

表 アルファカルシドール 1.0 μ g の投与による筋量変化

表

	サルコペニア	N	平均値	標準偏差	
全身筋量変化率	なし	43	99.2%	3.7%	P=.046
	あり	15	101.5%	3.9%	
下肢筋量変化率	なし	43	97.8%	7.2%	P=.000
	あり	15	106.4%	7.8%	
四肢補正筋量変化率	なし	43	98.5%	7.9%	P=.005
	あり	15	105.3%	7.6%	
下肢補正筋量変化率	なし	43	98.0%	7.4%	P=.000
	あり	15	106.5%	7.8%	

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）
分担研究報告書

栄養因子と体組成との関連に関する検討

研究分担者 細井孝之 国立長寿医療研究センター 臨床研究推進部長

研究要旨

筋肉量を含めた体組成に影響を及ぼす栄養因子の検討として、ビタミンKと体組成との関連を動物モデル(ラット)で検討した。その結果、ビタミンKは骨量の増加効果とともに、体脂肪の減少をもたらすことが示唆された。また、血清の中性脂肪を低下させる効果も観察された。今回の検討結果から、筋肉量やそのパフォーマンスに影響を与える栄養因子としてビタミンKについても検討していくべきであることが示された。

A. 研究目的

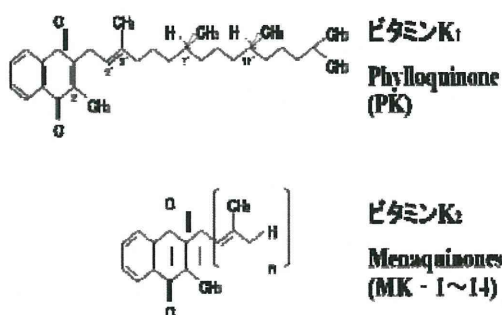
さまざまな要因が高齢者における低栄養をもたらすとともに、低栄養状態が、高齢者における機能障害の原因となる。低栄養状態は、「衰弱」のみならず、免疫力の低下、骨の脆弱性、そしてサルコペニアをもたらす。一方、サルコペニアの評価が低栄養状態の指標ともなるため、筋肉量の簡易的評価は栄養管理の現場でも活用されている。一方、筋肉量を規定する栄養因子に関する検討も積み重ねられ、蛋白質、とくにアミノ酸の重要性は確立されたもの考えられる。また、ビタミンの中ではビタミンDの不足状態が転倒のリスクを上昇されることや介入研究によって転倒頻度を低下させることなどから、筋肉量やその機能に影響を与えるものとして注目されている。一方、ビタミンKは、その発見の端緒となった正常な血液凝固システムにおける役割以外に骨代謝をはじめとするさまざまな生体機能に関わることが注目

されているが筋肉量を始めとする体組成に関する検討はまだほとんどできていない。近年、ビタミンK1やメナテロレノン以外のビタミンK2(図1)がメナテロレノンに転換されることや、核内受容体への結合を介する作用が明らかにされ、2部位の水酸化を経て核内受容体に作用するビタミンDとのアナロジーにおいて、「ホルモン」として認識すべき段階にきているとの考えかたもある。ただし、哺乳類においてはビタミンKの *de novo* 合成はなされ得ないという点でビタミンDとは異なる。このため、哺乳類におけるビタミンKは、食物由来のものを摂取されるか、腸管の細菌叢によって産生されたものを吸収することによってその需要が満たされている。ビタミンKが欠乏すると血液凝固障害による出血のために個体としての生命は維持できないことを考えると、ビタミンKは哺乳類において、まさに「ビタミン」であり、微生物との共生進化の点からも

興味深い対象である。

今回の研究ではサルコペニア研究におけるビタミンKの位置付けを明らかにすることを目的に動物モデル(ラット)におけるビタミンKの体組成に対する影響を検討した。なお、本研究は日本女子大学家政学部の五関正江博士らとの共同研究として行われたものである。

■ ビタミンKの構造



B. 方法

23 匹のラット (Sprague-Dawley 系、6 週令) を対照群、ビタミンK₁ (PK) 投与群、ビタミンK₂ (MK-4) 投与群の 3 群にわけた。PK 群にはビタミン K₁ を 600mg/kg、MK-4 群にビタミン K₂ (menatetrenone) を 600mg/kg の割合で含む食餌を与え、3 か月後に血液の生化学的パラメーター、骨密度、骨強度指標、体組成(とくに内臓脂肪と皮下脂肪)の測定を動物用CTに用いて行った。なお、動物実験にあたっては、倫理的規範に則って行われるべく十分な注意がはらわれた。

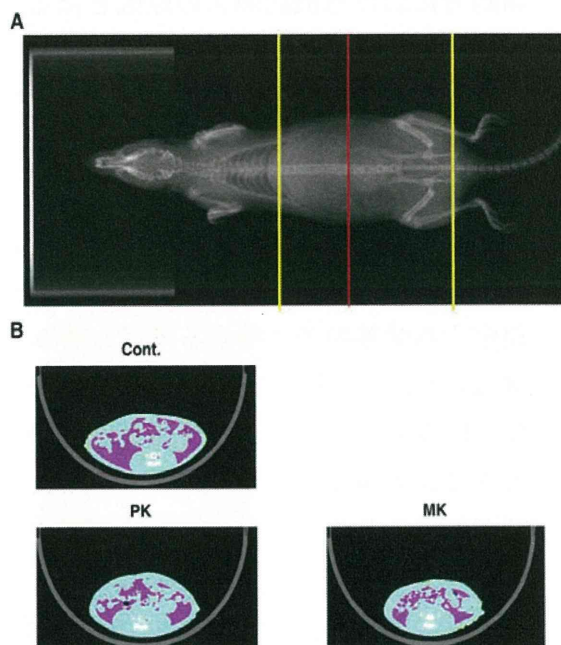
C. 研究結果

3 か月の実験期間終了後、PK 群においては大腿骨の骨密度は対照群に比較して有意に上昇していたが、MK-4 群では骨密

度の上昇は認められなかった。一方、骨強度指標である大腿骨の cross-sectional moment や polar moment は MK-4 群で有意な上昇が観察された。また、MK-4 群においては灰化カルシウム重量や皮質厚の上昇が認められた。

PK 群、MK-4 群ともに CT によって測定された総脂肪量が対照群に比して低下していた(それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$) (図 2)。また、血液の生化学パラメーターうち、中性脂肪値は、対照群に比して PK 群で 48%、MK-4 群で 29%低下していた。一方、血清カルシウム、リン、アルカリフォスファターゼ、insulin-like growth factor-1、骨代謝回転関連マーカーについては各群間で統計的有意差はなかった。

図 2 : 動物用CTによる脂肪量の測定



D. 考察

本研究によって、ビタミンKが体組成、とくに脂肪量に影響を与える可能性があることが示唆された。ラットにおける知見がヒトにどのように外挿できるかについては未知であるが、ヒトの体組成決定因子の一つとして検討していくべき栄養素として注目される。今回の実験系では筋肉量を測定することができなかったが、脂肪量と骨量の両方に影響が見られたことは、筋肉量への影響についても検討すべきであることが推察される。国内外の疫学調査によって、ビタミンK摂取量と大腿骨近位部骨折の頻度の間には負の相関が観察されている。一方、ヒトにおいてビタミンKと骨密度の間にはこの相関を説明するに足るものはないと考えられている。これらのことから、ビタミンKによる大腿骨近位部骨折の予防効果は骨密度以外の骨パラメーターつまり骨質関連パラメーターを介するものであることが考えられている。しかしながら、今回の研究結果はビタミンKが体組成の変容にも寄与する可能性を示しており、筋肉の量やパフォーマンスに影響し、抗虚弱作用を発揮していることも示唆している。

MK-4群において、灰化カルシウム重量や皮質厚の上昇が認められたにも関わらず、骨密度の有意な上昇が検出されなかったことは、今回の実験系における骨体積の増加をうかがわせる。近年ビタミンKは軟骨代謝にも影響を与えることが示唆されており、ビタミンKが成長板周辺の代謝亢進を介して骨の成長を促したことも想定される。

脂質代謝に及ぼすビタミンKの影響については、腸管をターゲットにしたメカニズムについても検討を進めている。

E. 結論

体組成を規定する栄養素として、ビタミンK群も注目されるべきであることが確かめられた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

出版物

1) 骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン
2011年版(ライフサイエンス出版、東京)
論文発表

2) Mayu Haraikawa, Natsuko Sogabe, Rieko Tanabe, Takayuki Hosoi, Masae Goseki-Sone. Vitamin K1 (Phylloquinone) or Vitamin K2 (Menaquinone-4) Induces Intestinal Alkaline Phosphatase Gene Expression. J Nutr Sci Vitamino 157: 274-279, 2011.

3) Natsuko Sogabe, Rieko Maruyama, Otto Baba, Takayuki Hosoi, Masae Goseki-Sone. Effects of long-term vitamin K1 (phylloquinone) or vitamin K2 (menaquinone-4) supplementation on body composition and serum parameters in rats. Bone 8: 1036-1042, 2011.

4) Yasuko Koudo, Tsuneko Ohouchi, Takayuki Hosoi, Toshiyuki Horiuchi. Association of CYP19 Gene Polymorphism With Vertebral Fractures in Japanese

Postmenopausal Women. Biochemical
Genetics. 2011.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

サルコペニアに関する危険因子の解明と簡便な診断法の確立

研究分担者 下方 浩史

国立長寿医療研究センター予防開発部長

研究要旨 生活習慣や既往歴など、サルコペニアのリスク要因について、無作為抽出された 40 歳以上の地域在住男性 1,783 名、女性 1,825 名での 10 年間の縦断的データを用いて、網羅的に検討を行った。DXA での筋肉量から診断されたサルコペニアでは運動不足、エネルギー摂取量の不足、たんぱく質・分岐鎖アミノ酸不足、低血圧、抑鬱、自覚的健康が良くないことが男女ともにリスクになっており、男性ではこれらに加えて喫煙と飲酒をしないことがリスクになっていた。身体機能からの診断されたサルコペニアでは、65 歳以上のみを対象としており、DXA での診断に比べてリスク要因ははっきりしなかったが、エネルギーの摂取不足が最も強いリスクであった。またたんぱく質・分岐鎖アミノ酸、ビタミン D の不足もリスクとなっていた。

A. 研究目的

老化に伴う筋量減少（サルコペニア）は、高齢者の ADL を低下させ、健康長寿を実現の大きな障害となる。しかし、老化に伴う筋量減少の実態は明らかでなく、またサルコペニア自体の簡便な基準がない。臨床の現場や住民調査などで使用できる簡便なサルコペニアの基準が必要である。さらにサルコペニアを予防するためには、その危険因子を明らかにしていく必要がある。これらの検討を 10 年以上にわたって継続されている一般住民のコホートのデータを使用して解明する。

B. 研究方法

1. 対象

「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究（NILS-LSA）」第 1 次調査から第 6 次調査までに参加した地域在住中高年者 3,608 名（男性 1,783 名、女性 1,825 名）を対象とした。平均年齢は、男性 57.8 ± 13.1 歳、女性 56.9 ± 12.8 歳で、延べ 14,010 回の測定を用いた。これらの参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の地域住民からの無作為抽出者である。

2. 測定項目

今回の検討に用いた測定項目は以下の通りである。

①身体計測値

- ・ BMI (kg/m²)
- ・ 下腿囲：下腿の最大囲 (cm)

②体力

- ・ 普通歩速度 (m/sec)
- ・ 握力 (kg) 利き手

③栄養素摂取量

・ 写真撮影を併用した秤量法による3日間の食事調査による エネルギー摂取量、たんぱく質、ビタミンD、筋肉合成関連アミノ酸 (イソロイシン、ロイシン、バリン、アルギニン) 摂取量

④心理検査

- ・ 抑鬱 (CES-D) カットオフ 15/16
- ・ 認知機能 (MMSE) カットオフ 23/24

⑤生活習慣調査

- ・ 飲酒習慣
- ・ 喫煙

⑥身体活動量

・ 歩数 (7日間測定)

・ 面接調査によるタイムスタディ及び運動習慣調査 (METS*min/y) による余暇身体活動量、総身体活動量

⑦サルコペニア指標

Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) (QDR 4500, Hologic)によって四肢除脂肪・除骨重量測定し、これを四肢筋量とした。Baumgartner ら (1998)の方法に準じ、四肢筋量 (kg) を身長 (m) の二乗で除した値を Skeletal Muscle Index (SMI)とし、サルコペニアの指標とした。その判定基準には同じ QDR 4500, Hologic で測定した Sanada ら

(2010) による YAM (Young Adult Mean: 18~40歳) の-2SD: 男性 6.87 kg/m²、女性 5.46kg/m² をサルコペニアの有無の判定基準とした。

また、昨年度の研究成果に基づいて、65歳以上の男女で、普通歩速度 1m/s未満、もしくは握力が男性 25kg未満、女性 20kg未満の脆弱高齢者で、BMI 18.5未満もしくは下腿囲 30cm未満をサルコペニアとした場合の検討も行った。

3. 解析方法

10年間の縦断的なデータ男女別に年齢調整して、飲酒、喫煙、既往歴、身体活動量、血圧、認知機能、抑鬱、栄養素摂取量とサルコペニア発症リスクを、一般化推定方程式 (GEE) を用いて推定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、国立長寿医療研究センターにおける倫理委員会での研究実施の承認を受けた上で実施し、調査の対象者全員からインフォームドコンセントを得ている。

C. 研究結果

①DXAによるサルコペニア

DXAでの筋肉量から診断されたサルコペニアでは、男性で飲酒をしないこと、喫煙がリスクとなっていた。既往歴では高血圧症のみが有意であった。自覚的健康度は良くないとオッズ比は1.2倍に高くなっており、健康との関連が示唆された。身体活動量は総身体活動量のみが関連していた。その他、エネルギー摂取量、血圧、抑鬱もサルコペニアのリスクにな

っていた（表1上）。女性では喫煙、飲酒との関連はなく、また既往歴との関連もなかった。自覚的健康度は男性と同様に良くないことがサルコペニアのリスクを上げていた。身体活動量は余暇身体活動量、総身体活動量がともにサルコペニア関連し、エネルギー摂取量、血圧高値もサルコペニアのリスクになっていた。抑鬱や認知機能との関連は認められなかった（表1下）。

栄養素との関連では男女ともにビタミンDとサルコペニアとの関連は認めなかったが、たんぱく質摂取量、イソロイシン、ロイシン、バリン、アルギニンの筋肉合成関連アミノ酸摂取量が多いほど、サルコペニアのリスクは下がっていた（表2）。

②身体機能、体格によるサルコペニア

全体として、身体機能、体格と各種の危険因子との関連は、DXAによるサルコペニアと危険因子との関連よりは弱かった。

男性では飲酒との関連は見られず、喫煙との関連が認められ、オッズ比は3.78（95%信頼区間1.765-8.094）であった。既往歴との関連はなく、また自覚的健康度との関連も認められなかった。身体活動量では余暇身体活動および歩数との関連が認められた。エネルギー摂取量、血圧との関連はあったが、抑鬱、認知機能との関連は認められなかった（表3上）。女性ではほとんどの項目でサルコペニアとの関連は検出されず、高血圧症既往、エネルギー摂取量のみがサルコペニアと関連していた（表3下）。一方、栄養素摂取量との関連は強く、男女ともにたんぱ

く質摂取量、イソロイシン、ロイシン、バリン、アルギニン摂取量が多いほど、サルコペニアのリスクは下がっていた。ビタミンDとサルコペニアとの関連は認められなかった（表4）。

D. 考察

ヨーロッパにおける老年学、栄養学などの学会によるワーキンググループである The European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) は2010年にサルコペニアの定義と診断についてのヨーロッパ・コンセンサスとして報告している。EWGSOPではサルコペニアを、加齢以外に明らかな誘因がない原発性サルコペニア（primary sarcopenia）と、加齢以外の何らかの要因がサルコペニアを引き起こす二次性サルコペニア（secondary sarcopenia）に分類し、さらに二次性サルコペニアを、ベッド上安静、運動しない生活スタイル、廃用、無重力身体などが原因となる活動性サルコペニア（activity-related sarcopenia）、高度な臓器障害、炎症性疾患、悪性腫瘍に伴う悪液質、内分泌疾患などによる疾患性サルコペニア（disease-related sarcopenia）、吸収不良、胃腸疾患、食思不振を引き起こす薬剤の使用に伴うエネルギーおよび蛋白質摂取不足などによる栄養性サルコペニア（nutrition-related sarcopenia）の3つに分けている。

これまでに報告されているサルコペニアの危険因子には遺伝的素因、性別、加齢、身長、体重、BMI、閉経、エストロゲン、テストステロン、総体脂肪量、身

体活動、カロテノイド、ビタミンD、分岐鎖アミノ酸および蛋白摂取量などがある。遺伝的な素因としては、myostatin の Lys153Arg 多型、alpha-actinin 3 の R577X 多型が筋量や筋力に関連しているとの報告がある。しかし、スポーツ選手では、こうした遺伝子多型の影響があっても、一般の高齢者では、むしろ生活習慣などの影響の方が大きいと思われる。廃用性症候群による筋萎縮は、高齢者のサルコペニアの最大の要因であろう。運動不足による筋量や筋力の低下はどの年代にも起きうる。しかし高齢者では筋の再生・増殖機能が低下しており、いったん減少した筋量は回復が難しい。筋量が低下し筋力が低下すれば、運動が困難になり、さらに筋量が低下するという悪循環に陥りやすい。

血中の 25-OH ビタミン D レベルは経口摂取あるいは皮膚で産生されたビタミン D の量を反映する指標である。25-OH ビタミン D は老化とともに低下することが知られている。ビタミン D はカルシウム代謝に関連するビタミンであり、摂取量の不足は骨粗鬆症などの骨疾患の要因となる。このビタミン D が、筋肉とも関連することが明らかになってきた。

ビタミン D 受容体は筋肉中に存在し、ビタミン D が低下することが筋の同化作用が下がってしまう。またビタミン D 受容体の遺伝子多型が高齢者のサルコペニアの要因のひとつであることも報告されている。ビタミン D の低下が高齢者の転倒や身体機能障害の要因であるとの報告がある。

アムステルダム縦断加齢研究

(Longitudinal Aging Study Amsterdam)での3年間の追跡研究ではベースラインの 25-OH ビタミン D が低値の場合には、高値の場合に比べて3年後にサルコペニアとなるオッズ比は 2.57 (95%信頼区間 1.40-4.70)であった。このような結果からビタミン D の摂取の不足が、高齢者のサルコペニアを引き起こす可能性があると思われる。

NILS-LSAでの検討ではビタミン D 摂取量とサルコペニアとの関連は認められなかったが、血中の 25-OH ビタミン D 濃度を含めてさらに検討を進める必要がある。

筋肉はたんぱく質からなっており、たんぱく質摂取量、アミノ酸摂取量が低下すれば、筋量は当然低下する。1食あたりのたんぱく質量が 20~25g である時が筋たんぱく質の合成が最も高いとされている。食事摂取基準では、健康な 70 歳以上者に必要なたんぱく質量は 1.06 g/体重 kg であり、男性 60g、女性 50g 以上が必要とされている。しかし一般的な高齢者の食事では、このたんぱく質摂取量を維持することが難しい場合が多い。

体内で合成できない必須アミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、バリンは炭素骨格が分岐した構造をもつことから分岐鎖アミノ酸と呼ばれる。これらの分岐鎖アミノ酸は筋肉をつくる主なたんぱく質であるアクチンとミオシンの主成分である。十分な分岐鎖アミノ酸を摂取することで筋肉の消耗を防ぐことができる可能性がある。分岐鎖アミノ酸は肉類、乳製品、レバーなどに多く含まれるが、高齢者ではこうした食品は敬遠されること

が多いことも、高齢者のサルコペニアの要因となっている可能性がある。NILS-LSAでの検討でもロイシン、イソロイシン、バリンの分岐鎖アミノ酸はサルコペニアのリスクを下げる作用が認められ、特に高齢者での摂取が勧められよう。

E. 結論

DXAでの筋肉量から診断されたサルコペニアでは運動不足、エネルギー摂取量の不足、たんぱく質・分岐鎖アミノ酸不足、低血圧、抑鬱、自覚的健康が良くないことが男女ともにリスクになっており、男性ではこれらに加えて喫煙と飲酒をしないことがリスクになっていた。

身体機能からの診断されたサルコペニアでは、65歳以上のみを対象としており、DXAでの診断に比べてリスク要因ははっきりしなかったが、エネルギーの摂取不足が最も強いリスクであった。またたんぱく質・分岐鎖アミノ酸、ビタミンDの不足もリスクとなっていた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書参照

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 原田敦、松井康素、下方浩史：認知症高齢者と骨粗鬆症との関連は。認知症高齢者の転倒予防とリスクマネジメント。武藤芳照、鈴木みずえ（編集）。日本医事新報社、東京 pp51-54, 2011.

2) 下方浩史、安藤富士子：サルコペニアのスクリーニング指標、サルコペニアの基礎と臨床。鈴木隆雄（監修）、島田裕之（編集）真興交易、東京。pp72-80, 2011.

3) 下方浩史、安藤富士子：サルコペニアの疫学。Modern Physician 31(11): 1283-1287, 2011.

4) 下方浩史、安藤富士子：日常生活機能と骨格筋量、筋力との関連。サルコペニア—研究の現状と未来への展望。日老会誌（印刷中）2012.

5) 下方浩史：高齢者の疾病—疫学、臨床的特徴。日本医事新報 4544: 42-45, 2011.

6) 下方浩史、安藤富士子：虚弱の危険因子、高齢者の虚弱—評価と対策—。Geriatric Medicine 49(3): 303-306, 2011.

7) 下方浩史、安藤富士子：運動器疾患の長期縦断疫学研究。ロコモティブシンドローム—運動器科学の新時代。医学のあゆみ 235(5): 319-324, 2011.

8) Kuzuya M, Enoki H, Hasegawa J, Izawa S, Hirakawa Y, Shimokata H, Iguchi A: Impact of caregiver burden on adverse health outcomes in community-dwelling dependent older care recipients. Am J Geriat Psych 19(4): 382-391, 2011.

9) Doyo W, Kozakai R, Kim H-Y, Ando F, Shimokata H: Spatio-temporal

components of the three-dimensional gait analysis of community-dwelling middle-aged and elderly Japanese: age- and sex-related differences. *Geriatr Gerontol Int* 11(1): 39-49, 2011.

10) Sugiura K, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Ando F, Shimokata H, Yano M: Dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake associated with bone mineral density: Findings from post-menopausal Japanese female subjects. *Osteoporosis Int* 22: 143-152, 2011.

11) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年齢者の膝関節変形と膝伸展筋力との関連。 *Osteoporosis Japan* (in press).

2. 学会発表

1) 土井剛彦、島田裕之、牧迫飛雄馬、吉田大輔、伊藤健吾、加藤隆司、下方浩史、鷺見幸彦、遠藤英俊、鈴木隆雄：高齢者における歩行指標は脳萎縮と関係するの
か？—MRIと3軸加速度計を用いた検討—第46回日本理学療法学会、2011年5月27日、宮崎。

2) 吉田大輔、島田裕之、牧迫飛雄馬、土井剛彦、伊藤健吾、加藤隆司、下方浩史、鷺見幸彦、遠藤英俊、鈴木隆雄：地域高齢者における内側側頭葉の脳萎縮と日常生活活動との関係。第46回日本理学療法学会、2011年5月27日、宮崎。

3) 下方浩史、安藤富士子：日常生活機能

と骨格筋量、筋力との関連。若手企画シンポジウム2「サルコペニア—研究の現状と未来への展望」。第53回日本老年医学会学術集会。2011年6月16日、東京。

4) 竹村真里枝、松井康素、原田敦、安藤富士子、下方浩史：地域在住中高年齢者の骨粗鬆症有病率と実際の治療率の検討。第53回日本老年医学会学術集会。2011年6月16日、東京。

5) 松井康素、竹村真里枝、原田敦、安藤富士子、下方浩史：握力による骨量減少および骨粗鬆症の発症の予測—地域在住中高年齢者を対象とした疫学縦断研究。第53回日本老年医学会学術集会。2011年6月16日、東京。

6) 洪英在、岡村菊夫、高橋龍太郎、下方浩史、児玉寛子、遠藤英俊、井藤英喜：高齢者医療における優先度調査—Web調査における一般、医師、看護師の相違。第53回日本老年医学会学術集会。2011年6月16日、東京。

7) Kozakai R, Ando F, Kim HY, Lee SC, Nishita Y, Tange C, Shimokata H: The effect of depression on the participation in the exercise habits in community-dwelling Japanese older people. The 16th Annual Congress of the European College of Sports Science, 9th, Jul, Liverpool.

8) 安藤富士子、下方浩史：血清カロテノイドが骨密度に与える影響—酸化要因・

抗酸化要因に着目した大規模縦断研究～
果樹試験研究推進協議会委託試験研究課
題成果発表会. 2011年7月7日、東京.

9) Ando F, Takemura M, Matsui Y,
Shimokata H: Prevalence and
Consultation Rates of Life-Style
Related Diseases in Japanese
Middle-Aged and Elderly Women. IEA
World Congress of Epidemiology, 7-11,
Aug, 2011. Edinburgh.

10) Doi T, Shimada H, Makizako H,
Yoshida D, Shimokata H, Ito K,
Washimi Y, Endo H, Suzuki T: Whole
Brain Atrophy and Spatiotemporal
Gait Parameters during Dual-task
Gait. Alzheimer's Association
International Conference, Paris, July
19, 2011.

11) Yoshida D, Shimada H, Makizako H,
Doi T, Ito K, Kato T, Shimokata H,
Washimi Y, Endo H, Suzuki T: The
relationship between atrophy of the
medial temporal area and daily
activities in community-dwelling older
adults. Alzheimer's Association
International Conference, Paris, July
19, 2011.

12) Shimokata H: Longitudinal study.
Japan International Cooperation
Agency (JICA) lecture, Obu, Sep 1,
2011.

13) Ando F, Kato Y, Otsuka R, Imai T,
Matsui Y, Takemura M, Shimokata H:
The effects of serum carotenoids on
bone mineral density in community
-dwelling Japanese middle-aged and
elderly women. The 9th Asia / Oceania
Congress of Geriatrics and Gerontology,
Melbourne, October 26, 2011.

14) 金興烈、李成喆、幸篤武、森あさか、
安藤富士子、下方浩史：中高齢者の相対
歩幅と歩行速度（無次元速度）に関する
研究. 日本未病システム学会

15) 安藤富士子、今井具子、加藤友紀、
大塚礼、松井康素、竹村真里枝、下方浩
史：血清カロテノイドと2年後の骨粗鬆
症／骨量減少発症リスク. 日本未病シス
テム学会

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定
を含む）

1. 特許取得

特願 2011-241907・百合野以子、佐藤
恵一、笠井康弘、下方浩史、安藤富士子・
骨粗鬆症リスク判定システム及びプログ
ラム・株式会社日立ソリューションズ・平
成 23 年 11 月 4 日.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1. サルコペニアのリスク

10年間の縦断データによる一般化推定方程式での年齢調整済みリスク推定
DXAによるSMIでの診断基準による(YAMの-2SD)

男性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
飲酒	少し飲む vs 飲まない	0.813	(0.716 – 0.923)	0.0014
飲酒	多く飲む vs 飲まない	0.763	(0.657 – 0.887)	0.0004
喫煙	吸う vs 吸わない	1.352	(1.172 – 1.559)	<0.0001
高血圧症	なし vs あり	0.856	(0.742 – 0.988)	0.0334
心疾患	なし vs あり	0.915	(0.709 – 1.182)	NS
脂質異常症	なし vs あり	0.918	(0.773 – 1.091)	NS
糖尿病	なし vs あり	1.174	(1.174 – 1.430)	NS
脳卒中	なし vs あり	0.937	(0.704 – 1.246)	NS
自覚的健康	普通・悪い vs 良い	1.205	(1.100 – 1.320)	<0.0001
余暇身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.936	(0.859 – 1.019)	NS
総身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.94	(0.886 – 0.998)	0.0437
歩数	1000歩ごと	0.988	(0.972 – 1.004)	NS
エネルギー摂取量	100kcalごと	0.966	(0.955 – 0.978)	<0.0001
収縮期血圧	10mmHgごと	0.905	(0.878 – 0.932)	<0.0001
拡張期血圧	10mmHgごと	0.828	(0.789 – 0.869)	<0.0001
抑鬱	CES-D 15以下 vs 16以上	1.218	(1.080 – 1.374)	0.0013
認知機能	MMSE 23以下 vs 24以上	0.808	(0.652 – 1.001)	NS

女性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
飲酒	少し飲む vs 飲まない	0.843	(0.703 – 1.011)	NS
飲酒	多く飲む vs 飲まない	0.807	(0.485 – 1.343)	NS
喫煙	吸う vs 吸わない	1.062	(0.788 – 1.433)	NS
高血圧症	なし vs あり	0.91	(0.789 – 1.049)	NS
心疾患	なし vs あり	1.168	(0.867 – 1.572)	NS
脂質異常症	なし vs あり	1.035	(0.895 – 1.196)	NS
糖尿病	なし vs あり	0.755	(0.570 – 1.001)	NS
脳卒中	なし vs あり	0.917	(0.610 – 1.380)	NS
自覚的健康	普通・悪い vs 良い	1.16	(1.040 – 1.294)	0.0078
余暇身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.814	(0.698 – 0.949)	0.0084
総身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.84	(0.766 – 0.922)	0.0003
歩数	1000歩ごと	0.981	(0.961 – 1.001)	NS
エネルギー摂取量	100kcalごと	0.955	(0.940 – 0.971)	<0.0001
収縮期血圧	10mmHgごと	0.9	(0.872 – 0.929)	<0.0001
拡張期血圧	10mmHgごと	0.845	(0.801 – 0.891)	<0.0001
抑鬱	CES-D 15以下 vs 16以上	1.108	(0.968 – 1.267)	NS
認知機能	MMSE 23以下 vs 24以上	1.012	(0.729 – 1.405)	NS

表 2. サルコペニアのリスク

10年間の縦断データによる一般化推定方程式での年齢調整済みリスク推定
DXAによるSMIでの診断基準による(YAMの-2SD)

男性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
たんぱく質	10g/日ごと	0.941	(0.916 — 0.968)	<0.0001
ビタミンD	5 μ g/日ごと	0.994	(0.965 — 1.023)	NS
イソロイシン	1g/日ごと	0.892	(0.840 — 0.948)	<0.0001
ロイシン	1g/日ごと	0.932	(0.899 — 0.966)	<0.0001
バリン	1g/日ごと	0.902	(0.855 — 0.950)	0.0001
アルギニン	1g/日ごと	0.931	(0.891 — 0.973)	<0.0001

女性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
たんぱく質	10g/日ごと	0.919	(0.888 — 0.951)	<0.0001
ビタミンD	5 μ g/日ごと	0.967	(0.933 — 1.003)	NS
イソロイシン	1g/日ごと	0.832	(0.773 — 0.897)	<0.0001
ロイシン	1g/日ごと	0.896	(0.858 — 0.936)	<0.0001
バリン	1g/日ごと	0.851	(0.798 — 0.907)	<0.0001
アルギニン	1g/日ごと	0.875	(0.827 — 0.926)	<0.0001

表3. サルコペニアのリスク

10年間の縦断データによる一般化推定方程式での年齢調整済みリスク推定
身体機能での診断基準による

65歳以上男性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
飲酒	少し飲む vs 飲まない	0.345	(0.108 – 1.105)	NS
飲酒	多く飲む vs 飲まない	0.947	(0.324 – 2.769)	NS
喫煙	吸う vs 吸わない	3.78	(1.765 – 8.094)	<0.0001
高血圧症	なし vs あり	0.55	(0.266 – 1.137)	NS
心疾患	なし vs あり	1.529	(0.615 – 3.805)	NS
脂質異常症	なし vs あり	0.664	(0.170 – 2.603)	NS
糖尿病	なし vs あり	1.888	(0.711 – 5.010)	NS
脳卒中	なし vs あり	0.961	(0.288 – 3.205)	NS
自覚的健康	普通・悪い vs 良い	2.594	(0.879 – 7.655)	NS
余暇身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.272	(0.095 – 0.778)	0.0152
総身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.729	(0.298 – 1.780)	NS
歩数	1000歩ごと	0.747	(0.632 – 0.884)	0.0007
エネルギー摂取量	100kcalごと	0.803	(0.736 – 0.876)	<0.0001
収縮期血圧	10mmHgごと	0.802	(0.658 – 0.978)	0.0294
拡張期血圧	10mmHgごと	0.729	(0.527 – 1.009)	<0.0001
抑鬱	CES-D 15以下 vs 16以上	1.241	(0.502 – 3.070)	NS
認知機能	MMSE 23以下 vs 24以上	0.76	(0.316 – 1.827)	NS

65歳以上女性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
飲酒	少し飲む vs 飲まない	0.978	(0.613 – 1.560)	NS
飲酒	多く飲む vs 飲まない	2.923	(0.386 – 22.161)	NS
喫煙	吸う vs 吸わない	1.648	(0.739 – 3.675)	NS
高血圧症	なし vs あり	0.51	(0.374 – 0.697)	<0.0001
心疾患	なし vs あり	1.191	(0.792 – 1.790)	NS
脂質異常症	なし vs あり	0.745	(0.520 – 1.069)	NS
糖尿病	なし vs あり	0.502	(0.245 – 1.029)	NS
脳卒中	なし vs あり	0.95	(0.308 – 2.930)	NS
自覚的健康	普通・悪い vs 良い	1.078	(0.745 – 1.560)	NS
余暇身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.995	(0.747 – 1.325)	NS
総身体活動量	100,000METS*min/yごと	0.862	(0.637 – 1.167)	NS
歩数	1000歩ごと	1.048	(0.996 – 1.104)	NS
エネルギー摂取量	100kcalごと	0.885	(0.839 – 0.934)	<0.0001
収縮期血圧	10mmHgごと	0.94	(0.865 – 1.022)	NS
拡張期血圧	10mmHgごと	0.936	(0.811 – 1.081)	NS
抑鬱	CES-D 15以下 vs 16以上	1.22	(0.895 – 1.663)	NS
認知機能	MMSE 23以下 vs 24以上	0.73	(0.453 – 0.453)	NS

表4. サルコペニアのリスク

10年間の縦断データによる一般化推定方程式での年齢調整済みリスク推定
身体機能での診断基準による

65歳以上男性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
たんぱく質	10g/日ごと	0.629	(0.629 – 0.827)	0.0009
ビタミンD	5 μ g/日ごと	0.896	(0.671 – 1.197)	NS
イソロイシン	1g/日ごと	0.381	(0.209 – 0.696)	0.0017
ロイシン	1g/日ごと	0.569	(0.401 – 0.807)	0.0016
バリン	1g/日ごと	0.431	(0.258 – 0.720)	0.0013
アルギニン	1g/日ごと	0.448	(0.285 – 0.705)	0.0005

65歳以上女性

		オッズ比	95%信頼区間	p値
たんぱく質	10g/日ごと	0.771	(0.687 – 0.866)	<0.0001
ビタミンD	5 μ g/日ごと	0.849	(0.762 – 0.946)	0.003
イソロイシン	1g/日ごと	0.612	(0.483 – 0.775)	<0.0001
ロイシン	1g/日ごと	0.752	(0.655 – 0.864)	<0.0001
バリン	1g/日ごと	0.655	(0.533 – 0.805)	<0.0001
アルギニン	1g/日ごと	0.696	(0.578 – 0.838)	0.0001

研究分担者 橋本 有弘

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所 再生再建医学研究部長

研究要旨 加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を解明するために、高齢者由来筋幹細胞を不死化し、詳細な分子細胞生物学的解析に堪える実験系を樹立した。橋本らによって開発されたヒト筋幹細胞の不死化技術、three factor method を適用することによって、75 歳男性、82 歳女性および 86 歳女性の腹直筋から分離した筋幹細胞を不死化することに成功した。さらに、成長因子要求性を解析した結果、後期高齢者由来不死化筋細胞のなかに筋ジストロフィー由来筋細胞と類似した応答性を示す細胞が存在することが明らかになった。

A. 研究目的

加齢にともなう筋再生能力の低下は、サルコペニアの発症と密接に関わっていると考えられる。筋再生には、骨格筋幹細胞（筋サテライト細胞）の働きが必須であるが、後期高齢者の筋幹細胞の性質については、解明が進んでいない。本分担研究では、後期高齢者骨格筋から分離した筋幹細胞の性質を、分子・細胞生物学的および病理学的に解析し、サルコペニアにおける筋幹細胞の役割を明らかにする。さらに、研究成果をもとに「骨格筋幹細胞を標的としたサルコペニアに対する新たな予防法ならびに重度化防止法」を提案する。

B. 研究方法

① ヒト筋幹細胞の分離と初代培養

国立長寿医療センターにおいて泌尿器科疾患のため開腹手術を受けられる方で、本人からの同意が可能な方を対象とした。なお、梅毒や肝炎などの感染症に罹患している方および主治医が不適当と認めた方は対象から除外した。同意が得られた方について、全身麻酔下での開腹手術時に、切開部

の腹直筋あるいは錐体筋を1 g程度摘出した。

筋組織は細切後、15 分間のタンパク質分解酵素処理を 2 回行い、筋幹細胞を分離した。骨格筋 30 -40mg に由来する細胞を、I 型コラーゲンを塗布したプラスチック培養皿に播き、37℃、10%CO₂の気相下で静置培養した。培養液は、Primary myocyte growth medium (pmGM) (Wada et al., 2002) を用いた。筋分化を誘導する場合は、1x10⁵細胞を 35-mm 培養皿に播き、2 日後に培地を Primary myocyte differentiation medium (pmDM) に交換し、4-6 日間培養した。

② 初代培養ヒト筋細胞の不死化

独自に開発した不死化法を用いて、後期高齢者由来不死化筋細胞を樹立した。初代培養ヒト筋細胞に、ヒトテロメラーゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺伝子およびヒト cyclin D1 遺伝子を導入・発現させることによって、ヒト筋細胞を、分化能を保持したまま不死化した (Shiomi et al., 2011)。

③ 不死化ヒト筋細胞の純化およびクローン化

不死化後の細胞集団に含まれる筋細胞の割合を、抗ヒト NCAM 抗体を用いたフローサイトメトリーによって検討した。筋細胞を分画する場合は、抗ヒト NCAM 抗体を用いたフローサイトメトリーによって NCAM 陽性細胞を分離した。細胞クロニングは、低密度培養後に形成されたコロニーを分離することによって行った。

(倫理面への配慮)

ヒト骨格筋組織の採取に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を受けた。臨床研究に関する倫理指針に則り、患者に対しては、文書を用いて説明し、患者本人より文書にて同意を得た。

C. 結果

① 後期高齢者筋組織に含まれる筋幹細胞のコロニー解析

82 歳女性の腹直筋から分離した初代培養細胞の筋分化能を検討した。腹直筋 8-10 mg から分離した細胞を、低密度で培養した。コロニー形成を確認した後、分化培地中で 6 日間培養し、筋分化を誘導した。分化マーカー myosin heavy chain に対する抗体で染色し、筋細胞のコロニーを同定したところ、形成率は 1.3 コロニー/mg muscle であった。これは、63 歳男性の筋形成率 2.88 コロニー/mg の半分以下であった。

また、82 歳女性の腹直筋由来初代培養では、分化特異的な myosin heavy chain 遺伝子の発現は確認されたもの、分化率は非常に低く、筋細胞の割合は 1%程度であると推定された。

② 後期高齢者不死化筋細胞の分離・純化

初代培養ヒト筋細胞は、継代に伴い速やかに増殖能、分化能を失ってしまうため、詳細かつ再現性の担保された解析を行うこ

とは困難である。我々は、独自に開発した不死化法を用いて、82 歳女性の腹直筋から分離した初代培養筋細胞を不死化した。しかし、初代培養中の筋細胞の割合が非常に低かったため、不死化前に筋細胞の含有率を高めることを試みた。磁気ビーズ標識抗体を用いて NCAM 陽性筋細胞の分離を行ったところ、筋細胞の含有率は、約 1%程度から 30-40%程度にまで上昇した。この細胞集団にレンチウイルスベクターを用いて 3 遺伝子を導入し、不死化した。不死化後の培養に含まれる後期高齢者由来不死化筋細胞の割合は、フローサイトメトリー法の結果、46%であった。そこで、さらにフローサイトメータを用いて NCAM 陽性細胞を分離した。その結果、不死化筋細胞をほぼ純化することに成功した。

③ 後期高齢者不死化筋細胞の増殖特性

75 歳男性および 82 歳女性の腹直筋から樹立した不死化筋細胞を用いて、後期高齢者不死化筋細胞の増殖特性を検討した。その結果、後期高齢者不死化筋細胞のなかに、basic FGF に対する高い応答性およびステロイドホルモンに対する低応答を示す細胞が含まれることが明らかになった。我々は、類似した性質を持つ細胞が、ディシェンヌ型筋ジストロフィー由来筋細胞中に含まれていることを見つけている。

(倫理面への配慮)

ヒト材料を用いた実験に関しては、国立長寿医療研究センターの倫理委員会の承認を得、規定にしたがって実施した。

D. 考察

82 歳女性の腹直筋から筋幹細胞を分離し、初代培養した。さらにこの初代培養筋細胞を、筋分化能を保ったまま不死化し、複数の筋細胞クローンを樹立した。ヒト初代培養筋細胞の増殖には制限があるため、

ヒト未分化筋細胞（筋幹細胞、筋前駆細胞）の性質に関しては、解明が進んでいない。我々は、世界にさきがけて、分化能を保持したまま、正常ヒト筋前駆細胞を不死化することに成功した。今回、加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を検討するために、後期高齢者筋組織から分離した筋細胞を不死化し、解析した。増殖特性を解析した結果、ステロイドホルモンに対する応答性が低いという、筋ジストロフィー筋細胞と似た性質を示すことが明らかになった。我々は、これまでに後期高齢者由来の3例を含め、20歳代から80歳代の筋組織に由来する不死化筋細胞を樹立している。これらの比較解析から、筋幹細胞の加齢変化を検討し、サルコペニア発症との関連性を明らかにしたい。また、不死化ヒト筋細胞については、さらに整備を進めて、ヒト筋幹細胞の加齢にともなう変化を解析するうえで有用な「不死化正常ヒト筋細胞パネル」を構築する予定である。

E. 結論

高い増殖・分化能を保持した不死化筋細胞クローンを、後期高齢者筋組織から分離・樹立し、増殖特性を解析した。後期高齢者筋組織に由来する筋幹細胞の増殖・分化特性を解明するための、有力な解析系が確立できた。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照

G. 研究発表

1. 論文発表（詳細は分担研究報告を参照）

Shiomi K, Kiyono T, Okamura K, Uezumi M, Goto Y, Yasumoto S, Shimizu S. and **Hashimoto N**, Cdk4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation

potential. *Gene Therapy*, 18: 857-866, 2011.

2. 学会発表

向敦史、橋本有弘

第34回日本分子生物学会年会 2011年12月 横浜

他4題

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

液性因子とサルコペニア

研究分担者 江頭正人 東京大学 特任准教授

研究要旨

加齢に伴う骨格筋量の減少が、メタボリックシンドロームのリスク数、インスリン抵抗性にどのような影響を及ぼしているのかについて検討した。対象は、65歳以上でADLの自立した高齢女性90例（平均75歳）。DEXA法により四肢骨格筋量ならびにskeletal muscle mass index (SMI) を求め、ウエスト周囲径を除くメタボリックシンドロームのリスク数との関連について検討を行った。腹部CTもちいて内臓脂肪面積 (VFA) の測定もおこなった。単相関にて、SMIは年齢と負、BMI・VFAと正の有意な相関が認められた。リスク数を目的変数とした重回帰分析では、BMI調整後、VFAは有意な正の相関、骨格筋量とは有意な負の相関がそれぞれ独立して認められた。高齢女性における骨格筋量減少は、内臓脂肪とは独立してリスク数を増加と関連していた。高齢者のメタボリックシンドロームの発症および進展には、骨格筋量の減少が関係していることが示唆された。

A. 研究目的

加齢にともない体組成は変化することが知られており、骨格筋量は減少し、内臓脂肪量は増加する。一方、メタボリックシンドロームの有病率は加齢に伴って、上昇することが知られており、加齢にともなう内臓脂肪量の増加が関連していると考えられているが、骨格筋量減少との関連は明らかではない。そこで、高齢者における骨格筋量が、内臓脂肪量とは独立して、メタボリックシンドロームのリスク数と負に相関している可能性があると考え、横断研究を行った。

B. 研究方法

対象は、健診で都内診療所を受診したADLに障害のない高齢女性90例。悪性腫瘍治療中、消化管手術の既往、内分泌疾患の治療中、心不全・腎不全、糖尿病治療薬、 β 遮断薬、 β 刺激薬、 α 遮断薬内服中、のものを除外した。平均年齢は、75±6歳で

あった。

四肢骨格筋量としては、DEXA法により四肢の骨格筋量を求め、さらに身長 (m) の2乗で除したskeletal muscle mass index (SMI) を用いた。内臓脂肪量の評価は、臍レベルの腹部CTから内臓脂肪面積 (VFA) を測定した。メタボリックシンドロームのリスクの評価としては、IDFの基準を用い、腹囲以外のリスク数 (0-4個) を求めた。

文中のデータは平均値±SDで表した。2変量の相関関係にはPearson's correlation coefficientを用いた。多変量解析には重回帰分析を用いて解析を行い、P 値<0.05を有意差の基準とした。

(倫理面への配慮)

本試験は、施設の倫理委員会で承認済みであり、参加については本人から書面による同意を得て行なわれた。