

## ラットの実験的 Mg 欠乏症に関する毒性薬理学的研究

### II. Mg 欠乏ラットの充血症状に対する抗ヒスタミン薬の影響

西尾 晃・吉満文隆・石黒 茂・宮尾 陟

(家畜薬理学研究室)

昭和57年 8月9日 受理

## Toxicological and Pharmacological Studies on the Magnesium Deficiency in Rats

### II. Effect of Antihistaminics on the Hyperemia Appearing in Magnesium Deficient Rats

Akira NISHIO, Fumitaka YOSHIMITSU, Shigeru ISHIGURO and Noboru MIYAO

(Laboratory of Veterinary Pharmacology)

#### 緒 言

ラットをマグネシウム (Mg) 欠乏飼料で飼育すると発赤, 充血および浮腫をともなう末梢血管の拡張がみられることは古くから指摘されてきた<sup>1)</sup>. この現象には mast cell からの histamine の遊離や mast cell および血小板からの serotonin の遊離が大きな関与をしているとされている<sup>1-3)</sup> が, 直接的な証明は不十分であると思われる.

前報<sup>4)</sup>において, 成長期のラットを Mg 欠乏飼料で飼育したときに観察される皮膚の充血症状の発現時には, 脾臓をはじめ数種の臓器で histamine 量の増加がみられるが, mast cell を豊富に含有している皮膚組織の histamine 量は, 対照群と有意の差がみられないことを明らかにし, mast cell からの histamine 遊離よりもむしろ histamine 合成系の促進が起こるのではないかとの推測を得た. しかし, Mg 欠乏時にみられる充血等の炎症症状の発現に histamine が直接関与しているかどうかについては未検討であった.

本論文では, Mg 欠乏時に観察される皮膚の充血症状に対して抗 histamine 薬が有効であるかどうか, 換言すれば, Mg 欠乏時の皮膚の充血に histamine が関与しているかどうかについて検討した.

#### 材 料 と 方 法

##### 1. 使用動物

幼若期の Wistar ラットを雌雄の別なく用いた. これらのラットを生後25日目に離乳し, その後3日間は, 粉末飼料に馴れさせるため合成粉末飼料 (対照飼料,

Table 1. Experimental diet

	% of total diet	
	Control	Deficient
Vitamine-free casein	20	20
Glucose	35	35
Sucrose	27.28	27.40
Cellulose	5	5
Liver oil	8	8
Choline chloride	0.15	0.15
Vitamine mixture* <sup>1</sup>	0.85	0.85
Mineral mixture* <sup>1</sup>	3.6	3.6
Magnesium oxide	0.1161	0.00167
Final Mg concentration	0.07* <sup>2</sup>	0.001

\*<sup>1</sup>. Mineral and vitamine mixtures were prepared by formula of Harper (6).

\*<sup>2</sup>. Replaced with sucrose in magnesium deficient diet.

組成は Table 1 に示した) で予備飼育したのち二群に分けた. I 群 (対照群) は0.07%の Mg を含む合成飼料で, II 群 (Mg 欠乏群) は0.001%の Mg を含む合成飼料で飼育し, 毎日体重および症状を観察した. 尿中に排泄される histamine 量を測定する場合は, 代謝ケージで一匹づつ飼育した. なお, 給水には脱イオン水を用いた.

##### 2. 試料の採取と化学分析

尿は 6N-HCl 6 ml を入れた三角フラスコに採取し, histamine 測定時まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した. 血漿はラットをペントバルビタールで軽く麻酔したのち, 開胸して心臓よりヘパリンを塗布し, 乾燥させた注射器で採血し, 3000 rpm-20 min. 遠心した上清を用いた.

尿の histamine は Shore の変法<sup>9)</sup> に準拠して抽出したのち蛍光定量<sup>10)</sup> した。血漿の電解質は原子吸光分光光度法により測定した。

### 3. 抗 histamine 薬

Histamine の H<sub>1</sub>-receptor antagonist として diphenhydramine hydrochloride (興和新薬) を, H<sub>2</sub>-receptor antagonist として cimetidine (藤沢薬品より供与) を用いた。

### 4. その他

その他の必要な事項については, それぞれの個所に記載した。数値の有意性の検討は *Student's t-test* により, 危険率 5% 以下を有意とした。

## 結 果

### 1. 成長曲線

粉末飼料の組成については Table 1 に示した。Vitamin と mineral の組成は Harper<sup>6)</sup> の組成に準拠した。対照群では 0.07% の Mg を, 欠乏群では 0.001% の Mg を含み, Mg 含量の差は sucrose 量で調整した。他の組成は全く同じである。このような飼料で成長期のラットを飼育したときの体重変化を Fig. 1 に

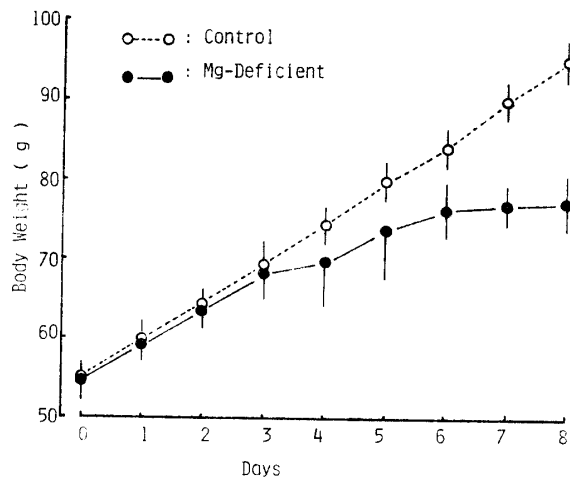


Fig. 1. Body weights for control and Mg-deficient rats. Vertical bars indicate standard deviation of the mean (n=6).

示した。対照群では日齢が進むともなって体重はほぼ直線的に増加したが, Mg 欠乏群では 4 日目頃より体重の増加率の抑制がみられた。この体重増加率の抑制は飼料摂取量の抑制によると考えられる。すなわち, Mg 欠乏群では 4 日目より飼料摂取量が対照群より減少し, 以後 8 日目まで次第に減少した。飲水量も対照群よりも少ない傾向がみられた。

### 2. 血漿の電解質

Mg 欠乏飼料給飼による血漿の電解質の変化を Fig. 2 に示した。血漿 Mg 値は Mg 欠乏飼料給飼 2 日目ですでに減少の傾向がみられ, 4 日目では対照群に比べて有意な減少を示し, 6 日目および 8 日目では対照群の 1/3 以下の値を示した。Ca, K および Na 値も多少の変動を示したが, 対照群との間には有意な差は認められなかった。

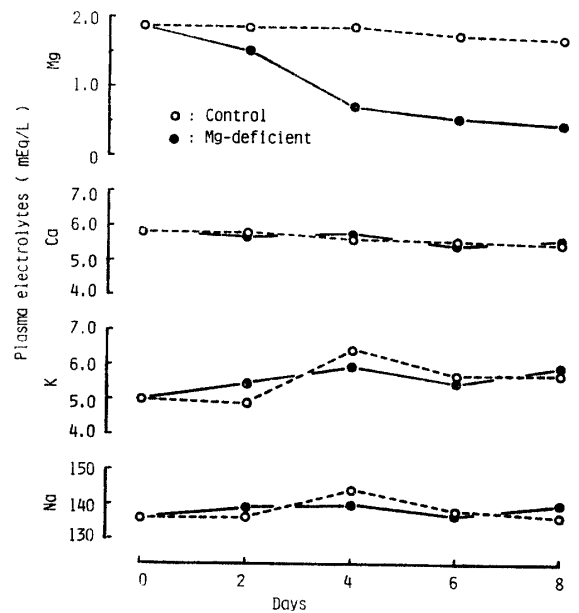


Fig. 2. Plasma electrolyte levels for control and Mg-deficient rats. Each point represents the mean of six rats.

### 3. 尿中 histamine 量

Mg 欠乏飼料給飼による尿中への histamine 排泄量を Fig. 3 に示した。尿中への histamine 排泄は 4 日目より増加しはじめたが, 個々のラットによる差は大きかった。5 日目より 8 日目までは対照群よりも 4 倍以上の増加を示した。対照群では実験期間中約 5~10 μg とほぼ一定量の histamine を排泄した。

### 4. 充血症状と抗 histamine 薬

#### (1) 充血症状の発現

本実験で用いた成長期のラットを Mg 欠乏飼料で飼育すると, 3~4 日目より耳介および四肢の発赤や充血症状がみられる。観察が容易な耳介の充血を, その程度により 0 から 5 まで五段階に評点した。評点の基準は次のとおりである。評点 0: 充血なし, 評点 1: 耳介の基部が充血, 評点 2: 耳介の半分までが充血, 評点 3: 耳介の 3/4 までが充血, 評点 4: 耳介の先端まで充血。このような評点を Mg 欠乏群と対照群の個

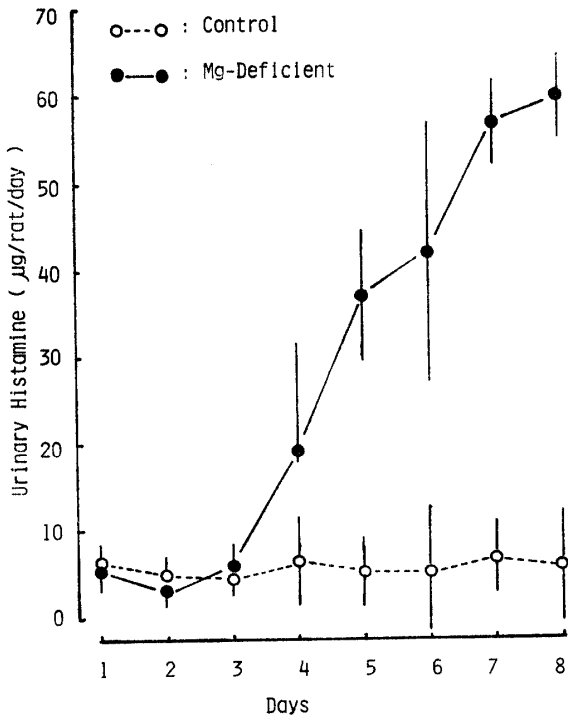


Fig. 3. Urinary histamine for control and Mg-deficient rats. Vertical bars indicate standard deviation of the mean (n=6).

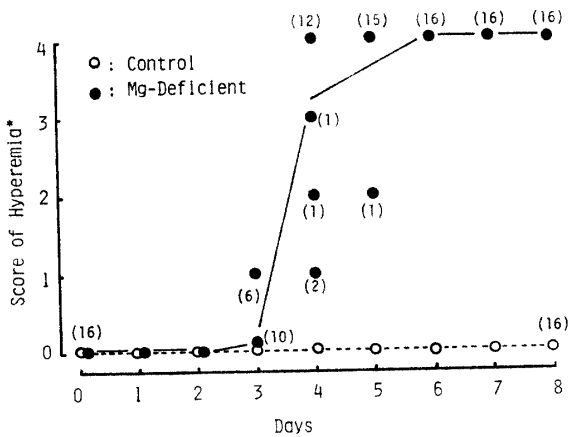


Fig. 4. Hyperemia of ears for control and Mg-deficient rats.

( ): number of rats. \* The following criteria were used for the scoring of hyperemia; 1: Hyperemic at base of ear, 2: Hyperemic at half of ear, 3: Hyperemic at three quarters of ear, 4: Hyperemic completely on ear.

個々のラットについて行った。その結果は Fig. 4 に示した。対照群では実験期間中すべてのラットは評点 0 を示した。欠乏群では充血症状の発現までの期間に多少の個体差がみられた。すなわち、3 日目では用いた

ラット 16 匹のうち 6 匹が評点 1 を示したが残りの 10 匹は評点 0 であった。4 日目では 12 匹が評点 4 を、1 匹が評点 3 を、1 匹が評点 2 を、2 匹が評点 1 を示し、全匹とも程度の差はあるが充血症状を示した。6 日目以降は全匹とも評点 4 を示した。

(2) 抗 histamine 薬の影響

Mg 欠乏により評点 4 を示した欠乏 7 日目のラットに抗 histamine 薬を投与して、その評点が減少するかどうかを調べた。その結果を Fig. 5 に示した。Histamine の H<sub>1</sub> receptor を遮断する diphenhydramine は投与後 45 分で評点 4 を 3 に減少させた。H<sub>2</sub> receptor の遮断薬である cimetidine は投与後 15 分で評点 4 を 3 に、45 分で 2 に減少させた。両遮断薬を併用すると、投与後 15 分で評点 4 を 3 に、45 分で 1 に、60 分で 0 に減少させた。なお、生理食塩水を投与した群では評点に影響はみられなかった。

上述したように、histamine の H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> receptor を遮断すると Mg 欠乏時に発現する充血症状を減弱させることが判明したので、連続投与したときの効果を調べた。すなわち、一群 4 匹の Mg 欠乏ラッ

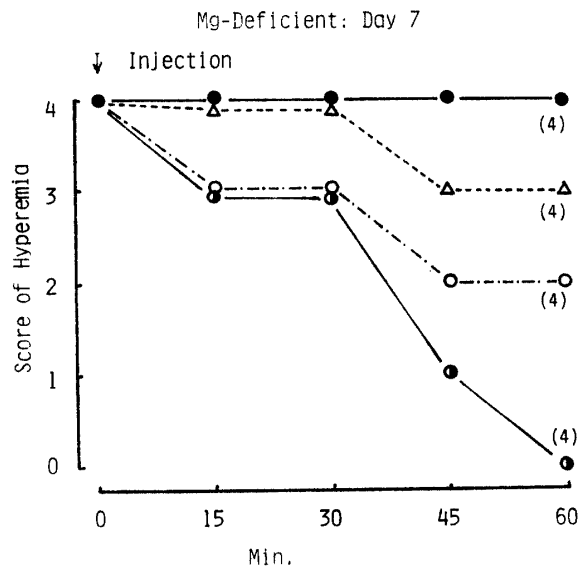


Fig. 5. Single injection of antihistaminics on the score of hyperemia\*.

\* Criteria of hyperemia are the same as Fig. 4.

( ): Number of rats.

- : Saline 1 ml/100 g (s. c.).
- △---△: Diphenhydramine hydrochloride 1 mg/100 g (s. c.).
- : Cimetidine 2 mg/100 g (s. c.).
- : Diphenhydramine hydrochloride (1 mg/100 g, i. p.) plus Cimetidine (1 mg/100 g, s. c.).

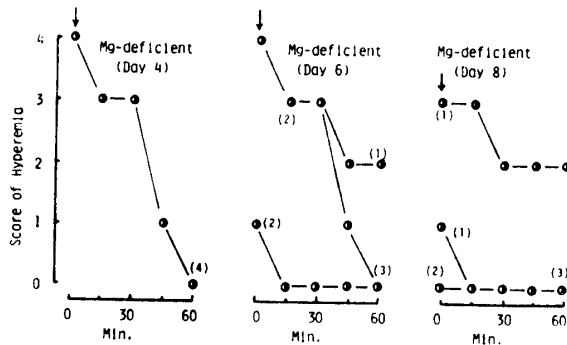


Fig. 6. Repeated injection of antihistaminics on the score of hyperemia\*.

\* Criteria of hyperemia are the same as Fig. 4.  
( ) ; Number of rats.

↓: Injection of antihistaminics (Diphenhydramine hydrochloride, 1 mg/100 g, i. p. plus Cimetidine, 1 mg/100 g, s.c.).

トに両遮断薬を欠乏の4日目より8日目まで一日3回(9:00, 12:00, 18:00)投与して、充血症状の推移を観察した。その結果を Fig. 6 に示した。用いたラット4匹は全例 Mg 欠乏4日目に評点4を示した。これらのラットに diphenhydramine と cimetidine を併用して投与すると、Fig. 5 に示したと同じような抑制効果がみられた。しかし、24時間後には再び充血症状が現われた。そこで、両薬物を一日3回連日投与し、充血症状が次第に抑制されるかどうかを調べた。図に示したように欠乏6日目と8日目の3回目を投与前の評点と投与後の評点を見ると、抑制効果が次第に強くなる傾向がみられた。すなわち、欠乏6日目では、抗 histamine 薬を投与する前にすでに評点が1になっているラットが2例あり、これらのラットは抗 histamine 薬投与により、すみやかに評点が0となった。欠乏8日目では評点1が1例、評点0が2例となり、4匹中3匹までが抗 histamine 薬投与前に評点1以下を示した。

## 考 察

前報<sup>8)</sup>と同じ組成の飼料 (Table 1) で、同日齢の成長期のラットを飼育したところ、体重増加率 (Fig. 1)、血漿電解質の変化 (Fig. 2) および尿中への histamine の排泄増加 (Fig. 3) とともに、前報と類似の成績を得た。すなわち、著者らの実験系の再現性が良好であることが示された。Mg 欠乏時に示される耳介の充血症状を定量化して表示した成績 (Fig. 4) は、症状発現の時間経過が、Fig. 3 で示した尿中への histamine の排

泄増加の時間経過とほぼ一致しており、耳介充血の原因が histamine によることを強く示唆するものと考えられる。

先人の報告によると、Mg 欠乏時に皮膚結合織中の mast cell が脱顆粒を起こしているとの観察<sup>2)</sup>がある。Mast cell は histamine の他に serotonin をも含有しているため、耳介の充血の原因が histamine によるもの根拠とはなりえない。Itokawa ら<sup>1)</sup>は、histamine を投与したときよりも serotonin を投与したときのほうが Mg 欠乏時にラットでみられる耳介の充血症状に類似していることから、Mg 欠乏時にみられる耳介の充血は serotonin によるものと主張している。他方、Gaudin-Harding ら<sup>5)</sup>は Mg 欠乏ラットにおいて serotonin 代謝が変わらないとの成績を示しており、これまでは充血症状が histamine によるのか serotonin によるのかを判定すべき直接的な証明がなく論争点となっていた。

著者らは、この点を明らかにする一つの手段として、histamine の特異的な遮断薬を用いた。Histamine は毛細血管の H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> receptor に作用して毛細血管を弛緩させ、その透過性を増大させるため、皮膚の充血や浮腫を生じさせることはよく知られている<sup>4)</sup>。そこで H<sub>1</sub> receptor 遮断薬として diphenhydramine を、H<sub>2</sub> receptor 遮断薬として cimetidine を用いて、Mg 欠乏時に示される耳介の充血が抑制されるかどうかを検討した。Fig. 5 に示したように diphenhydramine と cimetidine の単独投与は耳介の充血症状を部分的に抑制した。しかし、両薬物を併用すると完全に抑制された。すなわち、Mg 欠乏時に示される耳介の充血は、histamine の H<sub>1</sub> と H<sub>2</sub> の両 receptor を介する反応であることが証明された。さらに、両薬物の連続投与が Mg 欠乏時の耳介の充血症状を予防しうるかどうかを調べた。Fig. 6 に示した成績のように、Mg 欠乏4日目より8日目まで両遮断薬を1日3回投与すると4例中3例までが欠乏8日目ではその充血症状が著しく抑制され、充血症状の発症予防にも有効であることが示された。

以上述べたように、Mg 欠乏時に示される耳介の充血症状は、histamine によることが明確になり、耳介血管の H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> receptor を介する反応であることが証明された。流血中への histamine の増加が先人<sup>2,3)</sup>の言うように mast cell の脱顆粒によるのか、あるいは著者らが前報<sup>8)</sup>で示唆した histamine 合成系の増加によるのかは今後の問題点と考えられる。

## 要 約

## 文 献

成長期のラットを Mg 欠乏飼料で飼育したときにみられる耳介の充血症状に対する抗 histamine 薬の効果を検討し、以下の成績を得た。

1. Mg 欠乏飼料 (Mg: 0.001%) で離乳数日後の Wistar ラットを飼育すると、体重の増加率は給飼開始4日目から抑制された。飼料および水の摂取量も対照飼料 (Mg: 0.07%) を給飼した対照群より低下していた。

2. 血漿の Mg 値は Mg 欠乏飼料給飼4日目で有意に低下し、6日目以降は対照群の約1/3の値にまで低下した。血漿の Ca, K および Na 値は対照群との間に有意の差を示さなかった。

3. 尿中への histamine の排泄は、Mg 欠乏飼料給飼4日目より8日目まで次第に増加した。

4. 耳介の充血症状は、個体により症状発現までの日数に差があるが、Mg 欠乏飼料給飼3~4日目からみられ、6日目以降8日目までは全例にみられた。

5. Mg 欠乏時にみられる耳介の充血症状は、H<sub>1</sub> receptor の遮断薬である diphenhydramine や、H<sub>2</sub> receptor の遮断薬である cimetidine の単独投与により一部分抑制された。両遮断薬を併用投与すると完全に抑制された。

6. 両遮断薬を併用して1日3回、Mg 欠乏4日目より8日目まで連日投与すると、充血症状は次第に減弱した。

以上の成績から、Mg 欠乏時に示される耳介の充血症状は histamine によるものであり、耳介の H<sub>1</sub> および H<sub>2</sub> receptor の関与が明らかになった。

- 1) Itokawa, Y., Tanaka, C. and Kimura, M.: Effect of thiamine on serotonin levels in magnesium-deficient animals. *Metabolism*, **21**, 375-379 (1972)
- 2) Bélanger, L. F., Van Erkel, G. A. and Jakerow, A.: Behavior of the dermal mast cells in magnesium-deficient rats. *Science*, **126**, 29-30 (1957)
- 3) Bois, P., Gascon, A. and Beaulnes, A.: Histamine liberating effect of magnesium deficiency in the rat. *Nature*, **197**, 501-502 (1963)
- 4) Dobbins, D. E., Swindall, B. T., Haddy, F. J. and Dabney, J. M.: Blockade of histamine-mediated increases in microvascular permeability by H<sub>1</sub>- and H<sub>2</sub>-receptor antagonists. *Microvas. Res.*, **21**, 343-350 (1981)
- 5) Gaudin-Harding, F., Claveric-Benureau, S., Armier, J., Davy, J. and Lebel, B.: Aromatic amines (serotonin and histamine) and magnesium deficiency in the rat. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.*, **50**, 185-192 (1980)
- 6) Harper, A. E.: Amino acid balance and imbalance. *J. Nutr.*, **68**, 405-418 (1959)
- 7) Kruse, H. D., Orent, E. R. and Mc Collum, E. V.: Studies on magnesium deficiency in animals. I. Symptomatology resulting from magnesium deprivation. *J. Biol. Chem.*, **96**, 519-539 (1932)
- 8) Nishio, A., Ishiguro, S., Ikegaki, I. and Miyao, N.: Toxicological and pharmacological studies on the magnesium deficiency in rats. I. Histamine contents in some tissues of magnesium deficient rats. *Jpn. J. Vet. Sci.*, **44**, 653-659 (1982)
- 9) Oates, J. A.: Modifications of the Shore method. in Eichler, O. and Farah, A. (eds.). *Handbuch der experimentellen Pharmacologie*, Vol. XVII/I. p. 69-72, Springer-Verlag, Berlin, Heiderberg, N. Y. (1966)
- 10) Shore, P. A., Burkhalter, A. and Cohn, V. H.: A method for the fluorometric assay of histamine in tissues. *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, **127**, 182-186 (1959)

## Summary

The effects of dietary magnesium deficiency were studied in young Wistar rats. The magnesium deficient diet inhibited the animal growth. In the plasma magnesium concentration there was a progressive fall, reaching about one-third of the control value after 6 days. The plasma calcium, potassium and sodium concentrations were kept unaltered apparently. The histamine concentration in urine increased rapidly after 4 days, gradually increasing until 8 days. Three to four days after the feeding with magnesium deficient diet, hyperemia of the ears appeared. Both diphenhydramine and cimetidine reduced the hyperemia of the ears, the combination of the antagonists being superior to either antagonist injected alone.

These data indicate that the hyperemia of the ears is mediated by histamine in the magnesium deficient rat.