

| 主な副作用・理由 | 推奨される使用法 | 参考にしたガイドラインなど |
|---|--|---|
| 抗精神病薬による錐体外路症状の予防としての使用は避けるべきである。高齢者パーキンソン病ではレドopa剤などより効果的な治療薬がある。認知症を惹起・悪化する恐れがある。 | レドopa剤を使用する。 | Beers Criteria ⁴ 2012 高齢者の安全な薬物療法ガイドライン 2005 |
| ドパミン受容体遮断作用によりパーキンソン症状を出現・悪化しやすい。 | 使用すべきではない。急速なパーキンソン症状の悪化は薬剤性パーキンソニズムを疑う。 | Beers Criteria 2012 高齢者の安全な薬物療法ガイドライン 2005 |
| ドパミン受容体遮断作用によりパーキンソン症状を出現・悪化しやすい。 | 使用すべきではない。急速なパーキンソン症状の悪化は薬剤性パーキンソニズムを疑う。 | Beers Criteria 2012 |
| 注意事項 | | 参考にしたガイドラインなど |
| 閉塞隅角緑内障では禁忌。 | | パーキンソン病治療ガイドライン 2011 |

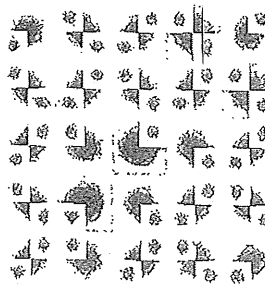
るので積極的に行うように勧められる⁷⁾。また、運動療法により転倒のリスクが減ることが指摘されている⁸⁾。視床下核刺激術や淡蒼球刺激術などの手術療法が開発されているが、手術時の年齢が若いほど手術効果も高いため、高齢者や認知機能障害を有する患者では通常施行されない。

(荒井啓行)

○文献

- 1) Fahn S, Oakes D, Shoulson L, et al : Levodopa and the progression of Parkinson's disease. N Engl J Med 351 : 2498-2508, 2004.
- 2) Goetz CG, Poewe W, Rascol O, et al : Evidence-based medical review update : pharmacological and surgical treatment of Parkinson's disease ; 2001-2004. Mov Disord 20 : 523-539, 2005.
- 3) Stowe RL, Ives NJ, Clarke C, et al : Dopamine agonist therapy in early Parkinson's disease. Cochrane Database Syst Rev : CD006564, 2008.
- 4) Arslan D, Laake K, Larsen JP, et al : Donepezil for cognitive impairment in Parkinson's disease ; a randomized controlled study. J Neurol Neurosurg Psychiatry 72 : 709-712, 2002.
- 5) Emre M, Arslan D, Albanese A, et al : Rivastigmine does dementia associated with Parkinson's disease. N Engl J Med 351 : 2509-2518, 2004.
- 6) Bedard MA, Pillon B, Dubois B, et al : Acute and long-term administration of anticholinergics in Parkinson's disease ; specific effects on the subcortico-frontal syndrome. Brain Cogn 40 : 289-313, 1999.
- 7) Keus SH, Munneke M, Nijkrake MJ, et al : Physical therapy in Parkinson's disease ; evolution and future challenges. Mov Disord 24 : 1-14, 2009.
- 8) Ashburn A, Fazakarley L, Ballinger C, et al : A randomized controlled trial of a home-based exercise programme to reduce the risk of falling among people with Parkinson's disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 78 : 678-684, 2007.

アルツハイマー病による 軽度認知障害



荒井啓行

東北大学加齢医学研究所脳科学研究部門老年医学分野教授,
同大学病院老年科科長

古川勝敏

東北大学加齢医学研究所脳科学研究部門老年医学分野准教授,
同大学病院老年科

大類 孝

東北大学加齢医学研究所高齢者薬物治療開発寄附研究部門教授,
同大学病院老年科

富田尚希

東北大学加齢医学研究所脳科学研究部門老年医学分野助教,
同大学病院老年科

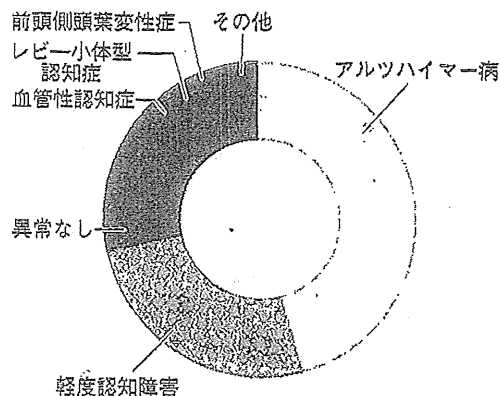
軽度認知障害は common condition

図1に示すのは、2011（平成23）年度における東北大学病院老年科物忘れ外来における診断内訳です。もっとも多いのはアルツハイマー病（AD）ですが、ADに次いで多いのが軽度認知障害（mild cognitive impairment；MCI）であることに驚きます。高齢化を背景にした認知症とくにADの激増とともに、マスコミや市民講演会などを通じた認知症に関する知識の普及・啓発によって、早期の医療機関受診につながっていることの反映と思われます。

では、軽度認知障害とはどのような病態を指すのでしょうか。表1のように、認知機能と生活機能の自立性という二つの側面からみて、両者ともに問題がなければ正常、認知機能に軽い問題はあるが生活機能の自立性が保たれていればMCI、認知機能と生活機能の自立性の両者が障害されていれば認知症とされています¹⁾。DSM-IVやNINCDS-ADRDAでも、「認知症とは、後天的な脳障害により一度獲得した知的機能が自立した日常生活が困難となるほどに持続的に衰退した状態」と理解されてきました。では、どのようなプロセスをたどって「自立した日常生活が困難な状況」にいたるのでしょうか。

平穏な生活を営んできた健常高齢者が突如

図1 東北大学病院老年科における診断結果



2011（平成23）年度の東北大学病院老年科物忘れ外来を受診した患者の診断内訳を示す。アルツハイマー病に次いで多いのが軽度認知障害であることに注目。東北大学病院が特定機能病院であるというバイアスがかかっている点も否定はできないが、この頻度は血管性認知症やレビー小体型認知症などよりもかなり高い

表1 正常、軽度認知障害と認知症の概念

| 概念分類 | 認知機能 | 日常生活の自立性 |
|--------|------|----------|
| 正常 | ○ | ○ |
| 軽度認知障害 | ↓ | ○ |
| 認知症 | ↓↓ | × |

正常、軽度認知障害および認知症のクラシカルな概念。認知機能と生活機能の自立性という二つの面から見て、両者ともに問題がなければ正常、認知機能に軽い問題はあるが生活機能の自立性が保たれていれば軽度認知障害（MCI）、認知機能と生活機能の自立性の両者が障害されていれば認知症と考えるのが一般的である

として「社会生活や日常生活機能の自立性が失われた状態」にいたるとは考えにくく、多くの場合、「正常でもない、認知症でもない、その中間的な段階」を経て認知症にいたる（進行する）と考えられます。その「中間的な段階」がMCIと呼ばれるものです²⁾。

MCIの背景疾患としては、ADなどの変性疾患、血管障害、向精神薬などの薬物による代謝性疾患、外傷によるものなど多様ですが、上述のように高齢化によるADの激増にともなう、ADの前駆段階としてのMCIやpreclinical AD（認知機能は正常ではあるが、バイオマーカーはすでにADがはじまっていることを指し示している状態）がcommon conditionになっているものと推測されています³⁾。

ADを背景病理とするMCI

.....

2011年、米国のAlbertらはADを背景病理とするMCI (mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease ; MCI due to AD) の診断基準を提案しました⁴⁾。詳細は別途邦訳されているので、そちらを参照願いますが⁵⁾、このAlbertらの提案は、ADを背景疾患として生じる認知機能障害の特徴を有するMCI患者を早期に拾い上げようとする点で大きな進歩であり、新薬臨床試験を成功に導く鍵として以前からもっとも重視されてきた要件の一つである「より均一な病理背景を有するサブグループをバイオマーカーを用いて絞り込むこと」に向かって大きく前進したといえるでしょう⁶⁾。

MCI due to ADの段階では、新しい情報に接しそれを保持するエピソード記憶機能の障害がもっとも頻繁にみられますが、ほかの認知機能は障害されていないため、補助的にメモを取ったりカレンダーをうまく使ったりして日常生活の自立性は保たれます。テレビに映った俳優や歌手の名前が想起できない、

あるいは買い物に行ったがうっかり一つ買い忘れてしまったなどは「良性健忘」といわれ、エピソード記憶障害とは区別されます。

エピソード記憶とは、日々の生活のなかで個人が経験する具体的な出来事の記憶です。出来事内容の情報のみならず、関連する時間・空間的信息も含まれ、さらにはその出来事にもなった感情や思考も記憶されています。たとえば、「先週の土曜日に家族で青葉城址に花見に行った。そのとき食べたずんだ餅がとても甘く美味しかった」といった記憶です。

ADではエピソード記憶の障害で初発し、その程度は全経過を通じてほかの認知機能障害より優勢にみられます。MCI due to ADの段階では、エピソード記憶のみの選択的な障害を意味する健忘症候群 (amnesic syndrome) に類似する病態を示し、Amnesic MCIとも呼ばれます。上述の例では、花見に行ったこと自体を忘却して回答できません。

エピソード記憶障害は、記銘、保持、想起という記憶に必要なプロセスのどの段階の障害であるのかが明らかにされていません。エピソード記憶が障害されると、日常生活にどのような不具合が生ずるのでしょうか。たとえば、「数時間前に息子さんに電話をかけたことを忘れ、同じ内容の電話を何度もかける」、「前日に背広を買ったが、同じような色の背広を今日も買って来た」、「1日1回の内服薬を朝飲んだことを忘れ、昼にまた飲もうとする」などです。日々の生活に支障が出るわけではありませんが、同居している家族は「何だか変だ。以前と違う」ことに気づきはじめます。

エピソード記憶をテストする検査がいくつも開発されていますが、それらの検査法に共通しているのは、即時再生機能と遅延再生機能の両者を調べることにより、時間軸に沿った記憶の保持能をチェックすることです。Free and Cued Selective Reminding Test,

Rey Auditory Verbal Learning Test, California Verbal Learning Testなどがこれに該当します。ほかに Wechsler Memory Scale における文章の一節を記憶させる論理記憶課題などもあります。

MCI では、記憶機能以外の認知機能障害についてもチェックする必要があります。実行機能、注意機能、言語機能、視空間認知機能などです。Trail Making Test (実行機能)、Boston Naming Test (言語機能)、Letter and Category Fluency Test (言語機能)、Figure Copying (視空間認知機能)、Digit Span Forward (注意機能) などがありません。しかし、上記のような確立された認知機能検査用具が手元にない場合には、別な方法で代替することもできます。たとえば、ペン、クリップ、1000円札を見せ、名称を言わせた後にそれらを別々の場所に隠し、数分後に何がどこへ置かれたかを問うこともあります。簡単に施行できる検査ですが、初期の軽度認知障害に対する感度は低く、また記憶以外の認知機能をチェックすることにはなりません。

一個人のなかで、時間軸に沿って認知機能が進行性に悪化することが MCI due to AD 診断の有力な根拠となるので、可能なかぎり認知機能の縦断的な変化を追うことが重要となります。すべての認知機能検査は年齢や教育歴、あるいは文化的背景の相違に影響を受けるとされています。いくつかの認知機能検査では、年齢や教育歴を配慮したうえでの正常範囲の設定がなされていますが、90歳以上の健常高齢者で正常範囲の設定がなされている検査はほとんどありません。多様な異なる文化的背景をもつ人種間で信頼性を検討するような研究は未実施のまま残されています。

臨床および認知機能評価の最初のステップは、患者本人、家族などの情報提供者または長年にわたり患者を診てきたかかりつけ医からもたらされる「認知機能低下の疑い」から

はじまります。認知機能低下の疑いは、患者本人や情報提供者から示される病歴である場合と、かかりつけ医による観察である場合があります。理想的には繰り返して評価できればそれに越したことはありませんが、1回の評価でそれを行なうには病歴に頼らざるをえないのが実情でしょう。

患者の示す認知機能レベルは、年齢や教育歴を考慮しても正常域から逸脱していますが、かといって日常生活が脅かされるほどのレベルにはいたっていません。障害されている認知ドメインはエピソード記憶だけであっても二つ以上であっても構いません。評価に当たる医師は、記憶機能がとくに強く障害されているとか、逆に言語機能障害や視空間機能障害などの記憶以外のドメイン障害が前面に出ているなどを記載していくことになります。典型的には、AD に進行する前段階としての MCI due to AD ステージではエピソード記憶の障害が中心となり、しだいに複雑な作業遂行が困難となりますが、まだ認知症レベルにはいたっていません。しかし、この段階でも海馬や嗅内皮質などの側頭葉内側構造物に萎縮や機能異常が生じていることが報告されています⁷⁾。

意味性認知症との違い

.....

一方、意味記憶は社会的・文化的に共有された知識や概念の記憶で、言葉の意味や物体の属性などを永続的に貯蔵する機能です。慣用句やことわざ、社会的通念、1日は24時間などの日常生活の決まりごととも意味記憶とされます。意味記憶を支える神経基盤として側頭葉前方部が注目されています⁸⁾。

AD 病変は側頭葉内側にはじまり、最終的には脳幹部を含めた全脳に広がりますが、MCI due to AD で側頭葉下面から外側、さらに前方へと神経変性が進行することはないため、MCI due to AD ステージで意味記憶

の明らかな障害をみることは少ないです。しかし、visual variant や language variant といった非典型的な MCI due to AD も少ないながら指摘されています⁴⁾。病初期から明らかな意味記憶障害があれば、前頭側頭葉変性症としての意味性認知症 (semantic dementia) を考えなければなりません。

<文 献>

- 1) Petersen RC, Smith GE, Waring SC et al: Mild cognitive impairment: Clinical characterization and outcome. Arch Neurol 56: 303-308, 1999
- 2) Winblad B, Palmer K, Kivipelto M et al: Mild cognitive impairment - beyond controversies towards a consensus: Report of the international working group on Mild cognitive impairment. J Intern Med 256: 240-246, 2004
- 3) 荒井啓行, 工藤幸司, 古川勝敏, 富田尚希: MCI の概念と Preclinical AD の提唱. Cognition and Dementia 10: 8-12, 2011
- 4) Albert MS, DeKosky ST, Dickson D et al: The diagnosis of mild cognitive impair-

ment due to Alzheimer's disease: Recommendations from the National Institute on Aging - Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers demen 7: 270-279, 2011

- 5) 荒井啓行: アルツハイマー病を背景にした軽度認知障害の診断——米国国立老化研究所/アルツハイマー病協会合同作業グループからの提言. Cognition and Dementia 11: 19-27, 2012
- 6) Mangialasche F et al: Alzheimer's disease: Clinical trials and drug development. Lancet Neurol 9: 702-716, 2010
- 7) Dickerson BC, Sperling RA.: Functional abnormalities of the medial temporal lobe memory system in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: Insights from functional MRI studies. Neuropsychologia 46: 1624-1635, 2008
- 8) 菊池大一, 藤井俊勝: エピソード記憶と意味記憶. 日本臨床 増刊号「認知症学 (上)」: 326-329, 2011

[あらい・ひろゆき/老年医学]

[おおるい・たかし/老年医学]

[ふるかわ・かつとし/老年医学]

[とみた・なおき/老年医学]

からだの科学

◎特別企画 **気になる胃腸** 屋嘉比康治/編

246

| | | |
|--|---|--|
| <p>気になる症状 逆流性食道炎・GERD 急性胃炎とAGML 慢性胃炎とヘリコバクター・ピロリ感染症 機能性ディスペプシア</p> | <p>中村孝司 黒澤 進・屋嘉比康治 森田賀津雄・平石秀幸 今瀬教人・徳永健吾・高橋信一 原澤 茂</p> | <p>消化性潰瘍 (胃・十二指腸潰瘍) 炎症性腸疾患 (クローン病) 過敏性腸症候群 大腸ポリープ ストレスと胃腸 胃腸を快適に保つために</p> <p>屋嘉比康治 鈴木康夫 松枝 啓 安食 元・久山 泰 金子 宏 加藤公敏・渡辺知明・荒川泰行</p> |
|--|---|--|

◎税込定価 1250円

III. 認知機能診断法

臨床診断

吉川勝敏 鎌田真希 石木愛子
富田尚希 荒井啓行

Clinical diagnosis

Katsutoshi Furukawa, Maki Kamada, Aiko Ishiki,
Naoki Tomita, Hiroyuki Arai

Department of Geriatrics and Gerontology,
Institute of Development, Cancer and Aging, Tohoku University

Abstract

The commonly followed definition of dementia is the one described by the International Statistical Classification of Diseases, 10th Revision (ICD-10, World Health Organization) or the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-V, American Psychiatric Association). The most important aspect in the diagnosis of dementia is the assessment of overall mental and functions, including living environment, activities of daily living, cognition, mental status, and behavior. Physicians should diagnose dementia on the basis of not only cognitive test results or radiological findings but also other available information, including that obtained from the families or caregivers. Tests for the quantitative evaluation of cognitive function and dementia include the Mini-Mental State Examination (MMSE), Hasegawa Dementia Scale-Revised (HDS-R), Clinical Dementia Rating (CDR), and Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R).

Key words: dementia, diagnosis, biomarker, cognitive test

はじめに

認知症の臨床診断において最も重要なことは、患者の生活環境、日常生活動作 (activity of daily living: ADL)、認知機能、精神症状、行動異常などを全人的かつ総合的に評価することである。単に Mini-Mental State Examination (MMSE) の点数や、放射線画像のみにより診断するのではなく、上記の情報を本人のみならず家族や介護者から十分に聴取したうえで、診察および検査を進めて最終診断を下すことが肝要だと考え

られる。

1. 認知症の定義

世界保健機関の国際疾病分類第10版 (International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision: ICD-10)¹⁾による認知症の定義は「通常、慢性または進行性の脳疾患によって生じ、記憶、思考、見当識、理解、計算、学習、言語、判断等多数の高次脳機能の障害からなる症候群」とされている (表1)。また米国精神医学会による精神疾

表1 ICD-10による認知症診断基準の要約

| | |
|----|---|
| G1 | 以下の各項目を示す証拠が存在する |
| 1) | 記憶力の低下 新しい事象に関する著しい記憶力の減退, 重症の例では過去に学習した情報の想起も障害され, 記憶力の低下は客観的に確認されるべきである |
| 2) | 認知能力の低下 判断と思考に関する能力の低下や情報処理全般の悪化であり, 従来の遂行能力水準からの低下を確認する |
| | 1), 2)により, 日常生活動作や遂行能力に支障をきたす |
| G2 | 周囲に対する認識(すなわち, 意識混濁がないこと)が, 基準G1の症状をはっきりと証明するのに十分な期間保たれていること, せん妄のエピソードが重なっている場合には認知症の診断は保留 |
| G3 | 以下の一項目以上を認める |
| 1) | 情緒易変性 |
| 2) | 易刺激性 |
| 3) | 無感情 |
| 4) | 社会行動の粗雑化 |
| G4 | 基準G1の症状が明らかに6カ月以上存在していて確定診断される |

患の診断・統計マニュアル改訂第3版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-III-R)²⁾では認知症の診断基準が明記されているが, 改訂4版(DSM-IV-TR)³⁾では認知症自体の診断基準の記載はなく, 各認知症疾患の基準の共通項が認知症の診断基準になっている。更に2013年, DSM-Vがリリースされた⁴⁾。DSM-IV-TRでは認知症関連の章は‘せん妄, 認知症, 健忘および他の認知障害’という診断カテゴリーであったが, DSM-Vではneurocognitive disordersとして一つにまとめられ, その中に①delirium, ②major neurocognitive disorder, ③minor neurocognitive disorderの3つに分類されている。②は従来の‘認知症’, ③は‘軽度認知機能障害(mild cognitive impairment: MCI)’に相当する。②においては1つ以上の認知機能領域において病前よりその機能が著しく低下しており, その機能低下は自立した生活を妨げるほど重篤であると定義されている。neurocognitive disordersの基礎疾患は, アルツハイマー病(Alzheimer's disease: AD), 血管性認知症(vascular dementia: VaD), 前頭側頭葉変性症(frontotemporal lobar degeneration), 頭部外傷による認知症, レヴィ小体型認知症(dementia with Lewy bodies: DLB), パーキンソン病, HIV感染症, 薬剤使用, ハンチントン舞

踏病, プリオン病, その他, と記載されている。

その他, 認知症の原因疾患を表2に提示する。一次性の脳障害, および脳以外の疾患によって生ずる二次性の脳障害, いずれも認知症の原因になりうる。一次性のものは大きく変性疾患と非変性疾患に分類される。現在我が国ではAD, VaD, DLBの順に多いと考えられている。4番目以下については, 報告によって異なるのが現状である⁵⁾。

2. 診断に際して

認知症の診断においては, まず問診による情報聴取から始める。循環器や消化器疾患の診断と異なるのは, 家族や介護者からの情報聴取が不可欠な点である。認知症患者において, 本人の物忘れや見当識障害の自覚が乏しいことは少なくない(自分の認知機能の低下を把握するだけの判断能力が低下しているともいえる)。家族や介護者から, 認知機能低下の発症時期, 臨床経過, 現在の臨床症状について詳細に聴取することが重要である。また, 認知症の記憶力障害や見当識障害といった中核症状のみならず, 患者のADLやbehavioral and psychological symptoms of dementia(BPSD)についてもそれらの経過, 現状を同伴者から詳しく聞き取るべきである。

表2 認知症の原因疾患

| | |
|--------------|--|
| I. 中枢神経疾患 | |
| A. 神経変性疾患 | a. アルツハイマー病 b. レヴィ小体型認知症 c. 前頭側頭葉変性症(ピック病を含む) d. 進行性核上性麻痺 e. 大脳皮質基底核変性症 f. ハンチントン病 g. 多系統萎縮症, 脊髄小脳変性症 h. 運動ニューロン病に伴う認知症 |
| B. 脳血管障害 | a. 血管性認知症(脳梗塞, 脳出血) b. ビンスワンガー病 c. 低酸素脳症 |
| C. 感染性疾患 | a. ウイルス感染(単純ヘルペス脳炎, AIDS 脳症, 亜急性硬化性全脳炎, 進行性多巣性白質脳症) b. 細菌感染(細菌性脳炎, 脳膿瘍) c. 真菌感染 d. スピロヘータ感染症(神経梅毒) e. プリオン感染症(クロイツフェルトヤコブ病) |
| D. 脳外科領域の疾患 | a. 正常圧水頭症 b. 慢性硬膜下血腫 c. 脳腫瘍 d. 脳外傷 |
| II. 全身疾患 | |
| A. 内分泌, 代謝疾患 | a. 甲状腺機能異常 b. 副腎機能異常(クッシング症候群) c. 糖尿病(低血糖も含む) d. 遺伝性代謝疾患(脂質, 糖タンパク, アミノ酸, など) |
| B. 肝疾患 | a. ウイルソン病, 高アンモニア血症 |
| C. 腎疾患 | a. 尿毒症 |
| D. 欠乏性疾患 | a. ウェルニッケ・コルサコフ症候群(ビタミンB ₁ 欠乏症) b. ペラグラ(ニコチン酸欠乏症) c. ビタミンB ₁₂ 欠乏症 |
| E. 中毒性疾患 | a. エタノール(アルコール性脳症) b. 薬剤(抗がん剤, 免疫抑制剤, 向精神薬, など) c. 金属(アルミニウム, マンガン, 水銀, など) d. その他(一酸化炭素, トルエン, ヒ素, など) |
| F. 非感染性炎症 | a. SLE, ベーチェット病, サルコイドーシス, 膠原病 |
| G. その他 | a. 貧血, 電解質異常, など |

問診の後は、いわゆる内科的な一般診察を行い、身体的な問題がないかどうかを確認する。次に神経学的診察を行う。筋トーンスの異常、腱反射の亢進、病的反射などについて注意を払い、局所神経学的症状(focal neurological signs)について確認する。例として、腱反射の左右差を認めればVaD、筋固縮などの錐体外路徴候を認めればDLBを疑う、などが挙げられる。

次に神経心理検査に移り、認知機能、BPSD

などの客観評価を進める。初診の段階では、MMSEまたは改訂版長谷川式認知症スケール(HDS-R)が一般的であろう。また介護者ならびに本人から情報を聴取して行うClinical Dementia Rating(CDR)は認知症診断におけるゴールドスタンダードと考えられている。ADの認知機能に特化した検査としてはAlzheimer's Disease Assessment Scale-Cognition(ADAS-Cog)、記憶に特化した検査としては改訂版

表3 NIA-AAのADによる認知症の診断基準

| 診断区分 | バイオマーカーによるADの可能性 | A β (PETあるいは脳脊髄液) | 神経細胞障害(脳脊髄液タウ, FDG-PET, MRI) |
|---------------------------------|------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| probable AD dementia | | | |
| 臨床診断基準による | 情報なし | 入手できない/疑わしい/不確定 | 入手できない/疑わしい/不確定 |
| ADの病態生理学的過程の3段階の根拠による | 中間 中間 高 | 入手できない/不確定 陽性 陽性 | 陽性 入手できない/不確定 陽性 |
| possible AD dementia (非典型的な臨床像) | | | |
| 臨床診断基準における | 情報なし | 入手できない/疑わしい/不確定 | 入手できない/疑わしい/不確定 |
| ADの病態生理学的エビデンスによる | 高(ただし、他の原因を除外するものではない) | 陽性 | 陽性 |
| ADによるものでなさそうな認知症 | 最低 | 陰性 | 陰性 |

(文献⁸⁻¹⁰⁾より引用)

Wechsler Memory Scale-Revised (WMS-R), BPSDの評価法としてはNeuropsychiatric Inventory (NPI)などが認知機能評価、認知症診断において高いエビデンスを有している。

血液ならびに脳脊髄液のバイオマーカーにおいては、血液では甲状腺機能、血糖値、ビタミンB₁₂ならびにB₁₂、アンモニアといった、認知機能に影響を及ぼしうる全身性の疾患に関する項目の検査を行う。脳脊髄液に関してはAD、プリオン病などで総タウ、リン酸化タウの上昇、またADにおいてアミロイド β ペプチド(A β)₁₋₄₂の低下がコンセンサスを得ている。近年、脳脊髄液における総タウ、リン酸化タウが認知症診断において保険収載され、日常診療において多用されてきている。一方、残念ながら血液のバイオマーカーについてはADなどの神経変性疾患において高いエビデンスを得たものはないのが現状である。

画像に関しては頭部CT、MRIといった形態画像、脳血流SPECTといった機能画像を組み合わせで診断に用いる(別稿「画像診断」参照)。

3. アルツハイマー病の新しい診断概念

米国のNational Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) と Alzheimer's Disease and Related Disorders

Association (ADRDA)は1984年にADの診断基準⁷⁾を発表した。この診断基準はこれまで臨床、研究の場で幅広く活用されてきた。一方、近年の、神経心理検査、脳脊髄液中のA β 、タウなどの体液バイオマーカー、更にCT、MRI、SPECT、PETといった放射線画像診断法の改良、開発に伴いこの1984年版の改訂が待ち望まれていた。そこで、2011年にNational Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA)が27年ぶりに新たなADの診断基準をリリースした⁸⁻¹⁰⁾(表3)。この診断基準は、ADの診断精度を高めること、更には認知症を発症する前のADの検出を可能にすることを目的としている。このNIA-AA基準で重要な点は、ADを「認知症発症後の状態」と定義するのではなく、「ADの病理学的所見の出現以降をAD」と定義している点である。ADの病理で最初に出現するのは、脳内へのA β の沈着であることがAlzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI)などの縦断研究で明らかになっている。すなわちアミロイドPETにおける脳内へのA β の沈着および脳脊髄液中のA β ₁₋₄₂の低下がADの病理変化で最も早期に確認されるバイオマーカーである。これらの知見より本基準では、生活に支障のない範囲の軽度の認知機能障害が出現し、かつADの病理が確認できた状態を「ADによるMCI

表4 DuboisらによるADクライテリア

| | AD 診断 | 特異的な記憶 検査での障害 | バイオマーカー のエビデンス | 追加条件 |
|--|-------|------------------|-------------------|------------------------------|
| 典型的AD (typical AD) | あり | 必要 | 必要 | なし |
| 非典型的AD (atypical AD) | あり | 不要 | 必要 | 特異的な臨床症状 |
| 前駆的AD (prodromal AD) | あり | 必要 | 必要 | 認知症はない |
| AD 認知症 (AD dementia) | あり | 必要 | 必要 | 認知症はある |
| 混合型AD (mixed AD) | あり | 必要 | 必要 | 合併症の存在 |
| 前臨床AD (preclinical AD) | | | | |
| 1) 無症候性のADリスク (asymptomatic at risk for AD) | なし | 示さない | 必要 | ADの症状はない |
| 2) 症状出現前AD (presymptomatic AD) | なし | 示さない | 不要 | ADの症状はなく、AD単一 遺伝子の突然変異がある |
| 3) 軽度認知機能障害 (mild cognitive impairment) | なし | 不要 | 不要 | ADに特異的な症状または バイオマーカーがない |

(文献^{12,13)}より引用)

(MCI due to AD)', 日常生活に支障をきたす認知機能の状態でのADの病理が確認された状態を 'ADによる認知症 (Dementia due to AD)' と定義している。更にこのNIA-AAで新規に加えられた診断カテゴリーに 'preclinical AD' がある。これはA β をはじめとした各種バイオマーカーはAD病理の存在を示唆するが、臨床症状が全くないか、あってもごく軽微な状態と定義される。この 'preclinical AD' の状態は、少なくとも我が国の認知症診療において現時点では治療介入の対象にはなりえず、あくまで研究上の定義といえる。'preclinical AD' が定義された背景には、これまでのアミロイドをターゲットとした根本治療薬の治験の失敗がある。過去の多くの治験ではDementia due to ADの認知症患者が対象であったが、実際A β の沈着は認知症発症の15-20年前に始まっていると推測されている。すなわち既にA β が十分に沈着し老人斑が形成されてしまったDementia due to ADの症例を対象にしても抗アミロイド薬は十分な効果を発揮できないので、より早期の状態の症例を対象にすべきだとの考え方より 'preclinical AD' の策定に至ったと考えられる。

NIA-AAの診断基準と別に、フランスのDuboisらがInternational Working Group for New Research Criteria for the Diagnosisというグループを結成し、2010年に新たなADの定義を提唱した^{12,13)}。彼らは研究上の基準としてADを表4のように分類した。バイオマーカーの重要性を強調し、かつprodromal ADやasymptomatic at risk for ADといったADの前駆段階を重要視した点においてはNIA-AA基準に類似している。

おわりに

認知症患者数の爆発的増加に伴い認知症対策は医療の枠を超えて、政治や社会をも巻き込んだ現代の日本のみならず世界各国の一大課題といえる。一方、英国などの欧州の幾つかの国では、認知症の有病率の低下も報告され始めた¹⁴⁾。これはなにより生活習慣病の適切なマネジメントが最大の原因であろうと推測される。今後も生活習慣病のマネジメントに加え、よりの確な認知機能の評価と認知症の診断が、今後の認知症対策において極めて重要であると考えられる。

圖文 献

- 1) World Health Organization: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, 10th Revision. World Health Organization, Geneva, 1993.
- 2) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 3rd Edition, Revised. American Psychiatric Association, Washington DC, 1987.
- 3) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th Edition, Text Revision. American Psychiatric Association, Washington DC, 2000.
- 4) American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 5th Edition. American Psychiatric Association, Washington DC, 2013.
- 5) 朝田 隆: DSM-V における認知機能障害診断の動向. *Cognition and Dementia* 11: 47-50, 2012.
- 6) 「認知症患者治療ガイドライン」作成合同委員会(編): 認知症患者治療ガイドライン(日本神経学会監), 医学書院, 2010.
- 7) McKhann G, et al: Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 34: 939-944, 1984.
- 8) Jack CR Jr, et al: Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 257-262, 2011.
- 9) Sperling RA, et al: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 280-292, 2011.
- 10) Albert MS, et al: The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 270-279, 2011.
- 11) McKhann GM, et al: The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 263-269, 2011.
- 12) Dubois B, et al: Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. *Lancet Neurol* 9: 1118-1127, 2010.
- 13) 葛西真理, 目黒謙一: Dubois criteria における 'prodromal AD'. *Cognition and Dementia* 11: 51-55, 2012.
- 14) Matthews FE, et al: A two-decade comparison of prevalence of dementia in individuals aged 65 years and older from three geographical areas of England: results of the Cognitive Function and Ageing Study I and II. *Lancet* 382: 1405-1412, 2013.

アルツハイマー病の 新診断基準と脳画像

東北大学加齢医学研究所老年医学分野

古川 勝敏, 鎌田 真希, 石木 愛子
富田 尚希, 荒井 啓行

KEY WORDS

- アルツハイマー病(AD)
- NIA-AAガイドライン
- Duboisクライテリア
- DSM-5

はじめに

近年の画像診断法の進歩に伴い、この数年で認知症、アルツハイマー病(Alzheimer's disease; AD)についていくつかの診断概念やガイドラインがリリースされている。本項では① National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA)によるガイドライン¹⁾、②フランスのDuboisを中心としたInternational Working Group for New Research Criteria for the Diagnosisが作成したいわゆるDuboisクライテリア²⁾、および③米国精神医学会による精神疾患の診断・統計マニュアル改訂第5版(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-5; DSM-5)³⁾という3つの診断基準において、脳画像がいかに取り扱われているかをまとめてみた。

I. NIA-AAのガイドライン

2011年にNIAとAAが共同で27年ぶりに新たなADの診断ガイドラインをリリースした(表1)¹⁾。このNIA-AAガイドラインのユニークな点は、ADを「認知症発症後の状態」と定義するのではなく、ADの病理学的所見の出現以降をADと定義しているところである。本基準では、生活に支障のない範囲の軽度認知機能障害(mild cognitive impairment; MCI)が出現し、かつADの病理が確認できた状態を「ADによるMCI(MCI due to AD)」, 日常生活に支障をきたす認知機能の状態をADの病理が確認された状態を「ADによる認知症(AD dementia)」と定義している。さらにこのガイドラインでは「preclinical AD」という概念が提唱されている。

ADの病理変化は①アミロイドβ(Aβ)の集積[脳脊髄液(CSF)中のAβ,

Brain imaging in the new diagnostic criteria of Alzheimer's disease

Katsutoshi Furukawa (准教授)

Maki Kamada

Aiko Ishiki

Naoki Tomita (助教)

Hiroyuki Arai (教授)

表1. NIA-AAのADによる認知症の診断基準^{1),4)}

| 診断区分 | バイオマーカーによる ADの可能性 | A β (PETあるいは脳脊髄液) | 神経細胞障害 (脳脊髄液タウ, FDG-PET, MRI) |
|--|------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| probable AD dementia | | | |
| 臨床診断基準による | 情報なし | 入手できない/疑わしい/不確定 | 入手できない/疑わしい/不確定 |
| ADの病態生理学的過程 の3段階の根拠による | 中間 中間 最高 | 入手できない/不確定 陽性 陽性 | 陽性 入手できない/不確定 陽性 |
| possible AD dementia (非典型的な臨床像) | | | |
| 臨床診断基準による | 情報なし | 入手できない/疑わしい/不確定 | 入手できない/疑わしい/不確定 |
| ADの病態生理学的 エビデンスによる | 高い(ただし, 他の原因を 除外するものではない) | 陽性 | 陽性 |
| ADによるもので なさそうな認知症 | 最低 | 陰性 | 陰性 |

アミロイドPET], ②シナプス機能の障害 (FDG-PET, functional MRI), ③タウ病理 (CSF中のタウ), ④脳萎縮 (structural MRI; sMRI), ⑤認知機能, ⑥臨床症状, の順に変化すると考えられる。本ガイドラインでは, これらのうち2つの重要な病理学的指標として (I)「A β 」と (II)「神経細胞障害」をあげている。それぞれの指標のバイオマーカーとして前者にはCSF中のA β とアミロイドPETを, 後者にはCSF中のタウ, FDG-PET, sMRIを含めている。

「preclinical AD」においては, 「A β 」の指標のみ陽性のものをStage 1, 「A β 」と「神経細胞障害」の両者が陽性のものをStage 2, 「A β 」と「神経細胞障害」に加えて「わずかな認知機能の変化」が加わったものをStage 3としている。

「MCI」においては, まずMCI自体をコアクリニカルクライテリアで定義し, 「MCI due to AD」は「A β 」と「神経細胞障害」の状態に従い, ADを原因とする可能性を「最低」, 「中間」, 「最高」の3段階に区別している。

「AD dementia」の診断カテゴリーを表1^{1),4)}に示す。ここでも臨床症状に加えて「A β 」と「神経細胞障害」のバイオマーカーの所見に従い「probable AD dementia」, 「possible AD dementia」ならびに「dementia-unlikely due to AD」に区別し, さらにADを原因とする可能性を「最低」, 「中間」, 「高い」, 「最高」に分類している。

II. Duboisクライテリア

NIA-AAの診断基準に先駆けて, フランスのBruno Duboisらが2007年と2010年に新たなADの定義を提唱した^{9),10)}。彼らは各種バイオマーカーを加味し研究上の基準としてADを表2⁹⁾のように分類した。バイオマーカーの重要性を強調し, かつprodromal ADやasymptomatic at risk for ADといったADの前駆段階を重要視した点においてはNIA-AA基準に類似している。Duboisクライテリアでは, ADのバイオマーカーを“pathophysiological markers”と“topographical markers”

とに分類し, 前者にはCSFのA β , 総タウ, リン酸化タウ, アミロイドPETを, 後者には内側側頭葉の萎縮とFDG-PETにおける側頭頂葉のグルコース代謝低下を含めている。pathophysiological markersはtopographical markersに比しADの早期より変化が現れるもので, topographical markersは神経変性を意味するマーカーとしている。さらにpathophysiological markersはpreclinicalも含めADのすべてのステージで変化するものであるが, topographical markersは認知機能に変化が現れた時点で変化するものと結んでいる。

III. DSM-5

2013年にDSMの新版であるDSM-5がリリースされた⁷⁾。前版のDSM-4-TRでは認知症については「せん妄, 認知症, 健忘および他の認知障害」という診断カテゴリーのなかにあったが⁹⁾, DSM-5ではneurocognitive disordersとして1つにまとめられ, さらにそれを

表2. DeboisらによるADクライテリア⁹⁾

| | AD診断 | 特異的な記憶検査での障害 | バイオマーカーのエビデンス | 追加条件 |
|---|------|--------------|---------------|--------------------------|
| 典型的AD (typical AD) | あり | 必要 | 必要 | 必要なし |
| 非典型的AD (atypical AD) | あり | 不要 | 必要 | 特異的な臨床症状 |
| 前駆的AD (prodromal AD) | あり | 必要 | 必要 | 認知症はない |
| AD認知症 (AD dementia) | あり | 必要 | 必要 | 認知症はある |
| 混合型AD (mixed AD) | あり | 必要 | 必要 | 合併症の存在 |
| 前臨床AD (preclinical AD) | | | | |
| 1) 無症候性のADリスク (asymptomatic at risk for AD) | なし | 示さない | 必要 | ADの症状はない |
| 2) 症状出現前AD (presymptomatic AD) | なし | 示さない | 不要 | ADの症状はなく、AD単一遺伝子の突然変異がある |
| 軽度認知機能障害 (mild cognitive impairment) | なし | 不要 | 不要 | ADに特異的な症状またはバイオマーカーがない |

delirium, major neurocognitive disorder, minor neurocognitive disorderの3つに分類している。neurocognitive disorderの基礎疾患は、AD、血管性認知症、前頭側頭葉変性症、頭部外傷による認知症、レヴィ小体型認知症、パーキンソン病、ヒト免疫不全ウイルス (human immunodeficiency virus: HIV) 感染症、薬剤使用、ハンチントン舞蹈病、プリオン病、その他、と記載されている。基本的にDSM-5は「臨床症状による診断」という姿勢が貫かれており、バイオマーカーや画像については解説において記載がある。DSM-5でのADの診断マーカーはNIA-AA基準に準拠しており、アミロイドPETやCSF中のAβは特異性が高くADの診断に有用であるが、MRIで見られる海馬や側頭頭頂葉の萎縮、FDG-PETでの側頭頭頂葉の代謝低下、CSF中の総タウ、リン酸化タウの上昇は、細胞障害の指標であり、ADとしての特異性はAβのマーカーより低いと記載されている。結論として現時点でこれらのマーカーは確証には至っておらず、さらなる検討、また新たなバ

イオマーカーの出現が期待されると結んでいる。

おわりに

述べてきたように、近年は毎年のように何らかの団体が新たな認知症の診断基準を発表する、という状況が続いている。これは認知症患者数の増加、ADNI (The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative) などの臨床研究の推進、新たな治療薬の開発、脳画像やバイオマーカーの開発、といったさまざまな要因が絡み合っただけの結果であろう。一方、2013年の時点ではまだタウイメージングを取り入れた診断基準はリリースされていない。今後はタウイメージングやfunctional MRIを含めた新たな診断基準が発表されていくことであろう。

文 献

1) Jack CR Jr, Albert MS, Knopman DS, et al: Introduction to the recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association work-

groups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 257-262, 2011

2) McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, et al: The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 263-269, 2011

3) Albert MS, DeKosky ST, Dickson D, et al: The diagnosis of mild cognitive impairment due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 270-279, 2011

4) Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, et al: Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 7: 280-292, 2011

5) Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al: Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria. *Lancet*

Neurol 6 : 734-746, 2007

- 6) Dubois B, Feldman HH, Jacova C, et al : Revising the definition of Alzheimer's disease : a new lexicon. Lancet Neurol 9 : 1118-1127, 2010
- 7) American Psychiatric Association :

Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders Fifth Edition. Washington DC. American Psychiatric Association, 2013

- 8) American Psychiatric Association : Diagnostic and Statistical Manual of

Mental Disorders Fourth Edition. Text Revision. Washington DC. American Psychiatric Association. 2000

Royal Jelly Prevents the Progression of Sarcopenia in Aged Mice In Vivo and In Vitro

Kaijun Niu,^{1,2} Hui Guo,³ Yinting Guo,⁴ Satoru Ebihara,⁵ Masanori Asada,⁶ Takashi Ohru,⁷
Katsutoshi Furukawa,⁶ Masakazu Ichinose,⁸ Kazuhiko Yanai,⁹ Yukitsuka Kudo,¹⁰ Hiroyuki Arai,⁶
Tatsuma Okazaki,⁸ and Ryoichi Nagatomi²

¹Lab of Nutritional Epidemiology, Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin, People's Republic of China.

²Division of Biomedical Engineering for Health & Welfare, Tohoku University Graduate School of Biomedical Engineering, Sendai, Japan.

³Tianjin University of Sport, Tianjin, China.

⁴Department of Behavioral Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan.

⁵Department of Internal Medicine and Rehabilitation Science, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai, Japan.

⁶Department of Geriatrics and Gerontology, Division of Brain Sciences, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.

⁷Division of Geriatric Pharmacotherapy, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.

⁸Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan.

⁹Department of Pharmacology, Graduate School of Medicine, Tohoku University, Sendai, Japan.

¹⁰Clinical Research, Innovation and Education Center, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan.

Address correspondence to Kaijun Niu, MD, Lab of Nutritional Epidemiology, Department of Nutrition and Food Science, School of Public Health, Tianjin Medical University, 22 Qixiangtai Road, Heping District, 300070 Tianjin, People's Republic of China. Email: nkj0809@gmail.com

Sarcopenia is characterized by the age-related loss of muscle mass and strength. One of the mechanisms of sarcopenia is the loss in the function and number of muscle satellite cells. Royal jelly (RJ) is a health food used worldwide. To obtain better digestion and absorption than RJ, protease-treated RJ (pRJ) has been developed. RJ and pRJ have been suggested to have potential pharmacological benefits such as prolonging the life span and reducing fatigue. Because these effects may improve sarcopenia and the functions of satellite cells, we examined the effects of RJ or pRJ treatment on the skeletal muscles in an animal model using aged mice. In vivo, RJ/pRJ treatment attenuated the decrease in the muscle weight and grip strength and increased the regenerating capacity of injured muscles and the serum insulin-like growth factor-1 levels compared with controls. In vitro, using isolated satellite cells from aged mice, pRJ treatment increased the cell proliferation rate, promoted cell differentiation, and activated Akt intracellular signaling pathway compared with controls. These findings suggest that RJ/pRJ treatment had a beneficial effect on age-related sarcopenia.

Key Words: Aged mice—Sarcopenia—Satellite cells—Royal jelly—Insulin-like growth factor-1—Akt signaling.

Received September 3, 2012; Accepted March 1, 2013

Decision Editor: Rafael de Cabo, PhD

THE population of people aged 60 and older is currently growing at the rate of 2.6% per year, which is more than twice the rate of growth of the total population in the world (1). In general, aging is accompanied by frailty, functional limitations, and disabilities that interfere with the activities of daily life. These factors reduce the quality of life of the elderly patients and eventually cause their loss of autonomy in daily life. Sarcopenia is the age-related loss of the muscle mass and strength, which causes frailty, functional limitations in daily living, disabilities, and, finally, a higher mortality rate in the elderly patients (2).

Satellite cells are resident myogenic progenitors in the skeletal muscles. They play a central role in the growth and regeneration of the skeletal muscles (3). In response to stimulation, satellite cells form myoblasts, fuse together, and generate new fibers (4). The age-related

functional disability and decrease in the number of satellite cells contribute to the development of sarcopenia (5). Thus, maintaining the functions of satellite cells and their numbers may reduce sarcopenia and, furthermore, may improve the regenerating capacity of the skeletal muscles in the elderly patients. However, to isolate satellite cells, specific cell surface markers were not available until recently (6).

Among the factors that stimulate satellite cells, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) plays a central role. IGF-1 stimulates satellite cell proliferation, their differentiation into myoblasts, and, finally, their differentiation into myotubes (4). IGF-1 is the most important mediator of muscle growth and repair (7). Furthermore, a recent study suggested the potential of IGF-1 to improve sarcopenia in the elderly patients (7).

Worker honeybees produce royal jelly (RJ) in their hypopharyngeal and mandibular glands (8). RJ has been used worldwide for many years as commercially available medical products and health foods and has been considered beneficial to health. These days, a modified RJ product, protease-treated RJ (pRJ), has been developed to improve digestion and absorption compared with regular RJ. Accumulating evidence suggests that RJ is rich in a wide variety of nutrients, including vitamins, minerals, and more than 20 amino acids (9). RJ also has numerous potential pharmacological capacities, such as prolonging the life span (in mice and nematodes) (10,11) and reducing fatigue (12), hypertension (13), and hypercholesterolemia, as well as antioxidant and anti-inflammatory effects (8,14–16).

Because these effects of RJ might have a potential to improve sarcopenia and the functions of satellite cells (17–21), we hypothesized that RJ might have a beneficial effect on the prevention of sarcopenia. Furthermore, we hypothesized that this effect might involve IGF-1. To the best of our knowledge, few studies have examined the effects of RJ on muscles in elderly patients or aged animals or the relationship between RJ and IGF-1. Thus, in this study, we examined the effects of the RJ/pRJ on muscle weight, muscle strength, satellite cell functions, the regenerating capacity of the skeletal muscles *in vivo* and *in vitro*, and the involvement of IGF-1 in an animal model using aged mice.

METHODS

Culture Conditions of Satellite Cells and Cell Proliferation Assay

Sorted satellite cells from untreated, aged mice were cultured in growth medium containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium with 20% fetal bovine serum (MP Biomedicals, Morgan Irvine, CA), 2.5 ng/mL basic fibroblast growth factor (Invitrogen, Eugene, OR), 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin (Sigma, St. Louis, MO). Satellite cells under eight passages were used in this study. Differentiation was induced as previously shown with some modifications in differentiation medium containing high-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium, 5% horse serum (Sigma), penicillin, and streptomycin for several days (22). RJ and pRJ were dissolved in water, sterilized by a filter, and then added to the culture medium at the following concentrations: 100, 200, 500, or 1000 µg/mL. Some cells were serum starved for overnight and then stimulated with 10 nM insulin (Sigma), which is a potent activator of Akt, for 5 minutes. The cells were cultured for 24, 48, or 72 hours, and the number of cells was determined by water-soluble tetrazolium-8 (WST-8, DOJINDO, Tokyo, Japan) assay using a cell-counting kit (23,24).

Mice and Dietary Treatment

Male C57BL/6 mice were obtained from Clea Japan (Tokyo, Japan) and maintained under specific pathogen-free conditions with unrestricted access to food and water. Experiments were carried out in accordance with guidelines established by the Tohoku University Committee on Animal Research. At the age of 21 months, mice were divided into five groups according to the diets provided for each group and maintained for the next 3 months, with 10 mice in each group. The five groups of diets were normal diet (controls), diet mixed with 1% weight RJ (1% RJ), diet mixed with 5% weight RJ (5% RJ), diet mixed with 1% weight pRJ (1% pRJ), and diet mixed with 5% pRJ (5% pRJ). All diets were manufactured by Oriental Yeast Co., Ltd. (Chiba, Japan), stored at 4°C, and sealed in plastic bags *in vacuo* until use to avoid oxidation. The base diet was composed of 20% milk casein, 0.3% cystine, 39.7% starch, 13.2% α -starch, 10% sucrose, 0.0014% cellulose, 1% vitamins, 3.5% mineral mixture, 0.25% choline bitartrate, and 0.5% *tert*-butylhydroquinone. The amounts of milk casein and starch were adjusted to equalize total proteins and calories between the groups in accordance with the amounts of added RJ/pRJ. Therefore, total energy and protein levels per weight were the same in all the diet groups. However, the amino acid contents were different among the groups. Dried RJ and pRJ powder was supplied by Institute for Bee Products & Health Science (Okayama, Japan). The vitamin and mineral components of RJ and pRJ were analyzed by Japan Food Research Laboratories (Tokyo, Japan) and are shown in Table 1. The mice had unrestricted access to food and water. After 3 months of the diet treatment, the grip strength was measured. Then, 25 mice (five mice from each group) were anesthetized and sacrificed, their sera were collected, and skeletal muscle samples were isolated. The other 19 (≥ 3 mice from each group) mice were sacrificed for evaluation of the regenerating capacity of injured skeletal muscles at 5 days after the injury.

Wire Hang Test

A wire mesh grid (10 × 10 cm) was used to assess the muscle strength. The mouse was placed on the wire mesh, then the mesh was inverted, and the mouse was forced to hang on the wire using its four limbs. The longest hanging time was recorded as the duration. The previously mentioned measuring process was repeated until the mouse could not hang on the wire mesh after the inversion. The number of repeated times is shown as the number of times (25).

Muscle Injury Model

After 3 months of the diet treatment, mice were anesthetized, and cardiotoxin from *Naja mossambica mossambica* (Sigma) dissolved in 100 µL phosphate-buffered saline (PBS) (10 µM) was injected into the tibialis anterior (TA) muscle. Five days later, the mice were sacrificed; and the

Table 1. Vitamin and Mineral Composition of Royal Jelly Products (mg/100 g)

| Components | Protease-Treated | |
|----------------------|------------------|-------------|
| | Royal Jelly | Royal Jelly |
| Minerals | | |
| Sodium | 40.2 | 2050 |
| Phosphorus | 662 | 580 |
| Iron | 3.21 | 2.8 |
| Calcium | 40.6 | 44.8 |
| Potassium | 814 | 766 |
| Magnesium | 90.9 | 74.3 |
| Copper | 1.34 | 0.91 |
| Zinc | 6.61 | 5.62 |
| Manganese | 0.22 | 0.17 |
| Selenium | >0.005 | 0.006 |
| Vitamins | | |
| Thiamine | 0.96 | 0.84 |
| Riboflavin | 2.03 | 1.92 |
| Vitamin B6 | 1.12 | 0.63 |
| α -Tocopherol | 0.1 | >0.1 |
| Folic acid | 0.12 | 0.06 |
| Pantothenic acid | 12.8 | 14.5 |
| Biotin | 0.0467 | 0.0722 |
| Inositol | >2 | 41 |
| Niacin | 14.8 | 15.4 |
| Choline | 620 | 480 |

TA muscles were isolated, frozen in 2-methylbutane pre-cooled in liquid nitrogen, and stored at -80°C for following histological analysis (26).

Measurements of Muscle Weight and Isolation of Satellite Cells

The satellite cells were isolated according to a previous study (6) with some modifications. The large hind-limb muscles of mice including the TA muscle, triceps surae muscle, quadriceps muscle, biceps femoris muscle, gluteus maximus muscle, and iliopsoas muscle were isolated, and the weights of the muscles were measured. Next, nonmuscle tissues were removed under a dissection microscope; the muscles were subjected to enzymatic dissociation with 0.2% collagenase Type II (Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ) for 60 minutes and then with 0.04 U/mL dispase (Gibco BRL, Grand Island, NY) for 45 minutes. The cell suspension was filtered through a cell strainer (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), incubated with antimouse CD16/CD32 monoclonal antibody (mAb, 2.4G2, BD Bioscience) to block Fc receptors and then with the following antibodies: fluorescein isothiocyanate-labeled anti-CD31, anti-CD45 (BD Bioscience), anti-CD11b, and anti-Sca-1 antibodies (eBioscience, San Diego, CA); PE-labeled anti-integrin- α 7 (MBL, Nagoya, Japan); and Alexa 647-labeled anti-CD34 (BD Bioscience). The cells were counted and sorted by FACSaria II flow cytometer (BD Bioscience) as previously shown (27).

Immunohistochemistry and Immunocytochemistry

Frozen muscle tissues were sectioned from a region approximately 3 mm from the top of the TA muscle (8 μm in thickness) using a cryostat. For embryonic myosin heavy chain (eMyHC) staining, frozen sections or cultured cells were fixed with acetone/methanol (50%/50%) for 30 seconds at -20°C . Specimens were blocked with 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 in PBS at room temperature for 45 minutes and then incubated with anti-eMyHC antibody (F1.652, DSHB, Iowa City, IA) at 1:2 dilution at 4°C overnight, followed by Rodamine-conjugated secondary antibody staining (Chemicon International, Temecula, CA) at room temperature in the dark for 1 hour. For PAX7 staining, cultured cells were fixed with PBS containing 4% paraformaldehyde at room temperature for 20 minutes and then blocked with 1% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 in PBS at room temperature for 45 minutes. After blocking, the cells were incubated with anti-Pax-7 antibody (R&D Systems, Minneapolis, NE) at 1:50 dilution at 4°C overnight followed by Alexa 488-coupled antimouse IgG antibody (Invitrogen) at 1:200 dilution at room temperature for 1 hour. Finally, the sections or cells were mounted in Vectashield Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector labs, Burlingame, CA). In vivo, the regenerating capacity of the injured skeletal muscles was evaluated by quantifying the percentage of eMyHC-immunoreactive area per field (28). Ten randomly selected fields at $\times 200$ magnification were measured in each sample. ImageJ software was used to quantify the eMyHC-immunoreactive areas per field. In vitro, the degree of differentiation of satellite cells of the aged mice was evaluated by the maximum diameter of the cells by Adobe Photoshop CS2 software (San Jose, CA). The muscle sections were stained for hematoxylin and eosin also. Images were taken using a phase-contrast and fluorescence microscope BZ9000 (Keyence, Osaka, Japan) (29).

Western Blot Analysis

PAX7, Type I IGF receptor (IGF-IR), Akt, and phosphorylated Akt (phospho-Akt) proteins were detected by Western blot analysis. In brief, the cells were rinsed twice with ice-cold PBS and lysed using RIPA Lysis Buffer (Upstate, Temecula, CA). The extracted protein fraction was electrophoresed in a sodium dodecyl sulfate and 10% polyacrylamide gel and then transferred onto an Immobilon transfer membrane (Millipore, Bedford, MA). The amount of protein loaded onto the gels was 36 μg per well. The membranes were immunoblotted with the primary antibodies to PAX7 (DSHB) at 1:100 dilution, GAPDH, IGF-IR, Akt, and phospho-Akt (Cell Signaling, Boston, MA) at 1:1000 dilution. Then, the membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated antirabbit immunoglobulin G (Cell Signaling) at 1:25,000 dilution, and the protein bands were detected with an

enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham, Buckinghamshire, UK) (30).

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

After RJ/pRJ treatment, the mice were anesthetized with diethyl ether, and blood samples were isolated from the inferior vena cava. The serum levels of interleukin-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-6, tumor necrosis factor- α , and IGF-1 were measured using a specific ELISA kit (R&D Systems) according to the manufacturer's instructions, respectively (22).

Statistical Analysis

Data are presented as mean \pm standard deviation. Differences were analyzed by one-way analysis of variance test (Post hoc, Tukey). A level of $p < 0.05$ was accepted

as statistically significant. All in vitro experiments were repeated at least three times.

RESULTS

Isolation and Characterization of Satellite Cells

As an initial step, we tried to identify the effect of RJ/pRJ on satellite cells. The characterization of satellite cells by cell surface markers has been established only very recently (6). Therefore, according to that study, we first tried to isolate satellite cells with some modifications. We enzymatically dissociated mononuclear cells from the mouse hind-limb muscles (Figure 1A, circle: upper muscles were isolated from a right leg and lower muscles were isolated from a left leg, from left to right, TA, triceps surae, quadriceps, divided biceps femoris into two, gluteus maximus, and

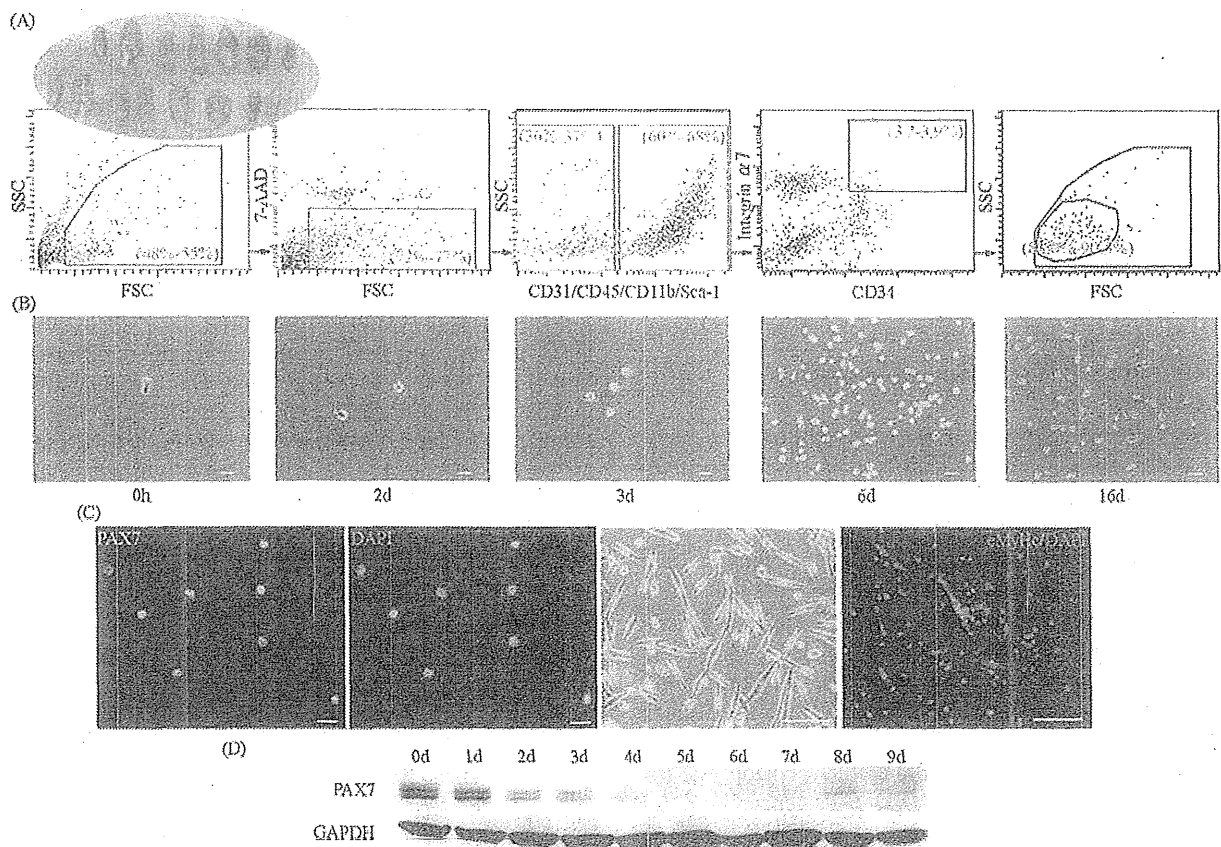


Figure 1. The isolation and characterization of the satellite cells. (A) A flow cytometer sorted the satellite cells from the hind-limb muscles after enzymatic dissociation (shown in circle on the left: upper muscles were isolated from a right leg and lower muscles were isolated from a left leg; from left to right: tibialis anterior, triceps surae, quadriceps, divided biceps femoris into two, gluteus maximus, and iliopsoas muscles) by gating for 7-AAD negative, then for CD31, CD45, CD11b, and Scal negative, and finally for integrin- α 7 and CD34 positive. Numbers in the gates show percentage of the cells in each gate among total cells. (B) The light phase-contrast microscopy shows the morphology of the isolated satellite cells cultured in proliferation medium for the indicated time periods. Scale bars: 50 μ m (left three panels) and 25 μ m (right two panels). (C) The sorted cells were immunoreactive with satellite cell marker Pax7 and nucleus marker DAPI after 2 days in the proliferation medium (left two panels: Pax7 in green and DAPI in blue). After 3 days in the differentiation medium, some cells formed tube-like shapes (the third panel from the left) and some cells were immunoreactive with an immature myotube marker eMyHc (right panel: eMyHc in red and DAPI in blue). Scale bars: 20 μ m (left two panels) and 50 μ m (right two panels). (D) Western blot analysis shows the levels of PAX7 protein in the satellite cells after the induction of differentiation for the indicated time periods. The GAPDH protein is a loading control.

iliopsoas muscle) and sorted them according to the cell surface markers (Figure 1A). We characterized satellite cells as 7-AAD (a dead cell marker) negative, CD31 (an endothelial cell marker) negative, CD45 (a pan-hematopoietic cell marker) negative, CD11b (a myeloid cell marker) negative, Scd1 (a mesenchymal cell marker) negative, and integrin- α 7 and CD34 positive (Figure 1A). We cultured the sorted cells in growth medium for several days and noted the proliferation of these cells, which suggested that these cells had the potential to re-enter the cell cycle (Figure 1B). After 2 days in the growth medium, the sorted cells were immunoreactive with satellite cell-specific transcriptional factor Pax7 and nucleus marker DAPI (Figure 1C, two panels in the left). To examine the potential of these cells to differentiate into myotubes, we cultured the cells in differentiation medium for 3 days (Figure 1C, two panels in the right). The cells fused and were immunoreactive with an immature myotube

marker embryonic myosin heavy chain (eMyHc, Figure 1C, the right panel), suggesting that the cells differentiated into myotubes. The sorted cells were cultured in the differentiation medium, and the expression levels of Pax7 gradually decreased in a time-dependent manner after the induction of differentiation (Figure 1D). These data suggested that the sorted cells had the characteristics of satellite cells and the potential to differentiate into myotubes.

Effects of RJ/pRJ on the Satellite Cells of the Aged Mice In Vitro

To examine the effect of RJ/pRJ on the proliferation rate of the satellite cells of the aged mice in vitro, we isolated satellite cells from aged mice and stimulated them with RJ/pRJ for 24 hours (Figure 2A, left panel), 48 hours (Figure 2A, center panel), or 72 hours (Figure 2A, right

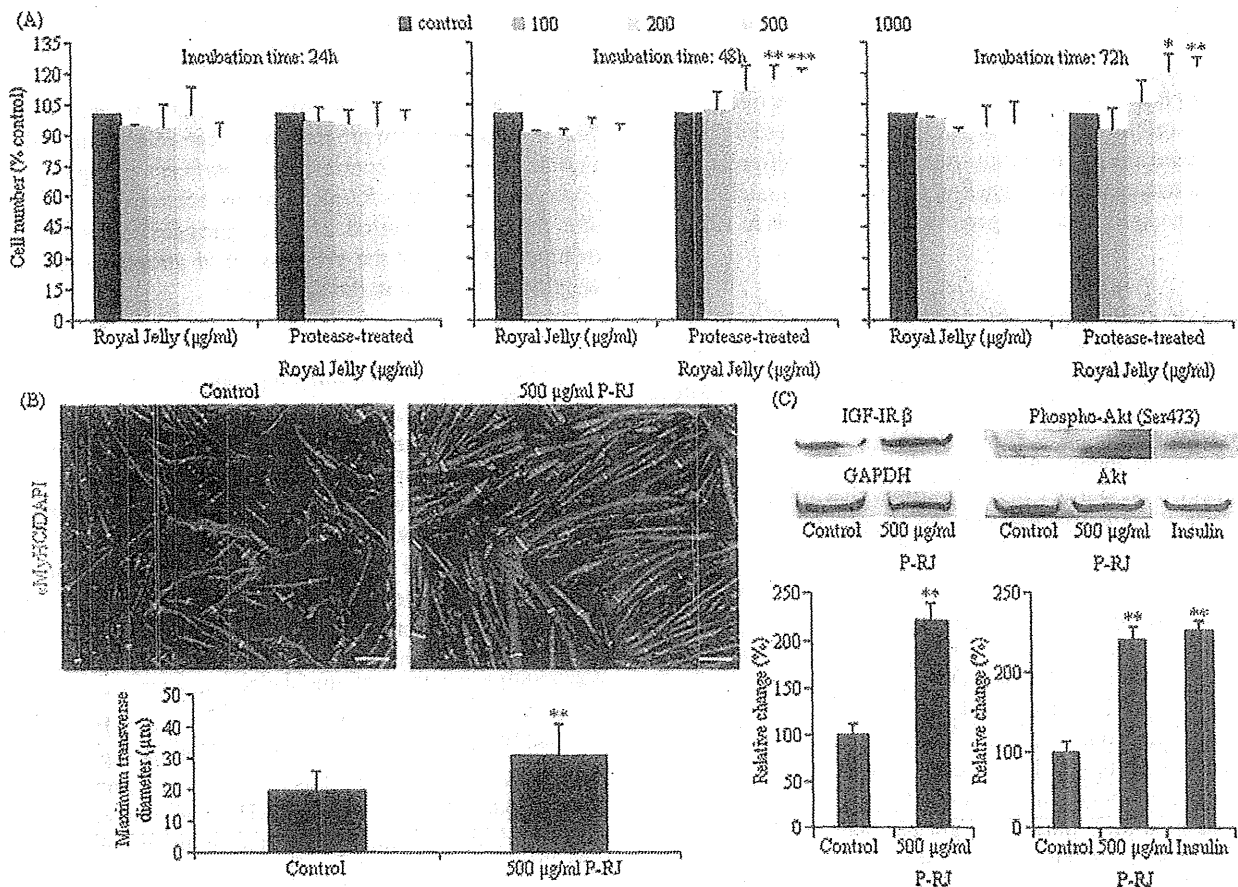


Figure 2. Effects of RJ/pRJ on the satellite cells of aged mice in vitro. (A) The satellite cells of the aged mice were treated with the indicated concentrations of RJ or pRJ for 24, 48, or 72 h, and the cell proliferation rate was measured at each time point. (B) The satellite cells of aged mice were cultured in differentiation medium with pRJ or without pRJ (control) for 5 days, then immunohistochemically stained for eMyHC in red and for DAPI in blue to evaluate their differentiation into myotubes. The maximum diameter of each myotube was marked with a green line (upper panels). We randomly selected 50 myotubes per field at $\times 400$ magnification, measured the maximum diameter of each myotube for 10 randomly selected fields per sample, measured the diameter, and calculated for each group (lower panel). Scale bars: 100 μ m. (C) The satellite cells of aged mice were pretreated with pRJ (500 μ g/mL) for 48 h, then the Western blot analysis detected IGF-1 receptor (IGF-IR), GAPDH, activated form of Akt (phospho-Akt), and total Akt. Insulin (10 nM) was used as a positive control. The densitometry quantified the band intensities. The graphs show the IGF-IR band intensities normalized by the GAPDH band intensities, and phospho-Akt band intensities normalized by the Akt band intensities. This figure is the representative of three independent experiments. Columns are mean \pm SD. * p < .05, ** p < .01, and *** p < .0001, compared with control.