



図 5 HRT 施行前後における%FMD および NOx の相関

#### D. 考察

これまで、動脈硬化のリスクファクターにより内皮依存性血管拡張反応が低下していること、および動脈硬化のリスクファクターのある患者において血中 ADMA 濃度が高いことが知られている。Rainer H らは、ADMA が高コレステロール血症で上昇し血管拡張反応、NOx と逆相関を示すことを報告し、Pia Lundman らは高トリグリセライド血症の患者では、内皮依存性血管拡張反応の低下と ADMA の上昇がみられることを報告しているが、それ以外には、血管拡張反応と血中 ADMA 濃度の両者を同時に検討している報告はない。また、閉経後に内皮依存性血管拡張反応が低下していることが報告されているが、血中 ADMA 濃度の報告はない。

本研究において、HRT により内皮依存性血管拡張反応が改善したにも関わらず、血中 ADMA 濃度の値は HRT により変動を示さなかった。本研究およびこれまでの報告で、HRT により血清 NOx が上昇することが知られており、NO 産生が増加していることは明らかである。

Framingham Study をはじめとする多くの疫学的研究により、動脈硬化疾患の発症頻度には、性差が存在し、特に閉経以前の女性は冠動脈疾患の発症が有意に低く、同年齢層での比較においても、閉経前女性のほうが閉経後女性より冠動脈疾患の発症が有意に低いことが示されている。また、閉経後女性に対する、HRT により動脈硬化疾

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により、抗動脈硬化作用を発揮すると考えられる。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参与している。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。

今回、我々の検討で、エストロゲンにより%FMD の改善と血中 NO<sub>x</sub> 濃度の上昇が認められたが、血中 ADMA 濃度は有意な変動を示さなかったことより、ADMA による eNOS の酵素活性阻害以外の機序によって、NO 産生を増加させていると考えられる。ただし、ADMA の血中濃度は、必ずしも血管壁局所における ADMA の濃度を反映していない可能性もあるので、今後、血管壁局所における ADMA の発現を検討する余地がある。

## E. 結論

HRT により閉経後女性の%FMD の改善が認められ、その際に、血中 NO<sub>x</sub> 濃度の上昇が認められたが、血中 ADMA 濃度は有意な変動を示さなかったことより、閉経後女性に対する HRT は、ADMA による eNOS の酵素活性阻害以外の機序によって、NO 産生を増加させ、血管内皮機能を改善させると考えられる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kozaki K, Kaminski WE, Tang J, Hollenbach S, Lindahl P, Sullivan C, Yu JC, Abe K, Martin PJ, Ross R, Betsholtz C, Giese NA, Raines EW. Blockade of platelet-derived growth factor or its receptors transiently delays but does not prevent fibrous cap formation in ApoE null mice. *Am J Pathol.* 2002 Oct;161(4):1395-407
- 2) Iijima K, Yoshizumi M, Hashimoto M, Akishita M, Kozaki K, Ako J, Watanabe T, Ohike Y, Son B, Yu J, Nakahara K, Ouchi Y. Red wine polyphenols inhibit vascular smooth muscle cell migration through two distinct signaling pathways. *Circulation.* 2002; 105(20): 2404-10.
- 3) Iijima K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Effect of red wine polyphenols on vascular smooth muscle cell function--molecular mechanism of the French paradox?. *Mech Ageing Dev.* 2002; 123(8): 1033-9.
- 4) 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.
- 5) Liang YQ, Akishita M, Kim S, Ako J, Hashimoto M, Iijima K, Ohike Y, Watanabe T, Sudoh N, Toba K, Yoshizumi M, Ouchi Y. Estrogen receptor beta is involved in the anorectic action of estrogen. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2002; 26(8): 1103-9
- 6) Ako J, Ikari Y, Hatori M, Hara K, Ouchi Y. Changing spectrum of infective endocarditis. *Circ J.* 2003; 67(1):3-7.

### 2. 学会・研究会発表

- 1) Tokumitsu Watanabe, Masahiro Akishita, Takashi Nakaoka, Koichi Kozaki, Katsuya Iijima, Yumiko Ohike, Naohide Yamashita, Yasuyoshi Ouchi. The effect of adenovirus-mediated transfer of estrogen receptor subtypes on growth of vascular smooth muscle. 75th American Heart Association Scientific Sessions. 2002.11.17-20, Chicago <抄録: *Circulation* 106 (suppl II): p242>
- 2) Tokumitsu Watanabe, Masahiro Akishita, Koichi Kozaki, Takashi Nakaoka, Katsuya Iijima, Yumiko Ohike, Yasuyoshi Ouchi. Differential Effects of Estrogen Receptor Subtypes on Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation. 12th International Vascular Biology Meeting, 2002.5.12-16, Karuizawa, Japan
- 3) Tokumitsu Watanabe, Masahiro Akishita, Kozaki Koichi, Masao Yoshizumi, Katsuya Iijima,

- Yumiko Ohike, Yasuyoshi Ouchi. The effect of overexpression of estrogen receptor subtypes on the proliferation of vascular smooth muscle cells. 第 66 回日本循環器学会、2002.4.24-26, 札幌 <抄録: Circulation Journal (suppl I): p464>
- 4) Yumiko Ohike, Masao Yoshizumi, Koichi Kozaki, Katsuya Iijima, Koichiro Nagano, Tokumitsu Watanabe, Bokyoung Son, Jing Yu, Yoshio Namba, Yasuyoshi Ouchi. Regulatory role of NG, NG-dimethylarginine dimethylaminohydrolase I and II in the neoinima formation after balloon injury of rat carotid artery. 第 66 回日本循環器学会、2002.4.24-26, 札幌 <抄録: Circulation Journal (suppl I): p433 >
- 5) Junya Ako, Masao Yoshizumi, Tokumitsu Watanabe, Katsuya Iijima, Yumiko Ohike, Bokyoung Son, Jing Yu, Koichiro Nagano, Koichi Kozaki, Yasuyoshi Ouchi. Mild hyperthermia sensitizes vascular smooth muscle cell to apoptosis. 第 66 回日本循環器学会、2002.4.24-26, 札幌 <抄録: Circulation Journal (suppl I): p838 >
- 6) Koichi Kozaki, Wolfgang Kaminski, Jingjing Tang, Per Lindahl, Paul Martin, Russell Ross, Christer Betsholtz, Elaine W. Raines. The absence of PDGF-B in circulating cells appears to delay but not prevent fibrous cap formation in ApoE null mice. 第 66 回日本循環器学会、2002.4.24-26, 札幌 <抄録: Circulation Journal (suppl I): p209 >
- 7) 大池裕美子、吉栖正雄、神崎恒一、飯島勝矢、長野宏一郎、渡辺徳光、三田智文、大賀栄次郎、橋本正良、大内尉義. 睡眠時無呼吸症候群における内因性 NO 合成酵素阻害物質 (ADMA) と血管内皮機能障害. 第 34 回日本動脈硬化学会総会、神戸、2002 年 7 月 <抄録: 抄録・プログラム集 p160>
- 8) 渡辺徳光、吉栖正雄、神崎恒一、大池裕美子、飯島勝矢、秋下雅弘、中岡隆志、大内尉義. オーフアン核内受容体 NGFI-B の抗酸化剤による血管平滑筋細胞アポトーシスへの関与. 第 7 回高血圧と動脈硬化研究会部会、2002.6.8, 東京
- 9) 渡辺徳光、秋下雅弘、中岡隆志、神崎恒一、宮原由紀子、山下直秀、大内尉義. エストロゲンの血管平滑筋細胞増殖抑制作用におけるエストロゲン受容体サブタイプの役割. 第 6 回 Molecular Cardiovascular Conference, 2002.8.30-9.1, 赤井川村
- 10) 神崎恒一. 増加する老年者の生活習慣病 高齢者における生活習慣病の動向. 第 44 回日本老年学会総会、2002 年 6 月、東京 <抄録: 日老医誌 39(Suppl): 155, 2002>
- 11) 大池裕美子、吉栖正雄、神崎恒一、飯島勝矢、長野宏一郎、渡辺徳光、橋本正良、大内尉義. 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. 第 44 回日本老年学会総会、2002 年 6 月、東京 <抄録: 日老医誌 39(Suppl):75, 2002>

## H. 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加齢医学講座教授
大池裕美子	東京大学医学部附属病院老年病科技官
渡辺 徳光	東京大学医学部附属病院老年病科医員

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 北海道大学医学部附属病院講師

【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索した。40 週齢雌性 Wistar ラット（更年期ラット）を用い、卵巣を摘出した群（OVX 群）、卵巣摘出後エストロゲン（17βエストラジオール）を補充した群（ERT 群）、sham operation 群（CON 群）を用意し、1 カ月後に3 群の脳を検索した。エストロゲンが減少した OVX 群では、脳における vascular endothelial growth factor（VEGF）とその血管増殖性受容体である KDR、および内皮型一酸化窒素合成酵素（eNOS）が遺伝子および蛋白レベルで減少しており、それとともに毛細血管数の減少が認められた。また、anti-apoptotic marker である Bcl-2 蛋白の減少が存在した。この更年期雌性ラットの脳血管には、ER-αおよび ER-βの両タイプの ER が存在したが、後者がより多かった。OVX によって両タイプの ER が共に減少したものの、ER-βの減少がより高度であった。これらの OVX による変化は、すべて ERT により復元された。すなわち、この更年期ラットモデルでは、エストロゲンが脳で VEGF や eNOS を介して毛細血管網形成を調節しているが、それが欠落すると毛細血管が減少し、エストロゲン補充によりそれが改善されることが明らかとなった。この結果は、ホルモン補充療法が神経細胞への直接作用のみならず、毛細血管網増強により脳の局所血流を改善する結果、精神神経系への効用をもたらす可能性を示唆するものである。

A. 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大脳毛細血管網構築とその調節因子、さらに ER 発現への作用を検索した。

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 ( $3\mu\text{g}/\text{day}$ ) を浸透圧ポンプにて補充) 群 (ERT 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、さらに脳を摘出した。脳の一部は  $-80^{\circ}\text{C}$  に予凍結し、一部は 4% パラホルムアルデヒド液で浸漬固定した後、通常のパラフィン固定を行った。

#### 【脳毛細血管の組織学的検索】

摘出ラット前頭葉の凍結標本より、8 ミクロン厚の冠状断組織切片を作成し、レクチン染色を行った。組織切片はアセトンで固定され、乾燥後 PBS 溶液 (0.1 M, pH 7.4) に浸漬した。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含むメタノールにて処置し、PBS で洗浄後、組織切片は GSA-B4 (PBS で 100 倍希釈) に  $4^{\circ}\text{C}$  で 24 時間浸漬され、peroxidase を用いて streptavidin で反応させた。最終的に 0.05 M の  $\text{NaHCO}_3$  (pH 9.6) で洗浄後 diaminobenzidine/  $\text{H}_2\text{O}_2$  により可視化された。鏡検は Olympus 製顕微鏡で行い、各切片毎から 30 画像のデータを収集し、管腔形成をしていない内皮細胞を毛細血管内皮細胞とみなし、その数を計測した。また、5 ミクロン厚のパラフィン固定冠状断組織切片を用い脱パラフィン後、抗第 VIII 因子抗体により内皮細胞を染色し、同様に毛細血管数を計測した。

#### 【免疫染色および免疫蛍光標識】

免疫染色的検索は、抗ヒト VEGF 抗体、抗ヒト KDR 抗体、抗ヒト Flt-1 抗体、抗ヒト eNOS 抗体、抗ヒト Bcl-2 抗体、抗マウス Bax 抗体、抗マウスリン酸化 Bad 抗体 PBS を使用して行った。パラフィン切片を 8-10  $\mu\text{m}$  の厚さに冠状断で薄切し、シランコーティングのスライドガラスに貼付後、キシレンによる脱パラフィン、下降エタノール系列を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。3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  に 15 分間反応させて内因性パーオキシダーゼのブロッキングを行い、次いで非特異的蛋白のブロッキングのためヤギ血清を含む PBS 液にて反応させた。一次抗体に  $4^{\circ}\text{C}$  で 24 時間反応させた後、適当なパーオキシダーゼ標識二次抗体により diaminobenzidine で可視化した。また、一部は 3 種類の蛍光二次抗体により標識し、可視化した。

ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  の免疫染色的検索は、5 ミクロン厚のパラフィン固定組織切片を用い、抗ヒト ER- $\alpha$  抗体および抗ヒト ER- $\beta$  抗体により染色さらに蛍光染色を行った。

#### 【In situ hybridization】

凍結標本より 20 ミクロン厚の冠状断組織切片を作成し、3-amino-propyltriethoxysilane でコーティングされたスライドガラス貼付後、4% パラホルムアルデヒド (pH 8.0 : 0.1 M triethanolamine-HCl, 0.25% acetic anhydride) で固定した。VEGF、KDR、Flt-1、eNOS、ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  の各 cDNA のヌクレオチドの一部に complementary なプローベが用意され、 $^{35}\text{S}$ -dATP により標識された。標識プローベは  $42^{\circ}\text{C}$  で 10 時間ハイブリダイ

ズされた。

### C. 結果

更年期雌性ラット脳において、OVX 群では CON 群に比し、毛細血管密度が減少していた。ERT 群ではこれが reverse された。OVX 群では、VEGF とその血管増殖性受容体である KDR、および eNOS が遺伝子および蛋白レベルで減少した。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 蛋白の減少が存在した。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 ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  の両タイプの ER 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。

以上の OVX による変化は、すべて ERT により復元された。

### D. 考案

本研究より、エストロゲンが更年期雌性ラット脳の毛細血管密度を、VEGF-KDR-eNOS 系を介して調節することが明らかとなった。また、ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  が脳血管に存在し、エストロゲンは ER- $\alpha$  および ER- $\beta$  の発現を調節し、脳では ER- $\beta$  の変化が大きかった。

この結果は、エストロゲンが痴呆の発症を遅らせる理由として、血管網増加による血流改善を想定させる。すなわち、エストロゲンが脳で ER- $\beta$  を発現させ、VEGF-KDR や eNOS の増強を介して毛細血管網形成を upregulate しているが、閉経後それが欠落すると毛細血管が減少し、血管性痴呆が惹起される。一方、エストロゲン補充によりそれが改善されることが示唆される。従って、ホルモン補充療法は神経細胞への直接作用のみならず、毛細血管網増強により脳の局所血流を改善する結果、精神神経系への効用もたらす可能性がある。

### E. 結論

エストロゲンは更年期モデルの雌性ラットにおいて、脳血管の ER- $\beta$  を増加させ、脳の毛細血管網を VEGF-KDR および eNOS 発現増大を介して密にすることが明らかとなった。また、卵巣摘出が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とから、閉経後女性へのホルモン補充療法が、脳毛細血管網の増強により脳の局所血流を改善し、血管性痴呆を軽減する可能性を示唆するものである。

### F. 健康危険情報



該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Jesmin S, Sakuma I, Hattori Y, Kitabatake A: In vivo estrogen manipulations on coronary capillary network and angiogenic molecule expression in middle-aged female rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1591-1597, 2002
2. Subrina Jesmin, Chishimba N. Mowa, Naoyuki Matsuda, Alaa-Eldin Salah-Eldin, Hiroko Togashi, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, and Akira Kitabatake. Evidence for a potential role of estrogen in the penis: Detection of estrogen receptor-a and -b messenger ribonucleic acid and protein. *Endocrinology* 143: 4764-4774, 2002
3. Liu MY, Hattori Y, Sato A, Ichikawa R, Zhang XH, Sakuma I: Ovariectomy Attenuates Hyperpolarization and Relaxation Mediated by Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Female Rat Mesenteric Artery: A Concomitant Decrease in Connexin-43 Expression. *J Cardiovasc Pharmacol* 40(6): 938-948, 2002
4. Jesmin S, Hattori Y, Sakuma I, Liu MY, Mowa CN, Kitabatake A: Estrogen deprivation and replacement modulate cerebral capillary density with vascular expression of angiogenic molecules in middle-aged female rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 23(2): 181-189, 2003

### 2. 学会発表

1. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Akira Kitabatake: Regulation of microvascular angiogenesis by estrogen in the heart of middle-aged female rats. 第66回日本循環器学会学術集会、札幌、2002.4.26.
2. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Akira Kitabatake: Hypoxia inducible factor-1 is overexpressed in coronary microvasculature in the heart of middle-aged female rats: Regression of coronary capillary after ovariectomy and its recovery after estrogen replacement. XIIth International Vascular Biology Meeting, Karuizawa, Japan, 2002.5.13.
3. Ichiro Sakuma: Comparison of the Effects of Conjugated Equine Estrogen versus Those of Estradiol Patch on Parameters of Fibrinolysis and Coagulation in Postmenopausal Women: A Randomized Cross-Over Study. American Heart Association 75th. Scientific Session, Chicago, U.S.A. 2002.11.18.
4. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Akira Kitabatake: Estrogen Mediates Flow-Preserving Neuroprotection via its Angiogenic Action and Sustained NO Production in Middle-Aged Female Rat Brain. 第67回日本循環器学会学術集会、福岡、2003.3.30.
5. Subrina Jesmin, Ichiro Sakuma, Yuichi Hattori, Akira Kitabatake: Decrease in Estrogen by Aging Renders Myocardium Ischemic and Estrogen Replacement May Not Fully Protect

Heart in Female Rats. 第 67 回日本循環器学会学術集会、福岡、2003.3.30.

6. Subrina Jesmin, 佐久間一郎, 縄手 聡, 北島 顕: エストロゲンによる冠毛細血管網構築の制御、第 25 回心筋代謝研究会、札幌、2002.7.19.
7. 佐久間一郎, 和田博司, 北島 顕: 閉経後女性における経皮吸収型エストロゲン製剤の凝固線溶系への影響. 第 17 回日本更年期学会学術集会、鹿児島、2002.10.27.

#### H. 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

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

分担研究者 市川 秀一 医療法人北関東循環器病院院長

【研究要旨】

＜研究課題1：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について ACE多型別による検討＞ アンジオテンシン変換酵素（angiotensin-converting enzyme; ACE）の遺伝子多型の欠損型（deletion; D）ではACE活性が高値であり、心血管病の発症が多い。以前我々は、ホルモン補充療法（hormone replacement therapy; HRT）が閉経後女性の血清ACE活性を低下させ、それに伴って血漿ブラジキニンが増加することを報告した。本研究では、ACE多型の違いによりHRTによる血漿ACE活性の低下と血漿ブラジキニンの増加が異なるか否かを検討した。HRTは、閉経後女性で血清ACE活性が高いD/D群とI/D群の血清ACE活性を低下させ、血漿ブラジキニンを上昇させた。一方、I/I群では低い血清ACE活性は、HRTにより低下しなかったが、血漿ブラジキニンは他の群と同様の上昇が認められた。I/I群では血清ACE活性の低下がみられなかったことから、このブラジキニンの上昇は、ACE活性の低下のみによるものではないことが示唆された。また、血漿ブラジキニンは全群で上昇しており、ブラジキニンが心保護作用を有することから考慮すると、HRTはACE多型性のすべての型の閉経後女性において有効である可能性がある。

＜研究課題2：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について＞ 多くの魚を摂取しているエスキモーは冠動脈疾患を有する割合が低い。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）が動脈硬化を抑制していると考えられている。HRTの動脈硬化抑制作用については不明な点が多い。本研究では、閉経後女性にHRTを行い、血漿DHAおよびEPA濃度に与える影響について検討した。HRTは閉経後女性の血清DHAおよびEPA濃度を増加させた。HRTによる血漿DHAおよびEPA濃度の増加はHRTによる抗動脈硬化作用の中の一つである可能性がある。さらに、これらの増加は心血管病だけでなく痴呆に対して有効である可能性を有している。

研究課題1：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について ACE多型別による検討

A. 研究目的

アンジオテンシン変換酵素（angiotensin-converting enzyme; ACE）の遺伝子多型の欠損型（deletion; D）ではACE活性が高値であり、心血管病の発症が多い。ホルモン補

充療法 (hormone replacement therapy; HRT) は閉経後女性の血清 ACE 活性を低下させ、この ACE 活性の低下が心血管病に対して保護作用を有している可能性がある。最近我々は、HRT により閉経後女性の血清 ACE 活性が低下し、それに伴って血漿ブラジキニンが増加することを発表した。ACE 活性はブラジキニン分解酵素 (キナーゼ II) と同じであるので、ACE 活性が低下すると血漿ブラジキニンが増加すると考えられている。そこで、HRT による血清 ACE 活性の低下と血漿ブラジキニンの増加が ACE 多型の違いにより異なるか否かを検討することが重要である。本研究では、ACE 多型の違いにより HRT による血清 ACE 活性の低下が異なるか否かを調べ、また、HRT による血漿ブラジキニンの増加が ACE 多型の違いに依存しているか否かを検討した。

## B. 研究方法

同意を得た連続 72 症例の閉経後女性のうち、最後まで研究に協力してくれた 68 例の症例 (平均年齢  $57 \pm 1$  歳 SEM) を対象とした。HRT 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 ヶ月間連続経口投与した。HRT 施行前に採血を行い、polymerase chain reaction (PCR) 法にて ACE 遺伝子多型の測定を行った。閉経後女性を D/D 群 ( $56 \pm 1$  歳 9 例)、挿入型 (insertion; I) /D 群 ( $56 \pm 1$  歳 33 例)、I/I 群 ( $55 \pm 2$  歳 26 例) の 3 群に分類した。すべての群において、HRT 施行前、3、6、12 ヶ月後に外来にて朝食前に 30 分以上の安静臥床後に血圧、脈拍を測定し採血した。採血後、直ちに 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。同時にエストラジオール、卵胞刺激ホルモンを服薬状況調査のため測定した。

## C. 研究結果

すべての群において、HRT によりエストラジオールは有意に上昇し、卵胞刺激ホルモンは有意に低下しており、服薬状況は良好であった。HRT 施行前の血清 ACE 活性は、D/D 群で  $18.3 \pm 2.0$  IU/L であり、I/D 群  $16.5 \pm 0.6$  IU/L ( $p < 0.05$ )、I/I 群  $11.9 \pm 1.0$  IU/L ( $p < 0.05$ ) に比べ有意に高かった。また、HRT により血清 ACE 活性は、D/D 群、I/D 群で 6 ヶ月後に  $13.0 \pm 1.8$  IU/L、 $14.0 \pm 0.6$  IU/L ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.001$ )、12 ヶ月後に  $12.0 \pm 1.9$  IU/L、 $14.0 \pm 0.7$  IU/L ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ ) と HRT 施行前に比べ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 群のすべての群で HRT 施行前  $18.1 \pm 4.9$  pg/mL、 $16.3 \pm 1.3$  pg/mL、 $24.1 \pm 2.9$  pg/mL に比べ、HRT 施行 6 ヶ月後には  $43.3 \pm 4.3$  pg/mL、 $51.3 \pm 5.5$  pg/mL、 $40.4 \pm 3.1$  pg/mL ( $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.001$ )、HRT 施行 12 ヶ月後にも  $56.7 \pm 6.8$  pg/mL、 $60.8 \pm 5.9$  pg/mL、 $64.2 \pm 6.5$  pg/mL ( $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ 、 $p < 0.01$ ) とそれぞれ有意に増加した。

#### D. 考察

本研究では、HRT は、閉経後女性において血清 ACE 活性が高い D/D 群と I/D 群の血清 ACE 活性を低下させたが、I/I 群では血清 ACE 活性は変化しなかった。一方、すべての群で HRT は血漿ブラジキニンを上昇させた。

Proudlar は、HRT が閉経後女性の血清 ACE 活性を低下させることを報告し、そして HRT に依存する ACE 活性の低下はアンジオテンシン II とキニン濃度の変化を通して血管機能に影響を与えていると推測した。我々が以前に発表した報告では、HRT が閉経後女性の血清 ACE を低下させ、血漿ブラジキニン濃度を増加させた。

ACE は冠動脈の血栓、血管収縮、平滑筋の増殖に関与しており、特に ACE 活性の高値である D/D 型は心筋梗塞、心筋症、左室肥大などの危険因子となっている。さらに、ACE 遺伝子の D 型を有する患者では I 型を有する患者よりも収縮期血圧が高く、降圧薬の効果も減弱している。このように、ACE 活性高値と ACE 遺伝子の D 型は心血管病発症の増加と関連している。

HRT が閉経後女性の ACE 活性を低下することが多くの研究で報告されている。そのメカニズムとしてエストロゲンがラットの ACE の mRNA をダウンレギュレーションしていることが考えられる。さらに、臨床研究において、エストロゲンが血管内皮細胞由来の一酸化窒素 (nitric oxide; NO) を増加させることは知られているが、エストロゲンによる一酸化窒素代謝産物の増加と血漿 ACE 活性の上昇が負の相関を呈していることが最近報告され、エストロゲンの刺激による NO 産生が ACE 活性を抑制している可能性も存在する。

最近、閉経後女性に対する HRT と ACE 遺伝子、ACE 活性に関する報告が発表された。この研究では、3 ヶ月の結合型エストロゲン単独療法で、ACE 遺伝子の I/D 型と I/I 型で血漿 ACE 活性が低下したが、D/D 型では血漿 ACE 活性は低下しなかった。この結果は本研究と一致しないが、HRT の投与期間の相違と血清 ACE 活性の測定感度によるのかもしれない。

一方、ブラジキニンは全身の動脈や冠動脈の血管抵抗を減弱し、心血管病に対しては血管拡張作用を有している。また、ブラジキニンは心筋の酸素消費量や虚血を減少させる作用などの心筋保護作用を有している。本研究では、HRT が閉経後女性の ACE 遺伝子の I/D 型と D/D 型で血清 ACE 活性を低下させ、ACE 遺伝子のすべての型で血漿ブラジキニンを増加させていることから、この HRT による血清 ACE 活性の低下とブラジキニンの増加は心血管病に対して有益な作用を有している可能性がある。

HRT は ACE 遺伝子の I/D 型と D/D 型を有する閉経後女性の血清 ACE 活性を低下させ、血漿ブラジキニンを増加させているが、I/I 型を有する閉経後女性に対しては、HRT は血清 ACE 活性を低下させないのに血漿ブラジキニンを増加させていることが興味のあるところである。Murphy らは、健常人の前腕からブラジキニンを注入し、

血中のブラジキニン濃度を測定し、ACE 遺伝子の多型と血漿ブラジキニン濃度が関連しないことを報告し、ACE 遺伝子の多型と局所のブラジキニンの産生は影響を受けない可能性についても言及している。ブラジキニンの半減期は 17 秒と短いので、血漿のブラジキニン濃度は必ずしもキニンの局所の産生を反映していないのかもしれない。よって、HRT による ACE 活性の低下だけでは、ブラジキニンの増加を説明するのは不可能である。

HRT は、閉経後女性の D/D 型と I/D 型の血清 ACE 活性を低下させ、血漿ブラジキニンを上昇させた。一方、I/I 型では低い血清 ACE 活性は、HRT により低下しなかったが、血漿ブラジキニンは他の型と同様の上昇が認められた。I/I 型では血清 ACE 活性の低下がみられなかったことから、このブラジキニンの上昇は、ACE 活性の低下のみによるものではないことが示唆された。

#### E. 結論

HRT は、閉経後女性の D/D 型と I/D 型の血清 ACE 活性を低下させ、すべての型で血漿ブラジキニンを上昇させた。よって HRT によるブラジキニンの上昇は、ACE 活性の低下のみによるものではないことが示唆された。また、HRT はすべての型で血漿ブラジキニンを上昇させており、ブラジキニンが心保護作用を有することから考慮すると、HRT の施行は ACE 多型のすべての型の閉経後女性において有効である可能性が考えられる。

### 研究課題 2：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について

#### A. 研究目的

最近の大規模臨床試験の Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)、HERS II および Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial で閉経後女性に対する HRT の虚血性心疾患の予防効果が認められなかったが、以前から多数の研究で、HRT が脂質・糖代謝改善作用、血管内皮由来の血管作動物質の産生促進などの抗動脈硬化作用を有することが報告されている。

食物として多くの魚を摂取しているエスキモーは冠動脈疾患を有する割合が低く、魚脂に多く含まれる n-3 不飽和脂肪酸が動脈硬化を抑制していると疫学調査にて報告されている。n-3 不飽和脂肪酸の中でも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) が主要な成分であり、DHA と EPA が抗動脈硬化作用をもたらすと考えられている。HRT の動脈硬化

抑制作用については不明な点が多い。HRT による抗動脈硬化作用の一つに DHA および EPA が関与している可能性がある。本研究では、閉経後女性に HRT を行い、血漿 DHA および EPA 濃度に与える影響について検討した。

## B. 研究方法

本研究に閉経後女性 104 例 (53.4±0.4 歳 SEM) を登録した。閉経後女性は 2 群に分類した。HRT 群として閉経後女性 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 ヶ月間連続経口投与した。一方、コントロール群として閉経後女性 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 ヶ月後に外来にて朝食前に採血した。採血後、直ちに血漿 DHA、EPA 濃度はガス-液体クロマトグラフィー法にて測定した。同時に血清脂質、エストラジオール、卵胞刺激ホルモンを服薬状況調査のため測定した。

## C. 研究結果

HRT 群においては、HRT によりエストラジオールは有意に上昇し、卵胞刺激ホルモンは有意に低下しており、服薬状況は良好であったが、コントロール群ではいずれも変化しなかった。HRT 群において、血漿 DHA および EPA 濃度が HRT 施行前 134 ±5 μg/mL、69 ±4 μg/mL に比べ、1 年後に 156 ±7 μg/mL、85 ±7 μg/mL とそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) 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、血清 low-density lipoprotein (LDL) コレステロールが HRT 施行前 198 ±5 mg/dL、123.6 ±4.0 mg/dL に比べ、6 ヶ月後に 187 ±4 mg/dL、103.2 ±3.4 mg/dL、12 ヶ月後に 184 ±4 mg/dL、99.8 ±3.6 mg/dL とそれぞれ有意 (全て  $p < 0.01$ ) に減少した。血清 high-density lipoprotein (HDL) コレステロールは、HRT 群において HRT 施行前 52.2 ±1.9 mg/dL に比べ、6 ヶ月後に 59.2 ±2.1 mg/dL、12 ヶ月後に 59.1 ±1.9 mg/dL とそれぞれ有意 ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ) に増加した。血清トリグリセライドは、HRT 群において HRT 施行前 110 ±8 mg/dL に比べ、12 ヶ月後に 126 ±9 mg/dL と有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した。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。

## D. 考察

HRT は閉経後女性の血漿 DHA、EPA 濃度を増加させた。脂質においては、HRT は血清総コレステロール、LDL コレステロールを減少させ、血清トリグリセライド、HDL コレステロールを増加させた。

DHA が心血管病に対して様々な有益な作用を有していることを多くの研究で報告

されている。虚血性心疾患を有している患者の血中および脂肪と冠動脈組織の DHA 量は、その疾病を有していない患者の量に比べ低くなっている。また、DHA は虚血由来の不整脈を予防する。このように、DHA は心血管病に対する保護作用を有しており、HRT による血漿 DHA 濃度の増加は HRT の抗動脈硬化作用の一部となっている可能性がある。

一方、EPA も血小板凝集の抑制、全血液粘度と赤血球細胞変性の低下、2 型糖尿病患者の足背動脈の拡張、血清トリグリセライドの減少などの作用を有している。本研究において、HRT が閉経後女性の血漿 EPA 濃度を増加させたことは、エストロゲンによる有益な作用の一つとなっている可能性がある。

HRT が閉経後女性の血漿 DHA と EPA 濃度を増加させる機序は不詳であるが、その機序を支持する 3 つの可能性がある。1) エストラジオールはウズラの卵管の DHA 濃度を増加させる、2) 妊娠下の脂質プールの貯留や動員によって、高濃度のエストロゲンとプロゲステロン状態である妊婦は、低濃度である非妊婦に比べ、高い DHA、EPA 濃度を持っている、3) エストロゲンが消化管から DHA と EPA の吸収を増加させている等の可能性が考えられる。

HRT は閉経後女性の脂質代謝に対して影響を与えている。HRT は閉経後女性の総コレステロールや LDL コレステロールを減少させ、HDL コレステロールやトリグリセライドを増加させる報告があり、本研究と結果が一致する。その機序として、エストロゲンによる肝性 LDL レセプターの活性の増加や肝性トリグリセライドリパーゼ活性の抑制、さらにリポプロテインリパーゼ活性の抑制などがある。

## E. 結論

本研究において HRT は閉経後女性の血清 DHA および EPA 濃度を増加させ、血清脂質の改善を認めた。HRT による血漿 DHA および EPA 濃度の増加は HRT による抗動脈硬化作用の中の一つである可能性がある。さらに、DHA は認知能を改善するので、HRT による DHA の増加は心血管病だけでなく痴呆に対しても有効である可能性を有している。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kasama S, Toyama T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Suzuki T, Kurabayashi M. Spironolactone improves cardiac sympathetic nerve activity and symptoms in patients with



- congestive heart failure. *J Nucl Med* 2002; 43: 1279-1285.
- 2) Sumino H, Ichikawa S, Ohyama Y, Nakamura T, Kanda T, Sakamoto H, Sakamaki T, Mizunuma H, Kurabayashi M. Effects of hormone replacement therapy on serum angiotensin-converting enzyme activity and plasma bradykinin in postmenopausal women according to angiotensin-converting enzyme-genotype. *Hypertens Res* 2003; 26: 53-58.
  - 3) Sumino H, Ichikawa S, Murakami M, Nakamura T, Kanda T, Sakamaki T, Mizunuma H, Kurabayashi M. Effects of hormone replacement therapy on circulating docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid levels in postmenopausal women. *Endocr J* 2003; 50: 51-59.
  - 4) Kasama S, Toyama T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Suzuki T, Kurabayashi M. Low-dose dobutamine stress <sup>99m</sup>Tc tetrofosmin quantitative gated SPECT performed during the acute phase of myocardial infarction predicts subsequent myocardial viability and detects stunned myocardium. *Nucl Med Commun* 2003; 24: 167-174.
  - 5) Kasama S, Toyama T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Suzuki T, Kurabayashi M. Effect of spironolactone on cardiac sympathetic nerve activity and left ventricular remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 574-581.
  - 6) Sumino H, Ichikawa S, Kumakura H, Takayama Y, Kanda T, Sakamaki T, Kurabayashi M. Effects of hormone replacement therapy on office and ambulatory blood pressure in Japanese hypertensive postmenopausal women. *Hypertens Res*, in press
  - 7) Tamama K, Sumino H, Ichikawa S, Kanda T, Kotajima N, Fukumura Y, Kurabayashi M, Murakami M. Hormone Replacement Therapy Causes a Decrease in Hepatocyte Growth Factor in Hypertensive Women. *J Hypertens*, in press
2. 学会・研究会発表
- 1) Kasama S, Manita M, Toshima S, Iwasaki T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Toyama T, Suzuki T, Kurabayashi M. Spironolactone treatment improves cardiac sympathetic nerve activity and symptoms in patients with congestive heart failure. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会, 2002.4.24-26, 札幌. <抄録: Jpn Circ J 66 (Suppl I): 397, 2002>
  - 2) Sugito Y, Kumakura H, Kasama S, Manita M, Toshima S, Iwasaki T, Takayama Y, Ichikawa S, Kurabayashi M. Hyperhomocysteinemia, hyperlipidemia, and hypertension are risk factors of cerebro-carotid vascular disease in patients with arteriosclerosis obliterans. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会, 2002.4.24-26, 札幌. <抄録: Jpn Circ J 66 (Suppl I): 725, 2002>
  - 3) Nogawa N, Kumakura H, Kasama S, Sugito Y, Manita M, Toshima S, Iwasaki T, Takayama Y, Ichikawa S, Hasegawa A, Kurabayashi M. Comparison of plaque-morphology and risk factors in patients with arteriosclerosis obliterans: Assessment of pre- and post-endovascular

- treatment by intravascular ultrasound. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会, 2002.4.24-26, 札幌. <抄録 : Jpn Circ J 66 (Suppl I): 734, 2002>
- 4) Kumakura H, Sugito Y, Kasama S, Manita M, Toshima S, Iwasaki T, Takayama Y, Ichikawa S, Kurabayashi M. Superiority of stent placement to PTA or atherectomy in the treatment of iliac-artery occlusive lesions. 第 66 回日本循環器学会総会・学術集会, 2002.4.24-26, 札幌. 2002.4.24-26. Sapporo. <抄録 : Jpn Circ J 66 (Suppl I): 735, 2002>
  - 5) 市川秀一、角野博之：【シンポジウム】内科の立場から ―HRT について― わが国における骨粗鬆症の予防・治療に関する HRT の最近の評価. 第 4 回日本骨粗鬆症学会総会. 2002.11.20-22, 東京.
  - 6) 角野博之、倉林正彦、市川秀一：ホルモン補充療法の腹部脂肪、脂質代謝に与える影響. 第 2 会群馬 HRT 研究会, 2003.2.7, 前橋.
  - 7) Kasama S, Kanai H, Ito T, Toshima S, Iwasaki T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Toyama T, Suzuki T, Kurabayashi M. Effect of spironolactone on cardiac sympathetic nerve activity and left ventricular remodeling in patients with dilated cardiomyopathy. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 292-293, 2003>
  - 8) Kasama S, Kanai H, Ito T, Toshima S, Iwasaki T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Toyama T, Suzuki T, Kurabayashi M. Spironolactone improves cardiac sympathetic nerve activity and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 330, 2003>
  - 9) Kumakura H, Ichikawa S, Takayama Y, Kasama S, Iwasaki T, Toshima S, Kanai H, Sumino H, Kurabayashi M, Itoh T. Aspirin reduces mortality in patients with arteriosclerosis obliterans. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 359, 2003>
  - 10) Ogino T, Kumakura H, Kanai H, Kasama S, Itoh T, Toshima S, Iwasaki T, Takayama Y, Ichikawa S, Takahashi T, Morishita Y. Which better therapy methods should we choose for peripheral vascular disease, catheter intervention or bypass grafting?. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 551, 2003>
  - 11) Kasama S, Kanai H, Ito T, Toshima S, Iwasaki T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S, Toyama T, Suzuki T, Kurabayashi M. Addition of valsartan to an ACE-inhibitor improves cardiac sympathetic nerve activity and cardiac function in patients with congestive heart failure. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. 2003.3.28-30. Fukuoka. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 555, 2003>
  - 12) Kasama S, Kanai H, Ito T, Toshima S, Iwasaki T, Kumakura H, Takayama Y, Ichikawa S,

Toyama T, Suzuki T, Kurabayashi M. Myocardial contractile reserve on dobutamine stress Tc-99m-tetrofosmin QGS predicts late spontaneous improvement in cardiac function in patients with dilated cardiomyopathy. 第 67 回日本循環器学会総会・学術集会, 2003.3.28-30. 福岡. <抄録 : Jpn Circ J 67 (Suppl I): 579, 2003>

H. 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学教室

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

I. 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)

II. 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)

分担研究者 大藏 健義 獨協医科大学越谷病院教授

【研究要旨】

<I. 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単独療法および ERT+選択的セロトニン再取り込み阻害薬の併用療法による臨床的効果の検討> 当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を実施するとともに SRQ-D、SDS を行い、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病評価尺度(HDRS)を行った。ERT (結合型エストロゲン 0.625mg/日を 12 週間連日投与) または ERT に SSRI を併用して 12 週間連日投与し、投与前と投与後 2 週、4 週、8 週、12 週に各種心理テストを行って効果を判定した。ERT 群では、SRQ-D、SDS、および日産婦式更年期アンケートの平均スコアは 2 週後より有意に低下したが、4~12 週にかけてもほぼ同じ値を維持していた。しかし、HDRS による他覚症状では、4~12 週後にかけて平均スコアは更に低下する傾向にあった。一方、ERT+SSRI 群では、すべての心理テストの平均スコアは 2 週後に有意に低下しただけでなく、4~12 週後にかけても平均スコアは更に低下した。以上のことから、更年期障害に併存した軽度~中等度の抑うつ症状に対してエストロゲン単独療法の効果が認められるが、これに SSRI を併用すると、更年期症状を含めて抑うつ症状に対する自覚症状および他覚症状は更に改善することが明らかになった。

<II. エストロゲン単独の持続療法が脳血流に及ぼす影響の検討> 結合型エストロゲン(CEE)0.625mg/日を 20 名の閉経後女性に連日投与して、投与前と投与後 6 週、12 週、半年、1 年、および 2 年後に脳血流を測定して推移を検討した。大脳血流量は 6 週後と 12 週後に有意に増加したが、半年後にはほぼ投与前値にまで低下した。しかし、1 年後には再び有意に増加したが、2 年後には再びほぼ投与前値まで低下した。一方、小脳血流量は 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 年後には再び有意な増加が認められただけでなく、2 年後にも有意な増加が観察された。以上の結果より、エストロゲンを連続投与していると大脳、小脳とも血流量は一定期間増加した後に減少し、再び増加、減少するという現象をくり返すことが判明した。脳血流の減少と増加には、エストロゲンレセプターの down-regulation と up-regulation がそれぞれ関与しているものと推察された。