

老齡ラットの運動時におけるカルシウム欠乏及び補充の骨格筋ミトコンドリア容量と骨強度に及ぼす影響

千家 弘行¹⁾ 山崎 先也²⁾ 岡本 啓³⁾
小河 繁彦⁴⁾ 李 西華⁵⁾ 田口 貞善¹⁾

¹⁾ 京都大学大学院人間・環境学研究科, ²⁾ 第一福祉大学人間福祉学部,
³⁾ 富山県立大学工学部, ⁴⁾ University of North Texas, ⁵⁾ 上海第2医科大学

要旨：本研究は、老齡期ラットを用いて、食餌中カルシウム (Ca) 含量の違いと持久運動の組み合わせが骨強度と骨格筋酸化能に及ぼす影響を検討することを目的とした。血清 Ca^{2+} 濃度は、持久運動及びCa含量の影響を受けなかった。大腿骨強度は、非運動群ではCaの影響を受けず、運動群のCa欠乏群だけが、Ca過剰群より低値を示した ($p < 0.05$)。骨格筋ミトコンドリア容量密度は、運動群だけにおいてCa含量およびCa摂取量に比例する関係が得られ、Ca過剰群はCa欠乏群に比し高値を示した ($p < 0.05$)。コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性は、運動群ではCa含量の影響を受けなかったが、非運動群では、Ca過剰により低値を示した ($p < 0.05$)。Ca標準食群における骨強度とSDH活性 (SO線維) 間で相関関係が得られた ($r = 0.644$, $p < 0.05$)。以上の結果から、食餌性カルシウムは骨代謝だけでなく、骨格筋代謝にも影響することが示唆された。

Key words：カルシウム含量, ミトコンドリア容量, 骨強度, コハク酸脱水素酵素, 持久運動

1. 緒 言

カルシウム欠乏は、血清カルシウム濃度を低下させるが、副甲状腺ホルモンの分泌を亢進し、骨吸収を高める。その結果、血清カルシウム濃度は一定に保たれ、骨カルシウム濃度および骨強度は低下する。また、カルシウム、ビタミンD、タンパク質、リン摂取量などが腸管のカルシウム吸収率に大きく関与するが、その他、運動と加齢が大きく作用すると考えられる。運動は腸管からのカルシウム吸収率を高め [1]、加齢は吸収率を低下させる [2]。さらに、Weltenら [3] は、カルシウム摂取量だけでなく運動負荷も最大骨量獲得に寄与することを明らかにしている。運動により骨格筋ミトコンドリア内のカルシウム濃度が増加すること [4] から、カルシウムとミトコンドリアの間に代謝的連関が存在することが推測される。

一方、カルシウム欠乏が血清カルシウム濃度の低下を招いた場合、細胞外液のカルシウム濃度も一時的に低下することになり、ミトコンドリアも一時的に低カルシウム濃度にさらされることになる。また、ミトコンドリア容量は、細胞外液のカルシウムイオン濃度に依存することが明らかにされ [5]、ミトコンドリア容量と酸化能力の間には有意な正の相関関係があることから [6]、カルシウム濃度が酸化系酵素活性にも影響することが考えられる。一方、Creedonら [7] は、カルシウム補足量を増加させ、長期間カルシウムを多量に摂取させた結果、大腿骨への影響はなかったと述べ、さらには、過剰のカルシウム摂取は体内のカルシウムバランスを崩すという報告があることから [8]、カルシウム補足量増加による骨量獲得については、一致した見解が得られていない。

そこで、本研究は、カルシウム代謝動態が、骨

代謝だけでなく骨格筋酸化能力に関わるかどうかを検証することを目的とした。さらに、カルシウム補足量に加えて運動の骨格筋機能への影響を検討するために骨強度、ミトコンドリア容量密度、酸化系酵素活性を指標として分析した。

II. 方法

A. 実験動物と実験群

本実験では、老齢期（69週齢）のWistar系雌ラットを30匹用いた。飼育室の温度は $22 \pm 1^\circ\text{C}$ に保ち、ケージで飼育した。室内照明は12時間毎に点灯と消灯を交互に行った。食餌と水は自由摂取とし、体重と摂食量を毎日計量した。なお、実験動物の取り扱いには日本生理学会の定めた指針（「生理学領域における動物実験に関する基本的指針」昭和63年制定）を遵守した。

実験群は飼料中（船橋農場製）のカルシウム（ CaCO_3 ）含有量の違いと運動・非運動群の観点から以下の6群を設けた（表1）。6群に分けられたラットは、カルシウム含量の異なる3種類のいずれかを6週間にわたり摂取した。

B. 運動負荷トレーニング

運動群には、回転運動器を用いて、速度10m/分の走運動を6週間にわたり毎日行わせた。1日の運動時間は、第1週目を90分/日、第2週目を120分/日、3～4週目を150分/日、5～6週目を180分/日とした。

C. 試料採取と分析項目

6週間の実験期間終了の翌日、ペントバルビタールナトリウム麻酔下で、右後肢より電子顕微鏡

観察用にヒラメ筋を摘出し、固定した。左後肢からは、組織化学的分析用にヒラメ筋を摘出し、液体窒素で急速凍結し、 -80°C 下で分析まで保存した。また、腹大動脈より採血後、心臓を摘出し、湿重量を測定した後、大腿骨も摘出した。血清カルシウム濃度は、カルシウムと0-クレゾールフタレインコンプレキシソンの錯体形成を利用したOCPC法を用い [9]、血清リン濃度は、モリブデン酸直接法で行った [10]。また、大腿骨強度は、小動物骨強度測定装置（マルトー社製MZ-500）を用い、大腿骨を12mm間隔で支持し、その上部より荷重をかける3点支持法により破断力を測定した。左後肢のヒラメ筋からは、クリオスタット（Leica社製JUNGCM1800）を用いて、 -25°C 下で厚さ $10\mu\text{m}$ の連続横断切片を作成し、myosin ATPase染色 [11] とコハク酸脱水素酵素（SDH）染色 [12] を施した。筋線維タイプは、Peterら [13] の方法により、slow-twitch oxidative (SO)、fast-twitch oxidative glycolytic (FOG) およびfast-twitch glycolytic (FG)、さらにSO線維とFOG線維の中間タイプ (INT) の4種類に分類した。1標本より無作為に3部位から合計200～300本の筋線維を抽出し、筋線維タイプ別組成比を算出した。SDH活性は、一定の光度下で顕微鏡（日本光学社製Y2F-21）からSDH染色切片の観察画像を画像処理装置（PIAS社製LA535FB）に入力し、その輝度を0～255段階で示し、その平均値を単一筋線維のSDH活性としてパーソナルコンピューター（日本電気社製PC-9801RX）で算出した。なお、輝度は、光がすべて透過する明るさを0レベル、全く透過しない明るさを255レベルと設定し、これを等分し

表1. 実験群とそのシンボル

	カルシウム含量		
	高カルシウム食 (2.24%Ca)	中カルシウム食 (0.74%Ca)	低カルシウム食 (0.03%Ca)
運動群	HCa-T (n=5)	MCa-T (n=5)	LCa-T (n=5)
非運動群	HCa-U (n=5)	MCa-U (n=5)	LCa-U (n=5)

てO.D. (Optical Density) とした。

電子顕微鏡観察のための組織固定は Eisenberg ら [14] の変法を用いた。ペントバルビタールナトリウム麻酔下でヒラメ筋を露出させ、前固定液 (2%グルタルアルデヒド-2%パラフォルムアルデヒド-0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH7.3, 4℃) を用い滴下固定した後、切り出し、さらに新しい前固定液に10分間浸けた。続いて、ヒラメ筋の筋腹部を1×3mm程度の大きさのブロックに細切し、前固定液にさらに3時間 (4℃) 浸した。次に、カコジル酸ナトリウム緩衝液中でブロックを洗浄し、後固定液 (1.5%オスミウム酸-0.1M カコジル酸ナトリウム緩衝液, pH7.3, 4℃) に12時間、さらに1%酢酸ウラニウム溶液に12時間 (4℃) 浸けた。脱水は、エタノール (70, 80, 90, 95, 100%) とアセトンを用いて、その後、Spurr Resin 樹脂に包埋した。超薄切片は、ウルトラミクロトーム (Reichert-Nissei Ultracut N) を用いて、シルバーゴールド切片を作成した。切片には3%クエン酸鉛水溶液で電子染色を10分間施した後、日立H-7000形電子顕微鏡 (75kV) で観察した。写真撮影は富士電子顕微鏡フィルムFGを用いて行った。直接倍率5000倍で撮影した電子顕微鏡写真を、3倍に引き伸ばし (15,000倍)、ステレオロジー分析手法であるPoint Counting法を用いて、ミトコンドリアの容量密度 (volume density (%)) を求めた。

D. 統計処理

データは、平均値±標準偏差で示した。統計処理は二元配置分散分析法を用い、カルシウム含量の違いおよび持久運動の影響を判定した。分散分析によって有意なF値が得られた場合には、post-hoc test (Fisher's PLSD) を用いて多重比較検定を行い、各群間の平均値の差の検定を行った。相関関係は、直線回帰により検定した。また、危険率はすべて5%水準 (p<0.05) で有意と設定した。

III. 結果

A. 飼料摂取量, カルシウム摂取量, 血清カルシウム濃度及び血清リン濃度

表2に飼料摂取量, カルシウム摂取量, 血清カルシウム濃度及び血清リン濃度を示す。飼料摂取量は、非運動群内の比較では、LCa-U群は、HCa-U群およびMCA-U群より高値を示したが (それぞれ, p<0.01, p<0.05), 運動群内の比較では、カルシウム含量による差異は認められなかった。

カルシウム摂取量は、運動群, 非運動群ともに3群間 (HCa群, MCA群, LCa群) においてそれぞれで有意な差を認めた (それぞれ, p<0.01)。また、カルシウム摂取量に対する持久運動の影響を見ると、HCa-T群がHCa-U群に対して、25.3%高値を示した (p<0.01)。

血清カルシウム濃度および血清リン濃度は、カルシウム含量の違いおよび持久運動の影響を受け

表2. 飼育摂取量, カルシウム摂取量, 血清カルシウム濃度と血清リン濃度

variable	非運動群			運動群		
	HCa-U	MCA-U	LCa-U	HCa-T	MCA-T	LCa-T
feed intake (g/day)	13.0 ± 0.7 ^a	14.0 ± 1.0 ^b	17.9 ± 2.0	16.3 ± 2.2	14.6 ± 2.9	15.4 ± 1.9
Ca intake (mg/day)	292 ± 16 ^c	103 ± 8	4 ± 1	366 ± 49	108 ± 22	3 ± 1
serum Ca (mg/dl)	11.8 ± 0.7	11.2 ± 0.7	10.5 ± 0.3	11.0 ± 0.6	11.1 ± 1.1	10.5 ± 0.3
serum phosphorus (mg/dl)	6.6 ± 0.8	6.4 ± 0.5	6.3 ± 0.1	5.8 ± 0.5	6.8 ± 0.3	6.2 ± 0.5

データは、平均値±SDで示した。表中略号は、表1に示した。有意差、^ap<0.01; HCa-U vs. LCa-U, ^bp<0.05; MCA-U vs. LCa-U, ^cp<0.01; HCa-U vs. HCa-T。

表3. 体重と組織湿重量

variable	非運動群			運動群		
	HCa-U	MCa-U	LCa-U	HCa-T	MCa-T	LCa-T
body weight (mg)	227 ± 26	289 ± 43	313 ± 34	276 ± 7	281 ± 13	294 ± 28
soleus muscle weight (mg)	90 ± 12	95 ± 9	108 ± 5	101 ± 5	96 ± 11	94 ± 10
(mg/100gB.W.)	33 ± 3	34 ± 6	35 ± 2	37 ± 3	34 ± 3	32 ± 2
heart weight (mg)	775 ± 40 ^a	837 ± 93 ^b	917 ± 29	843 ± 27	899 ± 75	907 ± 79
(mg/100gB.W.)	281 ± 25	291 ± 18	297 ± 39	306 ± 10	319 ± 15	308 ± 7

データは、平均値 ± SD で示した。表中の略号は、表1に示した。B.W. = Body Weight. 有意差, ^ap < 0.01; HCa-U vs. LCa-U, ^bp < 0.05; MCa-U vs. LCa-U.

なかった。

表3に体重、ヒラメ筋重量および心臓重量を示す。各重量は、いずれも持久運動の影響は認められなかったが、心臓湿重量のみカルシウム含量の影響を受け、非運動群内では、LCa-U群がHCa-U群とMCa-U群に対してそれぞれ18.3%、9.6%の高値を示した（それぞれ、p < 0.01, p < 0.05）。しかし、体重当たりの心臓重量で比較すると、持久運動、カルシウム含量の違いによる影響は認められなかった。

B. 大腿骨強度

図1に大腿骨強度を示す。大腿骨強度に対する持久運動の影響は認められなかった。一方、カルシウム含量の違いの影響が認められ、運動群では、LCa-T群（17.2 ± 0.6 kg force）がHCa-T群（19.8 ± 1.7 kg force）に対して低い骨強度を示した（p < 0.05）。非運動群では、カルシウム含量の違いによる骨強度の変化は示されなかった。

C. ミトコンドリア容量密度

図2にミトコンドリア容量密度（MVD）を示す。持久運動によりHCa-T群およびMCa-T群のMVDは、HCa-U群、MCa-U群に対して、それぞれ63.1%（5.5 ± 1.6% vs 8.9 ± 0.4%）、33.8%（5.3 ± 1.1% vs 7.0 ± 1.0%）の増加を示し、HCa群間では有意差を認めた。LCa-T群では、逆にLCa-U群に対してMVDは10%の減少（6.4 ±

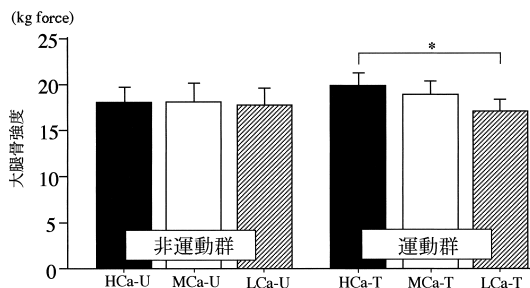


図1. 大腿骨強度の変化

データは、平均値 ± SD で示した。有意差；* p < 0.05 図中の略号は、表1に示した。

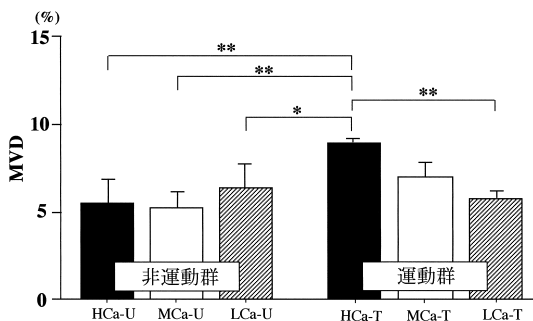


図2. ミトコンドリア容量密度（MVD）の変化
データは、平均値 ± SD で示した。有意差；* p < 0.05, ** p < 0.01.
図中の略号は、表1に示した。

1.6% vs 5.7 ± 0.7%) を示した。カルシウム含量の違いは非運動群内では影響しなかったが、運動群内では、HCa-T群 > MCa-T群 > LCa-T群の順

でMVDが高くなり、HCa-T群とLCa-T群間で有意な差を認めた ($p < 0.01$).

次に、カルシウム摂取量とMVDの関係を図3に示した。運動群だけにおいて、カルシウム摂取量とMVD間に直線的な関係が得られた。

D. コハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性

図4にコハク酸脱水素酵素活性を示す。ヒラメ

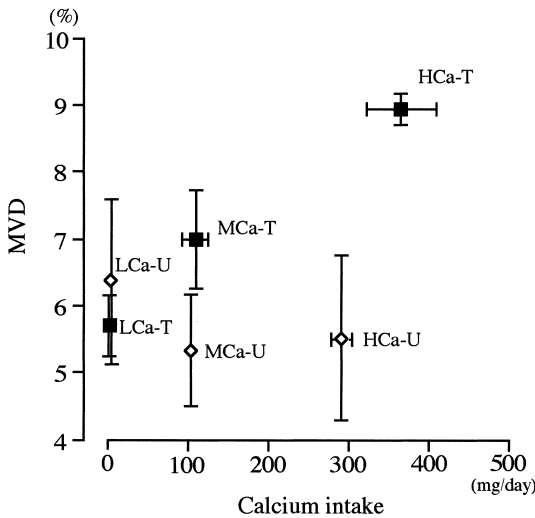


図3. カルシウム摂取量とミトコンドリア容量密度 (MVD) の関係
データは、平均値 \pm SD で示した。
図中の略号は、表1に示した。

筋のSO線維については、持久運動によるSDH活性の上昇は、HCa-T群とHCa-U群の間だけで示された ($p < 0.01$)。運動群内の比較において、HCa-T群がMCa-T群およびLCa-T群よりわずかに高いSDH活性を示したが、逆に非運動群のSDH活性は、HCa-U群 $<$ MCa-U群 $<$ LCa-U群の順を示し、HCa-U群 (129.6 ± 5.3 O.D.) とLCa-U群 (139.2 ± 2.9 O.D.) の間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。FOG線維のSDH活性は、カルシウム含量の違いの影響を受けなかったが、運動群ではカルシウム含量の高い群ほどSDH活性が高くなる傾向が見られた (HCa-T群 $>$ MCa-T群 $>$ LCa-T群)。

E. 大腿骨強度とSDH活性の関係

図5にMCa群の大腿骨強度とSDH活性の関係を示す。カルシウム過剰群 (HCa) および欠乏群 (LCa) では、いずれの筋線維タイプにおいても、大腿骨強度とSDH活性との間に相関関係を認めなかった。一方、MCa群では、両者間に相関関係が示され、SO線維においては統計的有意差が認められた ($r = 0.688$, $p < 0.05$)。

IV. 考 察

1 骨強度へのカルシウム含量と運動負荷の影響

先行研究では、加齢による腎尿細管における1 α -水酸化酵素の活性低下により腸管でのカルシ

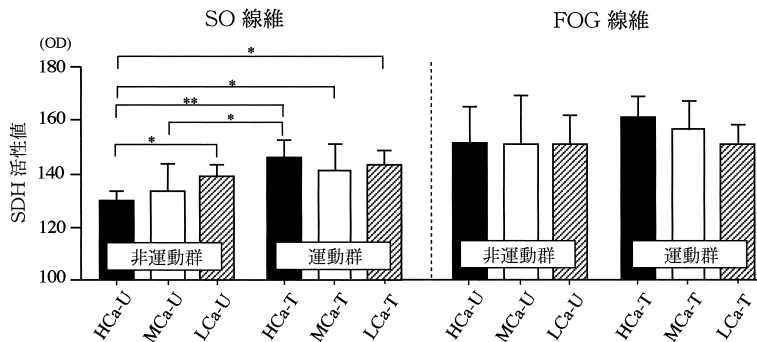


図4. 単一筋線維のコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性の変化
データは、平均値 \pm SD で示した。有意差; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。
図中の略号は、表1に示した。SO ; slow-twitch oxidative, FOG ; fast-twitch oxidative glycolytic, O.D. ; optical density.

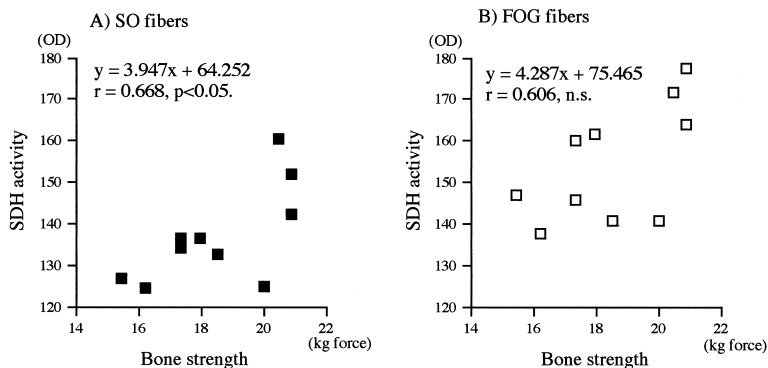


図5. 大腿骨強度とSDH活性の関係

図(A)は、SO線維、図(B)は、FOG線維を示す。

図中の略号は、表1に示した。SO；slow-twitch oxidative, FOG；fast-twitch oxidative glycolytic, O.D；optical density.

ウム吸収効率が低下することから [15], 若齢期より老齢期でカルシウム摂取の重要性が増すと考えられる。また, Kenneyら [16] は, カルシウム欠乏負荷による骨密度の減少を報告していることから, 老齢期は, カルシウム欠乏の影響を大きく受けるものと予想された。しかし, 本研究において, カルシウム欠乏群の大腿骨強度は, 非運動環境下において低下しなかった。この結果は, 老齢期では, カルシウム欠乏ストレスに対する骨感受性が低下することを示唆するものと考えられる。事実, Turnerら [17] は, カルシウムとリンを標準量の25%に制限した飼料を若齢ラットに供試した結果, 脊椎骨強度は低下するが, この骨強度の低下は, 加齢により抑制されることを明らかにしている。

さらに, カルシウム欠乏が骨強度の低下を誘発しなかった原因として, 本研究では, Ca含有量を変化させたが, リン含有量は, 一定(0.65%)であり, カルシウム欠乏食では, Caに対するPの相対比率が高まったが, 血清リン濃度に変化はなかったこと, 0.74%カルシウム食(MCa-U群)と比較して, カルシウム欠乏群(LCa-U群)における血清カルシウム濃度の減少が小さかったことが考えられる。一般的にはカルシウム欠乏は, 血清カルシウム濃度の低下を招きやすく, Ritaら [18] は, 本研究と同水準であるカルシウム欠乏

食(0.02%Ca)をウサギに70日間与えた結果, 血清カルシウム濃度の低下を報告している。この結果の差異は, 本研究の実験期間が42日間と短かったこと, 供試した飼料のビタミンD含有量(260IU/100mg)が十分量であったことに関係すると考えられる [19]。本研究では, 非運動群ではカルシウム欠乏により骨強度の低下が見られなかったのに対し, 運動群では, HCa-T群に比し, LCa-T群が低値を示したことは興味深い。このことは, 持久運動によりカルシウム代謝が亢進している時には, カルシウム欠乏刺激に対する閾値が低下し, カルシウム欠乏に対する感受性が高まること, 逆に加齢などによりカルシウム代謝が低下している場合には, カルシウム欠乏刺激に対する閾値が上昇することを示唆するものと思われる。すなわち, カルシウム欠乏負荷の骨強度に及ぼす影響は, カルシウム代謝の水準に依存していることが示唆される。

運動による機械的刺激の骨に対する影響について, Frost [20] は, 運動による機械的刺激により骨量が増加すると述べ, さらに, この骨量獲得にはある閾値以上の機械的刺激(最小有効ストレイン)が必要であることを示している。本研究では, HCa群, MCa群, LCa群の3群すべてにおいて, 走運動を負荷し, 骨に機械的刺激を与えたが, 骨強度の改善は認められなかった。この原因

として、運動負荷の機械的刺激の大きさと運動負荷による内分泌系の問題が推測される。骨強度の改善のためには低強度より高強度の運動負荷が効果的であると報告されているが [21], Yeh ら [22] は、トレッドミルランニングを16週間にわたり老齢雌ラットに実施させると、骨密度が増加すると報告している。したがって、本研究の骨に対する持久運動による機械的刺激は最小有効ストレイン以下であり、運動による機械的刺激よりもカルシウム欠乏の影響が大きかったものと推察される。このことはまた、カルシウム欠乏刺激により、最小有効ストレインが上昇してしまった結果、運動効果が得られ難くなったものと考えられる。この考えは、機械的刺激に対する骨の感受性は、成長期に比べ老齢期で低下するという先行研究の結果と一致する [23]。一方では、持久運動負荷の骨代謝に与える影響に関して内分泌系の関与が指摘され、特にエストロゲンは、運動による刺激を骨芽細胞に伝達する働きがあると考えられており、卵巣機能が低下すると運動を負荷しても骨に対して十分な効果を得ることはできない [24]。しかし、本研究では、76週齢の高齢ラットを用いているため、内分泌系の変化は小さいものと考えられる。

次に、カルシウムを補充した場合の骨強度の変化について運動を負荷して検討した。その結果、HCa群では、持久運動に関わらず、血清カルシウム濃度に変化は見られず、また、骨強度にも変化は認められなかった。Creedon ら [7] は、本研究と同様に、標準食 (5g Ca/体重kg) とその4倍に相当するカルシウム補充食 (20g Ca/体重kg) を3週間にわたり成長期ラットに与えた結果、大腿骨のカルシウム含有量 (%) と骨吸収が変化しなかったことを報告していることから、カルシウム補足量増加による骨強度の改善に関しては、所要量のカルシウムで十分であると考えられる。しかし、一方では、Mckane ら [27] は、カルシウム摂取量が平均2414mg/日と平均815mg/日である老齢の女性2集団 (平均年齢; 69.3歳) を比較した結果、両者に血清カルシウム濃度の差はないが、カルシウム摂取量が多い女性は少ない女性に

比べ、血清PTH濃度が47%低いことを報告している。したがって、カルシウム補足量の増大は骨吸収ホルモン分泌を抑制するが、骨量あるいは骨強度維持にどれほどの効果を有するかは不明であり、今後、詳しく評価する必要があると思われる。さらにWhitingら [8] は、カルシウム過剰摂取が生体に悪影響を及ぼし、ミネラルバランスを崩すことを指摘していることから、カルシウム補足量を増加させる場合には、適切な摂取量を守り、運動を組み合わせることが必要かも知れない。

2. 骨格筋酸化能へのカルシウム補足と運動負荷の影響

ミトコンドリア容量密度は持久運動で増加し、さらにはミトコンドリアのネットワーク構造も変化する [28] が、持久運動刺激による筋原線維中のミトコンドリア容量密度の増加は、エネルギー産生能力の亢進、つまり、筋収縮に対するエネルギー供給量を増加させ、脂肪酸の酸化能力を高めることにより、運動の持続時間を延長させるための機能的・形態的適応と考えられる [29, 30]。Ohishi ら [31] は、カルシウム欠乏状態における運動は、活性酸素種によるダメージをより受けやすくなることを報告していることから、カルシウム欠乏は骨代謝に影響するだけでなく、持久運動による酸化能の改善効果を打ち消す可能性が示唆される。そこで、本研究において持久運動による酸化能力の改善効果に対するカルシウム含量の違いの影響をみたところ、MVDおよびSDH活性ともに持久運動により標準カルシウム含量以上のHCa群およびMCa群では認められたが、カルシウム欠乏状態にあるLCa群では、運動の効果は認められなかった。これらのことは、運動による骨格筋酸化系能力を改善の効果を得るためには標準所要量 (MCa群) 以上のカルシウム摂取が必要であり、カルシウム欠乏状態での運動はその効果を縮小させてしまうことを示唆している。また、カルシウム欠乏は、PTHの分泌を亢進させ、PTHはミトコンドリア呼吸を阻害することから [32]、PTHなどの骨吸収ホルモンの関与が推測される。事実、本研究では、MVDを運動群内で

比較したところ、HCa-T群はMCa-T群、LCa-T群に比してそれぞれ27.0%、56.2%高く、MVDとカルシウム摂取量との間に直線的関係が示された(図4)。カルシウム摂取量の増加は、PTH分泌を減少させ[27, 33]、カルシウム欠乏はPTH分泌を亢進させることから、本研究で見られたカルシウム補足量によるMVD変化のメカニズムとしてPTH分泌の関与が示唆される。

骨格筋ミトコンドリア形態とCa²⁺濃度の関係に関する研究は、我々の知る範囲ではないが、Halestrapら[5]は、培養肝細胞のMVDがCa²⁺濃度に依存し、Ca²⁺濃度が高いほどMVDも比例して増大することを報告している。しかし、運動と骨格筋Ca²⁺濃度の関係についてGisselら[4]は、低頻度、長期間の電気刺激によりラット骨格筋におけるCa²⁺ uptakeとCa²⁺含有量の増大が起こること、Duanら[34]は、運動による筋損傷によりミトコンドリア内のカルシウム濃度が上昇することを報告している。骨格筋内Ca²⁺濃度の上昇は、タンパク質分解酵素の活性化を誘発し、Z線構造の崩壊を招く[35]。しかし、本研究における電子顕微鏡写真による観察では、Z線構造の乱れは認められず、持久運動によりSDH活性も上昇したことから、骨格筋内Ca²⁺濃度変化は生理的範囲内であったものと推察される。

しかしながら、一方では、酵素活性とCa²⁺の関係について、Hansfoldら[36]は、Ca²⁺がミトコンドリア内に存在するglycerol 3-phosphate dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase multienzyme complex, NAD-linked isocitrate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenaseを活性化するシグナルであることを明らかにし、そのメカニズムとして筋収縮により細胞質Ca²⁺濃度の増加が起こり、次いでミトコンドリア内Ca²⁺濃度が上昇することによりこれら3つの脱水素酵素活性を亢進させることを報告している。したがって、本研究で得られたMVDの変化にCa²⁺濃度の変化が関与していることが示唆されるが、本研究での血清カルシウム濃度の変動はわずかであり、Ca²⁺の関与については、さらなる検討が必要である。

非運動群では逆にカルシウムを補充したHCa-C群がLCa-C群より有意に低いSDH活性を示したことは注目される。本研究では、カルシウム過剰摂取による有意な血清Ca²⁺濃度の変化が観察されなかったことから、過剰摂取カルシウムが、生体にどのような機序により影響を与えるのかについては不明であるが、慢性的なカルシウム過剰摂取がカルシウムバランスを崩すことが指摘されている[8]。一方、速筋タイプであるFOG線維のSDH活性は、非運動群間の比較では、SO線維の結果とは異なりカルシウム摂取の影響は認められなかった。したがって、張力発揮に対するCa²⁺の作用には筋線維タイプにより異なるが、食餌性カルシウムの影響にも、筋線維タイプによる特異性があるのかもしれない。

3. 骨強度と骨格筋ミトコンドリアの関係

Doyleら[37]と小河ら[38]は、筋量と骨量に相関があること、また、Sinakiら[39]は、骨密度と背筋力に相関があることを報告している。このようにこれまで、筋出力パワーのパラメーターと骨強度に関する研究は多く行われてきたが、骨強度と骨格筋酸化能力との関係は、我々の知る範囲では報告がなされていない。そこで本研究では、大腿骨骨強度とヒラメ筋のSDH活性との関係を検討した結果、MCa群のみでSDH活性(SO線維)との間に有意な相関を認め、HCa群およびLCa群では、有意な相関は見られなかった。先行研究において、骨の変化は間接的に筋の変化を反映することが示唆されていることから[38]、本実験の結果は、運動負荷条件のみのMCa群では、骨代謝と骨格筋酸化能力に関連があることを示唆している。また、HCa群、LCa群において相関が見られなかった理由としては、カルシウム補足と持久運動の各要因によるそれぞれの作用が存在したためと推測される。つまり、カルシウム欠乏により非運動ラット(LCa-U群)のSDH活性はカルシウム補充群(HCa-U群)より有意に高値を示し、逆に、骨強度は、カルシウム欠乏、カルシウム補充により全く変化しなかったことが原因と考えられる。したがって、骨組織

と骨格筋でカルシウム負荷への応答に差が認められたことは、カルシウム補足量に対する閾値が、それぞれの組織において異なり、また、その作用機序が違うことを示唆しているものと考えられる。

謝辞 稿を終えるに当たり、本研究遂行に多大の御指導を賜りました京都大学名誉教授、丸山圭藏先生に謝意を表します。

文 献

1. 麻見直美, 森川尚美, 星名 綾, 五十嵐千恵, 江澤郁子: 卵巣摘出骨粗鬆症モデルラットの骨密度に対する自由運動の効果. 栄食誌 45: 423-427, 1992.
2. Armbrrecht HJ, Zenser TV, Bruns ME & Davis BB: Effect of age on intestinal calcium absorption and adaptation to dietary calcium. Am J Physiol 236: E769-774, 1979.
3. Welten DC, Kemper HC, Post GB, Van Mechelen W, Twisk J, Lips P & Teule GJ: Weight-bearing activity during youth is a more important factor for peak bone mass than calcium intake. J Bone Miner Res 9: 1089-1096, 1994.
4. Gissel H, Clausen T: Excitation-induced Ca^{2+} uptake in rat skeletal muscle. Am J Physiol 276: R331-339, 1999.
5. Halestrap AP: The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria *in vivo* and *in vitro* and its role in the control of mitochondrial metabolism. Biochim Biophys Acta 973: 355-382, 1989.
6. Hoppeler H, Luthi P, Claassen H, Weibel ER & Howald H: The ultrastructure of the normal human skeletal muscle. A morphometric analysis on untrained men, women and well-trained orienteers. Pflügers Arch 344: 217-232, 1973.
7. Creedon A & Cashman KD: The effect of calcium intake on bone composition and bone resorption in the young growing rat. Br J Nutrition 86: 453-459, 2001.
8. Whiting SJ & WOOD RJ: Adverse effects of high-calcium diets in humans. Nutr Rev 55: 1-9, 1997.
9. Connerty HV & Briggs AR: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. Am J Clin Pathol 45: 290-6, 1966.
10. 金井 泉: 臨床検査法提要 29: 484-487, 1983.
11. Padykula HA & Herman E: The specificity of the histochemical method for adenosine triphosphatase. J Histochem Cytochem 3: 170-195, 1955.
12. Nachlas MM, Tsou K, DeSousa E, Cheng C & Seligman AM: Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new p-nitrophenyl substituted ditetrazole. J Histochem Cytochem 5: 420-436, 1957.
13. Peter JB, Barnard RJ, Edgerton VR, Gillespie CA & Stempel KE: Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea pigs and rabbits. Biochemistry 11: 2627-2633, 1972.
14. Eisenberg BR, Kuda AM & Peter JB: Stereological analysis of mammalian skeletal muscle I. Soleus muscle of adult guinea pig. J Cell Biol 60: 732-754, 1974.
15. Rubin CT, Bain SD & McLeod KJ: Suppression of the osteogenic response in the aging skeleton. Calcif Tissue Int 50: 306-313, 1992.
16. Kenney MA & McCoy H: Adding zinc reduces bone strength of rats fed a low-calcium diet. Biol Trace Elem Res: 5835-5841, 1997.
17. Turner CH, Hinckley WR, Wilson ME, Zhang W & Dunipace AJ: Combined effects of diets with reduced calcium and phosphate and increased fluoride intake on vertebral bone strength and histology in rats. Calcif Tissue Int 69: 51-57, 2001.
18. Rita MD & James MI: Effects of dietary calcium on blood and tissue lipids, tissue phospholipids, calcium and magnesium levels in rabbits fed diets containing beef tallow. J Nutr 109: 1934-1945, 1979.
19. Stauffer M, Baylink D, Wergedal J & Rich C: Decreased bone formation, mineralization, and enhanced resorption in calcium-deficient rats. Am J Physiol 225: 269-76, 1973.
20. Frost HM: Bone mass and the mechanostat. Anat Rec 219: 1-9, 1992.
21. Taaffe DR, Snow-Harter C, Connolly DA, Robinson TL, Brown MD & Marcus R: Differential effects of swimming versus weight-bearing activity on bone mineral status of eumenorrheic athletes. J Bone Miner Res 10: 586-593, 1995.
22. Yeh JK, Aloia JF, Chen MM, Tierney JM & Sprintz S: Influence of exercise on cancellous bone of the aged female rat. J Bone Miner Res 8: 1117-1125, 1993.
23. Carter DR: Mechanical loading histories and cortical bone remodeling. Calcif Tissue Int 36: s19-s24, 1984.
24. Dalsky GP, Stocke KS, Ehsani AA, Slatopolsky E, Lee WC & Birge SJ Jr: Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women. Ann Intern Med 108: 824-828, 1988.
25. Prior JC, Yvette M, Vigna BA, Martin TS & Burgess AE: Spinal bone loss and ovulatory disturbances. N Engl J Med 323: 1221-1227, 1990.
26. Marcus R, Cann C, Madvig P, Minkoff J, Goddard M, Bayer M, Martin M, Gaudiani L, Haskell W, Genant H: Menstrual function and bone mass in elite women

- distance runners. Endocrine and metabolic features. *Ann Intern Med* 102 : 158–163, 1985.
27. McKane WR, Khosla S, Egan KS, Robins SP, Burritt MF, Riggs BL : Role of calcium intake in modulating age-related increases in parathyroid function and bone resorption. *J Clin Endocrinol Metab* 81 : 1699–1703, 1966.
 28. Kirkwood SP, Packer L & Brooks GA : Effects of endurance training on a mitochondrial reticulum in limb skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 255 : 80–88, 1987.
 29. Baldwin KM, Klinkerfuss GH, Terjung RL, Mole PA & Holloszy JO Respiratory capacity of white, red and intermediate muscle : adaptive response to exercise. *Am J Physiol* 222 : 373–378, 1972.
 30. Matoba H & Gollnick PD : Response of skeletal muscle to training. *Sports Med* : 240–251, 1984.
 31. Ohishi S, Kizaki T, Ookawara T, Toshinai K, Haga S, Karasawa F, Satoh T, Nagata N, Ji LL & Ohno H : The effect of exhaustive exercise on the antioxidant enzyme system in skeletal muscle from calcium-deficient rats. *Pflügers Arch* 435 : 767–74, 1998.
 32. Bogin E, Tevi J, Harary I & Massry SG : Effects of parathyroid hormone on oxidative phosphorylation of heart mitochondria. *Miner Electrolyte Metabolism* 7 : 151–156, 1982.
 33. Guillemant J & Guillemant S : Comparison of the suppressive effect of two dose (500 mg vs 1500 mg) of oral calcium on parathyroid hormone secretion and on urinary cyclic AMP. *Calcif Tissue Int* 53 : 304–306, 1993.
 34. Duan C, Delp MD, Hayes DA, Delp, PD & Armstrong RB : Rat skeletal muscle mitochondrial $[Ca^{2+}]$ and injury from downhill walking. *J Appl Physiol* 68 : 1241–1251, 1990.
 35. Raj DA, Booker TS & Belcastro ANx : Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflügers Arch: Eur. J. Physiol* 435 : 804–809, 1998.
 36. Hansford RG & Zorov D : Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem* 184 : 359–369, 1998.
 37. Doyle F, Brown J & Lanchance C : Relation between bone mass and muscle weight. *Lancet* 21 : 391–393, 1970.
 38. 小河繁彦, 山崎先也, 岡本 啓, 福田 俊, 家森幸男, 田口貞善 : 模擬無重力による高血圧自然発症ラット骨格筋の組織化学的特性及び骨代謝への影響. *日本生理誌* 57 : 419–426, 1995.
 39. Sinaki M, McPhee MC, Hodgson SF, Merritt JM & Offord KP : Relationship between bone mineral density of spine and strength of back extensors in healthy postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 61 : 116–122, 1986.