

令和元年6月20日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K00846

研究課題名(和文) 低マグネシウム血症に伴う突然死の原因究明とマグネシウム補充療法の有用性の検討

研究課題名(英文) Investigation of cause of sudden death associated with hypomagnesemia and examination of usefulness of magnesium replacement therapy

研究代表者

渡邊 マキノ (Watanabe, Makino)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：00255655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的マグネシウム欠乏(低マグネシウム血症)ラットを作製し、低マグネシウム血症に伴う突然死の原因究明のために心機能を、またマグネシウム補充が突然死の予防に有効であるかを検討した。本研究により、慢性的マグネシウム欠乏ラットで認められる心機能低下と貧血は、低マグネシウム血症発症後のMg補充によって、完全に改善することが明らかとなった。一方、慢性的なMg欠乏で認められた胸水貯留や四肢浮腫はビタミンB1欠乏症である脚気と症状が類似している。脚気は脚気衝心と呼ばれる心不全症状も発症することから、低マグネシウム血症に伴う突然死の原因として脚気衝心の可能性が示唆され、今後検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、慢性的なMg欠乏によって発症した低マグネシウム血症、貧血、心機能畏怖全は、発症後であっても充分量のMgを医薬品やサプリメント等で補うことによって完全に改善しうることが明らかとなった。一方で、当初、低マグネシウム血症と心機能の関連を検討していたが、研究を進める中で低マグネシウム血症によって、脚気様の症状が引き起こされることが明らかとなった。低マグネシウム血症と脚気(ビタミンB1欠乏症)の関連は明らかになっていないが、本邦における所得貧困層や高齢者の買い物難民などによる低栄養状況が突然死を引き起こす原因になり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the cause of sudden death by chronic magnesium (Mg) deficient (hypomagnesemia), we prepared the chronic Mg deficient rats, and it was also examined whether Mg supplementation was effective for preventing sudden death. The present study revealed that cardiac dysfunction and anemia observed in chronic magnesium-deficient rats are completely improved by Mg supplementation after hypomagnesemia. On the other hand, pleural effusion and limb edema observed in chronic Mg deficiency are similar in symptoms to beriberi that is vitamin B1 deficiency. Beriberi also develops heart failure symptoms called beriberi heart, suggesting the possibility of beriberi as a cause of sudden death associated with hypomagnesemia, which needs further investigation.

研究分野：生理学

キーワード：低マグネシウム血症 突然死 ミトコンドリア マグネシウム補充 貧血 脚気

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マグネシウム(Mg)欠乏と循環器疾患について、飲料水や土壌中の Mg 含有量が低い地域において、虚血性心疾患の罹患率や死亡率が高いという疫学的事実があるほか、実験系においても Mg 欠乏動物で高血圧が認められることや、心筋梗塞発症モデル動物の心筋内 Mg 含有量の低下などが報告されている。低 Mg 血症は様々な病態を惹起し、例えばメタボリックシンドローム発症の一因とされるが、臨床現場における経験的な報告が多く、メカニズムの解明に必要なエビデンスはほとんど得られていない。

我々のこれまでの研究において、まず Mg 欠乏の実験モデルを作製し、Mg 欠乏により虚血性心疾患が重症化することを明らかにした(文献1)。その後の検討では慢性的な Mg 欠乏では、低 Mg 血症のみならず、重篤な貧血が誘発され、脱毛や皮膚の炎症、四肢の浮腫、胸水・腹水の貯留が高頻度で認められること、摘出灌流心モデル実験では Basal の心拍数、左室発生圧とも正常群より有意に低下していることが示されており、これらの現象は心不全発症とも関連し、Mg 欠乏による突然死の可能性を裏付けるものであった。

### 2. 研究の目的

上述のように、慢性的な Mg 欠乏によって突然死が引き起こされる可能性が示唆されていたが、国内外において心機能と Mg、さらには低 Mg 血症との関連を病態生理学的に検討している研究はほとんどない。近年の日本人の食習慣の欧米化・脱日本化は低 Mg 血症発症のリスクを増加させていることが示唆されていることから、本研究ではこれまでの研究を踏まえ、食習慣などのライフスタイルの変化により今後増加する可能性が高くなると考えられる慢性的低 Mg 血症患者に対する心疾患の予防や治療効果の促進に重要な Mg 補充の有効性を立証するための基礎データを収集することとした。そのためには(1)慢性的低 Mg 血症に伴う病態の詳細な進展を明らかにし、(2)低 Mg 血症に伴う病態を最も効果的に予防・抑制する Mg 補充および Mg 投与プロトコルを決定することを目的とした。

本研究で得られた知見は低 Mg 血症による種々の病態の予防・治療の基礎となるだけでなく、患者の栄養管理にも直結し、栄養学と臨床医学の橋渡しになることが期待される。

### 3. 研究の方法

#### (1) 慢性的 Mg 欠乏モデルの作製

雄性 Sprague-Dawley ラット(5週齢)に Mg 欠乏食(日本クレア製:Mg 含有量 4.5 mg/100 g)と脱イオン水を8週間給餌し、Mg 欠乏群とした。Mg 補充群は、8週間の欠乏食期間後、通常食および水道水でさらに8週間飼育した。Mg 欠乏群、Mg 補充群の対照群は、それぞれ週齢を合せた正常ラット群とした。

#### (2) ラングENDORF 摘出灌流心モデルによる低酸素-再酸素化(虚血-再灌流)の影響の検討

ラットを麻酔下にて開腹し、下大静脈より採血をした後、開胸し、心臓を摘出し、直ちに定流量(13 ml/min)ラングENDORF 灌流を行った。安定化後、低酸素灌流(30分)-再酸素化(30分)を行った。灌流中は左心室内にラテックス製のバルーンを挿入し、心拍数(HR)、左室発生圧(LVDP)をモニターした。心機能は圧・心拍数積(Pressure rate product; PRP=LVDP × HR)で評価した(文献2)。

#### (3) ミトコンドリア機能の検討

虚血-再灌流障害の病態としてミトコンドリア透過性遷移孔(mitochondrial permeability transition pore; mPTP)が知られている。mPTP 開孔を指標として各群のラット心臓のミトコンドリア機能を比較した。

各群のラット心臓から遠心分離法によってミトコンドリアを単離した。ミトコンドリア浮遊液に蛍光 Ca<sup>2+</sup> 指示薬である Ca-Green 5N を添加し、1波長励起(488 nm)による蛍光を 510 nm で検出した。

ミトコンドリア浮遊液に Ca を添加するとミトコンドリア外液の Ca 濃度が上昇するが、外液の Ca はミトコンドリアに取り込まれるために、直ちにミトコンドリア外液の Ca 濃度は低下する。一定量の Ca を一定間隔で添加するうちに Ca 過負荷状態となり、ミトコンドリア内に取り込まれていた Ca が一気にミトコンドリア外に流出し、ミトコンドリア外液の Ca 濃度が急上昇する。この時点を mPTP 開孔とし、mPTP 開孔に要する Ca 量を各群で比較した。

#### (4) 血液検査(血算)、血中ビタミン濃度の検討

モデル動物の全身状態、貧血の分類、原因を検討するために下大静脈より採血を行い、血漿中の Mg 濃度測定その他、血液検査を行った。血算の測定項目は白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、ヘモグロビン濃度(Hb)、ヘマトクリット値(Hct)、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数(PLT)であった。また貧血に関連する因子として血中ビタミン B<sub>1</sub>、ビタミン B<sub>12</sub>、葉酸濃度を測定した。

#### (5) 摘出大動脈標本による血管収縮反応の評価

正常群、Mg 欠乏群のラットから胸部大動脈を摘出し、リング標本を作製し、収縮反応は高

濃度  $K^+$  (60 mM)、 $\alpha_1$  アゴニストであるフェニレフリン (PE;  $10^{-9} \sim 10^{-6}$  M) で誘発し、収縮反応の電位依存性、Ca 依存性を比較・検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 慢性的な低 Mg 血症による心機能低下に対する Mg 補充の効果

我々のこれまでの研究で、慢性的な低 Mg 血症により、ラット摘出灌流心モデルにおいて、心機能 (圧・心拍数積) の初期値が著明に低下し (図 1-A、B 中の点線) これは心拍数、左室発生圧の両方が有意に低下したことに起因していることが明らかになっている。

低 Mg 血症発症後に Mg 補充を行った結果、心機能の初期値は改善傾向が見られた (点線 ○)。また虚血-再灌流障害については、週齢を合せた正常群 (●) と同等となり、完全に改善されることが明らかとなった。

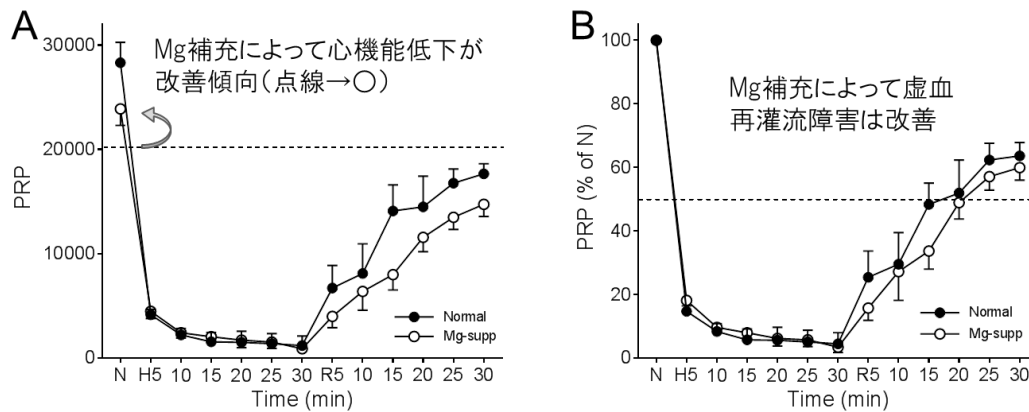


図 1 Mg 補充による心機能低下の改善

##### (2) 慢性的な低 Mg 血症によるミトコンドリア機能低下に対する Mg 補充の効果

我々のこれまでの研究で、慢性的な低 Mg 血症によって mPTP 開孔に要する Ca 量が著明に低下、即ちミトコンドリア機能が低下していることが明らかになっている (図 2B、Normal vs Mg-deficient)。

Mg 補充群 (Mg-def-supp) の心筋ミトコンドリアでは mPTP 開孔に要する Mg 量は週齢を合せた正常群 (Normal-supp) と同程度となり、ミトコンドリア機能は Mg 補充により充分に回復することが示された (図 2)。

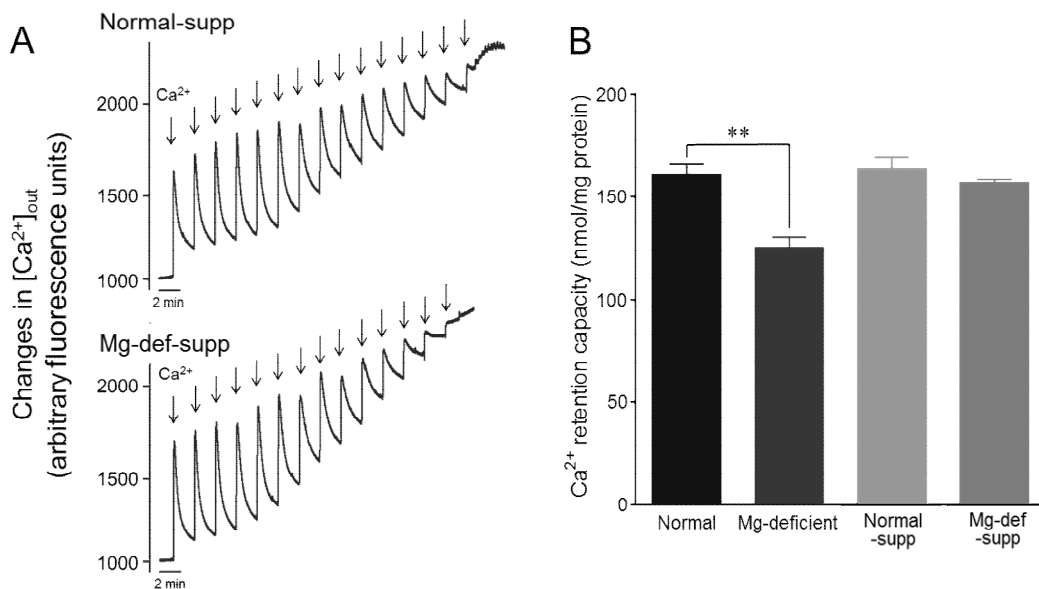


図 2 Mg 補充による心筋ミトコンドリア機能低下の改善

##### (3) 慢性的な Mg 欠乏によって誘発される貧血と Mg 補充の効果

慢性的な Mg 欠乏によって低 Mg 血症だけでなく、重篤な貧血が引き起こされることは明らか

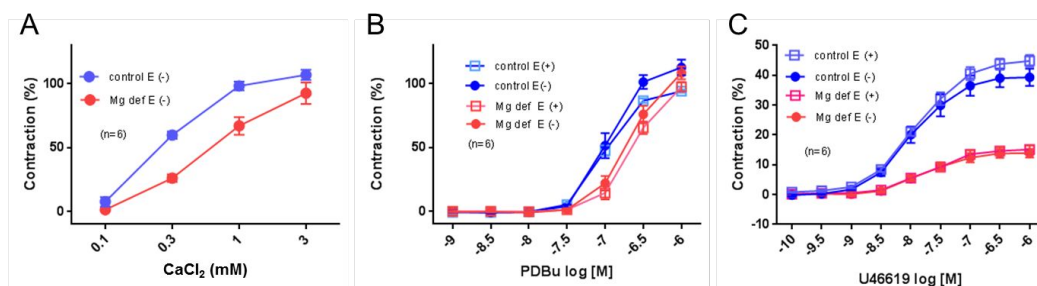
かになっていたが、貧血の種類および貧血の原因は明らかになっておらず、本研究において血算や血中ビタミン類の測定により原因を検討した。

Mg 補充群の血漿 Mg 濃度は正常群と同等まで回復し (正常群  $2.26 \pm 0.11$  vs Mg 欠乏群  $2.25 \pm 0.05$  mg/dL)、Mg 補充によって低 Mg 血症は完全に改善した。また貧血も Mg 補充によって回復し、赤血球数 ( $953.6 \pm 15.7$  vs  $870.4 \pm 13.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ )、ヘマトクリット値 ( $46.6 \pm 1.0$  vs  $43.3 \pm 6.6\%$ ) は正常値となった。

貧血の原因を確定するために血算を検討したところ、Mg 欠乏群では平均赤血球容積 (MCV) が有意に低下していたが、平均赤血球ヘモグロビン量 (MCH) は正常群と差がなかった。また葉酸が減少傾向だった。これらの結果より、慢性的な Mg 欠乏によって大球性正色素性貧血が引き起こされ、Mg 補充による治療は有効であることが示唆された。

#### (4) 血管収縮反応に対する Mg 欠乏の影響

これまでの検討で慢性的な Mg 欠乏は血管平滑筋の電位依存性収縮および非依存性収縮の両者を抑制することが明らかになっていた。本研究では、そのメカニズムの詳細をさらに検討した。その結果、Mg 欠乏群では Ca 除去・Ca イオノフォア存在下における Ca に対する収縮性が減弱していることが明らかになった (図 3-A)。また PKC を直接活性化する PDBu に



(phorbol 12,13-dibutyrate)に対する収縮性は正常群と大きな差は認めなかったが (図 3-B) プロスタグランジン H<sub>2</sub> アナログである U46619 に対する収縮性は Mg 欠乏群で著明に抑制された (図 3-C)。これらの結果より、慢性的な Mg 欠乏においては血管平滑筋の Ca 感受性を調節する機構に障害がある可能性が示唆された。

本研究により、慢性的な Mg 欠乏による心機能低下は、Mg 補充により十分に改善しうることが明らかとなった。また慢性的な Mg 欠乏で併発していた重篤な貧血は大球性正色素性貧血であり、Mg 補充により完全に改善することも明らかとなった。

慢性的 Mg 欠乏で認められていた phenotype の変化 (胸水貯留、四肢の浮腫など) については、脚気症状と類似しているとの指摘があり、実際、血中ビタミン B<sub>1</sub> レベルも低下傾向にあることから、慢性的な Mg 欠乏によってビタミン B<sub>1</sub> の吸収阻害または利用阻害などが起こる可能性が考えられる。脚気では神経症状の他に脚気衝心と呼ばれる心不全症状も見られることから、今後、Mg 欠乏と脚気の関連について検討する必要性が示唆された。

#### [参考文献]

1. Makino Watanabe, Atsuko Shinohara, Takehisa Matsukawa, Momoko Chiba, Jinrong Wu, Takafumi Iesaki, Takao Okada: Chronic magnesium deficiency decreases tolerance to hypoxia/reoxygenation injury in mouse heart. *Life Sciences*, 88, 658-663, 2011
2. Makino Watanabe, Takao Okada: Langendorff Perfusion Methods as an Ex vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Experimental Models of Cardiovascular Diseases Methods and Protocols*. Kiyotake Ishikawa (Ed.), Springer, NY, 107-116, 2018

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者および研究分担者には下線)

#### [雑誌論文] (計 1 件)

Makino Watanabe, Takao Okada: Langendorff Perfusion Methods as an Ex vivo Model to Evaluate Heart Function in Rats. *Experimental Models of Cardiovascular Diseases Methods and Protocols*. Kiyotake Ishikawa (Ed.), Springer, NY, 107-116, 2018

#### [学会発表] (計 5 件)

渡邊マキノ、柿木亮、中村京子、華藤恵美、家崎貴文、岡田隆夫：慢性 Mg 欠乏ラット心臓における低酸素耐性の低下と Mg 補充効果の検討．第 25 回日本病態生理学大会、2015 年 8 月 1 日、松山

Yuki Iwamoto, Shigetaka Fukuda, Shinya Fujioka, Makino Watanabe, Takao Okada, Takafumi Iesaki: Magnesium deficiency inhibits both voltage-gated and receptor operated vascular smooth muscle contraction. 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 23 日、札幌

Tsubasa Miyauchi, Arisa Takeda, Makino Watanabe, Takao Okada, Takafumi Iesaki: Mechanisms for inhibition of vascular smooth muscle contraction in magnesium deficient rat model. 第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎

Yuya Ohe, Yuki Yachid, Ryota Hashimoto, Kyoko Nakamura, Takafumi Iesaki, Makino Watanabe: Functional evaluation of myocardium mitochondria in magnesium deficient rat. 第 95 回日本生理学会大会、2018 年 3 月 30 日、高松

Takafumi Iesaki, Ryo Kakigi, Makino Watanabe: Magnesium deficiency attenuates vascular smooth muscle contraction in rat aorta. Experimental Biology 2018, April 21-25, San Diego, USA

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：家崎 貴文

ローマ字氏名：(IESAKI, Takafumi)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 10348956

研究分担者氏名：中村 京子

ローマ字氏名：(NAKAMURA, Kyoko)

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁): 90578858

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。