

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

池田 尚子¹, 今沢 孝喜², 中西 由季子³, 稲毛 寛子⁴, 鈴木 美季子⁴

¹ 昭和女子大学生生活科学部健康デザイン学科,

² 独立行政法人医薬基盤研究所生物資源研究部共用機器実験室,

³ 甲子園大学栄養学部フードデザイン学科, ⁴ 昭和女子大学大学院生活機構研究科

概要 近年マグネシウム(Mg)の慢性的摂取不足が長期持続した場合に起こる、心臓病や脳卒中などの循環器疾患との関係が注目されている。我々は、Mg 欠乏ラットによる組織学的検討において、心筋細胞の変性が強く、病理学的に虚血性心疾患の初期によく見られる病変と類似していることを観察している。そこで、今回循環器疾患の要因である Mg とカルシウム(Ca)とのバランスに着目し、ラットを用いて食餌による Mg 欠乏とカルシウム過剰の組み合わせの実験を実施した。

群構成は対照群、高 Ca 群(通常の2倍)、Mg 欠乏高 Ca 群、Mg 欠乏群の計4群で、各群6匹ずつとした。実験に用いた飼料の組成は AIN-93G の組成に準じ、対照群の食餌には酸化マグネシウムを含むミネラル混合を用い、Mg 欠乏群の食餌には上記ミネラル混合から酸化マグネシウムを除いたミネラル混合を用いた。実験期間は3週間とし、実験開始2週目の酸素消費量、二酸化炭素産出量および呼吸商を6分おきに18時間測定し、剖検後、血液は生化学的検査および病理組織学的検査に供した。

生体内 Mg 状態の指標とされている血清中の Mg 濃度は、Mg 欠乏高 Ca 群と Mg 欠乏群で対照群に比して、有意な低下を示し、明らかに Mg 欠乏状態であることが確認された。

対照群の心臓組織は電顕的にはほぼ正常構造を示し、心筋細胞のミトコンドリアおよび筋原線維には異常は認められなかった。高 Ca 群の心筋細胞のミトコンドリアの腫大化が認められた。Mg 欠乏群の心筋細胞のミトコンドリアの空胞変性、腫大化、筋原繊維の断裂、融解、グリコーゲン顆粒の蓄積が認められた。4群の中で、特に Mg 欠乏高 Ca 群の心筋細胞の変性が強く、筋原繊維の断裂、融解、およびクリスタの配列の乱れが認められた。また、このときの代謝機能として、高 Ca 群および Mg 欠乏高 Ca 群の酸素消費量と二酸化炭素産出量は、対照群と Mg 欠乏群に比して、どの時間帯も有意に高値を示した。また、Mg 欠乏高 Ca 群の呼吸商は Mg 欠乏群に比して、どの時間帯も高値を示した。

このことから、対照群を除いてどの群にも心筋細胞にミトコンドリアの変性が観察されたのは、Mg や Ca により生体内のミネラルバランスが崩れたために、心筋細胞のミトコンドリアに膨化、空胞変性、クリスタ配列の乱れなどの様々な形態学的変化が現れたものと考えられる。また、高 Ca 群および Mg 欠乏高 Ca 群の高 Ca 群は、酸素消費量と二酸化炭素産出量が高値を示したことから、Ca の過剰摂取はエネルギー代謝への影響を示唆する。また、心筋細胞の変性が一番強かったのは、Mg 欠乏高 Ca 群であることから、Ca 摂取量が多いと Mg の必要量が増加するので、Ca の過剰摂取は相対的に Mg 欠乏を助長する可能性がある。

1. 研究目的

マグネシウム(Mg)は、人体内に7番目に多く存在する必須ミネラルである。Mg の生体構成成分中の含量は、体

重 70 kg の成人で約 834-1,200 mmol(約 20-28 g)¹⁾ で、そのうち 60-65% は骨中、27% は筋肉中、6-7% は他の組織中、1% は細胞外液中に存在し²⁾、その役割は、タンパク

質の機能維持、体温や血圧の調節、神経の興奮、筋肉の収縮など 350 種類以上の酵素反応の触媒作用に重要な役割を果たしている³⁾。Mg が不足してもホメオスタシス作用により骨から溶出して、血液中 Mg 濃度はよほどの欠乏にならない限り低下をしない場合が多い。ラットを用いた動物実験において、Mg 欠乏により体重増加量の低下⁴⁻⁶⁾ や血清中総タンパク濃度の低下などタンパク質利用の低下が引き起こされることが報告されている⁷⁻⁸⁾。ヒトでは、近年、Mg の慢性的摂取不足と虚血性心疾患の発症との関係が認められている⁹⁻¹²⁾。Mg 欠乏に陥ると、疲労感、筋肉の痙攣、記憶障害、抑鬱症などの症状が現れると報告²⁻¹²⁾ されている。しかし、このような症状は欠乏がかなり進行してから出現するもので、このような症状になることは稀である。注意を要するのは、急性な欠乏状態というよりは、軽度の欠乏が慢性的に長期持続した場合に起こる虚血性心疾患など心臓病や脳卒中などの循環器疾患である。木村らはマウスが Mg 欠乏状態に陥ると、心臓、顎下腺、腸管、腎臓への Mg の取り込みが他の臓器に比べて多くなることを報告¹³⁾ している。また我々は、Mg 欠乏ラットによる組織学的検討において、心筋細胞の変性が強く、病理組織学的検索において虚血性心疾患の初期によく見られる病変と類似していることを観察¹⁴⁾ している。

そこで、循環器疾患の要因である Mg とカルシウム(Ca)とのバランスに着目し、ラットを用いて食餌による Mg 欠乏と Ca 過剰の組み合わせを実施して、心筋細胞の変性について超微形態学的に検討するとともにこのときの代謝機能がどのようになるかを明らかにする目的で、酸素消費量、二酸化炭素産出量および呼吸商を測定した。

2. 研究方法

2.1 実験動物ならびに飼育条件

実験動物として 3 週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットを日本チャールス・リバー(株)より購入し、空調制御された飼育室(室温 $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$; 相対湿度 $55 \pm 5\%$; 照明サイクル 12 時間明/12 時間暗)で、ステンレス製個別ケージに収容した。1 週間の馴化期間後、異常がみられない動物を選択し、各群の初期平均体重がほぼ等しくなるように群分けを行った。各群 6 匹ずつ 4 群に配した。飲料水は蒸留水とし、飲料水は実験期間を通して自由に摂取させた。

2.2 実験飼料

群構成は対照群、高 Ca 群(通常の 2 倍)、Mg 欠乏高 Ca 群(通常の 2 倍)、Mg 欠乏群の計 4 群で、各群 6 匹ずつとした。実験に用いた飼料の組成は AIN-93G¹⁵⁾ の組成に準じ、対照群の食餌には酸化マグネシウムを含むミネラル混合を用い、Mg 欠乏群の食餌には上記ミネラル混合から酸化マグネシウムを除いたミネラル混合を用いた。実験期間は 3 週間とし、実験開始 2 週目の酸素消費量、二酸化炭素産出量および呼吸商を 6 分おきに 18 時間測定し、剖検後、血液は生化学的検査および病理組織学的検査に供した。

飼料原料はオリエンタル酵母(株)より購入した。

3. 実験方法

実験期間は 3 週間とし、実験期間中、一般状態の観察および摂餌量の測定を連日実施し、体重は毎週測定した。呼気分析は 2 週目に測定した。動物はエーテル麻酔下で腹部大静脈から採血して、屠殺・剖検し、臓器重量を測定した。血液は生化学的検査に付し、臓器について病理組織学的検査に供した。

3.1 呼気分析の方法

酸素消費量、二酸化炭素産出量および呼吸商を 6 分おきに 18 時間測定した。ラットと飲料水を先にチャンバーに入れ、チャンバー内の呼気が安定した約 30 分後に飼料を与えた。OXYMAX システム(コロンパス社)を用いて、酸素の消費量(VO_2)、二酸化炭素の産出量(VCO_2)、呼吸置換比(RER)及び熱量をシステム専用ソフトで解析した。

3.2 生化学的検査

血液は遠心分離し、血清を得た。血清の Mg 濃度の測定にはマグネシウム B-テストワコー(和光純薬工業株式会社)を用いた。

3.3 超微形態学的検査

各群 2 匹の動物から心臓(左心室心尖部)を採取し、2.5% グルタルアルデヒド溶液(0.1 M リン酸緩衝溶液 pH 7.4)で固定した後、1% オスミウム酸溶液で後固定を行い、常法に従いエポック 812 樹脂包埋した。包埋した標本はオーブンで硬化させ、ウルトラカット(Reichert-Jung)で厚切り切片および超薄切片を作製し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛の二重電子染色を施し、透過型電子顕微鏡

(日本電子:JEM-100CXS)にて超微形態学的に検索した。

3. 4 統計学的解析

実験結果は平均値と標準偏差を算出し、二元配置分析で処理し、 $P<0.05$ を有意とした。

4. 結果

4. 1 死亡動物および一般状態

Mg 欠乏群は耳介部を中心とした皮膚炎の発症や鼻および口周辺の脱毛が実験開始 3 日目に観察された。実験開始から終了時まで死亡動物は認められなかった。

4. 2 体重変化

1 週目の Mg 欠乏 + 高 Ca 群の体重は対照群に比して、有意な低下が認められた。1 週目以降、成長の遅延や体重増加の抑制がみられ、実験終了時まで続いた。Mg 欠乏群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の最終体重は対照群に比して、有意な低下が認められた。

4. 3 臓器重量

Mg 欠乏群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の体重 100 g あたりの心、肝の重量は、対照群に比して有意な差が認めら

れなかった。Mg 欠乏 + 高 Ca 群の体重 100 g あたりの副腎の重量は、対照群に比して有意な増加が認められた。

4. 4 呼吸分析

Mg 欠乏 + 高 Ca 群の 7 時間の酸素消費量は、Mg 欠乏群に比して有意な増加が認められた (Fig. 1)。高 Ca 群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の酸素消費量は、対照群と Mg 欠乏群に比して、どの時間帯でも高い傾向が認められた (Fig. 1)。Mg 欠乏群の 1 時間の二酸化炭素産出量は、対照群に比して有意な増加が認められた (Fig. 2)。高 Ca 群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の二酸化炭素産出量は、対照群と Mg 欠乏群に比して、どの時間帯も高い傾向が認められた (Fig. 2)。また、Mg 欠乏 + 高 Ca 群の呼吸商は対照群および Mg 欠乏群に比して、どの時間帯も高い傾向が認められた (Fig. 3)。

4. 5 血清中 Mg 濃度測定

生体内 Mg 状態の指標とされている血清中の Mg 濃度は、Mg 欠乏群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の血清中 Mg 濃度は、対照群に比して有意な低下が認められ、明らかに Mg 欠乏状態であることが確認された。

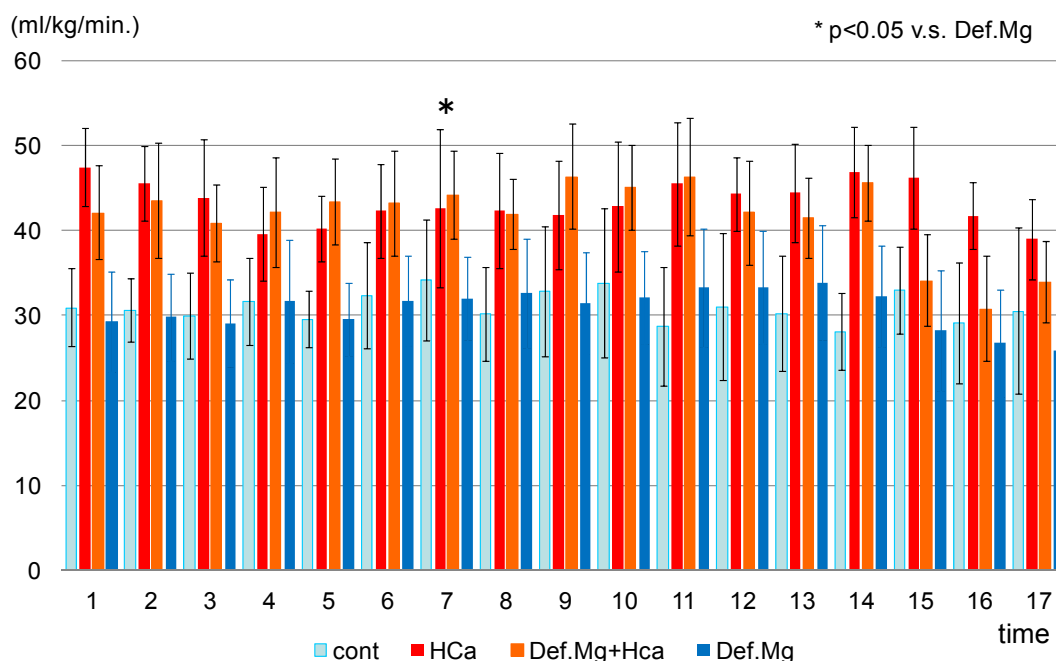


Fig. 1. Oxygen consumption levels at 2 weeks

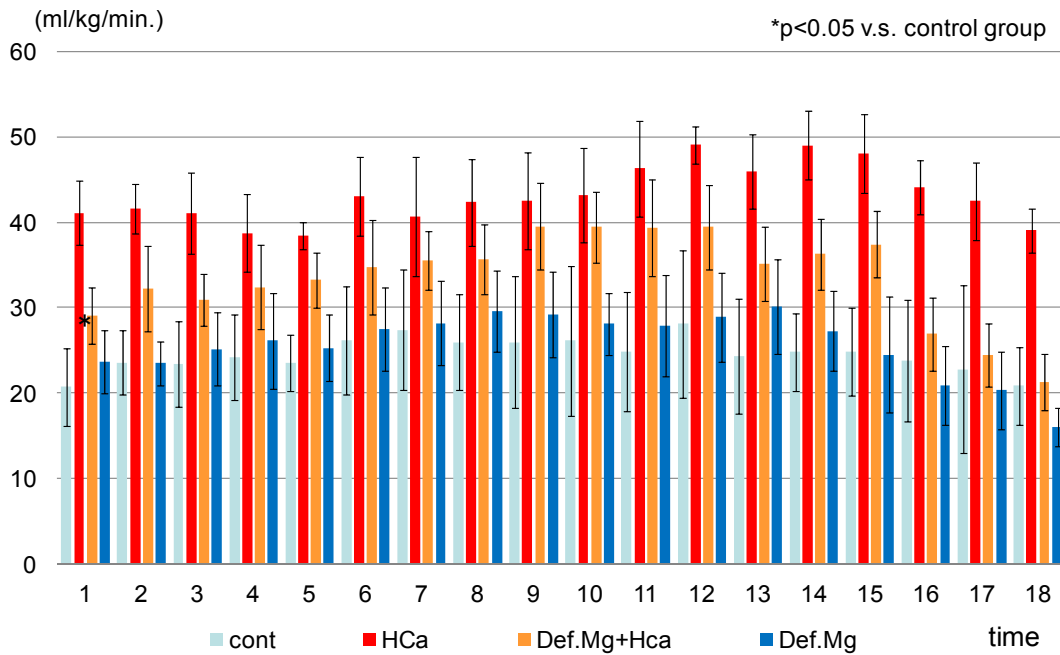


Fig. 2. Carbon dioxide exhalation levels at 2 weeks

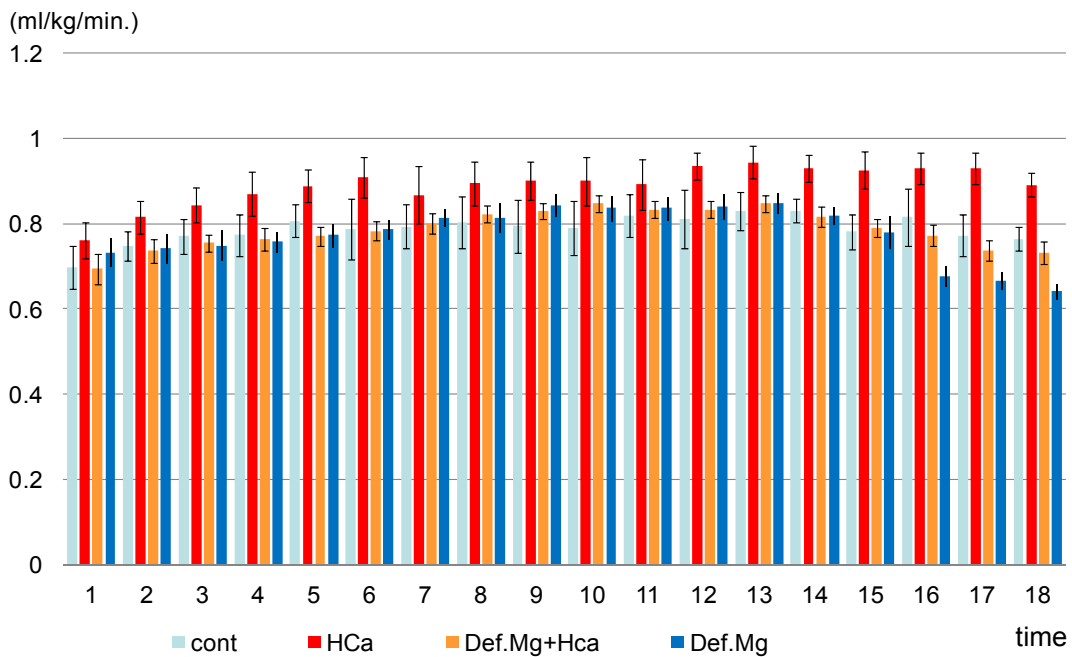


Fig. 3. Respiratory Quotient levels at 2 weeks

4. 6 超微形態学的検査

対照群の心臓組織は電顕的にほぼ正常構造を示し、心筋細胞のミトコンドリアおよび筋原線維には異常は認められなかった (Fig. 4)。高 Ca 群の心筋細胞のミトコンドリアの腫大化が認められた。Mg 欠乏群の心筋細胞のミトコン

ドリアの空胞変性、腫大化、筋原繊維の断裂、融解、グリコーゲン顆粒の蓄積が認められた。特に Mg 欠乏 + 高 Ca 群の心筋細胞の変性が強く、筋原繊維の断裂、融解および配列の乱れなどが観察され、グリコーゲン顆粒も認められた (Fig. 5, 6)。

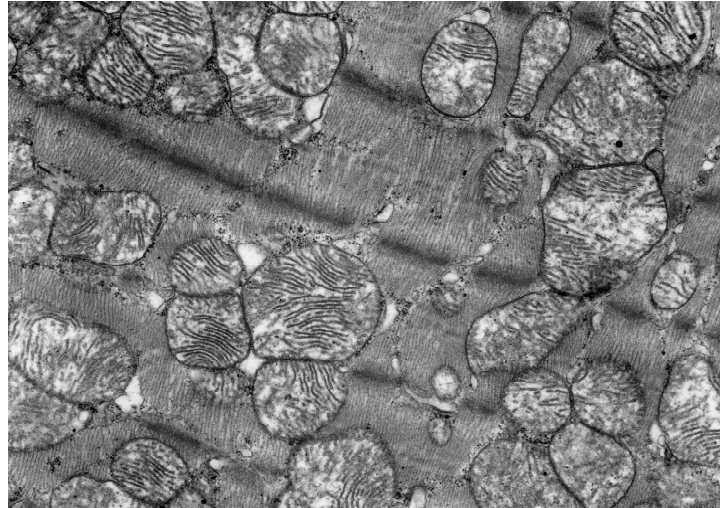


Fig. 4. Electron micrograph of normal mitochondria of cardiac myocytes and myofibril of the heart in a control group

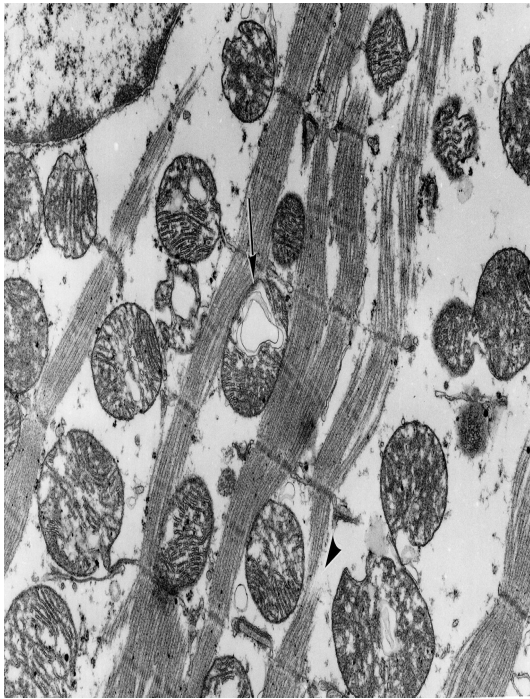


Fig. 5. Ultrastructural morphology of the myocardial cell of a magnesium deficient/calcium-doubled group, Z-bands of myocardial cell are disorganized, lysed and disarranged

5. 考 察

ラットを用いて、食餌による Mg 欠乏の生体に及ぼす影響について、Ca の混合比率を変えた実験条件を加えて、超微形態学的に検討するとともに、そのときの代謝機能についても検討した。

Mg 欠乏群と Mg 欠乏 + 高 Ca 群では対照群に比し、成

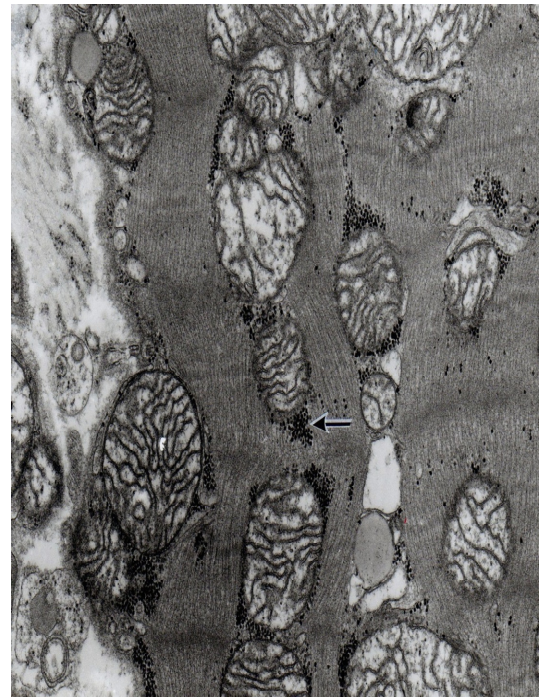


Fig. 6. Ultrastructural morphology of the myocardial cell of magnesium deficient/calcium-doubled group of mitochondria with glycogen granules

長の遅延や体重増加の抑制が認められ、実験終了時まで続いたのは、Mg 欠乏からもたらされたものであり、Mg はラットの成長の多くの代謝³⁾に関与をしていることを示すものであろう。生体内 Mg 状態の指標とされている血清中 Mg 濃度は、Mg 欠乏群と Mg 欠乏 + 高 Ca 群では対照群に比して、有意な低下が認められたことから明らかに

Mg 欠乏状態であることが確認された。

超微形態学的な観察では、対照群に比べてどの群も心筋細胞にミトコンドリアの変性が観察されたのは、Mg 欠乏や Ca 過剰のため細胞内外の浸透圧平衡が崩れ、水や電解質などの細胞質内に蓄積して細胞が膨化¹⁶⁾したためと考えられる。Mg や Ca により生体内のミネラルバランスが崩れることにより、心筋細胞のミトコンドリアの細胞内環境に変化が生じ、その結果、膨化、空胞変性など様々な形態学的変化が観察されたものとする。Mg 欠乏群および Mg 欠乏 + 高 Ca 群の心筋細胞のミトコンドリア周囲にグリコーゲン顆粒の蓄積が観察されたのは、Mg と Ca の不均衡が影響したものとする。グリコーゲンの蓄積は、心筋細胞の退行変性もしくはエネルギー代謝への影響を示唆するが、その発現機序の解明については今後の課題である。

さらに筋原繊維の断裂、融解が観察されたが、これらの変化は、病理組織学的検索において虚血性心疾患の初期によく見られる病変である¹⁷⁾。しかしながら、これらの病変が心筋層内小動脈の内腔狭窄に伴う軽度の虚血性心筋障害であるが、細胞質レベルでの代謝異常に伴う心筋の異常、すなわち代謝性心筋障害であるかは今回の実験からだけでは断定できない。いずれにしても Mg 欠乏における Ca の過剰(通常の 2 倍)は虚血性心疾患あるいは代謝性心筋障害の誘因となる可能性を示唆する。

なお、このときエネルギー代謝の状況を検討するため、酸素消費量と二酸化炭素産出量を測定したところ、Mg 欠乏 + 高 Ca 群の 7 時間の酸素消費量は、Mg 欠乏群に比して有意な増加が認められた。また、高 Ca 群は対照群と比して、Mg 欠乏 + 高 Ca 群は Mg 欠乏群と比して、酸素消費量と二酸化炭素産出量が、どの時間帯も高い傾向が認められた。このことは、食事由来の高 Ca(通常の 2 倍)は ATP 生産のためにミトコンドリアの酸素消費量と二酸化炭素の生成を上げて、細胞膜を通して Mg 輸送を阻止する可能性が考えられる。生体内の Mg 状態の悪化は、閉経後の女性で Ca の補給が心臓疾患を増加させるとの報告¹⁸⁾にも関与しているかもしれない。

また、心筋細胞の変性が一番強かったのは、Mg 欠乏高 Ca 群であることから、Ca 摂取量が多いと Mg の必要量が増加するので、Ca の過剰摂取は相対的に Mg 欠乏を助長する可能性を示唆する。

参考文献

- 1) Elin, R., J. Assessment of magnesium status. Clin. Chem., 33, 1965-1970 (1987)
- 2) Elin, R., J. Laboratory tests for the assessment of magnesium status in humans. Magnes Trace Elem., 10, 172-181 (1991)
- 3) 糸川嘉則 栄養生理学 装華房 p103(1990)
- 4) Fischer PWF, Giroux A. Effect of magnesium deficiency on mineral excretion and concentration in rat serum, heart and kidney. Nutr. Res., 4, 51-57(1984)
- 5) Kimura Y, Murase M, Nagata Y, Change in glucose homeostasis in rats by long-term magnesium-deficient diet. J Nutr. Sci. Vitaminol 42 407-422 (1996)
- 6) Kasaoka S, Kitano T, Hanai M, Futatsuka M, Esashi T, Effect of dietary magnesium level on nephrocalcinosis and growth in rats. J Nutr Sci Vitaminol 44 503-514
- 7) Rico MC, Lerma A, Planells E, Aranda P, Llopis Gonzalez J. Changes in the nutritive utilization of protein induced by Mg deficiency in rats. Int J Vitam Nutr Res 65 122-126 (1995)
- 8) Kikuchi T, Matsuzaki H, Sato S, Kajita Y, Chiba H, Tsuchiya H, Masuyama R, Uehara M, Suzuki K, Goto S Diminished kidney function and nephrocalcinosis in rats fed a magnesium-deficient diet. J Nutr Sci Vitaminol 44 515-523 (1998)
- 9) Karppen, H. : Epidemiological studies on the relationship between magnesium intake and cardiovascular diseases. Artery 9 190-199 (1981)
- 10) Seeling, M.S. and Heggtveit H.A. : Magnesium interrelationships in ischemic heart disease. Am J Clin Nutr 27 59-79 1974
- 11) Rayssiguier, Y. Magnesium and lipid interrelationships in the pathogenesis of vascular disease. Magnesium -Bulletin, la, 165-177 (1981)
- 12) Altura, B.M. and Altura, B.T.: Mg, Na and K interactions and coronary heart diseases. Magnesium 1: 241-265 (1982)
- 13) 木村修一、中津川研一、北原美智子、堀朋子、藤崎美由紀、川村美笑子、岩田錬、舟木善仁、井戸達雄、微量栄養素研究 11、171(1944)

- 14) 池田尚子、木村修一、今沢孝喜、西川秋佳、高橋道人 マグネシウム欠乏の栄養生理学的研究 Bull. Natl. Inst. Health Sci. 115 112-118 (1997)
- 15) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 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 1939-1951 (1993)
- 16) 畠山茂 病理学 医歯薬出版, p20~57 (1988)
- 17) 関口守衛、阿部一彦 カテーテル心生検による心筋疾患の電顕的観察、細胞 16, 140 (1984)
- 18) Bolland MJ, Barber PA, Doughty RN, Vascular events in healthy older women receiving calcium supplementation: a randomized controlled trial. BMJ. 336, 262-266 (2008)

Dietary Magnesium Deficiency and Calcium Doubled Induced Histological and Functional Damages of Rat Heart Muscles

Takako Ikeda ¹, Takayoshi Imazawa ², Yukiko Nakanishi ³, Hiroko Inage ³, Mikiko Suzuki ³

¹Showa Women's University of Life Sciences,

²National Institute of Biomedical Innovation of Senior Researcher,

³Showa Women's University Graduate School of Human Life Sciences Ymazakipan-Endowed Chair of Nutrition Research Laboratory on Aging

Summary

Epidemiologically, it has been suggested that dietary magnesium /calcium imbalance is associated with the risk of heart diseases. In the present study, the effects of magnesium deficiency and/or calcium on ultrastructure and function of myocardial cells were investigated in rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups, and respectively fed basal diet (AIN-93G) alone (control group), calcium-doubled AIN-93G diet (calcium-doubled group), magnesium-deficient AIN-93G diet (Mg-deficiency group) and magnesium-deficient/ calcium-doubled AIN-93G diet (Mg-deficiency/calcium-doubled group). After 2 weeks on these diets, indirect calorimetric measurements by continuous registration of oxygen consumption and carbon dioxide exhalation were recorded every 6 minutes for 18 hours. After 3 weeks, final body weight, weight gain and serum Mg concentration were significantly decreased due to the Mg-deficient diet. There was no significant difference in mean respiratory quotient (RQ) between 4 groups during the experimental periods and registration periods. However, the mean energy expenditure by oxygen consumption and carbon dioxide exhalation in calcium-doubled group and Mg-deficiency /calcium-doubled group showed a tendency to increase as compared to the control group and Mg-deficiency group values. Ultrastructurally, degenerative changes of organelle including swelling and vacuolation of mitochondria were observed in myocardial of rats fed Mg-deficiency /calcium-doubled diet for 3 weeks. Our results thus suggest that dietary magnesium deficiency gives rise to retrogressive changes in the heart, and concurrent calcium overintake synergistically enhances the myocardial injury due to magnesium deficiency.