

マグネシウムによる肥満細胞安定化作用とメカニズムの解明

風間 逸郎

宮城大学看護学群

概要 アドレナリンは、アナフィラキシーショックに対する治療の第一選択薬として用いられる。一方で、食品に含まれるミネラルであるマグネシウムは、健康維持作用に加え、抗アレルギー作用を有することも分かってきた。ラットの腹膜より単離した肥満細胞に対し、アドレナリン(1 μM ~1 mM)、または塩化マグネシウム(1~100 mM)を単独投与、またはアドレナリン 1 mM に塩化マグネシウムを併用投与したうえでエキソサイトーシスを誘発し、顕微鏡下で脱顆粒現象を観察した。全肥満細胞数に対する脱顆粒した細胞の割合を算出し、アドレナリンやマグネシウムがエキソサイトーシスの過程に及ぼす作用について定量化し、濃度間での比較を行った。

アドレナリンは、比較的low濃度(1, 10 μM)では肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制しなかったが、高濃度(100 μM , 1 mM)ではそれを抑制し、用量依存性の効果を発揮した。一方、塩化マグネシウムは、25 mM 以下の濃度では肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制しなかったが、50 mM 以上の高濃度ではそれを抑制し、100 mM では大きく抑制した。

そこで、単独では十分な効果が得られなかったアドレナリン(1 mM)に、塩化マグネシウム(10~100 mM)を併用投与したところ、25 mM 以上の濃度では、脱顆粒を起こした肥満細胞の割合が大きく低下した。

以上の結果より、アドレナリンに高濃度の塩化マグネシウムを加えることにより、肥満細胞の脱顆粒現象を抑制できることが明らかになった。本研究の結果、アドレナリンが実際に、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエキソサイトーシスの過程を用量依存性に阻害することによって、肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになった。また、マグネシウムも同様に、用量依存性に肥満細胞安定化作用を発揮し、とくに高濃度では肥満細胞からの脱顆粒を大きく抑制した。さらに本研究の結果、アドレナリンの肥満細胞安定化作用に対する、マグネシウムによる相乗効果が明らかになった。

1. 研究目的

アナフィラキシーに対しては、アドレナリンが第一選択薬として用いられる。アドレナリンは、心臓や血管・気道に分布するアドレナリン受容体を介し、心収縮力を増大、心拍数を増加、血管を収縮させたりすることにより、アナフィラキシーショックで起きる血圧低下を改善する。また、気道粘膜の浮腫を抑制し、気管支を拡張させることにより、アナフィラキシーにともなう喘鳴や気道の攣縮を改善する。そして、このような循環・呼吸器系への作用に加え、アドレナリンは、肥満細胞からの脱顆粒現象によるヒスタミンの放出を直接的に抑えることにより、アナフィラキシー症状に対して即効性を示すことも分かっている。一方で、食品に含

まれるミネラルの一つであるマグネシウムには、体内のカルシウムを維持することで骨を強めたり、筋肉や神経の働きを助け、ビタミン B1 と連携してエネルギー生産に関わったりすることで、高血圧の改善、肩こり・頭痛やその他の疼痛を改善する作用があることが知られてきた⁽¹⁾。また、最近では、これらの健康維持作用に加え、抗アレルギー作用を有することも分かってきた。そこで今回、アドレナリンと同様、マグネシウムについても、肥満細胞に対する直接作用を調べ、その抗アレルギー作用のメカニズムを明らかにしたいと考えた。救急の現場においても、必ずしもすべての患者に対してアドレナリンが有効であるとは限らず、アドレナリン抵抗性のアナフィラキシーショックも多い。もし、マグ

ネシウムによる抗アレルギー作用のメカニズムが明らかになれば、アナフィラキシーに対するアドレナリンの治療効果を補うなど、新しい発見ができるのではないかと考え、本研究を行うこととした。

2. 研究方法

2.1 肥満細胞の単離と脱顆粒現象の観察

25 週齢以上の雄性 Wister rat の腹膜を、細胞外液 (NaCl, 145; KCl, 4.0; CaCl₂, 1.0; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; BSA, 0.01%; pH 7.2) で洗浄し、洗浄液から肥満細胞を単離した。単離した後、アドレナリン (1 μM~1 mM) または塩化マグネシウム (1~100 mM) を含む細胞外液中に拡散し、細胞含有液とした。これらの肥満細胞に対し、顕微鏡下でエキソサイトーシスを誘発し、脱顆粒現象を観察した。なお、本細胞を用いた以下の実験は、細胞採取後 8 時間以内に、室温 (22~24°C) 条件下で行った⁽²⁾。

2.2 電気的細胞膜容量の測定

EPC-9 patch-clamp amplifier system (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) を用いたホールセル・パッチクランプ法によって電気的細胞膜容量 (membrane capacitance: Cm) を測定した。パッチパイペット内に電極内液 (K-glutamate, 145; MgCl₂, 2.0; HEPES, 5.0 mM; pH 7.2) を満たした時の電気抵抗は 4~6 MΩ であった。細胞外液中に浮遊させた肥満細胞に対してギガシールを作成した後、電極内に陰圧を加えて細胞膜の一部を破壊し、ホールセル・モードとした。内因性にエキソサイトーシスを誘発するために、電極内液中に GTP-γ-S 100 μM を加え、細胞膜の破壊と同時に、細胞内への灌流を開始した。測定には、Lock-in amplifier を用いて、800 Hz の正弦曲線の矩形波パルスを -80 mV の保持電位で補正した。電気的細胞膜容量 (Cm)、シリーズコンダクタンス (series conductance: Gs)、膜コンダクタンス (membrane conductance: Gm) を 120 秒間連続して記録した。なお測定中、アクセス抵抗 (series resistance: Rs) は 10 MΩ 以下に保った。

2.3 統計学的解析方法

得られたデータは、PulseFit software (HEKA Electronics, Lambrecht, Germany) 及び Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて解析した。また、Student の t test による両方向の分散分析を用いて統計学的有意差を検証した。p 値 0.05 以下で統計学的に有意であると判断した。

3. 研究結果と考察

3.1 肥満細胞の脱顆粒現象に対するアドレナリンの効果

アドレナリンは、アレルギーの重症型であるアナフィラキシーの第一選択薬として用いられているが、肥満細胞の“エキソサイトーシス”の過程そのものに対し、どのように作用するかについては、明らかになっていない。本研究では 1 μM~1 mM のアドレナリンを用いて、肥満細胞からの脱顆粒現象に対する影響を調べた (Figure 1)。その結果、低用量 (1, 10 μM) では肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制しなかったが、高用量 (100 μM, 1 mM) では有意に抑制し、用量依存性の効果を示した (Figure 1)。本研究の結果より、アドレナリンは、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエキソサイトーシスの過程そのものを直接的に抑えることによって、抗アレルギー効果を発揮することが明らかになった。これにより、アドレナリンが肥満細胞のレベルからアレルギー反応を根本的に抑えることにより、アナフィラキシーに対して即効性を発揮するメカニズムが確認された⁽³⁾。

3.2 アドレナリンが有する肥満細胞安定化作用についての電気生理学的検討

肥満細胞におけるエキソサイトーシスの過程では、分泌顆粒の細胞膜への融合に伴って、細胞膜の表面積が増加する。それによりこの過程は、電気生理学的にも、細胞膜容量; membrane capacitance (Cm) の継時的な増加として捉えられる。そこで本研究では、まず、肥満細胞のエキソサイトーシスの過程そのものに対する、アドレナリンの効果を明らかにするために、本薬剤の存在下で肥満細胞のエキソサイトーシスを誘発し、電気的細胞膜容量の変化を、パッチクランプ法を用いて測定した (Figure 2)。その結果、比較的低濃度アドレナリンの存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、およびエキソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加ともに、ほとんど抑制されなかった。しかし、高濃度アドレナリンの存在下では、肥満細胞からの脱顆粒現象、および細胞膜容量の増加ともに、ほぼ完全に抑制された (Figure 2)。このことから、アドレナリンは、濃度依存性にエキソサイトーシスに伴う細胞膜容量の増加を有意に抑制し、肥満細胞安定化作用を発揮することが明らかになった。

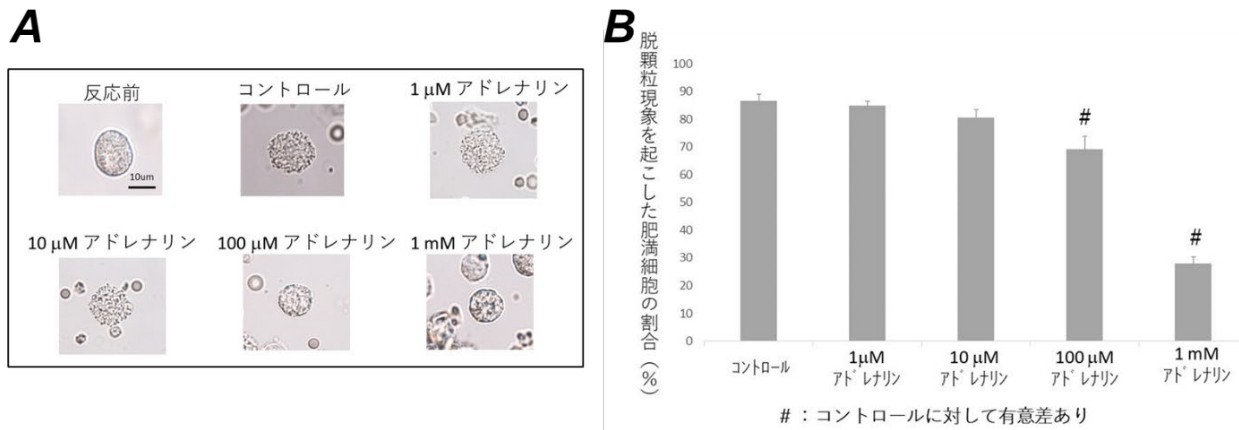


Fig. 1 Effects of adrenaline on mast cell degranulation.

(A) High dose adrenaline suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

(B) Adrenaline dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

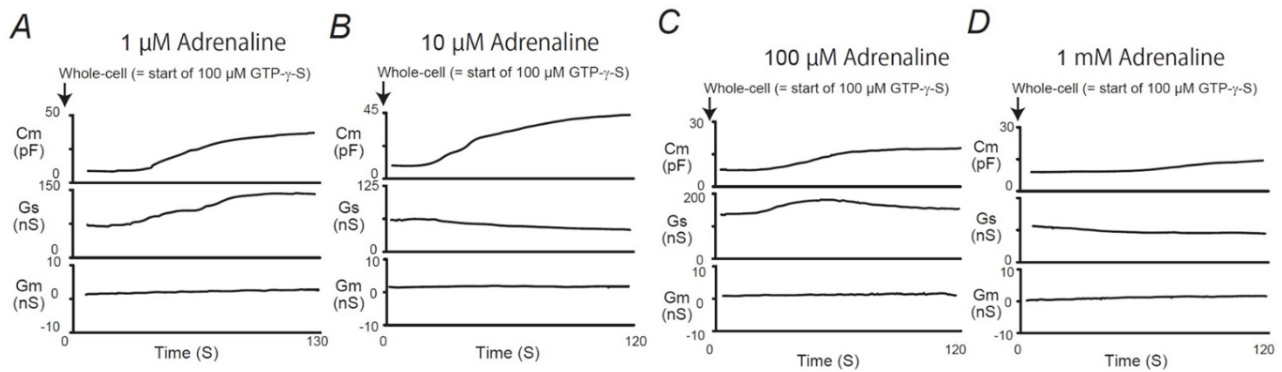


Fig. 2 Effects of adrenaline on membrane capacitance of mast cells.

High dose adrenaline suppressed the GTP-γ-S-induced increase in the membrane capacitance.

3. 3 肥満細胞の脱顆粒現象に対する塩化マグネシウムの効果

次に、肥満細胞の脱顆粒現象に対するマグネシウムの効果を見るために、単離した肥満細胞に対し、塩化マグネシウム 1~100 mM の存在下で、アドレナリンの場合と同様にエキソサイトーシスを誘発し、コントロール場合と比較した (Figure 3)。その結果、比較的 low 濃度の塩化マグネシウム (1~25 mM) の存在下では、肥満細胞の脱顆粒現象は抑制されなかったのに対し、50 mM の存在下では有意に抑えられ、100 mM の存在下では脱顆粒現象が大きく抑制された (Figure 3)。これらの結果より、塩化マグネシウムの場合、アドレナリンに比べれば高濃度が必要であったものの、アドレナリンと同様、用量依存性に肥満細胞からの脱顆粒現象を抑制することが明らかになった。

マグネシウムは、体内のカルシウムを維持することで骨を強めたり、高血圧や肩こり、頭痛を改善したりするほか、最近では抗アレルギー作用を有することも分かってきたが、そのメカニズムは明らかでなかった。本研究の結果、マグネシウムがアドレナリンと同様に、肥満細胞からの脱顆粒現象、つまりエキソサイトーシスのプロセスを用量依存性に阻害することによって、肥満細胞安定化作用を発揮することが示された。マグネシウムが細胞内外で増えた場合、細胞内へのカルシウムの流入が調節されることが知られている。本研究で、マグネシウムが肥満細胞安定化作用を発揮したメカニズムの詳細までは明らかでないが、何らかの機序により、カルシウムの作用と拮抗した可能性が高い。

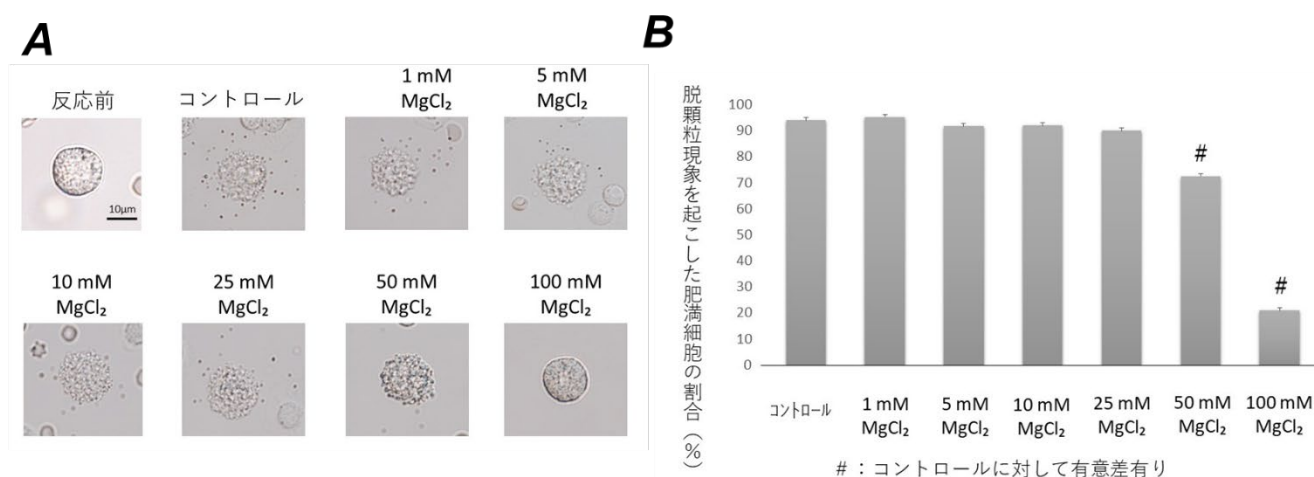


Fig. 3 Effects of magnesium chloride (MgCl₂) on mast cell degranulation.
 (A) High dose MgCl₂ suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.
 (B) MgCl₂ dose-dependently suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

3. 4 アドレナリンと塩化マグネシウムの併用効果

アドレナリンを単独投与した場合、最高濃度の 1 mM で肥満細胞の脱顆粒現象が大きく抑制されたが、十分ではなかった (**Figure 1**)。一方、塩化マグネシウムを単独投与した場合、50 mM 濃度から、有意に抑制効果が表れ始めた (**Figure 3**)。そこで最後に、マグネシウムによる相乗効果または相加効果を期待し、単離した肥満細胞に対し、アドレナリン 1 mM (細胞外液に溶解) 異なる濃度の塩化マグネシウム (10~100 mM) を加えたうえで、それらの存在下でエキソサイトーシスを誘発し、コントロールと比較した (**Figure 4**)。その結果、アドレナリン 1 mM に塩化マグネシウム 10 mM を併用投与した場合は、アドレナリン 1 mM 単独投与の場合と、脱顆粒現象に差は認められなかった (**Figure 4**)。しかし、塩化マグネシウム 25 mM 以上を併用投与した場合には、アドレナリン単独投与の場合に比べて脱顆粒現象が大きく抑制され (**Figure 4**)、マグネシウムによる相加効果にとどまらず、相乗効果が認められた。

アドレナリンを単独投与した場合、最高濃度の 1 mM により肥満細胞の脱顆粒現象が大きく抑制はされたが、十分ではなかった。本研究の結果、アドレナリンに高濃度の塩化マグネシウムを加えることによって、アドレナリンによる肥満細胞安定化作用を補うべく、マグネシウムによる相加乗効果が明らかになった。アドレナリンは、肥満細胞膜に発現する β_2 受容体を介した経路により、肥満細胞安定化作用を発揮することが知られている。マグネシウムは、この経路を何らかのメカニズムによって増強することにより、アドレナリンによる肥満細胞安定化作用に対する相乗効果を発揮した可能性が高い (**Figure 5**)。アドレナリンはアナフィラキシーに対する治療の第一選択薬として用いられるが、内服している薬の種類などによっては、必ずしもすべての患者に対して有効であるとは限らず、アドレナリン抵抗性のアナフィラキシーショックの報告も多い。このようなケースに対しては、アドレナリンの代替薬、または併用薬としてマグネシウムを投与することは、治療の選択肢のひとつになりうるであろう。

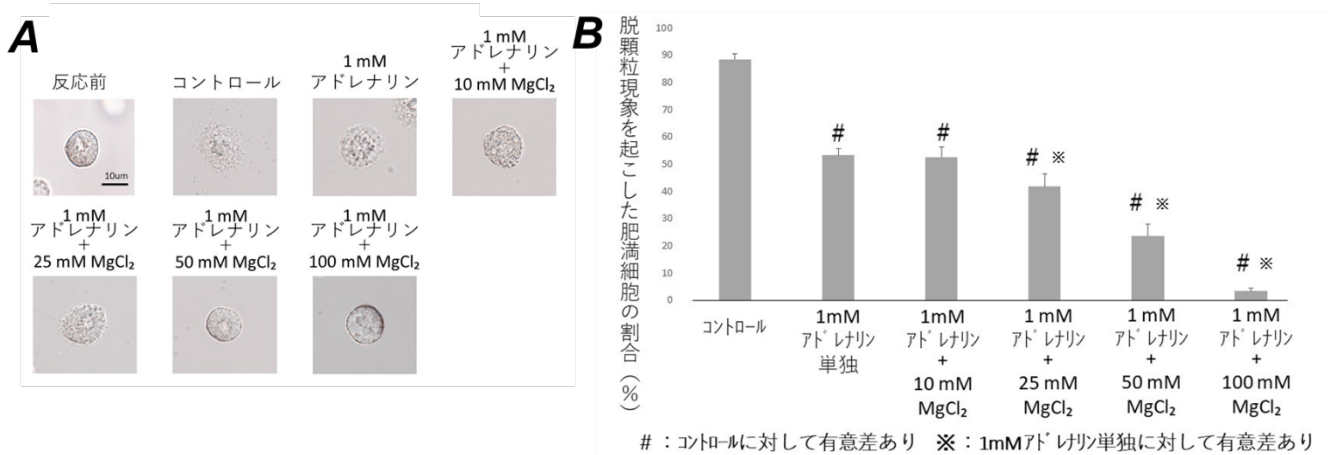


Fig. 4 Synergistic effects of adrenaline and magnesium chloride (MgCl₂) on mast cell degranulation.

(A) 1 mM adrenaline with 25 to 100 mM MgCl₂ suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

(B) 1 mM adrenaline with 25 to 100 mM MgCl₂ synergistically suppressed the degranulation from rat peritoneal mast cells.

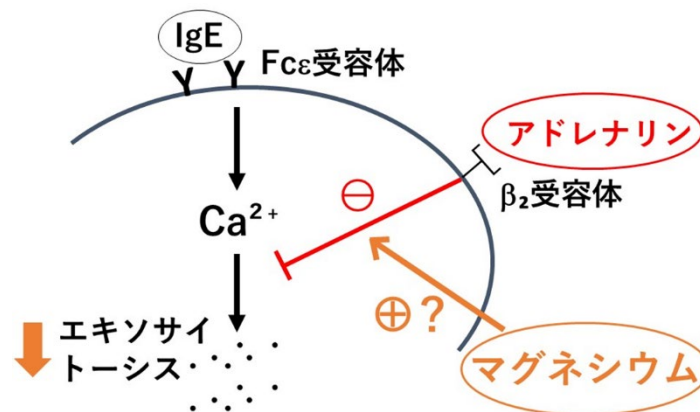


Fig. 5 Proposed mechanisms of magnesium by which it potentiates mast cell-stabilizing ability of adrenaline.

4. 結論および今後の課題

本研究により、アドレナリンと同様にマグネシウムも、肥満細胞におけるエキソサイトーシスの過程そのものを阻害することによって、用量依存性に抗アレルギー効果を発揮した。さらに、アドレナリンに高用量のマグネシウムを併用することによって、抗アレルギー作用を増強させる効果があることが明らかになった。肥満細胞膜上には、マグネシウム透過性の高いイオンチャネル (Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily M Member 7; TRPM7) が発現することが明らかになっており、これらのチャネル活性に伴う細胞内 Ca²⁺濃度の変化が、脱顆粒現象に影響を与える可能性が高い。今後は、マグネシウムによる肥満細胞安定化のメカニズムにおける TRPM7 の関与や、アドレ

ナリンによる β₂ 受容体を介した経路との関連についても明らかにしていきたい。

5. 文献

1. Kazama I, Kuwana R, Muto M, Nagano A, Fujimura R, Asada A et al. Subepicardial burn injuries in bullfrog heart induce electrocardiogram changes mimicking inferior wall myocardial infarction. *J Vet Med Sci* 2022;84:1205-1210.
2. Fujimura R, Asada A, Aizawa M, Kazama I. Cetirizine more potently exerts mast cell-stabilizing property than diphenhydramine. *Drug Discov Ther* 2022;16:245-250.
3. Abe N, Toyama H, Ejima Y, Saito K, Tamada T, Yamauchi M et al. alpha (1)-Adrenergic Receptor Blockade by Prazosin Synergistically Stabilizes Rat Peritoneal Mast Cells. *Biomed Res Int* 2020;2020:3214186.

Effects of Magnesium on Mast Cell-Stabilization

Itsuro Kazama

Miyagi University, School of Nursing

Summary

Adrenaline is the first-choice drug for anaphylaxis, since it quickly inhibits the release of histamine from mast cells. However, there are several cases that are resistant to adrenaline. Magnesium is one of the essential minerals for human body mainly consumed from daily foods. Besides health promoting functions, such as bone formation, helping to relax muscle and nervous tension, magnesium is known to exert anti-allergic effects. In the present study, using the differential-interference contrast (DIC) microscopy, we examined the effects of adrenaline (1 μ M to 1 mM) and magnesium chloride ($MgCl_2$) (1 to 100 mM) on the degranulation from rat peritoneal mast cells. Both adrenaline and $MgCl_2$ dose-dependently decreased the numbers of degranulating mast cells. At relatively higher concentrations, such as 50 and 100 mM, $MgCl_2$ markedly suppressed the numbers of degranulating mast cells. However, at concentrations equal to or lower than 25 mM, it did not significantly affect the numbers of degranulating mast cells. Of note, higher concentrations of $MgCl_2$ synergistically enhanced the suppressive effect of adrenaline on mast cell degranulation. The results provided in vitro evidence that magnesium dose-dependently inhibited the process of exocytosis, and that it synergistically potentiated the mast cell-stabilizing property of adrenaline.