

平成 28 年度

博士論文

発育期ラットにおける

**Female Athlete Triad** の低骨強度モデルに対する

高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果

筑波大学大学院 人間総合科学研究科 博士後期課程

体育科学専攻 運動栄養学研究室

相川 悠貴

# 目次

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| 目次.....                         | i    |
| List of Tables.....             | ix   |
| List of Figures.....            | xi   |
| 用語説明.....                       | xiii |
| 関連論文.....                       | xvi  |
| <br>                            |      |
| I 章 背景.....                     | 1    |
| <br>                            |      |
| II 章 文献研究.....                  | 5    |
| 1. 骨の構造と骨強度.....                | 5    |
| 1-1. 骨の構造.....                  | 5    |
| 1-2. 骨の成長と骨代謝.....              | 6    |
| 1-3. 骨強度の決定因子.....              | 6    |
| 1-4. 骨代謝の調節因子.....              | 7    |
| 1-5. 骨強度の測定方法.....              | 8    |
| 2. 運動の骨強度増強効果.....              | 9    |
| 3. 女性競技者のFAT問題.....             | 10   |
| 3-1. FATの概念.....                | 11   |
| 3-2. FATの発症率.....               | 12   |
| 4. FATにおける各主徴の関連.....           | 13   |
| 4-1. エネルギー有効性低値が月経異常に及ぼす影響..... | 13   |

|  |    |
|--|----|
| 4-2. エネルギー有効性低値が骨に及ぼす影響.....                   | 15 |
| 4-3. 月経異常が骨に及ぼす影響.....                         | 16 |
| 4-4. FATの3主徴の関連のまとめ.....                       | 17 |
| 5. 思春期の女性競技者における食事量減少が骨に及ぼす影響.....             | 17 |
| 6. 思春期におけるFATの低骨密度に対する予防策.....                 | 18 |
| 7. 高カルシウム摂取が女性競技者の骨に与える効果.....                 | 19 |
| 8. FATの骨問題に関連するラットを用いた研究.....                  | 19 |
| 8-1. FATの骨の研究におけるラットの有用性.....                  | 19 |
| 8-2. ラットにおける運動が骨に及ぼす影響.....                    | 21 |
| 8-3. ラットにおける食餌量減少が骨に及ぼす影響.....                 | 22 |
| 8-4. ラットにおける性周期異常が骨に及ぼす影響.....                 | 25 |
| 8-5. ラットにおけるカルシウム摂取量の違いが骨に及ぼす影響.....           | 25 |
| 9. 要約.....                                     | 27 |
| <br>   |    |
| III章 研究目的および課題.....                            | 29 |
| 1. 研究目的.....                                   | 29 |
| 2. 研究課題.....                                   | 29 |
| <br>   |    |
| IV章 研究課題1「発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルの作成」            |    |
| 1. 緒言.....                                     | 32 |
| 2. 研究課題1-1. 発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認..... | 35 |
| 2-1. 目的.....                                   | 35 |
| 2-2. 方法.....                                   | 35 |
| 2-2- I. 被験動物および飼育条件.....                       | 35 |

|  |    |
|--|----|
| 2-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取.....                             | 38 |
| 2-2-III. エネルギー有効性の算出.....                                    | 38 |
| 2-2-IV. 大腿骨重量および長さの測定.....                                   | 38 |
| 2-2-V. 大腿骨破断強度の測定.....                                       | 39 |
| 2-2-VI. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定.....                         | 39 |
| 2-2-VII. 統計処理.....   | 39 |
| 2-3. 結果.....   | 40 |
| 2-3-I. 摂食量, 走行距離, エネルギー有効性.....                              | 40 |
| 2-3-II. 体重, 臓器重量.....  | 41 |
| 2-3-III. 大腿骨破断強度.....  | 42 |
| 2-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度.....                                    | 43 |
| 2-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量,<br>脛骨骨面積..... | 44 |
| 2-4. 考察.....   | 45 |
| 3. 研究課題1-2. 発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響<br>の検討.....     | 47 |
| 3-1. 目的.....   | 47 |
| 3-2. 方法.....   | 47 |
| 3-2-I. 被験動物および飼育条件.....                                      | 47 |
| 3-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取.....                             | 48 |
| 3-2-III. エネルギー有効性の算出.....                                    | 48 |
| 3-2-IV. 走行周期の評価.....   | 48 |
| 3-2-V. 大腿骨重量および長さの測定.....                                    | 49 |
| 3-2-VI. 大腿骨破断強度の測定.....                                      | 49 |

|  |    |
|--|----|
| 3-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定.....                        | 50 |
| 3-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定.....                                    | 50 |
| 3-2-IX. 尿中カルシウム排出の測定.....                                    | 51 |
| 3-2-X. 統計処理.....   | 51 |
| 3-3. 結果.....   | 52 |
| 3-3-I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性.....                        | 52 |
| 3-3-II. 体重, 臓器重量.....  | 55 |
| 3-3-III. 大腿骨破断強度.....  | 56 |
| 3-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度.....                                    | 57 |
| 3-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量,<br>脛骨骨面積..... | 59 |
| 3-3-VI. 骨代謝マーカーおよび尿中カルシウム排出.....                             | 61 |
| 3-4. 考察.....   | 62 |
| 4. 要約.....   | 69 |

## V章 研究課題2「発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する

### 高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果の検討」

|  |    |
|--|----|
| 1. 緒言.....   | 70 |
| 2. 研究課題2-1. 発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取<br>の予防効果の検討..... | 73 |
| 2-1. 目的.....   | 73 |
| 2-2. 方法.....   | 73 |
| 2-2-I. 被験動物および飼育条件.....  | 73 |
| 2-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取.....                               | 75 |

|   |    |
|---|----|
| 2-2-III. エネルギー有効性の算出.....                                     | 75 |
| 2-2-IV. 走行周期の評価.....  | 75 |
| 2-2-V. 大腿骨重量および長さの測定.....                                     | 75 |
| 2-2-VI. 大腿骨破断強度の測定.....                                       | 75 |
| 2-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定.....                         | 75 |
| 2-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定.....                                     | 76 |
| 2-2-IX. カルシウム出納の測定.....                                       | 76 |
| 2-2-X. 統計処理.....  | 76 |
| 2-3. 結果.....  | 77 |
| 2-3-I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性.....                         | 77 |
| 2-3-II. 体重, 臓器重量.....   | 79 |
| 2-3-III. 大腿骨破断強度.....   | 80 |
| 2-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度.....                                     | 81 |
| 2-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量,<br>脛骨骨面積.....  | 82 |
| 2-3-VI. 骨代謝マーカー.....  | 84 |
| 2-3-VII. カルシウム出納.....   | 85 |
| 2-4. 考察.....  | 87 |
| 3. 研究課題2-2. 発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対するエネルギー充足の<br>予防効果の検討..... | 92 |
| 3-1. 目的.....  | 92 |
| 3-2. 方法.....  | 92 |
| 3-2-I. 被験動物および飼育条件.....                                       | 92 |
| 3-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取.....                              | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| 3-2-III. エネルギー有効性の算出.....  | 93  |
| 3-2-IV. 走行周期の評価.....   | 93  |
| 3-2-V. 大腿骨重量および長さの測定.....  | 93  |
| 3-2-VI. 大腿骨破断強度の測定.....  | 93  |
| 3-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定.....                                    | 93  |
| 3-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定.....  | 93  |
| 3-2-IX. カルシウム出納の測定.....  | 94  |
| 3-2-X. 統計処理.....   | 94  |
| 3-3. 結果.....   | 95  |
| 3-3-I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性.....                                    | 95  |
| 3-3-II. 体重, 臓器重量.....  | 97  |
| 3-3-III. 大腿骨破断強度.....  | 98  |
| 3-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度.....  | 99  |
| 3-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量,<br>脛骨骨面積.....             | 100 |
| 3-3-VI. 骨代謝マーカー.....   | 102 |
| 3-3-VII. カルシウム出納.....  | 103 |
| 3-4. 考察.....   | 105 |
| 4. 研究課題2-3. 発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・<br>エネルギー充足併用の予防効果の検討..... | 110 |
| 4-1. 目的.....   | 110 |
| 4-2. 方法.....   | 110 |
| 4-2-I. 被験動物および飼育条件.....  | 110 |
| 4-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取.....   | 111 |

|  |     |
|--|-----|
| 4-2-III. エネルギー有効性の算出.....                                    | 111 |
| 4-2-IV. 走行周期の評価.....   | 111 |
| 4-2-V. 大腿骨重量および長さの測定.....                                    | 111 |
| 4-2-VI. 大腿骨破断強度の測定.....                                      | 112 |
| 4-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定.....                        | 112 |
| 4-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定.....                                    | 112 |
| 4-2-IX. カルシウム出納の測定.....                                      | 112 |
| 4-2-X. 統計処理.....   | 112 |
| 4-3. 結果.....   | 113 |
| 4-3-I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性.....                        | 113 |
| 4-3-II. 体重, 臓器重量.....  | 115 |
| 4-3-III. 大腿骨破断強度.....  | 117 |
| 4-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度.....                                    | 118 |
| 4-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量,<br>脛骨骨面積..... | 119 |
| 4-3-VI. 骨代謝マーカー.....   | 121 |
| 4-3-VII. カルシウム出納.....  | 123 |
| 4-4. 考察.....   | 125 |
| 5. 要約.....   | 127 |
| VI章 総合討論.....  | 128 |
| 1. 発育期ラットにおいて自発走運動と食餌制限により作成されたFATの低骨強度モデル<br>の意義.....       | 128 |
| 2. 発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充                  |     |



|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 足の予防効果と骨強度決定因子への影響..... | 131 |
| 3. 本研究の限界と今後の課題.....    | 133 |
| <br>                    |     |
| VII章 要約と結論.....         | 135 |
| 1. 要約.....              | 135 |
| 2. 結論.....              | 137 |
| <br>                    |     |
| 謝辞.....                 | 138 |
| 参考文献.....               | 139 |

## List of Tables

### 研究課題1-1

|  |    |
|--|----|
| Table 1. Compositions of the experimental diets.                 | 37 |
| Table 2. Food intake, running distance, and energy availability. | 40 |
| Table 3. Body weight and internal organ weight.                  | 41 |
| Table 4. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.             | 44 |

### 研究課題1-2

|  |    |
|--|----|
| Table 5. Food intake, running distance, and energy availability. | 54 |
| Table 6. Body weight and internal organ weight.                  | 55 |
| Table 7. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.             | 60 |
| Table 8. Bone metabolic marker and urine calcium.                | 61 |

### 研究課題2-1

|   |    |
|---|----|
| Table 9. Compositions of the experimental diets.                  | 74 |
| Table 10. Food intake, running distance, and energy availability. | 78 |
| Table 11. Body weight and internal organ weight.                  | 79 |
| Table 12. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.             | 83 |
| Table 13. Bone metabolic marker                                   | 84 |

### 研究課題 2-2

|   |     |
|---|-----|
| Table 14. Food intake, running distance, and energy availability. | 93  |
| Table 15. Body weight and internal organ weight.                  | 94  |
| Table 16. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.             | 98  |
| Table 17. Bone metabolic marker                                   | 102 |

### 研究課題2-3

|   |     |
|---|-----|
| Table 18. Food intake, running distance, and energy availability. | 114 |
|---|-----|

|   |     |
|---|-----|
| Table 19. Body weight and internal organ weight.      | 116 |
| Table 20. Bone weight, bone size, BMC, and bone area. | 120 |
| Table 21. Bone metabolic marker                       | 122 |

## List of Figures

### 背景

Figure 1. The problem of low BMD in female athlete with low food intake. 4

### 先行研究

Figure 2. Cortical and cancellous bone in human femur. 5

### 研究課題 1-1

Figure 3. Experimental design. 35

Figure 4. Wheel cage. 36

Figure 5. Breaking force and energy of femur. 42

Figure 6. BMD of lumbar spine and tibia. 43

### 研究課題 1-2

Figure 7. Experimental design. 47

Figure 8. Metabolic cage. 48

Figure 9. Changes in food intake (A), running distance (B), energy availability (C),  
body weight (D). 53

Figure 10. Breaking force and energy of femur. 56

Figure 11. BMD of lumbar spine and tibia. 58

Figure 12. The summary of results in experiment 1-2 68

### 研究課題 2-1

Figure 13. Experimental design. 73

Figure 14. Breaking force and energy of femur. 80

Figure 15. BMD of lumbar spine and tibia. 81

Figure 16. Calcium (Ca) balance study. 86

Figure 17. The summary of results in experiment 2-1 91

研究課題 2-2

|   |     |
|---|-----|
| Figure 18. Experimental design.                     | 92  |
| Figure 19. Breaking force and energy of femur.      | 98  |
| Figure 20. BMD of lumbar spine and tibia.           | 99  |
| Figure 21. Ca balance study.                        | 104 |
| Figure 22. The summary of results in experiment 2-2 | 109 |

研究課題 2-3

|   |     |
|---|-----|
| Figure 23. Experimental design.                     | 107 |
| Figure 24. Breaking force and energy of femur.      | 117 |
| Figure 25. BMD of lumbar spine and tibia.           | 118 |
| Figure 26. Ca balance study.                        | 124 |
| Figure 27. The summary of results in experiment 2-3 | 126 |

## 用語説明

本研究において類出する用語の説明を以下に記す。

### ・骨強度 (bone strength)

骨の物理的な強さ。骨強度は約 60～70%が骨密度に決定され、残りが海綿骨骨梁幅や皮質骨厚などの骨構造、骨代謝状態、骨損傷蓄積、石灰化状態、骨組織化学組成等の骨質により決定される (Ammann & Rizzoli, 2003) (Morris & Mandair, 2011) 本研究では、骨破断特性測定により骨破断力と骨破断エネルギーを測定し、骨強度の評価を行った。

### ・骨密度 (BMD; bone mineral density)

骨塩量を骨の単位面積 ( $\text{cm}^2$ ) や単位体積 ( $\text{cm}^3$ ) で除した値。平面骨密度は  $\text{mg}/\text{cm}^2$ 、体積骨密度は  $\text{mg}/\text{cm}^3$  の単位で表されることが多い。

### ・骨塩量 (BMC; bone mineral content)

骨中におけるカルシウムなどの無機質の量。

### ・骨量 (bone mass)

骨の有機成分である骨基質 (コラーゲン主体) と無機成分である骨塩 (ハイドロキシアパタイト) の総量。広義には骨密度や骨塩量の意味も含む。

### ・骨代謝 (bone metabolism)

骨における組織の吸収と形成の一連の代謝活動。破骨細胞による骨組織の破壊が行われる骨吸収と、骨芽細胞による骨組織を形成する骨形成が行われる。

### ・荷重運動 (weight bearing exercise)

身体に対し、体重や器具による物理的負荷 (荷重負荷) が生じる運動。スポーツ別に荷重負荷の強度を明確に示した基準は無いが、Nichols *et al.* (2007) は女性競技者の骨密度

を論じた総説において、水泳、自転車为非荷重運動、ウォーキング、スキーを低荷重運動、スカッシュ、スピードスケートの中荷重運動、体操、バレーボールを高荷重運動と見なしている。ただし、非荷重運動でも微量の荷重負荷は生じる。

#### • Female athlete triad (FAT)

女性競技者や活動的な女性に現れるエネルギー有効性低値、月経異常、低骨密度の3主徴の健康問題を指す (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007)。この3主徴は、単独もしくは相互関連しながら女性の健康に悪影響を及ぼす (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007)。

#### • エネルギー有効性 (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ものであり、運動以外の身体機能に用いることができるエネルギー量を示したもの (Nattiv *et al.*, 2007)。エネルギー有効性が低値になると、生存に必要なエネルギーを確保するため、細胞の維持や成長、体温調節機能、生殖機能に用いるエネルギーを減少させ、健康障害を引き起こす (Nattiv *et al.*, 2007)。エネルギー有効性低値によるホルモン変化の例として、生命機能維持に必要なエネルギーを確保するため、血糖値を維持させるコルチゾールや成長ホルモンの増加、摂食行動を刺激するグレリンの増加、摂食行動を抑制するレプチンの減少を引き起こし、これらのホルモン変化が視床下部-下垂体-性腺軸の活動抑制を引き起こすと考えられている

(Misra, 2014)。日本では、energy availability の訳として利用可能エネルギーという訳が使用されることもある。

#### • 月経異常 (menstrual dysfunction )

28日前後の間隔の月経周期に乱れが生じていることを示す (Nattiv *et al.*, 2007)。また、月経周期の乱れのみならず、初経の遅れや月経状態には顕在化しない性ホルモン分泌異常の状態も、月経異常に含まれる (Nattiv *et al.*, 2007)。

#### ・低骨密度 (low BMD )

低骨強度とは、骨が適切な健康状態でなく、骨強度の低下や獲得抑制により骨障害の危険性が増加した状態である。骨折のリスクを完全に識別できる判断基準はないが、FATの公式見解では骨強度の約60～70%を決定する骨密度の評価によって、骨状態悪化の判断を行っている (Nattiv *et al.*, 2007)。競技者や活動的な女性の低骨密度状態の判断基準として、骨密度が同世代同性平均値 (Zスコア) の-1標準偏差 (SD) 未満とし、更に骨の健康状態が悪化した骨粗鬆症 (osteoporosis) の判断基準を骨密度がZスコアの-2SD未満としている (Nattiv *et al.*, 2007)。この判断基準は、World Health Organization (WHO) が定めた、閉経後女性の「骨粗鬆症」の判断基準、骨密度が最大となる30歳同性平均値 (Tスコア) の-2.5SD未満 (Kanis, 1994) とは異なる。



## 関連論文

Aikawa Y, Agata U, Kakutani Y, Higano M, Hattori S, Ogata H, Ezawa I, Omi N. 2015.

The interaction of voluntary running exercise and food restriction induces low bone strength and low bone mineral density in young female rats.

Calcif Tissue Int. 97(1):90-99. (研究課題 1-2)

Aikawa Y, Agata U, Kakutani Y, Kato S, Noma Y, Hattori S, Ogata H, Ezawa I, Omi N.

2016. The preventive effect of calcium supplementation on weak bones caused by the interaction of exercise and food restriction in young female rats during the period from acquiring bone mass to maintaining bone mass.

Calcif Tissue Int. 98(1):94-103. (研究課題 2-1)

## I 章 背景

日常的に運動を行っている女性競技者における低骨密度が Female Athlete Triad (FAT) の 1 主徴として問題視されている (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007). 本来, 運動は骨強度を高める有効な手段である. 運動は骨に荷重負荷を与え, 荷重負荷を骨細胞が感知し, 骨芽細胞や破骨細胞の活性や分化を調節して, 骨量を増加させる (Klein-Nulend *et al.*, 2012). 骨強度は約 60-70% が骨密度により決定される (Ammann & Rizzoli, 2003) ことから, 運動の荷重負荷により骨塩量を高め, 骨密度を高めることは, 骨強度を高めるために重要な手段の一つである. ヒトにおいては, 骨強度の指標として測定方法が確立されている骨密度の調査により, 日常的に走運動や跳躍運動などの荷重運動を行っている者やスポーツ競技者は, 非運動者よりも骨密度が高値となることが報告されている (Bennell *et al.*, 1997) (Duncan *et al.*, 2002) (Greene *et al.*, 2005) (Nichol *et al.*, 2007). しかし, その一方で, 日常的に荷重運動を行っている思春期女性競技者の 15% 以上が低骨密度だったと報告した研究が複数あり (Nichols *et al.*, 2006) (Barrack *et al.*, 2008) (Hoch *et al.*, 2009), 本来獲得できるはずの骨密度を獲得できていない女性競技者も散見される. この女性競技者や活動的な女性に生じる低骨密度は, アメリカスポーツ医学会により FAT の 1 主徴として位置づけられ, 問題提起が行われている (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007).

FAT とは, 女性競技者や活動的な女性に現れるエネルギー有効性 (細胞の維持や成長, 体温調節機能, 生殖機能に用いるエネルギー) 低値, 月経異常, 低骨密度の 3 主徴の健康問題を示す用語であり, アメリカスポーツ医学会は FAT に対する公式見解を発表し, 問題提起を行っている (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007) (Figure 1). この 3 主徴は, 単独もしくは相互に関連しながら女性の健康に悪影響を及ぼす (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007). そのため, FAT 問題の解決にむけて活動している FAT 連合 (Female Athlete

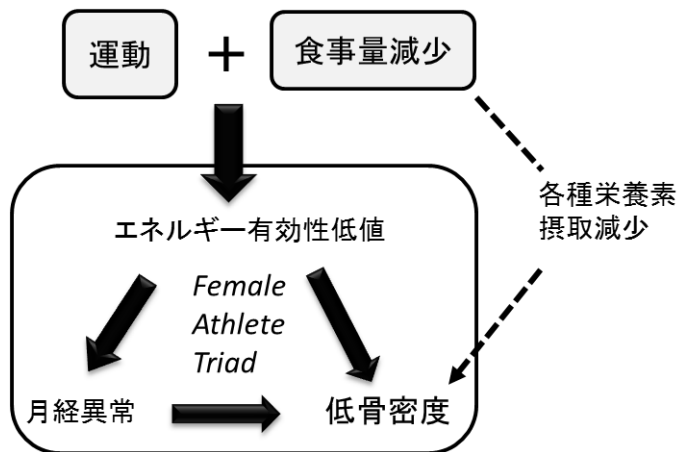
Triad Coalition) は、全ての女性が適正なエネルギー有効性、正常月経、適切な骨の健康状態となることを FAT 問題に対する最終目標としている (De Souza *et al.*, 2014).

FAT の 3 主徴の問題を全て解決することが目標とされる中でも、低骨密度は解決すべき課題であり、さらに思春期における低骨密度は予防すべき重要な課題である (Ackerman & Misra, 2011). 低骨密度は疲労骨折・外傷性骨折の危険因子である (Lauder *et al.*, 2000) (Mackey *et al.*, 2007) ことから、低骨密度の女性競技者は骨障害により日常生活や競技生活に悪影響を受ける可能性が高まる。さらに、低骨密度の中でも、骨量獲得増進時期である思春期の骨量獲得阻害による低骨密度は、以後の人生においても低骨密度が改善されず日常生活に支障を来す可能性があることから、とくに問題視されている (Ackerman & Misra, 2011). そのため、思春期の女性競技者に対して早期に介入を行い、適切な骨の健康状態に導くことが求められる。

思春期における FAT の低骨密度となる要因として、食事制限や摂食障害による食事量減少がある (Nattiv *et al.*, 2007). 運動による高いエネルギー消費量と、食事量減少による低いエネルギー摂取量が組み合わさることで、エネルギー有効性は低値となる。エネルギー有効性低値は細胞の維持や成長、体温調節機能、生殖機能に用いるエネルギーを減少させ、月経異常や低骨密度を引き起こす (Nattiv *et al.*, 2007). エネルギー有効性低値を防ぐため、日常的に高い運動量をほこる女性競技者や活動的な女性は、十分な食事摂取によりエネルギー摂取量を確保する必要がある。しかしながら、体重階級別競技や、体重減少が競技力向上につながると考えられている持続的競技、身体的な美しさが求められる審美的競技では、体重の減量行為のため、エネルギー摂取制限が用いられることがある (Fogelholm, 1994). 他にも、競技者は心理的ストレス、栄養知識の欠如、過度な運動量、食事準備時間の不足、ファストフードの利用、遠征、指導者の指示などにより、摂食異常が生じる (Coelho *et al.*, 2014). さらに、Coelho *et al.* (2014) は、思春期の女性競技者は成長による体重の増加が競技成績に負の影響を及ぼす可能性を心配することから、とくに摂食異常の危険性

が高まる可能性がある」と述べている。それらの理由により生じる食事量の減少は、エネルギー摂取量以外にも各種の栄養素摂取量の不足を導く。骨の成長や維持に影響を与える栄養素として、カルシウムやリン、たんぱく質などの骨の材料となる栄養素や、他にも、マグネシウム、ビタミン D、ビタミン K、脂質他、多くの栄養素が関与しており (Cashman, 2007)、これらの栄養素摂取量が不足することは、骨の成長抑制や脆弱化につながる。以上のことから、食事量減少は思春期における FAT の低骨密度の大きな要因となっている。

思春期における FAT の低骨密度の予防策として、骨の材料となるカルシウムを多く摂取すること (Manore, 2002) (Meyer *et al.*, 2007) (Nattiv *et al.*, 2007) や、エネルギー有効性を適正に保つために十分なエネルギーを摂取すること (Nattiv *et al.*, 2007) が考えられている。高カルシウム摂取が骨に与える効果について、摂食障害等の健康問題を有さない思春期男女においてサプリメントによるカルシウム摂取量増加は骨密度を増加させることや (Nowson *et al.*, 1997) (Stear *et al.*, 2003) (Prentice *et al.*, 2005)、女性長距離走者においてカルシウム摂取量が増加すると骨密度が高くなることや骨折発症率が低くなることが報告されている (Nieves *et al.*, 2010)。カルシウムはサプリメント製品や栄養強化食品により手軽に摂取可能であることや、体重に影響を与えない栄養素であることから、思春期の女性にとって受け入れやすい対策である。そのため、高カルシウム摂取は思春期における FAT の低骨密度に対する予防策として効果が期待される。しかし、FAT の低骨密度を呈する食事量が減少した女性競技者や活動的な女性において、高カルシウム摂取が骨に与える効果を検討した報告はない。また、十分なエネルギーを摂取し、エネルギー有効性低値を防ぐことは FAT の重要対策とされている (Nattiv *et al.*, 2007)。しかしながら、各種の栄養素摂取が減少した状態において、エネルギー充足のみで低骨密度を予防できるかは明らかになっていない。これらの予防策の効果が明らかになっていない原因として、研究対象者の招集や実験条件の統制が困難なことが挙げられる。



**Figure 1. The problem of low BMD in female athlete with low food intake.**

This figure is modified from the FAT position stand (Nattiv *et al.*, 2007).

The combination of exercise and food intake reduction has a risk of low bone strength in young female athletes. The combination causes low energy availability. Low energy availability causes menstrual dysfunction and low BMD. Additionally, several nutrients deficiency by food intake reduction causes low bone mineral density.

## II章 文献研究

### 1. 骨の構造と骨強度

#### 1-1. 骨の構造

骨は体を支え、内臓を保護し、筋肉と協調して運動機能を司る構造的機能と、カルシウム、リンなどの無機質を貯蔵して供給する代謝的機能を果たす重要な組織である

(Compston, 2001). 骨は、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞といった細胞成分と、それ以外の細胞外基質によって構成される (Hadjidakis & Androulakis, 2006). 骨基質は、リン酸カルシウムの結晶であるヒドロキシアパタイトが、I型コラーゲンを主体とする有機成分に沈着し石灰化した硬組織であり、骨の石灰化が構造に強度をもたらす (Golden & Abrams, 2014). 骨は肉眼的・顕微鏡的特徴から、皮質骨と海綿骨に分類できる (Figure 2) (Willems *et al.*, 2014). 皮質骨は骨の約 80%を構成し、細かく密集し、骨代謝が比較的遅く、曲げやねじれに高い抵抗力を持つ。海綿骨は骨の約 20%を構成し、密集しておらず網目状の構造であり、骨代謝が速く、弾性が高い (Hadjidakis & Androulakis, 2006). 大腿骨や脛骨のような長管骨の骨幹部は大部分が皮質骨で構成され、骨端部は表面が薄い皮質骨で覆われつつ内部が海綿骨で構成される (Clarke, 2008).

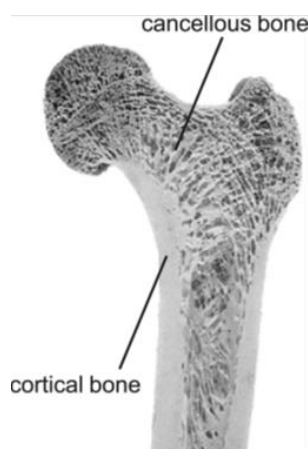


Figure 2. Cortical and cancellous bone in human femur (Willems *et al.*, 2014).

## 1-2. 骨の成長と骨代謝

長管骨の成長は、長軸方向（長さ）の成長が先に生じ、後に短軸方向（幅）の成長が生じる（Rauch, 2005）。長軸方向の成長は軟骨が骨端に生じることから始まる。軟骨はコラーゲン繊維、プロテオグリカン、水が構成要素の軟組織である。骨端に生じた軟骨が骨基质タンパク質へと置換され、石灰化され、網目状の海綿骨となる。骨端の海綿骨の距離が伸びてくると、中心部の方の海綿骨は吸収されつつ、さらに長軸方向の延伸が続いていく。短軸方向の成長は、骨表面の骨膜が骨形成を担う骨芽細胞により石灰化されることによる（Rauch, 2005）。骨の成長と形成はモデリングとよばれ、ほとんどは20歳までに行われる（Compston, 2001）。成熟期においても、モデリングは運動のような荷重負荷によって生じる可能性があるが、その反応は年齢の上昇により減少する。発育期および成熟期の骨の表面では、骨吸収と骨形成により組織を入れ替える骨のリモデリングが行われており、物理的機能の維持とカルシウムイオンやリンイオンなどの放出や吸着を行っている。リモデリングは破骨細胞が骨吸収を行い骨の表面を取り除き、骨芽細胞がその空間に類骨を形成し、後に骨の石灰化を行う（Compston, 2001）。

骨量は骨吸収と骨形成のバランスに依存しており、幼少期や思春期のように骨形成が超過すれば骨量が増加し、骨吸収が超過するようであれば骨量は減少する。ヒトの骨量は20～30歳代で最大となり、そのうちの約40～60%を思春期に獲得する（Golden & Abrams, 2014）。そのため、思春期は骨量獲得増進期といえる。

## 1-3. 骨強度の決定因子

人の生活活動は、とくに骨の構造的機能の影響を受ける。骨に障害が生じると、身体活動に支障が生じ、生活の質の低下につながることから、骨に障害が生じることを予防する必要がある。骨強度は約60～70%が骨密度に決定され、残りが海綿骨骨梁幅や皮質骨厚な

どの骨構造，骨代謝，骨損傷蓄積，石灰化状態，骨組織化学組成等の骨質により決定される（Ammann & Rizzoli, 2003）（Morris & Mandair, 2011）．骨密度は面積や体積あたりの無機質重量で表現される．骨密度はヒトの骨強度の指標として最も用いられ，骨密度の低値は，骨の障害である外傷性骨折や疲労骨折の危険因子であることが報告されている

（Lauder *et al.*, 2000）（Mackey *et al.*, 2007）．骨強度を高めることにより，骨障害を予防し，生活の質を低下させないことが人々にとって重要である．骨強度の大きな決定因子である骨密度を高めるためには，骨塩量を高めることが必要であるが，最大骨量は 60～80% が遺伝的要因により決定される．その他の最大骨量を決定する因子は，栄養素摂取，身体活動，ホルモン状態などがある（Compston, 2001）．女性の骨密度は男性よりも多くの世代において低く，閉経後には急激に骨密度が減少するため，発育期に骨密度を高めることや，成人期以降に骨密度の低下を防ぐことが重要なこととなる（Davies *et al.*, 2005）．

#### 1-4. 骨代謝の調節因子

文献研究 1-3 において，遺伝的要因以外に最大骨量に影響を与える因子として，栄養素摂取，身体活動，ホルモン状態などを挙げたが（Compston, 2001），栄養素摂取，身体活動もホルモン状態の変化を介して骨代謝に影響を及ぼすものが多い．骨のリモデリングには血中カルシウム量を調節する副甲状腺ホルモン（PTH; parathyroid hormone），カルシトニン，ビタミン D3 や，思春期に分泌が増加するエストロゲンが骨代謝を調整する主要ホルモンであり，その他にもインスリン様成長因子— I（IGF-1; insulin-like growth factor 1）などの成長因子によって調整を受ける（Siddiqui & Partridge, 2016）．PTH は骨吸収を刺激し，腎臓でのカルシウム再吸収を増加させ，血中カルシウム濃度を維持し，破骨細胞に応答して骨芽細胞の活性を高める．カルシトニンは破骨細胞の活性を低下させる．ビタミン D3 は腸管のカルシウム吸収を促進し，骨の石灰化を促進させる．さらに，ビタミン D3 は骨芽細胞の石灰化を促進させる（Hadjidakis & Androulakis, 2006）．エストロゲンは，（1）骨の



リモデリング活性を阻害する，(2) 破骨細胞への分化阻害やアポトーシス促進により，破骨細胞の数と活性，骨吸収を減少させる，(3) 骨芽細胞への分化促進やアポトーシス阻害により，骨芽細胞の数と活性，骨形成を促進させる，という3つの作用で，骨代謝を調節している (Rochira *et al.*, 2015). IGF-1 は骨芽細胞の増殖を刺激して骨代謝を調節する (Davies *et al.*, 2005).

また，長管骨のモデリングも成長ホルモン，IGF-1，グルココルチコイド，甲状腺ホルモン，エストロゲン，アンドロゲン，ビタミン D 等の内分泌信号の複雑な回路によって調整される (Nilsson *et al.*, 2005). 成長ホルモン，IGF-1，アンドロゲン，甲状腺ホルモンは軟骨細胞を増加させ，グルココルチコイドは軟骨細胞のアポトーシスを引き起こす．エストロゲンは軟骨細胞の増加を抑制し，成熟を亢進する．思春期において，性腺の成熟による性ホルモンの分泌増加や，それによる成長ホルモンやIGF-1の急激な分泌増加によって，骨強度や骨の大きさの急激な成長が生じる (Weaver, 2002) (Davies *et al.*, 2005).

#### 1-5. 骨強度の測定方法

動物の骨強度の測定方法の一つに，大腿骨のような長骨を用いて行う3点曲げ破断試験がある．この物理的試験では，荷重変形曲線が記録され，直線部の傾きを剛性，破断前の最大荷重を最大強度，曲線下面積をエネルギーという (Ammann & Rizzoli, 2003). これらの評価項目は，骨密度や骨構造といった，骨強度の様々な決定因子を測定して治療の効果を評価することと同様に，骨の脆弱性を評価することを可能にする (Ammann & Rizzoli, 2003). ヒトの骨強度の評価方法は，骨の破断は不可能であることから，WHO が骨粗鬆症の診断基準に骨密度を用いて以降 (Kanis, 1994)，二重エネルギーX線吸収 (DXA; dual-energy X-ray absorptiometry) 法による骨密度の測定が最も用いられる方法である (Celi, 2013). DXA 法は，少量の放射線量で，正確に，少ない費用で，苦痛なく，短期間で測定できる利点がある．FAT の骨問題における骨の健康状態の判断基準としても，骨密

度が用いられている (Nattiv *et al.*, 2007). その他の骨強度の評価測定方法として, microcomputed tomography ( $\mu$ CT) による骨微細構造の評価や (Benhamou, 2007) 骨標識法による骨形態計測, ラマン分光法による骨化学組成や結晶化度の評価方法などがある (Morris & Mandair, 2011) (Iwasaki *et al.*, 2011).

## 2. 運動の骨強度増強効果

身体活動は骨に荷重負荷を与える. 荷重負荷は骨基質を変形させ, その歪みを骨細胞が感知して, 骨形成タンパク質やプロスタグランジン E<sub>2</sub>, 一酸化窒素といった分子信号を産生し, 骨芽細胞や破骨細胞の活性や分化を調節して骨量を増加させる (Klein-Nulend *et al.*, 2012).

ヒトを対象とした研究においても, 荷重運動が骨の成長に有効なものであることが報告されている. 複数の研究をまとめた Nichols *et al.* (2007) の報告によると, 非荷重運動 (水泳・自転車) を除く女性運動競技者 (スキー・競歩, テニス・スカッシュ・スピードスケート, 体操・バレーボール, ウエイトトレーニング) は, 非運動者に比べて大腿骨頸部骨密度が 10~25% 高値となることを報告している. また, 前述に含まれない陸上競技を調査した Bennell *et al.* (1997) の研究では, 17 歳から 26 歳の男女の陸上競技瞬発系種目選手, 持久系種目選手と非運動者の全身骨塩量および部位別骨密度を比較したところ, 女性において, 全身骨塩量は各群間に有意な差は認められなかったと報告されている. 一方で, 上肢・腰椎骨密度は安静者と比較して瞬発系選手が高値を示し, 下肢骨密度は安静者と比較して瞬発系選手, 持久系選手が高値を示したと報告されている. Bennell *et al.* (1997) の同研究では, 男性において, 全身骨塩量, 上肢・腰椎骨密度は安静者と比較して瞬発系選手が高値を示し, 下肢骨密度は安静者と比較して瞬発系選手, 持久系選手が高値を示したと報告されている. Brahm *et al.* (1997) も同様に, 男性持久系走者は非走者よりも全身骨密

度、下肢骨密度が高値であることを報告している。さらに、思春期女性競技者の骨について、Duncan *et al.* (2002) は、15 歳から 18 歳の思春期女性の非競技者、水泳競技者、自転車競技者、走競技者、トライアスロン競技者の骨密度を比較したところ、走競技者のみ非競技者と比較して、全身骨密度、腰椎骨密度、大腿骨頸部骨密度、下肢骨密度が高値だったと報告している。Greene *et al.* (2005) は平均 15.9±1.6 歳の州代表以上のレベルの女性中距離走競技者と同性代の活動的でない女性を比較したところ、中長距離走競技者の脛骨遠位部骨塩量、脛骨遠位部体積骨密度は高値だったと報告している。

さらに、非競技者においても運動が骨に及ぼす効果は報告されている。非競技者である 10 歳から 15 歳の女性に対し、荷重運動である跳躍運動と有酸素運動の組み合わせ運動を 9 か月間行わせたところ、腰椎・大腿骨骨塩量は非運動群と比較して高値となることが報告されている (Heinonen *et al.*, 2000)。

これらのことから、荷重運動は骨強度を高める手段として有効であり、多くの場合、継続的に荷重運動を行う競技者は骨密度が高値となることが明らかとなっている。

### 3. 女性競技者の FAT 問題

運動は前述の通り、骨の成長に良い効果をもたらすことが報告されている一方で、運動により骨量増加が期待される女性競技者の中で、骨に問題を抱える者の存在も明るみにってきた。女性競技者や活動的な女性に生じる低骨密度は、アメリカスポーツ医学会により FAT の 1 主徴として位置づけられ、問題提起が行われている (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007)。

### 3-1. FAT の概念

FAT とは、女性競技者や活動的な女性にしばしば現れ、単独もしくは相互に関連しながら女性の健康に悪影響を及ぼすエネルギー有効性低値、月経異常、低骨密度の 3 主徴の健康問題である (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007). FAT の 3 主徴は過度な運動や食事量の減少などに起因する。アメリカスポーツ医学会は FAT の周知や早期発見、予防や治療のため、公式見解を公表し、問題提起を行っている (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007).

FAT の 3 主徴であるエネルギー有効性低値、月経異常、低骨密度とは次のような状態を示す用語である。エネルギー有効性とは、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ものであり、運動以外の身体機能に用いることができるエネルギー量を示したものである (Nattiv *et al.*, 2007). エネルギー有効性低値は、生存に必要なエネルギーを確保するため、細胞の維持や成長、体温調節機能、生殖機能に用いるエネルギーを減少させ、健康障害を引き起こす (Nattiv *et al.*, 2007). 月経異常とは、28 日前後の間隔の月経周期に乱れが生じていることや、初経の遅れや月経状態には顕在化しない性ホルモン分泌異常の状態を示す (Nattiv *et al.*, 2007). 低骨密度は、骨が適切な健康状態でなく骨強度の低下や獲得抑制により、骨障害の危険性が増加した状態の指標である (Nattiv *et al.*, 2007). FAT の公式見解では、骨状態の悪化について、骨折のリスクを完全に識別できる骨密度の基準はないものの、骨密度が z スコアの -1SD 未満の状態を低骨密度の判断基準としている (Nattiv *et al.*, 2007). FAT 連合は、FAT の問題について早期介入することで、各主徴が摂食障害や無月経、骨粗鬆症といった重大な最終段階へ移行することを防ぎ、全ての女性が適正なエネルギー有効性、正常月経、適切な骨の健康状態となることを目標としている (De Souza *et al.*, 2014).

FAT の 3 主徴全てを解決することが目標とされる中でも、低骨密度は予防すべき課題である。さらに、低骨密度の中でも、骨量獲得増進時期である思春期の骨量獲得阻害による低骨密度は、以後の人生においても低骨密度が改善されず日常生活に支障を来す可能性が

あることから、とくに問題視されている (Ackerman & Misra, 2011). Barrack *et al.* (2011) は低骨密度の思春期女性競技者は3年後も低骨密度、低骨塩量であったこと、Hartman *et al.* (2000) は神経性食欲不振から回復して中央値21年経過した中央値40.2歳の女性の骨密度は、正常値水準まで獲得できていなかったことを報告している。これらの報告から思春期に骨の成長を妨げられると以後の回復が困難であり、思春期の骨成長の阻害は重大な問題であることがわかる。

### 3-2. FAT の発症率

FAT の3主徴の発症率について、先行研究により報告されている。Hoch *et al.* (2009) は陸上競技トラック種目、クロスカントリー、バレーボール、バスケットボール、サッカー、テニス、水泳、ゴルフ、ソフトボールを行っている高校生競技者80人を対象に調査を行ったところ、エネルギー有効性低値 [ $\leq 45\text{kcal/kg lean body mass (LBM)}$ ] 29%、月経異常54%、低骨密度16%の発症率であり、2主徴の発症率はエネルギー有効性低値+月経異常が18%、エネルギー有効性低値+低骨密度が4%、月経異常+低骨密度が8%であり、3主徴全てを発症する者は1%だったと報告している。2007年にFATの3主徴は現在のものとなったが、それ以前の3主徴の一つは、エネルギー有効性低値ではなく摂食異常であり (Otis *et al.*, 1997) (Nattiv *et al.*, 2007)、摂食異常を3主徴の一つとして発症率を報告した研究もある。Nichols *et al.* (2006) は陸上競技、クロスカントリー走、サッカー、ソフトボール、水泳、バレーボール、テニス、ラクロスを行っている高校生競技者170人を対象に調査を行ったところ、摂食異常18.2%、月経異常23.5%、低骨密度21.8%であり、5.9%が2主徴を、1.2%が3主徴全てを有していたと報告している。Torstveit *et al.* (2005) はノルウェーの一流女性競技者186人を対象に調査を行ったところ、2主徴の発症率は摂食異常+月経異常が26.9%、摂食異常+低骨密度が10.2%、月経異常+低骨密度が5.4%であり、3主徴全てを発症する者は4.3%だったと報告している。Barrack *et al.* (2008) は

月経異常と低骨密度の2主徴の調査報告であるが、13~18歳の思春期女性クロスカントリー一走者93人を対象に調査を行ったところ、月経異常25.8%、低骨密度39.8%だったと報告している。これらの報告から、FATの3主徴全てを発症する者の割合は1.0~4.3%と高くはないが、3主徴のどれか一つ以上を発症する者の割合は高く、とくに解決すべき問題とされる思春期女性競技者の低骨密度の発症率も16~39.8%と高い。

また、男性でもFATの3主徴に類似した症状を有する者が報告されている。De Souza *et al.* (1994)は、一週間当たりの走行距離が50~90マイルの男性長距離走者に栄養調査、性ホルモンの検査、および骨密度評価を行ったところ、食事量の不足、血中黄体化ホルモン濃度および血中テストステロン濃度、骨密度の低値が認められたと報告している。男性競技者の食事量減少、性ホルモン減少と関連する低骨密度は、FATのような公式見解は発表されていないが、軽視できない問題である。

#### 4. FATにおける各主徴の関連

##### 4-1. エネルギー有効性低値が月経異常に及ぼす影響

月経異常には様々な種類があり、無月経（月経が年に数回以内）、希発月経（年に6回以下）、無排卵（排卵はないが出血は生じる）、黄体期欠乏（排卵は生じるかもしれないが、黄体化するためのプロゲステロン不足）、月経遅延などがある。無月経が最も厳しい症状であるが、全ての月経異常はエストロゲン分泌不足により、骨の健康に影響を及ぼす可能性がある（Manore, 2002）。

女性競技者の月経異常は、負のエネルギーバランスが大きな要因となる（Manore, 2002）（Maimoun *et al.*, 2014）（Misra, 2014）。Zanker & Swaine（1998）は女性長距離選手において、無月経者は正常月経者よりもエネルギー摂取量-エネルギー消費量の値が低値であることを報告した。エネルギー有効性低値は視床下部-下垂体-性腺軸に影響を与え、

性腺刺激ホルモン放出ホルモン，黄体化ホルモン，卵胞刺激ホルモンの分泌量低下や分泌拍動阻害を起こし，血中エストロゲン濃度が低下することで月経異常を生じさせる

(Maimoun *et al.*, 2014) (Misra, 2014). Loucks & Thuma (2003) の研究では，若年女性を対象に 5 日間，三大栄養素エネルギー摂取比率を固定した食事制限と運動によりエネルギー有効性を 45 kcal/kgLBM/day, 30 kcal/kgLBM/day, 20 kcal/kgLBM/day, 10kcal/kgLBM/day の 4 パターンに分け，ホルモンおよび骨代謝マーカーの変化を観察したところ，45 kcal/kgLBM/day 群と比較して 20 kcal/kgLBM/day 以下の群で，黄体化ホルモン分泌拍動頻度は低値となり，1 拍動当たりの黄体化ホルモン分泌量は高値となったと報告されている．この結果は，黄体化ホルモン分泌拍動がエネルギー有効性に依存する可能性を示唆している．また，Loucks *et al.*のグループはその後の研究において，同様の実験方法で，10kcal/kgLBM/day 群は血中エストラジオール濃度が低値となることも報告している (Ihle & Loucks, 2004).

エネルギー有効性低値による視床下部－下垂体－性腺軸の活動抑制は，生命機能維持に必要なエネルギーを確保するため，血糖値を維持させるコルチゾールや成長ホルモンの増加，摂食行動を刺激するグレリンの増加，摂食行動を抑制するレプチンの減少を引き起こし，これらのホルモン変化が視床下部－下垂体－性腺軸の活動抑制を引き起こすと考えられている (Misra, 2014)．この考えを支持する研究として，体重増加を恐れ，食事が減少しエネルギー有効性低値となる神経性食欲不振症の思春期女性は，血中コルチゾール，成長ホルモン，グレリン濃度は高値であり，レプチン，IGF-1，エストラジオール濃度は低値であったと報告した研究がある (Misra *et al.*, 2003) (Misra *et al.*, 2005)．さらに，各種のホルモンが視床下部－下垂体－性腺軸の活動に与える影響は，以下の通り報告されている．コルチゾールについて，Breen *et al.* (2008) は，雌羊における卵巣摘出後，性腺刺激ホルモン放出ホルモン継続投与状態に対し，ストレスホルモンであるコルチゾールの投与は，性腺刺激ホルモン放出ホルモン感受性低下により黄体化ホルモン分泌量を低値とし

たと報告している。レプチンについては、Welt *et al.* (2004) が、視床下部性無月経の女性に対し3ヶ月のレプチンの投与は、血中の黄体化ホルモンや卵胞刺激ホルモン、エストラジオール濃度を高値としたと報告している。グレリンは、Kluge *et al.* (2007) が、健康な女性に対するグレリンの投与は血中の黄体化ホルモン量を低値とした報告している。成長ホルモンについては、投与による影響ではないものの、Rickenlund *et al.* (2004) が、月経異常の持久系競技者において、血中の黄体化ホルモン濃度と成長ホルモン濃度は有意な負の相関が認められたと報告している。また、Rickenlund *et al.* (2004) の同研究は、血中の黄体化ホルモン濃度とコルチゾール濃度も有意な負の相関が認められたと報告している。これらの報告から、エネルギー有効性低値は生命機能維持に必要なエネルギーを確保するためのホルモン変化により、視床下部-下垂体-性腺軸の活動抑制を引き起こしていることがわかる。

#### 4-2. エネルギー有効性低値が骨に及ぼす影響

エネルギー有効性低値は、前述したホルモンバランスの変化により、月経のみならず、骨にも悪影響を及ぼす。Ihle & Loucks (2004) の研究によると、若年女性を対象に5日間、三大栄養素エネルギー摂取比率を固定した食事制限と運動によりエネルギー有効性を45kcal/kgLBM/day, 30kcal/kgLBM/day, 20kcal/kgLBM/day, 10kcal/kgLBM/dayの4群に分け、骨代謝に関連するホルモンおよび骨代謝マーカーの変化を観察したところ、血中エストラジオール濃度と骨吸収マーカーである尿中I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX; N-terminal telopeptide) 濃度の減少は10kcal/kgLBM/day群のみ生じ、血中インスリン濃度と骨形成マーカーである血中I型プロコラーゲンC-プロペプチド (PICP; type I procollagen carboxy-terminal propeptide) 濃度はエネルギー有効性の低下と同じように漸進的に減少していき、血中のIGF-1, 甲状腺ホルモンとオステオカルシン (OC; osteocalcin) 濃度は20kcal/kgLBM/day以下になると急激に減少したと報告している。こ



の報告は、エネルギー有効性低値は骨代謝に影響を与えるエストロゲンや IGF-1 などのホルモンの分泌量低値により骨代謝異常を引き起こし、女性競技者の骨を脆弱化させる可能性を示唆するものである。また、Barrack *et al.* (2010) は思春期女性長距離走者において通常骨代謝群と比較して、骨強度低下を導く可能性のある高骨代謝群はエネルギー摂取量が低値傾向 ( $p < 0.10$ ) だったと報告している。さらに、Pollock *et al.* (2010) は、正常月経である女性成人中長距離走競技者の骨密度について、全身骨密度と大腿骨頸部骨密度は正常だったが、腰椎骨密度中央値は Z スコア = -0.70、橈骨骨密度中央値は Z スコア = -2.2 だったと報告している。Pollock *et al.* (2010) は、骨密度が低値となった要因について、実験結果からは測定不足のため明確にできないとしつつも、エネルギー有効性の低値が影響を与えたかもしれないと考察している。これらの報告から、エネルギー有効性低値は骨に悪影響を及ぼすものであることがわかる。

#### 4-3. 月経異常が骨に及ぼす影響

Kaga *et al.* (2004) は高校生女性長距離走者において、下肢骨密度は正常月経者と比較して月経異常者は低値であることを報告している。また、Drinkwater *et al.* (1990) は女性競技者において、腰椎骨密度は常に正常月経である群と比較して現在正常月経であるが過去に稀発月経又は無月経だった群は低値であり、正常な月経周期が一度もない群は最も骨密度が低値であったと報告している。この結果から、Drinkwater *et al.* (1990) は月経周期の損失回数が多いほど骨密度は減少する可能性があるとし唆している。

月経異常者の骨密度が低値となる要因として、エストロゲン分泌量の減少がある。エストロゲン欠乏は骨の脆弱化を招く可能性が高く、月経異常者の低骨密度の治療策として、エストロゲンやプロゲステロンを補給するホルモン療法が行われることがある。女性競技者におけるホルモン療法の効果は、24~30 ヶ月間のホルモン療法により無月経女性長距離走者の骨密度を有意に増加させた (Cumming, 1996) という報告があれば、2 年間のホル

モン療法を行っても月経異常ダンサーの低骨密度は改善しなかった (Warren *et al.*, 2003) という報告もあり、効果は一定ではない。エストロゲン補給による低骨密度改善効果が一定でない原因として、月経異常状態では、エネルギー有効性低値を伴うことがあり、IGF-1 やレプチンなどの骨の成長や維持に関する他のホルモンも変動することが考えられる。

#### 4-4. FAT の 3 主徴の関連のまとめ

以上の先行研究から、エネルギー有効性低値、月経異常、低骨密度は各主徴間で関連していることがわかる。調査研究によると、3 主徴全てを有する者は 1~5.4% と多くはないが (Torstveit *et al.*, 2005) (Nichols *et al.*, 2006) (Hoch *et al.*, 2009)、エネルギー有効性低値、月経異常は低骨密度を引き起こすものであることから、骨の健康のためにそれぞれを注視する必要がある。

### 5. 思春期の女性競技者における食事量減少が骨に及ぼす影響

思春期における FAT の低骨密度となる要因として、食事制限や摂食障害による食事量減少がある (Nattiv *et al.*, 2007)。十分な食事摂取による栄養素摂取は、健康の維持や成長、怪我の予防や競技力発揮に重要であり (Meyer *et al.*, 2007)、運動による骨の同化効果をもたらすためにも必要である (Borer, 2005)。骨の成長や維持に影響を与える栄養素として、カルシウムやリン、たんぱく質などの骨の材料となる栄養素の他にも、その他の無機質、ビタミン類、脂質と多くの栄養素がある (Cashman, 2007)。そのため、食事量の減少は、先述したエネルギー有効性の問題に加え、各種の栄養素摂取量が減少することで、骨の成長や維持に悪影響を及ぼす。非競技者の思春期女性において、食事量の減少が生じる摂食障害を有する者は、健常者に比べて骨塩量の増加がすくないこと (Soyka *et al.*, 2002) や、骨密度が低値であること (Misra *et al.*, 2004) が報告されている。さらに、Barrack *et al.*

(2010) が思春期女性長距離走者において通常骨代謝群と高骨代謝群の栄養素摂取量を比較した研究は、先述したエネルギー摂取量以外にも、高骨代謝群は炭水化物、脂質摂取量は低値傾向 ( $p<0.10$ ) であり、カルシウム摂取量は低値 ( $p<0.05$ ) だったと報告している。これらのことから、食事量減少により、エネルギー有効性低値による低骨密度に加えて、各種栄養素摂取量の減少も女性競技者を低骨密度とする可能性があることが考えられる。以上のことから、思春期の女性競技者が骨の適切な健康を保つ上で、十分な食事摂取による栄養素摂取は必要である。

しかしながら、心理的ストレス、栄養知識の欠如、過度な運動量、食事を準備する時間の不足、ファストフードの利用、遠征、指導者の指示、心理的な落ち込み、細身を標準的と見なす社会の影響、体重や体型への批判などにより、食事量の減少が引き起こされる

(Coelho *et al.*, 2014)。また、体重階級別競技や持久的競技、審美的競技では、体重の減量行為が行われることがあり (Fogelholm, 1994)、その方法としてエネルギー摂取制限が用いられることがある (Fogelholm, 1994)。さらに、Coelho *et al.* (2014) は、思春期の女性競技者は成長による体重の増加が競技成績に負の影響を及ぼす可能性を心配することから、とくに摂食障害の危険性が高まる可能性があるとして述べている。

## 6. 思春期における FAT の低骨密度に対する予防策

思春期における FAT の低骨密度に対する予防策の主要点の一つに、エネルギー有効性を適正に保つことがあげられる。エネルギー有効性が低値となる要因として、食事量の減少や偏った食事内容によるエネルギー摂取量の減少や、急激な運動量の増加があり、それらを予防することが重要である。(Nattiv *et al.*, 2007) さらに、エネルギー摂取量を制限するような食事を行っている場合には、多くの栄養素の摂取量が不足する危険性があり、各種栄養素が不足しないよう心掛ける必要がある (Manore, 2002)。とくに骨の材料となるカル

シウムは、錠剤や粉末によるサプリメント製品や強化食品により手軽に補給が可能であり、カルシウムの適正な摂取による骨量減少抑制や、高カルシウム摂取による骨量増加効果、ビタミン D 高摂取による腸管カルシウム吸収を促進による骨量増加効果などが期待されている (Manore, 2002) (Nattiv *et al.*, 2007). しかし、FAT の低骨密度の栄養学的予防策の効果について、明らかになっていない。

## 7. 高カルシウム摂取が女性競技者の骨に与える効果

カルシウムは骨の構成成分の 39% を占めるものであり (Weaver, 2002), 高カルシウム摂取による骨強度増加や低下抑制に期待が寄せられている。これまでに、高カルシウム摂取が骨強度を高めるために有効であることが、多くの報告から示唆されている。

Nieves *et al.* (2010) は女性長距離走者において、カルシウム摂取量が増加すると骨密度を増加させることや骨折発症率を減少させることを報告している。Lappe *et al.* (2015) は非競技者の少女において、カルシウム摂取量は腰椎骨塩量獲得の予測因子だったと報告している。さらに、カルシウムサプリメント補給による高カルシウム摂取が思春期の男女の骨強度を高めることに有効であることも報告されている。カルシウムタブレットによりカルシウムを 1000mg 補給することで、摂食障害等の健康問題を有さない思春期の男女の骨密度を増加させたと報告されている (Nowson *et al.*, 1997) (Stear *et al.*, 2003) (Prentice *et al.*, 2005)。カルシウム補給の効果は、カルシウム摂取量が少ないザンビアの思春期前の男女においても骨塩量、骨密度を増加させたと報告されている (Dibba *et al.*, 2000)。これらのことから、カルシウム摂取量を高めることが、女性競技者の骨密度を高める策として期待されている (Nattiv *et al.*, 2007) (Meyer *et al.*, 2007) (Tenforde *et al.*, 2010)。しかし、FAT の低骨密度となるような食事量が減少した思春期女性競技者において、高カルシウム摂取が骨に与える効果を報告した研究はない。

## 8. FAT の骨問題に関連するラットを用いた研究

### 8-1. FAT の骨の研究におけるラットの有用性

FAT の骨の悪化状態やそれに対する予防策の研究を行うにはラットを用いることが有効である。Dimarco *et al.* (2007) はヒトでの FAT に関する研究は、身体的特徴や練習状況、生活習慣が同一の被験者を集めることが困難であり、さらには被験者の健康状態を害する可能性がある実験計画は制限を受けるため、困難であると述べている。そこで、ラットを研究に用いることが、対象者の招集や条件の統制の問題を解決することや、生物学的周期がヒトよりも短いため短期間での検討を可能にするため、有効であると述べている。また、ラットを用いての研究は、カルシウム出納をヒトより容易に測定できる。さらに、ラットでは、ヒトで測定不可能な直接的な骨強度の測定を可能にする。これは、ヒトにおける骨密度の測定に頼った骨強度の評価よりも、精確な骨強度の評価を可能にする。そのため、FAT の低骨密度について、低骨強度の問題まで踏み込んだ評価や予防策の検討を可能にする。

これまでのラットを用いた骨に関する研究において、運動の効果の検討 (Newhall *et al.*, 1991) (Shiga *et al.*, 2003) (McVeigh *et al.*, 2010) (Ahles *et al.*, 2013) や食餌制限の影響の検討 (Talbot *et al.*, 2001) (Hawkins *et al.*, 2010) (Joshi *et al.*, 2011) を行う際に、大型で発育が良い Sprague-Dawley (SD 系) ラットが多く用いられている。さらに、近年では、成熟期 SD 系雌ラットを用いて、走運動下での食餌制限が骨に与える影響の検討がされている (Dimarco *et al.*, 2007) (Swift *et al.*, 2012) (Yanaka *et al.*, 2012)。しかし、これまでに、発育期雌ラットにおいて、走運動下の食餌制限が骨に与える影響の検討は行われていない。

思春期における FAT の低骨強度の予防策についてラットを用いて検討するためには、骨

の成長時期が一致した発育期の雌ラットを用いる必要がある。ラットにおける発育期と成熟期を分ける統一された定義は無いが、ラットの骨に関する先行研究では、15 週齢以前が発育期または若年期とされ (Newhall *et al.*, 1991) (McVeigh *et al.*, 2010) (Ahles *et al.*, 2013), 16 週齢以降を成熟期 (Dimarco *et al.*, 2007) (Swift *et al.*, 2012) (Yanaka *et al.*, 2012) と表現されている。De Moss & Wright (1998) は性と種族別の骨成長の違いを 4 週齢, 8 週齢, 16 週齢, 24 週齢のラットを用いて検討した研究の中で, SD 系雌ラットの骨乾燥重量と骨カルシウム量は, 8 週齢と比較して 16 週齢において高値となるが, 16 週齢と 24 週齢に違いは見られなかったことを報告している。また, Sengupta (2013) はラットとヒトの年齢の関連について論じたレビュー上で, 離乳の観点から 3 週齢時を離乳期, 性細胞の分泌開始から 5.5 週齢時を第二次性徴期開始時期, 骨格の成長がほぼなくなる 30 週齢までを思春期から未成年期, 生殖活動停止が生じることから 85 週齢以降を閉経期に相当すると示している。これらのことから, 初潮を迎え, 性ホルモン分泌亢進による骨量獲得増進期である思春期の女性競技者の骨強度に関する研究について, ラットを用いて行う際には, 性成熟が始まる 5.5 週齢以降から, 骨量獲得が増進している 16 週齢以前の発育期に実験開始時期を設定することが適当であると考えられる。

## 8-2. ラットにおける運動が骨に及ぼす影響

ラットにおける運動が骨に与える影響はラットの性別・週齢, 運動方法により異なる報告がなされている。発育期雄ラットにおける回転車ケージを用いた自発走運動は, 大腿骨強度を高値とし (Shiga *et al.*, 2003) (Hattori *et al.*, 2014), 大腿骨・脛骨骨密度を高値とした (Newhall *et al.*, 1991) (Shiga *et al.*, 2003) (Hattori *et al.*, 2014) ことが報告されている。雌ラットにおける自発走運動は, 発育期雌ラットにおいて大腿骨乾燥重量, 脛骨骨梁厚を高値とした (Holy & Zérath, 2000) と報告されている。一方で, 成熟期雌ラットにおける自発走行動は, 脛骨骨密度を高値としたとする報告 (Omi *et al.*, 1994a) と, 大腿

骨骨塩量，骨密度，骨質に影響を与えなかったとする報告がある (Yanaka *et al.*, 2012).  
トレッドミル走運動は，発育期雌ラットにおいて 25m/min×60min のトレーニングを週 5 日行わせて 11 週間飼育したところ，脛骨骨塩量は高値を示したが，腰椎・脛骨骨密度に影響を与えなかったとする報告 (Iwamoto *et al.*, 2004) や，成熟期雌ラットにおいて 25m/min×45min, 斜度 15% のトレーニングを週 3 日行わせて 12 週間飼育したところ，脛骨骨塩量，骨密度，骨形態に影響を与えなかったとする報告がある (Swift *et al.*, 2012). また，落下運動を用いた研究では，発育期雌ラットにおいて 45cm の高さから落下を 1 日 10 回，週 5 日行わせて 8 週間飼育したところ，尺骨骨密度や骨梁厚が高値を示したと報告されている (Welch *et al.*, 2008). その他，負荷つき梯子登り (Ahles *et al.*, 2013) や水中運動 (McVeigh *et al.*, 2010) も，骨強度や骨量を高めたことが報告されている。また，骨長について，発育期雄ラットにおける自発走運動は骨長を高値とした報告 (Newhall *et al.*, 1991) や影響を与えなかったとした報告 (Hattori *et al.*, 2014) があり，見解が一致してない。落下運動は発育期雌ラットにおいて骨長に影響を与えなかったことが報告されている (Welch *et al.*, 2008). これらのことから，ラットを用いて運動が骨に与える影響や運動条件下の骨に関する研究を行う場合，目的や対象に合わせて運動方法を選択する必要があると考えられる。

### 8-3. ラットにおける食餌量減少が骨に及ぼす影響

ラットを用いた骨の研究では，食餌量を制限する方法や，飼料組成を調整した制限食を与える方法で，エネルギーおよび各栄養素摂取量の減少が骨に与える影響の検討が行われている。

30～40%の食餌量全体の制限もしくは炭水化物摂取量のみを減少させるエネルギー摂取制限は骨に悪影響を及ぼすことが報告されている。Joshi *et al.* (2011) は 3 週齢雌ラットにおいて，30%食餌制限を施し 50 日間飼育したところ，脛骨骨長は自由摂食群と比較して低値を示したが，骨強度は有意な差は認められなかったと報告している。Pando *et al.* (2014)

は3週齢雌ラットにおいて、40%食餌制限を施し10日間飼育したところ、上腕骨強度、骨梁数、骨梁厚、皮質骨厚は自由摂食群と比較して低値を示したが、骨密度について有意な差は認められなかったと報告している。また、成熟期雌ラットにおいて、40%エネルギー制限を施し9~10週間飼育を行ったところ、骨密度や骨強度は自由摂食群と比較して低値を示したことが報告されている (Talbot *et al.*, 2001) (Hawkins *et al.*, 2010)。

ラットにおいて、走運動下での食餌制限が骨に及ぼす影響も報告されている。Omi *et al.* (1998) は9週齢雌ラットにおいて、自発走運動下で安静条件と同量の食餌量にし、自発走運動による摂食量の増加を抑制した条件で92日間飼育したところ、安静条件との間に骨密度の違いは確認されなかったと報告している。Dimarco *et al.* (2007) は、18週齢雌ラットにおいて、自発走運動下で30%食餌制限を施し13週間飼育したところ、大腿骨・脛骨骨塩量は自由摂食群と比較して低値を示したが、大腿骨・脛骨骨密度は有意な差は認められなかったと報告している。一方で、同条件で飼育を行った Yanaka *et al.* (2012) は、大腿骨骨密度は自由摂食群と比較して食事制限群は低値を示したと報告している。雄ラットにおける自発走運動下での30%食餌制限は、発育期では大腿骨強度、脛骨骨密度を低値とするが、成熟期では骨強度にほとんど影響を与えないことが Hattori *et al.*によって報告されている (Hattori *et al.*, 2013) (Hattori *et al.*, 2014)。これらの先行研究は、ラットの週齢によって運動下の食餌制限の影響が異なることを示唆するものである。

Swift *et al.* (2012) のトレッドミル走を用いた研究では、16週齢雌ラットにおいて、トレッドミル走運動下で40%食餌制限および40%エネルギー制限を施し12週間飼育したところ、全身骨塩量は自由摂食群と比較して両制限群とも低値を示したが、脛骨骨密度は有意な差は認められなかったことが報告されている。また、Swift *et al.* (2012) は同研究において、食餌制限とエネルギー制限の間では、海綿骨質において有意な差が生じたものの、骨塩量、骨密度に有意な差は認められなかったことを報告している。この結果から、炭水



化物以外の各種栄養素摂取量も減少する食餌制限方法と餌中炭水化物量のみの調整によるエネルギー制限方法が骨に及ぼす影響の違いは小さいことが考えられる。

食餌制限, エネルギー制限が骨強度を低下させる要因として, カルシウム吸収量の低下, ホルモンバランスの異常が挙げられる. 成熟期雌ラットにおいて, 40%エネルギー制限を施したところ, 腸管カルシウム吸収量は非制限群と比較して低値を示したと報告されている (Cifuentes *et al.*, 2002). カルシウム吸収量が不足すれば, 骨の材料不足となり, 低骨塩量, 低骨密度に繋がる. 食餌制限, エネルギー制限が血中ホルモン濃度に与える影響について, 骨吸収を抑制するエストロゲンは, 成熟期雌ラットにおいて安静条件の食餌制限では有意な影響は認められず (Talbot *et al.*, 2001) (Cifuentes *et al.*, 2002) (Hawkins *et al.*, 2010), 運動条件下の食餌制限により低値となったと報告されている (Dimarco *et al.*, 2007) (Swift *et al.*, 2012). 骨形成を促進する IGF-1 は, 発育期雌ラットにおいてエネルギー制限により低値となったと報告されている (Joshi *et al.*, 2011). 一方で, 腸管カルシウム吸収を高め, 骨吸収を促進する PTH は, 成熟期雌ラットにおいて安静条件でエネルギー制限を施しても有意な差は認められなかった (Talbot *et al.*, 2001) (Cifuentes *et al.*, 2002) (Hawkins *et al.*, 2010) と報告されている.

単一の栄養素摂取制限が骨状態を悪化させることも報告されている. Takeda *et al.* (2012) は, 6 週齢雄ラットにおけるタンパク質摂取量 50%制限食による 10 週間の飼育は, 安静, トレッドミル走運動の両条件下において, 大腿骨強度を低値としたことを報告している. Talbot *et al.* (1998) は, 発育期と高齢期の雌ラットにおいて餌中カルシウム含有量が 0.5% と 0.1%の群に分け 9 週間飼育したところ, 骨密度は, 発育期, 高齢期ともに 0.5%群と比較して 0.1%群は低値を示したと報告している. Kaastad *et al.* (2001) は 24 週齢雌ラットにおけるビタミン D 欠乏食による 12 週間の飼育は, 大腿骨骨密度を低値としたことを報告している. Norazlina *et al.* (2004) は 12 週齢雌ラットにおけるビタミン E 欠乏食による 12 週間の飼育は, 腰椎カルシウム量を低値としたこと, Rude *et al.* (2006) は 6 週齢雌ラ

ットにおけるマグネシウム 50%制限食による 24 週間の飼育は、大腿骨骨端部骨塩量を低値としたことなどを報告している。

以上の報告から、ラットにおける安静下、走運動下の食餌制限は、性別や週齢により骨へ及ぼす影響が異なることや、栄養素によっては 1 種類の栄養素摂取量の減少のみでも骨に悪影響を及ぼすものがあることが明らかになっている。その一方で、発育期の雌ラットにおける走運動下で、安静条件の自由摂食量以下の摂食量にする食餌制限が骨へ及ぼす影響は明らかになっていない。

#### 8-4. ラットにおける性周期異常が骨に及ぼす影響

雌ラットにおいて性周期異常が骨に与える影響を検討する方法として、卵巣摘出手術モデルラットが用いられる。卵巣摘出手術は卵巣ホルモン（エストロゲン、プロゲステロン）の分泌を減少させることで、閉経後女性の骨の脆弱化モデルとなる（Kalu, 1991）。卵巣摘出手術による骨の脆弱化は、発育期である 6 週齢雌ラットの手術後 3 ヶ月間飼育においても報告されている（Park *et al.*, 2008）。これらの報告から、発育期・成熟期雌ラットにおける性周期異常が生じる状態は、骨の脆弱化を引き起こすものであることが明らかになっている。

さらに、卵巣摘出手術によらない性周期異常を生じさせる方法と、その条件下での骨の変化についても報告されている。Dimarco *et al.* (2007) は、成熟期雌ラットにおいて、自発走運動下で 30%食餌制限を施し 13 週間飼育したところ、26~32 日の間に全ラットにおいて膺分泌液観察による性周期異常を確認し、実験終了時に血中エストラジオール濃度、卵巣重量、骨塩量が低値となったことを報告している。このことから、自発走運動下での 30%食餌制限はラットの性周期異常と骨の脆弱化を引き起こす実験条件であると考えられる。しかし、発育期雌ラットにおいて運動下の食餌制限による性周期と骨強度への影響は明らかになっていない。

#### 8-5. ラットにおけるカルシウム摂取量の違いが骨に及ぼす影響

ラットにおけるカルシウム摂取量が骨に及ぼす影響を検討した研究は、前述した Talbott *et al.* (1998) の研究以外にも多く行われている。Creedon & Cashman (2001) は、発育期雌ラットにおいて餌中カルシウム含有量を 0.2%, 0.5%, 2.0% の群に分け 3 週間飼育したところ、大腿骨カルシウム量は 0.5% 群と比較して 0.2% 群は低値を示し、0.5% 群と 2.0% 群の間に有意な差は認められなかったことを報告している。Hunt *et al.* (2008) は、発育期雌ラットにおいて餌中カルシウム含有量を 0.1~0.7% 範囲で 0.1% 刻みに群を分け 13 週間飼育したところ、骨強度は 0.3~0.7% 群と比較して 0.1% 群, 0.2% 群において低値を示したことを報告している。これらの先行研究は、カルシウム摂取量が不足すると骨強度は低値となるものの、カルシウム摂取量を増加させても骨強度が増加しないことを示唆している。しかし、Viguet-Carrin *et al.* (2014) は、発育期雄ラットにおいて、餌中カルシウム含有量 0.2%, 0.5%, 1.2% 群に分け、全群においてカルシウム:リン比=5:3 になるよう餌中リン含有量も調整して 4 週間飼育したところ、骨強度は 0.5% 群と比較して 0.2% 群は低値を示し、2.0% 群は高値となることを報告している。一方で、骨長は 0.5% 群, 2.0% 群と比較して 0.2% 群は低値となることを報告している。また、Gala *et al.* (2001) は、卵巣摘出雌ラットにおいて、運動と高カルシウム摂取の併用効果を検討したところ、13 週間飼育後では大腿骨骨密度は運動単独群と運動+高カルシウム摂取群が高値を示し、28 週間飼育後では大腿骨骨密度は運動+高カルシウム摂取群が高値を示したと報告している。

以上の先行研究から、高カルシウム摂取はラットにおいて条件によっては骨強度や骨密度の高値を導くと言える。また、餌中カルシウム含有量が 0.2% 以下の場合、骨強度や骨量が低値となることと言える。

## 9. 要約

文献研究をまとめると、思春期における FAT の骨状態の悪化およびその関連要因について、以下のことが明らかになった。

- ・荷重運動は骨強度を高め、荷重運動を行う女性競技者は骨密度が高値となる。しかし、FAT の 1 主徴である低骨密度を有する競技者が存在する。走運動を行う思春期女性競技者では、骨密度が高値になることと、低値になることの両方が報告されている。

- ・FAT の 3 主徴であるエネルギー有効性低値、月経異常、低骨密度の全てに該当する者の割合は 1~4.3%と高くはないが、どれか一つ以上に該当する者の割合は高く、低骨密度の該当者は 16~39.8%と多い。

- ・思春期の FAT の低骨密度の原因に、食事量の減少がある。食事量の減少は、エネルギー有効性低値に加えて各種栄養素摂取量の減少により、思春期女性競技者を低骨密度とする可能性がある。

- ・思春期の FAT の低骨密度の予防策として、高カルシウム摂取や適正なエネルギー有効性の維持が期待されているが、十分な検討は行われていない。

- ・FAT の骨の悪化状態やそれに対する予防策の研究を行うには、ラットを用いての検討が、対象者の招集や条件の統制を可能する点や、骨折の危険性を直接的に評価できる骨強度を測定できる点などから有効である。

- ・思春期の女性競技者の骨強度に関する研究についてラットを用いて行う際には、性成熟が始まる 5.5 週齢以降から、骨量獲得が増進している 16 週齢以前の発育期に実験開始時期を設定することが適当であると考えられる。

そして、ラットにおいて、運動や食餌量減少、高カルシウム摂取の影響は次のようなことが報告されている。

- ・発育期雌ラットにおける自発走運動は骨量を高値とすることが報告されている。

- ・成熟期雌ラットにおいて、自発走運動下の 30%食餌制限がエネルギー有効性低値、性周

期異常，低骨量を引き起こすことが報告されている。しかし，発育期雌ラットにおいて，自発走運動と 30%食餌制限がエネルギー有効性，性周期，骨強度に及ぼす影響は明らかになっていない。

- ・高カルシウム摂取は，ラットにおいて条件によっては骨強度や骨密度の高値を導くことが報告されている。

## Ⅲ章 研究目的および課題

### 1. 研究目的

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果を明らかにすることを目的とした。

本研究の仮説として、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの低骨強度を、高カルシウム摂取単独やエネルギー充足単独、および二策の併用は予防すると仮説を立てた。

### 2. 研究課題

本研究の目的を達成するため、以下の研究課題を設定した。各研究課題にはそれぞれ複数の小課題を設定した。

なお、本研究では、骨の状態を評価する指標として、骨強度を用いることとした。FAT の骨状態の悪化について、ヒトでは骨密度の低下状態によって評価されるが、これは骨強度の評価の直接的な手法がないことや、骨密度が骨強度の強力な説明因子となるためである。しかし、本研究では、ラットを用いることで、骨折のリスクを直接的に評価し得る指標である骨強度を測定可能であることから、骨強度を骨の評価の中心指標と位置付けた。

#### 【研究課題 1】発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの作成

##### 研究課題 1-1. 発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認

自発走運動は荷重負荷運動かつエネルギー消費量の増加を伴う運動であり、走競技者と同様の荷重負荷を骨に再現できる方法である。さらに、走行距離の変動により性周期の乱

れや過活動の判断を可能とする優れた方法である。そこで、発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行った。

#### 研究課題 1-2. 発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響の検討

FAT の低骨密度は運動条件に食事量の減少が加わることが要因となって生じる (Nattiv *et al.*, 2007)。そこで、発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響を検討した。さらに、自発走運動と食餌制限が骨に影響を及ぼす際の交互作用や、骨長への影響についても併せて検討を行った。

#### **【研究課題 2】 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果の検討**

##### 研究課題 2-1. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討

高カルシウム摂取は、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルで生じる可能性のあるカルシウム吸収量低下を予防することと、高カルシウム摂取による骨強度増加効果により、低骨強度を予防することが予想された。そこで、高カルシウム食を用いて、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果を検討した。

##### 研究課題 2-2. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果の検討

エネルギー充足は、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対し、各種の栄養素摂取量が制限された中でも、エネルギー有効性低値を予防することで、低骨強度を予防することが予想された。そこで、グルコースを自由摂食させるエネルギー補給方法を用いて、

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果を検討した。

研究課題 2-3. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの低骨強度は、高カルシウム摂取とエネルギー充足を併用することで予防できる可能性が高まると考えられる。そこで、FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果を検討した。



## IV章 研究課題 1

### 「発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの作成」

#### 1. 緒言

FAT の低骨密度は、運動による荷重負荷により骨強度の高値が導かれる状態にあるにも係わらず、食事量の減少が加わることで生じる (Nattiv *et al.*, 2007). そこで、発育期ラットにおいて、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる FAT の低骨強度モデルの作成を、自発走運動と食餌制限の方法を用いて行うこととした。そのため、研究課題 1-1 では、自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行い、研究課題 1-2 では、自発走運動下の食餌制限が骨強度に与える影響の検討を行った。

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを作成するための運動方法として、自発走運動が適している。ヒトにおいて、思春期女性走競技者は骨密度が高値になることと (Duncan *et al.*, 2002) (Greene *et al.*, 2005)、低値になること (Barrack *et al.*, 2008) の両方が報告されている。このことは、走競技者は走運動により高骨強度となること、その一方で、走競技者は食事量の減少やエネルギー消費量の大幅な増加といった制限要因によって FAT の低骨強度が生じる危険性が高いことを示唆している。その走競技者と近い運動状況と運動による骨への荷重負荷を、ラットにおいて自発走運動を行わせることで再現できる。自発走運動により、成熟期雌ラットにおいて脛骨骨密度が高値となったことや (Omi *et al.*, 1994a)、発育期雌ラットにおいて大腿骨骨量が高値となったこと (Holy & Zérath, 2000) が報告されている。これらのことから、発育期雌ラットにおける自発走運動は、制限要因がなければ、思春期女性走競技者と同様に骨強度の高値を導く方法であり、FAT の低骨強度モデルの作成するために妥当な方法であると考えられる。さらに、自発走運動は

走行距離の変動により性周期の乱れや飢餓による過活動の判断を可能とし、ラットの身体状況の情報を多く入手できる利点もある。

発育期ラットにおいて自発走運動下で食餌制限を行なわせる方法は、高骨強度を導く運動条件下でもエネルギー・栄養素摂取不足により低骨強度を引き起こせる可能性が高い方法である。これはヒトの FAT の低骨強度が生じる状況と類似している。先行研究では、発育期、成熟期雌ラットにおいて安静条件下のエネルギー制限は低骨密度を引き起こすことが報告されている (Talbot *et al.*, 2001) (Mardon *et al.*, 2009) (Hawkins *et al.*, 2010)。さらに、成熟期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限は低骨塩量 (Dimarco *et al.*, 2007) や低骨密度 (Yanaka *et al.*, 2012) を引き起こすことが報告されている。しかし、それらの先行研究では、骨強度の評価は行われていない。一方で、発育期雄ラットにおいて、走運動下の食餌制限は低骨強度や低骨密度を引き起こすこと (Hattori *et al.*, 2014) が報告されている。しかし、発育期雌ラットにおける走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響は明らかになっていない。第二次性徴期である思春期は骨量獲得のための重要な時期であるため (Weaver, 2002)、思春期における骨の研究を行うことは重要なことである

(Barrack *et al.*, 2013)。そのため、性成熟が始まり、骨量獲得が増進している発育期ラットにおいて、走運動下の食餌制限が低骨強度を引き起こすかを検討することが必要となる。

また、これまでの研究では走運動下の食餌制限による骨への悪影響が、食餌制限単独の影響か、走運動と食餌制限の交互作用によるものかどうか、明らかになっていない。その要因として、成熟期雌ラットにおける走運動下の食餌制限が骨に悪影響を及ぼすことを報告した研究では、安静条件下の食餌制限群を設定してないことにより、食餌制限条件での運動の影響が検討されていないためである (Dimarco *et al.*, 2007) (Yanaka *et al.*, 2012) (Swift *et al.*, 2012)。発育期雄ラットにおける走運動下の食餌制限が低骨強度を引き起こすと報告した Hattori *et al.* の研究 (2014) では、安静条件下の食餌制限群を設定しているが、統計手法として二元配置の分散分析を用いておらず、交互作用の検討を行っていない。

走運動と食餌制限の組み合わせは、エネルギー有効性の大幅な低下を引き起こすことで、安静条件下での食餌制限以上に、骨に悪影響を及ぼすことも考えられるため、その組み合わせ効果の検討が必要である。

さらに、FATの骨問題について、骨の長軸方向の成長についての議論はあまり行われていない。思春期の競技者や活動的な者における食事量減少は、カルシウムやリン、タンパク質などの骨の材料不足や、エネルギー有効性低値による成長ホルモンや性ホルモンの分泌異常により、骨強度のみならず、骨の長軸方向の成長に影響を及ぼす可能性がある。

以上のことから、研究課題 1-1 では、発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行った。研究課題 1-2 では、発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に与える影響の検討を行った。併せて、研究課題 1-2 では、自発走運動と食餌制限が骨に影響を及ぼす際の交互作用や、骨長に及ぼす影響についての検討も行った。

## 2. 研究課題 1-1. 発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認

### 2-1. 目的

本課題は、発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行った。

### 2-2. 方法

#### 2-2- I. 被験動物および飼育条件

実験計画を Figure 3 に示した。7 週齢の SD 系雌ラットを 1 週間の予備飼育後に、安静群 (SED 群, n=8), 運動群 (EX 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, Figure 4) を用いた自発走運動を行わせ, 走行距離は 24 時間ごとに計測した。食餌組成は Table 1 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。なお, 本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。

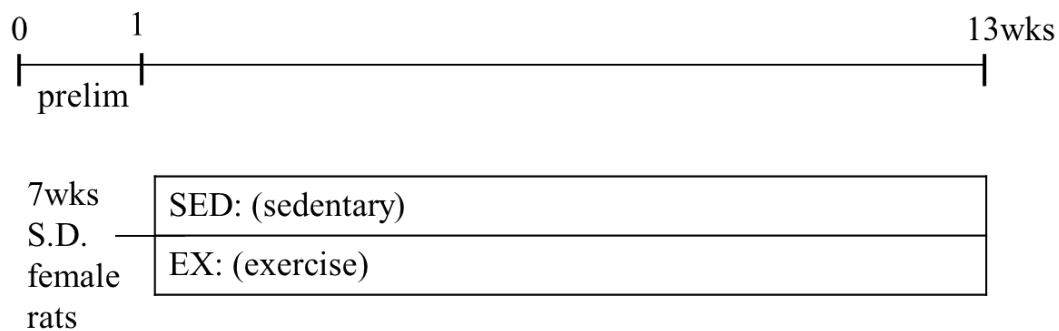


Figure 3. Experimental design.



**Figure 4. Wheel cage.**

**Table 1. Compositions of the experimental diet.**

| Constituents                               | (%)              |
|--|------------------|
| Glucose monohydrate                        | 62.37            |
| Casein <sup>1</sup>                        | 18.0             |
| Cystine                                    | 0.2              |
| Cottonseed oil                             | 10.0             |
| CaCO <sub>3</sub>                          | 1.490            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>            | 1.158            |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>            | 1.482            |
| Roughage                                   | 3.0              |
| Choline chloride                           | 0.2              |
| Water-soluble vitamin mixture <sup>2</sup> | 0.1              |
| Oil-soluble vitamin mixture                | ( ) <sup>3</sup> |
| Ca- and P-free salt mixture <sup>4</sup>   | 2.0              |
| -----                                      |                  |
| Energy (kcal/100 g)                        | 373              |

Compositions of the experimental diet were determined as previous study (Suda *et al.*, 1970).

Normal diet contained 0.6% Ca and 0.6% P.

<sup>1</sup>Casein contained 0.22mg calcium/g and 4mg phosphorus/g.

<sup>2</sup>The water-soluble vitamin mixture(in%): thiamin, 0.5; riboflavin, 0.5; pyridoxine, 0.5; calcium pantothenate, 2.8; nicotinamide, 2.0; inositol, 20.0; folic acid, 0.02; vitamin B12, 0.002; biotin, 0.01; and glucose monohydrate, 73.7.

<sup>3</sup>The rats received a supplement of the following oil –soluble vitamins in cottonseed oil three times a week: β-carotene, 70μg; 2-methyl-1.4-naphthoquinone, 105μg; α-tocopherol, 875μg; and vitamin D<sub>3</sub>, 525IU.

<sup>4</sup>Ca- and P-free salt mixture(in%): KCl, 57.7; NaCl, 20.9; MgSO<sub>4</sub>, 17.9; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O , 3.22; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.078; NaF, 0.133; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.004; KI, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.06; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.44; and (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.005.

## 2-2-II. 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12時間前から絶食を行った。解剖はジエチルエーテル麻酔下で行い、血液、腰椎、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。腰椎、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。また、腹腔内脂肪、足底筋、ヒラメ筋、子宮、副腎、胸腺を採取し湿重量を測定した。

## 2-2-III. エネルギー有効性の算出

ラットのエネルギー有効性はDimarco *et al.* (2007) の報告に基づき算出した。自発走運動によるエネルギー消費量は、Anantharaman-Barr & Decombaz (1989) の報告に基づき、算出した。以下に算出式を示した。

エネルギー有効性 (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) = 3.73 (kcal) × 食餌摂取量 (g)

運動によるエネルギー消費量 (kcal) = 5.0 (kcal) × 体重 (kg) × 走行距離 (km)

## 2-2-IV. 大腿骨重量および長さの測定

採取した左右大腿骨は周囲軟部組織を十分除去したのち、長さ (Length)、長径 (Major axis) および短径 (Minor axis) を、副尺付物差しを用いて測定し、湿重量 (Wet weight) を測定した。その後、大腿骨破断強度の測定を行った後、98~100℃の乾燥機 (Hi-temp Oven, DR200, Yamamoto Inc, Tokyo) 中で24時間乾燥後秤量し、乾燥重量 (Dry weight) を求めた。さらに、500~600℃の乾燥機中で15時間灰化後秤量し、灰化重量 (Ash weight) を求めた。

#### 2-2-V. 大腿骨破断強度の測定

大腿骨破断強度は既報に従い、骨破断特性測定装置 (DYN-1255, IIO 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、骨強度を示す骨破断力 (Breaking force) と骨破断エネルギー (Breaking energy) を求めた (Ezawa *et al.*, 1979). 骨破断力は骨が破断された時の荷重 (重力加速度) で表される (単位: dyn). 骨破断エネルギーは骨が破断されるまでの総仕事量 (骨に加わった荷重の総量) を示す (単位: erg).

#### 2-2-VI. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定

採取した腰椎および脛骨は、付着している筋肉組織等を十分に取り除き、骨塩量, 骨面積, 骨密度を求めた. 測定は DXA 法測定装置 (Aloka DCS-600R) を用いて行った (Omi *et al.*, 1994a). 腰椎は第 3-6 腰椎を解析した. 脛骨は脛骨全体の他, 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, 2, 3 分割目の値の合計を皮質骨主体の骨幹部として解析した. また, 骨密度は骨塩量の値を骨面積で除して算出した.

#### 2-2-VII. 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 19.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用し, 両群の差は対応のない t 検定を用いて検討した. 有意水準は 5%とした.



## 2-3. 結果

### 2-3- I . 摂食量, 走行距離, エネルギー有効性

摂食量, 走行距離, エネルギー有効性を Table 2 に示した. 摂食量, エネルギー摂取量は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した.

**Table 2. Food intake, running distance, and energy availability.**

|  | SED        | EX                      |
|--|------------|-------------------------|
| Food intake (g/day)  | 17.8 ± 0.5 | 19.5 ± 0.3 <sup>#</sup> |
| Energy intake <sup>1</sup> (kcal/day)                          | 66.3 ± 1.8 | 73.1 ± 1.0 <sup>#</sup> |
| Wheel running distance (km/day)                                | -          | 9.0 ± 1.1               |
| Exercise-induced<br>Energy expenditure <sup>2</sup> (kcal/day) | -          | 11.7 ± 1.5              |
| Energy availability <sup>3</sup> (kcal/day)                    | 66.3 ± 1.8 | 61.4 ± 1.4              |

Values are expressed as means ± SE. The values are expressed as the means of average of entire experimental period. # p<0.05 for vs. SED group.

<sup>1</sup> Energy intake was calculated by multiplying the amount of daily food intake in grams by the energy content of the food (3.73 kcal/g ).

<sup>2</sup> Exercise induced energy expenditure from daily wheel running was calculated as 5.0 kcal/kg body weight times kilometers run (Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989).

<sup>3</sup> Energy availability was calculated as energy intake minus exercise energy expenditure.

## 2-3-II. 体重, 臓器重量

体重, 臓器重量を Table 3 に示した. 実験開始時体重, 足底筋, 子宮重量, 副腎重量, 胸腺重量は両群間に有意な差は認められなかった. 最終体重, 腹腔内脂肪重量は, SED 群と比較して EX 群が有意な低値を示した. ヒラメ筋重量は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した.

**Table 3. Body weight and internal organ weight.**

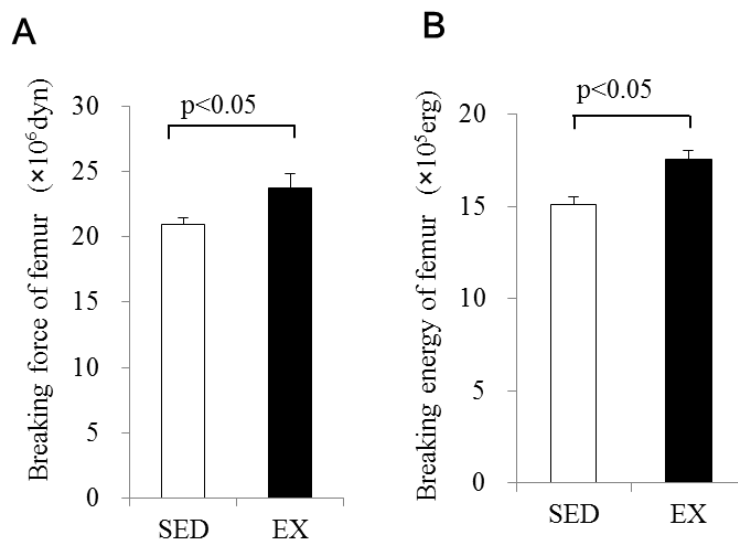
|                             | SED           | EX                         |
|-----------------------------|---------------|----------------------------|
| Initial body weight (g)     | 209 ± 3       | 209 ± 3                    |
| Final body weight (g)       | 336 ± 14      | 292 ± 6 <sup>#</sup>       |
| Abdominal fat weight (g)    | 24.3 ± 4.9    | 11.5 ± 1.7 <sup>#</sup>    |
| Plantaris muscle weight (g) | 0.34 ± 0.02   | 0.34 ± 0.01                |
| Soleus muscle weight (g)    | 0.110 ± 0.005 | 0.137 ± 0.005 <sup>#</sup> |
| Uterus weight (g)           | 0.53 ± 0.02   | 0.61 ± 0.04                |
| Adrenal gland weight (g)    | 0.037 ± 0.001 | 0.045 ± 0.003              |
| Thymus weight (g)           | 0.28 ± 0.03   | 0.22 ± 0.03                |

Values are expressed as means ± SE. The value of initial body weight is expressed as the initial of the experiment, and the values of others are expressed as the means at the end of the experiment.

<sup>#</sup> p<0.05 for vs. SED group.

### 2-3-III. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーを Figure 5 に示した．大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーは，SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した．



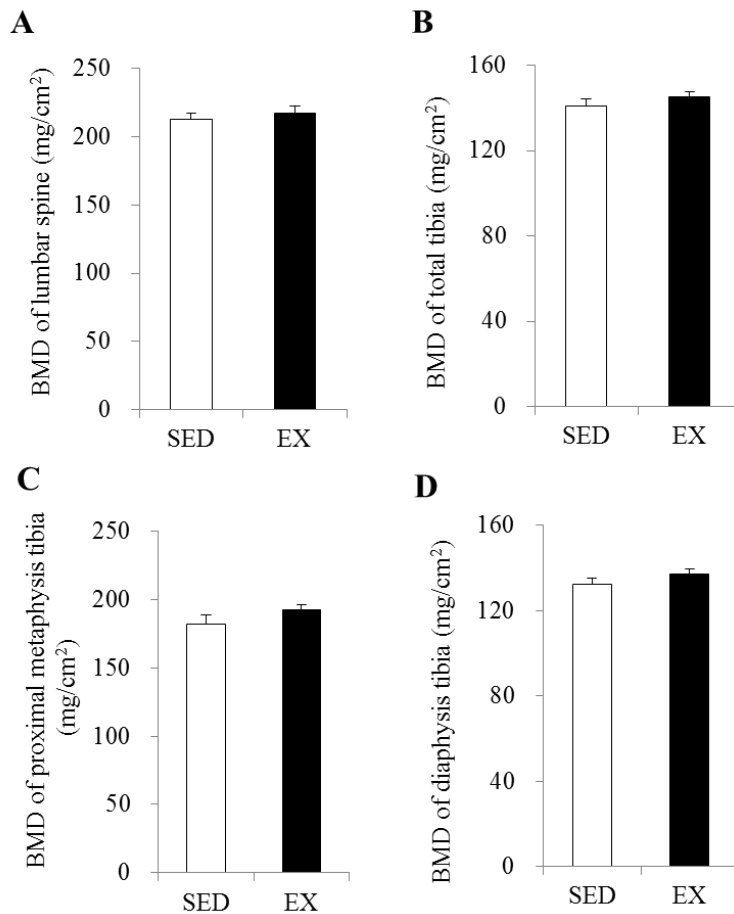
**Figure 5. Breaking force and energy of femur.**

A: Breaking force of femur. B: Breaking energy of femur

Bars are expressed as means  $\pm$  SE.

#### 2-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度

腰椎骨密度, 脛骨骨密度を Figure 6 に示した. 腰椎骨密度, 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は両群間に有意な差は認められなかった.



**Figure 6. BMD of lumbar spine and tibia.**

A: BMD of lumbar spine. B: BMD of total tibia. C: BMD of proximal metaphysis tibia. D: BMD of diaphysis tibia. Bars are expressed as means  $\pm$  SE.

2-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積

大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積を Table 4 に示した. 大腿骨湿重量, 大腿骨乾燥重量, 大腿骨灰化重量, 大腿骨長, 大腿骨長径, 大腿骨短径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨近位部骨面積は両群間に有意な差は認められなかった. 脛骨総骨塩量, 脛骨総骨面積, 脛骨近位部骨塩量, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した.

**Table 4. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.**

|   | SED           | EX                       |
|---|---------------|--------------------------|
| Wet weight of femur (g)                                   | 0.95 ± 0.02   | 0.92 ± 0.01              |
| Dry weight of femur (g)                                   | 0.61 ± 0.01   | 0.59 ± 0.01              |
| Ash weight of femur (g)                                   | 0.43 ± 0.01   | 0.42 ± 0.01              |
| Length of femur (cm)                                      | 3.63 ± 0.03   | 3.60 ± 0.01              |
| Major axis of femur (cm)                                  | 0.411 ± 0.007 | 0.395 ± 0.006            |
| Minor axis of femur (cm)                                  | 0.333 ± 0.004 | 0.338 ± 0.005            |
| BMC of lumbar (mg)  | 555 ± 22      | 542 ± 8.2                |
| Bone area of lumbar (cm <sup>2</sup> )                    | 2.60 ± 0.06   | 2.50 ± 0.04              |
| BMC of total tibia (mg)                                   | 280 ± 10      | 307 ± 7 <sup>#</sup>     |
| Bone area of total tibia (cm <sup>2</sup> )               | 1.98 ± 0.05   | 2.12 ± 0.02 <sup>#</sup> |
| BMC of proximal metaphysis tibia (mg)                     | 91 ± 4        | 100 ± 2 <sup>#</sup>     |
| Bone area of proximal metaphysis tibia (cm <sup>2</sup> ) | 0.50 ± 0.02   | 0.53 ± 0.01              |
| BMC of diaphysis tibia (mg)                               | 106 ± 4       | 119 ± 3 <sup>#</sup>     |
| Bone area of diaphysis tibia (cm <sup>2</sup> )           | 0.80 ± 0.02   | 0.87 ± 0.01 <sup>#</sup> |

Values are expressed as means ± SE. # p<0.05 for vs. SED group.

#### 2-4. 考察

発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行った。本研究の結果は、自発走運動は摂食量、大腿骨強度、脛骨骨塩量、骨面積を高値とした。一方で、大腿骨長に影響を与えなかった。

自発走運動を行わせた EX 群の走行距離は、 $9.0 \pm 1.1$ km だった (Table 2)。この走行距離は、骨の研究で用いられるトレッドミル走運動の走行距離が 1~2km であること

(Iwamoto *et al.*, 2004) (Swift *et al.*, 2012) (Takeda *et al.*, 2012) と比較して、長い走行距離であった。

本研究では、自発走運動は摂食量を高値とした (Table 2)。先行研究では、発育期雄ラットにおける 27-30m/min×60min のトレッドミル走運動は摂食量を低値としたこと

(Takeda *et al.*, 2012)、成熟期雌ラットにおける斜度 15% で 27-30m/min×45min のトレッドミル走運動は摂食量に影響を与えなかったこと (Swift *et al.*, 2012) が報告されており、本研究の発育期雌ラットにおける自発走運動が摂食量に与えた影響と異なる。走運動の種類により摂食量に与える影響が異なる要因は明らかとなっていないが、自発走運動による摂食量の増加は、エネルギー消費量の増加によるエネルギー有効性低値を防ぐ適応行動かもしれない。

本研究では、自発走運動は発育期雄ラットと同様に、発育期雌ラットにおいても大腿骨強度を高値とすることを明らかにした (Figure 5)。先行研究では、自発走運動が発育期雄ラットにおいて大腿骨強度を高値としたことは報告されている (Shiga *et al.*, 2003) (Hattori *et al.*, 2014)。しかし、発育期雌ラットにおいては、自発走運動は大腿骨骨量を高めたことが報告されている (Holy & Zérath, 2000) もの、骨強度に与える効果はこれまでに報告されていない。本研究では、自発走運動は発育期雄ラットと同様に、発育期雌ラットにおいて大腿骨強度を高値とすることを明らかにした。一方で、発育期雌ラットにおける自発走運動は脛骨骨塩量や脛骨骨面積を高値とし、骨の成長を促進したものの、脛骨骨密度に

有意な変化を与えなかった。本研究の結果は、発育期雌ラットにおける自発走運動が大腿骨強度を高める要因として、骨密度以外の因子も影響していることを示唆している。Holy & Zérath (2000) は発育期雌ラットにおける自発走運動は海綿骨骨梁幅を高値としたと報告しており、同条件の本研究においても同様の変化が生じていることが考えられ、骨構造の変化が骨強度の高値を導いたことが推察される。

本研究では、自発走運動により摂食量を増加させ、骨量獲得を促進し、骨強度獲得効果を引き出した。一方で、トレッドミル走運動は、発育期雄ラットにおいて摂食量を低値とし、大腿骨長や大腿骨灰化重量を低値としたことや (Takeda *et al.*, 2012)、成熟期雌ラットにおいて摂食量や骨塩量、骨密度に影響を与えなかったこと (Swift *et al.*, 2012) が報告されている。トレッドミル走運動により骨強度獲得が生じにくい要因として、エネルギー消費量の増加に対し摂食量を増加させる適応を起こせず、十分な栄養状態でないことが制御因子となっている可能性が推察される。

本研究のまとめとして、発育期雌ラットにおける自発走運動は骨強度を高値とすることが確認された。

### 3. 研究課題 1-2. 発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響の検討

#### 3-1. 目的

本課題は、発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に与える影響の検討を行った。併せて、自発走運動と食餌制限が骨に影響を及ぼす際の交互作用や、骨長に及ぼす影響についての検討も行った。

#### 3-2. 方法

##### 3-2- I. 被験動物および飼育条件

実験計画を Figure 7 に示した。7 週齢の SD 系雌ラットを 1 週間の予備飼育後に、安静群 (SED 群, n=8), 運動群 (EX 群, n=8), 安静 - 食餌制限群 (SED-FR 群, n=8), 運動 - 食餌制限群 (EX-FR 群, n=8) に分け, 12 週間の飼育を行った。運動条件, 食事組成, 飼育室環境は研究課題 1-1 と同様の方法を用いた。食餌制限群の摂食量は, SED 群の 70% になるよう調整した。結果として, 食餌制限群の摂食量は EX 群の 65% となった。なお, 本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。

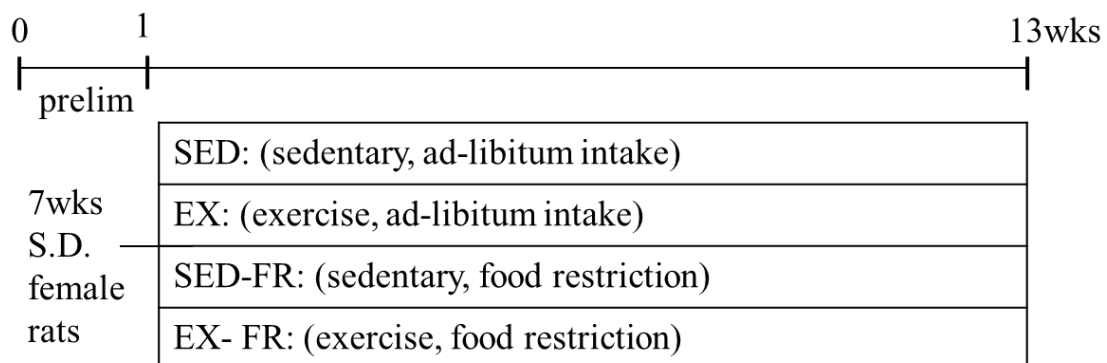


Figure 7. Experimental design.



### 3-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題 1-1 と同様に行った。加えて、本飼育 79 日目にラットを代謝ケージ (Figure 8) に移し、24 時間尿を 2 日間採取した。採取した尿はただちに 2500rpm で 15 分間の遠心分離し、上清を分注して-30℃で保存した。



**Figure 8. Metabolic cage.**

### 3-2-III. エネルギー有効性の算出

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-IV. 走行周期の評価

性周期と関連して、走行距離の増加する日が 4~5 日に 1 度生じる走行周期を有するかを調査するため、走行距離に対しスペクトル解析を行った。

まず、解析対象を実験開始後 30 日以降の走行距離を解析対象にした。先行研究により運動条件下の食餌制限による性周期異常は、30 日以降に生じると報告されている (Dimarco *et*

*al.*, 2007) ためである。その期間の走行距離に対し、観測しようとする現象の周波数よりもはるかに低い周波数の変動成分（トレンド）を取り除くため、経験的モード分解（EMD; Empirical mode decomposition）を行い、分析データからトレンドを抽出した。経験的モード分解は、信号を固有モード関数（IMF; Intrinsic mode function）と呼ばれる狭帯域かつトレンド成分を持たない信号の和に分解する手法である（Huang *et al.*, 1998）。その後、最大エントロピースペクトル分析法を用いて、走行周期パワースペクトルを推定した。最後に、局所スペクトルパワーに影響を与える総合スペクトルパワーの個体間差を除去するため、総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツ（4~5 日周期）スペクトルパワー割合を算出した。0.2~0.3 ヘルツのスペクトルパワー割合を算出した理由は、先行研究において、雌ラットは 4~5 日の性周期に合わせて、4~5 日に 1 度の発情後期に走行距離の増加が観察されているからである（Wang, 1923）（Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989）（Dimarco *et al.*, 2007）。もし、4~5 日に 1 度毎に周期的に走行距離が増加したら、総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合は高くなる。対照的に、性周期異常になると、走行周期が消失することが報告されている（Dimarco *et al.*, 2007）。そのため、ラットに性周期異常が生じたら、総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合は低くなる。

### 3-2-V. 大腿骨重量および長さの測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-VI. 大腿骨破断強度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量, 骨面積, 骨密度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った.

### 3-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定

骨形成マーカーである血清中骨型アルカリフォスファターゼ (BAP; Bone-specific alkaline phosphatase) は既報に従い測定した (Omi *et al.*, 1994b). p-ニトロフェニルリン酸基質法により測定した. 100mM p-Nitrophenylphosphatase (P-NPP), 50mM MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 1M 2-amino-2-methyl-1,3propane-diol-HCL (pH10.0) を各 10ml ずつメスフラスコに加え, 蒸留水で全量が 100ml になるようにメスアップし, これを反応溶液とした. 試験管に血清を 0.05ml 入れ 56°C の恒温槽で 10 分間の熱処理をし, 反応溶液を 3ml を加え, 37°C で 30 分間の呈色反応を行い, 1N NaOH 1.0ml で反応を停止させた. その後, 2000rpm で 15 分間の遠心分離した後, 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). また, 血清を最初の行程の恒温槽での熱処理をせずに, 反応溶液を加える以降過程 1 と同様の手順で実験を行い, 吸光度を測定した (過程 2). 過程 2 から過程 1 を引き, BAP 活性を求めた.

骨吸収マーカーである血清中酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP; Ttrateate-resistance acid phosphatase) は既報 (Omi *et al.*, 1994b) に従い, p-ニトロフェニルリン酸を用いた Sessey-Lowry 法により測定した. 試験管に血清を 0.05ml 入れ, 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°C の恒温槽で 60 分間の呈色反応を行った. その後, 1N NaOH 0.25ml を試験管に加え, 反応を停止させ, 420nm における比色法で吸光度を測定した.

骨吸収マーカーである尿中 deoxypyridinoline (DPD) は Metra DPD EIA Kit (Quidel 社, San Diego, CA, USA) を用いて測定した.

### 3-2-IX. 尿中カルシウム排出の測定

尿上清からプラズマ発光分光光度計 (ICAP-575v Nippon Jarrell-Ash) を用いて尿中カルシウム排出量の測定を行った。

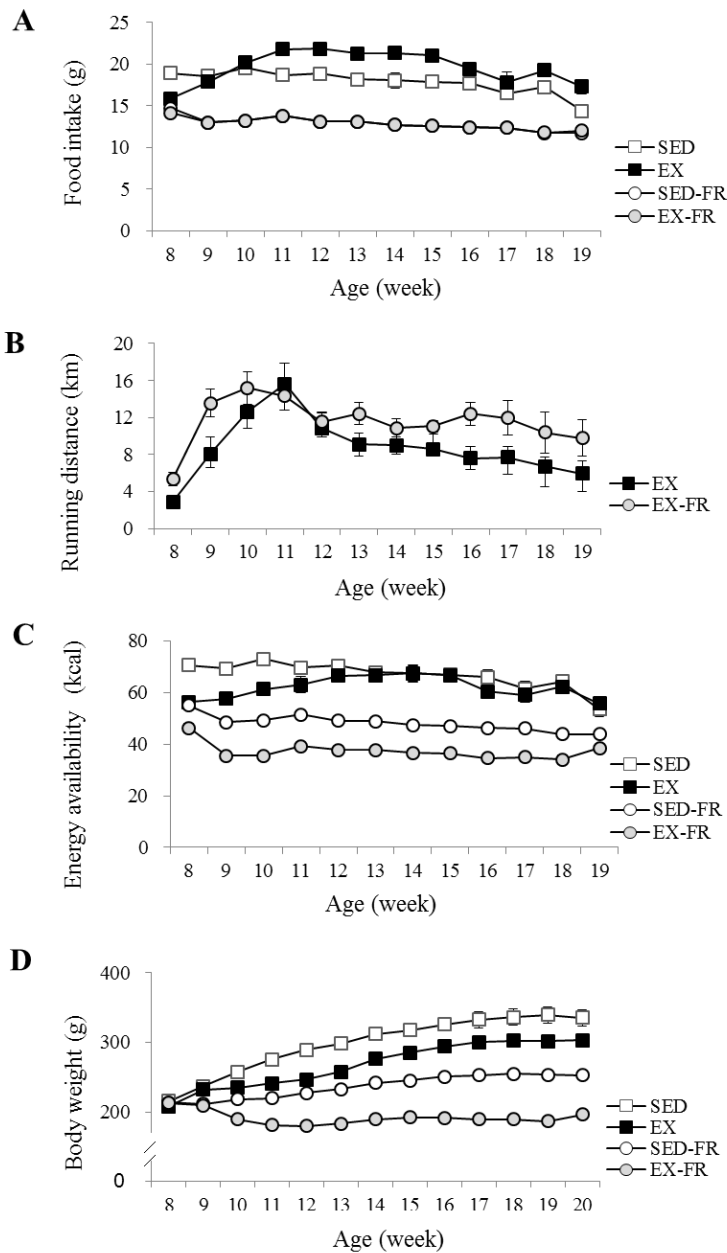
### 3-2-X. 統計処理

データは全て  $\text{mean} \pm \text{SE}$  で表した。二元配置の分散分析により、運動と食餌制限の主効果およびその交互作用を検定した。有意な交互作用が生じた場合、Bonferroni の多重比較検定を用い、各群間の差を検定した、単純主効果の検定を行った。主効果は、有意な交互作用が生じなかった場合のみ採用した。走行距離、走行周期、運動によるエネルギー消費量、走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合は対応のない t 検定を用いて検討した。統計ソフトは SPSS (version 19.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用した。有意水準は 5%とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性

実験期間中の毎週始まり日の摂食量, 毎週の平均走行距離, 毎週始まり日のエネルギー有効性の変化を Figure 9 に, 実験期間中の平均摂食量, 走行距離, エネルギー有効性を Table 5 に示した. なお, Figure 9 では, 図が煩雑になることを避けるため, 図中に有意差記号を示さなかった. 実験期間中の SED-FR 群, EX-FR 群の摂食量の制限は続いた. 実験期間中の平均摂食量, エネルギー摂取量, エネルギー有効性は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じた. 摂食量, エネルギー摂取量は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, SED 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示し, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. エネルギー有効性は, SED 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示し, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示し, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 実験期間中の走行距離, 運動によるエネルギー消費量は, EX 群と EX-FR 群間に有意な差は認められなかった. 一方で, 毎週の平均走行距離は, 8 週齢, 9 週齢, 16 週齢時において, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な高値を示した. 最終週である 19 週齢時の平均走行距離は EX 群と EX-FR 群間に有意な差は認められなかったものの, EX-FR 群は EX 群の 163%の走行距離となった. 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合は, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した.



**Figure 9. Changes in food intake (A), running distance (B), energy availability (C), body weight (D).**

Points are means  $\pm$  SE. However, the SE might not be noticeable in the figure if it was small. Food intake, and energy availability, body weight, were measured every other day, and running distance was measured every day. The value of body weight is expressed as the mean at the beginning of every week. The values of food intake, running distance and energy availability are expressed as the mean of the weekly average for each parameter.

**Table 5. Food intake, running distance, and energy availability.**

|  | SED        | EX                      | SED-FR                  | EX-FR                     | Two-way ANOVA |             |             |
|--|------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------|-------------|-------------|
|  |            |                         |                         |                           | Exercise      | Restriction | Interaction |
| Food intake (g/day)  | 17.8 ± 0.5 | 19.5 ± 0.3 <sup>#</sup> | 12.7 ± 0.0 <sup>#</sup> | 12.6 ± 0.0*               | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Energy intake <sup>1</sup><br>(kcal/day)   | 66.3 ± 1.8 | 73.1 ± 1.0 <sup>#</sup> | 47.3 ± 0.1 <sup>#</sup> | 47.2 ± 0.2*               | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Wheel running <sup>2</sup><br>distance (km/day)  | -          | 9.0 ± 1.1               | -                       | 11.5 ± 0.6                | -             | -           | -           |
| Percentage of the<br>power spectrum of the<br>running distance <sup>2,3</sup><br>(ratio) | -          | 0.43 ± 0.04             | -                       | 0.17 ± 0.03*              | -             | -           | -           |
| Exercise-induced<br>Energy expenditure <sup>2,4</sup><br>(kcal/day)                      | -          | 11.7 ± 1.5              | -                       | 11.0 ± 0.5                | -             | -           | -           |
| Energy availability <sup>5</sup><br>(kcal/day)   | 66.3 ± 1.8 | 61.4 ± 1.4              | 47.3 ± 0.1 <sup>#</sup> | 36.2 ± 0.6 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA. If a result showed significant interaction (p<0.05), the Bonferroni multiple comparison test was used to determine specific differences between means.

# p<0.05 for vs. SED group, \* p<0.05 for vs. EX group, † p<0.05 for vs. SED-FR group.

<sup>1</sup> Energy intake was calculated by multiplying the amount of daily food intake in grams by the energy content of the food (3.73 kcal/g).

<sup>2</sup> Data were analyzed by student's t test.

<sup>3</sup> To quantify the periodic component at about 4- or 5- day observed in the temporal profile of the running distance, we estimated the power in the frequency band from 0.2 to 0.3 Hz using spectral analysis of the detrended time series. Moreover, to exclude the interindividual difference in the total power affecting the local power, we also computed the proportion of the power spectrum of the running distance from 0.2 to 0.3 Hz in the total power spectrum.

<sup>4</sup> Exercise induced energy expenditure from daily wheel running was calculated as 5.0 kcal/kg body weight times kilometers run (Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989).

<sup>5</sup> Energy availability was calculated as energy intake minus exercise energy expenditure.

### 3-3-II. 体重, 臓器重量

実験期間中の毎週始まり日の体重の変化を Figure 9 に, 実験期間終了後の体重, 臓器重量を Table 6 に示した. なお, Figure 9 では, 図が煩雑になることを避けるため, 図中に有意差記号を示さなかった. EX-FR 群の体重の増加は抑制された. 最終体重, 腹腔内脂肪重量は, 運動の有意な主効果により低値とし, 食餌制限の有意な主効果により低値とした. それぞれの主効果により, EX-FR 群が最も低値を示した. 足底筋重量, 胸腺重量は, 食餌制限の有意な主効果により低値とした. ヒラメ筋重量は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 子宮重量は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, EX 群, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 副腎重量は, 各群間に有意な差は認められなかった.

**Table 6. Body weight and internal organ weight.**

|                             | SED           | EX                         | SED-FR        | EX-FR                      | Two-way ANOVA |             |             |
|-----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|----------------------------|---------------|-------------|-------------|
|                             |               |                            |               |                            | Exercise      | Restriction | Interaction |
| Final body weight (g)       | 336 ± 14      | 292 ± 6                    | 249 ± 4       | 190 ± 5                    | p<0.05        | p<0.05      | ns          |
| Abdominal fat weight (g)    | 24.3 ± 4.9    | 11.5 ± 1.7                 | 4.9 ± 1.1     | 1.4 ± 0.3                  | p<0.05        | p<0.05      | ns          |
| Plantaris muscle weight (g) | 0.34 ± 0.02   | 0.34 ± 0.01                | 0.28 ± 0.01   | 0.25 ± 0.02                | ns            | p<0.05      | ns          |
| Soleus muscle weight (g)    | 0.110 ± 0.005 | 0.137 ± 0.005 <sup>#</sup> | 0.095 ± 0.008 | 0.093 ± 0.005 <sup>*</sup> | ns            | p<0.05      | p<0.05      |
| Uterus weight (g)           | 0.53 ± 0.02   | 0.61 ± 0.04                | 0.67 ± 0.04   | 0.31 ± 0.06 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | ns          | p<0.05      |
| Adrenal gland weight (g)    | 0.037 ± 0.001 | 0.045 ± 0.003              | 0.035 ± 0.001 | 0.036 ± 0.004              | ns            | ns          | ns          |
| Thymus weight (g)           | 0.28 ± 0.03   | 0.22 ± 0.03                | 0.19 ± 0.01   | 0.17 ± 0.02                | ns            | p<0.05      | ns          |

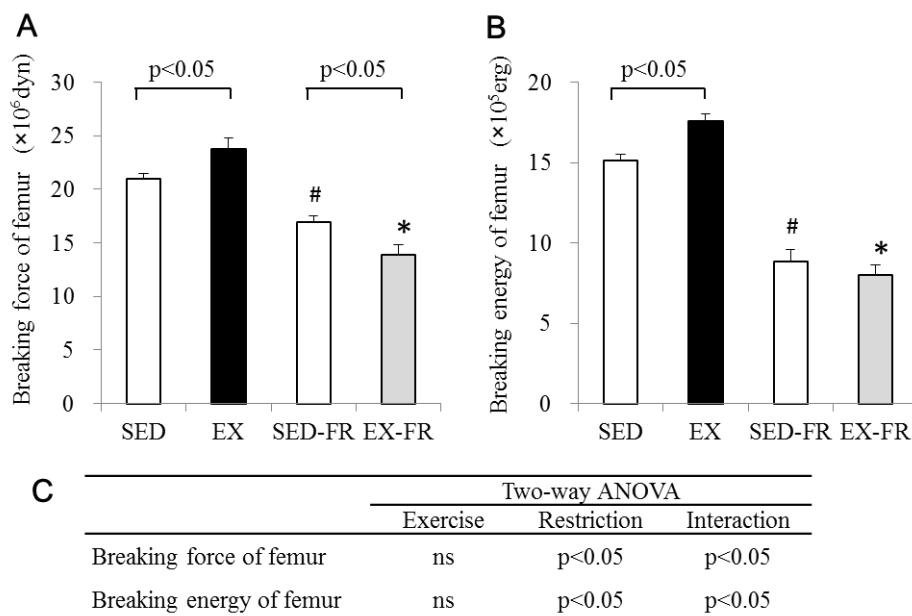
Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA. If a result showed significant interaction (p<0.05), the Bonferroni multiple comparison test was used to determine specific differences between means.

# p<0.05 for vs. SED group, \* p<0.05 for vs. EX group, † p<0.05 for vs. SED-FR group.



### 3-3-III. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力, 大腿骨破断エネルギーを Figure 10 に示した. 大腿骨破断力, 大腿骨破断エネルギーは, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, SED 群と比較して SED-FR 群が有意な低値を示し, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. さらに, 大腿骨破断力は, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した.



**Figure 10. Breaking force and energy of femur.**

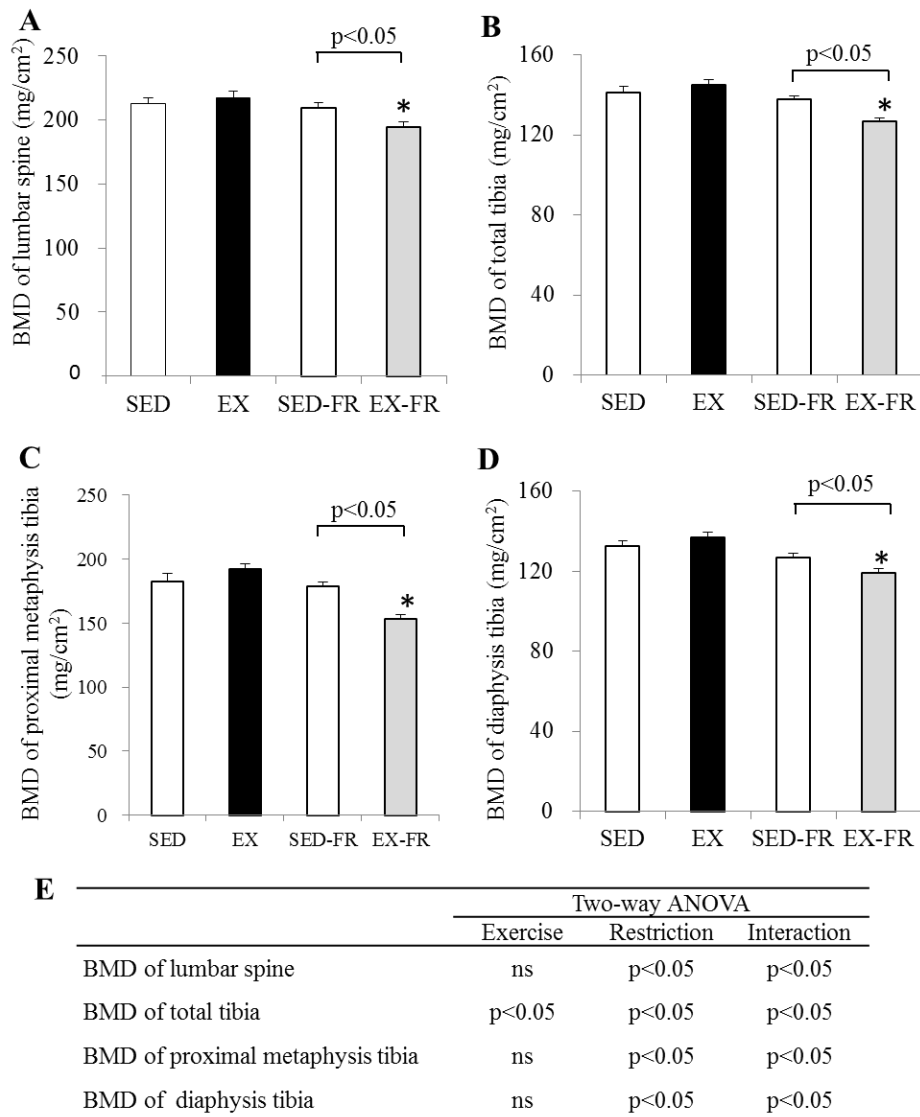
A: Breaking force of femur. B: Breaking energy of femur C: Data were analyzed by two-way ANOVA.

Bars are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA. If a result showed significant interaction (p<0.05), the Bonferroni multiple comparison test was used to determine specific differences between means.

# p<0.05 for vs. SED group, \* p<0.05 for vs. EX group.

#### 3-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度

腰椎骨密度, 脛骨骨密度を Figure 11 に示した. 腰椎骨密度, 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, EX 群, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した.



**Figure 11. BMD of lumbar spine and tibia.**

A: BMD of lumbar spine. B: BMD of total tibia. C: BMD of proximal metaphysis tibia. D: BMD of diaphysis tibia. E: Data were analyzed by two-way ANOVA.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Data were analyzed by two-way ANOVA. If a result showed significant interaction ( $p<0.05$ ), the Bonferroni multiple comparison test was used to determine specific differences between means.

\*  $p<0.05$  for vs. EX group.

### 3-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積

大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積を Table 7 に示した. 大腿骨湿重量, 大腿骨乾燥重量, 大腿骨灰化重量, 大腿骨長, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して SED-FR 群が有意な低値を示し, EX 群, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 大腿骨長径は, 運動の有意な主効果により低値となり, 食餌制限の有意な主効果により低値となった. それぞれの主効果により, EX-FR 群が最も低値を示した. 大腿骨短径, 脛骨近位部骨塩量は, 食餌制限の有意な主効果により低値となった. 脛骨総骨塩量, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, EX 群, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 脛骨総骨面積, 脛骨近位部骨塩量は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, SED-FR 群が有意な低値を示し, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 脛骨近位部骨塩量は, 運動と食餌制限の有意な交互作用が生じ, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し, SED-FR 群が有意な低値を示し, EX 群, SED-FR 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した.

**Table 7. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.**

|   | SED           | EX                       | SED-FR                   | EX-FR                      | Two-way ANOVA |             |             |
|---|---------------|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------|-------------|-------------|
|   |               |                          |                          |                            | Exercise      | Restriction | Interaction |
| Wet weight of femur (g)                                   | 0.95 ± 0.02   | 0.92 ± 0.01              | 0.85 ± 0.02 <sup>#</sup> | 0.75 ± 0.02 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Dry weight of femur (g)                                   | 0.61 ± 0.01   | 0.59 ± 0.01              | 0.55 ± 0.01 <sup>#</sup> | 0.46 ± 0.01 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Ash weight of femur (g)                                   | 0.43 ± 0.01   | 0.42 ± 0.01              | 0.39 ± 0.01 <sup>#</sup> | 0.30 ± 0.01 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Length of femur (cm)                                      | 3.63 ± 0.03   | 3.60 ± 0.01              | 3.51 ± 0.01 <sup>#</sup> | 3.36 ± 0.02 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Major axis of femur (cm)                                  | 0.411 ± 0.007 | 0.395 ± 0.006            | 0.395 ± 0.007            | 0.378 ± 0.007              | p<0.05        | p<0.05      | ns          |
| Minor axis of femur (cm)                                  | 0.333 ± 0.004 | 0.338 ± 0.005            | 0.323 ± 0.003            | 0.317 ± 0.003              | ns            | p<0.05      | ns          |
| BMC of lumbar (mg)  | 555 ± 22      | 542 ± 8.2                | 488 ± 13 <sup>#</sup>    | 382 ± 12 <sup>*,†</sup>    | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| Bone area of lumbar (cm <sup>2</sup> )                    | 2.60 ± 0.06   | 2.50 ± 0.04              | 2.33 ± 0.07 <sup>#</sup> | 1.96 ± 0.04 <sup>*,†</sup> | p<0.05        | p<0.05      | p<0.05      |
| BMC of total tibia (mg)                                   | 280 ± 10      | 307 ± 7 <sup>#</sup>     | 262 ± 8                  | 225 ± 5 <sup>*,†</sup>     | ns            | p<0.05      | p<0.05      |
| Bone area of total tibia (cm <sup>2</sup> )               | 1.98 ± 0.05   | 2.12 ± 0.03 <sup>#</sup> | 1.85 ± 0.03 <sup>#</sup> | 1.77 ± 0.03 <sup>*</sup>   | ns            | p<0.05      | p<0.05      |
| BMC of proximal metaphysis tibia (mg)                     | 91 ± 4        | 100 ± 3 <sup>#</sup>     | 81 ± 2 <sup>#</sup>      | 65 ± 3 <sup>*,†</sup>      | ns            | p<0.05      | p<0.05      |
| Bone area of proximal metaphysis tibia (cm <sup>2</sup> ) | 0.50 ± 0.02   | 0.53 ± 0.01              | 0.46 ± 0.01              | 0.43 ± 0.02                | ns            | p<0.05      | ns          |
| BMC of diaphysis tibia (mg)                               | 106 ± 4       | 119 ± 2 <sup>#</sup>     | 103 ± 6                  | 91 ± 2 <sup>*,†</sup>      | ns            | p<0.05      | p<0.05      |
| Bone area of diaphysis tibia (cm <sup>2</sup> )           | 0.80 ± 0.02   | 0.87 ± 0.01 <sup>#</sup> | 0.81 ± 0.03              | 0.76 ± 0.01 <sup>*,†</sup> | ns            | p<0.05      | p<0.05      |

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA. If a result showed significant interaction (p<0.05), the Bonferroni multiple comparison test was used to determine specific differences between means.

# p<0.05 for vs. SED group, \* p<0.05 for vs. EX group, † p<0.05 for vs. SED-FR group.

### 3-3-VI. 骨代謝マーカーおよび尿中カルシウム排出

血清 BAP, 血清 TRAP, 尿中 DPD, 尿中カルシウム排出を Table 8 に示した. 血清 BAP, 血清 TRAP, 尿中 DPD, 尿中カルシウム排出は, 運動と食餌制限の有意な交互作用は生じなかった. 血清 BAP, 血清 TRAP は, 運動の有意な主効果により増加し, 食餌制限の有意な主効果により増加した. それぞれの主効果により, EX-FR 群が最も高値を示した. 尿中 DPD は, 運動の有意な主効果により増加した.

**Table 8. Bone metabolic marker and urine calcium.**

|                                  | SED         | EX          | SED-FR      | EX-FR       | Two-way ANOVA |             |             |
|----------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|
|                                  |             |             |             |             | Exercise      | Restriction | Interaction |
| Serum BAP (mU)                   | 32.0 ± 3.8  | 56.9 ± 6.9  | 49.8 ± 5.1  | 72.6 ± 6.6  | p<0.05        | p<0.05      | ns          |
| Serum TRAP (mU)                  | 11.5 ± 0.6  | 14.9 ± 1.5  | 14.1 ± 1.5  | 18.5 ± 0.8  | p<0.05        | p<0.05      | ns          |
| Urine DPD (nmol/day)             | 4.09 ± 0.80 | 7.81 ± 1.25 | 4.76 ± 1.01 | 5.37 ± 0.94 | p<0.05        | ns          | ns          |
| Urine calcium excretion (mg/day) | 0.89 ± 0.11 | 1.17 ± 0.25 | 1.15 ± 0.25 | 1.61 ± 0.29 | ns            | ns          | ns          |

Values are expressed as means ± SE. Data were analyzed by two-way ANOVA.

### 3-4. 考察

本研究では、発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に与える影響の検討を行い、自発走運動と食餌制限が骨に影響を及ぼす際の交互作用や、骨長への影響も含めて検討を行った。その結果、自発走運動下の食餌制限はエネルギー有効性、全走行周期における4~5日に1度の走行距離増加周期の割合、子宮重量、骨強度、骨密度、骨塩量、骨面積、骨重量、骨長を低値とした。さらに、自発走運動と食餌制限は骨に対して有意な交互作用を有し、走運動と食餌制限の組み合わせは、食餌制限単独よりもエネルギー有効性、骨強度、骨密度、骨塩量、骨面積、骨重量、骨長を低値とした。

摂食量が増加する自発走運動に対し、食餌制限を組み合わせた。結果、自発走運動下の食餌制限はエネルギー有効性を低値とし、走運動と食餌制限の組み合わせは、運動や食餌制限単独よりもエネルギー有効性を低値とした。エネルギー有効性低値は細胞の維持や成長を含む生理的機能の低下を引き起こす (Loucks *et al.*, 2011)。そのため、自発走運動下の食餌制限はエネルギー有効性低値により体重増加を抑制し (Figure 9)、子宮重量を低値とした (Table 6) ことが考えられる。

自発走運動下の食餌制限は子宮重量を低値とし (Table 6)、全走行周期における4~5日に1度の走行距離増加周期の割合を低値としたことから (Table 5)、エストロゲン分泌量減少と性周期異常を引き起こしたことが示唆される。先行研究において、エストロゲン欠乏は子宮重量を低値とすることが報告されている (Erben *et al.*, 2004)。また、Dimarco *et al.* (2007) は、成熟期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限によりエストロゲン分泌量減少と性周期異常が生じ、自発走行周期が消失したことを報告している。これらのことから、本研究の発育期雌ラットにおいても、自発走運動下の食餌制限は、エストロゲン分泌量減少と性周期異常を引き起こしたことが示唆される。

自発走運動下の30%食餌制限は発育期雌ラットを過活動とする兆候が見られた。自発走運動下の30%食餌制限は、有意ではないものの全期間中の平均走行距離の増加を引き起こ

し、8週齢、9週齢、16週齢時の平均走行距離の有意な増加を引き越こした。最終週である19週齢時の平均走行距離は自由摂食の163%の走行距離とした。雌ラットにおいて、食餌制限により過活動が生じる際は、血中コルチコステロン濃度が高値のストレス状態にあることが報告されている (Martin *et al.*, 2007) (Duclos *et al.*, 2009)。本研究の発育期雌ラットにおいても、自発走運動下の食餌制限は過活動の兆候がみられたことから、ストレス状態であることが考えられる。一方で、過活動に伴うことがある自発的な摂食量の減少は生じていない。0.5時間～1.0時間の給餌時間に限定する厳しい食餌制限は、急激な走行距離の増加と自発的な摂食量の減少を引き起こし、急激な体重減少が生じ、最終的に死に至ることが報告されている (Routtenberg and Kuznesof, 1967)。本研究で用いた自発走運動下の30%食餌制限が導く状態は、摂食量が自発的に減少するような活動性食欲不振の症状を呈する神経性食欲不振症モデルとは異なると言える。

発育期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限は骨強度を低値とし、走運動と食餌制限の組み合わせは、食餌制限単独よりも骨強度を低値とした (Figure 10)。この結果は、我々の研究グループである Hattori *et al.* (2014) が発育期雄ラットにおいて行った研究と同様の結果だった。さらに、本研究では、二元配置の分散分析を用いて、走運動と食事制限は組み合わせることにより交互作用が生じることを明らかにした。研究課題 1-1 で確認したように、発育期雌ラットにおける自発走運動は自由摂食条件では骨強度を高値とする。しかし、食餌制限の条件では、自発走運動による骨強度を高める効果は生じず、逆に骨強度を低値とした。我々の知る限り、この交互作用を報告した研究は無く、新しい知見である。

発育期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限は腰椎骨密度、脛骨骨密度を低値とし、走運動と食事制限の組み合わせは腰椎骨密度、脛骨骨密度に対して交互作用を示した (Figure 11)。交互作用により、食餌制限下での走運動は骨密度を低値とすることが明らかになった。Dimarco *et al.* (2007) は、成熟期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限



は大腿骨および脛骨骨密度を低値としなかったと報告している。その報告は、発育期雌ラットを用いた本研究の結果や成熟期雌ラットを用いた Yanaka *et al.* (2012) の結果とは異なる。これらのことから、成熟期よりも発育期のほうが走運動下での食餌制限による骨密度への悪影響が生じやすいことが示唆される。一方で、本研究では、腰椎、脛骨骨密度や、脛骨骨幹部骨塩量、骨面積は骨強度の結果と完全に一致するものではなかった。脛骨近位部骨塩量と大腿骨破断強度が同様の変化を示し、脛骨近位部骨面積と大腿骨破断エネルギーが同様の変化を示したのみだった。これらの結果から、骨強度は骨密度以外にも骨塩量や骨面積、その他の因子の影響を複合的に受けたことが考えられる。走運動下の食餌制限が骨質に及ぼす影響について、Hattori *et al.* (2014) は発育期雄ラットにおいて、脛骨海綿骨骨梁数、皮質骨厚を低値とし、脛骨海綿骨骨梁幅を高値としたことを報告している。このことから、本研究の発育期雌ラットにおいても、走運動下の食餌制限により骨構造が変化し、その変化が骨強度の低値を導く一つの因子となっていたことが考えられる。

発育期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限は大腿骨長を低値とし、走運動と食餌制限の組み合わせは、食餌制限単独よりも大腿骨長を低値とした (Table 7)。先行研究では、自発走運動下の食餌制限が骨長に及ぼす影響について、Hattori *et al.* (2014) が発育期雄ラットにおいて骨長を低値としたことを報告している。Omi *et al.* (1998) が発育期雌ラットにおいて自発走運動による摂食量の増加を抑制すると、走運動下で充分量のエネルギーを摂取した条件より骨長を低値としたことを報告している。これらの報告は本研究の結果と同様であり、本研究の結果を支持するものである。また、自由摂食条件では骨長に影響を与えなかった自発走運動が、食餌制限の条件では骨長を低値とした。我々の知る限り、この交互作用を報告した研究は無く、新しい知見である。

自発走運動下の食餌制限や、走運動と食餌制限の交互作用が骨強度や骨長獲得を阻害させた調節機構の一つに、本研究では測定を行っていないものの、エネルギー有効性低値が骨代謝に係わるホルモン分泌を変化させたことが考えられる。ヒトにおいて、エネルギー

有効性低値は、骨代謝に影響を与えて骨強度を高めるエストロゲンや、骨強度や骨長を高める IGF-1 の分泌量を低値とする (Ihle & Loucks, 2004). エネルギー有効性低値がエストロゲン分泌の変化を引き起こす機構には、血糖値維持のためコルチゾールの増加が生じ (Misra, 2014), ストレス状態となることが関与している. コルチゾールは、黄体化ホルモン分泌量を低下させるホルモンであり (Breen *et al.*, 2008), 血中コルチゾール濃度と黄体化ホルモン濃度には有意な負の相関関係が報告されている (Rickenlund *et al.*, 2004). また、エネルギー有効性低値は、コルチゾールの増加以外にも、血糖値を維持させる成長ホルモンの増加、摂食行動を刺激するグレリンの増加、摂食行動を抑制するレプチンの減少を引き起こし、それらのホルモン分泌の変化が関与して視床下部-下垂体-性腺軸の活動抑制を引き起こす (Misra, 2014). そのため、本研究のラットにおいても、自発走運動下の食餌制限によりエネルギー有効性低値となり、コルチコステロンや成長ホルモン等の分泌の変化により、エストロゲン分泌が減少していたことが考えられる. 本研究の子宮重量や走行周期の解析結果はこの考察を支持する. Dimarco *et al.* (2007) や Yanaka *et al.* (2012) の、運動条件下での食餌制限は、成熟期雌ラットにおいて血中エストラジオール濃度を低値としたという報告も、この考察を支持する. 加えて、Barrak *et al.* (2010) は骨代謝が亢進した思春期女性走者において、エネルギー摂取量と血中エストラジオール濃度が低値だったと報告しており、エネルギー有効性低値は、エストロゲンの分泌量減少を介し骨代謝を亢進させ、それにより骨強度を低値とすることが考えられる. 本研究では、運動と食餌制限の主効果により骨形成指標である血中 BAP 活性と骨吸収指標である血中 TRAP 活性は高値となっており (Table 8), その考えを支持する結果だった. また、栄養素摂取量が少ない状態では、血中成長ホルモン濃度は増加するものの、成長ホルモン抵抗性を獲得し、血中 IGF-1 濃度が低値となる (Misra *et al.*, 2003). 血中 IGF-1 濃度は、発育期雌ラットにおいて安静条件下での食餌制限により低値となることが報告されており (Joshi *et al.*, 2011), 本研究の発育期雌ラットにおいても運動下食餌制限により IGF-1 分

泌が減少した可能性が高く、骨の成長抑制の調節因子の一つとなったことが推察される。

運動と食餌制限の組み合わせがエネルギー有効性低値により骨の脆弱化を引き起こす調節機構について、ホルモン濃度、骨代謝の変化について、エストロゲンや IGF-1 を中心に、更なる研究が必要である。

自発走運動下の食餌制限が骨強度や骨長獲得を阻害させた調節機構として、エネルギー摂取量減少とカルシウム摂取量の減少により生じる、カルシウム吸収やカルシウム蓄積の低下も考えられる。30%食餌制限では、エネルギー摂取量以外の各種栄養素摂取量が単独で減少する影響は少ない。カルシウム摂取量について、*Hunt et al.* (2008) は、発育期雌ラットにおいて、カルシウム含量が 0.2%以下の食餌（本研究餌のカルシウム含量の 1/3）を自由摂食させた場合に、骨の成長が妨げられたものの、カルシウム含量が 0.3%の食餌は骨に影響を及ぼさなかったことを報告している。他の栄養素についても、特定の栄養素摂取量を単独で 30%制限した場合に骨に悪影響が生じるという報告は、我々の知る限りではこれまでにされていない。しかし、エネルギー摂取量以外の各種栄養素摂取量が同時に 30%制限されることが骨に影響を及ぼすかどうかは明らかになっておらず、各種栄養素摂取量が同時に 30%制限されることによって骨強度や骨長の獲得が妨げられた可能性もある。エネルギー制限は成熟期雌ラットにおいてカルシウム吸収率を減少させたと報告されており (*Cifuentes et al.*, 2002)、本研究の食餌制限群では、さらにカルシウム摂取量の減少が加わることで、カルシウム吸収やカルシウム蓄積の大幅な低下が生じ、骨の成長抑制が生じたことが考えられる。

自発走運動下の食餌制限が骨に影響を及ぼしたことに、走行距離の増加が関与した可能性が考えられる。本研究では、自発走運動下のラットの走行距離の変動により性周期の乱れや飢餓による過活動を判断するため、走行距離の統制を行わなかった。その結果、自発走運動下の食餌制限群の走行距離は自由摂食群より高値となった。本研究では、食餌制限条件での自発走運動は安静状態よりも骨強度や骨密度の低値を引き起こした。この骨強度

の低値は、食餌制限条件での自発走運動によって、安静状態よりもエネルギー有効性を低値としたことが要因として考えられる。自発走運動下の食餌制限による走行距離の増加は、荷重負荷による骨への刺激が増加しても、エネルギー消費量増加により更なるエネルギー有効性の低下が生じることで、骨代謝に係わるホルモン分泌やカルシウム吸収の更なる悪化を引き起こし、骨強度や骨密度の低値を導く一つの因子となったと推察される。

本研究のまとめとして、発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限は骨強度を低値とすることが明らかになった (Figure 12)。また、自発走運動下の食餌制限は発育期雌ラットの骨長を低値とすること、自発走運動と食餌制限の組み合わせは発育期雌ラットの骨に対して有意な交互作用を有し、運動や食餌制限単独よりも骨強度や骨長を低値とすることが明らかになった。

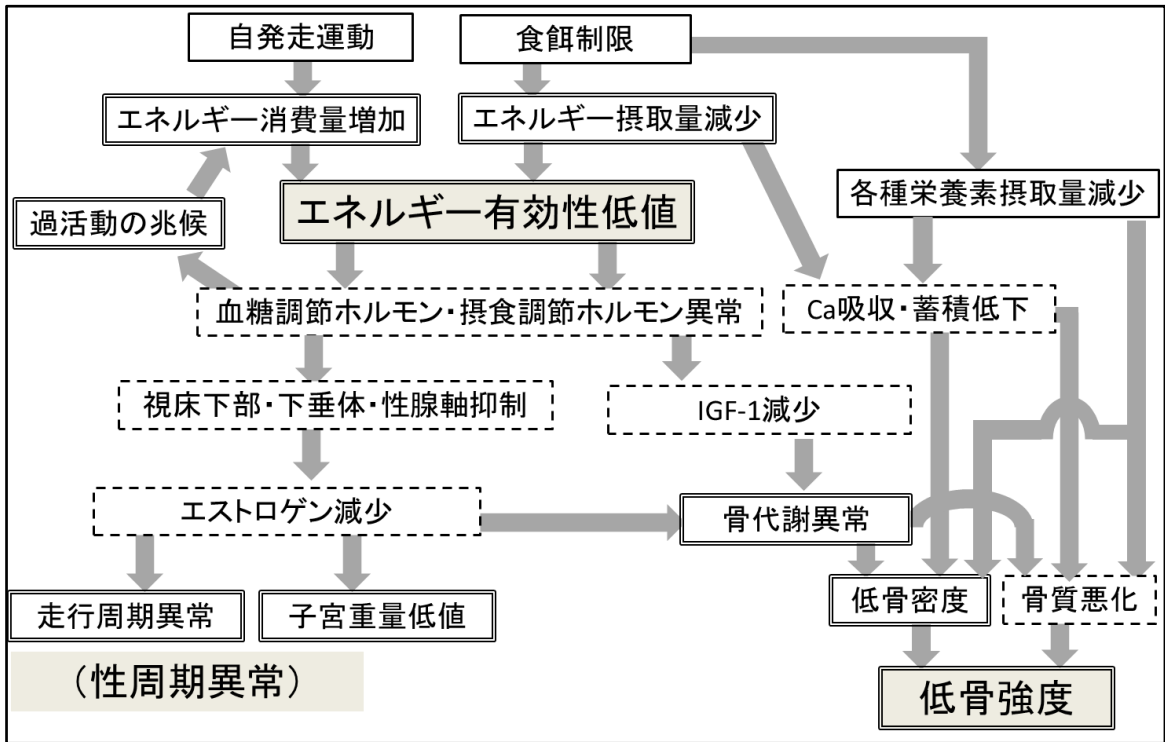


Figure 12. The summary of results in experiment 1-2.

This figure demonstrates the summary of results in experiment 1-2 and the mechanism of low bone strength caused by the interaction of exercise and food restriction in young female rats. The square written by line demonstrates experiment design, the square written by double line demonstrates results, and the square written by dotted line demonstrates speculation. We consider the low bone strength caused by the interaction of exercise and food restriction through low estrogen, low IGF-1, low Ca accumulation.

#### 4. 要約

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを作成するため、研究課題 1-1 では自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行い、研究課題 1-2 では自発走運動下の食餌制限が骨強度に与える影響の検討を行った。その結果、以下の知見を得た。

発育期雌ラットにおいて自発走運動により高骨強度を導くことが確認された。その自発走運動下で食餌制限により骨強度が低値となることが明らかになった。以上のことから、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる状態を再現した FAT の低骨強度モデルを、自発走運動と食餌制限を用いて作成することができたと考えられる。

さらに、この FAT の低骨強度モデルとなるラットは、骨状態以外では次のような特徴を持った。(1) 習慣的に長距離の走運動を行い、過剰に近い運動量、(2) 食餌量の減少、(3) エネルギー有効性低値。加えて、次のような特徴を持つことが推察される。(4) 性周期異常（走行周期の乱れより）、(5) エストロゲン分泌量減少（子宮重量、骨代謝マーカーより）、(6) ストレス状態（走行距離の過活動の兆候より）。

また、自発走運動下の食餌制限は発育期雌ラットの骨長を低値とすること、自発走運動と食餌制限の組み合わせは発育期雌ラットの骨に対して有意な交互作用を有し、運動や食餌制限単独よりも骨強度や骨長を低値とすることが明らかになった。

本課題で作成した上記の特徴をもつ発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを用いて、研究課題 2 では栄養による予防策の検討を行うこととした。

## v 章 研究課題 2

### 「発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する 高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果の検討」

#### 1. 緒言

研究課題 2 では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを用いて、思春期の FAT の低骨密度の予防策として考えられている高カルシウム摂取 (Manore, 2002) (Meyer *et al.*, 2007) (Nattiv *et al.*, 2007) と、エネルギー充足 (Nattiv *et al.*, 2007) の効果の検討を行うこととした。競技者にとって健康な骨状態とは、運動による過重負荷に適応して骨強度が高値となった状態と考えられる。そのため、本研究では、予防策の効果の判断を、FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値とし、走運動下自由摂食の高骨強度状態の骨強度と差が認められない場合を「低骨強度の予防」と捉える。そして、FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値としても走運動下自由摂食の高骨強度状態の骨強度より低値となる場合は「低骨強度の軽減」と捉える。

思春期における FAT の低骨密度の予防策に高カルシウム摂取が期待される。その理由として、摂食障害等の健康問題を有さない思春期男女において、高カルシウム摂取による骨密度増加効果が報告されているためである (Nowson *et al.*, 1997) (Stear *et al.*, 2003)

(Prentice *et al.*, 2005) (Nieves *et al.*, 2010)。さらに、カルシウム吸収の面からも、FAT の低骨密度の予防策として高カルシウム摂取の効果が期待される。運動と食事量減少の組み合わせが低骨強度を引き起こす原因の一つに、カルシウム吸収量の低下が考えられる。成熟期雌ラットにおいて、エネルギー制限はカルシウム吸収率を低下させたと報告されている (Cifuentes *et al.*, 2002)。運動と食事量減少の組み合わせは、エネルギー有効性低値によるカルシウム吸収率の低下とカルシウム摂取量低下による大幅なカルシウム吸収量低

下が生じ、低骨強度を引き起こしているかもしれない。そのため、食事量が減少した思春期の女性競技者や活動的な女性は、カルシウムを多く摂取する必要があると考えられる。しかし、FATの低骨強度を呈する食事量が減少した女性競技者や活動的な女性において、高カルシウム摂取が骨に与える効果は明らかになってない。

FATの低骨密度は、エネルギー有効性低値が大きな要因と考えられており (Nattiv *et al.*, 2007) (Loucks *et al.*, 2011)、十分なエネルギー摂取は低骨強度を予防する可能性は高い。研究課題 1-2 では、発育期雌ラットにおいて、運動と食事制限の交互作用は運動単独および食餌制限単独よりも、エネルギー有効性、骨強度を低値とすることを明らかにした。Swift *et al.* (2012) は、成熟期雌ラットにおいてトレッドミル走運動条件下で、全ての栄養素摂取量を減少させる食餌制限と、炭水化物のみ減少させるエネルギー制限は、どちらも骨量を低下させ、二つの制限間の骨量に有意な差は無かったことを報告している。これらの報告からも、走運動下の食餌制限による低骨強度は、エネルギー有効性低値が大きく影響していることが推察される。しかし、他の栄養素摂取量が減少した状態の中、エネルギー有効性を適正にすることのみでFATの低骨強度を予防するかは、明らかになっていない。また、Omi *et al.* (1998) は発育期雌ラットにおいて、安静条件と同量の食餌量では自発走運動による骨密度増加効果は生じないが、グルコースによりエネルギー補給を行うことで、エネルギー以外の栄養素摂取量は安静群と同量でも自発走運動による骨密度増加が生じたことを報告している。この報告からも骨の適正な成長にはエネルギー有効性低値を予防することが重要なことであると考えられる。

以上のことから、本課題では、発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果を明らかにすることを目的とした。研究課題 2-1 では、発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討を行い、研究課題 2-2 では、発育期ラットにおけるFATの低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果の検討を行った。さらに、高カルシウム摂取とエネルギー



充足の併用は、それぞれの単独策よりも FAT の低骨強度を予防する可能性が高まることが考えられる。そこで、研究課題 2-3 では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討を行った。また、各課題において、各予防策が骨長の獲得抑制や、低骨強度以外の FAT の 2 主徴であるエネルギー有効性低値、性周期異常に対する予防効果についての検討も行った。

## 2. 研究課題 2-1. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討

### 2-1. 目的

本課題は、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討を目的とした。

### 2-2. 方法

#### 2-2- I. 被験動物および飼育条件

実験計画を Figure 13 に示した。7 週齢の SD 系雌ラットを 1 週間の予備飼育後に、安静群 (SED 群, n=7)、運動群 (EX 群, n=7)、運動 - 食餌制限群 (EX-FR 群, n=7)、運動 - 食餌制限 + 高カルシウム食群 (EX-FR+Ca 群, n=8) に分け、12 週間の飼育を行った。運動条件、普通食食餌組成、飼育室環境は研究課題 1-1 と同様の方法を用いた。食餌制限は研究課題 1-2 と同様の方法を用いた。EX-FR+Ca 群には普通食ではなく、普通食の 2 倍のカルシウム含有量である 1.2%カルシウム含有量の高カルシウム食を制限量与えた。高カルシウム食と普通食の食餌組成を Table 9 に示した。なお、本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。

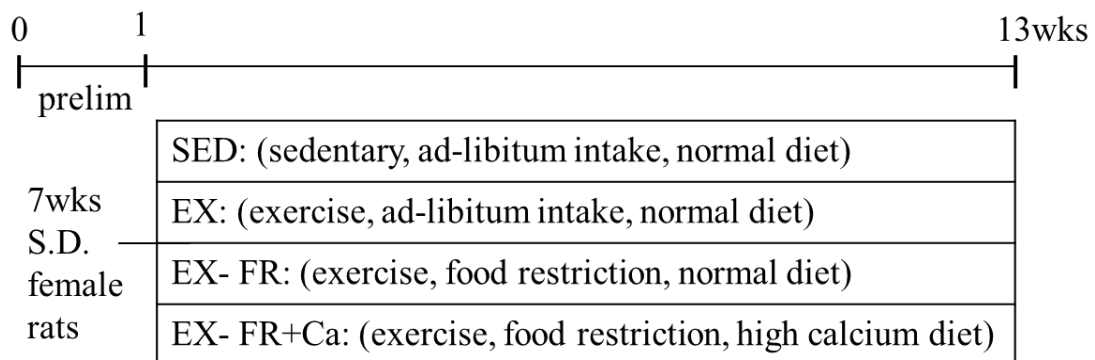


Figure 13. Experimental design.

**Table 9. Compositions of the experimental diets.**

| Constituents                               | normal<br>(g)    | high-Ca<br>(g)   |
|--|------------------|------------------|
| Glucose monohydrate                        | 62.37            | 60.87            |
| Casein <sup>1</sup>                        | 18.0             | 18.0             |
| Cystine                                    | 0.2              | 0.2              |
| Cottonseed oil                             | 10.0             | 10.0             |
| CaCO <sub>3</sub>                          | 1.490            | 2.988            |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>            | 1.158            | 1.158            |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>            | 1.482            | 1.482            |
| Roughage                                   | 3.0              | 3.0              |
| Choline chloride                           | 0.2              | 0.2              |
| Water-soluble vitamin mixture <sup>2</sup> | 0.1              | 0.1              |
| Oil-soluble vitamin mixture                | ( ) <sup>3</sup> | ( ) <sup>3</sup> |
| Ca- and P-free salt mixture <sup>4</sup>   | 2.0              | 2.0              |
| -----                                      |                  |                  |
| Energy (kcal/100 g)                        | 373              | 368              |

Compositions of the experimental normal diet were determined as previous study (Suda *et al.*, 1970). Normal diet contained 0.6% Ca and 0.6% P. High-Ca diet contained 1.2% Ca and 0.6% P.

<sup>1</sup>Casein contained 0.22 mg calcium/g and 4mg phosphorus/g.

<sup>2</sup>The water-soluble vitamin mixture(in%): thiamin, 0.5; riboflavin, 0.5; pyridoxine, 0.5; calcium pantothenate, 2.8; nicotinamide, 2.0; inositol, 20.0; folic acid, 0.02; vitamin B12, 0.002; biotin, 0.01; and glucose monohydrate, 73.7.

<sup>3</sup>The rats received a supplement of the following oil –soluble vitamins in cottonseed oil three times a week: β-carotene, 70μg; 2-methyl-1.4-naphthoquinone, 105μg; α-tocopherol, 875μg; and vitamin D<sub>3</sub>, 525IU.

<sup>4</sup>Ca- and P-free salt mixture(in%): KCl, 57.7; NaCl, 20.9; MgSO<sub>4</sub>, 17.9; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O , 3.22; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.078; NaF, 0.133; CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.004; KI, 0.01; MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.06; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.44; and (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O, 0.005.

## 2-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題 1-1 と同様に行った。加えて、本飼育 79 日目にラットを代謝ケージに移し、24 時間糞、尿を 2 日間採取した。糞は-30℃で保存した。採取した尿はただちに 2500rpm で 15 分間の遠心分離し、上清を分注して-30℃で保存した。

## 2-2-III. エネルギー有効性の算出

研究課題 1-1 と同様に行った。加えて、高カルシウム食を摂取させる EX-FR+Ca 群のエネルギー摂取量は以下のように算出した

エネルギー摂取量 (kcal) = 3.68 (kcal) × 高カルシウム食摂食量 (g)

## 2-2-IV. 走行周期の評価

研究課題 1-2 と同様に行った。

## 2-2-V. 大腿骨重量および長さの測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

## 2-2-VI. 大腿骨破断強度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

## 2-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量、骨面積、骨密度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

## 2-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定

研究課題 1-2 と同様に行った。

## 2-2-IX. カルシウム出納の測定

尿上清からプラズマ発光分光光度計 (ICAP-575v Nippon Jarrell-Ash) により尿中カルシウム排出量の測定を行った。糞は 550~600°C の乾燥機 (Hi-temp Oven, DR200, Yamamoto Inc, Tokyo) 中に約 15 時間入れ灰化した後, 1N 硝酸に溶解し, 糞中カルシウム排出量を尿と同様の方法で測定した。みかけのカルシウム吸収, カルシウム蓄積はカルシウム摂取量と尿中, 糞中カルシウム排出量と用いて以下の式から算出した。

カルシウム吸収量 (mg/day) = カルシウム摂取量 - 糞中カルシウム排出量

カルシウム吸収率 (%) = カルシウム吸収量 ÷ カルシウム摂取量 × 100

カルシウム蓄積量 (mg/day) = カルシウム吸収量 - 尿中カルシウム排出量

カルシウム蓄積率 (%) = カルシウム蓄積量 ÷ カルシウム摂取量 × 100

## 2-2-X. 統計処理

データは全て mean±SE で表した。EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群の差の検定に, 一元配置の分散分析を用いた。群間に有意な差が認められた場合, Tukey's 多重比較検定を行い, 各群間の差を検定した。SED 群の値は運動の効果の評価するためのみに用い, EX 群と対応のない t 検定を用いて差を検討した。統計ソフトは SPSS (version 19.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用した。有意水準は 5% とした。

## 2-3. 結果

### 2-3- I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性

実験期間中の平均摂食量, 走行距離, エネルギー有効性を Table 10 に示した. 普通食摂食量, カルシウム摂取量, エネルギー摂取量は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した. 普通食摂食量, カルシウム摂取量, エネルギー摂取量, 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. カルシウム摂取量は, EX-FR 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な高値を示した. カルシウム摂取量以外の項目は EX-FR 群と EX-FR+Ca 群間に有意な差は認められなかった. 摂食量, エネルギー摂取量, 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は, EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な低値を示し, カルシウム摂取量は EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な高値を示した.

**Table 10. Food intake, running distance, and energy availability.**

|   | SED         | EX                       | EX-FR                    | EX-FR+Ca                 |
|---|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Food intake (g/day)   | 17.8 ± 0.6* | 19.6 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 12.6 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.1 <sup>b</sup>  |
| Ca intake (mg/day)  | 107 ± 3*    | 118 ± 2 <sup>b</sup>     | 76 ± 0 <sup>c</sup>      | 151 ± 0 <sup>a</sup>     |
| Energy intake <sup>1</sup> (kcal/day)   | 66.4 ± 2.1* | 73.3 ± 1.2 <sup>a</sup>  | 47.2 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 46.4 ± 0.1 <sup>b</sup>  |
| Wheel running distance (km/day)   | -           | 8.7 ± 1.3                | 11.2 ± 0.6               | 10.9 ± 0.7               |
| Percentage of the power spectrum of the running distance <sup>2</sup> (Ratio) | -           | 0.44 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.17 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.18 ± 0.03 <sup>b</sup> |
| Exercise-induced Energy expenditure <sup>3</sup> (kcal/day)                   | -           | 11.4 ± 1.6               | 10.7 ± 0.5               | 10.3 ± 0.5               |
| Energy availability <sup>4</sup> (kcal/day)                                   | 66.4 ± 2.1  | 61.9 ± 1.4 <sup>a</sup>  | 36.5 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 36.1 ± 0.5 <sup>b</sup>  |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

<sup>1</sup> Energy intake was calculated by multiplying the amount of daily food intake in grams by the energy content of the food (normal diet, 3.73 kcal/g; high-Ca diet, 3.68 kcal/g).

<sup>2</sup> To quantify the periodic component at about 4- or 5- day observed in the temporal profile of the running distance, we estimated the power in the frequency band from 0.2 to 0.3 Hz using spectral analysis of the detrended time series. Moreover, to exclude the interindividual difference in the total power affecting the local power, we also computed the proportion of the power spectrum of the running distance from 0.2 to 0.3 Hz in the total power spectrum.

<sup>3</sup> Exercise induced energy expenditure from daily wheel running was calculated as 5.0 kcal/kg body weight times kilometers run (Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989).

<sup>4</sup> Energy availability was calculated as energy intake minus exercise energy expenditure.

## 2-3-II. 体重, 臓器重量

体重, 臓器重量を Table 11 に示した. 最終体重, 腹腔内脂肪重量は, SED 群と比較して EX 群が有意な低値を示した. ヒラメ筋重量は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した. 最終体重, 腹腔内脂肪重量, 足底筋重量, ヒラメ筋重量, 子宮重量, 副腎重量は, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 各項目において, EX-FR 群と EX-FR+Ca 群間に有意な差は認められなかった. 最終体重, 腹腔内脂肪重量, 足底筋重量, ヒラメ筋重量, 子宮重量, 副腎重量, 胸腺重量は, EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な低値を示した.

**Table 11. Body weight and internal organ weight.**

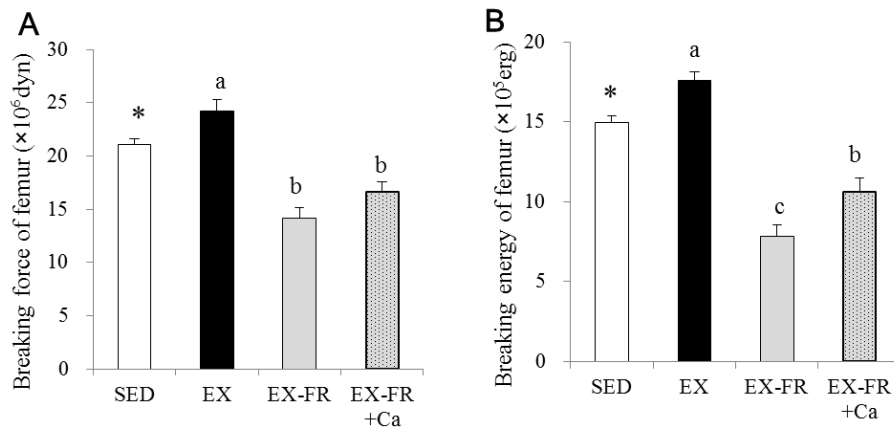
|                             | SED            | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ca                   |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Initial body weight (g)     | 208 ± 3        | 208 ± 3                    | 210 ± 4                    | 209 ± 3                    |
| Final body weight (g)       | 340 ± 15       | 295 ± 5 <sup>a</sup>       | 194 ± 4 <sup>b</sup>       | 187 ± 4 <sup>b</sup>       |
| Abdominal fat weight (g)    | 26.0 ± 5.3*    | 12.4 ± 1.7 <sup>a</sup>    | 1.6 ± 0.2 <sup>b</sup>     | 1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>     |
| Plantaris muscle weight (g) | 0.34 ± 0.02    | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.25 ± 0.13 <sup>b</sup>   | 0.23 ± 0.08 <sup>b</sup>   |
| Soleus muscle weight (g)    | 0.111 ± 0.005* | 0.138 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.095 ± 0.006 <sup>b</sup> | 0.086 ± 0.005 <sup>b</sup> |
| Uterus weight (g)           | 0.53 ± 0.03    | 0.62 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 0.32 ± 0.07 <sup>b</sup>   | 0.27 ± 0.06 <sup>b</sup>   |
| Adrenal gland weight (g)    | 0.037 ± 0.001  | 0.043 ± 0.003 <sup>a</sup> | 0.033 ± 0.002 <sup>b</sup> | 0.034 ± 0.002 <sup>b</sup> |
| Thymus weight (g)           | 0.29 ± 0.03    | 0.23 ± 0.08 <sup>a</sup>   | 0.18 ± 0.05 <sup>ab</sup>  | 0.15 ± 0.13 <sup>b</sup>   |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.



### 2-3-III. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーを Figure 14 に示した．大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーは，SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示し，EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した．大腿骨破断エネルギーは，EX-FR 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な高値を示した．また，大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーは，EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な低値を示した．



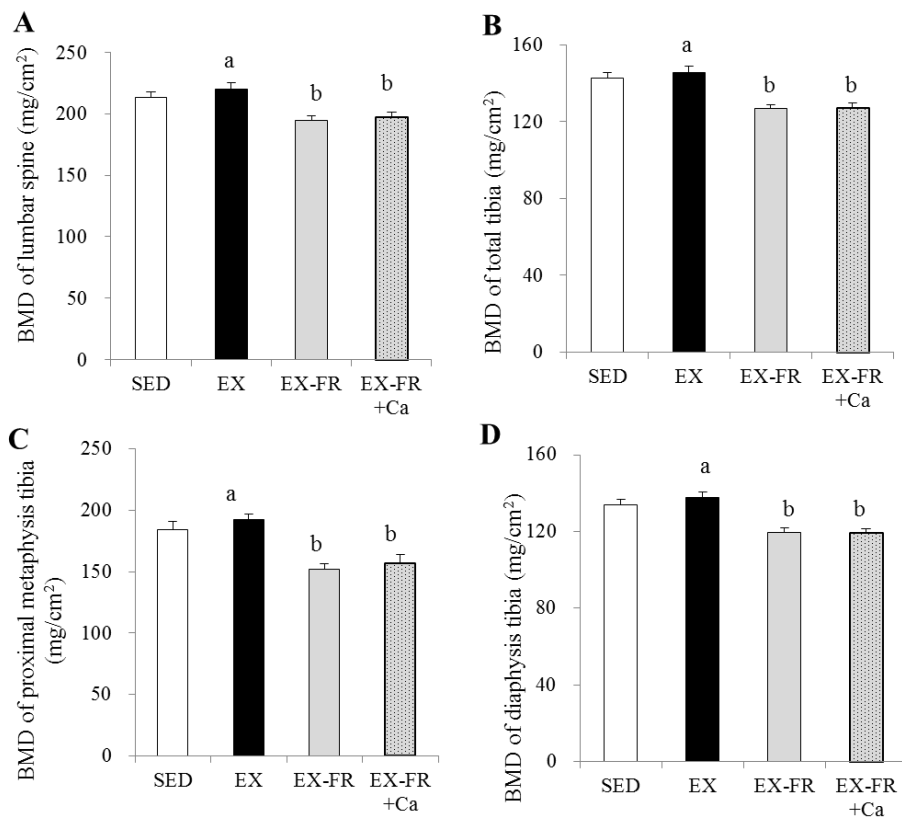
**Figure 14. Breaking force and energy of femur.**

A: Breaking force of femur. B: Breaking energy of femur

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 2-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度

腰椎骨密度, 脛骨骨密度を Figure 15 に示した. 腰椎骨密度は, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は, EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 腰椎骨密度, 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は, EX-FR 群と EX-FR+Ca 群間に有意な差は認められず, EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な低値を示した.



**Figure 15. BMD of lumbar spine and tibia.**

A: BMD of lumbar spine. B: BMD of total tibia. C: BMD of proximal metaphysis tibia. D: BMD of diaphysis tibia.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 2-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積

大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積を Table 12 に示した. 脛骨総骨面積, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は, SED 群と比較して EX 群が有意な高値を示した. 大腿骨湿重量, 大腿骨乾燥重量, 大腿骨灰化重量, 大腿骨長, 大腿骨短径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨総骨塩量, 脛骨総骨面積, 脛骨近位部骨塩量, 脛骨近位部骨面積, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は EX 群と比較して EX-FR 群が有意な低値を示した. 全ての項目において, EX-FR 群と EX-FR+Ca 群間に有意な差は認められなかった.

**Table 12. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.**

|   | SED           | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ca                   |
|---|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Wet weight of femur (g)                                   | 0.95 ± 0.02   | 0.92 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.74 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.76 ± 0.02 <sup>b</sup>   |
| Dry weight of femur (g)                                   | 0.61 ± 0.01   | 0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.46 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.49 ± 0.01 <sup>b</sup>   |
| Ash weight of femur (g)                                   | 0.43 ± 0.01   | 0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.31 ± 0.01 <sup>b</sup>   |
| Length of femur (cm)                                      | 3.63 ± 0.03   | 3.59 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 3.36 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 3.39 ± 0.03 <sup>b</sup>   |
| Major axis of femur (cm)                                  | 0.411 ± 0.007 | 0.396 ± 0.006              | 0.376 ± 0.007              | 0.376 ± 0.006              |
| Minor axis of femur (cm)                                  | 0.332 ± 0.004 | 0.338 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.316 ± 0.003 <sup>b</sup> | 0.313 ± 0.003 <sup>b</sup> |
| BMC of lumbar (mg)  | 558 ± 26      | 545 ± 8.9 <sup>a</sup>     | 378 ± 13 <sup>b</sup>      | 406 ± 17 <sup>b</sup>      |
| Bone area of lumbar (cm <sup>2</sup> )                    | 2.61 ± 0.07   | 2.48 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 1.94 ± 0.04 <sup>b</sup>   | 2.05 ± 0.06 <sup>b</sup>   |
| BMC of total tibia (mg)                                   | 284 ± 11      | 309 ± 7 <sup>a</sup>       | 225 ± 6 <sup>b</sup>       | 235 ± 9 <sup>b</sup>       |
| Bone area of total tibia (cm <sup>2</sup> )               | 1.97 ± 0.05*  | 2.15 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 1.79 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 1.85 ± 0.05 <sup>b</sup>   |
| BMC of proximal metaphysis tibia (mg)                     | 92 ± 4        | 101 ± 3 <sup>a</sup>       | 65 ± 3 <sup>b</sup>        | 71 ± 5 <sup>b</sup>        |
| Bone area of proximal metaphysis tibia (cm <sup>2</sup> ) | 0.50 ± 0.02   | 0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.45 ± 0.02 <sup>b</sup>   |
| BMC of diaphysis tibia (mg)                               | 108 ± 4*      | 121 ± 2 <sup>a</sup>       | 91 ± 2 <sup>b</sup>        | 92 ± 2 <sup>b</sup>        |
| Bone area of diaphysis tibia (cm <sup>2</sup> )           | 0.80 ± 0.01*  | 0.90 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.78 ± 0.05 <sup>b</sup>   |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 2-3-VI. 骨代謝マーカー

血清 BAP, 血清 TRAP, 尿中 DPD を Table 13 に示した. 各項目において, 各群間に有意な差は認められなかった.

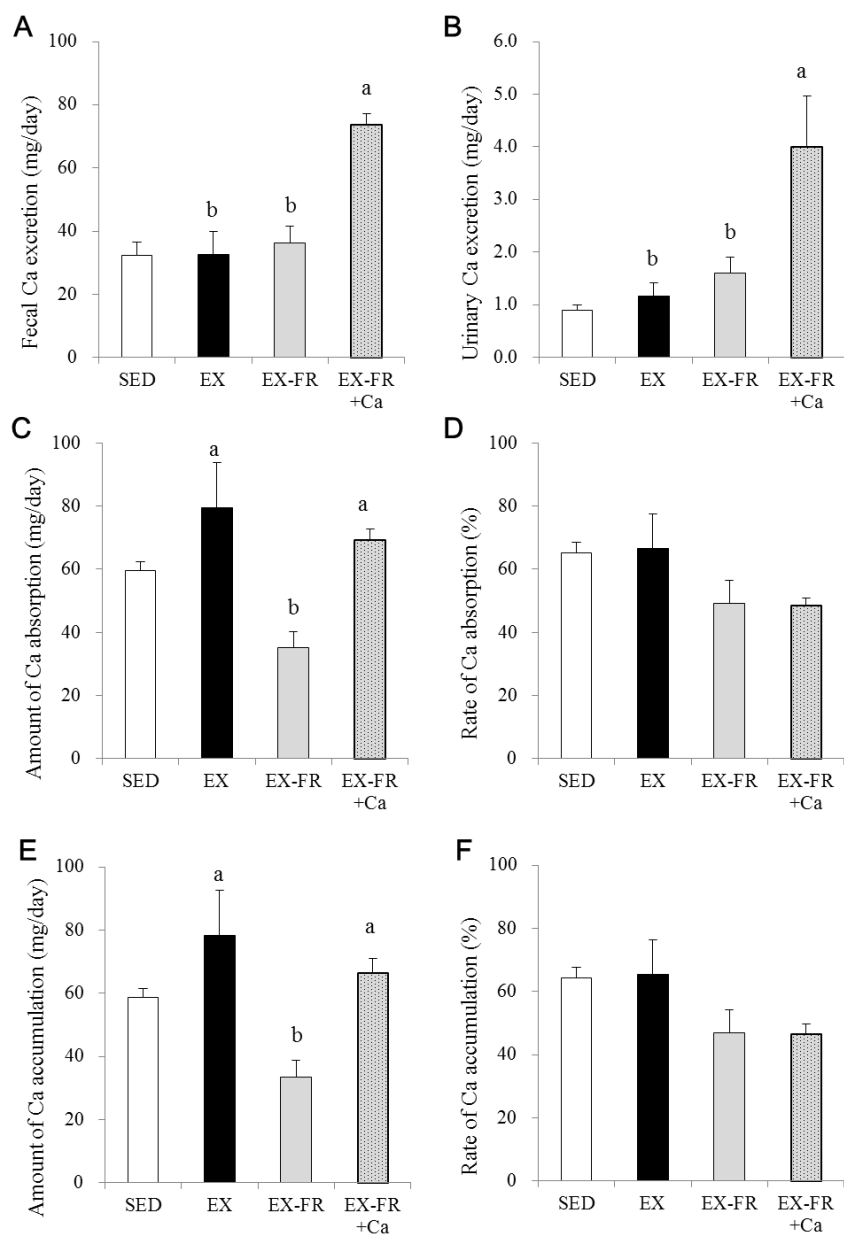
**Table 13. Bone metabolic marker.**

|                      | SED         | EX          | EX-FR       | EX-FR+Ca    |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Serum BAP (mU)       | 32.0 ± 4.3  | 59.4 ± 7.4  | 72.1 ± 7.8  | 79.2 ± 9.9  |
| Serum TRAP (mU)      | 11.6 ± 0.7  | 15.4 ± 1.7  | 17.9 ± 0.7  | 18.4 ± 1.1  |
| Urine DPD (nmol/day) | 3.78 ± 0.85 | 8.39 ± 1.27 | 5.09 ± 1.03 | 4.38 ± 0.50 |

Values are expressed as means ± SE.

### 2-3-VII. カルシウム出納

カルシウム出納試験の結果を Figure 16 に示した。カルシウム吸収量, カルシウム蓄積量は, SED 群と EX 群間に有意な差は認められず, EX 群と比較して EX-FR 群は有意な低値を示した。糞中カルシウム排出量, 尿中カルシウム排出量, カルシウム吸収量, カルシウム蓄積量は, EX-FR 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な高値を示した。また, 糞中カルシウム排出量, 尿中カルシウム排出量は EX 群と比較して EX-FR+Ca 群が有意な高値を示し, カルシウム吸収量, カルシウム蓄積量は, EX 群と EX-FR+Ca 群間に有意な差は認められなかった。カルシウム吸収率, カルシウム蓄積率は各群間に有意な差は認められなかった。



**Figure 16. Calcium(Ca) balance study.**

A: Fecal Ca excretion. B: Urinary Ca excretion. C: Amount of Ca absorption. D: Rate of Ca absorption. E: Amount of Ca accumulation. F: Rate of Ca accumulation.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ca groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 2-4. 考察

本研究では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討を行った。FAT の低骨強度モデルとなる自発走運動下の食餌制限条件に対し、高カルシウム食を与えて検討を行った。発育期雌ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は、標準食と比較して大腿骨強度を高値とした。一方で、高カルシウム食は体重、走行周期、子宮重量、骨密度、骨長、骨重量、骨塩量、骨面積に影響を与えなかった。

本研究において、高カルシウム摂取のため 1.2%カルシウム含有食を高カルシウム食として用いた。1.2%カルシウム含有量の高カルシウム食は、Viguet-Carrin *et al.* (2014) が、発育期雄ラットにおいて骨強度を高値とした餌であり、高カルシウム摂取により骨強度を高値とする効果が期待される餌である。また、Shah *et al.* (1990) は、発育期雌ラットにおいて、2.08%カルシウム含有量餌により肝臓の鉄蓄積量減少や心臓のカルシウム蓄積量の増加を生じさせたと報告している。本研究の 1.2%カルシウム含有量餌はその餌よりもカルシウム含有量が少なく、そのようなカルシウム過剰摂取による影響が少ないと考えられる。一方で、本研究で用いた 30%食餌制限が、安静や運動条件の発育期雌ラットにおいて不十分なカルシウム摂取量かどうかは不明であるが、30%カルシウム摂取制限のみでは、骨の成長阻害を引き起こす可能性は低いと考えられる。なぜなら、Hunt *et al.* (2008) はカルシウム含量が 0.2%以下の食餌を自由摂食させた場合に、発育期雌ラットの骨の成長が妨げられることを報告しているためである。しかしながら、エネルギー摂取制限は雌ラットのカルシウム吸収率を減少させるものであり (Cifuentes *et al.*, 2002)、そこにカルシウム摂取量の減少が加わることで、カルシウム吸収やカルシウム蓄積の大幅な低下が生じることが考えられる。そのため、我々は、1.2%カルシウム含有食は走運動下で食餌制限を行う発育期雌ラットにとって、カルシウム欠乏を救済しつつ、さらに、豊富なカルシウム摂取量からの豊富なカルシウム蓄積による骨強度増加効果を期待して検討を行った。本研究の



EX-FR+Ca 群のカルシウム摂取量は SED 群の 141%, EX 群の 125%, EX-FR 群の 199% であり, 高いカルシウム摂取量とすることができた。

高カルシウム食はエネルギー摂取量やエネルギー有効性に影響を与えなかった (Table 10)。そのため, 高カルシウム食は体重や臓器重量についても影響を与えなかったことが考えられる。さらに, 高カルシウム食は子宮重量と走行周期に影響を与えなかったことから, 走運動下の食餌制限による性周期異常を予防するものではないことも示唆している。

発育期雌ラットにおいて, 走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は, 骨強度を高値とした (Figure 14)。これまでに, 高カルシウム食について, *Viguet-Carrin et al.* (2014) が発育期雄ラットにおいて, 安静かつ自由摂取条件で骨強度を高値としたことを報告している。本研究の結果は, 走運動下の食餌制限条件においても同様に, 高カルシウム摂取が骨強度を高値とすることを明らかにした。しかしながら, 走運動下の食餌制限条件で高カルシウム食を与えても, 走運動下の自由摂食条件より骨強度は低値だった。

発育期雌ラットにおける走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は, 骨密度や骨塩量に影響を与えなかった (Figure 15) (Table 12)。この結果は, 発育期雌ラット (*Creedon & Cashman, 2001*) および発育期雄ラット (*Persson et al. 1993*) (*Viguet-Carrin et al., 2014*) において, 安静の自由摂食条件で高カルシウム食の効果を検討した先行研究と一致する。*Viguet-Carrin et al.* (2014) は, 高カルシウム食は骨強度を高めるものの, 骨密度, 骨微細構造, 骨形態, 骨代謝状態には影響を与えなかったことを報告している。そのため, *Viguet-Carrin et al.* (2014) はそれらの項目は, 高カルシウム食の骨強度を高めた説明要因にはならなかったと述べている。本研究の結果は, 高カルシウム食が導く骨強度を高める効果は, 骨密度, 骨重量, 骨塩量, 骨面積以外の要因に影響を受けていることを示唆している。今後, 高カルシウム摂取が骨強度を高める要因として, 骨の化学組成のような骨質を調査していくことが必要だろう。

発育期雌ラットにおける走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は, 骨長に影響を

与えなかった (Table 12). この結果は, *Viguet-Carrin et al.* (2014) が安静, 自由摂食条件で高カルシウム食の効果を検討した報告と一致している. このことは, 活動条件や食餌条件が異なっても, 高カルシウム摂取は骨長に影響を与えないことを示唆している.

本研究では, 高カルシウム摂取により高カルシウム吸収が生じるかを確かめるため, カルシウム出納試験を行った. 発育期雌ラットにおいて, 走運動下の食餌制限によりカルシウム吸収量とカルシウム蓄積量は低値となった (Figure 16). 一方で, 30%食事制限はカルシウム吸収率を有意な低値とせず, 先行研究のエネルギー摂取制限 (*Cifuentes et al.*, 2002) とは異なる結果だった. カルシウム摂取量が減少するとカルシウム吸収率が高まることが報告されており (*Shah et al.*, 1990), 食餌制限条件ではエネルギー摂取量減少とカルシウム摂取量減少によるカルシウム吸収率への影響が互いに作用し合い, その影響を消失させたことが考えられる. よって, 本研究の走運動下の食餌制限によりカルシウム吸収量とカルシウム蓄積量の低値は, 食事からのカルシウム摂取量の減少によるものだと考えられる. さらに, 発育期雌ラットにおける走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は, カルシウム吸収量を増加させ, カルシウム吸収率に影響を与えなかった. この結果は, 安静の自由摂食条件での高カルシウム摂取量はカルシウム吸収率を低下させたという報告 (*Cashman & Flynn*, 1996) と一致しない. このことから, 走運動下の食餌制限条件と安静の自由摂食条件では, 高カルシウム食がカルシウム吸収率に与える影響は異なることが示唆される. さらに, 高カルシウム食は走運動下の食餌制限によるカルシウム蓄積量の減少を防ぐが, 高値としないことも発見した (Figure 16). カルシウム蓄積量の結果は, 実験開始前の想定とは異なり, 1.2%カルシウム含有食は走運動下で食餌制限条件のカルシウム蓄積の低下を救済するものの, 豊富なカルシウム蓄積を導かないものであった. また, 骨重量や骨塩量に対する高カルシウム食の効果は認められなかった (Table 12). これらの結果から, 発育期雌ラットにおいて走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食により体内に多く吸収されたカルシウムは, 骨に蓄積されないことが示唆される.

高カルシウム食が骨強度を高値とする調節因子として、IGF-1 が関与した可能性が挙げられる。Viguet-Carrin *et al.* (2014) は、高カルシウム食が骨強度を高値とした調節因子として、高カルシウム食により IGF-1 が高値となったことを挙げており、本研究でも同様なことが推察される。IGF-1 は骨量や骨長の獲得を促進するホルモンである (Davies *et al.*, 2005)。しかし、Viguet-Carrin *et al.* (2014) の研究や本研究では、高カルシウム食は骨量や骨長に影響を与えていない。さらに、高カルシウム食が IGF-1 の分泌を促進する機構について、明らかになっていない。そのため、IGF-1 以外の調節因子も検討を行う必要がある。一方で、Viguet-Carrin *et al.* (2014) は高カルシウム食によっても PTH に影響が認められなかったという報告している。Chen *et al.* (2002) は発育期雌ラットに対し高カルシウム食 (Ca 含量 2.0%) を与えても、3, 7, 15, 30 日目の血清 PTH 濃度と血清カルシトニン濃度は普通食 (Ca 含量 1.18%) と有意な差は認められなかったと報告している。これらのことから、本研究においても、高カルシウム食は PTH やカルシトニンに影響を与えなかったことが推察される。しかしながら、走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食がこれらのホルモンについて、安静かつ食事量充分条件と同じ影響を及ぼすとは限らない。走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食が骨強度を高値とした調節因子について、IGF-1 や、IGF-1 と同じく FAT の低骨強度の調節因子と考えられるエストロゲン、カルシウム代謝を調節する PTH、カルシトニン、ビタミン D3 の検討を行う必要があるだろう。

本研究のまとめとして、発育期雌ラットにおいて、FAT の低骨強度モデルとなる自発走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食は標準食と比較して、大腿骨強度、カルシウム吸収量、カルシウム蓄積量を高値とした (Figure 17)。しかし、その骨強度は、自発走運動下の普通食自由摂食条件の高骨強度状態より低値だった。これらの結果から、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。加えて、FAT の低骨強度モデルに生じる骨長獲得抑制や低骨強度以外の FAT の 2 主徴であるエネルギー有効性低値、性周期異常に、高カルシウム摂取は影響を与えないこ

とが明らかになった。

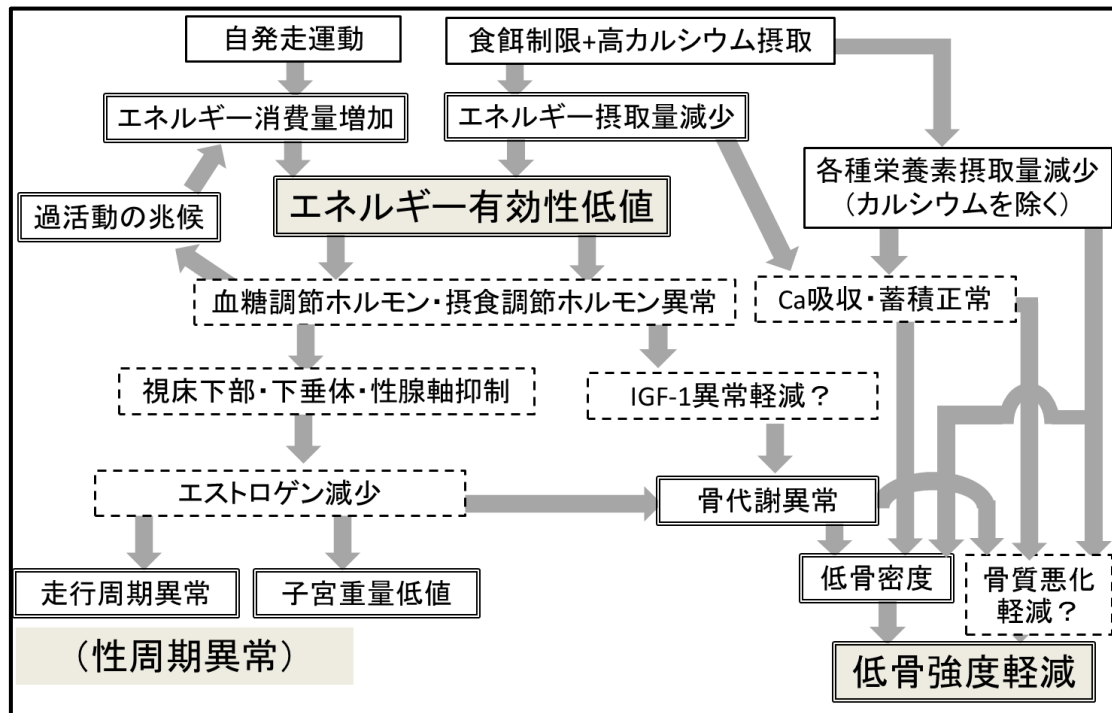


Figure 17. The summary of results in experiment 2-1.

This figure demonstrates the summary of results in experiment 2-1 and the mechanism of the preventive effect of calcium supplementation on weak bones caused by the interaction of exercise and food restriction in young female rats. The square written by line demonstrates an experiment design, the square written by double line demonstrates results, and the square written by dotted line demonstrates speculation. We consider that calcium supplementation had a positive effect on bone strength through the prevention of low IGF-1. Meanwhile, we consider that the effect was not sufficient to prevent lower bone strength because of low energy availability and inadequate various nutrient intakes.

### 3. 研究課題 2-2. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の 予防効果の検討

#### 3-1. 目的

本課題は、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果の検討を目的とした。

#### 3-2. 方法

##### 3-2- I. 被験動物および飼育条件

実験計画を Figure 18 に示した。7 週齢の SD 系雌ラットを 1 週間の予備飼育後に、安静群 (SED, n=7)、運動群 (EX 群, n=7)、運動 - 食餌制限群 (EX-FR 群, n=7)、運動 - 食餌制限+エネルギー補給群 (EX-FR+Ene 群, n=8) に分け、12 週間の飼育を行った。運動条件、食餌組成、飼育室環境は研究課題 1-1 と同様の方法を用いた。食餌制限は研究課題 1-2 と同様の方法を用いた。さらに、EX-FR+Ene 群には、普通食を制限量与えることに加えて、エネルギー充足のためのエネルギー補給の方法としてグルコースを自由摂食させた。なお、本実験は筑波大学における動物実験の倫理審査の承認を受け実施した。

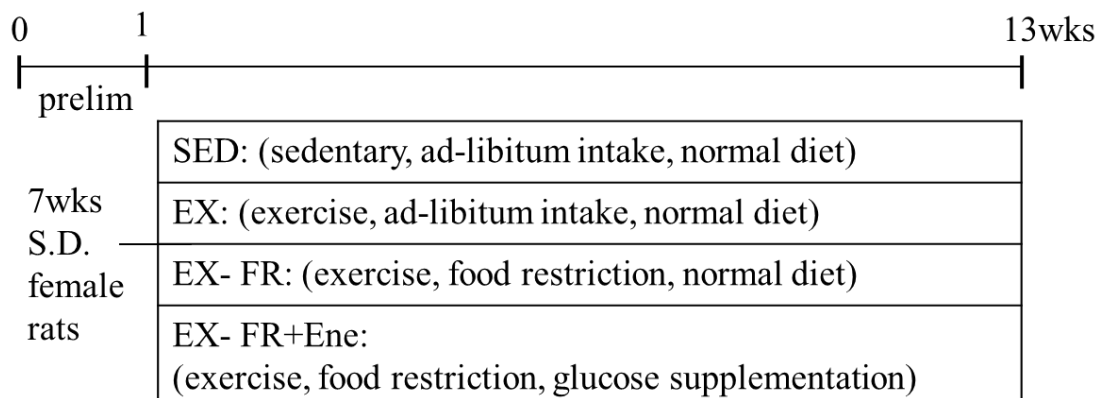


Figure 18. Experimental design.

### 3-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-III. エネルギー有効性の算出

研究課題 1-1 と同様に行った。加えて、グルコースを摂取させる EX-FR+Ene 群のエネルギー摂取量は以下のように算出した。

エネルギー摂取量 (kcal) = 3.73 (kcal) × 普通食摂取量 (g) + 3.36 (kcal) × グルコース摂取量 (g)

### 3-2-IV. 走行周期の評価

研究課題 1-2 と同様に行った。

### 3-2-V. 大腿骨重量および長さの測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-VI. 大腿骨破断強度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量，骨面積，骨密度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

### 3-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定

研究課題 1-2 と同様に行った。

### 3-2-IX. カルシウム出納の測定

研究課題 2-1 と同様に行った。

### 3-2-X. 統計処理

データは全て  $\text{mean} \pm \text{SE}$  で表した。EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ene 群の差の検定に、一元配置の分散分析を用いた。群間に有意な差が認められた場合、Tukey's 多重比較検定を行い、各群間の差を検定した。SED 群の値は運動の効果を評価するためのみに用い、EX 群と対応のない t 検定を用いて差を検討した。統計ソフトは SPSS (version 19.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用した。有意水準は 5% とした。

### 3-3. 結果

#### 3-3- I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性

実験期間中の平均摂食量, 走行距離, エネルギー有効性を Table 14 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. 総摂食量, エネルギー摂取量, 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は EX-FR 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示した. 普通食摂取量, カルシウム摂取量は, EX 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な低値を示し, 総摂食量は, EX 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示した. エネルギー摂取量, 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は EX 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった. 平均走行距離は各群間に有意な差は認められなかったものの, EX-FR 群は EX 群の 128%の走行距離となり, EX-FR 群は EX 群の 108%の走行距離となった.



**Table 14. Food intake, running distance, and energy availability.**

|  | SED         | EX                       | EX-FR                    | EX-FR+Ene                |
|--|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Normal diet intake (g/day)   | 17.8 ± 0.6* | 19.6 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>b</sup>  |
| Glucose intake (g/day)   | -           | -                        | -                        | 9.0 ± 0.5                |
| Total food intake (g/day)  | 17.8 ± 0.6* | 19.6 ± 0.3 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>c</sup>  | 21.6 ± 0.5 <sup>a</sup>  |
| Ca intake (mg/day)   | 107 ± 3*    | 118 ± 2 <sup>a</sup>     | 76 ± 0 <sup>b</sup>      | 76 ± 0 <sup>b</sup>      |
| Energy intake <sup>1</sup> (kcal/day)  | 66.3 ± 2.1* | 73.3 ± 1.2 <sup>a</sup>  | 47.3 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 77.2 ± 1.6 <sup>a</sup>  |
| Wheel running distance (km/day)  | -           | 8.7 ± 1.3                | 11.2 ± 0.7               | 9.4 ± 1.3                |
| Percentage of the power spectrum of the running distance <sup>2</sup> (rate) | -           | 0.44 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.17 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.42 ± 0.06 <sup>a</sup> |
| Exercise-induced Energy expenditure <sup>3</sup> (kcal/day)                  | -           | 11.4 ± 1.6               | 10.7 ± 0.5               | 12.0 ± 1.4               |
| Energy availability <sup>4</sup> (kcal/day)                                  | 66.3 ± 2.1  | 61.9 ± 1.4 <sup>a</sup>  | 36.5 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 65.1 ± 2.2 <sup>a</sup>  |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ene groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

<sup>1</sup> Energy intake was calculated by multiplying the amount of daily food intake in grams by the energy content of the food (normal diet, 3.73 kcal/g; glucose, 3.36 kcal/g).

<sup>2</sup> To quantify the periodic component at about 4- or 5- day observed in the temporal profile of the running distance, we estimated the power in the frequency band from 0.2 to 0.3 Hz using spectral analysis of the detrended time series. Moreover, to exclude the interindividual difference in the total power affecting the local power, we also computed the proportion of the power spectrum of the running distance from 0.2 to 0.3 Hz in the total power spectrum.

<sup>3</sup> Exercise induced energy expenditure from daily wheel running was calculated as 5.0 kcal/kg body weight times kilometers run (Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989).

<sup>4</sup> Energy availability was calculated as energy intake minus exercise energy expenditure.

### 3-3- II. 体重, 臓器重量

体重, 臓器重量を Table 15 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. 最終体重, 腹腔内脂肪重量, 足底筋重量, ヒラメ筋重量, 子宮重量, 胸腺重量は EX-FR 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示した. 各項目において, EX 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった.

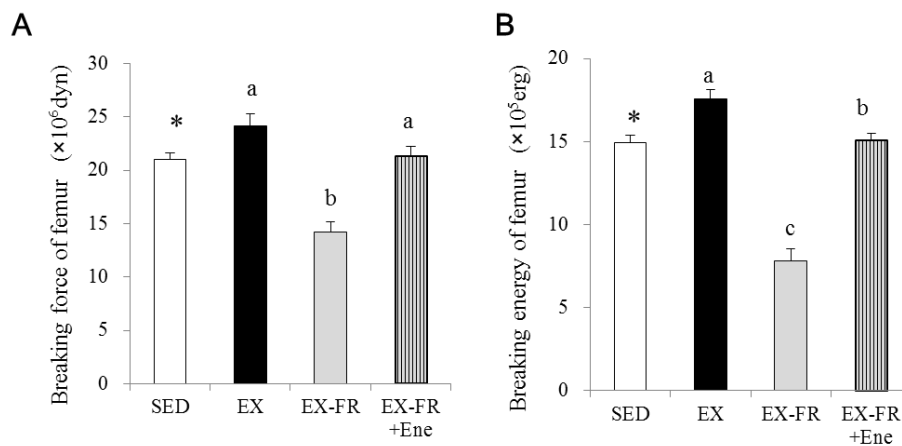
**Table 15. Body weight and internal organ weight.**

|                             | SED            | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ene                   |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Initial body weight (g)     | 208 ± 3        | 208 ± 3                    | 210 ± 4                    | 206 ± 2                     |
| Final body weight (g)       | 340 ± 15*      | 295 ± 5 <sup>a</sup>       | 194 ± 4 <sup>b</sup>       | 308 ± 12 <sup>a</sup>       |
| Abdominal fat weight (g)    | 26.0 ± 5.3*    | 12.4 ± 1.7 <sup>a</sup>    | 1.6 ± 0.2 <sup>b</sup>     | 16.3 ± 2.1 <sup>a</sup>     |
| Plantaris muscle weight (g) | 0.34 ± 0.02    | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.25 ± 0.13 <sup>b</sup>   | 0.33 ± 0.08 <sup>a</sup>    |
| Soleus muscle weight (g)    | 0.111 ± 0.005* | 0.138 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.095 ± 0.006 <sup>b</sup> | 0.131 ± 0.005 <sup>a</sup>  |
| Uterus weight (g)           | 0.53 ± 0.03    | 0.62 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 0.32 ± 0.07 <sup>b</sup>   | 0.60 ± 0.06 <sup>a</sup>    |
| Adrenal gland weight (g)    | 0.037 ± 0.001  | 0.043 ± 0.003 <sup>a</sup> | 0.033 ± 0.002 <sup>b</sup> | 0.040 ± 0.003 <sup>ab</sup> |
| Thymus weight (g)           | 0.29 ± 0.03    | 0.23 ± 0.08 <sup>ab</sup>  | 0.18 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.31 ± 0.04 <sup>a</sup>    |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ene groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 3-3-III. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーを Figure 19 に示した。SED 群，EX 群，EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である。大腿骨破断力，大腿骨破断エネルギーは，EX-FR 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示した。さらに，大腿骨破断力は，EX 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかったが，大腿骨破断エネルギーは，EX 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な低値を示した。



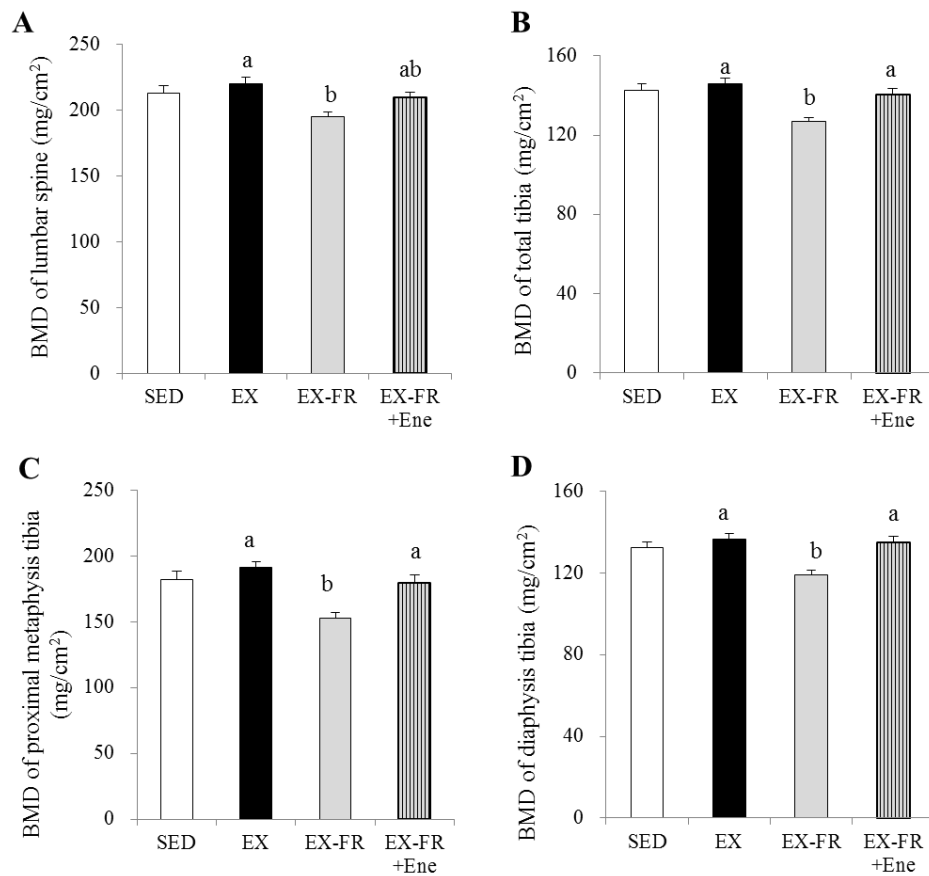
**Figure 19. Breaking force and energy of femur.**

A: Breaking force of femur. B: Breaking energy of femur

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ene groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 3-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度

腰椎骨密度, 脛骨骨密度を Figure 20 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は, EX-FR 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示した. 各項目において, EX 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった.



**Figure 20. BMD of lumbar spine and tibia.**

A: BMD of lumbar spine. B: BMD of total tibia. C: BMD of proximal metaphysis tibia. D: BMD of diaphysis tibia.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ene groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 3-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積

大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積を Table 16 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. 大腿骨湿重量, 大腿骨乾燥重量, 大腿骨灰化重量, 大腿骨長, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨総骨塩量, 脛骨総骨面積, 脛骨近位部骨塩量, 脛骨近位部骨面積, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は, EX-FR 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な高値を示し, EX 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった.

**Table 16. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.**

|   | SED           | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ene                   |
|---|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Wet weight of femur (g)                                   | 0.95 ± 0.02   | 0.92 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.74 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.89 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| Dry weight of femur (g)                                   | 0.61 ± 0.01   | 0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.46 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>    |
| Ash weight of femur (g)                                   | 0.43 ± 0.01   | 0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.40 ± 0.01 <sup>a</sup>    |
| Length of femur (cm)                                      | 3.63 ± 0.03   | 3.59 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 3.36 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 3.59 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| Major axis of femur (cm)                                  | 0.411 ± 0.007 | 0.396 ± 0.006              | 0.376 ± 0.007              | 0.396 ± 0.007               |
| Minor axis of femur (cm)                                  | 0.332 ± 0.004 | 0.338 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.316 ± 0.003 <sup>b</sup> | 0.329 ± 0.004 <sup>ab</sup> |
| BMC of lumbar (mg)  | 558 ± 26      | 545 ± 8.9 <sup>a</sup>     | 378 ± 13 <sup>b</sup>      | 529 ± 17 <sup>a</sup>       |
| Bone area of lumbar (cm <sup>2</sup> )                    | 2.61 ± 0.07   | 2.48 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 1.94 ± 0.04 <sup>b</sup>   | 2.53 ± 0.11 <sup>a</sup>    |
| BMC of total tibia (mg)                                   | 284 ± 11      | 309 ± 7 <sup>a</sup>       | 225 ± 6 <sup>b</sup>       | 302 ± 6 <sup>a</sup>        |
| Bone area of total tibia (cm <sup>2</sup> )               | 1.97 ± 0.05*  | 2.15 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 1.79 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 2.16 ± 0.04 <sup>a</sup>    |
| BMC of proximal metaphysis tibia (mg)                     | 92 ± 4        | 101 ± 3 <sup>a</sup>       | 65 ± 3 <sup>b</sup>        | 93 ± 3 <sup>a</sup>         |
| Bone area of proximal metaphysis tibia (cm <sup>2</sup> ) | 0.50 ± 0.02   | 0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.43 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.52 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| BMC of diaphysis tibia (mg)                               | 108 ± 4*      | 121 ± 2 <sup>a</sup>       | 91 ± 2 <sup>b</sup>        | 117 ± 3 <sup>a</sup>        |
| Bone area of diaphysis tibia (cm <sup>2</sup> )           | 0.80 ± 0.01*  | 0.90 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.87 ± 0.02 <sup>a</sup>    |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+Ene groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

## 2-3-VI. 骨代謝マーカー

血清 BAP, 血清 TRAP, 尿中 DPD を Table 17 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. 各項目において, EX-FR 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった.

**Table 17. Bone metabolic marker.**

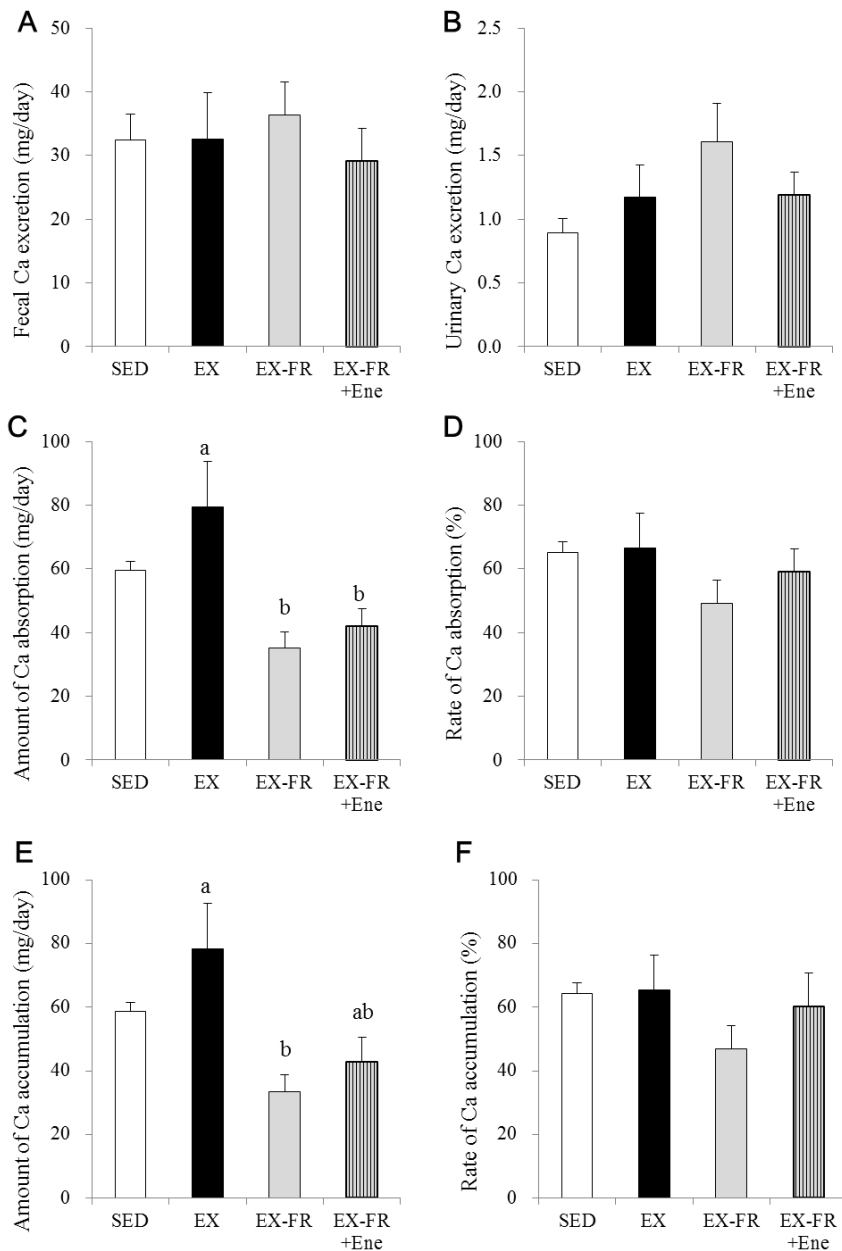
|                      | SED         | EX          | EX-FR       | EX-FR+Ene   |
|----------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Serum BAP (mU)       | 32.0 ± 4.3  | 59.4 ± 7.4  | 72.1 ± 7.8  | 47.9 ± 5.0  |
| Serum TRAP (mU)      | 11.6 ± 0.7  | 15.4 ± 1.7  | 17.9 ± 0.7  | 13.7 ± 0.9  |
| Urine DPD (nmol/day) | 3.78 ± 0.85 | 8.39 ± 1.27 | 5.09 ± 1.03 | 7.99 ± 0.83 |

Values are expressed as means ± SE.

### 3-3-VII. カルシウム出納

カルシウム出納試験の結果を Figure 21 に示した。SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である。カルシウム吸収量は, EX 群と比較して EX-FR+Ene 群が有意な低値を示した。各項目において, EX-FR 群と EX-FR+Ene 群間に有意な差は認められなかった。





**Figure 21. Ca balance study.**

A: Fecal Ca excretion. B: Urinary Ca excretion. C: Amount of Ca absorption. D: Rate of Ca absorption. E: Amount of Ca accumulation. F: Rate of Ca accumulation.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, and EX-FR+EnE groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

### 3-4. 考察

本研究では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果の検討を行った。FAT の低骨強度モデルとなる自発走運動下の食餌制限条件に対し、エネルギー補給を行い検討した。自発走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給は、エネルギー有効性、全走行周期における 4~5 日に 1 度の走行距離増加周期の割合、骨密度、骨長、骨重量、骨面積を高値とし、それぞれの項目で、自発走運動下の自由摂食条件との間に差が認められなかった。一方で、大腿骨骨強度はエネルギー補給により高値となったが、自発走運動下の自由摂食条件より低値となった。

研究課題 1-2 において、走運動と食餌制限の組み合わせは、エネルギー有効性低値により骨強度を低値とする可能性が示唆された。一方で、エネルギー有効性以外にも各種栄養素摂取量の不足が骨に悪影響を与えている可能性も考えられた。そこで、本研究では、エネルギー摂取源としてグルコース補給を用いて、各種栄養素摂取量が少ない状態での十分なエネルギー摂取量、エネルギー有効性は運動と食餌制限による低骨強度を予防するかを検討した。エネルギー補給源としてグルコースを用いた理由は、グルコースがエネルギー源となる三大栄養素の中で、骨に影響を与える可能性が高いたんぱく質や脂質 (Cashman, 2007) ではない炭水化物のためである。

体重、エネルギー摂取量、エネルギー有効性は、走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給により、走運動下の自由摂食条件との間に有意な差は認められなくなった (Table 14) (Table 15)。加えて、子宮重量、走行周期の変動は、走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給により、走運動下の自由摂食条件との間に有意な差は認められなくなった。これらの結果から、発育期ラットが走運動下で適正な成長や正常な性周期を保つためには、過度な栄養素摂取量の減少が生じない場合は、各種の栄養素摂取量より、十分なエネルギー摂取量、エネルギー有効性であることが重要な因子であることが示唆される。

平均走行距離は各群間に有意な差は認められなかったものの、自発走運動下の食餌制限

により 28%増加したことに対し、エネルギー補給を行うことで 8%増加に留まった。この結果から、自発走運動下の食餌制限により生じる過活動の兆候や食餌ストレス状態を、エネルギー充足により消失させたことが示唆される。

走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給は、骨強度を高値とした。しかしながら、その骨強度は、走運動下の自由摂食条件より低値だった (Figure 19)。我々の知る限り、エネルギーと炭水化物以外の全栄養素摂取量の減少が骨強度に与える影響を報告したものは無い。本研究の結果は、自発走運動下の食餌制限による低骨強度は、エネルギー充足単独では軽減することはできても、予防できないことを示した。

骨密度は、走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給により、走運動下の自由摂食条件との間に有意な差は認められなくなった (Figure 20)。Omi *et al.* (1998) は、発育期雌ラットにおいて自発走運動下の摂食量を安静群と同量にすると、走運動による骨密度を高値とする効果が生じなかったが、グルコース補給を行った群は骨密度が高値となったことを報告している。また、成熟雌ラットにおいて、安静条件下で炭水化物摂取量のみ減少させて、各種栄養素摂取量の制限は無く 40%エネルギー制限を行うと、骨密度が低値となることが報告されている (Talbot *et al.*, 2001) (Hawkins *et al.*, 2010)。本研究と先行研究の結果から、各種の栄養素摂取量より、エネルギー有効性が骨密度に大きな影響を与えることが示唆される。加えて、骨塩量や骨面積の結果は、骨密度の結果と同様であった (Table 16)。これらの結果から、走運動下の食餌制限による低骨強度をエネルギー充足により予防できなかった要因として、骨質の変化が影響していることが推察される。

骨長は、走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給により、走運動下の自由摂食条件との間に有意な差は認められなくなった (Table 16)。この結果から、エネルギー有効性を正常に維持することが、骨の長軸方向の成長にとって重要であることが考えられる。

骨代謝マーカーは、各群間に有意な差は認められなかったものの、自発走運動下の食餌制限により高骨代謝となることが、エネルギー補給を行うことで生じなかった (Table 17)。

この結果から、エネルギー有効性を正常に維持することが、骨代謝を正常に保つために重要であることが考えられる。

走運動下では食餌制限によりカルシウム吸収量とカルシウム蓄積量は低値となった (Figure 21)。この結果は、食餌からのカルシウム摂取量の減少によるものだと考えられる。その考えを支持する結果として、食餌制限条件でエネルギー補給を行っても、カルシウム吸収量に影響を与えなかった。一方で、カルシウム蓄積量は食餌制限条件でもエネルギー補給により、自由摂食条件と有意な差は認められなくなった (Table 15)。そのため、カルシウム吸収量が少ない中でのカルシウム蓄積には、エネルギー有効性も影響を与える要因となっていることが考えられる。さらに、骨塩量や骨灰化重量は食餌制限条件でもエネルギー補給群により、自由摂食条件と有意な差は認められなくなった。この結果より、運動条件下でエネルギー有効性を適正に保つことは、カルシウム摂取量が少ない状況において、体内に取り込んだカルシウムを骨に蓄積しやすい状態にすることが推察される。

走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給により低骨強度を軽減したことや骨長獲得阻害を予防した要因に、エネルギー有効性を正常に保つことで、エストロゲンや IGF-1 のような骨代謝に係わるホルモンの分泌異常を抑制したことが考えられる。エネルギー有効性低値は、血糖維持のため糖質コルチコイドや成長ホルモンを増加させ、摂食行動促進のためグレリンの増加やレプチンの減少を引き起こし、これらのホルモン変化がエストロゲンや IGF-1 のホルモン分泌異常を引き起こすと考えられている (Misra, 2014)。このエネルギー有効性低値による血糖維持や摂食行動促進のためのホルモン変化を、エネルギー補給により予防したことで、エストロゲンや IGF-1 のような骨代謝に係わるホルモンの分泌異常を抑制できたことが考えられる。本研究における走行距離の結果は、エネルギー補給によりコルチコステロンの増加を抑制したとする考えを支持するものであり、子宮重量や走行周期の結果は、エネルギー補給によりエストロゲンの分泌異常を抑制したとする考えを支持するものだった。

また、走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給は、過活動の兆候を消失させたことも、低骨強度を軽減したこと要因として考えられる。食餌制限条件での走行距離の増加は、エネルギー消費量を増加させエネルギー有効性を大幅な低値とし、骨強度の低値を導く可能性が考えられる。そのため、エネルギー補給により過活動の兆候を消失させたことは、エネルギー有効性低値の予防に貢献し、骨代謝に係わるホルモンの分泌やカルシウム蓄積の異常を抑制することに貢献したことで、低骨強度の軽減に寄与したことが考えられる。

一方で、エネルギーを充足しても低骨強度を軽減するにとどまり、予防できなかった原因には、各種栄養摂取量の複合的な減少が要因として考えられるが、その調節機構は不明である。カルシウムやリン、タンパク質の摂取量が同時に減少したことによる骨の構成成分の量的不足が原因なのか、それとも骨代謝に係わるホルモンの分泌異常が調節因子となったのか、今後の検討すべき課題である。

本研究の限界として、我々はエネルギー補給源としてグルコースのみを補給した。グルコース補給はエネルギー補給の影響のみならず、グルコース摂取量が高値となることによる影響を生じさせたかもしれない。高脂質低炭水化物食は骨密度の獲得が抑制したことが報告されており (Bielohuby *et al.*, 2010)、エネルギー補給源として脂質よりも炭水化物が骨強度獲得に有効であることが考えられる。一方で、発育期雄ラットにおいて、グルコース食 (50%グルコース) 飼育はフルクトース食 (40%フルクトース+10%グルコース) と比較して、骨強度、海綿骨梁厚、骨組織割合が低値となったことが報告されている (Bass *et al.*, 2013)。これらの報告から、エネルギー補給源を炭水化物として補給を行う場合でも、グルコース単独補給以外の方法を用いた場合、本研究とは異なる結果が生じる可能性が推察される。

本研究のまとめとして、発育期雌ラットにおいて、FAT の低骨強度モデルとなる自発走運動下の食餌制限条件でのエネルギー補給は骨密度、骨長、骨重量、骨塩量、骨面積が低値となることを予防した (Figure 22)。さらに、自発走運動下の食餌制限条件で生じる性周

期異常も、エネルギー補給で予防した。一方で、大腿骨骨強度は、自発走運動下の食餌制限条件でエネルギー補給により高値となるものの、自発走運動下の自由摂食条件の高骨強度状態と比較すると低値を示した。これらの結果から、FATの低骨強度モデルの低骨強度をエネルギー充足は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。加えて、FATの低骨強度モデルに生じる骨長獲得抑制や、低骨強度以外のFATの2主徴であるエネルギー有効性低値、性周期異常をエネルギー充足は予防することが明らかになった。

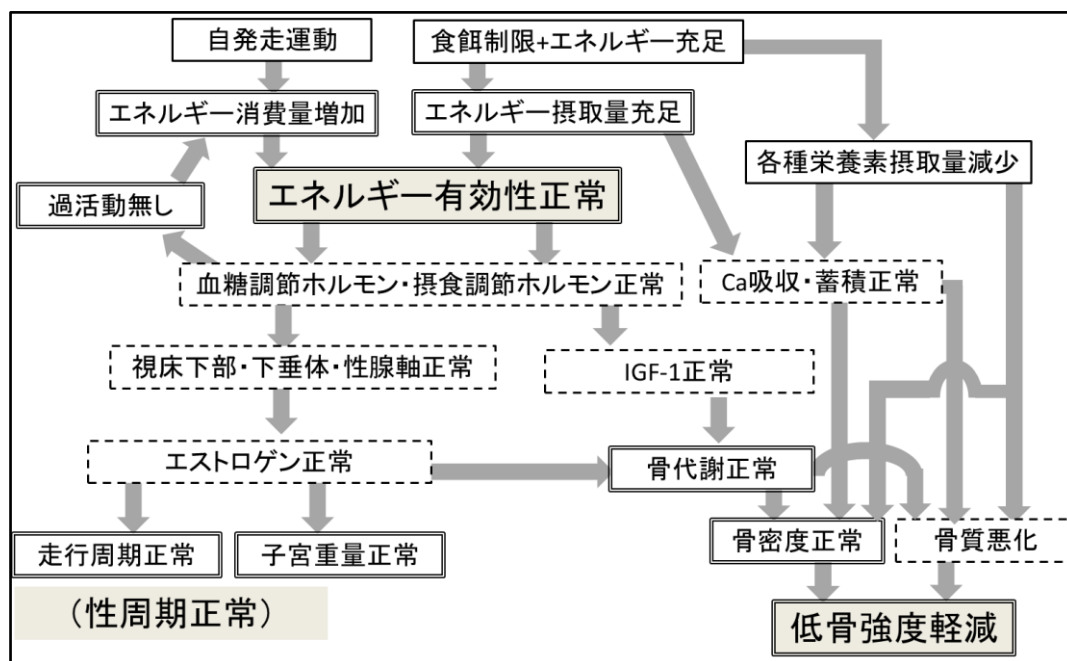


Figure 22. The summary of results in experiment 2-2.

This figure demonstrates the summary of results in experiment 2-2 and the mechanism of the preventive effect of adequate energy intake on weak bones caused by the interaction of exercise and food restriction in young female rats. The square written by line demonstrates an experiment design, the square written by double line demonstrates results, and the square written by dotted line demonstrates speculation. We consider that adequate energy intake had a positive effect on bone strength through the prevention of through low estrogen, low IGF-1, low Ca accumulation. Meanwhile, we consider that the effect was not sufficient to prevent lower bone strength because of inadequate various nutrient intakes.

## 4. 研究課題 2-3. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討

### 4-1. 目的

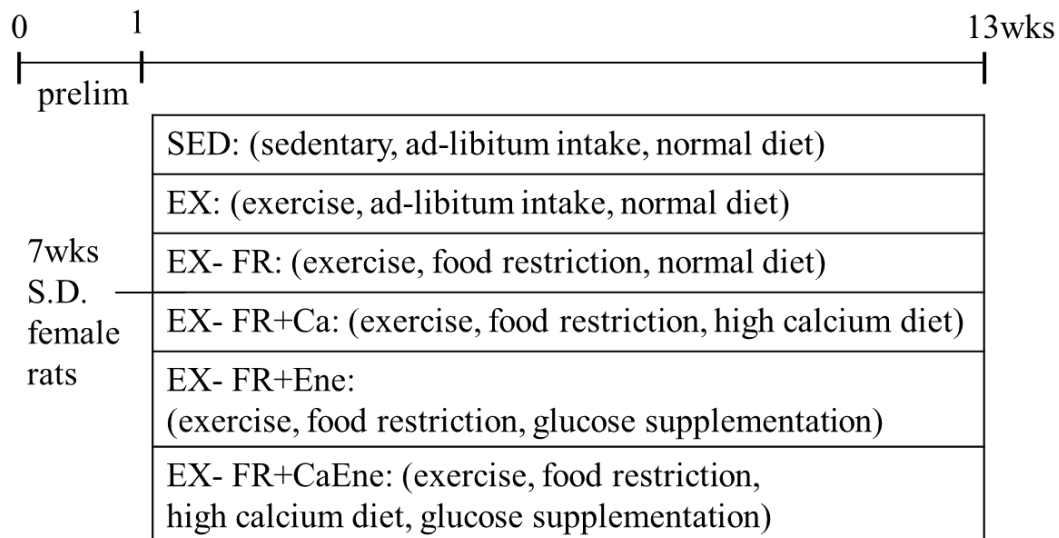
本課題では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討を行うことを目的とした。

### 4-2. 方法

#### 4-2- I. 被験動物および飼育条件

実験計画を Figure 23 に示した。7 週齢の SD 系雌ラットを 1 週間の予備飼育後に、安静群 (SED 群, n=7), 運動群 (EX 群, n=7), 運動 - 食餌制限群 (EX-FR 群, n=7), 運動 - 食餌制限 + カルシウム補給群 (EX-FR + Ca 群, n=8), 運動 - 食餌制限 + エネルギー補給群 (EX-FR + Ene 群, n=8), 運動 - 食餌制限 + エネルギー補給 + カルシウム補給群

(EX-FR + CaEne 群, n=8) に分け、12 週間の飼育を行った。運動条件, 普通食食餌組成, 飼育室環境は研究課題 1-1 と同様の方法を用いた。食餌制限は研究課題 1-2 と同様の方法を用いた。高カルシウム食は研究課題 2-1 と同様の方法を用い, エネルギー補給は研究課題 2-2 と同様の方法を用いた。



**Figure 23. Experimental design.**

#### 4-2-II. 飼育期間中および解剖時の測定・試料採取

研究課題 1-1 と同様に行った。

#### 4-2-III. エネルギー有効性の算出

研究課題 1-1, 研究課題 2-1, 研究課題 2-2 と同様に行った。加えて EX-FR+CaEne 群のエネルギー摂取量は以下のように算出した

エネルギー摂取量 (kcal) = 3.68 (kcal) × 高カルシウム食摂取量 (g) + 3.36 (kcal) ×  
グルコース摂取量 (g)

#### 4-2-IV. 走行周期の評価

研究課題 1-2 と同様に行った。

#### 4-2-V. 大腿骨重量および長さの測定

研究課題 1-1 と同様に行った。



#### 4-2-VI. 大腿骨破断強度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

#### 4-2-VII. 腰椎および脛骨骨塩量，骨面積，骨密度の測定

研究課題 1-1 と同様に行った。

#### 4-2-VIII. 骨代謝マーカーの測定

研究課題 1-2 と同様に行った。

#### 4-2-IX. カルシウム出納の測定

研究課題 2-1 と同様に行った。

#### 4-2-X. 統計処理

データは全て  $\text{mean} \pm \text{SE}$  で表した。EX 群，EX-FR 群，EX-FR+Ca 群，EX-FR+Ene 群，EX-FR+CaEne 群の差の検定に，一元配置の分散分析を用いた。群間に有意な差が認められた場合，Tukey's 多重比較検定を行い，各群間の差を検定した。SED 群の値は運動の効果を評価するためのみに用い，EX 群と対応のない t 検定を用いて差を検討した。統計ソフトは SPSS (version 19.0 J; SPSS Inc, Chicago, IL, USA) を使用した。有意水準は 5% とした。

### 4-3. 結果

#### 4-3- I. 摂食量, 走行距離, 走行周期, エネルギー有効性

実験期間中の平均摂食量, 走行距離, エネルギー有効性を Table 18 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 総摂食量, カルシウム摂取量, エネルギー摂取量, 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した. 普通食摂取量は, EX 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な低値を示し, 総摂食量, カルシウム摂取量, エネルギー摂取量は, EX 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した. 走行周期の総合スペクトルパワーにおける 0.2~0.3 ヘルツスペクトルパワー割合, エネルギー有効性は EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった.

**Table 18. Food intake, running distance, and energy availability.**

|   | SED         | EX                       | EX-FR                    | EX-FR+Ca                 | EX-FR+Ene                | EX-FR+CaEne              |
|---|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Food intake (g/day)   | 17.8 ± 0.6* | 19.6 ± 0.3 <sup>a</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.1 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>b</sup>  | 12.5 ± 0.0 <sup>b</sup>  |
| Glucose intake (g/day)  | -           | -                        | -                        | -                        | 9.0 ± 0.5                | 9.7 ± 0.4                |
| Total food intake (g/day)   | 17.8 ± 0.6* | 19.6 ± 0.3 <sup>b</sup>  | 12.6 ± 0.0 <sup>c</sup>  | 12.6 ± 0.1 <sup>c</sup>  | 21.6 ± 0.5 <sup>a</sup>  | 22.2 ± 0.4 <sup>a</sup>  |
| Ca intake (mg/day)  | 107 ± 3*    | 118 ± 2 <sup>b</sup>     | 76 ± 0 <sup>c</sup>      | 151 ± 0 <sup>a</sup>     | 76 ± 0 <sup>c</sup>      | 150 ± 0 <sup>a</sup>     |
| Energy intake <sup>1</sup> (kcal/day)   | 66.3 ± 2.1* | 73.3 ± 1.2 <sup>b</sup>  | 47.3 ± 0.1 <sup>c</sup>  | 46.4 ± 0.1 <sup>c</sup>  | 77.2 ± 1.6 <sup>a</sup>  | 78.6 ± 1.2 <sup>a</sup>  |
| Wheel running distance (km/day)   | -           | 8.7 ± 1.3                | 11.2 ± 0.7               | 10.9 ± 0.7               | 9.4 ± 1.3                | 9.0 ± 1.5                |
| Percentage of the power spectrum of the running distance <sup>2</sup> (Ratio) | -           | 0.44 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.17 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.18 ± 0.03 <sup>b</sup> | 0.42 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.55 ± 0.07 <sup>a</sup> |
| Exercise-induced Energy expenditure <sup>3</sup> (kcal/day)                   | -           | 11.4 ± 1.6               | 10.7 ± 0.5               | 10.3 ± 0.5               | 12.0 ± 1.4               | 11.7 ± 1.7               |
| Energy availability <sup>4</sup> (kcal/day)                                   | 66.3 ± 2.1  | 61.9 ± 1.4 <sup>a</sup>  | 36.5 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 36.1 ± 0.5 <sup>b</sup>  | 65.1 ± 2.2 <sup>a</sup>  | 66.8 ± 2.4 <sup>a</sup>  |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise.

\* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

<sup>1</sup> Energy intake was calculated by multiplying the amount of daily food intake in grams by the energy content of the food (normal diet, 3.73 kcal/g; high-Ca diet, 3.68 kcal/g; glucose, 3.36 kcal/g).

<sup>2</sup> To quantify the periodic component at about 4- or 5- day observed in the temporal profile of the running distance, we estimated the power in the frequency band from 0.2 to 0.3 Hz using spectral analysis of the detrended time series. Moreover, to exclude the interindividual difference in the total power affecting the local power, we also computed the proportion of the power spectrum of the running distance from 0.2 to 0.3 Hz in the total power spectrum.

<sup>3</sup> Exercise induced energy expenditure from daily wheel running was calculated as 5.0 kcal/kg body weight times kilometers run (Anantharaman-Barr & Decombaz, 1989).

<sup>4</sup> Energy availability was calculated as energy intake minus exercise energy expenditure.

#### 4-3-II. 体重, 臓器重量

体重, 臓器重量を Table 19 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 最終体重, 腹腔内脂肪重量, 足底筋重量, 子宮重量, 胸腺重量は EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した. 各項目において, EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった.

**Table 19. Body weight and internal organ weight.**

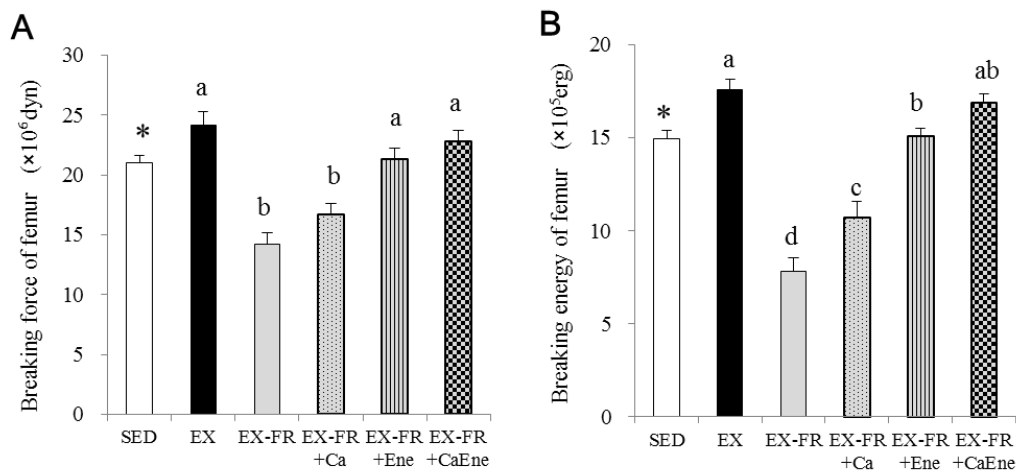
|                             | SED            | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ca                   | EX-FR+Ene                  | EX-FR+CaEne                |
|-----------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Initial body weight (g)     | 208 ± 3        | 208 ± 3                    | 210 ± 4                    | 209 ± 3                    | 209 ± 3                    | 209 ± 3                    |
| Final body weight (g)       | 340 ± 15*      | 295 ± 5 <sup>a</sup>       | 194 ± 4 <sup>b</sup>       | 187 ± 4 <sup>b</sup>       | 308 ± 12 <sup>a</sup>      | 303 ± 12 <sup>a</sup>      |
| Abdominal fat weight (g)    | 26.0 ± 5.3*    | 12.4 ± 1.7 <sup>a</sup>    | 1.6 ± 0.2 <sup>b</sup>     | 1.0 ± 0.1 <sup>b</sup>     | 16.3 ± 2.1 <sup>a</sup>    | 17.5 ± 2.7 <sup>a</sup>    |
| Plantaris muscle weight (g) | 0.34 ± 0.02    | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.25 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.23 ± 0.08 <sup>b</sup>   | 0.34 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>   |
| Soleus muscle weight(g)     | 0.111 ± 0.005* | 0.138 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.095 ± 0.006 <sup>b</sup> | 0.086 ± 0.005 <sup>b</sup> | 0.129 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.117 ± 0.005 <sup>a</sup> |
| Uterus weight (g)           | 0.53 ± 0.03    | 0.62 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 0.32 ± 0.07 <sup>b</sup>   | 0.27 ± 0.06 <sup>b</sup>   | 0.59 ± 0.06 <sup>a</sup>   | 0.57 ± 0.06 <sup>a</sup>   |
| Adrenal gland weight(g)     | 0.037 ± 0.001  | 0.043 ± 0.003              | 0.033 ± 0.002              | 0.034 ± 0.002              | 0.041 ± 0.003              | 0.040 ± 0.002              |
| Thymus weight (g)           | 0.29 ± 0.03    | 0.23 ± 0.08 <sup>ab</sup>  | 0.18 ± 0.05 <sup>ab</sup>  | 0.15 ± 0.13 <sup>b</sup>   | 0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>   | 0.27 ± 0.03 <sup>a</sup>   |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise.

\* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 4-3-III. 大腿骨破断強度

大腿骨破断力, 大腿骨破断エネルギーを Figure 24 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 大腿骨破断力, 大腿骨破断エネルギーは, EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した. EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった.



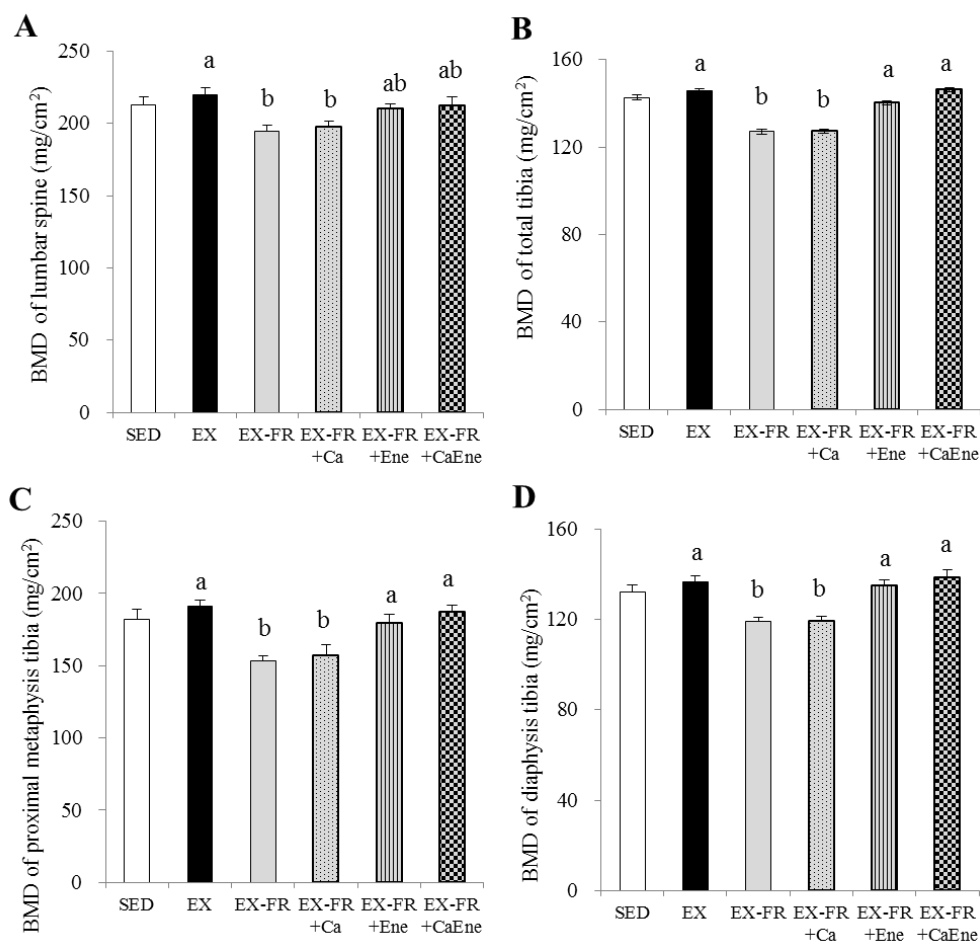
**Figure 24. Breaking force and energy of femur.**

A: Breaking force of femur. B: Breaking energy of femur

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 4-3-IV. 腰椎骨密度, 脛骨骨密度

腰椎骨密度, 脛骨骨密度を Figure 25 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 脛骨総骨密度, 脛骨近位部骨密度, 脛骨骨幹部骨密度は, EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した. 各項目において, EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった.



**Figure 25. BMD of lumbar spine and tibia.**

A: BMD of lumbar spine. B: BMD of total tibia. C: BMD of proximal metaphysis tibia. D: BMD of diaphysis tibia.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

4-3-V. 大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積

大腿骨重量, 大腿骨長, 大腿骨径, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨骨塩量, 脛骨骨面積を Table 20 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 大腿骨湿重量, 大腿骨乾燥重量, 大腿骨灰化重量, 大腿骨長, 腰椎骨塩量, 腰椎骨面積, 脛骨総骨塩量, 脛骨総骨面積, 脛骨近位部骨塩量, 脛骨近位部骨面積, 脛骨骨幹部骨塩量, 脛骨骨幹部骨面積は EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示し, EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった.



**Table 20. Bone weight, bone size, BMC, and bone area.**

|   | SED           | EX                         | EX-FR                      | EX-FR+Ca                   | EX-FR+Ene                   | EX-FR+CaEne                 |
|---|---------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Wet weight of femur (g)                                   | 0.95 ± 0.02   | 0.92 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.74 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.76 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 0.89 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 0.92 ± 0.03 <sup>a</sup>    |
| Dry weight of femur (g)                                   | 0.61 ± 0.01   | 0.60 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.46 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.49 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.59 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 0.60 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| Ash weight of femur (g)                                   | 0.43 ± 0.01   | 0.42 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.30 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.31 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.40 ± 0.01 <sup>a</sup>    | 0.42 ± 0.02 <sup>a</sup>    |
| Length of femur (cm)                                      | 3.63 ± 0.03   | 3.59 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 3.36 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 3.39 ± 0.03 <sup>b</sup>   | 3.59 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 3.61 ± 0.03 <sup>a</sup>    |
| Major axis of femur (cm)                                  | 0.411 ± 0.007 | 0.396 ± 0.006              | 0.376 ± 0.007              | 0.376 ± 0.006              | 0.396 ± 0.007               | 0.395 ± 0.006               |
| Minor axis of femur (cm)                                  | 0.332 ± 0.004 | 0.338 ± 0.005 <sup>a</sup> | 0.316 ± 0.003 <sup>b</sup> | 0.313 ± 0.003 <sup>b</sup> | 0.329 ± 0.004 <sup>ab</sup> | 0.330 ± 0.006 <sup>ab</sup> |
| BMC of lumbar (mg)  | 558 ± 26      | 545 ± 8.9 <sup>a</sup>     | 378 ± 13 <sup>b</sup>      | 406 ± 17 <sup>b</sup>      | 529 ± 17 <sup>a</sup>       | 574 ± 23 <sup>a</sup>       |
| Bone area of lumbar (cm <sup>2</sup> )                    | 2.61 ± 0.07   | 2.48 ± 0.03 <sup>a</sup>   | 1.94 ± 0.04 <sup>b</sup>   | 2.05 ± 0.06 <sup>b</sup>   | 2.53 ± 0.11 <sup>a</sup>    | 2.71 ± 0.09 <sup>a</sup>    |
| BMC of total tibia (mg)                                   | 284 ± 11      | 309 ± 7 <sup>a</sup>       | 225 ± 6 <sup>b</sup>       | 235 ± 9 <sup>b</sup>       | 302 ± 6 <sup>a</sup>        | 305 ± 11.7 <sup>a</sup>     |
| Bone area of total tibia (cm <sup>2</sup> )               | 1.97 ± 0.05*  | 2.15 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 1.79 ± 0.02 <sup>b</sup>   | 1.85 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 2.16 ± 0.04 <sup>a</sup>    | 2.08 ± 0.05 <sup>a</sup>    |
| BMC of proximal metaphysis tibia (mg)                     | 92 ± 4        | 101 ± 3 <sup>a</sup>       | 65 ± 3 <sup>b</sup>        | 71 ± 5 <sup>b</sup>        | 93 ± 3 <sup>a</sup>         | 96 ± 5 <sup>a</sup>         |
| Bone area of proximal metaphysis tibia (cm <sup>2</sup> ) | 0.50 ± 0.02   | 0.53 ± 0.01 <sup>a</sup>   | 0.43 ± 0.02 <sup>c</sup>   | 0.45 ± 0.02 <sup>bc</sup>  | 0.52 ± 0.02 <sup>ab</sup>   | 0.52 ± 0.02 <sup>ab</sup>   |
| BMC of diaphysis tibia (mg)                               | 108 ± 4*      | 121 ± 2 <sup>a</sup>       | 91 ± 2 <sup>b</sup>        | 92 ± 2 <sup>b</sup>        | 117 ± 3 <sup>a</sup>        | 118 ± 5 <sup>a</sup>        |
| Bone area of diaphysis tibia (cm <sup>2</sup> )           | 0.80 ± 0.01*  | 0.90 ± 0.02 <sup>a</sup>   | 0.77 ± 0.01 <sup>b</sup>   | 0.78 ± 0.05 <sup>b</sup>   | 0.87 ± 0.02 <sup>a</sup>    | 0.85 ± 0.02 <sup>a</sup>    |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise.

\* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 4-3-VI. 骨代謝マーカー

血清 BAP, 血清 TRAP, 尿中 DPD を Table 17 に示した. SED 群, EX 群, EX-FR 群の結果は研究課題 2-1 と同様である. SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である. 血清 BAP 活性, 血清 TRAP 活性は, EX-FR+Ca 群と比較して EX-FR+Ene, EX-FR+CaEne 群が有意な低値を示した. 尿中 DPD は, 各群間に有意な差は認められなかった.

**Table 21. Bone metabolic marker.**

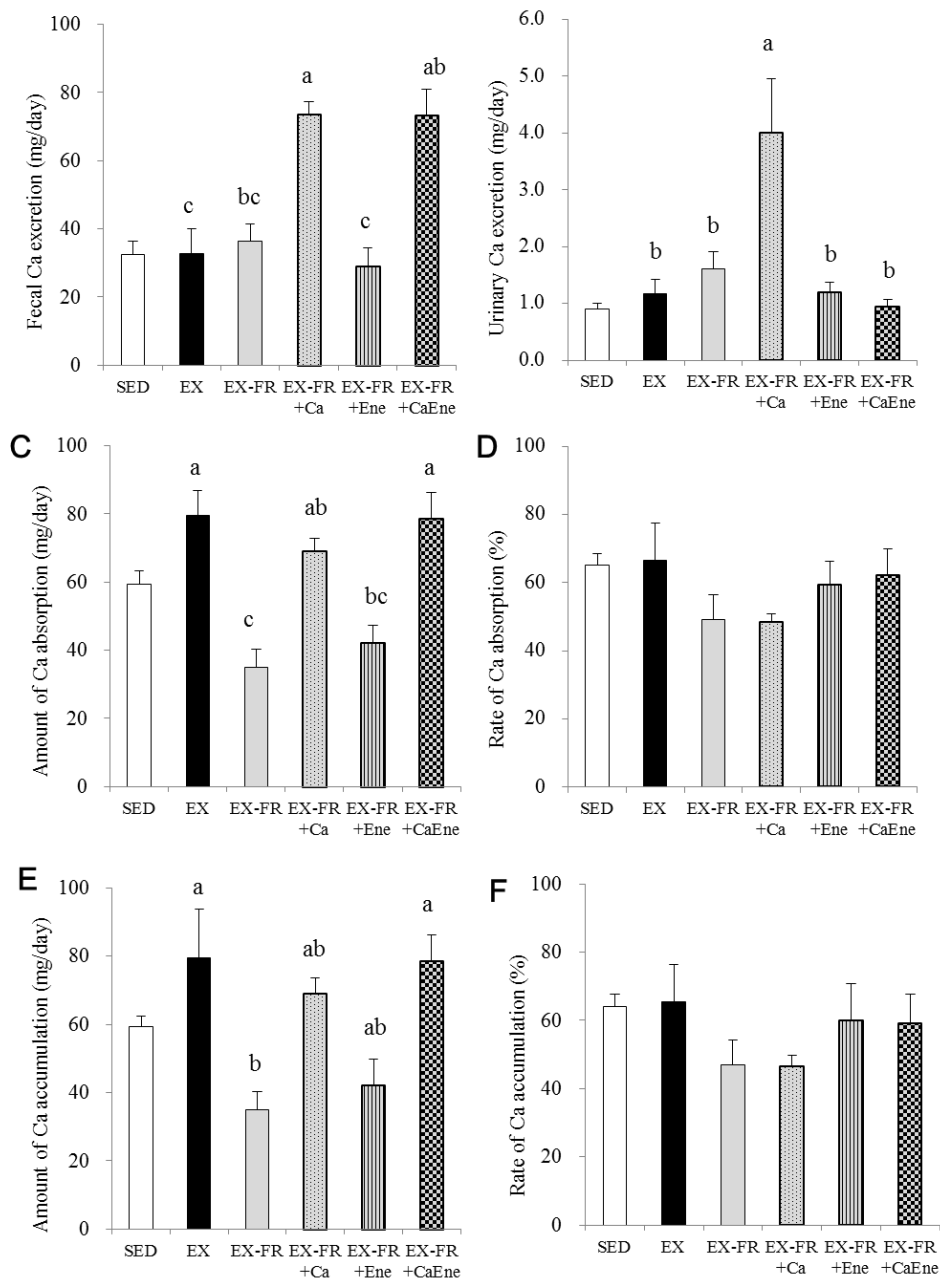
|                      | SED         | EX                       | EX-FR                    | EX-FR+Ca                | EX-FR+Ene               | EX-FR+CaEne             |
|----------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Serum BAP (mU)       | 32.0 ± 4.3  | 59.4 ± 7.4 <sup>ab</sup> | 72.1 ± 7.8 <sup>ab</sup> | 79.2 ± 9.9 <sup>a</sup> | 47.9 ± 5.0 <sup>b</sup> | 45.1 ± 3.1 <sup>b</sup> |
| Serum TRAP (mU)      | 11.6 ± 0.7  | 15.4 ± 1.7 <sup>ab</sup> | 17.9 ± 0.7 <sup>ab</sup> | 18.4 ± 1.1 <sup>a</sup> | 13.7 ± 0.9 <sup>b</sup> | 13.7 ± 0.8 <sup>b</sup> |
| Urine DPD (nmol/day) | 3.78 ± 0.85 | 8.39 ± 1.27              | 5.09 ± 1.03              | 4.38 ± 0.50             | 7.99 ± 0.83             | 8.5 ± 0.8               |

Values are expressed as means ± SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise.

\* p<0.05 for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 4-3-VII. カルシウム出納

カルシウム出納試験の結果を Figure 26 に示した。SED 群, EX 群, EX-FR 群, EX-FR+Ca 群, EX-FR+Ene 群の結果は研究課題 2-1, 2-2 と同様である。カルシウム吸収量, カルシウム蓄積量は, EX-FR 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示した。また, 糞中カルシウム排出量は EX 群と比較して EX-FR+CaEne 群が有意な高値を示し, カルシウム吸収量, カルシウム蓄積量は, EX 群と EX-FR+CaEne 群間に有意な差は認められなかった。



**Figure 26. Ca balance study.**

A: Fecal Ca excretion. B: Urinary Ca excretion. C: Amount of Ca absorption. D: Rate of Ca absorption. E: Amount of Ca accumulation. F: Rate of Ca accumulation.

Bars are expressed as means  $\pm$  SE. Unpaired t tests were used to compare results for SED group and EX group to assess the effect of exercise. \*  $p < 0.05$  for versus EX group. Data in EX, EX-FR, EX-FR+Ca, EX-FR+Ene, and EX-FR+CaEne groups were analyzed by the Tukey's post hoc comparison test. Means with unlike alphabet are significantly different.

#### 4-4. 考察

本研究では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討を行った。FAT の低骨強度モデルとなる自発走運動下の食餌制限条件に対し、高カルシウム食とエネルギー補給を行い検討した。その結果、エネルギー有効性、全走行周期における 4~5 日に 1 度の走行距離増加周期の割合、骨強度、骨密度、骨長、骨重量、骨面積、カルシウム蓄積量は、自発走運動下の自由摂食条件との間に有意な差は認められなかった。

カルシウム摂取量は、走運動下の自由摂食条件と比較して走運動下の食餌制限条件での高カルシウム食とエネルギー補給併用により高値となったものの (Table 18)、カルシウム吸収量、カルシウム蓄積量に有意な差は認められなかった (Figure 26)。この結果から、運動条件下でエネルギー摂取量が充分にある状態でも、余分に摂取したカルシウムは、体内に取り込まれないことが示唆される。そのため、走運動下でエネルギー摂取量が充分であり、豊富なカルシウム摂取量であっても、豊富なカルシウム蓄積による骨強度増加効果は生じないことが考えられる。しかし、走運動下の食餌制限条件による骨強度の低値を、高カルシウム摂取単独やエネルギー充足単独では予防できなかったものが、二策を併用することで予防できた要因には、エネルギー補給によるホルモン分泌異常抑制や過活動抑制効果に加えて、高カルシウム食により IGF-1 が高値となることが調節因子として貢献したことが推察される。

本研究のまとめとして、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は予防することが明らかになった (Figure 27)。

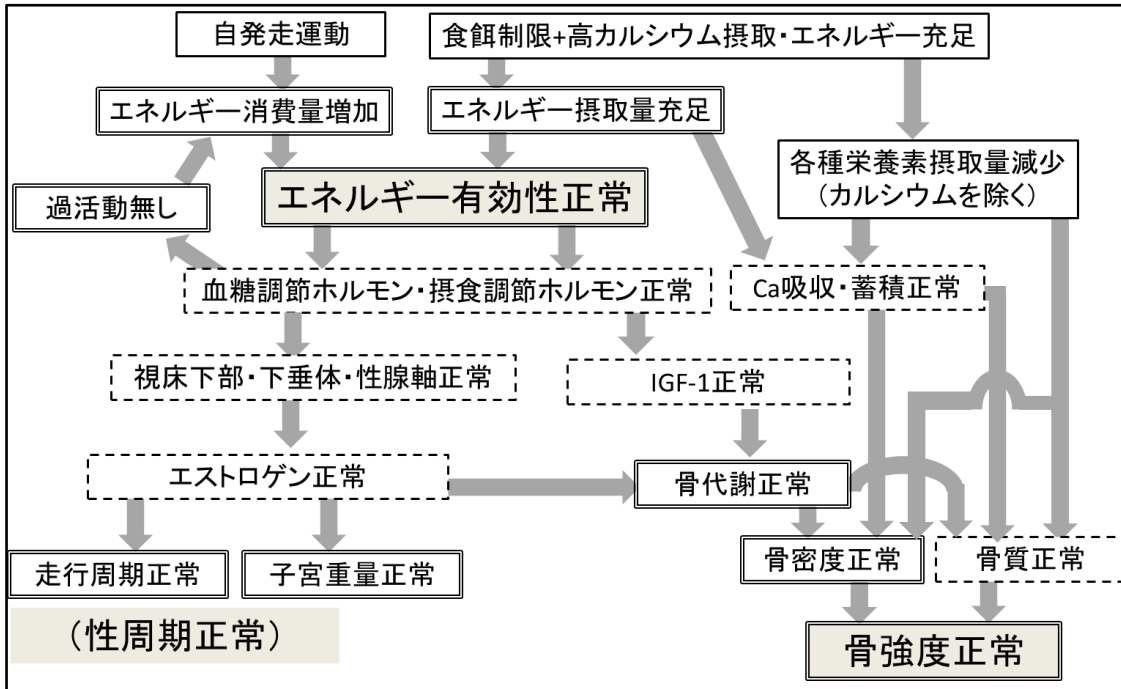


Figure 27. The summary of results in experiment 2-3.

This figure demonstrates the summary of results in experiment 2-3 and the mechanism of the preventive effect of calcium supplementation and adequate energy intake on weak bones caused by the interaction of exercise and food restriction in young female rats. The square written by line demonstrates an experiment design, the square written by double line demonstrates results, and the square written by dotted line demonstrates speculation.

## 5. 要約

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するカルシウム補給・エネルギー充足の単独と併用による予防効果の検討を行い、以下の知見を得た。

研究課題 2-1 では、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。加えて、FAT の低骨強度モデルに生じる骨長獲得抑制や、低骨強度以外の FAT の 2 主徴であるエネルギー有効性低値、性周期異常に、高カルシウム摂取は影響を与えないことが明らかになった。

研究課題 2-2 では、FAT の低骨強度モデルの低骨強度をエネルギー充足は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。加えて、FAT の低骨強度モデルに生じる骨長獲得抑制や、低骨強度以外の FAT の 2 主徴であるエネルギー有効性低値、性周期異常をエネルギー充足は予防することが明らかになった。

研究課題 2-3 では、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は予防することが明らかになった。



## VI章 総合討論

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果を明らかにすることを目的とし、2つの研究課題を設定した。研究課題1では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを作成し、研究課題2では、そのモデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果の検討を行った。

### 1. 発育期ラットにおいて自発走運動と食餌制限により作成された FAT の低骨強度モデルの意義

荷重運動による骨への荷重負荷は骨量を増加させる効果があり (Klein-Nulend *et al.*, 2012), 日常的に荷重運動を行っているスポーツ競技者は非競技者よりも骨密度が高値となる一方で (Bennell *et al.*, 1997) (Duncan *et al.*, 2002) (Greene *et al.*, 2005) (Nichol *et al.*, 2007), 食事量の減少等により骨密度が低値となる女性競技者も存在する (Nichols *et al.*, 2006) (Barrack *et al.*, 2008) (Hoch *et al.*, 2009). その低骨密度は FAT の 1 主徴として問題視されており (Nattiv *et al.*, 2007), 思春期における FAT の低骨密度は早期に介入が求められる重要な課題である。その予防策の検討には、動物モデルを用いることが有効な手段である。そのため、本研究では、発育期ラットにおいて、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる FAT の低骨強度モデルを自発走運動と食餌制限を用いて作成し、予防策の検討を行うこととした。

研究課題 1-1 では、発育期雌ラットにおいて自発走運動を行わせることで骨強度が高値になることが確認された。このことは、習慣的な走運動により骨強度が高値となるという点で走競技者と一致すると考えられる。FAT の低骨強度が生じる危険性が高い思春期女性走

技者と同様に、食事量の減少やエネルギー消費量の大幅な増加といった制限要因がなければ自発走運動は高骨強度を導く運動条件であることが確認されたため、自発走運動が FAT の低骨強度モデルの作成するための妥当な運動方法であると考えられる。

研究課題 1-2 では、発育期雌ラットにおいて自発走運動下の食餌制限により骨強度が低値となることが明らかになった。このことから、発育期ラットにおいて、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる状態を再現した FAT の低骨強度モデルを、自発走運動と食餌制限を用いて作成することができたと考えられる。先行研究では、自発走運動下の食餌制限は、成熟期雌ラットにおいて低骨塩量 (Dimarco *et al.*, 2007) や低骨密度 (Yanaka *et al.*, 2012) を引き起こすこと、発育期雄ラットにおいて低骨強度や低骨密度を引き起こすこと (Hattori *et al.*, 2014) が報告されている。しかし、発育期雌ラットにおける報告はこれまでに無かった。思春期女性と同様に、成熟が始まり、骨量獲得が増進する発育期ラットにおいて、自発走運動下の食餌制限が骨強度の低値を引き起こすことを明らかにしたことは、早期に介入が求められる思春期における FAT の低骨強度の予防策の検討を可能にする、意義深いことであると考えられる。

さらに、この FAT の低骨強度モデルとなるラットは、骨状態以外では次のような特徴を持った。(1) 習慣的に長距離の走運動を行い、過剰に近い運動量、(2) 食餌量の減少、(3) エネルギー有効性低値。加えて、次のような特徴を持つことが推察される。(4) 性周期異常 (走行周期の乱れより)、(5) エストロゲン分泌量減少 (子宮重量、骨代謝マーカーより)、(6) ストレス状態 (走行距離の過活動の兆候より)。これらのことから、本研究の FAT の低骨強度モデルとなるラットは、FAT の低骨強度を有する女性競技者の中でも、先に示した (1) ~ (6) の特徴もつ思春期女性競技者と類似した状態であった。例えば、自ら練習を組み立てつつも食事量の減少も相まってストレス状態となり、それによって過度な運動を行い、その結果、エネルギー有効性の大幅な低値、月経障害を有して、低骨強度となるような、FAT の 3 主徴を有する思春期女性走競技者と類似した状態となった。また、(2)

と（6）の特徴や体重の低値，過活動の兆候を生じさせた点において，神経性食欲不振症の状態（Hebebrand *et al.*, 2003）（Misra *et al.*, 2003）と近い状態を再現したと考えられる．本研究の FAT の低骨強度モデルに対して明らかとなった予防策の効果は，上記に例示したようなヒトに対し応用性が高く，同様の効果が得られやすいことが考えられる．

一方で，本研究の FAT の低骨強度モデルとなるラットは，（A）規則的，強制的な運動実施や（B）摂食能力の減少の特徴を持たなかった．これらのことから，例えば，チームに所属し，指示の元で走練習を行い，それが負荷となり摂食量が減少する食欲不振症の思春期女性走競技者や，神経性食欲不振症の中でも摂食能力や摂食意欲が減少する者とは異なる状態だった．そのようなヒトに対し，本研究の FAT の低骨強度モデルに対して明らかとなった予防策の効果は応用性が高くないと考えられる．摂食能力や摂食意欲が減少した神経性食欲不振症や，それにより FAT の低骨強度となる競技者を模した状態をラットに再現するのであれば，本研究で用いた 30%食餌制限よりも，過度な食餌制限と自発走運動を組み合わせる方法により活動性食欲不振モデルとする方法（Routtenberg *et al.*, 1967）（Gutierrez *et al.*, 2013）が考えられるが，そのモデルは中長期的には餓死を招く可能性があり，骨の状態の検討は困難である．Takeda *et al.*（2012）の，発育期雄ラットにおいて 27-30m/min×60min のトレッドミル走運動を行わせることで摂食量が減少するという報告を参考に，トレッドミル走運動の負荷強度別による摂食量および骨への影響について検討をおこなうことで，本研究とは異なる，規則的，強制的に運動を実施しつつ，摂食能力，摂食意欲が減少して FAT の低骨強度に苦しむ競技者モデルの作成ができると考えられる．

また，発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限は骨長を低値とすることを明らかにした（研究課題 1-2）．このことは，思春期女性競技者の食事量減少は身長獲得を抑制する可能性を示唆するものであり，競技種目によっては競技力向上の妨げになることが大いに考えられる，重要な発見である．

加えて，本実験では，食餌制限条件での自発走運動は，食餌制限条件の安静状態よりも

骨強度を低値とすることを明らかにした（研究課題 1-2）。これは、骨強度を高める効果を持つとされてきた荷重運動が、条件によっては正反対の効果が生じることを明らかにしたものであり、非常に意義深い。本実験の結果は、運動者にとって食事量の減少が骨に悪影響を及ぼすのみならず、食事量が減少した者にとって運動は骨に悪影響を及ぼす危険性を提唱するものである。

## 2. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果と骨強度決定因子への影響

思春期における FAT の低骨密度の予防策として、骨の材料となるカルシウムを多く摂取すること（Manore, 2002）（Meyer *et al.*, 2007）（Nattiv *et al.*, 2007）や、エネルギー有効性を適正に保つために十分なエネルギーを摂取すること（Nattiv *et al.*, 2007）があげられているが、その効果は明らかになっていない。研究課題 1 において、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを作成したことにより、予防策の効果の検討が可能になった。

本課題では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するカルシウム補給・エネルギー充足の単独と併用による予防効果の検討を行った。結果、高カルシウム摂取単独とエネルギー充足単独は低骨強度を軽減するものの、予防しないこと（研究課題 2-1）（研究課題 2-2）、高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は低骨強度を予防すること（研究課題 2-3）が明らかになった。また、高カルシウム摂取はエネルギー有効性低値、性周期異常、低骨密度、低骨量、低骨長は影響を与えず、エネルギー充足はそれらを予防することが明らかになった。

本課題での骨の測定項目の結果から、高カルシウム摂取が FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値としたことや、FAT の低骨強度モデルにエネルギー充足を行っても、走運動下自由摂食の高骨強度状態より骨強度が低値となったことは、骨質の違いによるものと推

察される。研究課題 2-1 において、高カルシウム摂取は FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値としたものの、骨量や骨密度は影響を与えなかった。Viguet-Carrin *et al.* (2014) は、安静、自由摂食条件では高カルシウム食は、骨強度を高値としたが骨密度や骨微細構造、骨形態、骨代謝状態に影響を与えなかったことを報告している。Viguet-Carrin *et al.* (2014) が測定を行っていない、骨の炭酸塩/リン酸塩比や、コラーゲン成熟度、骨結晶化度などの骨質の状態を調べていくことで、高カルシウム摂取が骨強度を高めた因子を解明することができるかもしれない。また、研究課題 2-2 において、エネルギー充足により、FAT の低骨強度モデルの骨強度は走運動下自由摂食の高骨強度状態より低値となったが、骨強度の決定因子である骨密度、骨塩量、骨量は、走運動下自由摂食の状態と有意な差は認められなくなった。この結果から、エネルギー以外の各種栄養素摂取量が 30%低下することにより生じた骨強度の低値は、骨質の低下による可能性が考えられる。その考察に対し、研究課題 2-3 の結果が更なる知見を加えた。高カルシウム摂取・エネルギー充足の併用により、FAT の低骨強度モデルの骨強度は、走運動下自由摂食の骨強度と有意な差は認められなくなった。運動条件下の食餌制限により骨強度が低値となることに対し、エネルギー充足のみでは骨質の低下を防げずに骨強度が低値となるところを、高カルシウム摂取により骨質の低下を抑制する効果を加えることで、骨強度が低値となることを予防したのではないかと推察される。また、研究課題 2-3 の結果は、研究課題 2-1 の高カルシウム摂取が FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値としたことや、エネルギー充足によっても FAT の低骨強度モデルの骨強度は走運動下自由摂食の骨強度より低値となったことが、骨質の違いによるとする考察を支持するものだったと言える。今後、各予防策で骨強度の違いが生じた要因について、骨構造や骨の炭酸塩/リン酸塩比、コラーゲン成熟度、骨結晶化度などの骨質の観点を中心に、更なる検討が必要だろう。

### 3. 本研究の限界と今後の課題

本研究では、発育期ラットにおいて FAT の低骨強度モデルを作成するため、自発走運動下の食餌制限を用いた。これは、FAT の低骨密度の要因として、運動条件に食事量の減少が加わることがあるためである (Nattiv *et al.*, 2007)。しかし、FAT の低骨強度は、食事量減少を伴わない月経異常や、ホルモン分泌異常等が原因となることもある。本研究において明らかとなった FAT の低骨強度に対するカルシウム補給・エネルギー充足の予防効果は、食事量減少による FAT の低骨強度に対する限定的なものであると考えられる。

また、本研究で FAT の低骨強度モデルの作成に用いた方法は、自発走運動と 30%食餌制限である。この方法により作成されたモデルは、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる状態を再現できたものの、運動環境や摂食能力は、食事量減少により FAT の低骨強度となる全ての女性競技者を網羅したものではない。神経性食欲不振症の女性競技者に近い状態や強制的な運動環境をラットに再現するのであれば、自発走運動下での 30%以上の過度な食餌制限や、トレッドミル走による運動を行わせるなど、本研究とは異なる方法を選択する必要がある。

また、運動は自発走運動、食餌制限は 30%食餌量制限、カルシウム補給は 1.2%カルシウム含有食、エネルギー補給はグルコースの自由摂食を用いた。自発走運動は荷重運動かつエネルギー消費量の増加を伴い、摂食量が増加する運動である。30%食餌量制限は、エネルギー摂取量と各種栄養素摂取量を制限しつつも、特定の栄養素単独の摂取量の制限による影響は少ないと考えられるものである。1.2%カルシウム含有食は、必要量以上の豊富なカルシウム摂取量にすることで、骨強度の増加を狙ったものである。グルコースの自由摂食は、エネルギー摂取量を充分量にすることを意図したものである。それぞれの方法が、異なる量や異なる種類の方法を用いれば、骨に対する影響は異なる可能性が考えられる。

今後は、本研究の各予防策により骨強度の違いが生じた要因について検討が不十分なため、骨構造、骨代謝状態、骨の化学組成といった骨質の観点を加えて更なる検討を行って

いくことや、本研究における骨強度の調節機構の解明のためエストロゲンや IGF-1 をはじめとする骨代謝に係わるホルモン変動について、検討する必要がある。さらに、本研究の知見をもとに、食餌制限量が異なる条件においての運動が骨強度へ与える影響の違いの検討や、体重制限が必要な競技者のために体重の増加を伴わずして骨強度の獲得抑制を予防する方法の検討、自発的に摂食量が抑制される運動負荷に対する予防策等について検討を行うことが、思春期における FAT の低骨強度の問題を解決することに貢献できるものと考えられる。

## VII章 要約と結論

### 1. 要約

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果を明らかにすることを目的とした。研究課題 1 では、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを作成し、研究課題 2 では、そのモデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果を行った。

#### **【研究課題 1】 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの作成**

##### 研究課題 1-1. 発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認

発育期雌ラットにおける自発走運動が骨強度に与える効果の確認を行った。その結果、大腿骨強度を高値とすることが確認された。これは、習慣的な走運動により骨強度が高値となるという点で走競技者と一致すると考えられ、FAT の低骨強度モデルの作成するための妥当な運動方法であることが確認された。

##### 研究課題 1-2. 発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響の検討

発育期雌ラットにおける自発走運動下の食餌制限が骨強度に及ぼす影響を検討した。さらに、自発走運動と食餌制限が骨に影響を及ぼす際の交互作用や、骨長への影響についても併せて検討を行った。その結果、自発走運動下の食餌制限は骨強度を低値とすることが明らかになった。また、エネルギー有効性低値、走行周期異常、子宮重量低値、骨長の獲得抑制を引き起こした。走行周期異常、子宮重量低値は性周期異常であることを示唆する結果である。さらに、自発走運動と食餌制限の組み合わせは発育期雌ラットの骨に対して



有意な交互作用を有し、食餌制限単独よりも骨強度や骨長を低値とすることが明らかになった。

以上、研究課題 1 より、高骨強度を導く運動条件下でも骨強度が低値となる FAT の低骨強度モデルを、自発走運動と食餌制限を用いて作成することができたと考えられる。

さらに、この FAT の低骨強度モデルとなるラットは、骨状態以外では（1）習慣的に走運動を行い、過剰に近い運動量、（2）食餌量の減少、（3）エネルギー有効性低値を有するものであり、（4）性周期異常、（5）エストロゲン分泌量減少、（6）ストレス状態を有することが推察される。

本課題で作成した上記の特徴をもつ発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルを用いて、研究課題 2 では栄養による予防策の検討を行った。

## **【研究課題 2】 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足の予防効果の検討**

### 研究課題 2-1. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果の検討

高カルシウム食を用いて、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取の予防効果を検討した。その結果、高カルシウム摂取は FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値とした。しかし、その骨強度は走運動下自由摂食の高骨強度状態より低値だった。以上の結果から、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。

### 研究課題 2-2. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果の検討

グルコースを自由摂食させるエネルギー補給方法を用いて、発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対するエネルギー充足の予防効果を検討した。その結果、エネルギー充足は FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値とした。しかし、その骨強度は走運動下自由摂食の高骨強度状態より低値だった。以上の結果から、FAT の低骨強度モデルの低骨強度をエネルギー充足は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。一方で、FAT の低骨強度モデルのエネルギー有効性低値、性周期異常、低骨密度、低骨長をエネルギー充足は予防した。

### 研究課題 2-3. 発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討

FAT の低骨強度モデルに対する高カルシウム摂取・エネルギー充足併用の予防効果の検討を行った。その結果、高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は FAT の低骨強度モデルの骨強度を高値とし、走運動下自由摂食の高骨強度状態と有意な差は認められなくなった。以上の結果から、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は予防することが明らかになった。

## 2. 結論

発育期ラットにおける FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取単独、エネルギー充足単独は軽減するものの、予防しないことが明らかになった。さらに、FAT の低骨強度モデルの低骨強度を高カルシウム摂取・エネルギー充足併用は予防することが明らかになった。

## 謝辞

本稿を終えるにあたり，博士前期課程および後期課程にわたり終始懇切丁寧なご指導を賜りました麻見直美准教授に対し深く感謝致します．また，ご多忙の中，審査を引き受けて頂いた大森肇教授，征矢英昭教授，向井直樹准教授には貴重なご指導とご助言を賜りました．諸先生方に深く感謝致します．そして，本研究に際し適宜ご助言とご協力を頂いた麻見研究室諸氏，心身を支えて下さった家族，友人に深くお礼申し上げます．

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

## 参考文献

Ackerman KE, Misra M. 2011. Bone health and the female athlete triad in adolescent athletes. *Phys Sportsmed.* 39(1):131-141.

Ahles CP, Singh H, Joo W, Lee Y, Lee LC, Colazas W, Pierce RA, Prakash A, Jaque SV, Sumida KD. 2013. High volumes of resistance exercise are not required for greater bone mineral density during growth. *Med Sci Sports Exerc.* 45(1):36-42.

Ammann P, Rizzoli R. 2003. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int.* 14 (Suppl 3):S13-S18.

Anantharaman-Barr HG, Decombaz J. 1989. The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats. *Physiol Behav.* 46(2):259-263.

Barrack MT, Rauh MJ, Nichols JF. 2008. Prevalence of and traits associated with low BMD among female adolescent runners. *Med Sci Sports Exerc.* 40(12):2015-2021.

Barrack MT, Van Loan MD, Rauh MJ, Nichols JF. 2010. Physiologic and behavioral indicators of energy deficiency in female adolescent runners with elevated bone turnover. *Am J Clin Nutr.* 92(3):652-659.

Barrack MT, Van Loan MD, Rauh MJ, Nichols JF. 2011. Body mass, training, menses,

and bone in adolescent runners: a 3-year followup. *Med Sci Sports Exerc.* 43(6):959-966.

Barrack MT, Ackerman KE, Gibbs JC. 2013. Update on the female athlete triad. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 6(2):195-204.

Bass EF, Baile CA, Lewis RD, Giraudo SQ. 2013. Bone quality and strength are greater in growing male rats fed fructose compared with glucose. *Nutr Res.* 33(12):1063-1071.

Benhamou CL. 2007. Effects of osteoporosis medications on bone quality. *Joint Bone Spine.* 74(1):39-47.

Bennell KL, Malcolm SA, Khan KM, Thomas SA, Reid SJ, Brukner PD, Ebeling PR, Wark JD. 1997. Bone mass and bone turnover in power athletes, endurance athletes, and controls: a 12-month longitudinal study. *Bone.* 20(5):477-484.

Bielohuby M, Matsuura M, Herbach N, Kienzle E, Slawik M, Hoefflich A, Bidlingmaier M. 2010. Short-term exposure to low-carbohydrate, high-fat diets induces low bone mineral density and reduces bone formation in rats. *J Bone Miner Res.* 25(2):275-284.

Borer KT. 2005. Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Med.* 35(9):779-830.

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):448-454.

Breen KM, Davis TL, Doro LC, Nett TM, Oakley AE, Padmanabhan V, Rispoli LA, Wagenmaker ER, Karsch FJ. 2008. Insight into the neuroendocrine site and cellular mechanism by which cortisol suppresses pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology.* 149(2):767-773.

Cashman KD, Flynn A. 1996. Effect of dietary calcium intake and meal calcium content on calcium absorption in the rat. *Br J Nutr.* 76(3):463-470.

Cashman KD. 2007. Diet, nutrition, and bone health. *J Nutr.* 137(11 Suppl):S2507-S2512.

Celi M, Rao C, Scialdoni A, Tempesta V, Gasbarra E, Pistillo P, Tarantino U. 2013. Bone mineral density evaluation in osteoporosis: why yes and why not? *Aging Clin Exp Res.* 25 (Suppl 1):S47-S49.

Chen H, Hayakawa D, Emura S, Ozawa Y, Okumura T, Shoumura S. 2002. Effect of low or high dietary calcium on the morphology of the rat femur. *Histol Histopathol.* 17(4):1129-1135.

Cifuentes M, Morano AB, Chowdhury HA, Shapses SA. 2002. Energy restriction

reduces fractional calcium absorption in mature obese and lean rats. *J Nutr.* 132(9):2660-2666.

Clarke B. 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 3 (Suppl 3):S131-S139.

Coelho GM, Gomes AI, Ribeiro BG, Soares Ede A. 2014. Prevention of eating disorders in female athletes. *J Sports Med.* 12(5):105-113.

Compston JE. 2001. Sex steroids and bone. *Physiol Rev.* 81(1):419-447.

Creedon A, Cashman KD. 2001. The effect of calcium intake on bone composition and bone resorption in the young growing rat. *Br J Nutr.* 86(4):453-459.

Cumming DC. 1996. Exercise-associated amenorrhea, low bone density, and estrogen replacement therapy. *Arch. Intern. Med.* 156(19):2193-2195.

Davies JH, Evans BA, Gregory JW. 2005. Bone mass acquisition in healthy children. *Arch Dis Child.* 90(4):373-378.

De Souza MJ, 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):383-391.

De Moss DL, Wright GL. 1998. Sex and strain differences in whole skeletal development in the rat. *Calcif Tissue Int.* 62(2):153-157.

De Souza MJ, Nattiv A, Joy E, Misra M, Williams NI, Mallinson RJ, Gibbs JC, Olmsted M, Goolsby M, Matheson G; Expert Panel. 2014. Female Athlete Triad Coalition Consensus Statement on Treatment and Return to Play of the Female Athlete Triad: 1st International Conference held in San Francisco, California, May 2012 and 2nd International Conference held in Indianapolis, Indiana, May 2013. *Br J Sports Med.* 48(4):289.

Dibba B, Prentice A, Ceesay M, Stirling DM, Cole TJ, Poskitt EM. 2000. Effect of calcium supplementation on bone mineral accretion in gambian children accustomed to a low-calcium diet. *Am J Clin Nutr.* 71(2):544-549.

Dimarco NM, Dart L, Sanborn CB. 2007. Modified activitystress paradigm in an animal model of the female athlete triad. *J Appl Physiol* 103(5):1469-1478.

Drinkwater BL, Bruemner B, Chesnut CH 3rd. 1990. Menstrual history as a determinant of current bone density in young athletes. *JAMA.* 263(4):545-548.

Duncan CS, Blimkie CJ, Cowell CT, Burke ST, Briody JN, Howman-Giles R. 2002. Bone mineral density in adolescent female athletes: relationship to exercise type and muscle strength. *Med Sci Sports Exerc.* 34(2):286-294.



Duclos M, Gatti C, Bessière B, Mormède P. 2009. Tonic and phasic effects of corticosterone on food restriction-induced hyperactivity in rats.

*Psychoneuroendocrinology*. 34(3):436-445.

Erben RG, Brunner KS, Breig B. 2004. Long-term sensitivity of uterus and hypothalamus/pituitary axis to 17 beta-estradiol is higher than that of bone in rats. *J Bone Miner Res*. 19(11):1827-1832.

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. *Nippon Eiyo Shokuryo Gakkaishi. J Jpn Soc Food Nutr*. 32(5):329-335.

Fogelholm M. 1994. Effects of bodyweight reduction on sports performance. *Sports Med*.

18(4):249-267.

Gala J, Díaz-Curiel M, de la Piedra C, Calero J. 2001. Short- and long-term effects of calcium and exercise on bone mineral density in ovariectomized rats. *Br J Nutr*.

86(4):521-527.

Golden NH, Abrams SA; Committee on Nutrition. 2014. Optimizing bone health in children and adolescents. *Pediatrics*. 134(4):e1229-e1243.

Greene DA, Naughton GA, Briody JN, Kemp A, Woodhead H, Corrigan L. 2005. Bone strength index in adolescent girls: does physical activity make a difference? *Br J Sports*

Med. 39(9):622-627.

Gutierrez E. 2013. A rat in the labyrinth of anorexia nervosa: contributions of the activity-based anorexia rodent model to the understanding of anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 46(4):289-301.

Hadjidakis DJ, Androulakis II. 2006. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 1092:385-396.

Hartman D, Crisp A, Rooney B, Rackow C, Atkinson R, Patel S. 2000. Bone density of women who have recovered from anorexia nervosa. *Int J Eat Disord.* 28(1):107-112.

Hattori S, Park JH, Agata U, Akimoto T, Oda M, Higano M, Aikawa Y, Nabekura Y, Yamato H, Ezawa I, Omi N. 2013. Influence of food restriction combined with voluntary running on bone morphology and strength in male rats. *Calcif Tissue Int.* 93(6):540-548.

Hattori S, Park JH, Agata U, Oda M, Higano M, Aikawa Y, Akimoto T, Nabekura Y, Yamato H, Ezawa I, Omi N. 2014. Food restriction causes low bone strength and microarchitectural deterioration in exercised growing male rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 60(1):35-42.

Hawkins J, Cifuentes M, Pleshko NL, Ambia-Sobhan H, Shapses SA. 2010. Energy restriction is associated with lower bone mineral density of the tibia and femur in lean but not obese female rats. *J Nutr.* 140(1):31-37.

Hebebrand J, Exner C, Hebebrand K, Holtkamp C, Casper RC, Remschmidt H, Herpertz-Dahlmann B, Klingenspor M. 2003. Hyperactivity in patients with anorexia nervosa and in semistarved rats: evidence for a pivotal role of hypoleptinemia. *Physiol Behav.* 79(1):25-37.

Heinonen A, Sievänen H, Kannus P, Oja P, Pasanen M, Vuori I. 2000. High-impact exercise and bones of growing girls: a 9-month controlled trial. *Osteoporos Int.* 11(12):1010-1017.

Hoch AZ, Pajewski NM, Moraski L, Carrera GF, Wilson CR, Hoffmann RG, Schimke JE, Gutterman DD. 2009. Prevalence of the female athlete triad in high school athletes and sedentary students. *Clin J Sport Med.* 19(5):421-428.

Holy X, Zérath E. 2000. Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats. *Med Sci Sports Exerc.* 32(9):1562-1569.

Huang NE, Shen Zheng, Long SR, Wu MC, Shih HH, Zheng Q, Yen NC, Tung CC, Liu HH. 1998. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. *Proc R Soc Lond A.* 454(1971):903-995.

Hunt JR, Hunt CD, Zito CA, Idso JP, Johnson LK. 2008. Calcium requirements of growing rats based on bone mass, structure, or biomechanical strength are similar. *J Nutr.* 138(8):1462-1468.

Ihle R, Loucks AB. 2004. Dose-response relationships between energy availability and bone turnover in young exercising women. *J Bone Miner Res.* 19(8):1231-1240.

Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, Abe H, Ichimura S, Sato Y, Toyama Y. 2004. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J Bone Miner Metab.* 22(1):26-31.

Iwasaki Y, Kazama JJ, Yamato H, Fukagawa M. 2011. Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone.* 48(6):1260-1267.

Joshi RN, Safadi FF, Barbe MF, Del Carpio-Cano F, Popoff SN, Yingling VR. 2011. Different effects on bone strength and cell differentiation in pre pubertal caloric restriction versus hypothalamic suppression. *Bone.* 49(4):810-818.

Kaastad TS, Reikerås O, Halvorsen V, Falch JA, Obrant KJ, Nordsletten L. 2001. Vitamin D deficiency and ovariectomy reduced the strength of the femoral neck in rats. *Calcif Tissue Int.* 69(2):102-108.

Kaga M, Takahashi K, Ishihara T, Suzuki H, Tanaka H, Seino Y, Makino H. 2004. Bone assessment of female long-distance runners. *J Bone Miner Metab.* 22(5):509-513.

Kalu DN. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner.*

15(3):175-191.

Kanis JA. 1994. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int.* 4(6):368-381.

Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. 2012. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater.* 24:278-291.

Kluge M, Schüssler P, Uhr M, Yassouridis A, Steiger A. 2007. Ghrelin suppresses secretion of luteinizing hormone in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 92(8):3202-3205.

Lappe JM, Watson P, Gilsanz V, Hangartner T, Kalkwarf HJ, Oberfield S, Shepherd J, Winer KK, Zemel B. 2015. The longitudinal effects of physical activity and dietary calcium on bone mass accrual across stages of pubertal development. *J Bone Miner Res.* 30(1):156-164.

Lauder TD, Dixit S, Pezzin LE, Williams MV, Campbell CS, Davis GD. 2000. The relation between stress fractures and bone mineral density: evidence from active-duty Army women. *Arch Phys Med Rehabil.* 81(1):73-79.

Loucks AB, Thuma JR. 2003. Luteinizing hormone pulsatility is disrupted at a threshold of energy availability in regularly menstruating women. *J Clin Endocrinol*

Metab. 88(1):297-311.

Loucks AB, Kiens B, Wright HH. 2011. Energy availability in athletes. *J Sports Sci.* 29(Suppl 1):S7-S15.

Mackey DC, Lui LY, Cawthon PM, Bauer DC, Nevitt MC, Cauley JA, Hillier TA, Lewis CE, Barrett-Connor E, Cummings SR; Study of Osteoporotic Fractures (SOF) and Osteoporotic Fractures in Men Study (MrOS) Research Groups. 2007. High-trauma fractures and low bone mineral density in older women and men. *JAMA.* 298(20):2381-2388.

Maïmoun L, Georgopoulos NA, Sultan C. 2014. Endocrine disorders in adolescent and young female athletes: impact on growth, menstrual cycles, and bone mass acquisition. *J Clin Endocrinol Metab.* 99(11):4037-4050.

Manore MM. 2002. Dietary recommendations and athletic menstrual dysfunction. *Sports Med.* 32(14):887-901.

Mardon J, Trzeciakiewicz A, Habauzit V, Davicco MJ, Lebecque P, Mercier S, Tressol JC, Horcajada MN, Demigne´ C, Coxam V. 2009. Dietary protein supplementation increases peak bone mass acquisition in energy-restricted growing rats. *Pediatr Res.* 66(5):513-518.

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):4318-4333.

McVeigh J, Kingsley S, Gray D, Loram LC. 2010. Swimming enhances bone mass acquisition in growing female rats. *J Sports Sci Med*. 9(4):612-619.

Meyer F, O'Connor H, Shirreffs SM; International Association of Athletics Federations. 2007. Nutrition for the young athlete. *J Sports Sci*. 25(Suppl 1):S73-S82.

Misra M, Miller KK, Bjornson J, Hackman A, Aggarwal A, Chung J, Ott M, Herzog DB, Johnson ML, Klibanski A. 2003. Alterations in growth hormone secretory dynamics in adolescent girls with anorexia nervosa and effects on bone metabolism. *J Clin Endocrinol Metab*. 88(12):5615-5623.

Misra M, Aggarwal A, Miller KK, Almazan C, Worley M, Soyka LA, Herzog DB, Klibanski A. 2004. Effects of anorexia nervosa on clinical, hematologic, biochemical, and bone density parameters in community-dwelling adolescent girls. *Pediatrics*. 114(6):1574-1583.

Misra M, Miller KK, Kuo K, Griffin K, Stewart V, Hunter E, Herzog DB, Klibanski A. 2005. Secretory dynamics of ghrelin in adolescent girls with anorexia nervosa and healthy adolescents. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 289(2):E347-E356.

Misra M. 2014. Neuroendocrine mechanisms in athletes. *Handb Clin Neurol.* 124:373-386.

Morris MD, Mandair GS. 2011. Raman assessment of bone quality. *Clin Orthop Relat Res.* 469(8):2160-2169.

Nattiv A, Loucks AB, Manore MM, Sanborn CF, Sundgot-Borgen J, Warren MP; American College of Sports Medicine. 2007. American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc.* 39(10):1867-1882.

Newhall KM, Rodnick KJ, van der Meulen MC, Carter DR, Marcus R. 1991. Effects of voluntary exercise on bone mineral content in rats. *J Bone Miner Res.* 6(3):289-296.

Nichols JF, Rauh MJ, Lawson MJ, Ji M, Barkai HS. 2006. Prevalence of the female athlete triad syndrome among high school athletes. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 160(2):137-142.

Nichols DL, Sanborn CF, Essery EV. 2007. Bone density and young athletic women. An update. *Sports Med.* 37(11):1001-1014.

Nieves JW, Melsop K, Curtis M, Kelsey JL, Bachrach LK, Greendale G, Sowers MF, Sainani KL. 2010. Nutritional factors that influence change in bone density and stress fracture risk among young female cross-country runners. *PM R.* 2(8):740-750.



Nilsson O, Marino R, De Luca F, Phillip M, Baron J. 2005. Endocrine regulation of the growth plate. *Horm Res.* 64(4):157-165.

Norazlina M, Chua CW, Ima-Nirwana S. 2004. Vitamin E deficiency reduced lumbar bone calcium content in female rats. *Med J Malaysia.* 59(5):623-630.

Nowson CA, Green RM, Hopper JL, Sherwin AJ, Young D, Kaymakci B, Guest CS, Smid M, Larkins RG, Wark JD. 1997. A co-twin study of the effect of calcium supplementation on bone density during adolescence. *Osteoporos Int.* 7(3):219-225.

Omi N, Morikawa N, Ezawa I. 1994a. The effect of voluntary exercise on bone mineral density and skeletal muscles in the rat model at ovariectomized and sham stages. *Bone Miner.* 24(3):211-222.

Omi N, Goseki M, Oida S, Sasaki S, Ezawa I. 1994b. The nutritional evaluation of globin on maintenance of bone metabolism in ovariectomized osteoporotic rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* 40(5):443-457.

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.

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):i-ix.

Pando R, Masarwi M, Shtaif B, Idelevich A, Monsonego-Ornan E, Shahar R, Phillip M, Gat-Yablonski G. 2014. Bone quality is affected by food restriction and by nutrition-induced catch-up growth. *J Endocrinol.* 223(3):227-239.

Park JH, Omi N, Nosaka T, Kitajima A, Ezawa I. 2008. Estrogen deficiency and low-calcium diet increased bone loss and urinary calcium excretion but did not alter arterial stiffness in young female rats. *J Bone Miner Metab.* 26(3):218-225.

Persson P, Gagnemo-Persson R, Håkanson R. 1993. The effect of high or low dietary calcium on bone and calcium homeostasis in young male rats. *Calcif Tissue Int.* 52(6):460-464.

.

Pollock N, Grogan C, Perry M, Pedlar C, Cooke K, Morrissey D, Dimitriou L. 2010. Bone-mineral density and other features of the female athlete triad in elite endurance runners: a longitudinal and cross-sectional observational study. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 20(5):418-426.

Prentice A, Ginty F, Stear SJ, Jones SC, Laskey MA, Cole TJ. 2005. Calcium supplementation increases stature and bone mineral mass of 16- to 18-year-old boys. *J Clin Endocrinol Metab.* 90(6):3153-3161.

Rauch F. 2005. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability.

J Musculoskelet Neuronal Interact. 5(3):194-201.

Rickenlund A, Thorén M, Carlström K, von Schoultz B, Hirschberg AL. 2004. Diurnal profiles of testosterone and pituitary hormones suggest different mechanisms for menstrual disturbances in endurance athletes. J Clin Endocrinol Metab. 89(2):702-707.

Rochira V, Kara E, Carani C. 2015. The endocrine role of estrogens on human male skeleton. Int J Endocrinol. 2015:165215.

Routtenberg A, Kuznesof AW. 1967. Self-starvation of rats living in activity wheels on a restricted feeding schedule. J Comp Physiol Psychol. 64(3):414-421.

Rude RK, Gruber HE, Norton HJ, Wei LY, Frausto A, Kilburn J. 2006. Reduction of dietary magnesium by only 50% in the rat disrupts bone and mineral metabolism. Osteoporos Int. 17(7):1022-1032.

Sengupta P. 2013. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Prev Med. 4(6):624-630.

Shah BG, Trick KD, Belonje B. 1990. Effects of dietary calcium on the metabolism of trace elements in male and female rats. J Nutr Biochem. 1(11):585-591.

Shiga K, Hara H, Okano G, Ito M, Minami A, Tomita F. 2003. Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial

bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *J Nutr.* 133(12):4207-4211.

Siddiqui JA, Partridge NC. 2016. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 31(3):233-245.

Soyka LA, Misra M, Frenchman A, Miller KK, Grinspoon S, Schoenfeld DA, Klibanski A. 2002. Abnormal bone mineral accrual in adolescent girls with anorexia nervosa. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(9):4177-4185.

Stear SJ, Prentice A, Jones SC, Cole TJ. 2003. Effect of a calcium and exercise intervention on the bone mineral status of 16-18-y-old adolescent girls. *Am J Clin Nutr.* 77(4):985-992.

Suda T, DeLuca HF, Tanaka Y. 1970. Biological activity of 25-hydroxyergocalciferol in rats. *J Nutr.* 100(9):1049-1052.

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):1038-1045.

Takeda S, Kobayashi Y, Park JH, Ezawa I, Omi N. 2012. Effect of different intake levels of dietary protein and physical exercise on bone mineral density and bone strength in growing male rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 58(4):240-246.

Talbott SM, Rothkopf MM, Shapses SA. 1998. Dietary restriction of energy and calcium alters bone turnover and density in younger and older female rats. *J Nutr.* 128(3):640-645.

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):2382-2387.

Tenforde AS, Sayres LC, Sainani KL, Fredericson M. 2010. Evaluating the relationship of calcium and vitamin D in the prevention of stress fracture injuries in the young athlete: a review of the literature. *PM R.* 2(10):945-949.

Torstveit MK, Sundgot-Borgen J. 2005. The female athlete triad exists in both elite athletes and controls. *Med Sci Sports Exerc.* 37(9):1449-1459.

Viguet-Carrin S, Hoppler M, Membrez Scalfo F, Vuichoud J, Vigo M, Offord EA, Ammann P. 2014. Peak bone strength is influenced by calcium intake in growing rats. *Bone.* 68:85-91.

Wang G. 1923. The relation between "spontaneous" activity and oestrous cycle in the white rat. *Comp Psychol Monogr.* 2:1-27.

Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, Holderness CC, Hyle EP, Hamilton WG, Hamilton L. 2003. Persistent osteopenia in ballet dancers with amenorrhea and delayed

menarche despite hormone therapy: a longitudinal study. *Fertil Steril.* 80(2):398-404.

Weaver CM. 2002. Adolescence: the period of dramatic bone growth. *Endocrine.* 17(1):43-48.

Welch JM, Turner CH, Devareddy L, Arjmandi BH, Weaver CM. 2008. High impact exercise is more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. *Bone.* 42(4):660-668.

Welt CK, Chan JL, Bullen J, Murphy R, Smith P, DePaoli AM, Karalis A, Mantzoros CS. 2004. Recombinant human leptin in women with hypothalamic amenorrhea. *N Engl J Med.* 351(10):987-997.

Willems NM, Langenbach GE, Everts V, Zentner A. 2014. The microstructural and biomechanical development of the condylar bone: a review. *Eur J Orthod.* 36(4):479-485.

Yanaka K, Higuchi M, Ishimi Y. 2012. Effect of long-term voluntary exercise and energy restriction on bone mineral density in mature female rats. *J Phys Fitness Sports Med.* 1(4):695-702.

Zanker CL, Swaine IL. 1998. Relation between bone turnover, oestradiol, and energy balance in women distance runners. *Br J Sports Med.* 32(2):167-171.