

早稲田大学審査学位論文

博士（スポーツ科学）

女性アスリートの骨粗鬆症予防のための
栄養生理学的研究

**Nutritional and physiological study of
osteoporosis in female athlete.**

2014年1月

早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科

谷中 かおる

YANAKA, Kaoru

研究指導教員： 樋口 満 教授

目次

第1章	緒論	
1	研究の背景及び目的	1
2	女性アスリート三主徴について	3
	a. エネルギー利用能	
	b. 月経機能障害	
	c. アスリート女性の骨密度	
3	アスリート女性における骨密度低下の作用機構	5
	a. ヒトを用いた研究	
4	大豆イソフラボンとその生理作用	6
5	本論文の目的	6
6	本論文の構成	7
第2章	自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度低下モデル動物の確立	12
	2-1 諸言	
	2-2 方法	
	2-3 結果	
	2-4 考察	
第3章	大豆イソフラボン摂取が自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度低下に及ぼす効果	27
	3-1 諸言	
	3-2 方法	
	3-3 結果	
	3-4 考察	
第4章	総括	42
第5章	結論	43
	引用文献	44
	謝辞	53

第1章：緒論

研究背景及び目的

女性のスポーツ参加人口は、ここ30年間で急激に増加している。National Federation of State High School Associationsによると、スポンサーがついた750万人の学生アスリートのうち、女性の占める割合は1972年には7%だったが、女性アスリートでは、2008-2009年には41%に上っている (Associations, 2010)。しかし、高い競技水準を保つために高強度で高頻度なトレーニングが要求されるため、摂食障害、運動性無月経、骨粗鬆症を引き起こす可能性がある。

1992年、米国スポーツ医学会 (ACSM: American College of Sports Medicine) により、摂食障害、運動性無月経、骨粗鬆症のそれぞれの疾患とその三つの疾患における相互関係について、“女性アスリートの三主徴 (FAT: The Female Athlete Triad)” という言葉が造られ、広く認識されるようになった (Nattiv A et al., 1994; Yeager K et al., 1993)。1997年に、三つの疾患の相互関係を示す模式図がスペクトラムとして描かれ (Figure 1) (Nattiv A et al., 1997)、2007年には科学的知見を基に最新の情報に更新された (Nattiv A et al., 2007)。

女性アスリートの三主徴は、摂食障害の有無に関わらずエネルギー摂取が除脂肪体重当たり 30kcal/kg を下回ると、発症率が高まることが知られている。Figure 1、左下の濃い矢印で描かれている三角は食事による摂取エネルギーが消費エネルギーを下回った状態、あるいは摂食障害を伴った、非健康的な状態を示しており、月経障害や骨粗鬆症に至る事が描かれている。一方、図中右上の濃い矢印で描かれている三角は、適正なエネルギー利用と正常月経と骨が健康である状態が描かれている。ACSM の目標は、高い競技水準のアスリートだけでなく、身体活動を多く行うすべての女性がスペクトラムの右上の状態、つまり健康的な状態にあることとしている。

アスリート女性の三主徴の作用機構は、運動トレーニングによるエネルギー利用の持続がエストロゲン分泌を低下させ、長期に渡ると骨粗鬆症を誘発する。また、これらの疾患は、高い競技水準のアスリートだけではなく、健康の維持・増進のためにスポーツを遂行している女性にとっても、発症する危険性があるため身体活動を多く行う人すべてにおいて予防を心がけなくてはならない。

Nichols et al. (2006) は、米国の女性アスリートの 21.8%、エリート水泳女性競技者の 17.9% が、低骨密度であったと報告している。さらに、正常月経競技者は無月経競技者と比較して骨密度が低い事が多数報告されていることから (Drinkwater BL et al., 1984; Marcus R et al., 1985; Myburgh KH et al., 1993; Otis CL et al., 1997)、低エストロゲンレベルが骨代謝に影響していることが示唆される。エストロゲン分泌の低下の他、エネルギー摂取不足は直接骨にも影響を及ぼすため、アスリート女性の骨粗鬆症の要因は主にエネルギー摂取不足とエストロゲン分泌の低下である。アスリートは一度骨折すると、競技生

活の中断を余儀なくされ、競技復帰に至るまで長い時間を要する為、その予防が重要である。

一方、骨代謝に有用な成分として植物性エストロゲンである大豆イソフラボンが注目されている。大豆イソフラボンは、化学構造がエストロゲンと類似しており、エストロゲンレセプターとの親和性を有し、生体内において弱いエストロゲン様作用を示す(Santell, R. C et al., 1997)。また、過剰摂取の場合を除き、発がん性の危険性が少ないことから、特に閉経期女性のホルモン代替医療の成分としても期待されている。現在は、骨の健康が気になる方のため特定保健用食品の関与成分として国の許可を受けている。これまで、疫学研究において大豆イソフラボンは、閉経期女性の骨密度低下に対し拮抗的に働くことが示されてきた(Ho SC et al., 2001)。また、動物を用いた実験においても卵巣摘出モデル動物の骨密度低下に対し、抑制効果があることが多数報告されている。さらに、閉経期女性において、大豆イソフラボン摂取と運動の実施が骨密度抑制効果をより増強することが示されており(Wu J et al., 2006)、大豆イソフラボンは低エストロゲン時の骨代謝に良い効果をもたらすことが多数示されてきた。

しかし、アスリート女性における骨密度の低下に対し、どのような影響をもたらすのかを検討した報告はない。そこで本研究は、アスリート女性の骨粗鬆症予防を課題とし、アスリート女性の骨粗鬆症モデル動物の確立を目的とすること、また骨粗鬆症モデル動物に対し、大豆イソフラボン摂取がどのような効果をもたらすのかを検討することを目的として行った。検討課題 1 では、アスリート女性の骨粗鬆症モデル動物確立するため、エネルギー制限及び自発運動負荷が成熟期雌ラットの骨に与える影響を検討した。また、検討課題 2 では、検討課題 1 で得られたモデル動物の骨密度低下に対し、大豆イソフラボン摂取がどのように影響するのかを検討した。

2. 女性アスリート三主徴について

a. エネルギー利用能

米国スポーツ医学会 (ACSM) によって示された、女性アスリート三主徴の定義を描いたスペクトラムでは、摂食障害の有無に関わらずエネルギー利用の不足が月経機能障害や骨粗鬆症を誘発する因子であることが示されている (Figure 1)。

エネルギー利用能の低下は体重制限を必要とされる競技種目を行うアスリート、あるいは摂食障害を伴った競技者に多くみられる。体操選手や長距離ランナーあるいはバレエダンサーなどにおいて発症率が高い。運動を行わない摂食障害の罹患率が 5.5-9% であるのに対し、女性アスリートにおける摂食障害の罹患率は 25-31% に上ると報告されており、(Byrne SM and Lean N., 2002; Sundgot-Borgen J et al., 2004) 女性アスリートは、運動を行わない人と比べエネルギー不足になりやすく、月経機能障害や骨粗鬆症に罹りやすい。1980 年にはダンサーにおけるエネルギーバランスと月経機能障害との関連性について初めて報告がなされ (Warren MP et al., 1980)、正常な月経機能を保つためにはエネルギーが重要であることが示された。その後、この関連性について多くの研究が行われた (Yeager KK et al., 1993; Nattiv A et al., 2007; Otis CL et al., 1997; Marcus R et al., 1985; Loucks AB and Thuma JR., 2003)。エネルギー利用能の低下は脳の視床下部に作用し GnRH (Gonadotropin releasing hormone) の分泌を抑制する。次いで下垂体後葉からの LH (Luteinizing Hormone) の分泌が低下するため末梢の卵巣に作用しエストロゲン分泌を抑制させる。このような作用機構によってアスリート女性の初経の遅延や月経機能不全が起こる。エネルギーの不足が 5 日間続くと LH の分泌が乱れること、低エネルギーの状態が 1 カ月以上続くと月経周期に影響を及ぼすと考えられている。さらに、エネルギー利用能の低下が 1 年間以上続くと骨密度に影響を及ぼす。

b. 月経機能障害

女性アスリートにおける月経機能障害はしばしばみられ、原発性無月経、続発性無月経がある。無月経とは通常の月経が起らないことであり (Stedman's., 2006)、原発性無月経とは 18 歳になっても初経が起きないことである。また続発性無月経とは 3 ヶ月間月経がないことであり、希発性月経とは月経周期が 40 日間以上とされている。

原発性無月経の発症の割合は、一般の女性で約 1% であるのに対し (Chumlea, WC et al., 2002)、体操選手、チアリーダー、ダイバーでは 22% を占めると報告されている (Beals, KA et al., 2003)。これらの種目を遂行する競技者では、発育期からの厳しい体重制限や過度のトレーニングにより月経機能障害が引き起こされる。また、続発性無月経あるいは揮発性無月経が占める割合は、一般の女性においては 2-5% であるのに対し (Pettersson F et

al., 1973)、体重制限を要求されるバレエダンサーやランナーでは 69%、65%、65-70% (Abraham SF et al., 1982; Dusek T. 2001; Nattiv et al., 2007)に上ると報告されている。女性アスリートの三主徴のスペクトラムにおいて、月経機能障害は続発性無月経から無月経までが示されており (Figure 1)、診断基準として、月経周期が続けて 3~6 回ないこととされている (Otis CL et al, 1997)。Table 1 には、異なる競技種目における原発性無月経及び続発性無月経の発症率を示した。月経機能障害の発症頻度は、競技により異なり、バレエで 6-79%、長距離走で 24-26%、水泳や自転車競技においては約 12%の割合で起こることが示されている。Table 1 のように、審美的観点から競技パフォーマンス向上のために体重制限を要求される競技種目である、バレエダンサーや長距離走を行う競技者での発症率が高いことから、エネルギー不足の状態や負のエネルギーバランスが要因となっていることがわかる (Marcus R et al., 1985; Loucks AB et al., 1989; Myerson M et al., 1991)。正常な月経周期を保つためには、体脂肪率が 22%以上必要であることが報告されており (Frisch RE et al., 1974)。これらの競技を遂行する競技者にとって正常月経を保つこと、また機能障害に罹った予後の治療が重要な課題である。

C. 女性アスリートの骨密度

一般的に適度な運動は骨代謝に良い影響を与える。運動がもたらす力学的負荷は骨塩の沈着を増加させコラーゲンの産生を促進する。これまで、宇宙飛行士や長期臥床は著しい骨密度の減少を誘導し骨粗鬆症を発症させることから、力学的負荷が骨代謝に重要であることが示されてきた。力学的負荷のかかる運動を遂行するアスリートは、運動習慣のない者と比較して骨密度が 5-30%高いが (Robinson TL et al., 1995; Risser WL et al., 1990; Fehling PC et al., 1995; Ducher et al, 2006; Lorentzon et al, 2005)、運動にエネルギー摂取不足や負のエネルギーバランスが加わると生殖内分泌系を乱し、やがて骨密度が低下する。ACSM は、女性アスリートの三主徴の相互関係のスペクトラムの中で骨について、適正な骨の健康 (optimal bone health) から骨粗鬆症 (osteoporosis) の範囲を示しており、骨粗鬆症は三主徴のなかで最もエネルギー摂取不足の状態が長く継続された時に起こる疾患である。1994 年 Nichols et al. は、アスリート女性の三主徴の骨の疾患に関する診断基準を、WHO の定義を用い、YAM (Young adult mean) の標準偏差が 1SD 以上で '骨量減少' とし、2.5SD 以上で '骨粗鬆症' としている。

アスリートにおける骨粗鬆症を発症する割合は競技種目によって異なり、月経機能障害や摂食障害を伴った長距離ランナーは、体操選手やサッカー、バレーボール、テニス競技者と比較して骨密度が低い (Misra M., 2008)。また、170 人の高校生を対象とした調査研究の結果、低骨密度に該当する女子高校生は 21.8%であったことが報告されている (Nichols et al., 2006)。さらに、一方では低骨密度と低エストロゲンレベルが相関しなかったとい

う報告もされているものの、月経機能不全の女性アスリートにおいては、低エストロゲンレベルと低骨密度の関連性が報告されている (Snow-Harter CM et al., 1994; Zanker CL et al., 1999)。

3. 女性アスリートにおける骨密度低下の作用機構

a. ヒトにおける研究報告

骨は体の支持組織として重要であるだけでなく生命現象の維持にも不可欠な組織であり、活発な代謝活動を行っている。骨組織中には血管や神経が分布しており、これらの働きによって骨の細胞は維持され、カルシウムやリンなどのミネラルの動態が調節されている。ヒトの骨量の一生を追うと、最大骨量 (PBM: Peak bone mass) の90%が18歳頃までに達成され (Recker et al., 1992; Henry et al., 2004; Whiting et al., 2004)、その後30歳頃まで5-12%の骨量が増加し、最大骨量を獲得する。女性は高齢期に入ると骨量が毎年約1%ずつ失われ、女性では閉経後その減少が約5%に増加する。我が国の骨粗鬆症の定義は、「原発性骨粗鬆症の診断基準(2000年度改訂版)」の中で、“骨強度の低下を特徴とし、骨折のリスクが増大しやすくなる骨格疾患”とされており (Conference report., 1991)、患者数は1000万人に上るが、女性の占める割合が圧倒的に多い (Yoshimura N., 2010)。米国においても1000万人を超える骨粗鬆症患者の80%以上は女性であることが報告されている (National Osteoporosis Foundation., 2008)。女性は高齢期のエストロゲン分泌の低下に伴い急速な骨量減少に対応する為、成長期に得られる最大骨量をいかに高めるかが重要である。とくに、女性アスリートは競技を遂行する時期が最大骨量を獲得する時期であり、トレーニングとエネルギーや栄養不足によって引き起こされる骨量減少を予防することが重要な課題である。

4. 大豆イソフラボンとその生理作用

大豆イソフラボンはフラボノイド化合物であり、その分布はマメ科、バラ科、アヤメ科など 300 種の植物に及びマメ科にもっとも多く含まれている (資料 1)。また、大豆を使用した大豆製品や加工食品にもイソフラボンが多く含まれている。イソフラボンの化学構造が女性ホルモンであるエストロゲンと類似していることから (Figure 2) 生体内で弱いエストロゲン様作用を発揮するため、植物性エストロゲン (phytoestrogen) と呼ばれており、主な生理作用として、抗酸化作用 (Whent M et al., 2011)、反エストロゲン様作用 (Ross C et al., 1996)、骨密度低下抑制作用 (Ishida H et al., 1998; Fantì P et al., 1998; Ishimi Y et al., 1999; Ishimi Y et al., 2000) などが知られている。しかし、イソフラボンの過剰摂取は乳癌細胞の増殖を促進する為 (de Lemos ML., 2001)、乳癌に罹患している者は注意が必要である。閉経期女性における骨密度低下抑制に有用であることから代替医療成分として、また、特定保健用食品の関与成分として期待されている。イソフラボンはエストロゲンレセプターの α 及び β に親和性を有し、種類により親和性が異なる。エストロゲンと比較すると ER との親和性は 100–500 倍低い、イソフラボンの中でもゲニステインやダイゼインは比較的親和性が高い。

また、ゲニステインは ER β との親和性が α よりも 20–30 倍高い (Kuiper GG et al., 1998; Morabito N et al., 2002)。ER の局在は、 α が子宮、乳腺、卵巣、睾丸、腎臓、脳視床下部、脳下垂体などに多く、 β が骨、血管、脳、肺、前立腺、膀胱などに多く局在している。ER β が骨に多く局在していることから、ゲニステインやダイゼインの摂取により骨密度低下抑制効果を示す報告が多数なされている (Ishimi Y et al., 2002; De Wilde A et al., 2004; Ishimi et al., 2001; Ishimi Y et al., 1999; Bao L et al., 2011)。さらに、イソフラボンの骨代謝への影響は *in vitro* でも多数検討されている。イソフラボンが骨代謝へ及ぼす作用機構として、2つの作用が考えられており 1つは破骨細胞のアポトーシスの抑制、2つ目は破骨細胞から分泌されるチロシンキナーゼ活性抑制効果である。細胞を用いた実験では、ゲニステインが骨芽細胞を刺激し石灰化を促進すること (Gao YH and Yamaguchi M., 1999; Yamaguchi M, Gao YH., 1998)、骨芽細胞ネガティブ調節因子である NF- κ B 活性を抑制すること (Yamaguchi M and Weitzmann MN., 2008) が報告されている。このように、大豆イソフラボンが骨密度低下抑制効果を示す事、さらに細胞を用いた検討からも骨へ及ぼす効果を有する事が数多くの研究より示されてきた。

5. 本論文の目的

以上に示した先行研究から、女性アスリートの骨粗鬆症予防と治療は重要な課題である。しかしながら、ヒトを対象としての検討は困難であり研究コストもかかる。一方、動物を

用いた検討は栄養素や非栄養素成分の効果を評価する上で重要な基礎データとなるが、女性アスリートの骨粗鬆症モデル動物は未だ確立されていない。さらに、モデル動物を用いた栄養素や非栄養素成分の効果を検討した報告は未だない。そこで本研究では検討課題 1 として、アスリート女性の骨粗鬆症モデル動物の確立を目的とし、自発運動及びエネルギー制限がラット骨密度に及ぼす影響を検討することとした。また検討課題 2 として、自発運動及びエネルギー制限誘発性骨密度低下に対し、大豆イソフラボン摂取が骨に与える影響を検討することを目的とした。

6. 本論文の構成

検討課題 1. 自発運動及びエネルギー制限が成熟期雌ラット骨密度に及ぼす影響を検討する (第 2 章)

検討課題 2. 大豆イソフラボン摂取が自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度低下に及ぼす効果を検討する (第 3 章)

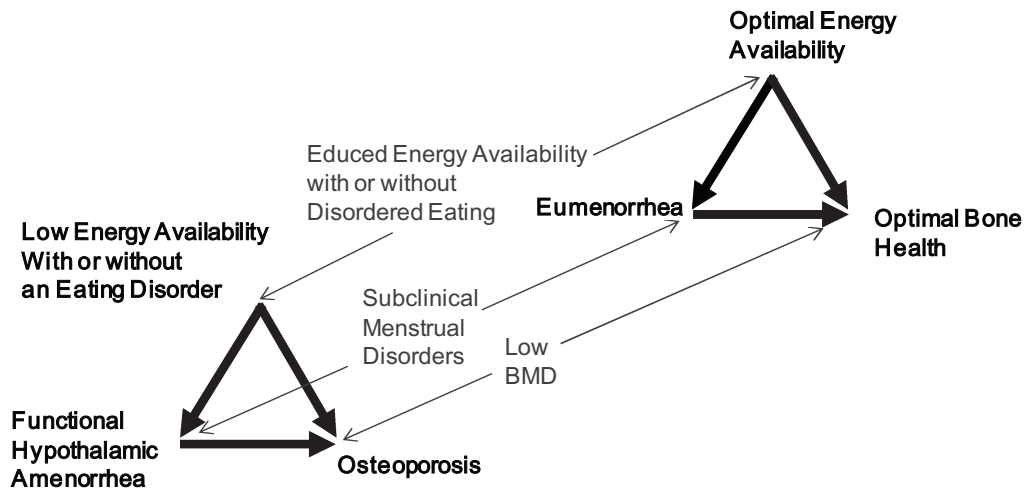


Figure 1. Female athlete triad. The spectrums of energy availability, menstrual function, and bone mineral density along which female athletes are distributed (narrow arrows). An athlete's condition moves along each spectrum at a different rate, in one direction or the other, according to her diet and exercise habits. Energy availability, defined as dietary energy intake minus exercise energy expenditure, affects bone mineral density both directly via metabolic hormones and indirectly via effects on menstrual function and thereby estrogen (thick arrows).

Table 1. Surveys of the prevalence of amenorrhoea and oligomenorrhoea in different athletic disciplines.

Activity	Study	n	Percentage with irregularities
General population	Peterson et al (1973)	1862	1.8
	Singh (1981)	900	5.0
Weight bearing sports:			
Ballet	Abraham et al (1982)	29	79.0
	Brooks-Gunn et al (1987)	53	59.0
	Feicht et al (1978)	128	6-43
	Glass et al (1987)	67	34.0
Running	Shangold and Levine (1982)	394	24.0
	Sanborn et al (1982)	237	26.0
Non-weight bearing sports			
Cycling	Sanborn et al (1982)	33	12.0
Swimming	Sanborn et al (1982)	197	12.0

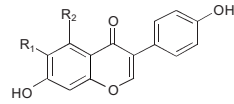
Reproduced with permission of Constantini NW & Warren MP.

資料1 イソフラボンの種類

分類	ダイゼイン型イソフラボン	グリシテイン型イソフラボン	ゲニステイン型イソフラボン
配糖体	ダイジン (D;Daidzin)	グリシチン (G l ;Glycitin)	ゲニステン (G ;Genistin)
マロニル配糖体	マロニルダイジン (MD;6 ^o -0- Malonyldaidzin)	マロニルグリシチン (MG l ;6 ^o -0- Malonylglycitin)	マロニルゲニステン (MG;6 ^o -0-Malonylgenistin)
アセチル配糖体	アセチルダイジン (A D;6 ^o -0- Acetyldaidzin)	アセチルグリシチン (A G l ;6 ^o -0-Acetylglycitin)	アセチルゲニステン (A G;6 ^o -0-Acetylgenistin)
サクシニル配糖体	サクシニルダイジン (S D;6 ^o -0- succinyldaidzin)	サクシニルグリシチン (S G l ;6 ^o -0- succinylglycitin)	サクシニルゲニステン (S G;6 ^o -0-succinylgenistin)
アグリコン	ダイゼイン (D e ;Daidzein)	グリシテイン (G l e ;Glycitein)	ゲニステイン (G e ;Genistein)

A

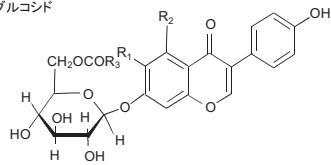
アグリコン



化合物	R ₁	R ₂
ダイゼイン	H	H
グリシチン	OCH ₃	H
ゲニステイン	H	OH

B

グルコシド



化合物	R ₁	R ₂	R ₃
ダイジン	H	H	H
グリシチン	OCH ₃	H	H
ゲニステン	H	OH	H
マロニルグルコシド			CH ₂ COOH
アセチルグルコシド			CH ₃
サクシニルグルコシド			CH ₂ CH ₂ COOH

Figure 2. 大豆イソフラボンのアグリコン及び配糖体の化学構造

第2章 自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度低下モデル動物の確立

2-1. 緒言

エネルギー制限が骨密度を低下させることがヒト及び動物の実験で多数報告されている (Talbot SM et al., 2001; Cifuentes M et al., 2002; Cifuentes M et al., 2005; Hawkins J et al., 2010; Turner RT et al., 2010)。ラットを用い、エネルギー制限が骨へ及ぼす影響を検討した報告では 10-60%の範囲での制限が検討されており、骨密度低下を誘導するのは 40-70%の報告が多く、その試験期間は9週間から12週間で検討されている (Banu MJ et al., 1999; Talbot SM et al., 2001; Cifuentes M et al., 2002; Cifuentes M et al., 2005; Talbot SM et al., 2001)。

一方、高強度で長期の運動が生殖内分泌系の機能不全を引き起こすことが、動物を用いた実験から明らかにされている (Chatterton RT Jr et al., 1989; Caston AL et al., 1995)。Williams et al. は、サルを用い高強度のトレッドミル走運動負荷がエネルギー利用能の低下を引き起こし、生殖内分泌系ホルモンの分泌応答及び性周期を乱すことを報告している (Williams NI et al., 2001)。また、彼らはサルを用いて同様の実験を行い運動によって乱れた性周期がエネルギーを供給すると回復することを報告しており (Williams NI et al., 2001)、生殖内分泌系のホルモン応答にエネルギーが重要であることが示唆されている。

上記のように、エネルギー制限が骨代謝に及ぼす影響を検討した報告、あるいは高強度の運動が生殖内分泌系への影響を検討した報告はなされているが、運動とエネルギー制限負荷により骨代謝及び生殖内分泌系ホルモンへの応答を同時に評価した研究報告は少ない。

Swift SN et al. はトレッドミル走運動に 40%エネルギー制限を負荷し骨密度への影響を検討したところ、12週間のエネルギー制限で骨量が(41%)減少した。また、Dimarco NM et al. (2007) らは、女性アスリート三主徴 (FAT) モデル動物の確立を目的として、自発運動及びエネルギーを負荷し検討を行っている。彼らは 34 日齢の雌ラットを用い、自発運動及び摂食制限を負荷が骨塩量 (BMC)、骨密度 (BMD)、性周期、血中エストロゲン濃度及びレプチン濃度に及ぼす影響を検討した。この報告では 14 週間のベースライン期間後、12 週間の介入期間後、摂食制限を負荷した群において、血中エストロゲン濃度、レプチン濃度、骨塩量が有意に低値を示したことを報告した。しかし、骨密度においては、摂食制限群とコントロール群の間に差は認められなかった。

そこで本研究は、女性アスリートの三主徴の骨粗鬆症モデル動物の確立を目的として、自発運動及びエネルギー制限負荷が骨密度及び性ホルモン分泌に及ぼす影響を検討した。

2-2 実験方法

使用動物及び飼料組成

8週齢雌性SDラット(日本エスエルシー株式会社、Shizuoka, Japan)を、自発的走運動群または非運動群に群分けし、自由摂取で10週間の飼育を行った。18週齢時点で自発的走運動群をエネルギー非制限群及(RC)びエネルギー制限群(RR)に群分けした。n数はそれぞれ、RC群:n=4、RR群:n=4、SED群:n=6とした。エネルギー制限群には、個々の動物が摂取していた2週間の摂食量の平均に対し、30%エネルギー制限の負荷を行った。また、非運動群(SED)については実験開始から食餌は自由摂取とした。

飼育環境

各ラットは個別のケージで飼育し、室温 23±1°C、湿度 60±5%、明期・暗期ともに12時間のサイクルに調節された部屋で飼育した。食餌摂取量及び飲水は、ベースライン期間は自由摂取とし、エネルギー制限群はエネルギー制限開始前2週間の食餌摂取量の平均に対し、30%の食餌制限を負荷した。

Table. 2 飼料組成

	Diet	
	AIN-93G	AIN-93M
	<i>g/kg diet</i>	
Corn starch	529.4	620.7
Casein milk	200.0	140.0
Sucrose	100.0	100.0
Corn oil	70.0	40.0
Cellulose	50.0	50.0
Mineral mixture ¹	35.0	35.0
Vitamin mixture (AIN-93-VX)	10.0	10.0
L-Cystine	3.0	1.8
Choline bitrate	2.5	2.5
Tert-butylhydroquione	0.014	0.008
Total (g)	1000	1000

¹Mineral mixture は、AIN-93G には AIN-93G-MX を、AIN93-M には AIN-93MX を用いた。

体重、摂食量及び走行距離の測定

ラットの体重と摂食量の測定は、ベースライン期間は週に2~3回、介入期間は週に3~4回測定した。走行距離は週に5回測定した。走行距離は(株)シナノ製作所製(Tokyo, Japan)の回転式運動量測定器(回転ケージ内寸: W 98 mm 直径 370 mm, 固定ケージ: 130 mm×390 mm×H 140 mm)を用いて測定した(資料2)。

資料2 ラット用回転式運動量測定器



大腿骨骨密度及び骨塩量の解析

右脚大腿骨の骨密度は、DCS-600EX-R (アロカ株式会社, Tokyo, Japan) を用いて DXA 法により測定した。骨密度は、骨塩量を面積で除することにより算出した。解析は、近位部、骨幹部、遠位部に3等分して行った。

骨形態計測

左大腿骨遠位部を70%エタノールで固定し、5 μ m の非脱灰切片を作成後、酒石酸耐性酸性フッ素染色を行った。標本の二次海面骨部分を、光学顕微鏡に連動した画像分析システムにより計測し、単位骨量 (BV/TV, bone volume/tissue volume)、骨梁数 (Tb. N, trabecular number)、骨梁幅 (Tb. Th, trabecular thickness)、骨梁間隙 (Tb. Sp, trabecular separation)、破骨細胞数 (Osteoclast Number/Tissue volume)、骨芽細胞数 (Osteoblast number/Tissue volume)、類骨面 (Osteoid Volume/Osteoid Surface)、類骨幅 (Osteoid Thickness) をそれぞれ算出した。

血中 17 β -エストラジオール濃度の測定

血中 17 β -エストラジオール濃度を ELISA 法によるキットを用いて測定した (17 β -Estradiol ELISA Kit, TOKIWA CHEMICAL INDUSTRIES CO., LTD.)。抗原酵素複合体溶液 100 μ L に固相抽出による濃縮を行った血漿を混合した。抗 E2 モノクローナル抗体固相化プレートに、100 μ L の標準溶液および血漿溶液を分注し室温で 60 分間インキュベートした。マイクロプレートを洗浄後、基質溶液を加え室温で 30 分間インキュベートした後、反

応低試液を加えてマイクロプレートリーダーを用い、450nm で比色定量を行った (MTP-650FA, コロナ電気株式会社, Ibaraki, Japan)

血中黄体形成ホルモン濃度の測定

血中黄体形成ホルモン濃度を ELISA 法によるキットを用いて測定した (Rodent LUTEINIZING HORMONE (LH) ELISA TEST, ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC.)。抗マウスポリクローナル抗体でコーティングされたマイクロプレートに 50 μ L の標準液及び血漿、酵素溶液を加え 37°C で 120 分間インキュベートした。マイクロプレートを洗浄後、基質溶液を加え遮光下室温で 20 分間インキュベートした後、反応停止液を加えてマイクロプレートリーダーを用い、450nm で比色定量を行った (MTP-650FA, コロナ電気株式会社, Ibaraki, Japan)。

血中オステオカルシン濃度の測定

血中オステオカルシン濃度は、ELISA 法によるキットを用いて測定した (Rat Osteocalcin ELISA kit DS)。希釈用プレートを用い 135 μ L の希釈溶液に 15 μ L の標準液及び血漿を加え混合した。抗ラットオステオカルシンモノクローナル抗体でコーティングされたマイクロプレートに希釈溶液 100 μ L を分注し、標準液及び血漿の調整済み混合溶液 25 μ L を加え、攪拌後、アルミホイル等でプレートを覆い、室温で 60 分間静置した。マイクロプレートを洗浄後、標識抗体を 100 μ L 加え、室温で 60 分間静置した。再度洗浄した後、基質用液 100 μ L を加え、室温、暗所で正確に 30 分間インキュベートした。反応停止液 100 μ L を加えてマイクロプレートリーダーを用い、450 nm で比色定量を行った (MTP-650FA, コロナ電気株式会社, Ibaraki, Japan)。

統計学的解析

体重、摂食量、走行距離のデータは、反復測定による分散分析を行い、Post hoc test として Fisher の最小有意差法による多重比較を行った。骨形態計測の有意差検定は、一元配置分散分析の後、Post hoc test として、Scheffe' s post hoc test (StatView 4.0, Abacus Concepts) による多重比較を行った。骨密度のデータは、体重を共変量因子として用い共変量分散分析を行った。全ての検定において危険率が 5%未満をもって有意とした。各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。

2-3 結果

Figure 3 には、試験期間中の体重(A)及び摂食量(B)の経時変化を示した。ベースライン期間の10週、11週、14週齢時におけるRC群の体重はSED群と比較して有意に高値を示した。10週、11週齢時のSED群はRR群と比較して有意に高値を示した。介入期間の17週、19週齢時の、RC群はSED群と比較して有意に高値を示した。また、介入期間時の20-32週齢時において、RR群はRC群及びSED群と比較して有意に低値を示した。摂食量は、ベースライン時の10週、13週、14週、16週齢時においてRC群はSED群と比較して有意に高値を示し、介入期間の17-29週齢においてもRC群はSED群と比較して有意に高値を示した。一方、ベースライン期間中、11週、14週、16週のRR群はSED群と比較して有意に高値を示した。また、介入期間の19-29週齢時及び32週齢時のRR群はRC群と比較して有意に低値を示した。

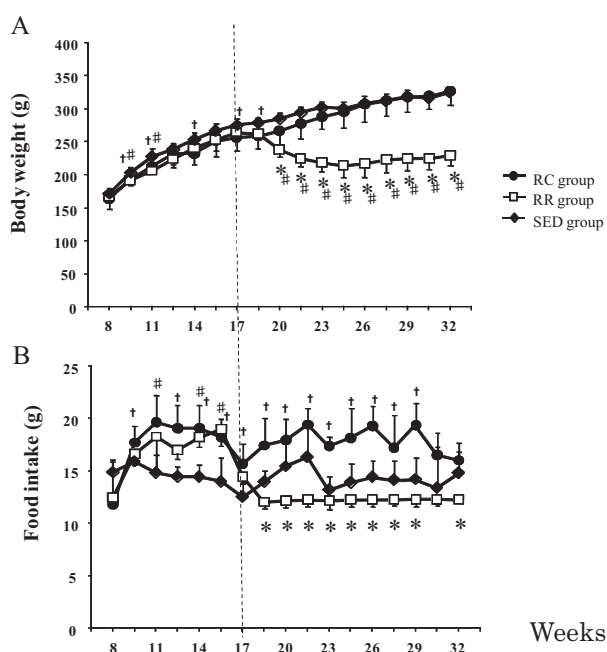


Figure 3. Time course of change in (A) body weight, and (B) food intake during the experimental period in the wheel running with *ad libitum*-feeding (RC) group, wheel running with restricted-feeding (RR) group, and sedentary control (SED) group. Values are given as means \pm SD; $n = 4$ for the RC group, $n = 4$ for the RR group, and $n = 6$ for the SED group. † $p < 0.05$, RC vs. SED group; * $p < 0.05$, RC vs. RR group, # $p < 0.05$, RR vs. SED group by, one-way ANOVA with repeated measures over time.

Figure 4. には、試験期間中における走運動負荷群の走行距離の推移を示した。110-119 日齢の走行距離は、RR 群が RC 群と比較して有意に低値を示したものの、その他の期間において、両群間に差は認められなかった。

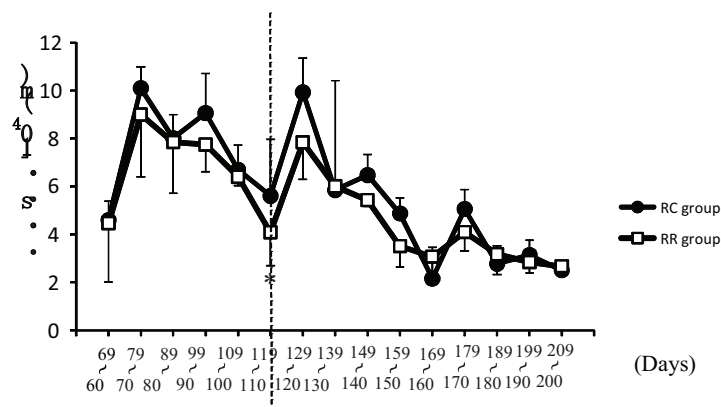


Figure 4. Running distances for rats included in the wheel-running groups (●) running *ad libitum*-fed (RC) group and (□) running restricted-fed (RR) group throughout the total duration of the experiment. Values are given as means \pm SD; $n = 4$ for each group. * Significantly different from the RC group. $p < 0.05$, by Student's t -test.

Figure 5 には大腿骨骨密度の経時変化を示した。8 週齢時、18 週齢時において 3 群間における大腿骨骨密度の差は認められなかった。しかし、32 週齢時において RR 群は RC 群及び SED 群と比較して有意に低値を示した。

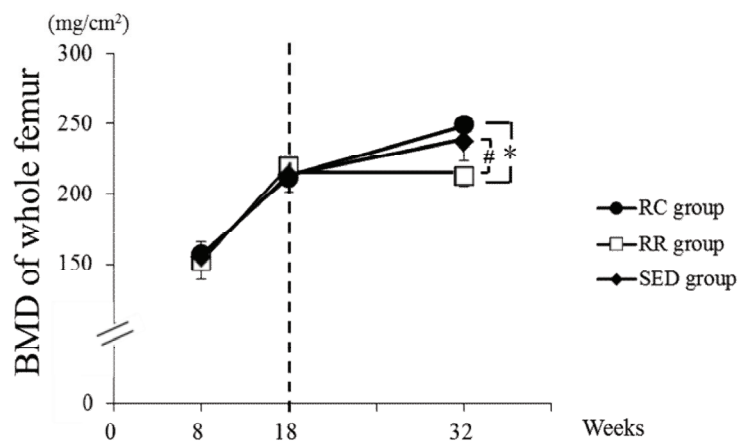


Figure 5. The change in the bone mineral density of the femur. (●) running *ad libitum*-fed (RC) group, (□) running restricted-fed (RR) group and (◆) sedentary control (SED) group. # Significantly different from RC group, * Significantly different from SED group. $p < 0.05$, by one-way ANOVA.

Figure 6 には、試験終了時における大腿骨の骨密度を、(A) 大腿骨全体、(B) 大腿骨近位部、(C) 大腿骨骨幹部、(D) 大腿骨遠位部に分けて測定した結果を示した。大腿骨全体及び大腿骨近位部において、RR 群は SED 群及び RC 群と比較して有意に低値を示した。また、大腿骨骨幹部及び大腿骨遠位部においては、RR 群は RC 群と比較して有意に低値を示した。RC 群は SED 群及び RR 群と比較して有意な差は認められなかった。

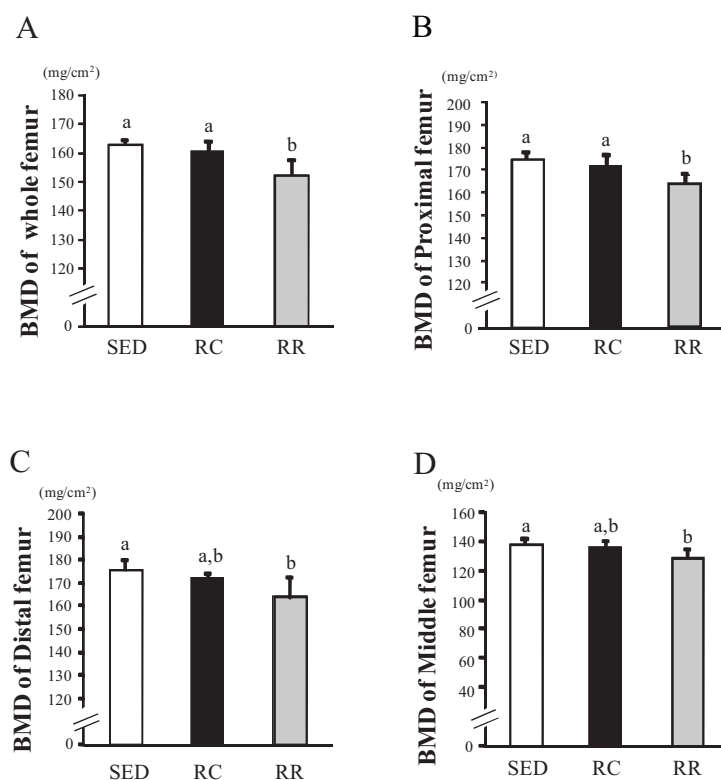


Figure 6. Effects of energy restriction with voluntary exercise on BMD of the femur: (A) whole femur, (B) proximal region, (C) middle region, and (D) distal region. Values are given as means \pm SD; $n = 4$ for the RC group, $n = 4$ for the RR group, and $n = 6$ for the SED group. Means with different letters indicate significantly different values at $p < 0.05$, One-way ANOVA.

Figure 7 に、大腿骨骨塩量の測定結果を示した。大腿骨全体(A)、近位部(B)及び遠位部(D)について RR 群は SED 群及び RC 群と比較して有意に低値を示した。同部位における SED 群と RC 群の間に有意な差は認められなかった。大腿骨骨幹部(C)において、RR 群は RC 群と比較して有意に低値を示した。しかし、SED 群は RC 群及び RR 群と比較して認められなかった。これらの結果は、骨密度の結果とほぼ一致している。

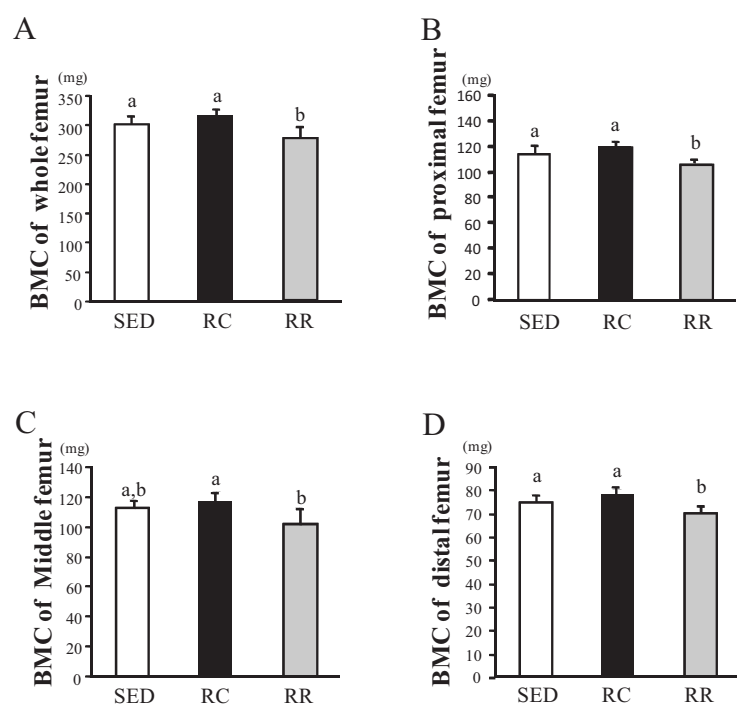


Figure 7. Effects of energy restriction with voluntary exercise on BMC of the femur: (A) whole femur, (B) proximal region, (C) middle region, and (D) distal region. Values are given as means \pm SD; n = 4 for the RC group, n = 4 for the RR group, and n = 6 for the SED group. Means with different letters indicate significantly different values at $p < 0.05$, One-way ANOVA.

Figure 8 に大腿骨骨面積の結果を示した。大腿骨全体(A)において、RR 群は RC 群と比較して有意に低値を示した。SED 群は RC 群及び RR 群と比較して差は認められなかった。また、三部位において三群間に有意な差は認められなかった。

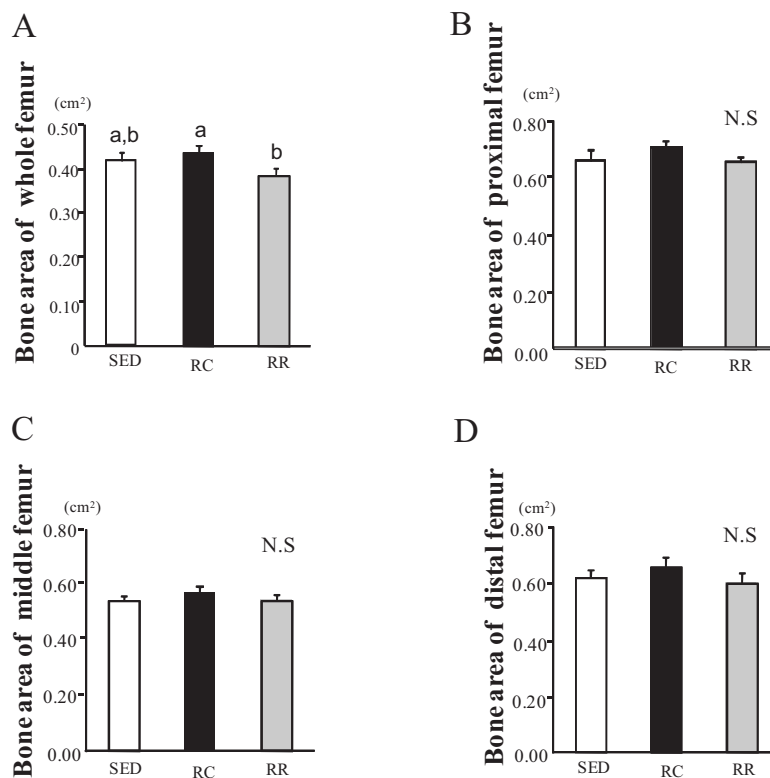


Figure 8. Effects of energy restriction with voluntary exercise on bone area of the femur: (A) whole femur, (B) proximal region, (C) middle region, and (D) distal region. Values are given as means \pm SD; $n = 4$ for the RC group, $n = 4$ for the RR group, and $n = 6$ for the SED group. Means with different letters indicate significantly different values at $p < 0.05$, One-way ANOVA.

Table 3 には、左大腿骨遠位部における形態計測の結果を示した。RR 群における単位骨量(BV/TV, %)及び骨梁数(Tb. N, N/mm)は、SED 群と比較して有意に低値を示した。また、RR 群における骨梁幅(Tb. Sp, μm)は、SED 群と比較して有意に高値を示した。破骨細胞数(N. Oc/TV, N/mm²)はRR群がSED群及びRC群と比較して有意に低値を示し、骨芽細胞(N. Ob/TV, N/mm²)には変化が見られなかった。類骨量(OV/OS, μ/m)は、RR 群が RC 群と比較して有意に高値を示した。類骨幅(O. Th, μ/m)は、RR 群は SED 群と比較して有意に高値を示した。

Table 3. Bone histomorphometry of cancellous bone of the distal femur.

Bone variable	SED	RC	RR	p value
BV/TV, %	24.9 \pm 2.3 ^a	20.6 \pm 4.7 ^{a,b}	13.9 \pm 8.3 ^b	< 0.05
Tb.N, N/mm	4.5 \pm 0.6 ^a	3.9 \pm 1.0 ^{a,b}	2.5 \pm 1.0 ^b	< 0.05
Tb.Sp, μm	169.8 \pm 28.2 ^b	220.2 \pm 80.8 ^{a,b}	399.2 \pm 202.4 ^a	< 0.05
N.Oc/TV, N/mm ²	50.1 \pm 11.6 ^a	34.8 \pm 12.4 ^a	18.8 \pm 2.9 ^b	< 0.05
N.Ob/TV, N/mm ²	38.2 \pm 5.7	38.3 \pm 22.2	60.2 \pm 45.3	NS
OV/OS, μ/m	2.8 \pm 0.1 ^b	3.0 \pm 0.3 ^{a,b}	3.3 \pm 0.4 ^a	< 0.05
O.Th, μ/m	2.7 \pm 0.1 ^b	3.0 \pm 0.3 ^{a,b}	3.2 \pm 0.4 ^a	< 0.05

Values are given as means \pm SD. BV/TV, bone volume/total volume; Tb.N, trabecular number; TbSp, trabecular separation; N.Oc/TV, Osteoclast Number/Tissue volume; N.Ob/TV, Osteoblast number/Tissue volume; OV/OS, Osteoid Volume/Osteoid Surface; O.Th, Osteoid Thickness. All variables are n = 4 for each group. Means with different letters indicate significantly different values at p < 0.05 by one-way ANOVA.

Figure 9 には、大腿骨遠位部の光学顕微鏡の測定写真を示した。SED 群(A)、RC 群(B)、RR 群(C)の順に海綿骨が減少している様子がわかる。

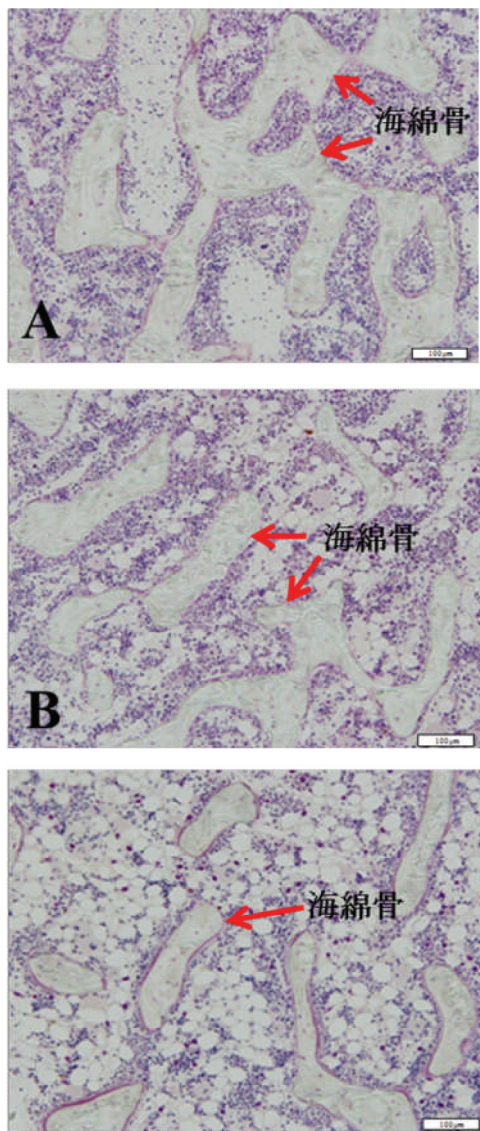


Figure 9. Photomicrograph of the distal femur of each group: (A) SED group, (B) RC group, (C) RR group. The RR group showed lower trabecular numbers and significantly increased osteoid surface area than that in the SED group. Scale bar = 100µm.

Table 4. には、解剖時における血中 E_2 濃度、LH 濃度、オステオカルシン濃度の結果を示した。血中エストロゲン濃度において、RR 群は、RC 群と比較して有意に低値を示した。LH 濃度は、RR 群は RC 群及び SED 群と比較して有意に低値を示した。また、オステオカルシン濃度は、3 群間において差は見られなかった。

Table 4. Plasma concentrations of E_2 , LH, and osteocalcin in rats.

	SED	RC	RR	<i>p</i> value
E_2 (pg/mL)	46.3 ± 10.3 _a	33.9 ± 6.3	33.6 ± 8.6 _b	< 0.05
LH (ng/mL)	2.4 ± 1.4 _a	2.2 ± 1.2 _a	0.5 ± 0.4 _b	< 0.05
OC (ng/mL)	57.1 ± 9.2	58.4 ± 3.0	55.7 ± 8.2	NS

Values are given as means ± SD. n = 4 for the RC group, n = 4 for the RR group, and n = 6 for the SED group. Means with different letters indicate significantly different values at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

2-4. 考察

本実験の主な知見は、自発運動及びエネルギー制限負荷により大腿骨骨密度が低値を示したこと、血中エストロゲン濃度、黄体形成ホルモン濃度に影響を与えたことである。

本実験は、女性アスリートの骨粗鬆症モデル動物確立を目的として、自発運動及びエネルギー制限が骨密度低下を誘導するか否かを検討した。自発運動と同様に、運動を負荷する手法の一つにトレッドミル走運動があるが、トレッドミル走運動は検討するにあたり実験動物の負担と実施者の労力を要することから、本研究では自発運動を用いて評価することとした。先行研究 Dimarco NM (2007)らの報告では、34日齢の雌ラットを用い、自発運動及びエネルギー制限負荷により骨密度低下は起きなかった。本実験は先行研究と比較し、試験開始時の動物の週齢を約4週間遅らせた8週齢時から試験を行った。その結果、自発運動及びエネルギー制限を負荷したRR群は、自発運動、自由摂食のRC群あるいは運動を負荷しないSED群と比較して有意に低値を示した。また、大腿骨骨密度の経時変化においてもRR群はRC群とSED群と比較して有意に低値を示した(Figure 5)。本研究のRR群の骨密度が低値を示したのは、4-8週の若齢期の自発運動がもたらす骨密度増加の効果が抑制されたためである可能性が考えられた。なお、本実験は8週齢から32週齢での検討であるがラットの最大骨量を獲得するピーク・ボーンマスは約10カ月齢であることから(Li XJ et al., 1992, Schapira D et al., 1992)、本試験期間中のラットの骨は成長過程の段階にあると考えられる。骨に対する自発運動の効果は週齢の進んだ成熟期よりも若少期の方が効果が表れやすい。Holy et al.らは4週齢の雌ラットを用い、自発運動の負荷が4週間以内に骨密度が上昇させると報告していることから(Holy X et al., 2000)、本実験における3群間の骨密度の差は、骨密度の増加を抑制していることが考えられた。また、RC群とSED群の骨密度には差が認められなかった。これは実験開始時の週齢が8週齢であったため、若齢期の自発運動の効果が現れなかったこと、さらにRC群の血中 E_2 レベルがSED群と比較して低下傾向(Table 4)であったことが低骨密度に関与している可能性が考えられた。しかし、RR群における骨密度低下はSED群における食餌摂取群を設けていなかったことから、自発運動によるものなのかあるいは食餌制限によるものなのかは明らかではない。今後、SED群に食餌制限群を負荷する群を設けることで骨密度の低下の要因がいずれの因子なのか明らかになると考えられる。

大腿骨遠位部における形態計測において、RR群、RC群との間に差は認められなかったが、SED群と比較して骨が悪化していることが示された(Table 1)。RR群における骨量(BV/TV, %)及び骨梁数(N. Tb)はSED群と比較して有意に低値を示し、骨梁間隙(Tb Sp)はSED群と比較して高値を示した。また、RR群における破骨細胞数(N. Oc/TV)は、RC群、SED群と比較して有意に低い値を示し、骨芽細胞数(N. Ob/TV)はSED群及びRC群と比較して差は認められなかった。さらにRR群における類骨面(OV/OS)及び類骨幅(OV. Th)についても、RR群はSED群と比較して有意に高値を示したことから、RR群の石灰化が遅れていることが考えられた。

これらの結果は、食餌制限あるいはエネルギー制限が骨構造の悪化を誘導し石灰化を遅らせていることが示唆された。

形態計測の結果より、骨芽細胞数(N. Oc/TV)の群間差は認められなかったが、骨形成マーカーである血中オステオカルシン濃度においても 3 群間における差は認められなかった (Table 4)。エネルギー制限が骨代謝及び血中オステオカルシン濃度に及ぼす報告は多数されている。エネルギー制限により骨形成を抑制し血中オステオカルシン濃度を減少させたこと (Grinspoon SK et al., 1995; Ndiaye B et al., 1995)が報告されている一方、エネルギー制限によりオステオカルシン濃度が増加したことが報告されている (Talbot SM et al., 1998; Rector RS et al., 2009; Hinton PS et al., 2009)。本実験ではこれらの先行研究とは異なる結果であったが、骨芽細胞数のばらつきが大きい為、エネルギー制限及び自発運動の影響は明らかではない。

生殖系内分泌の指標である血中 E_2 濃度及び LH 濃度は、エネルギー制限と自発運動により影響を及ぼした (Table 4)。本実験における動物の解剖時期は膣腔検査を行い、性周期を合わせて行っている。ラットの性周期はおおよそ 4-5 日間で周期が訪れるが発情後期及び発情休止期における E_2 濃度や LH 濃度については変動が少ないことから、本実験の解剖時期は発情後期あるいは発情休止期に行った。RR 群の血中 E_2 濃度は SED 群と比較して有意に低値を示し、LH 濃度は RC 群、SED 群と比較して有意に低値を示した。以上の結果から、自発運動及びエネルギー制限が E_2 、LH 濃度に影響を及ぼすことが示された。この結果は、視床下部-下垂体-卵巣 (Hypothalamus-pituitary-ovarian axis) 軸を乱している可能性が考えられ、RR 群における骨密度が低値を示した結果を裏付ける可能性が示された。エネルギー制限と生殖系内分泌のホルモン応答へ影響を与える報告は多数なされており、本実験においても先行研究のデータを支持する結果となった。

さらに、本実験の RR 群が骨密度の低値を示したのは、エネルギー制限及び自発運動負荷に加え、血中 E_2 濃度の低下が考えられたが、血中 E_2 濃度の低下は腸管からのカルシウム吸収を抑制することが報告されている (Cifuentes M et al., 2004)。そのため、本実験の RR 群における骨密度低下は、自発運動及びエネルギー制限に加え、血中の E_2 濃度の低下が直接的に骨に作用していたこと、さらに腸管からのカルシウム吸収を抑制したことが考えられた。

本実験では、自発運動及びエネルギー制限の負荷により大腿骨近位部における骨密度の低下を誘導した。さらに、血中 E_2 濃度が減少したことから、自発運動及びエネルギー制限誘発性骨密度低下に寄与した可能性が考えられた。なお、本実験は The Journal of Physical Fitness and Sports Medicine. p695-704. (2012)に掲載された。

第3章 大豆イソフラボン摂取が自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度低下に及ぼす効果

3-1. 緒言

検討課題 1 では、女性アスリートの骨粗鬆症モデル動物を確立するため、自発運動及び 30%エネルギー制限負荷がラット大腿骨骨密度、血中 E_2 及び LH 濃度に及ぼす影響を検討した。その結果、骨密度低下を誘導し、血中 E_2 濃度及び血中 LH 濃度が有意に低値を示した。検討課題 1 の結果より、自発運動及び 30%エネルギー制限は骨密度低下を誘導すること、さらに骨密度低下に低 E_2 濃度が寄与している可能性が考えられた。

動物を用い大豆イソフラボン摂取が骨代謝に与える影響を検討した報告は多数なされており、卵巣摘出モデル動物を用い、低エストロゲンレベル時の骨量減少において拮抗的に作用するか否かが検証されている (Ishida H et al., 1998; Fanti P et al., 1998; Ishimi Y et al., 1999; Ishimi Y et al., 2000)。大豆や大豆製品に含まるイソフラボンは 15 種類知られているが、種類により生理活性が異なる。また、骨は $ER\beta$ が有意である為、 $ER\beta$ に対して親和性の高いイソフラボンであるゲニステインやダイゼインの効果を示した報告が多数なされている (Ishimi Y et al., 2000; Komrakova M et al., 2011; Somjen D et al., 2008; Picherit C et al., 2000)。

卵巣摘出モデル動物を用い、骨量減少に対し拮抗的に働くか否かを検討した報告におけるゲニステイン投与量は、飼料含有量が約 0.05-0.2%(w/w)の範囲内で検討されており、劇的な効果が見られない報告が一部あるものの、骨量減少抑制効果が示されている (Yan Zhang et al., 2009; Sehmisch S et al., 2010; Qing Miao et al., 2012)。また、配糖体やアグリコンを含めた複数のイソフラボンが混合された粉末である Fujiflavone (P40) や Novasoy は約 40%イソフラボンが含まれているが、イソフラボン含有量が飼料に対し約 0.2%(w/w)の摂取で骨密度に効果が表れている (Yan Zhang et al., 2009; Wu Jian et al., 2004)。さらに、Fanti P (1998) らは、卵巣摘出モデル動物におけるゲニステインの投与量について、皮下投与での検討を行っており $1\mu\text{g}/\text{bw}^{-1}$ では効果が表れないが 5、 $25\mu\text{g}/\text{bw}^{-1}$ で効果を示すと報告している (Fanti P et al., 1998)。

イソフラボンの骨代謝への影響を検討した報告は、卵巣摘出モデル動物を用いた検討のほか、精巣摘出モデル動物あるいは尾部懸垂モデル動物で検討されている (Ishimi Y et al., 2006)。しかし、運動及びエネルギー制限が引き起こす骨密度低下への影響を検討した報告はなされていない。そこで、本検討課題では検討課題 1 で引き起こした骨密度低下モデル動物の骨あるいは性ホルモンである、血中エストロゲン濃度や黄体形成ホルモンに対し、大豆イソフラボン摂取がどのような影響を及ぼすのかを検討することとした。

3-2. 実験方法

大豆イソフラボン摂取が自発的走運動及びエネルギー制限誘発性、骨量減少に及ぼす影響

使用動物及び飼料組成

8週齢雌性SDラット(日本エスエルシー株式会社、Shizuoka, Japan)を、自発運動群または非運動群に群分けした。ベースライン期間における飼料は、AIN-93Gを用い、介入期間は、AIN-93Mを用いた。大豆イソフラボン添加食については、AIN-93M組成を基に、0.5%(w/w)の大豆イソフラボン粉末(フジフラボン P40, フジッコ株式会社, Kobe, Japan, Table 6)を添加した。また、AIN-93G及びAIN-93Mにおける試料中の大豆油をコーン油に置換して用いた。全ての試験群は、自由摂食で10週間飼育し、18週齢時に体重に基づき自発運動群を、自由摂食群(RC群)、30%食餌制限群(RR群)、30%食餌制限に0.5%大豆イソフラボン粉末添加食群(RR+Iso)に分けた。n数はそれぞれ、RC群:n=4、RR群:n=6、RR+Iso群:n=6とした。エネルギー制限群は、エネルギー制限開始より2週間前の食餌摂取量の平均に対し、30%の食餌制限を負荷した。

Table 5. 群分け

	自発運動の有無	食餌制限の有無	試料
RC group	あり	なし	AIN-93G(対照食)
RR group	あり	あり	AIN-93G(対照食)
RR+Iso group	あり	あり	0.5%フジフラボン食

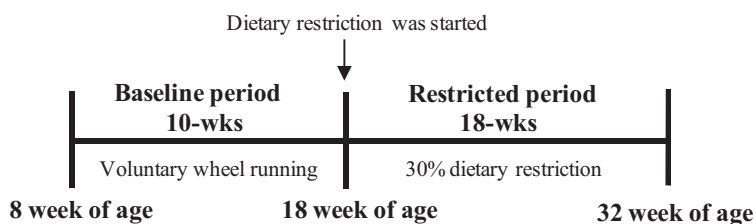


Figure 10. 実験プロトコル

飼育環境

各ラットは個別のケージで飼育し、室温 23±1°C、湿度 60±5%、明期・暗期ともに 12 時間のサイクルに調節された部屋で飼育した。ベースラインにおける自発運動群、非運動群については、食餌摂取及び飲水は全ての群において自由摂取とした。

Table 6. 試料組成

Ingredient	Diet		
	AIN-93G	AIN-93M	0.5% Isoflavone contained diet
			<i>g/kg diet</i>
Cornstarch	529.4	620.7	620.7
Casein	200	140.0	140.0
Sucrose	100	100.0	95.0
Corn oil	70	40.0	40.0
Cellulose	50	50.0	50.0
Mineral mix ¹	35	35.0	35.0
Vitamin mix (AIN-93-VX)	10	10.0	10.0
L-Cystine	3	1.8	1.8
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5
Tert-butylhydroquinone	0.14	0.008	0.008
Fujiflavone (P40 [*])	—	—	5.0
	1000	1000	1000

¹Mineral mixture は、AIN-93G には AIN-93G-MX を、AIN93-M には AIN-93MX を用いた。

*Fujiflavone P40 (Isoflavone 40% content)

Table 7. Isoflavone constituents in Fujiflavone P40

	Content, % [w/w]
Daidzin	22.48
Glycitin	14.00
Genistin	5.47
6"- <i>O</i> -Malonyldaizin	0.22
6"- <i>O</i> -Malonylglycitin	0.19
6"- <i>O</i> -Malonylgenistin	0.00
6"- <i>O</i> -Acetyldaizin	2.26
6"- <i>O</i> -Acetylglycitin	1.30
6"- <i>O</i> -Acetylgenistin	0.67
Daidzain	0.26
Glycitain	0.51
Genistein	0.07
Total isoflavone	47.34
(aglycone equivalent)	29.52

体重、摂食量及び走行距離の測定

ラットの体重と摂食量の測定は、ベースライン期間は週に2~3回、介入期間は週に3~4回測定した。走行距離は回転式運動量測定器(株式会社シナノ製作所, Tokyo, Japan)を用い、週に5回測定した。

大腿骨骨密度及び骨塩量の解析

右脚大腿骨の骨密度は、DCS-600EX-R (アロカ株式会社, Tokyo, Japan) を用いて DXA 法により測定した。骨密度は、骨塩量を面積で除することにより算出した。解析は、近位部、骨幹部、遠位部に3等分して行った。

血中エストラジオール濃度

血中のエストラジオール濃度を ELISA 法によるキットを用いて測定した (Estradiol sensitive ELISA, DRG International, Inc., USA)。血漿 230 μ L を 1mL のジエチルエーテ

ルで混合した後、5 分間の遠心分離(3,800 g)したのち -70°C で凍結させ、上澄みをエーテル画分とした。その後、室温で約 100 μL まで乾固し、150 μL のエーテルで再溶解後、約 20 μL まで乾固した。75 μL の Steroid free human serum を加え、血漿エストラジオール抽出液とした。抗エストラジオール抗体でコーティングされたマイクロプレートに 100 μL の標準液及び血漿エストラジオール抽出液、コントロール溶液を加え、200 μL の酵素溶液を分注した。10 秒間混合し、室温で 4 時間インキュベートした。マイクロプレートを洗浄後、200 μL の基質溶液を加え室温で 30 分間インキュベートした後、反応停止液を加えてマイクロプレートリーダーを用い、450nm で比色定量を行った (MTP-650FA, コロナ電気株式会社, Ibaraki, Japan)。

血中黄体形成ホルモン濃度の測定

血中黄体形成ホルモン濃度を ELISA 法によるキットを用いて測定した (Rodent LUTEINIZING HORMONE (LH) ELISA TEST, ENDOCRINE TECHNOLOGIES, INC.)。抗マウスポリクローナル抗体でコーティングされたマイクロプレートに 50 μL の標準液及び血漿、酵素溶液を加え 37°C で 120 分間インキュベートした。マイクロプレートを洗浄後、基質溶液を加え遮光下室温で 20 分間インキュベートした後、反応停止液を加えてマイクロプレートリーダーを用い、450nm で比色定量を行った (MTP-650FA, コロナ電気株式会社, Ibaraki, Japan)。

統計学的解析

体重、摂食量、走行距離のデータは、反復測定による分散分析を行い、Post hoc test として、Fisher の最小有意差法による多重比較を行った。骨形態計測の有意差検定は、一元配置分散分析の後、Post hoc test として Tukey' s honestly significant difference test (SPSS) による多重比較を行った。骨密度、骨塩量のデータは、運動と食餌の二要因とその交互要因による二元配置分散分析を行った後に、Post hoc test として、Fisher の最小有意差法による多重比較を行った。全ての検定において危険率が 5%未満をもって有意とした。各データは平均値 \pm 標準誤差で表した。

骨形態計測

左大腿骨遠位部を 70%エタノールで固定し、5 μm の非脱灰切片を作成後、酒石酸耐性酸性フッ素染色を行った。標本の二次海面骨部分を、光学顕微鏡に連動した画像分析システムにより計測し、単位骨量 (BV/TV, bone volume/tissue volume)、骨梁幅 (Tb. Th, trabecular thickness)、類骨面 (OV/BS, Osteoid Volume/Bone Surface)、骨芽細胞数 (Ob/BS, Osteoblast/Bone Surface)、骨芽細胞 (N.Ob/BS, Osteoblast number/Bone

Surface)、破骨細胞数 (N.Ob/BS, Osteoclast Number/Tissue volume)、石灰化速度 (MAR, Mineral Absorption Rate)、骨形成速度 (BFR/BS, Bone Formation Rate/Bone Surface)、骨形成速度 (BFR/BV; Bone Formation Rate/Bone volume)、骨形成速度 (BFR/TV; Bone Formation Rate/Tissue Volume)、骨梁数 (Tb. N, trabecular number)、骨梁間隙 (Tb. Sp, trabecular separation) をそれぞれ算出した。

3-3. 結果

Figure 11 には、試験期間中の体重(A)及び摂食量(B)の経時変化を示した。介入期間中 21-32 週齢における RR 群及び RR+Iso 群の体重は、RC 群と比較して有意に低値を示した。また、介入期間中の摂食量について 19-32 週齢時の RR 群及び RR+Iso 群は、RC 群と比較して有意に低値を示した。

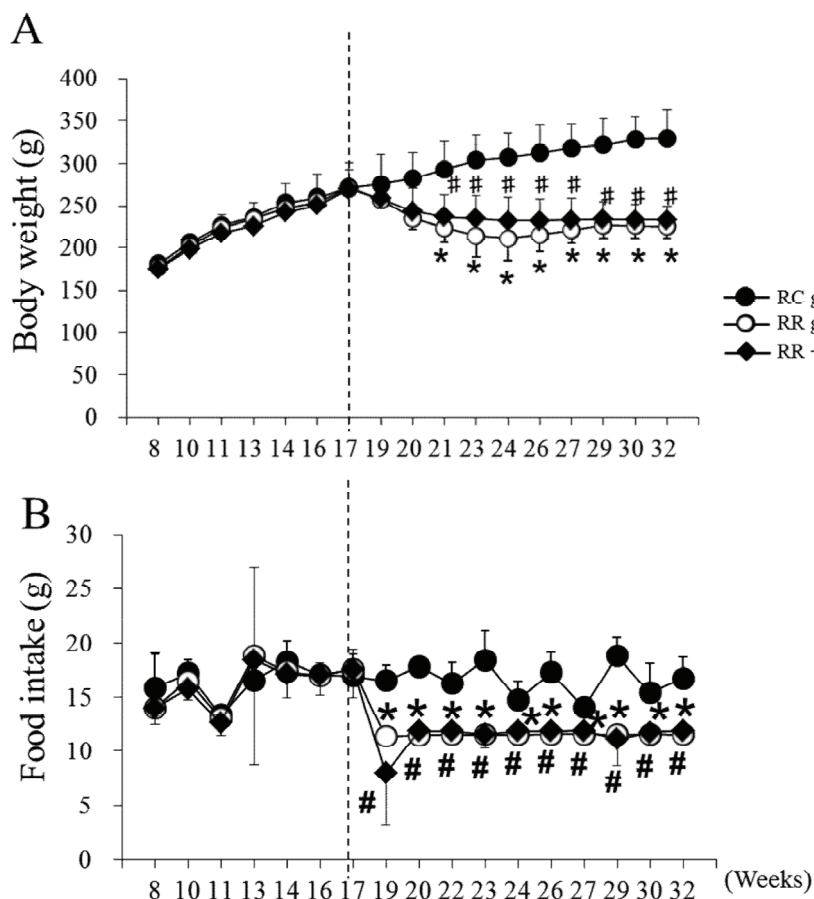


Figure 11. Time course of change in (A) body weight, and (B) food intake during the experimental period in the wheel running with *ad libitum*-feeding (RC) group, wheel running with restricted-feeding (RR) group, and running with restriction-isoflavone-feeding (RR+Iso) group. Values are given as means \pm SD; $n = 4$ for the RC group, $n = 6$ for the RR group, $n = 6$ for the RR+Iso group. * < 0.05 , RC vs. RR group; # $p < 0.05$, RC vs. RR+Iso group. by, one-way ANOVA with repeated measures over time.

Figure 12 には、試験期間中における走行距離の経時変化を示した。試験期間中すべて期間において3群間の差は認められなかった。

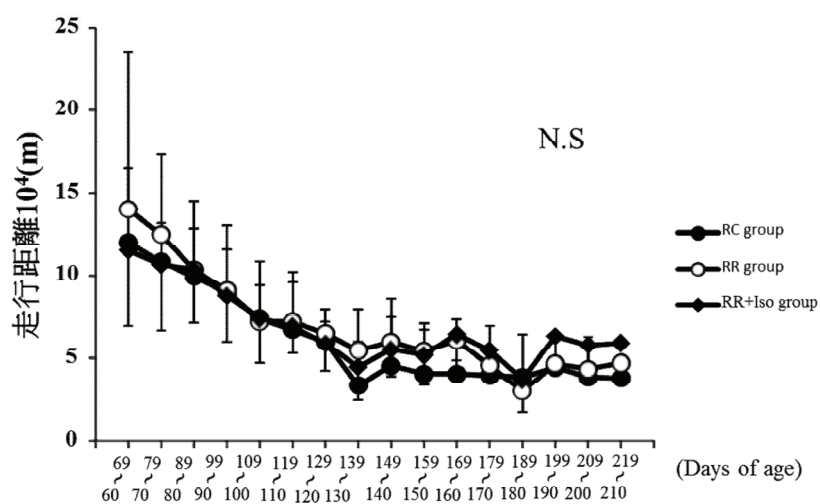


Figure 12. Running distance for rats included in the wheel-running groups (●) running *ad libitum*-fed (RC) group, (○) running restricted-fed (RR) group, and running restricted-fed Isoflavone (RR+Iso) group throughout the total duration of the experiment. Values are given as means \pm SD; n = 4 for the RC group, n = 6 for the RR group, n=6 for the RR+Iso group, by One-way ANOVA.

Figure 13 には、大腿骨骨密度の測定結果を示した。大腿骨近位部(B)において、RR 群は RC 群と比較して有意に低値を示した。しかし、RR+Iso 群は RC 群と比較して差は認められなかった。また、RR+Iso 群と RR 群の間にも差は認められなかった。また、大腿骨全体(A)においては、RR 群が RC 群と比較して低値を示す傾向が見られた ($p=0.067$)。大腿骨骨幹部(C)、大腿骨遠位部(D)については、すべての群間に有意な差は認められなかった。

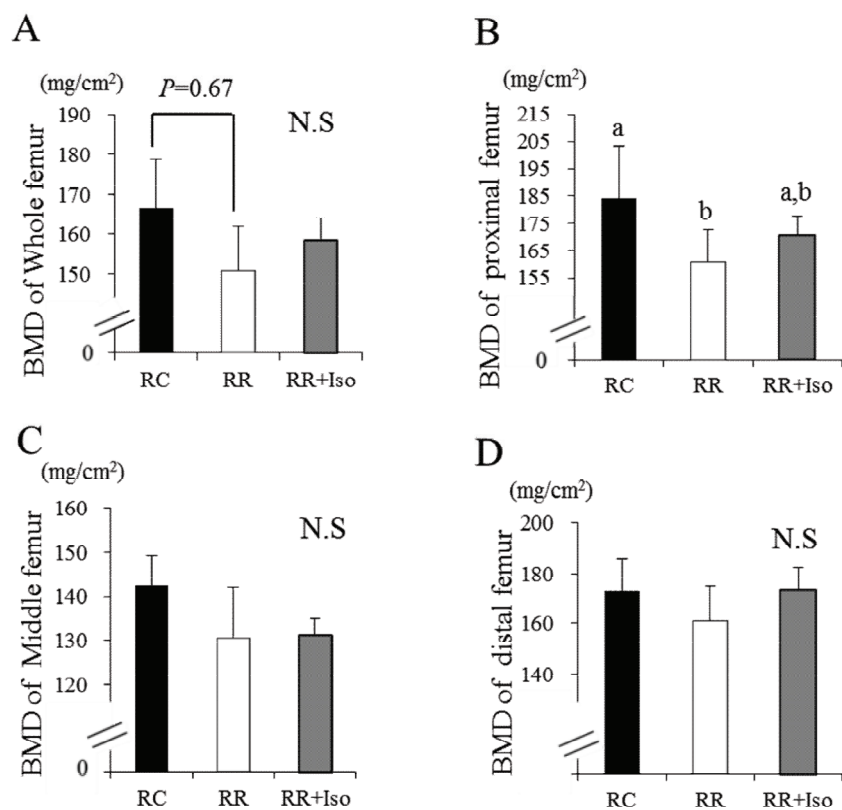


Figure 13. Effects of energy restriction with wheel running and isoflavone intake for 14 wks on BMD in female rats. Whole femur BMD (A), Proximal BMD (B), Middle BMD (C), Distal BMD (D). Values are means \pm SD, $n=4-6$, Means with different letters differ, $P<0.05$ by one-way ANOVA.

Figure 14 には、大腿骨の骨塩量を示した。大腿骨遠位部(C)において、RR+Iso 群は RC 群と比較して低値を示す傾向が見られたが、有意な差は認められなかった ($p=0.066$)。また、大腿骨全体(A)、大腿骨近位部(B)、大腿骨遠位部(D)については、全ての群間において有意な差は認められなかった。

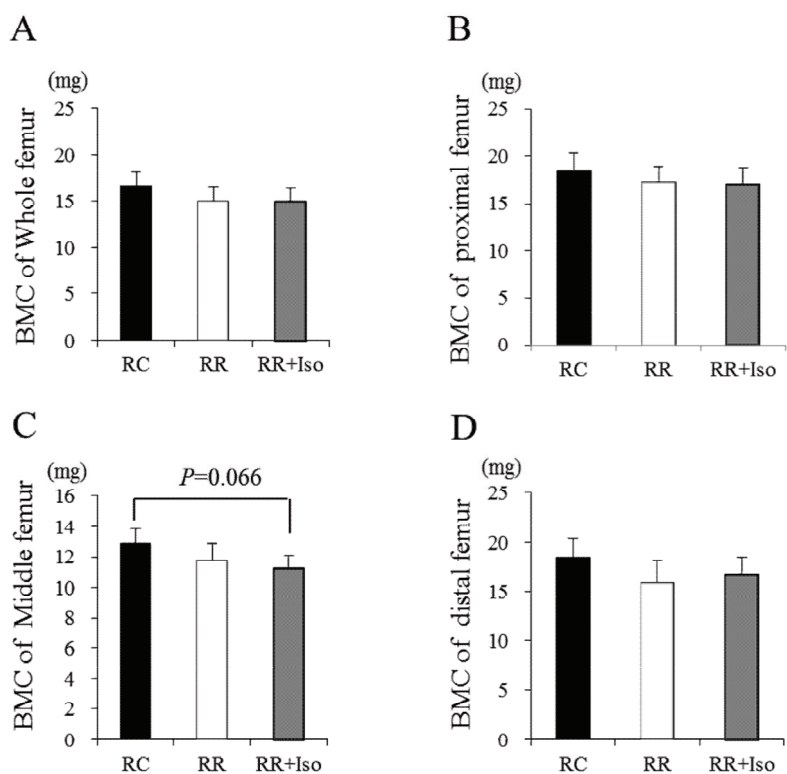


Figure 14. Effects of energy restriction with wheel running and isoflavone intake for 14 wks on BMC in female rats. Whole femur BMC (A), Proximal BMC (B), Middle BMC (C), Distal BMC (D). Values are means \pm SD, $n=4-6$, Means with different letters differ, $P<0.05$ by one-way ANOVA.

Figure 15 には、光学顕微鏡による大腿骨遠位部の様子を示した。RC 群 (A)、RR 群 (B)、RR+Iso 群 (C)、全ての群においてテトラサイクリンとカルセインにより海綿骨への色素沈着が認められた。

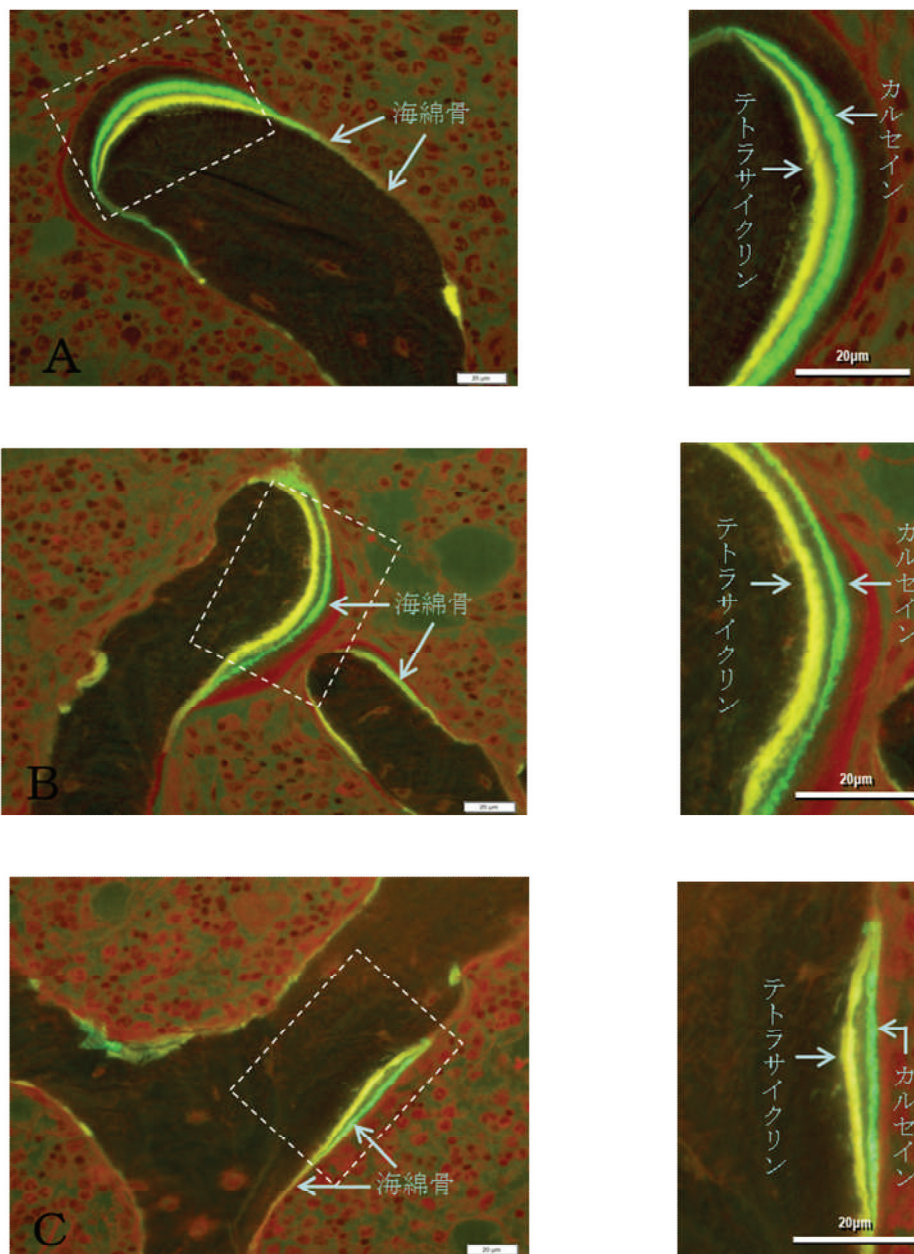


Figure 15. Photomicrograph of the distal femur of each group: (A) RC group, (B) RR group, (C) RR+Iso group.

Table 8 には、大腿骨遠位部における海綿骨形態計測測定結果を示した。骨量(BV/TV)は、RC群がRR群、RR+Iso群と比較して有意に高値を示した。骨梁幅(Tb.Th)は、RC群がRR+Iso群と比較して、有意に高値を示した。類骨面(OS/BS)、骨芽細胞(骨面)(Ob.S/BS)、骨芽細胞数(N.Ob/BS)、破骨細胞数(N.Oc/BS)は、全ての群間において有意な差は認められなかった。骨石灰化速度(MAR)は、RR+Iso群がRC群あるいはRR群と比較して有意に低値を示した。また、骨形成速度(BFR/BS及びBFR/BV)は、RR+Iso群がRR群と比較して、有意に低値を示した。骨石灰化速度(BFR/TV)は、RR+Iso群がRC群、あるいはRR群と比較して有意に低値を示した。骨梁数(Tb.N)及び骨梁間隙(Tb.Sp)は、全ての群間において有意な差は認められなかった。

Table 8. Bone histomorphometry of cancellous bone of the distal femur in rats.

Bone variable	RC	RR	RR+Iso	P value
BV/TV, %	33.5±4.3 ^a	19.1±8.5 ^b	21.4±5.5 ^b	< 0.05
Tb.Th, µm	70.8±9.9 ^a	58.5±8.8 ^{a,b}	55.4±5.2 ^b	< 0.05
OS/BS, %	3.7±1.9	9.7±5.9	3.0±3.1	N.S
Ob.S/BS, %	3.7±1.1	10.3±6.9	2.6±2.5	N.S
N.Ob/BS, N/mm	3.0±1.1	7.4±4.7	2.0±1.9	N.S
N.Oc/BS, N/mm	3.0±1.8	2.2±1.8	1.6±0.5	N.S
MAR, µm/day	1.3±0.1 ^a	1.2±0.1 ^a	0.9±0.2 ^b	< 0.05
BFR/BS, mm ² /mm ² /year	0.065±0.026 ^{a,b}	0.084±0.052 ^a	0.019±0.01 ^b	< 0.05
BFR/BV, % year	178.9±45.6 ^{a,b}	311.9±218.8 ^a	67.1±36.5 ^b	< 0.05
BFR/TV, % year	60.6±20.8 ^a	45.8±21.2 ^a	15.2±8.5 ^b	< 0.05
Tb.N, N/mm	4.8±0.7	3.2±1.3	3.8±0.7	N.S
Tb.Sp, µm	142.2±26.7	318.0±210.3	214.8±60.6	N.S

Values means ±SD, n=4-5, Means with different letters differ, P < 0.05 by one-way ANOVA.

Table 9 に、血中 E₂ 及び LH の測定結果を示した。血中 E₂ 濃度は、RR 群及び RR+Iso 群が RC 群と比較して有意に低値を示した。血中 LH 濃度については、すべての群間で差は見られなかった。

Table 9. Plasma concentrations of E₂ and LH in rats. Effects of energy restriction with wheel running and isoflavone intake on plasma E₂ and LH concentration.

	RC	RR	RR+Iso	<i>P</i> value
E ₂ (pmol/L)	26.0 ± 6.3 ^a	18.5 ± 1.8 ^b	16.9 ± 1.5 ^b	< 0.05
LH (ng/mL)	3.1 ± 1.4	2.5 ± 2.7	1.6 ± 0.5	N.S

Values means ±SD, n=4-6, Means with different letters differ, *P* < 0.05 by one-way ANOVA.

3-4. 考察

本研究の主な知見は、大腿骨近位部の骨密度の結果より自発運動+エネルギー制限(RR)群が自発運動+自由摂取(RC)群と比較して有意に低値を示したことから、またイソフラボン添加食(RR+Iso)群はRC群と比較して差が認められなかったことである。さらに、血中 E_2 濃度において、RR群及びRR+Iso群はRC群と比較して有意に低値を示したことから、イソフラボン添加食群が自発運動及びエネルギー制限誘発性の低 E_2 レベル時の骨密度低下を抑制したことが示唆された。しかし、自発運動及びエネルギー制限誘発性骨密度低下に対し、大豆イソフラボンがどのように作用しているのかは明らかとなっていないため、骨形態計測により詳細な検討を行った。

大豆イソフラボン摂取が卵巣摘出モデル動物などを用い、骨密度低下抑制効果を示す報告は多数なされている。大豆イソフラボン摂取が骨密度低下抑制を示す作用機構として、骨吸収阻害と骨形成の促進の両方から作用していることが考えられている。骨吸収においては、破骨細胞のアポトーシスあるいは活性化の抑制、また、チロシンキナーゼ活性の抑制である。骨形成に対する作用は、骨芽細胞におけるタンパク合成を促進し、アルカリフォスファターゼ活性を高めることにより、骨芽細胞の骨形成を促進する。本実験において、大腿骨骨密度は、イソフラボン添加食(RR+Iso)群は自発運動及びエネルギー制限(RR)群と比較して統計的有意差は認められなかったことから、骨量減少を緩やかに抑制した可能性が示唆された。しかし、両群間における骨芽細胞数(N. Ob/BS)には差は認められなかった。さらに、破骨細胞数(N. Oc/BS)についても差が認められなかったことから、本実験における大豆イソフラボン摂取の骨密度低下抑制効果は、骨形成を促進したのか、骨吸収を阻害したのかは明確ではない。しかし一方で、骨石灰化速度(MAR)はRR+Iso群がRC群あるいはRR群と比較して有意に低値を示した(Table 8)。これらの結果から、RR+Iso群は他の2群と比較して、骨石灰化速度を抑制していた可能性が示された。また、RR+Iso群の骨形成速度(BFR)は、RC群あるいはRR群と比較して有意に低値を示し、大豆イソフラボンが骨形成を抑制した可能性が示唆された。また、骨梁幅(Tb. Th)及び骨梁間隙(Tb. Sp)は、全ての群間において有意な差は認められなかった(Table 8)。

また、血中 E_2 濃度について、RR群及びRR+Iso群はRC群と比較して有意に低値を示した(Table 9)。この結果は、大腿骨骨密度(近位部)における結果と同様の傾向にあり、自発運動及びエネルギー制限誘発性骨密度の低下に血中 E_2 濃度の低下が寄与している可能性が考えられた。一方、血中LH濃度においては、全ての群間における差は認められなかったことから、生殖系内分泌応答である視床下部-下垂体-卵巣(Hypothalamus-pituitary-ovary軸)は乱されていない可能性が示された。

本実験では、自発運動及びエネルギー制限の負荷により大腿骨近位部における骨密度の低下を誘導し、大豆イソフラボン摂取により、骨密度低下を緩和した可能性が示唆された。さらに、自発運動及びエネルギー制限負荷群において血中 E_2 濃度が低値を示したことから、

大豆イソフラボン摂取が血中 E_2 欠乏時の骨量減少に抑制的に働く可能性が考えられた。

第4章 総括

本実験の目的は、女性アスリートの骨粗鬆症モデル動物確立の為、自発運動及びエネルギー制限が成熟期ラット骨密度に及ぼす影響を明らかにすること、さらに大豆イソフラボン摂取が骨密度低下に及ぼす影響を明らかにすることであった。以下に各実験のまとめを示す。

検討課題1：自発運動及びエネルギー制限がラット骨密度に及ぼす影響を検討した結果、骨密度低下を誘導した。血中 E_2 濃度及び LH 濃度が Sedentary 群と比較して低値を示したことから、生殖器系内分泌応答に影響している可能性が示された。

検討課題2：自発運動及びエネルギー制限誘発性、骨密度の低下に対し、大豆イソフラボン摂取が及ぼす効果を検討した。その結果、大豆イソフラボン摂取により、大腿骨骨密度低下を緩和した。さらに、自発運動及びエネルギー制限負荷群における血中 E_2 濃度が低値を示したことから、血中 E_2 レベルの低下時において大豆イソフラボンの有効性の可能性が示された。

第5章 結論

本研究はアスリート女性の骨粗鬆症モデル動物確立のため遂行された。検討課題1、検討課題2ともに、自発運動及びエネルギー制限負荷は成熟期雌ラット大腿骨骨密度を有意に低下させた。本検討課題で実施した自発運動及びエネルギー制限誘発性骨密度低下に対し、大豆イソフラボン摂取は骨密度低下を抑制した。さらに、血中 E_2 レベルの低下時における大豆イソフラボンの効果が示された。以上より、大豆イソフラボン摂取は自発運動及びエネルギー制限負荷時の骨密度低下を E_2 の役割を代替として働き、骨密度低下を抑制した可能性が示唆された。

引用文献

Associations, N.F. o. S. H. S. (2010). Interactive participation survey results. From. <http://www.nfhs.org/content.aspx?id=3282&linkidentifier=id&itemid=3282>

Abraham SF, Beumont PJ, Fraser IS, Llewellyn-Jones D. Body weight, exercise and menstrual status among ballet dancers in training. Br J Obstet Gynaecol. 1982 89:507-510.

Banu MJ, Orhii PB, Mejia W, McCarter RJ, Mosekilde L, Thomsen JS, Kalu DN. Analysis of the effects of growth hormone, voluntary exercise, and food restriction on diaphyseal bone in female F344 rats. Bone. 1999 25:469-480.

Bao L, Zou SE, Zhang SF. Dose-dependent effects of daidzein in regulating bone formation through estrogen receptors and peroxisome proliferator-activated receptor γ . Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2011 9:165-72.

BEALS, K.A. & M.M. MANORE. Disorders of the female athlete triad among collegiate athletes. Int. J. Sport. Nutr Exerc Metab 12.2002. : 281-293.

Bennell KL, Brukner PD. Epidemiology and site specificity of stress fractures. Clin Sports Med. 1997

Brooks-Gunn J, Warren MP., Mother-daughter differences in menarcheal age in adolescent girls attending national dance company schools and non-dancers. Ann Hum Biol. 1988 15:35-43.

Byrne S, McLean N. Elite athletes: effects of the pressure to be thin. J Sci Med Sport. 2002 5:80-94.

Cann CE, Martin MC, Genant HK, Jaffe RB. Decreased spinal mineral content in amenorrheic women. JAMA. 1984 3;251(5):626-9.

Caston AL, Farrell PA, Deaver DR (1995) Exercise training-induced changes in anterior pituitary gonadotrope of the female rat. J Appl Physiol 79: 194-201

Chumlea W.C., C.M. Schubert, A.F. Roche, *et al.* Age at menarche and racial comparisons in US girls. Pediatrics 111: 110-113.2003.

- Chatterton RT Jr, Hartman AL, Lynn DE, Hickson RC., Proc Soc Exp Biol Med. 1990 193:220-4. Exercise-induced ovarian dysfunction in the rat.
- Cifuentes M, Morano AB, Chowdhury HA, Shapses SA. Energy restriction reduces fractional calcium absorption in mature obese and lean rats. J Nutr. 2002 132:2660-2666.
- Cifuentes M, Riedt CS, Brolin RE, Field MP, Sherrell RM, Shapses SA. Weight loss and calcium intake influence calcium absorption in overweight postmenopausal women. Am J Clin Nutr. 2004 80:123-130. Erratum in: Am J Clin Nutr. 2005 81:199.
- Constantini NW & Warren MP. Physical activity, Fitness and Health 1992 Proceedings, pp 955-966. Champaign, IL: Human Kinetics, 1994.
Conference report., 1991: Consensus Development Conference: Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis
- De Souza MJ, West SL, Jamal SA, Hawker GA, Gundberg CM, Williams NI. The presence of both an energy deficiency and estrogen deficiency exacerbate alterations of bone metabolism in exercising women. Bone. 2008;43(1):140-8.
- De Wilde A, Lieberherr M, Colin C, Pointillart A. A low dose of daidzein acts as an ERbeta-selective agonist in trabecular osteoblasts of young female piglets. J Cell Physiol. 2004 200:253-262.
- de Lemos ML. Effects of soy phytoestrogens genistein and daidzein on breast cancer growth. Ann Pharmacother. 2001 35:1118-1121.
- Dimarco NM, Dart L, Sanborn CB., Modified activity-stress paradigm in an animal model of the female athlete triad. Appl Physiol. 2007 103:1469-1478.
- Drinkwater BL, Nilson K, Chesnut CH 3rd, Bremner WJ, Shainholtz S, Southworth MB., Bone mineral content of amenorrheic and eumenorrheic athletes. N Engl J Med. 1984 2 311:277-281.
- Dusek T. Influence of high intensity training on menstrual cycle disorders in athletes. Croat Med J. 2001 42:79-82.

- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 1998;8(3):274-81.
- Fehling PC, Alekel L, Clasey J, Rector A, Stillman RJ. A comparison of bone mineral densities among female athletes in impact loading and active loading sports. *Bone.* 1995 17:205-210.
- Fertil Steril. Current evaluation of amenorrhea. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. 2004 82:S33-39.
- Frisch RE, McArthur JW. Menstrual cycles: fatness as a determinant of minimum weight for height necessary for their maintenance or onset. *Science.* 1974 13:185(4155):949-51.
- Gao YH, Yamaguchi M. Anabolic effect of daidzein on cortical bone in tissue culture: comparison with genistein effect. *Mol Cell Biochem.* 1999 194(1-2):93-97.
- Hawkins J, Cifuentes M, Pleshko NL, Ambia-Sobhan H, Shapses SA. Energy restriction is associated with lower bone mineral density of the tibia and femur in lean but not obese female rats. *J Nutr.* 2010 140:31-37.
- Holy X, Zérath E. Bone mass increases in less than 4 wk of voluntary exercising in growing rats. *Med Sci Sports Exerc.* 2000 32:1562-1569.
- Ho SC, Chan SG, Yi Q, Wong E, Leung PC. Soy intake and the maintenance of peak bone mass in Hong Kong Chinese women. *J Bone Miner Res.* 2001;16(7):1363-9.
- Hulkko A, Orava S, Stress fractures in athletes. *Int J Sports Med.* 1987 8:221-226.
- Ishida H, Uesugi T, Hirai K, Toda T, Nukaya H, Yokotsuka K, Tsuji K. Preventive effects of the plant isoflavones, daidzin and genistin, on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet.
- Ishimi Y, Miyaura C, Ohmura M, Onoe Y, Sato T, Uchiyama Y, Ito M, Wang X, Suda T, Ikegami S. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology.* 1999 Apr;140(4):1893-900.

Ishimi Y, Yoshida M, Wakimoto S, Wu J, Chiba H, Wang X, Takeda K, Miyaura C, Genistein, a soybean isoflavone, affects bone marrow lymphopoiesis and prevents bone loss in castrated male mice. *Bone*. 2002 31:180-185.

Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, Takeda A, Ikegami S. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 11;274(3):697-701.

Kaufman BA, Warren MP, Dominguez JE, Wang J, Heymsfield SB, Pierson RN. Bone density and amenorrhea in ballet dancers are related to a decreased resting metabolic rate and lower leptin levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(6):2777-83.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998 139:4252-4263.

Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, Schmelz U, Frauendorf H, Grueger T, Wessling T, Klein C, Birth M, Stuermer KM, Stuermer EK., Impact of 4-methylbenzylidene camphor, daidzein, and estrogen on intact and osteotomized bone in osteopenic rats. *J Endocrinol*. 2011 211:157-68.

Lambrinoudaki I, Papadimitriou D. *Ann N Y Acad Sci*. Pathophysiology of bone loss in the female athlete. 2010 1205:45-50.

Li XJ, Jee WSS, Ke HZ, Mori S, Akamine T. 1992. Age related changes of cancellous and cortical bone histomorphometry in female Sprague-Dawley rats. *Cells Materials I (suppl)*: 25-37.

Loucks AB, Thuma JR. Luteinizing hormone pulsatility is disrupted at a threshold of energy availability in regularly menstruating women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 88:297-311.

Loucks AB, Mortola JF, Girton L, Yen SS. Alterations in the hypothalamic-pituitary-ovarian and the hypothalamic-pituitary-adrenal axes in athletic women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1989 68:402-411.

Marcus R, Cann C, Madvig P, Minkoff J, Goddard M, Bayer M, Martin M, Gaudiani L, Haskell W, Genant H. Menstrual function and bone mass in elite women distance runners. Endocrine and metabolic features. *Ann Intern Med.* 1985 102:158-163.

Marcus R, Cann C, Madvig P, Minkoff J, Goddard M, Bayer M, Martin M, Gaudiani L, Haskell W, Genant H. Menstrual function and bone mass in elite women distance runners. Endocrine and metabolic features. *Ann Intern Med.* 1985 102:158-163.

Misra M. Bone density in the adolescent athlete. *Rev Endocr Metab Disord.* 2008 9:139-44.

Myburgh KH, Bachrach LK, Lewis B, Kent K, Marcus R. Low bone mineral density at axial and appendicular sites in amenorrheic athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 25:1197-1202.

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F. Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res.* 2002 17:1904-1912.

Nakajima D, Kim CS, Oh TW, Yang CY, Naka T, Igawa S, Ohta F. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. *J Physiol Anthropol Appl Human Sci.* 2001 ;20(5):285-91.

Nattiv A, Agostini R, Drinkwater B, Yeager KK., The female athlete triad. The inter-relatedness of disordered eating, amenorrhea, and osteoporosis. *lin Sports Med.* 1994 13:405-418. Review.

Nattiv A, Loucks AB, Manore MM, Sanborn CF, Sundgot-Borgen J, Warren MP; American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine position stand. The female athlete triad. *Med Sci Sports Exerc.* 2007 39:1867-1882.

National Osteoporosis Foundation, "Fast Facts," 2008, <http://www.nof.org/osteoporosis/diseasefacts.htm>.

Nichols JF, Rauh MJ, Lawson MJ, Ji M, Barkai HS., Prevalence of the female athlete triad syndrome among high school athletes. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 2006 160:137-142.

- Otis CL, Drinkwater B, Johnson M, et al. American College of Sports Medicine Position
- Pettersson F, Fries H, Nillius SJ. Epidemiology of secondary amenorrhea. I. Incidence and prevalence rates. *Am J Obstet Gynecol.* 1973, 1;117:80-86.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP. Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr.* 2000 Jul;130(7):1675-81.
- Qing Miao, Jing-Ge Li, Shan Miao, Nan Hu, Jin Zhang, Song Zhang, Yan-Hua Xie, Jian-Bo Wang, and Si-Wang Wang. The Bone-Protective Effect of Genistein in the Animal Model of Bilateral Ovariectomy: Roles of Phytoestrogens and PTH/PTHrP Against Post-Menopausal Osteoporosis *Int J Mol Sci.* 2012 13:56-70.
- Risser WL, Lee EJ, LeBlanc A, Poindexter HB, Risser JM, Schneider V. Bone density in eumenorrheic female college athletes. *Med Sci Sports Exerc.* 1990 22:570-574.
- Robinson TL, Snow-Harter C, Taaffe DR, Gillis D, Shaw J, Marcus R. Gymnasts exhibit higher bone mass than runners despite similar prevalence of amenorrhea and oligomenorrhea. *J Bone Miner Res.* 1995 10:26-35.
- Santell, R. C., Chang, Y. C., Nair M. G., Helferich W. G. : Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats, *J. Nutr.*, 127, 263-269 (1997)
- Schapira D, Lotan-Miller R, Barziliai D, Silbermann M. 1992. The rat as a model for studies of the aging skeleton. *Cells Materials I (suppl)*:181-188.
- Skolnick, AA. 'Female Athlete Triad' risk for women. *JAMA* 1993;270:921-923.
- Snow-Harter CM., Bone health and prevention of osteoporosis in active and athletic women. *Clin Sports Med.* 1994 13:389-404.
- Stedman's Medical Dictionary 27th ed. 2000. Lippincott Williams & Wilkins.
- Swift SN, Baek K, Swift JM, Bloomfield SA. Restriction of dietary energy intake has

a greater impact on bone integrity than does restriction of calcium in exercising female rats. *J Nutr.* 2012 142:1038-1045.

Sundgot-Borgen J, Torstveit MK., Prevalence of eating disorders in elite athletes is higher than in the general population. *Clin J Sport Med.* 2004 14:25-32.

Talbott SM, Cifuentes M, Dunn MG, Shapses SA. *J Nutr.* 2001 131:2382-2387. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats.

Vaughn HT, Nitsch W. Iliac anterior rotation hypermobility in a female collegiate tennis player. *Phys Ther.* 2008 12:1578-1590.

Warren MP., The effects of exercise on pubertal progression and reproductive function in girls. *J Clin Endocrinol Metab.* 1980 51:1150-1157.

Warren MP, Brooks-Gunn J, Fox RP, Lancelot C, Newman D, Hamilton WG., Lack of bone accretion and amenorrhea: evidence for a relative osteopenia in weight-bearing bones. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991 72:847-53.

Williams NI, Caston-Balderrama AL, Helmreich DL, Parfitt DB, Nosbisch C, Cameron JL. Longitudinal changes in reproductive hormones and menstrual cyclicity in cynomolgus monkeys during strenuous exercise training: abrupt transition to exercise-induced amenorrhea. *Endocrinology.* 2001 142:2381-2389.

Williams NI, Helmreich DL, Parfitt DB, Caston-Balderrama A, Cameron JL. Evidence for a causal role of low energy availability in the induction of menstrual cycle disturbances during strenuous exercise training. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 86:5184-5193.

Wu J, Oka J, Tabata I, Higuchi M, Toda T, Fuku N, Ezaki J, Sugiyama F, Uchiyama S, Yamada K, Ishimi Y. Effects of isoflavone and exercise on BMD and fat mass in postmenopausal Japanese women: a 1-year randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2006 21:780-789.

Yamaguchi M, Weitzmann MN., The estrogen 17beta-estradiol and phytoestrogen genistein mediate differential effects on osteoblastic NF-kappaB activity. *Int J Mol Med.* 2009

23:297-301.

Yamaguchi M, Gao YH. Anabolic effect of genistein and genistin on bone metabolism in the femoral-metaphyseal tissues of elderly rats: the genistein effect is enhanced by zinc. *Mol Cell Biochem.* 1998 178(1-2):377-382.

Yeager KK, Agostini R, Nattiv A, Drinkwater B. The female athlete triad: disordered eating, amenorrhea, osteoporosis. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 25:775-777.

Yoshimura N, Muraki S, Oka H, Kawaguchi H, Nakamura K, Akune T. Cohort profile: research on Osteoarthritis/Osteoporosis Against Disability study. *Int J Epidemiol.* 2010 39:988-995.

Zanker CL. Bone metabolism in exercise associated amenorrhoea: the importance of nutrition. *Br J Sports Med.* 1999 33:228-229.

Turner RT, Iwaniec UT. Moderate weight gain does not influence bone metabolism in skeletally mature female rats. *Bone.* 2010 47:631-635.

Talbott SM, Cifuentes M, Dunn MG, Shapses SA. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged female rats. *J Nutr.* 2001 131:2382-2387.

Whent M, Lv J, Luthria DL, Kenworthy W, Yu LL. Isoflavone composition and antioxidant capacity of modified-lipoxygenase soybeans grown in Maryland. *J Agric Food Chem.* 2011 28;59(24):12902-9. Epub 2011 Nov 28.

Rassi CM, Lieberherr M, Chaumaz G, Pointillart A, Cournot G. Down-regulation of osteoclast differentiation by daidzein via caspase 3. *J Bone Miner Res.* 2002 17:630-638.

Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK. Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model. *Phytother Res.* 2010 24:S168-74. 1998 8:274-281.

Somjen D, Katzburg S, Kohen F, Gayer B, Livne E. Daidzein but not other phytoestrogens preserves bone architecture in ovariectomized female rats in vivo. *J Cell Biochem.* 2008 Apr 15;103(6):1826-32.

Vollman RF. The menstrual cycle. *Major Probl Obstet Gynecol.* 1977;7:1-193.

謝辞

本研究を論文の作成にあたり、早稲田大学スポーツ科学学院の樋口満教授、(独)国立健康・栄養研究所 石見佳子、食品保健機能研究部部長に真摯なるご指導を賜りましたことを深く感謝の意を申し上げます。また、終始温かいご指導、御助言を賜りました早稲田大学スポーツ科学学院 曹振波助教に深く感謝いたします。また、骨形態計測では真摯なるご指導を賜りました、東京大学大学院医学系研究科の秋本崇之講師に深く感謝いたします。

最後に本研究の糧となるすべての実験動物に哀愍の意を表します。