無菌動物の唾液腺コレステロール増加の機序

中 村 治 雄 隅 田 潤 ノ 助 吉 村 啓 一

北海道大学歯学部 口腔生理学講座*

〔受付：昭和51年5月14日〕

抄録：5～6週齢の ICR-JCL 雄無菌動物マウスの唾液腺コレステロール代謝について 普通動物の ICR-JCL 雄マウスを対照として比較し次の結果を得た。

無菌動物では顎下腺、舌下腺、肝および血液の総コレステロール値は増加し、コレステロールの生合成は酢酸-1-¹⁴C より顎下腺、舌下腺、血液および肝で増加したが、メパロン酸-2-¹⁴C よりとりこみにはいずれも変化なかった。コレステロール-7-³H 投与によるとりこみは顎下腺、舌下腺、耳下腺で変化ないが、肝で増加、腎で減少した。酢酸-1-¹⁴C より総-¹⁴C のとりこみは顎下腺、耳下腺で低下、舌下腺では変化なく、肝で増加、腎で低下した。また糞への中性ステロールの排泄は低下し、糞への総胆汁酸の排泄も低下し、胆汁酸の排泄の低下 β -muricholic 酸の排泄の増加をきたした。

以上のことから唾液腺のコレステロールの増加の機序は主として唾液腺のコレステロール生合成の増加によると思われる。

緒 論

無菌動物のコレステロール代謝については、Kellogg ら^{1,2)} は血清総コレステロール値、および肝総コレステロール値は増加し、糞への中性ステロールの排泄は減少し、かつその構成成分中には、コプロスタノール、コプロスタノンを含いており、また胆汁酸の排泄も中性ステロールの場合と同一で、排泄は減少し、その構成成分も異なり、Gustafsson ら³⁾ はコール酸-¹⁴C の排泄の半減期が著しくのびると報告している。以上のように無菌動物では、コレステロールの体内蓄積をきたす条件がそなわっている。

また一方口腔内領域においては、無菌動物では、齧蝕⁴⁾ および歯周病の発生⁵⁾ が抑制されると報告されている。

そこで無菌動物では、上述のごとくコレステロールは、体内に蓄積されるので、この蓄積と唾液腺のコレステロール値の消長、およびその作用機

序を解明するために行った。

実験方法

1. 総コレステロール値、コレステロール生合成、糞へのステロールおよび胆汁酸の排泄：

6週齢の ICR-JCL 雄の無菌動物マウスおよび、その対照として6週齢の ICR-JCL 雄マウスを用いた。

(1) 体重20g あたり、酢酸-1-¹⁴C、メパロン酸-2-¹⁴C を夫々5 μ Ci、0.125 μ Ci 皮下注射1時間後に舌下腺、顎下腺、血液、肝および糞を採取した。

前報⁶⁾のごとく組織をアセトン-エタノール(1:1)で抽出し、この抽出液について総コレステロール値を Zak 法⁷⁾で測定し、さらにアセトン-エタノール抽出液を、KOH 液でケン化後、石油エーテルで抽出し、唾液腺の場合はこの石油エーテル抽出液について、血液、肝の場合には、ステロールをジギトニッドとして分離し、gas flow counter または、液体シンチレーションカウ

The mechanism of increase in cholesterol content of salivary gland of germ-free mice.

Haruo NAKAMURA, Junnosuke SUMIDA, Keiichi YOSHIMURA (Department of Oral Physiology, Hokkaido University School of Dentistry, Sapporo)

* 札幌市北区北13条西7丁目 (〒060)

Jap. J. oral Biol., 18 : 311-318, 1976.

ンターでステロールの放射能を測定した。

糞については^{8,9)}, 90%エタノールで抽出後さらにエーテルで抽出し, 両抽出液を 30% KOH エタノール液でケン化後石油エーテルによる抽出の中性ステロールについて, また胆汁酸については, 不ケン化物除去後, HCl で酸性となし, 石油エーテルで抽出し, すべて TMSi 化し, ガスクロマトグラフィーにより測定した。

(2) ガスクロマトグラフィーによる分析

(i) ステロール

肝および糞の不ケン化物のステロールについて Yanaco G-80-FP を用い, column は 1% SE-30, 60~80mesh, 3mm×150cm Inject 温度290°C, column 温度196°-236°C, 10/min 昇温, N₂ gas 流量20ml/min, H₂ gas 圧0.39kg/cm² で行ない, 標準品としてスクワレン, コプロスタノール, コプロスタノン, コレステロール, カンペステロール, ステイグマステロール, シトステロールを用い, すべて TMSi 化し, 内部標準として 5 α -cholestane を用い, 5 α -cholestane の保持時間13分を 1.00として, その時の各標準物の保持時間をもとめ, これにより測定した。

(ii) 糞の胆汁酸¹⁰⁾ については column は 1% OV-I, 80-100mesh, 3mm×200cm, 250°C で行い, 標準物としてコール酸, α -muricholic 酸, β -muricholic 酸を用い, これにより測定した。

2. コレステロール-7-³H および 酢酸-1-¹⁴C よりのとり込み:

5週令の ICR-JCL 雄無菌動物マウスおよび対照の同週令の ICR-JCL 雄マウスにコレステロール-7-³H を体重20g あたり 0.2 μ Ci 注射3日後に酢酸-1-¹⁴C を体重20g あたり 5 μ Ci 注射1時間後に, 耳下腺, 顎下腺, 舌下腺, 肝, 腎および, 以上の組織をのぞいた残余生体(carass)を採取し, ³H および¹⁴C の2重標識試料について残余生体以外の組織は組織そのまま Packard 306型, Automatic Sample Oxidizer により ³H は, ³H₂O, ¹⁴C は, ¹⁴CO₂ となし, 液体シンチレーションカウンターで総-³H, 総-¹⁴C を測定した。また残余生体については, アセトン-エタノール抽出液について液体シンチレーションカウンターにより総-³H, 総-¹⁴C をまたアセトン-エーテル抽出液を

ケン化後, ステロールをジギトニッドとして分離しこのステロールの ³H, ¹⁴C を液体シンチレーションカウンターで測定した。すなわち残余生体については酢酸-1-¹⁴C よりの総脂質への総-¹⁴C, および, ステロールへのとり込み, またコレステロール-7-³H よりのとり込みについて測定した。また残余生体の総コレステロール値も測定した。

実験成績

1. 総コレステロール値については図1のごとく無菌動物では, 顎下腺, 舌下腺, 肝, 血液の総コレステロール値は増加していた。

図1 無菌動物の総コレステロール値
M±SE, N=11 □対照 ▨無菌動物

図2 無菌動物の酢酸-1-¹⁴C よりのコレステロール合成
M±SE, N=5, □対照 ▨無菌動物

2. コレステロールの生合成については図2のごとく無菌動物では、顎下腺、舌下腺、肝、血液において酢酸-1-¹⁴C よりのとり込みは増加していたが、メバロン酸-2-¹⁴C よりのとり込みは図3のごとく、顎下腺、舌下腺、肝、血液において変化はみられなかった。

図3 無菌動物のメバロン酸-2-¹⁴C よりのコレステロール生合成
M±SE, N=6, □対照 ▨無菌動物

3. ガスクロマトグラフィーによる分析
5α-コレスタンの保持時間13分を1.00とした時のステロールの標準物による保持時間と補正係数は表1のごとくである。

表1 標準ステロールの相対保持時間と補正係数

	保持時内	補正係数
スクワレン	1.09*	1.28
コプロスタノール	1.50	0.94
コプロスタノン	1.55	1.39
コレステロール	1.71	1.03
カンペステロール	1.98	1.00
ステイグマステロール	2.09	1.08
サイトステロール	2.28	1.62

* 5α-コレスタンの保持時間13分を1.00とした
(1) 肝のステロールについては表2のごとく無菌動物では、総ステロール値は増加しているが、そのステロールのうちコプロスタノール、およびコプロスタノンはほとんどなく、99%はコレステロールでこれも増加し、カンペステロール、ラノステノールは減少していた。

表2 ガスクロマトグラフィーによる肝ステロールの分析

ステロール	対照動物	無菌動物
コプロスタノール	0.053*	0
コレステロール	2.620(94%)**	3.719(99%)
カンペステロール	0.089	0.033
ラノステロール	0.021	0.010
合計(総ステロール)	2.783	3.762

* mg/g 肝 ** ステロール中の%

(2) 糞のステロールについては図4のごとく、飼料のステロールはコレステロール、カンペステロール、ステグマステロール、サイトステロールの4種類からなっている。対照動物の糞ではコプロスタノール、コプロスタノ、コレステロール、カンペステロール、ステイグマステロール、およびサイトステロールがみとめられるが、無菌動物ではコレステロールが腸内細菌によつて還元されて生成されるコプロスタノール、コプロスタノンはみとめられず、飼料に由来するサイトステロール、ステグマステロールおよびカンペステロールがみとめられた。したがって、糞のガスクロマト

図4 ガスクロマトグラフィーによる飼料および糞の不ケン化物の分析

mg/体重100g/日

図5 無菌動物の糞の胆汁酸と中性ステロール
($M \pm SE$, $N=5$) 総ステロール 21 ± 2 :
 13 ± 2 mg/100g/日 $P < 0.05$
□ 対照 ▨ 無菌動物

グラフィーの分析においては、飼料に由来するものは除外し、コレステロール、コプロスタノール、コプロスタノンについて測定し、その合計を中性ステロールとした値が図5のごとくで、無菌動物では、コプロスタノール、コプロスタノンは排泄されず、コレステロールのみであり、無菌動物では中性ステロール値(コレステロールのみ)の排泄は低下し、また総ステロール値(中性ステロール+飼料ステロール)も低下していた。

(3) 糞の胆汁酸については無菌動物では、総胆汁酸に対する%はコール酸6%, β -muricholic

図6 無菌動物のコレステロール-7- 3H の組織へのとりこみ

$M \pm SE$, $N=9 \sim 10$, □ 対照 ▨ 無菌動物

acid 39%, α -muricholic acid 3%, その他約50%の未同定の胆汁酸よりなるが、対照動物では、コール酸62%, β -muricholic acid 10%, α -muricholic acid 1%, その他約37%であり、かつ無菌動物では糞への総胆汁酸の排泄は図5のごとく低下し、また分布においても、コール酸の減少と β -muricholic acidの増加がみられた。

4. コレステロール-7- 3H よりの組織への 3H のとり込みは図6のごとく無菌動物では、顎下腺、舌下腺、耳下腺では変化はないが、肝では増加し、腎では減少し、残余生体では表3のごとく総脂質、およびステロールへのとり込みにも変化なかった。

5. 酢酸-1- ^{14}C よりの組織への ^{14}C のとり込みは図7のごとく、無菌動物では、顎下腺、耳下腺では減少したが、舌下腺では変化なく、肝では、増加、腎では減少し、残余生体では、表3のごとく、酢酸-1- ^{14}C よりのステロールへのとり込みには変化がなかったが、総脂質への総 ^{14}C のとり込みは、無菌動物では増加した。また表3のご

表3 酢酸-1- ^{14}C およびコレステロール-7- 3H よりの残余生体(carass)への総脂質およびステロールへのとりこみ

	対照動物	無菌動物	P
ステロール値(mg/g 組織)	4.14 $\pm$ 0.10*	4.26 $\pm$ 0.10	P<0.05
酢酸-1- ^{14}C よりの総脂質へのとりこみ、 総- ^{14}C (dpm/mg 組織)	7.27 $\pm$ 0.397	10.60 $\pm$ 1.372	
コレステロール-7- 3H よりの総脂質へのとりこみ、 総- 3H (dpm/mg 組織)	4.83 $\pm$ 0.26	4.53 $\pm$ 0.35	
酢酸-1- ^{14}C よりステロールへのとりこみ、 (dpm/mg ステロール)	288 $\pm$ 40	410 $\pm$ 85	
コレステロール-7- 3H よりステロールへのとりこみ、 (dpm/mg ステロール)	80.6 $\pm$ 13.9	111.7 $\pm$ 31.1	

* $M \pm SE$, $N=9 \sim 10$. 残余生体: 唾液腺, 肝, 腎を除いた組織

図 7 無菌動物の酢酸-1-¹⁴C よりの組織へのとりこみ

N=9~10, M±SE, □ 対照 ▨ 無菌動物

図 8 無菌動物の体重、唾液腺および肝の重量と体重100gあたりの重量

M±SE, N=10~11, □ 対照 ▨ 無菌動物

とく残余生体の総ステロール値には変化がなかった。

6. 唾液腺, 肝, 体重の重量および体重に対する重量は図8のごとく無菌動物では顎下腺, 舌下腺, 肝および体重の重量はひくく, また体重に対する重量も顎下腺で低下し, 肝では増加, 舌下腺では変化なかった。

考 按

無菌動物の ICR-JCL マウスでは, 顎下腺, 舌下腺の総コレステロール値は図1のごとく増加していた。この増加の機序を知るために第1にコレステロールの生合成について行ってみると, 酢酸-1-¹⁴C からのとり込みは増加するが, メバロン酸-2-¹⁴C からのとり込みには変化がないことから,

無菌動物では酢酸からメバロン酸にいたるコレステロール生合成の過程が著しく増加している。すなわち, メバロン酸が多く生合成されている事を示している。一般に, コレステロール生合成の, rate limiting step は酢酸とメバロン酸間, くわしくいえば, HMG-CoA とメバロン酸間にあるので無菌動物は唾液腺の HMG-CoA reductase 活性を増加させるのではないかと考えられる。また血液, 肝の場合にも唾液腺の場合と同様に, コレステロール生合成も総コレステロール値も増加しているので唾液腺の場合と同様に考えられる。

さて組織のコレステロール値の増加は第1にコレステロール生合成の増加, 第2にコレステロール生合成の増加, または減少, または変化がなくとも, 異化, またはコレステロールの消失などの変動の組み合わせによって組織コレステロールは増加する。第3は他組織よりの移動によるとり込みである。

そこで無菌動物では前述のごとく, 唾液腺のコレステロール生合成が増加するが, これは増加した血液コレステロール-¹⁴C, または肝コレステロール生合成の増加に由来するコレステロール-¹⁴C が唾液腺にとり込まれることにより, おこるのか否かを確めるために, コレステロール-7-³H を注射してとりこみをみると, 図6のごとく顎下腺, 舌下腺, 耳下腺へのコレステロール-7-³H のとり込みには変化はない。(しかしこれは, とり込まれたコレステロール-7-³H と排泄したコレステロール-7-³H の結果であるが) 従って唾液腺コレステロール生合成の増加は血液コレステロール-¹⁴C および組織のコレステロール-¹⁴C よりのとり込みによるのではないといえよう。しかしコレステロール-³H のとり込みは無菌動物の肝では増加し, 腎では減少していた。

次に酢酸-1-¹⁴C の組織への総-¹⁴C のとり込みをみると図7のごとく無菌動物では, 顎下腺, 耳下腺で低下しているが, 舌下腺では変化なく, 肝で増加し, 腎で減少していた。これは唾液腺では, 酢酸-1-¹⁴C の利用が変化ないか, または増加しているのに反し, 肝では増加し, 腎では低下し肝と唾液腺とは異っている。

酢酸-1-¹⁴C の総-¹⁴C のとり込みは, 例えば肝へ

のとり込みでは、脂質に80%、蛋白質に15%、糖に5%がとり込まれ¹¹⁾、このように、酢酸-1-¹⁴Cは、脂質には多くとり込まれるが、この脂質のうち、本実験の無菌動物では、図2のごとくコレステロールへのとり込みが増加していることは、無菌動物では、図7のごとく顎下腺、耳下腺では全体として総-¹⁴Cのとり込みが低下し、舌下腺では変化がないが、内部的にコレステロールのみについてみるとコレステロールへのとり込みが増加していることである。

唾液腺におけるコレステロールの異化¹²⁾については肝にくらべてほとんどおこなわれていないと考えられるので除外することにする。

また唾液の分泌によるステロールの排泄であるが唾液の成分としてステロールがふくまれているので、無菌動物の場合の唾液の分泌および排泄についても今後行ってみる必要がある。

さて先人の成績のごとく、当実験においても無菌動物では図5のごとく糞へのステロール、および胆汁酸の排泄がすくなく、また糞のステロールでは図4のごとくコプロスタノール、コプロスタノンがなく、また胆汁酸では、コール酸の排泄がすくなく、 β -muricholic酸が多いことは腸内細菌のないことに起因するわけであるが、これらの糞のステロール、胆汁酸の成績は、Kelloggら^{1,2,13)}、Eyssenら¹⁴⁾と同一でありステロールの体内蓄積をうながす要因である。

無菌動物の唾液腺コレステロールの増加は肝、および血液でのコレステロールの増加の機序とはことなり、ステロールの体外への排泄の低下にもとづく蓄積によるものではなくて、コレステロールの生合成の増加に起因すると考えられる。

肝について考察するに Gustafssonら³⁾は無菌動物では胆汁酸の排泄の半減期が低下した、Wostmannら¹⁵⁾は無菌動物ラットではコレステロール-26-¹⁴C投与による肝でのコレステロールの異化および消失も低下し、また残余生体 (carcass) においても同様であり、さらにコレステロール値についても残余生体、肝において増加したと報告している。本実験においても無菌動物では肝コレステロールは増加し、肝コレステロール生合成は増加し、糞へのステロール、胆汁酸の排泄は低下

しており、これらの結果をふまえて、肝のコレステロール-7-³H、および酢酸-1-¹⁴Cよりのとり込みについて考えてみると無菌動物での図6の肝のコレステロール-7-³Hのとり込みの増加は無菌動物での肝でのコレステロールの異化の低下および、消失の遅延を意味し、また無菌動物での図7の肝の酢酸-1-¹⁴Cよりの総-¹⁴Cの増加は肝での酢酸-1-¹⁴Cの利用の低下を意味している。すなわち酢酸は acetyl CoA となり malonyl-CoA から脂質に、HMG-CoA をへてステロールに、更に又 Krebs cycle に入り、glucose、アミノ酸の合成にも用いられるが、無菌動物の肝で酢酸-1-¹⁴Cの総-¹⁴Cの増加していることはこれらの酢酸代謝の回転不良を意味する。従って本実験の肝でのコレステロール-7-³H、および酢酸-1-¹⁴Cのとり込みの増加は無菌動物では肝でのコレステロール、コレステロール異化、および酢酸代謝の異常をきたすという先人の体内コレステロール蓄積の機序の一部をなしており、そのうらづけの一つと考えている。以上は唾液腺のコレステロール代謝の面よりのみ論じたが、何故に無菌動物の唾液腺コレステロール値の増加をきたすかについては、他の代謝系、内分泌系、中枢性などについて検討する必要がある。それは唾液腺は、多くの neuro-chemical および hormonal agent により応答することが知られているからである。

Coatesら²¹⁾は無菌動物ニワトリ、Combe²²⁾は無菌動物ラットで、Nの一日の摂取量が同一でもNの排泄が多いと報告しているが、これは本実験の体重の減少をうらずけるものである。さらに Chakhava²³⁾は無菌動物では副腎の肥大があり、グルココルチコステロイドが血中に増加し、副腎では減少し、Vcが多い。また Nomuraら²⁴⁾は睾丸のテストステロンの量が減少すると報告していることなどから、内分泌腺による作用も考えなければならないだろう。

結 論

無菌動物の ICR-JCL 雄マウスのコレステロール代謝を対照と比べて次の結果を得た。

1. 顎下腺、舌下腺、肝、血液の総コレステロール値は増加した。

2. コレステロールの生合成は顎下腺, 舌下腺, 肝, 血液において, 酢酸- $1\text{-}^{14}\text{C}$ よりのとり込みは増加したが, メバロン酸- $2\text{-}^{14}\text{C}$ よりのとり込みは, 変化がなかった。

3. コレステロール- $7\text{-}^3\text{H}$ の組織への総- ^3H のとり込みは顎下腺, 舌下腺, 耳下腺では変化がないが, 肝で増加し, 腎で減少していた。酢酸- $1\text{-}^{14}\text{C}$ の組織への総- ^{14}C のとり込みは顎下腺, 耳下腺で低下し, 舌下腺では変化がなく, 肝で増加し, 腎で

減少した。

4. 糞への中性ステロールおよび胆汁酸の排泄は低下した。

5. 体重は低下し, 顎下腺, 舌下腺の重量は低下し, 体重重量に対する体重比でも顎下腺で低下, 舌下腺で変化はなく, 肝で増加した。

以上より唾液腺の総コレステロール値の増加には唾液腺のコレステロールの生合成の増加も関与すると思われる。

Summary: The cholesterol metabolism of salivary gland of germ-free mice (ICR-JCL) was examined and compared with the conventional mice. In germ-free mice total cholesterol level increased in submaxillary gland, sublingual gland, liver and blood. The biosynthesis of the cholesterol from acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ increased in submaxillary gland, sublingual gland, blood and liver, while no change in biosynthesis from mevalonate- $2\text{-}^{14}\text{C}$ was observed. The uptake of cholesterol- $7\text{-}^3\text{H}$ in vivo did not change in submaxillary, sublingual, and parotid gland, while that of liver increased and that of kidney decreased. The uptake of acetate- $1\text{-}^{14}\text{C}$ decreased in submaxillary, parotid glands and kidney, while that of sublingual gland showed no change and that of liver increased. The excretion of the neutral sterol and bile acid into feces decreased.

From these results it has been suggested that the mechanism of increase in cholesterol of salivary gland may be mainly due to increase in biosynthesis of cholesterol.

文 献

- 1) KELLOGG, T. F. and WOSTMANN, B. S.: Fecal neutral steroids and bile acids from germfree rats *J. Lipid Res.*, 10 : 495-503, 1969.
- 2) KELLOGG, T. F.: Steroid balance and tissue cholesterol accumulation in germfree and conventional rats fed diets containing saturated and polyunsaturated fats *J. Lipid Res.*, 15 : 574-579, 1974.
- 3) GUSTAFSSON, B. E., BERGSTRÖM, S., LINDSTEDT, S. and NORMAN, A.: Turnover and nature of fecal bile acids in germfree and infected rats fed cholic acid- $24\text{-}^{14}\text{C}$. Bile acids and steroids 41. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 94 : 467-471, 1957.
- 4) ORLAND, F. J., BLAYNEY, J. R., HARRISON, R. W., REYNIEERS, J. A., TREXLER, P. C., WAGNER, M., GORDON, H. A. and LUCKEY, T. D.: Use of the germfree animals technique in the study of experimental dental caries. *J. dent. Res.*, 33 : 147-174, 1954.
- 5) ROVIN, S., SABES, W., EVERSOLE, L. R. and GORDON, H. A.: The periodontium of old germfree and conventional rats. *Germfree Research* (edited by Heneghan, J. B.) p. 175-180, Academic Press. N. Y., 1973.
- 6) 中村治雄, 新美育子, 石川昌子: 加齢および季節による唾液腺コレステロール代謝におよぼすエストロゲンの作用, 齒基礎誌 16 : 65-71, 1974.
- 7) ZAK, B.: Simple rapid microtechnic for serum total cholesterol. *Amer. J. Clin. Path.*, 27 : 583-588, 1957.
- 8) ABELL, L. L., MOSBACH, E. H. and KENDALL, F. E.: Cholesterol metabolism in the dog. *J. Biol. chem.*, 220 : 527-536, 1956.
- 9) MOSBACH, E. H., ZOMZELY, C. and KENDALL, F. E.: Separation of bile acids by column-partition chromatography. *Arch. Biochem. Biophys.*, 48 : 95-101, 1954.
- 10) EYSEN, H., PARMENTIER, G., COMPERNOLE, F., BOON, J. and EGGERMONT, E.: Trihydroxycoprostanic acid in the duodenal fluid of two children with intrahepatic bile duct anomalies. *Biochem. Biophys. Acta.*, 273 : 212-221, 1972.
- 11) 中村治雄: ウルソデスオキシコール酸の血清コレステロール低下作用の機序に関する研究, 日消誌, 62 : 1105-1114, 1965.
- 12) 吉田和子, 中村治雄: 唾液腺と肝のコレステロール代謝の比較, 特に生合成, とり込み, 消失について, 北海道医誌, 51 : 5号, 1976掲載予定.

- 13) KELLOGG, T. F.: Fecal bile acids and neutral sterols of gnotobiotic, antibiotic fed normal and normal human children. *Germ-free Research* (edited by Heneghan, J. B.) p. 79-81, Academic Press, N. Y. 1973.
- 14) EYSEN, H., PARMENTIER, G., MERTENS, J. and DE SOMER, P.: The bile acid of the mouse: Effect of microflora, age and sex. *ibid.*, p. 271-276.
- 15) WOSTMANN, B. S., WIECH, N. L. and KUNG, ELISABETH: Catabolism and elimination of cholesterol in germfree rats. *J. Lipid Res.*, 7 : 77-82, 1966.
- 16) SCHAEFFER, L. D. and DENNY, P. C.: Effect of isoproterenol and testosterone on protein synthesis and cyclic nucleotide metabolism in submandibular glands of young rats. *J. Dent. Res.*, 55 : B135, 1976.
- 17) SHAFER, W. G. and MUHLER, J. C.: Effect of gonadoectomy and sex hormones on the structure of the rat salivary glands. *J. Dent. Res.*, 32 : 262-268, 1953.
- 18) LIU, F. T. Y.: Effect of estrogen, thyroxin, and their combination on dental caries and salivary gland in ovariectomized and intact female rats. *J. Dent. Res.*, 46 : 471-477, 1967.
- 19) 中村治雄: 口腔内疾患と唾液腺代謝, 歯界展望, 43 : 1118-1122, 1974.
- 20) 中村治雄, 吉田和子, 鎌田 勉: 脳下垂体摘出動物の唾液腺コレステロール代謝, 北海道歯科医師会誌, 31 : 54-57, 1976.
- 21) COATES, M. E., HEWITT, D. and SLATER, D. N.: Protein metabolism in the germ-free and conventional chick *Germfree Research* (edited by Haneghan, J. B.) p. 291-295, Academic Press, N. Y., 1973.
- 22) COMBE, E.: Nitrogen metabolism in germ-free rats. *ibid.* p. 305-308.
- 23) CHAKHAVA, O. V.: Ascorbic acid and glucocorticoid levels in relation to underdeveloped lymphatic tissue in germfree guinea pigs. *ibid.* p. 507-511.
- 24) NOMURA, T., OHSAWA, N., KAGEYAMA, K., SAITO, M. and TAJIMA, Y.: Testicular functions of germfree mice. *ibid.* p. 515-519.