

ラット胚移植における三種混合麻酔薬の有用性

中務 胞・夏目 里恵・中本 千尋・高田 華子
 彭 菲・鈴木 康浩・崎村 建司
 新潟大学脳研究所
 基礎神経科学部門細胞神経生物学分野

The Usefulness of the Combination of Three Anesthetics in Rat Embryo Transplantation

Ena NAKATSUKASA, Rie NATSUME, Chihiro NAKAMOTO, Hanako TAKADA
 Peng FEI, Yasuhiro SUZUKI and Kenji SAKIMURA

*Department of Cellular Neurobiology,
 Branch Brain Research Institute,
 Niigata University*

要 旨

遺伝子改変ラット作製には遺伝子操作を施した胚を移植する必要があり、より効率的に作製するためには、麻酔効果が高く、取扱いが容易で、母体や産仔に影響のない麻酔の選択が必須である。近年、三種混合麻酔薬（塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノール）による簡便で麻酔効果の高い注射麻酔が広く使われるようになってきたが、この麻酔が妊娠個体や産仔へ及ぼす影響についての詳細は不明である。

そこで我々は、三種混合麻酔薬を投与した偽妊娠誘起SDラットの子宮へ胚盤胞期胚を移植し、着床率、妊娠維持、分娩、産仔数および保育状況について、麻酔を規定量（試験区1）、規定量の1.5倍（試験区2）および規定量の2倍（試験区3）投薬した3試験区を設け比較した。なお、術後直ちに塩酸メドミジンの拮抗剤である塩酸アチパメゾールを腹腔内投与し、覚醒を促した。

その結果、すべての群において、着床率、妊娠維持、分娩状況および産仔数に優位な差はなく、麻酔を2倍投薬した群でも、術後拮抗剤を投与することで速やかに覚醒し、自然分娩および保育を行うことが明らかになった。また、得られた産仔に外見上の異常は認められなかった。このことより、三種混合麻酔薬がラットの胚移植時麻酔として適切なものであると判断できる。しかし、三種混合麻酔薬を用いて実際にES細胞キメララット胚を移植したところ、麻酔の効きが悪く追加麻酔を行った個体の産仔数が規定量投与後胚移植を行った個体と比較し、低い値であった。この原因は明らかではないが、遺伝子操作を行った胚は着床及び妊娠維持に何らかの影響が在り、追加麻酔を行うことで、それらが妨げられている可能性も排除できない。

キーワード：ラット、麻酔薬、胚移植、生殖工学

Reprint requests to: Ena NAKATSUKASA
 Department of Cellular Neurobiology,
 Brain Research Institute, Niigata University,
 1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
 Niigata 951 - 8585, Japan.

別刷請求先：〒951-8585 新潟市中央区旭町道1-757
 新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 中務 胞

緒 言

標的ゲノム部位を特異的に変更することができる、「ゲノム編集」は、生物学および医学研究にとって不可欠であり¹⁾、近年、TALEN (転写活性化様エフェクターヌクレアーゼ)²⁾ や CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated proteins)³⁾ 等の ES 細胞を介さない遺伝子編集法が次々と開発されている。また、電気穿孔法を用いたゲノム導入⁴⁾ 等の新しい遺伝子導入技術の開発も盛んに行われ、今までマウスの専売特許であった遺伝子改変分野も新技術により、様々な動物種に応用されるようになってきた⁵⁾。

特にマウスと並び重要な実験動物であるラットは ES 細胞樹立^{6,7)} や生殖工学技術の遅れより遺伝子改変が困難であり、病理学、生理学、毒物学、栄養学、免疫学および薬理学等で膨大な蓄積データ⁸⁾ があるにも関わらず、ゲノム研究においては積極的な利用が見送られていた。しかし、新技術によりゲノム編集がラットでも容易に行えるようになり、近年、遺伝子改変ラットを用いた試験報告が増えつつある。

当研究室では遺伝子改変マウスの作製を年間30系統以上行っており、ベクター構築、ES細胞の樹立および遺伝子改変マウス作製のノウハウを蓄積してきた。これらを基盤として、マウスよりも脳高次機能解析に優れるラットにおいて遺伝子改変を行い、研究に使用すべく、その作製に取り組んでいる。この遺伝子改変ラットを効率的に作製するには遺伝子操作を施した胚を雌動物に移植する必要がある。そのためには麻酔効果が高く、取扱いが容易で、母体や産仔に影響のない麻酔方法の選択が必須である。一般的に実験動物に使用されている注射麻酔薬(ペントバルビタールナトリウム等)は、中枢神経系に迅速に作用するが、外科麻酔が得られる麻酔深度では血圧の低下、呼吸抑制あるいは停止等の症状を引き起こす可能性が高く、実験操作中の死亡事例もまれではない⁹⁾。また、自立歩行可能な覚醒までの時間も長く、術後管理に長時間を要する⁹⁾。そのためより安全で

確実な吸入麻酔(イソフルラン、ハロタン等)を用いた全身麻酔が推奨されるが、これら手法では専用の吸入麻酔装置を必要とし、複数の動物の手術を短時間に続けて行うことが多いマウスやラットなどの小動物では操作性やコスト面で使い勝手が良いとは言い難い。近年この問題を改善すべく、三種混合麻酔薬(塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノール)¹⁰⁾ による簡便で麻酔効果の高い注射麻酔法が広く使われるようになってきたが、麻酔薬の添付文章には妊娠動物に対する影響は未知であり、妊娠動物に対する使用は推奨されておらず、この麻酔が妊娠個体や産仔へ及ぼす影響についての詳細は不明である。

そこで我々は、三種混合麻酔薬を投与した偽妊娠誘起 SD ラットの子宮へ胚盤胞期胚を移植し、着床率、妊娠維持、分娩状況、産仔数および産仔保育について、麻酔薬を規定量(試験群1)、規定量の1.5倍(試験群2)および規定量の2倍(試験群3)投与した3試験群を設け比較した。なお、胚移植手術後直ちに三種混合麻酔に拮抗する塩酸アチパメゾールを腹腔内投与し、覚醒を促した。

材料と方法

動物実験

本研究は新潟大学動物実験指針に従い、新潟大学動物実験倫理委員会の審査を受け、学長に承認された計画に基づき、実施した。

動物

胚を移植するための偽妊娠誘起処置ラット(以下レシピエント)は8週から16週齢のSlc:SD雌ラット(日本エスエルシー株式会社)を精管結紮した同系統の雄ラット(8から52週齢)と交配させることによって作製した。移植用の胚は過排卵処置を行った4週齢のSlc:SDとBN/SsNSlc(日本エスエルシー株式会社)雄ラットを交配させることにより作製した。すべての動物は温度21-24℃、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、換気設定約54回/時間

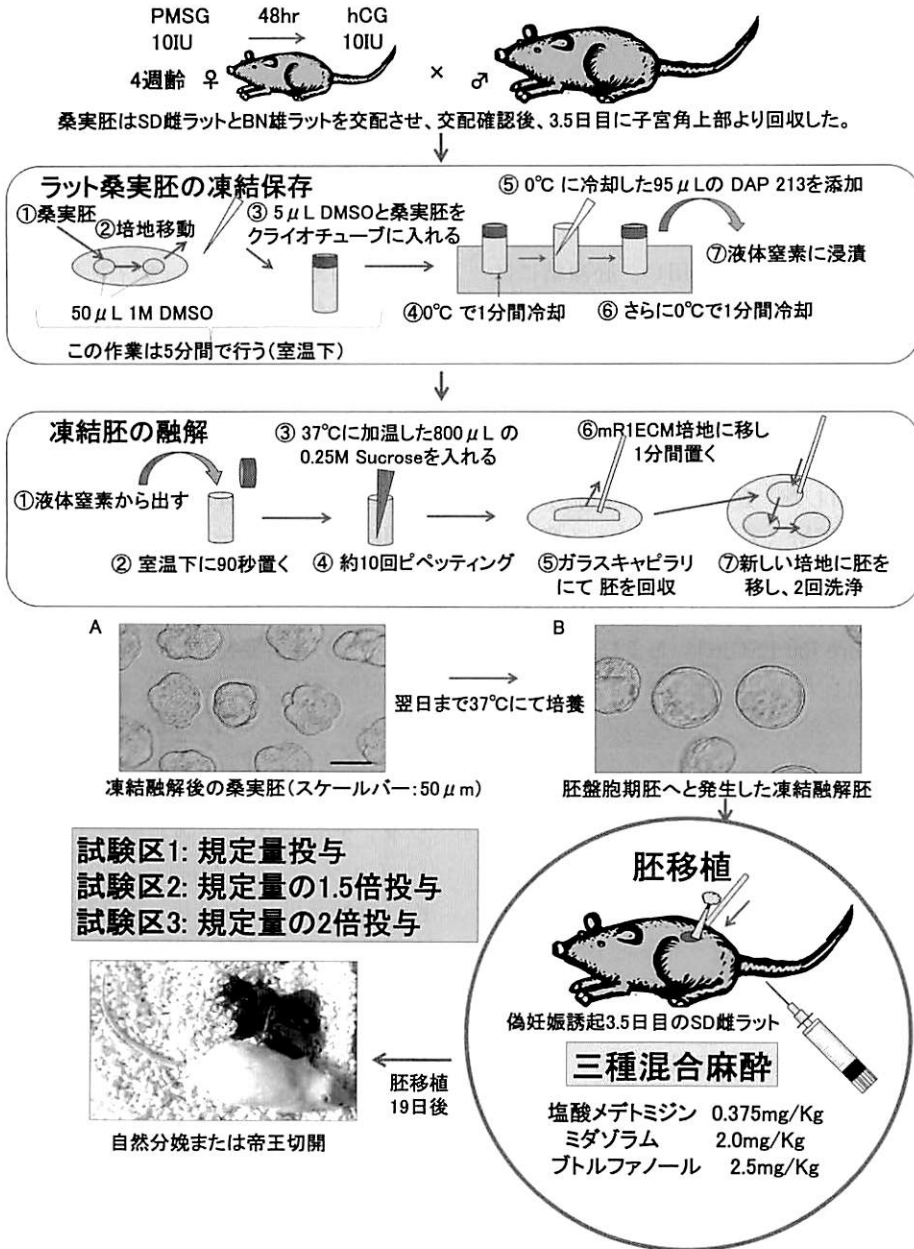


図1 実験スキーム

過排卵処置を施した幼若雌ラットと成熟雄ラットを交配させ、交配確認3.5日後に雌の子宮角上部より桑実胚を採取し、それら胚を凍結保存した。凍結保存した胚は、移植試験またはESインジェクションの前日に融解し、翌日まで培養して、胚盤胞期胚になったものを使用した。レシピエントラットには偽妊娠誘起処置を施した成熟雌ラットを用い、移植日の体重を基に三種混合麻酔薬を腹腔内に投与した。規定量投与したものを試験区1、規定量の1.5倍投与したものを試験区2、規定量の倍量投与したものを試験区3とし、麻酔投与後、胚移植を行った。胚移植19日後に分娩または自然分娩を行わなかった個体には帝王切開を施した。自然分娩した個体は離乳まで保育させ、保育状況を観察した。

のクリーンラックにて、プラスチックケージ（ポリサルホン）内に收容し、一般飼育用固形資料（オリエンタル酵母工業株式会社）及び限外濾過した水道水（新潟市水道局給水）を自由摂取させて飼育した。

培地

胚回収用には生理食塩水を用い、胚凍結には PB1 (modified phosphate-buffered saline) にて 1.0M に調整した DMSO (dimethyl sulfoxide) と DAP213 (2.0M DMSO, 1.0M acetamide, 3.0M propylene glycol) を用い、その融解には、PB1 にて 0.25M に調整した Sucrose (株式会社 LSI メディエンス) を使用した。桑実胚から胚盤胞までの胚培養には mR1ECM (アーク・リソース株式会社) を用いた。また、ES 細胞の培養には 2i (FGF-MAPK シグナル阻害剤, GSK の阻害剤), Rat LIF (Millipore Rat ESGRO) および Forskolin (Sigma) を添加した N2B27 2i 培地¹¹⁾ を使用した。

受容胚の採取

PMSG (10IU セトロロピン, あすか製薬株式会社) と hCG (10IU ゴナトロピン, あすか製薬株式会社) を腹腔内に投与することにより過排卵処置を施した幼若 (4 週齢) 雌ラットと BN 雄ラットを交配させ、翌日、陰スミア内に精子を調べることにより、交配の有無を確認した。交配確認後 3.5 日目に (交配確認日を 0.5 日とする) 子宮角上部より桑実胚を灌流法により回収した。

受容胚の凍結保存

50 μ L の 1M DMSO ドロップを 2 つ作製し、一つ目のドロップ底部に胚を入れ、ドロップ液中に浮き上がった胚が底部に沈んだことを確認後、二つ目のドロップ上部に胚を移した。胚が底部に沈み、脱水された胚が復元したことを確認したのちに、5 μ L の液と共にクライオチューブに移した。胚を 1M DMSO 投入から 5 分後、クライオチューブを 0 $^{\circ}$ C のチルヒーター上で 1 分間冷却し、同温に冷却した DAP213 を 95 μ L クライオチューブ内

に添加した。さらに 1 分間冷却後、液体窒素中に浸漬し凍結保存をおこなった。

凍結桑実胚の融解

凍結桑実胚の入ったクライオチューブを液体窒素から取り出し蓋をあけ、室温に 90 秒置き、37 $^{\circ}$ C に加温した 0.25 M Sucrose をチューブ内に 800 μ L 加え、10 回ピペティング後、シャーレの蓋に溶液をだし、再度 200 μ L の同液にてクライオチューブの共洗いをを行った。その後、溶液内の胚をガラスキャピラリーにて回収し、mR1ECM 培地の一つ目のドロップ (100 μ L) に入れ、1 分間置いた。次に、新たな mR1ECM のドロップにて 2 回洗浄して、24 時間、37 $^{\circ}$ C、CO₂ 5% 水蒸気飽和のインキュベータ内で培養し、胚盤胞期胚へ発生した胚をレシピエントの子宮に移植した。

胚移植時の麻酔薬投与

偽妊娠誘起を施した雌ラットに胚移植日の体重を基に三種類の薬剤を混合して腹腔内投与した。「塩酸メドミジン」(ドミツール 日本全薬) 0.375mg/Kg, 「ミダゾラム」(ミダゾラム注 サンド) 2.0mg/Kg, 「洒石酸ブトルファノール」(ベトルファール Meiji Seika ファルマ) 2.5mg/Kg。麻酔薬投与 10 分後、痛覚刺激に対して反応を示さなかった個体に胚移植を行った。麻酔は規定量 (試験群 1), 規定量の 1.5 倍 (試験群 2) および規定量の 2 倍 (試験群 3) の、3 試験区に分けて投薬した。また、胚移植後直ちに塩酸メドミジンの拮抗剤である塩酸アチパメゾール (アンチセダン 日本全薬工業) を腹腔内投与し、覚醒を促した。なお、塩酸アチパメゾールの投与量は投与した塩酸メドミジンの 2 倍量を用いた。

分娩状況

胚移植より、15 日目にレシピエントラットを個別飼育し、19 日目に分娩の確認を行った。自然分娩できなかった個体は 19 日目の夕方に帝王切開を行った。

保育状況

自然分娩したレシピエントについて、哺乳状況の観察を行った。また、分娩匹数と離乳匹数との差異についても調べた。

ES細胞培養

本研究には、当研究室にて樹立したSDおよびBN系統のES細胞を用いた。ES細胞には蛍光蛋白質GFPの変異体である、venus¹²⁾をモニター遺伝子として導入した。これらES細胞はN2B27 2i培地を用いて37℃、5%CO₂、水蒸気飽和のインキュベータにて培養した。インジェクション当日に培養したES細胞をアクターゼ (Innovative Cell Technologies, Inc.)にて処理し、遺伝子改変ラット作製に供与した。

ES細胞 injection

凍結融解後、胚盤胞へと発生した胚にSDまたはBN系統のES細胞を1胚あたり、3-5個注入した。注入後、規定量の三種混合麻酔薬を投与したレシピエントの子宮に胚を移植し、キメララットを作製した。移植に際し、麻酔の効きが悪く、痛覚刺激に対する反射がみられた個体に関しては、規定量の半分量の麻酔を追加投与した。(総投与量：規定量の1.5倍)なお、本試験は生殖系列伝達を確認できているES細胞を使用した。

統計学的処理

統計的な差はマン・ホイットニ検定(両側検定)によって確認した。すべての数値は平均値±標準偏差 (Mean ± SDM) で表記し、P値が0.05未満を統計学的有意であると判断した。

結 果

凍結胚の融解成績

凍結保存桑実胚の融解を行ったところ、969個中、934個の胚が回収でき(回収率：96.4%)、906個が生存していた(生存率：93.5%)(表1)。

凍結融解胚の発生成績

生存胚の一部を翌日まで培養したところ、790個中、700個が生存しており(生存率88.6%)、その内、617個が胚盤胞期胚へと発生していた(発生率：78.1%)(表2)。

三種混合麻酔薬を用いた胚移植成績および離乳までの保育状況

規定量三種混合麻酔薬を投与した試験群1ではレシピエント7匹に合計132個の胚盤胞期胚を移植し、全ての雌の妊娠が確認された。妊娠したすべての雌は分娩し、42匹の産仔が得られた(産仔率：31.8%)。離乳後レシピエントを剖検し、着

表1 DMSO/DAP213凍結保存液を用いたラット桑実胚の凍結融解成績

系統	クライオチューブ数	凍結胚数	凍結融解後の回収胚数	%回収率	生存胚数	%生存率
BN×SD	31	969	934	96.4	906	93.5

回収率：回収胚数/凍結胚数×100
生存率：生存胚数/凍結胚数×100

表2 凍結融解後24時間体外培養した桑実胚の発生成績

系統	24時間体外培養		%生存率	%発生率
	培養胚数	生存胚数		
BN×SD	790	700	88.6	78.1

生存率：生存胚数/培養胚数×100
発生率：胚盤胞期胚数/培養胚数×100

表3 三種混合麻酔投与量が胚移植後の着床、妊娠、産仔数に及ぼす影響

試験区	移植匹数	移植胚数	妊娠雌匹数	着床数 (平均±標準偏差)	着床率	分娩匹数	産仔数 (平均±標準偏差)	産仔率
試験区1 (規定量)	7	132	7	54 (6.7±2.4)	54/132 41.0%	7	42 (3.6±2.2)	42/132 31.8%
試験区2 (1.5倍投与)	4	72	4	44 (11.0±2.5)	44/72 61.10%	3	34 (8.5±5.3)	34/72 47.2
試験区3 (2倍投与)	6	113	6	43 (7.2±4.1)	43/113 38.10%	5	36 (6.0±4.3)	36/113 31.9

表4 三種混合麻酔を使用した偽妊娠誘起処置ラットへのESキメラ胚移植

三種混合麻酔	移植匹数	移植胚数	妊娠雌匹数	着床数 (平均±標準偏差)	着床率	分娩匹数	産仔数 (平均±標準偏差)	産仔率
規定量 投与区	101	1894	97	794 (7.9±4.0)	794/1894 41.9%	88	373 (3.7±3.0)	373/794 47.0%
追加麻酔区 (1.5倍投与)	6	111	6	45 (7.5±3.1)	45/111 40.5%	3	9 (1.5±1.4)	9/45 20%*

*: p < 0.05

床痕の個数を確認したところ、54個が確認でき、移植胚の41%が着床していた(表3)。

規定量の1.5倍三種混合麻酔薬を投与した試験群2ではレシピエント4匹に合計72個の胚盤胞期胚を移植し、全ての雌の妊娠が確認された。妊娠した雌の内、3匹が分娩し、34匹の産仔が得られた(産仔率: 47.2%)。自然分娩ができなかったレシピエント1匹の帝王切開を行ったところ、胎児はなく、着床痕のみであった。着床痕は44個で、移植胚の61.1%が着床していた(表3)。

規定量の2倍三種混合麻酔薬を投与した試験群3ではレシピエント6匹に合計113個の胚盤胞期胚を移植し、全ての雌の妊娠が確認された。妊娠した雌の内、5匹が分娩し、36匹の産仔が得られた(産仔率: 31.9%)。試験群2と同様に自然分娩ができなかったレシピエント1匹の帝王切開を行ったところ、胎児はなく、着床痕のみであった。着床痕は43個で、移植胚の38.1%が着床していた(表3)。

すべての群において、着床率および産仔数に有

意な差はなく、麻酔を2倍投与した試験群3でも、術後拮抗剤を投与することで速やかに覚醒して、自然分娩した。また、出産したすべての個体が離乳に至り、各試験区共に保育を行うことが明らかになった。加えて、保育中の行動にも麻酔の影響は見られなかった。さらに、得られた産仔に外見上の異常は認められなかった。

ES細胞インジェクション後のキメラ胚の移植成績

実際にES細胞をインジェクションしたキメラ胚を移植したところ、規定量にて移植手術を行うことができたレシピエント101匹について1894個のキメラ胚の着床率は41.9%(794個)であった。規定量では麻酔が効かず、追加麻酔を行った6匹のレシピエントの着床率も40.5%(45/111)と、規定量区と同等の着床が確認できた。しかし、規定量投与区では着床した胚の約半数(47.0%)が産仔へと発生するのに対し、追加麻酔区では着床した胚の1/4以下(20.0%)の胚が産仔まで発生することができ、産仔率は規定量麻酔薬を投与

したものと比較し、低い値であった（表4）。

考 察

本研究により三種混合麻酔法は、ラットへの胚移植時に適した麻酔薬であることが明らかになった。

胚移植技術は遺伝子改変動物を作製するのみならず、凍結胚や体外受精由来胚の個体復元にも必須の技術である。胚移植の成功には、移植者の技術はもちろんのこと、胚の品質、麻酔の選別、レシピエント動物の健康状態、術後処置等、いくつかの要因が関与している。特に麻酔薬の選別には注意が必要であり、使用する動物の性別、週齢、種、系統、体重、飼育環境、術後環境等により、適切な選択が要求される¹³⁾。

実験動物の麻酔は、実験内容によりいくつかの麻酔法が選択され施行されている。多くは倫理的な実験動物の施行における苦痛軽減を目的としたものであり、特に我が国の動物愛護法では動物実験を「できるだけ苦痛の少ない方法によって行わなければならない」と規定していることから、最新の情報を入手し、適切な麻酔施行を行わなければならない。実験動物の胚移植時に使用する麻酔薬としては副作用がなく、使用実績のあるケタミン¹⁴⁾が使用されてきたが、わが国では平成18年3月23日に「麻薬、麻薬原料植物、向精神薬および麻薬向精神薬原料を指定する政令」の改正により、ケタミンは麻薬と定められ、平成19年1月1日より法令として施行された。したがって許可のないケタミンの所有は違法となり、ケタミンを利用するには麻薬研究者や麻薬施用者の免許を取得する必要がある。全ての実験室にて容易に使用できなくなった。そこで、我々はケタミンに変わる新たな麻酔法として三種混合麻酔薬を検討した。

今回我々が使用した麻酔薬は、アドレナリン α 2受容体作動薬である塩酸メドミジン、ベンゾジアゼピン系鎮静剤であるミダゾラムとオピオイド κ 受容体作動薬である酒石酸ブトルフェノールである。薬剤の混合比は、Kawaiらの報告¹¹⁾およ

び各麻酔薬の添付文章に記載された推奨用量を参考にして調整した。本研究にて使用した三種混合麻酔薬は鎮痛作用、鎮静作用共にすぐれており¹⁰⁾¹⁵⁾、過剰投与した際にも拮抗剤として、アドレナリン α 2受容体作動薬に拮抗作用のある塩酸アチパメゾールで覚醒する。実際に術後すぐこの拮抗剤を投与すると、全ての個体が覚醒し、術後10分後には自立歩行を開始した。また、術中、術後に麻酔による死亡事例はなかった。また、どの試験区でも薬剤の副作用として麻酔薬の添付文章に記載のあるような、ふるえ、興奮、嘔吐等は認められなかった。拮抗剤投与後、麻酔下の動物の心拍数、呼吸数が急激に上昇するという報告¹⁶⁾もあるが、本研究のように胚移植を行う疾患のない8週から20週齢の偽妊娠誘起雌ラットに投与した場合、麻酔投与時に呼吸停止といった重篤な症状は認められなかったことから、呼吸補助等の装置は必要なく、手術時間が10分程度と短時間であるラットの胚移植に三種混合麻酔薬は適していると考えられる。しかしながら、本試験中、術中および術後の体温低下が認められた（データ非掲載）。術後の加温により、マウス胚の着床率が上昇するとの報告¹⁶⁾もあることより、術後の加温または保温については今後、考慮すべきであると考えられる。また、数例の動物において、ミダゾラムの副作用のひとつである、舌根沈下が認められた。このことより、覚醒までの間、気道確保（動物の体勢）には配慮が必要であるといえる。

遺伝子改変を行わない胚移植においては麻酔を過剰に投与したものでも、妊娠率ならびに産仔率に有意な差は認められなかったが、実際に遺伝子改変を行ったES細胞をインジェクションした胚盤胞期胚を移植した偽妊娠誘起処置雌ラットについて、追加麻酔を行わざるを得なかった個体の着床痕数は規定量投与したものと同等であったものの、産仔数が規定量投与後胚移植を行った個体と比較し、低い値であった。この原因は明らかではないが、遺伝子操作を行った胚は着床及び妊娠維持に何らかの影響が在り、追加麻酔を行うことで、それらが妨げられている可能性も排除できない。本研究において実際にキメラ胚を移植したレシピ

エント雌 107 匹中, 6 匹 (約 6%) に追加麻酔を施す必要があったが, その他の 101 匹については規定量投薬にて胚移植手術を行うことが可能であった。これらのことから, 本麻酔法は遺伝子改変ラットを作製するうえで, 実用的かつ安全な麻酔法であることが明らかになった。

結 論

遺伝子改変ラット作製時の胚移植ならびにすでに作製されている遺伝子改変ラットやモデルラットの胚移植についても三種混合麻酔薬は有効であり, 取扱いが容易なことより, 多くの実験動物施設で使用しうる麻酔であるといえる。

謝 辞

本研究は, 科学研究費基盤研究 A (24240048) の助成を受けて行われた。

参 考 文 献

- 1) Bogdanove AJ and Voytas DF: TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333: 1843 - 1846, 2011.
- 2) Joung JK and Sander JD: TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 49 - 55, 2013.
- 3) Wang H, Yang H, Shivalila CS, Dawlaty MM, Cheng AW, Zhang F and Jaenisch R: One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153: 910 - 918, 2013.
- 4) Kaneko T, Sakuma T, Yamamoto T and Mashimo T: Simple knockout by electroporation of engineered endonucleases into intact rat embryos. *Sci Rep* 4: 6382 - 6286, 2014.
- 5) Ma Y, Zhang L and Huang X: Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 281: 5186 - 5193, 2014.
- 6) Buehr M, Meek S, Blair K, Yang J, Ure J, Silva J, McLay R, Hall J, Ying QL and Smith A: Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts. *Cell* 135: 1287 - 1298, 2008.
- 7) Li P, Tong C, Mehrian-Shai R, Jia L, Wu N, Yan Y, Maxson RE, Schulze EN, Song H, Hsieh CL, Pera MF and Ying QL: Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts. *Cell* 135: 1299 - 1310, 2008.
- 8) Jacob HJ: Functional genomics and rat models. *Genome Res* 9: 1013 - 1016, 1999.
- 9) Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals. Committee on Pain and Distress in Laboratory Animals, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council (ed) National Academy press Washington, D. C. pp61 - 67, 1992.
- 10) Kawai S, Aneko S and Kurosawa T: Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp Anim* 60: 481 - 487, 2011.
- 11) Hirabayashi M, Tamura C, Sanbo M, Kato-Itoh M, Kobayashi T, Nakauchi H and Hoshi S: A retrospective analysis of germline competence in rat embryonic stem cell lines. *Transgenic Res* 22: 411 - 416, 2013.
- 12) Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K and Miyawaki A: A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol* 20: 87 - 90, 2002.
- 13) Arras M, Autenried P, Rettich A, Spaeni D and Rulicke T: Optimization of intraperitoneal injection anesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anesthesia depth. *Comp Med* 51: 443 - 456, 2001.
- 14) Dorsch MM, Otto K and Hedrich HJ: Dose pre-operative administration of metamizol (Novalgin) affect postoperative body weight and duration of recovery from ketamine-xylazine anaesthesia in mice undergoing embryo transfer: a preliminary report. *Lab Anim* 38: 44 - 49, 2004.
- 15) 今野和則, 堀内伸二, 磯江孝治, 松田浩典, 藤原広和, 小谷真美, 高島宏昌: ラットおよびウサギにおける 3 種混合麻酔薬の検討. *奈野研究所年報* 35: 53 - 59, 2012.
- 16) Bagis H, Odaman Mercan H and Dinnyes A:

Exposure to warmer postoperative temperatures
reduces hypothermia caused by anaesthesia and
significantly increases the implantation rate of
transferred embryos in the mouse. Lab Anim 38:
50-54, 2004.

(平成 27 年 6 月 15 日受付)
