

マグネシウム欠乏ラットにおける体内マンガン及び肝臓中 ピルビン酸カルボキシラーゼ活性の変化

木村 美恵子・氏原 真弓・糸川 嘉則
(京都大学医学部衛生学教室*)

Changes of Manganese Concentration in Various Tissues and Pyruvate Carboxylase Activity in Liver of Magnesium Deficient Rats

Mieko KIMURA, Mayumi UJIHARA and Yoshinori ITOKAWA
Department of Hygiene, Faculty of Medicine, Kyoto University

Wistar male rats were divided into two groups. To one group magnesium deficient diet was given and to the other group magnesium sufficient diet was given for 2 weeks. The biochemical properties of pyruvate carboxylase in crude rat liver mitochondria fractions were investigated with the method of the spectrophotometrical assay. The significant changes seen in magnesium deficient rats were as follows: Pyruvate carboxylase activity in liver crude mitochondrial fraction of magnesium deficient rats was decreased and manganese concentration was decreased in plasma and all tissues except blood. Positive correlation between pyruvate carboxylase activity and manganese concentration in liver was found. Magnesium concentration was decreased in brain, spinal cord, lung, spleen, kidney, testis, bone, blood and plasma, and was increased in liver.

Key words: Magnesium deficiency, pyruvate carboxylase, mineral imbalance

心疾患の原因の一つとして、マグネシウム摂取不足が注目されているが¹⁾、我々は動物実験においてマグネシウム欠乏により心発作を起こし死亡する例があることを見出している²⁾。しかし、何故マグネシウム欠乏により虚血性心疾患が発生するのか、その機構はまだ明らかにされていない。マグネシウム欠乏によりカルシウム、鉄、ナトリウム、カリウム、リン、亜鉛、銅等その他ミネラル類の増減が起こることをこれまでに報告^{2,3)}し、マグネシウム欠乏によりミネラル類のバランスが崩れることが原因の

*所在地：京都市左京区吉田近衛町（〒606）

一つであろうことを示唆した。本報告ではマグネシウム欠乏ラットにおける生体内マンガンの変化およびピルビン酸カルボキシラーゼ活性を中心に検討を加えた。

方 法

生後3週間のWistar系雄ラット40匹を2群に分け、マグネシウム欠乏及び正常の合成飼料 (Table 1) にて2週間飼育後、ネンブタール麻酔下にて腹部大動脈より採血後、各種臓器を摘出した。試料は硝酸

Table 1. Composition of experimental diet

	Control	Mg def.
Sucrose	15.00	15.00
Starch	38.30	38.30
Casein	30.00	30.00
Olive oil	10.00	10.00
Cellulose	2.00	2.00
Salt mixture	4.00	0
Salt mixture (Mg free)	0	4.00
Vitamin mixture	0.50	0.50
Choline chloride	0.20	0.20

にて湿式灰化し、マンガンはフレームレス原子吸光分光光度計 (AA-646, 島津製作所製 京都)。その他各種ミネラル量をシーケンシャル・プラズマ発光分析装置 (ICPS-1000 II, 島津製作所製 京都) を用いて測定した。

肝臓中マンガン酵素である pyruvate carboxylase 活性の測定法について以下のような検討を加え、crude mitochondria fraction を用いた簡便測定法を開発、本法を用いて肝臓中 pyruvate carboxylase 活性を測定した。即ち、Table 2 はラット肝臓組織中 crude mitochondria fraction の分離方法を示した。精製酵素を用いた Seructon らの方法⁴⁾を参照して、Table 3 に分析手順を示すような肝臓 crude

Table 2. Preparation of rat liver crude mitochondria

Liver homogenate with 9 volumes of 0.25 mmol/L sucrose containing 10 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.5)
 ↓
 The homogenate centrifuge at 700 × g for 10 min.
 ↓
 The supernatant centrifuge at 5,000 × g for 10 min.
 ↓
 The pellet suspend in 10 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.5)

Table 3. Assay of pyruvate carboxylase in rat liver

Reaction system (in total volume of 1 ml)
 enzyme (crude mitochondria of liver)
 100 mmol/L Tris-HCl (pH 7.8)
 2.5 mmol/L potassium ATP
 5 mmol/L MgCl₂
 15 mmol/L KHCO₃
 0.1 mmol/L Acetyl-CoA
 0.225 mmol/L NADH
 5 units malate hydrogenase
 and 250 μg of Triton X-100/total volume of 1 mL

↓

5 min. at 37°C for preincubation

↓

Reaction start by addition of sodium pyruvate (final 10 mmol/L)

↓

Follow by decrease in absorbance at 340 nm
 in double beam spectrophotometer

mitochondria fraction を用いて考案した。Fig. 1, 2, 3 に示すように、蛋白量として 1-6 μg ぐらいで生成 oxaloacetate 量とのあいだにより相関が得られ、pH 7.0 から 7.6 までの間の pH 依存性、25°C から 37°C までの温度依存性が確認された。

組織の一部はホルマリン固定後ヘマトキシリン-エオジン染色し、組織学的検討を行った。

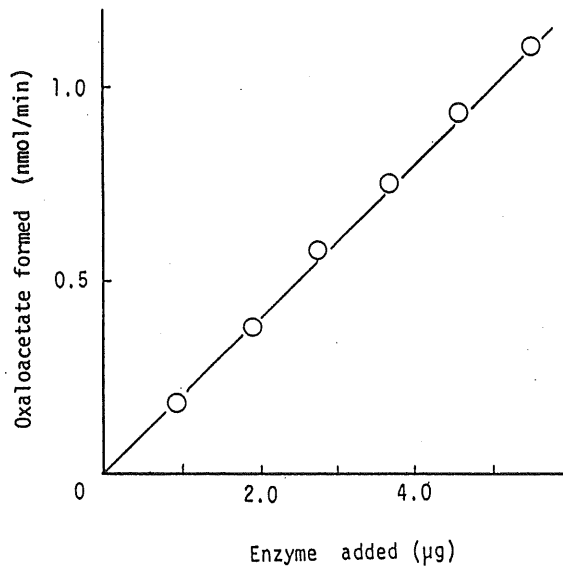


Fig. 1. Linearity with enzyme concentration of the formation of oxaloacetate from pyruvate and CO₂ with malate dehydrogenase and NADH.

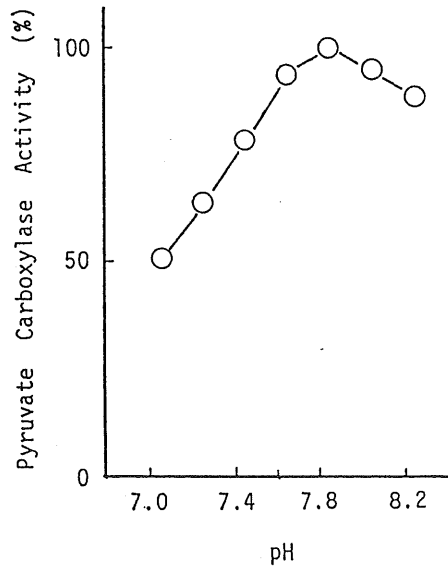


Fig. 2. Effect of pH on pyruvate carboxylase activity in rat liver mitochondria fraction.

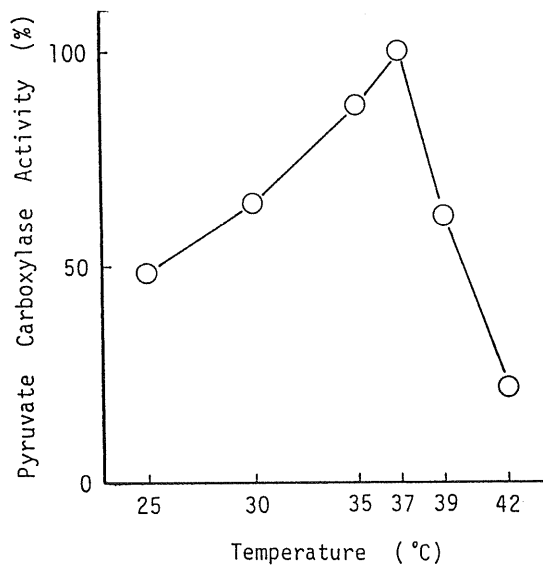


Fig. 3. Effect of temperature on pyruvate carboxylase activity in rat liver mitochondria fraction.

結果と考察

マグネシウム欠乏群ラットは飼育1週間位から鼻, 耳に発赤が認められ, 2週間近くになるとけいれん発作を起こし, 死亡するものもでた(死亡例はマンガン及び肝臓中 pyruvate carboxylase 活性の測定は不能であった)。Fig. 4 はラットの成長曲線をしめす。マグネシウム欠乏ラットでは著しい成長の遅延が起こる。

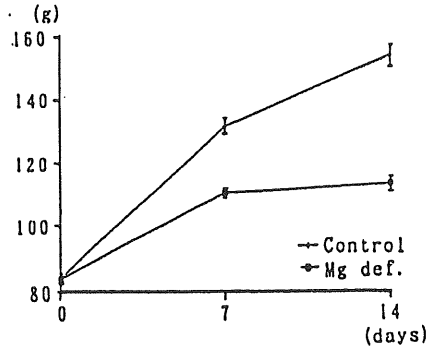


Fig. 4. Growth curves.

Table 4 はマグネシウム濃度を示した。脳, 脊髄, 肺, 脾臓, 腎臓, 睪丸, 骨, 血液, 血清中マグネシウム濃度はマグネシウム欠乏群が有意に低下したが, 肝臓では有意の上昇を示した。Table 5 はカルシウム濃度を示した。肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 睪丸, 血液中カルシウム濃度はマグネシウム欠乏群が有意に上昇し, 特に腎臓では顕著なカルシウム濃度の上昇が認められた。骨, 血清では有意の低下を示し

Table 4. Magnesium concentration in various tissues ($\mu\text{g/g}$)

	Control	Mg def.
Brain	176.26 \pm 0.87	163.14 \pm 0.95 #
Spinal cord	207.75 \pm 4.19	178.14 \pm 2.71 #
Heart	258.13 \pm 1.58	250.55 \pm 7.64
Lung	157.04 \pm 2.05	143.87 \pm 4.40 *
Liver	263.05 \pm 3.03	280.39 \pm 3.71 #
Spleen	249.74 \pm 4.07	237.04 \pm 4.41 *
Kidney	237.02 \pm 2.78	204.50 \pm 2.81 #
Testis	186.10 \pm 1.13	166.25 \pm 2.79 #
Bone	2495.89 \pm 37.93	980.70 \pm 20.40 #
Blood	48.17 \pm 0.65	22.27 \pm 0.42 #
Plasma	23.12 \pm 0.74	4.24 \pm 0.17 #

Mean \pm S.E.

* : Significant difference ($p < 0.05$) as compared to control.

: Significant difference ($p < 0.01$) as compared to control.

Table 5. Calcium concentration in various tissues ($\mu\text{g/g}$)

	Control	Mg def.
Brain	54.79 \pm 4.14	56.79 \pm 4.97
Spinal cord	440.97 \pm 94.48	344.77 \pm 102.5
Heart	39.26 \pm 0.68	42.27 \pm 2.33
Lung	77.31 \pm 0.58	86.44 \pm 2.75 *
Liver	37.92 \pm 1.22	48.76 \pm 1.41 #
Spleen	37.41 \pm 0.84	56.72 \pm 3.06 #
Kidney	64.32 \pm 1.02	405.51 \pm 72.93 #
Testis	39.88 \pm 0.48	50.44 \pm 1.90 #
Bone	135.20 \pm 28.64	102.46 \pm 12.36 * ¹⁾
Blood	61.46 \pm 0.72	73.54 \pm 1.61 #
Plasma	132.83 \pm 3.94	108.44 \pm 1.38 #

Mean \pm S.E. (1) : mg/g)

* : Significant difference ($p < 0.05$) as compared to control.

: Significant difference ($p < 0.01$) as compared to control.

Table 6. Manganese concentration in various tissues ($\mu\text{g/g}$)

	Control	Mg def.
Brain	0.46 \pm 0.014	0.40 \pm 0.013 #
Spinal cord	0.46 \pm 0.029	0.35 \pm 0.021 *
Heart	0.36 \pm 0.013	0.31 \pm 0.021 #
Lung	0.20 \pm 0.006	0.15 \pm 0.006 #
Liver	2.80 \pm 0.089	1.87 \pm 0.099 #
Spleen	0.24 \pm 0.013	0.18 \pm 0.008 #
Kidney	1.14 \pm 0.024	0.81 \pm 0.021 #
Adrenal gland	0.47 \pm 0.008	0.61 \pm 0.015 *
Testis	0.39 \pm 0.012	0.36 \pm 0.011
Bone	0.68 \pm 0.031	0.60 \pm 0.020 *
Blood	13.19 \pm 0.33	14.37 \pm 0.23
Plasma	5.64 \pm 0.14	3.58 \pm 0.11 #

Mean \pm S.D.

* : Significant difference ($p < 0.05$) as compared to control.

: Significant difference ($p < 0.01$) as compared to control.

た。マグネシウム欠乏により、各種組織中マグネシウム濃度の低下が認められるが、肝臓のみ反対に上昇したことはマグネシウム欠乏はマグネシウムそのものの不足の他、利用障害も併せ引き起こされ、肝臓中に残存する可能性が考慮される。また、これまでも報告²⁾しているように、カルシウムはマグネシウム欠乏にともなってバランスをくずし、骨から流出し、排泄経路である腎臓に沈着するものと考えられる。

Table 6 にマンガン濃度を示した。マンガン濃度は、正常群ラットに比較してマグネシウム欠乏ラットの脳、脊髄、肺、心、肝、脾、腎臓、骨及び血清で有意の低下が認められた。また、血清中濃度は有意の低下が認められたが、全血中濃度には有意の変化は認められなかった。これまでにマグネシウム欠乏時におけるマンガン栄養状態に関する情報は乏しいが、この様に著しい相互関係が認められることは、ともに2価の類似したイオンであり、マグネシウム欠乏によりマグネシウムの代わりにマンガンの利用が高まるという機構も考えられる。

マグネシウム欠乏ラット肝臓中 pyruvate carboxylase 活性測定結果は Fig. 5 に示すように、マグネシウム欠乏群では正常群に比べて有意の低下を示し、肝臓中マンガン濃度との間に有意の正の相関が認められた。この結果、マグネシウム欠乏によりマンガン欠乏及び pyruvate carboxylase 活性の低下を招き、著しいマンガン欠乏状態がもたらされることが明らかとなった。

近年、長期完全静脈栄養管理の患者にマンガン欠乏症発症例が見つけられてはいるが^{6,7)}、マンガン

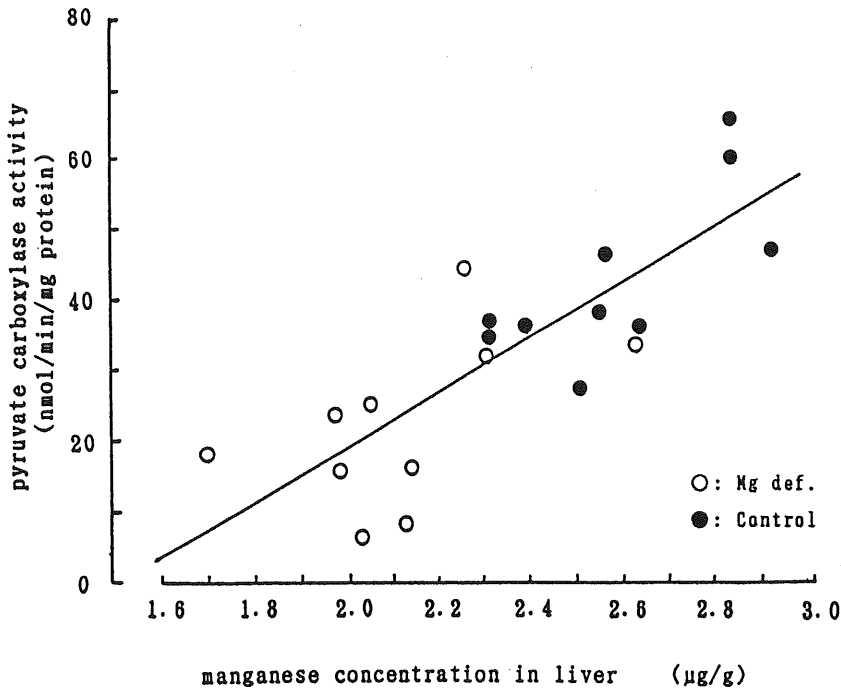


Fig. 5. Pyruvate carboxylase activities, and correlation between pyruvate carboxylase activity and manganese concentration at rat liver mitochondria fraction.

の腸管からの吸収率は5%以下と低く、すぐに胆汁から排泄され、通常条件下では欠乏にはなりにくい元素である。また、動物実験においても、マンガン欠乏飼料で動物を飼育しても一世代では容易に欠乏状態には陥らず、2世代飼育に依って初めてマンガン欠乏動物の作成が可能であることを報告した⁸⁾。そして、マンガンの再負荷により体内のマンガン欠乏状態は比較的早く回復するが、マンガン欠乏により2次的に発症した貧血など他のミネラルアンバランスや血清生化学検査値は回復が大幅に遅れることも明らかにしている^{9,10)}。

臨床現場では、血清中マンガン濃度の低下をマンガン欠乏の指標としているが、マンガンは投与経路（経口投与、経呼吸器、腹腔内投与または経静脈投与）によりその動態が異なり、経静脈投与では血清または血液中マンガン濃度の上昇が認められないにもかかわらず、脳に蓄積していることを明らかにした¹¹⁻¹³⁾。この様に血清や血液には必ずしも体内のマンガンの動向が反映されないため、その栄養アセスメント方法が問題となり、検討の結果、リンパ球中マンガン濃度が体内のマンガン栄養状態を良く反映することを見出した¹⁴⁾。しかし、マンガンの摂取不足によりマンガン欠乏状態は容易には引き起こされないが、本報で明らかになったように、マグネシウム欠乏により短期間でマンガン欠乏が発生することはマンガン栄養状態の判定にもう一つの問題点を投げかけるものである。

組織学的所見では大腿筋繊維の著しい萎縮・崩壊・細胞浸潤、心筋の細胞間隙の拡大、心筋内動脈の繊維化による血管の狭窄が認められ、腎では髄質尿細管内沈着物、糸球体の型不揃い等の障害が認められた。これらの結果はこれまでの報告¹⁾にもあるようにマグネシウム欠乏により筋組織の崩壊、血管狭窄がもたらされ、心疾患による発作死が発生し易くなることを裏づけるものである。

文 献

1. SEELIG, M. S. and H. A. HEGGTVEIT (1974) *Am. J. Clin. Nutr.* 27 : 59
2. 木村美恵子, 原田武尚, 糸川嘉則 (1983) *マグネシウム* 2 : 7
3. KIMURA, M. and Y. ITOKAWA (1989) *Magnesium in health and disease*, ed. by Itokawa and Durlach, Jhon Libbey & Co Ltd : pp. 95
4. SCRUCTON, M. C., M. R. OLMSTED and M. F. UTTER (1960) *Methods in Enzymology* 13 : 235
6. DAHLSTROM, K. A., M. E. AMENT, M. G. MEDHIN and S. MEURLING (1986) *J. Pediatr.* 109 : 625
7. YAMAMOTO, H. (1982) *Tokushima J. exp. Med.* 29 : 21
8. 片岡美紀子, 大熊新一, 佐藤誠, 松田晃彦, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1990) *JJPEN* 499
9. 松田晃彦, 木村美恵子, 片岡美紀子, 大熊新一, 佐藤誠, 糸川嘉則 (1990) *栄養アセスメント* 6 : 97
10. 松田晃彦, 木村美恵子, 糸川嘉則, 片岡美紀子, 大熊新一, 佐藤誠 (1990) *JJPEN* 12 : 504
11. 加畑寿明, 松田晃彦, 横井克彦, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1989) *日本衛生学雑誌* 44 : 667
12. 加畑寿明, 松田晃彦, 横井克彦, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1989) *JJPEN* 11 : 436
13. 加畑寿明, 松田晃彦, 横井克彦, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1988) *微量栄養素研究* 5 : 51
14. MATSUDA, A., M. KIMURA and Y. ITOKAWA (1989) *Clin. Chem.* 35 : 1939