

but not in nonatherosclerotic lesions [3]. Diabetes mellitus is a well-documented, high-risk factor for the development of atherosclerosis [4]. The hallmark of diabetes is the presence of hyperglycemia, which can accelerate senescence in endothelial cells [5]. In several publications, we have demonstrated that high glucose can induce endothelial cell senescence [3,6,7,8]. In fact, we previously reported that continuous high glucose stimulus causes endothelial senescence more markedly than hypertension or dyslipidemia stimulus [8].

Rapid fluctuations of glycemia, including postprandial hyperglycemia and interprandial hypoglycemia, may play a crucial role in the pathogenesis of diabetic cardiovascular complications [9,10]. In clinical practice, the intensive treatment goal targets minimizing the sharp fluctuations of blood glucose levels that occur in inadequately treated patients. Intermittent, rather than constant, hyperglycemia can induce an increased production of collagen by cultured mesangial cells [11]. Furthermore, intermittent high glucose has been demonstrated to exhibit more marked increases in endothelial cell apoptosis [12,13], endothelial expression of adhesion molecules [14], and vascular smooth muscle cell proliferation [15] than constant high glucose. Thus, glucose fluctuations appear to be more deleterious to vascular cell integrity than constant high glucose concentrations.

In the present study, we verified whether intermittent vs. constant exposure to high glucose might have different effects on cellular senescence in human vascular endothelial cells. We also evaluated how fluctuating glucose makes an impact on the changes in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and reactive oxygen species (ROS), both of which may play pivotal roles in endothelial cell senescence [2,3].

Materials and methods

Cell culture

Human umbilical venous endothelial cells (HUVECs) were purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA) and were cultured in endothelial cell growth medium-2 until the start of the experiment. To exclude the insulin effect [6], the cells were cultured in modified endothelial cell growth medium-2 that lacked insulin-like growth factor-1 but contained 2% fetal bovine serum during the experimental period. According to our previous study [3], five- to seven-passage subconfluent cells were used in the experiments. The cells were harvested at subconfluence and were seeded into six-well plates. Subsequently, they were exposed to the experimental condition for 3 days. They were grouped as follows: (1) constant normal glucose medium (5.5 mM); (2) constant high glucose medium (22 mM); and (3) alternating normal and high glucose media every 12 h (Fig 1). In the constant normal or high glucose group, each fresh medium was provided every 24 h. Mannitol was used to rule out the effect of osmotic pressure [6]. In measurements of telomere length, we continued the culture with every 3 days changing the tissue culture medium up to 28 days.

Measurement of cellular senescence

Cytochemical staining of senescence-associated- β -galactosidase (SA- β -gal) was performed using a Senescence Detection Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA), as previously described, which showed the detailed effect of endothelial senescence including the growth curve [6–8]. SA- β -gal activity was measured using flow cytometry [6]. Immunoblot detection was used to identify the tumor suppressor p53, which is known to be a canonical inducer of cellular senescence [16]. SA- β -gal activity was measured using a microscope [8]. The cells were fixed for 10 min in 2% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde in PBS and were incubated for 12 hours at 37°C without CO₂ with fresh β -gal staining solution: 1 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, 5 mM potassium ferrocyanide, 5 mM potassium ferricyanide, and

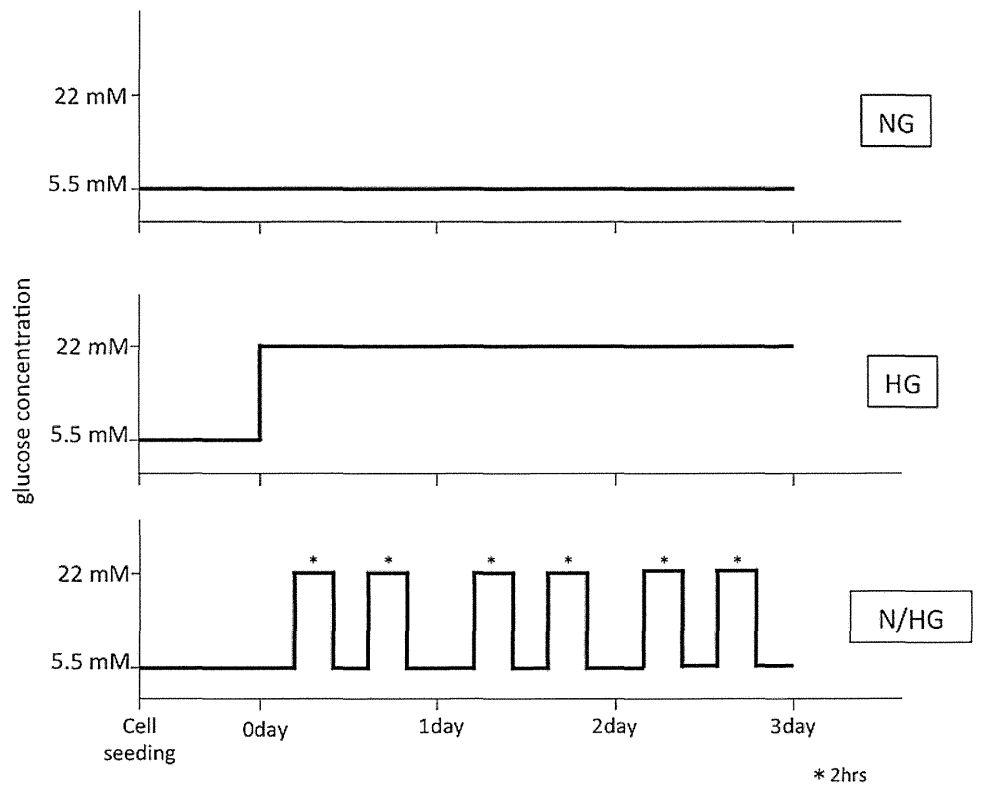


Fig 1. Research Design. The endothelial cells were exposed to the experimental condition for 3 days. They were grouped as follows: (1) constant normal glucose medium (5.5 mM:NG); (2) constant high glucose medium (22 mM: HG); and (3) alternating normal and high glucose media every 12 h (N/HG).

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g001

2 mM $MgCl_2$, pH 6.0. The cells were counterstained with 4'6-diamidinophenylindole (DAPI; 0.2 mg/ml in 10 mM NaCl) for 10 min to count the total number of cells. The percentage of SA- β -gal-positive cells was determined by counting the number of blue cells within a sample of 1,000 cells.

Cellular senescence related proteins such as p21, p16^{INK4a}, p16 and p53 were measured by western blotting. We used p21 (sc-397, SANTA CRUZ) rabbit polyclonal antibody (1:200), p16^{INK4a} (ab54210, abcam) mouse monoclonal antibody (1:500), p53 mouse monoclonal antibody as well as β -actin (ab8226, abcam) mouse monoclonal (1:15,000) as first antibody. We also used anti-rabbit IgG, HRP-Linked antibody (#7074, Cell Signaling) for p21 (1:5,000), anti-mouse IgG, HRP-Linked antibody (#7076, Cell Signaling) for p16 (1:5,000), p53 (1:5,000) and β -actin (1:10,000) as 2nd antibody.

We further quantified DNA Damage of endothelial cells by using QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN) and DNA Damage Quantification Colorimetric Kit (#K253-25, Bio Vision). Apurinic/apyrimidinic (AP) sites are one of the major types of DNA lesions formed during the course of base excision and repair of oxidized, deaminated or alkylated bases. It has been estimated that about 2×10^5 base lesions are generated per cell per day. The level of AP sites in cells can be good indicator of DNA lesion and repair against chemical damage and cellular senescence. This Kit utilizes the ARP (Aldehyde Reactive Probe) reagent that reacts specifically with an aldehyde group, which is the open ring from of the AP sites. After treating DNA containing AP sites with ARP reagents, AP sites are tagged with biotin residues, which can be quantified using avidin-biotin assay followed by a colorimetric detection.

Human telomerase activity and length

Telomerase activity was measured using the TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) [6]. Telomere length was measured via fluorescence in situ hybridization using flow cytometry [6, 17]. For the assay standardization, we added an aliquot of a single batch of 1,301 cells (a sub-line of human T cell lymphoblast-like cell) to each sample as an internal control.

Western blot analysis

Western blotting was performed as described in our previous reports [7,8,18]. The membrane was blotted with the indicated antibodies and was processed using chemiluminescence. Namely, we used p21 (sc-397, SANT CRUZ) rabbit polyclonal (1:200), p16^{INK4a} (ab54210, abcam) mouse monoclonal (1:500) and β -actin (ab8226, abcam) mouse monoclonal antibodies (1:15,000) as 1st antibodies and anti-rabbit IgG, HRP-Linked antibody (#7074, Cell Signaling) for p21 (1:5,000) anti-mouse IgG, HRP-Linked antibody (#7076, Cell Signaling) for p16 (1:5,000) and β -actin (1:10,000) antibodies as 2nd antibodies.

DNA Damage Quantification

To detect DNA damage quantification, we used QIAamp DNA Mini Kit (51304, QIAGEN) And DNA Damage Quantification Colorimetric Kit (#K253-25, Bio Vision). Apurinic/apyrimidinic (AP) sites are one of the major types of DNA lesions formed during the course of base excision and repair of oxidized, deaminated or alkylated bases. It has been estimated that about 2×10^5 base lesions are generated per cell per day. The level of AP sites in cells can be good indicator of DNA lesion and repair against chemical damage and cell aging. This Kit utilizes the ARP (Aldehyde Reactive Probe) reagent that reacts specifically with an aldehyde group, which is the open ring from of the AP sites. After treating DNA containing AP sites with ARP reagents, AP sites are tagged with biotin residues, which can be quantified using avidin-biotin assay followed by a colorimetric detection.

Nitric oxide and metabolites of nitric oxide measurement

To detect nitric oxide (NO) production by HUVECs, we loaded HUVECs with 4,5-diaminofluorescein diacetate (DAF-2 DA, Cayman Chemical, San Diego, CA, USA). This membrane-permeable dye is hydrolyzed intracellularly by cytosolic esterases releasing DAF-2, which is converted in the presence of NO into a fluorescent product, DAF-2 triazole [19].

The metabolites of NO (NO_x:NO₂⁻ and NO₃⁻) in the medium were measured using the HPLC system to develop NO_x measurement [20].

Analysis of ROS and superoxide generation

To detect intracellular ROS, including hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and peroxynitrite, we loaded the endothelial cells using the fluorescent probe 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester (CM-H₂DCFDA) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to produce a final concentration of 10 mM for 45 min in phosphate buffered saline at 37°C. At the end of the experiment, the cells were rinsed with phosphate-buffered saline and were subsequently placed in the culture medium. Imaging was conducted using a Cell Observer microscope and AxoVision software (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) [18]. The production of superoxide anion was speculated from measurements using dihydroethidium (DHE) (Invitrogen) [21–23]. The cells were incubated using fluorescent probes at the concentration of 10 mM at 37°C for 30 min, and flow cytometry was performed [8].

Transfection of siRNAs

All small interfering RNAs (siRNAs) were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). The nonsilencing control siRNA was used as a negative control. Scrambled siRNA-treated cells were also used as controls. The transfection of siRNA was performed in Opti-MEM I Reduced-Serum Medium using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) [24]. We confirmed the expression of a target gene by Western-blot. There are differences in the suppression ratio (namely reflecting the transfection efficiency) according to target genes. In siRNA of eNOS, the suppression ratio was approximately 99%. In siRNA of p22phox, it was 96.5%. There is a report that the transfection reagent (RNAiMAX), which we used in the present study, shows the high transfection efficiency in smooth muscle cell as adherent cell, too [25].

Statistics

The values are presented as the mean \pm standard deviation (SD). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test was used, and $p < 0.05$ was considered to be statistically significant.

Results

When HUVECs were exposed to constant high glucose, there was a significant increase in SA- β -gal activity, a widely used quantitative marker for aging *in vitro*. This effect was enhanced when the cells were exposed to intermittent high glucose concentrations (Fig 2A). Similarly, cytochemical staining SA- β -gal showed that the number of SA- β -gal positive cells showed that the number of SA- β -gal positive cells was induced by the high-glucose condition and was increased under the fluctuating-glucose condition (Fig 2B). SA- β -gal activity was not affected by osmolality, which was confirmed by the lack of effect of mannitol, as reported in our previous study [6].

Endothelial senescence related proteins such as p53, p21, p16^{INK4a} and were measured by western blotting (Fig 3A, 3B, 3C and 3D). Intermittent high glucose stimulus (IHG) increased these proteins significantly compared with the condition of normal glucose and tended to increase them than those by continuous high glucose stimuli. We further quantified DNA damage of endothelial cells. DNA damage was observed by the stimuli of intermittent high glucose (Fig 3E) as well as continuous high glucose stimuli. These results show that intermittent high glucose condition induced endothelial senescence, which starts as early as 3 days after the start of the stimuli.

The telomerase, a specialized ribonucleoprotein transcriptase that is important for long-term eukaryotic cell proliferation and genomic stability to replenish the DNA at telomeres, was significantly decreased in a constant high-glucose environment (Fig 4A). Subsequently, telomere length, a likely index of biological aging, was shortened by 4 weeks, which we continued the culture with every 3 days changing the tissue culture medium up to 28 days. It suggested replicative senescence (Fig 4B). In contrast, both telomerase activity and telomere length remained unchanged after exposure of HUVECs to intermittent high glucose (Fig 4A and 4B).

We have previously shown that eNOS plays a pivotal role in the regulation of the senescence program in vascular endothelial cells [2,6,7,8]. Under constant or intermittent high glucose, however, eNOS total expression, Ser-1177 eNOS phosphorylation, and Thr-495 eNOS dephosphorylation levels were substantially similar to those under normal glucose (Fig 5A–5D). When we examined the basal NO levels from HUVECs using the fluorescent dye DAF-2 DA, no significant difference was found among the three groups (Fig 5E). Concentration of NOx; metabolites of NO, NO₂⁻ + NO₃⁻, in culture medium also supports those data (Fig 5F).

Our previous studies have demonstrated that increased ROS plays a critical role in endothelial cell senescence caused by high-glucose stimuli [2,6,7,8]. ROS production was significantly

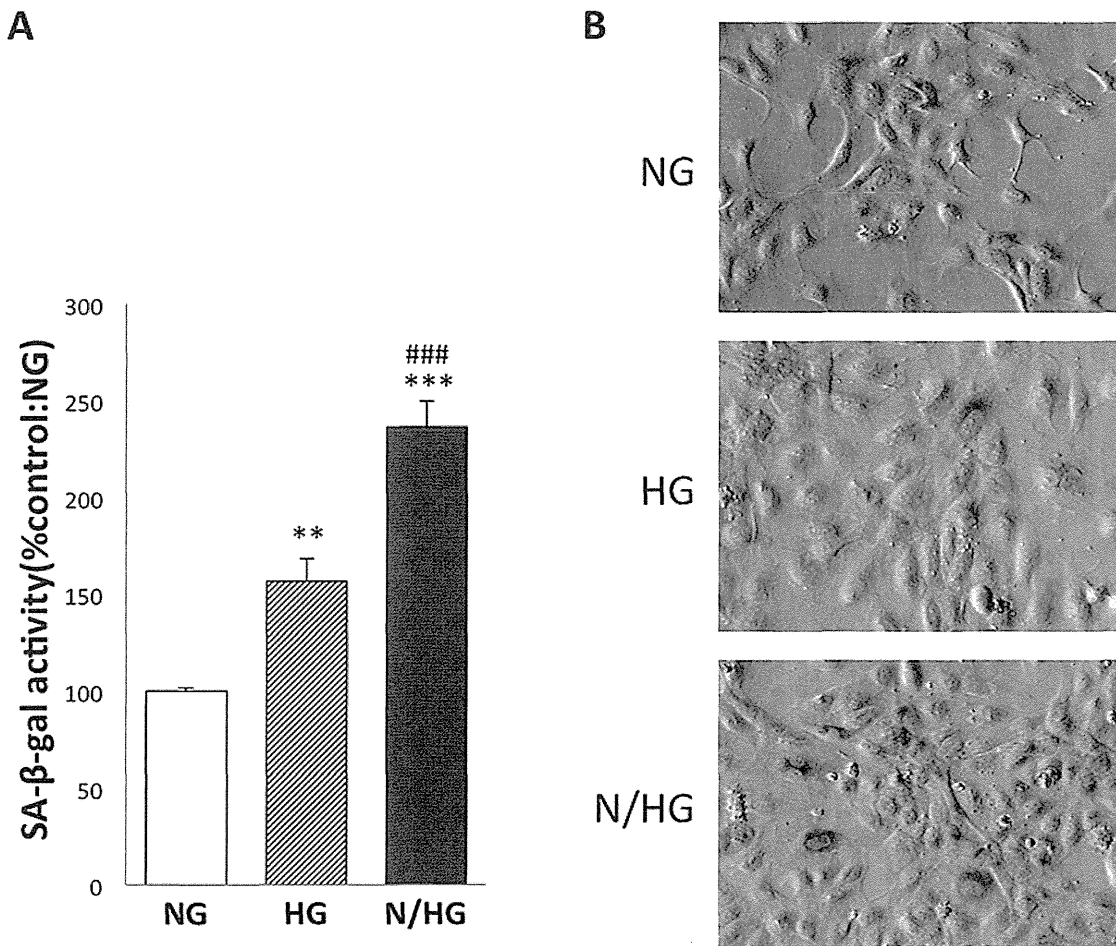


Fig 2. Effect of high glucose on SA-β-gal activity in HUVECs. NG, constant normal glucose (5 mM); HG, constant high glucose (22 mM); and N/HG, 5 mM alternating with 22 mM glucose. To confirm the effect of glucose in HUVECs, NG, HG and N/HG were cultured with each Stimulus for 3 days. HUVECs were cultured with constant high glucose (HG) and intermittent glucose (N/HG) introduced in Fig 1. Namely, N/HG was stimulated twice with HG (at 4-hour intervals) for a total of 4 hours daily (9 a.m. to 11 a.m., 3 p.m. to 5 p.m.), and was cultured in NG in other time of the total 4-hour HG stimulation. (A) SA-β-gal activity was evaluated cytochemically. The values of the three independent experiments are mean ± S.D. ***p*<0.01; ****p*<0.001 vs. NG; ###*p*<0.001 vs. HG. (B) SA-β-gal-positive cells (blue) can be detected via cytochemical staining.

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g002

increased by both constant and intermittent high glucose concentrations. The extent of increased ROS production was not different between constant and intermittent high glucose (Fig 6A). When superoxide was measured using the oxidative fluorescent dye DHE, a higher increase in superoxide production was observed under intermittent high-glucose conditions compared with constant high-glucose conditions (Fig 6B). NADPH oxidase is one of the most important sources of superoxide in vascular cells and p22^{phox} is a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system [20, 25, 26]. Constant exposure to high glucose did not alter the expression level of p22^{phox}; however, intermittent exposure to high glucose resulted in a striking up-regulation of p22^{phox} expression (Fig 6C). To explore the involvement of p22^{phox} up-regulation in the senescent action of glucose fluctuations in endothelial cells, we used siRNA to specifically ablate p22^{phox} mRNA in HUVECs. Our transfection of p22^{phox} siRNA effectively silenced the endothelial expression of p22^{phox} compared with that of the negative control siRNA (Fig 6D). Under the transfection of p22^{phox} siRNA, there was no difference in superoxide production between cells that were exposed to normal, constant high,

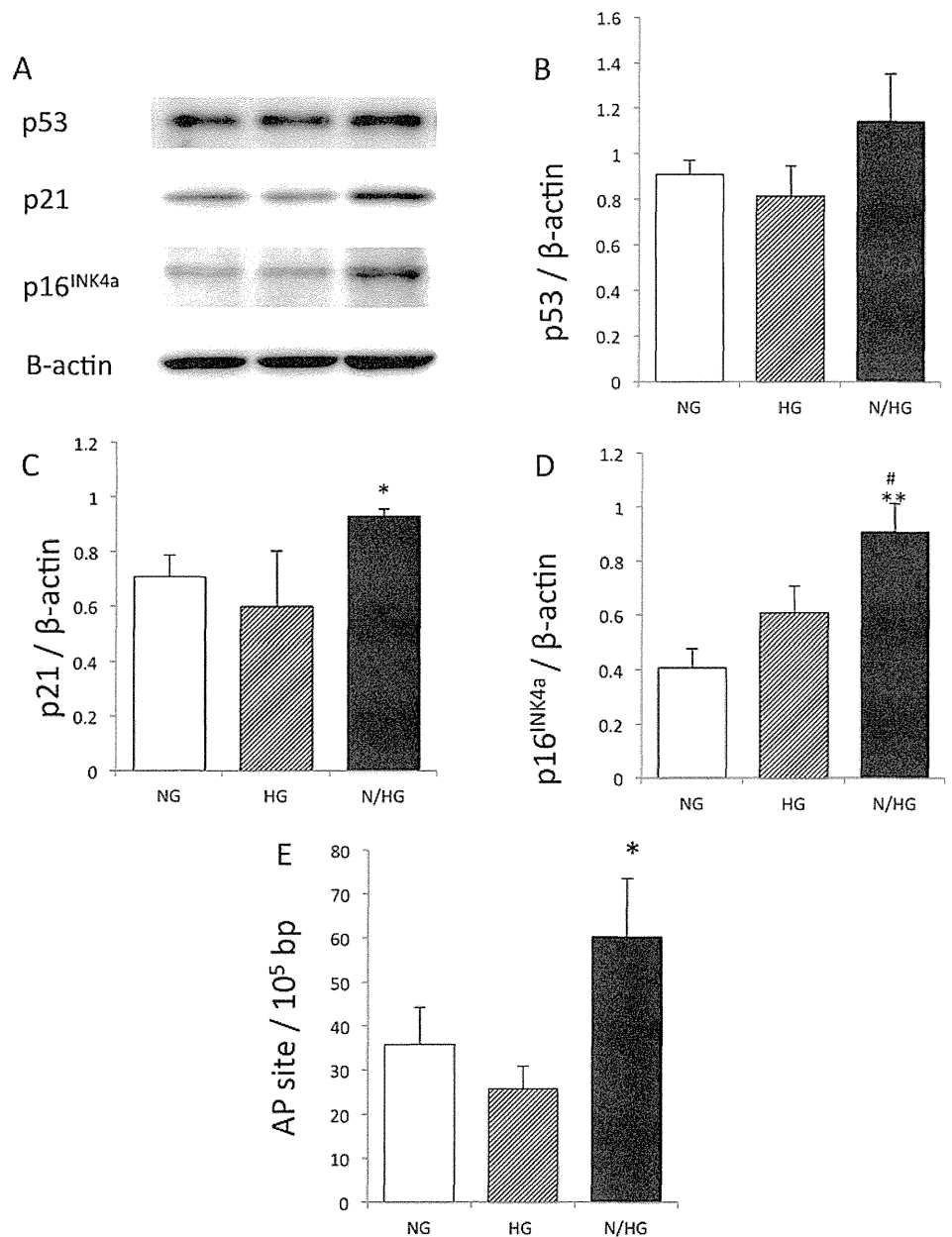


Fig 3. Effect of high glucose on p53, p21, p16^{INK4a}, and DNA ladder on Apurinic/aprimidinic (AP) sites. HUVECs were cultured with constant high glucose (HG) and intermittent glucose (N/HG) introduced in Fig 1. Namely, N/HG was stimulated twice with HG (at 4-hour intervals) for a total of 4 hours daily (9 a.m. to 11 a.m., 3 p.m. to 5 p.m.), and was cultured in NG in other time of the total 4-hour HG stimulation. (A)-(D): Effect of high glucose on p53, p21, p16^{INK4a} protein. (E): Effect of continuous and intermittent high glucose on endothelial DNA damage on Apurinic/aprimidinic (AP) sites. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ vs. NG; # $p < 0.05$ vs. HG. The values of the three independent experiments are mean \pm S.D.

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g003

or intermittent high glucose (Fig 6E). Furthermore, the increase of SA- β -gal activity observed in cells exposed to oscillating glucose was significant but less pronounced when p22^{phox} siRNA was transfected (Fig 6F, compared with Fig 2A). Under the transfection of p22^{phox} siRNA, there was no difference in DNA damage in AP site between cells that were exposed to normal, constant high, or intermittent high glucose (Fig 6G).

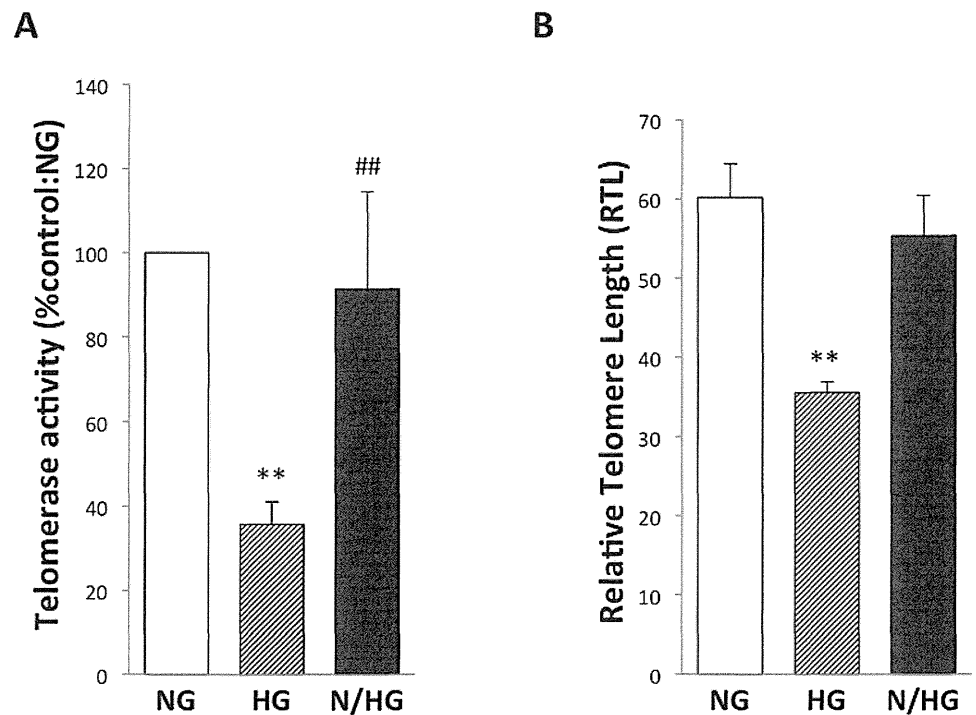


Fig 4. Effect of high glucose on telomerase activity and telomere length in HUVECs. NG, constant normal glucose (5 mM); HG, constant high glucose (22 mM); and N/HG, 5 mM alternating with 22 mM glucose. (A) Telomerase activity was measured by the telomere repeat application protocol (trap) assay. The values of the three independent experiments are mean \pm S.D. ** $p < 0.01$ vs. NG; ## $p < 0.01$ vs. HG. (B) Telomere length was measured to evaluate the relationship to replicative senescence. The data shown represent the average of two independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g004

Discussion

Endothelial cell dysfunction is identified to be an early culprit in causing the development of vascular complications in diabetes [26, 27]. Endothelial cell senescence causes endothelial dysfunction [1]. Thus, endothelial cell senescence may be involved in diabetes-related vascular disorders. Our recent studies have provided increasing evidence that high glucose accelerates endothelial cell senescence [3,6,7,8].

The present study showed that human vascular endothelial cells exposed to high glucose concentrations increased cell senescence, which was determined by measuring SA- β -gal activity. This evidence was more enhanced in cells that were exposed to intermediate rather than constant high glucose concentrations. Further, p16^{INK4a} and p21 were increased by 3 days intermittent high glucose stimuli. Although increase of p53 was not large compared with those of p16^{INK4a} and p21, the pathway via p16INK4a may be main process of cellular senescence, on the other hands, p53 relates apoptosis more than senescence [28]. Our findings may suggest that glucose fluctuation appears to be more deleterious to endothelial cells than a constant high glucose concentration and it may accelerate endothelial senescence within even 3 days.

As reported earlier [6,8], telomerase activity was markedly decreased when HUVECs were exposed to a constant high glucose concentration, and thus, presumably resulted in shortened telomeres. However, telomere extension by the overexpression of telomerase does not affect stress-induced senescence [29] but prevents replicative senescence [30]. Therefore, the change in telomerase activity, subsequent to the change in telomere length induced by a constant high

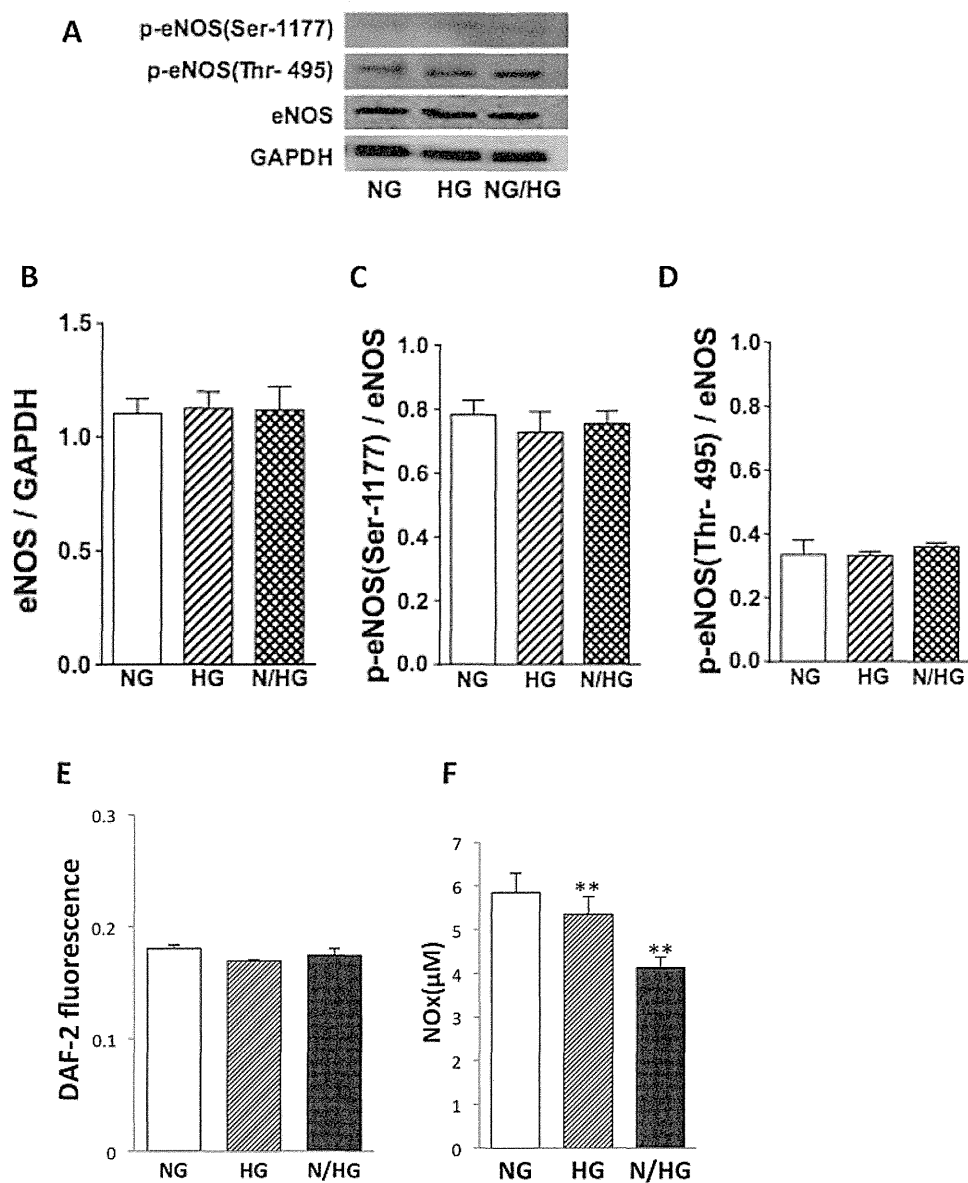


Fig 5. eNOS activity in HUVECs exposed to high glucose. NG, constant normal glucose (5 mM); HG, constant high glucose (22 mM); and N/HG, 5 mM alternating with 22 mM glucose. (A) Typical Western blots for total eNOS, Ser-1177 phosphorylated eNOS, and Thr-495 phosphorylated eNOS are shown. GAPDH served as the loading control. (B-D) Summary of quantification of densitometric measurement of the immunoblot data. Total eNOS expression and eNOS phosphorylation levels were normalized to GAPDH and total eNOS, respectively. (E) NO production by HUVECs, using the fluorescent dye DAF-2-DA. (F) The data of NOx (NO₂⁻ and NO₃⁻), NO metabolites measured by HPLC.

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g005

glucose concentration may represent replicative senescence. We studied telomere activity by 3 days observation, however, in measurements of telomere length, we continued the culture with every 3 days changing the incubation fluid up to 28 days to observe significant change of telomere length. It needs much longer time to observe change of the telomere length compared with the change of telomerase activity. Intermittent high glucose did not alter telomerase activity and telomere length. Telomerase activity, subsequently telomere length might be affected by ROS as below. It is reported that shorter telomeres with high telomerase activity in

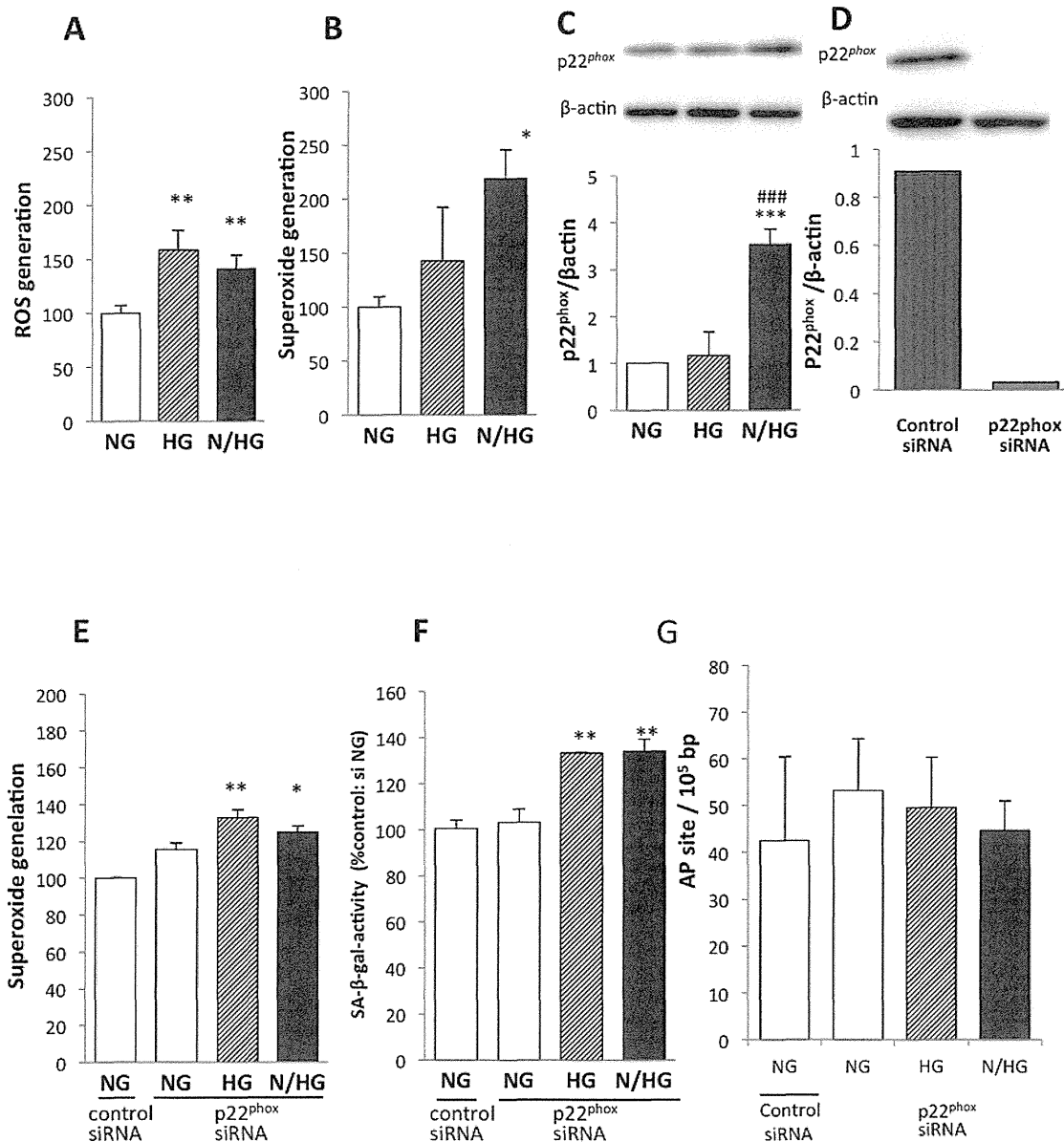


Fig 6. ROS and superoxide generation in HUVECs exposed to high glucose. NG, constant normal glucose (5 mM); HG, constant high glucose (22 mM); and N/HG, 5 mM alternating with 22 mM glucose. (A) Intracellular ROS was measured by visualizing the use of the fluorescent probe CM-H₂DCFDA. (B) Superoxide was detected via DHE and was analyzed using flow cytometry. (C) Expression of p22^{phox} protein levels. In the top, typical Western blots are shown. β-Actin served as loading control. (D) Transfection of p22^{phox} siRNA effectively eliminated p22^{phox} protein expression. (E) Transfection of p22^{phox} siRNA negated the increase in superoxide production in the fluctuating-glucose condition. (F) Transfection of p22^{phox} siRNA blunted the fluctuating glucose-induced SA-β-gal activity. (G) Transfection of p22^{phox} siRNA blunted DNA damage of AP site. The values of the three independent experiments are mean ± S.D. **p*<0.05; ***p*<0.01; ****p*<0.001 vs. NG; ###*p*<0.001 vs. HG.

doi:10.1371/journal.pone.0123169.g006

unstimulated leukocytes were associated with reduced social support and greater early life adversity [30]. The effect of telomerase might be complicated.

We have shown a pivotal role of increased ROS in endothelial cell senescence caused by high glucose stimuli [3,6,7,8]. In this study, no difference in ROS production was found between the cells exposed to constant and intermittent high glucose. The detection of ROS was performed after staining HUVECs with CM-H₂DCFDA, which is now used for monitoring

intracellular hydrogen peroxide, hydroxyl radical, and peroxynitrite production in cells. Thus, the enhanced cell senescent effect of glucose fluctuation cannot be attributed to the increased production of these radicals. When DHE, which is generally speculated to be specific for superoxide, was used as its probe, we found a larger production of superoxide in the cells incubated with oscillating glucose than in the cells with constant high glucose. There may be the limitation of the DHE method for the correct measurement of superoxide, however there are no perfect methods for that easily available except an ESR (electron spin resonance) method [21–23]. The endothelial expression of p22^{phox}, a critical component of the superoxide-generating NADH/NADPH oxidase system, was strikingly up-regulated under intermittent high-glucose conditions. Importantly, the ablation of p22^{phox} by siRNA abrogated the increase in superoxide production and undermined the implementation of endothelial cell senescence in a fluctuating-glucose environment. We thus suggest that glucose fluctuations display a more adverse effect on senescence in human vascular endothelial cells than constant high glucose concentrations, in part, by NADPH oxidase-derived superoxide overproduction. Nox2, referred to as gp91phox, likely plays a role, and the hetero-dimer with p22phox may be produced and may increase catalytic activity. Nox4 may play a role and may limit the actual catalytic activity [31, 32]. However, in this experiment, we did not evaluate the identification of the Nox2/Nox4 ratio because our primary object was to investigate the effect of intermittent high glucose (models of impaired glucose tolerance and metabolic syndrome) on endothelial senescence. Similarly, mitochondria may produce ROS as well as NADPH oxidase, however, we could not investigate the source of ROS in detail in the present study.

Our recent study has demonstrated that the antisenescence effect of calcium-channel blockers in human endothelial cells is associated with increased eNOS activity [8], implying that eNOS activation is important in the regulation of the senescence program in endothelial cells by NO-mediated delay of cellular senescence [2]. The activity of eNOS is regulated by reciprocal phosphorylation of the activating site Ser-1177 and inhibiting site Thr-495, which affects NO bioavailability [33]. We found that both constant and intermittent glucose led to no changes in eNOS total expression, Ser-1177 eNOS phosphorylation, Thr-495 eNOS dephosphorylation, or NO release from control levels in HUVECs. This finding suggests that the baneful effect of glucose fluctuation on endothelial cell senescence cannot be attributed to a substantial alteration in eNOS activation. Several papers have reported the expression of iNOS by high glucose in endothelial cells; however, the glucose concentration in those papers was higher (33 mM or more) than those in our finding (22 mM)[34,35], and inducers of iNOS, such as lipopolysaccharides, were simultaneously used in several experiments. Other papers have reported no induction of iNOS by high glucose in the cultured endothelium [36]. In fact, we have observed iNOS in neighboring necrotic areas in atherosclerosis but not in the endothelium in diabetic patients [37]. Altogether, we believe that iNOS is not induced by high glucose. The NOx amount was not increased in the present study and we did not detect iNOS under similar conditions [3,7]. We speculate that one reason is the non-use of IGF in the culture medium to rule out the effect of insulin in our study [6].

The present results may be clinically relevant. Our findings support a prior clinical report that fluctuations in blood glucose levels cause endothelial dysfunction in diabetic patients [38]. Additionally, our findings might support the hypothesis that impaired glucose tolerance causes atherosclerosis via stress-induced senescence. Thus, glucose fluctuation in blood can be a risk predictor for the occurrence and the progression of cardiovascular diseases in diabetes. Appreciably, turning up highly promising management of postprandial hyperglycemic spikes is an important determinant of overall glucose control to prevent the onset and the development of hyperglycemic or diabetic cardiovascular complications.

Conclusion

Impaired glucose tolerance occurs frequently in the elderly and poses an independent risk for atherosclerosis. Endothelial cellular senescence precedes atherosclerosis. Constant high glucose levels increased SA- β -gal activity, a cellular senescence marker, and showed replicative senescence. This effect was more pronounced in intermittent high glucose, which demonstrated a stress-induced senescence. Intermittent, but not constant, high glucose strikingly up-regulated the expression of p22^{phox}, an NADPH oxidase component, increasing superoxide. Intermittent high glucose promotes vascular endothelial senescence and, in part, depends on superoxide overproduction.

Acknowledgments

The authors thank Toshio Fujimori for his technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM TH. Performed the experiments: MM NM. Analyzed the data: MM TH. Contributed reagents/materials/analysis tools: MM TH YH MK. Wrote the paper: MM TH YH.

References

1. Minamino T, Komuro I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis, *Circ Res.* 2007; 100: 15–26. PMID: 17204661
2. Hayashi T, Yano K, Matsui-Hirai H, Yokoo H, Hattori Y, Iguchi A. Nitric oxide and endothelial cellular senescence. *Pharmacol Ther.* 2008; 120: 333–339. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.09.002 PMID: 18930078
3. Hayashi T, Matsui-Hirai H, Miyazaki-Akita A, Fukatsu A, Funami J, Ding QF, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by nitric oxide: Implications in atherosclerosis associated with menopause and diabetes, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103:17018–17023. PMID: 17075048
4. Chait A, Bornfeldt KE. Diabetes and atherosclerosis: is there a role for hyperglycemia? *J Lipid Res.* 2009; 50 (Suppl): S335–S339. doi: 10.1194/jlr.R800059-JLR200 PMID: 19029122
5. Yokoi T, Fukuo K, Yasuda O, Hotta M, Miyazaki J, Takemura Y, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 mediates cellular senescence induced by high glucose in endothelial cells. *Diabetes* 2006; 55:1660–1665. PMID: 16731828
6. Matsui-Hirai H, Hayashi T, Yamamoto S, Ina K, Maeda M, Kotani H, et al. Dose-dependent modulatory effects of insulin on glucose-induced endothelial senescence in vitro and in vivo: A relationship between telomeres and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011; 337:591–599. doi: 10.1124/jpet.110.177584 PMID: 21357660
7. Hayashi T, Kotani K, Yamaguchi T, Taguchi K, Iida M, Ina K, et al. Endothelial cellular senescence is inhibited by liver X receptor activation with an additional mechanism for its atheroprotection in diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111:1168–1173. doi: 10.1073/pnas.1322153111 PMID: 24398515
8. Hayashi T, Yamaguchi T, Sakakibara Y, Taguchi K, Maeda M, Kuzuya M, et al. eNOS-dependent anti-senescence effect of a calcium channel blocker in human endothelial cells. *PLoS One* 2014; 9: e88391. doi: 10.1371/journal.pone.0088391 PMID: 24520379
9. Ceriello A. The emerging role of post-prandial hyperglycaemic spikes in the pathogenesis of diabetic complications, *Diabet. Med.* 1998; 15:188–193. PMID: 9545118
10. Monnier L, Mas E, Ginet C, Michel F, Villon L, Cristol J.P, et al. Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *JAMA* 2006; 295:1681–1687. PMID: 16609090
11. Takeuchi A, Throckmorton DC, Brogden AP. Periodic high extracellular glucose enhances production of collagen III and IV by mesangial cells. *Am. J. Physiol.* 1995; 268:F13–F18. PMID: 7840239
12. Risso A, Mercuri F, Quagliaro L, Damante G, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis in human umbilical vein endothelial cells in culture. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2001; 281: E924–E930. PMID: 11595647

13. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Martinelli L, Motz E, Ceriello A. Intermittent high glucose enhances apoptosis related to oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. The role of protein kinase C and NAD(P)H-oxidase activation. *Diabetes* 2003; 52:2795–2804. PMID: 14578299
14. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Ros Da, Maier A, Zuodar G, et al. Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin expression in human umbilical vein endothelial cells in culture: The distinct role of protein kinase C and mitochondrial superoxide production, *Atherosclerosis* 2005; 183:259–267. PMID: 16285992
15. Sun J, Xu Y, Dai Z, Sun Y. Intermittent high glucose enhances proliferation of vascular smooth muscle cells by upregulating osteopontin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009; 313:64–69. doi: 10.1016/j.mce.2009.08.019 PMID: 19723557
16. Salminen A, Kaarniranta K. Control of p53 and NF- κ B signaling by WIP1 and MIF: role in cellular senescence and organismal aging, *Cell Signal.* 2011; 23:747–752. doi: 10.1016/j.cellsig.2010.10.012 PMID: 20940041
17. Spyridopoulos I, Haendeler J, Urbich C, Brummendorf TH, Oh H, Schneider MD, et al. Statins enhance migratory capacity by upregulation of the telomere repeat-binding factor TRF2 in endothelial progenitor cells. *Circulation* 2004; 110:3136–3142 PMID: 15520325
18. Taguchi K, Sakata K, Ohashi W, Imaizumi T, Imura J, Hattori Y. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2014; 349:199–208. doi: 10.1124/jpet.113.211854 PMID: 24570070
19. Herrera M 1, Hong NJ, Ortiz PA, Garvin JL. Endothelin-1 inhibits thick ascending limb transport via Akt-stimulated nitric oxide production. *J Biol Chem.* 2009; 284:1454–60. doi: 10.1074/jbc.M80432200 PMID: 19033447
20. Hayashi T, Juliet PA, Miyazaki A, Ignarro LJ, Iguchi A. High glucose downregulates the number of caveolae in monocytes through oxidative stress from NADPH oxidase: implications for atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 2007; 1772:364–72. PMID: 17240121
21. Nolly MB, Caldiz CI, Yeves AM. The signaling pathway for aldosterone-induced mitochondrial production of superoxide anion in the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 67:60–68. doi: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.004 PMID: 24355174
22. Han J, Tan P. Fuzi attenuates diabetic neuropathy in rats and protects Schwann cells from apoptosis induced by high glucose. *PLoS One.* 2014; 9:e86539. doi: 10.1371/journal.pone.0086539 PMID: 24466139
23. Wanschel AC, Caceres VM. Cardioprotective mechanism of S-nitroso-N-acetylcysteine via S-nitrosated betadrenoceptor-2 in the LDLr^{-/-} mice. *Nitric Oxide.* 2014; 36:58–66. doi: 10.1016/j.niox.2013.12.003 PMID: 24333561
24. Hunt MA, Currie MJ, Robinson BA, Dachs GU. Optimizing transfection of primary human umbilical vein endothelial cells using commercially available chemical transfection reagents. *J Biomol Tech.* 2010; 21:66–72. PMID: 20592869
25. Nabzdyk CS, Chun M, Pradhan L, Logerfo FW. High throughput RNAi assay optimization using adherent cell cytometry. *J Transl Med* 2011; 9:48 doi: 10.1186/1479-5876-9-48 PMID: 21518450
26. Christ M, Bauersachs J, Liebetrau C, Heck CM, Günther A, Wehling M. Glucose increases endothelial-dependent superoxide formation in coronary arteries by NAD(P)H oxidase activation: attenuation by the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, *Diabetes* 2002; 51:2648–52. PMID: 12145183
27. Sena CM, Pereira AM, Seiça R. Endothelial dysfunction—a major mediator of diabetic vascular disease, *Biochim Biophys Acta.* 2013; 1832:2216–31. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.08.006 PMID: 23994612
28. Chen J, Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, et al. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H1575–1586 PMID: 16243918
29. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells, *Science* 1998; 279:349–52. PMID: 9454332
30. Zalli A, Carvalho LA, Lin J, Hamer M, Erusalimsky JD, Blackburn EH, Steptoe A. Shorter telomeres with high telomerase activity are associated with raised allostatic load and impoverished psychosocial resources. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111:4519–4524 doi: 10.1073/pnas.1322145111 PMID: 24616496
31. Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol* 2009; 106: 326–332 doi: 10.1152/jappphysiol.91353.2008 PMID: 19036896
32. Erusalimsky JD, Skene C. Mechanisms of endothelial senescence *Exp physiol* 2008; 94.3:299–304

33. Park MH, Heo SJ, Park PJ, Moon SH, Sung SH, Jeon BT, et al. 6,6'-bieckol isolated from *Ecklonia cava* protects oxidative stress through inhibiting expression of ROS and proinflammatory enzymes in high-glucose-induced human umbilical vein endothelial cells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014; 174:632–43. doi: [10.1007/s12010-014-1099-4](https://doi.org/10.1007/s12010-014-1099-4) PMID: [25086922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25086922/)
34. Zhang X, Fu Y, Xu X, Li M, Du L, Han Y, et al. PERK pathway are involved in NO-induced apoptosis in endothelial cells cocultured with RPE under high glucose conditions. *Nitric Oxide*. 2014; 40:10–16. doi: [10.1016/j.niox.2014.05.001](https://doi.org/10.1016/j.niox.2014.05.001) PMID: [24813399](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24813399/)
35. Liu XJ 1, Zhang ZD, Ma XC. High glucose enhances LPS-stimulated human PMVEC hyperpermeability via the NO pathway. *Exp Ther Med*. 2013; 6:361–7. PMID: [24137189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24137189/)
36. Guo X, Chen LW, Liu WL, Guo ZG. High glucose inhibits expression of inducible and constitutive nitric oxide synthase in bovine aortic endothelial cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2000; 21:325–8. PMID: [11324460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11324460/)
37. Esaki T, Hayashi T, Muto E, Yamada K, Kuzuya M, Iguchi A. Expression of inducible nitric oxide synthase in T lymphocytes and macrophages of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*. 1997; 128:39–46 PMID: [9051196](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9051196/)
38. Torimoto K, Okada Y, Mori H, Tanaka. Relationship between fluctuations in glucose levels measured by continuous glucose monitoring and vascular endothelial dysfunction in type 2 diabetes mellitus, *Cardiovasc. Diabetology* 2013; 12:1. doi: [10.1186/1475-2840-12-1](https://doi.org/10.1186/1475-2840-12-1) PMID: [23280391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23280391/)



日本人の食事摂取基準(2015年版)に みる高齢者の栄養管理の考え方

葛谷雅文 先生 くすや・まさふみ ◎名古屋大学大学院医学系研究科地域在宅医療学・老年科学教授

昨年、日本人の食事摂取基準が改定され2015年版が発表された。2015年版は、特に高齢者の項において、今話題の概念であるサルコペニア(筋肉減弱症)、フレイルティ(虚弱)について紹介されていることが注目される。そこで、2015年版の作成に関した名古屋大学教授 葛谷雅文先生に、高齢者の栄養状態の特殊性や栄養管理の基本的な考え方等について伺った。

日本人の食事摂取基準(2015年版)の特徴

日本人の食事摂取基準(2015年版)の特徴としては、まず、5年前の基準では、その目的を「健康の維持・増進」と「生活習慣病の発症予防」としていましたが、今回はこれに「生活習慣病の重症化予防」が付け加えられました。これは、高齢化の進展や糖尿病などの生活習慣病の有病者数が増加したことが考慮されています。また、対象が健康な個人・集団だけでなく、高血圧や高血糖、腎機能低下や脂質異常など保健指導レベルにあるものも含まれました。そして、エネルギー摂取量の指標について、BMIで目標を示し、それを維持できる量を定める方針としたこと、食事摂取アセスメント、栄養の過不足の評価などが見直されたことなどが挙げられると思います。

また、高齢者の項について、2010年版の作成当時は高齢者の各種栄養素必要量の設定が大きな論点でしたが、今回の改定にあたって求められたことは、主に高齢者の特徴について言及することでした。その中で最も重要な点は、成人とは異なった高齢者独自の視点で栄養を考えていく必要があるということ、作業の過程で注目された病態がフレイル、サルコペニアです。それに認知症を加えて、システムティック・レビューを行いました。

フレイルとは

1980年頃から海外の文献でフレイルティ(frailty)、あるいはフレイルエルダリー(frail elderly)という用語が散見されるようになりました。フレイルティとは、老化に伴う種々の機能低下(予備能力の低下)を基盤とし、様々な健康障害に対する脆弱性が増加している状態、すなわち健康障害に陥りやすい状態を指します。日本人においては、ADLが低下して要介護認定を受けた高齢者と、自立している高齢者との中間にあたり、老化現象として見過ごされがちな身体的機能や筋肉量の低下をそのまま放置しておくとう要介護状態に陥りやすい方々が該当します。日本では、2006年に介護保険制度が改定され、介護に至らないようにするための予防が重視されるようになると、介護予防という言葉が使われ始めました。フレイルティは前述のように要介護状態に至る前段階として捉えることができ、この介護予防との関連性が高く、まさしく介護予防とフィットする概念といえます。

これまで日本では、フレイルティ、フレイルエルダリーにあたる高齢者は、一般的に虚弱高齢者という呼称が使われていましたが、「虚弱」だとネガティブすぎるという声がありました。日本老年医学会では、高齢化社会が進展する我が国にとってこの概念は非常に重要に

なっていくものと捉えており、一般の方々にも広く知ってもらおうと、2014年5月に、「フレイル」という名称でこの概念について声明を出しました。フレイルティだと発語が難しそうなので、一般にはフレイルという言葉を広めていこうということになったのです。

サルコペニアとフレイルの関連性

一方、サルコペニアの定義は、狭義では筋肉量減少のみ、広義では筋力低下や身体機能低下が含まれたものとされています。これに対してフレイルの定義は国際的に定まった基準はないのですが、今、最も使われているのは、2000年代になりFriedらが提唱したものです。表1に挙げた5項目のうち3項目が当てはまればフレイルとし、1~2項目が当てはまる場合はフレイルの前段階と定義づけをしました。

- | | |
|--------------|-----------------|
| ① 体重減少 | ② 主観的疲労感 |
| ③ 日常生活活動量の減少 | ④ 身体能力(歩行速度)の減弱 |
| ⑤ 筋力(握力)の低下 | |

上記の5項目中3項目以上該当すればフレイル、
1~2項目ならフレイルの前段階

表1 Friedらのフレイルの定義

この5項目のうち、サルコペニアと重なるのは、筋力と身体能力です。したがってサルコペニアがある人は、フレイルにも該当する人がかなり多いわけです。ただ、フレイルはサルコペニアに関連するような身体的な要素だけでなく、例えば精神・心理的な問題や社会的孤立といった環境、「認知症」の問題等も含めて考える必要がある大きな概念と捉えるべきものだと思います。

高齢者のたんぱく質の推定平均必要量は 0.85(g/kg 体重/日)

日本人の食事摂取基準(2015年版)の「高齢者」の項では、こうしたフレイルやサルコペニアについて触れ、特にたんぱく質との関係を主に概説しました。フレイルとサルコペニアの予防のターゲット臓器とゴールは、骨格筋とその機能維持であり、骨格筋量、筋力、身体機能はたんぱく質摂取量に強い関連があるためです。実際に高齢者はたんぱく質を十分摂れていない状況があることから、あえて強調して記載されています。

日本人の食事摂取基準(2015年版)では高齢者(70歳以上)のたんぱく質の推定平均必要量は0.85(g/kg 体重/日)と成人の0.72(g/kg 体重/日)よりも高い値を基に算出されています。推奨量算定係数を成人と同様の1.25とすると、高齢者のたんぱく質推奨量は1.06(g/kg 体重/日)となります。高齢者では軽度の腎機能障害ステージの範疇にある対象者も多く、これまででは、そうした方々に

はたんぱく質の摂取は控える指導がなされていましたが、サルコペニア、フレイルの予防を考慮すると、推奨量程度のたんぱく質を摂取することの危険性は低いと考えられます。

それ以外の栄養素との関係についてはシステムティックレビューを行い、その結果を掲載しました。また、認知症に関しては、栄養と認知症発症または認知機能低下リスクに関してシステムティックレビューを試み、エッセンスを記載しました。

高齢者の栄養管理の課題

① 高齢者の区分

高齢者といえば、これまで日本人の場合、65歳以上というイメージが定着しているようです。食事摂取基準においては、現在、高齢者を70歳以上で区切り、70歳以上高齢者についての細かい区分は定められていません。70歳にしているのは、厚生労働省が毎年行っている国民健康・栄養調査の年齢区分にある程度沿っているからです。

しかし当然、今後は70歳以上の人口が増えていくことが明白ですから、高齢者をもう少し細かく層別化する必要があることが問題点として上がっています。確かに90歳以上の人口も少しずつ増え、しかも、元気な90歳以上の方も増えてきているのは事実ですから「超高齢者」という視点も必要になるかもしれません。

② 高齢者の過栄養の留意点

病気に関連する栄養状態としては過栄養と低栄養があります。過栄養は生活習慣病に直結し、糖尿病や、高血圧、メタボリックシンドロームなどにつながり、ひいては動脈硬化性疾患を誘発します。しかしながら、これらの過栄養は高齢者、とくに後期高齢者に対しても成人と同様に心血管疾患の発症や生命予後に著しい影響を与えるか否かは十分検討する必要があります。

高齢者では内臓脂肪が蓄積しやすく、メタボリックシンドロームの有病率が高いことが知られる一方で、高齢者のメタボリックシンドロームは心血管病発症や心血管死のリスクにはならない、との報告も数多く存在します。例えばノルウェーのコホート研究では、40~59歳、60~74歳、75~89歳に分けてメタボリックシンドローム(国際糖尿病学会基準)の有無別に生存率(心血管死ならびに全死亡)をみたところ、40~59歳ではメタボリックシンドロームの存在は心血管死および全死亡に強く関連していたが、60歳以降では明らかな差は認められなくなったと報告されています。

また、BMIに関しても、BMI高値の全死亡さらには心血管死に関する影響は明らかに加齢とともに減少するとの報告もあります。日本人のコホート調査でも、BMI \geq 30kg/m²のような極端な肥満以外は高齢者の肥満による生命予後に与える影響はほとんどないことがわかっています。

このように成人で問題となった過栄養に関する健康障害、生命予後へのリスクは加齢とともに減弱してくるのが一般的であり、高齢者の栄養管理においては十分留意すべきでしょう。

③ 過栄養予防と低栄養予防の指導の矛盾

2015年版の総説では、日本人の生命予後で最も有利なBMIが年齢別に紹介され、それによると70歳以上では27.4kg/m²です。また、国内外の論文をもとに総死亡率が低いBMIの範囲などを検討した結果、年齢が高くなるほど栄養状態が悪い人の割合が増え、サルコペニア、フレイルの危険性が高まることが判明しました。そうしたデータも踏まえ、2015年版において目標とするBMIは70歳

年齢(歳)	目標とするBMI(kg/m ²)
18~49	18.5~24.9
50~69	20.0~24.9
70以上	21.5~24.9 ³

厚生労働省
日本人の食事摂取基準(2015年版)
の概要より

表2 2015年版において目標とするBMI^{1,2}

¹ 男女共通。あくまでも参考として使用すべきである。

² 観察疫学研究において報告された総死亡率が最も低かったBMIを基に、疾患別の発症率とBMIとの関連、死因とBMIとの関連、日本人のBMIの実態に配慮し、総合的に判断し目標とする範囲を設定。

³ 70歳以上では、総死亡率が最も低かったBMIと実態との乖離が見られるため、虚弱の予防及び生活習慣病の予防の両者に配慮する必要があることも踏まえ、当面目標とするBMIの範囲を21.5~24.9とした。

以上で「21.5~24.9」と設定されました(表2)。転倒予防や介護予防の観点もふまえ、50歳代以上はBMIの下限を上げています。

今回、BMIを重要視しているのは、栄養状態が健康に及ぼす影響が画一的なものではなく、年齢を考慮する必要があるためです。ただ、私が問題点としてあげたいのが、特定健診(メタボリックシンドローム健診(メタボ健診))の矛盾点です。メタボ健診の対象者は現在40歳から74歳までとなっており、そのBMIの目標値は25未満です。しかし実際に生命予後との関連を見ると、高齢者の適当なBMIはもう少し高値なのが現実です。一方、介護予防事業は65歳以上が対象です。市町村は要介護認定を受けていない65歳以上の高齢者全てに基本チェックリストを配布しています。25項目からなるチェック項目の中に低栄養予防に関する項目があります。例えば、「6ヵ月間で2~3kg以上の体重減少がありましたか」とBMIを問う設問です。

このように、65歳から74歳の高齢者はメタボ健診と介護予防事業両者の対象となっています。例えば、ある高齢者が、メタボ健診で保健師に「あなたはBMI 26です、もう少し痩せなきゃ駄目ですよ」と指導されたので半年で4kgほどダイエットしたとします。すると介護予防事業のチェックでは、逆に「あなた、痩せてきています。痩せ予防が必要です」といった指導の矛盾が起きる場合もあるでしょう。実際に市民、さらには医療者からも「過栄養予防」と「低栄養予防」ではいったいどちらが重要か、とよく質問されます。この点をしっかりと市民に指導する保健師、管理栄養士などに明確にする必要が大きいと思います。

その一つの対策としては、年齢の層別化を見直すことではないかと思っています。メタボ健診は64歳まで、高齢者になるまでというかたちで区切り、介護予防事業に関しては、65歳以上を対象にしてもよいですが、爆発的に増えるのは後期高齢者ですから、75歳以上の高齢者に重点的に行って、65歳から75歳までの10年間は生活習慣病予防の必要がある場合や、逆に低栄養予防を必要とする場合など様々ですから個別対応を行っていくといった方法です。

今後高齢者人口の増加にともない、データも集積されていくでしょうから、細かい層別化も実現していくと思います。

最後に

今後の超高齢社会を考えたときに今回ご紹介したフレイルの概念は非常に重要になると思います。特に、低栄養(体重減少)はフレイルの重要な要因であることは間違いありません。今後このフレイル・介護予防の概念が普及し、さらには予防法が市町村に広がるのが日本の超高齢社会を乗り切る大きな医療政策上の重要視点であると思います。低栄養の改善はその予防対策の一つとして、ますます重要になっていくと思います。

高齢者と栄養

～いきいきと生きるために(老年医学の立場から)～

葛谷 雅文*

はじめに

高齢者、特に75歳以上の後期高齢者は、一見健康そうに見えても多くの老年症候群（高齢者に高頻度で起こりうる症状）や慢性疾患を抱えている場合が少なくない。栄養管理には栄養過多が問題とされる場合と栄養不良が問題とされる場合がある。前者は近年、糖尿病、肥満、高血圧などの生活習慣病との関係で注目されている。しかし、後期高齢者においては、生命予後を考えた場合、肥満や栄養過多よりも、やせや栄養不良の評価、対策が重要である。栄養摂取不足により低栄養状態に陥った高齢者では、免疫能の低下を伴い、感染症を引き起こしやすいことが言われている。また主要疾患の治療を遅らせ、合併症を容易に引き起こすことが知られている。そのため、低栄養状態を把握し、高齢者に適切な栄養管理を行うことは、疾病予防、quality of life (QOL) 向上につながり重要であると思われる。さらに、高齢者の低栄養は、疾病予防以外の重要事項として「フレイル（虚弱）」と「サルコペニア」の問題が存在する。

1. 疾病予防以外の観点と栄養

—フレイルについて

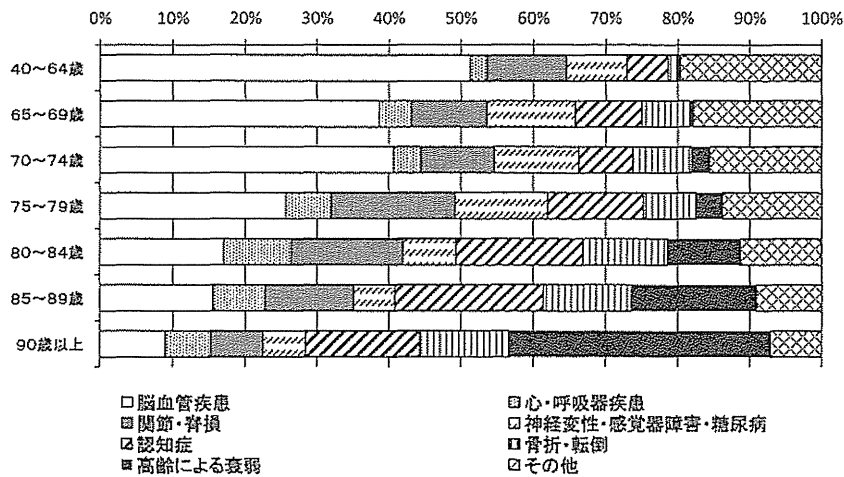
要介護状態とは日常生活動作 (activity of daily living, ADL) の低下や認知機能障害が原因で何らかの介護が不可欠な状態であり、平成12年からの介護保険が開始され、毎年要介護状態と認定される高齢者の数は増加し、既に500万人に到達している。今後さらに後期高齢者が増加するのは確実であり、要介護高齢者の数もさらに増加することが予想される。少しでも要介護状態になるのを遅らせることは今後の我が国においては喫緊の課題であることは言うまでもない。

図1は平成22年度の国民生活基礎調査のデータである¹⁾。要介護状態になる原因としては前期高齢者では明らかに脳血管疾患によるものが多い。しかし、脳血管疾患による割合は後期、超高齢者集団では低下して行き、「認知症」「骨折・転倒」「高齢による衰弱」を原因とする割合が増加する。これらのデータからは要介護状態の原因として脳血管疾患や認知症といった疾病が重要であることは間違いないが、「高齢による衰弱」が占める割合は思ったより高いことがわかる。さらに図2では要支援ならびに要介護状態に至った要因別の総数を示す。脳血管障害を主とした生活習慣病関連を要因とするのは全体の33.5%であった。一方、認知症、高齢による衰弱、関節疾患、骨折・転倒など所謂「老年症候群」を要因とするものは全体の50.1%に及び、生活習慣病を基盤とする者よりかなり多いのが分かる。

老年医学には「脆弱（フレイル）」の概念がある^{2,3)}。フレイルとは“老化に伴う種々の機能低下（予備能力の低下）を基盤とし、種々の健康障害に対する脆弱性 (vulnerability) が増加している状態”とされる。これは「機能障害」がある種の疾病（脳血管障害や骨折など）に起因するという「疾病モデル」ではなく、高齢者では老化に伴う予備能力の低下（恒常性低下）が「機能障害」につながるというシナリオを呈している（図3）。すなわちフレイルは日常生活動作に支障が出ている要介護状態と自立の中間に位置する状態と言える。まさしく、老年医学での「フレイル」は「老衰」と同様な意味で使用される。この状態は現在日本で使用されている「介護予防」に相当する高齢者とも言い換えることができる。

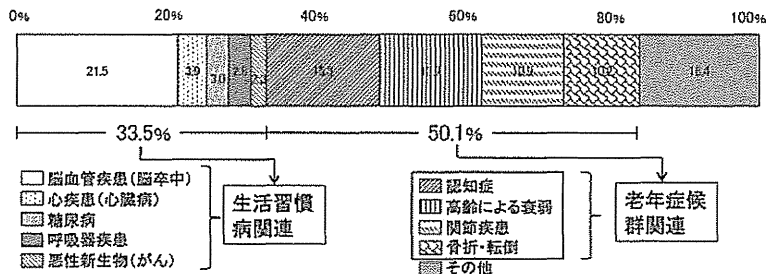
今まで欧米からは多くのフレイルの表現型の提唱があったが、現在 Fried らの提唱した定義を用いること

*Masafumi kuzuya：名古屋大学大学院医学系研究科地域在宅医療学・老年科学分野（老年内科）教授、名古屋大学未来社会創造機構教授、〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞65、TEL 052(744)2369



(資料:厚生労働省「平成22年国民生活基礎調査の概況」)

図1 平成22年度日本人の年齢階級別要介護に至った要因(%)



(資料:厚生労働省「平成22年国民生活基礎調査の概況」)

図2 介護が必要となった主な原因(要介護者, 要支援者合計)

が多い(表1)¹⁾。すなわち、体重の減少(低栄養)、身体機能の低下(歩行速度の低下)、筋力の低下(握力の低下)、主観的疲労感、生活活動度の低下の五項目のうち三項目以上あてはまる場合にフレイルと定義し、一つ～二つあてはまる場合は前段階(フレイル前段階)と評価する。前向き研究ではこの定義に当てはまるフレイルの生命予後は明らかに悪いことが証明されている。この中に体重減少(栄養障害)含まれていることに注目しておきたい。

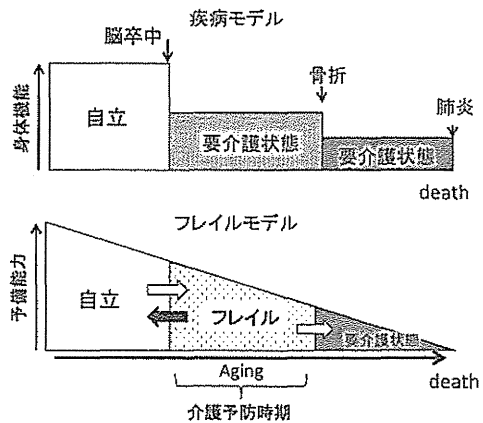


図3 要介護にいたる疾病モデルとフレイルモデル

表1 フレイルの定義

項目	虚弱*
1) 栄養	1年で体重が4.5kg以上減少
2) 身体能力	通常歩行速度評価 (15 feet歩行速度、性・身長階級別下位20%)
3) 筋力	握力低下 (性・BMI階級別下位20%)
4) うつ・活力	疲労感評価
5) 身体活動度	日常生活活動度

* 文献4)を参考に作成。1)~5)の項目のうち3項目以上に該当すれば虚弱と判定。1~2項目は虚弱前段階。

2. サルコペニア

サルコペニア (Sarcopenia) とは「加齢に伴う筋力の低下, または老化に伴う筋肉量の減少」を指し, Rosenberg IH により提唱された比較的新しい造語である³⁾。一般的に70歳までに20歳台に比較すると骨格筋面積は25-30%, 筋力は30-40%減少し, 50歳以降毎年1-2%程度筋肉量は減少する^{2,3)}。筋肉量の減少はtype II 筋肉線維 (速筋, 白筋) を中心とした萎縮と線維自体の減少に原因がある。

2010年に老年医学さらには栄養学に関連する4つのヨーロッパまたは国際学会が共同で European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) を立ち上げ, 表2のようなサルコペニアの定義を提唱した⁶⁾。すなわち, 骨格筋量の低下を必須としてそれ以外に筋力または運動機能の低下のいずれかが存在すればサルコペニアと診断するという定義である。さらには表3にあるように前サルコペニアと重度サルコペニアというカテゴリを提唱している。またサルコペニアの原因により原発性または二次性サルコペニアという概念を提示し, 原発性は年齢以外に明らかな原因が無い場合とし, 二次性はa) 活動量低下, b) 疾病の関与, c) 栄養障害の関与, を上げている⁶⁾。これにより今まで疾病が関与する骨格筋萎縮, カヘキシア (悪液質) もサルコペニアの亜系と考えるとしている。EWGSOPの報告の中には骨格筋量, 筋力, さらには運動能力の評価法に関しても提示されている⁶⁾。さらにはそれぞれの基準値も過去の報告例から提示しているが, 体型の異なる日本人にそのまま当てはめることはできない。

ここで, 上で述べたフレイルの定義を考えると, サルコペニアの定義に組み込まれている, 筋力または運動機能の低下が存在すれば, フレイルの定義の5項目の内, 2項目が既に当てはまる。すなわち, フレイル

表2 サルコペニアの診断

1. 筋肉量の低下
2. 筋力低下(握力で評価)
3. 運動機能の低下(歩行速度で評価)

項目1に加え項目2あるいは3を併せ持つ場合サルコペニアとする
文献6)より

表3 サルコペニアのステージ

	筋肉量	筋力	運動機能
前サルコペニア	↓		
サルコペニア	↓	↓ or ↓	↓
重度サルコペニア	↓	↓	↓

文献6)より

表4 サルコペニアの要因候補

身体活動度の低下
栄養(タンパク質)不足
骨格筋幹細胞(衛星細胞)の減少
酸化ストレス
炎症 (TNF- α , IL-6↑)
ホルモン変化
growth hormone ↓ → IGF-1 ↓
testosterone ↓
DHEAS ↓
cortisol ↓
estrogen ↓
インスリン抵抗性
ミトコンドリア機能低下
apoptosis
ビタミンD ↓、副甲状腺ホルモン ↑
renin angiotensin system
TNF- α : tumor necrosis factor- α , IL-6: interleukin-6
DHEAS: dehydroepiandrosterone sulfate
IGF-1, insulin-like growth factor-1

とサルコペニアは合併している可能性が高いことが分かる。

予防を考える上でその原因を把握する必要があるが, サルコペニアの要因について確定的なものはないが, 表4に可能性ある要因を記載した。しかし, おそらく単独因子でサルコペニアを説明することは難しく, 多因子が関わっている可能性が高い。

3. サルコペニアと栄養

筋肉たんぱくは様々な状況下で分解して行くため, 筋肉量を維持するためには筋細胞内でのたんぱく合成が必須である。筋肉たんぱくの合成にはその原料となるアミノ酸が必須であり, さらにその上流にあるたんぱく質の摂取が必須である。加齢とともに摂取したた

たんぱく質が効率的に使用されないのではないかと、すなわち筋肉でのたんぱく合成は加齢とともに低下するのではないかと報告が以前から存在した。現在では筋たんぱくの分解には加齢の影響は軽微であるが、アミノ酸に対しての筋肉のたんぱく同化反応の感受性が低下（たんぱく同化抵抗性）しているとの報告がある。

現在日本人の食事摂取基準（2015年度版）では高齢者（70歳以上）のたんぱく質推定平均必要量は0.85 g/kg体重/日と成人の0.72 g/kg体重/日より高い値が設定されている⁷⁾。推奨量算定係数を成人と同様に1.25とすると、高齢者たんぱく質推奨量は1.06 g/kg体重/日となる。平成22年、23年国民健康・栄養調査の結果では、たんぱく質摂取量の平均値は男性70歳以上では、71.9 g/日（標準偏差：23.4 g/日）となっている。女性では、70歳以上で61.5 g/日（標準偏差：19.9 g/日）となっている。平均値で見ると比較的十分なたんぱく質量を摂取しているように見えるが、標準偏差が大きく、推奨量に満たない対象者が相当数いることが想像できる。摂取たんぱくを増やすことだけにより筋肉量が増加するかどうかは議論があるところだが⁸⁾、減少を予防することはできる可能性がある。地域高齢者の観察研究（the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study）では摂取カロリー当たりのたんぱく質量により3年後の除脂肪体重ならびに四肢除脂肪体重の低下率が変化したたんぱく質摂取が多いほどその低下率が低いことが報告された⁹⁾。この報告では少なくとも0.7 g/kg/day～1.2 g/kg/dayまでは直線的にたんぱく質摂取量が多いほど除脂肪体重の減少は抑えられている。

一方高たんぱく質の摂取による体への悪影響（腎毒性など）が指摘されているが、腎疾患がない場合には極端な高タンパク食でない限り（2.0 g/kg/日まで）、重大な副作用につながることはまれである。実際筋肉量の減少をきたしやすい高齢者が筋肉量を維持するには0.8 g/kg/日では不十分で、1.0～1.3 g/kg/日程度の摂取が必要との指摘もある。欧米からの報告では1.6 g/kg/dayのたんぱくで運動による筋肉量増加を認めたとか、1.0 g/kg/dayが筋肉量の低下を予防する最低限のたんぱく摂取量などの報告もある¹⁰⁾。現在「日本人の食事摂取基準」（2015年度版）では高齢者でも成人と同様男性で推定平均必要量を50 g/day、

推奨量を60 g/day、女性で推定平均必要量を40 g/day、推奨量を50 g/dayとしているが、この推奨量では高齢者のサルコペニアを予防できない可能性がある、今後エビデンスの蓄積とともに、考え直す時期に来ているかもしれない。

4. おわりに

高齢者の栄養の問題は疾病予防もさることながら、フレイル予防、サルコペニア予防につながることを理解していただけたと思う。これらは全て要介護に至るプロセスに重要な問題であり、低栄養の問題を解決することにより、介護予防が達成できる可能性がある、重要項目得る。

参 考 文 献

- 1) 平成22年国民生活基礎調査の概況 <<http://www.estat.go.jp/estat/html/GL02100101.html>>
- 2) 葛谷雅文：老年医学における Sarcopenia & Frailty の重要性. 日老医誌 46 : 279-285, 2009
- 3) Kuzuya M. : Process of Physical Disability among Older Adults-Contribution of Frailty in the Super-aged Society. Nagoya J. Med. Sci. 74 : 31-37, 2012
- 4) Fried LP, Tangen CM, Walston J, et al. : Frailty in older adults : evidence for a phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 56 : M146-156, 2001.
- 5) Rosenberg IH. : Sarcopenia : origins and clinical relevance. J Nutr. 127 (5 Suppl) : 990S-991S, 1997.
- 6) Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, et al. : European Working Group on Sarcopenia in Older People. Sarcopenia : European consensus on definition and diagnosis : Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. Age Ageing. 39 : 412-23, 2010.
- 7) 日本人の食事摂取基準 2015年度版 第一出版社 2014.
- 8) Fiatarone MA, O'Neill EF, Ryan ND, et al. : Exercise training and nutritional supplementation for physical frailty in very elderly people. N Engl J Med 330 : 1769-1775, 1994.
- 9) Houston DK, Nicklas BJ, Ding J, et al. : Health ABC Study. Dietary protein intake is associated with lean mass change in older, community-dwelling adults : the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) Study. Am J Clin Nutr. 87 : 150-155, 2008.
- 10) Campbell WW. Synergistic use of higher-protein diets or nutritional supplements with resistance training to counter sarcopenia. Nutr Rev. 65 : 416-422, 2007.

Public Health Nutrition

ウェルネス 公衆栄養学

2015
年版

[編集] 前大道教子
松原知子



医歯薬出版株式会社