

9245 マグネシウム・カリウムの代謝異常と突然死に関する実験的研究

助成研究者:中村 元臣(中村学園大学 大学院研究科)

共同研究者:阿部志摩子(中村学園大学)

:後藤 純信(九州大学)

【研究目的】

近年Kを補給しても難治性不整脈が治癒せずMgの補給により治癒する症例が報告されるに至り、Mgと不整脈との関係が注目されている。

他方、わが国では急性心不全という死亡診断に代表される急死あるいは突然死が近年増加しているが、その実態と発生機序については全く手がかりが得られていない。本研究ではMg欠乏ラットを中心に実験動物に再現性よく突然死を誘発し得る方法を確立し、突然死前後の不整脈・脳波変化を明らかにし、突然死の発生機序として、N-methyl-d-aspartate (以下NMDAと略す) 受容体の役割を明らかにする。

【研究方法】

①生後3週令の幼若雄性ラットにMg欠乏食とコントロール食を与え、約2週後心電図電極を植え込んだ後、実験開始15日目よりホワイトノイズを与えて、突然死を誘発することを試みた。Telemetry法により覚醒下に連続記録された心電図を解析した。更に、一部のMg欠乏ラットに脳波電極を植え込み、突然死に至る痙攣発作時の脳波を記録解析した。NMDA受容体競合的拮抗薬としてd,l-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid (以下APHと略す) を、non-NMDA受容体遮断薬として6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (以下CNQXと略す) を用いた。②家兎に間歇的高脂血症を起こし冠動脈硬化家兎を作った。冠動脈硬化家兎に血管作動物質を与えて心電図変化を解析した。

【研究結果】

①Mg欠乏ラットに音刺激としてホワイトノイズを与えることにより、2時間に6回以上の疾走発作や強直性けいれん発作を繰り返すことが可能となったので、NMDA受容体の遮断剤の効果を検討することが出来た。その結果、表1に示す如く、競合的遮断剤APHで完全にけいれん発作とそれに伴う心電図や脳波の変化を防止し得た。

②間歇的高脂血症を8ヵ月間SPF家兎におこすことにより冠動脈硬化、ことに冠細小動脈硬化を高頻度に起こすことが出来た。これらの家兎では、エルゴノビンの大量(0.1mg/kg体重)を静注することにより、血圧上昇に伴って心電図上ST低下を認めたが致死的不整脈を誘発し得なかった。

【考察と結論】

①Mg欠乏ラットに音刺激を繰り返すことにより、再現性よく全身痙攣や突然死を任意に誘発することが可能となった。Mg欠乏だけでは不整脈は認められなかったが、全身痙攣を誘発した時、徐脈性不整脈と脳波上 spike を認めた。これらの変化は細胞外液のMgイオンの低下によりNMDA受容体を介して発生すると結論された。

②冠細動脈硬化家兎に突然死を誘発する方法を今後検討する必要がある。



9245 マグネシウム・カリウムの代謝異常と突然死に関する実験的研究

助成研究者:中村 元臣(中村学園大学 大学院研究科)

共同研究者:阿部志摩子(中村学園大学)

:後藤 純信(九州大学)

【研究の必要性と社会的背景】

- ①本邦では近年”心不全”ないし”急性心不全”と俗称される急死・突然死が年間約5万人と増加している。特に壮年男子の過労による”過労死”が社会の注目を引いている。突然死の大部分は致死的不整脈死と考えられ約8割が心室細動・心室頻拍であり、残り約2割が徐脈性不整脈であると考えられている。これら突然死の発症機序の詳細は不明であり、適当な実験動物モデルも開発されていない。
  - ②ストレス学者ハンス・セリエ教授(カナダ)はストレスを受けた動物の心筋ではマグネシウム(以下Mgと略す)やカリウム(以下Kと略す)の含量が低下し心筋障害を起こすこと、MgとKの前投与によりこれら心筋細胞障害を防止できると報告している。
  - ③本邦の都市部では食習慣の欧米化にともなってK・Mgの摂取量が低下し虚血性心疾患の発症数の増加との間に関係があること、アルコール多飲者では血清Mgの低下があること等が報告されている。
  - ④助成研究者は1987年、飲酒によっても誘発される冠動脈攣縮性狭心症では器質的冠動脈硬化度に無関係に突然死や致死的不整脈を起こし易いことを報告した(Circulation 75, 1110-1116, 1987)。現在、突然死を起こし易いうっ血性心不全や高血圧で利尿降圧剤の投与を受けている症例でMg不足が起こっていることが注目されている。
  - ⑤臨床的に低K血症ではジキタリス不整脈を起こし易いことが知られているが、Kの補充にも関わらず治癒しない難知性不整脈にMgの静注が効を奏する事が経験的に報告され始め、Mgと不整脈との関係が近年注目を引いている。しかし、低Mg血症で致死的不整脈を起こし易いか否かは明かでない。
  - ⑥脳神経細胞のN-methyl-d-aspartate受容体は細胞外液中のMgイオンにより調節され、in vitroではMgイオン低下により細胞内にCaイオンが流入し細胞興奮が起こることが発見され、けいれん発作とNMDA受容体との関係が注目されている。
- 以上のような背景から、ストレスとMg・Kの代謝異常とは相互に増幅しあって突然死や致死的不整脈を起こし易くすると考えられ本研究を計画するに至った。

### 【研究目的】

実験的中小動物に突然死や致死的不整脈を誘発する動物モデルを開発し、突然死の発症機序を研究する手がかりを得ることを本研究の目的とする。このため、①Mg欠乏ラットに音刺激をストレスとして与え、突然死を任意に誘発できる方法を開発した後、突然死前後の心電図と脳波異常を明らかにし、NMDA受容体遮断剤によりそれらが防止されるか否かを明らかにする。②進展した冠動脈硬化を有する家兎を作り、血管作動性物質を投与して誘発される心電図変化や組織学的心筋変化を明らかにする。

### 【研究方法】

#### ①Mg欠乏ラットを用いての実験

##### a) Mg欠乏ラットの作成

生後3週令のSprague Dawley雄性ラット（体重50g）に以下の合成飼料を作成して与えた。対照とするコントロールラットにはMgを40mg/100g飼料になるように調整して与えた。Mg欠乏食の構成は100g飼料当たり、ビタミンフリーのカゼイン（NBC）20.0g，精製ブドウ糖70.2g，コーン油5.0g，ビタミン混合物（AIN-76™）1.0g，塩化コリン0.3g，塩類混合物（AIN-76™）よりMgを除去した塩類3.5gである。この合成飼料を湿式灰化し原子吸光計で測定したMg含量は100g飼料当たり0.9mg以下であった。飲料水は脱イオン水を自由に与え各ラットは個別ケージで23℃、湿度50-60%で飼育された。体重を週2回測定した。

##### b) テレメトリー法による心電図記録

米国合衆国Data Science社製の心電図テレメトリー用のtransmitter (TA10EA-F2)を、Mg欠乏食あるいは対照食投与14日後にラットの腹腔内に植え込み、電極末端を第II誘導様になるように皮下に固定した。Transmitterより発信された心電図信号は同社製のReceiver(CTR 86)を介して、ポリグラフ（日本光電KK製）とデータレコーダー（TEAC）に記録した。

##### c) 脳波の記録

Mg欠乏ラットと対照ラットの一部について、実験食開始10日目に脳硬膜と海馬に脳波電極を植え込んだ後、心電図と同様覚醒下にポリグラフとデータレコーダーに記録した。

##### d) 音刺激法

ノイズジェネレーターを用いてホワイトノイズ（1sec on, 1sec off）を作成しテープに記録した。この録音テープをテープレコーダーを介して移動可能なスピーカーを用いて音を発生させ音量を用に応じて増減した。尚、これらノイズを与えている間、特殊に作製した密閉温度調節器付き大型飼育室内でラットは個別ケージ

内に飼育された。ノイズを与えている間、ラットの行動について終始実験者が観察した。

e) 血液と組織のMg, K, Ca, Naの濃度測定

屠殺に際し、ラットをペントバルビタール麻酔下に腹部大動脈より採血し血清を分離し、原子吸光計（島津製作所製）を用いてMg, K, Ca, Naを測定した。

f) 組織の形態学的検索

心臓の一部と腎の一部を切除して、ホルマリン固定後、ヘマトキシリン・エオジン染色で形態学的変化を検索した。

- ②日本白色家兎（SPF;体重2kg）20羽に1%コレステロールを2ヵ月間、普通食を2ヵ月間と間歇的に与え8ヵ月後にエルゴノピン（0.1mg/体重）を麻酔下に静注し体表面心電図をポリグラフに記録した。屠殺後心臓の組織学的検索を行った。

【研究結果】

①Mg欠乏ラットを用いての実験

a. 体重増加度の比較

50gより実験食を与えて14日間の体重増加度を比較した。Mg欠乏食投与ラットでは一日中約1.5gであり対照群のそれ5.0g/日より有意に低値であった。

b. 血清と組織内ミネラルの含量について

血清Mg濃度は平均0.53mg/dlで対照ラットの2.1mg/dlに比し統計学的有意に低値であった。（ $p < 0.01$ ）。

c. 心筋の組織学的変化

Mg欠乏ラットでは心筋の1部に細胞浸潤を認めることがあったが著しい変化ではなかった。

d. ノイズストレスによる全身痙攣発作と突然死の誘発について

- i) 痙攣発作誘発頻度：易刺激性を認めるMg欠乏ラットに音刺激を与えることにより、疾走、強直性、全身けいれんを誘発し得た。疾走が始まるとすぐに音刺激を中断すると、2時間に6～8回けいれん発作を繰り返し起こすことができた。従って、NMDA受容体遮断薬の効果を検討することが可能となった。

- ii) Mg欠乏ラットにおけるノイズストレスにより誘発されたけいれん発作前後の心電図

Mg欠乏状態あるいは低Mg血症そのものでは不整脈を認めなかった。

ホワイトノイズ刺激により誘発された痙攣発作時に、徐脈性不整脈を認め、主として、洞房ブロック、結節調律、心室固有調律を示し、もっとも著しい徐脈時の心拍数は60/分であったが、自然に洞機能の回復に伴って数分で正常に回復した。ただし、痙攣発作に伴って意識が回復されず死亡した4匹では脳波のBurst spikeの消失と同時に著明な徐脈性不整脈となり、脳波は平坦となり心室固有調律ののち心停止し死亡した。

iii) Mg欠乏ラットの音刺激による痙攣発作に伴う脳波変化

Mg欠乏ラットに音刺激を与えて誘発した疾走のみの時は脳波に著変を認めなかったが、強直性痙攣に伴って脳波上低電位の fast activity を認めた。全身痙攣発作ではこれらの脳波変化に引き続きBurst spikeを認めた。脳波変化から、神経細胞の興奮は、海馬より発射され脳皮質に伝搬されることが考えられた。

e. Mg欠乏ラットに誘発し得るけいれん発作とそれに伴う致死的不整脈の防止 (NMDA遮断剤をもちいて)

Mg欠乏ラット9匹にNMDA受容体の競合的遮断剤APIIを0.33mM/kg体重になるように腹腔内投与したところ、全例2時間後迄音刺激による全ての発作・心電図・脳波変化を防止し得た。これに反しCNQXでは0.1-0.3mM/kgの投与量で全く無効であった。対照として同時に音刺激を与えたMg欠乏ラットでは、恒常的にけいれん発作と心電図・脳波変化を来すことを認めた。

以上よりMg欠乏ラットのけいれん発作とそれに伴う心電図と脳波の諸変化は、細胞外Mgイオン濃度の低下により、海馬を中心とする辺縁系脳神経細胞内にNMDA受容体を介してCaイオンが過剰流入することによって起こると結論された。

②間歇的高脂血症家兎を用いての実験

1%コレステロール食を間歇的に8ヵ月間投与することにより、恒常的に冠細小動脈の閉塞性硬化病変を起こし得た。エルゴノビンの静注により体表面心電図でST低下を認めた。組織学的に乳頭筋を中心とする心内膜下壊死を認めたが、致死的不整脈は誘発されなかった。

【考察と今後の課題】

突然死の動物モデルの1つとして、Mg欠乏ラットにホワイトノイズを与えて確実に再現性よく痙攣発作と突然死を誘発することが可能となった。

低Mg血症やMg欠乏それ自身では有意の不整脈は起こらなかったが、強直性けいれん発作や全身けいれん発作に伴う昏迷期には、主として徐脈性不整脈が認められたが、致死的不整脈を認めなかった。脳波変化は、海馬を中心とした辺縁系より発していたこと、APIIによりこれら全身けいれん発作、易刺激性、心電図と脳波変化の全てが防止され、CNQXにより全く防止されなかったことより、Mg欠乏により脳脊髄液中のMg濃度が低下し、NMDA受容体を介してCaイオンの過剰流入により、けいれん発作や突然死が起こると考えられる。

他方、高度の冠細動脈硬化家兎を作ることには成功したが、家兎にエルゴノビンの大量静注により、心電図ST低下を誘発し得たが、心室性期外収縮の誘発以外に致死的不整脈を誘発し得なかった。従って、今後心筋虚血による突然死モデルの開発は続けて検討する予定である。

Table 1 Effects of NMDA-receptor blocker (APHEPT)\* and/or non-NMDA receptor blocker (CNQX)\*\* on frequency of white-noise-induced seizure in Mg deficient rats

Time after administration of drugs	APHEPT*		CNQX**	
	given	not given	given	not given
30-45 min	0/9 <sup>+</sup>	3/3	6/6	3/3
60-120 min	0/9 <sup>+</sup>	3/3	6/6	3/3
3-6 h	5/5	n.d.	n.d.	n.d.

\*APHEPT : dl-2-amino-7-phosphonoheptanoic acid

\*\*CNQX : 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2-3-dione

n.d. : not performed

+ : statistically significant by Fisher method ( $p < 0.01$ ) between Mg deficient rats given APHEPT and rats not given or rats given CNQX

Number in table indicates number of rats induced seizure divided by number of rats examined.

Title: Provocation of sudden death in animals related to metabolic abnormalities of magnesium and potassium

Motoomi Nakamura, Shimako Abe and Yoshinobu Goto\*

Graduate school of Health and Nutrition Sciences, NAKAMURA-GAKUEN and

\*Institute of Neurology, Kyushu University Medical School,  
Fukuoka, Japan

### Summary

Magnesium (Mg) deficiency can cause generalized seizure and sudden death in animals. The role of Mg deficiency in sudden infant death syndrome and cardiac arrhythmias remains unclear. In vitro studies suggested that decrease in extracellular Mg ion leads to epileptiform discharge in human epileptogenic neocortex, which was prevented by N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor blocker.

We induced seizure and sudden death by exposing Mg deficient rats to white-noise and electrocardiograms and electroencephalograms were recorded before, during and after seizure, apparently the first such documentation. Thereafter, effects of intraperitoneal administration of NMDA receptor blocker were studied.

The NMDA receptor blocker but not the non-NMDA blocker completely prevented the induction of seizure, while Mg deficiency and hypomagnesemia in rats caused no tachyarrhythmia but marked bradyarrhythmia was evident during seizure. We conclude that white-noise-induced seizure in Mg deficient rats is linked to increased neuronal excitability via the NMDA receptor in the brain.