

〔学術奨励賞〕
〔原 著〕

ラット大腿骨力学特性に関するカルシウム およびコラーゲン含有量の影響

古谷 安祐香
柴田 佳奈
吉里 秀雄
吉村 篤司

(名古屋工業大学大学院)

Influence of Calcium and Collagen Contents on Biomechanical Properties of Rat Femurs

Ayuka FURUTANI, Kana SHIBATA, Hideo YOSHIZATO
and Atsushi YOSHIMURA¹⁾

【Abstract】

The aim of the present study is to examine the influence of calcium and collagen contents on rat femur biomechanical properties using three points of a bending test. The rats used in the present study were divided into three groups, control, exercise and ovariectomy-group.

The collagen content and the plasticity energy of the ovariectomy group were lower than the values of the control group, but the biomechanical properties of the exercised group had no significant differences compared with those of the control group. Results from unified data, showed significant positive correlation between calcium and elastic energy and between collagen and maximum energy based on stress-strain curve.

The results presented here suggest the importance of considering not only calcium content but also collagen content with regard to bone biomechanical properties.

Keyword : three points of bending test, Sirius Red/Fast Green staining, calcium, collagen
キーワード : 三点曲げ負荷試験, Sirius Red/Fast Green 染色, カルシウム, コラーゲン

1) *Department of Life Science and Applied Chemistry, Nagoya Institute of technology*

1. 緒言

骨の成分は、無機成分と有機成分から構成され、無機成分のうちカルシウムとリンはヒドロキシアパタイトの主要な成分、そして有機成分ではコラーゲンが主要な成分である (Bart C, 2008). 骨の形成は、コラーゲンを核としてその周りにカルシウム複合体が結合した構造になっていて、コラーゲンは細胞同士が衝撃を受けないような機械的な弾性力として重要な役割を果たしている (Landis WJ, 1995).

一般的に、骨の特性を表す骨密度は、骨の強度と関連性が高いと考えられており、骨粗鬆症の検診や診断の指標として用いられている。しかし、オーバーユーズによる骨の傷害や運動ストレスによる骨折では、骨密度との強い関連がなかったことが指摘されている (Carbon R, et al., 1990; Magnusson HI, et al., 2001). したがって、骨の詳細な性質を分析するためには骨密度だけでなく骨の成分、材質特性や力学的な特性を評価することが重要であると考えられる。三点曲げ試験法は、骨の力学特性を評価することができるがよく用いられ、骨の堅さ (ヤング率)、弾性力および破断力を測定することができる (Rice JC, et al., 1988; John DC, 2003).

近年、骨の力学的な特性は、無機物質の主成分であるカルシウムだけでなく、有機物質の主成分であるコラーゲンも重要であると考えられている (Recker & Barger, 2004; Bart C, 2008). Bailey 等 (1999) は、海面骨の骨密度とその力学特性との間に関連がみられなかったことを指摘していることから、海面骨より皮質骨を用いて調べることが適切であると考えられる。また、これまで骨の力学的な特性と骨の無機成分であるカルシウムおよび有機成分であるコラーゲンとの関連を骨の皮質骨で統合的に検討した報告は十分に論議され尽くしていない。

そこで、本研究では、正常な成熟ラットに加えて、運動刺激により骨成分の変化が期待される成熟運動ラット (Boyde AI, 2003; Bocalini S, et al., 2010), さらに力学的な特性が悪化することことが期待できる骨粗鬆症を想定した更年期モデルラット (Carl CD, 1991; Dike NK, 1991; Kalu DN, 1991; Matkovic V, et al., 1994; Sumino H, et al., 2004; Shuid AN, et al., 2010) を用いて、皮質骨

の力学特性とカルシウムおよびコラーゲン量との影響について明らかにすることを目的とした。

2. 方法

1) 実験動物及びグルーピングと飼育条件

動物は、9週齢のWistar系雌性ラット (170~190g, 日本SLC) を用いて、12時間の明暗サイクルのある一定温度環境下 (室温23度, 湿度50~60%) で飼育した。餌 (固形試料CE-2) と水は自由に摂取させた。動物は1週間の予備飼育の後 (10週齢), 各群の平均体重がほぼ均等になるように、無作為に対照群 (正常成熟ラット, 5匹), 運動群 (成熟運動ラット, 6匹) と卵巣摘出群 (更年期モデルラット, 5匹) の3群に分けた。尚, 運動群には運動を開始し, 卵巣摘出群には卵巣の摘出手術を施し, その後3群とも17週間飼育した。尚, 卵巣の摘出は, エーテル麻酔処理後に, ペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) を腹腔内投与した麻酔下で卵巣を摘出し, その後縫合した。実験終了18~24時間後, すべてのラットは, エーテル麻酔とペントバルビタールナトリウム投与による安楽死後に大腿骨を摘出した。この動物実験は, 名古屋工業大学実験動物委員会で承認され, その要項に従って適切に実施した。

2) 骨成分の変化が期待される運動トレーニング

運動群には、週3回のドレッドミル運動を負荷した。その運動は、アップヒル (斜度6度) で分速20~25mの速度で1日合計30分間、17週間継続的に実施した。この運動は、ラットの最大酸素摂取量の約60~80%に相当し (Armstrong RB, et al., 1974), 中強度の運動である。運動に慣れさせるために、最初の1週間は5~7分の運動終了後に休憩 (3分程度) を入れて、3~5セット行った。2週から4週目は、10分程度の運動に休憩を入れて3セット実施した。5週目以降から17週目までは、30分間の連続したドレッドミル運動を実施させた。

3) 摘出した骨の準備と三点曲げ試験法

骨の摘出は、エーテル麻酔処理後にペントバルビタールナトリウム (50mg/kg) を腹腔内投与し安楽死させた後、大腿骨 (骨長約4cm) を取り出し、骨に付着した結合組織を綺麗に取り除いた。その後、骨の力学的測定を実施するまで50mlチューブ (乾燥を防ぐために生理食塩水を

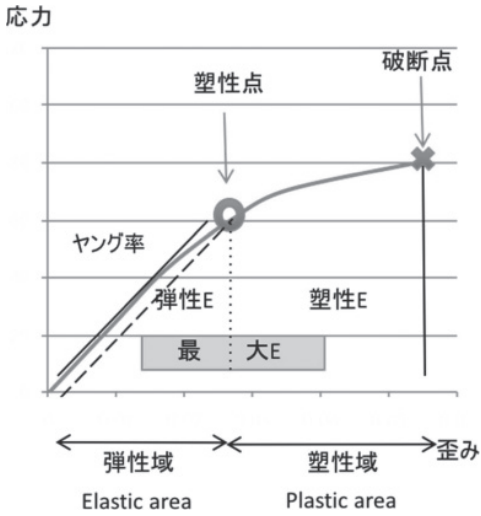


図 1 三点曲げ試験による応力-歪み曲線と力学的エネルギーの模式図。弾性 E (エネルギー) は、応力-歪み曲線と塑性点および塑性点と垂線を結んだ面積、塑性 E は、塑性点と破断点からの垂線を結んだ面積、最大 E は、弾性 E と塑性 E を合算した面積である。破断は、0.2% 永久歪みを用いて弾性 E を算出した仮想線を示す。ヤング率 (Young's modulus), 弾性 E (Elastic energy), 塑性 E (post-yield energy after plastic point), 最大 E (Total energy: 弾性 E + 塑性), 応力 (yield stress), 歪み (Strain)。

浸した脱脂綿を含む)に入れてフリーザー (-80 度) にて保存した。

実験に用いた大腿骨は、室温で 30 分間放置してから三点曲げ試験 (EZ Test, Shimadzu 社製) による破断実験を行った。三点曲げ試験の設定条件は、支点間距離 18 mm, ロードセル 500 N, 負荷速度 5 mm/min で実施した (John DC, 2003; Wang XL, et al., 2002)。応力-歪み曲線の作成に先立ち、各ラットの大腿骨の厚さと幅をデジタルノギスで測定し、備え付きのソフトプログラムにそれらの値を入れ分析した。尚、サンプルを平滑試験片として 0.01 秒ごとに分析した。その力学特性は、John 等 (2003) を参考して、図 1 に示したように、ヤング率 (Young' modulus), 弾性エネルギー (弾性 E: Elastic energy), 最大エネルギー (最大 E: Total energy) および塑性エネルギー (塑性 E: 最大 E から弾性 E を引いた値) を算出した。ちなみに、ヤング率は材料の硬さの

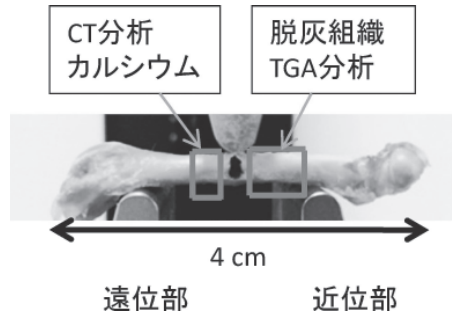


図 2 CT 分析, カルシウム, 脱灰組織 (コラーゲン) および TGA の分析した骨の部位を示す。骨の上方 (骨に負荷を与えた点) と下方 (2つの支点) は、三点曲げ試験の支点を示す。

指標, 弾性 E は変形に対する強さの指標, 最大 E は骨が破断するまでの全エネルギーの指標, そして塑性 E は骨を材料として考えた場合の正常な構造に回復する領域で, これ以上変形すると元の構造に戻らない限界点であり, 材料の壊れにくさの指標や骨のクラックなどが影響する指標である。尚, 鋼以外の柔らかい材料では, 塑性変形を示す降伏点 (これを越えた点では, 材料が正常な状態に回復しない点, John DC, 2003) で, 一般には耐力と定義されている。本研究では, 0.2% 永久歪みを用いて, 図 1 の応力-歪み曲線の直線部と平行に, 応力 0-歪み 0.2% のところから線を引き曲線との交点を塑性点とした。

4) CT, カルシウム, コラーゲンおよび熱重量分析の方法

4-1) CT による皮質骨の厚さ測定

三点曲げ試験前に、加圧点 (骨の中央部) を油性マーカーで印をつけ、皮質骨の厚さはマーカー付近の骨 (遠位部へ 5 mm 付近, 図 2 参照) を CT (inspeXio SMX-100CT, Shimadzu 社製) で撮影してコンピューターで分析した。分析した箇所は、1 個体当たり 4 カ所で厚さを測定し、その平均値を 1 個体の値とした。

4-2) カルシウム重量比の測定

カルシウムを分析するための組織切片は、骨の破断した部位から遠位部 (CT で分析した付近) を用いて作成された (図 2)。CT で分析した付近の骨を切り出し、その骨をアルミホイル容器に入れた凍結組織用包埋剤に浸漬して包埋した。その後、液体窒素で急冷したイソペンタンで凍結 (-160°C)

し、クライオスタットマイクロトーム内 (-20 度, Bright5030, Bright, Huntington) で 15 μ m 厚にスライスし、スライドガラスに貼り付けミネラル分析として用いた。その分析は、金属や材料などの分野で広く使用され、高い評価を得ている電界放出型電子プローブマイクロアナライザー (EPMA, JXA-8530F, 日本電子株式会社) を用いて、カーボン蒸着後の組織切片で行った。測定条件は、加速電圧 10.0 kv, 吸収電流 100 nA, 1000 倍率, ビーム径 50 μ m (円形) で、1 個体当たり 3~5 箇所元素分析を行い、その平均値を 1 個体の値とした。分析した元素は、骨組織の主要な成分である Ca, P, N, Na, Mg, O, C の 7 種を測定し、その重量濃度の合計を 100% で換算し、カルシウム量はその相対的 % (重量比) で評価した。

4-3) コラーゲン面密度の測定 (組織化学的手法による測定)

コラーゲン面密度は、骨の脱灰処理後のコラーゲン染色とその後 UV 分析による 2 つの手法を経て測定した。骨組織切片作成のための脱灰処理は、骨切片を破壊することなく作成でき、組織切片の面積を容易に測定することができる。作成した骨の部位は、破断点から近位部 (油性マークから約 0~5 mm の付近, 図 2) を用いて実施した。Shuttleworth 等 (1972) と Shah 等 (1995) の文献を参考にし、10% ギ酸または 10 mM EDTA (蒸留水で希釈) 溶液で 12 時間浸漬して脱灰し、その後 0.02 M の重炭酸アンモニウムで中和した。その後、1 個体当たり 8 枚 (UV で分析するための適切なコラーゲン染色濃度を得るため) の切片をスライドガラスに張り付け、Sirius Red/Fast Green Collagen 染色キット (Chondrex, Inc.) を用いて分析した (Marotta M. & Martino G., 1985)。その後、その濃度を分光光度計 (SHIMAZU UV mini 1240) で分析してコラーゲン量を測定するものである。最終的なコラーゲン量は、組織切片 1 mm² 当たりのコラーゲン面密度 (μ g/mm²) として表した。

4-4) 熱重量示差熱分析 (TGA : 示差熱・熱重量同時測定装置 DTG-60) による灰分重量比の測定

熱重量示差熱分析では、骨の破断点から近位部 (油性マークから約 6~10 mm の付近) を用いて分析した (図 2)。有機物量は、骨の初期値で

ある測定前の重さに対する減少した重量 (灰分重量比, 重量%) で表した。尚、アルミナ (温度変化による燃焼は起こらない) を基準物質として、測定開始温度 50℃ から骨の重量変化を測定し、その後毎分 10℃ で昇温し 580℃ で終了温度とした (Calafiori AR, et al., 1993; Mkukuma LD, et al., 2004; Trebacz H & Wójtowicz K, 2005)。

7) 統計処理

体重の変化は、繰り返しのある二元配置の分散分析を用い、飼育週に伴う群間の差は、フィッシャーテストを用いて有意差を判定した ($P < 0.05$)。群間におけるカルシウム重量比、コラーゲン面密度および力学特性の項目の差は、一元配置の分散分析で判定した。尚、2 つの項目間の相関は、ピアソン相関係数で判定した。また、対照群、運動群および卵巣摘出群のすべてのデータは、平均値と標準偏差 (SD) で示した。

3. 結果

1) 体重, 子宮重量の変化

図 3 に、対照群、運動群、卵巣摘出群の体重の変化 (平均値 \pm SD) を示した。卵巣摘出群では、飼育 8 週目から対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) な体重の増加が認められた。最終体重 (飼育 17 週目) は、対照群が 289.3 ± 13.8 g, 運動群が 280.6 ± 20.8 g, そして卵巣摘出群では 342.2 ± 22.9 g であった。一方、実験終了後の子宮重量の平均値 \pm SD は、対照群が 0.60 ± 0.15 g, 運動群は 0.50 ± 0.11 g

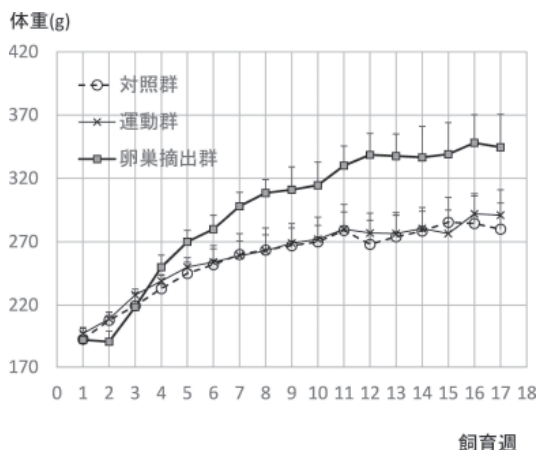


図 3 飼育 1 週目から 17 週目までの平均体重の平均値と標準偏差 (SD) を示す。* は、C 群との有意な差を示す ($P < 0.05$)。

そして卵巣摘出群は 0.08 ± 0.02 g で、卵巣摘出群の子宮重量は両群に比べて有意 ($P < 0.01$) に低い値であった。

2) コラーゲン面密度と熱重量示差熱分析 (TGA 分析) との関連

図4は、コラーゲン面密度と熱重量示差熱分析による有機物量との相関図を示し、 $r=0.537$ で有意 ($P < 0.05$) な値であった。表1には、3つの群におけるコラーゲン面密度を示した。対照群のコラーゲン面密度の平均値 \pm SDは $0.599 \pm 0.066 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 、運動群では $0.530 \pm 0.085 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ 、卵巣摘出群では $0.521 \pm 0.046 \mu\text{g}/\text{mm}^2$ の値を示し、対照群に比べ卵巣摘出群で有意 ($P < 0.05$) に低い値であった。また、TGA 分析による有機物質量 (減少した重量%) は、対照群の平均値 \pm SDは $19.57 \pm 0.62\%$ 、運動群では $18.58 \pm 0.51\%$ 、卵巣摘出群では $18.33 \pm 1.02\%$ を示した。コラーゲンの面密度

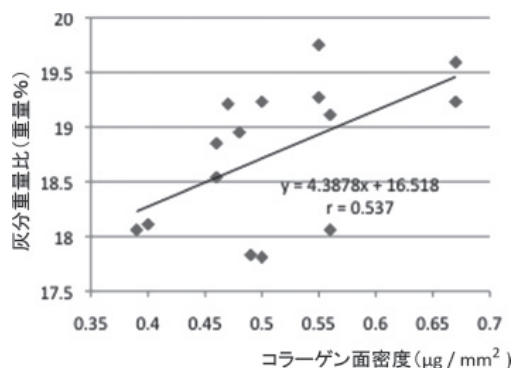


図4 3群のデータを合算した時の灰分重量比とコラーゲン面密度との相関図。相関係数 $r=0.537$ は、5%水準で有意な相関であった。

と同様に、対照群と卵巣摘出群に比べて有意 ($P < 0.05$) に低い値であった。

3) 卵巣摘出群、運動群、対照群におけるカルシウム重量比、コラーゲン面密度、皮質骨の厚さと力学特性との比較

表1には、3群におけるカルシウム重量比、コラーゲン面密度と力学特性の平均値 \pm SDを示した。カルシウム重量比は、対象群が 64.9 ± 1.87 (重量%)、運動群は 64.7 ± 1.12 (%), 卵巣摘出群は 65.2 ± 2.84 (%) で、3群間で有意な差は認められなかった。また、CTで測定された皮質骨の厚さは、対照群、運動群および卵巣摘出群の平均値と標準偏差は、それぞれ 0.80 ± 0.06 mm, 0.84 ± 0.01 mm, 0.79 ± 0.04 mm で、3群間に有意な差は認められなかった。力学特性であるヤング率、弾性E、および最大Eにおいても、3群間に有意な差は認められなかった。しかし、塑性Eでは、卵巣摘出群は対照群に比べて有意 ($P < 0.05$) に低い値であった。

4) 3つの群のデータを合算した時のカルシウム重量比 (%) およびコラーゲン面密度と力学特性との関連

表2は、3群のデータを合算した時の相関図で示した時のカルシウム重量比およびコラーゲン面密度と力学特性である弾性E、最大E、塑性Eとの相関係数を示した。

カルシウム重量比と力学特性との相関は、唯一弾性Eと $r=0.577$ で有意 ($P < 0.05$) に高い相関が認められた。図5には、その相関図を示したが、本実験で用いたラットのカルシウム重量比は62.5%から67.4%の範囲で、最小値に対する最

表1 対照群、運動群および卵巣摘出群におけるカルシウム重量比、コラーゲン面密度、皮質骨の厚さおよび力学特性。

	対照群	運動群	卵巣摘出群
カルシウム重量比	64.9 ± 1.87	64.7 ± 1.12	65.2 ± 2.84
コラーゲン面密度	0.599 ± 0.066	0.530 ± 0.085	0.521 ± 0.046 *
皮質骨の厚さ(mm)	0.80 ± 0.06	0.84 ± 0.01	0.79 ± 0.04
ヤング率 (MPa)	2295 ± 240	2051 ± 224	2193 ± 262
弾性 E (Nm/mm ³)	0.890 ± 0.125	0.958 ± 0.101	1.040 ± 0.148
最大 E (Nm/mm ³)	2.71 ± 0.52	2.71 ± 0.22	2.33 ± 0.34
塑性 E (Nm/mm ³)	1.82 ± 0.62	1.75 ± 0.23	1.29 ± 0.39 *

数値は、平均値と標準偏差 (SD)、カルシウム重量比は重量%そしてコラーゲン面密度は $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ を示す。*は、対照群との有意な差を示す ($P < 0.05$)。

表 2 3群のデータを合算した時のカルシウム重量比, コラーゲン面密度と力学特性との相関係数.

	カルシウム	コラーゲン	ヤング率	弾性 E	最大 E	塑性 E
カルシウム	—	-0.148	-0.089	0.577 *	-0.362	-0.409
コラーゲン	-0.148	—	0.667 *	-0.187	-0.270	-0.176
ヤング率	-0.089	0.667 *	—	-0.214	-0.302	-0.192
弾性 E	0.577 *	-0.187	-0.214	—	-0.467	-0.519
最大 E	-0.362	-0.270	-0.302	-0.467	—	0.938 **
塑性 E	-0.409	-0.176	-0.192	-0.519	0.938 *	—

カルシウムはカルシウム重量比, コラーゲンはコラーゲン面密度, E はエネルギーを示す. * は $P < 0.05$, ** は $P < 0.01$ で, 2つの項目間の有意な相関係数を示す.

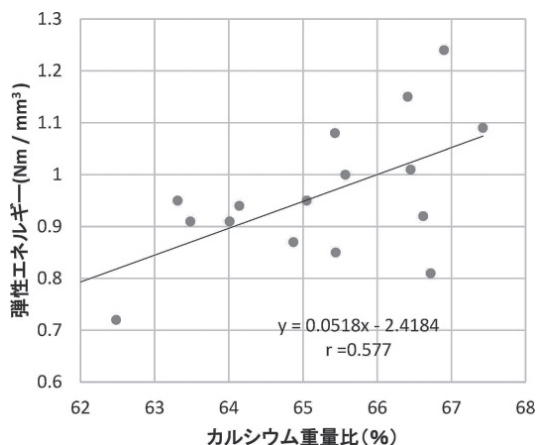


図 5 3群のデータを合算した時のカルシウム重量比と弾性エネルギーとの相関図. 相関係数 $r = 0.577$ は, 5%水準で有意な相関であった.

大値の割合は 1.08 倍で, 一方弾性 E は 0.71 から 1.25 の範囲で, 最小値に対する最大値は 1.76 倍で, カルシウム重量比に比べて弾性 E のバラツキが大きい値であった. また, ヤング率, 最大 E および塑性 E とは, 有意な関連が認められなかった.

一方, コラーゲン面密度と力学特性との相関は, ヤング率と $r = 0.667$ で有意 ($P < 0.05$) に高い相関であった. 図 6 には, その相関図を示したが, コラーゲン面密度の最小値に対する最大値の割合は 1.50 倍, 一方ヤング率の方は 1.51 倍で, 両項目とも類似したバラツキを示した.

また, 力学特性を示すヤング率, 最大 E, 弾性 E および塑性 E との関連は, 最大 E と塑性 E との間にのみ有意に高い相関 ($r = 0.938$, $P < 0.05$) であったが, その他の項目間では有意な関連が認められなかった.

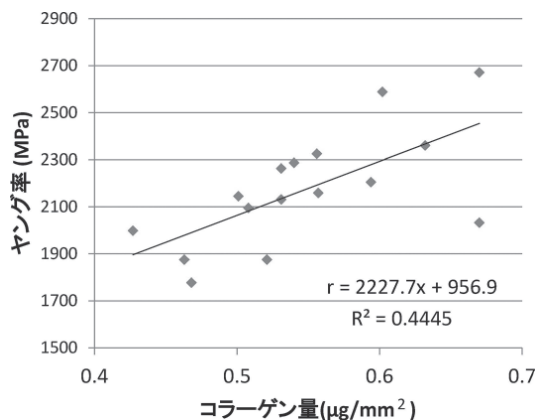


図 6 3群のデータを合算した時のコラーゲン量とそのヤング率との相関図. 相関係数 $r = 0.667$ は, 5%水準で有意な相関であった.

4. 考察

本研究では, カルシウム重量比やコラーゲン面密度が大腿骨の力学特性に与える影響を調べるために, 正常な成熟ラット, 成熟運動ラットと骨粗鬆症を想定した更年期モデルラットを用いて検討した. その結果, カルシウムだけでなくコラーゲンも骨の力学特性に関して重要な構成成分であることが示唆された.

1) 骨の力学特性とカルシウムの関係について

カルシウムは, 本来骨の硬さを示す指標であるとされているが (Rice JC, et al, 1988; John DC, 2003), 本研究ではカルシウム重量比と力学特性との間には変形に対する強さを示す弾性 E に対してのみ有意な相関が認められ, 骨の硬さを示すヤング率とは相関しない結果となった. この結果は Wen 等 (2015) のラビットの大腿骨を用いた

研究でヤング率とミネラル密度 (BMD) の間に関連がみられないことを示唆する先行研究を支持している。

ところで材料の壊れにくさの指標となる塑性 E は、骨の塑性変形 (正常な構造に回復する限界点) の限界点で、この低下は、骨のクラックや骨孔が多いことと関連し骨が脆く壊れ易いことが示唆されている (John DC, et al., 2003; Dubois-Ferrière VD, et al., 2014)。応力歪み曲線において、塑性 E は最大 E を反映しており、John 等 (2003) は、最大 E が高いと骨の壊れ難さ (タフネス) が高くなることを示唆する報告をしている。従来の骨の硬さとされてきた指標は「壊れにくさ」を示しているのかも知れない。

2) 骨の力学特性とコラーゲン量の関係について

これまで骨に含まれるコラーゲンは、骨に弾力性を与える有機物質であると示唆する報告がされている (Landis WJ, 1995)。しかしながら本研究では、コラーゲン面密度と弾性の間にはほとんど相関関係は見られなかった。

ところで超高齢者やがん患者の骨における研究では、コラーゲン量の低下に伴いヤング率が低下することが報告されている (Oxlund H, et al., 1995; Sekita A, et al., 2017)。本研究でも、コラーゲン面密度とヤング率との間にのみ有意な正の相関が認められ、コラーゲン量が低下するとヤング率も低下することが示された。骨を材料として考えれば、ヤング率は「硬さ」を評価しており、3点曲げ試験による力学特性からみると、骨の「硬さ」はカルシウムまたはミネラル密度より、コラーゲン量に反映されることが示唆された。コラーゲンは、骨を形成する重要な物質 (Landis WJ, 1995) であると同時に、骨の「硬さ」を保つために不可欠であることが推察される。

3) 運動や卵巣摘出による骨のカルシウムとコラーゲン量の変化

骨のカルシウムについて先行研究では、運動によって海面骨の骨密度やミネラル成分 (ヒドロキシアパタイト) が増加することが報告されている (Suominen H, et al., 1980, Boyde AI, 2003)。また、運動による海面骨と皮質骨の骨密度の変化については、海面骨に比べて皮質骨では影響されにくいことが指摘されている (Rice JC, et al., 1988; Bailey AJ, et al., 1999)。本研究で行った運動ト

レーニングでは皮質骨におけるミネラルの主成分に相当するカルシウムの重量比を変化させることはなかった。しかし、運動群における皮質骨の厚さは対照群より約 5% 増加していることから総重量は増加したと考えられる。すなわち組織あたりのカルシウムの密度は変化しないが、組織が肥大することが予想される。一方、卵巣を摘出したラットの骨では、皮質骨の骨密度が減少することが報告されている (Carl CD, et al., 1991; Kalu DN, 1991)。しかし、本研究では卵巣摘出群のカルシウム重量比は変化しなかった。また皮質骨の厚さ (0.79 mm) も対照群 (0.80 mm) との差が小さかった。本研究ではシャム手術群と比較していないことから、手術によるストレスの影響が存在する可能性があることや骨密度のデータを元にした先行研究とは直接比較できないが、約 4 ヶ月の卵巣摘出では骨全体のカルシウム量に影響がなかったと考えられる。

一方、骨のコラーゲンについては、2 ヶ月から 2 年の長期間の卵巣摘出を調べた報告では、卵巣摘出初期から皮質骨のコラーゲン量が減少することが示されている (Carl 等, 1991)。本研究での皮質骨のコラーゲン面密度も、対照群に比べて有意な減少を示した。これらの結果から、卵巣摘出は骨コラーゲン量を減少させるものと考えられる。本研究で測定したコラーゲン面密度は、TGA 法で得られた灰分重量比の値と有意な相関がみられたことや Carl 等 (1991) の生化学的手法による測定と近似した結果となり、正しい方向性で測定が行われているものと推察される。

骨のコラーゲン量と運動の影響については、生化学的な手法を用いた研究であるが、コラーゲンの合成率が運動によって増加することが海面骨や腱で報告されている (Suominen H, et al., 1980; Kjaer M, et al., 2005)。しかしながら、運動によっては、脛骨や大腿骨のコラーゲン量は変化しないとの報告もみられる (Shaw SR, et al., 1987)。

ヒトでは、オーバークイズによる骨の傷害 (Magnusson HI, et al., 2001) やエリート性競技者のストレスによる骨折が報告されているが (Carbon R, et al., 1990)、骨密度との関連は明確ではないことが指摘されている。一方、犬の長期間のトレーニング (1 年間) では、骨ミネラル密度は減少するがコラーゲンは増加することが報告さ

れており、コラーゲンは骨の維持に重要であることが指摘されている (Kaija P, 1999). また、運動では活性酸素が発生することは知られており、活性酸素等のストレス要因によって、カルシウム量だけでなくコラーゲンの代謝も減少することが指摘されている (Silverton S, 1994; Sheweita & Khoshhal, 2007). 本研究でのコラーゲン面密度は運動によって変化しなかった理由としては、運動の量や強度、期間に起因したものと考えられる。

一般に、外的なストレスや加齢、関節炎などによって骨コラーゲンのダメージを示すコラーゲン成熟架橋の増加やコラーゲンの変性や構造的な変化を引き起こす報告がされている (Knott L & Bailey AJ, 1998; John DC, 2003; Sekita A, et al., 2017). これのことから、骨の特性を評価するには、単にコラーゲン量を測定するだけではなく、コラーゲンの架橋や変性についても検討していく必要があるかも知れない。

参考文献

- Armstrong RB, Saubert CW, Sembroich WJ, Shepherd RE, Gollnich PD. (1974) Glycogen depletion in rat skeletal muscle fibers at different intensities and durations of exercise. *Pflugers Arch.*, 352 (3): 243-256.
- Bailey AJ, Sims TJ, Ebbesen EN, Mansell JP, Thomsen JS, Mosekilde L. (1999) Age-related changes in the biochemical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength. *Calcif Tissue Int.*, 65: 203-210.
- Bart C. (2008) Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.*, 3: 131-139.
- Bocalini S, Andrey J, Leonardo S. (2010) Moderate Resistive Training Maintains Bone Mineral Density and Improves Functional Fitness in Postmenopausal Women. *Journal Aging Res.*, ID 760818.
- Boyde AI. The real response of bone to exercise. *J Anat.*, 203 (2): 173-89, 2003.
- Carbon R, Sambrook P N, Deakin V, Fricker P, Eisman JA, Kelly P, Maguire K, Yeates MG. (1990) Bone density of elite female athletes with stress fractures. *Med J Aust.*, 153: 373-376.
- Carl CD, Lis M, Birgit S. (1991) Cortical Bone Mass, Composition, and Mechanical Properties in Female Rats in Relation to Age, Long-Term Ovariectomy, and Estrogen Substitution. *Calcif Tissue Int.*, 52: 26-33.
- Calafiori AR, Imbrogno L, Martino G, Nastro A, Rosati C, Marotta M. (1993) Thermal analysis of rat bone tissue. *Boll Soc Ital Biol Sper.*, 69: 691-698.
- Dayan D, Hiss Y, Hirshberg A, Bubis JJ, Wolman M. (1989) Are the polarization colors of picrosirius red-stained collagen determined only by the diameter of the fibers? *Histochemistry*, 93 (1): 27-29.
- Dike NK. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss, *Bone Miner.*, 15 (3): 175-191.
- Dubois-Ferrière V, Rizzoli R and Ammann P. (2014) A Low Protein Diet Alters Bone Material Level Properties and the Response to In Vitro Repeated Mechanical Loading. *BioMed Research International.*, Article ID 185075, 6 pages.
- John DC. (2003) Role of collagen and other organics in the mechanical properties of bone. *Osteoporos Int.*, 14: 29-36.
- Kalu DN. (1991) The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and Miner.*, 15 (3): 175-191.
- Kaija P, Jyrki N, Tuomas R. (1999) Do more highly organized collagen fibrils increase bone mechanical strength in loss of mineral density after one-year running training? *J Bone Miner Res.*, 14 (3): 321-329.
- Kjaer M, Langberg H, Miller BF, Boushel R, Crameri R, Koskinen S, Heinemeier K, Olesen JL, Døssing S, Hansen M, Pedersen SG, Rennie MJ, Magnusson P. (2005) Metabolic activity and collagen turnover in human tendon in response to physical activity. *J Musculoskelet Neuronal Interact.*, 5 (1): 41-52.
- Marotta M, Martino G. (1985) Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem.*, 150 (1):

- 86-90.
- Knott L, Bailey AJ. (1998) Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone.*, 22 (3): 181-187.
- Landis WJ. (1995) The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix. *Bone.*, 16 (5): 533-544.
- Magnusson HI, Westlin NE, Nyqvist F, Gärdsell P, Seeman E, Karlsson MK. (2001) Abnormally decreased regional bone density in athletes with medial tibial stress syndrome. *Am J Sports Med.*, 29 (6): 712-715.
- Matkovic V, Jelic T, Wardlaw GM, Ilich JZ, Goel PK, Wright JK, Andon MB, Smith KT. (1994) Heaney RP, Timing of peak bone mass in Caucasian females and its implication for the prevention of osteoporosis. Inference from a cross-sectional model. *J Clin Invest.*, 93 (2): 799-808.
- Marotta M, Martino G. (1985) Sensitive spectrophotometric method for the quantitative estimation of collagen. *Anal Biochem.*, 150 (1): 86-90.
- Mkukuma LD, Skakle JMS, Gibson IR, Imrie CT, Aspden RM, Hukins DW. (2004) Effect of the proportion of organic material in bone on thermal decomposition of bone mineral: an investigation of a variety of bones from different species using thermogravimetric analysis coupled to mass spectrometry, high-temperature X-ray diffraction, and Fourier transform infrared spectroscopy. *Calcif Tissue Int.*, 75 (4): 321-328.
- Oxlund H, Moskilde L, Ortoft G. (1996) Reduced concentration of collagen reducible cross links in human trabecular bone with respect to age and osteoporosis. *Bone.*, 19 (5): 479-484.
- Rice JC, Cowin SC, Bowman JA. (1988) On the dependence of the elasticity and strength of cancellous bone on apparent density. *J Biomech.*, 21 (2): 155-168.
- Sekita A, Aira Matsugaki, Takayoshi Nakano. (2017) Disruption of collagen/apatite alignment impairs bone mechanical function in osteoblastic metastasis induced by prostate cancer. *Bone.*, 97: 83-93.
- Shaw SR, Zernicke RF, Vailas AC, DeLuna D, Thomason DB, Baldwin KM. (1987) Mechanical, morphological and biochemical adaptations of bone and muscle to hindlimb suspension and exercise. *J Biomech.*, 20 (3): 225-234.
- Sheweita SA, Khoshhal KI. (2007) Calcium metabolism and oxidative stress in bone fractures: role of antioxidants. *Curr Drug Metab.*, 14 (5): 519-525.
- Shuid AN, Ping LL, Muhammad N, Mohamed N, Soelaiman IN. (2010) The effects of *Labisia pumila var. alata* on bone markers and bone calcium in a rat model of post-menopausal osteoporosis. *J Ethnopharmacol.*, 133 (2): 538-542.
- Silverton S. (1994) Osteoclast radicals, *J Cell Biochem.*, 56 (3): 367-373.
- Suominen H, Kiiskinen A, Heikkinen E. (1980) Effects of physical training on metabolism of connective tissues in young mice. *Acta Physiol Scand.*, 108 (1): 17-22.
- Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Nakajima Y, Minegishi T, Ishikawa O, Kurabayashi M. (2003) Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone mineral density in Japanese women. *Endocr J.*, 51 (2): 159-164.
- Trebacz H, Wójtowicz K. (2005) Thermal stabilization of collagen molecules in bone tissue. *Int J Biol Macromol.*, 37 (5): 257-262.
- Wang X, Shen X, Li X, Agrawal CM. (2002) Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone.*, 31 (1): 1-7.
- Wen XX, Wang FQ, Xu C, Wu ZX, Zhang Y, Feng YF, Yan YB, Lei W. (2015) Time Related Changes of Mineral and Collagen and Their Roles in Cortical Bone Mechanics of Ovariectomized Rabbits. *PLoS One.*, 10 (6): e0127973. doi:10.1371.