

マグネシウム欠乏に関するフローサイトメトリーによる表面解析

池田 尚子¹, 今沢 孝喜², 中西 由季子³, 中村 寛子⁴, 黒瀬 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基盤的研究部,

³甲子園大学栄養学部フードデザイン学科, ⁴株式会社加齢・栄養研究所

概要 日本人の食事摂取基準(2010)の推奨量は、成人男性 340 mg、成人女性 290 mg であるため、Mg 摂取量はかなり不足しており、日本人は慢性的な Mg 摂取不足の状態であることが推察される。また、2010 年アメリカ合衆国では、成人の約 60% がマグネシウム摂取不足の報告があり、これが肥満、動脈硬化、高血圧、骨粗鬆症、糖尿病、癌などの疾病の発生に、かなり関連しているとされる。このように Mg の生理的重要性はあきらかであるにも関わらず、Mg 欠乏の条件下での免疫能による慢性疾病の発症メカニズムについては必ずしも明らかではない。そこで、本研究は、Mg 欠乏下での免疫能に着目し、糖尿病モデルマウスを作成し、このマウスを用いて食餌による Mg 欠乏群を設けて免疫担当細胞をフローサイトメトリーにて表面解析を行った。

4 週齢雄の ICR 系マウスを用いて、ストレプトゾトシンを腹腔内に 2 回投与(100 mg/kg 体重)して、2型糖尿病を誘発させた。群構成は糖尿病モデルではない control 群、Mg 欠乏群、糖尿病モデル(Diabetes Mellitus: DM) DM 群、DM+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 10 日間とし、摂餌量、体重は毎日測定し、剖検後、血液を採取、胸腺、脾臓の重量を測定した。血液は Mg 濃度およびグルコース濃度を測定した。また、血液、脾臓、胸腺については、フローサイトメトリーにて表面解析を行った。

1 回目の実験では、血中グルコースの結果より糖尿病になっていたが、Mg 欠乏状態は観察されなかった。免疫を検討した結果、胸腺の T 細胞に糖尿病の影響がはっきりと見られた。未熟な細胞を示す CD4+CD8+細胞の割合が低くなっていることが示され、CD4+CD8+の細胞が損傷を受け、相対的に CD4+単独陽性、CD8+単独陽性の割合が高くなったと考えられる。そこで、もう一度実験を行い(2回目)Mg 欠乏状態になったもので免疫を再度測定した。今回は Mg 欠乏状態であったが、DM+Mg 欠乏群は糖尿病になっていたが、DM 群が糖尿病になっていない結果となった。2 回目の結果より、脾臓では、T 細胞において Control 群(P=0.047)、Mg 欠乏群(P=0.026)、DM 群(P=0.013)それぞれと比較して、DM+Mg 欠乏群は有意に高値を示した。B 細胞では、Mg 欠乏群と比較して DM+Mg 欠乏群は P=0.036 で有意に低値を示した。NK 細胞は、control 群と比較して DM+Mg 欠乏群 P=0.018 で有意に低値を示した。糖尿病あるいは、Mg 欠乏状態であると、B 細胞よりも T 細胞を割合的に増加させることにより、限られた免疫担当細胞による生体防御の体制を形成していることが推察された。今回は、マウスが Mg 欠乏により死亡してしまうことを考慮して、欠乏を緩めたこともあり、通常 Mg 欠乏になった時に観察される脾臓や胸腺の肥大も見られなかった。ただ、DM による免疫能への影響ははっきりと見られたことから、さらに強い Mg 欠乏状態を作成し、再度検討することが望まれる。

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、病理組織学的検討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。

また、日本人の食事摂取基準(2010)によれば、Mgの推奨量は、成人男性340mgに対して摂取量は241mg、成人女性290mgに対して204mgの摂取量であるため、Mg摂取量はかなり不足しており、日本人は慢性的なMg摂取不足の状態であることが推察される。また、2010年アメリカ合衆国では、成人の約60%がマグネシウム摂取不足の報告¹⁵⁾があり、これが肥満、動脈硬化、高血圧、骨粗鬆症、糖尿病、癌などの疾病の発生に、かなり関連しているとされる。このようにMgの生理的重要性はあきらかであるにも関わらず、Mg欠乏の条件下での免疫能による慢性疾病の発症メカニズムについては、必ずしも明らかではない。また、臨床試験からの証明では、Mg摂取量が不足すると、2型糖尿病になりやすくなり、Mg摂取量を多くすると2型糖尿病の発症を予防することができるという報告¹⁶⁻¹⁹⁾があるが、糖尿病におけるMg欠乏を基礎とする機序は十分に理解されていない。

そこで、本研究は、Mg欠乏下での免疫能に着目し、糖尿病モデルマウスを作成し、このマウスを用いて食餌によるMg欠乏群を設けて免疫担当細胞をフローサイトメリーにて表面解析を行った。

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4週齢のICR系雄マウスを日本チャールス・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、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4週齢雄のICR系マウスを用いて、ストレプトゾトシンを腹腔内に2回投与(100mg/kg体重)して、2型糖尿病を誘発させた。群構成は糖尿病モデルではないControl群、Mg欠乏群、糖尿病モデル(Diabetes Mellitus: DM)DM群、DM+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-93G²⁰⁾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。

飼料原料はオリエンタル酵母(株)より購入した。

2.3 実験方法

1回目の実験では、実験期間は7日間とし、実験期間中、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を連日実施した。剖検後、血液を採取し、胸腺、脾臓の重量を測定した。血液はMg濃度およびグルコース濃度を測定した。また、血液、脾臓、胸腺については、フローサイトメリーにて表面解析を行った。2回目の実験では、実験期間は10日間とし、実験期間中、一般状態の観察、体重および摂餌量の測定を連日実施した。剖検後は1回目の実験と同様に行った。

2.3.1 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)、グルコース濃度の測定にはグルコースCIIテストワ

コー(和光純薬工業株式会社)を用いた。

2. 3. 2 フローサイトメトリーによる表面解析

細胞の分離方法は摘出した脾臓および胸腺をピンセットで細かくし、RPMI・1640 倍地に浮遊させ、遠心により細胞を集めた。胸腺は培地に再浮遊し、細胞数を計測した。脾臓は上記の処理の後、溶血剤を加え溶血させた後、再度洗浄し培地に再浮遊させ、細胞数を計測した。モノクローナル抗体 FITC 標識抗マウス CD3 抗体、PE 標識抗マウス CD19 抗体、PE 標識抗マウス CD8a(Ly-2)抗体、PE 標識抗マウス CD4 抗体(L3T4)は、Phar-Mingen 社のものを使用した。モノクローナル抗体による染色と測定をおこなった。胸腺および脾臓は 5×10^5 個のリンパ球と、至適濃度に希釈した各抗体 10 μ L を 4°C で 30 分間反応させた。血液は、下記のモノクローナル抗体で染色し、溶血を行い測定に用いた。血液および脾臓は①FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD19、②FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD4、③FITC 標識抗マウス CD3 抗体と PE 標識抗マウス抗体 CD8 の 3 種類の組み合わせで 2重染色を、胸腺は、①FITC 標識抗マウス CD8 抗体と PE 標識抗 CD4 マウス抗体の組み合わせで、2重染色を行い、PBS で 2 回洗浄した。

2. 3. 3 統計学的解析

実験結果は、平均値±標準誤差により示した。有意差の検定は、一元配置分散分析を用いて統計学的に解析し、危険率5% 未満を有意差ありとした。

3. 結果

3. 1 死亡動物および一般状態

実験開始から終了時まで死亡動物は認められなかった。

3. 2 体重変化

1 回目の実験の最終体重は、DM 群は Control 群に比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に低値を示した。2 回目の実験の最終体重は DM+Mg(-) 群は Mg(-) に比して有意に低値を示した。成長曲線は、5 日以降に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。

3. 3 臓器重量

1 回目の実験では、胸腺重量、脾臓重量および細胞数は、群間差は認められなかった。しかし、胸腺細胞数では、

DM 群は Control 群と比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) と比して有意に低値を示した。2 回目の実験では、胸腺重量は、DM+Mg(-) 群は Control 群と比して、有意に低値を示した。胸腺細胞数は、DM+Mg(-) は DM 群と比して、有意に低値を示した。脾臓重量は、DM+Mg(-) 群はいずれの群と比して、有意に低値を示した。脾臓細胞数は、DM+Mg(-) 群は Control 群および Mg(-) 群と比して低値を示す傾向にあった(P=0.07)

3. 4 血清生化学的検査

血清中の Mg の濃度について、1 および 2 回目の Mg(-) 群は、Control 群に比して、2 回目の DM+Mg(-) 群は DM 群に比して、有意に低値を示した(Fig. 1)。つまり、1 および 2 回目の Mg(-) 群、2 回目の DM+Mg(-) 群は、明らかに Mg 欠乏状態であることが確認された。

血清中のグルコースの濃度については、1 回目の DM 群は、Control 群に比して、1 および 2 回目の DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して、有意に高値を示した(Fig. 1)。つまり、1 回目の DM 群および DM+Mg(-) 群、2 回目の DM+Mg(-) 群は、糖尿病モデルマウスであることが確認された。

3. 5 フローサイトメトリーによる表面解析

1 回目の血液では、B 細胞は、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に低値を示した(Fig. 2)。また、ヘルパー T 細胞は、DM 群は Control 群に比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に高値を示した(Fig. 2)。脾臓では、特に差が認められなかった。リンパ節では、キラー T 細胞は、DM 群は Control 群と比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群と比して有意に低値を示した。未熟な細胞を示す、胸腺の CD8+ および CD4+ は、DM 群は Control 群に比して、DM+Mg(-) 群では Mg(-) 群に比して有意に高値を示した。一方、CD4+CD8+ は DM 群では Control 群に比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に低値を示した。

2 回目の血液では、T 細胞では、DM+Mg(-) 群は、Control 群と比して、有意に高値を示した。脾臓では T 細胞は、DM+Mg(-) 群が、いずれの群と比しても有意に高値を示した。B 細胞は、DM+Mg(-) 群が、Mg(-) 群と比して、有意に低値を示した。NK 細胞は、DM+Mg(-) 群は、Control 群と比して、有意に低値を示した。リンパ節および胸腺においては特に差が認められなかった。

*:p<0.05, **p<0.01 : v.s. Control group
 ☆:p<0.05, ☆☆p<0.01 : v.s. DM group

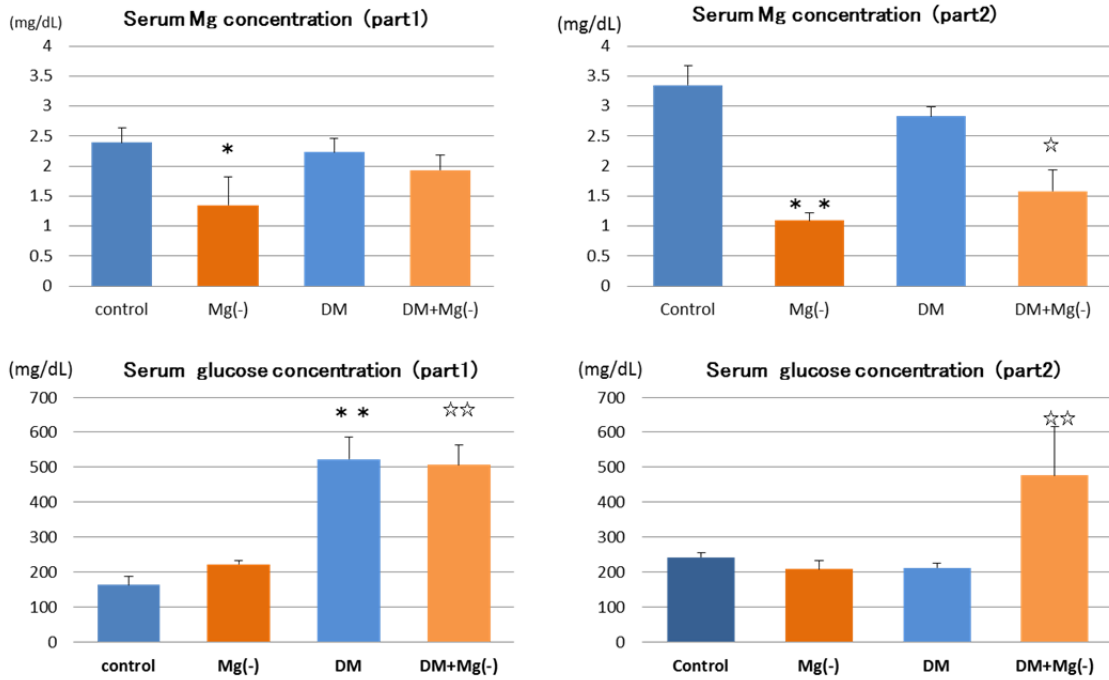


Fig. 1. Concentration of serum magnesium and glucose

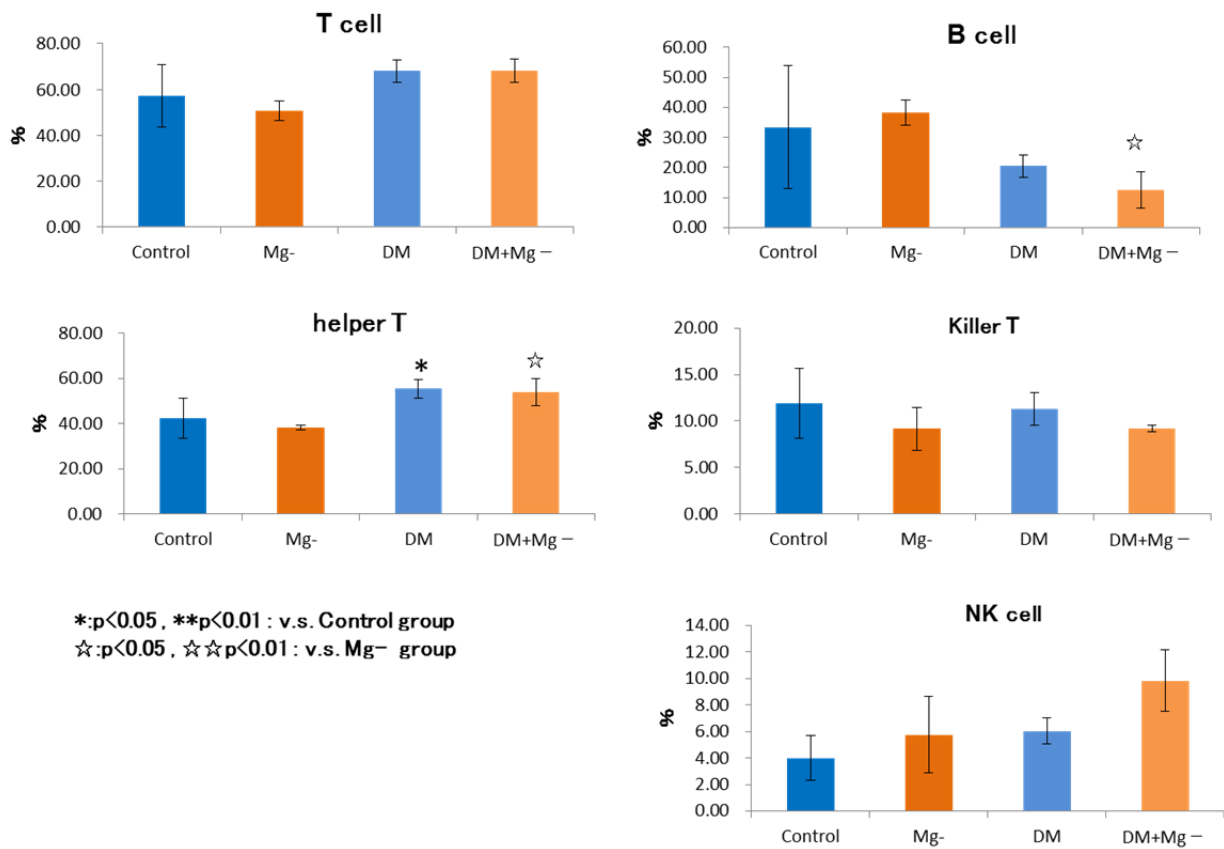


Fig. 2. Lymphocytes subsets from blood of mice (part 1)

4. 考 察

臨床試験からの証明では、Mg 摂取量が不足すると、2型糖尿病になりやすくなり、Mg 摂取量を多くすると2型糖尿病の発症を予防することができるという報告があるが、糖尿病における Mg 欠乏を基礎とする機序は十分に理解されていない。そこで、本研究は、Mg 欠乏下での免疫能に着目し、糖尿病モデルマウスを作成し、このマウスを用いて食餌による Mg 欠乏群を設けて免疫担当細胞をフローサイトメトリーにて表面解析を行うことを目的とした。

1 回目の実験では、血中グルコースの結果より糖尿病になっていたが、糖尿病モデルマウスで Mg 欠乏群は Mg 欠乏が観察されなかった。免疫能を検討した結果、血液の B 細胞は、DM+Mg(-) 群は Mg(-) に比して有意に低値を示した。また、ヘルパーT 細胞は、DM 群は Control 群に比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に高値を示した。つまり、B 細胞よりも T 細胞を割合的に増加させることにより、生体防御の体制を形成している可能性が示唆される。

また、胸腺の CD8+および CD4+は、DM 群は Control 群に比して、DM+Mg(-) 群は Mg(-) 群に比して有意に高値を示した。一方、CD4+CD8+は DM 群では、Control 群に比して、DM+Mg(-) 群では、Mg(-) 群に比して有意に低値を示した。これは、ストレプトゾトシン投与によって、胸腺の細胞数が減少するとともに、未熟な細胞を示す CD4+CD8+細胞の割合が低下し、CD4+または CD8+の成熟細胞の割合が高くなっていることが確認された。糖尿病モデルマウスでは、細胞性免疫能を司る、胸腺の細胞数が減少するとともに、未熟細胞である、CD4+CD8+の細胞の損傷を受けやすく、相対的に CD4+単独陽性、CD8+単独陽性の割合が高くなったと考えられる。

そこで、もう一度実験を行い(2 回目)Mg 欠乏状態になったもので免疫能を再度測定した。今回は Mg 欠乏状態であったが、DM+Mg(-) 群は糖尿病になっていたが、DM 群が糖尿病になっていない結果となった。2 回目の結果より、脾臓では、T 細胞において Control 群(P=0.047)、Mg(-) 群(P=0.026)、DM 群(P=0.013)それぞれと比較して、DM+Mg(-) 群は有意に高値を示した。B 細胞では、Mg(-) 群と比較してDM+Mg(-) 群はP=0.036で有意に低値を示した。NK 細胞は、Control 群と比較してDM+Mg(-) 群 P=0.018 で有意に低値を示した。糖尿病あるいは、Mg

欠乏状態であると、B 細胞よりも T 細胞を割合的に増加させることにより、限られた免疫担当細胞による生体防御の体制を形成していることが推察される。

今回得られた我々の結果は、Mg 欠乏の条件下で起こる免疫能として、胸腺の委縮²¹⁾、胸腺のアポトーシスの高いレベル²¹⁾、炎症、脾腫、脾臓中のマクロファージ数の増加²²⁾、CD8+ T細胞の割合の増加²²⁾の報告と同様なことが得られた。しかしながら、マウスが Mg欠乏により死亡してしまうことを考慮して、欠乏を緩めたこともあり、一方で報告のある、通常 Mg 欠乏になった時に観察される脾臓や胸腺の肥大は認められなかった。DM による免疫能への影響ははっきりと見られたことから、さらに強い Mg 欠乏状態を作成し、再度検討することが望まれる。

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 栄養の生理学 裳華房.p103(1990)
- 4) Fischer PWF, Giroux A. Effects 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) Karppanen, 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, Ia*, 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) Moshfegh A, Goldman J, Ahuja J, Rodes D, LaComb R. What We Eat in America, NHANES 2005-2006: Usual Nutrient Intakes from Food and Water Compared to 1997 Dietary Reference Intakes for Vitamin D, Calcium, Phosphorus, and Magnesium. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2009)
- 16) Barbagallo M, Dominguez LJ, Galioto A, *et al.* Role of magnesium in insulin action, diabetes and cardiometabolic syndrome X. *Mol Aspects Med.* 24, 39-52 (2003)
- 17) Sales CH, Pedrosa Lde F. Magnesium and diabetes mellitus: their relation. *Clin Nutr.* 25: 554-562 (2006)
- 18) Lopez-Riadura R, Willett WC, Rimm EB, *et al.* Magnesium intake and risk of type 2 diabetes in men and woman. *Diabetes Care.* 27: 134-140 (2004)
- 19) Rodriguz-Moran M, Guerrero-Romero P. Oral magnesium supplementation improves insulin sensitivity and metabolic control in type 2 diabetic subjects: a randomized double-blind controlled trial. *Diabetes Care.* 26: 1147-1152 (2003)
- 20) 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)
- 21) Malpuech-Brugère C, Nowacki W, Gueux E, Kuryszko J, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Accelerated thymus involution in magnesium-deficient rats is related to enhanced apoptosis and sensitivity to oxidative stress. *Br J Nutr.* 1999 May; 81(5): 405-11. (1999)
- 22) Maier J.A.M.; Malpuech-Brugere C.; Rock E.; Rayssiguier Y.; Mazur A. Serum From Magnesium -Deficient Rats Affects Vascular Endothelial Cells in Culture: Role of Hyperlipemia and Inflammation - Low concentration of plasminogen activator or increased concentration of plasminogen activator inhibitor *Journal of Nutritional Biochemistry*, 9,1,17-22 (6) (1998)

Effects of Dietary Magnesium Deficiency in the Mice with Special Reference to Flow Cytometry Examination

Takako Ikeda¹, Takayoshi Imazawa², Yukiko Nakanishi³, Hiroko Nakamura⁴, Mikiko Kurose⁴

¹ Department of Live Sciences, Showa Women's University, ² National Institute of Biomedical Innovation, ³ College of Nutrition, Koshien University, ⁴ Research Institute for Nutrition and Aging

Summary

According to the Dietary Reference Intakes for Japanese (2010), adult men and women are recommended to take Magnesium (Mg) 340 mg/day and 290 mg/day, respectively. Actual Mg intakes in Japanese have been taken lower than those recommendations. Therefore, many Japanese are suffered from chronic insufficient Mg. In the United States in 2010, it has been also reported that inadequate intake of magnesium is approximately 60% among adult population, associating with increasing of obesity, arteriosclerosis, hypertension, osteoporosis, diabetes, and cancer. Physiological importance of Mg even though it is recognized, the mechanism of disease onset by impairing the chronic immune function under conditions of Mg deficiency has not been clear. Therefore, in the present study, we examined the effects of Mg deficiency on immunocompetent cells in diabetic mice by flow cytometry.

Four-week-old male ICR mice, intraperitoneally administered two times (weight 100 mg/kg) of streptozotocin, were induced type 2- diabetes. Mice were divided into 4 groups (Control group, Diabetes Mellitus (DM) group, Mg deficient group, and DM + Mg deficient (DM+Mg) group) with 6 animals in each group fed the basal diet (AIN-93G, using a mixture of minerals, including magnesium oxide), or the Mg deficient diet for 10 days. Food intake and body weight were measured daily and after the autopsy, blood, thymus and spleen were collected and weighed. Blood glucose and Mg concentrations were measured. In addition, the blood, spleen and thymus were applied to a surface analysis by flow cytometry.

First Experiment: We confirmed mice were suffered from diabetes based on the blood glucose concentrations, while Mg deficiency was not observed. It was clearly shown the effects of diabetes on thymic T cells. The percentages of cells CD4 + CD8 + were lower than Control group indicating the immature cells increased. These results suggested that cells of CD4 + CD8 + were damaged and then the percentage of CD4 + positive and CD8 + positive relatively increased.

Second Experiment: We confirmed mice were suffered from Mg deficiency, while DM+Mg group mice were suffered from diabetes, but not in DM only group. In the spleen, compared with in Control group (P=0.047), Mg deficient group (P=0.026), and DM group (P=0.013) respectively, T cells in DM + Mg deficient group was significantly higher. B cells in DM + Mg deficient group showed a significantly lower value (P=0.036) compared to the Mg deficient group. NK cells in DM + Mg-deficient group showed a significantly lower value (P=0.018) compared with the Control group. Diabetes or Mg deficiency were suggested increasing T cells than B cells,

which forms a system of defense was limited by immunocompetent cells. In the present study, there was no enlargement of the thymus and spleen occurring under Mg deficient condition because the Mg deficient level was too mild considering that the mouse would have died due to lack of Mg. However, the impact of DM on immune function was observed clearly. It is necessary to examine the effects of stronger Mg-deficient diet on the immune function in diabetic mice.