

①

細胞間物質の老化による代謝変動
に及ぼす運動の影響

平成6年度
小山健藏

目 次

第1章 緒 論	3
第2章 加齢に伴う細胞間物質の変動	10
2-1. 組織における細胞間物質の量的変化	12
2-1-1. 目的	
2-1-2. 研究方法	
2-1-3. 結果	
2-1-4. 考察	
2-2. 組織コラーゲンの成熟過程	29
2-2-1. 目的	
2-2-2. 研究方法	
2-2-3. 結果	
2-2-4. 考察	
2-3. ヒト血清コラーゲン量	40
2-3-1. 目的	
2-3-2. 研究方法	
2-3-3. 結果	
2-3-4. 考察	
2-4. 結語	47
第3章 細胞間物質に及ぼす運動の影響	51
3-1. 組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響	54
3-1-1. 目的	
3-1-2. 研究方法	
3-1-3. 結果	
3-1-4. 考察	
3-2. 組織の弾性に及ぼす運動の効果	72
3-2-1. 目的	
3-2-2. 研究方法	
3-2-3. 結果	
3-2-4. 考察	

3-3.	運動に伴うヒト血清コラーゲン量	86
3-3-1.	目的	
3-3-2.	研究方法	
3-3-3.	結果	
3-3-4.	考察	
3-4.	結語	95
第4章	総括	100
第5章	文献	111
5-1.	本論文に直接関係のある研究論文	111
5-2.	参考論文	112

第1章 緒論

生体は、基本的構成単位である細胞の集合体であり、生命維持に必要な機能を営んでいる。生体は単に実質細胞のみで構成されているのではなく、個々の細胞は、複雑な細胞機能に適応した細胞固有の環境のもとに存在しており、組織・器官および器官系を連結・支持している結合組織が常に介在している。結合組織は、固有の結合組織細胞と細胞間物質から構成されており、細胞間物質が存在するスペースは、細胞外マトリックスと呼ばれている。

細胞間物質は、線維性のタンパク質や多糖類といった巨大分子である。細胞外マトリックスを形成する巨大分子は、特殊な細胞、特にマトリックスに広く分布する線維芽細胞から分泌される。細胞外マトリックスを構成する細胞外巨大分子としては、コラーゲンと多糖類グルコサミノグリカンがある。多糖類グルコサミノグリカンは、通常タンパク質と共有結合してプロテオグリカンを形成している。グルコサミノグリカンとプロテオグリカンは、高度に水和したゲル様の基底物質を形成し、そこにコラーゲン線維を埋め込んでいる。長いコラーゲン線維がマトリックスを強固にしてその形態を保ち、一方多糖類ゲルの水相が血液と組織細胞間での栄養分、代謝産物ホルモンの拡散を可能にしている。多くの場合、線維性のタンパク質であるエラスチンが存在しており、マトリックスに弾性を与えている

(Hay, 1981; Hay, 1982)。

組織内の細胞は、すべて複雑な細胞外マトリックスと接触している。細胞外マトリックスに存在する線維性のタンパク質としては、主として細胞を連結する支持体となるコラーゲンと弾性作用を司るエラスチンとにより構成されている。コラーゲンは、生体を構成する全タンパク質の約1/3を占める最も多い構造タンパク質である。コラーゲンは、現在まで、約13種類の異なったタイプが同定されている (Bailey 及び Peach, 1968; Bentzら, 1978; Bachingerら, 1980; Kuhn 及び Glanville, 1980; Mayne 及び Burgeson, 1987; Dixit, 1990)。

コラーゲンの構造は、図1に示す如くである。コラーゲン分子は、約1,050のアミノ酸のポリペプチド鎖 (α 鎖) 3本が中央部で右巻のラセン状にからまって出来ている。コラーゲンの分子量は約30万、直径1.5 nm、長さ約300 nmの棒状蛋白である。コラーゲンは、心臓、肝臓、筋肉など全身のあらゆる臓器に存在しているが、特に、皮膚、骨、腱、血管などの組織に多く、からだ全体あるいは臓器の構築、補強、支持、結合、境界形成といった役目を担っている。一方、エラスチンは、抽出・精製が難しく、その生合成や代謝など詳細なメカニズムについてはまだ不明な点が多いが、グリシン、アラニン、バリン等非極性アミノ酸が全体の90%を占める網状に広がった弾性線維である。エラスチンの構造は、図2に示す如くである。エラスチン分子は、共有結合による架橋を形成しており、エラスチンは伸

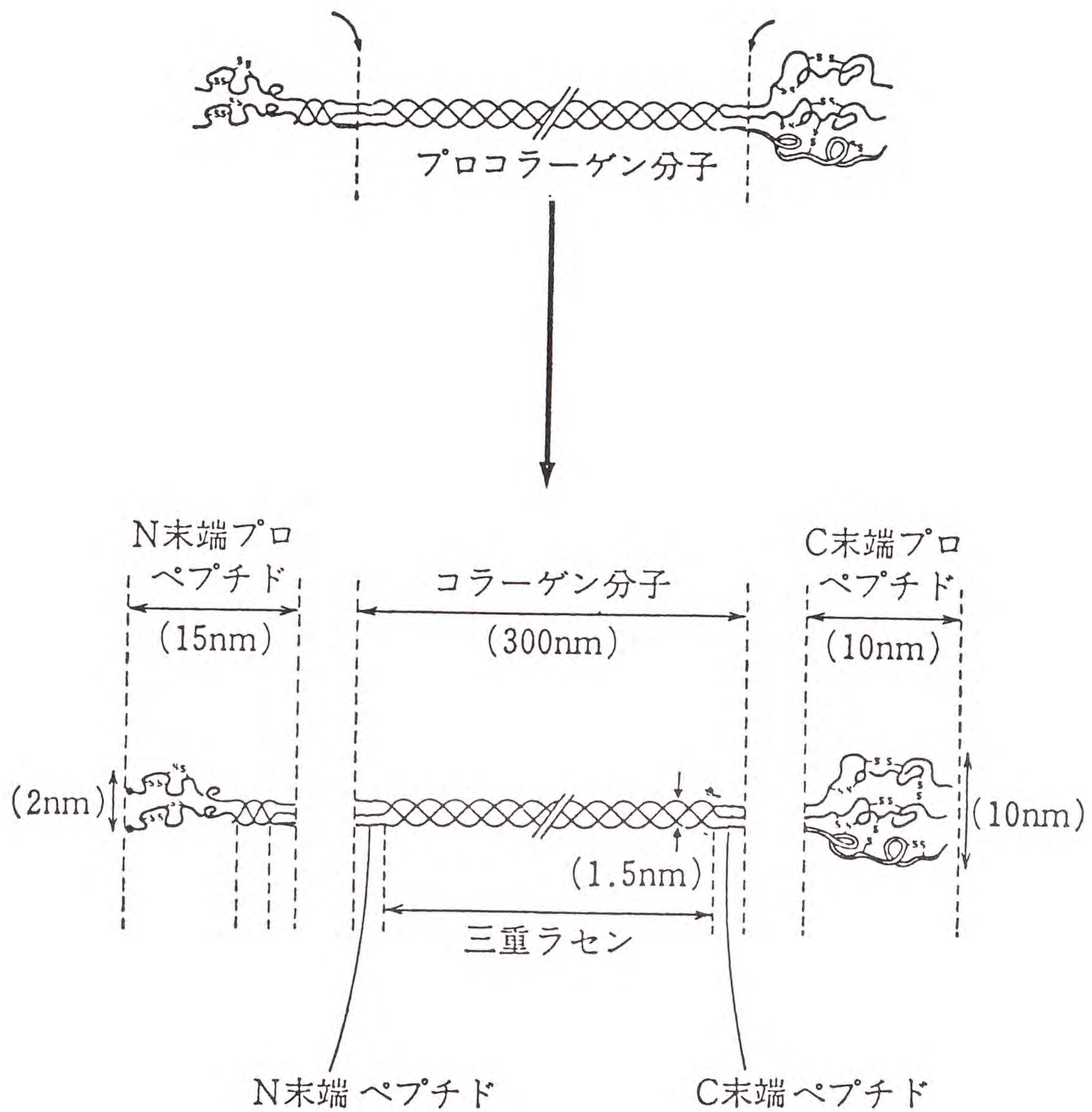


図1 コラーゲンの構造
 (Prockop, D.J.ら; N. Engl. J. Med 301, 13. より, 1979)

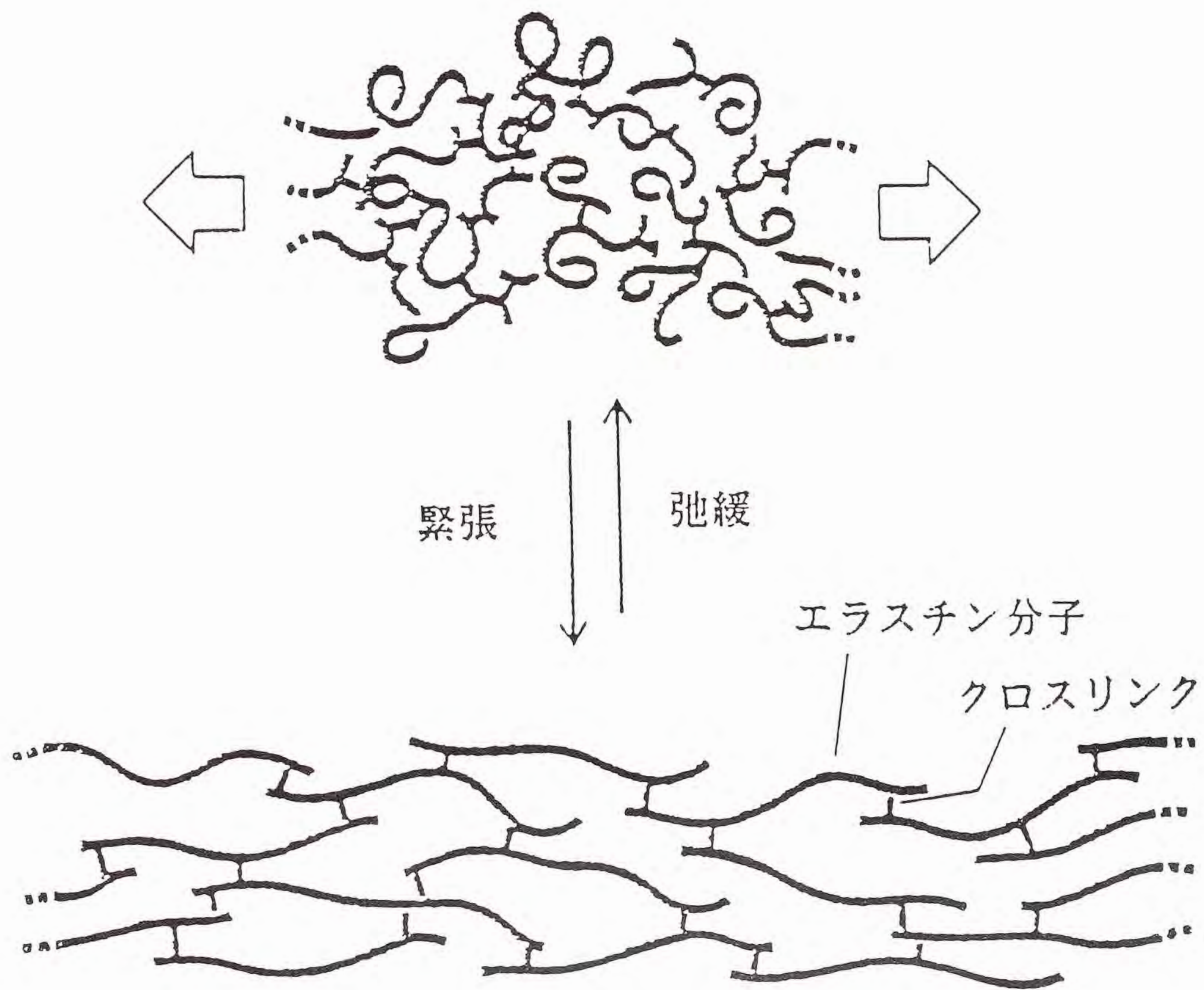


図2 エラスチンの構造
 (中村桂子・松原謙一; 細胞の分子生物学より, 1985)

長したり、巻戻ったりできるようにランダムコイル状を示している。

最近まで、細胞外マトリックスは、それ自体特別な機能を持たない不活性構造物にすぎないと考えられていたが、現在では、物理的、機械的な役割に加えて、生体にとって重要な機能を持つことが明らかにされ、注目されるようになった。細胞間物質は、単に、細胞相互の接着物質としての役割だけでなく、多数の細胞を一定の規則のもとに整然と集める役目を担っている。また、組織には通常二種類以上の性質を異にする細胞があるが、これらの細胞を互いに入り交えて集めるのではなく、同一種の細胞を集めるといった認識機構をも含めた接着を行なっている。さらに、細胞の分化機能の安定化に決定的役割を持つことも報告されている(久保木ら,1986)。細胞間物質の機能は、細胞の分化、移動、増殖など接触している細胞の行動を調節する複雑で重要な役割を果たすことである(Hay, 1981; Hay, 1982)。

ヒトは、加齢に伴う自然の推移として次第に老化が進行し、やがては死に至る。加齢現象が進み、老化がおこると、構造上の変化として、皮膚にしわがより、関節がかたくなり、腰が曲がるなどさまざまな老化現象が現われるが、さらに、機能的にも生理機能の低下がおこる。このような身体の構造と機能におこる老化現象には、細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンとが大きく関与していると考えられる。

文明の進歩により、ヒトのライフスタイルは著しく変化し、現代人における共通の傾向として運動不足が健康障害条件の一つとして認められてい

る。日常生活における運動不足の習慣が続く結果として、肥満や成人病などが増加し、健康維持の条件としての運動の重要性が論議されている。さらに、運動の生理的、生化学的研究が進み、運動やトレーニングが生体に及ぼす影響とそのメカニズムについても次第に明らかにされつつある。

加齢と生体のコラーゲンとの関係についての研究はかなり報告されているが、加齢の進行によるコラーゲンおよびエラスチンといった細胞間物質の推移についての研究は少ない。また運動習慣がヒトの老化にいかなる効果を与えるか、さらにまた、防御機構にどのような影響を及ぼすのか興味ある問題であるが、これらの領域については現在尚不明な点が多く残されている。加齢とともに細胞は確実に老化するが、さらに細胞間物質もまた老化する。老化のプロセスは、いろいろなメカニズムが複雑に関与して進行するが、特に組織・細胞と細胞間物質は、互いに影響しあっているものと考えられる。

本研究は、生体における細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンの代謝に加齢がどのように影響するのか、また、運動が細胞間物質の消長にどのように影響するのか観察し、細胞間物質の老化による代謝変動に及ぼす運動の影響について明らかにすることを目的とした。

本研究においては、1) 加齢に伴う細胞間物質の変動 2) 加齢に伴う組織コラーゲンの成熟過程 3) ヒト血清コラーゲン量と加齢との関係 4) 組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響 5) 組織の弾性に及ぼす運動の効果

6) 運動に伴うヒト血清コラーゲン量についてなどをとりあげて検討した。

第2章 加齢に伴う細胞間物質の変動

ヒトは、40才を過ぎる頃から肉体的・精神的に年をとったということを実感する。個体が発生し、発育・成長の段階を経て成熟を遂げた後は、加齢とともに次第に老化が進行するが、成熟過程に引き続いて起こる衰退の過程を aging という。老化の究極像は個体の死であり、aging は、直接死につながる生物学的現象であるといえる。aging の訳語として加齢という語が用いられるようになったが、その意味するところは、物理的な時間の経過とともに生体の老化に何らかの変化を示すことであるが、必ずしも死とは直接結びつかない現象をも含めており、一般に広義に解釈されている。aging の問題は、人間のみならず、地球上に生息する他の生物にも共通にみられる自然現象である。

aging の分子レベルの研究によると、あらかじめ遺伝子には寿命が何らかの形でプログラムされているという見方がある。細胞レベルでの研究では、二倍体細胞が細胞分裂を繰り返している間に、クローン全体が急に死に絶えるという現象が起こること、さらに、組織レベルの研究では、結合組織におけるコラーゲン生成が aging と深く関与していることなど、個体の組織・細胞の aging による変化に関心が持たれている。

暦のうえの年齢すなわち暦年齢に対して、個体の老化の進行状態からの年齢を生物学的年齢といい、細胞間物質の割合が、生物学的年齢を表す指

標になる可能性のあることが古くから指摘されている (Sobel 及び Marmorston, 1958; Casarett, 1964)。

細胞は、生体内で単独で存在するのではなく、同種細胞や異種細胞と共存しており、組織・器官を構成し、さらに個体を形成している。細胞間、組織間、器官間には種々の因子が介在して、互いに影響を与えあっている。結合組織は、進化した高等動物になるほど良く発達し、全身のあらゆる細胞をとりまく環境を形成している主要組織であるが、コラーゲンやエラスチンといった細胞間物質に富むことが特徴であり、また、加齢に伴う変化が現われやすい組織である。

本研究では、細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンの組織レベルでの加齢に伴う量的変化、コラーゲンの成熟過程、さらに、ヒトにおける血清コラーゲン量の変化から、加齢に伴う細胞間物質の変動について検討した。

2-1. 組織における細胞間物質の量的変化

2-1-1. 目的

細胞外マトリックスとその中に見い出されるマクロファージ、線維芽細胞、マスト細胞などを合わせて結合組織と呼ばれている。結合組織の量は、器官によって大きく変動し、皮膚や骨などではほとんどが結合組織から成るが、脳や脊髄には少量しか存在しない。

結合組織成分である細胞間物質は、細胞で合成され、細胞外に分泌される高分子物質の複雑な集合体である。線維成分のコラーゲンとエラスチンは、組織により量的に分布が異なり、組織の硬さや弾性に強い影響を与えている。コラーゲンは、量的に最も多い細胞外マトリックスタンパク質で、現在までに、タイプの異なるコラーゲンが約 13 種類同定されている (Bailey 及び Peach, 1968; Bentz ら, 1978; Bachinger ら, 1980; Kuhn 及び Glanville, 1980; Mayne 及び Burgeson, 1987; Dixit, 1990)。コラーゲンのタイプには、量的に多い線維型コラーゲン (I, II, III, V, XI)、基底膜コラーゲン (IV)、軟骨コラーゲン (II, IX, X, XI) などがある。一方、エラスチンの生合成や代謝については、現在でも、それらの詳細なメカニズムが明らかにされていない。

先行の研究は、動物のいろいろな器官を用いてコラーゲン量を測定しており、コラーゲン量が、身体の成長とともに増加することを報告している (Sobel ら, 1958; Sjoerdsma ら, 1965; Tomanex ら, 1979; Kovanen ら, 1987)。

Heikkinen (1969) は、コラーゲン量は成長に伴い増加するが、成長停止後コラーゲン代謝は遅延すると報告している。Chavapilら (1966) や Tomanexら (1979) は、心臓のコラーゲン量は加齢とともに増加することを認めているが、Lowry ら (1942)、Knorring ら (1970) は、心臓のコラーゲン量は加齢により変化しないと報告しており、組織の種類によっては一定の傾向が認められていない。これら従来の報告は、研究対象の動物の年齢が成熟期までの発育期であり、老齢期に至るまでの推移を観察しているものは少ないといえる。一方、加齢に伴うエラスチンの量的変化については、未だ明確な結論がでておらず、加齢による変化については、未知であるといつてよい。

本研究は、細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンとが、各々加齢に伴って実験動物の組織でどのように推移するのか明らかにし、コラーゲンとエラスチンとの関係について検討したものである。

2-1-2. 研究方法

実験対象は、dd系雄マウス 208 匹で、生後 3 週齢から飼育した。一つのケージ (幅 17.5 cm, 長さ 24.5 cm, 高さ 12.5 cm) に、マウスを 5 匹ずつ入れ、餌 (オリエンタル酵母 (株) MF 型飼料) と水は自由摂取とした。飼育室の温度は、 23 ± 1 °C に維持し、12 時間の明暗サイクルで光を制御した。

マウスは、エーテル麻酔下で心臓穿刺により採血屠殺後、組織を採取した。対象組織としては、皮膚、アキレス腱と心臓を用いた。皮膚は、剃毛の後、尾に近い右背部から、直径 1 cm のサークルあるいは、100 mg の重さに切り取った。腱は、右後肢より摘出した。心臓は、摘出後、血液を除去するために、冷却した生理的食塩水の中で洗浄し、血管をできるだけ除去したのちに、心臓全体をサンプルとした。

皮膚のコラーゲン量は、実施した時期、測定方法を異にするが、発育期から成熟期に相当する 4 週齢から 15 週齢まで毎週 5 匹ずつ、計 75 匹用い、Woessner 法 (1961) で測定した。また、成熟期以降の 14-18 週齢、27-34 週齢および 63-70 週齢で計 46 匹用い Neuman 及び Logan 法 (1950) で測定した。さらに、コラーゲン量とエラスチン量の変化およびエラスチン/コラーゲン比を調べるために、発育期から老齢期に至るまでの 4, 8, 12, 16 週齢および 81 週齢で計 27 匹用い、Fischer 及び Llaurodo 法 (1966) で前処理したのち、コラーゲン量とエラスチン量を Woessner 法 (1961) で測定した。

腱のコラーゲン量は、発育期から成熟期に相当する 4 週齢から 12 週齢まで毎週 5 匹ずつ用い、Woessner 法 (1961) で測定した。

心臓では、コラーゲン量とエラスチン量の変化およびエラスチン/コラーゲン比を調べるために、発育期から老齢期に至るまでの 4, 8, 12, 16 週齢および 81 週齢で計 27 匹用い、Fischer 及び Llaurodo 法 (1966) で前処理したのち、コラーゲン量とエラスチン量を Woessner 法 (1961) で測定した。

Neuman 及び Logan 法、Fischer 及び Llaurodo 法と Woessner 法の各々の測定方法は、図 3, 4, 5 に示す如くである。

コラーゲンとエラスチン量は、それらにのみ存在するヒドロキシプロリン濃度を測定することによって決定した。これらの定量法は、酸化、脱炭酸によって生じるピロールを p-ジメチルアミノベンズアルデヒドで発色させる方法である。発色液の吸光度は、分光光度計 (Hitachi Model 100-10) を用い測定した。

2-1-3. 結果

マウスの組織を用いて、加齢に伴うコラーゲンとエラスチンの量的変化について観察した。マウスにおける皮膚 (4—15 週齢) のヒドロキシプロリン量は、表 1 に示した。また、成熟期以降の 14—18, 27—34, 63—70 週齢のマウスの皮膚のヒドロキシプロリン量は、表 2 に示した。

発育期から成熟期までの皮膚におけるヒドロキシプロリン量は、4 週齢で 6.38 ± 0.67 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) であり 6 週齢で 21.96 ± 1.58 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) と 6 週齢まで急激に増加し、7 週齢で 23.41 ± 2.67 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) と最大となり、9 週齢以降 15.5 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) とほぼ一定の値となることを認めた。成熟期以降では、27—34 週齢で若干減少し、63—70 週齢で再び増加する傾向を示した。

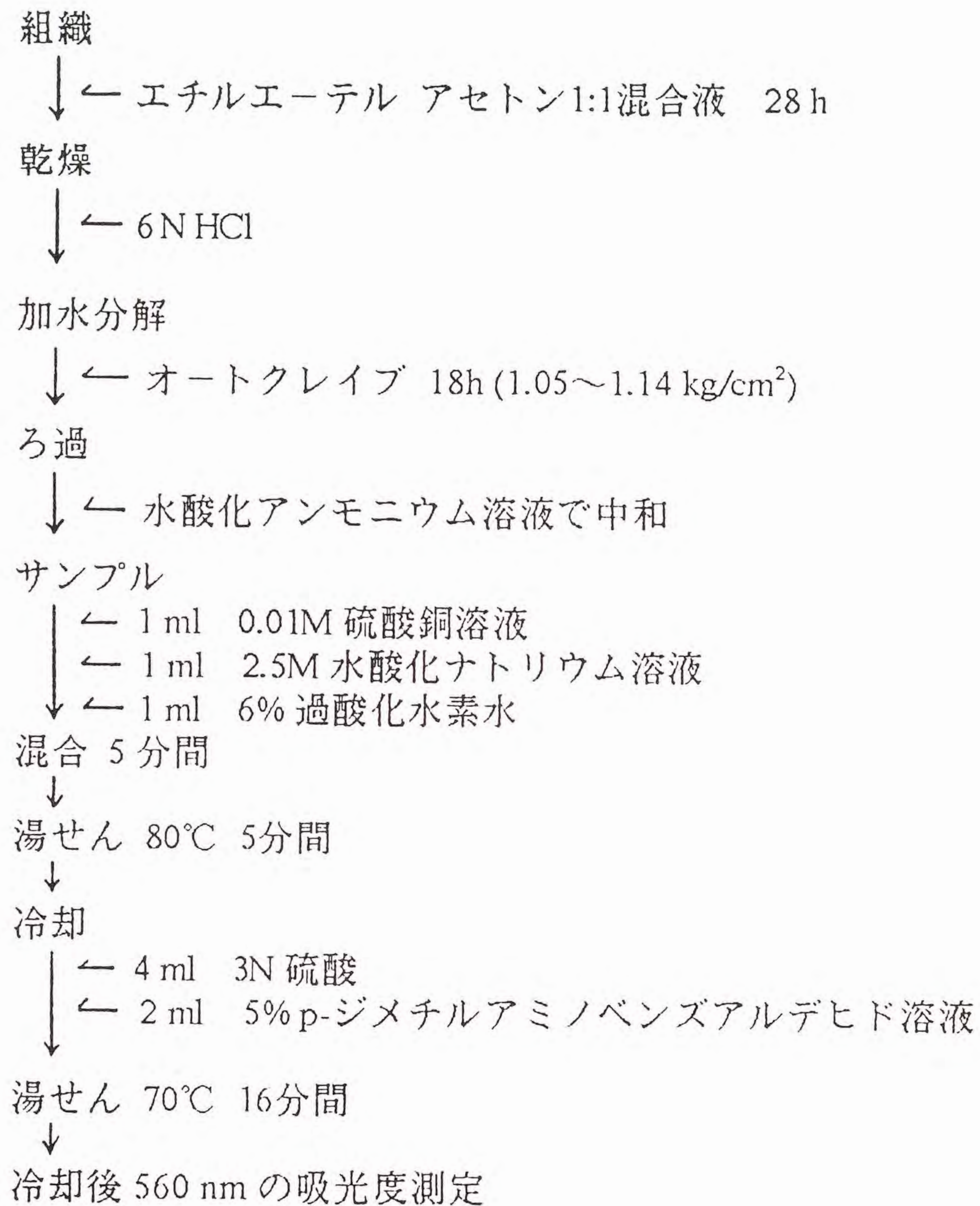


図3 Neuman 及び Logan 法

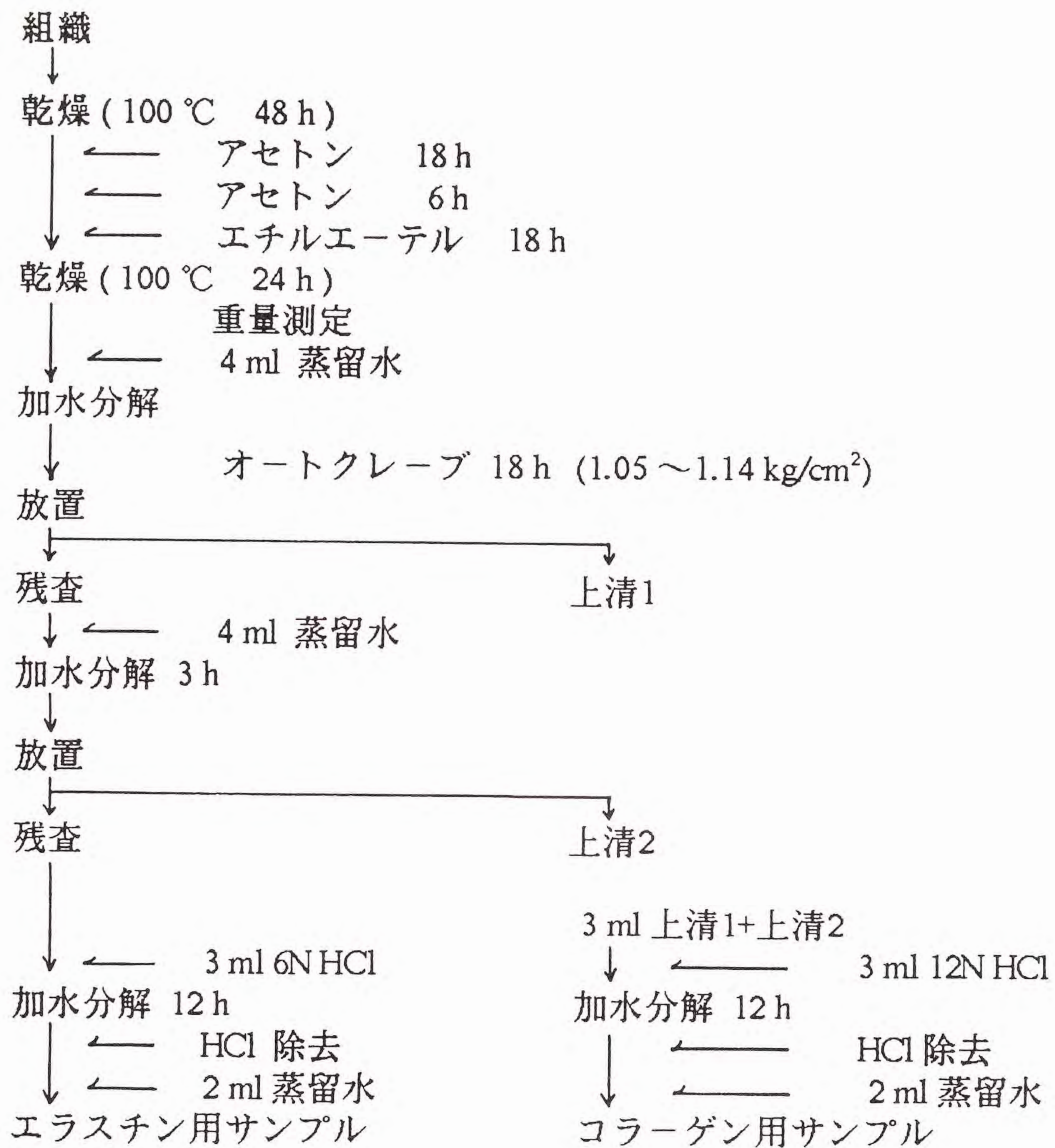


図4 Fischer 及び Llaurodo 法

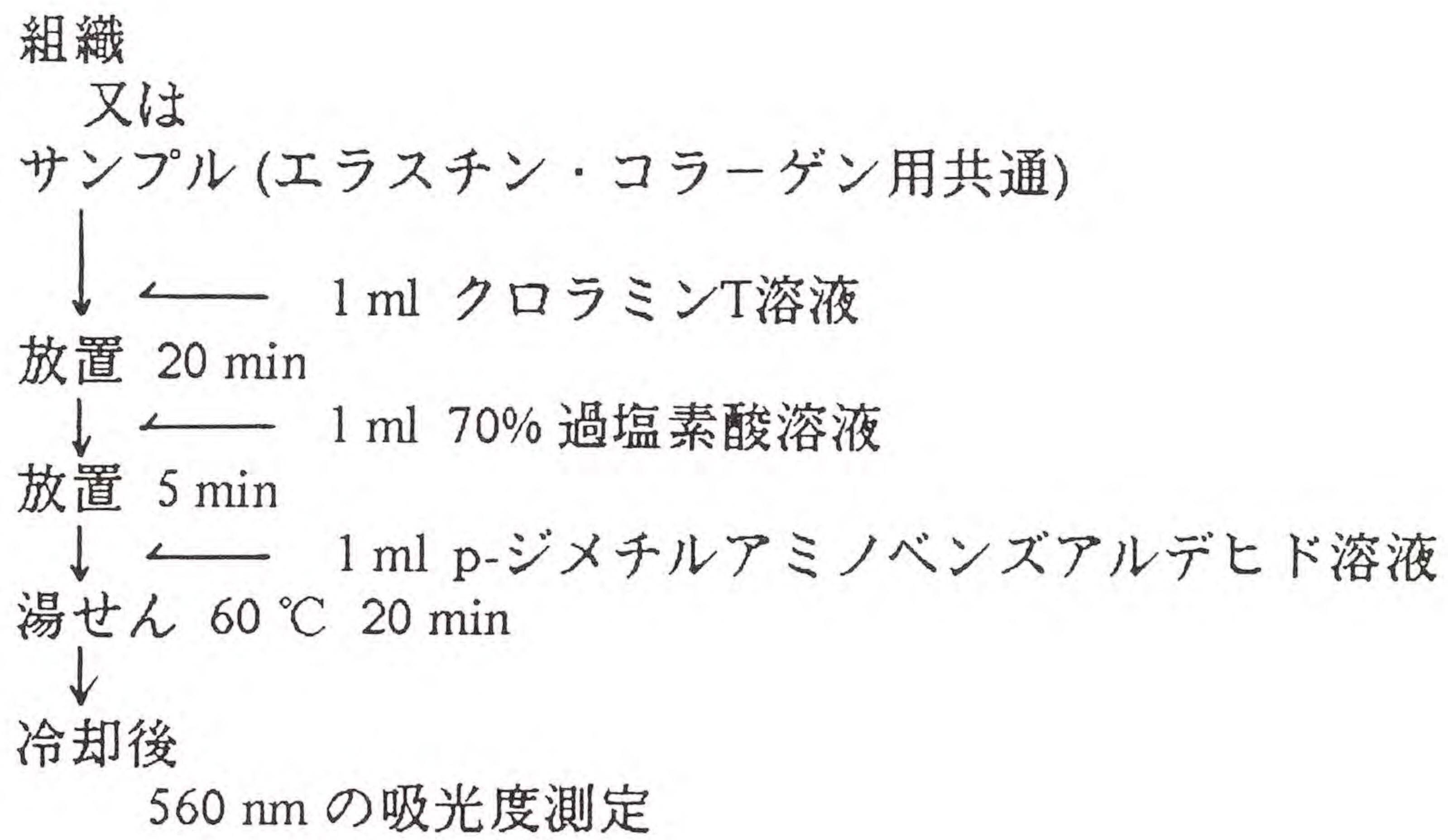


図 5 Woessner 法

表1 マウスにおける皮膚(4-15週齢)とアキレス腱(4-12週齢)の
ヒドロキシプロリン量

週齢	ヒドロキシプロリン量($\mu\text{g}/\text{mg}$ of tissue)	
	皮膚	腱
4	6.38 \pm 0.67	18.25 \pm 4.36
5	13.12 \pm 1.53	21.65 \pm 6.04
6	21.96 \pm 1.58	31.10 \pm 4.56
7	23.41 \pm 2.67	27.16 \pm 4.04
8	22.46 \pm 2.73	44.60 \pm 4.18
9	15.56 \pm 2.80	29.36 \pm 9.40
10	16.88 \pm 2.61	29.14 \pm 6.56
11	15.63 \pm 0.73	32.94 \pm 6.52
12	17.37 \pm 2.44	19.80 \pm 3.48
13	15.91 \pm 2.27	
14	15.94 \pm 3.46	
15	15.78 \pm 0.44	

平均値 \pm 標準偏差

表2 各週齢におけるマウスの皮膚のヒドロキシプロリン量

週齢	n	脱脂した皮膚のヒドロキシプロリン量	
		mg/100mg of wet weight	μg/mg of dry weight
14-18	13	0.84 ± 0.22	27.5 ± 2.8
27-34	13	0.55 ± 0.11	24.9 ± 5.9
63-70	20	0.95 ± 0.02	28.1 ± 1.9

平均値 ± 標準偏差

アキレス腱(4—12週齢)のヒドロキシプロリン量は、表1に示した。腱におけるコラーゲン量は、4週齢で 18.25 ± 4.36 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) であり8週齢で 44.60 ± 4.18 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet tissue) と最大値を示し、その後、漸次減少することを認めた。

表3には、発育期から老齢期に至る4, 8, 12, 16週齢と81週齢での皮膚および心臓におけるコラーゲン量を示した。皮膚におけるコラーゲン量は、4週齢時と8週齢時の比較では、8週齢には4週齢の約3倍に増加するが、16週齢で若干減少し、81週齢で再度増加した。心臓におけるコラーゲン量は、加齢とともに増加し、老齢期に相当する81週齢では、4週齢の約2倍に増加することを認めた。

加齢に伴うコラーゲンの量的な変化については、皮膚と腱のコラーゲン量は、発育期で最大値を示し、成熟期で若干減少し、老化するとともに再度増加する傾向にあることが認められた。心臓のコラーゲン量は、加齢とともに徐々に増加することが認められた。

加齢によるエラスチン量については、発育期から老齢期に至る4, 8, 12, 16週齢と81週齢で測定した。その成績を表4に示した。皮膚のエラスチン量は、週齢が進んでも約 0.7 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue) とほぼ一定の値であった。また、心臓のエラスチン量も約 0.46 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue) と週齢が進んでもほぼ一定の値であった。

皮膚と心臓のエラスチン/コラーゲン比については、表5に示した。皮

表 3 マウスの皮膚と心臓のコラーゲン量 (4,8,12,16 及び81週齢).

週齢	n	コラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue)	
		皮膚	心臓
4	5	21.2 \pm 4.1	2.34 \pm 0.31
8	5	59.1 \pm 7.4	2.64 \pm 0.41
12	5	59.0 \pm 6.9	2.64 \pm 0.38
16	5	42.5 \pm 10.3	3.13 \pm 0.43
81	7	69.0 \pm 17.2	4.95 \pm 0.77

平均値 \pm 標準偏差

表 4 マウスの皮膚と心臓のエラスチン量 (4,8,12,16 及び81週齢).

週齢	n	エラスチン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue)	
		皮膚	心臓
4	5	0.71 ± 0.07	0.47 ± 0.04
8	5	0.72 ± 0.14	0.44 ± 0.04
12	5	0.65 ± 0.07	0.46 ± 0.06
16	5	0.65 ± 0.04	0.51 ± 0.07
81	7	0.93 ± 0.15	0.41 ± 0.09

平均値 \pm 標準偏差

表 5 マウスの各週齢における皮膚および心臓での
エラスチン/コラーゲン比

週齢	n	エラスチン/コラーゲン比 (%)	
		皮膚	心臓
4	5	3.4 ± 0.4	20.2 ± 2.4
8	5	1.3 ± 0.2	17.1 ± 2.7
12	5	1.1 ± 0.2	17.7 ± 2.3
16	5	1.6 ± 0.4	16.5 ± 1.8
81	7	1.4 ± 0.3	8.3 ± 1.5

平均値 ± 標準偏差

膚のエラスチン/コラーゲン比 (% \pm SD) は、4 週齢で 3.4 ± 0.4 であり、8 週齢で 1.3 ± 0.2 と減少し、その後 81 週齢まで約 1.4% と一定であった。心臓のエラスチン/コラーゲン比 (% \pm SD) は、4 週齢で 20.2 ± 2.4 であったが、以後加齢とともに減少する傾向がみられ、8 週齢で 17.1 ± 2.7 と減少し、その後 81 週齢では 8.3 ± 1.5 と著明に減少した。

2-1-4. 考察

従来の研究は、種々の動物のいろいろな器官を用い、発育期におけるコラーゲン量について報告している。Sobel ら (1954) は、ラットの大腿骨を、Elster 及び Lowry (1950) は、モルモットの肝臓、腎臓、肺、骨格筋、心臓などのコラーゲン量について報告している。これらの研究は、いずれも発育期における組織ではコラーゲン量が増加することを明らかにしている。本研究においては、発育期から成熟期までの皮膚及び腱では、コラーゲン量は、4 週齢から 6 週齢まで急激に増加し、7 週齢あるいは 8 週齢の繁殖適齢期に最大値を示し、その後漸次減少することを認めた。Takeda ら (1973, 1975) は、DDD 系雄マウスの皮膚を用いて発育期から成熟期にいたる加齢によるコラーゲン量を測定し、6 週齢まで急激に増加することを認め、12 週齢で最大値を示し、その後漸次減少すると報告しており、著者の成績と同様の結果を示している。しかし、成熟期以降についてコラーゲンの量的

推移を検討した報告はほとんどない。本研究における皮膚組織を用いた検討では、老齡期まで若干減少するものの、ほぼ一定の値を示し、老齡期で再度増加することを認めた。従って、発育期と成熟期あるいはそれ以降の老齡期と、加齢による影響によりコラーゲン代謝に差異が生じる可能性のあることが推測される。加齢によるコラーゲンの量的変化が生じる機序については、不明であるが、Takeda ら (1973, 1975) は、加齢による皮膚コラーゲンの増減には、コラーゲン線維の太さの変化や内分泌の影響によるものと推測している。

心臓のコラーゲン量は、本研究では加齢が進むにつれて増加することを認め、皮膚や腱における量的推移と異なっていた。

コラーゲンは、I から XIII 型に分類されており、皮膚、腱と心臓は、I 型コラーゲンが主で III 型コラーゲンが僅か含まれている。器官は、基本的には上皮系組織と結合組織により構成されているが、この二つの組織は互いに入り交じって存在するのではなく、各々が一つの集団として存在し、両者の間には基底膜と呼ばれる明確な境界膜がある。その基底膜は上皮型、筋肉型と上皮-内皮型の三つの型がある (久保木ら, 1986)。心臓のコラーゲンの量的推移は、I 型, III 型以外に基底膜のコラーゲン量の影響が大きいものと考えられる。加齢による皮膚や腱と心臓のコラーゲン量の推移の違いは、この基底膜の型の違いによるものと推測される。

加齢に伴って進行する現象の一つに体内水分量の明らかな変化がある。

体内水分総量の体重に対する割合は、加齢によって多少減少するが、著しい変化は認められない。しかし、体内水分の分布には著しい変化があり、細胞内水分の減少と細胞外液量の増加とが観察されている。一般的に、細胞1個あたりの水分量は年齢的变化を示さないことが認められていることから、加齢に伴う体内水分の分布の変化は、実質細胞の減少と結合組織成分の増加を反映していると推測されている (Lowry 及び Hastings, 1952; Shock, 1961; Heikkinen, 1973)。

加齢に伴って体内の実質細胞の割合が減少し、結合組織の割合が増加する、また結合組織自体の中でも無定形基質が減少し、線維成分が増加するという一連の変化は、実質細胞への栄養の補給や代謝にとって悪影響を与えると推測される。Casarett (1964) は、線維成分のコラーゲンの蓄積が血液と実質細胞との間における栄養物や代謝老廃物の運搬を妨げになると報告している。さらに、Casarett (1964) は、コラーゲン量が増加することにより実質細胞の栄養不良を招きひいては細胞壊死を引き起こし、ついで細胞欠損の場所を埋めるために組織の線維化が起こるので益々悪循環が助長されるという考えを報告している。本研究の結果において、皮膚組織、腱組織や心臓でコラーゲン量が増加とともに増加することを認め、特に老齢期では、著しくコラーゲン量が増加することを認めた。この現象は、細胞への栄養不良に伴う線維化による可能性を示唆するものかもしれない。

一方、本研究においては、皮膚と心臓のエラスチン量は、4週齢から81

週齢で各々約 $0.7\mu\text{g}$ および約 $0.46\mu\text{g}$ であり、週齢が進んでもほぼ一定の値を示すことが認められた。加齢によってエラスチンが増量するという報告は稀であり、鶴藤 (1967) は、加齢によりエラスチンはむしろ量的に減少傾向がみられると報告している。Lefevre 及び Rucker (1980, 1983) は、血管壁のエラスチンの合成は、生後しばらくするとほぼ成長に見合ったものとなり、以後の新生や再生はほとんどみられないと述べている。つまり、エラスチンの量的変化は、加齢が進んでもほぼ一定の量にとどまるか、あるいはかえって減少することを示唆している。

コラーゲン量とエラスチン量との関係を見ると、弾性線維であるエラスチンは、一般に、中に長い弾力性に乏しいコラーゲン線維が織り込まれており、そのために伸展性が制限されている (Franzblau 及び Fraiss, 1982)。エラスチン/コラーゲン比をみると、本研究では皮膚のエラスチン/コラーゲン比 (%) は、4 週齢で 3.4 で、8 週齢で 1.3 と減少し、その後 81 週齢まで約 1.4 とほぼ一定の値を示した。一方、心臓のエラスチン/コラーゲン比 (%) は、4 週齢で 20.2 で、8 週齢で 17.1 と減少し、その後 81 週齢では 8.3 とさらに減少を示した。これらの成績は、加齢によるコラーゲン量の増加とエラスチン量が不変あるいは減少傾向を示すことに基づくものであり、組織は加齢とともに弾性を失う傾向を示す可能性のあることが示唆された。加齢による細胞間物質の消長については、エラスチン量よりもコラーゲン量が大きく関与しているものと考えられた。

2-2 組織コラーゲンの成熟過程

2-2-1 目的

コラーゲン分泌細胞は、遺伝的に異なるコラーゲン分子を合成するが、それらは合成後に適宜小胞体およびゴルジ体で水酸化や糖結合を受ける。コラーゲン分子は、細胞外部に分泌されてから集合して原線維になり、要求される張力への強度に応じた架橋結合を形成する (Trus 及び Piez, 1980)。分泌細胞は、コラーゲンとともに各種の非コラーゲンマトリックス巨大分子を適当量分泌して、その環境でのコラーゲン原線維の形と性質を決定していると推測されている (Trelstad 及び Hayashi, 1979; Trus 及び Piez, 1980)。

コラーゲンの合成・集合の過程を図6に示した。コラーゲンは、プロコラーゲン、コラーゲン分子、原線維を経てコラーゲン線維となる。コラーゲン線維は、さらにその強度を増すために、コラーゲンの分子内・分子間、あるいは、コラーゲン分子と他の物質の間に架橋結合ができる。この結合によって、コラーゲンはさらに安定化し、酵素による分解も受けにくくなり、また物理的強度も増すと考えられている (久保木ら, 1986)。

結合組織の aging を、その主成分のタンパク質であるコラーゲンの変化としてとらえて研究を進めたのは Verzarら (1956) である。彼らは、ラットの尾の腱のコラーゲンをを用いて、コラーゲン線維の熱収縮の抑制に必要な力が加齢に伴って増加することを見出し、コラーゲン線維の熱収縮力の大きさが、年齢の指標となることを提唱した。また、Kohn 及び Rollerson

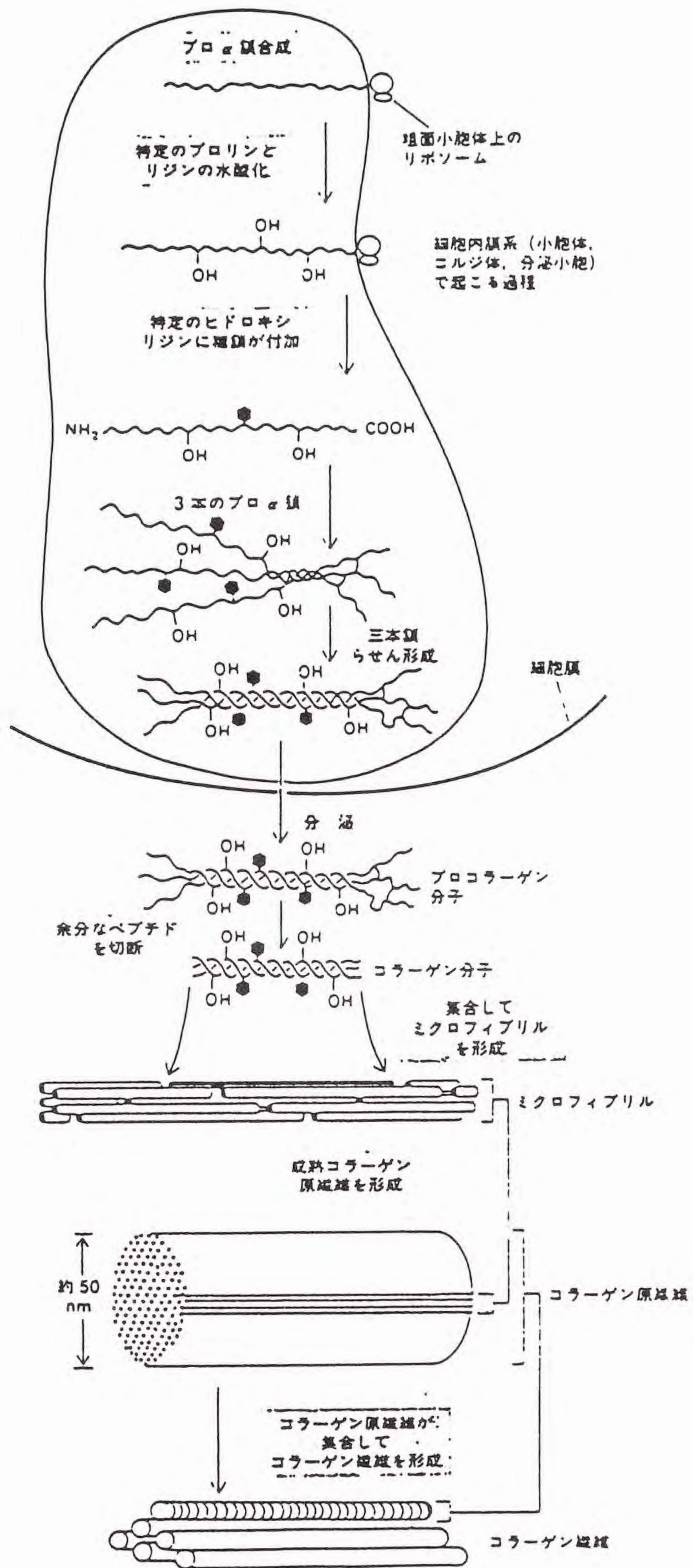


図6 コラーゲン原線維形成過程
(中村桂子・松原謙一; 細胞の分子生物学より, 1985)

(1958) は、ヒトの腱のコラーゲンの線維を酸につけると膨潤するが、この膨潤の程度は、年齢とともに低下すると報告した。これらのデータは、架橋結合形成の増加を示唆する所見である。

一方、Jackson 及び Fessler (1955) は、コラーゲンを冷温における抽出性の相違によりいくつかの分画に分けることができると報告した。それ以来、多少異なるいくつかの方法でコラーゲンを分画に分けることが試みられ、特にプロリンの取り込みから、代謝活性の相違が見い出された。中性塩可溶性、酸可溶性、不溶性分画の順に従って生合成後の時間的経過が長くなると報告されている (Gerberら, 1960)。このことは、分子内および分子間架橋の形成の差によると考えられており、架橋の形成が増すほど塩あるいは酸で可溶化されにくくなることを意味している。

本研究では、中性塩可溶性、酸可溶性、不溶性分画の割合によるコラーゲンの成熟の程度を検討するとともに、これらの加齢による推移を検討することにより、加齢に伴う組織コラーゲンの成熟過程について考察した。

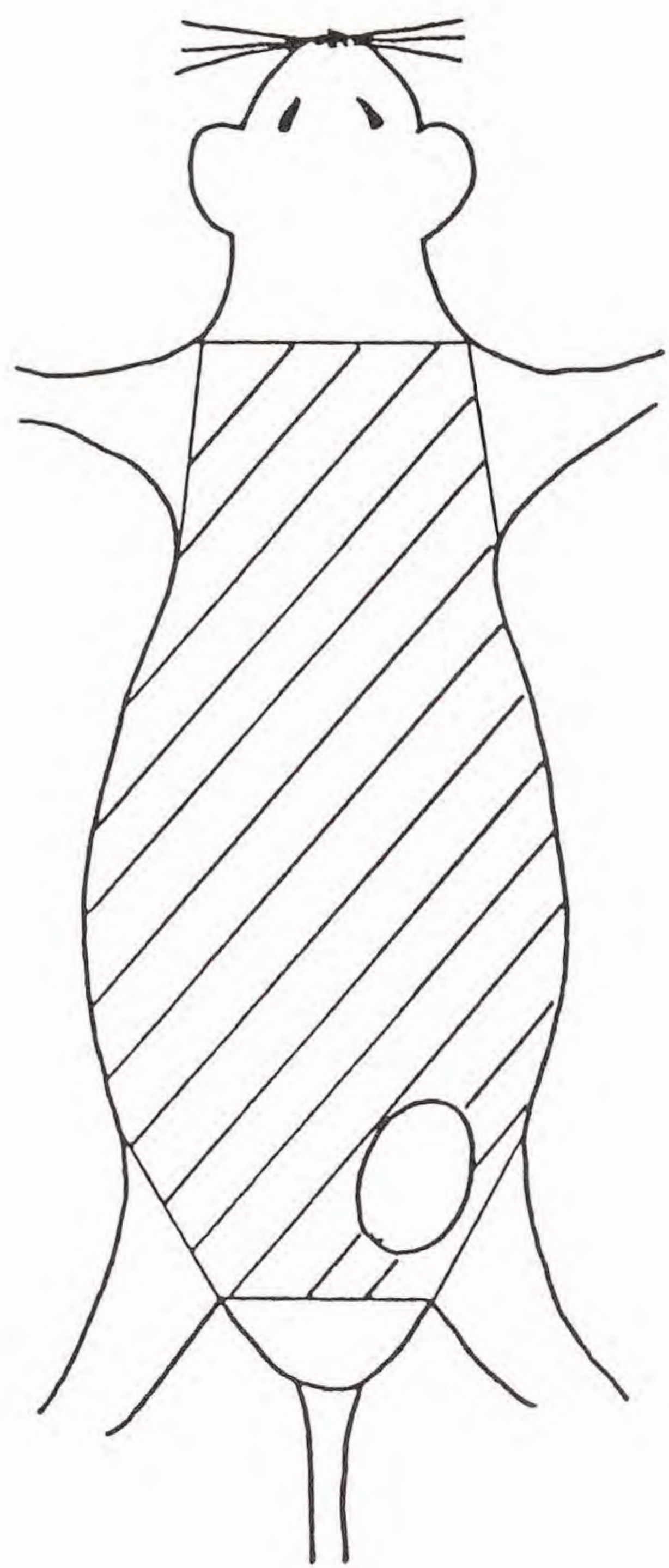
2-2-2. 研究方法

実験動物としては、dd 系雄マウスを 67 匹用い、生後3週齢から飼育した。一つのケージ (幅 17.5 cm, 長さ 24.5 cm, 高さ 12.5 cm) に、マウスを 5 匹ずつ入れて飼育し、餌 (オリエンタル酵母 (株) MF 型飼料) と水は自由摂取と

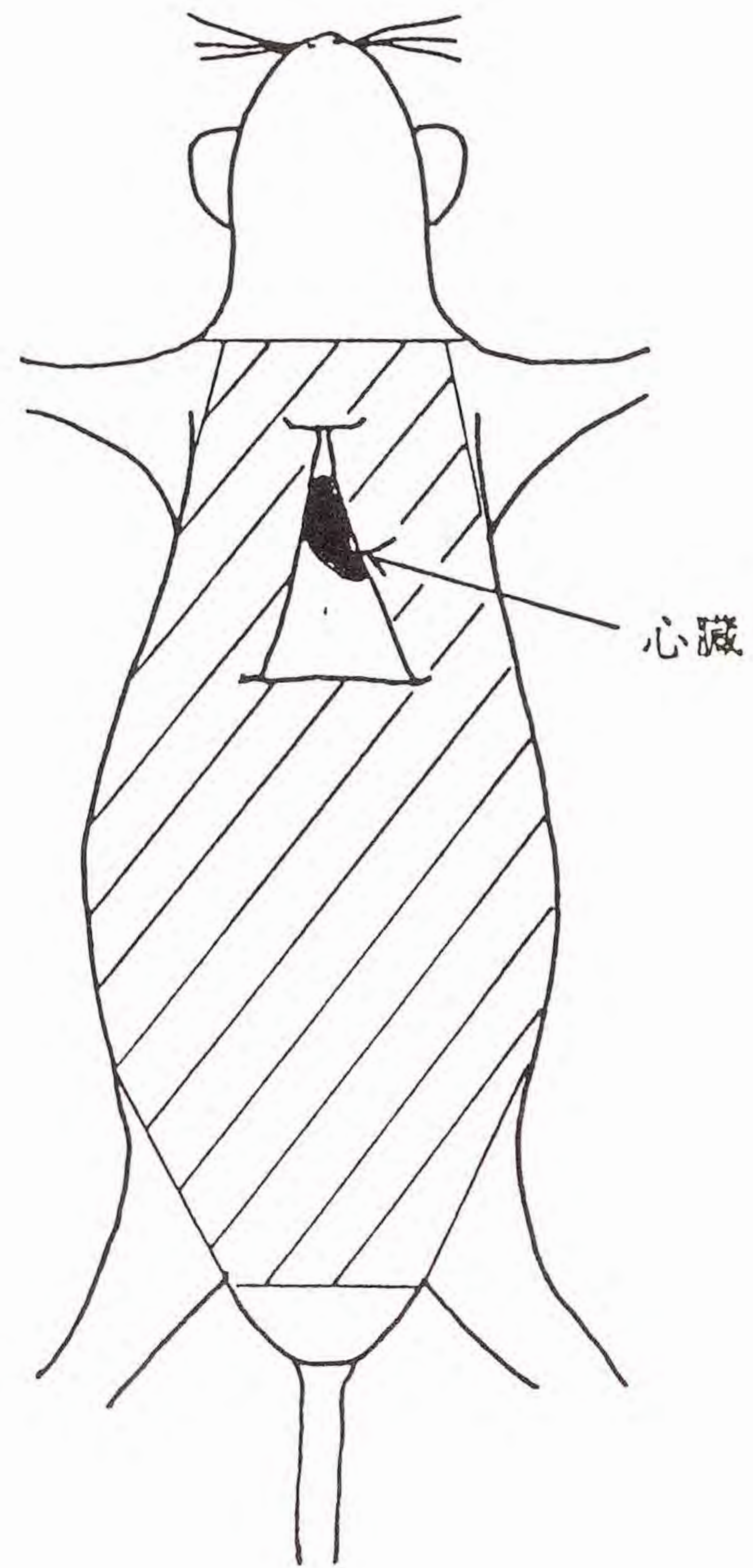
した。飼育室の温度は、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、12時間の明暗サイクルで光を制御した。

マウスは、発育期から成熟期までの5, 7, 9, 11, 13と15週齢、さらに、老齢期に相当する81週齢で実験に供した。マウスは、エーテル麻酔下で心臓穿刺により採血屠殺後、組織を採取した。

実験には、皮膚組織を用いた。皮膚は、剃毛の後、図7に示す如く尾に近い右背部から、直径1 cmのサークルに切り取った残りを用いた。皮膚は、冷却した生理食塩水で直ちに洗浄し、剃刀で皮下組織を注意深く取り除いた。その後、皮膚を細かく切り刻んだ。細かく切った皮膚は、冷水とともに遠沈管に入れ、 $10,000 \times g$ で15分間、予洗のために遠心分離した。残渣をアイスバス中で冷水とともにホモジネートした。遠心分離後、残渣に、20% NaCl/0.05M Tris-HCl (pH 7.5) 緩衝液を入れ、上清に脂質が浮いてこなくなるまで数回遠心分離を行い洗浄した。その残渣を用い図8に示すHeikkinen (1968) 法により、コラーゲン分画を塩と酢酸溶液で抽出、精製した。なお、遠心分離は、すべて $45,000 \times g$ で30分間、 4°C で実施した。これにより、0.45 M NaClで中性塩可溶性コラーゲン (NSC)、0.5 M 酢酸で酸可溶性コラーゲン (ASC) を、塩と酢酸溶液で抽出されなかった残りを不溶性コラーゲン (ISC) とし、各々の分画を得た。



背部



腹部

図 7 マウスの皮膚組織採取部位 (斜線部)

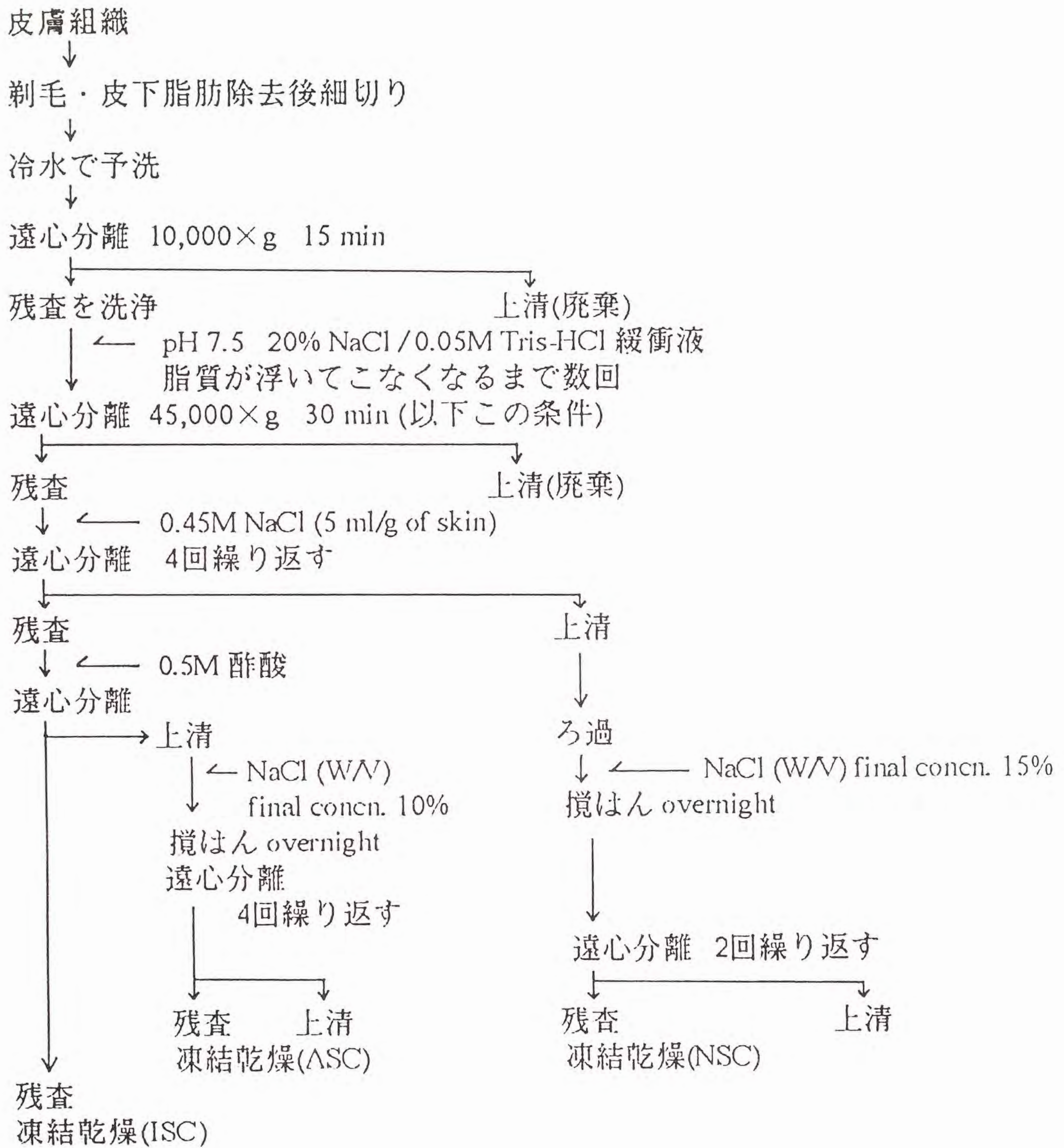


図8 Heikkinen 法

NSC; 中性塩可溶性コラーゲン

ASC; 酸可溶性コラーゲン

ISC; 不溶性コラーゲン

2-2-3. 結果

コラーゲンは、前述のようにその成熟の程度により塩や酸の溶液で可溶化される部分と可溶化されない不溶性の部分とに分けることができる。発育期から成熟期までの5, 7, 9, 11, 13と15週齢、さらに、老齢期に相当する81週齢での皮膚コラーゲン分画の相対比率について検討した結果を表6に示した。

5週齢では、中性塩や酸で可溶化されるコラーゲンの割合(%±SD)は、各々 4.29 ± 0.98 , 51.29 ± 2.05 であり、不溶性コラーゲンの割合は、 44.42 ± 2.60 であった。週齢が進むにつれて不溶性コラーゲンの割合が増える傾向を示した。繁殖適齢期である7週齢では、不溶性コラーゲンの割合は 75.63 ± 4.82 と急激に増え、一方酸可溶性部分が 18.26 ± 5.03 と減少したが、中性塩可溶性部分の割合は、 6.10 ± 1.94 と最大となった。成熟期である15週齢では不溶性部分が 81.92 ± 4.73 となり、一層増加する傾向が認められたが、中性塩可溶性部分と酸可溶性部分の割合は、各々 3.13 ± 1.17 と 14.97 ± 5.89 となり、可溶性部分は、5週齢の約 $1/4$ に減少した。さらに、老齢期に相当する81週齢では、不溶性部分の割合が 89.77 ± 3.76 となりさらに増加したが、中性塩可溶性部分と酸可溶性部分の割合は、各々 3.07 ± 1.60 , 7.16 ± 3.13 になり、可溶性部分は約10%にまで減少した。

加齢に伴う中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲンの推移を要約すると、酸可溶性コラーゲンは、加齢とともに減少し、不溶性コラーゲンの

表 6 5 週齡から 81 週齡までの皮膚コラーゲン分画の相対比率

週齡	n	NSC (%)	ASC (%)	ISC (%)
5	5	4.29 ± 0.98	51.29 ± 2.05	44.42 ± 2.60
7	5	6.10 ± 1.94	18.26 ± 5.03	75.63 ± 4.82
9	5	1.52 ± 0.43	17.02 ± 6.00	81.47 ± 5.56
11	5	2.35 ± 0.31	28.05 ± 4.69	69.59 ± 4.87
13	5	2.25 ± 0.33	18.30 ± 8.62	79.75 ± 9.32
15	5	3.13 ± 1.17	14.97 ± 5.89	81.92 ± 4.73
81	7	3.07 ± 1.60	7.16 ± 3.13	89.77 ± 3.76

平均値 ± 標準偏差

NSC; 中性塩可溶性コラーゲン

ASC; 酸可溶性コラーゲン

ISC; 不溶性コラーゲン

割合は繁殖適齢期までに急激に増加し、その後も徐々に増加し、老齢期で約90%にも達することを認めた。一方中性塩可溶性コラーゲンは、発育期初期にはその割合は多いが、その後発育・成熟とともにほぼ2~3%の割合で推移した。

2-2-4 考察

生体には多くの種類のタンパク質が存在している。しかし架橋結合を示すのはコラーゲンなど限られた高分子タンパク質だけである。コラーゲン線維の機械的な強さは、構成成分のコラーゲン分子そのものが、三本鎖でしっかりと巻かれたヘリックス構造に基づくものであり、さらに、分子間の架橋結合が側方の強さをも保持している。コラーゲンの架橋は、加齢に伴って単純に増加していくという考え方は、架橋物質であるピリジノリンやヒスチジノアラニンの発見によって修正され、成熟と老化に分けて架橋結合を考えるようになってきている。生体の成熟に伴って架橋の過程は、早い時期に出来るアルジミン化合物などによる未熟架橋、ピリジノリンなどによる成熟架橋、非常にゆっくりと形成され生体にとって望ましくないヒスチジノアラニンなどの老化架橋への変化または転換が考えられている(藤本, 1984)。一般に高分子化学では、コラーゲンのような線維状分子に架橋結合が存在すると溶けにくく、丈夫になると考えられている。またコラ

ーゲンの架橋の程度と可溶化の程度とは逆相関を示すと考えられている (藤本,1982)。

コラーゲンは、その成熟の程度により、塩や酸の溶液で可溶化される部分と可溶化されない不溶性の部分とに分けることができる (野田ら, 1975)。Gerber ら (1960) は、発育期の動物の皮膚において、プロリン-U-C¹⁴ でラベルしたコラーゲンの半減期は、中性塩可溶性、酸可溶性および不溶性コラーゲンとで、各々、2、25 と150 日以上であると報告している。藤本 (1990) は、ラットの場合、肝細胞中のタンパク質の半減期は 0.9 日、筋肉のタンパク質の半減期は 10.7 日で、成熟したラットのコラーゲンの半減期は約 300 日と述べている。これらの知見は、コラーゲンは体内に長い間とどまっておき、他のタンパク質に比べて代謝回転が非常に遅いことを意味している。

本研究において得られた加齢に伴う中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲンの推移の結果は、酸可溶性コラーゲンが、加齢とともに減少し、不溶性コラーゲンの割合が繁殖適齢期までに急激に増加し、その後徐々に増加し、老齢期で約 90 %にも達することを認めた。さらに中性塩可溶性コラーゲンは、発育初期にその割合が多く、その後ほぼ 2~3 %の割合で推移することを認めた。これらの現象は、加齢とともにコラーゲンの分子間に架橋結合が形成されることによる結果と考えられる。架橋結合が増加すると、塩や酸で溶けにくくなり、架橋結合のために全体としては重合体のま

まで可溶化されないで残存するものと推測される。コラーゲンは一度形成されるとずっとそのまま存在するのではなく、コラーゲン線維中のコラーゲン分子も古くなったり、また、特に発育の途中では、身体や組織が大きくなり、形が変わるとともに分解されて、新しいコラーゲン分子と交換される(野田ら, 1975; Williams ら, 1978)。

コラーゲンは、その成熟の程度により塩や酸の溶液で可溶化される部分と可溶化されない不溶性の部分とに分かれる。低温でうすい食塩水に可溶化されるコラーゲンは、大部分が一本鎖の α 成分になる。しかし、1モル位の比較的濃い食塩水で抽出したものでは、二本鎖の β 成分が増えてくる。1モルの食塩水による抽出後、残りの組織を 0.5モルの酢酸抽出のような比較的強い条件で可溶化されるものには、 β 成分の割合がさらに多くなり、また γ 成分も溶出してくる。このことは、抽出の条件が、穏やかであるほど、一本鎖、つまり架橋結合が形成されていない鎖が抽出され、逆に条件が強くなると二本鎖、三本鎖あるいは、それ以上に鎖同士が結合したものが抽出される。架橋の程度がさらに大きくなると、通常の抽出条件では可溶化されない不溶性コラーゲンになることが明らかにされている(久保木ら, 1986)。コラーゲンの成熟過程は、中性塩で可溶性化されるコラーゲンが新しく生成されたコラーゲン分子であり、コラーゲン分子は加齢とともに架橋形成が増加し、酸で可溶化されるコラーゲンや不溶性コラーゲンへと移行することが示唆された。

2-3. ヒト血清コラーゲン量

2-3-1 目的

組織コラーゲンの生成・分解に関しては、成長による組織の発育に伴い、コラーゲン線維は当然のことながら太くなる。その際、コラーゲンが生成、集積し、一方で分解・吸収され、形の修正が行なわれていると考えられている(野田ら, 1975; Williams ら 1978)。

コラーゲンの生成において、コラーゲン分子は、細胞外部に分泌されてから集合して原線維になり、原線維は、要求される強度に応じて架橋を形成すると考えられている(Trus 及び Piez 1980)。また、Williams ら(1978)は、細い線維が集合して、側面的な集合をしながら線維が成長していくと報告している。架橋の範囲や型は組織によって異なり、組織内でコラーゲン線維が変化すると考えられている(Trelstard 及び Hayashi, 1979)。

分解については、細胞内リソゾーム中のコラーゲン分解カテプシンと細胞外コラゲナーゼが関与している(Harris 及び Krane, 1974; Sellers 及び Murphy, 1981; Werb, 1989)。コラーゲンの分解には、コラゲナーゼが働き、その後他のコラーゲン分解関連酵素の関与により、コラーゲンは分解され、血液中から尿中へと排泄される。ヒドロキシプロリンは、コラーゲンに特異的に存在する環状イミノ酸であるが、血中のヒドロキシプロリンは、一般に遊離型およびペプチドの形で存在し、組織コラーゲンの分解に由来すると考えられている(堺, 1978)。血清ヒドロキシプロリンは、組織コラーゲ

ンの可溶性部分と不溶性部分のどちらに由来するのかを検討するには、プロリンにラベルしたものを注入し、組織コラーゲンと血清ヒドロキシプロリンを比較しなければならない。ヒトを対象にその検討を実施するのは現段階では困難である。しかしながら、ヒトにおける血清ヒドロキシプロリン量を測定することは、コラーゲンの分解・生成の情報を得る間接的手段として有用であると推測される。

本研究では、ヒトにおいて、加齢がコラーゲン代謝にどのように影響するのかを検討する第一段階として、健常者を対象に、加齢により血清中のヒドロキシプロリン量がどのように変化するか検討した。

2-3-2. 研究方法

健康な 20 才から 74 才までの成人男女 51 名を対象とし、加齢における血清ヒドロキシプロリン量の変化について検討した。

採血は、肘静脈より安静座位で実施した。採取した血液は、まず初めに、自動血球計数装置 (TOA Medical Electronics Co., Ltd.) を用いて、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値とヘモグロビン量を測定した。次に、血液を遠心分離して血清を分離しサンプルとした。

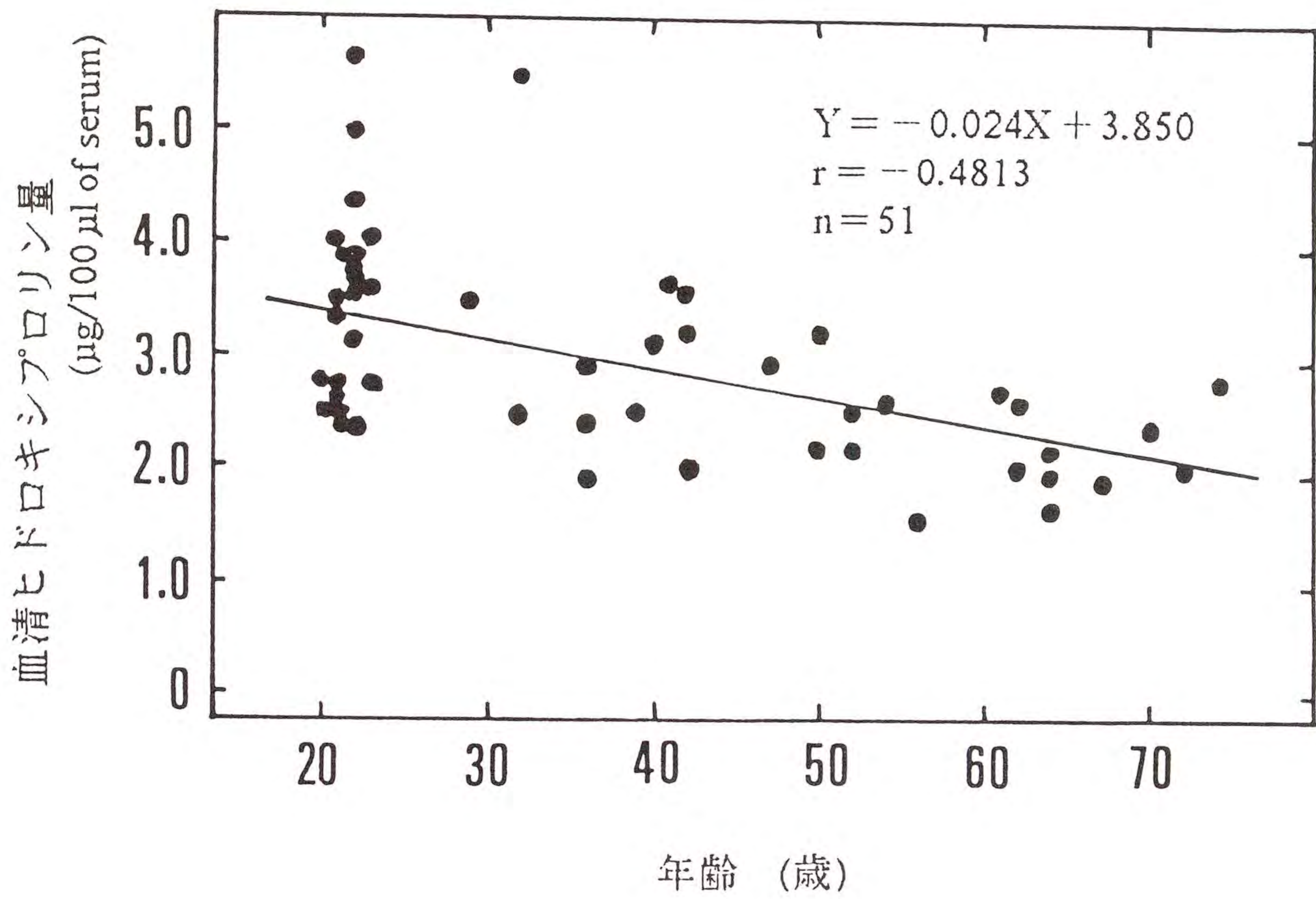
血清ヒドロキシプロリン量を測定するために、密封した試験管に血清を注入し、6N HCl を加え 130 °C で 3 時間加水分解した。水解物は、ロータリ

ーエバポレータを用い塩酸を除去した後、蒸留水 2 ml に置換した。その溶液を、サンプル前処理用フィルター(エキクロディスク Shodex DT)でろ過した。ヒドロキシプロリン量は、Woessner 法(1961)により酸化・脱炭酸によって生じるピロールを p-ジメチルアミノベンズアルデヒドで発色させ、発色させた溶液を、分光光度計(Hitachi Model 100-10)で 560 nm の吸光度より測定した。

2-3-3. 結果

血液諸量については、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値とヘモグロビン量で各々、 450.3 ± 49.1 ($\times 10^4/\text{mm}^3$)、 51.3 ± 8.9 ($\times 10^2/\text{mm}^3$)、 44.1 ± 5.2 (%) と 14.3 ± 2.0 (g/dl) で、いずれも正常範囲内の値を示し、血液学的異常は認められなかった。

標準曲線を求めるために、ヒドロキシプロリンを $0 \mu\text{g}$ から $10 \mu\text{g}$ で準備し、標準曲線は $Y = 0.088X + 0.020$ の式を得た。コラーゲン代謝への影響として、健康な 20 才から 74 才までの成人の血清ヒドロキシプロリン量の加齢による変化について検討し、その結果を図 9 に示した。血清ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of serum) は、20 才で平均約 4.0、60~70 才で平均約 2.0 となり、加齢とともに減少する傾向がみられ、血清ヒドロキシプロリン量と年齢との間には有意な負の相関 ($r = -0.481$, $P < 0.01$) が認められた。



2-3-4. 考察

コラーゲンは、生体を構成する全タンパク質の約1/3を占める最も多い構造タンパク質であり、コラーゲンが分解されると血中から尿中へと排泄される。コラーゲンの分解は、細胞内リソゾーム中のコラーゲン分解カテプシンと細胞外コラゲナーゼが関与している (Harris 及び Krane, 1974; Sellers 及び Marphy, 1981; Werb, 1989)。コラゲナーゼは、はじめ不活性なプロコラゲナーゼとして分泌された後、組織中の蛋白分解酵素により活性型のコラゲナーゼになると報告されている (Werb ら, 1977)。コラゲナーゼはコラーゲン分子をC末端から1/4の部位で切断し、その後コラーゲン分解関連酵素の関与により分解される。一方、コラーゲン分解カテプシンは、生体内の各種の組織に分布しており細胞内のコラーゲンの分解に関与していると報告されている (Burleigh 1974)。

コラーゲンに特異的に存在するアミノ酸であるヒドロキシプロリンは、血中あるいは尿中で遊離型およびペプチドの形で存在し、組織コラーゲンの分解に由来すると考えられている。従って、血中あるいは尿中のヒドロキシプロリンは、コラーゲンの代謝を反映するとみなすことができる。つまり、コラーゲンが分解され血中から尿中へと排泄されることは、代謝的に活性化可溶性コラーゲンの形成が活発になることを意味しているといえる (Smily 及び Ziff, 1964; Prockop 及び Kivirikko, 1967; Hall 及び Jackson, 1970)。

Prockop (1964) は、組織のコラーゲンと尿中のヒドロキシプロリンの比較から、 ^{14}C -プロリン注入後 15 時間の尿中のヒドロキシプロリンは、可溶性コラーゲンに対応していると報告している。さらに、彼は、組織コラーゲンで分解される部分は、可溶性コラーゲンがほとんどであり、不溶性コラーゲンは、1 割以下であると報告している。また成長期にはコラーゲン、特に可溶性コラーゲンの形成が活発となり、尿中へのヒドロキシプロリンの排泄が増加すると報告されている (Prockop, 1964; Zorab, 1969; Yoneyama, 1976)。著者は、本研究においてマウスの皮膚を用いた検討で、加齢とともに可溶性コラーゲンの割合が減少し、81 週齢で不溶性コラーゲンの割合が約 90%にも達することを認めた。加齢に伴うコラーゲン代謝の変化として、本研究では、健康な 20 才から 74 才までの成人の血清ヒドロキシプロリン量の変化について検討した。その結果、血清ヒドロキシプロリン量と年齢との間には有意な負の相関 ($r = -0.481, P < 0.01$) が認められた。加齢とともに血清ヒドロキシプロリン量が減少することは、コラーゲン代謝が遅延することを意味しており、コラーゲンの分解が抑制されることを示唆する成績である。コラーゲンの分解が抑制される機序としては、プロコラゲナーゼ活性の阻害、コラーゲン線維とコラゲナーゼとの結合阻害や血清蛋白である α_2 -マイクログロブリンによるコラゲナーゼ活性の阻害が考えられている (野田ら, 1975; 平山ら, 1984)。加齢の進行とともにこれらが作用して、

コラゲナーゼ活性の抑制を生じさせている可能性が推測された。また、実験動物と同様に、ヒトの組織におけるコラーゲンの変化は、代謝的に活発な可溶性コラーゲンの割合が加齢とともに減少し、コラーゲンの分子内および分子間架橋の形成が加齢とともに亢進し、不溶性コラーゲンの割合が増加していることを示唆するものである。

2-4. 結語

加齢に伴う細胞間物質の変動について検討するために、実験動物として、dd系雄マウスを275匹用い、細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンが、加齢に伴ない組織において量的にどのように変動するのか、また、加齢による中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲン分画の割合の推移について検討し、コラーゲンの成熟過程について考察した。さらに、実験動物の加齢と細胞間物質の量的・質的变化との関係に基づいて、健康な20才から74才までの成人51名を対象に、加齢におけるヒト血清ヒドロキシプロリン量の変化について検討し、次の成績を得た。

(1) 皮膚組織におけるコラーゲンの加齢による量的変化は、発育期から成熟期までについてみると、4週齢から6週齢まで急激に増加し、7週齢あるいは8週齢の繁殖適齢期に最大値を示し、成熟期以降漸次減少することを認めた。老齢期初期にコラーゲン量が再び増加し始め81週齢では4週齢の約3倍に達する傾向を認めた。

(2) 腱におけるコラーゲン量の成熟期までの加齢による変動は、繁殖適齢期である8週齢で最大値を示し、その後、漸次減少する傾向を認めた。

(3) 心臓におけるコラーゲン量は、加齢とともに徐々に増加し、老齢期に相当する81週齢では、4週齢の約2倍に増加することを認めた。

(4) 加齢によるエラスチン量については、皮膚のエラスチン量は、週齢が進んでも約0.7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue とほぼ一定の値であることを

認めた。また、心臓のエラスチン量も約 $0.46 \mu\text{g}/\text{mg}$ of dry defatted tissue と週齢が進んでもほぼ一定の値であることを認めた。

(5) 組織のエラスチン/コラーゲン比については、皮膚のエラスチン/コラーゲン比 ($\% \pm \text{SD}$) は、4週齢で 3.4 ± 0.4 であり、8週齢で 1.3 ± 0.2 と減少し、その後81週齢まで約1.4とほぼ一定の値であった。心臓のエラスチン/コラーゲン比 ($\% \pm \text{SD}$) は、4週齢で 20.2 ± 2.4 であり、8週齢で 17.1 ± 2.7 と減少し、その後81週齢では 8.3 ± 1.5 と減少する傾向を認めた。

(6) コラーゲンの塩や酸の溶液で可溶化される部分と可溶化されない不溶性の部分については、発育期である5週齢では、中性塩や酸で可溶化されるコラーゲンの割合 ($\% \pm \text{SD}$) は、各々 4.29 ± 0.98 , 51.29 ± 2.05 であり、不溶性コラーゲンの割合は、 44.42 ± 2.60 であることを認めた。

(7) 繁殖適齢期である7週齢では、不溶性コラーゲンの割合 ($\% \pm \text{SD}$) が 75.63 ± 4.82 と急激に増え、酸可溶性部分が 18.26 ± 5.03 と減少したが、中性塩可溶性コラーゲンの割合は、 6.10 ± 1.94 と最大となることを認めた。

(8) 成熟期である15週齢では、不溶性部分の割合 ($\% \pm \text{SD}$) が 81.92 ± 4.73 となり、中性塩可溶性部分と酸可溶性部分は、各々 3.13 ± 1.17 , 14.97 ± 5.89 で、可溶性部分は、5週齢の $1/4$ と減少した。さらに、老齢期に相当する81週齢では、不溶性部分の割合 ($\% \pm \text{SD}$) が 89.77 ± 3.76 となり、中性塩可溶性部分と酸可溶性部分の割合は、各々 3.07 ± 1.60 , 7.16 ± 3.13 で可溶性部分が約10%にまで減少することを認めた。

(9) 加齢に伴う中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲンの推移は、酸可溶性コラーゲンは加齢とともに減少し、不溶性コラーゲンの割合は繁殖適齢期までに急激に増加し、繁殖適齢期後徐々に増加し、老齢期で約90%にも達することを認めた。中性塩可溶性コラーゲンは、発育期初期にその割合は多く、その後ほぼ2~3%の範囲で推移した。

(10) 健康な20才から74才までの成人の血清ヒドロキシプロリン量の変化については、血清ヒドロキシプロリン量($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ of serum)は、20才で平均約4.0、60~70才で平均約2.0となり、加齢とともに徐々に減少することを認めた。血清ヒドロキシプロリン量と年齢との間に、有意な負の相関($r=-0.481, P<0.01$)が認められた。

以上の成績より、組織の細胞間物質は、量的にも質的にも、加齢の影響を受けることが認められた。組織コラーゲンの量的・質的变化から、発育期と老齢期でコラーゲンの代謝に差異が生じていることが示唆された。また、コラーゲンとエラスチンの関係では、発育期以降のエラスチン量は、ほぼ一定の値であり、逆にコラーゲン量が増加する傾向が認められ、組織は、加齢とともに弾性を失っている可能性が示唆された。さらに、ヒトにおいて、加齢とともに血清コラーゲン量が減少することは、コラーゲンの分解が抑制されていることが示唆され、代謝的に活性化可溶性コラーゲンの割合が減少することが推測された。また、ヒトの組織においても実験動物の組織同様、コラーゲンは分子内および分子間架橋の形成が促進される

ことによって、不溶性コラーゲンの割合が増加する傾向が示唆された。

第3章 細胞間物質に及ぼす運動の影響

最近、生活の文化的水準の向上や産業の省力化に伴うライフスタイルの変化により、現代人に共通の傾向として運動不足が認められている。

一般に動物の神経系・運動器系は、積極的に使用しない状態を続けると萎縮・退化し、その機能が低下するといわれている。例えば、病気で長期間臥床していると、四肢が細くなり、特に筋肉が萎縮して細くなる。現代人のライフスタイルの変化により、心疾患、糖尿病、骨粗鬆症、肥満など、いわゆる成人病の発生が増加の傾向を示している。これらの疾病症候群の発生要因の一つとして特に運動不足が注目されており、運動不足病 (Hypo-kinetic disease) の概念も提唱されており、健康に対する運動の重要性が問題になっている。Bock (1963) は、60歳後半までトレーニングを続けたマラソンランナーである DeMar の冠状動脈の所見には、ほとんど変性が認められなかったと報告した。また、心臓病患者の再発率や死亡率は運動を日常的に積極的に実施する処方により低下させることができるという知見も報告されている (Paffenbarger, 1975; 1978)。

しかし一方では、運動などにより個体にスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、過酸化水素などの不適當な過剰の活性酸素が増加され、活性酸素によりタンパク質やDNAが障害を受け、細胞の重要な成分が損傷し、その活性が低下するなどの報告もある (大柳, 1990)。また、白血球は身体の

中に侵入してきた細菌を殺すために活性酸素を発生させるが、細菌を殺すとともに周辺の組織・細胞をも損傷させてしまうとの報告もある(藤本, 1990; 大柳, 1990)。

加齢に伴う細胞のタンパク質合成は、細胞内に含まれる遺伝的情報によって影響を受ける。何らかの作用物質の影響でこの情報が変化すると、細胞機能が妨げられ、不活性で非機能的な細胞に変性することになる(大平, 1983)。

架橋結合は、アミノ酸鎖、核酸または他の重合体物質の化学的結合であり、タンパク質や核酸が正常な機能を発揮するためには、一定数の架橋結合が必要である。しかし、架橋結合が多くなりすぎると巨大分子化されたり異常分子を生じるために不活性化され、かえってこれらの高分子の機能が変化することが考えられる。特に、タンパク質は、生物的活動様式が三次元的に変化するために、このような影響を受けやすいことが推測される。第2章で既述したように、加齢とともに不溶性コラーゲンが増加することは、架橋結合形成が多くなりすぎていることを意味し、これが組織老化の要因となっているものと推測される。

生体にとって身体を動かすことは、生命維持のための最も基本的動作である。運動が細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンにどのような影響を与えるのか不明であるが、本研究は細胞間物質の変化をみることにより、組織・細胞への影響を検討するものである。

本研究では、組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響、組織の弾性に及ぼす運動の効果、さらに、運動に伴うヒト血清コラーゲン量などについて検討した。

3-1. 組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響

3-1-1. 目的

細胞は、正常な状態でコラーゲンを少しずつ産生し、細胞外に分泌すると同時に少しずつ分解している。すなわち、コラーゲンは、他のタンパク質に比べるとスピードは遅いけれども、ゆっくりと代謝回転している(藤本, 1990)。コラーゲンは、分子内および分子間架橋結合によって次第に成熟していく。架橋結合が多くなり過ぎると組織・細胞に支障をきたすと考えられている。架橋反応の過程は、単純な反応ではなくて一つの架橋反応が起こるとそれに続いて、より複雑な架橋反応へと進むと報告されている (Tanzer, 1973)。架橋構造の過程は、まず non-helical 部分にあるリジンまたはヒドロキシリジン残基の酸化によりアルデヒド化される。このアルデヒド化されたリジンは、アルドール縮合によって2分子に結合する。さらにアルドール縮合生成物は、ヒスチジンあるいはリジン残基と反応し複雑な架橋生成物を形成する (Bornstein 及び Peiz, 1966; Tanzer ら, 1973; Tanzer ら, 1976; 藤本, 1984)。コラーゲンは、分子内および分子間架橋結合の差によって成熟の程度が把握できると考えられている。その成熟の程度によりコラーゲンは、可溶性分画と不溶性分画に分けることができ、老化したコラーゲンは不溶性コラーゲンと考えられている (野田, 1975)。

加齢とともに、コラーゲンが老化していく、またそれにしたがって細胞も老化する。細胞老化については、いろいろなメカニズムが考えられている

が、いずれの要因が関与するにしても、細胞が老化し、その活性が低下してくると、コラーゲンの代謝回転もまた低下する。その結果、細胞の構造物としてのコラーゲンはその特性が劣化していき、細胞の活性はますます低下するものと考えられる。

トレーニングが結合組織に及ぼす変化については、多くの報告が認められる。持久性のトレーニングによって、アミノ酸の増加 (Tipton ら, 1970)、接合力の強化 (Adam, 1966; Viidik, 1967; Tipton ら, 1968) や腱のコラーゲン線維の肥大 (中川ら, 1988) が生じることなどが報告されている。運動によるコラーゲンの量的変化については、Heikkinen 及び Vuori (1972) は、マウスのアキレス腱を用いた研究において、運動によりコラーゲン量が増加すると報告している。コラーゲン代謝と運動について検討した報告はほとんどなく、可溶性・不溶性分画の割合についても運動が生体の分子レベルにどのように影響するのか、つまり、運動が架橋結合形成にいかなる変化をもたらすのか不明である。コラーゲンの老化、換言すれば、コラーゲンの代謝回転の低下を運動によって抑制し得るのかどうか興味のある問題であるが、この点に関する研究は全く見当たらない。

本研究では、組織のコラーゲン量が運動によりどのように変化するのか、さらにコラーゲン組成のうち、可溶性・不溶性分画の割合が運動によりどのように推移するのかを検討し、コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響について考察した。

3-1-2. 研究方法

実験動物は、dd系雄マウスを459匹用い、生後3週齢で飼育した。一つのケージ(幅17.5 cm, 長さ24.5 cm, 高さ12.5 cm)に、マウスを5匹ずつ入れ飼育し、餌(オリエンタル酵母(株)MF型飼料)と水は自由摂取とした。飼育室の温度は、 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、12時間の明暗サイクルで光を制御した。

コラーゲンの量的・質的推移について運動強度の違いによる影響を検討するために、対象を軽、中程度、激運動群と非運動群の4群に分けた。運動負荷については、動物用トレッドミル(夏目製作所, KN-73)を用い、生後4週齢より開始した。軽、中程度と激運動群のトレッドミル走は、1週間に5日、それぞれ、6 m/min, 12 m/min および 24 m/min のランニングスピードで15分間午前10時より実施した。Gotoら(1977)は、マウスのランニングスピードとオールアウトタイムとの関係を報告しており、本研究は、運動開始時の生後4週齢時のランニングスピードとオールアウトタイムより運動負荷を決定し、絶対強度として固定負荷法で実施した。

以上のような強度別の運動負荷を実施し、皮膚のコラーゲン量については、dd系雄マウスを4週齢から15週齢まで150匹、腱のコラーゲン量については、マウスを4週齢から12週齢まで165匹用いた。皮膚では4週齢から15週齢まで、非運動群は毎週5匹ずつ、軽、中程度と激運動群は隔週で各々5匹ずつ用い、腱では、4週齢から12週齢まで各群毎週5匹ずつ用い、Woessner法(1961)でコラーゲン量を測定した。また、腱について別のマウ

スを40匹用い、4週齢から7週齢まで強度別に運動負荷を4週間実施し、コラーゲン量を Woessner 法 (1961) で測定した。さらに、皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合については、4週齢から15週齢まで隔週で各々5匹ずつ用い、Heikkinen 法 (1968) で測定した。

老齢期に至るまでの運動の継続が、コラーゲンの量的・質的推移にどのように影響するのかを検討するために、対象を運動群と非運動群の2群に分けた。運動負荷は、動物用トレッドミル (夏目製作所, KN-73) を用い生後4週齢より開始した。運動群のトレッドミル走は、1週間に5日、12 m/min のランニングスピードで15分間、午前10時より実施した。

皮膚のコラーゲン量は、成熟期以降の14-18週齢、27-34週齢と63-70週齢で計92匹用いて、Neuman 及び Logan 法 (1950) で測定した。さらに、マウスを12匹用いて、4週齢から81週齢まで継続的に運動を負荷した対象の皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合について、老齢期である81週齢で、Heikkinen 法 (1968) により測定した。

マウスは、エーテル麻酔下で心臓穿刺により採血屠殺後、組織を採取した。組織は、皮膚とアキレス腱を用いた。皮膚は、剃毛の後、尾に近い右背部から、直径1 cm のサークルあるいは、100 mg の重さに切り取り、コラーゲン量のサンプルとした。さらに、その残りの皮膚は、冷却した生理的食塩水で直ちに洗浄し、皮下脂肪を剃刀で注意深く取り除き、可溶性・不溶性コラーゲンの割合を調べるためのサンプルとした。腱は、右後肢よ

り抽出した。

3-1-3. 結果

マウスを発育期、成熟期と老齢期とに区分してコラーゲン量について観察した。

皮膚のコラーゲン量における運動の影響について検討した。図 10 に 4 週齢から 15 週齢まで、運動強度別に運動を負荷したマウスの皮膚コラーゲン量の変化について示した。皮膚のコラーゲン量は、非運動群では 6 週齢まで急激に増加し、7 週齢で 23.41 ± 2.67 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin \pm SD) と最大値を示した。軽、中程度と激運動群の三つの強度の比較では、9 週齢で各々 22.19 ± 4.51 , 23.45 ± 2.75 と 25.66 ± 5.35 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin \pm SD) で 3 群とも最大となり、非運動群に比べると、ピークのズレを示すとともに、量的にも有意に増加していることを認めた。しかし、軽、中程度、激運動の運動強度別にみた 3 群間には有意の差は認められなかった。

成熟期と老齢期に至るまで、継続的な運動を実施したマウスの皮膚コラーゲン量の変化について検討した成績を図 11 に示した。14-18, 27-34 と 63-70 週齢における皮膚コラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of dry weight \pm SD) は、非運動群では、各々 27.5 ± 2.8 , 24.9 ± 5.9 と 28.1 ± 1.9 であり、運動群では各々、 24.6 ± 3.8 , 17.2 ± 2.8 と 24.8 ± 2.6 であった。4 週齢から 34 週齢までと 70 週齢

ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin)

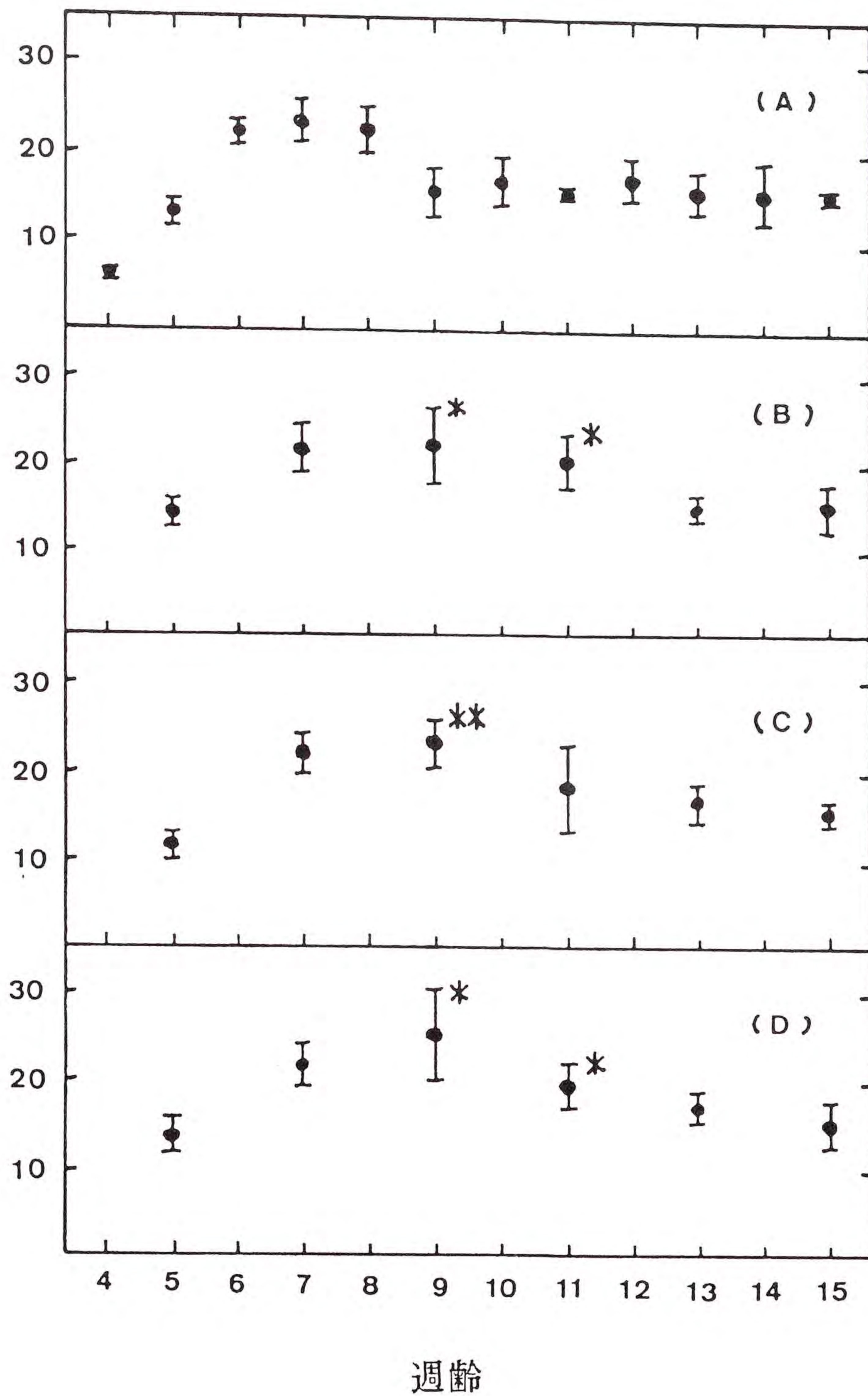


図 10 マウスにおける非運動群 (A) 軽運動群 (B) 中程度運動群 (C) および激運動群 (D) の皮膚のヒドロキシプロリン量
*, **; $P < 0.05$, $P < 0.01$

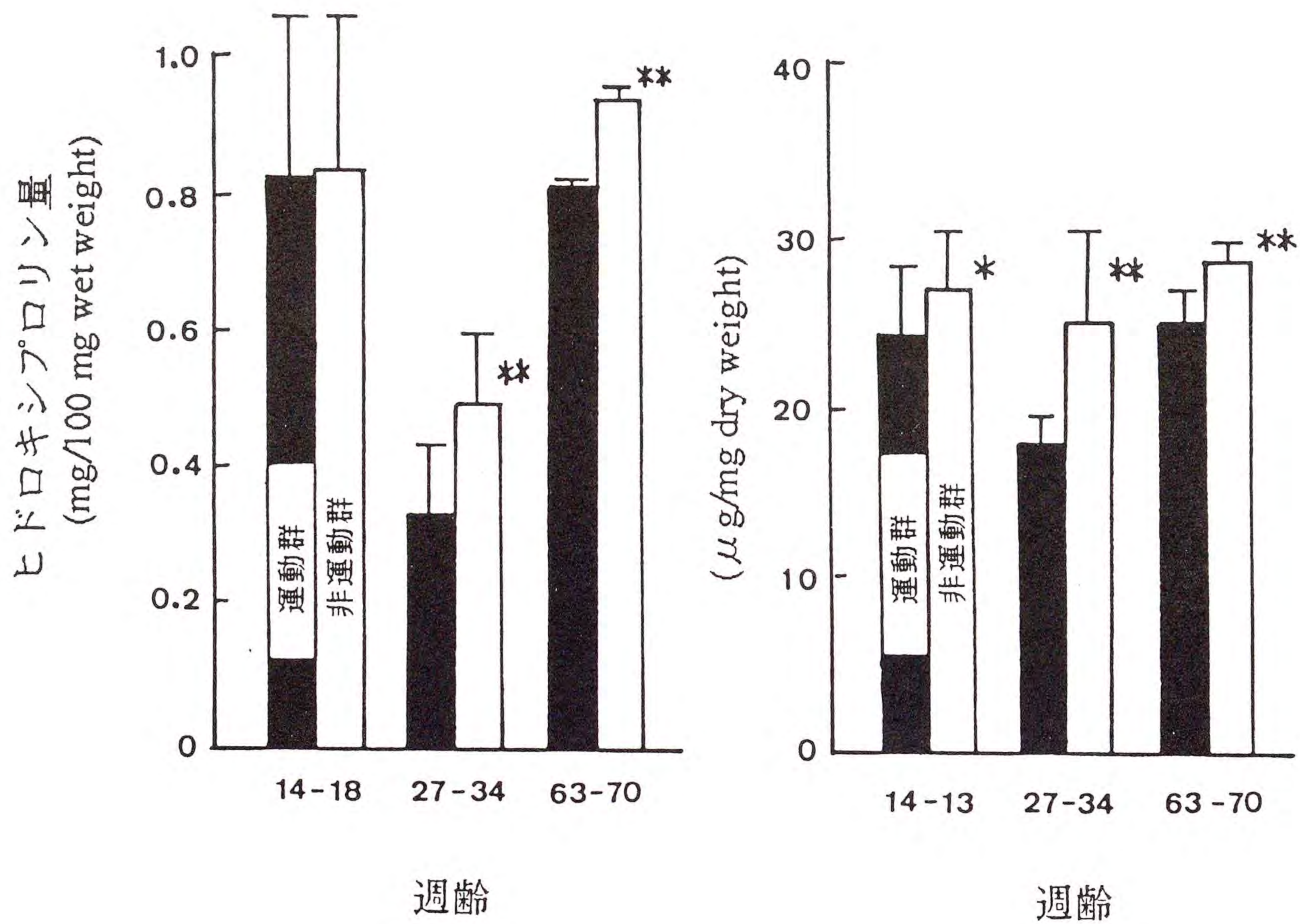


図 11 非運動群と運動群の各週齡における脱脂した皮膚のヒドロキシプロリン量 * , ** ; $P < 0.05$, $P < 0.01$

まで継続的な運動負荷を実施した群では、非運動群に比べるとコラーゲン量が有意に減少することを認めた。コラーゲンの量的変化としては、継続的運動により発育期では増加し、成熟期以降では反対に減少することを認めた。

図 12 は、発育期における運動強度別に負荷を行なった場合の腱のコラーゲン量の変化について示したものである。非運動群では、8 週齢で最大値を示し、 44.60 ± 4.18 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet weight \pm SD) であった。中程度運動群の7週齢および9週齢でのコラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of wet weight \pm SD) は、各々、 48.70 ± 2.92 と 44.36 ± 5.69 であり、非運動群の7週齢と9週齢の量は、各々、 27.16 ± 4.08 と 29.36 ± 9.40 で、中程度運動群のほうが非運動群に比べるとコラーゲン量が有意に多くなっていることを認めた。さらに、7週齢と9週齢で中程度運動群のコラーゲン量は、軽運動群や激運動群に比べ有意に多いことを認めた。

図 13 は、4 週齢から 7 週齢までの 4 週間、運動強度別に負荷を実施した皮膚及び腱のコラーゲン量の変化について示したものである。皮膚のコラーゲン量では有意な差が認められなかったが、腱のコラーゲン量は、中程度運動群では、トレーニング期間が 4 週間で非運動群、軽運動群に比べると有意に減少することを認めた。

成熟期に至る 15 週齢までの運動強度別の皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合についての成績を図 14 に示した。非運動群では、週齢が進むにつ

ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of tendon)

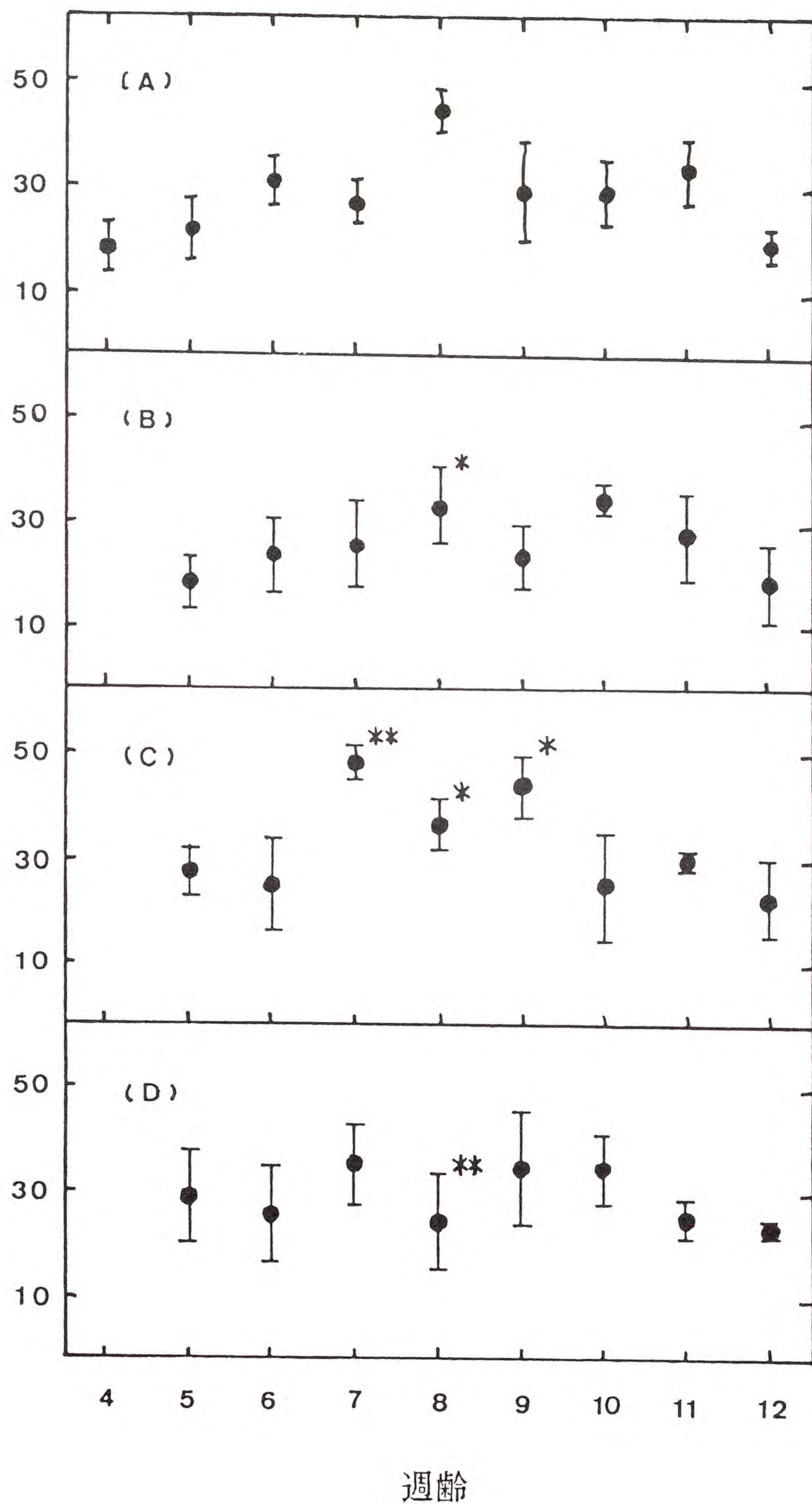


図 12 マウスにおける非運動群 (A) 軽運動群 (B) 中程度運動群 (C) および 激運動群 (D) のアキレス腱のヒドロキシプロリン量

*, **; $P < 0.05$, $P < 0.01$

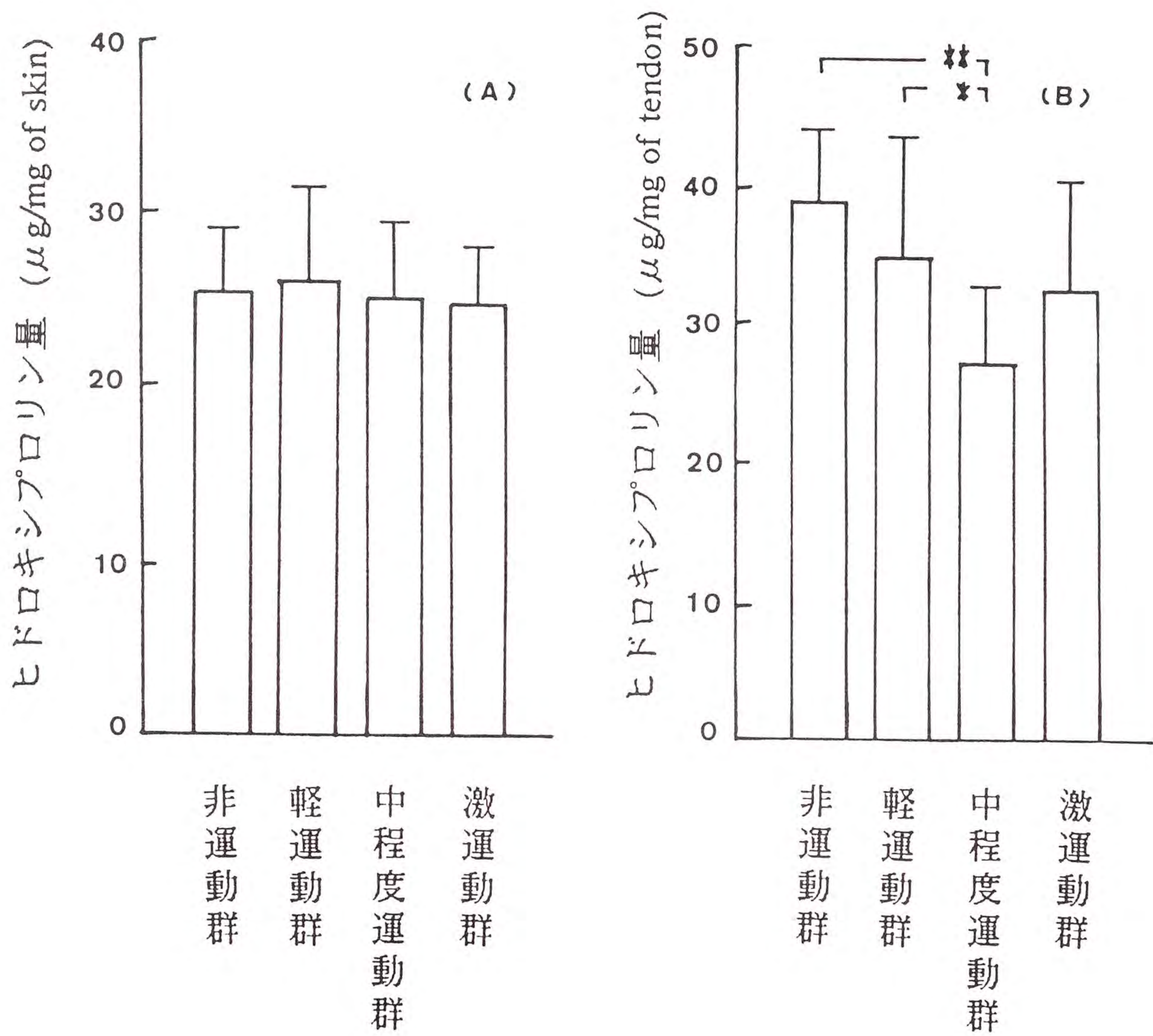


図 13 4群における7週齢での皮膚(A)およびアキレス腱(B)のヒドロキシプロロン量 * , ** ; $P < 0.05$, $P < 0.01$

れて不溶性コラーゲンの割合が増加し、15週齢で81.9%に達することを認め
めた。運動強度別にみた運動群では、非運動群に比べ可溶化されるコラ
ーゲンの割合が増加する傾向を認めた。すなわち、軽運動群においては有
意な差は認められなかったが、中程度および激運動群では、酸・中性塩で
可溶化されるコラーゲンの割合が約20%も多くなることを認め、11週齢と
13週齢では有意に増加する傾向が認められた。さらに、15週齢において、
中程度群と激運動群では、不溶性コラーゲンの割合が非運動群に比べ約10
%も少ないことが認められた。老齡期である81週齢まで運動を継続的に負
荷した場合の皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合について検討した結
果を図15に示した。中性塩可溶性、酸可溶性および不溶性コラーゲンの割
合(%±SD)は、非運動群で、各々、 3.07 ± 1.60 , 7.16 ± 3.13 と 89.77 ± 3.76
であり、運動群では、各々、 4.65 ± 1.93 , 11.62 ± 2.87 と 83.72 ± 3.62 であり、
運動を継続した群は、非運動群に比べ、酸で可溶化されるコラーゲンの割
合が有意に多く、一方不溶性コラーゲンの割合が有意に少なくなることを
認めた。

3-1-4. 考察

運動が結合組織に及ぼす影響について検討した先行研究によると、持久
性のトレーニングによって、アミノ酸の増加(Tiptonら, 1970)、接合力の強

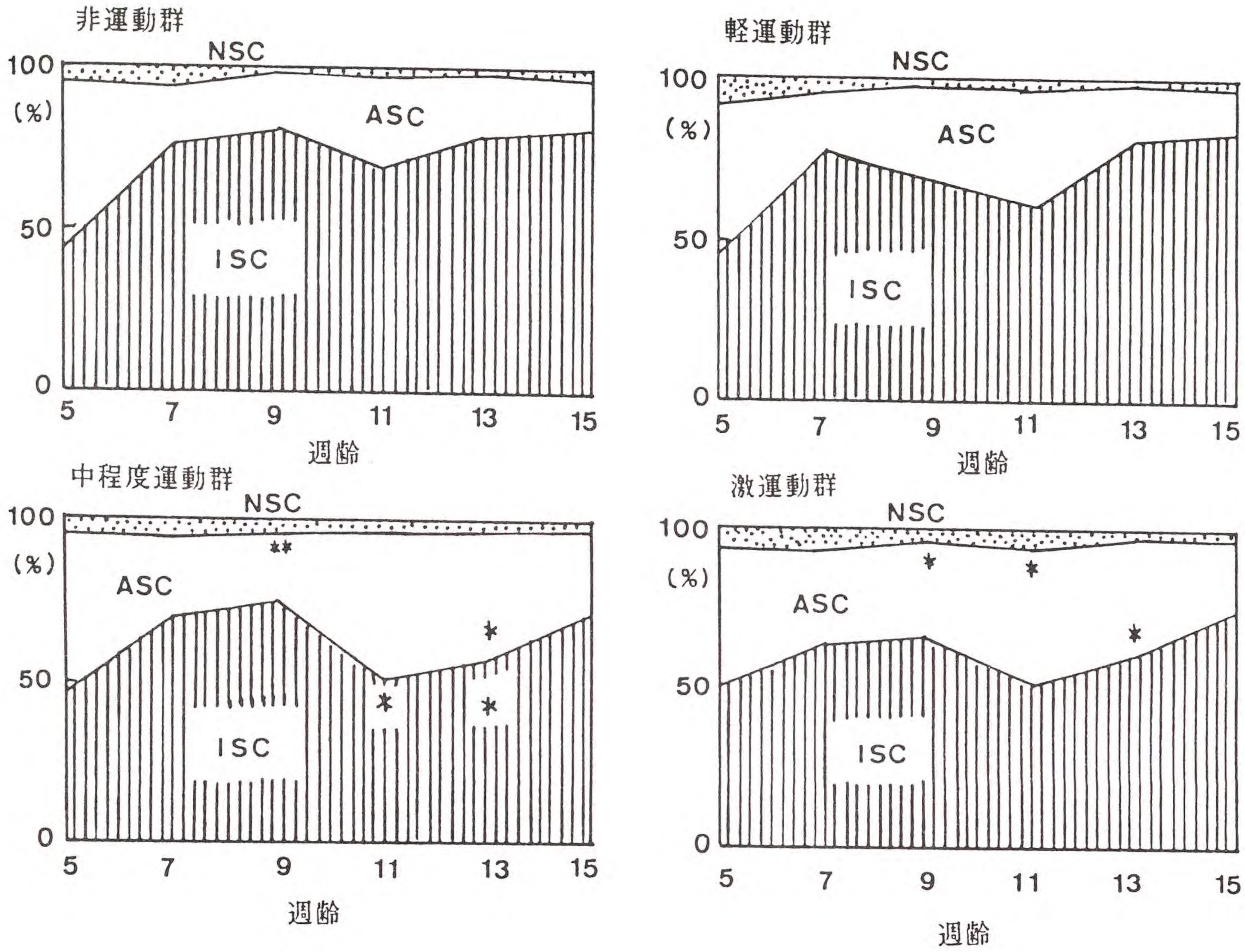


図 14 各週齢における各群のマウス皮膚コラーゲン分画の相対比率
 NSC: 中性塩可溶性コラーゲン
 ASC: 酸可溶性コラーゲン
 ISC: 不溶性コラーゲン
 *, **; $P < 0.05$, $P < 0.01$

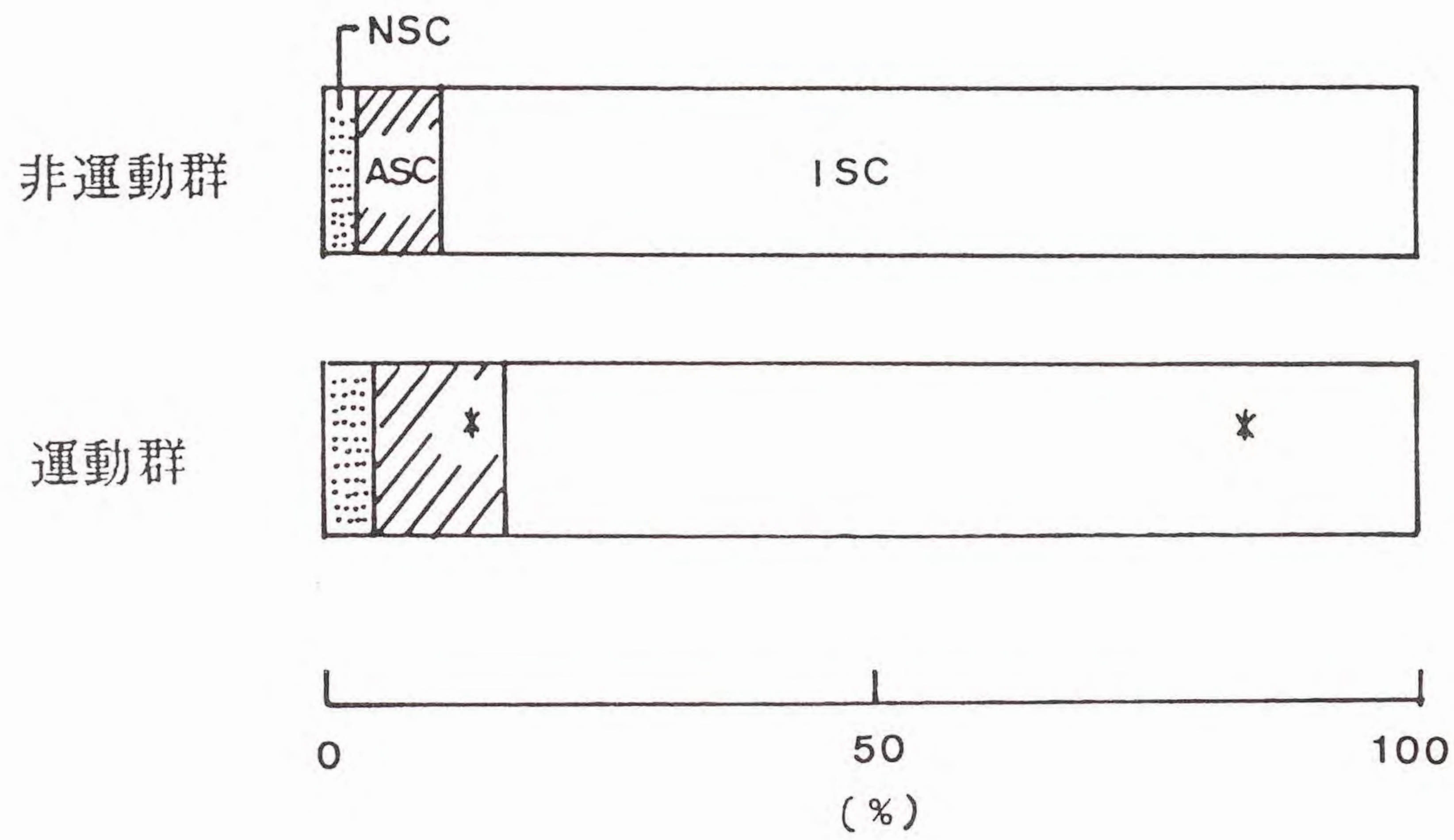


図 15 81週齢における両群の皮膚コラーゲン分画の相対比率
 NSC: 中性塩可溶性コラーゲン
 ASC: 酸可溶性コラーゲン
 ISC: 不溶性コラーゲン
 * ; $P < 0.05$

化 (Adam, 1966; Viidik, 1967; Tipton ら, 1968) や腱のコラーゲン線維の肥大 (中川ら, 1988) などを生じることが報告されている。運動によるコラーゲンの量的変化については、Heikkinen 及びVuori (1972) や Kisskinen 及び Heikkinen (1978) らが研究しているが、マウスのアキレス腱を用いた研究の結果、運動によりコラーゲン量は増加すると報告している。また Tipton ら (1970, 1975) も、イヌの靭帯における検討で、運動によりコラーゲン量が増加することを認めている。

著者は、発育期に運動強度別の負荷を行なった対象動物の腱のコラーゲン量について検討した結果、中程度運動群は、他の群に比べて増加することを認めた。しかし、腱においては、発育期のピーク時に相当する7から9週齢のあたりで一時的にコラーゲン量が減少することを認め、中程度運動では、トレーニング期間が4週間で有意に減少することを認めた。この一時的にコラーゲン量が減少したことの原因については、そのメカニズムを明らかにしえないが、トレーニングによる腱細胞の肥大化、またはコラーゲン線維の間には水分の保持などの働きを持つプロテオグリカンが存在しており (永井, 1984)、そのプロテオグリカンの関与が推測され、腱のコラーゲン線維に、質的な変化が生じていることを示唆する成績といえるかもしれない。

マウスを発育期、成熟期と老齢期とに区分して皮膚のコラーゲン量について観察した。その結果、発育期においては、非運動群ではコラーゲン量

は6週齢まで急激に増加し、7週齢で最大値を示すのに対し、運動群では、9週齢で最大となり非運動群と比べるとピークのズレを示すとともに、量的にも有意に増加していることを認めた。また、成熟期と老齢期に至るまで、4週齢から34週齢までと70週齢まで継続的な運動負荷を実施した群では、非運動群に比べてコラーゲン量が有意に減少することを認めた。継続的運動によるコラーゲンの量的変化としては、発育期では増加し、成熟期以降では減少することを認めた。このことは、運動により発育期と成熟期以降で、コラーゲンの代謝に差異が生じていることが示唆された。組織におけるコラーゲンの蓄積は、加齢に伴い一般に促進する傾向が認められるが、運動の継続によりコラーゲンの蓄積が抑制される可能性が示唆された。

成長に伴い体格が大きくなっていくが、当然のことながらコラーゲン線維が太くなる。その過程においては細い線維が集合して側面的に集合をしながら、線維が成長していくと報告されている(Williamsら, 1978)。コラーゲン分子は、細胞外部に分泌されてから集合して原線維になり、要求される強度に応じて架橋を形成すると考えられている(Trus及びPiez, 1980)。藤本(1982)は、架橋形成は動物あるいは個々のコラーゲン線維の成熟に伴って、アルデヒド型リジンなどの還元性架橋からピリジノリンなどの非還元性架橋への変化又は転換が起こると報告し、ち密な線維を構築して強度を高めたり、ムコ多糖を保持したり、あるいはコラゲナーゼなどに対する

抵抗性を増すなど、生理的機能にとってある程度の架橋は必要な過程と考えられている。また、さらに加齢が進むとコラーゲン線維の架橋は、まだ同定されていない物質で別の架橋に変換されると推測されている。

Gerberら(1960)は、発育期の動物を対象として検討し、その皮膚において、プロリン-U-C¹⁴でラベルしたコラーゲンの半減期は、中性塩可溶性、酸可溶性および不溶性コラーゲンで、各々2,25および150日以上であると報告している。すなわち、この成績は不溶性コラーゲンが一度形成されると容易に変化せず、組織内に残ることを意味しており、コラーゲンの量的変化のみならず、コラーゲンの成熟の程度を把握する必要があることを示唆するものといえる。

コラーゲン成熟の過程は、コラーゲンの可溶化について検討することによって、その程度を知ることができる。本研究では、成熟期に至る15週齢までの可溶性と不溶性コラーゲンの割合について検討したが、その結果非運動群では週齢が進むとともに不溶性コラーゲンの割合が約80%に増加することを認めた。運動群を運動強度別に分けて対比してみると、中程度および激運動群では、非運動群に比べ酸・中性塩で可溶化されるコラーゲンの割合が約20%も多くなることを認め、11週齢と13週齢で有意に増加することが認められた。さらに、老齢期である81週齢まで運動を負荷した対象動物の皮膚では、非運動群に比べ酸で可溶化されるコラーゲンの割合が有意に多く、不溶性コラーゲンの割合が有意に少なくなることを認めた。

コラーゲンの合成と分解の関係については不明な点が多いが、コラーゲンの線維形成は、細胞によるコラーゲンの合成と分泌および細胞外におけるコラーゲンの成熟と分解とによって規定されていると考えられている。細胞から分泌されるコラーゲン量が一定値に達すると線維形成が開始され、線維の数や直径がある閾値に達するとコラーゲンの分泌は停止すると考えられている (Green 及び Goldberg, 1965)。また、細胞から分泌されるムコ多糖もコラーゲンの産生に影響を与えるとの報告もあり、細胞外のムコ多糖とコラーゲン量とがあるレベルに達すると細胞からのコラーゲンの産生が低下し、反対に一定量以下になると合成と分泌が促進されると考えられている (Jackson, 1968)。Chvapil 及び Hurych (1968) は、酸素分圧の影響について述べ、局所の低酸素症は線維芽細胞のコラーゲンおよびムコ多糖の産生を促進させ、非コラーゲン性タンパク質の合成を抑制する。そして酸素分圧の上昇とともにコラーゲン分解が促進され、コラーゲンの合成と分解が平衡に達すると報告している。コラーゲンの分解については、細胞外コラーゲナーゼ、コラーゲン分解カテプシンや関連酵素が関与しており、それらの活性が促進されることが考えられる (Burleigh, 1974)。線維形成は、このようなフィードバック機構により統制されていると推測されるが、運動はこの機構に影響を与えており、コラーゲンの分解が産生を上回る結果、コラーゲンの合成と分泌が促進され、代謝的に活発な可溶性コラーゲンの割合が多くなると推測された。

運動を継続することは、コラーゲンの成熟過程における分子内および分子間の架橋形成が抑制されるとともに、コラーゲンの異化も促進されているものと考えられる。本研究の結果より、運動は細胞間物質であるコラーゲンの成熟・老化を抑制する可能性が示唆され、組織・細胞にとっての生理的機能の活性化に有利な条件を構築しているものと推測された。

3-2. 組織の弾性に及ぼす運動の効果

3-2-1. 目的

皮膚、血管や肺などの組織では、張力への強度に加えて弾性強度も必要な要因である。これらの組織の細胞外マトリックスは、網状に広がった弾性線維をもち、伸長したり再び巻戻ったりできるようになっている。弾性線維の主成分であるエラスチンは、架橋するランダムコイル状のタンパク質で、組織に弾力を与える働きがある。この弾性線維は、その中に長い弾力のないコラーゲン原線維が織り込まれているために伸展を制限し、それによって組織の断裂を防いでいる (Sandberg ら, 1981; Franzblau 及び Faris, 1982)。このことは、弾性特性を規定する主要な要素が弾性線維と膠原線維であることを意味している。

Cooper ら (1976) は、アテローム形成と運動との関係について研究し、運動は血清のコレステロール、トリグリセライド、グルコースなどのリスク要因を低下させ、さらにアテローム形成を遅延する可能性があるとして報告している。また Selvester ら (1977) や Kramsch ら (1981) は、継続的運動が動脈の硬化をある程度予防できる可能性を示唆している。運動は動脈硬化の進展防止に何らかの効果を及ぼすことが推測されるが、組織の硬化や弾力に直接関係のある細胞間物質が運動によりいかなる影響を受けるか検討した報告はきわめて少ない。Matsuda ら (1989) は、動脈のエラスチン量における運動の影響について検討し、ラットに9週齢から16週齢までの8週間水

泳運動を実施し、大動脈のエラスチン量が増加することを報告している。

本研究では、組織に弾性を与える作用のあるエラスチンを取りあげ、運動を継続することにより、エラスチンが量的にどのように推移するのかを明らかにし、運動が組織の弾性に及ぼす影響について検討した。

3-2-2. 研究方法

実験動物として dd 系雄マウスを 47 匹を用い、生後 3 週齢で飼育し、一つのケージ (幅 17.5 cm, 長さ 24.5 cm, 高さ 12.5 cm) にマウスを 5 匹ずつ入れ飼育した。餌 (オリエンタル酵母 (株) MF 型飼料) と水は自由摂取とした。飼育室の温度は $23 \pm 1^\circ\text{C}$ に維持し、12 時間の明暗サイクルで光を制御した。

老齢期に至るまで運動を継続させると組織のエラスチンが量的にどのように推移するのかを検討するため、マウスを運動群と非運動群の 2 群に分けた。運動負荷は動物用トレッドミル (夏目製作所, KN-73) を用い、生後 4 週齢より開始した。運動群のトレッドミル走は、1 週間に 5 日、12 m/min のランニングスピードで 15 分間午前 10 時より実施した。

マウスは、発育期から成熟期までの 4, 8, 12, および 16 週齢、さらに、老齢期に相当する 81 週齢で実験に供した。マウスは、エーテル麻酔下で心臓穿刺により採血屠殺後、組織を採取した。組織は皮膚と心臓を用いた。皮

膚は、剃毛の後、尾に近い右背部から直径 1 cm のサークルに切り取った。心臓は、摘出後血液を除去するために、冷却した生理的食塩水の中で洗浄し、血管をできるだけ除去し、心臓全体をサンプルとした。

発育期から老齢期に至るまでの 4, 8, 12, 16 週齢および 81 週齢で各々 5 匹用い、皮膚及び心臓のコラーゲン量とエラスチン量の測定を Fischer 及び Llaurodo 法 (1966) で前処理し、Woessner 法 (1961) で実施した。なお、81 週齢の非運動群としては 7 匹用いた。

3-2-3. 結果

発育期から老齢期に至るまでの 4, 8, 12, 16 週齢および 81 週齢で計 47 匹用い、皮膚及び心臓のコラーゲン量とエラスチン量を測定した。

両群の各週齢での皮膚のコラーゲン量を図 16 に示した。皮膚のコラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) は、4 週齢で 21.2 ± 4.1 であった。非運動群のコラーゲン量は、8, 12, 16 および 81 週齢で、各々、 59.1 ± 7.4 , 59.0 ± 6.9 , 42.5 ± 10.3 および 69.0 ± 17.2 であった。一方運動群のコラーゲン量は、8, 12, 16 および 81 週齢で、各々、 61.4 ± 1.5 , 65.6 ± 3.6 , 71.9 ± 7.9 および 44.1 ± 14.2 であった。運動群のコラーゲン量は、非運動群に比べると 16 週齢で有意に多く、老齢期の 81 週齢では、運動群のコラーゲン量は逆に非運動群に比し有意に少なくなることを認めた。

図 17 に両群の各週齢における皮膚のエラスチン量について示した。皮膚のエラスチン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) は、4 週齢で 0.71 ± 0.07 であった。非運動群のエラスチン量は、8, 12, 16 および 81 週齢で各々、 0.72 ± 0.14 , 0.65 ± 0.07 , 0.65 ± 0.04 および 0.93 ± 0.15 であった。一方運動群のエラスチン量は、8, 12, 16, 81 週齢の各々において 0.80 ± 0.07 , 0.75 ± 0.01 , 0.85 ± 0.09 および 1.29 ± 0.34 であった。非運動群では、皮膚のエラスチン量は約 $0.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin とほぼ一定の値を示すのに対し、運動群では、週齢が進むにつれて増加する傾向を認め、12, 16 および 81 週齢の各々で、非運動群に比べ有意にエラスチン量が多くなることを認めた。

表 7 に両群の各週齢における平均体重、心重量、体重に対する心重量の割合について示した。継続的な運動を行なった対象の心臓は、16 週齢と 81 週齢で非運動群に比べると、体重に対する心重量の割合でみると有意に増加することを認めた。

両群の各週齢での心臓のコラーゲン量を図 18 に示した。心臓のコラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) は 4 週齢で 2.34 ± 0.31 であった。非運動群のコラーゲン量は、8, 12, 16, 81 週齢の各々で 2.64 ± 0.41 , 2.64 ± 0.38 , 3.13 ± 0.43 , 4.95 ± 0.77 であった。運動群のコラーゲン量は、8, 12, 16, 81 週齢の各々で、 3.00 ± 0.54 , 2.60 ± 0.32 , 3.11 ± 7.9 および 3.82 ± 0.77 であった。すなわち、運動群のコラーゲン量は、非運動群に比し老齢期の 81 週齢におけるコラーゲン量が有意に少なくなることを認めた。

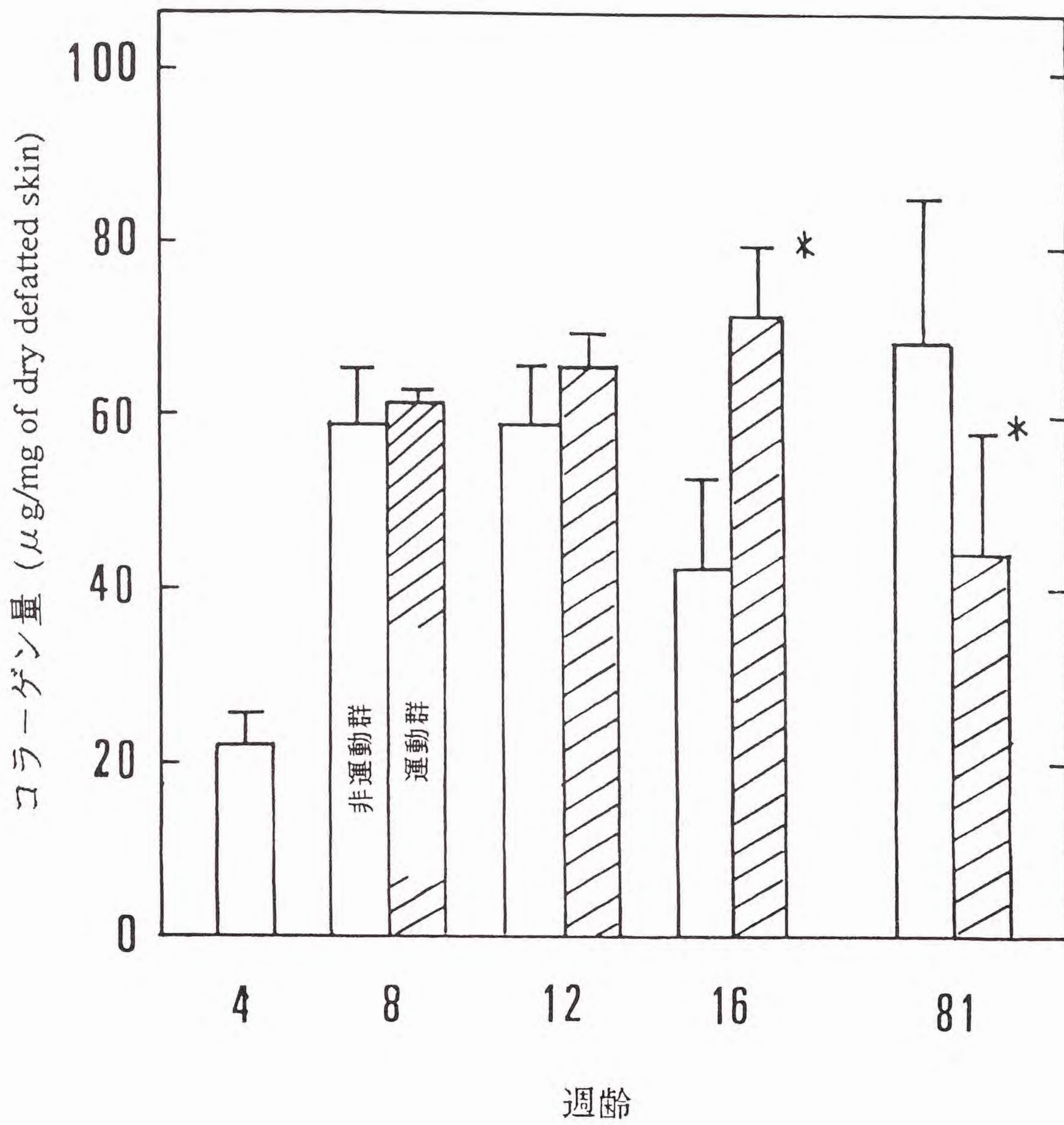


図 16 非運動群と運動群の各週齢における皮膚のコラーゲン量
*; P < 0.05

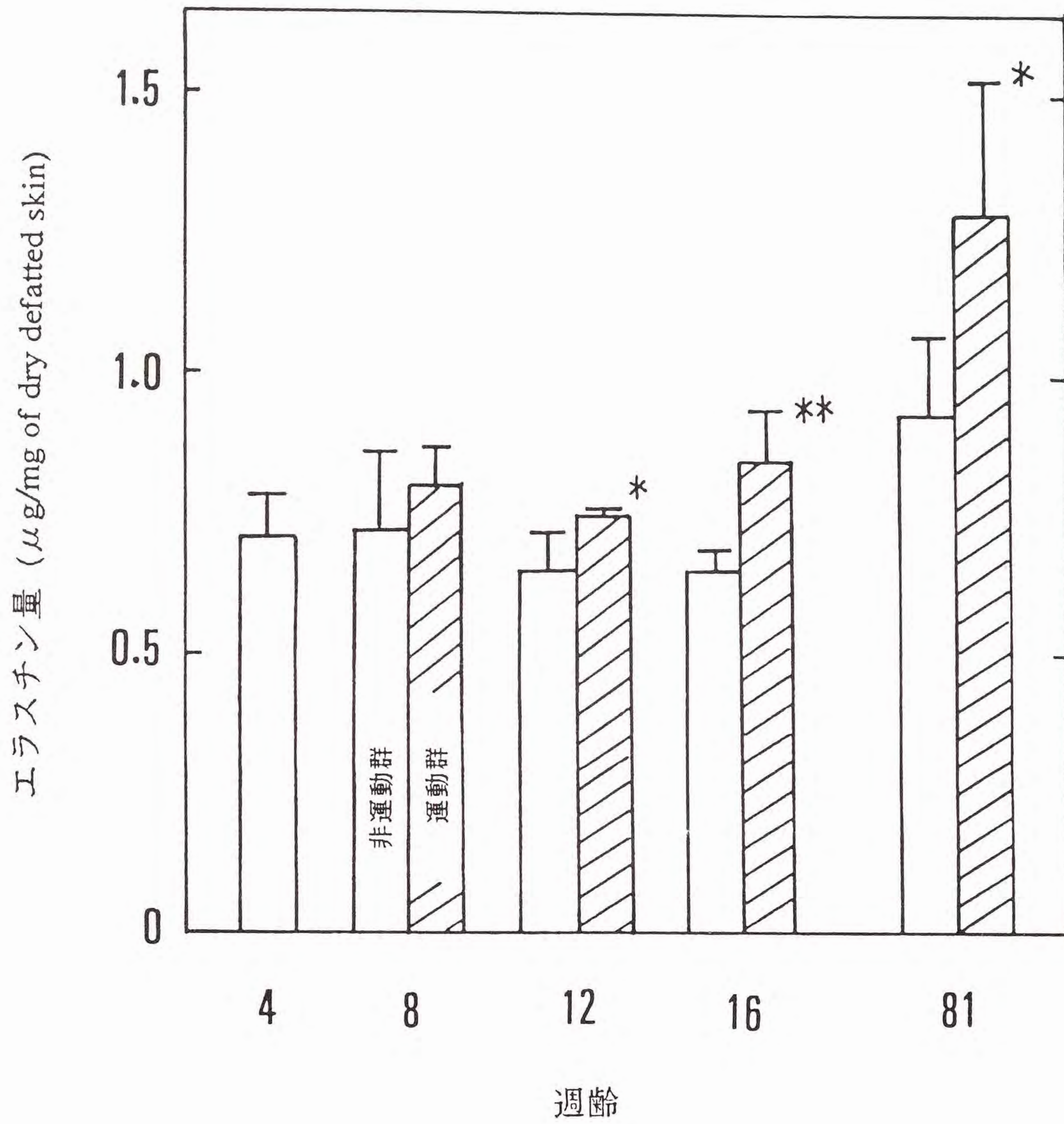


図 17 非運動群と運動群の各週齢における皮膚のエラスチン量
*, **; $P < 0.05$, $P < 0.01$

表 7 両群の各週齢における平均体重、心重量と体重に対する心臓の割合

群	週齢	n	平均体重 (g)	心重量 (mg)	体重に対する 心臓の割合 (%)
非運動群	4	5	26.2 ± 0.7	94.2 ± 4.9	0.36 ± 0.02
	8	5	39.5 ± 2.1	178.2 ± 25.6	0.45 ± 0.06
	12	5	50.5 ± 3.6	191.3 ± 46.4	0.36 ± 0.03
	16	5	43.4 ± 2.5	159.0 ± 8.5	0.37 ± 0.03
	81	7	58.3 ± 9.8	211.1 ± 11.6	0.37 ± 0.04
運動群	8	5	39.3 ± 3.5	180.1 ± 41.4	0.45 ± 0.09
	12	5	46.3 ± 4.2	192.1 ± 15.1	0.42 ± 0.07
	16	5	45.2 ± 2.8	178.7 ± 9.9	0.40 ± 0.03 *
	81	5	52.6 ± 5.1	221.1 ± 16.8	0.42 ± 0.02 *

平均値 ± 標準偏差, *; P < 0.05

図 19 に両群の各週齢での心臓のエラスチン量について示した。心臓のエラスチン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) は、4 週齢で 0.47 ± 0.04 であった。非運動群のエラスチン量は、8, 12, 16, 81 週齢で、各々 0.44 ± 0.04 , 0.46 ± 0.06 , 0.51 ± 0.07 , 0.41 ± 0.09 であった。運動群のエラスチン量は、8, 12, 16, 81 週齢で、各々、 0.55 ± 0.03 , 0.53 ± 0.05 , 0.62 ± 0.05 , 0.45 ± 0.09 であった。運動群の心臓のエラスチン量は、8 週齢および 16 週齢で非運動群に比べ、有意に増加することを認めた。

両群の各週齢における皮膚および心臓のエラスチン/コラーゲン比については表 8 に示した。非運動群の皮膚では、81 週齢までこの値はほぼ一定の割合を示した。また、非運動群の心臓におけるエラスチン/コラーゲン比は、週齢が進むにつれて減少する傾向を認めた。一方運動群では、皮膚および心臓ともにエラスチン/コラーゲン比が非運動群に比べ、増加する傾向を示し、皮膚では、81 週齢で、心臓では、16 週齢と 81 週齢で運動群の方が非運動群に比し有意に増加する傾向を認めた。

3-2-4. 考察

弾性線維と膠原線維は、組織の弾性特性を規定する主要な要素であり、特に弾性線維は、その中に長い弾力のないコラーゲン原線維が織り込まれているために、伸展を制限し、それによって組織が断裂することを防いで

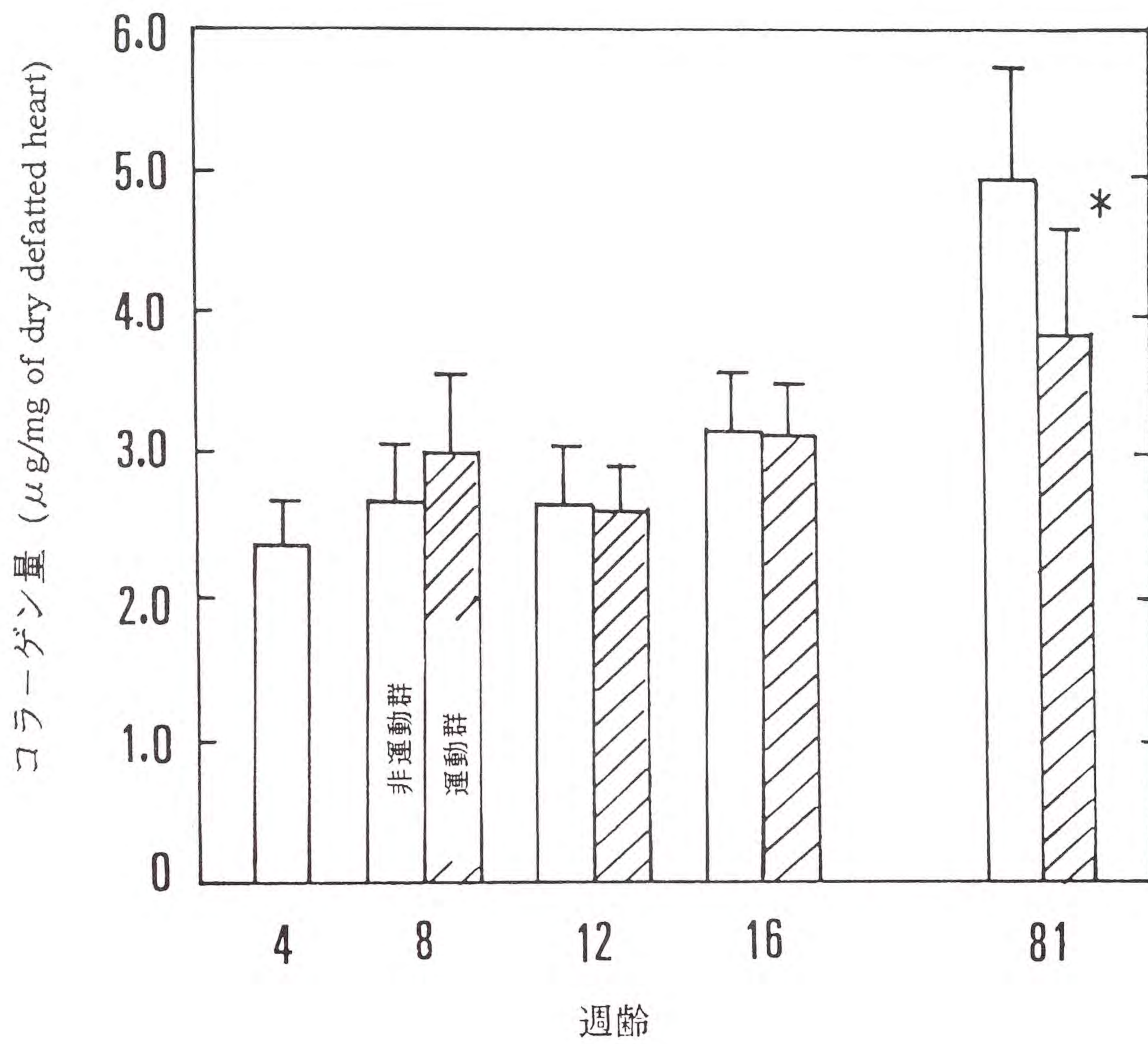


図 18 非運動群と運動群の各週齡における心臓のコラーゲン量
* ; $P < 0.05$

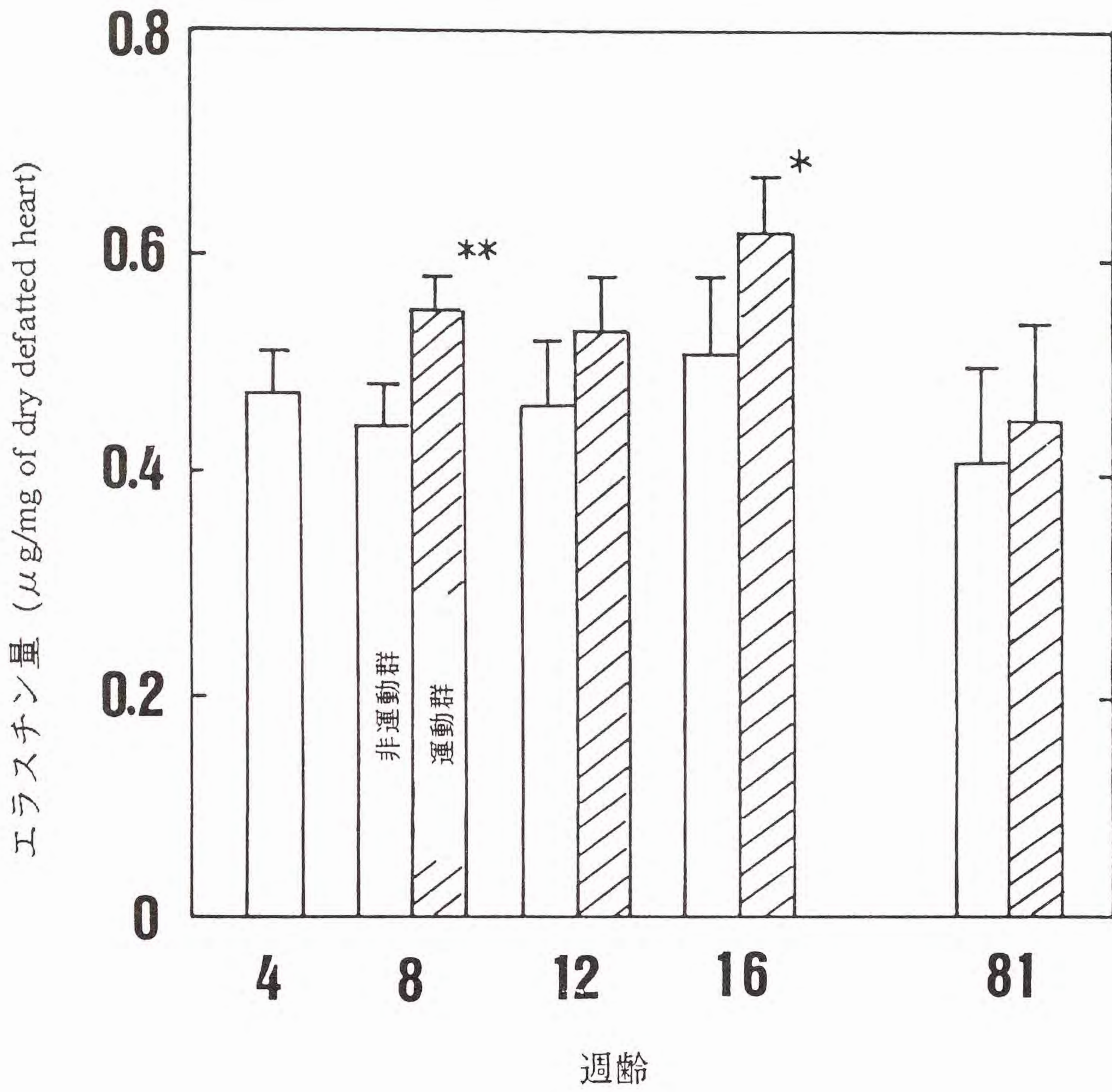


図 19 非運動群と運動群の各週齢における心臓のエラスチン量
*, **; $P < 0.05$, $P < 0.01$

表 8 両群の各週齢における皮膚および心臓の
エラスチン/コラーゲン比

群	週齢	n	エラスチン/コラーゲン比 (%)	
			皮膚	心臓
非運動群	4	5	3.4 ± 0.4	20.2 ± 2.4
	8	5	1.3 ± 0.2	17.1 ± 2.7
	12	5	1.1 ± 0.2	17.7 ± 2.3
	16	5	1.6 ± 0.4	16.5 ± 1.8
	81	7	1.4 ± 0.3	8.3 ± 1.5
運動群	8	5	1.3 ± 0.1	20.3 ± 5.3
	12	5	1.1 ± 0.1	20.9 ± 4.0
	16	5	1.2 ± 0.1	20.1 ± 2.5 *
	81	5	3.1 ± 0.7 **	11.8 ± 1.9 **

平均値 ± 標準偏差

*, **; 非運動群からの有意差 P < 0.05, P < 0.01

いる。また、弾性線維の主成分であるエラスチンは、架橋するランダムコイル状のタンパク質で組織に弾力を与える働きをしている (Sandberg ら, 1981; Franzblau 及び Faris, 1982)。

本研究においては、4 週齢から 81 週齢までマウスに継続的な運動を実施し、皮膚と心臓とのコラーゲン量とエラスチン量を測定した。皮膚のコラーゲン量は、運動群では非運動群に比べ 16 週齢で有意に多く、81 週齢では逆に有意に減少することを認めた。また、運動群の心臓のコラーゲン量は、非運動群に比べ、81 週齢で有意に減少することを認めた。これらの結果は、加齢に伴い組織におけるコラーゲンの蓄積が促進される傾向があり、運動の継続によりコラーゲンの蓄積が抑制される可能性を示唆している。一方皮膚のエラスチン量は、発育期のピークを過ぎる 12 週齢頃から、運動群では非運動群に比べ有意に増加し、その後老齢期に至るまで増加を続けることを認めた。また心臓のエラスチン量は、運動群では 8 週齢、16 週齢で非運動群に比べ有意に増加を示した。Lefever 及び Rucker (1980, 1983) は、血管壁のエラスチンの合成について報告しており、エラスチンの合成は、生後しばらくするとほぼ成長に見合ったものとなり、それ以後の新生や再生がほとんどみられないと述べている。Matsuda ら (1989) は、運動とエラスチンの量的変化について検討し、ラットに水泳運動を実施すると、大動脈のエラスチン量が増加することを報告している。本研究においても、運動を継続することによりエラスチン量は増加し、継続的運動により組織に

おけるエラスチンの代謝が亢進されることが示唆された。

John (1972) は、加齢とともにエラスチンのアミノ酸組成が変化することを報告しており、アスパラギン酸、グルタミン酸やセリンなどの極性の側鎖をもつアミノ酸の占める割合が加齢とともに多くなり、エラスチンの変性の生じることを示唆した。運動の継続により組織のエラスチンが増量する機序としては、運動によってエラスチンの変性あるいは崩壊が阻止されるか、または運動によって起こる血流の増大や血圧の上昇が刺激になり、エラスチン合成が促進されることなどが考えられる。先行研究及び本研究の結果のみから、その機序についての結論は下しえないが、運動の持つ効果についてさらに今後検討する必要がある。

継続的な運動負荷を行なった対象の心臓では、体重に対する心重量の割合が有意に増加することを認めたが、継続的なトレーニングにより心筋の肥大が生じることはヒトにおいて認められており、実験動物においてもトレーニングによる効果として心肥大が起こる可能性が推測される。

さらに、組織の弾性を示す指標であるエラスチン/コラーゲン比についてみると、非運動群の皮膚では8週齢から81週齢までほぼ一定の割合を示したが、運動群では81週齢に達するとその割合が有意に増加することを認めた。また、一方心臓におけるエラスチン/コラーゲン比は、非運動群では週齢が進むにつれて減少し、運動群では16週齢に達するとその割合が有意に増加することを認めた。

これらの結果は、運動習慣を与えないままでは加齢とともに次第に組織の弾性が失われること、および運動習慣を与えることにより組織の硬化を抑制する可能性のあることを示唆するものである。組織では、コラーゲン量の増加あるいは架橋形成により、加齢に伴う組織の硬化を引き起こすことが考えられる。また、組織において、炎症などのストレス状態が加わると組織の損傷が生じるが、その傷を修復するための機序としてコラーゲンの合成が促進し、さらに加齢とともに、修復コラーゲン線維が徐々に蓄積され、その結果として組織を硬化させることも考えられる。運動群では、皮膚および心臓ともに非運動群に比べて、エラスチン／コラーゲン比が増加する傾向を示した。運動を継続することにより、組織がその弾性を維持することが示唆された。組織における細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンの関係では、運動によりエラスチン量が増加し、逆にコラーゲン量が減少することを認め、この現象により組織の弾力が増すものと思われる。本研究の結果より、運動は組織の弾性の維持に影響していることが示唆された。

3-3. 運動に伴うヒト血清コラーゲン量

3-3-1. 目的

尿中へのペプチドの排泄は、タンパク質代謝の反映であり、血中あるいは尿中へのヒドロキシプロリン排泄は、コラーゲン代謝の指標とみなされている (Simly 及び Ziff, 1964; 堺, 1982)。ヒドロキシプロリンは、コラーゲンに特異的に含まれている環状イミノ酸であり、組織コラーゲンが分解されると、血中に移行し、さらに尿中へと排泄される。血中あるいは尿中のヒドロキシプロリンは、一部は遊離型で、大部分は、プロリンやグリシンとのペプチドである。

Hall 及び Jackson (1970) は、尿中のヒドロキシプロリン排泄量は、成長の急速な時期には、コラーゲン代謝の促進により、成人よりも増加することを報告している。血中あるいは尿中のヒドロキシプロリンの排泄には、組織コラーゲン、特に可溶性部分の分解に由来すると考えられており、可溶性コラーゲンの形成が活発になることにより、血中あるいは尿中のヒドロキシプロリンの排泄が増加することを意味している (Prockop, 1964; Zorab, 1969; Yoneyama, 1976)。

加齢による尿中ヒドロキシプロリン量については、Hall 及び Jackson (1970) や Yoneyama (1976) らにより報告されている。本研究においても、ヒト血清ヒドロキシプロリン量が加齢による影響を受けて、年齢が進むにつれて減少することを認め、その結果については第2章3節で詳細に述べた。

しかしながら、運動が血中あるいは尿中のヒドロキシプロリン量に及ぼす影響を及ぼすか検討した報告は全くない。

本研究では、ヒトを対象として、一過性の運動によって、血清ヒドロキシプロリンが量的にどのように変化するかを検討し、運動がヒト血清コラーゲン量に及ぼす影響について考察を加えた。

3-3-2. 研究方法

運動による血清ヒドロキシプロリンの変化を検討するために、18才から22才の健康な大学生を対象として、種々の運動負荷を実施した。対象は、陸上部員31名、水泳部員10名、バドミントン部員10名および非運動部員10名計61名である。

運動負荷としては、非運動部員、陸上部員とバドミントン部員を対象にトレッドミル上でオールアウト走を実施した。これらの対象の身体特性および体力特性を表9および表10に示した。さらに、陸上部員に3,000m走を、水泳部員については水泳を実施した。この対象の身体特性は、表9に示した。運動前と運動直後に、安静座位において肘静脈より採血した。

血液は、自動血球計数装置 (TOA Medical Electronics Co., Ltd.) を用い、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値およびヘモグロビン量を測定した。次に、血液は遠心分離により血清を分離し、その血清をサンプルとした。

表9 対象者の身体特性

	性別	n	年齢	身長 (cm)	体重 (kg)
非運動部員	男	5	20-23	171.6 ± 7.7	63.7 ± 13.0
	女	5	21-22	158.8 ± 5.3	52.0 ± 10.0
バドミントン部員		10	20-23	165.2 ± 9.2	57.9 ± 12.5
	男	5	18-23	170.5 ± 6.1	60.4 ± 2.7
	女	5	19-22	159.1 ± 3.7	54.6 ± 5.5
陸上部員(all out走)		10	18-23	164.8 ± 7.6	56.5 ± 4.9
	男	21	18-21	172.5 ± 6.0	60.3 ± 6.9
陸上部員(3000m走)	男	4	19-22	167.0 ± 6.1	59.8 ± 7.4
	女	6	18-22	160.6 ± 5.4	53.2 ± 5.6
		10	18-22	163.2 ± 6.3	54.8 ± 6.4
水泳部員	男	4	19-21	171.0 ± 8.7	60.5 ± 5.2
	女	6	19-21	158.0 ± 2.0	49.0 ± 5.2
		10	19-21	165.9 ± 9.6	55.6 ± 8.8

平均値 ± 標準偏差

表 10 トレッドミルでオールアウト走を実施した対象者の体力特性

	性別	n	$\dot{V}O_2/W$ max (ml/kg/min)	HR max (beat/min)	all out time (min)
非運動部員	男	5	51.8 ± 3.4	207.0 ± 5.4	6.3 ± 1.4
	女	5	40.1 ± 4.1	198.4 ± 7.8	5.1 ± 0.2
バドミントン部員	男	5	59.6 ± 1.9	197.4 ± 11.0	8.4 ± 0.9
	女	5	49.5 ± 5.6	183.2 ± 8.2	7.8 ± 0.8
陸上部員(all out走)	男	21	72.2 ± 7.2	196.5 ± 5.2	9.8 ± 0.7

平均値 ± 標準偏差

血清ヒドロキシプロリン量を測定するために、血清を密封した試験管に入れ、6 N HCl を加えて 130 °C で 3 時間加水分解した。水解物はロータリーエバポレータを用いて塩酸を除去した後、蒸留水 2 ml に置換した。その溶液をサンプル前処理用フィルター (エキクロディスク Shodex DT) でろ過し、Woessner 法 (1961) で測定した。

3-3-3. 結果

対象に種々の運動を負荷し、運動前と直後での血清ヒドロキシプロリン量の変化について検討した。

血液諸量 (赤血球数、白血球数、Ht 値、Hb 量) は、各群ともに運動直後に増加する傾向を認め、特に白血球数は各群とも、運動前に比べ直後で有意に増加することを認めた。

各群における、運動前と直後の血清ヒドロキシプロリン量とその変化率について図 20 に示した。血清ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ of serum \pm SD) は、トレッドミル上でオールアウト走を実施した運動前と直後で、各々非運動部員 (n=10) で 2.59 ± 0.43 , 3.24 ± 0.80 バドミントン部員 (n=10) で 2.25 ± 0.36 , 3.69 ± 1.83 陸上部員 (n=21) で 1.57 ± 0.43 , 2.12 ± 1.24 であった。また、陸上部員 (n=10) の 3,000 m 走の運動前と直後で各々 1.60 ± 0.90 , 3.75 ± 1.88 であり、水泳部員 (n=10) の水泳前と直後で各々 1.59 ± 0.81 ,

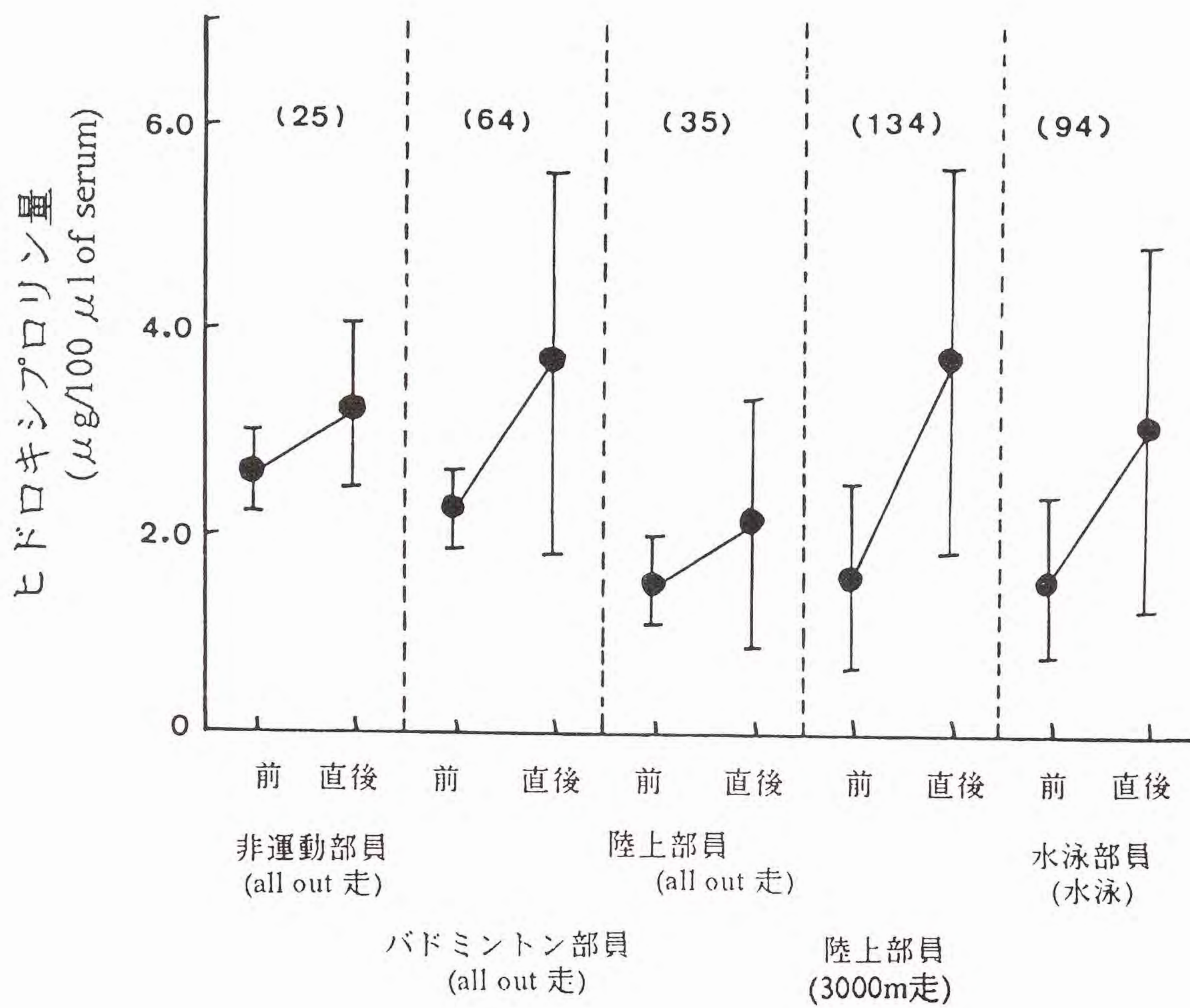


図 20 各群の運動前後における血清ヒドロキシプロリン量の
 平均値とその変化率
 ()内は変化率

3.09 ± 1.80 であった。血清ヒドロキシプロリン量の運動直後の変化は、陸上部員の 3,000 m 走、水泳部員の水泳、オールアウト走でのバドミントン部員、陸上部員、非運動部員の順で増加傾向が大きかった。一方、安静時の血清ヒドロキシプロリン量を比較すると、陸上部員と水泳部員の血清ヒドロキシプロリン量は、非運動部員あるいはバドミントン部員のそれよりも有意に低値を示すことを認めた。

3-3-4. 考察

運動によるコラーゲン代謝への影響を検討するため、ヒトに運動を負荷し、運動前と直後での血清ヒドロキシプロリン量の変化について検討した。各群とも運動直後には、血清ヒドロキシプロリン量が増加傾向を示した。運動直後での変化率は、多い順に、陸上部員 3,000 m 走で 134、水泳部員で 94、オールアウト走を実施した部員でバドミントン部員 64、陸上部員 35、非運動部員 25 であった。この成績は、一過性の運動がコラーゲン代謝を亢進させる可能性を示唆している。血清ヒドロキシプロリンは、組織コラーゲンの分解に由来すると考えられているが、Prockop (1964) は、組織のコラーゲンと尿中のヒドロキシプロリンの比較から、¹⁴C-プロリン注入後 15 時間の尿中ヒドロキシプロリンは、可溶性コラーゲンに対応していると

報告している。コラーゲンの分解酵素であるコラゲナーゼやカテプシンは、おそらく運動により酵素活性が高まり、Prockop (1964) の報告に認められるように、組織コラーゲンの可溶性部分の異化が促進され、血中ヒドロキシプロリン量が増加するものと推測される。また、運動鍛練者は、非運動鍛練者に比べるとトレーニングを繰り返すことにより、可溶性コラーゲンの割合が多くなっていることが示唆された。コラーゲンの線維形成は、細胞によるコラーゲンの合成と分泌および細胞外におけるコラーゲンの成熟と分解とによって規定されている (Green 及び Goldberg, 1965)。運動によりコラーゲンの分解が産生を上回る結果、コラーゲン合成と分泌が促進され、可溶性コラーゲンの割合が多くなると推測された。著者は継続的な運動を実施したマウスでは、非運動群に比べ組織のコラーゲン量が少なくなることとを認め、さらに、可溶性コラーゲンの割合が多くなっていることを認めた。このことから、継続的なトレーニングを行うことにより、組織のコラーゲン量が少なくなり、同時に可溶性コラーゲンから不溶性コラーゲンへの移行が抑制されているものと推測される。

運動に伴い、結合組織の DNA 合成が促進されることが知られている (山田ら, 1990)。このことは、細胞内から細胞外へプロコラーゲン分子の分泌が活発になることを示唆している。プロリンが水酸化されてヒドロキシプロリンになることが、コラーゲン分子の三重ラセン構造の安定化に必要であり、またこの水酸化が不十分な場合にはプロコラーゲン分子が細胞外

に分泌されにくいという報告がある (Prockop ら, 1979)。細胞外へ出たプロコラーゲン分子は、細胞間質の無定形基質の中を流れて、大部分は既存のコラーゲン線維の存在する場所に到達し、そこに沈着しコラーゲン分子から線維が形成される (鶴藤, 1967)。一方、コラーゲンの分解酵素であるコラゲナーゼやカテプシンがプロコラーゲンを分解するかどうかについてはいまだ不明である (平山ら, 1984)。本研究においては、安静時の各群の血清ヒドロキシプロリン量を比較した結果、陸上部員、水泳部員は、非運動部員あるいはバドミントン部員より有意に低値を示した。このことは、運動により、可溶性コラーゲンの異化が亢進し、生合成直後のプロコラーゲン分子や新しいコラーゲン分子の量が多くなっているか、あるいは、コラーゲンの分解酵素が血清蛋白により抑制されていると考えられる (平山ら, 1984)。いずれにせよ、運動鍛練者には、コラーゲンの量的・質的变化が生じているものと推測される。すなわち、日常的・継続的なトレーニングによってコラーゲンの代謝回転がスムーズかつ活発に進行する生理的な状態が維持されていると考えられる。また、陸上部員や水泳部員とバドミントン部員に差が認められたことは、運動種目による運動の質的な差、トレーニング強度の違いなどによるものと推測された。この点については、各群とも例数が充分とはいえず、さらにまた一過性の急性運動であり、結論を得るにいたらない。健康人を対象とする研究条件上の厳しい制約もあるが、今後の検討にまたねばならない。

3-4. 結語

細胞間物質に及ぼす運動の影響について検討するために、実験動物に dd 系雄マウスを 506 匹用い運動負荷を実施した。運動を継続することにより細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンが、組織においてどのような量的変動が生じるのか、また中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲン分画の割合がいかなる変動を示すのか検討することを目的として、コラーゲンの成熟に対する運動の影響について観察した。さらに、18 才から 22 才の健康な大学生 61 名を対象として、一過性の運動によって、血清ヒドロキシプロリンがいかなる量的変動を示すか検討し、次の成績を得た。

(1) 運動強度別に運動を負荷したマウス(4 週齢から 15 週齢まで)の皮膚コラーゲン量の変化については、非運動群では 6 週齢まで急激に増加し、7 週齢で 23.41 ± 2.67 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin \pm SD) と最大値を示した。軽、中程度と激運動群では、9 週齢で各々、 22.19 ± 4.51 , 23.45 ± 2.75 及び 25.66 ± 5.35 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of skin \pm SD) と 3 群とも最大値を示し、しかも非運動群に比べると、ピークのズレを示すとともに、量的にも有意に増加していることを認めた。

(2) 成熟期と老齢期に至るまで継続的な運動を実施したマウスの皮膚コラーゲン量については、4 週齢から 34 週齢までと 70 週齢まで継続的な運動負荷を実施した群では、非運動群に比べコラーゲン量が有意に減少することを認めた。

(3) 継続的な運動を負荷した群の皮膚のコラーゲン量は、非運動群に比

べ 16 週齢で有意に多く、老齢期である 81 週齢で逆に有意に少なくなることを認めた。また、運動群の心臓のコラーゲン量は、81 週齢において非運動群に比べ有意に少なくなることを認めた。コラーゲンの量的変化においては、継続的運動により発育期では増加し、成熟期以降では減少する傾向を認めた。

(4) 発育期において運動強度別に負荷を行なった実験動物の腱のコラーゲン量の変化について検討した結果、中程度運動群の 7 週齢と 9 週齢におけるコラーゲン量は、非運動群に比べ有意に多くなっていることを認めた。さらに、7 週齢と 9 週齢で中程度運動群の腱のコラーゲン量は、軽運動群や激運動群に比べ有意に多いことを認めた。また、中程度運動では、4 週間のトレーニング期間で非運動群、軽運動群に比べ腱のコラーゲン量は、一時的に有意に減少することを認めた。

(5) 成熟期に至る 15 週齢までの運動強度別の皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合については、非運動群では、週齢が進むにつれて不溶性コラーゲンの割合が増加し、15 週齢で 81.9 % になることを認めた。運動群を運動強度別に分けて検討した結果、軽運動群は非運動群に比べ有意な差は認められなかったが、中程度と激運動群とは、酸・中性塩で可溶化されるコラーゲンの割合が約 20 % も多くなることを認め、11 週齢と 13 週齢で有意に増加することが認められた。さらに、15 週齢においては、中程度と激運動群では、不溶性コラーゲンの割合が非運動群に比べ約 10 % も少ないこと

を認めた。

(6) 老齡期である 81 週齡まで運動を継続的に負荷した皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合については、中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲンの割合 (% \pm SD) は、非運動群で、各々、 3.07 ± 1.60 , 7.16 ± 3.13 と 89.77 ± 3.76 であり、運動群では、各々、 4.65 ± 1.93 , 11.62 ± 2.87 と 83.72 ± 3.62 であった。運動を継続した群では、非運動群に比べ酸で可溶化されるコラーゲンの割合が有意に多く、不溶性コラーゲンの割合が有意に少なくなることを認めた。

(7) 皮膚のエラスチン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) については、4 週齡で 0.71 ± 0.07 であった。非運動群のエラスチン量は、8, 12, 16 及び 81 週齡で、各々、 0.72 ± 0.14 , 0.65 ± 0.07 , 0.65 ± 0.04 及び 0.93 ± 0.15 であった。運動群のエラスチン量は、8, 12, 16 及び 81 週齡で、各々、 0.80 ± 0.07 , 0.75 ± 0.01 , 0.85 ± 0.09 及び 1.29 ± 0.34 であった。非運動群では、約 $0.7 \mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin とほぼ一定の値を示すのに対し、運動群では、週齡が進むにつれて増加することを認め、12, 16 及び 81 週齡で非運動群に比べ有意に多くなることを認めた。

(8) 心臓のエラスチン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ of defatted skin \pm SD) については、4 週齡で 0.47 ± 0.04 であった。非運動群のエラスチン量は、8, 12, 16 及び 81 週齡で、各々、 0.44 ± 0.04 , 0.46 ± 0.06 , 0.51 ± 0.07 及び 0.41 ± 0.09 であった。運動群のエラスチン量は、8, 12, 16 と 81 週齡で、各々、 0.55 ± 0.03 , $0.53 \pm$

0.05, 0.62 ± 0.05 及び 0.45 ± 0.09 であった。運動群の心臓のエラスチン量は、8週齢と16週齢において非運動群に比べ、有意に増加することを認めた。

(9) 運動群の皮膚および心臓におけるエラスチン/コラーゲン比は、皮膚および心臓ともに非運動群に比べ増加する傾向を示し、皮膚では、81週齢で、心臓では、16週齢と81週齢で運動群の方が非運動群に比べ有意に増加することを認めた。運動により、組織においてエラスチン量が増加し、逆にコラーゲン量が減少することが運動群と非運動群との組織の弾性の違いを生じる要因になることが認められた。

(10) 血清ヒドロキシプロリン量は、トレッドミル上でオールアウト走を実施した運動直後で増加傾向にあることを認めた。また血清ヒドロキシプロリン量は、陸上部員の3,000 m 走の運動直後および水泳部員の水泳直後で、増加傾向にあることを認めた。

(11) 血清ヒドロキシプロリン量の運動直後での変化は、陸上部員の3,000 m 走、水泳部員の水泳、オールアウト走でのバドミントン部員、陸上部員、非運動部員の順で増加傾向が著しかった。また、安静時の血清ヒドロキシプロリン量を比べると、陸上部員と水泳部員の血清ヒドロキシプロリン量は、非運動部員あるいはバドミントン部員のそれより有意に低値を示すことを認めた。

本研究で得られた成績から、運動は量的にも質的にも細胞間物質に影響を与えることが認められた。組織におけるコラーゲンの蓄積は、運動の継

続により抑制される可能性が示唆され、コラーゲンの成熟過程における分子内および分子間の架橋形成が抑制されるとともに、コラーゲンの異化も促進されていることが示唆された。また、運動を継続的に実施することは、組織の弾性の維持に効果のあることが示唆された。さらに、ヒトにおける血清コラーゲン量の運動による変化から、トレーニングを繰り返すことにより、可溶性コラーゲンの割合が多くなることが示唆され、運動により、組織においては可溶性コラーゲンから不溶性コラーゲンへの移行が抑制されていると推測された。

第4章 総括

運動と健康に関する科学的研究が進み、運動やトレーニングが生体に及ぼす影響とそのメカニズムについて、生理学的、生化学的に次第に明らかにされつつある。さらにまた、ヒトはだれでも加齢とともに老化が進行し、その終末像として死に至る。加齢現象が進行すると、生体の形態上の変化として、皮膚にしわがより、関節が硬化して可動性が低下し、脊柱彎曲などさまざまな老化現象が現われる。さらに、機能的にも内臓機能、神経機能など各種生理機能の低下がおこり、全身的にもいわゆる体力低下が現われてくる。このような加齢に伴う身体の構造と機能におこる老化現象には、細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンとが大きく関与しているものと考えられている。

結合組織の aging を、その主成分であるコラーゲンの熱収縮の変化としてとらえて研究を進めたのは Verzer らである。それ以来、加齢とコラーゲンの関係についてかなりの知見が報告されているが、加齢の進行による細胞間物質の推移についての研究はきわめて少ない。最近、健康維持・増進に対する運動の効果が医学的にも高く評価され臨床医学の分野にも広く応用されている。しかし、運動習慣がヒトの老化にいかなる効果を与えるか、さらにまた、生体の防御機構にどのような関連を有するのか興味ある問題であるが、不明な点もまだ多い。加齢とともに細胞は老化するが、細胞間

物質もまた老化する。従って、老化のプロセスに種々のメカニズムが関与するが、組織・細胞と細胞間物質は相互に影響しあうものと考えられる。

本研究は、生体における加齢が細胞間物質であるコラーゲンとエラスチンの代謝にどのように影響するのか、さらにまた、運動が細胞間物質の消長にどのように影響するか検討した。本研究の目的は、細胞環境因子としての細胞間物質に焦点をあて、細胞間物質の老化による代謝変動に及ぼす運動の影響について明らかにすることである。

本研究では、1) 加齢に伴う細胞間物質の変動 2) 加齢に伴う組織コラーゲンの成熟過程 3) ヒト血清コラーゲン量と加齢との関係 4) 組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響 5) 組織の弾性に及ぼす運動の効果 6) 運動に伴うヒト血清コラーゲン量 などを取りあげて検討を加えた結果、以下の知見を得た。

1. 加齢に伴う細胞間物質の変動

1-1. 加齢によるコラーゲンの量的変化

発育期から成熟期までの皮膚組織におけるコラーゲン量は、4週齢から6週齢まで急激に増加し、7週齢あるいは8週齢の繁殖適齢期に最大値を示し、成熟期以降漸次減少することを認めた。コラーゲン量は老齢期初期に再び増加し始め、81週齢では4週齢の約3倍に達することを認めた。

腱におけるコラーゲン量の成熟期までの加齢による変動は、繁殖適齢期

である 8 週齢で最大値を示し、その後、漸次減少する傾向を認めた。

皮膚と腱のコラーゲン量は、加齢によりほぼ同様の変化を示した。しかし、心臓におけるコラーゲン量は、加齢とともに徐々に増加し、老齢期に相当する 81 週齢では、4 週齢の 2 倍に増加することを認めた。

1-2. 加齢によるエラスチンの量的変化

皮膚のエラスチン量は、週齢が進んでも組織の脱脂乾燥重量 1 mg 当り約 0.7 μ g とほぼ一定の値であることを認めた。また、心臓のエラスチン量も脱脂乾燥重量 1 mg 当り約 0.46 μ g であり、週齢が進んでもほぼ一定の値を示すことが認められた。コラーゲンとエラスチンの関係では、発育期初期ではエラスチン量が多く、その後減少するが、コラーゲン量は逆に増加することが認められ、組織は加齢とともに硬化が進行する可能性が示唆された。

1-3. 加齢に伴う中性塩可溶性、酸可溶性と不溶性コラーゲンの推移

酸可溶性コラーゲンは加齢とともに減少し、不溶性コラーゲンの割合は繁殖適齢期までに急激に増加し、その後も徐々に増加し、老齢期で約 90 %にも達することを認めた。

中性塩可溶性コラーゲンは、発育期初期の割合は約 6 %と多く、その後ほぼ 2~3 %で推移した。

組織のコラーゲンの量的・質的变化は、発育期には可溶性コラーゲンが増加し、コラーゲンの架橋形成が完成する成熟期以降は、加齢とともに不

溶性コラーゲンが増加することが示唆された。

これらの成績から、組織の細胞間物質は、量的にも質的にも、加齢の影響を受けることが認められた。

1-4. ヒト血清コラーゲン量と加齢との関係

20才から74才までの健康な成人の血清ヒドロキシプロリン量の変化についてみると、血清ヒドロキシプロリン量 ($\mu\text{g}/100\mu\text{l of serum}$) は、20才で平均約4.0、60~70才で平均約2.0となり、加齢とともに徐々に減少することを認めた。血清ヒドロキシプロリン量と年齢との間には有意な負の相関 ($r=-0.481, P<0.01$) が認められた。加齢とともに血清コラーゲン量が減少することは、ヒトの組織においても、実験動物における組織と同様、架橋形成による不溶性コラーゲンの割合が増加していることが示唆された。

2. 細胞間物質に及ぼす運動の影響

2-1. 組織コラーゲン代謝に及ぼす運動の影響

マウスを発育期、成熟期および老齢期に区分し、運動群と非運動群における皮膚コラーゲン量について観察した。非運動群では6週齢までコラーゲン量は急激に増加し、7週齢で最大値を示したが、運動群では9週齢でコラーゲン量は最大となり、両群間にピークのズレが認められ、また量的にも有意に増加することを認めた。発育期の運動については、運動強度別に軽、中程度および激運動の3群に分けて検討したが運動強度別による

差は認められなかった。成熟期では、4週齢から34週齢まで継続的な運動負荷を実施した群では、非運動群に比べ皮膚のコラーゲン量が有意に減少することを認めた。老齢期では、4週齢から70週齢までと4週齢から81週齢まで継続的に運動を負荷した群において、非運動群に比べ皮膚のコラーゲン量が有意に減少することを認めた。

発育期に運動強度別に負荷を行なった動物の腱のコラーゲン量の変化については、中程度運動群の7週齢および9週齢でのコラーゲン量は、非運動群に比べ有意に多くなることを認めた。さらに、中程度運動群の7週齢と9週齢で腱のコラーゲン量は軽運動群や激運動群に比べ有意に多いことを認めた。また腱のコラーゲン量は、中程度運動では4週間のトレーニング期間で、非運動群、軽運動群に比べ一時的に有意に減少することを認めた。このことは、トレーニングによる腱細胞の肥大化、またはコラーゲン線維の間に存在する水分保持などの働きを持つプロテオグリカンの関与が推測された。

これらの成績より、コラーゲンの量的変化としては、継続的運動により発育期では増加し、成熟期以降では減少することが認められた。組織におけるコラーゲンの蓄積は、加齢に伴い促進する傾向にあるが、運動の継続により抑制される可能性が示唆された。

成熟期に至る15週齢までの対象について運動強度別の皮膚の可溶性と不溶性コラーゲンの割合について検討した結果、非運動群では、週齢が進む

につれて不溶性コラーゲンの割合が増加し、15 週齢で 81.9 %になることを認めた。運動群を運動強度別にみると、軽運動群は非運動群に比べて有意な差を認めなかったが、中程度と激運動群とは、酸・中性塩で可溶化されるコラーゲンの割合が約 20 %も多くなることを認め、11 週齢と 13 週齢で有意に増加することが認められた。さらに 15 週齢において、中程度と激運動群では、不溶性コラーゲンの割合が非運動群に比べ約 10 %も少ないことを認めた。さらに、老齢期に相当する 81 週齢まで運動を継続的に負荷した群では、非運動群に比べ、皮膚組織の酸で可溶化されるコラーゲンの割合が有意に多く、不溶性コラーゲンの割合が有意に少なくなることを認めた。これらの結果より、運動によって可溶性コラーゲンから不溶性コラーゲンへの移行が抑制されているものと推測された。そのメカニズムとしては、コラーゲンの成熟過程における分子内および分子間の架橋形成が抑制されるとともに、コラーゲンの異化も促進されていることが示唆された。

2-2. 組織の弾性に及ぼす運動の効果

運動群の皮膚のエラスチン量は、非運動群に比べ発育期のピークを過ぎる 12 週齢頃から有意に増加し、その後老齢期に至るまで増加することを認めた。継続的な運動を行った対象の心臓では、体重に対する心重量の割合が有意に増加することを認めた。運動群の心臓のエラスチン量は、非運動群に比べ 8 週齢と 16 週齢で有意の増加を示した。これらの成績より、継続的な運動により組織におけるエラスチンの代謝が亢進することが示唆さ

れた。

さらに、組織の弾性を示す指標であるエラスチン/コラーゲン比についてみると、非運動群の皮膚では8週齢から81週齢までほぼ一定の割合を示した。心臓におけるエラスチン/コラーゲン比は、非運動群では週齢が進むにつれて減少することを認めた。運動習慣を与えないままで対象動物を生活させると、加齢とともにコラーゲン量が増加し、その結果組織の弾性が失われることが示唆された。一方、運動群の皮膚および心臓におけるエラスチン/コラーゲン比は、皮膚および心臓ともに非運動群に比べて増加する傾向が認められ、皮膚では81週齢で、心臓では16週齢と81週齢で、運動群の方が非運動群に比べ有意に増加することを認めた。従って、動物が運動を継続することにより、組織は弾性を維持することが示唆された。

これらの成績より、運動習慣を与えることにより、組織においてはエラスチン量が増加し、逆にコラーゲン量が減少し、これらのことが組織の弾性に違いを生じさせる要因になるものと推測され、運動は組織の張力の維持に影響していることが示唆された。

2-3. 運動に伴うヒト血清コラーゲン量

18才から22才の健康な大学生を対象とし、一過性の運動を負荷することにより、血清ヒドロキシプロリン量がいかなる変化を示すか検討した。日常的な運動習慣のない一般学生(非運動部員)と、日常的に運動トレーニングを行っている運動部員を対象とした。運動直後、血清ヒドロキシプロ

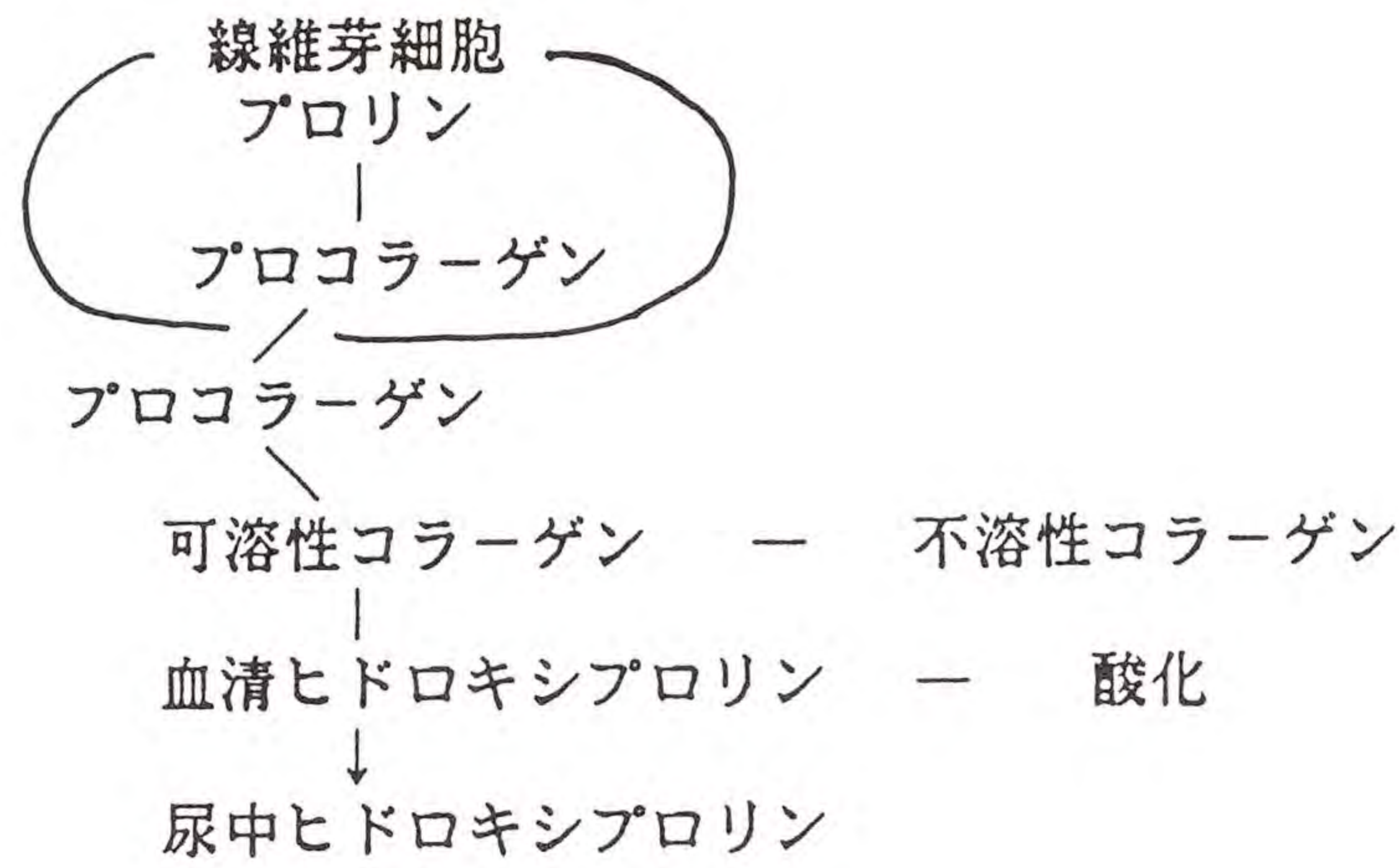
リン量は、増加傾向を示した。血清ヒドロキシプロリン量の運動直後における変化は、陸上部員の 3,000 m 走、水泳部員の水泳、オールアウト走を実施したバドミントン部員、陸上部員、非運動部員の順で増加傾向が著しいことを認めた。この成績より、一過性の運動により、組織コラーゲンの分解が亢進されることが示唆された。また、対象における変化率の違いは、運動種目やトレーニング強度の差により生じたものと推測される。さらに、安静時の血清ヒドロキシプロリン量を比べると、陸上部員と水泳部員の血清ヒドロキシプロリン量は、非運動部員あるいはバドミントン部員のそれよりも有意に低値を示すことを認めた。

ヒトにおける血清コラーゲン量の運動による変化から、トレーニングを繰り返すことにより、代謝的に活性化可溶性コラーゲンの割合が多くなることが示唆された。

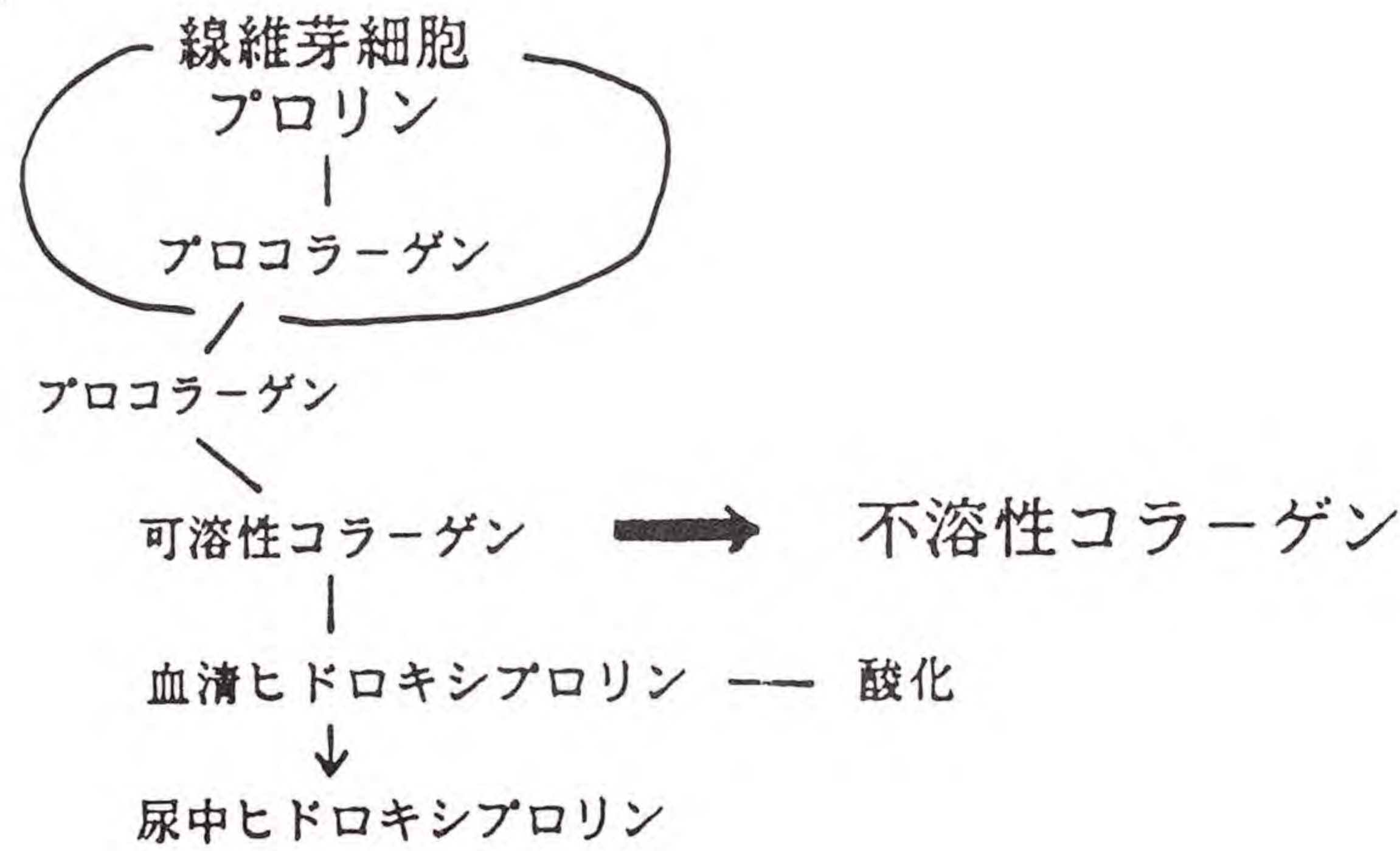
3. 本研究の成績より、加齢および運動とコラーゲン代謝との関係についての仮説を図 21 に示した。

加齢とコラーゲン代謝については、加齢に伴い血清ヒドロキシプロリン量が減少し、皮膚、腱、心臓といった組織のコラーゲン量が増加することが認められた。さらにそのコラーゲンは、不溶性部分の割合が多くなっていることが明らかになった。一方、エラスチンは加齢によっても量的変化を示さないことを認めた。

-コラーゲン代謝-



-加齢-



-運動-

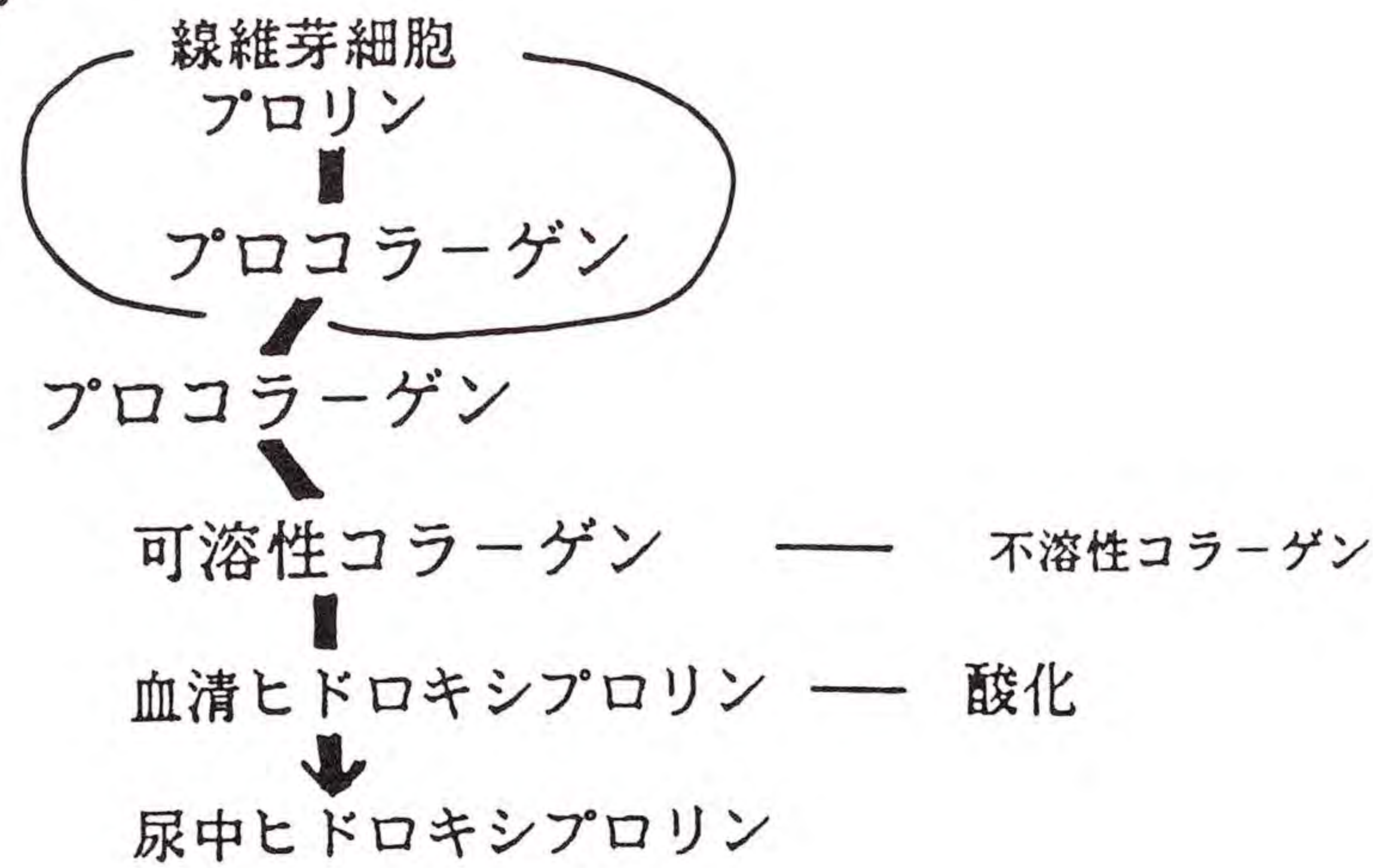


図 21 加齢および運動とコラーゲン代謝との関係についての仮説

運動とコラーゲン代謝については、運動を継続することにより、コラーゲン代謝が亢進され、コラーゲンの架橋形成が抑制されるとともに、分解もまた亢進されることが明らかになった。一方、エラスチンは加齢によって量的変化を示さなかったが、継続的運動により量的に増加することを認めた。運動によるエラスチンの増加は、組織の弾性維持に影響を与えていることが示唆された。

運動は動物にとって最も基本的で、生活上必要な日常的動作である。運動は生体の生理機能の活性化に影響することが知られているが、本研究の結果、運動の継続により、細胞間物質は生体機能に有用な効果を与え、さらにまた、組織・細胞の生理的機能の発現にも有利な条件を構築していることが示唆された。

本研究で得られた結果は、運動が生体の老化およびその防御機構に及ぼす影響を解明するための有用な知見を示したものと考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始御懇篤なる御指導と激励を賜りました
大阪市立大学 大学院生活科学研究科 健康生理学講座 前田如矢教授
に深甚なる謝意を表します。また、本研究に対し種々の御教示、御助言
を賜りました大阪市立大学 生活科学部 湯浅勲教授、片山洋子教授、
西成勝好教授に厚く御礼申し上げます。さらに、本研究に多大の御助言、
御援助を賜りました大阪教育大学 後藤英二教授、本研究に御協力頂い
た共同研究者の方々に併せて感謝の意を表します。

第5章 文献

5-1. 本論文に直接関係のある研究論文

- 1) Effects of Physical Activity on Collagen Content in Mice
Kenzo Koyama and Eiji Goto : J. Physical Fitness Jpn. 35: 177-188 (1986)
- 2) Effects of Exercise Training on Back Skin and Achilles Tendon Collagen Content in Growing Mice
Kenzo Koyama, Noriko Omichi, Hiroshi Kogawa, Masana Nakai and Eiji Goto : Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 37: 303-307 (1988)
- 3) 運動強度の違いが発育期マウスの腱および血中コラーゲン量に及ぼす影響
小山健蔵、仲井正名、後藤英二、前田如矢 : 体力研究 72: 87-92 (1989)
- 4) 運動がマウスの皮膚細胞間物質に及ぼす影響
小山健蔵、前田如矢 : 教育医学 37: 317-322 (1992)
- 5) Effects of Exercise Training on Skin Collagen in Growing Mice
Kenzo Koyama, Eiji Goto and Kazuya Maeda : Jpn. J. Phys. Fitness Sports Med. 41: 166-173 (1992)
- 6) Effects of Exercise Training on Collagen and Elastin Content of Heart in Mice
Kenzo Koyama and Kazuya Maeda : Educ. Med. 38: 203-208 (1992)
- 7) ヒトにおける血清ヒドロキシプロリン量と加齢との関係
小山健蔵、佐藤達也、大道乃里江、宮本忠吉、三村寛一、前田如矢 : Ann. Physiol. Anthropol. 12: 243-249 (1993)

5-2. 参考文献

- Adam, A. (1966) : Effects of exercise upon ligament strength. *Res. Quart.*, 37, 163-167.
- Bachinger, H. P., Bruckner, P., Timple, R., Prockop, D.J. and Engel, J. (1980) : Folding metabolism of the triple helix in type-III collagen and type-III pN-collagen; Role of disulfide bridges and peptide bond isomerization. *Eur. J. Biochem.* 106, 619-632.
- Bailey, A.J. and Peach, C. M. (1968) : Isolation and structural identification of a labile intermolecular crosslink in collagen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 812-819.
- Bentz, H., Bachinger, H.P., Glanville, R.W. and Kuhn, K. (1978) : Physical evidence for assembly of A and B chains of human placental collagen in a single triple helix. *Eur. J. Biochem.* 92, 563-567.
- Bock, A.V. (1964) : The circulation of a marathoner. *J. Sports Med. Physic. Fit.* 3, 80-86.
- Bornstein, P. and Piez, K.A. (1966) : The nature of the intramolecular cross-links in collagen. The separation and characterization of peptides from the cross-link region of rat skin collagen. *Biochemistry* 5, 3460-3473.
- Burleigh, M.C. (1974) : Cathepsin B1. A lysosomal enzyme that degrades native collagen. *Biochem. J.* 137, 387-398.
- Casarett, G.W. (1964) : Similarities and contrasts between radiation and time pathology. *Advances in Gerontol. Res.* 1, 109-163.

Chvapil, M. and Hurych, J. (1968) : Rev. Connective Tissue Res. ed.by Hall, D.A.
Academic Press, New York and London

Chvapil, M., Rakusan, K., Wachtlova, M. and Poupa, O. (1966) : Collagen in the
heart of wild and domesticated animals. Gerontologia. 12, 144-154.

Cooper, K.H. (1976) : Physical fitness levels vs selected coronary risk factors.
A cross-sectional study. J.A.M.A. 236, 166-169

Dixit, S.N. (1990) : Type-IV collagens: Isolation and characterization of two
structurally distinct collagen chains from bovine kidney cortices. Eur. J. Biochem.
106, 563-570.

Elster, S.K. and Lowry, E.L. (1950) : Collagen content of guinea pig tissue.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75, 127-129.

Fischer, G.M. and Llaurodo, J.G. (1966) : Collagen and elastin content in canine
arteries selected from functionally different vascular beds. Cir. Res. 14, 394-399.

Franzblau, C. and Faris, B. (1982) : Elastin. In Cell Biology of Extracellular
Matrix. ed. by Hay, E.D. Plenum, New York, 65-69.

藤本大三郎 (1990) : コラーゲンの老化と細胞の活動. 現代化学 12, 36-40.

藤本大三郎 (1984) : 結合組織の加齢. 日本臨床 42, 59-64.

藤本大三郎 (1982) : コラーゲン架橋とエイジング. コラーゲン代謝と疾患
(永井裕, 藤本大三郎編) 講談社サイエンティフィック, 東京 69-85.

- Gerber, G., Gerber, G. and Altman, K.I. (1960) : Studies on the metabolism of tissue proteins. I. Turnover of collagen labelled with proline-U-C¹⁴ in young rats. J. Biol. Chem. 235, 2653-2656.
- Goto, E., Shiraishi, T. and Kambayashi, H. (1977) : Influence of physical exercise during the growth period of mice. Osaka Kyoiku Univ. Ser.III 26, 123-129.
- Green, H. and Goldberg, B. (1965) : Synthesis of collagen by mammalian cell lines of fibroblastic and nonfibroblastic origin. Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 1360-1365
- Hall, D.A. and Jackson, D.S. (1970) : International review of connective tissue research. 5, 99-112. Academic press, London
- Harris, E.D. and Krane, S.M. (1974) : Collagenases. N. Engl. J. Med. 291, 557-563
- Hay, E.D. (1981) : Extracellular matrix. J. Cell Biol. 91, 205-223.
- Hay, E.D. (1982) : Cell biology of extracellular matrix. New York, Plenum.
- Heikkinen, E. (1968) : Transformation of rat skin collagen with special reference to the ageing process. Acta. Physiol. Scand. 317, 1-69.
- Heikkinen, E. (1969) : The ageing of connective tissue. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 108, 6-7.
- Heikkinen, E. (1973) : Aging of interstitial collagen. In Biology of collagen 1st ed by Viidik, A. and Vuust, J. Academic press, New York and London 1-14.

Heikkinen, E. and Vouri, L. (1972) : Effects of physical activity on the metabolism of collagen in aged mice. *Acta. Physiol. Scand.* 84, 543-549.

平山千里, 村脇義和, 谷本浩一 (1984) : 結合織の生化学 -代謝に関する諸因子-. *日本臨床* 42, 51-58.

Jackson, S.F. (1968) : *Treatise of collagen.* ed. by Gould, B.S. Academic Press London and New York

Jackson, D.S. and Fessler, J.H. (1955) : Isolation and properties of a collagen soluble in salt solution at neutral pH. *Nature* 176, 69-70.

John, R. (1972) : Chemical compositions of elastins isolated from aortas and pulmonary tissues of humans of different ages. *Biochem. J.* 127, 261-269.

Kiiskinen, A. and Heikkinen, E. (1978) : Effects of prolonged physical training on development of connective tissues in growing mice. *Proc. Int. Symp. Exercise Biochem.* 2nd. Abstracts. 25.

Knorring, J. (1970) : Effect of age on the collagen content of the normal rat myocardium. *Acta. Physiol. Scand.* 100, 253-256.

Kohn, R.R. and Rollerson, E.J. (1959) : Studies on the effect of heart and age in decreasing ability of human collagen to swell in acid. *J. Gerontol* 14, 11-16.

Korenchevsky, V. (1961) : *Physiological and pathological ageing.* New York, Hafner.

Kovanen, V., Suominen, H. and Peltonen, L. (1987) : Effects of aging and life-long physical training on collagen in slow and fast skeletal muscle in rats. A morphometric and immunohistochemical study. *Cell. Tissue Res.* 248, 247-255.

Kramsch, D.M., Aspen, A.J. and Abramowitz, B.B. (1981) : Reduction of coronary atherosclerosis by moderate conditioning exercise in monkeys on an atherogenic diet. *N. Engl. J. Med.* 305, 1483-1489.

久保木芳徳、畑隆一郎、吉里勝利 (1986) : 次世代タンパク質コラーゲン-動物の起源の謎からバイオオーガンまで 講談社 東京 1-200

Kuhn, K. and Glanville, R.W. (1980) : Molecular structure and higher organization of different collagen type. In *Biology of Collagen* ed. by Viidik, A. and Vuust, J. Academic press, New York 1-14.

Lefevre, M. and Rucker, R.B. (1980) : Aorta elastin turnover in normal and hypercholesterolemic Japanese quail. *Biophys. Acta.* 630, 519-529.

Lefevre, M. and Rucker, R.B. (1983) : Modification of arterial elastin in vivo. Effects of age and diet on changes in the N-terminal amino acid content of aorta elastin. *Biochem. Biophys. Acta.* 743, 338-342.

Lowry, O.H. and Hastings, A.B. (1952) : *Cowdry's problem of aging.* Baltimore

Lowry, O.H., Hastings, A.B., Hull, T.Z. and Brown, A.N. (1942) : Histochemical changes associated with aging. II. Skeletal and cardiac muscle in the rat. *J. Biol. Chem.* 143, 271-280.

Matsuda, M., Nosaka, T., Sato, M., Iijima, J., Ohshima, N. and Fukushima, H. (1989) : Effects of exercise training on biochemical and biomechanical properties of rat aorta. *Angiology* 40, 50-58.

Mayne, R. and Burgeson, R.E. (1987) : *Structure and function of collagen types.* Academic press, New York 1-317.

永井裕 (1984) : 結合組織の生化学. *日本臨床* 42, 1019-1027.

- 中川喜直, 佐藤智明, 福田芳郎, 広田公一 (1988): 有氣的、無氣的トレーニングがラット腱のコラーゲン線維に与える影響. 体力科学 37, 100-108.
- 中村桂子, 松原謙一 (1985): 細胞の分子生物学. 教育社. 東京
- Neuman, R.E. and Logan, M.A. (1950): The determination of hydroxyproline. J. Biol. Chem. 184, 299-306.
- 野田春彦, 永井裕, 藤本大三郎 編 (1975): コラーゲン. 南江堂 東京 1-287.
- 大平充宣 (1983): 運動生理学の基礎 ベースボールマガジン社 東京
- 大柳善彦 (1990): 活性酸素と病気 化学同人 東京
- Paffenbarger, R.S. (1975): Work activity and coronary heart mortality. N. Engl. J. Med. 292, 545-550.
- Paffenbarger, R.S. (1978): Physical activity as an index of heart attack risk in college alumni. Am. J. Epidemiol. 108, 161-175.
- Prockop, D.J. (1964): Isotopic studies on collagen degradation and the urine excretion of hydroxyproline. J. Cell. Invest. 43, 453-457.
- Prockop, D.J. and Kivirikko, K.I. (1967): Relationship of hydroxyproline excretion in urine to collagen metabolism. Ann. Intern. Med. 66, 1243-1266.
- Prockop, D.J., Kivirikko, K.I., Tuderman, L. and Guzman, N.A. (1979): The biosynthesis of collagen and its disorders. N. Engl. J. Med. 301, 13-24.

- 堺隆弘 (1978) : コラーゲン, コラーゲンと疾患 (野田春彦, 永井裕, 藤本大三郎編) 南江堂, 東京 207-249.
- 堺隆弘 (1982) : コラーゲンの病態生理, コラーゲン代謝と疾患 (永井裕, 藤本大三郎編) 講談社サイエンティフィック, 東京 192-199.
- Sandberg, L.B., Soskel, N.T. and Leslie, J.G. (1981) : Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states. *N. Engl. J. Med.* 304, 566-577.
- Sellers, A. and Marphy, G. (1981) : Collagenolytic enzymes and their naturally occurring inhibitors. *Int. Res. Conn. Tissue Res.* 9, 151-190.
- Selvester, R., Camp, J. and Sanmarco, M. (1977) : Effects of exercise training on progression of documented coronary arteriosclerosis in men. *Ann. NY Acad. Sci.* 301, 465-508.
- Shock, N.W. (1961) : Physiological aspects of aging in man. *Ann. Rev. Physiol.* 23, 97-122.
- Sjoerdsma, A., Udenfriend, S., Keiser, H. and Leroy, C. (1965) : Hydroxyproline and collagen metabolism. *Ann. Inter. Med.* 63, 672-694.
- Smily, J.D. and Ziff, M. (1964) : Urinary hydroxyproline excretion and growth. *Physiol. Rev.* 44, 30-44.
- Sobel, H. and Marmorston, J. (1956) : Hormonal influences upon connective tissue changes of aging. *J. Gerontol.* 11, 457-481.
- Sobel, H., Marmorston, J. and Moore, F.J. (1954) : Collagen and hexosamine content of femurs of rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 87, 346-349.

- Tanzer, M.L. (1973) : Cross-linking of collagen. *Science* 180, 561-566.
- Tanzer, M.L., Housley, T., Berube, L., Fairweather, R., Franzblau, C. and Gallop, P.M. (1973) : Structure of two histidine containing cross-links from collagen. *J. Biol. Chem.* 248, 393-402.
- Tanzer, M.L. (1976) : Cross-linking in *Biochemistry of Collagen*. ed. by Ramachandran, G.A. and Reddi, A.H. Plenum Press New York and London 137-157.
- Takeda, T., Suzuki, Y., Yao, C.S. and Yamada, S. (1973) : Experimental studies on the effect of aging and sex on collagen in mice. *Connective Tissue* 5, 29-34.
- Takeda, T., Suzuki, Y. and Yao, C.S. (1975) : Experimental studies on the effect of aging and endocrine control on collagen formation in various organs. *Acta. Path. Jpn.* 25, 135-151.
- Tipton, C.M., Schild, R.J. and Tomanex, R.J. (1968) : Influence of physical activity on the strength of knee ligament in rats. *Am. J. Physiol.* 212, 783-787.
- Tipton, C.M., James, S.L., Mergner, W. and Tchong, T. (1970) : Influence of exercise on the strength of the medial collateral knee ligament of dogs. *Am. J. Physiol.* 218, 894-901.
- Tipton, C.M., Matthes, M.R.D. and Carey, R.A. (1975) : Hydroxyproline concentrations in ligaments from trained and nontrained rats. In *Metabolic Adaptation to Prolonged Physical Exercise* ed. by Howald, H. and Poormans, J.R. Birkhauser Verlag Swizerland 262-267.
- Tomanex, R.J., Taunton, C.A. and Liskip, K.S. (1972) : Relationship between age, chronic exercise and connective tissue of the heart. *J. Gerontol.* 1, 33-38.

Trelstad, R.L. and Hayashi, K. (1979) : Tendon collagen fibrillogenesis: intercellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth. *Dev. Biol.* 71, 228-242.

Trus, B.L. and Piez, K.A. (1980) : Compressed microfibril models of the native collagen fibril. *Nature* 286, 300-301.

鶴藤丞 (1967) : 結合組織と加齢. *医学のあゆみ* 62, 308-313.

Verzar, F. (1956) : Das alter des kollagens. *Helv. Physiol. Acta.* 14, 207-221.

Viidik, A. (1967) : The effects of training on the tensile strength of isolated rabbit tendons. *Scand. J. Plastic Reconstruct Surg.* 1, 141-147.

Werb, Z. (1989) : Proteinases and matrix degradation. In: *Textbook of Rheumatology.* ed. by Kelley, W.N., Harris, E.D.Jr., Ruddy, S. and Sledge C.B. W.B. Saunders, Philadelphia 300-321.

Werb, Z., Mainardi, C.L., Vater, C.A. and Harris, E.D.Jr. (1977) : Endogenous activation of latent collagenase by rheumatoid synovial cells: Evidence for a role of plasminogen activator. *N. Engl. J. Med.* 296, 1017-1023.

Williams, B.R., Gelman, R.A. Poppko, O.C. and Piez, R.A. (1978) : Collagen fibril formation. *J. Biol. Chem.* 253, 6578-6585.

Woesnner, J.F.Jr. (1961) : The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this imino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 93, 440-447.

山田茂, 跡見順子, 富野士良, 原田邦彦, 岩垣丞恒, 渡辺雅之, 堤達也, 平田耕造 (1990) : 運動生理生化学. 培風館 1-272.

Yoneyama, K. (1976) : Urinary hydroxyproline as an index of growth potential
(2) A study on school children. Jap. J. Pub. Health 23, 540-544.

Zorab, P.A. (1969) : Normal creatinine and hydroxyproline excretion in young
persons. The Lancet 29, 1164-1169.