

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
研究報告書

高齢女性の健康増進のための
ホルモン補充療法に関する総合的研究

大内 尉義 (東京大学大学院医学系研究科加齢医学講座教授)
大蔵 健義 (獨協医科大学越谷病院産婦人科教授)
佐久間一郎 (北海道大学医学部附属病院循環器内科助手)
佐藤貴一郎 (国際医療福祉大学医療福祉学部医療経営管理学科教授)
武谷 雄二 (東京大学大学院医学系研究科生殖内分泌学講座教授)
細井 孝之 (東京都老人医療センター内分泌科医長)

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
総括研究報告書

高齢女性の健康増進のためのホルモン補充療法に関する総合的研究

主任研究者 大内 尉義 東京大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 ホルモン補充療法 (HRT) は尿失禁、皮膚の萎縮、さらに動脈硬化、骨粗鬆症、老年痴呆などの老年疾患を予防し、高齢女性の健康を保持、増進するための方法として注目されている。本研究は、HRTの有する老年疾患の発症予防、治療効果とquality of lifeに対する効果、臨床上の問題点と対策、HRTの対費用効果を検証すること、高齢女性におけるHRT適応基準の設定、具体的な実施法に関するガイドラインを作成することを目的としている。初年度の研究では、HRTの普及を妨げる医師側の要因を検討し、内科、整形外科など婦人科以外の医師に情報の提供するシステムを整備することが必要であることを示した。また、HRTには血管内皮機能の長期にわたる改善作用、脳血流増加作用による認知機能改善作用のあること、HRTの骨量増加作用にはエストロゲン受容体の遺伝子型によって差のあることなどの結果が得られた。一方、通常量のHRTにより、血栓形成傾向、子宮内膜肥厚作用のあることが示され、有害事象を最小に抑制するためにはHRTの用量を勧案する必要があることが示唆された。

分担研究者
大蔵健義
獨協医科大学越谷病院教授
佐久間一郎
北海道大学医学部助手
佐藤貴一郎
国際医療福祉大学教授
武谷雄二
東京大学大学院医学系研究科教授
細井孝之
東京都老人医療センター医長

ホルモンが急激に欠落することであるので、これらの疾患、病態を予防し、高齢女性の健康を保持、増進するための方法として女性ホルモン補充療法 (HRT) が世界的に注目されている。しかしHRTはわが国ではあまり一般化しておらず、また、高齢女性におけるHRTの適応の決定、実施法についてもまったくコンセンサスが得られていない。しかし、近年のHRTに対する社会的関心を考慮すれば、老年疾患全般の予防と治療を視野に入れたHRT実施法の確立とその効果、臨床上の問題点とその対策に関する検討は急務である。そこで、本研究は、HRTに関する臨床と研究に実績を持つ老年科医、内科医、婦人科医および医療経済学者がチームを形成し、(1) 老年疾患の発症予

A. 研究目的

女性における閉経は、更年期障害や、尿失禁、皮膚の萎縮など、高齢女性のquality of life (QOL)を障害する病態を惹起し、さらに動脈硬化性疾患、骨粗鬆症、老年痴呆、うつなどの老年疾患が著しく増加する基盤となる。この原因は、閉経とともにエストロゲンを初めとする女性

防、治療効果とQOLに対する効果、臨床上の問題点と対策、HRTの対費用効果を検証すること、(2)高齢女性におけるHRT適応基準の設定、具体的な実施法に関するガイドラインを作成することを目的とし、高齢女性の健康の保持、増進に、一つの方法で多面的に寄与できるというHRTの臨床的意義と老年疾患の予防によるHRTの医療経済的なメリットを明らかにしようとするものである。

B. 研究方法

1. 全体研究

1) HRTに対する医師の意識調査

全国基幹病院から無作為に抽出した医師を対象としてHRTに対する意識を質問紙法を用いて調査し、HRTの一般化を妨げている医師側の要因を分析した。全国を6部ブロック(北海道・東北、関東、中部、近畿、中国・四国、九州)にわけ、各ブロックからの調査対象医師数はそれぞれのブロックにおける総医師数に比例させた。全調査数は5000人とし、所属医療機関を病床100以上と100未満とにわけ、それぞれについて2,500人の医師を対象とした。医師の診療分野は診療科ベースで分類し、5,000人の対象者を内科2,000人、整形外科1,500人、産婦人科1,500人に振り分けた。アンケートの内容は、回答者の年齢、性、主な診療科(内科、老年科、産婦人科、整形外科、その他)、医療機関の形態、開設主体、薬事委員会の有無を基本情報として尋ねた。ひき続いてHRTに関し、HRT実施の有無とその方法、HRTに関する情報源、患者からのHRT依頼の

有無、HRTに期待する効果、有害事象経験の有無、有害事象を勘案した上でのHRTへの考え方、などの16項目である。

2) HRTに対する患者の意識調査(予備調査)

来年度、患者側のHRTに対する意識調査を全国規模で実施するための予備調査として、札幌市の女性約1,000名への質問票調査を企画し、25の質問(年齢、月経の状態、HRTを知っていたか否か、HRTの既往、さらにHRTと更年期障害、骨粗鬆症、皮膚症状、泌尿生殖器症状、高脂血症、痴呆症状への効果について、HRTの副作用について、HRTを希望するか否かについて、最終学歴、年収など)を設定して調査を行った。

2. 個別研究

1) 血管機能に対するHRTの影響

対象は当科外来受診患者で閉経後1年以上を経過した無症候性女性で、骨粗鬆症と診断されHRTを開始したた8名(平均年齢 54.8 ± 1.3 歳)を対象とした。HRTとしてはプレマリン(Conjugated estrogen: CEE) 0.625mgと酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA) 2.5mgを連日経口服用を基本とした。内皮依存性血管拡張能として超音波を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能としてニトログリセリン投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。計測時期は治療開始前、開始3ヶ月、開始6ヶ月、開始12ヶ月、開始18ヶ月、開始24ヶ月、血圧、血清ホルモン濃度、血清脂質、空腹時血糖値等を同時に

測定した。超音波による非侵襲的な血管機能検査を行い、HRTの効果を検討した。すなわち、前腕を加圧、駆血し、その急速解除後の反応性充血により惹起された、内皮依存性血管拡張である上腕動脈径の変化を超音波プローブにより測定し、HRT治療前後の血管機能の変化と、他の動脈硬化危険因子(血清脂質値、血圧、耐糖能、内蔵型肥満、凝固系など)の変動を検討した。(分担：大内)

2) HRTに対する骨量の反応性と遺伝子多型性との関係

エストロゲン受容体(ER)遺伝子の遺伝子型と骨代謝との関連を追及するため、ER遺伝子多型性と骨量の経年変化ならびにHRTに対する反応性との関連を検討した。閉経後骨粗鬆症患者を対照群60名、HRT群26名の2群にわけ、1年間の観察前後で腰椎L2-4の骨密度を測定した。ER遺伝子の多型性分析は、ER遺伝子の第1イントロンにあるrestriction fragment length polymorphism (RFLP) siteを解析しPvu IIで切断されない場合をP、切断される場合をpとし、遺伝子型はPP、Pp、ppと分類、Xba Iで切断されない場合をX、切断される場合をxとし、遺伝子型はXX、Xx、xxと分類した。(分担：細井)

3) 高齢女性の精神的健康に対するHRTの効果

14名の閉経後女性を対象として第1回目の脳血流を測定した後に、CEE 0.625mg/日または1.25mg/日を21日間投与し、後半の8~12日間(平均9.6±1.1日)MPA 5mgまたは10mg/日を併用して、第2回目の脳血流を測定して比較検討した。さらに、6名

の閉経後女性で第1回目の脳血流測定後、CEE 0.625mg/日+MPA 2.5mg/日を連日併用投与して21日目に第2回目の脳血流を測定した。さらに、6名中4名で連続投与を継続して4~6ヶ月後(平均5.5±1.0月)に第3回目の脳血流を測定して、これらの平均脳血流量を比較検討した。次に、6名のBinswanger型女性脳血管性痴呆(VD)患者にERTを行い、他の6名のVD患者にはエストロゲン補充療法(ERT)を行わずに対照群として、4週間に1回、外来にて認知機能検査を行った。認知機能検査にはMini-Mental State Examination (MMS)、長谷川式簡易知能評価スケール(HDS)、改訂長谷川式簡易知能評価スケール(HDS-R)を用い、観察期間は28週とした。ERTにはCEE 0.625mg/日を3週間投与し、1週間休薬する周期をくり返した。3周期に1回、MPA 5mg/日を周期の後半10日間併用投与した。(分担：大蔵)

4) 本邦高齢女性におけるHRTの至適投与量に関する検討

本邦閉経後女性への至適HRT用法・用量を凝固線溶系の面から検討し、副作用の少ない方法を決定することを目的とし、CEE 0.625mg+MPA同時継続投与法、結合型エストロゲン0.3125mg+MPA同時継続投与法および貼付型エストロジオール2mg/2日+MPA同時継続投与とエストロジオール2mg連続投与法を各3ヶ月間行い、血栓線溶系に関してDDダイマーのみならず各種の指標の変化を観察した。(分担：佐久間)

また、婦人科の視点から、HRTの至適投与量を検討するために、対象を、閉経

後一年以上経過した50歳以上の、子宮を有する婦人でHRTの適応のある患者とし、インフォームドコンセントを得た後に対象者を4群に無作為に分けた(CEE 0.3125mg/日+MPA 2.5mg/2日の低用量HRT群、通常量のHRT群、エストリオール2mg/日群、エストリオール4mg/日群)。HRT開始前に各症例の身長、体重、年齢、閉経年齢の記録、経膣及び子宮内超音波による子宮内膜の観察(内膜像と厚さ)、子宮内膜細胞診・組織診、血中ホルモンレベル(E2, P, FSH, LH)の測定を行った。HRT開始後は患者に所定の日誌を配布し、日々の服薬状況と性器出血量を記入させた。超音波、細胞診、組織診、採血は12週間毎に行い、それらと性器出血の状況の関連を解析した。(分担：武谷)

5) HRTの対費用効果に関する検討

HRTに関する班員からの医学的情報等に基づいて、HRTの対費用効果を計算し、HRTの医療経済上のメリットを明らかにすることを目的とし、本年はHRTに関する臨床研究データ、疫学データ、文献データの資料を収集した。(分担：佐藤)

C. 研究結果

1. 全体研究

1) HRTに対する医師の意識調査

a) アンケートの回収状況と集計対象のプロフィール：アンケート発送総数5,000に対して、1,003通が回収された(回収率20.0%)。年齢構成は39歳以下が10.4%、40歳から64歳51.8%、65歳以上37%であった。1,003名のうち男性は932名、女

性は66名、その他(不明)が5名であった。上記の年齢層別では39歳以下の集団で女性の占める割合が多く、男女比については明らかな地域差は認められなかった。全回答数における地域別の割合は、北海道・東北10.5%、関東28.0%、中部17.2%、近畿17.3%、中国・四国14.4%、九州14.4%、不明0.3%であり、ブロック別医師数にはほぼ比例していた。各科別の回収率は内科(老年科を含む)14.4%、産婦人科30.5%、整形外科14.7%であり、産婦人科医からの回答が多かった。回答者1,003名の内訳を医師が所属する医療機関の形態別にみると、無床診療所202、有床診療所183、ベッド数100床未満の病院44、ベッド数100床以上の病院541、大学病院48、その他ならびに不明が5であった。病床100以上の医療機関からの回答率は約22%、100未満の医療機関からは約17%であった。

a) HRT施行の有無とその内容：HRTを「行なっている」との回答は内科17.7%、産婦人科95.8%、整形外科11.4%であり、産婦人科での施行率が他科を大きく上回っていた。HRTの具体的内容を重複回答を許して全体でみると、エストラジオール製剤と黄体ホルモン併用が72.2%、エストリオール単独65.4%、エストラジオール製剤単独52.8%、エストラジオール貼付薬39.2%、エストラジオール貼付薬と黄体ホルモン剤の併用26.2%、その他の錠剤24.3%、注射剤22.0%であり副作用防止対策としての併用療法が浸透していることが伺われた。

b) HRTに関する情報源：学会論文・総

説誌 87.1%、学会報告 57.6%、MR 30.6%、医師会 14.4%であり、この傾向は各科別にみても大きな差異は認められなかった。医師会からの情報発信が少ないことが目立った。

c) 患者からのHRT要望の有無：「あり」の回答が内科 27.4%、整形外科 19.5%に対して、産婦人科は 88.4%と圧倒的に高い頻度をしめした。

d) HRTの効果に期待するもの：全体を通して、更年期障害の改善 93.7%、骨粗鬆症の予防・治療 91.6%と多くの医師が本療法の効果として認識されていた。続いて、生殖器症状の改善 63.8%、脂質の改善・予防 61.0%、皮膚症状の改善 63.8%、泌尿器症状の改善 38.6%、アルツハイマー病の予防や脳機能の改善 38.1%と続いた。産婦人科医師においてはこれらの項目間の既知比率は他科にくらべてやや少なく、HRTがもつ全身的作用について周知されていることが示唆された。

e) 有害事象：HRTによる有害事象の経験はHRT実施数が多い産婦人科では 90.2%と多く、整形外科でも 83.0%、内科では 53.7%が有害事象の経験あり、と回答された。有害事象の種類としては各科をとおして性器出血がもっとも多く(全体で 90.3%)、乳房痛が 70.6%と続いた。乳癌は 4.7%、子宮癌は 4.3%であったが、この頻度の評価はHRT非実施群や全国統計との比較が必要であろう。

f) Selective estrogen receptor modulators (SERM) について：開始したい 46.7%、開始したいが不安が残る 27.0%、開始したいとは思わない 11.3%、わからない

7.6%、不明 7.5%であった。産婦人科では「開始したい」が 78.3%と高率であった。一方で、内科や整形外科では「開始したいが不安が残る」がそれぞれ 37.8%、35.9%であり、情報が行き届いていないことが伺われた。

2) HRTに対する患者の意識調査(予備調査)

現在まで約200名から質問票を回収したが、その結果では、若い女性(30~40代)では今後HRTを試してみたいと考えている率が高いものの、まだわからないという解答が多く、50代では約半数の女性が試してみたいと考え、60~70代となるとその率は減ってくることを示された。また、HRTを開始したい一番の理由は、痴呆の予防と美しさを保つため、心配な点で一番多いのは乳癌であった。

2. 個別研究

1) 血管機能に対するHRTの影響

被験者閉経後女性8名(年齢 54.8 ± 1.3 歳)において、HRT開始後の各時期で、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1cは特に有意な変動を示さなかった。HRT開始後の血清エストラジオール濃度は開始3ヶ月後では開始以前に比して明らかに上昇していた。血清プロゲステロン濃度は開始以前に比して明らかな上昇は認められなかった。閉経後女性の%FMDは治療後経時的に増加傾向を示し、治療開始前 $4.7 \pm 0.7\%$ 、開始3ヶ月後 $6.4 \pm 0.6\%$ 、開始6ヶ月後 $7.2 \pm 0.6\%$ 、開始12ヶ月後 $8.2 \pm 0.8\%$ 、開始18ヶ月後 $7.9 \pm 0.7\%$ 、開始24ヶ月後 $8.1 \pm 0.9\%$ であり、

治療開始前に比し開始6ヶ月で%FMDは有意に増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.01$ 図1)。一方、%NTGは治療開始前で $13.4 \pm 1.2\%$ 、開始3ヶ月後 $14.6 \pm 1.6\%$ 、開始6ヶ月後 $16.2 \pm 1.6\%$ 、開始12ヶ月後 $15.5 \pm 0.6\%$ 、開始18ヶ月後 $14.8 \pm 0.9\%$ 、開始24ヶ月後 $14.9 \pm 1.1\%$ であり、治療開始前に比し各時期で有意差は認められなかった。

2) HRTに対する骨量の反応性と遺伝子多型性との関係

対照群における骨密度の年間変化率 (%/year, mean \pm SE) はPP群 0.137 ± 0.71 (n=14)、Pp群 -1.23 ± 0.94 (n=27)、pp群 -1.60 ± 0.67 (n=19)であり、pp群と他の群間で骨量減少速度に有意な差が認められた。また、Xbaによる分類では、xx群における骨量減少がXx群に比して有意に大きかった。一方HRT群では、PvuIIによる遺伝子型で3群に分類した場合、骨密度の年間変化率はPP群 3.58 ± 2.05 (n=6)、Pp群 6.77 ± 1.67 (n=10)、pp群 3.86 ± 2.22 (n=10)であった。しかしながら、各遺伝子型ごとに対照群とHRT群における骨密度の変化率を比較したところ、Pp群とpp群では有意差 ($p < 0.01$)があり、HRTの効果は遺伝子型によって量的な差異のあることが示唆された。

3) 高齢女性の精神的健康に対するHRTの効果

a) HRTの脳血流に及ぼす影響を検討した結果では、3週間後の大脳血流量 (CBF) と小脳血流量 (CbIBF) はいずれも有意に増加して ($p < 0.001$ と $p < 0.0001$)、平均増加率はそれぞれ $7.7 \pm 5.4\%$ と $6.3 \pm 4.2\%$ であった。すなわち、ERTに短期間MPAを

併用してもエストロゲンの脳血流増加の作用は減弱されず、ERT単独の効果と同じであった。

また、HRT前と3週間後のCBF) 及びCbIBFにはいずれも有意な変化は認められなかった。5.5ヶ月後のCBFは有意な変化を示さなかったが、CbIBFはHRT前に比べて有意に増加した ($p < 0.05$)。少量のMPAで燻A日継続して投与していると、大脳血流量ではエストロゲンの脳血流改善効果を消失してしまうことが推定されるが、小脳血流量は増加しており、今後症例数を追加し、長期間観察して検討する必要がある。

b) Binswanger型女性脳血管性痴呆患者にERTを行った結果では、群間比較ではMMS、HDS、HDS-Rの各スコアのいずれでも両群の間に有意差は認められなかった。ERT群では20週と24週でHDS-Rスコアは有意に上昇した ($p < 0.05$)。一方、対照群では4、12、20、24週のMMSスコアと16週のHDSスコアが有意に低下した ($p < 0.05$)。

4) 本邦高齢女性におけるHRTの至適投与量に関する検討

a) 脂質プロファイルへの効果では、以前より報告されているものと同じく、LDL-コレステロール、アポB、アポB/A1、Lp(a)の低下、HDL-コレステロール、アポA1の増加が認められている。また凝固系に関しては、結合型エストロゲン 0.625mg (+MPA) でDDダイマーが増加傾向を示し (症例数の関係で有意差は得られていない)、結合型エストロゲン 0.3125mg (+MPA) およびエストリオール 2mg では変

化は認められていない。線溶系の指標としてのPAI-1は、両投与薬とも変化を起こしていない。

以上より、本邦閉経後女性に結合型エストロゲンを用いる通常のHRTを行うと、凝固系がやや亢進してしまう可能性が示唆された。

b) 全症例とも閉経後であるため、HRT開始前に施行した超音波では子宮内膜は薄く、組織診でも萎縮を示し、血中エストラジオール (E2) 値の低下と黄体刺激ホルモン (FSH) 値の上昇が認められた。現時点では症例登録後の期間が短いため、HRT開始後の変化については解析できるだけのデータが不十分ではあるが、HRT開始後12週以上経た数例を観察する限りは、HRTの継続に支障をきたす程度の性器出血は経験されておらず、更年期症状等の自覚症状の改善をみ、HRT開始前に比べ血中E2の上昇、FSHの下降があり、超音波画像上も子宮内膜が軽度厚くなっている傾向が認められている。

5) HRTの対費用効果に関する検討
現在解析途上にある。(分担：佐藤)

D. 考察

1. 全体研究

本邦では閉経後女性の2%弱しかHRTを受けていない。その原因として、本邦ではHRTは婦人科のみで行われ、一般の内科医や家庭医はほとんど行わないことや、対象となる女性がHRTを知らないか、もし知っていてもその効果や副作用について疑念を持っている可能性がある。本研究において、HRTに対する医師

の意識を調査した結果から、閉経後女性におけるHRTは予想どおり産婦人科において活発におこなわれ、全身的な効果に対する期待も大きいことが判明した。しかし、他科においては更年期障害や骨粗鬆症以外に対する効果に関してはまだ知識が普及しておらず、特に医師会などを通じた系統的な情報伝達が必要と考えられた。また、HRTに対する患者の意識に関する予備調査からは、患者側でもHRTに対する強い関心が示唆されたが、やはり、HRTの内容に関してさらなる啓発が必要であると考えられた。本予備調査は平成11年度に入っても継続し、本研究班における全国規模の研究の叩き台とするが、対象年齢、質問票配布箇所、質問票の内容等の設定に関し、有用な情報が得られるものとする。特に質問票の説明や質問の内容により、解答が微妙に影響される可能性が明らかとなり全国規模での質問票作成の際に考慮すべきと思われる。

2. 個別研究

1) 血管機能に対するHRTの影響

短期間のHRTが血管内皮機能に及ぼす影響に関しては、HRTによって内皮機能は改善すると報告されているが、これらの研究は比較的短期間の研究であり、長期にわたるHRTにおいて内皮機能改善が保たれるか否かは不明であった。本研究の結果により少なくとも24ヶ月は内皮機能改善が保たれることが証明された。血管内皮細胞は、内皮細胞由来弛緩因子である一酸化窒素 (NO) を産生し、内皮依存性血管拡張反応を惹起するが、エストロ

ゲンは内皮細胞からのNO産生を増加させることで血管拡張に働くという報告が累積しつつある。血流依存性血管拡張反応はシアストレスによって内皮細胞から放出される血管拡張物質、特にNOによって引き起こされるが、エストロゲンは血管内皮細胞においてNOの産生を亢進させ、閉経後女性の血管内皮機能を改善すると考えられる。

2) HRTに対する骨量の反応性と遺伝子多型性との関係

われわれは以前、日本人閉経後女性において、腰椎骨塩量と全身骨骨塩量ともに、検討したER遺伝子の多型性についてPP型をもつ群がpp型よりも低値を示すことを報告した。Xba Iについてはxx型において骨塩量が低い傾向にあったが、各群間の差は統計学的には有意ではなかった。さらに今回の結果はER遺伝子の多型性が骨量減少速度の個人差やHRTに対する反応性と関連していることを示唆している。これらの結果を合わせて考えると、PPの遺伝子型は閉経後の骨量減少速度の速さよりも、いわゆる最大骨量の低さに影響をあたえることを通して閉経後女性の骨量との関連を生じていることが推察される。一方、xxの遺伝子型はその逆、つまり、閉経後の骨量減少速度の速さとの関連が大きいのではないかと思われる。今後、エストロゲン受容体遺伝子の多型性を同遺伝子内外の未知の疾患遺伝子の存在を示唆するマーカーとして考えていくことができるか否か、今後はsib-pair analysisなどの手法を用いた検討が必要であろう。

3) 高齢女性の精神的健康に対するHRTの効果

本研究の結果から、HRTでもっとも生理的な投与方法であるエストロゲンと黄体ホルモンの周期的順次投与方法では、大脳及び小脳の血流量はエストロゲン単独投与の場合と同じ程度に増加する(脳血流改善効果は同じ)ことが明らかにされた。これはHRTを行う際の重要な根拠の1つとなる。しかし、最近広く行われるようになったエストロゲンと黄体ホルモンの併用連続投与方法では、大脳血流量は改善されず小脳血流量のみ改善された。大脳では連続投与された黄体ホルモンがエストロゲンの脳血流改善効果を打ち消していることが推察されるが、これは併用連続投与方法を用いたHRTでは大変重要な問題であり、症例数を増加して更に長期間観察して検討する必要がある。また、エストロゲン補充療法は、脳血管性痴呆の女性患者にも有効である可能性を、一部ではあるが明らかにしたが、今後、症例数を追加して更に検討する必要がある。

4) 本邦高齢女性におけるHRTの至適投与量に関する検討

本研究では、本邦高齢女性におけるHRTの至適投与量を決定するために、内科的、婦人科的な有害事象の発生を検討している。まず、HRTにおける用法・用量と凝固線溶系への影響をみた検討から、高脂血症のみならず高血圧、糖尿病、肥満など、動脈硬化性疾患を発症し易い患者に対して通常のHRTを行った場合、脂質プロファイルの改善を筆頭に、種々の作用により動脈硬化の進展を抑制

し、ひいては虚血性心疾患発症を抑制する可能性があるものの、このような患者では凝固系亢進、線溶系の低下のため血栓傾向となる確率が高くなることが危惧される。そのため、本邦女性におけるHRTの用法・用量としては、結合型エストロゲン0.3125mg(+MPA)もしくはエストリオール2mgが至適となる可能性がある。一方、婦人科的には、HRTによる有害事象として重要な子宮内膜の性状に関する検討を行っている。組織閉経期の子宮内膜は萎縮しており、超音波断層法では薄く描出されること、それらの症例にHRTを開始すると内膜は厚みを増し、組織学的にも変化が認められることは、すでに多くの報告がある。しかし、異なるHRTを本邦婦人に行った場合の血中ホルモンレベルの変化と子宮内膜組織像・超音波像の変化と性器出血のパターンの関連についての報告はない。これらの関連が今後の本分担研究で明らかになれば、本邦高齢婦人に対するHRTの個別化が可能となり、QOLの向上に寄与すると考えられる。

E. 結論

1) わが国においてHRTをさらに普及させるためには、婦人科医以外の内科医、整形外科医および閉経前後の女性に対する情報の提供システムを整備することが必要である。

2) HRTには血管内皮機能の長期にわたる改善作用、脳血流増加作用による認知機能改善作用のあることが示された。

3) HRTには骨量の増加作用があるが、

その作用の強さにはエストロゲン受容体の遺伝子型によって差のあることが示され、HRTの治療効果に遺伝的背景が関与することが示唆された。

4) 通常量のHRTにより、血栓形成傾向、子宮内膜肥厚作用のあることが示され、有害事象を最小に抑制するためにはHRTの用量を勘案する必要のあることが示唆された。

厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

血管内皮機能に対するホルモン補充療法の影響に関する研究

分担研究者 大内 尉義 東京大学大学院医学系研究科教授

研究要旨 疫学的研究ならびに閉経後女性に対するホルモン補充療法(HRT)により、動脈硬化性疾患の発症が抑えられる事実から、女性ホルモンが抗動脈硬化作用を有すると考えられる。閉経後女性の骨塩量減少に対して女性ホルモンが治療に用いられている。外来受診患者で閉経後1年以上を経過した無症候性女性で、骨粗鬆症と診断されHRTを開始した8名(平均年齢55歳)を対象とし、血管内皮機能がどのような影響を受けるかを治療開始前、3ヶ月後、6ヶ月後、1年後を計測時期とし、中長期にわたる経時的な検討を行った。HRTを受けている患者における内皮依存性血管拡張能は改善傾向を認め、治療期間中にその効果の減弱は認められなかった。HRTによる動脈硬化性疾患の発症抑制には、女性ホルモンの内皮機能改善が関与している可能性が示唆された。

A. 研究目的

Framingham Studyをはじめとする多くの疫学的研究、ならびに閉経後女性に対するHRTにより動脈硬化性疾患の発症が約50%に抑えられるといった事実から、エストロゲンが抗動脈硬化作用を有すると考えられる。また動物実験モデルを用いた検討でもエストロゲンの抗動脈硬化作用が確認されている。さらに最近になってエストロゲン受容体 β の発現ならびにエストロゲン受容体 β を介すると考えられる抗動脈硬化作用の一部が報告され、エストロゲンの作用機序が次第に明らかになりつつある。

女性ホルモンの脂質代謝の改善といった動脈硬化のリスクファクターに対する作用に加えて、血管壁に対する直接作用も指摘されているが、詳細は不明である。

閉経後女性の骨塩量減少に対してHRTが抑制効果のあることが知られ、治療に用いられている。短期間のHRTで内皮依存性血管拡張反応が改善されることが報告されている。そこで本研究では、骨塩量減少をきたした閉経後女性でHRTを受けている患者を対象とし、血管内皮機能がどのような影響を受けるかを中長期にわたり経時的に検討した。

B. 研究方法

対象は当科外来受診患者で閉経後1年以上を経過した無症候性女性で、骨粗鬆症と診断されHRTを開始した8名(平均年齢 54.8 ± 1.3 歳)を対象とした。HRTとしてはプレマリン(Conjugated estrogen) 0.625mgとプロベラ(Medroxyprogesterone acetate) 2.5mgを連日経口服用を基本とした。内皮依存性血管拡張能として超音波

表1. Clinical Characteristics of Subjects and Serum Levels of Ovarian Hormones

	Pre HRT (n=8)	HRT 3 months (n=7)	HRT 6 months (n=7)	HRT 12 months (n=8)	HRT 18 months (n=8)	HRT 24 months (n=8)
Age (yr)	54.8 ± 1.3					
Body Mass Index (kg/m ²)	20.3 ± 1.0			20.6 ± 1.0		20.4 ± 1.0
Mean BP (mmHg)	85 ± 3	83 ± 4	80 ± 4	82 ± 3	82 ± 4	84 ± 6
Total cholesterol (mg/dl)	217 ± 12	215 ± 7	204 ± 10	199 ± 9	206 ± 10	210 ± 6
HDL cholesterol (mg/dl)	68 ± 6	82 ± 5	73 ± 4	71 ± 4	75 ± 6	83 ± 6
Triglyceride (mg/dl)	80 ± 9	78 ± 10	85 ± 15	83 ± 9	86 ± 9	78 ± 11
Fasting plasma glucose (mg/dl)	86 ± 3	84 ± 1	84 ± 2	84 ± 2	84 ± 2	87 ± 3
Hemoglobin A1c (%)	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.2	4.9 ± 0.2	4.9 ± 0.1	4.8 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Fibrinogen	320 ± 12	337 ± 29	272 ± 24	325 ± 28	312 ± 18	318 ± 17
Estradiol (pg/ml)	2 ± 2	88 ± 15**	76 ± 12**	85 ± 13**	71 ± 11**	90 ± 16**
Progesterone (ng/ml)	0.2 ± 0.07	0.1 ± 0.06	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.05	0.2 ± 0.06	0.2 ± 0.06

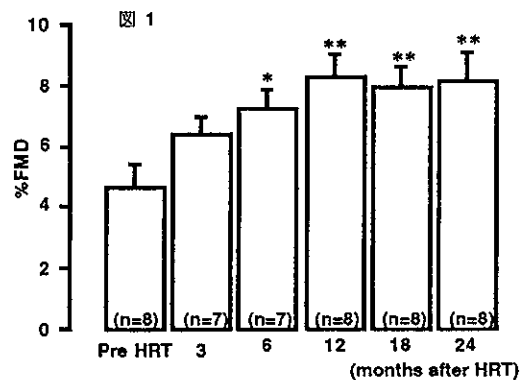
を用い右上腕動脈の反応性充血時の血管径増加率(%FMD)を計測した。同様に内皮非依存性血管拡張能として Nitroglycerin 投与後の血管径増加率(%NTG)を計測した。計測時期は治療開始前、開始3ヶ月後、開始6ヶ月後、開始12ヶ月後、開始18ヶ月後、開始24ヶ月後とし、血圧、血清ホルモン濃度、血清脂質、空腹時血糖値等を同時に測定した。

C. 研究結果

被験者閉経後女性8名の基礎データと血液検査の結果を表1に示す。HRT開始後の各時期では、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1cにおいて有意差は認められなかった。HRT開始後の血清 Estradiol 濃度は開始3ヶ月以降では開始以

前に比して明らかに上昇していた。血清 Progesterone 濃度は開始以前に比して明らかな上昇は認められなかった。

閉経後女性の %FMD は治療後経時的に増加傾向を示し、治療開始前で4.7±0.7%、開始3ヶ月後で6.4±0.6%、開始6ヶ月後で7.2±0.6%、開始12ヶ月後で8.2±0.8%、開始18ヶ月後で7.9±0.7%、開始24ヶ月後で8.1±0.9%であり、治療開始前に比し開始6ヶ月後以降で %FMD は有意に増加していた ($P<0.05$, $P<0.01$ 図1)。



一方、%NTG は治療開始前で13.4±1.2%、開始3ヶ月後で14.6±1.6%、開始6ヶ月後で16.2±1.6%、開始12ヶ月後で15.5±0.6%、開始18ヶ月後で14.8±0.9%、開始24ヶ月後で14.9±1.1%であり、治療開始前に比し各時期で有意差は認められなかった。

D. 考察

短期間のHRTが内皮機能に及ぼす影響の検討としては、Lieberman らによる平均年齢55歳の閉経後女性12人を対象にプラセボ、Estradiol 1mg, 2mg の9週間投与による Double-blind、placebo-controlled、cross-over trial の報告がある。彼らはEstradiol 1mg, 2mgで明らかな上腕動脈における血流依存性血管拡張反応の改善が、9週間という比較的短期間に認められたことを報告している。しかしながら、長期にわたるHRTにおいて内皮機能改善が保たれるか否かは不明であった。本研究により少なくとも24ヶ月は内皮機能改善が保たれることが証明された。

エストロゲンの作用機序に関しては脂質代謝改善等の動脈硬化のリスクファクターに対する作用と、動脈壁への直接作用に分けることができる。高コレステロール血症が動脈硬化のリスクであることはよく知られた事実であるが、エストロゲンに血清コレステロールレベルを変動する作用があることが多くの報告より明らかになっている。エストロゲンの投与により総コレステロールは低下する。またLDLコレステロールを低下させ、逆にHDLコレステロールを上昇させる。し

かし被験者の閉経後女性8名においてはHRT開始後の各時期では、BMI、平均血圧、総コレステロール、HDLコレステロール、中性脂肪、空腹時血糖、HbA1cにおいて有意差は認められなかった。それゆえエストロゲンによる内皮機能の改善はこれら動脈硬化のリスクファクターに対する作用を介するものである可能性は低いと考えられる。

上述した動脈硬化のリスクを改善する作用の他に、エストロゲンは直接血管壁に作用して抗動脈硬化作用を発揮することも指摘されている。血管構成細胞にエストロゲン受容体が存在することは、エストロゲンの血管に対する直接作用を示唆するものと考えられる。Colburn らが培養大動脈内皮細胞に、Nakao らが培養大動脈平滑筋細胞に、エストロゲンの結合部位があることを証明した。また遺伝子レベルでも血管平滑筋細胞にエストロゲン受容体が存在することが示された。Kim-Schulze らはヒト冠動脈ならびに臍帯静脈内皮細胞にエストロゲン受容体が存在することを報告した。エストロゲンの血管壁に対する作用が、すべてエストロゲン受容体を介するか否かは不明であるが、エストロゲン受容体の存在はエストロゲンと血管との関係を考える上で大変意義深いと思われる。

血管内皮細胞は、内皮細胞由来弛緩因子(Endothelium-derived relaxing factor, EDRF)を産生し血管の tonus の調節に関与している。EDRFは nitric oxide (NO) または NO 類似化合物 (nitrosotiol または nitrosoheme など) であると現在では考えら

れている。エストロゲンは内皮細胞からの NO 産生を増加させることで血管拡張に働くという報告が得られてきている。高コレステロール食で飼育したサルで冠動脈は内皮機能障害が認められるが、エストロゲンの投与がこの障害を防ぐという報告もある。この研究では冠動脈内にアセチルコリン(内皮細胞に対する NO 放出作用、中膜平滑筋に対する直接の収縮作用を有する)を注入し、血管径の変化を冠動脈造影で評価している。卵巣摘出後エストロゲン補充を行った群ではアセチルコリンにより血管拡張が認められたが、エストロゲン補充を行わなかった群では逆に血管収縮が起きている。同様の検討は臨床的にも行われており、Reisらは、冠動脈疾患を有する閉経後女性に対しエストロゲンの急性投与を行ったところ、アセチルコリンの冠動脈内投与に対する血管径の反応が改善したことを報告している。これらの報告は本研究で得られた結果を十分支持するものと考えられる。

血流依存性血管拡張反応は shear stress によって内皮細胞から放出される血管拡張物質、特に一酸化窒素 NO によって引き起こされるとされている。Joannidesらによって橈骨動脈における血流依存性血管拡張反応は NO 生成阻害薬の L-NMMA (NG-monomethyl L-arginine) によって拮抗されることが示されている。また Hayashiらは内皮細胞の温存された rabbit 大動脈リング標本では基礎 NO 放出量はエストロゲン濃度により制御されていることを報告している。これらのことから

Estradiol が血流依存性血管拡張反応時の NO 産生促進ないしは分解抑制に関与している可能性が示唆されたものと考えられる。NO 以外の血管拡張物質としては Prostacyclin が考えられるが、Prostacyclin 合成阻害剤の Indomethacin 投与が血管拡張に影響を与えなかったことを考えると、その関与は少ないと思われる。

エストロゲンの内皮細胞を介した作用とは別に、エストロゲンが内皮非依存性血管拡張作用として直接血管平滑筋に作用して血管拡張を惹起するという報告も見られる。Jiangらは高 K、endothelin-1 などで前収縮させた摘出ウサギ冠動脈を用いて Estradiol の血管拡張作用を報告している。これらの報告では内皮細胞の存在の有無は結果に影響を与えないことから、in vitro での Estradiol 急性投与による血管拡張作用は直接平滑筋に作用したものであると考えられる。一方 Gilliganらは Estradiol 急性投与により動脈硬化のリスクファクターを持つ閉経後女性では内皮非依存性血管拡張作用が認められたが、正常女性では認められなかったことを報告している。我々の検討では内皮非依存性血管拡張は変化を認められなかった。エストロゲンが主として内皮依存性血管拡張に作用している可能性が示唆された。

E. 結論

HRTにより閉経後女性の血管内皮機能は改善を示した。HRTによる動脈硬化性疾患の発症抑制には、女性ホルモンの内皮機能改善が関与している可能性が示唆

された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 江頭 正人、大内尉義. 中高年者における血管内皮依存性拡張能についての検討. 日老医誌 32:315, 1995,

2) 江頭 正人、大内尉義. 高コレステロール血症患者における血管内皮機能に関する検討. 日老医誌 33:722, 1996

3) Hashimoto M, Ouchi Y, et al. Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle. *Circulation* 92: 3431-55, 1995

4) Han SZ, Ouchi Y, et al. Inhibitory effects of insulin on Cytosolic Ca²⁺ level and contraction in the rat aorta endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Circulation Res* 77: 673-8, 1995

5) Han SZ, Ouchi Y, et al. 17beta-estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation* 91: 2619-26, 1995

6) Akishita M, Ouchi Y, et al. Estrogen inhibits endothelin-1 production and c-fos gene expression in rat aorta. *Atherosclerosis* 125:27-38, 1996

7) Akishita M, Ouchi Y, et al. Effects of estrogen on atherosclerosis formation and serum nitrite/nitrate concentrations in cholesterol-fed ovariectomized rabbits. *J Atheroscler Thromb* 3:114-9, 1996

8) Akishita M, Ouchi Y, et al. Estrogen inhibits cuff induced intimal thickening of rat femoral artery: effects on migration and

proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 130:1-10, 1997

9) Akishita M, Ouchi Y, et al. Estrogen attenuates endothelin-1 production by bovine endothelial cells via estrogen receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251:17-21, 1998

10) Ogawa S, Ouchi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor beta: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26: 3505-12, 1998

11) Hashimoto M, Ouchi Y, et al. The impairment of flow-mediated vasodilatation in obese men with visceral fat accumulation. *Int J Obes Relat Metab Disord* 22:477-84, 1998

12) Ogawa S, Ouchi Y, et al. Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett* 423(2):129-32, 1998

13) Ogawa S, Ouchi Y, et al. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243(1):122-6, 1998

2. 学会発表

1) 大内尉義. 動脈硬化における性差とエストロゲンの役割. 第3回性差医学シンポジウム、東京、1994年

2) 橋本正良、大内尉義、他：閉経後女性におけるホルモン補充療法の内皮依存性血管拡張能に対する影響—超音波を用いた検討—。第7回性差医学研究会、東京、1998年

3) 阿古潤哉、大内尉義、他：血管にお

けるエストロゲン受容体の発現とその役割。第7回性差医学研究会、東京、1998年

4) 須藤紀子、大内尉義、他：フリーラジカルによる血管内皮細胞のアポトーシス誘導と 17β エストラジオールの抑制作用。第30回日本動脈硬化学会総会、東京、1998年

5) Sudoh N, Ouchi Y, et al. A Reduction of Bax Expression Is Involved in the Mechanism of the Inhibitory Action of Estrogen on H₂O₂-Induced Apoptosis in Vascular Endothelial Cells. The 71st American Heart Association Scientific Sessions, Dallas, USA, 1998

厚生省科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

分担研究者 細井 孝之 東京都老人医療センター医長

骨粗鬆症の予防、治療とホルモン補充療法に関する研究

研究要旨 エストロゲン受容体 (ER) 遺伝子の多型性と骨密度ならびに骨代謝マーカーとの関連を検討したところ、特定のER遺伝子 genotype のなかに低骨密度を示すものが存在した。今回は我々はさらに、ER遺伝子多型性と骨量の経年変化ならびにホルモン補充療法 (HRT) に対する反応性との関連があることを示した。このことの臨床応用として、個人の骨量変化の予想や HRT の効果に应用できる可能性が示唆された。

A. 研究目的

骨粗鬆症は多因子性疾患であり、その背景因子は複数の遺伝的因子と環境因子にわけることができる。骨粗鬆症における病態の根本である低骨密度については遺伝的因子の影響が大きいことが示唆されてきている。

骨は成長、成熟し、老化する。加齢に伴うこれらの変化の中で閉経後数年間の女性に認められる骨密度の減少は最も大きなものである。閉経後女性における骨密度の減少は個体間で一様ではなくこの個人差は閉経に伴う女性ホルモン、特にエストロゲンの欠落という体内環境の大きな変化に対する反応性の多様性にもとづくものと捉えることができる。この多様性はエストロゲンの標的分子、すなわちエストロゲンレセプター (ER) の量的あるいは質的な多様性、さらにはそれらを規定する ER 遺伝子の多様性を反映している可能性がある。我々はこの可能性を探るために ER 遺伝子の多型性と骨密度ならびに骨代謝マーカーとの関連を検討

し、特定のER遺伝子 genotype のなかに低骨密度を示すものが存在することを示した。今回はさらに ER 遺伝子 genotype と骨代謝との関連を追及するために、ER 遺伝子多型性と骨量の経年変化ならびにホルモン補充療法 (HRT) に対する反応性との関連を検討した。

B. 研究方法

1. 対象：閉経後骨粗鬆症患者を対照群 60名、HRT 群 (estradiol 0.3125mg/day 内服) 26名の2群にわけ、1年間の観察前後で腰椎 L2-4 の骨密度を dual energy X ray absorptiometry (DXA) にて測定した。

2. ER 遺伝子の多型性分析：ER 遺伝子の多型性分析は Yaich や Zuppan らの方法で行なった。対象の末梢血白血球から抽出した DNA を用い、ER 遺伝子の第1イントロンにある restriction fragment length polymorphism (RFLP) site (Pvu II) をはさみこむ primers を用いた polymerase chain reaction (PCR) を行なった。PCR 産物に制限酵素 Pvu II または Xba I を作用させ、

電気泳動に供し、遺伝型の分類を行なった (Pvu IIで切断されない場合を P、切断される場合をpとし、genotypeはPP、Pp、ppと分類、Xba Iで切断されない場合を X、切断される場合をxとし、genotypeは XX、Xx、xxと分類)。

C. 研究結果

対照群における骨密度の年間変化率 (%/year、mean \pm SE)はPP群 0.137 ± 0.71 (n=14)、Pp群 -1.23 ± 0.94 (n=27)、pp群 -1.60 ± 0.67 (n=19)であり、pp群と他の群間で骨量減少速度に有意な差が認められた。また、Xba による分類では、xx 群における骨量減少がXx 群に比して有意に大きかった。なお XX は今回の集団にはみいだされなかった。

観察開始前の骨密度は、対照群よりも HRT 群の方が高値であったが、これは今回検討の対象となった集団が対照群 (未治療群) と HRT 群に無作為に振り分けられたものではないことを反映していると思われる。PvuII による遺伝子型で3 群に分類した場合、1年間の HRT によって骨量が増加しなかった群はなかった。すなわち、HRT による骨密度の年間変化率は PP 群 3.58 ± 2.05 (n=6)、Pp 群 6.77 ± 1.67 (n=10)、pp 群 3.86 ± 2.22 (n=10)であった。しかしながら、各 genotype 群ごとに対照群と HRT 群における骨密度の年間変化率を比較したところ、Pp 群 と pp 群では有意差 ($p < 0.01$)があり、遺伝子型による HRT の効果における magnitude の差があることが示唆された。

D. 考察

我々は日本人閉経後女性の一つの集団において、腰椎骨塩量と全身骨骨塩量ともに、検討した ER 遺伝子の多型性について PP型をもつ群が pp 型よりも低値を示すことを報告した。Xba I については xx 型において骨塩量が低い傾向にあったが、各群間の差は統計学的には有意ではなかった。また、Pvu II site と Xba I site との距離は約 50bp であるが、2つの RFLP の組み合わせを用いて対象を分類し、解析した。その結果、に PPxx 群とその他の群間で有意な骨塩量の差を認めている (論文-3)。さらに今回の結果は ER 遺伝子の多型性が骨量減少速度の個人差や HRT に対する反応性と関連していることを示唆している。

これらの結果を合わせて考えると、PP の遺伝子型は閉経後の骨量減少速度の速さよりも、いわゆる最大骨量の低さに影響をあたえることを通して閉経後女性の骨量との関連を生じていることが推察される。一方、xx の遺伝子型はその逆、つまり、閉経後の骨量減少速度の速さとの関連が大きいのではないかと思われる。しかしながら、先にも述べたように、今回の対照群と HRT 群の振り分けはプロスペクティブかつ無作為的に行なわれたものではなく、また、症例数も少ないことから、明確な結論を得るためには今後の積み重ねが必要である。

我々は、症例数を増やした上でもこれまでの結果が再現でき、骨量の減少速度との関係も示唆した。しかしながら、他のグループによる閉経後女性についての

検討においては少なくとも骨量の絶対値に関するエストロゲン受容体遺伝子多型性有意な効果は報告されていない。年齢と体重で補正した Z score に関するデータでの比較もまたれる。また、成長期女兒における身長、体重、体脂肪などの身体組成、カルシウム代謝との関連についても検討がされてきている。

遺伝子多型性は生物学、医学の面で多岐にわたって応用されている。その一つがいわゆるゲノムプロジェクトにおけるマーカーとしての利用であり、もう一つが個人の識別や疾患の原因遺伝子の探求における利用である。後者の場合には疾患の原因遺伝子を追及するにあたって、注目する型質 (phenotype) を規定する未知の遺伝子と既知の遺伝子(疾患遺伝子)との距離を遺伝学的につめていくことがしばしば行なわれる。この既知の遺伝子として、種々の遺伝子多型性がマーカーとして用いられる。今回我々は、エストロゲン受容体遺伝子の第一イントロンにある RFLP という多型性と閉経後女性骨量ならびにその変化との関連を示したが、この多型性をエストロゲン受容体遺伝子内外の未知の疾患遺伝子の存在を示唆するマーカーとして考えていくことができるか否か、今後は sib-pair analysis などの手法を用いた検討も必要である。

E. 結論

日本人閉経後女性の集団を利用してエストロゲン受容体遺伝子多型性と骨量の経年変化ならびにホルモン補充療法に対する反応性との関連が認められることを

示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Hoshiono S, Inoue S, Hosoi T, Saito T, Ikegami A, Kaneki M, Ouchi Y, Orimo H. Demonstration of isoforms of the estrogen receptor in the bone tissues and in osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int* 57: 466-468, 1995

2) Sano M, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Emi M, Shiraki M, Orimo H. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun* 217: 378-383, 1995

3) Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, Ouchi Y, Shiraki M, Orimo H. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J Bone Miner Res* 11:306-311, 1996

4) Hosoi T, Inoue S, Ouchi Y, Orimo H. Immunolocalization of activin-A in osteocalsts. *Gerontology* 42 (suppl 1): 20-24, 1996

5) Hosoi T, Asaka T, Motoo M, Tomita T, Shiraki M, Ouchi Y, Orimo H. Immunolocalization of transforming growth factor-β in the bone tissue. *Calcif Tissue Int* 59: 305-6, 1996

6) Shiraki M, Aoki C, Shiraki Y, Hosoi T, Kaneki M, Ouchi Y. Association of Bone Mineral Density with Apolipoprotein E Phenotype. *J Bone Miner Res* 12:1438-45, 1997

7) Suzuki T, Yoshida H, Hashimoto T, Yoshimura N, Fujiwara S, Fukunaga M, Nakamura T, Yoh K, Inoue T, Hosoi T and

Orimo H. Case-control study of risk factors for hip fractures in the Japanese elderly by a Mediterranean Osteoporosis Study (MEDOS) questionnaire. *Bone* 21: 461-467, 1997

8) Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, Soda M, Tokizawa T, Kagami I, Miyamoto S, Ibuki Y, Inoue S, Shiraki M, Ouchi Y. Estrogen receptor gene polymorphisms and bone mineral density of pre- and postmenopausal women. *Bone* 21: 379-383, 1997

9) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Hiroi H, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243:122-126, 1998

10) Ogawa S, Inoue S, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Cross-inhibition of both estrogen receptor alpha and beta pathways by each dominant negative mutant. *FEBS Lett* 423:129-132, 1998

11) Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor (ER) beta cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 26:3505-3512, 1998

12) Tsukamoto K, Inoue S, Hosoi T, Orimo H, Emi M. Isolation and radiation hybrid mapping of dinucleotide repeat polymorphism at the human estrogen receptor beta locus. *J Hum Genet* 3: 73-74, 1998

13) Miyao M, Hosoi T, Hoshino S, Inoue S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y. Polymorphism of insulin-like growth factor I gene and bone

mineral density. *Calcif Tissue Int* 63:306-11, 1998

14) Hosoi T, Miyao S, Inoue S, Hoshino S, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y. Association study of parathyroid hormone gene polymorphism and bone mineral density in Japanese postmenopausal women. *Calcif Tissue Int* 64:205-8, 1999

2.学会発表

1) 細井孝之、宮尾益理子、星野真二郎、井上聡、白木正孝、折茂肇、大内尉義。<シンポジウム>骨粗鬆症の遺伝的素因に関する検討。第4回日本未病システム学会, 1997

2) 星野真二郎、宮尾益理子、須貝正夫、細井孝之、大内尉義。<ワークショップ>骨粗鬆症健診システムに関する検討。第4回日本未病システム学会, 1997

3) 細井孝之。骨粗鬆症の予防と治療におけるDNA解析の応用。第34回日本老年医学会総会, 1997

4) 宮尾益理子、細井孝之、星野真二郎、井上聡、白木正孝、折茂肇、大内尉義。骨粗鬆症における遺伝的素因の解析---IGF-I遺伝子多型性と骨代謝。第34回日本老年医学会総会, 1997

5) 細井孝之、宮尾益理子、星野真二郎、須貝正夫、井上聡、塚本和弘、江見充、白木正孝、折茂肇、大内尉義。<ワークショップ:骨疾患における分子遺伝学の進歩>骨粗鬆症の分子遺伝学。日本人類遺伝学会第42回大会, 1997

6) 白木由美子、白木正孝、細井孝之、井上聡、大内尉義、折茂肇。女性ホルモ