

カルシウム摂取不足が骨格筋の 発育発達に及ぼす影響

鹿屋体育大学 竹倉 宏 明

(共同研究者) 聖マリアンナ医科大学 吉岡 利 忠

愛知教育大学 春日 規 克

The Effect of Lack of Calcium Intake on Skeletal Muscle Growth

by

Hiroaki Takekura

National Institute of Fitness and

Sports in Kanoya

Toshitada Yoshioka

St. Marianna University School of Medicine

Norikatsu Kasuga

Aichi University of Education

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the influence of lack of calcium intake and physical training on skeletal muscle growth.

Forty male Wistar rats were classified into normal diet control (NDC), low calcium diet control (LCDC), normal diet training (NTD) and low calcium diet training (LCDT) group at 3 weeks of age. Low calcium diet groups were given one-fifth calcium concentration of normal diet. Trained animals were run on a treadmill for 60 min per day at 25 m per min for 6 days per week for 8 weeks. The effects on the muscle growth of calcium intake limitation were assessed in term of bone weight, contractile properties and enzyme activities of

soleus and extensor digitorum longus muscles. There were decrease in femoris and Tibiae weight by about 50% in low calcium diet groups. Body weight and muscle weights of LCDT group gained less than other groups. Contraction time increase in low calcium diet groups.

Maximum tetanic tension decrease in low calcium groups. There were no significant differences in phosphofructokinase activity between the groups. In soleus muscle statistically significant decrease were found for succinate dehydrogenase activities in low calcium diet groups. A similar tendency was indicated in extensor digitorum longus muscle, but it was not significant. Training did not suppress the these results. It is assumed that the effects of calcium lack on skeletal muscle are almost the same as dystrophy muscle which is deteriorated by high concentration of calcium. And these results suggest that the lack of calcium intake affect the normal muscle developing.

要 旨

栄養障害が正常な発育発達を妨げ、疾病と強く関与することが知られているが、本研究では特にカルシウム摂取不足と骨格筋の発達に関して検討した。

この結果、カルシウム欠乏により後肢骨の重量は1/2程度に減少した。また、骨格筋の収縮速度の低下、最大張力の減少、ミトコンドリア内の酸化系酵素活性の低下が観察された。この結果は運動習慣の有無に関係せずに見られた。慢性のカルシウム摂取不足は低カルシウム血症を引き起こし、細胞内では逆にカルシウム濃度を上昇させる。このためカルシウム結合蛋白による調整機構の乱れが起こり、筋細胞全体の機能低下・発育抑制が起こったことが考えられた。

以上の結果より、骨の正常な発育と筋の発育による運動機能の発達にはカルシウムの摂取が重要であることが示された。

緒 言

発育期にある児童生徒の栄養障害は身体にさまざまな悪影響を及ぼすことにより、運動障害を引き起こすことが広く一般に認められている。特にカルシウム摂取の不足は、骨の強度を低下させ骨折を誘発するなどの他、最近ではさまざまな心身の疾病との関係も明らかになってきている¹⁹⁾。

生体内には約 10^6 mgのカルシウムが含まれており、この99%が骨を形成している。このため骨は生体カルシウムの貯蔵庫として各細胞・組織のカルシウム調整の役割を担っている。またカルシウムは血清中に約1 mg/mlの濃度で含まれ、この約50%が血清蛋白と結合し、40%がイオン化の状態に含まれている。血清中カルシウム濃度は副甲状腺ホルモンによる骨からのカルシウム放出、じん臓におけるカルシウムの再吸収・活性ビタミンDの生成と、甲状腺のカルチトニンによる骨へのカルシウムの取り込みにより主に調整されている。カルシウム欠乏により起こる低カルシウム血

症によって、じん臓・ひ臓細胞の組織呼吸の低下、交感神経の過緊張、白血球食菌作用の低下、高血圧、骨粗鬆症など多くの障害を誘発する⁷⁾。これはカルシウムが細胞膜電位の調整、細胞の分化、細胞骨格の分裂増殖、分子構造の変化、内分泌系の調節などの刺激伝達物質としては多くの働きをしているためである。

カルシウム不足に陥った場合、副甲状腺ホルモンの働きにより、骨から血液中へカルシウムが放出されるが、このホルモンは同時に細胞外から細胞内へのカルシウムの流入にも働き、細胞内カルシウム濃度を引き上げる。このことが血管平滑筋を収縮させ、高血圧の原因と考えられている¹⁷⁾。

骨格筋細胞において、カルシウム濃度は弛緩時には 10^{-7} M以下であり²¹⁾、細胞外液と 10^4 倍の差を持って保たれている。これは膜にあるカルシウムチャンネルなどの調整¹⁸⁾、細胞内膜系の調整によってなされている。骨格筋がカルシウム濃度差により膜電位・浸透圧、構造蛋白の分解合成、収縮弛緩の調整が行われているということは、筋細胞にとってその維持、発達、機能発揮という生命現象のほとんどがカルシウムにより調整されていることになる。しかし、カルシウム欠乏が骨格筋に与える影響を調べた報告はみられず、カルシウム摂取不足が問題となっている現在においてその詳細は不明である。

そこで本研究ではカルシウム摂取不足と運動が、骨格筋および骨の構造・機能特性に及ぼす影響を検討し、発育期の栄養障害により発現すると考えられる運動障害改善のための資料を提供することを目的とする。

1. 実験方法

1.1 実験動物

生後3週齢より飼育を開始したウイスター系雄性ラット40匹を11週齢時に実験を用いた。

1.2 飼育・トレーニング方法

実験動物は体重の平均がほぼ等しくなるように10匹ずつ、通常食対照(NDC)群、低カルシウム食対照(LCDC)群、通常食トレーニング(NDT)群、低カルシウム食トレーニング(LDCT)群の4群に分類した。低カルシウム群については、通常の固形飼料の1/5量のカルシウムを含む飼料にて飼育した。

トレーニングは、動物用トレッドミルを用いて速度25 m/min、時間60分間の持久的走運動を1日1回、週6日の頻度にて8週間行った。トレッドミルの傾斜は0度とした。トレーニングによる体重増加抑制が筋重量の発達にも影響し、これが対照群と比較する際、複雑な要素となる可能性を考慮し、対照群に対する飼料の供給はトレーニング群と体重が同様になるよう制限を加えた。

1.3 分析項目と方法

1) 骨格筋の収縮特性の測定

長指伸筋(EDL)およびヒラメ筋(SOL)を被験筋とした。血流を維持し筋を露出させ、坐骨神経からの間接電気刺激により収縮張力を測定した。刺激は0.1 msecの極大刺激を用いた。最大張力が得られる至適長における単収縮曲線よりtime to peak tension (TPT) と half relaxation time (HRT) を測定した。また、刺激頻度5 msecにて、最大強縮張力の測定を行った。次に、単収縮を5分間継続した時の1分ごとの初期値に対する低下率を相対値で算出した。

2) 骨格筋酵素活性の分析

収縮特性の測定に用いた、反対脚のEDLおよびSOLを摘出し、代謝特性を調べた。代謝特性は解糖系酵素としてフォスフォフルクトーキナーゼ(PFK)と酸化系酵素としてコハク酸脱水素酵素(SDH)の活性を定量し、いずれの酵素活性も $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{g muscle}$ の単位により示した。

3) 骨の分析

大腿骨と下腿骨(脛骨・腓骨)を摘出し、1%

パイリン水溶液中 (37°C) にて処理し、骨に付着する筋や腱を取り除いた後、真空乾燥を行い骨重量を測定した。また、大腿骨に含まれるカルシウム濃度の測定を行った。

4) 統計方法

各群間の差の検定には Student's t-test を用いて行い、いずれの場合にも危険率 5% 未満をもって有意とした。

2. 結果

実験時の各群の平均体重、筋重量、体重に対する筋重量相対値を標準偏差とともに表 1 に示した。通常食と低カルシウム食の対象群 (NDC vs LCDC) 間に、また通常食の対象群とトレーニング群 (NDC vs LCDC) 間には差が認められなかったが、低カルシウム食にて飼育しトレーニングを行った LCDT 群に体重の減少が観察され、

LCDC 群、NDT 群との間に有意差が得られた。通常食により飼育した場合、トレーニングにより両筋重量は増加するが、対体重比では EDL にのみ肥大が観察された。LCDT の筋重量が両筋とも最も低値を示したが、対体重比では大きな差がなく、EDL では逆に LCDC 群より高値を示した。

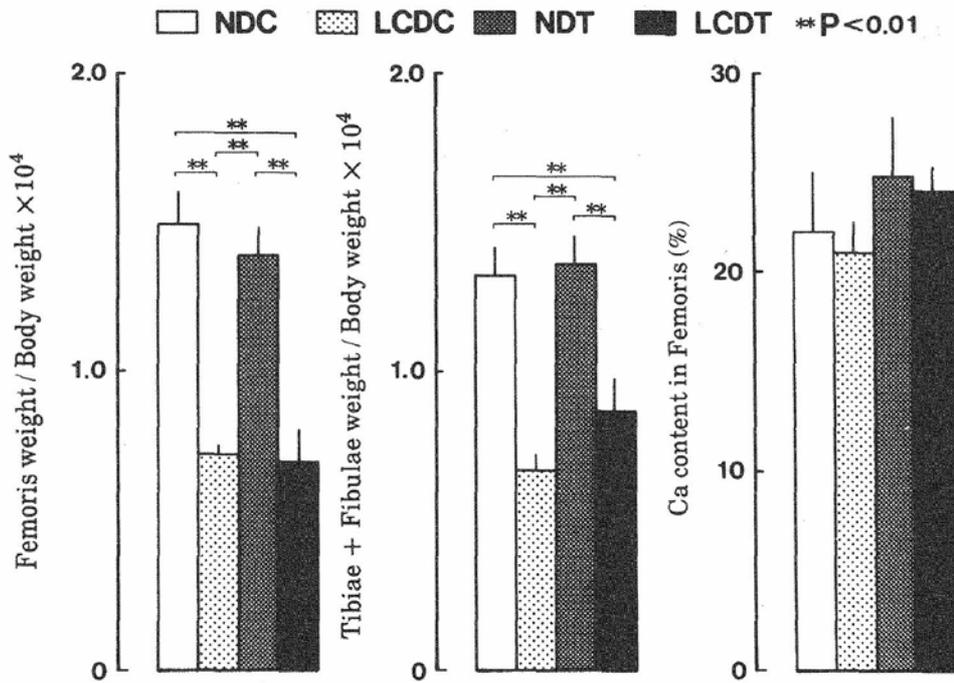
大腿骨および下腿骨の重量の対体重比を図 1 に示した。通常食群においてはトレーニングの影響はみられなかった。しかし、カルシウム摂取量に影響されやすい骨重量は、トレーニングの有無に関わらず顕著な低下が認められた。大腿骨内のカルシウム比には、トレーニングにより若干の高値が観察されるが統計上有意差が得られるほどの増加ではなく、また通常食と低カルシウム食群間でも差がみられなかった。

次に筋の機能特性に及ぼす低カルシウム食と低カルシウム下でのトレーニングの影響を調べた。

表 1 各群の体重、骨格筋重量、並びに骨格筋重量の対体重比の平均値±標準偏差値
NDC: 通常食コントロール群, LCDC: 低カルシウム食コントロール群,
NDT: 通常食トレーニング群, LCDT: 低カルシウム食トレーニング群

Groups	n		Body weight (BW,g)	muscle weight (MW, mg)		MW/BW × 10 ⁴	
				SOL	EDL	SOL	EDL
Normal diet control (NDL)	10	M S. D.	159.2 18.1	77.5 12.8	79.2 12.0	4.8 0.4	4.9 0.4
Low calcium diet control (LCDC)	10	M S. D.	172.7 10.7	76.3 10.1 *	83.8 7.8	4.4 0.5	4.8 0.4 *
Normal diet training (NDT)	10	M S. D.	172.3 10.7 *	92.8 16.4	93.0 7.8 *	5.4 0.9	5.4 0.3 *
Low calcium diet training (LCDT)	10	M S. D.	142.0 16.4	67.4 15.3	75.0 10.7	4.6 0.8	5.2 0.4

SOL: soleus, EDL: extensor digitorum longus muscles
Significant level; * P<0.05, ** P<0.01



Femoris : 大腿骨, Tibiae : 脛骨, Fibulae : 腓骨

図1 各群における大腿骨重量および脛骨+腓骨重量の対体重比, 並びに大腿骨におけるカルシウム含有量 (グループ名は表1と同じ)

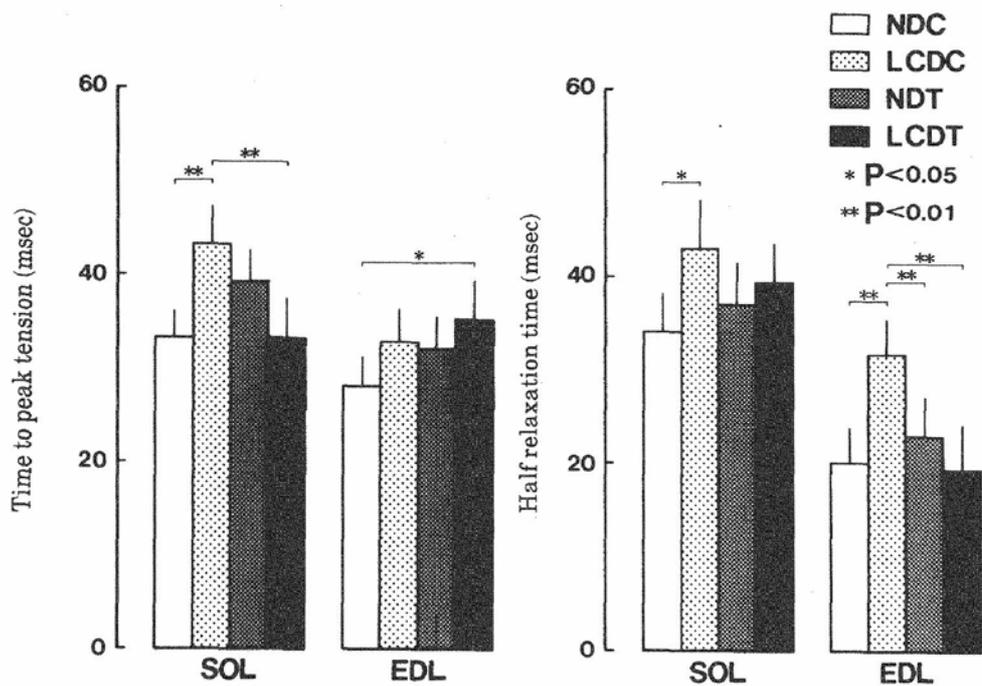


図2 各群における Time to peak tension 並びに Half relaxation time の平均値±標準偏差値 (グループ名は表1と同じ)

図2には各群の単収縮時間, 弛緩時間を示した。対照群にくらべ低カルシウム食対照群の収縮時

間, 弛緩時間ともに延長する傾向がみられた。しかし, その他の各筋, 各群のいくつかの間に統計

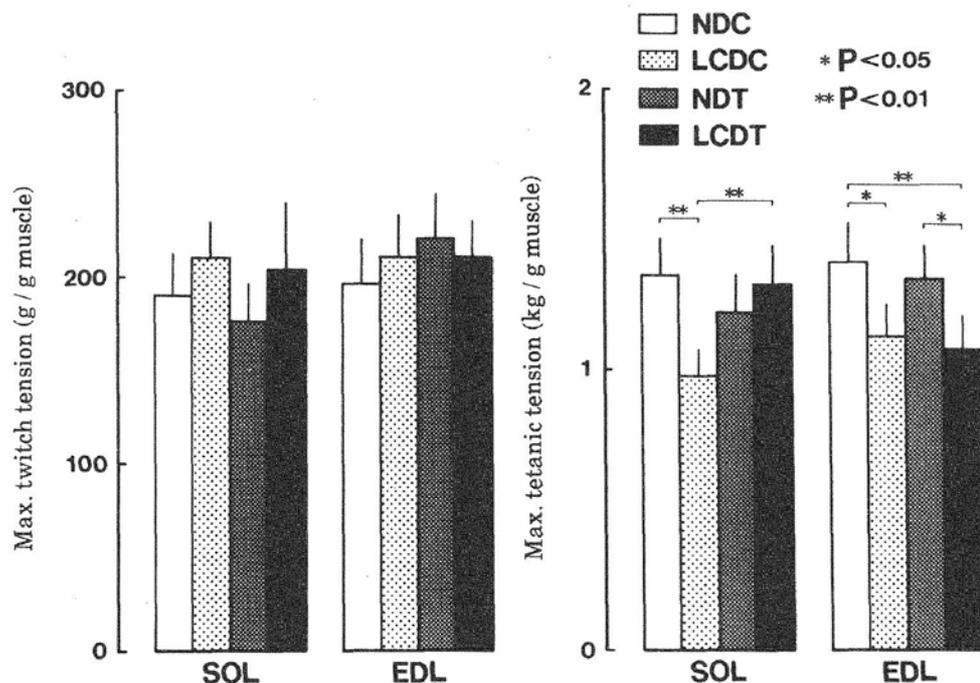


図3 各群における最大単収縮張力並びに最大強縮張力（グループ名は表1と同じ）

上の差が得られているが、一様の変化は観察されなかった。

測定した両筋の単収縮張力には各群間に差はみられなかった。しかし、最大強縮張力にはトレーニングを課したヒラメ筋を除いて、低カルシウム食群がその対照群より有意に低い値を示した（図3）。

図4、図5に示したSOLおよびEDLの疲労耐性には各群間に顕著な差は認められなかった。

持久的トレーニングによっても、わずかに解糖系酵素活性を上昇させることは知られているが、本研究では図6に示すようにPFK活性に対するトレーニングの効果はみられず、対照群に比べ低カルシウムトレーニング群（NDC vs LCDT）にのみ低下がみられた。酸化系酵素であるSDHにはトレーニングによる活性の増大傾向がみられ、特にSOLにおいて通常食、低カルシウム食に関係なくトレーニングによる増加が認められた。低カルシウム食の効果は、EDLのPFK活性を除き、一応に酵素活性を低下させ、特にSOLのデサントスポーツ科学 Vol.12

SDH活性に顕著な低下がみられた。

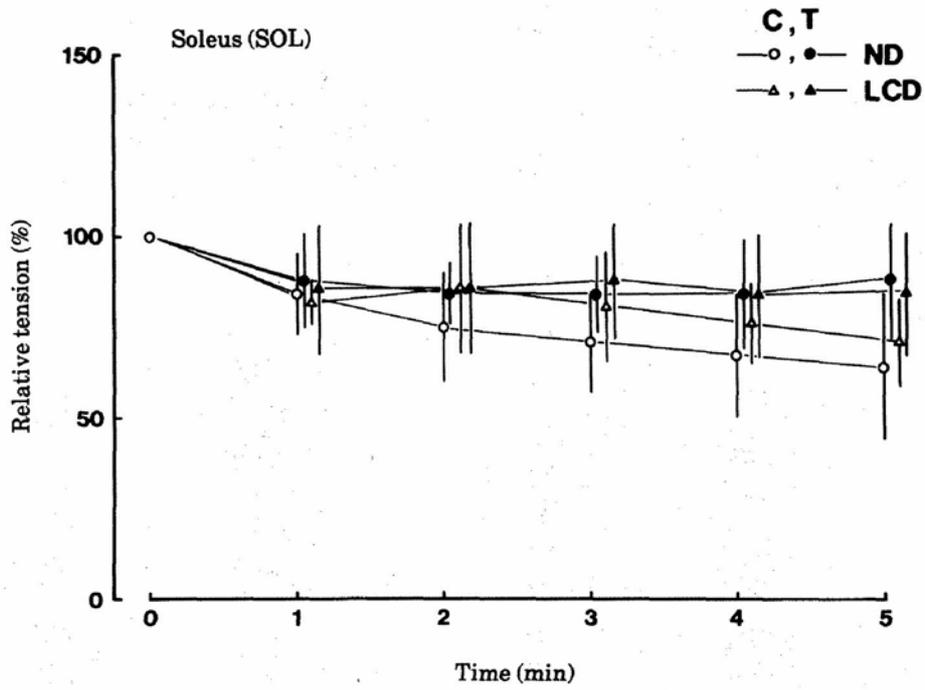
3. 考 察

生体内において、カルシウムはさまざまな調整機構に重要な役割を果たしている⁷⁾。しかし、国民栄養調査の結果では他の栄養状態はほぼ満たされているが、カルシウムのみが不足していることが報告されている¹⁷⁾。

本研究では、骨格筋というカルシウムによりその細胞の維持、分解合成、機能発揮（収縮）が調整されている組織に焦点をおき、カルシウム摂取不足にともなう発育筋への影響を調べた。

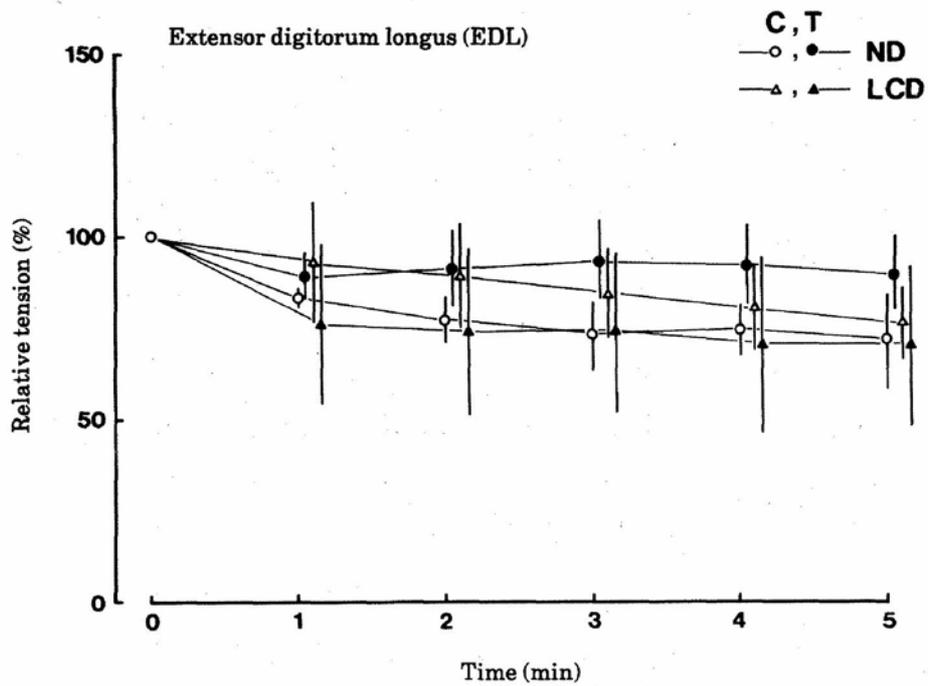
最初にカルシウム摂取が最も影響をおよぼすと考えられる骨の発育に関して、実験群間での比較を行った。飼料中のカルシウム含有量を1/5にして飼育したラットでは大腿骨・下腿骨とも約1/2程度の骨重量にしか発育しておらず、明かなカルシウム欠乏の影響が認められた。

Holbrookら⁹⁾は骨折経験者にカルシウム摂取量が低いことを報告しており、また骨粗鬆症の多



○：通常食コントロール群，△：低カルシウム食コントロール群，
●：通常食トレーニング群，▲：低カルシウム食トレーニング群

図4 各群における単収縮張力の継時的変化（ヒラメ筋）



○：通常食コントロール群，△：低カルシウム食コントロール群，
●：通常食トレーニング群，▲：低カルシウム食トレーニング群

図5 各群における単収縮張力の継時的変化（長指伸筋）

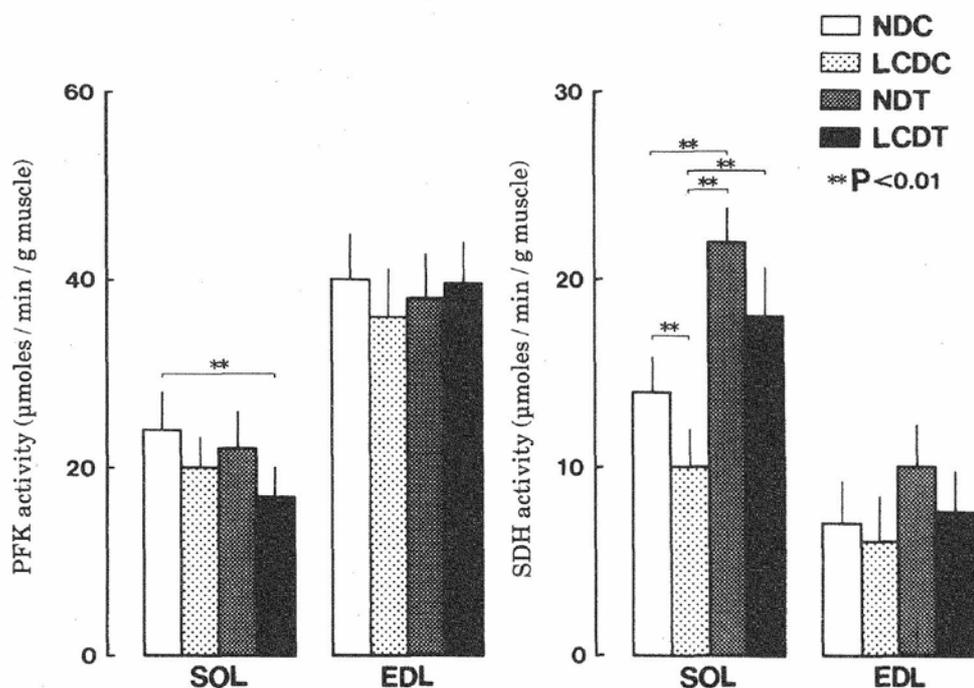


図6 各群における Phosphofruktokinase (PFK) 活性値および succinate dehydrogenase (SDH) 活性値の平均値±標準偏差値 (グループ名は表1と同じ)

い国ではカルシウム摂取量が少ないことも知られている。

骨のカルシウム取り込みは、主にカルチトニンの働きによるが、この取り込み量はカルシウム摂取量により強く依存する。カルシウムは十二指腸から空腸において、カルシウム結合蛋白の作用による能動輸送と小腸上皮細胞における管腔から細胞内への濃度勾配に従う受動輸送により吸収される。このためカルシウム摂取量が少ないと腸内カルシウム濃度が上昇せず、腸壁でのカルシウム透過吸収量は抑えられる。また成長期のカルシウム必要量は成熟後より約2倍量を要すると考えられており、本実験では十分なカルシウム摂取不足の条件が設定できたものと考えられる。

大腿骨中のカルシウム濃度には、いずれの群間にも差が認められなかったが、トレーニング群に若干の高値がみられた。Saville と Whyte¹⁶⁾ は走トレーニング後のラットの後肢骨重量が筋重量と相関を持って増加したことを報告し、また Saville と Smith¹⁵⁾ は後肢に負荷が加わるよう飼育し
デサントスポーツ科学 Vol.12

たラットの後肢骨カルシウム濃度に増大がみられたとしている。しかし、本研究では骨カルシウム濃度に対するトレーニングの影響は顕著なものではなく、また低カルシウム飼料での飼育であっても、骨カルシウム濃度を低下させず骨全体の発育に影響した。このことから、発育期のカルシウム欠乏は単に骨折発生の危険性と言うより、長育自体に影響する可能性が考えられた。

一方、体重の発育を見た場合、低カルシウム食にトレーニングを課した LCDT 群に体重の低値がみられた。また、この群には筋重量の低下も認められた。筋重量の発達は体重の増加に強く依存する。実験動物の場合、強制運動によるトレーニングはストレスとして摂取量を低下させる場合がある⁸⁾。またカルシウム欠乏により、ストレス性の血圧上昇、交感神経の過緊張などが起こることが知られている⁷⁾。通常食下でのトレーニング (NDT) 群には体重低下がみられず、LCDT 群にのみ見られた体重・筋重量の顕著な低下はトレーニングとカルシウム欠乏によるストレスの増強効

果が起こった結果と考えられる。

Leroith と Pimstone¹¹⁾ は蛋白摂取量不足がカルシウム吸収率を低下させることを、また Braithwaite¹²⁾ は蛋白摂取量の不足がカルシウム蓄積量を低下させることを報告している。逆にアミノ酸、特にリジン、アルギニンの小腸での吸収はカルシウムの吸収を促進することが示されている。このようにカルシウムと蛋白との間には密接な関係があり、これはカルシウムの生体内調整の働きがカルシウム結合蛋白を介して情報伝達されることによるものと考えられる。

カルシウム結合蛋白は骨格筋の場合、カルモジュリン、トロポニンを中心とする細胞内カルシウム受容体であることは広く認められている。またカルシウム結合蛋白には、カルシウムと結合することにより他の酵素活性を制御し細胞内代謝系を調整するもの、カルシウムと結合しその蛋白自体が持つ活性を上昇させ細胞内代謝に直接関与するもの、カルシウムと結合することにより分子構造を変え直接機能と関わるものがある⁹⁾。

他酵素活性に影響をおよぼすカルシウム結合蛋白であるカルモジュリンは166800の分子量を持ち全ての真核細胞に存在し³⁾、カルシウムと結合した活性型 Ca^{2+} -カルモジュリン複合体はホスホリラーゼ¹²⁾、 Ca^{2+} -、 Mg^{2+} -ATPase¹³⁾ などの活性を高めることが知られている。図2に見られた筋収縮時間の延長は、このようなカルシウム結合蛋白の関与が低下したことに関係する可能性が考えられた。

カルシウム摂取不足による血中カルシウム濃度の低下は、細胞内では逆にカルシウム濃度を上昇させる。筋細胞内にはカルシウムによりそれ自体が活性化される蛋白分解酵素（カルシウム依存性プロテアーゼ、CANP）の存在が知られている¹⁰⁾。

CANPの活性に必要なカルシウム濃度は、通常細胞内カルシウム濃度より高いが、収縮時の筋細胞内カルシウム濃度は十分なCANP活性化を

起こす。さらにCANPには、カルシウム濃度に μM (μ CANP) と mM レベル (m CANP) で活性化される2種類があることが示されている²⁰⁾。これは膜に局在したCANPがカルシウムの細胞内流入により活性化され、 m CANPの自己消化することにより活性化に変換が起こり、生理的カルシウム濃度での活性化を起こす μ CANPになると考えられている。

このようなCANPの機構が、筋収縮を繰り返すトレーニングなどの際、細胞骨格の分解に働き、再合成の働きが十分可能な栄養条件や他の代謝機構が安定していた場合には、活動性肥大を起こすものと考えられる。しかし、細胞内の慢性的カルシウム濃度の上昇は構造蛋白の分解を優位にすることが考えられる。筋細胞内のCANPの活性化は、 α -アクチニンを放出させZ膜の消失を引き起こす²⁾。このような代謝機構がカルシウム欠乏食時の筋細胞内に起こった場合、図3に見られるような収縮張力の低下を引き起こす十分な要因となることが考えられた。

細胞内カルシウムの増加と異常CANP活性の亢進がおこる進行性筋ジストロフィー症(DMP)において、多くの解糖系酵素活性に低下が認められる⁴⁾。また、DMP筋のSDH活性とチトクロムオキシダーゼに正常範囲内ではあるが低下がみられたことが、DireyfusとSchapira⁷⁾により報告されている。DMPが進行した筋には、ミトコンドリアの機能自体のエネルギー維持機序にも低下が起こることが報告されている¹⁴⁾。本研究ではPFK活性には低カルシウムの摂取の影響がみられず、また、SDH活性に低下傾向がみられた。

DMP筋の筋小胞体ではカルシウム取り込み能に低下が起こること、筋力が著しく低下することも知られている²²⁾。本研究で得られた結果のいずれもが、DMP筋の軽度の症状と一致し、カルシウム摂取不足により起こると考えられる細胞内カルシウム濃度の異常が、骨格筋の発達に抑制因子

となることが示唆された。

最近の栄養学の研究ではカルシウム不足と平行して糖質の取り過ぎと骨折との関係が問題視されている¹⁹⁾。糖の過剰摂取は血液 pH の酸性化を招くため、骨からのカルシウム放出により中和 (pH 7.3) が調整される。このため生体としては脱カルシウム化が起こる。免疫能低下、貧血、筋硬直をはじめ言語発達の遅れや自閉症の児童生徒に甘味飲料、甘味食品の取りすぎ傾向が強いことが報告されており¹⁹⁾、今後は、カルシウム摂取と糖摂取と骨格筋の発達との関係についても研究を進めていきたいと考える。

ま と め

日本人のカルシウム摂取量は、欧米諸国と比較して少ないことが、国民栄養調査において示されている。生体でのカルシウムの役割から考え、発育期のカルシウム欠乏は、骨の発育ばかりではなく骨格筋への障害を誘発することが予測される。そこで、実験動物を用いて、極度のカルシウム欠乏食による飼育が骨格筋の発達におよぼす影響を検討した。

離乳期である生後 3 週齢より成熟に至る生後 11 週齢まで、ウィスター系ラットを通常の 1/5 濃度のカルシウム濃度を含む飼料により飼育した。その結果、大腿骨・下腿骨重量/体重は約 1/2 程度に減少した。骨格筋における重量/体重の変化はみられないが、収縮時間の延長、最大強縮張力の低下が認められた。また、酸化系酵素であるコハク酸脱水酵素活性の低下が認められた。これらの結果は、同時期の持久的トレーニングの実施有無に関係なく現れた。

発育期のカルシウム必要量は、成人の約 2 倍とされている。この時期のカルシウム摂取不足が、筋の機能発達に抑制効果を持つことが示され、運動器障害の改善のため、カルシウムを含む栄養管理の必要性がより明かとなった。今後はカルシウ

ム欠乏を助長し、栄養源のバランスを崩す過剰の糖質摂取と筋の発達に関して検討し、栄養障害と運動機能発達の関係をより明確にしたいと考える。

文 献

- 1) Braithwaite, G. D.; *Br. J. Nutr.*, **40**, 505-507 (1978)
- 2) Busch, W. A., et al.; *J. Cell Biology*, **52**, 367-381 (1972)
- 3) Cheung, W. Y.; *Calcium and cell function*, Academic Press Inc. New York, 1-5 (1980)
- 4) DiMauro, S.; *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.*, **30**, 411-415 (1967)
- 5) Direyfus, J. C., Schapira, G.; *Spring-field*, pp 22 (1962)
- 6) 榎森康文, 他; *細胞工学*, **5**, 285-295 (1986)
- 7) 藤田拓男; *カルシウムの驚異, 生命の源・カルシウムの科学*, 講談社, 東京 (1989)
- 8) Goldspink, G., Ward, P. S.; *J. Physiol.*, **296**, 453-469 (1979)
- 9) Holbrook, T. L.; et al., *Lancet*, **13**, 1046 (1988)
- 10) Ishiura, S.; *Life Sci.*, **29**, 1079-1087 (1981)
- 11) Leroith, D., Pimstone, B. L.; *Clin. Sci.*, **44**, 305-319 (1973)
- 12) Meyer, W. L., et al.; *Biochemistry*, **3**, 1033-1039 (1964)
- 13) Niggli, V., et al.; *J. Biol. Chem.*, **256**, 8588-8592 (1981)
- 14) Peter, J. B., Worsfold, M.; *Biochem. Med.*, **2**, 364 (1969)
- 15) Saville, P. D., Smith, R.; *Am. J. Physiol. Anthropol.*, **25**, 35-42 (1966)
- 16) Saville, P. D., Whyte, M. P.; *Clin. Orthop. Rel. Res.*, **65**, 81-88 (1969)
- 17) 柴田博, 他; *カルシウム, 食事指導を考える, 牛乳・乳製品健康づくり委員会*, 東京 (1990)
- 18) Suko, J.; *Experientia.*, **29**, 396-398 (1973)
- 19) 田村豊幸; *カルシウム欠乏症*, 芽ばえ社, 東京 (1989)
- 20) Van Eldik, L. J., Watterson, D. M.; *Springer-Verlag*, pp 105-126 (1985)
- 21) Weber, A., et al.; *Biochem. Z.*, **345**, 329-369 (1966)
- 22) Wood, D. S.; *Neurology*, **28**, 447-457 (1978)