

Table 4 The odds ratios (and 95% confidence intervals) of tertiles of antioxidant intakes on low bone mineral density in post-menopausal Japanese female subjects

Dietary intake	Number	Range (mg/d) or ($\mu\text{g}/\text{d}$)	Model 1			Model 2			Model 3			
			OR	95% CI	<i>P</i> for trend	OR	95% CI	<i>P</i> for trend	OR	95% CI	<i>P</i> for trend	
Retinol ^a	Lowest (Q1)	97	(29–213)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	98	(218–383)	1.30	(0.61–2.75)		1.65	(0.74–3.69)		1.28	(0.56–2.94)	
	Highest (Q3)	98	(386–3531)	2.37	(1.16–4.85)	0.014	3.22	(1.38–7.51)	0.007	2.52	(1.03–6.14)	0.031
Vitamin C	Lowest (Q1)	96	(47–139)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	99	(140–214)	1.15	(0.55–2.40)		1.02	(0.47–2.22)		1.03	(0.45–2.36)	
	Highest (Q3)	98	(215–625)	0.35	(0.15–0.80)	0.004	0.25	(0.10–0.66)	0.001	0.25	(0.07–0.82)	0.010
Vitamin E	Lowest (Q1)	101	(3.2–7.2)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	97	(7.3–9.1)	0.61	(0.29–1.27)		0.56	(0.25–1.25)		0.49	(0.21–1.14)	
	Highest (Q3)	95	(9.2–30.9)	0.61	(0.29–1.27)	0.244	0.45	(0.16–1.31)	0.176	0.43	(0.14–1.36)	0.193
Lycopene	Lowest (Q1)	121	(0.00–0.06)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	76	(0.15–0.15)	1.02	(0.48–2.15)		1.10	(0.51–2.35)		1.06	(0.48–2.34)	
	Highest (Q3)	96	(0.36–1.78)	1.55	(0.79–3.04)	0.177	1.72	(0.85–3.47)	0.117	1.60	(0.75–3.38)	0.201
α -Carotene	Lowest (Q1)	95	(0.03–0.23)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	97	(0.24–0.37)	0.73	(0.36–1.48)		0.79	(0.38–1.66)		0.90	(0.42–1.95)	
	Highest (Q3)	101	(0.38–1.27)	0.77	(0.38–1.57)	0.522	0.78	(0.36–1.67)	0.551	1.05	(0.45–2.45)	0.882
β -Carotene	Lowest (Q1)	97	(0.34–1.52)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	99	(1.53–2.36)	0.61	(0.29–1.27)		0.63	(0.29–1.35)		0.74	(0.32–1.70)	
	Highest (Q3)	97	(2.37–8.19)	0.75	(0.37–1.53)	0.586	0.69	(0.31–1.55)	0.487	0.93	(0.33–2.62)	0.981
Lutein	Lowest (Q1)	98	(0.49–1.68)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	97	(1.70–2.58)	1.56	(0.74–3.28)		1.84	(0.83–4.06)		2.10	(0.89–4.93)	
	Highest (Q3)	98	(2.59–10.01)	1.25	(0.59–2.62)	0.762	1.39	(0.60–3.23)	0.698	1.94	(0.69–5.48)	0.339
β -Cryptoxanthin	Lowest (Q1)	98	(0.00–0.30)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	101	(0.31–1.21)	0.52	(0.25–1.10)		0.47	(0.22–1.01)		0.49	(0.22–1.10)	
	Highest (Q3)	94	(1.22–7.91)	0.46	(0.21–1.00)	0.099	0.40	(0.17–0.92)	0.068	0.53	(0.22–1.28)	0.295
Zeaxanthin	Lowest (Q1)	95	(0.08–0.46)	1.00			1.00			1.00		
	Middle (Q2)	100	(0.47–0.96)	1.73	(0.82–3.65)		1.95	(0.89–4.27)		1.71	(0.75–3.87)	
	Highest (Q3)	98	(0.97–6.09)	1.96	(0.93–4.13)	0.104	2.65	(1.11–6.31)	0.038	2.51	(0.99–6.33)	0.061

Model 1: Age, weight and height were adjusted. Model 2: Years since menopause, current tobacco use, regular alcohol intake, exercise habits, supplement use, and total energy intake were further adjusted. Model 3: Intakes of calcium, magnesium, potassium, and vitamins D were further adjusted

^a Preformed retinol

Table 5 The odds ratios (and 95% confidence intervals) of four groups stratified by dietary intakes of vitamin C and β -cryptoxanthin on low bone mineral density in post-menopausal Japanese female subjects

		β -Cryptoxanthin intake					
		Low intake (0–0.96mg/d)			High intake (0.97–7.91mg/d)		
		Number	OR	95%CI	Number	OR	95%CI
Vitamin C intake	Low intake (47–169 mg/d)	113	1.00	(Reference)	34	0.73	(0.27–1.99)
	High intake (170–625 mg/d)	36	0.52	(0.18–1.52)	110	0.42	(0.19–0.93)

Age, weight, height, years since menopause, current tobacco use, regular alcohol intake, exercise habits, supplement use, and total energy intake were adjusted

Discussion

The objective of this study was to investigate the associations of dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake with radial BMD in post-menopausal Japanese female subjects. The results indicate that radial BMD was significantly associated with a dietary pattern heavily loaded on β -cryptoxanthin and vitamin C. Furthermore, we found that a high intake of vitamin C with β -cryptoxanthin was inversely associated with a low radial BMD. This investigation is the first reported cross-sectional study to examine the association of dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake with BMD. Numerous antioxidant vitamins and carotenoids are contained in fruits and vegetables, and several recent epidemiological reports have shown inverse associations of antioxidant vitamin and carotenoid intake or serum level with low BMD, risk of fracture, and/or risk of osteoporosis [16–18]. However, the association of BMD with dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake has not been thoroughly studied. Our findings further support the hypothesis that high intakes of fruits and vegetables rich in antioxidant vitamins and carotenoids, especially vitamin C and β -cryptoxanthin, may be beneficial to bone health in post-menopausal women.

On the other hand, some epidemiological studies have reported that excessive intake of retinol may have adverse effects on BMD [34–36]. In our study, a positive association between the factor score of the “Retinol” pattern and low radial BMD was observed after adjustments for age, years since menopause, weight, height, current tobacco use, regular alcohol intake, exercise habits, use of dietary supplements, and total energy. For dietary antioxidants, a significantly higher odds ratio was observed in the highest tertile of preformed retinol intake against the lowest tertile used for the reference group after multivariate adjustments. The recommended daily intake of retinol activity equivalents is 600 μ gRE/day for Japanese women, with a tolerable upper intake of 3,000 μ gRE/day [37]. In the highest tertile of preformed retinol intake, all of them consumed more than the recommended dietary allowance

for Japanese adult females (600 μ gRE/day) although most subjects consumed less than 3,000 μ gRE/day. The effect of the dietary amount of preformed retinol on bone metabolism in Japanese female subjects has not been studied in detail, but a high intake of preformed retinol may be associated with the risk for low radial BMD. Further study is required.

In our data analyses, we identified three dietary patterns of antioxidant vitamin and carotenoid intake from the principal component analysis. Although all dietary patterns were heavily loaded on vitamin C intake, the highest positive loading between vitamin C, and dietary pattern was observed in the “ β -cryptoxanthin” pattern. On the other hand, an association between β -cryptoxanthin and dietary pattern was observed in only the “ β -cryptoxanthin” pattern, which had an extremely high factor loading. Vitamin C and β -cryptoxanthin are especially concentrated in citrus fruits such as Japanese mandarin orange. Therefore, a high intake of citrus fruit may be inversely associated with low BMD. In fact, in our previous study, we found that fruit intake was inversely associated with low radial BMD [25].

In animals, an experimentally induced deficiency of vitamin C led to impairments in bone mass, cartilage, and connective tissues [38, 39]. The protein in the bone matrix is over 90% collagen [40]. Vitamin C is an essential cofactor for the formation of collagen and the synthesis of hydroxyproline and hydroxylysine [41]. Therefore, vitamin C is an important micronutrient for the maintenance of bone health. Furthermore, it is well known that vitamin C reduces oxidative stress by scavenging singlet oxygen and peroxy radicals. The relationship between oxidative stress and BMD or osteoporosis has recently been reported [16–18]. From the finding of osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2, Iotsova et al. reported that NF- κ B proteins are important for osteoclastogenesis [42]. NF- κ B is activated by the exposure of cells to oxidative stress [43]. Therefore, it seems that reactive oxygen species enhance osteoclastogenesis and bone resorption. In fact, some studies have implicated reactive oxygen species in bone regulation [44, 45]. Furthermore, in epidemiological studies, it was reported that oxidative stress levels were

negatively associated with BMD and that antioxidant levels were lower in osteoporotic patients [19–24]. These previous findings in epidemiological and experimental studies suggest that antioxidant micronutrients may provide benefits to bone metabolism against oxidative stress. Therefore, it seems that vitamin C is an important micronutrient for the maintenance of bone health through its biological action on cofactors for collagen formation, the synthesis of hydroxyproline and hydroxylysine, and antioxidant activity.

Carotenoids, as antioxidants, may also play an important role in the prevention of oxidative stress-related osteoclastogenesis and bone resorption. Very recently, Yamaguchi et al. reported the beneficial effects of β -cryptoxanthin on bone metabolism [46–48]. Through *in vitro* and *in vivo* studies, they found that β -cryptoxanthin stimulated bone formation and inhibited bone resorption. Their results support the idea that β -cryptoxanthin may have a direct stimulatory effect on bone formation and an inhibitory effect on bone resorption. Recent epidemiological studies have shown an association of serum β -cryptoxanthin with bone health. Yang et al. examined serum-carotenoid concentrations in post-menopausal American female subjects and found that the serum concentrations of β -cryptoxanthin and lycopene were significantly lower in osteoporotic subjects than in non-osteoporotic subjects [22]. Furthermore, we found that serum β -cryptoxanthin was significantly but partially associated with radial BMD [25]. The results of these experimental and epidemiological studies strongly support the hypothesis that the development of osteoporosis may be reduced by β -cryptoxanthin intake.

In our data analysis, significantly lower odds ratios in the highest tertiles of vitamin C and β -cryptoxanthin intakes were observed, but these significant associations were not observed after adjusting for β -cryptoxanthin and/or vitamin C intakes, respectively (OR, 0.36; CI, 0.12–1.11 for vitamin C and OR, 0.70; CI, 0.27–1.90 for β -cryptoxanthin). These results indicate that a combined intake of vitamin C and β -cryptoxanthin may be associated with radial BMD. Next, we examined the association of low radial BMD with the combined intake of vitamin C and β -cryptoxanthin. A significantly lower odds ratio was observed in the high-intake group for both of vitamin C and β -cryptoxanthin than in the low-intake group for both nutrients after adjustments for age, years since menopause, weight, height, current tobacco use, regular alcohol intake, exercise habits, use of dietary supplements, and total energy. However, this significantly lower odds ratio became insignificant after further adjustments for intakes of calcium, magnesium, potassium, and vitamin D (data not shown). For this reason, we think that these micronutrients might be more relevant factors for BMD rather than vitamin C and β -cryptoxanthin, or there is no denying the possibility of multicollinearity among these nutrients because these

micronutrients were also rich in fruit and vegetables. From these results, we concluded that the intakes of vitamin C and β -cryptoxanthin may be significantly but partially associated with radial BMD, and these associations may be caused by a combination of vitamin C and β -cryptoxanthin. To our knowledge, there has been no experimental or epidemiological study of the combined effect of vitamin C and carotenoid on bone metabolism. It is conceivable that, rather than vitamin C alone, vitamin C intake combined with the intakes of other antioxidants such as carotenoids may yield an important dietary pattern conducive to the maintenance of bone health. Further studies on the complicated interactions of antioxidants on bone metabolism are required.

This study had some limitations. First, the data obtained here cross-sectional; therefore, only limited inferences can be made regarding temporality and causation. Furthermore, the sample size was limited, and thus further large-scale studies are required. Second, in our survey, portion size questions were not included for most items. Absolute nutrient intake could not be estimated from FFQ without portion size questions. Third, we evaluated radial BMD at 1/3 of the forearm length measured from the styloid process on the ulna. Therefore, an analysis of the association of serum carotenoids with BMD in cancellous bone, such as the femoral neck or lumbar spine, is required. Lastly, we could not evaluate the dietary patterns of other antioxidants such as flavonoids. Some studies have shown a beneficial effect of bioactive flavonoids on bone metabolism [49, 50].

In conclusion, dietary patterns heavily loaded on β -cryptoxanthin, and vitamin C are associated with radial BMD in post-menopausal Japanese female subjects. A high intake of vitamin C with β -cryptoxanthin is inversely associated with low radial BMD and may be beneficial to bone health. To determine whether antioxidant vitamins and carotenoids are beneficial to bone health, further cohort or intervention studies are required.

Acknowledgment This work was supported by a grant from the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries (MAFF) for a food research project titled “Integrated Research on Safety and Physiological Function of Food” and a grant from the Council for Advancement of Fruit Tree Science. We are grateful to the participants in our survey and to the staff of the health examination program for residents of the town of Mikkabi, Shizuoka, Japan. We are also grateful to the staff of the Seirei Preventive Health Care Center (Shizuoka, Japan).

Conflicts of interest None.

References

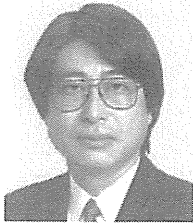
1. Ministry of Health, Labor and Welfare. Comprehensive survey of living conditions of the people on Health and Welfare. Section3 2004. Available at: <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-tyosa/k-tyosa04/4-2.html> (accessed 1 December 2009)

2. Christodoulou C, Cooper C (2003) What is osteoporosis? *Postgrad Med J* 79:133–138
3. Gennari C (2001) Calcium and vitamin D nutrition and bone disease of the elderly. *Public Health Nutr* 4:547–559
4. Prentice A (2004) Diet, nutrition and the prevention of osteoporosis. *Public Health Nutr* 7:227–243
5. Macdonald HM, New SA, Golden MH, Campbell MK, Reid DM (2004) Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol, and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. *Am J Clin Nutr* 79:155–165
6. New SA, Bolton-Smith C, Grubb DA, Reid DM (1997) Nutritional influences on bone mineral density: a cross-sectional study in premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 65:1831–1839
7. Prynne CJ, Mishra GD, O'Connell MA, Muniz G, Laskey MA, Yan L, Prentice A, Ginty F (2006) Fruit and vegetable intakes and bone mineral status: a cross-sectional study in 5 age and sex cohorts. *Am J Clin Nutr* 83:1420–1428
8. Okubo H, Sasaki S, Horiguchi H, Oguma E, Miyamoto K, Hosoi Y, Kim MK, Kayama F (2006) Dietary patterns associated with bone mineral density in premenopausal Japanese farmwomen. *Am J Clin Nutr* 83:1185–1192
9. McGartland CP, Robson PJ, Murray LJ, Cran GW, Savage MJ, Watkins DC, Rooney MM, Boreham CA (2004) Fruit and vegetable consumption and bone mineral density: the Northern Ireland Young Hearts Project. *Am J Clin Nutr* 80:1019–1023
10. Tucker KL, Chen H, Hannan MT, Cupples LA, Wilson PW, Felson D, Kiel DP (2002) Bone mineral density and dietary patterns in older adults: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 76:245–252
11. Gutteridge JM (1994) Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91:133–140
12. Rock CL, Jacob RA, Bowen PE (1996) Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients: vitamin C, vitamin E, and the carotenoids. *J Am Diet Assoc* 96:693–702
13. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC (2007) Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor- to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 282:27298–27305
14. Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC (2007) Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *J Bone Miner Res* 22:1492–1501
15. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR (1990) Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85:632–639
16. Basu S, Michaëlsson K, Olofsson H, Johansson S, Melhus H (2001) Association between oxidative stress and bone mineral density. *Biochem Biophys Res Commun* 288:275–279
17. Yalin S, Bagis S, Polat G (2005) Is there a role of free oxygen radicals in primary male osteoporosis? *Clin Exp Rheumatol* 23:689–692
18. Law MR, Hackshaw AK (1997) A meta-analysis of cigarette smoking, bone mineral density and risk of hip fracture: recognition of a major effect. *BMJ* 315:841–846
19. Melhus H, Michaëlsson K, Holmberg L, Wolk A, Ljunghall S (1999) Smoking, antioxidant vitamins, and the risk of hip fracture. *J Bone Miner Res* 14:129–135
20. Maggio D, Barabani M, Pierandrei M (2003) Marked decrease in plasma antioxidants in aged osteoporotic women: results of a cross-sectional study. *J Clin Endocrinol Metab* 88:1523–1527
21. Maggio D, Polidori MC, Barabani M, Tufi A, Ruggiero C, Cecchetti R, Aisa MC, Stahl W, Cherubini A (2006) Low levels of carotenoids and retinol in involutional osteoporosis. *Bone* 38:244–248
22. Yang Z, Zhang Z, Penniston KL, Binkley N, Tanumihardjo SA (2008) Serum carotenoid concentrations in postmenopausal women from the United States with and without osteoporosis. *Int J Vitam Nutr Res* 78:105–111
23. Sahni S, Hannan MT, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, Tucker KL (2009) Inverse association of carotenoid intakes with 4-y change in bone mineral density in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. *Am J Clin Nutr* 89:416–424
24. Sahni S, Hannan MT, Gagnon D, Blumberg J, Cupples LA, Kiel DP, Tucker KL (2009) Protective effect of total and supplemental vitamin C intake on the risk of hip fracture—a 17-year follow-up from the Framingham Osteoporosis Study. *Osteoporos Int* 20:1853–1861
25. Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Ando F, Yano M (2008) Bone mineral density in post-menopausal female subjects is associated with serum antioxidant carotenoids. *Osteoporos Int* 19:211–219
26. Wakai K, Egami I, Kato K, Lin Y, Kawamura T, Tamakoshi A, Aoki R, Kojima M, Nakayama T, Wada M, Ohno Y (1999) A simple food frequency questionnaire for Japanese diet—Part I. Development of the questionnaire, and reproducibility and validity for food groups. *J Epidemiol* 9:216–226
27. Egami I, Wakai K, Kato K, Lin Y, Kawamura T, Tamakoshi A, Aoki R, Kojima M, Nakayama T, Wada M, Ohno Y (1999) A simple food frequency questionnaire for Japanese diet—Part II. Reproducibility and validity for nutrient intakes. *J Epidemiol* 9:227–234
28. Science and Technology Agency (1983) Standard tables of food composition in Japan, 4th edn. Printing Bureau, Ministry of Finance, Tokyo, in Japanese
29. Science and Technology Agency (1997) Standard tables of food composition in Japan. (for new foods), 5th edn. Printing Bureau, Ministry of Finance, Tokyo, in Japanese
30. Yano M, Kato M, Ikoma Y, Kawasaki A, Fukazawa Y, Sugiura M, Matsumoto H, Ohara Y, Nagao A, Ogawa K (2005) Quantitation of carotenoids in raw and processed fruits in Japan. *Food Sci Technol Res* 11:13–18
31. Aizawa K, Inakuma T (2007) Quantitation of carotenoids in commonly consumed vegetables in Japan. *Food Sci Technol Res* 13:247–252
32. Sugiura M, Nakamura M, Ogawa K, Ikoma Y, Matsumoto H, Ando F, Shimokata H, Yano M (2009) Synergistic interaction of cigarette smoking and alcohol drinking with serum carotenoid concentrations: findings from a middle-aged Japanese population. *Br J Nutr* 102:1211–1219
33. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M et al (2001) Diagnostic criteria for primary osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 19:331–337
34. Feskanich D, Singh V, Willett WC, Colditz GA (2002) Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *JAMA* 287:47–54
35. Melhus H, Michaëlsson K, Kindmark A, Bergström R, Holmberg L, Mallmin H, Wolk A, Ljunghall S (1998) Excessive dietary intake of vitamin A is associated with reduced bone mineral density and increased risk for hip fracture. *Ann Intern Med* 129:770–778
36. Promislow JH, Goodman-Gruen D, Slymen DJ, Barrett-Connor E (2002) Retinol intake and bone mineral density in the elderly: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 17:1349–1358
37. Ministry of Health, Labor and Welfare. Recommended dietary allowance for Japanese: dietary reference intakes. Section 2 2009. Available at: <http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/05/dl/s0529-4i.pdf> (accessed 1 December 2009)

-
38. Poal-Manresa J, Little K, Trueta J (1970) Some observations on the effects of vitamin C deficiency on bone. *Br J Exp Pathol* 51:372–378
 39. Kipp DE, McElvain M, Kimmel DB, Akhter MP, Robinson RG, Lukert BP (1996) Scurvy results in decreased collagen synthesis and bone density in the guinea pig animal model. *Bone* 18:281–288
 40. Termine JD (1990) Cellular activity, matrix proteins, and aging bone. *Exp Gerontol* 25:217–221
 41. Peterkofsky B (1991) Ascorbate requirement for hydroxylation and secretion of procollagen: relationship to inhibition of collagen synthesis in scurvy. *Am J Clin Nutr* 54:1135S–1140S
 42. Iotsova V, Caamano J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R (1997) Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med* 3:1285–1289
 43. Baeuerle PA, Rupec RA, Pahl HL (1996) Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 44:29–35
 44. Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald L, Poser J, Mundy GR (1996) Oxygen-derived free radicals stimulate osteoclastic bone resorption in rodent bone in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 85:632–639
 45. Bax BE, Alam AS, Banerji B, Bax CM, Bevis PJ, Stevens CR, Moonga BS, Blake DR, Zaidi M (1992) Stimulation of osteoclastic bone resorption by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun* 183:1153–1158
 46. Yamaguchi M, Uchiyama S (2003) Effect of carotenoid on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro: the unique anabolic effect of beta-cryptoxanthin. *Biol Pharm Bull* 26:1188–1191
 47. Yamaguchi M, Uchiyama S (2004) Beta-cryptoxanthin stimulates bone formation and inhibits bone resorption in tissue culture in vitro. *Mol Cell Biochem* 258:137–144
 48. Uchiyama S, Yamaguchi M (2004) Oral administration of beta-cryptoxanthin induces anabolic effects on bone components in the femoral tissues of rats in vivo. *Biol Pharm Bull* 27:232–235
 49. Hosseinimehr SJ, Nemati A (2006) Radioprotective effects of hesperidin against gamma irradiation in mouse bone marrow cells. *Br J Radiol* 79:415–418
 50. Chiba H, Uehara M, Wu J, Wang X, Masuyama R, Suzuki K, Kanazawa K, Ishimi Y (2003) Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *J Nutr* 133:1892–1897

運動器疾患の長期縦断疫学研究

Longitudinal epidemiological study on locomotive organ disease



下方浩史(写真) 安藤富士子

Hiroshi SHIMOKATA¹ and Fujiko ANDO²

国立長寿医療研究センター予防開発部¹, 愛知淑徳大学健康医療科学部²

◎運動器症候群の予防方法を解明するためには、その危険因子を明らかにすることが必要である。一般住民を対象とした長期縦断疫学研究により、運動器疾患罹患の実態を明らかにするとともに、栄養や運動、疾病罹患、飲酒や喫煙などの生活習慣、遺伝的素因などと加齢にかかわる運動器疾患の発症との関連を解明することができる。国立長寿医療研究センターでは無作為抽出された一般地域住民を対象に、老化・老年病に関する基礎データの収集のための長期にわたる集団の大規模な縦断研究「老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」を平成9年度(1997)より行っている。NILS-LSAでの調査から、日本人全体で骨粗鬆症は1,000万人、変形性関節症は3,000万人を超える患者がいると推計された。現在、遺伝子や生活習慣、体力、栄養などさまざまな要因についての縦断的な解析から高齢者の運動器疾患のリスク要因を明らかにし、予防方法を開発するための研究を行っている。



長期縦断疫学, 老化, 骨粗鬆症, 変形性関節症

運動器症候群(ロコモティブシンドローム)とは、運動器の障害により要介護になるリスクの高い状態になることである。実際に要介護となる要因として関節疾患、転倒・骨折が大きな割合を占めている。高齢者における関節疾患のほとんどは変形性関節症であり、また高齢者の骨折は骨粗鬆症がおもな要因となっている。変形性関節症と骨粗鬆症に限っても、運動器症候群の推計患者数は4,700万人(男性2,100万人, 女性2,600万人)に達するという¹⁾。日本社会の高齢化に伴って、今後さらに急速にこれらの患者数は増大していくものと推定されている。また、運動器症候群は認知症の要因となるとも考えられており、運動器症候群の予防に関する研究は、日本において今後の進展が強く望まれる分野である²⁾。

運動器症候群の予防方法を解明するためには、その危険因子を明らかにすることが必要である。無作為抽出された一般住民を対象とした長期にわたる観察研究は、一般住民の間での運動器疾患罹患の実態を明らかにするとともに、栄養や運動、

疾病罹患、飲酒や喫煙などの生活習慣、遺伝的素因などと加齢にかかわる運動器疾患の発症との関連を解明するために不可欠である。こうした研究により、どのような素因をもち生活を送っている人が、どのような確率で運動器疾患に罹患していくのか、どのように対策を取れば、どのくらいの確率で予防できるのかを明らかにすることができる²⁾。

長期縦断疫学研究

国立長寿医療研究センターでは老化・老年病に関する基礎データの収集のために長期にわたる集団の大規模な縦断研究「老化に関する長期縦断疫学研究(NILS-LSA)」を平成9年度(1997)より行っている(図1)³⁻⁷⁾。対象は地域住民から年齢・性別に層化し無作為抽出された、観察開始年齢が40~79歳の男女である。抽出によって選定された人を説明会に招いて、検査の目的や方法などを十分に説明し、インフォームドコンセントを得たうえで検査を実施している。追跡中のドロップアウト

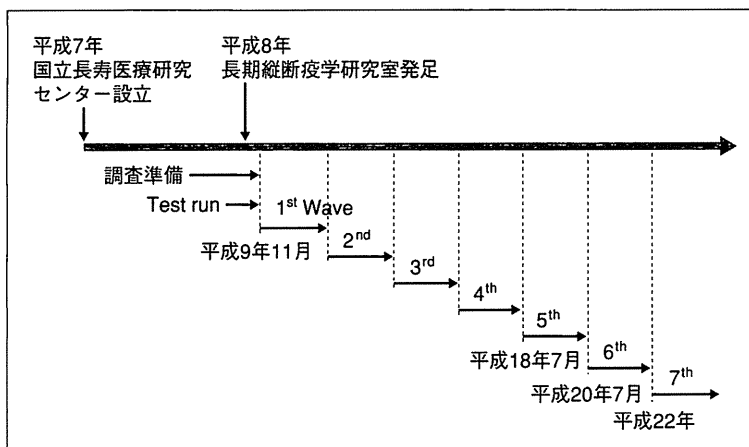


図 1 国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究 (NILS-LSA) の経緯

NILS-LSA では地域在住の中高齢者約 2,400 人の 10 年以上にわたるデータが蓄積されている。

トは、同じ人数のあらたな補充を行い、定常状態として約 2,400 人のダイナミックコホートをめざしている。

施設内に設けられた専用の検査センターで朝 9 時から夕方 4 時までの間に分刻みでスケジュールを組んで、1 日 7 名、週 4 日、年間を通して詳細な老化に関連する検査を行っている。平成 12 年 (2000) 4 月に 2,267 名の基礎集団が完成し、以後は 2 年ごとに検査を繰り返し行っており、現在は第 7 次調査を行っている。調査項目は頭部 MRI や超音波断層、骨密度測定、腹部 CT など最新の機器を利用した医学検査のみならず、詳細な生活調査、栄養調査、運動機能調査、心理検査など広汎で精度の高い内容である (図 2)。運動器疾患に関連した検査としては、DXA 法による全身骨、腰椎、左右大腿骨頸部の 4 スキャンでの骨密度測定、末梢骨定量 CT 検査法 (pQCT) による橈骨 16 スキャン、左右膝 X 線撮影、胸椎腰椎 X 線撮影、膝関節機能検査、転倒調査、膝痛調査、腰痛調査、骨折調査、骨代謝マーカー検査などを実施している。調査開始当初より、調査参加者のほぼ全員からの血液サンプルを用いて DNA を蓄積している。これほど背景因子が詳細に検討されている一般住民の DNA 試料の蓄積は、国内外でもほかにはほとんどないと思われる^{8,9)}。

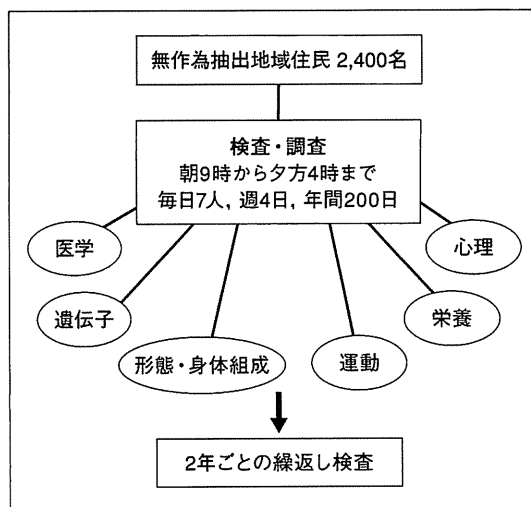


図 2 国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究 (NILS-LSA) の概要

加齢に伴う運動器疾患罹患の実態

NILS-LSA の第 5 次調査に参加した 40~88 歳の男性 1,200 名、女性 1,219 名の合計 2,419 名を対象として、立位で両膝の X 線写真を撮影し、Kellgren-Lawrence 分類 (KL 分類)¹⁰⁾にて変形性膝関節症を grade 0 から grade IV までに分類し、grade II 以上を変形性膝関節症と診断した。また、grade III 以上を膝関節高度変形として、10 歳ごとの年齢別および性別に有病率を算定した。図 3 に示すように、変形性膝関節症は男性よりも女性に多く、年

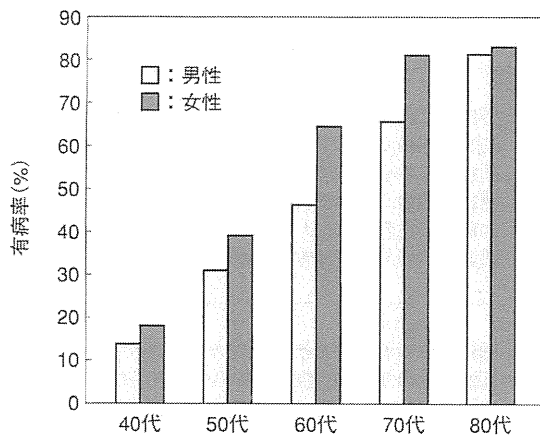


図3 年代別、性別の膝変形性関節症の有病率 (Kellgren-Lawrence 分類 grade II 以上)

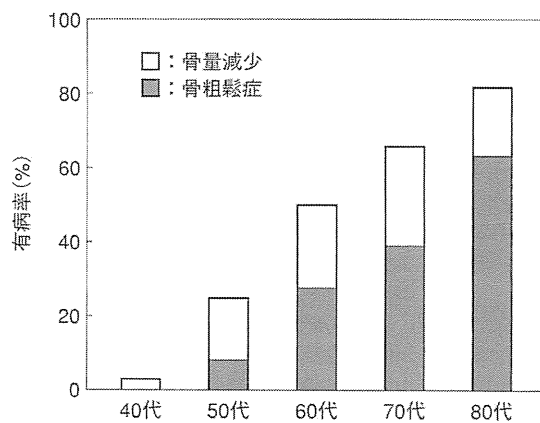


図4 女性の年代別の骨粗鬆症および骨量減少の有病率(日本骨代謝学会診断基準による腰椎骨密度からの判定)

齢とともに有病率は上昇する。40歳以上の女性全体での有病率は52.3%、男性で43.5%であった。また、KL分類 grade III以上の膝高度変形保有率は女性のほうが男性よりも2倍以上多く、また女性では年齢とともにその率は大きく上昇していた。上記の有病率を用いて日本人全体の人口構成から有病率を計算すると、男性1,278万人、女性1,950万人の合計3,228万人と推定された。

日本骨代謝学会の診断基準¹¹⁾を用いて、DXA法で計測した腰椎骨密度(第2, 3, 4腰椎の平均骨密度)および右大腿骨頸部骨密度により、性別、年齢別に骨粗鬆症の有病率を算定した(図4)。50歳以上の女性の有病率は、腰椎BMDの判定の場合26.1%、大腿骨頸部BMD判定の場合21.3%であった。骨粗鬆症・骨量減少の年代別有病率は、どちらの部位の判定でも加齢で高くなり、とくに60歳代で急に高くなった。腰椎に比べ、大腿骨頸部判定の場合、50, 60歳代での有病率は低かった。50歳以上の男性の骨粗鬆症有病率は、腰椎BMDの判定の場合7.6%、大腿骨頸部BMD判定の場合10.3%であった。骨粗鬆症・骨量減少の年代別有病率は、大腿骨頸部の判定において60歳代以降、男性でも加齢で高くなっていった。この結果をもとに、今回得られた骨粗鬆症有病率から見積もられる骨粗鬆症患者数は、腰椎骨密度による有病率を用いると50歳以上の女性で約811万人、50歳以上の男性で189万人と推計され、大腿骨頸部では女性685万人、男性250万人となる。男女合

計で骨粗鬆症患者数は900万~1,000万人と推定された。

骨粗鬆症疾患ゲノム研究

骨粗鬆症は生活習慣病であり、カルシウム摂取の不足ややせ、運動不足などの危険因子が指摘されている²⁾。一方で、骨粗鬆症の危険因子として家族歴がある。他の多くの生活習慣病や老年病と同じように、骨粗鬆症は遺伝的素因と生活習慣や加齢などが複雑に影響しあって発症する多因子疾患であると考えられている。疾患によって遺伝的要因の影響の強さは異なる。人種差や環境、生活習慣による違いはあろうが、アメリカのFraminghamスタディの報告では、骨密度の遺伝率(heritability)は約60%と推定されており、遺伝的な要因は比較的大きいと思われる¹²⁾。NILS-LSAでは、これまでに骨密度と有意な関連のあった31種類の遺伝子多型についてあらたに発見、あるいは確認の報告を行っている(表1)⁷⁾。

骨粗鬆症や骨密度への遺伝子多型の影響は、直接的な影響よりもむしろ生活習慣や環境因子による骨への影響を遺伝子多型が修飾する部分が大い可能性がある。図5は著者らの調査の解析結果である。閉経女性のDXA法による骨密度と除脂肪体重との関係へのエストロゲン受容体(ER α)遺伝子Xba I多型の影響について検討した¹³⁾。除脂肪体重として求めた筋量が多ければ骨密度は高いが、その影響はAA型よりもAG/GG型のほうが

表 1 NILS-LSAにおいて骨密度との関連をあらたに発見または確認した遺伝子多型

略号	遺伝子多型	骨密度への影響
カルシウム向性ホルモンおよび受容体		
<i>VDR</i>	vitamin D receptor (A-3731G)	男性の CC 型で大腿骨頸部の骨密度が高い
<i>ESR1</i>	estrogen receptor α (PP/pp)	高齢女性の CC 型で骨密度が低い
<i>ESR1</i>	estrogen receptor α (XX/xx)	高齢女性の GG 型で骨密度が低い
<i>OST</i>	osteocalcin (C298T)	閉経女性の TT 型で骨密度が低い
<i>ADR</i>	androgen receptor (CAG repeat)	未閉経女性の CAG リピートが多いと骨密度が低い
<i>CYP17A1</i>	cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1 (T-34C)	閉経女性の CC 型で骨密度が低い
サイトカイン, 成長ホルモンおよび受容体		
<i>IL-6</i>	interleukin-6 (C-634G)	閉経女性の GG 型で橈骨遠位の骨密度が低い
<i>TGF-β</i>	transforming growth factor- β 1 (T29C)	高齢女性の TT/TC 型で橈骨の骨密度が低い
<i>OPG</i>	osteoprotegerin (T950C)	未閉経女性の CC 型で橈骨近位の骨密度が低い
<i>OPG</i>	osteoprotegerin (T245G)	閉経女性の GG 型で大腿骨頸部骨密度が低い
<i>CCR</i>	chemokine receptor 2 (G190A)	若年男性と閉経女性の GG/GA で骨密度が低い
骨基質関連蛋白		
<i>MMP1</i>	matrix metalloproteinase-1 (1G/2G at-1607)	閉経女性の GG/GG 型で橈骨遠位骨密度が低い
<i>MMP9</i>	matrix metalloproteinase-9 (C-1562T)	男性の CT/TT 型で骨密度が低い
<i>COL</i>	collagen type 1 (G-1997T)	閉経女性の GG 型で骨密度が低い
<i>ICAM-1</i>	intercellular adhesion molecule-1 (Lys469Glu)	閉経女性の AA 型で骨密度が低い
<i>PLOD1</i>	procollagen-lysine 2-oxyglutarate 5-dioxygenase (Ala99Thr)	未閉経・閉経女性の GA/AA 型で骨密度が低い
<i>CX37</i>	connexin 37 (Pro319Ser)	男性の TT 型で骨密度が低い
その他		
<i>KLOT</i>	klotho (G-395A)	閉経・未閉経女性の GG 型で骨密度が低い
<i>MTP</i>	microsomal triglyceride transfer protein (G-493T)	未閉経女性の TT 型で骨密度が高い
<i>VLDLR</i>	VLDL receptor (triplet repeat)	男性の CGG リピート 8 以上で骨密度が高い
<i>ALAP</i>	adipocyte-derived leucine aminopeptidase (Lys528Arg)	未閉経女性の GA/AA 型で骨密度が低い
<i>LIPC</i>	hepatic lipase (C-514T)	閉経女性の TT 型で骨密度が低い
<i>CNR2</i>	cannabinoid receptor 2 gene (A/G, rs2501431)	未閉経・閉経女性の AA/AG 型で骨密度が低い
<i>PON1</i>	paraoxonase-1 (Gln192Arg)	閉経女性の GG 型で骨密度が低い
<i>PON1</i>	paraoxonase-1 (Met55Leu)	閉経女性の TT 型で骨密度が低い
<i>PON2</i>	paraoxonase-2 (Cys311Ser)	閉経女性の CC 型で骨密度が低い
<i>DRD4</i>	dopamine D4 receptor (C-521T)	男性の CC 型で骨密度が低い
<i>FOXC2</i>	forkhead box C2 (C-512T)	男女ともに T アリルで骨密度が低い
<i>PLN</i>	perilipin (C1243T)	男性の C アリルで骨密度が低い
<i>MAOA</i>	monoamine oxidase A (uVNTR)	未閉経・閉経女性のリピート 4 未満で骨密度低い
<i>SH2B1</i>	Src-homology-2-B (Ala484Thr)	未閉経・閉経女性の A アリルで骨密度が低い

強い。AG/GG 型の多型をもつ人は筋量を増やすことが、AA 型の人よりも骨粗鬆症の予防には効果的であることがわかる。筋量が少ない集団では AA 型のほうが骨密度は高いが、筋量が多い集団では AG/GG 型のほうが骨密度は高いという逆転が生じており、このため対象集団の筋量が異なれば、遺伝子多型の骨密度との関係はまったく逆になってしまう。遺伝子以外の個体差が十分に検討されていないことが、ゲノム研究での再現性が乏しいことの要因のひとつになっている可能性がある。感受性遺伝子多型をもっている人も発症しない人

もいる。その要因を探るというアプローチもある。感受性遺伝子多型をもっている発症した人、発症していない人について生活習慣などの要因を詳細に比較検討することで、感受性遺伝子をもっている人も骨粗鬆症をどうすれば予防できるかを明らかにすることができる。さらに生活習慣などの修飾可能な危険要因については、その縦断的变化についての検討も必要である。特定の遺伝子多型をもつ人が、たとえば身体活動量を 2 倍にしたとき骨密度はどう変化するのか、遺伝子多型によってその効果にどのような差があるのかを明らかにする

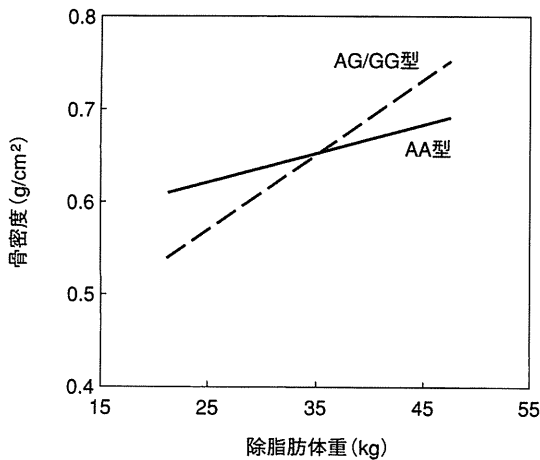


図5 閉経女性のDXA法による骨密度と除脂肪体重との関係へのエストロゲン受容体(ER α)遺伝子Xba I多型の影響¹³⁾
除脂肪体重, すなわち筋量が多ければ骨密度は高いが, その影響はAA型よりもAG/GG型のほうが強い。

ことが, 遺伝子多型を利用した実際の予防指導の際には重要である。こうしたデータを蓄積するためには, 多数の集団で長期にわたった詳細な生活習慣や環境要因の調査が必要である(「サイドメモ」参照)。

運動器疾患のリスク予想と予防

骨代謝マーカー測定によって骨粗鬆症や骨量減少の予測ができるかをNILS-LSAで検討した。骨代謝マーカーとしてオステオカルシン(OC), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), 尿中I型コラーゲン架橋N-ペプチド(NTx), デオキシピリジノリン(DPD)を測定したところ, 女性の腰椎でOC, BAP, NTxが, 女性の大腿骨頸部でDPD, BAP, NTxが, 男性の大腿骨頸部でBAPが6年後の骨粗鬆症や骨量減少の発症に有意に関連しており, これらのマーカーから将来の骨粗鬆症や骨量減少の発症を予測できる可能性が示された¹⁴⁾。

NILS-LSAでは, 生活習慣や環境要因との相互関係を考慮した骨粗鬆症の遺伝要因の検討も順次進めている。DXA法による骨粗鬆症診断結果と, 握力, 脚筋力など運動・体力に関する要因, カルシウム, ビタミンDなど栄養に関する要因, BMI, 除脂肪体重など体格・体型に関する要因, そのほか嗜好, 閉経, 骨代謝マーカーを含む血液尿検査

結果などの項目の追跡による縦断的なデータについて網羅的に検討を行うことで, それぞれ骨粗鬆症と関連の強い要因を抽出する。抽出された要因と遺伝子多型との相互作用を網羅的に検討し, その結果から最終的に骨粗鬆症と関連する生活習慣要因, 遺伝子多型, 生活習慣要因と遺伝子多型の交互作用を抽出し, 骨粗鬆症の予測を行う総合的なシステムの構築を行っている。長期縦断研究によりこうしたシステムが完成すれば, 骨粗鬆症の医療や予防の実用化へ一歩前進するものと期待される。

おわりに

高齢化が急速に進む日本の社会において, 高齢者の健康維持・増進はきわめて重要な課題である。高齢者が健康に長生きできることは国民の共通の願いであり, これを実現することが急務である。高齢者の運動器疾患は直接の死因とはならない場合がほとんどではあるが, 高齢者のQOLを阻害し, 寝たきりや廃用症候群を引き起こし, 認知症や肺炎の要因ともなる。高齢者の運動器疾患の予防と治療は高齢者の健康長寿を考える場合には欠かすことができない。そのためのエビデンスを集積する研究として, 疾患そのものだけでなく,

サイドメモ

縦断研究

加齢による変化を検討する方法には大きく分けて, 横断的方法と縦断的方法の2つがある。縦断的研究は同一の個人を継続して観察し, 加齢による実際の心身の変化, 加齢に関連する要因, 発育, 発達, 老化, 寿命などをとらえようとするものである¹⁴⁾。一方, さまざまな年齢を含む集団を設定して種々の検査を一度に実施し, 1歳ごとの, あるいは5歳, 10歳ごとの年齢群で検査値がどのように異なるのかを検討し, その差を加齢変化とする方法が横断的研究である。一度の調査で終了してしまう横断研究に比べて経時的な追跡を行う縦断研究は, 結論が出るまでに一般に数年から10年以上もの期間を要し, 調査を継続するための費用や人材の確保も必要である。しかし, 加齢変化の観察を行うためには横断的観察のみでは加齢による変化を正確にとらえることができない。

遺伝子や栄養，運動までを含めた学際的な長期縦断疫学研究の進展が望まれる。

文献

- 1) Yoshimura, N. et al. : *J. Bone Miner. Metab.*, **27** : 620-628, 2009.
- 2) 下方浩史：新老年学改訂第3版(大内尉義，秋山弘子編)。東京大学出版会，2010，pp.333-346.
- 3) 安藤富士子，下方浩史：*Medicina*, **45** : 430-433, 2008.
- 4) Shimokata, H. et al. : *J. Epidemiol.*, **10** : S1-S9, 2000.
- 5) 下方浩史：*Geriatric Med.*, **36** : 21-26, 1998.
- 6) 下方浩史：*Geriatric Med.*, **45** : 13-17, 2007.
- 7) 下方浩史，安藤富士子：日本老年医学会雑誌，**45** : 563-572, 2008.
- 8) 下方浩史・他：*Mol. Med.*, **39** : 576-581, 2002.
- 9) 下方浩史，安藤富士子：*Clin. Calcium*, **18** : 155-161, 2008.
- 10) Kellgren, J. H. and Lawrence, J. S. : *Ann. Rheum. Dis.*, **15** : 1-11, 1956.
- 11) 折笠 肇・他：日本骨代謝学会雑誌，**18** : 76-82, 2001.
- 12) Karasik, D. et al. : *J. Bone Miner. Res.*, **179** : 1718-1727, 2002.
- 13) Kitamura, I. et al. : *Bone*, **40** : 1623-1629, 2007.
- 14) 竹村真理枝・他：*Osteoporos. Jpn.*, **15** : 28-32, 2007.

* * *

2. サルコペニアの疫学

下方 浩史* 安藤 富士子**
しもかた ひろし あんどう ふじこ

- サルコペニアは 40 歳以上の地域在住男性の 25.0%, 女性の 24.2%に認められる。
- 加齢とともに男女で筋力は年間約 1%低下する。筋量は男性のみで低下し、女性では筋量の変化は少なく、筋肉の質的な変化があるものと思われる。
- 一般の高齢者では、筋力や筋量には遺伝子多型よりも生活習慣などの影響のほうが大きい。
- サルコペニアの主な危険因子は運動不足と低栄養、特に蛋白摂取の不足、カロテノイドやビタミン D の不足である。
- 適度な運動と適切な栄養摂取に心がけることで筋量や筋力の低下を防ぐことは十分可能であると考えられる。

Key Words

サルコペニア, 疫学研究, カロテノイド, ビタミン D, DXA,

サルコペニアは高齢者の ADL を低下させ、健康長寿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、また日常生活機能との関連もはっきりはしていない。特に一般地域住民での日常生活機能と骨格筋量、筋力との関連についての疫学研究は日本ではほとんどない。高齢者のサルコペニアや脆弱を予防していくためには、日本におけるサルコペニアの実態を明らかにするとともに、サルコペニアの危険因子を明らかにするような観察研究や介入研究などの疫学的研究が重要である。

□ サルコペニアの実態

サルコペニアの頻度はその定義により異なるが、米国での New Mexico Elderly Health Study からの報告¹⁾では、二重エネルギー X 線吸収法 (DXA) を用いた診断で、70 歳未満では 20%程度であるが、80 歳以上になると 50%以上がサルコペニアとなるとしている。

われわれは平成 9 年から、無作為抽出された地域住民を対象としたコホート研究「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)」を実施しており²⁾、第 5 次調査の参加者、40~88 歳の中老年者 2,419 名 (男性 1,200 名, 女性 1,219 名) を対象としてサルコペ

ニアの頻度について検討を行った。DXA (QDR 4500, Hologic) 装置をと用いて四肢除脂肪・除骨重量測定し、これを四肢筋量とした。前述の New Mexico Elderly Health Study の方法¹⁾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 DXA の Hologic QDR 4500 で測定した Sanada ら³⁾による YAM (young adult mean : 18~40 歳の若年成人平均値) から標準偏差の 2 倍を引いた男性 6.87 kg/m², 女性 5.46 kg/m² を基準値としてサルコペニアの有無を判定した。その結果、この基準値から 40 歳以上の男性の 25.0%が、女性の 24.2%がサルコペニアに分類された (図 1)。

運動神経線維のうち、筋線維を支配して実際の筋収縮に参与する α 運動ニューロンは、加齢とともに 50%も低下するといわれる。特に下肢では軸索が長くなって障害を受けやすい。また筋の増殖に必要な骨格筋組織特異的幹細胞であるサテライト細胞も数が減少することが知られている。食欲の低下や運動不足、性ホルモンの分泌低下、炎症反応の増大などサルコペニアを引き起こすさまざまな要因が、加齢に伴って増加する^{4,5)}。

SMI は男性年間約 0.3%低下するが、女性では SMI の低下はほとんどない。一方、筋力は男女

*国立長寿医療研究センター予防開発部 **愛知淑徳大学健康医療科学部

とも40歳以降、握力も下肢筋力も年間約1%ずつ減少する。このことは女性では筋肉の量的な変化よりも質的な変化が問題になっていることを示している。男性ではどの年代においても女性よりも筋力は強く、80代の男性の筋力は40代の女性の筋力にほぼ等しい(図2)。もともと女性は男性よりも筋力が弱いために、加齢による筋力の低

下は女性により大きな影響を与える。

□ サルコペニアの危険因子

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)⁶⁾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)に分類している。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、無重力状態などが原因となる身体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(表1)。

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、

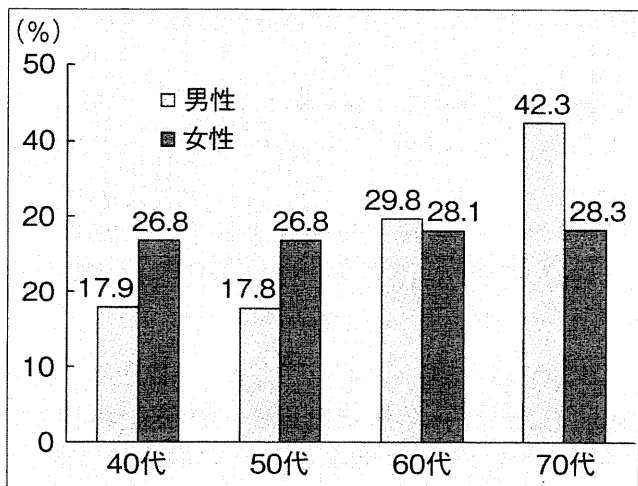


図1 年齢・性別にみたサルコペニアの頻度

DXA法により性別の若年成人平均値(YAM)の-2SDを基準としてサルコペニアの判定を行った。女性では年齢による変化はなかったが、男性では年代上昇で割合が有意に上昇していた(Cochran-Mantel-Haenszel検定でp trend<0.001)。

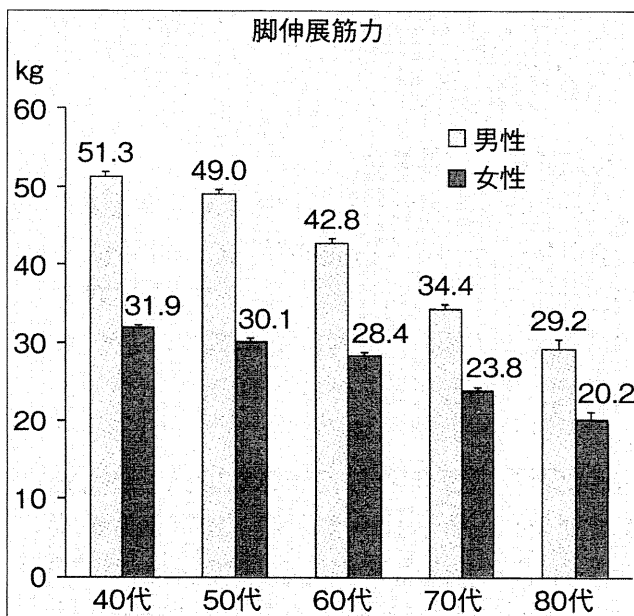
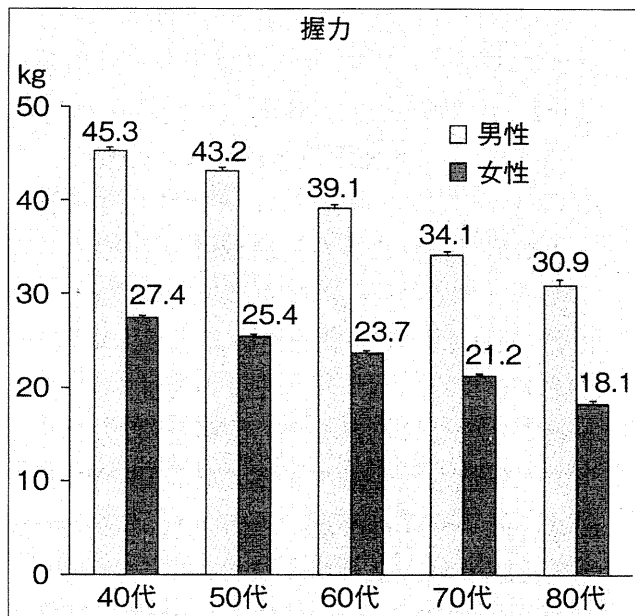


図2 年齢・性別にみた筋力

利き手の握力および脚伸展筋力(大腿四頭筋筋力)の年代別平均値および標準誤差。握力、脚伸展筋力は男女ともに、年代上昇に伴い減少していた(p trend<0.001)。しかし、男性では握力は80代でも女性の40代よりも大きく、また男性の脚伸展筋力は80代でも女性の40代とほぼ同じ値であった。

表1 サルコペニアの分類

分類	原因
原発性サルコペニア	
加齢性サルコペニア	加齢以外の原因がない
二次性サルコペニア	
身体活動性サルコペニア	ベッド上安静，運動しない生活スタイル，廃用，無重力状態
疾患性サルコペニア	高度な臓器障害（心臓，肺，肝臓，腎臓，脳），炎症性疾患，悪性腫瘍，内分泌疾患
栄養性サルコペニア	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，蛋白質摂取不足

(Cruz-Jentoft AJ, et al. : Age Ageing 39, 412-423, 2010. より引用)⁹⁾

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^{7,8)}。しかし，レジスタンストレーニングを行うスポーツ選手ではこうした遺伝子多型の影響があるとしても，一般の高齢者では遺伝子多型よりもむしろ生活習慣のほうが筋力や筋量への影響が大きいと思われる。

□ 身体活動とサルコペニア

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¹⁾。一方，筋力トレーニングを中心とした運動介入により高齢者でも筋力や筋量が増加するという報告は多く^{4,6)}，身体活動はサルコペニア予防の重要な要素であるともいえる。

□ 性ホルモンとサルコペニア

閉経により内臓脂肪は増加し，骨密度が低下し，筋量および筋力が低下する。一方，エストロゲンの投与はこれらの変化を予防する効果があるとされる。テストステロンの筋増殖効果はよく知られている⁹⁾。高齢男性のテストステロンの低下と筋量，筋力の低下が報告されている。加齢に伴い，性ホルモン結合グロブリン（SHBG）が増加し，生体作用を持つ遊離テストステロンが大きく低下

する。テストステロンは蛋白合成を促進する。テストステロンの低下は蛋白合成能の低下をきたし，筋肉を萎縮させる。さらにテストステロンの低下は筋サテライト細胞数の低下を引き起こし，筋肉の再生・増殖能を低下させるといわれている¹⁰⁾。

□ カロテノイドとサルコペニア

高齢者の筋力低下，身体機能低下はフリーラジカルによる酸化ストレスが原因の1つとなっている可能性が指摘されている。酸化ストレスは骨格筋のDNAを傷つけ，蛋白質や脂質に障害を与える^{11,12)}。

抗酸化作用を持つカロテノイドが不足すると，高齢者では筋力低下や歩行障害をきたすことが，いくつかの疫学的研究で報告されている。米国のWomen's Health and Aging Studiesでは，年齢，人種，喫煙，心血管性疾患，関節炎，血清IL-6を調整して検討したところ，血清総カロテノイドの低下は握力，腰や脚の筋力の低下と有意に関連していた¹³⁾。イタリア，トスカーナ州キャンティ地区の地域在住高齢者での研究でも，βカロテン摂取量が高齢者の脚伸展筋力と相関していた¹⁴⁾。

NILS-LSAのデータでは血清カロテノイドと体力・運動やADLとの関係が示されている。外出に不安がある人，階段の昇降や長距離の歩行が困難である人では，血清カロテノイドが低値を示した。一方，筋力や余暇活動時間，一日平均歩数は血清カロテノイドと正の相関を示し，特に日常活動量を示す一日平均歩数はすべての血清カロテノイドで正の関連を示していた。摂取エネルギー

で調整したβカロテン摂取量も正の関連を示したことから、単に「元気な人がたくさん食べている」のではなく、多く摂取する人が体力的にも健康であり、また、ADLの低下している人ではカロテノイドが不足している状況が明らかになった。

□ ビタミンDとサルコペニア

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が低下することで筋肉の蛋白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1つであることも報告されている¹⁵⁾。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^{16,17)}。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¹⁸⁾。

□ 蛋白質、アミノ酸とサルコペニア

筋肉は蛋白質からなっており、蛋白質摂取量、アミノ酸摂取量が低下すれば、筋量は当然低下する。1食あたりの蛋白質量が20~25gであるときが筋蛋白質の合成がもっとも高いとされている^{19,20)}。食事摂取基準では、健康な70歳以上者に必要な蛋白質量は1.06g/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、エネルギー消費量が減少し、食事量全体が少なくなってしまう高齢者の食事では、必要な蛋白質摂取を維持することが難しい場合もある。

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蛋白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^{21,22)}。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。

まとめ

サルコペニアは40歳以上の地域在住男性の25.0%、女性の24.2%に認められ、多くの人がサルコペニアの状態にある。サルコペニアは特に高齢者に多くみられ、健康長寿達成の大きな障害となる。サルコペニアの予防が、高齢化がさらに進んでいく今後の日本にとって重要な課題である。サルコペニアの主な危険因子は運動不足と低栄養、特に蛋白質摂取の不足、カロテノイドやビタミンDの不足である。筋力や筋量の低下には、老化による避けがたい生理的な要因もあるが、適度な運動と適切な栄養摂取に心がけることで、筋量や筋力の低下を防ぐことは十分可能である。

文献

- 1) Baumgartner RN, Koehler KM, Gallagher D, et al.: Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol* 147: 755-763, 1998
- 2) Shimokata H, Ando F, Niino N: A new comprehensive study on aging—the National Institute for Longevity Sciences, Longitudinal Study of Aging (NILS-LSA). *J Epidemiol* 10: S1-S9, 2000
- 3) Sanada K, Miyachi M, Tanimoto M, et al.: A cross-sectional study of sarcopenia in Japanese men and women: reference values and association with cardiovascular risk factors. *Eur J Appl Physiol* 110: 57-65, 2010
- 4) Volpi E, Nazemi R, Fujita S: Muscle tissue changes with aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7: 405-410, 2004
- 5) Doherty TJ: Aging and sarcopenia. *J Appl Physiol* 95: 1717-1727, 2003
- 6) Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al.: Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in

- Older People. *Age Ageing* 39 : 412-423, 2010
- 7) Clarkson PM, Devaney JM, Gordish-Dressman H, et al. : ACTN3 genotype is associated with increases in muscle strength in response to resistance training in women. *J Appl Physiol* 99(1) : 154-163, 2005 Jul
 - 8) Ivey FM, Roth SM, Ferrell RE, et al. : Effects of age, gender, and myostatin genotype on the hypertrophic response to heavy resistance strength training. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 55 : M641-648, 2000
 - 9) Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ : Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 9 : 186-197, 2009
 - 10) Solomon AM, Bouloux PM : Modifying muscle mass—the endocrine perspective. *J Endocrinol* 191 : 349-360, 2006
 - 11) Semba RD, Lauretani F, Ferrucci L : Carotenoids as protection against sarcopenia in older adults. *Arch Biochem Biophys* 458 : 141-145, 2007
 - 12) Weindruch R : Interventions based on the possibility that oxidative stress contributes to sarcopenia. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 50 : 157-161, 1995
 - 13) Semba RD, Blaum C, Guralnik JM, et al. : Carotenoid and vitamin E status are associated with indicators of sarcopenia among older women living in the community. *Aging Clin Exp Res* 15 : 482-487, 2003
 - 14) Cesari M, Pahor M, Bartali B, et al. : Antioxidants and physical performance in elderly persons : the Invecchiare in Chianti (InCHIANTI) study. *Am J Clin Nutr* 79 : 289-294, 2004
 - 15) Roth SM, Zmuda JM, Cauley JA, et al. : Vitamin D receptor genotype is associated with fat-free mass and sarcopenia in elderly men. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 59 : 10-15, 2004
 - 16) Suzuki T, Kwon J, Kim H, et al. : Low serum 25-hydroxyvitamin D levels associated with falls among Japanese community-dwelling elderly. *J Bone Miner Res* 23 : 1309-1317, 2008
 - 17) Kwon J, Suzuki T, Yoshida H, et al. : Concomitant lower serum albumin and vitamin D levels are associated with decreased objective physical performance among Japanese community-dwelling elderly. *Gerontology* 53 : 322-328, 2007
 - 18) Visser M, Deeg DJ, Lips P : Low vitamin D and high parathyroid hormone levels as determinants of loss of muscle strength and muscle mass (sarcopenia) : the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *J Clin Endocrinol Metab* 88 : 5766-5772, 2003
 - 19) Paddon-Jones D, Short KR, Campbell WW, et al. : Role of dietary protein in the sarcopenia of aging. *Am J Clin Nutr* 87 : 1562S-1566S, 2008
 - 20) Paddon-Jones D, Rasmussen BB : Dietary protein recommendations and the prevention of sarcopenia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 12 : 86-90, 2009
 - 21) Dreyer HC, Volpi E : Role of protein and amino acids in the pathophysiology and treatment of sarcopenia. *J Am Coll Nutr* 24 : 140S-145S, 2005
 - 22) Fujita S, Volpi E : Amino acids and muscle loss with aging. *J Nutr* 136(Suppl) : 277S-280S, 2006

Seminar

2. 虚弱の危険因子

下方 浩史 安藤富士子

KEY WORD

- 虚弱
- 高齢者
- 危険因子
- 体力
- 老化

SUMMARY

高齢者の虚弱は年齢が高いほど割合が高くなり、また男性よりも女性で割合が高い。虚弱の要因としては、低栄養、喫煙、慢性疾患への罹患、慢性炎症、性ホルモンの減少などの身体的要因に加えて、世帯の年収や教育歴、人種、生活空間など社会的な因子も重要である。高齢者ではこれらの多くの要因が重積し、虚弱を引き起こすものと考えられる。高齢者の虚弱に対しての運動や栄養による介入研究が数多く行われているが、その効果ははっきりしていない。運動介入や栄養の単独の介入では虚弱の予防は難しく、生活全般のサポートでの対応が望まれる。

はじめに

日本人の平均寿命は年々長くなり、高齢者、特に後期高齢者の人口が急増している。しかし、高齢になるほど虚弱な高齢者は増加する。一方で少子化が進み、今後は若い労働力が不足していくことが予想される。そのような状況で、介護のために若い人材の労力が費やされるようでは、日本の国が成り立っていかなくなってしまうだろう。高齢化する日本の社会で、介護や支援を要するような虚弱な高齢者を減らし、健康長寿を達成することは急務となっている。本稿では、高齢者の虚弱の要因を明らかにし、その予防法を探る。

性別、加齢と虚弱

虚弱は男性よりも女性に多い。日本では平均寿命は女性の方が男性よりも7歳近く長い。寝たきりの期間も女性の方が長く、虚弱の女性の数は男性よりも多い。しかし年齢を調整しても

虚弱のリスクは男性よりも女性の方が高い¹⁾。また、虚弱な女性の死亡率は男性よりも高いという報告もある²⁾。

虚弱の定義にもよるが、虚弱は75歳以上の20~30%に認められ、高齢になるほどその割合は高くなる³⁾。多くの研究で、加齢は虚弱の最も強い危険因子の1つに挙げられている。しかし、加齢そのものが虚弱の要因なのか、加齢に伴って生じる様々な障害や疾病が虚弱の要因であって、これらの要因をすべて除いても加齢が虚弱の要因であるかどうかについては、まだ十分には明らかにされていない。

生活習慣と虚弱

高齢者では一般に身体活動量が減り、また歯の脱落、嗅覚や味覚の低下、消化機能の低下など生理学的な要因に加えて、抑うつなどの精神的な要因のため食欲が低下する。こうした生活習慣の変化が高齢者の虚弱を引き起こす可能性が高い。虚弱の栄養学的要因として低栄養、瘦

慢性疾患と虚弱

せが重要である。特に摂取エネルギー、蛋白質や必須アミノ酸摂取の低下、ビタミンやミネラル、特にビタミンD、カロテン、ビタミンB₁₂、葉酸の摂取不足は高齢者の虚弱と関連が深いといわれている⁴⁾。

虚弱における栄養の指標としてアルブミン、コレステロールが使われてきた。横断的な解析では、低アルブミン血症(血清アルブミン3.5 g/dL未満)は地域在住高齢者の身体機能やADL障害に関連していた^{5,6)}。縦断的研究では、3.8 g/dL以下の低アルブミン血症が3年後の身体機能低下と関連していたが、7年後の身体機能低下とは関連をしていなかった。170 mg/dL未満の低コレステロール血症は死亡のリスクにはなっていたが、虚弱のリスクにはなっていなかった⁷⁾。コレステロールとアルブミンを組み合わせた縦断的な検討では、血清総コレステロールが5.2 mmol/L(201 mg/dL)以下で女性での虚弱危険因子となっていたが、血清アルブミンが4.3 g/dL以下での判定では男女とも虚弱危険因子とはならなかった。しかし、コレステロールとアルブミンの両方を組み合わせると、男性での虚弱危険因子となった⁸⁾。HDLコレステロールについても施設入所の高齢者の2年間の追跡で、身体機能低下の重要なリスクファクターになっていることが示されている⁹⁾。虚弱の栄養指標は、単独では虚弱を見逃してしまうこともある。いくつかの指標を組み合わせると判断することも重要であろう。

高齢者の虚弱についての大規模な縦断研究として、米国の40,657人の65~79歳の女性を対象とした3年間の追跡研究Women's Health Initiative Observational Study (WHI-OS)がある¹⁰⁾。WHI-OSではベースライン調査で16.3%が虚弱と判断され、さらに3年間の追跡で14.8%が新たに虚弱となった。虚弱の要因として生活習慣についても詳細な調査が行われているが、その結果では喫煙は虚弱の危険因子であるが、飲酒は少量ならばむしろ虚弱を予防するという結果が出ている。また、体重は低体重も肥満もともに正常体重に比べて虚弱の要因となっていた。

WHI-OSの報告では慢性疾患やうつ症状が虚弱の要因であり、一方、自覚的健康度が高いことは虚弱を防ぐ要因であった。虚弱との関連が認められた慢性疾患は、冠動脈疾患、脳血管障害、糖尿病、高血圧症、大腿骨頸部骨折、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、転倒、抑うつ、関節炎であった¹⁰⁾。さらに認知症や認知機能障害が、高齢者の虚弱と関連しているとする報告もある^{11,12)}。

慢性の炎症も虚弱の要因となる。IL-6が3.8 pg/mLを超える場合、CRPが2.65 mg/Lを超える場合には、3年間の追跡で有意に身体機能が低下していた⁷⁾。男性ホルモンの低下についても、高齢男性の虚弱の要因であるとの報告がある。米国での1,469名の65歳以上高齢男性の検討では、血清テストステロン濃度が低いほど虚弱の割合が多く、4年間の縦断的追跡でも血清テストステロン濃度が低いほど虚弱となるリスクが高かった¹³⁾。男性高齢者の場合、アンドロポーズと呼ばれる加齢に伴う男性ホルモンの低下が、虚弱の要因として重要である。副腎や性腺で産生される男性ホルモンの1種であるデヒドロエピアンドロステロン(DHEA)も低値であることが、高齢男女で虚弱と関連していた¹⁴⁾。これら様々な慢性疾患や病態が重積することで、さらに虚弱の危険が増加する。

社会経済的要因と虚弱

同じ定義を用いても、虚弱高齢者の分布には地域差があるといわれている。ヨーロッパ10カ国の調査では、65歳以上の虚弱高齢者の割合はスイスの5.8%からスペインの27.3%までと異なっており、同じヨーロッパでも概して南欧は北欧よりも虚弱な高齢者が多いと結果であった¹⁵⁾。この地域差には教育など社会経済的な要因が関与しているという。

米国のWHI-OSでは社会経済的要因として、世帯年収が高いほど、教育が長いほど、白人に比べむしろ黒人やアジア人でリスクが低かつ

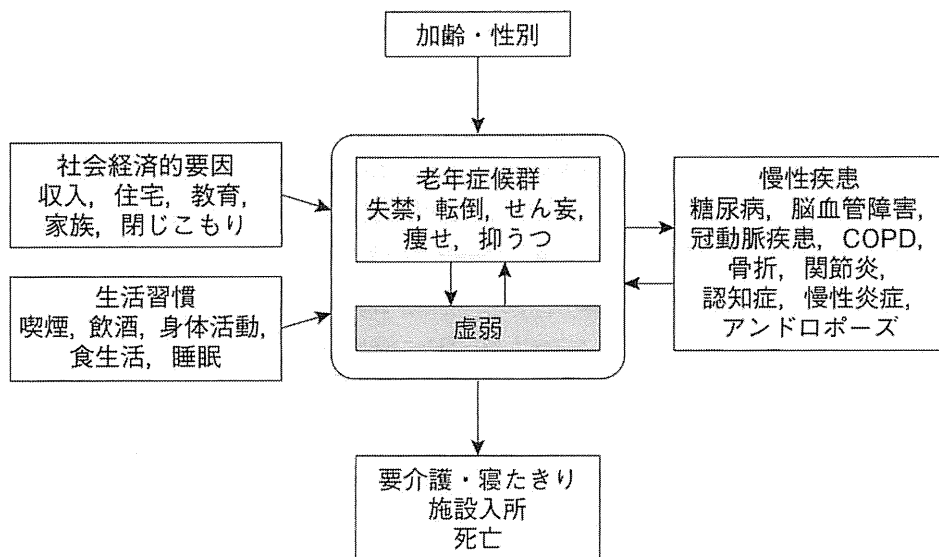


図1 高齢者の虚弱的要因と老年症候群

た¹⁰⁾。また、一人暮らしは虚弱となるリスクを20%下げていた。一人暮らしは、他の家族に依存できず自立が必要なためと思われる。一方で、3年間にわたる縦断的研究で、外出頻度が少ない、いわゆる「閉じこもり」で虚弱的の発生率が高かったとの報告もある¹⁶⁾。

虚弱的高齢者への介入研究

虚弱的の予防を目指しての介入研究が繰り返し行われている。1994年に『New England Journal of Medicine』に掲載された Fiatarone らによる虚弱的高齢者への古典的な介入研究がある¹⁷⁾。施設入所中の高齢者に対する無作為割付研究で、筋肉トレーニングにより虚弱的の有意な改善が認められている。運動による介入の虚弱的の改善効果については、ほかのよくデザインされた研究でも認められているが¹⁸⁾、否定的な結果の研究もある¹⁹⁾。

栄養での介入でも虚弱的の改善効果ははっきりしない。Fiatarone らによる無作為割付研究でのビタミン、ミネラル、蛋白質、脂質、炭水化物による栄養介入では、虚弱的の改善効果は認められなかった¹⁷⁾。必須アミノ酸であるバリン、ロイシン、イソロイシンの3つを分岐鎖アミノ酸という。筋肉を構成している必須アミノ酸の約35~40%がこの分岐鎖アミノ酸であり、筋肉

の蛋白質分解を抑制する。高齢者の筋量維持、増加にこの分岐鎖アミノ酸が有効だとする報告は多い²⁰⁾。しかし、実際に無作為割付研究を行っても、ロイシンをサプリメントとして3カ月間にわたって高齢男性に投与した介入試験では、筋肉量や筋力への影響はなかったという²¹⁾。このほかにもビタミンDの投与による栄養介入の研究などもあるが¹⁹⁾、虚弱的の改善効果は認められていない。

おわりに

老年症候群は高齢者に特有のあるいは高頻度にみられる諸症状であり、高齢者のADLやQOLを阻害する。老年症候群には、めまい、息切れ、痩せ、食欲不振、抑うつ、転倒、関節痛、視力低下、聴力低下などが含まれる。これらの老年症候群の諸症状は、高齢者虚弱的との関わりが強い。図1に示すように、加齢、性別は高齢者の虚弱的の要因として重要であるが、世帯年収や教育、住宅環境、家族構成などの社会経済的要因、喫煙、飲酒、身体活動、食生活などの生活習慣、糖尿病、脳血管障害、冠動脈疾患、COPD、骨折、関節炎、認知症、慢性炎症、アンドロポーズなどの慢性疾患や慢性的な病態が、高齢者の虚弱的を引き起こす。これらの要因は同時に様々な老年症候群の要因にもなる。さらに

高齢者の虚弱が老年症候群の原因ともなる。そして要介護や寝たきり、施設入所、最終的には死に至る。このように、多くの要因が重積し虚弱を引き起こす。運動介入や栄養の単独の介入では虚弱の予防は難しい。高齢者に対しての生活全般のサポートによる対応が望まれる。

文 献

- 1) Mor V et al : Functional transitions among the elderly : patterns, predictors, and related hospital use. *Am J Public Health* **84** : 1274-1280, 1994.
- 2) Puts MT et al : Sex differences in the risk of frailty for mortality independent of disability and chronic diseases. *J Am Geriatr Soc* **53** : 40-47, 2005.
- 3) Topinkova E : Aging, disability and frailty. *Ann Nutr Metab* **52**(Suppl 1) : 6-11, 2008.
- 4) Bartali B et al : Low nutrient intake is an essential component of frailty in older persons. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **61** : 589-593, 2006.
- 5) Salive ME et al : Serum albumin in older persons : relationship with age and health status. *J Clin Epidemiol* **45** : 213-221, 1992.
- 6) Jensen GL et al : Nutrition risk screening characteristics of rural older persons : relation to functional limitations and health care charges. *Am J Clin Nutr* **66** : 819-828, 1997.
- 7) Reuben DB et al : Peripheral blood markers of inflammation predict mortality and functional decline in high-functioning community-dwelling older persons. *J Am Geriatr Soc* **50** : 638-644, 2002.
- 8) Schalk BW et al : Lower levels of serum albumin and total cholesterol and future decline in functional performance in older persons : the Longitudinal Aging Study Amsterdam. *Age Ageing* **33** : 266-272, 2004.
- 9) Zuliani G et al : Low levels of high-density lipoprotein cholesterol are a marker of disability in the elderly. *Gerontology* **45** : 317-322, 1999.
- 10) Woods NF et al : Women's Health Initiative : Frailty : emergence and consequences in women aged 65 and older in the Women's Health Initiative Observational Study. *J Am Geriatr Soc* **53** : 1321-1330, 2005.
- 11) Black SA and Rush RD : Cognitive and functional decline in adults aged 75 and older. *J Am Geriatr Soc* **50** : 1978-1986, 2002.
- 12) Buchman AS et al : Frailty is associated with incident Alzheimer's disease and cognitive decline in the elderly. *Psychosom Med* **69** : 483-489, 2007.
- 13) Cawthon PM et al : Osteoporotic Fractures in Men (MrOS) Research Group : Sex hormones and frailty in older men : the osteoporotic fractures in men (MrOS) study. *J Clin Endocrinol Metab* **94** : 3806-3815, 2009.
- 14) Voznesensky M et al : The association between dehydroepiandrosterone and frailty in older men and women. *Age Ageing* **38** : 401-406, 2009.
- 15) Santos-Eggimann B et al : Prevalence of frailty in middle-aged and older community-dwelling Europeans living in 10 countries. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **64** : 675-681, 2009.
- 16) Xue QL et al : Life-space constriction, development of frailty, and the competing risk of mortality : the Women's Health And Aging Study I. *Am J Epidemiol* **167** : 240-248, 2008.
- 17) Fiatarone MA et al : Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. *N Engl J Med* **330** : 1769-1775, 1994.
- 18) Gill TM et al : A program to prevent functional decline in physically frail, elderly persons who live at home. *N Engl J Med* **347** : 1068-1074, 2002.
- 19) Latham NK et al : A randomized, controlled trial of quadriceps resistance exercise and vitamin D in frail older people : the Frailty Interventions Trial in Elderly Subjects (FITNESS). *J Am Geriatr Soc* **51** : 291-299, 2003.
- 20) Fujita S and Volpi E : Amino acids and muscle loss with aging. *J Nutr* **136**(Suppl) : 277S-280S, 2006.
- 21) Verhoeven S et al : Long-term leucine supplementation does not increase muscle mass or strength in healthy elderly men. *Am J Clin Nutr* **89** : 1468-1475, 2003.