下での数時間にわたる姿勢もしくはは生理・生態・習性の制御。
	マカク属サル用モンキーチェア	C	
身体検査	体重・体格測定	B	不動化のための麻酔をすることがある。
	体温測定	B	
	脳波測定	B	
	心電図測定	B	
	超音波画像測定	B	
	放射線画像撮影（X線、MRI、CT等）	B	
	蛍光・発光イメージング	B	
	移植腫瘍サイズ計測	B	
	運動量測定（強制せず）	B	
制限	絶食・絶水（別表1）	B~D	絶食・絶水は動物種による代謝時間の差を考慮。
行動観察	摂餌・摂水量、行動量の測定、発情行動の観察、オープンフィールド試験	B	自発行動の観察。
	強制運動、生態・習性の制限、劣悪環境への暴露、攻撃性試験	C/D	負荷・制限をかけたときの行動観察。
材料採取	麻酔下で行い、覚醒させず安楽死させる臓器・組織の採取	B	眼窩静脈叢からの採血は麻酔下で行う。 静脈採血を10回以上反復実施する場合はC。 マウス・ラットのテールカット
	スワブ採取（鼻腔、口腔、排泄腔）	B	
	カテーテルによる採尿/導尿（麻酔薬塗布）	B	
	無麻酔で行う採血（注射器または表皮薄切	B/C	

資料 1

	による末梢静脈採血など)		
	麻酔下の採血（動脈、眼窩静脈叢、体腔内血管）	C	は3~4週齢での採取が原則。
	麻酔下のバイオプシー（テールカット、耳介、皮膚、皮下脂肪、骨髄、腎臓、肝臓、消化管粘膜など）	C	
投与・接種	静脈、腹腔、筋肉（吹き矢を含む）、皮下（硬膜外を含む）、皮内、経皮（パッチ）/経粘膜、経口（胃ゾンデ、カテーテル使用含む）、経気道/吸入（気管内挿管を含む）	B	麻酔薬の投与を含む。胎齢15日以上のマウス・ラット胎子は苦痛カテゴリーを適用する。
	脳（室）、脊髄、鞘内、足底部、動脈、体表リンパ節、内臓血管（以上、麻酔下）	C	無麻酔で行う場合は理由を明記する。
	アジュバント乳化抗原 フロイント不完全 フロイント完全	C D	できるだけ不完全アジュバントを使用し、足底部は避ける。
移植	皮下、静脈内、腹腔内	B	足底部は選択した理由を明記。
	足底部/フッドパッド（麻酔下）	C	
	卵巣移植、臓器内移植（麻酔下）	C	
	臓器移植	D	
処置	麻酔下で行い、覚醒させず安楽死させる処置	B	灌流固定は安楽死処置後に実施するものとする。 別表2.放射線照射は線量と照射部位を考慮。
	気管内挿管（局所麻酔下）	B	
	内視鏡スコープ挿入（麻酔下）	B	
	紫外線照射（無拘束による日焼け実験）	B	
	浸透圧ポンプ埋め込み	C	
	脳内、筋肉内電極挿入（麻酔下）	C	
	脳室内カニューレ挿入（麻酔下）	C	
	動脈/静脈内カニューレーション（麻酔下）	C	
	留置針の設置 生態・習性を妨げない場合 生態・習性を妨げる場合	B C	
	刺激毛、紫外線による痛覚反応測定	B	
	放射線照射（別表2）	B~D	
手術	覚醒させず安楽死させる手術の実習	B	精管結紮、胚移植は開腹手術を

資料 1

(麻酔下)	帝王切開	C	伴う。
	頭蓋骨穿孔術	C	
	皮膚切開・縫合・2週間後の抜糸(実習)	C	
	脾臓摘出	C	
	精巣・卵巣摘出	C	
	精巣の腹膜固定	C	
	精管結紮(マウス・ラット)	C	
	胚移植(マウス・ラット)	C	
	卵管結紮	C	
病態モデル	食餌性肥満(機能障害なし)	B	原則として最大限の病態が発生することを前提にカテゴリーを選択する。 重篤に至る前に安楽死を行う場合は、その旨を明記し、適切なカテゴリーを選択する。
	大腸炎(局所・短時間)	C	
	膀胱炎(局所・短時間)	C	
	炎症性疼痛(局所・短時間)	C	
	自己免疫性疾患 重症に至らないもの	C	
	重症に至るもの	D	
	高脂血症	C	
	認知症	C	
	肥満	C	
	腎不全(ネフローゼを含む)	D	
	発がん	D	
	アトピー性皮膚炎(長期にわたってストレス大)	D	
	パーキンソン病	D	
	糖尿病	D	
	高血圧症(脳卒中モデルを含む)	D	
	心筋梗塞/虚血	D	
	脳梗塞(虚血)	D	
	脊髄損傷	D	
	末梢神経損傷/変性	D	
	筋ジストロフィー	D	
担がん	D		
薬理毒性	電気刺激	B	

資料 1

	テールフリック	B	
	ホットプレート	B	
	酢酸ライジング	C	
	単回投与毒性試験	D	
	反復投与毒性試験	D	
	生殖発生毒性試験	D	
	がん原性試験	D	
腫瘍/発がん 実験	がん細胞移植	D	最大の病態発現を前提にカテゴリーを選択する。
	化学発がん	D	
安楽死	化学的方法（麻酔薬の過剰投与、麻酔下のKCl投与、炭酸ガス吸入、安楽死として認められたその他のガスの吸入）	B	物理的方法は事前の軽麻酔処置を推奨する国もある。
	物理的方法（頸椎脱臼、脊髄破壊、断頭、麻酔等で意識喪失した動物の放血・全採血、胎子の低体温処置）	B	
感染寄生	顕性（致死を含む）	D	
	不顕性	C	
	抗体作製（アナフィラキシーショックを回避）	C	

資料 1

別表 1. 絶食・絶水の苦痛カテゴリー

動物種		カテゴリーB	カテゴリーC	カテゴリーD
		ほとんど不快感がない。 体重変動は日内変動程度	軽いストレスを与える。 体重変動は日内変動を超える。	強いストレスを与える。 2、3日で体重が20%以上減少したら中止
げっ歯類	絶食	12時間未満	12～24時間	24時間以上
	絶水	2時間未満	2～12時間	12時間以上
イヌ	絶食	24時間未満	24～48時間	48時間以上
	絶水	12時間未満	12～24時間	24時間以上
ネコ	絶食	24時間未満	24～48時間	48時間以上
	絶水	12時間未満	12～24時間	24時間以上

資料 1

別表 2. げっ歯類における放射線照射の苦痛カテゴリー (ここでの線量は 200kv、10mA のエネルギーの X 線照射による皮膚表面レベルでの線量)

照射条件	カテゴリーB	カテゴリーC	カテゴリーD
	照射の影響は一時的である	生理機能が一時的に損なわれるが回復する。 リンパ球等の一時的な減少	生理・生態・習性を損なう障害が残る。 骨髄死による致死的障害をもたらす。
全身あるいは胸腹部の照射	4Gy 以下	4Gy から 8Gy	8Gy 以上

照射条件	カテゴリーB	カテゴリーC	カテゴリーD
	照射の影響は一時的である	生理機能が一時的に損なわれるが回復する。 リンパ球等の一時的な減少	生理・生態・習性を損なう障害が残る。 骨髄死による致死的障害をもたらす。
手足・頭部への局所照射 (1 回)	8Gy 以下	8Gy から 20Gy	20Gy 以上

実験動物の安楽死処置法

安楽死とは、迅速かつ苦痛を伴わない安楽な死を意味する。一方で、安楽死後の試料採取や検索に障害とならないよう実験目的に沿うような方法を選択しなければならない。又、重要なのは死の確認である。呼吸停止及び心停止を確実に確かめなければならない。安楽死の方法としては、大きく二つの方法がある。なお、げっ歯類胎児・新生児については、別紙の日本実験動物医学会の【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】を参考にされたい。

(1) 物理的方法

頸椎脱臼と断頭の方法があるが、これらの方法は熟練した実験者が行えばマウスやラット等の小型実験動物の安楽死法として有効である。万一失敗した時は、実験動物にとって苦痛となりかねないので、細心の注意が必要である。さらに可能な限り前もって鎮痛薬や麻酔薬を投与する。

* 頸椎脱臼：マウスを平らな台の上に置き、一方の手の親指と人差し指で頭の後ろ（頸背部）を下方に押しつけ、他方の手で尾のつけ根の近くを持って身体を伸ばし固定する。次いで、頭を固定している手を前方へ押し、尾を持っている手を後ろ上方に一気に強く引く。正しく頸椎が脱臼されれば、瞬間でマウスの身体の力が抜けてしまう。一時的に体動が残るが間もなく止まる。瞬時に意識消失、死亡するため動物の苦痛は少ない。実験に支障がなければ事前に軽麻酔を行っておくのもよい。ラットの場合も同様の方法で行うことが出来るが、かなりの熟練と力がある。

* 断頭：マウスの場合にはよく切れる鋭利なハサミを用いる。ラットの場合には専用の断頭器が市販されているので利用する。この場合も実験に差し支えなければ事前に軽麻酔を施すことが望ましい。

(2) 化学的方法

* ペントバルビタールの過量投与

この麻酔薬は意識消失が早く、不安、興奮はなくその効果は用量、濃度及び投与速度に依存し、スムーズに安楽な状況にでき、安らかに死に至らしめることができる。又、マウスからイヌ・ブタまで各種の実験動物の安楽死に用いることができる。

麻酔適用量の3~4倍量又は100~150mg/kgを静脈内又は腹腔内投与を行う。

* 炭酸ガス

炭酸ガスには麻酔作用があり、まず意識消失が起こり、ついで無意識下で酸素欠乏により死亡する。この時、チャンバー中の炭酸ガス濃度をどのような状態にすべきかについては、動物福祉の観点から多くの議論があり、完全な結論は得られていない。つまり、最初から高濃度（50~100%）にしておくと、動物を曝した時に、動物は意識が消失する前の少なくとも10から5秒間、苦痛を感じている可能性がある。一方、濃度を徐々に上げていくと意識喪失前に空気の濃度が減っていくにつれて呼吸困難をまねく。

資料 2

このため、炭酸ガスと同時に酸素を加えるなどの対策が考えられるが、この事により意識喪失までの時間が長引くなどの問題が起こり、十分な解決策は得られていない。

ここでは、暫定方法として安楽死専用容器内に動物を入れ、「炭酸ガス濃度を1分間で20%ずつ徐々に上げ、5分間で100%にもっていく」方法、または酸素を加える方法であり「炭酸ガス：酸素（6：4）の混合ガス（加湿をすると良い）を容器内にいれ、動物が意識を喪失したところで炭酸ガスを100%に上げる」を提案する。動物は炭酸ガス安楽死専用容器にケージごとまたは直接入れてから、炭酸ガスまたは酸素との混合ガスを送る。100%に達したのちは、少なくとも10分はこの濃度のガスを流し続ける。

この場合、死亡の第一の原因は酸素欠乏であるために、死後変化として血液ガスの変化とともにほかの組織に対する低酸素血症による影響を考慮する必要がある。一方、炭酸ガス濃度の高い空気を吸えばヒトでも酸素欠乏を起こすため、室内の換気と装置の取扱いには注意が必要である。

* ハロタンやイソフルラン等の吸入麻酔薬も過量投与により安楽死を行なう事ができる。

* 硫酸マグネシウム (MgSO₄) 又は塩酸カリウム (KCL)

高用量投与により完全な神経遮断と低酸素血漿により死亡する。これらの薬物は鎮痛・麻酔作用がないため、動物をあらかじめ全身麻酔を行う必要がある。

文献：安楽死処分法の国際的なガイドとして次の文献が有用である。

AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition

(米国獣医学会動物の安楽死処置に関する指針：2013年版)

これには実験動物はもとより、ウシ等の家畜、愛玩動物、野生動物、両生類や水生動物等、多くの動物種に関する安楽死処置法が記載されている。

【東北大学医学部附属動物実験施設ホームページより抜粋】

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 (日本実験動物医学会ホームページより抜粋)

日本実験動物医学会は、動物実験に用いられるげっ歯類の胎児や新生児の人道的な取り扱い方法や最良の安楽死法について 2009 年 12 月に声明を発表した。これは我が国ではげっ歯類の胎児や新生児を用いた多くの研究がなされているが、その人道的な取り扱い方法や安楽死法に関するガイドラインがないため、研究者が動物実験を立案する際、あるいは動物実験委員会が実験計画書を審査する際の基準がなく混乱があったからである。日本実験動物医学会は専門委員会を立ち上げ、最新の知見を調査すると共に、胎児や新生児を利用する試験に関する（各国の）ガイドラインなども併せて調査し、議論・検討を行った結果を公表した。それからほぼ 5 年間の経過した 2014 年 9 月に、日本実験動物医学会は 2009 年に公表した声明の内容と最新の知見（1, 2, 3）との間に齟齬があることを認識し、再度専門委員会を立ち上げることにした。なお、今回の専門委員会は日本実験動物医学会と日本実験動物医学専門医協会（以下、本学協会）との合同委員会とした。専門委員会は、最新の知見を収集し議論を重ねて、げっ歯類の胎児・新生児の安楽死に用いる方法の留意点について 以下の見解に達したので、ここに報告する。

【背景】

げっ歯類の胎児や新生児は、新薬の開発過程における生殖発生毒性試験や、*in vitro* 試験に用いる初代培養細胞の供給源などとして実験に用いられる。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・麻酔などの処置や意識を消失した状態で安楽死を施すなどの人道的な取り扱いが必要とされる（3）。発生に関する研究から、胎児の発生初期の段階では脳・神経系は疼痛を知覚できるほど十分には発達していないが、妊娠後期の胎児は侵害刺激に対して忌避反応を示すことから、知覚神経系が十分に発達していることが報告されている（4, 5）。しかしながら、哺乳類の胎児・新生児であっても、早熟性の種（モルモット）と晩熟性の種（マウス、ラット、ハムスターなど）では中枢神経系の発達の状態が異なり、マウスやラットなどの胎児・新生児は、侵害刺激には反応しても脳は疼痛や不快を知覚する状態にないことが示されている（6）。この知見は従来の胎児・新生児に対する鎮痛の概念を大きく変更させるものであり、専門委員会はこの知見を基に前回の声明の内容を見直すこととした。

1. 疼痛管理

「人道的な取り扱いを考慮する必要がある」が意味するものは、「動物が苦痛を感じている」、言い換えれば、「個体として苦痛を感じるほど成熟している場合には疼痛管理を必要とする」である。このことに大きく寄与する因子として神経系の発達があることは言うまでもないが、特に、神経系が生理学的に機能していることが重要である（5, 7）。ここでは神経系の発達の程度を鑑み、胎児の発達段階を妊娠前期と妊娠後期に分け、さらに新生児を成獣と異なる一つの段階として、それぞれに疼痛管理の考え方を示す。

1) 妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は神経管の発達が未熟であり、疼痛を知覚するほど成熟していない。また、自身で生命を維持する能力が備わっていないため、母体を安楽死させる、あるいは母体から摘出すること等により、母体からの血流が途絶えると疼痛・不快などを知覚することなく死に至る。従って、神経系が未発達の状態にある妊娠前期の胎児については、鎮痛・麻酔を施すことなく実験に必要な処置を行って良い。また、胎児を安楽死させる方法を考慮する必要はない。

2) 妊娠後期の胎児

子宮内に存在して母体から血液の供給を受けているヤギの胎児は、母体から供給される強力な神経遮断作用、催眠作用や麻酔作用を有する物質により持続的に催眠状態にあり、疼痛刺激を知覚することがない状態におかれていることが報告されている(8)。この状態は哺乳類一般に保持されており、母体に対する鎮痛・麻酔処置が十分であれば子宮内の胎児に対して配慮する必要性はない(9)。また、母体が死亡した場合でも、子宮内の胎児は催眠状態のまま母体からの血流の途絶により死に至ることから、胎児を死亡した母体から摘出して安楽死を施す必要はない(3)。麻酔下の母体から摘出された胎児については、覚醒する個体があることから何らかの処置が必要となる可能性がある。妊娠後期の胎児は、侵害刺激に対して忌避反応を示す。また、母体から摘出した胎児では、摘出後に自発呼吸を開始する個体がみられ、適切な環境が与えられれば生存することも可能である。従って、摘出した胎児を試験に用いる場合には鎮痛・麻酔の処置を行うこと、あるいは意識を消失させて速やかに安楽死させることが必要である。特に、モルモットでは、母体から摘出した胎児は疼痛や不快を知覚するので、妊娠 34 日目以降のモルモット胎児には、摘出後速やかに鎮痛・麻酔を実施すべきである。一方、マウスやラットなどでは、妊娠 15 日目以降の胎児は、侵害刺激に対して忌避反応を示すが、脳が痛覚や不快を認識できるほどには発達していないため、鎮痛・麻酔を実施する必要はない。

3) 新生児

モルモットの新生児は成獣と同様に疼痛や苦痛を知覚することから、実験に際しては、成獣に準じて鎮痛・麻酔を施し、あるいは安楽死法を選択する。一方、マウスやラットなどの新生児は、生後も徐々に脳の機能が発達することから、疼痛や苦痛を知覚ようになるには一定の期間を必要とする。また、新生児のオピオイド受容体の数は成獣に比べて非常に多く、成熟するにつれて成獣の状態に減数すること(10)や、ラットの新生児は疼痛反応が成獣とは異なり、成獣と同様の反応を示すには生後 2 週間ほどを要することも報告されている(11)。本学協会は、7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児では、疼痛や苦痛を知覚するほど十分には神経系が発達していないため、実験や安楽死に際して鎮痛・麻酔を施す必要はないが、7 日齢以降の新生児に対しては、鎮痛・麻酔などの処置が必要であるとする。特に、生後 2 週間までは、低酸素状態に抵抗性であることを考慮して鎮痛・麻酔もしくは安楽死法を選択することが重要である。

2. 鎮痛・麻酔

胎児や新生児は成獣と異なり成長の過程にあることに配慮して、鎮痛薬や麻酔薬を選定することが必要である。特に、薬物の代謝・排泄に関わる肝機能や腎機能が十分に発達していないことに配慮して、用量・用法に注意する必要がある。この観点からペントバルビタールは、低用量では効果が不安定で高用量では致死的であるため麻酔薬として使用することを推奨しない(12)。

資料 2

1) 妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は神経系の発達が未熟であることから、実験に必要な処置を施す際に疼痛に対する配慮は必要ない。従って、鎮痛・麻酔の処置を行わなくても良い。

2) 妊娠後期の胎児

子宮内にある胎児に何らかの処置を施す場合、母体を十分に麻酔することに配慮すれば、胎児には特別の配慮をする必要はない。また、母体から摘出したマウスやラットの胎児は疼痛や不快を知覚しないことから、同様に、特別な配慮は不要である。しかし、母体から摘出したモルモットの胎児に何らかの処置を施す場合には、疼痛を知覚することに配慮して鎮痛や麻酔などを施す必要がある。マウスやラットなどの胎児に麻酔を施す場合には、イソフルランやセボフルランなどの吸入麻酔薬の使用や体温を低下させる麻酔法などが推奨される。ただし、胎児は低酸素状態に抵抗性であることから、イソフルランなどの吸入麻酔薬を用いた場合には、麻酔に要する時間が延長することに配慮して、詳細に観察する必要がある。なお、早熟性のモルモットでは妊娠 34 日齢以降の胎児を妊娠後期の胎児とする。

本学協会として推奨する麻酔法を以下に示す。

- (i) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬の使用（麻酔期に至るまでに時間を要することに配慮する）
- (ii) 胎児を直接、冷源に触れさせない条件での低体温（13）
- (iii) 胎児に注入可能な薬剤の使用（肝機能が十分に発達していない場合があるので、用量、用法に配慮する）

また、リドカインなどの局所麻酔薬、オピオイド類（ただし、パーシャルアゴニストであるブプレノルフィンは除外する）および非ステロイド性抗炎症薬の使用を推奨する。

3) 新生児

モルモットの新生児に何らかの処置を施す場合には、成獣と同様に、疼痛を知覚することに配慮して鎮痛や麻酔などを施す必要がある。マウスやラットなどの新生児に麻酔を施す場合には、イソフルランやセボフルランなどの吸入麻酔薬の使用や体温を低下させる麻酔法などが推奨される。また、マウスやラットなどの新生児は低酸素状態に抵抗性であることから、イソフルランなどの吸入麻酔薬を用いた場合には、麻酔に至る時間が延長することに配慮して詳細な観察が必要である。

本学協会として推奨する麻酔法を以下に示す。

- (i) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬の使用（マウスやラットなどの新生児は麻酔期に至るまでに時間を要することに配慮する）
- (ii) マウスやラットなどの新生児を直接、冷源に触れさせない条件での低体温（13）
- (iii) 注入可能な薬剤の使用（晩熟性の種の新生児は肝機能が十分に発達していない場合があるので、用量、用法に配慮する）

また、リドカインなどの局所麻酔薬、オピオイド類（ただしパーシャルアゴニストであるブプレノルフィンは除外する）および非ステロイド性抗炎症薬の使用を推奨する。

3. 安楽死

安楽死を実施する場合、安楽死に関わる作業者が経験する精神的不安、不快感、あるいは苦痛に配慮して科学的研究の目的を損なわない限り、最も心理的負担の少ない方法を選択することが望ましい。従って、頸椎脱臼や断頭などの方法は熟練者が実施することが必然ではあるが、選択する順位としては下に置き、かつ、深麻酔下で実施することを推奨する。なお、安楽死を目的として深麻酔を実施する際には、先に示した麻酔法に加えてペントバルビタールなどの注射麻酔薬を使用することができる。なお、マウスやラットなどの新生児を安楽死する場合には、特に7日齢未満の新生児は疼痛や不快を知覚することがないので、麻酔を施すことなく液体窒素に浸漬する方法や断頭などにより安楽死させることも可能であるが、動物実験委員会によりその科学的必然性が審査されることを推奨する。

マウスやラットなどの胎児や新生児の安楽死法として吸入麻酔薬を用いることは、胎児や新生児は低酸素状態に抵抗性であることから死に至る時間が延長すること、死の確認が容易でないことから、本学協会としては推奨しない。また、極超短波照射による安楽死法も胎児や新生児用の機材が市販されていないことから、推奨する方法から除外した。しかし、本学協会が推奨しない方法であっても、動物実験委員会が科学的研究の目的を果たすために不可欠であるとの研究者の判断を承認すれば、成獣に使用している安楽死法を胎児や新生児に適用することは可能であると考えられる。

1) 妊娠前期の胎児

妊娠前期の胎児は自身で生命を維持する能力が備わっていないため、特に安楽死させる必要はないが、モルモットの子宮から分離された胎児が Vital sign を示す場合には速やかに適切な安楽死の方法を講じ、死に至る時間を延長させてはならない。

2) 妊娠後期の胎児

妊娠後期の胎児を安楽死させる場合には、注射麻酔薬の過量投与や深麻酔下での化学的、あるいは物理的方法を推奨する。ただし、母体とともに安楽死させる場合には、母体を安楽死させた後積極的に胎児を安楽死させるために母体から摘出する必要はない。ただし、母体の死亡後に胎児が死に至るまでには時間を要することに配慮する（麻酔下の母体を放血により安楽死させた場合、出血停止後5分以上胎児を子宮内に留置する（14））。また、マウスやラットなどの胎児は、母体から摘出後であっても疼痛や不快を知覚しないことから、疼痛の軽減に配慮する必要はない。一方、モルモットの胎児は、成獣と同様に、科学的必然性が動物実験委員会で認められない限り、麻酔下に安楽死を実施する。

本学協会として推奨する安楽死法は以下の6種類である。

- (i) ペントバルビタールなどの腹腔内・胸腔内への過量投与
- (ii) 塩化カリウムの心臓内投与（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）
- (iii) 液体窒素への浸漬（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）
- (iv) 固定液への浸漬（深麻酔下にて実施）*
- (v) 断頭（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）
- (vi) 頸椎脱臼（モルモットの胎児は深麻酔下にて実施）**

*；晩熟性の種の胎児であっても死に至るまでに時間を要することから、深麻酔下で実施することを推奨する。

**；成獣の頸椎脱臼とは異なるため、頸椎損傷という表現がより適切と思われる。

3) 新生児

モルモットの新生児や、疼痛を知覚する日齢以降（生後 7 日齢）のマウスやラットなどの新生児を安楽死させる場合には、成獣と同様に、注射麻酔薬の過量投与や深麻酔下での化学的、あるいは物理的方法を推奨する。なお、マウスやラットなどの新生児では吸入麻酔薬単独で安楽死させることは、死に至る時間を考慮すると人道的ではない。なお、マウスやラットなどの 7 日齢未満の新生児は、同種の胎児と同様に疼痛や不快を知覚しないことから、疼痛の軽減に配慮する必要はない。

本学協会として推奨する安楽死法は以下の 8 種類である。

- (i) ペントバルビタールなどの腹腔内・胸腔内への過量投与
- (ii) 塩化カリウムの心臓内投与（7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下に実施）
- (iii) イソフルラン・セボフルランなどの吸入麻酔薬（7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児除く）
- (iv) 二酸化炭素（7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児は除く）*
- (v) 液体窒素への浸漬（7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下にて実施）
- (vi) 固定液への浸漬（深麻酔下にて実施）
- (vii) 断頭（7 日齢未満のマウスやラットなどの新生児を除いて深麻酔下にて実施）
- (viii) 頸椎脱臼

*；可能な限りホームケージにて二酸化炭素を徐々に置換する方法で実施する。

本声明では吸入麻酔薬の使用法については適宜コメントしたが、二酸化炭素の使用については言及していない。しかし、マウスやラットなどの胎児や新生児は低酸素状態に抵抗性であることから、二酸化炭素を麻酔として用いることはもとより、安楽死法に用いることも適切ではないと判断している。また、鎮痛・麻酔などの処置を必要とする胎児や新生児の日齢（胎齢）については、目安としての数字を示しているが、これらの内容を含めてここに記載した方法の是非は動物実験委員会判断すべきと考える。

最後に、ここに記載されている内容は現時点での科学が証明している事象から判断した結果をまとめたものであることから、新しい事象が判明した場合には、本学協会として速やかに新たな見解を取りまとめるよう努力する所存である。

2015 年 8 月 11 日
日本実験動物医学会
日本実験動物医学専門医協会
専門委員会委員

鈴木 真（委員長）、安居院 高志、黒澤 努、久和 茂、
中井 伸子、森松 正美、山添 裕之、横山 政幸

References

1. MLH Campbell et al., DJ Mellor and P Sandoe. How should the welfare of fetal and neurologically immature postnatal animals be protected? *Animal Welfare* (2014) 23, 369-379.

資料 2

2. DJ Mellor and RG Lentle, Survival implications of the development of behavioural responsiveness and awareness in different groups of mammalian young. *New Zealand Veterinary Journal*. (2015) 63, 131–140.
3. AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition
4. Report of the MRC Expert Group on Fetal Pain, 28 August 2001.
5. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2, working party report. *Laboratory Animals* (1997) 31, 1–32.
6. DJ Mellor, Galloping colts, fetal feelings, and reassuring regulations: putting animal welfare science into practice. *J Vet Med Educ* (2010) 100, 37–94.
7. DJ Mellor et al., The importance of ‘awareness’ for understanding fetal pain. *Brain Res. Review* (2005) 49, 455–471
8. DJ Mellor and TJ Diesch, Onset of Science: The potential for suffering in fetal and newborn farm animals. *Applied Animal Behav. Sci.* (2006) 100, 48–57. <http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-0D-02-062.html>
9. Guidelines to promote the wellbeing of animals used for scientific purposes: The assessment and alleviation of pain and distress in research animals. Australian Government 2008 <http://www.nhmrc.gov.au/publications/synopses/ea18syn.htm>
10. AH Dickson and W Rahman, Mechanisms of Chronic Pain and the Development Nervous System in Chronic and Recurrent Pain in Children and Adolescents. In *Progress Research and Management* edited by McGrath & GA Finley, IASP Press (1999) 13, 1–34
11. GA Barr, Maturation of the biphasic behavioural and heart rate response in the formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (1998) 60, 329–335
12. Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research (Committee on Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience and Behavioral Research, National Research Council), The National Academies Press, 2003
13. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Edited by RE Fish et al., 2nd edition, ACLAM, 2008
14. OIE. Article 7.5.5: Management of foetuses during slaughter of pregnant animals. In: *Terrestrial animal health code*. 2014 http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_aw_slaughter.htm

実験動物の被験物質の投与(投与経路、投与容量)及び採血に関する手引き

EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)、ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)
2000年2月作成

序文

本書は EFPIA(欧州連邦製薬工業協会)と ECVAM(欧州代替法バリデーションセンター)の主導により作成されたものである。本書は、最新設備を備えた安全性評価研究室において研究者が研究計画を立てる際の一助としてデータを使いやすくするだけでなく、実験動物の愛護にも最大限配慮することを目的として作られている。

本書はヨーロッパの製薬業界で働く研究者を対象として作られているが、一連のデータセット及び改良案の基礎となる原則は、研究所や大学、さらには異業種を問わず、動物に対して投与・採血等の技術を用いる全ての人にも同じように利用できるものと考えられる。

被験物質の投与や血液検体の採取を扱った文献は非常に多くあり、また、多くの研究所には長年の習慣や経験に基づいて作成された独自の「内部」指針も存在する。European Union Directive 86/609EEC(EU, 1986)の規定により、我々は苦痛を最低限に抑えるための実験法を改良する義務を負った。試験計画を立てたり、レビューする際に有益な予備知識がこの手引き書から得られることを期待している。

本書は可能な限り学術雑誌に掲載された文献に基づいているが、これが不可能な場合には、内部データ及びワーキンググループ(作業部会)での経験(並びに医薬品業界より提出された有用なコメント)を活用して最終意見としている。本書ではまた、被験物質の投与、採血に関連する技術をさらに改良するという継続的な要求も扱っており、それらを行う方法も提案する。動物実験の重複を避けるため、研究所間で積極的にデータを共有すべきであり、同時に、動物愛護に関する経験的な技術及び過量投与等に起因する科学的な問題も共有すべきである。本書に記載する推奨事項は、「正常」動物に関するものであり、例えば、妊娠期や授乳期の動物については特別の配慮が必要である。投与容量を多量にした場合や過剰量の採血を行った場合、特に麻酔薬を投与した場合には、試験結果の解釈に混乱を来すおそれがあると考えられる。

1. 被験物質投与に関する手引き

- (1) 緒言
- (2) 投与容量
- (3) 投与経路
- (4) 投与に用いる溶媒

2. 採血に関する手引き

- (1) 緒言
 - (2) 循環血液量
 - (3) 採血量
 - (4) 採血部位
 - (5) 針穿刺の頻度
 - (6) カニューレ挿入(cannulation)
 - (7) 麻酔
 - (8) 結論及び推奨事項
-

1. 被験物質投与に関する手引き

(1) 緒言

実験動物への投与は種々の科学的な研究に必要不可欠であり、規制当局の要求に合致させるためにも不可欠である。特に製薬企業では動物愛護と正当な科学研究を両立できる投与方法の基準が検討されてきた(Hull 1995)。

新薬の前臨床段階における安全性評価では、その医薬品に要求される安全域を確立するため、複数の「有効量」を投与することが一般的である。毒性が低い化学薬品や、通常の処方ではほとんど溶解しない化学薬品について、学術上の要求と規制上の要求の両方を満たすためには、個々の動物に対する投与容量を多量にしなければならないこともある。臨床使用目的もまた一般的な投与容量を上回ることを容認する要因となる。静脈内への適用を目的とした造影剤や血漿増量剤がその例である。

本ワーキンググループの目的は以下の通りである。

- a) 規制当局より求められる毒性試験で用いる通常の実験動物種に対する投与容量について、その指針を提供すること。
- b) 動物愛護と実用性の観点から最良の実施方法であることを説明できるような定型試験における投与量水準について、統一見解を提供すること。
- c) 一般的な試験において上限を提示できる投与量水準の指針を作成すること。なお、この指針は特殊な研究の場合にはあてはまらない。

(2) 投与容量

最も頻用されている動物種に一般的に用いられている投与経路で投与する際の投与容量を表1に示す。これらの投与容量は、公表文献及び内部指針に基づくコンセンサスの得られた値である。なお、マーモセットとミニブタも、ヨーロッパでは使用が増えていることから、現在では頻用動物種の範疇に含まれると考えられる。

表中の各欄には2つの数値が記載されている。各欄の左側の数値は、単回もしくは反復投与時の最適投与容量の基準を示したものである。括弧で括った2番目の数値(記載箇所のみ)は、投与可能な最大容量を示している。もし、この容量を超える場合には動物愛護の問題や科学的問題が密接に関係してくるため、信頼できる獣医外科学専門医に照会するべきである。なお、場合により、表中の数値の中には、薬局方の要件を配慮した数値もある。

表 1 推奨投与容量（許容最大投与容量を含む）

種	投与経路と投与容量 (mL/kg *は mL/投与部位)					
	経口	皮下	腹腔内	筋肉内	静脈内 (急速)	静脈内 (低速)
マウス	10 (50)	10 (40)	20 (80)	0.05* (0.1)*	5	(25)
ラット	10 (40)	5 (10)	10 (20)	0.1* (0.2)*	5	(20)
ウサギ	10 (15)	1 (2)	5 (20)	0.25 (0.5)	2	(10)
イヌ	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)
サル	5 (15)	2 (5)	— (10)	0.25 (0.5)	2	(—)
マーモセット	10 (15)	2 (5)	— (20)	0.25 (0.5)	2.5	(10)
ミニブタ	5 (15)	1 (2)	1 (20)	0.25 (0.5)	2.5	(5)

表に関連する脚注：

- (-)：利用できるデータなし
- 非水性注射物については吸収時間を考慮の上、再投与すること
- 筋肉内投与の投与部位は1日あたり2箇所を超えないこととする
- 皮下投与の投与部位は1日あたり2～3箇所までとする
- 皮下投与の投与部位については Freund のアジュバンドの投与は含まない。

上記に示した最大投与容量の幾つかは最近の文献 (Flecknell 1996, Wolfensohn & Lloyd 1994) から引用した値であるが、「最適の」投与容量と比べると高くなっている。特に反復投与を実施する際には、動物愛護に対して注意が必要であり、投与容量が多くなる被験物質の処方にも注意が必要である。投与容量を多くすると、それに対する生理反応が生じるため、試験期間は制限され、科学的妥当性も揺らぎかねない。従って、試験実施計画書の最終版を作成し、それらに基づいて試験を開始する際には、それに先だって、例えば査察機関や倫理審査委員会が倫理的な見地に立ってこれらの事項を熟慮することが必要不可欠といえる。また、科学的な理由のみならず倫理的な理由からも、新処方（新製剤）の大規模試験を行う際には、その前に、物理化学的配合変化に関する試験（in vitro 試験）と小規模な予備試験（少数の動物群を用いた試験）を実施することを強く勧める。投与容量は最低限、投与物質の処方及び投与の正確度に見合ったものでなければならない。

(3) 投与経路

経口投与

時として、投与前に実験動物の摂餌を制限する必要がある。このような要因は吸収に影響を及ぼす可能性がある。投与容量が多い（40mL/kg）と胃に過剰な負荷がかかり、急速に小腸に移行することが確認されている (Hejgaard et al 1999)。絶食期間は、動物種の摂餌のパターン、摂餌制限を始める時点、動物種の生理機能、投与所要時間、摂餌と照明のサイクルによって異なる (Vermeulen et al 1997)。正確な投与を行うため、また投与中の事故を避けるため、投与液は経口ゾンデを用いて投与することを勧める。

非経口投与

薬物を非経口投与する際に考慮すべき要因は、投与容量、投与前後の処方の安定性、pH、粘度、浸透圧、緩衝能、処方の無菌性や生体適合性と いえる。これらの要因は反復投与試験では特に重要となる。これらの要因については Claassen(1994)による一部の詳報に概説されている。投与容量、注射液の粘度、注射速度、及び動物種を考慮して、最も小さいサイズの注射針を使用すべきである。

a. 皮下投与

この投与経路は頻用されている経路である。この投与経路による吸収の速度及び程度は処方（製剤組成）によって異なる。

b. 腹腔内投与

この投与経路は反復投与試験ではほとんど使用されない。その理由は、合併症を生じるおそれがあるためである。さらに、腸管内に注射する危険性や、刺激性 物質の場合には腹膜炎を引き起こすおそれもある。薬物を懸濁液として腹腔内投与した場合、腹腔からの薬物吸収は当該薬物粒子の特性と溶媒の性質に左右され、薬物は体循環内と門脈循環内に吸収されるものと思われる。

c. 筋肉内投与

筋肉内注射を行うと、注入物質による筋線維への圧迫が避けられないため、痛みを伴うことがある。投与部位は、神経損傷を最小限に抑えるように選択しなければならない。また、反復投与試験では投与部位を順番に変える必要がある。親水性の処方（製剤組成）と疎水性の処方（製剤組成）とを区別する必要もある（吸収速度に差があり、疎水性のものでは24時間以上にもわたって貯溜する傾向がある）。さらに、反復投与試験では、炎症の発現やその後遺症を考慮する必要もある。

d. 静脈内投与

この投与経路については、急速静注、低速静注、静脈内持続注入に分類される。表1に示した値は、急速静注と低速静注に関するものである。

急速静注：静脈内投与経路を用いるほとんどの試験では、被験物質はおよそ1分程の短い時間で投与される。このように比較的急速な注入を行う場合、被験物質は血液と適合するものであって、粘性があまり高くないものでなければならない。投与容量を多量にしなければならない場合は、注射液を体温まで温めておくべきである。静脈内投与を行う場合、注入速度は重要な要素であり、ゲッ歯類についていえば、注入速度は3 ml/minを超えてはならないことが示唆される。イヌに生理食塩液 6mL/kg を急速静注しても、ヘマトクリット値や心拍数に変化は観察されなかったが、20mL/kg 投与時には15%の血液希釈と一過性の頻脈(1分間にわたり46%増加)が発現した(Zeoli et al 1998)。

低速静注：被験物質に期待される臨床適応(症)に応じて、あるいは、溶解性・刺激性といった制限因子が存在するため、低速静注による被験物質の投与を考慮しなければならない場合がある。特徴的なことに、低速静注の際には、被験物質を血管外に投与する恐れを最小限にするため、各種の手法が用いられる。5~10分間かけて低速静注する際には、標準注射針もしくは翼付き針を使用することもある。また、静注用カニューレを皮静脈にテープで固定するか(短時間の場合)、外科的に留置してから使用する(長時間もしくは反復持続注入の場合)のも良いだろう。

ラットに等張生理食塩液を1mL/minの流速で最大80mL/kgまで、4日間連日静脈内投与しても、苦痛の顕著な兆候も、肺の病変もみられないことが明らかにされている(Morton et al 1997a)。しかし、投与期間を30日に延長し、注入速度を0.25、0.5、1.0mL/minとした場合には、肺病変の発現率が増加し、重症度も悪化した。(Morton et al 1997b)。早期の時点ですでに好ましくない影響(有害作用)が生じていたのではないかと思われるが、時間が短かったために病変・病状等を発現するまでには至らなかったのかもしれない。

資料 3

持続注入：溶解度や、臨床適応(症)など低速静注と同様の理由で持続注入を考慮することが必要な時がある。しかし、持続注入を長期にわたって行う場合には特に注意が必要である。投与容量及び投与速度は、投与する被験物質及び輸液療法の実施を考慮して決定する。基準としては、単回投与の場合は循環血液量の 10% 未満の容量を 2 時間以上かけて投与する。循環血液量については本書の表 3 にまとめて示した。動物の拘束を最小限にして、ストレスを極力かけないことが長期間の持続注入試験を考える際の重要な要素となってくる。

一回の注入を行う時間も要素の一つである。表 2 に不連続な注入を行う場合(1 日 4 時間)と連続注入を行う場合(24 時間)の注入速度と投与容量の推奨値を示した(この表を完成するためにはもう少しデータが必要である)。

表 2 反復静脈内持続注入—投与容量／投与速度 (許容最大投与量／投与速度を含む)						
一日の投与時間	マウス	ラット	ウサギ*	イヌ	サル	ミニブタ
	一日の総投与液量 (mL/kg)					
4 時間	-	20	-	20	-	-
24 時間	96(192)	60(96)	24(72)	24(96)	60	24
	速度 (mL/kg/h)					
4 時間	-	5	-	5	-	-
24 時間	4(8)	2.5(4)	1(3)	1(4)	2.5	1

(-) : データなし

* : 胎児発生毒性試験(催奇形性試験)データに基づく

非水性注射物に関しては本文を参照

ウサギへの投与容量と投与速度は胎児発生毒性試験(催奇形性試験)データに基づく値であり、これらの試験では、母動物に 2mL/kg/h 以上の速度で投与すると、胎児には影響はないものの、母動物に血管周囲顆粒球浸潤(perivascular granular leukocyte cuffing)や増殖性心内膜炎が生じることが明らかにされている(McKeon et al 1998)。ラットへの注入速度は一般的に 1~4mL/kg/h の範囲である(Cave et al 1995;Barrow&Heritier 1995;Loget et al 1997)が、催奇形性試験を行う際には 2mL/kg/h を超えてはならない。マウス(van Wijik 1997)、イヌ及びサル(Perkin & Stejskal 1994)、及びミニブタ(未公表データ)の値は 1 ヶ月反復投与試験の成績に基づいている。

投与容量が多い場合の溶媒の重要性等、その他の制限事項については 4 つの文献(Cornelius et al 1978;Concannon et al 1992;Manenti et al 1992;Mann&Kinter 1993)で詳しく取り上げられている。これらのデータでは、静脈内に注入する許容最大液量は、使用する溶媒により大きく異なることが示されている。

e. 皮内投与

この部位は一般的に、免疫、炎症、感作反応の評価に用いられる(Leenaars 1997; Leenaars et al 1998)。投与物質はアジュバントとともに処方されることもある。皮膚の厚みに応じて、0.05~0.1 ml の投与容量を投与することができる。

(4) 投与に用いる溶媒

動物を用いるいずれの試験においても、溶媒の選択は重要な問題である。溶媒は被験物質の暴露を最適化するものでなければならぬが、研究対象である被験物質の試験結果に影響を与えるものであってはならない。つまり溶媒としての理想は生物学的に不活性であり、被験物質の生物物理学的特性に影響を与えず、動物に全く毒性を示さないものである。もし溶媒の成分が生物学的作用を示すのであれば、投与量を制限して、そのような作用を最小化するか、もしくは無くさなければならない。被験物質の投与に使われる単純な溶媒には等張性水溶液、緩衝液、共溶媒系、懸濁液、油などがある。非水性注射物については、再投与する前に、吸収時間を検討する必要がある。懸濁液を投与する際には投与液の粘度、pH、及び浸透圧を考慮に入れなければならない。共溶媒系を用いる時には溶媒自体も用量制限毒性(dose limiting toxicity)を示すということに注意しなければならない。多くの研究施設では実施される動物実験結果と研究対象物質の特性をもとに、最適な溶媒を容易に選択できる方法の開発が盛んに行われている。

2. 採血に関する手引き

(1) 緒言

採血は実験動物に対して行う最も通常の処置の一つである。実験用の哺乳類、鳥類からの採血法はBVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinementによる最初のレポート(1993)に概説されている。本書は、研究者に使いやすい形で、入手可能な最新情報に基づいた許容採血量に関する基準を提示するとともに、トキシコキネティクス試験(薬物動態試験)及び毒性試験の必要性を述べることも目的としている。各種のげっ歯類からの採血方法として、眼窩静脈叢から採血する方法が未だに一般的に使われているが、この方法による後遺症のことを考えてより好ましい代替法を提案する。

(2) 循環血液量

許容採血量(採血量限界)の計算は循環血液量に関するデータが正確かどうかにかかっている。文献を再検討したところ、これらの値にはかなりのばらつきがみられた。これはおそらく使用された手法や、動物の系統、性別などが関係しているものと思われる。最も頻用される測定方法としては、放射標識赤血球法(Smith 1970; Sluiter et al 1984; Fujii et al 1993)、放射標識トランスフェリン(Argent et al 1994)、放射標識血清アルブミン法(Callahan et al 1995; Carvalho 1989; Gillen et al 1994)、標識色素法(Schad et al 1987)、酵素希釈法(Holmes & Weiskopf 1987; Visser et al 1982)、Fibre Optics(Kisch et al 1995)、デキストラン-70(Van Kreef et al 1998)などがある。

安全性評価試験で一般的に使用されている動物種の循環血液量を表3に示す。同表には毒性試験で近年使用頻度が増加しているマウスとミニブタのデータも記載している。表示した値は、動物は正常な成熟動物であり、栄養水準も適切であることを前提として、様々な情報源から引用したものである(Altman & Dittmer 1974; Swenson 1977; Jain 1986; McGuill & Rowan 1989; First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993)。

動物種	血液量 (mL/kg)	
	推奨平均値*	平均値の範囲
マウス	72	63-80
ラット	64	58-70
ウサギ	56	44-70
イヌ(ビーグル)	85	79-90
アカゲザル	56	44-67
カニクイザル	65	55-75
マーモセット	70	-82
ミニブタ	65	61-68

*：推奨平均値は平均値の範囲の中央値

(3) 採血量

本書に記載の採血量に関する推奨事項は、公表文献をはじめ、ある特定の問題を本ワーキンググループ（working party；作業部会）に知らせるために実施された最近の研究（現在投稿中の研究）や、「内部」標準操作手順書から得られた情報に基づいている。

採血が限界に近づくにつれて、動物愛護の問題が最も重要となるが、動物の生理反応のもつ科学的な影響も、データの解釈や妥当性に影響を与えることから、考慮しなければならない。動物の一般症状を評価した際に疑わしいと思われる場合には、採血を行う前に責任者もしくは獣医学専門担当者に問い合わせることが望ましい。

Scipioni ら(1997)の研究で、ラットの総血液量の最高 40%を 24 時間かけて採取し、その 2 週間後に同様の採血を繰り返しても、肉眼的に明らかな病的所見は認められないことが確認された。全般的にみて、採血後の動物の状態にとって最も重要な問題、例えば、心拍数、呼吸パターン、各種ホルモン濃度を調べたデータはほとんどなく、運動やその所要時間など挙動面に関するデータもほとんどない。これらはすべて、過剰な採血を行うと、それに呼応して変化する可能性があるが、そのような変化を検討するにはかなりの努力と財源が必要になるものと思われる。とはいえ、血液学的検査パラメータであれば、容易に測定することができ、小規模なプロジェクト（Nahas らが提案）において各種血液量採取後の赤血球数（RBC）、ヘモグロビン値（HGB）、ヘマトクリット（HCT）、平均赤血球容積（MCV）、及び赤血球分布幅（RDW）が測定された。具体的には、動態試験を模倣するため、Sprague Dawley 系雌雄ラット（体重約 250 g）より循環血液量の 7.5%、10%、15%、及び 20%容量を 24 時間かけて採取し、その後最長 29 日間、これらのラットの追跡調査（事後観察）が行われた。

その結果、上記パラメータのいずれをみても、採血前の値（ベースライン値）に回復するのに要する期間にはかなりのばらつきがあること（及び、循環血液量の 15%及び 20%容量採血群では採血後 29 日が経過して

資料 3

も一部のパラメータ（MCV、RDW）は採血前の値に回復しないこと）が明らかとなった。従って、反復採血（multiple sampling：複数回採血）時に設ける回復期間は、ある「容量」採血群のすべてのラットが正常（すなわち、各動物毎にみた採血開始時の値±10%）に回復するのに要する期間とすることを本書では推奨する。通常の毒性試験で必要とされているように循環血液量の15%を超える血液量を1回に採取すると、非常に緩徐に採血を行わなければ、循環血液量減少性ショックを発現するおそれがあるため、そのような採血は奨められない。少量の採血を反復する場合には、上記のような急性作用は生じないものと思われる。

下記に採血許容量限界及び適切な回復期間についての指針を示すが、これらの指針は反復採血によるストレスはもとより、それ以外の操作手順によるストレスも考慮に入れて、動物に与える全般的な苦痛・過酷さを評価したものである。下表で、単回採血法及び反復採血法について取り上げる。なお、毒性試験では血液学的検査パラメータを批判的な目で評価しなければならないため、そのような毒性試験に用いる動物については、回復期間をさらに延長することを提案する。

単回採血（毒性試験等）		反復採血（トキシコキネティクス試験等）	
採血量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間	24時間で採血する量の循環血液量に対する割合（%）	およその回復期間
7.5%	1 week	7.5%	1 week
10%	2 weeks	10-15%	2 weeks
15%	4 weeks	20%	3 weeks

トキシコキネティクス試験及び薬物動態試験では通常、少量の採血を反復しなければならず、採血量が多くなる（循環血液量の20%）が、このように大量の血液を採取すると、血行動態に重大な影響が生じ、半減期の算出にも大きく影響することを忘れてはならない。

消失半減期は、動物を致死せしめる前24時間以内に最終の血液検体を採取すれば、算定できるものと思われる。上記表中の数値には、動物を最終的に麻酔で安楽死させる際に採取可能な最終の血液検体は含まれていない。提案の採血量についてはそのような介入処置を行うべきではないとしていることから、血液の補充（blood replacement）は考慮していない。

表4の値を用い、動物の正常な生理に著明な障害を与えない採血許容量の基準値（reference guide）を表5に示す。

種(体重)	血液量 (ml)	7.5% (ml)	10% (ml)	15% (ml)	20% (ml)
マウス (25g)	1.8	0.1	0.2	0.3	0.4
ラット (250g)	16	1.2	1.6	2.4	3.2
ウサギ (4kg)	224	17	22	34	45
イヌ (10kg)	850	64	85	127	170

資料 3

アカゲザル (5kg)	280	21	28	42	56
カニクイザル (5kg)	325	24	32	49	65
マーモセット (350g)	25	2.0	2.5	3.5	5
ミニブタ (15kg)	975	73	98	146	195

(4) 採血部位

これまでに静脈穿刺部位及び静脈切開部位の検討が行われているのは主にげっ歯類とウサギである (First Report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW 1993)。この情報について、採血方法の技術的進歩に重点をおいて概説するとともに、各動物種の採血部位の利点と欠点を表 6 に、推奨される反復採血部位を表 7 にそれぞれ示す。

採血経路／静脈	全身麻酔	組織損傷(1)	反復採血の可否	採血量	動物種
頸静脈	不要	軽度	可	+++	ラット、イヌ、ウサギ
橈側皮静脈	不要	軽度	可	+++	マカク属 イヌ
伏在静脈／外側足根静脈	不要	軽度	可	++(+)	マウス、ラット、マーモセット、マカク属、イヌ
耳介周囲静脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	++ +	ウサギ ミニブタ
大腿静脈	不要	軽度	可	+++	マーモセット、マカク属
舌下静脈	必要	軽度	可	+++	ラット
外側尾静脈	不要	軽度	可	++(+) +	ラット マウス、マーモセット
耳介中心動脈	不要 (局所麻酔)	軽度	可	+++	ウサギ
前大静脈	不要	軽度	可	+++	ミニブタ
尾の先切断 (1~3 mm 未滿)	必要	中等度	制限あり	+	マウス、ラット
眼窩静脈叢	必要	中等度/高度	可	+++	マウス、ラット
心臓(2)	必要	中等度	不可	+++	マウス、ラット、ウサギ

(1) 組織損傷の可能性は、組織損傷の発現率並びに後遺症（炎症反応、組織学的損傷など）の重症度に基づいている。

(2) 全身麻酔下での屠殺処理としてのみ実施

動物種	推奨部位
マウス	伏在静脈、外側尾静脈
ラット	伏在静脈、外側尾静脈、舌下静脈
ウサギ	耳介周囲静脈、耳介中心動脈、頸静脈
イヌ	橈側皮静脈、頸静脈、伏在静脈
マカク属サル	橈側皮静脈、伏在静脈、大腿静脈
マーモセット	大腿静脈、伏在静脈
ミニブタ	前大静脈

異なった部位から採血した検体では臨床病理学的検査値に差を生じることがあり、また、データベースと比較する場合もこの点に留意すべきである。

伝統的な採血経路については、標準的文献に採血方法が記載されている。しかし、その他の採血方法については特筆すべき事項があるため、以下に概説した。

・外側足根静脈（伏在静脈）

この方法は、ラット、マウス、ハムスター、スナネズミ、モルモット、フェレット、ミンク (Hem et al 1998) から、これより大型の動物まで、多くの実験動物に適用されており、循環血量の 5% まで採血が可能である。麻酔を行う必要がないため、薬物動態試験のように採血を繰り返し実施しなければならない試験に特に適している。伏在静脈は足根関節の外側にあり、剃毛後、アルコールでその部分を拭くだけで容易に見ることが出来る。動物をプラスチック製の筒のような適当な保定器の中に入れ、後ろ足を伸ばす。関節の上を軽く圧迫すると、静脈を浮き上がらせることができ、一番細い規格の針で静脈穿刺することにより溶血することなく十分速やかに血液を採取することが出来る（例えば、ラットやマウスには 25G~27G の針を使用する）。少量の採血を行う場合には、穿刺部位に単に針を突き刺すことによって血液の滴を形成し、その後、ヘマトクリット測定用微小管を用いて標準量を回収することもできる。採血後、採血部位を圧迫しておけば十分止血できる。また、痂皮を除去すれば、一連の採血が可能となる。

持続性の（微量）出血以外には合併症は報告されていないようであり、また、この方法は麻酔を必要としないという点でも優れている。動物愛護に関わる問題を体重増加や日内リズム（日周リズム）、行動等の点から検討した試験は行われていないが、それでもこの採血経路は動物の健康状態に重大な影響を及ぼすものではないと思われる。

・耳介周囲静脈／耳介中心動脈

ウサギやモルモットでは耳介周囲静脈から採血する方法が一般に用いられている。この採血経路はミニブ

タに適用されることもあり、その際には静脈内カニューレを併用することが多い。動物を確実に保定することが不可欠であり、採血の20~30分前に局所麻酔用クリームを耳介の皮膚に塗布しておく、針が皮膚を貫通する際に動物が頭を振るのを容易に防ぐことができる。また、耳介周囲静脈を被っている皮膚表面にワセリンを塗布した後に静脈穿刺して血液を採血用試験管に採取するという方法もある。大量の採血を行う場合、ウサギの耳介中心動脈より採血することもできるが、採血後は、出血の持続や血腫の形成を防ぐため、採血部位を2分間以上圧迫しておかなければならない。さらに、採血の5分後及び10分後に、出血が持続していないかどうか、動物をチェックする必要もある。耳介中心動脈にカニューレを留置すれば反復採血も可能になり、それによって、8時間に及ぶ薬物動態検討用血液検体の採取も容易に行うことができる。

・舌下静脈

この採血方法はラットなどのげっ歯類で容易に実施することができ、また、採血量の制限及び反復麻酔が不可欠であるという制限はあるものの、それ以外の点では大量(0.2~1 mlなど)の採血にも適している。改良法(Zellerら、1998)により、過去に認められた欠点の一部は改善され、反復採血にも適用できるようになっている。この採血方法を具体的に述べると、ラットを麻酔し、採血補助者がラットを仰臥位(仰向け)に保定する。次いで、頸部の弛緩した皮膚をつまみ上げて、頭部から戻る静脈を部分的にうっ血させる。別の採血補助者が綿棒で舌を徐々に引き出し、親指と人差し指でしっかりつかむ。次いで、舌下静脈の一つ(正中線の両側に各1本ずつ走っている)を23~25Gの皮下注射針で穿刺する。その際には、可能な限り舌の先端に近い部位を穿刺する。採血用試験管に血液を滴下できるようにラットを逆さにし、必要量の採血が終了した後は、頸部の圧迫を緩め、ラットを仰臥位(仰向け)にする。舌をもう一度引き伸ばし、乾いた綿棒で止血する。なお、通常、止血薬は不要である。

上記の方法で採血した場合、麻酔を施した未採血コントロールラットと比較して、採血したラットの摂餌・摂水量や体重増加に有意差は全く認められない。さらに、眼窩静脈叢からの採血に比較して、病的変化を認めることも少ないようである(Mahl et al 投稿中)。しかし、この採血法は麻酔が必要であり、このことが依然制約になっているものと思われる。

・外側尾静脈

この採血経路は原理的には外側足根静脈と類似しているが、少量の血液しか採取できない傾向がある(マウスでは0.1~0.15 ml、温めたラットでは最高2 mlまで)。採血は、外側尾静脈より注射針の付いた注射筒を用いて行うか、同尾静脈を穿刺する。麻酔は不要であり、そのため、この採血経路は特に反復採血に適している。出血を促進させるためには血管を拡張させる必要があり、そのような場合には、動物を37°Cの状態に5~8分間放置するか、あるいは尾を局部的に温めるとよい。動物の健康状態に影響を及ぼすような不都合なことはほとんど生じないようであるが、加温する場合には苦痛の徴候を示していないかどうか、動物を綿密にモニターしなければならない。

・前大静脈

ミニブタの場合、吊り網に入れて保定する方法や、あるいは仰向けにして前脚を尾の方向に引っ込めて保定する方法が用いられる。この他の方法として、畜産業で使用されている保定法(鼻先をくくりつける方法、両手両足を縛る方法、後ろ足で吊す方法)が用いられる場合もあるが、これらの方法は動物へのストレスが大きく、また、科学研究に悪影響を及ぼす可能性もあるため、実験動物には不適切である。迷走神経を傷つけないようにするため、頸部の右側から、胸骨柄側方、30~45°の角度で左肩に向かってまっすぐ採血針を挿入する。採血針が静脈に入ると、採血者は針先が急に動くような感覚をおぼえる。この感覚が得られれば、その後は血液を容易に採取することができる。この方法は連続静脈穿刺にも使用することができるが、採血

針を抜いた箇所には血腫が形成される。そのため、この方法は、1週間に1回以上の頻度で採血針を抜く操作が必要な採血には適さない (Swindle, 1998)。

・尾先端の切断

この採血方法は、ラット及びマウスで頻繁に使用されており、採血量は0.1~0.2 mlである。切断は適切な場合、尾の先端から0.5~1 mmの部分に限定すべきであるが、経時的に最大5 mmまで切除可能であり、従って、凝血塊（血餅）を除去すれば、短期間の反復採血も可能である。但し、連続的に切断したために尾が著しく短くなる（すなわち、短縮部位が5 mmを超える）ようなことがあってはならない。この方法は成熟しすぎた動物には適さない場合もある。麻酔を施すことが推奨される。

・心臓穿刺

この方法は必ず全身麻酔下で行うべきである。過去においては、代替採血経路がないために小型のげっ歯類で使用され、回復をみている。しかし、現在では別の採血法が適用可能となっており、この方法は苦痛を伴う可能性があり、また、心臓出血や心臓タンポナーデなどの致死性後遺症を生じる可能性もあるため、動物を致死せしめる際の採血時（最終採血時）のみに使用すべきである。

・眼窩静脈叢

眼窩静脈叢を採血経路とする方法は過去に頻用されていたが、その一方で、有害な作用を引き起こすことが認められた。その結果、このような作用を引き起こし、それらが苦痛を伴う可能性があるという理由で、この方法は問題視されるようになってきている。しかし、最近では、科学研究上の要件を満たし、動物愛護の面も向上させるという別の方法が開発されている。とはいえ、Technica Subgroupは、この新しい採血法を考慮に入れた上で、眼窩静脈叢からの採血の利点と欠点の一部を詳細に見直すことは価値があるとの考えを示した。

眼窩静脈叢からの採血はいずれの動物種を用いる場合も必ず全身麻酔下で行う必要があり、一部の国では麻酔の実施が規則で定められている。この方法については数多くの研究者によって詳しく説明されている (Stone 1954; Waynforth & Flechner 1992; Van Herck 1999)。

この採血法の改良に関する公表文献はほとんどない。具体的には、組織損傷を最小限に押さえる最適な方法として、結膜を貫通する方法（ラットの眼の側方から、あるいはラットの眼の背側もしくは上部側を経由する方法）が論じられている (First Report of the BVA / FRAME / RSPCA / UFAW 1993)。同一部位での採血については、2週間の間隔をおけば、大抵の場合、損傷した組織は修復されるはずである (van Herck et al 1992) が、だからといって、完全に治癒する前の初期段階に動物が苦痛を感じていないとは言いきれず、従って、眼窩静脈叢からの反復採血を懸念する声がある。研究の中には、眼窩静脈叢からの反復採血は動物の日内リズムに影響を及ぼさず (Beynen et al 1988; van Herck et al 1997)、長期的にみた眼窩組織の組織病理学的検査所見にも影響を及ぼさない (Krinke et al 1988; van Herck et al 1992) ことを明らかにした研究もあれば（すなわち、両試験とも、組織損傷はすべて治癒することを示している）、その一方で、組織学的変化、一般症状の異常所見、及び苦痛の痕跡が認められ、そのために動物を安楽死せざるを得なくなり、データが得られなかったとする研究 (McGee & Maronpot, 1979; Beynen et al 1988; Le Net et al 1994; van Herck et al 1998; van Herck et al (a) 投稿中; van Herck et al (b) 印刷中) もある。この他にも、下記に示すような重篤な有害作用（副作用）を生じる可能性がある。

- ・眼球後出血により、血腫が形成され、過度の圧力が眼に加わって、動物にほぼ確実に苦痛を与える。

- ・持続性出血を止めるために圧力を加えたり（例えば眼を押さえるなどして）、血腫の形成によって圧力が加わったりすると、角膜潰瘍、角膜炎、パンヌス形成、眼球破裂、微小眼炎 (micro-ophthalmia) を生じることがある。

- 視神経をはじめとする眼窩内組織が障害されると、視力低下（視野欠損）を生じることがあり、失明の原因にもなる。
- マイクロピペットによる脆弱な眼窩内骨の骨折及び神経損傷、並びに硝子体液の消失を伴う眼球貫通。

上記の望ましくない後遺症の多くは眼窩内の深部で起きており、見過ごされている可能性がある。望ましくない副作用の発生率は1~2%の間であると考えられる（Krinke et al 1988）が、採血者の技量によっては、たとえ経験を積んでいたとしても、さらに高率になる可能性もある（van Herck et al 1998 の Table 1 参照）。

(5) 針穿刺の頻度

針穿刺の回数を最小限に押さえることは、優れた科学データを得るのと同様に重要である。同一の穿刺部位を使用すべきではない。すなわち、静脈に沿って部位を変えて穿刺すること。

(6) カニューレ挿入（cannulation）

カニューレ挿入は反復採血を行う際に重要となる手技である。短期間（実験当日のみの使用）であれば、翼付針や套管針などの一時的なカニューレを用いることができるが、一方、長期間使用する場合には、生体適合カニューレの外科的留置が必要となる。このような方法を用いることで、動物の苦痛や不快さを最小限にとどめつつ、反復採血を行うことができる。subcutaneous vein access ports（皮下静脈アクセスポート）の使用も、そのポートを埋め込んだ動物を群から隔離せずに一緒に飼育できるという点で有用といえるが、下記に示すように、取り組まなければならない問題も数多く存在する。

- 外科的処置（手術）の技量が不可欠であり、長期間にわたり良好な結果を得るため（Popp & Brennan 1981）には、また、感染症などの合併症を避けるためには、外科的処置を無菌的に行わなければならない。血液凝固が頻発し、採血及び物質注入延長の妨げるになるおそれがある。

- 動物がカニューレを抜いたり、噛み切ったりしないように、動物の拘束や群からの隔離が必要であり、長期間使用する場合に subcutaneous vein access ports（皮下静脈アクセスポート）が好ましいのはこのためである。

- 長期間カニューレを挿入しておく、血管を貫通することがあり、また動物が成長しすぎてカニューレを使用できなくなるおそれもある。

(7) 麻酔

BVA/FRAME/RSPCA/UFAW の最初の報告（1993）に、各種麻酔薬が脾臓被膜の筋細胞（存在する場合）にどのような影響を及ぼすかについて幾つかコメントが示されており、この他に、止血を促進する点についても述べられている。実験用小動物からの採血に関して、注目すべきことに、midazolam（Hypnovel）併用下もしくは非併用下で fentanyl と flunixin（Hypnorm）を併用すると、いずれの動物種においても著明な末梢血管拡張が生じる。この末梢血管拡張により採血が一層容易になるが、その一方で、採血後の出血も生じやすくなる。そのため、確実に止血するよう、特に注意を払わなければならない。局所麻酔薬の使用を考慮すべきである。

(8) 結論及び推奨事項

現在では、すべての動物種から、特に以前は採血が容易でなかった小型のげっ歯類からも採血できる様々な代替法が存在する。そのうえ、採血法の中には、麻酔薬を必要とする方法や、特に反復採血を行わなければならない場合に動物愛護に重大な影響を及ぼしかねない望ましくない副作用を高率に発現する方法もある。そこで我々は下記事項を推奨する。

資料 3

- すべてのげっ歯類に推奨される採血経路は外側尾静脈、舌下静脈、及び外側足根静脈であり、ウサギについては耳介周囲静脈、耳介中心静脈、及び頸静脈が推奨される。
 - 回復をしながら眼窩静脈叢より採血する方法は、他の経路からの採血が不可能な場合に限り使用する。
 - 心臓採血は全身麻酔下で、動物を致死せしめる最終処置としてのみ実施する。
- 最後に、動物を用いるすべての実験操作と同様に、組織の損傷を最小限に抑えて確実に採血を行うには実験担当者の熟練と能力がきわめて重要であり、動物の健康と愛護のためにも不可欠である点を強調しておく。

Members of Technical Subgroup of EFPIA/ECVAM

Dr Karl-Heinz Diehl	Hoechst Marion Roussel	Germany
Dr Robin Hull	NIBSC	UK
Prof David Morton	Birmingham University	UK
Dr Rudolf Pfister	Novartis Pharma AG	Switzerland
Dr Yvon Rabemampianina	Pfizer	France
Dr David Smith	Astra Charnwood	UK
Dr Jean-Marc Vidal	Hoechst Marion Roussel	France
Dr Cor van de Vorstenbosch	NV Organon	Netherlands

2002年7月 中井伸子訳

References:

- Altman P L & Dittmer D S (eds) (1974), *Biology Data Book 2nd Edition, Vol 3* Bethesda, Maryland: Federation of American Societies of Experimental Biology
- Argent N B, Liles J, Rodham D, *et al* (1994), A new method for measuring the blood volume of the rat using ^{113m}Indium as a tracer, *Laboratory Animals*, 28, 172-175
- Barrow P C & Heritier B (1995), Continuous deep intravenous infusion in rat embryotoxicity studies: the effects of infusion volume and two different infusion fluids on pregnancy, *Toxicology Methods*, 5, 61-67
- Beynen A C, Baumans V, Haas J W M, *et al* (1988), Assessment of discomfort induced by orbital puncture in rats. In: *New Developments in Biosciences: their implications for laboratory animal science*. (Beynen A C, Solleveld H A, eds) Dordrecht, NL: Martinus Nijhoff, 431-436
- Callahan R J, Wilkinson R A, Bogdonov A A Jr (1995), Validation of plasma volume determinations in the rat using an In-111 labeled polymer and I-125 human serum albumin. 42nd Annual Meeting of the Society of Nuclear Medicine, Minneapolis, Minnesota, USA, June 12-15, 1995, *Nuclear Medicine*, 36, no.5 SUPPL, 157-158
- Carvalho J S (1989), Heterologous serum albumin as tracer for plasma volume measurements evaluated in conscious nondehydrated and 48-hour water-deprived rats, *Cardiovasc Pharmacol*, 13, 603-607
- Cave D A, Schoenmakers A C M, van Wijk J H *et al* (1995), Continuous intravenous infusion in the unrestrained rat: procedures and results, *Human & Experimental Toxicology*, 14, 192-200
- Claassen V (1994), Neglected factors in pharmacology and neuroscience research, *Techniques in the Behavioural and Neural Sciences: Vol 12*, Huston J P (ed), Amsterdam: Elsevier
- Concannon K T, Haskins S C & Feldman B F (1992), Hemostatic defects associated with two infusion rates of dextran 70 in dogs, *American Journal of Veterinary Research*, 53, 1369-1375
- Cornelius L M, Finco D R & Culver D H (1978), Physiologic effects of rapid infusion of Ringer's Lactate solution into dogs, *American Journal of Veterinary Research*, 39, 1185-1190
- EU (1986) Council Directive 86/609/EEC of 24 November 1986 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions of the Member States regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes, *Official Journal of the European Communities*, 29, L358, 1-29

資料 3

First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW, Joint working group on refinement (1993), Removal of blood from laboratory mammals and birds, *Laboratory Animals*, 27, 1-22

Flecknell P (1996), *Laboratory Animal Anaesthesia*, Harcourt Brace & Company, 2nd Ed, pp269

Fujii A, Yoshikawa K, Iwata T, *et al* (1993), A method for measurement of circulating blood volume with fluorescein isothiocyanate labeled red blood cells, *Japanese Anesthesiology*, 42, 545-551

Gillen C M, Takamata A, Mack G W *et al* (1994), Measurement of plasma volume in rats with use of fluorescent-labeled albumin molecules, *Applied Physiology*, 76, 485-489

Hejgaard K C, Alban L, Thomsen P, *et al* (1999), Assessing welfare of rats undergoing gavage with varying volumes. Measurements on open field behaviour, temperature, plasma corticosterone and glucose, *Revista de Ciencia*, 23-24 (Abstract) p16

Hem A, Smith A J, Solberg P (1998), Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink, *Laboratory Animals* 32, 364-368

Holmes M A, Weiskopf R B, (1987), Determination of plasma volume in swine by the enzyme-dilution method, *Am J Physiol* 252 (5 part 2)

Hull R M (1995), Guideline limit volumes for dosing animals in the preclinical stage of safety evaluation, *Human and Experimental Toxicology*, 14, 305-307

Jain N (1986), *Schalm's Veterinary Haematology 4th Edition*, Philadelphia: Lea and Febiger

Kisch H, Leucht S, Lichtwarck A M (1995), Accuracy and reproductivity of the measurement of actively circulating blood volume with an integrated fiberoptic monitoring system, *Critical Care Medicine*, 23, 885-893

Krinke A, Kobel W, Krinke G (1988), Does the repeated orbital sinus puncture alter the occurrence of changes with age in the retina, the lens, or the Harderian gland of laboratory rats? *Z. Versuchstierkunde*, 31, 111-119

Le Net J E L, Abbott D P, Mompon R P *et al* (1994), Repeated orbital sinus puncture in rats induces damages to optic nerve and retina, *Veterinary Pathology*, 31, 621

Loget O, Nanuel C, Le Bigot J-F *et al* (1997), Corneal damage following continuous infusion in rats, In: *Advances in Ocular Toxicology*, Green *et al* (eds), Plenum Press: New York, pp 55-62

資料 3

Mahl A, Heining P, Ulrich P *et al* (in press), Comparison of clinical pathology parameters with two different blood sampling techniques in rats – retrobulbar plexus versus sublingual vein, *submitted for publication to Laboratory Animals*

Manenti A, Botticelli A, Buttazzi A *et al* (1992), Acute pulmonary edema after overinfusion of crystalloids versus plasma: histological observations in the rat, *Pathologica*, 84, 331–334

Mann W A, and Kinter L B (1993), Characterisation of maximal intravenous dose volumes in the dog (*canis familiaris*), *Gen Pharmac*, 24, 357–366

McGee N & Maronpot R R (1979), Harderian gland dacryoadenitis in rats resulting from orbital bleeding, *Laboratory Animal Science*, 29, 639–641

McGuill M W & Rowan A N, (1989), Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques, *ILAR News*, 31, 5–18

McKeon M E, Walker M D, Wakefield A E *et al* (1998), Validation of infusion techniques in nonpregnant and pregnant rabbits using a novel harness system, *Toxicol Sci*, 42, 292

Morton D, Safron J A, Rice D W *et al* (1997a), Effects of infusion rates in rats receiving repeated large volumes of saline solution intravenously, *Laboratory Animal Science*, 47, 656–659

Morton D, Safron J A, Glosson J *et al* (1997b), Histologic lesions associated with intravenous infusions of large volumes of isotonic saline solution in rats for 30 days, *Toxicol Pathol*, 25, 390–394

Popp M B & Brennan M F (1981), Long-term vascular access in the rat: importance of asepsis, *American Journal of Physiology*, 241, H606–612

Schad H, Haider M, Brechtelsbauer H (1987), Determination of plasma volume with indocyanine green, *Anaesthetist*, 36, 608–614

Suiter W, Oomens L W M, Brand A *et al* (1984), Determination of blood volume in the mouse with chromium-51-labeled erythrocytes, *J Immunol Methods*, 73, 221–225

Smith B S W (1970), Comparison of iodine-125 and chromium-51 for measurement of total blood volume and residual blood content of tissue in the rat: evidence for accumulation of 51Cr by tissues, *Clin Chim Acta*, 27, 105–8

Swindle M M (1998), Surgery, anaesthesia, & experimental techniques, In: *Swine*, Ames, Iowa State University Press

資料 3

Swenson M J, (ed) (1977), *Dukes' Physiology of Domestic Animals*, 9th ed. Ithaca and London

Van Herck H, Baumans V, Brandt C J W M *et al* (1998), Orbital sinus blood sampling in rats as performed by different animal technicians: the influence of technique and expertise, *Laboratory Animals* 32, 377-386

Van Herck H, Baumans V, Van der Craats N R *et al* (1992), Histological changes in the orbital region of rats after orbital puncture, *Laboratory Animals*, 26, 53-58

Van Herck H, De Boer SF, Hesp APM *et al* (1997), Orbital bleeding in rats while under diethyl ether anaesthesia does not influence telemetrically determined heart rate, body temperature, locomotor activity and eating activity when compared with anaesthesia alone, *Laboratory Animals*, 31, 271-278

Van Herck H, Baumans V, Brandt C J W M, (a) (in press), Comparison of blood sampling from the retro-orbital sinus, the saphenous vein and the tail vein in rats: effects upon selected behaviour and blood variables. Submitted for publication to *Laboratory Animals*

Van Herck H, Baumans V, Boere H A G, (b) (in press), Orbital sinus blood sampling in rats: effects upon selected behavioural variables. Submitted for publication to *Laboratory Animals*

Van Wijk H (1997), A continuous intravenous infusion technique in the unrestrained mouse, *Anim Technol*, 48, 115-128

Van-Kreef B K, van-Beek E, Spaanderman M E A, *et al* (1998), A new method for plasma volume measurements with unlabeled dextran-70 instead of 125I-labeled albumin as an indicator, *Clin Chim Acta*, 275, 71-80

Visser M P, Kriek M T A, Willems G M, Hermens W T (1982), Plasma volume determination by use of enzyme dilution in the dog, *Laboratory Animals*, 16, 248-255

Wolfensohn S & Lloyd M (1998), Procedural data. In: *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*, S Wolfensohn, M Lloyd (eds), Oxford: Oxford University Press, p82

Zeller W, Weber H, Panoussis B, *et al* (1998), Refinement of blood sampling from the sublingual vein of rats, *Laboratory Animals* 32, 369-376

Zeoji A, Donkin H, Crewe C *et al* (1998), A limit rapid intravenous injection volume in dogs, *Toxicol Sci*, 42, 58 (abstract 284)

資料 3

動物実験に用いられる代表的な麻酔薬と鎮痛薬

まえがき

動物実験は結果として疼痛と苦痛を引き起こす。したがって倫理的および科学的理由からこれを最小限にするべきである。疼痛と苦痛が多く臓器の生理学的反応に影響を及ぼし、実験結果を左右することがある。疼痛の排除または緩和はこれらの影響の大きさを減少させ動物モデルの有効性を向上させる。

外科手術の際に生じる疼痛は適切な麻酔薬を用いることにより完全に阻止することができる。また、術後疼痛や外科的な実験手技以外によって生じる疼痛は鎮痛薬の投与により緩和される。しかしながら、麻酔薬や鎮痛薬は多くの臓器に作用し実験プロトコールに少なからず影響を及ぼす。これらの影響を最小限にするために、関係する薬物の薬効薬理を考慮して麻酔薬や鎮痛薬を的確に選択することが、動物の苦痛の軽減と実験結果の安定につながる。

全身麻酔薬を用い動物に麻酔を施す場合、動物が手術に適した麻酔状態であるかどうかを確かめる必要がある。麻酔が浅く動物が苦痛を感じてはいないか、または麻酔の過剰投与により麻酔が深すぎて死の危険にさらされていないか注意しなければならない。具体的な麻酔深度の判定法は各論に記述するが、一般的に反射の有無、呼吸数や深さの変化、心拍数や血圧の変化、他の痛み刺激に対する反応が麻酔深度の判定に用いられる。加えて、動物に外科的処置などを行った場合、動物が満足に回復しているかどうかを注意深く観察することも重要である。食欲の有無や行動の異常には特に注意が必要である。大きな外科手術などを行う場合、手術直後に鎮痛剤や感染予防のための抗生物質を投与することは手術からの早期回復にとっても有効である。

ここには代表的な実験動物であるマウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ブタ、霊長類に用いられる一般的で簡便な麻酔法および鎮痛薬について紹介する。このほかにも有効な方法が多数あり、詳細はぜひ専門書をご覧ください。なお、「麻薬及び向精神薬取締法」に定められた麻酔薬を研究に使用する施設は、厚生大臣又は都道府県知事に登録しなければならない。

また、法令の一部改正により、平成19年1月1日からヒト用のケタミン含有麻酔薬（ケタラール）の他、実験動物用の麻酔薬（動物用ケタラール、ケタミン（フジ）、ノモペイン注等）も、「麻薬及び向精神薬取締法」の対象薬となった。研究用として実験室等で使用する場合は、研究者個人が麻薬研究者の免許を取得し（問合せ先：宮城県保健福祉部薬務課）、厳密に管理する必要がある。

研究室において研究を指導している責任者が、麻薬研究者の免許を取得すれば、他の研究員（学生等）は麻薬研究者の下、麻薬研究者の補助者としてケタミンを使用することができる。

資料 4

* エーテルの不使用について

従来、吸入麻酔薬として用いられていたエーテルは、麻酔薬としては推奨しないこととした。これは、引火性爆発性があり、危険であることと動物に対しても気道刺激性が強いことが理由であり、欧米ではほとんど使用されていない。代わってイソフルランやセボフルランを推奨する。

* ペントバルビタールの不使用について

睡眠作用が強力で、心臓血管系及び呼吸器系の抑制作用が強く、つまり麻酔期が得られる用量は呼吸停止量に近い、さらに鎮痛作用や筋弛緩作用はないので単独使用は推奨しない。種々の理由から使用しなければならない場合には、吸入麻酔薬（イソフルラン、セボフルラン等）と併用することが望ましい。睡眠状態を得る薬剤として、マウスやラットの場合はペントバルビタール15~25mg/kgを腹腔内へ、イヌ等の大型実験動物の場合は10~15mg/kg（動物種により異なるので必要量を事前に確認する）を静脈にゆっくりと投与し、その後にイソフルランやセボフルランを小動物の場合はマスク麻酔、大型動物の場合は気管挿管による麻酔装置を用いた麻酔を施すことが望ましい。

1. マウス・ラットの全身麻酔法

(1) 注射麻酔

* 三種混合麻酔（塩酸メドミジン+ミダゾラム+酒石酸ブトルファノール）

（ミダゾラムは向精神薬であるので厳重な管理が必要である）

マウス用

塩酸メドミジン0.3mg/kg+ミダゾラム4mg/kg+酒石酸ブトルファノール5mg/kgになるように注射用水※で希釈し、腹腔内か筋肉内に投与する。これで1時間ほどの麻酔効果が期待できる。

実際の調合例：塩酸メドミジン（商品名ドミトール・原液濃度1mg/ml）0.75ml+ミダゾラム（商品名ドルミカム・原液濃度5mg/ml）2ml+酒石酸ブトルファノール（商品名ベトルファール・原液濃度5mg/ml）2.5mlを注射用水で希釈して25mlにする。この混合液をマウス体重10g当たり0.1ml、腹腔内か皮下に投与する。

※注射用水：注射用蒸留水であり大塚製薬など数社から販売されている。

ラット用

塩酸メドミジン0.15mg/kg+ミダゾラム2mg/kg+酒石酸ブトルファノール2.5mg/kgになるように注射用水で希釈する。すなわちマウス用に希釈した溶液を、注射用水でさらに2倍希釈することで使用できる。腹腔内か筋肉内に投与する。

資料 4

* 三種混合麻酔薬の拮抗剤

アチパメゾール (atipamezole) は合成 $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬であり、塩酸メドミジンの鎮静、鎮痛作用の抑制作用を示す。商品名はアンチセダン。基本的にはメドミジン投与量と同量 (マウス : 0.3mg/kg、ラット 0.15mg/kg) を腹腔内または皮下に投与すると数分間で覚醒する。アチパメゾール比較的安全な薬物なので、状況に応じて2倍量~5倍量を投与することも可能である。

* 二種混合麻酔 (塩酸ケタミン+塩酸キシラジン)

塩酸ケタミンが麻薬指定を受けたことにより、実験に使用する場合は都道府県知事より麻薬研究者免許証を取得する必要がある。15~30分の深い鎮静ないしは浅い麻酔状態が得られるため、小処置に利用されているが、老齢動物にも使用できる。塩酸ケタミン単独では麻酔状態には至らず、塩酸キシラジンと併用することにより、処置はやりやすくなる。しかし体性痛を伴う手術等には用いてはならない。

マウス用

塩酸ケタミン+塩酸キシラジン=80~100mg/kg+10mg/kgになるように注射用水で希釈し、腹腔内投与する。

実際の希釈例 : ケタール (塩酸ケタミン57.8mg/ml含有) : セラクタール (塩酸キシラジン23.3mg/ml含有) : 注射用水 = 2 : 0.6 : 12.4の割合で混合し、マウス体重10gあたり0.12mlを腹腔内投与する。

ラット用

塩酸ケタミン+塩酸キシラジン=90mg/kg+10mg/kgになるように混合し、腹腔内投与する。

実際の調合例 : ケタール (塩酸ケタミン57.8mg/ml含有) : セラクタール (塩酸キシラジン23.3mg/ml含有) = 18 : 5の割合で混合し、ラット体重100gあたり0.23mlを腹腔内投与する。

* チオペンタール

投与量30~40mg/kgで5~10分の短時間麻酔が得られる。静脈内投与である。血管外に漏出すると刺激が強いため注意が必要である。

(2) 吸入麻酔

* ハロタン、イソフルラン、セボフルラン等

吸入麻酔は注射麻酔法に比べ短時間、長時間にかかわらず麻酔深度についての調節が容易で、短時間で覚醒する安全な全身麻酔である。近年は小動物専用の吸入麻酔器が販売されており、簡便に使用できる。キャリアーガスに空気をを用い、気化器により適正な濃度の吸入麻酔薬を供給する。当初4~5%の濃度で導入し、約2~3%で維持する。直接

資料 4

吸入させるためには、吸入麻醉器に連結したノーズコーンを用いるとよい。最近、内視鏡を用いたマウスやラットの気管挿管の簡便な方法が報告されている。

短時間の麻酔では、麻酔瓶を使うこともできる。麻酔瓶に脱脂綿を置き吸入麻酔薬をしみこませる。その上に金網の台などを置き、動物を乗せ、蓋をして吸入させる。又、小型ビーカーやプラスチックの50ml遠心チューブに脱脂綿を詰め、吸入麻酔薬をしみこませ、動物の鼻に当て吸入させる方法等が一般的である。

なお、ハロタンには肝毒性及び妊娠婦人に対する影響がある。又、クロロホルムは、人に対して発癌性が認められ、麻酔薬としては不適である。

(3) 麻酔の判定及び管理

まず立ち直り反射の消失を確かめ、次にピンセット等で眼瞼反射、足指や尾、耳への刺激への反射など数カ所の反射の消失を確かめる。一方、呼吸数が極端に減り（正常はマウス180回/分、ラット90回/分）、大きな息をするのは過剰麻酔の危険な状態である。吸入麻酔であれば麻酔薬を遠ざけ、胸部を圧迫したり、ゴムやシリコンのスポイト（乳首）等で人工呼吸することにより回復することがあるが、注射麻酔では回復しない。麻酔中には体温低下をきたすので、保温マット等で保温することが勧められる。

2. モルモットの全身麻酔法

モルモットは、他のげっ歯類に比べ安全性の高い注射薬が得難く、術後に呼吸器感染、消化器障害や摂餌量の減少等の各種障害が発生しやすい。加えて、モルモットは抗生剤に感受性が高く、ペニシリン等の投与で腸炎を起こし死亡するため、実験目的別の効果的な麻酔薬を選択し、術前、術中、術後の管理を綿密に行う必要がある。

(1) 注射麻酔

モルモットは気道が狭いので、硫酸アトロピンの麻酔前投薬が欠かせない。これは心臓の迷走神経の過度の抑制を予防し、不整脈の発現を減少させ、副交感神経末端でアセチルコリンと拮抗し、気管平滑筋の弛緩作用、唾液や気道分泌物の抑制等の効果が期待される。通常は麻酔薬投与前約15～30分に0.05mg/kgを皮下注射しておく。

* 塩酸キシラジン+塩酸ケタミン

この組み合わせはモルモットの注射麻酔薬として比較的安全である。

ケタミンとキシラジンをそれぞれ40mg/kg+5mg/kgになるように混合し、腹腔内注射する。

* 塩酸ケタミン+ジアゼパム

硫酸アトロピン投与後、塩酸ケタミン5mg/kgとジアゼパム100mg/kgの割合で混合したものを筋肉内に投与する。

資料 4

(2) 吸入麻酔薬

* ハロタン、イソフルラン、セボフルラン等

これらの吸入麻酔薬も推奨される。ただし、ハロタンには、肝毒性及び妊娠婦人に対する影響がある。フェイスマスクによる麻酔は、キャリアーガスに酸素を用い、気化器により適正な濃度の吸入麻酔薬を供給する。当初5%の濃度で導入し、約3%で維持する。ジャー等を用いるときは、あらかじめ、約3%の濃度のガスに容器内の空気を置換しておく。直接吸入させるためノーズコーンを用いるとよい。

なお、クロロホルムは人に対して発癌性が認められ、推奨できない。

(3) 麻酔の判定

浅麻酔：痛覚反射が残っているため、痛み刺激に対し呼吸数や心拍数が増加し、眼瞼反射や瞳孔の収縮、流涙が見られ、咽喉頭反射が残っている。

麻酔期（手術適期）：呼吸は減少するが、規則的な胸腹式呼吸を繰り返し、血圧や心拍数が安定し、眼瞼反射は鈍く、瞳孔は散大気味だが安定している。咽喉頭反射は消失し、顕著な筋弛緩効果が見られる。痛覚反射が消失する。内臓の牽引による引き込み反射の消失がある。

注1] 咽喉頭反射：口腔を大きく開け咽喉頭を綿棒等で刺激すると、咽喉頭部を狭窄させ、オエーとなるのがこの反射であり、麻酔期にはこの反射が消失する。又、舌を引き出すと引き込む反射があり、この反射の消失を基準にすることもできる。更に、咽頭を刺激すると咳嗽反射と言ってせき込むが、この反射も消失する。

注2] 内臓牽引による引き込み反射：消化管は自律神経のうち副交感神経（迷走神経）の支配を受けており、蠕動運動等により消化管運動が起きているので、開腹時に臓器等の牽引により、引き込み反射が見られる。

深麻酔：腹式呼吸となり、呼吸数が顕著に減少する。心拍数、血圧が低下し、眼瞼・角膜反射の消失、角膜乾燥、腹筋の異常運動等が見られる。

3. ハムスターの全身麻酔法

ハムスターは、必ずしも安全性の高い麻酔法の検討が十分に行われているわけではない。加えて、ペントバルビタールは感受性に個体差があり、手軽に安全な麻酔を施しにくい。そのため、注射麻酔では鎮静薬・鎮痛剤と麻酔薬との併用がよく、吸入麻酔はハロタンと笑気等との組み合わせによる慎重な麻酔が望ましい。

(1) 注射麻酔

* 塩酸ケタミンと塩酸キシラジンの混合

塩酸ケタミン35mg/kgと塩酸キシラジン5mg/kgを腹腔内に投与する。

(2) 吸入麻酔

* ハロタン・イソフルラン・セボフルラン等

資料 4

これらの吸入麻酔薬が推奨される。麻酔はキャリアーガスに酸素を用い、気化器により適正な濃度の吸入麻酔薬を供給する。ジャー等を用いるときは、あらかじめ約3%の濃度のガスに容器内の空気を置換しておく。直接吸入させるためノーズコーンを用いるとよい。

(3) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

4. ウサギの全身麻酔法

ウサギは、ストレスに対する感受性が高い動物であり、できれば飼育室内で鎮静薬の投与（塩酸ケタミン25～50mg/kg筋肉内注射）を行い、その効果が現れるのを待って実験室へ移すと良い。又、ウサギは嘔吐、胃内容物を逆流することがきわめて少ない動物で、イヌ、ネコ等のように麻酔中の気道閉塞予防のために絶食絶水させる必要はない。

(1) 注射麻酔

ウサギは大きな耳を持ち耳静脈の確保が容易なことから、一般的には静脈内投与が行われる。しかし、術者にあまり麻酔の経験がない場合には、筋肉内注射を勧める。

* 塩酸ケタミン10mg/kgと塩酸キシラジン3mg/kgを別々に静脈内投与することにより30分程度の外科麻酔が得られる。

* 塩酸ケタミン35mg/kgと塩酸キシラジン5mg/kgを筋肉内投与することにより20～40分程度の麻酔が得られる。ただし、上記の静脈内投与とこの筋肉内投与を麻酔時及び覚醒時に比較すると、動脈血圧が30%程度抑制するので、注意を要する。

* ペントバルビタールは、ウサギでは無呼吸が発生し麻酔死が発生することがあるので、勧められない。

(2) 吸入麻酔

* 吸入麻酔薬にはハロタン、イソフルラン、セボフルランがある。いずれもよく使われている。吸入麻酔には各種の器具が必要である。簡易には、ビニール袋や麻酔箱にウサギを入れ、次に麻酔ガスを入れ、密閉する。この時、ビニール袋や麻酔箱には動物を観察する透明な観察窓が必要である。麻酔ガスの導入は麻酔器を用いるほか、脱脂綿等に十分量の吸入麻酔薬を吸収させ、麻酔箱内に置くことによってもできる。ただし、吸入麻酔濃度を制御できないので、動物の状態観察を十分行う必要がある。更に、即効性に優れるセボフルランでは、脱脂綿に麻酔薬を吸収させ、直径5cmの円筒状の容器の底に入れ、それを動物の鼻口部に当てることにより、麻酔導入可能である。

資料 4

安全な吸入麻酔は、吸入マスク（ネコ用吸入マスクが市販され、利用できる）を循環式の麻酔器に接続し、鼻口部に当てる。この場合もセボフルランは、ウサギではその臭いによる忌避行動を起こさないことから、使いやすい薬剤である。

(3) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

5. ネコの全身麻酔法

ネコの麻酔には獣医学の十分な知識と技術が必要であり、安易な麻酔は行うべきではない。専門家の指導を仰ぎ、又医学領域で多くの成書があるので、それらを参考にすべきである。

(1) 麻酔前投薬

* 硫酸アトロピン

抗コリン作動抑制薬として、流涎や気道の粘膜分泌を抑制し、気管支を拡張する。全ての麻酔の前投薬として有効である。麻酔30分前に0.03~0.1mg/kgを皮下又は筋肉内に投与する。

* 鎮静薬として塩酸クロルプロマジン、ジアゼパム、塩酸キラジン等の前投薬は、それぞれの麻酔薬の量を減少させたり副作用を抑えるのに有効である。使用方法等は各注射麻酔の項に併記した。

(2) 注射麻酔

* チオペンタール

10~20mg/kgの静脈内投与で数分から10数分の麻酔が得られる。上述の硫酸アトロピンや鎮静薬の前投薬が有効である。

* 塩酸ケタミン

15~35mg/kgの筋肉内投与により15~20分の麻酔が得られる。投与後は5~8分後にネコは盛んに舌なめずりをして舌を出し、眼は開いて瞳孔は散大し、横臥する。硫酸アトロピンの投与は有効である。

* 塩酸ケタミン+塩酸キシラジン

塩酸キシラジン1~2mg/kgを筋肉内注射し、10分後に10~15mg/kgの塩酸ケタミンを筋肉内注射をする。3~5分で外科的麻酔期が得られ、2時間程度持続する。

* 塩酸ケタミン+ジアゼパム

0.5~1.0mg/kgのジアゼパムと6~8mg/kgの塩酸ケタミンを混合し静脈内注射を行うと、15分程度の麻酔が得られる。

(3) 吸入麻酔

短時間、長時間にかかわらず麻酔深度についての調節が容易で、短時間で覚醒する安全な全身麻酔である。しかし、吸入麻酔用の器材設備と専門知識及び技術が必要であり、専門家の指導を仰ぐ必要である。ここでは、「8. イヌ、ネコにおける吸入麻酔法の概念」として最後に紹介した。

(4) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

6. イヌの全身麻酔法

イヌの麻酔には獣医学の十分な知識と技術が必要であり、安易な麻酔は行うべきではない。専門家に相談し、又獣医学的領域で多くの成書があるので、それらを参考にすべきである。

一般に全身麻酔をかけるときは、鎮痛（無痛）、意識の消失、筋弛緩、そして有害な反射がないことが求められる。事前の準備として全身状態の把握はもちろんのこと、イヌでは麻酔により嘔吐の見られることがあるので、絶食を行う。通常は12時間以上の絶食及び2~3時間の絶水を行う。次に、鎮静、分泌物の抑制、麻酔薬投与量の減少、迷走神経反射抑制、嘔吐抑制、覚醒時の興奮や体動抑制を目的として麻酔前投薬を行う。

(1) 麻酔前投薬

* 硫酸アトロピン（副交感神経遮断薬で唾液流涎や気管粘膜からの分泌抑制、迷走神経反射抑制を行う）：0.02~0.05mg/kgを筋肉内に投与する。投与後15~30分で効果が現れはじめ、1~2時間持続する。

* 塩酸クロルプロマジン（鎮静作用、自律神経遮断作用、抗ヒスタミン作用、制吐作用がある）：1~6mg/kgを筋肉内注射する。0.5~2.0mg/kgの静脈内注射、又は経口的に錠剤を投与する場合は0.5~8.0mg/kgで効果が得られる。

* ジアゼパム（強力な静穏・鎮静作用、自律神経安定化作用、抗痙攣作用及び筋弛緩作用を有し、血圧、呼吸等に及ぼす副作用が少ない）：一般に静脈内又は筋肉内注射で用いられ、2~3mg/kgで脱力、5mg/kgで横臥して1~2時間鎮静作用が持続する。

(2) 注射麻酔

イヌの静脈内注射は、前肢では橈側皮静脈、後肢では伏在（サフェナ）静脈で行う。

資料 4

* チオペンタール

超短時間作用性麻酔薬なので、比較的大型のイヌの吸入麻酔の導入や5～15分程度の小手術時に単独で使用される。呼吸抑制作用が強いので過剰に投与しないように注意しなければならない。

通常25mg/kgを静脈内に投与するが、個体差が大きく15～35mg/kgの範囲で適宜増減する、標準量の半量を比較的速やかに注入し、その後イヌの様子を見ながら残りの半量をゆっくりと追加注入する。最初の半量を注入したところでイヌは脱力し、倒れかかるようになる。その後さらに半量を注入すると、一旦瞳孔は散大するがしばらくすると縮小し、眼球の内方回転が見られ、ついには白い瞬膜が出てきて覆うようになる。眼瞼反射も麻酔期に入る。

* ペントバルビタール+塩酸キシラジン

上記ペントバルビタール単独投与の欠点を補うため、トランキライザーの麻酔前投薬を行う。例えば、ジアゼパム1～2mg/kgの筋肉内注射や塩酸キシラジンの1～2mg/kgの皮下注射を行うと円滑な導入と覚醒が得られ、ペントバルビタールの投与量も1/2～1/3ですむ。実際の例として、硫酸アトロピン0.03mg/kgの皮下注射後10分を経て塩酸キシラジン1～2mg/kgを皮下注射し、ついで5～10分後にペントバルビタール4～13.5mg/kgを徐々に静脈内注射する。これにより40～50分間の外科的麻酔期が得られる。追加麻酔が必要な時は、ペントバルビタールを2～5mg/kgの範囲で行う。

* 塩酸ケタミン

鎮痛作用は強力であるが、一般に内臓痛は残り、筋肉が弛緩しないため硬直したカタレプシー状態を示す。瞳孔は開いたままで、意識の完全消失もない。投与後まもなく痙攣性発作の生ずることがあるが、しばらくするとおさまる。咽喉頭反射が残るが、イヌの場合は塩酸ケタミン投与による気管チューブの挿管ができる。

塩酸ケタミン投与により強い流涎や気管粘膜からの分泌亢進がみられるので、硫酸アトロピンの前投薬は不可欠である。しかし、これにより角膜の乾燥や損傷が起こる恐れがあるので、眼軟膏を塗布する。

投与は10～20mg/kgを静脈内に投与する。安全域が広いため追加投与が可能であり、麻酔時間の延長が可能である。又、小型イヌには10mg/kgを筋肉内注射を行うことにより20～30分の麻酔期が得られるが、個体差は大きい。筋肉内注射時に疼痛があるので、ゆっくりと注入する。

* 塩酸ケタミン+塩酸キシラジン

筋肉を弛緩させるためにトランキライザーの前投薬が望ましい。ジアゼパム1～2mg/kg又は塩酸キシラジン1～2mg/kgを皮下もしくは筋肉内注射を行う。これにより塩酸ケタミンを半量程度に減らすことができる。例えば、硫酸アトロピン0.03～0.05mg/kgの皮下注射と同時に塩酸キシラジン1～2mg/kgを皮下注射し、20分後に塩酸ケタミン5～15mg/kgを筋肉内注射する。10～15分後に筋の弛緩と痛覚の消失が見られ、20～30分間にわたり外科的麻酔期が得られる。簡単な開腹手術も可能である。

資料 4

* プロポフォール：血液—脳関門を容易に通過するため、投与後迅速に麻酔作用が発現する。鎮静/催眠作用が作用の本質であり、鎮痛作用は非常に弱い。全身麻酔薬として用いる場合は、オピオイドあるいは局所麻酔を併用する必要がある。麻酔導入役として用いる場合：6～8mg/kg静脈投与

(3) 吸入麻酔

「9. イヌ、ブタ、ネコ、霊長類における吸入麻酔法の概念」参照。

(4) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

7. ブタの全身麻酔法

ブタの麻酔には獣医学の十分な知識と技術が必要であり、安易に麻酔を行うべきではない。専門家の指導を仰ぎ、又、獣医学領域で多くの成書があるので、それらを参考にすべきである。

ブタは繊細な動物で興奮しやすい性質があり、物理的拘束が困難である。よって、全身麻酔を行う際に麻酔前投薬を投与することによって麻酔の導入を容易にし、ブタのストレスを軽減させることができる。また、ブタでは麻酔により嘔吐が見られることがあるので、絶食を行う。通常は12 時間以上の絶食及び2～3 時間の絶水を行う。

(1) 麻酔前投薬

大量の注射薬（10ml 以上）を筋肉内投与する際にシリンジと針を延長チューブでつなぎ、ブタの筋肉内に針を刺し、ケージ内で拘束せずに投与する方法は有用である。

* 硫酸アトロピン

0.05mg/kg の硫酸アトロピンを筋肉内投与することにより唾液および気管支粘液の分泌が抑制される。吸入麻酔のために気管挿管を行う際に有効である。

* 塩酸ケタミン+塩酸キシラジン

10～20mg/kg の塩酸ケタミンと2～4mg/kg 塩酸キシラジンを混合し、筋肉内注射を行う。重度の鎮静および不動化が得られる。

* 塩酸メドミジン+ミダゾラム

0.04～0.06mg/kg の塩酸メドミジンと0.2～0.3mg/kg のミダゾラムとの混合液を筋肉内投与する。重度の鎮静が得られるが、不動化は完全ではない。

資料 4

* ジアゼパム

1~2mg/kg のジアゼパムを筋肉内投与することにより急速な鎮静を得られるが、完全な不動化を得るためには10~15mg/kg の塩酸ケタミンの追加投与を行う。

(2) 注射麻酔

ブタの静脈内注射の最も簡単な方法は耳の静脈からであり、確実に血管を確保するために留置針を留置することが望ましい。

* プロポフォール

2.5~3.5mg/kg のプロポフォールを静脈内注射することで10分ほどの外科麻酔が得られる。麻酔は追加投与（10~15分後とに1~2mg/kg）または持続注入（8~9mg/kg/h）によって延長できる。ただしプロポフォールは強い呼吸抑制があり補助呼吸が必要となる。

* チオペンタール

6~9mg/kg のチオペンタールを静脈内投与することにより5~10分の外科麻酔が得られる。

(3) 吸入麻酔

「9. イヌ、ブタ、ネコ、霊長類における吸入麻酔法の概念」参照

(4) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

8. 霊長類の全身麻酔法

霊長類の麻酔には獣医学の十分な知識と技術が必要であり、安易に麻酔を行うべきではない。専門家の指導を仰ぎ、又、獣医学領域で成書があるので、それらを参考にすべきである。

霊長類では麻酔により嘔吐の見られることがあるので、全身麻酔の前に絶食を行う。通常は12時間以上の絶食及び2~3時間の絶水を行う。霊長類は保定が困難であるためケージの筐体板を利用し保定を行う。この状態で大腿部または上腕部の筋肉に筋肉内注射または静脈内注射が行える。

(1) 注射麻酔

* 塩酸ケタミン+塩酸キシラジン

塩酸ケタミン10mg/kg+塩酸キシラジン0.5mg/kg の筋肉内注射により30分程度の外科麻酔が得られる。

* 塩酸メドミジン+ミダゾラム

0.06mg/kg の塩酸メドミジンと0.3mg/kg のミダゾラムとの混合液を筋肉内投与する。重度の鎮静が得られ、採血などの簡単な処置が行える。また、塩酸メドミジンには拮抗剤（塩酸アチパメゾール、商品名アンチセダン）がある。塩酸アチパメゾール0.24mg/kgの筋肉内投与により速やかに鎮静状態から覚醒する。

(2) 吸入麻酔

「9. イヌ、ブタ、ネコ、霊長類における吸入麻酔法の概念」参照

(3) 麻酔の判定

「2. モルモットの全身麻酔法 (3) 麻酔の判定」参照。

9. イヌ、ブタ、ネコ、霊長類における吸入麻酔法の概念

吸入麻酔は注射麻酔法に比べ短時間、長時間にかかわらず麻酔深度についての調節が容易で、短時間で覚醒する安全な全身麻酔である。しかし、麻酔チャンバー等で簡便に行える実験小動物と異なり、イヌ、ブタ、ネコ、霊長類の吸入麻酔には専用の吸入麻酔器が必要である。又、専門知識及び技術が必要である。従って、ここでは方法の紹介程度にとどめた。吸入麻酔の実施を希望する人は、吸入麻酔器等の整備と技術の習得のために専門家の指導を仰ぐ必要がある。

(1) 吸入麻酔薬：吸入麻酔薬にはガス麻酔薬と揮発性麻酔薬がある。

* ガス麻酔薬

ガス麻酔薬では笑気（亜酸化窒素N₂O）だけが使用されている。わずかに臭気のある非爆発性ガスである。麻酔作用は極めて弱いため笑気と酸素との混合ガスにハロタン、イソフルラン等の揮発性麻酔薬との併用により使用する。

* 揮発性麻酔薬

ハロタン：強力な麻酔薬であり、引火性・爆発性はなく、気道の刺激も少ない。何よりも調節性が優れているため、大部分の動物種で安全に麻酔を実施できる。導入、覚醒は早い。しかし、ハロタンの20%は肝臓で代謝されるため、短期間に反復投与すると肝臓障害を起こすことがある。肝臓障害を持つ動物には使用しない方が良い。又、比較的強い循環器系の抑制作用を有し、不整脈や期外収縮等も認められる。ハロタンの使用時には気化濃度を正確に保てる気化器が必要であるが、正確な気化器が市販されているので安全な麻酔が可能であり、利用頻度が高い。

イソフルラン：理想的な麻酔薬に近く、人の臨床では汎用されている。イソフルランはハロタンに比べ麻酔の導入、覚醒が早く、麻酔深度の調節や安定性が良い。麻酔作用も強力である。肝臓、腎臓に対する毒性もなく、心筋収縮に

資料 4

対する抑制も少なく、不整脈の発生もない。軽度の呼吸抑制作用や気道刺激性があるが、あまり問題にはならない。気化器は専用のものがあるが、ハロタン気化器を転用できる。

セボフルラン：イソフルランよりも少しは劣るが強力な麻酔作用を持つ。導入は速やかで蓄積性もないため、覚醒も早い。麻酔深度の調節性にも優れている。認可されたのが1990年と新しく、今後極めて有望な麻酔薬である。気化器は専用のものが必要である。

(2) 麻酔導入手技の実際 —ハロタン麻酔を例として—

* 必要器材：閉鎖循環式吸入麻酔器、ハロタン気化器、酸素ガス、酸素ガス減圧弁、フローメーター（流量計）、呼吸バック、Yピースと蛇管、気管チューブ、咽頭鏡等

* 実施の手順：1. 動物の準備（絶食、絶水等）

2. 前投薬（硫酸アトロピン、塩酸キシラジン、ジアゼパム等の投与）

3. 麻酔の導入（チオペンタール等の投与）

4. 気管チューブ挿管

5. 維持麻酔（ハロタンの導入）

6. 麻酔の覚醒（酸素のみの吸入）

7. 回復処置

10. 動物の痛みの臨床的判定

ヒトにとって痛いと感じられる刺激は動物にとっても同様に痛いと感じられ、それぞれ独特の方法で痛みを表現する。従って、動物が痛みを感じているか否かは、術後の動物の動作を注意深く観察したり（表1）、実施する手術の種類を知ることによりある程度判定することができる。

急性痛の生理学的徴候には、頻脈、頻呼吸、血圧の上昇、心拍数の増加、可視粘膜蒼白、流涎、高血糖、沈鬱、食欲減少、活動性の低下が含まれ、呼吸数もしばしば増加する。疼痛に対する反応は種や個体によって異なるが、行動パターンと徴候の変化が見られることが多い。表情の変化（目を細める、耳を下げるなど）、発声パターンの変化（うなる、鳴くなど）、行動の変化（臆病になる、攻撃的になる、痛みを感じている部位に触るとかみつくななどの防御的動作をしたり、その部位をなめたり、痛みを最も少なくできるように盛んに位置を変える、狂乱したように暴れるなど）、姿勢の変化（うずくまる、弓状になるなど）などがある。また、疼痛によって食欲が減退するので食餌の摂取量が減少し、グルーミング行動が減るので外見がみすぼらしくなる。

表 1 疼痛行動

表情	目を細める、耳を下げる
発声パターンの変化	吠える、うなる、鳴く
防御行動	逃げようとする、噛みつこうとする、患部をなめる
休みなく動く	落ち着きなく歩き回る、横になったり起きあがったりを繰り返す
異常な姿勢	伏臥の回避（祈りの姿勢）、腹部を弓なりに持ち上げて保護している、銅像のように立ったまま動かない、頭を下げている、腹部に頭を巻き付けたまま横になっている
横たわる	動くのを嫌がる、起き上がれない
その他	震えている、人への反応が乏しい、立毛、毛繕いをしない、流涎
生理学的徴候	頻呼吸、浅速呼吸、頻脈

1.1. 実験動物の術後管理と疼痛緩和

実験動物に外科的処置を行った後には鎮痛が必要である

痛みの伝達経路を遮断する薬物には、オピオイド、 α_2 -作動薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs : Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs）、局所麻酔薬、NMDA拮抗薬（ケタミン）などがある。購入や使用に免許が必要となる麻薬を使用しない場合、疼痛管理に利用できる薬物は、非麻薬性オピオイド（ブトルファノール、ブプレノルフィンなど）、 α_2 -作動薬（メデトミジン、キシラジンなど）、NSAIDs（アスピリン、インドメタシン、カルプロフェン、メロキシカム、ケトプロフェンなど）、局所麻酔薬（リドカイン、プピバカイン、マーカインなど）である。

一般的にオピオイドは術後疼痛のコントロールに使われる。ブプレノルフィンは多くの種で長時間（6~12 時間）効果が続き、安全に使い、鎮痛効果が高い。NSAIDsは一般的に鎮痛作用は弱い、メロキシカムやカルプロフェンやその他の最近市販されている薬剤の多くはオピオイドに匹敵する効果を持つ。多くの例から術後24 時間はオピオイドで、その後24時間以上をNSAIDs で行うのが効果的である。

鎮痛剤は特定の実験プロトコルを邪魔する副作用がある。臨床的にはあまり重要ではないがオピオイドは呼吸抑制、低血圧、便秘の原因となりうる。またNSAIDs はプロスタグランジンの産生を抑え、創傷治癒過程において血液凝固を阻害し、腎機能に影響を及ぼす可能性がある。しかし、市販されている様々な鎮痛薬の薬理を慎重に評価することにより、実験プロトコルに影響の少ない鎮痛剤投与計画を実施することが可能になる。鎮痛薬が禁忌の場合、手術の傷に比較的長期間効果が持続する局所麻酔薬のプピバカインを浸潤させ、4~6 時間の鎮痛を行う。

実験処置後1 日に数回は動物の様子を見に行かなければならない。手術の傷に注意をし、動物が噛んだり、なめたり、引っ掻いたりして体を傷つけたり、埋め込まれた器具（カテーテルやトランスデューサーなど）を壊さないようにしなければならぬ。肉食動物や霊長類では傷をなめるのを防ぐために時々首に付けるカラーが必要である。慢性実験では皮下にカテーテルや他の機器を埋め込んだほうがよい。

また、術後の感染防止のために衛生的な外科処置を行うことと術中や術後に適切な抗生物質を投与することが重要である。

表 2 代表的な鎮痛薬の種類、用法

区分	薬品名	マウス	ラット	モルモット	ウサギ	フェレット	霊長類
NSAIDs	アスピリン (Aspirin)	120mg/kg経口	100mg/kg経口	87mg/kg経口	100mg/kg経口	200mg/kg経口	20mg/kg経口 6-8時間毎
	カルプロフェン (Carprofen)	5mg/kg皮下	5mg/kg皮下	4mg/kg皮下 1回/日	1.5mg/kg皮下1回/日 または4mg/kg皮下 1回/日	4mg/kg皮下 1回/日	3-4mg/kg皮下 1回/日
	フルニキシム (Flunixin)	2.5mg/kg皮下 または筋肉 12時間毎	2.5mg/kg皮下 または筋肉 12時間毎	2.5mg/kg皮下 または筋肉 12時間毎	1-2mg/kg皮下 または筋肉 12時間毎	0.5-2mg/kg皮下 または筋肉 12時間毎	0.5-2mg/kg皮下 または静脈 1回/日
	イブプロフェン (Ibuprofen)	30mg/kg経口	15mg/kg経口	10mg/kg経口	10mg/kg経口	-	7mg/kg経口
	ケトプロフェン (Ketoprofen)	5mg/kg皮下	5mg/kg皮下	-	3mg/kg筋肉	3mg/kg筋肉	2mg/kg皮下 1回/日
	メロキシカム (Meloxicam)	5mg/kg皮下 または経口	1mg/kg皮下 または経口	0.1-0.3mg/kg 皮下または経口 1回/日	0.6-1mg/kg皮下 または経口	0.1-0.2mg/kg 皮下または経口	0.1-0.2mg/kg 皮下または経口 1回/日
	インドメタシン (Indomethacin)	1mg/kg皮下	2mg/kg皮下	8mg/kg皮下	12.5mg/kg皮下	-	-
	アセトアミノフェン (Acetaminophen)	200mg/kg経口	200mg/kg経口	-	-	-	-
非麻薬性	ブプレノルフィン (Buprenorphine)	0.05-0.1mg/kg 皮下12時間毎	0.01-0.05mg/kg 皮下または静脈 8-12時間毎 0.1-0.25mg/kg 経口8-12時間毎	0.05 mg/kg 皮下12時間毎	0.01-0.05mg/kg 皮下または静脈 8-12時間毎	0.01-0.03mg/kg 皮下、筋肉 または静脈 8-12時間毎	0.005-0.01mg/kg 筋肉または静脈 6-12時間毎
オピオイド	ブトルファンール (Butorphanol)	1-2mg/kg 皮下4時間毎	1-2mg/kg 皮下4時間毎	1-2mg/kg 皮下4時間毎	0.1-0.5mg/kg 静脈4時間毎	0.4mg/kg 筋肉4-6時間毎	0.01mg/kg静脈 3-4時間毎
	ペンタゾシン (Pentazocine)	5-10mg/kg 皮下3-4時間毎	5-10mg/kg 皮下3-4時間毎	-	5-10mg/kg 皮下、筋肉、 または静脈4時間毎	-	2-5mg/kg筋肉 または静脈 4時間毎

※：個体差や系統差により効果が異なるので、個体毎に鎮痛薬の効果を評価する必要がある。

表 3 推奨する侵襲度別鎮痛薬投与期間（マウス・ラット）

侵襲度	鎮痛薬投与期間（持続時間）	手技
軽度	24時間≦	皮下への浸透圧ポンプ埋め込み
		テールカット
		脳内電極挿入
		腹腔鏡によるバイオプシー
中程度	24時間～48時間	動脈/静脈内カニューレーション
		胚移植
		卵巣/精巣摘出
		開頭術
重度	48～72時間	整形外科手術
		開胸術
		臓器移植
		大規模開腹手術

※：侵襲度は、処置の時間、組織切除の程度、出血量、動物の健康状態、年齢、系統、術者の技術等の様々な要因により影響されることも考慮する必要がある。

1 2. バランス麻酔の概念と疼痛管理

吸入麻酔単独の全身麻酔は痛みを感じていないと考えている人は多いと思われるが、麻酔薬には鎮痛作用がほとんどないものも多く、その場合は脊髄や脳幹部では痛みを感じているのである。侵害刺激による循環動態反応や反射性の運動が吸入麻酔薬により抑制され、表面上、疼痛が認識されていないように見えるが、脊髄には常に刺激が与えられており、繰り返しの侵害刺激によりニューロンは敏感になっている。このような状態では、痛み刺激が強く認識されるため麻酔覚醒後の痛みは強くなる。

そこで、麻酔薬と鎮痛薬を併用することによって手術中のストレスを最小限にとどめるような工夫をされたバランス麻酔が考案された。つまり吸入麻酔薬には意識の消失を求め、鎮痛は別の鎮痛に求めることにより各々の薬剤の利点を最大限に引き出し、欠点を最小にしたコンビネーション麻酔がいわゆるバランス麻酔である。バランス麻酔における鎮痛薬投与の目的は、単なる痛み止めというわけではなく、安定した麻酔維持に必要な吸入麻酔薬の必要量を減少させること、低濃度で維持することにより循環抑制に代表される副作用を減少させること、術後の覚醒を促進すること、また、スムーズに術後鎮痛に移行させることにより術後管理の質を向上させることにも貢献する。

1 3. 先制鎮痛法とマルチモーダル鎮痛法

先制鎮痛（preemptive analgesia）とは、手術という侵害刺激にさらされる前に痛みの伝達経路を遮断する鎮痛薬を投与することをいう。いわゆる術前の痛みの管理法の一つである。Woolfは、局所麻酔薬を用いて知覚神経を麻痺

資料 4

させておくと侵害刺激を繰り返し与えても痛覚過敏が起こらないことを示した。これがその後の先制鎮痛という概念の基になり、動物実験によりその根拠が示されている。このことは、手術が始まる前から十分な鎮痛処置を行うことの重要性を示唆している。先制鎮痛法は、術後の痛みを予防あるいは軽減し、動物の回復を改善する効果がある。先制鎮痛はもっと積極的に実験動物に利用されるべきだと考える。

一方、マルチモーダル鎮痛 (multimodal analgesia) とは、適切な鎮痛効果を得るため、作用の異なる鎮痛薬を複数併用することである。術後痛の発症には複数の機序が関与していることから、それに対する鎮痛方法も複数の治療法を組み合わせることにより、相乗効果が得られ、かつ副作用を最小限にして鎮痛を得ることができる。術中だけでなく術後の侵害刺激を抑えることも考慮し、持続時間の長い鎮痛薬を選択すると良い。また、術中に急性神経刺激による侵害刺激を抑えても、術後も炎症による侵害刺激が持続するため、末梢神経や中枢神経の過敏性がすぐに生じてしまう。従って、炎症がおさまる時期まで侵害刺激を抑制することが重要になる。

1 4. 麻酔薬、鎮痛薬等の商品名

ここで取り上げた麻酔薬、鎮痛薬等の一部の商品名を掲載した。なお、現在ではこの他に多数のジェネリック薬品が市販されており、それぞれ商品名が異なる。

薬品名	商品名	薬品含有濃度
ペントバルビタール*	ソムノペンチル	64.8mg/ml
チオペンタール	ラボナール	300mg/ml, 500mg/ml, 5g/ml
塩酸ケタミン*	ケタラール静注用	10mg/ml
	動物用ケタラール50	50mg/ml
塩酸キシラジン	セラクタール	23.3mg/ml
ジアゼパム*	セルシン	5mg/ml, 10mg/ml
	ホリゾン	10mg/ml
プロポフォール	ディプリバン	10mg/ml
塩酸メドミジン	ドミトール	1mg/ml
塩酸アチパメゾール	アンチセダン	5mg/ml
ミダゾラム*	ドルミカム	5mg/ml
塩酸クロルプロマジン	コントミン	10mg/2ml, 25mg/5ml, 50mg/5ml
硫酸アトロピン	硫酸アトロピン	0.05mg/ml
酒石酸ブトルファノール	ベトルファール	5mg/ml
ブプレノルフィン*	レペタン注	0.2mg/ml
カルプロフェン	リマダイル注射液	50mg/ml
メロキシカム	メタカム0.5%注射液	5mg/ml

資料 4

ハロタン	フローセン	99.99%
イソフルラン	フォーレン	100%
	イソフル	100%
セボフルラン	セボフレン	100%

*印の薬品は麻薬及び向精神薬取締法に定められた麻酔薬を示す。

【東北大学動物実験センターホームページより抜粋、改変】