

## 卵摘による閉経モデルラットへのエストロゲン補充の影響

北村 文月<sup>1</sup> 山本 昌恵<sup>2</sup> 今本喜久子<sup>2</sup> 新穂千賀子<sup>3</sup>

<sup>1</sup>滋賀医科大学医学部附属病院

<sup>2</sup>滋賀医科大学医学部看護学科基礎看護学講座

<sup>3</sup>兵庫県立大学環境人間学部

### 抄録

卵摘による閉経モデルラットは、8週後までに対照群の体重より20%増の肥満となり、その差は長く保たれるが、3週間のエストロゲン補充中には体重は明らかに減少した。海綿骨から成る腰椎のBMDは、卵摘後に漸次低下し、エストロゲン補充後はわずかに上昇した。尿中のNTX値は、卵摘3週後にピークとなる一過性の上昇を示し、エストロゲン補充中は低値を保った。

乳腺組織は、一般に卵摘後には萎縮傾向を示すが、局所的に乳管-腺房系の上皮細胞や間質細胞の分裂増殖がみられた。その部位ではアロマターゼやエストロゲンレセプターの免疫染色性が増強していた。特に、エストロゲン補充後の乳腺では、免疫染色陽性を示す乳管-腺房系の上皮細胞の増殖、それを囲む線維性結合組織の増生、および炎症性細胞の浸潤がみられ、不整形に拡大した乳管内腔には乳汁や脂肪滴の貯留が確認された。

キーワード：卵摘閉経モデルラット、肥満、腰椎骨密度 (BMD)、エストロゲン補充、乳腺組織

### <はじめに>

閉経を迎えた女性は、卵巣機能の低下により血中エストロゲン量が減少する。ホルモン環境の急激な変化は骨吸収を亢進し、骨量減少から骨粗鬆症を発症するのみならず、いわゆる更年期障害の様々な不快症状を発現させる。こうした女性の心身の苦痛を軽減するために、婦人科領域ではホルモン補充療法(HRT)が有効であるといわれ利用されてきた<sup>1)</sup>。しかし、この治療法には重大なリスク発生が懸念され、特に乳癌の発生率が高まることが2002年のNIHの報告書に指摘されている<sup>2, 3)</sup>。

我々は、両側の卵巣を摘出(卵摘)した閉経モデルラットを用いて、卵摘直後から約2ヵ月間は過食状態で餌・水の摂取量が増え、対照群の体重より20%増の肥満になることを報告している<sup>4)</sup>。この体重増加は、卵摘によって摂食行動抑制に働くエストロゲンの血中濃度が低下した影響で食欲亢進して生じたと考察した。閉経に伴うこうした20%程度の肥満は自然な生理現象とみなしており、近年注目されているIntracrinology<sup>5)</sup>の考えに沿って、増加した脂肪組織中のアロマターゼが副腎アンドロゲンを局所的にエストロゲンに変換する代償的生理反応の発現と考えている。

一方、10~19週齢時に卵摘したラットを長期間(60週齢以上)飼育すると、肉眼的に明瞭な乳腺腫瘍が高頻度に発生することも報告した<sup>6)</sup>。

良性か悪性かにかかわらず、乳腺腫瘍の発生にはエス

トロゲンの影響が大きいと言われている<sup>7)</sup>。

前述のIntracrinologyに基づく乳腺腫瘍の発生機序は、卵摘により血中エストロゲン濃度は低下するものの、脂肪組織中のアロマターゼが活性化され、副腎から分泌された血中アンドロゲンを乳腺近傍でエストロゲンに変換するため、局所でエストロゲン濃度が高値となり、感受性の亢進した乳腺に異常を誘発すると説明できる<sup>8, 9, 10)</sup>。

本実験は、Intracrinologyの考えに基づきHRTが乳腺に異常発現のリスクを高める可能性を探るために、卵摘により肥満となる閉経モデルラットに3週間のエストロゲン補充を試みてその影響を考察した。

### <方法>

Wistar系雌ラット13匹を用いた(日本クレア)。全てのラットの実験過程は表1にまとめている。若い13週齢ラット6匹と高齢ラット(55および73週齢)4匹に両側の卵巣摘出(卵摘)術を施した。13週齢ラット3匹には開腹のみの偽手術を施した。術後6週と8週に、若いラットの3匹ずつ(卵摘2匹と偽手術1匹)を灌流固定した。残り3匹と55週齢・73週齢時卵摘の高齢ラット4匹には術後15週を経過してから小型のArzet<sup>®</sup>浸透圧ポンプ(DURECT社)を後頸部の皮下に埋め込んだ。

ミニ浸透圧ポンプには、プロピレングリコールでエストロゲンを3.3%に溶解した液を詰めた。持続注入速度は0.5 μL/hで3週間継続した。高齢卵摘ラット1匹のポン

表1 実験過程一覧

○: 体重測定、餌・水摂取量測定、NTX測定 △: 骨密度測定 取材: 灌流固定により組織摘出

ラット (数=n)	開始	手術	3日後	1-6W後	6W取材	7-8W後	8W取材	9-15W後	ガブ埋込	補充1-3W	3W後取材
13週齢 (n=6)	○△	卵摘術	○	○ 6回	△ 2匹	○ 2回	△ 2匹	○ 8回	△2匹 (補)	○ 3回	△ 2匹
13週齢 (n=3)		偽手術	○	○ 6回	△ 1匹	○ 2回	△ 1匹	○ 8回	△1匹 (補)	○ 3回	△ 1匹
55・73週齢 (n=4)	○△	卵摘術	○	○ 6回	-	○ 2回	-	○ 1回	△3匹 (補)	○ 3回	△ 3匹
									△1匹 (非)		△ 1匹

表2 腰椎骨密度(BMD)の変化

3匹以上の場合: BMD=平均値±SD

BMD単位: g/cm <sup>2</sup>	開始	6W後	8W後	15W後埋込前 (変化率%)	補充3W後 (変化率%)
ラット週齢					
13週齢卵摘術 (n=6)	0.243±0.010	0.239 (-1.6%)	0.238 (-2.1%)	0.236 (-2.9%)	0.239 (+1.3%) 補
13週齢偽手術 (n=3)		0.247 (+1.6%)	0.257 (+5.8%)	0.259 (+6.6%)	0.266 (+2.7%) 補
55・77週齢卵摘術 (n=4)	0.273±0.006	-	-	0.249±0.021 (-8.8%)	0.251±0.018 (+0.8%) 補
					0.236 (-5.2%) 非

ンプにはエストロゲンを含まない溶剤のみを詰めて埋めた。ポンプの埋込みから3週後にこれら7匹のエストロゲン補充ラットを灌流固定した。

全ての手術は、ペントバルビタールナトリウム液の腹腔内注射(30mg/kgbw)による麻酔下で実施した。術後は表1に示すように体重と餌・水摂取量を週1回、延べ21回測定した。

全尿は、術前と術後3日、術後1~8週およびエストロゲン補充中の1~3週に計13回代謝ケージで1泊させて採取し、冷凍で保存した。尿中の骨代謝産物であるNTX(I型コラーゲン架橋N-テロペプチド)は、キット試薬(持田製薬)を用いてELISA法で3回にまとめて測定した<sup>11,12)</sup>。

腰椎BMDの測定は、術前、取材前、ポンプ埋込前とエストロゲン補充後の延べ5回実施した。測定には二重エネルギーX線吸収(DXA)法の機種DPX-IQ(Lunar社)を用いた。

灌流固定後に摘出した組織片は、一昼夜浸漬固定してパラフィン包埋し、4μm薄切片を作成してH-E染色と免疫染色(ABC法)を施した。免疫染色に用いた抗体は、抗エストロゲンレセプター(ER)抗体(500倍希釈; Santa Cruz Biotechnology)と抗アロマトラーゼ抗体(200倍希釈; Bio Vision)である。

ラットは滋賀医科大学の動物生命科学センター内の調整環境下で飼育された。研究計画は、滋賀医科大学動物実験委員会の承認を得て、動物実験に関する指針に基づき慎重に実施した(承認番号2007-4-11)。

<結果>

1. 体重の推移

卵摘ラットと対照ラットの体重はこれまで報告した結果と類似の体重曲線を示した<sup>4)</sup>。図1に示したように、卵摘(13週齢時)ラットは6週後に対照群の平均体重より

11%増となり、8週後には対照群のそれより約20%増の肥満となった。その後15週まで、卵摘群と対照群の体重差は20%以内に保たれて推移した。

卵摘ラットの摂餌量は、卵摘後から8週間までの間は対照群より10~20%増しとなっていたが、その後両群間で摂餌量の差は明らかには認められなかった。即ち、卵摘後に生じた食欲亢進は卵摘後の8週間までに限られており、肥満の程度は対照群の20%を超えることはなかった。

浸透圧ポンプで持続的にエストロゲン補充を開始すると、一旦増加した体重は3週間で9%の減少を示した。偽手術の対照ラットはエストロゲン補充後も体重に変化がなく、これまで報告してきた偽手術や健常ラットの体重推移に相当していた。高齢卵摘ラットの場合も、卵摘後には術前の約20%増まで急上昇した体重が、ホルモン補充後は明らかに減少した。しかし、ホルモンを補充しなかった卵摘ラットは20%の体重増を維持していた。

以上の結果から、卵摘によりエストロゲンが低下すると食欲亢進が生じて必ず体重増加に傾くが、対照群の体重より20%を超えることはなく、エストロゲン補充により食欲抑制が生じて体重は減少することが明らかになった。摂食行動へのエストロゲンの生理作用は、ラットにおいても明瞭にその効果を確認することができた。

2. 腰椎BMDの推移

骨量測定では、全身の平均値、頭蓋部、膝関節部、および腰椎部に分けて骨密度(BMD)を求めた。しかし、卵摘によるエストロゲン低下やホルモン補充に対応してBMDに明瞭な変化を生じたのは腰椎部のみで、頭蓋骨や膝関節部では変動は不明瞭であった。腰椎は椎体部が海綿骨で構成されるため骨代謝の影響を受けやすいからと思われる。延べ5回の測定で得た腰椎のBMDを表2に示した。

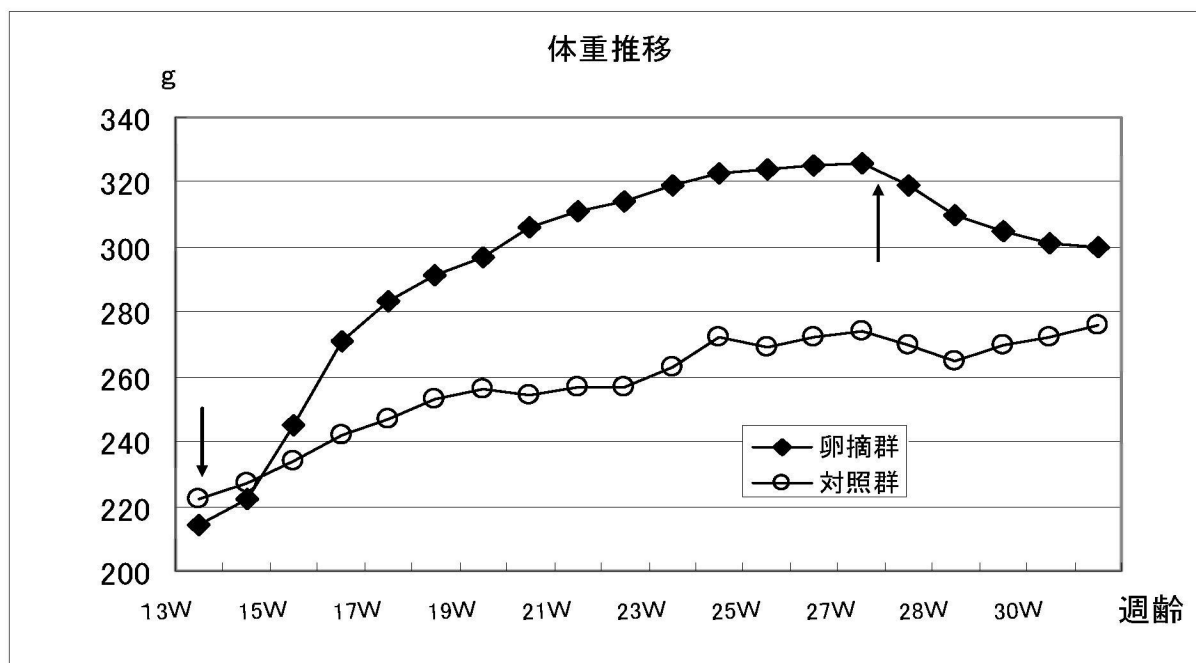


図1 卵摘ラットの体重推移

(↓ : 卵摘, ↑ : 補充ポンプ埋込)

ラットの腰椎 BMD は、13 週齢時に卵摘して 6 週後、8 週後および 15 週後には卵摘前より漸次減少した。しかし、卵摘 15 週後に変化率-2.9%と低下していた腰椎 BMD は、エストロゲン補充を 3 週間継続すると 1.3%増加した。偽手術ラットに補充すると、その変化率は+2.7%と倍になっていた。

高齢ラットの場合、腰椎 BMD の変化率は卵摘 15 週後に -8.8%であり、13 週齢時卵摘ラットより著明な BMD 減少を示した。その後、エストロゲン補充を 3 週間継続すると、BMD はわずかに 0.8%増加した。エストロゲン非補充の高齢卵摘ラットの場合、腰椎 BMD は 3 週後には変化率-5.2%とさらに低下した。以上の結果から、閉経ラットへのエストロゲン補充は、海綿骨から成り骨代謝が活発といわれる腰椎においてのみ BMD の増加には有効であることが認められたが、その他の骨部位ではこれと同じ傾向を確認することはできなかった。

### 3. 尿中の NTX 値

尿中の骨代謝産物 NTX 値の変動は図 2 に示した。測定に用いたラット数は少ないが、既に報告してきた NTX 値の変動と矛盾しない結果であった<sup>11, 12)</sup>。

手術直前のラットの NTX 値は、骨代謝が高回転型の若い健常ラットが示す正常範囲内の値であった。13 週齢時に卵摘すると、尿中 NTX 値は 3 週後に通常の 2 倍近い値のピークを有する一過性の上昇を示した。その後やや高い値が続いたが、卵摘 8 週後には術前とほぼ同じ NTX 値

にまで下がり、エストロゲン補充中はより低い値を保った。血中 Ca<sup>2+</sup>濃度の変動で上下する NTX 値は、上昇期には骨吸収が亢進して BMD は低下し、エストロゲン補充すると骨吸収が抑制されて NTX 値は低く保たれ、BMD が上昇する変動に一致していた。骨の代謝産物として尿に排出される NTX の値は、ヒト用のキットで調べたラットの尿でも骨吸収マーカーとみなすことができた。

### 4. 乳腺組織の変化

ラットの乳腺組織は、分岐した乳管-腺房系をなして真皮に薄く広がる皮筋下で皮下脂肪中に埋まっている。乳腺組織を観察すると、乳管部は 2 層の立方上皮細胞から成り、その先は短い細乳管として分岐し、小さな腺房を付けた乳腺小葉をなしている。乳腺小葉は比較的疎性の結合組織で周囲を取り巻かれている (図 3)。

卵摘ラットでは、エストロゲン低下の影響として外から見える乳頭が萎縮するだけでなく、乳管-腺房系も萎縮減少し、皮下脂肪中に点在するようになる。しかし、卵摘ラットの一部の乳腺では、乳管の立方上皮細胞が不規則に分裂増殖して乳管壁が不整形に肥厚し、腺小葉を囲む結合組織の増生もみられた。不整形の乳管腔内には時には少量の乳汁を認めることもあった。

免疫染色では、卵摘ラットの乳腺上皮細胞や間質細胞の核が抗 ER 抗体で明瞭に染め出され、それらの細胞質や脂肪細胞は抗アロマターゼ抗体で対照群よりも強くび慢性に染まっていた。

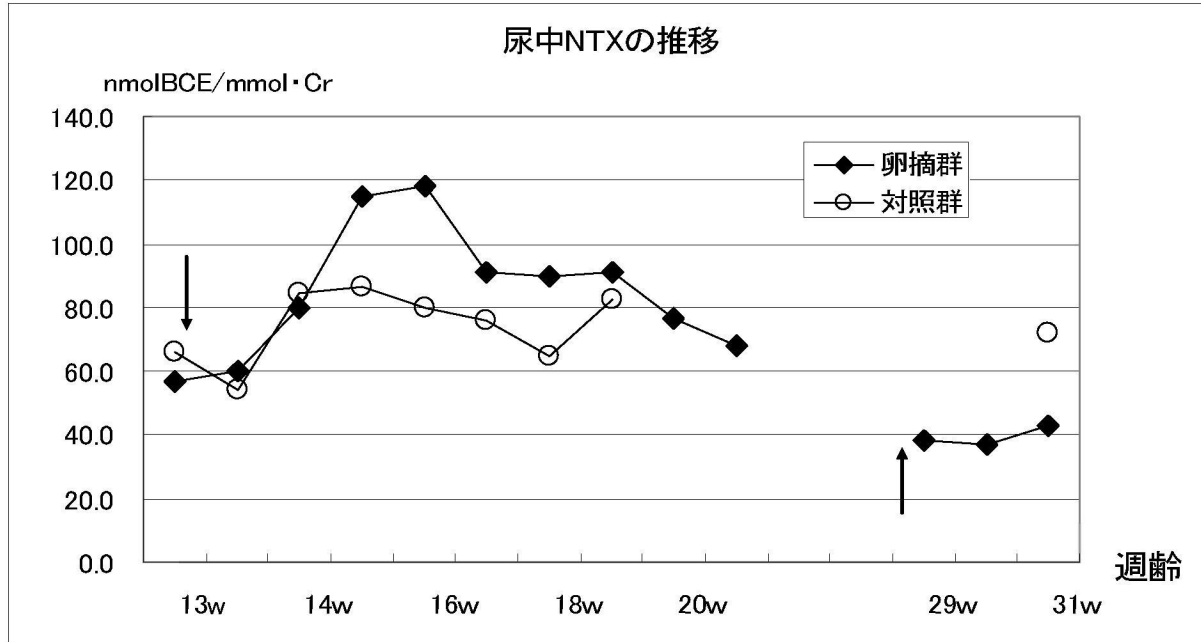


図2 尿中NTX (骨吸収マーカー) の推移 (↓:卵摘 ↑:補充(シンプ埋込))

卵摘時の週齢に関わりなく、その後にエストロゲン補充を3週間継続したラットでは、異常像はより著明となった。不整形の乳管-腺房系の内腔に乳汁や脂肪滴が大量に貯留していた(図4)。乳汁や脂肪滴が貯留している乳管近傍では、ER免疫陽性の乳管-腺房系上皮細胞の肥厚やアロマトラーゼ免疫陽性線維性結合組織の増生が認められ、免疫染色での陽性部位が拡大していた。

卵摘ラットの乳腺組織に異常を感じさせる上皮増殖や結合組織の増生がみられるだけでなく、エストロゲン補充後には異常組織の増生部位への炎症性細胞の浸潤が著しく認められた。

<考察>

今回の使用したラットは13匹と少なかったが、これまで我々が報告してきた卵摘による閉経モデルラットで確認された結果と一致していた。

卵摘後に食欲亢進で起こる肥満は、対照群の20%以内に収まっていた。増加した脂肪組織はアロマトラーゼの活性化に有効であり<sup>8-10</sup>、レプチン<sup>13</sup>が分泌されて摂食調節作用を行い20%以上の肥満は抑えられると思われた。従って、閉経に伴う肥満はエストロゲン低下に対する代償作用と考えられ、自然に起こる生理現象といえる。

卵摘ラットのBMDと尿中NTX値の推移は、血中Ca<sup>2+</sup>濃度の変動に応じて生じた骨吸収の結果であると捉えることができ、先の研究結果とも矛盾はなかった<sup>10,11</sup>。

卵摘ラットへのエストロゲン補充は今回初めて試みた。補充で血中Ca<sup>2+</sup>濃度が維持できれば当然これらの値は小幅な変動にとどまる。閉経モデルの肥満ラットでは、アロマトラーゼによるアンドロゲンの変換でホルモン補充なしでも局所でエストロゲンが高値に保たれる可能性があるため、骨吸収は抑制されうる<sup>9</sup>。

一般には、卵摘ラットでは血中エストロゲン濃度は低くなるため、乳頭だけでなく皮下組織に埋まる乳管-腺房系にも萎縮が見られた。しかし、明瞭な閉経が起こらないラットを卵摘して閉経モデルにすると、卵摘がラットの乳腺を易刺激性にすると考えられ、乳腺の萎縮と同時に乳管上皮の増殖や拡大した乳管内腔への乳汁貯留が起こることが確認された。

エストロゲンの標的器官である乳腺組織は、血中エストロゲン濃度が低下すると、感受性をさらに高め、末梢の脂肪組織に含まれるアロマトラーゼの作用でアンドロゲンがエストロゲンに変換されて、局所性に10倍以上の高濃度になると報告されている<sup>8,9</sup>。局所性エストロゲンの蓄積は易刺激性となっている乳腺に腫瘍発生のリスクを高めるという考えをこの結果からも支持できた<sup>9,10,14</sup>。

更に、卵摘ラットへのエストロゲン持続注入では、卵摘のみのラットに比べて不整形に分岐した乳管-腺房系の上皮細胞の分裂増殖、乳管上皮の肥厚、抗アロマトラーゼ抗体や抗ER抗体による免疫染色性の増強、乳汁や脂肪滴の貯留、線維性結合組織の増生などをより鮮明に示し

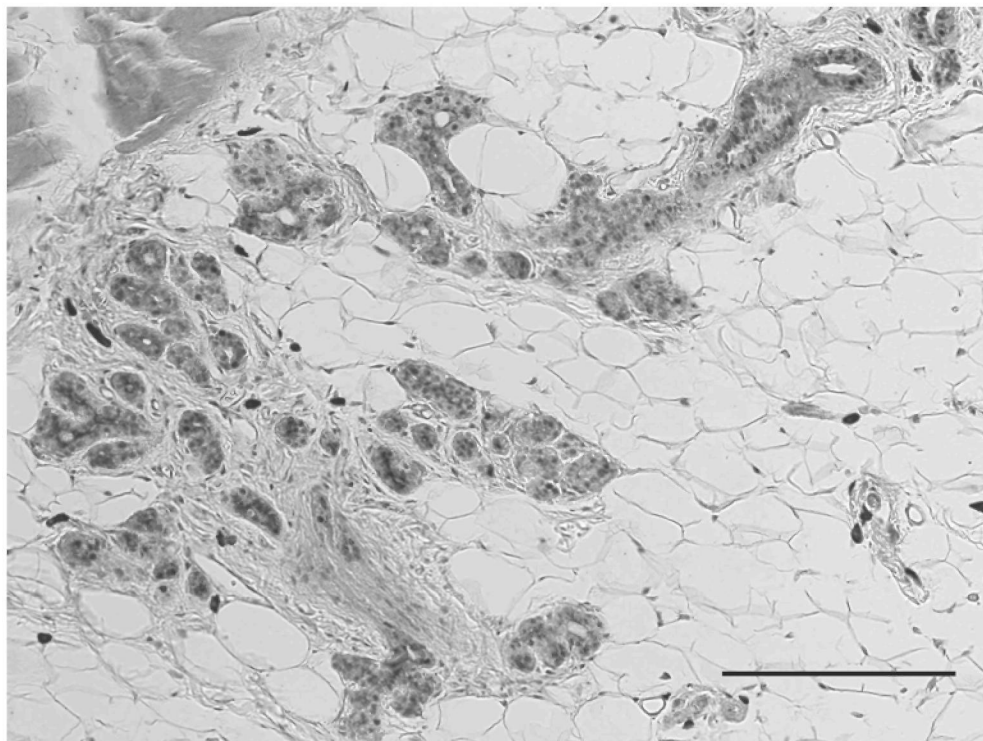


図3 偽手術(13週齢時)から8週後に取材した乳腺 ER免疫染色 Bar=100 $\mu$ m  
乳管-腺房系が脂肪組織内に埋まっている。乳管上皮細胞の核がER陽性を示している。

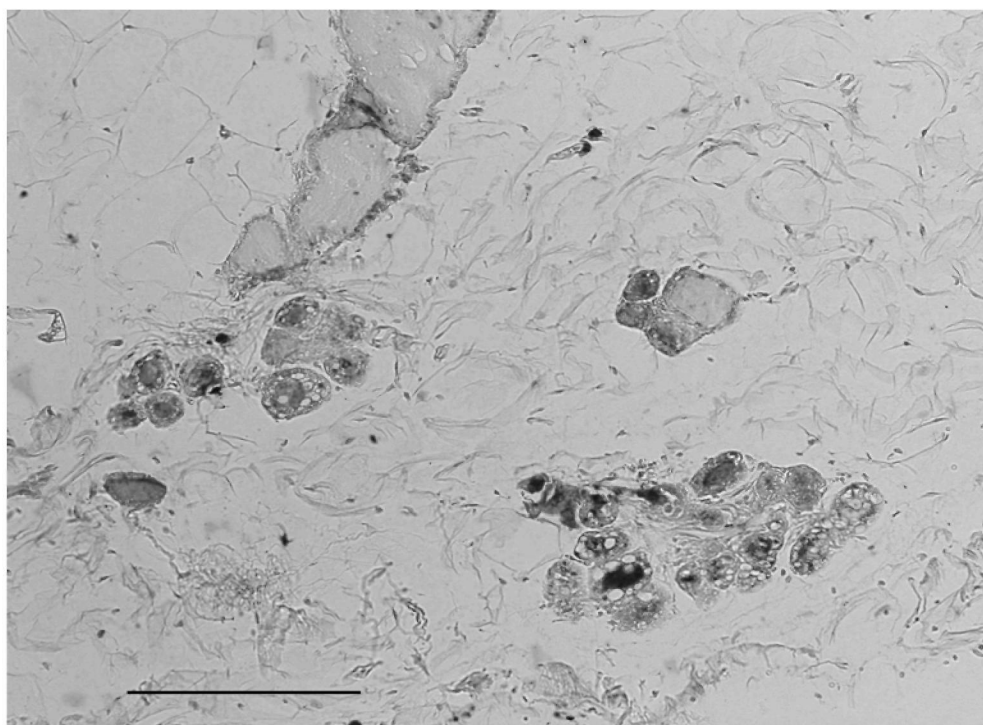


図4 卵摘(55週齢時)15週後に3週間エストロゲン補充した乳腺のER免疫染色 Bar=100 $\mu$ m  
不整形に拡大した乳管には乳汁が貯留し、腺房をなす上皮細胞は核がER強陽性である。

ており、局所での異常発生を示唆していた。

ヒトの場合、HRTによる外因性エストロゲンが乳腺に達

し乳管-腺房系に異常を誘発するだけでなく、アロマターゼの過剰発現の関与が腫瘍の発現には重要となる<sup>5,14)</sup>。卵

摘によって人工的閉経を迎えたラットにおいても、約 20% 程度の肥満になり脂肪が増加すると、標的細胞の ER 感受性が亢進し、アロマトラーゼ活性の増強により、外因性エストロゲンの蓄積などが腫瘍発現に深く関わるとみなされる<sup>9)</sup>。ヒトでもラットでも、閉経後のホルモン補充療法は乳腺付近のホルモン環境を二重に攪乱するリスクが高いと考える。

<結語>

本実験結果から、エストロゲンの生理作用を十分に証明でき、また閉経後の HRT のリスクを乳腺において示唆することができた。閉経に伴って発症する骨粗鬆症や更年期障害の治療法としてはリスクを有する HRT を極力避けることが望ましい。

<謝辞>

本研究は、滋賀医大の実験実習支援センター、動物生命科学センターおよび附属病院放射線科の設備・機器を利用して実施しました。関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

<文献>

- 1) 折茂肇 (編) : 最新骨粗鬆症. 6 婦人科における骨粗鬆症治療. 529-552, ライフサイエンス出版, 東京, 1999.
- 2) Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. JAMA. 288, 321-33. 2002.
- 3) Collaborative Group on Human Factors in Breast Cancer (Beral V, et al) : Breast cancer and hormone replacement therapy; collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52705 women with breast cancer and 108411 women without breast cancer. Lancet 350, 1047-1059, 1997.
- 4) 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 : 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. 滋賀医科大学看護学ジャーナル, 6(1), 24-9, 2008.
- 5) 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トラーゼ. 日本臨床, 65(6), 81-6, 2007.
- 6) 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 : 卵摘ラットの骨および乳腺の観察. 形態・機能, 6(1), 66, 2007.
- 7) 土橋一慶 : ホルモン補充療法と乳癌—スクリーニング・診断における注意点を中心に. 産婦人科治療, 83 (6), 693-695, 2001.
- 8) Miller WR, Hawkins RA, Forrest APM: Significance of aromatase activity in human breast cancer. Cancer Res (Suppl) 42, 3365s-3368s, 1982.
- 9) Sasano H, Suzuki T, Harada N: From endocrinology to intracrinology. Endocr Pathol, 9(1), 9-20, 1998.
- 10) Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T: New development in intracrinology of breast carcinoma. Breast Cancer, 13(2), 129-136, 2006.
- 11) 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.
- 12) 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 と腰椎の骨密度及び組織学的変化の関係. 形態・機能, 5 (2), 89-96, 2007.
- 13) 海老原健, 中尾一和 : レプチン, 医学のあゆみ, 210 (4), 243-249, 2004.
- 14) 笹野公伸 : 乳癌のホルモン依存性機構と Intracrinology, ホルモンと臨床, 52, 665-670, 2004.

## Effects of estrogen replacement on ovariectomized menopausal model rats

Fuzuki Kitamura<sup>1</sup>, Masae Yamamoto<sup>2</sup>, Kikuko Imamoto<sup>2</sup> and Chikako Niiho<sup>3</sup>

1) University Hospital, 2) Department of Fundamental Nursing, Faculty of Nursing, Shiga University of Medical Science, 3) School of Human Science and Environment, Hyogo Prefectural University

Key words : ovariectomized menopausal model rat, obesity, lumbar BMD( bone mineral density), estrogen replacement, mammary tissue

### Abstract

Menopausal model rats became obesity with 20% heavier body weight than controls' up to 8 weeks after ovariectomy, and kept obese condition for a long time, though they clearly lost weight during 3-week estrogen replacement. BMD of lumbar vertebrae composed of cancellous bone decreased gradually after ovariectomy, and then slightly increased during 3-week estrogen replacement. The NTX in urine indicated a transient increase with a peak at 3 weeks after ovariectomy, and maintained a rather low level during 3-week estrogen replacement.

In ovariectomized rats, some parts of the mammary tissue showed the proliferation of epithelial cells in the duct-acinar system and surrounding lobular interstitial cells, although the mammary glands generally caused atrophy after ovariectomy. Fairly positive immunostaining with antibodies against the aromatase and estrogen receptors was noted in the hyperplastic areas. Particularly, the mammary ducts enlarged irregularly and packed with milk and lipid droplets were occasionally observed in ovariectomized rats received 3-week estrogen replacement, in addition to an accumulation of immunopositive proliferating epithelial cells, hyperplasia of lobular connective tissue and serious infiltration of inflammatory cells.