

## ラットのインスリン感受性に及ぼす飼料摂取量制限ならびに マグネシウムおよびカルシウム欠乏の影響

古谷 勇馬, 松井 徹  
(京都大学大学院農学研究科\*)

### The Effect of Pair-feeding or Magnesium and Calcium Deficiency on Insulin Sensitivity in Rats

Yuuma FURUTANI and Tohru MATSUI

Division of Applied Biosciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University

#### Summary

Magnesium deficiency enhances insulin sensitivity in rats whereas it reduces insulin sensitivity in humans. Magnesium deficiency causes hypocalcemia in humans while the hypocalcemia is not observed in magnesium-deficient rats. In the present study, we examined the effect of pair-feeding or magnesium deficiency with calcium deficiency on insulin sensitivity in rats. Rats were pair-fed control diets or magnesium and/or calcium deficient diets for three weeks before intravenous insulin tolerance test (IVITT).

Magnesium deficiency significantly ( $P < 0.05$ ) increased glucose disappearance rate (Kitt) from plasma and decreased area under the curve (AUC) of plasma glucose in IVITT. Pair-feeding did not affect Kitt and AUC. Magnesium and calcium deficiency enhanced insulin sensitivity as well as magnesium deficiency alone. These results suggest that magnesium deficiency enhances insulin sensitivity not via the reduction of feed intake and the disturbance of calcium metabolism.

マグネシウム (Mg) は、解糖系における7つの酵素をはじめとする300以上の酵素反応の補因子としてはたらく、生化学的に重要な役割を担っている<sup>1)</sup>。したがって、Mg欠乏は糖代謝に悪影響を及ぼすことが考えられる。

Mg欠乏は糖尿病との関連が強いことが示唆されている。糖尿病患者においては、西洋の食習慣によるMg摂取が少ないことやMgの再吸収低下に伴う尿中Mg排泄増加が原因となり、血中や細胞内のMg濃度が低い状態にある<sup>2,3)</sup>。また、ヒトではMg不足によりインスリン感受性が低下する<sup>4)</sup>。これに対して、ラットではMg欠乏はインスリン感受性を高めることが報告されている。Kimuraら<sup>5)</sup>は、Mg欠乏ラットは血漿中グルコース濃度が低いが、血漿中インスリン濃度は対照ラットと比べて差がないことを報告している。Legrandら<sup>6)</sup>やReisら<sup>7)</sup>は、Mg欠乏ラットでは静脈内グルコース負荷試験における血中グルコースの消失速度が高まることを示している。また、Reisら<sup>8)</sup>は、静脈内インスリン負荷試験の結果から、Mg欠乏ラットではインスリン感受性が高まることを示唆している。このように、ヒトとラットとではMg欠乏がインスリン感受性に及ぼす影響が異なる。

Mg欠乏ラットでは飼料摂取量が減少する<sup>5,6)</sup>。また、制限給餌したラットではインスリン依存性のグルコーストランスporterであるGLUT4のトランスロケーションが促進されることが報告されている<sup>9)</sup>。したがって、Mg欠乏ラットでは飼料摂取量減少によりインスリン感受性が高まり、細胞内へのグルコース取り込みが増加する可能性がある。

Mg欠乏がカルシウム (Ca) 代謝に及ぼす影響はヒトとラットで異なる。ヒトではMg欠乏は低Ca血症を引き起こす<sup>10)</sup>のに対して、ラットでは、Mg欠乏は高Ca血症を引き起こす<sup>5,11,12)</sup>ことが知られている。また、ヒトにおいてCa不足はインスリン感受性を低下させることが報告されている<sup>13)</sup>。したがって、Mg欠乏がCa代謝に及ぼす影響の相違によって、ヒトとラットにおけるインスリン感受性に及ぼす効果が異なる可能性がある。さらに、Bussiereら<sup>12)</sup>は、ラットにおいて、典型的なMg欠乏症である耳部の炎症反応がCa欠乏により抑制されることを報告しており、Mg欠乏の効果はCa欠乏を併発させると消失する可能性がある。

本実験では、対照飼料の制限給与 (Pair-fed) ならびに、

\*所在地：京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

Mg および Ca 欠乏 (Mg-Ca 欠乏) 飼料の給与がインスリン感受性に及ぼす影響について検討した。

## 材料と方法

4 週齢の SD 系雄ラット 35 匹を 7 匹ずつ、対照群 (C 群)、Pair-fed 群 (P 群)、Ca 欠乏群 (CD 群)、Mg 欠乏群 (MD 群)、Mg-Ca 欠乏群 (MCD 群) の 5 群に割り当てた。各供試飼料は AIN-93G に準拠し (Table 1)、Mg 欠乏飼料では AIN-93G ミネラルミックスから Mg を除いた。また、Ca 欠乏飼料はミネラルミックス中 Ca 含量を 10% に減じたものとした<sup>14)</sup>。1 週間、AIN-93G 飼料による馴致を行った後、各試験飼料を給与した。C 群には対照飼料を自由摂取させた。それ以外の 4 群については、飼料摂取量

**Table 1** The composition of experimental diets (g/kg diet)

	Control	Ca deficient	Mg deficient	Mg-Ca deficient
Corn starch $\beta$	383.61	394.86	385	396.25
Casein	200	200	200	200
Corn starch $\alpha$	132	132	132	132
Sucrose	100	100	100	100
Corn oil	70	70	70	70
Cellulose	50	50	50	50
Mineral Mix (Mg, Ca free)	35	35	35	35
MgO	1.39	1.39	0	0
CaCO <sub>3</sub>	12.5	1.25	12.5	1.25
Vitamin mix	10	10	10	10
L-cystine	3	3	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5
Dietary Mg*	0.464	0.485	0.149	0.144
Dietary Ca*	4.528	0.532	4.495	0.458

\* : The mineral content was measured by atomic absorption spectrophotometry.

を同量にするために、前日の飼料摂取量が最少だった群と同量の飼料を給与した。また、総ての群において、純水を自由摂取させた。

試験飼料の給与開始から 3 週間後に、静脈内インスリン負荷試験 (IVITT) を行った。すなわち、15 時間絶食させたラットの尾静脈から約 20  $\mu$ L 採血を行った (インスリン投与 0 分)。続いて、0.75 U/kg BW のウシインスリン (Wako) を尾静脈内に投与し、インスリン投与後 10、20、30、60 分の血液を同様に採取した。採取した血液を 3000 rpm で 5 分間遠心して血漿を得た。血漿中グルコース濃度は市販のキット (グルコース CII-テストワコー、Wako) で測定した。インスリン投与後 0、10、20 分の血漿中グルコース濃度の値から、グルコース消失速度 (Kitt) を Borona ら<sup>15)</sup> の方法に基づいて算出した。すなわち、0、10、20 分の血漿中グルコース濃度をそれぞれ自然対数に変換したのから最小二乗法で回帰直線を描き、その直線から求めた血漿中グルコース濃度の半減期 (T) を算出し、 $Kitt = 0.625/T$  の式から Kitt を求めた。さらに、血漿中グルコース濃度の経時変化から、曲線下面積 (AUC) を算出した。

IVITT から 3 日後に、エーテル麻酔下でヘパリン処理した注射器を用いて、腹部大動脈から採血し、血漿中 Mg および Ca 濃度を原子吸光光度計 (AA6600F, SHIMADZU) を用いて測定した。また、腓腹筋を採取し、その重量を測定した。

各群間における平均値の差の検定には Tukey-Kramer の多重比較検定を用いた。すべての検定は  $P < 0.05$  を有意とした。

## 結果と考察

飼料摂取量は、制限給与した 4 群では C 群に比べて有意に低い値を示した (Table 2)。ほとんどの試験日で MD 群における飼料摂取量が最少となり、本実験における制限給与はほぼ MD 群に対する pair-feeding となった。増体重は、制限給与した 4 群では C 群に比べて有意な低値を示した。制限給与した群の中では、MD 群の増体重が最も小さく、C 群、P 群と比べて有意に低い値であった。一方、P 群、CD 群、MCD 群の間には差は認められなかった (Table 2)。Mg 欠乏ラットにおいては増体重の減少が生じることが報告されている<sup>5)</sup>が、飼料摂取量は制限給与した 4

**Table 2** Food intake and weight gain in rats fed the experimental diets

	Food intake (g/day)	Weight gain (g/day)
C	18.6 $\pm$ 0.5 <sup>a</sup>	7.6 $\pm$ 0.3 <sup>a</sup>
P	12.8 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	4.1 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup>
CD	12.7 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>
MD	12.5 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.2 $\pm$ 0.1 <sup>c</sup>
MCD	12.6 $\pm$ 0.1 <sup>b</sup>	3.6 $\pm$ 0.1 <sup>bc</sup>

Values are expressed as mean  $\pm$  SE (n = 7).

The different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

C; Control group, P; Pair-fed control group, MD; Mg deficient group, CD; Ca deficient group, MCD; Mg and Ca deficient group. Initial body weights (kg) : 127.3  $\pm$  3.2 in C, 130.7  $\pm$  3.7 in P, 129.9  $\pm$  3.3 in MD, 132.1  $\pm$  3.2 in CD and 132.1  $\pm$  4.4 in MCD.

群で差がなかったことから、Mg 欠乏ラットにおける増体重の減少は、飼料摂取量の減少のみに起因せず、かつ Ca 欠乏の影響を受けることが考えられる。

血漿中 Mg 濃度は、Mg 欠乏飼料を与えた MD 群、MCD 群でそれぞれ C 群、P 群、CD 群に比べて有意な低値を示した (Table 3)。血漿中 Ca 濃度は、MD 群では C 群、P 群に比べて差は認められなかった。また、CD 群では有意ではないが低値を示し、MCD 群は C 群、P 群、MD 群に比べて有意な低値を示した (Table 3)。

本実験では、試験開始から約 1 週間で総ての MD 群のラットにおいて耳根部の炎症反応が観察された (データは示さず)。しかし、MCD 群のラットにおいては試験開始から約 2 週間経過しても 4 匹にしか炎症反応が観察されず、試験期間中炎症反応が認められないラットも存在した。したがって、Mg 欠乏により生じる炎症反応は Ca 不足が加

**Table 3** Plasma Mg and Ca concentrations in rats fed the experimental diets

	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)
C	19.4 ± 1.4 <sup>a</sup> (6)	95.1 ± 4.4 <sup>a</sup> (5)
P	18.8 ± 0.9 <sup>a</sup> (7)	96.6 ± 2.7 <sup>a</sup> (7)
CD	22.1 ± 1.0 <sup>a</sup> (7)	84.9 ± 3.4 <sup>ab</sup> (7)
MD	6.9 ± 0.8 <sup>b</sup> (7)	97.4 ± 4.1 <sup>a</sup> (7)
MCD	4.9 ± 0.8 <sup>b</sup> (5)	71.3 ± 3.7 <sup>b</sup> (6)

Values are expressed as mean ± SE (the number of rats). The different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). Experimental groups were shown in Table 2.

**Table 4** The parameters of insulin sensitivity in rats fed the experimental diets

	Mg (mg/L)	Ca (mg/L)
C	19.4 ± 1.4 <sup>a</sup> (6)	95.1 ± 4.4 <sup>a</sup> (5)
P	18.8 ± 0.9 <sup>a</sup> (7)	96.6 ± 2.7 <sup>a</sup> (7)
CD	22.1 ± 1.0 <sup>a</sup> (7)	84.9 ± 3.4 <sup>ab</sup> (7)
MD	6.9 ± 0.8 <sup>b</sup> (7)	97.4 ± 4.1 <sup>a</sup> (7)
MCD	4.9 ± 0.8 <sup>b</sup> (5)	71.3 ± 3.7 <sup>b</sup> (6)

Values are means ± SE for 7 rats except for rats in C group and MD group (n = 6).

The different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). Experimental groups were shown in Table 2.

AUC: Area under the curve of plasma glucose concentration after insulin administration.

Kitt: The constant rate for plasma glucose disappearance after insulin administration.

わると低減することが示された。これは過去の報告<sup>12)</sup>を支持する結果であった。

MD群ではKittは高値を示し、AUCは低値を示した (Table 4)。しかし、KittおよびAUCはC群とP群との間で有意な差は認められなかった。MCD群では、MD群と同様、Kittは高値を、AUCは低値を示したが、MD群と比べて有意な差は認められなかった。KittおよびAUCの結果から示唆される、各群のインスリン感受性の変化をTable 5に示す。

このように、Mg欠乏によりインスリン感受性が高まることが示唆された。これは過去の報告<sup>8)</sup>を支持する結果であった。また、本試験程度の制限給餌はインスリン感受性に影響を及ぼさないことが示唆され、Mg欠乏ラットにおけるインスリン感受性亢進は、Mg欠乏の結果生じる飼料摂取量減少に起因しないことが示された。さらに、Mg欠乏により血漿中Ca濃度は変化しなかったことから (Table 3)、Mg欠乏によるインスリン感受性亢進は、血中Ca濃度とは関連がないことが考えられる。一方、MCD群では、MD群に比べて血漿中Ca濃度が低下した (Table 3) にもかかわらず、MD群と同様にインスリン感受性が高まり、インスリン感受性は両群で差が認められなかった。このことから、Mg欠乏ラットにおけるインスリン感受性亢進はCaの栄養状態に依存せず起こることが示唆される。

腓腹筋の重量はC群で他の群と比べ有意に高く、MD群において、他の制限給与した3群と比べて有意に低い値

**Table 5** The change of insulin sensitivity compared with C group in each group

	Insulin sensitivity
P	→
CD	→
MD	↑
MCD	↑

→ : comparable to C group, ↑ : higher than C group.

**Table 6** The gastrocnemius muscle weight in rats fed the experimental diets

	Gastrocnemius muscle weight (g)
C	1.34 ± 0.04 <sup>a</sup>
P	1.13 ± 0.04 <sup>b</sup>
CD	1.10 ± 0.04 <sup>b</sup>
MD	0.85 ± 0.06 <sup>c</sup>
MCD	1.06 ± 0.02 <sup>b</sup>

Values are expressed as mean ± SE (n = 7).

The different superscripts indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). Experimental groups were shown in Table 2.

を示した (Table 6)。一方、MCD群における腓腹筋重量はP群ならびにCD群との間に差は認められなかった。このことから、ラットではMg欠乏により腓腹筋重量が減少し、これはCa不足により回復することが示唆された。

全身のインスリン作用を介したグルコース取り込みのうち、約80%は筋肉によるものであり、全身のインスリン感受性には筋肉が重要な役割を果たしている<sup>16)</sup>。さらに、筋肉量の減少とインスリン感受性の低下とは関連があることも報告されている<sup>17)</sup>。本実験ではMg欠乏によりインスリン感受性が増強したにも関わらず、筋肉量は減少した。この結果は矛盾しているかもしれない。しかし、Reisら<sup>8)</sup>は、Mg欠乏ラットにおいて全身のインスリン感受性は増強するが、筋肉のインスリン作用は変化しないことを報告している。したがって、Mg欠乏によるインスリン感受性増強において、筋肉の寄与は小さいと考えられる。

本試験の結果から、Mg欠乏に起因する体重増加抑制、腓腹筋重量減少、そして耳根部の炎症反応は、Ca不足により軽減することが示された。また、Mg欠乏ラットでは高脂血症が生じるが<sup>12)</sup>、これもCa欠乏により軽減されることが報告されている<sup>12)</sup>。一方、Mg欠乏により生じる血漿中Mg濃度低下にはCa不足は影響しなかった。したがって、Ca不足はMg欠乏を軽減しないにもかかわらず、その効果を抑制することが示された。

このように、Mg欠乏の効果の一部はCaの影響を受けることが考えられる。実際、MgはCaに対する天然の拮抗剤として知られており<sup>18)</sup>、この関係が、Ca不足によるMg欠乏症軽減の一因であると考えられる。しかし、Mg欠乏により生じるインスリン感受性亢進はCa不足の影響を受けないことが本実験において示された。したがって、炎症反応のような典型的なMg欠乏症やMg欠乏による腓腹筋重量の減少と、Mg欠乏によるインスリン感受性の

増強とは異なる機序によって起こると考えられる。

本実験の結論として、Mg 欠乏ラットではインスリン感受性が高まり、これは飼料摂取量の減少が原因ではないこと、また、Ca 欠乏の影響を受けないことが示唆された。Mg 欠乏ラットにおいてなぜインスリン感受性が高まるかについては、直接の原因を本実験では示せず、いまだ詳細なメカニズムは不明である。今後の更なる研究が必要であると考えられる。

### 参考文献

- 1) Kimura M (2007) Overview of Magnesium Nutrition. in *New Perspectives in Magnesium Research*. Nutrition and health, eds. by Nishizawa Y, Morii H, Durlach J, Springer, London : pp. 69–93.
- 2) Sjogren A, Floren CH, Nilsson A (1988) Magnesium, potassium and zinc deficiency in subjects with type II diabetes mellitus. *Acta Med Scand* 224 : 461–466.
- 3) Paolisso G, Barbagallo M (1997) Hypertension, diabetes mellitus, and insulin resistance. *Am J Hypertens* 10 : 346–355.
- 4) Humphries S, Kushner H, Falkner B (1999) Low dietary magnesium is associated with insulin resistance in a sample of young, nondiabetic Black Americans. *Am J Hypertens* 12 : 747–756.
- 5) Kimura Y, Murase M, Nagata Y (1996) Change in glucose homeostasis in rats by long-term magnesium-deficient diet. *J Nutr Sci Vitaminol* 42 : 407–422.
- 6) Legrand C, Okitolonda W, Pottier AM, Lederer J, Henquin JC (1987) Glucose homeostasis in magnesium-deficient rats. *Metabolism* 36 : 160–164.
- 7) Reis MA, Latorraca MQ, Carneiro EM, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA, Reyes FG (2001) Magnesium deficiency improves glucose homeostasis in the rat: studies *in vivo* and in isolated islets *in vitro*. *Br J Nutr* 85 : 549–552.
- 8) Reis MA, Reyes FG, Saad MJ, Velloso LA (2000) Magnesium deficiency modulates the insulin signaling pathway in liver but not muscle of rats. *J Nutr* 130 : 133–138.
- 9) Dean DJ, Brozinick JT Jr, Cushman SW, Cartee GD (1998) Calorie restriction increases cell surface GLUT-4 in insulin-stimulated skeletal muscle. *Am J Physiol* 275 : E957–E964.
- 10) Suh SM, Tashjian AH Jr, Matsuo N, Parkinson DK, Fraser D (1973) Pathogenesis of hypocalcemia in primary hypomagnesemia: normal end-organ responsiveness to parathyroid hormone, impaired parathyroid gland function. *J Clin Invest* 52 : 153–160.
- 11) Zimmermann P, Weiss U, Classen HG, Wendt B, Eppler A, Zollner H, Temmel W, Weger M, Porta S (2000) The impact of diets with different magnesium contents on magnesium and calcium in serum and tissues of the rat. *Life Sci* 67 : 949–958.
- 12) Bussiere FI, Gueux E, Rock E, Mazur A, Rayssiguier Y (2002) Protective effect of calcium deficiency on the inflammatory response in magnesium-deficient rats. *Eur J Nutr* 41 : 197–202.
- 13) Pittas AG, Lau J, Hu FB, Dawson-Hughes B (2007) The role of vitamin D and calcium in type 2 diabetes. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 92 : 2017–2029.
- 14) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr (1993) 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.
- 15) Bonora E, Moghetti P, Zaccaro C, Cigolini M, Quarenna M, Cacciatori V, Corgnati A, Muggeo M (1989) Estimates of *in vivo* insulin action in man: comparison of insulin tolerance tests with euglycemic and hyperglycemic glucose clamp studies. *J Clin Endocrinol Metab* 68 : 374–378.
- 16) DeFronzo RA, Gunnarsson R, Björkman O, Olsson M, Wahren J (1985) Effects of insulin on peripheral and splanchnic glucose metabolism in noninsulin-dependent (type II) diabetes mellitus. *J Clin Invest* 76 : 149–155.
- 17) David BD, Burak S, Ken O (2006) Muscle Mass and Insulin Sensitivity in Children and Adolescents. *Horm Res* 66 (Suppl. 1) : 79–84.
- 18) Iseri LT, French JH (1984) Magnesium: nature's physiologic calcium blocker. *Am Heart J* 108 : 188–193.