

カルシウム摂取量及び筋活動量がラット後肢筋 及び骨の特性に及ぼす影響

鹿屋体育大学 教授 大平 充 宣
大原 誠
吉永 智雄
田中 隆人
日本女子体育大学 教授 黒田 善雄

高齢化社会に入り始めた今日、老化に伴う骨粗鬆症は大きな社会問題の一つである。特に女性は閉経後に急激な骨密度の低下が起こる。老化に伴う骨密度の低下を完全に防止する処方はないが、若い頃の骨塩量が高い程老化による減少度（少なくともピーク値に対する相対値）は少ないと言われている。従って、若い頃、例えば bone mineral density (BMD) のピーク値を高めておく必要がある。

BMD を上昇させる方法として、運動及びカルシウム (Ca) 摂取が注目され、研究も実施されている。例えば運動習慣があるかないかでグループ分けして、両群を比較した研究も数多く見られる。しかし、この方法では運動の量や強度などの分類は非常にあいまいである。一定の時間を決めてトレーニングさせる方法も、ヒトを対象とすると、それ以外の時間の活動量などは全くコントロールできない。運動はしないよりした方がいいという示唆は得られても、最低どれ位の強度の運動を1日何時間位やればいい…というような結果を引き出すことができない。骨密度の低下は、女性長距離ランナーでも認められており、運動のやりすぎはマイナスであることも示唆されている。従って、単に運動しないよりした方がいいとも言えなくなってしまう。

長時間の bed rest や宇宙飛行に伴う骨密度の低下も大きな関心事である。Bed rest 中の患者さんは運動の中止を余儀なくされており、宇宙では運動しようにも非常に困難である。こういう場合、Ca 摂取量を増やすだけでは効果はなく、最低量の運動やそのタイプなどが解明されると、その意義は大きい。更には、運動により骨形成が刺激されるとすれば、それに応じて Ca の必要量も増すはずである。従って、抗重力筋活動量と Ca 投与量、又はこれらの両者を変えてラットに与えた場合の、後肢筋及び骨の反応を追求した。

方 法

生後3週齢のウイスター系雄ラット66匹を任意に次の7群に分けた。日本クレア (CE-2) のラット用粉末飼料中に含まれる Ca 量 (1.18/100g) を正常 Ca 群 (100% Ca 含有量) とし、低 Ca 食 (日本クレア, No. A12001) に、炭酸カルシウムを加えることにより、次の7種のグループに分けた：高 Ca 群 (120%, n=10)、正常 Ca 群 (100%, n=10)、及び低 Ca 群 (80%、60%、40%、20%、及び0%)。0%低 Ca 群は6匹であるが、それ以外の低 Ca 群はそれぞれ n=10であった。ラットはステンレス製

のケージ (50×29×20cm) に2匹ずつ飼育した。動物飼育室の温度及び湿度は、それぞれ約23℃及び約55%とし、明暗は12時間毎にコントロールした。

与える餌の量は約12時間以内に食べつくす程度で、発育に応じて漸増したが、8日目から実験終了まで20g/日/匹の一定とした。餌の量は各群同量ずつ pair feeding したが、水は蒸留・脱イオン水を自由に与えた。22日目には、0%低Ca群以外は任意に5匹ずつ後肢懸垂群とケージコントロール群の2群に分けた。懸垂群は、尾部を懸垂し、後肢を完全に床から離して飼育したが、餌及び水は前肢を使って自由に摂取させた。

10日間の後肢懸垂後、全群のサンプリングを行った。ネブタールの腹腔内注入により麻酔した後、まずヘパリンコーティングしたシリンジで頸静脈より採血した。血液は4℃下で15分間 (3,500rpm) 遠心分離し、上澄の血漿を採取し、分析まで-80℃下で凍結保存した。血漿ではCa及び無機リン酸濃度を測定した。次いで後肢を解剖し、両脚からヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、前脛骨筋、長指伸筋、長内転筋、それに大腿骨及び脛骨・腓骨を採取した。骨格筋は湿重量を測定し、その後の分析のために液体窒素で冷したイソペンタン中で瞬間凍結し、-80℃下に保存した。骨は付着した筋や腱などをなるべく除去した後、左後肢骨は5%パバイン液 (50℃) に浸した。骨以外のタンパク質等を除去した後、長さ、重さ、容積を測定した。

結果及び考察

図-1に示されるようにCa欠乏食 (0%Ca) 群の血漿中Ca濃度は100%Ca群より有意に低かったが、他の群には低Ca又は高Ca食の影響も後肢懸垂の影響も認められなかった。血漿無機リン酸レベルは、餌中のCa量が少ないほど、高くなる傾向が認められた (図-2)。体重は低Ca群が低い傾向にあったが、ケージコントロールラットでは、正常群に対し有意に低かったのは0%Ca群のみであった (図-3)。100%Ca群で後肢懸垂を施したグループに対しては、20,40,及び60%Ca群も有意に低値であった。筋重量に対する低Ca食の影響はより顕著であった。どの筋の重量も餌中のCa含有が60%以下になると次第に軽くなり、0%Ca群が最も軽量であった。ヒラメ筋 (図-4) と足底筋 (図-5) は後肢懸垂の影響で軽くなる現象が認められ、特にヒラメ筋では有意であった。しかし、懸垂による萎縮はCa摂取量の違いによる影響は受けなかった。又、前脛骨筋重量は、後肢懸垂の影響を受けなかった。

後肢骨には骨格筋以上に低Ca食の影響が顕著に見られた。特に骨重量はCa摂取量が低いほど、低くなる傾向が認められたが、大腿骨 (図-7)、脛骨・腓骨 (図-10) 共に餌中のCa濃度が80%から60%に減ると大きな低下が認められた。骨長にも似たような傾向は認められたが、骨重量に見られたCa摂取不足の影響ほど顕著でなかった (図-8及び11)。脛骨・腓骨の場合、餌中のCa含有が60%を切ると、100%Ca群に比べて筋長は有意に短かった。大腿骨にも似たような現象が見られたが、100%Ca群より有意に短かったのは0%Ca群のみであった ($p<0.05$)。しかしこの場合、大腿骨が骨折している例もあり、骨長に大きなばらつきが認められた。骨容積もCa摂取量が少ない群ほど低

くなる傾向にあった (図-9 及び12)。大腿骨では、100%Ca群のケージコントロールに比べて、0、20、及び60%Ca群が有意に低値であった。脛骨・腓骨の場合、統計的有意性は0%Ca群にのみに認められた。

これらの結果をまとめてみると、Ca欠乏食群以外は血漿中Ca濃度は全群正常群と同レベルであった。しかしながら、体重、筋重量、骨重量は明らかにCa摂取量が少ない群ほど低値であり、発育期のCa摂取量はこれらの発育に大きな影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、Ca摂取不足による骨の発育抑制は、骨重量に対しては顕著であったが、骨長に対する影響はマイナーであった。後肢における骨長の延長化は体内Ca含有量よりも、たとえば筋の収縮によるメカニカルな圧迫が重要な役割を果たしているのかもしれない。筋骨格系の発育は抑制されている訳であるからCa欠乏が起きているのは明らかであろうが、血漿中Caレベルはほぼ正常に保たれており、たとえば骨長の発育にとって必要とされるCa量にクリティカルなレベルがあるとすれば、本研究においてはCa量がそのレベル以上であったとも推察されよう。しかしながら、骨重量や筋容積は明らかにコントロールより低値であり、これらの発育にとってはCa量が不十分であったと言える。また、言い方を変えれば、血漿中Ca濃度の測定は、体内Ca量の推定には役に立たないとも言えよう。

まとめ

10日間の抗重力筋活動除去の影響は、特にヒラメ筋には顕著な萎縮として現れたが、骨には大きな変化は認められなかった。しかし、今回の報告では形態的特性だけ取り扱っているもので、機能的にもそうであるのか明らかでない。現在、骨塩量や引張り強度、圧迫強度、ねじり強度などの力学的分析も進めているので、次年度は機能的特性についても報告できよう。Myosin heavy chain expressionの分析により、骨格筋線維タイプの分類も実施中である。

図-1

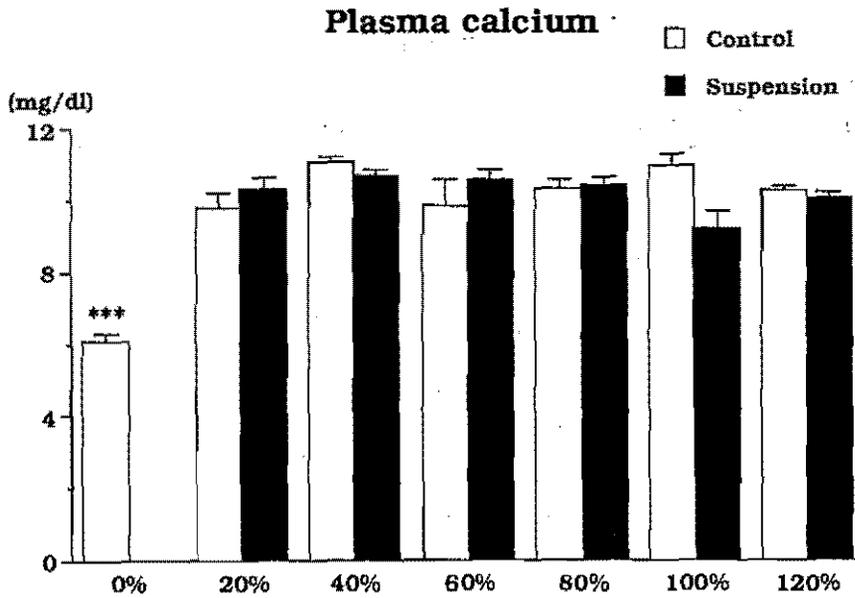


図-1: 血漿中カルシウム(Ca)濃度。平均±SEM。横軸の%は餌中のCa濃度が1.2%になるように炭酸カルシウムをCa欠乏食(0%)に加えた正常(100%)群に対する餌中のCa含有量を示す。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control by Scheffe's post hoc test.

図-2

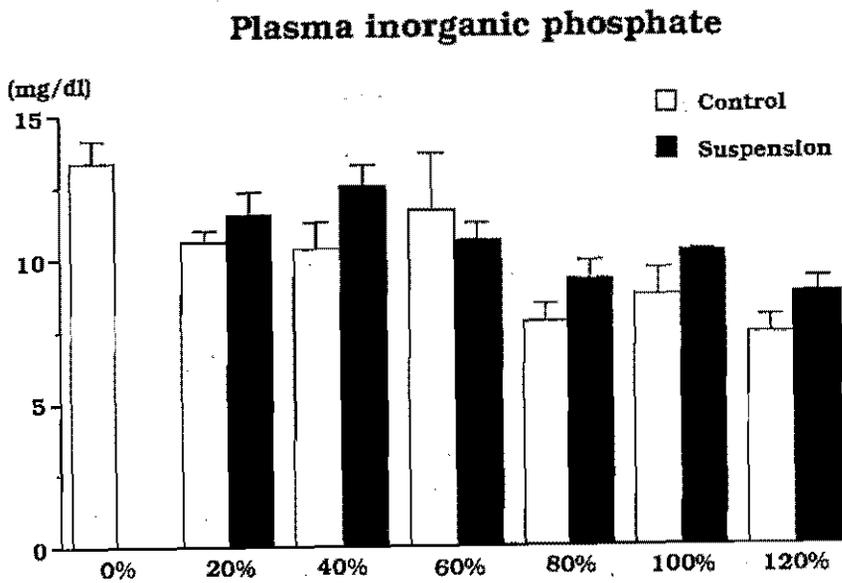


図-2: 血漿中無機リン酸濃度。平均±SEM。

図-3

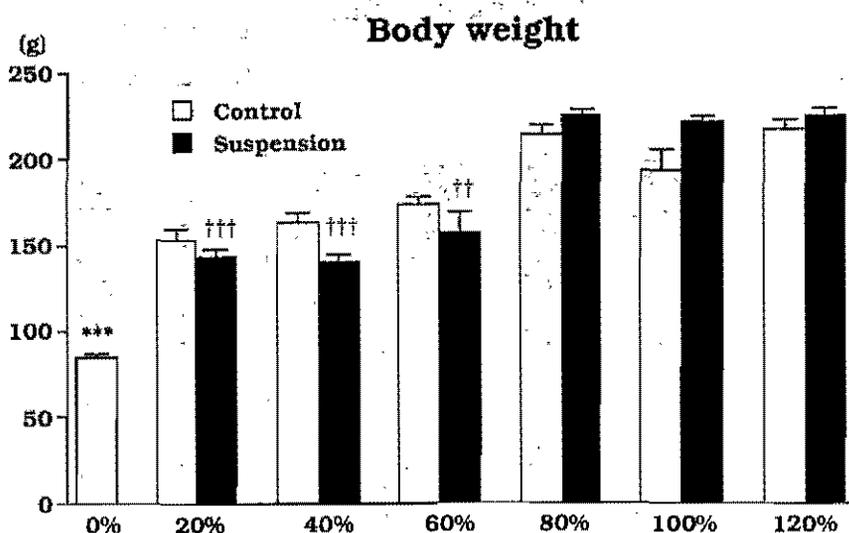


図-3: 体重。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and ††: $p < 0.01$ and †††: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test.

図-4

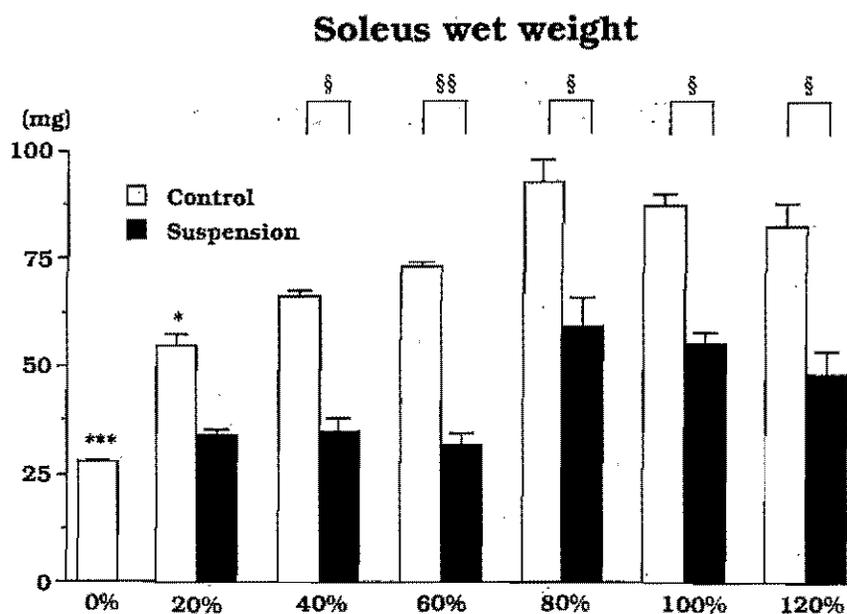


図-4: ヒラメ筋湿重量。平均±SEM。*: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and §: $p < 0.05$ and §§: $p < 0.01$ vs. control by scheffe's post hoc test.

图-5

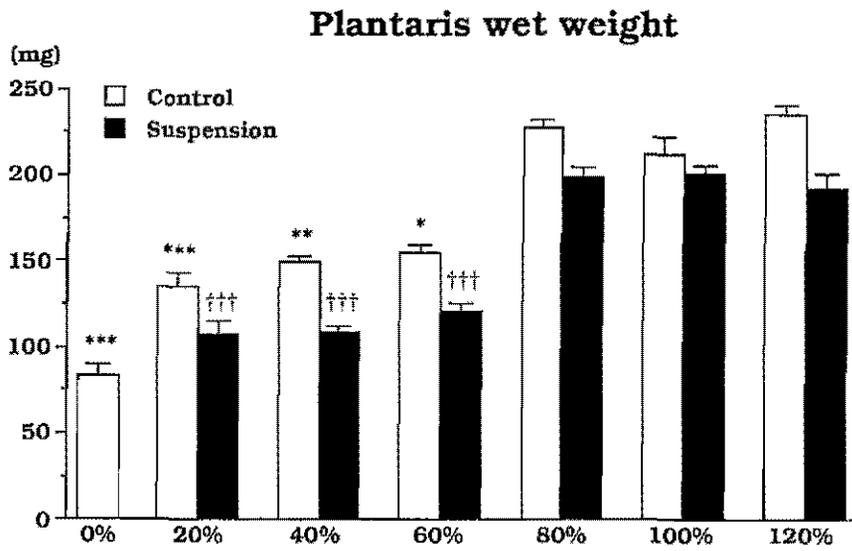


图-5: 足底筋湿重量。平均 \pm SEM。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.05$, and ***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and †††: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test。

图-6

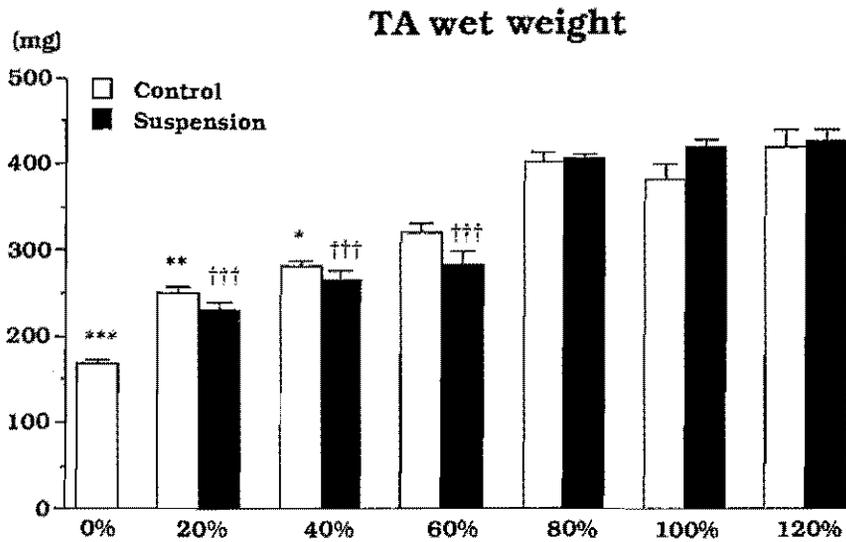


图-6: 前脛骨筋湿重量。平均 \pm SEM。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, and ***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and †††: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test。

図-7

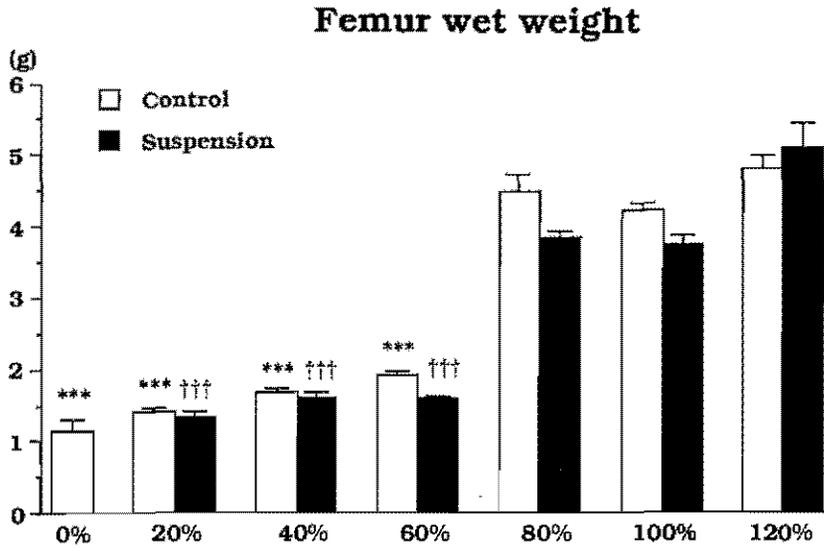


図-7: 大腿骨湿重量。平均 \pm SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and †††: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test.

図-8

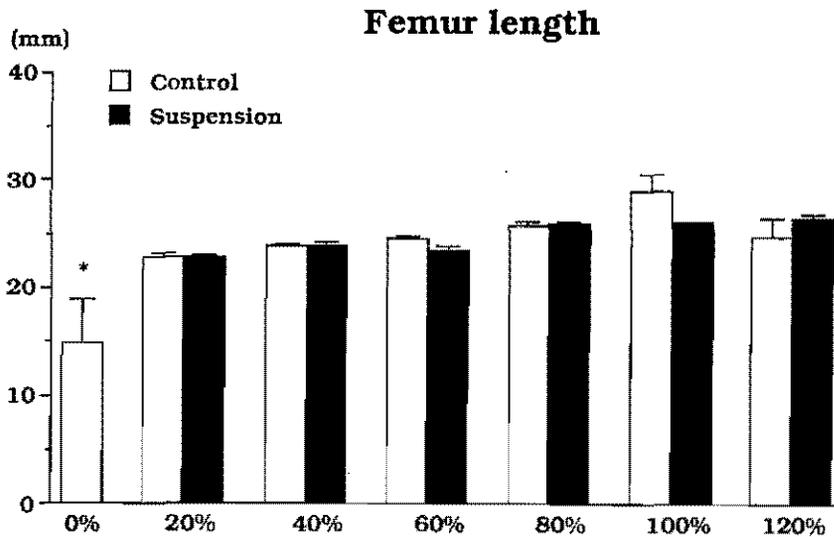


図-8: 大腿骨長。平均 \pm SEM。*: $p < 0.05$ vs. 100% Ca - control by Scheffe's post hoc test.

图-9

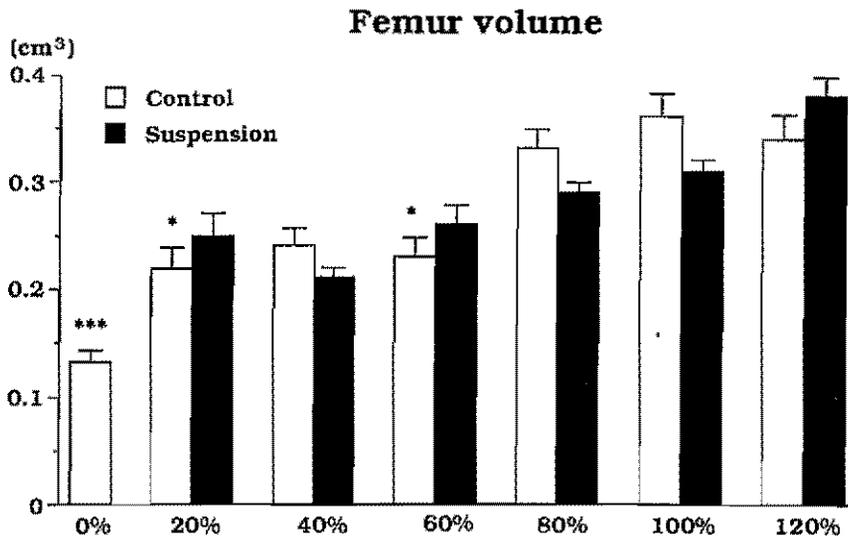


图-9: 大腿骨容积。平均±SEM。*: $p < 0.05$ and ***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control by Scheffe's post hoc test。

图-10

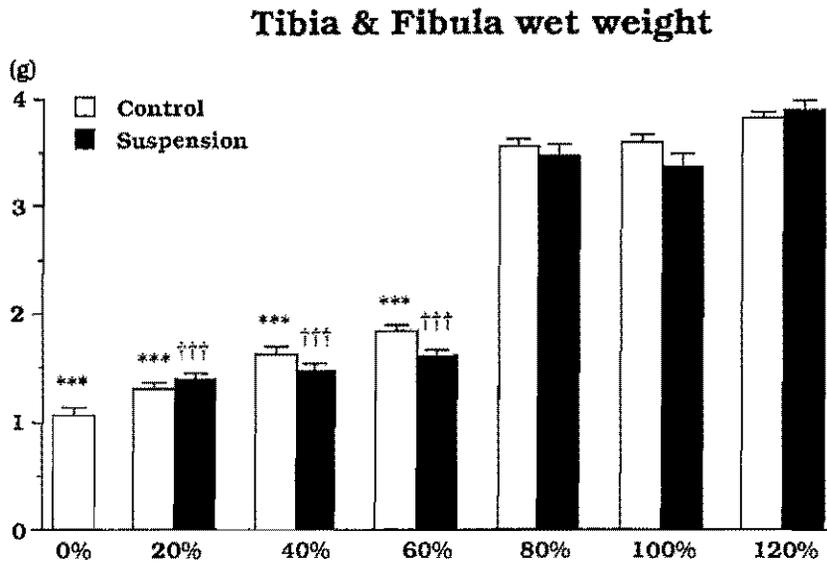


图-10: 胫骨·腓骨湿重量。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and †††: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test。

図-11

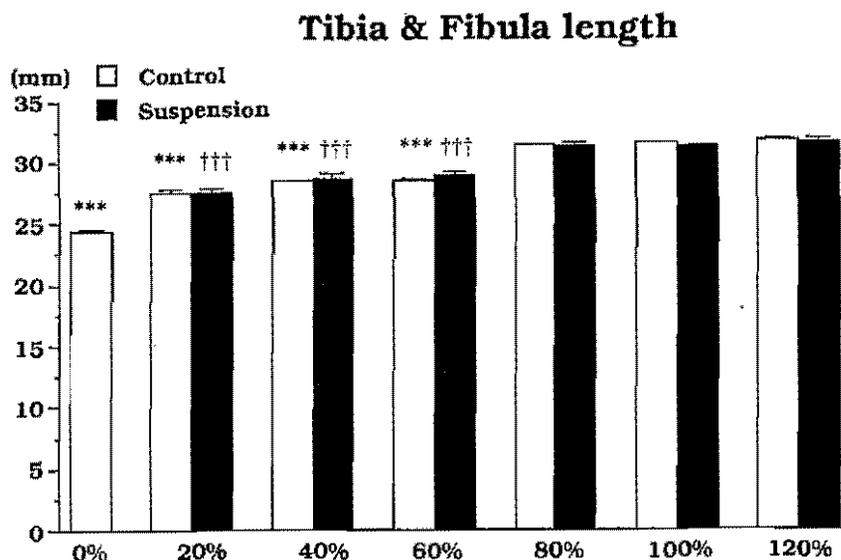


図-11: 脛骨・腓骨長。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control, and ###: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - suspension by Scheffe's post hoc test。

図-12

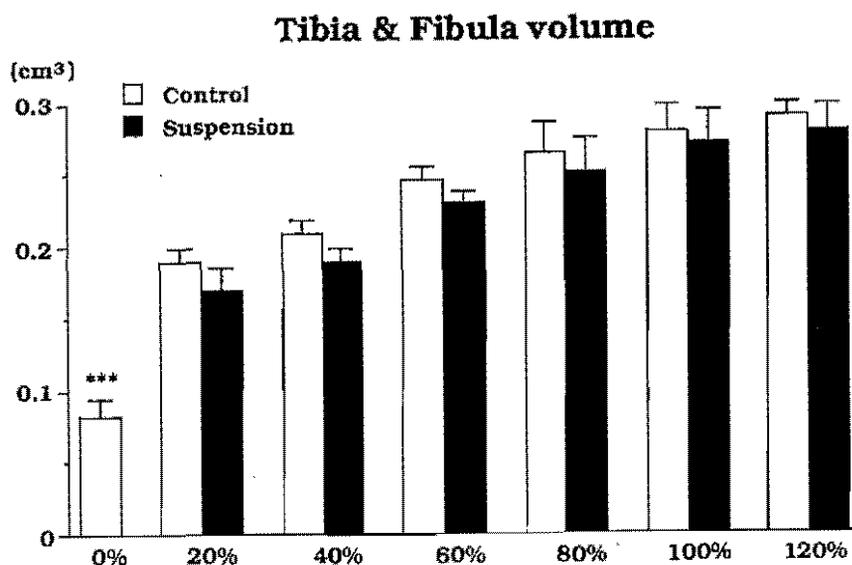


図-12: 脛骨・腓骨容積。平均±SEM。***: $p < 0.001$ vs. 100% Ca - control by Scheffe's post hoc test。