

平成 25 年度  
博 士 論 文

成長期の過度な走運動トレーニングによる骨成長の抑制  
に対するタンパク質摂取の効果

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 博士後期課程  
体育科学専攻 運動栄養学研究室

武田 哲子

# 目次

目次 .....	i
List of Tables.....	vi
List of Figures.....	viii
List of Appendices .....	ix
用語説明 .....	x
関連論文 .....	xii
第 I 章 緒言 .....	1
1. 研究背景 .....	1
2. 本研究の目的 .....	2
第 II 章 先行研究 .....	3
1. 運動と骨成長 .....	3
1-1. 骨の成長・発達 .....	3
1-2. 運動と骨代謝 .....	4
1-3. 成長期の運動と骨形成 .....	6
2. タンパク質摂取と骨 .....	9
2-1. タンパク質摂取量の影響 .....	9
2-2. コラーゲン摂取の影響 .....	11
第 III 章 研究目的および課題 .....	15
1. 研究目的 .....	15
2. 研究課題 .....	16
第 IV 章 研究課題 1.....	19
1. 背景 .....	19
2. 目的 .....	19

3. 研究方法	19
3-1. 被験動物および飼育条件	19
3-2. 運動プロトコール	22
3-3. 試料採取	22
3-4. 大腿骨重量および長さ	22
3-5. 骨塩量および骨密度	23
3-6. 大腿骨破断強度測定	23
3-7. 骨代謝マーカー	23
3-8. 統計処理	24
4. 結果	25
4-1. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率	25
4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量	26
4-3. 副腎重量	27
4-4. 大腿骨長さ, 幅および重量	28
4-5. 骨塩量および骨密度	29
4-6. 体重または副腎重量と, 骨指標との相関関係	33
4-6. 大腿骨破断強度	35
4-7. 骨代謝マーカー	36
5. 考察	37
<b>第V章 研究課題 2</b>	<b>40</b>
1. 背景	40
2. 目的	40
3. 研究方法	40
3-1. 被験動物および飼育条件	40
3-2. 運動プロトコール	43
3-3. 試料採取	43
3-4. 大腿骨重量および長さ	43
3-5. 骨塩量および骨密度	43
3-6. 大腿骨破断強度	43

3-7. 骨代謝マーカー .....	43
3-8. カルシウム出納 .....	43
3-9. 統計処理 .....	44
4. 結果 .....	45
4-1. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率 .....	45
4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量 .....	47
4-3. 副腎重量 .....	49
4-4. 大腿骨長さ, 幅および重量 .....	50
4-5. 骨塩量および骨密度 .....	52
4-6. 大腿骨破断強度 .....	56
4-7. 骨代謝マーカー .....	58
4-8. カルシウム吸収量 .....	60
5. 考察 .....	63
第VI章 研究課題 3 .....	67
1. 背景 .....	67
2. 目的 .....	67
3. 研究方法 .....	67
3-1. 被験動物および飼育条件 .....	67
3-2. 運動プロトコール .....	70
3-3. 試料採取 .....	70
3-4. 大腿骨重量および長さ .....	70
3-5. 骨塩量および骨密度 .....	70
3-6. 大腿骨破断強度 .....	70
3-7. 骨代謝マーカー .....	70
3-8. 統計処理 .....	70
4. 結果 .....	71
4-1. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率 .....	71
4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量 .....	73
4-3. 副腎重量 .....	74

4-4. 大腿骨長さ, 幅および重量	75
4-5. 骨塩量および骨密度	77
4-6. 大腿骨破断強度	81
4-7. 骨代謝マーカー	82
5. 考察	83
<b>第V章 研究課題 3-2</b>	<b>87</b>
1. 背景	87
2. 目的	87
3. 研究方法	87
3-1. 被験動物および飼育条件	87
3-2. 運動プロトコール	90
3-3. 試料採取	90
3-4. 大腿骨重量および長さ	90
3-5. 骨塩量および骨密度	90
3-6. 大腿骨破断強度	90
3-7. 骨代謝マーカー	90
3-8. 統計処理	90
4. 結果	91
4-1. 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率	91
4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量	93
4-3. 副腎肪重量	94
4-4. 大腿骨重量	95
4-5. 骨塩量および骨密度	96
4-6. 大腿骨破断強度	100
4-7. 骨代謝マーカー	101
5. 考察	102
<b>第V章 総合討議</b>	<b>104</b>
<b>第VI章 結論</b>	<b>109</b>

謝辭 .....	110
引用文献 .....	111
Appendices .....	125

## List of Tables

### 研究課題 1

Table 1	飼料組成	21
Table 2	体重、飼料摂取量	25
Table 3	大腿四頭筋、腹腔内脂肪重量	26
Table 4	大腿骨長さ、重量	28
Table 5	体重および副腎重量と骨指標の相関関係	34
Table 6	大腿骨破断強度	35
Table 7	骨代謝マーカー	36

### 研究課題 2

Table 8	飼料組成	42
Table 9	体重、飼料摂取量	46
Table 10	大腿四頭筋、腹腔内脂肪重量	48
Table 11	大腿骨長さ、重量	51
Table 12	大腿骨破断強度	57
Table 13	骨代謝マーカー	59

### 研究課題 3-1

Table 14	飼料組成	69
Table 15	体重、飼料摂取量	72
Table 16	大腿四頭筋、腹腔内脂肪重量	73
Table 17	大腿骨長さ、重量	76
Table 18	大腿骨破断強度	81
Table 19	骨代謝マーカー	82

### 研究課題 3-2

Table 20	飼料組成	89
Table 21	体重、飼料摂取量	92

Table 22	大腿四頭筋、腹腔内脂肪重量	93
Table 23	大腿骨重量	95
Table 24	大腿骨破断強度	100
Table 25	骨代謝マーカー	101



## List of Figures

### 先行研究

- Fig. 1 運動および栄養状態が骨に及ぼす影響概念図 8
- Fig. 2 コラーゲンからコラーゲンペプチドの生成 14

### 研究課題 1

- Fig. 3 実験プロトコル 20
- Fig. 4 副腎重量 27
- Fig. 5 腰椎骨塩量、骨密度 30
- Fig. 6 脛骨骨塩量、骨密度 32

### 研究課題 2

- Fig. 7 実験プロトコル 41
- Fig. 8 副腎重量 49
- Fig. 9 腰椎骨塩量、骨密度 53
- Fig. 10 脛骨骨塩量、骨密度 55
- Fig. 11 腸管カルシウム吸収量 61

### 研究課題 3-1

- Fig. 12 実験プロトコル 68
- Fig. 13 副腎重量 74
- Fig. 14 腰椎骨塩量、骨密度 78
- Fig. 15 脛骨骨塩量、骨密度 80

### 研究課題 3-2

- Fig. 16 実験プロトコル 88
- Fig. 17 副腎重量 94
- Fig. 18 腰椎骨塩量、骨密度 97
- Fig. 19 脛骨骨塩量、骨密度 99

## List of Appendices

Appendix 1 運動時の体重 1kg あたりのタンパク質必要量	127
Appendix 2 骨サイズの指標	127
Appendix 3 胸腺重量	128
Appendix 4 尿中カルシウム排泄量	128
Appendix 5 クレアチニンクリアランス	128
Appendix 6 マリンコラーゲンオリゴ栄養成分	129

## 用語説明

本研究において頻出する用語の説明を以下に記す。

### 骨吸収

破骨細胞による石灰化した骨組織の破壊・吸収。

### 骨形成

骨芽細胞による骨組織の形成。

### **GH (growth hormone)**

脳下垂体から分泌されるホルモン。骨や筋の成長に関する作用や代謝を調節する作用があり、標的器官に直接的または間接的に作用する。

### **IGF-I (insuline-like growth factor-I)**

成長ホルモンの作用を受けて肝臓から分泌されるインスリン様成長因子。

### メカニカルストレス

重力や運動など外からかかる機械的負荷。

### コラーゲン

皮膚、血管、腱、歯などほとんどの組織に存在する繊維状のタンパク質。体を構成する全タンパク質の約 30%を占める。

### コラーゲンペプチド

コラーゲンを加熱処理して構造を崩したゼラチンを加水分解して分子量を数千程度まで小さくしたもの。

### **TRAP (tartrate-resistant acid phosphate) 活性**

血中に存在する酸性フォスファターゼの一種。破骨細胞に局在し、骨吸収の際、骨の分解産物と共に血中に放出されることから、骨吸収の亢進に伴い血中の値も増加する。

### **BAP (bone specific alkaline phosphatase) 活性**

細胞膜にある糖タンパク質で、アルカリ条件下でリン酸エステルを無機リンおよびアル

コールに分解する酵素。骨組織に存在するものを **BAP** という。有機リン酸エステルを分解して無機リン酸塩濃度を高めるとともに、ヒドロキシアパタイト結晶の形成を阻害するピロリン酸を加水分解することにより骨の石灰化を促進する。血清 **BAP** 値は骨芽細胞系の全細胞数を推測するものと考えられ骨形成マーカーとして用いられる。

### **OVX ラット(overiectomized rat)**

卵巣摘出術を施したラット、ヒト閉経後骨粗鬆症の動物モデルとして利用されることが多い。

## 関連論文

Takeda S, Kobayashi Y, Park JH, Ezawa I, Omi N. 2012, “Effect of different intake level of dietary protein and physical exercise on bone mineral density and bone strength in growing male rat”, *J Nutr Sci Vitaminol* vol. 58, no. 4, pp. 240-246.

Takeda S, Park JH, Kawashima E, Ezawa I, Omi N. 2013, “Hydrolyzed collagen intake increases bone mass of growing rats trained with running exercise”, *J Int Soc Sports Nutr*, vol. 10, no.35, 9pp.

# 第 I 章 緒言

## 1. 研究背景

成長期における運動は骨密度および骨強度の増加をもたらす骨成長の促進に効果的であるという報告が多い (Bourrin *et al.*, 1994; Hind *et al.*, 2007). 運動は骨組織に対し刺激を与え、その刺激によって骨は量およびその形態を変化させることができる (Wolff, 1892). 成長期において獲得する骨量が高めることは将来の骨粗鬆症予防につながることから、成長期の適度な運動は非常に重要である. しかしその一方で、成長期アスリートには骨障害発生のリスクがあることも報告されている. 成長期の骨に高負荷が繰り返しかかることで起こる骨端症や疲労骨折といった骨障害のほか (鳥居ら, 2003), 長距離ランナー等, 一般的に体重を軽くすることが求められるような競技において低体重と関連して発症する低骨密度の問題も報告されている (Hreljac *et al.*, 2004; Fredericson *et al.*, 2006). アスリートにとって成長期にこのような骨障害が発生することは選手生命に関わる重大な問題であることからその予防は重要な課題である.

骨成長および骨障害予防のためには栄養素等摂取状況を良好に保つことも重要である. 成長期におけるタンパク質摂取不足やカルシウム摂取不足等, 骨の材料になる栄養素の摂取不足は骨成長を抑制することが報告されている (Orwoll *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 2012). また, エネルギー摂取量の低下も骨成長抑制に強く関わっている (Soden *et al.*, 2012). これらのことから, 日々のトレーニングによるエネルギー消費量が多いアスリートにおいては運動を行っていない人よりも栄養素等摂取量を増加させる必要がある. しかし, 実際には陸上の長距離種目のようにエネルギー消費量が多い競技や, 体重が軽い方が有利な競技, または体重制限のある競技では, 必ずしも消費量に見合い成長を十分に促進させる食事量を確保できていないとはいえない (Aerenhouts *et al.*, 2011). このように競技力向上を目指し強度の高いトレーニングを行う成長期アスリートにとっては骨の成長に適した体重と栄養素等摂取状況の維持は容易では

なく、その栄養対策の検討は成長期アスリートにとって有益な研究である。

タンパク質は、骨、筋、皮膚等の体の組織を構成する重要な栄養素で、骨においてはコラーゲンとしてその 25% を占める (Oishi *et al.*, 2002)。タンパク質必要量はエネルギー消費量や体重に応じて増加し、高強度運動を行うアスリートでは一般の基準の約 1.5~2 倍多く必要であるといわれている (Nattiv *et al.*, 2007)。タンパク質摂取量の違いは筋に対する運動トレーニングの効果に影響を及ぼすということが報告されており (Tarnopolsky *et al.*, 1992)、トレーニング効果を十分に発揮し筋量を増やすためには適切な量のタンパク質摂取が必要である。また、筋量増加に効果的なタンパク質摂取については摂取量だけでなくどのようなタンパク質を摂取するかについても検討されている。例えば、必須アミノ酸の一つであるロイシン摂取が筋タンパク合成を促進することが知られている (Anthony *et al.*, 2000)。また、タンパク質はその種類によって吸収速度が異なり、運動後の筋タンパク合成刺激の強さや合成量が異なることが示唆されている (Boirie *et al.*, 1997)。このように骨格筋に対するタンパク質摂取の効果についての報告は多い一方で、運動トレーニングが骨に及ぼす影響に対してタンパク質摂取量や摂取源の違いが及ぼす影響についての報告は少ない (Zernicke *et al.*, 1995; Ribeiro *et al.*, 2010)。しかし、成長期アスリートにおける骨障害予防または骨成長促進のための栄養素等摂取については筋発達同様にパフォーマンス向上や成長期以降の競技人生を支えるために重要な課題である。

## 2. 本研究の目的

成長期アスリートの骨の成長に対するタンパク質摂取の影響を明らかにするために、本研究ではタンパク質摂取量の違いおよびコラーゲンペプチド摂取が成長期に過度な走運動トレーニングを行ったラットの骨に及ぼす影響を検討する。

## 第Ⅱ章 先行研究

### 1. 運動と骨成長

#### 1-1. 骨の成長・発達

発育期は身長・体重の著しい増加とともに全身の骨格系も大きな変化をとげる。女子では11～14歳,男子では13～17歳が骨形成の最も盛んな時期である。発育期の長管骨の成長は,長軸方向(長さ)の成長と横軸方向(径)の成長から成り,モデリングと呼ばれる調節機構である。横軸成長は骨膜での骨芽細胞による骨基質形成および石灰化と,骨内膜側での破骨細胞による骨吸収が一定のバランスを保ちながら起こるので,皮質骨厚はあまり変化しないで骨幹部の肥厚が生じる(Frost *et al.*, 1973; 須田ら, 1985)。破骨細胞により骨組織が吸収される場所と骨芽細胞により新しく骨組織がつくられる場所が異なり,吸収と形成が連関しているので骨としての一定の形態が造形される。成長終了後は,破骨細胞により吸収された場所に正確に一致して骨芽細胞が骨組織を形成していくリモデリングとよばれる調節機構が骨組織の入れ替えの主体となる(Oguro *et al.*, 1988)。一方,長軸成長では多くの骨において軟骨が形成され,その軟骨が骨へと置換されるという過程を経る軟骨内骨化により骨が形成される。軟骨内骨化では骨形成の前に軟骨内形成が先んじて行われる。間葉系細胞は軟骨細胞へと分化し,将来長管骨になる軟骨原器を形成する。細胞は徐々に肥大化し,軟骨組織へのカルシウム沈着タンパク(X型コラーゲンなど)や血管を軟骨内に引き込むタンパク(vascular endothelial growth factor: VEGF)を分泌するようになる。やがて肥大化した軟骨細胞は周囲にリン酸カルシウム沈着を伴いながらアポトーシスを呈し,自らが導きこんだ血管を通じて軟骨組織へと供給される破軟骨細胞,骨芽細胞の働きにより骨に置換される。骨の中央部から生じたこの変化は,徐々に骨の両端に向かって進行し,軟骨組織は次々と骨組織へと置換され骨が形成される(上田ら, 2008)。軟骨組織は将来の骨



の長軸方向にそって各分化段階の軟骨細胞が配列し、軟骨端部から中心部にかけて、静止細胞層、増殖細胞層、肥大化細胞層に区分できるようになる。静止軟骨細胞層から増殖軟骨細胞層への細胞供給が続く限り、骨身長は継続されることになる。その後二次性徴に伴う性ホルモン分泌とともに軟骨分化が促進され、静止軟骨細胞層までが増殖・肥大化を呈するようになり、思春期に認められる急速な身長増加スパートが生じるが、やがて成長軟骨に認められた軟骨細胞とともに身長増加の停止が生じる（上田ら，2008）。

## 1-2. 運動と骨代謝

骨成長は遺伝因子に加え、生活習慣の影響も大きく受けることが指摘されている（Chesnut *et al.*, 1991）。その一つに運動の要因があげられる。運動によるホルモン分泌など全身性の変化は間接的に骨に作用する。Borer らは、走運動を行わせたハムスターにおいて成長ホルモン（Growth hormone: GH）の分泌量増加に伴う骨長軸成長の促進を観察している（Borer *et al.*, 1977）。GHは下垂体前葉から分泌され、直接および間接的に骨や筋などに作用し成長を促進する。骨の長軸成長はとくにこの成長因子の作用が影響している（須田ら，1985）。また、運動は腸管からのカルシウム吸収量を増加させることも報告されており（Yeh *et al.*, 1989; Zittermann *et al.*, 2002）、カルシウム代謝の維持にも貢献していると考えられる。

一方、荷重など物理的的刺激は骨に直接的に作用する。骨は外的および内的な機械的負荷（メカニカルストレス）に対しその外形および内部構造を変化させることにより適応することが知られている（Wolff *et al.*, 1892）。*in vivo* の実験では機械的負荷を与える方法として、創外固定器などによる軸圧負荷（Dodds *et al.*, 1993）、たわみ負荷（Raab-Cullen *et al.*, 1994）、前腕骨を1本切除する方法（Lanyon *et al.*, 1982）などが用いられ、増負荷により骨量が増加することが報告されている。反対に、尾部懸垂（Bikle *et al.*, 1994）、不動化（Jee *et al.*, 1993）、

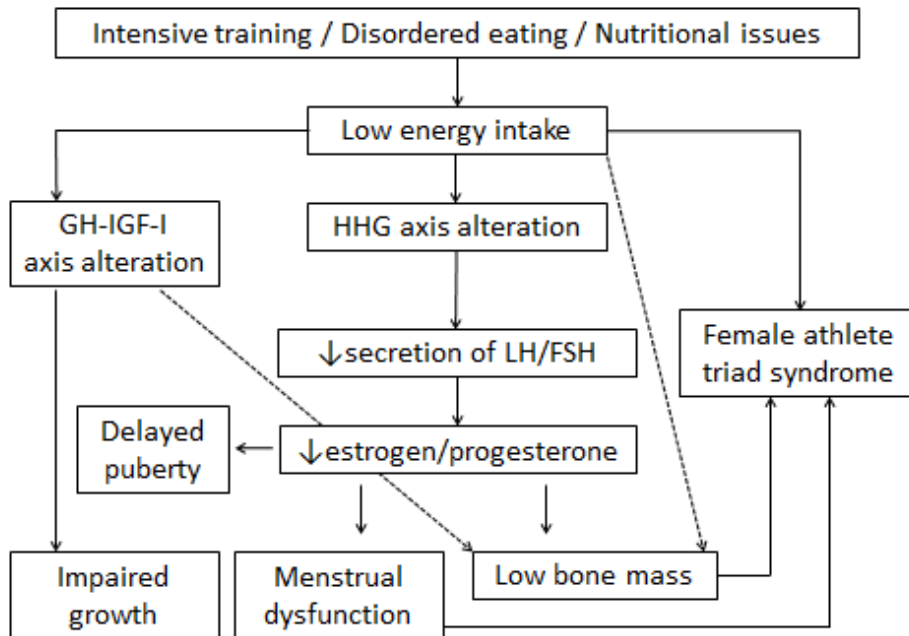
無重力 (Bikle *et al.*, 1994, Westerlind *et al.*, 1995) による減負荷に対して骨量の減少が報告され、機械的負荷による骨量増加が明らかにされてきた。また、機械的負荷による骨局所に作用するホルモンやサイトカインなどの液性因子の変化が報告されている。Chambers らはラットの尾骨に機械的負荷を与えたところ、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 分泌およびプロスタグランジン (prostaglandin: PG) 産生を介して尾骨の骨量が増加すること、またその際に骨細胞において転写調節性 DNA 結合タンパク質 (c-fos) およびインスリン様成長因子 (insuline-like growth factor I: IGF-I) の mRNA の発現が促進されることを示した (Chambers *et al.*, 1994)。また Klein らはマウスの胎児を用いて骨の器官培養を行い加圧刺激が骨吸収を抑制することを示している (Klein *et al.*, 1993)。さらに減負荷の実験においても、ラットの尾部懸垂によって後肢の骨髄細胞における IGF-I, IGF-II, トランスフォーミング増殖因子  $\beta 2$  (TGF- $\beta_2$ ) の産生が低下すること (Zhang *et al.*, 1995), space flight によりラットの後肢骨膜における TGF- $\beta$  の mRNA 発現が抑制されることが示されている (Westelind *et al.*, 1995)。骨に生じるこのような変化は主に骨細胞が刺激に対するセンサーとして働き、骨吸収と骨形成のバランスを調節していると考えられている (Lanyon *et al.*, 1993)。前述した c-fos や TGF- $\beta$  および IGF-I の mRNA の発現が機械的負荷を与えた骨細胞において上昇することや (Raab-Cullen *et al.*, 1994), 近年では新たな骨細胞特異的マーカーとして dentin matrix protein-1: DMP-1 や E11/gp38, sclerostin なども機械的負荷に応じてその発現が影響を受けることが明らかになっている (Gluhak-Heinrich *et al.*, 2003; Zang *et al.*, 2006; Robling *et al.*, 2008)。骨細胞をジフテリア毒素で選択的に死滅させることのできるトランスジェニックマウスを用いた実験では、ジフテリア毒素投与後、骨組織はメカニカルストレスの応答能を著しく失うことから (Tatsumi *et al.*, 2007), メカニカルストレスを感知した骨細胞から生じるさまざまな生理的反応が骨代謝を調整していることが明らかにされている。

### 1-3. 成長期の運動と骨形成

運動の骨成長に対する影響は、その種類や強度によって異なる。一般的に荷重負荷の小さい水泳運動では荷重負荷のかかる運動よりも骨量獲得の効果が小さく、反対に、ジャンプやスクワットのような運動の方が荷重骨の骨量増加に有効であることが示されている (Notomi *et al.*, 2000; 2001; Westerlind *et al.*, 1998)。このように骨成長にとっては骨に荷重負荷のかかる運動が効果的であることが認識されているが、その一方で、その運動強度によっては骨に負の影響を与えることも示唆されている。成長期の実験動物においては高強度もしくは過剰な運動負荷が骨量を減少させることや骨構造を悪化させることなどが報告されている (Forwood *et al.*, 1993; Iwamoto *et al.*, 1999; Notomi *et al.*, 2001; Westerlind *et al.*, 1998)。骨の長さの成長に対する運動の効果についても、運動は促進的に作用する (Borer *et al.*, 1977; Chvapil *et al.*, 1973) という一方で、抑制的に作用する (Kiiskinen *et al.*, 1978; Matsuda *et al.*, 1986)、との報告もあり対照的な影響が確認されている。これらの実験結果をふまえて American College of Sports Medicine による骨の健康のための身体活動の Position Stand では (Kohrt *et al.*, 2004)、骨の健康のための身体活動とは、骨に衝撃の加わるジャンプなどの要素がある適度な強度の運動で、レジスタンストレーニングであれば 1RM の 60% 以下であること、1 週間に少なくとも 3 日で 1 回 10~20 分を 2 セット程度が望ましいとしている。

骨の成長を目的に成長期の子どもに運動を薦めるのであれば上記のような骨にとって「適度」と考えられる運動を行うことが望ましいといえるが、アスリートにとっての運動はトレーニングであり、健康のためというよりも競技力向上のために行っている。そのため、成長期の運動トレーニングが成長期アスリートの骨の健康に負の影響を与えるという示唆もなされている。Macdougall らは男性ランナーを対象に骨密度と走行距離との関係を調査したところ、週に 15~20mile 走る選手の骨密度は高いが、それよりも走行距離が

多い選手では骨密度が低下する傾向であったことを示した (Macdougall *et al.*, 1992). また, Bass らは成長期の女子体操選手を対象に身長伸びを調査したところ, 運動を行っていない対照群と比較して身長が低値だったことを示した (Bass *et al.*, 2000). さらに Eliakim らは, 成長期の男子運動選手において運動を行っていない対照群と比較して 5 週間の運動トレーニング後の IGF-I, インスリン様成長因子結合タンパク 3 型 (insulin-like growth factor binding protein 3: IGFBP3) が低値を示したことを報告している (Eliakim *et al.*, 1998). ほかに同様の結果を示した報告があり (Caine *et al.*, 2001; Jahreis *et al.*, 1991), 成長期における運動トレーニングは好影響と悪影響の両方の側面を持っているとも考えられている. また, これらの報告では同時に運動群における栄養素等摂取不足が観察されており (Eliakim *et al.*, 1998; Caine *et al.*, 2001), 実際のスポーツ現場においては運動トレーニングによる影響だけではなく, 運動負荷に対して栄養素等摂取が見合っていないことが骨形成抑制の要因であるとも考えられている (Genazzani *et al.*, 2005) (Fig.1).



**Fig.1 Possible pathogenic mechanisms of long- term consequences of excessive physical training during adolescence.**

Intensive training and the often associated disordered eating habits may induce inadequate energy intake and related caloric deficiency, which deranges the growth hormone (GH)-insulin-like growth factor-I (IGF-I) axis, impairing linear growth and eventually the attainment of genetically adequate adult height. In addition, intensive training and inadequate energy intake may interfere with the hypothalamic-hypophyseal-gonadal (HHG) axis, leading to reduced secretion of gonadal sex steroids and so to delayed puberty and menstrual dysfunctions. Nutritional deficiencies, low energy intake, GH-IGF-I axis alterations, HHG axis alteration, acting by derangement of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Altogether these mechanisms may result in complete clinical manifestation of the female athlete triad syndrome (LH, luteinizing hormone; FSH, follicle-stimulating hormone). (Bertelloni et al., 2006)

## 2. タンパク質摂取と骨

### 2-1. タンパク質摂取量の影響

慢性的なタンパク質摂取不足は骨のサイズや骨量に負の影響を与えることが報告されている。Orwollらは成長期のラットを用いた実験で、低タンパク質摂取が成長の遅延を (Orwoll *et al.*, 1992), また Likimaniらは低タンパク質摂取が骨塩量の減少をもたらすこと (Likimani *et al.*, 1992), を報告している。低タンパク質摂取が骨に及ぼす影響の原因には、IFG-I分泌の抑制や (Yahya *et al.*, 1990), 代謝性アシドーシスを引き起こし (Viteri *et al.*, 1983), それが骨吸収を亢進させること (Reidenberg *et al.*, 1966; Barzel *et al.*, 1969), などが考えられている。これらのことから成長期における骨成長のためにはタンパク質摂取量を十分に確保することが必要であり、実際に、ヒトにおいてタンパク質摂取量と骨量の関係を検討した横断研究では、両者の間に正の相関関係が示されている (Chevalley *et al.*, 2008)。

一方、高タンパク質摂取が骨に及ぼす影響については未だ議論が続いている。高タンパク質摂取は骨量に負の影響をもたらすことが報告されている一方で (Ellis *et al.*, 1972; Mazess *et al.*, 1974), 骨密度には影響を与えないまたは正の相関関係がある (Freudenheim *et al.*, 1986; Tylavsky *et al.*, 1988), との報告もあり不明な点が多い。このような横断研究または摂取タンパク質量を調整した介入研究は、骨粗鬆症およびそれに伴う骨を予防する目的に閉経前後女性を対象に多く行われているが、成長期の子どもに対する研究の数は少ない。近年では子どもを対象に行った調査において、タンパク質摂取量と骨密度に正の相関関係がみられているが (Chevalley *et al.*, 2008), 横断研究のみで検討が不十分である。高タンパク質摂取が骨に負の影響を及ぼす原因の一つとして考えられているのが、尿中カルシウム排泄量の増加による負のカルシウム平衡が引き起こされることである。Anandらは成人男性を対象に摂取タンパク質量を 47, 95, 142g/日の 3 段階に設定してカルシウム出納をみたところ、タンパク質摂取増

加に伴い尿中カルシウム排泄量が増加し、カルシウム平衡は負の値を示したと報告している (Anand *et al.*, 1974). ほかに成人を対象に同様の結果が報告されている (Johnson *et al.*, 1970; Kitano *et al.*, 1988). とくに動物性タンパク質摂取の増加は骨量減少と関係している可能性が示唆されている. 魚介類を含む動物由来のタンパク質である動物性タンパク質は酸性負荷の増大をもたらすとされている (Barzel *et al.*, 1969). 酸性負荷とは、体液中の二酸化炭素あるいは水素イオン濃度が上昇して酸性に傾こうとする力のことであるが、それを排泄するため身体にはいくつかの機能が備わっている (原田ら, 2002). その一つが、骨がカルシウム等の塩基を遊離することで酸性負荷を軽減する機能である. そのため、動物性タンパク質摂取増加が継続すると、骨量が減少すると考えられている (Barzel *et al.*, 1969; Barzel, 1976). 65 歳以上の女性を対象にした 2 年間のコホート研究において、植物性タンパク質摂取が多く動物性が少ない対象者ほど骨量減少や骨折が少ないという結果が示され (Sellmeyer *et al.*, 2001), 動物性タンパク質を多く摂取することにより骨吸収が促進することが示唆された. また、閉経前女性を対象にした実験ではカルシウム含量の多いアルカリ性ミネラルウォーターはカルシウム含量の多い酸性ミネラルウォーターよりも骨吸収を抑制するという報告がなされ (Wynn *et al.*, 2009), 同様に、酸性負荷が骨吸収を促進する可能性が示唆されている. また、代謝性アシドーシスの成熟雄ラットを用いた実験では通常のカルシウム摂取で尿中カルシウム排泄の増加、骨強度の低下などが確認されている (Won, 1996). しかし一方で、小児ではタンパク質摂取量の増加に伴う尿中カルシウム排泄量の増加や負のカルシウム平衡がみられないという報告もあり (Hawks *et al.*, 1942), 骨形成が著しい成長期への影響については議論の余地がある. さらにこれまでの対象はほとんどが安静状態の動物や活動量が多くないヒトであり、アスリートのように活動量が多い対象での検討は少ない (Poortmans *et al.*, 2000).

運動強度が高まるにつれて、タンパク質が分解されていることを示すアミノ

酸酸化速度が運動強度に依存して上昇することからタンパク質必要量は増加すると考えられている (Babij *et al.*, 1983). そのためアスリートは一般の推奨量よりも多くタンパク質を摂取することが推奨されており (Rodriguez *et al.*, 2009) (appendix 1), 先行研究において, 筋力トレーニングを行うとともにタンパク質摂取量を増加させると, 体タンパク質の合成が上昇すると報告されている (Tarnopolsky *et al.*, 1992). また, 成長期男性においてレジスタンストレーニング後のプロテイン投与が筋タンパク合成に与える影響を調べた実験では, トレーニング後に 20 g のプロテインサプリメントを投与すると筋タンパク合成が高められることが確認されている (Moore *et al.*, 2009). このように運動とタンパク質摂取量の影響については主に骨格筋の合成と分解に着目して実験が行われており, 運動とタンパク質摂取量が骨に及ぼす影響については検討が少ない. 運動とタンパク質摂取量の関係についてこれまでに行われたいくつかの実験では, 高タンパク質摂取でトレッドミル走運動させた成長期ラットにおいて大腿骨の骨強度が増加したことが示されている (Zernicke *et al.*, 1995). 一方で, Ribeiro らは成長期のラットに水泳運動を行わせた実験で脛骨の長さに対して高タンパク質摂取と標準タンパク質摂取に効果の違いはみられなかったとしている (Ribeiro *et al.*, 2010). 前者の実験では後者と異なり, 荷重負荷のかかる運動を行わせていることや骨強度を効果の指標としていたことから骨に影響がみられたのかもしれない. しかし, 前者の実験は運動時間が 1 日 20 分を 1 週間に 3 日と少なく, 毎日トレーニングを行うアスリートを想定すると運動量が不十分であるといえる. これらのことから, 成長期アスリートを想定し, 成長期における運動トレーニングおよびタンパク質摂取量の違いが骨に及ぼす影響についてはさらに検討する必要があると考えられる.

## 2-2. コラーゲン摂取の影響

コラーゲンは, 皮膚, 血管, 腱, 歯などほとんどの組織に存在するタンパク



質で、生体を構成する全タンパク質の約 30%を占める。そのうち骨では有機成分の約 90%を占めている（藤本，1994）。コラーゲンのアミノ酸組成は、グリシン（Gly）が約 3 分の 1 と最も多く（appendix 5）、ポリペプチド鎖を形成している（Hulmes *et al.*, 1973）。このポリペプチド鎖は Gly-X-Y という配列で、3 つのアミノ酸ごとにグリシンを含み、X、Y は任意のアミノ酸であるが、X はプロリンが、Y はプロリンまたはヒドロキシプロリンである割合が高い。コラーゲンはその物理化学的性質から構造や機能の異なる分子ファミリーに分けられ約 30 種類の型があり（Hulmes *et al.*, 1973）、骨のコラーゲンはほぼ純粋に I 型である。

骨は骨基質にミネラルが沈着して形成される。骨基質はコラーゲンと非コラーゲン性タンパク質で構成されているが、骨基質の約 90%がコラーゲンで、残りの 10%がオステオカルシン、オステオネクチン、オステオポンチンなどの非コラーゲン性タンパク質である。この骨基質にリン酸カルシウムの結晶（hydroxyapatite）が沈着して骨組織が形成されることから、コラーゲンは骨の石灰化の基質として重要な役割を果たしている（藤本，1994）。さらに、コラーゲンは骨芽細胞および未分化の前骨芽細胞の増殖分化の足場としての役割を果たしている（Shimizu *et al.*, 2001; Mizuno *et al.*, 2000）。未熟な骨芽細胞をコラーゲングル内で培養すると増殖と分化が促進されることが報告されている（Holliday *et al.*, 1997; Mizuno *et al.*, 2000）。

このコラーゲンの変性体であるゼラチンや、それらの分解産物であるコラーゲンペプチドは、すでに美容や健康食品用素材として広く用いられているが、その有効性について科学的な検証は十分であるとはいえない。コラーゲンが熱によって変性されたものがゼラチンで、ゼラチンをさらに加水分解して分子量を数千程度まで小さくしたものがコラーゲンペプチドである（Fig.2）。とくにコラーゲンペプチドは分子量が小さいことから、その体内での機能性が注目されている。通常タンパク質はアミノ酸まで分解された後、腸管で吸収されると

考えられている。しかし、コラーゲンペプチドはアミノ酸まで分解されずにペプチドのまま吸収されるとの報告がある (Oesser *et al.*, 1999)。Oesser らはマウスに放射性同位体で標識したコラーゲンペプチドを経口摂取させたところ、吸収されたペプチドの分子量は 500~15000 (アミノ酸にすると 5~150 個) であったことを報告した。このような、アミノ酸まで分解されずに吸収されるコラーゲンペプチドの特徴が、生体内において分解されたアミノ酸とは異なる効果を発揮する可能性があるとして、近年では、このコラーゲンペプチドが骨芽細胞に働きかけ骨形成を促進する機能を持つ可能性が示唆されている。小腸および骨芽細胞にはこのペプチドを取り込むペプチドトランスポーターと呼ばれる輸送体が存在し、その輸送体を通じて直接吸収されたコラーゲンペプチドが骨芽細胞において骨芽細胞の成熟や I 型コラーゲンをはじめとする骨基質タンパク質の発現を誘導するのではないかと考えられている (Tsuruoka *et al.*, 2007)。このようにコラーゲンペプチドの吸収や細胞内での機能については徐々に明らかになってきているが、生体への効果の検討は不十分である。骨および骨代謝に対する効果についてはこれまでに、卵巣摘出骨粗鬆症モデルラット (OVX ラット) を用いた実験で、コラーゲンペプチド摂取によって骨塩量および骨密度が増加すること (Wu *et al.*, 2003)、骨組織中の I 型コラーゲン量が増加すること (Nomura *et al.*, 2005)、が報告されている。また、ヒトの骨粗鬆症患者に対して骨吸収を抑制するカルシトニンと同時にコラーゲンペプチドを投与すると、カルシトニンを単独で投与した場合と比較して骨吸収の指標である尿中ピリジノリン排泄が低下することが確認された (Moskowitz *et al.*, 2000)。このように生体に対するコラーゲンペプチド摂取の効果はいくつか検討されているが、そのほとんどが骨粗鬆症患者 (またはモデル) や高齢者を対象にしており、成長期の骨形成に対する効果については検討が不十分である。加えて、運動を組み合わせるコラーゲンペプチド摂取の効果を検討した実験はほとんどなく、それらが骨形成に及ぼす効果は不明である。



Fig.2 コラーゲンからコラーゲンペプチドの生成

### 第Ⅲ章 研究目的および課題

#### 1. 研究目的

先行研究によって、成長期において適度な荷重負荷を与える運動は骨量を増加させ骨の成長に寄与することが明らかにされている。しかし、競技力向上を目的としたトレーニングを行うアスリートでは必ずしも骨の成長促進に最適な強度や種類の運動を行っているとはいえない。さらに、エネルギー消費量が多い競技や体重制限等がある競技を行っている選手では体の成長に十分な栄養素等摂取が困難であり (Thompson, 1998; Juzwiak *et al.*, 2008; Aerenhouts *et al.*, 2011), このことが骨の成長に負の影響を与える可能性も考えられる (Bass *et al.*, 2000; Eliakim *et al.*, 1998)。骨の成長のうち骨量の増加には、体重による荷重負荷 (Wronski *et al.*, 1983; EI Hage *et al.*, 2009), と筋の発揮する張力としての負荷が強く影響することから (Geiser *et al.*, 1958; Jones *et al.*, 1977), 成長期における体重増加の抑制は骨量増加を抑制する可能性がある。また、骨の長さの成長には特に脳下垂体由来の GH や GH の作用を受けて肝臓から分泌される IGF-I の影響が大きい (Ganong *et al.*, 1985), それらの分泌は栄養素等摂取不足により抑制されることから (Livingstone, 2013), 成長期における体重制限やエネルギー消費量の増大は骨の長さの成長抑制を引き起こすことも考えられる。その予防・改善には、運動量を減らすことや食事量を増やし栄養素等摂取が不足しないようにすることがあげられるが、競技成績を重視した場合その選択ができない場合もある。

その対策として、本研究では骨の有機成分であるタンパク質に着目する。タンパク質は運動量の増加に合わせ摂取量を増加させることで筋タンパク合成を促進することが明らかとなっていることから (Tarnopolsky *et al.*, 1992), アスリートにおいて、タンパク質は摂取量を増加させることが薦められている栄養素である (Nattiv *et al.*, 2007)。しかしエネルギー摂取量を増加させるのでは

なくタンパク質摂取量を増加させることで成長期アスリートの骨の成長にどのような影響があるのかは明らかになっていない。先行研究において、タンパク質摂取量は IGF-I の分泌量と正の相関関係があったことが報告されている (Yahya *et al.*, 1990)。このことからタンパク質摂取量の増加は成長因子の作用を高め、その作用の影響をとくに強く受けるとされる骨の長さの成長に寄与するのではないかと考えた。さらに本研究では骨基質の大部分を占める成分であるコラーゲンに着目する。コラーゲン摂取は骨量減少予防や軟骨損傷に対して効果的である可能性が報告されており (Wu *et al.*, 2003; Moskowitz *et al.*, 2000), 成長期の骨量増加効果も期待できるが運動と合わせた効果は未だ明らかになっていない。以上の背景から、成長期において過度な運動を行うアスリートの骨の成長に対してこれらの栄養摂取が有効かどうかを明らかにするために、成長期ラットに対して過度な運動トレーニングを行わせ、高タンパク質摂取またはコラーゲンペプチドを摂取が骨に及ぼす影響を検討する。

成長期の過度な運動トレーニングが骨成長に与える影響に対して高タンパク質摂取やコラーゲンペプチド摂取が効果的に作用するようであれば成長期アスリートの骨成長促進や骨障害予防に有用な知見となる。本研究では、運動負荷を十分にコントロールした上で、タンパク質摂取の違いが骨に及ぼす影響を検討するためにラットを用いた動物実験を行うこととした。検討課題は以下のとおりである。

## 2. 研究課題

### 研究課題 1: 成長期の過度な走運動トレーニングが骨に及ぼす影響

荷重負荷のかかる走運動トレーニングは骨の成長促進効果があるとされるが、その一方で運動強度が高く、運動に見合った十分な栄養素等摂取量が確保できない場合は運動が骨に負の影響を与える、もしくは運動効果がみられないということが報告されている (Genazzani *et al.*, 2005)。競技力向上を目的とし

トレーニングを行う成長期アスリートを想定し、成長期ラットに対して中～高強度（約80%VO<sub>2</sub>max）に相当（Shepherd *et al.*, 1976）する走運動トレーニング（以下、中強度走運動トレーニング）を長期間（8週間）行わせ、運動トレーニングおよびその際の摂食状況が骨サイズ、骨量、骨強度および骨代謝に及ぼす影響を検討する。

### 研究課題 2：骨成長の抑制に対する高タンパク質摂取の効果

運動トレーニングによって骨格筋などのタンパク質の分解が亢進することが知られている（Babij *et al.*, 1983）。そのためアスリートでは筋量を維持増進させるため、運動量の増加に伴い摂取タンパク質量を増加させることが推奨されているが（Nattiv *et al.*, 2007）、骨への効果はほとんど検討されていない。成長期の過度な運動トレーニングが骨成長に及ぼす影響に対しタンパク質摂取量を増加させることが効果的に作用するかを、ラットを用いて検討する。研究課題 1 に基づき成長期雄ラットに過度な走運動トレーニングを行わせ、食餌中タンパク質量を重量比 20%（標準タンパク質摂取）およびその 2 倍量である重量比 40%（高タンパク質摂取）に設定し、骨サイズ、骨量、骨強度および骨代謝への影響を比較する。また、タンパク質摂取不足の影響および標準摂取の必要性を確認するために重量比 10%（低タンパク質摂取）の群も設け、タンパク質摂取量の違いが骨に与える影響を検討する。

### 研究課題 3：骨成長の抑制に対するコラーゲンペプチド摂取の効果

コラーゲンは、骨組織に存在するタンパク質で骨構造の約 25%を占める（Oishi *et al.*, 2002）。骨量減少動物モデルにおいて、コラーゲン摂取による骨量減少の抑制が報告されているが（Wu *et al.*, 2003）、成長期における報告は少なく、また運動との併用効果は不明である。成長期の過度な運動トレーニングが骨成長に及ぼす影響に対しコラーゲンペプチド摂取が効果的に作用するか

を，ラットを用いて検討する．研究課題 1 に基づき過度な走運動トレーニングを行わせた成長期雄ラットに対して，飼料のタンパク質の一部をコラーゲンペプチドに置き換えた飼料を与え，骨サイズ，骨量，骨強度および骨代謝への影響を検討する．

## 第IV章 研究課題 1

### 「成長期の過度な走運動トレーニングが骨に及ぼす影響」

#### 1. 背景

競技力向上を目的に運動トレーニングを行うアスリートにとっては運動強度や栄養素等摂取状況が骨の成長に適正であるとは限らない。他方、アスリートにとって体を支える骨の障害を予防すること、骨を強くすること、さらに多くの場合は大きく成長させることは重要な課題である。そのための栄養対策を検討するにあたり、成長期のアスリートを想定し過度な運動トレーニングおよびその際の摂食状況が骨に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

#### 2. 目的

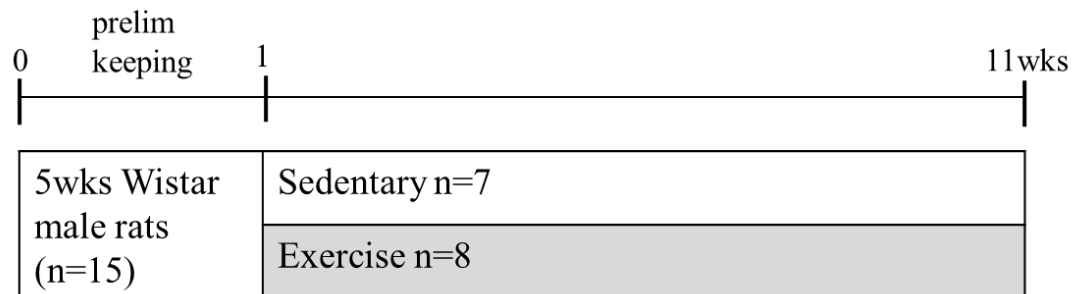
成長期ラットに対する中強度以上の長期トレーニングの負荷は食餌摂取および体重増加の抑制を引き起こし、その結果骨の成長も抑制されるという仮説をもとに、成長期の雄ラットを用い、中強度走運動トレーニングを行ったラットの骨および骨代謝に及ぼす影響を検討する。

#### 3. 研究方法

##### 3-1. 被験動物および飼育条件

プロトコールを Fig.3 に示した。実験動物には 5 週齢の Wistar 系雄ラット (15 匹) を用いた。飼料は成長期ラットの飼料基準 (AIN-93) (Reeves *et al.*, 1997) に基づき作成した。飼料組成は Table 1 に示した。ラットを安静群 (Sedentary 群) と運動群 (Exercise 群) に分け計 2 群とした。飼育は  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度  $50 \pm 5\%$ 、12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00a.m.~8:00p.m.) の環境下で行い、飼料および脱イオン蒸留水は自由摂取させた。なお、本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。





**Fig.3 Experimental Protocol**

Sedentary group (n=7), Exercise group (n=8). At 6wks of age the exercise group began running on a treadmill.

**Table 1. Composition of experimental diets.**

Constituents	weight ratio (%)
Glucose monohydrate	60.4
Casein(Vitamin-free)	20.0
Cystine	0.2
Cottonseed oil	10.0
CaCO <sub>3</sub>	1.4879
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.1424
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4621
Cellulose powder a)	3.0
Choline chloride	0.2
Water soluble Vitamin mixture b)	0.1
Oil soluble Vitamin mixture	c)
Ca.P free salt mixture d)	2.0

a) ADVANTEC Cellulose Powder, no. 49020040.

b) The water soluble vitamin mixture (in %) : thiamine, 0.5 ; riboflavin, 0.5 ; pyridoxine, 0.5 ; calcium pantothenate, 2.8 ; nicotinamide, 2.0 ; inositol, 20.0 ; folic acid, 0.02 ; vitamin B12, 0.002 ; biotin, 0.01 ; and glucose monohydrate, 3.7. c)The rats received a supplement of fat-soluble vitamin in cotton seed oil three times a week which was supplied with 70 µg of β-carotene, 105 µg of 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 875µg of α to copherol and 525 I.U. of vitamin-D3. d) The Calcium (Ca) Phosphorus (P) free salt mixture (in %) : potassium chloride,57.7; sodium chloride,20.9;magnesium sulfate,anhydrous,17.9; copper( II )sulfate pentahydrate,0.078; sodium fluoride,0.113; cobalt(II )chloride,0.004; potassium iodide,0.01; magnese( II )sulfate pentahydrate,0.06; hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate,0.005; iron( II )sulfate heptahydrate,3.22; zinc sulfate heptahydrate,0.44.

Diet was controlled at 0.6% Ca and 0.6% P.

### 3-2. 運動プロトコール

トレーニングは小動物用トレッドミル (KN-73, 夏目製作所, 東京) を用いた走行運動とし, 週 6 回の頻度で行った. 運動群は運動適応期間を 9 日間設け, ランニングスピードおよび運動時間を漸増的に上げ (それぞれ 10-25m/min・10-60 分) 走行させた. 実験開始 17 日目から本走行を開始, さらに漸増的にランニングスピードを上げ (25-30m/min), 最終的に 27m/min を 30 分, 30m/min を 30 分の計 60 分連続走行させた. なお, 本走行期間は 60 日間である. 本研究の実験動物においては 30m/min のランニングスピードは 70~80%  $VO_2max$  に相当する (Shepherd *et al.*, 1976). 運動前後に準備運動 (15m/min・5 分) とクールダウン (15m/min・5 分) を実施し, 1 日の総走行時間は 70 分とした.

### 3-3. 試料採取

体重および飼料摂取量は 2 日ごとに測定した. 飼育最終日に, 12 時間絶食させたラットをジエチルエーテル麻酔下で解剖を行い, 腰椎, 左右の大腿骨および脛骨を採取した. 腰椎と脛骨は骨塩量測定まで 70% エタノールで保存した. また, 副腎, 大腿四頭筋, 腹腔内脂肪を採取し湿重量を測定した.

### 3-4. 大腿骨重量および長さ

採取した左右大腿骨は周囲軟部組織を十分除去したのち, 長さ (Length), 長径 (Long width) および短径 (Short width) を, 副尺付物差しを用いて測定した. その後 98~100°C の乾燥機 (Hi-temp Oven, DR200, Yamamoto Inc, Tokyo) 中で 24 時間乾燥後秤量し, 乾燥重量 (Dry weight) を求めた. さらに, 500~600°C のマッフル炉中で 15 時間灰化し恒量を得て, 灰化重量 (Ash weight) を求めた.

### 3-5. 骨塩量および骨密度

採取した腰椎および脛骨は周囲軟部組織を十分に除去したのち、骨塩量 (Bone mineral content: BMC) および骨密度 (Bone mineral density: BMD) を測定した。測定は既報 (Hirasawa *et al.*, 2001) に従い、二重エネルギーX線吸収測定装置 (DXA: DCS-600R, Hitachi Aloka Medical Ltd, Tokyo) を用いて行った。

### 3-6. 大腿骨破断強度測定

大腿骨は軟部組織を十分取り除き、既報 (Ezawa *et al.*, 1979) に従い骨破断特性測定装置 (DYN-1255, Iio Co., Japan) を用いて大腿骨の骨幹部中央を破断し、破断強度を求めた。骨破断力は骨の強さを示し、骨が破断されたときの荷重 (重力加速度) で表される (単位: dyn)。また、骨破断エネルギーは骨が破断されるまでの仕事量 (1dyn の力が加わったときにその方向に動いた仕事量) を示す (単位: erg)。骨破断力および骨破断エネルギーは体重による荷重負荷量の影響の違いを取り除くため大腿骨乾燥重量で補正した値も求めた。

### 3-7. 骨代謝マーカー

酒石酸抵抗性ホスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphate: TRAP) は骨吸収マーカーとして従来から用いられてきた破骨細胞機能を反映するマーカーである。酒石酸で分解されない酸性ホスファターゼで、破骨細胞で産生される。TRAP は既報 (Omi, 1994) に従い、p-ニトロフェニルリン酸を用いた Sessey-Lowry 法により測定した。血清サンプル 0.1ml を試験管に移し、10mM のクエン酸 Na 緩衝液 (pH5.5) 0.4ml を添加し、パラフィルムで栓をして 37°C の恒温槽で 60 分間加温した。その後、0.1M p-ニトロフェニルニリン酸ナトリウム六水和物、0.2M クエン酸 Na、0.2M NaCl、0.08M L(+)酒石酸 Na を 40ml ずつ用いた混合液 2ml を各試験管に加え、反応を停止させ、420nm における比

色法で吸光度を測定（セルポジショナ CPS-260、島津製作所）、測定した。

アルカリホスファターゼ（alkaline phosphatase: ALP）は、アルカリ条件下でリン酸エステルを無機リン酸とアルコールに加水分解する反応を触媒する酵素である。骨代謝研究では、非常に重要な酵素の一つであり、特に骨型アルカリホスファターゼ（BAP）は骨形成マーカーとして評価されている（尾上ら，2007）。骨での役割は、骨芽細胞の細胞膜に存在し、無機リン酸を供給することにより、石灰化局所のリン酸濃度を高め、石灰化を促進する酵素と考えられている。BAP 活性を既報に従い測定した（Omi, 1994）。p-ニトロフェニルリン酸基質法により測定した。0.1M p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六化合物、50mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1M 2-Amino-2-methyl-1, 3-propanediol を各 10ml ずつメスフラスコに加え、蒸留水で全量が 100ml になるようにメスアップし、これを反応溶液とした。試験管に血清を 0.05ml 加え 56°C の恒温槽で 10 分間加温し(A)，反応溶液を 3ml 加え、37°C の恒温槽で 30 分間加温し、1N NaOH を 1ml ずつ加え反応を停止させた。2000rpm で 15 分間遠心分離した後、上清を 420nm における比色法で吸光度を測定した。また、血清を最初の行程の恒温槽での加温はせずに、反応溶液と反応させ以下同様の手順で吸光度を算出した (B)。なお、BAP 活性は (B) - (A) により算出した。

### 3-8. 統計処理

データはすべて mean ± SE で表した。また、統計ソフトは SPSS (version 21.0 J; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用し、各指標の両群の差は対応のない t 検定 (Student t-test) を用い検討した。また、「骨サイズ」、「骨重量」および「骨密度」と、「体重」および「副腎重量」の関係を検討にはピアソン (Pearson) の積率相関係数を算出した。統計的有意水準は 5% とした。

#### 4. 結果

##### 4-1. 最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率

最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率を Table 2.に示した．実験開始時の体重は両群間に差はなかった．最終体重および体重増加量は運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p<0.001$ ）．同様に 1 日あたりの飼料摂取量，摂取エネルギーおよび飼料効率は運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p<0.001$ ）．

**Table 2. Final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency.**

	Sedentary	Exercise
Initial body weight (g)	159.1 ± 1.55	155.8 ± 1.69
Final body weight (g)	455.5 ± 12.74	350.0 ± 7.55***
Body weight gain (g/d)	4.30 ± 0.15	2.92 ± 0.05***
Food intake (g/d)	18.76 ± 0.44	15.20 ± 0.22***
Energy intake (kcal/d)	70 ± 2	57 ± 1***
Food efficiency <sup>a)</sup>	0.23 ± 0.01	0.19 ± 0.00***

a) Food efficiency was calculated by body weight gain (g/d)/Food intake (g/d). Values are expressed as means ± SE. \*\*\*:  $P<0.001$  vs. sedentary group.

#### 4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量

大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量を Table 3 に示した。体重補正した大腿四頭筋重量は運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.05$ )。一方、腹腔内脂肪重量は運動群が安静群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )。

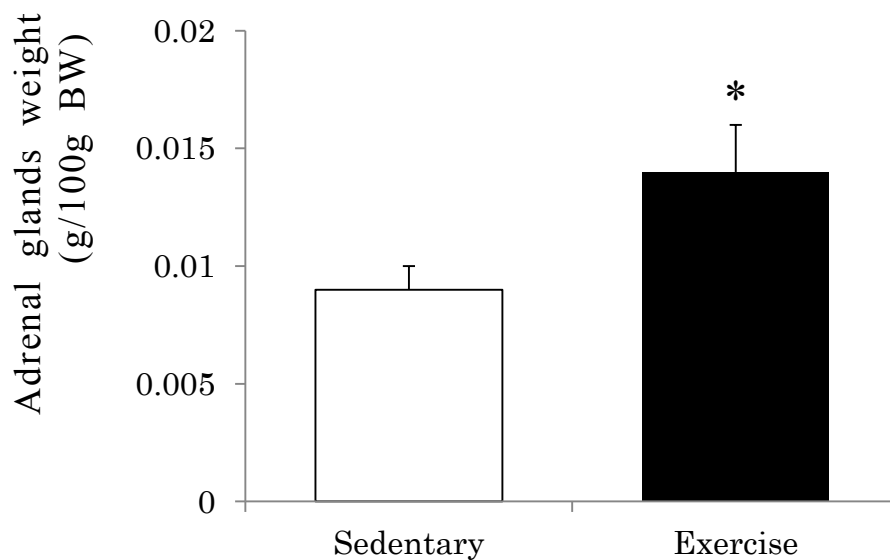
**Table 3. Muscle and fat weight.**

	Sedentary	Exercise
Quadriceps femoris weight (g)	3.048 ± 0.169	2.697 ± 0.089
Quadriceps femoris weight (g/100g BW)	0.668 ± 0.029	0.778 ± 0.027*
Abdominal fat weight (g)	34.111 ± 1.178	14.824 ± 1.109****
Abdominal fat weight (g/100g BW)	7.501 ± 0.239	4.237 ± 0.293****

Values are expressed as means ± SE. \*:  $P<0.05$ , \*\*\*\*:  $P<0.001$  vs. sedentary group.

### 4-3. 副腎重量

副腎重量を Fig.4 に示した. 体重補正した副腎重量は運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.05$ ).



**Fig.4 Adrenal glands weights.**

Vertical bars indicate the standard error. \*:  $P<0.05$  vs. sedentary group.



#### 4-4. 大腿骨長さ, 幅および重量

大腿骨の長さ, 幅および重量を Table 4 に示した. 大腿骨の長さ (Length) および短径 (Short width) においては運動群が安静群よりも有意な低値を示した (各  $p < 0.001$ ). 大腿骨乾燥重量 (Dry weight) および灰化重量 (Ash weight) は運動群が安静群よりも低値を示した (各  $p < 0.01$ ). 乾燥重量および灰化重量ともに体重補正した値では運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p < 0.001$ ).

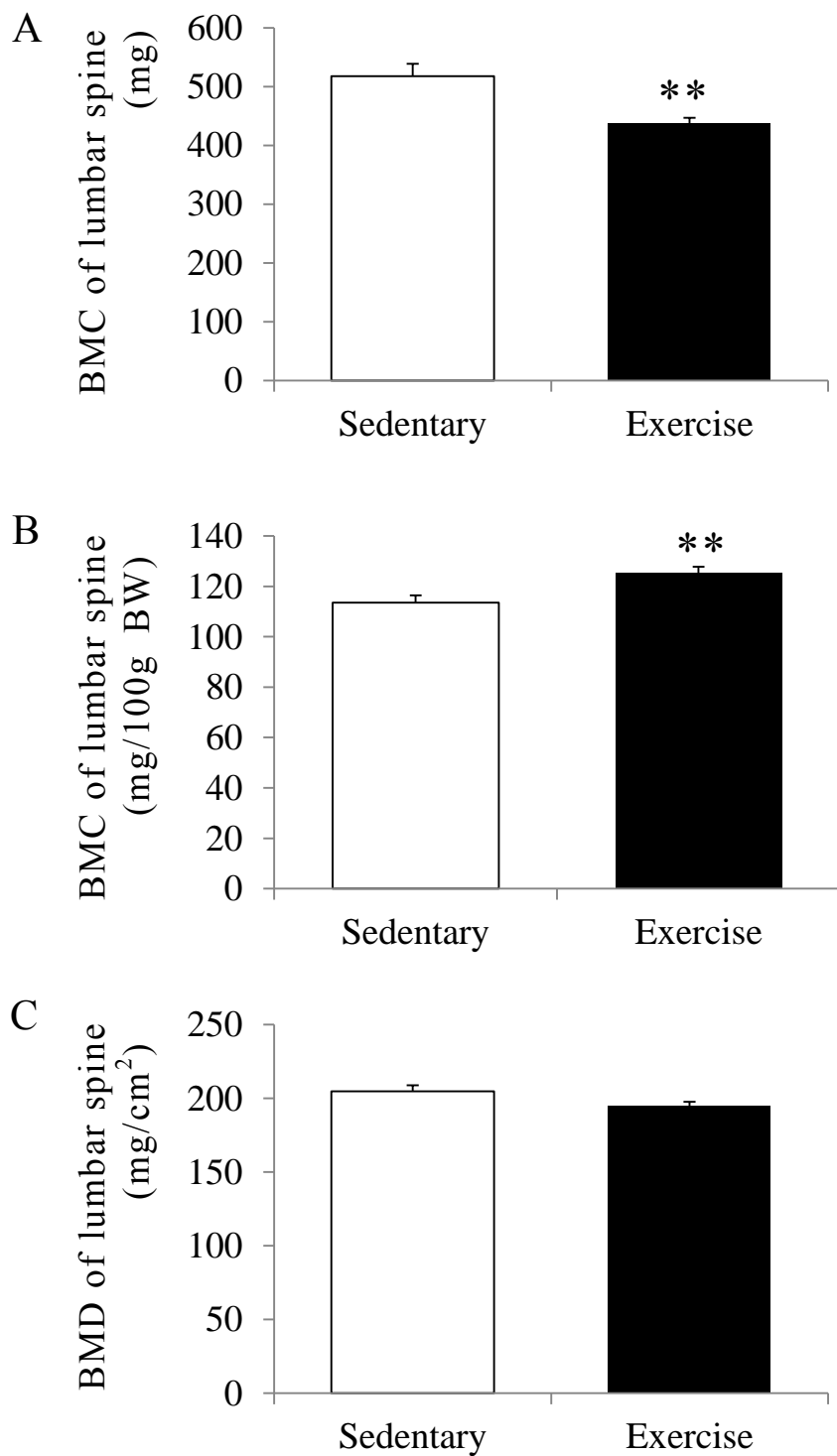
**Table 4. Femoral length and weights.**

	Sedentary	Exercise
Length(cm)	3.812 ± 0.025	3.729 ± 0.015**
Long width(cm)	0.468 ± 0.004	0.467 ± 0.004
Short width(cm)	0.354 ± 0.004	0.337 ± 0.002**
Dry weight(g)	1.345 ± 0.038	1.198 ± 0.02**
Dry weight(g/100g Body Wt.)	0.296 ± 0.007	0.343 ± 0.004***
Ash weight(g)	0.832 ± 0.023	0.748 ± 0.013**
Ash weight(g/100g Body Wt.)	0.183 ± 0.005	0.214 ± 0.003***

Values are expressed as means ± SE. \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. sedentary group.

#### 4-5. 骨塩量および骨密度

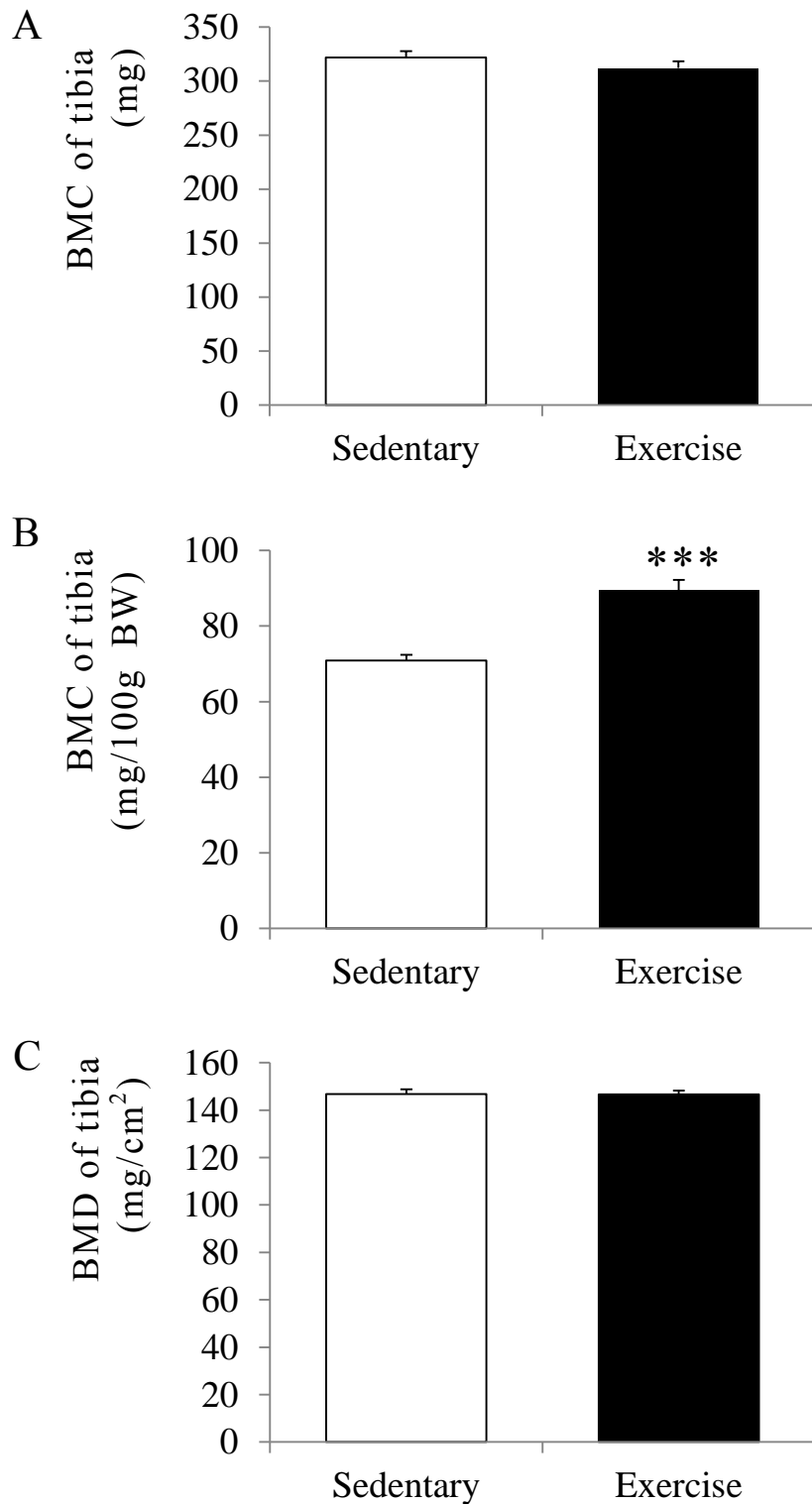
腰椎骨塩量 (A), 体重補正した腰椎骨塩量 (B) および腰椎骨密度 (C) を Fig.5 に示した. 腰椎骨塩量 (BMC of lumbar spine) において運動群が安静群よりも有意な低値を示し ( $p<0.01$ ), 反対に体重補正した腰椎骨塩量においては運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ ). 一方で, 腰椎骨密度 (BMD of lumbar spine) には両群間に有意な差はみられなかった.



**Fig.5 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of lumbar spine.**

A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The lumbar spine of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*: P<0.01 vs. sedentary group.

脛骨骨塩量 (A), 体重補正した脛骨骨塩量 (B) および脛骨骨密度 (C) を Fig.6 に示した. 脛骨骨塩量 (BMC of tibia) および骨密度 (BMD of tibia) においては両群間に有意な差はみられなかった. 一方で, 体重補正した脛骨骨塩量は運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ).



**Fig.6 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of tibia.**

A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The tibia of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. sedentary group.

#### 4-6. 体重または副腎重量と、骨指標との相関関係

最終体重または体重補正した副腎重量と、骨サイズ (Length, Long width, Short width), 骨重量 (Dry weight, Ash weight) および BMC, BMD との相関係数を Table 5 に示した. 安静群および運動群を含めた全ての群で検討すると, 長さ ( $p<0.001$ ), 短径 ( $p<0.001$ ), 大腿骨乾燥重量 ( $p<0.001$ ), 大腿骨灰化重量 ( $p<0.001$ ), 腰椎骨塩量 ( $p<0.001$ ) および骨密度 ( $p<0.05$ ) と体重との間に有意な正の相関関係が認められた. 反対に副腎重量との関係では, 長さ ( $p<0.01$ ), 短径 ( $p<0.01$ ), 大腿骨乾燥重量 ( $p<0.001$ ) および大腿骨灰化重量 ( $p<0.01$ ) に有意な負の相関関係が認められた. また, 安静群と運動群に分けてそれぞれの群で比較すると, 安静群では副腎重量と骨の指標との間に負の相関関係は認められず, 運動群では, 長さ ( $p<0.05$ ), 長径 ( $p<0.0$ ), 大腿骨乾燥重量 ( $p<0.001$ ) および大腿骨灰化重量 ( $p<0.001$ ) との間に有意な負の相関関係が認められた.

**Table 5. Correlations between body weight or adrenal glands weight and bone parameters.**

	Length	Long width	Short width	Dry weight	Ash weight	Lumbar spine BMC	Lumbar spine BMD	Tibia BMC	Tibia BMD
<b>All</b>									
Body weight	0.700***	0.015	0.732***	0.833***	0.814***	0.874***	0.532*	0.236	0.107
Adjusted adrenal glands weight	-0.543**	-0.095	-0.506**	-0.624***	-0.678**	-0.524	-0.436	-0.193	-0.217
<b>Sedentary</b>									
Body weight	0.778**	-0.324	0.626*	0.599*	0.509	0.814*	0.344	0.263	0.340
Adjusted adrenal glands weight	-0.133	0.756**	0.044	-0.029	-0.028	-0.039	-0.229	0.187	-0.179
<b>Exercise</b>									
Body weight	0.503*	0.306	0.468	0.736**	0.820*	0.522	-0.081	-0.137	0.109
Adjusted adrenal glands weight	-0.607*	-0.559*	-0.525	-0.815***	-0.977***	-0.600	-0.229	-0.200	-0.271

Data are represented as Pearson correlation (P value: \* $<0.05$ , \*\* $<0.01$ , \*\*\* $<0.001$ ).

BMC: bone mineral content, BMD: bone mineral density.

#### 4-6. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力および破断エネルギーの結果を Table 6 に示した。破断力，大腿骨乾燥重量で補正した破断力および破断エネルギーは両群間に有意な差はみられなかった。一方で，乾燥重量で補正した破断エネルギーは運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ )。

**Table 6. Breaking force and energy of the femoral diaphysis.**

	Sedentary	Exercise
Breaking force ( $\times 10^6$ dyn)	28.185 $\pm$ 1.656	26.593 $\pm$ 1.094
Adjusted breaking force ( $\times 10^6$ dyn/dry Wt.) <sup>a)</sup>	41.905 $\pm$ 1.475	44.414 $\pm$ 1.243
Breaking energy ( $\times 10^5$ erg)	23.618 $\pm$ 2.247	26.391 $\pm$ 0.805
Adjusted breaking energy ( $\times 10^5$ erg/dry Wt.) <sup>a)</sup>	36.598 $\pm$ 2.096	44.093 $\pm$ 0.903**

a) Breaking force and energy adjusted to the dry weight. Values are expressed as means  $\pm$  SE.

\*\* :  $P<0.01$  vs. sedentary group.



#### 4-7. 骨代謝マーカー

TRAP 活性値および BAP 活性値の結果を Table 7 に示した。TRAP は両群間に有意な差はみられなかった。一方で、BAP は運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )。

**Table 7. Serum TRAP activity and BAP activity.**

	Sedentary	Exercise
TRAP(mmol/min)	28.485 ± 3.411	23.815 ± 2.341
BAP(mmol/min)	85.397 ± 6.400	59.125 ± 6.306*

TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase activity, BAP: Bone-specific alkaline phosphatase activity. Values are expressed as means ± SE. \*:  $P<0.05$  vs. sedentary group.

## 5. 考察

成長期の雄ラットを用い、過度な走運動トレーニングが骨サイズ、骨量、骨強度および骨代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、運動群は安静群よりも体重増加量が低値で、骨のサイズおよび骨量の増加が抑制された。

運動は骨に機械的負荷を与え成長期の骨量を増加させるとされている (Iwamoto *et al.*, 1999; Notomi *et al.*, 2001)。骨量増加に効果的なのはとくに荷重負荷のかかる運動で、実験動物およびヒトにおいて骨量や骨強度の増加効果が報告されている (Kohrt *et al.*, 2004)。本研究においても、体重補正した骨重量および乾燥重量で補正した骨強度において運動群が安静群よりも有意な高値を示した (Fig.5,6, Table 4,6)。しかし一方で、補正していない骨そのものの重量には、その運動による効果が認められなかった (Table 4)。骨量の増減に関する力学的要因として、体重による荷重負荷 (Wronski *et al.*, 1983; EI Hage *et al.*, 2009)、と筋の発揮する張力としての負荷が考えられており (Geiser *et al.*, 1958; Jones *et al.*, 1977)、また走行中に筋に要求される力学的需要は体重に依存する。本研究において運動群は安静群よりも走運動トレーニングを行った分エネルギー消費量が多いと推測されるものの飼料摂取量は低値を示し、その結果体重増加量が安静群よりも低値を示した (Table 2)。このことにより運動群では少ない体重の影響を受け、骨サイズや骨量が安静群よりも低値を示したと考えられる。実際に、骨の長さ、骨重量、骨塩量および骨密度と体重との関係を検討したところ、骨の長さ、乾燥重量、腰椎骨塩量および骨密度において体重と有意な正の相関関係が認められた (Table 5)。

一方、骨の長さの成長は成長板に内在する軟骨細胞の増殖と分化の一連の過程によりなされ、これには全身循環系および局所産生性の液性因子が強く影響する (須田ら, 1985)。特に脳下垂体由来の GH や GH の作用を受けて肝臓から分泌される IGF-I の影響が大きい (Ganong *et al.*, 1985)。そのため、本研究でみられた安静群と運動群の骨の長さの違いは、運動に起因した内分泌系の変化

によるものかもしれない。Borer らは自発運動させたハムスターにおいて骨の長さの成長促進と GH 分泌量の増加がみられたことを報告しており (Borer *et al.*, 1977), 運動が骨の長さの成長を促進させる可能性を示唆している。一方で, 水泳運動させたラットでは GH の分泌が抑制されたとの報告もあり (Terry *et al.*, 1976), 運動条件で骨への影響が異なる可能性が考えられている。また, 栄養素等摂取不足は血中 IGF-I 値を低下させることも明らかになっている (Livingstone, 2013)。実際に, 本研究では運動群の骨の長さは安静群よりも低値を示したことから (Table 4), 本研究の運動トレーニングの実施およびその際の食餌摂取の抑制が GH や IGF-I などの成長因子に抑制的に作用し骨の長さの成長が抑制された可能性が考えられる。また, GH や IGF-I は副腎皮質から分泌されるグルココルチコイド (Glucocorticoids: GC) によってその分泌や作用が抑制されることが知られている (井村ら, 1986)。本研究では運動群において体重補正した副腎重量が安静群よりも有意な高値を示し (Fig.4), このことは, 運動群において GC が多く分泌されていた可能性を示唆している (Buuck *et al.*, 1971)。副腎肥大はストレスの増大に対して認められる反応であることから (Selye, 1946), 過度な運動によってストレスが生じていたことが推察される。またこのことは運動群において胸腺萎縮が観察されたことによっても示されている (Appendix 3)。そこで骨の長さ, 骨重量, 骨塩量および骨密度と体重補正した副腎重量との関係を検討したところ, 骨の長さおよび乾燥重量において体重補正した副腎重量と有意な負の相関関係が認められた (Table 5)。また, 安静群と運動群を分けて検討すると, 安静群においてはその関係は認められず, 運動群においてのみこれらの指標に有意な負の相関関係が認められた。これらのことから, 本研究の過度な走運動トレーニングは運動ストレスを惹起させ, その結果 GH や IGF-I の作用が抑制され, 骨の成長抑制が引き起こされたと考えられる。

本研究の運動トレーニングが成長期の骨代謝に及ぼした影響を血清の骨吸

収マーカー（TRAP 活性）および骨形成マーカー（BAP 活性）を用いて検討した（Table 7）。成長期の骨代謝回転は骨吸収および骨形成のどちらも亢進するが、骨形成優位のため骨量が増加する（千勝ら，1999）。続いて成長期以降では代謝回転が成人レベルへと抑制され、高齢期の骨代謝は一般的に骨吸収および骨形成ともに低下するが、骨吸収優位のために骨量が減少する（千勝ら，1999）。本研究では運動群において TRAP 値に安静群との差はみられなかったものの、BAP 値は安静群よりも有意な低値を示しており、本研究のような体重増加の抑制を伴うような過度の運動トレーニングの実施は成長期の骨形成（骨芽細胞の増殖・分化）亢進を抑制し、骨サイズや骨量の増加を抑制する可能性が示唆された。

これらから、本研究における成長期の体重増加抑制を伴うような過度の走運動トレーニングは、体重あたりの骨量や骨強度の増加をもたらす一方で、骨そのもので評価すると骨成長が抑制され、骨量や骨の長さの成長抑制を引き起こすことが示された。その原因には、運動によるエネルギー消費量の増加に見合った食餌量が確保できず体重増加が抑制され骨への負荷が軽減されたこと、運動量に見合った栄養素等摂取ができないことや運動ストレスの影響で成長因子である GH や IGF-I の作用が抑制されたこと、これらが成長期における骨形成優位の骨代謝を抑制したことが考えられる。

このような状況において、骨に対する運動トレーニング効果をより発揮させるためには運動量に見合った食餌量（エネルギー、栄養素）を確保し体重増加を抑制させないことや運動強度を軽減し運動ストレスを抑制することが重要であると考えられる。しかしながら、実際に、アスリートとして競技を継続する場合、それらの改善が困難な場合もある。そこでそのような成長期アスリートを想定し、彼らの骨成長を進める栄養改善策を検討するために研究課題 1 と同様の運動を行わせたラットにおいて、タンパク質摂取の有効性を研究課題 2 および 3 で検討する。

## 第 V 章 研究課題 2

### 「骨成長の抑制に対する高タンパク質摂取の効果」

#### 1. 背景

成長期における過度な走運動トレーニングは、その際の食餌摂取量および体重増加量の影響を強く受け、それらが抑制されるような状況においては骨サイズおよび骨量増加の抑制を引き起こすことが示された（研究課題 1）。このことへの栄養の対策としてタンパク質摂取に着目する。タンパク質摂取量と成長因子である IGF-I 分泌量との間には正の相関関係があることが報告されている（Yahya *et al.*, 1994）。アスリートはタンパク質を一般の推奨量よりも多く摂取することが推奨されており、筋タンパク合成に関しては筋力トレーニングを行うとともにタンパク質摂取量を増加させると、体タンパク質合成が上昇したという報告がある（Tarnopolsky *et al.*, 1992）。しかし、タンパク質摂取量の増加が骨に与える影響は明らかでない。

#### 2. 目的

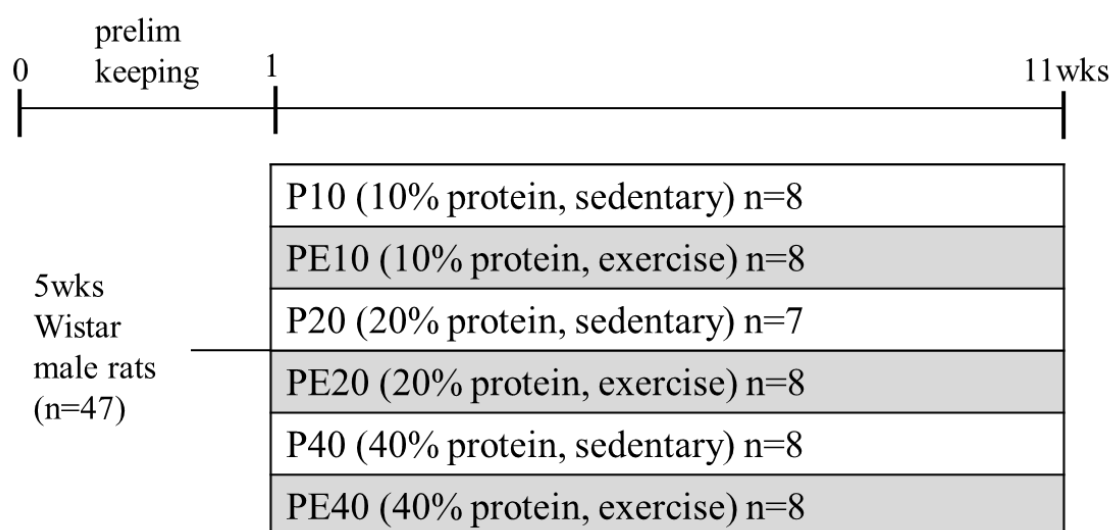
タンパク質摂取量を増加させることが骨の成長に効果的に作用すること、また、タンパク質摂取量が少なければさらに骨の成長が抑制されることを仮説とし、成長期の雄ラットを用い、タンパク質摂取量の違いが過度な走運動トレーニングを行ったラットの骨、骨代謝およびカルシウム代謝に及ぼす影響を検討する。

#### 3. 研究方法

##### 3-1. 被験動物および飼育条件

プロトコールを Fig.7 に示した。実験動物には 5 週齢の Wistar 系雄ラット（47 匹）を用いた。タンパク質源にはカゼインを用い、飼料中のタンパク質含量を

重量比 10%, 20%, 40%の 3 群とした. さらに各飼料群を安静群 (P10 群, P20 群, P40 群) と運動群 (PE10 群, PE20 群, PE40 群) に分け計 6 群とした. 飼料組成は Table 8 に示した. 飼育環境は研究課題 1 と同様に設定し, 飼料および脱イオン蒸留水は自由摂取させた. なお, 本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した.



**Fig.7 Experimental Protocol.**

P10 group (n=8), PE10 group (n=8), P20 group (n=7), PE20 group (n=8), P40 group (n=8), PE40 group (n=8). At 6wks of age the exercise group began running on a treadmill.

**Table 8. Composition of experimental diets.**

Constituents	10% Protein	20% Protein	40% Protein
	weight ratio (%)		
Glucose monohydrate	70.2	60.4	40.8
Casein(Vitamin-free)	10.0	20.0	40.0
Cystine	0.2	0.2	0.2
Cottonseed oil	10.0	10.0	10.0
CaCO <sub>3</sub>	1.4932	1.4879	1.4774
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2304	1.1424	0.9666
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5748	1.4621	1.2372
Cellulose powder a)	3.0	3.0	3.0
Choline chloride	0.2	0.2	0.2
Water soluble Vitamin mixture b	0.1	0.1	0.1
Oil soluble Vitamin mixture	c)	c)	c)
Ca.P free salt mixture d)	2.0	2.0	2.0

a) ADVANTEC Cellulose Powder, no. 49020040.

b) The water soluble vitamin mixture (in %) : thiamine, 0.5 ; riboflavin, 0.5 ; pyridoxine, 0.5 ; calcium pantothenate, 2.8 ; nicotinamide, 2.0 ; inositol, 20.0 ; folic acid, 0.02 ; vitamin B12, 0.002 ; biotin, 0.01 ; and glucose monohydrate, 3.7. c)The rats received a supplement of fat-soluble vitamin in cotton seed oil three times a week which was supplied with 70 µg of β-carotene, 105 µg of 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 875µg of α to copherol and 525 I.U. of vitamin-D3. d) The Calcium (Ca) Phosphorus (P) free salt mixture (in %) : potassium chloride,57.7; sodium chloride,20.9;magnesium sulfate,anhydrous,17.9; copper( II )sulfate pentahydrate,0.078; sodium fluoride,0.113; cobalt( II )chloride,0.004; potassium iodide,0.01; magnese( II )sulfate pentahydrate,0.06; hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate,0.005; iron( II )sulfate heptahydrate,3.22; zinc sulfate heptahydrate,0.44. Diets were controlled at 0.6% Ca and 0.6% P.

### 3-2. 運動プロトコール

運動は研究課題 1 と同様に行った。

### 3-3. 試料採取

試料は研究課題 1 と同様に採取した。

### 3-4. 大腿骨重量および長さ

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-5. 骨塩量および骨密度

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-6. 大腿骨破断強度

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-7. 骨代謝マーカー

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-8. カルシウム出納

カルシウム出納はタンパク質摂取量の影響を受ける可能性が示唆されている。動物性タンパク質摂取の増加による酸性負荷の増大は、骨からのカルシウム等塩基の遊離を増加させ、結果的に尿中カルシウム排泄量の増加と骨量の減少が起こると考えられている (Barzel *et al*, 1969; Barzel, 1976)。この影響は主に高齢者を対象とした実験において観察されているが見解は一致していないため、本研究における成長期ラットのカルシウム出納を検討した。

群分け 1 週間後にラットを代謝ケージに移し 24 時間尿および糞を 2 日間採



取した (1st). 同様に試験 1 から 1 か月後 (2nd) と, さらに 1 か月後 (3rd) にも 24 時間尿および糞を採取した. 採取した尿はただちに遠心分離 (2500rpm, 15min), その上清を用いて蒸留水で希釈しプラズマ発光分光光度計 (ICAP-575v Nippon Jarrell-Ash) により尿中カルシウム排泄量の測定を行った. 糞は 550~600°C のマッフル炉中で灰化 (約 15 時間) した後 1N 硝酸に溶解し, 糞中カルシウム排泄量を尿と同様の方法で測定した. なお, 各試験に用いた飼料のカルシウム含量の実測値は, 低タンパク質食で試験 1 : 0.60%, 試験 2 : 0.66%, 試験 3 : 0.61%, 標準タンパク質食で試験 1 : 0.59%, 試験 2 : 0.57%, 試験 3 : 0.54%, 高タンパク質食で試験 1 : 0.61%, 試験 2 : 0.59%, 試験 3 : 0.48% であった. みかけのカルシウム吸収量は出納試験ごとにカルシウム摂取量から糞中カルシウム排泄量を引いて求めた.

### 3-9. 統計処理

データはすべて mean ± SE で表した. また, 統計ソフトは SPSS (version 21.0 J; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用し, 各群の差は運動およびタンパク質摂取量を主効果として二元配値分散分析 (Two-way analysis of variance) を用い検討した. 交互作用が認められた場合, グループ間の多重比較は Bonferroni を用い検定した. また, 交互作用が認められずタンパク質摂取量の主効果が認められた場合, 群間の比較を Tukey test を用い検定した. 統計的有意水準は 5% とした.

## 4. 結果

### 4-1. 最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率

最終体重，体重増加量，飼料摂取量および飼料効率を Table 9. に示した．実験開始時の体重は各群間に差はなかった．最終体重，体重増加量では有意な交互作用が認められ，単純主効果を検定した結果，運動に関して，どの飼料群においても運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p < 0.001$ ）．また，飼料に関して，最終体重において安静群間で低タンパク質群は標準および高タンパク質群よりも有意な低値を示した（ $p < 0.001$ ， $p < 0.05$ ）．同様に飼料摂取量，摂取エネルギーおよび飼料効率においても有意な交互作用が認められ，どの飼料群においても運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p < 0.001$ ）．運動群において飼料による差はみられなかった．

**Table 9. Final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency.**

	Diet group			Two-way ANOVA (p value)	Multiple comparison
	10% protein	20% protein	40% protein		
<b>Initial body weight (g)</b>					
Ex(-)	157.0 ± 1.76	159.1 ± 1.55	159.3 ± 1.27	Exercise 0.228	
Ex(+)	157.8 ± 1.73	155.8 ± 1.69	155.8 ± 2.12	Protein 0.929 Interaction 0.487	
<b>Final body weight (g)</b>					
Ex(-)	399.8 ± 8.65	455.5 ± 12.74	435.8 ± 7.68	Exercise <0.001	10%, 20%, 40%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	334.3 ± 5.50	350.0 ± 7.55	359.8 ± 6.81	Protein <0.001 Interaction 0.038	Ex(-): 10%<20%, 40%
<b>Body weight gain (g/d)</b>					
Ex(-)	3.53 ± 0.10	4.30 ± 0.15	4.05 ± 0.10	Exercise <0.001	10%, 20%, 40%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	2.77 ± 0.06	2.92 ± 0.05	3.07 ± 0.09	Protein <0.001 Interaction 0.348	Ex(-): 10%<20%, 40%
<b>Food intake (g/d)</b>					
Ex(-)	17.93 ± 0.34	18.76 ± 0.44	16.77 ± 0.28	Exercise <0.001	10%, 20%, 40%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	15.34 ± 0.22	15.20 ± 0.22	15.06 ± 0.26	Protein <0.001 Interaction 0.008	Ex(-): 10%, 40%<20%
<b>Energy intake (kcal/d)</b>					
Ex(-)	66 ± 1	70 ± 2	65 ± 1	Exercise <0.001	10%, 20%, 40%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	56 ± 1	57 ± 1	58 ± 1	Protein <0.001 Interaction 0.008	Ex(-): 10%, 40%<20%
<b>Food efficiency<sup>a)</sup></b>					
Ex(-)	0.22 ± 0.00	0.23 ± 0.01	0.27 ± 0.01	Exercise <0.001	10%, 20%, 40%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	0.20 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.23 ± 0.00	Protein <0.001 Interaction 0.005	Ex(-): 10%, 20%<40%

a) Food efficiency was calculated by body weight gain (g/d)/Food intake (g/d). Values are expressed as means±SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Protein level interaction.

#### 4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量

大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量を Table 10 に示した。大腿四頭筋重量には有意な交互作用は認められず，運動および飼料に有意な主効果が認められた。運動群は安静群よりも有意な低値を示し ( $p<0.05$ )，低タンパク質群は高タンパク質群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )。一方，体重補正した大腿四頭筋重量は運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ )。また，腹腔内脂肪重量は運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ )。

**Table 10. Muscle and fat weight.**

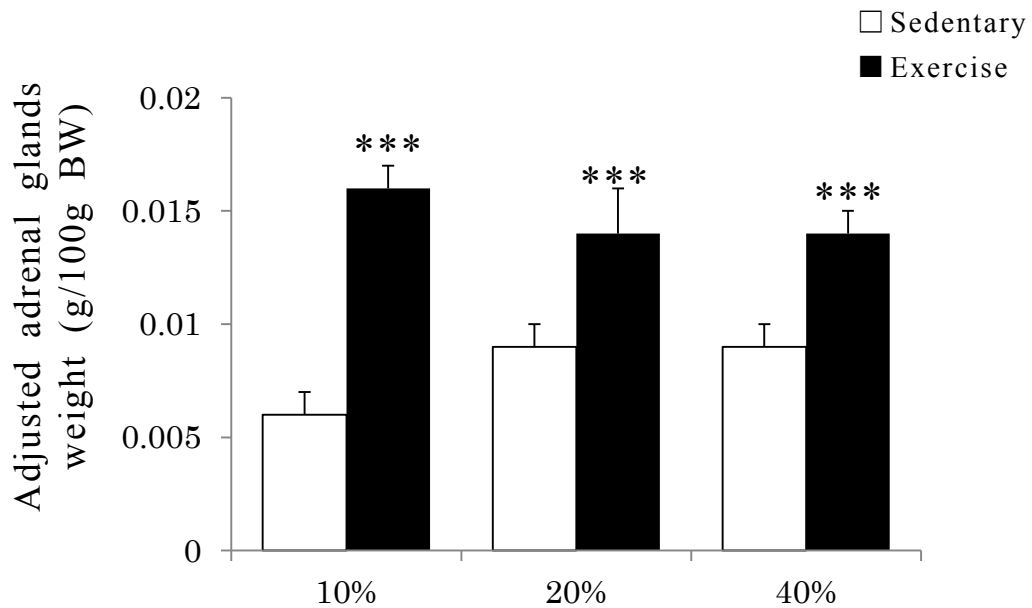
	Diet group			Two-way ANOVA		Multiple comparison
	10% protein	20% protein	40% protein	(p value)		
<b>Quadriceps femoris weight(g)</b>						
Ex(-)	3.042 ± 0.066	3.048 ± 0.169	3.068 ± 0.148	Exercise	<0.05	Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	2.606 ± 0.013	2.697 ± 0.089	2.886 ± 0.062	Protein	<0.05	10%<40%
				Interaction	0.639	
<b>Quadriceps femoris weight(g/100g BW)</b>						
Ex(-)	0.696 ± 0.023	0.668 ± 0.029	0.702 ± 0.028	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
Ex(+)	0.778 ± 0.032	0.778 ± 0.027	0.803 ± 0.017	Protein	0.500	
				Interaction	0.848	
<b>Abdominal fat weight (g)</b>						
Ex(-)	25.216 ± 1.293	34.111 ± 1.178	26.992 ± 1.270	Exercise	<0.001	10%, 20%, 40%: Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	10.496 ± 1.222	14.824 ± 1.109	13.666 ± 0.818	Protein	<0.001	Ex(-): 10%, 40%<20%
				Interaction	0.033	
<b>Abdominal fat weight (g/100g BW)</b>						
Ex(-)	5.975 ± 0.006	7.501 ± 0.239	6.167 ± 0.495	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	3.123 ± 0.004	4.237 ± 0.293	3.803 ± 0.235	Protein	<0.001	20%>10%, 40%
				Interaction	0.348	

.Values are expressed as means±SE.

Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Protein level interaction.

#### 4-3. 副腎重量

副腎重量を Fig.8 に示した. 有意な交互作用は認められず, 運動のみ有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p < 0.001$ ).



**Fig.8 Adrenal glands weight.**

Vertical bars indicate the standard error. 10%:10% protein group, 20%:20% protein group, 40%:40% protein group. \*\*\*:  $P < 0.001$  vs. sedentary group.

#### 4-4. 大腿骨長さ，幅および重量

大腿骨長さ，長径，短径および重量を Table 11 に示した．大腿骨の長さにおいて有意な交互作用は認められず，運動および飼料に有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ )．また，低タンパク質群が標準タンパク質群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )．長径および短径には有意な交互作用が認められた．単純主効果を検定した結果，飼料に関して，安静群において低タンパク質群が標準および高タンパク質群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.05$ )．大腿骨乾燥重量および灰化重量においては有意な交互作用は認められず，運動のみ有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )．反対に，体重補正した大腿骨乾燥重量および灰化重量は運動群が安静群よりも有意な高値を示した (各  $p<0.001$ )．

**Table 11. Femoral length and weights.**

	Diet group			Two-way ANOVA		Multiple comparison
	10%protein	20%protein	40%protein	(p value)		
Length(cm)						
Ex(-)	3.769 ± 0.015	3.812 ± 0.025	3.769 ± 0.021	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	3.671 ± 0.022	3.729 ± 0.015	3.721 ± 0.006	Protein	0.019	10%<20%
				Interaction	0.342	
Long width(cm)						
Ex(-)	0.448 ± 0.006	0.468 ± 0.004	0.479 ± 0.006	Exercise	0.273	10%; Ex(-)<Ex(+)
Ex(+)	0.468 ± 0.004	0.467 ± 0.004	0.473 ± 0.003	Protein	0.001	Ex(-); 10%<20%, 40%
				Interaction	0.016	
Short width(cm)						
Ex(-)	0.332 ± 0.009	0.354 ± 0.004	0.351 ± 0.003	Exercise	0.101	20%; Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	0.339 ± 0.003	0.337 ± 0.002	0.342 ± 0.003	Protein	0.028	Ex(-); 10%<20%, 40%
				Interaction	0.029	
Dry weight(g)						
Ex(-)	1.259 ± 0.013	1.345 ± 0.038	1.314 ± 0.023	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	1.189 ± 0.025	1.198 ± 0.020	1.238 ± 0.029	Protein	0.052	
				Interaction	0.199	
Dry weight(g/100g BW)						
Ex(-)	0.316 ± 0.006	0.296 ± 0.007	0.302 ± 0.006	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
Ex(+)	0.356 ± 0.008	0.343 ± 0.004	0.344 ± 0.006	Protein	<0.001	10%>20%, 40%
				Interaction	0.378	
Ash weight(g)						
Ex(-)	0.812 ± 0.042	0.832 ± 0.023	0.836 ± 0.017	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	0.734 ± 0.016	0.748 ± 0.013	0.760 ± 0.034	Protein	0.602	
				Interaction	0.986	
Ash weight(g/100g BW)						
Ex(-)	0.205 ± 0.010	0.183 ± 0.005	0.192 ± 0.005	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
Ex(+)	0.219 ± 0.005	0.214 ± 0.003	0.211 ± 0.008	Protein	0.201	
				Interaction	0.499	

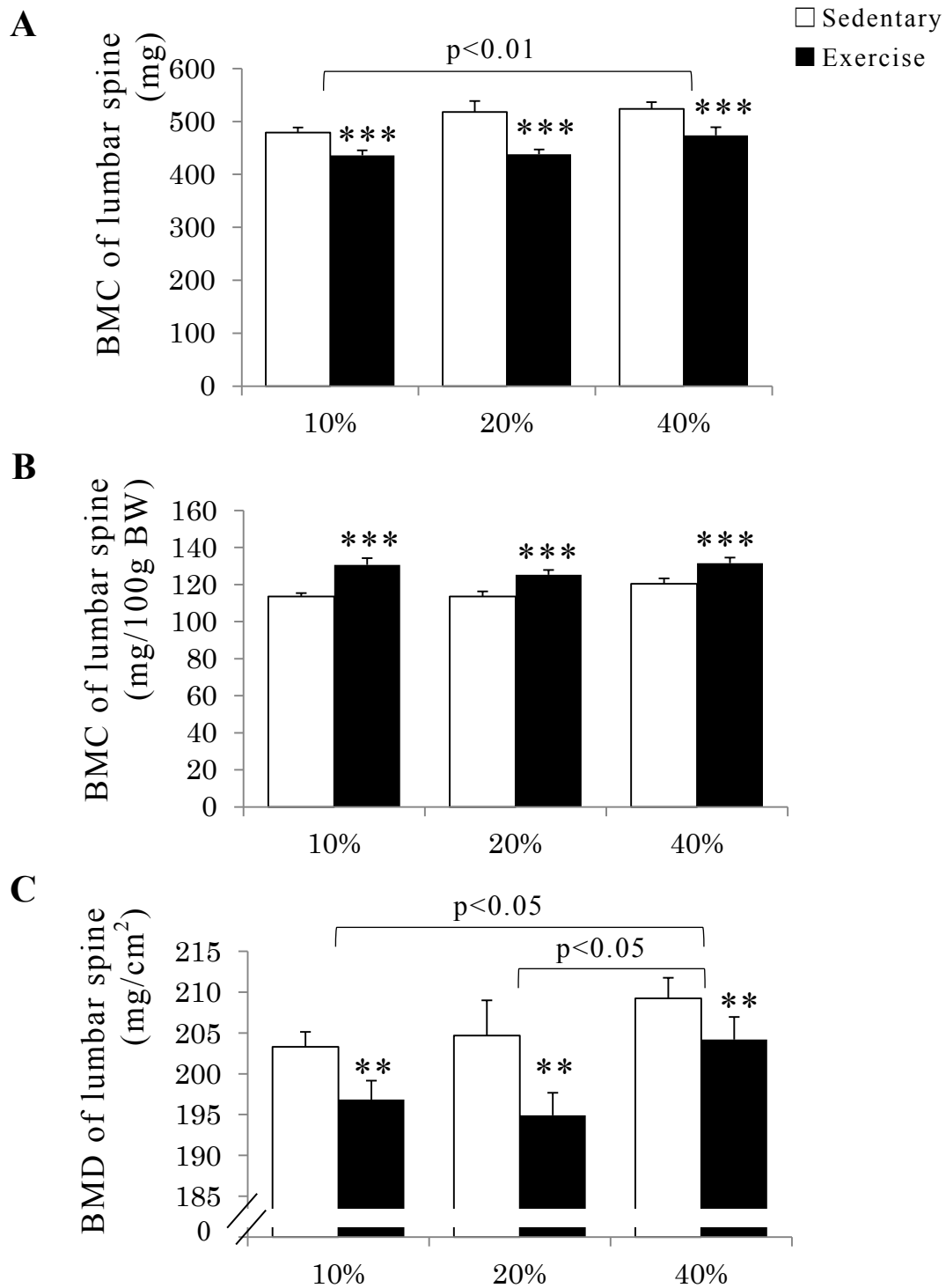
Values are expressed as means±SE.

Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Protein level interaction.



#### 4-5. 骨塩量および骨密度

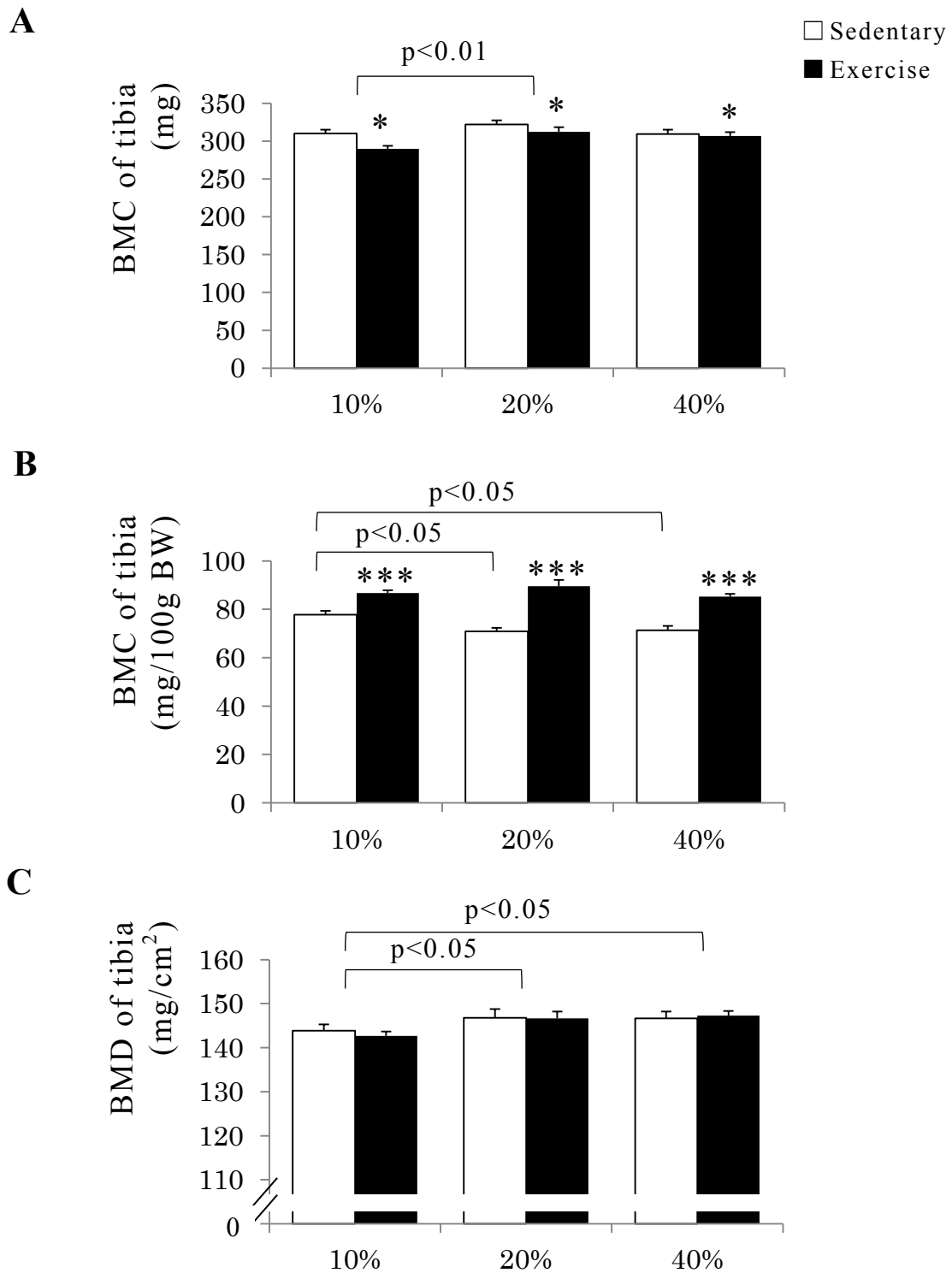
腰椎骨塩量 (A), 体重補正した腰椎骨塩量 (B) および腰椎骨密度 (C) を Fig.9 に示した. 腰椎骨塩量において有意な交互作用は認められず, 運動および飼料の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ ). また, 低タンパク質群が高タンパク質群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). 一方, 体重補正した腰椎骨塩量においては運動の主効果のみ認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ ). 腰椎骨密度においても交互作用は認められず, 運動および飼料の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な低値 ( $p<0.01$ ), 高タンパク質群がその他の飼料群と比較して有意な高値を示した (各  $p<0.05$ ).



**Fig.9 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of lumbar spine.**

A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The lumbar spine of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. 10%:10% protein group, 20%:20% protein group, 40%:40% protein group. \*\*: P<0.01 vs. sedentary group.

脛骨骨塩量 (A), 体重補正した脛骨骨塩量 (B) および脛骨骨密度 (C) を Fig.10 に示した. 脛骨骨塩量において有意な交互作用は認められず, 運動および飼料の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ ). また, 低タンパク質群は標準タンパク質群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). 一方, 体重補正した脛骨骨塩量においては有意な交互作用が認められ, 単純主効果を検定した結果, 運動に関して, どの飼料においても運動群が安静群よりも有意な高値を示した (各  $p<0.001$ ). また飼料に関して, 安静群間では低タンパク質群が標準および高タンパク質群よりも有意な高値を示した (各  $p<0.05$ ). 脛骨骨密度においては有意な交互作用は認められず, 飼料のみ有意な主効果がみられ, 低タンパク質群がその他の飼料群と比較して有意な低値を示した (各  $p<0.05$ ).



**Fig.10 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of Tibia.** A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The Tibia of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. 10%:10% protein group, 20%:20% protein group, 40%:40% protein group. \*: P<0.05, \*\*\*: P<0.001 vs. sedentary group

#### 4-6. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力および破断エネルギーの結果を Table 12 に示した。骨破断力においては有意な交互作用は認められず、運動および飼料の有意な主効果が認められ、安静群が運動群よりも有意な高値を ( $p<0.01$ )、低タンパク質群が他の飼料群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )。乾燥重量で補正した大腿骨破断力は有意な交互作用が認められ、単純主効果を検定した結果、運動に関して、高タンパク質群において運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )。また、飼料に関して、安静群間において低タンパク質群が標準および高タンパク質群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。さらに、運動群間においても低タンパク質群は標準タンパク質群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.01$ )。骨破断エネルギーは有意な交互作用が認められ、単純主効果を検定した結果、運動に関して、高タンパク質群において運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )。また、飼料に関して、安静群間において低タンパク質群が標準タンパク質群および高タンパク質群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.001$ ,  $p<0.01$ )。さらに、運動群間においても低タンパク質群および高タンパク質群は標準タンパク質群と比較して有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )。乾燥重量で補正した骨破断エネルギーにも有意な交互作用が認められ、単純主効果を検定した結果、飼料に関して、安静群間において低タンパク質群は標準タンパク質群および高タンパク質群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ )。運動群間においては標準タンパク質群が低タンパク質群および高タンパク質群よりも有意な高値を示した (各  $p<0.001$ )。また、運動に関して、標準タンパク質群の比較で運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ )。

**Table 12. Breaking force and energy of the femoral diaphysis.**

	Diet group			Two-way ANOVA			Multiple comparison
	10%protein	20%protein	40%protein	(p value)			
<b>Breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn)</b>							
Ex(-)	23.375 $\pm$ 1.052	28.185 $\pm$ 1.656	29.871 $\pm$ 0.926	Exercise	0.004		Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	21.963 $\pm$ 0.987	26.593 $\pm$ 1.094	25.710 $\pm$ 1.164	Protein	<0.001		10%<20%, 40%
				Interaction	0.113		
<b>Adjusted breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn/dry Wt.)<sup>a)</sup></b>							
Ex(-)	37.233 $\pm$ 1.431	41.905 $\pm$ 1.475	45.503 $\pm$ 1.005	Exercise	0.982		40%: Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	38.780 $\pm$ 1.463	44.414 $\pm$ 1.243	41.418 $\pm$ 1.293	Protein	<0.001		Ex(-): 10%<20%, 40%; Ex(+): 10%<20%
				Interaction	0.025		
<b>Breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg)</b>							
Ex(-)	17.937 $\pm$ 0.956	23.618 $\pm$ 2.247	22.116 $\pm$ 1.231	Exercise	0.231		40%: Ex(-)>Ex(+)
Ex(+)	16.276 $\pm$ 2.195	26.391 $\pm$ 0.805	18.729 $\pm$ 1.310	Protein	<0.001		Ex(-): 10%<20%, 40%; Ex(+): 10%, 40%<20%
				Interaction	0.038		
<b>Adjusted breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg/dry Wt.)<sup>a)</sup></b>							
Ex(-)	28.507 $\pm$ 1.295	36.598 $\pm$ 2.096	33.528 $\pm$ 1.564	Exercise	0.312		20%: Ex(-)<Ex(+)
Ex(+)	28.112 $\pm$ 1.863	44.093 $\pm$ 0.903	30.059 $\pm$ 1.315	Protein	<0.001		Ex(-): 10%<20%, 40%; Ex(+): 10%, 40%<20%
				Interaction	0.001		

a) Breaking force and energy adjusted to the dry weight. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Protein level interaction..

#### 4-7. 骨代謝マーカー

TRAP 活性値および BAP 活性値の結果を Table 13 に示した。TRAP において各群に有意な差はみられなかった。一方で、BAP には有意な交互作用は認められなかったが、運動の主効果の傾向が認められ、運動群が安静群よりも低値傾向を示した ( $p=0.051$ )。また、飼料の有意な主効果が認められ、低タンパク摂取群が標準タンパク摂取群よりも高値傾向 ( $p=0.095$ )、高タンパク摂取群よりも有意な高値 ( $p<0.001$ ) を示した。

**Table 13. Serum TRAP and BAP activity.**

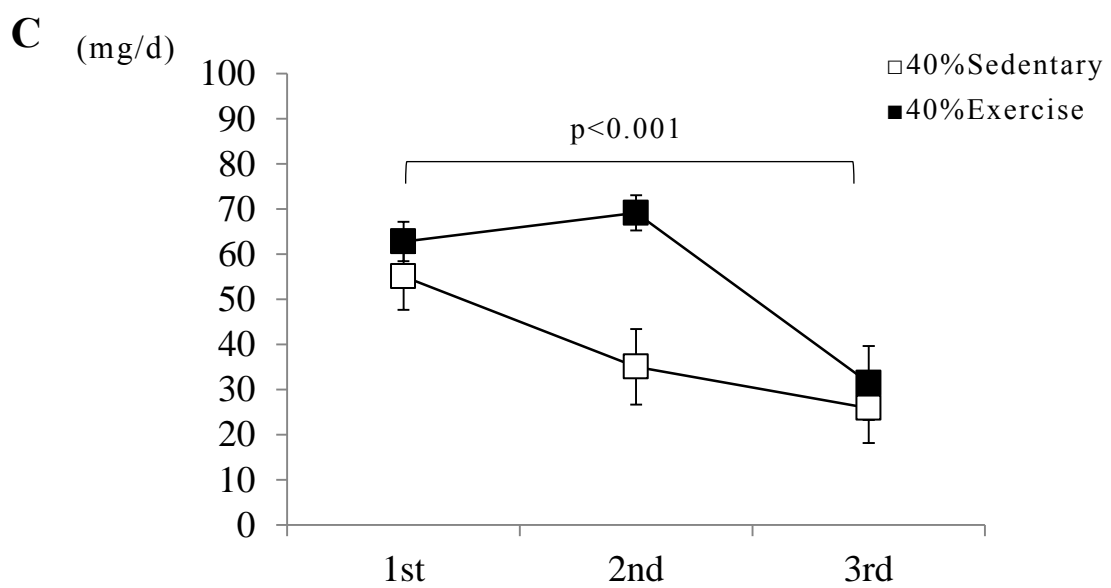
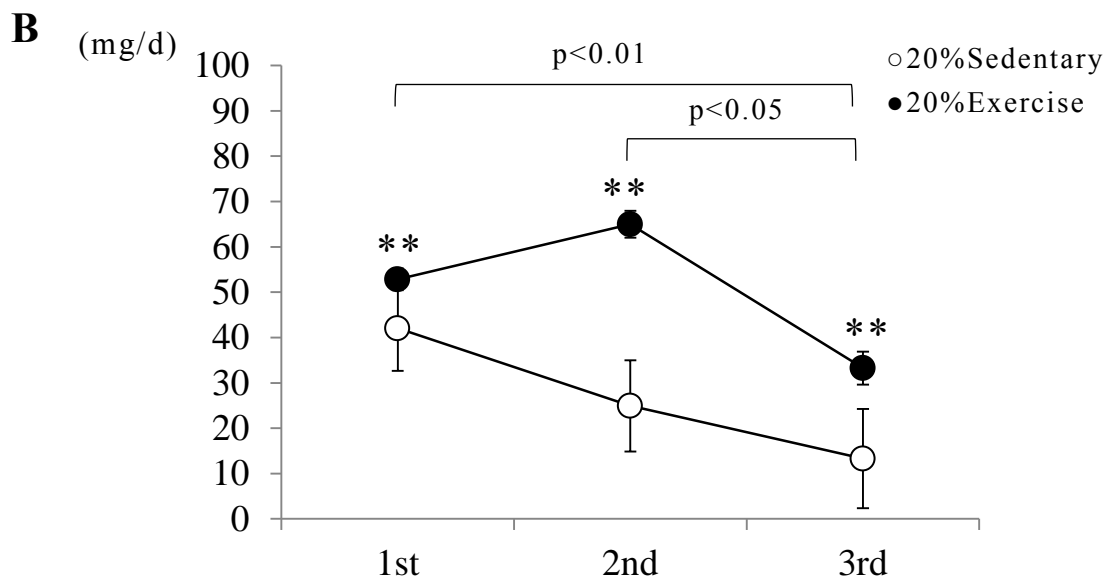
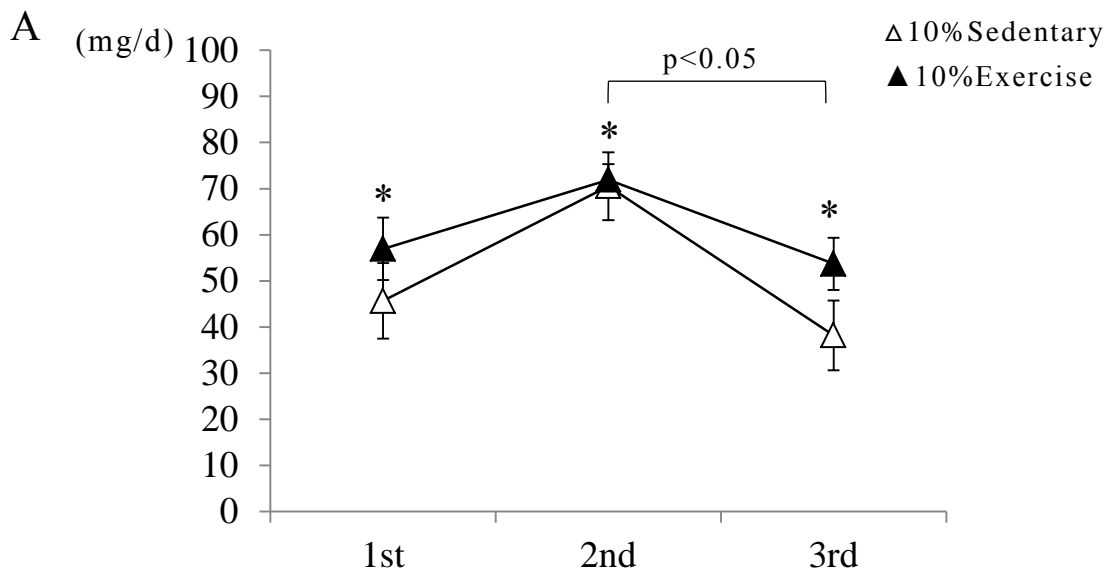
	Diet group			Two-way ANOVA (p value)	Multiple comparison
	10%protein	20%protein	40%protein		
TRAP(mmol/min)					
Ex(-)	29.541 ± 3.154	28.485 ± 3.411	24.555 ± 2.824	Exercise 0.133	
Ex(+)	24.995 ± 2.184	23.815 ± 2.341	23.703 ± 3.567	Protein 0.524 Interaction 0.694	
BAP(mmol/min)					
Ex(-)	100.770 ± 16.952	85.397 ± 6.400	59.865 ± 11.030	Exercise 0.051	
Ex(+)	86.111 ± 7.051	59.125 ± 6.306	53.442 ± 3.333	Protein 0.001 Interaction 0.595	10%>40%

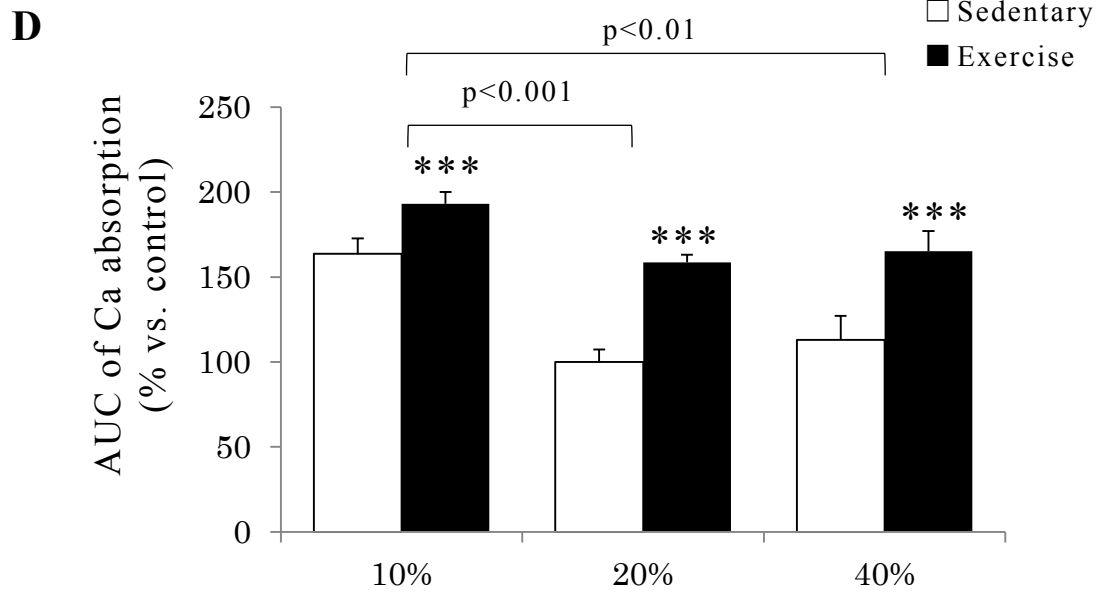
TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase activity, BAP: Bone-specific alkaline phosphatase activity. Values are expressed as means ±SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Protein level interaction.



#### 4-8. カルシウム吸収量

カルシウム出納試験の結果から腸管カルシウム吸収量の推移を Fig.11 に示した。統計分析は A: 低タンパク質群 (P10, PE10), B: 標準タンパク質群 (P20, PE20), C: 高タンパク質群 (P40, PE40) に分けて運動および測定時期を主効果とし繰り返しのある二元配置分散分析を行った。カルシウム吸収量はどの飼料群においても有意な交互作用は認められず、測定時期に有意な主効果が認められ、実験開始 2 か月後の解剖前 (3rd) に有意な低下を示した。運動は低タンパクおよび標準タンパク質群の分析で有意な主効果が認められ、運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.05$ ,  $p<0.01$ )。一方、高タンパク質群には運動の有意な主効果は認められなかった。さらにこの腸管カルシウム吸収量推移のグラフの直線下面積を P20 (Control) と比較した割合で表し、運動および飼料を主効果とし二元配置分散分析を行った (D)。その結果有意な交互作用は認められず、運動に有意な主効果が認められ、運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ )。また、飼料にも有意な主効果が認められ、カルシウム吸収量では低タンパク質群が標準タンパク質群 ( $p<0.001$ ) および高タンパク質摂群 ( $p<0.01$ ) よりも有意な高値を示した。





**Fig.11 Intestinal Ca absorption.**

Three studies were carried out to determine the Ca absorption. Feces were collected at three phases, 1st; the day following the grouping, 2nd; one month from the 1st measurement, 3rd; two months from the 1st measurement. A) 10% protein groups, B) 20% protein groups, C) 40% protein groups, D) an approximate AUC of Ca absorption (% vs. control; P20 group). Data were analyzed by Two-way repeated measures analysis of variance. Vertical bars indicate the standard error. P value indicates statistical significant difference among measurement period. \* P<0.05, \*\*P<0.01 vs. sedentary group.

## 5. 考察

成長期雄ラットを用い、過度な走運動トレーニングにより抑制された骨成長に対する高タンパク質摂取の影響を検討した。その結果、標準飼料の2倍（高）のタンパク質量の飼料において、研究課題1で示した標準タンパク質飼料と同様に運動群では安静群より骨成長が抑制されることが示された。低タンパク質摂取ではさらに骨サイズ、骨塩量、骨密度や骨強度の増加が抑制されたことから、骨成長に対するタンパク質摂取の必要性が示されたが、高タンパク質摂取にしても骨成長が促進されるわけではないことが明らかとなった。

骨の長さや幅など骨サイズはどの飼料においても運動群が安静群よりも低値でタンパク質摂取量の増加による骨サイズの成長促進効果は認められず（Table 11）、タンパク質を多くとればとるほど骨サイズが増大するわけではないことが明らかとなった。前述のように骨の長軸方向の成長には GH や IGF-I などの成長因子が強く影響している（Ganong *et al.*, 1985）。それに対してタンパク質摂取不足は IGF-I の分泌を減少させること、またタンパク質摂取量と IGF-I 値には正の相関関係があることが示されている（Yahya *et al.*, 1990）。本研究では直接 GH や IGF-I 値を測定していないが、それらの作用の指標として骨の長さおよび筋重量を分析したところ、骨の長さは低タンパク質群が標準タンパク質群より、大腿四頭筋重量は低タンパク質群が高タンパク質群よりも有意な低値を示し（Table 10, 11）、低タンパク質摂取により成長因子の作用が抑制される可能性を示唆した。一方で、高タンパク質摂取による標準タンパク質摂取以上の骨の長さや筋重量の成長は観察されず、タンパク質摂取量の増加は、体重増加抑制を伴う過度な走運動トレーニングが引き起こす骨の長さの成長抑制を改善しないことが示された。本研究と同様に成長期ラットを用い高タンパク質摂取の影響を検討した研究においても、高タンパク質摂取が脛骨の長さの成長を促進させる効果がないことを示唆しており（Ribeiro *et al.*, 2006）、この結果は本研究の結果を支持するものである。

また、先行研究ではタンパク質摂取量の違いは骨量にも影響を与え、低タンパク質摂取ではカルシウム代謝および骨代謝を変化させ、骨量を減少させることが示唆されている。低タンパク質摂取は腸管カルシウム吸収量の減少と低カルシウム尿症を引き起こすこと (Bourne, 1985)、また低タンパク質摂取によって骨吸収代謝が亢進することが報告されており (Kerstetter *et al.*, 1998)、実際に、ヒト (Garn *et al.*, 1981; Orwoll *et al.*, 1987; Wootton *et al.*, 1979) および実験動物 (Ferretti *et al.*, 1988; Reddy *et al.*, 1971; Shires *et al.*, 1980) において低タンパク質摂取と骨量減少との関連が示されている。このことからカルシウム代謝を正常に保ち、骨量を維持するためには十分なタンパク質摂取量の維持が必要であると考えられており、本研究においても低タンパク質摂取による骨量および骨強度の増加抑制が認められた (Fig.9, 10, Table 12)。一方で、本研究では低タンパク質摂取群において腸管カルシウム吸収量や尿中カルシウム排泄量の減少および骨吸収の亢進は認められなかった。(Table 13, Fig.11, appendix4)。この相違は、先行研究における低タンパク質飼料が飼料重量比 5%だったのに対し、本研究の低タンパク質飼料が飼料重量比 10%と制限が緩やかだったため、カルシウム代謝に対する影響が小さかったことが考えられる。しかし、本研究においても低タンパク質摂取群の骨サイズおよび骨量は他の飼料群よりも低値を示しており (Table 11, Fig.9, 10)、このことは低タンパク質摂取によって体重増加が抑制されたこと (荷重負荷の減少) が強く影響しているものと考えられる。過度な運動トレーニングにより体重増加および骨形成が抑制されるような状況においては、とくにタンパク質が不足しないよう適切な量を十分に摂取する必要があることを示している。

他方、高タンパク質摂取にしても骨成長促進効果は認められず、カルシウム代謝および骨代謝への明らかな影響も認められなかった結果と一致した。高タンパク質摂取については高齢者を対象とした実験において、尿中カルシウム排泄量の増加を引き起こし、骨量に負の影響をもたらすことがいくつか報告され

ている (Ellis *et al.*, 1972; Mazess *et al.*, 1974; Heaney *et al.*, 1982). しかし, 本研究では運動群においてのみ高タンパク質摂取による尿中カルシウム排泄量の増加が観察されたものの (appendix4), 骨量にはその影響が反映されず (Fig.9, 10), 骨代謝にも負の影響は認められなかった (Table 13). これまでの報告では, 加齢によって糸球体のろ過率が低下することが影響し, カルシウム再吸収量の減少が引き起こされ, それを補うため骨吸収が亢進し骨量が減少すると考えられている (Brenner *et al.*, 1982). このような高タンパク質摂取による腎機能への影響の確認のため, 本研究ではその指標として糸球体ろ過率 (クレアチニンクリアランス) を測定したが高タンパク質摂取群と標準タンパク質摂取群に有意な差はみられていない (appendix5). このことから, 成長期における高タンパク質摂取は腎機能やカルシウム代謝および骨量に明らかな負の影響を及ぼさないと考えられる. ヒトにおける先行研究においても, 小児にはタンパク質摂取量の増加に伴う尿中カルシウム排泄量の増加や負のカルシウム平衡がみられないという結果が報告されている (Hawks *et al.*, 1942). このことから, 成長期の高タンパク質摂取はカルシウム代謝および骨代謝に対して骨吸収を亢進させるような負の影響はないものの, 骨形成を亢進させるような効果もなく, そのため過度な運動トレーニングにより抑制された骨成長を促進させる効果もないことが示された. ただし, 骨の強さについては標準タンパク質摂取の運動群で大腿骨破断エネルギーが他の運動群よりも有意な高値を示し, 高タンパク質摂取群との差が認められた (Table 12). 骨強度の 70% は骨密度に, その他 30% は骨サイズやコラーゲン架橋等といった骨質の要因によって規定されている (NIH, 2001). 荷重骨である脛骨の骨密度においては標準タンパク質と高タンパク質摂取群は同等であったことから高タンパク質摂取はそれら骨質の要因になんらかの影響を及ぼし成長期の運動による骨強度増加の効果を抑制したのかもしれない. 骨強度に影響を与える骨質への影響については更なる検討が必要である. また, 非荷重骨である腰椎においては骨塩量および骨密度が

高タンパク質摂取によって増加したことから、非荷重骨に対してのタンパク質摂取増加による骨量増加効果の可能性およびそのメカニズムについては十分な検討が必要である。

以上より、成長期における過度な走運動トレーニングによって抑制された荷重骨のサイズや骨量の成長はタンパク質摂取量を増加させてもその成長抑制は改善されないことが示された。

## 第VI章 研究課題 3

### 「骨成長の抑制に対するコラーゲンペプチド摂取の効果」

#### 1. 背景

成長期における過度な走運動トレーニングは、食餌摂取および体重増加を抑制し、骨サイズおよび骨量増加の抑制を引き起こすことが示された（研究課題 1）。このことへの栄養の対策としてコラーゲンペプチド（以下コラーゲン）摂取に着目する。コラーゲンはおもに高齢者（または動物）を対象に骨量減少を抑制する効果をもたらすことが示されているが（Wu *et al.*, 2003）、成長期の骨を対象にコラーゲン摂取と運動との併用効果は示されていない。

#### 2. 目的

成長期の雄ラットを用い、コラーゲン摂取が過度な走運動トレーニングを行った骨に及ぼす影響を検討する。コラーゲンは骨構造の成分であり、それを足場にカルシウムが沈着し骨組織を形成することから、コラーゲン摂取により骨の有機成分および骨塩量・骨密度が増加することを仮説とし、飼料のタンパク質源であるカゼインの一部をコラーゲンに置き換えた飼料摂取の効果を検討する。

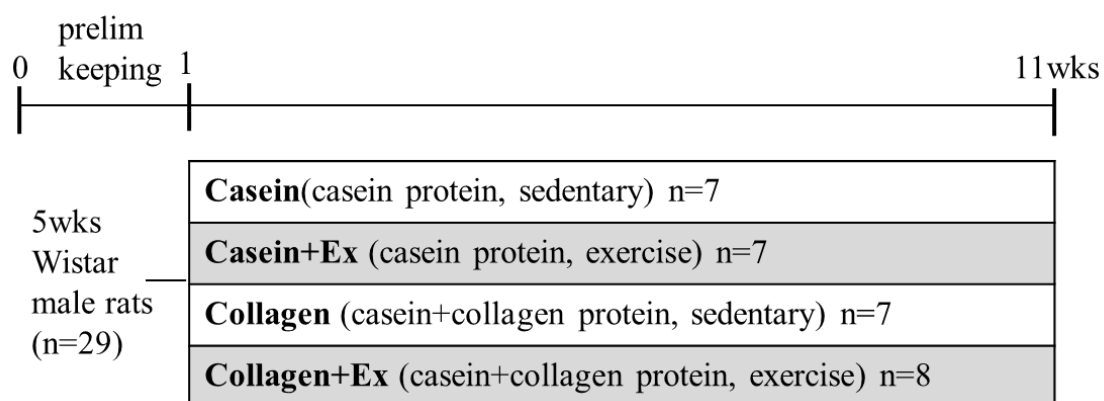
#### 3. 研究方法

##### 3-1. 被験動物および飼育条件

プロトコールを Fig.12 に示した。実験動物には 5 週齢の Wistar 系雄ラット（29 匹）を用いた。タンパク質源にはカゼインを用い、飼料中のタンパク質含量を飼料重量に対し 20%とした。また、コラーゲン摂取群は飼料中のカゼインの 3 割をマリンコラーゲンオリゴ CF（JNC 株式会社製、以下コラーゲン）（appendix6）に置き換えた。さらに各群を安静群（Casein 群，Collagen 群）と



運動群 (Casein+Ex 群, Collagen+Ex 群) に分け計 4 群とした. 飼料組成は Table 14 に示した. 飼育環境は研究課題 1 と同様に設定し, 飼料および脱イオン蒸留水は自由摂取させた. なお, 本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した.



**Fig.12 Experimental Protocol.**

Casein group (n=7), Casein+Ex group (n=7), Collagen group (n=7), Collagen+Ex group (n=8). At 6wks of age the exercise group began running on a treadmill.

**Table 14. Composition of experimental diets.**

Constituents	collagen(—)	collagen(+)
	weight ratio (%)	
Glucose monohydrate	60.4	60.3
Casein(Vitamin-free)	20.0	14.0
Hydrolyzed collagen	—	6.0
Cystine	0.2	0.2
Cottonseed oil	10.0	10.0
CaCO <sub>3</sub>	1.4879	1.4777
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.1424	0.9667
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.4621	1.2373
Roughage a)	3.0	3.0
Choline chloride	0.2	0.2
Water soluble Vitamin mixture b)	0.1	0.1
Oil soluble Vitamin mixture c)	c)	c)
Ca.P free salt mixture d)	2.0	2.0

a) ADVANTEC Cellulose Powder, no. 49020040.

b) The water soluble vitamin mixture (in %) : thiamine, 0.5 ; riboflavin, 0.5 ; pyridoxine, 0.5 ; calcium pantothenate, 2.8 ; nicotinamide, 2.0 ; inositol, 20.0 ; folic acid, 0.02 ; vitamin B12, 0.002 ; biotin, 0.01 ; and glucose monohydrate, 3.7. c)The rats received a supplement of fat-soluble vitamin in cotton seed oil three times a week which was supplied with 70 µg of β-carotene, 105 µg of 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 875µg of α to copherol and 525 I.U. of vitamin-D3. d) The Calcium (Ca) Phosphorus (P) free salt mixture (in %) : potassium chloride,57.7; sodium chloride,20.9;magnesium sulfate,anhydrous,17.9; copper( II )sulfate pentahydrate,0.078; sodium fluoride,0.113; cobalt(II )chloride,0.004; potassium iodide,0.01; magnese( II )sulfate pentahydrate,0.06; hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate,0.005; iron(II )sulfate heptahydrate,3.22; zinc sulfate heptahydrate,0.44. Diets were controlled at 0.6% Ca and 0.6% P.

### 3-2. 運動プロトコール

研究課題 1 と同様に実施した。

### 3-3. 試料採取

研究課題 1 と同様に実施した。

### 3-4. 大腿骨重量および長さ

研究課題 1 と同様に実施した。

### 3-5. 骨塩量および骨密度

研究課題 1 と同様に実施した。

### 3-6. 大腿骨破断強度

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-7. 骨代謝マーカー

研究課題 1 と同様に行った。

### 3-8. 統計処理

データはすべて mean±SE で表した。統計ソフトは SPSS (version 21.0 J; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用した。運動およびコラーゲン摂取を主効果として二元配値分散分析 (Two-way analysis of variance) を用い検討した。交互作用がみられた場合、グループ間の多重比較は Bonferroni を用い検定した。統計的有意水準は 5% とした。

## 4. 結果

### 4-1. 最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率

最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率を Table 15 に示した．実験開始時の体重は各群間に差はなかった．最終体重，体重増加量，飼料摂取量，摂取エネルギーおよび飼料効率においては有意な交互作用は認められず，運動のみ有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p < 0.001$ ）．

**Table 15. Final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency.**

			Two-way ANOVA		Multiple comparison
			(p value)		
Initial body weight (g)					
Casein	EX(-)	115.3 ± 0.9	Exercise	0.739	
	EX(+)	116.1 ± 1.5	Collagen	0.665	
Collagen	EX(-)	116.3 ± 1.6	Interaction	0.787	
	EX(+)	116.4 ± 1.8			
Final body weight (g)					
Casein	EX(-)	405.3 ± 5.5	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	342.0 ± 7.2	Collagen	0.250	
Collagen	EX(-)	391.0 ± 8.5	Interaction	0.350	
	EX(+)	340.5 ± 7.3			
Body weight gain (g/d)					
Casein	EX(-)	4.0 ± 0.1	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	3.1 ± 0.1	Collagen	0.189	
Collagen	EX(-)	3.7 ± 0.1	Interaction	0.259	
	EX(+)	3.0 ± 0.1			
Food intake (g/d)					
Casein	EX(-)	20.9 ± 0.2	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	18.2 ± 0.4	Collagen	0.215	
Collagen	EX(-)	20.2 ± 0.2	Interaction	0.147	
	EX(+)	18.3 ± 0.3			
Energy intake (kcal/d)					
Casein	EX(-)	78 ± 1	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	68 ± 1	Collagen	0.143	
Collagen	EX(-)	75 ± 1	Interaction	0.153	
	EX(+)	68 ± 1			
Food efficiency <sup>a)</sup>					
Casein	EX(-)	0.19 ± 0.00	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	0.17 ± 0.00	Collagen	0.224	
Collagen	EX(-)	0.18 ± 0.01	Interaction	0.784	
	EX(+)	0.16 ± 0.00			

a) Food efficiency was calculated by body weight gain (g/d)/Food intake (g/d). Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Collagen intake interaction.

#### 4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量

大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量を Table 16 に示した。各指標に有意な交互作用は認められず，体重補正した大腿四頭筋重量には運動の有意な主効果が認められた。運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ )。一方，腹腔内脂肪重量にも運動の有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )。

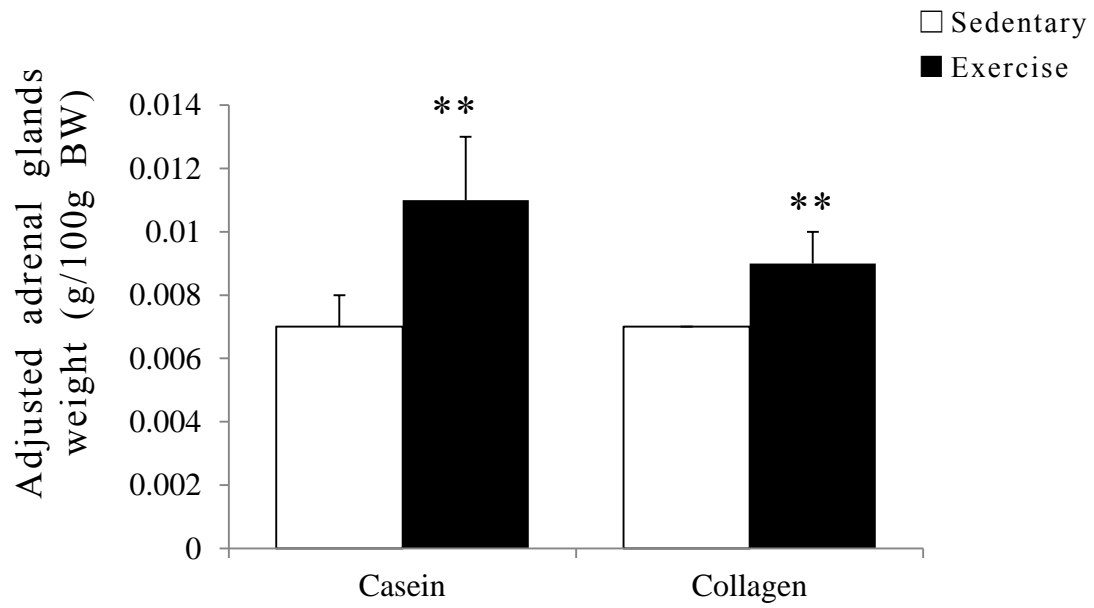
**Table 16. Muscle and fat weight.**

			Two-way ANOVA (p value)		Multiple comparison
Quadriceps femoris weight (g)					
Casein	EX(-)	2.660 ± 0.112	Exercise	0.913	
	EX(+)	2.731 ± 0.072	Collagen	0.498	
Collagen	EX(-)	2.812 ± 0.135	Interaction	0.432	
	EX(+)	2.719 ± 0.111			
Quadriceps femoris weight (g/100g BW)					
Collagen(-)	EX(-)	0.657 ± 0.031	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
Casein	EX(+)	0.792 ± 0.009	Collagen	0.159	
	EX(-)	0.719 ± 0.030	Interaction	0.253	
Collagen	EX(+)	0.798 ± 0.024			
Abdominal fat weight (g)					
Casein	EX(-)	27.267 ± 2.393	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	18.609 ± 0.072	Collagen	0.082	
Collagen	EX(-)	25.424 ± 1.203	Interaction	0.483	
	EX(+)	14.374 ± 1.936			
Abdominal fat weight (g/100g BW)					
Casein	EX(-)	6.697 ± 0.517	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	5.377 ± 0.302	Collagen	0.087	
Collagen	EX(-)	6.494 ± 0.241	Interaction	0.218	
	EX(+)	4.182 ± 0.511			

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Collagen intake interaction.

#### 4-3. 副腎重量

体重補正した副腎重量を Fig.13 に示した. 有意な交互作用は認められず, 運動のみ有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ ).



**Fig.13 Adrenal glands weight.**

Vertical bars indicate the standard error. \*\*:  $P<0.01$  vs. sedentary group.

#### 4-4. 大腿骨長さ，幅および重量

大腿骨長さ，幅および重量を Table 17 に示した．大腿骨の長さには有意な交互作用は認められず，運動のみ有意な主効果が認められ，運動群が安静群と比較して有意な低値を示した ( $p<0.01$ )．また，大腿骨乾燥重量および灰化重量においても有意な交互作用は認められず，運動の有意な主効果が認められ，乾燥重量では運動群が安静群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ )．反対に，体重補正した大腿骨乾燥重量および灰化重量では運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p=0.001$ ,  $p<0.001$ )．また，体重補正した大腿骨乾燥重量にはコラーゲン摂取の有意な主効果が認められ，コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ )．同様に体重補正した灰化重量においてもコラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも高値傾向を示した ( $p=0.095$ ) を示した．



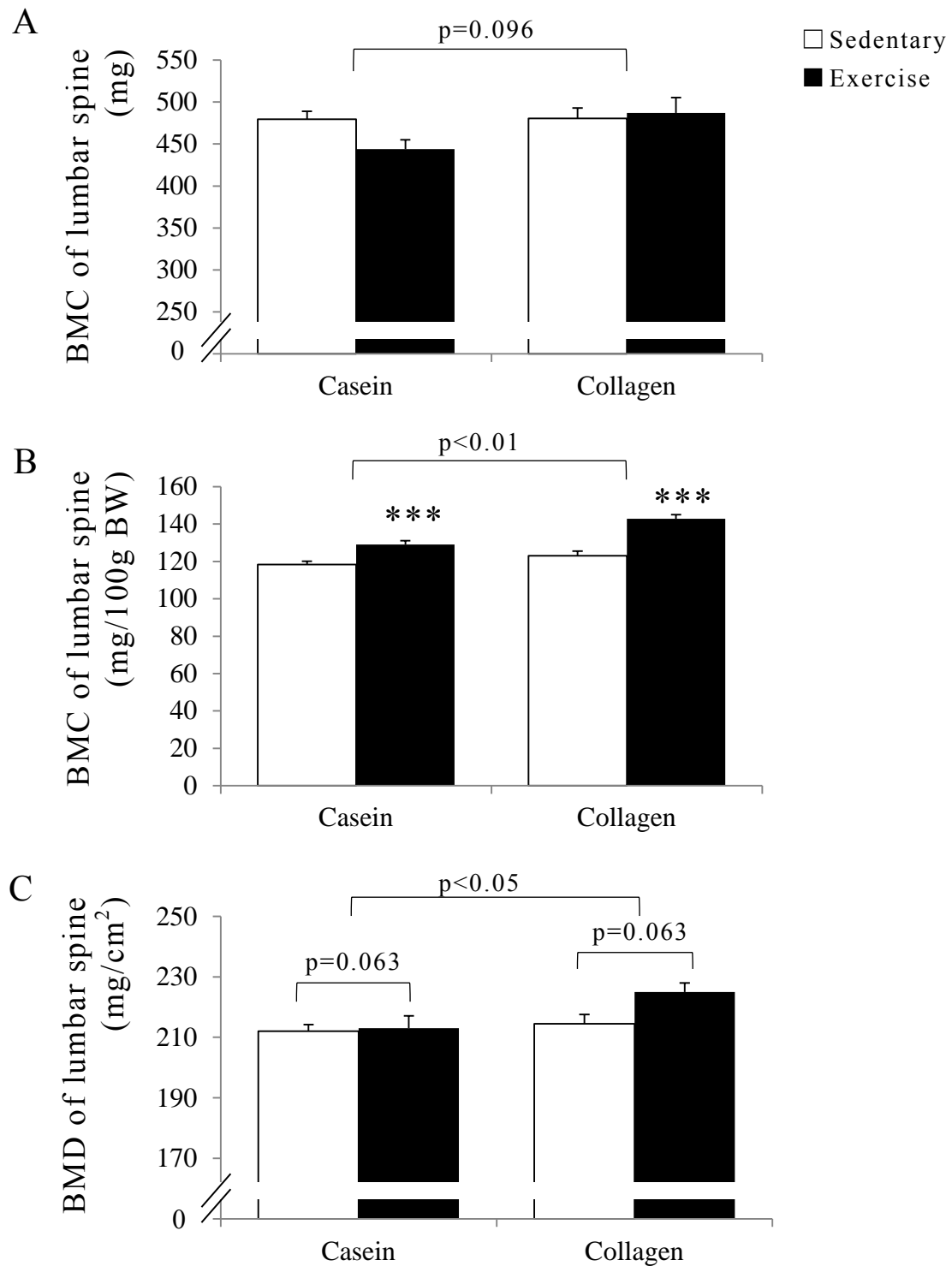
**Table 17. Femoral length and weights.**

			Two-way ANOVA (p value)		Multiple comparison
<b>Length(cm)</b>					
Casein	EX(-)	3.710 ± 0.014	Exercise	0.004	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	3.623 ± 0.023	Collagen	0.216	
Collagen	EX(-)	3.699 ± 0.017	Interaction	0.109	
	EX(+)	3.675 ± 0.018			
<b>Long Width(cm)</b>					
Collagen(-)	EX(-)	0.440 ± 0.005	Exercise	0.848	
	EX(+)	0.438 ± 0.004	Collagen	0.266	
Collagen(+)	EX(-)	0.444 ± 0.006	Interaction	0.722	
	EX(+)	0.445 ± 0.005			
<b>Short Width(cm)</b>					
Collagen(-)	EX(-)	0.352 ± 0.004	Exercise	0.169	
	EX(+)	0.345 ± 0.003	Collagen	0.328	
Collagen(+)	EX(-)	0.346 ± 0.004	Interaction	0.591	
	EX(+)	0.343 ± 0.003			
<b>Dry weight(g)</b>					
Casein	EX(-)	0.6363 ± 0.0088	Exercise	0.013	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	0.6031 ± 0.0110	Collagen	0.152	
Collagen	EX(-)	0.6450 ± 0.0142	Interaction	0.540	
	EX(+)	0.6247 ± 0.0088			
<b>Dry weight(g/100g BW)</b>					
Casein	EX(-)	0.1570 ± 0.0021	Exercise	0.001	Ex(-)<Ex(+) Collagen(-)<Collagen(+)
	EX(+)	0.1751 ± 0.0027	Collagen	<0.001	
Collagen	EX(-)	0.1649 ± 0.0021	Interaction	0.851	
	EX(+)	0.1838 ± 0.0028			
<b>Ash weight(g)</b>					
Casein	EX(-)	0.3981 ± 0.0109	Exercise	0.193	
	EX(+)	0.3793 ± 0.0117	Collagen	0.572	
Collagen	EX(-)	0.3998 ± 0.0128	Interaction	0.686	
	EX(+)	0.3899 ± 0.0108			
<b>Ash weight(g/100g BW)</b>					
Casein	EX(-)	0.0982 ± 0.0016	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
	EX(+)	0.1101 ± 0.0026	Collagen	0.095	
Collagen	EX(-)	0.1022 ± 0.0016	Interaction	0.896	
	EX(+)	0.1147 ± 0.0034			

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Collagen intake interaction.

#### 4-5. 骨塩量および骨密度

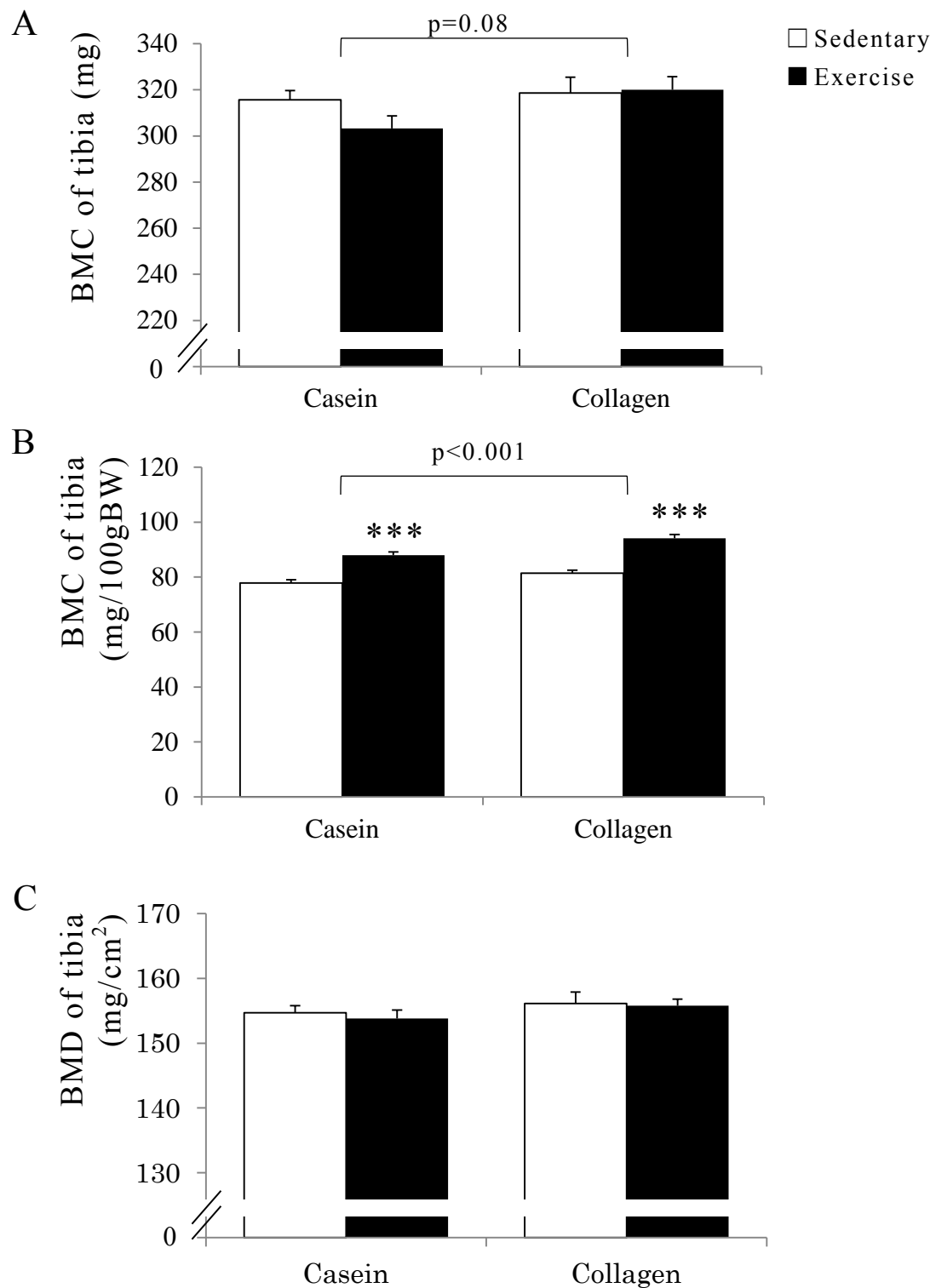
腰椎骨塩量 (A), 体重補正した腰椎骨塩量 (B) および腰椎骨密度 (C) を Fig.14 に示した. これらに運動およびコラーゲン摂取の有意な交互作用は認められなかった. 腰椎骨塩量においてはコラーゲン摂取の主効果の傾向が認められ, コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも高値傾向を示した ( $p=0.096$ ). 体重補正した腰椎骨塩量および腰椎骨密度においては運動の有意な主効果またはその傾向が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値または高値傾向を示した ( $p<0.001$ ,  $p=0.063$ ). またどちらにもコラーゲン摂取の有意な主効果が認められ, コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ ,  $p<0.05$ ).



**Fig.14 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of lumbar spine.**

A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The lumbar spine of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P < 0.01$  vs. sedentary group.

脛骨骨塩量 (A), 体重補正した脛骨骨塩量 (B) および脛骨骨密度 (C) を Fig.15 に示した. これらに運動およびコラーゲン摂取の有意な交互作用は認められなかった. 脛骨骨塩量においては腰椎と同様にコラーゲン摂取の主効果の傾向が認められ, コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも高値傾向を示した ( $p=0.08$ ). さらに体重補正した脛骨骨塩量においても腰椎と同様に運動およびコラーゲン摂取の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示し ( $p<0.001$ ), コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ). 脛骨骨密度には各群間に有意な差はみられなかった.



**Fig.15 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of Tibia.** A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The tibia of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P < 0.01$  vs. sedentary group.

#### 4-6. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力および破断エネルギーの結果を Table 18 に示した。これらの指標において各群間に有意な差はみられなかった。

**Table 18. Breaking force and energy of the femoral diaphysis.**

			Two-way ANOVA (p value)	
<b>Breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn)</b>				
Casein	EX(-)	29.358 $\pm$ 1.396	Exercise	0.490
	EX(+)	26.702 $\pm$ 0.928	Collagen	0.757
Collagen	EX(-)	27.124 $\pm$ 1.304	Interaction	0.090
	EX(+)	28.253 $\pm$ 0.798		
<b>Breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn/dry Wt.)<sup>a</sup></b>				
Casein	EX(-)	46.010 $\pm$ 1.922	Exercise	0.533
	EX(+)	44.234 $\pm$ 1.190	Collagen	0.226
Collagen	EX(-)	41.576 $\pm$ 1.580	Interaction	0.068
	EX(+)	45.153 $\pm$ 1.075		
<b>Breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg)</b>				
Casein	EX(-)	20.301 $\pm$ 1.598	Exercise	0.447
	EX(+)	19.430 $\pm$ 1.116	Collagen	0.323
Collagen	EX(-)	19.752 $\pm$ 1.671	Interaction	0.170
	EX(+)	22.751 $\pm$ 1.096		
<b>Breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg/dry Wt.)<sup>a</sup></b>				
Casein	EX(-)	31.732 $\pm$ 2.364	Exercise	0.133
	EX(+)	32.073 $\pm$ 1.57	Collagen	0.484
Collagen	EX(-)	30.452 $\pm$ 2.089	Interaction	0.182
	EX(+)	36.135 $\pm$ 1.714		

a) Breaking force and energy adjusted to the dry weight. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Collagen intake interaction.

#### 4-7. 骨代謝マーカー

TRAP 活性値および BAP 活性値の結果を Table 19 に示した。TRAP においてはコラーゲン摂取の主効果の傾向が認められ、コラーゲン摂取群がカゼイン摂取群よりも低値傾向を示した (p=0.072)。BAP においては各群間に有意な差はみられなかった。

**Table 19. Serum TRAP activity and BAP.**

			Two-way ANOVA (p value)	
TRAP(mmol/min)				
Casein	EX(-)	19.39 ± 2.11	Exercise	0.224
	EX(+)	24.59 ± 3.36	Collagen	0.072
Collagen	EX(-)	17.75 ± 0.97	Interaction	0.271
	EX(+)	18.01 ± 2.20		
BAP(mmol/min)				
Casein	EX(-)	34.38 ± 14.05	Exercise	0.522
	EX(+)	48.16 ± 10.98	Collagen	0.263
Collagen	EX(-)	29.24 ± 7.13	Interaction	0.516
	EX(+)	29.15 ± 8.48		

TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase activity, BAP: Bone-specific alkaline phosphatase activity. Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Collagen intake interaction.

## 5. 考察

成長期雄ラットを用い、過度な走運動トレーニングにより抑制された骨成長に対するコラーゲン摂取の影響を検討した。その結果、コラーゲン摂取によって骨量増加抑制の影響を緩和する傾向が示された。

研究課題 1 および 2 と同様に、タンパク質源にカゼインのみを使用した場合、過度な走運動トレーニングは摂食量および体重増加を抑制し成長期ラットの腰椎および脛骨の骨量増加も抑制したが、コラーゲン摂取によって骨量増加傾向が認められ、その影響が緩和されることが示唆された (Fig.14,15)。

Guillerminet らは、卵巣摘出ラット (OVX ラット) を用いた実験で豚由来のコラーゲン摂取が OVX ラットの骨密度減少を抑制することを報告している (Guillerminet *et al.*, 2011)。また、溝口らも同様に OVX ラットを用いた実験で魚由来のコラーゲン摂取が OVX ラットの大腿骨骨密度および骨強度の減少を抑制することを示した (Mizoguchi *et al.*, 2006)。これらは高齢期の骨量減少を抑制するためのコラーゲン摂取効果を検討した研究だが、本研究では成長期ラットにおいてコラーゲン摂取による骨量増加効果傾向が認められ、コラーゲン摂取は成長期における骨量増加にも効果的である可能性が示された。一般的に卵巣を摘出したラットは閉経後女性の骨粗鬆症モデルとして用いられ、その骨代謝動態は骨吸収、骨形成ともに亢進した高骨代謝回転型であるが、骨吸収が優位となり骨量が減少する (千勝ら, 1999)。溝口らはコラーゲン摂取による骨量減少抑制効果とともに、骨形成マーカーである血清オステオカルシン (osteocalcin: OC) 値が、コラーゲン摂取の OVX ラットにおいて基準食摂取の OVX ラットよりも高値を示したことも観察している (Mizoguchi *et al.*, 2006)。このことから OVX ラットにみられたコラーゲン摂取の効果は骨形成を亢進させ骨代謝動態を改善した結果であると考えられる。一方で、成長期の骨代謝は骨吸収および骨形成のどちらも亢進するが、骨形成が優位となり骨量が増加する (千勝ら, 1999)。本研究の成長期の運動群では研究課題 1 で示したように



骨吸収は安静群と同等だが、骨形成は低値を示しており、成長期に充進する骨形成が過度な運動トレーニングにより抑制されていたと考えられる。このことに対し研究課題3においてコラーゲン摂取による影響を検討した。しかしながら、研究課題3においては研究課題1および2の骨代謝の結果と異なり、運動群における骨形成の抑制は認められなかった (Table 19)。加えて、コラーゲン摂取による骨量増加傾向が認められたにも関わらず、骨代謝の結果では骨形成に対する効果は認められず (Table 19)、骨量の結果と対応した結果は得られなかった。これは研究課題1から導いた前提と異なる結果だが、これには研究課題3における安静群の最終体重が研究課題1および2と比較して低値で (Table 15)、運動群との差が少なかったことが影響している可能性が考えられる。また、実際に骨の長さおよび骨量にはこれまでの結果と同様に過度な運動トレーニングによる成長抑制が観察されていることから、測定した解剖時以前の骨代謝においては運動トレーニングによる骨形成の抑制やコラーゲン摂取の影響がみられたかもしれない。本研究では TRAP および BAP 活性を解剖時に採取した血液サンプルから測定した。解剖時のラットは 16 週齢で、著しい成長期は過ぎた時期の骨代謝を反映しており、コラーゲン摂取の骨代謝への影響は比較的早い時期にみられていた可能性も考えられる。予備的に行った実験の結果では、本研究の半分の実験期間 (4 週間) の時点でのラットの骨代謝動態は、運動トレーニングによる骨形成抑制の傾向と、コラーゲン摂取がそれを緩和する傾向が観察されており、コラーゲン摂取による骨形成充進の可能性が示唆されている。骨代謝動態への影響については、試験期間途中の骨代謝マーカーを測定するなどしてし、今後詳細に評価する必要がある。

このようなコラーゲン摂取による骨量増加の可能性にはいくつかのメカニズムが考えられる。前述の溝口らは、コラーゲン摂取した OVX ラットにおいてコラーゲン飼料に多く含まれるヒドロキシプロリンやグリシンの血清中濃度が増加したと報告している (Mizoguchi *et al.*, 2006)。グリシンやヒドロキシ

プロリンは骨組織を構成する I 型コラーゲンの約 60% を占めるアミノ酸であることから (Hulmes et al., 1973), 摂取したコラーゲンがアミノ酸に分解・吸収され, 体内で骨組織の材料が増加したことで骨形成が進み, 骨密度が増加した可能性が示唆されている (Mizoguchi et al., 2006). 他方, *in vitro* の実験ではコラーゲンペプチドとしての骨形成効果 (機能としての効果) が報告されている. Guillerminet らは, 牛・豚および魚由来のコラーゲンを添加した骨芽細胞において骨形成マーカーである ALP 活性がコラーゲン添加によって増加したことを示している (Guillerminet F et al., 2010). ALP は細胞膜にある糖タンパク質で, 骨組織に存在する骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) はヒドロキシアパタイト結晶の形成を阻害するピロリン酸を加水分解することにより骨の石灰化を促進すると考えられている (尾上ら, 2007). また Tsuruoka らも同様にコラーゲン添加によって骨芽細胞における I 型コラーゲン産生量が増加することを報告している (Tsuruoka et al., 2007). 彼らはその効果の要因として, コラーゲンによる Osterix (骨芽細胞分化の早期に発現が促進され分化を誘導する Runx2 の下流にあると考えられている) の発現増加を示している. これらの報告は, 分解されていないコラーゲンが直接骨芽細胞に作用するとその分化・増殖を誘導する効果 (機能としての効果) を発揮することを示唆するものである. 生体においては, コラーゲンなどポリペプチドはアミノ酸に分解され吸収されるのが一般的だが, 近年ではコラーゲンペプチドはアミノ酸まで分解されずにペプチドのまま吸収される可能性や (Oesser et al., 1999), 吸収されたペプチドは骨や皮膚など細胞に取り込まれることが報告されている (大和, 2004). 本研究において摂取したコラーゲンがどのように消化吸収されたのかは明らかでないが, 一部分解されずに吸収されていたとすれば骨芽細胞に対してこのような機能的な効果を発揮した可能性も考えられる. また, 研究課題 2 において高タンパク質摂取による骨量増加の明らかな効果は示されなかったことをふまえると, グリシンやヒドロキシプロリンなど骨組織の材料となるアミノ酸の

摂取が増加した効果よりも、コラーゲンとして吸収され骨局所に直接的に機能したことで骨量が増加した可能性は十分に考えられる。今後はコラーゲン経口摂取とその代謝に着目し、骨芽細胞への作用を詳細に検討する必要がある。

他方、骨の長さにはコラーゲン摂取の効果はみられず、これまでの研究課題の結果と同様に、過度な運動トレーニングによる骨成長抑制の影響が認められた。前述のように運動群において骨の長さの成長が抑制されたのは、長期の過度な走運動トレーニングの実施によって引き起こされた運動ストレスおよび食餌摂取量の不足が GH や IGF-I などの成長因子に抑制的に作用したためであると考えられるが、この作用に対してコラーゲン摂取は関与しないまたは影響が少ないと推察される。実際、コラーゲン摂取によって GH や IGF-I など成長因子の全身に対する作用が促進されることがあれば、骨のみならず筋の発達にも効果的であると考えられるが、大腿四頭筋重量の結果にコラーゲン摂取の効果はみられていない (Table 16)。

このように、本研究では成長期における体重増加を抑制するような過度な運動トレーニングが引き起こす骨成長抑制に対して、コラーゲン摂取は骨量増加抑制の緩和に寄与する可能性が示された。本実験ではコラーゲンペプチドの飼料中含有量を成長期ラットの骨密度に増加効果が確認された先行研究における摂取量を参考に設定した (Wu *et al.*, 2003)。研究課題 2 において高タンパク質摂取による骨成長促進効果は得られなかったが、骨量増加効果の可能性が示されたコラーゲン摂取においては多くとることで骨の材料として、または骨形成を促進させる機能的な役割を果たしさらに骨量を増加させるかもしれない。そこで研究課題 3 の補足として、過度な走運動トレーニングを行わせた成長期ラットの骨に対してコラーゲン摂取量の増加がさらなる骨量増加をもたらすかどうかを検討した。

## 第V章 研究課題 3-2

### 「コラーゲンペプチド摂取量増加の効果」

#### 1. 背景

成長期における過度な走運動トレーニングは体重増加を抑制し運動ストレスを惹起させ、骨成長に対する運動効果を抑制することが示された（研究課題 1）。また、このことへの栄養の改善策としてコラーゲン摂取が骨サイズの増大促進効果はないものの、骨量増加に有効である可能性が示された（研究課題 3-1）。摂取タンパク質源にカゼインのみを用いた飼料では高タンパク質摂取による骨成長促進効果は認められなかったが（研究課題 2）、骨量増加効果示されたコラーゲンペプチドを含む飼料ではその摂取量の増加が骨量増加効果を高めるかもしれない。

#### 2. 目的

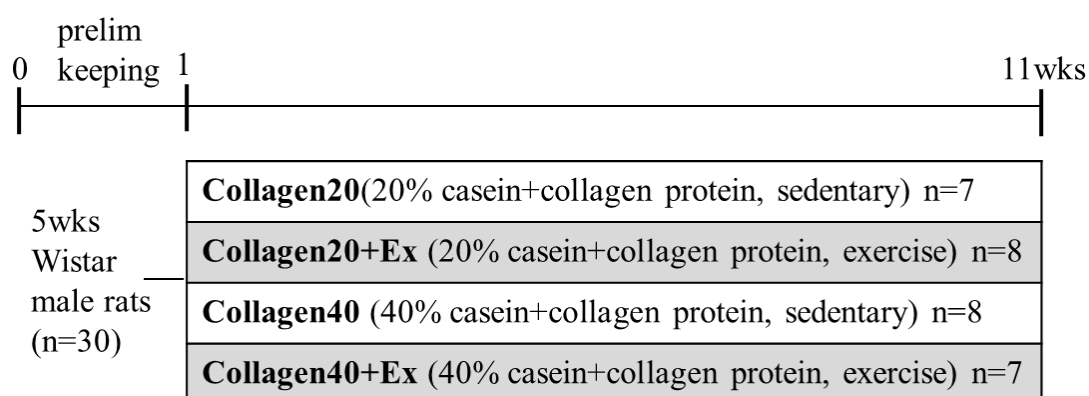
成長期の雄ラットを用い、コラーゲン摂取の増加が過度な中強度走運動トレーニングを行った骨形成に及ぼす影響を検討する。コラーゲンを含む飼料ではその摂取量の増加によって骨量効果が高まることを仮説とし、コラーゲンを含む高タンパク質飼料とコラーゲンを含む標準タンパク質飼料の骨量への効果の違いを検討する。

#### 3. 研究方法

##### 3-1. 被験動物および飼育条件

プロトコールを Fig.16 に示した。実験動物には 5 週齢の Wistar 系雄ラット（30 匹）を用いた。タンパク質源にはカゼインおよびマリンコラーゲンオリゴ CF（JNC 株式会社製，以下コラーゲン）（appendix6）を用い，飼料中のタンパク質含量を飼料重量に対し 20%または 40%とした。各飼料のタンパク質重量の

3割をコラーゲンに置き換えた。各群を安静群（Collagen20群，Collagen40群）と運動群（Collagen20+Ex群，Collagen40+Ex群）に分け計4群とした。飼料組成はTable 20に示した。飼育環境は研究課題1と同様に設定し，飼料および脱イオン蒸留水は自由摂取させた。なお，本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。



**Fig.16 Experimental Protocol.**

Collagen20 group (n=7), Collagen20+Ex group (n=8), Collagen40 group (n=8), Collagen40+Ex group (n=7). At 6wks of age the exercise group began running on a treadmill.

**Table 20. Composition of experimental diets.**

Constituents	20% protein	40% protein
	weight ratio (%)	
Glucose monohydrate	60.3	40.6
Casein(Vitamin-free)	14.0	28.0
Hydrolyzed collagen	6.0	12.0
Cystine	0.2	0.2
Cottonseed oil	10.0	10.0
CaCO <sub>3</sub>	1.4777	1.4734
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9667	1.0636
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2373	1.3613
Roughage a)	3.0	3.0
Choline chloride	0.2	0.2
Water soluble Vitamin mixture b)	0.1	0.1
Oil soluble Vitamin mixture	c)	c)
Ca.P free salt mixture d)	2.0	2.0

a) ADVANTEC Cellulose Powder, no. 49020040.

b) The water soluble vitamin mixture (in %) : thiamine, 0.5 ; riboflavin, 0.5 ; pyridoxine, 0.5 ; calcium pantothenate, 2.8 ; nicotinamide, 2.0 ; inositol, 20.0 ; folic acid, 0.02 ; vitamin B12, 0.002 ; biotin, 0.01 ; and glucose monohydrate, 3.7. c)The rats received a supplement of fat-soluble vitamin in cotton seed oil three times a week which was supplied with 70 µg of β-carotene, 105 µg of 2-methyl-1,4-naphthoquinone, 875µg of α to copherol and 525 I.U. of vitamin-D3. d) The Calcium (Ca) Phosphorus (P) free salt mixture (in %) : potassium chloride,57.7; sodium chloride,20.9;magnesium sulfate,anhydrous,17.9; copper( II )sulfate pentahydrate,0.078; sodium fluoride,0.113; cobalt( II )chloride,0.004; potassium iodide,0.01; magnese( II )sulfate pentahydrate,0.06; hexaammonium heptamolybdate tetrahydrate,0.005; iron( II )sulfate heptahydrate,3.22; zinc sulfate heptahydrate,0.44. Diets were controlled at 0.6% Ca and 0.6% P.

### 3-2. 運動プロトコール

研究課題 1 と同様に実施した.

### 3-3. 試料採取

研究課題 1 と同様に実施した.

### 3-4. 大腿骨重量および長さ

研究課題 1 と同様に実施した.

### 3-5. 骨塩量および骨密度

研究課題 1 と同様に実施した.

### 3-6. 大腿骨破断強度

研究課題 1 と同様に行った.

### 3-7. 骨代謝マーカー

研究課題 1 と同様に行った.

### 3-8. 統計処理

データはすべて mean±SE で表した. 統計ソフトは SPSS (version 21.0 J; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) を使用した. 運動およびコラーゲン摂取量を主効果として二元配値分散分析 (Two-way analysis of variance) を用い検討した. 交互作用がみられた場合, グループ間の多重比較は Bonferroni を用い検定した. 統計的有意水準は 5%とした.

## 4. 結果

### 4-1. 最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率

最終体重，体重増加量，飼料摂取量，飼料効率を Table 21 に示した．実験開始時の体重は各群間に差はなかった．また，どの指標にも有意な交互作用は認められなかった．最終体重，体重増加量には運動のみ有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p < 0.001$ ）．また，飼料摂取量には運動および飼料の有意な交互作用が認められ，単純主効果を検定したところ，運動群が安静群よりも有意な低値（ $p < 0.001$ ），40%群は20%群よりも有意な低値を示した（ $p < 0.001$ ）．一方，摂取エネルギーおよび飼料効率においては運動のみ有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した（各  $p < 0.001$ ）．



**Table 21. Final body weight, body weight gain, food intake, and food efficiency.**

			Two-way ANOVA		Multiple comparison
			(p value)		
<b>Initial body weight (g)</b>					
20%	EX(-)	116.3 ± 1.6	Exercise	0.718	
	EX(+)	116.4 ± 1.8	Diet	0.862	
40%	EX(-)	116.6 ± 1.2	Interaction	0.669	
	EX(+)	115.6 ± 0.6			
<b>Final body weight (g)</b>					
20%	EX(-)	391.0 ± 8.5	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	340.5 ± 7.3	Diet	0.760	
40%	EX(-)	391.5 ± 5.4	Interaction	0.706	
	EX(+)	335.7 ± 8.7			
<b>Body weight gain (g/d)</b>					
20%	EX(-)	3.7 ± 0.1	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	3.0 ± 0.1	Diet	0.662	
40%	EX(-)	3.7 ± 0.1	Interaction	0.688	
	EX(+)	3.0 ± 0.1			
<b>Food intake (g/d)</b>					
20%	EX(-)	20.2 ± 0.2	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	18.3 ± 0.3	Diet	<0.001	20%>40%
40%	EX(-)	19.3 ± 0.2	Interaction	0.799	
	EX(+)	17.5 ± 0.1			
<b>Energy intake (kcal/d)</b>					
20%	EX(-)	75 ± 1	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	68 ± 1	Diet	0.171	
40%	EX(-)	74 ± 1	Interaction	0.96	
	EX(+)	67 ± 1			
<b>Food efficiency<sup>a)</sup></b>					
20%	EX(-)	0.18 ± 0.01	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	0.16 ± 0.00	Diet	0.113	
40%	EX(-)	0.19 ± 0.00	Interaction	0.391	
	EX(+)	0.17 ± 0.01			

a) Food efficiency was calculated by body weight gain (g/d)/Food intake (g/d). Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Diet interaction.

#### 4-2. 大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量

大腿四頭筋重量および腹腔内脂肪重量を Table 22 に示した。各指標に有意な交互作用は認められず，体重補正した大腿四頭筋重量には運動の有意な主効果が認められた。運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.05$ )。一方，腹腔内脂肪重量にも運動の有意な主効果が認められ，運動群が安静群よりも有意な低値を示した (各  $p<0.001$ )。

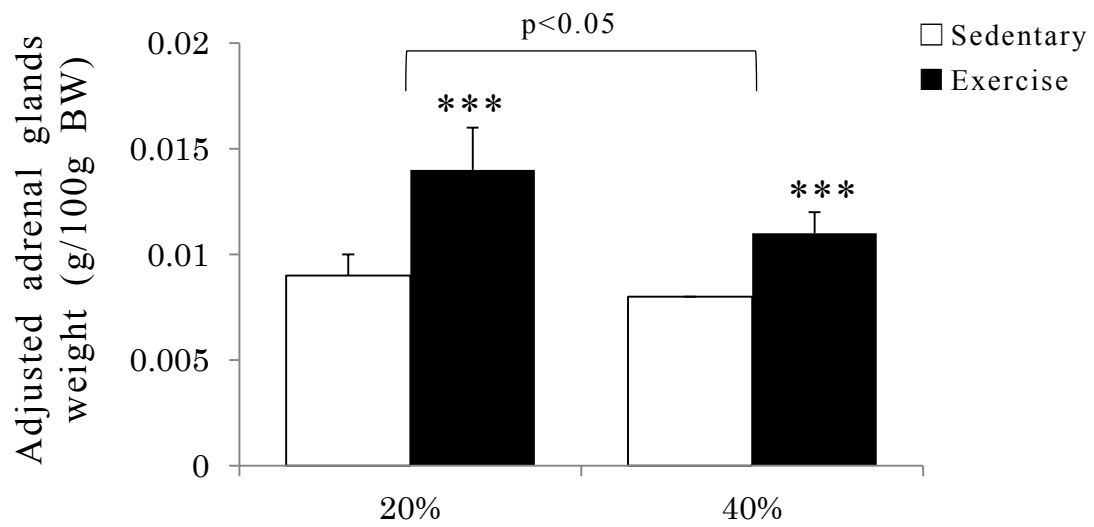
**Table 22. Muscle and fat weight.**

			Two-way ANOVA (p value)		Multiple comparison
Quadriceps femoris weight (g)					
20%	EX(-)	2.812 ± 0.135	Exercise	0.524	
	EX(+)	2.719 ± 0.111	Diet	0.135	
40%	EX(-)	2.607 ± 0.139	Interaction	0.921	
	EX(+)	2.539 ± 0.151			
Quadriceps femoris weight (g/100g BW)					
20%	EX(-)	0.719 ± 0.030	Exercise	0.016	Ex(-)<Ex(+)
	EX(+)	0.798 ± 0.024	Diet	0.202	
40%	EX(-)	0.666 ± 0.033	Interaction	0.807	
	EX(+)	0.762 ± 0.055			
Abdominal fat weight (g)					
20%	EX(-)	25.424 ± 1.203	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	14.374 ± 1.936	Diet	0.762	
40%	EX(-)	26.252 ± 0.788	Interaction	0.338	
	EX(+)	12.787 ± 0.934			
Abdominal fat weight (g/100g BW)					
20%	EX(-)	6.494 ± 0.241	Exercise	<0.001	Ex(-)>Ex(+)
	EX(+)	4.182 ± 0.511	Diet	0.822	
40%	EX(-)	6.707 ± 0.184	Interaction	0.380	
	EX(+)	3.823 ± 0.306			

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Diet interaction.

### 4-3. 副腎肪重量

体重補正した副腎重量を Fig.17 に示した. 有意な交互作用は認められず, 運動の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ). また, 飼料の有意な主効果も認められ, 40%群が 20%群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ ).



**Fig.17 Adrenal glands weight.**

Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P<0.001$  vs. sedentary group.

#### 4-4. 大腿骨重量

大腿骨の重量を Table 23 に示した。大腿骨乾燥重量および灰化重量においては各群に有意な差は認められなかった。また、体重補正した乾燥重量および灰化重量には運動および飼料の有意な交互作用は認められず、運動のみ有意な主効果が認められ、運動群が安静群よりも有意な高値を示した（各  $p < 0.001$ ）。

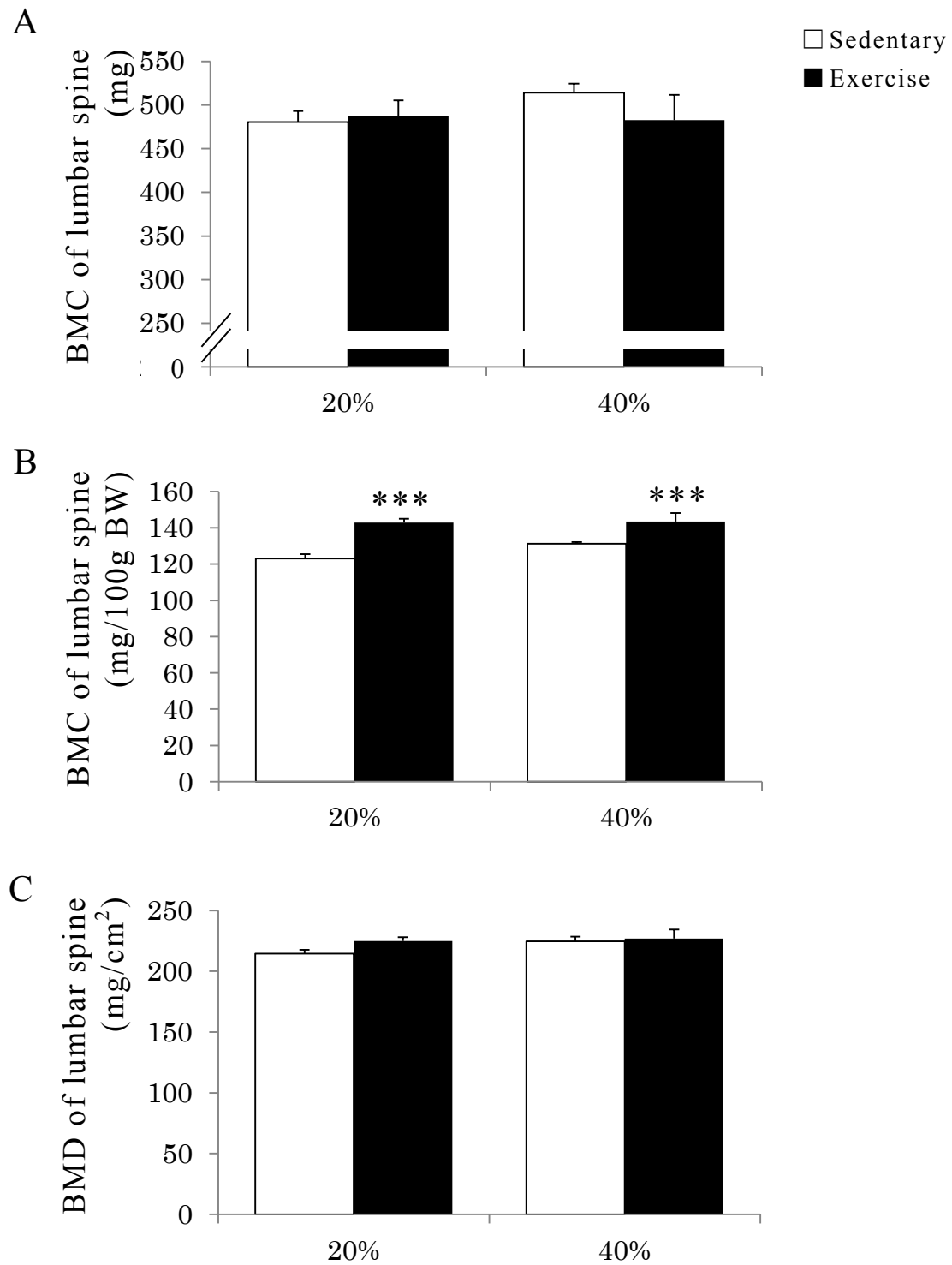
**Table 23. Femoral weight.**

			Two-way ANOVA (p value)		Multiple comparison
Dry weight(g)					
20%	EX(-)	0.6450 ± 0.0142	Exercise	0.122	
	EX(+)	0.6247 ± 0.0088	Diet	0.769	
40%	EX(-)	0.6475 ± 0.0082	Interaction	0.566	
	EX(+)	0.6436 ± 0.0199			
Dry weight(g/100g BW)					
20%	EX(-)	0.1649 ± 0.0021	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
	EX(+)	0.1838 ± 0.0028	Diet	0.245	
40%	EX(-)	0.1654 ± 0.0016	Interaction	0.144	
	EX(+)	0.1915 ± 0.0040			
Ash weight(g)					
20%	EX(-)	0.3998 ± 0.0128	Exercise	0.654	
	EX(+)	0.3899 ± 0.0108	Diet	0.243	
40%	EX(-)	0.4086 ± 0.0071	Interaction	0.676	
	EX(+)	0.4083 ± 0.0175			
Ash weight(g/100g BW)					
20%	EX(-)	0.1022 ± 0.0016	Exercise	<0.001	Ex(-)<Ex(+)
	EX(+)	0.1147 ± 0.0034	Diet	0.076	
40%	EX(-)	0.1044 ± 0.0012	Interaction	0.348	
	EX(+)	0.1215 ± 0.0034			

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Diet interaction.

#### 4-5. 骨塩量および骨密度

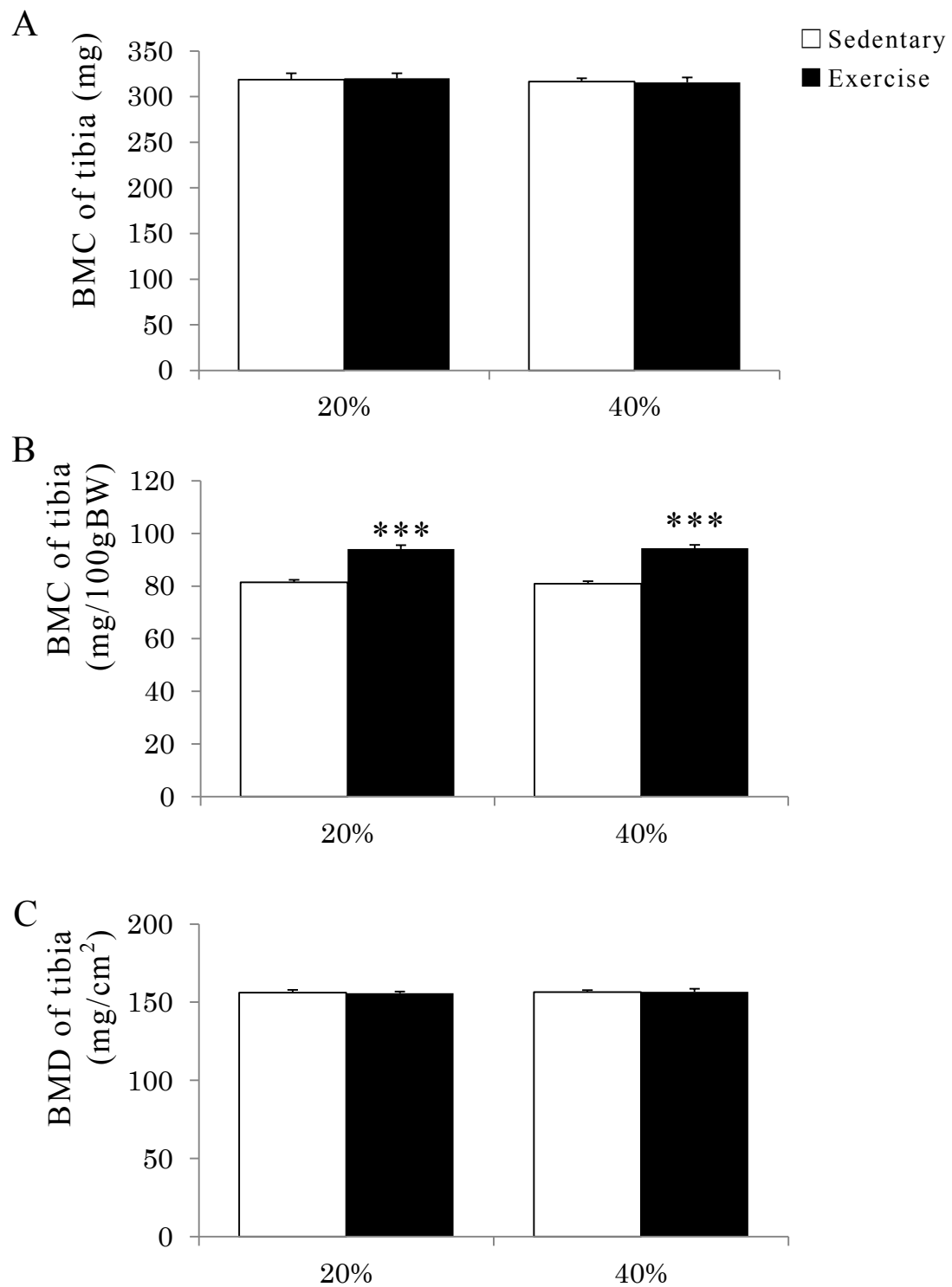
腰椎骨塩量 (A), 体重補正した腰椎骨塩量 (B) および腰椎骨密度 (C) を Fig.18 に示した. これらに運動および飼料の有意な交互作用は認められなかった. また, 腰椎骨塩量および骨密度においては各群に有意な差は認められなかった. 体重補正した腰椎骨塩量においては運動の有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ).



**Fig.18 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of lumbar spine.**

A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The lumbar spine of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P < 0.01$  vs. sedentary group.

脛骨骨塩量 (A), 体重補正した脛骨骨塩量 (B) および脛骨骨密度 (C) を Fig.19 に示した. これらに運動および飼料の有意な交互作用は認められなかった. また脛骨骨塩量および骨密度においては各群に有意な差は認められなかった. 体重補正した脛骨骨塩量には運動のみ有意な主効果が認められ, 運動群が安静群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ).



**Fig.19 Bone mineral content (BMC) and Bone mineral density (BMD) of Tibia.** A) BMC, B) BMC adjusted to the body weight, C) BMD. The tibia of each rat was isolated by dissection, and the muscle and connective tissue were carefully removed. BMC and BMD were then measured by dual-energy X-ray absorptiometry. Vertical bars indicate the standard error. \*\*\*:  $P < 0.01$  vs. sedentary group.



#### 4-6. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力および破断エネルギーの結果を Table 24 に示した。これらの指標において各群間に有意な差はみられなかったが、大腿骨破断力においては運動の主効果の傾向が認められ、運動群が安静群よりも高値傾向を示した (p=0.082)。

**Table 24. Breaking force and energy of the femoral diaphysis.**

			Two-way ANOVA (p value)	
<b>Breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn)</b>				
20%	EX(-)	27.124 $\pm$ 1.304	Exercise	0.578
	EX(+)	28.253 $\pm$ 0.798	Diet	0.241
40%	EX(-)	28.949 $\pm$ 1.027	Interaction	0.649
	EX(+)	29.061 $\pm$ 1.279		
<b>Breaking force (<math>\times 10^6</math> dyn/dry Wt.)<sup>a</sup></b>				
20%	EX(-)	41.576 $\pm$ 1.580	Exercise	0.082
	EX(+)	45.153 $\pm$ 1.075	Diet	0.203
40%	EX(-)	44.490 $\pm$ 1.257	Interaction	0.401
	EX(+)	45.758 $\pm$ 1.522		
<b>Breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg)</b>				
20%	EX(-)	19.752 $\pm$ 1.671	Exercise	0.418
	EX(+)	22.751 $\pm$ 1.096	Diet	0.644
40%	EX(-)	22.209 $\pm$ 1.459	Interaction	0.264
	EX(+)	21.727 $\pm$ 1.370		
<b>Breaking energy (<math>\times 10^5</math> erg/dry Wt.)<sup>a</sup></b>				
20%	EX(-)	30.452 $\pm$ 2.089	Exercise	0.148
	EX(+)	36.135 $\pm$ 1.714	Diet	0.596
40%	EX(-)	33.061 $\pm$ 2.019	Interaction	0.266
	EX(+)	31.544 $\pm$ 2.682		

a) Breaking force and energy adjusted to the dry weight. Values are expressed as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Diet interaction.

#### 4-7. 骨代謝マーカー

TRAP 活性値および BAP 活性値の結果を Table 25 に示した。TRAP においては運動および飼料の有意な主効果は認められず、飼料のみ有意な主効果が認められ、40%群が 20%群よりも有意な高値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、BAP においては各群間に有意な差はみられなかった。

**Table 25. Serum TRAP activity and BAP.**

			Two-way ANOVA (p value)	
TRAP(mmol/min)				
20%	EX(-)	17.75 ± 0.97	Exercise	0.626
	EX(+)	18.01 ± 2.20	Diet	0.049
40%	EX(-)	20.47 ± 1.43	Interaction	0.747
	EX(+)	21.75 ± 1.67		
BAP(mmol/min)				
20%	EX(-)	29.24 ± 7.13	Exercise	0.975
	EX(+)	29.15 ± 8.48	Diet	0.955
40%	EX(-)	28.98 ± 6.53	Interaction	0.986
	EX(+)	32.54 ± 5.90		

TRAP: Tartrate resistant acid phosphatase activity, BAP: Bone-specific alkaline phosphatase activity. Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA at the 5% level of significance. Interaction means Exercise-Diet interaction.

## 5. 考察

成長期の雄ラットを用い、コラーゲン摂取量の増加が成長期の過度な走運動トレーニングにより抑制された骨成長に及ぼす影響を検討した。その結果、コラーゲン摂取量を増加させてもさらなる骨量増加効果は得られないことが示された。

研究課題 3-1 において、コラーゲン摂取による大腿骨乾燥重量、腰椎および脛骨骨塩量・骨密度の増加効果が示唆されたことから、これらの指標においてコラーゲン摂取量の増加がさらなる効果をもたらすか検討したが、各指標にコラーゲン増加による骨量増加効果は認められなかった (Table 23, Fig.18, 19)。成長期ラットに対してコラーゲン摂取による骨密度への影響を検討した実験では、骨量増加の効果が認められるにはある一定以上のコラーゲン摂取が必要であると報告されているが (Wu *et al.*, 2003)、本研究の結果から、骨量増加効果が認められるコラーゲン摂取量を増加させてもその効果が高まるわけではないということが示唆された。また、*in vitro* の実験では骨芽細胞に添加したコラーゲンペプチドによる ALP 活性の上昇は、ある一定の濃度以上ではそれ以上の効果が認められないことや (Guillerminet F *et al.*, 2010)、骨芽細胞数の増加は頭打ちになることが示されている (Tsuruoka *et al.*, 2007)。本研究のように生体において経口摂取させた場合のコラーゲンがどれくらい吸収されていたか、またどのような形で吸収されたかは不明だが、これら *in vitro* の結果も合わせて考えると、仮にコラーゲンが分解されずペプチドの状態で吸収され細胞に運ばれたとしても、多く摂取することによる骨量効果は限られていることが推察される。研究課題 2 の結果と合わせると、異なるタンパク質源を混合させた場合でも、高タンパク質摂取には骨成長促進の効果はなく、タンパク質摂取量は適量を維持することが重要であることが示された。ただし、本研究のようにコラーゲンをタンパク質源として飼料中タンパク質の一部を置き換えて摂取するのではなく、サプリメントとして飼料に追加する、または強制的に体内

に投与するというように摂取方法を変えることでその影響が異なる可能性も考えられる．骨量増加効果を高めるコラーゲン摂取方法についてはさらに検討が必要である．

## 第V章 総合討議

成長期に過度な走運動トレーニングを行うアスリートは骨成長が抑制される可能性があることを示し、その骨成長を助けるタンパク質摂取を検討することを目的に、3つの研究課題を設定した。研究課題1では成長期において体重増加が抑制されるような過度の運動トレーニングを行うアスリートを想定し、過度な走運動トレーニングが骨に与える影響を検討した。研究課題2および3ではその運動トレーニング期間中の高タンパク質摂取（研究課題2）、またはタンパク質源としてのコラーゲン摂取（研究課題3）が抑制された骨成長に与える影響を検討した。

### 成長期の過度な走運動トレーニングが骨に及ぼす影響と骨成長のための課題

骨に荷重負荷のかかる運動は、骨伸長や骨量増加効果をもたらす（Boerer *et al.*, 1977, Forwood *et al.*, 1993）。一方で、運動強度が高く骨への刺激が強ければ強いほど骨形成が促進されるというわけではない（Kiiskinen *et al.*, 1978, Matsuda *et al.*, 1986）。とくに成長期のアスリートにおいては強度の高い運動トレーニングを実施し、そのうえ運動量に見合った食事量を確保できず栄養素等摂取が不足することから骨成長が抑制される可能性が問題視されている（Genazzani *et al.*, 2005）。

本研究ではラットを用い、成長期における過度な走運動トレーニングは体重増加の抑制とともに骨サイズや骨量の増加を抑制し、骨強度を高める効果をもたらさないことを示した（研究課題1）。本研究で行ったトレッドミル走運動のような荷重負荷のかかる運動が骨量を増加させることやその結果骨の強度を高めることはこれまでに多くの実験で確かめられている（Notomi *et al.*, 2000）。また、その効果は運動がもたらすホルモン等の全身性の変化に加え、運動の機械的負荷による骨局所に作用するホルモンやサイトカインなどの液性因子の

変化によるものであると明らかにされつつある (Gluhak-Heinrich *et al.*, 2003; Zang *et al.*, 2006; Robling *et al.*, 2008; Tu *et al.*, 2012). 一方で, 実際のスポーツ現場からの報告では, 運動トレーニングを行っている成長期の子どもがそうでない子どもと比較して必ずしも骨の成長が進んでいるわけではないとも報告されており (Macdougall *et al.*, 1992; Bass *et al.*, 2000), 運動トレーニングを行っているにも関わらず何らかの要因により骨成長が抑制されていると考えられる. 本研究の結果から, その背景には運動ストレスや摂食量および体重増加の抑制が強く関係し, これらを引き起こすような過度の運動トレーニングは成長期に高まるはずの骨形成を抑制する可能性が示唆された. これは高齢者の骨量減少にみられるような低骨代謝回転や骨吸収の亢進とは異なる骨代謝動態の変化である. アスリートにおける摂食量の減少や体重増加の抑制には, 競技特性を考慮した意図的な減量や高強度運動による食欲の低下 (King *et al.*, 1994), 長時間の運動トレーニングによる消費量の増大などさまざまな要因が考えられるが, 栄養素等摂取不足や低体重を引き起こすような過度な運動トレーニングは骨成長促進効果をもたらさないことが示された. 骨サイズや骨量の増加および骨強度に対する運動の成長促進効果を得るためには体重増加を抑制しないこと, そのために運動に見合った食事量 (エネルギー, 栄養素) を確保することが重要な要因であることも示された. しかしその一方で, 競技特性を考慮して体重を増加させることや運動強度の減少が困難な場合もあり, そのような状況における骨成長のための対策が求められる.

### **過度な運動トレーニングを行う成長期アスリートの骨成長のためのタンパク質摂取量**

運動トレーニングによって増加する栄養素等必要量を食事から十分に確保し成長期の体重増加を妨げないことが骨成長には重要であることが示されたが, 陸上の長距離種目などのように競技によっては食事制限を行い, 低い体重

を維持することが有利とされる種目もある（田中ら，2001）．しかしその結果，骨サイズや骨量増加が抑制されることは低身長や荷重骨での障害等，アスリートにとって競技成績や将来の健康にかかわる大きな問題である．

本研究ではエネルギー摂取量を変えずにタンパク質摂取量を増加することによる骨成長への効果を検討したが，高タンパク質摂取にしても骨サイズの増大をもたらさないこと，また荷重骨の骨量や骨強度の増加にも効果がないことが示された（研究課題 2）．骨格筋についてはタンパク質摂取量を増加させることで筋のタンパク合成量が増加するとされているが（Tarnopolsky *et al.*, 1992），骨成長についてはこれまで報告が少なく一致した見解が得られていない．これは実験で採用する運動の種類，強度の違いや対象の年齢（週齢）等によるものが影響していると考えられる．本研究の結果から，骨が急速に成長する時期において運動ストレスが生じ、骨成長が抑制されるような過度の走運動トレーニングに対して，一定以上のタンパク質摂取は骨サイズの増大や骨量の増加など骨成長に必須であり，不足すると骨成長が著しく抑制されることが示されたが，必要以上摂取しても過度な運動トレーニングによる骨成長の抑制を緩和する効果やさらに骨成長を促進させる効果はないことが示された．つまり，過度な運動トレーニングを行うアスリートにおいて，低タンパク質摂取ではさらに骨成長が抑制されるため不足しないように摂取することが重要だが，一方で高タンパク質摂取は食事量を増やすこと以外の骨成長のための効果的な栄養対策にはならないことが明らかとなった．しかし，非荷重骨については荷重骨とは異なり高タンパク質摂取による骨量増加効果の可能性が示唆されたことから今後さらに検討する必要がある．

#### 成長期アスリートにおける骨成長のためのコラーゲン摂取

成長期における過度な走運動トレーニング時にはエネルギー摂取量を同等としタンパク質量を増加させても荷重骨の骨成長促進効果が得られないこと

が示されたが（研究課題 2）、摂取するタンパク質の一部をコラーゲンペプチドに置き換えた飼料では骨量増加効果の可能性が示された（研究課題 3）。コラーゲン摂取の効果はこれまで主に高齢期の骨量減少抑制効果が報告されてきたが（Wu *et al.*, 2003; Guillerminet *et al.*, 2011）、本研究では新たに、過度な運動トレーニングを行う成長期の骨量増加にも効果的に作用する可能性が示された。これまで先行研究においてコラーゲンによる骨形成効果は、骨を構成するアミノ酸補給となること、またはコラーゲンが直接骨芽細胞で作用し骨形成代謝を亢進させることによると考えられている（Guillerminet *et al.*, 2010; Tsuruoka *et al.*, 2007）。今回の結果がどのようなメカニズムによって得られたのかは不明だが、過度な走運動トレーニングによって骨成長が抑制されたのは成長期の骨形成代謝が抑制されたことによると考えられることから（研究課題 1）、コラーゲン摂取によって骨形成が亢進され、成長期の骨にも骨量増加効果が示されたのかもしれない。

### 本研究の限界と今後の課題

本研究では過度な走運動トレーニングを行わせたラットを「成長期に過度なトレーニングを行うアスリート」と想定して実験を進めた。また、ラットにおいて観察された安静群と運動群との間の食餌摂取量の差を、「運動を行っているが運動量に見合った栄養素等摂取量を確保できていない場合」とし、その後の研究課題を進めた。しかし、ラットにおいて運動群にみられた体重増加の抑制と、実際に成長期アスリートにみられる身体状況は、たとえ体重増加が抑制された状態という点で共通していたとしても、アスリートの体重増加抑制の要因は意図的な体重制限、消費量の増大、ストレスによる食欲不振などさまざまである。本研究の成果はあくまでラットにおいて過度な走運動トレーニングによって骨成長が抑制された場合に対しての成果であり、今後ヒトへの応用につなげるためには骨の成長が抑制される要因を限定してその対策を検討する必



要がある.

## 第VI章 結論

成長期における過度な走運動トレーニングは、運動ストレスとなり食餌摂取および体重増加を抑制し、骨形成代謝を抑制することで骨サイズおよび骨量増加の抑制を引き起こす。これまで荷重負荷のかかる運動は骨成長に効果的に作用するとされてきたが、成長期のアスリートにおいて必ずしも骨成長が進んでいるわけではないという現状に対して、本研究ではその背景の一つを明らかにした。そのうえで、体重を増加させること以外の骨成長のための栄養対策として、成長因子の作用を高めることや骨の有機成分として材料の役割を果たすことが期待されるタンパク質の摂取に着目して骨成長に対する効果を検討し、以下の結論が得られた。

1) 高タンパク質摂取による骨成長抑制の予防や改善の効果は期待できない。ただし、低タンパク質摂取では骨の成長がさらに著しく抑制されるため、とくに成長期において過度な運動トレーニングを行うような場合には、タンパク質摂取量は必要量を確保することが重要である。

2) コラーゲンペプチド摂取によって骨量は増加する可能性がある。

成長期の過度な走運動トレーニングによって抑制される可能性のある骨成長に対してコラーゲン摂取は骨量増加のための栄養対策の一つとなりえる。コラーゲン摂取効果のメカニズムを明らかにするためには、運動ストレスとそれによる食餌摂取量の減少が骨成長に与える影響をさらに詳細に検討する必要がある。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，博士前期課程および後期課程の六年間にわたり終始懇切丁寧なご指導を賜りました麻見直美准教授に対し深く感謝致します．また，ご多忙の中，審査を引き受けて頂いた征矢英昭教授，大森肇教授，矢作直也准教授には貴重なご指導とご助言を賜りました．諸先生方に深く感謝致します．そして，本研究に際し適宜ご助言とご協力を頂いた麻見研究室諸氏に深くお礼申し上げます．

最後に研究の糧となったすべての実験動物に対し，深い感謝と追悼の意を表します．

## 引用文献

- Aerenhouts, D., Deriemaeker, P., Hebbelinck, M. & Clarys, P.** 2011, "Energy and macronutrient intake in adolescent sprint athletes: a follow-up study ", *Journal of sports sciences*, vol. 29, no. 1, pp. 73-82.
- Anand, C.R. & Linkswiler, H.M.** 1974, "Effect of protein intake on calcium balance of young men given 500 mg calcium daily", *The Journal of nutrition*, vol. 104, no. 6, pp. 695-700.
- Anthony, J.C., Anthony, T.G., Kimball, S.R., Vary, T.C. & Jefferson, L.S.** 2000, "Orally administered leucine stimulates protein synthesis in skeletal muscle of postabsorptive rats in association with increased eIF4F formation", *The Journal of nutrition*, vol. 130, no. 2, pp. 139-145.
- Babij, P., Matthews, S.M. & Rennie, M.J.** 1983, "Changes in blood ammonia, lactate and amino acids in relation to workload during bicycle ergometer exercise in man", *European journal of applied physiology and occupational physiology*, vol. 50, no. 3, pp. 405-411.
- Barzel, U.S.** 1976, "Acid-induced osteoporosis: an experimental model of human osteoporosis ", *Calcified tissue research*, vol. 21 Suppl, pp. 417-422.
- Barzel, U.S. & Jowsey, J.** 1969, "The effects of chronic acid and alkali administration on bone turnover in adult rats ", *Clinical science*, vol. 36, no. 3, pp. 517-524.
- Bass SL** 2000, " The prepubertal years: a uniquely opportune stage of growth when the skeleton is most responsive to exercise?", *Sports medicine*, vol. 30, no. 2, pp. 73-78.
- Bikle, D.D., Harris, J., Halloran, B.P. & Morey-Holton, E.** 1994, "Altered skeletal pattern of gene expression in response to spaceflight and hindlimb elevation", *The American Journal of Physiology*, vol. 267, no. 6 Pt 1, pp. E822-7.

- Boirie, Y., Dangin, M., Gachon, P., Vasson, M.P., Maubois, J.L. & Beaufriere, B.** 1997, "Slow and fast dietary proteins differently modulate postprandial protein accretion", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 26, pp. 14930-14935.
- Bourne, G.H.** 1985, *World Review of Nutrition and Dietetics -Minerals in Food and Nutritional Topics*.
- Bourrin, S., Genty, C., Palle, S., Gharib, C. & Alexandre, C.** 1994, "Adverse effects of strenuous exercise: a densitometric and histomorphometric study in the rat", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 76, no. 5, pp. 1999-2005.
- Brenner, B.M., Meyer, T.W. & Hostetter, T.H.** 1982, "Dietary protein intake and the progressive nature of kidney disease: the role of hemodynamically mediated glomerular injury in the pathogenesis of progressive glomerular sclerosis in aging, renal ablation, and intrinsic renal disease", *The New England journal of medicine*, vol. 307, no. 11, pp. 652-659.
- Buuck, R.J. & Tharp, G.D.** 1971, "Effect of chronic exercise on adrenocortical function and structure in the rat", *Journal of applied physiology*, vol. 31, no. 6, pp. 880-883.
- Caine, D., Lewis, R., O'Connor, P., Howe, W. & Bass, S.** 2001, "Does gymnastics training inhibit growth of females?", *Clinical journal of sport medicine : official journal of the Canadian Academy of Sport Medicine*, vol. 11, no. 4, pp. 260-270.
- Chesnut, C.H.**, 3rd 1991, "Theoretical overview: bone development, peak bone mass, bone loss, and fracture risk", *The American Journal of Medicine*, vol. 91, no. 5B, pp. 2S-4S.
- Chevalley, T., Bonjour, J.P., Ferrari, S. & Rizzoli, R.** 2008, "High-protein intake enhances the positive impact of physical activity on BMC in prepubertal boys ",

*Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 23, no. 1, pp. 131-142.

**Chow JW & Chambers TJ** 1994, "Indomethacin has distinct early and late actions on bone formation induced by mechanical stimulation ", *The American Journal of Physiology*, vol. 267, pp. E287-E292.

**Chvapil, M., Bartos, D. and Bartos, F.** 1973, "Effect of long-term physical stress on collagen growth in the lung, heart, and femur of young and adult rats", *Gerontologia*, vol. 19, pp. 263-270.

**Dodds, R.A., Ali, N., Pead, M.J. & Lanyon, L.E.** 1993, "Early loading-related changes in the activity of glucose 6-phosphate dehydrogenase and alkaline phosphatase in osteocytes and periosteal osteoblasts in rat fibulae in vivo", *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 8, no. 3, pp. 261-267.

**El Hage, R., Jacob, C., Moussa, E., Groussard, C., Pineau, J.C., Benhamou, C.L. & Jaffre, C.** 2009, "Influence of the weight status on bone mineral content and bone mineral density in a group of Lebanese adolescent girls ", *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*, vol. 76, no. 6, pp. 680-684.

**Eliakim, A., Brasel, J.A., Mohan, S., Wong, W.L. & Cooper, D.M.** 1998, "Increased physical activity and the growth hormone-IGF-I axis in adolescent males", *The American Journal of Physiology*, vol. 275, no. 1 Pt 2, pp. R308-14.

**Ellis, F.R., Holesh, S. & Ellis, J.W.** 1972, "Incidence of osteoporosis in vegetarians and omnivores", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 25, no. 6, pp. 555-558.

**Ezawa.I, Okada.R, Nozaki.Y & Ogata.E** 1979, "Breaking-properties and ash contents of the femur of growing rat fed a low calcium diet.", *J Jpn Soc Food Nutr*, vol. 32, pp. 329-335.

- Ferretti, J.L., Tessaro, R.D., Delgado, C.J., Bozzini, C.E., Alippi, R.M. & Barcelo, A.C.** 1988, "Biomechanical performance of diaphyseal shafts and bone tissue of femurs from protein-restricted rats", *Bone and mineral*, vol. 4, no. 4, pp. 329-339.
- Forwood, M.R. & Burr, D.B.** 1993, "Physical activity and bone mass: exercises in futility? ", *Bone and mineral*, vol. 21, no. 2, pp. 89-112.
- Fredericson, M., Jennings, F., Beaulieu, C. & Matheson, G.O.** 2006, "Stress fractures in athletes", *Topics in magnetic resonance imaging : TMRI*, vol. 17, no. 5, pp. 309-325.
- Freudenheim, J.L., Johnson, N.E. & Smith, E.L.** 1986, "Relationships between usual nutrient intake and bone-mineral content of women 35-65 years of age: longitudinal and cross-sectional analysis", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 44, no. 6, pp. 863-876.
- Frost, H.M.** 1973, *Bone modeling and skeletal modeling errors*.
- Ganong.W.F** 1985, *Review of Medical Physiology*, Lange Medical Publications.
- Garn, S. M., C. G. Rohmann, M., Behar, F.Viteri, M. A. Guseman.** 1962, "Compact bone deficiency in protein-calorie malnutrition.", *Science*, , no. 145, pp. 1444-1445.
- Garn, S., Kangas.** 1981, *Recent Advans in Pathogenesis and Treatment*, University Park Press, Baltimore.
- GEISER, M. & TRUETA, J.** 1958, "Muscle action, bone rarefaction and bone formation; an experimental study", *The Journal of bone and joint surgery.British volume*, vol. 40-B, no. 2, pp. 282-311.
- Genazzani, A.D.** 2005, "Neuroendocrine aspects of amenorrhea related to stress", *Pediatric endocrinology reviews : PER*, vol. 2, no. 4, pp. 661-668.
- Glastre, C., Braillon, P., David, L., Cochat, P., Meunier, P.J. & Delmas, P.D.**

1990, "Measurement of bone mineral content of the lumbar spine by dual energy x-ray absorptiometry in normal children: correlations with growth parameters", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 70, no. 5, pp. 1330-1333.

**Gluhak-Heinrich, J., Ye, L., Bonewald, L.F., Feng, J.Q., MacDougall, M., Harris, S.E. & Pavlin, D.** 2003, "Mechanical loading stimulates dentin matrix protein 1 (DMP1) expression in osteocytes in vivo", *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 18, no. 5, pp. 807-817.

**Grimston, S.K., Willows, N.D. & Hanley, D.A.** 1993, "Mechanical loading regime and its relationship to bone mineral density in children", *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 25, no. 11, pp. 1203-1210.

**Guillerminet, F., Fabien-Soule, V., Even, P.C., Tome, D., Benhamou, C.L., Roux, C. & Blais, A.** 2011, "Hydrolyzed collagen improves bone status and prevents bone loss in ovariectomized C3H/HeN mice ", *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, .

**Heaney, R.P. & Recker, R.R.** 1982, "Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women", *The Journal of laboratory and clinical medicine*, vol. 99, no. 1, pp. 46-55.

**Holliday, L.S., Welgus, H.G., Fliszar, C.J., Veith, G.M., Jeffrey, J.J. & Gluck, S.L.** 1997, "Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase", *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 35, pp. 22053-22058.

**Hreljac, A.** 2004, "Impact and overuse injuries in runners", *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 36, no. 5, pp. 845-849.

**Hind K, B.M.** 2007, "Weight-bearing exercise and bone mineral accrual in children and adolescents: a review of controlled trials", *Bone*, vol. 40, pp. 14-27.



- Hulmes, D.J., Miller, A., Parry, D.A., Piez, K.A. & Woodhead-Galloway, J.** 1973, "Analysis of the primary structure of collagen for the origins of molecular packing", *Journal of Molecular Biology*, vol. 79, no. 1, pp. 137-148.
- Iwamoto, J., Yeh, J.K. & Aloia, J.F.** 1999, "Differential effect of treadmill exercise on three cancellous bone sites in the young growing rat ", *Bone*, vol. 24, no. 3, pp. 163-169.
- Jahreis, G., Kauf, E., Frohner, G. & Schmidt, H.E.** 1991, "Influence of intensive exercise on insulin-like growth factor I, thyroid and steroid hormones in female gymnasts", *Growth regulation*, vol. 1, no. 3, pp. 95-99.
- Jee, W.S., Tang, L., Ke, H.Z., Setterberg, R.B. & Kimmel, D.B.** 1993, "Maintaining restored bone with bisphosphonate in the ovariectomized rat skeleton: dynamic histomorphometry of changes in bone mass", *Bone*, vol. 14, no. 3, pp. 493-498.
- Johnson, N.E., Alcantara, E.N. & Linkswiler, H.** 1970, "Effect of level of protein intake on urinary and fecal calcium and calcium retention of young adult males", *The Journal of nutrition*, vol. 100, no. 12, pp. 1425-1430.
- Jones, H.H., Priest, J.D., Hayes, W.C., Tichenor, C.C. & Nagel, D.A.** 1977, "Humeral hypertrophy in response to exercise", *The Journal of bone and joint surgery.American volume*, vol. 59, no. 2, pp. 204-208.
- Juzwiak, C.R., Amancio, O.M., Vitalle, M.S., Pinheiro, M.M. & Szejnfeld, V.L.** 2008, "Body composition and nutritional profile of male adolescent tennis players", *Journal of sports sciences*, vol. 26, no. 11, pp. 1209-1217.
- Kerstetter, J.E., O'Brien, K.O. & Insogna, K.L.** 1998, "Dietary protein affects intestinal calcium absorption", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 68, no. 4, pp. 859-865.
- King, N.A., Burley, V.J. & Blundell, J.E.** 1994, "Exercise-induced suppression of

appetite: effects on food intake and implications for energy balance", *European journal of clinical nutrition*, vol. 48, no. 10, pp. 715-724.

**Kitano, T., Esashi, T. & Azami, S.** 1988, "Effect of protein intake on mineral (calcium, magnesium, and phosphorus) balance in Japanese males", *Journal of nutritional science and vitaminology*, vol. 34, no. 4, pp. 387-398.

**Kiiskinen, A. & Heikkinen, E.** 1978, "Physical training and connective tissues in young mice: biochemistry of long bones", *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, vol. 44, no. 1, pp. 50-54.

**Klein-Nulend, J., Semeins, C.M., Veldhuijzen, J.P. & Burger, E.H.** 1993, "Effect of mechanical stimulation on the production of soluble bone factors in cultured fetal mouse calvariae", *Cell and tissue research*, vol. 271, no. 3, pp. 513-517.

**Kohrt, W.M., Bloomfield, S.A., Little, K.D., Nelson, M.E., Yingling, V.R. & American College of Sports Medicine** 2004, "American College of Sports Medicine Position Stand: physical activity and bone health", *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 36, no. 11, pp. 1985-1996.

**Lanyon, L.E., Goodship, A.E., Pye, C.J. & MacFie, J.H.** 1982, "Mechanically adaptive bone remodelling", *Journal of Biomechanics*, vol. 15, no. 3, pp. 141-154.

**Likimani S, Whitford GM & Kunkel ME** 1992, "The effects of protein deficiency and fluoride on bone mineral content of rat tibia", *Calcif.Tissue Int.*, vol. 50, no. 2, pp. 157-164.

**Likimani S, Whitford GM & Kunkel ME** 1992, "The effects of protein deficiency and fluoride on bone mineral content of rat tibia", *Calcif.Tissue Int.*, vol. 50, no. 2, pp. 157-164.

**Livingstone, C.** 2013, "Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 125, no. 6, pp. 265-280.

**MacDougall, J.D., Webber, C.E., Martin, J., Ormerod, S., Chesley, A., Younglai,**

- E.V., Gordon, C.L. & Blimkie, C.J.** 1992, "Relationship among running mileage, bone density, and serum testosterone in male runners", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 73, no. 3, pp. 1165-1170.
- Matsuda, J.J., Zernicke, R.F., Vailas, A.C., Pedrini, V.A., Pedrini-Mille, A. & Maynard, J.A.** 1986, "Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 60, no. 6, pp. 2028-2034.
- Mazess, R.B. & Mather, W.** 1974, "Bone mineral content of North Alaskan Eskimos", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 27, no. 9, pp. 916-925.
- Mizoguchi.T, Tamura.K, Yoshida.T, Nagasawa.S, Terashima.N, Horosawa.N, Yagasaki.H, Matahira.Y & Ito.M** 2006, "Mineral and collagen derived from fish-skin supplementation improves bone metabolism in ovariectomized rats part2", *J Jpn Dent Mater*, vol. 25, no. 2, pp. 192-192.
- Mizuno, M., Fujisawa, R. & Kuboki, Y.** 2000, "The effect of carboxyl-terminal propeptide of type I collagen (c-propeptide) on collagen synthesis of preosteoblasts and osteoblasts", *Calcified tissue international*, vol. 67, no. 5, pp. 391-399.
- Moore, D.R., Tang, J.E., Burd, N.A., Reracich, T., Tarnopolsky, M.A. & Phillips, S.M.** 2009, "Differential stimulation of myofibrillar and sarcoplasmic protein synthesis with protein ingestion at rest and after resistance exercise", *The Journal of physiology*, vol. 587, no. Pt 4, pp. 897-904.
- Moskowitz, R.W.** 2000, "Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease", *Seminars in arthritis and rheumatism*, vol. 30, no. 2, pp. 87-99.
- Nattiv, A., Loucks, A.B., Manore, M.M., Sanborn, C.F., Sundgot-Borgen, J., Warren, M.P. & American College of Sports Medicine** 2007, "American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad ", *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 39, no. 10, pp. 1867-1882.

**NIH Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis, and Therapy** 2001, "Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy", *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 285, no. 6, pp. 785-795.

**Nomura, Y., Oohashi, K., Watanabe, M. & Kasugai, S.** 2005, "Increase in bone mineral density through oral administration of shark gelatin to ovariectomized rats", *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, vol. 21, no. 11-12, pp. 1120-1126.

**Notomi, T., Lee, S.J., Okimoto, N., Okazaki, Y., Takamoto, T., Nakamura, T. & Suzuki, M.** 2000, "Effects of resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats ", *European journal of applied physiology*, vol. 82, no. 4, pp. 268-274.

**Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M.** 2001, "Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats.", *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 16, no. 1, pp. 166-174.

**Oesser, S., Adam, M., Babel, W. & Seifert, J.** 1999, "Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL)", *The Journal of nutrition*, vol. 129, no. 10, pp. 1891-1895.

**Oguro I, Ozawa H.** 1988, "The histochemical localization of acid phosphatase activity in BMU.", *Journal of bone and mineral metabolism*, vol. 6, pp. 190-195.

**Oishi, Y., Fu, Z.W., Ohnuki, Y., Kato, H. & Noguchi, T.** 2002, "Molecular basis of the alteration in skin collagen metabolism in response to in vivo dexamethasone treatment: effects on the synthesis of collagen type I and III, collagenase, and tissue inhibitors of metalloproteinases", *The British journal of dermatology*, vol. 147, no. 5, pp. 859-868.

**Omi, N., Goseki, M., Oida, S., Sasaki, S. & Ezawa, I.** 1994, "The nutritional evaluation of globin on maintenance of bone metabolism in ovariectomized

osteoporotic rats", *Journal of nutritional science and vitaminology*, vol. 40, no. 5, pp. 443-457.

**Orwoll, E., Ware, M., Stribrska, L., Bikle, D., Sanchez, T., Andon, M. & Li, H.** 1992, "Effects of dietary protein deficiency on mineral metabolism and bone mineral density", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 56, no. 2, pp. 314-319.

**Orwoll, E.S., Weigel, R.M., Oviatt, S.K., Meier, D.E. & McClung, M.R.** 1987, "Serum protein concentrations and bone mineral content in aging normal men", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 46, no. 4, pp. 614-621.

**Poortmans, J.R. & Dellalieux, O.** 2000, "Do regular high protein diets have potential health risks on kidney function in athletes?", *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, vol. 10, no. 1, pp. 28-38.

**Raab-Cullen, D.M., Thiede, M.A., Petersen, D.N., Kimmel, D.B. & Recker, R.R.** 1994, "Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression", *Calcified tissue international*, vol. 55, no. 6, pp. 473-478.

**Reddy, G.S. & Rao, B.S.** 1971, "Effect of dietary calcium, vitamin C and protein in development of experimental skeletal fluorosis. II. Calcium turnover with <sup>45</sup>Ca; calcium and phosphorus balances", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 20, no. 7, pp. 650-656.

**Reeves, P.G.** 1997, "Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet", *The Journal of nutrition*, vol. 127, no. 5 Suppl, pp. 838S-841S.

**Reidenberg, M.M., Haag, B.L., Channick, B.J., Shuman, C.R. & Wilson, T.G.** 1966, "The response of bone to metabolic acidosis in man", *Metabolism: clinical and experimental*, vol. 15, no. 3, pp. 236-241.

**Ribeiro SML, Rogero MM, Bacurau RFP, Campos PL, Luz SS, Lancna Jr AH & Tirapegui J** 2010, " Effects of different levels of protein intake and physical training on growth and nutritional status of young rats", *Journal of nutritional*

*science and vitaminology*, vol. 56, pp. 177-184.

**Rice, S., Blimkie, C.J., Webber, C.E., Levy, D., Martin, J., Parker, D. & Gordon, C.L.** 1993, "Correlates and determinants of bone mineral content and density in healthy adolescent girls", *Canadian journal of physiology and pharmacology*, vol. 71, no. 12, pp. 923-930.

**Robling, A.G., Niziolek, P.J., Baldrige, L.A., Condon, K.W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T.M., Harris, S.E. & Turner, C.H.** 2008, "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 9, pp. 5866-5875.

**Rodriguez NR, DiMarco NM, Langley S, American Dietetic Association, Dietitians of Canada & American College of Sports Medicine: Nutrition and Athletic Performance.** 2009, "Position of the American Dietetic Association, Dietitians of Canada, and the American College of Sports Medicine: Nutrition and athletic performance.", *Journal of the American dietetic Association*, vol. 109, no. 3, pp. 509-527.

**Sellmeyer DE, Stone KL, Sebastian A & Cummings SR.** 2001, "A high ratio of dietary animal to vegetable protein increases the rate of bone loss and the risk of fracture in postmenopausal women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 73, no. 1, pp. 118-122.

**SELYE, H.** 1946, "The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation", *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, vol. 6, pp. 117-230.

**Shepherd, R.E. & Gollnick, P.D.** 1976, "Oxygen uptake of rats at different work intensities", *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, vol. 362, no. 3, pp. 219-222.

**Shimizu, T., Sasano, Y., Nakajo, S., Kagayama, M. & Shimauchi, H.** 2001, "Osteoblastic differentiation of periosteum-derived cells is promoted by the physical

contact with the bone matrix in vivo", *The Anatomical Record*, vol. 264, no. 1, pp. 72-81.

**Soden, S.E., Garrison, C.B., Egan, A.M. & Beckwith, A.M.** 2012, "Nutrition, physical activity, and bone mineral density in youth with autistic spectrum disorders", *Journal of developmental and behavioral pediatrics : JDBP*, vol. 33, no. 8, pp. 618-624.

**Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. & Ikeda, K.** 2007, "Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction", *Cell metabolism*, vol. 5, no. 6, pp. 464-475.

**Tarnopolsky, M.A., Atkinson, S.A., MacDougall, J.D., Chesley, A., Phillips, S. & Swarcz, H.P.** 1992, "Evaluation of protein requirements for trained strength athletes", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 73, no. 5, pp. 1986-1995.

**Terry, L.C., Willoughby, J.O., Braseau, P., Martin, J.B. & Patel, Y.** 1976, "Antiserum to somatostatin prevents stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 192, no. 4239, pp. 565-567.

**Thompson, J.L.** 1998, "Energy balance in young athletes", *International Journal of Sport Nutrition*, vol. 8, no. 2, pp. 160-174.

**Tomljenovic Borer, K. & Kuhns, L.R.** 1977, "Radiographic evidence for acceleration of skeletal growth in adult hamsters by exercise", *Growth*, vol. 41, no. 1, pp. 1-13.

**Tsuruoka, N., Yamato, R., Sakai, Y., Yoshitake, Y. & Yonekura, H.** 2007, "Promotion by collagen tripeptide of type I collagen gene expression in human osteoblastic cells and fracture healing of rat femur", *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, vol. 71, no. 11, pp. 2680-2687.

**Tu, X., Rhee, Y., Condon, K.W., Bivi, N., Allen, M.R., Dwyer, D., Stolina, M., Turner, C.H., Robling, A.G., Plotkin, L.I. & Bellido, T.** 2012, "Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading", *Bone*, vol. 50, no. 1, pp. 209-217.

**Tylavsky, F.A. & Anderson, J.J.** 1988, "Dietary factors in bone health of elderly lactoovovegetarian and omnivorous women", *The American Journal of Clinical Nutrition*, vol. 48, no. 3 Suppl, pp. 842-849.

**Viteri.F.E & B.Torun** 1983, *Manual of Clinical Nutririon*, Nutrition Publication.

Webber CE, Gordon GL, Chambers LF, MArtin J, Blimkie CJ & McCartney N 1993, *Body composition and bone mass in female adolescents and elderly subjects entering exercise programs.*

**Westerlind, K.C. & Turner, R.T.** 1995, "The skeletal effects of spaceflight in growing rats: tissue-specific alterations in mRNA levels for TGF-beta", *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 10, no. 6, pp. 843-848.

**Westerlind, K.C., Fluckey, J.D., Gordon, S.E., Kraemer, W.J., Farrell, P.A. & Turner, R.T.** 1998, "Effect of resistance exercise training on cortical and cancellous bone in mature male rats", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 84, no. 2, pp. 459-464.

**Wolff J** 1892, *Das Gesetz der Transformation der Knochen*, .

**Won, J.H., Fukuda, S., Sato, R. & Naito, Y.** 1996, "Bone histomorphometric changes due to differences in calcium intake under metabolic acidosis in rats", *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, vol. 58, no. 7, pp. 611-616.

**Wootton, R., Brereton, P.J., Clark, M.B., Hesp, R., Hodkinson, H.M., Klenerman, L., Reeve, J., Slavin, G. & Tellez-Yudilevich, M.** 1979, "Fractured neck of femur in



the elderly: an attempt to identify patients at risk", *Clinical science (London, England : 1979)*, vol. 57, no. 1, pp. 93-101.

**Wronski, T.J. & Morey, E.R.** 1983, "Effect of spaceflight on periosteal bone formation in rats", *The American Journal of Physiology*, vol. 244, no. 3, pp. R305-9.

**Wu, J., Wang, X.X., Chiba, H., Higuchi, M., Takasaki, M., Ohta, A. & Ishimi, Y.** 2003, "Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice ", *Journal of applied physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, vol. 94, no. 1, pp. 335-342.

**Wynn, E., Krieg, M.A., Aeschlimann, J.M. & Burckhardt, P.** 2009, "Alkaline mineral water lowers bone resorption even in calcium sufficiency: alkaline mineral water and bone metabolism", *Bone*, vol. 44, no. 1, pp. 120-124.

**Yahya, Z.A., Bates, P.C. & Millward, D.J.** 1990, "Responses to protein deficiency of plasma and tissue insulin-like growth factor-I levels and proteoglycan synthesis rates in rat skeletal muscle and bone ", *The Journal of endocrinology*, vol. 127, no. 3, pp. 497-503.

**Yeh, J.K., Aloia, J.F. & Yasumura, S.** 1989, "Effect of physical activity on calcium and phosphorus metabolism in the rat", *The American Journal of Physiology*, vol. 256, no. 1 Pt 1, pp. E1-6.

**Zernicke, R.F., Salem, G.J., Barnard, R.J., Woodward, J.S., Jr, Meduski, J.W. & Meduski, J.D.** 1995, "Adaptations of immature trabecular bone to exercise and augmented dietary protein", *Medicine and science in sports and exercise*, vol. 27, no. 11, pp. 1486-1493.

**Zhang, K., Barragan-Adjemian, C., Ye, L., Kotha, S., Dallas, M., Lu, Y., Zhao, S., Harris, M., Harris, S.E., Feng, J.Q. & Bonewald, L.F.** 2006, "E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation", *Molecular and cellular biology*, vol. 26, no. 12, pp. 4539-4552.

**Zhu, K. & Prince, R.L.** 2012, "Calcium and bone", *Clinical biochemistry*, vol. 45, no. 12, pp. 936-942.

**Zittermann, A., Sabatschus, O., Jantzen, S., Platen, P., Danz, A. & Stehle, P.** 2002, "Evidence for an acute rise of intestinal calcium absorption in response to aerobic exercise ", *European journal of nutrition*, vol. 41, no. 5, pp. 189-196.

上田晃三, 清野佳紀 2008, "骨の成長・発達", *バイオメカニズム学会誌*, vol. 32, no. 2, pp. 57-60.

井村裕夫 1986, *内分泌・代謝病学*, 2nd edn, 医学書院

尾上佳子, 太田博明 2007, "BAP による骨代謝の評価", *分子リウマチ*, vol. 4, pp. 141-146.

須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 1985, *骨の科学*, 医歯薬出版.

千勝典子, 松本俊夫 1999, *カルシウムその基礎・臨床・栄養*, 初版 edn, ライフサイエンス出版, 東京.

田中宏暁, 沢木啓祐, 重松森雄 2001, "体重は長距離の記録の主な規定因子である", *日本運動生理学雑誌*, vol. 8, no. 1, pp. 51-52.

鳥居俊 2003, "スポーツ競技と疲労骨折", *からだの科学*, vol. 230, pp. 58-63.

原田玲子, 内田さえ, 鈴木敦子 & 佐藤優子 2002, *人体の構造と機能*, 医歯薬出版.

藤本大三郎 1994, *コラーゲン*, 共立出版.

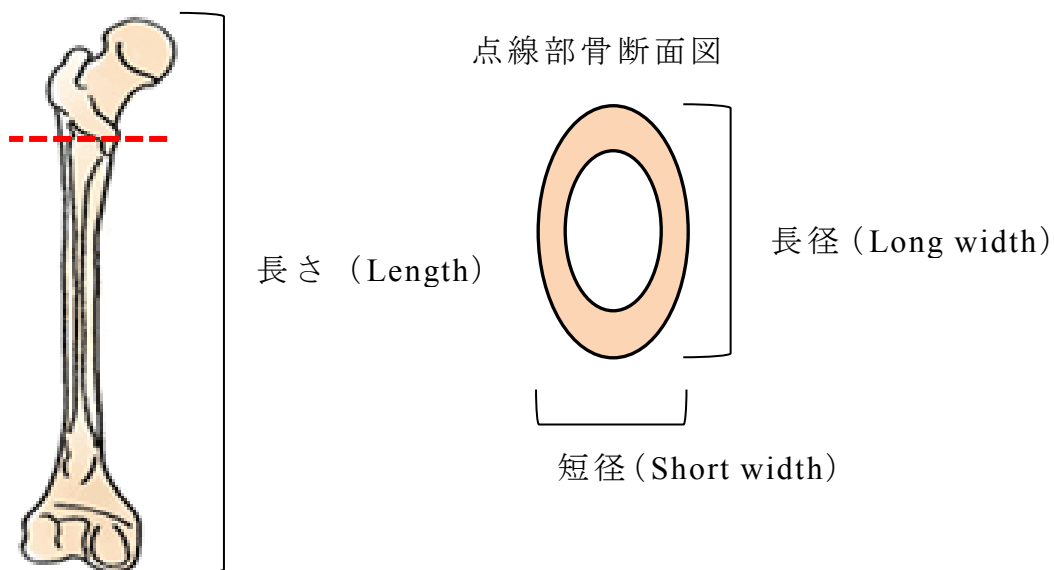
## Appendices

### Appendix 1: 運動時の体重 1kg あたりのタンパク質必要量

運動の内容	体重1kg当たりの たんぱく質必要量(g)
活発に活動をしていない人	0.8～1.0
一流の持久的運動選手	1.6
中強度の持久的運動(40～60分、週4～5回)	1.2
余暇としての持久的運動(最大酸素摂取量55%以下、30分、週4～5回)	0.8～1.0
フットボール選手、パワー系スポーツ	1.4～1.7
瞬発的運動(トレーニング初期)	1.5～1.7
瞬発的運動(安定期)	1.0～1.2
女性選手	男性よりも15%少ない

(Sports Nutrition, 2002; Nutrition for Health, Fitness, & Sport, Seventh edition, 2005)

### Appendix 2: 骨サイズの指標



### Appendix 3: 胸腺重量(研究課題 1)

	Sedentary	Exercise
Thymus gland (g/100g BW)	0.094 ± 0.014	0.078 ± 0.004

### Appendix 4: 尿中カルシウム排泄量(研究課題 2)

	1st	
	Sedentary	Exercise
Urinary Ca excretion (mg/d)		
10% protein	1.079 ± 0.176	0.684 ± 0.057
20% protein	0.738 ± 0.066	0.619 ± 0.063
40% protein	0.696 ± 0.045	0.724 ± 0.062
	4th	
	Sedentary	Exercise
Urinary Ca excretion (mg/d)		
10% protein	0.801 ± 0.134	0.447 ± 0.013
20% protein	0.696 ± 0.056	0.468 ± 0.015
40% protein	0.811 ± 0.053	0.855 ± 0.067
	7th	
	Sedentary	Exercise
Urinary Ca excretion (mg/d)		
10% protein	1.047 ± 0.168	0.607 ± 0.059
20% protein	0.868 ± 0.051	0.646 ± 0.046
40% protein	0.772 ± 0.046	0.860 ± 0.091

### Appendix 5: クレアチンクリアランス(研究課題 2)

	Diet group		
	10%protein	20%protein	40%protein
Creatinine Clearance (Urinary Cr/ Serum Cr)			
Ex(-)	30.337 ± 1.441	47.390 ± 3.885	36.131 ± 1.542
Ex(+)	29.951 ± 1.889	37.287 ± 3.308	38.995 ± 2.976

## Appendix 6: マリンコラーゲンオリゴ栄養成分(研究課題 3)

Nutrient composition		
	(/100g)	
Energy	388kcal	
Protein	96.6g	
Fat	0.0g	
Carbohydrate	0.0g	
	Casein	Marine Collagen Oligo
	(mg/100g)	(mg/100g)
isoleucine	4900	1200
leucine	8400	2000
lysine	7100	2500
methionine	2600	1300
cystine	430	N.D.
phenylalanine	4500	1100
tyrosine	5000	300
threonine	3700	2600
tryptophan	1100	N.D.
valine	6000	2200
histidine	2700	700
arginine	3300	4600
alanine	2700	13200
aspartic acid	6300	4500
glutamic acid	19000	7800
glysine	1600	32500
proline	10000	11000
serine	4600	3400

N.D. (not detected)