Immobilization Osteoporosis に対する Estrogen の予防効果

折 茂 肇 藤 田 拓 男 吉 川 政 己*

Estrogen の骨粗鬆症に対する予防効果を検討するためにラットにおいて右下肢をギプス固定することにより実験的 immobilization osteoporosis を作成し同時に結合型 estrogen を投与し大腿骨X線像, 骨皮質幅, 骨内 Ca 含量および脛骨内 collagen 含量の測定を行った. 実験は生後 6 週後および生後 6 ヶ月の Wistar 系雌ラットを用い生後 6 ヶ月の群ではさらに卵巣摘除の影響についても検討を行った. まず生後 6 週のラットにおいては 4 週間の右足ギプス固定により右大腿骨密度, 骨皮質幅, Ca 含量および右脛骨内 collagen 含量の著明な減少が認められたが, これらの減少は結合型 estrogen の同時投与により有意に抑制された. 次に生後 6 ヶ月のラットにおいては 8 週間の右足ギプス固定によるも右大腿骨および脛骨には対照群のそれと有意の変化が認められなかった. しかし卵巣摘除を行うと同期間のギプス固定により大腿骨密度, 骨皮質幅, Ca 含量, 脛骨内 collagen 含量は対照群に比して有意に減少しさらに又 estrogen の防止効果も有意に認められた. 以上の事実は外因性 estrogen がラットにおける immobilization osteoporosis を防止する作用のあること, さらにまた内因性 estrogen が immobilization osteoporosis の発生を防止している可能性を示すものである.

緒 言

骨粗鬆症は一般に骨量の減少を伴う疾患であるがその予防ないしは治療についてはいまだに満足すべきものがない現状である. これは一つには本症の成因がさまざまであり, かつまた慢性に経過するため治療に長期間を要し薬剤の効果判定が困難であるためと考えられる. Albright ら¹⁾は本症が閉経期以後の女性に多いことから性ホルモン不均衡説を唱えestrogen が本症の予防ないしは治療に有効であることを指摘したが, それ以来骨粗鬆症と estrogen の関係について大いに注目されるに至った. Lindquist ら²⁾はラットにおいて estrogen が骨吸収抑制作用を有することを報告し Lafferty ら³⁾はヒトにおいても同様の作用が認められると述べている. Henneman ら⁴⁾は estrogen 治療を受けた 15 例の骨粗鬆症の内 13 例においてカルシウム代謝の改善が認められたと述べているが骨粗鬆症に対する estrogen の効果を確定的に示した報告は意外に少ない. 著者らはこの点をはっきり証明する目的でラットにおいて実験的骨粗鬆症を作成しこれに対する estrogen の予防効果を検討した. ラットで実験的骨粗鬆症を作成する方法としては従来から低 Ca

食で飼育する方法^{5,6)}, 副腎皮質 steroid を投与する方法⁷⁾, EDTA を投与する方法⁸⁾, ビタミン A を投与する方法⁹⁾等が知られており, 著者⁶⁾も以前これらの方法を用いた成績について報告したが今回ラットの右下肢をギプス固定することにより immobilization osteoporosis を作成しこれを実験的骨粗鬆症の model として用いた.

実 験 方 法

〔実験 I〕 生後 6 週の Wistar 系雌ラット 24 匹を以下のごとき 4 群に分け (各群 6 匹ずつ) 実験を行った.

- 第 1 群 対照群
- 第 2 群 右下肢ギプス固定群
- 第 3 群 右下肢ギプス固定と同時に結合型 estrogen 25 γ /日 経口投与群
- 第 4 群 右下肢ギプス固定と同時に結合型 estrogen 100 γ /日 経口投与群

実験期間は 6 週間, 飼育は Ca 含量 1.5% の Oriental rat chow (オリエンタル酵母工業) を用い水は随時投与した. 結合型 estrogen は蒸留水 1 ml に溶解し胃管にて投与しギプスは一週間毎に交換しその都度新しくした.

〔実験 II〕 生後 6 ヶ月の Wistar 系雌ラット 36 匹を無処理群と卵巣摘除群の 2 群 (各群 8 匹ずつ) に分けそのおのおのをさらに次のごとき 3 群に分けて実験を行った. なお卵巣摘除は実験開始 2 日前に行った.

* H. Orimo, T. Fujita, M. Yoshikawa: 東京大学医学部老年病学教室: 文京区本郷 7-3-1.
受付: 1970年9月1日.

無処置群

第1群 対照群

第2群 右下肢ギプス固定群

第3群 右下肢ギプス固定と同時に結合型 estrogen
50r/日 経口投与群

卵巣剔除群

第4群 対照群

第5群 右下肢ギプス固定群

第6群 右下肢ギプス固定と同時に結合型 estrogen
50r/日 経口投与群

実験期間は8週間、飼育は実験Ⅰと同じ条件のもとに行った。実験Ⅰにおいては6週間後、実験Ⅱにおいては8週間後に腹部大動脈より採血、動物を屠殺後、右大腿骨および脛骨を分離し軟部組織を除去した。血清 Ca は Webster の方法¹⁰⁾により測定し大腿骨の Ca 含量は大腿骨を焼灼炉にて 800°C で一昼夜灰化後同じ方法を用いて測定した。次いで大腿骨の hydroxyproline 含量を Miyada および Tappel の方法¹¹⁾により測定し collagen 量を次式を用いて計算した。

$$\left(\text{Collagen} = \text{Hydroxyproline} \times \frac{100}{13.2} \right)$$

大腿骨の X 線像は島津 2-D-150-L-2 型 X線装置を用いて 42 KUP, 50 mA, 0.1 秒, FFD 100 cm の条件下にて撮影しこの X 線像を用いて大腿骨中央の骨皮質幅をすでに報告した方法¹²⁾により測定した。実験Ⅰにおいては右大腿骨をホルマリンで固定後大腿骨頭から一定の距離にて横断面切片を作成し非脱灰切片について von Kossa の Ca 染色を行った。

結 果

1. 体重の変化

実験Ⅰにおいては6週間の実験期間中に対照群を除いた各群からおのおの1匹が不明の原因により死亡した。各群のラットの最終体重は第1群 200±2.5 g, 第2群 180±4.7 g, 第3群 185±2.3 g, 第4群 190±4.3 g で各群の間に統計的有意差は認められなかった。

実験Ⅱにおける体重曲線は図1に示すごとくで無処置群および卵巣摘除群のいずれの群においてもギプス固定群は対照群に比し体重減少の傾向を示しさらに無処置群においては結合型 estrogen の投与により有意の体重減少を認めた。

2. 血清 Ca の変動

実験Ⅰにおける血清 Ca の変動を表1に示す。ギプス固定群の血清 Ca 値は対照群のそれに比して軽度ではあ

図1. 実験Ⅱに於ける体重曲線、各群はおのおの6匹の平均値を示す。

表1. Effect of estrogens on the serum calcium in rats of immobilization osteoporosis

Treatment	No. of rats	Serum calcium, mg/100 ml
		Mean ± SE
Control	6	10.1 ± 0.20*
Immobilization	5	9.5 ± 0.09**
Immobilization + estrogen 25 r/rat	5	9.3 ± 0.21
Immobilization + estrogen 100 µg/rat	5	9.8 ± 0.12

* is significantly larger than ** with $P < 0.05$

表2. Effect of estrogen on the serum calcium in 6 mo. old rats of immobilization osteoporosis

	Serum calcium, mg/100 ml	
	Mean ± SE	
	Intact	Ovariectomized
Control	10.4 ± 0.08 (6)	9.9 ± 0.15* (6)
Immobilization	10.1 ± 0.17 (6)	9.1 ± 0.06** (6)
Immobilization + Premarin 50 µg/rat	9.8 ± 0.12 (5)	9.5 ± 0.18 (5)

No. of Rats in () * ** with $P < 0.05$

図 2. 実験 I における大腿骨内 Ca 含量および脛骨内 Collagen 含量を示す。
(*<** および +<++ $p<0.05$)
() 内はラット数を示す。

るが有意の減少を示した。ギプス固定と同時に 結合型 estrogen を投与した群の血清 Ca 値はギプス固定群の

それと有意差は認められなかった。実験 II における血清 Ca 値は表 2 に示すごとくで卵巣摘除後血清 Ca は軽度減少する傾向が認められ卵巣摘除群においてはギプス固定群より血清 Ca は減少する傾向が認められた。

3. 大腿骨の Ca 含量

実験 I における大腿骨の Ca 含量を図 2 に実験 II におけるそれを図 3 に示す。実験 I においてはギプス固定により大腿骨内 Ca 含量は著しく減少するが結合型 estrogen の同時投与によりこの減少は抑制される傾向にあり、とくに結合型 estrogen 100 μ g 投与群ではこの抑制効果は統計的に有意であった。実験 II ではまず無処置群においては 8 週間のギプス固定によっても大腿骨内 Ca 含量は有意の減少を示さなかった。これに対して卵巣摘除群では同期間のギプス固定により大腿骨内 Ca 含量は対照群のそれに比し有意の減少を示し、さらに結合型 estrogen がこの減少を有意に防止することが認められた。

4. 脛骨内の Collagen 含量

実験 I および実験 II の脛骨内 collagen 含量をそれぞれ図 2 および図 4 に示す。実験 I においてはギプス固定

図 3. 実験 II における大腿骨内 Ca 含量を示す。各群はおのの 6 匹の平均値を示す。

図 4. 実験 II における脛骨内 collagen 含量を示す。各群はおのの 6 匹づつの平均値を示す。

図 5. 実験 I における大腿骨の X 線像

PP はギプス固定群, Pr は結合型 estrogen の略

により脛骨内 collagen 含量は著明に減少するがこの減少は結合型 estrogen の同時投与により有意に抑制された。実験 II において無処置群ではギプス固定により脛骨内 collagen 含量は不変であった。しかしながら卵巣摘除群ではギプス固定により有意の脛骨内 collagen の減少が認められ estrogen の投与によりこれが防止されることが見出された。

5. 大腿骨 X 線像

実験 I における大腿骨 X 線像を図 5 に示す。ギプス固定により骨密度は著明に減少するがこの減少は結合型 estrogen 投与により防止されることが認められる。実験 II では無処置群においてはギプス固定による大腿骨密度の減少は明らかではないが、卵巣摘除群においてはギプス固定による骨密度の減少が著明でさらには又結合型

estrogen の防止効果も認められた (図 6 a, b)。

6. 大腿骨皮質幅の変動

大腿骨皮質幅の測定法を図 7 に示すがこの方法により測定した結果を実験 I については表 3 に実験 II については表 4 に示す。実験 I においてはギプス固定により大腿骨皮質幅は著しく減少し結合型 estrogen の投与はこれを防止する傾向が認められる。実験 II においては無処置群ではギプス固定による大腿骨皮質幅は不変であったが卵巣摘除群ではギプス固定により有意の骨皮質幅の減少を認めさらにはこの減少が結合型 estrogen 投与により有意に防止されることが認められた。

7. 大腿骨組織像の変化

右大腿骨の非脱灰横断切片に von Kossa 染色をほどこしたものを図 8 に示すがギプス固定により大腿骨内外

a. 実験Ⅱの無処置群の大腿骨 X 線像
PP はギプス固定群, Pr は結合型エストロゲンを表わす。

b. 実験Ⅱの卵巣摘除群の大腿骨 X 線像
PP: ギプス固定群, Pr: 結合型 estrogen を表わす。

図 6.

の Ca 含量 (とくに内側において) が著しく減少し結合型 estrogen の投与によりこの減少が防止される像が認められた。

考 察

骨粗鬆症は一つの疾患単位ではなく種々の原因による一つの症候群であるが、その成因に関しては現在でもなお不明の点が多く多くの説がだされている。Albright

ら¹⁾は本症が閉経期以後の女性に多いことから性ホルモン不均衡説を唱えたがそれ以来 estrogen が本症予防ないしは治療の目的で広く用いられるにいたった。Henneman¹³⁾はすべての婦人が閉経後には骨粗鬆症の予防のため estrogen を服用すべきであるとさえ極論しているが実際にその効果をはっきり証明した報告は以外と少ない。Young および Nordin¹⁴⁾は閉経期後には骨吸収率が増加するために骨粗鬆症が起こりやすくなると述べてお

表 3. Effect of estrogens on the cortical thickness of tibia in rats of immobilization osteoporosis

Treatment	No. of rat	Cortical thickness, % of bone width
		Mean $\pm$ SE
Control	6	51.0 $\pm$ 1.0
Immobilization	5	34.0 $\pm$ 3.0*
Immobilization + estrogen 25 r/rat	5	41.0 $\pm$ 4.0
Immobilization + estrogen 100 μ g/rat	5	46.0 $\pm$ 1.0**

** is significantly larger than * with $P < 0.05$

表 4. Effect of estrogen on the cortical thickness of femur in 6 m. old rats

	Cortical thickness, % of bone width	
	Mean $\pm$ SE	
	Intact	Ovariectomized
Control	44.0 $\pm$ 2.0 (6)	40.0 $\pm$ 2.0 (6)
Immobilization	36.0 $\pm$ 2.0 (6)	30.0 $\pm$ 1.0 (6)*
Immobilization + premarin 50 μ g/rat	36.0 $\pm$ 2.0 (5)	37.0 $\pm$ 1.0 (5)**

No. of rats in () ** < * $P < 0.05$

図 7. 大腿骨皮質幅の測定法

り内因性 estrogen が骨粗鬆症を防止している可能性を示唆した。Lafferty ら³⁾は 5 例の閉経期後および老人性骨粗鬆症に ethinyl estradiol を平均 2～3 ヶ月間投与し骨吸収率が減少することを balance study および ^{45}Ca を用いる Kinetic study により証明しており Henneman ら⁴⁾も骨粗鬆症による身長短縮が estrogen 投与により防止されることを認めている。Nordin ら¹⁵⁾は骨粗鬆

症に estrogen を投与すると血清 Ca および尿中 Ca は軽度低下するが便中 Ca 排泄はほとんど変わらないことを報告し血清 Ca の低下は estrogen の骨吸収抑制作用に基づくものであろうと考えた。しかしながら estrogen 投与により骨 X 線像ではっきりした改善を認めたとする報告はほとんどなく、したがって estrogen の骨に対する直接作用の証明はなかなか困難であると考えられる。

著者らはこの点を検討するためにラットにおいて実験的骨粗鬆症を作成し estrogen の予防効果につき検討を行った次第である。ラットにおいて実験的骨粗鬆症を作成する方法としては前述のごとく低 Ca 食で飼育する方法⁵⁾⁶⁾、副腎皮質ホルモンを投与する方法⁷⁾、EDTA を投与する方法⁸⁾、ビタミン A を投与する方法⁹⁾などが知られている。これらの方法は我々の経験によればラットの成長および食餌摂取に大なる影響を及ぼすので本実験ではより全身的影響の少ない immobilization osteoporosis を用いることにした。この方法はラットの下肢をギブス固定するもので骨の成長および体重等に対する影響は我々の結果が示すごとく比較的少ないものである。もとよりかかる実験的骨粗鬆症をヒトにおける骨粗鬆症と同一視することはできない。しかしながら immobilization osteoporosis がヒトにおいてもギブス固定や poliomyelitis 等に罹患後かなり短時間内に発生することやその

図 8. 大腿骨 Ca 含量に及ぼす結合型 estrogen の影響
黒く染まっている部分が Ca 沈着を示す。(von Kossa 染色)
PP: ギプス固定, Pr: 結合型 estrogen を表わす。

発生機序において骨吸収の亢進が重要な役割を演じていることを考えるとその発生病理はかなり似かよっているものと推定される。Whedon ら¹⁶⁾は poliomyelitis 患者において3ヵ月後に麻痺肢の骨粗鬆症を認めたと述べており Geiser ら¹⁷⁾はウサギにおいてギプス固定後5週間で骨粗鬆症を認めている。一般に実験的骨粗鬆症は老ラットにおけるよりも若ラットにおいて作りやすいといわれているが我々の成績でも生後6週のラットでは6週間のギプス固定により著明な immobilization osteoporosis を作り得たが生後6ヵ月の成熟ラットにおいては8週間のギプス固定によってもこれを作り得なかった。しかしながら生後6ヵ月の成熟ラットにおいても卵巣摘除後は immobilization osteoporosis を作り得たことは誠に興味深い事実で内因性 estrogen が骨粗鬆症の発生を防止している可能性を示唆するものといえよう。

Estrogen の骨に対する作用は動物の種類により異なりニワトリ¹⁸⁾、マウス¹⁹⁾においては骨形成を促進させるがラット²⁾およびヒト³⁾ではかかる作用はなく骨吸収を抑制するといわれている。すなわちマウスでは estrogen 投与により長管骨の長さおよび密度が著しく増加し一見 Albers-Schonberg 氏病を思わせる所見を呈し破骨細胞の形成および骨吸収は全く認められないという¹⁹⁾。

Simmons²⁰⁾らはマウスにおいて estrogen 投与により骨芽細胞中への ³H-thymidine の取り込みが増加したがって骨形成が増加することを認めた。ニワトリやハトにおいては estrogen の作用は詳細に研究されており、これらの鳥類においては estrogen はリン蛋白の生成および運搬をコントロールし産卵および骨髄内骨形成およ

び石灰化に重要な役割を演じているといわれている。ラットにおいては estrogen 投与により長管骨の骨吸収が抑制されることが Lindquist ら²¹⁾により報告されているが著者ら²²⁾も同じくラットにおいて dihydrotachysterol 投与により誘発された骨吸収が estrogen 投与により抑制されることを認めている。immobilization osteoporosis の発生病因については古くから骨芽細胞の機能減退が考えられている²³⁾が最近 Burkhardt ら²⁴⁾はあらかじめ副甲状腺摘除を行うと immobilization osteoporosis が起こらなくなることを見出し副甲状腺ホルモンによる骨吸収の増加が本症の発生に重要であろうと述べている。もしもそうであるなら estrogen はかかる骨吸収を抑制することにより immobilization osteoporosis の発生を防止する可能性が考えられる。

終りにご協力くださった東洋醸造研究所早野和夫博士および桜田豊三学士に感謝する。

文 献 1) Albright, F.: Osteoporosis, Ann. Int. Med. 27: 861. 1947. 2) Lindquist, B. et. al.: Skeletal metabolism in estrogen-treated rats studied by means of Ca^{45} , Endocrinology 66: 100, 1960. 3) Lafferty, F. W. et al.: Effect of androgens, estrogens and high calcium intakes on bone formation and resorption in osteoporosis, Amer. J. Med. 36: 514, 1964. 4) Hen-neman, P.H. and Wallach, S.: The use of androgens and estrogens and their metabolic effects, Arch. Int. Med. 100: 715, 1957. 5) Harrison, M. and Fraser,

R.: Bone structure and metabolism in calcium-deficient rat, *J. Endocrinol.* **21**: 167, 1961.

6) 折茂肇: 実験的骨粗鬆症に対する Thyrocalcitonin の効果, *日老医誌* **6**: 428, 1969.

7) Storey, E.: The influence of adrenal cortical hormones on bone formation and resorption, *Clin. Orthop.* **30**: 197, 1963.

8) 柴田尚一: The effect of ethylenediamine tetraacetic acid on the metabolism of calcium and inorganic phosphorus, *日整外会誌* **35**: 1199, 1962.

9) Foster, G. V. et. al.: In vivo effect of calcitonin on rats treated with toxic doses of vitamin A, *Excerpta Medica International Congress Series No. 157, Abstract of the 3rd International Congress of Endocrinology (Mexico, June, 1968)*.

10) Webster, W. W., Jr.: A simple microspectrophotometric method for determination of serum calcium. *Amer. J. Clin. Path.* **37**: 330, 1962.

11) Miyada, O. S. and Tappel, A. L.: Colorimetric determination of hydroxyproline. *Anal. Chem.* **28**: 909, 1956.

12) Fujita, T. et. al.: Prevention of experimental bone atrophy by thyrocalcitonin. *Endocrinol. Jap.* **15**: 8, 1967.

13) Vaughan, J. M.: The physiology of bone. Clarendon Press, Oxford, 1970, p. 220.

14) Young, M. M. and Nordin, B. E. C.: Effects of natural and artificial menopause on plasma and urinary calcium and phosphorus. *Lancet* **2**: 118, 1967.

15) Nordin, B. E. C., et. al.: The measurement and meaning of urinary calcium. *Clin. Orthop.* **52**: 293, 1967.

16) Whedon, G. D. and Shorr, E.: Metabolic studies in paralytic acute anterior poliomyelitis. II Alterations in calcium and phosphorus metabolism. *J. Clin. Invest.* **36**: 966, 1957.

17) Geiser, M. and Trueta, J.: Muscle action, bone rarefaction and bone formation. *J. Bone Jt. Surg.* **40 B**: 282, 1958.

18) Bloom, M. A. et. al.: Calcification and ossification. Medullary bone changes in the reproductive cycle of female pigeons. *Anat. Rec.* **83**: 99, 1942.

19) Urist, M. R. et. al.: Endosteal bone formation in estrogen-treated mice. *J. Bone Jt. Surg.* **32**: 143, 1950.

20) Simmons, D. J.: Cellular changes in the bones of mice as studied with triated thymidine and the effect of estrogen. *Clin. Orthop.* **26**: 176, 1963.

21) Lafferty, F. W. et. al.: Effect of androgens, estrogens and high calcium intakes on bone formation and resorption in osteoporosis. *Amer. J. Med.* **36**: 222, 1964.

22) Orimo, H. Fujita, T., Yoshikawa, M. and Hayano, K. A progeria-like syndrome produced by dihydrotachysterol: Its prevention by conjugated estrogens. *J. Amer. Geriat. Soc.* **18**: 11, 1970.

23) Fourman, P. and Royer, P.: Calcium metabolism and bone. Blackwell Scientific Publications. Oxford and Edinburgh, 1968, p. 260.

24) Burkhart, J. M. and Jowsey, J.: Parathyroid and Thyroid Hormones in the development of Immobilization Osteoporosis. *Endocrinology* **81**: 1053, 1967.

Abstract

Effect of Estrogen on Immobilization Osteoporosis in Rat

Hajime Orimo, Takuo Fujita & Masaki Yoshikawa*

The inhibitory effect of estrogens on the development of immobilization osteoporosis in rat was studied through the analysis of calcium and hydroxyproline content of the femur and tibia, and the measurement of cortical thickness of the femurs. In 6 weeks old rat, immobilization of the right hind limb through the application of a plaster cast for 6 weeks caused a marked decrease in the calcium content of the femur and the hydroxyproline content of the tibia. This decrease, however, was significantly inhibited by the simultaneous oral administration of 100 μ g of conjugated estrogens. Furthermore, administration of conjugated estrogens

significantly protected against the decrease in the bone density and the cortical thickness of the femurs of the immobilized limbs of rats. In 6 month old rats, immobilization of the right hind limb for 8 weeks had no effect. However, after ovariectomy immobilization caused a significant decrease in both calcium and hydroxyproline content of the bones and the cortical thickness of the femurs. Furthermore, these changes were significantly inhibited by the simultaneous administration of conjugated estrogens. It is concluded that conjugated estrogens diminished effect of immobilization on the development of osteoporosis in rat.

* Department of Geriatrics, Faculty of Medicine, University of Tokyo, Hongo 7-3-1, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan.