

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)

A. 研究目的

更年期障害の 21.6% は心因性的原因によると報告されており (久嶋勝司, 1984)、また、更年期外来受診者の 24% は精神障害を合併するという (赤松達也, 2000)。これらの心因性あるいは精神障害の多くはうつ、あるいは抑うつ状態を指しているものと思われる。事実、更年期外来ではうつまたはその傾向のある閉経後女性を診察することも少なくない。しかしながら、うつに対する ERT の効果については、これを肯定する報告と否定する報告とがあり、結論は出ていないのが現状である。また、SSRI は新しいタイプの抗うつ剤であり、従来のものに比べ副作用も少なく、婦人科医でも外来で使いやすい。したがって、本研究では、更年期外来受診者の中からうつ傾向のある閉経後女性を選んで、ERT 単独あるいは ERT と SSRI の併用療法を行い、抑うつ症状に対するそれぞれの臨床的効果を比較検討した。

B. 研究方法

1. 対象

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とともに、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 (Hamilton Depression Rating Scale : 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 ± 2.0 (平均 \pm SE) 歳と 53.0 ± 2.5 歳であった。

2. 治療法

ERT には結合型エストロゲン (CEE) 0.625mg (プレマリン錠[®]、日本ワイスレダリー社) を用い、SSRI としてはパロキセチン 10mg (パキシル錠[®]、グラクソ・スミスクライン社) を用いた。投与法は、それぞれ次のとおりとした。

ERT: CEE 0.625mg 錠を毎日朝 1 回、12 週間連日投与した。12 週間後に 1 週間休薬した後に、CEE 0.625mg/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。

ERT+SSRI: 上記 ERT を行うとともに、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。

3. 各種心理テスト: SRQ-D、SDS、HDRS、日産婦式更年期アンケートなどの各種

心理テストは、投与前と投与後2週、4週、8週、12週に行って、群内比較を行うとともに群間比較を行った。統計的処理は、Wilcoxon test と Mann-Whitney test を用いて有意差検定を行った。

C. 研究結果

1. SRQ-D: ERT 群の平均スコア (平均±SE) は、投与前値 (17.9±2.3) に比べて投与後すべての週数で有意 (いずれも $p<0.05$) に低下した (図 1)。平均スコアの減少が最も大きかったのは4週後で、投与前値の 60.8 ± 6.8 (平均±SE) %に低下した。一方、ERT+SSRI 群の平均スコアは投与前値 (15.0±1.2) に比べて、すべての週数で有意に低下した (図 1)。平均スコアの減少が最も大きかったのは8週後で、投与前値の 30.4 ± 8.4 %に低下した。

ERT 群と ERT+SSRI 群の比較では、4週後 ($p<0.05$) と8週後 ($p<0.01$) 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 (それぞれ、 47.1% vs 60.8% と 30.4% vs 64.2%)、(図 1)。

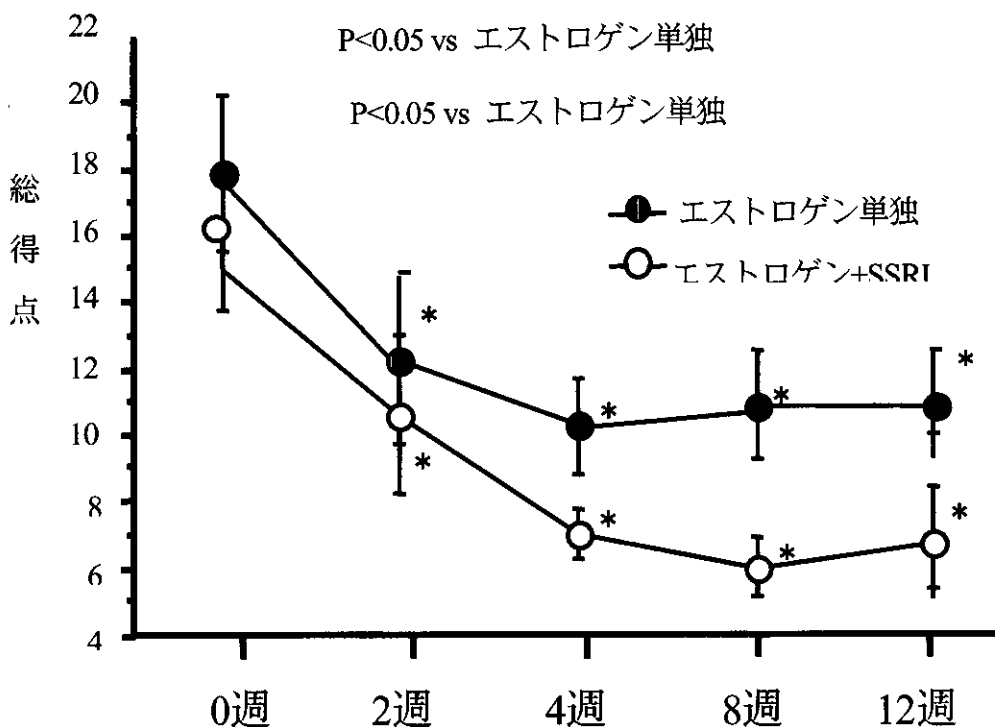


図 1. SRQ-Dの推移

2. SDS

ERT 群の平均スコアは、投与前値 (47.9 ± 3.3) に比べて投与後すべての週数で有

意 (いずれも $p<0.05$) に低下した (図 2)。平均スコアの減少が最も大きかったのは 4 週後で投与前値の $79.2\pm 4.5\%$ に低下した。一方、ERT+SSRI 群の平均スコアは投与前 (45.2 ± 1.8) に比べて、投与後いずれの週数でも有意 (いずれも $p<0.05$) に低下した (図 2)。平均スコアの減少が最も大きかったのは 8 週後で、投与前値の $67.3\pm 7.6\%$ 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 ($p<0.05$) のみで、平均スコアの低下は併用群で有意に大きかった (67.3% vs 80.9%) (図 2)。

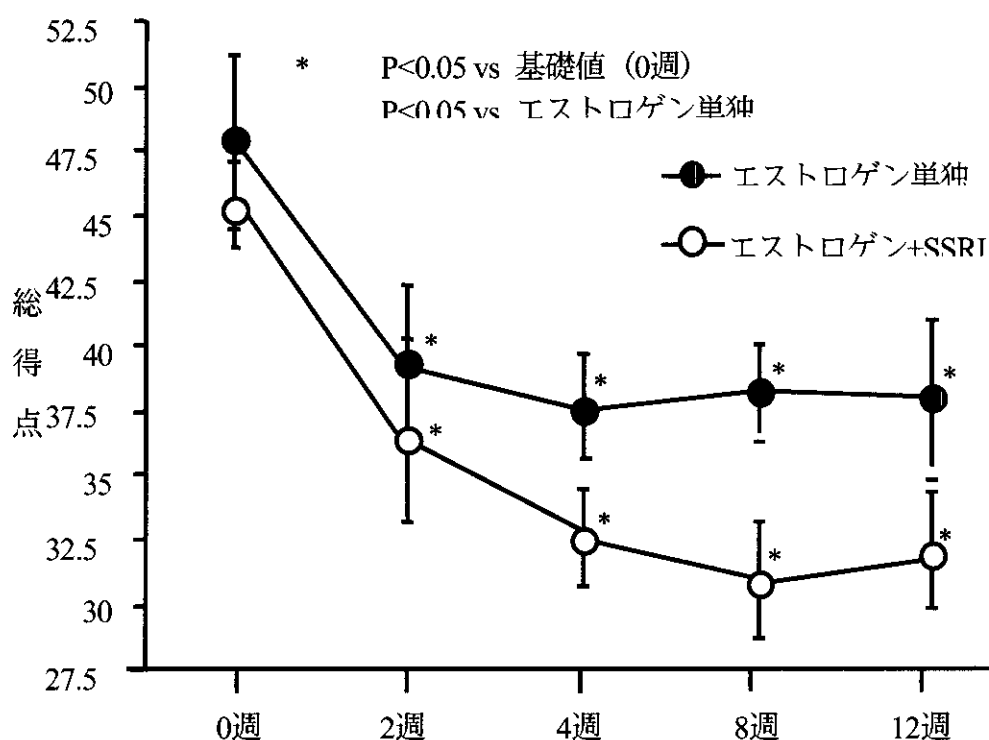


図 2. SDSの推移

3. HDRS

ERT 群の平均スコアは、投与前値 (13.8 ± 1.8) に比べて投与後すべての週数で有意 (いずれも $p<0.05$) に低下した (図 3)。平均スコアの減少が最も大きかったのは 8 週後で、投与前値の $35.1\pm 8.5\%$ に低下した。一方、ERT+SSRI 群の平均スコアは、投与前値 (11.2 ± 1.2) に比べて投与後すべての週数で有意 (いずれも $p<0.05$) に低下した (図 3, 次ページ)。平均スコアの減少が最も大きかったのは 8 週後で、投与前値の $28.0\pm 8.6\%$ に低下した。なお、図 3 から明らかのように、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。

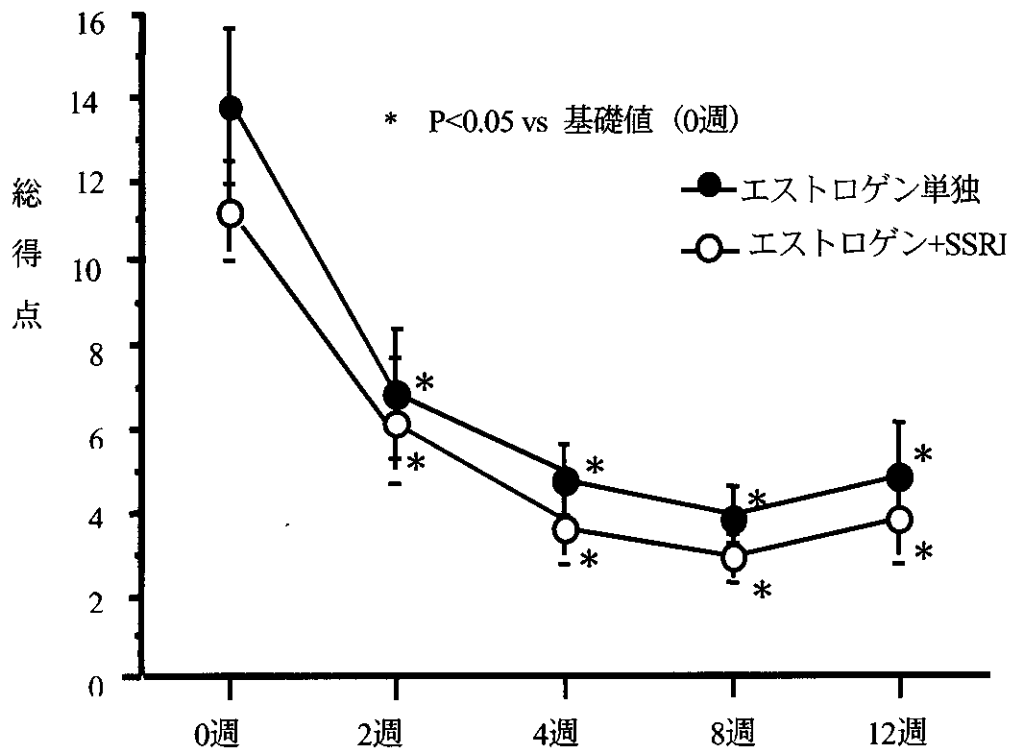


図3. HDRSの推移

4. 更年期スコア

ERT 群の平均スコアは、投与前値 (32.8 ± 2.1) に比べて投与後すべての週数で有意 (いずれも $p < 0.05$) に低下した (図4)。平均スコアの減少が最も大きかったのは8週後で、投与前値の $59.3 \pm 9.0\%$ に低下した。一方、ERT+SSRI 群の平均スコアも投与後すべての週数で有意 (いずれも $p < 0.05$) に減少した (図4、次ページ)。平均スコアの減少が最も大きかったのは8週後で、投与前値の $24.2 \pm 8.5\%$ に低下した。

ERT と ERT+SSRI 群の比較では4週後と8週後に有意差 (いずれも $p < 0.05$) 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 (それぞれ投与前値の 37.4% vs 60.9% 、 24.2% vs 59.3%)。

D. 考察

本研究における患者の抑うつ症状について、SRQ-D で16点以上、SDS で40点以上をうつ傾向ありとして対象とした。しかし、同時に行ったHDRSでは、一般に15点以上をうつ病としている。HDRSが15点以上であった症例は、ERT群の9例中3例のみであり、ERT+SSRI群でのHDRSはすべて15点未満であった。したがって、本研究での抑うつ症状は大部分が軽度のものであり、中等度のもは一部であったといえる。また、SRQ-D、SDS、更年期アンケートは自己評価式であり、自覚症状を

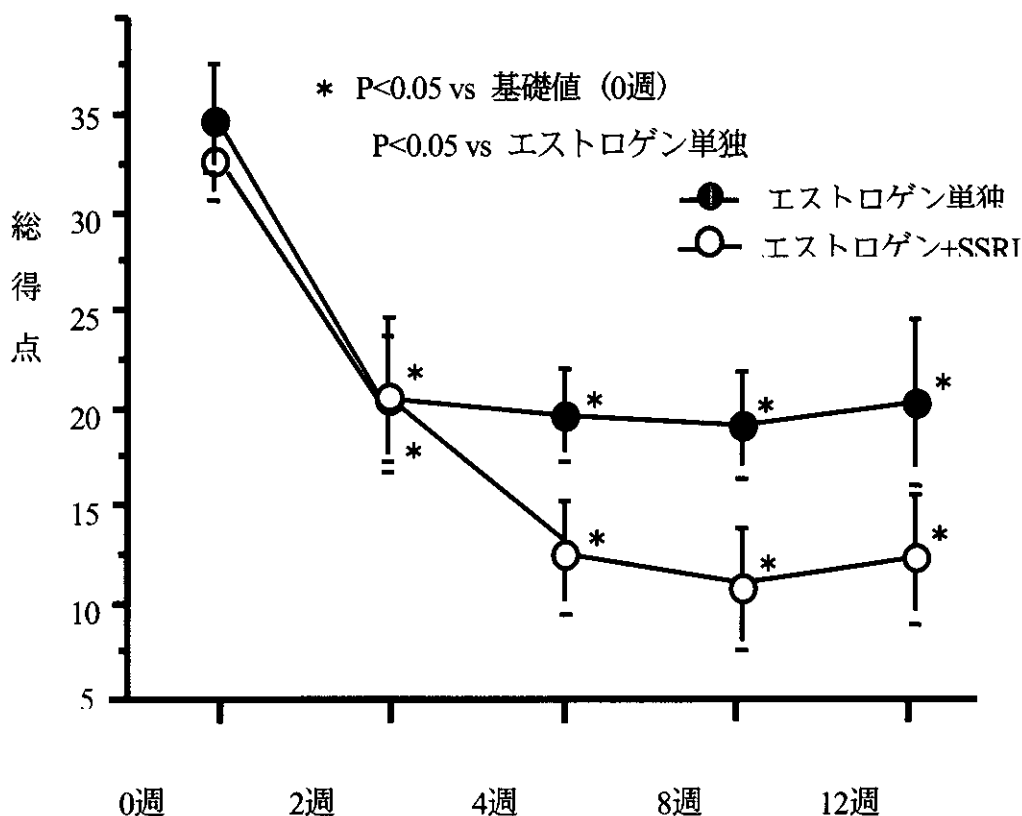


図4. 更年期アンケートの推移

表しているのに対して、HDRS は検者により客観的に評価されるので、他覚症状を表している。

抑うつ症状に対するエストロゲン単独の効果を表す指標をして、ERT 群の平均スコアは SRQ-D、SDS とともに 2 週間後に有意に低下して、以降 4~12 週後にかけてではほぼ同じスコア値で推移している。これに対して、HDRS では平均スコアは 2 週後に有意に低下した後、4~12 週後にかけて更に低下する傾向を示した。この HDRS に関する限り、ERT 群の平均スコアの変化は次に述べる ERT+SSRI 群のそれとほとんど同じ変化を示した。これらの事実は、抑うつ症状はエストロゲン投与 2 週間には自覚症状として有意に改善されるが、4~12 週後にかけてはそれ以上の改善はなく、ほぼ同じ状態が維持される。一方、他覚症状としてその内容を評価すると、4 週後以後も更に症状が改善していることを意味しているものと思われる。また、更年期アンケートの平均スコアの変化も、SRQ-D、SDS とほぼ同じ推移をたどった。

一方、ERT+SSRI 群での抑うつ症状に対する効果は、SRQ-D、SDS、HDRS のいずれでも 2 週間後に有意に現れるが、4~12 週後にかけて更に改善した。つまり、自覚症状としての抑うつ症状の改善は、2 週後より 4~12 週後の方が大きく、QOL (quality

of life) の改善という点からは、併用療法の方が効果が大きいことが判明した。更年期アンケートについても全く同じことが言えるが、両群ともまだ例数が少なく、例数を追加して更に検討する必要がある。

E. 結論

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、エストロゲン単独の補充療法も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は更に改善する。

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報告 (第2報)

A. 研究目的

平成 10～12 年度厚生省長寿科学総合研究事業の「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研究」(大内尉義主任研究者) および平成 13 年度厚生省長寿科学総合事業「老年者に対するホルモン補充療法に関する総合的研究」(武谷雄二主任研究者) の分担研究で、HRT が大脳および小脳の脳血流に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。特に一昨年度は、休薬期間を置いた周期的順次投与方法では大脳および小脳の脳血流増加は3年間は維持されるが、通常量併用持続療法〔結合型エストロゲン (CEE) 0.625mg/日+酢酸メドロキシプロゲステロン(MPA)2.5mg/日〕では大脳血流量の有意な増加は認められなかったことを報告した。一方、小脳血流量では3週後と半年後に有意な増加が認められたが、1年後には投与前値のレベルに戻り、大脳血流量と小脳血流量に対する併用持続療法の効果に乖離が認められた。併用持続療法で大脳血流量に有意な血流増加が認められなかった原因として、エストロゲンの長期持続投与によるエストロゲンレセプターの減少(down-regulation)と黄体ホルモン併用の影響(エストロゲン効果の抑制)という2つの異なった因子による影響であると推察された。2つの因子のうちどちらがより関与しているかを明らかにするために、子宮摘出後の閉経後女性に CEE0.625mg/日を単独で持続投与して脳血流量の推移を観察した。昨年度はその第1報として投与後6週、半年、1年について報告したが、本年度は症例数を増やすとともに、投与後6週、12週、半年、1年および2年の脳血流について第2報として報告する。

B. 研究方法

対象と方法

当科更年期外来を受診中で既に子宮を摘出している閉経後女性 20 名（平均年齢±SD: 51.0±4.9 歳）を対象として、CEE0.625mg/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、^{99m}Tc-ECD 法と用いて松田らの方法により定量的に測定した。統計的処理は、paired t-test を用いて行った。

C. 研究結果

CEE 投与前後の平均大脳血流量(CBF)の推移と変化率を表 1 に示した。

表 1 CEE/0.625mg/日単独持続療法前後の大脳血流量(CBF)の推移と変化率

	基礎値 n=20	6週後 n=20	12週後 n=14	半年後 n=16	1年後 n=16	2年後 n=7
CBF (ml/100g/min)	45.5±2.9	46.6±3.7 *	49.0±4.1 *	46.5±4.0	47.2±4.5	*47.2±5.2
変化率	————	2.5±4.4	6.1±7.4	1.6±6.7	3.3±6.2	1.3±8.4

Mean±SD * P<0.05 vs 基礎値

6 週後と 12 週後の平均 CBF は有意に（いずれも p<0.05）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（p<0.05）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、平均小脳血流量（Cb1BF）は 6 週後と 12 週後に有意に（それぞれ p<0.05 と P<0.01）増加したが、半年後は有意ではなかった（表 2, 次ページ）。しかし、1 年後には再び有意な増加（p<0.01）が認められただけでなく、2 年後も有意な増加（p<0.05）が観察された。

D. 考察

一昨年度の大内班で報告した CEE 0.625mg/日の通常量併用持続療法では、3 週後、半年後および 1 年後の平均 CBF は、いずれも有意な変化は認められなかった。しかし、3 週後と半年後の Cb1BF は、いずれも投与前値に比べて有意に（p<0.05）増加したが、1 年後には投与前値まで低下した。昨年度の結果から、黄体ホルモン(MPA)

表2 CEE/0.625mg/日単独持続療法前後の小脳血流量(Cb1BF)の推移と変化率

	基礎値 n=20	6週後 n=20	12週後 n=14	半年後 n=16	1年後 n=16	2年後 n=7
Cb1BF (ml/100g/min)	51.8±4.1	52.9±4.2 *	56.1±3.1 *	53.4±4.9	54.2±4.5 *	55.32±6.2 *
変化率	—————	3.0±4.3	7.9±4.5	4.4±8.1	5.6±6.7	2.8±6.5

Mean±SD * P<0.05 vs 基礎値 * P<0.01 vs 基礎値

併用の影響を除いたエストロゲン単独の持続投与の場合には、6週後のCBFは有意に増加するが、半年後と1年後のCBFでは有意な増加が認められないことが判明した。つまり、エストロゲン投与開始後6週間までは有意に増加していたCBFも半年後以降は脳内エストロゲンレセプターの減少により脳血流の増加作用が消失することが推察された。一方、小脳血流量は6週後と1年後に有意に増加していた。本年度の報告では全体の症例数を増やすとともに、12週後と2年後についても報告した。その結果、CBFは半年後と2年後に有意な増加が認められず、また、Cb1BFは半年後のみ有意な増加が認められなかった。このことは、エストロゲンを連続投与していると、大脳、小脳とも血流量は増加と減少を繰り返すことを意味している。しかし、減少しても2年以内であれば、投与前値以下に低下することはなかった。エストロゲンを連続投与することによって、増加していた脳血流が低下することはエストロゲンレセプターのdown-regulationで説明できるが、それに続く増加はエストロゲンレセプターのup-regulationが起こるのであろうか。その機序は不明であり、今後検討を要する重要な課題である。

E. 結論

CEE 0.625mg/日単独の持続療法を続けていると、大脳、小脳とも一定期間は脳血流は増加するが、やがて減少してほぼ基礎値にまで低下する。しかし、一定期間後には再び増加して、後に再び降下することが判明した。エストロゲン単独を連続投与していると、エストロゲンレセプターのdown-regulationとup-regulationが繰り返されるのではないかと推察された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Hoshimoto K, Hayashi M, Ohkura T: Mature adrenomedullin concentrations in plasma during pregnancy. *J Matern-Fetal Inves Medicine*. 11:126-129, 2002.
- 2) Hayashi M, Ueda Y, Hoshimoto K, Ota Y, Fukasawa I, Sumori K, Kaneko I, Abe S, Uno M, Ohkura T, Inaba N: Changes in urinary excretion of six biochemical parameters in normotensive pregnancy and preeclampsia. *Am J Kidney Dis* .39(2)2, : 392-400, 2002.
- 3) Hayashi M, Hoshimoto K, Ohkura T, Inaba N: Increased levels of macrophage colony-stimulating factor in the placenta and blood in preeclampsia. *Am J Reprod Immunol* .47:19-24, 2002.
- 4) Hayashi M, Inoue T, Hoshimoto K, Hirabayashi H, Negishi H, Ohkura T: The levels of five markers of hemostasis and endothelial status at different stage of normotensive pregnancy. *Acta Obstet Gyn Scan*. 81 : 208-213, 2002.
- 5) Hayashi M, Ohkura T: Elevated levels of serum macrophage colony-stimulating factor in normotensive pregnancies complicated by intrauterine fetal growth restriction. *Exp Hematol*. 30 : 388-393, 2002.
- 6) Hayashi M, Hoshimoto K, Ohkura T: Changes in blood macrophage colony-stimulating factor levels after cesarean section normotensive pregnancy and preeclampsia. *Am J Med Sci*. 324 : 5-9, 2002.
- 7) Hoshimoto K, Komine F, Hayashi M, Ohkura T: Plasma soluble Fas changes during early pregnancy and miscarriage. *Clin Chim Acta*. 323 : 157-160, 2002.
- 8) Hayashi M, Inoue T, Hoshimoto K, Negishi H, Ohkura T: Characterization of five marker levels of the hemostatic system and endothelial status in normotensive pregnancy and preeclampsia. *Eur J Haematol*. 69 : 297-302, 2002.
- 9) Wang SJ, Sakamoto T, Yasuda S, Fukasawa I, Ota Y, Hayashi M, Ohkura T, Zheng JH, Inaba N: The relationship between telomere length and telomerase activity in gynecologic cancers. *Gynecol Oncol*.84 : 81-84, 2002.
- 10) 小峰富美子、星本和倫、星本和種、林 雅敏、大藏健義：凍結融解後のヒト精子生存率と高速直進精子の関係. *臨床婦人科産科*, 56 (9) : 1167-1171, 2002.

2. 学会・研究会発表

- 1) Ohkura T: Comparison between the effects of long-term sequential versus continuous estrogen and progestogen therapy on cerebral blood flow in postmenopausal women, 13th Annual Meeting of the North American Menopause Society, Chicago, Abstracts p.66, October, 2002.

- 2) Hayashi M , Tomobe K , Hoshimoto K , Ohkura T : M-CSF levels in benign and malignant ovarian tumors, The 9th Biennial Meeting oh the International Gynecologic Cancer Society, Seoul, Int J Gynecol Cancer.12 : 573, October, 2002
- 3) 大藏健義 : ホルモン補充療法. 久喜市医師会講演 招請講演、埼玉、2002.6.
- 4) 大藏健義 : 加齢と脳機能 (脳血流を中心に) . 第 7 回産婦人科医の更年期 ME 研究会 招請講演、東京、2002.6.
- 5) 大藏健義 : 脳血流と記憶に及ぼす HRT の効果. 第 17 回日本更年期医学会学術集会 教育講演、鹿児島、2002.10、プログラム・要旨集 pp.69.
- 6) 望月善子、大津礼子、大石 曜、大藏健義、稲葉憲之 : ホルモン補充療法における骨量増加作用について. 第 54 回日本産婦人科学会総会学術講演会、東京、2002.4.
- 7) 濱田佳伸、大藏健義 : 更年期外来における骨塩量(BMD)と胸焼け (胃食道逆流症 : GERD) の関連. 第 17 回日本更年期医学会学術集会、鹿児島、2002.10、プログラム・要旨集 pp.81.
- 8) 大藏健義 : 更年期の物忘れアンケート調査に関する検討 (第 2 報) . 第 17 回日本更年期医学会学術集会、鹿児島、2002.10、プログラム・要旨集 pp.88.

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

- I. 17β -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
- II. 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～

分担研究者 本庄英雄 京都府立医科大学教授

【研究要旨】

- I. 17β -estradiol (E_2)、non-feminizing estrogen J861 および α -tocopherol が単球の血管内皮への接着に及ぼす影響を、血管モデルをつくりより生体に近い状態で観察した。単球の血管内皮への接着は E_2 ではほとんど抑制されなかった。J861 は α -tocopherol とほぼ同等の抑制力を示し、 $10^{-5}M$ では約 60%まで単球の血管内皮への接着を減らした。この機序は J861 や α -tocopherol により血管内皮の E-selectin、ICAM-1 の発現が抑制されることによることを分子レベルで検討した。
- II. 17β -estradiol (E_2) がタウ蛋白のリン酸化に及ぼす影響を定量的に観察した。生理学的濃度の E_2 でリン酸化タウ蛋白発現量が 15～20%有意な減少を認めた。 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ことが示唆された。

A. 研究目的

閉経後に女性の心血管性疾患が著しく増加することより、エストロゲンと動脈硬化との関連が注目されるようになった。臨床的にエストロゲンは血清HDL-C レベルを増加させ、LDL-C レベルを減少させ血清脂質プロファイルを改善することが知られているほか、基礎的にも種々の抗動脈硬化作用が証明されている。しかし2002年7月の米国 WHI の報告によれば、エストロゲンの動脈硬化に対する一次予防は否定的であった。

動脈硬化の進行機序において単球の血管内皮への接着、侵入、血管壁での貪食、増殖という段階をへることが知られている。単球の血管内皮への接着もrolling, firm adhesion という2段階をへる。Rolling には血管内皮上に発現したE-selectin が単球の sialy X との結合が関与し、firm adhesion には血管内皮上に発現した ICAM-1 と単球の Mac-1 との結合が関与するといわれ、これら接着因子の産生はエストロゲンにより減少することが分子レベルで示され、エストロゲンにより単球の内皮への接着が減少すると考えられる。今回我々は 17β -estradiol (E_2)、J-861、 α -tocopherolが単球の血管内皮への接着の段階で及ぼす効果を検討した。生体内の血管内皮、血流状態に似た

モデルを作成し、単球が内皮に接着する様子を肉眼的に観察したことは、分子レベルでは漠然としか把握できなかったエストロゲンの効果を視覚に捕らえるという意味で、意義のあることと考えられる。今回使用したJ-861は 17α -estradiol の誘導体で、ステロイド環の8,9位が二重結合となっており、Dリングがメチル化された構造をもつ。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で、アルツハイマー病の治療、予防薬としても今後期待される。HRT をより長期にわたって行い、より高い効果を得るには、乳腺や子宮にたいするトラブルに適切に対処することが重大事項であり、J-861 がエストロゲンにも劣らぬ抗動脈硬化作用を有せば、中高年女性の QOL を改善するうえで理想的な薬剤といえるだろう。

B. 研究方法

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) をゲラチンとフィブロネクチンをコートしたガラススライド上で培養した。培養液中に 10^{-7}M , 10^{-6}M , 10^{-5}M の各薬剤 E₂, J861, α -tocopherol を添加し、24 時間培養した。培養後 20U/ml の IL-1 β で 4 時間刺激した。骨髓腫由来の単球 U937 細胞を HBSS1ml 中に 10^5 個となるように灌流液を調整した。内皮が付着したガラス壁にかかる流圧は 1.0 dyne/cm^2 に調整し、液を 7 分間灌流した。U937 細胞が HUVEC に接着する様子をビデオテープに撮影記録した後、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た。接着した U937 細胞の数を mm^2 あたりに換算し、薬剤を添加せずに IL-1 β (20U/ml) で 4 時間刺激したときに 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。

また分子レベルからも単球の血管内皮の接着の機序を、E-selectin, ICAM-1 を測定することにより検討した。HUVEC を 96well の組織培養プレートで培養後、E₂, J861, α -tocopherol の各薬剤を 10^{-7}M , 10^{-5}M の濃度で添加し 24 時間培養した。別に ICI 182700 (エストロゲンレセプター阻害薬) 10^{-4}M を付加したプレートを作成した。培養細胞を IL-1 β (20U/ml) で 4 時間刺激した。ELISA (streptavidin-biotin 法) を施行後、吸光度を 490nm の波長で測定した。薬剤を添加せずに IL-1 β (20U/ml) で 4 時間刺激したときの測定値をコントロール (100%) として、各薬剤の各濃度における値を比較した。

C. 研究結果

E₂ を添加した場合、 10^{-7}M で 96%、 10^{-6}M で 88%、 10^{-5}M で 71% にまで、濃度依存性に HUVEC に接着した U937 細胞の数は減少した。J-861 を添加した場合、 10^{-7}M で 92%、 10^{-6}M で 74%、 10^{-5}M で 58% にまで、濃度依存性に HUVEC に接着した U937

細胞の数は減少した。 α -tocopherol を添加した場合、 10^{-7}M で 91%、 10^{-6}M で 71%、 10^{-5}M で 57%にまで、濃度依存性に HUVEC に接着した U937 細胞の数は減少した。

HUVEC における E-selectin の発現は J861 により、 10^{-7}M で 82%、 10^{-5}M で 68%と濃度依存性に抑制され、 α -tocopherol により 10^{-7}M で 80%、 10^{-5}M で 66%と濃度依存性に抑制された。 10^{-5}M の J861 に ICI 182700 を付加したところ 78%に抑制され、 10^{-5}M の α -tocopherol に ICI 182700 を付加したところ 68%に抑制された。HUVEC における ICAM-1 の発現は J861 により、 10^{-7}M で 78%、 10^{-5}M で 56%と濃度依存性に抑制され、 α -tocopherol により 10^{-7}M で 77%、 10^{-5}M で 52%と濃度依存性に抑制された。 10^{-5}M の J861 に ICI 182700 を付加したところ 64%に抑制され、 10^{-5}M の α -tocopherol に ICI 182700 を付加したところ 54%に抑制された。

D. 考察

HUVEC を 20U/ml の濃度の IL-1 β で刺激したが、これはショック時における生理的濃度であるといわれている。局所炎症部における IL-1 β の濃度が計測できないため、この濃度で刺激した。HUVEC が付着したガラス壁にかかる流圧は 1.0 dyne/cm² に調整したが、この圧は生理的血流で血管壁にかかる圧と同等である。U937 細胞はヒト骨髓腫由来の単球であるが、血管壁に侵入する能力はないといわれる。生理的状态に似たモデルを作成し、単球の血管内皮への接着の様子を観察しえた。 10^{-7}M の E₂ では単球の血管内皮への接着をほとんど抑制することができなかった。E₂ の生理的濃度は 10^{-10}M から 10^{-9}M であるので、おそらく生理的濃度の E₂ では単球の血管内皮への接着を抑制することは不可能と思われる。J861 は α -tocopherol とほぼ同様に単球の血管内皮への接着を抑制した。 10^{-5}M の α -tocopherol は生体に投与可能な濃度であり、単球の血管内皮への接着を約 60%にまで抑えることができた。J861 の生体への投与可能濃度は現在わかっていないが、J861 は子宮や乳腺にほとんど作用しないことを考えると E₂ より高い濃度を投与することも可能であるとおもわれる。接着を抑制する機序は、E-selectin や ICAM-1 といった接着因子の血管内皮上での発現が抑制されることによることが、当研究から示唆される。これらの接着因子の抑制は α -tocopherol に ICI 182700 を付加したときにはほとんど変わらなかったが、J861 に ICI 182700 を付加したときには抑制効果が完全にではないが阻害されたことより一部エストロゲンレセプター (ER) を介するものであると思われる。HUVEC には ER α の存在は認めなかったが、ER β の存在を認めた。 α -tocopherol は生理的濃度で、動脈硬化進展の第 1 段階である接着を強く抑制する。J861 は α -tocopherol とほぼ同等の接着抑制力をもつことが示唆されたが、生体へのどの程度の濃度まで投与可能であるかという問題がある。

E. 結論

J861 は α -tocopherol とほぼ同等に単球の血管内皮への接着を抑制する。接着抑制の機序は血管内皮上の E-selectin、ICAM-1 といった接着因子の発現抑制によると考えられる。J861 の接着因子発現抑制は ER を介さない直接作用と、おそらく ER β を介する経路が考えられる。

II. 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～

A. 研究目的

ホルモン補充療法 (HRT) は Alzheimer 病 (AD) の予防に有効であることが、多くの疫学的報告によりほぼ明らかとなった。AD の病理組織学的特徴として老人斑 (SP) と神経原繊維変化 (NFT) が挙げられる。NFT は SP に比べ AD 特異性は低いが、NFT の出現部位と神経細胞の脱落部位はよく一致し、AD 病状との関連性が高いといわれている。NFT は Paired helical filament (PHF) で構成され、PHF の生成にはタウ蛋白のリン酸化が関与しているといわれる。エストロゲンがタウ蛋白のリン酸化に及ぼす影響を調べた報告はほとんどない。以前の報告では、タウ蛋白のリン酸化はアンドロゲンにより抑制されるが、エストロゲンには影響されないとするもので、このことが男性に比べて女性の AD 発症が多い一因ではないかと推測されている。今回、エストロゲンがタウ蛋白のリン酸化に与える影響を追試検討した。

B. 研究方法

PC12 細胞 (ラットの褐色神経細胞腫由来) を NGF (nerve growth factor) 存在下にて neuronal phenotype に分化させ、アミロイド β ($A\beta$) 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た。 $A\beta$ を添加して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観察した。

C. 研究結果

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^{-10} 、 10^{-9} M E_2 で前培養した場合、コントロールに比較してリン酸化タウ発現量の有意な減少を認めた。 10^{-10} M E_2 で前培養した場合約 15%、 10^{-9} M E_2 で前培養した場合約 20% のリン酸化タウ発現量の減少を認めた。

D. 考察

今回の検討では生理的濃度である 10^{-10} , 10^{-9} M E₂ で前培養した場合、リン酸化タウ発現量は有意に減少した。エストロゲンは神経保護作用を有することが知られている。タウ蛋白のリン酸化を抑制することによって PHF の生成減少から NFT の減少につながる事が予測される。NFT は AD の病理組織学的所見としてよく知られているが、NFT が神経細胞死にどのように関わっているかは不明である。NFT の減少によっても、エストロゲンが AD 発症予防に作用する可能性があることが示唆された。今回の結果は以前の報告との間に discrepancy があるので今後さらに検討を要する。

E. 結論

生理学的濃度でエストロゲンはタウ蛋白のリン酸化を抑制し、PHF 生成を抑え NFT 減少させることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, Koshihara H, Kitaoka Y, Honjo H. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2002; 83(1-5):149-55.
- 2) Ishihara H, Kitawaki J, Kado N, Koshihara H, Fushiki S, Honjo H. Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas. *Fertil Steril.* 2003; 79(3 Suppl 1):735-42.
- 3) Tatsumi H, Kitawaki J, Tanaka K, Hosoda T, Honjo H. Lack of stimulatory effect of dienogest on the expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 by endothelial cell as compared with other synthetic progestins. *Maturitas.* 2002; 42(4):287-94.

2. 学会・研究会発表

- 1) 本庄英雄. 更年期と痴呆. 第 43 回日本母性衛生学会総会、2002 年 9 月、旭川 <抄録: 母性衛生 43(3): 29>
- 2) 岩佐弘一, 本庄英雄. 更年期におけるエストロゲン補充療法と中枢神経機能—エストロゲンとアルツハイマー病. 第 75 回日本内分泌学会学術集会、2002 年、4

月、大阪 <抄録: 日本内分泌学会雑誌 78(1): 24>

- 3) 辰巳弘, 北脇城, 細田哲也, 田中一範, 本庄英雄. J861 が単球の血管内皮への接着に及ぼす影響. 第 54 回日本産科婦人科学会総会, 2002 年 4 月, 東京 <抄録: 日本産科婦人科学会雑誌 54(2): 47>

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>

岩佐 弘一 京都府立医科大学産婦人科助手

厚生科学研究費補助金（長寿科学研究事業）

分担研究報告書

高齢者に対するホルモン補充療法の総合的検討

分担研究者 林 登志雄

名古屋大学大学院医学系研究科講師

【研究要旨】

1) 後期高齢者に対するホルモン補充療法の基礎検討—エストリオール (E3、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。血管内皮機能の改善、骨塩量の有意な上昇が認められた。 2) E3 の抗動脈硬化作用の検討—E3 は保険適用されているが女性ホルモンとしての血管への作用は十分に検討されていない。高コレステロール食負荷家兔 (0.5%、12 週間飼育) を用いて E3 と 17 β -estradiol (E2) の抗動脈硬化作用を検討した。E3 (0.3mg/kg/day) 投与は、E2 に匹敵する抗動脈硬化作用を示した。 3) ヒト由来マクロファージの NO 及び活性酸素放出能の検討—サイトカイン刺激で双方が上昇し、エストロゲン前処置はこれを押さえたが、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。

A. 研究目的

後期高齢者に対する少量の女性ホルモンによるホルモン補充療法の有用性を検討する。エストリオール (E3) の抗動脈硬化作用を検証する。進行動脈硬化病変には iNOS 及び活性酸素生成酵素が亢進している。女性及び男性ホルモン製剤の影響を検討した。

B. 研究方法

1) 後期高齢者に対するホルモン補充療法の基礎検討

性器外作用に比し性器作用が弱く、保険適用されているエストロゲン製剤、E3 (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) E3 の抗動脈硬化作用の検討

E3 は保険適用されているが、女性ホルモンとしての血管への作用は未だ十分に検討されていない。そこで高コレステロール食負荷家兔 (0.5%、12 週間飼育) を用いて E3 と 17 β -estradiol (E2) の抗動脈硬化作用を検討した。E3 (0.3mg/kg/day) 投与群とは、E2 (0.1 mg/kg/day) 群を比較した。

3) ヒト由来マクロファージの NO 及び活性酸素放出能の検討

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 γ 、TNF α 等のサイトカイン刺激で iNOS、活性酸素産生酵素を刺激し、これ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。

活性酸素放出酵素として NADPH oxidase 阻害剤、Xanthine/Xanthine oxidase 阻害剤、iNOS 阻害剤、NOS 阻害剤、及び前者と後者の共処置の効果を增強した。

(倫理面への配慮)

対象となる患者さんには書面で同意を得た。また、同意の撤回は自由とした。

C&D. 研究結果と考察

1) 後期高齢者に対するホルモン補充療法の基礎検討

E3 (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。血管内皮機能の改善、骨塩量の有意な上昇が認められた。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) E3 の抗動脈硬化作用の検討

E3 は女性ホルモンとしての血管への作用は十分に検討されていない。高コレステロール食負荷家兎 (0.5%、12 週間飼育) を用いて E3 と E2 の抗動脈硬化作用を検討した。E3 (0.3mg/kg/day) 投与は、E2 (0.1 mg/kg/day) に匹敵する抗動脈硬化作用を示した。

3) 培養ヒト由来マクロファージ THP1 の NO 及び活性酸素放出能の検討

サイトカイン刺激で双方が上昇し、エストロゲン前処置はこれを押さえたが、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 阻害剤の効果を增強した。

E. 結論

1) 後期高齢者に対するホルモン補充療法の基礎検討

E3 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。血管内皮機能の改善、骨塩量の有意な上昇が認められた。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) E3 の抗動脈硬化作用の検討

E3 (0.3mg/kg/day) 投与は、E2 (0.1 mg/kg/day) に匹敵する抗動脈硬化作用を示した。

3) 進行動脈硬化症では病変深部に iNOS が存在するが、低酸素領域でもありヒト由来マクロファージが同一刺激で iNOS のみならず NADPH oxidase を産生することと、性ホルモンに特殊な作用が認められたことは興味深い。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura H, Hayashi T, Esaki T, Kanda S, Kano H, Hattori A, Iguchi A. Standardization of plasma brain natriuretic peptide concentrations in older Japanese-relationship to latent renal dysfunction and ischemic heart disease. *J Am Geriatr Soc.* 2002 ;50:1504-9
- 2) Kano H, Hayashi T, Sumi D, Matusi-Hirai H, Tsunekawa T, Endo H, Iguchi A. Estriol retards and stabilizes atherosclerosis through an NO-mediated system. *Life Sci.* 2002 71:31-42.
- 3) Hayashi T, Kano H, Sumi D, Iguchi A, Ito I, Endo H. The long-term effect of estriol on endothelial function and bone mineral density in octogenarian women. *J Am Geriatr Soc.* 2002,50:777-778.
- 4) Thakur NK, Hayashi T, Sumi D, Kano H, Matsui-Hirai H, Tsunekawa T, Iguchi A. Anti-atherosclerotic effect of beta-blocker with nitric oxide-releasing action on the severe atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002 Feb;39:298-309.
- 5) Sakuma I, Liu MY, Sato A, Hayashi T, Iguchi A, Kitabatake A, Hattori Y. Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen. *Br J Pharmacol.* 2002;135:48-54.
- 6) Taku Tsunekawa T, Hayashi T, Suzuki Y, Matsui-Hirai H, Kano H, Fukatsu A, Nomura N, Miyazaki A, Iguchi A. Plasma Adiponectin Plays an Important Role in Improvement of Insulin Resistance by Glimepiride in Elderly Type 2 Diabetics. *Diabetes Care* (in press)

2. 学会発表

- 1) 恒川 卓、林 登志雄、加納初世、平井寿子、深津亜樹子、井口昭久. 糖尿病自然発症ラット血管障害における NO-活性酸素系の関与. 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 p225>

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

QOLの向上を目指した至適ホルモン補充療法の策定

分担研究者 武谷雄二 東京大学大学院医学系研究科教授

【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) に障害を及ぼす病態を惹き起こす。これらの疾患を予防・治療し、高齢女性の健康を維持、増進するための方法として、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疾患の予防と治療が可能となる方法であるが、本邦においては十分に一般化しているとは言えず、高齢女性における HRT の適応の決定、実施法についても全くコンセンサスが得られていない。本研究班は、老年疾患全般の予防と治療を視野に入れた、本邦高齢女性に対する適切な HRT の確立を目指すものであるが、本分担研究では骨量減少の予防に有効な HRT の開発に関する研究を行い、本邦高齢女性の 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することを目的とした。そのために、さまざまな投与様式による HRT 施行中の対象女性の骨量の変化、性器出血の状態、子宮内膜組織像、超音波断層法による子宮内膜厚および血中ホルモンレベルの相互関係を解析し、対象に応じた最適な投与方法の個別化を検討した。

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 QOL に障害を及ぼす病態を惹き起こし、さらに骨粗鬆症、動脈硬化性疾患、老年痴呆、鬱状態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はじめとする女性ホルモンが急激に欠乏することにあるので、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、女性ホルモンの補充療法 (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いない。その理由として、性器出血などによりコンプライアンスがあまり好くないことなどが考えられる。また現在わが国では米国女性と同量のホルモン剤が投与されているが、日本人の体格や薬物代謝能などを考慮すると、米国女性よりも血中エストロゲン濃度が高くなり、性器出血などの有害事象の発生頻度が高くなる可能性がある。本研究班は、HRT に関する臨床と研究に実績をもつ老年病科医、内科医、婦人科医、および医療経済学者がチームを形成しているが、われわれは主に骨量減少の予防に有効な HRT の開発に関する分担研究を行い、本邦高齢女性の HRT の至適治療法、臨床上の注意点に関するガイドラインを策定することを目的とし、本邦高齢女性に対する適切な HRT の確立を目指すものである。