

成熟マウスにおける唾液サンプルを用いたストレス評価
(Evaluation of stress response using saliva sample in adult male mouse)

学位論文の内容の要約

獣医生命科学研究科 応用生命科学専攻 博士後期課程 平成 25 年入学

野 原 正 勝

(指導教員: 教授 天 尾 弘 実)

血漿及び血清は、さまざまな生理活性物質を測定するサンプルとして一般的に広く用いられている。しかしながら、血漿又は血清を得るための採血そのものが、ヒトやその他の動物に対してストレスとなり得ることから、採血は侵襲性の高い採材方法であると言える。マウスから連続採血を行う場合、サフェナ静脈及び尾静脈を用いることが推奨されており、サフェナ静脈で循環血液量の 5%、尾静脈からは 0.1–0.15 ml の血液を得ることができるが、この量の血液を用いてアッセイ系で物質を検出することも困難である。このような理由から、全血を採取する方法として、断頭又は心臓穿刺による全採血が一般的に用いられており、これらの方法を用いた場合、全血でおよそ 1 ml、血漿では全血の半分の量である 0.5 ml 程度のサンプルを得ることが出来る。しかしながら、このサンプル量が酵素抗体法 (EIA) を用いて複数の物質を測定するのに十分な量である一方で、実験処置による何らかの反応を経時的に観察するために、各タイムポイントで動物を犠牲にする結果、数多くのマウスが必要となる。この問題に加えて、同一個体のマウスを用いて、処置前後の反応、複数のタイムポイントを観察することは不可能である。

近年、血漿又は血清の代わりに、生理活性物質を検出するための侵襲性の低いサンプルとして唾液が注目されている。ヒトにおいて、グルココルチコイド及び唾液 amylase の活性がストレス応答のバイオマーカーとして知られているが、マウス又はラットのような小型の実験動物において、ストレスのバイオマーカーとして唾液中 corticosterone (CORT) 又は amylase 活性を評価している報告はほとんど存在しない。そこで本研究では、ストレス応答を評価するために唾液中の CORT の濃度及び amylase 活性を測定した。

本研究は、マウスにおけるストレス応答を評価する上で唾液中 CORT が指標として利用可能か否かを明らかにするために、1. マウスの唾液中から CORT が検出されること、そして外因性の cortisol を投与することにより、血液中から唾液中へとグルココルチコイドが移行することを確認した (第 2 章)。次いで、2. 異なる種類の麻酔薬がマウスの唾液分泌に与える影響、拘束ストレス負荷による血漿中及び唾液中 CORT 濃度への影響を比較し、さらに、化学的ストレスの例として、抗がん剤が唾液分泌に与える影響を評価した (第 3 章)。最後に、3. マウスにおいて唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間をストレス負荷前後の唾液中 CORT 濃度及び amylase 活性を指標として検討した (第 4 章)。

1. マウスの唾液サンプルを用いたグルココルチコイドの測定 (第2章)

本章では、唾液中の CORT が EIA により検出されること、そして cortisol を 2.0 mg/kg の投与用量で腹腔内 (ip) に投与されたマウスにおいて、グルココルチコイドが血液中から唾液中へと移行することを確認した。移行を確認するために投与された cortisol は主にヒトにおいて合成され、げっ歯類では合成されないグルココルチコイドである。また、唾液分泌は、pilocarpine hydrochloride (0.5 mg/kg ip) によって促進された。得られた唾液及び血漿サンプルは、EIA による cortisol の測定のために用いられた。

唾液中 CORT は EIA により検出され、そして cortisol 投与の結果、マウスの血漿及び唾液中に cortisol を検出した。その一方で、溶媒を投与されたマウスの唾液からは cortisol が検出されなかったが、血漿中に非常に低いレベルで cortisol が存在していた。本研究の EIA では、CORT との交差反応が 2% を示す抗 cortisol 抗体を使用した。溶媒を投与した対照群において血中に cortisol が検出された理由は、抗 cortisol 抗体の交差反応によるものと推察される。

本研究の結果は、EIA を用いて唾液中 CORT の検出が可能であることを明らかにした。また、マウス唾液において検出された cortisol は、外因性のグルココルチコイド由来であり、cortisol は血液中から唾液腺を経由して唾液中に移行した可能性が示唆された。これらの結果、唾液中のグルココルチコイドは血中のグルココルチコイドの濃度を反映しているものと結論付けた。

2. 唾液サンプルを用いたマウスの副腎機能評価のための麻酔及びストレスの条件検討 (第3章)

本章ではまず、異なる 2 種類の麻酔薬 (三種混合麻酔薬及び pentobarbital) が唾液分泌に与える影響について検討した。近年、実験動物に対し広く用いられている pentobarbital に代わる麻酔薬として、三種混合麻酔薬は注目されている。三種混合麻酔薬は、medetomidine hydrochloride, midazolam 及び butorphanol tartrate で構成されており、本研究では、それぞれ 0.3, 6.0, 7.5 mg/kg ip で投与された。一方、pentobarbital sodium は 40 mg/kg ip で投与された。次いで、マウス用保定器を用いた 60 分間の拘束ストレス負荷の後、三種混合麻酔下又は無麻酔下での血漿及び唾液中の CORT 濃度を比較した。さらに、抗がん剤である cyclophosphamide (CPA; 50

mg/kg ip) がマウスの唾液分泌及び唾液中 CORT 濃度に与える影響を比較した。

三種混合麻酔群及び pentobarbital 麻酔群の間には、唾液中 CORT 濃度及び唾液量に有意な差は認められなかったが、三種混合麻酔群の唾液中タンパク質濃度は pentobarbital 麻酔群と比較して、有意に低い値を示した。麻酔下及び無麻酔下において、非ストレス群と比較して、60 分間の拘束ストレス負荷群の血漿中 CORT 濃度は有意に高い値を示した。拘束ストレス負荷群の唾液中 CORT 濃度もまた、非ストレス群と比較して有意に高い値を示した。一方、抗がん剤投与実験では、生理食塩水投与群と比較して、CPA 投与群の唾液 CORT 濃度は有意な上昇を示さなかった。さらに、唾液分泌量及び唾液中タンパク質濃度において、対照群及び CPA 投与群の間に有意な差は認められなかった。

三種混合麻酔薬は拮抗薬が存在し、鎮痛剤も含まれることから、動物に対する倫理面からも、pentobarbital に代わる麻酔として推奨されているが、本研究の結果から、唾液採取を目的とした場合の麻酔薬として、三種混合麻酔薬と pentobarbital に大きな差はないことが確認され、唾液の採取には三種混合麻酔薬が適していることを示唆した。また、拘束ストレス実験の結果から、マウスにおいて、唾液中 CORT 濃度が、拘束ストレス負荷による血漿中 CORT 濃度の変化を反映していることが示唆された。さらに本研究において、CPA (50 mg/kg ip) の投与は、マウスの唾液分泌及び唾液中 CORT 濃度に影響を及ぼさなかったことから、CPA の投与条件について更なる検討が必要であると考えられた。

3. 唾液採取を目的とした麻酔からの適正な回復期間の検討 (第 4 章)

本章では、ストレス負荷前後で、成熟雄マウスにおける唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間を評価した。本研究では、麻酔からの回復期間の検討を行うために、ストレス負荷前後に異なる 4 つの回復期間 (1, 3, 5 及び 7 日間) を設定した。唾液採取時間は、20 分ごとの 2 つのフラクション (0–20 及び 20–40 min) に分けられた。また、唾液中 CORT 濃度は EIA により、amylase 活性はドライケミストリーを利用した臨床化学分析装置により測定された。

拘束ストレス負荷は 4 つの回復期間すべてにおいて、唾液中 CORT 濃度を有意に上昇させた。一方で、唾液中 CORT 濃度の上昇における統計学的根拠は、7 日間の回復期間の方が、その他の回復期間と比較して高い有意水準であった ($p < 0.001$ vs

$p < 0.05$)。さらに、拘束ストレス負荷により、前半 20 分間における amylase 活性は、3 及び 7 日間の回復期間において有意な上昇が認められ、1 及び 5 日間において有意な上昇は認められなかった。反対に、後半のフラクションにおける amylase 活性は、1 及び 5 日間において有意な下降が認められ、3 及び 7 日間において拘束ストレス負荷前後の amylase 活性に変化は認められなかった。

本研究の結果は、同一個体のマウスを用いたストレス実験における唾液採取を目的とした麻酔からの回復には、7 日間の回復期間が望ましいことが示唆された。さらに、amylase 活性を用いて拘束ストレス負荷に対する反応を評価するために、唾液採取の初期の唾液サンプルが適しているであろうことが示唆された。

本研究の結論として、マウス唾液サンプルを用いて、唾液中の CORT を EIA により検出することが可能であり、そして、唾液中 CORT 濃度は血漿中 CORT 濃度を反映していることが示唆された。これはマウスにおける身体的ストレスに対する有用な低侵襲性のバイオマーカーと期待される。さらに、麻酔下のマウスから採取された唾液中の CORT 濃度及び amylase 活性を指標として拘束ストレス負荷を評価するために、麻酔からの適切な回復期間は、1 週間が望ましいと考えられる。加えて本研究の成果は、動物実験及び実験動物における福祉の基本理念である 3Rs の内の Reduction 及び Refinement に貢献すると考えられる。