

マウスにおける唾液分泌反応の測定法の研究

— Richter 法の改良 —

村井 繁夫 齊藤 弘子 米倉 秀夫
畠山 赴夫 伊藤 忠信

岩手医科大学歯学部薬理学講座* (主任: 伊藤忠信教授)

〔受付: 1982年1月19日〕

抄録: 著者らはマウスの唾液分泌量測定法に関して, 少量のウレタンと固定板を併用する新しい不動化法(M法)を考案し, 測定感度, 測定値の散布度, マウスの死亡率などについて Richter 法(R法)や Parkes 法(P法)と比較検討した。

不動化はM法がウレタン0.5g/kgと固定板の併用, R法はウレタン1.8g/kgの単独投与, P法はジアゼパム50mg/kgの単独投与で行い, ピロカルピンはそれぞれ0.8mg/kg (s.c.), 2mg/kg (s.c.) および1mg/kg (i.v.)を投与した。測定感度は三方法ともほぼ同程度であったが, 測定値の散布度はM法が最小で, R法とP法の約半分であった。M法の不動化条件は催唾剤のLD50をむしろ高め, M法ではマウスの死亡例はみられなかった。一方, R法とP法は催唾剤の毒性を著しく増強し, その結果, 測定中にも死亡例が発現し24時間後の死亡率は50%を越した。

以上の結果より, M法は従来のR法やP法と比較して実験精度の高さとマウスに対する為害性の低さの点で優れていると考えられる。

緒 言

唾液腺の生理的機構や薬物の抗コリン活性を研究する目的で, 種々の動物において唾液分泌反応の測定が行われている¹⁻⁷⁾。マウスを用いる実験法としては, 分泌される唾液を濾紙に吸収させてそのしみの面積から分泌量を求める間接法(Richter 法¹⁾が代表)と唾液腺導管に挿入したキャピラールからの流出量を測る直接法(Junqueira 法²⁾)がある。前者の方法は手技の簡便さ, 実験能率の良さなどの点で後者よりもはるかに優れた特徴がある³⁾。

著者らが Richter 法(R法と略)とR法の実験条件を一部改変した Parkes 法¹⁰⁾(P法と略)を検討したところ, 被検薬の種類や投与量

によっては測定中あるいは測定終了後に動物の全てが死亡するなど, 両方法ともその後の実験遂行が不可能な状態をしばしば招いた。これは両方法で用いているマウスの固定法(不動化法)に原因があると考えられる。そこで著者らはマウスの死亡を招かずしかも十分な不動状態がえられる実験条件の検討を試み, 少量のウレタンと固定板を併用する新しい不動化法を考案した。

本論文では, 著者らの唾液分泌量測定法(M法と略)の測定感度, 測定値の散布度, マウスの死亡率などについて, R法およびP法と比較した結果を報告する。

Studies on the method for measurement of salivary response in mice—improvement in the Richter's method

Shigeo MURAI, Hiroko SAITO, Hideo YONEKURA, Takeo HATAKEYAMA and Tadanobu ITOH

(Department of Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 7: 25-33, 1982

実験方法および材料

1. M法による唾液分泌量の測定

一群10匹の雄マウス (ddY, 26—30 g) にウレタン 0.5g/kg (0.2ml/10g, i. p.) と水道水 0.5ml (p. o.) を投与後, 細く裂いたガムテープでアクリル製の特製固定板上に四肢と頭部を固定した。図1に示したように, 最も重要な頭部の固定には4本のテープを用いた。まず, 後方に首をすくめるのを防ぐためにNo. 1のテープを前方より後頭部にまわして固定した。次に頭の持ち上げを防ぐため, No. 2のテープで頭頂部を上から押えた。その後, No. 3とNo. 4のテープで両耳をNo. 2のテープ上に固定した。これらの操作中, 両耳の固定が最も重要で, 両耳の固定により「もがき」などによる顎と沔紙面との接触点のずれはほとんどみられなかった。ウレタン

投与後1時間に, ピロカルピン 0.8mg/kg (0.1 ml/10g, s. c.) をマウスの腰背部皮下に投与し, 直ちに傾斜したアクリル板上に敷いた沔紙 (東洋, No. 2) 上に置き, 唾液の採取を開始した。採取開始後10分毎にマウスを新しい沔紙面に移動した。移動後, 沔紙上の唾液によるしみの周囲をボールペンでなぞり, そのしみの面積値を画像解折装置 (AMOI 型, Kontron 社) により計測した。ピロカルピン投与直後から90分間 (9回移動) に得られたしみの面積値の総和を全唾液分泌量とした。アトロピンとクロルプロマジン はピロカルピンの投与1時間前に, アミトリプチリンは30分前に投与した。なお, 唾液量と沔紙のしみの面積との関係を実験には, ピロカルピンにより誘導されたウサギの唾液を採取して用いた。得られたデータについては, student の t 検定により対照群との有

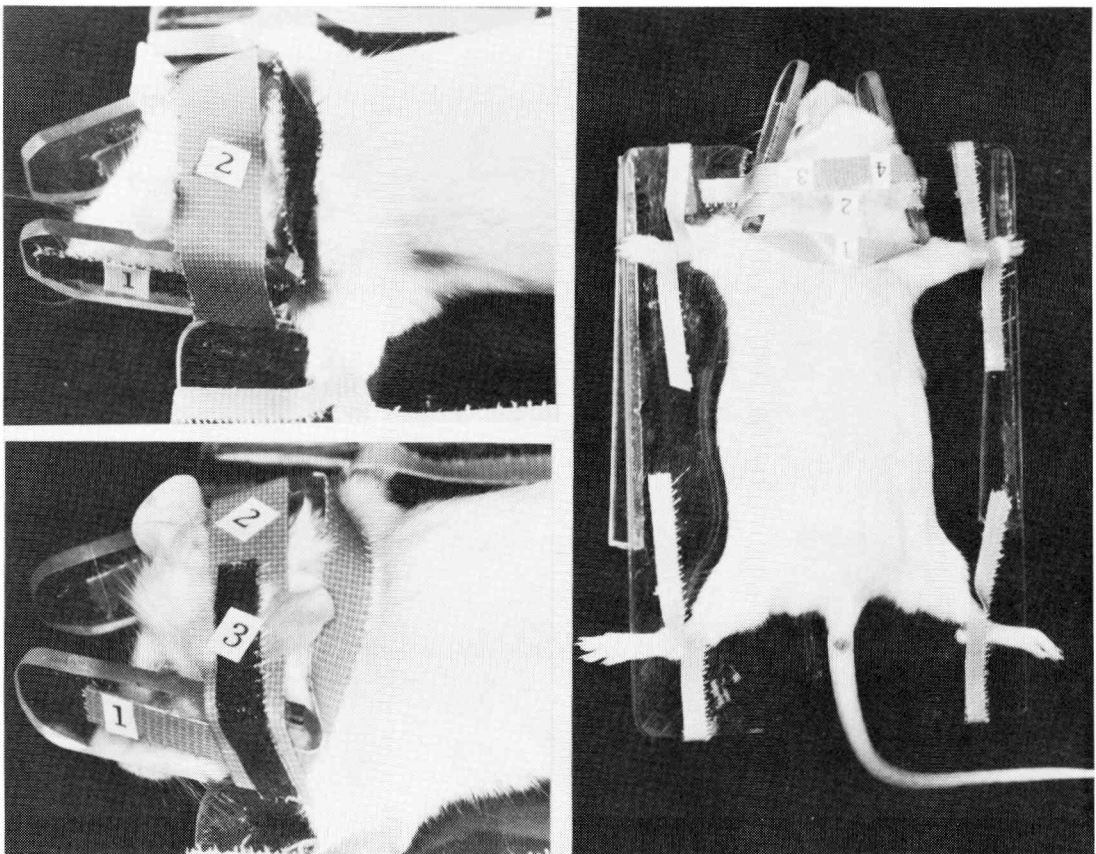


図1 M法におけるマウスの固定法 (tying の順序と固定姿勢)

意差を検定した。全ての実験は室温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度50~60%の恒温室で行われた。

2. R法による唾液分泌量の測定

実験条件は Richter の報告¹⁾にほぼ従った。一群12匹の雄マウス (ddY, 25—28 g) をウレタン 1.8g/kg (0.2ml/10g, i. p.) で麻醉し、15分後にピロカルピン 2.0mg/kg (0.1ml/10g, s. c.) を投与し直ちに沔紙 (東洋, No. 2) 上に置き唾液の採取を開始した。本方法での採取は5分間毎、20分間 (4回移動) であるが、本研究では90分間 (18回移動) 測定した。なお、沔紙上のしみの面積の測定は著者らの方法を用いた。

3. P法による唾液分泌量の測定

実験条件は Parkes らの報告¹⁰⁾にほぼ従った。一群12匹の雄マウス (ddY, 25—28 g) をジアゼパム 50mg/kg (0.1ml/10g, i. p.) で鎮静し、30分後にピロカロピン 1 mg/kg (0.1ml/10g, i. v.) を投与した。投与後直ちに沔紙 (東洋, No. 2) 上に置き、唾液の採取を開始した。本方法における唾液採取は5分間毎、10分間 (2回移動) であるが、比較のため90分間 (18回移動) 行った。しみの面積の測定は著者らの方法を用いた。

本研究で用いた薬物は次の通りである。塩酸ピロカルピン (鳥居薬品), ウレタン (和光純薬), ジアゼパム (ホリゾン注, 山之内), 塩酸クロルプロマジン (ウインタミン注, 塩野義), 硫酸アトロピン (和光純薬)。薬物は必要に応じて 0.9% NaCl 液に溶解して濃度を調整し、対照群には 0.9% NaCl 液を等量投与した。

実験結果

1. 唾液量としみの面積値との関係

図2に示したように、検討した25—400 μl の範囲内では、唾液量とそれを沔紙上に滴下して得られたしみの面積値との間に直線性が成立した。

2. ピロカルピンの唾液分泌反応

1) M法による測定

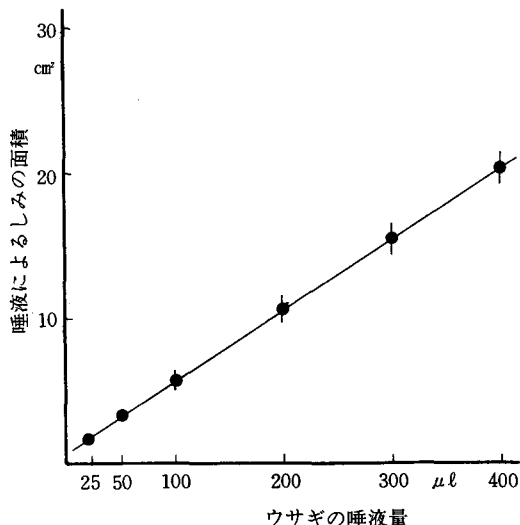


図2 唾液量と唾液によるしみの面積との関係 (Mean \pm S.E., n = 8~9)

ピロカルピン 0.2—6.4 mg/kg の唾液分泌反応は、各用量とも20分値 (移動2回目) で最大に達し、ほぼ90分間持続した。分泌反応の累積曲線は各用量ともほぼ40分値まで直線的であった。分泌量は40分間採取の場合0.2—1.6mg/kg の範囲で、一方、90分間の場合には 0.2—3.2 mg/kg の範囲で用量依存的であった。以上の結果を図3(a), (b)に示した。

2) R法およびP法による測定

R法の場合、ピロカルピン 2 mg/kg の唾液分泌反応曲線のパターンはM法の場合と類似し、また分泌反応も投与後90分間でほぼ終了した。10分間当りの分泌量の最大値 (最大分泌値) はM法の場合よりもやや早く出現し、10—15分値で得られた。一方、P法のピロカルピン 1 mg/kg の反応曲線はM法やR法とは異ったパターンを示し、最大分泌値は5分値で得られた。分泌量はその後急速に低下し、20分値は5分値の約24%にすぎなかった。その後軽度な分泌反応が投与後90分でもみられた。以上の結果を図4に示した。

3. 各種薬物の抗コリン作用と死亡率の測定

3種類の測定法を用いて、アトロピン、クロルプロマジン、アミトリプチリンの抗コリン活

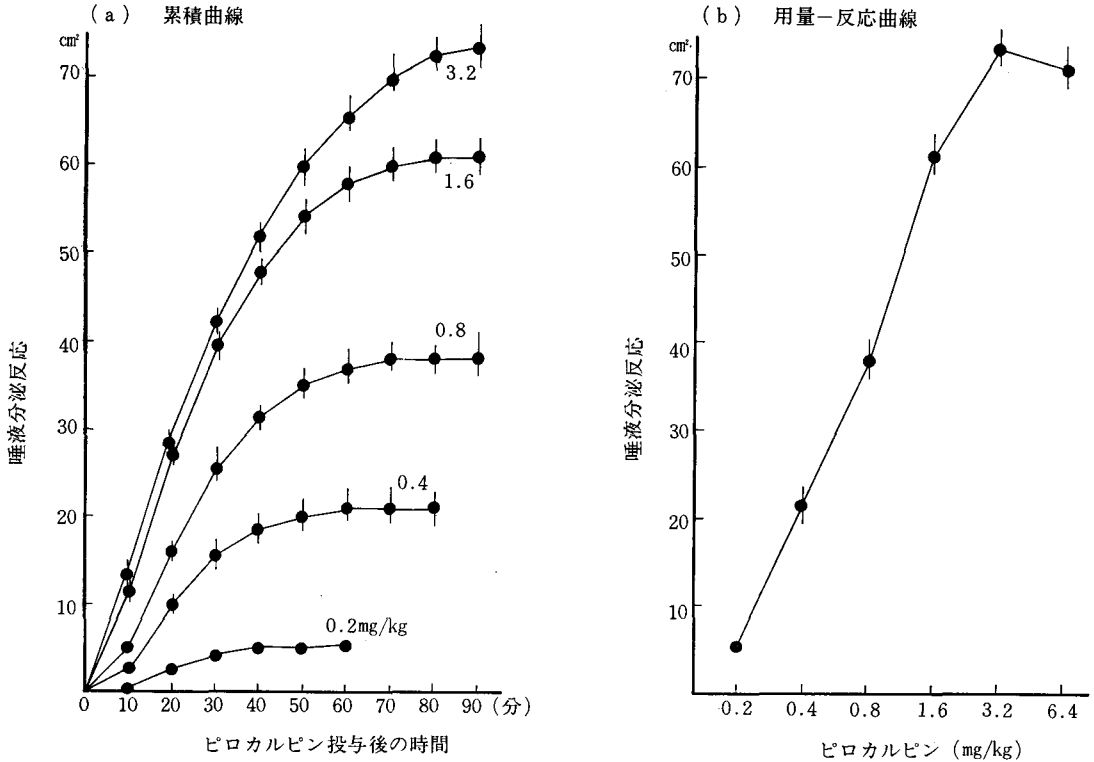


図3 マウスにおけるピロカルピンの唾液分泌作用 (Mean ± S.E., n = 12)

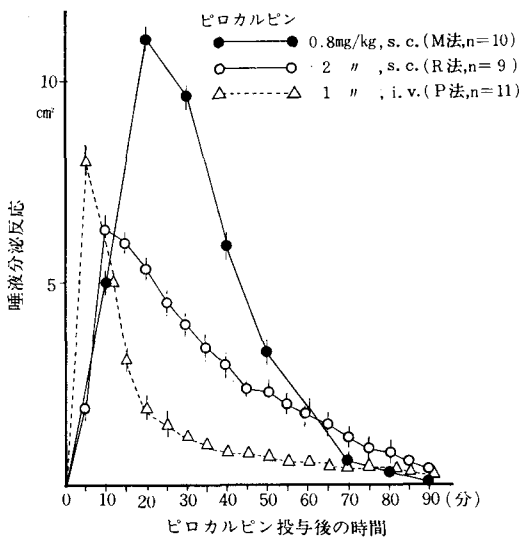


図4 M法, R法およびP法における唾液分泌反応 (Mean ± S.E.)

性と測定中および測定終了後のマウスの死亡率を測定した。M法, R法, P法におけるアトロピン 8 μg/kg の抑制率はそれぞれ26%, 29%

および18%で, 三方法の測定感度にはほとんど差はなかった。また, その他の被検薬においても, 三方法の抑制率には著しい差はみられなかった。R法とP法において, 測定時間を90分間に延長するとR法では抑制率の低下, すなわち測定感度の低下をきたしたが, P法ではむしろ上昇した。

測定値の撤布度を示す変異係数を三方法の対照群と比較すると, M法が10.0%であったのに対して, R法とP法は約2倍大きい18.3%と20.2%の値を示した。R法とP法の変異係数は測定時間を20分間と10分間から90分間に延長しても, それぞれ22.4%と20.2%で変化を示さなかった。

測定中のマウスの死亡例は三方法の対照群において, P法の一匹だけであったが, 測定終了後24時間における死亡率は, M法が0%であったのに対してR法が25%, P法が25%であった。被検薬投与群の場合, 測定中の死亡率はM

法, P法ともに0%であったがR法ではクロロプロマジン投与群の33.3% (8/24匹) が死亡した。24時間後の死亡率は, M法が0% (0/60匹) であったのに対して, R法では60% (43/72匹), P法では68% (48/71匹) で, 後二方法では半数以上のマウスが死亡した。以上の結果を表1—(1), 1—(2), 1—(3)と表2に示した。

4. ピロカルピンの唾液分泌反応曲線に及ぼす抗コリン薬の影響

M法とR法の場合, どの被検薬投与群も最大分泌値はP法の場合よりも遅れて出現し, 反応曲線のパターンも変化した。一方, P法ではどの被検薬投与群でも最大分泌値は5—10分に出現し, 反応曲線のパターンはほとんど変化しな

表1 ピロカルピンの唾液分泌反応に対する各種薬物の抗コリン作用とマウスの死亡率の測定

(1) M 法

薬物 ¹⁾	用量 mg/kg, s.c.	唾液分泌反応 ²⁾ , 平均±S.E., cm ²				抑制率, %		死亡数		
		20分間測定	N ³⁾	90分間測定	N	20分間	90分間	20分間	90分間	24時間
対照		16.07±0.46	10	37.83±0.28	10			0/10	0/10	0/10
アトロピン	0.008	10.47±0.72	10	28.13±1.58	10	34.8	25.6	0/10	0/10	0/10
	0.125	2.50±0.56	10	11.30±1.50	10	84.4	70.1	0/10	0/10	0/10
クロロプロマジン	4	5.35±0.56	10	20.12±1.26	10	66.7	46.8	0/10	0/10	0/10
	40	1.84±0.14	10	11.00±0.87	10	88.6	70.9	0/10	0/10	0/10
アミトリプチリン	2	9.32±0.79	10	24.46±0.81	10	42.0	35.3	0/10	0/10	0/10
	12	0.50±0.15	10	3.58±0.49	10	96.9	90.5	0/10	0/10	0/10

- 1) 前処理時間は本文中に記載
- 2) ピロカルピン0.8mg/kg, s.c.
- 3) 動物数

(2) R 法

薬物	用量 mg/kg, s.c.	唾液分泌反応, 平均±S.E., cm ²				抑制率, %		死亡数		
		20分間測定	N	90分間測定	N	20分間	90分間	20分間	90分間	24時間
対照		19.79±1.04	12	51.01±3.82	9			0/12	3/12	4/12
アトロピン	0.008	14.03±0.93	12	43.49±3.68	9	29.1	14.7	0/12	3/12	4/12
	0.125	6.05±1.08	12	36.24±4.6	12	69.4	29.0	0/12	0/12	0/12
クロロプロマジン	4	8.17±1.16	11	測定不能	—	58.7	—	1/12	12/12	—
	40	10.30±1.43	5	測定不能	—	48.0	—	7/12	12/12	—
アミトリプチリン	2	14.11±1.19	12	49.49±5.64	10	28.7	3.0	0/12	2/12	8/12
	12	3.65±0.48	12	17.60±1.99	11	81.5	65.5	0/12	1/12	7/12

(3) P 法

薬物	用量 mg/kg, s.c.	唾液分泌反応, 平均±S.E., cm ²				抑制率, %		死亡数		
		10分間測定	N	90分間測定	N	10分間	90分間	10分間	90分間	24時間
対照		12.94±0.77	11	28.12±1.72	11			1/12	1/12	3/12
アトロピン	0.008	10.65±1.52	12	22.21±2.50	12	17.7	21.0	0/12	0/12	5/12
	0.125	0.80±0.40	12	3.47±1.64	12	93.8	87.7	0/12	0/12	2/12
クロロプロマジン	4	7.42±2.99	12	14.91±0.93	2	42.7	47.0	0/12	10/12	11/12
	40	2.73±0.62	12	5.51±1.45	11	78.9	80.4	0/12	1/12	12/12
アミトリプチリン	2	6.81±0.91	12	11.01±1.60	12	47.3	60.8	0/12	0/12	9/12
	12	0.85±0.12	11	1.13±0.20	11	93.4	96.0	0/11	0/11	9/11

表2 M法, R法, P法におけるピロカルピンの唾液分泌反応のバラツキ

測定法	ピロカルピン mg/kg	N ¹⁾	測定時間	唾液分泌反応 ²⁾ , cm ²	散布度 ³⁾
M 法	0.8, s. c.	10	90 分	37.83±0.28	10.0%
R 法	2.0, s. c.	12	20 分	19.79±1.04	18.3%
P 法	1, i. v.	11	10 分	12.94±0.77	19.8%

1) 動物数 2) 平均±S.E.
3) 変異係数=S. D./Mean×100(%)

かった。以上の結果を図5に示した。

5. ピロカルピンの唾液分泌反応に及ぼす不
動化剤の影響

ウレタン0.5 g/kg (s. c.), 1.8 g/kg (s. c.)
およびジアゼパム50 mg/kg (i. p.) 投与群に
おいて、ピロカルピン0.8 mg/kg (s. c.) の全
唾液分泌量を測定した。ウレタン0.5g/kg投与
群の全唾液分泌量を100%とすると、ウレタン
1.8g/kg投与群の分泌量は83%、ジアゼパム投
与群は54%の低い値を示した。以上の結果を表
3に示した。

6. ピロカルピンのLD50値に及ぼす不動化
剤の影響

ウレタン0.5g/kg (s. c.), 1.8g/kg (s. c.)
およびジアゼパム50mg/kg (i. p.) 投与群にお
いて、ピロカルピンのLD50値を測定した。ウ
レタン0.5g/kg投与群におけるピロカルピンの
LD50値は、対照群のLD50値よりもむしろ大
きな値を示したが、ウレタン1.8g/kgおよびジ
アゼパム投与群のLD50値は著しく低下した。
以上の結果を表4に示した。

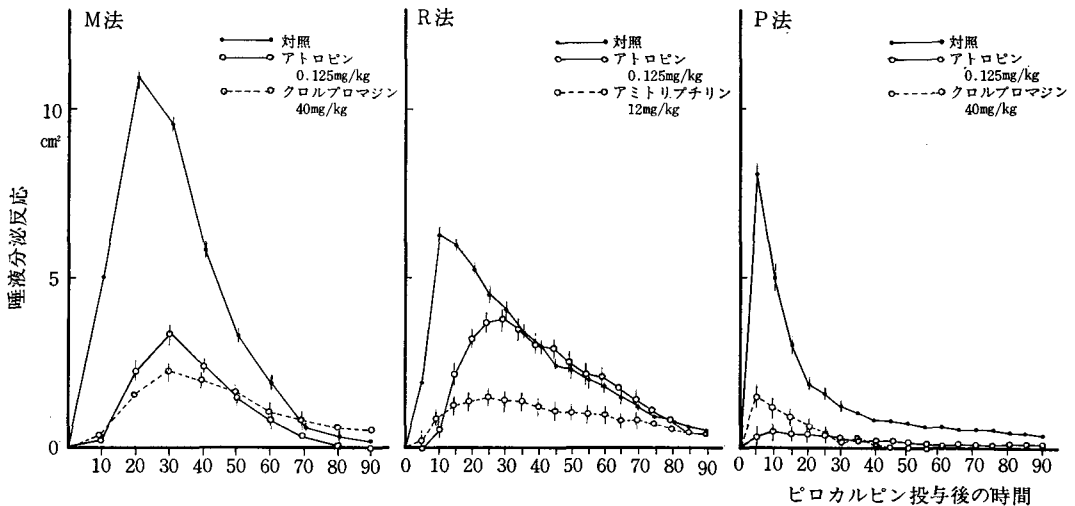


図5 ピロカルピンの催唾作用に対する各種薬物の抑制効果 (Mean ± S.E., n = 10~12)

表3 マウスにおけるピロカルピン (0.8mg/kg, s. c.) の唾液分泌反応に及ぼす不動化剤の影響

不動化剤, s. c.	N ¹⁾	唾液分泌反応, 平均± S.E., cm ²	%	危険率 ²⁾
ウレタン0.5 g/kg 投与群 (M法)	10	37.83±0.28	100	
ウレタン1.8 g/kg 投与群 (R法)	10	31.36±1.73	83.0	P<0.01
ジアゼパム50 mg/kg 投与群 (P法)	12	20.27±3.0	53.6	P<0.001

1) 動物数
2) M法との比較

表4 マウスにおけるピロカルピンのLD50値に及ぼす不動化剤の影響

不 動 化 剤	ピロカルピンのLD50値 ²⁾ , mg/kg
対 照 群 ¹⁾	195.0 (166.8—227.9) ³⁾ s. c.
ウレタン0.5g/kg, s. c. 投与群 (M法)	340.0 (251.9—459.0) s. c.
ウレタン1.8g/kg, s. c. 投与群 (R法)	3.5 (2.2— 5.4) s. c.
対 照 群 ¹⁾	125.0 (105.9—147.5) i. v.
ジアゼパム50mg/kg, i. p. 投与群 (P法)	0.7 (0.6— 0.9) i. v.

- 1) は0.9% NaCl液を投与した。
- 2) はLitchfield-Wilcoxon法により算出した。
- 3) は95%信頼限界

考 察

マウスを用いて唾液分泌反応を測定する方法としては、R法が最も広く用いられている。R法はラット¹²⁾、ウサギ⁵⁾、ネコ¹³⁾などを用いた方法と比べて、(1)混合唾液量しか測定できない。(2)分泌量が少ない固有唾液量は測定できない。(3)そのため、ピロカルピンなどの催唾剤の投与により増幅された唾液分泌反応を測定せざるをえないなど、実験条件にいくつかの制限がある。一方、R法の(1)極めて簡便な手技、(2)抗コリン作用に対する高い測定感度、(3)多数の検体を迅速に処理し、短時間で被検薬の用量反応曲線を作製しうるなどの特徴は、従来、抗コリン活性の検定における標準的方法の一つとされてきたBrownらのウサギを用いた方法⁵⁾よりも優れている。

唾液分泌量を沓紙上に広がったしみの面積として求めるR法では、動物が動いて顎と沓紙との接触点がずれた場合しみの面積値と唾液量とが相関しなくなる。したがって、R法の場合マウスを十分に麻酔して不動化することが極めて重要なポイントになる。不動化法としてはR法では高用量のウレタン(1.8g/kg)が、R法を一部改変したP法では高用量のジアゼパム(50mg/kg)が用いられている。これらの不動化条件は著者らの追試でも深麻酔状態を引き起し、不動化に関する限り十分に有効であった。しかしながら、これらの不動化条件には、いくつかの問題点があると考えられる。

第一の問題点はウレタンやジアゼパムの大量

投与が催唾剤として使用するピロカルピンの急性毒性を極めて強く増強することである。例えば、Richter¹¹⁾はウレタン1.8g/kgの前投与によりマウスでのピロカルピンのLD50値が170mg/kgから約1/30の5.5mg/kgまで低下したことを報告している。また、これらの薬物のこの著しい毒性増強効果は、本実験の結果(表4)からも明らかである。Richter¹¹⁾およびLavyら⁹⁾の検討によれば、R法において測定時間内(20分間)でのマウスの死亡率は1%前後であった。P法のParkesら¹⁰⁾はこの点に関しては報告していない。本実験においても対照群に関する限り、測定時間内での死亡例はP法での一匹にすぎなかった。しかし、この時のマウスの全身状態は極めて不良で、測定開始90分におけるR法とP法の対照群の死亡例の合計は4/24匹にも達した。マウスの衰弱程度は被検薬投与群の場合一段と著しく、両方法での死亡率の合計はわずか20分以内の測定時間にもかかわらず9/144匹に達し、24時間後の死亡率にいたっては両方法とも50%を越す高率を示した。これらの結果はR法、P法ともかなり重症な中毒症状の状態下で実験が行われることを示すものである。

第二の問題点は不動化剤自体がピロカルピンの催唾効果を抑制することである。一般的には、ウレタンやジアゼパムの制唾作用は軽度であるとされている¹⁴⁾。しかし、本実験の結果(表2)から明らかなように、両薬剤とも投与量が多い場合にはピロカルピンの催唾作用を抑制する。例えば、ウレタン0.5g/kg投与群にお

けるピロカルピン0.8mg/kgによる全唾液分泌量と比べると、ウレタン1.8g/kg投与群とジアゼパム投与群の全唾液分泌量は有意に減少した。この結果はR法、P法ともに、被検薬による抑制作用の他に不動化剤による抑制作用が加わる実験条件であることを示している。M法よりも完全な不動化を起す両方法での測定結果が、M法よりも2倍も大きなバラツキを示した一因は不動化剤のこの制唾作用にあると考えられる。しかしながら、R法、P法ともこの点に関して何らの考慮が払われていない。

第三の問題点は測定時間の長さである。測定時間はM法(90分間)とR法(20分間)、P法(10分間)とでは大きく相違している。ピロカルピンの催唾効果が70—90分間持続するにもかかわらず測定時間を短く設定した理由として、Richter¹⁾は長い測定時間は感度の低下を招くことを挙げている。本実験の結果でもR法での抗コリン薬の抑制率は、Richterの主張通り20分間測定時の方が90分間測定時より大きい。また、M法でも同じ傾向が認められた。しかし、問題は測定時間が短いため、R法、P法ともに測定時間内に採取される唾液量が少いことにある。図4に示したように、ピロカルピンの催唾効果は投与量にもよるが、大体70—90分間持続した。そこで、90分間の採取量である全唾液分

泌量を100とすると、R法とP法の測定時間内の採取量はそれぞれ39と46にしか達しない。これらの数字は、唾液腺に対する被検薬の影響が単に催唾剤の作用発現を遅延させるだけでも、あるいは催唾剤の効果の時間経過を変化させるだけにすぎなくとも、高い制唾効果が算出される危険性があることを示すものである。一般的に、最大分泌値の出現時間は被検薬の投与により遅延する傾向がある。例えばR法において最大分泌値の出現時間は、対照群が 12.1 ± 3.3 分(平均 \pm S. D.)であったのに対してアトロピン投与群では 29.2 ± 3.6 分であった。長い測定時間は測定感度と実験能率の低下を招くとはいえ、上記の危険を避ける意味から少なくとも60分間以上の測定を実施すべきと考える。

以上の結果からみて、R法、P法で用いている不動化条件は、催唾剤の効果を抑制するばかりでなく、マウスに対する為害作用が強すぎ、実験条件としては不適当なものと考えられる。それに対して、M法はR法、P法と比較して、(1)抗コリン作用に対する測定感度が低いこと、(2)測定値のバラツキが小さいこと、(3)ピロカルピンの毒性をむしろ弱めるので、高用量の被検薬を投与できること、(4)ピロカルピンの短時間内反復投与が可能であること(未発表)などの利点を有する為害性の低い方法である。

Abstract : A new technique (M method) immobilizing mice on the filter paper for measuring pilocarpine-induced salivation was developed, and compared with Richter's (R) and Parkes's (P) method in regard to the sensitivity and the variance of salivation and the mortality in mice.

Mice were immobilized by using a small dose (0.5 g/kg, s. c.) of urethane and a fixed tray for M method, a large dose (1.8 g/kg, s. c.) of urethane for R method and a large dose (50 mg/kg, i. p.) of diazepam for P method.

The degree of activity to the antagonist effect of anticholinergics in three methods was almost the same, but the variance of the measured values which obtained in M method was the lowest and approximately one-half of those obtained in R and P method. The condition of immobilization in M method decreased the acute toxicity of pilocarpine. On the other hand, the condition of immobilization in R and P method remarkably potentiated the toxicity of pilocarpine and reduced the value of LD₅₀ of pilocarpine, showing the high mortality rate over 50 per cent.

From these results, it is concluded that M method is superior to R and P method with respect to low variance of the measured values and low toxicity to mice.

文 献

- 1) Richter, W. : Estimation of anticholinergic drug effect in mice by antagonism against pilocarpine-induced salivation. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 24 : 243-254, 1966.
- 2) Oshika, H., Endo, J., Takemura, H. and Tanaka, M. : A possible role of alpha adrenergic receptors in salivation induced by isoproterenol in mice. *Japan. J. Pharmacol.* 28 : 650-652, 1978.
- 3) Woodruff, C. R. and Carpenter, F. G. : Actions of catecholamines and physostigmine on rat parotid salivary secretion. *Am. J. Physiol.* 225 : 1449-1453, 1973.
- 4) Bloom, G. D., Carlsöö, B. and Danielsson, A. : Dopamine-induced amylase secretion from guinea pig submandibular gland. *Brit. J. Pharmacol.* 54 : 523-528, 1975.
- 5) Brown, D. W. and Quinton, R. M. : The assay of antiacetylcholine agents for antagonism of pilocarpine-induced salivation in rabbits. *Brit. J. Pharmacol.* 12 : 53-60, 1957.
- 6) Emmelin, N. and Engström, J. : Supersensitivity of salivary glands following treatment with bretylium or guanethidine. *Brit. J. Pharmacol.* 16 : 315-319, 1961.
- 7) Watson, E. L. and Siegel, I. A. : Diphenylhydantoin effects on salivary secretion and microsomal calcium accumulation and release. *Eur. J. Pharmacol.* 37 : 207-211, 1976.
- 8) Junqueira, L. C. U., Toledo, A. M. S. and Saad, A. : Studies on the physiology of rat and mouse submaxillary glands : I. Amylase and protease activities in serum, submaxillary gland, and submaxillary saliva of rat and mouse. International Series of Monographs on Oral Biology, vol. 3. Salivary Glands and Their Secretions, Edited by Sreebny, L. M. and Meyer, J., Pergamon Press, Oxford, 105-118, 1964.
- 9) Lavy, U. I. and Mulder, D. : Salivary inhibition in mice and rabbits by a number of anticholinergics. A methodological investigation. *Arch. int. Pharmacodyn.* 178 : 437-445, 1969.
- 10) Parkes, M. W. and Parkes, J. C. : Supersensitivity of salivation in response to pilocarpine after withdrawal of chronically administered hyoscine in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 46 : 315-323, 1972.
- 11) Bulbring, E. and Dawes, G. S. : A method for the assay of atropine substitutes on the salivary secretion. *J. Pharmacol. exptl. Ther.* 84 : 177-183, 1945.
- 12) Schneyer, C. A. and Schneyer, L. H. : Method for collection of rat saliva. International Series of Monographs on Oral Biology, vol. 3. Salivary Glands and Their Secretions, Edited by Sreebny, L. M. and Meyer, J., Pergamon Press, Oxford, 309-312, 1964.
- 13) Emmelin, N. and Muren, A. : The sensitivity of submaxillary glands to chemical agents studied in cats under various conditions over long periods. *Acta Physiol. Scand.* 26 : 221-231, 1952.
- 14) 山本 敏, 猪木令三, 小島硯藏, 石田 甫, 溝口幸二 : 唾液腺分泌活動に対する麻酔薬の影響, 日薬理誌, 62 : 213-219, 1966.