

セレン欠乏ラットにおける各種微量元素の生体内挙動

蛭沼利江子¹⁾, 榎本秀一¹⁾, 安部文敏¹⁾, 桜井 弘²⁾
(¹⁾ 理化学研究所, ²⁾ 京都薬科大学)

Behavior of various trace elements in Se-deficient rats

Rieko HIRUNUMA¹⁾, Shuichi ENOMOTO¹⁾, Fumitoshi AMBE¹⁾, and Hiromu SAKURAI²⁾

¹⁾ *The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN)*, ²⁾ *Kyoto Pharmaceutical University*

Uptake and distribution of various trace elements in the Se-deficient (I), (II), and control rats were examined by the multitracer technique, which can be used to evaluate the behavior of many elements under the same experimental condition. Wistar male rats born to Se-deficient dam were fed with Se-deficient diet for 12 weeks after birth to make them Se-deficient rats (I). Wistar male rats (4 weeks old) were fed with Se-deficient diet for 8 weeks to make them Se-deficient rats (II). And 4-week-old rats were fed with Se-adequate diet (0.2ppm of Se) for 8 weeks to use them control ones. The multitracer solution was injected intravenously into each rat. The Se-deficient (I), (II), and control rats were sacrificed at 3, 12, 24, and 72h after injection, and the radioactivity in their organs was measured using high-purity Ge detectors. The uptake of Se was higher in the brain of the Se-deficient rats (I) and (II) than in that of the control ones. The uptake of Se was higher in the testicles of the Se-deficient rats (II) than in that of the control ones. The uptake of As and Fe was larger in the liver of the Se-deficient rats (I) than in that of the Se-deficient (II) and control ones. Selenium enhances As excretion to bile in the rats. The observed accumulation of As in Se-deficient rats (I) suggests that bile excretion of As was decreased by the severe Se-deficiency. The increase of Fe uptake in the liver of Se-deficient rats (I) suggests an increase of Fe-binding proteins, such as ferritin in the liver.

セレンは、生体にとって必須であると同時に毒性が強く、適正な摂取量の範囲が狭い生体微量元素である。生体内におけるセレンの作用の一つに、カドミウムや水銀などの重金属による中毒症状を軽減する働きがあることが報告されている^{1), 2)}。その際、セレンはカドミウムや水銀の排泄を促進するのではなく、血液中で、これらの重金属と高分子量の複合体を形成し、その複合体が赤血球中に長時間滞留す

ることにより、これらの重金属の標的臓器である腎臓への蓄積量を減少させる^{1)~4)}。また、この高分子量複合体は、各臓器へ取り込まれた際にも、臓器中の不溶性画分に沈着するために各々の金属の毒性を発現させないことが知られている⁵⁾。逆に、セレンが不足した状態では、これらの重金属の毒性は増強される。カドミウムや水銀と同様にセレンが欠乏することにより毒性が増強される元素としては、銀、銅、ヒ素などが報告されている^{6),7)}。その他にも、セレンは、鉛、亜鉛、コバルト、ビスマス、スズ、マンガ、テルビウム、パラジウム、タングステン、モリブデン、タリウム、クロム、ニッケル、鉄、金、白金など様々な元素と相乗あるいは拮抗作用を示すと報告されている^{5),8)}。しかし、セレンと相互作用を示す元素は、現在までに報告されているこれらの元素の他にも多数存在すると考えられる。そこで、多種類の元素の挙動を同時に追跡できるマルチトレーサー法の特性を活かし、セレン欠乏ラットにおける各種元素の各臓器への取り込みの経時変化およびセレンと各種元素との相互作用を検討した。

また、生体でセレンは極微量で十分であり、セレン欠乏開始時期の違いによる生体への影響の変化を評価し、成長過程におけるセレンの重要性を把握するために、二通りのセレン欠乏状態のラットを作成した。すなわち、胎仔期からセレン欠乏状態としたセレン欠乏 (I) 群、離乳後からセレン欠乏状態としたセレン欠乏 (II) 群の二種類のセレン欠乏ラットを作成し、セレン欠乏状態とした時期の違いから生じる各種元素の取り込みの違いや生化学的な相違について検討した。

実験方法

妊娠確定14日目のWistar系ラットにセレン欠乏餌（オリエンタル酵母社製）および超純水を自由摂取させ、出産まで飼育した。さらに、出産後も仔ラットが離乳するまでは同一条件で飼育した。離乳後、雄を選別し、同様のセレン欠乏餌および超純水で12週齢になるまで飼育した。このセレン欠乏ラットをセレン欠乏 (I) 群とした。一方、セレン欠乏 (II) 群は、4週齢の雄のWistar系ラットを、同様のセレン欠乏餌および超純水で12週齢まで飼育したラットを実験に供した。また、コントロール群は、4週齢の雄のWistar系ラットに、0.2ppmのセレンを含有するセレン添加餌および超純水を8週間自由摂取させ、12週齢になったラットを実験に供した。

理研リングサイクロトロンを用いて、135MeV/nucleonまで加速した¹⁴Nなどの重イオンビームを銀ターゲットへ照射した。生成した多種類の放射性同位体から無担体、無塩のマルチトレーサーを得るために、ターゲット物質である銀は濃硝酸に溶解した後、濃塩酸を加えて塩化銀として沈殿させて除去した。得られた上澄液がマルチトレーサー溶液であり、その溶液を蒸発乾固後、生理食塩水に溶解して投与用マルチトレーサー溶液とした。

セレン欠乏 (I), (II) およびコントロール群に投与用マルチトレーサー溶液を0.1mlずつ尾静脈内投与した。投与から3時間、12時間、24時間および72時間後に解剖し、高純度ゲルマニウム半導体検出器で各臓器中の γ 線を測定し、各種元素の取り込みの経時変化を調べた。

セレン欠乏状態を評価するための指標として、下記の測定項目1~10について測定した。項目1は、血液を遠心して分離した赤血球を用い、項目2~5は、遠心分離した血清を用いた。また、項目6~8は全血を用いた。これらの検査値から、セレン欠乏 (I) および (II) 群の血液学的および血液生化学的の症状

についてコントロール群と比較した。さらに、項目9および10は機器中性子放射化分析法を用いて定量した。

- 測定項目 1：赤血球中のグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) 活性
 2：血清中のGSH-Px活性
 3：血清中のセレン濃度
 4：血清中の鉄濃度
 5：血清中の総鉄結合能 (TIBC)
 6：血液中のヘモグロビン濃度
 7：血液中の平均血球ヘモグロビン量
 8：血液中の平均血球ヘモグロビン濃度
 9：各臓器中のセレン濃度
 10：各臓器中の鉄濃度

結果および考察

セレン欠乏 (I) 群は著しい成長障害をおこしており、体重はコントロール群の約1/2の約100gであった。一方、セレン欠乏 (II) 群の体重および各臓器の重さは、コントロール群の重さとはほぼ一致していた。しかし、外見上はコントロール群と差の認められないセレン欠乏 (II) 群においても、GSH-Px活性の低下が認められた。セレン欠乏 (I), (II) およびコントロール群における赤血球および血清中のGSH-Px活性と血清中のセレン濃度をTable. 1に示した。セレン欠乏 (I) および (II) 群の赤血球中のGSH-Px活性は、それぞれコントロール群の約1/10, 約1/2に低下していた。一方、血清中のGSH-Px活性は、それぞれコントロール群の約1/300, 約1/30であった。GSH-Px活性の低下したセレン欠乏ラットの体内では過酸化物が除去できずに蓄積していると考えられる。さらに、胎仔の時期からセレン欠乏状態としたセレン欠乏 (I) 群は、セレン欠乏 (II) 群よりも極めて低いGSH-Px活性を示した。このことは、セレン欠乏 (I) 群の体内には、セレン欠乏 (II) 群よりも多くの過酸化物が蓄積していると示唆している。

Table 1. Glutathione peroxidase activity and Se content of Se-deficient (I), (II), and control rats

	GSH-Px activity		Se content
	Red blood cell (U/mg protein)	Serum (U/mg protein)	Serum (ppb)
Se-deficient rats (I)	14 ± 1*	0.12 ± 0.01*	43 ± 3*
Se-deficient rats (II)	56 ± 4*	1.4 ± 0.1*	92 ± 11*
Control rats	130 ± 6	38.6 ± 2.6	628 ± 48

1U=1 μ mol NADPH oxidised/min

Values are mean \pm S.D. of 5 rats. (* p<0.01)

また、セレン欠乏 (I) および (II) 群の血清中のセレン濃度は、コントロール群と比較してそれぞれ約1/15, 約1/7に低下していた。血清中に存在するセレンの60~70%はセレノプロテイン-Pに結合していると報告されている^{9), 10)}。このことから、本実験結果によるセレン欠乏 (I) および (II) 群のセレン濃度の低下は、セレノプロテイン-Pが減少していることを示唆している。

血清中のセレン濃度だけでなく、Table. 2に示したように、セレン欠乏 (I) および (II) 群において各臓器中のセレン濃度は、コントロール群の臓器中のセレン濃度と比較して低下していた。セレン欠乏 (I) および (II) 群の腎臓、肝臓、脾臓および精巣のセレン濃度は、欠乏状態の度合いに依存した低下を示した。一方、セレン欠乏 (I), (II) 群の脳内セレン濃度はほぼ一致しており、コントロール群の濃度の約2/3であった。胎仔期からセレン欠乏状態であるセレン欠乏 (I) 群は、成長不良を起こしているにも拘らず、セレン欠乏 (I) および (II) 群の脳内セレン濃度の減少が同程度であったことから、脳の機能を維持することに最小限必要なセレンは、すでに胎仔期に母親ラットから移行し胎仔の脳内に蓄積したものと考えられる。これまでのセレンの研究から、母親の体内に保留されていたセレンが胎盤を通して胎仔に移行するために、胎仔の体内のセレン濃度はほとんど減少しないと報告されている¹¹⁾。また、セレンの欠乏下でも、脳はセレン濃度を最も長期間維持する臓器であることが報告されている¹²⁾。これらの報告は、本研究結果を裏付けるものと考えられる。

次に、マルチトレーサーを投与した各群におけるセレンの各臓器への経時的な取り込みをFig. 1に示した。肝臓におけるセレンの取り込みは、投与後、どの時間においてもコントロール群のセレン量が最も多く、セレン欠乏 (II) 群、セレン欠乏 (I) 群の順で減少した。また、全ての群において、投与3時間以内にセレンは肝臓へ速やかに取り込まれ、その後その取り込まれたセレン量は減衰することなく肝臓中に蓄積していた。肝臓は生体内で最も多くセレンを含有する臓器であり、主にGSH-Pxとして存在していることが知られているが、セレン欠乏状態の動物に極微量のセレンを投与した場合、セレンは肝臓より内分泌組織に多く取り込まれることが報告されている¹²⁾。本実験において得られた結果も、セレン欠乏 (I) 群およびセレン欠乏 (II) 群におけるセレンの取り込みは、肝臓ではなく内分泌系の組織へ優先したと考えられる。

Table 2. Content (ppm) of Se and Fe in various organs of Se-deficient (I), (II), and control rats determined by instrumental neutron activation analysis

Se	Bone	Brain	Kidney	Liver	Spleen	Testicles
Se-deficient rats (I)	ND	0.6 ± 0.1*	0.6 ± 0.1*	0.07 ± 0.03*	0.3 ± 0.1*	2.4 ± 0.2*
Se-deficient rats (II)	ND	0.7 ± 0.1*	1.5 ± 0.2*	0.19 ± 0.05*	1.1 ± 0.2*	8.3 ± 1.2*
Control rats	ND	1.0 ± 0.1	7.9 ± 1.0	3.1 ± 0.3	2.3 ± 0.2	10.3 ± 1.4

Fe	Bone	Brain	Kidney	Liver	Spleen	Testicles
Se-deficient rats (I)	58 ± 6*	130 ± 20	300 ± 35	654 ± 41*	2434 ± 247*	157 ± 10
Se-deficient rats (II)	43 ± 4	142 ± 18	300 ± 26	497 ± 41	2726 ± 238*	148 ± 17
Control rats	40 ± 6	160 ± 24	258 ± 26	452 ± 45	1431 ± 241	150 ± 13

Values are mean ± S.D. of 5 rats. (* p<0.01)

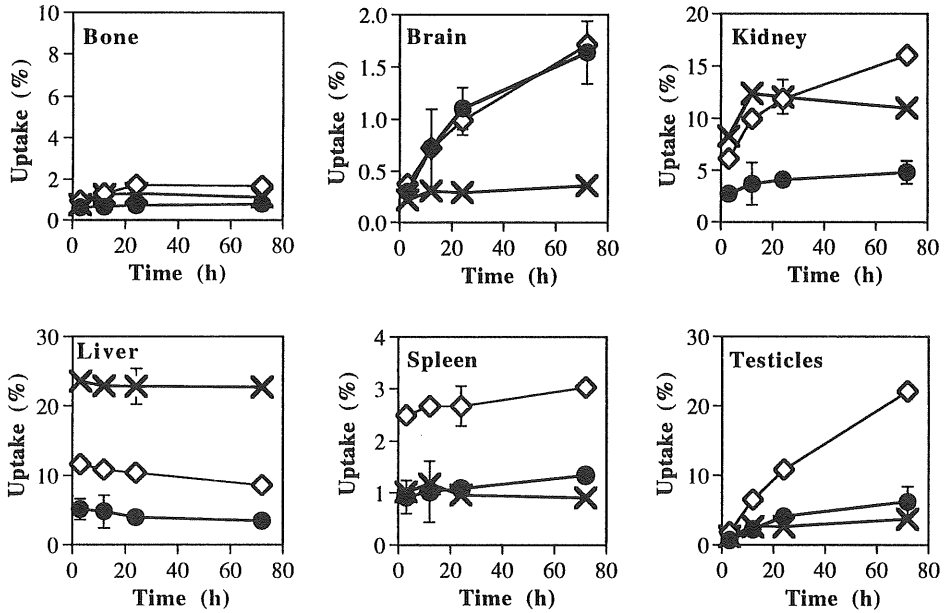


Fig. 1 Time-dependent uptake (%) of Se in various organs of the Se-deficient (I), (II), and control rats

● Se-deficient (I) ◇ Se-deficient (II) ✕ Control

セレン欠乏 (I) および (II) 群の脳内へ移行したセレンの取り込み量はほぼ一致し、コントロール群と比較して経時的な増加を示した。Table. 2に示したように、セレン欠乏ラット (I) および (II) 群において、脳内のセレン濃度はほぼ一致して低濃度であった。セレンが不足してくると各臓器中のセレン濃度は低下するが、脳はセレンを最も長く保持する臓器であり、また、セレン欠乏時に微量のセレンを投与した場合は脳に最も速く取り込まれることが報告されている¹²⁾。ここで得られた結果は、内分泌系の一つとして脳にも優先的にセレンを取り込む性質があることを示唆している。

セレン欠乏 (II) 群の精巣へ取り込まれたセレンは、コントロール群の取り込み量と比較して増加した。しかし、セレン欠乏 (I) 群の精巣へ取り込まれたセレンは、コントロール群の取り込み量とほぼ一致した値を示した。セレンは精子形成に重要な役割を担っていることが知られており⁵⁾、セレン欠乏 (II) 群の精巣へのセレンの取り込みの増加はこのことに起因していると考えられる。一方、セレン欠乏 (I) 群では、成長不良による二次性徴の遅れのために、セレンの必要量が少なかったことが示唆された。

セレン以外の各元素の取り込み量や挙動に関しては、セレン欠乏 (II) 群ではコントロール群と一致しており、変化が認められなかった。セレン欠乏 (II) 群は、GSH-Px活性の低下が認められセレン不足による影響は出ているものの、セレン以外の元素の挙動に影響を及ぼす程のセレン欠乏状態ではないことが明らかとなった。一方、セレン欠乏 (I) 群においては、各臓器、特に肝臓へのヒ素および鉄の取り込みが、コントロール群と比較して増加した。Fig. 2 (1) に、脳、肝臓および脾臓におけるヒ素の経時的

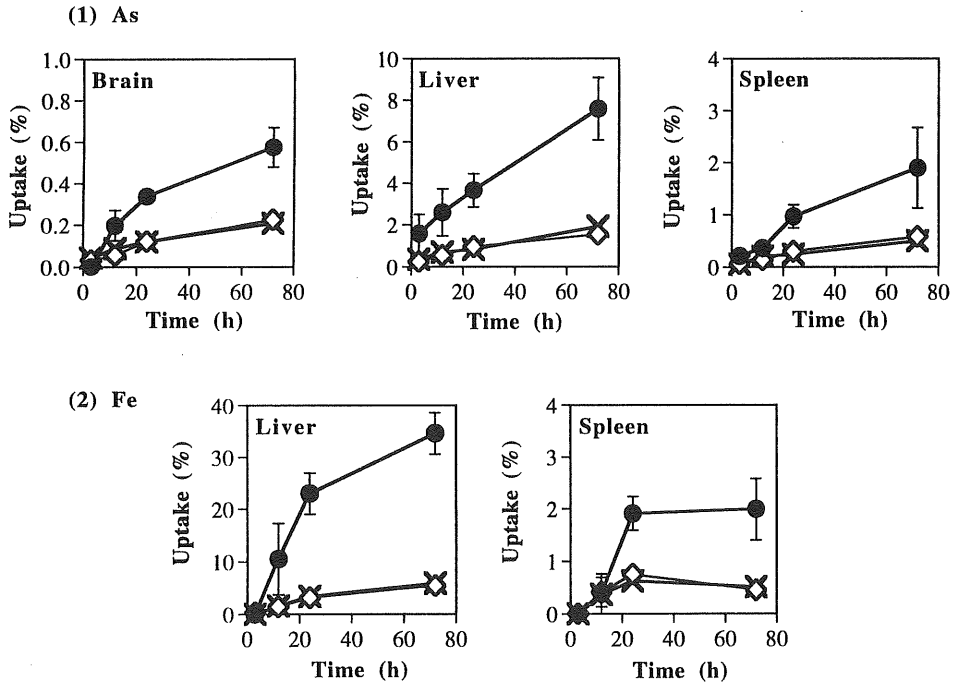


Fig. 2 Time-dependent uptake (%) of (1) As and (2) Fe in various organs of the Se-deficient (I), (II), and control rats

● Se-deficient (I) ◇ Se-deficient (II) ✕ Control

な取り込みを示し、Fig. 2 (2) に、肝臓および脾臓における鉄の経時的な取り込みを示した。ヒ素はセレン中毒を緩和する作用をもち、セレンもヒ素中毒を緩和する作用があることが報告されている¹³⁾。また、ヒ素はセレンの胆汁排泄を促進し、セレンはヒ素の胆汁排泄を促進すると報告されている⁷⁾。さらに、肝臓中においてヒ素はセレンと結合して生体にとって無毒化の化学形をとり、胆汁中に排泄されると報告されている⁷⁾。以上を鑑みると、セレン欠乏 (I) 群における肝臓中のヒ素の取り込みの増加は、セレン不足により、ヒ素のメチル化が減少した、あるいは、胆汁からのヒ素排泄が減少したことに起因していると考えられる。

また、セレン欠乏 (I) 群の肝臓および脾臓における鉄の取り込みが増加し、鉄の取り込みに対してセレン不足が影響する結果が得られたことから、血液中の鉄の影響について注目した。各群の血液中のヘモグロビン濃度、血液中の平均血球ヘモグロビン量、血液中の平均血球ヘモグロビン濃度、血清中の鉄濃度、TIBC、トランスフェリン飽和率を Table. 3 に示した。その結果、血清中の鉄濃度、TIBC、トランスフェリン飽和率はセレン欠乏 (I) および (II) 群ともコントロール群とほぼ一致した。トランスフェリンは、セレン欠乏による影響を受けないことが示唆された。さらに、ヘモグロビンに対してもセレン欠乏による影響が認められなかった。以上のことから、セレン欠乏 (I) 群における鉄の取り込みの増加は、血液中の鉄によるものではないことが明らかとなった。

さらに、機器中性子放射化分析法を用いて各臓器中の鉄濃度を定量した結果 (Table. 2) から明らかな

Table 3. Iron status in the serum and hematologic parameters in the blood of Se-deficient (I), (II), and control rats

	Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	Transferrin saturation ($\mu\text{g}/\text{dl}$)
Se-deficient rats (I)	205 \pm 71	523 \pm 44	50 \pm 19
Se-deficient rats (II)	173 \pm 28	552 \pm 30	31 \pm 4
Control rats	171 \pm 62	543 \pm 73	43 \pm 9

	Hemoglobin Hb (g/dl)	Mean corpuscular hemoglobin MCH (10^{-12}g)	Mean corpuscular hemoglobin concentration MCHC (%)
Se-deficient rats (I)	16 \pm 2	23 \pm 5	40 \pm 5
Se-deficient rats (II)	16 \pm 1	19 \pm 1	37 \pm 1
Control rats	15 \pm 1	22 \pm 2	39 \pm 2

Values are mean \pm S.D. of at least 3 rats.

ように、セレン欠乏 (I) 群の肝臓および脾臓中の鉄濃度はコントロール群と比べて増加していた。セレン欠乏 (I) 群の肝臓中の鉄濃度は、コントロール群の肝臓中の濃度の1.5倍と増加したが、セレン欠乏 (II) 群においては有意な差が認められなかった。このことより、胎仔期からセレン欠乏状態とした場合のみ、肝臓において鉄の蓄積が増加することが示唆された。また、セレン欠乏 (I) および (II) 群の脾臓中の鉄濃度は、共にコントロール群の脾臓中の濃度の約2倍であり、脾臓においては欠乏状態開始時期によらず短期間でもセレン不足の影響が現れることが示唆された。

以上の結果から、セレン欠乏ラット (I) の肝臓における鉄の取り込みの増加は、血液中の鉄の影響ではなく、肝臓への鉄の蓄積増加が原因であることが明らかとなった。肝臓における鉄の蓄積増加は、鉄含有タンパク質であるカタラーゼあるいはフェリチンの影響が考えられる。カタラーゼは、GSH-Pxと同様に活性酸素を除去する作用を有するヘムタンパク質である。1980年にLeeらは、セレンおよびビタミンEの欠乏において、肝臓中のカタラーゼは減少するが、セレンのみの欠乏において、肝臓中のカタラーゼは変化しないと報告している¹⁴⁾。また、鉄含有タンパク質であるフェリチンの血清中の濃度を測定したKawamotoらの研究によると、12週間セレン欠乏状態で飼育したラットの血清中の濃度はコントロール群と変わらないが、24週間セレン欠乏状態で飼育したラットの血清中の濃度は高くなると報告している¹⁵⁾。本実験では肝臓中のフェリチンは測定していないが、セレン欠乏ラット (I) では増加していると推測される。セレン欠乏ラット (II) の肝臓における鉄の取り込みの増加はフェリチンが関与していると考えられる。

ま と め

離乳後からセレン欠乏餌で飼育したセレン欠乏ラット (II) は、GSH-Px活性が低下しており、さらに各臓器中のセレン濃度が低下していることからセレン不足であることは明らかであった。しかし、マルチトレーサーを投与したセレン欠乏ラット (II) の各臓器における各種元素の取り込みは、セレンの挙動

のみコントロール群の挙動と異なっていた。セレン以外の元素の挙動に関しては、コントロール群の結果と一致しており、セレン以外の元素の挙動に影響を及ぼさないことが分かった。

一方、胎仔期からセレン欠乏状態で飼育したセレン欠乏ラット (I) におけるヒ素および鉄の体内動態は、コントロール群の結果と異なっており、セレンの関与する各種タンパク質がこれらの元素の体内動態に影響を与えることが示唆された。セレン欠乏ラット (I) の肝臓におけるヒ素の取り込みの増加は、ヒ素のメチル化の減少あるいは、胆汁からのヒ素排泄の減少が考えられる。セレン欠乏ラット (I) の肝臓における鉄の取り込みの増加は、鉄貯蔵タンパク質であるフェリチンが関与していると考えられる。

参 考 文 献

- 1) Gasiewicz, T.A. and J.C. Smith (1978) *Chem. Biol. Interact.* 23 : 171
- 2) Thomas, D. J. and J. C. Smith (1984) *Environ. Res.* 34 : 287
- 3) Urano, T., N. Imura and A. Naganuma (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 239 : 862
- 4) Gambhir, J. and R. Nath (1992) *Indian J. Exp. Biol.* 30 : 597
- 5) 千葉百子, 鈴木和夫 (1996) 健康と元素, 南山堂, 東京 : pp.72
- 6) Berry, J.P., L. Zhang, and P. Galle (1995) *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 27 : 21
- 7) Levander, O. A. (1977) *Environ. Health Perspect.* 19 : 159
- 8) 木村修一, 左右田健次 (1987) 微量元素と生体, 秀潤社, 東京 : pp. 57
- 9) Steinert, P., D. Bächner, and L. Flohé (1998) *Biol. Chem.* 379 : 683
- 10) Hill, K.E. and R. F. Burk (1997) *Biomed. Environ. Sci.* 10 : 198
- 11) Bedwal, R.S. and A. Bahuguna (1994) *Experientia* 50 : 626
- 12) Behne, D., H. Hilmert, S. Scheid, H. Gessner, and W. Elger (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 966 : 12
- 13) Moxon, A.L. and K. P. DuBois (1939) *J. Nutr.* 18 : 447
- 14) Lee, Y.H., D. K. Layman, and R. R. Bell (1981) *J. Nutr.* 111 : 194
- 15) Kawamoto, N.C. and K. Yasumoto (1995) *Biosci. Biotech. Biochem.* 59 : 302