

ス法による筋量減少と筋力あるいは歩行機能の低下の選定基準を当てはめてサルコペニアと判定された 351 名のうち、サルコペニア改善教室参加希望者 186 名を RCT より 4 群に分け、「運動+栄養」に 47 名、運動に 46 名、栄養に 47 名、対照に 46 名割り付けた。調査方法として、次ぎの調査項目を介入前後に 2 回行った。面接調査（面接法で健康度自己評価、痛み、転倒、TMIG 指標、基本的な生活機能、尿失禁、既往歴、生活習慣等）。身体組成（インピーダンス法で体脂肪率、脂肪量、筋量）。体力測定（握力、膝伸展力、通常歩行速度、最大歩行速度、Timed Up & Go テスト、開眼片足立ち）。介入として、1. 運動指導（運動群に週 2 回、1 回 60 分の筋力強化運動を 3 カ月）。2. 栄養指導（栄養群に茶カテキン 540mg を 1 日 1 缶飲料する指導を 3 カ月。飲んだ時間と量を「カテキン酸摂取記録カード」記録し、カテキン摂取 compliance を徹底管理した。次年度は、対象として、地域在住 75 歳以上の高齢者 1,377 名を調査し、筋肉量の減少、筋力低下、BMI 減少、歩行機能の低下者をサルコペニアと操作的に定義し、該当者 304 名（22.1%）を選定した。304 名を対象にサルコペニア改善教室参加者を募集したところ、155 名が参加を希望し、149 名が不参加であった。参加希望者 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 群に分けた。運動群には週 2 回、1 回当たり 60 分の筋力強化運動を 3 か月間指導した。栄養群にはロイシン 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。3 年度は、次年度の試験は、2009 年 4

月～7月に第 1 次指導、8月～10月に crossover 指導を行った介入が終了して 3 年後に該当する 2012 年 10 月に追跡調査を実施し、73 人（47.1%）が参加した。調査項目は、聞き取り調査、体力測定、身体組成の計測であった。

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：

対象者は、山梨県在住の 70 歳以上の高齢者で本研究参加に同意した女性 60 人（運動介入群 30 人、79.4 歳；対照群 30 人、74.5 歳）。両群に対して運動介入後二年目の測定を行い、運動介入前と比較した。測定項目は、身体形態（身長、体重、骨格筋量、体脂肪量、骨密度）、身体能力（握力、膝伸展力、股屈曲力、10m 歩行速度、体前屈、開眼片足立ち時間）、転倒暦と QOL（SF36）のスコアなど。骨格筋量や骨密度の測定は DXA 法、膝伸展力と股屈曲力の測定は筋力計（ミュータス F-1）を使用した。運動実施においては、運動介入群には指導員の下で週 1 回、1 回 60 分の太極拳的「気らく運動」を行った。また、運動群介入群には、毎日自宅で自主的に気らく運動を 30 分以上実施させた。長期介入運動として「気らく運動」の特徴は、①日常生活に密着した簡単で、場所と時間帯にとらわれず家でも一人で気軽にでき、高齢者に適合した毎日楽しく続けられる生活型運動である。②従来の高い負荷の運動による筋量の増加や筋力アップの発想に対して、日常生活の経絡疎通運動で筋肉の質を高めることによって、無理のない低中負荷でも骨格筋量や骨格筋力の維持・アップが可能な全身運動である。また、運動介入群には「気らく運動」貯金表を配布し、

毎日運動時間をチェックして月末に提出させた。対照群には、定期的（年2回）に健康知識などのミニ講座を提供した。

（倫理面への配慮）

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：ヒト筋組織採取に関しては、国立長寿医療研究センター倫理委員会および大分大学 IRB での研究実施の承認を受けた上で実施し、患者に対しては、本研究への参加について文書を用いて説明し、患者本人より文書にて同意を得た。

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：動物実験計画は実験施設（東京都健康長寿医療センター研究所）で承認された方法に従って行った。

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：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。

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：本研究は、国立長寿医療研究センター倫理・利益相反審査の承認を得て実施し、本研究への参加について文書を用いて説明し、対象者本人から書面の同意を得た。

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：大腿骨近位部骨折に関

しては、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、本研究への参加について文書を用いて説明し、対象者本人から書面の同意を得た。対照および薬剤効果等の他の検討に関しては、過去の診療データベースと診療録調査によっており、倫理面の問題は生じないと考えられた。

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：今回の検討は患者を対象とする研究を立案するための機器のパフォーマンスを検討するものであり、倫理面の問題は生じないと考えられた。動物実験の倫理的側面については日本女子大学における倫理委員会で審議され、研究参加からは書面による承諾を得た。

3-3) サルコペニアに関与する液性因子の研究：実験動物の取り扱いは、東京大学の動物実験に関する倫理指針にそっておこなわれた。臨床研究は実施施設（医療法人秀行会）の倫理委員会の承認のもと、本試験への参加について本人から書面の同意を得て行った。

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：本研究は杏林大学医学部医の倫理委員会の承認のもと実施した。

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：本研究のプロトコルは東京都健康長寿医療センター倫理委員会の承諾を得た。

また、介入参加者にはプログラムの内容、指導期間、指導効果などについて詳細に説明し、介入参加有無を自ら選択するように指導すると共に自筆の承諾書を得た上で実施した。

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：本研究は、健康科学大学倫理委員会の承諾を得た上で、研究参加者には研究の目的や運動実施内容、測定項目などの説明を行って同意を得た。

C. 研究結果

(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 後期高齢者筋組織からの筋幹細胞の分離

75歳以上高齢者2名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、筋管細胞が形成され、分化特異的な myosin heavy chain 遺伝子の発現が確認された。後期高齢者筋組織にも、(1) 増殖・分化能を有する筋幹細胞が存在し、(2) 分離培養が可能であることが明らかになった。

② 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歳女性の筋から分離した初代培養細胞の筋分化能を検討した。筋 8-10 mg から分離した細胞を低密度で培養した。コロニー形成確認後、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歳女性の筋由来初代培養では、分化特異的 myosin heavy chain 遺伝子の発現は確認されるも、分化率は非常に低く、筋細胞割合は 1%程度と推定された。

③ 後期高齢者筋細胞の不死化

初代培養ヒト筋細胞は継代に伴い速やかに増殖分化能を失って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った。我々は、初代培養ヒト筋細胞の増殖停止機構を解析し、ヒトテロメラーゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺伝子およびヒト cyclin D1 遺伝子を導入してヒト筋細胞を分化能保持のまま不死化できることを明らかにした (Shiomi, et al., 印刷中)。この不死化法を用いて、2名の腹直筋から分離の初代培養筋細胞を不死化に成功した。得られた不死化筋細胞は、高い分化能を示し、成熟筋線維の特徴の横紋構造形成も認められた。

④ 後期高齢者不死化筋細胞の増殖特性

75歳男性と2歳女性の筋から樹立した不死化筋細胞で、後期高齢者不死化筋細胞の増殖特性を検討し、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。我々は類似の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。

⑤ 後期高齢者由来不死化筋細胞の遺伝子発現解析

未分化筋細胞は様々な分泌性因子(サイトカイン、成長因子など)を発現していることが報告されている。これらの自己分泌性

因子の未分化筋細胞における生理的意義については不明点が多いものの、筋細胞の増殖分化の制御に関わっている可能性がある。23歳女性、75歳男性および86歳女性の正常腹直筋から分離・樹立した不死化筋細胞Hu37KDpp(以下Hu37)、Hu20IIKD(以下Hu20)Hu27KD(以下Hu27)における成長因子、サイトカインおよびそれらの関連因子の発現をRT-PCR法によって比較検討した。その結果、Hu37に比べてHu20とHu27で共通に上昇傾向が見られた遺伝子として、inhibin β B、BMP4、JAG2が、Hu20とHu27のどちらかで上昇が認められた遺伝子としてはInhibin β Aが同定された。Inhibin α は、明瞭な増減を示さなかった。また、osteopontin発現は、Hu20とHu27で共通に低下傾向が見られた。この結果から、高齢者由来筋細胞では、TGF β スーパーファミリー分子の発現が増大している可能性が示唆された。

⑥ 後期高齢者由来不死化筋細胞の分化能の解析

Hu20、Hu27および82歳女性の腹直筋由来の不死化筋細胞Hu46ppKD(以下Hu46)の筋分化能を、Hu37と比較検討した。いずれの筋細胞も、分化培養で4日目以降、MyHCを発現し、細胞融合して筋管細胞を、形成した。後期高齢者由来不死化筋細胞は、Hu37と同程度の分化能力を持つことが明らかになった。

⑦ 運動機能の低下した患者由来筋組織の病理学的解析

下肢変形性関節症などで人工関節手術時に微小筋組織を摘出した。変形性股関節症(2例)は大臀筋、変形性膝関節症(4例)と膝大腿骨内顆骨壊死(1例)は大腿四頭筋(内側広筋)を摘出した。内訳は、男性3名、女

性4名、年齢は77歳から80歳であった。

凍結組織薄切で碎片化し作業がきわめて困難で、抗体染色(筋線維タイプ特異的抗体など)は中止し、一般染色(ヘマトキシリン-エオシン染色)によって組織像を把握した。その結果、いずれの筋組織にも顕著な脂肪化を認めた。凍結組織薄切が困難の原因は、筋組織内脂肪蓄積のためと考えられた。脂肪化程度は標本ごとに差が認められた。女性患者大腿四頭筋4例を比較すると、筋組織内脂肪化の程度が著しい例ほど、骨格筋組織中筋線維数は減少し、膝伸展筋屈曲筋筋力は低下している傾向が見られた。これらの脂肪化は「骨格筋組織内」に見られる脂肪蓄積で、筋組織外脂肪組織の増加ではなかった。また、脂肪は筋線維中でなく、筋線維間の間質に蓄積していた。ただし、中心核線維は認められず、筋再生は誘導されていない。炎症細胞浸潤も認められなかった。

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

補体欠損マウスにMuSK蛋白を免疫し筋萎縮発症に成功。100%で同調して重篤症状を示す。発症経過は再現性高く、体重減少を指標に発病初期から病態を解析可能である。発症マウスは易疲労性、筋力低下で顎挙上不能、脊柱彎曲がみられる。前肢筋力低下は体重減少に応じて測定できた。血中MuSK抗体も発症マウスで顕著に上昇。発症マウスの体重減少は筋萎縮によるものと予想されたため、発症マウスの筋横断面をHE染色で観察したところ筋太さが均一でないことがわかった。一方、炎症細胞進入や筋の核は筋線維の中央部には観察されなかった。

これは筋力低下が筋線維の炎症変化や筋ジストロフィーで観察されるような筋線維の顕著な再生像がないことを示している。疾患マウスの筋電図変化はMG患者と同じで神経筋接合部形態を共焦点顕微鏡で見ると運動神経終末縮小とAChR凝集の顕著減少が観察された。運動神経終末 sprouting も顕著で老化動物シナプスでも運動神経終末 sprouting が顕著に観察される。電子顕微鏡によるシナプス後膜変化を観察したところシナプスの溝および襞の顕著減少が観察された。発症マウス横隔膜膜電位では微小終板電位 (MEPP) と終板電位 (EPP) が低下していた。MEPP 低下はシナプス後膜の伝導障害を示す。計測値からプレシナプスからの放出 ACh の Quantal content (QC) は低下を認め、プレシナプスからの ACh 放出も障害されていた。老化マウス神経筋シナプスに神経終末 sprouting を伴う顕著形態変化が観察された。

補体欠損マウスに MuSK 蛋白の 2 回目免疫後に全マウスが筋力低下と筋萎縮を発症した。このマウスは 100% の確率で同調して重篤症状を示すだけでなく、神経筋シナプス形態異常を示すことを 2012 年に論文発表した。正常マウスでは座骨神経を 3Hz 刺激で得られた筋電図で compound muscle action potential (CMAP) 波形パターンにおいて漸減反応は全く観察されないが、発症マウスでは異常基準値 10% 以上の典型的漸減反応がおきる。発症マウスに 3, 4-DAP を腹腔投与すると漸減反応を示していた CMAP が顕著改善される。さらに、発症マウスで一番目の CMAP が 12mV から最大 34.7mV、正常マウスでも上昇することを明らかにした。1, 3, 4-DAP は神経筋シナプス伝導を顕著に

改善すると考えられた。

3, 4-DAP の作用機序を明らかにするために、ガラス微小電極法によりマウス横隔膜膜電位を測定した。発症マウスでは MEPPs と EPPs および QC の低下が測定された。MEPPs 低下はシナプス後膜に伝導障害が存在することを示す。QC 低下はプレシナプスからの ACh 放出も障害されていることを示す。次に、3, 4-DAP を発症マウスからの摘出横隔膜に投与すると、EPPs は 136%、面積は 259% も増強した。さらに、QC 平均値は 3, 4-DAP 処理後に 141% 増強した。また、正常コントロールでも増強作用があった。以上から、3, 4-DAP は発症マウスにおいて、プレシナプス機能の賦活で CMAP 漸減反応を改善し、さらに CMAP を増強することがわかった。さらに、正常コントロールマウスの MEPPs も増強することから (36%)、3, 4-DAP はポストシナプス機能も亢進する可能性を見いだした。1, 3, 4-DAP はプレシナプス機能を賦活すると考えられた。

C2C12 筋管細胞培養系にリコンビナント agrin を添加すると蛍光標識 α -bungarotoxin で染色可能な AChR 凝集が筋管細胞表面上に形成。Agrin 刺激前に抗 MuSK IgG または Fab 抗体を培養系添加すると全発症ウサギ由来抗体で AChR 凝集形成が抑制。また、agrin 刺激により AChR 凝集誘導後に抗 MuSK Fab 抗体添加すると、凝集の数と大きさ減少が認められ、抗 MuSK 抗体はともに AChR 凝集形成と維持の抑制が *in vitro* で示された。抗 MuSK 抗体は agrin による AChR の凝集形成を抑制すると考えられた。MuSK チロシンキナーゼ活性は agrin にて活性化されるが抗 MuSK IgG 抗体は agrin の非存在下で MuSK 活性化を誘導。

agrinによるAChR凝集形成抑制にもかかわらず、MuSK活性化は抑制されなかった。抗MuSK Fab抗体はMuSK活性化を誘導せず、agrinによるMuSK活性化を抑制。一価と二価の抗MuSK抗体が異なる作用機序を介してagrinによるAChR凝集抑制を示しており、MuSK機能制御には複数メカニズムが関与。抗MuSK抗体はMuSKを介したシグナル伝達を妨害すると考えられた。

MuSK活性化には細胞内アダプター分子Dok-7との相互作用も必要。抗MuSK IgG抗体はMuSKと同様にagrinの非存在下でDok-7活性化を誘導し、agrinによるDok-7活性化を抑制しなかった。一方、抗MuSK Fab抗体はagrinによるDok-7活性化を抑制。また、Dok-7の経時的タンパク発現レベル減少がagrin刺激によって誘導され、活性化Dok-7が何らかのダウンレギュレーションを起こすと考えられた。しかし、抗MuSK IgG抗体はagrinの非存在下でDok-7の発現レベル減少を誘導しており、ダウンレギュレーションを加速でDok-7の機能抑制していると考えられた。一方、抗MuSK Fab抗体はagrinによるDok-7発現レベル減少を抑制し、agrinによる刺激経路の上流に存在するMuSK活性化が抑制されたことでDok-7活性化が誘導されなかったと考えられた。以上から、一価と二価の抗MuSK抗体が異なる作用機序を介してMuSKとDok-7の相互作用を抑制し、最終的にAChR凝集が抑制されると考えられた。加えて、MuSKが支配する維持機構において、Dok-7が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。抗MuSK抗体はMuSKとDok-7の相互作用を抑制すると考えられた。

(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

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

サルコペニアの性・年代別頻度：SMIでの診断基準（YAM-2SD）で求めたサルコペニア性別頻度は、男性で25.0パーセント、女性で24.2パーセントと、性差はなかった。年代別では、男性は加齢とともにサルコペニア頻度が高くなっていったが（ p trend < 0.0001）、女性は、加齢変化はなかった（ p trend NS）。性・年代別SMI：男性の平均値 \pm SDは 7.42 ± 0.83 kg/m²、女性は 5.96 ± 0.73 kg/m²で男性の方が高かった（ p < 0.0001）。SMIは、男性では加齢とともに低下していたが（ p trend < 0.0001）、女性では加齢変化はなかった。

筋力の加齢変化：握力は、男女とも年齢が高いほど低下した（ p trend < 0.0001）。低下率は男性の方が大きかったが、80代でも40代女性より大きかった。膝伸展筋力も握力と同じ結果であった。

SMIと身体測定値、アルブミンとの相関解析：SMIに影響する変数を求めるとともに、SMIの推定式作成のために、SMIと身体測定値、アルブミンとの相関解析を行ったところ、SMIは上腕囲、下腿囲、大腿囲、腹囲BMIと強い相関があったが、アルブミンとは相関はなく、体脂肪率とは弱い相関が認められた。最も相関が強かったのはBMIで相関係数は男性0.77、女性0.73と高かった。周囲長は女性で下腿囲が最も相関強く、男性で上腕囲、下腿囲、大腿囲で相関係数はほぼ同じ値となった。

65歳以上の男女について、年齢、BMI、下腿

から SMI を推定する重回帰式の作成を試みた。その結果、以下の回帰式を得ることができた。

男性：SMI=-0.1026×年齢+0.1341×BMI+0.6034×下腿囲+2.5653

(r²=0.651)

女性：SMI=-0.0413×年齢+0.0513×BMI+0.4438×下腿囲+0.5509

(r²=0.558)

DXA で判定したサルコペニアのリスク

DXA での筋量から診断されたサルコペニアでは、男性で飲酒しない、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、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、エネルギー摂取量、血圧、抑鬱もサルコペニアリスクになっていた。女性では喫煙、飲酒、既往歴は関連せず、自覚的健康度は男性同様に良くないことがサルコペニアリスクを上げた。身体活動量は余暇身体活動量、総身体活動量ともにサルコペニアに関連し、エネルギー摂取量、血圧高値もサルコペニアリスクだった。抑鬱や認知機能は関連しなかった。

栄養素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、サルコペニアリスクは下がっていた。

身体機能、体格で判定したサルコペニアのリスク

身体機能、体格と各危険因子との関連は DXA によるサルコペニアと危険因子の関連より弱かった。男性で飲酒は関連せず、喫

煙が関連し、オッズ比は 3.78 であった。既往歴、自覚的健康度との関連はなかった。身体活動量では余暇身体活動と歩数が関連した。エネルギー摂取量、血圧との関連はあったが、抑鬱、認知機能は関連しなかった。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関連していた。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なかった。

サルコペニアが縦断的 ADL 低下に影響するリスク

サルコペニアは歩行速度毎秒 1 m 未満あるいは握力男性 25kg 未満、女性 20kg 未満、DXA 判定で四肢筋量低下が認められるものとした場合、サルコペニアを有する高齢者は男性では 32 人 (4.6 パーセント)、女性では 85 人 (11.8 パーセント) であった。6 年間の追跡での ADL 低下リスクはサルコペニア群が非サルコペニア群に比べて高くなっていた。サルコペニア群と非サルコペニア群のあいだの ADL 低下のオッズ比は 1.54 (95%CI: 1.16-2.06, p=0.003) とサルコペニア群で有意に高くなっていた。男性の握力基準値を 30kg 未満とした場合にはサルコペニアは、男性で 94 人 (13.5 パーセント)、女性で 85 人 (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。

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付

再現性の検討は、前腕前面での級内相関係数(1,2)はOD1が0.952、OD2が0.957、大腿前面ではOD1が0.965、OD2が0.959であった。筋厚との関係は、前腕前面の脂肪厚とNIRS値との相関係数はOD1が-0.518、OD2が-0.437と有意であった($p < 0.01$)。大腿前面の脂肪厚とNIRS値もOD1が-0.506、OD2が-0.460と有意であった($p < 0.01$)。前腕前面の筋厚とNIRS値との相関係数はOD1が0.193、OD2が0.200、大腿前面の筋厚とNIRS値とはOD1が-0.074、OD2が-0.022と有意でなかった。四肢筋量・脂肪量の推定は、SMIを従属変数とし、筋量との相関が高かった前腕前面OD1および身長と体重を独立変数とした重回帰分析の結果、標準偏回帰係数は身長が-0.681($p = 0.211$)、体重が1.452($p = 0.015$)、前腕前面OD1が0.375($p = 0.161$)でモデルの重相関係数は0.83であった。四肢脂肪量を従属変数としたモデルでは標準偏回帰係数は身長が-0.467($p = 0.205$)、体重が0.516($p = 0.135$)、前腕前面OD1が-0.778($p = 0.002$)で、重相関係数は0.92であった。

非サルコペニアとサルコペニア高齢者の身体特性は分担報告書の表1に示した。多重ロジスティック回帰分析の結果、サルコペニアの有無は交絡因子による調整後も手段的ADLの低下と有意な関連性を認めた。非サルコペニアに対してサルコペニア高齢者は手段的ADL障害を有するオッズ比が1.29(95%CI: 1.02-1.64, $p < 0.03$)となった。EWGSOPが提唱するアルゴリズムに従うと、日本人高齢者におけるサルコペニアの有症率は11.4%(521名)であった。一方、握力と筋量によって判定されたサルコペニアの有症率も11.4%で、両者の結果は完全に一致

した。EWGSOPのアルゴリズムで歩行速度が0.8m/s以下の高齢者121名中、筋量の低下を認めてサルコペニアと判定されたのは32名(26%)であった。

次に、サルコペニアの有症率を性別に比較すると男性が15.0%(344名)、女性が7.7%(177名)で、男性の方が高い有症率を示した。また、サルコペニアの有症率を年齢階級別に算出すると、男女とも高齢であるほど有症率が高く、80歳以上におけるサルコペニア有症率は30.4%に達した。

四肢筋量推定式はDXAでの四肢筋量と説明変数(OD値1、身長、体重、性別、年齢)の関係を重回帰分析で検討し、標準化係数(β)は身長が0.12($p < 0.001$)、体重が0.69($p < 0.001$)、OD値1が0.16($p < 0.001$)、性別が0.28($p < 0.001$)、年齢が-0.04($p = 0.085$)となり、これらの変数をすべて投入した回帰モデルの決定係数は0.92であった。また、投入変数から年齢を除いた回帰モデルにおいても決定係数は0.92となった。以上から、四肢筋量推定式は下記モデルを採用した。

$$y = 0.06 \times (\text{身長}) + 0.25 \times (\text{体重}) + 4.79 \times (\text{OD値1}) + 1.99 \times (\text{性別}) - 11.44 \dots \dots (1)$$

投入変数の単位は、身長(cm)、体重(kg)、OD値1(前腕前面)、性別(男性=1、女性=0)

サルコペニア有症率は、Normative sample(3,807名)における筋力(握力)と筋量(SMI)の下位20%をカットオフ値とすると筋力低下基準値は男性が $\leq 28.8\text{kg}$ 、女性が $\leq 18.2\text{kg}$ 、筋量低下は男性が $\leq 8.33\text{kg}/\text{m}^2$ 、女性が $\leq 7.25\text{kg}/\text{m}^2$ となった。上記カットオフ値をEWGSOPアルゴリズムに当てはめる

と、サルコペニア有症率は7.2%、該当者は344名であった。筋力と筋量のみで判定する別アルゴリズムについても、同様のカットオフ値を用いてサルコペニア有症率を算出し、サルコペニア有症率は6.9%、該当者は333名であった。この333名は全員が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

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

大腿骨近位部骨折は男性53名、女性304名、年齢は平均82.3才、対照は男性530名、女性1,625名、年齢は平均69.8才、年齢と性別に差があった。体重、全身骨BMDおよびT-scoreは大腿骨近位部骨折が低値であった。年齢、性で補正して比較すると、SMIは大腿骨近位部骨折が平均5.93kg/m²、対照が平均6.13kg/m²と骨折群が低かった(P<0.001)。SMIを上下肢に分けると、上肢は大腿骨近位部骨折が平均1.48kg/m²、対照が平均1.50kg/m²で差はなかったが、下肢は大腿骨近位部骨折が平均4.45kg/m²、対照が平均4.64kg/m²と骨折群の方が低かった(P<0.0001)。日本人の基準値によるサルコペニアは、大腿骨近位部骨折で47.4%、対照で31.9%とやはり骨折群がサルコペニアが多かった(P<0.0001)。一方、骨粗鬆症は、大腿骨近位部骨折で73.8%、対照で39.8%とやはり骨折群にて骨粗鬆症が多かった(p<0.0001)。大腿骨近位部骨折患者はサルコペニアあるいは骨粗鬆症を有する割合が高いことが分かったので、ロジスティック回帰によりサルコペニアと骨密度やその他

の有意な項目で多変量解析すると、サルコペニア有無はオッズ比1.414(p=0.007)、年齢はオッズ比1.102(p=0)、男性はオッズ比1.043(p=0.843)、体重はオッズ比0.986(p=0.101)、全身骨BMDはオッズ比0.057(p=0)と、サルコペニアは骨密度と独立して大腿骨近位部骨折の危険因子となっていることが判明した。

筋量と転倒の関連性研究では、転倒と外傷の有無を確認できた431名で、転倒なし100名、転倒あり骨折なし59名、転倒あり骨折あり272名であった。補正四肢筋量は、転倒あり骨折あり群(5.717kg/m²)は、転倒なし群(6.094kg/m²)、転倒あり骨折なし群(6.042kg/m²)より有意に低下していた(p<0.05)が、転倒なし群と転倒あり骨折なし群の間には差はなかった。下肢補正筋量も同様で、転倒あり骨折あり群は、転倒なし群、転倒あり骨折なし群より低下していた(p<0.05)が、後者2群間には差はなかった。上肢補正筋量は3群とも差がなかった。サルコペニア該当者は転倒なし群で18%、転倒あり骨折なし群で17%、転倒あり骨折あり群で45%と転倒あり骨折あり群で有意に多かった(p<0.05)。

ビスホスホネート(A)群は、年齢平均72.4歳、女性の占める率91.5%、体重47.4kg、身長149.3cm、Lean Mass6217.0g、脂肪量13119.0g、骨量1486.0g、サルコペニアの割合38.7%で、アルファカルシドール(D)群は、年齢平均73.7歳、女性の占める率90.4%、体重48.7kg、身長150.1cm、Lean Mass31721.0g、脂肪量14187.0g、骨量1489.0g、サルコペニアの割合32.7%であった。対照(C)群は、年齢平均72.4歳、女性の占める率81.1%、体重50.1kg、身

長 151.4cm、Lean Mass34400.0 g、脂肪量 13161.0 g、骨量 1649.0 g、サルコペニアの割合 32.2%であった。対照(C)群における骨格筋指標(SMI)は、開始時 6.091 kg/m²、薬剤投与1年後が 5.990 kg/m²、その間の変化率は-1.11%で、下肢 SMI は、開始時 4.636 kg/m²、1年後が 4.548 kg/m² で、その間の変化率は-1.70%であった。ビスホスホネート(A)群における SMI は、開始時 5.702 kg/m²、薬剤投与1年後が 5.747 kg/m² で対照(C)群に比して有意に増加しており(p=.017)、変化率は 1.20%であった。下肢 SMI は、開始時 4.346 kg/m²、薬剤投与1年後が 4.366 kg/m² で対照(C)群に比して有意に増加しており(p=.008)、変化率は 0.94%であった。アルファカルシドール(D)群における SMI は、開始時 5.872 kg/m²、薬剤投与1年後が 5.882 kg/m² で対照(C)群に比して有意差なく、変化率は 0.51%で、下肢 SMI は、開始時 4.508 kg/m²、薬剤投与1年後が 4.486 kg/m² で対照(C)群に比して有意差なく、その間の変化率は-0.10%であった。骨粗鬆症とサルコペニア合併率の検討は、2773名のうち、サルコペニア 976名、35.2%、非サルコペニア 1,797名、64.8%、骨粗鬆症 977名、35.2%、非骨粗鬆症 1,796名、64.8%であった。

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

Vscan は極めてコンパクトで携帯性に優れるが、良好な解像度が得られる深度は 6 cm 前後で、皮膚、皮下脂肪の深さは十分な解像度を得ることは困難であった。一方、高性能超音波断層装置によりリニア型プローブを用いて上腕部を検討すると、皮膚、皮

下組織、腱、骨膜等の境界を明瞭に区別でき、厚さを正確に測定することが可能で、筋内輝度分布も観察可能で個人差指標に用いられ、特に矢状断面は各栄養評価指標に有用であることが示唆された。

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)。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。

男女合計 193名(平均年齢 22歳)の協力を得て研究が進められた。ビタミンD摂取量は広く分布し、摂取基準の 1日 5.5 μ gを下回っている者も多く認められた。ビタミンD充足状態を示す代表的な生物学的指標である血清 25OHD とビタミンDとの関連をみると弱い正の相関が認められた。ビタミンD摂取量が極めて少ない集団においても血清 25OHD が 10ng/mlを下回る例は認められなかった。これは、今回の対象において血清 25OHD濃度がビタミンD欠乏の領域に達するものがいなかったことを示し、経口摂取以外の供給源から得られるビタミンD、すな

わち皮膚における紫外線の影響下で産生されるビタミン D の寄与が示唆される。ビタミン D 充足状態をカルシウム代謝の観点からうかがう時に用いられるのが血清副甲状腺ホルモンであり、とくに intact parathyroid hormone (iPTH)が汎用される。ビタミンD摂取量と血清 iPTH との関連をみると、負の相関をしめすサブグループが存在するかにも見えたが、今回の対象者全体で検討すると有意な関連は認められなかった。血清 25OHD と血清 iPTH との関連も同様であった。一方、骨形成を反映する生化学パラメーターである血清 BAP と血清 25OHD との関連には弱い正の相関が認められた。

3-3)サルコペニアに関与する液性因子の研究

初年度におけるアンドロゲンの筋肉増強作用に関する基礎研究は、8週齢マウスに週5回の中等度運動負荷を4週間加えることで対照に比べヒラメ筋アンドロゲン受容体のタンパクレベル発現は増加した。アンドロゲン受容体 mRNA レベルには運動負荷による変化はなかった。C2C12細胞で周期的電気刺激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た。同様にアンドロゲン受容体 mRNA レベルに変化はなかった。AMPK 阻害薬前処置により電気刺激によるアンドロゲン受容体のタンパクレベル上昇はさらに増強し、AMPK 活性化薬により電気刺激による増強反応は消失した。MEK/ERK 経路阻害薬前処置により電気刺激によるアンドロゲン受容体タンパクレベルの増強反応は消失した。プロテオソーム阻害薬の存在下では、電気刺激によるアンドロゲン受容体タンパ

クレベルの増強反応はなかった。

サルコペニアの液性因子を探索する臨床研究：BMI は 21.9(kg/m²)、四肢筋量指標は 5.65(kg/m²)であった。四肢筋量指標と下腿周囲径に正相関が認められた ($r=0.71$, $p<0.01$)。同様に四肢骨格筋量指標と握力も正相関が認められた ($r=0.55$, $p<0.05$)。四肢筋量指標と BMI には相関はなかった。既報と同様に、血清レプチン濃度と体幹脂肪量指標に正相関が認められた ($r=0.83$, $p<0.01$)。大変興味深いことに、血清レプチン濃度と四肢筋量指標に負の相関が認められた ($r=-0.56$, $p<0.05$)。血清レプチン濃度に対する重回帰分析によれば、体幹脂肪量指標が独立した正の ($\beta=0.72$, $p<0.01$)、四肢筋量指標が独立した負の ($\beta=-0.4$, $p<0.05$) 説明変数であった。

次年度における高齢女性90例において、SMI は、単相関による解析にて、年齢と有意な負の相関 ($\beta=-0.25$, $P<0.01$) が、また BMI ($\beta=0.79$, $P<0.01$) 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、四肢骨格筋量とは有意な負の相関 ($\beta=-0.26$, $P=0.04$)、VFA とは有意な正の相関 ($\beta=0.37$, $P=0.01$) がそれぞれ独立して認められた。

3年度における、血清除去にともなう HAEC のアポトーシスの程度は、C2C12細胞との共培養により、有意に軽減した。マウスのヒラメ筋において運動負荷により上昇する内皮細胞の各種生存因子を検討したところ、VEGF mRNA レベルの有意な上昇が確認された。また、運動負荷により血中の VEGF レベルは上昇していた。一方で、マウス廃用性萎縮モデルにおけるヒラメ筋では、VEGF mRNA レベルは有意に低下していた。共培養

における培養上清においても VEGF の分泌がみとめられた。VEGF 受容体 (VEGFR2) のアンタゴニストの存在下にて共培養による内皮細胞アポトーシス抑制効果は減弱した。PGC-1alpha の siRNA によるノックダウンにより、C2C12 細胞における VEGF mRNA 発現、VEGF 分泌は低下した。グアニリルサイクラーゼ活性化薬である BAY41-2272 により、PGC-1alpha の C2C12 細胞における発現は上昇し、VEGF mRNA 発現、VEGF 分泌は増加した。また、共培養系に BAY41-2272 を添加すると内皮細胞アポトーシス抑制効果はさらに増強した。

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

初年度に計測した 31 名のうちサルコペニアの筋量指標として頻用される DXA とインピーダンス法の両方を測定した 9 名について比較をおこなった結果、男女併せても DXA 法で測定した除脂肪量 (g) とインピーダンス法で測定した四肢、体幹の筋量 (kg) との間に高い相関が認められた。このことから、筋量を測定するための golden standard とされる DXA 法と比較して、本研究で使用した体組成計の数値は十分信頼性が高いものと考えられる。

3 年度までに、EWGSOP のフローチャートにしたがってサルコペニアを判定した結果、男性 52 名のうち 35 名 (67%)、女性 85 名のうち 42 名 (49%) がサルコペニアと判定された。次に、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、補正四肢筋量との関連について検討した。転倒の有無とサルコペニアの有

無を X² 検定で調べたところ有意差は認められなかった。次に、サルコペニアの 3 つの構成要因である歩行速度、握力、補正四肢筋量と転倒の有無に関して t 検定を行った結果、男性では握力のみが転倒の有無で有意差が認められたのに対して、女性では歩行速度、握力に関して転倒の有無で有意差が認められたが、補正四肢筋量については転倒の有無で差は認められなかった。その他、女性では Timed Up&Go テスト、老年症候群の保有数、開眼片脚立ち時間、ファンクショナルリーチ、虚弱指標においても転倒の有無で有意差が認められた。さらに、転倒の有無を目的変数としたロジスティック回帰分析を行った結果、年齢、性別、歩行速度、握力、補正四肢筋量のうち握力のみが転倒の有無と有意な関連要因として挙げられた。

(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

初年度における 3 カ月介入で通常歩行速度は、運動+カテキン群で事前 1.24 ± 0.19 m/sec から事後 1.30 ± 0.18 m/sec ($P=0.021$)、最大歩行速度は運動+カテキン群で事前 1.65 ± 0.26 m/sec から事後 1.72 ± 0.23 m/sec ($P=0.024$)、運動群で事前 1.58 ± 0.28 m/sec から事後 1.73 ± 0.25 m/sec ($P<0.001$)、Timed Up & Go は運動群で事前 7.17 ± 1.44 秒から事後 6.53 ± 0.73 秒 ($P=0.038$)、カテキン群で事前 8.34 ± 3.84 秒から事後 7.59 ± 2.88 秒 ($P=0.027$) の有

意な向上が観察されたが、対照群は有意ではなかった。

次年度において、4群間の初期値を比較すると、年齢、身長、体重、BMI、筋肉量、骨格筋量、歩行速度、膝伸展力、運動習慣、尿失禁、骨粗鬆症既往、糖尿病既往等々全項目で差はなかった。3か月間の変化を群間比較すると、足の筋肉量(F=4.253, P=0.007)、通常歩行速度(F=4.213, P=0.007)、最大歩行速度(F=9.374, P<0.001)、膝伸展力(F=3.558, P=0.020)で差が見られ、運動+アミノ酸補充群の変化が有意に大であった。介入前後の足筋肉変化量は、運動群と運動+アミノ酸補充群で、通常歩行速度変化量は、アミノ酸補充群、運動群、運動+アミノ酸補充群で、膝伸展力変化量は運動+アミノ酸補充群で有意な変化を示した。一方、「足の筋肉量+膝伸展力」の変化は「運動+アミノ酸補充群」でOR=4.89、「足の筋肉量+通常歩行速度」の変化は「運動+アミノ酸補充群」でOR=4.11で有意に高かった。

最終年度における3年後の追跡調査参加者は、運動+栄養群15人、運動群22人、栄養群17人、対照群19人、合計73人であり、82人は不参加であった。追跡調査参加者と不参加者の介入前の初期値を比較したところ、握力、膝伸展力、歩行速度は両群間で有意差は見られなかったが、開眼片足立ちで有意差が見られ追跡調査参加者 32.7 ± 22.8 秒、不参加者 21.9 ± 21.4 秒(P=0.003)と不参加者で有意に低い値を示した。一方、聞き取り調査項目では貧血既往のみで不参加者の割合が高かった(P=0.044)。

介入前後、3年後の追跡調査における身体機能の変化を繰り返しのある分散分析より検討した(4群×3回)。その結果、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。

具体的な値の変化をみると通常歩行速度は運動+栄養群(事前= 1.34 ± 0.22 m/s、事後= 1.56 ± 0.19 m/s、追跡= 1.22 ± 0.23 m/s)、運動群(事前= 1.27 ± 0.27 m/s、事後= 1.52 ± 0.24 m/s、追跡= 1.18 ± 0.25 m/s)、栄養群(事前= 1.26 ± 0.15 m/s、事後= 1.41 ± 0.17 m/s、追跡= 1.21 ± 0.14 m/s)、対照群(事前= 1.18 ± 0.24 m/s、事後= 1.23 ± 0.24 m/s、追跡= 1.05 ± 0.19 m/s)であり、最大歩行速度は運動+栄養群(事前= 1.85 ± 0.27 m/s、事後= 2.14 ± 0.34 m/s、追跡= 1.69 ± 0.36 m/s)、運動群(事前= 1.71 ± 0.26 m/s、事後= 2.00 ± 0.27 m/s、追跡= 1.59 ± 0.34 m/s)、栄養群(事前= 1.62 ± 0.25 m/s、事後= 1.96 ± 0.25 m/s、追跡= 1.70 ± 0.23 m/s)、対照群(事前= 1.56 ± 0.32 m/s、事後= 1.66 ± 0.33 m/s、追跡= 1.49 ± 0.34 m/s)であった。

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：太極拳のRCT開始

初年度においては、両群に介入前測定を行い、身体形態項目では、身長、体重、骨格筋量、体脂肪量、骨密度に差はなかったが、年齢は運動介入群が高かった。身体機能項目では、握力、膝伸展力、股屈曲力、体前屈、開眼片足立ち時間に差はなかったが、10m歩行速度は対照群が運動介入群より速かった。また、転倒歴やQOLの項目では差はなかった。

次年度では、2011年7月に運動介入後の第一回目測定を行い、運動介入後における

る身体形態、身体機能、QOL (sf36) は両群で差はなかった。介入群の運動介入前後の身体形態と身体機能は10m歩行速度で差(介入前7.2秒、介入後6.3秒、 $p=0.001$)が見られたが、ほかはなかった。介入群の運動介入前後のQOLは、全体健康観(介入前57.3、介入後66.8、 $p=0.05$)、社会生活機能(介入前68.9、介入後84.2、 $p=0.05$)、心の健康(介入前63.4、介入後77.5、 $p=0.05$)で向上が見られた。運動介入前後の転倒率は有意な減少(介入前36.6%、介入後13.3%、 $p=0.05$)が見られた。対照群の運動介入前後の身体形態と身体機能は筋量が増加(介入前32.2kg、介入後33.1、 $p=0.01$)が見られたが、握力(介入前23.9kg、介入後22.3kg、 $p=0.01$)、膝伸展力(介入前21.9kg、介入後19.8kg、 $p=0.05$)、体前屈(介入前38.8、介入後36.7cm、 $p=0.05$)で差が見られた。対照群の運動介入前後のQOLと転倒率は有意な変化が見られなかった。

3年度では、2012年10月に運動介入群と対照群の両群に対して、運動介入後の二年目の測定を行い、運動介入前との比較を行った。運動介入群における運動介入前後の比較では、骨格筋量と骨密度に有意な差は見られなかった。身体能力における運動介入前後の比較では、握力と開眼片足立ちの項目では有意な差は見られなかったが、膝伸展力(運動介入前18.9 \pm 6.9kg、運動介入後21.4 \pm 7.7kg、 $p=0.01$)、股屈曲力(運動介入前20.2 \pm 4.3kg、運動介入後21.8 \pm 4.0kg、 $p=0.05$)、10m歩行速度(運動介入前7.29 \pm 1.9秒、運動介入後6.86 \pm 1.6秒、 $p=0.05$)、座位体前屈(運動介入前36.0 \pm 6.0cm、運動介入後38.4 \pm 8.0cm、 $p=0.05$)の項目では有意な差が見られた。転倒率の比較では有意

な減少が見られた(運動介入前36.6%、運動介入後16.6%、 $p=0.05$)。QOLの比較では、身体機能(運動介入前76.9 \pm 19.9、運動介入後87.8 \pm 12.3、 $p=0.05$)、体の痛み(運動介入前65.2 \pm 20.9、運動介入後76.3 \pm 16.1、 $p=0.05$)、全体の健康観(運動介入前57.0 \pm 19.6、運動介入後71.6 \pm 15.9、 $p=0.01$)の項目スコアで有意な差が見られた。対照群における運動介入前後の比較では、骨格筋量には有意な差は見られなかったが、骨密度では有意な差が見られた(運動介入前0.916 \pm 0.09g/cm³、運動介入後0.902 \pm 0.08g/cm³、 $p=0.01$)。身体能力における運動介入前後の比較では、握力(運動介入前23.9 \pm 4.0kg、運動介入後22.2 \pm 3.2kg、 $p=0.01$)、膝伸展力(運動介入前21.9 \pm 5.9kg、運動介入後18.9 \pm 5.6kg、 $p=0.01$)、股屈曲力(運動介入前21.4 \pm 3.5kg、運動介入後19.7 \pm 2.3kg、 $p=0.05$)、座位体前屈(運動介入前38.8 \pm 6.5cm、運動介入後35.2 \pm 7.3cm、 $p=0.01$)の項目で有意な差が見られた。対照群の転倒率の比較では有意な差が見られなかった。QOLの比較では、日常身体機能(身体)項目のスコアで有意な減少が見られた(運動介入前78.2 \pm 20.6、運動介入後68.1 \pm 27.1、 $p=0.05$)。

D. 考察

(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

橋本は世界にさきがけて高齢女性の筋から筋幹細胞を分離初代培養し、初代培養細胞の筋分化能を保ったまま不死化し、複数筋細胞クローンを樹立した。ヒト初代培養筋細胞増殖には制限があるため、その性質は

未解明で、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を検討するために後期高齢者筋組織からの分離筋細胞を不死化し解析した。増殖特性を解析し、ステロイドホルモンへの低応答性という、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、各年代の筋組織由来の不死化筋細胞を樹立している。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、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。

3年度には、運動機能低下患者の下肢筋組織を組織学的に検討し、著しい脂肪化を見いだした。脂肪化には個人差があるが、全例の筋組織に脂肪化が認められた。このような著しい脂肪化は老化マウスでは認められず、ヒト固有の加齢依存的な現象である可能性が考えられる。骨格筋組織脂肪化は筋ジストロフィーなどの筋疾患においてしばしば認められる。筋組織に潜在している脂肪前駆細胞の増殖が、筋線維壊死脱落によって刺激され、筋組織内で脂肪分化するものと考えられる。初期の脂肪化は、筋線維壊死の結果誘導されると考えられる。しかし、過剰な脂肪化が増悪要因となって、さらに筋線維の壊死が促進される可能性がある。本研究で見いだされた著しい筋組織脂肪化は、老化マウスなどでは決してみることができない、運動機能の低下したヒト筋組織に特徴的な組織病理像である。高齢者に見られる「筋量や筋力の低下（サルコ

ペニア）」の進行に関しても、筋組織の脂肪化が増悪作用をもたらし、病態の進行（悪化）を促しているのかもしれない。仮にそうであれば、筋組織における過剰脂肪化抑制によって、サルコペニア進行を抑制し、リハビリテーションなどによる治療効果を高めることが期待できる。今後、(1)高齢者筋組織における脂肪化が筋幹細胞および筋線維に与える影響と、(2)骨格筋組織内脂肪化の抑制による治療の可能性について検討する必要がある。不死化ヒト筋細胞の分離・樹立が可能になったことにより、これまで不明の点が多かった未分化ヒト筋細胞（筋幹細胞、筋前駆細胞）の性質を詳細に検討することができるようになった。自己分泌性因子の発現解析の結果、高齢者由来筋細胞において、Inhibin α の発現レベルは、若年成人由来筋細胞と同程度であるのに対して Inhibin β B は上昇していた。この結果は、高齢者由来筋細胞では、Inhibin α 鎖と Inhibin β 鎖の二量体である・nhibinではなく、Inhibin β 鎖の二量体である activin の産生量が増大している可能性を示唆している。Activin タンパク質の産生と筋機能の関連性という新たな検討課題が提示された。さらに、私たちは、後期高齢者由来筋細胞の特性を、DNA アレイによる網羅的遺伝子発現解析によって明らかにしようと、研究を進めている。

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

サルコペニアの早期発見、リハビリ効果判定のための指標は介護予防対策に必要である。筋力測定や運動機能スコアは早期発見と予防に必ずしも有効とは言えず、異な

る次元のバイオマーカーが求められており、その探索を目的として筋可塑性に注目している。若年者では運動神経終末を含む筋は修復力強く筋萎縮に抵抗性である。本研究では神経筋シナプス筋側に限局して発現する MuSK が筋と運動神経終末を含むシナプスの機能維持に重要なことを明らかにした。この機構が障害されると筋とシナプスを維持することができず急速に筋萎縮が誘導される。MuSK は筋と運動神経細胞の相互作用の中心的役割を果たし、そのメカニズムは筋と運動神経側の両方にまたがり複雑多様である。運動神経終末と筋との間で高齢者や老化動物でも顕著なシナプス形態変化が報告されている。

我々は、老化により MuSK 機能が単純に減弱するためサルコペニアが発症するとは考えていない。その根拠は、このモデルマウスは重症筋無力症を発症するが、全く同じ病態が高齢者や老化動物で観察されるわけではない。例えば、MG の特徴である筋電図はサルコペニアでは計測されない。しかしシナプス形態の変化はサルコペニアでも観察されるため、MuSK の支配下にある重要な維持機構がサルコペニアの成因と強く関係していると予想している。

サルコペニアのメカニズムに基づく新しい診断・予防・治療法の開発を目的としている。若年者では運動神経終末を含む筋は修復力が強く筋萎縮に抵抗性である。そして、神経筋シナプス筋側に限局発現している MuSK が筋と運動神経終末を含むシナプス機能維持に重要な役割を果たしており、その機構が破綻すると筋力低下・萎縮を誘導することを疾患モデルマウスを開発して 2012 年に成果として論文発表できた。この

モデルマウスは神経筋シナプス機能を亢進する薬物探索に有用で、我々は 3,4-DAP を有効な治療薬候補として、その有効性と機序を本年度に解析を行った。3,4-DAP はカリウムチャンネル阻害剤としてプレシナプス機能を亢進するとされてきたが、加えてポストシナプスへも未知の機能があることを我々は示した。3,4-DAP は欧米では別疾患に認可されているが、我が国では未認可である。我々は抗 MuSK 抗体重症筋無力症に 3,4-DAP が有効である根拠を初めて示した。我々は今回、3,4-DAP が高齢者リハビリテーションの促進補助薬としての可能性を見いだした。我々は、MuSK 機能の単純減弱でサルコペニアが発症するとは考えていない。その根拠は、抗 MuSK 抗体重症筋無力症のモデルマウスと全く同病態が高齢者や老化動物で観察されていない。例えば、MG の特徴の筋電図(漸減反応)はサルコペニアでは計測されない。しかしシナプス形態変化(シナプス喪失、運動神経終末 sprouting)はサルコペニアでも観察される。さらに高齢マウスの神経筋シナプス機能が低下していることを電気生理的に観察している。従って MuSK 支配下の重要維持機構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。サルコペニアは多様な原因により筋萎縮へ収束する病態の大きな集合群であり、まだ単一概念として捉えているだけであるが、高齢者が何らかの疾患で運動障害を回復するためにリハビリで改善する群としない群に分かれることが経験的にわかっているが、その診断・予防法は全く確立されていない。高齢者リハビリテーションの促進補助薬という発想はこれまで無かった。これは、微小生体内神経筋シナプスを標的としたリハ

ビリという新しい考え方で、欧米では 3,4-DAP が LEMS の治療薬として認可されていることから、他疾患への適応のハードルはかなり低い。今後、我々は老化マウスを使って 3,4-DAP がサルコペニア予防・治療に有効であるかどうか検討する。

最近になって、間接的ながらも MuSK との関連性が報告されてきた。神経型セリンプロテアーゼの neurotrypsin は MuSK の活性化分子である agrin を分解する唯一のプロテアーゼとして知られている。この neurotrypsin を神経細胞特異的に過剰発現させ、agrin 分解を促進させたマウスでは、若齢時から AChR 凝集の断片化といった神経筋シナプスの形態変化とともに、サルコペニア様の筋症状が現れると報告されている。これは神経筋シナプス維持機構の破綻がサルコペニアの発症に関与していることを支持するものであり、agrin 分解促進による MuSK 活性化低下が発症に寄与していることを示唆している。さらにヨーロッパでは、neurotrypsin による agrin の分解産物 (CAF) の血中濃度を測定し、サルコペニアのバイオマーカーとして利用する研究がすでに進行している。69 名の高齢者の血清中の CAF 濃度を測定したところ、男性高齢者の筋量と負の相関関係が認められており、ビタミン D 投与と運動トレーニング負荷後に CAF 濃度が低下するとも報告されている。サルコペニアバイオマーカーとしては炎症性サイトカインの IL-6 や TNF- α が知られているが、臨床的に利用できるほどに特異性は高くない。一方、血中の CAF は老化に伴う神経筋シナプスの形態変化と因果関係があり、新たなサルコペニアのバイオマーカー

ーとして興味深い。しかしながら、neurotrypsin ノックアウトマウスや neurotrypsin 抵抗性の agrin を過剰発現させたマウスにおいても、実際の老化によって生じるサルコペニア症状を抑制することはできなかったと報告されている。サルコペニア発症が agrin の分解のみに依存しておらず、複数の要因に起因することを示唆する結果ではあるが、agrin 刺激を伝達する LRP4、MuSK、Dok-7 など下流の分子の発現レベルや活性も考慮する必要があるのではないかと考えられる。実際に我々の結果では、MuSK と Dok-7 の機能が神経筋シナプスの維持機構に重要な役割を果たしていることが示された。特に、二価の抗 MuSK 抗体によって誘導される Dok-7 の発現レベル減少は興味深い。これらに関与する分子メカニズムの解明は、サルコペニアの成因を知る上で重要な手がかりとなるはずであり、新たなバイオマーカーの同定にも繋がっていくと考えられる。

(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

初年度は、EWGSOP のサルコペニア簡易基準を参考に、日本人一般地域住民で Physical performance に支障が生じる可能性のある集団を捉えることを目指して、独自基準を作成した。判定項目は簡単に測定できるものとした。さらに、Muscle performance と筋量を分けて考えることとし、Muscle performance は普通歩速度と握力で評価し、筋量は測定困難な SMI の代わりに BMI と下

腿囲で評価することとした。まず普通歩速度 1m/s 未満、もしくは握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満である場合には脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、BMI 18.5kg/m² 未満、もしくは下腿囲 30cm 未満である場合をサルコペニアとした。今回の対象者にこの基準を当てはめると、65 歳以上の男女 944 名のうち、23.6 パーセントが脆弱高齢者であり、さらに全体の 5.3 パーセントがサルコペニアと診断された。その内訳は男性の 1.9 パーセント、女性の 8.7 パーセントと女性で割合が高くなっていた。ここに示したサルコペニアの簡易基準案は、身長、体重、握力計とメジャー、ストップウォッチがあれば実施できる。スクリーニング検査として有用と思われる。

次年度では、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素因、性、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、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。ビタミン D 受容体は筋肉に存在し、ビタミン D 低下で筋同化作用がさがることやビタミン D 受容体遺伝子多型が高齢サルコペニアの

要因のひとつであることも報告され、ビタミン D 低下が高齢者の転倒や身体機能障害の要因とする報告がある。アムステルダム縦断加齢研究ではベースラインの 250H 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 であった。ビタミン D 摂取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。必須アミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、バリンは分岐鎖アミノ酸と呼ばれ、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摂取で筋肉消耗を防げる可能性はある。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。

3 年度では、介護予防を目指して、EWGSOP サルコペニア簡易基準を参考に地域住民を対象としたサルコペニアの簡易基準作成を行い、身体機能に支障が生じ、将来要支援要介護となるようなる可能性のある集団を捉えることを目指した。地域住民を対象とした場合には EWGSOP によるサルコペニア簡易基準では、特に歩行速度を 0.8m/秒を判定基準にした場合にはほとんどすべての人がサルコペニアでないと判断されてしまう。

今回は歩行速度を 1.0m/秒を判定基準とし、握力が男性 25kg 未満、女性 20kg 未満で脆弱高齢者と判断し、脆弱高齢者のうち、実際に筋肉量が減少している場合をサルコペニアとした。男性の握力の基準値を海外で用いられていることが多い 30kg とした場合の検討も行っている。6 年間追跡で非サルコペニアに比べてサルコペニアである場合の ADL 低下のオッズ比が 1.54 倍で有意に高くなっていた。男性の握力基準値を 30kg とより厳しくした場合には、オッズ比は 1.31 倍と有意ではあったが小さな値となり、日本人男性では 25kg を採用した方が ADL 低下を予測するためにより適していることがわかった。

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

初年度では、NIRS による身体組成計測は再現性から考えると、高い級内相関係数を示し、信頼性の高い方法と考えられた。NIRS と筋および皮下脂肪厚との関連では脂肪厚と相関関係は認められたが筋厚とは有意ではなく、筋量の直接測定は NIRS では難しいとも考えられた。二重 X 線エネルギー吸収法による SMI と脂肪量の推定では、NIRS と身長と体重をあわせたモデルでそれぞれ 83% と 92% が説明可能であり、NIRS 値で筋量と脂肪量のある程度推定することが可能と考えられた。とくに脂肪量の推定では NIRS 値が最も高い標準偏回帰係数を示し、身体組成計測に有益である可能性が示された。

次年度では、サルコペニア有症率は、欧米では概ね 10~30% と報告されている。アジ

アでは香港中国人高齢者で、男性 12.3%、7.6%、台湾で男性 23.6%、女性 18.6% とされているように、アジアのサルコペニア有症率は欧米よりやや低い傾向を示している。本研究では、EWGSOP アルゴリズムと握力と筋量で判定するアルゴリズムの 2 つでサルコペニア判定したが、両者の有症率は完全に一致し、サルコペニア判定基準に歩行速度を含めること、あるいは基準値妥当性に再検討の必要性が示唆されている。サルコペニア有症率の性差は、研究で結果が分かるが、男性で高い有症率を認めるとした研究が多く、本研究も同様であった。しかし、高齢期の筋量低下率は女性より男性で大きく、若年者平均値を基準としたカットオフ設定では男性がサルコペニアと判定されやすく、成人を基準としたカットオフ値設定が妥当かどうか、検証の必要がある。次に、サルコペニアと手段的 ADL は交絡因子による調整後も関連性が認められ、先行研究を支持している。Baumgartner et al. は DXA による筋量から SMI を算出し、若年者の -2 標準偏差以下をサルコペニアと定義したうえで、手段的 ADL との関連性について検討し、男性では過去 1 年間の転倒経験、杖や歩行器の使用、バランス機能低下、手段的 ADL の低下、女性では手段的 ADL の低下のみがサルコペニアと関連を認めた。また、筋量測定に生体電気インピーダンス法 (BIA) を用いた報告でも同様の結果が得られている。手段的 ADL は基本的 ADL より高次生活機能として位置づけられており、手段的 ADL 低下は将来の基本的 ADL 障害、ひいては要介護状態を招く危険性がある。今回の結果は、サルコペニアが高齢期の生活障害を引き起こす危険因子の 1 つである

可能性を示唆している。一方で、手段的 ADL 低下がサルコペニアを引き起こす可能性も指摘されており、このような悪循環を断ち切ることがサルコペニアの予防戦略にとって極めて重要だと考える。今後は縦断的な観察研究、あるいは介入研究によって、サルコペニアの危険因子の同定ならびにその予防プログラムの開発や効果検証が求められる。

3 年度では、四肢筋量の推定式について、NIRS 測定値に身長、体重、性別を加えた回帰モデルにより DXA 測定四肢筋量の 92% が説明でき、決定係数は過去に報告の推定式決定係数よりも高値であった。これは今回のモデルの方が以前より当てはまり良く、回帰式推定精度や妥当性の改善が示された。一般に筋量は加齢とともに減少するため年齢は四肢筋量の説明変数と考えられたが、今回は四肢筋量と年齢に有意な関係が認められなかった。本研究は対象年齢層を 65 歳以上に限定しているため、若年者を含めた場合に比べて筋量の取り得る値（範囲）は小さくなる。今回、四肢筋量と年齢に有意な関係が認められなかったのは、対象年齢幅が小さかったことが影響したと推察された。この結果は高齢者特化の四肢筋量推定モデルにおいて年齢は筋量の説明変数として必ずしも必要ではないことを示唆する。NIRS による筋量評価は DXA や生体電気インピーダンス法（bioelectrical impedance analysis: BIA）と比べて測定精度が劣るが、今回の推定式を適用することで、NIRS を用いた四肢筋量測定精度は向上し、NIRS は測定姿勢に制約がなく非侵襲的かつ短時間に計測できるという利点を有する点を踏まえると、NIRS は要介護高齢者や大規模調査に

おける筋量評価のツールとして幅広く応用できると考えられた。サルコペニア有症率については、これまでサルコペニア判定のカットオフ値は若年成人の平均 SMI から 2 標準偏差を減じた値がよく用いられており、Baumgartner ら（1998）の報告では男性が 7.26 kg/m²、女性が 5.45 kg/m²、日本人を対象とした真田ら（2010）の報告では男性が 6.87 kg/m²、女性が 5.46 kg/m² であったとされている。しかしながら、この算出方法がサルコペニア判定の基準値として適切か否かは十分に検討されていない。今回我々は、大規模コホートから normative sample を抽出し、サルコペニア判定における筋量（SMI）のカットオフ値（下位 20%）を算出した。その結果、SMI は男性が 8.33 kg/m²、女性が 7.25 kg/m² となり、これらは過去に報告されているカットオフ値よりも高値を示した。ただし、筋量測定法が異なるため単純に比較することはできない。また、いずれの算出方法がサルコペニアの判定基準として妥当であるか、今回の結果から論じることができない。今後は、予測妥当性の検証を踏まえた基準値の更なる検討が必要となるであろう。今回算出されたカットオフ値を EWGSOP が提唱するアルゴリズムに当てはめると、地域在住高齢者の 7.2%（344 名）がサルコペニアと判定された。また、筋力と筋量のみで判定する別のアルゴリズムを用いると、サルコペニアと判定された者が 333 名（6.9%）となり、この 333 名は全員が EWGSOP のアルゴリズムでもサルコペニアと判定された。これらの結果は、有症率に多少の違いがあるものの平成 23 年度の報告内容とほぼ一致した。サルコペニアの有症率は、その判定方法に依存する。した