

ダール食塩感受性ラットにおけるマグネシウムの 心筋内エネルギー代謝改善効果 —³¹P NMR 法による検討—

秋田 信之¹, 羽根田 俊¹, 田中 邦雄², 菊池 健次郎¹

¹旭川医科大学第一内科 ²同実験実習機器センター

はじめに

マグネシウム (Mg) は生体の細胞内に豊富に存在する陽イオンであり, 多くの酵素活性化の媒体として働いている. ATP 依存性の酵素反応には Mg をキレートした ATP が基質となるため, 高エネルギー化合物の合成経路や電子伝達系にも Mg が必須である. それゆえ, Mg は心筋や血管平滑筋をはじめ, 神経, 内分泌の機能調節を介して各種疾患の成因や病態形成に深くかかわっている¹⁾. Altura ら¹⁾は, ラットに Mg 欠乏食を投与すると血圧が上昇し, この血圧上昇は血中 Mg が減少することにより, 血管平滑筋細胞収縮に必須である細胞内カルシウム (Ca) イオン濃度上昇を抑制できないことによると報告している. また, 実験的および臨床的な虚血性心疾患や心不全時に心筋内 Mg 含有量や血清 Mg 濃度が減少すること^{2)~4)}が明らかとなり, それらの病態における Mg 投与の有効性が検討されているが, 一定の結論が得られていない^{2),3)}.

ダール食塩感受性 (Dahl salt sensitive ; DS) ラットは, 高塩食により血圧の上昇とともに代償性に心肥大を生じるために, 食塩感受性高血圧や心肥大モデルとして注目されている^{5),6)}.

最近, 我々は, 高塩食により血圧上昇を来した DS ラットにおいて血管反応性が障害されていること, Mg 慢性投与が血管反応性を改善させるとともに血圧上昇も抑制することを報告した⁷⁾. しかし, Mg 投与の心肥大に対する効果および心筋エネルギー代謝動態に対する効果についての検討はなされていない. そこで, 今回, 我々は Mg 投与の肥大心における心筋エネルギー代謝動態に対する効果を明らかにするために, DS ラット摘出灌流心臓において心周期内エネルギー変動および虚血再灌流時エネルギー代謝に対する Mg の急性および慢性効果, さらにその際の細胞内 Mg 変動を ³¹P-核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance ; NMR) 法を用いて検討した.

対象・方法

1. 対象動物

5 週齢雄性 DS (Dahl/Iwai) ラット 58 匹を, 0.3% 食塩含有餌に蒸留水を飲水させた群 (低塩群), 8% 食塩含有餌に蒸留水を飲水させた群 (高塩群), 8% 食塩含有餌に 15.4 g/l Mg 濃度のアスパラギン酸 Mg を含む飲料水を飲水させた群 (高塩・Mg 慢性投与群) の 3 群に分

キーワード ³¹P NMR spectroscopy, Dahl rat, perfused heart, energy metabolism, magnesium

け、同一条件で4週間飼育した。

2. 血圧, 心重量, 血中イオン化 Ca 値および Mg 値測定実験

9週齢 DS ラット 18匹で tail cuff 法により収縮期血圧を, 更に体重, 心重量を測定した。同時に, 血中イオン化 Ca 値および Mg 値を選択的イオン電極法 (NOVA 8, NOVA Biomedical) を用いて測定した。

3. 心周期内エネルギー代謝動態実験

9週齢 DS ラット 20匹をペントバルビタールによる腹腔内麻酔後, 心臓を摘出し Langendorff 法で定圧灌流 (100 cm H₂O) した。灌流液として 1.2 mM Mg を含む Krebs-Henseleit 灌流液 (37°C, pH 7.4) を用い, 95% O₂-5% CO₂ の混合ガスで通気した。右心室内にペースングカテーテルを挿入し, 電気刺激装置 (日本光電 SEN-3301) およびアイソレータ (日本光電 SS-302J) を用いて 300 拍/分で右室ペースングを行った。また, 左心室内にラテックスバルーンを挿入し, 圧トランスデューサー (日本光電 TP-200T) によって左室内圧を測定した。なお, 高塩群の一部で摘出心臓を 4.8 mM Mg を含む灌流液に切り換えることにより Mg の急性投与を行った群 (高塩・Mg 急性投与群) も作成した。

心筋エネルギー代謝動態は ³¹P-NMR 法 (日本電子製 GX-270-FT-NMR spectrometer) を用いて計測した。静磁場強度 6.3 tesla のもとでリン共鳴周波数は 109.25 MHz であり, RF パルス幅を 10 マイクロ秒とした。心周期内エネルギー代謝動態は我々が既に報告した RF パルスをトリガー信号とするペースング同期法⁸⁾により測定した。本実験では, 300 拍/分のペースング周期のもとで 1 心周期 (0.2 秒) 内の 8 等分割位相について, 各位相当たり RF パルス繰り返し時間 425 ミリ秒で 480 回の信号積算 (3.4 分間) を行い, 8 位相のスペクトルを得るのに 27.2 分を要した。8 位相で観測し

た NMR スペクトルについて無機リン (Pi), クレアチンリン酸 (PCr) および β-ATP の各ピークの面積を計測して, 各リン酸化合物の心周期内変動を検討した。なお, 本実験で用いた灌流液には 1.2 mM も KH₂PO₄ が含まれており, 細胞内 Pi ピークの左側に細胞外 Pi ピークとして観察される。細胞外 Pi ピークはほとんど変化しないので, これを含めた全体の Pi ピーク面積を求めた⁸⁾。また, 細胞内 pH は PCr に対する細胞内 Pi ピークの化学シフトから求めた。

4. 虚血再灌流実験

9週齢 DS ラット 20匹から摘出した心臓を Langendorff 法で 15 分間の通常灌流後に 15 分間虚血 (global ischemia) にし, その後 15 分間再灌流を行った。高塩・Mg 急性投与群では虚血 5 分前に 1.2 mM Mg を含む灌流液から 4.8 mM Mg を含む灌流液に切り換え, 再灌流時に再び 1.2 mM Mg を含む灌流液にもどした。

虚血再灌流実験では, RF パルス繰り返し時間を 0.5 秒として心周期に無関係に 600 回の信号積算を行い, 5 分間ごとに NMR スペクトルを観測して β-ATP のピーク面積を, また前述のように細胞内 Pi と PCr の化学シフトの差から心筋細胞内 pH を求めた。さらに, 左室内圧を虚血前 5 分, 0 分, 虚血後 15 分および再灌流後 15 分の時点で測定した。

5. 心筋細胞内イオン化 Mg ([Mg²⁺]_i) 濃度

[Mg²⁺]_i 濃度は NMR スペクトルの α-ATP と β-ATP の共鳴周波数の差 (δ_X) から算出した⁹⁾。

すなわち,

$$[\text{Mg}^{2+}]_i = K_d (\Phi^{-1} - 1)$$

$$\Phi = \frac{[\text{ATP}]_{\text{free}}}{[\text{ATP}]_{\text{total}}} = \frac{\delta_X - \delta_1}{\delta_2 - \delta_1}$$

δ₁, δ₂ はそれぞれ Mg-ATP および ATP 単独

2000年6月5日受理 2000年7月6日改訂

別刷請求先 〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1 旭川医科大学第一内科 秋田信之

(Mg free) における ATP の α 位と β 位の共鳴周波数の差である. さらに解離定数 K_d には細胞内の pH によって補正值 (F) を乗じた¹⁰⁾.

$$F = \frac{1 + 10^{6.5 - \text{pH}}}{1 + 10^{6.5 - 7.2}}$$

6. 統計学的処置

数値は平均値 \pm 標準誤差で表した. 有意差検定には対応のある t 検定あるいは多量比較検定 (Bonferroni/Dunn) を用い, 危険率 5% 未満を有意差ありとした.

結 果

1. 血圧, 心重量, 血中イオン化 Ca 値およびイオン化 Mg 値

体重は高塩・Mg 慢性投与群で低塩群, 高塩群に比し, 軽度ではあるが有意に低値であった (Table 1). 収縮期血圧は高塩食により有意に上昇し, Mg 慢性投与はその上昇を有意に抑制した (Table 1). また, 心重量および心重量対体重比は高塩食により有意に増加し, Mg 慢性投与はこれらを有意に低下させた (Table 1).

血中イオン化 Ca 値は低塩群, 高塩群, 高塩・Mg 慢性投与群の各群間で有意差を認めなかった. 血中イオン化 Mg 値は高塩食・Mg 慢性投与群で低塩群および高塩群に比し有意に高値であった (Table 1).

2. 心周期内エネルギー変動および $[\text{Mg}^{2+}]_i$ 値変動

Fig. 1 に示すように, ペーシング周期を 0.2 秒に設定し, 拡張末期を 0 秒として心周期内 8 位相において得られた NMR スペクトルより各種リン酸化合物の心周期内変動を観測した. Pressure-rate product で表す心仕事量は, 低塩群に比し高塩群, 高塩・Mg 慢性投与群および高塩・Mg 急性投与群 (それぞれ 14.7 ± 0.4 , 10.3 ± 0.2 , 10.1 ± 0.2 , 10.1 ± 0.3 mmHg \times min⁻¹ $\times 10^3$) で有意に低下していた. Fig. 2 に各群の NMR スペクトルから得られた Pi, PCr, β -ATP の心周期内変動を示した. すべての群において, 心収縮に伴って Pi の増加および PCr, β -ATP の減少が生じ, その後筋弛緩に伴って前値に回復した. 心収縮に伴う各リン酸化合物の変化は低塩群に比し高塩群で急峻で, 高塩・Mg 慢性投与群および高塩・Mg 急性投与群で

Table 1. Effect of Long-term Treatment with Magnesium on Body Weight, Systolic Blood Pressure, Ventricular Weight and Levels of Blood Ca^{2+} and Mg^{2+}

	Low salt group	High salt group	High salt · chronic Mg group
Body weight (g)	303 \pm 6	285 \pm 9	268 \pm 8***
Systolic blood pressure (mmHg)	109 \pm 4	188 \pm 5**	152 \pm 5***
Whole heart weight (mg)	872 \pm 10	1163 \pm 13**	963 \pm 15***
LV weight (mg)	699 \pm 10	982 \pm 12**	801 \pm 13***
RV weight (mg)	173 \pm 2	181 \pm 2*	162 \pm 3**
$\frac{\text{Whole heart weight}}{\text{Body weight}} \times 10^3$	2.89 \pm 0.08	4.10 \pm 0.22**	3.60 \pm 0.13***
$\frac{\text{LV weight}}{\text{Body weight}} \times 10^3$	2.31 \pm 0.06	3.46 \pm 0.19**	2.99 \pm 0.11***
blood Ca^{2+} level (mM)	1.35 \pm 0.03	1.32 \pm 0.01	1.28 \pm 0.02
blood Mg^{2+} level (mM)	0.41 \pm 0.03	0.50 \pm 0.01	0.73 \pm 0.05*#

Values are means \pm S.E. of 6 hearts in each group. LV: left ventricle, RV: right ventricle

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with low salt group

$p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with high salt group

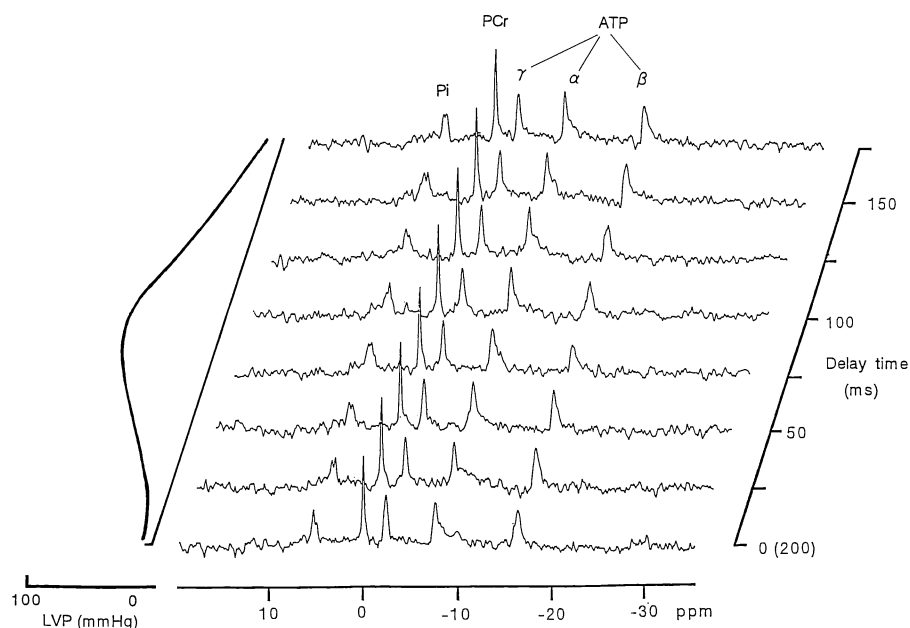


Fig. 1. Representative NMR spectra observed at eight positions during one cardiac cycle in rat fed a low salt diet. The left ventricular pressure (LVP) was also shown. The peaks of Pi, PCr and ATP were clearly seen in every spectrum.

はそれらの変化は緩やかであった。細胞内 pH はすべての群において心周期による変動はなく、各群間にも有意な差を認めなかった (Fig. 2)。

次に、リン酸化合物の心周期内における最大変動幅を求めることにより心筋内エネルギー代謝動態を検討した。Fig. 3 に示すように、低塩群では Pi 変動が $10.5 \pm 2.7\%$ 、PCr 変動が $7.9 \pm 0.9\%$ 、 β -ATP 変動が $8.6 \pm 0.7\%$ であったのに対し、高塩群では Pi 変動が $14.5 \pm 4.2\%$ 、PCr 変動が $10.5 \pm 2.7\%$ と増大傾向を、 β -ATP 変動が $14.4 \pm 4.8\%$ と有意に増大していた。一方、高塩・Mg 慢性投与群では高塩群に比し、Pi 変動が $9.3 \pm 3.8\%$ 、PCr 変動が $9.5 \pm 2.4\%$ と減少傾向を、 β -ATP 変動が $7.3 \pm 1.6\%$ と有意な減少を認めた。さらに、高塩・Mg 急性投与群では高塩群に比し、Pi 変動が $13.0 \pm 1.3\%$ 、PCr 変動が $8.5 \pm 0.7\%$ と減少傾向を、 β -ATP

変動が $8.0 \pm 0.9\%$ と有意な減少を認めた。

$[Mg^{2+}]_i$ 値はすべての群において心周期内変動は認められなかった (Table 2)。さらに、 $[Mg^{2+}]_i$ 値はすべての位相において低塩群、高塩群および高塩・Mg 慢性投与群の 3 群間に差は認めず、高塩・Mg 急性投与群において他の 3 群に比し約 65% 有意に高値であった (Table 2)。

3. 虚血再灌流時エネルギー変動および $[Mg^{2+}]_i$ 値変動

心仕事量は虚血前 5 分の時点で、高塩群で低塩群に比し有意に大で、高塩・Mg 慢性投与群で高塩群に比し有意な低下を認めた (Table 3)。また、虚血前 5 分の時点で 1.2 mM Mg を含む灌流液より 4.8 mM Mg を含む灌流液に切り換えた高塩・Mg 急性投与群では虚血前 0 分の時点で心仕事量が他の 3 群に比し有意に低下していた (Table 3)。心仕事量はすべての群

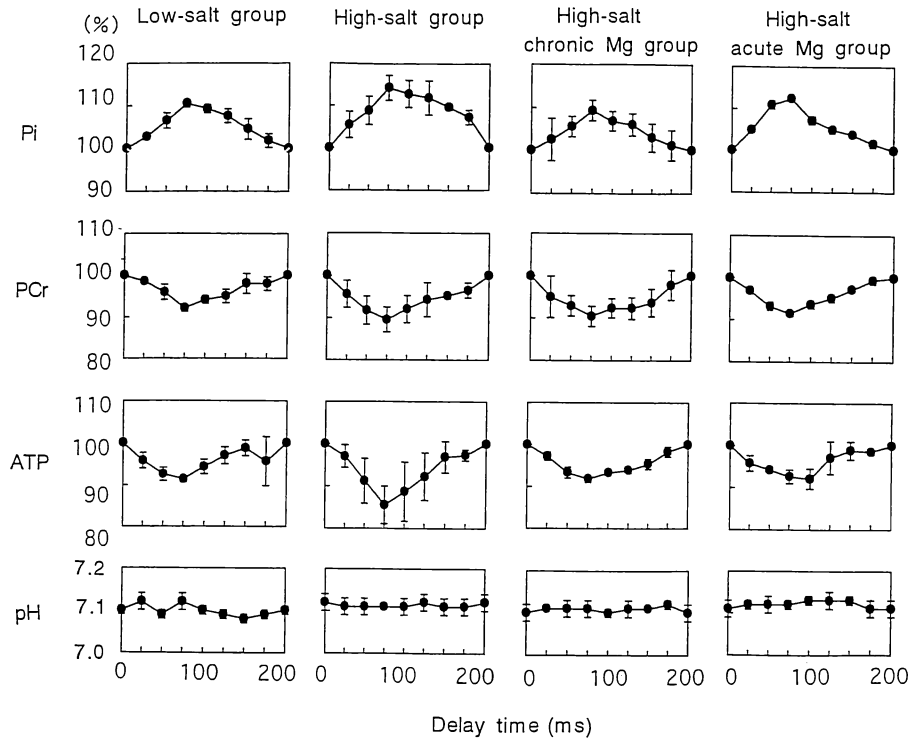


Fig. 2. Changes in the relative concentrations of phosphate compounds and pH during a cardiac cycle. In all group, the level of Pi increased, but the levels of PCr and ATP decreased at the peak of systole, and then returned to the initial levels at the end of diastole. Cyclical change in the level of pH was not observed.

において虚血後速やかにゼロとなり、虚血再灌流後15分の時点では4群間で差がなく、また虚血前5分の時点に対する回復率も4群間で差を認めなかった (Table 3)。

Fig. 4に虚血再灌流時のNMRスペクトルの代表例を示した。虚血によりATPは軽度な減少を、PCrは著明な減少を、一方、Piは著明な増加を示し、再灌流によりそれらは虚血前値に回復した。心筋内のpHはすべての群で虚血により低下し、再灌流により回復した (Table 4)。虚血によるpH低下の程度は、高塩群で低塩群に比し有意に大であり、再灌流時のpHの回復も有意に悪かった (Table 4)。高塩・Mg慢性投与群および高塩・Mg急性投与群では

高塩群に比し、虚血時のpHの低下が有意に軽度で、再灌流時のpHの回復も良好であった (Table 4)。

ATPはすべての群において虚血により減少し、再灌流により回復した (Fig. 5)。低塩群において、ATPは虚血15分の時点で虚血前値の $77.2 \pm 0.7\%$ まで低下し、再灌流15分の時点で虚血前値の $87.4 \pm 0.3\%$ まで回復した (Fig. 5)。高塩群において、ATPは虚血15分の時点で虚血前値の $63.1 \pm 0.3\%$ と低塩群に比し有意に低下し、再灌流15分の時点における回復も $77.6 \pm 0.4\%$ と低塩群に比し有意に悪かった (Fig. 5)。一方、高塩・Mg慢性投与群では、虚血15分の時点のATP低下は虚血前

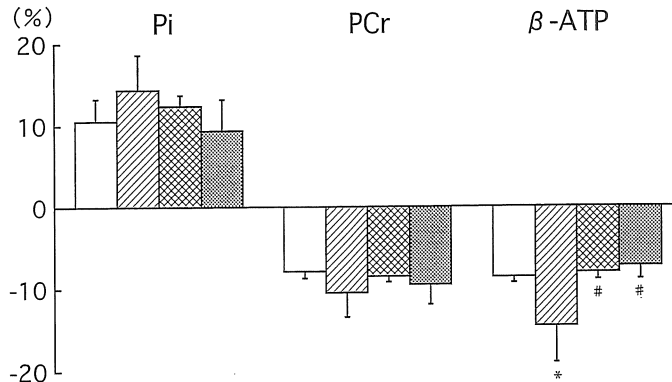


Fig. 3. Maximum changes in the relative concentrations of phosphate compounds during a cardiac cycle. The symbols of \square , \square (diagonal lines), \square (cross-hatched) and \square (dotted) represent low salt group, high salt group, high salt · chronic Mg group and high salt · acute Mg group, respectively. * $p < 0.05$: compared with low salt group, # $p < 0.05$: compared with high salt group. The magnitude of fluctuation of ATP level during a cardiac cycle significantly increased in high salt group than in low salt group. Both chronic Mg treatment and acute Mg treatment significantly decreased this magnitude compared with high salt group.

Table 2. Change of $[Mg^{2+}]_i$ Level during a Cardiac Cycle at Ventricular Pacing

	Low salt group	High salt group	High salt · chronic Mg group	High salt · acute Mg group
$[Mg^{2+}]_i$ (mM)				
phase 1	0.482 ± 0.002	0.478 ± 0.004	0.482 ± 0.002	$0.790 \pm 0.006^{**\#\#\$\$}$
2	0.480 ± 0.003	0.478 ± 0.002	0.484 ± 0.002	$0.786 \pm 0.004^{**\#\#\$\$}$
3	0.484 ± 0.002	0.480 ± 0.003	0.486 ± 0.002	$0.786 \pm 0.007^{**\#\#\$\$}$
4	0.484 ± 0.002	0.478 ± 0.002	0.484 ± 0.002	$0.786 \pm 0.004^{**\#\#\$\$}$
5	0.480 ± 0.003	0.478 ± 0.002	0.486 ± 0.002	$0.782 \pm 0.005^{**\#\#\$\$}$
6	0.484 ± 0.002	0.478 ± 0.003	0.484 ± 0.002	$0.782 \pm 0.008^{**\#\#\$\$}$
7	0.486 ± 0.002	0.482 ± 0.004	0.486 ± 0.002	$0.786 \pm 0.004^{**\#\#\$\$}$
8	0.486 ± 0.002	0.480 ± 0.003	0.484 ± 0.002	$0.790 \pm 0.006^{**\#\#\$\$}$

Values are means \pm S.E. of 5 hearts in each group. Phase 1 was obtained at an end-diastolic point and the following phases were delayed every 25 ms.

** $p < 0.01$, compared with low salt group

$p < 0.01$, compared with high salt group

\\$ $p < 0.01$, compared high salt · chronic Mg group

値の $70.7 \pm 0.6\%$ と高塩群に比し有意に軽度で、再灌流 15 分の時点での回復も虚血前値の $85.8 \pm 0.3\%$ と高塩群に比し有意に良好であっ

た (Fig. 5). また、高塩 · Mg 急性投与群においても、虚血 15 分の時点の ATP の低下は虚血前値の $75.6 \pm 0.5\%$ と高塩群に比し有意に軽

Table 3. Changes of Pressure-rate Product during Preischemia, Ischemia and Reperfusion

		Low salt group	High salt group	High salt · chronic Mg group	High salt · acute Mg group
pressure-rate product (mmHg × min ⁻¹ × 10 ³)					
preischemia	5 min	19.5 ± 0.6	21.6 ± 0.4*	19.0 ± 0.2 [#]	21.8 ± 0.3*
ischemia	0 min	19.5 ± 0.3	21.4 ± 0.4*	18.9 ± 0.4 [#]	12.7 ± 0.3 ^{§§***#}
	15 min	0 ± 0 ^{§§}	0 ± 0 ^{§§}	0 ± 0 ^{§§}	0 ± 0 ^{§§}
reperfusion	15 min	11.3 ± 0.1 ^{§§}	11.9 ± 0.6 ^{§§}	10.8 ± 0.3 ^{§§}	10.9 ± 0.1 ^{§§}

Values are means ± S.E. of 5 hearts in each group.

^{§§} p < 0.01, compared with preischemia in each group

* p < 0.05, ** p < 0.01, compared with low salt group

[#] p < 0.05, ^{##} p < 0.01, compared with high salt group

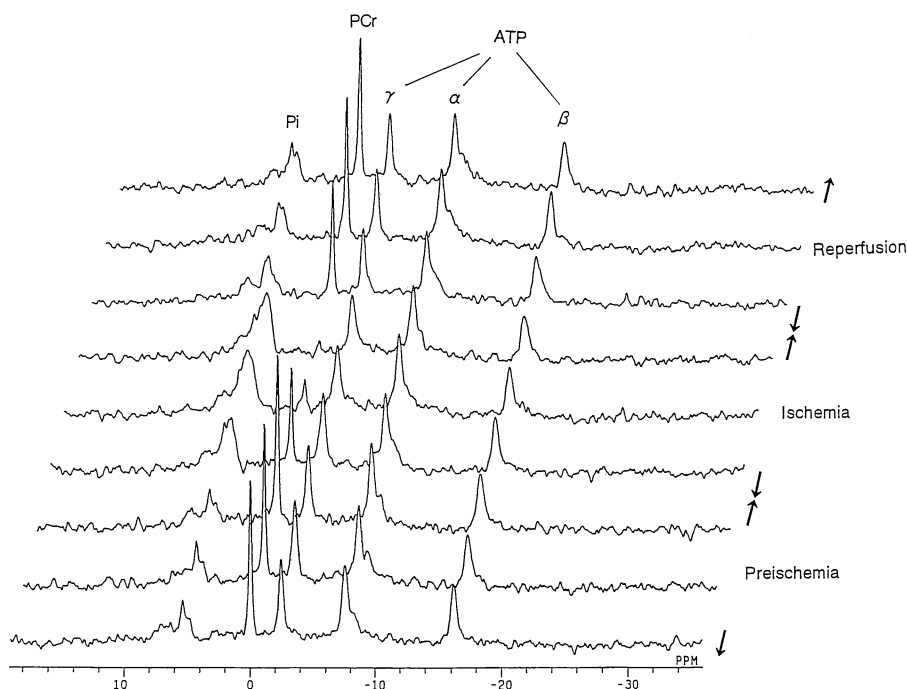


Fig. 4. Representative NMR spectra observed during preischemia, ischemia and reperfusion in rat fed a low salt diet. The peaks of Pi, PCr and ATP were clearly seen in every spectrum.

度で、再灌流 15 分の時点での回復も虚血前値の 85.5 ± 0.4% と高塩群に比し有意に良好であった (Fig. 5).

虚血再灌流時の細胞内 [Mg²⁺]_i 値はすべて

の群で虚血により上昇し、再灌流により速やかにほぼ虚血前値に回復した (Fig. 6). 低塩群において [Mg²⁺]_i 値は 15 分間虚血により 0.47 ± 0.01 mM より 1.11 ± 0.02 mM と約 2.4

Table 4. Change of Intracellular pH during Preischemia, Ischemia and Reperfusion

	Low salt group	High salt group	High salt · chronic Mg group	High salt · acute Mg group	
intracellular pH					
preischemia	10 min	7.19 ± 0.02	7.15 ± 0.02	7.16 ± 0.02	7.16 ± 0.02
	5 min	7.17 ± 0.02	7.15 ± 0.02	7.14 ± 0.02	7.13 ± 0.01
ischemia	0 min	7.18 ± 0.02	7.14 ± 0.02	7.14 ± 0.02	7.14 ± 0.01
	5 min	6.96 ± 0.02 ^{§§}	6.89 ± 0.01 ^{§§}	6.96 ± 0.03 ^{§§}	6.98 ± 0.01 ^{§§}
	10 min	6.80 ± 0.02 ^{§§}	6.63 ± 0.01 ^{§§**}	6.73 ± 0.03 ^{§§#}	6.84 ± 0.01 ^{§§##}
reperfusion	15 min	6.61 ± 0.02 ^{§§}	6.46 ± 0.02 ^{§§**}	6.56 ± 0.01 ^{§§#}	6.71 ± 0.02 ^{§§##}
	5 min	6.96 ± 0.02 ^{§§}	6.72 ± 0.02 ^{§§**}	6.90 ± 0.04 ^{§§#}	6.96 ± 0.02 ^{§§##}
	10 min	7.05 ± 0.01 ^{§§}	6.91 ± 0.04 ^{§§*}	7.00 ± 0.02 ^{§§}	7.03 ± 0.01 ^{§§#}
	15 min	7.05 ± 0.01 ^{§§}	6.99 ± 0.02 ^{§§*}	7.02 ± 0.02 ^{§§}	7.05 ± 0.01 ^{§§#}

Values are means ± S.E. of 5 hearts in each group.

§ p < 0.05, §§ p < 0.01, compared with preischemia 10 min in each group

* p < 0.05, ** p < 0.01, compared with low salt group

p < 0.05, ## p < 0.01, compared with high salt group

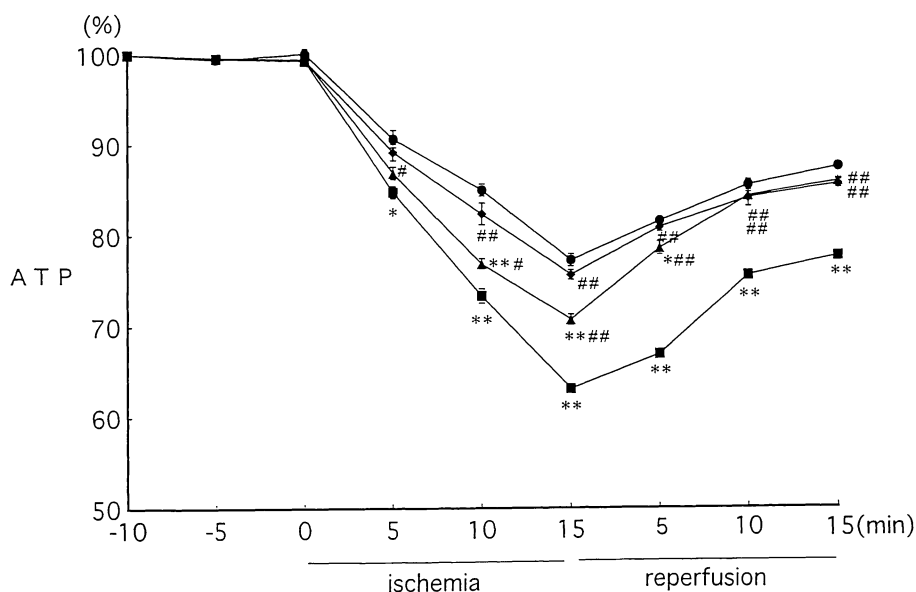


Fig. 5. Changes in the relative concentration of myocardial ATP during preischemia, ischemia and reperfusion. The symbols of ●, ■, ▲ and ◆ represent low salt group, high salt group, high salt · chronic Mg group and high salt · acute Mg group, respectively. *p < 0.05, **p < 0.01 : compared with low salt group, ##p < 0.01, #p < 0.05 : compared with high salt group. In all group ATP level decreased during ischemia and then returned during reperfusion. The magnitude of its reduction was significantly bigger in high salt group than in low salt group, and both chronic Mg treatment and acute Mg treatment significantly improved it.

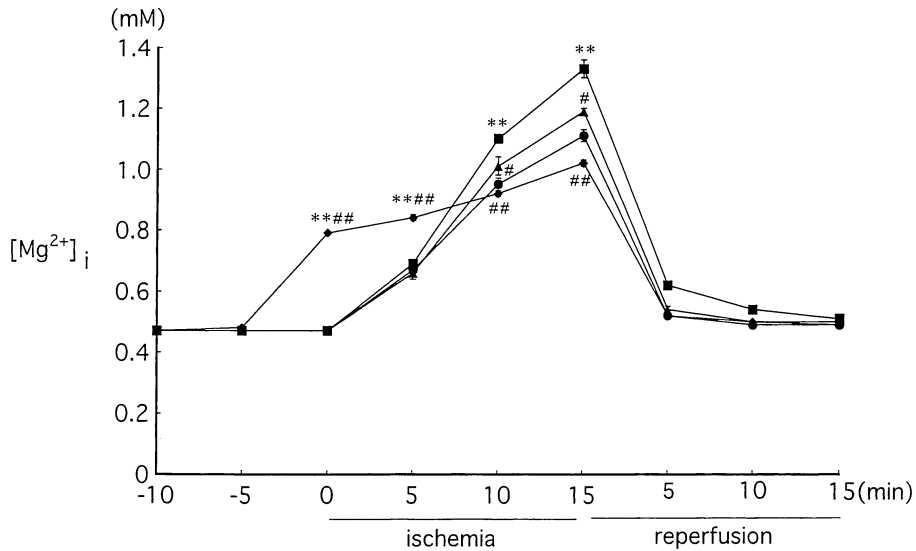


Fig. 6. Changes in the level of $[Mg^{2+}]_i$ during preischemia, ischemia and reperfusion. The symbols of ●, ■, ▲ and ◆ represent low salt group, high salt group, high salt · chronic Mg group and high salt · acute Mg group, respectively. ** $p < 0.01$: compared with low salt group, ## $p < 0.01$, # $p < 0.05$: compared with high salt group, In all group, $[Mg^{2+}]_i$ level increased during ischemia and then returned to the preischemia level during reperfusion. The magnitude of its increase was significantly bigger in high salt group than in low salt group, and both chronic Mg treatment and acute Mg treatment significantly improved it.

倍有意に増加し、再灌流により減少し、再灌流15分の時点では 0.49 ± 0.01 mMであった (Fig. 6). 高塩群において、 $[Mg^{2+}]_i$ 値は虚血前0分の時点で 0.47 ± 0.01 mMと低塩群と差はなかったが、虚血により著明に上昇し虚血15分の時点で 1.33 ± 0.03 mMと低塩群に比し有意に高値であり、再灌流時における減少も緩やかな傾向を示した (Fig. 6). 一方、高塩・Mg慢性投与群では、虚血15分の時点で $[Mg^{2+}]_i$ 値は 1.19 ± 0.01 mMと低塩群より高値を示したが、高塩群に比し有意に低値であった (Fig. 6). さらに、高塩・Mg急性投与群でも、虚血5分前のMg投与により虚血前0分の時点で $[Mg^{2+}]_i$ 値は 0.79 ± 0.01 mMと他の3群に比し有意に上昇し、虚血による $[Mg^{2+}]_i$ 値の上昇も少なく、虚血15分の時点で 1.02 ± 0.01 mMと高塩群に比し有意に低値であった

(Fig. 6).

考 案

高血圧モデルラットにおいては血中Mgレベルが減少しており、その減少が高血圧の病態形成に一部関与していると考えられている¹⁾. しかし、Mgの長期投与が降圧効果を発揮するか否かについては相反する報告^{11)~13)}がなされている. Alturaら¹¹⁾は、WistarラットにMg欠乏食を12週間与えたところ、血中Mgの欠乏に応じて血圧の上昇と細動脈管径の狭小化が起こると報告している. Evansら¹²⁾は、高血圧自然発症ラット (spontaneously hypertensive rat; SHR) で餌中のCa量とMg量を同時に変化させて12週間観察し、収縮期血圧は投与Ca量と負の相関を示すが投与Mg量とは

相関しなかったと報告している。一方, Touyz ら¹³⁾は SHR における 17 週間の Mg 補給が赤血球内 Mg^{2+} 濃度の上昇と Ca^{2+} 濃度の低下を伴い, 血圧の上昇を抑制することを報告している。さらに, Mathew ら¹⁴⁾はモノクロタリン誘発肺高血圧ラットにおいて, Mg の長期投与が肺高血圧と右心肥大の形成を有意に抑制したと報告している。

今回, 我々は DS ラットに高塩含餌食と Mg 慢性投与を行い, Mg の血圧および心肥大に対する効果を評価した。その結果, DS ラットにおいて高塩負荷は血圧を上昇, 心重量を増加させ, Mg 慢性投与は血中 Mg^{2+} 値の上昇を伴って高塩負荷によるこれらの変化を有意に抑制した。Mg による血圧低下の機序として, Mg が細胞膜の電位依存性 Ca チャネルを抑制し, 細胞膜 Ca-ATPase および筋小胞体膜 Ca-ATPase を活性化して細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させ血管平滑筋の収縮を低下させること, Mg が血管作動性物質に対する血管反応性を改善させること⁷⁾などが考えられる。一方, Mg による心肥大退縮の機序として, Mg が心筋細胞内 Ca^{2+} 濃度の増加や各種酵素の活性化を抑制することによる直接効果と, 血圧低下により心臓への圧負荷^{15),16)}を軽減させることによる間接効果などが考えられる。

肥大心では量的な変化のみならず, 質的な変化も生じている可能性があるため, 肥大心においては心筋エネルギー代謝面からの検討も重要である。Fossel ら¹⁷⁾, Kusuoka ら¹⁸⁾および Toyo-oka ら¹⁹⁾は, ³¹P NMR を用いて心筋エネルギー代謝が心周期内に変動することを報告している。我々も既に, ³¹P NMR を用いてペーシング刺激信号によって RF パルス繰り返し時間を制御することにより, 心周期内等分割位相でのエネルギー代謝動態を正確に測定できることを報告している⁸⁾。一方, 心筋内 $[Mg^{2+}]_i$ 値については幾つかの報告がなされているが^{1),20)}, 動物種や測定法によって報告されている値に違いがある。ラットにおいて ³¹P NMR,

¹⁹F NMR を用いた報告では, $[Mg^{2+}]_i$ 値は 0.5 ~ 1.4 mM であるとされている^{1),19)}。

³¹P NMR を用いた本実験において, DS 高塩群で DS 低塩群に比し心仕事量は有意に低下していたが, ATP の心周期内最大変動幅は有意に大きくエネルギー需要は増大していた。さらに, Mg の慢性および急性投与は, 高塩群における ATP の心周期内最大エネルギー変動幅の増大を同様に改善させた。一方, $[Mg^{2+}]_i$ 値は低塩群および高塩群共約 0.48 mM であり, 両群間に差がなく心周期内変動も認めなかった。Mg の慢性投与では $[Mg^{2+}]_i$ 値は増加しなかったが, Mg の急性投与でその増加を認めた。この Mg 慢性投与によるエネルギー代謝動態の改善は, 長期間における血中 Mg^{2+} 値の上昇による膜イオン透過性抑制, $Na^+ - K^+ - ATPase$ の活性化などという心筋細胞への作用や, 心肥大退縮に伴う収縮蛋白の量的および質的变化などによるものと考えられる。一方, Mg 急性投与によるエネルギー代謝動態の改善は, この $[Mg^{2+}]_i$ 値の増加により細胞内への Ca^{2+} 取り込みに対する拮抗作用や, $[Mg^{2+}]_i$ の細胞内補酵素としての作用の増強などによると思われる。

我々は既に, 急性心筋梗塞患者において血清総 Mg 値は低下しており, この低下には交感神経活性の亢進に基づく血清遊離脂肪酸の上昇が関与していることを報告している⁴⁾。急性心筋梗塞患者において Mg 投与の梗塞範囲縮小効果や予後改善効果について多くの大規模臨床研究が行われているが, いまだ結論が得られていない^{2),3)}。一方, 単一心筋細胞において蛍光色素法を用いた検討では, 虚血時および低酸素時には $[Mg^{2+}]_i$ 値は上昇しており, この上昇は $MgATP \rightleftharpoons Mg^{2+} + ATP$ という平衡状態が ATP 流出により変化するためであるとされている²¹⁾。さらに, Barbour ら²²⁾は, NMR 法によりラット灌流心で $[Mg^{2+}]_i$ 値は虚血により上昇し, 再灌流により虚血前値に回復し, その際細胞外 Mg^{2+} 値を上昇させ心仕事量を減少

させるとATPが良好に保持されたと報告している。さらに、最近、preconditionが虚血中の $[Mg^{2+}]_i$ 値の上昇を抑制したという報告²³⁾が出されている。

そこで、我々はDSラット灌流心臓の虚血再灌流実験において³¹P NMR法を用い $[Mg^{2+}]_i$ 値を観測しつつ、心仕事量、細胞内pHおよびATPを比較検討した。その結果、高血圧性心肥大を伴う高塩群で低塩群に比し虚血前の時点で心仕事量は大で、虚血により $[Mg^{2+}]_i$ 値は有意に上昇し、pHおよびATPは有意に低下し、再灌流による心仕事量、pHおよびATPの回復も有意に不良であった。一方、高塩・Mg慢性投与群では、高塩群に比し虚血前に心仕事量は有意に低下し、虚血による $[Mg^{2+}]_i$ 値の上昇やpHおよびATPの低下は有意に抑制され、再灌流によるpHおよびATPの改善も有意に良好であった。さらに、高塩群におけるMgの急性投与は、虚血前の $[Mg^{2+}]_i$ 値を高塩群に比し有意に増加し、これに伴い心仕事量を有意に抑制し、虚血による $[Mg^{2+}]_i$ 値の上昇とpHおよびATPの低下を有意に抑制し、再灌流によるpHおよびATPの回復を有意に改善した。このMg慢性投与の効果は、心肥大の退縮と圧負荷の軽減によりATP利用の効率が良好化し、そのため虚血によるエネルギー減少を軽減することにより細胞内pHの低下を抑制し、虚血再灌流障害を改善したためと考えられる。さらに、Mg急性投与の効果は、Mg投与により虚血前より $[Mg^{2+}]_i$ 値を上昇させることで、細胞内への Ca^{2+} 流入を防ぎ心仕事量を低下させATPの減少を抑制したことなどが心筋保護的に作用したものと推測される。しかし、その機序の正確な解明には、MgATPやMgADPの動態および細胞内 Ca^{2+} 動態を含め、より詳細な検討が必要である。

結 論

高塩負荷DSラットにおいて、Mg慢性投与

は血中 Mg^{2+} 濃度の上昇を伴って血圧を低下、心肥大を退縮させ、心周期内および虚血再灌流時のエネルギー代謝動態を改善させた。さらに、Mg急性投与は心筋細胞内イオン化Mg値の上昇に伴い心周期内および虚血再灌流時のエネルギー代謝動態を改善させた。以上より、Mgの慢性および急性投与が肥大心における心筋エネルギー代謝を改善させる効果を発揮することが強く示唆された。

文 献

- 1) Altura BM, Altura BT. Role of magnesium in pathogenesis of hypertension: relationship to its actions on cardiac and vascular smooth muscle. In: Laragh JH, Brenner BM, ed. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. vol 1. New York, USA: Raven Press, Ltd., 1990; 1003-1025
- 2) Baxter GF, Sumeray MS, Walker JM: Infarct size and magnesium: insights into LIMIT-2 and ISIS-4 from experimental studies. Lancet 1996; 348: 1424-1426
- 3) Thel MC, O'Connor CM: Magnesium in acute myocardial infarction. Coron Artery Dis 1995; 6: 831-837
- 4) 大友 透, 菊池健次郎, 小村博昭, 他: 治療下慢性心疾患患者と急性心筋梗塞患者における血清Mg濃度と重症度, および血漿noradrenaline濃度との関連. JJSMgR 1991; 10: 95-106
- 5) Yamazaki K, Katoh H, Yamamoto N, et al.: Characterization of new inbred strains of Dahl-Iwai salt-sensitive and salt-resistant rats. Lab Anim Sci 1994; 44: 462-467
- 6) Inoko M, Kihara Y, Morii I, Fujiwara H, Sasayama S: Transition from compensatory hypertrophy to dilated, failing left ventricles in Dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol 1994; 267: H2471-H2482
- 7) Takahashi F, Ogawa Y, Haneda T, Kikuchi K: Effect of long-term oral magnesium treatment on blood pressure and vascular reactivity in Dahl salt-sensitive rats. Clin Exp Nephrol 1998; 2: 321-329

- 8) Tanaka K, Honda H, Akita N : A gating ^{31}P NMR method triggered by pulses for cardiac pacing. *NMR Biomed* 1992 ; 5 : 329-334
- 9) Gupta RK, Moore RD : ^{31}P NMR studies of intracellular free Mg^{2+} in intact frog skeletal muscle. *J Biol Chem* 1980 ; 255 : 3987-3993
- 10) Bock JL, Wenz B, Gupta RK : Change in intracellular Mg adenosine triphosphate and ionized Mg^{2+} during blood storage : detection by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Blood* 1985 ; 65 : 1526-1530
- 11) Altura BM, Altura BT : Magnesium-calcium interrelationships in vascular smooth muscle. *Magne Bull* 1986 ; 8 : 338-350
- 12) Evans GH, Weaver CM, Harrington DD, Babbs CF, Jr : Association of magnesium deficiency with the blood pressure-lowering effect of calcium. *J Hypertens* 1990 ; 8 : 327-337
- 13) Touyz RM, Milne FJ : Magnesium supplementation attenuates, but does not prevent, development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1999 ; 12 : 757-765
- 14) Mathew R, Gloster ES, Altura BT, Altula BM : Magnesium aspartate hydrochloride attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension in rats. *Clin Sci* 1988 ; 75 : 661-667
- 15) Miyata S, Haneda T, Osaki J, Kikuchi K : Renin-angiotensin system in stretch-induced hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells. *Eur J Pharmacol* 1996 ; 307 : 81-88
- 16) Osaki J, Haneda T, Sakai H, Kikuchi K : cAMP-mediated c-fos expression in pressure-overloaded acceleration of protein synthesis in adult rat heart. *Cardiovasc Res* 1997 ; 33 : 631-640
- 17) Fossel ET, Morgan HE, Ingwall JS : Measurement of changes in high-energy phosphates in the cardiac cycle by using gated ^{31}P nuclear magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 3654-3658
- 18) Kusuoka H, Inoue M, Tsuneoka Y, Watari H, Hori M, Abe H : Augmented energy consumption during early systole as a mechanism of cyclical changes in high-energy phosphates in myocardium assessed by phosphorus nuclear magnetic resonance. *Jpn Circ J* 1985 ; 49 : 1099-1107
- 19) Toyo-oka T, Nagayama K, Umeda M, Eguchi K, Hosoda S : Rhythmic change of myocardial phosphate metabolite content in cardiac cycle observed by depthselected and EKG-gated *in vivo* ^{31}P NMR spectroscopy in a whole animal. *Biochem Biophys Res Commun* 1986 ; 135 : 808-815
- 20) Headrick JP, McKirdy JC, Willis RJ : Functional and metabolic effects of extracellular magnesium in normoxic and ischemic myocardium. *Am J Physiol* 1998 ; 275 : H917-H929
- 21) Luthi D, Gunzel D, McGuigan JAS : Mg-ATP binding : its modification by spermine, the relevance to cytosolic Mg^{2+} buffering, changes in the intracellular ionized Mg^{2+} concentration and the estimation of Mg^{2+} by ^{31}P -NMR. *Exp Physiol* 1999 ; 84 : 231-252
- 22) Barbour RL, Altura BM, Reiner SD, Dowd TL, Gupta RK, Altura BT : Influence of Mg^{2+} on cardiac performance, intracellular free Mg^{2+} and pH in perfused hearts assessed with ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Magn Trace Elem* 1991 ; 10 : 99-116
- 23) Soares PR, Albuquerque CP, Chacko VP, Gerstenblith G, Weiss RG : Role of preischemia glycogen depletion in the improvement of post-ischemic metabolic and contractile recovery of ischemia-preconditioned rat heart. *Circulation* 1997 ; 96 : 975-983

Magnesium Improves Myocardial Energy Metabolism : Assessment in Dahl Salt Sensitive Rats by ^{31}P Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

Nobuyuki AKITA¹, Takashi HANEDA¹, Kunio TANAKA²,
Kenjiro KIKUCHI¹

¹First Department of Internal Medicine, ²Central Laboratory for Research and Education,
Asahikawa Medical College
2-1-1 Midorigaoka-Higashi, Asahikawa, Hokkaido 078-8510

The effect of magnesium (Mg) on myocardial energy metabolism during both the cardiac cycle and myocardial ischemia was studied in rats using ^{31}P nuclear magnetic resonance (^{31}P NMR) spectroscopy. The rats were fed a low salt (0.3% NaCl) diet or high salt (8% NaCl) diet with or without Mg in the drinking water (aspartic acid Mg, 15.4 g/l) for 4 weeks. Systolic blood pressure (SBP), heart weight, and the level of blood ionized Mg (Mg^{2+}) were measured. The hearts were perfused with a Krebs-Hensleit buffer by the Langendorff method. The levels of myocardial adenosine triphosphate (ATP), creatine phosphate (PCr) and intracellular Mg^{2+} were then measured using ^{31}P NMR. The high salt diet significantly elevated SBP and increased the heart weight. The long term oral Mg treatment significantly prevented these changes, while showing an increase in the blood Mg^{2+} level. In each group, the levels of ATP and PCr decreased at the peak of systole and then returned to the initial levels at the end of diastole. The magnitude of fluctuation of the ATP level during the cardiac cycle was significantly higher in the high salt diet group than in the low salt diet group. Both long term oral Mg treatment and acute Mg treatment with perfusate containing a high concentration of Mg significantly reduced the magnitude of fluctuation of the ATP level in the high salt diet group. In each group, the levels of intracellular Mg^{2+} did not change during the cardiac cycle. In all groups, the ATP level significantly decreased during ischemia and then returned to its previous level during reperfusion. At the same time the intracellular Mg^{2+} level significantly increased and then returned to the initial level during reperfusion. These changes during ischemia were significantly larger in the high salt diet group than in the low salt diet group. Both long term Mg treatment and acute Mg treatment significantly improved these changes during ischemia in high salt diet group. These results suggest that Mg administration improves the myocardial energy metabolism in Dahl salt sensitive rats.