

報 文

牛乳と食品添加物からのカルシウム、リン摂取がカルシウム、リンの恒常性および骨代謝に与える影響の違い

山本 早苗^{*1} 石田 裕美^{*1} 上西 一弘^{*2}

Different Effects of Calcium and Phosphorus Intake from Milk or Food Additives on Calcium and Phosphorus Homeostasis and Bone Turnover

YAMAMOTO Sanae^{*1}, ISHIDA Hiromi^{*1}, UENISHI Kazuhiro^{*2}

Abstract: To examine the different effects of calcium and phosphorus from milk or food additives on calcium and phosphorus homeostasis and also bone metabolism, a 4-weeks intervention study was conducted. Twenty-four healthy young women consumed 400 ml milk or a corresponding amount of calcium- and phosphorus-added cookies every day in addition to their usual diet. As a result, serum and urinary calcium and inorganic phosphorus and also serum intact parathyroid hormone (PTH) did not change in both groups. However, urinary deoxypyridinoline/creatinine (DPD/CRE) as a bone absorption marker significantly decreased only in the milk intake group. These results suggest the possibility of different effects of calcium and phosphorus from milk or food additives on bone metabolism.

リンは、カルシウムとともに骨のハイドロキシアパタイトを形成しており、骨の健康に不可欠なミネラルである¹⁾。天然の食品中に幅広く存在しており、また、食品添加物として加工食品等に幅広く添加されているため^{2, 3)}、不足よりもむしろリン摂取量の増加、もしくは低カルシウム摂取との組み合わせによる低カルシウム／リン摂取が骨へ負の影響を与えている可能性が指摘されている^{1, 4-8)}。

近年、加工食品の消費量増加に伴い、食品添加物からのリン摂取量が増加している。米国では、食品添加物からのリン摂取推定量は1980年に400mg/日であったが、1990年には470mg/日に増加している⁵⁾。ただし、日本における食品添加物由来のリン摂取量に関する報告はない。

天然の食品中のリンの中でも、存在形態によって腸管からの吸収率が異なるが⁹⁻¹¹⁾、通常の食事からの吸収率は60～70%といわれている¹²⁾。一方、食品添加物中のリンの中でも、リン酸基がひとつであるオルトリン酸と複数のポリリン酸、ピロリン酸とでは生体での利用性が異なると言われている。オルトリン酸の吸収率が高いが、ポリリン酸、ピロリン酸は胃腸内での溶解性が低く、利用性は低い¹²⁾。ただし、ポリリン酸、ピロリン酸はカルシウムなど他のミネラルと結合し、これらミネラルの吸

収を阻害する¹³⁾。このような中で、天然の食品中のリンと添加物中のリンとは、生体におけるカルシウム、骨代謝に与える影響が異なる可能性が示唆されている^{14, 15)}。Karpらは、一日の短期的試験において、リン化合物摂取時の血清副甲状腺ホルモン（PTH）濃度の上昇が、他の食品、チーズ、肉、穀類からのリン摂取時よりも大きいことを示した¹⁴⁾。しかし、食品を使用しての試験のため、カルシウムやたんぱく質など他の栄養素量が一律ではなく、このことが結果に影響した可能性がある。また、一日の中での短期試験であるため、長期的影響については分からない。また、習慣的な摂取に着目したKemiらの報告の中では、リン化合物が添加されているプロセスチーズを摂取する者は摂取しない者より血清PTH濃度が高かった¹⁵⁾。ただし、プロセスチーズにはオルトリン酸とポリリン酸またはピロリン酸が添加されており、これらを区別していないため、リンの吸収率の問題か、カルシウムの吸収阻害の問題かが明らかでない。

本研究では、天然の食品である牛乳と、食品添加物からのカルシウム、オルトリン摂取の、血清および尿中カルシウム、無機リン、血清 intact PTH 濃度、また骨吸収、骨形成に与える影響の違いを、4週間の介入試験により検討した。

*1 給食・栄養管理研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Administrative Dietetics, Kagawa Nutrition University

*2 栄養生理学研究室, 女子栄養大学: Laboratory of Physiological Nutrition, Kagawa Nutrition University

方 法

1. 参加者および試験時期

参加者は、2009年の管理栄養士養成大学2年生の女子大学生24名である。介入期間は2009年6月19日からの4週間である。なお、参加者には、事前に試験の趣旨や参加方法などについて説明し、本人から文書により同意の得られた者を対象とした。なお、この研究は香川栄養学園倫理審査委員会の承認を得て行った。

2. 介入方法

参加者には、1ヵ月間の介入期間中、日常の食事をなるべく変えずに、任意の時間に実験食品を毎日摂取するように依頼した。参加者をⅠ群（牛乳群）12名、Ⅱ群（カルシウム・リン添加群）12名に無作為に分けて行った。なお、参加者には、実験食品の摂取の有無や体調などを示した日誌の記載を依頼した。介入前の0日目、介入終了後の28日目に身体計測、早朝空腹時採血、採尿（スポット尿）を行った。また、介入前と介入中の食事摂取状況を把握するため、食事記録と食物摂取頻度調査を行った。

3. 実験食品

Ⅰ群は牛乳200ml×2本/日（森永牛乳、常温保存可能品）とし、1週間毎にまとめて配布した。Ⅱ群は、食品添加物として指定されているリン酸一カルシウム $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ （太平化学産業、大阪）、炭酸カルシウム CaCO_3 （純正化学、東京）を添加し、牛乳400mlと同等のエネルギー、たんぱく質、脂質、カルシウム、リン量となるよう、クッキーを作成し、一日分の実験食品とした。なお、食品添加物以外のクッキーの材料はなるべくカルシウム、リン含有量が少ないものを使用した。Ⅱ群のクッキーは、牛乳と同様に1週間毎にまとめて配布した。作成したクッキーはその都度、配布したものと同じものを分析用サンプルとして回収し、重量を測定後、粉碎し、一部のサンプルを約0.3g精秤、石英製三角フラスコ内で550℃にて灰化した。灰化後、1%硝酸を加えて50mlに希釈し、濾過（Minisart 0.45μm）後、適宜希釈してICP発光分析装置Leeman Labs（Leeman Labs Inc., USA）を用いて、サンプル中のカルシウム、リン濃度を測定した。

4. 介入期間前、期間中の摂取エネルギー、栄養素量

介入によって日常の食事摂取状況に変化がないことを確認するため、介入前3日間、介入中6日間における実験食品以外の摂取食品について、秤量法による食事記録を依頼した。食事記録より、エネルギー、たんぱく質、脂質、ビタミンD、カルシウム、リン摂取量を、五訂増補日本食品標準成分表を用いて算出した。また、カルシウム/リンmg摂取比（以下カルシウム/リン比）を算出した。さらに、介入0日目と28日目の調査時に、自

記式の半定量的食物摂取頻度調査（FFQ-POP: Food Frequency Questionnaire for the prevention and management of osteoporosis）¹⁶⁾を実施した。FFQ-POPは過去1ヵ月の食物摂取状況を問うものである。カルシウム、リン、カルシウム/リン比に関しては、実験食品中のカルシウム、リン含有量（測定値）と各自の摂取状況より平均摂取量を算出し、食事記録より算出したカルシウム、リン摂取量に加えて介入中のカルシウム、リン摂取量、カルシウム/リン比（計算値）を求めた。

5. 身体計測

介入0日目に身長を、介入0日と28日目の早朝空腹時に体重、体脂肪率の測定を行った。体脂肪率は8電極式多周波インピーダンス法（MFBI法）¹⁷⁾で測定した。測定機種はInBody 7.2（バイオスペース、東京）を用いた。

6. 血清カルシウム、無機リン、intact PTH、TRACP-5b、BAP濃度の測定

前日22時以降、水以外の飲食を控えてもらい、介入0日目、28日目に早朝空腹時採血を行った。血清カルシウム濃度（mg/dL）、無機リン濃度（mg/dL）、intact PTH濃度（pg/mL）、骨吸収マーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ5b（TRACP-5b）濃度（mU/dL）¹⁸⁾、骨形成マーカーとして骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）濃度（U/L）を測定した。測定は（株）SRL（東京、日本）に依頼した。血清カルシウムの測定法はorthocresolphthalein complexone（OCPC）法¹⁹⁾、無機リンはモリブデン酸直接法²⁰⁾、intact PTHは電気化学発光免疫測定（ECLIA）法²¹⁾、TRACP-5bは定量的酵素免疫測定法（EIA）法²²⁾、BAPはEIA法²³⁾である。

7. 尿中カルシウム、無機リン、DPD、クレアチニン濃度の測定

早朝空腹時採血と合わせて採尿を行った。第一尿排泄後、原則第二尿を採尿することとした。尿中カルシウム濃度（mg/dL）、無機リン濃度（mg/dL）、骨吸収マーカーとしてデオキシピリジノリン（DPD）濃度（nmol/L）、クレアチニン濃度（mg/dL）を測定し、各測定値のクレアチニン換算値を算出した。測定は（株）SRL（東京、日本）に依頼した。尿中カルシウムの測定法はOCPC法¹⁹⁾、無機リンはモリブデン酸直接法²⁰⁾、DPDはEIA法²⁴⁾である。

8. 統計解析

介入前と介入中の実験食品以外、または実験食品を含めたエネルギー、および栄養素摂取量、カルシウム/リン比の違いを確認するため、対応のあるt検定を行った。また、介入前および介入中の群間のエネルギー、栄養素摂取量、カルシウム/リン比の違いを確認するため、Studentのt検定を行った。

介入0日目と28日目の体重、体脂肪率、血清カルシウム、無機リン、intact PTH、TRACP-5b、BAP濃度、尿中カルシウム、無機リン、DPDクレアチニン換算値の変化を検討するため、対応のあるt検定を行った。群間の違いを検討するため、Studentのt検定を行った。

統計解析にはSPSS (Ver. 15.0) を用いた。いずれの解析も有意水準は5%未満とした。

結 果

1. 解析対象者

研究参加者のうち、介入によって食事量またはカルシウム摂取量が明らかに減少または増加した者、具体的には、食事記録によるエネルギー摂取量が600kcal/日以上減少した者、カルシウム摂取量が300mg/日以上減少した者と増加した者、また、血清コレステロール値が高い者、骨代謝が他の者と比較して高い者を除いたI群8名、II群9名を解析対象者とした。なお、I群の2名は介入前の食事記録時に、明らかにいつもと違う食事内容であっ

たと申告したが、FFQ-POPの結果では、介入前と介入中の食事摂取状況に変化がないと認められたため、解析対象者とした。介入開始時点における対象者の平均年齢は19.8±0.2歳であり、I群とII群の間に違いはなかった。なお、日誌より、介入による体調等の変化は見られなかった。

表1 実験食品のエネルギー、栄養素量

	牛乳 400ml	カルシウム・リン添加 クッキー	
	計算値	計算値	測定値
エネルギー (kcal)	276	275	—
たんぱく質 (g)	13.6	13.1	—
脂質 (g)	15.7	14.3	—
ビタミンD (μg)	1.2	0.0	—
カルシウム (mg)	453	453 †	457 (101%)
リン (mg)	383	383 ‡	373 (97%)

平均値 () 内は計算値に対する測定値の割合 (%)

† うち 438mg は Ca (H₂PO₄)₂ および CaCO₃ 由来

‡ うち 348mg は Ca (H₂PO₄)₂ 由来

表2 介入前、介入中の実験食品以外のエネルギー、栄養素摂取量 (食事記録およびFFQ-POPの結果)

	介入群	介入前	介入中	p 値 †
食事記録				
エネルギー (kcal)	I	1,297±218 §	1,412±97	0.177
	II	1,629±227 §	1,564±330	0.574
たんぱく質 (g)	I	45.0±13.5 ‡	48.2±7.0	0.507
	II	57.7±10.1 ‡	57.5±13.0	0.949
脂質 (g)	I	34.8±11.8 ¶	42.3±8.8 ‡	0.100
	II	56.6±6.1 ¶	53.5±11.0 ‡	0.533
ビタミンD (μg)	I	4.7±4.2	2.4±1.5	0.195
	II	5.0±3.0	3.3±2.9	0.233
カルシウム (mg)	I	388±125	410±47	0.687
	II	520±164	504±172	0.836
リン (mg)	I	706±203	743±91	0.663
	II	911±208	903±250	0.904
カルシウム/リン比	I	0.55±0.87	0.56±0.08	0.699
	II	0.57±0.09	0.55±0.09	0.771
FFQ-POP				
エネルギー (kcal)	I	1,569±138	1,570±258	0.993
	II	1,544±318	1,541±261	0.969
たんぱく質 (g)	I	65.8±14.2	68.8±17.1	0.724
	II	65.3±10.6	66.0±14.4	0.885
脂質 (g)	I	56.7±14.3	56.6±10.9	0.982
	II	64.2±12.1	63.8±13.9	0.918
ビタミンD (μg)	I	7.3±1.4	6.7±1.2	0.083
	II	7.6±1.6	7.8±1.2	0.724
カルシウム (mg)	I	424±152	385±129	0.415
	II	448±88	373±89	0.057

平均±標準偏差

I: 牛乳群, II: カルシウム・リン添加群

† 対応のあるt検定

‡ Studentのt検定 $p < 0.05$

§ Studentのt検定 $p < 0.01$

¶ Studentのt検定 $p < 0.001$

2. 実験食品中のエネルギー、栄養素量

実験食品 1 日分のエネルギー、たんぱく質、脂質、ビタミン D、カルシウム、リンの計算値およびカルシウムとリンの実測値、計算値に対する割合（％）を表 1 に示す。計算値として、カルシウム・リン添加クッキー中のカルシウム 453mg 中 438mg、カルシウム・リン添加クッキー中のリン 383mg 中 348mg が添加物由来である。

3. 介入前および介入中のエネルギーおよび栄養素摂取量

秤量記録による食事記録および FFQ-POP により計算した対象者の介入前、介入中における、実験食品分を除いたエネルギー、栄養素摂取量およびカルシウム／リン比を表 2 に示す。なお、FFQ-POP に関しては、リン摂取量に関しての妥当性が検討されていないため、リン摂

表 3 介入前、介入中の実験食品を含めたカルシウム、リン摂取量およびカルシウム／リン比

	介入群	介入前	介入中	p 値 †
カルシウム (mg)	I	388±125	863±45	<0.001
	II	520±164	960±170	<0.001
リン (mg)	I	706±203	1,124±92	<0.001
	II	911±208	1,274±248	<0.001
カルシウム／リン比	I	0.55±0.87	0.77±0.06	<0.001
	II	0.57±0.09	0.76±0.05	<0.001

平均 ± 標準偏差

I：牛乳群、II：カルシウム・リン添加群

† 対応のある t 検定

表 4 介入前、介入後の身長、体重および体脂肪率

	介入群	介入前	介入後	p 値 †
身長 (cm)	I	161.1±5.7	—	—
	II	160.3±4.3	—	—
体重 (kg)	I	55.0±6.9	54.8±7.0	0.621
	II	53.0±6.1	53.1±6.0	0.963
体脂肪率 (%)	I	27.6±5.0	26.5±4.5	<0.001
	II	27.0±6.0	27.0±5.6	0.829

平均 ± 標準偏差

I：牛乳群、II：カルシウム・リン添加群

† 対応のある t 検定

表 5 介入前、介入後の血清および尿中測定値

	介入群	介入前	介入後	p 値 †
血清カルシウム (mg/dL)	I	9.6±0.2	9.4±0.2	0.111
	II	9.6±0.2	9.4±0.3	0.347
血清無機リン (mg/dL)	I	4.2±0.4	4.0±0.4	0.164
	II	4.2±0.4	3.9±0.4	0.135
尿中カルシウム／クレアチニン (mg/mmol CRE)	I	8.3±4.7	6.9±4.3	0.427
	II	6.8±2.5	6.1±3.5	0.592
尿中無機リン／クレアチニン (mg/mmol CRE)	I	44.3±13.4	54.3±15.3	0.111
	II	48.9±16.3	59.9±30.2	0.435
血清 intact PTH (pg/mL)	I	47±12	41±9	0.240
	II	36±12	36±16	0.942
血清 TRACP-5b (mU/dL)	I	202±48	185±40	0.268
	II	196±49	214±54	0.074
血清 BAP (U/L)	I	20.3±5.0	19.1±5.1	0.194
	II	17.3±3.2	17.0±3.2	0.489
尿中 DPD/クレアチニン (nmol/mmol CRE)	I	7.5±2.0	6.0±1.6	<0.05
	II	7.1±2.1	7.0±1.9	0.736

平均 ± 標準偏差

I：牛乳群、II：カルシウム・リン添加群

† 対応のある t 検定

取量およびカルシウム／リン比は算出していない。食事記録におけるⅠ群の介入前のエネルギー、たんぱく質、脂質摂取量はⅡ群よりも低かったが、介入中は脂質のみの違いとなった。FFQ-POPではこのような違いは確認されなかった。表3には実験食品を考慮に入れたときの介入前、介入中のカルシウム、リン摂取量およびカルシウム／リン比を示す。Ⅱ群の2名が1日のみ実験食品1日分の1/4を、1名が1日のみ同じく1日分の1/2を摂取しなかったため、その分を差し引いて各個人の平均摂取量を算出した。介入によって、Ⅰ群Ⅱ群ともにカルシウム、リン摂取量およびカルシウム／リン比が増加した。

4. 身長および体重と体脂肪率の変化

表4に対象者の身長と、介入0日目および28日目の体重、体脂肪率を示す。群間に有意な違いは見られなかったが、Ⅰ群のみ体脂肪率が低下した。

5. 血清、尿中カルシウム、無機リン、血清 intact PTH、骨代謝マーカーの変化

表5に介入0日目および28日目の血清カルシウム、無機リン濃度、尿中カルシウムおよび無機リンクレアチニン換算値、血清 intact PTH 濃度、血清 TRACP-5b, BAP 濃度、尿中 DPD クレアチニン換算値を示す。Ⅰ群においてのみ、尿中 DPD クレアチニン換算値が低下した (7.5 ± 2.0 vs. 6.0 ± 1.6 nmol/mmol CRE, $p < 0.05$)。群間の差は見られなかった。

考 察

本研究では、4週間の牛乳摂取と食品添加物からのカルシウム、リン摂取が、カルシウム、リン代謝、骨代謝に与える影響が異なるか否かを検討した。月経周期により、血清カルシウム、無機リン濃度が変化することが知られている²⁵⁾。多くの場合、月経周期は28日であるため、女性ホルモン分泌が等しい時期である4週間後に介入の評価を行えるよう、本研究では介入期間を4週間とした。その結果、牛乳群（Ⅰ群）においてのみ、骨吸収マーカーである尿中 DPD クレアチニン換算値が減少した。牛乳を天然の食品の例として用いた理由は、牛乳はカルシウムだけでなく、リンの主な供給源となり得ること²⁶⁾、牛乳中のカルシウムの生体利用に関する研究はこれまでに多く報告されていること²⁷⁻²⁹⁾、また毎日等量を摂取することが比較的容易であることなどからである。

日本人のリン摂取量の水準は、2006年の国民健康・栄養調査結果によると平均1,004 mg/日である³⁰⁾。この調査法は、食品成分表に記載されていない加工食品については、原材料となる食品の量を専門家が推定し、栄養素量を計算するため、食品添加物からのリン摂取量を過小評価している可能性がある。一方、日本人の食品添加物の一日摂取量調査研究³¹⁾では、国民栄養調査による食品群毎の一日平均摂取量を求め、マーケットバスケット

方式により実測して求めている。この報告におけるリン摂取量は平均1,399 mg/日であった。この値と先に示した国民健康・栄養調査における値の差を食品添加物からの過小評価されたリン摂取量と仮定すると、400 mg 弱/日となる。本研究では、この日本人が食品添加物から摂取していると推定されるリン量を目安とし、リンの負荷量とした。

4週間のカルシウム、リンの負荷によって早朝空腹時の血清カルシウム、無機リン、intact PTH 濃度は変化が見られなかった。過去の研究では、食事からのカルシウムやリンの摂取量の変化は、血清カルシウム、無機リン濃度の概日リズムを変えるが^{32, 33)}、早朝空腹時には違いが見られなかった^{32, 34)}。一方、血清カルシウム、無機リン濃度は、PTHにより恒常性が保たれていると言われており³⁵⁾、リン負荷3時間後の血清PTH濃度は上昇していたが、血清カルシウム、無機リン濃度に変化は見られていなかった³⁶⁾。ただし、早朝空腹時の血清PTH濃度は変化が見られていない報告が多い^{32, 36, 37)}。本研究でも、血清カルシウム、無機リン、intact PTH 濃度の日内変化に実験食品による違いがあったが、早朝空腹時の値であるために、血清カルシウム、無機リン、intact PTH 濃度の違いが見られなかった可能性がある。

さらに、Ⅰ群とⅡ群ともに、尿中カルシウム、無機リンクレアチニン換算値にも変化は見られなかった。カルシウム摂取量増加により尿中無機リン排泄量は低下し³⁸⁻⁴¹⁾、また、リン摂取量増加により尿中カルシウム排泄量は低下すると言われており^{13, 38, 42-47)}、本研究では、この両者の作用により尿中カルシウム、リン量の変化が見られなかった可能性がある。

本研究では、牛乳の負荷によってのみ骨吸収マーカーである尿中 DPD クレアチニン換算値が減少した。ただし、同じく骨吸収マーカーである血清 TRACP-5b 濃度は変化が見られなかった。牛乳やスキムミルク中のカルシウムは、炭酸カルシウムと生体利用性は同等であり^{28, 39)}、リン酸カルシウムも他のカルシウム塩と同様に吸収がよいと言われている²⁷⁾。また、オルトリンはカルシウムの吸収を下げないことより¹³⁾、Ⅰ群とⅡ群とでは、カルシウムの吸収に違いはなかったと推測できる。そのため、牛乳の摂取でのみ骨吸収が低下したのは、牛乳と食品添加物中のオルトリンの吸収量の違いによる可能性が考えられる。カルシウムやリンの摂取以外にも、たんぱく質^{48, 49)}やビタミンD⁵⁰⁾の摂取が骨代謝に影響を与えていると言われているが、Ⅰ群、Ⅱ群におけるたんぱく質、ビタミンD摂取量の違いは見られなかった。ただし、栄養素の摂取以外にも運動など^{1, 51, 52)}、骨吸収に影響する因子の存在が考えられるが、今回の研究では把握できていない。今後、運動など他の因子の骨代謝への影響を考慮に入れた更なる研究が必要である。また、血清 TRACP-5b には変化が見られなかったのは、尿中 DPD とは実験食品に対する反応が異なる可能性が考えられる。尿中 DPD は骨組織中のコラーゲン代謝物質で

あり、骨吸収の指標を直接的に見ているマーカーであるのに対し⁵³⁾、血清 TRACP-5b は破骨細胞の活性を示す指標である⁵⁴⁾。

本研究では、牛乳群でのみ、4 週間の介入によって体脂肪率が減少した。乳・乳製品の摂取が体脂肪量減少を促進する理由として、カルシウムだけでなく、牛乳中の他の成分、生物活性物質等が体脂肪減少に貢献する可能性が示唆されている⁵⁵⁾。本研究の結果もこの可能性を支持するものであった。

本研究の限界は、介入前、期間中の実験食品以外の食事の選択は、参加者の任意で行われたため、介入前、介入中の摂取栄養素量を全て同等とすることができなかった点である。より正確にカルシウム、リン代謝への影響を見るためには、食事を全て統一する必要があるが、対象者の負担を考えると、長期的な試験は難しいと考える。

本研究では、日本人の若年成人女性において、4 週間の牛乳 400 ml/日の摂取は、骨吸収を低下させるが、同等量の食品添加物からのカルシウム、リン摂取は骨代謝に影響を与えなかったことより、牛乳中のカルシウム、リン摂取と、食品添加物からのカルシウム、リン摂取は、骨代謝に与える影響が異なる可能性が示唆された。

本研究を行うにあたり、介入試験に参加していただいた学生の皆様に心から御礼申し上げます。なお、本研究は、牛乳・乳製品の機能性等に関する調査・研究事業の助成により行われた。

参考文献

- Vicente-Rodriguez G, Ezquerro J, Mesana MI, *et al.*: Independent and combined effect of nutrition and exercise on bone mass development. *J Bone Miner Metab* **26**, 416-424 (2008).
- Calvo MS, Park YK.: Changing phosphorus content of the U.S. diet: potential for adverse effects on bone. *J Nutr* **126**, 1168S-1180S (1996).
- Uribarri J, Calvo MS.: Hidden sources of phosphorus in the typical American diet: does it matter in nephrology? *Semin Dial* **16**, 186-188 (2003).
- Massey LK, Strang MM.: Soft drink consumption, phosphorus intake, and osteoporosis. *J Am Diet Assoc* **80**, 581-583 (1982).
- Calvo MS.: Dietary phosphorus, calcium metabolism and bone. *J Nutr* **123**, 1627-1633 (1993).
- Subar AF, Krebs-Smith SM, Cook A, Kahle LL.: Dietary sources of nutrients among US adults, 1989 to 1991. *J Am Diet Assoc* **98**, 537-547 (1998).
- Nieves JW.: Osteoporosis: the role of micronutrients. *Am J Clin Nutr* **81**, 1232S-1239S (2005).
- Palacios C.: The role of nutrients in bone health, from A to Z. *Crit Rev Food Sci Nutr* **46**, 621-628 (2006).
- Nordin BEC.: Phosphorus. *Journal of Food and Nutrition* **45**, 62-75 (1988).
- Uribarri J.: Phosphorus homeostasis in normal health and in chronic kidney disease patients with special emphasis on dietary phosphorus intake. *Semin Dial* **20**, 295-301 (2007).
- Bohn L, Meyer AS, Rasmussen SK.: Phytate: impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. *J Zhejiang Univ Sci B* **9**, 165-191 (2008).
- Anderson JJ.: Nutritional biochemistry of calcium and phosphorus *J Nutr Biochem* **2**, 300-307 (1991).
- Zemel MB, Linkswiler HM.: Calcium metabolism in the young adult male as affected by level and form of phosphorus intake and level of calcium intake. *J Nutr* **111**, 315-324 (1981).
- Karp HJ, Vahia KP, Karkkainen MU, Niemisto MJ, Lamberg-Allardt CJ.: Acute effects of different phosphorus sources on calcium and bone metabolism in young women: a whole-foods approach. *Calcif Tissue Int* **80**, 251-258 (2007).
- Kemi VE, Rita HJ, Karkkainen MU, *et al.*: Habitual high phosphorus intakes and foods with phosphate additives negatively affect serum parathyroid hormone concentration: a cross-sectional study on healthy premenopausal women. *Public Health Nutr* **12**, 1885-1892 (2009).
- Uenishi K, Ishida H, Nakamura K.: Development of a simple food frequency questionnaire to estimate intakes of calcium and other nutrients for the prevention and management of osteoporosis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **54**, 25-29 (2008).
- Sun G, French CR, Martin GR, *et al.*: Comparison of multifrequency bioelectrical impedance analysis with dual-energy X-ray absorptiometry for assessment of percentage body fat in a large, healthy population. *Am J Clin Nutr* **81**, 74-78 (2005).
- Oddie GW, Schenk G, Angel NZ, *et al.*: Structure, function, and regulation of tartrate-resistant acid phosphatase. *Bone* **27**, 575-584 (2000).
- Connerty HV, Briggs AR.: Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am J Clin Pathol* **45**, 290-296 (1966).
- Drewes PA.: Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin Chim Acta* **39**, 81-88 (1972).
- Inomata K, Yamashita H, Yamashita H, Noguchi S.: [Measuring method of intact PTH]. *Modern Medical Laboratory* **30**, 107-112 (2002).
- Miura T, Igarashi Y, Ohashi K, *et al.*: Development and basic studies of a novel immunoassay kit for osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase (TRACP 5b) activity (in Japanese). *Osteoporosis Japan* **12**, 42-45 (2004).
- Gomez B, Jr., Ardakani S, Ju J, *et al.*: Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin Chem* **41**, 1560-1566 (1995).
- Robins SP, Woitge H, Hesley R, Ju J, Seyedin S, Seibel MJ.: Direct, enzyme-linked immunoassay for urinary deoxypyridinoline as a specific marker for measuring bone resorption. *J Bone Miner Res* **9**, 1643-1649 (1994).
- Dullo P, VEDI N.: Changes in serum calcium, magnesium and inorganic phosphorus levels during different phases of the menstrual cycle. *J Hum Reprod Sci* **1**, 77-80 (2008).

- 26) Huth PJ, DiRienzo DB, Miller GD.: Major scientific advances with dairy foods in nutrition and health. *J Dairy Sci* **89**, 1207-1221 (2006).
- 27) Gueguen L, Pointillart A.: The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* **19**, 119S-136S (2000).
- 28) Martini L, Wood RJ.: Relative bioavailability of calcium-rich dietary sources in the elderly. *Am J Clin Nutr* **76**, 1345-1350 (2002).
- 29) Teucher B, Majsak-Newman G, Dainty JR, McDonagh D, FitzGerald RJ, Fairweather-Tait SJ.: Calcium absorption is not increased by caseinophosphopeptides. *Am J Clin Nutr* **84**, 162-166 (2006).
- 30) Ministry of Health and Welfare Annual Report of the National Nutrition Survey in 2006 (in Japanese). Tokyo: Daiichi Publishing Co., (2009).
- 31) Tsuji S, Yomota C, Shibata T, *et al.*: Daily Intake of Naturally Occurring Chemically Synthesized Food Additives in Japan. *J Food Hyg Soc Japan* **36**, 428-441 (1995).
- 32) Calvo MS, Kumar R, Heath H, 3rd.: Elevated secretion and action of serum parathyroid hormone in young adults consuming high phosphorus, low calcium diets assembled from common foods. *J Clin Endocrinol Metab* **66**, 823-829 (1988).
- 33) Calvo MS.: The effects of high phosphorus intake on calcium homeostasis. *Adv Nutr Res* **9**, 183-207 (1994).
- 34) Portale AA, Halloran BP, Morris RC, Jr.: Physiologic regulation of the serum concentration of 1,25-dihydroxy-vitamin D by phosphorus in normal men. *J Clin Invest* **83**, 1494-1499 (1989).
- 35) Moe SM.: Disorders involving calcium, phosphorus, and magnesium. *Prim Care* **35**, 215-237, v-vi (2008).
- 36) Whybro A, Jagger H, Barker M, Eastell R.: Phosphate supplementation in young men: lack of effect on calcium homeostasis and bone turnover. *Eur J Clin Nutr* **52**, 29-33 (1998).
- 37) Calvo MS, Kumar R, Heath H.: Persistently elevated parathyroid hormone secretion and action in young women after four weeks of ingesting high phosphorus, low calcium diets. *J Clin Endocrinol Metab* **70**, 1334-1340 (1990).
- 38) Spencer H, Menczel J, Lewin I, Samachson J.: Effect of High Phosphorus Intake on Calcium and Phosphorus Metabolism in Man. *J Nutr* **86**, 125-132 (1965).
- 39) Mortensen L, Charles P.: Bioavailability of calcium supplements and the effect of Vitamin D: comparisons between milk, calcium carbonate, and calcium carbonate plus vitamin D. *Am J Clin Nutr* **63**, 354-357 (1996).
- 40) Yoshinaga J, Morita M, Yukawa M, Shiraishi K, Kawamura H.: Certified reference material for analytical quality assurance of minor and trace elements in food and related matrixes based on a typical Japanese diet: interlaboratory study. *J AOAC Int* **84**, 1202-1208 (2001).
- 41) Kemi VE, Karkkainen MU, Karp HJ, Laitinen KA, Lamberg-Allardt CJ.: Increased calcium intake does not completely counteract the effects of increased phosphorus intake on bone: an acute dose-response study in healthy females. *Br J Nutr* **99**, 832-839 (2008).
- 42) Bell RR, Draper HH, Tzeng DY, Shin HK, Schmidt GR.: Physiological responses of human adults to foods containing phosphate additives. *J Nutr* **107**, 42-50 (1977).
- 43) Spencer H, Kramer L, Osis D, Norris C.: Effect of phosphorus on the absorption of calcium and on the calcium balance in man. *J Nutr* **108**, 447-457 (1978).
- 44) Heaney RP, Recker RR.: Effects of nitrogen, phosphorus, and caffeine on calcium balance in women. *J Lab Clin Med* **99**, 46-55 (1982).
- 45) Spencer H, Kramer L, Rubio N, Osis D.: The effect of phosphorus on endogenous fecal calcium excretion in man. *Am J Clin Nutr* **43**, 844-851 (1986).
- 46) Brian K, Bzik BS, WDM, Florian L, Cerklewski phD.: Evidence that resorption of young men is not increased by high dietary phosphorus obtained from milk and cheese. *Nutrition Research* **16**, 1143-1146 (1996).
- 47) Karkkainen M, Lamberg-Allardt C.: An acute intake of phosphate increases parathyroid hormone secretion and inhibits bone formation in young women. *J Bone Miner Res* **11**, 1905-1912 (1996).
- 48) Kerstetter JE, O'Brien KO, Insogna KL.: Low protein intake: the impact on calcium and bone homeostasis in humans. *J Nutr* **133**, 855S-861S (2003).
- 49) Ince BA, Anderson EJ, Neer RM.: Lowering dietary protein to U.S. Recommended dietary allowance levels reduces urinary calcium excretion and bone resorption in young women. *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3801-3807 (2004).
- 50) Kulie T, Groff A, Redmer J, Hounshell J, Schragar S.: Vitamin D: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med* **22**, 698-706 (2009).
- 51) Maimoun L, Manetta J, Couret I, *et al.*: The intensity level of physical exercise and the bone metabolism response. *Int J Sports Med* **27**, 105-111 (2006).
- 52) Specker B, Vukovich M.: Evidence for an interaction between exercise and nutrition for improved bone health during growth. *Med Sport Sci* **51**, 50-63 (2007).
- 53) Vesper HW, Demers LM, Eastell R, *et al.*: Assessment and recommendations on factors contributing to preanalytical variability of urinary pyridinoline and deoxypyridinoline. *Clin Chem* **48**, 220-235 (2002).
- 54) Halleen JM, Tiitinen SL, Ylipahkala H, Fagerlund KM, Vaananen HK.: Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin Lab* **52**, 499-509 (2006).
- 55) Van Loan M.: The role of dairy foods and dietary calcium in weight management. *J Am Coll Nutr* **28**, Suppl 1: 120S-129S (2009).