



| | |
|------------|--|
| Title | 食餌制限したラットで誘発する骨粗鬆症 |
| Author(s) | 孙, 丽曼; 石丸, 哲二; 玉城, 一; 知念, 功 |
| Citation | 琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(50): 157-163 |
| Issue Date | 2003-12-01 |
| URL | http://hdl.handle.net/20.500.12000/3609 |
| Rights | |

食餌制限したラットで誘発する骨粗鬆症

孙丽曼*・石丸哲二**・玉城 一***・知念 功***

Liman SUN*, Tetsuji ISHIMARU**, Hajime TAMAKI*** and Isao CHINEN***

Inducement of Osteoporosis by Restricted Food Intake in Rats

キーワード：骨粗鬆症，食餌制限，女性ホルモン，骨密度

Key words : osteoporosis, diet, estrogen, bone density.

Summary

Six-weeks-old female Wister strain rats were kept on standard feed prepared according to AIN-93G for 1 week before commencing the experiment. Then, the animals were divided into control group (group 1) fed *ad libitum* standard feed and 5 groups (group 2-6) of a diets as it is, doubled protein, mineral and vitamin, fat, and mineral, vitamin and protein, respectively maintained under 50% diet for 3 weeks. One group contained 5 rats. Breaking power of the femur, bone density and density of X-ray picture were examined to check introduction of osteoporosis by diet.

1. Body weight dropped about 10g for 3 weeks by a diet of 50%.
2. Length of bone were significantly short at all restricted groups.
3. Bone density, mineral content and breaking power notably decreased in all diet groups, but density of picture of X-ray raised. Dieting by 50% percent diet of seven weeks age female rat for three weeks certainly caused osteoporosis.
4. Weight of a uterine significantly declined at diet group, osteoporosis bringing about by a diet suggests due to a lack of estrogen from reduction of a womb by it.

緒言

骨粗鬆症は男性よりも女性に多く，更に閉経後に多くなり始め，50歳頃から急激に増加する。骨粗鬆症になると歩行困難になったり，寝たきりになることも少なくなく，決定的な治療法がないことから，極めて深刻な病気である。女性ホルモンの一種であるエストロゲンが閉経とともに激減するので，骨粗鬆症はエストロゲンの減少により誘発すると言われている。そのため，骨粗鬆症の研究には卵巣を摘出し

たラットがモデル動物としてよく使用されている¹⁻³⁾。しかしながら卵巣を摘出しても骨粗鬆症を誘発しない場合がしばしば見られる⁴⁾⁵⁾。Aitken *et al.*²⁾ は卵巣を摘出して10カ月後，Lindgren *et al.*³⁾ は6カ月後に粗鬆化を認めているが，Barzel⁴⁾，Orimo *et al.*⁵⁾ は粗鬆化は認められなかったと報告している。このため骨粗鬆症の研究では確実に骨粗鬆症を誘発する方法または適切なモデル動物の開発が必要である。

鎌田⁶⁾らは鶏を食餌制限すると骨の破断エネルギー等が減少したと報告している。これは食餌制限により，骨の形成に必要なビタミンやミネラルが不足し，骨粗鬆症を誘発したとも考えられることから，今回は，まず標準食を与えた自由食群 (Group 1) と食餌制限群をつくった。さらに食餌制限群は標準食を与えた群 (Group 2)，タンパク質を2倍にした食餌を与えた群 (Group 3)，ビタミンとミネラルを2倍にした食餌を与えた群 (Group 4)，脂肪を2倍にした食餌を与えた群 (Group 5)，ビタミン，ミネラル，タンパク質を2倍にした食餌を与えた群 (Group 6) をつくり，3週間50%食餌制限し，大腿骨の破断エネルギー等を測定し，骨粗鬆症の誘発とその要因について研究した。

実験方法

1. 供試食餌の組成

食餌として，AIN-93G⁷⁾⁸⁾ (標準食) と，これに対してタンパク質を2倍にした制限食，ビタミンとミネラルを2倍にした制限食，脂肪を2倍にした制限食，およびビタミン，ミネラル，タンパク質を2倍にした制限食を用いた。これらの組成を Table 1 に示す。

2. 実験動物と処理

実験動物として6週齢のWistar系雌ラットを用いた。まず，すべてのラットにAIN-93G標準食を7日間自由摂食

Table 1 Dietary composition of all groups.

| | <i>Ad libidum</i> | | A experimental diet used at 50% of food restriction | | | |
|----------------------|-------------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|
| | Group 1 (n = 5) | Group 2 (n = 5) | Group 3 (n = 5) | Group 4 (n = 5) | Group 5 (n = 5) | Group 6 (n = 5) |
| (g/100g diet) | | | | | | |
| Casein | 20.0 | 20.0 | 40.0 | 20.0 | 20.0 | 40.0 |
| β -Cornstarch | 39.7 | 39.7 | 32.9 | 39.7 | 37.2 | 32.9 |
| α -Cornstarch | 13.2 | 13.2 | - | 13.2 | - | - |
| Sucrose | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 | 10.0 |
| Oil (Soybean oil) | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 7.0 | 14.0 | 7.0 |
| Fiber Cellulose | 5.0 | 5.0 | 5.0 | - | 13.75 | - |
| Mineral mix | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 7.0 | 3.5 | 7.0 |
| Vitamin mix | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 2.0 | 1.0 | 2.0 |
| L-Cystine | 0.3 | 0.3 | 0.6 | 0.3 | 0.3 | 0.6 |
| Choline bitartrate | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 0.25 | 0.25 | 0.5 |
| t-Butylhydroquinone | 0.0014 | 0.0014 | 0.0028 | 0.0014 | 0.0014 | 0.0028 |
| Energy (kcal/100g) | 394.8 | 394.8 | 394.8 | 394.8 | 394.8 | 394.8 |

Basal Composition of Experimental Diets was Based on AIN-93G (American Institute of Nutrition) formulation.

させ予備飼育を行った。その後、自由摂食群と食餌制限群に分け、実験を行った。

各群に5匹ずつを用い、3週間飼育した。自由摂食群 Group 1は AIN-93G 標準食を自由に摂取させて対照群として用いた。Group 2から Group 6まではそれぞれの制限食を自由摂食群の摂取量を100%として、それに対して50%食餌制限した。Group 2には AIN-93G 標準食を与えた。Group 3にはタンパク質を2倍にした制限食を与えた。Group 4にはビタミンとミネラルを2倍にした制限食を与えた。Group 5には脂肪を2倍にした制限食を与えた。Group 6にはビタミン、ミネラル、タンパク質を2倍にした制限食を与えた。

実験期間中、Group 1のラットの摂食量および全てのラットの体重を毎日測定した。屠殺後、血液を採取し、肝臓、腎臓および副腎の重量を測定し、更に自由食群 Group 1と食餌制限群 Group 6の子宮重量も測定した。また、左右大腿骨を摘出し、筋肉および軟骨を完全に除去し、破断実験等に供するまで -60°C で保存した。

なお、食餌制限を確実にするため、摂食量が一定になる6週齢のラットを用い、7日間予備飼育し、摂食量が一定になったのを確かめた上で、実験を行った。また、骨粗鬆症とエストロゲンは関係があることから、エストロゲンの分泌が多い雌ラットを用いた。

すべてのラットはステンレスケージで分別飼育し、食餌は粉餌用給餌器に入れて与えた。飼育室は室温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 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。

3. 測定法

大腿骨の骨塩量と骨密度は二重エネルギーX線吸収法 (Dual energy X-ray absorptiometry; DXA) で測定した。DCS-600 (Aloka) を用い、左大腿骨をピッチ0.6mmで測定し、その後画像処理を行い、大腿骨の長、幅および骨塩量を求めた。

X線写真は、Mammography system (Senographe 600T Yokokawa Medical System) を用いて、左大腿骨を Kodak (Ektasan B/RA) フィルムで撮影した。その後、その透過度はさくらXレイフィルム濃度解析機 PDM-5型 (小西六写真工業) 骨密度計量器 (Screen DM-550, Dainihonsukurin Seizou) を用いて測定した。

破断エネルギーは、Peng *et al.*⁹⁾ の方法でイントロン型圧縮試験機 (東洋ボールドイン製 TM-3) を用い、Three-point bending 方式で測定した。支点間距離14mm、プランジャースピード40 mm/minで左大腿骨中央部を破断し、破断エネルギーを求めた。

4. 統計処理

得られた実験結果はすべて平均値 \pm 標準偏差で示した。各群間の有意差検定は、Duncan's new multiple rang test を用いて行った。なお、有意水準を $p < 0.05$ とした。

実験結果

食餌摂食量を Figure 1 に示した。予備飼育中、ラットは1日平均12gの標準食を摂取したので、食餌制限には制限食をその半分の6.0gを毎日与えた。その後、自由摂食群 Group 1はそのまま自由摂食し、摂食量を毎日測定した。

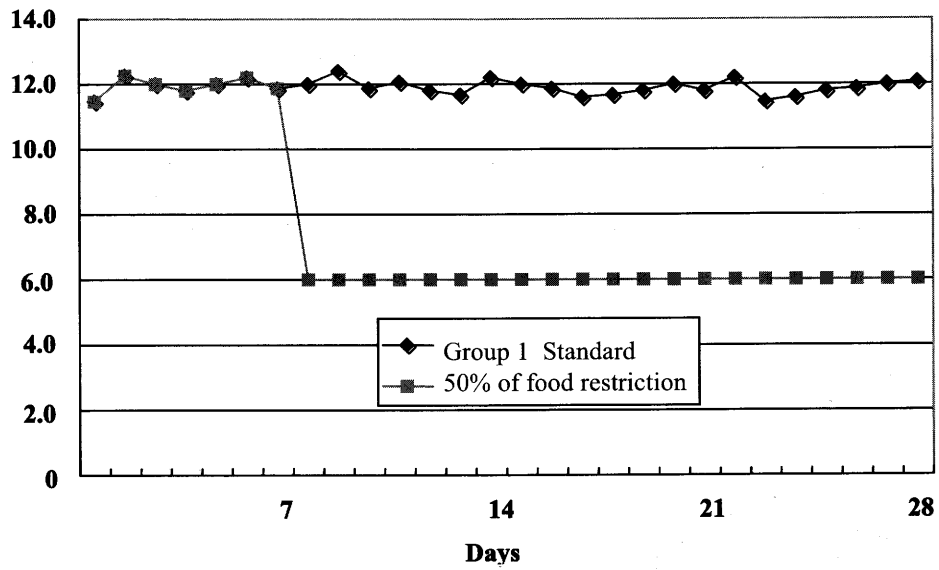


Fig.1 Food intake of six groups.

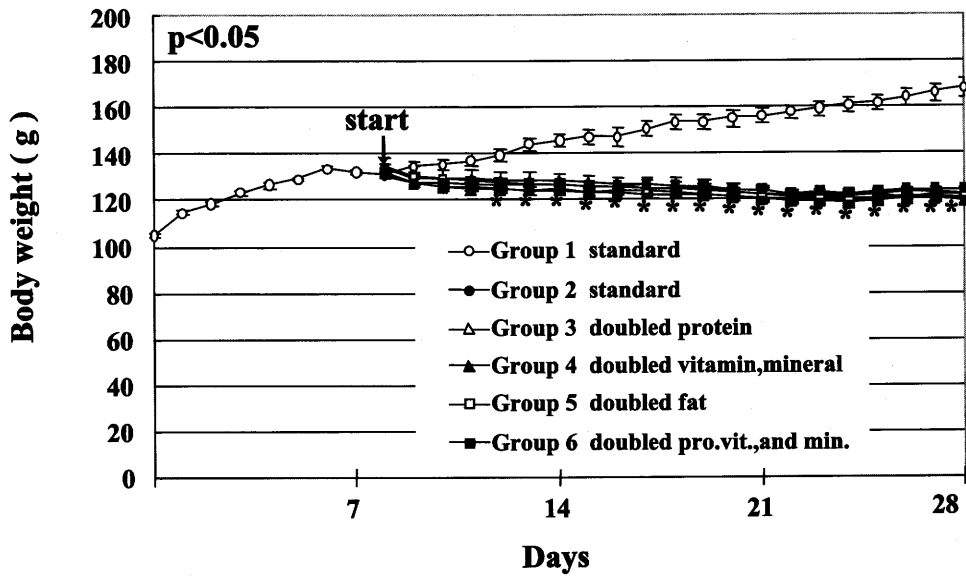


Fig.2 Body weight gain.

Body weight differences between the first day of experiment and the last days are shown. Means \pm SD (n=5)

Table 2 Tissue weight per 100g of body weight.

| | <i>Ad libidum</i> | A experimental diet used at 50% of food restriction | | | | |
|----------------------|--------------------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 | Group 5 | Group 6 |
| (g/100g body weight) | | | | | | |
| Liver | 3.49 ± 0.15 ^a | 2.61 ± 0.12 ^b | 2.70 ± 0.14 ^b | 2.47 ± 0.04 ^b | 2.27 ± 0.03 ^b | 2.45 ± 0.02 ^b |
| Kidney | 0.71 ± 0.02 ^a | 0.74 ± 0.01 ^a | 0.83 ± 0.03 ^b | 0.77 ± 0.01 ^a | 0.73 ± 0.01 ^a | 0.81 ± 0.01 ^b |
| Fat depot | 0.41 ± 0.08 ^a | 0.04 ± 0.00 ^b | 0.06 ± 0.01 ^b | 0.05 ± 0.01 ^b | 0.06 ± 0.01 ^b | 0.04 ± 0.01 ^b |

Means±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different $p < 0.05$.

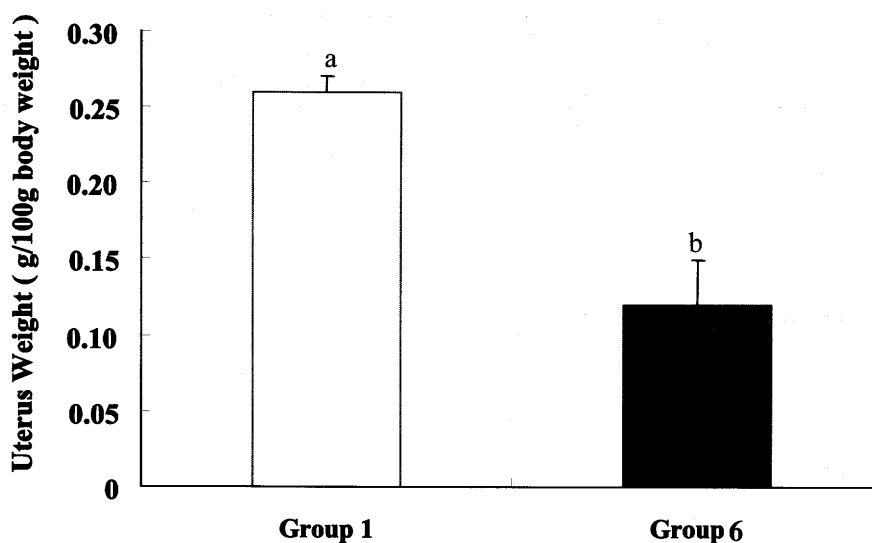


Fig.3 Uterus weight per 100g of body weight (g) of group 1 and group 6.

Means ±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different ($p < 0.05$)

食餌制限群は自由摂食群の半分 6.0g を毎日それぞれの群に対応する制限食を与えた。

実験を行った3週間の体重の増減量を Figure 2 に示した。飼育中、自由摂食群 Group 1 の体重は徐々に増加し、3週間で約 170g になり、体重が約 35g 増加した。それに対し、食餌制限群の体重は最初の2週間は徐々に減少し、その後は、一定になり、飼育終了後は開始時と比べ、食餌制限群はすべて約 10g 減少した。

体重100g 当りの臓器の重量を Table 2 と Figure 3 に示した。肝臓および腎臓周辺脂肪重量はすべての食餌制限群と自由食群に比べて有意に減少した。腎臓重量は自由食群に比べてタンパク質2倍にした Group 3 と Group 6 で有意に増加した。子宮の重量では、食餌制限群の Group 6 は自由食群に比べて有意に減少した。

左大腿骨の骨密度を Table 3 に示した。大腿骨の長さはすべての食餌制限群は自由食群に比べて有意に短かったし、その幅も短くなる傾向が見られた。骨塩量では、食餌制限

群は自由食群に比べて有意に減少した。骨密度は三カ所で測定したが、いずれの箇所でも食餌制限群は自由食群に比べて有意に減少した。

左大腿骨のX線写真像を Figure 4 に示した。骨端部のX線写真では自由食群は全体的に白くなったが、食餌制限群は逆に全体的に黒くなった。

X線透過濃度を Table 4 に示す。X線透過濃度は十カ所で測定したが、いずれの箇所でも自由食群は低かった。特に1と4の所では食餌制限群は自由食群に比べて有意に高かった。

左大腿骨の破断エネルギーを Figure 5 に示した。破断エネルギーはすべての食餌制限群は自由食群に比べて有意に減少した。特に脂肪を2倍にした Group 5 では他の食餌制限群に比べて有意に減少した。

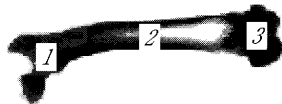
Table 3 Bone mineral content and density of the left femur determined by DXA¹ method

| | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 | Group 5 | Group 6 |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Length (cm) | 3.034±0.025 ^a | 2.920±0.023 ^b | 2.924±0.012 ^b | 2.908±0.009 ^b | 2.924±0.015 ^b | 2.928±0.004 ^b |
| Width (cm) | 0.278±0.002 ^a | 0.268±0.004 ^a | 0.270±0.008 ^a | 0.276±0.002 ^a | 0.276±0.005 ^a | 0.264±0.002 ^b |
| BMC ² (g) | 0.150±0.019 ^a | 0.068±0.018 ^b | 0.072±0.014 ^b | 0.094±0.016 ^b | 0.094±0.009 ^b | 0.098±0.010 ^b |
| BMD ³ No.1 | 0.138±0.012 ^a | 0.065±0.007 ^b | 0.650±0.002 ^b | 0.072±0.021 ^b | 0.071±0.007 ^b | 0.092±0.015 ^b |
| (g/cm ²) No.2 | 0.064±0.003 ^a | 0.024±0.003 ^b | 0.040±0.013 ^b | 0.037±0.006 ^b | 0.040±0.007 ^b | 0.027±0.040 ^b |
| No.3 | 0.171±0.009 ^a | 0.094±0.008 ^b | 0.086±0.003 ^b | 0.129±0.012 ^b | 0.105±0.010 ^b | 0.128±0.026 ^b |

¹DXA : Dual energy X-ray absorptiometry, ²BMC : Bone mineral content, ³BMD : Bone mineral density.

Means±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different p < 0.05.

Position checked



Group 1 Group 2 Group 3 Group 4 Group 5 Group 6

Fig.4 Left femur picture of X-ray

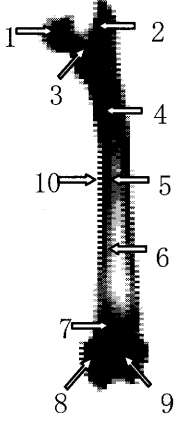
考 察

本研究の食餌制限では、食餌の投与を容易するため、摂食量が一定になる6週齢のラットを用い、7日間予備飼育し、摂食量が一定になるのを確かめた上で、その半分量を食餌制限量として与えた。また、骨粗鬆症はエストロゲンの欠乏により誘発することが知られているので、エストロゲン

の多いと予想される雌ラットを用いた。

骨密度は三カ所で測定したが、いずれの箇所でも食餌制限群の値は低かった。X線透過濃度は十カ所で測定したが、いずれの箇所でも食餌制限群は黒くなり、濃度が高かった。更に破断エネルギーは食餌制限群で有意に低かった。このことからすべての食餌制限群は骨粗鬆症を誘発したと判断できる。また、骨の形成に必要なカルシウム、ビタミンが

Table 4 X-ray film images of the femur of rats

| Position checked | No | Group 1 | Group 2 | Group 3 | Group 4 | Group 5 | Group 6 |
|---|----|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
|  | 1 | 0.49 ± 0.03 ^a | 0.69 ± 0.04 ^b | 0.72 ± 0.04 ^b | 0.63 ± 0.02 ^b | 0.72 ± 0.03 ^b | 0.70 ± 0.03 ^b |
| | 2 | 0.67 ± 0.08 ^a | 0.59 ± 0.03 ^a | 0.70 ± 0.03 ^a | 0.65 ± 0.05 ^a | 0.70 ± 0.06 ^a | 0.73 ± 0.04 ^a |
| | 3 | 0.53 ± 0.07 ^a | 0.47 ± 0.03 ^a | 0.66 ± 0.02 ^b | 0.60 ± 0.03 ^a | 0.65 ± 0.02 ^b | 0.70 ± 0.04 ^b |
| | 4 | 0.79 ± 0.05 ^a | 0.95 ± 0.04 ^b | 1.09 ± 0.05 ^b | 0.93 ± 0.05 ^b | 1.03 ± 0.03 ^b | 0.97 ± 0.02 ^b |
| | 5 | 1.10 ± 0.03 ^a | 1.18 ± 0.03 ^a | 1.34 ± 0.03 ^b | 1.19 ± 0.03 ^a | 1.31 ± 0.05 ^b | 1.24 ± 0.04 ^b |
| | 6 | 1.33 ± 0.03 ^a | 1.30 ± 0.06 ^a | 1.44 ± 0.05 ^a | 1.36 ± 0.02 ^a | 1.48 ± 0.05 ^a | 1.43 ± 0.08 ^a |
| | 7 | 1.03 ± 0.05 ^a | 1.48 ± 0.05 ^b | 1.11 ± 0.07 ^a | 1.35 ± 0.07 ^b | 1.35 ± 0.03 ^b | 1.43 ± 0.04 ^b |
| | 8 | 0.30 ± 0.02 ^a | 0.34 ± 0.02 ^a | 0.40 ± 0.04 ^b | 0.31 ± 0.02 ^a | 0.38 ± 0.03 ^b | 0.35 ± 0.02 ^a |
| | 9 | 0.37 ± 0.03 ^a | 0.49 ± 0.02 ^b | 0.49 ± 0.04 ^b | 0.46 ± 0.05 ^a | 0.55 ± 0.06 ^b | 0.46 ± 0.01 ^a |
| | 10 | 0.69 ± 0.04 ^a | 0.71 ± 0.02 ^a | 0.72 ± 0.02 ^a | 0.68 ± 0.02 ^a | 0.71 ± 0.02 ^a | 0.84 ± 0.05 ^b |

Means±SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a and b) are significantly different $p < 0.05$.

所要量を満している Group 4 と Group 6 でも、骨粗鬆症症状を見られたことから、骨粗鬆症の症状はこれらの栄養素の不足によるものではないと判断できる。逆に脂肪を2倍にした Group 5 では、この骨粗鬆症症状は更に悪化していたが、これは脂肪量が Group 1 と同じであることから、用いた脂肪はリノール酸の多いサラダ油であるので、脂肪量が他の栄養素に比べ多いことにもとづく脂肪量のアンバランスにより、生ずると推察される¹⁰⁾、リノール酸の多い食物ではリウマチを誘発していることもあることから、リノール酸が他の栄養素に比べ多いことによっても推察された。

次に、子宮重量を比べた場合、食餌制限群は自由食群に比べ極めて低かった。子宮は食餌制限中に女性ホルモンのエストロゲンを投与するとその投与量に応じて大きくなる¹¹⁾、エストロゲンは骨粗鬆症の予防改善効果があることから、食餌制限した場合、子宮が小さくなっていることは、食餌制限により、子宮が小さくなり、エストロゲンが欠乏し、骨粗鬆症を誘発したと推察された。卵巣を摘出し、骨粗鬆症を誘発させる場合もエストロゲンを欠乏させ、誘発させるので、この食餌制限する場合も子宮が小さくなっているから、エストロゲンが欠乏して誘発していると考えられる。その点では同じあると言えるであろう。Barzel と Orimo *et al.*^{4) 5)} は、卵巣摘出法では粗鬆化は出現しなかったと報告している。エストロゲンは脂肪組織でも生成^{12) 13)}されることから、卵巣摘出後、自由摂食させ、体重が増加すると脂肪組織でエストロゲンが生成し^{13) 14)}、骨粗鬆症を誘発しないことが考えられる。仮りにこの方法が確実であったとしても、卵巣を摘出する煩雑さは依然として残る。これに対して、食餌制限法は、7週齢の雌ラットを3週間50%食餌制限すると確実に骨粗鬆症が誘発することが確認でき、簡便

な方法として予防研究に有効である。

要 約

6週齢のWistar系雌ラットにAIN-93G標準食を自由摂食させながら1週間予備飼育した後、自由食群と食餌制限群に分けた。自由食群は標準食を自由摂取させた。食餌制限群は標準食群、標準食中のタンパク質を2倍にした群、ビタミンとミネラルを2倍にした群、脂肪を2倍にした群、ビタミン、ミネラル、タンパク質を2倍にした群の5群をつくって3週間50%食餌制限し、大腿骨の破断エネルギー等を調べ、骨粗鬆症を誘発するか研究した。

1. 3週間の食餌制限でラットの体重は約10g減少した。自由食群では約35g増加した。

2. 食餌制限群の骨の長さが有意に短くなった。

3. 大腿骨の骨塩量、骨密度、骨破断エネルギーはビタミン、ミネラルが所要量みだしている群も含め、すべての食餌制限群で有意に減少したが、X線透過濃度は逆に有意に高くなり、7週齢の雌ラットを3週間50%食餌制限すると骨粗鬆症を誘発した。

4. 子宮の重量は、食餌制限すると有意に減少した。このことは、食餌制限により誘発した骨粗鬆症は子宮が小さくなり、エストロゲンが欠乏し、誘発したと推察された。

引用文献

- 1) Saville PD (1969) Changes in skeletal mass and fragility with castration in the rats. A model of osteoporosis. *J Am Geriatr Soc* 17: 155-66.
- 2) Aitken JM, Anderson JB (1972) Osteoporosis after

Table 5 Mechanical properties of a left femur

| | Strength (N) | Ductility (10 ⁻³ m) | Stiffness (×10 N/m) | Toughness (×10 ⁻³ J) |
|---------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Group 1 | 95.3 ± 17.8 ^a | 36.5 ± 10.4 ^a | 78.7 ± 17.9 ^a | 26.6 ± 6.2 ^a |
| Group 2 | 82.6 ± 6.3 ^a | 31.9 ± 7.5 ^a | 81.2 ± 12.4 ^a | 12.4 ± 5.0 ^b |
| Group 3 | 78.4 ± 10.2 ^a | 26.8 ± 5.7 ^a | 80.8 ± 11.7 ^a | 13.0 ± 5.1 ^b |
| Group 4 | 82.2 ± 9.0 ^a | 30.4 ± 5.3 ^a | 80.2 ± 9.0 ^a | 13.1 ± 4.2 ^b |
| Group 5 | 70.7 ± 17.7 ^a | 27.9 ± 2.5 ^a | 67.2 ± 15.8 ^a | 9.8 ± 2.6 ^c |
| Group 6 | 81.4 ± 13.4 ^a | 30.0 ± 7.0 ^a | 80.8 ± 6.6 ^a | 13.6 ± 6.2 ^b |

Means ± SD (n=5). Values not sharing common superscript letters (a, b and c) are significantly different p < 0.05.

oophorectomy in the mature female rat and the effect of estrogen and/or progestogen replacement therapy in its prevention. *J Endocrinol* **55** : 79–87.

3) Lindgren JU, Lindholm TS (1979) Effect of 1-alpha-hydroxyvitamin D₁ on osteoporosis in rats induced by oophorectomy. *Calcif Tiss Intl* **27** : 161–4.
 4) Barzel US (1975) Studies in osteoporosis: the long-term effect of oophorectomy and of ammonium chloride ingestion on the bone of mature rats. *Endocrinology* **96** : 1304–6.
 5) Orimo H, Fugita T, Yoshikawa H. (1972) Increased sensitivity of bone to parathyroid hormone in ovariectomized rats. *Endocrinology* **90** : 760?3.
 6) Kamada Y, Oshiro N, Miyagi M, Oku H, Hongo F, Chinen I (1998) Osteopathy in broiler chicks fed toxic mimosine in leucaena lucocephala. *Biosci Biotechnol Biochem* **62** : 34–8.
 7) Reeves PG, Rossow KL, Lindlauf J (1993) Development and testing of the AIN-93G purified diets for rodents: results on growth, kidney calcification and bone mineralization in rats and mice. *J Nutr* **123** : 1923–31.
 8) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GCJr (1993) AIN-93G purified diets for laboratory rodents: final report of the

american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* **123** : 1939–51.

9) Peng TC, Kusy RP, Garner SC, Hirsch PF, De Blanco MC (1987) Influence of lactation and pregnancy+lactation on mechanical properties and mineral content of the rat femur. *J Bone Miner Res* **2** : 249–57.
 10) 峰尾 哲, 松尾成人, 小西靖彦 (1998) サイトカインとn-3系多価不飽和脂肪酸. *Foods Food Ingredients J Jpn* **178** : 61-7
 11) 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.
 12) Simpson ER, Zhao Y (1996) Estrogen biosynthesis in adipose. Significance in breast cancer development. *Ann NY Acad Sci* **4** : 18–26.
 13) 江澤郁子, 林 泰史 (1991) 骨粗鬆症, p.58. 農山村文化協会, 東京.
 14) Coldham NG, Dave M, Sivapathasundaram S, McDonnell DP, Connor C, Sauer MJ (1997) Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ Health Perspect* **7** : 734–42.