

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)

野原 正勝

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)

野原 正勝

平成 28 年 3 月

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

指導教員:教授 天尾 弘実

第1章	緒言	1
2-(1)	序論	6
2-(2)	材料及び方法	6
2-(2)-1)	供試動物	6
2-(2)-2)	薬物の調製	7
2-(2)-3)	唾液採取の手順	7
2-(2)-4)	唾液中 corticosterone の検出	8
2-(2)-5)	Cortisol 投与による血漿中及び唾液中 cortisol 濃度への影響	8
2-(2)-6)	血漿中及び唾液中グルココルチコイド濃度の測定	8
2-(2)-7)	統計処理	10
2-(3)	結果	10
2-(3)-1)	唾液中 corticosterone の検出	10
2-(3)-2)	Cortisol 投与による血漿中及び唾液中 cortisol 濃度への影響	10
2-(4)	考察	10
2-(5)	小括	11
第3章	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	15
3-(1)	序論	15
3-(2)	材料及び方法	15
3-(2)-1)	供試動物	15
3-(2)-2)	薬物の調製	16
3-(2)-3)	唾液採取の手順	16
3-(2)-4)	麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響	16
3-(2)-5)	無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較	16
3-(2)-6)	麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較	17
3-(2)-7)	Cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響	17
2-(2)-8)	唾液中 corticosterone 濃度及びタンパク質濃度の測定	17
3-(2)-9)	統計処理	17
3-(3)	結果	18
3-(3)-1)	麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響	18

3-(3)-2)	無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較	18
3-(3)-3)	麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較	18
3-(3)-4)	Cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響	18
3-(4)	考察	19
3-(5)	小括	21
第 4 章	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	25
4-(1)	序論	25
4-(2)	材料及び方法	25
4-(2)-1)	供試動物	25
4-(2)-2)	薬物の調製	26
4-(2)-3)	唾液採取の手順	26
4-(2)-4)	唾液中 corticosterone 濃度を指標とした麻酔からの回復期間の評価	26
4-(2)-5)	唾液 amylase 活性を指標とした麻酔からの回復期間の評価	26
4-(2)-6)	唾液中 corticosterone 濃度及び amylase 活性の測定	27
4-(2)-7)	統計処理	27
4-(3)	結果	27
4-(3)-1)	唾液中 corticosterone 濃度を指標とした麻酔からの回復期間の評価	27
4-(3)-2)	唾液 amylase 活性を指標とした麻酔からの回復期間の評価	28
4-(4)	考察	28
4-(5)	小括	30
第 5 章	総括	35
要約		48
Summary		52

第1章 緒言

生命は、外部及び内部環境の変化に対応して内部環境を一定の範囲内に維持しようとする機能を有している(恒常性の維持)。侵襲的な外部環境の変化であるストレス刺激が生体に加わると、恒常性が乱されて生体の内部環境に歪みが生じるが、生体内では外部環境因子に適応するために生体防御機構が働く(ストレス応答)。ストレス学説を提唱した Selye は数多くの実験により、ストレスの種類(例えば疼痛、毒素、低温、高温又は飢餓など)にかかわらず、ストレスを負荷された動物における生理学的な反応が互いに酷似していることを見出しており、この知見から、ストレス応答は非特異的な反応であり、またストレスの種類(精神的又は身体的)にかかわらず共通の反応を示すと結論付けている [43]。ストレス応答には副腎が重要な役割を演じるが、副腎が反応に至るには2つの経路が知られており、それぞれ視床下部-下垂体-副腎軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis; HPA 軸)、交感神経-副腎髄質軸 (sympathetic-adrenal-medullary axis; SAM 軸) と呼ばれている。ストレスのバイオマーカーとして、HPA 軸を介したストレス応答ではグルココルチコイド (cortisol, corticosterone) が、SAM 軸を介したストレス応答では、カテコラミン (adrenaline, noradrenaline) 及び chromogranin A が知られており [33,40]、さらに、副腎髄質から放出される noradrenaline により分泌が亢進する α -amylase が、副腎髄質機能のマーカーとして注目されている [13,61]。

生体に身体的なストレス刺激が加わると、主に HPA 軸を介したストレス応答が起こる。すなわち、生体に加わったストレス刺激は脳辺縁系で受容された後、視床下部に伝わり、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone; CRH) の分泌を促進する。CRH は脳下垂体前葉に作用して副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone; ACTH) の分泌を促進し、ACTH は副腎皮質に作用して、グルココルチコイドの分泌を促進する。このようにグルココルチコイドは、動物が感受するストレスを科学的に評価するうえで有効なストレス応答のバイオマーカーとなっている。一方 SAM 軸を介したストレス応答は、精神的なストレス刺激により強く反応すると考えられている [13]。SAM 軸の刺激伝達としては、ストレス刺激が視床下部から交感神経、副腎髄質に伝達され、副腎髄質から血中へのカテコラミン分泌が亢進する。加えて、カテコラミンと共に、chromogranin A は副腎髄質及び交感神経末端から共放出され [40]、また副腎髄質から分泌された noradrenaline は唾液腺 (耳下腺) に作用し、唾液 α -amylase の分泌を促進する [13,29,61]。以上のようにストレス刺激は生体に種々の生理活性物質を放出させる。

ストレス反応性ホルモンを含む、さまざまな生理活性物質を測定するサンプルとして、血漿

及び血清が一般的に用いられている。しかしながら、血漿及び血清を得るための採血は、ヒト及び動物に対してストレスとなり、侵襲性の高いサンプル採取方法であると言える。またマウスを用いて連続採血を行う場合、伏在静脈(サフェナ静脈)又は尾静脈からの採血が推奨されており、伏在静脈からは循環血液量の5%(体重40gのマウスで約0.14ml)、尾静脈からは0.1から0.15mlの血液が得られる[8]。しかしながら、これらの部位から得られる血液サンプルを用いて種々の測定系により生理活性物質の検出を行うには、サンプル量が微量であるために、限界がある。さらに、マウスにおいて全血を採取する方法として一般的に用いられる断頭又は心臓穿刺などによる採血法は、全血でおよそ1ml、血漿に至っては全血の分量の0.5ml程度しか得られず、複数の物質を免疫測定法により測定するのに十分な量とは言い難い。加えて、実験処置による何らかの反応を観察する場合には、マウスからの採血量と各種アッセイ系の感度を考え合わせると、ほとんどの実験系では各タイムポイントにおいて全採血によりマウスが犠牲となり、数多くのマウスを実験に用いる必要がある。さらにこの問題に加え、同一個体における処置前後の反応を観察することは不可能である。一方、侵襲性の高い血液サンプルの代わりに、糞便、尿及び唾液を含めた非侵襲的なサンプルを生理活性物質の測定に用いることが可能である[34,50]。とりわけ、唾液中のバイオマーカーにおけるストレス応答の研究が多く行われている[18,40]。さらにこれらのサンプルは、実験処置による何らかの反応の経時的な変化を、同一個体を用いて観察することを可能にする。またヒト、イヌ及びヒツジにおいて、グルココルチコイド、 α -amylase 及び chromogranin A を含めたストレス応答のバイオマーカーには、血漿中及び唾液中濃度の間におおよその相関関係があることが報告されている[10,33,40,57]。唾液中のバイオマーカーの中でもグルココルチコイドに関する報告が最も多く、非げっ歯類のさまざまなストレス関連の研究において、唾液サンプルが cortisol 測定を目的に利用されている[10,14,15,24,39,41,52]。しかしながら、小型実験動物を用いたストレスに対する応答を、唾液中のこれらのバイオマーカーにより評価した報告はほとんど存在せず、グルココルチコイドについては、げっ歯類を用いた研究では、ラットを用いた隔離ストレス負荷による唾液中 corticosterone 濃度の変化の報告[5]が1報存在するのみで、ストレス負荷がマウスの唾液中 corticosterone 濃度に与える影響に言及している報告は存在しない。

ヒトの唾液は、綿球のような吸収体の使用又は流涎により容易に採取可能である。その一方でマウスの唾液は、マウスが覚醒下では唾液を嚥下するために容易に得ることができず、唾液採取のための麻酔が必要となる[6,19]。唾液採取を目的とした適切な麻酔薬について比較検討した報告は、ラットを用いた神経遮断性麻酔(flunisolone 及び fentanyl) 及び pentobarbital 麻

酔下における唾液分泌速度及び唾液成分組成の比較を行った報告 [23] があるのみで、マウスを用いた報告は存在しない。

動物実験における代表的な注射用麻酔薬として、pentobarbital 及び ketamine が挙げられる。Pentobarbital は動物実験において広く一般的に用いられてきた麻酔薬である。しかしながら、pentobarbital は循環器系及び呼吸器系を抑制する作用があり、ほとんどの小型実験動物において外科麻酔深度が得られるのは、呼吸器不全を引き起こす量に近い用量を投与したときのみであること、さらに鎮痛作用に乏しいということから、外科的手術に用いる際に pentobarbital の単独使用は推奨されない [11,32]。比較して ketamine は pentobarbital とは異なり、血圧上昇及び中等度の呼吸抑制を引き起こし、強力な鎮痛作用及び筋弛緩作用がある [11,32]。しかしながら ketamine は、2007 年 1 月 1 日より麻薬指定されており、学術研究上 ketamine を使用する必要がある場合には麻薬研究者免許を受けなければならない、麻酔薬として ketamine を容易に使用することができないという現状がある (麻薬, 麻薬原料植物, 向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令 [平成一八年三月二三日政令第五九号] 第一条; 麻薬及び向精神薬取締法第三条)。以上の理由から近年、これらに代わる麻酔薬として、3 種類の麻酔薬・鎮痛薬: medetomidine, midazolam 及び butorphanol を組み合わせた三種混合麻酔薬 [26] が注目されている。

麻酔薬には特定の作用部位が存在しており、medetomidine は α_2 -adrenaline 受容体、pentobarbital 及び midazolam は GABA_A (γ -aminobutyric acid, type A) 受容体 [32]、また非麻薬性鎮痛薬の butorphanol はオピオイド受容体に結合し作用する [17]。Pentobarbital 及び midazolam の結合部位を有する GABA_A 受容体は唾液腺腺房細胞にも存在しており、この受容体は唾液分泌において水分分泌及びタンパク質分泌共に抑制的に作用する [58]。一方、麻酔薬ではないが、唾液分泌促進剤である pilocarpine は muscarine 受容体のアゴニストであり [19,60]、この muscarine 受容体もまた唾液腺腺房細胞に存在し、唾液分泌における水分分泌について促進的に作用する [58]。Pilocarpine により唾液分泌が促進されていない通常の状態では得られる唾液量が極めて少ないため、マウス唾液の採取には pilocarpine の投与が必要不可欠である。以上のように麻酔薬は唾液分泌に密接に関係しており、唾液採取に適切な麻酔条件の設定が重要な課題となっている。そこで本研究では、唾液採取に適した麻酔薬を選択することも研究目的とした。

本研究では、低い侵襲性で採材が可能であり、かつ同一個体における経時的変化の観察を可能にする唾液に着目し、主に身体的ストレスである拘束ストレス負荷試験を行い、唾液中

の corticosterone 及び α -amylase を指標としてストレス応答の評価を行った。さらに、本研究から得られる成果が、実験動物学分野における福祉の基本理念である 3Rs の内の Reduction (使用動物数の削減) に貢献するのみならず、Refinement (苦痛軽減を中心とする動物実験の洗練) にも貢献するかについても検討を行った。

本論文は 5 章構成であり、第 1 章 (本章) では本研究を行うにあたっての背景及び目的を、第 2 章から第 4 章では本論を記述し、最後の第 5 章において総括を行った。第 2 章ではまず、ストレス応答の指標となる corticosterone を、唾液成分に干渉されることなくマウス唾液サンプルから酵素抗体法 (enzyme immunoassay, EIA) を用いて検出可能かを確認するために、唾液サンプル中における corticosterone について直線性試験 (用量依存性の確認) 及び添加回収試験 (サンプルに既知濃度の標準物質を添加し、その添加量が測定値に反映されるかの確認) を行い検討した。さらに唾液から検出されるグルココルチコイドの由来が、血中を循環しているグルココルチコイドであることを確認するために、動態試験を行った。物質の動態を調べる際は、被験物質 (本研究では corticosterone) に放射性同位体をトレーサーとして標識する方法が一般的であるが、放射性同位体は放射性同位元素等取扱施設の放射線管理区域で取り扱う必要があるなど、使用に制限がある。一方、horseradish peroxidase (HRP) などの酵素をトレーサーとして標識する方法もあるが、HRP の分子量はおよそ 44,000 であり [59], corticosterone の分子量 346 の約 127 倍と非常に大きいため、corticosterone の血中から唾液腺腺房細胞を介した唾液中への移行を HRP が阻害する可能性が考えられる。そこで本研究では、corticosterone (17-deoxycortisol) と構造が酷似した、ヒトにおける主要なグルココルチコイドであり、げっ歯類では合成されない cortisol (分子量 362) をマウスに投与することにより、血漿及び唾液から投与後に検出される cortisol の濃度を比較した。次いで第 3 章では、唾液採取に適した麻酔薬を選択することを目的に、実験動物において広く用いられている麻酔薬である pentobarbital 及び近年注目されている三種混合麻酔薬の唾液分泌に与える影響を評価した。また、身体的ストレスである拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 濃度の変化が、麻酔下で採取された唾液中の corticosterone 濃度に反映されるかを確認するために、麻酔下及び無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度の比較を行った。さらに、拘束ストレスとは異なるストレスとして、化学的ストレスを選択し、抗がん剤としても用いられている cyclophosphamide の投与を行った。Cyclophosphamide は、ヒトにおいて唾液分泌量を減少させることが報告されており [21,22], またラットにおける cyclophosphamide 投与実験は、嘔吐のシグナルである 5-hydroxytryptamine (serotonin, 5-HT) の代謝産物である 5-hydroxyindole

acetic acid (5-HIAA) の脳脊髄液中濃度の上昇及び異味症を引き起こすとともに、血漿中 corticosterone 濃度を上昇させることが報告されている [53]。そこで、cyclophosphamide 投与がマウスの唾液分泌に与える影響を検討するために、同一個体マウスにおける cyclophosphamide 投与前後及び対照群との唾液分泌量、唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度を比較し評価を行った。

さらに第 4 章では、マウスにおける唾液採取は麻酔下で行う必要があり、この麻酔そのものがストレス応答を引き起こす可能性があることから [2,7]、同一個体マウスにおける唾液採取を目的とした麻酔がストレス実験に影響を及ぼさなくなる適切な回復期間を検討するために、唾液中 corticosterone 濃度を指標に拘束ストレス反応について評価を行った。また、精神的ストレス及び副腎髄質活性のバイオマーカーとして知られる唾液 amylase 活性が、身体的ストレスである拘束ストレス負荷試験においても有効なストレスマーカーとなり得るかを検討するとともに、唾液 amylase 活性を指標に、唾液採取を目的とした麻酔からの回復期間の検討も行った。そして最後に、第 5 章において第 2 章から第 4 章までの結果及び結論をまとめ、総括を行った。

第2章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

2-(1) 序論

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用いられている。しかしながら、この血漿又は血清を得るための採血は、生体に対してストレスとなることから、侵襲性の高いサンプル採取方法であるといえる。マウスから採血を行う場合、断頭又は心臓穿刺による方法が一般的であり、何らかの反応を経時的に観察する場合には、マウスからの採血量と各種アッセイ系の感度を考え合わせると、ほとんどの実験系では、各タイムポイントにおいて動物の犠牲が必要となる。一方、血漿又は血清に代わる低い侵襲性のサンプルとして近年注目されている唾液サンプルは、同一個体のマウスを用いて何らかの処置による経時的な変化を観察することを可能にする。本研究では、この低い侵襲性で採材が可能であり、かつ同一個体における経時的変化の観察が可能となる唾液に着目し、唾液中 corticosterone を主に測定することにより、マウスが受容するストレスの評価を行った。Corticosterone は、動物が受容するストレスを科学的に評価するうえで有効なストレスマーカーであるグルココルチコイドの1種であり、げっ歯類における主要なグルココルチコイドである。

本章ではまず、ストレス応答の指標となる corticosterone が、マウス唾液サンプルから唾液成分に干渉されることなく EIA により検出されるかを確認するために、唾液サンプル中における corticosterone の用量依存性及び添加回収率の検討を行った。

次いで、唾液から検出されるグルココルチコイドの由来が、血中を循環しているグルココルチコイドであることを確認するために、ヒトにおいて主要なグルココルチコイドであり、げっ歯類では合成されない cortisol をマウスに投与し、投与後に血漿及び唾液から検出される cortisol の濃度を比較した。

2-(2) 材料及び方法

2-(2)-1) 供試動物

本研究で一貫して用いた成熟雄性 Kwl:ICR マウスは、株式会社 紀和実験動物研究所 (Wakayama, Japan) より購入し、すべてのマウスに市販の固形飼料 (EF; Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan) を水道水と共に不断給与した。また、温度 (23–25°C)、相対湿度 (40–60%) 及び明暗サイクル (12 h, 07:00–19:00 h) が維持管理された飼育室に設置したラミナフローラック (Tokiwa Kagaku Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan) 内で、ポリカーボネート製飼育ケージ (幅 220 mm, 奥行き 320 mm, 高さ 130 mm; Tokiwa Kagaku Kikai Co., Ltd.) にて 4 匹/ケージ

でマウスを飼育した。飼育ケージ, 床敷き (木製), 給水瓶 (250 ml) については, 高圧蒸気滅菌 (121°C, 20 分) したものを使用した。本章で行った研究では, 9 から 13 週齢のマウスを使用し, 試験前の体重は 43.9 ± 1.2 g (平均値 \pm 標準誤差) であった。

すべてのマウスの取り扱いは, 日本獣医生命科学大学動物実験規定及び公益社団法人日本実験動物学会の動物実験に関する指針 [20] に従った。また, 本研究における動物実験は, 日本獣医生命科学大学動物実験委員会により承認されている (13-98, 26K-19, 27K-70)。

2-(2)-2) 薬物の調製

すべての薬剤について, 0.1 ml/10 g 体重の投与量で腹腔内 (intraperitoneal, ip) に投与した。麻酔薬として, medetomidine のアンタゴニストである atipamezole が迅速な覚醒を引き起こすことから [11,32,51], 三種混合麻酔薬を用いた。三種混合麻酔薬は, 3 種類の麻酔薬・鎮痛薬: medetomidine, midazolam 及び butorphanol [26] を Naganuma ら [35] の投与用量となるように滅菌生理食塩水 (0.9%) と共に混和した。すなわち, medetomidine hydrochloride (Dormitor[®]; Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd., Fukushima, Japan), midazolam (Dormicum[®]; Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan) 及び butorphanol tartrate (Vetorphale[®]; Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan) の投与用量がそれぞれ 0.3, 6.0 及び 7.5 mg/10 ml/kg となるように混和した。唾液分泌促進剤 (催唾剤) である pilocarpine hydrochloride (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) 及び medetomidine のアンタゴニストである atipamezole hydrochloride (Antisedan[®]; Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd.) を滅菌生理食塩水で溶解し, それぞれ 0.5 及び 0.3 mg/kg の投与用量で投与した。また, cortisol (hydrocortisone; Nacalai Tesque, Inc.) を sesame oil (Nacalai Tesque, Inc.) で溶解して, 2.0 mg/kg の投与用量で投与した。なお, cortisol は主にヒトで合成され, げっ歯類では合成されないグルココルチコイドである。

2-(2)-3) 唾液採取の手順

マウスに三種混合麻酔薬を投与し, 10 分後に催唾剤である pilocarpine hydrochloride (0.5 mg/kg ip) を投与した。分泌された唾液をマウスの口腔内に静置した綿球 (直径約 5 mm, 全長約 10 mm) に吸収させ, 唾液を含む綿球は適宜新しい綿球と交換した。唾液採取終了後, 麻酔から覚醒させるために atipamezole hydrochloride (0.3 mg/kg ip) をマウスに投与した。麻酔下及び唾液採取の間は, 38°C に設定したホットプレートを用いてマウスの体温を維持した。

唾液を含んだ綿球を, 底に穴 (直径約 1.5 mm) を開けた 1.5 ml マイクロチューブに移し, このチューブを空の 1.5 ml マイクロチューブに重ねた状態で, 3,000×g (4°C), 30 分間の遠心分

離を行い、綿球から唾液を抽出した。さらに、綿球から抽出した唾液を 22,140×g (4°C) で 20 分間遠心分離し、唾液に混在している残渣を沈殿させて上清を得た。また、得られた唾液を corticosterone 濃度又は cortisol 濃度の測定まで-80°C で凍結保存した。

唾液分泌量は、唾液を含んだ綿球の重量から、遠心分離後に 60°C で一晩乾燥させた綿球の重量を引くことにより算出し、唾液 1 mg を 1 µl とした。

2-(2)-4) 唾液中 corticosterone の検出

唾液中の corticosterone が EIA によって検出されることを明らかにするために、用量依存性 (直線性) の確認を行った。すなわち、マウス唾液を 12.5, 25, 50 及び 100 µl/well の用量でマイクロプレートに加え、唾液中 corticosterone 濃度の測定を行った。また、サンプルに既知濃度の標準物質を添加し、その添加量が測定値に正確に反映されるかを確認するために、添加回収試験を行った。すなわち、2.06, 6.17 及び 18.5 ng/ml の corticosterone 標準物質をマウス唾液サンプルに添加し、唾液中 corticosterone 濃度の測定を行った。標準物質添加前サンプルの測定値に添加した標準物質の濃度を加えた値 (予測値) に対する標準物質添加後サンプルの測定値の割合を回収率 (%) とし、下式に従い算出した。

$$\text{回収率 (\%)} = \frac{\text{標準物質添加後サンプルの測定値 (ng/ml)}}{\text{予測値 (ng/ml)}} \times 100$$

2-(2)-5) Cortisol 投与による血漿中及び唾液中 cortisol 濃度への影響

三種混合麻酔薬投与直後、マウスに cortisol (2.0 mg/kg ip) 又は溶媒である sesame oil を投与し、その 10 分後に pilocarpine を投与して、40 分間の唾液を採取した。唾液採取終了後、直ちに麻酔下で断頭によりマウスを安楽死させ、heparin 処理されたサンプリングカップ (2.5 IU/カップ) に血液を採取した。血漿を得るために、採取した血液を 22,140×g (4°C) で 20 分間遠心分離し、得られた血漿を唾液と共に cortisol 濃度の測定まで-80°C で凍結保存した。

2-(2)-6) 血漿中及び唾液中グルコルチコイド濃度の測定

血漿中グルコルチコイド濃度を測定するために、血漿中グルコルチコイドを Kanosaka ら [25] の方法に従い、diethyl ether を用いて抽出した。また、血漿及び唾液中の corticosterone 及び cortisol 濃度を競合法の原理を用いた EIA により測定し、一次抗体として、anti-corticosterone-3-CMO-BSA IgG (FKA 420-E; Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) 及び anti-cortisol-3-CMO-BSA IgG (FKA 404-E; Cosmo Bio Co., Ltd.) をそれぞれ最終希釈率が

1:3,500,000 及び 1:280,000 となるように使用した。また HRP 標識グルココルチコイドとして, corticosterone-3-CMO-HRP (FKA 419; Cosmo Bio Co., Ltd.) 及び cortisol-3-CMO-HRP (FKA 403; Cosmo Bio Co., Ltd.) をそれぞれ最終希釈率が 1:175,000 及び 1:280,000 となるように使用した。アッセイ内及びアッセイ間変動は, それぞれ corticosterone 測定系が 7.0 及び 14.0%, cortisol 測定系が 4.5 及び 4.4% であり, corticosterone に対する抗 cortisol 抗体の交差反応は, 2.0% であった。

本章において, corticosterone の検出には, 測定系の検討を行うことから市販の二次抗体固相化プレート Precoated (Mouse Anti-Rabbit IgG) EIA 96-Well Strip Plate (Cayman Chemical Company, MI, USA) を使用し, cortisol の検出には, 市販の二次抗体 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., PA, USA) を高結合能イムノプレート F8 MaxiSorp Loose Nunc-Immuno Module (Thermo Fisher Scientific, Inc., MA, USA) に固相化したプレートを使用した。なお, いずれの二次抗体固相化プレートを使用しても, 同等の結果が得られることを確認している。以下に cortisol の検出に用いた二次抗体固相化プレートの作製手順を記す。まず市販の二次抗体を 50 mM carbonate/bicarbonate buffer (pH 9.6) を用いて 3.5 µg/ml となるように溶解して 100 µl/well ずつ分注し, 室温で 24 時間静置した後に, プレートと結合しなかった二次抗体を除去するために, wash buffer (0.1% Tween[®] 20-0.5% Triton[™] X-100-150 mM NaCl) を用いてウェルを 4 度洗浄した。次いで, 組成が 1% bovine serum albumin (BSA)-5% sucrose-50 mM phosphate buffered saline (PBS) である blocking buffer を 200 µl/well ずつ分注して室温で 2 時間以上静置し, プレートの使用まで 4°C の冷所で保存した。また, プレートの使用時には, wash buffer を用いてウェルを 4 度洗浄した。さらに, 本研究で用いた EIA の手順の概略を以下に示す。

二次抗体が固相化されたマイクロプレートに, EIA buffer (0.1% Tween[®] 20-0.5% Triton[™] X-100-1% BSA-25 mM ethylenediaminetetraacetic acid-50 mM PBS, pH 7.4), グルココルチコイド標準物質 (corticosterone, 0 ng/ml 及び 2.06–500 ng/ml; cortisol, 0 ng/ml 及び 1.23–300 ng/ml) 又はサンプル, 一次抗体及び HRP 標識グルココルチコイドを加えて総量を 175 µl/well とし, 穏やかに攪拌しながら室温で一晩のインキュベーションを行った。一晩のインキュベーションの後, 未反応物を除去するために wash buffer を用いてウェルを 4 度洗浄した後に, 発色基質として SureBlue Reserve[™] TMB Microwell Peroxidase Substrate (1-Component) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc., MD, USA) を原液で 100 µl/well 加えて, 穏やかに攪拌しながら室温で反応させた。適度な発色が得られた時点で, 2N HCl 50 µl/well を添加して発色反

応を停止させ、マイクロプレートリーダー (infinite® F50; Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) を用いて吸光度 (主波長 450 nm, 副波長 600 nm) を測定した。

2-(2)-7) 統計処理

統計処理は、JSTAT software version 10.0 for Windows (<http://toukeijstat.web.fc2.com/>) を用いて、唾液量 ($\mu\text{l}/\text{well}$) 及び corticosterone の測定値 (ng/ml) の間の関係性について単回帰分析を行った。また、すべての結果について、平均値 \pm 標準誤差で表し、有意水準が 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意とした。

2-(3) 結果

2-(3)-1) 唾液中 corticosterone の検出

用量依存性 (直線性) の確認について、唾液量 ($\mu\text{l}/\text{well}$) 及び唾液中 corticosterone の測定値 (ng/ml) の間に高い正の相関 ($r = 0.9777$, $p < 0.001$) が認められた (Fig. 2.1)。また添加回収試験の結果、2.06 ng/ml の標準物質を添加した唾液では 109.3%、6.17 ng/ml では 104.5%、18.5 ng/ml では 111.7% の回収率であった (Table 2.1)。

2-(3)-2) Cortisol 投与による血漿中及び唾液中 cortisol 濃度への影響

結果を Fig. 2.2 に示す。Cortisol を 2.0 mg/kg ip で投与したマウスにおける cortisol 濃度は、血漿で 633.1 ± 35.9 ng/ml 、唾液で 75.6 ± 4.4 ng/ml であった。溶媒 (sesame oil) を投与したマウスの唾液中からは cortisol が検出されなかったのに対して、血漿中からは非常に低いレベルで cortisol が検出された (8.2 ± 0.4 ng/ml)。また、cortisol 投与後 10 から 50 分までの 40 分間における唾液中 cortisol 濃度は、cortisol 投与の 50 分後における血漿中 cortisol 濃度のおよそ 12% の値であった。

2-(4) 考察

唾液中の corticosterone が EIA によって検出されることを明らかにするために用量依存性 (直線性) の確認を行った結果、添加した唾液量 ($\mu\text{l}/\text{well}$) 及び唾液中 corticosterone の測定値 (ng/ml) の間に高い正の相関 ($r = 0.9777$, $p < 0.001$) を認めた (Fig. 2.1)。また、測定の正確性を確認するために行った添加回収試験の結果、適切な範囲内 (80–120% 程度) に収まる回収率が得られた (Table 2.1)。これらの結果から、本研究の唾液サンプルを用いた EIA による corticosterone 測定において、良好な用量依存性が認められ、唾液中に含まれる成分による干渉は認められず、唾液中の corticosterone を EIA により検出することが可能であることが明らかと

なった。

次いで、唾液中のグルココルチコイドの由来が血液を循環しているグルココルチコイドであることを確認するために、主にヒトで合成され、マウスでは合成されない cortisol をマウスに投与して、血漿中及び唾液中から cortisol が検出されることを確認した。マウスへの cortisol 投与の結果、血漿及び唾液において cortisol が検出された。一方で、溶媒投与後の唾液において cortisol は検出されなかったが、血漿においては非常に微量な cortisol を検出した (Fig. 2.2)。マウスを含めたげっ歯類はグルココルチコイドとして corticosterone を有しており、内因性の cortisol は存在しない。本章の研究において EIA で使用した抗 cortisol 抗体は、corticosterone に対して 2.0% の交差反応を示す。したがって、溶媒を投与した対照群において cortisol が検出されたのは、抗 cortisol 抗体の corticosterone に対する交差反応に起因していると考えられる。また、血中のタンパク質と結合していない遊離型の cortisol は、唾液腺腺房細胞を容易に通過することができることが報告されている [27]。本章の結果は、マウス唾液において検出された cortisol が、外因性のコルチコステロイド由来であることを示しており、cortisol が血液から唾液へと唾液腺を経由して移行していることを示唆している。そして唾液中のグルココルチコイドが、血液循環に乗っているグルココルチコイドの量を反映していることも示唆している。

本章の結果から、唾液中の corticosterone を EIA により検出することができることが明らかとなった。また、血中のグルココルチコイドが唾液中へと移行しており、唾液中グルココルチコイド濃度が血中グルココルチコイド濃度を反映していることが示唆された。これらの結果を受けて、次章では、マウスにおいて唾液採取を行う際に用いる麻酔薬の検討を行い、次いで身体的ストレスである拘束ストレス負荷が血中及び唾液中 corticosterone 濃度に与える影響、さらに化学的ストレスがマウス唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度に与える影響を比較した。

2-(5) 小括

本章では、唾液中の corticosterone が EIA により検出されること、そして cortisol を 2.0 mg/kg ip で投与されたマウスにおいて、グルココルチコイドが血中から唾液中へと移行することを確認し、以下の結論を得た。

- 1) 唾液中の corticosterone は EIA により検出可能であることが明らかとなった。
- 2) 血液を循環しているグルココルチコイドは、唾液腺を経由して唾液中に移行すること、そして、唾液中グルココルチコイド濃度は血中グルココルチコイド濃度を反映していることが示唆された。

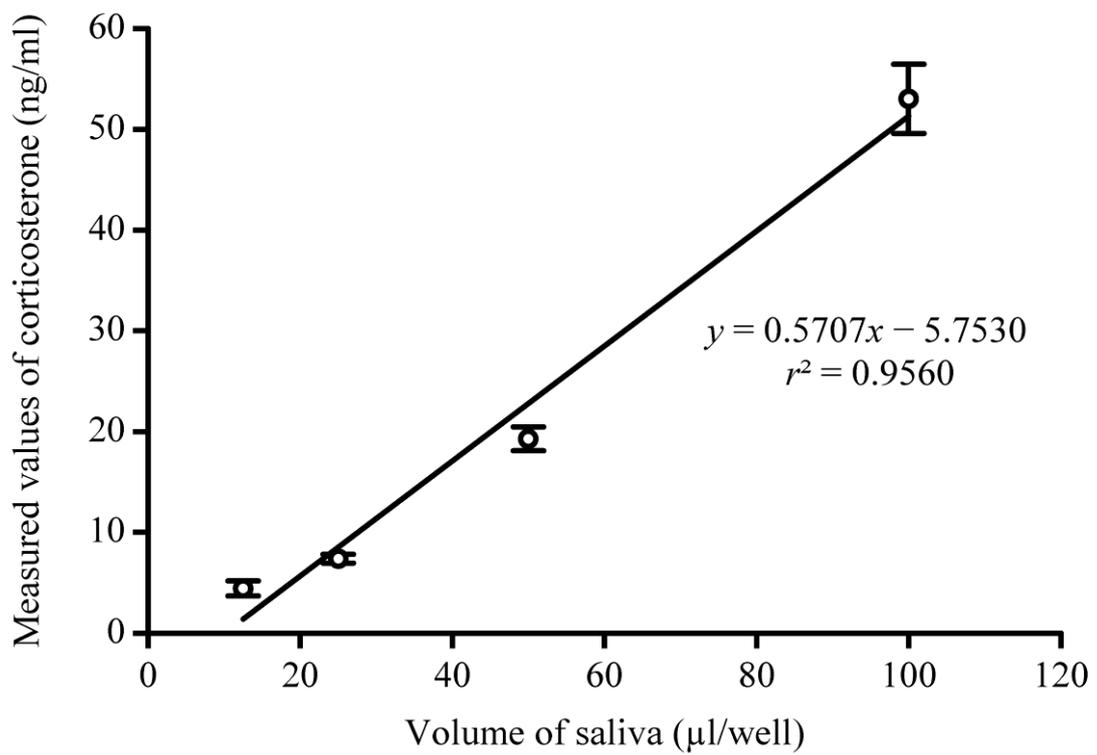


Fig. 2.1 唾液量 (µl/well) 及び唾液中 corticosterone の測定値 (ng/ml) における回帰直線。マウス唾液を EIA により 4 重測定した。また、値は平均値 ± 標準誤差で示す。統計処理は単回帰分析を行った ($r = 0.9777$, $p < 0.001$)。

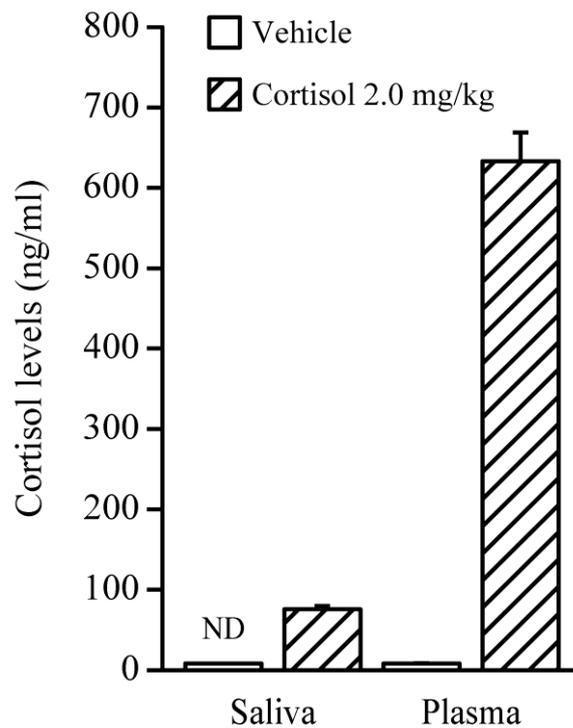


Fig. 2.2 Cortisol 投与 (2.0 mg/kg ip) による唾液中及び血漿中 cortisol 濃度への影響。白抜きの棒は溶媒 (sesame oil) 投与群を, 斜線の棒は cortisol 投与群を示す。それぞれの群は, 9 から 13 週齢の雄性 ICR マウス 6 匹から成る。値は平均値 \pm 標準誤差で示す。また, ND は not detectable を示す。

Table 2.1 Corticosterone 測定系におけるマウス唾液を用いた添加回収試験。

Corticosterone added (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Expected (ng/ml)	Recovery (%)*
0	22.2		
2.06	26.5	24.2	109.3
6.17	29.6	28.3	104.5
18.5	45.5	40.7	111.7

*Recovery (%) = Observed (ng/ml)/Expected (ng/ml) × 100

第3章 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

3-(1) 序論

ヒトの唾液は、綿球のような吸収体の使用又は流涎により容易に採取可能である。その一方でマウスの唾液は、マウスが覚醒下では唾液を嚥下するために容易に得られず、唾液採取のための麻酔が必要となる [6,19]。唾液採取を目的とした適切な麻酔薬について比較検討した報告は、ラットを用いた神経遮断性麻酔 (fluanisone 及び fentanyl) 及び pentobarbital 麻酔下における唾液分泌速度及び唾液成分組成の比較を行った報告 [23] があるのみで、マウスを用いた報告は存在しておらず、唾液採取に適切な麻酔条件の設定が重要な課題となっている。そこで本章では、まず、唾液採取に適切な麻酔薬を選択するために、動物実験において一般的に広く用いられてきた pentobarbital 及び近年注目されている三種混合麻酔薬を用い、これらの異なる2種類の麻酔薬がマウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度に与える影響を比較した。次いで、前章において唾液中のグルココルチコイド濃度が血中のグルココルチコイドの濃度を反映していることが示唆されたことを受けて、本章では、マウスにおいて拘束ストレス負荷試験による血漿中 corticosterone 濃度の変化が、唾液中の corticosterone 濃度に反映されるかを確認することを目的に、麻酔又は無麻酔下における、拘束ストレス負荷前後の血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度の比較を行った。

さらに、拘束ストレスとは異なるストレスとして化学的ストレスを選択し、化学的ストレス負荷がマウス唾液分泌に与える影響を検討した。抗がん剤としても用いられている cyclophosphamide は、ヒトにおいて唾液分泌量を減少させることが報告されており [21,22]、またラットにおける cyclophosphamide 投与実験は、嘔吐の指標である異味症を引き起こすとともに、血漿中 corticosterone 濃度を上昇させることが報告されている [53]。そこで、cyclophosphamide による化学的ストレスが、マウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度に与える影響を評価することを目的に、同一個体マウスにおける cyclophosphamide 投与前後及び対照群との唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度を比較した。

3-(2) 材料及び方法

3-(2)-1 供試動物

本章で行った研究では、麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響及び拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較において 10 から 11 週齢、cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響において 27 から 29 週齢のマウスを使用した。また、試験前の体

重は、麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響において 42.1 ± 0.4 g (平均値 \pm 標準誤差), 拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較において 41.7 ± 0.3 g, cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響において 51.4 ± 2.3 g であった。マウスの飼育条件等は本研究を通じて共通であり, 詳細は第 2 章の「2-(2)-1 供試動物」に記載したとおり, ポリカーボネート製飼育ケージにて 2 から 4 匹/ケージのマウスを飼育した。

3-(2)-2) 薬物の調製

すべての薬剤について, 0.1 ml/10 g 体重の投与量で ip 投与した。また, 三種混合麻酔薬, pilocarpine, atipamezole については, 本研究を通じて共通であり, 第 2 章の「2-(2)-2) 薬物の調製」に記載の投与用量に従い滅菌生理食塩水を用いて調製した。

Pentobarbital sodium (Somnopentyl; Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan) を滅菌生理食塩水で溶解し, 40 mg/kg の投与用量で投与した。また, cyclophosphamide monohydrate (Sigma-Aldrich Co., LLC., MO, USA) を滅菌生理食塩水で溶解し, cyclophosphamide として 50 mg/kg の投与用量で投与した。

3-(2)-3) 唾液採取の手順

唾液は, 第 2 章の「2-(2)-3) 唾液採取の手順」に従い採取した。また, 採取した唾液を 50 mM PBS で 10 倍希釈し, 唾液中タンパク質濃度測定のためのサンプルとした。

3-(2)-4) 麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響

三種混合麻酔薬又は pentobarbital 投与の 10 分後に pilocarpine を投与し, 40 分間の唾液を採取した。唾液採取終了後, 三種混合麻酔薬を投与したマウスに atipamezole を投与して, マウスを覚醒させた。得られた唾液を唾液分泌量, 唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度測定に用いた。

3-(2)-5) 無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較

マウスへの拘束ストレス負荷は, 透明なアクリル製円筒型のマウス固定装置 (ICN-3; 内径 36 mm, 全長 100 mm; ICM Co. Ltd., Ibaraki, Japan) を用いて行い, 拘束時間は 60 分とした。拘束ストレス負荷後, 採血のために直ちに断頭によりマウスを安楽死させ, 血液を heparin 処理されたサンプリングカップに採取した。また非ストレス群については, 拘束ストレス負荷を行うことなく, 断頭によりマウスを安楽死させて採血を行った。採取した血液は, 血漿を得るために $22,140 \times g$ ($4^{\circ}C$) で 20 分間遠心分離し, 得られた血漿を唾液と共に corticosterone 濃度の測定

まで-80°Cで凍結保存した。

3-(2)-6) 麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較

拘束ストレス負荷群については、固定装置を用いて 60 分間拘束し、拘束からの解放直後、三種混合麻酔薬を投与した。三種混合麻酔薬投与の 10 分後に pilocarpine を投与して 40 分間の唾液採取後、血液を得るために直ちに麻酔下で断頭によりマウスを安楽死させた。また、得られた血液を上述のように処理した。一方、拘束ストレス負荷を受けない非ストレス群は、40 分間の唾液採取の後、麻酔下で断頭により安楽死させた。

3-(2)-7) Cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響

唾液の採取は、同一個体のマウスを用いて生理食塩水又は cyclophosphamide 投与前後で 2 回行った (プレ-ポスト試験)。プレ試験 (薬物投与前) の唾液採取は生理食塩水又は cyclophosphamide を投与することなく、40 分間の唾液採取を行い、プレ試験の唾液採取の後、1 週間の回復期間を設けてポスト試験を行った。ポスト試験では生理食塩水又は cyclophosphamide (50 mg/kg ip) 投与の 2 時間 50 分後に三種混合麻酔薬を投与し、さらに 10 分後に pilocarpine を投与して 40 分間の唾液を採取した。すなわち、唾液採取の開始が生理食塩水又は cyclophosphamide 投与の 3 時間後となるように設定した。得られた唾液を、唾液分泌量、唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度測定サンプルとして用いた。

2-(2)-8) 唾液中 corticosterone 濃度及びタンパク質濃度の測定

本章において、corticosterone の検出には、第 2 章の「2-(2)-6) 血漿中及び唾液中グルコルチコイド濃度の測定」と同様に市販の二次抗体を高結合能イムノプレートに固相化したプレートを使用し、第 2 章:2-(2)-6) の手順に従って血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度を測定した。

唾液中タンパク質濃度については、タンパク質測定キット Qubit[®] Protein Assay Kits 及び蛍光光度計 Qubit[®] 2.0 fluorometer (共に Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて、製品取扱説明書に従い測定した。なお、サンプル量は 10 µl, working solution の量は 190 µl とした。

3-(2)-9) 統計処理

統計処理は、JSTAT software version 10.0 for Windows (<http://toukeijstat.web.fc2.com/>) を用いて行い、また、すべての結果は平均値 ± 標準誤差で表した。麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響、並びに麻酔下又は無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の血漿中

及び唾液中 corticosterone 濃度の比較では、血漿又は唾液中 corticosterone 濃度について、それぞれ 2 群間で、Student's *t*-test 又は paired *t*-test を行った。また、cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌量、唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度の変化について repeated measures two-way analysis of variance (ANOVA) を行った後に、生理食塩水投与群及び cyclophosphamide 投与群間で Student's *t*-test を行った。また統計処理の結果、有意水準が 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意とした。

3-(3) 結果

3-(3)-1) 麻酔薬の種類によるマウスの唾液分泌への影響

結果を Fig. 3.1 に示す。三種混合麻酔薬投与群及び pentobarbital 投与群の間に、唾液分泌量 (A) 及び唾液中 corticosterone 濃度 (C) において有意な差は認められなかった (A, 893.8 ± 93.2 vs. 826.8 ± 37.6 μ l, $p = 0.5522$; C, 5.6 ± 0.6 vs. 8.3 ± 1.3 ng/ml, $p = 0.0765$)。一方、唾液中タンパク質濃度 (B) において、三種混合麻酔薬投与群が pentobarbital 投与群と比較して有意に低い値を示したのに対して、唾液中タンパク質濃度で補正した corticosterone 濃度 (D) においては、両群の間に有意な差は認められなかった (B, 573.6 ± 75.5 vs. 1027.3 ± 82.1 μ g/ml, $p = 0.0028$; D, 10.5 ± 1.6 vs. 8.1 ± 1.2 ng/mg protein, $p = 0.2823$)。

3-(3)-2) 無麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較

Figure 3.2A は、無麻酔下における 60 分間の拘束ストレス負荷後直ちに採取した血漿中の corticosterone 濃度を示している。拘束ストレス負荷群の血漿中 corticosterone 濃度は、非ストレス群と比較して有意に高い値を示した (403.0 ± 16.5 vs. 97.9 ± 12.1 ng/ml, $p < 0.001$)。

3-(3)-3) 麻酔下における拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の比較

Figure 3.2B は、麻酔下における血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度を示している。血漿は、拘束ストレス負荷に続く 40 分間の唾液採取終了後に得られた。拘束ストレス負荷群の血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度は共に、非ストレス群の濃度と比較して有意に高い値を示した (血漿中, 258.5 ± 11.3 vs. 170.4 ± 6.0 ng/ml, $p < 0.001$; 唾液中, 19.7 ± 1.8 vs. 6.3 ± 1.3 ng/ml, $p < 0.001$)。

3-(3)-4) Cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響

唾液分泌量の結果について Fig. 3.3A に示す。薬物投与前の生理食塩水投与群及び cyclophosphamide 投与群の唾液分泌量は、それぞれ 957.5 ± 52.0 及び 992.7 ± 125.2 μ l であ

った。また two-way ANOVA の結果, 薬物投与の前後 (Intact–Treatment) では $F(1, 10) = 0.0437$, $p = 0.8386$, 投与薬物の種類 (Saline–Cyclophosphamide) では $F(1, 10) = 0.9128$, $p = 0.3619$ であり, 唾液分泌量において薬物投与の前後及び投与薬物の種類による影響は認められなかった。さらに, 薬物投与後の生理食塩水投与群及び cyclophosphamide 投与群間の唾液分泌量に有意な差は認められなかった (987.3 ± 127.0 vs. $884.9 \pm 116.2 \mu\text{l}$, $p = 0.5708$)。

唾液タンパク質濃度の結果について Fig. 3.3B に示す。薬物投与前の生理食塩水投与群及び cyclophosphamide 投与群の唾液中タンパク質濃度は, それぞれ 620 ± 18 及び $717 \pm 61 \mu\text{g/ml}$ であった。また ANOVA の結果, 薬物投与の前後では $F(1, 10) = 1.0367$, $p = 0.3326$, 投与薬物の種類では $F(1, 10) = 0.0791$, $p = 0.7843$ であり, 唾液中タンパク質濃度において薬物投与の前後及び投与薬物の種類による影響は認められなかった。さらに唾液中タンパク質濃度は, cyclophosphamide 投与により生理食塩水投与群と比較して高くなる傾向にあるものの, 投与薬物の種類の間には有意な差は認められなかった (795 ± 179 vs. $592 \pm 107 \mu\text{g/ml}$, $p = 0.4011$)。

唾液中 corticosterone 濃度の結果について Fig. 3.3C に示す。薬物投与前の生理食塩水投与群及び cyclophosphamide 投与群の唾液中 corticosterone 濃度は, それぞれ 4.2 ± 0.5 及び $3.2 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ であった。また ANOVA の結果, 薬物投与の前後では $F(1, 10) = 0$, $p = 0.9949$, 投与薬物の種類では $F(1, 10) = 0.4786$, $p = 0.5048$ であり, 唾液中 corticosterone 濃度において薬物投与の前後及び投与薬物の種類による影響は認められなかった。さらに, cyclophosphamide 投与により唾液中 corticosterone 濃度は生理食塩水投与群と比較して高くなる傾向にあるものの, 投与薬物の種類の間には有意な差は認められなかった (3.8 ± 0.6 vs. $2.8 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$, $p = 0.2866$)。

3-(4) 考察

異なる 2 種類の麻酔薬 (三種混合麻酔薬及び pentobarbital) がマウス唾液分泌に与える影響を, 唾液分泌量, 唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度を測定することにより評価した結果, 唾液分泌量及び唾液中 corticosterone 濃度に麻酔間で有意な差は認められなかった (Fig. 3.1A, C)。一方, 唾液中タンパク質濃度において, 三種混合麻酔薬投与群が pentobarbital 投与群と比較して有意に低い値を示したのに対して, 唾液中タンパク質濃度で補正した corticosterone 濃度では, 両群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 3.1B, D)。麻酔薬には特定の作用部位が存在しており, benzodiazepine 誘導体 (三種混合麻酔薬の中の

midazolam) 及び barbiturate 誘導体 (pentobarbital) は, GABA_A 受容体のアゴニストである [32]。この GABA_A 受容体は唾液腺の腺体にも存在し, benzodiazepine 又は barbiturate 誘導体は, GABA_A 受容体の結合部位に結合することで唾液分泌 (水分分泌及びタンパク質分泌) に抑制的に作用する [58]。本研究において, 唾液分泌量及び唾液中 corticosterone 濃度では三種混合麻酔薬投与群及び pentobarbital 投与群の間に有意な差が認められなかった一方で, 唾液中タンパク質濃度では三種混合麻酔薬投与群及び pentobarbital 投与群の間に差が認められたのは, midazolam 及び pentobarbital の唾液タンパク質分泌抑制の程度に差があり, midazolam に, より強い抑制作用がある及び/又は pentobarbital の抑制作用が弱いことが考えられる。Pentobarbital は動物実験において広く一般的に用いられてきた麻酔薬である。しかしながら, pentobarbital は, 循環器系及び呼吸器系を抑制する作用があること, ほとんどの小型実験動物において外科麻酔深度が得られるのは, 呼吸器不全を引き起こす量に近い用量を投与したときのみであること, さらに鎮痛作用に乏しいという理由から, 外科的手術に用いる際の pentobarbital 単独使用は推奨されない [11,32]。一方 pentobarbital に代わる麻酔薬として三種混合麻酔薬が近年注目されており, この麻酔薬は 3 種類の麻酔薬・鎮痛薬: medetomidine, midazolam 及び butorphanol で構成されている [26]。三種混合麻酔薬を構成する medetomidine にはアンタゴニストとして atipamezole が存在しており, atipamezole は迅速な覚醒を引き起こし [11,32,51], また三種混合麻酔薬の中の butorphanol は鎮痛薬であるため鎮痛作用も有する [17]。以上のことから, 三種混合麻酔薬は動物に対する倫理面からも, pentobarbital に代わる麻酔薬として推奨されているが, 本研究の結果は, 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及び pentobarbital の間に大きな差は認められず, 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ている。

本章における拘束ストレス負荷試験の結果は, 拘束ストレス負荷が血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度を有意に上昇させることを示しており (Fig. 3.2), 拘束ストレス負荷を受けたマウス及びラットにおける血漿中 corticosterone 濃度の変化を報告した先行研究と一致している [16,44,54,56]。さまざまなストレス関連の研究において, 血液サンプルのみならず非げっ歯類の唾液サンプルが cortisol 測定を目的に利用されている [10,14,15,24,39,41,52]。しかしながらげっ歯類を用いた研究では, ラットを用いた隔離ストレス負荷による唾液中 corticosterone 濃度の変化の報告 [5] が 1 報存在するのみで, ストレス負荷がマウスの唾液中 corticosterone 濃度に与える影響に言及している報告は存在しない。本章における拘束ストレス負荷試験の結果は, 60 分間の拘束ストレス負荷がマウスの唾液中 corticosterone 濃度を有意に上昇させること

を示しており、マウス唾液中の corticosterone 濃度に拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 濃度の変化が反映されていることを示唆している。

さらに本章において、cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響を検討した結果、cyclophosphamide 投与群及び生理食塩水投与群の間に唾液分泌量の有意な差は認められなかった (Fig. 3.3A)。また cyclophosphamide 投与は、唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度を上昇させる傾向にあるものの、生理食塩水投与群と比較して濃度に有意な差は認められなかった。しかしながら生理食塩水投与群と比較して、cyclophosphamide 投与群の唾液中 corticosterone 濃度は上昇する傾向が認められた。これらの結果から、モデル動物の作製には至らなかったが、マウスにおける cyclophosphamide 投与による化学的ストレスに対するモデルとしての可能性が期待された。抗がん剤投与による嘔吐モデル動物として、イヌ又はフェレットなどが用いられている [9,42]。これらの動物は高価であり、ハンドリングも困難であるのに対して、マウスは比較的安価で、ハンドリングも容易であり、豊富なバックグラウンドデータが蓄積されていることから、化学的ストレスを評価できるモデルマウス作製の実現は、嘔吐及び制吐薬などの研究に有効であると考えられる。また、ヒトにおいて cyclophosphamide による化学療法が唾液分泌量を減少させること [21,22]、ラットにおいて cyclophosphamide (50 mg/kg ip) 投与の 3 時間後に血漿中 corticosterone 濃度が上昇することが報告されている [53]。しかしながら、本章において、cyclophosphamide (50 mg/kg ip) の投与は、マウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度には影響を及ぼさなかったことから、cyclophosphamide の投与条件について、さらなる検討が必要であると考えられる。

3-(5) 小括

本章では、異なる 2 種類の麻酔薬が唾液分泌に与える影響、麻酔下及び無麻酔下における、拘束ストレス負荷前後の corticosterone 濃度の変化、そして cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響を評価し、以下の結論を得た。

- 1) 三種混合麻酔薬は、唾液採取を目的とした麻酔薬として適していることが示唆された。
- 2) マウスにおいて、唾液中 corticosterone 濃度は、拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 濃度の変化を反映していることが示唆された。
- 3) Cyclophosphamide (50 mg/kg ip) の投与はマウス唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度に影響を及ぼさず、cyclophosphamide の投与条件について、さらなる検討が必要である。

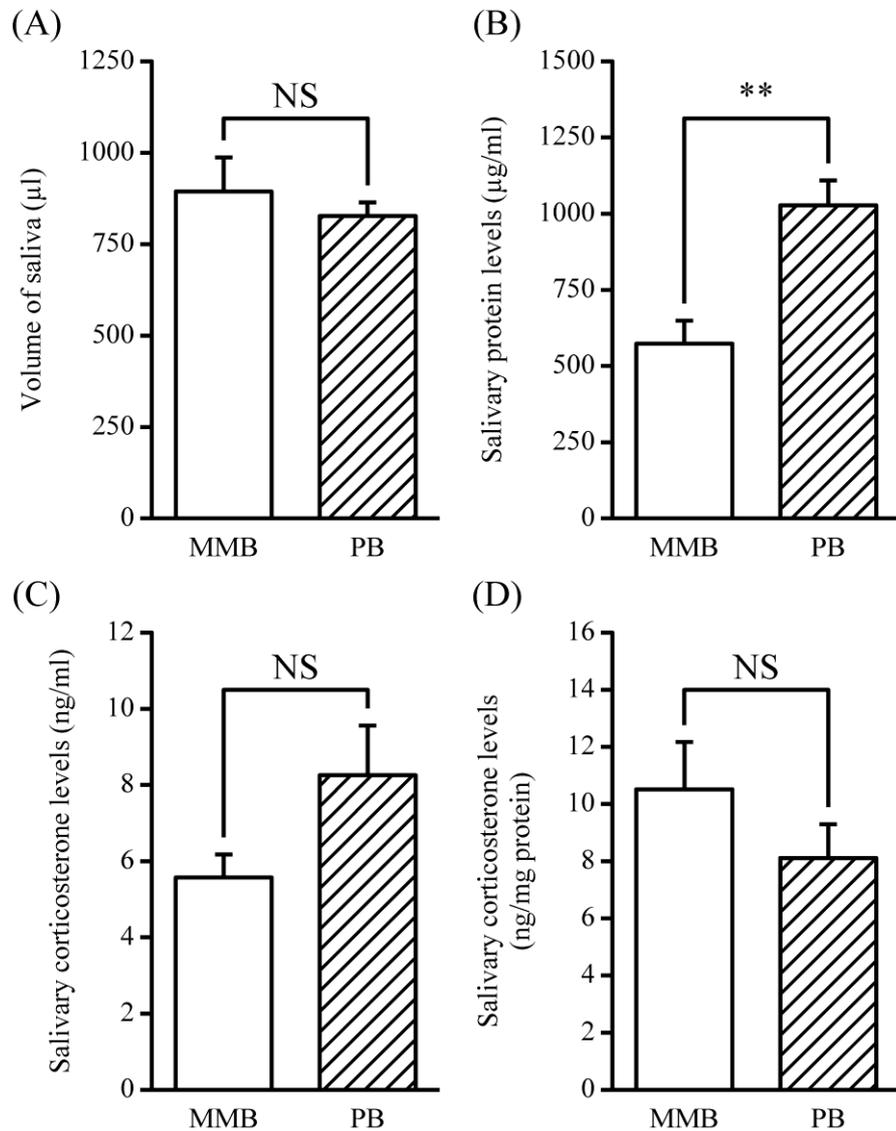


Fig. 3.1 三種混合麻酔薬及び pentobarbital sodium (40 mg/kg ip) による唾液分泌への影響。グラフはそれぞれ唾液分泌量 (A), 唾液中タンパク質濃度 (B), 唾液中 corticosterone 濃度 (C) 及び唾液中タンパク質濃度で補正された corticosterone 濃度 (D) を表す。また、白抜きの棒は三種混合麻酔群を、斜線の棒は pentobarbital 麻酔群を示す。それぞれの群は、10 週齢の雄性 ICR マウス 5 から 6 匹から成り、値は平均値 ± 標準誤差で示す。統計処理は Student's *t*-test を行った (** $p < 0.01$)。また NS は not significant を示し、MMB は三種混合麻酔薬を、PB は pentobarbital sodium を示す。

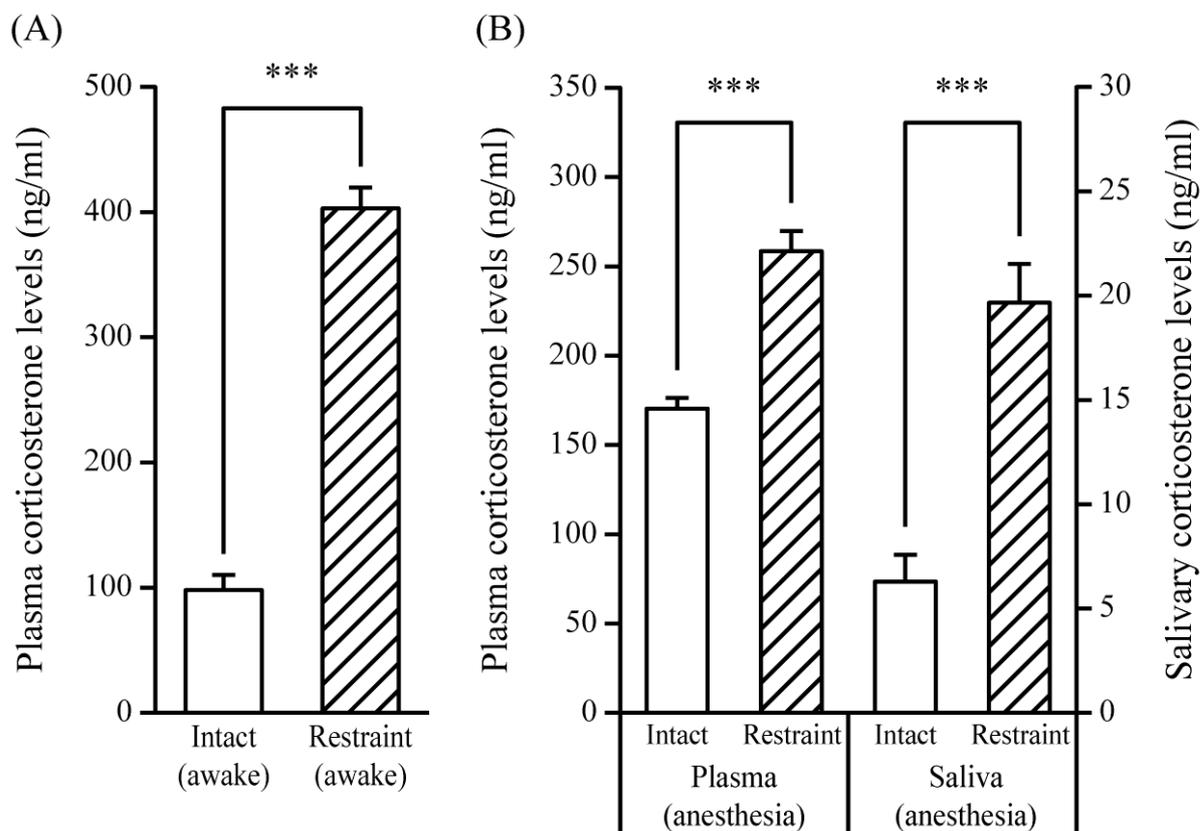


Fig. 3.2 三種混合麻酔下又は無麻酔下の成熟雄性 ICR マウスにおける拘束ストレス負荷 (60 分) による corticosterone 濃度への影響。拘束ストレス負荷群は、60 分間の拘束ストレス負荷後直ちに断頭により安楽死させた (A)。無処置群及び拘束ストレス負荷群は、10 分間の麻酔導入の後、40 分間の唾液を採取し、唾液採取後断頭により安楽死させた (B)。白抜き棒は無処置群を、斜線の棒は拘束ストレス負荷群を示す。それぞれの群は、10 週齢の雄性 ICR マウス 6 から 7 匹から成り、値は平均値 ± 標準誤差で示す。統計処理は Student's *t*-test を行った (***) $p < 0.001$ 。

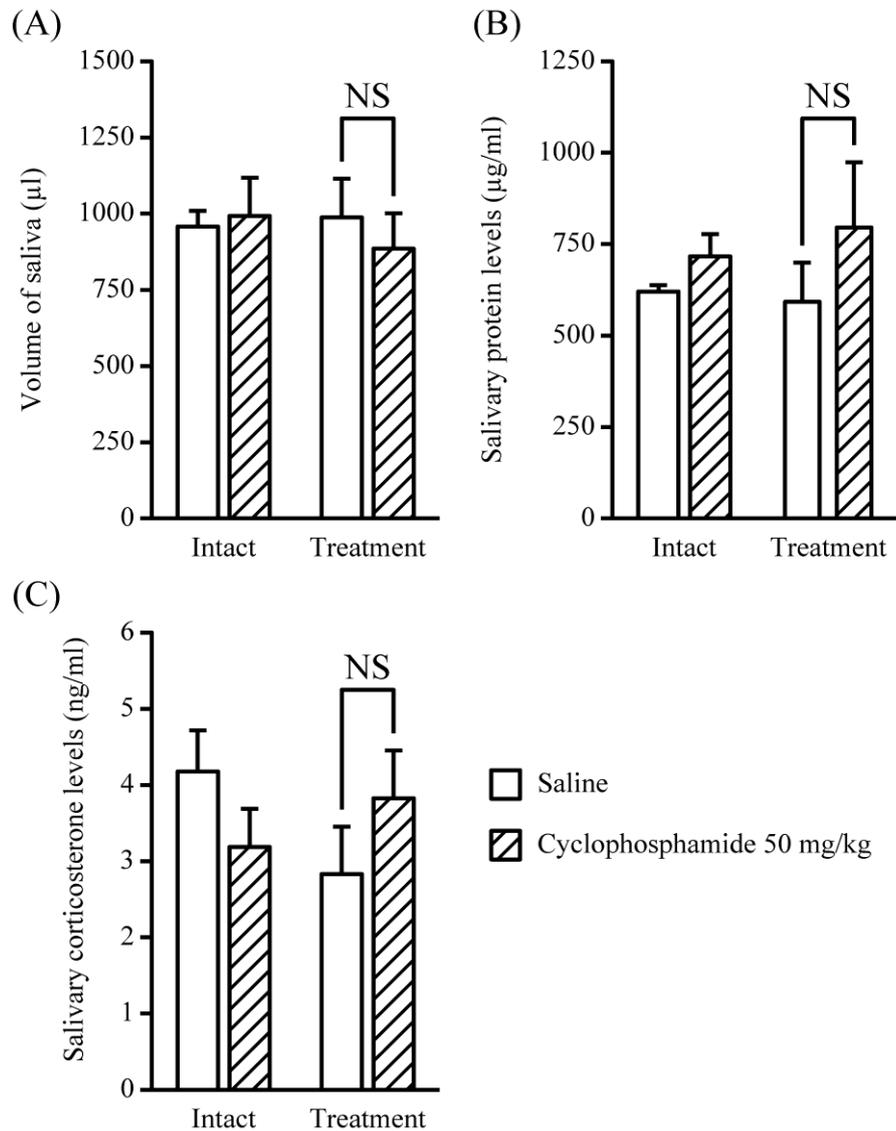


Fig. 3.3 Cyclophosphamide (50 mg/kg ip) による唾液分泌への影響。グラフはそれぞれ、唾液分泌量 (A)、唾液中タンパク質濃度 (B) 及び唾液中 corticosterone 濃度 (C) を表す。また、白抜きの棒は生理食塩水投与群を、斜線の棒は cyclophosphamide 投与群を示す。それぞれの群は、27 から 29 週齢の雄性 ICR マウス 5 から 7 匹から成り、値は平均値 ± 標準誤差で示す。統計処理は repeated measures two-way ANOVA 及び処置群における処置の種類について Student's *t*-test を行った。また、NS は not significant 示す。

第4章 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

4-(1) 序論

唾液サンプルは同一個体を用いて、何らかの処置に反応した生理活性物質の経時的な変化を観察することを可能にする。ストレス実験では、ストレス負荷前後で得られた唾液中のストレスマーカーのレベルを比較することにより、生体が受容したストレスを評価することが可能であり、ヒトでは唾液中の cortisol を測定した研究が報告されている [15,24,52]。げっ歯類を用いた研究では、ラットの隔離ストレスモデルで唾液中の corticosterone 濃度を測定した報告があるが、マウスを用いた研究は皆無である。同一個体マウスにおけるストレス負荷試験で唾液サンプルを用いる場合、ストレス負荷前後で2度、麻酔下での唾液採取が必要であり、得られた唾液中の corticosterone 濃度を比較することにより、ストレス評価が可能となる。しかしながら、麻酔下におけるマウス唾液の採取には、麻酔そのものがストレス応答を引き起こす可能性がある [2,7]。そこで本章では、同一個体マウスにおける唾液採取のための麻酔がストレス実験に影響を及ぼさなくなる適切な回復期間を検討する目的で、拘束ストレス負荷前後の唾液中 corticosterone 濃度変化を指標にストレス反応の評価を行った。

唾液中に存在するストレスマーカーとして、グルココルチコイドの他に唾液 amylase が知られている [40]。唾液 amylase の測定により、副腎髄質からのカテコラミン分泌を推測することが可能であり、また、唾液 amylase は精神的ストレスのバイオマーカーとも考えられていることから、ヒトにおいて多くの研究が行われている [36]。しかしながら、唾液 amylase 活性を指標にラットを用いたストレス実験を行っている報告 [1,30] が存在する一方で、マウスを用いた報告はこれまでのところ存在していない。そこで本章では、精神的ストレスのバイオマーカーである唾液 amylase 活性が、マウスを用いた身体的ストレスである拘束ストレス負荷試験におけるストレスマーカーとして有効であるかを検討するために、corticosterone に加えて、拘束ストレス負荷前後における唾液 amylase 活性の比較を行った。さらに、唾液 amylase 活性を指標に、唾液採取を目的とした麻酔からの回復期間の検討も行った。

4-(2) 材料及び方法

4-(2)-1) 供試動物

本章では、10から11週齢のマウスを使用した。また、試験に供する前の体重は 42.1 ± 0.2 g (平均値 \pm 標準誤差) であった。マウスの飼育条件等は本研究を通じて共通であり、詳細は第2章の「2-(2)-1) 供試動物」に記載したとおり、ポリカーボネート製飼育ケージにて3から4匹/ケ

ージのマウスを飼育した。

4-(2)-2) 薬物の調製

本章で使用した三種混合麻酔薬, pilocarpine 及び atipamezole は本研究を通じて共通であり, 第 2 章の「2-(2)-2) 薬物の調製」に記載の投与用量に従い調製した。また, すべての薬剤について, 0.1 ml/10 g 体重の投与量で ip 投与を行った。

4-(2)-3) 唾液採取の手順

唾液採取の手順は, 第 2 章の「2-(2)-3) 唾液採取の手順」に従った。また, 50 mM PBS で 10 倍希釈した唾液を唾液中タンパク質濃度測定サンプルとし, 生理食塩水で 100 倍希釈した唾液を唾液 amylase 活性測定サンプルとした。

4-(2)-4) 唾液中 corticosterone 濃度を指標とした麻酔からの回復期間の評価

同一個体のマウスを用いて, 唾液採取を目的とした適切な回復期間を検討するために, ストレス負荷前の麻酔下での唾液採取の後に異なる 4 つの回復期間 (1, 3, 5 及び 7 日間) を設定した。まず, 拘束ストレス負荷前であるベースラインの唾液サンプルを得るために, 麻酔処置及び拘束ストレス負荷を受けたことのないマウスに三種混合麻酔薬を投与し, 麻酔下で唾液採取を行った。次に, ベースラインの唾液採取から, それぞれ 1, 3, 5 及び 7 日間の間隔を置き, 固定装置を用いて 60 分間, マウスを拘束した。解放後直ちに三種混合麻酔薬をマウスに投与し, 再度唾液採取を行った。唾液採取時間は, 拘束ストレス負荷前後共に 40 分間であり, 唾液採取は, 40 分間を 20 分ごとの 2 つのフラクション (0-20 及び 20-40 分) に分割して行った。また唾液採取終了後, マウスに atipamezole を投与して麻酔から覚醒させた。なお唾液中 corticosterone 濃度については, 2 つのフラクションにおける唾液分泌量の比から 40 分間の唾液として算出した。

4-(2)-5) 唾液 amylase 活性を指標とした麻酔からの回復期間の評価

前項「唾液中 corticosterone 濃度を指標とした麻酔からの回復期間の評価」で採取された唾液を唾液 amylase 活性測定サンプルとして用い, 2 つのフラクションそれぞれの唾液 amylase 活性を測定した。

4-(2)-6) 唾液中 corticosterone 濃度及び amylase 活性の測定

本章において、corticosterone の検出には、第 2 章の「2-(2)-6) 血漿中及び唾液中グルココルチコイド濃度の測定」と同様に市販の二次抗体を高結合能イムノプレートに固相化したプレートを使用し、第 2 章:2-(2)-6) の手順に従って唾液中 corticosterone 濃度を測定した。

唾液 amylase 活性は、amylase 活性測定キット FUJI DRI-CHEM SLIDE AMYL-P III 及び臨床化学分析装置 FUJI DRI-CHEM 3500 (共に Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan) を用いて、製品取扱説明書に従い測定した。なお、本製品のスライドは血漿中及び血清中 amylase 活性測定用であるが、マウス唾液サンプルを用いた用量依存性、失活操作による amylase 活性の消失を確認している。

4-(2)-7) 統計処理

すべての結果は、平均値 ± 標準誤差で表し、唾液中 corticosterone 濃度及び唾液 amylase 活性に対して、Student's paired *t*-test を、JSTAT software version 10.0 for Windows (<http://toukeijstat.web.fc2.com/>) を用いて行った。また、有意水準が 5% 未満 ($p < 0.05$) の場合を有意とした。

4-(3) 結果

4-(3)-1) 唾液中 corticosterone 濃度を指標とした麻酔からの回復期間の評価

拘束ストレス負荷を受けた 1, 3, 5 及び 7 日間 (Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7) の唾液中 corticosterone 濃度は、それぞれの拘束ストレス負荷前であるベースラインの濃度と比較して有意に高い値を示した (Day 1, 11.3 ± 0.9 vs. 8.1 ± 1.2 ng/ml, $p = 0.0429$; Day 3, 11.7 ± 1.7 vs. 4.4 ± 0.8 ng/ml, $p = 0.0165$; Day 5, 11.8 ± 1.7 vs. 6.0 ± 0.8 ng/ml, $p = 0.0323$; Day 7, 14.1 ± 1.5 vs. 5.4 ± 0.5 ng/ml, $p < 0.001$; Fig. 4.1)。

一方、唾液中 corticosterone 濃度について、Fig. 4.1 のベースラインの濃度を 1 としたときの相対値で拘束ストレス負荷群の濃度を表し、ベースラインの値と比較した場合、1, 3 及び 5 日間の回復期間において有意な上昇率を示さなかったのに対して (Day 1, 1.7 ± 0.3 vs. 1.0 ± 0.2 ng/ml, $p = 0.1247$; Day 3, 3.5 ± 0.9 vs. 1.0 ± 0.2 ng/ml, $p = 0.0610$; Day 5, 2.5 ± 0.6 vs. 1.0 ± 0.1 ng/ml, $p = 0.0528$; Fig. 4.2), 7 日間の回復期間では、ベースラインの値と比較して、拘束ストレス負荷群の唾液中 corticosterone 濃度 (相対値) は有意な上昇率を示した (2.7 ± 0.3 vs. 1.0 ± 0.1 ng/ml, $p = 0.0036$; Fig. 4.2)。

4-(3)-2) 唾液 amylase 活性を指標とした麻酔からの回復期間の評価

唾液採取 (40 分間) の前半 20 分間で採取された唾液の amylase 活性を Fig. 4.3 に示す。拘束ストレス負荷により、1 及び 5 日間の回復期間における唾液 amylase 活性値に有意な上昇は認められなかった (Day 1, 48.2 ± 6.1 vs. 41.5 ± 3.8 kU/l, $p = 0.5941$; Day 5, 46.5 ± 5.5 vs. 39.3 ± 2.0 kU/l, $p = 0.1200$)。一方、3 及び 7 日間の回復期間においては、唾液 amylase 活性値の有意な上昇が認められた (Day 3, 52.2 ± 8.7 vs. 33.0 ± 6.8 kU/l, $p = 0.0301$, Day 7, 42.7 ± 7.2 vs. 26.7 ± 4.6 kU/l, $p = 0.0259$)。

唾液採取 (40 分間) の後半 20 分間で採取された唾液の amylase 活性を Fig. 4.4 に示す。拘束ストレス負荷により、3 及び 7 日間の回復期間における唾液 amylase 活性値に有意な変化は認められなかった (Day 3, 26.3 ± 2.5 vs. 40.4 ± 8.6 kU/l, $p = 0.0629$, Day 7, 27.9 ± 3.4 vs. 28.0 ± 4.3 kU/l, $p = 0.9708$)。一方で、1 及び 5 日間の回復期間においては、唾液 amylase 活性値の有意な低下が認められた (Day 1, 26.7 ± 2.1 vs. 46.5 ± 4.5 kU/l, $p < 0.001$, Day 5, 31.4 ± 2.0 vs. 48.8 ± 2.1 kU/l, $p < 0.001$)。

4-(4) 考察

本章において、唾液中 corticosterone 濃度を指標に、同一個体マウスの唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間の検討を行った。検討の結果、拘束ストレス負荷は 4 つのすべての回復期間 (Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7) において、唾液中 corticosterone 濃度を有意に上昇させた (Fig. 4.1)。一方で、唾液中 corticosterone 濃度の上昇における統計学的な根拠は、7 日間の回復期間のほうがその他の回復期間と比較して高い有意水準であり ($p < 0.001$ vs $p < 0.05$)、第 1 種の過誤 (偽陽性) を犯す確立は非常に低いと考えられる。また、それぞれの拘束ストレス負荷前であるベースラインの唾液中 corticosterone 濃度に対する拘束ストレス負荷後の濃度の割合 (相対値) で比較した場合、1, 3 及び 5 日間の回復期間において有意な上昇率を示さなかったのに対して、7 日間の回復期間はベースラインと比較して唾液中 corticosterone 濃度の有意な上昇率を示した (Fig. 4.2)。覚醒下におけるマウス唾液の採取は容易ではなく、唾液採取のための麻酔が必要となる [6,19]。しかしながら、麻酔下におけるマウス唾液の採取には、麻酔そのものがストレス応答を引き起こす可能性がある [2,7]。古くから麻酔薬として用いられてきた diethyl ether は引火性があり、また空気又は酸素と混合すると爆発性を生じるなどの理由から、現在麻酔薬としての使用を推奨されていないが [3,11], diethyl ether 麻酔はラットの血漿中 corticosterone 濃度を上昇させることが報告されており [12,55], 麻

酔そのものが生体に対してストレスとなり得ることを示唆している。ラットにおける反復又は単回の拘束ストレス負荷による CRH 遺伝子の転写反応を報告している論文では、7 日間隔の反復ストレス負荷により、血漿中 corticosterone 濃度及び室房核内における CRH のヘテロ核 RNA 量が単回拘束ストレス負荷と同等なレベルにまで上昇することが示されている [28]。またラットにおいて、nicotine 投与による慢性ストレス負荷により、上昇した血清中 corticosterone 濃度は、7 日間の断薬により、生理食塩水投与ラットと同等のレベルにまで低下することが報告されている [45]。拘束ストレス負荷が身体的ストレスである一方で、nicotine 投与は HPA 軸を賦活化させて血漿中 ACTH 濃度を上昇させるという報告 [31] から、麻酔と同様に化学的ストレスであると考えられる。したがってこれらの報告から、身体的及び化学的ストレスからの回復には 7 日間隔が必要であることが示唆される。以上のことから、同一個体のマウスを用いたストレス実験において、最短で拘束ストレス負荷前であるベースラインの唾液採取の翌日には拘束ストレス負荷試験により良好なストレス反応を得ることが可能であるが、唾液採取を目的とした麻酔からの回復期間には、7 日間隔が望ましいことが示唆された。

さらに本章では、精神的ストレスのバイオマーカーである唾液 amylase が、身体的ストレスである拘束ストレス負荷試験においても、ストレスマーカーとして有効であるかを検討するとともに、唾液 amylase を指標に唾液採取を目的とした麻酔からの回復期間の検討を行った。拘束ストレス負荷試験の結果、40 分間の唾液採取の前半 20 分間で採取された唾液の amylase 活性値は、1 及び 5 日間の回復期間において、拘束ストレス負荷による有意な上昇を示さず、3 及び 7 日間の回復期間においては有意に活性値が上昇した (Fig. 4.3)。反対に、後半のフラクションにおける amylase 活性値は、1 及び 5 日間の回復期間において有意に低下し、3 及び 7 日間において拘束ストレス負荷前後の amylase 活性に有意な変化は認められなかった (Fig. 4.4)。唾液 amylase は精神的ストレスのバイオマーカーとして知られており、とりわけヒトにおいて多くの研究が行われている [36]。唾液 amylase の分泌制御は SAM 軸を介して行われており、唾液 amylase の分泌は副腎髄質から分泌される noradrenaline により亢進する [61]。また、拘束ストレス負荷は血漿中 noradrenaline 濃度を上昇させることが報告されており [4]、さらに Matsuura らはラットを用いて、拘束ストレス負荷によるストレス応答を、唾液 amylase 活性を指標に評価することが可能であることを報告している [30]。本章におけるマウスを用いたストレス実験では、唾液採取前半のフラクションで得られた唾液の amylase 活性に、ベースラインと比較して上昇又は上昇傾向が認められた。この結果は以上の報告から、本章のマウスを用いたストレス実験においても、拘束ストレス負荷が血中 noradrenaline 濃度を上昇させることにより唾液 amylase 分

泌が亢進し、結果として唾液 amylase 活性が上昇したと推察される。ヒトにおいて心理社会的ストレス負荷により上昇した唾液 amylase 活性は、ストレス負荷の 10 分後にはストレス負荷前の唾液 amylase 活性値と同等のレベルにまで低下し [37,46]、また血漿中 noradrenaline 濃度も同様の推移を示すことが報告されている [46]。さらにラットにおいて、5 分間の拘束ストレス負荷は血漿中 noradrenaline 濃度を上昇させるが、ストレス負荷の 30 分後には、非ストレス負荷ラットの血漿中濃度と同等のレベルにまで低下している [4]。加えて、唾液 amylase 分泌制御には、副腎髄質から分泌される noradrenaline のホルモン作用の他に、交感神経からの唾液腺への直接神経作用があり、ホルモン作用と比較してカテコラミンは応答時間が非常に早いことが知られている [61]。本章におけるマウスを用いたストレス実験では、唾液採取後半のフラクションで得られた唾液の amylase 活性値が低下又は低下傾向を示した。この結果は、拘束ストレス負荷により強く亢進していた交感神経の活動が、拘束ストレスからの解放により、反動として非ストレス時の活動状態と同等又はそれ以下に低下することで唾液腺への神経作用が減衰するとともに、副腎髄質から分泌される noradrenaline が減少して、血中 noradrenaline 濃度が低下したためであると推察される。以上のことから、マウスを用いた拘束ストレス負荷試験においても、副腎髄質機能及び精神的ストレスのバイオマーカーとして知られている唾液 amylase 活性を指標にストレス応答を評価することが可能であること、さらに、唾液 amylase 活性を指標として拘束ストレス負荷に対する反応を評価するためには、ストレス負荷後 20 分間の唾液サンプルが適していることが示唆された。また、唾液 amylase 活性を指標にストレス実験を行う場合においても、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。

4-(5) 小活

本章では、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適切な回復期間を、拘束ストレス負荷前後の唾液中 corticosterone 濃度及び唾液 amylase 活性を指標として検討し、以下の結論を得た。

- 1) 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。
- 2) 唾液 amylase 活性を用いた拘束ストレス負荷に対する反応の評価には、ストレス負荷後 20 分間の唾液サンプルが適していることが示唆された。

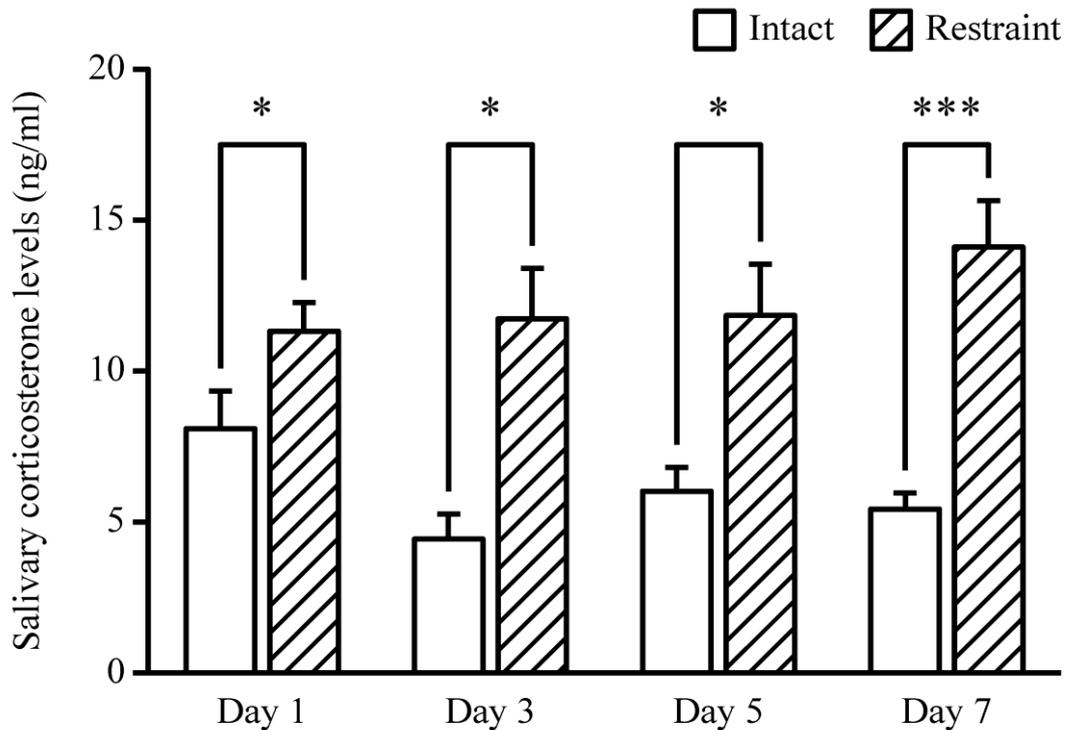


Fig. 4.1 同一個体の成熟雄性 ICR マウスを用いたストレス実験における唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間の検討。唾液中 corticosterone 濃度を指標とした。拘束ストレス負荷前 (Intact) における唾液採取から、1, 3, 5 及び 7 日間の間隔 (それぞれ Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7) を置いた後に、固定装置による 60 分間の拘束ストレス負荷を行い、再度唾液を採取した (Restraint)。白抜き棒は拘束ストレス負荷前であるベースラインを、斜線の棒は拘束ストレス負荷群を示す。それぞれの群は、10 から 11 週齢の雄性 ICR マウス 7 から 10 匹から成る。値は平均値 \pm 標準誤差で示す。統計処理は Student's paired *t*-test を行った (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$)

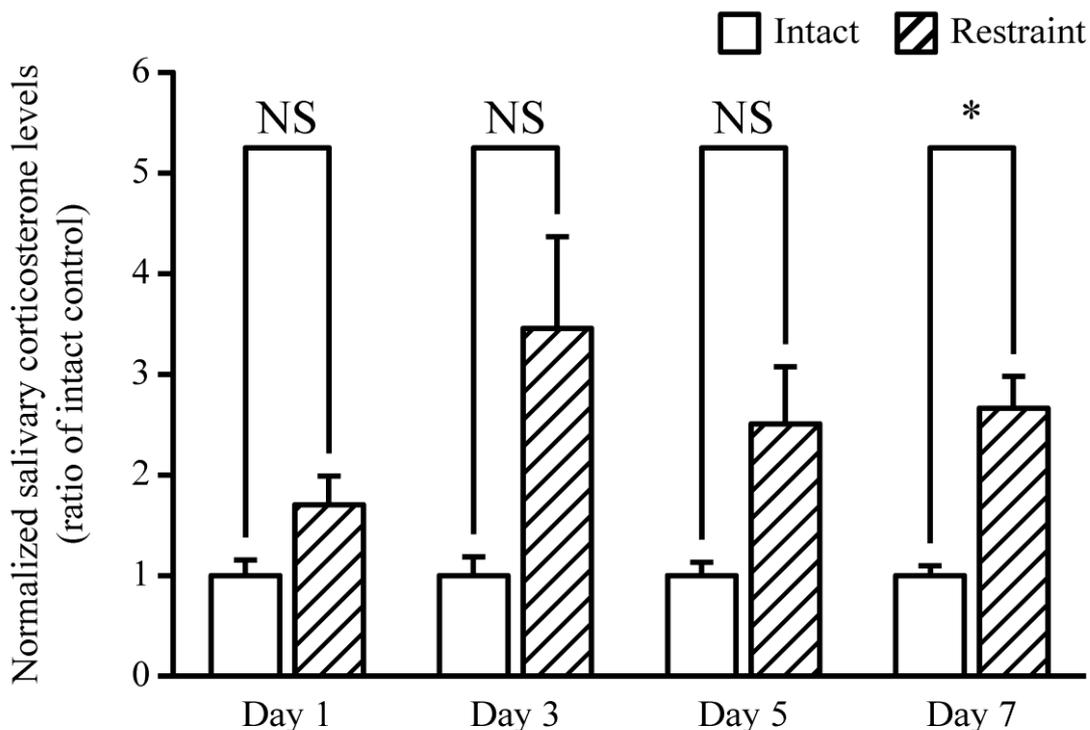


Fig. 4.2 同一個体の成熟雄性 ICR マウスを用いたストレス実験における唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間の検討。Fig. 4.1 における拘束ストレス負荷後の唾液中 corticosterone 濃度をそれぞれの回復期間の拘束ストレス負荷前であるベースラインに対する割合 (相対値) で表した。拘束ストレス負荷前 (Intact) における唾液採取から、1、3、5 及び 7 日間の間隔を置き (それぞれ Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7), 固定装置による 60 分間の拘束ストレス負荷の後に再度唾液を採取した (Restraint)。白抜きのはらは非ストレス群を、斜線のはらは拘束ストレス負荷群を示す。それぞれの群は、10 から 11 週齢の雄性 ICR マウス 7 から 10 匹から成る。値は平均値 \pm 標準誤差で示す。統計処理は Student's paired *t*-test を行った (* $p < 0.05$)。また、NS は not significant を示す。

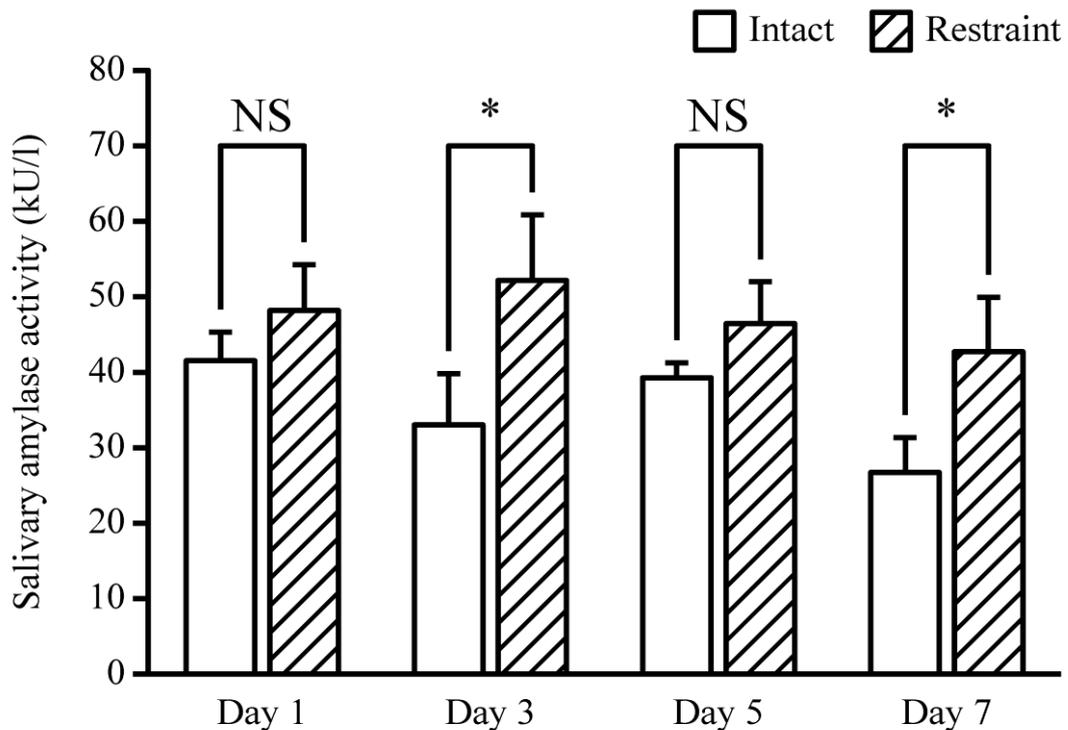


Fig. 4.3 同一個体の成熟雄性 ICR マウスを用いたストレス実験における唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間の検討。唾液 amylase 活性を指標とし、グラフは唾液採取 (40 分間) の前半 20 分間の唾液 amylase 活性を表す。拘束ストレス負荷前 (Intact) における唾液採取から、1, 3, 5 及び 7 日間の間隔を置き (それぞれ Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7), 固定装置による 60 分間の拘束ストレス負荷の後に再度唾液を採取した (Restraint)。白抜きの棒は非ストレス群を、斜線の棒は拘束ストレス負荷群を示す。それぞれの群は、10 から 11 週齢の雄性 ICR マウス 7 から 10 匹から成る。値は平均値 \pm 標準誤差で示す。統計処理は Student's paired *t*-test を行った (* $p < 0.05$)。また、NS は not significant を示す。

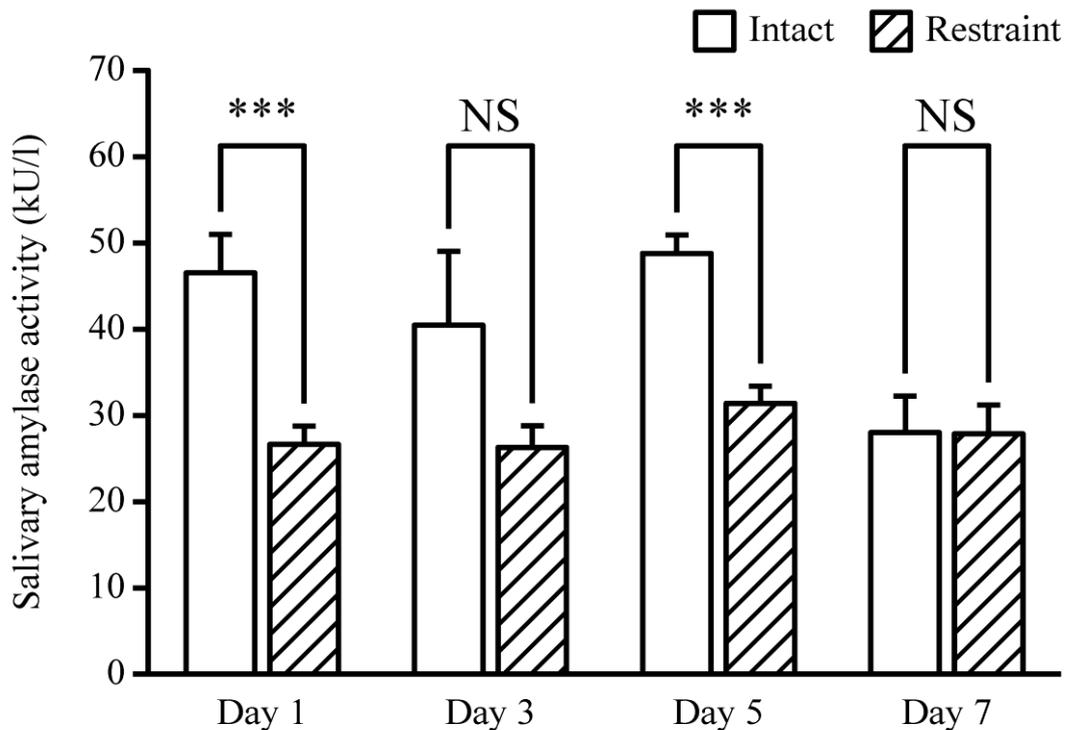


Fig. 4.4 同一個体の成熟雄性 ICR マウスを用いたストレス実験における唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間の検討。唾液 amylase 活性を指標とし、グラフは唾液採取 (40 分間) の後半 20 分間の唾液 amylase 活性を表す。拘束ストレス負荷前 (Intact) における唾液採取から、1, 3, 5 及び 7 日間の間隔を置き (それぞれ Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7), 固定装置による 60 分間の拘束ストレス負荷の後に再度唾液を採取した (Restraint)。白抜きの棒は非ストレス群を, 斜線の棒は拘束ストレス負荷群を示す。それぞれの群は, 10 から 11 週齢の雄性 ICR マウス 7 から 10 匹から成る。値は平均値 \pm 標準誤差で示す。統計処理は Student's paired *t*-test を行った (***) $p < 0.001$ 。また, NS は not significant を示す。

第5章 総括

本論文は、採血と比較して採材の際に侵襲が少ない唾液に着目し、マウスにおける拘束ストレス負荷に対する応答を評価するうえで、唾液中 corticosterone 濃度及び唾液アミラーゼ活性がストレスマーカーとして有効であるかを検討し、さらに同一個体マウスを用いたストレス実験を行ううえで、唾液採取を目的とした麻酔から回復期間を検討した初めての報告である。

第2章では、まず、ストレス応答の指標となる corticosterone をマウスの唾液サンプルから唾液成分に干渉されることなく EIA により検出できるかを、唾液サンプルの直線性試験及び添加回収試験を行い確認した。直線性試験及び添加回収試験の結果、添加した唾液量 ($\mu\text{l}/\text{well}$) 及び唾液中 corticosterone の測定値 (ng/ml) の間に高い正の相関が認められ (第2章 Fig. 2.1), また適切な範囲内に収まる回収率を得た (第2章 Table 2.1)。これらの結果から、唾液サンプルを用いた EIA による corticosterone 測定において良好な用量依存が認められ、また唾液に含まれる成分は測定に干渉せず、唾液中の corticosterone を EIA により検出できることが明らかとなった。

次いで、唾液から検出されるグルココルチコイドの由来が、血中を循環しているグルココルチコイドであることを確認するために、ヒトにおける主要なグルココルチコイドであり、げっ歯類では合成されない外因性の cortisol をマウスに投与し、cortisol 投与が血漿中及び唾液中 cortisol 濃度に与える影響を確認した。マウスへの cortisol 投与の結果、血漿中及び唾液中に cortisol が検出された一方で、溶媒投与後の唾液中に cortisol は検出されなかった (第2章 Fig. 2.2)。以上の結果から、cortisol 投与後にマウス唾液から検出された cortisol の由来は外因性のグルココルチコイドであり、cortisol が血中から唾液腺を経由して唾液中へと移行した可能性が示唆された。また、唾液中グルココルチコイド濃度は血中のグルココルチコイド濃度を反映していることが示唆された。

続く第3章では、まず、唾液採取に適切な麻酔薬を選択するために、三種混合麻酔薬及び pentobarbital の異なる2種類の麻酔薬がマウスの唾液分泌に与える影響を検討した。麻酔間における唾液分泌量及び唾液中 corticosterone 濃度を比較した結果、麻酔間に有意な差は認められなかった (第3章 Fig. 3.1A, C)。一方唾液中タンパク質濃度において、三種混合麻酔薬投与群が pentobarbital 投与群と比較して有意に低い値を示したのに対して、唾液中タンパク質濃度で補正した corticosterone 濃度では、両群の間に有意な差は認められなかった (第3章 Fig. 3.1B, D)。Pentobarbital は動物実験において広く一般的に用いられてきた麻酔薬であるが、鎮痛作用に乏しいなど理由から、pentobarbital の単独使用は現在推奨されていない [11]。

一方, medetomidine, midazolam 及び butorphanol の 3 種類の麻酔薬・鎮痛薬で構成される三種混合麻酔薬 [26] においては, butorphanol が鎮痛薬であり [17], medetomidine のアンタゴニストである atipamezole は麻酔からの迅速な覚醒を引き起こす作用がある [11,32,51]。以上のことから, 三種混合麻酔薬は動物に対する倫理面からも, pentobarbital に代わる麻酔薬として推奨されている。本研究によって, 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 との間に大きな差は認められないことから, 唾液の採取には三種混合麻酔薬が適していることが示唆された。

次いで身体的ストレスである拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 濃度の変化を, 麻酔下で採取された唾液中の corticosterone 濃度が反映しているかを確認するために, 拘束ストレス負荷前後の血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度を比較した。拘束ストレス負荷試験の結果, 拘束ストレス負荷により血漿中及び唾液中 corticosterone 濃度は有意に上昇した (第 3 章 Fig. 3.2)。この結果は, マウス唾液中 corticosterone 濃度が拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 濃度の変化を反映していることを示唆している。

さらに, 化学的ストレスの例として, 抗がん剤としても用いられている cyclophosphamide 投与がマウスの唾液分泌に与える影響を検討した結果, cyclophosphamide 投与群及び生理食塩水投与群の間に唾液分泌量の有意な差は認められなかった (第 3 章 Fig. 3.3A)。また cyclophosphamide 投与は, 唾液中タンパク質濃度及び唾液中 corticosterone 濃度を上昇させる傾向にあるものの, 生理食塩水投与群と比較して濃度に有意な差は認められなかった (第 3 章 Fig. 3.3B, C)。ヒトにおいて, cyclophosphamide による化学療法が唾液分泌量を減少させること [21,22], ラットにおいて cyclophosphamide (50 mg/kg ip) 投与の 3 時間後に血漿中 corticosterone 濃度が上昇することが報告されている [53]。しかしながら, 本研究において, cyclophosphamide (50 mg/kg ip) の投与は, マウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度には影響を及ぼさなかったことから, 高用量での曝露又は曝露時間の延長等の cyclophosphamide 投与条件について, さらなる検討が必要であると考えられる。

最後に第 4 章では, 唾液採取のための麻酔そのものがストレス応答を引き起こす可能性があることから [2,7], マウスにおける唾液採取を目的とした麻酔がストレス実験に影響を及ぼさなくなる適切な回復期間を, 唾液中 corticosterone 濃度及び唾液 amylase 活性を指標としてストレス負荷前後で比較検討した。唾液中 corticosterone 濃度を指標に検討を行った結果, 4 つのすべての回復期間 (Day 1, Day 3, Day 5 及び Day 7) において, 拘束ストレス負荷は唾液中 corticosterone 濃度を有意に上昇させた (第 4 章 Fig. 4.1)。その一方で, 統計学的な根拠は, 7

日間の回復期間のほうがその他の回復期間を比較して高い有意水準を示していた。また、それぞれの回復期間における唾液中 corticosterone 濃度について、拘束ストレス負荷前であるベースラインの濃度を 1 としたときの相対値で拘束ストレス負荷群の濃度を表し、ベースラインの値と比較した場合、1, 3 及び 5 日間の回復期間において有意な上昇率を示さなかったのに対して、7 日間の回復期間はベースラインと比較して唾液中 corticosterone 濃度の有意な上昇率を示した (第 4 章 Fig. 4.2)。古くから麻酔薬として用いられてきた diethyl ether は、ラットの血漿中 corticosterone 濃度を上昇させることが報告されており [12,55], 麻酔そのものが生体に対してストレスとなり得ることを示唆している。またラットにおいて、7 日間隔の反復ストレス負荷時のストレスマーカー (CRH ヘテロ核 RNA) レベルは、単回ストレス負荷時と同等のレベルにまで上昇すること [28], また化学的ストレスと考えられる nicotine の反復投与により上昇した血清中 corticosterone 濃度は、7 日間の断薬により生理食塩水投与ラットと同等のレベルにまで低下することが報告されている [45]。これらの研究報告からも、本研究の結果は支持される。

さらに唾液 amylase 活性を指標に検討を行った結果、40 分間の唾液採取の前半 20 分間で採取された唾液の amylase 活性値は、1 及び 5 日間の回復期間において、拘束ストレス負荷による有意な上昇を示さず、3 及び 7 日間の回復期間においては有意に活性値が上昇した (第 4 章 Fig. 4.3)。反対に、後半のフラクションにおける amylase 活性値は、1 及び 5 日間の回復期間において有意に低下し、3 及び 7 日間において拘束ストレス負荷前後の amylase 活性に有意な変化は認められなかった (第 4 章 Fig. 4.4)。唾液 amylase は精神的ストレスのバイオマーカーとして知られているが、ラットにおいて、唾液 amylase 活性を指標に身体的ストレスである拘束ストレス負荷によるストレス応答を評価できることが報告されている [30]。

以上の結果から第 4 章では、マウスを用いた拘束ストレス負荷試験においても、精神的ストレスのバイオマーカーとして知られている唾液 amylase 活性を指標にストレス応答を評価することが可能であることが示され、唾液 amylase 活性を指標としてストレス応答を評価するためには、ストレス負荷後の早い段階の唾液サンプルが適していることが示唆された。さらに、唾液採取を目的とした麻酔からの回復には、唾液中 corticosterone 濃度又は唾液 amylase 活性を指標にストレス実験を行う場合、7 日間の回復期間が望ましいことが示唆された。

生理活性物質の測定に利用可能な非侵襲性のサンプルとして、糞便、尿及び唾液が挙げられ、野生動物であるウミネコ (*Larus crassirostris*) 及び展示動物であるモルモット (*Cavia porcellus*) の糞便を用いて、糞便中のグルココルチコイド濃度を測定している報告が存在する [48,49]。糞便採取は容易であり、野生動物及び展示動物に対して、より非侵襲的である一方で、

糞便のように排泄されるタイミングが不明確なサンプルは、動物実験において、実験処置による何らかの反応を観察する際には、不都合である。一方、薬物により分泌を促進することができ、計画的に採取することが可能である唾液サンプルの利用は、糞便と比較して、さまざまな実験に応用が可能で、動物実験において、薬物の影響又はストレス応答を分単位で観察するうえで、圧倒的に有利であると考えられる。ヒトにおけるストレス研究では、唾液 cortisol によりストレス応答を評価する報告が多く存在しており [15,24,52]、唾液 amylase によるストレス応答の評価もまた多くの報告が存在する [36]。しかしながら、げっ歯類を用いた研究では、ラットにおいて隔離ストレスによる唾液中 corticosterone 濃度の変化を報告した 1 報があるのみで [5]、マウスにおいて唾液中 corticosterone 濃度について言及している報告は存在しない。一方、唾液 amylase についても、ラットにおいて唾液 amylase 活性を指標にストレス実験を行っている報告は存在するが [1,30]、マウスを用いた報告は存在していない。本論文は、マウスにおいて唾液中 corticosterone 濃度及び唾液 amylase 活性が、拘束ストレス負荷試験に対する反応のバイオマーカーとして有効であるかを検討した報告であり、本研究の成果は、マウス唾液サンプルを用いたストレス関連研究に貢献するものと考えられる。

Russell 及び Burch は、1959 年に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 (Reduction, Refinement 及び Replacement) を提唱した [47]。使用数の削減 (Reduction) は、より少ない動物で同等な情報を得られる又は苦痛度が上昇することなく少数の動物を長期間飼育することで最大限の情報が得られること、また実験の洗練 (Refinement) は、動物のウェルビーイングの向上及び苦痛の軽減又は排除のための適切な実験処置が行われることと定義される [38,47]。さらに、代替法の利用 (Replacement) は、高等動物を使用しないことであり、脊椎動物の代わりに高等植物、微生物又はコンピュータプログラムのような物理的・化学的システムなどの無生物を用いる絶対的置換 (absolute replacement)、高等動物の代わりに系統発生的に低位の動物を用いる相対的置換 (relative replacement) がある [38,47]。

生理活性物質を測定するためのサンプルを得るために、マウスから採血を行う場合、断頭又は心臓穿刺による方法が一般的であるが、各タイムポイントにおいてマウスが犠牲となることから、同一個体マウスにおける何らかの処置による反応の経時的な変化を観察することは困難であり、試験を行うためには数多くの動物が必要となる。一方唾液採取は採血と比較して侵襲の少ない採材方法であり、マウスを犠牲にする必要がないため、同一個体マウスを用いて繰り返し採材を行うことが可能となる。結果として唾液サンプルの使用は、試験に使用する動物数を抑えることとなり、3Rs のうちの Reduction に貢献すると考えられる。

唾液サンプルはマウスにおいて同一個体を用いた試験を行うことを可能にする一方で、マウスから唾液を採取するためには、覚醒下ではマウスが唾液を嚥下するため、マウスに麻酔を施す必要がある [6,19]。本研究において唾液採取を行うために使用している麻酔薬は、近年注目されている、medetomidine, midazolam 及び butorphanol の 3 種類の麻酔薬・鎮痛薬から成る三種混合麻酔薬 [26] であり、medetomidine のアンタゴニストである atipamezole を投与することにより、マウスが速やかに麻酔から覚醒するため [11,32,51]、唾液サンプルの繰り返し採材を容易にする。三種混合麻酔薬を構成する成分である butorphanol は非麻薬性鎮痛薬であり [17]、鎮痛作用に乏しい pentobarbital とは異なり [11]、疼痛管理を行うことが可能である。したがって、麻酔下における侵襲の少ない唾液採取は、3Rs のうちの Refinement にも貢献すると考えられる。

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 corticosterone を EIA により検出することが可能であり、そして唾液中 corticosterone 濃度は血漿中 corticosterone 濃度の変化を反映することが示唆された。また、精神的ストレスのバイオマーカーとして知られる唾液 amylase 活性は、身体的ストレスである拘束ストレス負荷の後、早い段階において上昇することが示された。これらのことから、唾液中 corticosterone 及び唾液 amylase 活性は、マウスにおける身体的ストレスに対する侵襲の少ないバイオマーカーとして有効であることが期待される。さらに、麻酔下のマウスから採取された唾液中の corticosterone 濃度及び唾液 amylase 活性を指標として拘束ストレス負荷による反応を評価するために、唾液採取を目的とした麻酔からの適切な回復期間は、7 日間が望ましいと考えられる。

加えて本研究の成果は小型実験動物において、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 のうちの Reduction のみならず、麻酔下における侵襲の少ない唾液採取となることから Refinement の理念にも貢献すると考えられる。

本研究の基となる学術論文は、以下の論文として公表予定である。

Nohara, M., Tohei, A., Sato, T., and Amao, H.

Evaluation of response to restraint stress by salivary corticosterone levels in adult male mouse.

J. Vet. Med. Sci. 2016. Vol. 78 (in press).

謝辞

本論文を書き終えるにあたり、本研究のすべてにわたってご指導ご鞭撻いただきました、日本獣医生命科学大学 実験動物学教室の天尾弘実教授、藤平篤志准教授に心より感謝いたします。研究活動のみならず、さまざまな活動の機会を頂けたことで、博士後期課程の3年間を有意義に過ごすことができました。本当にありがとうございました。

本論文の審査過程においてさまざまなご助言とご指導を賜りました、日本獣医生命科学大学 獣医学部 獣医学科 比較動物医学教室の横須賀誠教授、応用生命科学部 動物科学科 動物生産化学教室の太田能之教授、動物生体防御学教室の有村裕准教授に、厚く御礼申し上げます。

また私が研究所に在職の折に、公益財団法人 結核予防会 結核研究所 生体防御部の堀田康弘博士からご教示くださいました薬理学に関する知識は、研究活動を遂行するうえでの一助となりました。

さらに、cortisol 投与による血漿中及び唾液中 cortisol 濃度への影響を検討するうえで尽力してくれた佐藤巧学士、cyclophosphamide 投与によるマウスの唾液分泌への影響を検討するうえで尽力してくれた白川裕学士、マウスの維持管理及び研究補助をしてくださった佐々木梓織学士、好永将志学士、高口晃学士及び大鶴茜氏をはじめとする実験動物学教室の4年生の皆様にも大変お世話になりました。

最後に、ここに書ききれなかった方々を含め、院生生活の中でお世話になったすべての方々に、あらためて深く感謝いたします。

参考文献

1. Alterman, A., Mathison, R., Coronel, C.E., Stroppa, M.M., Finkelberg, A.B., and Gallar, R.V. 2012. Functional and proteomic analysis of submandibular saliva in rats exposed to chronic stress by immobilization or constant light. *Arch. Oral Biol.* 57: 663–669.
2. Borsook, D., George, E., Kussman, B., and Becerra, L. 2010. Anesthesia and perioperative stress: consequences on neural networks and postoperative behaviors. *Prog. Neurobiol.* 92: 601–612.
3. Brunson, D.B. 2008. Pharmacology of Inhalation Anesthetics. pp. 83–96. *In: Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.* (Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J., and Karas, A.Z. eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
4. Bhler, H.U., da Prada, M., Haefely, W., and Picotti, G.B. 1978. Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and different animal species. *J. Physiol.* 276: 311–320.
5. Colaianna, M., Schiavone, S., Zotti, M., Tucci, P., Morgese, M.G., Bckdahl, L., Holmdahl, R., Krause, K.H., Cuomo, V., and Trabace, L. 2013. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling.* 18: 1385–1399.
6. Cotrim, A.P., Sowers, A.L., Lodde, B.M., Vitolo, J.M., Kingman, A., Russo, A., Mitchell, J.B., and Baum, B.J. 2005. Kinetics of tempol for prevention of xerostomia following head and neck irradiation in a mouse model. *Clin. Cancer Res.* 11: 7564–7568.
7. Derbyshire, D.R. and Smith, G. 1984. Sympathoadrenal responses to anaesthesia and surgery. *Br. J. Anaesth.* 56: 725–739.
8. Diehl, K.H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J.M., and van de Vorstenbosch, C. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J. Appl. Toxicol.* 21: 15–23.
9. Elwood, C., Devauchelle, P., Elliott, J., Freiche, V., German, A.J., Gualtieri, M., Hall, E., den Hertog, E., Neiger, R., Peeters, D., Roura, X., and Savary-Bataille, K. 2010. Emesis in dogs: a review. *J. Small Anim. Pract.* 51: 4–22.
10. Fell, L.R., Shutt, D.A., and Bentley, C.J. 1985. Development of a salivary cortisol

- method for detecting changes in plasma "free" cortisol arising from acute stress in sheep. *Aust. Vet. J.* 62: 403–406.
11. Flecknell, P. 2009. Anesthesia. pp. 19–78. *In: Laboratory animal anaesthesia*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
 12. Gärtner, K., Büttner, D., Döhler, K., Friedel, R., Lindena, J., and Trautschold, I. 1980. Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Lab. Anim.* 14: 267–274.
 13. Granger, D.A., Kivlighan, K.T., el-Sheikh, M., Gordis, E.B., and Stroud, L.R. 2007. Salivary α -amylase in biobehavioral research: recent developments and applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1098: 122–144.
 14. Greenwood, P.L. and Shutt, D.A. 1992. Salivary and plasma cortisol as an index of stress in goats. *Aust. Vet. J.* 69: 161–163.
 15. Griebel, M., Nees, F., Gerber, B., Ebert, A., Flor, H., Wolf, O.T., Gass, A., Hennerici, M.G., and Szabo, K. 2015. Stronger pharmacological cortisol suppression and anticipatory cortisol stress response in transient global amnesia. *Front. Behav. Neurosci.* 9: 63.
 16. Harizi, H., Homo-Delarche, F., Amrani, A., Coulaud, J., and Mormède, P. 2007. Marked genetic differences in the regulation of blood glucose under immune and restraint stress in mice reveals a wide range of corticosenitivity. *J. Neuroimmunol.* 189: 59–68.
 17. Heavner, J.E. and Cooper, D.M. 2008. Pharmacology of Analgesics. pp. 97–123. *In: Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. (Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J., and Karas, A.Z. eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
 18. Hellhammer, D.H., Wüst, S., and Kudielka, B.M. 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology.* 34: 163–171.
 19. Imamura, T.K., Yoshino, Y., Yamachika, S., Ishii, H., Watanabe, N.Y., Inoue, H., and Nakagawa, Y. 2012. Inhibition of pilocarpine-induced saliva secretion by adrenergic agonists in ICR mice. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 39: 1038–1043.
 20. Japanese Association for Laboratory Animal Science. 1987. Guidelines for animal experimentation. *Exp. Anim.* 36: 285–288 (in Japanese).
 21. Jensen, S.B., Mouridsen, H.T., Reibel, J., Brüner, N., and Nauntofte, B. 2008. Adjuvant chemotherapy in breast cancer patients induces temporary salivary gland hypofunction.

- Oral Oncol.* 44: 162–173.
22. Jensen, S.B., Pedersen, A.M., Reibel, J., and Nauntofte, B. 2003. Xerostomia and hypofunction of the salivary glands in cancer therapy. *Support. Care Cancer.* 11: 207–225.
 23. Johansson, I., Linder, J., and Bratt, P. 1989. Comparison of saliva secretion rate and composition in the rat using a pentobarbital or a neuroleptanalgesic type of anaesthesia. *Caries Res.* 23: 75–77.
 24. Jones, A., McMillan, M.R., Jones, R.W., Kowalik, G.T., Steeden, J.A., Deanfield, J.E., Pruessner, J.C., Taylor, A.M., and Muthurangu, V. 2012. Adiposity is associated with blunted cardiovascular, neuroendocrine and cognitive responses to acute mental stress. *PLoS One.* 7: e39143.
 25. Kanosaka, T., Taya, K., and Sasamoto, S. 1992. Radioimmunoassay of corticosterone using ¹²⁵I-labeled radioligand. *J. Reprod. Dev.* 38: j85–j89 (in Japanese with English abstract).
 26. Kawai, S., Takagi, Y., Kaneko, S., and Kurosawa, T. 2011. Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice. *Exp. Anim.* 60: 481–487.
 27. Kirschbaum, C. and Hellhammer, D.H. 1989. Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology.* 22: 150–169.
 28. Ma, X.M. and Lightman, S.L. 1998. The arginine vasopressin and corticotrophin-releasing hormone gene transcription responses to varied frequencies of repeated stress in rats. *J. Physiol.* 510 (Pt 2): 605–614.
 29. Maruyama, Y., Kawano, A., Okamoto, S., Ando, T., Ishitobi, Y., Tanaka, Y., Inoue, A., Imanaga, J., Kanehisa, M., Higuma, H., Ninomiya, T., Tsuru, J., Hanada, H., and Akiyoshi, J. 2012. Differences in salivary alpha-amylase and cortisol responsiveness following exposure to electrical stimulation versus the Trier Social Stress Tests. *PLoS One.* 7: e39375.
 30. Matsuura, T., Takimura, R., Yamaguchi, M., and Ichinose, M. 2012. Estimation of restraint stress in rats using salivary amylase activity. *J. Physiol. Sci.* 62: 421–427.
 31. Matta, S.G., Beyer, H.S., McAllen, K.M., and Sharp, B.M. 1987. Nicotine elevates rat plasma ACTH by a central mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 243: 217–226.

32. Meyer, R.E. and Fish, R.E. 2008. Pharmacology of Injectable Anesthetics, Sedatives, and Tranquilizers. pp. 27–82. *In: Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals.* (Fish, R.E., Brown, M.J., Danneman, P.J., and Karas, A.Z. eds.), Elsevier, Amsterdam, Netherlands.
33. Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., and Veissier, I. 2007. Exploration of the hypothalamic–pituitary–adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92: 317–339.
34. Möstl, E. and Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest. Anim. Endocrinol.* 23: 67–74.
35. Naganuma, Y., Morii, K., Saitou, T., Hashimoto, M., and Koyama, H. 2013. Effect of Medetomidine/Midazolam/Butorphanol in three mouse strains. *Exp. Anim.* 62: Supplement, S86.
36. Nater, U.M. and Rohleder, N. 2009. Salivary alpha-amylase as a non-invasive biomarker for the sympathetic nervous system: current state of research. *Psychoneuroendocrinology.* 34: 486–496.
37. Nater, U.M., Rohleder, N., Gaab, J., Berger, S., Jud, A., Kirschbaum, C., and Ehlert, U. 2005. Human salivary alpha-amylase reactivity in a psychosocial stress paradigm. *Int. J. Psychophysiol.* 55: 333–342.
38. National Research Council. 2011. Key Concepts. pp. 1–10. *In: Guide for the care and use of laboratory animals,* The National Academy Press, Washington, D.C., USA.
39. Negrão, J.A., Porcionato, M.A., de Passillé, A.M., and Rushen, J. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *J. Dairy Sci.* 87: 1713–1718.
40. Obayashi, K. 2013. Salivary mental stress proteins. *Clin. Chim. Acta.* 425: 196–201.
41. Ott, S., Soler, L., Moons, C.P., Kashiha, M.A., Bahr, C., Vandermeulen, J., Janssens, S., Gutiérrez, A.M., Escribano, D., Cerón, J.J., Berckmans, D., Tuytens, F.A., and Niewold, T.A. 2014. Different stressors elicit different responses in the salivary biomarkers cortisol, haptoglobin, and chromogranin A in pigs. *Res. Vet. Sci.* 97: 124–128.
42. Percie du Sert, N., Holmes, A.M., Wallis, R., and Andrews, P.L. 2012. Predicting the emetic liability of novel chemical entities: a comparative study. *Br. J. Pharmacol.* 165:

- 1848–1867.
43. Price, E.O. 1985. Evolutionary and Ontogenetic Determinants of Animal Suffering and Well-Being. pp. 15–49. *In: Animal Stress.* (Moberg, G.P. ed.), Williams & Wilkins, Maryland.
 44. Rademacher, D.J., Meier, S.E., Shi, L., Ho, W.S., Jarrahan, A., and Hillard, C.J. 2008. Effects of acute and repeated restraint stress on endocannabinoid content in the amygdala, ventral striatum, and medial prefrontal cortex in mice. *Neuropharmacology*. 54: 108–116.
 45. Rasmussen, D.D. 1998. Effects of chronic nicotine treatment and withdrawal on hypothalamic proopiomelanocortin gene expression and neuroendocrine regulation. *Psychoneuroendocrinology*. 23: 245–259.
 46. Rohleder, N., Nater, U.M., Wolf, J.M., Ehlert, U., and Kirschbaum, C. 2004. Psychosocial stress-induced activation of salivary alpha-amylase: an indicator of sympathetic activity? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1032: 258–263.
 47. Russell, W.M.S. and Burch, R.L. 1969. *The Principles of Humane Experimental Technique.* Universities Federation for Animal Welfare, Hertfordshire, England (reprinted in 1992).
 48. Sato, M., Wakabayashi, S., and Sakai, H. 2009. Noninvasive monitoring of stress via fecal corticosterone levels in guinea pigs on public display. *Transactions of Nihon University, School of Dentistry*. 37: 21–29 (in Japanese with English abstract).
 49. Sato, M., Yashima, K., Shioya, M., Wakabayashi, S., and Sakai, H. 2008. Changes in fecal corticosterone concentrations in brooding period of the Black-tailed Gulls (*Larus crassirostris*). *Transactions of Nihon University, School of Dentistry*. 36: 49–54 (in Japanese with English abstract).
 50. Sheriff, M.J., Dantzer, B., Delehanty, B., Palme, R., and Boonstra, R. 2011. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 166: 869–887.
 51. Taylor, R., Hayes, K.E., and Toth, L.A. 2000. Evaluation of an anesthetic regimen for retroorbital blood collection from mice. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 39: 14–17.
 52. Therrien, F., Drapeau, V., Lalonde, J., Lupien, S.J., Beaulieu, S., Doré, J., Tremblay, A., and Richard, D. 2010. Cortisol response to the Trier Social Stress Test in obese and reduced obese individuals. *Biol. Psychol.* 84: 325–329.

53. Tohei, A., Kojima, S., Ikeda, M., Hokao, R., and Shinoda, M. 2011. Effects of cyclophosphamide on the kaolin consumption (pica behavior) in five strains of adult male rats. *J. Vet. Med. Sci.* 73: 901–906.
54. Tohei, A., Mogi, Y., Kon, H., Hokao, R., and Shinoda, M. 2003. Strain difference in pituitary–adrenal axis between Wistar-Imamichi and Long Evans adult male rats. *Exp. Anim.* 52: 437–439.
55. Tohei, A., Tomabechi, T., Mamada, M., Akai, M., Watanabe, G., and Taya, K. 1997. Effects of repeated ether stress on the hypothalamic–pituitary–testes axis in adult rats with special reference to inhibin secretion. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 329–334.
56. Tohei, A., Umezu, M., Kanai, T., Yamaguchi, K., Kosaku, A., Kon, H., and Shinoda, M. 2010. Pituitary–adrenal functions in a hereditary hypothyroid (rdw) rat. *Exp. Anim.* 59: 95–98.
57. Vincent, I.C. and Michell, A.R. 1992. Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Res. Vet. Sci.* 53: 342–345.
58. Wang, H.Y. 2001. Existence and function of GABA receptor complex on inhibitory mechanism of salivary secretion. *Shikwa Gakuho.* 101: 724–731 (in Japanese).
59. Welinder, K.G. 1979. Amino acid sequence studies of horseradish peroxidase. Amino and carboxyl termini, cyanogen bromide and tryptic fragments, the complete sequence, and some structural characteristics of horseradish peroxidase C. *Eur. J. Biochem.* 96: 483–502.
60. Yamada, S., Maruyama, S., Takagi, Y., Uchida, S., and Oki, T. 2006. In vivo demonstration of M₃ muscarinic receptor subtype selectivity of darifenacin in mice. *Life Sci.* 80: 127–132.
61. Yamaguchi, M. 2007. Stress evaluation using a biomarker in saliva. *Folia Pharmacol. Jpn.* 129: 80–84 (in Japanese).

要約

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% (体重40gのマウスで約0.14ml)、尾静脈からは0.1–0.15ml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は困難である。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1ml、血漿では全血の半分の量である0.5ml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 (enzyme immunoassay, 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 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 corticosterone 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うえで唾液中 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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、corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 濃度を比較した。さらに、抗がん剤としても用いられている cyclophosphamide (50 mg/kg ip) がマウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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 corticosterone 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、cyclophosphamide 投与群の唾液 corticosterone 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 cyclophosphamide 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 corticosterone 濃度が、拘束ストレス負荷による血漿中 corticosterone 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、cyclophosphamide (50 mg/kg ip) の投与は、マウスの唾液分泌及び唾液中 corticosterone 濃度に影響を及ぼさなかったことから、cyclophosphamide の投与条件について、さら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 corticosterone 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 corticosterone 濃度を有意に上昇させた。一方で、唾液中 corticosterone 濃度の上昇における統計学的根拠は、7 日間の回復期間のほうが、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 corticosterone を EIA により検出することが可能であり、そして、唾液中 corticosterone 濃度は血漿中 corticosterone 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 corticosterone 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。

Summary

Plasma and serum samples are generally acceptable for detection of various physiologically active substances, while drawing blood could be stress for human and animals. In case of collecting repeated blood samples from mouse, using saphenous and lateral tail vein are recommended, and these sites yield 5% of circulating blood volume from saphenous veins and 0.1–0.15 ml from lateral tail vein, and the detection of the substances by any assay in this amount of blood sample is limited. Blood sampling by decapitation or cardiac puncture is employed as collection to whole blood, and it obtained approximately 1 ml of whole blood and modestly 0.5 ml of plasma. This volume is enough to measure multiple substances by an immunoassay, and in this case, a large number of mice are needed as a result of the sacrifice of animals at each time point of any responses to experimental treatments. In addition to this problem, it is impossible to investigate multiple time points, before and after responses to the treatment in the mouse of the same individual.

Recently, saliva is recognized as low-invasive sample for detection of physiologically active substances instead of plasma or serum. In this study for evaluation of stress response in the adult male mouse, we measured salivary corticosterone levels and salivary amylase activity, because glucocorticoids and salivary amylase have been known as biomarkers of stress response. However, in the small experimental animals such as mice and rats, few studies have been examined evaluation of salivary corticosterone and salivary amylase activity as a stress biomarker.

In order to clarify the whether salivary corticosterone is available to evaluate stress response in mice, 1. we confirmed that the corticosterone was detected in mouse saliva and that the glucocorticoid transferred from blood to saliva after administration of exogenous cortisol (chapter 2), 2. compared salivary secretion in mouse treated different anesthetic agents, and corticosterone levels between plasma and saliva in response to restraint stress, and evaluated saliva secretion in mouse treated with anticancer drug (chapter 3), and 3. examined adequate recovery periods from anesthesia for saliva collection between pre-stress and post-stress and also examine salivary corticosterone and amylase activity in mice (chapter 4).

1. Measurement of glucocorticoids levels using mouse saliva sample (chapter 2)

We confirmed that corticosterone in saliva was detected by enzyme immunoassay (EIA) and that glucocorticoids transferred from blood to saliva in mice treated with 2.0 mg/kg via intraperitoneal (ip) injection of cortisol. Cortisol is the glucocorticoid produced principally in humans but not in rodents. Saliva secretion was enhanced by pilocarpine hydrochloride (0.5 mg/kg ip). Obtained saliva and plasma samples used for measurement of cortisol levels by EIA.

Salivary corticosterone was detected by EIA and the cortisol was detected in plasma and saliva in mice as a result of cortisol injection. Conversely, in the mice treated with vehicle, the cortisol was not detected in saliva but it existed at very low levels in plasma. In this study, anti-cortisol showing 2% cross-reaction with corticosterone was used for EIA. The reason why cortisol detected in vehicle control group, might account for the cross-reactivity of anti-cortisol.

Results of this study revealed that the salivary corticosterone was detected by EIA, and the results indicate that the origin of cortisol detected in mouse saliva is considered as exogenous corticosteroid, and the cortisol could be transferred from blood to saliva via salivary glands. From these results, we concluded that the glucocorticoids in saliva might reflect to the levels of its blood circulation.

2. Investigation of anesthetic agent and stress conditions for evaluation of adrenal function using saliva sample of mouse (chapter 3)

We compared the effects of two different types of anesthetic agents (mixed anesthetic agents and pentobarbital) on salivary secretion. Mixed anesthetic agents consisting of medetomidine, midazolam and butorphanol are regarded as anesthetic agent instead of pentobarbital generally used in animal experiments. In this study, the mixed anesthetic agents were composed of medetomidine hydrochloride (0.3 mg/kg ip), midazolam (6.0 mg/kg ip) and butorphanol tartrate (7.5 mg/kg ip), and pentobarbital sodium was treated at a dosage of 40 mg/kg intraperitoneally injection. We also compared corticosterone levels between plasma and saliva in response to re-

straint stress with or without the mixed anesthesia. Mice were immobilized for 60 minutes by restrainer. Furthermore, we examined effect of anticancer drug (cyclophosphamide, 50 mg/kg ip) on salivary secretion and on salivary corticosterone levels.

Salivary corticosterone levels and volume of saliva were not significant differences between the mixed anesthesia group and pentobarbital anesthesia group. However, salivary protein levels in the mixed anesthesia group were significantly lower than the levels in the pentobarbital anesthesia group. The plasma corticosterone levels of restraint (60 min) group were significantly higher than the levels of the non-stress control group with or without anesthesia. The salivary corticosterone levels of restraint group were also significantly higher than the levels of the control group. Cyclophosphamide treated group did not show significant increase of salivary corticosterone levels compared to the vehicle control group. Moreover, volume of saliva secreted and salivary protein levels were not shown significant differences between control and cyclophosphamide groups.

Results of this study indicate that the mixed anesthetic agents are recommended agent for saliva sampling. The salivary corticosterone levels are significantly increased as a result of 60 minutes immobilization. The results suggest that salivary corticosterone levels reflect changes in plasma corticosterone levels caused by restraint stress in the mouse. Moreover, cyclophosphamide (50 mg/kg ip) does not significantly affect salivary secretion and on salivary corticosterone levels in mouse in the present study.

3. Investigation of the adequate recovery period from anesthesia for saliva collection (chapter 4)

We evaluated the adequate recovery period from anesthesia for saliva collection between pre-stress and post-stress in adult male mouse. In the investigations evaluating for recovery periods from anesthesia, four different time points (1, 3, 5 and 7 days) were set as a recovery periods. Salivary collection was divided into two fractions (0–20 and 20–40 min). Salivary corticosterone

was determined by EIA and the amylase activity was measured using a dry chemistry system.

Restraint stress increased significantly corticosterone levels of saliva collected for 40 minutes in all four groups. On the other hand, the statistical evidence of corticosterone increase is more rigorous in a 7-day recovery group ($p < 0.001$) than the others ($p < 0.05$). Moreover, salivary amylase activities of prior fraction were shown significant increase in 3- and 7-day recovery groups by restraint stress, but not in 1- and 5-day recovery groups. Conversely, the activities of posterior fraction were shown significant decrease in 1- and 5-days recovery groups, and the activities in 3- and 7-days recovery group was unchanged by restraint stress.

Results of this study indicate that recovery period from anesthesia for saliva collection in stress experiment is preferable for 7 days in the same individual of mice. Furthermore, to evaluate salivary amylase activity in response to restraint stress using saliva sample, saliva sample in early period of saliva collection would be preferable.

In conclusion, we suggest that the collected saliva is available for EIA of corticosterone and that the salivary corticosterone levels reflect the plasma corticosterone levels, and it will be a useful less-invasive biomarker of physical stress in mice. Moreover, to evaluate restraint stress by salivary corticosterone level and amylase activity in mice under anesthesia, adequate recovery period from anesthesia is preferable for a week. Additionally, the present study may contribute to concepts of Reduction and Refinement of the 3Rs in small animal experiments.