

2012/7003B (1/2)

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

平成22年度～24年度 総合研究報告書

(1)

高齢者における加齢性筋肉減弱現象(サルコペニア)

に関する予防対策確立のための包括的研究

(H22-長寿-一般-002)

研究代表者 原田 敦

研究分担者 細井 孝之

下方 浩史

橋本 有弘

秋下 雅弘

(平成22年度)

江頭 正人

(平成23・24年度)

重本 和宏

金 憲経

鈴木 隆雄

島田 裕之

神崎 恒一

金 信敬

平成25年3月

目 次

I. 総合研究報告書	
高齢者における加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア） に関する予防対策確立のための包括的研究 原田 敦	1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	77
III. 研究成果の刊行物・別刷	91

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

総合研究報告書

高齢者における加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア）に関する
予防対策確立のための包括的研究

研究代表者 原田 敦

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 副院長

研究要旨

高齢者に頻発する加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア）は、筋量及び筋力の減少を特徴とし、生活機能低下や虚弱をもたらし、健康長寿を阻害する。その診断や予防の重要性は前より認識されていたが、大規模調査や予防に関する科学的対策確立は我が国では皆無であった。本研究では特に後期高齢者を対象として多領域研究課題を設定し、サルコペニア予防戦略に関する総合的研究を以下のように実施した。サルコペニアの定義や診断は、国際的合意のないまままで推移し、いまだに国際的な合意には至っていないが、2010年に European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) から欧州のコンセンサスレポートが発表され、本格的な合意への大きな一歩が踏み出された。そこで、我が国におけるサルコペニアへの理解を深める一助となるべく、本論文の監訳を Q&A を付けて形で企画した。

(1) サルコペニアに関する基礎的研究のうち、骨格筋幹細胞による筋再生のメカニズムの研究では、3年間で、加齢に伴うヒト筋幹細胞の性質変化を解明するため、複数の高齢者由来筋幹細胞を不死化に成功し、セルソーターによる細胞分画および細胞クローン化によって、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。橋本らが開発したヒト筋幹細胞不死化技術を適用し、後期高齢者の筋から分離した筋幹細胞不死化に成功し、成長因子要求性を解析し、後期高齢者由来不死化筋細胞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した。また、運動機能の低下した高齢患者から抽出した下肢筋を組織学的に検討し、著しい筋組織の脂肪化を認めた。加齢に伴うヒト筋幹細胞性質変化を解明するために、高齢者の下肢骨格筋由来不死化筋幹細胞と若齢者由来不死化筋細胞の遺伝子発現パターンの違いを検討した。遺伝子発現解析によって高齢者筋細胞で発現増大している分泌性因子を同定した。筋組織の加齢変化と筋幹細胞の加齢変化との関連性の解明が重要課題と考えられる。

また、診断に有効な特有のバイオマーカー探索の研究では、サルコペニアによる運動機能の低下-寝たきり-認知症の悪循環は、高齢者の要介護増加に繋がっていくことから、超高齢社会の現在の日本にとって社会的要請の強い重要課題である。従って、そのメカニズム解明は科学的根拠に基づいた早期予防、リハビリの有効性および効果判定、新た

な治療法の開発基盤のために必須である。本研究では、筋と運動神経の相互作用に着目し、筋量や筋力とは次元の異なる定量可能なサルコペニアのパラメーターの発見と、それを利用したサルコペニアの新たな診断・予防・治療法の開発を目的としている。初年度は、補体欠損マウスに抗 MuSK (muscle-specific kinase) 蛋白を免疫し筋萎縮発症に成功した。筋径不均一で炎症変化や筋線維顕著再生がなく、筋電図では運動神経終末縮小と AChR 凝集の顕著減少がみられ、顕著な運動神経終末 sprouting、シナプスの溝と襞の顕著減少、シナプス後膜伝導障害を示す横隔膜微小終板電位低下がみられ、シナプスからの放出 ACh の Quantal content は低下し、プレシナプスからの ACh 放出も障害されていた抗 MuSK (Muscle-specific kinase) 抗体で発症する重症筋無力症動物モデルで筋と運動神経の相互維持作用の破綻で発症する筋萎縮メカニズムを明らかにした、MuSK 支配下の重要維持機構(おそらく複数)がサルコペニア成因と強く関係していると予想している。従って、MuSK の機能を制御する分子の同定はサルコペニアの新たなバイオマーカーとして利用できる可能性があると考えている。次年度は、モデルマウスと電気生理学的手法にてシナプス伝導を顕著に改善することでモデルマウスに対して有効な薬物を見だし、さらに高齢者のリハビリテーションの促進補助薬 (アジュバント治療) の可能性を提唱した 3 年度は、*in vitro* のアッセイシステムと重症筋無力症のモデル動物由来の抗 MuSK 抗体を用いて、MuSK の活性化・機能抑制に関与する分子メカニズムを解析したので報告した。

(2) サルコペニアに関する疫学的調査に基づく診断方法の確立のための研究のうち、疫学的調査に基づく診断方法の確立のための研究では、加齢による筋量変化の実態解明及びサルコペニア基準値作成と診断法開発を行った。初年度は、40 歳以上の地域住民 2,419 名を対象に DXA による補正四肢筋量 (SMI) 判定で、男性 25%、女性 24% がサルコペニアに分類され、男性では加齢でその割合は増えるも女性は変化しなかった。簡易基準は、体力や身体計測から中程度の Physical performance に支障が生じる集団を捉えることを目指し、普通歩速度 1m/s 未満もしくは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満で脆弱高齢者と判断し、そのうち、BMI 18.5kg/m² 未満もしくは下腿囲 30cm 未満をサルコペニアとしたところ、65 歳以上の男女の 5% がサルコペニアとされた。次年度は、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 歳以上地域在住男性 1,783 名、女性 1,825 名での 10 年間縦断的データで網羅的検討を行った。DXA での筋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リスクになっており、男性はさらに喫煙と飲酒しないことがリスクになっていた。身体機能から診断されたサルコペニアでは、65 歳以上のみが対象で 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、エネルギー摂取不足が最も強いリスクで、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。3 年度は、65 歳以上の地域住民を対象

に、サルコペニアと6年後までのADL低下リスクについて検討した。サルコペニアは歩行速度が毎秒1 m未満あるいは握力が男性25kg未満、女性20kg未満で、DXAによる判定で四肢筋量の低下が認められるものとした。サルコペニアを有する高齢者は男性では4.6パーセント、女性では11.8パーセントであった。6年間の追跡でのADL低下のオッズ比が1.54 (95%CI:1.16-2.06, $p=0.003$) と有意に高くなっていた。男性の握力の基準値を30kg未満とした場合にはサルコペニアの有病率は、男性で13.5パーセント、女性で11.8パーセントであり、6年間の追跡でのADL低下のオッズ比は1.31 (95%CI:1.03-1.67, $p=0.028$)であった。

高齢者を対象としたサルコペニアの実態調査と予防対策の研究では、初年度は、近赤外分光法 (near infrared spectroscopy : NIRS) による身体組成計測の信頼性と妥当性を検討し、近赤外分光法測定値は高い再現性を有し、皮下脂肪厚と有意に関連した。NIRS計測値および身長と体重を加えた重回帰モデルでは、筋量の83%、四肢脂肪量の92%が説明可能であった。次年度は、地域在住高齢者5,111名を対象とした疫学調査から日本人高齢者におけるサルコペニア有症率を算出し、手段的ADLとの関連性を検討した。EWGSOPアルゴリズムに従うと地域在住高齢者におけるサルコペニア有症率は11.4%であった。この有症率は、握力と筋量のみで判定する別のアルゴリズムの結果と完全に一致した。サルコペニア有症率は性別、年齢階級別に比較するととりわけ男性、高齢になるほど高かった。また、サルコペニアは手段的ADLの低下と有意な関連性を示すことが明らかとなった。3年度は、NIRSを用いた四肢筋量推定法の妥当性を検討した。従属変数に二重エネルギーX線吸収法で測定した四肢筋量、独立変数に身長、体重、性別、NIRS測定値を投入した重回帰モデルを採用し、高齢者四肢筋量を推定する回帰式を作成した結果、上記回帰モデルによって四肢筋量の92%を説明できた。作成した四肢筋量推定式を大規模コホート調査結果に適用し、日本人高齢者4,806名のサルコペニア有症率を算出した。EWGSOPアルゴリズムに従うと地域におけるサルコペニア有症率は7.2%で、筋力と筋量のみで判定のアルゴリズムからは6.9%となり、333名がサルコペニアと判定され、全員がEWGSOPアルゴリズムでもサルコペニアと判定された。

(3) 高齢者専門病院受診高齢者におけるサルコペニアに関する臨床研究のうち、運動器疾患の研究では、サルコペニアが要介護の重要要因である転倒・骨折など的高齢者の運動器疾患発症にどのように関連するか、また、運動器疾患発症を減らすためにサルコペニアに対してどのような介入方法があるのかを明らかにすることには非常に重要な意義を持つ。そこで、DXAによるSMIを求めることができる骨粗鬆症データベースによる後ろ向き研究で検討した。初年度は、大腿骨近位部骨折357名にDXAで測定したSMIを日本人基準値によってサルコペニアの診断を行い、本骨折歴のない対照2155名と比較した結果、年齢、性で調整後も、本骨折患者がサルコペニアを有する率は47%と対照の32%と骨密度と独立して高かった。さらに上下肢に分けて検討すると下肢筋量のみが本骨折

と関連性を持っていた。このことから、サルコペニアは大腿骨近位部骨折の独立した危険因子で、特に下肢筋量が重要であることが示された。次年度は、当該データベースから転倒の関連を確認できた 431 名で解析し、SMI は転倒なし群は、転倒あり骨折あり群より低く、転倒あり骨折なし群と差なく、下肢 SMI も同様だった。サルコペニア該当者は、転倒なし群 18%、転倒あり骨折なし群 17%、転倒あり骨折あり群 45%と、転倒あり骨折あり群で有意に多く、サルコペニアは重度外傷を来す危険性の高い転倒と関連する可能性が示唆された。3年度は、既存の骨粗鬆症薬剤の筋量に対する効果を後ろ向きコホートにて検討し、SMI は、1年間薬剤なしで観察した患者群に比較してアルファカルシドール単独で治療した群では有意な変化が見出せなかったが、ビスホスホネート単独で治療した群では有意に増加していた。さらに、歩行機能に重要な下肢筋量の指標となる下肢 SMI も同様な結果であった。また、骨粗鬆症とサルコペニアの合併率は 45%と高いものであった。

栄養評価指標の研究では、初年度は、栄養評価で筋指標を得る手段として超音波画像装置を検討し、超小型携帯型超音波装置は携帯性に優れるが解像度特性とプローブのために皮膚、皮下組織、筋肉の画像には不適と思われた。リニア型プローブの超音波断層装置による情報は多く、栄養学指標としての皮膚、脂肪、筋肉の測定値を得るための有用になると期待された。次年度は、筋肉量を含めた体組成に影響する栄養因子のうち、ビタミン K と体組成との関連を動物モデル(ラット)で検討した結果、ビタミン K は骨量増加効果とともに体脂肪減少をもたらすと示唆され、血清中性脂肪の低下効果も観察され、筋肉量やそのパフォーマンスに影響する栄養因子としてビタミン K を検討していくべきである。3年度は、筋肉量を含めた体組成に影響する栄養因子として、ビタミン D に注目し、ビタミン D 摂取量と血清 25 水酸化ビタミン D (25OHD) との関連、血清 25OHD と血清 intact parathyroid hormone (iPTH) との関連、血清 25OHD と血清骨特異型アルカリフォスファターゼ (BAP) との関連を検討した。若年者の集団において、ビタミン D の摂取量が基準値を下回る者が多く、血清 25OHD の濃度からビタミン D 不足状態にある者が多かった。一方、ビタミン D 摂取が極めて少ない集団においても血清 25OHD はビタミン D 欠乏のレベルまでは低下せず、日光によるビタミン D の産生が寄与していることが示唆された。

液性因子の研究では、初年度は、中等度運動で筋アンドロゲン受容体のタンパクレベル発現は増加し、マウス筋細胞の C2C12 細胞でも電気刺激装置による周期的細胞収縮誘導によりアンドロゲン受容体のタンパクレベル発現は増加し、運動にともなうアンドロゲン受容体タンパクレベル発現上昇は AMPK とユビキチン/プロテオソーム経路により負に、MEK/ERK 経路により正に制御された。高齢女性患者 26 名で DXA による SMI と血清レプチン濃度に負の相関を認め、レプチンはサルコペニアマーカーとなる可能性が示唆された。次年度は、加齢に伴う骨格筋量減少が、メタボリックシンドロームリスク数、インスリン抵抗性にどう影響するのか検討した。対象は 65 歳以上で ADL の自立した高齢

女性 90 例。DEXA 法により 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リスク数との関連を検討した。腹部 CT もちいて内臓脂肪面積 (VFA) も測定した。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、リスク数を目的変数とした重回帰分析で、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、内臓脂肪と独立してリスク数増加と関連し、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、骨格筋量減少が関係していると示唆された。3 年度は、マウスならびに培養マウス C2C12 細胞を用いて、骨格筋における VEGF の分泌が、軽度運動負荷により増加、廃用性萎縮にともない低下することを明らかにした。骨格筋細胞における VEGF の発現は、グアニリルシクラーゼ-PGC-1 α の関与も明らかになった。骨格筋由来 VEGF が内皮細胞保護作用をもつマイオカインとして作用している可能性がある。

老年症候群 (特に転倒) の研究では、サルコペニアによる老年症候群で特に問題になるのが歩行障害・転倒であるので、既報の方法でサルコペニアを評価して転倒関連検査を行い、その関連や転倒そのものとの関係を解析する。初年度は、患者 31 名のうち筋量指標として頻用される DXA 法と生体電気インピーダンス法で測定をした 9 名で、DXA による lean body mass (g) とインピーダンス法で測定した四肢、体幹の筋量と $r > 0.9$ の高い相関が認められ、今後、インピーダンス法で筋量測定してサルコペニア/転倒関連検査を進めていく。2-3 年度は、杏林大学病院高齢診療科ならびにももの忘れセンターの通院中の 65 歳以上の患者のうち 137 名 (男性 52 名、女性 85 名、平均年齢 80.6 歳) を対象として、European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) が提唱するサルコペニア判定流れ図にしたがってサルコペニアの実態を調査した。その結果、男性では 52 名中 35 名 (67%) が、女性では 85 名中 42 名 (49%) がサルコペニアと判定された。これは同じ研究班内の報告である地域在住高齢者における数値 (10%前後) と比べてかなり高い値である。また、サルコペニアのアウトカムとして重要と位置付けられる転倒 (既往) と、サルコペニアもしくはその判定要因となっている身体機能 (歩行速度)、筋力 (握力)、筋肉量 (補正四肢筋量) との関係を調べたところ、筋力のみが有意差が認められ、筋肉量には全く差が認められなかった。その他の測定項目の結果を鑑みて、転倒の差と関連する要因は男女で大きく異なることが判明した。今後、同じコホートについて縦断調査を行い、サルコペニアの実態を明らかにしていく予定である。

(4) サルコペニアの予防方法の確立についての介入研究のうち、運動と栄養処方を用いた介入研究では、初年度の運動と栄養処方を用いた介入研究では、サルコペニア改善教室参加者希望者 186 名を RCT により 4 群に分け、運動群には週 2 回筋力強化運動を、栄養群には茶カテキン 540mg を 1 日 1 缶飲料する指導を 3 カ月間実施した結果、運動群のみならずカテキン群においても移動能力の有意な改善が観察され、運動指導、栄養指導ともにサルコペニア予防に有効であることが示唆された。次年度は、地域在住 75 歳以上

の後期サルコペニア高齢者の体力や身体組成の改善に及ぼす運動、栄養補充の効果を検証するために、介入参加者 155 名を RCT により運動+栄養群 38 名、運動群 39 名、栄養群 39 名、健康教育群 39 名の 4 群に分け、運動群には週 2 回、1 回当たり 60 分の筋力強化運動を、栄養群はロイシン 42.0%含有の必須アミノ酸 3g を 1 日 2 回（一日総補充量 6g）補充する指導を 3 か月間行った。その結果、運動あるいは栄養補充による単独介入は不十分であり、「運動+栄養補充」の複合的介入が有効であることが明らかになった。3 年度は、地域在住 75 歳以上の後期サルコペニア高齢者の体力や身体組成の改善を目的とした運動、栄養補充の介入参加者 155 人を対象に、介入終了 3 年後に追跡調査を実施した。その結果、追跡調査参加者は 73 人（47.1%）と低かった。介入前後、追跡における身体機能変化を検討したところ、筋力（握力、膝伸展力）の群間変化は有意ではなかった。しかし、通常歩行速度（F 値=3.230、P=0.030）、最大歩行速度（F 値=5.514、P=0.002）の群間変化は統計学的に有意であった。また、3 ヶ月運動・栄養介入によって、改善される身体機能の向上効果は 3 年後にはほぼ消失してしまう可能性が強く示唆された。

太極拳を用いた介入研究では、人間の老化に伴う重大な変化は、骨格筋量の進行的な低下、それも体力や機能の低下を導く大幅な低下である。高齢者における加齢性筋肉減弱現象（SP）予防のための運動介入はとても重要である。特に高齢者の特徴に合った筋力の維持・増強のための運動介入には、持続できで簡単な運動の開発が課題である。初年度は、地域在住の 70 歳以上の高齢者 60 人（運動介入群 30 人、対照群 30 人）を対象に太極拳的「気らく運動」を長期（3 年）実施する追跡調査の 1 年目として、運動介入前の身体機能、QOL、サルコペニア関連指標などの測定を行い、運動介入を実施した。2-3 年度では、長期の追跡調査を行い、両群の運動介入後の SP 関連指標、身体能力、転倒率、QOL などの測定を行い、運動介入前と比較を行った。2 年間以上の運動介入の結果、骨格筋量の維持、骨格筋力の維持・アップ、骨密度の増加や転倒率の減少、身体能力と QOL の維持・向上が可能であることを示した。高齢者の身体特徴に配慮した太極拳的「気らく運動」は、毎日楽しく続けられる適切な運動としてサルコペニア予防に効果的であることを示唆した。

以上のように、基礎的研究では、後期高齢者由来培養筋細胞は、筋細胞の加齢変化を解明するために有用で、同定した診断バイオマーカーの大規模臨床研究による評価を開始する客観的根拠を得た。疫学的調査に基づく研究では、高齢住民の DXA 判定によるサルコペニア頻度は男性 5%、女性 12%で、その指標、危険因子、予後を明らかにし、近赤外分光法判定による頻度は 7%で、筋量測定は簡便であり、要介護高齢者に有益と考えられた。高齢者専門病院における臨床研究では、サルコペニアは骨粗鬆症の 45%に合併し、ビスホスホネートが筋量増加効果を有する可能性を初めて報告し、栄養因子として脂溶性ビタミンの重要性が示唆され、病態に様々な液性因子が関与し、高齢外来患者のサルコペニア頻度は男性 67%、女性

49%と高く、性別考慮のわが国独自基準を模索すべきことが示された。予防のための介入研究では、地域住民にてサルコペニアの高齢地域女性に運動とアミノ酸やカテキン補充を併用した介入はサルコペニア改善に有用で、地域高齢者に対する2年の太極拳的「気らく運動」介入は筋力や歩行機能の改善と転倒減少をもたらした。

EWGSOP 論文は、サルコペニア：定義と診断に関する欧州関連学会のコンセンサス—高齢者のサルコペニアに関する欧州ワーキンググループの報告—の監訳という論文に、日本老年医学会理事長の総監修のもと、本研究班員が案を作成して日本老年医学会からアドバイザーと査読のご協力により完成し、日本老年医学会雑誌に掲載され、学会ホームページからダウンロードできる。

研究分担者

細井 孝之 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 臨床研究推進部長
下方 浩史 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 予防開発部長
橋本 有弘 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 再生再建医学研究部長
秋下 雅弘 東京大学医学部附属病院 老年病科 准教授（平成22・23年度）
江頭 正人 東京大学 特任准教授（平成24年度）
重本 和宏 独立行政法人 東京都健康長寿医療研究センター研究所
老年病研究チーム 研究部長
金 憲経 独立行政法人 東京都健康長寿医療研究センター研究所 研究副部長
鈴木 隆雄 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 研究所所長
島田 裕之 独立行政法人 国立長寿医療研究センター 自立支援システム開発室室長
神崎 恒一 杏林大学医学部 高齢医学 教授
金 信敬 健康科学大学 教授

高齢者に頻発する加齢性筋肉減弱現象（サルコペニア）は、筋量及び筋力の減少を特徴とし、生活機能低下や虚弱をもたらし、健康長寿を阻害する。その診断や予防の重要性は前より認識されていたが、大規模調査や予防に関する科学的対策確立は我が国では皆無であった。本研究では特に後期高齢者を対象として多領域研究課題を設定し、サルコペニア予防戦略に関する総合的研究を以下のように実施した。

また、サルコペニアの定義や診断は、国際的合意のないままで推移し、いまだに国際的な合意には至っていないが、2010年に European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) から欧州のコンセンサスレポートが発表され、本格的な合意への大きな一歩が踏み出された。そこで、我が国におけるサルコペニアへの理解を深める一助となるべく、本論文の監訳を Q&A を付けて形で企画した。

A. 研究目的

(1) サルコペニアに関する基礎的研究

1-1) 骨格筋幹細胞による筋再生のメカニズムとサルコペニアとの関連性

後期高齢者骨格筋由来の筋幹細胞の性質を、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、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。

1-2) サルコペニア診断に有効な特有のバイオマーカー探索

筋の維持には、神経筋シナプスでの ACh に

よる順行性シグナルが必要で、未知の逆行性シグナルを同定できれば、筋と運動神経細胞の相互維持のメカニズムとサルコペニアの因果関係を解明することが可能となる。この相互維持メカニズムを動物モデルで明らかにし、さらに、筋からの逆行性シグナルをバイオマーカーとして利用するための探索を行った。

サルコペニアの主因である「筋と運動神経の相互維持メカニズムの破綻」において神経筋シナプス筋側に発現のレセプター型チロシンキナーゼ MuSK が重要な役割を果たすことを抗 MuSK 抗体で発症の重症筋無力症疾患モデルマウスで証明。重症筋無力症疾患マウスは筋萎縮筋力低下を示し、神経筋シナプスでは AChR 凝集散乱やシナプス膜減少が認められ、ポストシナプス側変化だけでなく運動神経軸索の分岐伸展や神経終末縮退といったプレシナプス側変化も認めた。老化動物神経筋シナプスでも AChR 凝集断片化とシナプス全体構造単純化と見なされる形態変化が現れモデルマウス形態と共通点が多い。従って、MuSK 支配下にある重要維持機構破綻がサルコペニア成因にも関与の可能性が高いと考えられた。MuSK 活性化による AChR 凝集は運動神経終末分泌の agrin によって誘導される。Agrin はポストシナプス膜発現の LRP4 に結合し、細胞外領域複合体を形成し MuSK 活性化し、アダプタータンパク Dok-7 による細胞内刺激も MuSK 活性化に重要である。前述のように、サルコペニア成因に MuSK が強く関与することを考慮すると、機能制御分子同定はサルコペニアの新バイオマーカーとして利用できる可能性がある。本研究では、in vitro アッセイシステムと抗 MuSK 抗体を用いて、MuSK の活性

化機能抑制に関与する分子メカニズムを解析。

(2) サルコペニアに関する疫学的調査に基づく診断方法の確立のための研究

2-1) 地域在宅高齢者を対象とした長期縦断疫学データに基づくサルコペニア危険因子の分析と簡便な診断方法の確立

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、サルコペニア自体の簡便基準がない。臨床現場や住民調査などで使用できる簡便なサルコペニア基準が必要である。またサルコペニアを予防するためには、危険因子を明らかにしていく必要がある。さらにサルコペニアがADL低下を引き起こすかどうかを明らかにする縦断的検討も必要である。これらの検討を長期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。今年度は、65歳以上の地域住民を対象にサルコペニアと6年後までのADL低下リスクについて検討した。

2-2) 高齢者を対象としたサルコペニアの実態調査と予防対策の確立：介護高齢者スクリーニング機器で検討

サルコペニアは高齢期の身体的虚弱の主要原因で老年医学における重要課題である。サルコペニアは加齢による筋量減少と定義されており (Evans WJ, et al. 1993)、筋力や有酸素性能力の低下と関連し、サルコペニアは高齢期の身体虚弱発生の主要因となるため、早期発見と予防対策は老年医学における重要課題である (Morley, 2004)。これまで定義がいくつか提唱されてきたが、筋加齢変化の理解や筋量測定技術が進歩し

たにも関わらず、国際合意は得られていない。また、サルコペニアは疾患単位として認められていないのが現状で、有効な予防や治療法も確立されていない (Cruz AJ, et al. 2010)。わが国では筋量加齢変化に関する実証報告が少なく、サルコペニアに関する研究報告もわずかで、サルコペニア判定には筋量評価が必須となるが、要介護高齢者においては評価困難な場合も少なくない。過去に我々は近赤外分光法 (near infrared spectroscopy : NIRS) を用いた身体組成計測が信頼性と妥当性を兼ね備え、NIRS測定値に身長と体重を加えた回帰モデルによって、四肢筋量の83%が説明可能であると報告した。測定姿勢に制約がなく非侵襲的かつ短時間に計測可能なNIRSは要介護高齢者の簡便筋量評価ツールとして有用である。しかし、四肢筋量推定式一般化のため、対象者数を増やして新回帰モデルを再構築する必要があった。本研究ではより多数の地域在住高齢者を対象としてNIRS測定値を用いた四肢筋量の回帰モデルを再検討した。また、新たに作成した四肢筋量推定式を大規模コホートの調査結果に適用し、日本人高齢者のサルコペニア有症率を算出した。

(3) 高齢者専門病院受診高齢者におけるサルコペニアに関する臨床研究

3-1) 病院受診者における運動器疾患とサルコペニアの関連性

高齢社会で著増する後期高齢者の生活機能を減弱させる虚弱の臨床的表現型としてサルコペニアが特筆され、それと要介護の重要要因である高齢者運動器疾患との関連性を明らかにすることの意義は大きい。そこで、サルコペニアの診断を筋量で行い、それが大腿骨近位部骨折、転倒とどう関連す

るのかを検討した。さらに、サルコペニアにどのような介入法があるのかを明らかにすることにも大きな意義がある。本研究では、サルコペニアの基本となっている筋量に注目して、骨粗鬆症既存薬から活性型ビタミン D 製剤および強力な骨量増加作用を持つ骨吸収抑制剤のビスホスホネートについて、筋量に効果があるのかについて検討した。さらに、扱った臨床データベースにて骨粗鬆症とサルコペニアの合併状況を検討した。

3-2) 病院受診者における栄養評価指標とサルコペニアの関連性

筋量簡易評価は栄養サポートチーム (NST) の栄養評価指標として上腕周囲長と皮下脂肪厚からの筋量推定は日常的に行われ確立したものが再現性が高いとは言えず、皮膚皮下組織の加齢影響が測定値に関連する可能性がある。以上から、本研究では、筋肉厚測定を低侵襲的に可能とする超音波法に注目し、超小型携帯超音波測定機器のこの領域における可能性も検討した。ビタミン K は血液凝固システム以外にさまざまな生体機能に関わると注目されるが筋量等、体組成の検討はまだほとんどない。サルコペニアにおけるビタミン K 位置付けを明らかにするために動物モデルにおけるビタミン K の体組成に対する影響を検討した。また、ビタミン D は不足状態が転倒リスクを上昇させ。ビタミン D 介入が転倒頻度を低下させるなど、筋量やその機能に影響を与えると注目されている。ビタミン D は骨粗鬆症予防に重要であるのみならず、サルコペニア予防や転倒リスク軽減にも重要なビタミンと言え、ビタミン D の摂取量と充足

状況について検討した。

3-3) サルコペニアに関与する液性因子の研究

筋肉増強効果を有するアンドロゲン作用機構解明に関する基礎研究と液性因子を探索する研究を行った。アンドロゲンは骨格筋肥大作用をもつが骨格筋アンドロゲン受容体の発現調節機構は明らかではない。マウス骨格筋細胞 cell line である C2C12 細胞ならびにマウス骨格筋をもちいてアンドロゲン受容体の発現調節機構を検討した。また、サルコペニアのバイオマーカーは明らかでなく、高齢女性を対象に身体測定値、身体機能、骨格筋量、脂肪量、血中レプチン濃度について関連を横断解析した。加齢に伴って骨格筋量は減少し内臓脂肪量は増加するも、メタボリックシンドローム有病率は加齢に伴って上昇する。加齢に伴う内臓脂肪量増加が関連するとされているが、骨格筋量減少との関連は明らかでなく、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。さらに、運動は心血管疾患の予防効果を示す一方、身体活動の低下サルコペニアが死亡率や心血管疾患発症のリスクになる機序は明らかではなく、骨格筋由来の液性因子が内皮細胞保護効果をもつかどうかを検討した。

3-4) 外来通院高齢者における老年症候群（特に転倒）とサルコペニアに関する横断的/縦断的研究

高齢者の要介護招来の最大原因は虚弱、虚弱の最大要因はサルコペニアなので、サル

コペニアの病態を理解し、適切対策を講ずることは要介護抑止に重要である。サルコペニアが起こる結果、身体機能に問題が生じ、そのため老年症候群が発生する。その中で特に問題になるのが歩行障害・転倒である。サルコペニアの定義に関して2010年にEWGSOPからコンセンサスレポートが発表された。同報告ではサルコペニアを歩行速度、筋力、身体機能を指標として流れ図にしたがってスクリーニングするよう提唱している。なお、身体機能は通常歩行速度など、筋力は握力など、筋肉量はDXA、生体インピーダンス法などを用いて計測するよう紹介している。また、サルコペニアの結果、日常生活活動度（基本的ADL、手段的ADL）、生活の質（QOL）、代謝・炎症マーカー、転倒、施設や病院への入所・入院、社会的支援の必要性、死亡率などをアウトカムとすることが推奨されている。本研究では杏林大学病院もの忘れセンターに通院中の患者を対象にEWGSOPの基準に照らした場合、サルコペニアと判定される対象者がどのくらいいるのか、また、転倒をアウトカムとした場合、転倒とサルコペニアもしくは転倒と歩行速度、筋力、補正四肢筋量がどのような関係にあるかを調べることを目的とした。2年目までは横断的に、3年目には縦断的に解析する。

(4) サルコペニアの予防方法の確立についての介入研究

4-1) 地域在宅高齢者、特に後期高齢者におけるサルコペニア予防のための運動と栄養処方を用いた無作為割付け比較介入試験の実施

地域在宅サルコペニア高齢者を対象に実施した3ヶ月間の運動指導、栄養補充の介入

終了、3年後の追跡調査を行い、介入の長期効果を検証する。

4-2) 太極拳のサルコペニア予防効果に関する無作為割付け比較介入試験の実施

サルコペニアは、加齢による進行性及び全身性の骨格筋量及び骨格筋力の低下を特徴とする症候群と定義され、生活体力、ADL、QOLの低下に関連し、要介護状態に陥る要因の一つと考えられる。介護予防事業における運動器の機能向上プログラムは、サルコペニア予防の介入方法の一つであると考えている。日本では運動介入によるサルコペニアの予防に関する研究は始まったばかりである。特に、運動する対象が高齢者であるため、高齢者の身体特徴を十分に考慮した運動内容を考えることが重要である。つまり、サルコペニアの指標である骨格筋量と骨格筋力の維持・増強効果があつて、運動の強度や運動のやり易さが高齢者に適合する介入方法が求められている。近年、太極拳などが高齢者の身体能力や転倒予防に効果的であるとの研究があり、高齢者に適合である運動としても知られてある。そこで、本研究は、地域在住高齢者に太極拳の特徴と気功や経絡疎通を取り入れた生活型運動「気らく運動」を実施することで、サルコペニアの予防効果を検討する。

B. 方法

(1) サルコペニアに関する基礎的研究

1-1) 骨格筋幹細胞による筋再生のメカニズムとサルコペニアとの関連性

①ヒト筋幹細胞の分離と初代培養

国立長寿医療研究センターの手術で同意

が得られた場合に筋 1 g 摘出し、タンパク質分解酵素処理にて筋幹細胞を分離し、骨格筋 30-40mg に由来する細胞を I 型コラーゲン塗布プラスチック培養皿に播き、培養液 Primary myocyte growth medium (pmGM) にて静置培養。筋分化誘導には 1×10^5 細胞を 35-mm 培養皿に播き 2 日後に培地を pmDM に交換し 6-7 日間培養。

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。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。細胞クローニングは、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。

④ 不死化ヒト筋細胞の培養

不死化ヒト筋細胞は、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°C 、10% CO_2 の気相下で静置培養した。培養液は、Primary myocyte growth medium (pmGM) [20% FCS, 2% Ultrosor G (Biosepra, PALL) in high-glucose (4.5 g/ml) DMEM] を用いた。筋分化を誘導する場合は、 1×10^5 細胞を 35-mm 培養皿に播き、2 日後に培地を Primary myocyte differentiation

medium (pmDM) [2% FCS, $5 \mu\text{g/ml}$ holo-transferrin (bovine), $10 \mu\text{g/ml}$ insulin, 10 nM selenite in hDMEM] に交換し、4-6 日間培養した。定法にしたがって細胞抽出液を調製し、免疫ブロット解析をおこない、筋分化マーカー-myosine heavy chain (MyHC) を検出した。

⑤ 不死化ヒト筋細胞の遺伝子発現解析

不死化ヒト筋細胞から RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。この RNA を鋳型として cDNA を合成した。RT-profiler PCR array-Common cytokines (QIAGEN) を用いて分泌性因子の遺伝子発現を、リアルタイム PCR 法によって解析した。発現量は 23 歳女性から分離樹立した不死化筋細胞 Hu37KDpp を基準として変形性膝比較検討した。

⑥ ヒト筋組織の組織病理学的解析

国立長寿医療センターで整形外科手術を受けられ、本人同意が可能な方を対象とした。なお、感染症罹患および主治医が不相当と認めた者は対象から除外した。同意取得者について、麻酔下での手術時に切開部近傍骨格筋を 0.1-0.4 g 程度摘出し、急速凍結後、 -80°C 超低温槽に保存した。クリオスタットを用いて薄切し、4%パラフォルムアルデヒドで固定後、ヘマトキシリン-エオシン染色を行った。

1-2) サルコペニア診断に有効な特有のバイオマーカー探索

①リコンビナント蛋白の作成と免疫

筋萎縮を高率発症する補体欠損マウスを 2 系統入手し、補体欠損マウス (A/WySnJ) メスに MuSK 蛋白を免疫し抗 MuSK 抗体で動物発症モデルを作成。抗原はラット筋細胞

mRNA から細胞外ドメインの cDNA を PCR で増幅し発現ベクター内で His-tag と付加し 293T 細胞にトランスフェクションしてコンビナント蛋白を発現作成。リコンビナント蛋白は His-tag 結合レジンで精製。リコンビナント蛋白を補体欠損マウスあたり 20 μ g をアジュバントと免疫し体重を記録して発症モニター。対照群として PBS とアジュバントを同様に免疫して実験を行った。3, 4-DAP の効果判定は体重 20g の発症マウスに 1.6mg/ml の 3, 4-DAP を 100ml 腹腔へ注射し 20 分後に筋電図測定しサンプルを含むタイロッド溶液に 3, 4-DAP を 100 μ M になるように加え, 20 分後に微小電極法で RMP, MEPPs, EPPs を測定して QC を算出

②発症した筋萎縮モデルマウスの病態解析

前肢筋力を室町機械 MK-380M で測定。筋電図を座骨神経に 3Hz 反復電気刺激を加え腓腹筋中央部で測定。筋、シナプスの病理学的形態変化を HE 染色やシナプス免疫染色で解析。アセチルコリン受容体で AChR を染色し、一次抗体及び二次抗体で蛍光染色し、共焦点顕微鏡で神経筋シナプス形態変化を観察記録。電子顕微鏡で神経筋シナプスを観察するため透過型電子顕微鏡の観察用切片を作成。MuSK 抗体価を ELISA 法で HRP 標識抗マウス IgG 抗体を使って測定。MuSK 抗体の機能を、MuSK 蛋白を免疫して発症したマウス血清中抗 MuSK 抗体がどの機序で神経筋シナプス AChR 凝集を抑制するか培養 C2C12 筋細胞を使って検討。C2C12 細胞は筋芽細胞から筋管細胞へ分化誘導できリコンビナント agrin を培養細胞に添加すると MuSK のタイロシンリン酸化誘導とともに細胞表面 AChR 凝集を誘導。このシステムにより agrin-Lrp4-MuSK を介した AChR 凝集シグ

ナル伝達解析を行える。agrin と抗 MuSK 抗体を C2C12 に同時添加して AChR 凝集抑制に伴う MuSK 活性化シグナル変化を解析。血清 MuSK 抗体の IgG サブクラスを精製して解析。さらに精製 MuSK 抗体 IgG をパブリン処理で Fab 分画を精製して抑制実験に用いた。MuSK リン酸化は agrin を分化した C2C12 培養筋細胞に添加し作成したライゼートに抗リン酸化抗体によるウエスタン解析により検討。C2C12 培養筋細胞のライゼートに MuSK 抗で免疫沈降サンプルを泳動し PVDF メンブレンに転写。二次抗体は抗マウス peroxidase で発色した。ウサギの MuSK 抗体で MuSK 蛋白を検出。微小電極法による膜電位を横隔膜標本を作製し簡便型ガラス管微小電極法による膜電位を測定。静止膜電位 (RMP) と微小終板電位 (mepp) を測定後、骨格筋特異的 Na チャンネル阻害剤である α -conotoxin を作用させ、動きを止めた状態で電気神経刺激による終板電位を測定。各電位は RMP による補正と non-linear summation の補正を行った後に直接法による Quantal content (QC) を算出。

③老化マウスの神経筋シナプスの形態

生後 4 ヶ月の若年および 28 ヶ月の老齢マウスの神経筋シナプスの形態を共焦点顕微鏡で解析した。方法は 2-(3) と同じ方法で行った。

④リコンビナントタンパク作製

マウス脊髄由来 mRNA から神経型 agrin cDNA 配列を PCR クローニングし、発現ベクターに挿入して COS-7 細胞にトランスフェクションした。数日後に細胞培養メディウムを回収し、Sephadex G-200 カラムを用いてリコンビナント agrin を精製。

⑤ 抗 MuSK 抗体調製

MuSK タンパク免疫で重症筋無力症発症したウサギから血清回収し、ProteinG カラムで二価 IgG 抗体を精製、抗 MuSK IgG 抗体は MuSK 活性化作用を有するため、IgG 抗体をパパイン処理し、ProteinA カラムで MuSK 活性化能を有さない一価 Fab 抗体を作製。また、正常ウサギ血清からも IgG 画分と Fab 断片を精製、抗 MuSK 抗体に対するコントロールとした。

⑥ In vitro での AChR 凝集実験

C2C12 筋芽細胞を播種しコンフルエント後に培養メディアウムを 2.5% horse serum/DMEM に交換して筋管細胞形成を誘導し、分化誘導 3 日後、リコンビナント agrin による刺激 30 分前に抗 MuSK IgG 抗体または Fab 抗体 を培養系に添加し、AChR 凝集形成に及ぼす影響を検討。Agrin 刺激 15 時間後に Alexa594 標識 α -bungarotoxin を添加して AChR 凝集を染色し、固定後に蛍光顕微鏡下で観察。また、agrin 刺激 11 時間後に抗 MuSK Fab 抗体を添加し、すでに形成された AChR 凝集に及ぼす影響を検討。

⑦ 免疫沈降実験

分化誘導 3 日後、agrin 刺激 30 分前に抗 MuSK IgG 抗体または Fab 抗体を培養系に添加。Agrin 刺激 30 分後に細胞のライセートを回収し、抗 MuSK 抗体を用いた免疫沈降を行った。MuSK リン酸化は抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロットで解析。また、agrin 刺激 2 時間後と 8 時間後にもライセート回収し抗 Dok-7 抗体による免疫沈降も行い、Dok-7 リン酸化とタンパク発現レベルを解析。

(2) サルコペニアに関する疫学的調査に基づく診断方法の確立のための研究

2-1) 地域在宅高齢者を対象とした長期縦断疫学データに基づくサルコペニア危険因子の分析と簡便な診断方法の確立

初年度の対象は、「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 5 次調査参加者 40-88 歳までの地域在住中高年者 2,419 名 (男性 1,200 名、女性 1,219 名) を対象とした。愛知県大府市および東浦町の地域住民からの無作為抽出者である。測定項目は、身体計測値：上腕囲、臍位腹囲、大腿囲、下腿囲。体力：普通歩速度、速歩速度、上体起こし、膝伸展筋力、脚伸展パワー、握力(利き手)。Physical performance：SF36 の physical performance 項目。軽度：体を前に曲げる、百メートル以上歩く、中等度：適度の運動、階段を 1 階上まで登る、数百メートル以上歩く、高度：階段を数階上まで登る、激しい運動、少し重い物を運ぶ、1 キロ以上歩く。サルコペニア指標：Dual-energy X-ray Absorptiometry (DXA) によって四肢筋量測定し、四肢筋量を身長²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 Sanada ら (2010) による YAM (Young Adult Mean: 18-40 歳) -2SD: 男性 6.87 kg/m²、女性 5.46kg/m² を用いた。次年度の対象は、第 1 次から第 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) で、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。測定項目は、身体計測値：BMI、下腿囲。体力：普通歩速度、握力(利き手)。栄養素摂取量：写真撮影併用の秤量法による 3 日間食事調査による エネルギー摂取量、たん

ばく質、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。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。生活習慣調査：飲酒習慣、喫煙。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。サルコペニア指標。初年度成果に基づき、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。解析方法は、10年間縦断的データ男女別に年齢調整し、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。

3年目の対象は、第4次調査から第7次調査までに参加した65歳以上の地域在住高齢者 1,413 人（男性 694 人、女性 719 人）で、平均年齢は、男性 71.3 歳、女性 71.6 歳、延べ 3,561 回の測定結果を用いた。測定項目は、体力：普通歩速度（m/sec）、握力（kg）利き手。ADL 低下：SF36 Physical Performance Score について調査し、要支援・要介護となる場合に相当するが 75 点以下を ADL 低下ありとした。サルコペニア指標は EWGSOP に基づいて行った。ただし、一般住民に適応できるように歩行速度 1m/秒 未満、握力男性 25kg 未満、女性 20kg 未満を基準とした。また、握力男性基準値を 30kg とした検討も行った。解析方法は、6年間縦断データによる一般化推定方程式（GEE）での性別・年齢調整済みリスクを推定した。

リスクはサルコペニア群と非サルコペニア群で比較し、オッズ比を求めた。統計学的検討は SAS（Ver. 9.3）を用いた。

2-2) 高齢者を対象としたサルコペニアの実態調査と予防対策の確立：介護高齢者スクリーニング機器で検討

初年度は、要介護高齢者の筋量測定のた NIRS（BFT-3000）を用い、再現性検討：健康若年者 9 名を対象に NIRS 再現性を検討。前腕前面と大腿前面に近赤外光を当て吸光度を 1 日間隔で 2 回測定し、級内相関係数を算出。筋厚との関係：地域在住高齢者 90 名を対象に前腕前面および大腿前面の NIRS 測定値（OD1[脂肪組織への高透過性]と OD2[水への高透過性]）と超音波による脂肪および筋厚との相関関係を検討。四肢筋量・脂肪量の推定：入院患者 11 名を対象とし DXA 法による四肢筋量指標（SMI）および脂肪量と NIRS 測定値との関係を調べ、重回帰分析を用いて筋量および脂肪量の推定式を算出。2年度は、大府市在住の 65 歳以上高齢者で調査参加した 5,111 名に身体組成、筋力、歩行機能を評価し、最終的に 4,590 名（男性 2,297 名、女性 2,293 名）のデータからサルコペニア有症率を算出。サルコペニア判定には EWGSOP で提唱されたアルゴリズムを用いた。このアルゴリズムでは歩行速度（0.8 m/s）以外のカットオフ明記がないため、筋量（SMI）と握力については、日本人若年者参照値は真田ら（2010）の報告と新・日本人の体力標準値 2000 から算出。また、サルコペニア判定のもう 1 つの方法として握力と筋量のみを用いた独自アルゴリズムを作成し、EWGSOP 結果と比較した。身体組成は多周波体組成計（MC-980A、

TANITA 社) にて四肢筋量 SMI (kg/m²) によって評価。握力は利き手最大値を採用。歩行速度は加速減速路を設けた 7.5m 歩行路を通常速度の平均速度を算出。手段的 ADL は基本チェックリストの 3 項目 (公共交通機関利用、日用品買い物、預貯金管理) で評価し、1 項目以上で “いいえ” と回答した場合を “手段的 ADL 低下あり” と判定。多重ロジスティック回帰分析を用いて手段的 ADL 低下とサルコペニアの関連性を検討した。最終年度には、四肢筋量の推定式: 筋量評価には BFT-3000 (Kett 社製) を用い、地域在住高齢者 225 名 (平均 72.9 歳、男性 124 名、女性 101 名) を対象に DXA により測定された四肢筋量と NIRS 測定値 (前腕前面の OD1 値)、身長、体重、性別、年齢との関係を調べ、重回帰分析を用いて四肢筋量を推定する回帰式を作成。サルコペニアの有症率: 2011 年 8 月～2012 年 2 月に実施した大規模コホートの参加者 5,104 名のうち、握力と歩行速度、NIRS 測定が実施できた 4,806 名 (平均 72.1 歳、男性 2,338 名、女性 2,468 名) を対象とした。四肢筋量は作成推定式と NIRS 測定値を用いて算出し SMI に変換。サルコペニア判定は EWGSOP アルゴリズムを用いた。このアルゴリズムでは筋力 (握力) と筋量 (SMI) 低下のカットオフ値が明記されていない。そこで、OSHPE 参加者から以下の者 (脳卒中、パーキンソン病、アルツハイマー病、うつ病の既往歴がある者、基本的日常生活動作が非自立あるいは要介護認定者、歩行速度 < 1.0 m/s、MMSE < 21 点、握力と歩行速度、NIRS 測定が不可能だった者) を除いた 3,807 名を normative sample として抽出し、握力と SMI の下位 20% をカットオフ値として、サ

ルコペニア有症率を算出。サルコペニア判定法として筋力と筋量のみで判定する別のアルゴリズムを適用し同様のカットオフ値でサルコペニア有症率を算出。

(3) 高齢者専門病院受診高齢者におけるサルコペニアに関する臨床研究

3-1) 病院受診者における運動器疾患とサルコペニアの関連性

研究デザイン: 国立長寿医療研究センターにて 2002 年以降に骨粗鬆症の診断のために、二重エネルギーエックス線吸収測定法 (Dual energy x-ray absorptiometry: DXA) で全身骨密度を含む骨量評価を実施した 2,868 名のデータベースによる後ろ向き研究。この集団は、全身骨密度測定時に全身体組成 (骨量、脂肪量、lean mass) が得られ、四肢 lean mass から補正四肢筋量 Skeletal Muscle Index (SMI) = (上肢筋量 + 下肢筋量) / 身長² を求めることができる者である。

初年度は、大腿骨近位部骨折との関連を検討するため、国立長寿医療研究センターで治療した 55 才以上の大腿骨近位部骨折患者 357 名を対象とし、対照には上記骨粗鬆症データベースのうち大腿骨近位部骨折歴のある者を除外した 55 才以上の 2,155 名を使用した。DXA は術前、入院後 2 日以内に行われており、SMI を求めた。また、上肢筋量を身長² で補正した補正上肢筋量と下肢筋量を身長² で補正した補正下肢筋量も求め、解析に使用した。サルコペニア診断は筋量により判定し、カットオフ値は日本人 YAM-2 SD、すなわち、男性で 6.87 kg/m²、女性で 5.46 kg/m² を使用した。

次年度は、転倒との関連を検討するため、

上記データベースから転倒と外傷を確認できた患者群を抽出し、転倒及び外傷と筋量と関係を補正四肢筋量などで解析した。

3年度は、既存骨粗鬆症薬の筋量効果を検討するため、後ろ向きコホートで薬剤使用群と非使用群で比較した。対象は、2004年10月から2011年5月までにDXAにより骨密度と体組成を測定した延べ患者数は5,999名、一方、骨粗鬆症薬処方された延べ患者数は33,734名で、そのうち1年間のビスホスホネート単独投与とDXA評価がなされた患者は199名で、ビスホスホネート(A)群とした。また、1年間のアルファカルシドール単独投与とDXA評価がなされた患者は156名で、アルファカルシドール(D)群とした。一方、1年間骨粗鬆症薬なしでDXA評価で経過観察がされた患者は233名で対照(C)群とした。主要アウトカムは骨格筋量指標SMIでC群と比較した。また、骨粗鬆症とサルコペニアの合併率は、対象は、上記データベースからの患者2,773名とし、サルコペニア判定はSMIカットオフ値により、骨粗鬆症は大腿骨頸部骨密度が若年成人平均の70%未満を基準値として診断した。

3-2) 病院受診者における栄養評価指標とサルコペニアの関連性

初年度は一般診療で用いられている超音波断層撮影装置(Philips社製)と超小型携帯超音波測定機器(GE社Vsan)の筋肉厚、皮下脂肪厚、皮膚厚の測定における有用性について比較検討。

次年度は23匹のラットを対照群、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、PK群にビタミンK1600mg/kg、

MK-4群にビタミンK2(menatetrenone)600mg/kgの割合で含む食餌を与え、3か月後に血液生化学的パラメーター、骨密度、骨強度指標、体組成(内臓脂肪と皮下脂肪)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。

3年度は、健常若年者集団(175名)についてビタミンD摂取量を3日間の食事記録から算定した。血清25水酸化ビタミンD(25OHD)濃度、血清副甲状腺ホルモン(iPTH)、骨特異的アルカリフォスファターゼ(BAP)を測定し、ビタミンD摂取量との関連や、それぞれの想定値との関連を検討した。なお、血清25水酸化ビタミンD濃度はRIA法にて測定した。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。

3-3) サルコペニアに関与する液性因子の研究

初年度は、アンドロゲン筋肉増強作用に関する基礎研究として、マウス筋芽細胞C2C12細胞に電気刺激装置で周期的細胞収縮を誘導し疑似運動刺激とし個体レベル検討としてC57/BLマウスにトレッドミル装置で運動負荷しアンドロゲン受容体発現はタンパクレベルをウエスタン解析、mRNAレベルを定量的リアルタイムRT-PCR法で施行。サルコペニアの液性因子を探索する臨床研究として、都内診療所老人健診を受診したADLが保たれている65歳以上女性26例を対象に身体計測(身長、体重、ウエスト周囲径、ヒップ周囲径、上腕周囲径、上腕三頭筋皮下脂肪厚、大腿周囲径、下腿周囲径、BMI)、

身体機能測定（握力、開眼片足立ち、Up and go test、歩行速度、脚伸展筋力）と DXA 法にて四肢筋量指標ならびに体幹脂肪量指標を測定。血中レプチン濃度は空腹時採血にて ELISA 法にて測定。

データ解析として、身体測定値、身体機能測定値、四肢筋量指標、体幹部脂肪量指標、血中レプチン濃度をもちいて単相関分析と血中レプチン濃度について他因子を説明変数とした重回帰分析を行った。

次年度は、メタボリックシンドロームリスクとの関連検討のため、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 例を対象に、悪性腫瘍治療中、消化管手術既往、内分泌疾患治療中、心不全・腎不全、糖尿病治療薬、 β 遮断薬、 β 刺激薬、 α 遮断薬内服中を除外した。平均年齢は 75 ± 6 歳であった。DXA 法にて四肢筋量指標 (SMI) を用いた。内臓脂肪量評価は臍レベル腹部 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リスク評価としては IDF 基準を用い、腹囲以外のリスク数 (0-4 個) を求めた。2 変量相関関係には Pearson's correlation coefficient、多変量解析には重回帰分析を用いた。

3 年度は、培養骨格筋細胞 (C2C12 細胞) と大動脈内皮細胞 (HAEC) の共培養をおこない、血清除去にともなう HAEC のアポトーシスに対する共培養の抑制効果を検討した。また、8 週齢の C57BL/6L マウスに対し 4 週間の中程度のトレッドミル負荷をおこない、ヒラメ筋における VEGF を含む増殖因子の遺伝子発現を RT-PCR にて検討した。また、マウス血中ならびに培養上清中の VEGF 濃度は ELISA にて検討した。

3-4) 外来通院高齢者における老年症候群（特に転倒）とサルコペニアに関する横断的/縦断的研究

対象は杏林大学病院高齢診療科ならびにも忘れセンターの通院中の 65 歳以上の患者 137 名 (男性 52 名、女性 85 名、68~93 歳：平均年齢 80.6 歳)。測定項目は、身体測定：身長、体重、BMI、筋肉量：インピーダンス法 (タニタ体組成計 BC-118E 使用して四肢別に測定)、身体機能：歩行速度、3m Up&Go テスト (TUG)、タンデム歩行、ファンクショナルリーチ、筋力：握力、老年症候群：幻覚、妄想、不眠、めまい、麻痺、痺れ、歩行障害、つまずき、頻尿、尿失禁、便秘、食欲低下、体重減少の 13 項目について有無を調査、過去 1 年間の転倒歴であった。以上の測定値をもとに、EWGSOP のサルコペニア診断フローチャートにしたがってサルコペニア患者を識別し、過去 1 年間の転倒歴と筋力 (握力)、身体機能 (歩行速度)、筋肉量 (身長補正した四肢筋肉量) との関係 (t 検定と多重ロジスティック解析) を解析した。最初の 2 年間は上記項目をできるだけ多くの患者に行い、各指標の関係を統計的に解析する。3 年目に同一患者に再度同じ検査を行い、各指標の経年変化を調査する。

(4) サルコペニアの予防方法の確立についての介入研究

4-1) 地域在宅高齢者、特に後期高齢者におけるサルコペニア予防のための運動と栄養処方を用いた無作為割付け比較介入試験の実施

初年度は、対象として、包括的健康診断した 72 歳以上高齢女性 974 名にインピーダン