

#### D. 考察

短期間の女性ホルモン補充療法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 にて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、長期にわたる女性ホルモン補充療法において内皮機能改善が保たれるか否かと低用量の女性ホルモンが内皮機能を改善するかは不明であった。本研究の結果、36 カ月の長期にわたって内皮機能の改善が維持され、その改善効果は低用量の HRT においても維持されることが示された。

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を変動させ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 LDL コレステロールは低下し、HDL コレステロールは上昇する。しかし高脂血症を有さなかった閉経後女性 11 名においては HRT 開始後の各時期で、BMI、平均血圧、総コレステロール、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。また、HDL コレステロールは 24 カ月の時点で上昇する傾向が認められたが、内皮機能が改善する 3~12 カ月よりもはるかに遅い時点であった。以上より、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とは考えにくい。

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が指摘されている。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意義深い。

血管内皮細胞は、内皮細胞由来弛緩因子 (Endothelium-derived relaxing factor, EDRF) を産生し血管のトーン調節に関与している。EDRF の本体は nitric oxide (NO) であると考えられている。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いる。高コレステロール食で飼育したサルの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た。

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支持するものと考えられる。

血管内皮機能の異常は動脈硬化の初期変化と考えられているが、その機能評価は従来アセチルコリンの動脈内投与等による侵襲的検査法が主体であった。血流依存性血管拡張による血管内皮機能の評価は、高解像度の超音波を用いることで非侵襲的に行うことができる。われわれは冠動脈危険因子の重積によって血管内皮機能が低下することや血管内皮機能と頸動脈内膜中膜厚が逆相関する事をすでに報告している。上腕動脈の血管内皮機能は冠動脈の血管内皮機能と相関することや、心血管イベントとも関連があることも報告されている。したがって HRT によって血管内皮機能を保つことは、動脈硬化の進展防止につながると考えられる。CEE 0.625mg+MPA 2.5mg は一般に欧米で用いられている用量であり、本邦の閉経後婦人に対して適量か否かは定かではない。通常量の HRT では不正性器出血や子宮体癌、また乳癌や血栓症などの有害事象を心配する声が多い。低用量の HRT が通常量と同程度に有効だとすれば、有害事象等の発生は減少するものと思われる。今回のわれわれの検討では通常量の半量でも血管内皮機能は保持されることが示され、本邦閉経後婦人への HRT 投与量として半量でも十分効果が期待できる可能性が示された。

## E. 結論

女性ホルモン補充療法により閉経後女性の血管内皮機能は改善を示した。この改善は女性ホルモン補充療法中、長期にわたって維持され、また通常量の半量の女性ホルモン補充療法においても改善効果が認められた。通常量もしくは通常量の半量の女性ホルモン補充療法は血管内皮機能の改善によって、動脈硬化性疾患の発症を抑制することが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hashimoto M, Miyao M, Akishita M, Hosoi T, Toba K, Kozaki K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Effects of long-term and reduced-dose hormone replacement therapy on endothelial function and intima-media thickness in postmenopausal women. *Menopause*. 2002; 9(1):58-64.
2. Ako J, Kozaki K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Transient left ventricular apical ballooning without coronary artery stenosis: a form of stunning-like phenomenon? *J Am Coll Cardiol*. 2002; 39(4):741-2.
3. Hashimoto M, Kim S, Eto M, Iijima K, Ako J, Yoshizumi M, Akishita M, Kondo K, Itakura H, Hosoda K, Toba K, Ouchi Y. Effect of acute intake of red wine on flow-mediated vasodilatation of the brachial artery. *Am J Cardiol*. 2001; 88(12):1457-60.
4. Fujimura T, Takahashi S, Urano T, Ogawa S, Ouchi Y, Kitamura T, Muramatsu M, Inoue

5. Differential expression of estrogen receptor beta (ERbeta) and its C-terminal truncated splice variant ERbetax as prognostic predictors in human prostatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 289(3):692-9.
5. Watanabe T, Yoshizumi M, Akishita M, Eto M, Toba K, Hashimoto M, Nagano K, Liang YQ, Ohike Y, Iijima K, Sudoh N, Kim S, Nakaoka T, Yamashita N, Ako J, Ouchi Y. Induction of nuclear orphan receptor NGFI-B gene and apoptosis in rat vascular smooth muscle cells treated with pyrrolidinedithiocarbamate. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21(11):1738-44.
6. Matsuo S, Nakamura Y, Takahashi M, Ouchi Y, Hosoda K, Nozawa M, Kinoshita M. Effect of red wine and ethanol on production of nitric oxide in healthy subjects. *Am J Cardiol.* 2001; 87(8):1029-31.
7. Sudoh N, Toba K, Akishita M, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Kim S, Liang YQ, Ohike Y, Watanabe T, Yamazaki I, Yoshizumi M, Eto M, Ouchi Y. Estrogen prevents oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis in rats. *Circulation.* 2001; 103(5):724-9.
8. Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet.* 2000; 45(6):327-30.
9. Inoue S, Ogawa S, Horie K, Hoshino S, Goto W, Hosoi T, Tsutsumi O, Muramatsu M, Ouchi Y. An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279(3):814-9.
10. Watanabe T, Akishita M, Toba K, Kozaki K, Eto M, Sugimoto N, Kiuchi T, Hashimoto M, Shirakawa W, Ouchi Y. Influence of sex and age on serum nitrite/nitrate concentration in healthy subjects. *Clin Chim Acta.* 301: 169-179, 2000
11. Ogawa S, Saito T, Matsuda Y, Seki N, Hayashi A, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M, Hori T, Inoue S. Chromosome mapping of RNF16 and rnf16, human, mouse and rat genes coding for testis RING finger protein (terf), a member of the RING finger family. *Cytogenet Cell Genet.* 2000; 89(1-2):56-8.
12. Ishikawa M, Akishita M, Kozaki K, Toba K, Namiki A, Yamaguchi T, Orimo H, Ouchi Y. Expression of parathyroid hormone-related protein in human and experimental atherosclerotic lesions: functional role in arterial intimal thickening. *Atherosclerosis.* 2000;152(1):97-105.
13. Hashimoto M, Kozaki K, Eto M, Akishita M, Ako J, Iijima K, Kim S, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Association of coronary risk factors and endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery. *Hypertens Res.* 2000; 23(3):233-8.
14. Ogawa S, Fujita M, Ishii Y, Tsurukami H, Hirabayashi M, Ikeda K, Orimo A, Hosoi T, Ueda M, Nakamura T, Ouchi Y, Muramatsu M, Inoue S. Impaired estrogen sensitivity in bone by inhibiting both estrogen receptor alpha and beta pathways. *J Biol Chem.* 2000; 275(28):21372-9.
15. Hoshino S, Hosoi T, Miyao M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S. Identification of a novel polymorphism of estrogen receptor-alpha gene that is associated with calcium excretion

in urine. *J Bone Miner Metab.* 2000;18(3):153-7.

16. Ogawa S, Hosoi T, Shiraki M, Orimo H, Emi M, Muramatsu M, Ouchi Y, Inoue S. Association of estrogen receptor beta gene polymorphism with bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 269(2):537-41.

17. Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Kim S, Eto M, Ako J, Liang YQ, Sudoh N, Hosoda K, Nakahara K, Toba K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit proliferation of vascular smooth muscle cells and downregulate expression of cyclin A gene. *Circulation.* 2000; 101(7):805-11.

18. Nagano K, Toba K, Akishita M, Watanabe T, Kozaki K, Eto M, Hashimoto M, Sudoh N, Ako J, Yoshizumi M, Ouchi Y. Prostanoids regulate proliferation of vascular smooth muscle cells induced by arginine vasopressin. *Eur J Pharmacol.* 2000; 389(1):25-33.

19. 鷺見尚己, 村嶋幸代, 鳥羽研二, 大内尉義. 退院困難が予測された高齢入院患者に対する早期退院支援の効果に関する研究 特定機能病院老年病科における準実験研究. 病院管理 38(1); 29-40, 2001

20. 大内尉義 編. 高齢女性の健康増進のためのホルモン補充療法ガイドライン. メディカルレビュー社・東京, 2001

21. 大内尉義. 女性における虚血性心疾患 成り立ちからホルモン補充療法まで. p20-28, 2000, 村山正博監修, 天野恵子, 大川真一郎編, 医学書院・東京

## 2. 学会発表

1) 梁 一強, 金 承範, 秋下雅弘, 阿古潤哉, 飯島勝矢, 大池裕美子, 渡辺徳光, 吉栖正雄, 大内尉義. エストロゲンの肥満抑制作用について. 第7回末病システム学会, 2001.1.19-20, 名古屋

2) 梁 一強, 金 承範, 秋下雅弘, 阿古潤哉, 飯島勝矢, 大池裕美子, 渡辺徳光, 須藤紀子, 長野宏一朗, 吉栖正雄, 大内尉義. Inhibitory effect of estrogen on body weight gain via central estrogen receptor- $\beta$  in ovariectomized rats. 第65回日本循環器学会総会・学術集会, 2001.3.25-27, 京都. <Abstract: Jpn Circ J 65(suppl): 513, 2001>

3) Hashimoto M, Miyao M, Akishita M, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Long term and reduced dose effects of hormone replacement therapy on endothelial function and intima-media thickness in post menopausal woman. The 5th International Conference on Preventive Cardiology, 2001. 5.27-31, Osaka

4) Liang YQ, Kim S, Akishita M, Yoshizumi M, Hashimoto M, Ako J, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y. Estrogen attenuates ovariectomy induced body weight gain through estrogen receptor beta--in the central nervous system (CNS). The 5th International Conference on Preventive Cardiology, 2001. 5.27-31, Osaka

5) 大内尉義. 【シンポジウム II: 循環器病発症の素因/女性と循環器病】循環器病における性差. 第36回日本循環器管理研究協議会総会・日本循環器病予防学会, 2001.5.27-30, 大阪. <抄録: 日本循環器病予防学会誌 36(2); 108, 2001>

- 6) 須藤紀子, 鳥羽研二, 秋下雅弘, 江頭正人, 阿古潤哉, 金 承範, 橋本正良, 飯島勝矢, 梁 一強, 渡辺徳光, 大池裕美子, 吉栖正雄, 大内尉義. 酸化剤により誘導される血管内皮アポトーシスのエストロゲンによる抑制. 第2回 Blood Vessel Club, 2001.6.11, 東京
- 7) 大内尉義, 佐久間一郎, 大藏健義, 井上 聡, 佐藤貴一郎, 武谷雄二. ホルモン補充療法に対する一般女性の意識—長寿科学総合研究によるアンケート調査結果—. 第43回日本老年医学会学術集会, 2001.6.13-15, 大阪. <抄録: 日老医誌 2001,38(Suppl): 122>
- 8) 小川純人, 井上 聡, 大内尉義. エストロゲン受容体  $\alpha$ ,  $\beta$  双方のシグナル系を抑制する変異体を発現させた, エストロゲン低応答型トランスジェニックラットを用いた骨, 血管作用の解析. 第43回日本老年医学会学術集会, 2001.6.13-15, 大阪. <抄録: 日老医誌 2001,38(Suppl): 136>
- 9) 井上聡, 小川純人, 大内尉義: 【シンポジウム】血管のエストロゲン受容体とその生体機能. 第74回日本内分泌学会学術集会, 2001.6.29-7.1, 横浜. <抄録: 日本内分泌学会雑誌 77(1):15, 2001>
- 10) Iijima K, Hashimoto M, Ako J, Eto M, Kim S, Ohike Y, Watanabe T, Yoshizumi M, Ouchi Y. Role of Endothelium-Dependent Flow-Mediated Dilatation of the Brachial Artery in Predicting Coronary Events. 17th World Congress of Gerontology, 2001.7.1-7.6, Vancouver, CANADA. <Abstract: Gerontology 47(suppl 1): 397, 2001>
- 11) 藤田雅代, 小川純人, 福岡秀興, 津久井通, 大内尉義, 井上聡: 【優秀演題賞】エストロゲン受容体を介する骨代謝調節機構の性差の検討—トランスジェニックラットを用いた解析. 第19回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋. <抄録: 日本骨代謝学会雑誌 19(2); 41, 2001>
- 12) 井上聡, 小川純人, 大内尉義. 心血管系の性ホルモン応答機構と疾患—血管のエストロゲン受容体とその生体機能. 第19回日本骨代謝学会, 2001.8.8-11, 名古屋. <抄録: 日本内分泌学会雑誌 77(1); 15, 2001>
- 13) 高橋悟, 浦野友彦, 小串哲生, 大内尉義, 北村唯一, 井上聡. 前立腺癌におけるエストロゲン応答遺伝子 EBAG9 の発現. 第66回日本泌尿器学会東部総会, 2001.10.11-13, 東京. <抄録: 日泌尿会誌 92(2); 372, 2001>
- 14) 藤村哲也, 高橋悟, 井上聡, 浦野友彦, 小串哲生, 大内尉義, 北村唯一. ヒト前立腺癌における estrogen receptor  $\alpha$ ,  $\beta$  の発現. 第66回日本泌尿器学会東部総会, 2001.10.11-13, 東京. <抄録: 日泌尿会誌 92(2); 268, 2001>
- 15) 須藤紀子, 鳥羽研二, 秋下雅弘, 江頭正人, 阿古潤哉, 金 承範, 橋本正良, 飯島勝矢, 梁 一強, 渡辺徳光, 大池裕美子, 吉栖正雄, 大内尉義. エストロゲンは酸化ストレスによる血管内皮細胞のアポトーシスを抑制し, 抗動脈硬化作用を有する. 第9回性差医学研究会, 2000.3.11, 東京. <抄録: 性差医学 No.7:2001>
- 16) 大内尉義, 細井孝之, 佐久間一郎, 大藏健義, 佐藤貴一郎, 井上 聡, 武谷雄二. 閉

経後女性のホルモン補充療法に関する医師の意識調査. 第42回日本老年医学会学術集会, 2000.6.15-17, 仙台. <抄録: 日老医誌 37(Suppl): 130, 2000>

17) 大内尉義. エストロゲンと血管内皮細胞機能. 第73回日本内分泌学会, 2000.6.16-18, 京都. <抄録: 日本内分泌学会雑誌 76(2); 434, 2000>

18) 小川純人, 星野眞二郎, 細井孝之, 白木正孝, 折茂肇, 江見充, 井上聡, 大内尉義. エストロゲン受容体 $\beta$  (ER  $\beta$ ) 遺伝子多型の骨量に及ぼす影響. 第18回日本骨代謝学会, 広島, 2000年7月. <抄録: 日本骨代謝学会雑誌 18(2); 171, 2000>

19) 浦野友彦, 高橋悟, 小串哲生, 北村唯一, 村松正実, 大内尉義, 井上聡. 前立腺癌におけるエストロゲン受容体とエストロゲン応答遺伝子の発現とその役割. 第59回日本癌学会総会, 横浜, 2000年10月. <抄録: 日本癌学会 59回総会記事 242-243, 2000>

20) 井上聡, 小川純人, 村松正実, 大内尉義. 核内レセプターの高次機能 エストロゲンレセプターのドミナントネガティブ体と生体機能. 第73回日本生化学大会, 2000.10.12-14, 横浜. <抄録: 生化学 72(8); 705, 2000>

21) 大蔵 健義, 大内尉義, 細井孝之, 佐久間一郎, 佐藤貴一郎, 井上聡, 武谷雄二, 熊坂高弘. ホルモン補充療法に関する一般女性の意識調査. 第15回日本更年期医学会学術集会, 2000.10.14-15, 札幌. <抄録: 日更年期医誌 8(suppl); 136, 2000>

22) Liang YQ, Kim S, Akishita M, Yoshizumi M, Hashimoto M, Ako J, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Ouchi Y. Estrogen attenuates ovariectomy-induced body weight gain through estrogen receptor beta--in the central nervous system. 73rd American Heart Association Scientific Sessions. 2000.11.12-15, New Orleans, USA. <Abstract: Circulation 102(Suppl): II-349>

23) 神崎恒一, 大内尉義. Rain EW. PDGF-Bの除去はアポEノックアウトマウスの動脈硬化病変を遅延しない. 第2回関東心・血管フォーラム, 2001.5.12, 長野

24) 神崎恒一. 血中のPDGF-B鎖を除去したApoE $^{-/-}$ マウスの動脈硬化病変. 第4回 Blood Vessel Club, 2001.9.10, 東京

#### G. 知的所有権の所有状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

<研究協力者 大内 尉義 (東京大学大学院医学系研究科教授)>

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

エストロゲンの細動脈および毛細血管への作用

分担研究者 佐久間一郎 北海道大学大学院医学研究科講師

【研究要旨】 ホルモン補充療法は、アルツハイマー病の発症を遅らせる作用がある。その効用の機序として、エストロゲンの細動脈の EDHF に対する作用、および脳における毛細血管網への作用を検索した。さらに、cardiac syndrome X の機序として、エストロゲン欠落による心臓毛細血管網の異常の有無を検索した。40 週齢雌性 Wistar ラットを用い、卵巣を摘出した群（OVX 群）、卵巣摘出後エストロゲン（ $17\beta$  エストラジオール）を補充した群（ER 群）、sham operation 群（CON 群）を用意し、1 カ月後に 3 群のラット腸間膜動脈、心臓、脳を検索した。腸間膜動脈では、平滑筋静膜電位が OVX 群で他群より浅くなり、アセチルコリンによる過分極反応および弛緩反応が他群より低下した。また、OVX 群では他群と比べ、ギャップジャンクションの構造蛋白であるコネキシン 43 の発現が低下していた。従って、エストロゲンは EDHF の機能をコネキシン発現を介して調節し、EDHF 機能を増強することが明かとなった。さらに、エストロゲンが欠落した OVX 群では、脳や心臓の VEGF や eNOS が減少していた。すなわち、この更年期ラットモデルでは、残存エストロゲンが VEGF や eNOS を介して毛細血管網を調節しているが、それが欠落すると脳や心臓で毛細血管網が減少すること、エストロゲン補充によりそれが改善されることが明かとなった。この結果は、ホルモン補充療法が EDHF を介して血管拡張を惹起し、さらに毛細血管網増強により脳や心臓の局所血流を改善する可能性を示唆するものである。ホルモン補充療法の精神神経系への効用は、エストロゲンによりこのような細動脈・毛細血管系の改善をもたらすものかもしれない。今後、脳・心臓ともに、エストロゲンにより実際に局所血流が改善し、心臓や脳の機能が改善するが否かを検討する必要がある。

#### A. 研究目的

閉経後女性に欠落したエストロゲンを少量投与するホルモン補充療法は、更年期障害を是正し、骨粗鬆症を改善するほか、動脈硬化の進展を抑制して虚血性心疾患の発症や再発を予防し、さらにアルツハイマー病の発症を遅らせる作用があるとされ、高齢女性の活動性と生活の質を大いに高めると考えられる。このエストロゲンの効用の中で、脳神経系への効果に関しては、その一部は血管系への作用による可能性がある。本研究班の分担研究として、本年度はエストロゲンの細動脈および毛細血管への作用を検索した。

エストロゲンは内皮型一酸化窒素（NO）合成酵素（eNOS）を誘導し、NO 生成増加の結果血管を拡張して動脈硬化抑制や臓器保護をもたらすとされている。内皮由来血管弛緩因子としては、内皮由来弛緩因子（EDRF=NO）、プロスタサイクリン（PGI<sub>2</sub>）のほか、第三の弛緩因子として内皮由来過分極因子の存在（EDHF）が知られている。EDHF の本態としては、P450 生成物や過酸化水素、ギャップジャンクションを介した

内皮細胞の過分極の平滑筋への伝搬などの説があり、まだ確定はしていないが、種差や血管の部位によって種々のものがあると考えられている。それらの EDHF の共通点は、特に小動脈や細動脈において、平滑筋の K チャンネルを開口して拡張を惹起することであり、ら血圧調節や局所血流制御に重要な因子とされている。従って、脳循環においても重要な機能を有する可能性がある。

以前より、われわれはラットの腸間膜動脈を用い、平滑筋膜電位と EDHF の作用を検索してきたが、今回、更年期のモデルとして 40 週齢の中年雌性ラットを用い、エストロゲンの卵巣摘出およびエストロゲン補充がそれらにどのような影響を及ぼすかを検討した。また、ラット腸間膜動脈では、EDHF は内皮細胞の過分極がギャップジャンクションを介して平滑筋へ伝搬する結果によるとされている。ギャップジャンクションを構成するコネキシンはエストロゲンによりダイナミックに調節されているとの報告があるので、その効果を検索した。

胸痛に心電図変化を伴う（伴わないこともあるが）ものの、冠動脈造影で太い冠動脈には有意の狭窄を認めない一連の症候群は（coronary） syndrome X と呼ばれている。Syndrome X は細動脈以下の細い血管に障害が存在することで惹起されると考えられているが、閉経後女性に多く、エストロゲン投与により症状が改善することがあるとされている。以前より、われわれは心筋の毛細血管網の検討を行ってきた。本研究の一環として、上記と同様のモデルを用い、エストロゲンの心臓毛細血管への影響を検索した。さらに、同様の検索を脳の血管について行った。

## B. 研究方法

40 週齢雌性 Wistar ラットを用い、ペントバルビタール麻酔下 (50mg/kg, i.p.) で卵巣を摘出した群 (OVX 群)、卵巣摘出後エストロゲンを補充した (水溶性 17  $\beta$  エストラジオール (3  $\mu$  g/day) を浸透圧ポンプにて補充) 群 (ER 群)、sham operation 群 (CON 群) を用意し、1 カ月後、3 群のラットに対してジエチルエーテルで深麻酔後下大静脈から血液を採取し、さらに腸間膜動脈、心臓、脳を摘出した。

### 1) 血管平滑筋細胞膜電位と血管張力の測定

95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub> の混合ガスで酸素化した生理的塩類溶液 (PSS; NaCl 118.2, KCl 4.7, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgCl<sub>2</sub> 1.2, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, glucose 10.0 mM, pH=7.4) 中で、周囲の脂肪組織および結合組織を剥離した後に腸間膜動脈を短軸方向に切断し、長さ 3 mm のリング状標本を作製した。さらに長軸に沿って切断し、長方形の動脈標本を作製した。内皮細胞除去標本は、血管内皮細胞を PSS で湿らせた綿棒で擦過して作成した。標本は内皮細胞面上面にして、3 ml の器官浴槽内にステンレスピンで仮固定し、37°C の PSS 溶液を 7 ml/min の速度で灌流した。60 分間の平衡時間の後に標本を本固定し、さらに 30 分後に実験を開始した。血管平滑筋細胞の膜電位は 3M の KCl を満たしたガラス微小電極 (抵抗値 40-80M  $\Omega$ ) を内皮細胞側より刺入することにより測定した。約 2 分間の安定した膜電位を確認した後に、ACh を投与し膜電位変化を記録した。



膜電位の電気信号はオシロスコープ（日本光電、VC-10）でモニターし、感熱レコーダー（グラフテック、WR3101）に記録した。

上記と同様の方法で作製した、長さ 3 mm のラット腸間膜動脈のリング状標本を 25 ml の器官浴槽内に懸垂固定した。浴槽内を 95%O<sub>2</sub> と 5%CO<sub>2</sub> の混合ガスで通気した 37℃ の PSS で満たした。標本には 1 g の前張力をかけ、トランスデューサー（ユニークメディカル、UMTB-1）によって発生張力を等尺性に測定した。トランスデューサーからの電気信号はアンプ（日本光電、AP-621G）で増幅し、ペンレコーダー（理化電気、R-64）にて記録した。安定した標本の収縮性を得るために、等張性高カリウム溶液（80 mM）による収縮反応を反復して観察し、一定の収縮が得られた後に実験を開始した。フェニレフリン、インドメタシン、N-ニトロアルギニンなどの投与後に、アセチルコリン（ACh）による弛緩反応の変化を測定した。

## 2) 腸間膜動脈の免疫染色およびウエスタンブロッティング

PBS 溶液（0.1 M, pH 7.4）及び 4% パラフォルムアルデヒド液にて心腔内灌流後に腸間膜動脈を注意深く採取し、周囲の脂肪組織および結合組織を剥離した後、4% パラフォルムアルデヒド液で 2 時間固定浸漬した。引き続き 70~100% のエタノール系列で 3 時間ごとに脱水操作を行い、その後キシレンで 2 時間 3 回の浸透を行った。次に溶解した硬パラフィン（58~60℃）に 6 時間 3 回浸透させた後、パラフィン切片を作製した。切片を 5 μm の厚さに薄切しシランコーティングのスライドグラスに貼付した。キシレンによる脱パラフィン、下降エタノール系列による切片の水和を行い 5 分間流水中で水洗したあと、PBS に 5 分間浸漬させた。0.3% 過酸化水素水加メタノールに 10 分間反応させ内因性パーオキシダーゼのブロッキングを行なった。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、非特異的蛋白のブロッキングのため 2% ウシ血清アルブミンを含む PBS 液にて 1 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、湿箱内でポリクローナルウサギ抗ラットコネキシン 43 抗体（希釈率 1:100、ザイメッド社）を常温 24 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、湿箱内で二次抗体としてパーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体（ENVISION+、ダコ社）を常温、1 時間反応させた。PBS で 5 分間 3 回洗浄後、DAB 溶液に約 5 分間反応させ、精製水で切片上の試薬を洗い流し、精製水に浸漬した。エタノール系列での脱水、キシレンによる透徹を行った後エンテランニュー（メルク社）により封入した。完成した標本を光学顕微鏡で観察した。

Tris-HCl（50 mM, pH 7.4）30 ml で心腔内灌流後に腸間膜動脈を注意深く採取し、周囲の脂肪組織および結合組織を剥離した後、素早く液体窒素で凍結した。プロテアーゼ阻害剤カクテル錠（Complete tablet, ベーリンガーマンハイム社）を溶解した Tris-HCl（50 mM, pH 7.4）に血管を浸し、ポリトロンでホモジェナイズした（speed9, 60 秒間）。ホモジネートを 3000 g, 10 分間遠心し、得られた上清を 100000 g, 60 分間遠心し、ペレットを膜蛋白分画として Tris-HCl に懸濁し膜標本とした。蛋白定量は、DC プロテインアッセイキット（バイオラッド社）を使用した。膜蛋

白標本をそれぞれ 20  $\mu$ g をサンプルバッファーに溶解し、12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離した後、PVDF 膜（バイオラッド社）に電氣的にブロッティングした（80V, 90 分間）。PVDF 膜を 2%ウシ血清アルブミンを含む TTBS 液（50 mM Tris, 0.15 M NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.6, 0.1% v/v Tween20）にて 1 時間ブロッキングし軽く TTBS で洗浄後に、ポリクローナルウサギ抗ラットコネキシン 43 抗体（希釈率 1:1000、ザイメッド社）を 4°C、24 時間反応させた後、TTBS 液で 10 分間 3 回洗浄した。その後二次抗体としてパーオキシダーゼ標識デキストラン結合抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体（ENVISION+, 希釈率 1:100、ダコ社）を常温、1 時間反応させた後、TTBS 液で 10 分間 3 回洗浄した。バンドの検出に化学発光キット（ECL plus、アマシャム社）を使用した。

### 3) 心臓と脳における検討

心筋内の毛細血管についてはその内皮細胞を二重染色法により、alkaline phosphatase を含む動脈性毛細血管内皮細胞を青色に、dipeptidylpeptidase III を含む静脈性毛細血管内皮細胞を赤色に染色した。両方の酵素を含む中間型毛細血管内皮細胞は紫色に染色された。脳に関しては、毛細血管内皮細胞を第 VIII 因子抗体にて染色した。さらに免疫組織染色および in site hybridization により VEGF、KDR（VEGF の angiogenic receptor）、eNOS の発現を検索した。

## C. 研究結果

### 1) 血管平滑筋細胞膜電位と血管張力の測定

OVX 群では CON 群と比較し EDHF による血管弛緩反応が低下し、また平滑筋静止膜電位が浅くなり、ACh による膜過分極反応も抑制された。これらの変化は ER 群では改善された。同週齢の雄性ラットの腸間膜平滑筋静止膜電位および ACh による膜過分極反応は ER 群と同程度であった。また、カリウムチャンネル開口薬のピナシジルや 1-EBIO による膜過分極には三群で有意差を認めなかった。血中 17  $\beta$  エストラジオール値は、OVX 群で低値となり、ER 群では CON 群よりやや高値となった。他の二群と比較して LDL コレステロールが高値であったが、三群間で内皮細胞の eNOS の発現に顕かな差を認めなかった。血中 17  $\beta$  エストラジオール値は、OVX 群で低値となり、ER 群では CON 群よりやや高値となった。他の二群と比較して LDL コレステロールが高値であったが、三群間で内皮細胞の eNOS の発現に顕かな差を認めなかった。

### 2) 腸間膜動脈の免疫染色およびウエスタンブロッティング

コネキシン 43 抗体を用いた免疫染色での検討では、CON 群、ER 群においてラット腸間膜動脈の内皮側及び中膜の外側強い染色部位を認めたが、OVX 群においては染色の程度は著しく低下していた。

各群の腸間膜動脈の膜蛋白分画におけるコネキシン 43 の発現の変化をウエスタンブロッティングによって解析した結果、43kDa にコネキシン 43 が検出された。OVX 群での蛋白発現量は CON 群に対して有意な減少を認めた。ER 群と OVX 群の比較では

優位差は認めなかったものの、ER 群における蛋白発現量の増大傾向が認められた。

### 3) 心臓と脳における検討

心臓および脳において、OVX 群では CON 群に比し、毛細血管密度が減少した。ER 群ではこれが reverse された。心臓の毛細血管では卵巣摘出により動脈性毛細血管が減り、エストロゲン補充では静脈性毛細血管が増加した。また、中年雌性ラットでは、心臓内の血管にはエストロゲン受容体として  $\alpha$  と  $\beta$  両受容体が存在したが、卵摘によりエストロゲン  $\beta$  受容体が減少し、エストロゲン補充によりそれが reverse された。心臓でも脳でも、OVX 群では CON 群に比して、VEGF と KDR さらに eNOS の発現が減少し、エストロゲン補充によりそれらは reverse された。また、OVX 群では anti-apoptotic marker である Bcl の発現が減少し、エストロゲン補充により reverse した。

## D. 考察

本研究より、エストロゲンが中年雌性ラットの腸間膜平滑筋静止膜電位および ACh による EDHF 反応に大きく関与することが明かとなった。この実験は更年期女性における閉経をシュミレートしており、更年期におけるエストロゲン補充療法の役割を示唆すると考えられる。また、本研究においてエストロゲンの急性投与が静止膜電位及び ACh による過分極反応に影響を与えなかった。従って、EDHF 反応におけるエストロゲンの急性効果はなく、核内レセプターを介した慢性効果と考えられる。

免疫染色やウエスタンブロット解析の結果により、卵巣摘出群において腸間膜動脈のコネキシン 43 の発現が減少し、エストロゲン補充で回復を認めたことから、エストロゲンがラット腸間膜動脈のコネキシン 43 蛋白発現の増強に関与することが示唆された。以前よりエストロゲンはコネキシン発現を増強し、たとえばエストロゲンが非常に増加する妊娠ラットでは、通常 EDHF 反応の認められない大動脈でも、EDHF 反応が出現するようになるという。従って、更年期や老年期においても、エストロゲンは EDH をコネキシンを介して増加し、各臓器への血流を増加させように機能している可能性がある。臓器の十分な循環確保のためにも、ホルモン補充療法は有用である可能性がある。

本研究では、更年期ですでにエストロゲンレベルが若年期の 10 分の 1 ほどとなっている状態で、エストロゲンの欠落と補充が心臓および脳の毛細血管密度を調節することが明かとなった。この結果は、syndrome X に閉経後に増加し、エストロゲンが症状軽減に有効な場合がある臨床知見と合致するものとも言えるかもしれない。また、脳での変化も、エストロゲンが痴呆の発症を遅らせる理由として、エストロゲンによる脳の血管網増加による血流改善を想定させる。いずれの場合も、機能実験を行い、それぞれ心筋虚血と、脳循環および神経機能・学習能との関係を明かとする必要があると考えられる。

## E. 結論

エストロゲンは雌性ラットの腸間膜において、EDHFの機能をコネキシン発現を介して調節し、EDHF機能を増強することが明かとなった。

また、エストロゲンが更年期モデルラットにおいて、心臓や脳の毛細血管網をVEGFやeNOSを介して調節し、毛細血管網を増加させることが明かとなった。また、卵巣摘出は毛細血管網を減少させ、さらにエストロゲンの補充がこれらを改善した。この結果は、ホルモン補充療法がEDHFを介して血管拡張を惹起し、さらに毛細血管網増強により心と脳の局所血流を改善する可能性を示唆するものである。

今後、心臓および脳ともに、エストロゲンにより局所血流が改善し、心臓や脳の機能が改善するが否かをモデル使用し、もしくは臨床的に、検討する必要があるだろう。

## E. 結論

### 1. 論文発表

1. Hiroshi Tomioka, Yuichi Hattori, Mitsuhiro Fukao, Watanabe H, Yasuhiro Akaishi, Atsushi Sato, Kim TQ, Ichiro Sakuma, Akira Kitabatake, Morio Kanno: Role of endothelial  $Ni^{2+}$ -sensitive  $Ca^{2+}$  entry pathway in regulation of EDHF in porcine coronary artery. *Am J Physiol* 280(2): H730-H737, 2001
2. MingYue Liu, Yuichi Hattori, Mitsuhiro Fukao, Atsushi Sato, Ichiro Sakuma, Morio Kanno: Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle. *Br J Pharmacol* 132(5): 1035-1046, 2001
3. Mitsuhiro Fukao, Ichiro Sakuma, Atsushi Sato, Ming-Yue Liu, Satoshi Nawate, Satoko Watanuki, Yasuhiro Akaishi, Hiroko Takano, Satoshi Watanabe, Kazuhiro Abe, Akira Kitabatake, Morio Kanno: Essential role of estrogen in the EDHF-mediated responses of mesenteric arteries from middle-aged female rats: possible contribution of gap junctional protein connexin-43. In *EDHF 2000*. ed Paul M. Vanhoutte. Taylor & Francis, London. pp313-322, 2001
4. Ichiro Sakuma, Ming-Yue Liu, Atsushi Sato, Tosio Hayashi, Akihisa Iguchi, Akira Kitabatake, Yuichi Hattori. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *Br J Pharmacol* 135(1): 48-54, 2002
5. Nobumasa Shirai, Naomasa Makita, Koji Sasaki, Hisataka Yokoi, Ichiro Sakuma, Harumizu Sakurada, Jun Akai, Akinori Kimura, Masayasu Hiraoka, Akira Kitabatake: A mutant cardiac sodium channel with multiple biophysical defects associated with overlapping clinical features of Brugada syndrome and cardiac conduction disease. *Cardiovascl Res* 53: 348-354, 2002
6. S. Jesmin, I. Sakuma, Y. Hattori, S. Fujii, A. Kitabatake: Long-acting calcium channel blocker benidipine suppresses expression of angiogenic growth factors and prevents cardiac

remodeling in a Type II diabetic rat model. *Diabetologia* 45: 2002, in press

7. 佐久間一郎、和田博司、北島 顕：心血管病変と HRT. *からだの科学* 219: 50-54, 2001

8. 佐久間一郎、北島 顕：ライフスタイルの変化と生活習慣病：心血管系疾患. *臨床婦人科産科* 55(10): 1140-1144, 2001

9. 佐久間一郎、北島 顕：syndrome X (microvascular angina). *臨床医* 27(増刊号): 1050-1052, 2001

10. 佐久間一郎：女性と循環器疾患－虚血性心疾患. *臨床婦人科産科* 56(1): 44-47, 2002

11. 佐久間一郎：循環器科における女性ホルモン補充療法. *循環器診療二頁の秘訣*. 永井良三編集. 金原出版、東京. pp4-5、2002.02.28.

## 2. 学会発表

1. Ichiro Sakuma: HRT and coagulation/fibrinolysis. 1st Scientific Meeting of the Asian-Pacific Menopause Federation. Seoul, Korea. 2001.05.28.

2. Ichiro Sakuma: The Role of Hormone Replacement Therapy in Preventing Cardiovascular Diseases in Post-menopausal Women. The 5th International Conference on Preventive Cardiology. Osaka, Japan. 2001.05.30.

3. Ichiro Sakuma: Hormone Replacement therapy (HRT) for cardiovascular prevention in women. The 3rd Congress of the Asian Pacific Society of Atherosclerosis and Vascular Diseases. Cebu, Philippines. 2002.02.20.

4. Ichiro Sakuma: Effects of Diabetes and Estrogen on Angiogenesis of the Heart. 23th Spring Scientific Conference of the Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis. Seoul, Korea. 2002.03.09.

5. S. Jesmin, I. Sakuma, A. Kitabatake: Estrogen Replacement Therapy may Improve Coronary Blood Flow in Senile Female Rats: an Investigation at Molecular Level. International Symposium on Medicine in the New Millennium "Towards Better Prediction and Prevention of Disease". Kyoto, Japan. 2001.6.2.

6. S. Nawate, M. Fukao, I. Sakuma, A. Sato, M-Y. Liu, S. Miwa, A. Kitabatake: EDHF-mediated Responses are Regulated by Estrogen Via the Increased Expression of GAP Junctional Protein Connexin43 in the Mesenteric Arteries of the Middle-aged Female Rats. 8th International Symposium on Mechanisms of Vasodilatation. Boston, USA. 2001.6.2.

7. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Chishimba Mowa, Satoshi Nawate, Takao Makino, Takamitsu Soma, Kazuhiko Nagai: Regression of Coronary Capillary after Ovariectomy and Its Recovery after Estrogen Replacement in the Heart of Middle-Aged Female Rats. American Heart Association 74th. Scientific Session. Anaheim, USA. 2001.11.11-14.

8. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Chishimba Mowa, Satoshi Nawate, Takao

Makino, Takamitsu Soma, Kazuhiko Nagai: Ovariectomy Reduces and Estrogen Replacement Recovers Capillary Density, Expressions of Angiogenic Factors and the Related Receptors in the Brain of Middle-Aged Female Rats. American Heart Association 74th. Scientific Session. Anaheim, USA. 2001.11.11-14.

9. 佐久間一郎：生活習慣病治療薬－付随的作用と予後－・血管内皮細胞機能に対する作用：エストロゲン．第22回日本臨床薬理学会年会．横浜．2001.12.15.

10. 佐久間一郎：我が国の女性における動脈硬化進展予防～日本循環器学会虚血性心疾患の一次予防新ガイドラインに基づいて．第53回日本産婦人科学会総会・学術講演会ランチョンセミナー．札幌．2001.5.12.

11. 佐久間一郎：加齢とエストロゲン．第47回日本内分泌学会学術集会ランチョンセミナー．横浜．2001.6.30.

#### G. 知的所有権の所有状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

循環器機能と至適ホルモン補充療法の策定

分担研究者 市川秀一 医療法人北関東循環器病院内科院長

【研究要旨】 女性における閉経は女性ホルモンの急激な欠落により、更年期障害など、高齢女性の quality of life (QOL) を障害する病態を引き起こし、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を作る。これらの老年疾患を予防し、高齢女性の健康を維持、増進するための方法として、世界的に女性ホルモン補充療法 (hormone replacement therapy; HRT) が注目されている。HRT は一つの方法で多面的な老年疾患の予防と治療が可能となる方法である。高齢女性に対する至適HRTの策定のため、特に循環器領域からのアプローチを試みた。研究課題1として、閉経後女性の体重・体脂肪が増加と、腹部脂肪分布の変化の着目し、Computed tomography (CT)を用いてHRTが体重およびCTによる腹部脂肪分布に与える影響について検討した。研究課題2としてはHRTによる心血管保護作用の一つである可能性に着目し、高血圧症閉経後女性の左室肥大 (LVH)、および心肥大調節因子に与える影響を検討した。

研究課題 1. 閉経後女性におけるホルモン補充療法の体重および腹部脂肪分布に及ぼす影響

A. 研究目的

女性は閉経後に体重および体脂肪が増加する。さらに腹部脂肪分布は閉経前では皮下脂肪型であったが、閉経後には内臓脂肪型へと移行する。これらの原因の一つに、閉経に伴うエストロゲンの低下が関与している可能性がある。

閉経後女性の間では、エストロゲンを投与するホルモン補充療法 (Hormone replacement therapy : HRT) が体重を増加させるといわれているが、実際のところは、はっきりしない。HRT が体重および内臓脂肪を減らすか、または予防するという報告もあれば、逆にHRT がそれらを増加させるという報告もあり、HRT が閉経後女性の体重および腹部脂肪分布に与える影響については意見が一致しない。

Computed tomography (CT) は、腹部脂肪分布を内臓脂肪型と皮下脂肪型に正確に測定できる装置である。今までにCTを使用して、HRTによる閉経後女性の腹部脂肪分布に与える影響について検討されていない。そこで我々は、閉経後女性にHRTを1年間施行し、体重およびCTによる腹部脂肪分布に与える影響について検討した。

## B.研究方法

閉経後女性 35 例 (HRT 群) に、結合型エストロゲン (0.625mg/日) に酢酸メドロキシプロゲステロン (2.5mg/日) を併用し 1 年間連続経口投与した。一方、年齢、機能、生活レベルが同等で HRT を希望しなかった閉経後女性 26 例をコントロール群として同期間観察した。HRT 施行前、および 1 年後、外来にて体重測定、CT にて腹部脂肪分布の測定を行った。腹部脂肪分布による腹部総脂肪 (皮下脂肪+内臓脂肪)、皮下脂肪、内臓脂肪は、CT 上、腰椎の L2~L4 レベルでの腹部脂肪面積で示した。また、皮下脂肪優位か内臓脂肪優位かを評価するため皮下脂肪と内臓脂肪との比 (皮下脂肪/内臓脂肪) を Subcutaneus : Visceral (S : V) 比として採用した。

## C.研究結果

体重は両群で変化しなかった。HRT 群で腹部脂肪分布は変化しなかった。コントロール群では、1 年後に腹部総脂肪、皮下脂肪がそれぞれ有意 ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.05$ ) に増加した。両群で S : V 比は変化しなかった。コントロール群の内臓脂肪の増加は、HRT 群の変化に比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に大きかった。全 61 症例の平均 S : V 比の値によってそれぞれ 2 群に分け、内臓型肥満-HRT 群 (19 例)、皮下脂肪型肥満-HRT (16 例)、内臓型肥満-コントロール群 (16 例)、皮下脂肪型肥満-コントロール群 (10 例) の計 4 群に分割した。4 群とも体重は変化しなかった。内臓型肥満-HRT 群において皮下脂肪、S : V 比がそれぞれ有意 ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ ) に増加した。さらに内臓型肥満-コントロール群においては、内臓脂肪が有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。両皮下脂肪肥満群では腹部脂肪分布は変化しなかった。内臓型肥満-HRT 群の S : V 比の変化は内臓型肥満-コントロール群のものより有意 ( $p < 0.05$ ) に大きかった。

## D.考察

HRT は閉経後女性の体重を増加させず、内臓脂肪の蓄積を抑制した。さらに、HRT は内臓型肥満を有する閉経後女性の腹部脂肪分布を内臓型肥満から皮下脂肪型肥満に移行させた。内臓型肥満は心血管病の危険因子の一つであることから、この HRT による内臓型肥満から皮下脂肪型肥満への腹部脂肪分布の移行が HRT の心血管保護作用の中の一つであるのかもしれない。

## E.結論

HRT は閉経後女性の体重を増加させず、内臓脂肪の蓄積を抑制した。さらに、HRT は内臓型肥満を有する閉経後女性の腹部脂肪分布を内臓型肥満から皮下脂肪型肥満に移行させた。



## 研究課題 2. ホルモン補充療法による高血圧性左室肥大の退縮 — 心肥大調節因子への影響 —

### A. 研究目的

左室肥大 (Left ventricular hypertrophy : LVH) は心血管病の危険因子である。最近、HRTが高血圧症を有する閉経後女性の左室重量を減少させるとの報告があり、これがHRTによる心血管保護作用の一つである可能性が出てきた。また、HRTが血圧、アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin-converting enzyme : ACE) 活性、血漿アルドステロン、インスリン抵抗性などの心肥大調節因子に影響を与えるとの報告がある。そこで我々は、HRTがLVHを退縮させるか否か、またLVHが退縮した場合、HRTによる心肥大調節因子の変化がHRTによるLVHの退縮に関与しているか否かを調べるため、HRTが高血圧症閉経後女性のLVH、および心肥大調節因子に与える影響を検討した。

### B. 研究方法

3年以上降圧剤治療下のLVHを有する高血圧症閉経後女性11例(HRT群)に、結合型エストロゲン(0.625mg/日)に酢酸メドロキシプロゲステロン(2.5mg/日)を併用し1年間連続経口投与した。一方、年齢、機能、生活レベルが同等でHRTを希望しなかった同様の降圧剤治療下のLVHを有する高血圧症閉経後女性10例をコントロール群として同期間観察した。HRT施行前、および1年後、外来にて血圧、心エコー検査の測定、採血にて心肥大調節因子である血清アンジオテンシン変換酵素 (Angiotensin-converting enzyme : ACE) 活性、血漿アルドステロン、インスリン抵抗性を調べた。

### C. 研究結果

HRTにより両群ともに血圧の変化はなかった。HRT群において、左室重量係数、および心室中隔壁厚がHRT施行前 $145 \pm 7 \text{g/m}^2$ 、 $12.7 \pm 1.2 \text{mm}$ に比べ、1年後に $132 \pm 7 \text{g/m}^2$ 、 $11.7 \pm 0.9 \text{mm}$ とそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.05$ ) に減少した。一方、コントロール群においては、左室重量係数、心室中隔壁厚ともに変化はなかった。また、HRT群において、血清ACE活性、および血漿アルドステロンがHRT施行前 $13.4 \pm 1.0 \text{IU/L}$ 、 $75.5 \pm 9.2 \text{ng/L}$ に比べ、1年後に $10.9 \pm 1.1 \text{IU/L}$ 、 $56.5 \pm 8.6 \text{ng/L}$ とそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ ) に減少したが、インスリン抵抗性は低下傾向があるものの有意ではなかった。血清ACE活性、および血漿アルドステロンの変化は左室重量係数の退縮と関連しなかった。コントロール群においては、血清ACE活性、血漿アルドステロン、インスリン抵抗性は変化しなかった。

### D. 考察

HRTは高血圧症閉経後女性の左室重量係数、および心室中隔壁厚を減少させた。またHRTは血清ACE活性、および血漿アルドステロンを低下させた。血清ACE活性、および血漿アルドステロンの変化は左室重量係数の退縮と相関しなかった。以上から、HRTによるLVHの退縮は今回我々が用いた血圧、血清ACE活性、血漿アルドステロン、およびインスリン抵抗性の変化によりもたらされるのではなく、エストロゲンの心筋細胞に対する直接作用、かつ/または他の心肥大調節因子の変化を介してもたらされるのかもしれない。HRTによる高血圧症閉経後女性のLVHの退縮は、HRTによる心血管系保護作用の一つである可能性がある。

## E. 結論

HRTにより高血圧症閉経後女性のLVHは退縮するが、これは、血圧、血清ACE活性、血漿アルドステロン、およびインスリン抵抗性の変化によりもたらされるのではないと推測された。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kanda T, Ichikawa S, Sumino H, Sakamaki T, Nakamura T, Tsukui S, Nara M, Kobayashi I, Tamura J. Positive correlation between circulating leptin levels and lipid lipoproteins in postmenopausal women administrated hormone replacement therapy. *Res Commun Mol Path Pharm.* 2000, 107: 179-185.
- 2) Umeda M, Ichikawa S, Kanda T, Sumino H, Kobayashi I. Hormone replacement therapy increases plasma level of angiotensin II in postmenopausal hypertensive women. *Am J Hypertens.* 2001, 14: 206-211.
- 3) Nogawa N, Sumino H, Ichikawa S, Kumakura H, Takayama Y, Nakamura T, Kanda T, Mizunuma H, Kurabayashi M. Effect of long-term hormone replacement therapy on angiotensin-converting enzyme activity and bradykinin in postmenopausal women with essential hypertension and normotensive postmenopausal women. *Menopause.* 2001, 8: 210-215.
- 4) Miya Y, Sumino H, Ichikawa S, Nakamura T, Kanda T, Kumakura H, Takayama Y, Mizunuma H, Sakamaki T, Kurabayashi M. Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women. *Hypertens Res.* 2002, 25: 153-159.

### 2. 学会・研究会発表

- 1) 角野博之、宮 芳紀、齊藤勇一郎、中村哲也、倉林正彦、市川秀一、熊倉久夫、高山嘉朗、神田享勉、酒巻哲夫、水沼英樹. ホルモン補充療法の左室肥大、及び心肥大調節因子に与える影響. 第4回フォーラム高血圧と臓器障害, 2001.
- 2) Miya Y, Sumino H, Nogawa N, Saitoh Y, Nakamura T, Kurabayashi M, Ichikawa S,

Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Sawada Y, Sakamaki T. Effects of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy and growth-promoting factors in hypertensive postmenopausal women. 第 65 回日本循環器学会総会. 2001.

3) 角野博之、市川秀一、熊倉久夫、高山嘉朗、宮 芳紀、齊藤勇一郎、中村哲也、倉林正彦. 閉経後女性における女性ホルモン補充療法下の血圧調節には、アンジオテンシン II とブラジキニンが重要な役割をする. 第 24 回日本高血圧学会総会. 2001.

4) 角野博之、市川秀一、熊倉久夫、高山嘉朗、大山良雄、倉林正彦. ホルモン補充療法の有効性はアンジオテンシン変換酵素多型別と関連するか？－血清アンジオテンシン変換酵素活性と血漿ブラジキニンからの検討－. 第 24 回日本高血圧学会総会. 2001.

#### G. 知的所有権の所有状況

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

<研究協力者 角野博之 群馬大学医学部第二内科>

厚生労働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

高齢女性の精神的健康とホルモン補充療法

分担研究者 大藏 健義 獨協医科大学越谷病院産科婦人科 教授

【研究要旨】

<研究課題 I：更年期の物忘れアンケート調査に関する研究（第1報）—大蔵式更年期もの忘れアンケート（OCQF）の開発とOCQFによる物忘れの種類とその出現頻度>

更年期女性の物忘れを分析するための問診表の開発を目的とした。(1)名前、(2)何かしようとしていた時、(3)家事、(4)約束・伝言、(5)最近の記憶、の5項目に関する物忘れを選んで質問形式にした。各項目とも4題ずつの質問とした計20問である。各質問について「なし」、「たまに」、「時々」、「頻ぱんに」の4段階に分けて自己評価するアンケートを作成した（大蔵式更年期もの忘れアンケート：OCQF）。当科更年期外来および一般婦人科外来を受診した168名の女性（平均53.8±7.3歳）を対象とした。今回は物忘れの種類とその出現頻度、特に物忘れの程度を知る上で最も重要な「頻ぱんに」の頻度について報告した。このアンケート調査により、更年期女性の物忘れは「頻ぱんに」の頻度が高いことが判明した。OCQFは更年期女性の物忘れの内容分析に有用であると考えられる。

<研究課題 II：ホルモン補充療法（HRT）が脳血流に及ぼす効果に関する研究>

1. 通常量結合型エストロゲン（CEE）単独持続療法

昨年度報告した通常量併用療法「CEE0.625 mg/日+酢酸メドロキシプロゲステロン（MPA）2.5mg/日」が脳血流量に及ぼす効果と比較するために、子宮摘出後の閉経後女性（n=15）を対象としてCEE0.625 mg/日の単独持続療法を行った。大脳血流量は6週後に有意に増加したが、半年後と1年後では投与前値のレベルに低下した。一方、小脳血流量は6週後に有意に増加したが、半年後は有意ではなかった。しかし、1年後には再び有意な増加が観察された。

2. 低用量(半量)併用持続療法—CEE0.3125 mg /日単独またはCEE0.3125 mg /日+MPA1.25 mg /日—での症例数追加

昨年度の報告に症例数を追加して6週後、半年後、1年後とした。大脳および小脳の血流量はいずれも6週後に有意に増加したが、半年後と1年後ではいずれも有意な変化は認められなかった。昨年度報告した1年後の大脳および小脳の血流量はいずれも有意な減少であったが、症例数を追加した今回は有意な減少は認められなかった。

研究課題 I：更年期の物忘れアンケート調査に関する研究（第1報）—大蔵式更年期もの忘れアンケート（OCQF）の開発とOCQFによる物忘れの種類とその出現頻度

A. 研究目的

更年期外来を受診する女性が訴える症状は多種多様であるが、それらの症状の中でも物忘れの頻度が高いことが報告されている。森（1987）は、222例の更年期障害女性の67.6%が物忘れ自覚していると報告している。また、岡本ら（1999）は519例の更年期外来受診者に22項目からなる更年期スコアを用いて調査したところ、有症率の高かったものは「肩や首がこる」（81.8%）、「目が疲れる」（75.0%）、「物忘れが多い」（73.8%）の順であったと報告している。このように更年期外来で経験する物忘れの頻度は高いのであるが、どのような