

原著

異なる週齢で卵摘したラットにおける体重と骨密度の経時的変化

北村 文月、大庭 涼子、北川 智香子、下畠 美土、山中 峻吾、今本 喜久子

滋賀医科大学医学部看護学科基礎看護学講座 形態機能部門

要旨

Wistar 系ラットを 10、13 および 57 週齢時に卵巣摘出 (卵摘) して、体重と腰椎の骨密度 (BMD) を最長 100 週齢時まで測定した。体重は術直後から増加を示し、8~20 週後に 15~20%増の有意な体重差となった。これに対応する餌・水の摂取量は、卵摘群では術後 10 週間にわたって約 30%の増加を示し、それ以後は健常群との差は消失した。

健常群の腰椎部 BMD は、25~50 週齢の期間に最大 BMD を保った後、徐々に低下して 90 週齢を越えると最大 BMD の 80% になった。10 週齢時卵摘群は健常群より低い増加率で 26~40 週齢の間に 11%低い最大 BMD を保った。13 週齢時卵摘群は卵摘時の BMD からほとんど変わらず推移し、57 週齢時卵摘群はゆるやかな低下を示した。卵摘の時期によりその後の体重と BMD の推移が異なることが示された。

キーワード： Wistar 系ラット、卵巣摘出、体重、餌・水摂取量、骨密度 (BMD)

序文

卵巣エストロゲンは血中 Ca^{2+} 濃度の維持に深く関わっており、卵巣機能の低下する閉経前後には骨吸収が亢進し、骨密度 (Bone Mineral Density : BMD) が急激に低下すると言われる^{1~2)}。また、この時期の女性によく見られる肥満傾向の原因は、種々の生活習慣の弊害や社会環境的ストレスによる過食であるとみなされている。肥満の予防に努めることはメタボリックシンドロームの予防につながり、健康維持の基本であると考えられている。生活習慣病の発生率の最も低い体格指数 (BMI : Body-Mass Index) は 22.2 であるとされるが³⁾、この値は年齢に応じて大きく異なり、高齢者では太りすぎより痩せすぎの方がむしろ死亡率が高くなるなど健康上の危険が大きいと言われる^{4~5)}。骨についても、健康な高齢者では必ずしも加齢に伴って BMD は低下せず、骨粗鬆症は肥満よりも痩せのタイプに多いと報告されている^{6~7)}。

閉経後の骨量減少や肥満の研究には、BMD や体重の縦断的なデータが欠かせない。しかし、ヒトを対象とした縦断的研究は長期化する上に、正確な閉経時期が分かりにくいことや、運動不足やストレスによる過食の影響も無視できないという問題がある。従って、閉経前後における BMD と体重の生理的変化のメカニズム解明には、より単純化された実験動物を用いて雌性に共通の生理現象を

追求することが有効と考える。

閉経モデル動物としては卵巣摘出 (卵摘) ラットがよく用いられる。しかし、卵摘が即閉経を意味するとは言いがたい。卵摘時の週齢や、卵摘からどれほど経過しているかで、実験データが異なることが予測されるからである。卵摘後の肥満について言及した研究もあるが^{8~10)}、ラットの卵摘時の週齢に注目し、卵摘前後の BMD と体重の変化を併せて長期間観察した基礎データの報告はほとんどない。閉経後の骨量減少や肥満の予防にはエビデンスに基づいた対応策が必要であると考えられる。

成長期、成熟期への移行期、高齢期と思われる異なる 3 週齢で卵摘したラットを最長 100 週齢まで観察し、体重と腰椎部 BMD の経過からこれらに卵摘による影響がどのように生じるかを考察した。本研究には数年間にわたり測定したデータをまとめて用いた。得られたデータは Microsoft Excel XP を用いて処理し、健常群と卵摘群の値の有意差を t 検定 ($p < 0.05$) で検証した。

材料と方法

使用した Wistar 系ラットは空調完備の施設内で飼育した 40 匹であり、内訳は 10 週齢時卵摘ラット 4 匹に対し同健常 4 匹、13 週齢時卵摘ラット 16 匹に対し同健常 8 匹、57 週齢時卵摘ラット 5 匹に対し同健常 3 匹である。両側の卵巣摘出は、

ペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射（用量 30mg/kgbw）による麻酔下で実施した。卵摘後の性周期消失は膣スミアの細胞診で確認した。

体重測定は週 1 回行った。1 ケージごとの餌・水摂取量を術後 20 週まで週 1 回計量し、匹数で割って 1 匹当たりの摂取量とした。ただし、13 週齢ラットの水摂取量においては、卵摘ラット 4 匹と健常群 3 匹のみのデータであり、卵摘 6 週後まで週一回代謝ケージを用いて一日の餌・水摂取量と尿量を 1 匹ずつ測定した。

BMD (g/cm^2) 測定は、二重エネルギー X 線吸収法 (Dual Energy X-ray Absorptiometry: DXA) で機器 DPX-IQ (LUNAR 社製) を用いて 500g 以下の小動物測定モードで実施した。卵摘後 6 ヶ月までは約 4 週毎に行い、それ以後は 8 週毎に行った。麻酔下で定形に整えたラットを全身スキャンで測定し、腰椎部 (L2~L5) の値を得た。

卵摘群のうち、卵摘するまでのデータは健常群のデータとして扱った。卵摘直後と BMD 測定直後の週は麻酔の影響で食餌量が少なく体重も上昇率が低下するため、麻酔後第 1 週目の値は第 2 週目との平均値で示した。

本研究計画は、滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得ており、動物実験に関する指針に沿って行った（承認番号 2003-5-11, 2005-5-7）。

結果

①体重推移

平均体重の推移をグラフで示した（図 1）。健常群は、測定を開始した 5 週齢から 10 週齢の 212g まで急激に増加した。

体重曲線から、10 週齢は成長期であり、13 週齢は成長期から成熟期への移行期、57 週齢は高齢期である。体重は 90 週齢ごろまでゆるやかに上昇し続け、90 週齢を過ぎると死の数週間前から急激な体重減少が生じた。100 週齢以上の生存率は 80% に満たなかった。

10 週齢時に平均 189g、13 週齢時に平均 227g、57 週齢時に平均 302g と標準的な体重であったラットをそれぞれの時期に卵摘した。いずれの時期に卵摘しても、術後 1 週目は手術および麻酔の影響で一時的な体重減少が見られたものの、体重は術後 2 週目から明らかに増加し始め、10 週齢時卵

摘、13 週齢時卵摘では、術後 4 週目に健常群と比較して平均値に有意差が認められた（各々 $t=3.1$ 、 $t=5.7$ ）。57 週齢時卵摘では術後 6 週目に有意差が認められた（ $t=2.7$ ）。体重の増加は健常群に比べ約 50g 増（15~20%増）が限度であり、長期間飼育してもそれ以上には差が広がり続けることはなく、健常群とほぼ平行して推移した。健常群の体重が低下し始める 90 週齢ごろでもゆるやかな増加が見られた。

②餌・水摂取量

術後 21 週までの餌・水摂取量の週あたり平均値をグラフで示した（図 2）。卵摘前の 10、13、57 週齢時の餌摂取量は週当たりの平均値が 80、109、90g であった。水摂取量は週あたり 150~200g の範囲内であった。健常群でも成長期終盤である 13~20 週齢の期間では餌・水摂取量が多い傾向にあった。摂取量は加齢に伴いやや増加する傾向を示した。13 週齢の一部のラットで代謝ケージを用いて測定した 1 日当たりの尿量は 15~20ml であり、飲水量に対して妥当な値であると思われた。

餌・水摂取量は卵摘から約 10 週間は特に多く、約 30%もの増加となっていた。10 週齢時卵摘群では、健常群に比べて 1 匹当たりの餌が週平均 11.3g、水は 54.0g 増加していた。成長期終盤の 13 週齢時卵摘群でも卵摘 6 週後までの平均では、餌 17.0g、水 43.9g の増加を認めた。高齢の 57 週齢においても、10、13 週齢時卵摘群ほど多くはないものの、同様に増加していた。卵摘から 1 年以上経過した高齢ラットとその同週齢健常ラットの摂取量を同時期に測定したデータに差がなかったことから、これらの増加は一時的なものであると言える。

③腰椎部 BMD

健常群の腰椎部 BMD は、6 週齢で $0.186 \text{ g}/\text{cm}^2$ 、10 週齢では $0.230 \text{ g}/\text{cm}^2$ であった。6 週齢から 13 週齢の $0.248 \text{ g}/\text{cm}^2$ までは、週あたり平均 4.8% の増加率で急激に上昇し、25~45 週齢の期間で最大 BMD $0.270 \text{ g}/\text{cm}^2$ 付近を維持した後、57 週齢の $0.266 \text{ g}/\text{cm}^2$ を経て約 90 週齢までゆるやかに低下し、100 週齢では卵摘群と差がなかった。

10 週齢時卵摘群では低く上昇を続け、25 週齢で

健常群より平均 3.3%低い最大 BMD に至り、43 週齢までの期間それを維持した。13 週齢時卵摘群では、卵摘後はほとんど大きな変化がなく、ゆるやかに低下した。57 週齢の高齢ラットでは、卵摘から 5 週後に約 10%の有意な減少を示した($t=2.3$)。その後は横ばいとなり、健常群との差は消失した。

考察

健常群の体重推移は通常のラットの体重曲線から標準的であると言える（日本クレア資料）。

卵巣摘出によりエストロゲンが低下したラットでは、ヒトの場合と同様に BMD の明瞭な低下を予測した。しかし、卵摘後の BMD は若齢の 10 週齢では健常群より低い増加率で上昇し、13 週齢時ラットでは横ばいで推移し、高齢の 57 週齢ラットだけが減少の後に横ばいとなった。

カルシウム代謝においては、上皮小体ホルモン (PTH)、カルシトニンおよび活性型ビタミン D₃ の相互作用が重要で、骨吸収と骨形成の繰り返しにより血中 Ca²⁺濃度の恒常性が維持される^{11~14})。その他にもライフサイクルに関わる成長ホルモンやエストロゲン、外傷・ストレスなどに関わる糖質コルチコイドの影響も報告されている^{1, 11, 15})。

卵摘により血中 Ca²⁺濃度が不足すると、PTH の間接的作用で破骨細胞が活発に骨吸収を行うため、尿中には骨基質の代謝産物である I 型コラーゲン N-テロペプチドが増加するが、卵摘時のラットの性成熟度によりその増加の様子が異なる^{16~17})。従って、実験に用いるラットの性成熟度の違いにより、卵摘が骨に及ぼす影響に差が生じたと考えられる。成長期の若齢ラットでは、血中 Ca²⁺濃度の維持にエストロゲンよりも成長ホルモンの影響が大きいと、卵摘後も血中 Ca²⁺が大きく不足することはなく、BMD は低下しなかったと推測した。

卵巣エストロゲンは、骨形成増進や腸管における Ca²⁺吸収を促進する働きによって血中 Ca²⁺濃度を維持する他¹¹)、摂食行動の抑制やエネルギー消費の増加にも関わることが知られている¹⁰)。卵摘直後から見られたラットの過食と体重増加は、血中エストロゲン濃度の急激な低下により、摂食行動が制御されなくなったことや、エネルギー消費が低下し活動量が減少したことなどの関与が推察される。それに加えて、我々の胃粘膜の観察によ

り、成長ホルモン分泌促進や摂食促進の作用をもつグレリンが^{18~19})、卵摘ラットの過食に伴って固有胃腺の腺頸部に増加していたことも関与すると考えている（未発表データ）。

しかしながら、卵摘ラットの過食は一過性のものであり、体重は増加し続けることなく健常群より 15-20%増を保って推移した。卵摘後は脂肪の増加に伴って、強力な摂食抑制とエネルギー消費増加作用を持つレプチンの発現も増大して体重増加の抑制に貢献していると推測される²⁰)。

閉経後のエストロゲンは副腎のアンドロゲンが皮下や、脂肪組織でホルモン変換酵素であるアロマターゼにより変換されて産生されることが知られている²¹)。アロマターゼは、閉経によりエストロゲンが低下すると、高値になった FSH や LH の影響で活性化するとされている^{21, 22})。副腎のアンドロゲン分泌が ACTH により促進されると、その増加したアンドロゲンを、局所で活性化したアロマターゼがエストロゲンに変換する²³)。近年、脂肪組織は最大級の内分泌臓器と呼ばれるほど、様々な役割が明らかになりつつある。異所性エストロゲンの産生では、Intracrinology と呼ばれる末梢組織でのホルモン産生機構において豊富な脂肪中のアロマターゼが重要な役割を果たすと考えられている²³)。末梢で代償的に生じたエストロゲンが、BMD へ及ぼす卵摘の影響を小幅にとどめたため、卵摘後の腰椎部 BMD は健常群より低く推移し、卵摘後も減少し続けることはなく健常群とほぼ平行したゆるやかな経過をたどったと考える。

ラットではヒトのような明らかな閉経は報告されていないため、本実験では卵摘によりその後の変化が顕著に現れた可能性がある。しかしながら、閉経前後の女性によく見られる肥満は、アロマターゼが副腎皮質からのアンドロゲンをエストロゲンに変換するための場である脂肪組織を増やすための代償的な生理現象であろう。高齢期に高い BMD を維持するには、成長期に BMD を最大限に確保しておくことが重要であることは言うまでもないが、閉経後のある程度の脂肪は BMD 維持に有益な存在であると言える。

閉経後は、末梢組織でエストロゲンレセプターの発現が強まっている可能性が高い。近年、閉経で失われたエストロゲンを補うことで BMD 低下を

予防しようとするホルモン補充療法が行われているが、これは局所でのエストロゲン濃度を過剰にするおそれがあるため、慎重に行うべきであると指摘されている²⁴⁾。本研究で得た知見を基礎データとして念頭に入れて、今後は閉経後骨粗鬆症や肥満についての研究を進めたいと考える。

文献

- 1) 須田立雄, 宮浦千里: 骨粗鬆症の成因研究の現況. 「骨粗鬆症学」 日本臨牀社 (編), 13-20, 日本臨牀社, 大阪, 2004.
- 2) 国立長寿医療研究センター 老化に関する縦断的研究 National Institute for Longevity Sciences Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA) MONOGRAPH - The First Wave (November, 1997 - April, 2000), The Second Wave (April, 2000 - May, 2002), The Third Wave (May, 2002 - May, 2004)
- 3) Matsuzawa Y., Tokunaga K., Kotani K., Keno Y., Kobayashi T., Terui S.: Simple estimation of ideal body weight from body mass index with the lowest morbidity. *Diab Res Clin Pract*, 10, s159-s64, 1990.
- 4) 葛谷文男, 下方浩史: 老年者の痩せの基準. *老化と疾患*, 8, 1007-12, 1995.
- 5) Andres R.: Effect of obesity on total mortality. *Int J Obesity*, 4, 381-6, 1980.
- 6) Hugh Taggart, David Craig, Karen McCoy: Healthy elderly individuals do not inevitably lose bone density and weight as they age. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 39, 283-90, 2004.
- 7) Soo Lim, Hyojee Joung, Chan Soo Shin, Hong Kyu Kee, Ki Sook Kim, Eun Kyung Shin, Hee-Young Kim, Min-Kyung Lim, Sung-Il Cho: Body composition changes with age have gender-specific impacts on bone mineral density. *Bone*, 35, 792-8, 2004.
- 8) Michael G. Griffin, Robert Kimble, Wendy Hopfer, Roberto Pacifici: Dual-Energy X-ray Absorptiometry of the Rat. Accuracy, Precision, and Measurement of Bone Loss. *J Bone Miner Res*, 8(7), 795-800, 1993.
- 9) S. Ikeda, H. Tsurukami, M. Ito, A. Sakai, T. Sakata, S. Nishida, S. Takeda, A. Shiraishi, T. Nakamura: Effect of Trabecular Bone Contour on Ultimate Strength of Lumbar Vertebra After Bilateral Ovariectomy in Rats. *Bone*, 28(6), 625-33, 2001.
- 10) 清水弘行: 女性肥満の成因. 特に性ホルモンと肥満の基礎的検討. *肥満研究* 8(3): 254-8, 2002.
- 11) 竹内靖博 (編): 骨粗鬆症のマネジメントのすべて. ホルモンと臨床, 第48巻春季増刊号, 医学の世界社, 東京, 2000.
- 12) Milne M.D.: Observations on the action of the parathyroid hormone in the human subject. *J Physiol*, 3(3-4), 63, 1950.
- 13) Copp D. H., Cameron E. C., Cheney B. A., Davidson A. G., Henze K. G.: Evidence for calcitonin — a new hormone from the parathyroid that lowers blood calcium. *Endocrinology*, 70, 638-49, 1962.
- 14) Klein R., Gow R. C.: Interaction of parathyroid hormone and vitamin D on the renal excretion of phosphate. *J Clin Endocrinol Metab*, 13(3), 271-82, 1953.
- 15) Arends N. J., Boonstra V. H., Mulder P. G., Odink R. J., Stokvis-Brantsma W. H., Rongen-Westerlaken C., Mulder J. C., Delemarre-Van de Waal H., Reeser H. M., Jansen M., Waelkens J. J., Hokken-Koelega A. C.: GH treatment and its effect on bone mineral density, bone maturation and growth in short children born small for gestational age: 3-year results of a randomized, controlled GH trial. *Clin Endocrinol*, 59(6), 779-87, 2003.
- 16) 北村文月, 黒川 清, 今本喜久子: 卵巣摘出ラットにおける尿中 NTX の推移と腰椎の骨密度および組織的変化の関係. *形態・機能*, 5(2), 2007.
- 17) 北村文月, 黒川 清, 今本喜久子: 卵巣摘出ラットにおける腰椎骨密度の推移にともなう尿中の I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチドと

カルシウム, 形態・機能, 4(1), 13-8, 2005.

18) Kojima M., Hosoda H., Date Y., Nakazato M., Matsuo H., Kangawa K.: Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. Nature, 402, 656-60, 1999.

19) Nakazato M., Murakami N., Date Y., Kojima M., Matsuo H., Kangawa K., Matsukura S.: A role for ghrelin in the central regulation of feeding. Nature, 409, 194-8, 2001.

20) Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J. M.: Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature. 372(6505), 425-32, 1994.

21) Sasano H., Suzuki T., Harada N.: From

endocrinology to intracrinology. Endocr Pathol, 9(1), 9-20, 1998.

22) Geller S., Scholler R.: FSH and LH pituitary reserve and output in the postmenopause. Maturitas. 2(1), 45-52, 1980.

23) 笹野公伸, 三木康宏: 乳癌における局所ホルモン環境とアロマターゼ. 日本臨牀, 65(6), 81-6, 2007.

24) Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators: Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. JAMA. 288, 321-33, 2002.

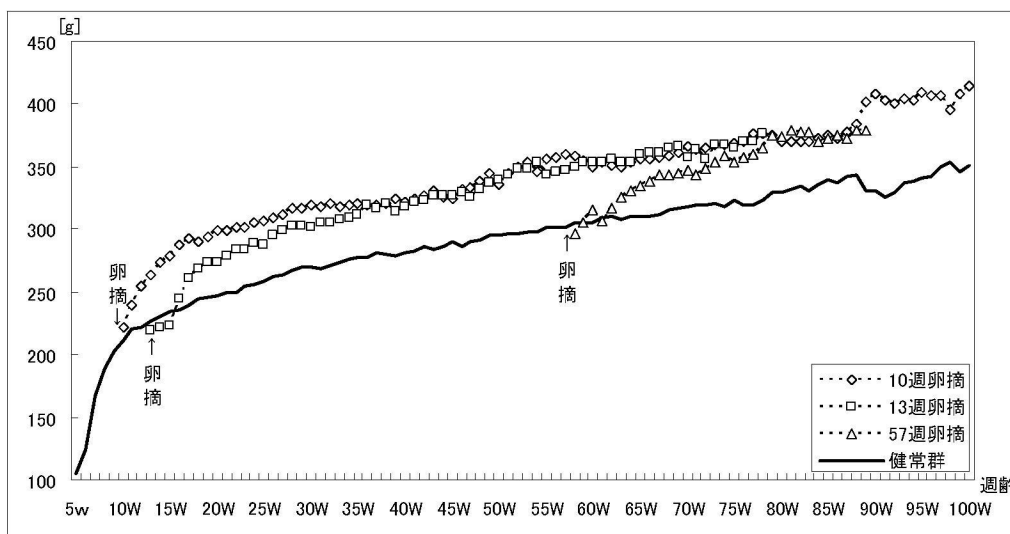


図1 卵摘後の体重変化

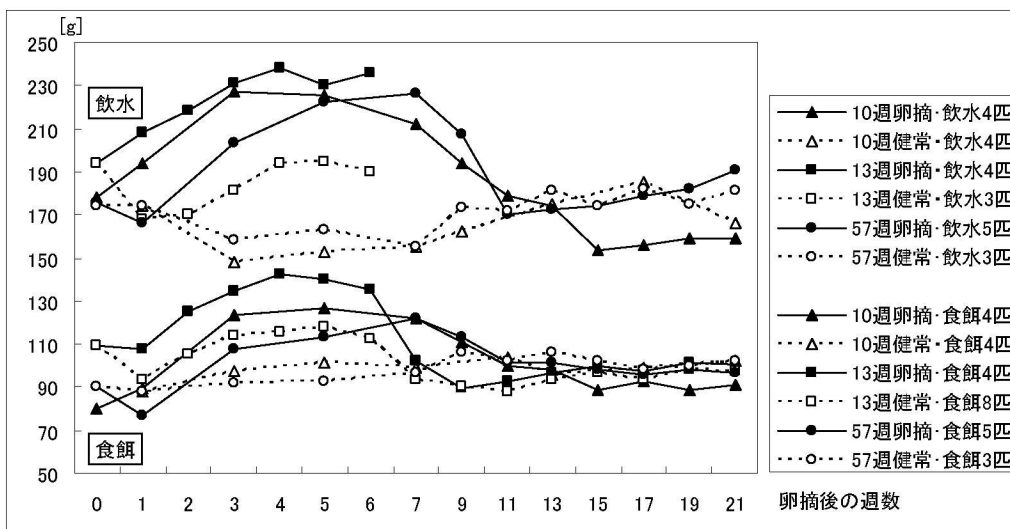


図2 卵摘後の食餌・飲水量変化 (一匹あたりの平均値)

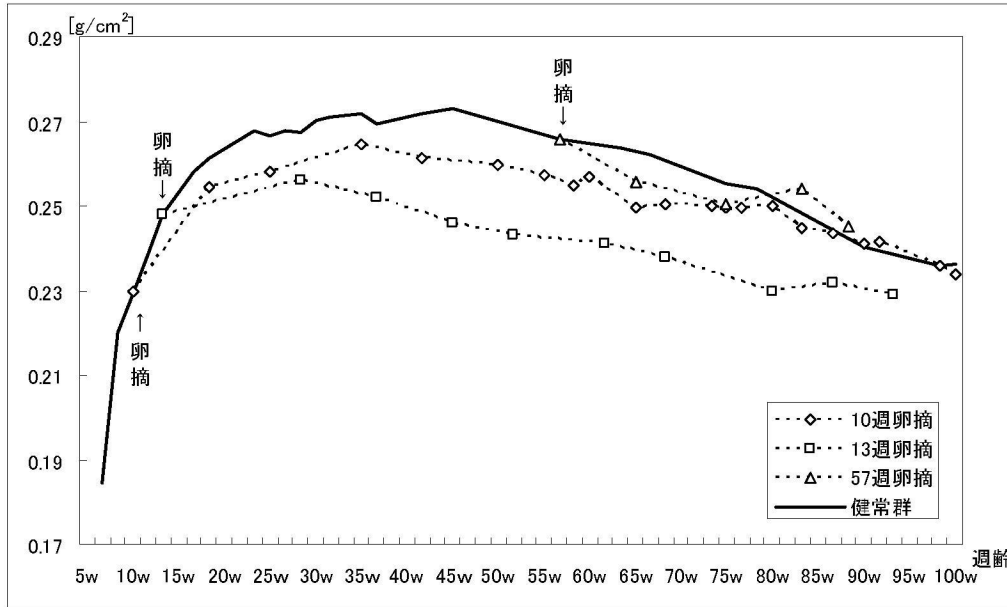


図3 卵摘後の腰椎部BMD変化

Transitional changes of the body weight and the BMD in rats ovariectomized at different ages

Fuzuki Kitamura, Ryoko Ohba, Chikako Kitagawa, Mido Shimohata,
Shungo Yamanaka, Kikuko Imamoto

Department of Fundamental Nursing, School of Nursing, Faculty of Medicine,
Shiga University of Medical Science

Key words

Wistar rat, ovariectomy, body weight, food and water intake, bone mineral density

Abstract

Wistar rats with ovariectomy (OVX) at ages of 10, 13, and 57 weeks were chronologically measured the body weight and bone mineral density (BMD) up to age of 100 weeks. The body weights increased soon after OVX, indicating 15–20% heavier weight than those of controls after 8 to 20 weeks. Concomitantly, the food and water intake in rats with OVX increased 30% more than that of controls for 10 weeks after OVX.

The controls gained the maximum BMD around ages of 25–50 weeks, and reduced gradually until 80% of the maximum BMD at ages of more than 90 weeks. The BMD of rats with OVX at 10 weeks reached the maximum around 26–40 weeks of age, which was 11% less than that of the controls. The BMD in rats with OVX at 13 weeks was little changes, while that in rats with OVX at 57 weeks gradually declined. Based on these results, we discussed the effect of the OVX at different ages on the body weight and the BMD in rats.