

# 琉球大学学術リポジトリ

## カルシウム欠乏食による骨粗鬆症に対する運動,ナトリウム,カリウムの効果

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 琉球大学農学部</p> <p>公開日: 2008-02-13</p> <p>キーワード (Ja): カルシウム欠乏食, 骨粗鬆症, 運動, ナトリウム, カリウム</p> <p>キーワード (En): calcium deficient food, osteoporosis, running, sodium and potassium</p> <p>作成者: ?, ?曼, 玉城, 一, 老松, 聡, 石丸, 哲二, 大田, 豊, 勝出, 直文, 知念, 功, Sun, Liman, Tamaki, Hajime, Oimatsu, Satoshi, Ishimaru, Tetsuji, Ohta, Yutaka, Katsuyama, Naofumi, Chinen, Isao</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	<p><a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/3574">http://hdl.handle.net/20.500.12000/3574</a></p>

# カルシウム欠乏食による骨粗鬆症に対する運動, ナトリウム, カリウムの効果

孙 丽曼<sup>1</sup>, 玉城 一<sup>1</sup>, 老松 聡<sup>1</sup>, 石丸哲二<sup>2</sup>, 大田 豊<sup>3</sup>, 勝山直文<sup>3</sup>, 知念 功<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>琉球大学農学部生物資源学科, <sup>2</sup>大分県武蔵町立武蔵中学校, <sup>3</sup>琉球大学医学部

## Effect of Running, Sodium and Potassium on Osteoporosis Due to Calcium Deficient Food Intake in Rats.

Liman SUN<sup>1</sup>, Hajime TAMAKI<sup>1</sup>, Satoshi OIMATSU<sup>1</sup>, Tetsuji ISHIMARU<sup>2</sup>, Yutaka OHTA<sup>3</sup>  
Naofumi KATSUYAMA<sup>3</sup> and Isao CHINEN<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratories of Applied Biochemistry, Faculty of Agriculture,

University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara-cho, Okinawa 903-0213, Japan

<sup>2</sup>Musashi Junior High School, 810 Nariyoshi Musashi-mati Higashikunisaki-gun Oita 873-0404 Japan

<sup>3</sup>Faculty of Medicine, University of the Ryukyus, Senbaru 1, Nishihara-cho, Okinawa 903-0213 Japan

**Abstract:** Seven-week old female Wistar rats fed calcium deficient food for 2 weeks succumbed to osteoporosis with significant decreases in bone fracture energy and high level of relative X-ray density. Lording of running, sodium supplying food intake and potassium supplying food intake were appeared to inhibit osteoporosis due to rise the increase of bone fracture energy and reduce the high level of relative X-ray density. Sodium supplying food intake and potassium supplying Ca<sup>2+</sup> deficient food intake brought increase of serum estradiol level by reduction of urinary deoxypyridinoline.

キーワード: カルシウム欠乏食、骨粗鬆症、運動、ナトリウム、カリウム

Key words: calcium deficient food, osteoporosis, running, sodium and potassium.

### 緒 論

一般に骨粗鬆症は、I型とII型に分けられる<sup>1)</sup>。I型は、閉経後に見られる骨粗鬆症で、尿中のデオキシピリジノリンが高くなり、エストロゲン等<sup>2)</sup>や運動<sup>3)</sup>が有効である。卵巣摘出による骨粗鬆症もこれに属する。II型の骨粗鬆症は、老年性骨粗鬆症で、血液中のアルカリホスファターゼが高くなり、ビタミンD<sub>3</sub><sup>5)</sup>やK<sub>2</sub><sup>6)</sup>が有効である。

栄養素の不足や欠乏によっても骨粗鬆症は誘発する。まず、タンパク質、ミネラルおよびビタミンを不足することなく、炭水化物と脂肪で、3週間、50%食餌制限すると大腿骨の破断エネルギー、骨密度が有意に減少し、骨が折れやすい状態の骨粗鬆症になる。<sup>7)</sup> この骨粗鬆症では、尿中のデオキシピリジノリンが高くなる点、エストロゲン<sup>7)</sup>および運動<sup>8)</sup>が有効な点がI型の骨粗鬆症と類似する。その他サトウキビワックス<sup>9)</sup>および紫蘇油、DHA、EPA等の魚油が有効である。

タンパク質欠乏食を3週間投与しても骨粗鬆症は誘発する<sup>10)11)</sup>。この骨粗鬆症は、尿中のアルカリホスファターゼが

高くなる点<sup>12)</sup>、ビタミンD<sub>3</sub><sup>12)</sup>やK<sub>2</sub><sup>12)</sup>が有効な点で、II型の骨粗鬆症と類似する。その他この骨粗鬆症には、運動<sup>13)</sup>も効果がある。

カルシウム欠乏食でも2週間で骨粗鬆症は誘発する<sup>14)</sup>。この骨粗鬆症では、食餌摂取量、体重、子宮重量、血中エストロゲンは減少せず、尿中のデオキシピリジノリンが高くなり、尿中のカルシウムが激減する。

運動は、I型の骨粗鬆症とII型の骨粗鬆症に有効である。また、1価のナトリウムやカリウムは、2価のカルシウムと異なり、貯蔵されることなく、絶えず排泄される。そのためそれらを多くとるとカルシウムの代わりにこれらが排泄されて、骨からのカルシウムの溶出が抑制されると考えられる。そのためにカルシウム欠乏食を投与しながら、運動を負荷したり、カルシウム欠乏食にナトリウムやカリウムを付加して、カルシウム欠乏食により誘発する骨粗鬆症に対するこれらの阻害性について研究した。

\*Corresponding author (E-mail: isao@agr.u-ryukyu.ac.jp)

Table 1. Dietary composition.

	Standard Group 1	Calcium-free			
		Control Group 2	Running Group 3	Na Group 4	K Group 5
(g/100 g)					
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
$\beta$ -Cornstarch	39.7	39.7	39.7	39.7	39.7
$\alpha$ -Cornstarch	13.2	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Soybean-oil	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0
Fiber cellulose	5.0	6.2	6.2	5.7	5.6
Mineral mix	3.5	2.3	2.3	2.3	2.3
Vitamin mix	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
t-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014	0.0014
NaCl	0	0	0	0.518	0
KCl	0	0	0	0	0.661
Energy(kcal/100 g)	394.8	394.8	394.8	394.8	394.8

Group 1,4,5(n=5), Group 2,3(n=6).

\*The basal composition of experimental diets was based on AIN-93G(American Institute of Nutrition) formulation.

## 実験方法

### 1. 実験飼料

飼料は、まずAIN-93G<sup>15)16)</sup>に従って、標準食を調製した。カルシウム欠乏食は、カルシウム欠乏ミネラル混合物(特別注文, オリエンタル酵母株)を用いた。ナトリウム付加食は、カルシウム欠乏ミネラル混合物を用い、更にナトリウムが標準食の3倍になるようにナトリウムを添加した。カリウム付加食は、同様にカルシウム欠乏ミネラルを混合物を用い、さらにカリウムを標準食の3倍添加した(Table 1)。

### 2. 実験動物

6週齢のWistar系雌ラットを用い、1週間標準食で、予備飼育し、その後、5グループに分けた(各グループ体重が等しくなるようにした)。Group 1, 4, 5は5匹, Group 2, 3は6匹用いた。Group 1は標準食, Group 2はCa欠乏食を与えた。またGroup 3はCa欠乏食を与え、ランニングを毎日時速0.7Km負荷した。Group 4はナトリウム付加食を, Group 5はカリウム付加食を与えた。実験中動物はステンレスゲージで分別飼育し、飼料は粉餌用給餌器に入れて与えた。飼育室は室温 $25 \pm 2$ ℃および湿度 $60 \pm 5$ %に調節し、12時間で明暗交代する環境に設定した。実験期間中は体重、摂食量を毎日測定し、実験最終日の前日には午前5時から11時まで6時間尿を採取した。

実験最終日には断頭屠殺を行い、採取した血液は12,000 rpmで遠心分離して血清を得た。心臓、脾臓、膵臓、肝臓、腎臓、副腎、子宮および大腿骨を摘出し、各重量を測定し体重100gあたりの重量に換算した。また、大腿骨は筋肉および軟骨を完全に除去した後、尿、血清と共に分析するまで $-40$ ℃で保存した。そして大腿骨は破断エネルギーおよびX線

透過率を測定した。また、血清エストラジオール濃度、血清および尿中のカルシウム濃度、尿中アルカリフォスファターゼ活性、尿中デオキシピリジノリン濃度を測定した。

### 3. 測定方法

血清中のエストロゲン濃度の測定にはエストラジオールEIAキット(フナコシ株式会社)を使用した。尿中のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性はアルカリフォスファターゼテストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。血清中と尿中のカルシウム濃度の測定は、カルシウムE-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を使用した。尿中のデオキシピリジノリン(Dpd)濃度の測定はオステオリックスDpd(住友製薬バイオメディカル株式会社)を使用した。

破断力は大腿骨をPeng et al.<sup>17)</sup>の三点曲げ試験に従って行った。大腿骨正面を下にして両骨端部を固定し、プランジャーで骨幹中央部にイントロン型圧縮試験機(東洋ボールドイン製, TM-3)で負荷をかけ、破断した。この時自動平衡記録計からStress-Strain curveを得た。測定条件は支点間距離14mm, 荷重40kg重, プランジャースピードは40mm/min, チャート速度500mm/minとした。得られたcurveから大腿骨のStrength(破断時に必要な最大力で、破断の起こりにくさを示す), Ductility(破断終了時までのチャートの距離で物性を示す), Stiffness(降伏点までのチャートの傾きで物性弾性抵抗を示す)を求め、Toughness(破断終了までのチャートの面積で、破断までに必要なエネルギー)はcurveをスキャナーでコンピューターに取り込ませ、画像処理ソフト(NIHimage)で面積を求め、測定した。

X線写真の透過度はMammography systemはKodak(ektasan B/RA)フィルムで大腿骨のX線撮影を行い、その濃度を透過濃度計DM-550(DAINIPPON SEREEN

Table 2. Body weight gain and food intake.

Groups	Body weight			Food intake
	Initial (g) <sup>1)</sup>	Final (g) <sup>2)</sup>	Gain (g)	Total (g)
Group 1	120.8±6.384 <sup>a</sup>	145.2±8.758 <sup>a</sup>	24.4±5.08 <sup>a</sup>	127.4±13.54 <sup>a</sup>
Group 2	120.7±3.983 <sup>a</sup>	139.0±3.899 <sup>a</sup>	18.3±2.66 <sup>a</sup>	116.8±7.468 <sup>a</sup>
Group 3	121.2±3.869 <sup>a</sup>	139.0±7.589 <sup>a</sup>	17.8±4.12 <sup>a</sup>	118.2±11.46 <sup>a</sup>
Group 4	121.2±4.764 <sup>a</sup>	141.8±7.085 <sup>a</sup>	20.6±2.51 <sup>a</sup>	123.4±12.22 <sup>a</sup>
Group 5	120.8±4.970 <sup>a</sup>	141.2±9.783 <sup>a</sup>	20.4±6.07 <sup>a</sup>	116.4±11.87 <sup>a</sup>

Means±SD(Group 1,4,5 n=5, Group 2,3 n=6).  
 1) at start of experiment. 2) at final of experiment.  
 Superscript letters(\*)are significantly different(\*=P<0.05).

Table 3. Organ weight per 100g of body weight.

Groups	Heart (g)	Spleen (g)	Pancreas (g)	Liver (g)	Kidney (g)	Adrenal (g)
Group 1	0.35±0.03 <sup>a</sup>	0.27±0.03 <sup>a</sup>	0.45±0.06 <sup>a</sup>	2.73±0.15 <sup>a</sup>	0.71±0.03 <sup>a</sup>	0.035±0.005 <sup>a</sup>
Group 2	0.35±0.03 <sup>a</sup>	0.25±0.03 <sup>a</sup>	0.38±0.10 <sup>a</sup>	2.73±0.09 <sup>a</sup>	0.74±0.05 <sup>a</sup>	0.036±0.008 <sup>a</sup>
Group 3	0.34±0.03 <sup>a</sup>	0.24±0.02 <sup>a</sup>	0.40±0.07 <sup>a</sup>	2.93±0.18 <sup>a</sup>	0.76±0.04 <sup>a</sup>	0.036±0.011 <sup>a</sup>
Group 4	0.33±0.02 <sup>a</sup>	0.24±0.01 <sup>a</sup>	0.36±0.12 <sup>a</sup>	2.69±0.07 <sup>a</sup>	0.74±0.02 <sup>a</sup>	0.034±0.005 <sup>a</sup>
Group 5	0.34±0.02 <sup>a</sup>	0.26±0.02 <sup>a</sup>	0.42±0.10 <sup>a</sup>	2.69±0.12 <sup>a</sup>	0.75±0.05 <sup>a</sup>	0.031±0.007 <sup>a</sup>

Means±SD(Group 1,4,5 n=5, Group 2,3 n=6).  
 Superscript letters(\*)are significantly different(\*=P<0.05).  
 Kidney and adrenal means total weight of right and left ones.

MFG CO LTD) を用いX線透過度を測定した。

4. 統計処理

実験結果は全て平均±標準偏差で示した。Statistical analysis systemを用い、有意水準をp<0.05とした。

実験結果および考察

1. 体重および摂食量

使用したラットの体重は飼育開始時には、平均120.94 gで、各グループ間で、有意差はなかった。各飼料を2週間間投与後は、Group 1は、24.4 g増の145.2 gで、Group 2は、18.3 g増の139.0gで、Group 3は17.8 g 増の139.0gで、Group 4は、20.6g増の141,8gで、Group 5は、20.4g増の141.2gであった。各グループ間に有意差はみられなかった。摂食量は、Group 1-5の順に、127.4g, 116.8g, 118.2g 123.4g, 116.4gであった。各グループ間に有意な差はなかった。(Table 2)

カルシウム欠乏食を投与した場合は、体重および摂食量で、変化が見られないのが特徴である。

2. 臓器の重量

心臓は、0.33-0.35 g で、各グループ間で、有意差はなかつ

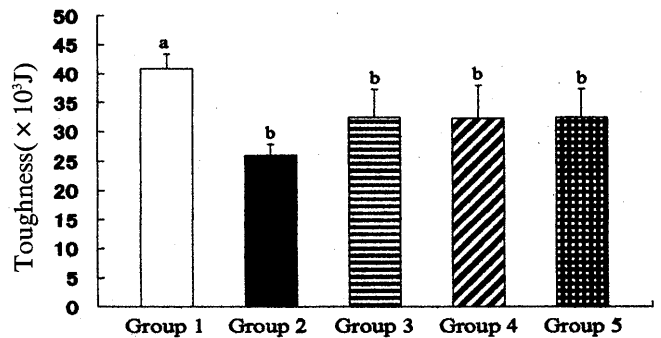


Fig. 1. Breaking energy of the left femur of rats. Mean±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

た。脾臓は、0.24-0.27 g で、有意差はみられなかった。膵臓は、0.38-0.45 gで、有意差はみられなかった。肝臓は、2.69-2.95 gで、有意差はみられなかった。腎臓は、0.71-0.76gで、有意差はなかった。副腎は、0.031-0.036 gで、有意差はなかった (Table 3).

各臓器の重量にも変動が見られないのが、特徴である。

3. 骨の破断エネルギー

大腿骨の破断エネルギー(x10-3J)では、標準食を投与した Group 1は、40.87であった。カルシウム欠乏食を投与した

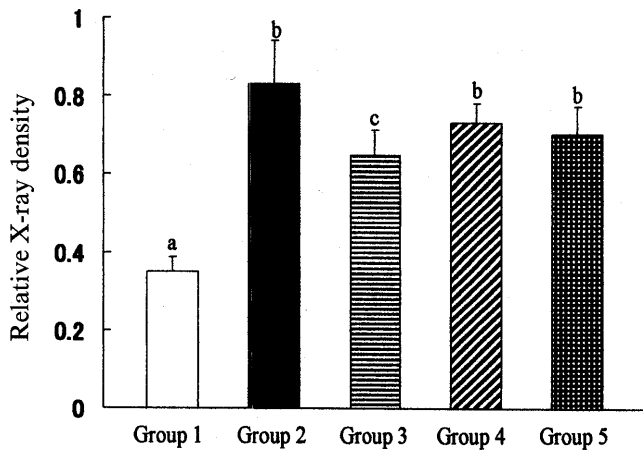


Fig. 2. X-Ray film images of the femur. Mean±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a, b and c) are significantly different (p<0.05).

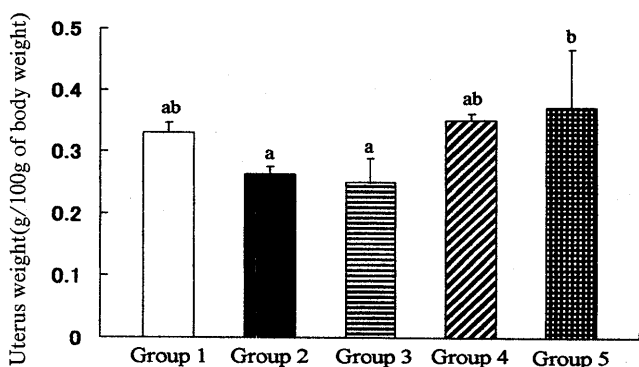


Fig. 3. Uterus weight(g) per 100g of body weight. Mean±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

Group 2 は, 25.45 で, 有意に低くなった。運動を負荷した Group 3 は, 32.45 で, ナトリウム付加食を投与した Group 4 は, 32.33 で, カリウム付加食を投与した Group 5 は, 32.38 であり, Group 3, 4, および 5 は, 有意差はないが, Group 1 に比べ, 低く, Group 2 に比べると高かった。(Fig. 1)

このように運動負荷, ナトリウム付加食, カリウム付加食は, カルシウム欠乏食に比べて, 骨の破断エネルギーは, 有意ではないが, 高い傾向が見られることから, 有効と思われる。

#### 4. 大腿骨のX線写真透過度

骨を写したX線写真では, カルシウム等は, X線を吸収し, 白くなるために, その濃度が高くなると, その透過度は低くなる。その透過度は, Group 1-5 の順に, 0.352, 0.795, 0.647, 0.748, 0.704 で, あった。Group 1 は, Group 2 に比べて有意に低くなった。Group 3, 4, 5 は, Group 1 に比べて, 高かったが, Group 2 と比べると, Group 3 は有意に低かった。Group 4 と 5 は, Group 2 と比べると有意差はないが, 低かった (Fig. 2)。

運動負荷は, カルシウム欠乏食群に比べて有意に低いことから, 運動は有効と思われる。ナトリウム付加食群やカリウム付加食群も有意差はないが, 高い傾向が見られることから, 有効と思われる。

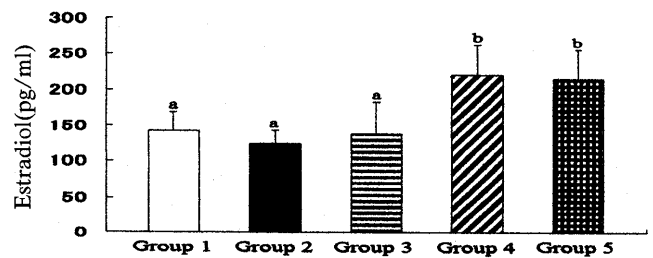


Fig. 4. Uterus weight(g) per 100g of body weight. Mean±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

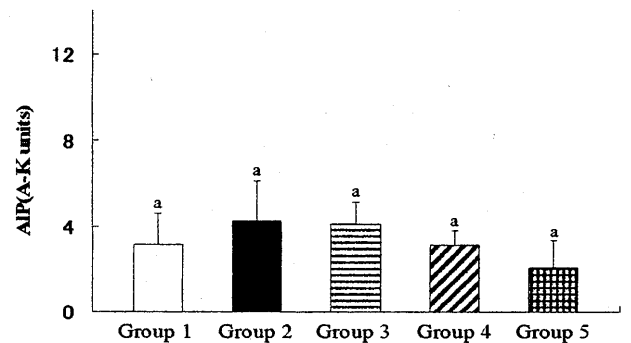


Fig. 5. Alkaline phosphatase activity in urine. Mean±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05). \*ALP is alkaline phosphatase.

#### 5. 子宮の重量

子宮の重量は, 体重100g当たりで表した。Group 1-5 の重量は, 0.33g, 0.26g, 0.25g, 0.35g, 0.37g であった。Group 1 は, Group 2 と Group 3 と同じで, 有意差はなかった。Group 1 に比べて, Group 4 と 5 は高かった。特に Group 5 では有意差が見られた (Fig. 3)。

カルシウム欠乏食を投与しても子宮の重量は, 標準食群と変わらないことは, 以前の研究<sup>14)</sup>でも見られており, その研究結果とよく一致している。ナトリウム付加食群とカリウム付加食群では, 子宮重量が高くなった。特にカリウム付加食群では, 有意に高くなった。ナトリウムやカリウム付加は, I型の骨粗鬆症に有効ではないかと思われる。

#### 6. 血清エストラジオール濃度

血清エストラジオール濃度 (pg/mL) は, Group 1-5 は, 90.10, 118.30, 154.96, 221.12, 215.20 であった。Group 1 は, Group 2 と Group 3 と同じで, 有意差はなかった。Group 1 に比べて, Group 4 と 5 は有意に高かった (Fig. 4)。

子宮の重量と血清エストラジオール濃度は, よく反映するといわれている<sup>15)</sup>。本研究結果でもその両者はよく反映している。更にナトリウム付加食群とカリウム付加食有意に高くなり, ナトリウムとカリウムがI型の骨粗鬆症群で有効であると思われる。

#### 7. アルカリホスファターゼ活性

骨形成マーカーとして用いられているアルカリホスファターゼ活性 (A-K Unit) は, Group 1-5 の順に, 3.14, 4.26, 4.10,

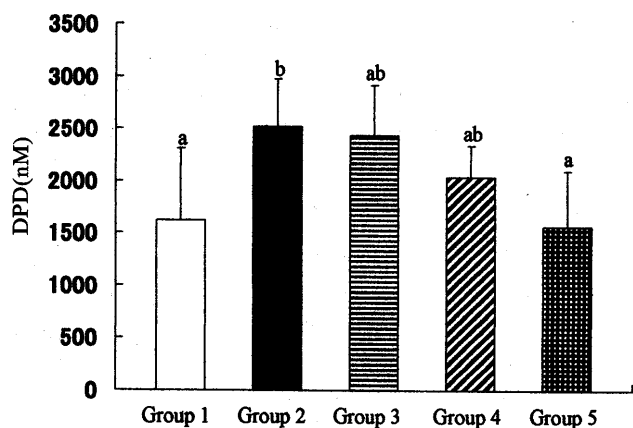


Fig. 6. Concentration of deoxypyridinoline in urine. Mean ± SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

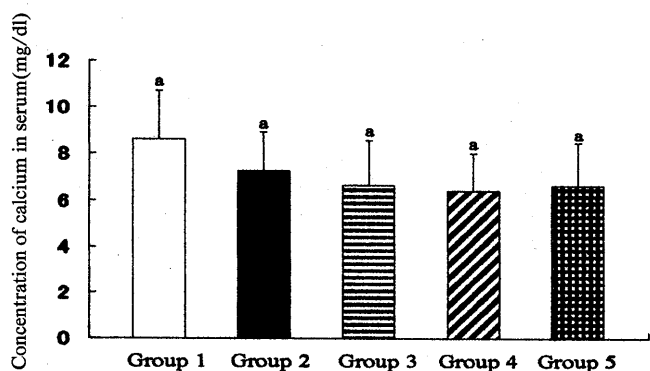


Fig. 7. Concentration of calcium in serum. Mean ± SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

3.09, 2.08 であった。各グループ間に有意差は見られず、同じであった (Fig. 5)。

この活性は、II型の骨粗鬆症で、高くなることから、カルシウム欠乏による骨粗鬆症は、II型の骨粗鬆症とは全く関係がないと思われる。

### 8. 尿中デオキシピリジノリン濃度

骨吸収マーカーである尿中デオキシピリジノリン濃度 (nM) はGroup 1-5で、1620.13, 2522.38, 2433.63, 2033.22, 1586.69であった。Group 1に比べて、Group 2-4は高かったが、Group 5は、同じであった (Fig. 6)。

尿中のデオキシピリジノリンが、カルシウム欠乏食投与で、高くなることは、以前の研究<sup>14)</sup>でも見られ、その結果とよく一致している。ナトリウム付加食とカリウム付加食で、その値が低くなっているが、それらの付加で、エストロゲンが増加し、それにより、低くなっているとも考えられる。

### 9. 血清カルシウム濃度

血清中のカルシウム濃度 (mg/dL) は、Group 1から5の順に8.62, 7.23, 6.64, 6.64, 6.62であった。各グループ間で、有意差は見られず同じであった (Fig. 7)。

血液中のカルシウム濃度は、ホメオスタシスとして、一定であるといわれている<sup>19)</sup>。本研究結果でも一定で、そのこととよく一致している。

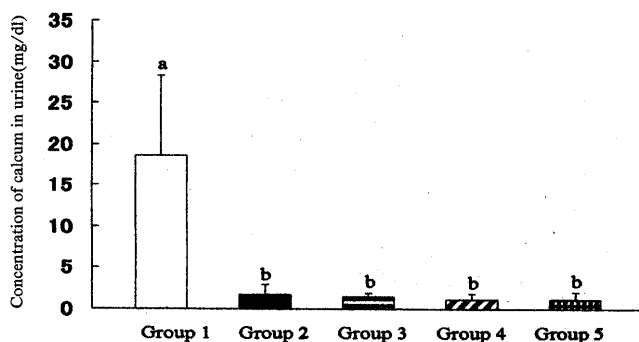


Fig. 8. Concentration of calcium in urine. Mean ± SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different (p<0.05).

### 10. 尿中カルシウム濃度

尿中のカルシウム濃度 (mg/dl) は、Group 1から5で、18.56, 1.72, 1.46, 1.14, 1.19であった。Group 1に比べて、Group 2-5は、極端に低かった。また、Group 2-5間では、有意差はなかった (Fig. 8)。

カルシウム欠乏食を投与すると尿中のカルシウム濃度が著しく低くなることは、以前の研究でも見られており、その結果とよく一致している。

## 要 約

カルシウム欠乏食を2週間投与した7週齢の雌ラットは、骨の破断力が低下し、X線写真の透過度が有意に低下し、骨が折れやすい状態の骨粗鬆症になった。運動の負荷、ナトリウム付加食、カリウム付加食は、これらの低下や増加を軽減し、骨粗鬆症を阻害傾向がみられた。ナトリウム付加食やカリウム付加食では、血中のエストロゲンが増加し、尿中のデヒドロキシピリジノリンが低下した。

## 文 献

- 1) Riggs, BL. and Melton LJ. 3rd. 1986. Involutional osteoporosis. *N. Engl J Med.*, 314: 1676-1686.
- 2) Cheema, C. and Grant BF, R. 1989. Effect of estrogen on circulating "free" and total 1,25-dihydroxyvitamin D and on the parathyroid vitamin D axis in postmenopausal women. *J. Clin. Invest.*, 83: 537-542.
- 3) Isamoto J. Takeda T. and Ichimura S. 1998. Effects of exercise on bone mineral density in mature osteopenic rats. *J Bone Miner. Res.*, 13: 1308-17.
- 4) Gatti, D. and Asmi, S. 1999. New bisphosphonated in the treatment of bone diseases. *Drugs Aging*, 15: 285-296.
- 5) Tilyard, MW., Spears, GF., Thomson, J. and Dovey, S. 1995. Treatment of postmenopausal osteoporosis with calcitriol or calcium. *N. Engl J. Med.*, 326: 357-362.
- 6) Hara, K. Asami, S. 1999. New bisphosphonates in

- the treatment of bone diseases. *Drugs Aging*, 15: 285-296.
- 7) 孫麗曼, 大田豊, 勝山直文, 玉城一, 屋宏典, 知念功. 2002. 食餌制限したラットで誘発する骨粗鬆症に対するエストロゲンの効果. *日本栄養食糧学会誌*, 55: 149-155.
  - 8) 孫麗曼, 玉城一, 大田豊, 勝山直文, 知念功. 2003. 食餌制限したラットで誘発する低骨量症に対する運動の効果. *日本栄養食糧学会誌*, 56: 237-242.
  - 9) Tamaki, H., Sun, LM., Ohta, Y., Katsuyama, N. and Chinen, I. 2003. Inhibition of osteoporosis in rats fed with sugar cane wax. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67: 423-425.
  - 10) Bonjour, JP., Ammann, P., Chevalley, T. and Rizzoli, R. 2001. Protein intake and bone growth. *Can. J. Appl. Physiol.*, 26: S153-S166.
  - 11) Bourrin, S., Toromanoff, A., Ammann, P., Bonjuour, JP. and Rizzoli R, 2000. Dietary protein deficiency induces osteoporosis in aged male rats. *J. Bone Miner. Res.*, 15: 1555-1563.
  - 12) Sun, LM., Tamki, H., Ohta, Y., Katsuyama, N., Ishimuru, T. and Chinen, I., 2004. Inhibition of osteoporosis induced by protein deficiency food intake by active vitamin D<sub>3</sub> and vitamin K<sub>2</sub> in rats. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 68: 1385-1387.
  - 13) Tamaki, H., Sun, LM., Ohta, Y., Katsuyama N., Ishimuru, T. and Chinen, I., 2004. Running inhibits osteoporosis induced by protein-deficient (PD) food intake *Biosci Biotechnol Biochem.*, in press.
  - 14) Sun, LM., Tamki, H., Ohta, Y., Katsuyama, N., Ishimuru, T. and Chinen, I., 2004. Characteristics of Osteoporosis Due to Calcium Deficient Food in Rats. *Sci. Bull. Fac. Agric. Univ. Ryukyus*, 51:119-125.
  - 15) Reeves, PG., Rossow, KL. and Lindlauf, J. 1993. Development and testing of the AIN-93G purified diets for rodents: result on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J. Nutr.*, 123: 1936-1951.
  - 16) Reeves, PG., Nielsen, FH. and Fahey, GC. Jr, 1993. AIN-93G purified diets for laboratory rodents: Final report of the Amerindian Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-78A rodent diet. *J. Nutr.*, 123:1936-1951.
  - 17) Peng, TC., Kusy, RP., Garner, SC., Hirsch, PF., and De Blanco, MC. 1987. Influence of lactation and pregnancy+lactation mechanical properties and mineral content of the rat femur. *J. Bone Miner Res.*, 2: 249-257.
  - 18) Simpson, ER. and Zhao, Y. 1996. Estrogen biosynthesis in adipose. Significance in breast cancer development. *Ann NT Acad Sci.*, 4: 18-26.
  - 19) Borowicz, M. and Talalaj M., Marcinowska-Suchowierska E., Kapuscinski, P. and Brzowski, R., 1995. Effect of clodronate on calcium phosphate-magnesium homeostasis, bone mass and vertebral deformities in postmenopausal women. *Bone*, 17: 467-472.