Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Decreased cytosolic free calcium concentration in lymphocytes of magnesium-supplemented DOCA-salt hypertensive rats

鈴木，洋

(Degree)
博士（医学）

(Date of Degree)
1989-03-31

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲0801

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000801

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

〔65〕

氏名・(本籍)	錦木　洋（兵庫県）
学位の種類	医学博士
学位記番号	医博い第624号
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の日付	平成元年3月31日
学位論文題目	DECREASED CYTOSOLIC FREE CALCIUM CONCENTRATION IN LYMPHOCYTES OF MAGNESIUM－SUPPLEMENTED DOCA－SALT HYPERTENSIVE RATS (DOCA食塩高血圧ラットの血圧及びリンパ球内遊離カルシウム濃度に対する経口的マグネシウム投与の作用)
審査委員	主査　教授　福崎　恒 教授　中村和夫　教授　伊東　宏

論文内容の要旨

［緒言］ ヒトの本態性高血圧症において末梢血管抵抗の上昇していることが知られており、そのメカニズムのひとつにナトリウム代謝の障害に起因する細胞内遊離カルシウム濃度の上昇が想定されている。マグネシウムは“natural calcium blocker”と言われin vitroで血管収縮に対し抑制的に作用することが認められているが、高血圧症に対し経口投与した際の降圧効果に関しては未だ一定の見解は得られていない。そこで我々は高血圧モデルの一つである酢酸デオキシコルチコステロン（DOCA）食塩高血圧ラットに4週間にわたりマグネシウムを経口投与し、その血圧およびリンパ球をもちいて測定した細胞内遊離カルシウム濃度に対する影響を検討した。

［方法］ ペントバルビタール麻酔下で左腎を摘出した6週齢の雄Wistarラットを3群に分け第1群には100g当たり250mgのマグネシウムを含有する標準飼料および1％食塩水を与え、DOCA（30mg／kg体重）をゴマ油に溶解し毎週皮下投与した（DS群）。第2群には標準食に1％MgOを添加した高マグネシウム飼料（850mg／100g）および1％食塩水を与えDOCAを同様に投与した（DS－Mg群）第3群には対照として標準飼料および脱イオン水を与えゴマ油を皮下投与した（C群）。体重および血圧（tail cuff法）を毎週測定し、4週間代謝ケージ中で飼育、尿量、尿中電解質排泄量を測定の後、断頭した。血漿中マグネシウム濃度をXylidine－blue法にて測定し、脾臓を摘出、RPMI－1640中で乱切、ガーゼにて濾過し比重遠心法にてリンパ球浮遊液を得た。

リンパ球内マグネシウム濃度は、得られたリンパ球を170mM塩化コリンで洗浄、超音波細

胞破砕器にて破砕した後、硝酸を加え灰化し、蒸留水で溶解、原子吸光分光光度計にて測定し、Lowry法にて測定した蛋白濃度で補正した。

リンパ球内遊離カルシウム濃度はTsienらの方法に従い、蛍光指示薬であるQuin－2を用いて測定した。すなわち50μMのQuin－2AMを含むRPMI－1640中でリンパ球をインキュベートした後、蛍光分光光度計にて励起波長339nm、走査波長495nmにて蛍光強度（F）を測定した。100μMジギトニンにてQuin－2を外液カルシウム（1mM）で飽和し、次いでEGTA（2mM）を加えてカルシウム濃度を十分低下させ、それぞれにおける蛍光強度（Fmax,Fmin）を測定した。細胞内遊離カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]$ i）は次式により求めた。

$$[Ca^{2+}]\ i\ (nM) = 115 \times (F - Fmin) / (Fmax - F)$$

［結果］ DS群の収縮期血圧（mmHg）は第2週目以降C群に比し有意に高値を示し、第4週においてはそれぞれ、180.6±23.4、120.6±8.2(平均±標準偏差)であった($P<0.001$)。DS－Mg群においては収縮期血圧は全期間を通じてC群と有意の差は認められず、第3週以降DS群に比し有意に低値にとどまり第4週において136.7±23.0($P<0.005$ vs.DS) であった。DS群およびDS－Mg群における体重はそれぞれ第3、第2週以後C群に比し有意に低値であったがDS群とDS－Mgの間には全期間を通じて有意差を認めなかった。

リンパ球内マグネシウム濃度（nEq／mg protein）はDS群160.6±18.3、DS－Mg群164.9±6.9と、C群の182.3±13.9に比し有意の低値($P<0.05$)を示しDS群とDS－Mg群には差を認めなかった。血漿マグネシウム濃度（mg／dl）はC群2.26±0.27、DS群2.21±0.26に対しDS－Mg群2.53±0.35とDS－Mg群にて高値の傾向を示した。リンパ球内遊離カルシウム濃度はDS群は84.5±7.1、DS－Mg群70.5±7.0とDS－Mg群で有意の低値（$P<0.005$）を示した。C群においては78.8±4.7とDS群、DS－Mg群いずれとも有意の差を認めなかった。DS－Mg群及びDS、DS－Mgをあわせた群においてリンパ球内遊離カルシウム濃度と第4週の収縮期血圧の間には有意の正相関を認めた（各$r=0.91$, $P<0.02$, $r=0.61$, $P<0.05$)。尿量および尿中ナトリウム排泄量はDSおよびDS－Mg群において第1週目よりC群に比し著明に増加しており、DS群とDS－Mg群の間では第4週の尿中ナトリウム排泄量を除き差を認めなかった。

［考察］ 実験的高血圧モデルの1つであるDOCA食塩高血圧ラットに経口的にマグネシウムを投与することによりリンパ球内遊離カルシウム濃度の減少を伴い血圧上昇は有意に抑制された。Luthringerらは経口的マグネシウム投与により同様の降圧効果を報告しているが、彼らは同時にマグネシウム投与ラットにおいて体重減少と尿中ナトリウム排泄の増加を認めている。本研究においてはDS群、DS－Mg群の間に体重の有意の差は認められず、尿中ナトリウム排泄量も第4週においてDS－Mg群における増加を認めたのみであった。これらの違いはDOCAの投与量、実験期間の違い等によるものと考えられるが、我々の今回の結果よりマグネシウム投与は体重の有意の減少なしにDOCA食塩高血圧症ラットに降圧をもたらしうることが明かとなった。

ヒトにおける高血圧症、とくにその大多数を占める本態性高血圧においては病態メカニズム上不明な点が少なくないが、一般に末梢血管抵抗は増大している。末梢血管抵抗はおもに細動脈の血管平滑筋トーヌスにより規定され、血管平滑筋の収縮は細胞内遊離カルシウムの上昇を伴っていることがin vitroで証明されている。したがってヒトおよび実験的高血圧症において細胞内遊離カルシウム濃度が上昇していることが想定されており血小板、リンパ球などの流血中の細胞を用いての研究が既に報告されている。血小板を用いた研究の多くは高血圧群と対照正常血圧群の間に有意差を認めているがリンパ球を用いた研究では我々同様その差を認めないとするものが多い。ともに細胞内にカルシウム依存性の収縮蛋白をもち細胞表面にAngiotensin Ⅱレセプターを有するということからも血小板がより血管平滑筋に近似しているためにこの違いが生じたと推測されるが、リンパ球の細胞内遊離カルシウムもイノシトール燐脂質代謝に引き続き起こる細胞内貯蔵部位よりのカルシウムの放出およびカルシウムチャンネルを介する細胞外よりのカルシウムの流入により規定されており、血管平滑筋との共通性を有している。今回マグネシウム投与によりDOCA食塩高血圧ラットにおいて有意にリンパ球細胞内遊離カルシウムが低下し、収縮期血圧と正の相関を認めたことより血管平滑筋においも同様に細胞内遊離カルシウムが低下していることが示唆された。細胞外マグネシウムはカルシウムの細胞内への流入を抑制することが知られており、また細胞内マグネシウムは小胞体よりのカルシウムの放出を抑制しCa－ATPaseによる小胞体へのカルシウムの取り込みを促進し、いずれも細胞内遊離カルシウムが低下する方向に作用する。我々の実験ではマグネシウム投与によりリンパ球内マグネシウム濃度は変化しなかったが、血漿マグネシウムは増加傾向を認め、細胞内遊離カルシウム低下の機序は主に細胞外よりのカルシウム流入に対するマグネシウムの抑制的な作用によることが推測された。

［結論］ DOCA食塩高血圧ラットにマグネシウムを経口的に投与することによりその血圧上昇は抑制され、リンパ球内遊離カルシウム濃度が低下した。同様のことがヒトにおいても起こりうると考えられ、マグネシウムの投与が本態性高血圧症に対する非薬物的療法の一つとなりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本態性高血圧症（EHT）の成因と治療の両面から各種電解質の意義が注目されている。本研究は、このような観点から、殊にMgに着目し、一つの高血圧モデルであるDOCA食塩高血圧ラットを用い、Mg経口投与の降圧効果とその機序を検討する目的でなされたものである。（方法） 標準飼料及び標準飼料に1％の割合でMgOを添加した高Mg飼料のそれぞれで飼育したDOCA食塩高血圧ラットの両群並びに標準飼料と脱イオン水を与えた正常血圧群の計3群である。（以下、各群はそれぞれDS群、DS－Mg群及びcontrol群と呼ぶことにする）

これら3群に対し、4週間にわたり次の如き観察がなされた。即ち、毎週尿量と尿中電解質

排泄量を測定して後、断頭し、血漿Mg濃度及び摘出脾臓から得られたリンパ球の細胞内MgとCaの濃度が測定された。

（結果） DS群では対照群と比べ収縮期血圧（SBP）の著明な上昇がみられたが、DS－Mg群ではかかる血圧上昇は明らかに抑制された。DS群とDS－Mg群の間には体重差はみられなかった。血漿Mg濃度はDS－Mg群で高い傾向がみられた。リンパ球内Mg濃度はDS及びDS－Mgの両群共対照群より低値を示したが、両群相互間では差はなかった。一方、リンパ球細胞内遊離Ca濃度はDS－Mg群がDS群より明らかに低値を示したが、対照群と他の2群との間には差はなかった。DSとDS－Mgの両群を一括して、リンパ球内遊離Ca濃度とSBPとの関係をみたところ、両者の間に正相関が認められた。尿量と尿中Na排泄量は、DS及びDS－Mgの両群では、対照群と比べ著しい増加を示したが、DSとDS－Mgの両群間では明らかな差はみられなかった。

以上の成績より、DCCA食塩高血圧ラットにおいて、Mgの経口投与が降圧にあずかること、更にその機序として血管平滑筋細胞内の遊離Ca濃度の低下の関与が示唆された。なお、細胞内遊離Ca濃度の低下機序には、小胞体へのCaの取り込みの促進よりは、細胞外よりのCa流入の抑制のあずかる可能性の大きいことが推定された。

本研究は、EHTにおけるMg経口投与が降圧効果を有する可能性を指摘すると共に、その機序に関し、示唆に富む実験成績を提示したものとして価値ある集積とみなされる。依って、本研究者は医学博士の学位を得る資格を有するものと認めた。（以上）