



Title	妊娠期および泌乳期マウスにおける乳腺組織の形態と核酸含量の変化
Author(s)	上地, 俊徳; 森, 浩作; 大泉, 弘; 清水, 美帆; 與儀, 沙織; 仲田, 正; 本郷, 富士彌
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(48): 137-144
Issue Date	2001-12-01
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3652
Rights	

妊娠期および泌乳期マウスにおける乳腺組織の 形態と核酸含量の変化

上 地 俊 徳*・森 浩 作**・大 泉 弘*・清 水 美 帆**
與 儀 沙 織**・仲 田 正**・本 郷 富士彌*

Shuntoku UECHI, Kosaku MORI, Hiromu OIZUMI, Miho SIMIZU
Saori YOGI, Tadashi NAKADA and Fujiya HONGO:

Changes in morphology and in the amount of Nucleic Acids
in mammary glands of pregnant and lactating ddY mice

キーワード：乳腺，マウス，核酸

Key Words : mammary gland, mouse, nucleic acid

Summary

Primiparous ddY mice were used to determine the extent of mammary gland growth during pregnancy and lactation. Mice were autopsied at day 0, 5, 10 and 15 of pregnancy, and day 7 of lactation. Mammary glands (third thoracic mammary) were collected from the skin at the thoracic region following the removal of skin fat. The weight of the dry fat-free mammary gland, mammary gland area, deoxyribonucleic acid (DNA) content, and ribonucleic acid (RNA) content were measured.

1. Mammary gland weight increased gradually with the progress of pregnancy. The maximum weight was observed at the lactating phase. The area of mammary gland tissue also aligned with the weight of the mammary gland, and it showed maximum value at the lactating phase.

In morphology, it was found that the basic structure of the mammary gland changed in connection with progress of pregnancy, during the lactation phase, and then the round alveolar cells came to cover the whole mammary gland tissue.

2. The total amount of DNA and RNA in the mammary glands increased linearly after the 10th day of the pregnancy, and each showed maximum growth on the 7th day of lactation. Except for the value of day 5 of pregnancy, the RNA/DNA ratio also increased linearly in connection with progress of pregnancy, and showed maximum growth during the lactating phase.

From these results it is concluded that progressive changes in both morphology and nucleic acid contents in the mammary glands of pregnant and lactating ddY mice could be investigated.

緒 言

乳腺の発達とホルモンとの関係については多くの研究報告¹⁻⁴⁾がある。乳腺は多種のホルモンの支

*琉球大学農学部生物資源科学科

**琉球大学農学部生物生産学科

配下にあるが、その中でもプロゲステロン (progesterone) は乳汁を合成し分泌する乳腺胞の発達を、エストロゲン (estrogen) は乳汁を排泄する乳管の発達をそれぞれ特異的に誘起することが明らかにされている^{5,6)}。乳腺の発達を調べる指標としてその重量、面積および脂質含量の測定、あるいはDNAへの[3H]-thymidineの取り込みを測定する方法やMRI(Magnetic Resonance Imaging)法、組織学的方法などがあるが、乳腺中の核酸を定量する方法もその一つで、マウスやラットにおいて妊娠により乳腺中のDNA量が増加したとの報告がある^{7,8)}。また、ラットで乳腺細胞数と泌乳量に高い相関が見られたとの報告⁹⁾もある。

今回、我々はマウス乳腺の妊娠期から泌乳期に至る間での発育状況および機能的推移を調べるために、非妊娠、妊娠5日目、10日目、15日目および泌乳期の各時点でマウスを屠殺し、乳腺のホルマウント標本の顕微鏡観察から形態的变化を、乳腺中の核酸含量から機能的変化をそれぞれ検討し、若干の知見を得たので報告する。

材料および方法

1. 供試動物

日本エスエルシー(株)より8週齢のddY系の雌および雄マウスを購入し、2週間以上予備飼育した。予備飼育期間中に膣垢検査を行ない、正常な性周期サイクルが見られた雌マウスを選抜して供試した。飼育室の湿度は $60 \pm 10\%$ 、室温は $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、照明は12時間毎明暗(8:00~20:00明)とし、MF固形飼料(オリエンタル酵母工業、株)と水は自由摂取とした。

2. 妊娠マウスの作出

排卵誘起のために雌マウスに妊馬血清性腺刺激ホルモンPMSG(セロトロピン; 帝国臓器製薬、株)5単位を1回皮下投与し、それから2日後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモンhCG(ゴナドトロピン; 帝国臓器製薬、株)5単位を1回腹腔内投与した。その後直ちに1ケージあたり雌雄各1匹を同居、交配させた。交尾があった時に形成される膣栓(vaginal plug; 乳白色、ケージ内に落ちているか膣内に詰まっている)の有無を調べ、膣栓あるいは膣垢中に精子が確認された日を妊娠1日とした。妊娠の最終的な確認は屠殺時の帝王切開により子宮内胎児の存在の有無によって行なった。ただし、妊娠5日目については、発生学的に受精卵着床の有無の確認が困難なため、卵巣組織切片のHE染色標本における妊娠黄体の存在を判定の参考に用いた。なお、対照として非妊娠マウス(intact; ホルモン処置も施していない無交配の処女マウス)を用い、参考として偽妊娠マウス(交尾後10日目に屠殺)も用いた。

3. 乳腺ホルマウント標本の作成および乳腺面積の測定

妊娠の経過に伴う乳腺の形態的および機能的変化を調べるために妊娠前、妊娠5日目、10日目、15日目および泌乳期(分娩後7日目)の各時点でエーテル過麻酔処置により5匹ずつ屠殺した。2匹をホルマウント標本作成用に、3匹を核酸定量用に用いた。

乳腺の剥離に際し、腹側からの剥離法を用いた場合は乳腺を損傷する可能性が高いことを考慮して、背部正中線から皮膚や周辺の脂肪組織と一緒に剥離した。次に、皮膚の皮毛部がコルク板に接するように張り付け、70%アルコールに24時間浸漬して脱脂後、左右5対ある中の胸部第3乳腺1対をできるだけ完全に採取した。乳腺から血管や筋肉組織などをピンセットで丁寧に取り除いて整形し、常法に従ってホルマウント標本を作成した。HE染色後、ビオライト封入し、光学顕微鏡による乳腺の形態学的観察と写真撮影を行なった。また、名古屋大学実験書の方法¹⁰⁾に基づいて乳腺面積(最長縦軸×最長横軸, mm^2)を算出した。

4. 乳腺重量および乳腺中の核酸定量

所定の方法によりアルコールおよびエーテルで脱水・脱脂した後の胸部第3乳腺1対の重量を測定し、これを乳腺重量 (weight of dry fat-free mammary gland) とした。核酸の抽出に際し、乳腺に蒸留水 2 ~ 12 ml (妊娠 15 日目は 6 ml, 泌乳期は 12 ml, それ以外は 2 ml) を加えてホモゲナイズした。これに冷 10%TCA (トリクロル酢酸水溶液) 2.5 ml を加え、よく混和後、遠心分離 (3000rpm, 4℃, 10 分) により酸可溶性成分を除去した。この操作を 2 度繰り返し行ない、得られた沈澱画分について STS の変法¹¹⁾ に準じて DNA(deoxyribonucleic acid), RNA(ribonucleic acid) を抽出した。抽出溶液中の核酸は日立ダブルビーム分光光度計 (U-2000A 形) を用いて、波長 260nm における抽出溶液の吸光度を測定し、標品の検量線より乳腺中の核酸量を算定した。成績は第 3 乳腺 1 対当たりの量で表した。また、RNA/DNA 比を求め、乳腺細胞当たりの活性の指標とした。

結果および考察

1. 乳腺重量

図 1 に妊娠各期および泌乳期における乳腺重量を示した。乳腺重量は妊娠 5 日目までは対照マウスと同等であったが、その後は妊娠の経過に伴って次第に増加し、対照マウスと比較して妊娠 10 日目で約 2

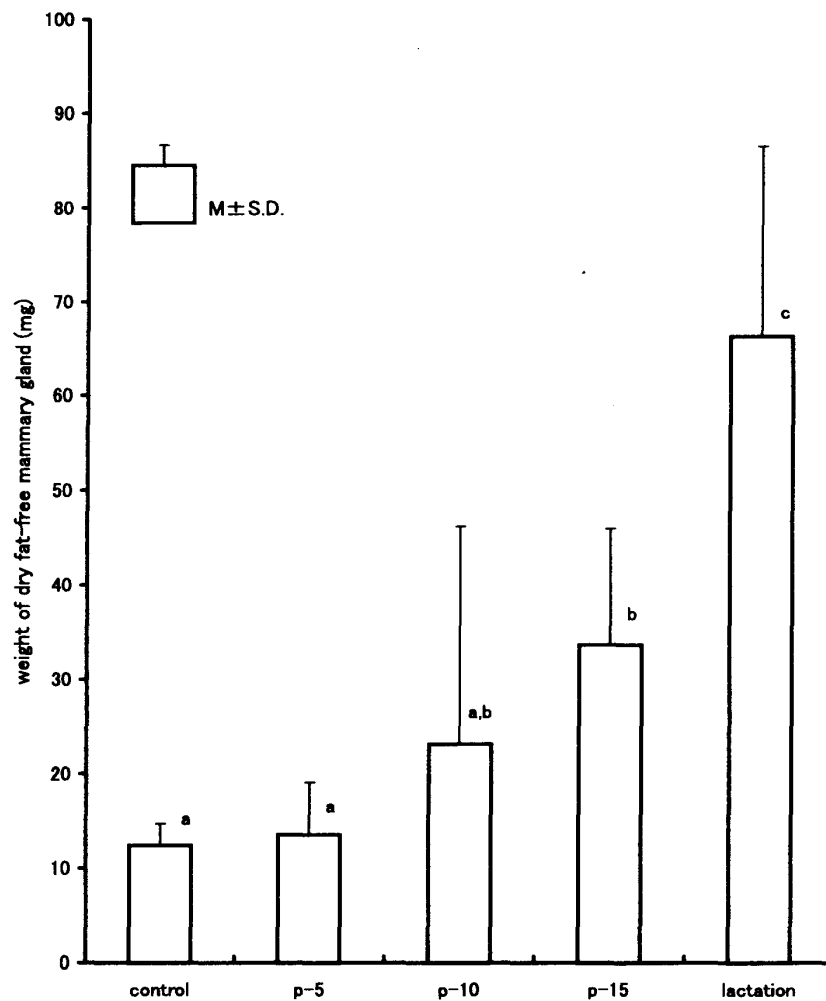


Fig.1 Changes of the weight of dry fat-free mammary gland during pregnancy and lactation in ddY mice.

^{a,b,c}Values with different superscript differ ($p < 0.05$).

p-5, p-10, p-15 : 5, 10, 15 days at pregnancy.

倍, 妊娠 15 日目で約 3 倍, 泌乳期マウスでは 5 倍以上に達した. 泌乳期マウスにおける乳腺重量の著しい増加は細胞数の増加を示すものと考えられ, 乳腺組織の活性も極大付近にあると思われる. 卵胞成長, 排卵, 受精, 妊娠, 分娩, 哺育という完全生殖周期における妊娠中期から泌乳期間での乳腺重量の変化を知ることができた. なお, 成績は示さないが, 偽妊娠マウスの乳腺には重量増加は全く見られず, 対照マウスの $1/2$ 以下の値であった.

2. 乳腺面積および乳腺の形態学的変化

図 2 にホルマウント標本より算出した妊娠各期および泌乳期における乳腺面積を示した. 妊娠 5 日目では対照マウスとほとんど差がなかったが, その後妊娠の経過に伴って増加し, 泌乳期において最大値を示した. こうした変動は乳腺重量のそれとほぼ同調していた.

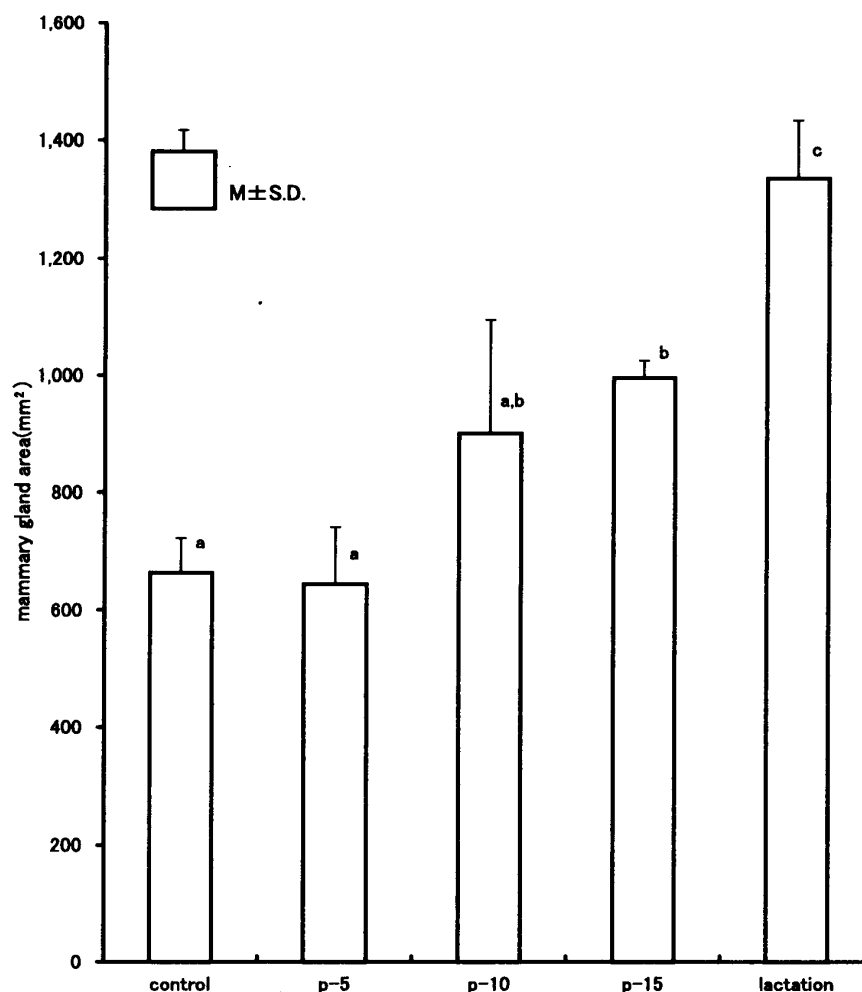


Fig.2 Changes of the mammary gland area during pregnancy and lactation in ddY mice.

^{a,b,c}Values with different superscript differ

図 3 に妊娠各期および泌乳期における乳腺組織の実体顕微鏡写真を示した. 妊娠の後半から泌乳期にかけて乳管の分枝および乳腺胞の形態が少しずつ変化していく様子が見られた. すなわち, 対照マウス (1) に比べて, 妊娠 5 日目 (2) では乳管の分枝や乳腺胞の形成状態がやや劣るが, 乳管はすこし密になっていた. 妊娠 10 日目 (3) では乳腺胞には変化はないが, 乳管が太くなった. 妊娠 15 日目 (4) では乳管の分枝と乳腺胞の形成が顕著になった. 泌乳期 (5) になると, 乳腺胞の発達が一層顕著となり, 乳管が見えなくなるくらい全面が乳腺胞で覆い尽くされた. この他に, 乳腺胞には形態的な変化も見ら

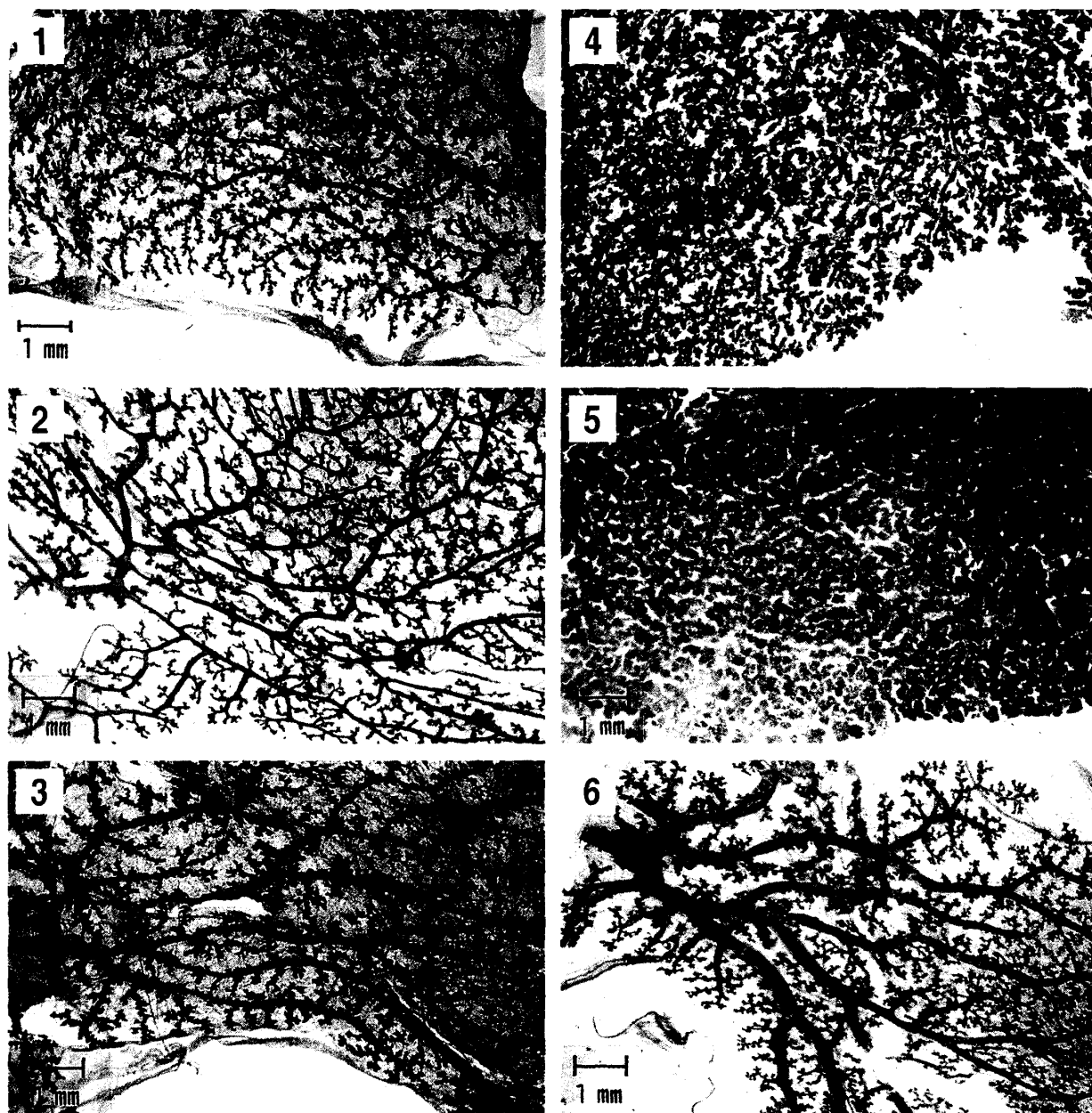


Fig.3 Whole mount preparations of the 3rd thoracic mammary gland of virgin, pregnant and lactating ddY mice (HE stain, $\times 5$; the right side of mammary gland)

- (1): Mammary gland of virgin mouse
- (2): Mammary gland of mouse at Day 5 of pregnancy
- (3): Mammary gland of mouse at Day 10 of pregnancy
- (4): Mammary gland of mouse at Day 15 of pregnancy
- (5): Mammary gland of mouse at lactation
- (6): Mammary gland of false pregnant mouse

れ、妊娠各期でアメーバー状であった乳腺胞は泌乳期には円味を呈していた。これは泌乳期において乳腺胞での乳汁の合成と分泌が非常に盛んであることを示す所見の一つと考えられる。

乳腺の発達に関与するホルモンとしてエストロゲン、プロゲステロン、プロラクチン、副腎皮質ホルモンなどが知られているが、乳腺の発達には主としてエストロゲンが、乳腺胞の発育には主としてプロゲステロンが作用するとされている^{5,6)}。今回、ホルモンの測定は行なわなかったが、ホルマウント標

本の顕微鏡観察により、一連のホルモンの支配下で引き起こされる妊娠期および泌乳期におけるマウス乳腺の形態的発達過程を確認することができた。

3. 乳腺中の総 DNA および RNA 量

図4に妊娠期および泌乳期における胸部第3乳腺中の総DNA量を示した。総DNA量は妊娠10日目までは緩やかに増加し、対照マウスに比べて有意な変化は認められなかったが、その後直線的に増加し、妊娠15日目には有意な高値を示した。泌乳期には総DNA量はさらに増加し、対照あるいは妊娠5日目の値の約7倍に達した。DNAは細胞の核内に主として存在し、細胞当たりのDNA量が一定であることから、総DNA量の増減は乳腺細胞実数の増減を表すものと考えられている。マウスの細胞核あたりのDNA量は約10pgとされ¹²⁾、これを今回の実験結果に当てはめて試算すると、各期における胸部第3乳腺の乳腺細胞数は対照で3,500万、妊娠5日目で3,000万、妊娠10日目で5,000万、妊娠15日目で12,000万、泌乳期で21,000万と推定された。妊娠期から泌乳期にかけての乳腺細胞数の増加と乳腺組織の面積増大および乳腺実質重量の増加は互いに関連して変動していることが確認された。

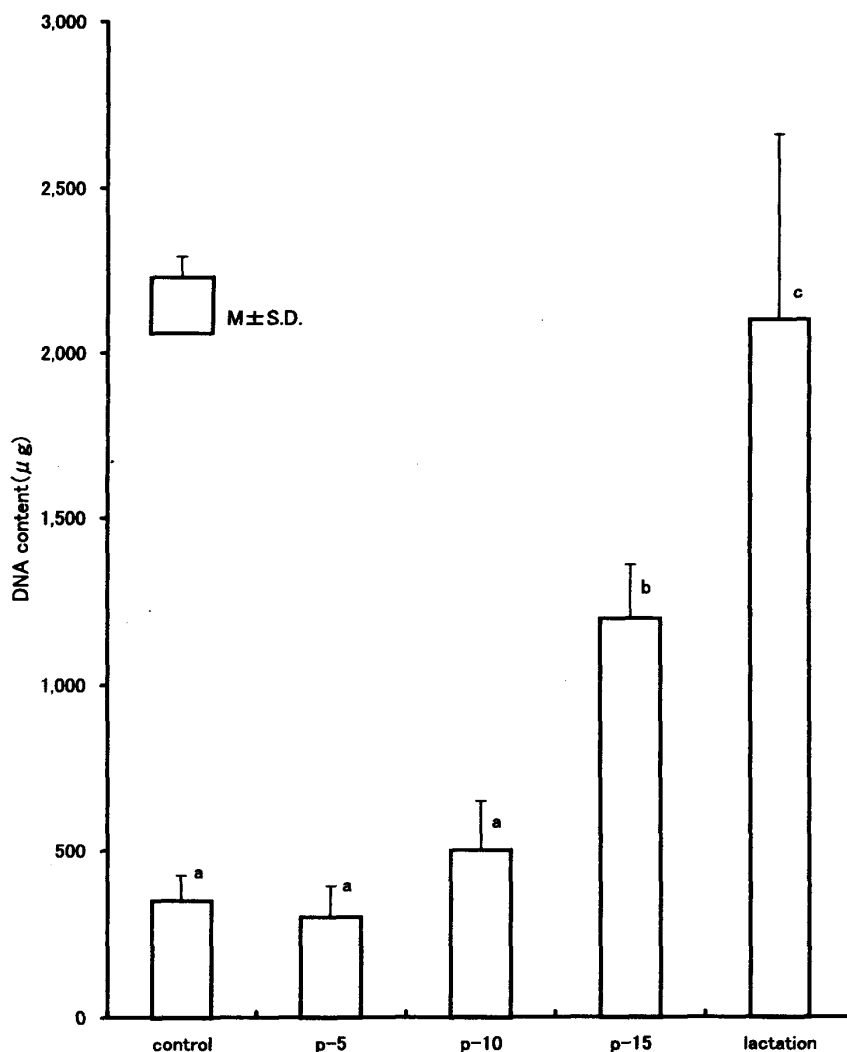


Fig.4 Changes of DNA content in mammary gland during pregnancy and lactation in ddY mice.

^{a,b,c}Values with different superscript differ

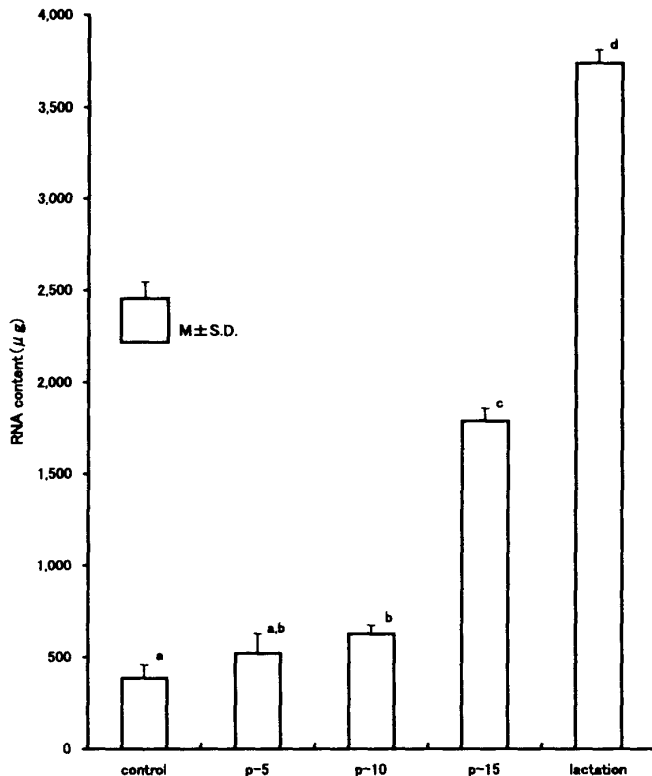


Fig.5 Changes of RNA content in mammary gland during pregnancy and lactation in ddY mice.
a,b,c,d Values with different superscript differ

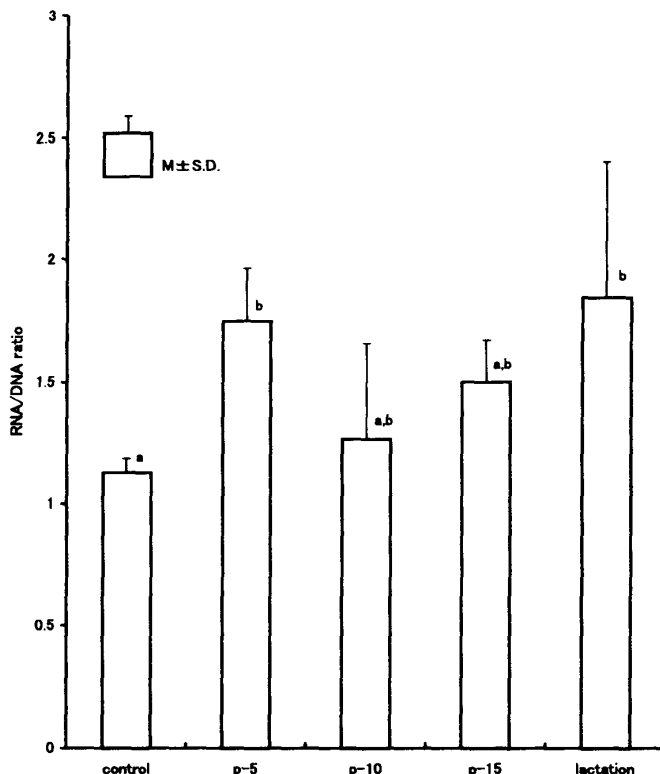


Fig.6 The RNA/DNA ratio of the mammary gland during pregnancy and lactation in ddY mice.
a,b Values with different superscript differ

図5に妊娠期および泌乳期における胸部第3右乳腺中の総RNA量を示した。総RNA量は妊娠10日目までは大きな変化は見られなかったが、その後直線的な増加を示し、妊娠15日で対照の約5倍、泌乳期では約10倍に達した。RNAは蛋白質合成に関与する物質であることから、蛋白合成の盛んな時期とそれ以外の時期とでは細胞中あるいは組織中におけるその含有量には差が生じることとなる。すなわち、乳腺中のRNA量の多寡はその機能と密接に関連して変動し、哺育のために多量の乳汁を必要とする泌乳期において、総RNA量は最も高い値を示し、乳汁合成とその分泌機能が最も盛んになっていることが分った。

図6には妊娠各期および泌乳期におけるRNA/DNA比を示した。この値は個々の乳腺細胞当たりの活性を示す指標と考えられるが、妊娠5日目の値を除けば、妊娠の経過にともなって上昇する傾向が見られ、哺育活動の盛んな泌乳期で最も高い値を示した。なお妊娠5日目の値が高値を示したのはRNA量が増えたからではなくDNA量が低かったことに因るもので、生理的な意義は無いように思われた。

要 約

マウス乳腺の妊娠期から泌乳期に至る発育状況および機能的推移を調べるために、0日目(非妊娠)、妊娠5日目、10日目、15日目および泌乳期の各時点でマウスを屠殺し、乳腺のホルマウント標本の顕微鏡観察から形態的变化を、乳腺中の核酸含量から機能的変化をそれぞれ検討した。

1. 乳腺重量は妊娠の経過に伴って次第に増加し、泌乳期に最大値を示した。乳腺組織面積もこれと同調した変化を示し、泌乳期に最大値を示した。形態的には、乳腺の基本構造(乳管、乳腺胞)は妊娠経過に伴って変化し、乳管の分枝、伸長、成長などが認められ、泌乳期マウスでは丸型の乳腺胞が乳腺組織全体を覆うようになった。

2. 乳腺中の総DNA量と総RNA量は妊娠10日目以降直線的に増加し、泌乳期においてそれ

ぞれ最大値を示した。RNA/DNA比も妊娠5日目の値を除くと、妊娠経過に伴って大きくなり、泌乳期で最大値を示した。

以上、妊娠マウスの乳腺ホルマウント標本の顕微鏡による形態学的観察と、乳腺中の総DNA、総RNA量を指標にして、乳腺の形態学および機能的活性の変化を調べる事が十分可能であることが分った。

引用文献

1. Hahn, D. R. and C. W. Turner. 1966 Effect of estrogen and progesterone on mammary gland DNA and feed intake in hypophysectomized female rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. And Med.*, 122:183-186
2. Kumaresan, P. and C. W. Tuner. 1965 Effect of insulin and alloxan on mammary gland growth in rats, *J. Dairy Sci.*, 48:1378-1381
3. Kumaresan, P., R. R. Anderson and C. W. Turner. 1966 Effect of various hormones on mammary gland of ovariectomized rats, *Proc. Soc. Exp. Biol. And Med.*, 125:556-558
4. Moon, R. C. 1965 Mammary growth in rats treated with somatotropin during pregnancy and/or lactation, *Proc. Soc. Exp. Biol. And Med.*, 118:181-183
5. Knight, C. H. and M. Peaker. 1982 Development of the mammary gland, *J. Reprod. Fertil.* 65:521-536
6. Tucker, H. A. 1969 Factors affecting mammary gland cell numbers, *J. Dairy Sci.* 52:720-729
7. Munford, R. E. 1963 Changes in the mammary glands of rats and mice during pregnancy, lactation and involution. 2. Levels of deoxyribonucleic acid, and alkaline and acid phosphatases, *J. Endocrinology*, 28, 17
8. Moon, R. C. 1962 Influence of graded thyroxin levels on mammary gland growth, *Am. J. Physiol.*, 203:942-946
9. Tucker, H. A. 1966 Regulation of mammary nucleic acid content by various suckling intensities, *Am. J. Physiol.* 210:1209-1214
10. 名古屋大学畜産学教室編. 1970, 畜産学実験法, 養賢堂
11. 水野重樹著, 1969 生物化学実験法 A 一般分析法 2 核酸の一般的分離・定量法, 東京大学出版会
12. 大場義樹, 1986 クロマチン, 東京大学出版会