

中京大学博士審査学位論文

大学院体育学研究科

高リン食条件におけるラットのジャンプトレーニングが骨代謝に及ぼす影響

Effects of Jump Training on Bone  
Metabolism in Rats under High Phosphorous  
Diet Conditions

2017年3月19日学位授与

中京大学大学院体育学研究科体育学専攻

王国棟

# 目次

---

構成	1
第1章 序論	3
第1節 はじめに	4
第2節 研究小史	6
第3節 研究の目的	11
第2章 高リン食条件における8週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響	14
第1節 目的	15
第2節 方法	15
第3節 結果	19
第4節 考察	30
第3章 高リン食条件における2週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響	34
第1節 目的	35
第2節 方法	35
第3節 結果	36

第4節 考察	44
第4章 総括	48
第1節 本研究の目的に対する結論とまとめ	49
第2節 今後の展望	51
第3節 謝辞	52
参考文献	53

# 構成

本論文は以下の2編により構成されている.

1. 発育期雄ラットにおけるジャンプトレーニングと高リン食摂取が骨に及ぼす影響.

[第2章を構成]

王 国棟, 本田 亜紀子, 水野 貴正, 原田 健次, 十河 直太, 梅村 義久

体力科学, 16(3): 295-303, 2015.

DOI : 10.7600/jspfsm.64.295.

2. Effects of Jump Training on Bone and Calcium and Phosphorus Metabolism in Rats Fed a Phosphorus Enriched Diet.

[第3章を構成]

G Wang, A Honda, Y Umemura

Journal of Exercise Physiology online, 19(5):123-135, 2016.

# 第 1 章

---

## 序論

第1節 はじめに

第2節 研究小史

- 1) メカニカルストレスに対する骨の応答
- 2) 骨に有益な運動様式
- 3) 運動とリン・カルシウム代謝及び維芽細胞増殖因子 23 の変化
- 4) ラットのジャンプトレーニング
- 5) 骨粗鬆症予防のための運動

第3節 研究の目的

## 第1節 はじめに

骨は脊椎動物において骨格を構成し、リン酸カルシウムを多分に含んだ硬い組織である。生体内において骨は二つの重要な役割を担っている。一つは柔らかい体組織や身体の様々な器官を支える支柱となることであり、全身を骨が貫きつつ、かつ腱によって相互に連結しており、支点・力点・作用点を形成することで運動を可能とする。もう一つは保護であり、脊椎動物の場合は頭蓋骨と胸郭を構成する骨が脳や心臓・肺などの重要な臓器を守っている<sup>1)</sup>。

骨は進化の過程ではまずカルシウム調節器官として発達してきたものと考えられている。主成分はリン酸カルシウムである。そのため、骨の形成にはカルシウム、リンの摂取が不可欠である。ヒトが生を受けてから一生を終えるまでの間、骨は不変なものではなく常に古いものから新しいものへ置き換わっている。これを細胞レベルで観察すると古くなった骨を破骨細胞の働きで溶解する骨吸収と骨芽細胞が新しい骨をつくる骨形成を絶えず繰り返し行っており、この繰り返しのことは骨代謝と呼ばれている<sup>2)</sup>。骨代謝に関与する要因は様々であり、例えば、副甲状腺ホルモンやカルシトニン、エストロゲンなどのホルモン、カルシウムやリン、ビタミンDなどの栄養摂取が骨代謝に関与している。しかし、これらの因子が単体で骨代謝に影響を与えているのではなく、複雑に関与し合うことによって骨量が調節されている。

現代社会が進歩することによって、従来に比べるとヒトのライフスタイルや食生活が変化してきた。便利な交通手段による身体の活動時間の短縮、加工食品による栄養摂取のバランスの崩れなどの現代の生活習慣は、人々の健康を脅かす原因となっている。いまや加齢や生活習慣による骨量低下に伴うリスクは国単位ではなく世界規模での社会問題に発展しており、一刻も早い対策を講じることが急務となっている。

また、現代の食生活においては加工食品が多用されるが<sup>3-5)</sup>、加工食品には食品添加物が多く使われている<sup>6, 7)</sup>。加工食品に使われる食品添加物は多種多様であるが、

その成分にはリン酸が含まれているものが多種類存在する<sup>6, 7)</sup>。リン酸は変色防止、保水性の向上、pHの調整、炭酸ガスの安定などの効果があるため、清涼飲料水、醤油、味噌、農水産物の加工品、畜肉魚肉の加工品などに添加物として使われている。また、でんぷんの糊化を防ぐために冷凍食品にも加えられることが多い。このため、多くの国で現代の食生活においてはリンの摂取が年々増加していると考えられる<sup>8, 9)</sup>。日本においてもリンの摂取量は1960年の1,243 mg/日、1975年の1,332 mg/日から1995年の1,421mg/日まで徐々に増加している<sup>10)</sup>。国民健康・栄養調査において2006年以降リン摂取量はほとんど増加していないものの高いレベルを維持している。一方、カルシウム摂取量は2006年においては540 mg/日であったが、2010年には510 mg/日、2014年には497mg/日と減少する傾向にある<sup>11, 12)</sup>。従って、カルシウム摂取量に対するリン摂取量の比率はなお上昇する傾向にある。また、一般的に行われる栄養調査では食品のデータベースの改定が食品の多様化に追いついていないためリンの摂取量が過少評価されているという報告があり<sup>10, 13)</sup>、リンの摂取量は調査報告以上に増えている可能性も考えられる。

リンの摂取は体内のカルシウム代謝と密接に関連しており、リンを過剰摂取した場合には腸管でのカルシウムの吸収が減少し、血中のリン酸濃度の増加とカルシウム濃度の減少を引き起こし、副甲状腺ホルモン（PTH）の分泌を亢進させる<sup>14, 15)</sup>。このPTHの増加は骨塩量を減少させる可能性が指摘されており<sup>16)</sup>、ラットを用いた実験において極度のリンの過剰摂取は骨塩量減少および骨の発育不全を起こしたことが報告されている<sup>17)</sup>。また、リンの過剰摂取の問題はカルシウム摂取量とも関連しており、リン：カルシウムの摂取比率（P/Ca）が大きくなることにより、全身性のリン・カルシウム代謝および骨代謝に大きな影響を及ぼすとされている<sup>18)</sup>。

現段階において骨代謝に影響が出るほどのリンの過剰摂取が指摘されることは少ないが、前述のように食品添加物などによりリン摂取量が多くなっており、またリン：

カルシウムの摂取比率 (P/Ca) が大きくなっているという現状がある。

## 第2節 研究小史

身体的トレーニングは骨塩量を増加させることが知られている<sup>15)</sup>。骨は骨自身に与えられた荷重に適応して骨塩量を増加させ、骨強度を強くすると考えられている<sup>19)</sup>。また、骨塩量を増加させることに効果的な荷重は、大きくて速い負荷、すなわち衝撃的 (ハイインパクト) な荷重であることが明らかとなっている<sup>20)</sup>。本節ではメカニカルストレスに対する骨応答を検討している研究報告を紹介するとともに、本論文で採用しているジャンプトレーニングの有効性についての先行研究をまとめる。

### 1) メカニカルストレスに対する骨の応答

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収がバランスよく働きあって古いものから新しいものへ置き換わっており、この代謝過程を骨のリモデリングという。ウォルフの法則 Wolff's law<sup>21)</sup>によると、骨は力学的環境に応じて骨形成と骨吸収を変化させ、その強度を維持するために適した形と量に調整する特性がある。一方、他の先行研究<sup>22, 23)</sup>ではメカニカルストレスの減少は骨形成を抑制することにより骨量を減少させることが報告されている。力学的負荷の増減に対する骨のリモデリングの適応の解明は、現在でも骨の研究における重要な課題の一つである。

メカニカルストレスを感受するためには、骨細胞自身に感知機構を備えているはずであると考えられている。Frost<sup>24, 25)</sup>は、骨には自身に与えられた力学的負荷 (メカニカルストレス) を歪みとして感知するセンサーが存在されているという理論を提唱した。また、Chakkalakal<sup>26)</sup>は細胞骨格の変化を引き起こすような刺激に対応して、細胞膜の変形や電位変化が膜のチャネルの開閉に影響し、これがメカニカルストレスの

感知機構として作用していると推測している。しかし、これらの機構やセンサーを介しているメカニカルストレスによる刺激が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化や骨芽細胞自体の活性化を起こすということは証明されておらず、今後の報告が待たれている。

また、Truner<sup>27)</sup>によると、骨がメカニカルストレスに適応して継続的に骨量やアーキテクチャを変える時には、以下の特徴がある。①静的ではなく、動的な荷重によって影響される。②適応応答を開始するには低回数メカニカルストレスで十分である。③骨細胞は、習慣的なメカニカルストレスに適応しているため、ルーチン的な荷重の信号には敏感ではなくなる。

## 2) 骨に有益な運動様式

運動が骨に対し有益な効果をもたらすという研究報告はこれまで多くなされている。ラットを用いた動物実験ではランニング<sup>28)</sup>、重量支持<sup>29)</sup>、塔登り<sup>30)</sup>、水泳<sup>31)</sup>、ジャンプ<sup>32-34)</sup>など様々な運動様式が骨量増加に適していることが報告されている。一方、Cassellら<sup>35)</sup>は人を対象とした研究によると、水泳選手に比べてよりハイインパクトメカニカルストレスを受けた体操選手において骨密度が有意に高くなったと報告しており、強い衝撃的な負荷を受ける運動が骨量増加に有効であることを報告している。

Juら<sup>36)</sup>はラットを用いる研究において、大腿骨におけるジャンプトレーニングとランニングは、両方とも海綿骨量を増加させるが、ジャンプトレーニングは既存の骨梁を厚くすることによって増加させるのに対して、ランニングは新しい骨梁を作り、骨梁の連結性を増加させることによって海綿骨量を増加させると報告している。この結果は負荷の様式や強度により骨代謝の適応が異なる可能性を指摘している。

また、Bégotら<sup>37)</sup>の報告によると、ランニングはカルシウム欠乏またはリン過剰摂取の条件においてもラットの脛骨の骨量や骨強度の増加に効果的な方法であると報告している。

一方、梅村ら<sup>32)</sup>は成長中のラットにおいて一日わずか5回のジャンプトレーニングによって、脛骨の骨量や骨強度が有意に増加したと報告している。この結果から、ジャンプトレーニングは少ない回数でも骨量増加に有効な運動様式であると考えられる。また、本田ら<sup>34)</sup>は、ハイインパクトかつ低頻度のジャンプトレーニングは卵巣摘出ラット及び偽手術ラットにおいて下肢の骨形成効果があったと報告している。これらの研究成果から骨量、骨強度の増加に適したメカニカルストレスの特性は、歪みが強く (high-impact : ハイインパクト)、歪み速度の速い (high-strain rate : ハイストレインレート) ものであると考えられる。

### 3) 運動とリン・カルシウム代謝及び線維芽細胞増殖因子 23 の変化

骨にメカニカルストレスを与えると、それに対する局所の骨の骨塩量及び骨強度が増加することは知られている。これは運動によって血中のリンとカルシウムが骨に沈着した結果と考えられる。特にラットにおいてはメカニカルストレスによる骨塩量増加の適応が早く、このため血中のリンとカルシウムの濃度が一時的に減少すると考えられる。そこで、体内のリンとカルシウムの恒常性を維持するために腸管でのカルシウム吸収を増加する必要があり、腎臓においてビタミンDの活性化が促進される可能性が考えられる。実際にIwamotoら<sup>38)</sup>や梅村ら<sup>39)</sup>によって、運動によりラットの血中活性型ビタミンD濃度が上昇することが報告されている。

線維芽細胞増殖因子 23 (Fibroblast Growth Factor 23: FGF23) は骨細胞において産生され、腎近位尿細管でのリン再吸収とビタミンDの活性化を抑制することにより、血中リン濃度を低下させるホルモンである<sup>40, 41)</sup>。また FGF23 は、慢性腎臓病に伴う骨ミネラル代謝異常 (Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder: CKD-MBD) の発現にも関与することが示されている<sup>42)</sup>。従って FGF23 の作用を調節する方法が、今後リン代謝異常症の新たな治療法となる可能性がある。近年 FGF23 についての研究

は増加しているが、運動との関連についての研究はほとんどない。運動によるメカニカルストレスが FGF23 の調節因子の一つとなることにより、活性型ビタミン D の合成に関与し、全身のリン・カルシウム代謝に及ぼす影響を与えている可能性がある。

#### 4) ラットのジャンプトレーニング (Fig. 1)

前述したようにジャンプはラットの骨量、骨強度を高めるトレーニングとして有効な手段の一つである。以下に具体的なトレーニング手順及び特徴を述べる<sup>43)</sup>。

ラットには四方を板で囲んだ箱状の木枠の底から、箱の上端に上肢で捕まるようジャンプをさせる (Fig. 1)。その後ラットを静かに底に戻して、繰り返しジャンプをさせる。トレーニングの初期には箱の底に電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電) を設置し、3 秒に 1 回の割合で約 80 ボルトの直流電流が流れるように設定する。この電気刺激を用いてジャンプさせるが、ラットは 1 ~ 2 日でトレーニングに慣れて、電気刺激を与えなくても自発的にジャンプをするようになるので、その後はほとんど電気刺激を使用しない。通常では箱の高さを 40 cm 程度に設定し、ジャンプは 1 日に 10 ~ 20 回、約 3 秒毎にジャンプをさせるトレーニングを行う。電気刺激はトレーニングの初期のみ使われるので、骨に影響をほとんど及ぼさないと考えられている。

ジャンプトレーニングは他のトレーニング方法とは異なる以下の特徴がある。先行研究<sup>37)</sup>でランニングは高リン食あるいは低カルシウム条件においてラット骨の改善に効果的であったが、ランニングが骨に与える影響は複雑で、メカニカルストレス以外にアナロビクな因子やエアロビクな因子も含んでいる。それに対してジャンプトレーニングは、ジャンプの動作が短時間で済むため、メカニカルストレス以外の影響がほぼないと考えられる。また、水泳やランニングなどの他のトレーニングよりもラットに対するストレスも少なく、優れたトレーニング法であると考えられる。

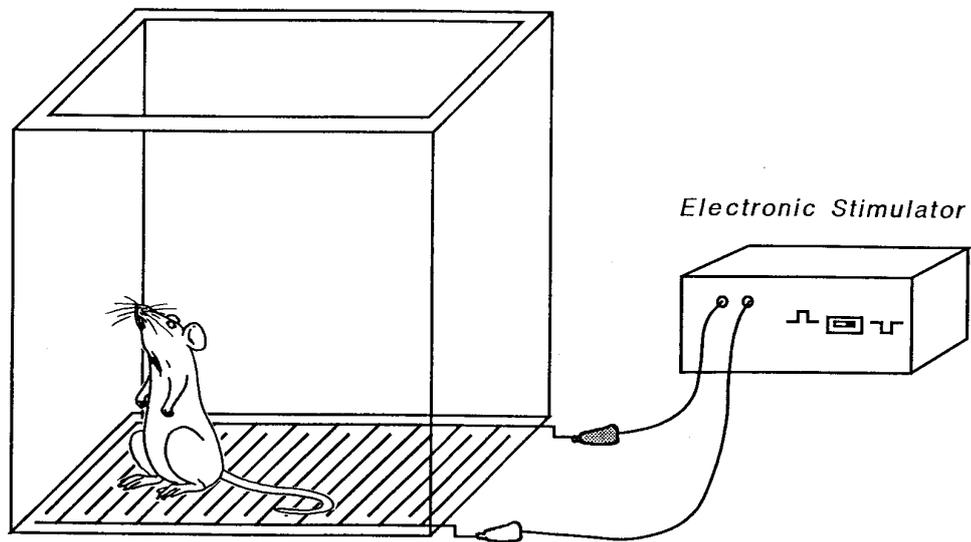


Fig. 1. ラットのジャンプトレーニング(梅村らの図から引用 : 1999)

### 5) 骨粗鬆症予防のための運動

骨粗鬆症とは骨量の減少と骨組織の微細構造の異常の結果、骨に脆弱性が生じ、骨折が生じやすくなる疾患である。特に女性は男性よりも加齢によって女性ホルモンが減少することによって骨密度が低下しやすくなる。

Warden ら<sup>44)</sup>と Umemura ら<sup>45)</sup>は骨に負荷を加えるトレーニングでは、骨径が顕著に増大することを報告しているが、骨径の増大は強度を高める因子の一つである。一旦、太くなった骨はトレーニングを中止しても骨径は保たれ、骨強度に利することが示されている。また、人においても低反復回数のジャンプトレーニングは骨量増加に有効であることが多く報告されている<sup>46-50)</sup>。以上の研究より、骨粗鬆症の予防対策の一つ

として若齢期にメカニカルストレスを受ける運動をすることにより骨を太くすることが重要であると考えられる。これにより人生において骨強度を保つことに利点がある。今後さらに人口に占める高齢者の比率が高まることが予想されている現代において、骨粗鬆症の予防、治療対策は重要課題であるといえる。

### 第3節 研究の目的

本研究は成長期の雄ラットを用い、ジャンプトレーニングと高リン食が骨代謝等に及ぼす影響について以下の2点に焦点を当てて検討した。

- 1) 高リン食条件におけるジャンプトレーニングが骨塩量と骨強度に及ぼす影響
- 2) 高リン食条件におけるジャンプトレーニングがリンとカルシウム代謝に及ぼす影響

以上の研究により、リン摂取が過多となった食餌条件でもメカニカルストレスが骨量・骨強度を増加させ、骨粗鬆症の予防としての効果があるかについて明らかとすることを目的とした。Frost<sup>24, 25)</sup>によると、骨は非日常的に受ける強度のメカニカルストレスに適応するが、その負荷強度がルーチンになると適応を止める。そこで本研究ではジャンプトレーニングに対する骨代謝の変化を、適応初期(研究1)と適応後期(研究2)に分けて検討することとした。また、本研究で用いる高リン食条件は、成長に影響を及ぼさない程度の比較的軽いリン負荷食とした。

**研究1 「高リン食条件における8週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響」**

ラットにおいて 8 週間の運動トレーニングは骨塩量や骨強度を十分に増加させることが知られており、メカニカルストレスに適応した状態であると考えられる。そこで研究 1 においてはトレーニング期間を 8 週間とした。

Bégot ら<sup>37)</sup>はラットを用いて、6 週間のランニングとカルシウム及びリンの比率の異なる食餌条件を組み合わせる実験を行った結果、ランニングは食餌条件にかかわらず脛骨パラメータと骨梁構造に有益な影響を及ぼしたと報告している。しかし、ランニング運動は有酸素運動であるので、トレーニングが骨に与える影響は複雑で、メカニカルストレス以外の因子も含むと考えられている。そこで、本研究ではラットの標準食にリンを添加して P/Ca = 2.0 に調整した高リン食を作成し、P/Ca = 1.0 である通常食と比較して、ジャンプトレーニング（ハイインパクトトレーニング）が下肢の骨に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。また、各食餌条件においてハイインパクトトレーニングが全身性のリン・カルシウム代謝に及ぼす影響について、新しく発見された骨から分泌されてリン代謝を調節するホルモンである線維芽細胞増殖因子 23 (Fibroblast Growth factor 23 : FGF23) の血中濃度を含めて検討を行った。FGF23 の測定意義については、メカニカルストレスが骨細胞を刺激した場合、骨細胞が主体となって、FGF23 の分泌を通して全身性のリン・カルシウム代謝を調整している可能性があると考えたためである。

## 研究 2 「高リン食条件における 2 週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響」

研究 1 においてはトレーニング期間を 8 週間としたため、骨のメカニカルストレスに対する適応が進んだ段階において、高リン食条件でジャンプトレーニングが骨代謝及びリンとカルシウム代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、ジャンプトレーニングは通常食においても高リン食においてもラットの脛骨の骨塩量や骨強度などを増加

させた。しかし、8 週間のトレーニング中に骨は習慣性の負荷に適応して、骨細胞の感受性が低下していたと考えられる<sup>27)</sup>。骨塩量増加が著しいと考えられる適応の初期段階では、リンとカルシウム代謝に及ぼす影響が異なる可能性がある。そこで、トレーニング期間を2週間という短期間に設定し、高リン食および通常食条件においてジャンプトレーニングが骨代謝およびリン・カルシウム代謝に及ぼす影響を検討した。また、FGF23 の変化についても検討した。

## 第2章

---

### 高リン食条件における8週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響

- 第1節 目的
- 第2節 方法
- 第3節 結果
- 第4節 考察

## 第1節 目的

高リン食条件における8週間のラットのジャンプトレーニングが骨塩量や骨強度に与える影響を明らかにすることを目的とした。また、FGF23は最近発見されたホルモンであり、骨細胞から分泌され、主に腎尿細管でリンの再吸収と抑制するとともに、ビタミンDの活性化を抑えて、カルシウム代謝にも影響を与えていることが知られている。本研究では、FGF23についての影響も検討した。

## 第2節 方法

### 1. 実験動物

実験には8週齢のウィスター系の雄性ラット42匹を日本エスエルシー株式会社から購入し、1週間の予備飼育の後、以下の4群に分けた。

- ①通常食安静群 (NC ; n=10)
- ②通常食ジャンプトレーニング群 (NE ; n=10)
- ③高リン食安静群 (HC ; n=11)
- ④高リン食ジャンプトレーニング群 (HE ; n=11)

実験開始後7週目にNCの1匹が死亡したため(原因不明)、NC群は9匹となった。飼育環境は、実験期間を通して設定温度を $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ とし、中京大学動物実験棟の飼育室にて1匹ずつワイヤー・ケージ(24cm×38cm×20cm)で飼育した。人工照明により、朝6時から夜18時まで暗期とし、18時から翌日朝6時まで明期として12時間昼夜サイクルの明期と暗期を設定し、トレーニングは暗期に実施した。本研究は中京大学動物倫理委員会の承認を得て実施した。

## 2. 餌の設定

基本の飼料として、CE-2（日本クレア）を用いた。CE-2 粉末飼料のミネラルの含有量を Table 1 (A) に示す。ラットの高リン食は基本の飼料にリン酸二水素ナトリウム及びデキストリンを添加して、リン・カルシウム比 (P/Ca) を 2.0 に設定した。通常食群には基本の飼料に塩化ナトリウムを加えナトリウム含有量を高リン食に合致させたうえ、デキストリンを少量加えて、リン・カルシウム比を 1.0 に設定した (Table 1 (B))。各個体の 1 日当たりの食餌摂取量を 12 週齢時と 17 週齢時に測定した。

**Table 1. Mineral component of based feed and additives**

**(A) Mineral component of based feed (CE-2)**

Minerals	Component (per 100g)
Ca (g)	1.06
P (g)	0.99
Mg (g)	0.34
K (g)	1.02
Mn (mg)	9.96
Fe (mg)	30.64
Cu (mg)	0.71
Zn (mg)	5.45
Na (g)	0.31

**(B) Additives to the 100g of based feed and P/Ca ratio**

	Normal diet	High-phosphorus diet
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O (g)	0.35	5.38
NaCl (g)	1.89	0
Dextrin (g)	3.76	0.62
P/Ca ratio	1.0	2.0

### 3. トレーニングプログラム

予備飼育 1 週間後の 8 週間 (9 ~ 17 週齢) をトレーニング期間とした。その間、ジャンプ群のラットには、四方を板で囲んだ箱の底から、箱の上端に上肢で捕まるようジャンプをさせた<sup>18-21)</sup>。トレーニングの初期には箱の底に電気刺激装置 (SEN-3301, 日本光電) を設置して、電気刺激を用いてジャンプさせたが、ラットは 1 ~ 2 日でトレーニングに慣れたため、その後はほとんど電気刺激を使用しなかった。箱の高さを 40 cm に設定し、ジャンプは 1 日に 20 回、約 3 秒毎にジャンプをさせるトレーニングを週 5 日行った。

### 4. 測定項目

飼育期間中を通して、体重を毎週、汎用電子天びん (FZ1200IWP, エー・アンド・デイ) にて測定した。トレーニング期間終了後、イソフルラン麻酔下にて失血死させ、血清生化学検査に用いる血液を採取した。また、左右の脛骨を摘出し、骨を損傷しないように注意深く軟部組織を除去した。

#### *骨塩量・密度の測定*

左脛骨についてはDual energy X-ray absorptiometry (DXA) 法を用いた骨塩量測定装置 (DSC-600 EX, アロカ) にて、骨塩量及び骨密度を測定した<sup>14, 23)</sup>。測定は超高精度モードにて実施した。本研究と同様の方法で行った先行研究において、測定値の変動係数は 2.6 ~ 2.7% であった<sup>20, 21)</sup>。この測定においては、X線はラットの後肢の外側 (Lateral) に対応する脛骨の外側面から内側 (Medial) に対応する内側面への向きで照射した。

#### *骨長及び骨強度の測定*

右脛骨についてはノギスにて骨長、および骨幹中央部の短径および長径を測定し、その後骨強度試験機 (TK-252C/RDT, 室町機械) を用いて 3 点支持の破断実験を行い、骨強度を測定した。両端支点間の距離は 16 mm とし、その中間位で上からプランジャーを 10 mm/min の速度で変位させて被検骨を破断し、プランジャーにかかる最大曲げ荷重と破断までに要した破断エネルギーを測定した。また、骨の歪み (変位) と骨に加わる力の関係より、スティフネスを算出した。破断は個々の骨の骨幹中央部で行われるようにプランジャーを設定した。

### 血液の分析

血液を遠心分離機で分離してから、血清を凍結保存した。保存された血清を用いて、オルトクレゾールフタレインコンプレクソン法<sup>24)</sup>にて総カルシウムを、モリブデン酸直接法<sup>25)</sup>にて無機リンを測定した。活性型ビタミン D は RIA による 2 抗体法にて測定した。また、ELISA 法にて FGF23 (FGF23 ELISA Kit, Kainos Laboratories Inc) を測定した。

## 5. 統計的手法

各項目については、平均値±標準偏差で示した。統計には統計ソフト SPSS 17.0 for Windows を用いて、二元配置分散分析 (食餌 × トレーニング) を行い、危険率 5 % 以下を有意水準とした。交互作用が有意であった場合には、Tukey の HSD テストによって各運動群と安静群の群間差を検定した。

## 第3節 結果

### 1. 餌の摂取量

食餌摂取量は、12週齢と17週齢時において、各個体の1日当たりの摂取量を測定したが、トレーニングのみ主効果が有意であり、交互作用と食餌の主効果がなく、ラットの高リン食群と通常食群の食餌量に有意な差はなかった (Table 2).

**Table 2. Consumption of food per day**

	Group				Main effect		Inter
	NC (n = 9)	NE (n = 10)	HC (n = 11)	HE (n = 11)	Exercise	Feed	
12th wk	29.2 ± 3.9	22.4 ± 1.7	29.0 ± 5.7	25.9 ± 2.7	***	ns	ns
17th wk	28.0 ± 3.2	22.3 ± 1.8	27.6 ± 4.8	23.4 ± 1.5	***	ns	ns

**Food, g. NC = Normal diet sedentary control group (n = 9); NE = Normal diet jump exercise group (n = 10); HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11); HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11); Inter = Interaction. Data are presented as means ± SD, ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*\*\*P < 0.001).**

## 2. 体重・骨長・短径・長径

体重は実験期間を通じて4群とも増加したが、いずれの週齢においてもトレーニング、食餌の主効果及び交互作用は有意ではなかった。解剖時の体重にも有意な群間差がなく、この実験におけるジャンプトレーニングおよびラットの高リン食は体重に影響を及ぼさなかった (Table 3).

骨長には、トレーニングの主効果が有意であり、ジャンプトレーニングにより骨長は長くなったが、有意な交互作用がなかった。短径は、トレーニングの主効果及び交互作用が有意であり、食餌の主効果は見られなかった。下位検定の結果によると HE は HC より有意に太かった。長径は、トレーニングの主効果が有意であったが、交互作用および食餌の主効果は見られなかった (Table 3)。

**Table 3. Final body weight, tibial length, longitudinal and transverse thickness of tibia**

	Group				Main effect		Inter
	NC (n = 9)	NE (n = 10)	HC (n = 11)	HE (n = 11)	Exercise	Feed	
<b>Body weight</b>							
Initial body weight	267.4 ± 6.9	267.1 ± 7.0	267.0 ± 6.4	267.5 ± 8.0	ns	ns	ns
Final body weight	451.0 ± 25.1	441.7 ± 21.9	436.1 ± 27.8	452.7 ± 23.9	ns	ns	ns
<b>Tibia</b>							
Tibial length	43.86 ± 0.96	44.20 ± 0.34	43.42 ± 0.34	44.15 ± 0.07	**	ns	ns
Transverse thickness	2.59 ± 0.06	2.64 ± 0.09	2.50 ± 0.09	2.68 ± 0.09 <sup>†</sup>	***	ns	*
Longitudinal thickness	3.62 ± 0.15	3.71 ± 0.10	3.51 ± 0.10	3.77 ± 0.21	***	ns	ns

**Body weight, g; Tibial length, mm; Longitudinal thickness, mm; Transverse thickness, mm; NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11); Inter = Interaction. Data are presented as means ± SD, ANOVA reveals significant main effects of exercise and interaction of feed and exercise (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001). <sup>†</sup>P < 0.001: a significant difference from HC (Tukey-HSD).**

### 3. 血清のリン・カルシウム代謝関連物質

トレーニング期間終了後の血液のデータにおいて、活性型ビタミンDはトレーニングと食餌の両方に有意な主効果があったが、交互作用は有意ではなかった。しかし、高リン食群では活性型ビタミンDがトレーニングにより増加する傾向があった。血中総カルシウムは、トレーニングの主効果のみ有意でありトレーニングにより増加したが、交互作用と食餌の主効果は有意ではなかった。血中無機リンは、トレーニングの主効果および交互作用は有意ではなかったが、食餌の主効果が有意であり、ラットの高リン食において増加した。FGF23は、トレーニングの主効果及び交互作用は有意ではなかったが、食餌の主効果が有意であり、ラットの高リン食で顕著に増加した (Table 4)。

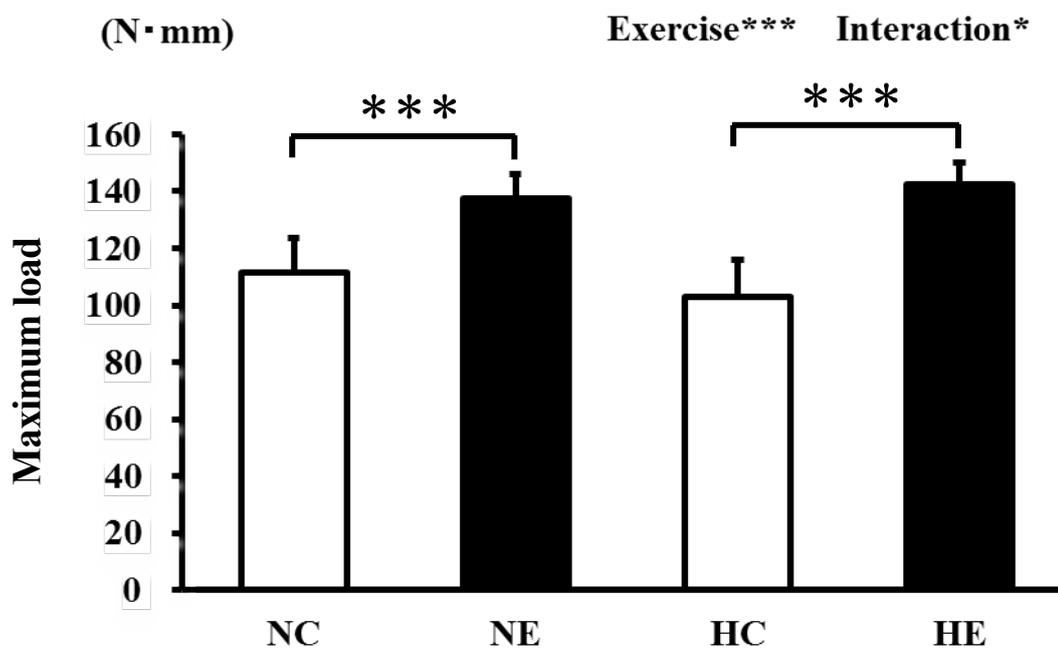
**Table 4. Serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, calcium, inorganic phosphorus and FGF23 levels**

	Group				Main effect		Inter
	NC (n = 9)	NE (n = 10)	HC (n = 11)	HE (n = 11)	Exercise	Feed	
1,25-D	111.8 ± 20.3	120.0 ± 16.9	155.2 ± 23.6	179.6 ± 23.5	*	***	ns
Cal	9.23 ± 0.22	9.38 ± 0.22	9.14 ± 0.36	9.46 ± 0.49	*	ns	ns
Inor p	6.19 ± 0.43	6.35 ± 0.55	7.97 ± 1.32	8.45 ± 1.87	ns	***	ns
FGF23	411.8 ± 53.1	430.0 ± 57.8	868.1 ± 92.8	819.6 ± 103.7	ns	***	ns

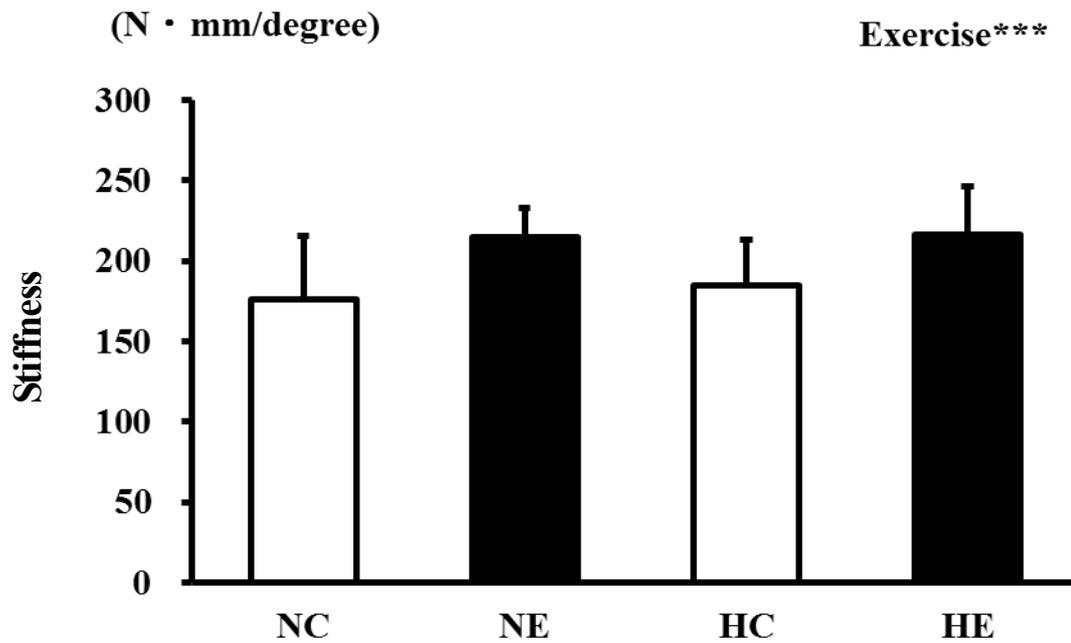
**1,25-D = 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> (pg/ml); Cal = Calcium (mg/ml); Inor p = Inorganic phosphorus (mg/ml); FGF23 (pg/ml). NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11). Inter = Interaction. Data are presented as means ± SD, ANOVA reveals significant main effects of feed and exercise (\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001).**

#### 4. 骨強度・骨塩量

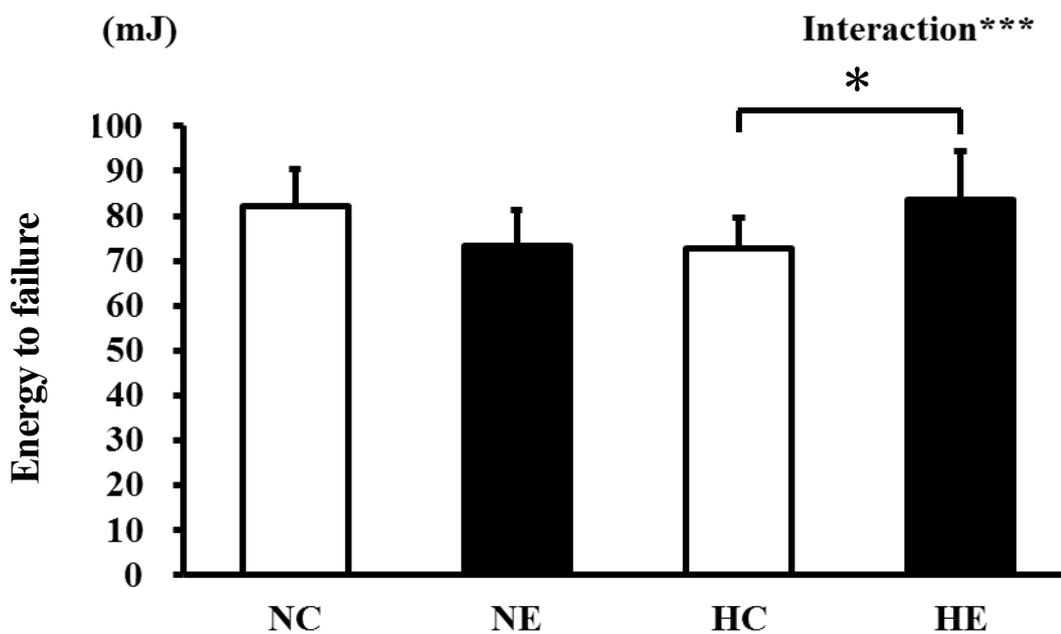
破断試験における右脛骨の最大荷重は，トレーニングの主効果及び交互作用が有意であったが，食餌の主効果はなかった (Fig. 2 (A)). スティフネスは，トレーニングの主効果が有意であり，ジャンプトレーニングでスティフネスが高くなることが明らかとなったが，有意な交互作用及び食餌の主効果はなかった (Fig. 2 (B)). 破断エネルギーは，トレーニングと食餌両方とも主効果はなかったが，有意な交互作用が見られた (Fig. 2 (C)). DXA 法によって測定した左脛骨全体の骨塩量は，トレーニングの主効果が有意であったが，交互作用及び食餌の主効果は有意ではなかった (Fig. 3).



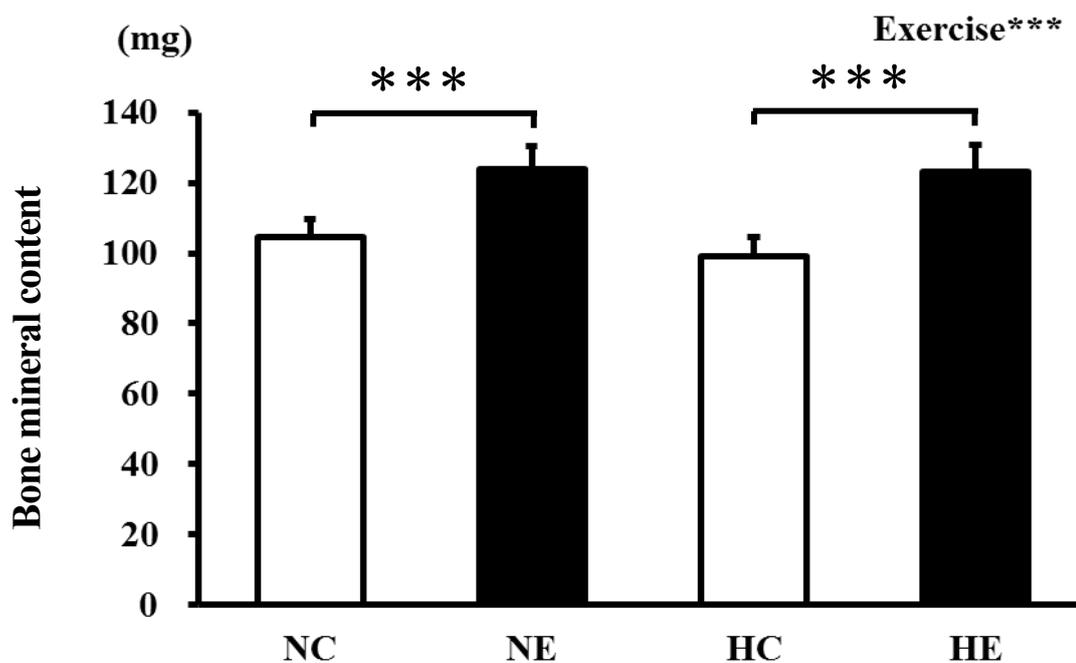
**Fig. 2 (A).** Effects of jump exercise and high-phosphorus diet on the maximum load. NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise and interaction of feed and exercise (\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001).



**Fig. 2 (B).** Effects of jump exercise and high-phosphorus diet on the stiffness. NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*\*\*)  $P < 0.001$ ).



**Fig. 2 (C).** Effects of jump exercise and high-phosphorus diet on the energy to failure. NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*P < 0.05; \*\*\*P < 0.001).



**Fig. 3. Effects of jump exercise and high-phosphorus diet on the bone mineral content of tibia by DXA. NC = Normal diet sedentary control group (n = 9), NE = Normal diet jump exercise group (n = 10), HC = High phosphorus diet sedentary control group (n = 11), HE = High phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*\*\*)P < 0.001).**

## 第4節 考察

本研究では若年齢のラットを用い、P/Ca 比が 1.0 である通常食摂取と P/Ca 比が 2.0 である高リン食摂取において、8 週間のジャンプトレーニングが骨およびリン・カルシウム代謝に及ぼす影響について検討した。その結果、ジャンプトレーニングは通常食においても高リン食においても脛骨の骨塩量や骨強度を増加させることが明らかとなった。さらに、骨強度及び骨幹中央部の短径では交互作用が有意であり、高リン食において運動の効果がより高い可能性が示された。

現代の食生活においては食品添加物からのリン摂取量が増加していると考えられる。この事実を経年的に示すデータは少ないが、Calvo は<sup>51)</sup> 米国では食品添加物からのリン摂取推定量は 1980 年に 400mg/日であったが、1990 年には 470mg/日に増加したと報告している。さらに、2000 年代に入ってさらに食品添加物からのリン摂取が増え、米国の 1 日のリンの耐容上限量である 4000mg を超える人が数パーセントいると推定されている<sup>4)</sup>。また、通常の栄養調査ではリン摂取量を過少評価する可能性があることが指摘されている<sup>7, 9)</sup>。2013 年度の日本の国民健康・栄養調査によると、成人の 1 日当たりのカルシウムの摂取量は 498mg であり、リンの摂取量は 985mg であった<sup>52)</sup>。日本人のリンの摂取量の耐容上限量は、日本人の栄養摂取基準 2010 年度版においては 3000mg に設定されており、耐容上限量以内であろうことが推察される。しかし、我が国においても加工食品の普及で摂取リン量は増加しているものと考えられる<sup>7)</sup>。

ヒトのリン・カルシウム摂取量とラットのリン・カルシウム摂取量を単純に比較することは難しい。ラットは骨成長が止まらない動物であり、一般にラット用飼料にはカルシウムおよびリンが多く含有されており、P/Ca 比は 1 程度である。そこで、本研究では標準的なラット用飼料にリン酸塩や塩を添加して、P/Ca 比が 1.0 の通常食と 2.0 の極端ではないラットの高リン食を作成して実験を行った。本実験では、ラットの高

リン食を作成する上でナトリウムを添加したため、ナトリウムの摂取が通常より多くなった。通常より多いナトリウム摂取はカルシウム代謝に影響を及ぼす可能性があるため、コントロール群にもナトリウムを添加してバランスをとった。

本研究の結果において、体重にはラットの高リン食の影響が観察されなかった。同じくラットを用いた先行研究において、P/Ca 比が 2.0 および 3.0 の場合において通常食に比べて 8 週間で体重が有意に減少したことが報告されており<sup>14)</sup>、本研究の結果とは異なる。一方、別の先行研究においては 4 週間の実験で P/Ca 比が 2.0 で体重に影響を及ぼさなかったことが報告されている<sup>53)</sup>。この結果の不一致は設定する食餌の配合において電解質の含有量が異なったことが一因となったことが考えられる。本研究は後述の先行研究の手法に準じてラットの高リン食を作成したので、P/Ca 比が 2.0 の高リン食は体重または骨成長に影響を及ぼさなかった。また、ジャンプトレーニングも体重に影響を及ぼさなかった。本実験において 4 群間の体重に群間差がないことは、骨塩量、骨強度などの測定結果を評価することを容易にしている。一方、Bégot ら<sup>37)</sup>の研究では P/Ca 比が 1.7 のラットの高リン食において、回転ケージを用いた 1 日に平均約 5 km の自由走が骨に及ぼす影響を観察している。その結果、ラットの高リン食においても自由走は、骨重量や海綿骨密度を上昇させると報告している。しかし同時に、自由走では体重が増加することも報告されている。従って、この研究において自由走が骨塩量を増加させた理由から、運動によって体重が増加した影響を排除することは難しい。

本研究では、ジャンプトレーニングを用い、ラットの高リン食と組み合わせて骨への影響を検討した。ジャンプトレーニングは先行研究で骨塩量、骨密度及び骨形態、骨強度を高めるのに有効な方法であると証明されている<sup>32, 45)</sup>。他のトレーニングと比べてジャンプトレーニングの特徴は、運動の回数が少ないため運動の代謝系への影響が少なく、また体重変化を伴うことなく骨塩量及び最大荷重を増加できることである。

本実験においても、一日にわずか20回のジャンプトレーニングを8週間で行うことにより有意な体重変化を伴わず骨へのジャンプトレーニングの効果が顕著に見られた。先行研究ではジャンプトレーニングにより、コントロール群比で脛骨の骨塩量を約19.2%上昇させたのに対し<sup>54)</sup>、本実験では約18.5% (通常食)、25.1% (ラットの高リン食) 上昇させ、ほぼ一致した結果を得た。1日20回のジャンプトレーニングでは、運動の代謝系への影響は少ないと考えられるため、メカニカルストレスが骨塩量を増加させていることを強く示唆していると考えられる。本研究の結果は、ラットの高リン食においても骨に荷重を与えると骨塩量を増加させること、通常食よりもラットの高リン食においてその効果はより顕著である可能性を示している。

血中のリン・カルシウム代謝関連のデータにおいては、高リン食において明らかに血中リン濃度が増加し、FGF23 濃度も顕著に増加した。本研究において高リン食によってFGF23が上昇したことは、ヒトの研究において摂取するリン量の増加または経口リン負荷がFGF23およびPTHの増加を促進させるという報告と一致しており<sup>55-58)</sup>、血清の無機リン濃度の上昇が骨細胞からのFGF23分泌を高めることを支持する結果であった。一方、FGF23の上昇は腎臓での活性型ビタミンDの合成を抑制させるが、ラットの高リン食においては逆に活性型ビタミンD濃度が増加した。これは本研究では原因は明らかにならなかったが、ラットの高リン食によりPTHが増加したことに起因すると考えられる。先行研究では、血中活性型ビタミンDは血中PTH濃度が高くなるに従って上昇したことを報告している<sup>59)</sup>。

一方、運動は活性型ビタミンD濃度を上昇させ、血中の総カルシウム濃度を増加させた。運動がラットの活性型ビタミンD濃度を上昇させたことは、Iwamotoら<sup>38)</sup>の先行研究と一致する。本研究では、運動が活性型ビタミンDを増加させる因子について、運動による骨への荷重が骨から分泌されるFGF23を減少させ、このことがシグナルとなるという仮説を立てた。しかし、本実験においてはFGF23の減少傾向は観察された

ものの有意な差を見出すことができず、仮説の証明には至らなかった。この一つの原因としては、ラットでは4週間のジャンプトレーニングでコントロール比10%以上の有意な骨塩量の増加が報告されており<sup>60)</sup>、ラットにおいて8週間のトレーニング期間は比較的長く、骨の荷重に対する適応期間が終了しかけているからかもしれない。トレーニング期間が短く適応初期であれば結果は異なっていた可能性がある。

本実験の結果、ラットの高リン食および骨に荷重を与える運動は、全身性のリン・カルシウム代謝に影響を及ぼすこと、高リン食摂取条件のラットにおいても骨に荷重を与える運動は骨塩量、骨強度を増加させることが明らかとなった。

## 第3章

---

### 高リン食条件における2週間のジャンプトレーニングがラットの骨代謝及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響

- 第1節 目的
- 第2節 方法
- 第3節 結果
- 第4節 考察

## 第1節 目的

トレーニング期間を2週間という短期間に設定し、高リン食および通常食条件においてハイインパクトかつ低頻度のジャンプトレーニングによるメカニカルストレスがラットの脛骨の特性（骨塩量，骨強度など）に及ぼす影響を検討することを目的とした。また，リン・カルシウム代謝及びFGF23の変化についても検討した。

## 第2節 方法

### 1. 被検動物，飼育環境及び餌の設定

被検動物，飼育環境およびの餌の設定は研究1と同様に実行した。

（第2章参照）

### 2. トレーニングプログラム

（第2章参照）

本研究では，ジャンプトレーニングを2週間（9～11週齢）で行った。

### 4. 測定項目

体重は毎週，汎用電子天びん（FZ1200IWP，エー・アンド・デイ）にて測定した。ジャンプトレーニング前及びジャンプトレーニング1週間後にFGF23濃度を測定するために尾の先端の切断によって血液サンプルを集めた。トレーニング期間終了後，イソフルラン麻酔下にて失血死させて，血清生化学検査に用いる血液を採取した。また，左右の脛骨を摘出し，骨を損傷しないように注意深く軟部組織を除去した。

## 血液の分析

トレーニング前及び1週間後の FGF23 の濃度とトレーニング終了後のオステオカルシン、FGF23、PTH、活性型ビタミン D、総カルシウム、無機リンの濃度を測定するため血清サンプルを遠心分離して凍結保存した。

オルトクレゾールフタレインコンプレクソン法 (OCPC 法) にて総カルシウムを、モリブデン酸直接法にて無機リンを測定した。活性型ビタミン D は RIA による 2 抗体法にて測定した。また、ELISA 法にて FGF23 及びオステオカルシン及び PTH を測定した。

## 骨長・骨塩量・骨密度及び骨強度の測定

骨長・骨塩量・骨密度及び骨強度の測定の手順は研究1と同様に実行した。

(第2章参照)

## 5. 統計的手法

各項目については、平均値±標準偏差で示した。統計には統計ソフト SPSS 17.0 for Windows を用いて、二元配置分散分析 (食餌 × トレーニング) 及び三元配置分散分析 (食餌 × トレーニング × 週齢) を行い、危険率 5%以下を有意水準とした。交互作用が有意であった場合には、Tukey の HSD テストによって各運動群と安静群の群間差を検定した。

## 第3節 結果

### 1. 体重

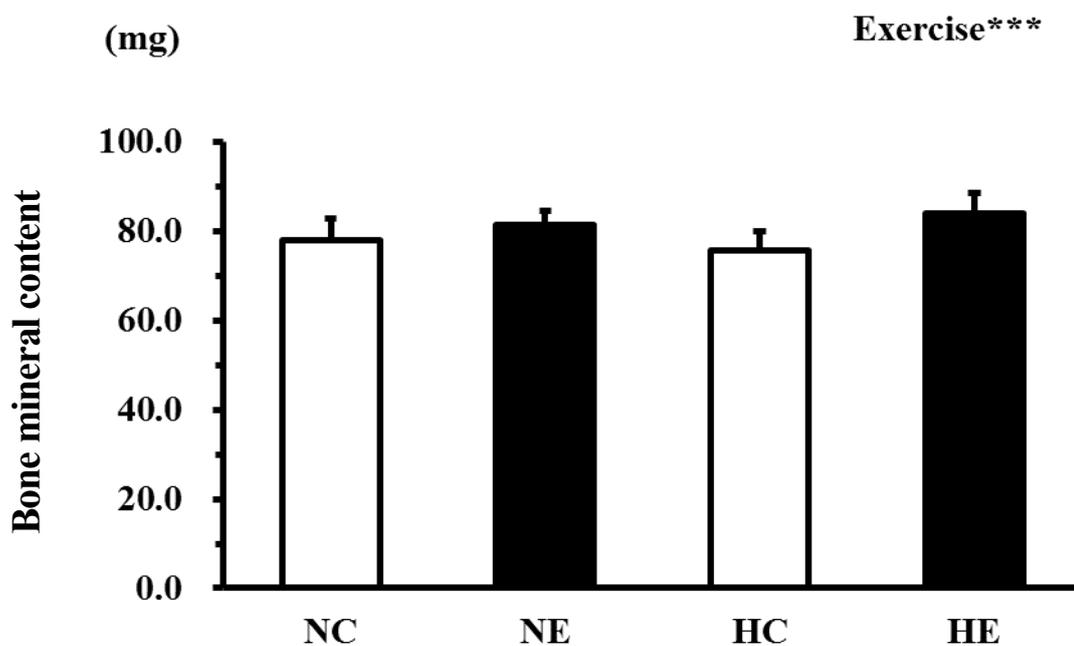
2 週間の実験終了後各群のラットの最終体重は増加したが、群間有意差が見られな

かった (Table 5). いずれの週齢においても, ジャンプトレーニングと食餌の相互作用と主効果はなかった.

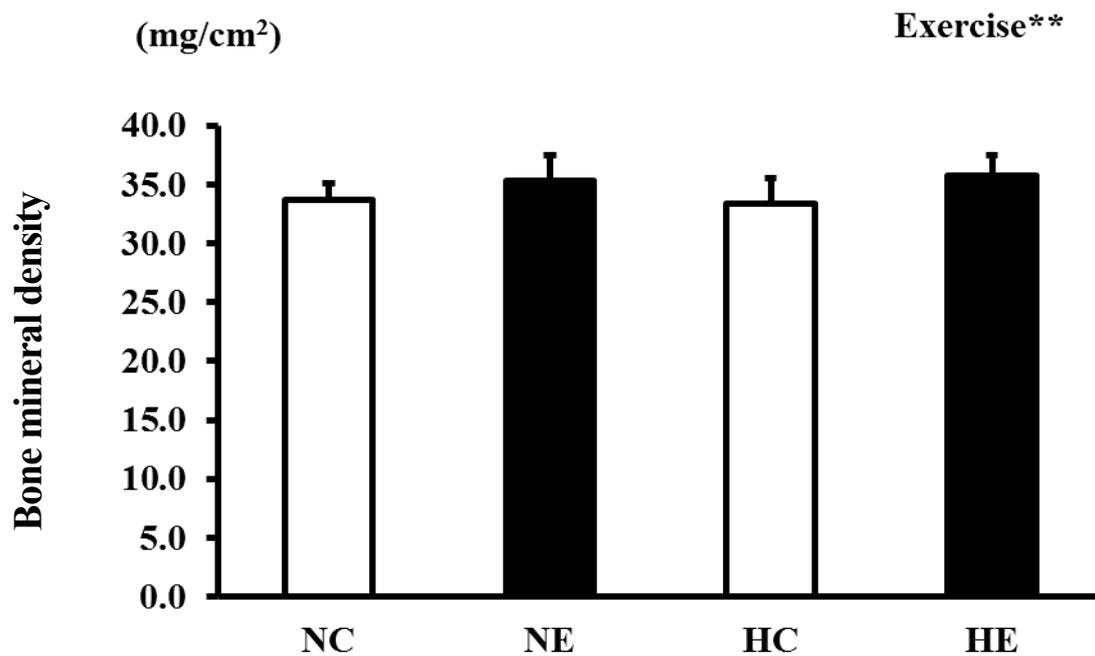
## 2. 骨塩量・骨密度

骨塩量は, 2 週間のジャンプトレーニング後においても, 食餌条件にかかわらずジャンプトレーニングによって有意に増加した. しかし, 交互作用が有意ではなかった (Fig. 4).

骨密度についても, 同じく 2 週間のジャンプトレーニングで運動の主効果が見られたが, 食餌の主効果及びジャンプトレーニングと食餌の交互作用はなかった. (Fig. 5).



**Fig. 4. Effects of jump training and high-phosphorus diet on the bone mineral content of the tibia evaluated by dual X-ray absorptiometry. NC = Normal diet sedentary control group (n = 10); NE = Normal diet jump exercise group (n = 10); HC = High-phosphorus diet sedentary control group (n = 11); HE = High-phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*\*\*P < 0.000).**



**Fig. 5. Effects of jump training and high-phosphorus diet on the bone mineral density of the tibia evaluated by dual X-ray absorptiometry. NC = Normal diet sedentary control group (n = 10); NE = Normal diet jump exercise group (n = 10); HC = High-phosphorus diet sedentary control group (n = 11); HE = High-phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise (\*\*P < 0.01).**

### 3. 骨長と骨強度

骨長では、2 週間の実験終了後ジャンプトレーニングと食餌の主効果及び交互作用の何れも有意差がなかった (Table 5).

骨強度では、2 週間の実験終了後ジャンプトレーニングと食餌の主効果及び交互作用の何れも有意差が見られなかった (Table 5).

**Table 5. Body weight, tibial lengths and maximum loads after two weeks**

	Group				Main effect		Inter
	NC	NE	HC	HE	Exercise	Feed	
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 11)			
Body weight	352 ± 18	338 ± 10	339 ± 18	338 ± 11	ns	ns	ns
<b>Tibia</b>							
Tibial length	41.2 ± 1.5	40.8 ± 0.3	40.9 ± 0.5	41.2 ± 0.7	ns	ns	ns
Maximum load	79.8 ± 6.9	83.0 ± 4.2	80.9 ± 5.7	84.4 ± 8.9	ns	ns	ns

**Body weight, g; Tibial length, mm; Maximum load, N/mm. NC = Normal diet sedentary control group (n = 10); NE = Normal diet jump exercise group (n = 10); HC = High-phosphorus diet sedentary control group (n = 11); HE = High-phosphorus diet jump exercise group (n = 11); Inter = Interaction. Data represent means ± SD.**

#### 4. 血清のリン・カルシウム代謝関連物質

FGF23 では、三元配置分散分析（トレーニング × 食餌 × 週齢）を行ってから、1 週間後及び 2 週間後の特定時点での FGF23 濃度の変化を検討するため、二元配置分散分析（トレーニング × 食餌）を行った。ジャンプトレーニングと食餌の交互作用が見られ実験開始 1 週間後の時点で高リン食における FGF23 の濃度が顕著に増加した。2 週間後の時点では高リン食によって FGF23 の濃度が顕著に増加したが、ジャンプトレーニングにより有意に減少した (Fig. 5)。

オステオカルシンは、ジャンプトレーニングによって濃度が有意に上昇した。交互作用が有意であり、高リン食条件でジャンプトレーニングの効果がより高かった (Table 6)。

カルシウムは、ジャンプトレーニングによって濃度が下がった。しかし、交互作用及び食餌の主効果がなかった (Table 6)。

血清無機リンにおいては、高リン食群が有意に高かったが、ジャンプトレーニングによって下がった。ジャンプトレーニングと食餌の交互作用がなかった (Table 6)。

活性型ビタミン D は、高リン食条件によって有意に高くなった。しかし、交互作用及びジャンプトレーニングの主効果が見られなかった (Table 6)。

副甲状腺ホルモンでは、ジャンプトレーニングと食餌の交互作用及び主効果の何れも有意ではなかった (Table 6)。

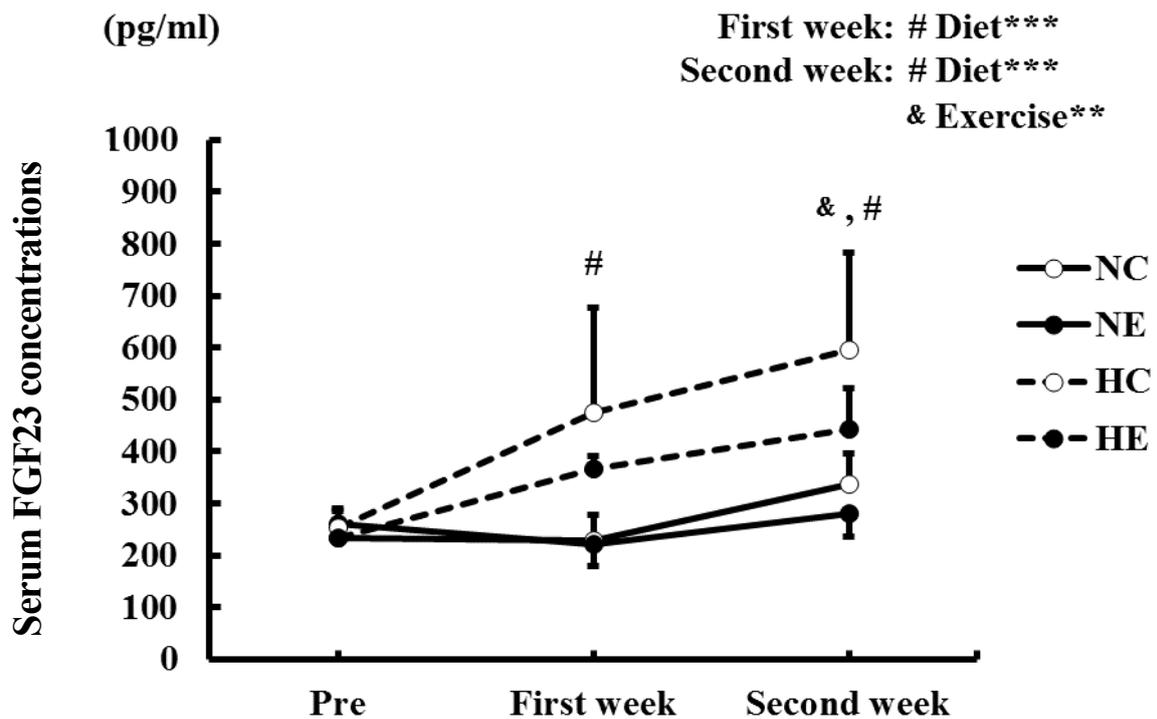


Fig. 5. Effects of jump exercise and high-phosphorus diet on serum FGF23 concentrations (pg/ml). NC = Normal diet sedentary control group (n = 10); NE = Normal diet jump exercise group (n = 10); HC = High-phosphorus diet sedentary control group (n = 11); HE = High-phosphorus diet jump exercise group (n = 11). ANOVA reveals significant main effects of exercise and diet (#main effect of diet at First week: \*\*\*P < 0.001; &main effect of exercise at second week: \*\*P < 0.01; #main effect of diet at second week: \*\*\*P < 0.001)

**Table 6. Serum levels of osteocalcin, calcium, inorganic phosphorus, 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> and PTH after two weeks.**

	Group				Main Effect		Inter
	NC	NE	HC	HE	Exercise	Feed	
	(n = 10)	(n = 10)	(n = 11)	(n = 11)			
Oste	0.65 ± 0.13	0.67 ± 0.08	0.52 ± 0.10	0.68 ± 0.09 <sup>†</sup>	**	ns	*
Cal	9.90 ± 0.59	9.27 ± 0.52	9.95 ± 0.98	9.45 ± 0.28	**	ns	ns
Inor P	8.94 ± 1.49	7.74 ± 0.77	10.25 ± 2.10	8.90 ± 0.95	**	**	ns
1,25-D	174.4 ± 36.4	182.6 ± 38.4	201.5 ± 39.7	211.4 ± 37.0	ns	*	ns
PTH	16.83 ± 15.04	7.36 ± 4.75	55.32 ± 72.8	26.60 ± 25.44	ns	ns	ns

Oste = Osteocalcin, ng/ml; Cal = Calcium, mg/ml; Inor p = Inorganic phosphorus, mg/ml; 1,25-D = 1,25-(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, pg/ml; PTH, pg/ml. NC = Normal diet sedentary control group; NE = Normal diet jump exercise group; HC = High-phosphorus diet sedentary control group; HE = High-phosphorus diet jump exercise group; Inter = Interaction. Data are presented as means ± SD, ANOVA reveals significant main effects of exercise and diet (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01) and interaction of exercise and feed (\*P < 0.05); <sup>†</sup>significant difference compared with HC group by the Tukey–HSD test: \*\*P < 0.01.

#### 第4節 考察

本研究では、通常食及び高リン食条件において、2週間という短期間のジャンプトレーニングが骨及びリン・カルシウム代謝に及ぼす影響を検討した。その結果、2週間のジャンプトレーニングによって脛骨の骨強度は増加しないが、脛骨の骨塩量と骨密度は有意に増加した。また、血清のオステオカルシン、総カルシウム、無機リンにはジャンプトレーニングの影響が表れること、血清無機リンおよび活性型ビタミンDには高リン食の影響が表れることが明らかとなった。さらに、血清のFGF23の濃度は高リン食の介入期間と伴に増加していくこと、ジャンプトレーニングによって上昇が抑制されることが明らかとなった。

先行研究<sup>20, 38, 61)</sup>では、ジャンプトレーニングは骨の骨塩量の増加及び骨組織形態の改善には有効な運動様式と報告されている。更に、Bégotら<sup>37)</sup>の研究では、カルシウム欠乏またはリン過剰摂取の不均衡な食餌条件において、ランニングが総脛骨の骨量の増加や微細な骨構造の改善に効果的な方法であると報告されている。本研究では、ジャンプトレーニングと高リン食条件を合わせて、骨にどのような影響を与えるかを検討した。先行研究でよく使われるランニング及び水泳運動に比べると、ジャンプトレーニングは有酸素運動の要因をあまり持っていないことが特徴であると考えられている。また、1日わずか20回のジャンプで、ラットの全身の代謝に影響が少なく、体重変化を伴うこともなく、高リン食条件においても骨塩量を有意に増加できることもジャンプトレーニングの特徴である。

本研究では、1日20回のジャンプトレーニングをわずか2週間行っただけで、高リン食においても体重の変化を伴わずに脛骨の骨塩量及び骨密度を有意に増加させることができることが明らかとなった。本田ら<sup>34)</sup>の研究では、コントロール群に比べてジャンプトレーニングによって脛骨の骨塩量は19.2%増加したが、本研究ではそれぞれのコントロール群に比べて通常食群において4.5%、高リン食群において10.8%増加し

た。この差が小さいのは、2週間の短期間のためと考えられる。

骨強度については、ジャンプトレーニングと高リン食の交互作用が見られなかった。骨強度よりも骨塩量のほうがジャンプの影響を受けやすかったと考えられる。最近では骨の量的要素だけでなく、質的要素も考慮することが重要と考えられている。骨は外部のメカニカルストレスに対して適応のプロセスを持っていると考えられている。2週間のジャンプトレーニングによって骨塩量と骨密度が有意に増加したが、骨強度に関する他の要素（骨質、骨微細構造）の変化まではより長い実験期間が必要であると考えられる。

骨におけるオステオカルシンは非コラーゲン性蛋白質の25%を占める。これは、骨代謝及びカルシウムイオンの恒常性の維持に寄与していると考えられている<sup>62, 63</sup>。オステオカルシンは石灰化期間中に骨芽細胞によって分泌されているので、骨形成マーカーとして利用されている。本研究では、オステオカルシンにおいてそれぞれの対照群と比較した場合、通常食群においては群間有意差がなかったが、高リン食群において見られた。したがって、通常食条件よりも高リン食条件においてジャンプトレーニングの効果がより顕著であり、骨形成の作用がより高いことが考えられる。

本研究において、血清無機リンの濃度が高リン食によって有意に増加したが、ラットにジャンプトレーニングをさせると有意に減少した。また、ジャンプトレーニングによって血中カルシウムの濃度も有意に減少した。無機リンとカルシウム濃度の低下の一つの原因は、2週間の適応初期における骨形成作用によってリン酸カルシウムが多量に沈着したことであると考えられる。この結果は研究1の結果と異なっており、ジャンプトレーニングに対する適応期間による差異であると考えられる。

副甲状腺ホルモンにおいては有意差が見られなかったが、通常食に比較すると高リン食によって濃度が高くなる傾向が見られた。これにより通常食より高リン食において血中ビタミンDの濃度が高くなったと考えられる。しかし、2週間のジャンプトレ

ーニングは血清副甲状腺ホルモン及び活性型ビタミンDの濃度に影響を及ぼさなかった。

FGF23については、本研究の結果からみると1週間後の時点では高リン食によって有意に高くなったが、通常食群においては有意な変化が見られなかった。これは、高リン食によって血中無機リンの濃度が上昇することに起因すると考えられている<sup>45, 55)</sup>。しかし、この時点ではジャンプトレーニングがFGF23の濃度に有意な影響を与えなかった。一方、2週間後の時点では、1週間後の時点に比べてFGF23の濃度が高リン食によって更に有意に増加した。また、通常食群と高リン食群の両方ともにおいて、各安静群に比べてジャンプトレーニング群ではFGF23の濃度が有意に抑制された。従って、2週間後の時点ではジャンプトレーニングによるメカニカルストレスが骨細胞に作用し、FGF23の分泌を抑制した可能性が指摘できる。しかし、血清無機リンの濃度がジャンプトレーニング群で有意に低値を示しており、血清無機リンはFGF23の主な調節因子であることが知られているので、この影響でFGF23の濃度が低値を示したと考えることが妥当である。すなわち、ジャンプトレーニングによるメカニカルストレスが直接的にFGF23の調節因子となったのではなく、血清無機リン低下によってFGF23の低値を示したと考えられる。

本研究の問題点としては、まず成長中のラットを用いて実験を行ったことにあるWelchら<sup>20)</sup>の研究によると成長中のラットの骨はハイインパクトトレーニングに積極的な応答を示していると報告している。したがって、成熟したラットを使用した場合、結果が違っていただかもしれない。また、本研究では骨形成マーカーのデータだけ注目して、骨吸収マーカーを測定しなかった。このため高リン食条件で骨塩量がより増加するとは言い切ることはできない。さらに、高リン食条件においてもわずか2週間のジャンプトレーニングが骨塩量を有意に増加させたが、脛骨の骨強度に影響を及ぼさなかった原因は不明である。また、いくつかの先行研究<sup>64)</sup>ではマイクロCT分析に

よって骨微細構造における異なる負荷及び異なる運動様式に対する骨の応答を明らかにしている。本実験で三次元マイクロ-CT 解析を使用したならば、骨強度がジャンプトレーニングによって増加しなかった理由を明らかにした可能性があると考えている。

本研究の結論として、高リン食においてもわずか2週間のジャンプトレーニングによって脛骨の骨塩量及び骨密度を増加させることが可能であることが分かった。また、高リン食によって血清無機リンの濃度が有意に上昇するが、ジャンプトレーニングをすると抑制される。これと平行してFGF23が低値を示すことが明らかとなった。

## 第4章

---

### 総括

- 第1節 本研究の目的に対する結論とまとめ
- 第2節 今後の展望
- 第3節 謝辞
- 第4節 参考文献

## 第1節 本研究の目的に対する結論とまとめ

本研究では、現代の食生活を模した低強度の高リン食条件において、ジャンプトレーニングが骨塩量・骨強度及び全身のリン・カルシウム代謝に及ぼす影響について骨の適応後期と適応初期に分けて検討した。以下に本研究の目的に対する結論を記す。

1) **高リン食条件におけるジャンプトレーニングが骨塩量と骨強度に及ぼす影響**  
ジャンプトレーニングは食餌条件にかかわらずラットの脛骨の骨塩量を増加させた。研究2の2週間のトレーニングにおいては骨強度の変化は有意でなかったものの、研究1の8週間のトレーニングではその差は有意であり、一定以上のトレーニング期間を設ければ骨強度の増加に有効であることが明らかとなった。また、いくつかの骨の変数においては交互作用が検出され、通常食よりも高リン食においてジャンプトレーニングの効果がより高い可能性が示された。これらの結果は、現代の食生活においてメカニカルストレスを与える運動は骨量や骨強度の増加に重要な因子であることを示した。

2) **高リン食条件におけるジャンプトレーニングがリンとカルシウム代謝に及ぼす影響**

高リン食によって血清の無機リン濃度が増加することが明らかとなった。また、血清の活性型ビタミンDとFGF23の増加が観察されたが、これらは血清の無機リン濃度の増加に起因すると考えられた。

8週間のジャンプトレーニングにおいては血清カルシウム濃度が有意に増加し、無機リンには有意な差がなかった。一方、2週間のジャンプトレーニングにおいては血

清カルシウム濃度および無機リンが有意に減少した。この結果は、8週間のトレーニング期間後よりも2週間のトレーニング期間後において骨の非日常的なメカニカルストレスに対する応答が大きく、骨へのリン酸カルシウムの沈着が活発に行われていた結果と考えられる。

FGF23については、2週間のジャンプトレーニングによって安静群に比べて有意に低値を示した。この結果は研究1と異なっており、メカニカルストレスがFGF23の分泌に影響を与えたことが示された。しかし、2週間のジャンプトレーニングでは血清無機リン濃度がジャンプトレーニング群で有意に低値を示しており、これによりFGF23濃度が低値を示したと考えられた。すなわち、メカニカルストレスが直接的に骨細胞のFGF23分泌の調節因子となったのではなく、血清無機リン酸のメカニカルストレスに対する適応初期の一時的な低下によってFGF23が低値を示したと考えられる。

以上の結果をまとめると、

- 1) 高リン食は血中無機リン濃度および活性型ビタミンD濃度を上昇させるなどリンやカルシウム代謝を変化させる。
- 2) メカニカルストレスを与えるジャンプトレーニングは食餌条件にかかわらず骨量・骨強度を増加させることに有効である。
- 3) FGF23は骨の適応初期にはトレーニングによって低値を示すが、メカニカルストレスがFGF23の調節因子であるか否かは不明である。

本研究では、リン摂取の機会が増加した現代の食生活においてもメカニカルストレスを与える運動は、骨量増加に重要な因子であることを示した。

## 第2節 今後の展望

骨粗鬆症 (osteoporosis) とは、骨密度の低下または骨の微細構造の劣化により骨強度が低下し、骨折しやすくなる疾患である。女性ホルモンの分泌低下による閉経後骨粗鬆症と加齢による老人性骨粗鬆症に大別されている。厚生労働省などによると、日本国内の患者は高齢女性を中心に年々増加しており、推計で 1100 万人を超えている。その 8 割は女性であり、男性には加齢による骨量の減少が要因の一つとなる。骨粗鬆症は生活習慣病とも言われ、予防するには発症前の適正体重の維持とやせの防止、適切な運動、カルシウムやビタミン D など栄養素の摂取は重要である。骨を丈夫に保つには、骨に適度な負荷をかける運動が不可欠である。運動の刺激によって骨細胞の働きが活発になり、骨量が増えて、骨折しにくくなるといわれている。また、運動で筋肉を鍛え、バランス感覚を養うにより転倒予防につながる。

人の生涯を通じての骨の健康維持と考えた場合、若いうちに骨量や骨密度を高めなければならないという報告がある。本研究の目的は骨粗鬆症の治療ではなく、将来の有効な予防手段の研究に一役を担えることである。そこで、本研究では骨量増加に適した運動様式であるジャンプトレーニングを用い、現代の食生活に似せた低強度の高リン食条件において、骨塩量・骨強度および全身性のリン・カルシウム代謝にどのような影響及ぼすについて検討した。その結果、ジャンプトレーニングが食餌条件にかかわらず、骨塩量を増加するには有効な運動様式であると分かった。そのために、現代食生活においても骨に速いメカニカルストレスを与えるハイインパクト運動が必要と考えられる。本研究で得た結果は今後のトレーニングプログラム作成に寄与できると考えている。

### 第3節 謝辞

本論文を作成するあたり，終始懇切なるご指導を頂いた中京大学教授 梅村 義久先生に深く感謝いたします。

貴重なご教示を賜りました中京大学教授 北川 薫先生，元中京大学教授 山本高司先生，中京大学教授 松本 孝朗先生，中京大学教授 荒牧 勇先生 に心より大変感謝いたします。また，私の研究活動において，研究の考え方や実験のやり方などを教えて下さった中京大学運動生理研究室員である 本田 亜紀子様心より感謝いたします。

最後に，私は日本に来て以来，生活上や研究上で，運動生理学研究室の皆様にお世話になりました。ここに深く感謝の意を表します。

## 参考文献

---

- 1) 天児 民和. 神中整形外科科学総論. 南山堂. 1989.
- 2) 植野 満. 骨粗鬆症-ヒトは骨から老化する-. 日本評論社. 1997.
- 3) Calvo MS, Park YK. Changing phosphorus content of the US diet: potential for adverse effects on bone. *J Nutr*, 126: 1168 - 1180, 1996.
- 4) Uribarri J, Calvo MS. Hidden sources of phosphorus in the typical American diet. Does it matter in nephrology? *Semin Dial*, 16: 186 - 188, 2003.
- 5) Gutierrez OM, Wolf M, Taylor EN. Fibroblast growth factor 23, cardiovascular disease risk factors, and phosphorus intake in the Health Professionals Follow-Up Study. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 2871 - 2878, 2011.
- 6) Calvo MS, Tucker KL. Is phosphorus intake that exceeds dietary requirements a risk factor in bone health? *Ann N Y Acad Sci*, 1301: 29 - 35, 2013.
- 7) Calvo MS, Uribarri J. Public health impact of dietary phosphorus excess on bone and cardiovascular health in the general population. *Am J Clin Nutr*, 98: 6 - 15, 2013.
- 8) Takeda E1, Yamamoto H, Yamanaka-Okumura H, Taketani Y. Dietary phosphorus in bone

- health and quality of life. *Nutr Rev*, 70: 311 - 321, 2012.
- 9) Oenning LL, Vogel J, Calvo MS. Accuracy of methods estimating calcium and phosphorus intake in daily diets. *J Am Diet Assoc*, 88: 1076 - 1080, 1988.
- 10) Takeda E1, Sakamoto K, Yokota K, Shinohara M, Taketani Y, Morita K, Yamamoto H, Miyamoto K, Shibayama M. Phosphorus supply per capita from food in Japan between 1960 and 1995. *J Nutr Sci Vitaminol*, 48: 102 - 108, 2002.
- 11) 健康・栄養情報研究会. 国民健康・栄養の現状(平成 18 - 25 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より). 第一出版株式会社, 2006 - 2013.
- 12) 厚生労働省平成 26 年「国民健康・栄養調査」の結果.  
<http://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/0000106405.html>, 2015.
- 13) Sullivan CM, Leon JB, Sehgal AR. Phosphorus-containing food additives and the accuracy of nutrient databases: implications for renal patients. *J Ren Nutr*, 17: 350 - 354, 2007.
- 14) Bai RJ, Cheng XG, Yan D, Qian ZH, Li XM, Qu H, Tian W. Rabbit model of primary hyperparathyroidism induced by high-phosphate diet. *Domest Anim Endocrinol*, 42: 20 - 30, 2012.
- 15) Chilibeck PD, Sale DG, Webber CE. Exercise and bone mineral density. *Sports Med*, 19:

103 - 122, 1995.

- 16) Lotinun S, Evans GL, Bronk JT, Bolander ME, Wronski TJ, Ritman EL, Turner RT.

Continuous parathyroid hormone induces cortical porosity in the rat: effects on bone turnover and mechanical properties. *J Bone Miner Res*, 19: 1165 - 1171, 2004.

- 17) Huttunen MM, Tillman I, Viljakainen HT, Tuukkanen J, Peng Z, Pekkinen M,

amberg-Allardt CJ. High dietary phosphate intake reduces bone strength in the growing rat skeleton. *J Bone Miner Res*, 22: 83 - 92, 2007.

- 18) Brot C, Jørgensen N, Madsen OR, Jensen LB, Sørensen OH. Relationships between bone

mineral density, serum vitamin D metabolites and calcium: phosphorus intake in healthy perimenopausal women. *J Intern Med*, 245: 509 - 516, 1999.

- 19) Frost HM. On our age-related bone loss: insights from a new paradigm. *J Bone Miner Res*,

12: 1539 - 1546, 1997.

- 20) Welch JM, Turner CH, Devareddy L, Arjmandi BH, Weaver CM. High impact exercise is

more beneficial than dietary calcium for building bone strength in the growing rat skeleton. *Bone*, 42: 660 - 668, 2008.

- 21) Wolff J. *The Law of Bone Remodeling*. Springer-Verlag, 1986.

- 22) Morey ER, Baylink DJ. Inhibition of bone formation during space flight. *Science*, 201: 1138 - 1141, 1978.
- 23) Yagodovsky VS, Trifanidi LA, Gorokhova GP. Space flight effects on skeletal bones of rats (light and electron microscopic examination). *Aviat Space Environ Med*, 47: 734 - 738, 1976.
- 24) Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec*, 219: 1 - 9, 1987.
- 25) Frost HM. Muscle, bone, and the Utah paradigm: a 1999 overview. *Med Sci Sports Exerc*, 32: 911 - 917, 2000.
- 26) Chakkalakal DA. Dielectric properties of fluid-saturated bone. *J Biomech*, 23: 425 - 34, 1990.
- 27) Turner CH. Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*, 23: 399 - 407, 1998.
- 28) Bennell KL, Khan KM, Warmington S, Forwood MR, Coleman BD, Bennett MB, Wark JD. Age does not influence the bone response to treadmill exercise in female rats. *Med Sci Sports Exerc*, 34: 1958 -1965, 2002.
- 29) Notomi T, Lee SJ, Okimoto N, Okazaki Y, Takamoto T, Nakamura T, Suzuki M. Effects of

- resistance exercise training on mass, strength, and turnover of bone in growing rats. *Eur J Appl Physiol*, 82: 268 - 274, 2000.
- 30) Notomi T, Okimoto N, Okazaki Y, Tanaka Y, Nakamura T, Suzuki M. Effects of tower climbing exercise on bone mass, strength, and turnover in growing rats. *J Bone Miner Res*, 16: 166 - 174, 2001.
- 31) Swissa-Sivan A, Simkin A, Leichter I, Nyska A, Nyska M, Statter M, Bivas A, Menczel J, Samueloff S. Effect of swimming on bone growth and development in young rats. *Bone Miner*, 7: 91 - 105, 1989.
- 32) Umemura Y, Ishiko T, Yamauchi T, Kurono M, Mashiko S. Five jumps per day increase bone mass and breaking force in rats. *J Bone Miner Res*, 12: 1480 - 1485, 1997.
- 33) Umemura Y, Sogo N, Honda A. Effects of intervals between jumps or bouts on osteogenic response to loading. *J Appl Physiol*, 93: 1345 - 1348, 2002.
- 34) Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Shimizu T, Umemura Y. High-impact exercise strengthens bone in osteopenic ovariectomized rats with the same outcome as Sham rats. *J Appl Physiol*, 95: 1032 - 1037, 2003.
- 35) Cassell C, Benedict M, Specker B. Bone mineral density in elite 7- to 9-yr-old female

- gymnasts and swimmers. *Med Sci Sports Exerc*, 28: 1243 - 1246, 1996.
- 36) Ju Yi, Sone T, Ohnaru K, Choi HJ, Fukunaga M. Differential effects of jump versus running exercise on trabecular architecture during remobilization after suspension-induced osteopenia in growing rats. *J Appl Physiol*, 112: 766 - 772, 2012.
- 37) Bégot L, Collombet JM, Renault S, Butigieg X, Andre C, Zerath E, Holy X. Effects of high-phosphorus and/or low-calcium diets on bone tissue in trained male rats. *Med Sci Sports Exerc*, 43: 54 - 63, 2011.
- 38) Iwamoto J, Shimamura C, Takeda T, Abe H, Ichimura S, Sato Y, Toyama Y. Effects of treadmill exercise on bone mass, bone metabolism, and calciotropic hormones in young growing rats. *J Bone Miner Metab*, 22: 26 - 31, 2004.
- 39) 梅村 義久, 水野 貴正, 松本 実, 十川 直太. ジャンプトレーニングが活性型ビタミンDの血清濃度に及ぼす影響. 中京大学体育研究紀要, 2012.
- 40) Ferrari SL, Bonjour JP, Rizzoli R. Fibroblast growth factor-23 relationship to dietary phosphate and renal phosphate handling in healthy young men. *J Clin Endocrinol Metab*, 90: 1519 - 1524, 2005.
- 41) Ellam TJ, Chico TJ. Phosphate: the new cholesterol? The role of the phosphate axis in

- non-uremic vascular disease. *Atherosclerosis*, 220: 310 - 318, 2012.
- 42) Isakova T, et al. Fibroblast growth factor 23 is elevated before parathyroid hormone and phosphate in chronic kidney disease. *Kidney Int*, 79: 1370 - 1378, 2011.
- 43) 梅村 義久. 骨重量・骨強度を高めるジャンプトレーニング. *バイオメカニクス研究*. 3: 160 - 162, 1999.
- 44) Warden SJ, Fuchs RK, Castillo AB, Nelson IR, Turner CH. Exercise when young provides lifelong benefits to bone structure and strength. *J Bone Miner Res*, 22: 251 - 159, 2007.
- 45) Umemura Y, Nagasawa S, Sogo N, Honda A. Effects of jump training on bone are preserved after detraining regardless of estrogen secretion state in rats. *J Appl Physiol*, 104: 1116 - 1120, 2008.
- 46) Fuchs RK, Bauer JJ, Snow CM. Jumping improves hip and lumbar spine bone mass in prepubescent children: a randomized controlled trial. *J Bone Miner Res*, 16: 148 - 156, 2001.
- 47) Fuchs RK, Snow CM. Gains in hip bone mass from high-impact training are maintained: a randomized controlled trial in children. *J Pediatr*, 141: 357 - 362, 2002.
- 48) Johannsen N, Binkley T, Englert V, Neiderauer G, Specker B. Bone response to jumping is

- site-specific in children: a randomized trial. *Bone*, 33: 533 - 539, 2003.
- 49) Kato T, Terashima T, Yamashita T, Hatanaka Y, Honda A, Umemura Y. Effect of low-repetition jump training on bone mineral density in young women. *J Appl Physiol*, 100: 839 - 843, 2005.
- 50) McKay HA, MacLean L, Petit M, MacKelvie-O'Brien K, Janssen P, Beck T, Khan KM. "Bounce at the Bell": a novel program of short bouts of exercise improves proximal femur bone mass in early pubertal children. *Br J Sports Med*, 39: 521 - 526, 2005.
- 51) Calvo MS. Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J Nutr*, 123: 1627 - 1633, 1993.
- 52) 健康・栄養情報研究会. 国民健康・栄養の現状(平成 25 年厚生労働省国民健康・栄養調査報告より). 第一出版株式会社, 2013.
- 53) Masuyama R, Nakaya Y, Katsumata S, Kajita Y, Uehara M, Tanaka S, Sakai A, Kato S, Nakamura T, Suzuki K. Dietary calcium and phosphorus ratio regulates bone mineralization and turnover in vitamin D receptor knockout mice by affecting intestinal calcium and phosphorus absorption. *J Bone Miner Res*, 18: 1217 - 1226, 2003.
- 54) Honda A, Sogo N, Nagasawa S, Kato T, Umemura Y. Bones benefits gained by

- jump-training are preserved after detraining in young and adult rats. *J Appl Physiol*, 105: 849 - 853, 2008.
- 55) Antoniucci DM, Yamashita T, Portale AA. Dietary phosphorus regulates serum fibroblast growth factor-23 concentrations in healthy men. *J Clin Endocrinol Metab*, 91: 3144 - 3149, 2006.
- 56) Burnett SM, Gunawardene SC, Bringhurst FR, Jüppner H, Lee H, Finkelstein JS. Regulation of C-terminal and intact FGF-23 by dietary phosphate in men and women. *J Bone Miner Res*, 21: 1187 - 1196, 2006.
- 57) Vervloet MG, van Ittersum FJ, Büttler RM, Heijboer AC, Blankenstein MA, ter Wee PM. Effects of dietary phosphate and calcium intake on fibroblast growth factor-23. *Clin J Am Soc Nephrol*, 6: 383 - 389, 2011.
- 58) Sigrist M, Tang M, Beaulieu M, Espino-Hernandez G, Er L, Djurdjev O, Levin A. Responsiveness of FGF-23 and mineral metabolism to altered dietary phosphate intake in chronic kidney disease (CKD): results of a randomized trial. *Nephrol Dial Transplant*, 28: 161 - 169, 2013.
- 59) Bergwitz C, Jüppner H. Regulation of phosphate homeostasis by PTH, vitamin D, and

FGF23. *Annu Rev Med*, 61: 91 - 104, 2010.

- 60) Sogo N, Honda A, Nagasawa S, Umemura Y. A few separated jump training sessions three times per week increase bone strength in rats. *Adv. Exerc. Sports Physiol*, 3: 91 - 95, 2011.
- 61) Multanen J, Nieminen MT, Häkkinen A, Kujala UM, Jämsä T, Kautiainen H, Lammentausta E, Ahola R, Selänne H, Ojala R, Kiviranta I, Heinonen A. Effects of high-impact training on bone and articular cartilage: 12 - month randomized controlled quantitative MRI study. *J Bone Miner Res*, 29: 192 - 201, 2014.
- 62) D'Amelio P, Panico A, Spertino E, Isaia GC. Energy metabolism and the skeleton: Reciprocal interplay. *World J Orthop*, 3: 190 - 198, 2012.
- 63) Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, McKee MD, Jung DY, Zhang Z, Kim JK, Mauvais-Jarvis F, Ducy P, Karsenty G. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130: 456 - 469, 2007.
- 64) Sehmisch S, Galal R, Kolios L, Tezval M, Dullin C, Zimmer S, Stuermer KM, Stuermer EK. Effects of low-magnitude, high-frequency mechanical stimulation in the rat osteopenia model. *Osteoporos Int*, 20: 1999 - 2008, 2009.