

低カルシウム食は加齢と運動に伴う酸化ストレスを促進するか

防衛医科大学校衛生学教室 教授 大野 秀 樹
大石 修 司 十枝内 厚 次
木崎 節 子 芳賀 脩 光
瀬川 雅 彦 唐澤 富士夫
福田 孝 一 佐藤 哲 雄

研究目的

低カルシウム (Ca) を与えたラットにおける加齢と運動の活性酸素とその防御システムに対する影響を検索することを目的とした。本報告は、ヒラメ筋を中心としたものであるが、他の組織については、現在測定中である。なお、大動脈の張力への影響、及び免疫への影響についてもあわせて検討した。

研究方法

- 1) 実験動物、飼料及び運動負荷：オスWistar系ラットを低Ca食(0.01%Ca)とコントロール食(1.04%Ca)群に分けた。低Ca群は、さらに1カ月 (Ca-1) と3カ月 (Ca-3) 投与群に分けた。いずれの群とも半数のラットには、サンプリング直前に“exhaustive”になるまで、20m/min、傾斜0°の条件で急性電動式トレッドミル走を実施した。すべてのラットの年齢は、サンプリング時に26週齢となるようにした。申請書に準拠して、血液、ヒラメ筋、褐色脂肪組織 (BAT)、胸部下行大動脈などを採取し、一部を除いて-80℃で冷凍保存した。
- 2) 血漿無機質、電解質と副甲状腺ホルモン (PTH) の測定：血漿無機質 (Ca、P) 濃度はイオン電極法、モリブデン酸直接法によって、電解質 (Na, K, Cl) 濃度は炎光光度法、電量滴定法によって、PTH濃度はRIAの2抗体法によってそれぞれ測定した。
- 3) 酸化ストレスの評価：血液から好中球を分離し、 O_2^- と 1O_2 に比較的特異的に反応して発光するウミホタル、ルシフェリン誘導体(MCLA)を用いて、Luminescence Reader BLR-301 (Aloka) (Nakano, M. et al. : Anal. Biochem., 159 : 363-369, 1986) によって、好中球の活性酸素発生能を測定した。
- 4) ヒラメ筋の抗酸化酵素の評価：グルタチオンペルオキシダーゼ活性は、 ϵ -ブチルヒドロペルオキシドを基質として、酸化型グルタチオン (GSSG) の生成速度を、グルタチオン (GSH) 還元酵素を共存させることでGSHサイクルと共存させて、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の減少を340nmで測定することによって評価した。カタラーゼ (CAT) 活性は、紫外部吸収 (H_2O_2 の吸収) を利用して測定した。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) は、Cu, Zn-SOD, Mn-SODの両アイソザイムについて、活性とタンパク量の両面から検討した。酵素活性は、シアン添加によって両活性を分離した後、チトクロームC法により測定した。両酵素タンパク量は、

申請者らのグループが開発した酵素免疫定量法 (ELISA) (Ohno, H. et al.: Exercise and Oxygen Toxicity, Sen, C. K. et al., eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 127-161, 1994) によって評価した。加えて、Cu, Zn-SOD, Mn-SODのmRNAの発現をNorthern blot法(Oh-ishi, S. et al.: Mech. Ageing Dev., 84: 65-76, 1995) によって検索した。なお、ミトコンドリア機能を知るために、クエン酸合成酵素 (CS) 活性をShepherdとGarlandの方法 (Methods Enzymol., 13: 11-16, 1969) によって測定した。タンパク質濃度はLowry法により決定した。

5) 胸部大動脈の収縮機構の評価: 摘出した胸部下行大動脈の周囲の結合組織を除去した後に3mm幅の血管輪を作成した。一部の血管は、金属針を用いて内皮を機械的に除去した。マグヌス管 (1.5 ml, 37°C) 内に2本のフックを用いて血管輪を吊して一方は固定し、他方は歪計 (BT-611T、昭和測器) に接続した (Karasawa, F. et al.: Clin. Exp. Pharmacol. Physiol., 20: 705-711, 1993)。収縮力の測定は、塩化カリウム (KCl) あるいは、 α_1 アゴニストであるフェニルエフリンを累積的に投与して行った。

6) 脾細胞、腹腔細胞の免疫能: 本実験は、安静の対照群とCa-3群のみについて行った。

i) 脾細胞の調製とマイトジェン反応: 脾細胞は、脾臓をホモジナイズしナイロンメッシュ (アベ科学) を通して調製した。赤血球は、0.16Mトリス-塩化アンモニウム等張緩衝液 (pH7.2) で除去した。調製した脾細胞を組織培養液に懸濁し、コンカナバリンA (Con A, 2.5 μ g/ml) あるいはリポ多糖 (LPS, 25 μ g/ml) とともに、37°Cで72時間培養した。培養終了8時間前に 3 H-thymidine (TdR, 0.5 μ Ci/well) を加え、細胞内への取り込みを細胞増殖の指標とした (Kizahi, T. et al.: Immunology, 86: 456-462, 1995)。細胞は、LABO MASHセルハーベス (LABO Science) でガラスフィルター上に回収し、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Aloka) で測定した。

ii) 腹腔細胞の調製と貪食能: 腹腔に20mlの冷却リン酸緩衝液 (PBS, pH7.2) を注入し、腹腔細胞を回収して組織培養液に懸濁した。蛍光ラテックスビーズ (Polysciences) にラットIg画分を加え、37°Cで30分間オプソニン化した。オプソニン化したビーズと腹腔細胞を振盪しながら37°Cで2時間培養した。冷却PBSで3回洗浄後、2.5%ホルムアルデヒド/PBSに懸濁し、20分間氷上で固定し、貪食能をFACStarPLUS (Becton Dickinson) で分析した。

研究結果及び考察

- 1) 体重とヒラメ筋、BAT重量: Table1に示すように、体重はCa-1、Ca-3群ともに対照群よりも有意に増加した。これは、Ca不足により一種の精神的ストレスが生じ、過食状態に陥ったためかもしれない。すなわち、BAT重量のCa欠乏群での増大傾向は、摂食性熱産生を意味しているのかもしれない。一方、ヒラメ筋の体重当たりの重量には差が見られなかった。
- 2) 持久走能: Table2に示すとおり、両Ca欠乏群ともに持久走能力が有意に低下した。このメカニズムは非常に興味深いですが、まだ説明できるだけの材料がない。今後の課題としたい。
- 3) 血漿無機質、電解質及びPTH濃度: 意外なことに、血漿Ca、PTH濃度のどちらもCa欠乏群で変動

を示さなかった (Table3)。これは、他の報告 (Wong, K.M. et al. : Calcif. Tissue Int., 32 : 213-219, 1980; Armbrecht, H. J. : Am. J. Physiol., 246 : E266-E270, 1984) とほぼ一致した。本研究を含めたいずれの研究も十分に成熟した3カ月齢以降に低Ca食投与を開始しており、Ca骨吸収によって不足分を代償する能力があったため、と考えられた。実際、サンプリング時に肋骨をハサミで切るときに、対照群と比較して低Ca群の方が明らかに手応えが小さかった。現在、大腿骨の骨密度を測定中である。しかし、この説明は、PTH濃度が上昇しなかったことに対しては、満足のいくものではない。P濃度は両Ca欠乏群で有意に低下したが、いずれも他の因子と異なり急性運動後著明に増加したことは興味を持たれる。血漿電解質濃度は、Ca-3群が低K血症を示した以外は有意な変動が認められなかった。

- 4) 好中球の活性酸素発生能：Table4に示すとおり、安静時には3群間に有意差が見られなかった。一方、急性運動後、Ca-3群には他群と異なり著しい活性酸素発生能の増大が認められた。この事実は、長期間Ca欠乏状態が続くと、運動時に活性酸素の発生が高まり生体に負の影響を及ぼすことを示唆する。
- 5) ヒラメ筋CS, GSH-Px及びCAT活性：Table5に示すように、CS活性にはCa欠乏食の影響が認められず、ミトコンドリア・TCAサイクルレベルには大きな変化はなかったことが推測された。GSH-Px活性は、Ca-1群で有意の減少を示したものの、Ca-3群では対照群との差が観察されなかった。しかしながら、Ca-3群のみに急性運動後の有意な減少が見られた。逆に、CAT活性はCa-1群で有意に上昇したが、急性運動後は両Ca欠乏群ともに低下傾向が見られた。Ca-1群のCAT活性の上昇は、GSH-Px活性の低下を代償しているのかもしれない。両酵素活性の運動後の減少は、酸化ストレスの影響をより強く受けることを示唆している。
- 6) ヒラメ筋SODアイソザイム：Cu, Zn-SODについては、安静時のCa-1群の酵素活性のみが有意の上昇を示した (Table6)。Mn-SODは、安静時のCa-3群の酵素活性が増加傾向を示し、タンパク量は明らかに増加した。このMn-SODの増加は、Table4で示した運動時の活性酸素発生能の増大に対する備えであるのかもしれない。しかし、驚いたことに、Ca-1、Ca-3群ともに急性運動直後にMn-SOD活性は変化を示さなかったが、酵素タンパク量は著減した。これは、運動による比活性 (酵素活性/酵素タンパク量) の上昇を意味する。この比活性の上昇のメカニズムは、今後の課題としたい。一方、mRNAの発現は、両アイソザイムともにCa欠乏群で増大し、その傾向は、とくにCa-1群で著明であった (Table7)。Ca-3群では、Cu, Zn-SOD, Mn-SODの両方に急性運動後のmRNA発現の有意な増加が見られた。これらのmRNA発現の増加は、Ca欠乏状態における酸化ストレスの増大を示唆しているかもしれない。また、興味あることに酵素タンパク量とmRNA発現レベルが必ずしも一致しなかった。

7) 胸部下行大動脈の収縮力

- i) KClの影響：収縮は、80mMK⁺による収縮を基準に百分率で表わした。その結果、測定したすべての群の間に血管内皮の存在の有無にかかわらず差が見られなかった (Fig. 1A, B)。KClによる

血管収縮は、 K^+ による膜の脱分極が電位依存性Caチャンネルを賦活し、細胞外から流入した Ca^{2+} によって生じると考えられている。従って、Ca欠乏食や急性運動負荷は、電位依存性Caチャンネルの機能、あるいは細胞内 Ca^{2+} による収縮機構に影響を与えなかった、と推定された。

ii) フェニルエフリンの影響：コントロール食の内皮温存群 (Fig. 2A) では、急性運動により血管収縮力は有意に増大したが、Ca欠乏食により収縮力は有意に低下し、急性運動を負荷すると一層減少した。しかし、内皮除去群ではいずれの群の間にも有意の差は認められなかった (Fig. 2B)。従って、Ca欠乏食やCa欠乏食摂取時の急性運動による血管平滑筋のフェニルエフリン感受性の低下は内皮依存性と考えられた。本研究では、シクロオキシゲナーゼ阻害薬としてインドメタシン ($10^{-6}M$) を用いたのでプロスタノイドの関与はなかったと思われ、内皮依存性血管弛緩因子もしくはエンドセリンなどの関与が推測された。

8) 脾細胞、腹腔細胞の免疫能

i) 脾細胞：Ca-3群のCon AまたはLPSに対する反応性に有意な変化は見られず、特異免疫を司るT細胞あるいはB細胞機能に対するCa欠乏食の影響は観察されなかった (Fig. 3)。

ii) 腹腔細胞：Fig. 4に示すように、腹腔細胞の貪食細胞数には有意の減少が見られた。この減少は、異物や老廃物などを処理する非特異免疫能の低下を示唆する。腹腔貪食細胞の多くを占めるマクロファージは、抗原提示細胞として特異免疫反応の誘導に不可欠であることから、その数の減少は侵入微生物、感染細胞、腫瘍細胞などを排除する免疫反応の低下も示唆した。

まとめ

本研究では、ほとんどCaを含まない飼料を最大3カ月間与えたにもかかわらず、血漿CaとPTH濃度からは、一見、ラットはCa欠乏の影響を受けていないように見えた。しかし、体重、大動脈の収縮力、腹腔細胞の免疫能、持久走能などの変化から、生体は予想以上に低Caによる不安定な状態に陥っていることが推測された。さらに、抗酸化酵素の変動から、Ca欠乏による酸化的ストレスの増大が示唆された。とくに、3カ月間低Ca食を摂取したラットでは、急性運動後に好中球の活性酸素発生能が著増し、ヒラメ筋の両SODアイソザイム・mRNAの発現も有意に増大したことから、Ca欠乏状態での激運動の有害性（危険性）が暗示された。

Table 1 Effects of low-calcium diets on body, soleus muscle, and brown adipose tissue weights in rats

Diet		Body weight	Soleus muscle		Brown adipose tissue	
		(g)	(mg)	(mg/100g body weight)	(mg)	(mg/100g body weight)
Normal-Ca						
	Rested	311 ± 3	115 ± 4	37.1 ± 1.3	337 ± 18	107 ± 6
	Acutely exercised	328 ± 6 ^a	119 ± 7	36.1 ± 1.7	328 ± 25	99.6 ± 6
Low-Ca						
1 mo	Rested	330 ± 5 ^b	127 ± 3 ^b	38.6 ± 1.2	382 ± 15	116 ± 5
	Acutely exercised	324 ± 5	122 ± 8	37.4 ± 2.1	416 ± 14	129 ± 5
3 mo	Rested	340 ± 7 ^b	133 ± 4 ^b	39.2 ± 1.6	386 ± 25	113 ± 6
	Acutely exercised	334 ± 12	126 ± 10	37.8 ± 2.9	434 ± 15	131 ± 7

Values are means ± SEM of six rats. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values); ^bP < 0.05 (vs. "normal-Ca, rested" values).

Table 2 Effects of low-calcium diets on the capacity for endurance exercise in rats

Diet	Running time (min)
Normal-Ca	106 ± 4
Low-Ca	
1 mo	81.1 ± 5.1 ^a
3 mo	74.0 ± 6.4 ^a

Values are means ± SEM of six rats. ^aP < 0.05 compared with normal-Ca rats.

Table 3 Effects of low-calcium diets on the concentrations of minerals, electrolytes, and immunoreactive parathyroid hormone (PTH) in plasma of rats

Diet	Ca (mg/100 ml)	P (mg/100 ml)	Na (mEq/l)	K (mEq/l)	Cl (mEq/l)	PTH (pg/ml)
Normal-Ca						
Rested	9.52 ± 0.29	5.72 ± 0.55	140 ± 0	5.10 ± 0.23	101 ± 1	152 ± 8
Acutely exercised	9.58 ± 0.39	7.16 ± 0.81	142 ± 0	4.36 ± 0.31	103 ± 2	136 ± 13
Low-Ca						
1 mo Rested	9.42 ± 0.08	3.36 ± 0.12 ^b	143 ± 1	5.12 ± 0.27	104 ± 1	150 ± 11
1 mo Acutely exercised	10.2 ± 0.2 ^a	6.38 ± 0.67 ^a	142 ± 0	5.30 ± 0.25	102 ± 1	135 ± 19
3 mo Rested	9.86 ± 0.05	3.64 ± 0.17 ^b	139 ± 0	4.38 ± 0.10 ^b	99.2 ± 0.5	150 ± 8
3 mo Acutely exercised	10.0 ± 0.09	5.76 ± 0.26 ^a	140 ± 0	4.36 ± 0.11	100 ± 1	154 ± 9

Values are means ± SEM of five rats. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values); ^bP < 0.05 (vs. "normal-Ca, rested" values).

Table 4 Effects of low-calcium diets on light emission (O₂⁻ plus ¹O₂ production) by granulocytes from rats

Diet	Maximal light intensity	
	(kcpm)	(%)
Normal-Ca		
Rested (12)	126 ± 11	100 ± 9
Acutely exercised (13)	124 ± 15	98.6 ± 11.6
Low-Ca		
1 mo Rested (8)	102 ± 12	81.2 ± 9.5
1 mo Acutely exercised (8)	100 ± 13	79.9 ± 10.1
3 mo Rested (8)	87 ± 13	69.6 ± 10.0
3 mo Acutely exercised (8)	143 ± 15 ^a	114 ± 14 ^a

Values are means ± SEM. Figures in parentheses are numbers of animals. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values).

Table 5 Effects of low-calcium diets on the activities of citrate synthase (CS), glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in soleus muscle of rats

Diet		Protein (mg/g wet tissue)	CS (U/mg protein)	GSH-Px (U/mg protein)	CAT (mU/mg protein)
Normal-Ca					
	Rested	28.7 ± 1.6	0.331 ± 0.014	33.9 ± 0.7	60.4 ± 5.4
	Acutely exercised	28.0 ± 1.5	0.286 ± 0.014	36.6 ± 1.7	63.5 ± 3.4
Low-Ca					
1 mo	Rested	31.0 ± 1.6	0.355 ± 0.010	30.7 ± 1.1 ^b	74.1 ± 2.1 ^b
	Acutely exercised	30.0 ± 1.2	0.358 ± 0.014	32.2 ± 1.3	61.6 ± 1.9 ^a
3 mo	Rested	25.9 ± 1.0	0.359 ± 0.022	32.0 ± 1.0	71.3 ± 2.8
	Acutely exercised	29.6 ± 1.9	0.356 ± 0.024	28.1 ± 1.2 ^a	58.0 ± 5.3

Values are means ± SEM of six rats. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values); ^bP < 0.05 (vs. "normal-Ca, rested" values).

Table 6 Effects of low-calcium diets on the values of superoxide dismutase (SOD) isoenzymes in soleus muscle of rats

Diet	Cu,Zn-SOD		Mn-SOD		
	Activity (U/mg protein)	Content (µg/mg protein)	Activity (U/mg protein)	Content (µg/mg protein)	
Normal-Ca					
	Rested	21.7 ± 3.2	2.27 ± 0.35	6.82 ± 0.57	2.16 ± 0.24
	Acutely exercised	23.3 ± 2.2	1.99 ± 0.07	5.81 ± 0.27	1.62 ± 0.19
Low-Ca					
1 mo	Rested	31.6 ± 1.6 ^b	2.48 ± 0.56	6.71 ± 0.17	2.74 ± 0.23
	Acutely exercised	34.6 ± 1.1	2.04 ± 0.08	6.56 ± 0.24	1.45 ± 0.09 ^a
3 mo	Rested	28.2 ± 3.2	3.81 ± 0.79	8.02 ± 0.29	3.88 ± 0.36 ^b
	Acutely exercised	33.2 ± 3.5	2.72 ± 0.10	7.24 ± 0.42	1.99 ± 0.18 ^a

Values are means ± SEM of six rats. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values); ^bP < 0.05 (vs. "normal-Ca, rested" values)

Table 7 Effects of low-calcium diets on the expression of mRNAs for superoxide dismutase isoenzymes (Cu,Zn-SOD and Mn-SOD) in soleus muscle of rats

Diet		Cu,Zn-SOD (%)	Mn-SOD (%)
Normal-Ca			
	Rested	100 ± 18	100 ± 17
	Acutely exercised	93.5 ± 11.9	114 ± 16
Low-Ca			
1 mo	Rested	355 ± 48 ^b	228 ± 14 ^b
	Acutely exercised	380 ± 46	212 ± 16
3 mo	Rested	163 ± 16 ^b	151 ± 15
	Acutely exercised	299 ± 42 ^a	204 ± 12 ^a

Values are means ± SEM of five rats. The relative abundance of Cu,Zn-SOD and Mn-SOD mRNA expressions was expressed as percentages of normal-Ca, rested rats after normalization to 28S rRNA levels. ^aP < 0.05 (vs. "rested" values); ^bP < 0.05 (vs. "normal-Ca, rested" values).

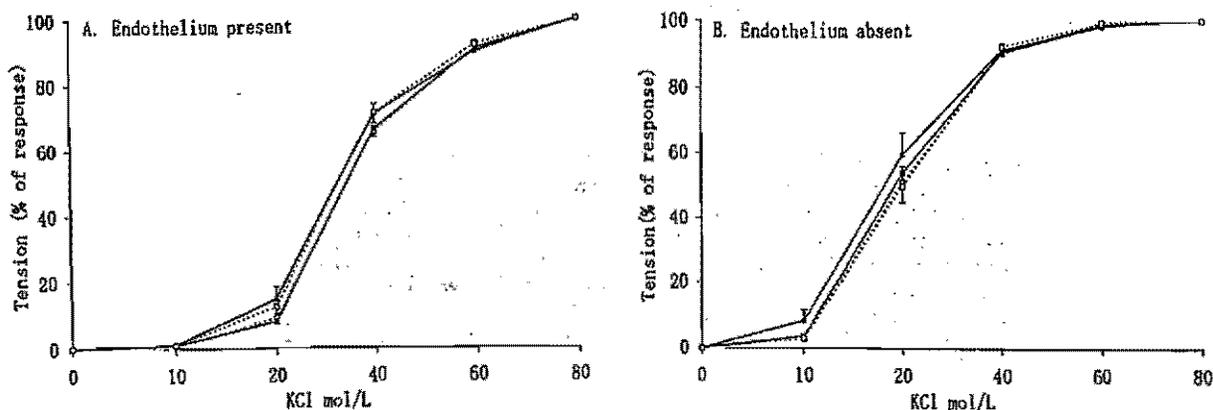


Fig. 1. Cumulative concentration-relaxation relationships of rat aortic rings (A) with and (B) without endothelium exposed to increasing concentrations of KCl. Values are means ± SEM of eight rats. (○) normal-Ca, rested rats; (●) normal-Ca, acutely exercised rats; (□) low-Ca, rested rats (Ca-1 plus Ca-3 rats); (■) low-Ca, acutely exercised rats (Ca-1 plus Ca-3 rats).

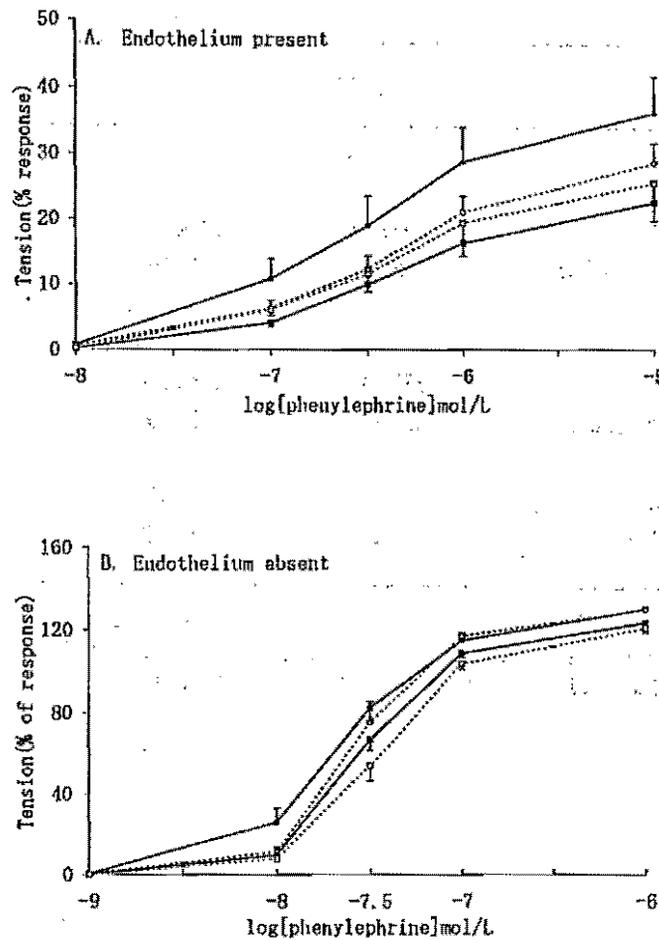


Fig. 2. Cumulative concentration-relaxation relationships of rat aortic rings (A) with and (B) without endothelium-exposed to increasing concentrations of phenylephrine. Values are means \pm SEM of eight rats. (○) normal-Ca, rested rats; (●) normal-Ca, acutely exercised rats; (□) low-Ca, rested rats (Ca-1 plus Ca-3 rats); (■) low-Ca, acutely exercised rats (Ca-1 plus Ca-3 rats). A: statistically significant between the four groups ($P < 0.05$).

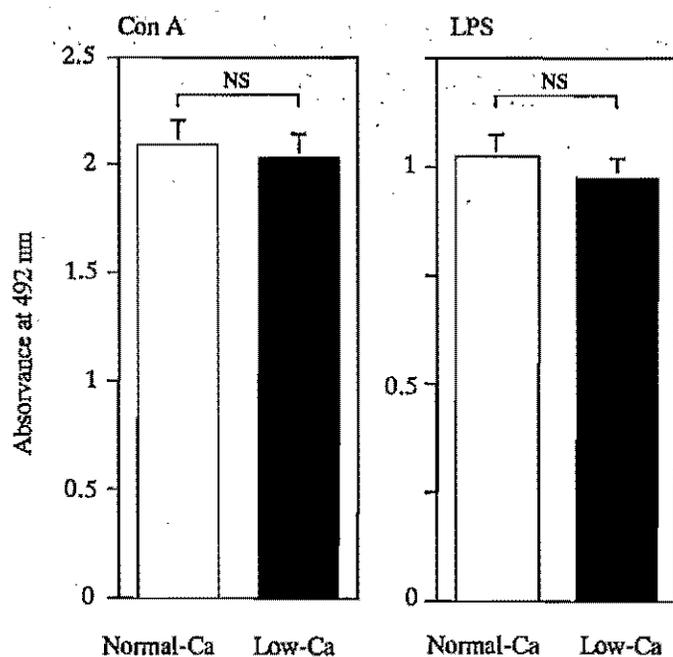


Fig. 3. Proliferative responses to mitogens in spleen cells from mice reared with normal-Ca or low-Ca diets for 3 months. Spleen cells (5×10^5 /well) were stimulated with concanavalin A (Con A) ($2.5 \mu\text{g/ml}$) or lipopolysaccharide (LPS) ($25 \mu\text{g/ml}$) at 37°C for 72 h. Proliferative responses were determined using CellTiter⁹⁶. Values are means \pm SEM of three mice. NS, not significantly different.

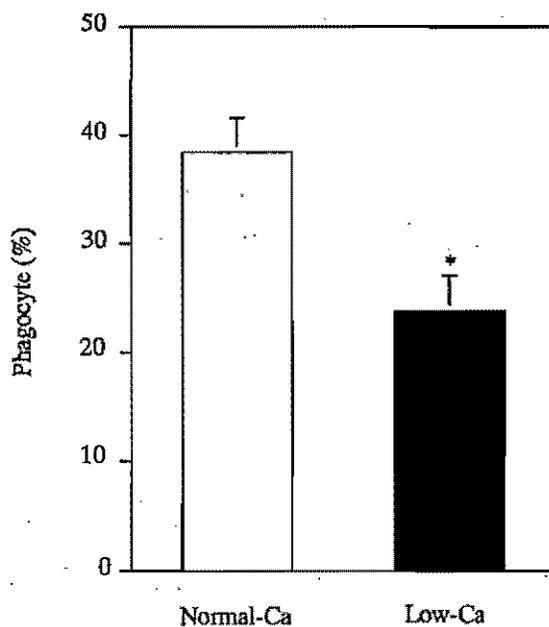


Fig. 4. Percentages of phagocytes in peritoneal cells from mice reared with normal-Ca or low-Ca diets for 3 months. Peritoneal cells were incubated with opsonized latex beads containing fluorescence yellow green dye at 37°C for 1 h. After the incubation, cells were analyzed by flow cytometry. Values are means \pm SEM of three mice. * $P < 0.05$ compared with normal-Ca mice.