

種々のカルシウム／マグネシウム比で培養した ヒト線維芽細胞の活性と海洋深層水添加効果

Cell viability of human fibroblasts cultured with various ratios of calcium and magnesium and effects of deep seawater supplementation

山田勝久¹・鈴木正宏¹・野村道康¹・柴田雄次²・今田千秋²

Katsuhisa YAMADA¹, Masahiro SUZUKI¹, Michiyasu NOMURA¹, Yuji SHIBATA² and Chiaki IMADA²

Abstract

It has been discussed that the increase in the intake ratio of calcium and magnesium (Ca/Mg ratio) increases the risk of the ischemic heart disease. Though there are some reports on Ca/Mg ratio concerning the ischemic heart disease in animal experiments, there are few reports of experiments on cultured cells. Therefore, we investigated the influence of various ratios of Ca/Mg on the cell viability of cultured fibroblasts at various passage numbers. As a result, cell viability of cultured fibroblasts at passage number 14 or more significantly decreased with rises in Ca/Mg ratios. Furthermore, it was shown that this phenomenon was related to Ca/Mg ratios and not to rising Ca concentrations used in this report. Additionally, it was shown that the supplementation of DSW collected from Izu-Akazawa, Japan which did not change the Ca/Mg ratio, to cells in a state of decreased cell viability due to the increased Ca/Mg ratios showed an inhibition against decreasing their cell viability. Considering these results, it is suggested that the application of DSW will be a promising approach on health maintenance because the Ca/Mg ratio has been an increasing trend along with the diversification of the Japanese diet.

Key Words: Calcium, Magnesium, Fibroblast, Cell-viability, Deep seawater

要 旨

カルシウム／マグネシウム摂取比（以後、Ca/Mg比）の増大は虚血性心疾患のリスクを生じさせることは周知のとおりである。また動物実験によるCa/Mg比の増大と虚血性心疾患についての報告はあるが、Ca/Mg比に関する細胞レベルの研究報告はほとんど見当たらない。そこで継代数が異なる培養線維芽細胞を用いて、CaおよびMgのさまざまな割合の影響を調査した。その結果、継代数が14回の細胞（老化したと考えられる細胞）ではCa/Mg比が高い条件で培養すると細胞活性が顕著に低下した。この現象は本研究で使用された範囲内でのCa濃度の増加にかかわらずCa/Mg比に依存することが示唆された。しかし、Ca/Mg比の増大に伴って細胞活性が低下する条件において、Ca/Mg比を変えない量の伊豆赤沢産の海洋深層水（以後、DSW）を添加して培養した結果、細胞活性の低下が阻止されることが示唆された。本研究の結果から、食の多様化に伴ってCa/Mg比が増加傾向にある日本の食事に対してDSWの利用は健康維持上有用な一つのアプローチになると思われる。

キーワード：カルシウム、マグネシウム、線維芽細胞、細胞活性、海洋深層水

¹ (株)ディーエイチシー (〒106-0047 東京都港区南麻布2-8-21 南麻布MICビル7F)

² 東京海洋大学 大学院 (〒108-8477 東京都港区港南4-5-7)

1. 緒 言

DSWは太陽光の透過が著しく低下する補償深度以深の海水であるために低温であり、生菌数も少なく清浄である。また無機栄養塩の消費者である植物プランクトンが増殖できない環境であるために富栄養性を示し、これら3つの特性がほとんど変動することなく安定していることから有望資源として注目されている。これまでDSWは海産物の養殖や飲料水などに利用実績があるのみならず、温度差発電や空調の冷媒へも応用されている(高橋, 2000)。さらにDSWはヒトの健康分野への利用に対しても大いに期待される場所であるが、残念ながらDSWの摂取意義を考慮した基礎的な研究例は未だ少ないのが現状である。健康分野への利用にあたり、DSWに豊富に含まれるミネラル類の特徴については注目に値する。一般に海水と陸水では、そのミネラル組成に根本的な違いがあり、海水は陸水よりもNaを多含する。また海水はMg濃度が高いため、CaとMgの存在バランスが、海水と陸水では逆転している(鷹城, 1990)。ヒトの健康に対するCaとMgのバランスの影響については、Karppanen *et al.* (1978)の研究が有名である。彼らは食事から摂取されるCa/Mg比が増大すると、虚血性心疾患による死亡リスクが上昇することを世界的規模の疫学的研究により明らかにした。彼らの報告後、飲料水中のCa/Mg比と心臓血管系による死亡の関係が調査されて、Mg含有量と虚血性心疾患には負の相関が報告されている(Rylander *et al.*, 1991)。さらにKousa *et al.* (2006)は、フィンランドのある地域における調査で、虚血性心疾患による死亡率は飲料水中のMg含有量と負の相関を示し、高濃度のMgを含む飲料水は虚血性心疾患による死亡のリスクを下げることを示唆されたと報告している。最近ではオランダにおける調査で、水道水の硬度と虚血性心疾患および脳卒中による死亡率との関係について今回は有意な関係を見出せなかったが、Mg摂取不足の影響については、慎重に再調査することが望まれるとの報告がある(Leurs *et al.*, 2010)。上述のとおり、世界中で関連研究が盛んに行われるようになってきた。わが国でもOrimo

(1986)が、Caがアテローム動脈硬化症のイニシエーターであることを明らかにしており、最近では藤岡ら(2005)によるMgと循環器疾患についての相関など、ヒトを対象とした研究は世界的規模で長年にわたり数多く見られる。また実験動物を用いた研究もこれまで盛んに行われて来た経緯がある。ラットにおけるCa代謝に対する加齢とMgの影響(Mcelroy *et al.*, 1991)をはじめ、Sutoo and Akiyama (2001)は高血圧雄性ラットを用いてCaとMgの脳室内投与による脳の血圧制御作用を検討した。その結果、Caは収縮期の血圧を上昇させるが、Mgは低下させ、さらにCaの作用を用量依存的に抑制することを報告している。池田ら(2012)はマウスを用いて食餌によるMg欠乏群および高Ca摂取群を設けた実験を行い、Mgの欠乏群および高Ca摂取群には心筋細胞の変性ならびにミトコンドリアの異常が観察されたと述べている。このようにCa/Mg比のヒトに対する疫学的研究や動物実験の報告は数多く見られるが、生体を構成する最小単位である細胞に関する研究はほとんど見られない。そこで本研究では、血管新生と関わりが深いとされている線維芽細胞(藤原ら, 2008)を用い、Ca/Mg比がヒト由来の培養線維芽細胞に及ぼす影響について調査した。次に継代数が18回の線維芽細胞(老化したと考えられる)を用い、Ca/Mg添加比の増大に伴う細胞活性の低下に対するDSWの効果を調査した。さらに、継代数が19回の線維芽細胞を用い、細胞活性が低下するCa/Mg=2におけるDSW添加効果について、直上の表面海水(以後、SSW)を対照として比較検討したのでこれらについて報告する。

2. 材料と方法

2.1 試薬

CaCl₂(特級, 和光純薬), MgCl₂·6H₂O(特級, 和光純薬), PBS(-)(Ca/Mgを含有しない等張リン酸緩衝液, 細胞培養用, 日水製薬), イーグルMEM(①, 細胞培養用, 日水製薬), 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(生化学用, ナカライテスク, 以後MTT), トリプシン-

EDTA (2.5 g/L Trypsin: 1 mM EDTA solution, ナカライテスク), 牛胎仔血清 (免疫生物研究所, 以後FBS), DSW (伊豆赤沢, 北緯34°50'19", 東経139°08'11", 深度800 m, DHC), SSW (伊豆赤沢, 北緯34°50'19", 東経139°08'11", 深度0 m, DHC), メタロアッセイキット (Ca測定LS-MPR, Mg測定LS, メタロジェネティックス)

2.2 細胞および継代培養

ヒト由来線維芽細胞 (NB1RGB RCB0222, 理化学研究所バイオリソースセンター, 以後NB1RGB) を1枚の培養シャーレ (ϕ 90, 日本ジェネティック) に播種し, コンフルエント状態まで培養後, トリプシン—EDTAを用いて細胞を剥離させて新しい培養シャーレ2枚に継代し, この操作を重ねて継代回数とした. なおNB1RGBの培養は, すべて37°C, 5%CO₂の条件で行い, 細胞の増殖及び前培養は10%FBS含有イーグルMEM培地を用いた.

2.3 細胞活性評価

あらかじめコンフルエント状態まで増殖させた培養シャーレ2枚分のNB1RGBを用いて96穴マイクロプレート (培養細胞用, イワキ) に 2×10^4 個/穴になるように播種し, 1日間前培養を行った. 前培養後, 各試験に供する評価用の培地 (試料添加培地, 200 μ L/穴) に置換してさらに1日間培養した. 培養後の細胞活性は, 細胞内のエネルギー生産を担うミトコンドリアの電子伝達系を指標としたMTT還元法 (山田ら, 2007) によりマイクロプレートリーダー (モデル550, バイオラッド) を用いてOD₅₇₀-OD₆₅₀の値を測定した.

なお細胞活性残存率は, 以下の式により求めた.

$$\begin{aligned} & \text{細胞活性残存率 (\%)} \\ &= \frac{\text{試料添加区の細胞活性}}{\text{試料無添加区の細胞活性}} \times 100 \end{aligned}$$

2.4 FBS濃度の検討

本研究において一般に細胞の増殖や維持のために必携となるFBSの影響を極力排除するために, 培地に添加するFBSの最低濃度を調査した. 0~10%の

範囲で2%ごとにFBS濃度が異なるイーグルMEM培地を調製し, 2.2の操作に準じて用意したNB1RGBを用いて96穴マイクロプレートに 2×10^4 個/穴になるように播種後, FBS濃度が異なる上述の培地を用いて1日間培養した. 培養後2.3の方法に準じて操作し, 細胞活性残存率を求めた ($n=8$).

なお本研究で用いたFBS中に含まれるCaおよびMgの含有量については, 前述のメタロアッセイキット (Fujita *et al.*, 2013; Sakamoto *et al.*, 2012) を用いて測定した.

2.5 Ca/Mg添加比と細胞活性

2.2の方法に準じて用意した継代回数が10, 12, 14, 19および21回のNB1RGBについて, それぞれ培地中のCa濃度が, おおむねヒトの血清中の濃度 (日本透析医学会, 2006) の範囲である2.0, 3.0および3.5 mMとなるように調製したCaCl₂溶液に, おおむねのCa濃度におけるCa/Mg添加比が1~4となるようにMgCl₂ · 6H₂Oを添加した2%FBS含有イーグルMEM培地を用いて1日間培養した. 培養後, 細胞活性残存率を2.3の方法に準じて求めた ($n=8$). なお, CaCl₂およびMgCl₂ · 6H₂O溶液を加えない系を対照区として, その場合の細胞活性を100%として縦軸上に記した.

2.6 DSW添加効果

2.5の方法で得られた結果を基に, Ca/Mg添加比の増大とともに細胞活性の低下が見られる継代回数が18回のNB1RGBを用いて2.5の方法に準じて試験を行い, 各Ca/Mg比における0.5%DSW添加の影響を調べた ($n=8$). さらに本効果の特異性を検討するために, 継代回数が19回のNB1RGBを用いてCa/Mg=2の条件でDSWの添加効果を濃度 (添加濃度, 0~0.4%) との関係について調査した ($n=8$). この比較対照としては, DSW取水点直上の海表面で採水されたSSWを用いた. なお本試験におけるDSWおよびSSWの添加濃度は, 培地中のCa/Mg比にほとんど影響しない程度に調整した.

2.7 統計処理

得られたデータは、必要に応じて平均値±標準偏差で表した。なお、データ間の有意差はノンパラメトリック多重比較検定 (Steel-Dwass検定) を行い、 $p < 0.05$ を有意と判定した。

3. 結果

3.1 FBS濃度の検討

イーグルMEM培地に添加するFBSの最低濃度を検討した結果をFig. 1に示した。FBS無添加 (0%) ではNB1RGBの細胞活性は極めて低かったが、2%以上では高い細胞活性が得られ、その活性はFBS濃度が10%に至るまで有意差が見られなかった。なお本研究で用いたFBS中のCaおよびMg含量の測定結果をTable 1に示した。この結果から、2%FBS含有イーグルMEM中に含まれるCaおよびMgの濃度は、それぞれ0.52 mMおよび0.29 mMとなり、Ca/Mg = 1.79であった。

Table 1. Concentrations of Ca and Mg in the FBS

Minerals	Concentration
	mg/100 mL
Calcium	18.78
Magnesium	5.07

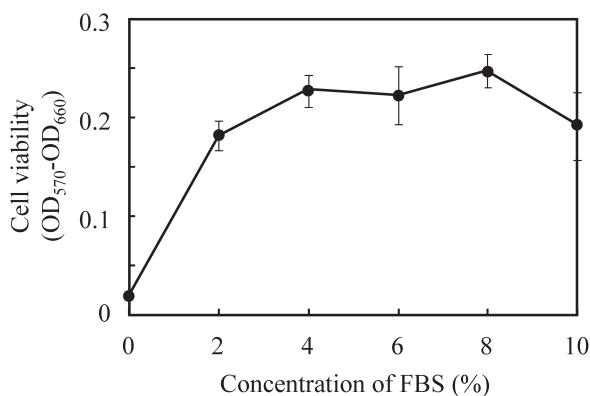


Fig. 1. Cell viability of NB1RGB cultured with various concentrations of FBS. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD).

3.2 Ca/Mg添加比と細胞活性

継代回数が異なるNB1RGBに対して、Ca/Mg添加

比が1~4となるように調整した2%FBS含有イーグルMEM培地で培養した結果、継代回数が10回および12回のNB1RGBでは、Ca濃度の増加およびCa/Mg添加比に関わらず高い細胞活性が確認された (Figs. 2~4)。しかしながら継代回数が14, 19および21回のNB1RGBでは、Ca濃度にかかわらずCa/Mg添加比の増大に伴って細胞活性は有意に低下し ($p < 0.05$), Ca/Mg ≥ 2 では細胞活性がほぼ消失した (Figs. 2~4)。

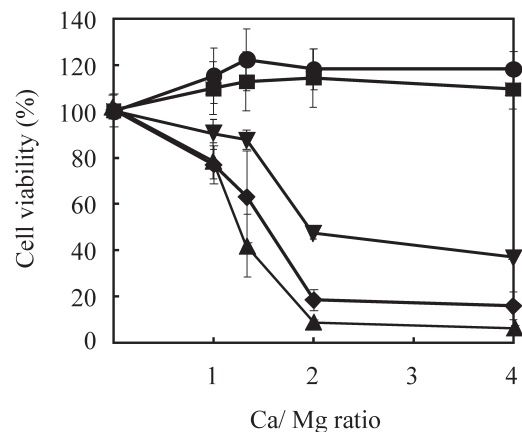


Fig. 2. Influence of various Ca/Mg ratios in the case of 2 mM Ca on the cell viability of NB1RGB at various passage numbers. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD). ●, 10th passage; ■, 12nd passage; ▲, 14th passage; ◆, 19th passage; ▼, 21st passage

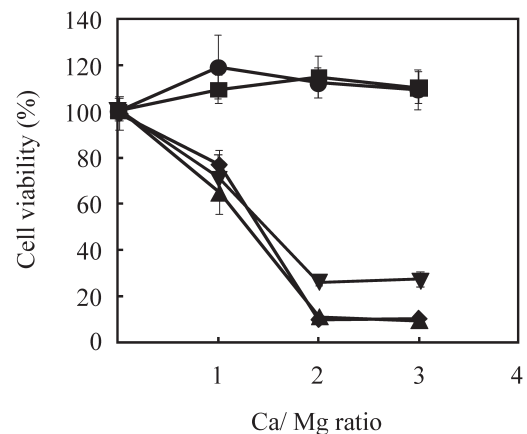


Fig. 3. Influence of various Ca/Mg ratios in the case of 3 mM Ca on the cell viability of NB1RGB at various passage numbers. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD). ●, 10th passage; ■, 12nd passage; ▲, 14th passage; ◆, 19th passage; ▼, 21st passage

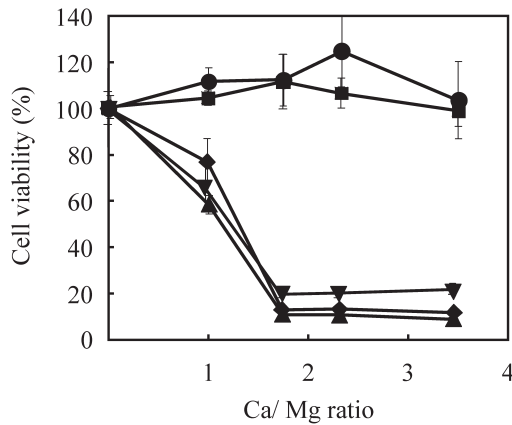


Fig. 4. Influence of various Ca/Mg ratios in the case of 3.5 mM Ca on the cell viability of NB1RGB at various passage numbers. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD). ●, 10th passage; ■, 12nd passage; ▲, 14th passage; ◆, 19th passage; ▼, 21st passage

3.3 DSW添加効果

3.1の結果から、継代回数が18回のNB1RGBを用いて、各Ca/Mg添加比における0.5%DSW添加(終濃度)の影響について検討した結果、Ca/Mg添加比の増大とともに細胞活性が低下する現象に対して、 $\text{Ca/Mg} \leq 2$ において0.5%DSWの添加が細胞活性の低下を抑止する効果が観察された (Fig. 5)。さらにその効果は添加濃度依存的に高まることが示唆された。SSWとの比較では、添加濃度が0.1~0.3%の範

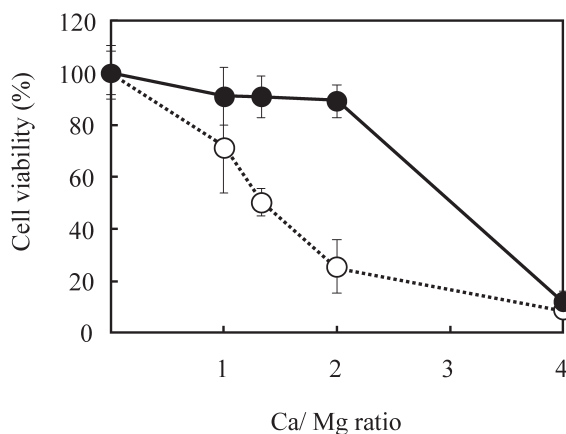


Fig. 5. Effect of supplementation of DSW on the cell viability of NB1RGB at passage number 18 cultured with various Ca/Mg ratios in 2 mM Ca. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD). ●, With 0.5% DSW; ○, Without DSW

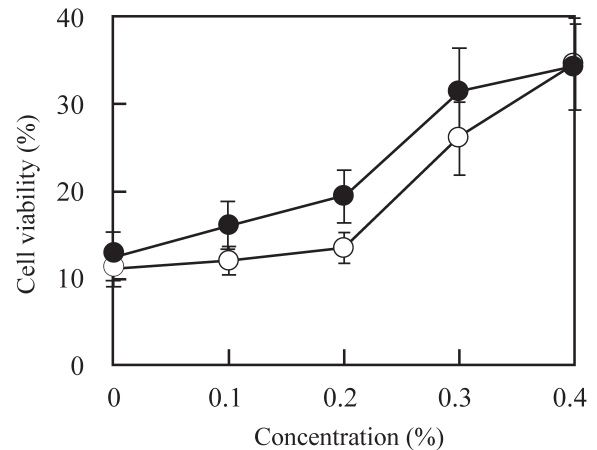


Fig. 6. Effect of supplementation of various concentrations of DSW and SSW on the cell viability of NB1RGB at passage number 19 cultured with the ratio of Ca/Mg=2 in 2 mM Ca. Cell viability were measured by MTT assay as described in materials and methods ($n=8$, bars mean \pm SD). ●, DSW; ○, SSW

围においてDSWの方が高い効果を示す傾向が見られたが、0.4%ではその差異は消失した (Fig. 6)。

4. 考 察

Ca/Mg比が細胞活性に及ぼす影響を検討するにあたり、培地調製に用いるFBSの影響を考慮して、まずNB1RGBの培養維持に必要なFBSの最低濃度について調査した。その結果、FBS濃度と細胞活性の関係は2%以上の添加濃度で本研究の試験期間において十分に細胞の維持が可能と判断され、それ以上の濃度を添加しても細胞活性にほとんど変動が見られなかった。この結果から、本研究におけるFBSの添加濃度は2%とした。なお今回使用したFBS中のCaおよびMgの含量測定値 (Table 1) から2%FBS中に含まれるCaおよびMg量はそれぞれ94 μ Mおよび42 μ Mであり、十分に低い濃度であった。したがって本研究で添加されたCaおよびMgの濃度(それぞれ2~3.5 mM, および0.5~3.5 mM)を考慮すると、FBS由来のCaおよびMgの影響は極めて小さいものと考えられたのでFBSが及ぼす影響については考察から外すことにした。

一般に保存株として樹立された培養細胞の多くは分裂寿命を有さない、いわゆる癌化細胞である。本

研究に先立ち、NB1RGBをはじめとして腸管上皮細胞 (Caco-2)、肝細胞 (Hep-G2) など種々の起原生物種から樹立された6種の培養細胞について、Ca/Mg比が細胞活性に及ぼす影響を調査した。その結果、NB1RGBのみがCa/Mg添加比の増大にともない細胞活性が低下する傾向を示したが、その他の細胞種の細胞活性は全く変動しなかった(データ未提示)。NB1RGBは分裂寿命を有する正常細胞である。その継代回数はすなわち細胞の老化を意味し、その機能や形態は継代回数が少ない若い細胞とは大きく異なることが知られている(村野, 1998)。本研究で細胞活性の指標とした細胞内小器官のミトコンドリアについては、石井(2002)が線虫を用いた研究で、細胞の老化はミトコンドリアの機能低下に起因すると述べている。またKrishnan *et al.* (2007)は、老化とともにミトコンドリアDNAの変異が増加することを報告している。これらの報告から細胞の老化はミトコンドリアの機能劣化に起因すると思われる。この細胞老化とミトコンドリア機能の関係については、斉藤ら(2005)が細胞の老化に加えてMg不足が重なると細胞内にCaが蓄積してアポトーシスを引き起こすと報告している。次にミトコンドリアの機能とCaとの関係に関する研究について遡ると、Peterson *et al.* (1986)が、老化にともなう細胞内のCa濃度の上昇は、グルコースやグルタミンの酸化促進によってミトコンドリアの機能低下を来すと述べている。上述の背景の下、本研究では継代回数が異なるNB1RGBを用いて培地中のCa/Mg添加比の増大と細胞活性の変動について調査した結果、2%FBS含有イーグルMEM培地に2.0~3.5 mMのCa濃度の範囲でCa/Mg比が1~4となるようにMgを添加した培地を用いて培養したNB1RGBの細胞活性は、継代回数が12回以下のいわゆる若い細胞ではCa/Mg添加比に関わらず高い細胞活性を維持した。しかしながら継代回数が14回以上のいわゆる老化した細胞では若い細胞とは異なり、Ca/Mg添加比の増大にともなう細胞活性が顕著に低下した。なおいずれの細胞においても、Ca濃度の影響は小さいものと思われた。このことからNB1RGBの細胞活性は、添加するCaの濃度よりも継代回数とCa/Mg比

の影響をより大きく受けることが示唆された。本研究で細胞活性の評価法として用いたMTT還元法は、ミトコンドリアの脱水素酵素活性を測定する方法なのでエネルギー生産に密接に関連しており(森本・田中, 1990)、本研究で得られた結果は上述の数々の報告にあるように、老化に伴うミトコンドリアの機能低下に起因するものと思われる。老化した細胞ではミトコンドリアの劣化が起こる。これにCa/Mg比の偏重などの負荷が加わるとミトコンドリアの機能失調(細胞活性消失)が誘導されて、遂にはアポトーシスに至るものと考えられる。すなわち本研究の結果は、若い細胞では全く影響のないCa/Mg比であっても、老化すると致命的な負荷因子となる可能性を示唆したものであると考えられる。

次に、継代回数が多いNB1RGBはCa/Mg比の増大に伴い細胞活性が低下することに着目し、継代回数が18回のNB1RGBを用いてDSWの添加効果を調査した。その結果、0.5%DSW添加によりCa/Mg \leq 2の範囲ではあるが、細胞活性の低下を抑止する効果が確認された。DSW中にはCaおよびMgがそれぞれ約10 mMおよび約50 mM含まれていることから(Table 2)、0.5%DSW中のCaおよびMgはそれぞれ約50 μ Mおよび約250 μ Mと推定される。これらはいずれも低濃度であることから、0.5%DSWの添加が本研究で設定した各Ca濃度におけるCa/Mg比に直接影響したとは考えにくい。木村(2001)は海水中に存在する多くの微量元素が相互関係にあることを報告しているため、本研究で見られたDSWの添加効果もCa/Mg比の改善によるものではなく、DSW中の微量元素間の相互作用が影響しているのかも知れない。また本研究で調査したSSWの添加試験においても、DSWとほぼ同じ結果が得られているので、本効果

Table 2. Concentrations of Ca and Mg in DSW of Izu-Akazawa, Japan in 2014

Minerals	DSW	SSW
	mg/L	
Sodium	10,400	9,860
Potassium	426	320
Calcium	407	309
Magnesium	1,220	1,090

は海水中の微量元素間の相互作用に起因する可能性が高まったと考えている。しかしながら、その具体的なメカニズムの解明については今後の課題である。なお本研究の結果は、Ca/Mg比が増大する傾向にあるわが国の食事実態において(木村, 2010)、身体を構成する最小単位である細胞の加齢とCa/Mg比および海水成分摂取との関係の一端を示唆したものであり、また海水成分の供給源として世界に比類のない数のDSW取水地を有するわが国においては、ヒトの健康におけるDSW利用の意義を細胞レベルで検証できたものと考えている。

最後に老化が生体を構成する最小単位である細胞内のミトコンドリアの劣化に始まり、これにCa蓄積やMg不足などの外的要因が加わると細胞死に至るというプロセスを考慮すると、健康長寿のためには脂質や糖質の摂取量に対する配慮に留まらず、加齢に応じたCa/Mg比にも留意して総合的にバランスの良い食事を心がけることの重要性が改めて認識されたと考えている。本研究の結果は長年にわたるヒトの研究および動物実験の結果と矛盾しないものであったことから、本報がCa/Mg比に起因する疾病に対するメカニズム研究ならびに海洋深層水の利用研究発展の一助となれば幸いである。

参考文献

藤岡由夫, 横山光宏 (2005) マグネシウムと循環器疾患 マグネシウムと動脈硬化～血管の石灰化を含めて～. *Clin. Calcium*, 15, 221-225.

Fujita, T., K. Noguchi and I. Terashima (2013) Apoplastic mesophyll signals induce rapid stomatal responses to CO₂ in *Commelina communis*. *New Phytol.*, 199, 395-406.

藤原 隆・星 和典・樺木勝巳・大沼俊名 (2008) 組織常在性線維芽細胞は新生血管の内皮細胞に分化する. *顕微鏡*, 43, 90-94.

池田尚子・今沢孝喜・中西由季子・稲毛寛子・鈴木美季子 (2012) マグネシウム欠乏におけるカルシウム過剰の栄養生理学的・病理組織学的検索. *ソルト・サイエンス研究財団助成研究報告集*, 2010, 105-112.

石井直明 (2002) 老化と疾病 基礎老化疾患モデル線虫. *現代医療*, 34, 355-360.

Karppanen, H., R. Pennanen and L. Passinen (1978) Miner-

als, coronary heart disease and sudden coronary death. *Adv. Cardiol.*, 25, 259-24.

木村美恵子 (2001) 海のミネラルと健康. *深層海水と健康研究会誌*, 1, 39-58.

木村美恵子 (2010) 栄養素としてのマグネシウム. *腎と骨代謝*, 23, 173-182.

Kousa, A., A. S. Havulinna, E. Moltchanova, O. Taskinen, M. Nikkarinen and J. Eriksson (2006) Calcium: Magnesium ratio in local groundwater and incidence of acute myocardial infarction among males in rural Finland. *Env. Health Persp.*, 114, 730-734.

Krishnan, K. J., L. C. Greaves, A. K. Reeve and D. Turnbull (2007) The ageing mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res.*, 35, 7399-7405.

Leurs, L. J., L. J. Schouten and P. A. Van Den Brand (2010) Relationship between tap water hardness, magnesium, and calcium concentration and mortality due to ischemic heart disease or stroke in the Netherlands. *Environ. Health Perspect*, 118, 414-420.

Mcelroy, S. T., J. E. Link, R. P. Dowdy, K. R. Zinn and M. R. Ellersieck (1991) Influence of age and magnesium on calcium metabolism in rats. *J. Nutr.*, 121, 492-497.

村野俊一 (1998) エイジングの分子細胞生物学老化遺伝子研究の新展開細胞のエイジングと遺伝子発現. *現代医療*, 30, 443-448.

日本透析医学会 (2006) 透析患者における二次性副甲状腺機能亢進症治療ガイドライン. *日本透析医学会雑誌*, 39, 1435-1446.

森本美恵・田中英二 (1990) 細胞増殖能測定のためのMTTアッセイの基礎的研究. *北海道大学医療技術短期大学部紀要*, 3, 15-20.

Orimo, H. (1986) Role of Ca in the initiation and progression of atherosclerosis. *Ther. Res.*, 5, 6-14.

Peterson, C. and J. E. Goldman (1986) Alterations in calcium content and biochemical processes in cultured fibroblasts from aged and alzheimer donors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 2758-2762.

Rylander R., H. Bonevik and E. Rubenowitz (1991) Magnesium and calcium in drinking water and cardiovascular mortality. *Scand. J. Work Environ. Health*, 17, 91-94.

Sakamoto, A., Y. Terui, T. Yamamoto, T. Kasahara, M. Nakamura, H. Tomitori, K. Yamamoto, A. Ishihama, A. J. Michael and K. Igarashi (2012) Enhanced biofilm formation and/or cell viability by polyamines through stimulation of response regulators UvrY and CpxR in the two-component signal transducing systems, and

- ribosome recycling factor. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 44, 1877-1886.
- 齊藤 昇・西山省二 (2005) マグネシウム研究・最近の進歩・老化とマグネシウム. *Clin. Calcium*, 15, 1791-1798.
- Sutoo, D. and K. Akiyama (2001) Opposite effects of calcium and magnesium on the central blood pressure regulation in the spontaneously hypertensive rats. *Jpn. J. Pharmacol.*, 86, 366-368.
- 鷹城一夫 (1990) マグネシウム資源とマグネシウムの製造方法. *素材物性学雑誌*, 3, 97-117.
- 高橋正征 (2000) 海にねむる資源・海洋深層水. あすなろ書房, 東京, 189 pp.
- 山田勝久・今田千秋・土屋孝弘・宮本勝城・辻坊裕・小林武志・濱田 (佐藤) 奈保子 (2007) 海洋環境より分離された糸状菌培養液の美白素材への応用研究. *日本化粧品技術者会誌*, 41, 254-261.
- (2014年8月25日受付；2014年10月3日受理)