

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

老年者に対するホルモン補充療法に関する総合的研究

平成 14 年度総括・分担研究報告書

主任研究者 武谷 雄二

平成 15 (2003) 年 4 月

# 目 次

I. 総括研究報告書	
老年者に対するホルモン補充療法に関する総合的研究	.....1
武谷 雄二	
II. 分担研究報告書	
1. 閉経後女性ホルモン補充療法における内因性 NO 合成酵素阻害物質 (ADMA) と血管内皮機能障害	.....15
神崎 恒一	
2. エストロゲンの細動脈および毛細血管への作用	.....24
佐久間 一郎	
3. ホルモン補充療法によるブラジキニンおよび不飽和脂肪酸に対する影響	.....29
市川 秀一	
4. 更年期障害に併存する抑うつ症状に対するエストロゲン補充療法 (ERT) および ERT と選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の併用療法に関する臨床的検討 (中間報告)	
結合型エストロゲン (CEE) 0.625mg/日単独の通常量持続療法が脳血流に及ぼす影響に関する研究 (第 2 報)	.....38
大藏 健義	
5. 17 $\beta$ -estradiol および non-feminizing estrogen J861 が単球の血管内皮への接着に及ぼす影響	
Alzheimer 病におけるエストロゲンのリン酸化タウ蛋白発現の影響について	
~神経原繊維変化におけるエストロゲンの影響~	.....49
本庄 英雄	
6. 高齢者に対するホルモン補充療法の総合的検討	.....55
林 登志雄	
7. QOL の向上を目指した至適ホルモン補充療法の策定	.....58
武谷 雄二	
8. 閉経後女性の痴呆に関するホルモン補充療法の予防効果アセスメントモデルに関する研究	.....73
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	.....77
IV. 別刷	.....79

## 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

#### 老年者に対するホルモン補充療法に関する総合的研究

主任研究者 武谷雄二 東京大学大学院医学研究科教授

【研究要旨】本研究は、(1) 閉経後女性約 600 例に対して HRT を行い、2-3 年間追跡することによって、臨床的問題点を具体的に検討し、本邦の女性により適した HRT を策定するための基礎データを収集する、(2) 65 歳以上の高齢者について、知的機能を含めた総合的機能評価を 1 年ごとに行い、HRT が高齢女性の自立に必要な機能に及ぼす効果を症例対照研究により検証する、(3) 前年度までの研究班の課題であった、効果、有害事象からみた本邦女性のための HRT の至適治療法の確立および HRT の対費用効果に関する研究を継続し、(4) これらの研究から得られたデータをもとにガイドラインを改訂する、ことを目的としている。これまで、186 例の登録が済みであり、今後も登録症例を増やし、目標症例数の 600 例を目指して、組み入れを進めていく予定である。また、個別研究では HRT の効用として、①血管に対して、単球の血管内皮への接着の阻害、血漿 DHA、EPA 濃度、ブラジキニン濃度の増加、ACE 活性の低下 (ACE 多型の違いによる) によって、心血管保護作用がある可能性があること、また ADMA を介さない機序で血管内皮機能を改善させること、②脳に対して、毛細血管網形成を促進し、脳血流を増加させ、うつやアルツハイマー型痴呆に対して有益である可能性が示された。③後期高齢者に対して、低用量 HRT やエストリオールの使用が有用である可能性がある。④アセスメントモデルの構築によって、アルツハイマー型痴呆の発症予防効果を確認し、経済評価に向けた課題を明らかにした。本研究によって、高齢女性の健康の保持、増進に多面的に寄与することが可能な HRT の臨床的意義がさらに明確になることが期待される。

#### 分担研究者

市川秀一	医療法人北関東循環器病院院長
大蔵健義	獨協医科大学越谷病院教授
佐久間一郎	北海道大学大学院医学系研究科講師
佐藤貴一郎	国際医療福祉大学医療福祉学部教授
林登志雄	名古屋大学大学院医学系研究科講師
本庄英雄	京都府立医科大学教授
神崎恒一	東京大学大学院医学系研究科講師
<研究協力施設	名古屋市立大学医学研究科生殖・発生学 (産科婦人科) >

#### A. 研究目的

閉経は女性において更年期障害や、尿失禁、皮膚の萎縮など、QOL を損なう病態を引き起こし、さらには虚血性心疾患や脳卒中等の動脈硬化性疾患、骨粗鬆症、うつ、アルツハイマー型痴呆などの老年疾患を引き起こす基盤となる。この原因は、閉経を境にエストロゲンをはじめとする女性ホルモンが急激に欠落することにあるので、上記の病態、疾患を予防し、高齢女性の健康を保持、増進するために女性ホルモン補充療法 (HRT) が実施されている。しかし、我が国において HRT が未だ一般化せず、また、高齢女性における適応、実施法についてコンセンサスが得られないうちに、HERS (JAMA 280:605-613, 1998)、HERS II (JAMA 288:49-57, 2002)、さらには WHI (JAMA 288:321-333, 2002) において、エストロゲン 0.625 mg+プロゲステロン 2.5 mg によるホルモン補充療法は心血管イベントに対する予防効果が無く、むしろ乳癌や静脈血栓症のリスクを増大させるため、冠動脈疾患の予防を目的として行うべきではないという報告がなされた。しかしながら、これらの報告に関する注意点として、米国における乳癌の発症率は日本の 3 倍以上、静脈血栓症の発症率は 10~20 倍に達すること、肥満、高血圧、喫煙習慣、試験参加前からの HRT の経験等、試験対象者の生活習慣、さらには遺伝的素因を含めた環境因子が日本人とは大きく異なることを考慮に入れなければならない、その意味で、本邦独自の HRT の方法、ベネフィット、リスクを調査しなければならないと考えられる。

我々、長寿科学総合研究事業班は平成 11-13 年度の 3 年間、「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」班 (主任研究者：大内尉義、以下、大内班) において、血管機能、骨代謝、精神神経疾患 (痴呆、うつ)、有害事象の観点から、本邦高齢女性にとってリスクの低い HRT 法の開発通常量の半量投与方法) に関する共同研究を行い、HRT の適応決定、至適治療法、臨床上の注意点に関するガイドラインを策定してきた。

本研究班は、大内班の 3 年間にわたる研究成果を引継ぎ、さらに以下の研究を進展させることを目的として、HRT に関する臨床と研究に実績を有する老年科医、内科医、婦人科医および医療経済学者が再度チームを形成している。

(1)参加各施設において既に HRT を受けているか、新規に HRT を開始する女性約 600 例を登録して約 3 年間追跡することにより、本邦女性の HRT に関連してどのような問題点が生じるか、また、それをどう解決できるか、HRT の満足度はどうであるか、などの臨床的問題点を具体的に検討し、本邦の女性に適した HRT 法を策定するための基礎データを収集する (全体研究)。

(2)各施設での登録症例のうち、65 歳以上の高齢者について、知的機能を含めた総合的機能評価を 1 年ごとに行い、高齢女性の自立に必要な機能に及ぼす HRT の効果を症例対照研究により検証する (全体研究)。

(3)大内班の課題であった、効果、有害事象からみた本邦女性のための HRT の至適治

療法の確立および HRT の対費用効果に関する研究を継続する。

(4)以上の研究から得られたデータをもとに、大内班が策定したガイドラインを改訂する。

本研究によって、本邦高齢女性の QOL の維持、多種老年疾患の予防と治療のために、さらには医療経済的にも有益と思われる HRT 法が確立されることが期待される。

## B. 研究方法

### <全体研究>

(1) HRT を受けている本邦女性の追跡調査：各施設および関連施設において現在 HRT を施行している、あるいは新規に HRT を開始する症例を、インフォームド・コンセントを得た後に本試験に登録し、研究班が継続する約 2～3 年間にわたって追跡する。年齢、診断名など臨床背景データとともに、HRT 開始の理由、HRT の具体的な方法、有害事象や合併症の発現などを追跡調査する。既に HRT を受けている症例と合わせ全部で約 600 例の登録を見込んでいる。追跡項目としては、HRT 継続の有無と中止した際の理由、HRT による有害事象の発生の有無と内容（不正性器出血、乳房痛、浮腫など）、処置と経過、合併症（骨粗鬆症、虚血性心疾患、脳血管障害、その他の動脈硬化性疾患、血栓性疾患、痴呆、感染症、悪性腫瘍）の発症の有無をフォローし、HRT の満足度、問題点についてアンケート調査を行い、本邦女性における HRT の実態を明らかにする。また半年に 1 回血液検査を行い、血清脂質プロファイル、血液凝固線溶系、血清エストロゲン、肝腎機能、空腹時血糖およびインスリン値とインスリン抵抗性の指標である HOMA 指数を測定し、特に新規登録症例では HRT の前後で各数値を比較することにより、HRT の効果を検討する。さらに、HRT の有害事象として、問題となっている血栓性疾患の発症に関しては、調査組み入れ対象のうち、インフォームド・コンセントの得られた症例を対象に、第 VII 因子遺伝子の R353Q 変異、plasminogen activator inhibitor (PAI)-1 遺伝子の 4G/5G 多型、フィブリノーゲン遺伝子の-455G/A 多型を解析し、凝固線溶系の遺伝子多型と追跡期間中の血栓性疾患発症の有無の関係を調べ、遺伝子多型からみた HRT 適応基準を策定する。

(1) 高齢女性の知的および自立機能に対する HRT の効果：

登録症例のうち、65 歳以上の高齢女性については総合機能評価を行う。評価項目としては、日常生活動作 (ADL および IADL)、知的機能 (Minimental State Examination (MMSE))、うつ傾向の有無 (Geriatric Depression Scale (GDS-15))、意欲指標 (Vitality Index) を 1 年に 1 回追跡調査する。

なお、本研究では対照群を設定する必要があるため、年齢、機能、居住地域、生活レベルが同等で、HRT を受けていない症例を対象にインフォームドコンセントを得たのち登録し、症例対照研究の手法で解析する。これによって、高齢女性における知

的および自立機能に及ぼす HRT の影響を明らかにする。総合機能評価は専用の定まったチェック項目にしたがって実施する。

#### <個別研究>

##### (1) 血管機能に対する HRT の効果

###### ① HRT における内因性 NO 合成酵素阻害物質 (ADMA) と血管内皮機能障害

HRT、しかも低用量の E2 でも内皮依存性血管拡張反応が改善することを我々は昨年報告したが、今回長期間にわたる HRT が内皮依存性血管拡張反応を改善するか、また、その際、内皮機能と関連の深い血中 ADMA 濃度、NOx を追跡測定し、HRT の効果との関係について検討した。

対象は東京大学医学部附属病院老年病科外来で、骨粗鬆症と診断され、HRT を開始した 7 名 (48-61 歳、平均年齢 52.6±1.9 歳)である。HRT は結合型エストロゲン 0.625 mg/日と酢酸メドロキシプロゲステロン 2.5mg/日の連日経口服用を基本とした。内皮依存性血管拡張反応として超音波を用いた反応性充血時血管径を測定した (%FMD)。血漿 ADMA 濃度は、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により、また、NO 代謝産物である NOx は Griess 法により測定した。なお、計測時期は治療開始前、開始 3、6、12、18、24、36 カ月後とした。

###### ② 閉経後女性における血清 ACE 活性および血漿ブラジキニンに与える影響 ACE 多型別による検討

閉経後女性 68 例 (平均年齢 57±1 歳 SEM) を対象として、結合型エストロゲン (0.625 mg/日) に酢酸メドロキシプロゲステロン (2.5 mg/日) を併用し 12 カ月間連続経口投与した。なお、HRT 施行前に採血を行い、PCR 法によって ACE 遺伝子多型を解析し、D/D 群 (56±1 歳 9 例)、挿入型 (insertion; I) /D 群 (56±1 歳 33 例)、I/I 群 (55±2 歳 26 例) の 3 群に分類した。ACE 活性は ACE カラー法にて、また血漿ブラジキニンはラジオイムノアッセイにて測定した。

###### ③ 閉経後女性における HRT の血中ドコサヘキサエン酸およびエイコサペンタエン酸に与える影響

魚油に多く含まれるドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid; DHA) およびエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) には抗動脈硬化作用があることが知られている。そこで、閉経後女性 104 例 (53.4±0.4 歳 SEM) を 2 群に分け、59 例 (53.5±0.5 歳) に、結合型エストロゲン (0.625 mg/日) と酢酸メドロキシプロゲステロン (2.5 mg/日) を併用し 12 カ月間連続経口投与した。一方、コントロール群として、45 例 (53.2±0.7 歳) を同期間観察した。すべての群において、HRT 施行前、6、12 カ月後に、朝食前採血を行い、血漿 DHA、EPA 濃度をガス-液体クロマトグラフィー法にて測定した。

###### ④ 単球の血管内皮への接着に及ぼすエストロゲン、エストロゲン関連物質の影響 (実

## 験的検討)

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に  $10^{-7}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-5}$ M のエストラジオール ( $E_2$ )、J861 (17  $\alpha$ -estradiol の誘導体で、乳腺や子宮に対してほとんど作用することなく、強い抗酸化作用と神経栄養作用を有するように開発された薬剤)、 $\alpha$ -tocopherol を添加し、24 時間培養した。培養後 20U/ml の IL-1 $\beta$  (20U/ml) で 4 時間刺激した。ここに、骨髓腫由来の単球 U937 細胞浮遊液を 1.0 dyne/cm<sup>2</sup> で、7 分間灌流し、細胞が接着する様子を撮影記録した。接着した U937 細胞の数を顕微鏡下に 20 箇所無作為に選びカウントし、薬剤を添加せずに IL-1 $\beta$  で刺激したときに HUVEC に接着した U937 細胞の数を 100% として、各薬剤の各濃度における値を比較した。

また、HUVEC をプレート上に培養後、 $E_2$ 、J861、 $\alpha$ -tocopherol の各薬剤を  $10^{-7}$ M、 $10^{-5}$ M の濃度で添加し 24 時間培養後、IL-1 $\beta$  (20U/ml) で 4 時間刺激した。細胞を回収後、E-selectin、ICAM-1 の発現を ELISA 法で測定した。

### (2) 脳機能に対する HRT の効果

#### ① 脳組織毛細血管網構築に対するエストロゲンの効果 (実験的検討)

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ことが報告されている。その機序との関連で、エストロゲンの脳における毛細血管網構築およびその調節因子、エストロゲン受容体 (ER) サブタイプ発現への作用を検討した。

40 週齢雌性 Wistar ラットを用いて、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 (ERT 群)、sham operation 群 (CON 群) を準備し、1 カ月後、血液の採取、固定した脳における毛細血管数の計測を行った (凍結切片をレクチン染色)。さらに、連続切片を用いて免疫染色、In situ hybridization を行い、VEGF、KDR、Flt-1、eNOS、Bcl-2、Bax、Bad、エストロゲン受容体 (ER- $\alpha$  および ER- $\beta$ ) の発現を検討した。

#### ② HRT の脳血流に対する効果

獨協医科大学越谷病院産科婦人科更年期外来を受診中で、子宮摘出後の女性 20 名 (平均年齢 $\pm$ SD: 51.0 $\pm$ 4.9 歳) を対象として、結合型エストロゲン 0.625mg/日を連日投与した。脳血流の測定は投与前と、投与開始後 6 週後、12 週後、半年後、1 年後および 2 年後に行った。脳血流の測定法は、<sup>99m</sup>Tc-ECD 法を用いて松田らの方法により定量的に測定した。

#### ③ ERT と選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)による、うつに対する効果

獨協医科大学越谷病院産科婦人科更年期外来を受診した閉経後女性に、日産婦式更年期アンケートと東邦大式 SRQ-D(Self-rating Questionnaire for Depression)と SDS(Self-rating Depression Scale)を施行し、SRQ-D16 点以上または SDS40 点以上をうつ傾向ありとして、ハミルトンうつ評価尺度 (HDRS) を行い、同意を得た上で治療対象とし

た。12週間の治療を完遂した ERT 群(n=8)と ERT+SSRI 群(n=5)の平均年齢は、それぞれ  $54.3 \pm 2.0$  (平均 $\pm$ SE) 歳と  $53.0 \pm 2.5$  歳であった。

ERT には結合型エストロゲン (CEE) 0.625mg を用い、SSRI としてはパロキセチン 10mg を用いた。投与法は、12週間の CEE 連日投与、1週間の休薬の後、CEE0.625mg/日を 25日間投与し、周期の後半に黄体ホルモン (MPA 5mg/日) を 12日間併用して 5日間休薬する、周期的順次投与法に移行した。

また、上記 ERT に加えて、夕食後に 1日1回 SSRI を投与した。最初の 2週間は 10mg 錠 1錠とし、3週間目より 1回 2錠に増量して、合計で 12週間投与した。

#### ④ Alzheimer 病神経原繊維変化におけるエストロゲンの影響 (実験的検討)

PC12 細胞 (ラットの褐色神経細胞腫由来) を NGF (nerve growth factor) 存在下で neuronal phenotype に分化させ、アミロイド  $\beta$  ( $A\beta$ ) の添加により誘導されるリン酸化タウの発現を抗リン酸化タウ抗体を用いた蛍光免疫染色法で確認した。分化した PC12 細胞をコントロール群および  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$  M の  $E_2$  の存在下で 3日間の前培養した群に分け、 $A\beta$  を添加した各群におけるリン酸化タウの発現量をフローサイトメトリーにより定量的に解析した。

#### (3) 本邦に適した HRT 実施を目指した多面的研究

##### ① エストリオールによる HRT の効果

1. 後期高齢者に対するホルモン補充療法の検討：性器外作用に比し性器作用が弱いエストリオール ( $E_3$ , 2mg/day) を平均年齢 80.3 才の高齢女性 12 名に 2年間投与した。コントロール群として非投与群 12 名をおいた。

2.  $E_3$  の抗動脈硬化作用の検討：高コレステロール食負荷ウサギ (0.5%コレステロール含有食、12週間飼育) を用いて  $E_3$  (0.3mg/kg/day) と  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (0.1 mg/kg/day) の抗動脈硬化作用を比較検討した。

3. 人由来マクロファージの生物活性に対する性ホルモンの作用：培養 THP-1 細胞を PMA で刺激しマクロファージ化し、さらに  $IFN\gamma$ 、 $TNF\alpha$  等のサイトカイン刺激で iNOS、活性酸素産生酵素を刺激した。この系に対するエストロゲン、アンドロゲン、各受容体拮抗薬の作用を検討した。

##### ② 骨量減少の予防を視野に入れた本邦における至適 HRT の策定のための検討

本邦閉経期女性における骨量減少を防止することのできる、対象に応じた最適な投与薬剤、投与方法および投与量の策定をはかるために、投与様式の異なる HRT 施行中の対象女性の骨量減少の程度、性器出血の状態、子宮内膜組織所見、経膈超音波法による子宮内膜厚と血中ホルモンレベルの相互関係を解析した。対象は閉経後 1年以上経過した 45 歳以上 75 歳以下で子宮を有する女性で、明らかな骨折を有さず、骨代謝に影響を与える薬剤を服用していない患者で、以下の 4 群に無作為に割り付けた。

1. 低用量 HRT 群 (結合型エストロゲン 0.625mg/1 日おき、酢酸メドロキシプロゲス



テロン2.5mg/1日おき)

2. 低用量 HRT+ビタミン K2 (グラケ-45mg 分 3/日)

3. 低用量 HRT+エチドロネート (400mg/日・2週間、10週間休薬)

4. 低用量 HRT+ビタミン K2+エチドロネート

HRT 開始前に各症例の身長、体重、年齢、閉経年齢の記録、経膈超音波による子宮内膜厚の計測、子宮内膜組織診、血液検査(血算、生化学、凝固系、E2)のほか、DXA法による骨量測定、血液による骨代謝マーカーの測定を行った。骨代謝マーカーは月に1回ずつ、骨量測定は24週間ごとに行った。

(4) アセスメント・モデルを用いた HRT によるアルツハイマー型痴呆の発症予防に関する検討

アルツハイマー型痴呆症(AD)の予防効果について、経済評価の前提となる、発症を起点にして AD 患者の病態を追跡するアセスメント・モデルを構築し、HRT 群と非 HRT 群を比較考量する方法を採用した。

① HRT 群と非 HRT 群との比較とアウトカム：更年期障害や骨粗鬆症に対して HRT を行った患者を対象に、AD に対するアウトカムの指標として、無症候を続けられる人数と AD の病態別患者数の変化を無治療群と比較し評価した。

② 対象者：モデル分析の出発点は 65 歳、閉経後の女性で、AD 無症候性 10 万人のコーホート集団を対象とした。

② 治療内容とシミュレーション期間：ここでの HRT は、自然閉経後の更年期障害の治療および退行期骨粗鬆症患者にプレマリンを 0.625mg 投与することを標準レジメンとしている。薬剤投与期間は薬剤や治療の医学的特性からは 7 年程度とされるが、実際の臨床ではより長期にわたると想定されることから 15 年間とした。さらに病態別患者数の推計にかかわるモデルによるシミュレーション期間は無症候性コーホートが無治療でほぼ 0 人となる 105 歳までの 40 年を分析対象期間とした。

## C. 研究結果

### <全体研究>

現在、症例の登録が進んでおり、全体で 186 例の登録が済んでいる。なお、研究協力施設として、新たに名古屋市立大学医学研究科生殖・発生学(産科婦人科)が症例の組み込みに協力している。186 例のうち、65 歳未満の HRT 症例が 107 例(平均年齢  $56.0 \pm 4.6$  歳)、65 歳以上の HRT 症例が 65 例(平均年齢  $73.5 \pm 6.7$  歳)、65 歳未満の HRT 症例が 3 例(平均年齢  $60.7 \pm 2.1$  歳)、65 歳以上の非 HRT 症例が 11 例(平均年齢  $71.1 \pm 4.2$  歳)となっている。

なお、遺伝子解析に関して、新規の症例組み入れ期間の延長を東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会に申請し、平成 14 年 7 月 19 日承認を受けた。これに

よって登録期間が平成16年3月31日までとなった。

今後も登録症例を増やし、目標症例数の600例を目指して、組み入れを進めていく予定である。

## <個別研究>

### (1) 血管機能に対するHRTの効果

#### ① HRTにおける内因性NO合成酵素阻害物質(ADMA)と血管内皮機能障害

閉経後女性の%FMDは、治療後経時的に増加傾向を示し、開始3ヶ月後以降有意に増加したが、血中ADMA濃度に関しては有意な変動を認めず、またNOxは、%FMDの改善に伴い、増加する傾向が認められ、%FMDとのあいだに正相関が認められた。

#### ② 閉経後女性における血清ACE活性および血漿ブラジキニンに与える影響 ACE多型別による検討

HRT施行前の血清ACE活性は、D/D群において、I/D群、I/I群よりも有意に高値を示した。また、HRTにより血清ACE活性は、D/D群、I/D群において、6ヵ月後、12ヵ月後に、HRT施行前に比べて、それぞれ有意に低下したが、I/I群では変化を認めなかった。

一方、血漿ブラジキニンは、D/D群、I/D群、I/I群のすべての群において、HRT施行前に比べて、HRT施行6ヵ月後、12ヵ月後に有意に上昇した。

#### ③ 閉経後女性におけるHRTの血中ドコサヘキサエン酸およびエイコサペンタエン酸に与える影響

HRT群において、血漿DHAおよびEPA濃度は、施行前に比べ、1年後に有意( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ )に増加したが、コントロール群ではいずれも変化しなかった。

また血清脂質は、HRT群において、血清総コレステロール、LDLコレステロールがHRT施行前に比べて、6ヵ月後、12ヵ月後に、それぞれ有意に減少した。また、血清HDLコレステロールは、HRT施行前に比べて、6ヵ月後、12ヵ月後に、それぞれ有意に増加し、トリグリセライドは、12ヵ月後に有意に増加した。なお、コントロール群ではいずれの血清脂質も変化しなかった。

#### ④ 単球の血管内皮への接着に及ぼすエストロゲン、エストロゲン関連物質の影響(実験的検討)

E2の添加ではU937細胞のHUVECへの接着はほとんど抑制できなかったが、J861、 $\alpha$ -tocopherolは、濃度依存的にU937細胞のHUVECへの接着数を減少させた。また、これを裏付けるように、HUVECにおけるE-selectin、ICAM-1の発現はJ861、 $\alpha$ -tocopherolにより濃度依存性に抑制された。これら接着因子の発現の抑制は $\alpha$ -tocopherolにIC182700を付加した際にはリバーシなかったが、J861にIC182700を付加したときには部分的に抑制効果が阻害された。このことからJ861による単球

の内皮への接着には一部エストロゲン受容体の関与があるものと思われる。

## (2) 脳機能に対する HRT の効果

### ①脳組織毛細血管に対するエストロゲンの効果 (実験的検討)

更年期雌性ラット脳において、OVX 群では対照群に比し、毛細血管密度が減少した。ERT 群ではこれが対照群のレベルまで回復した。OVX 群では、VEGF とその受容体である KDR、および eNOS が遺伝子および蛋白レベルで減少した。一方、非血管増殖性受容体の Flt-1 には有意な変化は認められなかった。また、anti-apoptotic marker である Bcl-2 蛋白が減少し、apoptotic marker の Bax およびリン酸化 Bad は変化しなかった。

更年期雌性ラット脳血管にはエストロゲン受容体 ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  の両タイプが存在し、後者がより豊富であった。OVX によって両タイプの ER が共に減少したものの、ER- $\beta$  の減少がより高度であった。また、OVX による変化は、すべて ERT により回復した。

### ② HRT の脳血流に対する効果

結合型エストロゲン投与 6 週後と 12 週後に、平均大脳血流量 (CBF) は有意に増加したが、半年後にはほぼ投与前値にまで低下した。しかし、1 年後には再上昇し、2 年後には再びほぼ投与前値まで低下した。

一方、平均小脳血流量 (CbIBF) は 6 週後と 12 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 年後には再上昇し、この上昇は 2 年後にも持続して見られた。

### ③ ERT と選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) による、うつに対する効果

1. SRQ-D : ERT 群の平均スコアは、投与前値に比べて投与後すべての週数で有意に低下した。また、ERT+SSRI 群の平均スコアも投与前値に比べて、すべての週数で有意に低下した。ERT 群と ERT+SSRI 群の比較では、4 週後と 8 週後に有意差が認められ、平均スコアの低下は併用群で有意に大きかった。

2. SDS : ERT 群の平均スコアは、投与前値に比べて投与後すべての週数で有意に低下した。また、ERT+SSRI 群の平均スコアは投与前値に比べて、投与後いずれの週数でも有意に低下した。ERT 群と ERT+SSRI 群の比較では、有意差が認められたのは 8 週後のみで、平均スコアの低下は併用群で有意に大きかった。

3. HDRS : ERT 群の平均スコアは、投与前値に比べて投与後すべての週数で有意に低下した。また、ERT+SSRI 群の平均スコアは、投与前値に比べて投与後すべての週数で有意に低下した。ERT 群と ERT+SSRI 群の平均スコアの変化はほとんど同じ推移を示しており、どの週数でも両群間に有意差は認められなかった。

4. 更年期スコア : ERT 群の平均スコアは、投与前値に比べて投与後すべての週数で有意に低下した。また、ERT+SSRI 群の平均スコアも投与後すべての週数で有意に減

少した。ERT と ERT+SSRI 群の比較では 4 週後と 8 週後に有意差が認められ、平均スコアの低下は併用群で有意に大きかった。

#### ④ Alzheimer 病神経原繊維変化におけるエストロゲンの影響（実験的検討）

分化した PC12 細胞に A $\beta$  を添加したところリン酸化タウの発現を認めた。10<sup>-10</sup>, 10<sup>-9</sup> M E<sub>2</sub> で前処置した場合、コントロールに比較してリン酸化タウの発現量は有意に減少した。

### （3）本邦に適した HRT 実施を目指した多面的研究

#### ① E3 による HRT の効果

1. 後期高齢者に対するホルモン補充療法の検討： E3 (2mg/day) 投与群において、血管内皮機能の改善、骨塩量の有意な上昇が認められた。しかしながら、性器出血を 2 名に認め、継続を拒否され脱落例となった。その他の副作用は認めなかった。

2. 高コレステロール食負荷ウサギ (0.5% コレステロール含有食、12 週間飼育) において、E3 (0.3mg/kg/day) 投与は、17 $\beta$ -estradiol (E2) (0.1 mg/kg/day) に匹敵する抗動脈硬化作用を示した。

3. 人由来マクロファージの生物活性に対する性ホルモンの作用：IFN $\gamma$ 、TNF $\alpha$  等のサイトカイン刺激によって、THP-1 マクロファージの iNOS、活性酸素産生酵素が上昇し、エストロゲンの前処置はこれを抑えたが、アンドロゲンは単独では抑制しなかった。しかし、アンドロゲンは NADPH oxidase 阻害剤の効果を増強した。

#### ② 骨量減少の予防を視野に入れた本邦における至適 HRT の策定のための検討

低用量 HRT は、性器出血を起こすことがあるものの、その頻度・量ともに少なく、コンプライアンスの点から本邦女性に対する HRT として施行しやすいものであるといえる。また、現在、低用量 HRT 群 8 例、低用量 HRT+ビタミン K2 投与群 8 例、低用量 HRT+エチドロネート投与群 4 例、低用量 HRT+ビタミン K2+エチドロネート投与群 7 例につきフォロー中で、さらに症例数の増加をはかっている。現在のところ、研究開始から 24 週後の DXA による骨量測定まで進んでいる例はわずかであるが、ビタミン K2 の同時投与が骨量増加に寄与することを示すデータは得られていない。

### （4）アセスメント・モデルを用いた HRT によるアルツハイマー型痴呆の発症予防に関する検討

#### 1. アセスメント・モデルの構築

現時点で得られる最新の情報を利用する形で、HRT の有効性をシステムシミュレーションするためのプロトタイプを構築した。モデルの構造は昨年度に提示した概念モデルを縮小した形となっている。

##### （1）AD の発症率

AD の発症率は男女比が 1 : 1.5~3 と女性に多いことが特徴的で、本研究でのモデル分析でも女性に限定した。1994 年以降の研究では一部を除いて、HRT を受けてい

る女性にはADの発症が少なく、またADと診断されたうちHRTを受けていない群の率が高いことが報告され、HRTを受けていた女性のAD発症の相対危険度が0.24から0.69まで幅があるものの、ADの発症予防効果があったと報告されている。ただし、ADに対するHRTの発症抑制効果についてはBrennerらの報告など反論・反証も少なくなく、未だ確立した知見とは言えず、大規模前向き試験の必要性が指摘されている。

HRT群のAD発症については、先進国の調査研究でも幅があるが、最近のZandiの前向き調査の結果によるとHRTによって相対危険率0.59、10年以上HRTを受けていると0.41となること、さらに現在HRTを受けている患者でも10年以上でないで発症率が低下しないことが報告された。そこで、本モデルでは閉経後のHRTは10年が標準的レジュメンであることに準じてこの成果を採用することとした。

## (2) ADの病態と進行推移率

海外では認知機能レベルを示すMini-Mental State Examination (MMSE) スコアを測定基準としてADの病態を分類し、病態進行のモデル分析や、薬物治療の費用分析を行っているが、わが国においては発症後の病態推移について把握することは困難である。こうしたわが国での病態推移に関するデータの入手困難性を考慮し、抗痴呆薬として頻用されるドナベジルを治療段階で使用するモデル分析の可能性を利用し、推移確率を適用することが研究効率の向上につながると考えられる。

## 2. モデルによるHRT効果分析の結果

非HRT群では75歳の260人程度から急激に増加し、87歳で1,200人、5倍を超えるに至る。その後、急速に減少し105歳で0人になるが、発症により母体となる無症候集団が減少だけでなく、次の中等度に進行する患者と死亡が加わるためである。これに対し、HRT群は発症が抑止され、75歳で150人程度、ピーク時の87歳でも490人程度である。HRT群ピーク時の発症者でも非HRT群に比べ約10年の遅れが現れている。

加齢とともに発症が変化するのに対応して無症候性の高齢者も差が生じる。非HRTとHRT群とも加齢にともなって無症候者は単調な傾向で減少を続ける。75歳以降両群に差が生じ、80歳で約2,000人、90歳で6,000人程度の差が生じることが予測される。

病態別患者数を両群で比較してみると、軽度AD患者数の年齢別推移は、全体での解析と同様、HRT群で発症が抑止され、また、病態推移確率(33.9%)にもとづきもとづき中等度ADに進行して移行する患者と、死亡する患者は減少する。次に、中等度の患者数の推移についてもHRT群で発症が抑止され、ピーク時の患者数の差は865人程度である。さらに、高度AD患者数の推移はピーク時の患者数の差で1,150人程度と大きな開きがある。

#### D. 考察

全体研究としては、(1) HRT を受けている本邦女性の追跡調査および、(2) 高齢女性の知的および自立機能に対する HRT の効果を現在検討中であり、次年度までに、本邦女性のための至適 HRT 法の策定を目指している。また、HERS や WHI (JAMA 288:321-333, 2002) で問題となった乳癌や静脈血栓症のリスクを検証し、血栓症に関する遺伝的素因との関連を今後明らかにする必要がある。

個別研究は大きく、(1)血管機能に対する HRT の効果、(2)脳機能に対する HRT の効果、(3)本邦に適した HRT 実施を目指した多面的研究、(4)アセスメント・モデルを用いた HRT によるアルツハイマー型痴呆の発症予防に関する検討の 4 つのプロジェクトからなる。

(1) 血管機能に対する HRT の効果を検討するプロジェクトからは、①HRT による内皮依存性血管拡張反応の改善に関して、血中 ADMA 濃度、NO<sub>x</sub> 濃度との相関を解析した結果、血中 ADMA 濃度は変動せず、NO<sub>x</sub> は%FMD が改善するに伴い、増加する傾向を認めたことから、HRT による内皮依存性血管拡張反応の改善は ADMA を介さない機序で NO の産生が増加することによること、②HRT は ACE 多型の違いによって閉経後女性の ACE 活性を低下させる一方、血漿ブラジキニン濃度は ACE 多型の違いとは無関係に上昇することが判明し、HRT はこのような humoral factor を介して心血管保護作用を有する可能性があること、③閉経後女性に HRT を行うと、血漿 DHA および EPA 濃度が増加することから、HRT の血管保護作用として、DHA、EPA の上昇による抗動脈硬化作用があること、さらにこのことは痴呆に対しても予防効果がある可能性を示唆していること、④単球の血管内皮への接着は 17β-estradiol ではほとんど抑制されなかったのに対して、non-feminizing estrogen J861 は α-tocopherol とほぼ同程度に単球の血管内皮への接着を抑制し、その機序として J861 や α-tocopherol によって、血管内皮の E-selectin、ICAM-1 の発現が抑制されることが明らかとなった。以上①～④の結果から、使用薬剤による違いはあるが、HRT は単球の血管内皮への接着を阻害し、また、血漿 DHA および EPA 濃度を増加させ抗動脈硬化作用を有する可能性があること、HRT は ADMA を介さない機序で内皮機能を改善させること、さらに HRT は ACE 多型の違いによって ACE 活性を低下させるほか、血漿ブラジキニン濃度を増加させ、心血管保護作用を発揮する可能性があることが明らかとなった。

(2) 脳機能に対する HRT の効果を検討するプロジェクトからは、①HRT は毛細血管網の形成を増加させ、脳の局所血流を改善する可能性があること。②実際、結合型エストロゲン 0.625mg/日の連続投与は脳の血流量を一時的に増加させ、小脳の血流量を長期間増加させること。③閉経後女性のうつ症状に対して、エストロゲン単独

療法(ERT)、その際、エストロゲンに選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を併用するとその効果が増強すること。④ $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) はタウ蛋白のリン酸化を抑制し、神経原繊維変化を減少させる可能性があることが示され、以上の結果から、HRT は毛細血管網の形成を増加させ、脳血流を改善させ、うつやアルツハイマー型痴呆の発症予防効果がある可能性が示唆された。

(3) 本邦に適した HRT 実施を目指した多面的研究からは、①後期高齢者に対する  $E_3$  (2mg/day) 補充によって、血管内皮機能の改善、骨塩量の有意な上昇が認められ、これを裏付けるための動物実験で、 $E_3$  は  $E_2$  に匹敵する抗動脈硬化作用が認められたこと、また、 $E_2$  にはマクロファージからの NO 及び活性酸素放出能を抑える働きがあること、②低用量 HRT はコンプライアンスの点から本邦女性に対する HRT として施行しやすいものであること、HRT による骨量減少の予防のためのビタミン K2 もしくはエチドロネート併用の有効性について検討を進めていること、が報告された。この結果から、 $E_3$  や低用量 HRT の施行が、本邦の高齢者に対して、安全性、骨量や血管機能の改善の面から有用であることが期待される。

(4) HRT によるアルツハイマー型痴呆の発症予防効果を測定するアセスメントモデルを構築し、アルツハイマー型痴呆の発症数および軽度、中等度、高度の各病態の患者数でその効果を確認し、経済評価に向けた課題を明らかにすることができた。

## E. 結論

1) 全体研究として、HRT を受けている本邦女性の追跡調査および、高齢女性の知的および自立機能に対する HRT の効果を検討中である。現在、186 例の登録が済んでいる。

2) HRT は単球の血管内皮への接着を阻害すること、さらに血漿 DHA および EPA 濃度を増加させることによって抗動脈硬化作用を発揮する可能性があること、また、HRT は ADMA を介さない機序で血管内皮機能を改善させること、さらに HRT は ACE 多型の違いによって ACE 活性を低下させるほか、血漿ブラジキニン濃度を増加させ、心血管保護作用を示す可能性があることが明らかとなった。

3) HRT は脳の毛細血管網形成を促進し、脳血流を改善させ、うつに対する治療効果やアルツハイマー型痴呆の発症予防効果がある可能性が示された。

4) 後期高齢者に対するホルモン補充療法として、低用量の HRT やエストリオールの使用が血管機能や骨量に対して有用である可能性がある。

5) アセスメントモデルの構築によって、アルツハイマー型痴呆の発症予防効果を確認し、経済評価に向けた課題を明らかにすることができた。

## F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

全体研究としてはなし

2. 学会・研究会発表

全体研究としてはなし

H. 知的財産権の出願・登録状況

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

閉経後女性ホルモン補充療法における  
内因性 NO 合成酵素阻害物質 (ADMA) と血管内皮機能障害

分担研究者 神崎 恒一 東京大学大学院医学系研究科講師

【研究要旨】

閉経後女性に対する女性ホルモン補充療法（HRT）は内皮依存性血管拡張反応を改善させることが報告されている。一方、ADMA (asymmetric NG,NG-dimethylarginine) は、内因性の NO 合成酵素阻害物質であり、動脈硬化危険因子を有する患者で血中濃度が上昇していることが報告されており、血管内皮機能低下の一因である可能性があるが、HRT と血中 ADMA 濃度の関連について検討した報告はない。我々は、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 7 名 (48-61 歳、平均年齢 52.6 ± 1.9 歳) を対象として、治療前後で血中 ADMA 濃度、NOx および内皮依存性血管拡張反応 (%FMD) を検討した。%FMD は、治療後、約 2 倍の有意な増加を認めた。一方、血中 ADMA 濃度は、一定の傾向を認めなかった。NOx は、%FMD が改善するに伴い、増加する傾向を認めた。また、治療前後における %FMD と NOx が正の相関 ( $p < 0.05$ ) を示した。以上より、HRT により %FMD の改善が認められたが、血中 ADMA 濃度は有意な変動を示さなかったことより、%FMD の改善に血中 ADMA が関与している可能性は低いと考えられる。

A. 研究目的

血管内皮細胞は単に血管の内壁を覆い、血液成分と生体組織間を隔てているのみならず、多彩な生理的機能を有し、循環を中心とした生体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。また、血管内皮細胞は、NO、Prostacyclin などの血管拡張物質や Endothelin などの血管収縮物質を分泌し、血管の tonus の調節に深く関わっている。

動脈硬化の早期病変として、血管内皮細胞の機能異常があり、障害をもつ血管内皮細胞は NO の産生 および放出が減少し、内皮依存性血管拡張反応が低下するといわれ、Lieberman らは短期間（9 週間）のエストロゲン補充療法によって内皮依存性血管拡張反応が改善することを報告している。一方、ADMA は、血管病変進展と深く関わる加齢、高血圧、糖尿病などの動脈硬化危険因子を有する患者では、血中濃度が上昇することなどが、報告されており、ADMA が Risk Factor による血管内皮機能低下の一因になっている可能性がある。

本研究では、閉経後女性を対象に HRT を行い、3, 6, 12, 18, 24, 36 カ月という

長期間にわたって、内皮依存性血管拡張反応、血中 ADMA 濃度、NOx を追跡測定し、HRT の効果について検討した。

## B. 研究方法

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 7 名 (48-61 歳、平均年齢  $52.6 \pm 1.9$  歳) を対象とした。使用薬剤は、プレマリン (Conjugated estrogen) 0.625mg/日とプロベラ (Medroxyprogesteron acetate) 2.5mg/日の連日経口服用を基本とし、子宮筋腫により子宮摘出術をうけている 1 名に関しては、プレマリンの単独投与とした。

反応性充血による血流依存性血管拡張反応 (Flow mediated dilatation: FMD) は内皮依存性血管拡張反応であると考えられている。内皮障害が動脈硬化発症の最初のイベントであると考えられており、FMD の低下は動脈硬化の初期変化を捉えうると考えられる。内皮依存性血管拡張反応として超音波を用い、安静時の右上腕動脈 (肘より 3-5 cm 上部) 血管径、および 5 分間の駆血解除後の反応性充血時血管径を測定し、血管径の増加率を %FMD として表した。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 (図 1)。

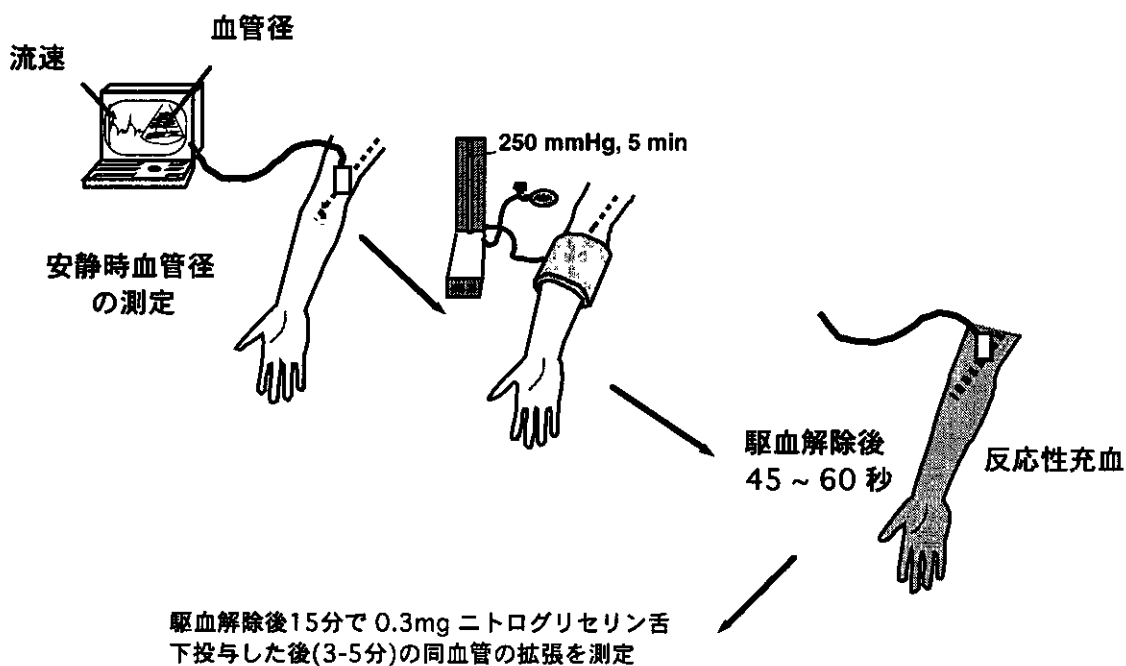


図 1 : 血流依存性血管拡張反応

血漿中 ADMA 濃度は、高速液体クロマトグラフィー蛍光検出法により定量した。EDTA 採血後、血漿を分離し、血漿 (または細胞培養液)  $10 \mu\text{l}$  に移動相  $40 \mu\text{l}$  を加

え、オートサンプラーを用いて high-performance liquid chromatography (HPLC) に注入した。陽イオン交換カラムを用いてアルギニン類縁体を吸着したのち、カラムスイッチングを行い、分離カラムに注入する。イオン対クロマトグラフィーにより NMMA, ADMA および SDMA を分離した後、溶出液に、*o*-フタルアルデヒドとチオールにより蛍光誘導体化し、蛍光検出した。NO<sub>x</sub> 測定は、亜硝酸イオンと硝酸イオンに分離後、ナフチルエチレンジアミンとの反応による Griess 法により測定した。計測時期は治療開始前、開始 3、6、12、18、24、36 カ月後とした。

### C. 研究結果

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 3.7±0.5%、開始 3 ヶ月後で 6.6±0.7%、開始 6 ヶ月後で 7.7±0.9%、開始 1 年後で 7.8±0.9%、開始 1.5 年後で 6.7±0.6%、開始 2 年後で 7.3±1.0%、開始 3 年後で 6.4±0.4%と有意に増加していたが、%NTG は、治療開始前で 12.3±1.7%、開始 3 ヶ月後で 14.3±1.8%、開始 6 ヶ月後で 15.7±1.8%、開始 1 年後で 13.8±1.1%、開始 1.5 年後で 13.4±0.8%、開始 2 年後で 13.9±1.4%、開始 3 年後で 15.1±1.3%と一定の傾向を認めなかった (図 2)。血中 ADMA 濃度に関しては、一定の傾向を認めず (図 3)、両者の相関関係も認められなかった (図 4)。

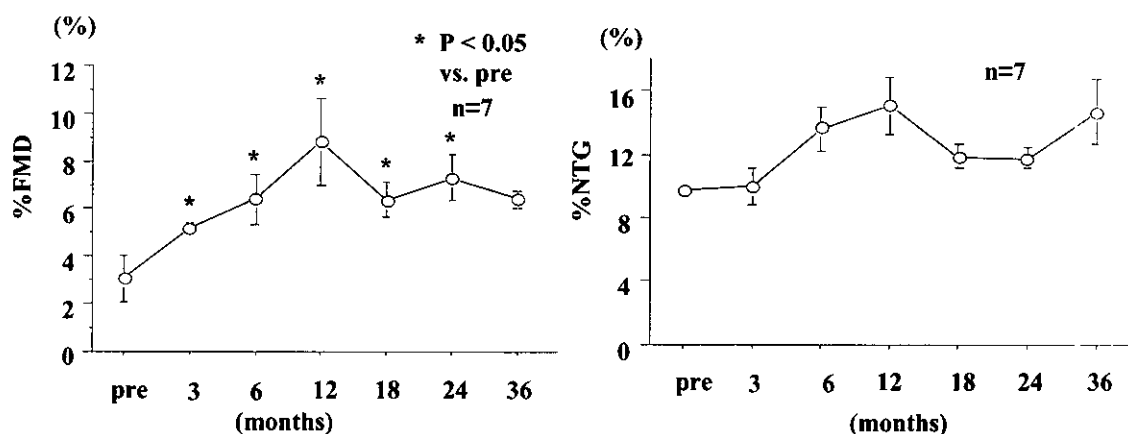


図 2 HRT 施行前後における%FMD、%NTG の変動

HRT 施行前 (pre)、施行後、経時的に%FMD、%NTG の測定を行った。mean ± SE

一方、NO<sub>x</sub> は、%FMD が改善するに伴い治療前で 37.7±15.7×10<sup>-6</sup>M、開始 3 ヶ月後で 58.6±27.0×10<sup>-6</sup>M、開始 6 ヶ月後で 126.6±64.6×10<sup>-6</sup>M、開始 1 年後で 74.4±18.6×10<sup>-6</sup>M と増加する傾向が認められ (図 3)、%FMD と NO<sub>x</sub> は正相関関係にあり、p<0.05 であった (図 5)。なお、治療前のみにおける%FMD と血中 ADMA 濃度に相関関係は認められなかったが、治療後のみの検討では、両者に逆相関関係 (p<0.05) を示し

