

#### D. 考察

1. 寝たきりの原疾患として、前期高齢者までは脳血管障害が60-80%を占めるが、後期高齢者以降では女性・骨関節疾患が急増する。
2. 前期高齢者で寝たきりとなる高齢者では、BMI 高値、TG 高値、HDL-C (Apo A1) 低値、拡張期血圧高値、インスリン抵抗性高値であった (SD-LDL も高い傾向)。一方、総蛋白、Alb も高値であったが、これはより若年であり、栄養状態が保たれていることを反映すると考えられた。
3. 脳血管障害で寝たきりとなる高齢者では、男性、BMI 高値値、糖尿病があると寝たきり年齢が低下した。
4. 骨関節疾患で寝たきりとなる高齢者では、脳血管障害、肺炎と関連した。

#### E. 結論

前期高齢者での寝たきりとなる高齢者では、インスリン抵抗性、耐糖能障害、低HDL-C、高TGが関連しており、メタボリックシンドロームとの関連が想定された。

一方、後期高齢者となって転倒・骨折で寝たきりとなる高齢者の要因として、脳血管障害、肺炎が抽出された。

積年の生活習慣病は、早期の寝たきりの原因となることが示された。また後期高齢者になつての骨折・転倒による寝たきりにも脳血管障害の予防が重要であることが示唆された。

#### F. 健康危惧情報

特にありません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tanaka Y, Takata T, Satomi T, Sakurai T, Yokono K. The double-edged effect of insulin on the neuronal cell death associated with hypoglycemia on the hippocampal slice culture. *Kobe J Med Sci.* 54:E97-107, 2008

Umegaki H, Iimuro S, Kaneko T, Araki A, Sakurai T, Ohashi Y, Iguchi A, Ito H  
Factors associated with lower mini mental state examination scores in elderly Japanese diabetes mellitus patients. *Neurobiol Aging.* 2008 Jul;29(7):1022-6.

Yoshino H, Sakurai T, Oizumi XS, Akisaki T; Yokono K, Kondoh T; Kohmura E, Umentani K

Dilation of perforating arteries in rat brain in response to systemic hypotension

is more sensitive and pronounced than that of pial arterioles -Simultaneous visualization of perforating and cortical vessels by in-vivo microangiography  
Microvasc Res. in press 2008

Nakajima S, Kondoh T, Morishita A, Yamashita H, Kohmura E, Sakurai T, Yokono K, Umetani K.

Loss of CO<sub>2</sub>-induced distensibility in cerebral arteries with chronic hypertension or vasospasm after subarachnoid hemorrhage. Kobe J Med Sci. 2008 Feb 8;53(6):317-26.

Tsukamoto R, Akisaki T, Kuranaga M, Takata T, Yokono K, Sakurai T  
Hasegawa Dementia Scale-Revised, for screening of early Alzheimer's disease in the elderly with type 2 diabetes  
Geriatrics and Gerontology International, in press

Sakurai T, Iimuro S, Araki A., Umegaki H, Ohashi Y, Yokono K, Ito H  
Age-associated increase in abdominal obesity and insulin resistance, and usefulness of AHA/NHLBI definition of metabolic syndrome for predicting cardiovascular disease in Japanese elderly with type 2 diabetes mellitus Gerontology submitted

櫻井 孝、横野浩一

チアゾリジン誘導体

日本臨床66 増刊号1「アルツハイマー病」552-526, 2008

見市義亮、櫻井 孝、横野浩一

糖尿病における認知機能障害—概念・特徴・診断・治療

日本臨床 別冊 新時代の糖尿病学(4) —病因・診断・治療研究の進歩— 468-474, 2008

櫻井 孝、横野浩一

後期高齢者の代謝における特徴

総合臨床 57:2433-2437, 2008

亀野まみ、高田俊宏、安田尚史、原賢太、岡野裕行、櫻井 孝、永田正男、横野浩一

意識消失で発症し、細菌性髄膜炎に続発性血管炎を合併した高齢者の1例

日本老年医学会雑誌 45:434-7, 2008

櫻井 孝:脳卒中

生活習慣病ガイドブック 兵庫県医師会生活習慣病対策プロジェクト会議編 社団法人兵庫県医師会 p. 59-62, 2008

櫻井 孝：認知症

生活習慣病ガイドブック 兵庫県医師会生活習慣病対策プロジェクト会議編 社団法人兵庫県医師会 p. 63-66, 2008

芳野弘、櫻井 孝、横野浩一

合併症のある認知症患者への対応 1) 糖尿病

認知症治療の最前線 監修 中村重信 メディカルレビュー社 78-79, 2008

櫻井 孝：糖尿病

シリーズ認知症第2巻「認知症学とマネジメント」2008 印刷中

松沢俊興、櫻井 孝：糖尿病に対するCGA, 老年医学update2008-09 日本老年医学学会雑誌編集委員会編 メディカルレビュー社 p18-25, 2008

櫻井 孝

糖尿病

高齢者を診療する医師のための研修カリキュラム 大内尉義監修 長寿科学振興財団 p283-288, 2008

櫻井 孝

糖尿病 実地医科のための高齢者診療ガイド 大内尉義監修 同人社 p 222-226, 2008

櫻井 孝、横野浩一

肥満とやせ、メタボリックシンドローム 新老年学（第3版） 東京大学出版 印刷中

## 2. 学会発表

第51回日本糖尿病学会学術集会（2008年22-24日、東京）芳野弘、櫻井 孝、永田正男、横野浩一、長谷川和男

高齢者における糖尿病、生活習慣病の重積が動脈硬化性病変、ADL低下に及ぼす作用について

第185回日本内科学会近畿地方会（平成20年6月7日 大阪）田中寛、佐々木弘智、安田尚文、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一

急速な増悪を来すも救命し得たサリチルアミド配合総合感冒薬による間質性肺炎の1例

第50回日本老年医学会(2008年6月19-21日 千葉) 飯島勝矢、飯室聡、大橋靖雄、櫻井孝、荒木厚、大内尉義、井藤英喜

高齢者糖尿病患者におけるメタボリックシンドロームは摂取カロリーよりも physical activity(生活活動強度)の低下が大きく関与する

第50回日本老年医学会(2008年6月19-21日 千葉) 櫻井 孝、飯室聡、荒木厚、梅垣宏行、大橋靖雄、横野浩一、井藤英喜

高齢者糖尿病における腹部肥満、インスリン抵抗性、とメタボリックシンドロームの意義

第50回日本老年医学会(2008年6月19-21日 千葉) 明寄太一、櫻井 孝、横野浩一

高齢者医療における関心及び教育における検討—兵庫県医師会生活習慣病対策プロジェクト会議アンケート調査より

第50回日本老年医学会(2008年6月19-21日 千葉) 来住稔、安田尚史、亀野まみ、荒井隆志、森山啓明、櫻井 孝、原賢太、永田正男、横野浩一

高齢者糖尿病患者の微量アルブミン尿期における腎機能低下

第50回日本老年医学会(2008年6月19-21日 千葉) 藤平和弘、永田正男、来住稔、奥町恭代、黒原みどり、森山啓明、原賢太、櫻井 孝、馬場久光、横野浩一

高齢2型糖尿病患者における腎症進展・心機能低下の促進因子・抑制因子の検討

第186回日本内科学会近畿地方会(平成20年9月6日 京都) 松本晃典、中村晃、明寄太一、安田尚文、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一

未分化転化により急速な増悪を来した甲状腺乳頭癌の1例

第27回日本認知症学会学術集会(平成20年10月10日-12日) 櫻井 孝、塚本瑠奈、倉永雅子、松沢俊興、芳野 弘、見市義亮、明寄太一、高田俊宏、横野浩一

高齢者糖尿病における早期アルツハイマー病のMMSE、HDS-Rプロフィールの検討

第19回日本老年医学会近畿地方会(平成20年11月15日) 中田由香子、安田尚史、岸上景子、矢谷宏文、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一

臭化ジスチグミンによるコリン作動性クリーゼをきたした高齢者の1例

第19回日本老年医学会近畿地方会(平成20年11月15日) 小林寛和、安田尚史、吉岡淳

思、河野泰博、森山啓明、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一  
糖尿病の経過中に低血糖発作、低蛋白血症を認めた1例

第19回日本老年医学会近畿地方会（平成20年11月15日）阿部泰尚、河野泰博、高田俊  
宏、安田尚史、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一  
コントロール不良の緩徐進行性1型糖尿病（SPIDDM）に子宮留膿腫を合併した1例

第45回日本糖尿病学会近畿地方会（平成20年11月22日 神戸）櫻井 孝、松沢俊興、松  
井美保、横野浩一、上田容生  
シンポジウム2「高齢者糖尿病の療養指導～理論と実際～」認知症を合併した高齢者糖尿病  
の管理

第187回日本内科学会近畿地方会（平成20年11月29日 京都）櫛田早絵子、田中碧、明  
寄太一、安田尚文、森山啓明、原賢太、櫻井 孝、永田正男、横野浩一  
バクタによると思われる急性膵炎と肝障害を合併した巨細胞性動脈炎の1例

The 38th annual meeting of the Society for Neuroscience (Nov. 15-19, 2008 Washington,  
DC) . X. Wang, T. Takata, T. Sakurai, K. Yokono

Different effects of monocarboxylates on long term potentiation (LTP) and neuronal  
cell survival in the presence of  $\beta$ -amyloid.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 特にありません。
2. 実用新案登録特にありません。
3. その他 特にありません。

「効率的転倒予測技術の開発と転倒予防介入による生活機能の持続的改善効果に関する縦断研究」

分担研究者 秋下雅弘 東京大学大学院医学系研究科加齢医学 准教授

研究要旨：1) 外来通院あるいは介護施設入所中の高齢骨粗鬆症患者 10名（男性3名、女性7名、78～93歳）に対し、6ヶ月間のDHEA補充療法（25mg/日内服）を実施し、大腿骨骨密度（DXA法）を測定した。骨密度は有意に増加し、臨床検査値異常や自覚的有害事象はみられなかった。2) 外来通院中の高齢患者163名（平均77歳、男性32%）を追跡調査し、2年間にみられた転倒の有無と服用薬剤、原疾患、易転倒性（転倒スコア、開眼片足立ち持続時間）との関連を解析した。単変量のロジスティック回帰分析では年齢、簡易転倒スコア、開眼片足立ち時間、服薬数が、多変量では服薬数（1.2倍/薬剤）のみが有意に転倒の発生と関連した。

#### A. 研究目的

高齢者の転倒は、骨折や硬膜下血腫のような外傷性疾患を引き起こすだけでなく、転倒を契機とした抑うつや閉じこもりなど様々な老年症候群にもつながるとされ、日常生活障害や要介護の原因として重要な問題となっている。

本研究班では、効率的転倒予測技術の開発と転倒予防介入による生活機能の持続的改善効果を達成することを目的とし、多方面からのアプローチが行われている。その中で、分担研究者は長野県 K 村の地域在住高齢者における転倒リスクの評価と介入、都内の外来通院患者における転倒リスクに関する評価を検討してきた。

虚弱高齢者ではアンドロゲン分泌の低下が日常生活機能障害につながることで、転倒予防運動教室により転倒関連身体機能の向上と関連してアンドロゲン分泌が増加することを報告した。また、副腎皮質ホルモン前駆体で抗老化サプリメントとしても用いられる DHEA (Dehydroepiandrosterone) は、高齢者において認知機能や ADL の改善効果に加えて骨量増加作用を有する可能性が示唆されているが、これまでに高齢者の骨粗鬆症患者で検討した報告はない。

一方、外来通院中の高齢患者は高血圧や不眠症など様々な疾患の治療目的で多くの薬剤を服用しているが、過去2年の分担研究者の研究では、背景疾患や特定薬剤よりも多剤併用が転倒リスクであることが横断研究では示されたが、追跡調査は行われていなかった。

今年度は、1) 高齢骨粗鬆症患者に対する DHEA 補充療法により骨量が増加するかどうかの小規模介入研究、2) 外来患者の多剤併用あるいは老年疾患が実際に転倒多発につながるかどうかを追跡調査する縦断研究を行った。

#### B. 研究方法

##### 1. 高齢骨粗鬆症患者に対するDHEA補充療法の効果：

長野県桔梗ヶ原病院通院中、あるいは介護施設入所中の高齢者骨粗鬆症患者10名（男性3名、女性7名、78-93歳）に対し、DHEAカプセル（米国アテナクリニック社）（25 mg/日）を投与し、投与前、投与後6ヶ月における大腿骨骨密度を骨密度測定装置（Lunar Prodigy、GE Healthcare社）を用いて測定した。

## 2. 多剤併用と転倒リスク：

都内診療所の外来通院中65歳以上の高齢者163名（平均77歳、男性32%）を追跡調査した。男性 42名（26%、登録時平均77歳）女性121名（74%、登録時平均77歳）だった。登録時に、年齢、性別、過去1年間の転倒歴を含む転倒チェックシート（鳥羽ら、22項目および簡易版13点満点）、開眼片足立ち持続時間（秒）、高血圧・高脂血症・糖尿病の有無、内服薬につき調査を行っており、今回はその後2年間の転倒の有無について調査した。転倒の有無に

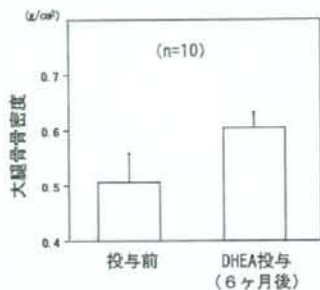


図1. DHEA補充療法による骨密度の変化

よる背景因子はt検定と

$\chi^2$ 二乗検定により、転倒

を目的変数とした危険因子の解析はロジスティック回帰分析により検討した。

（倫理面への配慮）参加施設の倫理委員会による承認と本人から書面の同意を得て行った。

## C. 研究結果

### 1. 高齢骨粗鬆症患者に対するDHEA補充療法の効果：

DHEAカプセルを6ヶ月間投与した結果、大腿骨骨密度は投与前に比べて増加傾向を呈した（図1）。また試験期間中、DHEA補充療法群に臨床検査値異常や自覚的有害事象などはみられなかった。

### 2. 多剤併用と転倒リスク：

追跡期間2年間の転倒は34名（20.9%、男性6名、女性28名）にみられ、転倒者の登録時平均年齢は80歳であった。

転倒の有無で分けると、両群で年齢（ $p < 0.005$ ）、服薬数（ $p < 0.0005$ ）、転倒スコア（ $p < 0.0005$ ）、簡易転倒スコア（ $p < 0.0005$ ）、開眼片足立ち時間（ $p < 0.005$ ）に有意差があり、また開始時に聞いた過去1年間の転倒歴（ $p < 0.05$ ）と関連が認められた。降圧薬、睡眠薬など薬剤カテゴリーとの関連は認められなかった。

ロジスティック回帰分析により2年間の転倒発生と関連した項目は、加齢（ $p < 0.05$ ）、簡易転倒スコア（ $p < 0.005$ ）、開眼片足立ち時間（ $p < 0.005$ ）、服薬数（ $p < 0.0005$ ）であった。



各因子を共変量としたロジスティック重回帰分析を行ったところ、服薬数のみが有意な関連因子で、転倒リスクは内服薬が1剤増すごとに約1.2倍に増加した(表1)。

表1. 転倒発生の関連因子；ロジスティック回帰分析

	Unadjusted		Adjusted	
	相対危険度	95%信頼区間	相対危険度	95%信頼区間
年齢 (1歳)	1.05 <sup>*</sup>	1.02-1.14	1.04	0.98-1.11
性 (M=1,F=0)	0.55	0.21-1.45	0.51	0.18-1.44
開眼片足立ち (1秒)	0.95 <sup>†</sup>	0.91-0.98	0.98	0.93-1.02
転倒スコア (1点)	1.22 <sup>‡</sup>	1.08-1.37	1.11	0.98-1.28
服薬数 (1剤)	1.31 <sup>‡</sup>	1.13-1.52	1.19 <sup>‡</sup>	1.01-1.42

\* p<0.05, † p<0.005, ‡ p<0.0005

#### D. 考察

高齢者の転倒予防に有効な介入方法として、筋力やバランスを向上する運動療法や運動教室が一般に認識されている。しかし、転倒骨折に大きく関連する骨量に対する運動の効果は一時的であり、3か月の運動教室終了後1年で骨量は低下してしまうことが分担研究者、主任研究者らの調査でわかっている。そこで、運動の効果を補強する方法として、DHEAのようなアンドロゲン投与により骨量増加を図ることが転倒による骨折や転倒自体を減らす可能性が検討されるべきである。アンドロゲンには骨代謝に対する好影響の他に、筋肉増強効果も存在するため、高齢者に対して有望な手法と考えられる。

今回の検討は少数例で、対症も置かない前後比較であったが、今後は対照群との比較や、症例数を増やすなどの検討をしていく必要がある。またDHEA投与による骨代謝への影響について、大腿骨、腰椎、全身などの部位別骨密度変化、骨型アルカリフォスファターゼや尿中I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTx)などの骨代謝マーカーの変化についても今後解析を進めていく必要がある。

高齢者は、生活習慣病や老年症候群の治療目的で、外来患者でも平均4-5種類の薬剤を服用している。不要な薬剤を減らすことは、薬物有害事象、特に薬剤性転倒を減らすことにつながると考えられる。本研究では転倒リスクの高い薬剤を抽出し、今後の減薬介入に役立てることが目的であった。当初、睡眠薬や降圧薬といった過去に転倒危険を高めるとの報告がある薬剤の服用が、転倒スコアや開眼片足立ち持続時間といった易転倒性の指標と関連するとの解析結果が横断調査で得られた。しかし、追加の多変量解析により、多剤併用こそが易転倒性と関連し、特定の薬剤が関連するという結果にはならなかった。

今年度の研究で、追跡期間中の転倒の発生に関連していたのは、ロジスティック重回帰分析では服薬数のみであり、結局これまでの横断研究を指示する結果であった。したがって、なるべく服薬数を減らし、多剤併用を解消することで転倒リスクが減少することが想定される。しかし、単純な減薬は原病の悪化を招き、あるいは患者を不安にさせる危険も

大きく、日本老年医学会が発表している「高齢者に対して特に慎重な投与を要する薬物のリスト」などのチェックリストを利用した減薬介入試験が望ましい。

さらに、おそらく一部の薬剤が転倒リスクを高めることは確かであり、今回のような200名規模ではなく数千名規模の観察研究を行えば明らかにされることが期待される。同時に、高齢患者で頻用される薬剤の中でも、例えば降圧薬や睡眠薬、過活動膀胱治療薬など同系統薬の中で転倒リスクを高めるものとそうでない薬剤があると考えられ、服用の影響をみる無作為比較試験を行うことで明らかにできると考えられる。

#### E. 結論

1) 高齢骨粗鬆症患者に対する DHEA 補充療法が骨量増加に有効である可能性がある。2) 外来通院患者の多剤併用が転倒と関連することが縦断調査からもわかった。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) Kawashima Y, Akishita M, Kozaki K, Hasegawa H, Toba K. Stress-induced blood pressure elevation in subjects with mild cognitive impairment: effects of the dual-type calcium channel blocker, cilnidipine. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8:278-83.
- 1) Okamoto T, Okamoto L, Lisanti MP, Akishita M. Switch to oral hypoglycemic agent therapy from insulin injection in patients with type 2 diabetes. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8:218-26.
- 2) Hirao T, Urata Y, Kageyama K, Ikezaki M, Kawakatsu M, Matsuse M, Matsuo T, Akishita M, Nagata I, Kondo T. Dehydroepiandrosterone augments sensitivity to gamma-ray irradiation in human H4 neuroglioma cells through down-regulation of Akt signaling. *Free Radic Res.* 2008;42:957-65.
- 3) Yu J, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Okabe T, Ouchi Y. Raloxifene analogue LY117018 suppresses oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis through activation of ERK1/2 signaling pathway. *Eur J Pharmacol.* 2008;589:32-6.
- 4) Kojima T, Akishita M, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Nocturia in elderly hypertensives - no influence of low-dose thiazide added to losartan. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56:2155-6.
- 5) Yamamoto Y, Watari Y, Brydun A, Yoshizumi M, Akishita M, Horiuchi M, Chayama K, Oshima T, Ozono R. Role of the angiotensin II type 2 receptor in arterial remodeling

after wire injury in mice. *Hypertens Res.* 2008;31:1241-9.

6) Ota H, Eto M, Kano MR, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y. Cilostazol inhibits oxidative stress-induced premature senescence via upregulation of Sirt1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1634-9.

7) Sonohara K, Kozaki K, Akishita M, Nagai K, Hasegawa H, Kuzuya M, Yokote K, Toba K. White matter lesions as a feature of cognitive impairment, low vitality and other symptoms of geriatric syndrome in the elderly. *Geriatr Gerontol Int.* 2008;8:93-100.

8) Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y. Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Endocrinology.* 2008;149:1646-53.

9) Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Association of plasma dehydroepiandrosterone-sulfate levels with endothelial function in postmenopausal women with coronary risk factors. *Hypertens Res.* 2008;31:69-74.

10) Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Shinichiro H, Kume H, Akishita M, Ouchi Y. Increase in oxidative stress levels in elderly patients with obstructive sleep apnea syndrome: effects of age and sex. *J Am Geriatr Soc.* 2008;56:569-71.

11) Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:571-9.

Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, Akishita M, Ouchi Y. Effects of age and sex on plasma adrenomedullin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55:1891-2. Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y. Adiponectin Antagonizes Stimulatory Effect of TNF $\alpha$  on Vascular Smooth Muscle Cell Calcification: Regulation of Gas6-Mediated Survival Pathway by AMP-Activated Protein Kinase. *Endocrinology.* 2008 Jan 3 [Epub ahead of print].

2) Ota H, Akishita M, Eto M, Iijima K, Kaneki M, Ouchi Y. Sirt1 modulates premature senescence-like phenotype in human endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43:571-9.

3) Teramoto S, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Hanaoka Y, Ishii M, Hibi S, Kume H, Akishita M, Ouchi Y. Effects of age and sex on plasma adrenomedullin levels in patients with obstructive sleep apnea syndrome. *J Am Geriatr Soc.* 2007;55:1891-2.

4) Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Association of plasma dehydroepiandrosterone-sulfate levels with endothelial function in postmenopausal women with coronary risk factors. *Hypertens Res.* in press.

- 5) Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men. *Hypertens Res.* 2007;30:1029-1034
- 6) Xi H, Akishita M, Nagai K, Yu W, Hasegawa H, Eto M, Kozaki K, Toba K. Potent free radical scavenger, edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 191:281-289, 2007.
- 7) Yu J, Eto M, Akishita M, Kaneko A, Ouchi Y, Okabe T. Signaling pathway of nitric oxide production induced by ginsenoside Rb1 in human aortic endothelial cells: A possible involvement of androgen receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353:764-9.
- 8) Son BK, Kozaki K, Iijima K, Eto M, Nakano T, Akishita M, Ouchi Y. Gas6/Axl-PI3K/Akt pathway plays a central role in the effect of statins on inorganic phosphate-induced calcification of vascular smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 2007;556:1-8.

## 2. 学会発表

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

- 1) 秋下雅弘 (教育企画) : 老年診療に関する最近の話題. ホルモン補充療法. 日本老年医学会学術集会, 千葉, 2008. 6. 20
- 2) 秋下雅弘 (若手企画シンポジウム) : 健康な老年期を送るための更年期医学 (Pre-Geriatric Medicine) を考える : サクセスフルエイジング達成を目標に, ホルモン補充療法の将来性. 日本老年医学会学術集会, 千葉, 2008. 6. 20
- 3) 秋下雅弘 (ワークショップ) : メンズヘルスの最先端- テストステロンの医学- . テストステロンと動脈硬化. 日本抗加齢医学会総会, 東京, 2008. 6. 7
- 4) 小川純人, 秋下雅弘, 山田思鶴, 浜達哉, 神崎恒一, 大内尉義, 鳥羽研二 (一般ポスター) : 地域在住高齢者における転倒スコアと活力度指標および基本チェックリスト項目との関連性の検討. 日本老年医学会学術集会, 千葉, 2008. 6. 21
- 5) 小島太郎, 秋下雅弘, 中村哲郎, 野村和至, 大池裕美子, 小川純人, 飯島勝矢, 江頭正人, 大内尉義 (一般口演) : 内服薬が高齢者の転倒に与える影響. 日本老年医学会学術集会, 千葉, 2008. 6. 21

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

なし

## 1. 特許取得

なし

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

研究協力者

東京大学大学院医学系研究科 小川純人

同上 小島太郎

老人保健施設まほろばの郷 山田思鶴

同上 浜 達哉

秀行会阿部クリニック 中村哲郎

杏林大学医学部 鳥羽研二

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

「効率的転倒予防技術の開発と転倒予防介入による生活機能の持続的改善効果に関する縦断研究」

分担研究者 丸山直記 (東京都老人総合研究所 副所長)

筋力維持要因としてのビタミンCの機能を解析することを目的として多検体を性格に定量できる測定系を開発した。神経筋接合部位を構成する分子の同定を目的としてバイオマーカーの探索を行った。幾つかの候補分子が同定されており今後も解析を進める。神経筋接合部位を構成するMuSK分子遺伝子発現の測定系を確立し、加齢、神経切断、ギプス固定の影響を解析した。いずれの場合においても MuSK 遺伝子の発現が増加することから新規バイオマーカーとしての可能性が示唆された。現在、企業との連携により臨床検査キットの開発を進めている

A. 目的

高齢者に顕在化する身体機能低下、特に筋力の低下や筋肉減少症(サルコペニア)は転倒の要因である。本研究は筋肉を中心として転倒防止あるいは筋力増強に資する要因を解明することを目的とするものである。今年度は血中アスコルビン酸(ビタミンC)の精度の高い測定法と多数の検体を処理する方法論の開発を行った。神経筋接合部位を構成するMuSK (muscle specific kinase)分子をバイオマーカーとして確立するための技術開発とその応用を進めた。

B. 研究方法

1) HPLCを用いたアスコルビン酸(ビタミンC)定量法の開発と多検体処理法の開発

筋重量に及ぼすアスコルビン酸(ビタミンC)を定量的に評価する方法が未確立であることからHPLCを用いて多数の検体を処理する方法論を開発した。総ビタミンC定量のためデヒドロアスコルビン酸からアスコルビン酸に還元する際に分解が生ずるために正確な定量ができない。これを抑制する方法としてtris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を用いた還元法を開発した。

2) 新規筋バイオマーカーの探索

ヒトに於ける神経筋接合部位の解析に有用なバイオマーカーをTorpedo Japonicaの神経筋接合部位を対象に探索をする。ヒトの相同遺伝子も同定し、組み替え蛋白を用いた臨床検査測定系を開発する。

3) 加齢あるいは廃用性萎縮におけるMuSK遺伝子発現の解析

ヒトの運動器障害のモデルとしてのマウスにおける加齢あるいは神経切断や四肢拘束（ギプス固定）による廃用性萎縮による MuSK 遺伝子の発現への影響を RT-PCR で解析した。

#### 4) ヒト血清中の MuSK 分子の定量法の開発

遺伝子組み替えによるヒト MuSK 分子蛋白を作製する。さらにマウスに免疫しモノクローナル抗体を作製する。確立されたモノクローナル抗体を用いた血中測定系を開発する。

### C. 結果

#### 1) HPLC を用いたアスコルビン酸（ビタミンC）定量法の開発と多検体処理法の開発

デヒドロアスコルビン酸をメタリン酸溶液中で安定化する際に用いる DTT は加水分解を誘導し正確な定量ができないことから、tris (2-carboxyethyl) phosphine ( TCEP ) を用いる方法を開発したところデヒドロアスコルビン酸の還元がほぼ 100% 可能となった。血液をこの方法により処理して HPLC-電気化学検出器を用いて測定する系を確立した。これにより 1 日に約 100 検体の血液中のアスコルビン酸（ビタミンC）濃度を高い精度で測定できるようになった。

#### 2) 新規筋バイオマーカーの探索

筋力発現に必須である分子の探索を進めている。ヒトに於ける神経筋接合部位の解析に有用なバイオマーカーを Torpedo Japonica の神経筋接合部位を対象に網羅的に解析を進めた結果、複数の候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子の塩基配列を決定後、ヒトゲノム中の相同遺伝子を同定し、高齢者の筋肉障害に応用できる測定系を開発することを進めている。

#### 3) 加齢あるいは廃用性萎縮における MuSK 遺伝子発現の解析

加齢に伴い筋力発現に重要な神経筋接合部位に形態学的変化が出現することを見いだした。中心的な分子である MuSK 遺伝子の発現を解析した。MuSK 分子の 2 画分 (2Ig 及び 4Ig) に対応する mRNA を RT-PCR で定量化した。6ヶ月齢マウスにおける発現を 1 単位として神経切断、四肢拘束及び加齢 (29ヶ月齢) における MuSK 発現を定量化した結果、いずれも MuSK の発現が正常若齢と比較して増加していた (図 1、図 2)。無処置の加齢マウスに於ける MuSK 発現は他群と比較して大きくは無かった。神経切断及び四肢拘束の解析に用いたマウスは若齢であることから、加齢に伴う MuSK 発現能は低下していると思われる。今後の解析が必要である。

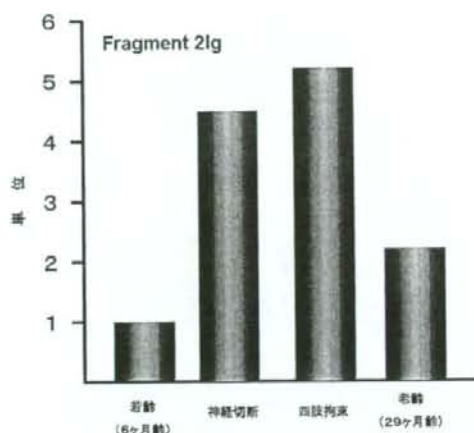


図 1

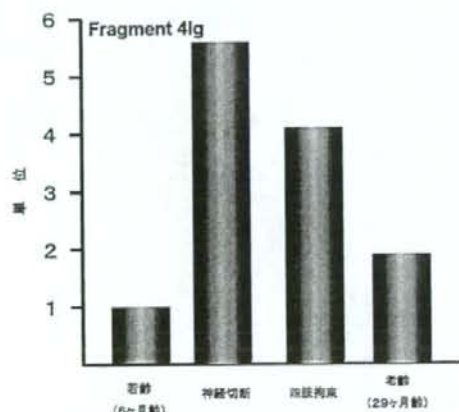


図 2

#### 4) ヒト血清中の MuSK 分子の定量法の開発

ヒト MuSK の組み替え蛋白の作製に成功した。この組み替え蛋白をマウスに免疫してモノクローナル抗体を確立した。確立した抗体を用いた血中 MuSK 測定系を企業との共同研究で進めている。

#### D. 考察

1) 血中アスコルビン酸 (ビタミンC) を安定して精度が高いレベルで多数測定する方法論を確立した。このシステムの応用により集団でのアスコルビン酸 (ビタミンC) の定量が可能となった。

2) 神経筋接合部位に於けるヒトの相同遺伝子を探索して候補遺伝子が見つかった。



今後の解析が必要である。

3) 加齢に伴い MuSK 遺伝子は増加する。さらに神経切断あるいは四肢拘束を加えると MuSK 遺伝子が増加することが明らかとなった。この事実は筋力低下に伴い代償的に MuSK 遺伝子の発現が増加することを示唆している。

4) 加齢に伴う筋力低下や廃用性萎縮では MuSK が増加することから血中の MuSK 分子の定量化は診療に貢献すると思われる。

#### E. 研究業績

1) Rath B, Pandey RS, Debata PR, Maruyama N, Supakar PC Sr.

Molecular characterization of senescence marker protein-30 gene promoter: Identification of repressor elements and functional nuclear factor binding sites  
BMC Mol Biol. 9:43, 2008

2) Shigemoto K, Kubo S, Jie C, Hato N, Abe Y, Ueda N, Kobayashi N, Kameda K, Mominoki K, Miyazawa A, Ishigami A, Matsuda S, Maruyama N. Experimentally induced myasthenia gravis with muscle-specific kinase. Ann N Y Acad Sci. 1132:93-98, 2008

3) Jang B, Kim E, Choi J-K, Jin J-K, Kim, J-I, Ishigami A, Maruyama N, Carp RI, Kim Y-S, Choi E-K. Accumulation of citrullinated proteins by upregulated peptidylarginine deiminase 2 in brains scrapie-infected mice: A possible role pathogenesis. Amer J Pathol 173:1131-1144, 2008

4) Furusawa H, Sato Y, Tanaka Y, Inai Y, Amano A, Iwama M, Kondo Y, Handa S, Murata A, Nishikimi M, Maruyama N, Goto S, Takahashi R, Ishigami A. Vitamin C is not essential for carnitine biosynthesis in vivo: Verification in vitamin C depleted SMP30/GNL knockout mice. Biol Pharm Bull 31:1673-1679, 2008

5) Sato Y, Kajiyama S, Amano A, Kondo Y, Sasaki T, Handa S, Takahashi R, Fukui M, Hasegawa G, Nakamura N, Fujinawa H, Mori T, Ohta M, Obayashi H, Maruyama N, Ishigami A. Hydrogen-rich pure water prevents superoxide formation in brains of vitamin C-depleted SMP30/GNL knockout mice. BBRC 375:346-350, 2008

6) Kondo Y, Sasaki T, Sato Y, Amano A, Aizawa S, Iwama M, Handa S, Shimada N, Fukuda

M, Akita M, Lee J, Jeong K, Maruyama N, Ishigamai A.

Vitamin C depletion increases superoxide generation in brains of SMP30/GNL knockout mice. BBRC 377:291-296, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得                    特にありません。
2. 実用新案登録特にありません。
3. その他                    特にありません。

厚生労働科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)

分担研究報告書

「効率的転倒予防技術の開発と転倒予防介入による生活機能の持続的改善効果に関する縦断研究」

分担研究者 羽鳥正仁 (東北大学整形外科 准教授)

#### ビタミンDの骨格筋細胞への作用

ビタミンDはカルシウム代謝に関与する重要なビタミンであり、骨粗鬆症治療に用いられている。近年、活性型ビタミンD<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)の投与によって高齢者の転倒頻度が減少することが報告されている。VD<sub>3</sub>投与による筋力増強がそのメカニズムの一つとして注目されるが、*in vitro*での骨格筋への作用はいまだ明らかではない。我々はマウス骨格筋の細胞株であるC2C12筋芽細胞を用いてVD<sub>3</sub>による骨格筋への作用を検討した。

**【方法】**(増殖期)C2C12は10%胎児ウシ血清で培養すると、分化することなく増殖する。ディッシュにC2C12を播種し、VehicleあるいはVD<sub>3</sub> 1, 10, 100 nMを加えた。72時間培養後に、細胞数・WST-1活性の計測、PI染色を用いたフローサイトメリーによる細胞周期解析、細胞形態の比較を行った。

(分化期)Confluentに達したC2C12を2%ウマ血清(HS)の培地へ交換すると細胞が融合し筋管細胞へ分化する。Confluentに達し、培地を2%HSへ交換した時点で、VehicleあるいはVD<sub>3</sub> 1, 10, 100 nMを加えた。4日間培養後のミオシン重鎖(MHC)の発現を定量的PCR、免疫染色、Western blottingで計測した。

**【結果】**(増殖期)増殖期では、VD<sub>3</sub>の濃度依存性に細胞数、WST-1活性が減少し、細胞周期ではG1 arrestの細胞の割合が増加した。細胞形態上はVD<sub>3</sub> 100 nMを添加した群で肥大化した細胞が多数観察された。

C2C12の増殖期には筋芽細胞の増殖を抑制し、分化初期では筋管細胞への分化を抑制していた、この結果からは、VD<sub>3</sub>はむしろ筋肉の分化増殖を抑制するという、臨床で見られる結果とは異なる方向に働いていることになる。しかし、実験系は成熟した筋組織とは異なり、筋芽細胞の占める割合の多い細胞集団であるため異なった結論が得られたのではないかと考えた。そこでC2C12筋芽細胞を十分に分化させた後VD<sub>3</sub>を加える実験系を行うこととした。

(分化期)分化初期では、MHCの発現量がVD<sub>3</sub>の濃度依存性に低下した。

C2C12をディッシュに播種し、コンフルエントまで増殖させ、2%HSで分化させた。経時的なMHCの発現を検討する予備実験によると、2%HSに転換後6日でMHCの発

現がほぼ一定となる結果であったので、2%HSに転換後8日目よりVD3を加える実験系(分化後期)においてMHCのmRNAと蛋白発現、さらに分速筋を構成するMHC type IIa・IIbのmRNA発現量およびMHC fastの蛋白量を計測した。この結果、分化後期では、MHCの蛋白発現量はVD3 1 nM添加群で最大となった。MHC type IIのmRNA発現量はVD3 1nM群で最大となり、type IIaの発現量はVD3 1nM群で有意に増加した。また、MHC fastの蛋白発現量はVD3 1nM群で有意に増加した。分化後期に適切な量のVD3を加えると、VD3の同化作用がみられた。この実験系のほうが成熟した筋組織により条件が近いと考えられ、VD3の筋力増強効果をin vitroでしめす一つの証拠たり得るのではないかと思われる。

#### 学会発表

第30回米国骨代謝学会(ASBMR)、第55回米国整形外科基礎学会(ORS)で報告