

2013/0015A

平成25年度厚生労働科学研究費補助金
長寿科学総合研究事業

総括・分担研究報告書

加齢による運動器への影響に関する研究
ーサルコペニアに関する包括的検討ー
(H25-長寿-一般-004)

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
	江頭	正人
	重本	和宏
	金	憲経
	鈴木	隆雄
	島田	裕之
	神崎	恒一
	村木	重之
	宮地	元彦
	石橋	英明

平成26年3月

目 次

I. 総括研究報告書

- 加齢による運動器への影響に関する研究
—サルコペニアに関する包括的検討— 1
原田 敦

II. 分担研究報告書

1. サルコペニアに対するビスホスホネート有効性の検証 53
原田 敦
2. 骨粗鬆症患者の体組織と薬物治療による変化における
脂溶性ビタミンの役割 65
細井 孝之
3. 地域住民におけるサルコペニアに関する縦断的研究 69
下方 浩史
4. サルコペニアに対する治療薬開発のための
不死化ヒト筋細胞を用いた検定系の開発 87
橋本 有弘
5. 骨格筋由来液性因子とサルコペニアに関する
探索的研究 91
江頭 正人
6. サルコペニア診断の新バイオマーカー候補の
臨床的評価 93
重本 和宏
7. 地域在住後期高齢者における sarcopenic obesity の早期予防の
ための包括的介入プログラムの効果検証 105
金 憲経
鈴木 隆雄

8. サルコペニアを有する高齢者の神経筋協調機能 島田 裕之	109
9. もの忘れ外来通院患者を対象としたサルコペニアの 実態調査とサルコペニア臨床的意義解明の研究 神崎 恒一	117
10. 高齢者一般住民におけるサルコペニアの運動器への影響 および予防対策 村木 重之	123
11. (1) 特定健診・特定保健指導の標準的な質問票による 身体活動調査によるサルコペニアのスクリーニング (2) サルコペニア診断のための四肢筋量指数の代替指標 ：下腿最大周囲長 宮地 元彦	135
12. サルコペニアとロコモティブシンドロームの 判定基準の関連性の検討 石橋 英明	141
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	161
IV. 研究成果の刊行物・別刷	173

厚生労働科学研究補助金（長寿科学総合研究事業）

総括研究報告書

加齢による運動器への影響に関する研究

—サルコペニアに関する包括的検討—

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・先端診療部長

研究要旨

サルコペニアの概念は、筋量と筋力の低下で身体障害をもたらす症候群と定義され、歩行速度と筋量を診断や介入の基準とするなど、最近欧米で大きく変化した (Cruz-Jentoft, AJ Age and Ageing 2010, Morley JE J Am Med Dir Assoc 2011)。これに対応して我が国でも日本人データでサルコペニアの運動器への影響やロコモとの関連等を明らかにすることが求められている。そこで、これまでの研究を発展させ、サルコペニアの現状と機序を研究し、予防、診断、治療の包括的検証を実施し、マニュアルを作成する。

(1) 診断については、次のような研究を展開した。

宮地研究では、歩行で最も活動する下腿三頭筋の筋量を反映する下腿の最大周囲長により四肢筋量指数の推定ならびにサルコペニアの診断指標である四肢筋量指数の代替指標となりうるか否かを横断的に検討することを目的とした。参加者は 40～89 歳の男女 535 名であった。下腿最大周囲長を左右 2 回測定し、その平均値を用いた。サルコペニア判定は、DXA 法で四肢除脂肪軟組織量を身長 2 乗で除した骨格筋指数により、先行研究を基に男性 6.87kg/m²、女性 5.46kg/m² 以下を該当者とした。その結果、下腿最大周囲長は四肢筋量指数と男性で高い相関 ($r=0.82$) が、女性で中程度の相関 ($r=0.67$) が見られた。ROC 解析の結果、下腿最大周囲長によるサルコペニア推定の感度・特異度は男性 0.91 と 0.90、女性 0.82 と 0.71 で、カットオフ値は男性 34.1cm、女性 32.8cm であった。以上より、下腿最大周囲長は四肢筋量指数の有用な代替指標であることが示唆された。

重本研究では、筋量の進行的低下に伴う機能低下、すなわちサルコペニアは高齢者の ADL と QOL を損なう主要原因となることから、早期診断や有効な介護予防対策は急務の課題である。臨床的にサルコペニアと診断されるケースは、筋力低下や筋萎縮だけでなく、認知症を含む他の老年病症候群を合併しているケースが多く、病態改善の有効な治療や予防がなかなか困難である。そこで、早期にサルコペニアを診断して、運動や栄養補給による介入や薬物治療などの効果を客観的な指標で判定することで介護予防を可能にするバイオマーカーが求められている。本研究は、筋力と筋量とは全く別の次元の計測可能なバイオマーカーを発見しており、それを利用してサルコペニアの新しい診断・予防・治療法の開発を目的としている。バイオマーカー分子のアッセイシステムを開発して老化モデル動

物に加え、筋力、筋量、運動能力、最大酸素摂取量、体脂肪のデータの揃った 20 歳から 70 歳の男女 1,000 名の検体、および高齢者の検体を使いバイオマーカーの評価を行う。詳細については、知財の関係でまだ公表することができない。そこで本年度は、バイオマーカーの生物学的意義と評価的評価の根拠を定めるために、マウスの加齢性筋萎縮の解析とエネルギー代謝能の加齢変化を単一筋線維レベルで解析したので報告する。

江頭研究では、骨格筋における液性因子または液性因子受容体を網羅的に検討し、交感神経β受容体刺激により、骨格筋において VDR の発現が上昇することを明らかにした。また、ビタミン D 刺激により GDNF が上昇することが明らかになった。これらのシグナルの活性化により、神経筋機能が改善し、サルコペニアの治療に有用である可能性がある。

神崎研究では、杏林大学病院高齢診療科と、もの忘れセンターに通院中の 65 歳以上の患者のうち、初回と 1 年後の調査が可能であった 64 名（男性 25 名、女性 39 名、平均年齢 83 歳）を対象として、サルコペニアの頻度、各種測定値の変化量同士の関連について調査、解析した。EWGSOP に基づくサルコペニアの頻度は初回評価時 57%、1 年後評価時 46% で減少傾向であった。そのうち、初回評価時も 1 年後もサルコペニアであった者の頻度は 22 例（39%）、初回評価時にサルコペニアで 1 年後には非サルコペニアと判定された者の頻度は 10 例（18%）、初回評価時に非サルコペニアで 1 年後にはサルコペニアと判定された者の頻度は 4 例（7%）、初回評価時も 1 年後も非サルコペニアであった者の頻度は 20 例（36%）であった。サルコペニアを規定する 3 要因について、①筋肉量の減少と体重、BMI、握力の低下、老年症候群の増加との間に相関がみられた。②握力の低下と筋肉量の低下、老年症候群（傾向）の増加との間に相関がみられた。③歩行速度の低下と IADL の低下との間に相関がみられた。今後、①サルコペニアから非サルコペニアに戻った症例の分析、②症例数を増やして再解析すること、③経過観察を行うことができなかった症例について、初回評価時のサルコペニアの頻度はどうであったか、各種測定値がどうであったか、どのような要因で追跡できなくなったか、について調査を続けていく予定である。

石橋研究では、サルコペニアとロコモティブシンドローム（以下、ロコモ）はともに運動器の脆弱性を示す概念でその予防と改善は重要な課題となっている。サルコペニアとロコモは、ともに運動器障害による移動機能低下と筋力低下を示すため、概念的、操作的に共通部分が多い。一方、正確な分別はなされておらず、混乱を来たしている。両者を操作的に整理することは、両者を判定する上での混乱を避けるために不可欠である。そこで本研究では、地域在住の中高年者を対象にしてサルコペニアとロコモの判定基準を含む様々な指標による調査を行い、両者の該当状況を検討する。今年度は、伊奈町において住民票から無作為に抽出した要支援・要介護非該当の一般中高年者を対象として、運動機能測定と調査票調査を行った。462 名のデータを解析したところ、ロコモのチェック法や指標は、陽性率がそれぞれで異なるものの、すべて運動機能測定値との関連が高かった。また、EWGSOP アルゴリズムによるサルコペニア判定率は、8.4%と低いものであった。今後は対象者数が増えるため、そのデータ収集後にロコモとサルコペニアの関係を明らかにする予定

である。サルコペニアまたはロコモの包含関係、それぞれの該当者の特徴が明らかになる。

(2) 予防については、次のような研究を展開した。

下方研究では、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。日本人の中高齢者集団を対象とする解析の結果、血中の遊離テストステロンレベルの低値は筋量サルコペニアの発症予測に有用である可能性が示された。一方で、AR-CAGリピート数の多寡によって、遊離テストステロンと筋量の関連は異なることが明らかとなり、AR-CAGリピート数が少ない場合と比較してAR-CAGリピート数が多い場合において、血中の遊離テストステロンレベルは筋量をより反映することが示唆された。

村木研究では、サルコペニアは要介護の大きな原因の一つであるが、サルコペニアに関するエビデンスレベルの高い疫学研究はこれまで皆無に近く、予防対策は極めて困難であった。本研究では、高齢地域住民コホート研究でサルコペニアの実態把握と危険因子解明により質の高いエビデンスに基づいた予防法提言で要介護者を低減することを最終目的としている。対象は東京都板橋区、和歌山県日高川町、和歌山県太地町在住の一般住民で研究への同意が得られて参加者登録した3,040人（男性1,062人、女性1,978人）、いずれのコホートも地域代表性は確認されている。同コホートはH17年よりベースライン調査を行い、H20年よりサルコペニアをターゲットにしたコホート調査に拡大している。初年度は蓄積データよりサルコペニアの実態解明を行い、筋力、筋量とも50代から60代を境に急激に低下することが明らかとなった。さらに、筋力は80歳以上では若年者の半分程度まで低下するも、筋量は70程度にとどまっており、筋力低下は筋量低下のみでは説明できないことも明らかになった。また、筋力と運動器疾患や運動機能、QOL、要介護との関連を検討し、下肢筋力は変形性膝関節症、変形性腰椎症、腰椎圧迫骨折、膝痛、腰痛などの運動器疾患、6m歩行時間、5回椅子立ち上がり時間、片足立ち時間などの運動機能や、QOL、要介護のいずれとも関連を認めており、筋力増強訓練により、QOL向上、要介護予防が期待できると考えられた。さらに、追跡調査が高い追跡率をもって完了し、現在データ整理中である。来年度は、ベースライン調査及び追跡調査のデータを統合することにより、サルコペニアの自然経過の解明、運動器疾患の発生、進行への影響、腰痛、膝痛などの運動器症状の発生、改善への影響、ADL低下、QOL低下、要介護発生への影響、サルコペニアの危険因子、防御因子の解明を行う。

島田研究では、地域在住高齢者10,331名を対象とした疫学調査を実施し、その結果を基に日本人高齢者におけるサルコペニアの有症率を算出し、手段的ADLとの関連性を検討した。EWGSOPで提唱された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の有症率は11.6%であった。サルコペニアの有症率は女性が男性より高く、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。

金、鈴木研究では、包括的健診に参加した地域在住高齢者1,778人の中から、「体脂肪

率の上昇+骨格筋量の減少」、「体脂肪率の上昇+筋力の衰え」、「体脂肪率の上昇+歩行速度の低下」を sarcopenic obesity と操作的に定義したところ、sarcopenic obesity 有症率は男性 9.9%、女性 13.5%と女性で高かった。男性 sarcopenic obesity 高齢者は、血清アルブミン値は低く、転倒率は有意に高かった。女性 sarcopenic obesity 高齢者は、高血圧、高脂血症、膝 OA、転倒率が有意に高い特徴を示した。これらの結果より、sarcopenic obesity 高齢者に対する転倒予防策の確立が今後の課題といえる。

(3) 治療については、次のような研究を展開した。

原田研究では、薬の中にサルコペニアに対する効果もあるものがあれば、その治療的意義は高い。先行研究で筋肉量も増加させてサルコペニアも改善させている可能性が示唆されたアレンドロネートについて、European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP と略) によるアルゴリズムを使用して、基準値は、骨格筋指標、男性 6.87 kg/m²、女性 5.46 kg/m²とし、通常歩行速度、1.0m/s、握力、男 30kg 女 20kg によってサルコペニアを合併していると診断された骨粗鬆症患者にアレンドロネートとアルファカルシドール併用あるいはアルファカルシドールの無作為比較対照試験を主要評価項目として骨格筋量指標、握力、通常歩行速度を設定して開始した。

細井研究では、薬としても用いられているビタミン K は血液凝固系以外にも多様な生体機能に影響を及ぼすことが知られている。近年筋肉細胞にもビタミン K 依存性蛋白質の遺伝子が発現されていることが示唆された。今回の研究はビタミン K が、ガンマカルボキシラーゼ (GGCX) の補酵素として働く際の作用が、GGCX 遺伝子の機能的な塩基多型によって異なる可能性を検討した。

橋本研究では、独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、骨粗鬆症治療薬アレンドロネートの、ヒト筋細胞に対する直接作用を解析した。アレンドロネートは、ヒト未分化筋細胞の増殖、遊走および筋分化を阻害した。しかし、最終分化した筋管細胞の生存および分化形質の発現には、影響を与えなかった。

A. 研究目的

診断については

宮地研究では、我が国ではサルコペニア診断に関するコンセンサスは確立されていない。それが確立している欧米では、診断には DXA 全身スキャンによる四肢筋量測定が必須である。ヨーロッパのサルコペニア診断基準、「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」では、DXA 検査前のスクリーニングに握力と歩行速度の体力測定を用いているが、握力は握

力計、歩行速度は 10m 歩行トラックが必要であり、我が国の臨床現場にはいくつかの困難が伴うので、DXA 前に検査必要者をスクリーニングできる簡便法が望まれている。欧米ではサルコペニア診断基準に、DXA 全身スキャンにより測定された四肢筋量を身長² 乗で除した四肢筋量指数が用いられている。四肢筋量の最も簡便な測定法として四肢周囲長が古くから実施されている。四肢周囲長は、前腕、上腕、大腿、下腿で測定されるが、歩行で最も多く活動し、皮下脂

筋蓄積が少ない下腿周囲長は、他よりも筋量をより忠実に反映すると考えた。そこで本研究では、下腿最大周囲長は DXA で測定した四肢筋量指数と相関し、サルコペニアの代替指標となりうると仮説し、横断的手法により検討した。

重本研究では、サルコペニアのバイオマーカー開発は、臨床検体だけでなく加齢マウス使用で新規バイオマーカーの生物学的意義と臨床的意義の統合的評価が可能となる。しかし、加齢マウスを使いサルコペニアに伴う骨格筋の様々な報告では、同月齢でも解析結果が異なる。また、超高齢者に相当する 32 ヶ月齢でサルコペニア様症状の顕在化するマウスを使った研究や、さらに骨格筋を構成する筋線維単位での筋萎縮の病理学的変化および加齢に伴うエネルギー代謝機能の変化に関するデータは、現在開発しているバイオマーカーの臨床的評価に必要な情報である。そこで、本年度は 32 ヶ月齢の老齢マウスを用い、筋線維単位の加齢性筋萎縮及びエネルギー代謝能の加齢による病理学的変化を解析した。

江頭研究では、骨格筋の維持や身体活動の増加は、日常生活の維持のみならず、心血管疾患や認知症のリスク低下とかかわっている。また、身体活動の低下やサルコペニアが、死亡率や心血管疾患発症のリスクになることが知られている。このことは、骨格筋と全身の臓器、組織との間に液性因子を介したクロストークが存在することを示唆するが、その詳細は明らかではない。われわれは、運動時にみとめられる交感神経β受容体刺激によって発現が変動する骨格筋由来液性因子または液性因子受容体について探索的な検討をおこなった。

神崎研究では、高齢者が要介護状態になる重要な原因のひとつにサルコペニアがある。その定義に関して 2010 年に European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) からコンセンサスレポートが発表され、サルコペニアを歩行速度、筋力、身体機能を指標とし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るよう紹介している。また、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。昨年の報告で、EWGSOP で判定した場合、①男性 52 名中 35 名 (67%)、女性 85 名中 42 名 (49%) がサルコペニアと判定され、②転倒既往とサルコペニアの関連要因として、筋力のみには差が認められ、筋肉量は差がなかったことを報告した。本年は同じ対象者で、1 年後の追跡を行った 64 名の患者を対象に各測定値変化について調査した。

石橋研究では、ロコモティブシンドローム（以下、ロコモ）は、加齢に伴う運動器障害、すなわち運動機能低下と運動器疾患による移動機能障害を意味し、平成 19 年に日本整形外科学会（日整会）が提唱した概念で、平成 25 年度からその認知度の増加が健康日本 21（第二次）の目標のひとつに策定された。ロコモ予防は、超高齢社会で自立した高齢者の増加、健康寿命の延伸にきわめて重要である。サルコペニアは、加齢に伴う筋肉量減少を意味し、補正四肢筋量が若年成人平均の -2SD 未満の状態と定

義され、わが国では、75歳以上女性の該当率は21.7%との報告があり、移動機能低下から高齢者の自立を脅かすと考えられている。このように両者とも、高齢者に多く、運動器に起因する移動機能障害をきたし、自立を損なう要因となるなど、共通点が多い。しかし、類似病態である一方で、両者を明確に区別する基準・方法はない。さらに、中高年者で両者の分布の特徴、重複状況、どちらが重症かなどは不明である。本研究では、地域在住一般高齢者を対象に、サルコペニアを判定する EWGSOP (the European Working Group on Sarcopenia in Older People) 基準の指標である歩行速度、握力、筋肉量を測定し、ロコモの危険度を指標であるロコモーションチェック、ロコモ度テスト(立ち上がりテスト、2ステップテスト、ロコモ25)を評価し、これら以外の運動機能やADL、生活動作などの指標を調査することで、サルコペニアとロコモの一般高齢者における該当率、両者の関連性について検討する。

予防については

下方研究では、サルコペニアは虚弱の中核的病態の一つであり、少子高齢化が進む日本でその対策が急務である。サルコペニアの予防・治療戦略を構築する上でその有症率や危険因子の把握は不可欠であり、将来のサルコペニア発症を予測し得るバイオマーカーの開発は重要である。今年度は、強い筋蛋白同化作用を有するテストステロンと四肢筋量の関連についてテストステロンの分画ごとに検討を行い、血中のテストステロンレベルがサルコペニアの発症を予測するバイオマーカーとして有用であることを明らかにすることを目的とした。

村木研究では、高齢による衰弱は平成22年度国民生活基礎調査において要介護の原因の3位を占め、急速に超高齢化したわが国においてその予防は喫緊の課題で、主たる原因としてサルコペニアによる脆弱化が挙げられ、サルコペニア状態になると運動の量と質が低下し行動範囲が狭まり、より虚弱化が進行するとともに様々なレベルでのADLが低下し、容易に要支援・要介護へと移行するため、サルコペニア予防対策は喫緊の課題である。しかし、サルコペニアに関するエビデンスレベルの高い疫学研究はこれまで皆無に近く、本研究では高齢地域住民コホート研究においてサルコペニアの実態把握と危険因子解明により、質の高いエビデンスに基づいた予防法提言により要介護者を低減することを最終目的としている。そのために、東京都板橋区、和歌山県日高川町、和歌山県太地町在住の一般住民において地域住民コホート調査を平成17年度より行ってきた。本研究では初年度に、同調査の蓄積データを解析し、サルコペニアの実態解明、筋力および筋量と、転倒、運動器疾患、運動機能、QOL、要介護との関連を明らかにするとともに、追跡調査を完了させた。

島田研究では、高齢期における生活障害の危険因子として、近年注目されているのがサルコペニアで、その中核症状は筋量あるいは筋力の低下である。このような骨格筋の器質的あるいは機能的変化は加齢に伴って加速し、基本的ならびに手段的ADLの低下を起こすと報告されている。日本は世界一の長寿大国で、サルコペニアは諸外国に比して重要となる。また、人種による体格の違いを考慮すると、欧米の研究結果を

そのまま日本人に当てはめることは適当ではないと考えられる。サルコペニア研究は緒についたばかりで、その実態や影響に関する知見は不足している。その予防戦略を確立するには、日本人高齢者のサルコペニア実態を把握しスクリーニング法を確立して ADL 障害に対する影響を検証する必要がある。本研究では日本人高齢者を対象の大規模調査から地域在住高齢者におけるサルコペニア実態を把握するとともに、サルコペニアと手段的 ADL との関連性を検討し、サルコペニアが日常生活機能に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

金、鈴木研究では、地域在住高齢者における sarcopenic obesity 高齢者を選定する精度の高い基準を作成し、その特徴を調べる。

治療については

原田研究では、2010 年の EWGSOP のコンセンサスでサルコペニアの定義診断が整理されたが、サルコペニアと診断されても治療には運動や栄養が有効とされるものの、薬剤で有効性および安全性について十分なエビデンスのあるものはまだないため、その開発が待たれている。我々の昨年度までのデータベース後ろ向き研究で、骨粗鬆症薬アレンドロネートは骨量のみでなく筋肉量も増加させ、サルコペニアも改善させている可能性が示唆された。もし骨粗鬆症に高い有効性のあるアレンドロネートにサルコペニアにも効果があるならば、その治療的意義は高い。それを検証するには、最新診断基準によるサルコペニア患者に治療の有効性評価項目として、筋肉量だけでなく、筋力や歩行速度を含めた無作為比較対照試験 (RCT) が必要である。そこで、本研究で

は、以下のような臨床試験を計画した。

細井研究では、骨粗鬆症の治療薬は骨代謝のみならず多方面の生体機能に作用することが注目されている。中でも骨格筋に対する望ましい作用を骨粗鬆症治療薬が備えていることが確認されれば、転倒予防効果が期待されることになり、骨粗鬆症薬物療法の目的である骨折発生予防をさらに推し進める可能性が示唆されることになる。ビタミン K は血液凝固に必要なビタミンとして発見されたが、近年は骨代謝に対する作用が注目され、骨粗鬆症治療薬として認可されて久しい。さらに最近、筋肉細胞内にビタミン K 依存性蛋白質の遺伝子発現が見いだされ (Zderic TW and Hamilton MT 2012)、骨粗鬆症治療薬としてのビタミン K が筋肉にも作用することが示唆された。我々はビタミン K が補酵素として働くところのガンマカルボキシラーゼ (GGCX) をコードする遺伝子に機能的遺伝子多型性 (SNP) GGCX 8762 G>A 遺伝子多型を見出しており (Bone 2007)、この多型性がビタミン K の作用における個人差に結びつきうることを報告した。本研究はこの機能的 SNP がビタミン K の作用における個人差に関連するかを検討することを目的とした。本研究は日本女子大学家政学部五関正江教授とそのグループとの共同研究として行われた。

橋本研究では、加齢にともなう筋再生能力の低下はサルコペニアの発症と密接に関わっていると考えられる。筋再生には骨格筋幹細胞 (筋サテライト細胞) の働きが必須である。サルコペニアにおける筋幹細胞の役割については未だ不明の点が多いものの、「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」の開発に期待が

寄せられている。本分担研究では、独自に樹立した不死化ヒト筋細胞を用いて、サルコペニアにおける治療薬を開発するための検定系を確立する。さらに、当研究班で見いだされた候補薬物の作用機序の解析を通じて、標準となる「ヒト筋細胞の機能検定法」の確立をめざす。

B. 研究方法

診断については

宮地研究では、参加者は40~89歳の男女535名で、下腿最大周囲長は、立位でふくらはぎの最も太い部分の周囲長を、布巻き尺で左右2回ずつ測定し、その平均値を用いた。サルコペニア判定のために、二重放射線吸収法(DXA法)により四肢の除脂肪軟組織量を測定し、それと身長から、骨格筋指数(kg/m^2) = 四肢除脂肪軟組織量(kg) / 身長(m^2)を算出した。真田らの報告に基づき、サルコペニアの参照値として、日本人の40歳未満の健康男女の四肢除脂肪軟組織量指数の平均値の-2SDに該当する、男性： $\leq 6.87\text{kg}/\text{m}^2$ 、女性： $\leq 5.46\text{kg}/\text{m}^2$ を採用し、これに該当する参加者をclass IIサルコペニアと判定した。

(倫理面の配慮) 本研究は独立行政法人国立健康・栄養研究所倫理審査委員会の承認を得た。全ての研究参加者は研究内容を口頭と書面で説明を受け、同意書に署名の上、本研究に参加した。

重本研究では、1. 実験動物 東京都健康長寿医療センター動物実験委員会の承認を得て行った。C57BL/6NCrマウス(♀、若齢群; 8ヶ月齢と老齢群; 32ヶ月齢)を東京都健康長寿医療センター研究所動物施設に

て飼育した。飼料は自由に摂取させ、給水は自由に摂取させた。本研究には各群3~6匹ずつ用いた。2. 凍結筋横断切片作成 マウス屠殺後、下肢骨格筋を採取し、十分に冷却したイソペンタン内でサンプルを急速凍結し、 -28°C クリオスタット内で厚さ8 μm の連続切片を作製した。3. 組織化学的染色 1) HE (hematoxylin eosin) 染色 2) COX (cytochrome c oxidase) 染色 本染色はミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの活性を反映する。3) NADH-TR (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase tetrazolium) 染色 本染色は、主にミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの活性を反映する。4) SDH (succinate dehydrogenase) 染色 本染色はミトコンドリア呼吸鎖複合体IIの活性を反映する。5) α -GPD (α -glycerophosphate dehydrogenase) 染色 α -GPDは、解糖系で生じたNADHをミトコンドリア内でFADH₂に変換する反応に関与する。 α -GPDは解糖系代謝の律速酵素ではないが、多くの先行研究にて解糖系代謝酵素活性の指標として用いられている。6) ATPase (adenosine triphosphate phosphatase pH4.7) 染色 本染色は、アルカリ性溶液中と酸性溶液中でのミオシン重鎖のATPase活性の変化が、筋線維タイプによって異なる性質を利用し、各筋線維タイプを分類する方法である。7) ATPase (adenosine triphosphate phosphatase pH4.7) 染色 本染色は、アルカリ性溶液中と酸性溶液中でのミオシン重鎖のATPase活性の変化が、筋線維タイプによって異なる性質を利用し、各筋線維タイプを分類する方法である。本研究では、酸性溶液中のATPase染色を行った。4. 免疫組織染色

封入後、すぐに蛍光顕微鏡または共焦点蛍光顕微鏡で組織形態を観察し、画像取得した。8) mGT (modified Gomori trichrome) 染色 本染色はミトコンドリア機能異常に伴うミトコンドリア数の増加や形態変化を染出する。5. 画像解析 1) 筋線維数及び筋線維面積の測定 HE 染色の画像を基に、全筋線維数及び筋線維面積を測定した。筋線維面積は少なくとも 100 本以上の筋線維面積を平均化した。2) 各筋線維タイプの筋線維面積の測定 免疫組織染色の画像を基に、各筋線維タイプの数及び面積を測定した。各筋線維タイプごとに、30~100 本の筋線維を目安に平均化した。3) 各筋線維タイプ単位のミトコンドリア活性及び α -GPD 活性の測定 ATPase (pH4.7) 染色または免疫組織染色で筋線維タイプを区別した。定量的解析をするために各筋線維タイプごとに、少なくとも 30 本以上の筋線維におけるエネルギー代謝酵素活性を平均化した。また、筋全体のエネルギー代謝酵素活性の評価として、上記した染色で得られた筋全体の画像を intensity に変換し評価した。4) ミトコンドリア COXIV の蛍光強度の測定 本解析は共焦点蛍光顕微鏡によって得られたミトコンドリア画像の解析を行った。各筋線維タイプ単位のミトコンドリア COXIV の発現を解析するために、筋線維タイプと COXIV の多重免疫組織染色を行った。COXIV の発現を調べるために、各筋線維タイプ単位の COXIV の蛍光強度を評価した。定量的な解析をするために各筋線維タイプごとに、30 本の筋線維を目安に得られた値を平均化した。5) sarcoplasmic mass-like fiber の定量的な解析 mGT 染色で得られた画像を基に、約 200~400 本の筋線維を含んだ領

域の sarcoplasmic mass-like fiber の数を割合 (%) として算出した。6). リアルタイム PCR による mRNA の発現解析 RNA を抽出し精製し、RNA 収量を定量後、150ng の RNA を逆転写反応させ、cDNA を得た。目的遺伝子の発現量を解析するために、標的特異的プライマー及び SYBER® Premix EX Taq™ II を用いて、cDNA を PCR 反応させ、ABI StepOne™ and StepOnePlus™ によって遺伝子発現を解析した。

(倫理面への配慮)

本課題の遂行に必要な動物実験においては、東京都健康長寿医療センターで承認されており、また国の「動物の保護及び管理に関する法律」に従い、動物愛護の観点に十分配慮して行った。また、本課題の遂行に必要な組み換え DNA 実験は東京都健康長寿医療センターで承認されている。

本報告書の研究では、患者検体や医療情報などを使っておらず倫理委員会の承認を必要としない。

江頭研究では、無刺激ならびにイソプロテレノール刺激をおこなった培養骨格筋細胞 (C2C12 細胞) から mRNA を抽出し、cDNA マイクロアレイをおこないイソプロテレノールにて発現が変動する遺伝子を網羅的に検討した。変動が認められた遺伝子のなかで液性因子または液性因子受容体をコードする遺伝子を抽出した。それらの遺伝子のイソプロテレノールによる発現調節に関するメカニズムについても検討を加えた。

(倫理面への配慮)

東京大学の動物実験に関する倫理指針にそって本実験はおこなわれた。

神崎研究では、対象は杏林大学病院高齢診療科ともの忘れセンターに通院中の65歳以上の患者で、初回と1年後の調査が可能だった64名（男性25名、女性39名、平均年齢83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、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項目について調査、過去1年の転倒歴。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でサルコペニアを識別し、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）との関係を解析した。

（倫理面への配慮）

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。

石橋研究では、本研究は地域在住一般中高年者を対象とし、埼玉県伊奈町で、自治体の協力を得て、60代70代の男女のうち、要介護・要支援認定および身体障害者手帳取得者を除く3,800名を抽出した。調査は、①第1次横断調査、②介入調査、③第2次横断調査の3回を計画し、①は平成25年10月-12月、②は平成26年3月-10月、③は平成26年10月-11月の調査期間とした。①400名～600名、②300名（介入群200名、対照群100名）、③300名～500名の協力を想定し、協力の案内を住民票から抽出した、①1,400名、②1,200名、③1,200名に研究協力の案内文を送ることとした。①第1次横断調査については、501名（35.7%）

の参加希望者があり、調査当日の不参加者を除く462名（30.0%）が実際の参加者数である。②介入調査、③第2次横断調査については、これから調査を行う予定である。

(1) 横断調査 研究協力者に対し、案内、自記式調査票を送付した。自記式調査票の内容は、1. 疾患の既往および健康状態、2. 要介護認定、3. 運動習慣、4. ロコチェック、5. 転倒歴、6. 栄養の質問、7. 咬合機能について、8. EQ-5D、9. WOMAC（痛み、こわばり、生活状況）、10. ロコモ25。調査日に次の運動機能測定を行った。①立ち上がりテスト、②2ステップテスト、③開眼片脚起立持続時間、④6m歩行時間、⑤膝伸展筋力、⑥足趾把持力、⑦筋肉量（タニタ製MC-190 B I A法）、⑧ファンクショナルリーチテスト、⑨握力、⑩5回立ち上がりテスト。本年度はすべての対象者の調査が終了していないため、本年度中に測定を行った462名に対し、測定結果の平均値（全体および性別・年代別）、ロコモの指標であるロコチェック、ロコモ度テスト（立ち上がりテスト、2ステップテスト、ロコモ25）の該当率と、該当群/非該当群間での運動機能測定値の差を調べることに留めた。

(2) 介入調査 300名を対象として、1,200名に協力依頼文書を送付し、349名（29.1%）から参加希望の回答を得た。実施は、平成26年3月から10月を予定し、横断調査と同項目を、運動機能測定を開始時に行う。介入群には、ロコモーショントレーニング（スクワット、開眼片脚起立、踵上げ、ウォーキング）を指導し、トレーニング方法の詳細を記したパンフレットと記録つけるためのトレーニングノートを渡す。その後、

決められた回数を自宅で実施し、3 ヶ月後、6 ヶ月後に、開始時と同様な調査を行う。

(倫理面への配慮)

本調査の実施については、埼玉医科大学倫理委員会の承認を得た。調査内容は、自記式調査票と運動機能測定である、後者は中高年者によく行われる安全度の高い種目を実施している。調査に先立ち、口頭および文書による説明を行い、調査内容、同意の自由および同意撤回の自由、不同意や同意撤回の際も不利益のないこと、論文等で発表する際の個人を識別し得る情報は公表しないことなどを説明し、文書による同意を得ている。

予防については

下方研究では、1. 中高年男性における筋量サルコペニアと関連するテストステロンレベル

1) 対象 「国立長寿医療研究センター・老化に関する長期縦断疫学研究 (NILS-LSA)」の第1次調査から第6時調査までに参加した、40歳以上の男性957名を対象とし、延べ4,187回、または2,010回の測定データを解析に用いた。これらの参加者は愛知県大府市および知多郡東浦町の地域住民から無作為に抽出されている。2) 測定項目 ① 四肢筋量は、二重エネルギーX線吸収法 (DXA) を用いて測定された四肢の筋重量を身長二乗で除した Skeletal muscle index (SMI) を指標とした。サルコペニアのカットオフポイントは SMI の日本人若年成人平均値マイナス2標準偏差である 6.87kg/m² とした。② テストステロン 第1次調査時で全対象者より早朝血液から、総テストステロン (TT)、遊離テストステロン (FT) 濃

度を測定。また、455名より性ホルモン結合グロブリン (SHBG) 濃度を測定。血中 SHBG、TT およびアルブミン濃度を基に cFT 濃度を算出。テストステロン濃度カットオフポイントは40代日本人男性の平均値マイナス2標準偏差とし、対象者を二群に分類。3) 解析方法 10年の縦断データを用いて、サルコペニア発症リスクについて、ロジスティック回帰を拡張し繰り返しデータの解析が可能な一般化推定方程式 (GEE) により求めた。調整項目は年齢、余暇身体活動量、栄養摂取量 (総エネルギー、総タンパク質、ビタミンD)、既往歴 (脳卒中、心疾患、がん、糖尿病、骨粗鬆症、関節炎)、喫煙の有無とした。統計解析には SAS Ver. 9.3 を用いた。

2. 中高年女性における筋量サルコペニア発症と関連するテストステロンレベル

1) 対象 NILS-LSA の第1次と第5時調査の両方に参加し、データ欠損の無い40歳以上女性430名を対象とした。2) 測定項目 ① 四肢筋量 上述のように SMI を算定し、サルコペニアのカットオフポイントは SMI 日本人若年成人平均値マイナス2標準偏差である 5.46kg/m² とした。② テストステロン 第1次調査時で全対象者の血液から、TT、FT 濃度を測定。対象者の分類はアンドロゲン濃度を基に TT は三分位点で、また FT は RIA の検出限界値である 0.7pg/ml 未満を Low 群とし、残りを等分した3群に分けた (Low, Middle, High 群)。3) 解析方法 8年間の縦断データを用いてサルコペニア発症のオッズ比をロジスティック回帰分析により求めた。調整項目は年齢、BMI、余暇身体活動量、栄養摂取量 (総エネルギー、総タンパク質、ビタミンD)、血中 CRP 濃度、

既往歴(心疾患、骨粗鬆症、関節炎)、月経の有無、喫煙の有無、とした。統計解析には SAS Ver. 9.3 を用いた。

3. アンドロゲン受容体遺伝子 (AR) 多型とテストステロンの相互作用が中高齢者の四肢筋量に与える影響

1) 対象 NILS-LSA の第 1 次調査に参加した 1,139 名のうち、血中 SHBG 濃度を測定し、必要なデータに欠損の無い 40 歳以上の男性 461 名、女性 432 名を対象とした。2) 測定項目 ① 四肢筋量 上述の通り ② テストステロン 早朝血液から、TT、SHBG、アルブミン濃度を測定し、cFT 濃度を算出。③ 血中リンパ球より DNA を抽出し、PCR にて増幅後、DNA シーケンサーにより AR-CAG リピート数 (rs4045402) を測定。対象者 461 名の平均 CAG リピート数は男性が 23.1 回、女性が 22.8 回であった。従って、CAG リピート数 23 回未満を Short (S) アレル、23 回以上を Long (L) アレルとして分類し、男性は S 群および L 群の 2 群に、また女性は SS 群、SL 群、LL 群の 3 群に分けた。3) 解析方法 従属変数に SMI、独立変数にテストステロン (TT, bioT, cFT)、CAG リピート群 (S 群, L 群)、およびテストステロン×CAG リピート群の交互作用項を投入した一般線形モデルを用いた。交互作用項が有意 ($p < 0.05$) の場合、CAG リピート群ごとに傾きを比較した。調整項目の異なる複数のモデルを設定し、解析を実施した (モデル 1 調整無し; モデル 2 年齢、喫煙の有無; モデル 3 年齢、喫煙の有無 BMI、余暇身体活動量、総エネルギー摂取量、糖尿病既往歴の有無)。統計解析には SAS Ver. 9.3 を用いた。

(倫理面への配慮) 全ての研究は「疫学研究における倫理指針」並びに「ヒトゲノム・

遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守して行った。NILS-LSA に関しては国立長寿医療研究センターにおける倫理審査委員会での研究実施の承認を受けた上で実施している。調査に参加する際には説明会を開催し、調査の目的や検査内容、個人情報の保護などについて十分に説明を行い、調査の対象者全員から検体の保存を含むインフォームドコンセントを得ている。また同一個人に繰り返し検査を行っており、その都度インフォームドコンセントを行い、本人への確認を行っている。分析においては、参加者のデータを全て集団的に解析し、個々のデータの提示は行わず、個人のプライバシーの保護に努めている。

村木研究では、本研究の対象は、東京都板橋区、和歌山県日高川町、和歌山県太地町在住の一般住民において同意が得られ参加者登録した 3,040 人 (男性 1,062 人、女性 1,978 人) で、いずれのコホートも地域代表性は確立されている。平成 17 年よりベースライン調査を行い平成 20 年の第 1 回追跡調査時よりサルコペニアをターゲットとしたコホート調査へ拡大させ、同調査では筋力評価に関して、握力、下肢筋力測定、体組成計による筋量測定を行った。握力は TOEI LIGHT 握力計を用い、下肢筋力は簡易筋力測定・訓練器を用いて左右下肢筋力を測定し、強い方を筋力とした。一方、筋量はタニタ製体組成計による四肢筋量測定を行い多い方を対象者筋量とした。その他調査項目は、既往歴、生活習慣・運動習慣、転倒状況に関する詳細な問診票、栄養調査 (BDHQ)、膝痛関連指標 (WOMAC)、腰痛関連指標 (Oswestry Disability Index)、QOL 関

連指標 (EQ5D、SF8)、ADL・要介護度調査、整形外科専門医による診察所見、身体計測、歩行速度、立ちしゃがみ時間、片脚起立時間など運動機能テスト、単純X線撮影（腰椎・股関節・膝関節）、血液・尿検査など多数に及ぶ。

（倫理面への配慮）本研究計画における臨床研究は、東京大学倫理委員会の承認を得ている（東京大学研究倫理審査委員会 1264、東京大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会 1326）。本研究課題は、各種法律・政令・各省通達特に、疫学研究に関する倫理指針（平成 19 年文部科学省・厚生労働省告示第 1 号）、臨床研究に関する倫理指針（平成 20 年厚生労働省告示第 415 号）、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 25 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号）および、東京大学が定めた倫理規定を遵守して行う。臨床情報蒐集や血液検体の採取に際しては、文書を用いて説明し同意書を取得しているが、同意の撤回が対象者の自由意志でいつでも可能であり、同意の撤回により不利益を受けることはないことを説明している。同意取得には強制にならないよう十分に配慮し、また十分な判断力のないものは対象から除外している。サンプル、個人情報および解析結果は、鍵付保管庫で厳重に保管し秘密を厳守している。結果を学術論文や学会で報告する場合も参加者の人権及びプライバシーの保護を優先し、個人を識別しうる情報は公表しない。個人情報はコードナンバーとして暗号化され、患者が特定されることは決してない。

島田研究では、大府市在住 65 歳以上高齢

者と名古屋市在住 70 歳以上高齢者 10,331 名を対象に、筋力、筋量、歩行機能を評価し、要介護認定者を除外し、筋力、歩行機能、筋量の全測定に参加した 9735（男性：4749、女性：4986 名）でサルコペニア有症率を算出した。サルコペニア判定には the European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) の提唱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) 以外のカットオフ値が明記されていないため、筋量 (skeletal muscle index: SMI) と握力は Yoshida et al (2012) 報告を参考にし、握力は男性 28.8kg 以下、女性 8.2kg 以下を筋力低下とし、筋量は男性 7.09kg/m² 以下、女性 5.91 kg/m² 以下を筋量低下とした。身体組成は、多周波体組成計にて全身と部位別の筋脂肪量を測定し、四肢筋量を身長 2 乗で補正した SMI で評価した。握力は利き手の最大値を採用し、歩行速度は 2.5m 歩行路に 2.0m の加速減速路を設けた歩行路を通常速度で 5 回歩き、平均速度 (m/s) を算出した。手段的 ADL は基本チェックリスト 5 項目（公共交通機関の利用、日用品の買い物、預貯金の管理、階段利用、椅子から立ち上がり）を用いた。手段的 ADL 低下を従属変数、サルコペニアと潜在的交絡因子（年齢、性別、高血圧、脳血管疾患、心臓病、糖尿病、高脂血症、骨粗鬆症）を独立変数に投入した多重ロジスティック回帰分析で、手段的 ADL 低下とサルコペニアの関連性を検討した。

（倫理面への配慮）本研究は、国立長寿医療研究センター倫理・利益相反審査の承認を得て実施した。

金、鈴木研究では、H24 年度板橋区女性

575人、H25年度板橋区女性638人、H23年度草津町288人（男性107人、女性181人）、H24年鳩山町277人（男性138人、女性139人）、合計約1,778人を対象に包括的検診を実施し、身長、体重、血圧、聞き取り調査（健康度自己評価、過去1年間の転倒、転倒恐怖感、骨折歴、外出頻度、生活機能、運動習慣、社会活動、痛み、既往歴等々）体力（筋力、歩行機能、バランス能力）、身体組成（DXA法による体脂肪率、筋肉量、骨密度）、血液成分（アルブミン、コレステロール、クレアチニン、HbA1c、ヘモグロビン等々）のデータを収集した。選定基準は、①体脂肪率上昇：男性49人（20.0%）、女性504人（33.0%）、②筋肉量減少：男性69人（28.2%）、女性305人（19.9%）、③体力：通常歩行速度低下：男性23人（9.4%）、女性301人（20.1%）、握力低下：男性67人（27.7%）、女性279（19.5%）より作成した。

（倫理面への配慮）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、健診参加者には個別に調査目的、調査内容、個人情報管理、調査結果の活用、結果のフィードバックなどについて詳細に説明し、調査参加有無を自ら選択するように説明すると共に自筆の承諾書を得た上で実施した。

治療については

原田研究では、対象は骨粗鬆症とサルコペニアを合併している患者。選択基準は、50歳以上の患者、骨粗鬆症に関しては骨粗鬆症の予防と治療ガイドライン2011の薬物治療開始基準に合致する者、サルコペニアに関しては下記基準値*を用いたEWGSOP診

断アルゴリズムでサルコペニアと診断された者。*サルコペニアの診断基準値は、骨格筋指標は日本人基準値である男性が6.87 kg/m²未満、女性が5.46 kg/m²未満とし、通常歩行速度は、1.0m/s未満（Morley2011）、握力は、男30kg女20kg未満（Laurentani2003）とした。目標症例数は全体で100例で、当院では70例とした。前述の骨粗鬆症データベースでは骨粗鬆症患者の45%がサルコペニア筋肉量基準値以下で通常の骨粗鬆症患者の半数が対象になるものと予測された。方法は、多施設共同無作為対照比較試験（RCT）で標準的骨粗鬆症の薬剤治療をして骨評価と同時に筋肉効果も評価する。本試験に同意後に下記スクリーニング検査を行う。無作為に介入群と対照群に分け、次ぎの開始時検査後、骨粗鬆症薬として介入群にアレンドロネート35mgとアルファカルシドール0.5μg、対照群にアルファカルシドール0.5μgを投与する。観察項目を確認しながら、6ヶ月で中間評価、12ヶ月で最終評価し、アウトカムを比較する。スクリーニング検査は二重エネルギーX線吸収（DXA）法による骨密度（BMD）と骨格筋量指標、握力、通常歩行速度。開始時検査は立ち上がり・2ステップテスト・ロコモ指数25、胸椎腰椎XP、血液検査（iPTH、NTX、BAP、CPK、CRP、GH、Ca）、中間評価はBMDと骨格筋量指標、握力、通常歩行速度、血液検査。最終評価はBMDと骨格筋量指標、握力、通常歩行速度、ロコモ指数25、胸椎腰椎XP、血液検査。観察項目はコンプライアンス、転倒、有害事象。主要評価項目は骨格筋量指標、握力、通常歩行速度。副次評価項目はBMD、ロコモ指数25、転倒率、一般安全性。実施場所は、国立長寿医療研

究センター病院、東京大学医学部附属病院、杏林大学医学部附属病院、伊奈病院整形外科。

(倫理面への配慮) 1) 本研究は「ヘルシンキ宣言」および「臨床研究に関する倫理指針」を遵守し、被験者個人の尊厳と人権の尊重、個人情報保護等の倫理的観点から十分に配慮しながら研究を遂行する。2) 被験者本人又は本人が不能ならば家族などの代諾者に方法、意義を説明して十分な理解と署名による同意を得た場合にのみ行い、試験参加に協力しない場合でもいかなる不利益も被らないことを明白にしておく。3) 被験者のプライバシーを尊重し、結果については秘密を厳守し、研究の結果得られるいかなる情報も研究目的以外に使用されることはない。連結可能匿名化にて、個人情報ならびに連結対応表は臨床研究推進部の鍵のかかったロッカーを使用して保管する。4) 被験者が試験参加中止を希望した場合は速やかに中止する。その結果被験者が不利益を被ることはない。5) 研究結果は専門の学会あるいは雑誌に発表されることがあるが、その場合も被験者のプライバシーは厳格に守秘する。

細井研究では、①対象：研究内容の説明を受け、書面にて同意を得たいずれも 20 歳台の健常男性 97 名と健常女性 92 名。代謝性疾患は除外項目とした。②血液生化学検査：空腹時の静脈血を用いて、血中ビタミン K 濃度、血清インタクトオステオカルシン (intact OC)、低カルボキシル化オステオカルシン (undercarboxylated OC, ucOC)、骨型アルカリホスファターゼ (BAP) を測定した。③GGCX 遺伝子多型タイピング：GGCX

遺伝子多型は、R325Q(974G>A) (dbSNP: rs699664) についてタイピングした。全血から抽出した DNA を用いて当該領域を PCR によって増幅したものについてダイレクトシーケンスを行った。④食事調査：採血直前の 3 日間の食事記録に基づいて熟練した管理栄養士が食事調査を行い、確立されたソフトウェアを用いて摂取栄養素量を算定した。⑤統計学的解析：対象集団全体、または遺伝子型でわけたグループ別に血中の生化学パラメーターと摂取ビタミン K 量との関連を検討した。

(倫理面への配慮) 研究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。

橋本研究では、①不死化ヒト筋細胞の培養：ヒトテロメラーゼ遺伝子、ヒト CDK4R24C 遺伝子、ヒト cyclin D1 遺伝子を導入・発現させ、未分化ヒト筋細胞を分化能保持したまま不死化した。本研究では、42 歳女性骨格筋由来の不死化ヒト筋細胞クローン Hu5/KD3 を用いた。不死化ヒト筋細胞は I 型コラーゲン塗布の培養皿に播き、37°C 10%CO₂ の気相下で静置培養。培養液は Primary myocyte growth medium (pmGM) を用い、筋分化誘導の場合は 2x10⁵ 細胞を培養皿に播き、2 日後に培地を Primary myocyte differentiation medium (pmDM) に交換し 4-6 日間培養した。②筋分化誘導、分化マーカー、増殖マーカーの検出：細胞を 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、分化マーカー-myosine heavy chain (MyHC) に対するモノクローナル抗体 (MF20) か トロポニン T 抗体と反応後、HRP か FITC 標識二次

抗体と反応させた。核は DAPI あるいはヘマトキシリンによって対比染色した。③BrdU の取り込みによる DNA 合成細胞の検出：Hu5/KD3 を $10 \mu\text{M}$ BrdU を含む培地中で 4 時間標識し PFA 固定後、塩酸処理、中和処理後、抗 BrdU 抗体と反応。Cy3 標識二次抗体によって BrdU 陽性核を検出し、DAPI 染色による全核数に対する割合を算出した。④イムノブロット解析：細胞を PBS で洗浄後、1%SDS in HEPES-buffered saline で溶解。細胞溶解液を SDS-PAGE で分離後、PVDF メンブレンに転写。メンブレンは特異抗体と incubation 後、アルカリ性フォスファターゼ標識二次抗体と反応させ、BCIP/NBT を基質とした発色法により特異的タンパク質を検出。

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

C. 研究結果 診断については

宮地研究では、参加者の年齢中央値は 63 歳であった。サルコペニア該当者は男性 9.8%、女性 7.8%で、体重、BMI、下腿最大周囲長が有意に低く、年齢が有意に高かった。男性(左)と女性(右)の下腿最大周囲長と四肢筋量(上)との関係、ならびに下腿最大周囲長と四肢筋量指数(下)との関係は、男性では相関係数が 0.8 を超える高い相関が見られ、女性では 0.7 程度の中等度の相関が見られた。下腿最大周囲長によるサルコペニア診断の ROC 分析の結果で、

ROC 曲線下面積は男性 96%、女性 82%であった。感度と特異度は男性 0.91 と 0.90、女性 0.82 と 0.72 で、カットオフ値は男性 34.1cm、女性 32.8cm であった。

重本研究では、1. 老齢マウス下肢骨格筋は骨格筋間で筋萎縮の様式が異なる。若齢(8カ月齢)・老齢マウス(32カ月齢)から、老齢マウスの下肢骨格筋において筋重量及び体重補正筋重量の顕著な減少を認めた。加齢性筋萎縮は、筋線維数減少と筋線維面積低下に起因するとされるが、老齢マウスの筋萎縮様式を HE 染色によって解析した。老齢マウスひらめ筋では筋線維数減少に起因し、長趾伸筋腓腹筋では筋線維面積低下に起因し、前脛骨筋では筋線維数減少と筋線維面積低下に起因した筋萎縮であることが判明し、老齢マウス下肢骨格筋では骨格筋間で筋萎縮様式が異なることを明らかにした。2. 老齢マウス下肢骨格筋は筋線維タイプ特異的に筋萎縮様式が異なる。加齢性筋萎縮は速筋線維(Type2B fiber)選択的におきるとされるが、マウス下肢骨格筋で筋線維タイプに対する免疫組織染色法により、各筋において筋線維タイプ特異的に筋萎縮様式が異なることが判明した。筋線維数変化は、長趾伸筋で Type2B fiber 減少し、ひらめ筋・前頸骨筋・腓腹筋で Type2A fiber が減少していた。一方で速筋優位筋(長趾伸筋、前頸骨筋、腓腹筋)では共通して Type2B fiber 特異的筋線維面積低下を示した。3. ミトコンドリア機能の変化 加齢に伴うミトコンドリア機能異常がサルコペニア発症要因の 1 つとされており、病理学的・組織化学的に単一筋線維レベルで筋線維萎縮とミトコンドリア機能変化の因果関係をひらめ筋と長趾伸筋に絞って解析した。

ミトコンドリア機能指標としてミトコンドリア呼吸鎖複合体IV活性を反映する COX、呼吸鎖複合体 I 活性を反映する NADH-TR、呼吸鎖複合体 II 活性を反映する SDH 染色を行い、老齢マウスひらめ筋で SDH 活性は維持されていたものの COX 及び NADH-TR 活性が低下したことから、ミトコンドリア呼吸酵素活性の顕著低下が示された。ミトコンドリアバイオジェネシスやミトコンドリア呼吸機能を正に制御する PGC1 α 、PGC1 α の下流でミトコンドリア DNA 転写を促進する Tfam、ミトコンドリア呼吸鎖複合体IVの一部をコードする COXIV の mRNA 量を定量的リアルタイム PCR 法によって解析し、老齢マウスひらめ筋におけるミトコンドリア関連遺伝子発現の顕著低下を確認した。一方で、老齢マウス長趾伸筋では、ミトコンドリア呼吸酵素活性及び PGC1 α の mRNA 発現量に顕著な変化は認められなかった。次に、老齢マウスの筋線維タイプ特異的筋萎縮とミトコンドリア呼吸酵素活性変化との関連性を調べ、老齢マウスひらめ筋におけるミトコンドリア呼吸酵素活性低下は、筋萎縮を呈した Type2A fiber でなく Type1 fiber 特異的に引き起こされることが示された。老齢マウス長趾伸筋では各筋線維タイプ単位でミトコンドリア呼吸酵素活性が維持されることが明らかとなった。次に、ミトコンドリア呼吸酵素活性低下とミトコンドリア蛋白質発現変化との関連を明確にするために、COXIV に対する特異抗体を用いた免疫組織染色を行い、ミトコンドリア蛋白質発現変化を筋線維タイプ単位で解析し、老齢マウスひらめ筋では若齢と比較して Type1、Type2A fiber 共に COXIV の蛍光強度が低下したが、Type1 fiber でその低下がより顕著

であった。4. ミトコンドリアの形態変化 組織化学的手法であるゴモリトリクローム変法を使った。mGT 染色はミトコンドリア機能低下に伴うミトコンドリア形態異常を光学顕微鏡的に赤紫色に染出する。老齢マウスひらめ筋で筋線維膜直下に異常集積物が観察される筋線維の増加が認められ、この集積物がミトコンドリアと予想し、mGT 染色、COX 染色、COXIV の免疫組織染色で、集積物はミトコンドリア呼吸酵素 COX 活性が非常に高く、ミトコンドリア蛋白質 COX IV の免疫組織染色像と共局在を示した。さらに定量解析の結果、sarcoplasmic mass-like fiber 出現に筋線維タイプ特異性はなく、Type1, 2A fiber とともに同程度割合で病理所見が観察された。5. 解糖系酵素活性の解析 老齢マウスひらめ筋と長趾伸筋における解糖系代謝機能を解析した。解糖系代謝酵素活性の指標とされる α -GPD 染色を凍結筋切片に施し、老齢マウスひらめ筋と長趾伸筋では共に α -GPD 活性に顕著変化は認められず、各筋線維タイプ単位で活性が維持されることが判明した。

江頭研究では、マイクロアレイ解析によりイソプロテレノールによるビタミン D 受容体 (VDR) mRNA の発現上昇が認められた。VDR mRNA のイソプロテレノールによる上昇は、定量的 RT-PCR にても確認された。また、ウェスタンブロット解析によりイソプロテレノールによる VDR タンパクレベルの発現上昇も確認された。選択的 β 2 受容体活性化薬であるホルモテロールならびにフェモテロールにより同様に VDR 発現上昇が認められ、イソプロテレノールの効果が選択的 β 2 受容体拮抗薬 ICI118551 により遮断されることから、イソプロテレノールの効果は、