

厚生労働科学研究費補助金

地域医療基盤開発推進研究事業

根拠に基づく更年期障害治療推進のための洋漢統合医学的エビデンスの構築

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 並木 隆雄

平成22(2010)年 5月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告	
更年期障害患者における桂枝茯苓丸の治療効果とER・遺伝子多型	
研究代表者 並木 隆雄 千葉大学大学院医学研究院客員准教授	-----4
II. 分担研究報告	
1. 血中抗ミューラー管ホルモン値の経年変化と臨床的有用性の検討	
研究分担者 上野 光一 千葉大学大学院薬学研究院 教授	-----17
2. 健常男性における血中抗ミューラー管ホルモン値の経年変化の検討	
研究分担者 地野 充時 千葉大学大学院医学研究院 助教	-----28
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----37
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----38

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
（総括・分担）研究報告書

更年期障害患者における桂枝茯苓丸の治療効果とER・遺伝子多型
研究代表者 並木 隆雄 千葉大学大学院医学研究院 客員准教授

研究要旨 個人差を考慮し、患者一人一人に合った医療を提供するテーラーメイド医療の実現に向けて、男女の差である性差および遺伝子多型に注目し研究を行なった。ホルモン補充療法と桂枝茯苓丸の効果を無作為化試験で検討したがHRTで脱落例が多く、ホルモン補充療法との比較ができなかった。したがって、桂枝茯苓丸の有効性とERβ遺伝子多型との相関について検討した。その結果、SSgenotypeにおいて、Kupperman indexにおいて、桂枝茯苓丸が優位に有効であった。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

上野光一・千葉大学大学院薬学研究院
薬理学・高齢者薬剤学・教授

地野充時・千葉大学大学院医学研究院
院・先端和漢診療学・助教

A. 研究目的

本研究は、更年期障害症状のうちホルモン補充療法（HRT）と桂枝茯苓丸（KB）の効果を無作為に比較することで、桂枝茯苓丸がどの症状により有効性があるか検討するとともに、桂枝茯苓丸有効例と無効例についてエストロゲン受容体遺伝子多型解析で識別しようとするものである。これにより桂枝茯苓丸有用性の科学的エビデンスが蓄積できるとともに、桂枝茯苓丸の服用効果が期待できる患者を推定でき、漢方療法のエビデンス、漢方製剤の適正使用を遺伝子多型解析という新たな切り口から確立できることを目的とする。

B. 研究方法

対象患者：問診などにより更年期障害と診断された女性患者。

ただし、1. 子宮または卵巣の手術、合併症がある症例 2. 甲状腺機能亢進症および甲状腺機能低下症を発

症した症例 3. 血管拡張作用を有する薬剤を服用している症例を除く。

上記患者にエストロゲン受容体の遺伝子多型（ERβ：CAリピート数及びRsa多型）を解析し、SS型群（両アレルともCAリピート数21以下）とその他群に分け、それぞれについて、無作為にHRTまたはKBを処方する。12週後に症状を調査し、KB群とHRT群における有効性・有用性頻度を統計解析することにより、更年期障害の治療と遺伝子多型の相関、症状の改善度を明らかにしようとするものである。

問診表—患者用

Kupperman index：問診表(表1)

Simplified menopausal index (SMI)：問診表(表2)

既往歴・併用薬・がん検診の有無等の問診表

寺澤の気血水スコア(表3)

自己評価式抑うつ性尺度 (Self-rating Depression Scale：SDS)

SF-36 (MOS Short-Form 36-Item Health Survey)

治療効果調査は診察および書面を用いる対面聞き取り方式で行った。治療前後で更年期障害の自覚スコアおよび他覚スコアを求める。

遺伝子解析は患者より末梢血を採取し、DNAを抽出する。PCRによりER遺伝子領域を増幅し、ダイレクトシーケンス法、DNAフラグメント解析法およびRFLP法を用いて多型解析を行う。

●血液検査項目

卵胞刺激ホルモン (FSH)

17β-エストラジオール (E2)

抗ミュラー管ホルモン (AMH)

血清 FSH 濃度 40 mIU/mL 以上または血清 E2 濃度 20 pg/mL 以下または血清 AMH 濃度 14.28 pmol/L 以下のいずれかを満たす者

【遺伝子多型解析とランダム化による群決定】

同意を取得した患者の血液より ERβ 遺伝子 CA リピート多型の解析を行った。CA リピート数が 21 以下を S allele、22 以上を L allele とし、SS genotype・非 SS genotype (SL+LL) に分け、ランダム化封筒法による抽選を行い、治療群を決定した。

桂枝茯苓丸 (KBG) 群：

ツムラ桂枝茯苓丸エキス顆粒 (医療用)

7.5g 分 3 day 1~day 28 の 28 日間

ホルモン補充療法 (HRT) 群：ディビゲル®

1mg (エストラジオール軟膏剤)

1包 day 1~day 28 の 28 日間

1日1回 左右いずれかの大腿部もしくは下腿部の約 400 cm²の範囲に塗布

プロベラ®錠 2.5mg (メドロキシプロゲステロン酢酸エステル錠)

2錠 分 2 day 15~day 28 の 14 日間

【治療】

桂枝茯苓丸およびホルモン補充療法剤を処方し、3ヶ月間服用していただいた。期間中、1ヶ月ごとに来院していただき、治療経過を観察した。明らかに治療効果がみられなかった場合や副作用が生じた場合、他の漢方薬に変更した。

(倫理面への配慮)

研究は、生命倫理委員会の承認を得て実施した。対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意 (インフォームド・コンセント) については、生命倫理委員会に提出した書類に基づいて行った。

また本研究はヘルシンキ宣言

(2000年 英国エジンバラ改訂版) に基づく倫理的原則に従っている。

C. 研究結果 (図表は業績の後に添付)

2008年11月~2009年12月の期間に27名の患者のエントリーがあった。2009年12月31日までに治療開始から3ヶ月目の診察を終了した患者は22名であった。このうち除外項目がなく、ホルモン基準値を満たし、ランダム化比較試験に組み込むことができた患者は7名であった。除外項目があった患者は15名で、ホルモン基準値を満たさなかった方が5名、子宮筋腫・子宮がんの既往があった方が6名、HRTの副作用歴のあった方2名、甲状腺疾患の治療中であった方が1名、重度の関節リウマチの治療中であった方が1名であった。ランダム化に組み込まれた7名のうち桂枝茯苓丸群は6名、HRT群1名であった (図1)。HRT群に組み込まれた患者1名は治療を開始したが、副作用発現により治療中止となり、漢方薬での治療を行うこととなった。現在HRT群で3ヶ月間の治療を終えた患者はいない状況である。このため本報告では、2009年12月31日までに治療開始から3ヶ月目の診察を受けた患者のうち、AMHが14.28 pmol/L以下で卵巣機能が低下していると考えられる21名について、遺伝子多型別に桂枝茯苓丸による治療効果の治療前後の比較を行った。21名の患者の治療群は図1の通りである。遺伝子多型解析によるgenotypeの結果については患者21名のCAリピート分布を図2にしめしたようになった、19リピートと24リピートを頂点とする二峰性の分布となった。CAリピート数の平均値は21.4であり、21リピートと22リピートを境に群分けを行ったところ、SS genotype 7名、SL genotype 8名、LL genotype 6名となった (表6)。genotypeごとの年齢、BMIなどの患者背景に差はみられなかった。治療効果の比較についてはgenotypeごとの年齢、BMI、初期症状、初診時ホルモン値の比較を表6に示す。初診時の各項目でgenotype間に差はみられなかったが、SS genotypeにおいてKupperman index 全体と精神神経症状が、S alleleを持つSS・SL genotypeにおいて血管運動神経症状が比較的強い傾向がみられた。更年期スコアの治療前後の比較を図3に、気血水スコアを表に示す。また、初回測定時の血清AMH濃度と治療前後の女性ホルモン値は治療前後のいずれのスコアにおいてもgenotype間に差はみられなかった。各genotypeにおける治療前後のスコアを比較したところ、更年期症状の全体スコアにおいては、Kupperman index においてSS genotype で有意な改善がみられ、SMIではすべてのgenotype において有意な改善がみられた (図3A)。

血管運動神経症状（顔がほてる、汗をかきやすい、腰や手足が冷える、息切れするの4項目）では、Kupperman index および SMI において L allele を持つ LL・SL genotype で有意な改善がみられた。気血スコアに関しては気虚スコア (Fig. 4 A) において LL genotype で、血虚スコア (Fig. 4 D) において S allele を持つ SS・SL genotype で、瘀血スコア (図 4 E) において L allele を持つ LL・SL genotype で有意な改善がみられた。治療前の血清 AMH 濃度は LL genotype が高い傾向にあったが、ほとんどの患者で正常範囲 (14.28~48.55 pmol/L) を下回っていた。血清 FSH 濃度と血清 E2 濃度は両ホルモンとも個人差が大きかった。更年期の基準値は FSH が 40 mIU/mL 以上、E2 が 20 pg/mL 以下であるが、初診時にこの条件を満たした患者は、すでに閉経している患者 10 名中 FSH は 6 名、E2 は 7 名であった。

桂枝茯苓丸の治療効果に関し、Kupperman index の重症度に変化があった場合、血管運動神経症状は全 12 点中 3 点以上改善した場合を効果があったとみなし、genotype 別に比較を行った。その結果、全体スコアにおいて LL genotype で有意な差はみられなかったが total score の改善した患者の割合が高く、血管運動神経症状において LL genotype で有意に改善した患者が多かった (表 7)。また、血管運動神経症状の効果の有無を allele ごとに比較したところ (図 5)、24 allele を持つ人で特に効果があり、19 allele を持つ人で効果がみられない場合が多かった。

D. 考察

今回の研究の結果、SS genotype において桂枝茯苓丸の Kupperman index の重症度での治療効果が有意に高かった。また、L allele を持つ LL genotype と SL genotype において、SMI での重症度や血管運動症状および瘀血に対し効果がみられた。以前の研究においては SS genotype で症状が強く、HRT を行っている患者が多かったという結果であった (1, 2)。今回の研究では治療前のスコアに genotype 間で有意な差はみられなかったが、SS genotype において更年期スコアの総合点および精神神経症状が高い傾向がみられ、以前の研究と同様の傾向がみられたと考えられる。

また、S allele を持つ SS・SL genotype においては血虚スコアが改善し、血管運動神経症状以外の症状が改善されていることが示唆された。

漢方療法は古くから更年期障害治療に用いられ、HRT と同等 (3) の治療効果があるという報告や、更年期症状の中でも特にホットフラッシュに漢方製剤が効果を示すという報告がされている (4)。桂枝茯苓丸は瘀血の代表的治療薬であり、のぼせやほてりなどの血管運動神経症状に効果が高い報告がある (5)。LL genotype に対し桂枝茯苓丸が効果的であった。精神神経症状の比較的強い SS genotype では桂枝茯苓丸の単独療法では治療前後の有意な更年期スコアの改善はみられず、治療効果がみられた患者は半数弱にとどまった。他の漢方薬や HRT による治療、HRT と漢方の併用など、他の治療法のほうが効果的である可能性も考えられる。

桂枝茯苓丸の hot flash に対する作用の解明に、末梢血管の強い弛緩作用を示す CGRP (Calcitonin Gene-Related Hormone) に着目した研究が行われている。ラットに CGRP を投与すると皮膚温度が上昇し、卵巣摘出 (OVX: ovariectomized) を行うことでエストロゲン欠乏状態になっているラットに CGRP を投与するとさらに皮膚温度が上昇する。この OVX ラットに桂枝茯苓丸および E2 を投与すると皮膚温度が改善したと報告されている (6)。また、更年期障害患者の血中 CGRP 濃度を測定した研究では、hot flash の起こっている期間中に CGRP が上昇し、桂枝茯苓丸による治療を行ったところ治療前後で CGRP の減少がみられたと報告されている (7)。これらのことより桂枝茯苓丸の hot flash 改善作用は CGRP と関連していると考えられている。

Kupperman index により更年期症状の評価を行っている研究は世界で多く報告されており、HRT の剤形別評価の比較試験でも用いられている (8)。今回の研究では更年期症状の特に血管運動神経症状を表す“瘀血”の症状を漢方専門医により他覚的に評価も行っており、LL genotype において桂枝茯苓丸の治療により瘀血スコアが顕著に低下したことから、桂枝茯苓丸は LL genotype の患者の更年期症状を自覚的にも他覚的にも改善でき、効果がみられたということが示唆された。

更年期症状を訴え受診してくる患者のうち、子宮がんや子宮筋腫の既往歴を持つ患者が多数いた。子宮筋腫で子宮を摘出した患者では、エストロゲンの分泌が低下するため、更年期の症状が出やすい可能性が考えられる。これらの患者に HRT を行うことは子宮がん誘発のおそれはないため可能である。この場合、エストロゲン製剤のみの単独療法がガイドラインでは推奨されている(9)。一方、子宮筋腫でも摘出はせずに閉経による自然収縮で経過をとっている患者や、GnRH アナログの投与により筋腫を収縮させていた患者もいた。GnRH アナログでの治療を行っている場合、卵巣機能が低下するため、更年期の症状が出やすい可能性がある。これらの患者にエストロゲン製剤の使用によりホルモンを補充してしまうと、収縮していた腫瘍が悪化してしまう可能性があるため、禁忌または慎重投与となっている。また、ランダム化に組み込み HRT 群になった患者はプロゲステロン製剤により副作用が起こってしまった。この患者は閉経前であり、FSH・E2 は正常範囲であった。これらのことより、更年期障害で受診してくる患者にホルモン値での更年期診断で HRT を使用するのは困難な場合も多いことが明らかとなった。しかし、HRT ガイドラインに記載もあるように強いホットフラッシュ症状に効果的であるなど HRT のメリットもあるため、さらなる患者の組み入れを行い、ランダム化比較試験により効果を比較するのが望ましい。今回の検討では、日本人において、漢方薬を希望するものには、本人の希望だけでなく、子宮筋腫の合併などの合併症のために HRT の使用が難しいものなどが多い傾向があった。このため、多施設での検討などのかかなりの工夫が必要であると考えられた。

今後 ER β 遺伝子多型とエストロゲンの関係や、桂枝茯苓丸治療効果のメカニズム、AMH と更年期障害発症や病因との関係など、さらなる研究が期待される。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表 なし

2. 学会発表

1. Sugai H, Ugai K, Takeo C, Hirai A, Amano K, Namiki N, Sato H, Yamaura K, Muramatsu M, Ueno K : Association of ER β gene polymorphisms with climacteric symptoms. (国際東洋医学会、2010年 2月、幕張)
2. Kakikura H, Matsumoto Y, Sugai H, Ueno K, Hisanaga A, Kita T, Chino A, Namiki T, Terasawa K : Association of serum Anti-mullerian hormone (AMH) level for climacteric symptoms (国際東洋医学会、2010年 2月、幕張)
3. Kakikura H, Ito A, Matsumoto Y, Ueno K, Kaneko A, Hisanaga A, Kita T, Chino A, Namiki T, Terasawa K : Pharmacogenetics of keishibukuryogan therapy for climacteric symptoms (国際東洋医学会、2010年 2月、幕張)
4. 柿倉遙、並木隆雄、松本友香理、地野充時、伊藤彩乃、菅井波名、久永明人、喜多敏明、佐藤洋美、山浦克典、上野光一：更年期障害患者におけるエストロゲン受容体 β 遺伝子多型と桂枝茯苓丸の治療効果に関する研究 (第130回日本薬学会年会、2010年 3月、岡山)

H.引用文献

- (1) Takeo C, Negishi E, Nakajima A, Ueno K, Tatsuno I, Saito Y, Amano K, Hirai A 2005 Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with menopausal symptoms. *Gender medicine* 2(2):9-105
- (2) Takeo C, Ugai K, Araki J, Zhang L, Baba M, Ohashi W, Ueno K, Suzuki Y, Amano K, Hirai A, Muramatsu M 2008 Pharmacogenetics of hormone replacement therapy for climacteric symptoms. *Biochem Biophys Res Commun* 374(4):604-608
- (3) Ushiroyama T, Sakuma K, Nosaka S 2005 Rate of Identification of eight-principle pattern and physiological activity in women with climacteric symptoms in japanese kampo medicine. *Japanese Journal of Oriental Medicine* 56(5):779-787
- (4) Pan B, Kato Y, Sengoku K, Takuma N, Niizeki N, Ishikawa M 2004 Treatment of climacteric symptoms with herbal formulas of traditional chinese medicine. *Gynecol Obstet Invest* 57(3):144-148
- (5) 寺澤 捷年 症例から学ぶ 和漢診療学 1998 医学書院、東京
- (6) Noguchi M, Ikarashi Y, Yuzurihara M, Kase Y, Chen J, Takeda S, Aburada M, Ishige A 2003 Effects of the japanese herbal medicine keishi-bukuryo-gan and 17beta-estradiol on calcitonin gene-related peptide-induced elevation of skin temperature in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 176(3):359-366
- (7) Chen J, Shiraki M 2003 Menopausal hot flash and calcitonin gene-related peptide effect of keishi-bukuryo-gan, a kampo medicine, related to plasma calcitonin gene-related peptide level. *Maturitas* 45(3):199-204
- (8) Baksu B, Baksu A, Gker N, Citak S 2009 Do different delivery systems of hormone therapy have different effects on psychological symptoms in surgically menopausal women? A randomized controlled trial. *Maturitas* 62(2):140-145
- (9) 本邦におけるホルモン補充療法ガイドライン (案). 2009 日本産婦人科学会雑誌(1):35-97

(表1)症状の自覚スコア : Kupperman index

クッパーマン指数

氏名: _____ 年齢: _____ 日付: ____ / ____ / ____

次の質問を読んで、現在あなたの状態に 最もよくあてはまる と思われる欄の数字に ○印 をつけてください。すべての質問に答えて下さい。

症状の種類	症状の強さ				評価度	値	症候群
	強	中	弱	無			
顔が熱くなる(ほてる)	3	2	1	0	4		① 血管運動 神経障害様症状
汗をかきやすい	3	2	1	0			
腰や手足が冷える	3	2	1	0			
息切れがする	3	2	1	0			
手足がしびれる	3	2	1	0	2		② 知覚障害様症状
手足の感覚が鈍い	3	2	1	0			
なかなか寝つけない	3	2	1	0	2		③ 不眠
寝ついていても目を覚ましやすい	3	2	1	0			
興奮しやすい	3	2	1	0	2		④ 神経質
神経質である	3	2	1	0			
つまらないことでよくよする	3	2	1	0	1		⑤ ゆうつ
ゆううつになることが多い	3	2	1	0			
めまいや吐き気がする	3	2	1	0	1		⑥ めまい
疲れやすい	3	2	1	0	1		⑦ 全身倦怠
肩こり、腰痛、手足の節々に痛みがある	3	2	1	0	1		⑧ 関節痛・筋肉痛
頭が痛い	3	2	1	0	1		⑨ 頭痛
心臓の動悸がある	3	2	1	0	1		⑩ 心悸亢進
皮膚を蟻が這うような感じがする	3	2	1	0	1		⑪ 蟻走感
					指数		

更年期の症状を数値化して表します。

症状をその程度に応じて4段階(強い=3、中程度=2、弱い=1、無し=0)で表現し、

その結果を指数化して更年期障害の程度を判断します。

それぞれの症状の種類のうち、一番強い症状の強さを、その症候群の強さとします。

得られた指数を合計した数値がクッパーマン指数です。

判定: 16~20: 軽症 21~34: 中等度 35以上: 重症

表2 症状の自覚スコア : SMI

簡略更年期指数 (SMI)

氏名: _____ 年齢: _____ 日付: 200 / / _____

次の質問を読んで、現在あなたの状態に 最もよくあてはまる と思われる欄の数字に ○印 をつけてください。すべての質問に答えて下さい。

症状の種類	症状の強さ				値
	強	中	弱	無	
顔がほてる	10	6	3	0	
汗をかきやすい	10	6	3	0	
腰や手足が冷える	14	9	5	0	
息切れ、動悸がする	12	8	4	0	
寝つきが悪い、眠りが浅い	14	9	5	0	
怒りやすく、イライラする	12	8	4	0	
くよくよしたり、憂うつになる	7	5	3	0	
頭痛、めまい、吐き気がよくある	7	5	3	0	
疲れやすい	7	4	2	0	
肩こり、腰痛、手足の痛みがある	7	5	3	0	
	指数				

更年期の症状を数値化して表します。

症状をその程度に応じて4段階(強い、中程度、弱い、無し)で表現し、

その結果を指数化して更年期障害の程度を判断します。

- 判定: 0~25 異常なし
 26~50 食事、運動に注意
 51~65 更年期・閉経外来を受診
 66~80 長期間の計画的な治療
 81~100 各科の精密検査、長期の計画的な対応

健康調査表

最近1～2週間の状態についてお答え下さい

症状が全くない場合は

症状があるが気がならない程度の場合は

症状がはっきりあるが、日常生活に支障のない程度の場合は

症状が強く、しばしば日常生活に支障をきたす場合は

のいずれか一つに○をつけて下さい。

記入日	年	月	日
-----	---	---	---

いいえ

すこし

はい

非常に

- 1 からだがだるい いいえ・すこし・はい・非常に
- 2 からだが重い いいえ・すこし・はい・非常に
- 3 氣力が少ない いいえ・すこし・はい・非常に
- 4 集中力がない いいえ・すこし・はい・非常に
- 5 疲れやすい いいえ・すこし・はい・非常に
- 6 風邪をひきやすい いいえ・すこし・はい・非常に
- 7 昼間、眠くなる いいえ・すこし・はい・非常に
- 8 眠れない・眠りが浅い いいえ・すこし・はい・非常に
- 9 朝、起きにくい いいえ・すこし・はい・非常に
- 10 憂うつである いいえ・すこし・はい・非常に
- 11 蒸熱感におそわれる いいえ・すこし・はい・非常に
- 12 ちよつとした頭に、痛みやすい いいえ・すこし・はい・非常に
- 13 顔が紅潮する いいえ・すこし・はい・非常に
- 14 足が冷え、顔がほせる いいえ・すこし・はい・非常に
- 15 手や足が冷える いいえ・すこし・はい・非常に
- 16 朝起きると身体がこわばる いいえ・すこし・はい・非常に
- 17 からだがむくみっぽい いいえ・すこし・はい・非常に
- 18 しびれや感覚の鈍いところがある いいえ・すこし・はい・非常に
- 19 手のひらや足の裏に汗をかく いいえ・すこし・はい・非常に
- 20 こむらがりやすい いいえ・すこし・はい・非常に
- 21 スズキと断つような頭痛が発作的におこる いいえ・すこし・はい・非常に
- 22 頭が重い いいえ・すこし・はい・非常に
- 23 目がぼれる いいえ・すこし・はい・非常に
- 24 めまいがする いいえ・すこし・はい・非常に
- 25 立ちくらみがする いいえ・すこし・はい・非常に

●(表3)症状の自覚スコア：寺澤の気血水スコア

氏名 _____ ID番号 _____

・初診時の症状を10としたとき現在はいくつに相当しますか？、下の線に印をつけて下さい。

症状	0	5	10
26 車酔いしやすい			いいえ・すこし・はい・非常に
27 足水がでる			いいえ・すこし・はい・非常に
28 つばが多い			いいえ・すこし・はい・非常に
29 泡のような痰がでる			いいえ・すこし・はい・非常に
30 喉がつかえた感じがする			いいえ・すこし・はい・非常に
31 胸がつかえた感じがする			いいえ・すこし・はい・非常に
32 咳こむ			いいえ・すこし・はい・非常に
33 急に動悸がする			いいえ・すこし・はい・非常に
34 ケツプがでやすい			いいえ・すこし・はい・非常に
35 食欲がない			いいえ・すこし・はい・非常に
36 吐き気がする			いいえ・すこし・はい・非常に
37 吐くことがある			いいえ・すこし・はい・非常に
38 肋骨の下の部分のお腹が重音しい			いいえ・すこし・はい・非常に
39 急に腹が痛くなる			いいえ・すこし・はい・非常に
40 腹が張る			いいえ・すこし・はい・非常に
41 腹がゴロゴロ鳴る			いいえ・すこし・はい・非常に
42 下痢しやすい			いいえ・すこし・はい・非常に
43 水のような下痢をする			いいえ・すこし・はい・非常に
44 おならがよくでる			いいえ・すこし・はい・非常に
45 痔がある			いいえ・すこし・はい・非常に
46 尿が多い			いいえ・すこし・はい・非常に
47 尿が少ない			いいえ・すこし・はい・非常に
48 頻尿感がある			いいえ・すこし・はい・非常に
49 時間によって症状がいろいろ変わる			いいえ・すこし・はい・非常に
50 月経不順・月経障害がある			いいえ・すこし・はい・非常に

表 4 Characteristics of the CA repeats polymorphism of ERβ genotype in randomized trial.

	genotype	
	SS	non-SS
Keishibukuryogan	2	4
HRT	0	1
Total	2	5

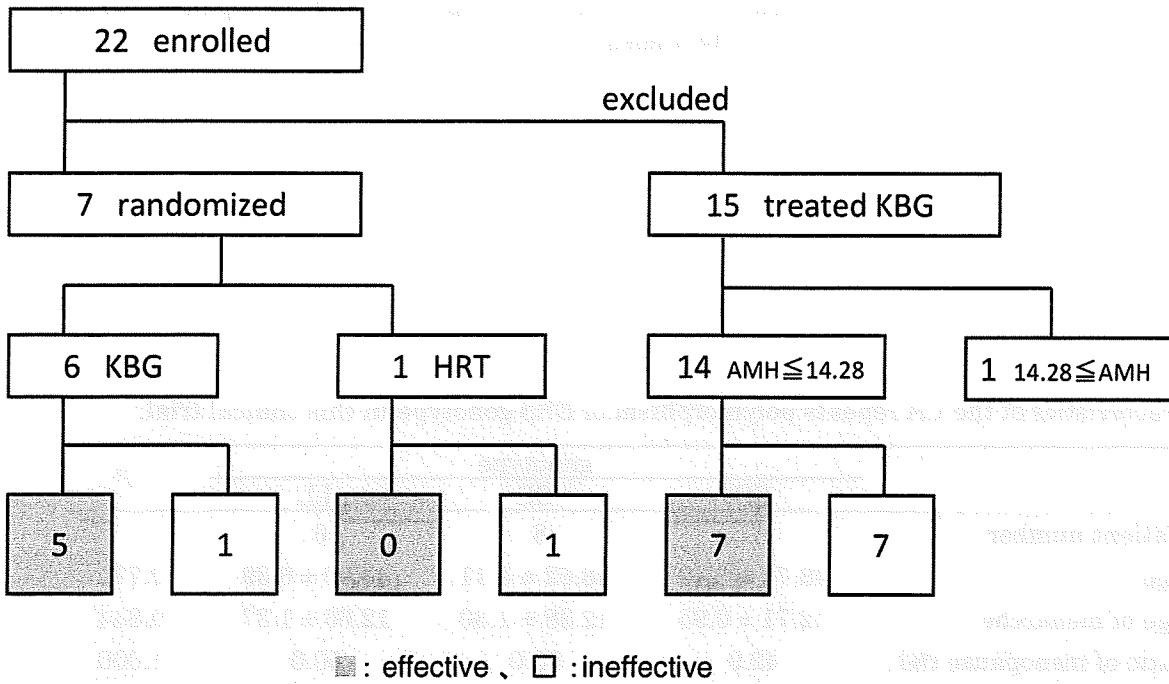


図.1 Characteristics of this clinical trial.

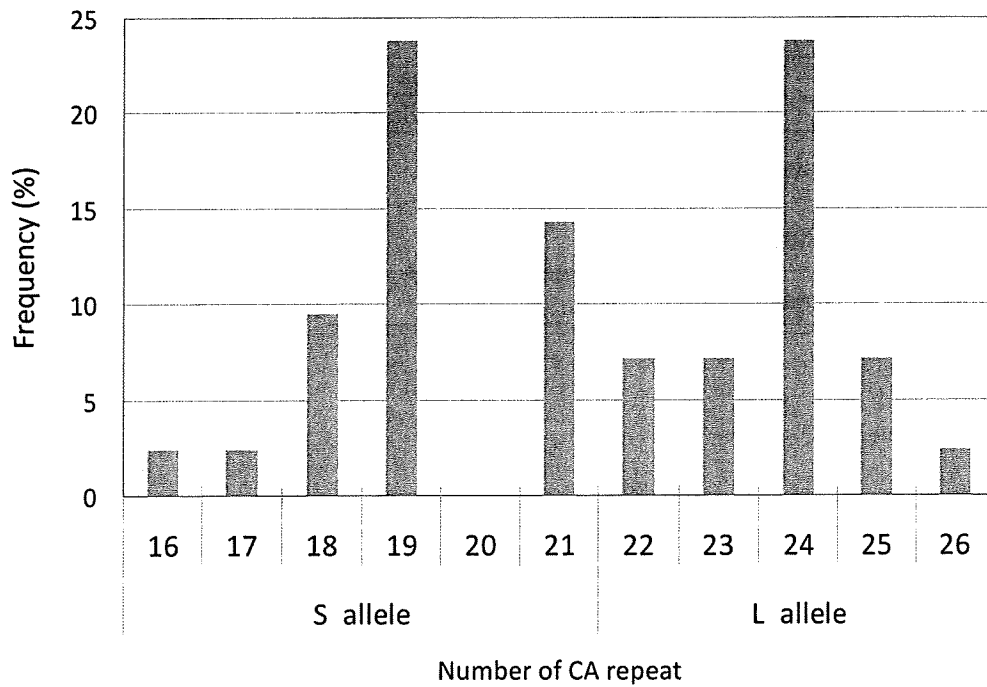


图 2 Allele frequencies of the CA repeats polymorphism of ERβ gene in 22 menopausal women (44 alleles).

表 6 Characteristics of the CA repeats polymorphism of ERβ genotype in this clinical trial.

	genotype			P
	SS	SL	LL	
Patient number	7	8	6	
age	49.71 ± 3.40	48.62 ± 3.11	48.00 ± 6.39	0.772
age of menarche	12.71 ± 0.95	12.38 ± 1.30	12.66 ± 1.37	0.844
ratio of menopause (%)	42.9	50.0	50.0	1.000
BMI (kg/m ²)	22.38 ± 4.11	22.48 ± 5.24	19.87 ± 1.86	0.463
SDS	47.57 ± 9.54	46.88 ± 7.20	46.17 ± 7.49	0.953

Results are shown as mean ± S.D.

P-value of ratio of menopause is calculated Fisher exact test and others are calculated by 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test.

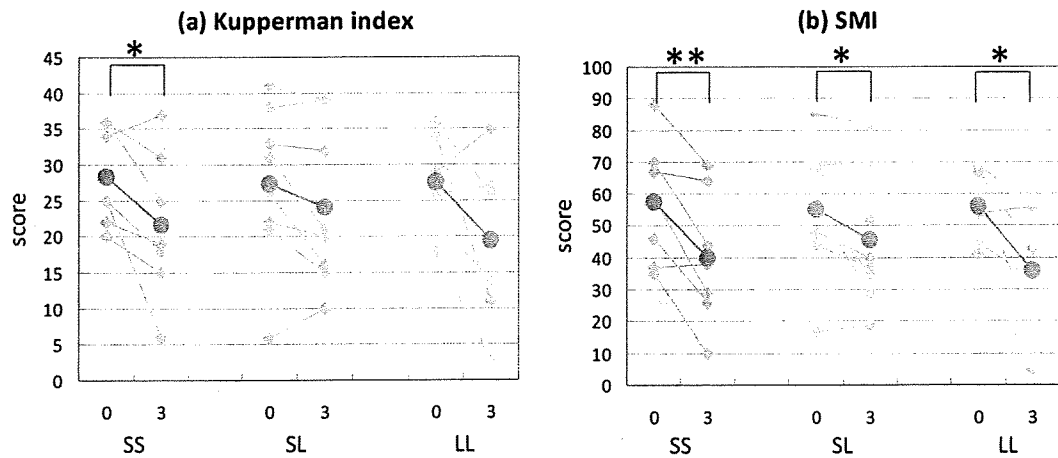
表7 Characteristics of menopausal index and serum concentration of hormones at first visit (0 month) by each genotype of the CA repeats polymorphism of ER β gene in this clinical trial.

	genotype			<i>P</i>
	SS (n=7)	SL (n=8)	LL (n=6)	
Kupperman index	28.29 \pm 6.85	27.25 \pm 11.16	27.50 \pm 6.92	0.973
Vasomotor symptoms in KI	4.86 \pm 2.67	4.88 \pm 2.36	3.67 \pm 2.88	0.644
Psychological symptoms in KI	6.57 \pm 2.30	5.38 \pm 2.56	5.33 \pm 3.44	0.643
SMI	57.4 \pm 19.3	55.1 \pm 20.3	55.8 \pm 11.4	0.969
Vasomotor symptoms in SMI	24.00 \pm 9.66	23.63 \pm 10.53	27.00 \pm 6.07	0.772
Psychological symptoms in SMI	11.86 \pm 5.98	9.38 \pm 4.41	8.67 \pm 4.93	0.499
AMH (pmol/L)	3.00 \pm 1.97	1.80 \pm 1.29	4.10 \pm 5.41	0.482
FSH (mIU/mL)	19.8 \pm 15.3	33.2 \pm 35.1	33.4 \pm 33.3	0.917
E2 (pg/mL)	124.3 \pm 112.2	101.8 \pm 96.37	140.9 \pm 205.8	0.830

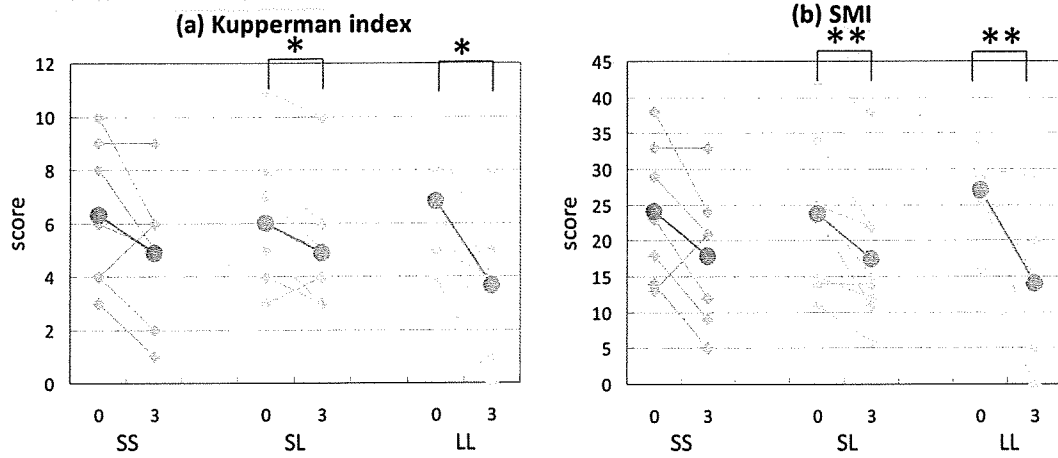
Results are shown as mean \pm S.D.

P-values are calculated by 1-way ANOVA or Kruskal-Wallis test.

(A) Total score



(B) Vasomotor symptoms



(C) Psychological symptoms

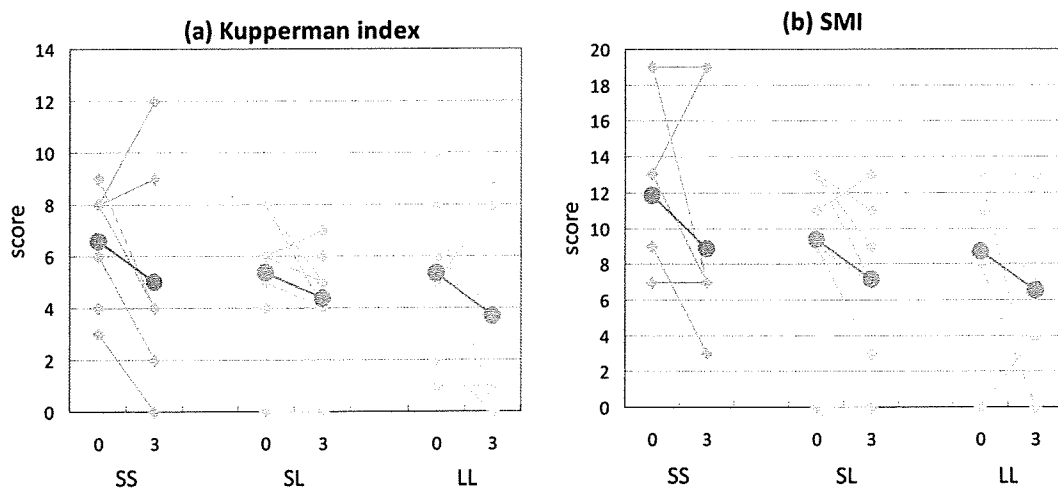


图 3 Two menopausal indexes and those vasomotor and psychological symptoms scores before and after 3 month treatment compared with each genotype of the CA repeats polymorphism of ERβ gene. P-values are calculated by Paired test.
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

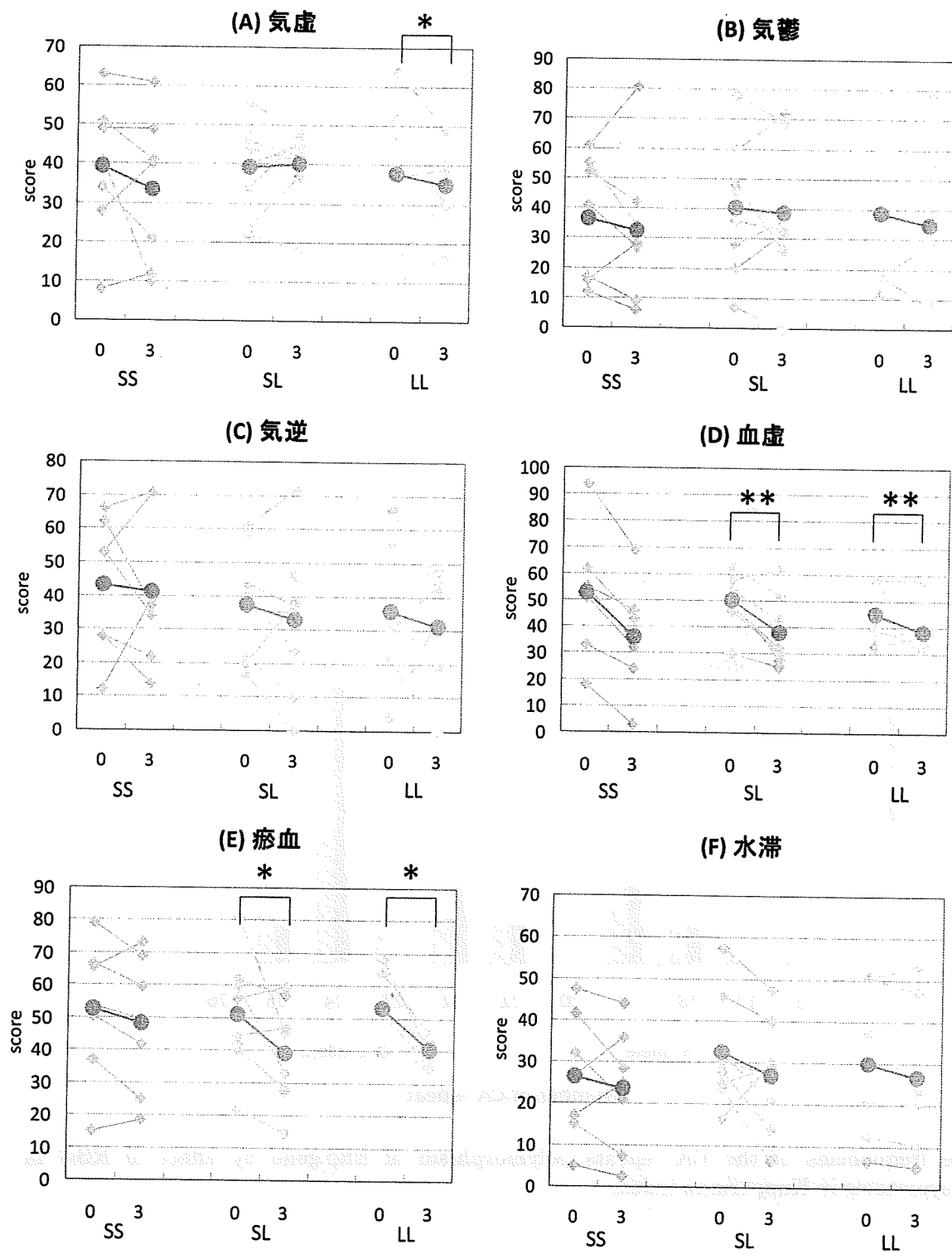


図4 Kampo scores before and after 3 month treatment compared with each genotype of the CA repeats polymorphism of ERβ gene. P-values are calculated by Paired test.
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

表7 Characteristics of effect of KBG by the CA repeats polymorphism of ER β genotype.
 (A) Total score of Kupperman index

	genotype	n		P
		effective	ineffective	
	SS	3	4	0.355
	SL	2	6	
	LL	4	2	

P-values are calculated by Fisher exact test.

(B) Vasomotor symptoms in Kupperman index

	genotype	n		P
		effective	ineffective	
	SS	1	6	0.014
	SL	0	8	
	LL	4	2	

P-values are calculated by Fisher exact test.

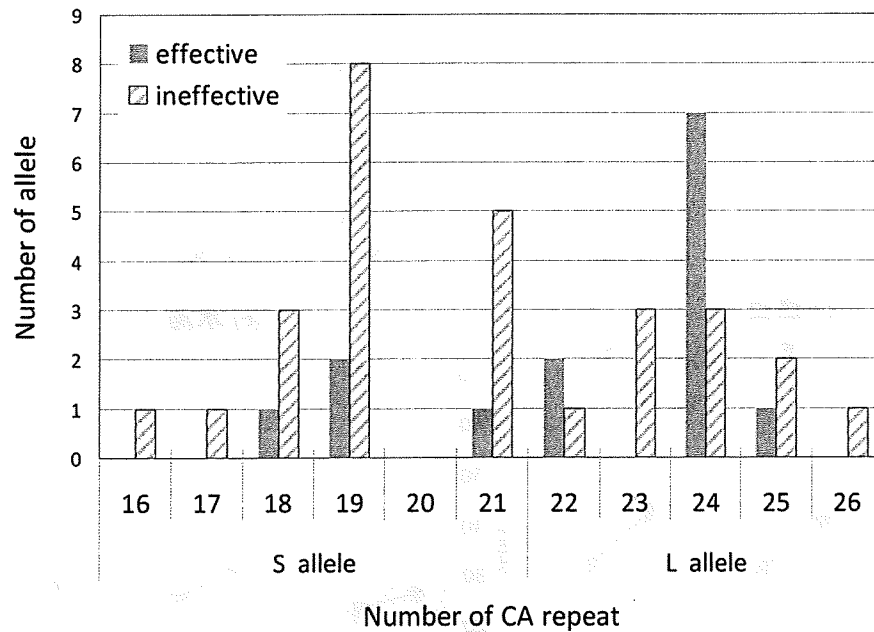


图5 Allele frequencies of the CA repeats polymorphism of ER β gene by effect of KBG in Vasomotor symptoms in Kupperman index.

The allele frequencies of the CA repeats polymorphism of ER β gene by effect of KBG in Vasomotor symptoms in Kupperman index. P-values are calculated by Fisher exact test. P<0.05 ** P<0.01

厚生労働科学研究費補助金（地域医療基盤開発推進研究事業）
（分担）研究報告書

血中抗ミュラー管ホルモン値の経年変化と臨床的有用性の検討

研究分担者 上野 光一 千葉大学大学院薬学研究院 教授

研究要旨

血中抗ミュラー管ホルモン（AMH）値は経年的に低下し、早期に卵巣機能低下を表すことがわかった。更年期障害で受診する患者の血中FSH・E2濃度は正常範囲内であることが多く、これらの検査値は更年期の指標にはならないことが明らかとなった。一方、更年期障害患者の血中AMH値を測定したところ多くの患者で正常基準値以下であり、卵巣機能の低下が示唆された。また、更年期障害自覚症状のある方は無い方よりもAMHが低値であった。このため、AMHは更年期障害を表す客観的な指標となり、新規診断マーカーとして有用である可能性が示唆された。

研究分担者氏名：上野光一

所属研究機関名：千葉大学・大学院
薬学研究院・教授

A. 研究目的

1. 背景

本研究事業での更年期障害患者を対象とした臨床研究において、当初更年期障害の基準を「血清 FSH 濃度 40 mIU/mL 以上または血清 E2 濃度 20 pg/mL 以下(1)」としていたが、その基準を満たしている患者はほとんどいなかった。

すでに閉経をしている患者の約半数もこの基準を満たしておらず、E2 が非常に高い場合もあった。FSH の上昇は E2 の低下よりも先に起こるため、FSH の基準値を 20 mIU/mL 以上に緩和したが、この基準を満たす患者も少なかった。このため、これらのホルモン値で更年期障害であるということを診断することは難しいことが判明した。

現在、婦人科領域での更年期障害の診断は、ホルモン値ではなく症状により診断が行われている。日本においても 2009 年 1 月「本邦におけるホルモン補充療法ガイドライン」が報告されたが(2)、FSH・E2 による診断基準やホルモン値を考慮することは記載されていない。しかし、エストロゲンがまだ十分に分泌されている状態で

さらにHRTを行うと、エストロゲンの副作用発現が懸念される。また、一律の診断基準がないため、医師によってはホルモン値が正常であれば更年期障害ではないと診断してしまう場合や、循環器内科や精神科など、他科の受診をすすめられてしまう場合がある。他科を受診した場合も、器質的な病因が見つからないことが多く、適切な治療を受けられない場合もある。

一方で、抗ミュラー管ホルモン（Anti-Mullerian hormone: AMH）はミュラー管抑制物質（Mullerian inhibiting substance: MIS）とも呼ばれTGF-βファミリーに属する140kDaのグリコプロテインホルモンである(3)。AMHをコードしている遺伝子は2.75kbで5つのexonからなっており、染色体19p33に位置している(4)。

女性においてAMHは卵巣の成熟卵胞前胞状卵胞、胞状卵胞の顆粒膜細胞より分泌されている(5)。女性におけるAMH産生分泌能は性成熟とともに増加し比較的低濃度で維持されるが、その後年齢とともに減少し、閉経後はほとんど分泌されなくなるということが報告されている(6,7)。以上のことから、AMHは卵巣予備能（ovarian reserve）の指標となり、生殖補助医療（assisted reproductive technology: ART）で卵巣予備能を予測するOvarian reserve test (ORT) のひとつとして検査が行われている。

2. 目的

FSHの上昇が起こる前の更年期症状が現れ始める時期により sensitivity、specificity の高い、新たな診断マーカーの発見が望まれる。我々は卵巣予備能の指標である AMH に着目し、卵巣機能の低下を“更年期への移行”にとらえ、AMH がより早期に更年期障害を表す指標になるのではないかという可能性を考えた。そのような可能性を示唆する報告はいくつか出されているが(8,10)、実際の更年期障害の症状の有無について検討している報告はない。そこで本研究においては、AMH 濃度と更年期障害の症状の相関を調査し、AMH を更年期診断の補足手段として活用できるか実際に検証することを目的とした。

B. 研究方法

本研究では、1) 日本人における健常人女性の年代別AMHの推移とFSH・E2および更年期症状との関連を比較した。さらに、2) 健常人女性と更年期障害で医療機関を受診している患者とのAMH濃度と更年期症状の強さとの相関を調べ、健常人のうち更年期年代である40~50代と更年期障害患者との各ホルモン値の比較を行った。

【対象者】

20歳から59歳までの健康な女性 163名
および更年期障害患者 21名

【除外項目】

卵巣機能に影響のある疾患の既往がある方(PCOS、卵巣がん、卵巣のう腫など)、血清AMH濃度値がPCOSの基準範囲(44.98 pmol/L以上)に含まれる方および妊娠中の方

【同意取得】

対象者に説明文を用いて説明を行い、問診表(Kupperman index)及び同意書の記入をお願いした。

【問診表記入項目】

Kupperman index、生年月日、月経周期、生殖機能疾患の既往歴及びその他の既往歴

【血液検査項目】…3項目

抗ミュラー管ホルモン (AMH)、卵巣刺激ホルモン (FSH) 及び 17 β -エストラジオール (E2)

【血液検査】

医療従事者による採血を行い、株式会社エスアールエル (SRL) に検査を委託した。

【統計解析】

年代間の比較は Bartlett test にて等分散性を確認し、等分散の場合は Tukey-Kramer test にて、非等分散の場合は Steel-Dwass test にて多重比較を行った。健常人と更年期障害患者の比較は F-test にて等分散性を確認し、等分散の場合は

Student's *t* test にて、非等分散の場合は Welch's *t* test にて検定を行った。相関係数は PASW Statistics 18 を用い、Pearson correlation test により求めた。sensitivity、specificity の算出および頻度分布の検定は PASW Statistics 18 のクロス集計表を用い、Fisher's exact test にて行った。統計解析には StatLight 1997 (Yukms) を用いた。

【倫理面への配慮】

本研究は千葉大学大学院医学研究院、千葉大学大学院薬学研究院並びに千葉大学環境フィールド科学センターにおいて各倫理審査委員会の承認を得て行った。なお、遺伝子情報および医療機関における処方薬剤情報は個人のプライバシーに深く関わる重要な情報であるため、スタンドアローンのパーソナルコンピュータで管理し、その取り扱いには十分配慮した。

C. 研究結果 (図表は業績の後に添付)

1) 健常人女性におけるホルモン測定

健常人女性の血清 AMH 濃度は年代が高くなるにつれて顕著に低下し、20代と比較して他の全ての年代で有意に低下していた。血清 FSH 濃度は年代が高くなるにつれて上昇し、40代・50代で20代・30代と比較して有意に上昇していた。血清 E2 濃度は50代において、他の年代と比較して有意に低下していた。Kupperman index は50代で上昇傾向を示したが、有意な差は認められなかった (Table.1、Fig.1)。

2) 抗ミュラー管ホルモン測定の更年期障害診断への応用

健常人と更年期障害患者の計 184 名分の各ホルモン値と Kupperman index との相関を求めたところ、AMH との間で有意な相関がみられた (Table.2、Fig.2)。その他のホルモンとの相関は認められなかった。また、Kupperman index を中等度以上 (21 以上) と軽度以下 (20 以下) の2群に分けて AMH を比較したところ、中等度以上の群において有意に AMH が低かった (Fig.3)。これら2群の AMH 濃度の中央値 6~16 pmol/L の間で cut-off 値の検討を sensitivity、specificity を求め、Fisher's exact test にて検定を行った。検査会社の示す正常値が 14.28~45.88 pmol/L (95%CI) であることを考慮すると、14 pmol/L が sensitivity と有意差も高く、最適であると考えられた (Table.3)。

さらに、更年期障害患者 (patient) と健常人 40~50 代 (control) のホルモン値の比較を行ったところ、control よりも patient において AMH が有意に低かった。FSH は同等であり、E2 は control よりも patient において高い傾向がみられたが、両ホルモンとも個人差が大きかった (Fig.4)。

D. 考察

今回、更年期障害に対する臨床研究を行うにあたり、従来の FSH および E2 のホルモン基準値に当てはまる患者が非常に少ないということが判明した。そこで新たな診断マーカーの候補として卵巣機能の指標として生殖医療領域で測定や研究が行われている AMH に着目し、測定を行うこととした。その結果、更年期症状を訴えて受診した患者のほとんどで AMH は正常基準値の 14.28 pmol/L を下回っていた (Fig.4A)。また、更年期の年代であっても健康な人では AMH の値が高いのではないかと仮定し、AMH を更年期障害の診断マーカーとして用いることを目標として、健常人の AMH 測定を行った。

健常人女性の AMH 測定を行った結果、年代ごとに顕著な低下がみられた (Fig.1A)。健常人においても、40 代以降では正常基準値を下回る方も多くなり、50 代のほとんどで検出されなくなることが明らかとなった。FSH・E2 では 40-50 代の健常人・更年期障害患者においても、自覚的には閉経を迎えて 1 年以上経っているという方の中にも更年期の基準値を満たさず、高値を示す方もいた (Fig.4B,C)。今回の研究では月経周期による測定日の限定は行っていないため、FSH・E2 では排卵期にあたる人では高値を示していた。血清 FSH・E2 濃度の値は、月経周期の影響を受けてしまい測定日が限られてしまう。また卵巣機能がかなり低下しないと FSH・E2 の変動が起こらないという点からこれらの値から閉経の予測をすることは困難であり、“更年期”の定義の中でも完全な閉経“後”の状態であるという指標としてしか使えない。さらに薬物投与や超音波検査が患者の負担になってしまうなどの問題点が挙げられている。

一方で AMH は FSH の上昇が起こる以前に急激に低下することが報告されている (8)。また、FSH・E2・LH などの女性生殖機能に関わるホルモンが月経周期によって変動するのに対し、AMH は月経周期を通じてあまり変化がないことが示されている (8,10)。

これらのことより、AMH は月経周期のどの時期でも測定でき、FSH・E2 より早期に卵巣機能低下を示す、より良い指標となり得ると考えられ、実際に生殖医学領域では ORT の新たな手法として注目されている (11)。さらに本研究の結果から同じ年代の間でのばらつきも少ないことがわかった。このため、AMH を測定することで 5 年以内に閉経することを予測できる (12) という意見もあり、AMH はまさに閉経の“前”後 5 年間である更年期の予測に適しているといえる。

Kupperman index による更年期症状が中等度以上 (21 以上) と軽度以下 (20 以下) の 2 群に分け、AMH を比較したところ、症状のある方で有意に AMH が低かった (Fig.3)。そこで、この 2 群の各中央値である 6~16 pmol/L 付近の sensitivity・specificity を算出し、cut-off 値の探索を行った (Table.3)。cut-off 値を下げると specificity は上がるが、AMH は年齢によっても顕著に低下するため、健康で AMH の低い方も多くなり sensitivity が低下してしまう。また、cut-off 値を上げると AMH が正常である人が多く含まれてしまう。このため検査会社による正常範囲が 14.28~45.88 pmol/L であることを考慮すると、正常下限値である 14 pmol/L 付近において sensitivity も高く有意差も顕著であるので、この値を基準にするのが妥当なのではないかと考えられる。また、更年期の年代である 40-50 代の健常人と更年期障害患者の AMH の比較を行ったところ、更年期障害患者で有意に AMH が低下していた (Fig.4A)。これらにより同年代であっても更年期症状を持っている方ほど AMH が低下しており、AMH が更年期障害の指標に有用なのではないかということが示唆された。

更年期障害発症の原因はいまだ完全に明らかにはなっていないが、原因のひとつに卵巣機能が低下し、ホルモンバランスが崩れてしまうことがある。AMH は成熟卵胞から分泌され、成熟卵胞数の制御に関わっているが (13)、閉経に近づき成熟卵胞数が減少すると AMH が減少し、FSH 感受性の成熟卵胞も減少してしまう。これに対し排卵を起こそうとして FSH の分泌量が増す。こういった過程からホルモンのバランスが崩れ、種々の身体の不調が起こってしまうのではないかと考えられるため、AMH の低下も更年期障害の病因の 1 つになっている可能性がある。

AMHと同様に卵胞成熟や月経周期のホルモンバランスに関与している因子としてアクチビン、インヒビン、GDF9などがある。これらもTGF- β ファミリーに属している(14)。更年期においてAMHとともにFSHより早期に低下するマーカーとしてインヒビンB (inhibin B: INHB) に関しても研究が行われている(15,16)。INHBは月経前に低下することでGnRH分泌を促し、FSH分泌増加に作用していると考えられている(17)。この作用は月経前に働くが、更年期になるとINHBは低下するため、GnRHの分泌、FSHの分泌の増加が起こる。しかし、INHBは月経周期により変動も大きく、研究領域での測定は行われているがELISAキットが一時発売中止であり、受託検査会社での測定は行っていなかった。2010年3月9日医学生物研究所(MBL)よりINHBのELISAキット販売再開が発表されたが、検査会社による測定は未定であるため、ELISA測定を病院内で行っている施設での研究的測定用となりそうである。このためINHBよりもAMHのほうがより簡便に測定ができ、安定したマーカーとなり得ると考えられる。

AMHを実際の医療現場で測定していくにはいくつかの課題がある。1つめにAMH測定の問題点として挙げられるのは、AMHの測定用試薬がImmunotech Beckman Coulter社およびDiagnostic System Laboratories社の2製品があり、それぞれの試薬により単位、基準値が異なるため文献値と直接比較できない場合があるという点である。単位はpmol/Lとng/mLが用いられており、 $\text{ng/mL} \times 7.14 = \text{pmol/L}$ と換算することはできるが、ELISAの方法などの違いにより異なる場合がある。また、世界的にみた場合AMHの研究グループの使用はほぼ半数ずつであるが、Beckman社に比べDSL社の測定値が低い値を示すといわれている。

現在、AMHの自動測定器が開発中であり、すべての測定が自動測定器で行われるようになれば統一されるのではないかとされている。2つめに生殖医療領域において、AMHが低値であっても卵胞が1つでも成熟していれば顕微鏡下で受精させ子宮内に戻す卵細胞質内精子注入法(intracytoplasmic sperm injection: ICSI)を行うことで妊娠することは不可能ではないため、下限値を設けてcut-offしてしまうことは難しいという難点がある。

AMHと更年期症状との間に相関がみられたが、健康な人でもAMHは年齢とともに低下し50代では、ほぼ0 pmol/Lになってしまうため、下限値を設けてAMH単独で診断を行うことは難しいと考えられる。このため、AMHが正常基準値以下であり、かつKupperman indexが21以上で中等度以上の症状がある患者は更年期障害、と診断する、あるいはAMHが正常基準値以上でKupperman indexが高い場合は更年期以外の疾患を疑うなど、AMHを補助診断の材料として用いて更年期障害に対する治療を行うのが有用なのではないかと考えられる。

最後に、現在日本での血清AMH測定は保険適用外であるという点がある。の発表や教育セミナーも行われており、生殖医療領域でのAMH測定は増加していると考えられる。

生殖医療領域でORTとして測定が行われているが、検査会社に受託する場合、現在ではAMHの測定検体数が少ないため測定日も少なく、結果がわかるまで数日を要する。日本人におけるAMH測定値をまとめた大規模な論文報告はないが日本生殖医学会、受精着床学会をはじめ、学会で現在、更年期障害患者の診断における血清AMH濃度の測定は行われていないが、今回の研究の結果AMHとKupperman indexの間で有意な相関があり、受診患者のほとんどで正常値を下回っていた。このため患者の主訴だけによらない客観的な診断の指標として、AMHを更年期障害の診断に用いることができるのではないかと考えられる。このような結果を受けて今後AMH測定が保険適用となり、更年期障害やPCOSの診断などでより簡便に測定できるようになり、さらに研究が発展していくことを期待したい。

E. 結論

- (1) 健康な女性において血清AMH濃度は年代が上がるにつれ有意に減少し、50代ではほとんど検出されなくなった。
- (2) AMHとKupperman indexに有意な相関がみられ、また、Kupperman indexが高く更年期症状がある方は同年代の健康な人と比べてAMHが低いことが明らかとなった。これにより、AMHが正常基準値以下であり、Kupperman indexが21以上で中等度以上の症状がある患者は更年期障害であると診断できる可能性が示唆された。