



えんどう ひでとし  
遠藤 英俊 先生

昭和57年滋賀医科大学卒業。同62年名古屋大学医学部大学院修了。平成2年米国国立老化研究所客員研究員。同5年国立病院研究所中部病院内科医長。同10年より国立長寿医療センター包括診療部長。現在に至る。

学会など：日本内科学会内科認定医、日本老年医学会副総務、老年病専門医、日本ケアマネジスト学会理事、日本高齢者虐待防止学会理事、日本老年精神医学会理事・専門医、日本認知症学会副総務、日本認知症ケア学会副総務。

関心あるテーマ：老年医学、認知症、ケアマネジスト、回想法、DCM、高齢者虐待

がやはり一番の課題であり、それをある意味では、かかりつけ医のバックアップをやっていたくサポート医の方の拡充を図っていきたいと思っています。かかりつけ医の方は初年度だけで6,885人、サポート医の方もいま300人強ということですから、それなりに順調に伸びていると思います。しかし、課題としては、積極的に取り組まれている都道府県と、取り組まれない都道府県があるということです。

鳥羽 それは、都市部と地方との差ですか。

中井川 必ずしもそういうことではないです。

鳥羽 では、サポート医を教えるという教育者の数は足りているのですか。

中井川 サポート医が何名必要なのかという点で、いろいろな議論がありますし、具体的にいいますと、先ほどいいましたように、都道府県によってサポート医の数に差があるので、はっきりとしたことはいえません。ただかかりつけ医をサポート医がどのような形で育てていくのかということが、課題だと思います。

鳥羽 三鷹市の場合、サポート医は2人いますが、そのサポート医がかかりつけ医を教える講習会にオブザーバーとして出席してくれと依頼がきます。でもサポート医はさすがに整形外科の方と麻酔科の方なので、すべてのかかりつけ医の先生の質問には答えられないような状態です。サポート医の方は非常に熱心に取り組んでおられますが、その方たちの継続教育も必要ではないかと思っています。

中井川 それは重要な課題として受け止めたいと思います。

鳥羽 遠藤先生、何かご意見はございますか。  
遠藤 特定の専門医を養成するより、実は地域でネットワークができる、医師会の相談、企画運営、かかりつけ研修、など先生にご協力いただきたいのです。

地域とリーダー的な先生を養成させていただいているので、一部質問に答えられない場合も出てきているかもしれません。しかし、地域の底上げという意味では非常に強力で、課題としては、フォローアップ研修という、サポート医とかかかりつけ医が、常に情報をリフレッシュ

の力は大きいので、システムとして家族教育を考えていくことはとても有効だと思います。

ただ、エビデンスをわれわれも出さないと、どういうプログラムがよいとか、どういう方法論がよいということを少し検討する必要があるのだらうと思います。確立したものができれば、行政も動きやすくなると思います。

### 認知症専門職の教育

鳥羽 今後の教育としては、やはりそれぞれの専門職教育も大切です。最近、認知症学会でも、認知症の専門医、サポート医、認定看護師、ヘルパーなどありますが、様々な専門職の資格や養成について、行政ではどのような仕組みを考えておられますか。

中井川 医療の方では、かかりつけ医をいかに普及させていくかということが一番です。そこ

していくようなシステムが必要です。

たとえば認知症介護指導者もそうですし、看護、介護や医師の教育のシステムができていますが、ブラッシュアップできていません。ブラッシュアップ(現任研修)できる政策教育を期待しているところです。

鳥羽 サポート医、あるいは地域のケアマネジャーの教育も非常に大切だと思うのですが、浦上先生、いかがでしょうか。

浦上 鳥取県では適切な先生方がサポート医になってくださっていて助かっています。サポート医の先生方は全部に対応するのではなく連携作りをしていただくことが大事だと思います。

鳥取県の西部医師会では、サポート医の先生から声をかけて、かかりつけ医の研修会が開催され、その中でいろいろな先生方に講演していただき、勉強しています。

鳥羽 確かに非常に熱心な先生が一度サポート医になられると、質問も多くなりますので、専門医や認知症を診ることのできる医師とのホットラインの整備を急ぐ必要があると思います。

遠藤 もの忘れ外来もおそらく全国で1,000くらいあると思いますが、十分ではないのですね。もの忘れ外来というのは専門医、サポート医の機能を有効に連携しながら高めていくということではよいのではないのでしょうか。

## 今後の希望

鳥羽 では最後に、いい足りないこと、今後の課題についてなど何かございますか。

中井川 本日のテーマの地域で支えるということを行いますと、いかに医療・介護を含めて総合的に支えていくかということが課題になります。先進的に取り組まれている自治体は、どんどん先を行かれていて、厚生労働省としては、一番手グループがどんどん先に進む一方で、二番手、三番手以降をどうやって育てていくのかというのが課題だと思っています。

平成19年度はそういう意味で各都道府県、必ず1カ所、医療・介護の連携を含めた地域支

とば けんじ 先生  
鳥羽 研二 先生



昭和53年東京大学医学部卒業。同年同附属病院医員。同55年東京警察病院内科勤務。平成元年米国ペンシルベニア大学生理生物学教室客員研究員。同8年プリンストン大学老年医学研究員。同年東京大学医学部助教授。同12年杏林大学医学部高齢医学主任教授。同18年杏林大学病院もの忘れセンター長(併任)。現在に至る。

日本老年医学会(専門医・指導医、評議員、理事)、日本痴呆症学会(評議員)など。

現在の研究領域:

- 1) 老年定価群、総合的機能評価
  - 2) 高齢者の意欲を客観的に判定するVitality Indexの開発と応用
  - 3) 高齢者の総合的機能評価の国際比較
- Ⅱ) 認知症
- 1) 認知症の早期発見
  - 2) 非薬物療法の定量的効果判定

援モデルを作ってくださいということをお願いしています。そのときに、そのモデル地域でどんな資源があるかを把握する必要があると思います。その情報を地域包括支援センターなどを通じて、当該地域の住民にオープンにする必要があります。情報を把握し、住民にオープンにするということは、当然、資源となる人たちにそのネットワークの中に入れていただくことへの合意を得られることにもなりますので、ぜひそういうネットワークの構築をやっていきたいと思っています。

浦上 認知症の地域での健診、予防教室をやってみて一番感じたことは、早期発見、早期予防だけでなく、同時に真の啓発活動になっているということです。なぜかという、講演会などで話を聞いてもらうと、「ああいい話だった、よくわかった」と言われるのですが、それは他人事なのです。わが事として真剣に考えていないのです。しかし、実際に健診をやると自分の

こととしてしっかり捉えてもらえるのです。ですから、私は単なる講演会だけでなく講演会プラス健康診断ということ併せてやっていくべきだと思います。

そして、若い方にも知ってもらうということです。やはり講演会というと65歳以上の方がよく来られるのですが、若い方はほとんど来られません。そういう意味ではマスコミで取り上げてもらうと、若い方にもみていただけますし、「殯の森」などの認知症をテーマにした映画がグランプリを獲ると、若い人の間でも認知症のことが話題に挙がります。私は子どもたちと同様に若い方への啓蒙も今後、大事だと思っています。

遠藤 これまで認知症がらみで医者とケアマネジャー、医者同士、病院と診療所、などいろいろな取り組みはされてきて、確かに形はみえてきたのですが、もう一歩進む時代になってきたのではないかと思います。もう少しネットワークを強固なものにするシステムが欲しいと思っています。

たとえば一般市民でいえば、認知症サポーター(20万人)の10%でもよいので、その人たちが徘徊ネットワークへの協力、認知症の人や家族を支援する地域のボランティア的な組織にならないかなということを考えています。例えば、

私が一番考えているのは、認知症でいえば徘徊と孤独死ですね。見守りというか、地域でサポーターになった方がちょっと声をかけたり、支え合うというようなシステムができてくるとよいと思っています。そういうネットワークのさらなるバージョンアップを望んでいます。

## おわりに

鳥羽 介護保険ができて、家に他人の方が入ることによって、いままでわからなかった虐待といったものもある程度わかってきました。

本日はいろいろなご意見をいただいて、ネットワークという人と施設の連携、地域でどういう人がいて何ができるのかということが整理されなければいけないと思いました。

いまのところは地域ネットワークに関わる人が自分の仕事以外に、努力してネットワークを作っているような状況です。これが本当に国の施策としてプラスになるということであれば、一定の皆様業務の中でネットワーク事業をぜひ認めて欲しいと思います。

本日は、どうも、大変ありがとうございました。

日本臨牀 65 卷 増刊号 9 (2007 年 11 月 28 日発行) 別刷

# 新時代の骨粗鬆症学

—骨折予防を見据えて—

## XVII. 骨折予防

転倒ハイリスク者の早期発見における  
‘転倒スコア’の有用性

鳥羽研二 菊地令子 岩田安希子

## XVII. 骨折予防

## 転倒ハイリスク者の早期発見における‘転倒スコア’の有用性

A simple screening test for risk of falls in the elderly

鳥羽研二 菊地令子 岩田安希子

**Key words** : 転倒, 危険因子, 内的要因, 環境要因, 実用性

## はじめに

転倒・骨折は高齢者における寝たきり要因の第3位に位置づけられ、骨粗鬆症性骨折の中で最も重い骨折である大腿骨頸部骨折は、その90%以上が転倒によって生ずるとされている<sup>1)</sup>。転倒は骨折を合併しなくても、数度の転倒を経験すると、意欲や日常生活動作能力(ADL)を低下させる<sup>2)</sup>。地域住民におけるADL依存の危険因子として、転倒は約2倍のリスクであり<sup>3)</sup>、転倒予防は寝たきり予防に極めて重要である。

従来、転倒危険因子は、特定のフィールドでの横断的、あるいは縦断的解析によってなされているが、抽出された危険因子は、身体的脆弱性、歩行機能の低下など共通の危険因子がある一方、めまいや痴呆などは成績が一致していない<sup>4)</sup>。転倒は、内的要因である身体的側面と、外的要因である環境要因による複合的症候群ととらえられるが、後者は地域や文化的、生活習慣的側面により大きく異なる可能性もある。

従来の転倒危険因子は、病歴、現症、血液検査、生活能力などの簡便な検査、専門調査員による測定検査、特殊な機器を用いた検査などが統一性なく調査され、一般健康診断に適應できかどうかの観点に著しく欠けていた(表1)。本研究では、内外の文献的レビューを基に、転

表1 測定方法の難易度で分けた転倒の危険因子

特殊機器, 医師の間診などが必要な専門検査
歩行運動系(関節症, ミオパチーなど)
歩行速度遅延
バランス低下
下肢筋力低下
心血管系障害(不整脈, 起立性低血圧など)
神経系障害(痴呆, パーキンソンニズムなど)
薬剤(鎮静薬, 睡眠薬など)
問診票などで可能な簡易な方法
老研式活動能力指標低下
(手段的ADL, 知的能動性, 社会的役割の13項目で構成)
過去の転倒歴
環境要因: 照明不良, 障害物, 段差, 不適切な履物など

倒ハイリスク者の早期発見の評価方法作成ワーキンググループの研究班によって簡易な‘転倒リスク予測表’を作成し、その評価表の妥当性、有効性を検証した。

## 1. 方法

平成14年度厚生労働省科学研究効果的医療技術の確立推進、転倒骨折班の合同討議、内外のレビュー<sup>1,2)</sup>から、筋力低下、バランス欠如、歩行障害、視力障害、移動障害、認知機能障害、

Kenji Toba, Reiko Kikuchi, Akiko Iwata: Department of Geriatric Medicine, Kyorin University, School of Medicine 杏林大学医学部 高齢医学

ADL障害, 起立性低血圧, 加齢, 転倒の既往, 慢性疾患, 薬剤, 段差が必須項目としてあげられた。これらの項目を具体的に質問票のみで被験者が内容を理解し, かつ因子のもつ意味が変容しないよう議論を重ね, 問診票を完成した(表2)。繰り返し再現性, 季節変動などの基本的検討は既になされ, 良好な結果を得ている<sup>3)</sup>

## 2. 調査対象

全国7地域(浦臼町, 仙台市, 塩尻市, 多摩地区, 香北町, 相良村, 水上町)の住民2,439人(男性932人, 女性1,507人:76.3±7.4歳)。問診票の意味を説明し調査の同意を得た後, 自記式にて回答, 自記不可能な場合は調査員が聞き取り調査を行った。

## 3. 解析

(1) 過去の転倒歴を従属変数として, 多変量解析を行った。

(2) 観察期間中の転倒歴を従属変数として, 過去の転倒歴を含む, 調査票の項目を独立変数とし重回帰分析を行った。年齢, 性は強制注入した。

p値が0.05未満を統計学的に有意とした。なお有意な傾向として,  $p < 0.1$ の項目も記載した。

## 4. 結果

各項目の出現頻度: 過去1年の転倒歴は708人(男性229人, 女性479人, 平均年齢77.5±7.4歳), 転倒率は29.0%, 観察期間中は25%であった。骨折は1.8%にみられた。問診票と出現頻度を表2に示す。

転倒スコアと転倒率を図1に示す。スコアが大きくなるほど転倒率が高くなることが示された。

観察期間中の転倒を評価し得た376症例で, 過去の転倒歴を従属変数として, 重回帰分析を行った。

独立した有意な危険因子として, つまづく( $p < 0.0001$ ), 階段昇降に手すりが必要( $p < 0.01$ ), 歩く速度が遅くなってきた( $p < 0.01$ ), 片足立ち( $p = 0.06$ ), 家の中に障害物がある( $p < 0.05$ ), 家

表2 質問項目と出現頻度

1) 転倒: 回答数2,439人で708例(4.7±1.0回/年)	28.8%
2) つまづくことがある	56.5%
3) 手すりにつかまらず階段の昇り降りができない	50.6%
4) 歩く速度が遅くなってきた	65.2%
5) 横断歩道を青のうちに渡りきれない	17.0%
6) 1kmくらい続けて歩けない	35.8%
7) 片足で5秒くらい立てない	38.6%
8) 杖を使っている	28.3%
9) タオルを固く絞れない	16.8%
10) めまい, ふらつきがある	32.4%
11) 背中が丸くなってきた	44.9%
12) 膝が痛む	47.3%
13) 目が見えにくい	53.1%
14) 耳が聞こえにくい	42.5%
15) 物忘れが気になる	63.7%
16) 転ばないかと不安になる	45.8%
17) 毎日薬を5種類以上飲んでいる	31.2%
18) 家の中で歩くとき暗く感ずる	11.4%
19) 廊下, 居間, 玄関に障害物がある	20.8%
20) 家の中に段差がある	69.1%
21) 階段を使わなくてはならない	27.7%
22) 生活上, 家の近くの急な坂道を歩く	33.3%

の中の段差( $p = 0.09$ ), 階段の使用( $p < 0.05$ ), 坂道の使用( $p < 0.05$ )が抽出された。ロジスティック回帰分析においては, つまづくが3.8倍の転倒危険率, 階段昇降に手すりが必要, 歩く速度が遅くなってきたの身体要因が2倍の危険率だったのに対し, 環境要因は2倍以下だった。階段の使用は0.6倍で, 転倒に対して転倒率を減少させる方向の因子であった。年齢, 性は有意ではなかった。

同一の症例で, 観察期間中の転倒を従属変数として行った多変量解析では, 加齢( $p < 0.0001$ ), 過去の転倒( $p < 0.0001$ ), 背が丸くなってきた( $p < 0.05$ ), 物忘れの自覚( $p < 0.05$ ), めまい( $p < 0.05$ ), 膝の痛み( $p = 0.09$ )が抽出された。ロジスティック回帰分析においては, 過去の転倒が5.8倍と最もオッズ比が高く, 次いで加齢(10歳)は2.9倍, 物忘れの自覚は2.1倍であり, 背が丸くなってきた, と膝の痛みは2倍未満であった。めまいは0.56倍で転倒率を減少させる方向の因子であった。性差は有意ではなかった。

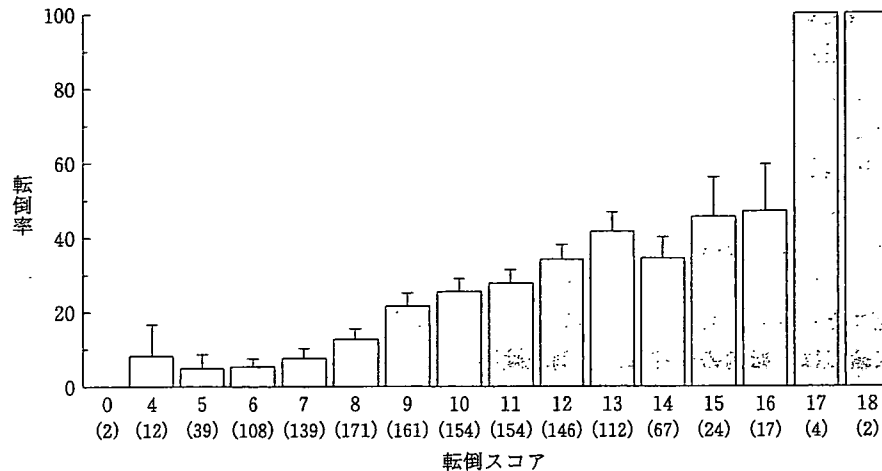


図1 転倒スコアと転倒率(過去1年)  
21項目(21点満点)

## 5. 考 察

転倒は多数の内的要因、外的要因による、多危険因子の重層的な症候群(multiple risk factor syndrome)の一つである<sup>1)</sup>。

Rubenstein は、転倒に関する大規模研究のレビューを行い、筋力低下、バランス欠如、歩行障害、移動障害、ADL障害はほとんどすべての研究で一致した危険因子であるが、視力障害、認知機能障害は半数の研究では危険因子として有意でなく、起立性低血圧は7研究中2つのみ有意であったと報告している<sup>4)</sup>。このように、比較的人種や地域の差異が小さくないと予測される内的要因でも、危険因子としての重みは、対象によって異なる成績である。転倒の危険評価表の開発は、主として、介護施設<sup>5)</sup>や病院<sup>6-8)</sup>で行われ、その要因として過去の転倒、認知機能、感覚機能、運動・歩行機能、薬剤、立ちくらみ、慢性疾患があげられている。転倒の大部分は家庭内で起き、居間など室内で過半数が起きるとされているが、外的要因に関しては、危険因子を標準化する試みはほとんどない。地域における転倒危険因子の抽出は多く行われているが<sup>9-13)</sup>、機能評価は質問紙票のみで完了せず、測定に人手を要するものがほとんどである。また、内的要因と外的要因を公平に並べて、転倒の危険因

子としての意味を調査した研究はなく、外的要因を加えた地域での簡易な危険因子評価表は見当たらない。

本研究では、過去の成績<sup>1,2,4)</sup>および、転倒評価表ワーキンググループの研究成績から、内的要因の選択を行った。外的要因に関しては、筋力低下、バランス欠如、歩行障害、移動障害、ADL障害と関連する外的因子に焦点を絞り、バリアフリーの観点から、障害物、段差、階段、坂道など多様な因子を下位項目にあげた。視力障害と関連して、‘部屋が暗く感ずるか’も加えた。

本研究では、過去の転倒と将来の転倒を従属変数として、各因子が独立した危険因子であるかを検定した。過去の転倒に対しては、独立した有意な危険因子として、内的要因では‘つまずく’、‘階段昇降に手すりが必要’、‘歩く速度が遅くなってきた’、‘片足立ち5秒ができない’が抽出され、外的要因では‘家の中に障害物がある’、‘家の中の段差’、‘階段の使用’、‘坂道の使用’が抽出された。これらは、筋力低下、バランス欠如、歩行障害、移動障害、ADL障害<sup>3)</sup>と関連する内的因子を具体的記述によって因子としてとらえたものと評価されよう。最近の転倒の前向きコホート研究のメタアナリシスでは、下肢筋力低下が上肢筋力低下よりオッズ比が高い

ことが示されている<sup>10)</sup>。今回の下位項目でも、下肢筋力に関係がある項目のみが抽出されたことと一致した成績と考える。

外的要因では、‘家の中に歩行上の障害物がある’、‘家の中の段差’という、比較的改善可能な因子が関連していたことは、転倒予防に関連しても興味深い。また、階段の使用が転倒予防の方向に働いていたことは、転倒予防体操、筋力訓練の可能性を示唆するものとして興味深い。

過去の成績では、転倒の既往は、転倒危険因子として最も重要で、内外研究で3.8倍平均である<sup>1)</sup>。今回の前向き研究でも、過去の転倒が5.8倍と最もオッズ比が高く、加齢(2.9倍)、骨粗鬆症と関連する‘円背’(1.8倍)、痴呆と関連する‘物忘れの自覚’(2.1倍)、変形性膝関節症と関連する‘膝関節痛’(1.6倍)などの身体要因のみが有意であり、下肢筋力や環境要因は有意ではなかった。

下肢筋力や環境要因関連の要素が有意でなかった原因は、これらの要素を強くもつ群は過去の転倒者に多いため、‘過去の転倒’を独立変数とした場合に、独立した危険因子としてのパワーを失ったと考えるのが妥当であろう。

他の検査方法との比較としては、本スコアの有用性に関し、松林らが、この問診票を用い、

北海道浦臼町で施行した調査がある。過去の転倒を従属変数として、転倒危険を察知するカットオフポイントは、転倒スコア10点以上で、感度、特異度とも70%以上の結果であった。また、従来のUp & Goテストや、歩行速度、functional reachより、転倒予測の感度、特異度に優れている結果を得ている(松林公蔵：長寿科学転倒介入研究班(班長鳥羽研二)、2006年度報告書)。

#### おわりに

転倒予防事業で、今後の転倒危険者を抽出する検査を考える場合、従来のように、環境因子の問診票と下肢筋力検査(歩行速度、片足立ち時間)などに時間を費やすより、過去の転倒回数を十分聴取し、身体的側面(骨粗鬆症、痴呆、膝関節症)の情報を得るため、‘転倒スコア’を活用することが、簡易で有用であると示唆された。

共同研究者(敬称省略)：杏林大学高齢医学 山田思鶴、産業医科大学 大河内二郎、京都大学東南アジア研究所 松林公蔵、国際医療福祉大学 高橋 泰、名古屋大学老年科 鈴木裕介、東京都老人総合研究所 高橋龍太郎、東北大学老年呼吸器内科 佐々木英忠。

本研究は、厚生労働省科学研究、長寿科学総合研究事業の助成によって行われた。

#### ■ 文 献

- 1) 鈴木隆雄：転倒の疫学。日老医誌 40: 85-94, 2002.
- 2) 鳥羽研二ほか：効果的医療技術の確立推進研究, 2003年度班研究報告書, 2003.
- 3) 鳥羽研二ほか：転倒リスク予測のための「転倒スコア」の開発と妥当性の検証。日老医誌 42: 346-362, 2005.
- 4) Rubenstein LZ: Falls. In: Ambulatory Geriatric Care (ed by Yoshikawa TT), McGraw Hill, New York, 1993.
- 5) Tinetti ME, et al: Fall risk index for elderly patients based on number of chronic disabilities. Am J Med 80(3): 429-434, 1986.
- 6) Nyberg L, Gustafson Y: Using the Downton index to predict those prone to falls in stroke rehabilitation. Stroke 27(10): 1821-1824, 1996.
- 7) Morse JM, et al: Development of a scale to identify the fall-prone patients. Can J Aging 8: 366-377, 1989.
- 8) Brians LK, et al: The development of the RISK tool for fall prevention. Rehabil Nurs 16: 67-69, 1991.
- 9) Tinetti ME, et al: Risk factors for falls among elderly persons living in the community. N Engl J Med 319: 1701-1707, 1988.
- 10) O'Loughlin JL, et al: Incidence of and risk factors for falls and injurious falls among the community-dwelling elderly. Am J Epidemiol 137: 342-354, 1993.



- 11) Davis JW, et al: Risk factors for falls and for serious injuries on falling among older Japanese women in Hawaii. *J Am Geriatr Soc* 47: 792-798, 1999.
- 12) Campbell AJ, et al: Risk factors for falls in a community-based prospective study of people 70 years and older. *J Gerontol* 44: M112-M117, 1989.
- 13) Tromp AM, et al: Fall-risk screening test: a prospective study on predictors for falls in community-dwelling elderly. *J Clin Epidemiol* 54: 837-844, 2001.
- 14) Moreland JD, et al: Muscle weakness and falls in older adults: a systematic review and meta-analysis. *J Am Geriatr Soc* 52: 1121-1129, 2004.

# 高齢者の半数に老年症候群の病態が認められる

## 老年症候群と機能障害:退職者健康調査

Geriatric conditions and disability: the Health and Retirement Study

**■背景** 失禁や転倒など加齢に伴う病態・状態(老年症候群)は、従来の医学的な疾患モデルに含まれていない概念であり、高齢者のケアで見逃されている可能性がある。老年症候群の有病率と高齢者における健康および障害への影響について、一般住民からなる標本集団での検討はなされていない。

**■目的** 全米を代表するデータを用いて、老年症候群の有病率を調査し、日常生活動作(ADL)における依存性との関連について検討する。

**■研究デザイン** 横断的解析。

**■設定** 2000年に実施されたHealth and Retirement Studyの調査。

**■参加者** 地域およびナーシングホームで生活している65歳以上の成人(n = 11,093;米国内の高齢者3450万人を代表する標本)。

**■評価項目** 老年症候群(認知障害、転倒、失禁、体格指数[BMI]低値、めまい、視覚障害、聴覚障害)および日常生活動作(ADL;入浴、着替え、食

事、移動、排泄)での介助必要度。

**■結果** 65歳以上の成人のうち、49.9%に1つ以上の老年症候群があった。一部の老年症候群は一般的な慢性疾患(心疾患や糖尿病など)と同程度の有病率であった。人口統計学的特性および慢性疾患で補正しても、老年症候群とADLにおける介助への依存度との関連は強く、統計学的に有意であった(老年症候群1つ:補正リスク比[RR], 2.1[95% CI, 1.9~2.4];老年症候群2つ:RR, 3.6[95% CI, 3.1~4.1];老年症候群3つ以上:RR, 6.6[95% CI, 5.6~7.6])(表)。

**■限界** 本研究は、自己申告データに基づいた横断的解析である。評価項目が調査の質問票に限定されていたため、せん妄や身体の脆弱など重大な状態の評価が含まれていない。生存バイアスが推定値に影響した可能性がある。

**■結論** 老年症候群の有病率は高齢者における慢性疾患とほぼ同じで、(機能)障害と強く関連してい

表 老年症候群の主要障害・状態と日常生活動作(ADL)依存度の関連

Geriatric Condition	Model 1: $\geq 1$ ADL Dependencies		Model 2: Bathing		Model 3: Dressing		Model 4: Eating	
	Prevalence, %†	Risk Ratio (95% CI)‡	Prevalence, %†	Risk Ratio (95% CI)‡	Prevalence, %†	Risk Ratio (95% CI)‡	Prevalence, %†	Risk Ratio (95% CI)‡
Cognitive impairment	47.9	3.6 (3.3-3.9)	41.0	4.4 (4.0-4.9)	35.2	4.2 (3.8-4.5)	23.5	6.1 (5.1-7.1)
Injurious falls	21.7	1.2 (1.1-1.3)	17.8	1.4 (1.3-1.5)	15.4	1.3 (1.2-1.5)	7.7	1.0 (0.9-1.2)
Incontinence (use of pads)	26.2	1.9 (1.7-2.0)	20.5	2.0 (1.8-2.2)	19.2	2.3 (2.0-2.6)	10.2	2.1 (1.8-2.4)
Low BMI	27.7	1.5 (1.3-1.7)	23.7	1.6 (1.3-1.9)	16.1	1.2 (0.9-1.5)	12.9	1.6 (1.3-1.9)
Dizziness	21.0	1.2 (1.1-1.3)	13.5	1.0 (0.9-1.1)	13.8	1.2 (1.1-1.3)	6.6	1.2 (1.0-1.3)
Vision impairment	31.8	1.7 (1.6-1.9)	24.1	1.7 (1.5-1.9)	20.1	1.6 (1.5-1.8)	13.7	2.2 (1.9-2.5)
Hearing impairment	14.5	1.0 (1.0-1.1)	10.4	1.0 (0.9-1.1)	9.4	1.0 (0.9-1.1)	4.8	0.9 (0.8-1.0)

\* Prevalences and risk ratios are weighted by using the Health and Retirement Study (HRS) respondent population weights to adjust for the complex sampling design of the HRS. ADL = activities of daily living; BMI = body mass index.

† Prevalence of dependency for each geriatric condition.

‡ Each model was adjusted for 7 geriatric conditions simultaneously, and for 6 demographic characteristics (age, sex, race, marital status, education, and net financial worth) and 7 chronic diseases (heart disease, lung disease, diabetes, cancer, musculoskeletal disorder, stroke, and psychiatric disorder).

る症例もある。老年症候群は現在の保健医療モデルの対象になっていないが、高齢者の健康と機能にとって重要であり、高齢者ケアで取り組むべき課題であることが、本研究の結果から示唆される。

**解説****後期高齢者の在宅医療を推進するうえで国内での調査が必要に**

鳥羽 研二 杏林大学医学部高齢医学教授

老年症候群は高齢者にみられる頻度の高い病態で、原因はともかく、自立を妨げ医療だけでなくケアを必要とする状態と考えられ、文献上55個もの老年症候群が挙げられているが、何をもちいて老年症候群とするのかといった根本的な定義は定まっておらず、重症度の判定も不明確である。

本研究では、このため「高齢者によくみられる病態」という名称を用い、米国国立老年学研究所の研究費を得てミシガン大学が縦断的に行っているHealth and Retirement Studyのデータから、自立度(ADL)との関連を分析している。全米の高齢者から偏りなく抽出された回答のあった11,093人の65歳以上の高齢者から、自己記入式で、病態として、もの忘れ、尿失禁、転倒、やせ、めまい、視力低下、難聴の7項目および入浴、着衣、食事、移動、排泄行為の依存度を調査した。病態のいずれか1つをもつ出現頻度は、前期高齢者(65～74歳)では4割であるが、後期高齢者(75～84歳)では過

半数に増加し超高齢者(85歳以上)では、3分の2以上に達する。中でも、後期高齢者の10人に1人が尿失禁、めまい、難聴に悩み、超高齢者では、5人に1人もの忘れ、尿失禁、転倒、めまい、難聴を訴えている。

ADLとの関連では、慢性疾患の種類を考慮に入れても、高齢者によくみられる病態の数がADL依存のリスク上昇ともっとも強く関連し、1個で2.1倍、2個で3.6倍で、3個以上の病態を持つADL依存のリスクは6.6倍で、脳血管障害の3倍よりはるかに高かった。このような病態は、従来の臓器別疾患体系から傍流にあるため、従来軽視されがちであった。

多くの慢性疾患と同等の出現頻度があり、より生活機能障害に影響の強い「高齢者によく見られる病態」の重要性を指摘している。

今回の未回答者8,000人には、病態の重いものや認知症の存在があるとされ、自己記入式という調査の方法からも、病態の合併頻度はより高く、外来や在宅

医療において「高齢者によくみられる病態」に対し、医療関係者により関心をもつことが求められると結んでいる。

わが国における、80歳以上の高齢者の有訴率は2人に1人であり今回の結果と一致する。

また、解説者の調査によれば、入院・入所高齢者において、5人に1人以上が10以上の病態を有し、ADLの指標であるBarthel Indexと老年症候群の数が逆相関することを示している(鳥羽研二:治療学2004;38:716～719)。

今後後期高齢者の在宅医療を推進する上で、わが国でも、全国的な地域疫学調査が必要であろう。

# Risk assessment for falls in the elderly population

Kenji Toba

*Department of Geriatric Medicine, Kyorin University, Tokyo, Japan*

**Objective:** To evaluate whether a simple questionnaire composed of 22 items, including several environmental factors, could establish predictive validity for identifying fallers.

**Patients and methods:** The study included 2439 community-dwelling elderly people ( $76.3 \pm 7.4$  years old). Scores on the questionnaire containing only dichotomous questions (yes or no) were compared between fallers and non-fallers. A multivariate analysis was performed to identify independent risk factors for falls in a longitudinal study ( $n = 342$ ).

**Results:** A logistic regression analysis revealed that advanced age, a history of falls, cognitive dysfunction, a round back and knee joint pain were independent risks for falls. On the other hand, no environmental factors were found as independent risks for falls.

**Conclusion:** A simple fall predicting score is useful for identifying high-risk individuals in clinical settings.

**Keywords:** elderly, falls, risk assessment.

## Introduction

Falls are the third leading cause of a bed-ridden state in the elderly in Japan.<sup>1</sup> Previous studies evaluating the risk factors for falls have used a history of falls, results of physical performance tests, activity of daily living (ADL) and balance and gait as predictors.<sup>2–4</sup> On the contrary, environmental factors have not been evaluated due to difficulty in estimating geographic, climatic and cultural variations. In the present study, we present an easy screening method for finding high-risk individuals for falls, based on the results obtained from our large-scale epidemiological research on falls.

## Patients and methods

The research involved 2439 older adults (932 men and 1507 women), with a mean age of 76.3 years ( $76.3 \pm 7.4$ ), living in seven different communities in Japan. The communities were located in Hokkaido, the northern area of Japan – which is cool in summer and heavily snowy in winter – and in Kochi, the southern area – which is subtropical. Other places were Tokyo

and Miyagi, and Nagano and Gunma, characterized as flat and the mountainous regions, respectively.

A new fall assessment questionnaire (Table 1) developed by our group – unlike the previous ones, which required a large number of staff and expensive machinery – was designed to be easy for respondents to complete and to involve a smaller number of staff and no equipment.

The more “yes” answers a subject had to these questions, the higher incidence of falls in this person was observed (Fig. 1).

## Results

Among those who participated in this survey, 29% experienced a fall and 1.5% suffered a fall-related fracture over the previous year. This finding is consistent with the results of studies carried out in other countries.

The incidence rates of falls, slightly higher in the cold latitudes, varied from 20–40% in the sites examined for this study and therefore no correlation was observed between the falls rate and topographic and climatic variations. Furthermore, a decline in fall rates, being found in all locations except snowy Hokkaido in our prospective study, implies that the survey per se is an effective intervention program to reduce falls.

Correspondence: Dr Kenji Toba, Department of Geriatric Medicine, Kyorin University, 6-20-2 Shinkawa, Mitaka-shi, Tokyo 181-8611, Japan. Email: toba@tcn-catv.ne.jp

Table 1 Questionnaire

For identifying risk factors for falls		
Q1.	Have you fallen during the last 12 months? If "yes", how many times?	Yes/No
Q2.	Have you tripped during the last 12 months?	Yes/No
Q3.	Do you need handrails when climbing stairs?	Yes/No
Q4.	Do you feel your walking speed has declined recently?	Yes/No
Q5.	Is it hard to cross the road within the green signal interval?	Yes/No
Q6.	Is it hard to walk 1 km without a rest?	Yes/No
Q7.	Is it hard to stand on one foot for about 5 seconds?	Yes/No
Q8.	Do you use a cane when you walk?	Yes/No
Q9.	Is it hard to squeeze a towel tightly?	Yes/No
Q10.	Do you feel dizzy at times?	Yes/No
Q11.	Is your back bent?	Yes/No
Q12.	Do you have knee pain?	Yes/No
Q13.	Do you have visual problems?	Yes/No
Q14.	Do you have hearing problems?	Yes/No
Q15.	Do you think you are forgetful?	Yes/No
Q16.	Do you worry about falling when you walk?	Yes/No
Q17.	Do you take more than five prescribed medicines?	Yes/No
Q18.	Is it dark in your home?	Yes/No
Q19.	Are there any obstacles inside your house?	Yes/No
Q20.	Is there any difference in level inside your home?	Yes/No
Q21.	Do you have to use stairs in daily living?	Yes/No
Q22.	Do you have to walk up or down a steep slope around your house?	Yes/No

In a logistic regression analysis using the incidence of falls as a dependent variable, the risk of falls was 3.8-fold higher in subjects who had experienced tripping during the last 12 months. Also, fall rates were twice as high for those who had declined physically, for example, by needing handrails while climbing stairs and noticing a slowed walking speed. On the contrary, environmental factors increased the risk of falls by less than twofold, and especially using stairs in daily living was associated negatively (0.6-fold) with the risk of

falls. There was no significance found in age and gender differences.

Furthermore, a multivariate analysis using the prediction of future falls as a dependent variable ( $n = 342$ ) found that an odds ratio (OR) for future falls was 5.8 and was highest for those who had reported a history of falls. Advanced age (increasing every 10 years) was an additional risk factor (OR, 2.9), followed by forgetfulness (OR, 2.1), kyphosis (OR, <2.0) and knee-joint pain (OR, <2.0). Dizziness was identified as a factor reducing fall risk (OR, 0.56) and gender difference was not an independent predictor of future falls.

## Discussion

A history of falls has been defined as the most important risk factor for falls and showed an average OR of 3.8 in studies performed by both domestic and overseas researchers.<sup>1-4</sup> In our prospective study, a history of falls also showed the highest OR of 5.8, and moreover, only physical risk factors – such as aging (OR 2.9), kyphosis associated with osteoporosis (OR, 1.8), forgetfulness (OR 2.1) with dementia, and knee-joint pain with osteoarthritis deformans – significantly predicted future falls. However, weakness in lower-extremity muscles or environmental hazards did not indicate a statistically significant relationship.

The subjects who had fallen in the past are likely to have been exposed to environmental hazards and have had lower extremity weakness. Thus, it seems reasonable to understand that environmental hazards or lower-extremity muscle weakness decreased impact on future falls when the analysis was performed by using a history of falls as an independent variable.

In order to identify high-risk individuals, emphasis should be placed on careful inquiry about the number of previous falls, instead of spending a great deal of time on questionnaires regarding environmental risks or lower-extremity function tests (walking speed or one-foot standing), which we had done in the past. In addition, we introduce the Fall Predicting Score, which is designed to efficiently detect persons at risk for future falls, by simply summing the presence of three physical risk factors for falls (osteoporosis, dementia and knee-joint pain).

Finally, a round back, being found as a significant predictor in our prospective study, raises important questions, particularly whether a prolonged false posture may predispose individuals toward a round back, or whether sarcopenia and osteopenia may share the same exacerbating mechanism such as vitamin D deficiency, thereby leading to a round back.

## Conflict of Interest

No conflict of interest has been declared by the author.

Sum of risks of subscale and falls during last 12 months  
(full score 21)

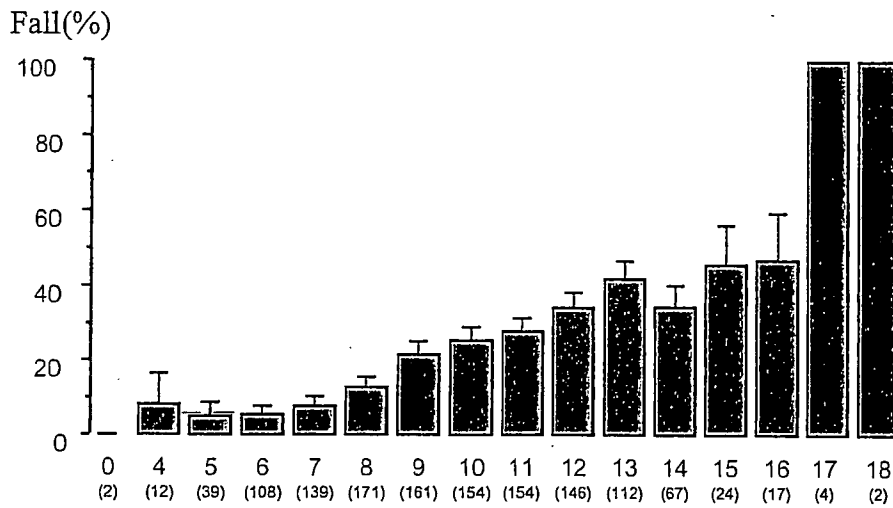


Figure 1 Subjects with multiple risk factors tend to fall more frequently.

References

1 Suzuki T. Epidemiology and implication of falling among the elderly. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2002; 40: 85-94.  
 2 Rubenstein LZ. Falls. In: Yoshikawa TT, ed. *Ambulatory Geriatric Care* 1993.

3 Tinetti ME, Williams TF, Mayewski R. Fall risk index for elderly patients based on number of chronic disabilities. *Am J Med* 1986; 80: 429-434.  
 4 Nyberg L, Gustafson Y. Using the Downton index to predict those prone to falls in stroke rehabilitation. *Stroke* 1996; 27: 1821-1824.

**$\alpha_2$ -Adrenergic receptor regulates TLR4-induced NF- $\alpha$ B activation through  $\alpha$ -arrestin 2**

Takako Kizaki,<sup>1</sup> Tetsuya Izawa,<sup>2</sup> Takuya Sakurai,<sup>1</sup> Shukoh Haga,<sup>3</sup> Naoyuki Taniguchi,<sup>4</sup> Hisao Tajiri,<sup>5</sup> Kenji Watanabe,<sup>6</sup> Noorbibi K. Day,<sup>7</sup> Kenji Toba,<sup>8</sup> and Hideki Ohno<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Predictive Medicine and Sport Science, Kyorin University, School of Medicine, Mitaka 181-8611, Japan; <sup>2</sup>Department of Kinesiology, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, Hachioji 192-0397, Japan; <sup>3</sup>Institute of Health and Sport Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8475, Japan; <sup>4</sup>Department of Biochemistry, Osaka University Medical School, Suita 565-0871, Japan; <sup>5</sup>Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine, The Jikei University School of Medicine, Tokyo 105-8461, Japan; <sup>6</sup>Watanabe Clinic, Shizuoka 422-8067, Japan; <sup>7</sup>Department of Pediatrics, University of South Florida/All Children's Hospital, St. Petersburg, FL 33701, USA; <sup>8</sup>Department of Geriatric Medicine, Kyorin University, School of Medicine, Mitaka 181-8611, Japan

Short title: Cross-talk between  $\alpha_2$ AR and TLR pathways

Address for reprint requests and other correspondence: Takako Kizaki, Ph.D., Department of Molecular Predictive Medicine and Sport Science, Kyorin University, School of Medicine, 6-20-2, Shinkawa, Mitaka, Tokyo 181-8611, Japan. E-mail: [kizaki@kyorin-u.ac.jp](mailto:kizaki@kyorin-u.ac.jp)

Key words: Monocytes/Macrophages, Nitric Oxide,  $\alpha_2$ -Adrenergic Receptor, Toll-like Receptor, NF- $\alpha$ B,

---

### Summary

Toll-like receptors (TLRs) play an important role in innate immunity. Meanwhile,  $\alpha_2$ -adrenergic receptors ( $\alpha_2$ AR) provide the key linkages for the sympathetic nervous system to regulate the immune system; however, its role in macrophages remains uncertain. Here, we demonstrated the cross-talk between  $\alpha_2$ AR and TLR signaling pathways.  $\alpha_2$ AR expression was down-regulated by TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS) stimulation. To investigate the physiological consequence of the down-regulation, the macrophage cell line, RAW264 cells were transfected with  $\alpha_2$ AR expression vector (RAWar). LPS-stimulated inducible nitric oxide synthase (NOS II) expression and NO production were markedly suppressed in RAWar cells. The activation of nuclear factor  $\alpha$ B (NF- $\alpha$ B) and degradation of the inhibitor of NF- $\alpha$ B (I $\alpha$ B $\alpha$ ) in response to LPS were markedly decreased in these cells. The level of  $\alpha$ -arrestin 2, which regulates  $\alpha_2$ AR signaling, was also reduced in RAW264 cells after stimulation with LPS, but not in RAWar cells. Overexpression of  $\alpha$ -arrestin 2 (RAWarr2) also inhibited NO production and NOS II expression. Further, we demonstrated that  $\alpha$ -arrestin 2 interacted with cytosolic I $\alpha$ B $\alpha$  and that the level of I $\alpha$ B $\alpha$  co-immunoprecipitated by anti- $\alpha$ -arrestin 2 antibodies was decreased in RAW264 cells but not in RAWar or RAWarr2 cells. These findings suggest that LPS-stimulated signals suppress  $\alpha_2$ AR expression, leading to down-regulation of  $\alpha$ -arrestin 2 expression, which stabilizes cytosolic I $\alpha$ B $\alpha$  and inhibits the NF- $\alpha$ B activation essential for NOS II expression, probably to ensure rapid and sufficient production of NO in response to microbial attack.



## Introduction

The ability of the innate immune system to recognize and respond to microbial components has been chiefly attributed to a family of type I transmembrane receptors termed Toll-like receptors (TLRs), which are expressed abundantly on antigen-presenting cells such as macrophages and dendritic cells and can discriminate among the distinct molecular patterns associated with microbial components [1, 2]. TLR-initiated activation of NF- $\alpha$ B is essential for the regulation of inducible nitric oxide synthase (NOS II) and several proinflammatory cytokines in response to invading pathogens. NO produced by NOS II has a number of important biological functions, including roles in host defense against intracellular pathogens and tumor-cell killing. Although this basic definition is still accepted, over the past decade, NO has been shown to play a much more diverse role in the immune system as well as in other organ systems, including not only beneficial but also detrimental effects [3, 4]. For example, the systemic inflammatory response syndrome, which includes severe septic shock and multiple organ system failure, remains a leading cause of death in critically ill patients. Therefore, it is necessary to clarify the molecular mechanisms of TLR-initiated signaling that leads to NO production in response to microbial components.

NF- $\alpha$ B is found predominantly in the cytoplasm complexed with members of the inhibitor of NF- $\alpha$ B (I $\alpha$ B) family. The release of NF- $\alpha$ B from I $\alpha$ B proteins is an essential step in the generation of transcriptionally competent NF- $\alpha$ B. The consensus is that I $\alpha$ B proteins mask the nuclear localization signals of NF- $\alpha$ B proteins, thereby regulating NF- $\alpha$ B activity, primarily by limiting their nuclear translocation. Recent studies, however, have indicated that I $\alpha$ B $\alpha$  is detected in both the nucleus and cytoplasm and that although the NF- $\alpha$ B complexes shuttle between the nucleus and cytoplasm under all conditions, they are unable to bind DNA due to their association with proteins of the I $\alpha$ B family [5-7]. Nuclear I $\alpha$ B $\alpha$  is not sensitive to signal-induced degradation. Therefore, following stimulation, NF- $\alpha$ B activities are dependent on the level of cytoplasmic NF- $\alpha$ B/I $\alpha$ B $\alpha$  complexes.

Recently, we demonstrated that the level of  $\alpha_2$  adrenergic receptor ( $\alpha_2$ AR) expression influences TLR4 signaling [8].  $\alpha_2$ AR is a member of a family of G protein-coupled receptors (GPCRs) and is the key link involved in immune system regulation via the sympathetic nervous system [9, 10]. Primary and secondary lymphoid organs, such as the thymus, spleen, and lymph nodes, receive extensive sympathetic/noradrenergic innervation, and lymphocytes, macrophages, and many other immune cells bear functional  $\alpha_2$ AR. Therefore,  $\alpha_2$ AR stimulation regulates proinflammatory cytokine production, lymphocyte traffic and proliferation, and antibody secretion through cAMP generation and protein kinase A (PKA) activation [10, 11]. However, the role of  $\alpha_2$ AR in the TLR signaling pathway in macrophages remains vague. On the other hand, we others showed that arrestins are cytosolic proteins that play a critical role in the regulation of GPCR signaling [12, 13].

Recent studies have shown that they also interact with their partner molecules in a variety of signaling pathways, including NF- $\kappa$ B signaling [14-16]. In the present study, we investigated the physiological consequence of the down-regulation of  $\alpha_2$ AR expression in macrophages and analyzed the cross-talk between the signaling of  $\alpha_2$ AR and TLRs.

## Materials and Methods

### *Cell Culture*

The murine macrophage cell line RAW264 (RCB0535) was purchased from RIKEN Cell Bank (Ibaraki, Japan) and cultured as described in our previous study [17]. The cells were stimulated with 1  $\mu$ g/ml lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* 055 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Cell viability was assessed by using the trypan blue dye exclusion test. Cell size was measured by flow cytometric analysis of forward light scatter characteristics (FSC) using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

### *Electrophoretic mobility shift assay*

Nuclear extracts were prepared as described [18]. The NF- $\kappa$ B oligonucleotide probe (5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG-3') was purchased from Promega (Madison, WI) and labeled with biotin at its 3' end. The nuclear protein (2  $\mu$ g) and excess amount of labeled oligonucleotide probes were incubated in 20  $\mu$ l EMSA buffer [20 mM HEPES, pH 7.6, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.2% Tween, 30 mM KCl, 1  $\mu$ g poly (dI-dC), 1  $\mu$ g poly L-lysine] at room temperature for 15 min, electrophoresed in 7% polyacrylamide gels, transferred onto the Biodyne Plus Membrane (Pall BioSupport Division, Port Washington, NY), and UV cross-linked. To detect signals, the blots were incubated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate in a blocking reagent for 15 min and with a chemiluminescent reagent for 5 min. The blots were then exposed to Kodak X Omat AR film (GE Healthcare Bio-Science, Piscataway, NJ).

### *Western Blotting Analysis*

Cell membrane proteins were prepared using the Plasma Membrane Protein Extraction Kit (Bio Vision, Mountain View, CA). Cytoplasmic protein extracts were prepared as described (30). The protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad, Hercules, CA), and equal amounts of membrane proteins or cytoplasmic proteins were loaded. The samples were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene difluoride membranes (Applied Biosystems, Foster City, CA). The membranes were blocked with 10% non-fat dried milk in Tris-buffered saline (TBS) and incubated with goat polyclonal antibodies (Abs) against  $\alpha_2$ AR, goat polyclonal Abs against

$\alpha$ -arrestin 2, or rabbit polyclonal Abs against  $\text{I}\alpha\text{B}\alpha'$  and NOS II (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); this was followed by incubation with appropriate secondary Abs (horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat or goat anti-rabbit IgG; DAKO, Kyoto, Japan). To ensure equal protein loading, the membranes were incubated with rabbit anti-actin or anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz) for detection of cytoplasmic or cell surface GAPDH [19] after stripping. Immunoreactivity was visualized using an enhanced chemiluminescence reagent (ECL; GE Healthcare Bio-Science).

#### *Immunoprecipitation*

The cells were lysed with lysis buffer (20 mM Tris/HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% Nonidet P-40, and protease inhibitors). The samples were clarified by centrifugation at 21,000 g at 4°C for 30 min. The protein concentration was determined using the Bradford reagent (Bio-Rad).  $\alpha$ -Arrestin 2 was immunoprecipitated with anti- $\alpha$ -arrestin 2 monoclonal Abs (Santa Cruz Biotechnology) from equal amount of samples, followed by treatment with 10  $\mu$ l of protein G-Sepharose beads (GE Healthcare Bio-Science). After extensive washing, the complexes were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting by using rabbit polyclonal Abs against  $\text{I}\alpha\text{B}\alpha'$ .

#### *Determination of Nitrite Concentration*

Nitrite in the cell culture supernatants was measured using the assay system of Ding *et al.* [20]. The nitrite concentration was calculated by comparing with sodium nitrite that was used as a standard. In some experiments, 200  $\mu$ M pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC, Sigma) was added to the cultures.

#### *Determination of Intracellular cAMP Concentration*

Cells were cultured with or without LPS for 6 h and were stimulated with Salbutamol ( $1 \times 10^{-6}$  M) for final 30 min. Cell supernatants were then removed and cells were lysed. Intracellular cAMP was determined with a commercially available enzyme immunoassay (GE Healthcare Bio-Science).

#### *Real-time PCR*

Total cellular RNA was extracted from cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen), and aliquots of 2  $\mu$ g were reverse-transcribed with ReverScript I (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) and an oligo(dT)15 primer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) at 42°C for 50 min. cDNAs were amplified by PCR under the following conditions by using the oligonucleotide primers and cycles listed in Table 1: 94 °C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec for NOS II and 18S rRNA, and 94 °C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec for total and transfected  $\alpha_2\text{AR}$  and  $\alpha$ -arrestin 2. The quantity of the cDNA template included in these reactions and the number of

amplification cycles were optimized to ensure that the reactions were stopped during the linear phase of product amplification, thus permitting semiquantitative comparisons of mRNA abundance between different RNA preparations.

#### *$\kappa_2$ AR and $\kappa$ -arrestin 2 Plasmid Constructs and Stable Transfection*

Full-length murine  $\alpha_2$ AR ( $\kappa_2ar$ ) and  $\alpha$ -arrestin 2 ( $\kappa arrestin2$ ) cDNAs were obtained by PCR using the primers 5'-GCTGAATGAAGCTTCCAGGA-3'(sense) and 5'-GCCTGTATTACAGTGGCGAG-3' (antisense) for  $\alpha_2$ AR and 5'-GGCGGGCGGAGGGCGGCGAG-3'(sense) and 5'-CGTCCTAGCAGAACTGGTCA-3' (antisense) for  $\alpha$ -arrestin 2. The amplified  $\alpha_2$ AR and  $\alpha$ -arrestin 2 fragments were subcloned into the pGEM-T Easy vector (Promega) and then into *NotI*-digested pcDNA4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). The amplified PCR products were sequenced using an automatic DNA sequencer (Applied Biosystems). The plasmid DNA used for transfection was prepared using the EndoFree Plasmid Kit (Qiagen). RAW264 cells were transfected with the pcDNA4 vector, pcDNA4- $\alpha_2ar$ , or pcDNA4- $\alpha arrestin2$  using LipofectAMINE Reagent (Invitrogen). Selection was initiated in a medium containing 500  $\mu$ g/ml Zeocine (Invitrogen).

#### *Luciferase Assays*

The full-length murine NOS II promoter fragment was cloned into the pGL3-enhancer luciferase reporter gene vector (Promega) (pGL3-NOS II) as described [21]. RAW264 cells were transfected using the LipofectAMINE Reagent with constructs containing the luciferase reporter gene, and luciferase activity was determined using the Dual Luciferase Assay System Kit (Promega) as described [21]. Activity was normalized relative to an internal co-transfected constitutive control (*Renilla* luciferase expression vector, pRL-TK; Promega). In some experiments, RAW264 cells were transiently co-transfected with NF- $\alpha$ B-responsive promoter reporter-luciferase construct pNF- $\alpha$ B-Luc (Clontech, Palo Alto, CA) or pGL3-NOS II and pcDNA4- $\alpha_2ar$  or I $\alpha$ B $\alpha$  dominant-negative vector pCMV-I $\alpha$ B $\alpha$ M (Clontech).

#### *Statistical Analysis*

The Student's t test for unpaired samples was used to compare two means. For more than two groups, statistical significance of the data was assessed by ANOVA. Where significant differences were found, individual comparisons were made between groups using the t statistic and adjusting the critical value according to the Bonferroni method. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . Data in the text and figures are expressed as means  $\pm$  SEM.