

原 著

カルシウム欠乏卵巣摘出ラットを用いた永久硬水および
一時硬水の骨形成効果に関する基礎研究緒 方 文 彦¹⁾ 長 井 紀 章²⁾ 伊 藤 吉 将²⁾ 川 崎 直 人^{1,3)}

1) 近畿大学薬学部公衆衛生学研究室

2) 近畿大学薬学部製剤学研究室

3) 近畿大学アンチエイジングセンター

The effect of permanent or temporary hard water
consumption on osteogenesis
in calciprivic ovariectomized ratsFumihiko OGATA¹⁾ Noriaki NAGAI²⁾ Yoshimasa ITO²⁾ Naohito KAWASAKI^{1,3)}

1) Department of Public Health, Faculty of Pharmacy, Kinki University

2) Department of Advanced Design for Pharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, Kinki University

3) Antiaging Center, Kinki University

要約

本研究では、卵巣摘出ラットを用いてミネラル水飲水量と骨粗鬆症との関連性について基礎的検討を実施した。給餌方法は、低カルシウム食と精製水（PW群）、低カルシウム食と永久硬水（PH群）および低カルシウム食と一時硬水（HT群）の3種類とした。実験開始3ヶ月後、PH群およびTH群の骨密度は、PW群のそれと比較し、高値を示した（ $p < 0.05$ ）。これらのことから、永久硬水および一時硬水は、骨量の維持に寄与していることが明らかとなった。さらに、実験開始3ヶ月後のPW群においては、実験開始直後と比較し、骨中および血中のカルシウムおよびマグネシウム濃度は減少傾向を示した。一方、PH群およびHT群では、骨中および血中のカルシウムおよびマグネシウム濃度を維持していた。PH群およびTH群では骨量の維持が可能であることが示唆された。また、PW群、PH群およびTH群間において血清カルカリフォスファターゼに有意な差は認められなかった。（臨床環境 24：94-101, 2015）

《キーワード》永久硬水、一時硬水、卵巣摘出ラット、カルシウム含量

受付：平成27年10月5日 採用：平成27年10月8日

別刷請求宛先：川崎直人

〒577-8502 大阪府東大阪市小若江3-4-1, 近畿大学薬学部公衆衛生学研究室

Reprint Requests to Naohito Kawasaki Ph. D., Faculty of Pharmacy, Kinki University, 3-4-1, Kowakae, Higashi-Osaka, Osaka, 577-8502, Japan

Abstract

In this study, we investigated the relationship between mineral water consumption and osteogenesis in ovariectomized rats that received either a low-calcium diet and purified water (PW group), a low-calcium diet and permanent hard water (PH group), or a low-calcium diet and temporary hard water (TH group) over a 3-month period. After 3 months, the bone density of both the PH and TH groups was greater than that of the PW group ($p < 0.05$), which indicated that either permanent hard water or temporary hard water can contribute to the maintenance of bone density. Moreover, the levels of calcium and magnesium in the bone and blood of the PW group decreased after 3 months. Conversely, both the PH and TH groups maintained calcium and magnesium levels in their bone and blood. Scanning electron microscopy imaging and electron probe microanalysis of the bone in the PH and TH groups showed maintenance of bone density over the 3-month study period. There was no significant difference in serum alkaline phosphatase levels between the PW group and the PH or TH groups. These results suggest that the consumption of permanent hard water or temporary hard water could be beneficial for osteogenesis.

(Jpn J Clin Ecol 24 : 94 – 101, 2015)

《Key words》Permanent hard water, temporary hard water, ovariectomized rat, calcium content

緒 言

骨粗鬆症は、加齢とともに骨吸収と骨形成のバランスが崩れ、骨折が起こりやすくなる疾患であり、相対的に骨吸収が優位になることに伴う骨量減少や骨の微細構造の変化による骨強度の低下がみられる。高齢化社会を迎えた現在、我が国の骨粗鬆症患者は推定1,100万人といわれており、これら骨粗鬆症は社会問題の1つになっている¹⁾。骨を構成し、骨が貯蔵庫となっている必須ミネラルは「骨ミネラル」と定義されており、カルシウムおよびマグネシウムは、それぞれ細胞外ミネラルおよび細胞内ミネラルと分類されている²⁾。カルシウムは骨の主要な成分であり、閉経後の女性のカルシウム摂取量と骨量の間には正の相関関係があることが広く知られている³⁾。また、閉経後骨粗鬆症の患者では血中および骨中マグネシウム濃度が低下しており、マグネシウム投与により骨密度が改善することが報告されている⁴⁾。すなわち、閉経後の女性や高齢者では、カルシウムやマグネシウムの不足状態を生じていることが推察される⁵⁾。これらのことより、カルシウムおよびマグネシウム摂取が、骨粗鬆症防止に重要であることは明らかであり、効果的なカルシウム、マグネシウムの摂取法を把握または確立することは今後の我が国

において非常に重要である。

一方、世界各地で水質調査が実施され、飲料水の総硬度(カルシウム+マグネシウム)と循環器疾患の発生率は、逆相関することが報告されており⁶⁾、カルシウムとマグネシウムの代謝的意義が解明され始めている。我々はこれらミネラルを外部から取り入れており、その摂取方法は食事と飲料水からが主である。飲料水から摂取するカルシウムやマグネシウムなどのミネラルは、食事からの摂取量に比較して少なく、飲料水からの摂取を重要視しないとの意見がある⁷⁾。しかし、マグネシウムなどのミネラルは、種々の補酵素の役割を担っているため、少量の上乗せであっても重要な役割を演じると考えられ、飲料水からのミネラル摂取の重要性が認識され始めている。これらのことから、様々な状態下におけるカルシウム摂取と骨粗鬆症進行の関係をj知することは超高齢化社会を迎える我が国において重要と考えられる。また、これまでに当研究グループでは、高ミネラル水摂取がカルシウム欠乏卵巣摘出ラットの骨密度および血中カルシウム濃度の維持に有用であることを明らかとした⁸⁾。すなわち、飲料水から摂取するカルシウムが骨粗鬆症防止に寄与できることを解明した。しかし、骨粗鬆症防止のためのカルシウムの摂取形態などに関しては明らかとなっていない

のが現状である。飲料水中の硬度（カルシウム＋マグネシウム）は、永久硬度（硫酸塩、硝酸塩、塩化物などのように煮沸によって析出しないカルシウム塩およびマグネシウム塩）および一時硬度（炭酸水素塩のように煮沸により炭酸塩となり、析出するカルシウム塩およびマグネシウム塩）に分類されて、水道法による水質基準においては、300mg/L以下と規定されている。したがって、骨粗鬆症防止に寄与できるカルシウム塩およびマグネシウム塩を明らかにすることができれば、カルシウムおよびマグネシウムをより効率的に摂取することが可能であると考えられる。

本研究では、高齢女性かつ低カルシウム摂取条件下における、飲料水からのミネラル摂取形態が骨形成に及ぼす影響について明らかとすべく、カルシウム欠乏状態の卵巣摘出ラットを用い、永久硬水および一時硬水の飲水が血中および骨中カルシウム濃度へ与える影響について検討した。

方 法

1. 使用動物および実験材料

実験には卵巣摘出ラット（卵巣を摘出した5週齢 Wister 雌性ラット）及び精製水、永久硬水、一時硬水を用いた。卵巣摘出ラットは清水実験材料（京都）から購入し、飼育繁殖固形飼料 CE-2（日本クレア、大阪）及び水道水により1週間順化させた後、6週齢となったラットを実験に用いた。動物は、順化後無作為に低カルシウム飼料および精製水（PW 群）、低カルシウム飼料および永久硬水（PH 群）、低カルシウム飼料および一時硬水（TH 群）の3群に分け、1-3ヵ月給餌した。低カルシウム飼料は、AUN-93G 組成を基本として調製し、その組成は51.9% コーンスターチ、20% ミルクカゼイン、10% グラニュー糖、7% 精製大豆油、5% 結晶セルロース、3.5% ミネラル Mix、1% α コーンスターチ、1% ビタミン Mix (AIN-93VX)、0.3% L-シスチン、0.25% 重酒石酸コリンおよび0.0014% 第3ブチルヒドロキノン（最終 Ca 含有濃度0.006%）であり、永久硬水および一時硬水は、それぞれ硫酸カルシウム（和光純薬工業株式

社、大阪）および炭酸カルシウム（和光純薬工業株式会社、大阪）を用い、カルシウム濃度が200mg/Lに調製したものをを用いた。また、これらラットは、25°Cに保たれた環境下で飼育し、飼料および水は自由に摂取させた。なお、動物実験は近畿大学実験動物規定に従って行った。

2. 血中および骨中カルシウムとマグネシウム濃度の測定

ペントバルビタールナトリウム（30 mg/kg、i.p.、東京化成株式会社、東京）投与にて全身麻酔後、ラット大静脈から採血し、その後、さらにペントバルビタールナトリウムを過剰投与することで安楽死させ、大腿骨の採取を行った。血清は、得られた血液をヘパリンと共に遠心分離（15,000 rpm、4°C、15 min）することで得た。血清中カルシウムおよびマグネシウム濃度は、得られた血清を試料とし、1% 硝酸で適宜希釈後、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES、株式会社島津製作所、京都）を用いて測定した。

ラット大腿骨は、2時間煮沸後、自然乾燥した。その後、マッフル炉において2時間昇温、48時間保持（550°C）、自然冷却することにより実験に供した。収率（以下、骨密度とする）は、炭化前後における重量差から算出した。灰化後の大腿骨は、1% 硝酸50 mLに完全溶解し、適宜希釈し、ICP-AESにおいてカルシウムおよびマグネシウム濃度を測定した^{9,10}。なお、血中および骨中のカルシウムとマグネシウム濃度は、実験開始時の初濃度との比で表した。

3. 電子顕微鏡撮影および元素分析

ラットから採取した大腿骨の電子顕微鏡撮影および元素分析は、それぞれ電子顕微鏡装置 JSM-5500LV（日本電子株式会社、大阪）および電子マイクロアナライザ JXA-8530F（日本電子株式会社、大阪）により行った。

4. アルカリフォスファターゼ活性（ALP）の測定

血清中アルカリフォスファターゼ（ALP）は、

p-ニトロフェニルリン酸基質法によるアルカリフォスファターゼ活性測定キット (和光純薬工業株式会社) により測定した¹⁰⁾。

5. 統計解析

データは、平均±標準偏差として表した。有意差は、Student's t-testにて解析し、0.05未満のp値を有意な差として示した。

結 果

Figure 1には各群におけるラット体重 (A)、飼料摂取量 (B)、飲水量 (C) の経時変化を示す。すべての群において実験開始1ヶ月後までは、大きな変化は認められなかった。しかし、実験開始2~3ヶ月後には、PW群と比較しPH群およびTH群で体重および飲水量に有意な差が確認された ($p<0.05$)。次に、大腿骨の骨密度を Fig. 2に示す。その結果、PW群では実験開始から骨密度の低下が見られた。一方、永久硬水および一時硬水の飲水により、骨密度の低下が抑制された。また、先の体重および飲水量 (Fig. 1) と同様に、実験開始2~3ヶ月後のPW群の骨量 ($47.5\pm 2.4 \sim 48.5\pm 1.5\%$) と比較し、PH群 ($51.7\pm 1.0 \sim 54.6\pm 2.0\%$) およびTH群 ($52.3\pm 1.7 \sim 53.3\pm 0.6\%$) のそれでは有意に高値であった (2~3ヶ月、平均値±標準偏差、 $n=3$)。これらのことより、永久硬水および一時硬水の飲水により骨密度が高まることが示唆された。Figures 3および4には、血中および骨中カルシウムとマグネシウム濃度比の経時変化を示す。PW群の血中および骨中カルシウムは、時間経過に伴い減少傾向を示した (実験開始3ヶ月後の血中および骨中カルシウム量: $88.7\pm 27.0\text{mg/L}$ および $0.18\pm 0.01\text{g/g}$)。一方、PH群およびTH群の血中および骨中カルシウム (実験開始3ヶ月後の血中および骨中カルシウム量、PH群: $106\pm 4.6\text{mg/L}$ および $0.23\pm 0.01\text{g/g}$ 、TH群: $100.8\pm 1.7\text{mg/L}$ および $0.23\pm 0.01\text{g/g}$) は、減少傾向を示さず、永久硬水および一時硬水の飲水は、血中および骨中のカルシウム維持に寄与していることが示唆された。また、血中および骨中マ

グネシウムに関しても同様の傾向を示し、PW群と比較し、実験開始3ヶ月後に有意な差が認められた ($p<0.05$)。さらに、PH群およびTH群の両群においては差が認められず、ほぼ同程度であった。Figure 5には、大腿骨の電子顕微鏡画像を示す。その結果、永久硬水および一時硬水の飲水により、大腿骨表面での骨膜および皮質骨の破壊所見がなく、顕著な劣化は認められなかった。また、大腿骨表面の元素分析より (Fig. 6)、実験開始3ヶ月後のカルシウムおよびマグネシウムは、実験開始時とほぼ同程度以上の量含有していることが明らかとなった。Figure 7には、血中ALP濃度を示す。その結果、各群間で有意な差は認められなかった。

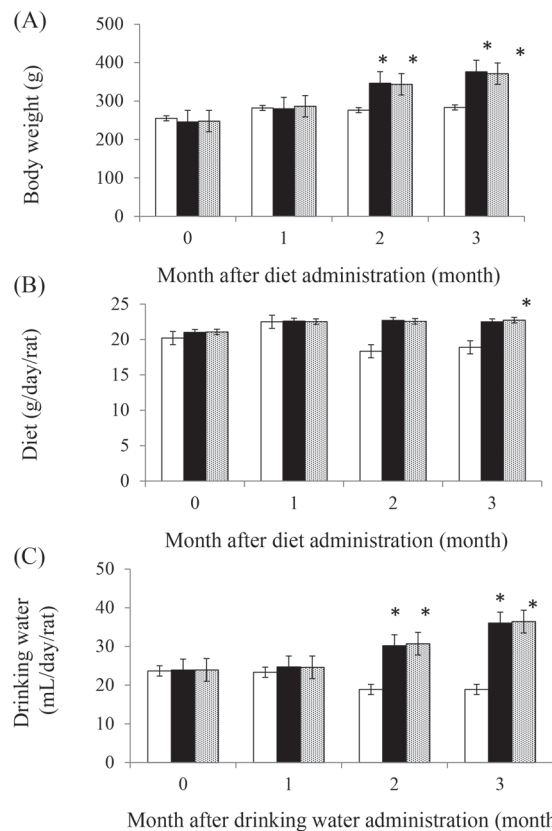


Fig. 1. Changes of body weight (A), diet (B), and drinking water (C) in ovariectomized rats

The data are presented as means \pm S.D. of 3 ovariectomized rats. * $p < 0.05$, vs. P.W. □: P.W., ■: PH, ▨: TH

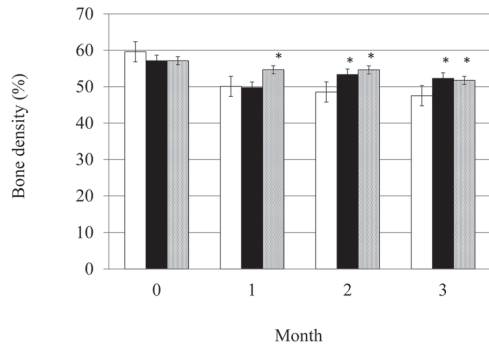


Fig. 2. Bone density of ovariectomized rats

The data are presented as means ± S.D. of 3 ovariectomized rats. * $p < 0.05$, vs. P.W. □: P.W., ■: P.H., ◇: T.H

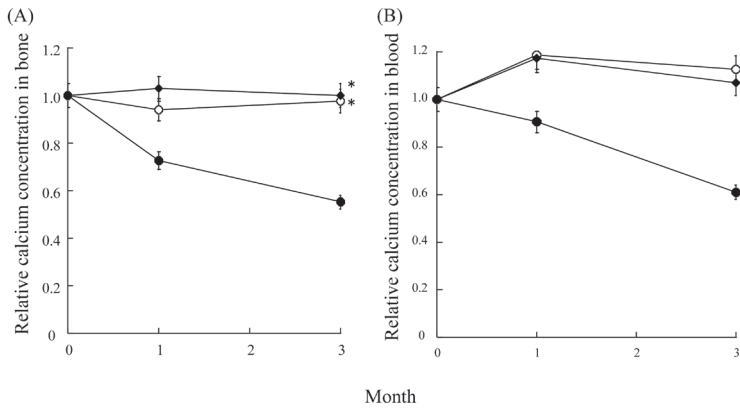


Fig. 3. Relative calcium concentration in bone (A) and in blood (B) of ovariectomized rats

The data are presented as means ± S.D. of 3 ovariectomized rats. * $p < 0.05$, vs. P.W. ●: P.W., ○: P.H., ◆: T.H

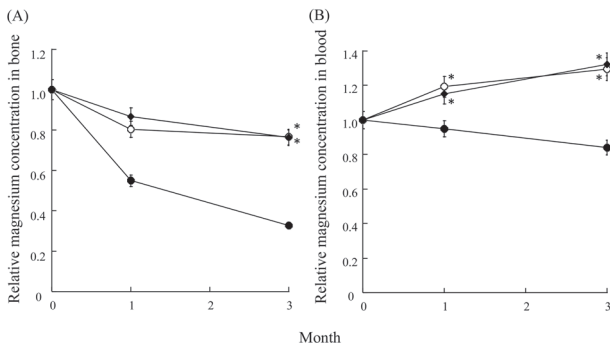


Fig. 4. Relative magnesium concentration in bone (A) and in blood (B) of ovariectomized rats

The data are presented as means ± S.D. of 3 ovariectomized rats. * $p < 0.05$, vs. P.W. ●: P.W., ○: P.H., ◆: T.H

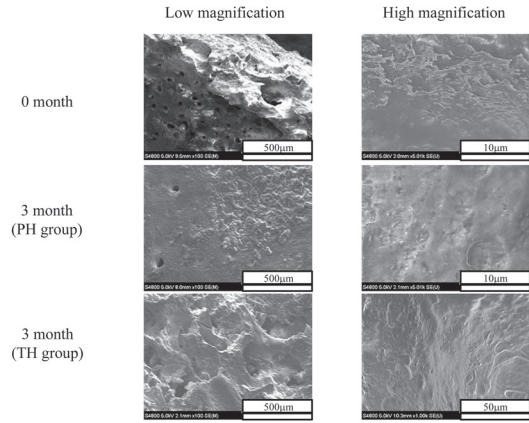


Fig. 5. SEM images of bone

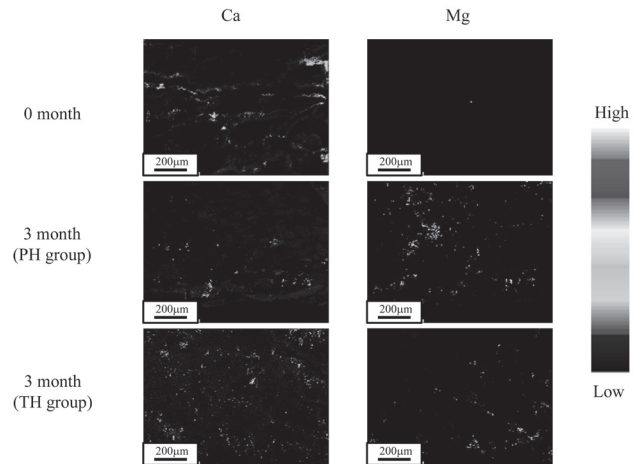


Fig. 6. Amount of calcium and magnesium onto bone surface

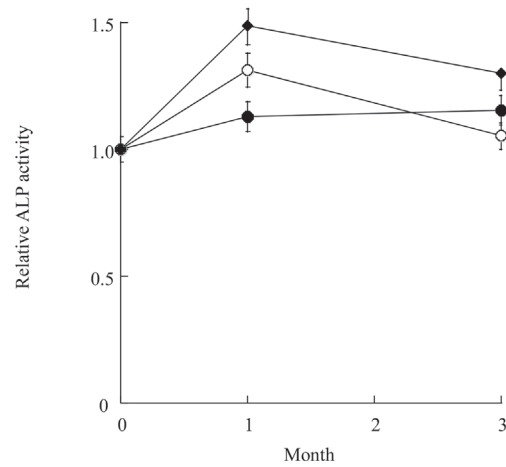


Fig. 7. Relative ALP activity in blood of ovariectomized rats

The data are presented as means ± S.D. of 3 ovariectomized rats. * $p < 0.05$, vs. P.W. ●: P.W., ○: P.H., ◆: T.H

考 察

骨粗鬆症は、骨量の減少と骨内部の構造変化という生理現象が過度に進行した疾患である。骨量は加齢により減少するが、とくに女性は閉経を迎える40~50歳代以降に急激な骨量減少が認められる。骨は、体の支持組織としての役割を担うだけでなく、カルシウム代謝や細胞の分化成熟を担う組織でもある¹²⁾。近年、我が国では人口の高齢化が進むにつれ寝たきりの高齢者や痴呆性高齢者の数が増加している。この寝たきりの原因の第3位が骨折であり、骨折による寝たきり予防の観点から、骨粗鬆症に対する関心が高まっている¹³⁾。骨密度の改善には、カルシウムやマグネシウムの摂取が重要であるが、一つのミネラルは必ず他のミネラルに影響を及ぼすことが知られている。このためミネラル摂取に関する研究ではミネラルの総合的な把握が必要であり、単一のミネラルの動態だけを論じるのではなく相互作用、相互関係が存在する主たるミネラルもあわせて検討する必要があると考えられている。例えば、カルシウムが生体内で有効利用されるためには、マグネシウムのサポートが必要である^{7,14)}。

一方、生活に密接に関連する飲料水の成分と骨粗鬆症との関連性を検証した研究は少ない。飲料水中の成分である硬度(カルシウムおよびマグネシウム)は永久硬度と一時硬度に分類されており、飲料水からのミネラル摂取は、たとえ微量であっても毎日体内(骨)に蓄積される。したがって、飲料水摂取によるミネラル蓄積と骨密度との関連性が示唆されれば、骨粗鬆症予防に寄与できる貴重な研究報告になると考えられる¹³⁾。また、骨粗鬆症防止に寄与できるカルシウム塩およびマグネシウム塩が明らかとなれば、より効率的にミネラルを摂取することが可能である。

骨粗鬆症の研究を行う上で、そのモデル動物の選択は非常に重要である。卵巣摘出ラットは、卵巣摘出によるエストロゲンの分泌低下が主因で骨減少が引き起こされることから、閉経後骨粗鬆症に近い疾患モデルであり^{15,16)}、骨吸収促進および骨形成抑制条件下における影響を評価することが

可能である。また、ラットのカルシウム欠乏による骨強度の低下実験では、卵巣摘出ラットへ低カルシウム飼料(0.01-0.3%)の給餌が報告されている^{17,18)}。そこで本研究では、卵巣摘出ラットを用い、カルシウム欠乏下による骨量低下と永久硬水および一時硬水の飲水による骨形成機能改善効果について基礎的検討を行った。

まず、カルシウム欠乏が十分に認められるモデル(Control)として卵巣摘出ラットへ低カルシウム飼料および精製水を投与したPW群、そして低カルシウム飼料と永久硬水または一時硬水を投与したPH群、TH群[一定のカルシウム供給(カルシウムとして200 mg/L)が行われる]について比較検討を行った。

本条件下における体重、飼料給餌量及び飲料水飲水量について検討したところ、実験開始1ヶ月後までは、各群で有意な差は認められなかった。しかし、実験開始2ヶ月後からは、体重および飲料水飲水量においてPW群とPH群またはTH群で有意な差が認められた($p < 0.05$)。本実験系におけるカルシウム摂取は、基本的に永久硬水および一時硬水による飲水に依存しており、卵巣摘出ラットを用いた条件は、ヒトの閉経後骨粗鬆症及びカルシウム欠乏状態に類似している。このため飲料水からのミネラル摂取が骨形成及びカルシウム欠乏機能障害へ与える影響を検討するのに適するものと考えられた。一方、実験期間においてPH群とTH群間で差は認められなかった。

次に、各群における骨密度の経時的変化について検討を行ったところ、先の体重および飲料水飲水量と同様にPW群と比較し、PH群またはTH群において実験開始2ヶ月後から有意な差が認められた。また、実験開始3ヶ月後におけるPH群とTH群間では、差は認められなかった。これらの結果は、本研究条件下において、永久硬水または一時硬水が骨密度の維持に有効であることを示唆している。また、PW群の骨中および血中カルシウム量は、実験期間を通して減少傾向を示した。一方、PH群およびTH群では骨中および血中カルシウム量ともに有意な減少は認められず、実験開始3ヶ月後では、PW群と比較し有意に高値で

あった ($p < 0.05$)。したがって、閉経状態における永久硬水および一時硬水の飲水は、骨密度のみならず、骨中および血中のカルシウムの維持にも寄与できることが明らかとなった。また、PH群とTH群間においては、差が認められなかったことから、永久硬水および一時硬水ともに骨粗鬆症防止に有効であると考えられる。先行研究において、カルシウムの腸吸収には、カルシウムイオン含有濃度が重要であり、飼料からのカルシウム(固形粒子状態)摂取よりも、飲料水中に含まれるカルシウムイオンがより効率よく吸収されることが報告されている¹⁹⁾。本研究結果より、少なくとも硫酸塩(永久硬水)および炭酸塩(一時硬水)由来のカルシウムイオンは、有意差なく骨粗鬆症防止に寄与できるものと考えられる。

また、先行研究より、ナトリウム、カリウム、マグネシウムなどのミネラルが骨粗鬆症の発症に関与する可能性が報告されている^{13,20,21)}。これらのミネラルは、種々の補酵素の役割を担っているため、ごく少量であっても重要な役割を担うと考えられており、その挙動の評価・検討は重要である⁷⁾。特に、マグネシウムは骨強度、構造の保持、リモデリングに強く関与するため、マグネシウムの摂取は閉経後の女性、高齢者において骨量減少を予防する可能性が指摘されている^{22,23)}。本研究において、PW群の骨中および血中マグネシウムは、カルシウムの挙動と同様に実験期間を通して減少傾向を示した。また、PH群およびTH群においては、実験開始3ヶ月後にPW群と比較し、有意な差が認められ ($p < 0.05$)、PH群およびTH群間では差は認められなかった。したがって、永久硬水および一時硬水ともに骨中および血中マグネシウムの保持に寄与していることが明らかとなった。栄養素としてのカルシウムやマグネシウムは、イオンまたは可溶性の形態で吸収されるため、その吸収率はカルシウム塩およびマグネシウム塩の溶解性が大きく関与すると考えられる^{24,26)}。しかし、その吸収率・利用率は溶解度のみでは説明することが出来ず、共存物質や生理状態などによって異なる^{27,28)}。本研究結果より、少なくとも硫酸塩(永久硬水)および炭酸塩(一時硬水)は、

骨中および血中カルシウムとマグネシウムの維持に、同程度寄与していることが明らかとなった。

さらに、実験開始時(0ヶ月)および実験開始3ヶ月後のラット大腿骨の電子顕微鏡画像および元素分析を行ったところ、永久硬水および一時硬水の摂取時には骨表面の顕著な劣化は観察できず、大腿骨表面に存在しているカルシウムおよびマグネシウムの減少も認められなかった。これらは、先の骨中および血中カルシウムとマグネシウムの挙動と類似している。また、骨芽細胞の活性化に伴い上昇するマーカーであり、骨形成を反映するパラメーターである血中ALPは、各群間においていずれも同程度であった。

以上、ヒトの骨粗鬆症発生抑制のためには、カルシウム摂取が重要な役割を担い、その摂取形態も重要な因子であると考えられる。本研究では永久硬水(永久硬度)および一時硬水(一時硬度)由来のカルシウム摂取が、骨密度、血中および骨中カルシウムの維持に有用であることを明らかとした。また、硫酸塩(永久硬水)および炭酸塩(一時硬水)飲水による骨粗鬆症予防への寄与に差がないことを示した。今後、より効率的なカルシウム摂取、また骨粗鬆症発生抑制のためのカルシウム摂取形態について明らかにしていくことは非常に重要な検討課題であると考えられる。また、マグネシウムをはじめとする各種ミネラルの挙動についても総括的に評価する必要があると考えられる。

利益相反

開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Katsumi H, Kusamori K, et al. Development of delivery system of bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. YAKUGAKU ZASSHI 130: 1129-1133, 2010
- 2) Nishimuta M, Effects of sodium intake on the balances of minerals (Na, K, Ca, Mg and P). Bull Soc Sea Water Sci Jpn 59: 109-114, 2005
- 3) Heaney R P, Recker R R, et al. Calcium absorption

- in women: Relationships to calcium intake, Estrogen status, and age. *J Bone Miner Res* 4: 469-475, 1989
- 4) Rude R K, Magnesium Deficiency: A Cause of heterogeneous disease in humans. *J Bone Miner Res* 13: 749-758, 1998
 - 5) Kobayashi M, Hara K, et al. Effect of menatetre none (V.K2) on bone mineral density and bone strength in Ca/Mg deficient rats. *Folia Pharmacol Jpn* 120: 195-204, 2002
 - 6) Schroeder H A, Relation between mortality from cardiovascular disease and treated water supplies. *J Am Med Assoc* 172: 1902-1908, 1960
 - 7) Yasui M, Effects of minerals in drinking water on central nervous system tissues and bones -As a material of deep ocean water for drinking water-. *Bull Coastal Oceanography* 40: 49-58, 2002
 - 8) Ogata F, Nagai N, et al. Fundamental study on effect of high-mineral drinking water for osteogenesis in calciprivia ovariectomized rats. *YAKUGAKU ZASSHI* 134: 679-685, 2014
 - 9) Han L K, Kai F, et al. Effects of long-term administration of caffeine on fat storage in ovariectomized rats. *YAKUGAKU ZASSHI* 124: 841-846, 2004
 - 10) Ebara S, Ogushi M, Effect of folate deficiency on bone mass in mice. *Trace Nutrients Res* 27: 17-20, 2010
 - 11) Yamamoto M, Takahashi Y, Controlled release by biodegradable hydrogels enhances the ectopic bone formation of bone morphogenetic protein. *Biomaterials* 24: 4375-4383, 2003
 - 12) Tanaka T, Suzuki S, et al. Kudzu isoflavonoids suppress bone resorption in ovariectomized mice. *Trace Nutrients Res* 27: 35-38, 2010
 - 13) Tsuchiya H, Miyake T, et al. The influence of drinking water components and lifestyle on bone density. *Minzoku Eisei* 64: 313-325, 1998
 - 14) Yasui M, Ota K, Aluminum decreases the magnesium concentration of spinal cord and trabecular bone in rats fed a low calcium, high aluminum diet. *J Neurol Sci* 157: 37-41, 1998
 - 15) Svanberg M, Knuutila M, The effect of dietary xylitol on recalcifying and newly formed cortical long bone in rats. *Calcif Tissue Int* 53: 135-138, 1993
 - 16) Jiang Y, Zhao J, et al. Long-term changes in bone mineral and biomechanical properties of vertebrae and femur in aging, dietary calcium restricted, and/or estrogen-deprived/-replaced rats. *J Bone Miner Res* 12: 820-831, 1997
 - 17) Stern L S, Matkovic V, et al. The effects of gallium nitrate on osteopenia induced by ovariectomy and a low-calcium diet in rats. *Bone Miner* 25: 59-69, 1994
 - 18) Hughes M R, Brumbaugh P F, et al. Regulation of serum 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by calcium and phosphate in the rat. *Science* 190: 578-580, 1975
 - 19) Nagai N, Ito Y, Delay of cataract development in the shumiya cataract rat by water containing enhanced concentrations of magnesium and calcium. *Curr Eye Res* 32: 439-445, 2007
 - 20) Yoshikawa S, Ohmori S, et al. The amount of the trace element in the hair on Parkinson's disease. *Biomed Res Trace Elements* 4: 167-168, 1993
 - 21) Sun L, Tamaki H, et al. Effect of running, sodium and potassium on osteoporosis due to calcium deficient food Intake in rats. *Univ Ryukyus Repository* 51: 113-118, 2004
 - 22) Schaafsma A, de Vries P J, et al. Delay of natural bone loss by higher intake of specific minerals and vitamins. *Crit Rev Food Sci Nutr* 41: 225-249, 2001
 - 23) Mildred S, Interrelationship of magnesium and estrogen in cardiovascular and bone disorders, eclampsia, migraine and premenstrual syndrome. *J Am Coll Nutr* 12: 442-458, 1993
 - 24) Duflos C, Bellaton C, et al. Calcium solubility, intestinal sojourn time and paracellular permeability codetermine passive calcium absorption in rats. *J Nutr* 125: 2348-2355, 1995
 - 25) Bronner F, Pansu D, Nutritional aspects of calcium absorption. *J Nutr* 129: 9-12, 1999
 - 26) Pansu D, Duflos C, et al. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *J Nutr* 123: 1396-1404, 1993
 - 27) Weaver C M, Martin B R, et al. Oxalic acid decreases calcium absorption in rats. *J Nutr* 117: 1903-1906, 1987
 - 28) Hara H, Suzuki T, et al. Ingestion of guar gum hydrolysate, a soluble fiber, increases calcium absorption in totally gastrectomized rats. *J Nutr* 129: 39-45, 1999