マウス顎下腺の性差の意義に関する一考察

——顎下腺唾液の毒性について——

平 松 正 彦 畠 山 桂 子 南 直 臣

城西歯科大学 歯科薬理学教室*

〔受付：昭和54年10月17日〕

抄録：雄マウスの phenylephrine 刺激唾液の毒性について検討した。その結果、唾液はモルモット、ラット、ハムスターに対して強い毒性を示すことを認めた。マウスに対する毒性は比較的軽度であった。雄マウスの顎下腺抽出液にも強い毒性が認められた。唾液中の毒性物質は kallikrein 様のタンパク分解酵素であることが示唆された。以上の結果から、マウス顎下腺の生理学的機能について考察した。

結 言

マウスの顎下腺に形態学および生化学的な著明な性差がみられることはよく知られている。顎下腺分泌細管中の分泌顆粒は、雄が雌に比較して著しく多く、この顆粒は androgen 依存性である¹⁻³⁾。また、雄マウスの顎下腺中には nerve growth factor (NGF) をはじめとし、epidermal growth factor (EGF), esteroprotease, renin-like enzyme などの androgen 依存性タンパク質が多量に存在し⁴⁻⁷⁾、これらのあるものは分泌顆粒由来であることが確かめられている⁸⁻¹⁰⁾。その他、2・3の酵素活性にも性差がみられることが報告されている^{11,12)}。しかし、マウス顎下腺のこれら性差の生理学的意義については不明である。

Liuzzi ら¹³⁾は、NGF の研究途上で、雄マウスの顎下腺抽出液を幼弱マウスに投与した際、強い毒性が認められることを報告した。星野ら^{14,15)}はこの点をさらに検討し、毒性因子 (lethal factor) はタンパク様物質であり、androgen 依存性であることを確かめている。しかし、lethal factor の意義と本質については明らかではない。

本研究でわれわれは、1) マウス顎下腺の lethal factor は唾液中に分泌されていること、2) その毒性活性はマウスに対してよりもむしろ他の動物に対して極めて強いこと、3) lethal factor の本質は kallikrein 様のタンパク分解酵素であることを明らかにした。ここにこれらの結果を報告し、それに基づくマウス顎下腺の性差の意義について考察したい。

実験材料および方法

1. 実験動物

ICR, C3H, BALB/c, C57BL, ddN 系マウス、Wistar 系ラット、Hartley 系モルモットおよび Golden ハムスターを実験に使用した。雌雄差および週齢は各項に記載した。

2. 唾液の採取

14~16週齢の雄の ICR 系マウスに、Nembutal 麻酔下で、phenylephrine (α -adrenergic agent) の 1 mg/kg を尾静脈に投与し、唾液を分泌させた。Phenylephrine 投与後10~15分の時点で分泌唾液を採取した。唾液は経口用ゾンデを用いて口腔内を 1 ml の精製水で洗浄することにより採取した。およそ1400匹のマウスから得た唾液をプー

One approach for the physiological significance of the sexual difference in the mouse submaxillary gland. Toxicity of submaxillary gland saliva.

M. HIRAMATSU, K. HATAKEYAMA and N. MINAMI (Department of Dental Pharmacology Josai Dental University)

* 埼玉県坂戸市けやき台1の1 (〒350-02)

Jap. J. oral Biol., 22 : 23-29, 1980.

ルし、濾過し、凍結乾燥して保存し、用に臨んで生理食塩液に溶解して実験に使用した。一部の実験では、同週齢の雌マウスおよび雄の顎下腺摘除マウスから同様に唾液を採取し、実験に使用した。

3. 顎下腺抽出液の調製

雌雄マウス (ICR, C3H, BALB/c, C57BL, ddN, いずれも14週齢), ラット (雄, 16週齢), ハムスター (雄, 14週齢) およびモルモット (雄, 18週齢) の顎下腺を、生理食塩液で10% homogenate とし、5,000×g で30分間遠心分離した上清を実験に使用した。

4. 毒性 (LD₅₀)

分泌唾液および顎下腺抽出液をマウス (ICR と C3H, 雌雄いずれも4週齢), ラット (雌雄いずれも4週齢), ハムスター (雄, 5週齢) およびモルモット (雄, 4週齢) の腹腔内に投与し、投与後の肉眼的所見と死亡率を観察した。LD₅₀ は24時間以内の死亡率を基準とし、Litchfield & Wilcoxon 法¹⁶⁾で算出した。

5. タンパク質量

試量中のタンパク質量は、bovine serum albumin を対照とし、Lowry ら¹⁷⁾の方法に従って定量した。

6. 等電点分画

唾液の等電点分画は Vesterberg ら¹⁸⁾の方法に従って行った。110ml 容量のカラムを使用し、1% ampholine (pH 3~10) の sucrose 密度勾配で700volt, 48時間, 0~2°C の条件下で分画した。分画後、2ml の fraction に分取し、pH, タンパク質量および酵素活性を測定した。

7. DEAE-Sephadex A-50による分画

試量を10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) で平衡化した DEAE-Sephadex A-50のカラム (1.6×23cm) に添加し、同 buffer の NaCl 濃度勾配 (0~0.1M) で溶出した。流速は10ml/hour とし、5ml の fraction に分取した。

8. Kallikrein 活性

a) 合成基質による測定

α -N-benzoyl-L-arginine ethyl ester (BAEE) を基質とし、Nustad ら¹⁹⁾の方法に従って測定した。酵素活性は1分間あたりの BAEE 水解能 (μ

mol) で表現した。

b) Kinin 遊離活性

イヌの plasma (58°C で30分間処理し、透析したもの) を基質とし、Nustad ら²⁰⁾の方法に従って測定した。遊離した kinin 量はマグヌス管 (7ml 容量) 中でラットの摘出子宮標本による bio-assay で定量した。酵素活性は1分間あたりに遊離する kinin 量を bradykinin 相当量 (μ g) で表現した。

9. Chymotrypsin および trypsin 活性

Chymotrypsin 活性は N-acetyl-L-tyrosine ethyl ester (ATEE) を、trypsin 活性は α -N-benzoyl-DL-arginine-P-nitroanilide (BAPA) をそれぞれ基質として使用し、Bhoola ら²¹⁾の方法に従って測定した。酵素活性はいずれも1分間あたりの基質水解能 (μ mol) で表現した。

10. アクリルアミドゲル電気泳動

7%ポリアクリルアミドゲルを支持体とし、pH 9.5の条件で Davis²²⁾の方法に従って行った。泳動後のゲルは Coomassie brilliant blue で染色し、7.5%酢酸で脱色した。

実験結果

1. 唾液および顎下腺抽出液の毒性

Phenylephrine 刺激により、ICR 系雄マウス一匹あたりタンパク質量として平均5.2mg を得ることができる。Table 1 に示したように、Phenylephrine 刺激唾液はモルモット、ラットおよびハムスターに対して強い毒性を示した。マウスに対する毒性は比較的軽度であった (唾液投与直後にモルモットで、せき、くしゃみ様の症状、一部のマウスとラットで writhing syndrome 症状が認められた。また、すべての動物で立毛、体温下降および衰弱が認められ、致死時間は大部分が24時間以内であった)。

モルモットに対して最も毒性が強く、かりにその体重を200g とした場合、唾液の LD₅₀ は1.32 mg protein/animal となり、マウス一匹あたりの唾液のタンパク質量よりはるかに低い。顎下腺を摘除した雄マウスに phenylephrine 刺激した際に得られた唾液は全く無毒であった。従って、唾液中の毒性物質は顎下腺由来であると考えられる。

Table 1 Toxic activity of phenylephrine-induced saliva and saline extract of SMG from ICR-strain male mice

Species	Sex	LD ₅₀ (μ g protein per g body weight)	
		Phenylephrine-induced saliva	SMG extract
Guinea pigs	♂	6.6	24.1
Rats	♂	15.1	41.2
	♀	13.3	39.6
Hamsters	♂	26.3	80.9
Mice(ICR)	♂	127.6	380.0
	♀	119.4	321.6
Mice(C3H)	♂	95.3	286.2
	♀	84.7	241.8

SMG ; submaxillary gland

Fig. 1 Isoelectric focusing of phenylephrine-induced saliva. The saliva containing 400mg protein was isoelectrofocused as described in methods.

事実、雄マウスの顎下腺抽出液にも強い毒性が認められた (Table 1)。Phenylephrine 刺激した雌マウスの唾液の毒性は、雄マウスのそれに比較してはるかに低かった。Phenylephrine 無処置の正常雄マウスの唾液は軽度ではあるが毒性が認められた。

唾液の毒性は65°C、30分の熱処理で失活し、また、非透析性であった。従って、唾液中の毒性物

Table 2 Mortality rates of eight fractions of isoelectric focusing to guinea pigs and rats

Fractions	Mortality rates	
	for guinea pigs (15 μ g*)	for rats (30 μ g*)
I	0/8	0/10
II	0/8	0/10
III	0/10	1/10
IV	10/10	10/10
V	2/10	3/10
VI	0/8	0/10
VII	0/8	0/10
VIII	3/10	4/10

* ; protein per g body weight

質はタンパク様物質であることが示唆された。

2. 唾液の等電点分画

唾液中の毒性物質を分離精製する目的で phenylephrine 刺激唾液 (400mg protein) を等電点分画で分離した。その結果は Fig. 1 に示した。分離されたタンパク peak I-VIIIのうち、peak IV、VおよびVIIIは BAEE 水解能および kinin 遊離活性を示すことから、kallikrein 様酵素を含むことが明らかである。Peak IIとVIIIは chymotrypsin 様酵素、peak IIIとVは trypsin 様酵素を含む (Fig. 1)。

各 peak を精製水に対して48時間透析した後、濃縮し、モルモットとラットに対する死亡率について比較検討した (Table 2)。その結果、peak IV に最も強い毒性が認められ、また、peak VとVIII

にも比較的強い毒性が認められた。これらの3つの peak がいずれも kallikrein 活性を示すことから、唾液中の毒性物質は kallikrein 様酵素であることが推察された。

Fig. 2 Chromatography of fraction IV with DEAE-Sephadex A-50. The sample containing 80mg protein was applied to the column and fractionated as described in methods.

3. DEAE-Sephadex A-50による分画

最も強い毒性を示した peak IV (タンパク質量として80mg) をさらに DEAE-Sephadex A-50で分画した。その際の分離パターンは Fig. 2に示したように、3つのタンパク peak に分離された。これらの peak (IV-A, B, C) のモルモットに対する死亡率を検討した結果、peak IV-C にのみ、強い毒性が認められた ($8 \mu\text{g protein/g body weight}$ の死亡率; $10/10$)。

Peak IV-C はアクリルアミドゲル電気泳動で単一のタンパク band を示し、また、BAEE 水解能と kinin 遊離活性を示すことから (Fig. 2), kallikrein 様酵素であることがわかった。

4. 顎下腺抽出液の毒性

マウス唾液中の毒性物質は顎下腺由来であることを確かめたので、顎下腺抽出液の毒性をマウスの系統および2・3の種属間で比較検討した。結果は Table 3に示したように、顎下腺抽出液の毒性は、雄マウスが雌マウスに比較して著しく強く、また、雄マウスの抽出液の毒性はマウスの系統間で共通に認められた。さらに、毒性の程度は kallikrein 様活性 (BAEE 水解能) の程度とよく一致した。ラット、ハムスターおよびモルモット

Table 3 Toxic activity and BAEE-esterase activity of saline extracts of SMGs from mice and other animals

Strains or species	Sex	LD ₅₀ (μg protein per g body weight)		BAEE-esterase activity* (μmol BAEE hydrolyzed per min per mg protein)
		for guinea pigs	for rats	
Mice				
ICR	♂	24.1	41.2	147.9±10.9
	♀	78.6	128.9	45.4± 5.8
C3H	♂	32.6	59.8	121.5± 3.1
	♀	>200	>400	17.9± 0.6
BALB/c	♂	22.6	37.4	215.3± 6.1
	♀	>400	>800	7.8± 1.5
C57BL	♂	24.9	43.3	161.9±18.0
	♀	>400	>800	5.5± 0.8
ddN	♂	38.2	58.9	128.0±16.1
	♀	>400	>800	5.9± 1.7
Rats	♂	>200	>200	18.9± 2.4
Hamsters	♂	>800	>800	5.0± 0.4
Guinea pigs	♂	>2000	>2000	0.2

*; Mean ± S. E. of 6-8 animals.

の顎下腺抽出液には毒性はほとんど認められなかった。

考 察

一般に顎下腺は外分泌腺であると考えられている。雄マウスの顎下腺中に多量に存在する NGF, EGF および estero-protease も外分泌タンパク質であることが明らかにされている²³⁻²⁶⁾。従って、マウス顎下腺の性差の意義を考察するには、まず、顎下腺唾液の生理学的役割を明らかにする必要があると思われる。

本研究から、雄マウスの顎下腺唾液は比較的高い毒性を持つことが明らかとなった。また、その毒性物質の本質は kallikrein 様のタンパク分解酵素であることが示唆された。本研究では phenylephrine 刺激唾液を使用した。正常雄マウスの唾液中にも軽度ではあるが、毒性活性が認められた(昼間よりも夜間に分泌が多く、夜間採取唾液は phenylephrine 刺激唾液の約 $1/10$ の毒性活性を持つ)。また、顎下腺中の毒性物質は雄マウスの系統間で共通に認められ、雌マウスではその量は極めて低かった。ラット、モルモットおよびハムスターの顎下腺抽出液には毒性はほとんど認められなかった。

予試験での結果、唾液中の BAEE 水解活性は phenylephrine と norepinephrine 投与で著しく上昇し、 α -blocker である phentolamine と phenoxylbenzamine の前処置でその上昇が完全に block されることから、顎下腺中の毒性物質は α -receptor を介して唾液中に分泌されることが示唆された。マウス顎下腺中の NGF や EGF も α -receptor の刺激を介して唾液中に分泌されることが知られているが²³⁻²⁵⁾、それらの生理学的意義については未だ明らかにされていない。

マウス顎下腺の機能として、単なる消化作用以外に抗菌作用、情報伝達、生殖との関係などが考えられるが、これらの点を説明した報告はなされていない。

本研究で、phenylephrine 刺激唾液の毒性がマウスに対してよりも他の動物に対して強く現われたことは興味深い。この点を説明するには次の3つの可能性が考えられる。1) マウスは kallikrein

に対する基質 (kininogen) の量が低いこと、2) 遊離する kinin に対する感受性が低いこと、3) kallikrein に対する inhibitor が存在すること。

また、生理学的に考察した場合、マウスの顎下腺唾液は異種の動物(あるいは他の生物)に対し防禦的作用を持つ可能性が示唆される。マウスは一般に雌に比べ雄がはるかに闘争的であることはよく知られている。

食虫類では古くから顎下腺が毒腺としての働きを持つことが知られており、一部の種属では、その毒性は多量のタンパク分解酵素によると考えられている^{27,28)}。雄マウスの顎下腺中には estero-protease や renin などの androgen 依存性のタンパク分解酵素が多量に存在し、また、NGF と EGF も、 γ subunit と EGF-binding protein としてタンパク分解活性を持つことが確かめられている^{29,30)}。蛇毒中に高濃度で NGF が存在することも興味ある点である^{31,32)}。今後マウスの顎下腺の機能を行動面と関連させて考察したい。

文 献

- 1) LACASSAGNE, A.: Dimorphisme sexuel de la glands sousmaxillarie chez la souris. *C. R. Soc. Biol.*, 133 : 180-181, 1940.
- 2) JUNQUEIRA, L. C., FAJER, A., RABINOVITCH, M. and FRANKENTHAL, L.: Biochemical and histochemical observations on sexual dimorphism of mice. *J. Cell Comp. Physiol.*, 34 : 129-158, 1949.
- 3) HOSOI, K. and UEHA, T.: Effect of sex hormones on synthesis of proteins contained in granules present in convoluted tubular cells of mouse submandibular glands. *J. Biochem.*, 82 : 351-358, 1977.
- 4) ANGELETTI, R. A. and BRADSHAW, R. A.: Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: Amino acid sequence. *Pros. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 68 : 2417-2420, 1971.
- 5) COHEN, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237 : 1555-1562, 1962.
- 6) ANGELETTI, R. A., ANGELETTI, P. U. and CALISSANO, P.: Testosterone induction of estero-proteolytic activity in the mouse submaxillary gland. *Biochim. Biophys. Acta.*, 139 : 372-381, 1967.

- 7) OLIVER, W. J. and GROSS, F.: Effect of testosterone and duct ligation on submaxillary renin-like principle. *Am. J. Physiol.*, **213** : 341-346, 1967.
- 8) SCHWAB, M. E., STÖCKEL, K. and THOENEN, H.: Immunocytochemical localization of nerve growth factor (NGF) in the submandibular gland of adult mice by light and electron microscopy. *Cell. Tiss. Res.*, **169** : 289-299, 1976.
- 9) GRESIK, E. and BARKA, T.: Immunocytochemical localization of epidermal growth factor in mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.*, **25** : 1027-1035, 1977.
- 10) PASQUINI, F., PETRIS, A., SBARAGLIA, G., SCOPELLITI, G., CENCI, G. and FRATI, F.: Biological activities in the granules isolated from the mouse submaxillary gland. *Exp. Cell Res.*, **86** : 233-236, 1974.
- 11) HOSOI, K., KOBAYASHI, S., HIRAMATSU, M., MINAMI, N. and UEHA, T.: Androgenic regulation of N-acetyl β -glucosaminidase activity in the submandibular glands of mice. *J. Biochem.*, **85** : 1483-1488, 1979.
- 12) NAKAMURA, T., FUJII, M., KAIHO, M. and KUMEGAWA, M.: Sex difference in glucos-6-phosphate dehydrogenase activity in the submandibular gland of mice. *Biochim. Biophys. Acta.*, **362** : 110-120, 1974.
- 13) LIUZZI, A. and ANGELETTI, P. U.: Studies on the toxic effects of mouse submaxillary gland extracts. *Experientia.*, **24** : 1034-1035, 1968.
- 14) HOSHINO, K. and LIN, C. D.: Transplantability of salivary glands of mice and its lethal effect on the hosts. *Anat. Rec.*, **160** : 474-475, 1968.
- 15) LIN, C. D. and HOSHINO, K.: Testosterone dependency of the lethal factor in mouse submandibular gland isografts. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **47** : 335-338, 1969.
- 16) LITCHFIELD, J. T. and WILCOXON, F.: A simplified method of evaluation dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **96** : 99-113, 1949.
- 17) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. and RANDALL, R. J.: Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193** : 265-275, 1951.
- 18) VESTERBERG, O. and SVENSON, H.: Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. *Acta Chem. Scand.*, **20** : 820-834, 1966.
- 19) NUSTAD, K., PIERCE, J. V. and VAAJE, K.: Synthesis of kallikrein by rat kidney slices. *Br. J. Pharmac.*, **53** : 229-234, 1975.
- 20) NUSTAD, K. and PIERCE, J. V.: Purification of rat urinary kallikreins and their specific antibody. *Biochemistry.*, **13** : 2312-2319, 1974.
- 21) BHOOLA, K. D., DOREY, G. and JONES, C. W.: The influence of androgens on enzymes (chymotrypsin and trypsin-like proteases, renin, kallikrein and amylase) and on cellular structure of the mouse submaxillary gland. *J. Physiol.*, **235** : 502-522, 1973.
- 22) DAVIS, B. J.: Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **121** : 404-427, 1964.
- 23) BYYNY, R. L., ORTH, D. N., COHEN, S. and DOYNE, E. S.: Epidermal growth factor: effect of androgens and adrenergic agents. *Endocrinology.*, **95** : 776-782, 1974.
- 24) WALLACE, L. J. and PARTLOW, L. M.: α -Adrenergic regulation of secretion of mouse saliva rich in nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **73** : 4210-4214, 1976.
- 25) BURTON, L. E., WILSON, W. H. and SHOOTER, E. M.: Nerve growth factor in mouse saliva. Rapid isolation procedures for and characterization of 7s nerve growth factor. *J. Biol. Chem.*, **253** : 7807-7812, 1978.
- 26) JUNQUEIRA, L. C.: Salivary glands and their secretions (edited by Sreebny, L. M. and Meyer, J.) p. 105-118, Pergamon Press, New York, 1964.
- 27) PEARSON, O. P.: On the cause and nature of a poisonous action produced by the bite of a shrew (*Blarina brevicauda*). *J. Mammal.*, **23** : 159-166, 1942.
- 28) PEARSON, O. P.: The submaxillary glands of shrews. *Anat. Rec.*, **107** : 161-167, 1950.
- 29) SERVER, A. C. and SHOOTER, E. M.: Comparison of the arginine esteropeptidases associated with the nerve and epidermal growth factors. *J. Biol. Chem.*, **251** : 165-173, 1976.
- 30) TAYLOR, J. M., MITCHELL, W. M. and COHEN, S.: Characterization of the binding protein for epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.*, **249** : 2188-2194, 1974.
- 31) PEARCE, F. L., BANKS, B. E., BANTHORPE, D. V., BERRY, A. R., DAVIES, H. S. and VERNON, C. A.: The isolation and characterization of nerve-growth factor from the venom of *Vipera russelli*. *Eur. J. Biochem.*,

29 : 417-425, 1972.

- 32) HOGUE-ANGELETTI, R. A., FRAZIER, W. A., JACOBS, J. W., NIALI, H. D. and BRADSHAW, R. A.: Purification, characte-

rization, and partial amino acid sequence of nerve growth factor from cobra venom. *Biochemistry.*, 15 : 26-34, 1976.