

セレンウム欠乏ラットにおける *tert*-ブチルヒドロペルオキシド 惹起溶血に対する添加セレンウムの効果

安本 教傳¹⁾・金 天浩¹⁾・鈴木 鐵也¹⁾・吉田 宗弘²⁾
(¹⁾京都大学食糧科学研究所*, ²⁾関西医科大学公衆衛生学教室**)

Effect of Dietary Selenium on *tert*-Butyl Hydroperoxide-induced Hemolysis in Selenium-deficient Rats

Kyoden YASUMOTO¹⁾, Cheon Ho KIM¹⁾, Tetsuya SUZUKI¹⁾, and Munehiro YOSHIDA²⁾

¹⁾The Research Institute for Food Science, Kyoto University, ²⁾Kansai Medical University

Previously we reported that hemolysis of erythrocytes, induced *in vitro* by *tert*-butyl hydroperoxide (t-BuOOH), was greater for erythrocytes from Se-deficient than from Se-adequate rats. Neither exogenous glutathione (GSH) nor endogenous α -tocopherol suppressed the t-BuOOH-induced hemolysis. Here, we report recovered resistance to hemolysis by erythrocytes from rats initially made Se-deficient (18 mo) and subsequently repleted with sodium selenite for 12 wk. Freshly isolated erythrocytes were incubated with 0.6 mM t-BuOOH in isotonic saline-phosphate (pH 7.4) with 1 mM NaN₃, 1 mM KCN and 2 mM GSH for 2 h 37°C. Hemolysis of erythrocytes from Se-deficient/repleted rats was 95% after 3 wk, 14% after 5 wk and 5% after 7 wk Se repletion, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were 9% of normal at 3 wk, 19% at 5 wk and 26% at 7 wk. Pyruvate kinase (PK) activity was elevated during Se deficiency and returned to normal in Se-repleted (12 wk) rats.

セレンウム（セレン）は動物にとって必須微量元素であり¹⁾，グルタチオンペルオキシダーゼの反応中心を構成し²⁾，その生体内における役割はよく知られている。また，その欠乏症としてはラットの肝壊死，牛や羊の白筋症をはじめ，ヒトについても心筋障害を引き起こす中国の克山病などが知られている。克山病は中国で発見された心筋障害を主症状とする風土病で，土壤や作物中のセレン含量及びGSH-Px活性の低下と深く関連し，セレン投与によりその発生率の激減が認められたことが報告されている³⁾。我々は前報⁴⁾でセレン欠乏飼料で飼育したラットとセレン充足飼料で飼育したラットの赤血球の酸化障害に対する抵抗性を比較検討し，酸化的溶血の防止に果たすセレン依存性GSH-Px系の役割の

*所在地：宇治市五ヶ庄官有地（〒611）

**所在地：守口市文園町1（〒570）

重要性を示す結果を得た。本研究では、セレン欠乏飼料で長期間飼育したラットをセレン充足飼料（セレンとして0.1ppmを亜セレン酸ナトリウムの形で添加）に転換飼育し、セレン給餌による赤血球のtert-ブチルヒドロペルオキシド（t-BuOOH）惹起溶血耐性の回復の有無を赤血球中のセレン依存性グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）活性の回復との関連から調べた。さらに長期間に亘るセレン欠乏飼料給餌による代償性造血の亢進の有無についても検討した。

方 法

今回の実験に用いたのは、雄のWistar系ラットで、離乳直後からセレン欠乏飼料^{5,6)}で飼育したセレン欠乏群と、それに0.1ppmのセレンを亜セレン酸ナトリウムとして添加したセレン充足飼料を与えたセレン充足群、各4匹を18ヶ月間飼育した。赤血球中のGSH-Px活性はLittleらの方法⁷⁾、セレン含量はWatkinsonの方法⁸⁾によって測定し、t-BuOOH惹起溶血試験は前報の方法⁴⁾により行った。赤血球中のpyruvate kinase (PK)活性はSeamanらの方法⁹⁾に従って測定した。

結 果 と 考 察

セレン欠乏飼料で3ヶ月間飼育したセレン欠乏ラットの赤血球中のセレン含量及びGSH-Px活性はいずれもセレン充足飼料で飼育したセレン充足のそれの2%以下にまで低下し、そのレベルは18ヶ月間ほとんど変わらなかった（Fig. 1）。ヘマトクリット（Ht）値は飼育開始後12ヶ月間は両群共にほとんど変化が認められなかったが、18ヶ月後には有意差はないが、セレン欠乏群のそれはセレン充足群に比べ低い傾向を示した（Fig. 2）。

一方、PK活性は若い赤血球で高い活性を示すことが知られているが⁹⁾、本酵素活性を比較したところ、飼育開始12ヶ月後からセレン欠乏ラットでのPK活性がセレン充足ラットのそれよりも有意に高く、18ヶ月後にはセレン充足ラットのそれの約2倍以上の比活性を示していた（Fig. 2）。

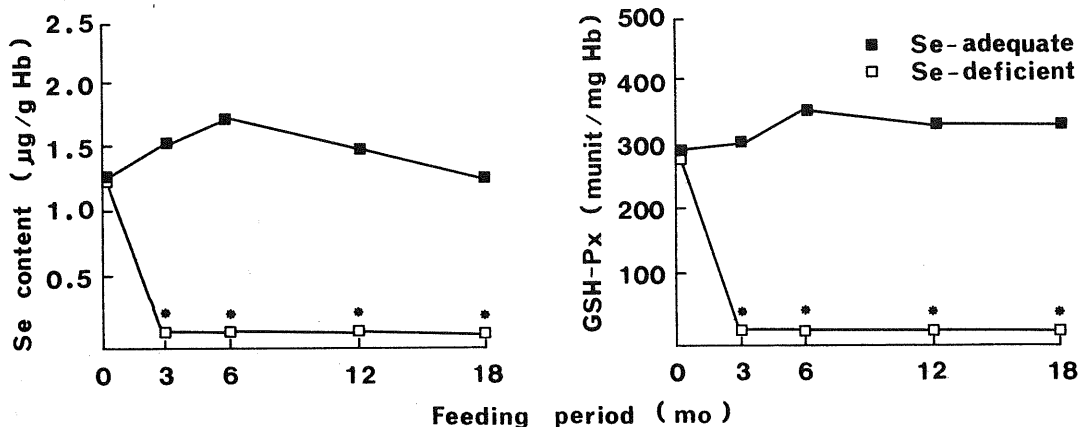


Fig. 1. Changes in the levels of Se content and GSH-Px activity in erythrocytes of Se-adequate and Se-deficient rats. Each plot is mean of four animals. *, $P < 0.005$.

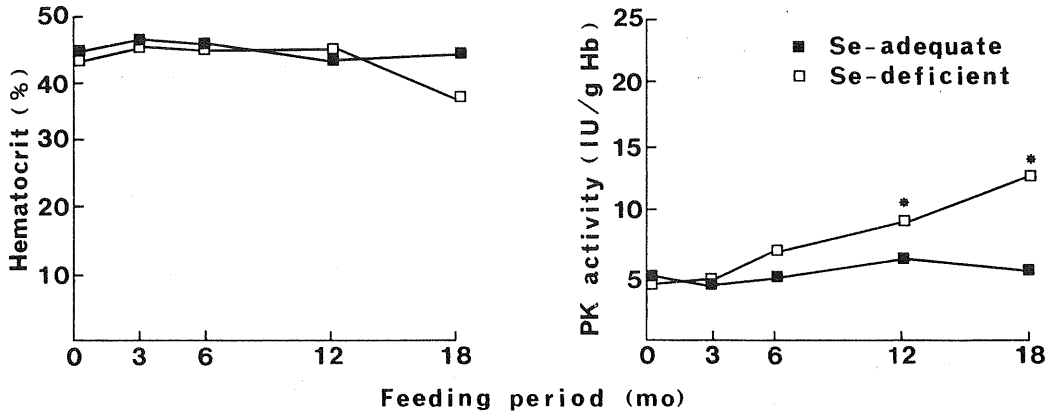


Fig. 2. Changes in the levels of hematocrit (Ht) and pyruvate kinase (PK) activity in erythrocytes of Se-adequate and Se-deficient rats. Each plot is mean of four animals. *, P < 0.005.

Table 1. Effect of dietary Se on GSH-Px activity and t-BuOOH-induced hemolysis in Se-deficient rats

		Se supplemented period (wk)			
		0	3	5	7
GSH-Px activity ¹ (munit/mg Hb)	Se +	319 ± 14	325 ± 11	336 ± 10	353 ± 11
	Se -	ND	30 ± 4	63 ± 10	91 ± 14
	(%)	—	(9)	(19)	(26)
Se content ¹ (μg/gHb)	Se +	1.3 ± 0.10	1.5 ± 0.12	1.5 ± 0.07	1.5 ± 0.03
	Se -	ND	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.03	0.5 ± 0.03
	(%)	—	(11)	(20)	(33)
Hemolysis ² (%)	Se +	5 ± 3	3 ± 1	5 ± 1	6 ± 3
	Se -	98 ± 2	95 ± 8	14 ± 1	5 ± 2

Means ± SEM (n = 4).

¹In erythrocytes.

²The reaction mixture (1.0ml) contained 10% erythrocyte as packed cells, 1 mM NaN₃, 1 mM KCN, and 2 mM GSH in isotonic phosphate buffer (pH 7.4), and was incubated with 0.6 mM t-BuOOH for 2 h at 37°C.

セレン欠乏ラットの赤血球中のGSH-Px活性及びセレン含量, ならびにセレン欠乏飼料からセレン充足飼料への転換によるt-BuOOH惹起溶血感受性の変化をTable 1に示した。セレン充足飼料に転換3週間後ではGSH-Px活性及びセレン含量いづれもセレン充足ラットのその約10%にまでしか回復しておらず, t-BuOOH惹起溶血に対する抑制効果も認められなかった。5週間後にはGSH-Px活性及びセレン含量ともに約20%まで回復し, t-BuOOHによる溶血に対しても明らかな溶血抑制効果が認められた。さらに, 12週間後には赤血球中のGSH-Px活性はセレン充足ラットのその約60%にまで上昇し, PK活性もセレン充足ラットのそのレベルにまで回復し, またHt値もセレン充足のそれとほぼ同程度に

Table 2. Effect of dietary Se on Ht and erythrocyte PK activity in Se-deficient rats

	Se-adequate	Se-repleted ¹	Se-deficient
GSH-Px activity (munit/mg Hb)	342 ± 8	190 ± 35*	ND
Pyruvate kinase activity (IU/g Hb)	6.6 ± 0.50	7.4 ± 1.00	11.7 ± 0.78**
Hematocrit (%)	45 ± 1	41 ± 3	33 ± 2**

Means ± SEM (n = 4).

¹Rats were repleted by feeding the Se-adequate diet for 12 wk.

Significantly different from Se-adequate, *, P < 0.01, **, P < 0.005

まで上昇し、貧血の回復も認められた (Table 2)。

これに対し、セレン充足飼料への転換を行わなかった群、すなわち、18ヶ月以後もセレン欠乏飼料で飼育したラットではセレン充足ラット群と比較し、PK 活性の有意な上昇、Ht 値の有意な減少が認められた。今回の実験で得られた結果を総合的に考察すると、セレン欠乏ラットでは赤血球膜が酸化ストレスを受け易くなった結果、寿命が短縮し、それを補完するために代償性造血の亢進が起こるのであろう、と考えられる。また、セレン欠乏状態が長期間続いた場合は、赤血球生産能力が赤血球崩壊に追いつかず、溶血性貧血が起きるのであろう。

文 献

1. SCHWARZ, K. and C. M. FOLTZ (1957) J. Am. Chem. Soc. 79 : 3292
2. ROTRUCK, J. T., A. L. POPE, H. E. GANTHER, A. B. SWANSON, D. G. HAFEMAN and W. G. HOEKSTRA (1973) Science 179 : 58
3. CHEN, X., G. YANG, J. CHEN, X. CHEN, Z. WEN and K. GE (1980) Biol. Trace Elem. Res. 2 : 91
4. YASUMOTO, K., C. H. KIM, T. SUZUKI and M. YOSHIDA (1988) Trace Nutr. Res. 4 : 79
5. 安本, 鈴木, 金 (1986) 微量栄養素研究第3集 : 111
6. KIM, C. H., T. SUZUKI, M. YOSHIDA and K. YASUMOTO (1988) Nutr. Res. 8 : 767
7. LITTLE, C., R. OLINESCUE, K. C. REID and P. J. O'BRIEN (1970) J. Biol. Chem. 245 : 3632
8. WATKINSON, J. H. (1966) Anal. Chem. 38 : 92
9. SEAMAN, C., S. WYSS and S. PIOMELLI (1980) Am. J. Hematol. 8 : 31