雌雄ラット耳下腺のメトキサミンおよびピロカルピン刺激 唾液成分の加齢的变化について

福岡歯科大学歯科補綴学第一講座 (指導: 羽生哲也教授)

福岡歯科大学口腔生化学講座 (指導: 阿部公生教授)

稲 永 昭 彦

昭和62年4月25日受付

Developmental Changes of the Composition in Parotid Saliva of Male and Female Rats in Response to Methoxamine and Pilocarpine

Akihiko Inanaga

The First Department of Prosthodontics (Director: Prof. Tetsuya Habu)

Department of Oral Biochemistry (Director: Prof. Kimio Abe)

Fukuoka Dental College, Fukuoka, 814-01, Japan

Saliva secreted in response to α_1 -adrenergic and cholinergic receptor agonists such as methoxamine (Methox), α -methylnoradrenaline, and pilocarpine (Pilo) was collected from the cannulated ducts of parotid glands of both male and female rats from 4 to 10 weeks and 3.5, 8, and 15 months of age. It was analyzed for volume, for the concentrations of protein, potassium, calcium, inorganic phosphate, and amino acid residues, and for the types of proteins, amylase activity and isozymes. After the collection of saliva, the parotid glands were carefully removed and weighed.

The wet weights of the glands increased substantially up to 8 weeks of age and then reached almost plateau values and finally tended to decrease at 15 months of age in both sexes. The salivary volumes secreted in response to Methox and Pilo were positively correlated with the parotid gland weights in both sexes. The concentrations of protein, potassium, and inorganic phosphate were inversely related to the salivary flow rates only at relatively low rates of flow in contrast that the amylase activity was positively correlated with the concentration of protein independent of the nature of the stimulus, age, and sex. In the α_1 -adrenoceptor stimulation, the amylase activity was positively correlated with the concentration of calcium independent of age and sex.

The types of protein, amino acid residues, and amylase isozymes did not show a great deal of differences at least qualitatively independent of the nature of the stimulus, age, and sex from 4 weeks up to 15 months of age. However, in parotid saliva of several rats at 8 and 15 months of age, the abnormal proteins were electrophoretically observed independent of the nature of the stimulus and sex. The relatively low molecular proteins in parotid saliva were selectively adhered to the resin plate regardless of the types of plate without polishing procedures in only dry states.

Thus, it was conclusively elucidated that the secretory function of both α_1 -adrenergic and cholinergic receptors in the parotid glands of rats was complete at early stages and intact up to 15 months of age although some exceptions were observed in the protein secretion at elderly stages.

Key words : *Rat parotid saliva / Aging / Types of proteins / Electrolyte / Amylase / Resin plate*

緒 言

唾液腺は、腺房部、導管部、血管、自律神経、感覚神経、筋上皮細胞および結合織性の間質などで構成されている複雑な組織である。ラット耳下腺の分化増殖と分泌機能の開始は顎下腺や舌下腺より遅れて始まるが、成熟化は顎下腺より早く、出生後25日前後ではほぼ完成することが確認されている¹⁻¹³⁾。また幼若ラットを用いて、耳下腺内のアミラーゼ¹¹⁾や耳下腺スライスの cAMP 量の変化やアミラーゼ分泌¹⁴⁾を測定したり、耳下腺外導管を切断し、流出する唾液のナトリウムとカリウム量を測定して、再吸収機能や自律神経系の完成時期^{8,9)}を、あるいは微小穿刺法を用いて再吸収機能やタンパク質とアミラーゼの分泌¹⁵⁾を観察した報告もみられるが、導管切断で流出した、あるいは微小穿刺法で採取した唾液には組織液の混入が考えられる。

一方、成熟ラット耳下腺唾液の性状に関する報告¹⁶⁻²³⁾には、中高年齢ラットの耳下腺唾液の性状に関する報告はほとんどみられない。耳下腺や顎下腺組織では、中高年齢化に伴い脂肪化、結合織化、リンパ球やリンパ組織の蓄積化、あるいは腫瘍化などが生じるという報告^{24,25)}や中高年齢化に伴い腺内のアミラーゼやタンパク質の合成が低下、特に分泌性タンパク質の合成能力が加齢に伴い変化するという報告²⁸⁻³¹⁾がある。これに対し、中高年齢になっても耳下腺の交感神経性 β -受容体の機能や数は変化しないという報告^{13,26)}もある。しかし分泌された唾液タンパク質からこれらのことを証明した報告はみられない。さらに耳下腺の交感神経性 α -受容体の生理機能は、 β -あるいはムスカリン性受容体の場合と異なり、中高年齢になると変化すると報告³²⁻³⁴⁾されているが、このことが耳下腺の唾液性状にどんな影響を与えるかについての報告はみられない。ラット耳下腺の加齢に伴う性差に関する報告も腺内のアミラーゼ³⁵⁾、細胞周期³⁶⁾および刺激の頻度と分泌唾液量との関係³⁷⁾などに関する報告をみるだけである。

本実験では幼若時から中年齢に至る雌雄ラットから交

感神経性 α_1 -受容体刺激薬であるメトキサミンと副交感神経性受容体刺激薬であるピロカルピンを用いて純粋な耳下腺唾液を採取し、その唾液中の主要パラメータを測定することにより、これら受容体の分泌機能の加齢に伴う変化を明らかにしようとした。このほかに義歯床用レジジンに付着する耳下腺唾液タンパク質の分析も行った。

実験材料ならびに方法

I. 実験動物

4～8の各週齢、10週齢、3.5月齢、8月齢および15月齢の Sprague-Dawley 系ラットで、体重の近似する9～15例ずつをそれぞれ1群として使用した。固型飼料（オリエンタル酵母，MF，東京）と水道水を自由に与え、3.5週齢までは親と同居させた。飼育室は日内リズムの影響をなくすために12時間の明暗周期とし、消灯は午後6時に行った。各週および各月齢に達したラットは遅くとも1～2日後には実験に用いた。ただし、ピロカルピン塩酸塩（半井，京都，以下，Pilo と略記，8 mg/体重 kg）刺激の4週齢の雌では、2日後でも唾液採取ができなかったため、4日後に採取した。唾液採取日には午前9時から午後5時まで絶食させ、水道水だけを与えた。

II. 分泌刺激薬および遮断薬

交感神経性 α_1 -受容体 (Re と略記) 刺激薬にはメトキサミン塩酸塩（メキサミン注射液，日本新薬，京都，Methox と略記，6 mg/kg）および α -メチルノルアドレナリン塩酸塩（Regis, U.S.A., α -mNA と略記，20mg/kg）を用いた。副交感神経性 Re の刺激薬として Pilo を用いた。このほかに8月齢ラットの耳下腺唾液のタンパク質成分の刺激差を比較観察するために、Table 1 に示した各種 Re 刺激薬を用いた。また、4週齢から15月齢に至るラット耳下腺の唾液分泌の抑制実験から、交感神経性 α_1 -および副交感神経性 Re の機能変化を観察するために、各種の Re 遮断薬を用いた (Table 1)。なお、各刺激薬および遮断薬は規定の用量を腹腔内に1回投与したが、遮断薬は刺激薬投与

Table 1 The different types of the autonomic agonists and antagonists

Agonist and antagonist	Dose (mg/kg)	Selectivity	Company (Location)
1. Isoproterenol	30	Non-selective β -receptor	Nakarai (Kyoto)
2. Terbutaline	8	β_2 -receptor	Fujisawa (Osaka)
3. Clonidine	5	α_2 -receptor	Tokyokasei (Tokyo)
4. Phenoxybenzamine	25	α_1 -and α_2 -receptor	Tokyokasei (Tokyo)
5. Phentolamine	25	α_1 -and α_2 -receptor	Cibagaigy (Hyogo)
6. Dihydroergotamine	25	α_1 -and α_2 -receptor	Tokyokasei (Tokyo)
7. Atropine	1	Nicotinic receptor	Merck (Germany)
8. Propranolol	10	Non-selective β -receptor	Sumitomokagaku (Osaka)

1—3, Agonist ; 4—8, Antagonist.

の15～30分前に投与した。

Ⅲ. 耳下腺唾液の採取

体重測定後、ラット腹腔内にペントバルビタールナトリウム塩 (Nembutal, Abbott 社, U.S.A., 50mg/kg) を注射して麻酔したのち、セロテープでラットの四肢を板に張り付けて仰臥位に固定した。ついで唾液採取中の呼吸困難を防止するためにラットに気管切開を施した。

耳下腺唾液の採取は、Abe ら (1975)¹⁶⁾ の報告に従い、耳下腺外導管開口部に細いポリエチレンチューブ (PE 10, Clay Adams 社, U.S.A.) を挿入 (Fig. 1) し、各種の刺激条件下に分泌する唾液を採取した。分泌唾液量は、15分間の採取唾液を重量既知の小試験管内に集め、比重1.00とみなして秤量によって決定した。

Ⅳ. 腺湿重量の測定

唾液採取の終了後、両側耳下腺部を開き、脂肪組織と外導管部を取り除いた。つぎに両側の腺体を摘出し、ただちに腺湿重量を測定した。

Ⅴ. 唾液成分の分析

A. 総タンパク質量の測定

総タンパク質量の測定は、Lowry ら (1951)⁴³⁾ の方法を一部改変した Dawes (1965)⁴⁴⁾ の方法を用い、標準タンパク質には、唾液タンパク質に最も近似した定量値が得られるカゼイン (Hammarsten, Merck, Germany) を使用した。

B. アミラーゼ活性の測定

アミラーゼ活性はブルーデキストランを用いるアミラーゼ活性試験法 (1971)⁴⁵⁾ によって測定した。

C. カリウム、カルシウムおよび無機リン酸濃度の測定

唾液中のカリウムとカルシウムは Dawes (1967)⁴⁶⁾,

Fig. 1 The photograph of a rat collecting parotid saliva with thin polyethylene tubes (PE-10) from both parotid gland ducts

1969⁴⁷⁾ の方法に従い、原子吸光分光光度計を用いて定量した。無機リン酸濃度は Chen ら (1956)⁴⁸⁾ の方法で測定した。

D. 各種電気泳動法

電気泳動用の各タンパク質試料は、カルシウム結合性タンパク質の沈殿を防止するために⁴⁹⁾ 1 Mの $\text{Na}_3\text{-EDTA}$ (pH 8.6) を加え、 -80°C で凍結保存した。これを、蒸留水で24時間透析したのち、凍結乾燥粉末にした。必要に応じて、一定のタンパク質濃度に再溶

解したのち、各種の電気泳動およびアミノ酸分析の試料とした。

電気泳動法は以下の方法を用いた。すなわち塩基性と酸性の7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いる

Kapitany ら (1973)⁵⁰⁾の方法および Phast system (Pharmacia, Sweden) の Native (Gradient ゲル10~15%), SDS (Gradient ゲル10~15%) および pH 3~5 と 3~9 の pH 勾配の等電点 (IEF) 電気泳動法である。

アミラーゼのアイソザイムの検出は Murata ら (1986)⁵¹⁾の報告に準じ、Phast system の pH 3~5 の等電点電気泳動法で各アイソザイムを分離したのち、アミラーゼ活性染色を行った。なお、試料のタンパク質量は、Kapitany ら (1973)⁵⁰⁾の方法では150 μ g/カラムであったが、Phast system では1 μ g/レーンを用いた。

E. ゲルの染色

Kapitany ら (1973)⁵⁰⁾の酸性および塩基性ゲルの染色には Abe ら (1978)¹⁷⁾の報告に従い、Wool fast blue と Fast green を用いた。Phast system では、銀染色を行った。

F. アミノ酸分析

前述の方法で調製した、24時間透析後の凍結乾燥粉末2mgを2.0mlの6N HClに溶解したのち、加水分解時間の影響をなくすために各試料ごとに24, 48および72時間の加水分解を行い、これら3つの試料の結果からそれぞれの平均値を求めた。加水分解は脱酸素後、約115°Cで行った。その後、50°CでHClを完全に蒸発させたのち、2mlの0.001N HClで再溶解させたものをアミノ酸分析用試料とした。アミノ酸分析は、Amino acid analyzer (LKB, 4151, Sweden)を用いた。

G. 唾液タンパク質付着実験用レジン試験片の作製

レジン試験片には、加熱重合型の Acron (G-C) および流し込み型の Palapress (Kulzer)を用いた。

前述の各レジン片は、一片14.0mmの正方形で、厚さは1.5mmである。試験片の片面は、レジン床の研磨面を想定して鏡面仕上げにしているのに対し、反対面は臨床に即して石膏面から分割したままで、両面とも一切研磨操作を加えていない。しかし側面だけは耐水ペーパーの#600で一層だけ研磨した。

H. レジン試験片に付着したタンパク質の同定

8月齢の雄ラットから Pilo 刺激唾液を400 μ l採取し、蒸留水を加え1mlに希釈した中に2種類のレジン試験片を1片ずつ浸漬した。続いて浸漬液を37°Cの孵卵器

内で乾燥しないように密封して1週間保存するか、1週間かけて徐々に乾燥させた。この結果、前実験ではレジン試験片に付着するタンパク質が、極く微量であったが、後の実験ではタンパク質が付着したので、この方法を採用した。前述のラットから唾液を2ml採取し、蒸留水で5mlに希釈して2種類のレジン試験片を15片ずつ浸漬した。小歯ブラシで剥離し、蒸留水に溶かし込んだ付着タンパク質を24時間透析し、凍結乾燥粉末にして Phast system の Native (Gradient ゲル10~15%) 電気泳動法でタンパク質成分の分析を行った。

成 績

I. ラットの体重、耳下腺の湿重量および唾液分泌特性の加齢的变化と性差

A. 体重および腺湿重量の加齢的变化と性差

ラットの加齢による体重ならびに腺湿重量の変動を Fig. 2 に示す。体重は、4週齢では性差が認められな

Fig. 2 Changes of body weight and weights of the parotid glands of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age

- , Body weight of male rats ;
- , One of female rats ;
- , Gland wet weights of male rats ;
- , Ones of female rats.

かったが、5週齢から雄の体重増加が顕著で10週齢で雌の約1.7倍、3.5月齢で約1.6倍、15月齢で約1.8倍であった。

腺湿重量は、5週齢まで性差はなかったが6週齢から明瞭な性差が認められた (Fig. 2)。雄では5~8週

齢まで腺湿重量が急増し、8週齢から3.5月齢までは漸増した。しかし雌雄とも15月齢では耳下腺の腺湿重量は減少し、6週齢の値まで減少した。雌では雄と類似の増加傾向を示したが、増加率は非常に少なかった。

B. Methox および Pilo 刺激に対する分泌応答の加齢的变化と性差

4～8の各週齢、10週齢、3.5と15月齢の雌雄ラットに Methox と Pilo を投与して、分泌機能の加齢的变化と性差を検索した結果を Figs. 3～9 および Table 2 に示した。

a. 分泌唾液量と分泌速度の変動

分泌唾液量 (Fig. 3) は採取時間15分の唾液量 (μ l) を示し、また分泌速度は単位腺湿重量当たり1分間の分泌量 (nl/mg 腺湿重量/min) を測定した。

Methox 刺激の分泌唾液量は、雄では、分泌開始の4週齢から3.5月齢にかけて漸増し、3.5月齢で最高値を示した。15月齢になると顕著に減少し、4週齢の値より低くなった。雌では5週齢で最高値を示したのち加齢とともに漸減し、15月齢では同月齢の雄の値に近似した。Pilo 刺激の場合では、雄は7週齢まで増加したが、これ以降は15月齢まで plateau を形成した。雌は10週齢まで漸増し、その後は15月齢まで plateau を形成した。また、分泌唾液量の有意な加齢差および性差は Pilo 刺激の場合にのみ認められた (Table 2)。

腺湿重量と分泌唾液量の相関を Fig. 4 に示す。両者は刺激の種類、年齢および性別に関係なく、 $Y=0.8x-25.0$ ($r=0.583$, $P<0.01$) の順相関を示した。

Fig. 3 Changes of the salivary volume secreted by the parotid glands of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to methoxamine and pilocarpine

●, Methoxamine-stimulated parotid saliva of male rats ;

○, Methoxamine-stimulated parotid saliva of female rats ;

■, Pilocarpine-stimulated parotid saliva of male rats ;

□, Pilocarpine-stimulated parotid saliva of female rats ;

All symbols are also applicable to Figs. 4—18.

Table 2 Two way analyses of variances of age and sex effects on the developmental changes of several parameters in parotid saliva of rats

Factor	In methoxamine-stimulated saliva		In pilocarpine-stimulated saliva	
	A	B	A	B
Vol. of saliva	N.S.	N.S.	$P<0.01$	$P<0.01$
Salivary flow rate	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Protein concentration	N.S.	N.S.	N.S.	$P<0.01$
Protein secreted (mg/h)	$P<0.05$	$P<0.05$	$P<0.01$	$P<0.05$
(μ g/mg/h)	$P<0.05$	N.S.	$P<0.05$	$P<0.01$
Amylase activity	N.S.	N.S.	N.S.	$P<0.01$
Potassium concentration	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Calcium concentration	N.S.	N.S.	N.S.	$P<0.05$
Inorg. P. concentration	N.S.	$P<0.05$	N.S.	N.S.

Factor A and B denote age and sex differences respectively by ANOVA

Fig. 4 Relationships between volume of saliva secreted and the weights of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine. Numbers in figures (4, 7, 11, 12, 14, 16, and 18) denote the weeks and months (3.5 M and 15M) of age.

唾液の分泌速度の変化 (Fig. 5) は, Methox および Pilo による両刺激の雌では分泌量変化と類似した。しかし, 両刺激の雄は, 6 週齢では分泌量の増加とは逆に, 速度が遅くなる傾向を示した。この時期は腺湿重量が急増した時期である。また, 両刺激唾液の分泌速度には統計的に有意な加齢差および性差は認められなかった (Table 2)。

Fig. 5 Changes of the salivary flow rates secreted by the parotid glands of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

b. タンパク質濃度と分泌タンパク質量の変動

タンパク質濃度 (Fig. 6) は, Methox 刺激の雌雄および Pilo 刺激の雄はともに類似の推移を示し加齢とともに漸増し, 15月齢で最高値を示した。しかし Pilo 刺激の雌は10週齢まで変動が大きかった。また, Pilo 刺激の場合には, 各年齢とも雌のほうが有意に高い値を示した (Table 2)。

唾液分泌速度とタンパク質濃度の相関を Fig. 7 に示す。刺激の種類, 年齢および性別を考えず, Pilo 刺激の雌を除いた場合の回帰直線は, $Y = 0.05x - 1.4$ ($r = 0.812$, $P < 0.001$) を示した。Methox 刺激の雌雄だけを

Fig. 6 Changes of protein concentration in parotid saliva of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age elicited by both stimuli

Fig. 7 Relationships between protein concentration and flow rate of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

併せた場合の相関は、 $Y = -0.01x + 0.7$ ($r = -0.579$, $P < 0.03$) の逆相関を示し、Pilo 刺激の雄は $Y = 0.04x - 0.5$ ($r = 0.692$, $P < 0.07$) と順相関の傾向を示したが、雌はほとんど相関しなかった。

mg/h で表示した分泌タンパク質量 (Fig. 8) の比較ではいずれの場合も加齢により増加した。単位腺湿重量当たりの分泌タンパク質量 ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$, Fig. 9) も、mg/h の結果と同様の傾向を示した。両表示 (mg/h および $\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$) の分泌タンパク質量には、Methox 刺激の分泌タンパク質量 ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$) に性差が認めら

Fig. 8 Changes of the amounts (mg/h) of protein secreted by the parotid gland of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

Fig. 9 Changes of the amounts ($\mu\text{g}/\text{mg}/\text{h}$) of protein secreted by the parotid gland of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

れなかったことを除けば、そのほかはいずれも加齢差および性差が認められた (Table 2)。

c. アミラーゼ活性の変動

アミラーゼ活性の加齢的变化を Fig. 10 に示す。アミラーゼ活性は Figs. 11, 12, 16 も同様に対数値で示している。両刺激の雄は、ともに類似の加齢的变化を示した。5～7週齢にアミラーゼ活性が低下したが、その後の年齢ではほぼ plateau を形成した。Pilo 刺激の雌では、加齢によるアミラーゼ活性の変動はほとんど認められなかったが、Methox 刺激の場合には 7, 8 および 10 週齢でアミラーゼ活性が低下した。また Pilo 刺激の場合だけに統計的に有意な性差が認められた (Table 2)。

Fig. 10 Changes of amylase activity expressed logarithmically in parotid saliva of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

腺湿重量とアミラーゼ活性の相関を Fig. 11 に示す。Methox 刺激の雄は順相関の傾向 ($r = 0.692$, $P < 0.07$) を示したのに対し、雌および Pilo 刺激の雌雄はいずれも有意な相関を示さなかった。また、アミラーゼ活性と分泌速度の相関図は Fig. 7 に類似していた (Fig. 省略)。タンパク質濃度とアミラーゼ活性の相関を Fig. 12 に示す。刺激の種類、年齢、性別を考えず、全被験年齢の相関 (Fig. 12) を検討したところ、 $Y = 0.4x + 5.4$ ($r = 0.849$, $P < 0.001$) で有意に高い順相関を示した。しかし、各刺激の雌雄個別の相関には有意差は得られな

Fig. 11 Relationships between amylase activity expressed logarithmically and the weights of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

Fig. 12 Relationships between amylase activity expressed logarithmically and protein concentration of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

かった。

d. カリウム (K)

K濃度の加齢的变化を Fig. 13 に示す。Methox 刺激の雄は各年齢ごとに変動の激しいことが認められた。Pilo 刺激の雄は 4～5 週齢にかけて 63.8% 減少したのち、15 月齢までわずかに増加した。15 月齢では 10 週齢の

Fig. 13 Changes of the concentration of potassium in parotid saliva of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

値に比較して 36.1% 増加した。両刺激の雌は 8 週齢まで類似した変動を示したが、10 週齢以降では Methox 刺激は増加傾向、Pilo 刺激は減少傾向を示した。また統計的に有意な加齢差および性差は得られなかった (Table 2)。

唾液分泌速度と K 濃度の相関を Fig. 14 に示す。刺激の種類、年齢および性別を考えない場合の相関関係は、 $Y = -0.5x + 54.2$ ($r = -0.837$, $P < 0.001$) で、有意な逆相関を示した。しかし各刺激を個別に検討した場合、Methox 刺激の雄は $Y = -0.7x + 63.1$ ($r = -0.828$, $P < 0.03$) と有意な逆相関を示したが、雌では有意な相

Fig. 14 Relationships between potassium concentration and flow rate of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

関 ($r=0.630$, $P<0.10$) は得られなかった. Pilo 刺激の雄も有意な相関は認められなかったが, 雌は $Y=-0.3x+47.9$ ($r=-0.971$, $P<0.02$) で有意な逆相関を示した.

e. カルシウム (Ca)

Ca 濃度の加齢的变化を Fig. 15 に示す. Methox 刺激の雄と Pilo 刺激の雌および Methox 刺激の雌と Pilo 刺激の雄は, 類似の加齢的变化を示した. すなわち, 前者群では5週齢で一度減少後に7~8週齢まで増量したが, その後に減少し, その減少した値でほぼ plateau を形成した. 後者群では10週齢まで漸減後に15月齢まで漸増した. しかし, Ca 濃度には両刺激とも, 統計的に有意な加齢差は認められなかったが, Pilo 刺激の場合には性差が認められた (Table 2).

Fig. 15 Changes of the concentration of calcium in parotid saliva of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

Ca 濃度とアミラーゼ活性の相関を Fig. 16 に示す. 両者の相関は Methox 刺激では極めて高かった. すなわち, Methox 刺激では, 雄は $Y=0.6x+4.0$ ($r=0.749$, $P<0.05$) を示し, 雌は $Y=2.1x-0.6$ ($r=0.928$, $P<0.02$) を示した. しかし Pilo 刺激の雌雄には有意な相関は認められなかった.

f. 無機リン酸 (Pi)

Pi 濃度の加齢的变化を Fig. 17 に示す. Methox 刺激の雄では10週齢までに増加がほぼ終了するが, 雌は3.5月齢以降も増加傾向が続き, 15月齢の値は10週齢に比較して50.0%増加した. しかし, Pilo 刺激の雌雄にのみ特異的な動きが認められた. すなわち5~6週齢まで

Fig. 16 Relationships between amylase activity expressed logarithmically and calcium concentration of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

Fig. 17 Changes of the concentration of inorganic phosphate in parotid saliva of male and female rats from 4 weeks to 15 months of age in response to both stimuli

急激に減少するが, 6週齢から15月齢まではほとんど変化がなく, 幼若時に高い Pi 濃度を示した. 雄の場合には, 6週齢を除くと, 10週齢まで漸減し, その後15月齢まで増加した. しかし, 両刺激とも, 統計的に有意な加齢差は認められなかったが, Methox 刺激にのみ性差が認められた (Table 2).

唾液分泌速度と Pi 濃度の相関を Fig. 18 に示す.

刺激の種類, 年齢および性別を考えず, 分泌速度が $65\text{nl}/\text{mg}/\text{min}$ 以下の相関関係は $Y = -0.02x - 2.6$ ($r = -0.542$, $P < 0.01$) となり有意な逆相関を示した. しかし, 分泌速度が $65\text{nl}/\text{mg}/\text{min}$ 以上では $Y = 0.02x - 0.7$ ($r = 0.735$, $P < 0.05$) となり Pi 濃度は分泌速度に有意な順相関を示した. しかし, 両刺激とも雌雄を別々に検討した場合には, 有意な相関関係は得られなかった.

Fig. 18 Relationships between inorganic phosphate concentration and flow rate of the parotid glands of male and female rats in response to methoxamine and pilocarpine

Ⅱ. 唾液のタンパク質成分, アミラーゼアイソザイムパターン, およびアミノ酸組成の加齢的变化, 性差および刺激差

A. 唾液のタンパク質成分の変化

Methox および **Pilo** 刺激耳下腺唾液のタンパク質成分の加齢差, 性差および刺激差を, 各種の電気泳動法を用いて検索した. タンパク質成分は代表例を Figs. 19~22に示した. 低い pH 域の IEF 像 (Fig. 21) に個体差が認められた以外は, 顕著な加齢差, 性差および刺激差は観察できなかった. また, 各種の **Re** 刺激薬すなわち, 交感神経性 β_1 -, β_2 -, α_1 -および α_2 -**Re**, あるいは副交感神経性 **Re** 刺激薬をそれぞれ用いて 8 月齢ラット耳下腺唾液のタンパク質成分の変化を検討した. **SDS**, **Native** および **IEF** 像を Fig. 23 に示した. どんな電気泳動法を用いて検討してみても, 用いた各 **Re** 刺激薬の種類に関係なく, 分泌するタンパク質成分には顕著な相違は出現しなかった. しかしながら, ラットが 8 および 15 月齢の中年齢になると, Fig. 24 に示すように, 性別や刺激の種類に関係なく, 個体により老化の兆候と思われる特徴的なタンパク質が認められるよう

Fig. 19 Anionic polyacrylamide disc gel (7.5%) electrophoresis of male rat parotid saliva elicited by pilocarpine from 4 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D), 8 (E), and 10 (F) weeks of age

Results obtained from both male and female rats in response to methoxamine were very similar and were therefore unshown. These results are also applicable to Figs. 20, 21, and 22.

になった. しかしこれらの特徴は, **SDS** 電気泳動法では認められなかった.

B. アミラーゼアイソザイムパターンの変化

IEF (pH 3~5) を用いてアミラーゼアイソザイムパターンを検討したのが, Fig. 25 である. 本実験の **Methox** および **Pilo** 刺激唾液には pH 4.23, 4.58, 4.71 および 4.86 の等電点をもつ 4 種のアイソザイムが検出できた. これらのアイソザイムにも, タンパク質成分の場合と同様に, 加齢差および刺激差はほとんど認められなかった.

C. アミノ酸組成の変化

アミノ酸組成の分析は **Methox** 刺激唾液の場合には, 各種のパラメータを測定後に残ったタンパク質が少量となりアミノ酸組成の分析ができなかった. 同様に交感神経性 α_1 -**Re** 刺激薬である α -**mNA** 刺激唾液と **Pilo** 刺激唾液のタンパク質のアミノ酸組成を検索した (Tables 3~5). 耳下腺唾液タンパク質のアミノ酸

Fig. 20 The electrophoretograms stained with silver of parotid saliva of male(1) and female(2) rats in response to pilocarpine from 4(A), 5(B), 6(C), 7(D), 8(E), and 10(F) weeks, and 3.5(G) and 15(H) months of age using native gradient(10—15) gels of the Phast system

Fig. 21 The electrophoretograms stained with silver of male(1) and female(2) rat parotid saliva in response to pilocarpine from 4(A), 5(B), 6(C), 7(D), 8(E), and 10(F) weeks, and 3.5(G) and 15(H) months of age using isoelectric focussing gradient (pH 3—5) gels of the Phast system
S ; Standard substance.

Fig. 22 The electrophoretograms stained with silver of male (1) and female (2) rat parotid saliva in response to pilocarpine from 4 (A), 5 (B), 6 (C), 7 (D), 8 (E), and 10 (F) weeks, and 3.5 (G) and 15 (H) months of age using SDS gradient (10—15) gels of the Phast system
S; Standard substance.

Fig. 23 The electrophoretograms stained with silver of male rat parotid saliva elicited by clonidine (A), methoxamine (B), pilocarpine (C), terbutaline (D), and isoproterenol (E) at 8 months of age using SDS gradient (10—15) gels (1), native gradient (10—15) gels (2), and isoelectric focussing gradient (pH 3—9) gels (3) of the Phast system
F and G denote standard substances for SDS and IEF electrophoreses, respectively.

Fig. 24 The electrophoretograms stained with silver of male(1) and female(2) rat parotid saliva at 3.5 (F), 8 (G), and 15 (H) months of age using native gradient(10—15) gel(1 and 2) and IEF(3), but not SDS gradient gel, electrophoreses in response to pilocarpine (1 and 3) and methoxamine (2) Arrows denote unusual proteins demonstrated in middle aged rats(G and H).

残基の特徴は 1) アスパラギン酸, プロリン, グリシン, グルタミン酸, ロイシンおよびバリン残基が高濃度であり, 2) セリン, アラニン, スレオニン, リジン, アルギニン, イソロイシンおよびフェニルアラニン残基が中程度を示し, 3) メチオニン, チロシンおよびヒスチジン残基が少量であった. また, シスチンは検出できなかった. 加齢差は, 雄ラットの α -mNA 刺激 (Table 3) ではグルタミン酸とプロリン残基に, Pilo 刺激 (Table 6) ではプロリンとバリン残基にしか認められなかった.

アミノ酸組成の性差は, Pilo 刺激の場合で検討 (Table 6) した. 性差はアスパラギン酸, スレオニン, グリシン, アラニン, バリンおよびチロシン残基に認められた.

Ⅲ. 義歯床への付着タンパク質について

耳下腺唾液のタンパク質成分が義歯床に付着するかどうかを, 2 種類のレジン試験片を用いて検討した. タンパク質成分は刺激の種類で影響を受けなかったことがわかったので, 8 月齢ラットの Pilo 刺激唾液を用いた. 37°C で 1 週間の浸漬保存ではレジンの種類に関係なく試験片に付着するタンパク質も極めて少量であった. また, 表面の鏡面仕上げ処理は, タンパク質付着に抑制的に働いた. 付着したタンパク質成分を分析するためには, 電気泳動で銀染色できるタンパク質量を採取しなければならなかった. 37°C で唾液を乾燥させた. この処理により, レジン床に付着するタンパク質が多くなった (Fig. 26).

この付着したタンパク質成分を検討したのが Fig. 27 である. 付着するタンパク質成分は比較的移動度の大きい成分であることがわかった.

Fig. 25 The electrophoretograms of amylase isozyme patterns (arrows) of male rat parotid saliva at 8 months of age in response to pilocarpine (B) and methoxamine (C) detected by the Blue Dextran method using the isoelectric focussing gradient (pH 3—5) gels of the Phast system. See the method in the text

A denotes standard substance and D electrophoretogram of proteins stained with silver of parotid saliva of male rats at 8 months of age in response to pilocarpine as controls. No sex difference of amylase isozyme patterns was observed and was therefore unshown.

Fig. 26 A photograph of pilocarpine-stimulated parotid salivary proteins adhered to the mucosal surface of the two types of resin plates, incubated at 37°C for 1 week up to dry states, and stained with Wool Fast Blue
A, Acron; B, Palapress.

Fig. 27 An electrophoretogram stained with silver of pilocarpine-stimulated parotid salivary proteins of male rats at 8 months of age adhered selectively to the resin plate using native gradient (10—15) gels of the Phast system

A denotes pilocarpine-stimulated saliva of male rats at 8 months of age as controls and B denotes proteins adhered selectively to resin plate (Acron).

Ⅳ. 自律神経系機能の加齢的变化について

自律神経性 Re 遮断薬と Methox あるいは Pilo とを組み合わせ、唾液分泌の有無から自律神経系の機能を検討した (Table 7). Methox 刺激の場合にはフェノキシベンザミン、フェントラミンおよびジヒドロエルゴタミンにより、Pilo 刺激ではアトロピンにより、全被験年齢ラットの唾液分泌が完全に抑制された。このことから、交感神経性 α_1 -Re および副交感神経性 Re の分泌機能は 4 週齢ですでに完成し、15 月齢に至るまで不変であることが示唆された。

Table 3 The effects of α -methylnoradrenaline on amino acid composition of male rat parotid saliva from 4~10 weeks to 3.5 months of age

Age (week and month)	4	5	6	7	8	10	3.5M	F-analysis
Lysine	4.0*	4.2	4.1	4.3	4.2	4.1	4.5	N.S.
Histidine	2.2	2.3	2.3	2.3	2.2	2.3	2.9	N.S.
Arginine	4.3	4.0	4.6	4.3	4.6	4.3	4.4	N.S.
Aspartic acid	12.6	12.8	12.7	13.2	13.2	12.5	13.0	N.S.
Threonine	4.3	4.5	4.5	4.5	4.8	4.4	4.8	N.S.
Serine	6.5	6.7	6.7	6.6	6.8	6.6	6.7	N.S.
Glutamic acid	10.1	11.3	9.4	9.9	9.2	9.2	8.9	P<0.05
Proline	12.7	12.8	11.2	11.0	9.9	11.8	11.9	P<0.01
Glycine	10.6	10.5	10.7	10.0	9.7	10.5	9.2	N.S.
Alanine	6.2	6.0	5.9	6.1	6.2	6.4	6.2	N.S.
Valine	7.9	7.2	8.1	8.3	7.9	8.2	7.0	N.S.
Methionine	0.3	0.3	0.5	0.4	0.4	0.5	0.7	N.S.
Isoleucine	3.6	3.5	3.6	3.9	4.2	3.5	3.4	N.S.
Leucine	9.6	9.1	9.7	9.6	10.6	9.9	10.0	N.S.
Tyrosine	1.3	1.1	2.1	1.6	2.1	1.8	2.3	N.S.
Phenylalanine	3.8	3.7	3.9	4.0	4.0	4.0	4.1	N.S.

*, Total amino acids are expressed as 100 residues.

These are also applicable to Tables 4 and 5.

Table 4 The effects of pilocarpine on amino acid composition of male rat parotid saliva from 4~10 weeks to 3.5 months of age

Age (week and month)	4	5	6	7	8	10	3.5M
Lysine	4.0	3.9	3.5	4.1	3.9	4.3	3.9
Histidine	2.2	2.2	2.1	2.1	2.1	2.1	2.3
Arginine	3.6	4.3	4.0	4.2	3.8	4.0	4.6
Aspartic acid	12.3	12.3	12.1	12.5	12.8	13.0	12.8
Threonine	4.2	4.3	3.9	4.0	4.2	3.9	5.8
Serine	6.8	6.3	6.6	6.4	6.4	5.9	5.5
Glutamic acid	9.4	10.1	10.0	9.4	9.3	9.2	10.2
Proline	13.9	13.5	15.9	13.4	12.2	14.0	12.4
Glycine	9.8	10.2	9.5	9.2	9.6	8.8	10.5
Alanine	6.0	5.8	6.0	6.2	6.7	6.4	5.2
Valine	6.7	6.8	6.6	7.0	7.7	7.2	7.1
Methionine	0.8	0.7	0.6	0.7	0.6	0.8	0.5
Isoleucine	4.4	4.2	4.3	4.3	4.6	4.2	4.2
Leucine	10.7	10.2	10.1	10.9	11.0	10.9	9.5
Tyrosine	1.4	1.4	1.1	1.6	1.1	1.4	1.8
Phenylalanine	3.8	3.8	3.7	4.0	4.0	3.9	3.7

Table 5 The effects of pilocarpine on amino acid composition of female rat parotid saliva from 5 to 10 weeks of age

Age (week and month)	5	6	7	8	10
Lysine	3.8	4.0	3.9	4.3	3.9
Histidine	1.6	1.8	1.7	2.0	1.9
Arginine	3.9	3.8	4.0	4.2	4.2
Aspartic acid	11.3	10.3	12.2	11.1	11.9
Threonine	5.5	5.7	5.2	4.9	4.9
Serine	6.7	10.3	6.6	7.2	7.7
Glutamic acid	11.0	11.3	9.9	11.1	8.9
Proline	12.0	12.8	11.0	10.6	12.1
Glycine	11.0	9.5	10.3	10.1	9.8
Alanine	4.5	5.0	4.6	4.9	4.2
Valine	8.0	7.3	8.3	8.3	8.2
Methionine	0.8	0.8	1.1	1.1	0.8
Isoleucine	4.1	3.7	4.4	4.4	4.1
Leucine	10.6	9.3	11.4	10.2	11.9
Tyrosine	1.6	1.4	2.0	2.0	1.9
Phenylalanine	3.6	3.0	3.4	3.6	3.6

Table 6 Two way analyses of variances of age and sex effects on the developmental changes of amino acid concentration in parotid saliva of rats in response to pilocarpine

Factor	A	B
Lysine	N.S.	N.S.
Histidine	N.S.	N.S.
Arginine	N.S.	N.S.
Aspartic acid	N.S.	P<0.01
Threonine	N.S.	P<0.01
Serine	N.S.	N.S.
Glutamic acid	N.S.	N.S.
Proline	P<0.05	N.S.
Glycine	N.S.	P<0.01
Alanine	N.S.	P<0.01
Valine	P<0.05	P<0.01
Methionine	N.S.	N.S.
Isoleucine	N.S.	N.S.
Leucine	N.S.	N.S.
Tyrosine	N.S.	P<0.01
Phenylalanine	N.S.	N.S.

Factor A and B denote age and sex differences respectively by ANOVA

Table 7 The effects of different autonomic blockers in combination with methoxamine and pilocarpine on the salivation of the parotid glands of male rats from 4 weeks to 15 months of age

Stimulants + Blockers	Methoxamine			Pilocarpine		
	Phentolamine Phenoxybenzamine Dihydroergotamine	Atropine	Propranolol	Phentolamine	Atropine	Propranolol
Age (week and month)						
4	—*	+**	+	+	—	+
5	—	+	+	+	—	+
6	—	+	+	+	—	+
7	—	+	+	+	—	+
8	—	+	+	+	—	+
10	—	+	+	+	—	+
3.5M	—	+	+	+	—	+
15M	—	+	+	+	—	+

*, Denotes no salivation ; **, Denotes salivation occurred

考 察

老人人口の増加に伴う義歯装着患者の増加が、将来補綴学分野の重要な課題になることは必至である。しかしながら、老齢化に伴う口腔組織の変化に関する研究は近年になってようやく積極的に始まったばかりである^{52), 53)}。咬合や咀嚼機能が耳下腺の機能に関係することは、多数の研究者^{38~42)}が報告している。これらのことから、本実験では、4週齢から15月齢に至るラット耳下腺の交感神経性 α_1 —と副交感神経性 Re の分泌機能を年齢、刺激の種類および性別から検討した。また義歯床への付着タンパク質の分析も行った。以下の3項目について考察する。

A. 腺湿重量と分泌唾液量について

ラット耳下腺の腺湿重量は、雌雄ともに、3週齢では非常に小さく ($132.9 \pm 3.1 \text{ mg}$, $n=12$)、どんな刺激薬を用いても唾液採取はできなかった。このことは、ラット耳下腺は2, 3週齢になると急激に増殖し、分泌機能だけでなく、副交感および交感神経支配が完了するという報告^{2, 3, 12~15)}と一致しなかった。また4週齢になったばかりの雌ラットの場合には、Pilo 刺激耳下腺唾液は採取できなかった。4週齢になって4日後に初めて実験群の%のラットの唾液採取が可能となった。Methox 刺激の場合には Pilo 刺激と異なって4週齢になったばかりで唾液採取ができた。どういう理由で3週齢で、あるいは、Pilo 刺激の雌の場合には4週齢の初めでも、唾液が採取できなかったかはわからないが、耳下腺唾液のタンパク質濃度が極端に高くなり、粘度が上昇したことが原因かも知れない。先人達の報告^{2, 3, 12~15)}のように、3週齢では分泌機能をすでに備えているが、極く少量の唾液しか分泌しないために、本採取法では唾液が採取できなかったとも思われる。雌ラットの Pilo 刺激の耳下腺の分泌唾液量のみが、腺湿重量と順相関しなかった結果も、同様のことが原因であったと思われる。4~8週齢にかけて腺湿重量が急上昇し、それ以後漸増した。さらに、15月齢で減少した。このことは、ヒト顎下腺の重量は中高年齢化とともに減少するという報告⁵⁴⁾と一致する。体重が5週齢から統計的に有意な性差を示したのに対し、腺湿重量は5週齢まで性差を示さなかったが、5週齢以後の腺湿重量の増加には明瞭な性差が認められた。このことは、ヒト顎下腺⁵⁴⁾やラット顎下腺^{55, 56)}に認められた性差に関する報告と同傾向を示した。

分泌唾液量には、Methox 刺激を行った雌雄ラット

とも加齢差は認められなかった。このことは、Baum (1981a³⁷⁾, 1981b⁵²⁾) のヒト耳下腺に関する報告と一致する。分泌唾液量の性差については、Methox 刺激の場合には性差は認められなかったが、Pilo 刺激には加齢差だけでなく性差も認められた (Table 2)。このことは、Dawes ら (1965)⁵⁷⁾ の報告と一致する。また、本実験の分泌唾液量は、刺激の種類、年齢および性別を考えなかった場合には腺湿重量に有意な順相関を示した。しかし両刺激の雌の場合には、両者間に有意な相関は認められなかった。

ヒトの顎下腺⁵⁸⁾および耳下腺⁵⁹⁾の分泌唾液量は腺湿重量と順相関するという報告がみられる。また、ラット顎下腺でも Pilo 刺激の場合には、雌雄ともに、分泌唾液量は腺湿重量に順相関したが Methox 刺激の場合には、雌雄ラットはともに、顆粒管の発育し始める6週齢より分泌唾液量と腺湿重量とは順相関しなくなったので、Abe ら (1987)⁵⁶⁾ は交感神経性 α_1 —Re が強く支配する顆粒管⁶⁰⁾は水分分泌に抑制的に働く可能性を示唆している。これらのことから、特殊な場合を除くと、分泌唾液量は一般に腺湿重量に順相関すると考えた方がいいように思える。したがって、ラットでは腺湿重量と体重が順相関している幼若時では分泌唾液量は体重に順相関することになる。しかし Dawes ら (1978)⁵⁹⁾ がヒト耳下腺唾液の分泌量は体重とか、身長などに順相関しないと述べていることから、成熟期以後の分泌量には腺湿重量以外の因子も大きく関与することになる。

唾液腺からの分泌唾液量は主として副交感神経性 Re および交感神経性 α —Re により調節されている¹⁷⁾。しかしながら、ラット耳下腺では副交感神経性 Re および交感神経性 β —Re の数や機能^{13, 26, 34)}は加齢で変化しないが、 α —Re の生理機能^{32~34)}は老齢化で減退すると報告されている。しかし、本実験で用いた各週齢のラット耳下腺の副交感神経性、交感神経性 α_1 —および β —Re の分泌機能は完全であったことが示されている (Table 7)。しかし、老齢化に伴い唾液腺は分泌、合成機能^{27, 28, 30, 31)}だけでなく、組織学的^{24, 25)}にも脂肪化や結合組織化が起こり、腺湿重量も減少するから⁵²⁾分泌唾液量も老齢化で減少することが予想できるし、多くの研究者⁶¹⁾もこれと類似の報告をしている。しかし本実験に用いた15月齢ラットは老齢というより中年齢という表現が適当であるから、分泌唾液量に加齢に伴う有意な減少は認められなかった。しかしヒトの場合でも同様な報告^{37, 52)}がみられる。

Sreebny ら (1971)⁶²⁾ および Hand ら (1981)³⁸⁾ な

どは、栄養価が十分でも液体飼料をラットに与えると、耳下腺の腺湿重量が顕著に減少することを報告している。また下顎切歯切断実験⁴¹⁾や咬合挙上板⁴⁰⁾などの矯正装置を装着して咀嚼機能を減少させても、耳下腺は萎縮すると報告されている。また逆に、栄養価の低い容積の大きい飼料でラットを飼育すると、耳下腺の腺湿重量が大きくなることが報告³⁹⁾されている。これらのことから、耳下腺の大きさには、加齢と同様に咀嚼や咬合が大きく関与していることになるので補綴物製作の優劣は分泌唾液量に重大な影響を与えることになると思われる。逆に、この種の研究が発展することにより、作製された補綴物が、顎口腔系にどのように調和しているかを判定することも可能となるのではないかとと思われる。

B. タンパク質濃度、アミラーゼ活性および無機質濃度について

タンパク質濃度および両表示の分泌タンパク質量は、Pilo 刺激の雌を除いた場合には、加齢に伴い有意に増加した。また、両刺激とも、一部を除くと、顕著な性差を出現した。一般に耳下腺唾液のタンパク質濃度、分泌タンパク質量およびアミラーゼ活性の程度は、交感神経性 β -Re, α -Re および副交感神経性 Re 刺激の順に小さくなる^{16,17,63,64)}。しかしながら、Pilo は、特にラット耳下腺の場合には、副交感神経性 Re だけでなく、交感神経性の上顎神経節の節後線維も刺激することが明らかにされている⁶⁵⁾ので、交感神経性 α_1 -Re を刺激する Methox 刺激で認められた Pilo 刺激の場合より低いタンパク質濃度、分泌タンパク質量およびアミラーゼ活性は理解できる。これらのことは、先人達^{16,17,63-65)}の報告とも一致した。一般に、タンパク質濃度および分泌タンパク質量は各種の実験条件により変動することが知られている^{16,17)}が、特に唾液の分泌速度に大きな影響を受ける^{20,47)}。本実験でもタンパク質濃度は分泌速度と、それが速い場合と遅い場合とで、それぞれ順および逆相関することがわかった (Fig. 7)。これらの相関は刺激の種類、年齢および性別に関係しないことが、幼若および成熟ラットを用いた顎下腺^{19,55,56)}や耳下腺唾液¹⁹⁾のタンパク質の分泌に関する報告からも理解できる。本実験ではタンパク質濃度と分泌速度との相関関係に刺激差が認められたような結果を示している (Fig. 7) が、これは、たまたま本実験に用いた2種類の刺激が偶然に遅い分泌速度と速い分泌速度を示したにすぎないと考えられる。したがって、Pilo 刺激の雌ラットの場合以外のタンパク質濃度や分泌タンパク質量は、年齢、性別および刺激の種類に関係なく、

成熟ラットと全く同じ機構により決定されていることがわかる。

アミラーゼ活性では、タンパク質濃度と同じく、Pilo 刺激の場合に性差が認められた。このことは、Bellavia ら (1981)³⁵⁾の報告と一致した。しかし、両刺激とも加齢差は出現しなかった (Table 2)。このこともヒト耳下腺での観察⁵²⁾と一致した。特に耳下腺唾液のアミラーゼ活性は、タンパク質濃度や分泌タンパク質量と同じく、 β -Re, cAMP およびプロテインキナーゼに依存することは周知のことである^{12,13,34)}。したがって、ラット耳下腺唾液のアミラーゼ活性はタンパク質濃度と極めて類似の挙動を示すことになる。すなわち、老齢化でタンパク質濃度が低下するとアミラーゼ活性も低下する^{54,66)}。また、アミラーゼ活性と腺湿重量およびアミラーゼ活性と唾液の分泌速度との相関関係は、タンパク質濃度とこれらのパラメータとの相関関係を極めて類似していた。すなわち、分泌速度が遅い場合と速い場合とでアミラーゼ活性はその速度と逆あるいは順相関した。このことは、アミラーゼ活性は唾液の分泌速度に大きな影響を受けるという多くの報告⁶⁷⁾と一致する。本実験でも、アミラーゼ活性はタンパク質濃度と極めて高い相関係数をもつ有意な順相関を示した (Fig. 12)。これらのことから、アミラーゼ活性も年齢、性別および刺激の種類に関係なく、成熟ラットの場合と類似の結果を示すことがわかった。

Ca とタンパク質あるいはアミラーゼとは、特に耳下腺の場合には、平衡関係を保って分泌することが報告⁶⁸⁻⁷⁰⁾されている。しかし、タンパク質やアミラーゼ分泌には交感神経性 α_1 -および副交感神経性 Re はほとんど重要な役割を演じていないことが報告⁶⁸⁾されている。本実験で用いた Methox および α -mNA (未発表データ) はどちらも交感神経性 α_1 -Re 刺激薬であり、また Pilo は交感神経性 β -Re 刺激作用を一部分しかもたない⁶⁵⁾から、Ca 濃度とタンパク質濃度における本実験の相関関係は先の報告⁶⁸⁻⁷⁰⁾と異なる結果を示している。

しかしながら、交感神経性 α_1 -Re 刺激唾液のアミラーゼ活性と Ca 濃度は Methox と α -mNA (未発表データ) のどちらの刺激の場合も、また雌雄ラットとも、有意な順相関を示した。しかし Pilo 刺激の場合の雌雄ラットの場合には両者間に順相関は存在しなかった。本実験の Methox および Pilo 刺激の Ca 濃度には、加齢に伴う特徴的な推移は観察できなかったし、Methox 刺激の場合には、性差も認められなかった。こ

のことは、**Methox** を用いたラット顎下腺唾液での報告^{55, 56)}あるいはヒト全唾液を用いた実験結果⁷¹⁾と一致しなかったが、**Pilo** 刺激の場合には、ラット顎下腺での報告⁵⁶⁾と一致した。一般に、**Ca**、アミラーゼおよびタンパク質は、既述のように、同じ機構で分泌するから、アミラーゼ活性やタンパク質濃度の高い **Pilo** 刺激唾液の **Ca** 濃度の方が **Methox** 刺激のものより有意に高い値を示したことは理解できる。本実験では、全 **Ca** 量を測定したが、ヒト唾液の全 **Ca** 量と遊離の **Ca** イオン濃度とは順相関することが報告⁷²⁾されている。また、結合型の **Ca** 濃度はタンパク質濃度に順相関することも報告⁷⁰⁾されているので、本実験で測定した全 **Ca** 量の加齢差、性差および刺激差に関する実験結果は遊離あるいは結合型 **Ca** 濃度にも適応することができる。

Kおよび **Pi** 濃度には加齢差は認められなかった。特に **Pi** 濃度の場合には、ヒト全唾液に関する報告⁷¹⁾と一致した。しかし、**Pilo** 刺激のラット顎下腺唾液の **K** および **Pi** 濃度は加齢差を示すという報告^{55, 56)}とは一致しなかった。**Pi** 濃度は **Methox** 刺激唾液に性差が認められた。これらの本実験結果は、ヒト全唾液⁷¹⁾およびラット顎下腺唾液での報告^{55, 56)}と一致した。しかしヒト全唾液の **Pi** 濃度は、50歳以上になると性差を示すが、5～9歳児では性差を示さなかったと報告⁷¹⁾されている。本実験での **K** および **Pi** 濃度は、年齢、性別および刺激の種類に関係なく、唾液の分泌速度に逆相関した。このことは、多くの先人達の報告^{18, 55, 56)}と一致する。したがって、**Pi** および **K** 濃度は分泌速度と強く関係していることになるので、両パラメータに認められた性差は腺湿重量あるいは腺湿重量に相関する分泌唾液量に認められる性差を反映した結果である。だから、幼若時に性差が認められなかった結果は肯定できる。しかし唾液腺での **K** の放出には、副交感神経性、交感神経性 α_1 —およびペプチド性 **Re** がそれぞれ関与していることはよく知られている⁷³⁾。

幼若および成熟ラット顎下腺の交感神経性 α_1 —および α_2 —**Re** の刺激は高濃度の **K** を唾液中に分泌するが、成熟ラット耳下腺唾液中には高濃度の **K** を分泌しないことが報告^{21-23, 55, 56)}されている。本実験でも、**Methox** 刺激唾液の **K** 濃度は、雌雄とも、**Pilo** 刺激のものより有意に高い値を示していたが、幼若および成熟ラット顎下腺唾液^{21-23, 55, 56)}に認められたような高値を示すことはなかった。このことは、本実験に用いた各年齢のラット耳下腺では、**Na**、**Cl** および **K** が **Cotransport** 系⁷⁴⁾を介して、**Bosolaterally** に放出されていると考

えることができる。

C. 唾液のタンパク質成分、アミラーゼアイソザイムパターンおよびアミノ酸組成について

幼若⁵⁵⁾および成熟の雌雄ラット顎下腺あるいは犬や猫の顎下腺および耳下腺⁷⁵⁾などは、刺激の種類や年齢により、質的に異なるタンパク質成分や糖鎖の異なるグリコプロテインを分泌することが報告されている。特にラット顎下腺では、交感神経性 α_1 —および α_2 —**Re** 刺激の場合^{17, 21-23, 55)}には、交感神経性 β —および β_2 —**Re** あるいは副交感神経性 **Re** 刺激の場合と異なるタンパク質成分が分泌する。しかし、成熟ラット耳下腺では刺激の種類により、質的に異なるタンパク質成分が分泌するという報告はみられない。本実験で用いた **Methox** および **Pilo** 刺激の場合には、唾液のタンパク質成分は加齢差、性差および刺激差を出現しなかった。また8月齢ラットを用いた本実験結果 (**Fig. 23**) では、交感神経性 β —、 β_2 —、 α_1 —および α_2 —**Re**、あるいは副交感神経性 **Re** 刺激唾液のタンパク質成分は、各種の電気泳動法で検討してみても極めて類似の電気泳動像が得られた。これらの所見は、**Dawes** (1981⁷⁶⁾, 1984⁷⁷⁾ のヒト耳下腺での報告やウサギの腭液酵素の分泌にみられる **Parallelism**⁷⁸⁾ を肯定する。しかし、腭液酵素の場合には、**Parallelism** を示さないという報告⁷⁹⁾もある。また、ヒト耳下腺の場合には個体差がみられるという報告⁷⁶⁾もある。本実験でも **IEF** の等電点の低い微量成分の電気泳動像に性別、年齢および刺激の種類に関係なく個体差が出現した。また雌雄ラットが8および15月齢になると、タンパク質成分に顕著な相違が出現するようになった (**Fig. 24**)。これらのタンパク質成分が老齢化の診断や兆候になりうるかどうかは不明であり、今後の研究が待たれる。**Kim** および **Kim** らの一連の報告²⁷⁻³¹⁾によると、非分泌性タンパク質の合成は加齢で変化しないという。また、分泌性タンパク質の合成は低下するが、分泌タンパク質の **SDS** ゲルによる電気泳動像には質的な差異は認められなかったという。このことは **SDS** 電気泳動法に関する本実験結果と一致する。

しかし肝臓では加齢とともにアルブミンの合成が促進し、フェリチン合成は変化しないが、ヘムタンパク質の合成は低下すると報告⁸⁰⁾されている。そして、これらの変化は加齢に伴う細胞機能の変化のためであることが示唆されている。ラット耳下腺では、分泌タンパク質合成の低下は細胞の代謝活性の低下、形態的变化あるいは細胞数の減少などの影響を受けないし、特殊なタンパク

質成分のみが合成低下するのではないことが報告されているが、本実験では中年齢化で質的に出現したり、量的に増量する画分が発見できた。このことは特殊なタンパク質成分の合成系が促進することを示唆している。しかしながら、加齢に伴って老化の兆候と思われるタンパク質成分が出現したことが、加齢に伴う腺組織の脂肪化、結合繊維化^{24, 25, 52)}あるいは分泌タンパク質の合成能の低下と関連するかどうかは現時点では不明である。

ヒト唾液のアミラーゼアイソザイムの分析は、先人達⁸¹⁾により色々な方法で行われてきている。現在では、6, 7種に分離されている。この6, 7種が糖鎖をもたない群と糖鎖の付加した群に分類されている。ヒト唾液のアミラーゼアイソザイムの等電点は pH 5.22, 5.65, 5.80, 5.80 および 6.65, あるいは pH 5.80, 6.20, 6.35, 6.65 および 6.90 であることが報告⁸¹⁾されている。ラットではヒトの場合と大きく異なり、pH 4.23~4.86 の等電点をもつ4種のアイソザイムが検出された。これらのアイソザイムは同一のタンパク質から由来し、タンパク質合成後にコルギー野で糖鎖が付加され2群にわかれる。各アイソザイムのアミノ酸組成は同じであり、おそらく一次構造も同じであろうと考えられている。これらのアイソザイムの生理的意義は現在も不明である。

アイソザイムパターンは4°Cの短期間の貯蔵では変化しないが、長期間の貯蔵では各アイソザイムの量的比が変化する。また、pH 8~9で貯蔵すると1つのアイソザイムがもう1つのアイソザイムに変化することがあると報告⁸¹⁾されている。また、これらのアイソザイムは遺伝的支配を受ける⁸¹⁾。また、Chilla ら (1974)⁶⁶⁾は老齢ラットでは、アミラーゼ活性の比活性が相当に低くなるが、この低下は2つのアイソザイム活性の減少に起因するという。さらに Murata ら (1986)⁵¹⁾によると導管結紮によるラット耳下腺の萎縮はアイソザイムパターンを変えるという。しかし、本実験では各種の電気泳動法を用いて検討したタンパク質成分の分析結果やアミラーゼアイソザイムの検討結果は、アイソザイムパターンが年齢、性別および刺激の種類で少なくとも質的に変化するという所見は得られなかった。これらの所見は加齢でタンパク質成分は変化しないという報告²⁶⁾と軌を一にする。しかし、本実験で用いたラットは最高齢でも15月齢であったので、老齢(24月齢)化によりパターンが変化するかどうかはわからなかった。しかし、交感神経性 β -Re の機能は老齢化で変化しないという報告^{13, 26)}があるから、 β -Re 依存性成分のアミラーゼアイソザイムが老齢化で質的に変化するとは考えられな

い。

唾液のタンパク質成分のうちの高濃度画分は、さらに高い分解能をもつ電気泳動法(イモビライン)などで再検討すると、複数の成分から構成されていたり、高プロリンタンパク質成分のように染色性の極めて低い成分が存在する可能性があるので、タンパク質成分の変化をアミノ酸組成の分析からも検討した。ラット耳下腺唾液のアミノ酸組成は、ヒトの場合⁸²⁾と類似していた。このことは、ヒト耳下腺唾液の場合には刺激差が認められないという報告⁸²⁾や成熟ラット耳下腺の場合に刺激薬の投与量²²⁾や刺激の種類^{23, 63)}でアミノ酸組成は大きくは変わらないという報告と一致した。また、本実験のアミノ酸組成の変化はタンパク質成分分泌の Parallelism と一致するものであった。また特殊な画分以外は、質的に大きく異なる成分の重複化は少ないように思われた。

結 論

加齢に伴う交感神経性 α_1 -受容体(Re)と副交感神経性 Re の分泌機能の変化を明らかにするため、幼若時から中年齢に至る雌雄ラット耳下腺から交感神経性 α_1 -Re および副交感神経性 Re 刺激薬により分泌する純粹唾液を採取し、分析した。

実験動物には、4~8の各週齢、10週齢、3.5月齢、8月齢および15月齢の雌雄ラットを使用した。分泌刺激薬には、交感神経性 α_1 -Re 刺激薬としてメトキシミン塩酸塩(Methox)を、副交感神経性 Re 刺激薬としてピロカルピン塩酸塩(Pilo)を用いた。測定は、分泌唾液量、唾液の分泌速度ならびに唾液中のタンパク質濃度、アミラーゼ活性、K・Ca・Pi 濃度、タンパク質成分、アミラーゼアイソザイムパターン、アミノ酸組成およびレジン試験片付着タンパク質について行い、以下の結果を得た。

1. 耳下腺の腺湿重量は、雄では8週齢まで急増し、その後3.5月齢まで漸増したが、15月齢では減少した。雌の場合では3.5月齢まで漸増後、15月齢で減少した。雌雄とも3.5月齢までは体重の変化に順応していたが、15月齢では体重の動きと逆行した。腺湿重量の性差は体重より1週齢遅れて6週齢より出現した。

2. 耳下腺の分泌唾液量は Methox 刺激の場合には、加齢差および性差は認められなかったが、Pilo 刺激の場合には、加齢差および性差が認められた。分泌唾液量は年齢、性別および刺激の種類に関係なく、腺湿重量に順相関した。

3. タンパク質濃度には、両刺激の雌雄とも、加齢差は得られなかったが、Pilo 刺激の場合には性差が認められた。両表示の分泌タンパク質量は、両刺激とも加齢差および性差を示した。また、タンパク質濃度は、年齢や性別に関係なく、分泌速度の速い時と遅い時とで、それぞれの速度に順あるいは逆相関した。

4. アミラーゼ活性には両刺激とも加齢差は認められなかったが、Pilo 刺激には性差が認められた。アミラーゼ活性は、年齢、性別および刺激の種類に関係なく、タンパク質濃度に順相関した。また、交感神経性 α_1 -Re 刺激唾液のアミラーゼ活性は Ca 濃度に順相関した。

5. K 濃度には加齢差および性差は認められなかった。また、K 濃度は年齢、性別および刺激の種類に関係なく、唾液の分泌速度に逆相関した。

6. Ca 濃度には加齢差は認められなかった。しかし、性差は Methox 刺激には認められなかったが Pilo 刺激に認められた。

7. Pi 濃度には両刺激とも加齢差は認められなかったが、Methox 刺激の場合には性差が認められた。また、Pi 濃度は、年齢、性別および刺激の種類に関係なく、比較的分泌速度の遅いときには唾液の分泌速度に逆相関した。

8. 唾液のタンパク質成分には大きな加齢差、性差および刺激差は認められなかった。このことから、ラット耳下腺のタンパク質成分分泌には4週齢から15月齢に至るまで **Parallelism** が維持されていることがわかった。しかし、8および15月齢の中年齢になると性別や刺激の種類に関係なく、唾液中に特徴的なタンパク質を分泌するラットが多くなった。

9. Methox および Pilo 刺激唾液には pH 4.23, 4.58, 4.71および4.86の等電点をもつ4種のアイソザイムが検出された。アミラーゼアイソザイムパターンにも大きな加齢差、性差および刺激差は認められなかった。

10. アミノ酸組成にも大きな加齢差、性差および刺激差は認められなかった。

11. Re 遮断薬を Methox あるいは Pilo と組み合わせることによって、自律神経系の分泌機能の加齢的变化を検討した結果、いくつかの組み合わせにおいて全被験年齢ラットの唾液分泌が完全に抑制された。

12. レジン試験片に付着する唾液のタンパク質成分は Pilo 刺激の場合、電気泳動上、移動度の大きいものが多かった。また、鏡面仕上げ処理はタンパク質の付着を抑制した。

各種パラメータの測定結果からラット耳下腺の交感神経性 α_1 -Re および副交感神経性 Re の分泌機能は幼若時に完成し、中年齢に至るまで不変であることが示唆された。しかし、8～15月齢になると、老化の兆候と思われる異常タンパク質成分が認められるようになった。

謝 辞

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜わった福岡歯科大学歯科補綴学第一講座羽生哲也教授ならびに口腔生化学講座阿部公生教授に深甚なる感謝の意を表します。また、常に適切なる御教示、御校閲を戴きました九州歯科大学口腔生化学講座野口知雄教授に厚く御礼申し上げます。なお有益なる御助言を戴きました九州歯科大学歯科補綴学第一講座豊田静夫教授ならびに口腔科学講座天野仁一郎教授に厚く御礼申し上げます。

引 用 文 献

- 1) Ball, W.D. : Development of the rat salivary glands. 1. Accumulation of parotid gland DNase activity. *J. Exp. Zool.* 178 : 331—342, 1971.
- 2) Redman, R.S. and Sreebny, L.M. : Proliferative behavior of differentiating cells in the developing rat parotid gland. *J. Cell Biol.* 46 : 81—87, 1970.
- 3) Redman, R.S. and Sreebny, L.M. : Morphologic and biochemical observations on the development of the rat parotid gland. *Dev. Biol.* 25 : 248—279, 1971.
- 4) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Growth pattern of postnatally developing rat parotid gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130 : 603—607, 1969.
- 5) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Influence of physiological activity on mitosis in immature rat parotid gland. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 133 : 349—352, 1970 a.
- 6) Schneyer, C.A. : *Regulation of salivary gland size* (Ed. Goss, R.J.). Academic Press, New York, 1972, 211—232.

- 7) Klein, R.M. : β -Adrenergic drug induced hyperplasia in the immature rat parotid and submandibular glands. *Eur. J. Pharmacol.* **105** : 327—331, 1984.
- 8) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Effects of denervation on development of function and structure of immature rat parotid. *Am. J. Physiol.* **212** : 871—876, 1967.
- 9) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Time course and autonomic regulation of development of secretory function of rat parotid. *Am. J. Physiol.* **214** : 808—813, 1968.
- 10) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Autonomic regulation of postnatal changes in cell number and size of rat parotid. *Am. J. Physiol.* **219** : 1268—1272, 1970 b.
- 11) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Autonomic regulation of changes in rat parotid amylase during postnatal development. *Am. J. Physiol.* **223** : 172—175, 1972.
- 12) Grand, R.J., Chong, D.A. and Ryan, S.J. : Postnatal development of adenylate cyclase in rat salivary glands : Patterns of hormonal sensitivity. *Am. J. Physiol.* **228** : 608—612, 1975.
- 13) Ludford, J.M. and Talamo, B.R. : β -Adrenergic and muscarinic receptors in developing rat parotid glands. *J. Biol. Chem.* **255** : 4619—4627, 1980.
- 14) Grand, R.J. and Schay, M.I. : Development of secretory function in rat parotid gland. *Pediat. Res.* **12** : 100—104, 1978.
- 15) Mangos, J.A. : Micropuncture study of postnatal functional maturation of the rat parotid. *J. Dent. Res.* **57** : 826—833, 1978.
- 16) Abe, K. and Dawes, C. : Circadian variations in pilocarpine and isoprenaline-induced protein secretion by rat parotid gland. *Archs. Oral Biol.* **20** : 543—546, 1975.
- 17) Abe, K. and Dawes, C. : The effects of electrical and pharmacological stimulation on the types of proteins secreted by rat parotid and submandibular glands. *Archs. Oral Biol.* **23** : 367—372, 1978.
- 18) Young, J.A., Cook, D.I., Jones, G., McGirr, J. and Thompson, C. : The effect of phenylephrine on excretion of fluid and electrolytes by the parotid and mandibular glands of the rat. *AJEBAK.* **57** : 555—562, 1979.
- 19) 阿部公生・及川 将・阿部成生・高田 登 : ラット顎下腺の蛋白質分泌に及ぼすピロカルピンの作用. 岐歯学誌 **10** : 242—252, 1982.
- 20) Abe, K., Oikawa, M. and Abe, S. : Rate of protein excretion of rat submandibular and parotid saliva elicited by different stimuli. *J. Gifu Dent. Soc.* **10** : 460—471, 1983.
- 21) Abe, K. and Dawes, C. : Dopamine-induced secretion of protein and of some electrolytes by rat submandibular and parotid glands. *Archs. Oral Biol.* **27** : 635—643, 1982.
- 22) Abe, K. and Dawes, C. : The effects of α -methylnoradrenaline on protein and electrolyte secretion by rat submandibular and parotid glands. *Comp. Biochem. Physiol.* **78C** : 383—389, 1984.
- 23) Abe, K. and Dawes, C. : The effects of oxymetazoline on secretion of protein and some electrolytes by rat submandibular and parotid glands. *Comp. Biochem. Physiol.* **80C** : 347—353, 1985.
- 24) Andrew, W. : A comparison of age changes in salivary glands of man and of the rat. *J. Gerontol.* **7** : 178—190, 1952.
- 25) Waterhouse, J.P., Chisholm, D.M., Winter, R.B., Pater, M. and Yale, R.S. : Replacement of functional parenchymal cells by fat and connective tissue in human submandibular salivary glands : An age-related change. *J. Oral Path.* **2** : 16—27, 1973.

- 26) Ito, H., Baum, B.J. and Roth, G.S. : β -Adrenergic regulation of rat parotid gland exocrine protein secretion during aging. *Mech. Ageing Dev.* 15 : 177—188, 1981.
- 27) Kim, S.K., Weinhold, P.A., Han, S.S. and Wagner, D.J. : Age-related decline in protein synthesis in the rat parotid gland. *Exp. Geront.* 15 : 77—85, 1980.
- 28) Kim, S.K., Weinhold, P.A., Calkins, D.W. and Hartog, V.W. : Comparative studies of the age-related changes in protein synthesis in the rat pancreas and parotid gland. *Exp. Geront.* 16 : 91—99, 1981 b.
- 29) Kim, S.K., Calkins, D.W., Weinhold, P.A. and Han, S.S. : Changes in the synthesis of exportable and nonexportable proteins in parotid glands during aging. *Mech. Ageing Dev.* 18 : 239—250, 1982.
- 30) Kim, S.K. and Calkins, D.W. : Secretory protein synthesis in parotid glands of young and old rats. *Archs. Oral Biol.* 28 : 1—4, 1983.
- 31) Kim, S.K. : Age-related changes in the cellular level of amylase and protein synthesis in the rat parotid gland. *J. Dent. Res.* 60 : 738—747, 1981a.
- 32) Ito, H., Hoopes, M.T., Roth, G.S. and Baum, B.J. : Adrenergic and cholinergic mediated glucose oxidation by rat parotid gland acinar cells during aging. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 98 : 275—282, 1981.
- 33) Ito, H., Baum, B.J., Uchida, T., Hoopes, M.T., Bodner, L. and Roth, G.S. : Modulation of rat parotid cell α -adrenergic responsiveness at a step subsequent to receptor activation. *J. Biol. Chem.* 257 : 9532—9538, 1982.
- 34) Bodner, L., Hoopes, M.T., Gee, M., Ito, H., Roth, G.S. and Baum, B.J. : Multiple transduction mechanisms are likely involved in calcium-mediated exocrine secretory events in rat parotid cells. *J. Biol. Chem.* 258 : 2774—2777, 1983.
- 35) Bellavia, S.L., Sanz, E.G., Vermouth, N.T., Rins, M.L. and Aoki, A. : Sex difference in the rate of postnatal development of amylase activity in the rat parotid gland. *Archs. Oral Biol.* 26 : 59—60, 1981.
- 36) Klein, R.M. and Harrington, D.B. : Acinar cell cycle of developing rat parotid gland : Comparison of males and females. *J. Dent. Res.* 55 : 712, 1976.
- 37) Baum, B.J. : Evaluation of stimulated parotid saliva flow rate in different age groups. *J. Dent. Res.* 60 : 1292—1296, 1981a.
- 38) Hand, A.R. and Ho, B. : Liquid-diet-induced alterations of rat parotid acinar cells studied by electron microscopy and enzyme cytochemistry. *Archs. Oral Biol.* 26 : 369—380, 1981.
- 39) Johnson, D.A. and Sreebny, L.M. : Effect of increasing the bulk content of the diet on the rat parotid gland and saliva. *J. Dent. Res.* 61 : 691—696, 1982.
- 40) Hioki, S., Matsumoto, M., Mitsui, S., Oikawa, M., Abe, S., Takada, N. and Abe, K. : The effects of incisal bite plane on rat parotid glands. *J. Gifu Dent. Soc.* 9 : 293—304, 1981.
- 41) 村田篤彦 : ラット3大唾液腺に及ぼす両側下顎切歯切断の影響. 岐歯学誌 9 : 40—66, 1981.
- 42) 鴨頭和利 : 上顎側方拡大装置のラット顎下腺および舌下腺に及ぼす影響. 九州歯会誌 41 : 233—256, 1987.
- 43) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265—275, 1951.
- 44) Dawes, C. : Some characteristics of parotid and submandibular salivary proteins. *Archs. Oral Biol.* 10 : 269—279, 1965.
- 45) 早川哲夫・戸田安士・仁川正一・服部 正・野田愛司・菊池三郎 : Amylase test Daiichi 法, Remazol

brilliant blue R starch 法, および Caraway 法による唾液および唾液アミラーゼの基質特異性. 日本消化器病学会誌 69:143—147, 1972.

- 46) Dawes, C. : The secretion of magnesium and calcium in human parotid saliva. *Caries Res.* 1:333—342, 1967.
- 47) Dawes, C. : The effects of flow rate and duration of stimulation on the concentrations of protein and the main electrolytes in human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.* 14:277—294, 1969.
- 48) Chen, P.S., Toribara, T.Y. and Warner, H. : Microdetermination of phosphorus. *Analyt. Chem.* 28:1756—1758, 1956.
- 49) Dawes, C. : Disodium ethylenediaminetetraacetate as an aid for the reconstitution of lyophilized human salivary proteins before paper electrophoresis. *Archs. Oral Biol.* 8:653—656, 1963.
- 50) Kapitany, R.A. and Zebrowski, E.J. : A high resolution PAS stain for polyacrylamide gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* 56:361—369, 1973.
- 51) Murata, K., Ikeno, T. and Kuzuya, H. : Ligation of the parotid duct changes zymograms of amylase isozymes in the parotid gland and the serum of rats. *Jpn. J. Oral Biol.* 28:229—232, 1986.
- 52) Baum, B.J. : Research on aging and oral health : An assessment of current status and future needs. *Spec. Care Dent.* 1:156—161, 1981b.
- 53) Grzegorzczuk, P.B., Jones, S.W. and Mistretta, C.M. : Age-related differences in salt taste acuity. *J. Gerontol.* 34:834—840, 1979.
- 54) Scott, J. : Age, sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands. *Archs. Oral Biol.* 20:885—887, 1975.
- 55) 阿部成生 : 幼弱ラット顎下腺の交感神経性 α_1 -受容体機能の加齢変化にみられる性差. 歯基礎誌 27:909—932, 1985.
- 56) Abe, K., Hidaka, S., Ishibashi, K., Yanabu, M., Kamogashira, K., Itoh, T. and Matsumoto, M. : Developmental changes in the volumes, protein and some electrolyte concentrations of male and female rat submandibular saliva secreted in response to methoxamine and pilocarpine. *J. Dent. Res.* 66:In Press, 1987.
- 57) Dawes, C. and Shaw, J.H. : The effects of changes in the proportion and type of dietary carbohydrate on the amylase and protein concentrations in rat saliva. *Archs. Oral Biol.* 10:261—267, 1965.
- 58) Ericson, S., Hedin, M. and Wiberg, A. : Variability of the submandibular flow rate in man with special reference to the size of the gland. *Odont. Revy* 23:411—420, 1972.
- 59) Dawes, C., Cross, H.G., Baker, C.G. and Chebib, F.S. : The influence of gland size on the flow rate and composition of human parotid saliva. *J. Canad. Dent. Ass.* 44:21—25, 1978.
- 60) Matthews, R.W. : The effects of autonomic stimulation upon the rat submandibular glands. *Archs. Oral Biol.* 19:989—994, 1974.
- 61) Gutman, D. and Ben-Aryeh, H. : The influence of age on salivary content and rate of flow. *Int. J. Oral Surg.* 3:314—317, 1974.
- 62) Sreebny, L.M., Johnson, D.A. and Robinovitch, M.R. : Functional regulation of protein synthesis in the rat parotid gland. *J. Biol. Chem.* 246:3879—3884, 1971.
- 63) Abe, K. and Nitta, H. : Amino acid composition of salivary protein secreted by the parotid

- glands of rats in response to parasympathomimetic and sympathomimetic drugs. *Archs. Oral Biol.* 29 : 127—130, 1984.
- 64) Leslie, B.A., Putney, J.W. and Sherman, J.M. : α -Adrenergic, β -adrenergic and cholinergic mechanisms for amylase secretion by rat parotid gland *in vitro*. *J. Physiol.* 260 : 351—370, 1976.
- 65) Schneyer, C.A. and Hall, H.D. : Comparison of rat salivas evoked by auriculo-temporal and pilocarpine stimulation. *Am. J. Physiol.* 209 : 484—488, 1965.
- 66) Chilla, R., Niemann, H., Arglebe, C. and Domagk, G.F. : Age-dependent changes in the α -isoamylase pattern of human and rat parotid glands. *ORL.* 36 : 373—382, 1974.
- 67) Blomfield, J., Rush, A.R. and Allars, H.M. : Interrelationships between flow rate, amylase, calcium, sodium, potassium and inorganic phosphate in stimulated human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.* 21 : 645—650, 1976.
- 68) Schneyer, C.A., Sukanthapree, C. and Schneyer, L.H. : Neural regulation of calcium and amylase of rat parotid saliva. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 156 : 132—135, 1977.
- 69) Schneyer, C.A., Sukanthapree, C., Schneyer, L.H. and Jirakulsomchok, D. : Total salivary calcium and amylase output of rat parotid with electrical stimulation of autonomic innervation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 159 : 478—483, 1978.
- 70) Windeler, A.S. and Shannon, I.L. : The effect of flow rate on parotid fluid calcium and protein levels. *Archs. Oral Biol.* 11 : 1043—1045, 1966.
- 71) Wainwright, W.W. : Human saliva. XV. Inorganic phosphorus content of resting saliva of 650 healthy individuals. *J. Dent. Res.* 22 : 403—414, 1943.
- 72) Maier, H., Coroneo, M.T., Antonczyk, G. and Heidland, A. : The flow-rate-dependent excretion of ionized calcium in human parotid saliva. *Archs. Oral Biol.* 24 : 225—227, 1979.
- 73) Putney, J.W. : Muscarinic, alpha-adrenergic and peptide receptors regulate the same calcium influx sites in the parotid gland. *J. Physiol.* 268 : 139—149, 1977.
- 74) Petersen, O.H. and Maruyama, Y. : Calcium-activated potassium channels and their role in secretion. *Nature* 307 : 693—696, 1984.
- 75) Dische, Z., Kahn, N., Rothschild, C., Danilchenko, A., Licking, J. and Wang, S.C. : Glycoproteins of submaxillary saliva of the cat. Differences in composition produced by sympathetic and parasympathetic nerve stimulation. *J. Neurochem.* 17 : 649—658, 1970.
- 76) Dawes, C. : The effects of exercise on protein and electrolyte secretion in parotid saliva. *J. Physiol.* 320 : 139—148, 1981.
- 77) Dawes, C. : Stimulus effects on protein and electrolyte concentrations in parotid saliva. *J. Physiol.* 346 : 579—588, 1984.
- 78) Gilliland, E.L. and Glazer, G. : Parallel secretion of enzymes by the rabbit pancreas. *J. Physiol.* 303 : 33—41, 1980.
- 79) Dagorn, J.C. : Non-parallel enzyme secretion from rat pancreas : *in vivo* studies. *J. Physiol.* 280 : 435—448, 1978.
- 80) Beauchene, R.E., Roeder, L.M. and Barrows, C.H. : The interrelationships of age, tissue protein synthesis, and proteinuria. *J. Gerontol.* 25 : 359—363, 1970.
- 81) Merritt, A.D. and Karn, R.C. : The human α -amylases. *Adv. Hum. Genet.* 8 : 135—234, 1971.
- 82) Feller, R.P., Shannon, I.L. and Wescott, W.B. : Total amino acid levels of parotid saliva at different rates of gland function. *J. Dent. Res.* 53 : 772, 1974.