

博士論文

食餌制限を伴う自発走行運動が  
成長期および成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響

平成25年度

服部 聡士

筑波大学大学院 人間総合科学研究科

体育科学専攻

# 目 次

## 用語解説

I . 序論.....	1
II . 文献研究.....	4
1. 骨の形態と機能	
2. 骨における運動と栄養素等の摂取の重要性	
3. 運動が骨量や骨代謝動態に及ぼす影響	
4. 栄養素等摂取量の不足が骨に及ぼす影響	
5. Energy availability の低下が女性アスリートの骨に及ぼす影響	
6. Energy availability の低下が雌性動物の骨に及ぼす影響	
7. Energy availability の低下が男性アスリートの骨に及ぼす影響	
8. Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響	
III . 研究課題.....	14
1. 問題提起と研究の焦点	
2. 研究課題	
IV . 研究課題 1	
食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨構造に及ぼす影響 —成長期雄ラットにおける検討—	
緒言.....	18
— 研究課題. 1 — 1	
方法.....	20

結果.....	24
考察.....	30
一 研究課題. 1 - 2	
方法.....	31
結果.....	34
考察.....	40
研究課題. 1 要約.....	43

## V. 研究課題 2

### 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨形態に及ぼす影響 —成熟期雄ラットにおける検討—

緒言.....	44
一 研究課題. 2 - 1	
方法.....	45
結果.....	47
考察.....	53
一 研究課題. 2 - 2	
方法.....	54
結果.....	56
考察.....	62
研究課題. 2 要約.....	65

## VI. 研究課題 3

### 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態 に及ぼす影響

緒言.....	66
---------	----

方法.....	68
結果.....	72
考察.....	85
要約.....	89
<b>VII. 総合討論.....</b>	<b>90</b>
1. Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響	
2. 発育段階の違いによって、なぜ骨の形質に違いがみられたのか	
3. 食餌制限による走行距離の増大に伴う Energy availability の低下	
4. 研究限界と今後の課題	
5. スポーツ競技現場への示唆	
<b>VIII. 総括.....</b>	<b>98</b>
<b>IX. 謝辞.....</b>	<b>101</b>
<b>X. 引用文献.....</b>	<b>103</b>

# 用語解説

## <用語解説>

本研究で用いる主な用語は以下のとおりである。

### **Energy availability**

エネルギー摂取量から，運動によるエネルギー消費量を除いたエネルギー量を示し，生理機能のために利用可能なエネルギー量として考えられている。Energy availability には今のところ定着した日本語訳は存在しないため，本研究では Energy availability と呼ぶ。

### **骨密度 (Bone mineral density: BMD)**

骨塩量 (bone mineral content: BMC, g, 骨中におけるカルシウムなどのミネラルの量) を骨の単位面積 ( $\text{cm}^2$ ) や単位体積 ( $\text{cm}^3$ ) で除した値を示す。本研究では，二重エネルギーX線吸収法 (Dual-energy X-ray Absorption; DXA) による2次元による骨密度評価を行っているため，単位は「 $\text{g}/\text{cm}^2$ 」で示す。アメリカ国立衛生研究所 (National institute of Health, NIH) の NIH コンセンサス会議によって，骨強度は骨密度と骨質の二つの要因からなり，骨密度は骨強度の 70% を説明すると定義されている #153。

### **骨代謝 (Bone metabolism)**

生体の骨は，破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を絶えず繰り返している。既存の骨が吸収され，その部位に新しい骨が形成される連鎖機構を骨代謝という。骨代謝は組織学的に以下の 5 つの相 (phase) に分類されている。

#### 1. 休止相

骨の表面が lining cell と呼ばれる扁平な骨芽細胞に覆われており，骨吸収や骨形成は行われていない状態

## 2. 活性化相

副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone, PTH）や IL-1 などの骨吸収を促進するホルモンやサイトカインが lining cell に作用し，lining cell を活性化する

## 3. 吸収相

骨芽細胞系細胞や骨髄基質細胞から破骨細胞系細胞へのシグナル伝達によって，破骨細胞の分化と遊走が生じ，骨吸収が行われる

## 4. 逆転相

骨吸収窩に，マクロファージの単核細胞が出現する

## 5. 形成相

骨芽細胞により，骨吸収窩に I 型コラーゲンを主体にした類骨組織を作る．この類骨組織と骨組織の接点から石灰化が始まり，骨形成が行われる

## 骨形態計測法

骨の切片（薄切）標本を作製し，顕微鏡で観察することで，骨組織中の骨梁の長さや面積，細胞の数を計測することで，骨吸収や骨形成などの様々な情報を集める方法．その指標には以下の単位が用いられている．

### 石灰化の指標

- ・骨石灰化速度（Mineral Apposition rate; MAR,  $\mu\text{m}/\text{day}$ ）

標識期間あたりの二重組織の距離

- ・骨形成速度（Bone Formation Rate / Bone Surface; BFR/BS,  $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$ ）

骨形成速度（表面基準）

### 骨吸収の指標

- ・類骨面 (Osteoid Surface / Bone Surface; OS/BS, %)  
骨面の骨長に対する類骨面の割合
- ・骨芽細胞面 (骨面) (Osteoblast Surface / Bone Surface; Ob.S/BS, %)  
骨面の長さに対する骨芽細胞面の周長
- ・骨芽細胞数 (骨面) (Osteoblast Number / Bone Surface; Ob.N/BS, N/mm)  
骨面の長さあたりの骨芽細胞の数

### 破骨細胞の指標

- ・吸収面 (Eroded Surface / Bone Surface; ES/BS, %)  
骨面の長さあたりの破骨細胞の数
- ・破骨細胞面 (Osteoclast Surface / Bone Surface; Oc.S/BS, %)  
骨面の周長に対する破骨細胞面の周長
- ・破骨細胞数 (Osteoclast Number / Bone Surface; Oc. N/BS, N/mm)

### **骨吸収 (Bone resorption)**

骨吸収は破骨細胞が骨基質を溶解する現象を示す。骨を吸収する際、破骨細胞は骨表面に波状縁を構築し、プロトン ( $H^+$ ) と塩素イオン ( $Cl^-$ ) を吸収窩に分泌し、酸性環境を作る。さらに、骨有機成分の分解に関わるカテプシン K やメタロマトリックスポロテアーゼ 9 (MMP9) も波状縁から分泌し、骨ミネラルを脱灰する。このような破骨細胞による骨組織の脱灰と、それに続く有機成分の分解・脱却を骨吸収という。骨吸収は血中カルシウム濃度の維持や骨のリモデリングのために不可欠である。

### **骨形成 (Bone formation)**

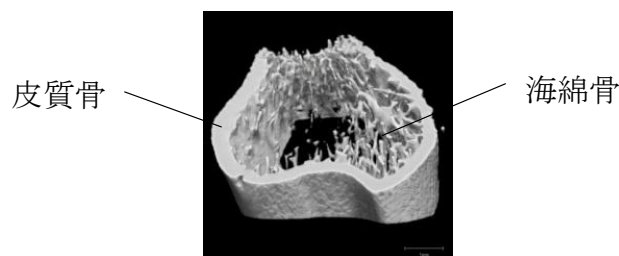
骨形成は骨芽細胞が骨を形成する現象を示す。休止相の骨芽細胞は bone lining cell と呼ばれ、扁平で線維細胞様を呈している。これに対し、形成相に入ると骨



芽細胞は活性型骨芽細胞（active osteoblast）となり，I型コラーゲンやオステオポンチンなどの細胞外基質タンパク質や，増殖因子である forming growth factor（TGF- $\beta$ ），BMPなどを合成・分泌する．活性型骨芽細胞によって産生された骨基質は，類骨（osteoid）と呼ばれている．類骨が形成されると，非結晶性リン酸カルシウムの蓄積がみられ，次第にこれがハイドロキシアパタイト結晶に変換され，石灰化が進行する．このような骨芽細胞による骨形成は，破骨細胞による骨吸収に続いて開始され，規則正しく行われる．

## 骨の構造

骨は外層を形成している硬く緻密な皮質骨（Cortical bone）と，その内側に位置して網状を呈する海綿骨（Spongy bone）とに区別でき，両者は互いに明瞭な境界を持たずに移行している．海綿骨は網状骨とも呼ばれ，分岐した骨の小柱である骨梁（trabecular bone）の3次元的な網工によって構成されている．



## TBPf（Trabecular Bone Pattern factor）

TBPfは骨梁の連結性を表す．基本的に，骨梁表面の形状が凹である骨梁は連結性が良好であり，凸である骨梁は連結性が低いという考え方で，骨梁表面の形状を評価して連結性を定量化する方法である．骨梁の面積をわずかに変化させたときの骨梁集計の変化を算出する方法で，数字の小さい方が連結性が良好であることを意味する．

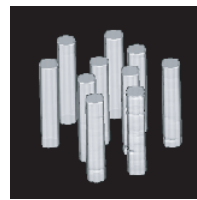
## SMI (Structure Model Index)

SMI は rod 様構造から plate 様構造までの骨梁の形態を定量化して、その体積比を算出するパラメーターである。骨梁構造指標を理想的な plate 様構造のときを 0、rod 様構造からのときを 3 として、混合状態を中間値で表現する。plate 様構造では骨梁幅をわずかに増加させても骨梁表面積は変化しないのに対して、rod 様構造では骨梁幅をわずかに増加させると骨梁の表面積が増加することにより、plate と rod あるいはその中間の構造を認識させ、それに容積を掛けることで、plate と rod 様構造の割合を定量する方法である。

plate様構造



rod様構造



# I. 序論

## <序論>

骨は生体を構築する基本構造である。骨が身体を支持する役割を担い、荷重負荷に応じて変化することは400年ほど前から既に提言されている。16世紀のイタリアの学者ガリレオ・ガリレイは「体重が重くなると、それを支えるための骨も太くならなければならない。」と提唱しており、荷重負荷に対する骨の適応は数百年にも渡って人々の興味を集めてきた問題である (Knut SchmidtNielsen, 1984)。運動は日常生活では起こり得ない多大な機械的負荷を骨に与えることから、さらなる骨量の獲得を惹起させる。運動に伴う骨量の獲得は、骨の発育のみならず、骨強度の増加にも寄与し、生涯に渡って身体を支える基盤となる。このことから、運動が骨に及ぼす影響について研究を行うことは、体育科学や健康科学にとって、重要なテーマである。

運動による骨の変化が引き起こされる条件として、食事からの栄養素等の摂取が充分に行われていることが必要である。運動の際に生じたメカニカルストレスは、骨の内部にあるメカノレセプターによって感知される。そして、生理学的なシグナルとして変換され、骨吸収を減少させるとともに骨形成を促進させる (Cowin SC et al, 1991)。これらの一連の反応による新たな骨量の獲得は、骨の構成物質であるカルシウムやリンなどの栄養素等が充分に摂取された状態でなければ起こらないことは周知の事実である。しかし、近年ではそれらが充分に補充されている状況下であっても、エネルギー摂取量が不足すると運動による骨強度の増加が起こらない可能性があることが指摘されている。エネルギー摂取量の不足は体脂肪を減少させ、アンドロゲンなどの性ホルモンやレプチン、インスリン様成長因子-1 (Insulin-like-growth factor; IGF-1) などの骨の獲得に必要な因子を減少させる (Speakman JR et al, 2011)。

このように、エネルギー摂取量の不足によって骨代謝のバランスが乱れ、その結果として運動による骨強度の増加も阻害される可能性がある。

これらのことから、運動による骨量の獲得を惹起させるためには、十分な栄養素等の摂取が行われていることが必要不可欠である。

近年、一部のスポーツ競技では、細みの体型や低体重であることが競技特性上で有利となり、栄養素等の摂取が不十分とならざるを得ない状況が生まれている。例えば、それらには陸上競技の長距離走やフィギュアスケートなどのスポーツ競技が含まれる。低体重によるランニング・エコノミーの向上や、細みの体型による審美性の増加といった点で、これらのスポーツ競技ではパフォーマンスを行う上で有利となる。その反面、これらのスポーツ競技を行うアスリートでは、疲労骨折などの骨障害の発症率が非常に高いことが報告されている (Bennell KL et al, 1996)。とくに、女性アスリートではその傾向が顕著である。運動に伴う多量のエネルギー消費や、心理的なストレスによる拒食症などを原因とする Energy availability の低下、運動誘発性無月経、それらに伴う骨の脆弱化は Female Athlete Triad (FAT) としてアメリカスポーツ医学会 (American college of sports medicine, ACSM) によって定義づけられている (Nattiv A Loucks AB et al, 2007; Otis CL et al, 1997)。実際に、運動によるエネルギー消費に対し、食事からの十分なエネルギーを摂取できていない女性アスリートは、一般成人女性と比較しても低骨密度の傾向にあることが多くの研究によって報告されている (Yeager KK et al, 1993; Rencken ML et al, 1996; Hind K et al, 2006; Ackerman KE et al, 2011)。

このように、栄養素等の摂取量の不足によって骨の脆弱化が引き起こされる可能性については、とくに女性アスリートに着目される傾向にある。その一方で、先述したスポーツ競技を行う男性アスリートにおいても、骨障害が発症していることが報告されている (Burge MR et al, 1997)。したがって、男性アスリートにおいても女性アスリートと同様に低骨密度の選手が多いこと

が予想されるが、これまでに報告されているそれらのアスリートの骨密度を評価した報告では、必ずしも結果が一致していない。すなわち、男性長距離ランナーなどのエネルギー摂取量が不足している傾向にあるアスリートでは、一般成人男性と比較して低骨密度の選手が多いという報告があるが (Kemmler W et al, 2006; Maïmoun L et al, 2003), 対照的に、低骨密度のアスリートが存在するという報告もある (Burge MR et al, 1997). さらに、骨障害の発症数の年齢分布に着目すると、ジュニア期の選手はシニア期の選手と比較して、骨障害の発症数は高く、また、発育段階による差も見受けられる (Dixon S et al, 2011; Orava S et al, 1981; 亀山泰, 2010). これらのことから、男性アスリートの骨の研究は、様々な報告が行われてきたが、一致した見解が得られていない状況にある。

そこで、本研究では、エネルギー摂取量の不足が日常的に運動を行っている雄性動物の骨に及ぼす影響について、動物モデルを用いて検討し、より統合的な理解を目指す。すなわち、エネルギー摂取量の不足は運動条件下にある雄性動物の骨の脆弱化を招くか、それらの影響は発育段階によって異なるのか、その際の骨代謝の変化にはどのような違いがあるのか、について検討を行う。骨評価の指標として骨密度以外にも、マイクロフォーカス X 線スキャンを用いた三次元骨構造解析を行い、より多面的に追及する。本研究は、健康科学、体育科学の分野において基礎的な知見をもたらす研究であると考えられる。

## II. 文献研究

## <文献研究>

本研究では、Energy availability の低下が成長期および成熟期の雄性動物の骨に及ぼす影響について、実験動物を用いて検討する。そこで本章では、「運動」と「エネルギー摂取量の不足」のそれぞれが骨に及ぼす影響について、報告されている知見をまとめる。次に、低骨密度が報告されているアスリートを想定した動物モデルについて概説する。

### 1. 骨の形態と機能

骨はハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite) と呼ばれるリン酸カルシウムなどの無機性成分と、I型コラーゲン (type-1 collagen) などのコラーゲン物質とオステオネクチン, オステオポンチン, プロテオグリカン (デコリン, バイグリカン等) などの非コラーゲン物質から成る有機性成分から構成され、脊椎動物において骨格を形成している。これらは器官の支持や保護, さらには腱によって相互に連結することで, 身体を運動させる役割などを担うことから, 身体を構成する上で極めて重要な組織であることが知られている。また, 骨内では血中カルシウム濃度などの生体の恒常性 (homeostasis) を保つために骨代謝が行われている (Frost HM, 1979)。骨代謝は, リモデリングと呼ばれる「破骨細胞による骨吸収」と「骨芽細胞による骨形成」のカップリングによって行われている。これらは皮質骨と海綿骨の両方で生じ, 活性化 (activation), 骨吸収 (resorption), 骨形成 (formation) という一連の連鎖反応 (ARF 説) として理解されている (Frost HM, 1973) 骨吸収開始に先立ち, 局所の骨基質タンパクの構造的変化, 細胞外液のイオン濃度の変化, 骨細胞の表面電荷の変化と形態変化などがみられる。破骨細胞による骨吸収が起こ



ると、骨芽細胞が誘導される。骨芽細胞は、I型コラーゲンに代表される骨基質成分を分泌することによって類骨（osteoid）を形成する。その後、この類骨の石灰化（calcification）によって骨基質が形成され、骨のリモデリングサイクルが完了する。このように、骨のリモデリングは細胞間の複雑なメカニズムの上に成り立っており、機械的負荷などの外的要因や、ホルモンレベルの変化などの内的要因が影響することで、通常のリモデリングとは異なるさらに複雑な様相を呈することが知られている。

## 2. 骨における運動と栄養素等の摂取の重要性

骨代謝は遺伝的要因、性別、年齢、喫煙などの様々な因子により影響を受けることが知られており (Kanis JA, 2002), なかでもメカニカルストレスと栄養素等は骨代謝に大きなインパクトを与える (Kanis JA, 2002; Santora AC 2nd, 1987). メカニカルストレスは、骨量の増加や骨形態の適応を惹起し、骨強度の維持に貢献する (Iwamoto J et al, 1998). 一方で、栄養素等の不足は骨代謝における骨吸収の促進と骨形成の遅滞を誘導し、骨強度を低下させることが報告されている (Ferguson VL et al, 1999). これらのことから、身体運動に伴う適度なメカニカルストレスと栄養素等の摂取は、骨の発育発達や骨強度の維持に必要不可欠である。しかし、近年では「運動によって増加した栄養素等の必要量に対して、食事からの十分な補充が行われていない」状態の選手が散見される (Loucks AB, 2007). それにより、生殖機能の低下や骨折リスクの増加など、様々な障害や異常が発生している (Nattiv A Loucks AB et al, 2007). したがって、“運動”と“栄養素等”の因子が、生体に対してどのような変化をもたらすのか、また、これらにはどのような関連性があるのか、ということについて様々な研究が行われている。

### 3. 運動が骨量や骨代謝動態に及ぼす影響

一般的に、運動に伴う機械的負荷は骨の発育発達に寄与することが知られている。とくにバレーボールのような骨に掛かる機械的負荷の大きい運動は骨密度を増加させる上で有効であることが明らかにされている (Fehling PC et al, 1995)。また、ランニングのように、跳躍運動と比較して機械的負荷の小さい運動によっても骨密度は増加することが報告されている (Arce JC et al, 1993)。動物実験においてもジャンプトレーニングで骨密度の増加がみられること (Umemura Y et al, 1997)、さらに、トレッドミルや回転車ケージを用いた走運動でも骨密度が増加することが報告されている (Chen MM et al, 1994; Newhall KM et al, 1991)。とくに、運動の骨に対する影響は成長期において大きい。Sprague-Dawley ラットの骨の成長速度は、4-11 週齢時に最も高値を示すことが知られており (Omi N et al, 1998)、Omi らは成長期に当たる 9 週齢の Sprague-Dawley ラットに対して、トレッドミルを用いた走運動を行わせたところ、安静状態で飼育した群よりも骨密度が有意な高値を示したことを確認している (Omi N et al, 1998)。また、これらの運動による骨密度の増加は、骨吸収の抑制と骨形成の促進による骨代謝の変化に起因することが知られている (Xie L et al, 2006)。実際に、Xie らは 9 週齢の雌 BALB/cByJ マウスに対して一日当たり 15 分間、10 マイクロストレインの機械的負荷を脛骨に 3 週間与え、骨形態計測による脛骨の骨代謝を評価したところ、脛骨骨幹部において Oc.S/BS などの骨吸収の指標が低値を示し、BFR/BS などの骨形成の指標では高値を示すことを報告している (Xie L et al, 2006)。

骨内には機械的負荷を感知し、伝達する機構が存在している。この機械的負荷の感知・伝達はメカノトランスダクション (mechanotransduction) と呼ばれているが、骨細胞 (osteocyte) が機械的負荷を感知する役割、すなわちメカノレセプターとしての働きを担っているといわれている (Cowin SC et al,

1991; Weinbaum S et al, 1994; Duncan RL et al, 1995). 骨細胞は周りをハイドロキシアパタイト結晶で囲まれ、細長い細胞突起を骨細管中に長く伸ばし、骨中の骨細胞同士、あるいは骨表面上の骨芽細胞などとギャップ結合を介して接し、高度に発達した細胞間ネットワークを形成する。この細胞間ネットワークを介して骨細胞は多くの骨構成細胞と様々なコミュニケーションを交わしている (Papachristou DJ et al, 2009). 骨が機械的負荷を受けると、それによって生じた骨の歪みを骨細胞が敏感に感知する。骨の歪みによって骨小腔および骨細管を満たす体液に流れが生じ、その体液の流れが骨細胞の細胞膜の表面を引きずるように働き、その刺激が骨細胞に伝達される (Burger EH et al, 1999). それによって、骨細胞のギャップ結合コネクチン (connexin) やプロスタグランジン (PG) 合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (Cyclooxygenase-2; COX-2) などのシグナル伝達物質の発現が上昇する (Papachristou DJ et al, 2009). その反応は、骨細胞自身またはシグナル伝達物質を介した細胞間ネットワークを通じて骨芽細胞・破骨細胞へと伝わり、骨形成の増加および骨吸収の減少が起こると考えられている (Papachristou DJ et al, 2009).

これらのことから、運動に伴う機械的負荷は、骨そのものによって直接的に感知され、骨代謝の変化が生じることで、負荷に対する骨の量的・構造的適応が惹起されることが明らかにされている。

#### 4. 栄養素等摂取量の不足が骨に及ぼす影響

エネルギーなどの栄養素等摂取量の不足は骨折リスクを増加させる可能性があることが知られている (Misra M et al, 2006). 食事から摂取したエネルギーは身体運動における筋活動や、その他の身体諸器官における生理機能に利用される (Manore MM Kam LC et al, 2007). エネルギー摂取量が低下すると、

全身の細胞機能が変調し、体温の維持、成長、生殖などが障害される (Loucks AB, 2007). また、骨に現れる変化についても顕著であり、女性の摂食量の不足に着目した研究は多く行われている。生理機能に利用可能なエネルギー量が減少すると、視床下部 - 下垂体 - 性腺軸 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis ; HPG-axis) に異常が生じる ( Martin B et al, 2008 )。雌性動物では、視床下部から下垂体への性腺刺激ホルモン分泌ホルモン ( GnRH; gonadotropin-releasing hormone) の分泌が低下し、下垂体での卵胞刺激ホルモン (FSH; follicle-stimulating hormone) や黄体刺激ホルモン (LH; luteotropic hormone) などの卵巣に作用するゴナドトロピン (Gonadotropin) の産生が低下することが報告されている (Kinoshita M et al, 2003)。さらに、卵巣におけるエストロゲン分泌量の減少が起こり、月経異常を引き起こす (Sanborn CF et al, 1982)。エストロゲンが減少すると、骨吸収が著しく促進され、骨密度 (Bone Mineral Density; BMD) の減少や、それらに付随して骨強度 (Bone strength) の減少が起き、閉経後骨粗鬆症と類似した病態となる (Reid IR, 2008)。Bachrach らは、摂食障害の思春期女性患者の腰椎骨密度を同年代の健康女性のものと比較したところ、有意な低値を示したことを報告している (Bachrach LK et al, 1990)。また、動物実験においてエネルギー制限を行うと、雌ラットの骨の脆弱化が引き起こされることが報告されている (Talbot SM et al, 2001)。Talbot らは 20 週齢の Sprague-Dawley 系雌ラットを自由摂取群と、自由摂取群に対して 40% のエネルギー制限を行い、タンパク質、ミネラルなどの摂取量は同量になるよう調整したエネルギー制限食群に分けて 9 週間の飼育を行ったところ、エネルギー制限食群の骨強度や骨密度は低値を示したことを報告している (Talbot SM et al, 2001)。したがって、タンパク質やミネラルを十分に摂取していても、エネルギー摂取量が不足すると骨の脆弱化が引き起こされる可能性が示唆されている。

このように、エネルギーなどの栄養素等摂取量の不足は、身体の内分泌系の変化を引き起こし、骨密度を低下させ、骨折リスクを増加させることが、多くの報告によって明らかにされている。

## 5. Energy availability の低下が女性アスリートの骨に及ぼす影響

食事摂取量の不足は、日常的にスポーツなどの身体運動を行い、定期的に骨に対して機械的負荷が掛かっている条件の下であっても、骨密度を減少させる可能性が報告されている (Dimarco NM et al, 2007). Energy availability は食事から摂取したエネルギー量から、運動によって消費されるエネルギー量を除いた生理機能に利用可能なエネルギー量として定義され、「Energy availability = エネルギー摂取量 - 運動によるエネルギー消費量」の計算式によって算出される (Nattiv A Loucks AB et al, 2007). 長距離ランナー、フィギュアスケーター、体重別階級制の種目の競技者は、エネルギー消費量が過多、もしくはエネルギー摂取量が過少であることにより、Energy availability が低下している選手が多く存在していることが報告されている (Manore MM Kam LC et al, 2007). また、Energy availability が低下すると骨折リスクを著しく増加させる可能性があることが明らかにされている (Manore MM Kam LC et al, 2007). とくに女性アスリートでは、Energy availability の低下による月経異常を伴った骨密度の減少がみられることが報告されている (Otis CL et al, 1997). これは摂食障害 (Eating disorder) などによる Energy availability の低下、運動誘発性無月経 (Functional Hypothalamic Amenorrhea)、骨粗鬆症 (Osteoporosis) と合わせて Female athlete triad (FAT) と定義されており、女性アスリートが健全な競技生活を送る上での重大な課題となっており (Manore MM Kam LC et al, 2007), 早急な問題の解決が必要である. FAT の影響は骨量獲得期である成長期において著しく影響が大きいことが明らかにされている (Russell M et

al, 2009; Rencken ML et al, 1996). Kathryn らは, 若年期の女性アスリートを正常月経群と運動誘発性無月経群に分け, 二重エネルギーX線吸収測定法 (Dual-energy X-ray Absorption, DXA) と末梢骨用定量的コンピュータ断層画像法 (Peripheral quantitative computed tomography; pQCT) を用いた骨評価を行ったところ, 運動誘発性無月経群では腰椎および大腿骨骨密度において低値を示し, 骨構造の指標である海綿骨の骨梁容積比, 骨梁数, 骨梁幅, 皮質骨の指標である皮質骨容積, 皮質骨幅などでも低値を示したことを報告している (Ackerman KE et al, 2011). このことから, Female athlete triad は成長期において, 骨量獲得の阻害のみならず, 骨構造の破綻も招くことが考えられる.

## 6. Energy availability の低下が雌性動物の骨に及ぼす影響

Energy availability の低下が生体にどのように影響を与えているのか, 詳細に検討するために, 動物モデルを用いて Female athlete triad を再現した報告が行われている. Dimarco らは, 「栄養素等摂取量の不足」と「運動による過剰なエネルギー消費を伴うトレーニング」を雌性動物で再現するために, 食餌制限と回転車ケージを用いた自発走行運動を雌ラットに行わせている. その結果, 雌性動物に月経異常や, BMD・骨強度の減少が引き起こされることが認められている (Dimarco NM et al, 2007; Loucks AB, 2007). また, Dimarco らの報告のように多量のエネルギー消費は伴わないものの, トレッドミルによる強制走行運動と食餌制限を行わせた Swift らの報告でも, 類似した結果が認められている (Swift SN et al, 2012). これらの走運動と食餌制限による骨の脆弱化は, エストロゲンの減少を介した破骨細胞の分化促進に起因すると考えられている.

これらのことから、雌性動物を対象とした報告では、運動条件下であっても食餌摂取量が不足し、Energy availabilityが低下すると、骨の脆弱化が引き起こされる可能性が示唆されている。

## 7. Energy availability の低下が男性アスリートの骨に及ぼす影響

上述したように、女性アスリートの Energy availability の低下による骨の脆弱化の問題や、動物モデルを用いて Female athlete triad の現象を再現した報告は行われている。一方で、近年では女性アスリートに関する報告と比べて報告数は少ないものの、男性アスリートにおいても Energy availability の低下によって、骨折リスクが増加する可能性が症例報告によって示唆されている。Mark らは、一週間当たりの走行距離が 50~90 マイルの白人男性ランナーに栄養調査、性ホルモンの検査、および骨密度評価を行ったところ、食事摂取量の不足、黄体形成ホルモン (luteinizing hormone; LH) およびテストステロン (Testosterone) の減少、さらに著しい骨密度の減少 ( $0.608\text{g/cm}^2$ ;  $z\text{ score}=-3.01$  SD below age-matched controls) が認められたことを報告している (De Souza MJ et al, 1994)。また、女性アスリートのみならず、男性の長距離ランナーなどの持久性競技のアスリートや、体重別階級制の種目の選手においても同様に、Energy availability が低下している選手が存在することが報告されている (De Souza MJ et al, 1994; Roemmich JN et al, 1997a; Roemmich JN et al, 1997b; Manore MM Kam LC et al, 2007)。これらのことから、男性アスリートにおいても骨の脆弱化が起きている選手が存在していること、また、その原因として Energy availability の低下が骨に影響している可能性が考えられる。しかし、長距離ランナーなどの骨密度を調査した報告では、一般男性と比較して骨密度は低値を示すという報告がある一方で (Brahm H et al, 1997)、高値を示すと

いう報告もあることから (Kemmler W et al, 2006), Energy availability と骨との関連性については明らかにされていないのが現状である。

## 8. Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響

Energy availability の低下が男性アスリートの骨に及ぼす影響については、骨密度などを調査した報告で一致した見解が得られていない。その理由として、Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響は、発育段階に応じて異なることが関連している可能性がある。その根拠となるような結果が、雄性動物に対して食餌制限を行った幾つかの報告で明らかにされている。Devlin らは 3 週齢の C57Bl/6J 雄マウスを自由摂取群と、自由摂取群に対する -30% の摂食制限を行った食餌制限群に分けて 6 週齢時および 12 週齢時に解剖を行い、骨の評価を行ったところ、全身 BMD、大腿骨骨破断強度、骨梁容積比 (Bone Volume/Tissue Volume) において、食餌制限群では自由摂取群に対して有意な低値を示したことを報告している (Devlin MJ et al, 2010)。この結果は、ヒトの成長期に相当するマウスの 3-12 週齢時では、食餌制限を行うと骨に対してネガティブな影響を及ぼす可能性を示唆している。また、ヒトを対象とした報告においても、Castro らは思春期の摂食障害患者の骨密度を評価したところ、骨密度は著しく減少していたことを報告している (Castro J et al, 2002)。対照的に、食餌制限によって成熟期の雄性動物の骨に現れる変化は、成長期とは異なる可能性がある。Mark らは 14 週齢の C57Bl/6J 雄マウスを自由摂取群と、自由摂取群に対する -40% の食餌制限を行った食餌制限群に分けて 24 週齢時に解剖を行い、骨の評価を行ったところ、食餌制限群の大腿骨破断強度や脛骨近位部の皮質骨幅は自由摂取群に比べて減少しているものの、全身 BMD に有意な差は認められず、また、骨梁容積比においても減少は認められないことを報告している (Hamrick MW et al, 2008)。さらに、この現象は



Mark らの報告の特異的なものではなく, Tatsumi らの行った長期的な食餌制限が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討した報告などでも, 再現性を持って類似した結果が示されている (Tatsumi S et al, 2008).

これらのことから, Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響は発育段階によって異なる可能性があるが, それらの関連性については十分には知られていない.

### III. 研究課題

## < 研究課題 >

### 1. 問題提起と研究の焦点

運動は骨の発育や骨強度の増加に寄与している。とくに、スポーツにおいては、日常生活の中では得ることのできない高強度の過重負荷が骨に掛かることから、さらなる骨量増加を惹起させることが知られている。しかし、長距離走やフィギュアスケートなどのような一部のスポーツ競技では、活動量に見合った十分な栄養素等の摂取を行えておらず、生理機能に利用可能なエネルギー量の不足、すなわち **Energy availability** の低下が生まれている。また、それらのスポーツを行っているアスリートは、疲労骨折などの骨障害の発症率が高いことが知られている (Nattiv A Loucks AB et al, 2007)。

これまでの **Energy availability** の低下と骨との関連性について検討した報告では、女性アスリートの場合、**Energy availability** の低下している対象者の骨の脆弱化との高い関連性が、年代に関わらずに多くの報告でみられる (Nattiv A Loucks AB et al, 2007)。一方で、男性アスリートの場合は、必ずしもそれらの関連性は一致していない。その理由として、文献研究で述べたように **Energy availability** の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響は発育段階によって異なる可能性がある。しかし、それらの関連性については明らかにされておらず、様々な側面からの検討が必要である。

以上のことを踏まえ、本研究では男性のアスリートを想定し、雄の実験動物を用いて、**Energy availability** の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響について、骨の評価指標を用いて明らかにすることを目的とする。すなわち、本研究は、  
(1) **Energy availability** の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響について、骨強度や骨密度、骨構造などの評価指標を用いて検討することによって、骨の表

現型の詳細な理解を目標とするものである。(2)とくに、その影響は発育段階によって異なる可能性があることから、成長期と成熟期の実験動物を用いて検討する。(3)さらに、発育段階での影響の違いについて検討するために、骨代謝動態も検討する。

本研究では、Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響について明らかにするために、以下の研究課題を設定した。

## 2. 研究課題

**研究課題.1 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨構造に及ぼす影響—成長期雄ラットにおける検討—**

—研究課題.1-1. 自発走行運動による機械的負荷の成長期雄ラットの骨に対する効果の検証

—研究課題.1-2. 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響

**研究課題.2 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨形態に及ぼす影響—成熟期雄ラットにおける検討—**

—研究課題.2-1. 自発走行運動による機械的負荷の成熟期雄ラットの骨に対する効果の検証

—研究課題.2-2. 食餌制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響

**研究課題.3. 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態に及ぼす影響**

**研究課題. 1**では, 成長期における骨の反応に着目する. **研究課題. 1-1**では, 自発走行運動による機械的負荷の骨に対する効果の検証を行う. これまで, 運動の骨に対する効果の検証は自発走行運動のみならず, ジャンプトレーニングやトレッドミル上での走運動など, 様々な運動形態による検討が行われてきた. 一方, 本研究では長距離ランナーなどのアスリートを想定して, 実験動物に過剰なエネルギー消費を伴う運動を行わせる必要がある. そこで, 本研究では食餌制限によって, 過剰な活動を再現することができる自発走行運動を採用した. しかし, 実際に本研究の運動条件が骨量などの変化を起こし得るのか否かについては明らかではない. そこで, **研究課題. 1-1**では自発走行運動が骨に及ぼす影響について, 骨強度や骨密度などの評価指標を用いて検証した.

**研究課題. 1-2**では, 研究課題.1-1での自発走行運動の骨に対する効果の妥当性を得た上で, 食餌制限を伴う自発走行運動が骨に及ぼす影響について検討した. 本実験では, 新たに食餌制限の要因が加わることから, 安静状態で食餌制限のみを行う群を加え, 結果の比較検討を行った. また, 二次元の骨の評価指標のみならず, 卓上型マイクロフォーカス X 線 CT システム ( $\mu$ CT) を用いて骨の測定を行うことで, 皮質骨や海綿骨を分割して評価し, 三次元の骨の凹凸構造 (SMI, TBPf など) を算出することで, より詳細な検討を目指した.

**研究課題. 2**では, 成熟期における骨の反応について着目する. **研究課題. 2-1**では, 成熟期における自発走行運動による機械的負荷の骨に対する効果の検証を行う. 先行研究では, 運動による骨の反応は発育段階によって異なる可能性があることが報告されている. とくに, 成長期では運動による骨のレスポンスは大きいことが知られている. このことから, 研究課題. 1 で得られ

た自発走行運動の成長期雄ラットの骨への効果が，成熟期雄ラットにおいても同様にみられるとは限らない．そこで，**研究課題. 2-1**では自発走行運動の成熟期雄ラットにおける骨への効果を検証しようとした．

**研究課題. 2-2**では，研究課題.2-1での自発走行運動の成熟期雄ラットの骨に対する効果の妥当性を得た上で，食餌制限を伴う自発走行運動が骨に及ぼす影響について検討した．**研究課題. 2-2**でも研究課題.1と同様に，食餌制限群を設けた上で，骨構造などの評価も行い，統合的な理解を目指した．

ここまでの研究課題で，食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期の骨強度，骨密度，および骨構造などに及ぼす影響について検討してきたが，どのような作用機序を持って，骨の形質が現れるのかについては分からなかった．そこで，**研究課題. 3**では，骨代謝動態について着目した．骨組織は破骨細胞による骨吸収と，骨芽細胞による骨形成によって維持されている．そこで，骨代謝の動態を評価することで，なぜ成長期と成熟期では異なる骨の反応が現れるのか，検討することができるのではないかと考えた．これらのことから，**研究課題. 3**では実験動物の解剖直前にカルセインを投与することで，骨の標識を行い，骨形態計測による骨代謝の動態の評価を行った．これによって，破骨細胞の数や細胞面などの骨吸収の指標や，骨芽細胞の数，細胞面，また類骨面といった骨芽細胞の指標，さらに **Mineral apposition rate (MAR)** などの石灰化速度の指標を観察することで，食餌制限を伴う自発走行運動が骨に及ぼす影響の発育段階における違いについて調べようとした．

## IV. 研究課題 1

## 研究課題. 1 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨構造に及ぼす影響—成長期雄ラットにおける検討—

### <緒言>

成長期のアスリートは日常的に運動トレーニングによって機械的負荷を受けているにも関わらず、疲労骨折などの骨障害の発症率が非常に高いことが知られている (Dixon S et al, 2011; Orava S et al, 1981). 実際に, Orava らはアスリートを年代別に分け, 疲労骨折の発症率について横断的に検討したところ, 13 歳から 15 歳のアスリートが最も高値を示したことを明らかにしている (Orava S et al, 1981). また, 持久系競技や体重別階級制競技の成長期の女性アスリートの骨障害は, Energy availability の低下を原因とする月経異常が主要因となっている可能性が報告されている (Orava S et al, 1981; Nattiv A Loucks AB et al, 2007). 同様に, 男性のそれらの競技種目を行っているアスリートも Energy availability の低下に起因すると考えられる骨障害の発症が報告されている (Burge MR et al, 1997). このことから, 成長期の男性アスリートにおいても Energy availability が低下すると骨密度の減少や骨構造の脆弱化などが起こる可能性が考えられる.

日常的に運動を行い, 骨に対して機械的負荷が掛かっている状況下であっても, 食餌制限は成長期の骨の発育を阻害する可能性がある. Devlin らは成長期の雄マウスに対して, 食餌制限が骨に及ぼす影響について検討している. その結果, 食餌制限を行ったマウスでは自由摂取を行ったマウスと比較して骨密度の低下と, 骨梁容積比や骨梁幅の減少, さらに皮質骨幅の減少などがみられることを報告している (Devlin MJ et al, 2010). このことから, 骨に対



して機械的負荷が掛かっている状況下であっても，食餌制限を行うと骨に対してネガティブな影響が現れる可能性が考えられる．しかし，成長期の雄性動物を用いて食餌制限を伴う運動トレーニングが骨に及ぼす影響について検討した報告はほとんどみられない．このことから，我々は成長期の骨が運動による機械的負荷を受けている条件下にあったとしても，エネルギー摂取量が不足すると骨強度の減少や骨構造の脆弱化などが起こるのではないかと考えた．

そこで，本研究では食餌制限を伴う運動トレーニングが成長期雄ラットの骨強度や骨形態に及ぼす影響について検討することを目的とした．研究課題. 1-1 では，自発走行運動の運動プロトコルとしての妥当性について検証するために，自発走行運動の成長期雄ラットの骨に及ぼす効果の検証を行った．さらに，研究課題. 1-2 において食餌摂取制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討した．

# 研究課題.1-1. 自発走行運動による機械的負荷の成長期雄ラットの骨に対する効果の検証

## <方法>

目的：自発走行運動による機械的負荷の成長期雄ラットの骨に対する効果の検証を行うこと

### 1. 実験動物および飼育条件

プロトコルを Fig. 1-1-1 に示した. 4週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (n=15) を 1 週間の予備飼育後に, コントロール (YC) 群 (n=7), 運動 (YEx) 群 (n=8) に分け, 12 週間の飼育を行った. Ex 群の運動は回転車ケージ (1m/回転, Fig. 1-1-2) を用いた自発走行運動を行わせ, 走行距離は 24 時間ごとに計測した. 食餌組成は Table. 1-1-1 に示した. 飼育は室温  $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 湿度  $50 \pm 5\%$ , 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00~20:00) の環境下で行い, 脱イオン蒸留水は自由摂取させた.

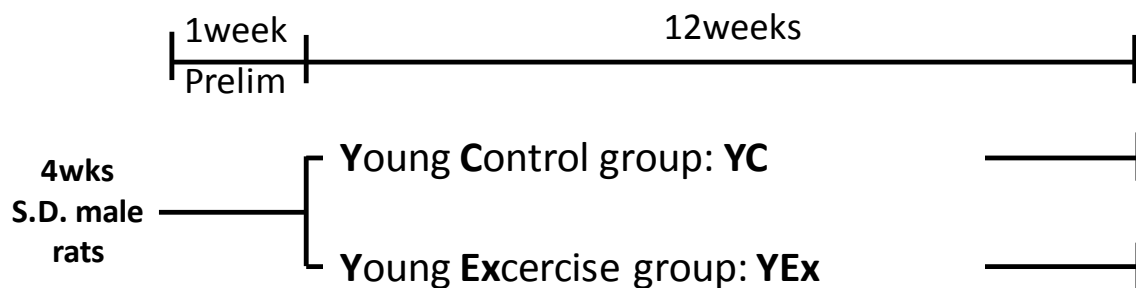
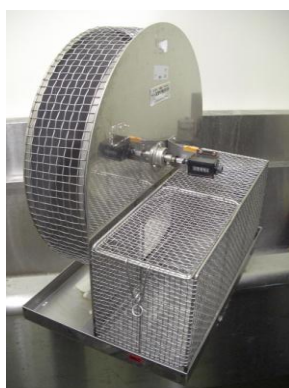


Fig. 1-1-1. Experimental protocol. Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx. After 1 weeks prelim period, the rats were carried out experimental to investigate the effect of voluntary running on the bone.



**Fig. 1-1-2. Free access to a wheel cage.**

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

Constituents	Diet (Ca=0.6%, P=0.6%)
Glucose monohydrate	62.4
Casein (vitamin Free)	18.0
Cystine	0.2
Cottonseed oil	10.0
CaCO <sub>3</sub>	1.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5
Roughage	3.0
Choline chloride	0.2
Water soluble Vitamin mixture <sup>a)</sup>	0.1
Oil soluble Vitamin mixture	(b)
Ca.P free salt mixture <sup>c)</sup>	2.0

a)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 ; foricacid, 0.02 ; vitamin B12, 0.002 ; biotin, 0.001; and glucose monohydrate, 73.7.

b)The rats received a supplement of fat-soluble vitamin in cotton seed oil three times a week which was supplied with 70µg of β-carotene, 105µg of 2-methyl-1, 4-naphthoquinone, 875µg of α to copherol and 575 I.U. of vitamin-D3.

c)The Ca P 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

## 2. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

走行距離は毎日、体重および飼料摂取量は2日ごとに測定した。解剖時には前夜からの絶食を行った。解剖はジエチルエーテル麻酔下で行い、血液、左右の大腿骨および脛骨を採取した。血液は腹部大動脈より採取し、1500rpmで15分間の遠心分離を行い、得られた血清を分注して-80℃で保存した。脛骨は採取後70%エタノールに浸漬して保存した。大腿骨は採取後、ただちに軟部組織を取り除いた。

## 3. 大腿骨破断特性

大腿骨破断特性は既報に従い、骨破断特性測定装置 DYN-1255 (DYN-1255, HIO DENKI, Tokyo, Japan) により、支点間距離 1cm, プランジャースピード 100mm/min, フルスケール 50kg, チャートスピード 120cm/min の条件で大腿骨の骨幹部中央を破断し、破断力を求めた (Ezawa I et al, 1979)。

骨破断力は骨の強さを示し、骨が破断された時の荷重 (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)。

## 4. 脛骨骨塩量および骨密度の測定

採取した脛骨は、付着している筋肉組織等を十分に取り除き、骨塩量、骨密度を求めた。

測定は二重エネルギーX線測定装置 (Dual-energy X-ray Absorption, DXA 装置: Aloka DCS-600R) を用いて行った (Omi N et al, 2001)。また、脛骨は脛骨全体 (Total tibia) の他、脛骨全長を5分割し、近位より1分割目の値を海綿骨主体の近位部の骨塩量、2,3分割目の値の合計を皮質骨主体の骨幹部の骨塩量として解析した。また、骨密度は骨塩量の値を骨面積で除して算出した。

## 5. 三次元骨構造の測定

海綿骨および皮質骨の骨構造の測定は、既報に従い高解像度マイクロコンピュータ断層撮影 (micro-computed-tomography;  $\mu$ CT, inspeXio SMX-90CT, SHIMADZU, Tokyo, Japan) を用いて行った (Harada S et al, 2011). 脛骨近位部および骨幹部の撮影は X 線エネルギー; 70 keV, インテグレーションタイム; 0.12 秒, ボクセルサイズ; 0.025 mm/pix の条件下で行った. 骨の三次元画像の構築は TRI-BONE system (Ratoc System Engineering, Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて行った (Harada S et al, 2011).

脛骨近位部の海綿骨は、骨梁容積比 (Bone volume / Tissue volume; BV/TV, %), 骨梁幅 (Trabecular thickness; Tb.th,  $\mu$ m), 骨梁数 (Trabecular number; Tb.th, N/mm), 骨梁幅 (Trabecular separation; Tb.Sp, mm), SMI (Structure Model Index), TBPf (Trabecular bone pattern factor) を算出した. SMI とは骨梁の構造が理想的な板状のときを SMI=0, 棒状のときを SMI=3 として, その間の混合状態を 0~3 の値で指標化したものである (Hildebrand T et al, 1997). また, TBPf とは 3 次元空間上で骨梁の表面近傍体積の変化に対する表面積の変化量を計算した指標である. 凹面 (板状), 凸面 (棒状) の指標となる.

脛骨近位部および骨幹部の皮質骨は、皮質骨体積 (Cortical bone volume; CV,  $\text{mm}^3$ ), 骨領域全体積 (All bone volume; AV,  $\text{mm}^3$ ), 皮質骨の割合 (Cortical bone ratio; CV/AV, %), 皮質骨幅 (Cortical bone thickness; Cb.th,  $\mu$ m) を算出した.

## 6. 統計処理

データは全て mean  $\pm$  SE で表した. また, 統計ソフトは SPSS (version 18.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用し, 両群の差は対応のない T-test を用いて検討した. 有意水準は 5% とした.

## <結果>

### 1. 体重, 体重増加量, 走行距離, 飼料摂取量, および飼料効率

初期体重, 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率を Table. 1-1-2 に示した. 初期体重に群間の差はみられなかった. 最終体重, 体重増加量は YEx 群が YC 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). 飼料摂取量に群間の差はみられなかった. 飼料効率は YEx 群が YC 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ ).

**Table. 1-1-2. Body weight, Food intake, Running distance, and Food efficiency.**

	Initial BW (g)	Final BW (g)	BW gain (g/day)	Running distance (km/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency <sup>a)</sup>
YC	91.1±1.2	532.9±16.8	5.89±0.21	—	21.7±1.1	0.27±0.01
YEx	92.1±0.9	479.0±10.6 <sup>**</sup>	5.16±0.15 <sup>**</sup>	3.64±0.85	21.8±0.3	0.24±0.01 <sup>***</sup>

Value are expressed as mean±SE

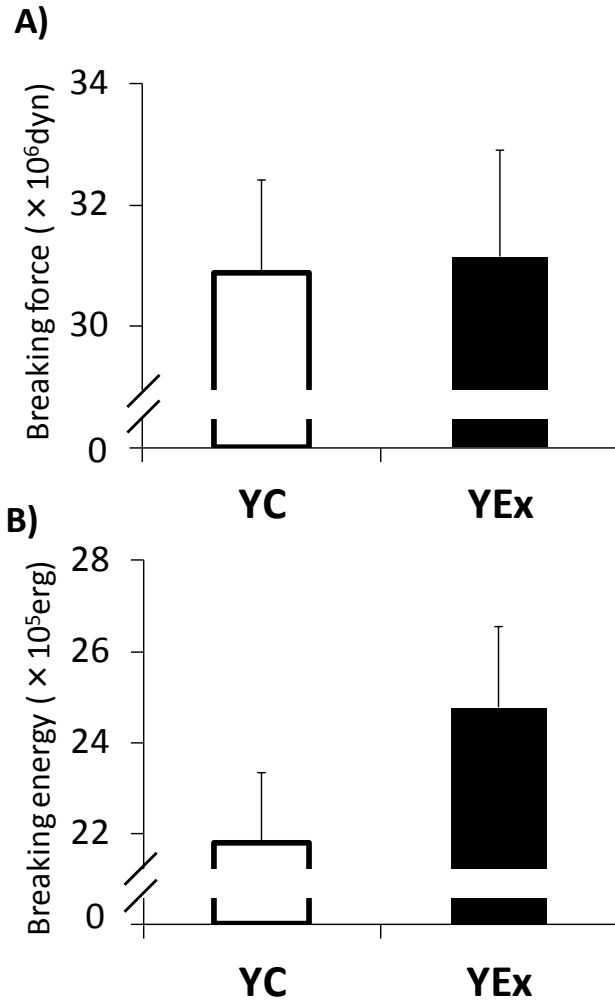
Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

<sup>a)</sup>Food efficiency was calculated by “Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day).

\*Indicates significantly different between two groups, \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

## 2. 大腿骨破断強度

骨破断力および骨破断エネルギーを Fig. 1-1-3 に示した。骨破断力および骨破断エネルギーでは、群間に統計的に有意な差はみられなかった。



**Fig. 1-1-3. Bone strength.**

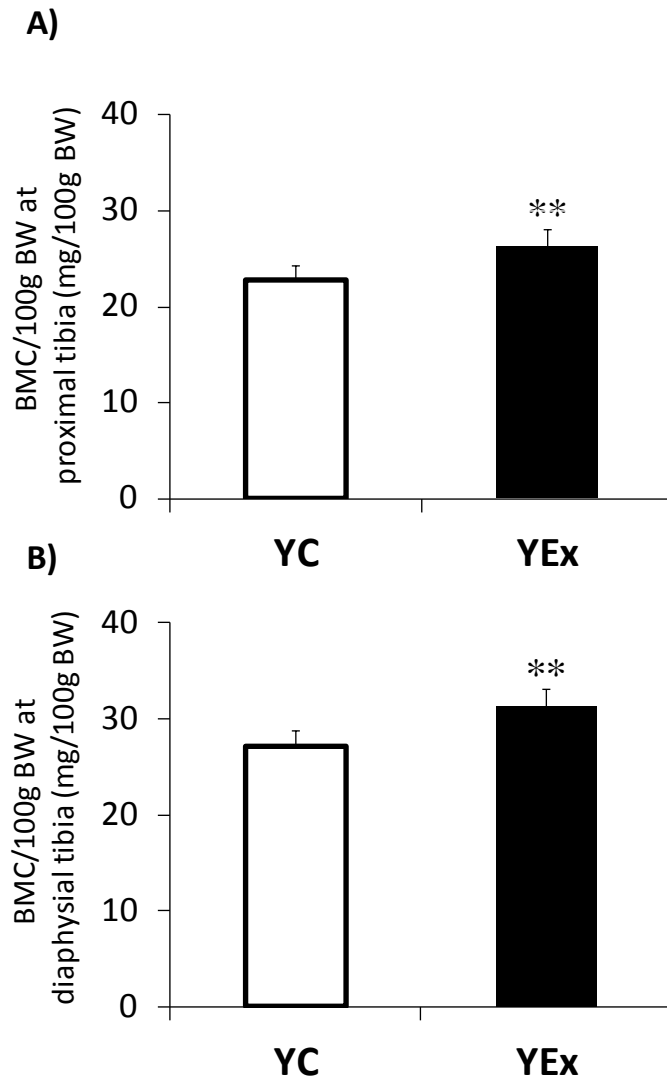
Breaking force (A), Breaking energy (B) at femoral diaphysis.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.

### 3. 脛骨骨塩量

脛骨近位部および骨幹部の骨塩量を Fig. 1-1-5 に示した。脛骨近位部および脛骨骨幹部において, YEx 群は YC 群よりも有意な高値を示した (all  $p < 0.01$ )



**Fig. 1-1-4. BMC per Body Weight at tibia.**

BMC/ 100g BW at proximal tibia (A), BMC/100g BW at diaphysial tibia (B).

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

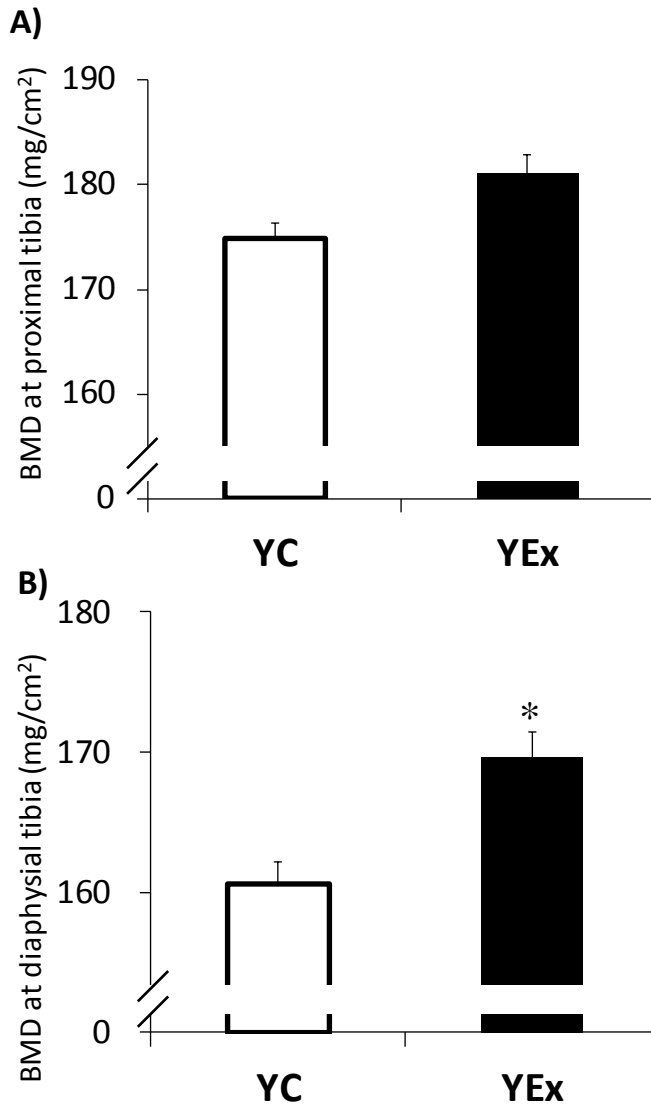
BMC was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean  $\pm$  SE.

\*\*\* $p < 0.01$  vs YC group.



#### 4. 脛骨骨密度

脛骨近位部および骨幹部の骨密度を Fig. 1-1-5 に示した。脛骨近位部において、YEx 群は YC 群よりも高値を示し ( $p=0.29$ )、脛骨骨幹部においては YEx 群は YC 群よりも有意な高値を示した ( $p<0.05$ )。



**Fig. 1-1-5. BMD at tibia.**

BMD at proximal tibia (A), BMD at diaphysial tibia (B).

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean  $\pm$  SE.

\* $p<0.05$  vs YC group.

## 5. 脛骨近位部の骨構造

脛骨近位部の骨梁および皮質骨の骨形態を Table. 1-1-3 に示した。骨梁の骨梁容積比，骨梁幅，骨梁数，骨梁間隔，SMI，TBPf に群間の有意差は認められなかった。また，皮質骨体積，骨領域全体積，皮質骨の割合，皮質骨の幅に群間の有意差は認められなかった。

**Table .1-1-3 Bone morphology. Trabecular bone and cortical bone at proximal tibia.**

	YC	YEx
Trabecular BV/TV (%)	12.0±1.6	14.0±0.8
Trabecular thickness (mm)	72.4±3.2	72.3±1.0
Trabecular number (N/mm)	1.7±0.2	1.9±0.1
Trabecular separation (mm)	585.6±94.8	454.0±30.5
SMI	2.39±0.13	2.37±0.04
TBPf (1/mm)	6.90±0.68	0.18±0.03
-----		
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	15.6±0.6	15.0±0.5
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	43.9±1.2	42.4±2.2
Cortical bone ratio (%)	35.6±1.0	35.7±1.0
Cortical bone thickness (mm)	441.9±14.1	431.1±7.9

Values are expressed mean±SE.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

## 6. 脛骨骨幹部の骨構造

脛骨骨幹部の皮質骨の骨形態を Table. 1-1-4 に示した。皮質骨体積および皮質骨の幅において YEx 群は YC 群よりも高値を示した (all  $p < 0.05$ )。骨領域全体積，皮質骨の割合においては群間に有意な差は認められなかった。

**Table .1-1-4 Bone morphology. Cortical bone at diaphysial tibia.**

	YC	YEx
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	11.0±0.2	12.0±0.3*
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	16.1±0.4	17.3±0.7
Cortical bone ratio (%)	68.5±0.8	69.9±1.5
Cortical bone thickness (mm)	664.3±9.8	705.4±13.5*

Values are expressed mean±SE.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx.

\* $p < 0.05$  vs YC group.

## <考察>

本研究では、自発走行運動の成長期雄ラットの骨に対する効果の検証を行った。体重補正を行った骨塩量、および骨密度において、YEx群は有意な高値を示した。このことから、自発走行運動は成長期雄ラットの骨量増加を引き起こす上で、妥当な運動モデルであったと考えられる。

脛骨の骨密度の結果では、脛骨近位部では自発走行運動によって骨密度の増加傾向は認められたものの、統計的に有意な差はみられなかった。その一方で、脛骨骨幹部では有意な高値を示した。また、 $\mu$ CTによる皮質骨の骨構造の変化についても同様に、近位部では皮質骨容積などで群間の差はみられないが、骨幹部ではYEx群において有意な高値を示している。先行研究によって、長管骨に対する機械的負荷の影響は近位部よりも骨幹部で大きく、皮質骨幅の骨構造の変化は骨幹部で顕著にみられることが報告されている(Hsieh YF et al, 2001)。このことから、本研究でみられた部位によって異なる骨量や骨構造の変化は、長管骨における機械的負荷に対する反応の違いに起因する可能性が考えられる。

本研究のまとめとして、自発走行運動によって成長期雄ラットの骨の骨塩量、骨密度、および骨構造に増加傾向がみられた。このことから、自発走行運動は骨量増加を引き起こす上で、妥当な運動モデルであったと考えられる。

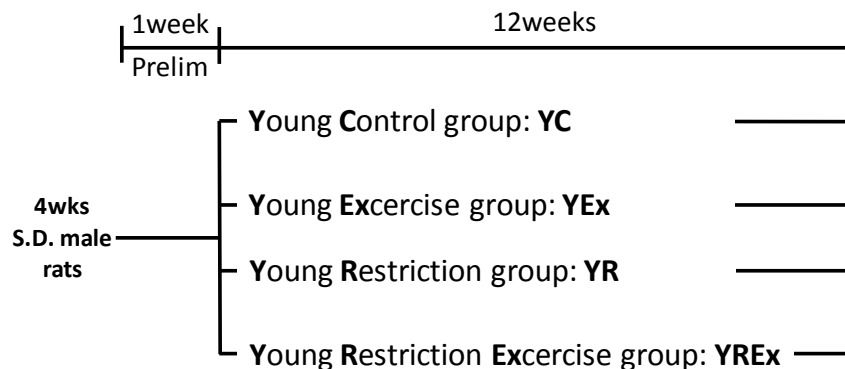
## 研究課題.1-2. 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響

### <方法>

目的：食餌制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討すること

#### 1. 実験動物および飼育条件

プロトコルを Fig. 1-2-1 に示した. 4週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (n=28) を 1 週間の予備飼育後に, コントロール (YC) 群 (n=7), 運動 (YEx) 群 (n=7), 食餌制限群 (YR) 群 (n=7), 食餌制限+運動群 (YREx) 群 (n=7) に分け, 12 週間の飼育を行った. 運動条件は研究課題. 1-1 と同様の方法を用いた. 食餌制限群 (YR 群・YREx) の摂食量は YC 群の 70% になるよう調整した. 飼育は室温  $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , 湿度  $50 \pm 5\%$ , 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00~20:00) の環境下で行い, 脱イオン蒸留水は自由摂取させた.



**Fig. 1-2-1. Experimental protocol.**

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction Exercise group: YREx.

After 1 weeks prelim period, the rats were carried out experimental to investigate the effect of voluntary running on the bone.

## 2. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題. 1-1 と同様の方法で行った.

## 3. Energy availability の算出方法

ラットの Energy availability は Anantharaman らの報告に基づき, 以下の方法を用いて算出した (Anantharaman-Barr HG et al, 1989).

Energy availability (kcal) = エネルギー摂取量 (kcal) - 運動によるエネルギー消費量 (kcal)

エネルギー摂取量 (kcal) = 4.11 (kcal) × 食餌摂取量 (g)

運動による消費エネルギー量 (kcal) = 5.0 (kcal) × 体重 (kg) × 走行距離 (km)

## 4. 血中アンドロゲンレベル

フリーテストステロン (Free testosterone) およびジヒドロテストステロン (Dihydrotestosterone) は ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) キット (Free Testosterone; IBL International, Hamburg, Germany / DHT; IBL International, Hamburg, Germany) を用いて行った (Park JH et al, 2011).

## 5. 大腿骨破断特性

研究課題. 1-1 と同様の方法で行った.

## 6. 脛骨骨塩量および骨密度の測定

研究課題. 1-1 と同様の方法で行った.

## 7. 統計処理

データは全て mean $\pm$ SE で表した. また, 統計ソフトは SPSS(version 18.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用し, 群間の差は一元配置を用いて検討した. 群間の多重比較は Tukey-test を用い, 有意水準を 5% として検討した.

## <結果>

1. 体重, 走行距離, 飼料摂取量, 飼料効率, および血中アンドロゲンレベル  
 初期体重, 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率, 血中アンドロゲンレベルを Table. 1-2-1 に示した. 実験開始時の体重に群間の差はみられなかった. 最終体重, 体重増加量は YEx 群および YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し (YC vs YEx:  $p<0.05$ , vs YR:  $p<0.001$ ), YREx 群は他の全ての群 (YC, YEx, YREx 群) に対して有意な低値を示した (all  $p<0.001$ ). 走行距離は YREx 群が YEx 群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ ). 飼料摂取量は YR 群および YREx 群が YC 群に対して有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). 飼料効率 YEx 群および YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し (YC vs YEx:  $p<0.001$ , vs YR:  $p<0.001$ ), YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p<0.001$ ).

**Table. 1-2-1. Body weight, Running distance, food intake, and hormonal levels**

	YC	YEx	YR	YREx
Initial BW (g)	91.1±1.2	91.0±1.6	92.4±1.0	90.7±0.8
Final BW (g)	532.9±16.8	476.0±11.7*	375.0±5.5***	248.6±11.0***, ††, †††
BW gain (g/day)	5.9±0.2	5.1±0.2*	3.8±0.1***	3.1±0.8***, ††, †††
Running distance (km/day)	—	3.6±0.9	—	11.5±1.2†††
Food intake (g/day)	21.7±0.5	21.7±0.4	15.5±0.1***	15.6±0.0***
Food efficiency (g/day) <sup>a)</sup>	0.30±0.01	0.27±0.00***	0.26±0.01***	0.15±0.00***, ††, †††
Energy availability (kcal) <sup>b)</sup>	89.2±1.9	83.5±2.1	63.9±0.2***, †††	53.3±1.4***, ††, †††
Free testosterone (pg/ml)	14.5±6.2	17.8±9.0	8.7±3.6	5.0±2.1
Dihydrotestosterone (pg/ml)	606.8±156.7	647.7±250.9	409.6±140.9	346.5±77.7

Values are expressed mean±SE.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx.

<sup>a)</sup> Food efficiency was calculated by “Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day).”

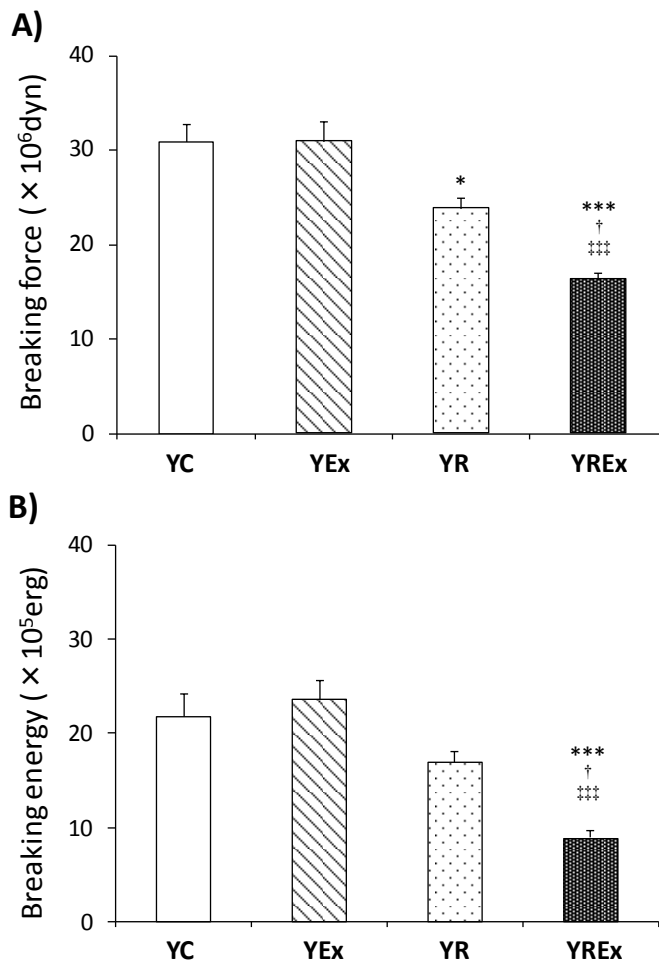
<sup>b)</sup> Energy availability was calculated as dietary energy intake minus exercise energy expenditure.

\* $p<0.05$ , \*\*\* $p<0.001$  vs YC group, †† $p<0.001$  vs YR group, ††† $p<0.001$  vs YEx group.



## 2. 大腿骨破断強度

骨破断エネルギーおよび骨破断力を Fig. 1-2-2 に示した。骨破断エネルギーは, YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p < 0.001$ )。骨破断力では YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.05$ ), YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p < 0.001$ )。



**Fig. 1-2-2. Bone strength.**

Breaking force (A), Breaking energy (B) at femoral diaphysis.

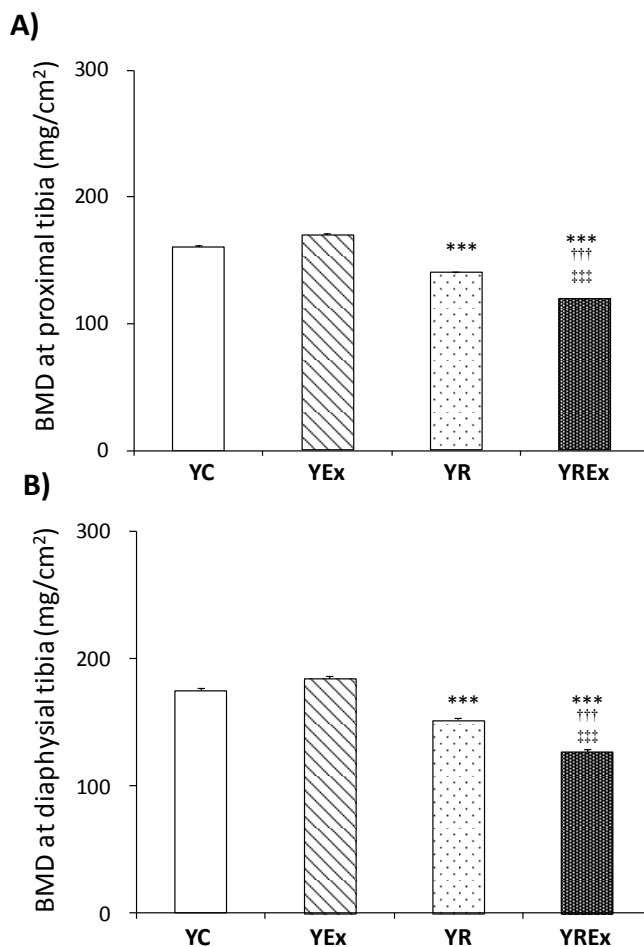
Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx

Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs YC group, † $p < 0.05$  vs YR group, ‡ $p < 0.001$  vs YEx group

### 3. 脛骨骨密度

脛骨近位部および骨幹部の骨密度を Fig. 1-2-3 に示した。脛骨近位部において, YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.05$ ), YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p<0.001$ ), 脛骨骨幹部においても同様に, YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.05$ ), YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p<0.001$ ) .



**Fig. 1-2-3. BMD at tibia.**

BMD at proximal tibia (A), BMD at diaphysial tibia (B).

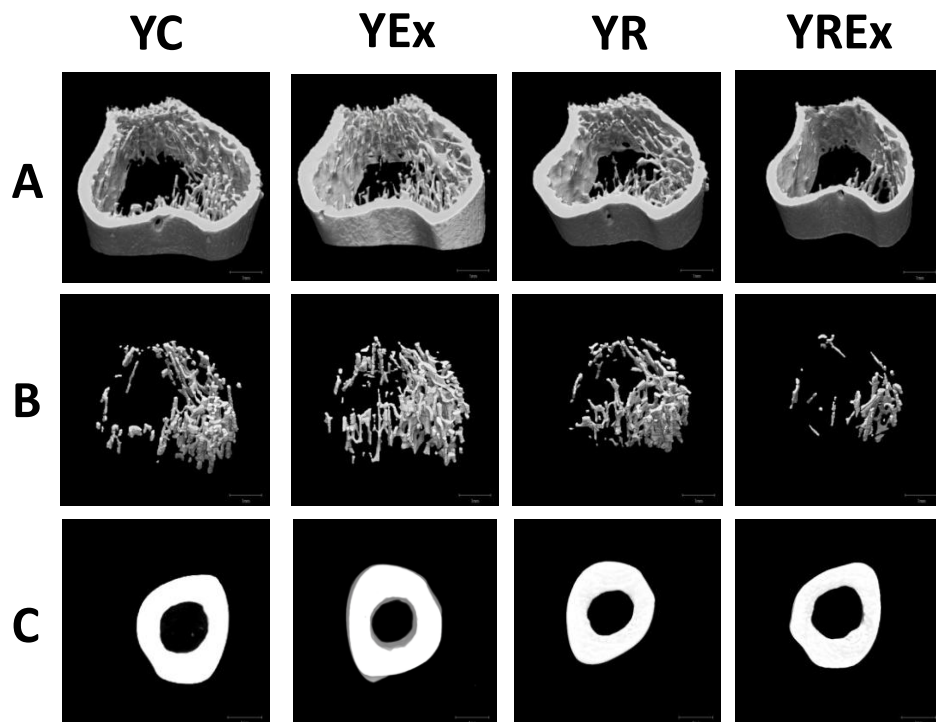
Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx.

BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean  $\pm$  SE.

\*\*\* $p<0.001$  vs YC group, ††† $p<0.001$  vs YR group, ‡‡‡ $p<0.001$  vs YEx group

#### 4. 脛骨近位部および骨幹部の三次元画像

脛骨近位部および骨幹部の三次元画像を Fig. 1-2-4 に示した. YC 群と比較して運動群では近位部の骨梁の増加と皮質骨幅の増大がみられた. 一方で, YR 群では骨梁の減少と皮質骨幅の減少がみられた. さらに, YREx 群では著しい骨梁の減少と皮質骨幅の減少がみられた.



**Fig. 1-2-4. Representative  $\mu$ CT images of the groups.**

$\mu$ CT images at proximal tibia (A), trabecular bone at proximal tibia (B), and cortical bone at diaphysial tibia (C) are shown.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx.

Food restriction induced deteriorated trabecular structure, although bone tissues were exposed to mechanical loading by running exercise.

## 5. 脛骨近位部の骨構造

脛骨近位部の骨梁および皮質骨の骨形態を Table. 1-2-2 に示した。骨梁の骨梁容積比において YREx 群は YC 群および YEx 群よりも有意な低値を示した (YC vs YREx:  $p < 0.05$ , YEx vs YREx:  $p < 0.001$ )。骨梁幅では有意な差は認められなかった。骨梁数および骨梁間隔において YREx 群が YC 群よりも有意な低値を示した (all  $p < 0.001$ )、SMI、TBPf に群間の差は認められなかった。また、皮質骨体積においては YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.001$ )、YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p < 0.001$ )。骨領域全体積においても YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.01$ )、YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (vs YC:  $p < 0.001$ , vs YR:  $p < 0.01$ , vs YEx:  $p < 0.01$ )。皮質骨の割合には群間の差は認められなかった。皮質骨の幅においては YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.05$ )、YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (vs YC:  $p < 0.001$ , vs YR:  $p < 0.01$ , vs YEx:  $p < 0.01$ )。

**Table .1-2-2. Bone morphology. Trabecular bone and cortical bone at proximal tibia.**

	YC	YEx	YR	YREx
Trabecular BV/TV (%)	12.0±1.6	14.4±0.5	10.6±0.5	8.5±0.4 <sup>*,***</sup>
Trabecular thickness (mm)	74.2±3.2	70.9±1.6	70.9±1.6	69.4±2.9 <sup>***</sup>
Trabecular number (N/mm)	1.7±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.2±0.0 <sup>***</sup>
Trabecular separation (μm)	585.6±94.8	609.0±44.3	609.0±44.3	753.0±28.4 <sup>***</sup>
SMI	2.4±0.1	2.4±0.1	2.4±0.1	2.6±0.1
TBPf (1/mm)	6.9±0.7	6.6±0.5	6.6±0.5	6.6±1.1
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	15.6±0.6	15.0±0.5	12.7±0.2 <sup>***</sup>	9.8±0.3 <sup>***,††,†††</sup>
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	43.9±1.2	42.8±2.5	36.0±0.7 <sup>**</sup>	27.2±1.3 <sup>***,††,†††</sup>
Cortical bone ratio (%)	35.6±1.0	35.4±1.1	35.4±0.7	36.2±1.3
Cortical bone thickness (μm)	441.9±14.1	429.6±9.0	396.3±9.7 <sup>*</sup>	336.6±12.7 <sup>***,††,†††</sup>

Values are expressed mean±SE.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs YC group, †† $p < 0.01$ , ††† $p < 0.001$  vs YR group, ††† $p < 0.001$  vs YEx group

## 6. 脛骨骨幹部の骨構造

脛骨骨幹部の皮質骨の骨形態を Table. 1-2-3 に示した。皮質骨体積においては YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.01$ ) , YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (all  $p < 0.001$ ) 。骨領域全体積においても YR 群が YC 群よりも有意な低値を示し ( $p < 0.01$ ) , YREx 群は他の全ての群に対して有意な低値を示した (vs YC:  $p < 0.001$ , vs YR:  $p < 0.001$ , vs YEx:  $p < 0.001$ ) 。皮質骨の割合には群間の差は認められなかった。皮質骨の幅においては YREx 群が YC 群および YEx 群に対して有意な低値を示した (vs YC:  $p < 0.01$ , vs YEx:  $p < 0.001$ ) 。

**Table .1-2-3 Bone morphology. Cortical bone at diaphysial tibia.**

	YC	YEx	YR	YREx
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	11.0±0.2	11.9±0.3	9.7±0.2 <sup>**</sup>	8.3±0.2 <sup>***, ††, †††</sup>
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	16.1±0.4	17.0±0.7	13.9±0.3 <sup>**</sup>	11.8±0.3 <sup>***, ††, †††</sup>
Cortical bone ratio (%)	68.5±0.8	70.5±1.4	70.0±1.2	70.2±0.6 <sup>**</sup>
Cortical bone thickness (μm)	664.3±9.8	711.2±13.0	636.5±14.5	587.9±10.1 <sup>***</sup>

Values are expressed mean±SE.

Young Control group: YC, Young Exercise group: YEx, Young Restriction group: YR, Young Restriction plus Exercise group: YREx.

\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs YC group, †† $p < 0.001$  vs YR group, ††† $p < 0.001$  vs YEx group

## <考察>

本研究では、食餌制限を伴う運動トレーニングが成長期雄ラットの骨強度、骨密度、骨形態に及ぼす影響について検討することを目的とした。本研究の結果では、YC 群と比較して YREx 群では骨強度、骨密度、骨梁容積比、皮質骨量と皮質骨幅の有意な低下がみられた。これらの結果から、成長期雄ラットにおいて食餌制限を伴う自発走行運動は骨強度や骨密度の減少と、骨構造の異常を引き起こすことが示唆された。

YREx 群の骨密度や、皮質骨幅などの皮質骨の骨構造は YC 群と比較して有意な減少が認められた。それらの結果は、成長期雄ラットにおいて Energy availability の低下は骨の脆弱化を招く可能性があることを示唆すると考えられる。一般的に、皮質骨量や皮質骨幅は機械的負荷によって増加することが知られている (Chen JL et al, 2001; Li CY et al, 2003; McCarthy RN et al, 1992; Yao W et al, 2001)。しかし、本研究では食餌制限を行うことによって、運動による機械的な負荷の効果が骨にみられなくなった。このことから、本研究の結果は機械的負荷が骨に掛かっていたとしても、食餌制限は骨強度を減少させることを示唆していると考えられる。

一方で、YREx 群では他の群と比較して著しい骨梁の減少がみられたが、YR 群では同様の結果は認められなかった。この結果に関して、YREx 群は運動によってエネルギー消費量が増加していることから、YREx 群の Energy availability は YR 群よりも低下しており、Energy availability の低下による骨に対する影響は YREx 群は YR よりも大きかったのではないかと考えられる。Energy availability の低下は内分泌系に関与し、アンドロゲン分泌量を減少させることが報告されている (Devlin MJ et al, 2010)。また、アンドロゲン分泌量の減少は骨代謝に影響し、骨の脆弱化を招くことが明らかにされている

(Venken K et al, 2007). 実際には, Sanderson らは雄の Lobund-Wistar ラットを自由摂取群と食餌制限群 (自由摂取群の 35%の食餌制限) に分け, 食餌制限が骨に及ぼす影響について検討したところ, 食餌制限は大腿骨遠位部の骨塩量の減少と骨梁減少を引き起こすことを報告している (Sanderson JP et al, 1997). そのため, YREx 群の結果から, Energy availability がより低下することによって, 骨に対する影響は大きくなる可能性を示唆すると考えられる.

YREx 群において, 骨強度や骨密度は他の群と比較して低値を示していたにも関わらず, フリーテストステロン (Free testosterone) とジヒドロテストステロン (DHT; Dihydrotestosterone) に減少傾向は認められたが, 統計的に有意な差ではなかった. アンドロゲンの分泌は HPG-axis を介して調整され, 骨代謝の調整因子として関与している (Dixon S et al, 2011). 例えば, アンドロゲンは破骨細胞のアンドロゲンレセプターと結合し, 骨吸収を抑制することがヒト, マウス, トリの細胞を対象とした検討で明らかにされている. 一方で, Chen らは食餌制限が雄ラットのアンドロゲン産生量に及ぼす影響について縦断的に検討したところ, 短期的な食餌制限を行うと自由摂取群と比較して著しくアンドロゲンレベルを減少させるものの, 長期的な食餌制限では自由摂取群と食餌摂取群との間に有意な差がみられなくなることを明らかにしている. この現象のメカニズムは明らかではないが, 食餌制限に対する適応が起きたのではないかと考えられている (Chen H et al, 2005). このことから, 本研究の実験条件も食餌制限を行った YR 群と YREx 群は長期的な Energy availability の低下に対して適応し, その結果として自由摂取を行った YC 群および YEx 群との統計的に有意な差が認められなくなったのではないかと考えられる.

YREx 群の走行距離は YEx 群よりも有意な高値を示した. この結果は食餌制限による Activity-stress paradigm, すなわち飢餓状態によって動物の活動量が増加する現象に基づくものであると考えられる (Routtenberg A et al, 1967).

この現象は飢餓状態における求餌行動として解釈されているが，その詳細なメカニズムについては明らかにされていない (Katch VL et al, 1979). これらのことから，本研究で認められた YREx 群の著しい活動量の増加は Activity-stress paradigm によって引き起こされたと考えられる．今後の実験として，機械的負荷を統一した検討を行う場合には，食餌制限をさらにシビアな条件で行った上で，走行距離を統制するような実験条件での検討が必要であると思われる．

本研究には研究限界が存在すると考えられる．第一に，本研究の結果から Energy availability の低下を伴う運動トレーニングは骨の脆弱化を招くことは明らかになったものの，走行距離や Energy availability のレベルが群によって異なることから，どのように Energy availability の低下がどのように骨に影響を及ぼすか明らかではない．このことから，走行運動による機械的負荷の強度や頻度を調整し，また，pair-feeding を行うなどの Energy availability の低下量を調整した同じ実験条件での検討が求められる．

本研究のまとめとして，食餌制限を伴う運動トレーニングは成長期雄ラットの骨強度の減少と骨形態の異常を引き起こすことが示唆された．本研究の結果は，成長期の雄の生体において骨の脆弱化を招く可能性があることを示唆するものであると考えられる．



## <要約>

本研究課題では，食餌制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響について調べ，以下の知見を得た．

- 1．自発走行運動は成長期雄ラットの骨の変化を惹起させる
- 2．食餌制限を伴う自発走行運動は，成長期雄ラットの骨強度や骨密度を低下させる
- 3．食餌制限を伴う自発走行運動は，成長期雄ラットの骨構造の脆弱化を招く

以上のことから，食餌制限を伴う自発走行運動は成長期雄ラットの骨の脆弱化を招くことが示された．

## V. 研究課題 2

## 研究課題. 2 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨形態に及ぼす影響—成熟期雄ラットにおける検討—

### < 緒言 >

研究課題. 1 では、Energy availability の低下は成長期の雄性動物の骨の脆弱化を引き起こすことが明らかとなった。このことから、Energy availability の低下は成長期の男性アスリートの骨折リスクを増加させる要因となり得る可能性がある。一方で、Energy availability の低下は成熟期の男性アスリートの骨に対して、あまり影響しない可能性がある。実際に、男性アスリートの骨障害は成長期に多く発症しており、成熟期では発症数は減少していることが報告されている (Orava S et al, 1981)。そこで、我々は成熟期の雄性動物では Energy availability の低下によって骨は変化しにくいのではないかと考えた。

これらのことから、本研究では食餌摂取量の不足を伴う運動トレーニングが成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討することを目的とした。研究課題. 2-1 では、自発走行運動の運動プロトコルとしての妥当性について検証するために、自発走行運動の成熟期雄ラットの骨に及ぼす効果の検証を行った。さらに、研究課題. 2-2 において食餌摂取制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討した。

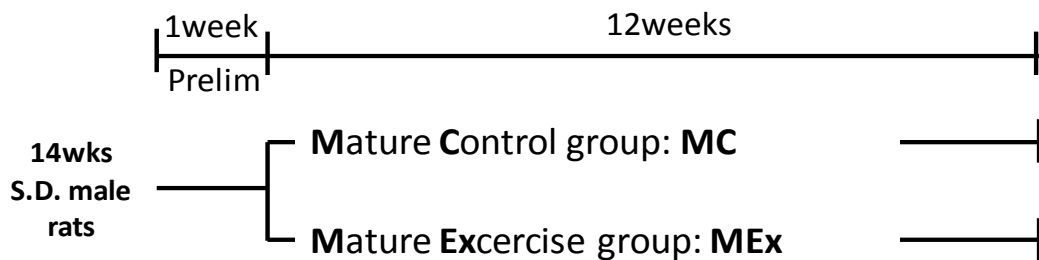
## 研究課題.2-1. 自発走行運動による機械的負荷の成熟期雄ラットの骨に対する効果の検証

### <方法>

目的：自発走行運動による機械的負荷の成熟期雄ラットの骨に対する効果の検証を行うこと

#### 1. 実験動物および飼育条件

プロトコルを Fig. 2-1-1 に示した. 14 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (n=15) を 1 週間の予備飼育後に, コントロール (MC) 群 (n=7), 運動 (MEx) 群 (n=8) に分け, 12 週間の飼育を行った. 運動条件および食餌組成は研究課題. 1 と同様の条件で行った. 飼育は室温  $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , 湿度  $50 \pm 5\%$ , 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00~20:00) の環境下で行い, 脱イオン蒸留水は自由摂取させた.



**Fig. 2-1-1. Experimental protocol.**

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

After 1 weeks prelim period, the rats were carried out experimental to investigate the effect of voluntary running on the bone.

## 2. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 3. 大腿骨破断特性

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 4. 脛骨骨塩量および骨密度の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 5. 三次元骨構造の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 6. 統計処理

研究課題. 1-1 と同様の方法で行った.

## <結果>

### 1. 体重, 体重増加量, 走行距離, 飼料摂取量, および飼料効率

初期体重, 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率を Table. 2-1-1 に示した. 初期体重に群間の差はみられなかった. 最終体重, 体重増加量は MEx 群が MC 群よりも有意な低値を示した (最終体重;  $p<0.001$ , 体重増加量;  $p<0.01$ ). 飼料摂取量には群間の差はみられなかった. 飼料効率は MEx 群が MC 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ ).

**Table. 2-1-1. Body weight, Food intake, Running distance, and Food efficiency.**

	Initial BW (g)	Final BW (g)	BW gain (g/day)	Running distance (km/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency <sup>a)</sup>
<b>MC</b>	425.8±8.2	649.1±14.8	3.1±0.8	—	22.6±2.0	0.17±0.03
<b>MEx</b>	427.9±5.3	537.8±20.4 <sup>***</sup>	1.5±0.3 <sup>**</sup>	1.36±0.54	22.9±2.3	0.07±0.01 <sup>**</sup>

Value are expressed as mean±SE

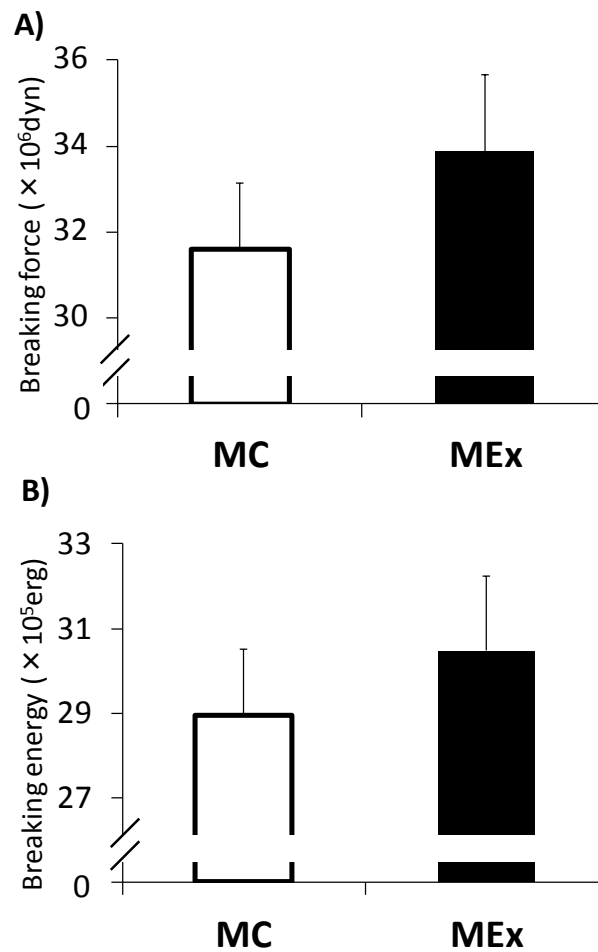
Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

<sup>a)</sup>Food efficiency was calculated by “Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day).”

\*Indicates significantly different between two groups, \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$

## 2. 大腿骨破断強度

骨破断エネルギーおよび骨破断力を Fig. 2-1-2 に示した。骨破断エネルギーおよび骨破断強度では、群間に統計的に有意な差はみられなかった ( $p=0.75$ ,  $p=0.46$ )。



**Fig. 2-1-2. Bone strength.**

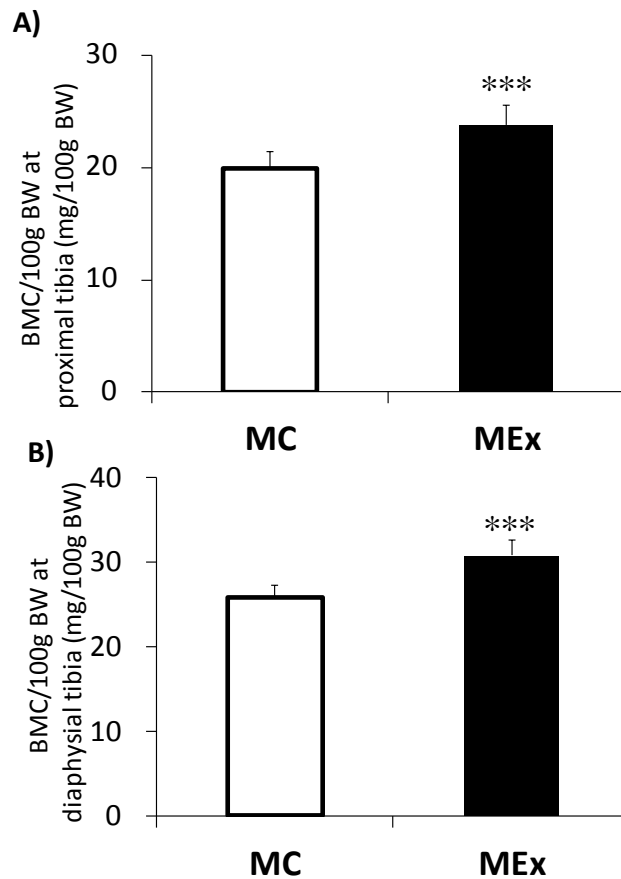
Breaking force (A), Breaking energy (B) at femoral diaphysis.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.

### 3. 脛骨骨塩量

脛骨近位部および骨幹部の骨塩量を Fig. 2-1-3 に示した。脛骨近位部および脛骨骨幹部において MEx 群は MC 群よりも有意な高値を示した (all  $p < 0.001$ )。



**Fig. 2-1-3. BMC per Body weight at tibia.**

BMC per BW at proximal tibia (A), BMD per BW at diaphysal tibia (B).

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

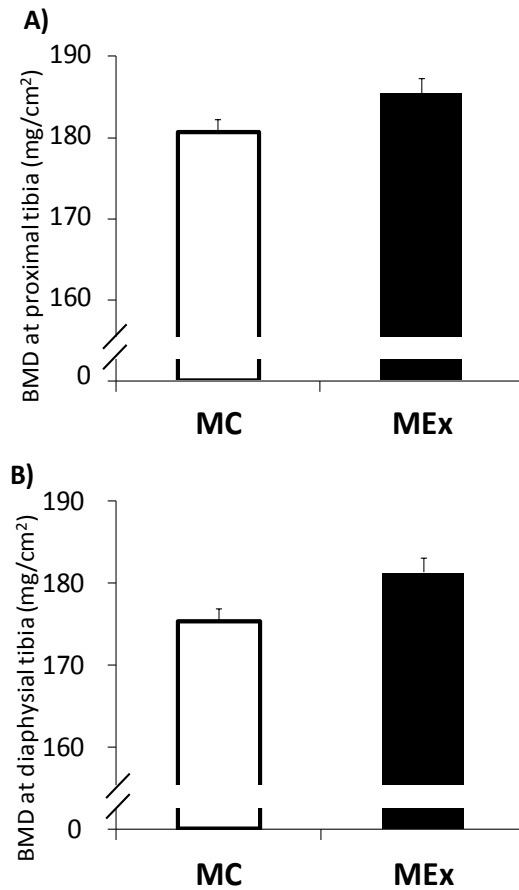
BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean  $\pm$  SE.

Indicates significantly different between two groups, \*\*\* $p < 0.001$ .



#### 4. 脛骨骨密度

脛骨近位部および骨幹部の骨密度を Fig. 2-1-4 に示した。脛骨近位部において群間に差はみられず、脛骨骨幹部においては MEx 群は MC 群よりも高値傾向を示した ( $p=0.13$ )。



**Fig. 2-1-4. BMD at tibia.**

BMD at proximal tibia (A), BMD at diaphysial tibia (B).

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean±SE.

## 5. 脛骨近位部の骨構造

脛骨近位部の骨梁および皮質骨の骨構造を Table .2-1-2 に示した。骨梁の骨梁容積比，骨梁幅，骨梁数，骨梁間隔，SMI，TBPf に群間の差は認められなかった。また，皮質骨体積，骨領域全体積，皮質骨の割合，皮質骨の幅に群間の差は認められなかった。

**Table .2-1-2 Bone morphology. Trabecular bone and cortical bone at proximal tibia.**

	MC	MEx
Trabecular BV/TV (%)	9.9±1.8	11.1±1.9
Trabecular thickness (mm)	67.1±2.9	69.2±1.9
Trabecular number (N/mm)	1.5±0.2	1.6±0.3
Trabecular separation (mm)	708.8±113.8	630.0±96.6
SMI	2.6±0.1	2.4±0.1
TBPf (1/mm)	7.8±1.0	6.8±0.6
<hr/>		
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	15.3±0.3	16.0±0.6
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	39.8±1.7	40.8±1.6
Cortical bone ratio (%)	38.8±1.3	39.2±0.9
Cortical bone thickness (mm)	452.0±8.7	468.8±12.9

Values are expressed mean±SE.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

\*Indicates significantly different between two groups, \*p<0.05.

## 6. 脛骨骨幹部の骨構造

脛骨骨幹部の皮質骨の骨構造を Table. 2-1-3 に示した。皮質骨体積および皮質骨の幅において MEx 群は MC 群よりも高値を示した ( $p<0.05$ )。骨領域全体積，皮質骨の割合においては群間に有意な差は認められなかった。

**Table .2-1-3 Bone morphology. Cortical bone at diaphysial tibia.**

	MC	MEx
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	12.8±0.4	13.3±0.6*
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	18.8±0.7	18.7±1.1
Cortical bone ratio (%)	67.9±0.6	71.6±1.5
Cortical bone thickness (mm)	704.0±14.3	760.4±18.1*

Values are expressed mean±SE.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx.

\*Indicates significantly different between two groups, \* $p<0.05$ .

## <考察>

本研究では自発走行運動による機械的負荷の成熟期雄ラットの骨に対する効果の検証を行った。本研究の結果から、ME<sub>x</sub>群において、骨塩量は有意な高値を示し、近位部および骨幹部の皮質骨幅などの骨構造においても有意な高値が認められた。このことから、自発走行運動は成熟期雄ラットの骨量などの変化を引き起こす上で、妥当な運動モデルであったと考えられる。

骨密度の結果において、ME<sub>x</sub>群はMC群よりも高値傾向を示したものの、統計的に有意な差は認められなかった。先行研究において、成熟期以降の骨は成長期よりも機械的負荷に対する反応は異なることが報告されている。実際にBennellらは成熟期ラットに対して、荷重負荷トレーニングを行わせ、骨密度の変化について検討したところ、骨密度の変化はほとんど認められなかったことを報告している (Bennell K et al, 2000)。本研究で行った成熟期雄ラットの飼育期間は14-27週齢時であり、成熟期であったことから、自発走行運動による著しい骨密度の増加は認められなかった可能性がある。

本研究のまとめとして、自発走行運動は成熟期の骨塩量の増加や、骨構造的な変化を引き起こした。このことから、自発走行運動は機械的負荷に対する骨の反応を惹起させる上で、効果的な運動モデルであった可能性が考えられる。

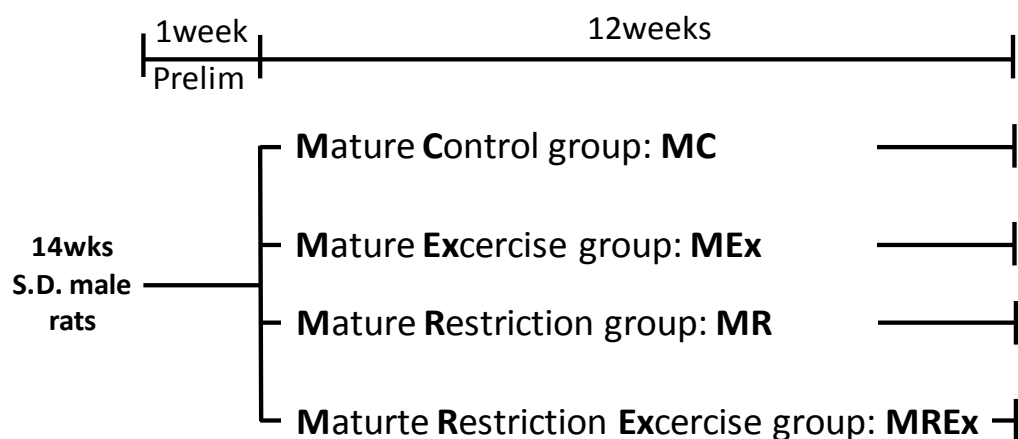
## 研究課題.2-2. 食餌制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響

### <方法>

目的：食餌制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討すること

#### 1. 実験動物および飼育条件

プロトコルを Fig. 2-2-1 に示した. 14 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (n=28) を 1 週間の予備飼育後に, コントロール (MC) 群 (n=7), 運動 (MEx) 群 (n=7) 食餌制限群 (MR) 群 (n=7), 食餌制限+運動群 (MREx) 群 (n=7) に分け, 12 週間の飼育を行った. 運動条件および食餌制限は研究課題. 1 と同様の条件で行った. 飼育は室温  $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , 湿度  $50 \pm 5\%$ , 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00~20:00) の環境下で行い, 脱イオン蒸留水は自由摂取させた.



**Fig. 2-2-1. Experimental protocol.**

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

After 1 weeks prelim period, the rats were carried out experimental to investigate the effect of voluntary running on the bone.

## 2. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 3. Energy availability の算出方法

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 4. 血中アンドロゲン濃度の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 5. 大腿骨破断特性

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 6. 脛骨骨塩量および骨密度の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 7. 三次元骨構造の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 8. 統計処理

研究課題. 1-2 と同様の方法で行った.

## <結果>

1. 体重, 走行距離, 飼料摂取量, 飼料効率, および血中アンドロゲンレベル  
 初期体重, 最終体重, 体重増加量, 飼料摂取量, 飼料効率, 血中アンドロゲンレベルを Table. 2-2-1 に示した. 初期体重に群間の差はみられなかった. 最終体重は MEx 群が MC 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.01$ ), MR 群および MREx 群は MC 群および MREx 群よりも有意な低値を示した (MR vs MC:  $p<0.001$ , vs MEx:  $p<0.001$  / MREx vs MC:  $p<0.001$ , vs MEx:  $p<0.001$ ). 体重増加率は MR 群が MC 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), MREx 群が MC 群および MEx 群よりも有意な低値を示した (MREx vs MC:  $p<0.001$ , vs MEx:  $p<0.01$ ). 走行距離は MREx 群が MEx 群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ ). 飼料摂取量は群間に統計的な有意差はみられなかった. 飼料効率は MR 群および MEx 群は MC 群よりも有意な低値を示した (MR vs MC:  $p<0.01$ , MR vs MC:  $p<0.01$ ). MREx 群は MC 群および MEx 群より有意な低値を示した (MREx vs MC:  $p<0.001$ , MC vs MEx:  $p<0.01$ ). フリーテストステロンおよびジヒドロテストステロンにおいては群間に有意な差は認められなかった.

**Table.2-2-1 Body weight, Running distance, and hormonal levels**

	MC	MEx	MR	MREx
Initial BW (g)	425.8±8.2	427.1±5.6	425.9±3.2	425.1±1.9
Final BW (g)	649.1±14.8	553.1±13.0 <sup>***</sup>	455.9±4.2 <sup>***,†††</sup>	397.4±21.0 <sup>***,†††</sup>
BW gain (g/day)	3.1±0.8	1.7±0.1	0.4±0.1 <sup>***</sup>	-0.1±0.3 <sup>***,††</sup>
Running distance (km/day)	—	1.4±0.9	—	8.1±0.7 <sup>†††</sup>
Food intake (g/day)	22.6±2.0	21.7±2.0	17.5±0.1	17.6±0.4
Food efficiency (pg/ml) <sup>a)</sup>	0.17±0.03	0.08±0.01 <sup>**</sup>	0.02±0.06 <sup>***</sup>	-0.01±0.02 <sup>***,††</sup>
Energy availability (kcal) <sup>b)</sup>	92.7±8.0	91.5±8.5	71.7±0.2	67.2±1.6 <sup>*</sup>
Free testosterone (pg/ml)	17.7±9.1	8.2±4.0	20.6±10.6	8.2±4.6
Dihydrotestosterone (pg/ml)	728.0±175.7	568.0±105.0	750.2±163.1	542.2±160.5

Values are expressed mean±SE.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

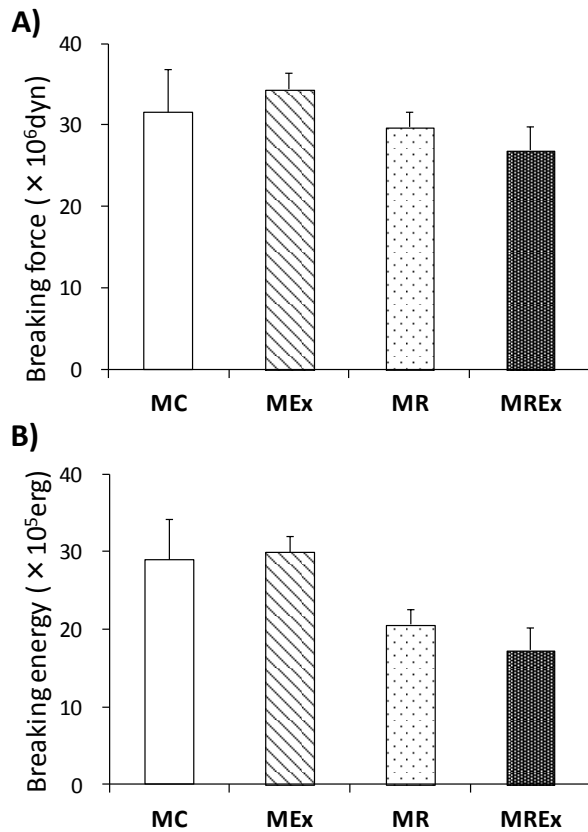
<sup>a)</sup> Food efficiency was calculated by “Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day).”

<sup>b)</sup> Energy availability was calculated as dietary energy intake minus exercise energy expenditure.

\*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$  vs MC group, †† $p<0.001$ , ††† $p<0.001$  vs MEx group

## 2. 大腿骨破断強度

骨破断エネルギーおよび骨破断力を Fig. 2-2-2 に示した。骨破断エネルギーおよび骨破断力において群間に有意な差はみられなかった。



**Fig. 2-2-2. Bone strength.**

Breaking force (A), Breaking energy (B) at femoral diaphysis.

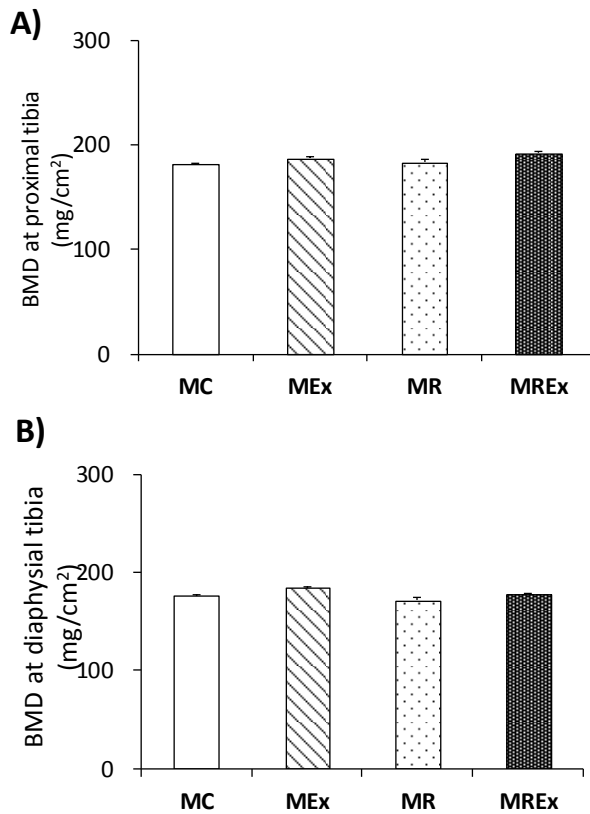
Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.



### 3. 脛骨骨密度

脛骨近位部および骨幹部の骨密度を Fig. 2-2-3 に示した。脛骨近位部においては MREx 群は MC 群よりも低値傾向を示した ( $p=0.088$ )。また、脛骨骨幹部においても MREx 群は MC 群よりも低値傾向を示した ( $p=0.057$ )。



**Fig. 2-2-3. BMD at tibia.**

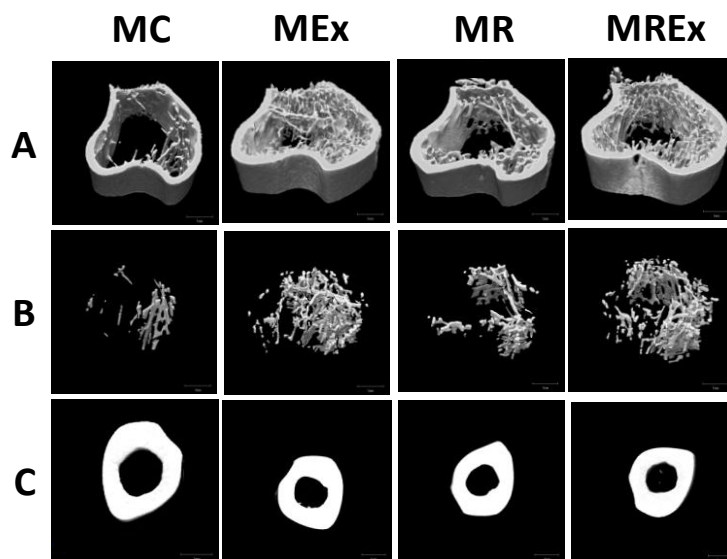
BMD at proximal tibia (A), BMD at diaphysial tibia (B).

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

BMD was measured by dual energy X-ray absorptiometry. Values are mean  $\pm$  SE

#### 4. 脛骨近位部および骨幹部の三次元画像

脛骨近位部および骨幹部の三次元画像を Fig. 2-2-4 に示した。MC 群と比較して他の群では近位部の骨梁の増加傾向がみられた。一方で、皮質骨幅には群間の差がみられなかった。



**Fig. 2-2-4. Representative  $\mu$ CT images of the groups.**

$\mu$ CT images at proximal tibia (A), trabecular bone at proximal tibia (B), and cortical bone at diaphysial tibia (C) are shown.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

Food restriction induced deteriorated trabecular structure, although bone tissues were exposed to mechanical loading by running exercise.

## 5. 脛骨近位部の骨構造

脛骨近位部の骨梁および皮質骨の骨構造を Table. 2-2-2 に示した。骨梁および皮質骨の骨構造の各パラメーターにおいて群間の差はみられなかった。

**Table .2-2-2. Bone morphology. Trabecular bone and cortical bone at proximal tibia.**

	MC	MEx	MR	MREx
Trabecular BV/TV (%)	9.9±1.8	11.9±1.8	10.6±0.9	13.6±0.6
Trabecular thickness (mm)	67.1±2.9	69.9±1.8	67.0±2.8	68.9±0.5
Trabecular number (N/mm)	1.5±0.2	1.7±0.3	1.6±0.1	2.0±0.1
Trabecular separation (mm)	708.8±113.6	574.5±78.1	585.2±50.3	443.6±20.0
SMI	2.6±0.1	2.4±0.1	2.5±0.0	2.5±0.1
TBPf (1/mm)	7.8±1.0	6.9±0.7	8.3±0.6	8.4±0.8
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	15.3±0.3	16.5±0.2	14.8±0.5	14.9±0.4
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	39.8±1.7	41.8±1.4	37.5±1.3	38.0±1.9
Cortical bone ratio (%)	38.8±1.3	39.6±0.9	39.6±1.6	39.6±1.5
Cortical bone thickness (mm)	452.0±8.7	479.5±6.5	451.5±17.4	452.3±9.9

Values are expressed mean±SE.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

## 6. 脛骨骨幹部の骨構造

脛骨骨幹部の皮質骨の骨構造を Table. 2-2-3 に示した。皮質骨体積および骨領域全体積においては群間の差は認められなかった。皮質骨の割合は MREx 群は MC 群よりも有意な高値を示した ( $p<0.01$ )。皮質骨の幅においては MEx 群および MREx 群が MC 群に対して有意な高値を示した (MC vs MEx:  $p<0.05$ , vs MREx:  $p<0.01$ )。

**Table .2-2-3. Bone morphology. Cortical bone at diaphysial tibia.**

	MC	MEx	MR	MREx
Cortical bone volume (mm <sup>3</sup> )	12.8±0.4	13.6±0.5	12.2±0.3	13.1±0.3
All bone volume (mm <sup>3</sup> )	18.8±0.7	19.1±1.1	17.4±0.8	17.5±0.3
Cortical bone ratio (%)	67.9±0.6	71.7±1.6	71.4±2.0	74.8±0.5**
Cortical bone thickness (mm)	704.0±14.3	771.5±13.8*	727.2±23.8	785.2±14.6**

Values are expressed mean±SE.

Mature Control group: MC, Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction group: MR, Mature Restriction Exercise group: MREx.

\* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$  vs MC group

## <考察>

本研究において、我々は食餌制限を伴う運動トレーニングが成熟期雄ラットの骨形態、骨密度および骨強度に及ぼす影響について、 $\mu$ CT、DXA法、骨破断テストを用いて検討した。その結果、骨破断と骨形態の結果では、MREx群、MEx群およびMR群においてMC群との差はみられなかった。これらの結果から、食餌制限を伴う運動トレーニングは、成熟期雄ラットの骨形態や骨密度にはあまり影響しない可能性を示唆すると考えられる。

雌ラットにおいて食餌制限を行うと、骨の減少を誘導することが明らかにされている (Dimarco NM et al, 2007)。Dimarcoらは28週齢の成熟期Sprague-Dawley系雌ラットを自由摂取で自発走行運動を行っている群と、自由摂取群の70%の食餌制限を行い、自発走行運動を行っている群に分け、12週間の飼育を行い、骨の比較を行ったところ、食餌制限を行った群では自由摂取群と比較して、骨密度が低値を示したことを報告している (Dimarco NM et al, 2007)。一方で、本研究の結果では、成熟期雄ラットに対して食餌制限と自発走行運動を行い、自由摂取群との比較を行ったが、それらの実験条件による骨密度の減少や骨形態の変化は認められなかった。これらのことから、Energy availabilityの低下に対する骨の応答には雌雄差が存在する可能性がある。

本研究の結果における脛骨近位部の皮質骨体積はMC群とMR群との間に有意な差はみられなかった。先行研究では、食餌制限のレベルと皮質骨の減少量との間に関連性があることが示唆されている。Lambertらは雄ラットにおいて自由摂取群に対する35%の食餌制限を行ったところ、脛骨の皮質骨の横断面積などの指標が自由摂取群と比較して差がみられなかったことから、40%の食餌制限では皮質骨の減少が起こる可能性を示している (Westerbeek

ZW et al, 2008). 一方で, Westerbeek らの 35%の食餌制限を雄ラットに行った報告では, 脛骨の皮質骨におけるそれらの指標で自由摂取群と比較して差がみられなかったことから, 35%の食餌制限では皮質骨の減少が起こらない可能性が示されている (Lambert J et al, 2005). これらのことから, 食餌制限と皮質骨の減少には関連性があると考えられる. 一方で, 本研究の食餌制限の実験条件は自由摂取群の摂食量に対する 30%の食餌制限で行い, 皮質骨の指標において自由摂取群との差は認められなかった. このことから, 本研究の食餌制限の条件設定は皮質骨の減少を起こし得るものではなかったと考えられる. 対照的に, MREx 群の皮質骨体積は MEx 群よりも有意な減少がみられた. 食餌摂取量は MR 群と MREx 群はほぼ同量であったが, MREx 群の Energy availability は運動によるエネルギー消費によって MR 群よりもさらに低下していたと考えられる. 以上のことから, 著しい Energy availability の低下によって MREx 群の皮質骨は減少したと考えられる.

一方で, MEx 群および MREx 群の脛骨骨幹部の皮質骨幅は MC 群よりも有意な高値を示していた. 一般的に, 走行運動は皮質骨幅を増大させることが明らかにされている. さらに, 機械的負荷に伴う骨形成増加に伴う皮質骨の増加は, 長管骨においては近位部よりも骨幹部で大きいことが報告されている (Mosley JR et al, 1997). さらに, 先行研究では長管骨の近位部と骨幹部では, 機械的負荷によって骨形成が活性化する閾値が異なるとの報告もされている (Hsieh YF et al, 2001). したがって, 機械的負荷に対する骨組織の感受性は部位によって異なる可能性がある.

食餌制限は雌雄ともに, HPG-axis を介して性ステロイドホルモンのレベルを減少させることが明らかにされている. 本研究では血中アンドロゲン濃度の群間の差はみられなかった. 先行研究では 40%の食餌制限は血中エストロゲン濃度を減少させることが報告されている (Martin B et al, 2007). さらに, 短期間 (24-48 時間) の絶食状態は雌ラビットの LH レベルを減少させること

も報告されている (Martin B et al, 2007). 一方で, 雄ラットにおいて 50%の食餌制限は血中アンドロゲン濃度を減少させるが (Wayne NL et al, 1991), 40%の食餌制限は影響しないことが報告されている (Martin B et al, 2007). これらのことから, 本研究の食餌制限の条件設定はアンドロゲンレベルを減少させ得る条件設定ではなかった可能性がある.

本研究にはいくつかの研究限界が存在する. 第一に, 皮質骨や血中アンドロゲン濃度に群間の差がみられなかったことから, 30%の食餌制限は食餌制限の設定条件として少なかった可能性がある. 第二に, 本研究は 13 週間の飼育期間の終了時のサンプリングのみであるため, 骨代謝の Energy availability の低下に対する適応メカニズムが不明である. 今後, 縦断的な検討を行っていく必要があると考えられる.

本研究のまとめとして, 食餌摂取量の不足を伴う運動トレーニングは成熟期雄ラットの骨形態や骨強度をあまり変化させない可能性が示唆された. 本研究の結果は, 男性アスリートの骨障害は女性アスリートよりも少ないことの一つの理由となり得ると考えられる.

## <要約>

本研究課題では，食餌制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について調べ，以下の知見を得た．

- 1．自発走行運動は成熟期雄ラットの骨の変化を惹起させる
- 2．食餌制限を伴う自発走行運動によって，成熟期雄ラットの骨強度は変化しない
- 3．食餌制限を伴う自発走行運動は，成熟期雄ラットの骨密度や骨構造にはあまり影響しない

以上のことから，食餌制限を伴う自発走行運動は，成熟期雄ラットの骨強度を変化させず，また，骨密度や骨構造にはあまり影響しないと考えられる．



## VI. 研究課題 3

### 研究課題. 3. 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態に及ぼす影響

#### <緒言>

研究課題.1 および研究課題.2 において，食餌制限と自発走行運動を成長期および成熟期雄ラットに行ったところ，成長期雄ラットでは骨密度を減少し，骨構造の脆弱化がみられたが，その一方で成熟期では骨密度や骨構造にはほとんど変化がみられなかった。

近年，食餌制限の骨への影響は雄性動物では発育段階によって異なる可能性があることが指摘されている． Devlin らは成長期の 3 週齢 C57Bl/6J 雄マウスに対して食餌制限を行い，骨に現れる変化について検討したところ，骨形成・石灰化速度の減少と骨吸収の増加とともに，骨密度の減少や骨構造的な異常（骨梁容積比の減少，皮質骨幅の減少など）がみられ，骨破断強度も低下することを報告している (Devlin MJ et al, 2010)． 対照的に，成熟期の動物に食餌制限を行った報告では，食餌制限によって骨はあまり影響されない可能性が指摘されている． Hamrick らは成熟期の 15 週齢 C57BL/6 雄マウスに対して食餌制限を行ったところ，骨破断強度や皮質骨幅は減少するものの，骨密度や骨梁の形態的变化は認められないことを報告している (Hamrick MW et al, 2008)． このことから，研究課題.1 および研究課題.2 でみられた結果は， Energy availability の低下に対する発育段階の違いによって引き起こされた可能性がある。

骨密度や骨強度は，その値を評価する時点までの骨代謝動態に起因する．すなわち，骨密度の低下は，一定期間の骨吸収優位の骨代謝動態を呈していた結果である．本研究では，食餌制限を伴う自発走行運動によって成長期で

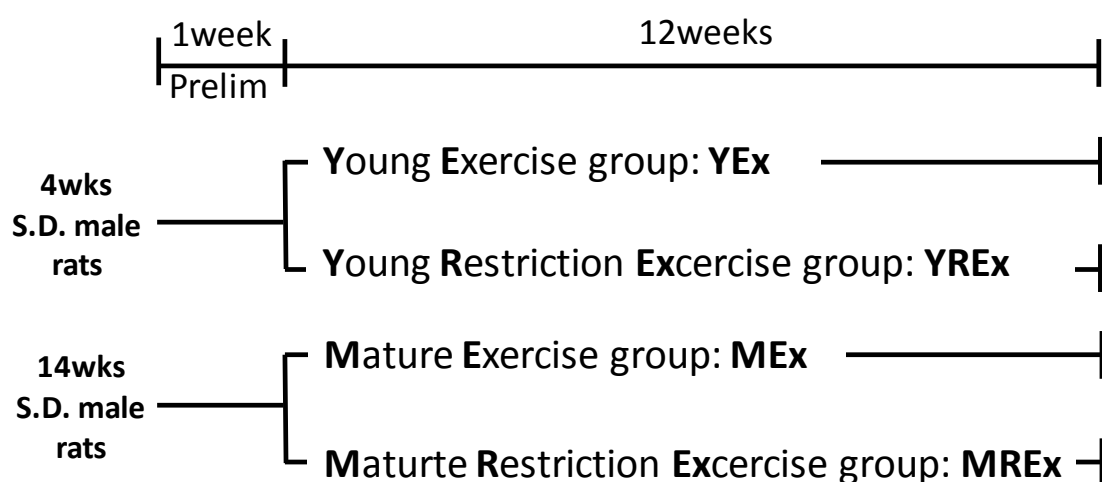
は骨密度および骨強度の低下が引き起こされたが，成熟期では骨強度は低値傾向を示したものの，骨密度は維持されていた．したがって，これらの骨代謝動態を評価することで，メカニズムの一端を明らかにすることができると考えられる．

## <方法>

目的：食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態に及ぼす影響について検討すること

### 1. 実験動物および飼育条件

プロトコルを Fig. 3-1 に示した. 4 週齢および 14 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラット (各 n=14) を 1 週間の予備飼育後に, 成長期コントロール (YEx) 群 (n=7), 成長期食餌制限および運動 (YREx) 群 (n=7), 成熟期コントロール (MEx) 群 (n=7), 成熟期食餌制限および運動 (MREx) 群 (n=7) に分け, 12 週間の飼育を行った. 運動条件および食餌組成は研究課題. 1 と同様の条件で行った. 飼育は室温  $22 \pm 1^{\circ} \text{C}$ , 湿度  $50 \pm 5\%$ , 12 時間ごとの明暗サイクル (明期 8:00~20:00) の環境下で行い, 脱イオン蒸留水は自由摂取させた.



**Fig. 3-1. Experimental protocol.**

Young Exercise group: YEx, Young Restriction Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction Exercise group: MREx.

After 1 weeks prelim period, the rats were carried out experimental to investigate the effect of voluntary running on the bone.

## 2. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 3. 大腿骨破断特性

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 4. 脛骨骨塩量および骨密度の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 5. 血中アンドロゲン濃度の測定

研究課題. 1 と同様の方法で行った.

## 6. 骨形態計測

脛骨近位部の組織形態計測は既報に従って行った (Meunier P, 1976). 骨の標識を行うために解剖 6 日前と 3 日前にカルセイン (8mg/kg) を実験動物の首下部に皮下投与した. 解剖時に脛骨を摘出し, 70%エタノール中で骨を固定した. 固定した検体の筋などの軟部組織を十分に取り除いた上で, 骨の標本の作製を行った. 標本作製の前には, 骨折の有無を X 線の撮影を行い, 異常が認められないことを確認した. 標本の作製は技工用エンジンを用いて脛骨近位部の二次海綿骨化部分を切断し, Villanueva Bone Strain 中で 4 日間浸透させた. その後, 脱水を行った上でメチルメタクリレート (Methyl methacrylate: MMA) 樹脂で包埋し, 30°C から 40°C の室温に調整したインキュベーター中で重合を行い, ミクロトームを用いて厚さ 5 $\mu$ m のブロック成形を行った. これらの一連の手順によって, 非脱灰薄切標本を作製した. 得られた標本を顕微鏡で観察し, 吸収面 (Eroded Surface/Bone Surface; ES/BS, %), 類骨面

(Osteoid Surface/Bone Surface; OS/BS, %) , 骨芽細胞面 (Osteoblast Surface/Bone Surface; Ob.S/BS, %) , 破骨細胞面 (Osteoclast Surface/Bone Surface; Oc.S/BS, %) , 骨芽細胞数 (Osteoblast Number/Bone Surface; Ob.N/BS, N/mm) , 破骨細胞数 (Osteoclast Number/Bone Surface; Oc.N/BS, N/mm) , 骨石灰化速度 (Mineral Apposition rate; MAR,  $\mu\text{m}/\text{day}$ ) , 骨形成速度 (Bone Formation Rate/Bone Surface; BFR/BS,  $\text{mm}^3/\text{mm}^2/\text{year}$ ) を測定した.

#### 7. 血清中骨型アルカリフォスファターゼ (**Bone-specific Alkaline Phosphatase; BAP**)

血清中 BAP は P-ニトロフェニルリン酸基質法により測定した.

血清 50 $\mu\text{l}$  に 0.1M p-Nitrophenylphosphatase (P-NPP), 50M  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1M 2-amino-2-methyl-1,3propane-diol-HCL (pH10.0) を含む混合液 3.0ml を入れ, 37 $^\circ\text{C}$  で 30 分間の呈色反応を行い, 1N NaOH 1.0ml で反応を停止した. その後, 2000rpm で 10 分間の遠心分離を行い, 分光光度計 (セルポジションナ CPS-260, 島津製作所) を用いて 420nm の吸光度を測定した (過程. 1). 次に, 56 $^\circ\text{C}$  のホットバス中で 10 分間の熱処理を行い, 過程. 1 と同様の方法で実験を行い, Alp (Alkaline Phosphatase) の残存活性を測定した (過程. 2). 臓器非特異型 Alp は熱処理によって失活するため, 過程. 1 と過程. 2 の差から BAP 活性を求めた.

#### 8. 血清中酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (**Trateate-resistance Acid phosphatase; TRAP**)

血清中 TRAP は 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 50 $\mu\text{l}$  に 100mM p-NPP, 200mM sodium citrate buffer, 200mM sodium chloraide, 80mM L(+)-sodium tartrate を含む混合液 1.0ml を入れ, 37 $^\circ\text{C}$  で 60

分間の呈色反応を行い、0.25ml 1N NaOH で反応を停止し、420nm の分光光度計を用いて、420nm の吸光度を測定した。

## 9. 統計処理

データは全て mean ± SE で表した。また、統計ソフトは SPSS (version 18.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用し、発育段階 (成長期, もしくは成熟期), 飼育条件 (自由摂取, もしくは食餌制限) の影響は二元配置分散分析 (Two-way analysis of variance) を用いて検討した。群間の多重比較は Tukey-test を用い、有意水準を 5% として検討した。Energy availability と骨量との関連については、ピアソンの相関係数を求めて検討した。

## <結果>

### 1. 体重，走行距離，飼料摂取量，および飼料効率

体重，走行距離，および飼料摂取量に関連する結果を Table. 3-1 に示した。

初期体重は YEx 群と YREx 群，MEx 群と MREx 群との間に差はみられなかった。最終体重は YREx 群が YEx 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.001$ )，MREx 群は MEEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ )。体重増加量は YREx 群が YEx 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.001$ )，MREx 群が MEEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ )。

走行距離は YREx 群が YEx 群よりも有意な高値を示し ( $p<0.001$ )，MREx 群が MEEx 群よりも有意な高値を示した ( $p<0.001$ )。

食餌制限を行った YREx 群と MREx 群の飼料摂取量は，それぞれが YEx 群および MEEx 群の飼料摂取量と比較して有意な低値を示した ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ )。制限量は，YREx 群は YEx 群の-28.2%，MREx 群は MEEx 群の-18.9%であった。飼料効率は YREx 群が YEx 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.001$ )，MREx 群が MEEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ )。

食餌制限を行わせた YREx 群および MREx 群の Energy availability は，自由摂取の YEx 群および MEEx 群と比較して，有意な低値を示した ( $p<0.001$ ,  $p<0.05$ )。減少量は，YREx 群は YEx 群の-40.3%，MREx 群は MEEx 群の-26.6%であった。



**Table.3-1 Body weight, Running distance, and food intake.**

	<b>YEx</b>	<b>YREx</b>	<b>MEx</b>	<b>MREx</b>
Initial BW (g)	91.0±1.6	90.7±0.8	427.1±5.6	425.1±1.9
Final BW (g)	476.0±11.7	248.6±11.0 <sup>***</sup>	553.1±13.0	397.4±21.0 <sup>†††</sup>
BW gain (g/day)	5.1±2.2	3.1±0.8 <sup>***</sup>	1.7±0.1	-0.1±0.3 <sup>†††</sup>
Running distance (km/day)	3.6±0.9	11.5±1.2 <sup>***</sup>	1.4±0.9	8.1±0.7 <sup>†††</sup>
Food intake (g/day)	21.7±0.4	15.6±0.0 <sup>***</sup>	21.7±2.0	17.6±0.4 <sup>†</sup>
Food efficiency (pg/ml) <sup>a)</sup>	0.27±0.00	0.15±0.00 <sup>***</sup>	0.08±0.01	-0.01±0.02 <sup>†††</sup>
Energy availability (kcal) <sup>b)</sup>	89.2±1.9	53.3±1.4 <sup>***</sup>	91.5±8.5	67.2±1.6 <sup>†</sup>

Values are expressed mean±SE.

Young Exercise group: YEx, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

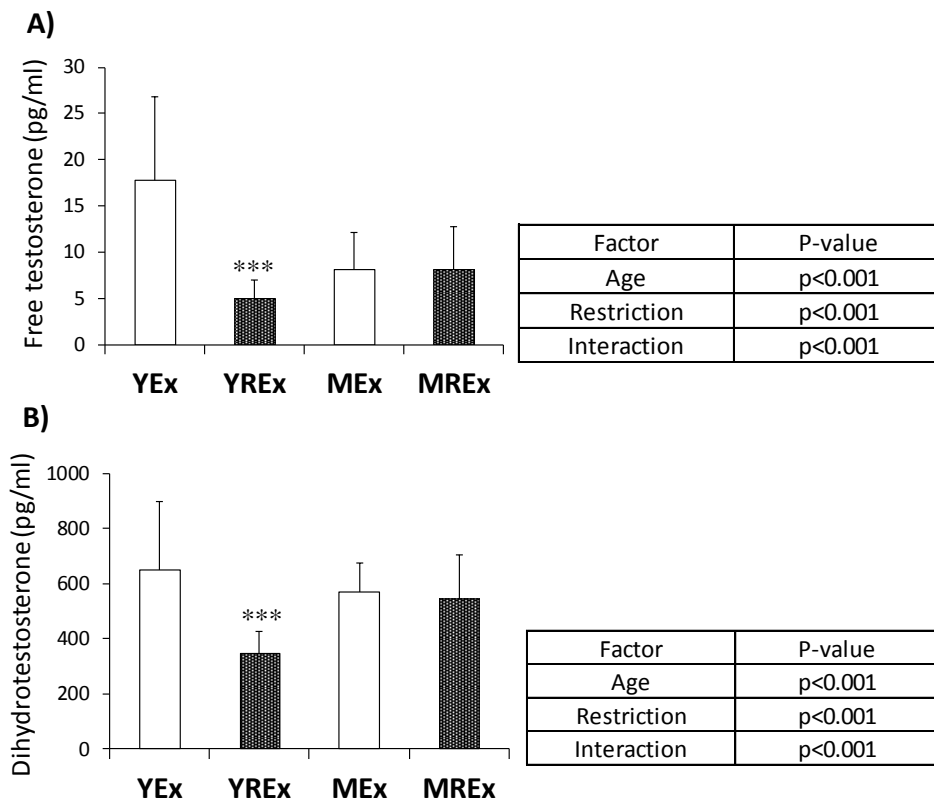
<sup>a)</sup>Food efficiency was calculated by “Body weight gain(g/day)/Food intake(g/day).

<sup>b)</sup> Energy availability was calculated as dietary energy intake minus exercise energy expenditure.

\*\*\*p<0.001 vs YC group, †p<0.05, ††p<0.001 vs MEx group

## 2. 血中アンドロゲンレベル

血中フリーテストステロン濃度および血中ジヒドロテストステロン濃度を Fig. 3-2 に示した. 血中フリーテストステロン濃度および血中ジヒドロテストステロン濃度において YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.001$ ). 血中フリーテストステロン濃度および血中ジヒドロテストステロン濃度において, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 食餌制限の影響によっても有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 発育段階と食餌制限の交互作用がみられた ( $p<0.001$ ).



**Fig. 3-2. Serum androgen levels.**

Free testosterone (A), Dihydrotestosterone (B) in serum.

Young Exercise group: YEx, Young Restriction Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction Exercise group: MREx.

Serum androgen level was measured by ELISA. Values are mean  $\pm$  SE.

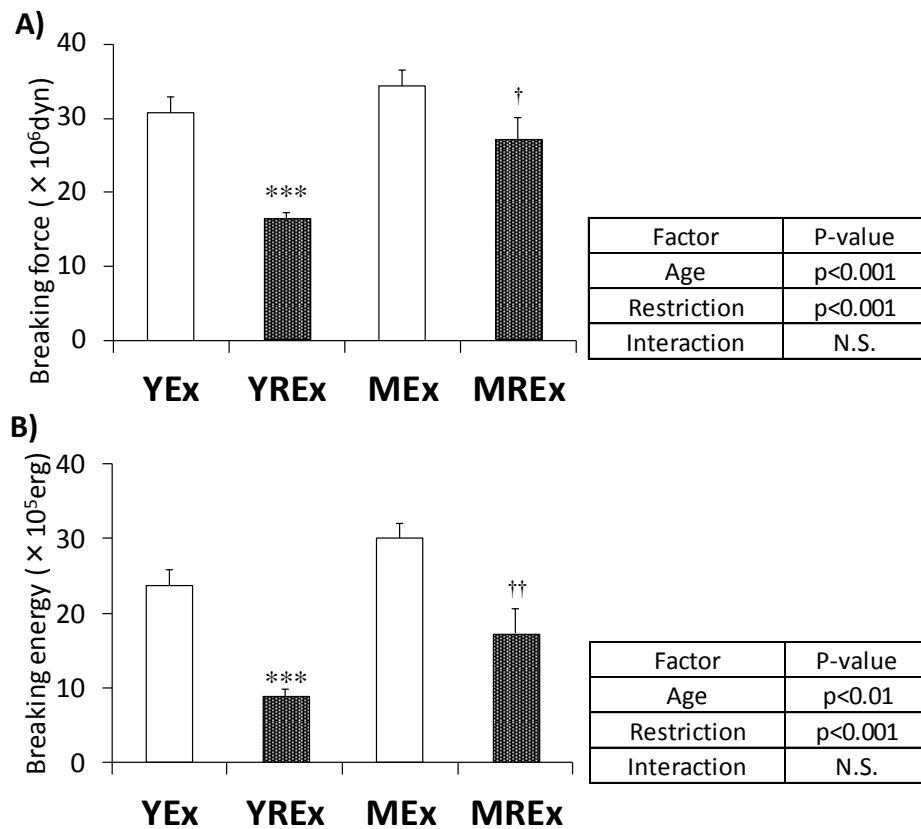
\*\*\* $p<0.001$  vs YEx group

### 3. 大腿骨破断強度

骨破断力および骨破断エネルギーを Fig. 3-3 に示した。骨破断力および骨破断エネルギーにおいて，YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示し

( $p<0.001$ )，MREx 群は MEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ )。また，発育段階の影響によって

有意な低値を示し ( $p<0.01$ )，食餌制限の影響によっても有意な低値を示した ( $p<0.001$ )。



**Fig. 3-3. Bone strength.**

Breaking force (A), Breaking energy (B) at femoral diaphysis.

Young Exercise group: YEx, Young Restriction Exercise group: YREx.

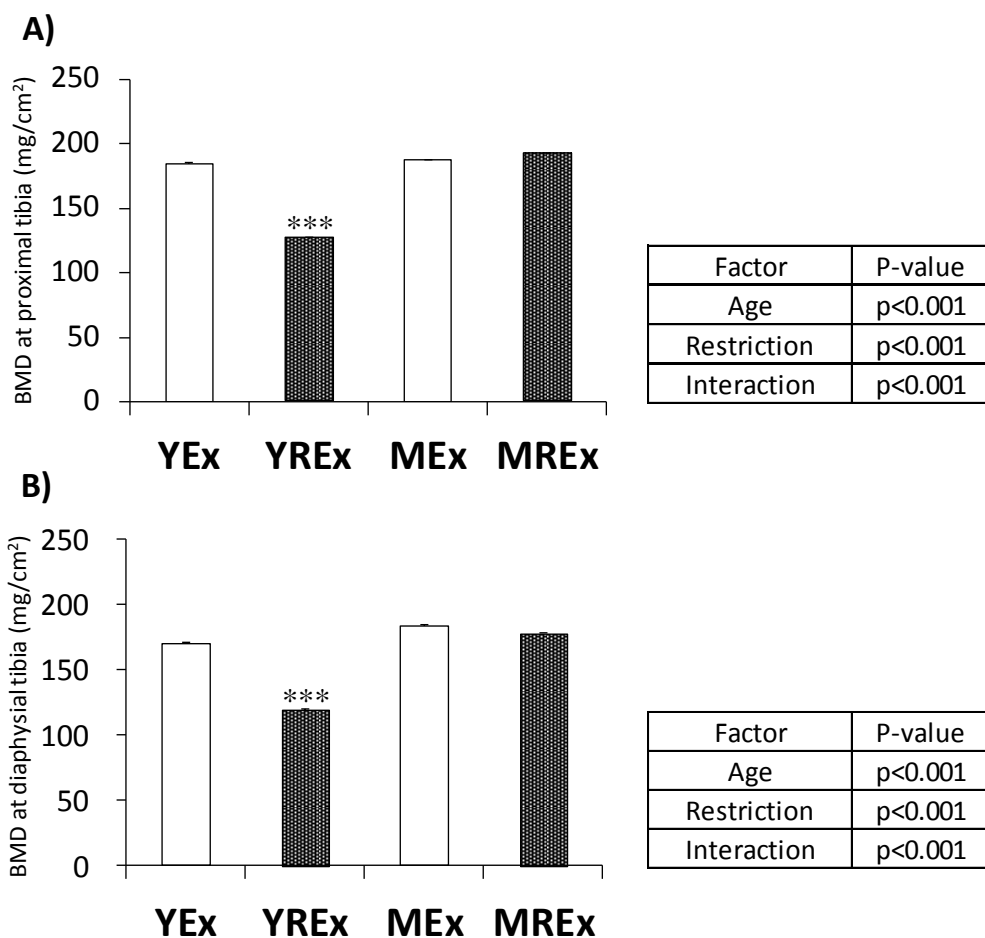
Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction Exercise group: MREx.

Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.

\*\*\* $p<0.001$  vs YEx group,  $^{\dagger}p<0.05$ ,  $^{\dagger\dagger}p<0.01$ , vs MEx group

#### 4. 脛骨骨密度

脛骨近位部および骨幹部の骨密度を Fig. 3-4 に示した。脛骨近位部と骨幹部において YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示した ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$ )。また、各部位において、発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ )、食餌制限の影響によっても有意な低値を示した ( $p < 0.001$ )。さらに、発育段階と食餌制限の交互作用がみられた ( $p < 0.001$ )。



**Fig. 3-4. BMD at tibia.**

BMD at proximal tibia (A), BMD at diaphysial tibia (B).

Young Exercise group: YEx, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

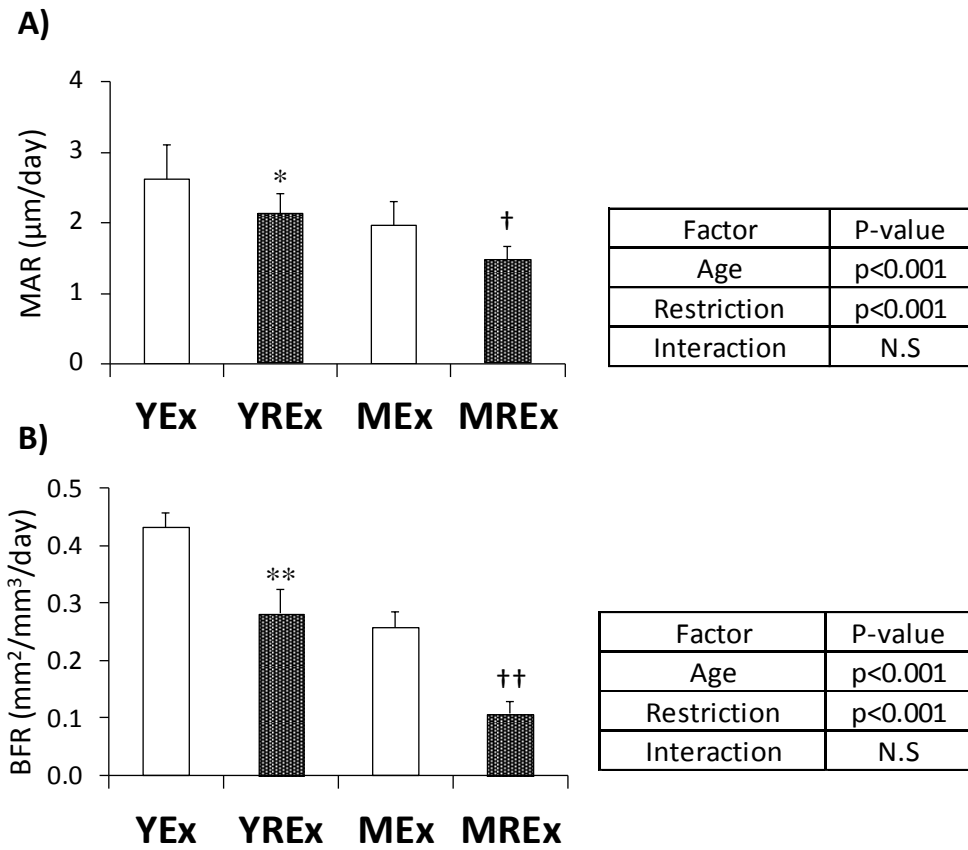
Bone strength was measured by three point bending test. Values are mean  $\pm$  SE.

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  vs YEx group

## 5. 骨形態計測による石灰化速度の指標

脛骨近位部の MAR と BFR を Fig. 3-5 に示した. MAR において YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.01$ ), MREx 群は MEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.05$ ). また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 食餌制限の影響によっても有意な低値を示した ( $p<0.001$ ). 食餌制限による MAR の低下は YREx 群は YEx 群の  $-18.3\pm 6.4\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-26.0\pm 3.5\%$  だった.

BFR において YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示し ( $p<0.05$ ), MREx 群は MEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 食餌制限の影響によっても有意な低値を示した ( $p<0.001$ ). 食餌制限による BFR の低下は YREx 群は YEx 群の  $-29.8\pm 10.4\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-64.0\pm 6.5\%$  だった.



**Fig. 3-5. Calcification at proximal tibia.**

Mineral Apposition rate at proximal tibia (A), Bone formation rate at proximal tibia (B).

Young Exercise group: YEx, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

Values are mean  $\pm$  SE. \*p<0.05, \*\*p<0.01, vs YEx group, †p<0.05, ††p<0.01, vs MEx group.

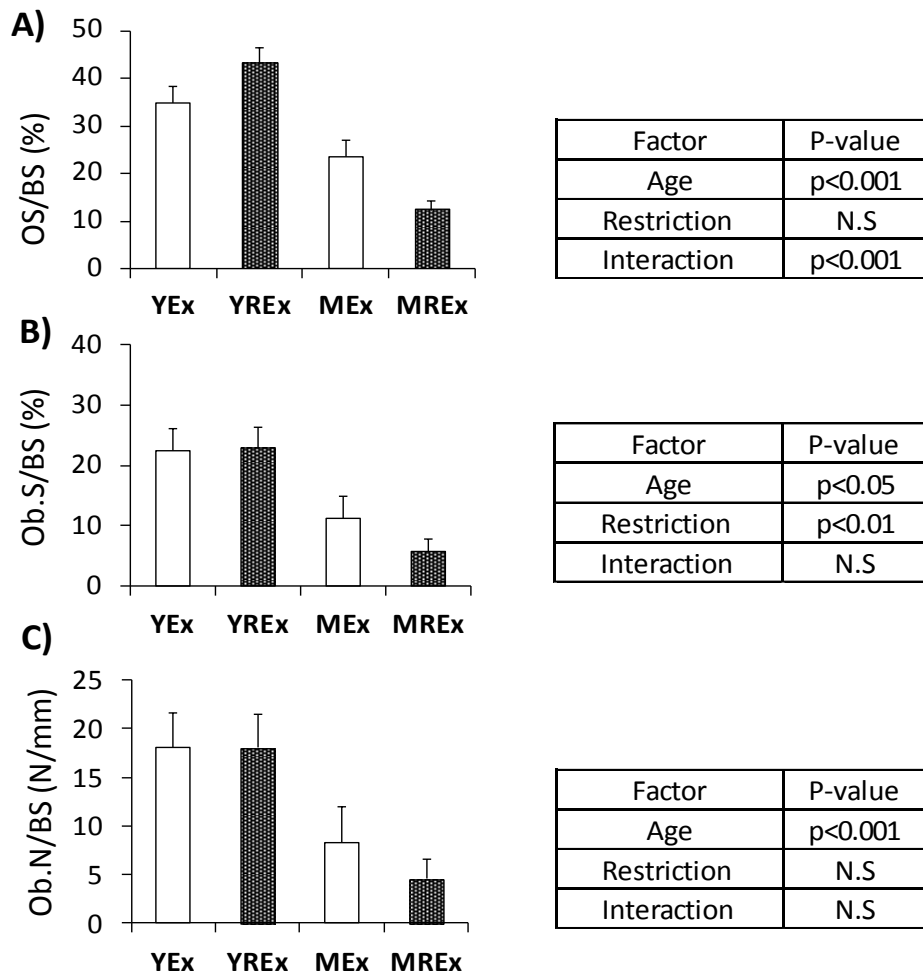
## 6. 骨形態計測による骨形成の指標

脛骨近位部の OS/BS, Ob.S/BS, Ob.N/BS を Fig. 3-6 に示した.

OS/BS において群間の差はみられなかった. また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 発育段階と食餌制限の交互作用がみられた ( $p<0.001$ ). 食餌制限による OS/BS の変化は YREx 群は YEx 群の  $23.7\pm 9.8\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-47.4\pm 8.5\%$  だった.

Ob.S/BS において群間の差はみられなかった. また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.05$ ), 食餌制限の影響によって有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). 食餌制限による Ob.S/BS の変化は YREx 群は YEx 群の  $1.6\pm 15.4\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-47.8\pm 14.8\%$  だった.

Ob.N/BS において群間の差はみられなかった. また, 発育段階の影響によって有意な低値を示した ( $p<0.05$ ). 食餌制限による Ob.N/BS の変化は YREx 群は YEx 群の  $-0.03\pm 16.0\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-44.6\pm 12.7\%$  だった.



**Fig. 3-6. Bone formation at proximal tibia.**

Osteoid surface / Bone surface at proximal tibia (A), Osteoblast surface / Bone surface at proximal tibia (B), Osteoblast number / Bone surface at proximal tibia (C).

Young Exercise group: YEx, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MEx, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

Values are mean  $\pm$  SE..

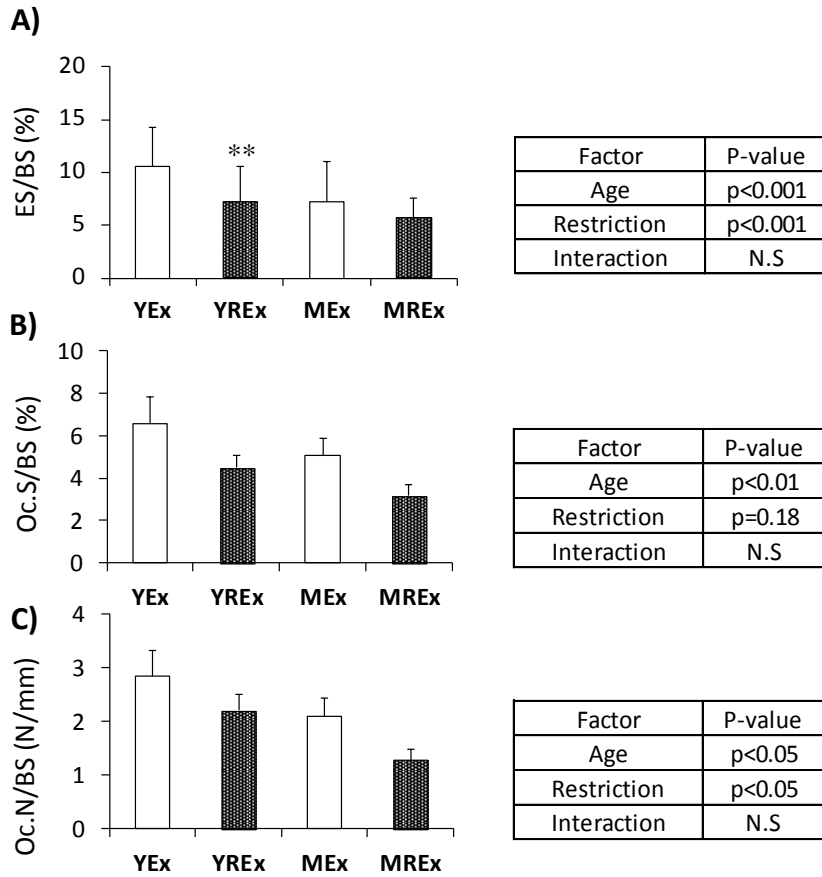


## 7. 骨形態計測による骨吸収の指標

脛骨近位部の ES/BS, Oc.S/BS, Oc.N/BS を Fig. 3-6 に示した. ES/BS において YREx 群は YEx 群よりも有意な低値を示した ( $p<0.01$ ). また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.001$ ), 食餌制限の影響によって有意な低値を示した ( $p<0.001$ ). 食餌制限による ES/BS の低下は YREx 群は YEx 群の  $-32.2\pm 3.8\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-23.1\pm 7.1\%$  だった.

Oc.S/BS において群間の差はみられなかった. また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.01$ ), 食餌制限の影響によって低値傾向を示した ( $p=0.18$ ). 食餌制限による Oc.S/BS の低下は YREx 群は YEx 群の  $-31.7\pm 8.6\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-37.9\pm 10.1\%$  だった.

Ob.N/BS において群間の差はみられなかった. また, 発育段階の影響によって有意な低値を示し ( $p<0.05$ ), 食餌制限の影響によって有意な低値を示した ( $p<0.05$ ). 食餌制限による Ob.N/BS の低下は YREx 群は YEx 群の  $0.03\pm 16.0\%$ , MREx 群は MEx 群の  $-44.6\pm 12.7\%$  だった.



**Fig. 3-7. Bone resorption at proximal tibia.**

Eroded surface / Bone surface at proximal tibia (A), Osteoclast surface / Bone surface at proximal tibia (B), Osteoclast number / Bone surface at proximal tibia (C).

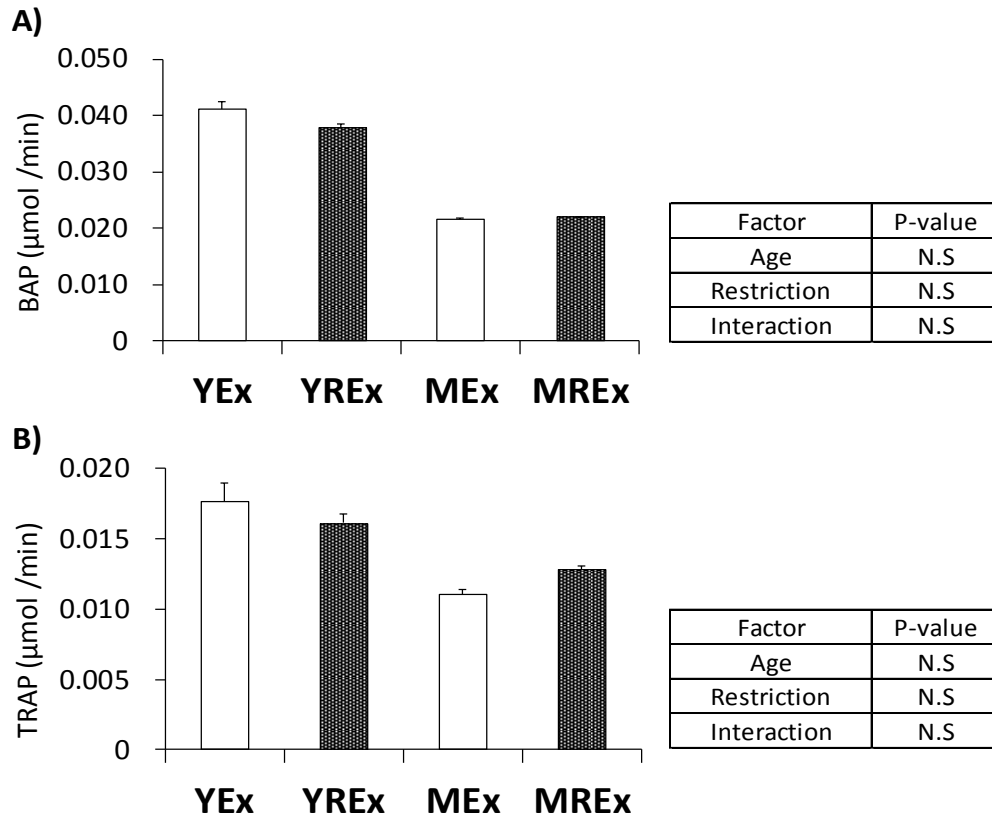
Young Exercise group: YC, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MC, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

Values are mean  $\pm$  SE. \*\*p<0.01, vs YEx group, †p<0.05, vs MEx group.

## 8. 骨代謝マーカー

血清中 BAP および TRAP を Fig. 3-7 に示した. BAP において群間の差はみられず, 各要因の影響もみられなかった. また, TRAP においても群間の差はみられず, 各要因の影響もみられなかった.



**Fig. 3-7. Bone metabolic marker.**

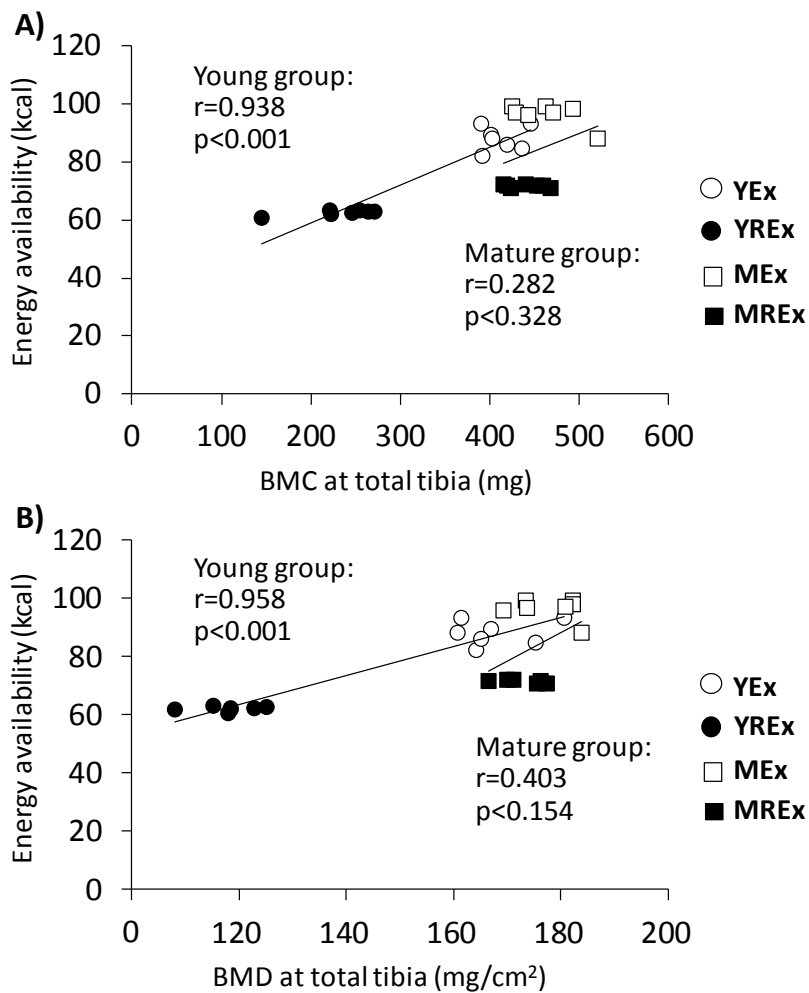
Bone-specific Alkaline Phosphatase; BAP (A), Ttrate-resistance Acid phosphate; TRAP (B).

Young Exercise group: YC, Young Restriction and Exercise group: YREx.

Mature Exercise group: MC, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

## 9. Energy availability と骨量との相関

Energy availability と骨量との相関を Fig. 3-8 に示した。Energy availability と骨塩量において、成長期群で有意な相関関係がみられたが (Young group:  $r=0.938$ ,  $p<0.001$ ), 成熟期群ではみられなかった。また, Energy availability と骨密度において, 成長期群で有意な相関関係がみられたものの (Young group:  $r=0.958$ ,  $p<0.001$ ), 成熟期群ではみられなかった Mature group:  $r=0.403$ ,  $p<0.154$ ).



**Fig. 3-8. Correlation between energy availability and bone volume.** Correlation between energy availability and bone mineral content (A), Correlation between energy availability and bone mineral density (B). Young Exercise group: YC, Young Restriction and Exercise group: YREx. Mature Exercise group: MC, Mature Restriction and Exercise group: MREx.

## <考察>

本研究においては，食餌制限を伴う自発走行運動が，成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態に及ぼす影響について検討した．その結果，食餌制限により，成長期群と成熟期群の骨代謝は低骨代謝回転型に変化した，成長期群は骨強度と骨密度の減少がみられたが，成熟期群では骨強度は低値傾向を示したものの，骨密度に変化は認められなかった．このことから，骨代謝動態は，骨の表現型とは異なる結果を示した．

Energy availability の低下が骨に及ぼす影響は，発育段階の異なる雄性動物において異なった影響を及ぼす可能性がある．研究課題.1 および研究課題.2 と同様に，成長期では Energy availability が低下すると骨密度の低下がみられ，対照的に成熟期では変化はみられなかった．さらに，Energy availability と骨量との相関関係を評価したところ，成長期では骨塩量と骨密度で有意な相関関係がみられたが，成熟期では骨塩量と骨密度において関連性は認められなかった．このことから，Energy availability の低下は成長期では著しい骨量低下を招くが，成熟期ではあまり影響しない可能性がある．

本研究の骨形態計測による骨代謝動態の結果は，成長期群と成熟期群の食餌制限+運動群において，石灰化速度，骨形成，骨吸収は，運動群よりも低値を示した．Tatsumi らは成長期の F344 雄ラットに対して，食餌制限を行い，骨形態と骨代謝に現れる変化を縦断的に検討している．その結果，食餌制限を行うと石灰化速度と骨形成の減少と共に骨吸収の亢進が起き，骨密度の減少がみられるが，食餌制限を継続すると加齢に伴って骨吸収が減少し，低骨代謝回転型となり，骨密度の群間の差はほとんど認められなくなることを報告している (Tatsumi S et al, 2008)．この報告でみられた食餌制限下における骨代謝の変化のメカニズムは明らかではないが，食餌摂取量の不足に対して

骨代謝が適応し、骨吸収を抑制することで骨量減少を抑制したのではないかと考察されている。本研究の成熟期群の骨代謝動態においても同様に、低骨代謝回転型となっていたことから、加齢に伴う骨代謝の食餌制限に対する適応が起きたのではないかと考えられる。

本研究の結果では YREx 群は YEx 群と比較して骨密度や骨強度の低下など、明らかな骨の減少が認められたが、石灰化速度・骨形成の低下とともに骨吸収の低下も観察された。これらの結果に関して、成長期群（YEx 群・YREx 群）の骨代謝を評価した週齢が関連していると考えられる。すなわち、本研究では、骨代謝の評価は解剖直前の 17 週齢時に行った。Hughes らは 17 週齢時の S.D 系雄ラットの骨の成長速度は、5-11 週齢の rapidly growing phase よりも著しく減少することを明らかにしている (Hughes PC et al, 1970)。したがって、本研究の成長期群の骨の発育段階は、骨代謝動態を評価した解剖時には成熟期へと移行していた可能性がある。ゆえに、成長期群の骨代謝動態は成熟期群のものと同様の様相を呈したと考えられる。本研究では、食餌制限によって骨密度や骨構造などの骨の形質に変化がみられると予想される 13 週間の飼育を行った。このことから、本研究ではエンドポイントの骨代謝動態の評価のみを行い、経時的変化を検討していないため、成長期群の骨代謝動態において、常に骨代謝動態が低回転型を示したのか、高回転型から変化したのか、不明である。成長期群の骨密度や骨強度が著しく低下していたことから推察すると、飼育期間内に骨吸収が骨形成よりも亢進していた時期があった可能性があると思われる。

また、本研究では発達段階の影響によっても石灰化速度、骨形成、骨吸収は低値を示した。一般的に、骨のモデリングが亢進している成長期では骨代謝は高代謝回転型となること、対照的に、成熟期では成長期と比較して骨代謝回転は低下することが知られている (Parfitt AM, 1984; Sinha R et al, 1988)。

このことから、本研究で観察された発育段階の影響による骨代謝の低下は、加齢に伴った骨代謝の変化に起因するものと考えられる。

一方で、血清中の骨代謝マーカーの結果（BAP, TRAP）では、発育段階と食餌制限の影響はみられなかった。したがって、骨形態計測による脛骨近位部の骨代謝動態と、血清中の骨代謝マーカーの結果は一致していない。先行研究において、食餌制限を行った際の雄性動物の骨の反応は下肢と他の部位では異なるという報告が行われている（Hamrick MW et al, 2008）。本研究で行った骨形態計測は脛骨近位部のみに限定おり、血清中の骨代謝マーカーのように全身の骨代謝動態を反映はしていない。このことから、他の部位の骨代謝動態は、脛骨近位部の骨代謝動態とは異なっていることが予想され、そのために、本研究の骨形態計測の結果と骨代謝マーカーとの結果が一致していなかった可能性が考えられる。

血中アンドロゲンレベル（Free testosterone, Dihydrotestosterone）は発育段階と食餌制限の影響によって、YREx 群において低値を示した。先行研究において、血中アンドロゲンレベルは加齢に伴って減少する可能性が指摘されている（Chen H et al, 1994; Wang C et al, 1993; Wang C et al, 2002）。Wu らの行った加齢と血中アンドロゲンレベルとの関連性について検討した報告では、若年期（3months age）、成熟期（12months age）、および老年期（20months age）の雄ラットの血中アンドロゲンレベルを測定し、比較したところ、週齢が高いほど血中アンドロゲンレベルは低値を示すことを報告している（Wu D et al, 2009）。このことから、本研究における成長期群と成熟期群の血中アンドロゲンレベルの差は発育段階の影響によるものであると考えられる。また、本研究では食餌制限の影響によっても、血中アンドロゲンレベルは YREx 群において低値を示した。食餌制限の血中アンドロゲンレベルに及ぼす影響は成熟期よりも成長期では大きくなる可能性が報告されている（Chen H et al, 2005）。Chen らは食餌制限が雄ラットの血中テストステロンレベルやライディッチ細

胞のテストステロン産生能，および 17-Hydroxylase などのアンドロゲン産生に關与する酵素の活性に及ぼす影響について検討している．この報告では，成長期では食餌制限によって，血中テストステロンレベルやテストステロン産生能，酵素活性は低値を示すこと，その一方で，成熟期のラットでは食餌制限の影響はほとんどみられないことを示している (Chen H et al, 2005)．このことから，本研究でみられた食餌制限の血中アンドロゲンへの影響は，成長期と成熟期の違いにも起因するものではないかと考えられる．

本研究の研究限界として，成長期群と成熟期群の走行距離が異なることが挙げられる．走行距離の違いによって，骨に加わる機械的負荷が異なることから，成長期群と成熟期群で運動の効果が異なる可能性がある．また，発育段階によって栄養素等の必要量が異なることから，本研究では相対的な食餌制限量（30%）に設定し，実験を行った．しかし，成長期と成熟期群の間で走行距離の違いにより，エネルギー消費量が異なることから，**Energy availability** も相対的に妥当な量であったか分からない．今後，走行距離を調整した上で，実験を行う必要があると考えられる．

本研究のまとめとして，食餌制限を伴う自発走行運動は成長期において骨密度の減少や骨構造の脆弱化を引き起こすこと，一方で，成熟期の骨はあまり影響を受けないこと，その理由として成熟期では骨吸収が減少し，低骨代謝回転となることで，骨の脆弱化を抑制する可能性が示唆された．



## <要約>

本研究課題では，食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について検討し，以下の知見を得た．

- 1．食餌制限を伴う自発走行運動によって，成長期群の骨密度は減少するが，成熟期雄群ではその変化が認められない
- 2．13週間の実験により，成長期群と成熟群の脛骨近位部の骨形成，石灰化速度，骨吸収は減少し，低骨代謝回転型の骨代謝動態の様相がみられる

以上のことから，食餌制限を伴う自発走行運動は成長期雄ラットの骨量を減少させるが，成熟期では変化がみられないこと，また，成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態は低骨代謝回転型を示す可能性が示唆された．

## VII. 総合討論

## <総合討論>

骨は生体を支持し，生体を構築する上で極めて重要な組織である．運動は骨量の増加などを惹起させることから，骨強度の増大・維持に寄与することが明らかにされている (Iwamoto J et al, 1998; Fehling PC et al, 1995)．しかし，長距離ランナーやフィギュアスケーターなどは日常的に運動を行っているにも関わらず，骨障害の発症率が高いことが報告されている (Burge MR et al, 1997; Iwamoto J et al, 2003)．女性アスリートの場合，Energy availability (エネルギー摂取量－運動によるエネルギー消費量) の低下に起因した骨密度の減少が起こり，障害に至ると考えられている (Nattiv A Loucks AB et al, 2007; Dimarco NM et al, 2007)．男性アスリートにおいても，同様にそれらの競技種目における骨障害の発症が確認されているにも関わらず，Energy availability の低下と骨との関連性については未だ明らかにされていない (Burge MR et al, 1997)．また，男性アスリートの骨障害発症数は，ジュニア期で高値を示し，シニア期への移行に従って減少していることが報告されている (Orava S et al, 1981; 亀山泰, 2010)．このことから，我々は「Energy availability の低下は男性アスリートにおいても骨の脆弱化の原因となるが，その影響は発育段階によって異なるのではないか」と考えた．そこで，本研究では仮説を検証するために，発育段階の異なる動物モデルを用い，Energy availability の低下が発育段階の異なる雄性動物の骨に及ぼす影響について様々な評価法を用いて詳細に検討した．以下に，本研究から得られた知見から，Energy availability と骨との関連性について議論する．

### 1. Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響

本研究では、Energy availability の低下が雄性動物の骨に及ぼす影響について検討するため、食餌制限を伴う自発走行運動を発育段階の異なる雄の動物モデルに行わせ、骨量や骨構造に現れる変化について調べた。その結果、1) Energy availability が低下すると、雄性動物の骨強度が減少すること、また、2) 成熟期よりも成長期において、その影響は顕著であり、成長期では著しい骨密度の減少と骨構造の脆弱化が引き起こされる可能性が示唆された（研究課題. 1, 研究課題. 2）。これらの結果は、男性アスリートの骨障害の発症に、Energy availability の低下が関連している可能性を示すものであると考えられる。

本研究でみられた「発育段階による骨の反応の違い」とよく一致する見解が、これまでの食餌制限の研究で見られている。Devlin らは 30% の食餌制限を成長期雄マウスに行ったところ、自由摂取で飼育したマウスと比較して、骨密度の減少や骨構造の脆弱化が認められたことを明らかにしている (Devlin MJ et al, 2010)。その一方で、40% の食餌制限を成熟期雄マウスに行った Hamrick らの報告では、骨密度や骨構造などに影響はほとんど認められないことを報告している (Hamrick MW et al, 2008)。これらの報告は、「エネルギー摂取量の不足が骨に及ぼす影響は発育段階によって異なる」という点において、本研究の結果とよく合致する。これらのことから、雄性動物における Energy availability の低下は発育段階によって、骨に対する影響が異なる可能性が考えられる。

一方、本研究で行った実験は、13 週間の飼育を行った際の実験終了時の骨の評価のみに終始している。そのため、本研究では生体の発育に伴う縦断的な骨の変化については全く検討することができなかった。Tatsumi らは食餌制限が骨に及ぼす影響について、縦断的に検討を行ったところ、加齢に伴って食餌制限群と自由摂取群の骨量の差はほとんど認められなくなることを明らかにしている (Tatsumi S et al, 2008)。したがって、本研究で認められた成長

期と成熟期雄ラットの骨の反応の違いについても、発育段階の違いに起因するものである可能性がある。

## 2. 発育段階の違いによって、なぜ骨の形質に違いがみられたのか

骨組織は骨吸収と骨形成による骨代謝によって、構成されることが知られている (Frost HM, 1973). Energy availability の低下は、発育段階によって異なる骨の変化を引き起こしたことから (研究課題. 1, 研究課題. 2), 研究課題. 3 では骨代謝動態を評価することで、それらの違いが現れる理由について追及した。しかし、本研究における骨形態計測を指標とした骨代謝動態の結果では成長期群も成熟期群と同様に、食餌制限群では自由摂取群と比較して低骨代謝回転型となっており、発育段階による骨代謝の反応の違いを認めることができなかった。

成熟期群の骨は、Energy availability が低下しても骨密度や骨構造に自由摂取群との差は認められなかった。また、骨代謝の結果では、骨吸収の減少と共に骨形成の減少がみられたことから、骨吸収と骨形成のバランスの平衡が保たれることで骨組織が維持されたと考えられる。一方で、成長期群では骨密度の著しい減少と骨構造の脆弱化が認められたにも関わらず、骨代謝の結果は成熟期群と同様の傾向がみられたことから、骨の形質と骨代謝との結果が一致していない。食餌制限を成長期雄マウスに行った Devlin らの報告では、骨密度の減少と共に骨吸収が亢進し、骨形成の減少がみられている。さらに、雄マウスに対して長期的な食餌制限を行い、骨代謝動態について検討した Tatsumi らの報告では、長期的な食餌制限を行うと骨吸収は減少することが明らかにされている (Tatsumi S et al, 2008)。本研究の成長期群の骨代謝は、実験終了時の 17 週齢時に評価した。先行研究において、17 週齢時の Sprague-Dawley 系雄ラットの骨の成長はほとんど認められないことが報告されており (Hughes PC et al, 1970), 本研究で評価した成長期群の骨代謝は成熟

期の様相へと変化していた可能性がある。このことから、成長期群と成熟期群の骨代謝の結果に違いが認められなかったのかもしれない。しかし、これらの仮説を証明するには **Low energy availability** が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響について、骨の成長速度が高値を示す 4-9 週齢時での骨代謝動態の評価を行う必要があり、今後のさらなる検討が必要である。

### 3. 食餌制限による走行距離の増大に伴う **Energy availability** の低下

食餌制限によって、実験動物の走行距離は増大することが知られている。これは、**Activity-stress paradigm**、すなわち飢餓状態における動物の活動量が増加する現象に基づくものであると考えられている (Louise Burke, 2007)。本研究でも食餌制限によって、成長期および成熟期雄ラットの走行距離は増大しており (研究課題.1, 研究課題.2)、先行研究と同様の現象が起きたと考えられる。この走行距離の増加によって、成長期および成熟期群の **REx** 群 (食餌制限 + 自発走行運動) では **R** 群 (食餌制限 + 安静状態) と比較して、**Energy availability** の著しい低下が認められている。これらの現象による過剰な **Energy availability** の低下が、**R** 群ではみられない骨代謝動態の変容、および骨密度や骨構造の変化を引き起こしたと考えられる。

### 4. 研究限界と今後の課題

運動および栄養素等摂取と骨との関連性についての観点から、本研究の研究限界と今後の課題を以下に示す。

#### 1) ラットを用いた実験結果のヒトにおける一般化の問題

本研究では、「雄性の齧歯類動物において、食餌制限は骨に影響を及ぼす」という報告が行われていること、食餌制限を伴う運動トレーニングという実験条件が設定可能であること、また、ラットでもヒトと同様に骨の成長期と

成熟期が存在していることから、ラットを動物モデルとして選択して実験を行った。しかし、本研究で得られた結果が全てヒトで一般化することができるのかについては明らかではない。例えば、その一つに骨端線閉鎖がある。ヒトでは成熟期に入ると骨端線閉鎖が行われ、骨のモデリングは停止することが知られている。しかし、ラットの場合は骨端線閉鎖が行われず、常にモデリングは行われることが明らかにされている。本研究では、それらの違いを考慮し、ラットの骨構造や骨代謝動態などの評価は一次海綿骨部分を避け、二次海綿骨部分で行ったが、実際に本研究の結果がヒトで一般化することができるか、否かについては明らかではない。今後、本研究で得られた知見が、どの程度にヒトで一般化することができるのか、検討していく必要がある。

## 2) ミネラルなどの微量栄養素摂取量と骨との関連

本研究では、全ての栄養素等摂取量が不足しているアスリートを想定し、食餌制限群の食餌制限量をコントロール群（自由摂取）の30%に設定して、実験を行った。今回の研究では、最も骨に対して影響を及ぼしている可能性のあるエネルギー摂取量に着目した。しかし、骨を構成する主成分である栄養素（カルシウム・リン）などの摂取量に関しても制限されており、他の栄養素も骨に対して影響を及ぼしていた可能性が考えられる。本研究では Energy availability と骨との関連性を示すことができたが、今後の課題として微量栄養素摂取量と骨との関連性を知るためには、エネルギー摂取量のみを制限し、他の必要な栄養素に関しては充分量を摂取させるような検討が必要である。

## 3) Energy availability の低下によって引き起こされる骨の経時的変化

本研究では、Energy availability の低下によって骨密度の低下や骨構造の脆弱化が起きると予想される実験期間として13週間を設定した。実際に、実験

終了時における骨密度や骨構造に明らかな群間の差を認めることができた。しかし、それらの結果がどのような経時的変化によって引き起こされたのかについて、明らかにするまでには至っていない。今後、実験開始時のベースラインの群や、数週間ごとの経時的な骨量や骨代謝動態などの変化について検討する群を設けることで、Energy availability の低下によって骨がどのように変化するのか、知ることができると思われる。

## 5. スポーツ競技現場への示唆

### 1) Energy availability の低下は男性アスリートにおいても、骨折リスクを増加させる要因となり得る

これまでの Energy availability の低下と骨との関連性については、女性アスリートにおいて、大きく着目されており、男性アスリートでは重要視されていなかった。しかし、我が国においても、男性長距離ランナーなどの疲労骨折は報告されており(向井ら, 2003), 解決すべき問題となっている。一方、本研究で得られた知見では、雄性動物でも成長期と成熟期の発育段階の違いに関わらず、Energy availability が低下すると骨強度は低下することが示された。このことから、男性アスリートにおいても Energy availability の低下は骨折リスクの増加を招く重大な因子であることが示された。

現在の我が国におけるスポーツ競技現場でのトレーニング方法は経験的に構築された方法論に基づいている部分があり、多量のトレーニングに伴うエネルギー消費がアスリートの Energy availability の低下を生み出す一要因となっている可能性がある。例えば、その一つに長距離走における「走り込み」が挙げられる。走り込みは冬季や夏季の鍛錬期によく用いられるトレーニング方法であり、LSD (Long Slow Distance) や乳酸性作業閾値 (Lactate threshold; LT) レベル前後の強度で行うペースランニングを主体としたトレーニング方



法である。トレーニング戦略や各選手の経験や感覚といった部分で「走り込み」のトレーニングを取り入れざる得ない側面はあるが、その反面、これらのトレーニング方法では、著しいエネルギー消費を伴う。したがって、トレーニングによるエネルギー消費に見合った食事からのエネルギー摂取に努めるとともに、定期的な食事摂取量の調査や体脂肪量の計測、血中ホルモンレベルの測定を行い、コンディショニングの維持に努める必要性があると思われる。

## 2) Energy availability の低下は成長期の男性アスリートで、とくに著しく骨折リスクを増大させる可能性がある

成長期にある中学・高校生のアスリートでは、Energy availability の低下による骨折リスクは、とくに大きくなる可能性が考えられる。本研究では、Energy availability が低下すると成長期では骨密度は大きく減少し、骨構造も脆弱化がみられた。実際に、成長期の男性アスリートに着目した報告でも、疲労骨折の発症数は他の年代と比較して多いことが明らかにされている（亀山ら，2010）。このように、成長期は他の年代と比較して、Energy availability の骨の脆弱化を引き起こすリスクが高いと考えられる。

しかし、近年の中高生期のトレーニングレベルは質・量ともに増加傾向にあり、「トレーニングレベルの低年齢化」が進んでいる。例えば、全国高等学校駅伝競走大会などに出場するような高等学校では、月間走行距離が 1000km を越えるようなトレーニングを行っているチームもある。このような成長期における高レベルのトレーニングによって中間層の選手の競技記録は伸びているものの、トップ選手の記録の向上はあまり認められない。実際に、男子 10000m 走の競技記録は約 30 年間に渡って殆ど短縮されていないのが現状である。もし仮に、過度のトレーニングによる Energy availability の低下が骨障害を招き、将来的にトップ選手となり得るタレントの育成を害しているとす

るならば、由々しき事態であると考える。したがって、成長期の男性アスリートの体力レベルや身体の発育段階をよく検討した上で、リスクマネジメントを考慮したトレーニング処方を行うことが重要であると思われる。

## VIII. 総括

## <総括>

本研究では、1) 食餌制限を伴う自発走行運動は雄性動物の骨の脆弱化を招くか、2) その影響は発育段階の違いによって異なるのか、骨破断強度・骨密度・骨構造・骨代謝動態などの指標を用いて、統合的に検討することを目的とした。この目的を達成するために、本研究では動物モデルを用いて、3つの研究課題を設定した。研究課題.1では**成長期**雄ラットに焦点を当て、食餌制限を伴う自発走行運動が骨に及ぼす影響について、研究課題.2ではそれらが**成熟期**雄ラットの骨に及ぼす影響について、研究課題.3では成長期と成熟期の骨代謝動態の反応の違いについて検討するために、食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝に及ぼす影響について検討した。

### 研究課題.1 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨構造に及ぼす影響—成長期雄ラットにおける検討—

本研究では自発走行運動の成長期の骨への効果について検証したのち、食餌制限を伴う自発走行運動が成長期雄ラットの骨に及ぼす影響について、骨密度や骨構造などの指標を用いて検討し、以下の知見を得た。

1. 自発走行運動によって、成長期雄ラットの骨塩量・骨密度に増加がみられた。
2. 食餌制限を伴う自発走行運動によって成長期雄ラットの骨密度の減少や骨構造の脆弱化がみられ、骨破断強度の減少が認められた。

## 研究課題.2 食餌制限を伴う自発走行運動が雄ラットの骨強度および骨形態に及ぼす影響—成熟期雄ラットにおける検討—

本研究では自発走行運動の成熟期の骨への効果について検証したのち、食餌制限を伴う自発走行運動が成熟期雄ラットの骨に及ぼす影響について、骨密度や骨構造などの指標を用いて検討し、以下の知見を得た。

1. 自発走行運動によって、成熟期雄ラットの骨塩量・骨密度に増加傾向がみられた。
2. 食餌制限を伴う自発走行運動によって成熟期雄ラットの骨破断強度や骨密度、骨構造には変化がみられなかった。

## 研究課題.3. 食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期雄ラットの骨代謝動態に及ぼす影響

本研究では、食餌制限を伴う自発走行運動が成長期および成熟期の骨代謝動態に及ぼす影響について、骨形態計測を用いることで石灰化速度・骨形成・骨吸収の指標を測定し、以下の知見を得た。

1. 食餌制限を伴う自発走行運動によって、成長期雄ラットの骨密度は減少するが、成熟期ではあまり影響がみられない
2. 成熟期の脛骨近位部の骨形成、石灰化速度、骨吸収は食餌制限の食餌制限によって低下することから、低骨代謝回転型の骨代謝動態の様相を呈する

本研究における一連の結果より，以下のことが示唆された．過剰なエネルギー消費を伴う運動トレーニングや摂食量の不足によって，Energy availability が低下すると発育段階に関わらず，雄性動物の骨強度は減少する．また，成長期において Energy availability の低下の影響はとくに大きく，成長期では著しく骨密度は低下し，骨構造の脆弱化も引き起こされる．対照的に，成熟期ではあまり骨密度や骨構造の変化はみられない．それらの発育段階による骨の形質の違いがみられる理由として，成熟期では骨吸収を低下させることで低骨代謝回転型へと変容し，Energy availability の低下に対して骨代謝を適応させている可能性がある．本研究で得られた知見から，長距離ランナーなどの男性アスリートにおいて骨障害の発症率が高く，とくに成長期で発症率が顕著に高くなる原因として，摂食量の不足と過剰なトレーニングによる Energy availability の低下が重要な要因であることが示唆された．本研究は，発育段階の異なる雄性動物における Energy availability の低下と骨との関連性について，明らかにしたものである．

## IX. 謝辭

## <謝辞>

本研究の実験および執筆にあたり，修士からの長年の懇切丁寧な指導を賜りました筑波大学 体育系 麻見直美准教授に心から感謝致します．また，競技現場目線でのご指摘を下さいました鍋倉賢治教授，本研究の本質的な意義や構成をご指導下さいました西平賀昭教授，スポーツ医学の観点からの的確なご指摘を下さいました向井直樹准教授に深厚なる謝意を表します．

また，ときに厳しく実験や論文のご指導を下さった建国大学 朴鐘薫氏，東京大学 秋本崇之講師には感謝の念に尽きません．そして，筑波大学大学院に進学するに当たり，研究指導と共に精神的な部分を厳しくご指導下さった鹿児島大学 徳田修司教授，常に高みを目指せとご指導下さった志布志高等学校 川井田茂元教諭に心から感謝致します．

実験の計画段階から議論に至るまで，ご協力，ご助言を頂いた縣右門氏をはじめとする運動栄養学研究室の皆様，健康体力学研究室の皆様に深く感謝致します．

最後に，鹿児島から快く送り出してくれた両親，友人，恩師の皆様に深厚なる謝意を表します．



## X. 引用文献

## <参考文献>

亀山泰. 2010. 成長期の疲労骨折. 臨床スポーツ医学, Vol. 27, No. 4.

向井直樹. 2003. 疲労骨折の診断と治療. 臨床スポーツ医学, Vol. 20, 246-249.

Ackerman KE, Nazem T, Chapko D, Russell M, Mendes N, Taylor AP, Bouxsein ML, Misra M. 2011. Bone microarchitecture is impaired in adolescent amenorrheic athletes compared with eumenorrheic athletes and nonathletic controls. *J Clin Endocrinol Metab.* 96(10):3123-33.

Anantharaman-Barr HG, Decombaz. 1989. The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats. *Physiol Behav.* 46(2):259-63.

Arce JC, De SMJ, Pescatello LS, Luciano AA. 1993. Subclinical alterations in hormone and semen profile in athletes. *Fertil Steril.* 59(2):398-404.

Bachrach LK, Guido D, Katzman D, Litt IF, Marcus R. 1990. Decreased bone density in adolescent girls with anorexia nervosa. *Pediatrics.* 86(3):440-7.

Bennell K, Page C, Khan K, Warmington S, Plant D, Thomas D, Palamara J, Williams D, Wark JD. 2000. Effects of resistance training on bone parameters in young and mature rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 27(1-2):88-94.

Bennell KL, Crossley K. 1996. Musculoskeletal injuries in track and field: incidence, distribution and risk factors. *Aust J Sci Med Sport.* 28(3):69-75.

Brahm H, Ström H, Piehl-Aulin K, Mallmin H, Ljunghall S. 1997. Bone metabolism in endurance trained athletes: a comparison to population-based controls based on DXA, SXA, quantitative ultrasound, and biochemical markers. *Calcif Tissue Int.* 61(6):448-54.

Burge MR, Lanzi RA, Skarda ST, Eaton. 1997. Idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in a male runner is reversed by clomiphene citra. *Fertil Steril.* 67(4):783-5.

Burger EH, Klein-Nulend J. 1999. Mechanotransduction in bone role of the

lacuno-canalicular network. *FASEB J.* 13 Suppl:S101-12.

Castro J, Toro J, Lazaro L, Pons F, Halperin I. 2002. Bone mineral density in male adolescents with anorexia nervosa. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry.* 41(5):613-8.

Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR. 1994. Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat. *J Androl.* 15(6):551-7.

Chen H, Luo L, Liu J, Brown T, Zirkin BR. 2005. Aging and caloric restriction: effects on Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol.* 40(6):498-505.

Chen JL, Yao W, Frost HM, Li CY, Setterberg RB, Jee WS. 2001. Bipedal stance exercise enhances antiresorption effects of estrogen and counteracts its inhibitory effect on bone formation in sham and ovariectomized rats. *Bone.* 29(2):126-33.

Chen MM, Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintz S. 1994. Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats: a histomorphometry and dual energy x-ray absorptiometry study. *Bone.* 15(3):313-9.

Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. 1991. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng.* 113(2):191-7.

De SMJ, Arce JC, Pescatello LS, Scherzer HS, Luciano AA. 1994. Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med.* 15(7):383-91.

De SMJ, Arce JC, Pescatello LS, Scherzer HS, Luciano AA. 1994. Gonadal hormones and semen quality in male runners. A volume threshold effect of endurance training. *Int J Sports Med.* 15(7):383-91.

Devlin MJ, Cloutier AM, Thomas NA, Panus DA, Lotinun S, Pinz I, Baron R, Rosen CJ, Bouxsein ML. 2010. Caloric restriction leads to high marrow adiposity and low bone mass in growing mice. *J Bone Miner Res.* 25(9):2078-88.

Dimarco NM, Dart L, Sanborn CB. 2007. Modified activity-stress paradigm in an animal model of the female athlete triad. *J Appl Physiol.* 103(5):1469-78.

Dixon S, Newton J, Teh J: Stress fractures in the young athlete: a pictorial review. 2011. *Curr Probl Diagn Radiol.* 40(1):29-44.

- Duncan RL, Turner CH. 1995. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int.* 57(5):344-58.
- 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.* 32: 329-335.
- Fehling PC, Alekel L, Clasey J, Rector A, Stillman RJ. 1995. A comparison of bone mineral densities among female athletes in impact loading and active loading sports. *Bone.* 17(3):205-10.
- Ferguson VL, Greenberg AR, Bateman TA, Ayers RA, Simske SJ. 1999. The effects of age and dietary restriction without nutritional supplementation on whole bone structural properties in C57BL/6J mice. *Biomed Sci Instrum.* 35:85-91.
- Frost HM. 1979. Treatment of osteoporoses by manipulation of coherent bone cell populations. *Clin Orthop Relat Res.* (143):227-44.
- Frost HM. 1973. Metabolism of bone. *N Engl J Med.* 18;289(16):864-5.
- Hamrick MW, Ding KH, Ponnala S, Ferrari SL, Isaacs CM. 2008. Caloric restriction decreases cortical bone mass but spares trabecular bone in the mouse skeleton: implications for the regulation of bone mass by body weight. *J Bone Miner Res.*23(6):870-8.
- Harada S, Tominari T, Matsumoto C, Hirata M, Takita M, Inada M, Miyaura C. 2011. Nobiletin, a polymethoxy flavonoid, suppresses bone resorption by inhibiting NF  $\kappa$  B-dependent prostaglandin E synthesis in osteoblasts and prevents bone loss due to estrogen deficiency. *J Pharmacol Sci.* 115(1):89-93.
- Hildebrand T, Rüeggsegger. 1997. Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin.* 1(1):15-23.
- Hind K, Truscott JG, Evans JA. 2006. Low lumbar spine bone mineral density in both male and female endurance runners. *Bone.* 39(4):880-5.
- Hsieh YF, Robling AG, Ambrosius WT, Burr DB, Turner CH. 2001. Mechanical loading of diaphyseal bone in vivo: the strain threshold for an osteogenic response varies with location. *J Bone Miner Res.* 16(12):2291-7.

Hughes PC, Tanner JM. 1970. The assessment of skeletal maturity in the growing rat. *J Anat.* 106(Pt 2):371-402.

Iwamoto J, Takeda T, Ichimura S. 1998. Effect of exercise on tibial and lumbar vertebral bone mass in mature osteopenic rats: bone histomorphometry study. *J Orthop Sci.* 3(5):257-63.

Iwamoto J, Takeda T. 2003. Stress fractures in athletes: review of 196 cases. *J Orthop Sci.* 8(3):273-8.

Kanis JA. 2002. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 1;359(9321):1929-36.

Kanis JA. 2002. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet.* 1;359(9321):1929-36.

Katch VL, Martin R, Martin J. 1979. Effects of exercise intensity on food consumption in the male rat. *Am J Clin Nutr.* 32(7):1401-7.

Kemmler W, Engelke K, Baumann H, Beeskow C, von SS, Weineck J, Kalender WA. 2006. Bone status in elite male runners. *Eur J Appl Physiol.* 96(1):78-85.

Kinoshita M, Moriyama R, Tsukamura H, Maeda KI. 2003. A rat model for the energetic regulation of gonadotropin secretion: role of the glucose-sensing mechanism in the brain. *Domest Anim Endocrinol.* 25(1):109-20.

Knut S. 1984. Scaling: Why is Animal Size so Important?.

Lambert J, Lamothe JM, Zernicke RF, Auer RN, Reimer RA. 2005. Dietary restriction does not adversely affect bone geometry and mechanics in rapidly growing male wistar rats. *Pediatr Res.* 57(2):227-31.

Li CY, Jee WS, Chen JL, Mo A, Setterberg RB, Su M, Tian XY, Ling YF, Yao W. 2003. Estrogen and "exercise" have a synergistic effect in preventing bone loss in the lumbar vertebra and femoral neck of the ovariectomized rat. *Calcif Tissue Int.* 72(1):42-9.

Loucks AB. 2007. Low energy availability in the marathon and other endurance sports. *Sports Med.* 37(4-5):348-52.

Louise B. 2007. Middle-and Long-Distance Running. Practical sports nutrition. 109-139.

Maïmoun L, Lumbroso S, Manetta J, Paris F, Leroux JL, Sultan C. 2003. Testosterone is significantly reduced in endurance athletes without impact on bone mineral density. *Horm Res.* 59(6):285-92.

Manore MM KLC, International AF. 2007. The female athlete triad: components, nutrition issues, and health consequences. *J Sports Sci.* 25:S61-71.

Martin B, Pearson M, Kebejian L, Golden E, Keselman A, Bender M, Carlson O, Egan J, Ladenheim B, Cadet JL, Becker KG, Wood W, Duffy K, Vinayakumar P, Maudsley S, Mattson MP. 2007. Sex-dependent metabolic, neuroendocrine, and cognitive responses to dietary energy restriction and excess. *Endocrinology.* 148(9):4318-33.

McCarthy RN, Jeffcott LB. 1992. Effects of treadmill exercise on cortical bone in the third metacarpus of young horses. *Res Vet Sci.* 52(1):28-37.

Meunier P. 1976. Iliac trabecular bone volume in 236 controls. Representativeness of iliac samples. *Proc. of the first workshop on bone morphometry.* 100-105.

Misra M, Klibanski A. 2006. Anorexia nervosa and osteoporosis. *Rev Endocr Metab Disord.* 7(1-2):91-9.

Mosley JR, March BM, Lynch J, Lanyon LE. 1997. Strain magnitude related changes in whole bone architecture in growing rats. *Bone.* 20(3):191-8.

Nattiv A LAB, American CM. 2007. American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc.* 39(10):1867-82.

Newhall KM, Rodnick KJ, van MC, Carter DR, Marcus R. 1991. Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. *J Bone Miner Res.* 6(3):289-96.

Omi N, Nakamura T, Ezawa I. 1998. Modulation of bone mass and turnover in growing rats by voluntary weight-bearing exercise and glucose supplementation. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 44(3):409-421.

Omi N, Tsukahara N, Ezawa I. 2001. Effect of milk on bone metabolism in growing

male and female rats. *J Home Econ Jpn.* 52(8):689-698.

Orava S, Jormakka E, Hulkko A. 1981. Stress fractures in young athletes. *Arch Orthop Trauma Surg.* 98(4):271-4.

Otis CL, Drinkwater B, Johnson M, Loucks A, Wilmore J. 1997. American College of Sports Medicine position stand. The Female Athlete Triad. *Med Sci Sports Exerc.* 29(5).

Papachristou DJ, Papachroni KK, Basdra EK, Papavassiliou AG. 2009. Signaling networks and transcription factor regulating mechanotransduction in bone. *Bioessays.* 31(7):794-804.

Parfitt AM. 1984. Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences. *Calcif Tissue Int.* 1:S123-8.

Park JH, Aizawa K, Iemitsu M, Sato K, Akimoto T, Agata U, Maeda S, Ezawa I, Omi N. 2011. DHEA administration activates local bioactive androgen metabolism in cancellous site of tibia of ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 89(2):105-10.

Reid IR. 2008. Relationships between fat and bone. *Osteoporos Int.* 19(5):595-606.

Rencken ML, Chesnut CH, Drinkwater BL. 1996. Bone density at multiple skeletal sites in amenorrheic athletes. *JAMA.* 17;276(3):238-40.

Roemmich JN, Sinning WE. 1997. Weight loss and wrestling training: effects on nutrition, growth, maturation, body composition, and strength. *J Appl Physiol.* 82(6):1751-9.

Roemmich JN, Sinning WE. 1997. Weight loss and wrestling training: effects on growth-related hormones. *J Appl Physiol.* 82(6):1760-4.

Routtenberg A, Kuznesof AW. 1967. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. *J Comp Physiol Psychol.* 64(3):414-21.

Russell M, Stark J, Nayak S, Miller KK, Herzog DB, Klibanski A, Misra M. 2009. Peptide YY in adolescent athletes with amenorrhea, eumenorrheic athletes and non-athletic controls. *Bone.* 45(1):104-9.

- Sanborn CF, Martin BJ, Wagner WWJ. 1982. Is athletic amenorrhea specific to runners?. *Am J Obstet Gynecol.* 15;143(8):859-61.
- Sanderson JP, Binkley N, Roecker EB, Champ JE, Pugh TD, Aspnes L, Weindruch. 1997. Influence of fat intake and caloric restriction on bone in aging male rats. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 52(1):B20-5.
- Santora AC. 1987. Role of nutrition and exercise in osteoporosis. *Am J Med.* 26;82(1B):73-9.
- Sinha R, Smith JCJ, Soares JHJ. 1988. The effect of dietary calcium on bone metabolism in young and aged female rats using a short-term in vivo model. *J Nutr.* 118(10):1217-22.
- Speakman JR, Mitchell SE. 2011. Caloric restriction. *Mol Aspects Med.* 32(3):159-221.
- Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA. 2012. Restriction of dietary energy intake has a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr.* 142(6):1038-45.
- Talbott SM, Cifuentes M, Dunn MG, Shapses SA. 2001. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. *J Nutr.* 131(9):2382-7.
- Tatsumi S, Ito M, Asaba Y, Tsutsumi K, Ikeda K. 2008. Life-long caloric restriction reveals biphasic and dimorphic effects on bone metabolism in rodents. *Endocrinology.* 149(2):634-41.
- Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. 1997. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res.* 12(9):1480-5.
- Venken K, Movérare-Skrtic S, Kopchick JJ, Coschigano KT, Ohlsson C, Boonen S, Bouillon R, Vanderschueren D. 2007. Impact of androgens, growth hormone, and IGF-I on bone and muscle in male mice during puberty. *J Bone Miner Res.* 22(1):72-82.
- Wang C, Leung A, Sinha-Hikim AP. 1993. Reproductive aging in the male brown-Norway rat: a model for the human. *Endocrinology.* 133(6):2773-81.
- Wang C, Hikim AS, Ferrini M, Bonavera JJ, Vernet D, Leung A, Lue YH,



Gonzalez-Cadavid NF, Swerdloff RS. 2002. Male reproductive ageing: using the brown Norway rat as a model for man. *Novartis Found Symp.* 242:82-97.

Wayne NL, Wade GN, Rissman EF. 1991. Effects of food restriction and social cues on sexual maturation and growth in male musk shrews (*Suncus murinus*). *J Reprod Fertil.* 91(1):385-92.

Weinbaum S, Cowin SC, Zeng Y. 1994. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech.* 27(3):339-60.

Westerbeek ZW, Hepple RT, Zernicke RF. 2008. Effects of aging and caloric restriction on bone structure and mechanical properties. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 63(11):1131-6.

Wu D, Lin G, Gore AC. 2009. Age-related changes in hypothalamic androgen receptor and estrogen receptor alpha in male rats. *J Comp Neurol.* 10;512(5):688-701.

Xie L, Jacobson JM, Choi ES, Busa B, Donahue LR, Miller LM, Rubin CT, Judex S. 2006. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone.* 39(5):1059-66.

Yao W, Jee WS, Chen JL, Li CY, Frost HM. 2001. A novel method to 'exercise' rats: making rats rise to erect bipedal stance for feeding - raised cage model. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* (3):241-7.

Yeager KK, Agostini R, Nattiv A, Drinkwater B. 1993. The female athlete triad: disordered eating, amenorrhea, osteoporosis. *Med Sci Sports Exerc.* 25(7):775-7.