

Table 3 Standardized partial regression coefficient (β) for PCS, MCS, and subscales as dependent variables by multivariate regression analysis.

	PCS	MCS	PF	RP	BP	GH	VT	SF	RE	MH
FES	-0.42*	-0.12	-0.42*	-0.42*	-0.27*	-0.25*	-0.30*	-0.24*	-0.27*	-0.27*
Age	0.08	-0.06	0.10	0.06	0.07	-0.04	-0.11	0.07	-0.04	0.01
BMI	0.06	0.07	0.07	0.02	0.15	0.05	0.05	0.11	-0.02	0.18*
Total										
number of complicating conditions	-0.13	-0.00	-0.03	-0.08	-0.19*	-0.13	-0.03	-0.16	-0.05	0.01
MMSE	-0.13	0.11	-0.08	-0.04	-0.17	-0.02	0.01	-0.05	0.11	-0.00
Subscore of transfer	0.04	0.01	0.04	0.05	-0.00	0.09	0.08	-0.05	-0.01	0.08
Subscore of locomotion	0.14	0.01	0.19	0.21*	0.02	-0.12	0.04	0.04	0.14	0.04
R ²	0.33	0.03	0.33	0.33	0.19	0.09	0.13	0.11	0.12	0.15

FES=Falls Efficacy Scale; BMI=Body-mass index; MMSE=Mini-Mental State Examination.

* $p < 0.05$

地域在住高齢者の骨密度に関連する要因の検討

名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻 内藤善規
指導教員 加藤智香子

【要旨】

近年、転倒による骨折が身体活動の減少を助長し、結果的に寝たきりとなる高齢者が増加している。基礎体力や骨量減少がその主な原因であると言われており、骨密度と身体活動との関連が述べられている。一方、衝撃力の強い運動は骨量を高めるとの報告もあるが、運動強度を客観的に評価して骨密度との関連について報告したものはない。そこで、骨密度と運動強度との関連及び骨密度と強く関連する要因について検討した。

その結果、骨密度と高強度、中強度、低強度いずれの運動強度とも関連は見られず、年齢と現在の運動習慣との関連が認められた。このことから、一時的に強度の強い運動をすることよりも、運動を継続して行うことの方が骨密度の減少を緩やかにする可能性があるかと推察された。

Key Words : 骨密度、身体活動、運動強度

【緒言】

わが国では、先進諸国に類を見ない速さで高齢化が進み、2020年(平成32年)には全人口の4人に1人が高齢者という超高齢社会が目前に迫っている¹⁾。

このような急速な高齢化の中で、高齢者の骨折の問題が注目されており、中でも大腿部頸部骨折は寝たきりの原因となるだけでなく、生活の質を大きく低下させるため、この問題を解決することは重要な課題である。とりわけ骨折の原因となる骨粗鬆症では骨密度の低下が認められるので、骨密度に影響を及ぼす要因を明らかにすることは骨折の予防につながり、重要であると示唆されている²⁾。

先行研究では、骨密度に関連する要因として、年齢⁴⁾、歩数⁴⁾、運動量⁵⁾、カルシウム摂取量⁶⁾、現在の運動習慣⁷⁾、過去の運動習慣⁴⁾が言われている。

一方、骨に対しては強い運動をすることが良いと言われており、先行研究では衝撃力の強い運動は骨量を高める³⁾と報告されているが、運動の強さをスポーツの種類を問う主観

的な方法で評価しており、運動強度を客観的に評価し骨密度と運動強度との関連について言及された報告はない。

【目的】

地域在住の高齢女性における骨密度と運動強度との関連及び骨密度と強く関連する要因の検討をすること。

【方法】

○対象

地域の転倒予防教室、健康教室、老人クラブ、市民講座の参加者で地域在住の前期高齢者(65~74歳)の女性36名(平均年齢69.1±2.9歳)を対象とした。

○方法

1) 骨密度測定

AOS-100NW;ALOCA社製(図1)を用い、踵骨の定量的超音波測定法[QOS]にて測定した。測定部位は右踵骨に統一した。腰掛座位で、足置き台に足を載せた後、振動子にエコ

ゼリーを塗り、振動子を踵の両側に密着させた後に測定した。測定結果は音響的骨評価値 (Osteo Sono-assessment Index : OSI) を採用した。

2) 身体活動度

身体活動度の指標として、生活習慣記録機 (ライフコーダ EX ;スズケン社製) を用いた (図 2)。入浴、就寝時を除いて 10 日間装着後、歩数 (歩)、運動量 (kcal)、運動強度 (秒) の 7 日間分のデータを解析した (連続して装着可能であった 7 日間を抽出した)。1 日の運動強度は、図 3 のように自動的に 9 段階に分類し、表示される。これを津下⁸⁾と同様に 1~3 を低強度、4~6 を中強度、7~9 を高強度とした。これらの強度はそれぞれ、低強度は歩行、中強度は速歩、高強度はジョギングに相当すると報告されている⁸⁾。歩数 (歩)、運動量 (kcal) は自動的に算出されたものの 1 週間分の和、運動強度は分類した低、中、高の各強度の 1 週間の合計時間 (秒) を Excel 処理によってそれぞれ求めた。

3) 現在及び過去の運動習慣

国民栄養調査⁹⁾に準じ、1 回 30 分以上、週 2 回以上、1 年以上の運動を現在まで続けている場合を「現在の運動習慣あり」、過去に行っているが、現在までは続けない場合を「過去の運動習慣あり」とした。

4) カルシウム自己チェック表

骨粗鬆症学会で用いられているカルシウム自己チェック表¹⁰⁾を用い、カルシウムを含む種々の飲食物の摂取頻度をそれぞれ質問し、その合計点を求めた (表 1)。

5) 一般情報

年齢、身長、体重、Body Mass Index (BMI) を調査した。



図 1 : AOS-100NW; ALOCA 社製



図 2 : ライフコーダ EX;スズケン社製

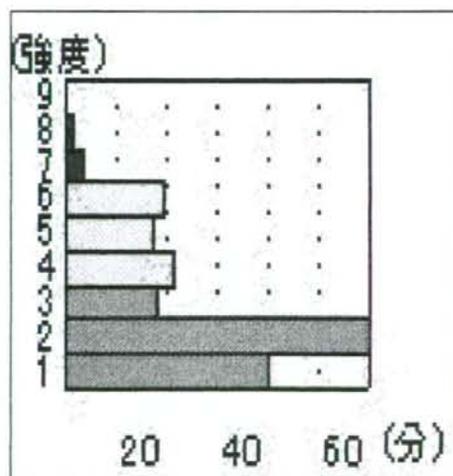


図 3 : 運動強度別の合計時間/day

表1：カルシウム自己チェック表（骨粗鬆症学会）

問	0点	0.5点	1点	2点	4点
1. 牛乳を毎日どのくらい飲みますか？	ほとんど飲まない	月1~2回	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日
2. ヨーグルトをよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	ほとんど毎日2個
3. チーズなど乳製品やスキムミルクをよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	2種類以上毎日
4. 大豆、納豆など豆類をよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	2種類以上毎日
5. 豆腐、がんも、厚揚げなど大豆製品をよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	2種類以上毎日
6. ほうれん草、小松菜、チンゲンサイなど青菜をよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	2種類以上毎日
7. 海そう類をよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	
8. シシャモ、丸干しいわしなど骨ごと食べられる魚を食べますか？	ほとんど食べない	月1~2回	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日
9. しらす干し、干しえびなど小魚類をよく食べますか？	ほとんど食べない	週1~2回	週3~4回	ほとんど毎日	2種類以上毎日
10. 朝食、昼食、夕食と1日3食を食べていますか？			1日1~2食	欠食が多い	1日3回食べる(3点)

6) 統計処理

骨密度と各要因間の相関分析には Spearman の順位相関係数(ρ)を用いた。現在及び過去の運動習慣は運動習慣の有無で群分けし、2群間において Man-Whitney の U 検定を用いた。なお、有意水準は5%未満とした。

7) 倫理的配慮

本研究は名古屋大学医学部倫理委員会医学部会の承認を得て行った。対象者には、本研究の概要、本研究による利益・不利益、本研究で得られた個人情報の保護について十分に説明し、同意を得た上で行った。

【結果】

1) 骨密度について

O S Iによる骨密度の平均値は 2.33 ± 0.19 で、最高値が 2.77、最低値が 1.94 であった。

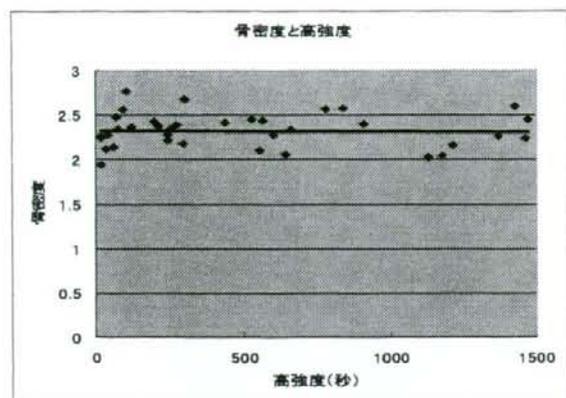
本研究では骨減少症（若年成人女性と比較して 70~79%）が7名、骨粗鬆症（若年成人女性と比較して~69%）が0名であり、骨密度の低い人は少なかった。

2) 骨密度と運動強度との関連

骨密度と高強度 ($\rho=0.10$)、中強度 ($\rho=0.06$)、低強度 ($\rho=0.04$) とも有意な相関はみられなかった（3つの関連を図4~6にて図示）。

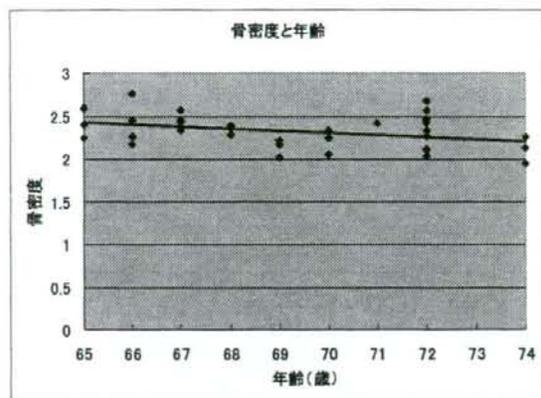
3) 骨密度と関連した要因

統計的に有意な相関あるいは差が認められた要因は年齢 ($\rho=-0.36$) (図7) と現在の運動習慣 ($p=0.05$) (図8) であった。その他の要因は、それぞれ歩数 ($\rho=0.06$)、運動量 ($\rho=0.15$)、カルシウム自己チェック表 ($\rho=0.06$)、過去の運動習慣 ($p=0.41$) で、有意な相関及び差はみられなかった。



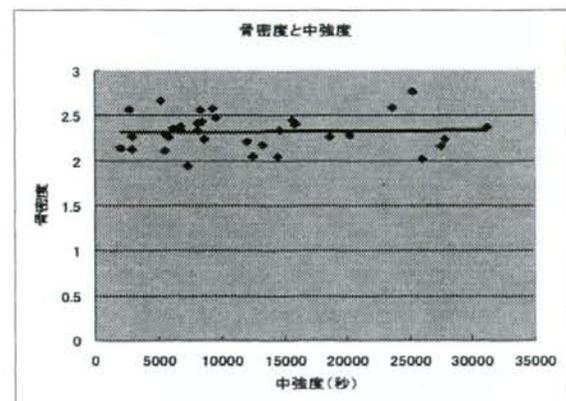
Spearman の順位相関係数(ρ)=0.10

図4：骨密度と高強度との関連



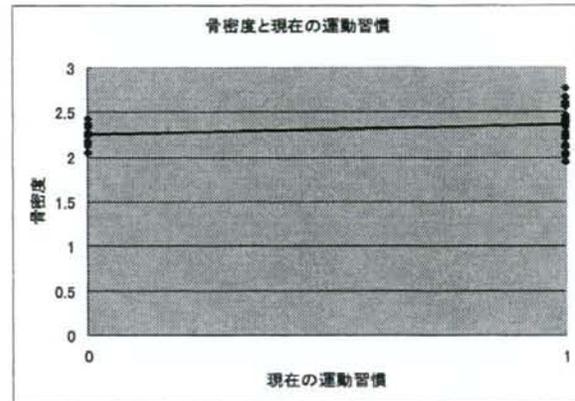
Spearman の順位相関係数(ρ)=-0.36*

図7：骨密度と年齢との関連



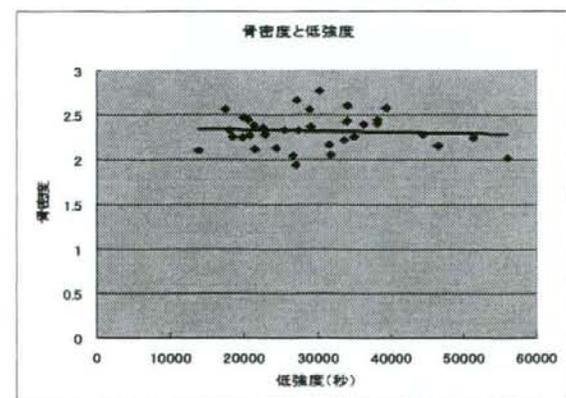
Spearman の順位相関係数 (ρ) =0.06

図5：骨密度と中強度との関連



Mann-Whitney のU検定 $p=0.05^*$

図8：骨密度と現在の運動習慣との関連



Spearman の順位相関係数(ρ)=0.04

図6：骨密度と低強度との関連

【考察】

1) 骨密度測定について

本研究では超音波骨評価装置 (AOS-100NW: ALOCA社製) を用いて骨密度を評価した。1960年から70年代にかけて超音波を用いた骨評価に関する研究が行われてきたが、1984年 Langtonら¹¹⁾が大腿骨頸部骨折患者の減衰係数は正常者に比べて低く、骨脆弱性の指標となる可能性を示して以来、骨粗鬆症の新しい非侵襲的判定法として注目されてきた。また、踵骨の定量的超音波測定法[QOS]は、65歳以上の閉経後女性の大腿骨

近位部骨折リスクの評価に有用であると述べられている¹⁰⁾ため、本研究でこれを採用した。この方法は、短時間で行える簡便な測定法であり、無害である。

2) 骨密度と運動強度及び関連がみられた要因

45・74歳の男女(男性:2296名、女性:2914名)を対象に行ったJakesら³⁾の研究では、週2時間の高強度の運動をしている人の骨密度が有意に高く、中強度の運動が骨密度に影響を与えなかったと報告されている。

しかし、この研究では運動強度の評価を運動(スポーツ)の種類で分けており、主観的な自己評価で行っている。そこで本研究では、ライフコーダEXを用い、運動の強度を客観的指標で評価することを試みた。その結果、骨密度と高強度、中強度、低強度、いずれの運動強度とも関連はみられなかった。

本研究で骨密度と関連の見られた要因は年齢と現在の運動習慣であった。柳本ら⁴⁾の先行研究でも年齢との関連が認められていたが、対象者が65~99歳(平均年齢78±1.0歳)と広いのに対し、本研究では、対象者は前期高齢者(65~74歳)に限っていた中でも関連が見られ、年齢は骨密度と強く関連している要因であると推察された。また、骨密度と現在の運動習慣との関連は、山口⁷⁾の研究でも指摘しているが、現在の運動習慣を「日常身体活動が活発か否か」で尋ねている。一方、本研究では一般的に用いられている国民栄養調査に準じており(1回30分以上、週2回以上、1年以上運動を継続しているか)、現在という点だけではなく、1年以上という継続的な意味を含んでおり、一時的な強い運動よりも、継続した運動は骨密度の減少を緩やかにする可能性があるとして推察された。

本研究の対象者では、36名中23名が運動習慣ありと回答し、そのうち15名が散歩をしていた。柳本ら⁴⁾は、高齢者において、歩行活

動などの身体活動を継続することが骨量低下を抑制すると述べており、日常的に歩行することの重要性を示唆している。また、関口¹²⁾は1日歩数の20%増を目標とし、毎日継続して歩行すれば骨量減少予防効果があると考えられると報告しており、楊¹³⁾は理想的な1日の歩数は9000歩と考えられると述べている。これらのことから、歩数を増やすと同時に歩行運動を日常的に継続して行っていくことで、骨密度の減少を緩やかにする可能性があると考えられた。

3) 本研究の限界と今後の展望

本研究で用いた現在の運動習慣は継続的な意味を含んでいるが、継続した期間等の詳細な検討ができなかった。

また、ライフコーダでの身体活動度の測定期間をMatthews¹⁴⁾らと同様に1週間としたが、測定期間中に旅行をした人、体調不良で不動であった人がおり、日常的な身体活動度を反映できなかった可能性も考えられた。

本研究では、地域在住の健康教室等、比較的健康意識の高い人が対象となっており、骨減少症及び骨粗鬆症と予想される骨密度の低い人が少なかった。このため、対象者の偏りが生じた可能性は否定しきれない。

今後幅広い対象者を募り、運動を継続した期間等について詳しい検討をすることで、より精度の高い研究となる可能性が考えられた。

【まとめ】

地域在住の高齢女性における骨密度と運動強度との関連及び骨密度と強く相関する要因の検討をした。

1) 骨密度と運動強度との関連はみられず、骨密度と関連がみられた要因は、年齢と現在の運動習慣であった。

2) 継続した運動は骨密度の減少を緩やかにする可能性が推察された。

【謝辞】

本研究に参加いただきました転倒予防教室、健康教室、老人クラブ、市民公開講座参加者の皆様、また研究に際しご協力いただいた名古屋大学医学部老年情報学寄附講座准教授・大西丈二先生、及び名古屋大学総合体育科学センター教授・島岡清先生に深く感謝いたします。

【文献】

- 1) 古田加代子、流石ゆり子、風間喜美子：在宅高齢者の身体活動量と体力の関連—生活習慣記録機（ライフコーダ）と生活体力を指標として—。日本看護医療学会雑誌。6(1)：15-23,2004.
- 2) 上田晃子、吉村典子、森岡聖次、他：骨密度に影響を及ぼす要因に関する検討。日本公衆衛生雑誌。43(1)：50-60,1996.
- 3) Jakes RW. Et al. : Patterns of physical and ultrasound attenuation by heel bone among Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer (EPIC Norfolk) : population based study. BMJ 322 : 140-143 ,2001.
- 4) 柳本有二、押田芳治、佐藤祐造：高齢女性の骨量および体力とそれらの関与する身体活動について。臨床スポーツ医学。18(6),2001.
- 5) 楊鴻生：骨粗鬆症の予防—運動の効果。公衆衛生。55(1),1991.
- 6) Reid IR, Ames RW, Evans MC, et al. : Long-term effects of calcium supplementation on bone loss and fractures in postmenopausal women : a randomized controlled trial. Am J Med 1995;98:331-5.
- 7) 山口淳：生活習慣としての身体活動と骨量について—超音波法による骨定量—。関西臨床スポーツ医・科学研究会誌。13：51-54, 2003.
- 8) 津下一代：運動療法の患者教育とその実際—歩数計の有効利用を中心に—。PRACTICE. 17(5),2000.
- 9) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成 15 年国民栄養調査結果の概要。2003.
- 10) 折茂肇：骨粗鬆症の予防と治療のガイドライン 2006 年版。ライフサイエンス出版。p.19,66,67.
- 11) 中村美詠子、青木伸雄、那須恵子、他：一地域における骨粗鬆症に関する疫学的研究—超音波骨密度測定装置を用いた検討—。日本公衆衛生雑誌。41(12),1994.
- 12) 関口秀隆：骨粗鬆症予防教室における縦断的骨密度調査。臨床スポーツ医学。16(7), 832-835, 1999.
- 13) 楊鴻生：骨粗鬆症に対する運動療法。臨床スポーツ医学。17(2), 157-160, 2000.
- 14) Matthews, E.C., Ainsworth, E.B, Thompson, W.R., Bassett, R.D., JR.: Sources of variance in daily physical activity levels as measured by an accelerometer. Med. Sci. Sports Exerc., 34, 1376-1381, 2002.

地域在住高齢者と介護施設高齢者の健康関連QOLに関連する因子の検討

名古屋大学医学部保健学科理学療法専攻 川村皓生

指導教員：加藤智香子

要旨

近年、急速な高齢化により健康で自立した生活の期間の延長が重要と言われており、中でも医療の分野では健康関連 QOL (HQOL) が注目されている。しかし HQOL の関連因子については明らかにされていない部分が多い。そこで地域在住高齢者と介護施設高齢者を対象として、HQOL を The MOS 8-Item Short-Form Health Survey(SF-8)によって評価し、身体能力、転倒不安、抑うつなどの項目との関連を調査した。結果、地域群では SF-8 の身体的サマリースコアに強く影響を与えていた因子は抑うつと転倒不安で、精神的サマリースコアは転倒不安と抑うつであった。また、施設群では身体的サマリースコアには転倒不安が関連したが、精神的サマリースコアと関連したものはなかった。このことから、高齢者の HQOL には心の問題が強く影響しており、地域・施設といった生活環境の違いで HQOL の関連因子も異なる可能性が推察された。

Key Words : 健康関連 QOL、関連因子、高齢者

【緒言】

近年、わが国では急速な高齢化が進行しており、2005 年の 65 歳以上人口の総人口に占める割合は約 20%、2050 年には 35.7%と人口の 3 人に 1 人が高齢者になると予測されている¹⁾。「健康日本 21」²⁾によると、介護予防の観点から単に長寿のみでなく、健康で自立した生活期間の延長、いわゆる高齢者の quality of life(QOL)の維持・向上が重要視されている。中でも医療の分野では特に、疾患によって影響を受け、医療によって変化していく患者の身体的・精神的・社会的な側面に着目した健康関連 QOL(以下、HQOL)が注目されており³⁾、この HQOL の評価と維持・向上はリハビリテーションにおいても重要な課題であると考えられる。しかし HQOL がどのような因子によって影響を受けているかについては、明らかにされていない部分が多い。

先行研究では、HQOL に関連する因子として、年齢⁴⁾⁵⁾、身体能力⁶⁾⁹⁾、転倒経験¹⁰⁾¹¹⁾、転倒不安¹²⁾、抑うつ⁴⁾¹³⁾¹⁴⁾、人間関係や余暇活動などの社会的交流⁸⁾¹⁵⁾¹⁶⁾などが報告されているが、対象や方法がそれぞれ異なっており、多方面の因子に着目して HQOL に与え

る影響の強さを検討した研究は少ない。また、今井(2005)¹⁷⁾の研究では地域・施設・デイケアの 3 群間で HQOL に有意な差は見られなかったが、そのような生活環境の違いにより HQOL の関連因子は異なる可能性もあるのではないかと考えられる。

【目的】

- I. 地域在住高齢者の HQOL の関連因子を調べ、その影響の強さを検討すること。
- II. 介護施設高齢者の HQOL 関連因子と違いがあるかどうかについて検討すること。

【方法】

○対象

本研究では、両群とも 70 歳以上 90 歳未満の高齢女性で、MMSE(Mini-Mental State Examination)¹⁸⁾21 点以上の、正常の認知機能を有する者を対象とした¹⁹⁾。

I. 地域在住高齢者(地域群)

N 市在住の高齢者を対象とした転倒予防教室、健康教室、老人クラブ及び市民公開講座の参加者で計 32 名(平均年齢 75.0±4.3 歳)を対象とした。要介護認定はされておらず、移動は全員自立である。

II. 介護施設高齢者（施設群）

介護老人保健施設入所者で、ヒッププロテクター臨床試験*参加者の初期評価データのうち、本研究の条件に一致した者 45 名（平均年齢 84.1±4.5 歳）を対象とした。このため、一部で評価項目・評価指標が異なっている。要介護度は全員Ⅱで、その内歩行が自立しているものは 24 名、全部又は一部介助が必要な者は 21 名であった。

*ヒッププロテクター臨床試験

43 施設 391 名が参加している、転倒による大腿骨頸部骨折予防を目的としたヒッププロテクターについての無作為対照比較試験。

○評価方法

1) HQOL

今回の研究では、HQOL の指標として The Medical Outcomes System 8-Item Short-Form Health Survey (SF-8)²⁰⁾を用いた。これは、疾患の種類に限定されない包括的な HQOL 尺度である SF-36 をもとに開発されたもので、科学的な信頼性・妥当性を持ち国際的に利用されている²¹⁾。SF-8 は、SF-36 の 8 つの健康概念である身体機能、日常役割機能(身体)、体の痛み、全体的健康感、活力、社会生活機能、日常役割機能(精神)、心の健康をそれぞれ 1 項目ずつ、計 8 項目で測定する尺度である。これら 8 つの下位尺度から、身体的サマリースコア (Physical Component Summary ; 以下 PCS) と精神的サマリースコア (Mental Component Summary ; 以下 MCS) という 2 つの上位尺度が、関連の強さに応じた係数によって重み

付けされ、算出される (表 1)。本研究では SF-8 のうち、この PCS、MCS という 2 つの上位尺度を HQOL の指標として用い、各項目との関連を調査した。

なお、SF-8 の得点は国民標準値に基づいたスコアリング (NBS) を用いて得点化される²⁰⁾。そのため全ての得点は SF-8 の日本国民標準値 50 点 (標準偏差 10 点) を平均値としている。

2) 一般情報

年齢、Body mass index(BMI)、疾患数 (心疾患、高血圧、脳卒中、糖尿病、パーキンソン病、起立性低血圧、不整脈、てんかん発作、変形性関節症、関節リウマチ、眼疾患の 11 疾患の有無の合計数)、家族構成 (①一人暮らし ②二人暮らし ③三人以上と同居、の 3 段階)、過去の職業の有無 (地域群のみ) について調査した。施設群では過去の職業の有無についての情報は得られなかった。

3) 転倒経験

過去 1 年以内の転倒の有無を聞き取りによって調査した。

4) 転倒不安

転倒不安の指標には Falls Efficacy Scale (FES)²²⁾を用いた (表 2)。これは、10 項目の動作について、転倒せずに行える自信がどれだけあるかを測定する尺度である。各項目を 1 点 (大変自信がある) から 10 点 (全く自信がない) で評価し、10 項目の合計点が FES スコア (10~100 点) となる。このスコアが高いほど転倒不安が大きいということになる。

表 1 SF-8 の下位尺度と身体的・精神的サマリースコアとの関連の強さ

	身体	精神		身体	精神
身体機能	◎	△	活力	○	○
日常役割機能 (身体)	◎	△	社会生活機能	○	◎
体の痛み	◎	△	日常役割機能 (精神)	○	◎
全体的健康感	◎	○	心の健康	△	◎

[◎ 強い関連、○ 中程度の関連、△ 弱い関連]

5) 身体能力

身体能力の指標には地域群では 10m 最大歩行速度; Maximum Walking Speed (MWS)²³⁾を用いて測定した。

施設群ではおよそ半数が自立歩行不可であるため、Functional Independent Measure (FIM)の運動項目を身体能力の指標とした。

6) 社会的交流

社会的交流の指標には、「『閉じこもり』アセスメント表」²⁴⁾を一部抜粋・改変した質問紙を用いた(表 3)。外出頻度や趣味の有無など、5項目の択一式質問からなっている。

7) 抑うつ

抑うつ度の指標には地域群では Geriatric Depression Scale (GDS)簡易版²⁵⁾²⁶⁾を用いた(表 4)。これは 15 項目の質問に「はい」か「いいえ」で回答し、5 点以上で「うつ傾向」、10 点以上で「うつ状態」とされる。

施設群では GDS の情報は得られなかったため、精神安定剤・抗うつ剤・催眠剤の服用の有無を指標とした。

○倫理的配慮

本研究は、名古屋大学医学部倫理委員会保健学部会の承認を得て行った。

表 2 Falls efficacy scale (FES) 質問項目

1. 入浴する
2. 戸棚やタンスを開ける
3. 簡単な食事の用意をする
4. 家のまわりを歩く
5. 布団に入ったり、布団から起き上がる
6. 電話にすぐ応対する
7. 座ったり、立ったりする
8. 服を着たり、脱いだりする
9. 日常のちょっとした掃除をする
10. 日常のちょっとした買い物をする

表 3 社会的交流質問項目 ※ () 内は施設群

1. 一日中家(病室)の外には出ず、家(病室)の中で過ごすことが多いですか?
1. はい 0. いいえ
2. 買い物、散歩、通院などで(施設外に)外出する頻度はどれくらいですか?
1. 毎日1回以上 2. 2~3日に1回程度
3. 1週間に1回程度 4. ほとんど外出しない
3. 親しくおしゃべりしたり、行き来するような友達は近くにいますか?
1. はい 0. いいえ
4. 友達・近所(施設内)の人または別居家族や親戚と会っておしゃべりする頻度はどれくらいですか?
1. ほとんど毎日 2. 2~3日に1回程度
3. 1週間に1回程度 4. 1ヶ月に1回程度
5. ほとんどない
5. 家(病室)の中または家の外(施設内)で趣味・楽しみ・好きでやっていることがありますか?
1. はい 0. いいえ

表 4 geriatric depression scale (GDS) 質問項目

1. 毎日の生活に満足していますか
2. 毎日の活動力や周囲に対する興味が低下したと思いますか
3. 生活が空虚だと思いますか
4. 毎日が退屈だと思ふことが多いですか
5. 大抵は機嫌良く過ごすことが多いですか
6. 将来の漠然とした不安に駆られることが多いですか
7. 多くの場合は自分が幸福だと思ふますか
8. 自分が無力だなあと思ふことが多いですか
9. 外出したり何か新しいことをするよりも家にいたいと思ふますか
10. なによりもまず、物忘れが気になりますか
11. いま生きていることが素晴らしいと思ふますか
12. 生きていても仕方がないと思ふ気持ちになることがありますか
13. 自分が活気にあふれていると思ふますか
14. 希望がないと思ふことがありますか
15. 周りの人があなたより幸せそうに見えますか

○統計学的処理

PCS・MCS と各因子との相関分析は Spearman の順位相関係数(ρ)を用いた。

次に相関のあった因子を説明変数として重回帰分析(ステップワイズ法)に投入し、標準偏回帰係数(β)を算出してその関連の強さを検討した。

なお、統計学的有意水準は5%未満とした。また、全ての統計には SPSS14.0J を用い、統計を行った。

【結果】

1) 対象者の特性

本研究の対象者の特性を表5に示す。各項目の平均値±標準偏差または割合(%)を示した。「有り/無し」「はい/いいえ」の質問項目については「有り」「はい」の割合を%で示した。

表5 対象者の特性

		地域群	施設群	
HQOL	PCS ^a	48.3±5.03	39.9±10.7	
	MCS ^a	51.1±5.85	51.3±7.96	
一般情報	年齢 ^a	75.0±4.28	84.1±4.46	
	BMI ^a	22.7±2.73	21.7±3.32	
	疾患数 ^a	1.38±1.16	1.69±1.06	
	家族構成 ^b			
	(①一人暮らし②二人暮らし③三人以上と同居)	①21.9 ②40.6 ③37.5	①37.8 ②11.1 ③51.1	
	過去の職業の有無 ^b	75.0	—	
転倒経験	過去1年以内の転倒の有無 ^b	12.5	40.0	
転倒不安	FES ^a	19.8±12.5	45.5±23.0	
身体能力	10m 最大歩行速度(m/min) ^a	110±19.4	—	
	FIM 運動項目 ^a	—	67.4±15.9	
社会的交流	1. 家の中で過ごすことが多い ^b	9.38	42.2	
	2. 外出頻度 ^b			
	(①毎日1回以上②2~3日に1回 ③1週間に1回④ほとんど外出しない)	①53.1 ②46.9 ③0 ④0	①0 ②0 ③13.3 ④86.7	
	3. 友達の有無 ^b	87.5	71.1	
	4. 友達と会って話す頻度 ^b			
	(①ほぼ毎日②2~3日に1回③1週間に1回 ④1ヶ月に1回⑤ほとんどない)	①31.3 ②40.6 ③28.1 ④0 ⑤0	①26.7 ②53.3 ③6.67 ④8.89 ⑤4.44	
	5. 趣味の有無 ^b	94.4	60.0	
	抑うつ	GDS ^a	3.09±3.67	—
		抗うつ剤等の服薬の有無 ^b	—	15.6

^a平均±標準偏差 ^b割合(%)

2) 地域群の PCS・MCS に関連した因子

地域群の PCS と相関があった因子は、疾患数、転倒不安、抑うつ(GDS)、身体能力(10m 最大歩行速度)であった。MCS と相関があった因子は過去の職業、転倒不安、抑うつ(GDS)、社会的交流(友達の有無、趣味の有無)であった(表6)。

さらに、PCS・MCS と相関が見られた項目を説明変数として重回帰分析(ステップワイズ法)に投入したところ、PCS に最も強く影響を与えている因子は抑うつ(GDS)で($\beta=-0.47$)、その次に転倒不安が選ばれた($\beta=-0.33$)。MCS に最も強く影響を与えている因子は転倒不安で($\beta=-0.45$)、その次に抑うつ(GDS)が選ばれた($\beta=-0.35$) (表7)。

3) 施設群の PCS・MCS に関連した因子

施設群の PCS と相関があった因子は転倒不安であった。MCS と相関があった因子はなかった(表8)。

表6 地域群のPCS・MCSと各因子との相関

		PCS	MCS
		rho	rho
一般情報	年齢	-0.34	-0.08
	BMI	-0.03	0.07
	疾患数	-0.46**	-0.10
	家族構成	-0.13	-0.13
	過去の職業の有無	-0.07	-0.36**
転倒経験	過去1年以内の転倒の有無	-0.10	-0.04
転倒不安	FES	-0.56**	-0.52**
身体能力	10m最大歩行速度	0.45*	0.30
社会的交流	1. 家の中で過ごすことが多い	-0.04	-0.06
	2. 外出頻度	0.10	-0.22
	3. 友達の有無	0.06	0.38*
	4. 友達と会って話す頻度	0.22	-0.35
	5. 趣味の有無	0.34	0.39*
抑うつ	GDS	-0.50**	-0.46*

PCS=Physical Component Summary MCS= Mental Component Summary
 BMI=Body Mass Index FES=Falls Efficacy Scale GDS=Geriatric Depression Scale
 rho=Spearman の順位相関係数 *p<0.05 **p<0.01

表7 PCS・MCSに関連した因子の影響の強さの検討

		PCS
		β
抑うつ	GDS	-0.47**
転倒不安	FES	-0.33*
		MCS
		β
転倒不安	FES	-0.45**
抑うつ	GDS	-0.35*

PCS=Physical Component Summary MCS= Mental Component Summary
 FES=Falls Efficacy Scale GDS=Geriatric Depression Scale
 β = 標準偏回帰係数 *p<0.05 **p<0.01
 基準: 投入するFの確率 \leq 0.05 除去するFの確率 \geq 0.10

表8 施設群のPCS・MCSと各因子との相関

		PCS	MCS
		rho	rho
一般情報	年齢	0.07	-0.04
	BMI	0.23	0.18
	疾患数	-0.29	-0.15
	家族構成	-0.24	0.23
転倒経験	過去1年以内の転倒の有無	-0.15	-0.14
転倒不安	FES	-0.55**	0.09
身体能力	FIM	0.15	0.17
社会的交流	1. 家の中で過ごすことが多い	0.01	0.09
	2. 外出頻度	0.22	-0.13
	3. 友達の有無	-0.02	-0.13
	4. 友達と会って話す頻度	0.02	0.06
	5. 趣味の有無	0.04	0.06
抑うつ	抗うつ剤等の服薬の有無	-0.07	-0.15

PCS=Physical Component Summary MCS= Mental Component Summary
 BMI=Body Mass Index FES=Falls Efficacy Scale FIM=Functional Independent Measure
 rho=Spearman の順位相関係数 *p<0.05 **p<0.01

【考察】

本研究では、高齢者の HQOL に関連している因子を多方面の因子に着目して、その影響の強さを検討するために、地域在住高齢者と介護施設高齢者において HQOL を SF-8 によって評価し、様々な因子との関連を調査した。

1) 地域群について

地域群の PCS と関連のあった項目は疾患数、10m 最大歩行速度、FES、GDS であった。MCS と関連のあった項目は、過去の職業の有無、FES、社会的交流、GDS であった。疾患や歩行能力といった身体機能の低下は身体的健康感の低下に直接関わっていると考えられる。さらに転倒不安や抑うつといった精神的な問題が自身の身体機能を過小評価しているのではないかとと思われる。

過去に職業を持っていて現在働いていない者は MCS が低い傾向にあったことは、職業を失ったことによる社会的役割の喪失体験が HQOL に影響を及ぼしているためではないかと推察した。

また、転倒不安については抑うつなどの精神的な問題のほか、身体機能や歩行能力などとの関連が報告されており¹²⁾²⁸⁾²⁹⁾、改善には身体的・精神的両方の面からのアプローチが必要であると思われる。

重回帰分析の結果では、MCS だけでなく PCS にも疾患や歩行能力といった身体機能よりも転倒不安や抑うつといった精神的な機能の方が強く影響しており、HQOL には心の問題が深く関わっていることが示唆された。竹田ら(2005)²⁷⁾による地域在住高齢者の趣味や生きがいについて調査した研究では、趣味や生きがいを持っている高齢者は、QOL が高く、抑うつ度が低く保たれている。またその内容も、友人と会う、老人クラブへの参加など、人との交流が含まれるものが多い。本研究でも社会的交流の友達の有無と趣味の有無の項目について HQOL との関連が見られており、地域支援事業などを通して、人との交流ができる場への参加や生涯続けられる趣味作りを促すことが、地域在住高齢

者の HQOL の維持・向上に重要なことではないかと思われた。

2) 施設群について

施設群では PCS と転倒不安との相関が見られたが、MCS と相関の見られた項目はなかった。施設群において相関の見られた因子が少なかったことはいくつかの理由が考えられる。

石原ら(2001)¹³⁾による介護施設入所者の HQOL 関連因子を調査した研究では、抑うつ(GDS)が HQOL と強く関連していたが、今回施設群では関連が見られなかった。本研究では施設群は既に得られていたデータを使用したため GDS のデータがなく、抑うつの指標として代わりに抗うつ剤などの服用の有無を用いたが、葛谷ら(2006)³⁰⁾によると要介護高齢者で GDS によりうつ傾向を示した者でも実際に抗うつ剤を服用しているものは4分の1程度に留まると報告しており、うつ傾向があっても薬を服用していない、いわゆる「隠れうつ」が多く存在していた可能性が考えられる。そのため、施設においても抑うつと HQOL との関連は否定できない。

また、地域群に比べ生活環境や関わる人が限定されており、その施設の特色に大きな影響を受けやすいことである。蛭江(1993)³¹⁾や Birren ら(1998)³²⁾によると、介護職員や家族が疾病・障害の程度や施設でのケアが QOL に重要と感じているのに対し、入所者本人は安心感や家族・職員との人間関係に高いウェイトをおいており、施設ではそうした本人と周りの意識の違いを認識した上での関わりが重要であると思われる。そのため介護施設高齢者の HQOL には職員との人間関係、施設的环境や介護方法など、今回着目しなかった因子が関わっている可能性が考えられた。

今回着目したもので以外で HQOL の関連因子と考えられるものについて、今回は施設群の対象者は全員要介護度Ⅱであったが、要介護度の違いにより HQOL やその関連因子が異なる可能性も考えられる⁹⁾³³⁾。また、今回は性別による身体機能の違いを除去するた

めに女性に限定して調査を行ったが、藤本ら(2004)⁴⁾は男性と女性で HQOL の関連因子に違いが見られたと報告している。これらの点を踏まえ、今後さらに評価する項目を増やして HQOL との関連を検討する必要があるであろう。

3) 地域群と施設群の HQOL 関連因子の違い
 今回は地域群と施設群で HQOL 関連因子が異なる結果となった。平均年齢や評価指標の違いがあるにせよ、生活環境の違いによって本人が生活の上で重要と考えること、つまり HQOL の関連因子が異なる可能性も考えられ、今後さらなる調査が必要である。

4) 本研究の限界と今後の展望

本研究の限界としては、施設群の対象者が別の研究で既に得られていたデータであったため、地域群と施設群の平均年齢の差が大きかったことや、評価指標を全ては一致させることができなかつたために、厳密な比較はできなかつた点が考えられる。しかし、本研究で対象とした施設の入所者の年齢層は全国の介護施設入所者の年齢層と類似しており(図 1)、一般的な施設の特徴を捉えることはできたのではないかと考えられる。

また今後の展望として、評価する項目を増やしたり対象の幅を広げたりすることで HQOL に影響を与えている因子をより正確に捉えることが可能であると思われる。

身体機能が低いからといって必ずしも HQOL が低いわけではなく、社会交流や人間関係の充実が HQOL を高い水準に保つために大切なことであり、それは地域や施設での介護予防の観点からも重要な課題であると考えられる。

VI. まとめ

地域在住高齢者と介護施設高齢者を対象に、HQOL の関連因子を調べその影響の強さを見るとともに、生活環境の違いにより関連因子に違いがあるかどうかについて検討した。

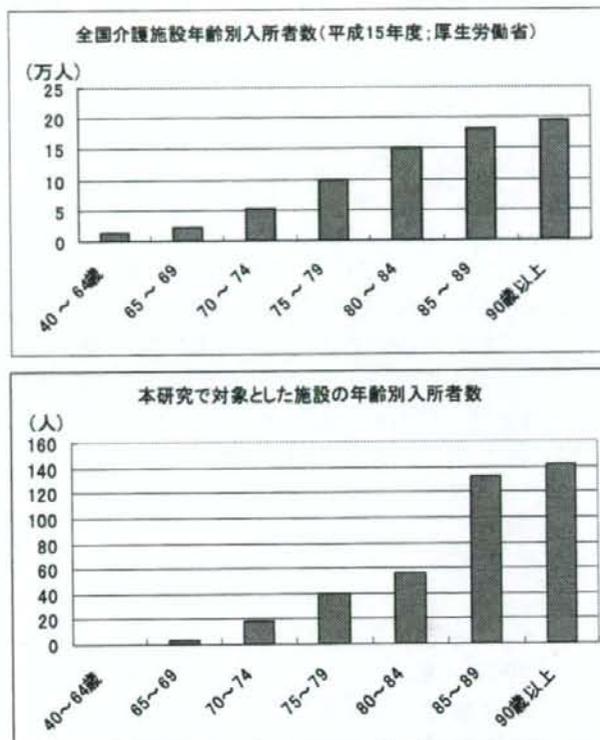


図 1 全国と本研究の年齢階級別介護施設入所者数

- 1) 地域群では PCS には抑うつと転倒不安が、MCS には転倒不安と抑うつが強く関連した。
- 2) 施設群では PCS と転倒不安との関連が見られたが、MCS と関連を示したものはなかった。

このことから高齢者の HQOL には身体機能よりも心の問題が強く影響しており、社会交流や適切なケアにより健康感が維持されるのではないかと推察された。

VII. 謝辞

本研究に参加していただいた転倒予防教室、健康教室、老人クラブ、市民公開講座参加者の皆様、また研究に際しご協力いただいた国立長寿医療センター機能回復診療部長・原田敦先生、名古屋大学医学部老年情報学寄附講座准教授・大西丈二先生、及び名古屋大学総合保健体育科学センター教授・島岡清先生に深く感謝いたします。

Ⅷ. 文献

- 1) 厚生統計協会編：国民の福祉の動向. 厚生生の指標. 52(12)：4-12, 2005.
- 2) 厚生省監修：平成 12 年度版 厚生白書. pp58-85, 2000.
- 3) 出江紳一、鈴鴨よしみ：健康関連 QOL とリハビリテーション. 総合リハビリテーション. 33(11)：997-1002, 2005.
- 4) 藤本弘一郎、岡田克俊、泉俊男ら：地域在住高齢者の生きがいを規定する要因についての研究. 厚生生の指標. 51(4)：24-32, 2004.
- 5) 堤文夫：要介護高齢者の QOL 評価—SF-36 を用いて—. 理学療法学. 34(4)：189-192, 2007.
- 6) 宮原洋八、黒後裕彦：地域在住高齢者における健康関連 QOL と生活機能、社会的属性間の関連. 健康支援. 7(2)：149-152, 2005.
- 7) 萩野浩：大腿骨頸部骨折と QOL. 骨粗鬆症治療. 3(2)：134-139, 2004.
- 8) 亀田亮：老人保健施設入所者の QOL 評価. 理学療法探求. 第 8 卷：10-14, 2005.
- 9) 田中清、田丸淳子：介護と QOL. 骨粗鬆症治療. 3(2)：140-145, 2004.
- 10) 坪山直生、竹村俊一、石橋孝ら：転倒経験と健康感の関連. Osteoporosis Japan. 12(3)：391-393, 2004.
- 11) 村田伸、津田彰：在宅障害高齢者の転倒と QOL との関連性. 健康支援. 7(2)：141-148, 2005.
- 12) 鈴木みずえ、大山直美、山田紀代美ら：虚弱高齢者の転倒恐怖感 (Fear of Falling) と Health-related QOL の関連性. GERONTOLOGY. 13(4)：487-494, 2001.
- 13) 石原一成、三村達也、弘原海剛ら：老人保健施設入所女性の ADL と QOL および身体機能との関連性. 理学療法科学. 16(4)：179-185, 2001.
- 14) 石原一成、三村達也、弘原海剛ら：在宅高齢女性の ADL および QOL の関連性. 教育医学. 46(5)：1142-1152, 2001.
- 15) 大森純子：前期高齢女性の近隣他者との交流関係と健康関連 QOL との関連. 日本公衛誌. 54(9)：605-613, 2007.
- 16) 藤井菜穂子、小野玲、米田稔彦ら：老人福祉センターに通所している地域高齢者の余暇活動と Quality of Life. 神戸大学医学部保健学科紀要. 第 20 巻：53-59, 2004.
- 17) 今井仁美：生活環境の異なる高齢者の QOL 比較. 名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻卒業論文集：1-7, 2005.
- 18) Marshal F. Folstein, Susan E. Folstein, Paul R. McHugh：“MINI-MENTAL STATE” A PRACTICAL METHOD FOR GRADING THE COGNITIVE STATE OF PATIENTS FOR THE CLINICIAN. Journal of psychiatric research. 12：189-198, 1975.
- 19) J-L. Novella, C. Jochum, J. Ankri, et al：Measuring general health status in dementia: Practical and methodological issues in using the SF-36. Aging clinical and experimental research. 13(5)：362-269, 2001.
- 20) 福原俊一、鈴鴨よしみ：SF-8 日本語版マニュアル. pp5-124, 京都, NPO 健康医療評価研究機構, 2004.
- 21) 福原俊一、鈴鴨よしみ：健康関連 QOL 尺度 SF-8 と SF-36. 医学のあゆみ. 213(2)：133-136, 2005.
- 22) Mary E. Tinetti, Donna Richman, Lynda Powell: Falls efficacy as a measure of fear of falling. Journal of Gerontology:PSYCHOLOGICAL SCIENCES. 45(6)：239-243, 1990.
- 23) 内山靖、小林武、潮見泰蔵：臨床評価指標入門 適用と解釈のポイント (初版). pp127-133, 東京, 共同医書出版社, 2003.
- 24) 新開省二：『『閉じこもり』アセスメント表の作成とその活用法』厚生科学研究所, ヘルスアセスメントマニュアル—生活習慣病・要介護状態予防のために—, pp113-141, ヘルスアセスメント検討委員会監修, 2000.

- 25) 松林公蔵、小澤利男：評価の方法 d 老年者の情緒に関する評価. *Geriatric Medicine*. 32(5) : 541-546, 1994.
- 26) Sheikh, J.I., Yesavage, J.A., Brooks, J.O. 3d., et al : Proposed factor structure of the Geriatric Depression Scale . *Int.Pshchogeriatr*. 3(1):23-28, 1991.
- 27) 竹田徳則、近藤克則、吉井清子ら：居宅高齢者の趣味生きがい—作業療法士による介護予防への手がかりとして. 総合リハビリテーション. 33(5) : 469-476, 2005.
- 28) 加藤智香子、猪田邦雄、長屋正博ら：施設入所高齢者の転倒恐怖と QOL、ADL、身体活動量との関連. *Osteoporosis Japan*. 15(2) : 317-319, 2007.
- 29) 盛内麻美：転倒恐怖に与える影響因子について. 名古屋大学医学部保健学科理学療法学専攻卒業論文集 : 1-7, 2005.
- 30) 葛谷雅文、益田雄一郎、平川仁尚ら：在宅用介護高齢者の「うつ」発症頻度ならびにその関連因子. *日本老年医学会雑誌*. 43(4) : 512-517, 2006.
- 31) 蛭江紀雄：老人ホームにおける老人の QOL. *老年精神医学雑誌*. 4(9):993-998, 1993.
- 32) J E. Birren , J E.Lubben , D E.Deutchman, et al : 虚弱な高齢者の QOL その概念と測定 (三谷嘉明他訳). pp34-61, 東京, 医歯薬出版, 1998.
- 33) 田中清、田丸淳子、高尾文介：老人保健施設入所者の QOL 調査. *Osteoporosis Japan*. 12(3) : 349-351, 2004.

ORIGINAL ARTICLE

Haruhiko Tokuda · Shinji Takai · Yoshiteru Hanai
Atsushi Harada · Rie Matsushima-Nishiwaki
Hisaaki Kato · Shinji Ogura · Osamu Kozawa

Potentialiation by platelet-derived growth factor-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblasts

Received: June 28, 2007 / Accepted: November 15, 2007

Abstract We previously reported that basic fibroblast growth factor (FGF-2) stimulates the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) via p44/p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. In the present study, we investigated the effect of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) on FGF-2-induced VEGF release in MC3T3-E1 cells. PDGF-BB significantly enhanced the FGF-2-stimulated VEGF release. The amplifying effect of PDGF-BB was dose dependent in the range between 0.1 and 30 ng/ml. AG1295, a selective inhibitor of PDGF receptor kinase, which reduced the autophosphorylation of PDGF receptor- β , suppressed the enhancement by PDGF-BB without affecting the FGF-2 effect. PDGF-BB failed to strengthen the FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase or SAPK/JNK. The amplification by PDGF-BB of FGF-2-stimulated VEGF release was reduced by PD98059, a specific inhibitor of MEK, or SP600125, a specific inhibitor of SAPK/JNK. These results strongly suggest that PDGF-BB potentiates FGF-2-stimulated VEGF release at a point downstream from p44/p42 MAP kinase and SAPK/JNK in osteoblasts.

Key words FGF · PDGF · MAP kinase · VEGF · osteoblast

Introduction

Bone metabolism is strictly regulated by two functional cells, osteoblasts and osteoclasts, which are responsible for bone formation and bone resorption, respectively [1]. It has been shown that osteoblasts synthesize basic fibroblast growth factor (FGF-2), and FGF-2 is embedded in bone matrix [2,3]. FGF-2 expression in osteoblasts is detected during fracture repair [4]. Therefore, it is recognized that FGF-2 may play a pivotal role in fracture healing, bone remodeling, and osteogenesis [5]. We have previously reported that FGF-2 autophosphorylates FGF receptors 1 and 2 among four structurally related high-affinity receptors, possessing an intrinsic protein tyrosine kinase activity in osteoblast-like MC3T3-E1 cells [6]. In addition, we reported that FGF-2 stimulates induction of heat shock protein 27 in these cells [7].

Bone remodeling carried out by osteoblasts and osteoclasts is accompanied with angiogenesis and capillary outgrowth [8,9]. Because capillary endothelial cells provide the microvasculature during bone remodeling, it is generally recognized that the activities of osteoblasts, osteoclasts, and capillary endothelial cells are closely coordinated and regulate bone metabolism [10]. These functional cells are considered to influence one another via humoral factors as well as by direct cell-to-cell contact. It is well known that vascular endothelial growth factor (VEGF) is an angiogenic growth factor highly specific for vascular endothelial cells [11]. As for bone metabolism, it has been shown that inactivation of VEGF causes complete suppression of blood vessel invasion concomitant with impaired trabecular bone formation and expansion of hypertrophic chondrocyte zone in mouse tibial epiphyseal growth plate [12]. Evidence is accumulating that osteoblasts among bone cells produce and secrete VEGF in response to various physiological agents [11,13–15]. We have previously shown that FGF-2

H. Tokuda (✉) · Y. Hanai
Department of Clinical Laboratory, National Hospital for Geriatric Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Aichi 474-8511, Japan
Tel. +81-562-46-2311; Fax +81-562-46-8396
e-mail: tokuda@ncgg.go.jp

H. Tokuda · S. Takai · Y. Hanai · R. Matsushima-Nishiwaki · H. Kato · O. Kozawa
Department of Pharmacology, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan

A. Harada
Department of Functional Restoration, National Hospital for Geriatric Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Aichi, Japan

H. Kato · S. Ogura
Department of Emergency and Disaster Medicine, Gifu University Graduate School of Medicine, Gifu, Japan

stimulates VEGF release in osteoblast-like MC3T3-E1 cells, and that among the mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily [16], p44/p42 MAP kinase and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) act as positive regulators in the VEGF release [17,18]. These findings led us to speculate that VEGF secreted from osteoblasts may play a pivotal role in the regulation of bone metabolism [10,19]. However, the exact mechanism underlying VEGF synthesis and its release in osteoblasts remains to be clarified.

Platelet-derived growth factor (PDGF) is a mitogenic factor, which mainly acts on connective tissue cells [20,21]. PDGF occurs as five different isoforms [21]. PDGF isoforms were initially isolated from human platelets, but have been shown to be synthesized and released from a variety of cell types including osteosarcoma and osteoblasts [20,22,23]. As for bone metabolism, PDGF-BB reportedly stimulates osteoblast proliferation and induces bone resorption [23]. It is recognized that PDGF, released during platelet aggregation, plays an important role in fracture healing as a systemic factor and that PDGF also regulates bone remodeling as a local factor [23]. We have previously reported that PDGF-BB activates phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase D via tyrosine kinase activation, resulting in protein kinase C activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells [24]. In addition, we recently showed that phosphatidylinositol 3-kinase negatively regulates the PDGF-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in these cells [25]. However, the exact role of PDGF-BB in osteoblasts has not yet been fully clarified.

In the present study, we investigated the effect of PDGF-BB on FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. We here show that PDGF-BB upregulates FGF-2-stimulated VEGF release in MC3T3-E1 cells, and that PDGF-BB acts at a point downstream from p44/p42 MAP kinase and SAPK/JNK.

Materials and methods

Materials

FGF-2, PDGF-BB, and mouse VEGF enzyme immunoassay kit were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). AG1295 (6,7-dimethyl-2-phenylquinoxaline), PD98059, and SP600125 were obtained from Calbiochem-Novabiochem (La Jolla, CA, USA). Phospho-specific PDGF receptor- β antibodies, PDGF receptor- β antibodies, phospho-specific p44/p42 MAP kinase antibodies, p44/p42 MAP kinase antibodies, phospho-specific SAPK/JNK antibodies, and SAPK/JNK antibodies were purchased from Cell Signaling (Beverly, MA, USA). The ECL Western blotting detection system was purchased from Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Other materials and chemicals were obtained from commercial sources. AG1295, PD98059, and SP600125 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The maximum concentration of DMSO was 0.1%, which did not affect the assay for VEGF or Western blot analysis.

Cell culture

Cloned osteoblast-like MC3T3-E1 cells, which have been derived from newborn mouse calvaria [26], were maintained as previously described [27]. Briefly, the cells were cultured in α -minimum essential medium (α -MEM) containing 10% fetal calf serum (FCS) at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. The cells were seeded into 35-mm- (5 × 10⁴) or 90-mm- (5 × 10⁵) diameter dishes in α -MEM containing 10% FCS. After 5 days, the medium was exchanged for α -MEM containing 0.3% FCS. The cells were used for experiments after 48 h. When indicated, the cells were pretreated with AG1295, PD98059, or SP600125 for 60 min.

VEGF assay

The cultured cells were pretreated with PDGF-BB for 60 min, and then stimulated by various doses of FGF-2 in 1 ml α -MEM containing 0.3% FCS for the indicated periods. When indicated, the cells were pretreated with AG1295, PD98059, or SP600125 for 60 min. The conditioned medium was collected at the end of the incubation, and the VEGF concentration was measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) kit.

Western blot analysis

The cultured cells were stimulated by FGF-2 or PDGF-BB in α -MEM containing 0.3% FCS for the indicated periods. The cells were washed twice with phosphate-buffered saline and then lysed, homogenized, and sonicated in a lysis buffer containing 62.5 mM Tris/HCl, pH 6.8, 2% sodium dodecyl sulfate (SDS), 50 mM dithiothreitol, and 10% glycerol. The cytosolic fraction was collected as a supernatant after centrifugation at 125 000 g for 10 min at 4°C. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was performed by Laemmli [28] in 10% polyacrylamide gel. Western blotting analysis was performed as described previously [29] by using phospho-specific PDGF receptor- β antibodies, PDGF receptor- β antibodies, phospho-specific p44/p42 MAP kinase antibodies, p44/p42 MAP kinase antibodies, phospho-specific SAPK/JNK antibodies, or SAPK/JNK antibodies, with peroxidase-labeled antibodies raised in goat against rabbit IgG being used as second antibodies. Peroxidase activity on the polyvinylidene fluoride (PVDF) sheet was visualized on X-ray film by means of the ECL Western blotting detection system. When indicated, the cells were pretreated with PDGF-BB for 60 min.

Determination

The absorbance of enzyme immunoassay samples was measured at 450 nm with EL 340 Bio Kinetic Reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, USA). The densitometric analysis was performed using Molecular Analyst/Macintosh (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Statistical analysis

The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni method for multiple comparisons between pairs, and a $P < 0.05$ was considered significant. All data are presented as the mean \pm SEM of triplicate determinations. Each experiment was repeated three times with similar results.

Results

Effect of PDGF-BB on FGF-2-induced VEGF release in MC3T3-E1 cells

PDGF-BB, which by itself did not affect the VEGF levels, significantly potentiated the FGF-2-stimulated VEGF release in a time-dependent manner in osteoblast-like MC3T3-E1 cells (Fig. 1). The amplifying effect of PDGF-BB on the VEGF release was dose dependent in the range between 0.1 and 30 ng/ml (Fig. 2). PDGF-BB (30 ng/ml) caused about 200% enhancement of the FGF-2 effect on VEGF release.

Effect of AG1295 on the amplification by PDGF-BB of the FGF-2-induced VEGF release in MC3T3-E1 cells

PDGF receptor has an intrinsic protein tyrosine kinase activity [20]. To elucidate whether the upregulating effect

of PDGF-BB on FGF-2-induced VEGF release is mediated through the activation of PDGF receptor kinase in MC3T3-E1 cells, we examined the effect of AG1295, a specific inhibitor of PDGF-receptor kinase [30], on the enhancement by PDGF-BB. AG1295 significantly suppressed the amplification by PDGF-BB of FGF-2-induced VEGF release whereas it had no effect on the FGF-2-induced VEGF release (Table 1). We found that AG1295, which by itself had little effect on the phosphorylation of PDGF receptor- β , actually attenuated the PDGF-BB-induced phosphorylation of PDGF receptor- β (Fig. 3).

Effects of PDGF-BB on the FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase or SAPK/JNK in MC3T3-E1 cells

We have previously shown that p44/p42 MAP kinase and SAPK/JNK play roles as positive regulators in the FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblast-like MC3T3-E1 cells [17,18]. To clarify whether the enhancement by PDGF-BB of the FGF-2-stimulated VEGF release is an event via activation of p44/p42 MAP kinase or SAPK/JNK in these cells, we next examined the effect of PDGF-BB on the FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase or SAPK/JNK. However, PDGF-BB failed to affect the FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase (Fig. 4). In addition, the FGF-2-induced phosphorylation of SAPK/JNK was not enhanced by PDGF-BB (data not shown).

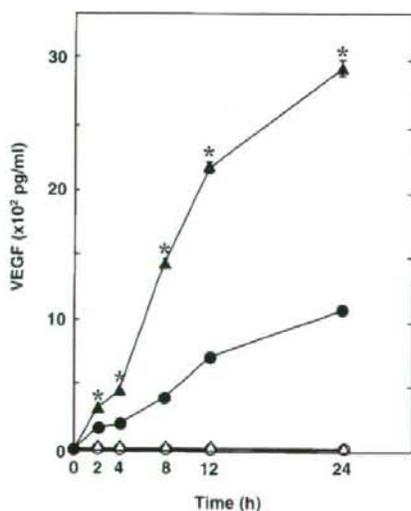


Fig. 1. Effect of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) on fibroblast growth factor (FGF)-2-stimulated vascular endothelial growth factor (VEGF) synthesis in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were pretreated with 30 ng/ml PDGF-BB (▲, △) or vehicle (●, ○) for 60 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 (●, ▲) or vehicle (○, △) for the indicated periods. Each value represents the mean \pm SEM of triplicate determinations. Similar results were obtained with two additional and different cell preparations. * $P < 0.05$, compared to the value of FGF-2 alone

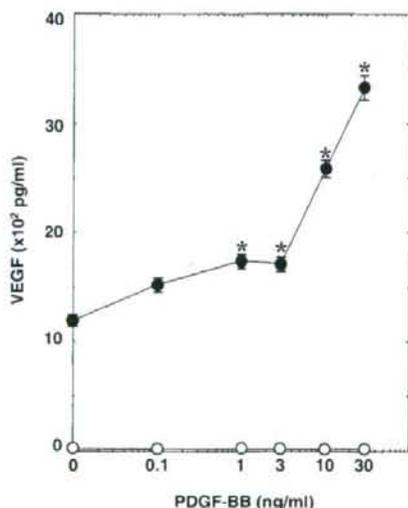


Fig. 2. Dose-dependent effect of PDGF-BB on FGF-2-stimulated VEGF synthesis in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were pretreated with various doses of PDGF-BB for 60 min, and then stimulated by 70 ng/ml FGF-2 (●) or vehicle (○) for 24 h. Each value represents the mean \pm SEM of triplicate determinations. Similar results were obtained with two additional and different cell preparations. * $P < 0.05$, compared to the value of FGF-2 alone

Table 1. Effect of AG1295 on the enhancement by PDGF-BB of FGF-2-stimulated VEGF release in MC3T3-E1 cells

AG1295	PDGF-BB	FGF-2	VEGF (pg/ml)
-	-	-	<7.8
-	-	+	1191 ± 67*
-	+	-	<7.8
-	+	+	3335 ± 141**
+	-	-	<7.8
+	-	+	1158 ± 75
+	+	-	<7.8
+	+	+	2520 ± 135***

The cultured cells were pretreated with 0.7 μM AG1295 or vehicle for 60 min, and then incubated with 30 ng/ml PDGF-BB or vehicle for 60 min. The cells were subsequently stimulated by 70 ng/ml FGF-2 or vehicle for 24 h. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. Similar results were obtained with two additional and different cell preparations. **P* < 0.05, compared to the control; ***P* < 0.05, compared to the value of FGF-2 alone; ****P* < 0.05, compared to the value of FGF-2 with PDGF-BB pretreatment. PDGF-BB, platelet-derived growth factor-B; FGF-2, fibroblast growth factor 2; VEGF, vascular endothelial growth factor

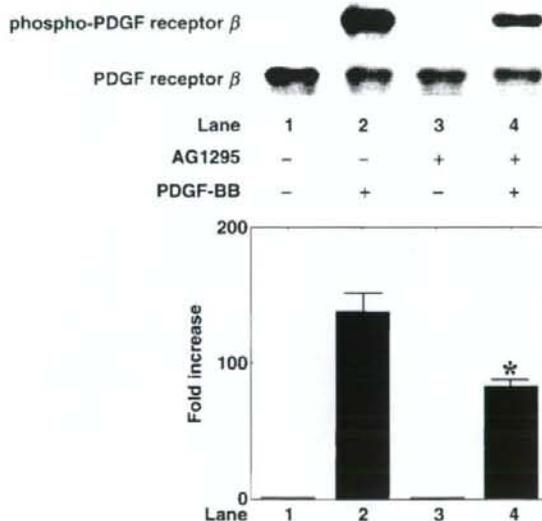


Fig. 3. Effect of AG1295 on the PDGF-BB-induced autophosphorylation of PDGF receptor-β in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were pretreated with 0.7 μM AG1295 or vehicle for 60 min, and then stimulated by 30 ng/ml PDGF-BB or vehicle for 60 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-specific PDGF receptor-β or PDGF receptor-β. The histogram shows quantitative representations of the levels of PDGF-BB-induced phosphorylation obtained from laser densitometric analysis of three independent experiments. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. Similar results were obtained with two additional and different cell preparations. **P* < 0.05, compared to the value of PDGF-BB alone

Effects of PD98059 or SP600125 on the amplification by PDGF-BB of the FGF-2-induced VEGF release in MC3T3-E1 cells

We further examined the effect of PD98059, a specific inhibitor of MEK1/2, upstream kinases that activate p44/

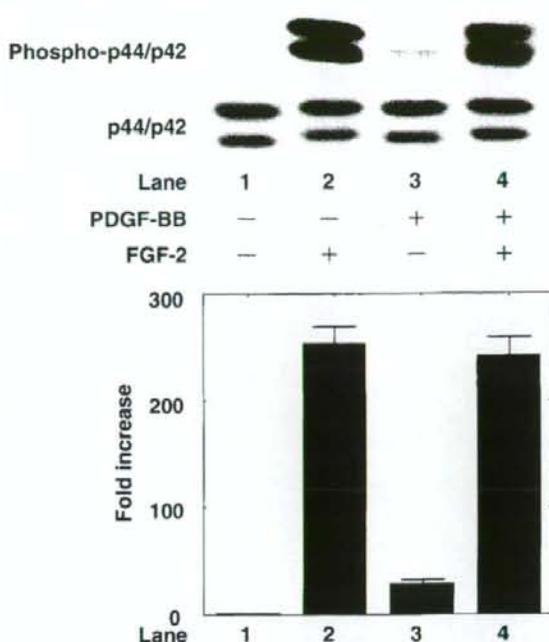


Fig. 4. Effect of PDGF-BB on FGF-2-induced phosphorylation of p44/p42 MAP kinase in MC3T3-E1 cells. The cultured cells were pretreated with various doses of PDGF-BB for 60 min, and then stimulated by 30 ng/ml FGF-2 or vehicle for 20 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-specific p44/p42 MAP kinase or p44/p42 MAP kinase. The histogram shows quantitative representations of the levels of FGF-2-induced phosphorylation obtained from laser densitometric analysis of three independent experiments. Each value represents the mean ± SEM of triplicate determinations. Similar results were obtained with two additional and different cell preparations

p42 MAP kinase [31], on the enhancement by PDGF-BB. PD98059 significantly suppressed the enhancement by PDGF-BB of the FGF-2-induced VEGF release in addition to the effect of FGF-2 alone. In addition, SP600125, a specific SAPK/JNK inhibitor [32], also reduced the enhancement by PDGF-BB of the VEGF release (Table 2).

Discussion

In the present study, we demonstrated that PDGF-BB, which by itself had no effect on the levels of VEGF, significantly enhanced FGF-2-stimulated VEGF release in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. FGF-2 significantly elicited VEGF release within 2 h after the stimulation, and the enhancement by PDGF-BB was also observed within 2 h. On the other hand, the levels of VEGF release induced by FGF-2 and the enhancement by PDGF-BB were stepped up after 8 h and sustained until 24 h after the stimulation. It is possible that both transcriptional processes and post-transcriptional reactions are involved in the VEGF release