

日本人中高年女性におけるエストロゲン受容体遺伝子多型と 骨代謝指標ならびに腰椎骨密度との関連性

奈良県立医科大学公衆衛生学教室

大 門 位 守

RELATIONSHIP BETWEEN ESTROGEN RECEPTOR GENE POLYMORPHISMS AND BONE MINERAL DENSITY OR BONE METABOLIC MARKERS —STUDIES IN JAPANESE MIDDLE-AND HIGHER-AGED WOMEN—

TAKASHI OHKADO

Department of Public Health, Nara Medical University

Received August 20, 1999

Abstract: The estrogen receptor (ER) gene polymorphisms of *Pvu* II and *Xba* I restriction were examined in parallel with bone mineral density of the lumbar vertebrae (BMD) and bone metabolic markers, such as serum bone Gla protein (BGP), serum bone alkaline phosphatase (B-ALP) and urinary hydroxyproline (Hyp), in 178 healthy Japanese women, 30 of whom were premenopausal and 148 postmenopausal. The allele was defined as capital P or X, when the ER gene was not digested with *Pvu* II or *Xba* I; otherwise, it was defined as small letter p or x. The distribution of the *Pvu* II and *Xba* I restriction fragment length polymorphism (RFLP) was as follows: PP, 32 (16.9%); Pp, 96 (50.8%); pp, 61 (32.3%) and XX, 5 (2.6%); Xx, 74 (39.2%); and xx, 110 (58.2%); respectively. The allele frequencies were 42.3% for P, 57.7% for p, 22.2% for X and 77.8% for x. In PX haplotype distribution, 5 (2.6%), 19 (10.1%), 8 (4.2%), 51 (27.0%), 45 (23.8%), 4 (2.1%) and 57 (30.2%) of the subjects had PPXX, PPXx, PPxx, PpXx, Ppxx, ppXx and ppxx types, respectively. Neither PpXX nor ppXX haplotype was found in the study subjects. *Pvu* II genotypes had no correlation with either BMD or biochemical markers for the bone metabolism. Although the subjects with heterozygous Xx genotype had higher BMD than those with homozygous XX or xx, *Xba* I genotypes did not have any statistically significant correlation with the bone metabolic markers. These results suggest that ER gene polymorphisms of *Pvu* II and *Xba* I restriction may not have any effect on either osteogenetic or osteoclastic steps of the bone metabolism, at least in Japanese middle- and higher-aged women. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 50, 418~430, 1999)

Key words: estrogen receptor gene, DNA polymorphism, bone mineral density, bone metabolic markers

緒 言

骨粗鬆症は、高齢化社会を迎えている多くの国で大きなヘルスケアの問題を提供している。特に、超高齢社

会の到来を目のあたりにしている我が国では、今後ますます増加する疾患と考えられているのみならず、低骨密度は骨粗鬆症の重要なリスクファクターの一つであり骨折の原因ともなっている。因に、平成9年度では、寝た

きりの原因の第1位の脳血管疾患(38.7%)に次ぎ、骨粗鬆症と骨折は寝たきりの原因の第2位(13.2%)を占めるまでに至り¹⁾、患者のADL(日常生活動作, activities of daily living)を著しく制限することももちろん、QOL(生活の質, quality of life)までも低下させ、社会医学上重大な課題を提供している。

骨密度は、妊娠や出産をはじめ、栄養や運動などライフスタイル要因に影響されるが、家系や双生児を対象とした多数の研究^{2,3)}によると、遺伝要因にも大きく影響されることが報告されている。骨密度に影響を与えると考えられている遺伝子として、小児や若年者にも発症して発症頻度に性差が見られない突発性骨粗鬆症でのI型コラーゲン遺伝子⁴⁾、70歳以上の高齢者に好発する老人性骨粗鬆症でのビタミンD受容体遺伝子(vitamin D receptor gene, VDR 遺伝子)³⁾・下流領域の多型⁴⁻⁷⁾、閉経後の女性に好発して皮質骨より海綿骨が侵されやすい閉経後骨粗鬆症でのエストロゲン受容体(estrogen receptor, ER)遺伝子⁷⁻¹⁰⁾や骨形成促進因子の1つであるTransforming growth factor- β 1(TGF- β 1)遺伝子¹¹⁾などのDNA多型が検討されている。しかしながら、これらの遺伝子のどれが重要なのか、また、各遺伝子の相互作用などについては未だほとんど解明されておらず、骨密度にどのように関与するのかは定かではない。低骨密度の原因となる遺伝子変異がある程度解明されているものは、ビタミンD依存性クル病I型の原因遺伝子としてのVDR遺伝子エクソン領域¹²⁾、I型コラーゲン遺伝子^{13,14)}、ER遺伝子エクソン2などの突然変異に関する報告¹⁵⁾に留まっているのが現状であり、VDR遺伝子イントロン領域多型の骨密度への関与については異論^{16,17)}も多い。

閉経期を挟んでエストロゲンが欠乏すると最終的に骨密度が減少する詳細な機序は、未だ明らかにされていないが、エストロゲンの減少につれてインターロイキン-1(IL-1)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターロイキン-6(IL-6)などのサイトカインの血中レベルが増加して、そのため破骨細胞の分化、活性化さらには破骨細胞形成率が亢進して骨吸収が促進される^{4,18)}と考えられている。

本研究では、ER遺伝子多型が骨密度または骨代謝指標に何らかの影響を有するのかを解析するため、ER遺伝子のイントロン1からエクソン2近接部位に制限酵素Pvu IIとXba Iによる切断部位をもつ2つの多型^{19,20)}に焦点をあて、中高年の日本人女性の同遺伝子多型を解析して、ER遺伝子型の分布、頻度を明らかにした。同一対象者の腰椎骨密度、および骨形成の指標である血清骨

Gla-タンパク量(bone Gla-protein, BGP)、血清骨型アルカリフォスファターゼ(bone alkaline phosphatase, B-ALP)活性値および骨吸収の指標である尿中ハイドロキシプロリン(hydroxyproline, Hyp)値とER遺伝子型の関わりについても統計的に解析した。

対象と方法

1. 対象

福井県下の某地域在住の中高年女性189名(34~80歳、平均60.3歳)を対象としてエストロゲン受容体遺伝子多型の分布を検討した。このうち、問診で、月経の状況、婦人科疾患、内分泌疾患、整形外科的疾患の既往歴および現症を尋ね、骨代謝および骨強度に非生理的影響が存在した(また、している)可能性を持つ11名を除いた178名について、体格指標として身長および体重を測定し、骨密度および骨代謝指標の測定を行った。最終的な対象者は、有経者30名(34~52歳、平均43.3歳)、閉経者148名(48~80歳、平均63.5歳)の合計178名である。これらの調査研究は、書面によるインフォームドコンセントを得た後に遂行された。

2. エストロゲン受容体(estrogen receptor, ER)遺伝子多型の解析

(1) ゲノムDNAの抽出と精製:

空腹時の対象者の肘静脈からEDTA存在下に末梢血3mlを得、Ficoll-Paque液(アマシャムファルマシアバイオテック社、東京)を用いた密度勾配遠心法によりリンパ球を分離し、QiaAmp Blood Kit (Qiagen GmbH社、Hilden, Germany)によりゲノムDNAを抽出、精製した²¹⁾。

(2) ポリメラーゼ連鎖反応(polymerase chain reaction, PCR):

ER遺伝子多型は、ER遺伝子のイントロン1上の制限酵素Pvu IIとXba Iに対する切断部位^{19,20,22)}の有無で区別した(Fig. 1)。これらの2つの制限酵素切断部位を含むER遺伝子のイントロン1とエクソン2の境界領域1.3 kbpの増幅は、Yaich²²⁾らより短い24-merプライマーセット、すなわち上流プライマー、5'-TATCTGTATCTTTTCCTATTCCTCC-3'と下流プライマー5'-GCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3'を合成した。PCR反応は対象者のゲノムDNA(100-300 ng)を鋳型とし、上記の合成プライマーセットおよびTaq DNA polymerase(United States Biochemical, OH, U.S.A.)を用い、94°C30秒、61°C40秒、72°C90秒の反応を30サイクル繰り返すことにより行った。

(3) 制限酵素断片長多型解析(restriction fragment

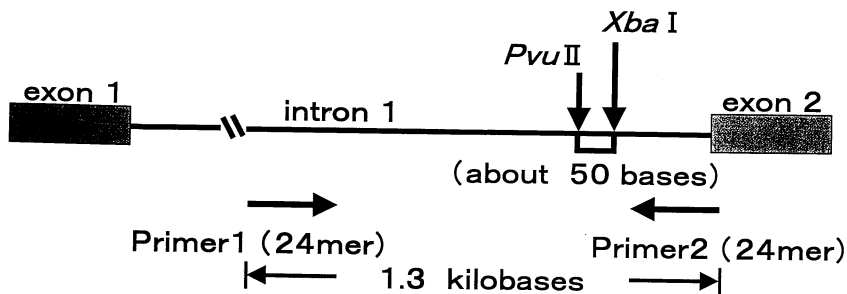


Fig. 1. Location of *Pvu* II and *Xba* I restriction sites on the estrogen receptor (ER) gene.

length polymorphism, RFLP) :

PCR産物を1.0%アガロースゲル電気泳動(2 mM EDTA含有0.04 M トリス-酢酸緩衝液, pH 8.0中, 室温で100 V 30分間泳動)にかけ, エチジウムブロマイド(1 μ g/ml)で染色した. 1.3 kbp相当部位をアガロースゲルより切り出して抽出, 精製した後, エンドヌクレアーゼ *Pvu* II(宝酒造, 大津)または *Xba* I(宝酒造, 大津)で37°C, 2時間消化した. 消化産物は上記と同様の条件で1.0%アガロースゲル電気泳動を行い, 検出されたDNA断片のサイズにより切断部位の有無を判定した. それぞれの酵素で切断される場合をpまたはx, 切断されない場合をPまたはXと表示した. 切断片の大きさは, 同時に泳動したDNAサイズマーカー(アマシヤム フアルマシア バイオテック社, 東京)により判定した.

3. 骨密度(bone mineral density, BMD)測定

二重エネルギー X線吸収測定法(Dual energy X-ray absorptiometry, DXA)(骨密度測定装置, QDR-1000/W, Hologic社, MA, U.S.A.)で, 第2~4腰椎骨前後像を分解能1 mm \times 1 mmで測定して得た平均骨密度(g/cm²)を対象者の個々のBMDとした. 測定に使用されたDXAは, 機器精度管理が定期的に行われているものであり, 短期間(日変動)の変動係数(CV%)は1.01%であった.

4. 骨代謝指標の測定

採血した血液は, 凝固完了後速やかに血清を分離し, 分離した血清は急速凍結後, 分析に使用するまで-80°Cで保存した. 尿は, 早朝第1尿を採取し, 分析まで-20°Cで保存した. 骨形成の指標としてBGPおよびB-ALPを, 骨吸収の指標としてHypを骨代謝指標として測定した.

(1) 血清 BGP 測定 :

Hosodaらにより開発された, 酵素抗体法(enzyme immunoassay, EIA法)²³⁾によった. ヒトBGPのN末端およびC末端領域に対応する2種の特異ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ-EIA法キット(帝人社, 東京)にて, N末端およびC末端領域が完全なBGP分子のみを測定した. この方法の測定限界は1.0 ng/mlであった.

(2) 血清 B-ALP 活性測定 :

レクチン共沈澱法を用いる既報²⁴⁾に従って測定した. すなわち, 血清に小麦胚芽レクチン(WGA, Sigma社, MO, U.S.A.)を加え, B-ALPを特異的に吸着させて沈澱分離後, その上清のALP活性および総ALP活性をBessey-Lowry法で測定した. B-ALPは総ALP活性から上清のALP活性を差し引いて算出した. この方法の測定限界は0.2 BL単位であった.

(3) 尿中 Hyp 測定 :

既報²⁴⁾に従って, 尿を6 N塩酸性下で115°Cで一晩加水分解後, 中和して, Bergman & Loxley法²⁵⁾に準じて比色定量した. 本法の測定限界は0.1 μ g/mlであった. 尿中Hypの測定値は, 尿中クレアチニン(creatinine, Cr)で補正しHyp/Cr(mg/g)で表示した.

5. 統計学的解析

ER遺伝子型と骨密度の関連については統計解析システムパッケージSAS system(Release 6.12, SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いて, 年齢, 身長, 体重, 月経の有無を共変量として分散共分散分析を行った. BMDの最小自乗平均値の有意差の検定はScheffeの多重比較法で行った.

ER遺伝子型と骨代謝指標の関連性の検討では, 血清BGP値と尿中Hyp/Crは対数正規分布を示したので, 以下の検討には対数変換値を用いた. 平均値の有意差の

検定は、一元配置分散分析後 Bonferroni の多重比較法で行い、有意水準を5%とした。

結 果

1. ER 遺伝子多型の分布

Pvu II および *Xba* I での ER 遺伝子のイントロン1とエクソン2の境界領域1.3 kbp の PCR 産物および制限酵素分解産物のアガロース電気泳動パターンを Fig. 2 に示した。*Pvu* II 消化では1.3 kbp バンドのみを示して全く切断されないもの PP, 切断されない1.3 kbp バンド以外に850 bp と450 bp の切断片の3種のバンドを生

じるもの Pp, そして、完全に切断され850 bp と450 bp の切断片の2種のバンドを生じるもの pp の3つの ER 遺伝子型が判別された。*Xba* I 消化では、1.3 kbp バンドのみを示し全く切断されないもの XX, 切断されない1.3 kbp バンド以外に900 bp と400 bp の切断片の3種のバンドを生じるもの Xx, そして、完全に切断され900 bp と400 bp の切断片の2種のバンドを生じるもの xx の3つの ER 遺伝子型が判別された。

ゲノム DNA 解析対象者189名の ER 遺伝子多型の分布状況を, Fig. 3 に示した。*Pvu* II による ER 遺伝子多型は, PP が32名(16.9%), Pp が96名(50.8%), pp が

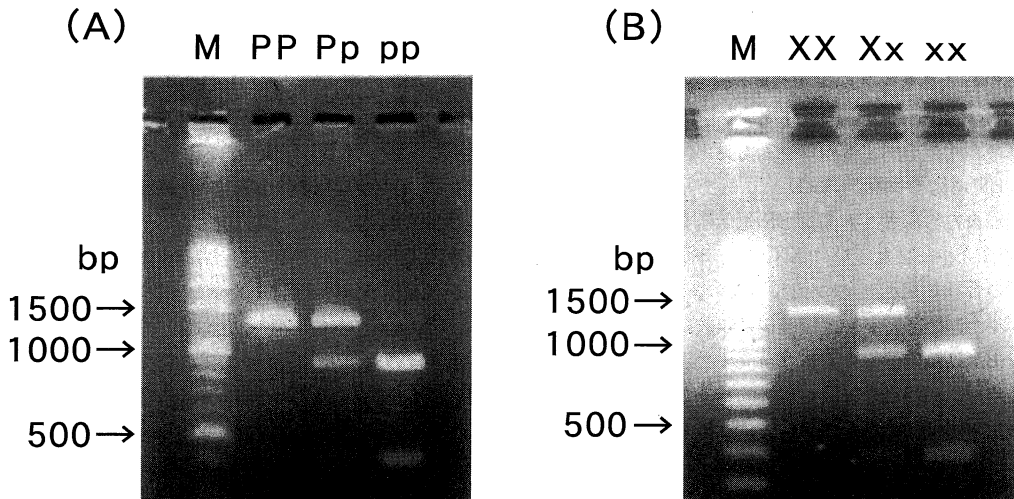


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis patterns of the ER gene fragments digested with *Pvu* II (A) and *Xba* I (B).

M : DNA size markers ; PP : homozygote without the *Pvu* II restriction site ; Pp and pp : heterozygote and homozygote with *Pvu* II restriction site, respectively.
 XX : homozygote without the *Xba* I restriction site ; Xx and xx : heterozygote and homozygote with *Xba* I restriction site, respectively.

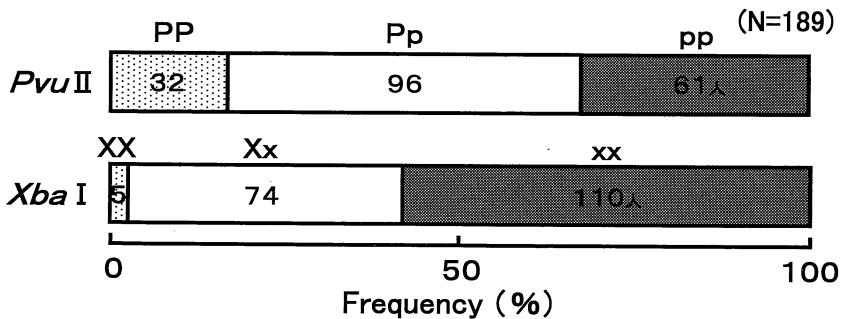


Fig. 3. Frequency of *Pvu* II and *Xba* I polymorphisms of the ER gene in 189 Japanese women.

61名(32.3%)なる分布を示し, *Xba* IによるER遺伝子多型はXXが5名(2.6%), Xxが74名(39.2%), xxが110名(58.2%)なる分布を示した. 遺伝子出現頻度は, 対立遺伝子Pが42.3%, pが57.7%で, 対立遺伝子Xが22.2%, xが77.8%であり, 各遺伝子型の分布はHardy-Weinberg則に適合していた.

Pvu IIおよび*Xba* Iを用いた切断状況による2種の遺伝子多型の組み合わせであるハプロタイプの本調査研究対象者での分布状況をFig. 4に示した. ppxxが57名(30.2%)で最も多く, PpXxが51名(27.0%), Ppxxが45名(23.8%)で, これに次ぐ. 対立遺伝子pxをもつppxx, PpXx, PpxxおよびppXxの4種のハプロタイプだけで83%を占める. PPXxを示すものは19名(10.1%), PPxxは8名(4.2%), PPXXは5名(2.6%)でこれらのハプロタイプの出現頻度は全体で17%に過ぎない. また, 本調査研究対象者の中で, PpXXまたはppXXハプロタイプを示すものは一人も見出せなかった.

2. ER 遺伝子多型とBMD

閉経後の対象者148名をER遺伝子型によりPP, Pp, ppの3グループならびにXX, Xx, およびxxの3グループの合計6グループに分け, 各グループに属する対象者の年齢, 閉経時年齢, 閉経後の年数, 身長, 体重の特性をBMD測定値とともにTable 1に示した. 年齢, 閉経時年齢, 閉経後の年数の年齢的特性ならびに身長, 体重の基本的身体的特性において, この6グループ間では

ほとんど相違は見出されなかった.

腰椎BMD値は, ER遺伝子型のXXグループで, Xxまたはxxのグループより軽度の低値を示すものの, 統計学的に有意ではなく, また*Pvu* II多型のPP, Pp, およびppのグループ間で, 何らの相違は見られなかった.

閉経後の対象者からなるこれらの各遺伝子型グループ間で, 年齢, 身長, 体重を分散共分散分析により調整したBMDの最小自乗平均値で比較すると, ER遺伝子型PP, Pp, およびppのグループ間では, BMD値に有意差は見られなかった. また, ER遺伝子型XXとXxのグループ間では, BMDはXXで明らかな低値($P < 0.1$)を示したが, 5%有意差には至らなかった(Fig. 5).

有経者30名では, ER遺伝子型XXを持つものは見出されず, 対象者数は少ないものの, 年齢的特性ならびに身長, 体重の基本的身体的特性において, この5グループ間でほとんど相違はなく, 各グループの年齢, 身長, 体重を調整したBMD値も, ER遺伝子の*Pvu* II多型間でも*Xba* I多型間のどちらでも, 統計学的に何らの有意差は見出されなかった(Table 2).

なお, 有経者のBMDは, 閉経後の対象者のBMD値より有意に高値($p < 0.05$)を示した.

3. ER 遺伝子多型と骨代謝指標

閉経後の対象者148名を前出の結果の項目2と同様に, ER遺伝子多型によりPP, Pp, ppの3グループならびにXX, Xx, およびxxの3グループの合計6グループに分け, 各グループに属する対象者の年齢, 閉経時年齢, 閉経後の年数, 身長, 体重の特性を血清BGP, 血清B-ALP, 尿中Hyp/Crの骨代謝指標とともに検討した. 各グループに属する対象者の年齢, 閉経時年齢, 閉経後の年数, 身長, 体重の特性は, Table 1に示した通りであるので, Table 3には各グループの骨代謝指標である血清BGP, B-ALPおよび尿中Hyp/Crのみを示した.

血清BGPおよび血清B-ALPは, これら6グループ間でほとんど相違はなく, 統計学的にも有意差は見出されなかった. 尿中Hyp/Cr値については, *Pvu* II多型の3グループ間では, ppグループで他グループに比べて軽度の高値が見られ, *Xba* I多型の3グループ間では, XXグループで, Xxまたはxxのグループより軽度の低値が見られたが, 統計学的に有意ではなかった.

前出の結果の項2と同様に, 有経者30名を, ER遺伝子型により, PP, Pp, ppの3グループならびにXx, およびxxの2グループの合計5グループに分け, 血清BGP, 血清B-ALP, 尿中Hyp/Crの骨代謝指標をTable 4に示した. (各グループに属する対象者の身体特性は, Table 2に前出した通りである).

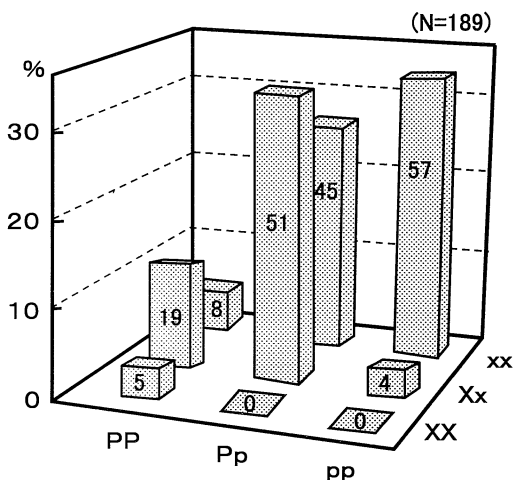


Fig. 4. Frequency of the PX haplotypes of the ER gene in 189 Japanese women.

これら5グループでは、ER 遺伝子型の Pp グループで、血清 BGP、血清 B-ALP、尿中 Hyp/Cr の3つの骨代謝指標のいずれも高値を示したが、統計学的に有意差は見出されなかった。また有経者の血清 BGP、血清 B-ALP および尿中 Hyp/Cr 値はいずれも閉経者の各骨代

謝指標より有意に低値であった($p < 0.05$)。

4. ER 遺伝子ハプロタイプと BMD および骨代謝指標
BMD、血清 BGP、血清 B-ALP および尿中 Hyp/Cr 値の測定対象者 178 名(閉経者 148 名、有経者 30 名)を ER 遺伝子上の PX ハプロタイプでグループ分けして、それ

Table 1. Basic characteristics and BMD among postmenopausal women with different ER genotypes

	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Study subjects	27	76	45	5	59	84
Age(years)	64.4 (5.7)	63.5 (6.8)	64.0 (6.0)	65.6 (5.2)	63.2 (6.3)	64.1 (6.4)
Age at menopause	49.3 (3.2)	49.4 (4.1)	48.2 (4.1)	50.3 (2.6)	49.5 (3.5)	48.6 (4.3)
Years after menopause	15.3 (7.0)	14.1 (8.2)	15.3 (8.2)	15.3 (5.4)	13.5 (7.5)	15.5 (8.4)
Height(cm)	148.3 (4.5)	149.3 (6.6)	148.7 (5.8)	146.5 (7.3)	150.3 (6.3)	148.1 (5.6)
Weight(kg)	52.2 (7.0)	52.9 (7.7)	51.0 (8.4)	51.3 (8.9)	53.4 (8.0)	51.3 (7.5)
BMD(g/cm ²)	0.80 (0.17)	0.80 (0.13)	0.77 (0.14)	0.69 (0.12)	0.83 (0.14)	0.77 (0.13)

BMD : Bone mineral density of the lumbar spines.
Values are represented as mean and SD in parentheses.

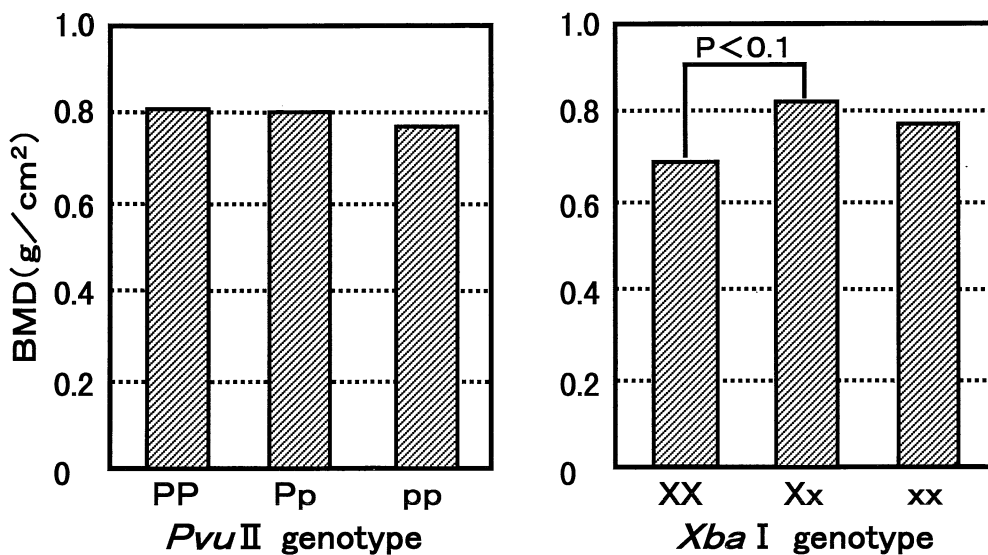


Fig. 5. Bone mineral density(BMD) of the lumbar spines in the postmenopausal women grouped by *Pvu* II and *Xba* I polymorphisms of the ER gene. BMD of the lumbar spines is represented as the least square mean adjusted for age, height, and weight by the analyses of variances and covariances.

Table 2. Basic characteristics and BMD among premenopausal women with different ER genotypes

	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Study subjects	3	15	12	0	13	17
Age(years)	43.3 (5.5)	44.6 (4.4)	41.8 (3.6)		44.4 (4.8)	42.6 (3.8)
Height(cm)	157.3 (4.4)	154.7 (6.9)	151.6 (5.7)		155.0 (7.1)	152.7 (5.7)
Weight(kg)	46.7 (3.3)	58.8 (7.3)	53.4 (10.1)		54.2 (8.3)	56.4 (9.6)
BMD(g/cm ²)	0.95 (0.10)	1.06 (0.13)	0.98 (0.13)		0.99 (0.09)	1.04 (0.15)

BMD : Bone mineral density of the lumbar spines.

Values are represented as mean and SD in parentheses.

Table 3. Bone metabolic markers among premenopausal women with different ER genotypes

	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Study subjects	27	76	45	5	59	84
BGP(ng/ml)	12.4 (3.30)	12.5 (5.33)	12.1 (4.80)	11.6 (3.16)	12.4 (4.89)	12.3 (4.91)
B-ALP(BL units)	1.41 (0.33)	1.56 (0.46)	1.46 (0.38)	1.38 (0.29)	1.49 (0.41)	1.52 (0.43)
urinary Hyp/Cr(mg/g)	40.3 (13.3)	40.9 (15.7)	45.1 (23.5)	35.1 (7.00)	42.6 (17.0)	42.2 (19.2)

BGP : Bone Gla protein.

B-ALP : Bone alkaline phosphatase.

Hyp/Cr : hydroxyproline/creatinine.

Values are represented as mean and SD in parentheses.

Table 4. Bone metabolic markers among premenopausal women with different ER genotypes

	PP	Pp	pp	XX	Xx	xx
Study subjects	3	15	12	0	13	17
BGP(ng/ml)	7.23 (4.15)	9.91 (4.25)	8.95 (4.36)		9.29 (4.47)	9.20 (4.17)
B-ALP(BL units)	1.20 (0.10)	1.29 (0.53)	1.08 (0.30)		1.30 (0.53)	1.12 (0.31)
urinary Hyp/Cr(mg/g)	22.0 (7.58)	30.3 (11.1)	24.9 (9.62)		28.2 (10.8)	26.6 (10.4)

BGP : Bone Gla protein.

B-ALP : Bone alkaline phosphatase.

Hyp/Cr : hydroxyproline/creatinine.

Values are represented as mean and SD in parentheses.

それぞれのグループの年齢, 身長, 体重の特性, BMD, 血清 BGP, 血清 B-ALP および尿中 Hyp/Cr 値を Table 5 に示した(PpXX および ppXX のハプロタイプを持つ対象者は見出されなかった).

ハプロタイプ, PPXX を持つグループの BMD 測定値が他のハプロタイプを持つグループよりわずかに低値であること, PPxx を持つグループの血清 B-ALP, ppXx

を持つグループの尿中 Hyp/Cr 値が他のハプロタイプを持つグループのものより軽度の高値を示す以外は, これらの測定値にはほとんど相違は見出されなかった.

年齢, 身長, 体重を分散共分散分析により調整した BMD の最小自乗平均値で比較しても, これらハプロタイプの 7 グループ間では, なんらの有意差も見出されなかった.

Table 5. BMD and bone metabolic markers among whole study subjects with different ER haplotypes

	PPXX	PPXx	PPxx	PpXx	Ppxx	ppXx	ppxx
Study subjects	5	18	8	49	42	4	52
Age(years)	65.6 (5.2)	59.8 (9.1)	64.1 (8.8)	59.9 (9.7)	60.8 (9.4)	58.3 (10.2)	59.4 (10.8)
Height(cm)	146.5 (7.3)	150.7 (4.6)	147.9 (4.4)	151.4 (7.4)	149.0 (6.3)	149.7 (6.4)	149.3 (5.9)
Weight(kg)	53.1 (8.9)	51.9 (6.0)	52.2 (10.2)	54.2 (8.7)	53.9 (7.2)	52.6 (6.4)	51.4 (8.9)
BMD(g/cm ²)	0.69 (0.12)	0.89 (0.17)	0.76 (0.15)	0.86 (0.14)	0.84 (0.19)	0.91 (0.11)	0.81 (0.17)
BGP(ng/ml)	11.6 (3.16)	12.0 (4.39)	12.5 (2.40)	12.0 (5.22)	12.1 (5.27)	9.65 (4.09)	11.6 (4.91)
B-ALP(BL units)	1.38 (0.29)	1.30 (0.27)	1.99 (1.07)	1.53 (0.48)	1.51 (0.48)	1.30 (0.20)	1.39 (0.41)
Hyp/Cr(mg/g)	35.1 (7.00)	38.6 (15.4)	39.7 (13.8)	40.0 (16.3)	38.3 (14.4)	46.6 (32.1)	40.4 (22.3)

BMD : Bone mineral density of the lumbar spines.

BGP : Bone Gla protein.

B-ALP : Bone alkaline phosphatase.

Hyp/Cr : hydroxyproline/creatinine.

Values are represented as mean and SD in parentheses.

考 察

近年急増している原発性骨粗鬆症の多くは女性に好発する閉経後骨粗鬆症であり、したがって骨粗鬆症のリスク要因のなかに加齢に加えて閉経が大きな比重を占めていることが、本調査と同一の対象者の閉経前後での骨量測定によっても示されてきた^{26,27)}。閉経後に見られる骨量の急激な低下は、閉経に伴う卵巣機能の喪失、すなわちエストロゲンの分泌の低下によるものである。エストロゲンの欠乏とともに骨量が減少する機序については前述したようにまだ不明な点が多いが、エストロゲン投与が骨量減少の予防または治療を可能にしたことも事実である²⁸⁾。これらのことから骨芽細胞²⁹⁾のみならず破骨細胞³⁰⁾にも発現しているエストロゲン受容体(ER)を介して、エストロゲンが多様な作用により骨代謝に関与していることは明らかである。

最近、エストロゲンが骨形成に重要な役割を果たしていることを著明に示した報告^{15,31,32)}のなかで、SmithらはER遺伝子の突然変異により骨量の減少が引き起こされることを示した。ER遺伝子のホモ接合性突然変異を有する男性例では、157番目アミノ酸であるアルギニンがストップコドン(CGA → TGA)に置換した変異が確認され、結果として機能的レセプター蛋白が欠失しており、その骨密度は年齢調整した健常女性のそれより3.1SDも低く特異的な表現型の異常が報告された¹⁵⁾。この

症例では、男性でもER欠失により骨粗鬆症が生じることを示すものとして注目され、骨塩の成熟に対するエストロゲン作用の解明に重要な役割を果たした。しかしヒトにおけるER遺伝子の突然変異例が1例のみであり、これは多型マーカーとしての意義は低い。

これに対し、ゲノム上の多型性は高頻度にみられ、ER遺伝子の多型性を示す部位として1つのマイクロサテライトの多型³³⁾と2つのRFLP部位^{19,20)}とが知られ、骨との関連についての検討がいくつかの研究グループでなされた⁸⁻¹⁰⁾。前者はER遺伝子の上流約1 kbの部位に存在するチミン、アデニンの二つの塩基(TA)の繰り返し数の多型であり、12回繰り返しTAをもつ遺伝子型が低BMDとの関連があると報告している⁹⁾。また後者はER遺伝子イントロン1にある制限酵素 *Pvu* II と *Xba* I で切断されるか否かの多型であり、閉経後女性についてPP型ではpp型に比べ低BMDを示したと報告されている^{8,10)}。

今回、著者らもVDR遺伝子に加えてER遺伝子も骨粗鬆症の有力な候補遺伝子と考え、本研究の対象者について前述のER遺伝子のイントロン1領域での *Pvu* II, *Xba* I 多型を検出し、骨密度との関連性について検討した。

RFLP解析が可能であった対象者189人における各遺伝子型の出現頻度は、*Pvu* II多型ではPP 16.9%、Pp 50.4%、pp 32.3%、*Xba* I多型ではXX 2.6%、Xx

39.2%, xx 58.2%であり, 遺伝子頻度はPが42.6%, pが57.4%, Xが23.3%, xが76.7%で各遺伝子型の分布はHardy-Weinberg則に適合していた. この2つのER遺伝子多型の頻度は, 日本人についてのKobayashi⁹⁾らの報告とはほぼ同様であった. またHan³⁴⁾らの閉経後の女性を対象とした調査でも*Pvu* II多型で対立遺伝子Pは41.5%, pは58.5%, *Xba* I多型で対立遺伝子Xは21.8%, xは78.2%と報告され, コーカシアン的女性ではXが34%, xが66%であった²⁰⁾. 著者らの本調査も含めて日本人は対立遺伝子Xの頻度が低いが地域や人種による分布の差はあまり大きくないと考えられる. VDR遺伝子イントロン8領域の*Bsm* I, *Apa* I, *Taq* I多型でその遺伝子頻度が人種によって大きく異なるのとは違っている^{6,35,36)}.

189人の内, 両側卵巣摘除術および腰椎変形の強い11人を除く178人について, ER遺伝子多型とBMDとの関連を年齢, 月経の有無, 身長, 体重を共変量とした分散共分散分析によって検討した. その結果, 閉経者148名についてのみ*Xba* IではBMDの値はXX < xx < XxであったがBMDの分散を有意($p < 0.05$)に説明した. *Pvu* II多型とBMDの関連は認められなかった. *Pvu* IIおよび*Xba* I遺伝子型の2つの組み合わせではPPxxよりもPPXXのBMDが低い傾向であったが年齢, 体格を調整したBMDとは有意な関連は認められなかった. Kobayashi⁹⁾らはER遺伝子のこの2つの多型によって検出されたハプロタイプPPxxが閉経女性の低骨量と関連があったとした. 本調査ではTable 5に見られるようにハプロタイプPPXXやPPxxを持つ対象者は年齢の高い閉経者が多く占めているので見かけ上BMDも低値となっているのであろう. 本研究ではむしろXが低骨密度との関連性を示唆していたが, 年齢, 身長, 体重を調整した最小自乗平均骨密度とER遺伝子型のいずれとも有意な関連は認められなかった. Mizunuma³⁷⁾らは*Xba* I多型と骨密度の関連を解析すると遺伝子型Xxを持つBMDの方がxxをもつBMDより高いと報告している. そして*Xba* I多型は最大骨塩量(ヒトの一生を通して20~30歳の間に到達する最大骨塩量をいう, peak bone mass, PBM)とリンクしているとした.

Ongphiphadcanakul¹⁰⁾らの報告でも骨量と*Pvu* II多型の関連は閉経者では閉経後年数, 年齢, 体格など調整しても全く見られなかったとしている. 以上のことは閉経者の骨密度に対するER遺伝子の影響は, あるとしても小さく, 閉経に伴う明らかなエストロゲンの分泌の低下に比べてもその影響は小さいと云うことを示している. 骨量に対する遺伝要因は加齢に伴う骨量減少よりもむ

しろPBMに影響を与えているのかもしれない. 女性の骨量は, 卵巣機能の発達に伴い著しく増加し, 卵巣機能が完成する頃には最大骨量の90%以上が獲得される. その後30歳半ばまでは緩やかな増加が観察され, こうして獲得された最大骨量は卵巣機能が低下する閉経時まで維持されると考えられる³⁸⁾. したがって, エストロゲンの骨形成促進作用は女性の最大骨量の獲得に重要な影響を及ぼすであろうし, その受容体であるER遺伝子の最大骨量との関連は注目すべき課題と考える.

Kobayashi⁹⁾らはPPをもつ閉経女性はBMDが有意に低かったとしているのは注目すべきことであるが, タイの調査ではPPをもつ有経者のBMDは少し高い傾向であった. このことはER遺伝子多型は卵巣機能の状態により骨代謝に異なった作用をするのではないかと, 例えばPPをもつ閉経前の女性はより高い最大骨量をもつ可能性がある. PP型も閉経後には骨量減少が促進されその結果低骨密度となるのではないかと. 今回の調査研究では若年有経者が少ないためPBMを外挿し, 詳細な解析をするデータが得られずER遺伝子との関連性については解析できなかった.

遺伝的要因に加えて, 体重³⁹⁾, カルシウム摂取量⁴⁰⁾や運動⁴¹⁾もまたPBMに影響を与えているとされている. タイでの調査¹⁰⁾ではカルシウム摂取量ではなく, 体重が有経者でER遺伝子型と体重の負荷する部位のBMDに有意に関連したと言う. 彼らの結果はエストロゲン不応症の低骨密度の症例¹⁵⁾と関連してER遺伝子型が最大骨量の決定になんらかの役割を果たしている可能性を示している.

ER遺伝子のイントロン1の多型がどのように骨代謝に影響しているのかは明らかではない. *Pvu* II, *Xba* I多型はER遺伝子内のエキソン領域と連鎖しているかもしれないし, インスリン様成長因子(IGF1), PTH関連ペプチドなどの遺伝子を含む骨代謝に影響する他の遺伝子と関連しているかもしれない.

ERが骨芽細胞と破骨細胞の両方に存在すること^{29,30)}やエストロゲンの分泌量に依存する骨のリモデリング機構から推察するとER遺伝子多型は骨代謝回転に影響していることも考えられる. 本研究でも骨形成を表す血清BGP, 骨型ALP活性, 骨吸収を表すとされる尿中Hpy値を骨代謝指標として有経者と閉経者について測定したところ3つの骨代謝指標のいずれも閉経者で有意に高く, 閉経後の骨代謝は高回転型であることが示された. 西野ら²⁴⁾は本研究と同一対象者の骨代謝指標の年齢及び閉経前後での変化を詳細に調べ, 閉経前5年から閉経後5年に相当する45歳から55歳での上昇が最も大きいこと

を示した。Christiansen⁴²⁾らは、閉経直後の女性の橈骨遠位の骨量を測定し、骨量減少の速いグループ、いわゆる fast bone losers は血中 BGP, ALP や尿中 Hyp 値を測定することによって事前に抽出できると報告した。Iki^{43,44)}らも本研究と同一対象者を調査し、橈骨遠位のみでなく腰椎についても Fast bone losers を骨代謝指標(血中 BGP, ALP や尿 Hyp, デオキシピリジノリン (deoxypyridinoline, DPyr) で把握しうることを示唆し、骨代謝指標の測定がスクリーニング法になりうる可能性を示した。このように骨代謝指標に影響する大きな要因は閉経であり、今回の ER 遺伝子型や二つの遺伝子型の組み合わせであるハプロタイプと骨代謝指標はなんの関連性も見い出せなかった。px を1つ以上もつ対象者の尿中 Hyp が高い傾向にあった(Table 5)のは閉経後の対象者が多かったことによるのであろう。

Kobayashi⁹⁾らや Mizunuma³⁷⁾らの BMD と ER 遺伝子多型との関連性についての本研究との相違の原因は不明であるが、ER 遺伝子多型の分布や骨密度もライフスタイルやコホートの違いにより影響を受けていることも考えられる。本研究の対象者が地域在住者ではあるものの骨粗鬆症検診の参加者であり、無作為抽出標本でもないのでバイアスの可能性は否定できない。また多くの他の腰椎骨密度についての調査研究と同様に横断研究であり、コホート効果の混入も除外できない。しかしながら、ER 遺伝子型の頻度は Hardy-Weinberg 平衡からは、ずれがなかったことから今回の調査対象者は1つのコホート集団とみなすことができる。今後はこれらも含め他のコホートでの調査や例数を増やし骨代謝マーカーや OC 遺伝子多型⁴⁵⁾、TGF- β 1 遺伝子多型¹¹⁾のような他の骨代謝関連遺伝子多型とのリンクについても検討する必要があると思われる。

結 語

エストロゲン受容体(ER)遺伝子のイントロン1領域に存在する2つの遺伝子多型(*Pvu* II 多型と *Xba* I 多型)に関して RFLP 解析を行い、健常日本人中高年女性の腰椎骨密度および骨代謝指標との関連を検討した結果、以下の点が明らかになった。

- 1) 日本人女性の ER 遺伝子の対立遺伝子 p(57.7%)と x(77.8%)の頻度は高く、対立遺伝子 X がやや少ないものの欧米人、タイや韓国などアジア人と同様の頻度でありこの ER 遺伝子型については人種差は見られなかった。
- 2) 遺伝子型 XX が閉経者の低骨密度とわずかに関連していたがその他の遺伝子型 PP, Pp, Xx, xx と年齢、体格を調整した骨密度とは関連性はなかった。

- 3) 腰椎骨密度と骨代謝指標(血清 BGP, 骨型 ALP 活性, 尿中 Hyp/Cr)について有経者と閉経者を比較すると、閉経者で骨密度は有意に低く、3つの骨代謝指標は有意に高値であった。

- 4) 2つの遺伝子多型のハプロタイプの頻度は px の組み合わせをもつ ppxx, PpXx, Ppxx, ppXx が 83%と多かったが、骨密度や骨代謝指標とは関連がなかった。

(謝辞：稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜った奈良県立医科大学公衆衛生学教室米増國雄教授に深甚なる謝意を表します。また、DNA の RFLP 解析、骨代謝指標の測定などの実験遂行面で直接ご指導いただいた本学公衆衛生学教室土肥祥子助教授、骨密度の測定および統計学的解析のご指導をいただいた近畿大学医学部公衆衛生学教室の伊木雅之教授、さらに、本調査で血液、尿検体採取と測定に際して多大のご協力をいただいた富山医科薬科大学地域看護学科の梶田悦子教授、富山県衛生研究所西野治身博士に心から感謝いたします。また研究遂行に際し、御協力いただきました本学公衆衛生学教室の諸兄姉に深謝いたします。

なお、本研究成果は第5回日本骨粗鬆症研究会(1996年)、第19回奈良県公衆衛生学会(1998年)で口演発表した。)

文 献

- 1) 厚生統計協会：生活習慣病対策。国民衛生の動向：101-111, 1998.
- 2) Slemenda, C. W., Christian, J. C., Williams, C. J., Norton, J. A. Q. and Johnston, C. C. Jr. : Genetic determinants of bone mass in adult women: A reevaluation of the twin model and potential importance of gene interaction on heritability estimates. *J. Bone Miner. Res.* **6**: 561-567, 1991.
- 3) Sowers, M. F., Boehnke, M., Jannausch, M. L., Crutchfield, M., Corton, G. and Burns, T. L. : Familiality and partitioning of variability of femoral neck bone mineral density of women of childbearing age. *Calcif. Tissue Int.* **50**: 110-114, 1992.
- 4) Simon, L. S. : Osteoporosis in The Merck Manual of Diagnosis and Therapy (Beers, M. H. and Berkow, R., eds.), 17th ed., Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N. J., pp.469-473, 1999.
- 5) Morrison, N. A., Yeoman, R., Kelly, P. J. and

- Eisman, J. A. : Contribution of trans-acting factor alleles to normal physiological variability : Vitamin D receptor gene polymorphisms and circulating osteocalcin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** : 6665-6669, 1992.
- 6) Morrison, N. A., Qi, J. C., Tokita, A., Kelly, P. J., Crofts, L., Nguyen, T. V., Sambrook, P. N. and Eisman, J. A. : Prediction of bone density from vitamin D receptor alleles. *Nature* **367** : 284-287, 1994.
 - 7) Willing, M., Sowers, M., Aron, D., Clark, M. K., Burns, T., Bunten, C., Crutchfield, M., D'Agostino, D. and Jannausch, M. : Bone mineral density and its change in white women : estrogen and vitamin D receptor genotypes and their interaction. *J. Bone Miner. Res.* **13** : 695-705, 1998.
 - 8) Sano, M., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., Emi, M., Shiraki, M. and Orimo, H. : Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **217** : 378-383, 1995.
 - 9) Kobayashi, S., Inoue, S., Hosoi, T., Ouchi, Y., Shiraki, M. and Orimo, H. : Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene. *J. Bone Miner. Res.* **11** : 306-311, 1996.
 - 10) Ongphiphadhanakul, B., Rajatanavin, R., Chanprasertyothin, S., Piaseu, N., Chailurkit, L., Sirisriro, R. and Komindr, S. : Estrogen receptor gene polymorphism is associated with bone mineral density in premenopausal women but not in postmenopausal women. *J. Endocrinol. Invest.* **21** : 487-493, 1998.
 - 11) Yamada, Y., Miyauchi, A., Goto, J., Takagi, Y., Okuizumi, H., Kanematsu, M., Hase, M., Takai, H., Harada, A. and Ikeda, K. : Association of a polymorphism of the transforming growth factor β 1 gene with genetic susceptibility to osteoporosis in postmenopausal Japanese women. *J. Bone Miner. Res.* **13** : 1569-1575, 1998.
 - 12) Hughes, M. R., Malloy, P. J., Kieback, D. G., Kesterson, R. A., Pike, J. W., Feldman, D. and O'Malley, B. W. : Point mutations in the human vitamin D receptor gene associated with hypocalcemic rickets. *Science* **242** : 1702-1705, 1988.
 - 13) Spotila, L. D., Colige, A., Sereda, L., Constantinos-Deltas, C. D., Whyte, M. P., Riggs, B. L., Shaker, J. I., Spector, T. D., Hume, E., Olsen, N., Attie, M., Tenenhouse, A., Shane, E., Briney, W. and Prockop, D. J. : Mutation analysis of coding sequences for type I procollagen in individuals with low bone density. *J. Bone Miner. Res.*, **9** : 923-932, 1994.
 - 14) Shapiro, J. R., Stover, M. L., Burn, V. E., McKinstry, M. B., Burshell, A. L., Chipman, S. D. and Rowe, D. W. : An osteopenic nonfracture syndrome with features of mild osteogenesis imperfecta associated with the substitution of a cysteine for glycine at triple helix position 43 in the pro α 1 (I) chain of type I collagen. *J. Clin. Invest.* **89** : 567-573, 1992.
 - 15) Smith, E. P., Boyd, J., Frank, G. R., Takahashi, H., Cohen, R. M., Specker, B., Williams, T. C., Lubahn, D. B. and Korach K. S. : Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N. Engl. J. Med.* **331** : 1056-1061, 1994.
 - 16) Peacock, M. : Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: a contrasting view. *J. Bone Miner. Res.* **9** : 1294-1297, 1995.
 - 17) Eisman, J. A. : Vitamin D receptor gene alleles and osteoporosis: an affirmative view. *J. Bone Miner. Res.* **10** : 1289-1293, 1995.
 - 18) Pacifici, R., Brown, C., Puscheck, E., Friedrich, E., Slatopolsky, E., Maggio, D., McCracken, R. and Avioli, L. V. : Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** : 5134-5138, 1991.
 - 19) Castagnoli, A., Maestri, I., Bernardi, F. and DelSenno, L. : Pvu II RFLP inside the human estrogen receptor gene. *Nucleic Acids Res.* **15** : 866, 1987.
 - 20) Zuppan, P. J., Hall, J. M., Ponglikitmongkol, M., Spielman, R. and King, M. C. : Polymorphisms at the estrogen receptor (ESR) locus and linkage relationships on chromosome 6q. *Cytogenet. Cell Genet.* **51** : 1116, 1989.
 - 21) Davis, R. W. : Rapid DNA isolations for enzymatic and hybridization analysis. *Methods in*

- Enzymol. **65** : 404-411, 1980.
- 22) **Yaich, L., Dupont, W. D., Cavener, D. R. and Parl, F. F.** : Analysis of the *Pvu* II restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res.* **52** : 77-82, 1992.
- 23) **Hosoda, K., Eguchi, H., Nakamoto, T., Kubota, T., Honda, H., Jindai, S., Hasegawa, R., Kiyoki, M., Yamaji, T. and Shiraki, M.** : Sandwich immunoassay for intact human osteocalcin. *Clin. Chem.* **38** : 2233-2238, 1992.
- 24) 西野治身・田中朋子・土肥祥子・伊木雅之・梶田悦子・日下幸則・鏡森定信 : 中高年女性の腰椎骨密度とそれに影響する要因(第2報)骨代謝の生化学指標からみた年齢および閉経の骨密度への影響. *日衛誌.* **49** : 807-815, 1994.
- 25) **Bergman, I. and Loxley, R.** : The determination of hydroxyproline in urine hydrolysates. *Clin. Chim. Acta.* **27** : 347-349, 1970.
- 26) 梶田悦子・伊木雅之・西野治身・土肥祥子・森山忠重・飛田芳江・出口洋二・日下幸則・緒方 昭 : 中高年女性の腰椎骨密度とそれに影響する要因(第1報)腰椎骨密度の Dual-energy X-ray absorptiometry による測定成績と年齢, 閉経の影響. *日衛誌.* **49** : 674-683, 1994.
- 27) **Iki, M., Dohi, Y., Nishino, H., Kajita, E., Kusaka, Y., Tsuchida, C., Yamamoto, K. and Ishii, Y.** : Relative contributions of age and menopause to the vertebral bone density of healthy Japanese women. *Bone* **18** : 617-620, 1996.
- 28) **Riggs, B. L. and Melton, L. J. III rd.** : The prevention and treatment of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **327** : 620-627, 1992.
- 29) **Komm, B. S., Terpening, C. M., Benz, D. J., Graeme, K. A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G. L., O'Malley, B. W. and Haussler, M. R.** : Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* **241** : 81-84, 1988.
- 30) **Pensler, J. M., Radosevich, J. A., Higbee, R. and Langman, C. B.** : Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors. *J. Bone Miner. Res.* **5** : 797-802, 1990.
- 31) **Korach, K. S.** : Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science* **266** : 1524-1527, 1994.
- 32) **MacGillivray, M. H., Morishima, A., Conte, F., Grumbach, M. and Smith, E. P.** : Pediatric endocrinology update: an overview. The essential roles of estrogens in pubertal growth, epiphyseal fusion and bone turnover: lessons from mutations in the genes for aromatase and the estrogen receptor. *Horm. Res.* **49** : Suppl 1 : 2-8, 1998.
- 33) **DelSenno, L., Aguiari, G. L. and Piva, R.** : Dinucleotide repeat polymorphism in the human estrogen receptor (ESR) gene. *Hum. Mol. Genet.* **1** : 354, 1992.
- 34) **Han, K. O., Moon, I. G., Kang, Y. S., Chung, H. Y., Min, H. K. and Han, I. K.** : Nonassociation of estrogen receptor genotypes with bone mineral density and estrogen responsiveness to hormone replacement therapy in Korean postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **82** : 991-995, 1997.
- 35) **Hustmyer, F. G., Peacock, M., Hui, S., Johnston, C. C. and Christian, J.** : Bone mineral density in relation to polymorphism at the vitamin D receptor gene locus. *J. Clin. Invest.* **94** : 2130-2134, 1994.
- 36) **Iki, M., Dohi, Y., Yonemasu, K., Kajita, E., Nishino, H., Kusaka, Y., Morita, A. and Sato, K.** : Vitamin D Receptor gene haplotype and bone density in Japanese postmenopausal women. *Osteoporosis Int.* **6** (suppl 1) : S138, 1996.
- 37) **Mizunuma, H., Hosoi, T., Okano, H., Soda, M., Tokizawa, T., Kagami, I., Miyamoto, S., Ibuiki, Y., Lnoe, S., Shiraki, M. and Ouchi, Y.** : Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women. *Bone* **21** : 379-383, 1997.
- 38) **Soda, M. Y., Mizunuma, H., Honjo, S., Okano, H., Ibuiki, Y. and Igarashi, M.** : Pre- and postmenopausal bone mineral density of the spine and proximal femur in Japanese women assessed by dual energy X-ray absorptiometry: a cross-sectional study. *J. Bone Miner. Res.* **8** : 183-189, 1993.
- 39) **Reid, L. R., Plank, L. D. and Exans, M. C.** : Fat

- mass is an important determinant of whole body bone density in premenopausal women but not in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**: 779-782, 1992.
- 40) **Johnston, C. C. Jr., Miller, J. Z., Slemenda, C. W., Reister, T. K., Hui, S., Christain, J. C. and Peacock, M.**: Calcium supplementation and increases in bone mineral density in children. *N. Engl. J. Med.* **327**: 82-87, 1992.
- 41) **Recker, R. R., Davies, K. M., Hinders, S. M., Heanesy, R. P., Stegman, M. R. and Kimmel, D. B.**: Bone gain in young adult women. *JAMA* **268**: 2403-2408, 1992.
- 42) **Christiansen, C., Riis, B. J. and Rodbro, P.**: Prediction of rapid bone loss in postmenopausal women. *Lancet* **1**: 1105-1108, 1987.
- 43) **伊木雅之・梶田悦子・三田村純枝・西野治身・土肥祥子・飛田芳江・出口洋二・日下幸則**: 中高年女性の腰椎骨密度からみたいわゆる Fast Bone Losers の特徴. *Osteoporosis Japan* **2**: 320-321, 1994.
- 44) **Iki, M., Kajita, E., Dohi, Y., Nishino, H., Kusaka, Y., Tsuchida, C., Yamamoto, K. and Ishii, Y.**: Age, menopause, bone turnover markers and lumbar bone loss in healthy Japanese women. *Maturitas* **25**: 59-67, 1996.
- 45) **Dohi, Y., Iki, M., Ohgushi, H., Gojo, S., Tabata, S., Kajita, E., Nishino, H. and Yonemasu, K.**: A novel polymorphism in the promoter region for the human osteocalcin gene: the possibility of a correlation with bone mineral density in postmenopausal Japanese women. *J. Bone Miner. Res.* **13**: 1633-1639, 1998.