

高リン食で飼育したラットの腎無細胞画分の Ca, Mg, P 量と脂肪酸組成

岸本三香子, 松浦 寿喜, 市川 富夫
(武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

Ca, Mg, P contents and fatty acid composition of subcellular fractions of kidney of rats fed a high phosphorus diet.

Mikako Kishimoto, Toshiki Mathuura and Tomio Ichikawa

*Department of Food Science and Nutrition,
School of Human Environmental Sciences,
Mukogawa Women's University, Nishinomiya 663-8558, Japan*

We studied the alteration of kidney function with increase kidney calcium, magnesium and phosphorus contents in rats fed a high-phosphorus diet. Five-week-old male SD rats were used. The rats were fed a diet with either a control (0.3%) or a high (1.5%) level of phosphorus for 20 days. Body weight gain and food intake were depressed, and nephrocalcinosis was determined by analysis of kidney calcium in rats fed a 1.5% phosphorus diet. Calcium, magnesium and phosphorus contents of nucleus fraction, mitochondrial fraction, microsomal fraction and cytosol of kidney were determined. And composition of fatty acid and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in each fraction were measured. In every fraction from rats fed a 1.5% phosphorus diet, contents of calcium, magnesium and phosphorus were significantly elevated than those of a control diet. Composition of fatty acid of mitochondrial fraction and microsomal fraction in rats fed a 1.5% phosphorus diet were different from those of a control diet. But TBARS in the mitochondrial and microsomal fractions were same.

緒言

ラットを用いた実験では、高リン(P)食摂取はカルシウム(Ca)代謝に影響を及ぼし腎石灰化を起す¹⁻³⁾。腎石灰化は腎へのリン酸カルシウムの沈着であり、腎臓皮髄境界部に発症する⁴⁾。高P食だけでなく、食餌中Ca、マグネシウム(Mg)、P割合において低Ca食、Mg欠乏食^{5, 6)}、Ca/Pの摂取比が低値⁷⁾においても引き起こされる。また、蛋白質^{8, 9)}、脂質¹⁰⁾、糖質源¹¹⁾の種類、摂取量の差違においても石灰化の発症が報告されている。前回の高P食投与による実験では¹²⁾、成長の阻害と血漿中尿素窒素量の増加および腎臓に著しくCa、Mg、P

の蓄積がみられ腎機能への強い影響が示唆された。しかし、腎石灰化と腎臓の機能低下の関係は十分に明らかでない。本実験では、腎臓の細胞分画を行い、粗核画分、ミトコンドリア(Mt)画分、ミクロソーム(Ms)画分、細胞質液に分け、無細胞画分のCa、Mg、P含量を測定し、Mt画分、Ms画分については過酸化脂質量を測定し高P食摂取時の腎石灰化との関連性を検討した。

実験方法

1. 飼育飼料

実験飼料組成を Table 1. に示す。標準飼料は Ca:0.5%, P:0.3%, 高P食は Ca:0.5%, P:1.5%

とし、Mgはどちらも0.05%とした。Pの調整にはリン酸2水素カリウムを用い、シュークロースの一部を置き換えた。飼料の原料はオリエンタル酵母(株)から購入した。作製した飼料のCa、Pの実測値の平均値は、標準飼料0.6、0.3%、高P食0.6、1.5%であった。

Table 1. Composition of Hi-P diet.

	Control	Hi-P
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn starch	15.0	15.0
Sucrose	48.25	42.98
Corn oil	5.0	5.0
Cellulose	5.0	5.0
Vitamin mix ¹⁾	0.8	0.8
Choline chloride	0.2	0.2
Mineral mix ²⁾	3.5	3.5
CaCO ₃	1.25	1.25
KH ₂ PO ₄	0.7	5.97
Ca (%)	0.5	0.5
P (%)	0.3	1.5
Mg (%)	0.05	0.05

¹⁾According to AIN-76 Vitamin mixture.

²⁾According to AIN-76 Mineral mixture, without Ca, P sources.

2. 実験動物の飼育

4週令SD系雄ラットを日本クレア(株)より購入し、個別ゲージにて、室温23±1℃、湿度55±7%、12時間ごとの明暗サイクル(8:00am~8:00pm, 8:00pm~8:00am)の環境下で飼育した。標準飼料で1週間予備飼育した後、各飼料で3週間飼育した。試験期間中の飼料、およびイオン交換水は自由摂取とした。試験期間中の体重および、飼料摂取量は2~3日に1度測定した。ラットは各群それぞれ12匹用いた。

飼育終了日にネブタール麻酔下のラット腹部大動脈よりヘパリン処理した注射器で採血して脱血後、腎臓を摘出した。血漿および臓器は測定に使用するまで-30℃で冷凍保存した。

実験項目のうち、脂肪酸分析(Table 4.)には、別に5匹を同様に同期飼育したラットの腎臓を使用

した。

3. 血漿のCa, Mg, P濃度の測定

血漿中Caの測定には、カルシウムC-テストワコー、MgはマグネシウムB-テストワコー、PはホスファC-テストワコー(いずれも和光純薬工業(株))を使用した。

4. 腎機能指標の測定

血漿クレアチニン量、尿素窒素量、尿酸量は、ドライケム法(富士ドライケム5500, 富士フィルム(株))により測定した。

5. 無細胞画分の調製

腎臓に9倍量の0.25Mショ糖溶液(10mM Tris-HCl(pH7.6), 0.2mM EDTAを含む)を加えホモジナイズ後、600×gで遠心分離し、得られた沈殿を粗核画分とする。上清をさらに8000×gで遠心分離し、得られた沈殿をMt画分とし、上清を105000×gで遠心して得られた沈殿をMs画分、上清を細胞質液とした。無細胞画分の調製には左腎臓を用いた。

6. 無細胞画分のCa, Mg, P量の測定

各画分の一定量を550℃の電気炉で15時間灰化し、試料溶液を調製した。Ca含量、Mg含量は原子吸光光度法¹³⁾で測定した。カルシウム測定用Ca標準溶液およびマグネシウム測定用Mg標準溶液は、いずれも和光純薬工業(株)市販特級を用いた。P含量はホスファC-テストワコー(和光純薬工業(株))を使用して測定した。

7. 腎脂肪酸分析

Kates法¹⁴⁾により脂質を抽出し、塩酸メタノール法でメチルエステル化¹⁵⁾した後、ガスクロマトグラフ(GC)法により脂肪酸を定量した。GC装置は、キャピラリーカラムHR-SS-10 0.25mm×50m(信和加工(株)製)を装着したGC-14B(島津製作所(株))を用いた。分析温度は、カラム槽温度150~220℃(3℃/min)、気化室温度、検出器温度とも250℃とした。キャリアガスは窒素、検出器はFIDとした。標準物質としてMIX ME-37(フナコシ社製)、DHA(SIGMA社製)を用いた。

8. Mt, Ms画分の過酸化脂質量の測定

チオバルビツール酸法¹⁶⁾により過酸化脂質量を測定し、過酸化脂質量は生成したマロンジアルデヒド当量で示した。タンパク量はLowry法¹⁷⁾により、標準物質にはウシ血清アルブミンを用いた。

9. 統計解析

表中の数値はすべて平均±標準偏差を示した。有

意差の検定は比較すべき数値の等分散性を F-検定により検定後, t-検定により行った. 危険率は 5% 以下を有意とした.

実験結果

1. 動物の成長

体重は高 P 食投与により, 飼育開始数日後から標準食に比較して低値を示した (Fig. 1). 餌摂取量も低下傾向を示し, 食効率は, 標準食 0.35, 高 P 食 0.33 となり, 有意に成長阻害が見られた.

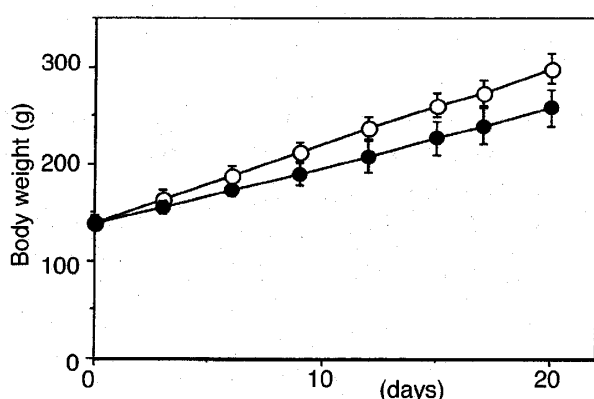


Fig. 1. Growth curve of rats fed 0.3% phosphorus diet (○—control) and 1.5% phosphorus diet (●—hi-p) for 20 days.

Value are means \pm SD (n=12).

2. 腎臓器重量およびミネラル含量

無作為に抽出した各群 6 匹の左腎臓の重量とミネラル含量を示した. 腎臓重量は高 P 食により標準食の約 2 倍に増加した. ミネラル量は, Ca は約 170 倍, Mg は 7 倍, P は 10 倍量に達した (Table 2).

3. 血漿中ミネラル量および腎機能の指標

血漿中 Ca, Mg, P 量および腎機能の指標を Table 3. に示した. 高 P 食投与により血漿中 Mg 濃度および P 濃度は有意に低下した. Ca 濃度に差はみられなかった. 腎機能の指標測定結果では, クレアチニン量および尿素窒素量は高 P 食により有意に高値を示し, 尿酸量に差は見られなかった.

4. 各画分中のミネラル量

各画分中の Ca, Mg, P 量を Fig. 2., 3., 4. に示した. 高 P 食投与により腎臓の粗核画分, Mt 画

分, Ms 画分, 細胞質液いずれの画分にもミネラルの増加が見られた. 高 P 食投与による粗核画分には, 腎ホモジネートの 70~80% のミネラルが蓄積されているが, Mt, Ms 画分, 細胞質液にも明らかな蓄積が観察された. 粗核画分では Ca, Mg, P それぞれが 29mg, 0.94mg, 17mg (標準食 0.025, 0.024, 0.41), Mt 画分では 0.79, 0.033, 0.61 (0.039, 0.009, 0.058), Ms 画分では 0.83, 0.050, 0.98 (0.044, 0.020, 0.27), 細胞質液では 0.23, 0.092, 1.09 (0.054, 0.068, 0.83) に達した. いずれの画分においても Ca の蓄積が最も顕著であった.

Table 2. A kidney (Left) weight and its mineral contents.

n=6	Control	Hi-P
wet weight (g)	1.01 \pm 0.08	2.02 \pm 0.34*
Ca (mg)	0.21 \pm 0.04	36.47 \pm 8.30**
Mg (mg)	0.19 \pm 0.02	1.34 \pm 0.26**
P (mg)	2.58 \pm 0.38	25.10 \pm 5.40**

Data expressed as mean (g or mg/a kidney) \pm SD. **, * Statistically significant at the P < 0.01, P < 0.05 level each when compared with control.

Table 3. Concentration of Ca, Mg, P in plasma and indicators of kidney function.

n=12	Control	Hi-P
Ca	9.40 \pm 0.51	9.04 \pm 0.65
Mg	1.58 \pm 0.14	1.18 \pm 0.16**
P	6.80 \pm 0.35	5.91 \pm 0.49**
Creatinine	0.3 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1**
Urea nitrogen	11.4 \pm 1.6	27.4 \pm 9.7**
Uric acid	0.8 \pm 0.3	0.8 \pm 0.2

All data expressed as mean (mg/dl) \pm SD.

**Statistically significant at the P < 0.01 level when compared with control.

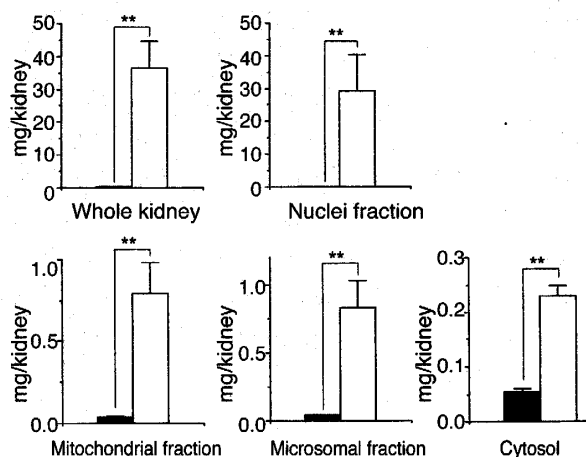


Fig. 2. Calcium contents of various subcellular fractions of kidney in rats fed the 0.3% (■) or 1.5% phosphorus (□) diet. Values are means \pm SD (n=6). ** Statistically significant at the P<0.01 level.

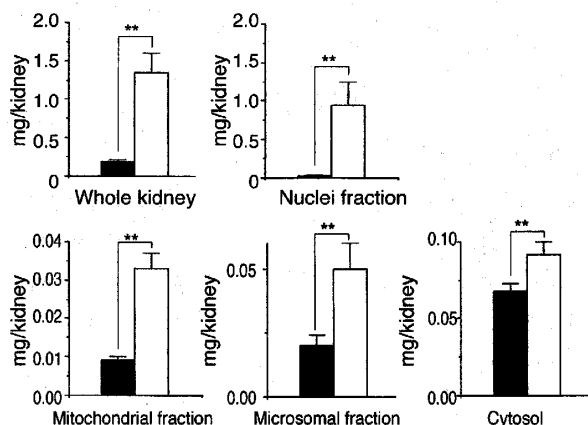


Fig. 3. Magnesium contents of various subcellular fractions of kidney in rats fed the 0.3% (■) or 1.5% phosphorus (□) diet. Values are means \pm SD (n=6). ** Statistically significant at the P<0.01 level.

5. Mt 画分, Ms 画分中の脂肪酸組成

腎臓の Mt 画分, Ms 画分中の脂肪酸組成を Table 4. に示した. 標準食の Mt 画分, Ms 画分の脂肪酸組成はほぼ同様の傾向を示した. 高 P 食 Mt 画分では, 標準食と比較して, 16:0 が有意に低値を, 20:4 が有意に高値を示し, 飽和脂肪酸の割合は有意に低値であり, 多価不飽和脂肪酸の割合は高値を示した. 一方, 高 P 食 Ms 画分では, 16:0 が有意に高値を, 22:6 が有意に低値を示し, 飽和脂肪酸の割合は有意に高く, 多価不飽和脂肪酸の割合および不飽和指数は低値を示した.

6. Mt 画分, Ms 画分中の過酸化脂質量

各画分中の過酸化脂質量を Table 5. に示した. Mt 画分, Ms 画分と比較して腎ホモジネートの値も示した. ホモジネートおよび Ms 画分において若干低い傾向にあるが, いずれの画分においても差はみられなかった.

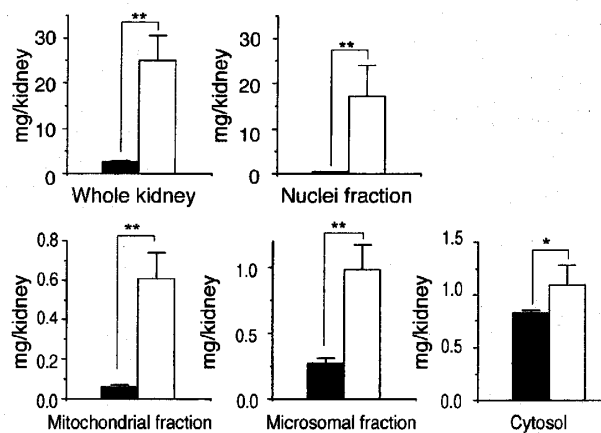


Fig. 4. Phosphorus contents of various subcellular fractions of kidney in rats fed the 0.3% (■) or 1.5% phosphorus (□) diet. Values are means \pm SD (n=6). **, * Statistically significant at the P<0.01, P<0.05 level each.

Table 4. Fatty acid composition of kidney mitochondrial fraction and microsomal fraction.

Mt			Ms		
Fatty acid n=5	Control	Hi-P	Fatty acid n=5	Control	Hi-P
16:0	19.2±1.2	15.7±0.9**	16:0	18.4±0.5	19.8±0.7**
18:0	17.0±0.3	17.9±0.6*	18:0	18.8±0.4	19.3±0.7
18:1(n-7, n-9)	9.5±0.5	9.1±0.2	18:1(n-7, n-9)	8.4±0.7	8.5±0.2
18:2(n-6)	12.0±1.0	11.9±0.8	18:2(n-6)	9.7±1.3	9.5±0.5
20:4(n-6)	39.5±1.1	42.8±1.2**	20:4(n-6)	42.0±1.4	40.6±0.4
22:6(n-3)	2.8±0.2	2.5±0.2	22:6(n-3)	2.7±0.2	2.3±0.1**
Saturated	36.2±1.5	33.7±0.7**	Saturated	37.2±0.7	39.1±0.8**
Monounsaturated	9.5±0.5	9.1±0.2	Monounsaturated	8.4±0.7	8.5±0.2
Polyunsaturated	54.2±1.0	57.2±0.9**	Polyunsaturated	54.4±0.6	52.5±0.7**
P/S ratio a	1.5±0.1	1.7±0.1**	P/S ratio a	1.5±0.0	1.3±0.0**
Double bond index b	2.1±0.1	2.2±0.0**	Double bond index b	2.2±0.0	2.1±0.0**

Data expressed as mean(%)±SD.

**, *Statistically significant at the P<0.01, P<0.05 level each when compared with control.

a P/S ratio: polyunsaturated/saturated ratio

b Double bond index: $\Sigma((\%) \times (\text{the number of double bond})/100)$

Table 5. TBARS of kidney.

n=6	Control	Hi-P
Homogenate	0.52±0.13	0.43±0.07
Mt	0.34±0.09	0.33±0.09
Ms	0.42±0.06	0.35±0.08

Date expressed as mean(MDA nmol/mg protein)±SD.

考 察

ラットに高P食を投与することにより成長阻害がみられ^{18~20)}, 腎臓に石灰化を引き起こす^{1~3)}. 本実験においても, 腎臓中のCa量, Mg量, P量を定量した結果, 標準食に比べ高P食投与ではCaは約170倍, Mgは約7倍, Pは約10倍含まれており, 著しいミネラルの沈着がみられた. 報告^{21, 22)}と同じように腎に石灰化が発症していると考えられた.

腎石灰化による腎機能に及ぼす指標は多く報告されているが, 結果は必ずしも一致していない. 本実験では主として腎臓糸球体機能に及ぼす指標として用いられている血漿中クレアチニンおよび尿素量について測定した. 本実験では, 高P食投与により血漿中尿素量およびクレアチニン量は増加した. 高P食投与により血漿中尿素量が増加することが報告

されており²³⁾, 今回も同様の結果を得た. また, 食事性Pレベルは血漿クレアチニン濃度に影響を及ぼさないという報告²⁴⁾通り, 前回の実験ではクレアチニン濃度には影響を与えなかったが, 本実験では高P食により高い値を得た. 今回の実験では腎臓へのミネラルの蓄積も増加していることから, 障害が大きいとも考えられる. 血漿中ミネラル濃度は, 前回同様血漿中Ca濃度には影響はみられず, また血漿中Mg, P濃度は減少した. 以上のように, 本実験においても食事性Pレベルは生体内のCa, Mg, P代謝に大きく影響を及ぼし, 腎臓には何らかの機能障害が引き起こされていると考えられる.

前回の実験では, 腎臓中のミネラル含量および, 過酸化脂質量と脂肪酸組成について検討した. 本実験では, 腎臓の細胞分画を行い, 粗核画分, Mt画分, Ms画分, 細胞質液に分け, これら無細胞画分に及ぼす影響を検討した. 無細胞画分のCa, Mg, P含量を測定し, Mt画分, Ms画分については, 過酸化脂質量と脂肪酸組成を測定した. 高P食投与により, 腎臓にはミネラル量が増加し, 腎無細胞画分へのミネラルの著しい蓄積が観察された. 粗核画分, Mt画分, Ms画分, 細胞質液いずれの画分にも著しいミネラルの蓄積が見られた. 高P食では, 各ミネラルとも腎ホモジネートの70~80%は

粗核画分に蓄積されるが、Mt, Ms 画分, 細胞質液にも著しく見られた。Mt 画分ではそれぞれが標準食群の 20, 3.7, 10 倍量, Ms 画分では 19, 2.5, 3.6 倍量に達した。いずれの画分においても Ca の蓄積が最も顕著であった。

細胞内ではミネラルの流入により細胞膜に障害を与えることが知られている。Mt, Ms 画分中の細胞膜やオルガネラ膜の主要構成要因としての脂質は生体にとっては不可欠な膜機能の発現に参与している。膜脂質中のリン脂質の脂肪酸組成は膜の流動性を維持するうえで重要である。さらに、リン脂質に含まれる高度不飽和脂肪酸は、活性酸素が引き金になる過酸化反応を受けやすい^{25, 26)}ともいわれていることから、脂質過酸化によりオルガネラの構造が破壊され、細胞に傷害を及ぼし、臓器の機能に障害を起こす可能性も示唆されている^{26, 27)}。本実験では、Mt, Ms 画分へのミネラルの蓄積による影響を検討するため、脂肪酸組成及び過酸化脂質量を調べた。前回の腎ホモジネートの脂肪酸組成分析では、高 P 食投与により 22:6(DHA)が有意に低値を示したが、他の脂肪酸組成には差はみられず、高度不飽和脂肪酸割合、不飽和指数にも差はみられなかった。本実験での Mt, Ms 画分では、標準食の Mt 画分, Ms 画分の脂肪酸組成はほぼ同様の傾向を示した。しかし、高 P 食 Mt 画分は、標準食と比較して、16:0 が有意に低値を 20:4 が有意に高値を示し、飽和脂肪酸の割合は有意に低値であり、高度不飽和脂肪酸の割合は高値を示した。一方、高 P 食 Ms 画分は、16:0 が有意に高値を 22:6 が有意に低値を示し、飽和脂肪酸の割合は有意に高く、高度不飽和脂肪酸の割合および不飽和指数は低値を示した。いずれの画分においても高 P 食投与により脂肪酸組成に異なった影響を及ぼした。高 P 食の過酸化脂質量について、Ms 画分において若干低い傾向にあったが、両画分において差はみられなかった。不飽和指数値から、数値の低い標準食 Mt 画分および高 P 食 Ms 画分において脂質過酸化反応がおこりやすい条件にあることを示している。このことが高 P 食 Ms 画分の過酸化脂質量の低値傾向と関連している可能性が推察されるが、明らかでない。高 P 食投与による石灰化と各無細胞画分との関係を明らかにするために、無細胞画分の機能との関連において研究を進める必要がある。

要 約

体重約 90g の SD 系雄ラットに P レベル 0.3% (標準食) と 1.5% (高 P 食) を自由摂取させ 3 週間飼育した。解剖時に血漿, および腎臓器を摘出し, 以後の実験に使用した。腎臓器中 Ca, Mg, P 量, 血漿中 Ca, Mg, P 濃度と, 腎機能の指標となる血漿中の生化学パラメーターを測定した。さらに腎臓については, 常法により無細胞画分を分離し, 各画分の Ca, Mg, P 量を定量し, Mt, Ms 画分については過酸化脂質生成量, 脂肪酸組成を調べ, 高 P 食投与時の腎石灰化と腎機能について検討を試みた。

- 1) 高 P 食投与により飼料摂取量, 体重増加量が低下し成長阻害がみられた。
- 2) 高 P 食投与により腎重量が増加した。血漿中 Ca 濃度は変わらなかったが, Mg, P 濃度は低下した。腎機能の指標については, 血漿中尿素窒素量およびクレアチニンが増加した。腎糸球体の機能低下を起こしていることが示唆された。
- 3) 腎臓中 Ca, Mg, P 量が増加した。Ca は約 170 倍, Mg は 7 倍, P は 10 倍量に達した。粗核画分, Mt 画分, Ms 画分, 細胞質液いずれの画分にも著しいミネラルの蓄積が見られた。高 P 食では, 腎ホモジネートの 70~80% は粗核画分に蓄積されるが, Mt, Ms 画分にも著しく, Mt 画分ではそれぞれが標準食群の 20, 3.7, 10 倍量, Ms 画分では 19, 2.5, 3.6 倍量に達した。いずれの画分においても Ca の蓄積が最も顕著であった。
- 4) 高 P 食投与の Mt 画分では, 標準食と比較して, 16:0 が有意に低値を, 20:4 が有意に高値を示し, 飽和脂肪酸の割合は有意に低値であり, 高度不飽和脂肪酸の割合は高値を示した。一方, Ms 画分では, 16:0 が有意に高値を, 22:6 が有意に低値を示し, 飽和脂肪酸の割合は有意に高く, 高度不飽和脂肪酸の割合および不飽和指数は低値を示し, 高 P 食投与による Mt 画分, Ms 画分の脂肪酸組成に異なった影響を及ぼした。
- 5) 高 P 食投与による Mt, Ms 画分の過酸化脂質量に差は見られなかった。

文 献

- 1) Hoek, A.C., Lemmens, A.G., Mullink, J.W.M.A. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **118**, 1210-1216(1988)
- 2) Mars, Y.W.H.M., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **38**, 249-

- 258(1988)
- 3) Woodard, J.C. and Jee, W.S.S., *J. Nutr.*, **114**, 2331-2338(1984)
 - 4) Al-Modhefer, A.K.J., Atherton, J.C., Garland, H.O., Singh, H.J. and Walker, J., *J. Physiol.*, **380**, 405-414(1986)
 - 5) Goulding, A. and Malthus, R.S., *J. Nutr.*, **97**, 353-358(1969)
 - 6) Kikuchi, T. Matsuzaki, H. Sato, S. Kajita Y. Chiba, H. Tsuchiya, H. Masuyama, R. Uehara, M. Suzuki, K and Goto, S., *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **44**, 515-523(1998)
 - 7) Ritskes-Hoitinga, J. and Beynen, A.C., *Prog. Food. Nutr. Sci.*, **16**, 85-124(1992)
 - 8) Calvo, M.S., Bell, R.R. and Forbes, R.M., *J. Nutr.* **112**, 1401-1413(1982)
 - 9) Stonard, M.D., Samuels, D.M. and Lock, E.A., *Fd. Chem. Toxic.*, **22**, 139-146(1984)
 - 10) Kaunitz, H. and Johnson, R.E., *Metabolism*, **25**, 69-77(1976)
 - 11) Bergstra, A.E., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *J. Nutr.* **123**, 1320-1327(1993)
 - 12) 岸本三香子, 倉本周子, 川口真規子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大紀要, **45**, 67-72(1995)
 - 13) 小原哲二郎, 鈴木隆雄, 岩尾裕之, 食品分析ハンドブック, 建帛社, 東京, pp.281-283(1982)
 - 14) 日本生化学会編, 生化学実験講座3 脂質の化学, 東京, pp12-13(1974)
 - 15) 日本生化学会編, 生化学実験講座3 脂質の化学, 東京, pp198-199(1974)
 - 16) 村上亜由美, 内田三香子, 松浦寿喜, 市川富夫, 武庫川女子大紀要, **43**, 31-36(1995)
 - 17) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275(1951)
 - 18) 秋本 誠, 鈴木和春, 遠藤幸江, 五島孜郎, 栄養学雑誌, **44**, 79-86(1986)
 - 19) 鈴木和春, 菅家祐輔, 五島孜郎. 栄養学雑誌, **36**, 77-84(1978)
 - 20) 松崎広志, 上原万里子, 鈴木和春, 五島孜郎, マグネシウム, **13**, 81-94(1994)
 - 21) Ritskes-Hoitinga, J., Lemmens, A.G., Danse, L.H.L.C. and Beynen, A.C., *J. Nutr.*, **119**, 1423-1431(1989)
 - 22) 松崎広志, 上原万里子, 鈴木和春, 佐藤 茂, 五島孜郎, 栄食誌, **48**, 217-223(1995)
 - 23) Schaafsma, G., Duursma, S.A., Visser, W.J. and Dekker, P.R., *Bone*, **6**, 155-163(1985)
 - 24) Adams, C., Ritskes-Hoitinga, J., Lemmens, A.G. and Beynen, A.C., *Nutr. Rep. Int.*, **40**, 923-929(1989)
 - 25) Freeman, b, a., Crap, J.D., *Lab. Invest.*, **47**, 412-426(1982)
 - 26) 八木國男, 五島雄一郎:過酸化脂質と疾患, 医学書院, 東京(1981)
 - 27) 内山 充, 松尾光芳, 嵯峨井勝:過酸化脂質と生体, 学会出版センター, 東京(1985)