

実験動物の安楽死の課題

安楽死処置における セコバルビタールの有用性

赤木 佐千子、平山 晴子、樫木 勝巳

(岡山大学 自然生命科学研究支援センター 動物資源部門)

1. はじめに

実験動物の安楽死処置は、化学薬剤を使った方法と物理的な方法に大別され、一般的に化学薬剤を使った非観血的な方法は、処置者の心理的な負担が比較的軽減されることから物理的な方法より好まれるとされる^[1]。化学薬剤、中でもバルビツレートは実験動物の血液中に入ると脳内にすみやかに移行、急速に麻酔作用を示しつつ用量依存的に呼吸抑制を示し、投与された実験動物はゆるやかに死に至ることから安楽死薬として広く用いられている^[1-3]。特にペントバルビタールは、薬剤の作動特性、化学的安定性、及び薬剤価格等の理由から第一の選択薬とされている^[1, 3]。しかし、日本では、2009年に医療用のネンブタール注射液の販売が中止^[4]、2018年には動物用のソムノペンチル注射液の終売がアナウンスされ、2020年4月1日現在、ペントバルビタールナトリウムの粉末試薬を入手できるものの医薬品としてペントバルビタール注射液を入手することはできなくなった。

2. ペントバルビタールの代替薬について

2018年のソムノペンチル注射液の終売告知時点で筆者の一人である樫木は、国立大学法人動物実験施設協議会（国動協）中型動物委員会を委員長として主宰していた。この委員会の所掌範囲は、ウサギ、イヌ、ブタ等の家畜をはじめ、マカク属のサルやコモンマーモセットといった実験動物として用いられる霊長類に関する情報収集等である。その委員会において霊長類を取り扱っている動物実験施設に所属する委員からソムノペンチル注射液終売後の霊長類の安楽死処置について問題の提起がなされた。そこで、ペントバルビタールを用いた安楽死処置に代わる代替方法の情報を集めるために国動協会員施設向けに「ソムノペンチル終売後の安楽死方法について」と題したアンケートを2019年1～2月にかけて実施した^[5]。

このアンケートでは、超短時間作動型バルビツレートであるチオペンタール及びチアミラールをペントバルビタールの代替薬として使用することを検討しているとの回答が有効回答の

60%程度に認められた。これはおそらく獣医学教育においてペントバルビタールに並んでこれらのバルビツレートが採り上げられ、現場の獣医師にとって馴染みがあったことによると考えられる。一方で、獣医医療現場等でチオペンタール及びチアミラールを安楽死薬として用いたことのある経験者からは、これらの薬物では個体間での生体応答にばらつきが見られるので他の化学薬剤を使った方法、又は物理的方法との併用が必要であるとの意見も寄せられた。いずれにせよ、これら超短時間作動型バルビツレートを用いた実験動物の安楽死処置に関する情報が少なく、このアンケートからはこれらの薬剤を安楽死処置におけるペントバルビタールの代替薬と推奨できるか否かについて結論を出せなかった。

このような経緯に加え、中型動物に限らずマウス・ラットを含むほぼすべての動物を用いた動物実験の実施上、バルビツレートを用いた安楽死処置が必要であること、粉末試薬からの自己調整によって作製された薬液では溶液中の添加物のコントロールがなされていない等の理

由で実験動物福祉の観点からその使用の是非については議論されていること、及び向精神薬として管理しなければならない試薬から調整した薬溶液をストックして使用する場合における管理上の問題点が考えられるので、我々は、医薬品として市販されているセコバルビタールに着目、これがペントバルビタールの代替薬となりうるのかを検討することにした。

3. セコバルビタールについて

バルビツレートは、表1に示したように尿素に脂肪族ジカルボン酸が結合したピリミジン構造を持つ複素環式化合物を基本骨格とした化合物群である^[2]。基本骨格に含まれる尿素由来構造中の酸素原子の硫黄原子への置換、又は炭素原子に結合する官能基の違いで多く派生物が作られている。これらは作用持続時間によって超短時間作動型、短時間作動型、中時間作動型、長時間作動型に大きく分類され、超短時間作動型と短時間作動型に分類される全身麻酔や麻酔導入に用いられるバルビツレートが実験動物の安楽死処置にも用いることが可能であるとされている^[1, 3]。日本では、ペントバルビタールを除くと超短時間作動型のチオペンタールとチアミラール、並びに短時間作動型のセコバルビタールの注射液が、それぞれラボナール、イソゾール、アイオナールの商品名で市販されている。

ペントバルビタールを含むこ

れらのバルビツレートは化学構造的によく似ており、チオペンタールとペントバルビタール、チアミラールとセコバルビタールが互いにそれぞれチオバルビツレートとオキシバルビツレートのアナログの関係にある。これからセコバルビタールは、チオペンタールに対してチアミラールがそうであるようにペントバルビタールより強い麻酔作用と薬効の早期発動性を示すとともに、オキシバルビツレートがもつ化学的安定性が与えられた化合物であると推測できる。なお、セコバルビタールは米国において人の尊厳死にも用いられているが^[6]、我々が調べた限りにおいて、実験動物の安楽死に使うことができるバルビツレートとされていること^[1]以外の安楽死処置に関する情報をほとんど見いだすことができなかった。

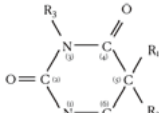
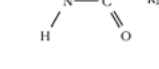
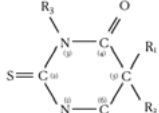
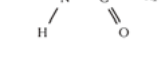
4. セコバルビタールならびにチアミラルールの安楽死処置への適用可否についての検討

本検討では、1998年に薬価が大幅に引き上げられたチオペン

タールについて薬剤価格に加え、チアミラールと比較して安楽死処置に用いる動機となる点が見出せなかったため検討から除外し、ペントバルビタール、セコバルビタール及びチアミラールを投与したときのラットの生体応答を以下の方法で取得、これら生体情報等を比較した。

この比較実験では、体重360～550gのオスのWistarラットを用いた。最初に、ラットをランダムに5匹ずつ3群にグループに分け、2～3%イソフルランの吸入により安定した全身麻酔下に置き、右側総頸動脈を剖出、剖出部より左心室内へ向けてカニューレを挿入した。カニューレに血圧測定用の圧トランスデューサーを接続することにより動脈血圧を測定した。また呼吸数を測定するためラットを体動測定用の圧トランスデューサーの上に静置し、呼吸に伴う体動を測定、この値から呼吸数を算出した。心電図用電極を左右前肢および左後肢に設置、右後肢端には光学パルストランスデューサーを装着し、心電図並

表1. ペントバルビタール, セコバルビタール, チオペンタール, チアミラルールの比較

物質名	基本骨格	作動性	R ₁ 官能基	R ₂ 官能基	R ₃ 官能基	注射液の添加物 ^[4, 7]
ペントバルビタール		短時間型	ethyl	1-methyl-butyl	-H	プロピレングリコール, エタノール等
セコバルビタール		短時間型	allyl	1-methyl-butyl	-H	添加物なし
チオペンタール		超短時間型	ethyl	1-methyl-butyl	-H	炭酸ナトリウム等
チアミラール		超短時間型	allyl	1-methyl-butyl	-H	炭酸ナトリウム等

びに経皮的動脈血酸素飽和度 (SpO₂) を測定した。これらの生体情報は PowerLab システム (ADInstruments 社) を用いて経時的に記録した。なお、確実にバルビツレートを経皮的に腹腔内へ投与するために、留置針を経皮的に腹腔内に穿刺、これを留置することにより投薬ルートを確認した。測定は図1に示した手順で実施した。すなわち、測定および投与の準備を完了した後、動脈血圧の安定化を確認、その後、イソフルランの供給を停止した。イソフルラン供給停止後の血圧上昇を確認、直後に投与部位の確認のための墨汁を混和したバルビツレート注射液の投与を開始した。用量は、予備実験とセコバルビタール及びチアミラールの医薬品インタビューフォームからの情報^{18, 9)}を参考にラットにおけるペントバルビタールの安楽死用量である 150 mg/kg に合わせた。

ペントバルビタールでは、投与2分以内に血圧および心拍数の低下が始まり、次いで呼吸数の低下が起こった。その後、深く不規則な呼吸が出現、SpO₂は検出限界の70%以下となり、10～16分後(平均11分53秒 ± 2分17秒)に呼吸が停止した(図2)。呼吸停止後には心拍数も低下、血圧安定時の心拍数の20%レベルになる徐脈出現までの所要時間は、15分9秒 ± 2分43秒であった。その後、心拍数はさらに低下し、10分程度経過後、心電図からQRS波が消失した。一方、心電図のQRS波が消失

せずに、30分以上継続する個体も観察される場合があったので、安楽死処置の死亡判定における心拍数の確認は無意味ではないが、実地レベルでの目安としては用い難い印象を与えた。セコバルビタールもペントバルビタールと同様の経過を辿って死に至るが、その薬効作用が強いために呼吸停止までと20%レベルの徐脈出現までの所要時間は、それぞれ7分55秒 ± 56秒、12分24秒 ± 2分5秒とペントバルビタールに比べて短時間であった。しかし、心電図からのQRS波の消失は呼吸停止後約10分以内には出現しなかった。

一方、チアミラールの呼吸停止までの所要時間は平均8分33秒 ± 3分5秒で、平均値こそセコバルビタールのそれに近似したレベルであったが、20%レベルの徐脈出現までの所要時間は14分31秒 ± 3分6秒とペントバルビタールと同レベルであった。チアミラールでは個体間での生体応答にばらつきが見られ、呼吸停止1分以上経過後に心肺機能が回復したような兆候を示す場合や、喘ぎ呼吸様の体動を示す例が観察された(図1～3)。これは先のアンケート回答にあった安楽死における超短時間作動型バルビツレートに関する意見と一致する。しかし、いずれの

個体も最終的には追加処置なく死に至っているため、少なくともラットの安楽死処置では、チアミラールを用いることはできると思われる。一方で、動物が痛みを感じていると誤解する要因となりうる想定外の体動等は、安楽死処置に慣れていない処置者にとって心理的な負担となる可能性が考えられ、また、何よりも見方によっては実施している安楽死処置について誤解を生じさせる可能性も十分に考えられるので、本剤を用いる安楽死処置では追加作業の準備と合わせ、作業実施時に特別に注意を払っておく必要がある。ちなみに、このような体動は、本検出中においてペントバルビタールおよびセコバルビタールを用いた場合には観察されなかった。

5. まとめ

以上の結果からペントバルビタールの代替薬としてチアミ

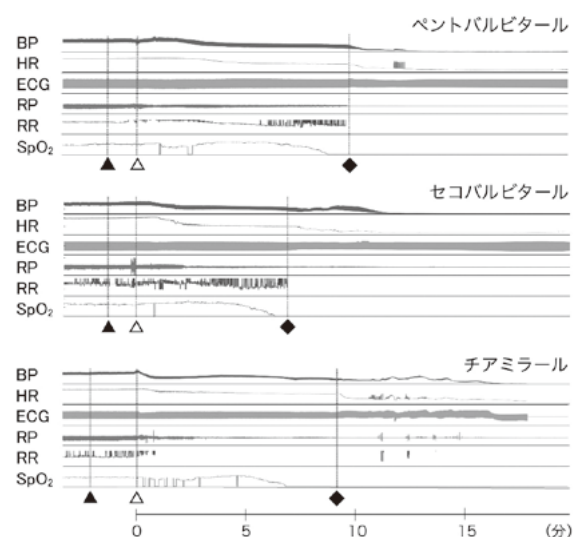


図1. バルビツレートによる安楽死処置時の生体情報の推移
BP: 血圧, HR: 心拍数, ECG: 心電図, RP: 呼吸圧, RR: 呼吸数, SpO₂: 経皮的動脈血酸素飽和度
▲: イソフルラン供給停止, △: バルビツレート投与, ◆: 呼吸停止

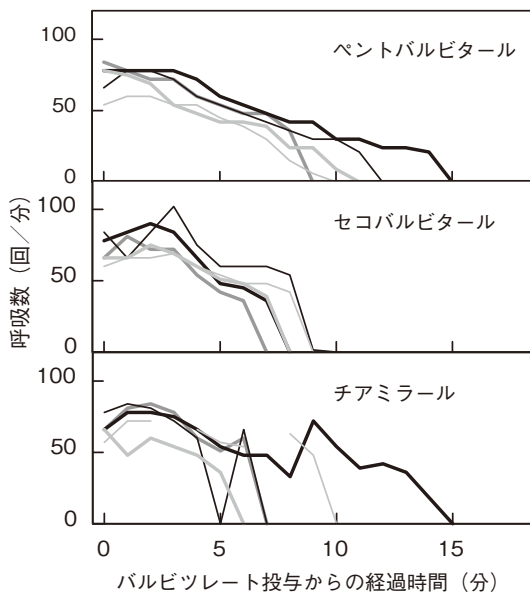


図2. 三種類のバルビツレートを用いた時の安楽死処置における呼吸数変化

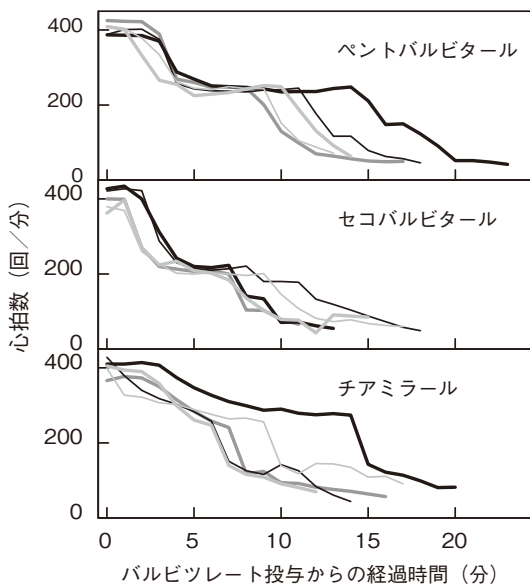


図3. 三種類のバルビツレートを用いた安楽死処置における心拍数変化

ラル、セコバルビタール両薬剤とも実験動物の安楽死処置に使用することはできると結論できる。しかし、チアミラルールは向精神薬として規制を受けていないという利点を持つが、化学的安定性に乏しく基本的に要時調整が必要であること¹⁸⁾、および動物の状態をコントロールし

難しいといったペントバルビタールにはない特性を示す薬剤である(図1、図2)。よって、手慣れた処置者がこの薬剤の特性を理解した上で安楽死処置に用いる必要がある。一方、セコバルビタールはペントバルビタールに非常によく似た作用特性を示すのみならず、麻酔作用はより強力であることから個体間のばらつきもペントバルビタール使用時に比べても比較的抑えられ、動物の状態をコントロールしやすい印象を与える(図2、図3)。また、薬効の早期発動性という特性から処置時間の短縮化も可能である。化学構造的にもペントバルビタールに非常に類似(表1)、代謝されても似たような化合物が残余することが予想されるので、これまでの実験結果との整合性の確保の面からも有利である。さらに、セコバルビタール注射液にはペントバルビタール注射液のような添加物が含まれていないので¹⁴⁾、これら添加物の影響も実験結果から排除することも可能となる。したがって、通常市場流通下において3年間安定であるという薬剤の保存性¹⁹⁾を加味した上での価格面とセコバルビタールが麻薬及

び向精神薬取締法において第1種向精神薬に分類されていることによる管理面について折り合いがつけば、セコバルビタールはペントバルビタールの代替安楽死薬の第一候補として強く推奨することができる。なお、我が国では製造や輸出入に関わらない教育及び学術研究の目的で使用する場合には、セコバルビタールをペントバルビタールが分類されている第2種向精神薬と同様の取り扱うことができる。とされている。

さて、以上の結論の元となった実験結果は、実験手技の都合上、麻酔深度第3期第3相のいわゆる外科的麻酔深度からスタートしての検討であった。そこで、参考例として無処置のラットをペントバルビタールとセコバルビタールで安楽死処置したときの経過例を雌雄1例ずつであるが表2に示す。すなわち、ペントバルビタールでは、薬剤投与90秒ほどで不動化、4~5分後に引っ張り試験での無応答化、15~16分後に呼吸停止は認められるが、セコバルビタールでは60秒ほどで不動化がおり、引っ張り試験での無応答化は約3分後に見られる。呼吸の停止は5~6分後に認められ、図1とほぼ同じような結果となった。いずれの場合も性差は認められなかった。したがって、図1からも示唆されるように呼吸停止から4~5分ほどのマージンを確保しておけば、この間にほぼ不可逆的な中枢神経系の抑制が起こっていると推測できる。すな

表2. Wistarラットを用いた安楽死処置例

性別 体重	ペントバルビタール		セコバルビタール	
	♂ 588.4g	♀ 302.0g	♂ 560.7g	♀ 318g
不動化	1分10秒	1分20秒	50秒	60秒
正向反射消失	1分45秒	1分40秒	1分20秒	1分20秒
後肢引っ張り 試験の無応答化	5分	4分30秒	3分15秒	3分
呼吸停止	16分15秒	14分20秒	5分20秒	5分
呼吸停止後の体動	なし	なし	なし	なし

わち、セコバルビタールを用いたラットの安楽死では、呼吸停止とチアノーゼ状態にあること確認すれば、仮に心拍動があったとしても呼吸停止からのマージンとなる時間経過をもって死亡と判定することができる。

本稿で紹介した動物実験（承認番号 OKU-2018937 及び OKU-

2018938）は、岡山大学動物実験規則に基づき実施された。

Reference

- [1] Andrews, E.J., Bennett, B. T., Clark, J. D., Houpt, K. A., Pascoe, P. J., Robinson, G. W., Boyce, J.R. Euthanasia, in "Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia 3rd ed." Thurmon, J.C., Tranquilli, W.J., Beneson, G. J.eds., Williams & Wilkins, Maryland, 1996, 862-882.
- [2] Lumbs, W. V. & Jones, E. W.,

Injectable Anesthetics, in "Lumb & Jones' Veterinary Anesthesia 3rd ed." Thurmon, J.C., Tranquilli, W.J., Beneson, G. J.eds., Williams & Wilkins, Maryland, 1996, 210-240.

- [3] The AVMA Panel on Euthanasia, Methods of Euthanasia, in "AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2020 Edition." The AVMA Panel on Euthanasia eds., American Veterinary Medical Association, Illinois, 2020, 22-55.
- [4] 公益社団法人日本麻酔学会医薬品ガイドライン改定ワーキンググループ, 催眠鎮静剤, 麻酔薬および麻酔関連薬使用ガイドライン第3版, 公益社団法人日本麻酔学会, 2018, 5-37
- [5] 国立大学法人動物実験施設協議会 2018—2019年中型動物委員会, ソムノペンチル終売後の中型動物の安楽死法アンケート (国動協内部資料), 2019.
- [6] Oregon Health Authority, Oregon's Death with Dignity Act 2013 Report, 2014.
- [7] 公益社団法人日本麻酔学会医薬品ガイドライン改定ワーキンググループ, 静脈関連薬, 麻酔薬および麻酔関連薬使用ガイドライン第3版, 公益社団法人日本麻酔学会, 2018, 86-98.
- [8] 日医工株式会社, イソゾール注射液0.5g 医薬品インタビューフォーム第5版, 2018.
- [9] 日医工株式会社, 注射用アイオナール・ナトリウム (0.2) 医薬品インタビューフォーム第10版, 2020.