

PIXE 分析による無機セレン投与後の Se のラット体内動態

化学形による相違

夏堀雅宏 尾関源 世良耕一郎*1 ニツ川章二*2 伊藤伸彦

北里大学獣医畜産学部

034-8628 青森県十和田市東 23 番地 35-1

*1 岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

*2 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター

020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

1. はじめに

セレン(selenium ; Se)はその毒性の反面、体内保持濃度が生理的濃度より低下すると重篤な欠乏症を発現する必須微量元素の 1 つである。Se 欠乏症の緩和やその予防的見地から Se の投与が必要となる場合があるが、Se は栄養レベルと中毒レベルが比較的接近している微量元素であり、その生理活性を効率よくかつ安全に利用するためには、直接的な毒性や残留も理解した上で投与形態ならびに投与方法を適切に選択あるいは改善する必要がある。夏堀ら⁸⁻¹⁰⁾は正常ラットの *in vivo* における静脈内および経口の亜 Se 酸ナトリウム投与後の体内動態および尿中・糞中への排泄過程を、さらに金子ら⁴⁻⁵⁾は、その臓器中および血漿中 Se 濃度を同時解析することで、投与経路による臓器分布の違いを動態学的パラメータで示した。一方、Se 欠乏飼料給餌ラットにおいて⁷⁵Se を投与した場合には、⁷⁵Se の体内保持量の増加が示されており¹⁾、このことから、Se 欠乏状態時の Se 体内動態は正常時と異なると考えられている。これについて磯村ら³⁾、石井ら²⁾は Se 欠乏飼料給餌ラットにおける亜 Se 酸ナトリウム投与後の血漿中 Se 濃度の経時的推移や尿および糞中 Se 排泄への影響を調べ、尿中排泄が血漿中 Se 濃度に比べて相対的に低下したことから、これは Se の欠乏した各器官、組織へ Se が供給されたと考えた。さらに尾関ら¹²⁾は Se 欠乏飼料給餌ラットにおける亜 Se 酸ナトリウム投与後の臓器中および血漿中 Se 濃度の同時解析を行い、欠乏期間の延長に伴い、最高濃度時間や半減期が上昇し、更に大半の臓器で、実測値から得られた正味の濃度時間曲線下面積も上昇していたことから、Se 欠乏状態におかれた動物では Se 摂取量の低下に伴い、投与された Se を血漿および臓器中により長く保持することが明らかになった。このように、本研究室ではこれまで亜 Se 酸ナトリウムの体内動態について種々の条件で検討を行ってきた。一方で Se 酸は非経口投与された場合の体内での分布・代謝が亜 Se 酸とは異なる¹⁷⁾ことが知られている。このため本研究ではラットに Se 酸ナトリウムを経口投与した後の血漿、尿中 Se 濃度を PIXE 法で測定し、さらにラット血漿中 Se 濃度の経時的な推移と尿中 Se 排泄について、過去の亜 Se 酸ナトリウム経口投与の結果^{6-8,16)}と比較した。

2. 方法

2-1. 使用動物

ラット (Slc:Wistar、雌、8 週齢、n=10, BW 130~150 g, 日本エスエルシー) を用いた。ラットは代謝ケージ (ラットメタボリックケージ、kn-650 夏目製作所) 内で 2 週間飼育・馴致した。このラットには市販固形飼料 (CE-2、日本クレア) および水道水を自由摂取させた。この飼料中 Se 含量は放射化分析により $0.44 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ であった⁸⁾。馴致および実験期間中の動物の体重、飼料摂取および飲水量、尿量は毎日測定し、記録した。

2-2. Se 酸 Na 溶液の作製とラットへの投与

セレン酸 (selenic acid, 関東化学) 100 μl を生理食塩水 900 μl に溶解させ、次にこの溶液 200 μl を生理食塩水 9.8cc に溶解させ 1.66mg/ml (Se 0.90mg/ml) 投与溶液とした。馴致後のラットに、調整した Se 酸 Na 溶液を約 2.2ml/kg B.W. (Se 2mg/kg B.W.) 用意し、経口ゾンデを用いて胃内に直接投与した (投与時におけるラットは、11~13 週齢である)。Se 投与後も引き続き、普通固形飼料と飲水を自由摂取させた。

2-3. 試料の採取・調製と PIXE 分析

血液は投与前日から投与後 10 日間まで経時的 (1, 3, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96, 120, 144, 192, 240 時間) に尾静脈より、5%ヘパリン加生理食塩水で内筒をリンスした 1ml シリンジにて約 100 μl 採血した。血液は採取後すぐに 2,000g \times 5 分間遠心分離し、血漿を採取した。得られた血漿はマイクロチューブに移した後、凍結保存した(-20)。尿試料は、投与前後の 10 日間、毎日全量を採取し、それぞれ容量および重量を測定した。その後、尿試料はそれぞれ攪拌し、1ml を測定用尿試料として凍結保存した(-20)。

得られた液体試料はメノウ皿上に滴下し、試料 50 μl に対し内部標準としてインジウム標準液(1000ppm 原子吸光分析用標準液、和光純薬工業)を血漿試料には 5 μl (終濃度 100ppm)、尿試料には 10 μl 加えた(終濃度 200ppm)。この試料をメノウ皿上でよく攪拌した後、その 5 μl をマイラー製ターゲットホルダーに貼り付けた 4 μm 厚のポリプロピレン膜上に滴下、乾燥させて分析試料とした。これらの試料には、小型サイクロトロン(MCY-1750 島津製作所, (社)日本アイソトープ協会、仁科記念サイクロトロンセンター; 岩手医科大学サイクロトロンセンター)を用いて、陽子線を照射し PIXE 分析を行った。陽子線 (2.9 MeV) を用い、約 3~40 分の照射中に放出された X 線スペクトルを Si(Li)検出器(ORTEC、U.S.A.、エネルギー分解能 5.9 keV)および波高分析器(MCA7800 SEIKO EG&G 製、東京)で検出した。得られた X 線エネルギースペクトルをパーソナルコンピューター(PC9801、NEC)に転送し、PIXE スペクトル解析プログラム(SAPIX Ver.3)で Se 含有量を決定した¹³⁻¹⁴⁾。

2-4. 血漿中 Se の動態解析

血漿中 Se 濃度の動態パラメータ解析は、定常状態を考慮した一次吸収過程を含む 2-コンパートメントオープンモデル (Eq.1)で解析した⁸⁾。動態解析には非線形最小自乗法プログラム (MULTI)¹⁸⁾を用い、薬物動態学的パラメータを算出した。また、血漿中 Se 濃度 - 時間曲線 (Cp) から、曲線下面積 (Area Under Concentration-time curve: AUC) を求めた。実際には Se 酸 Na 投与前の血漿中に含まれる平均 Se 濃度をバックグラウンドとして、それより高い濃度を示してから、バックグラウンド濃度 (C₀) に戻るまでの範囲として正味の AUC (AUC_{net}) を求めた。

$$C_p = F \cdot D \cdot K_a / (V_d \cdot (K_{el} - K_a)) \cdot (\exp(-K_a \cdot t) - \exp(-K_{el} \cdot t)) + C_0 \quad \dots \text{Eq.1}$$

2-5. 尿中 Se 排泄量の補正および平均 Se 排泄量の算出

1 日当たりの尿中排泄量は PIXE 分析で得られた尿中排泄濃度と尿重量の積として求めた。それらをさらに体重で補正し、体重 1kg 当たりの排泄量に換算した。また、亜 Se 酸ナトリウム投与前 2 日間の尿中の平均 Se 排泄量は、個体差と日々の変動を考慮して個体ごとに求めた。さらに、投与量(2mg/kg B.W.)に対する、投与後 10 日目までの正味の累積尿中 Se 排泄量の割合を、累積尿中 Se 回収率として求めた。また投与後 10 日目までの累積尿・糞中 Se 回収率を合計して、投与量に対する合計累積 Se 回収率を求めた。これらの実験結果を比較するために長岡ら⁷⁾・夏堀ら⁸⁾のデータから亜 Se 酸 Na を同用量、同じ経口投与でラットに投与した結果を引用した。

3. 結果

3-1. 血漿中 Se 濃度の変化

Se 酸 Na 投与群の投与後 50 時間と 240 時間までの血漿中 Se 濃度の推移および主要動態パラメータを Fig.1 に示す。Se 酸 Na 投与前の平均血漿中 Se 濃度は $0.22 \pm 0.09 \mu\text{g/ml}$ (mean \pm SD)であった。Se 酸 Na 投与後の血漿中 Se の最高濃度時間(T_{max})は約 9 時間であり、亜 Se 酸 Na 投与群(T_{max} : 24 時間)に較べ著しく短時間であった。吸収速度定数(K_a)は Se 酸 Na 投与群で $0.17 \pm 0.06/\text{h}$ であり、亜 Se 酸 Na 投与群の $0.03 \pm 0.08/\text{h}$ の 6 倍と高値を示し、一方 Se 酸 Na 投与群の分布相の速度定数(α)は $0.09 \pm 0.03/\text{h}$ と亜 Se 酸 Na 投与群の消失速度定数(K_{el})の値 $0.08 \pm 0.16/\text{h}$ とほぼ同じ値を示した。また、亜 Se 酸 Na は吸収速度定数 (K_a) が消失速度定数 (K_{el}) より小さく、消失過程が吸収速度に律速された flip-flop と呼ばれる現象を示したのに対し、Se 酸 Na では吸収速度定数が α および β よりも大きく、この結果 Se の速やかな吸収が示された。また Se 酸 Na 投与群の分布相の半減期($T_{1/2}(\alpha)$)は 8.5 ± 26 時間であり、亜 Se 酸 Na の半減期($T_{1/2}$)は 8.7 時間であった。AUCnet は $52.5 \pm 2.4 \text{ mg}\cdot\text{h}/\text{ml}$ で亜 Se 酸 Na 投与群 ($10.4 \pm 2.4 \text{ mg}\cdot\text{h}/\text{ml}$) の約 5 倍の値を示した ($p < 0.01$)。 T_{max} は 9.3 ± 2.1 時間と亜 Se 酸 Na 投与群の T_{max} (約 24 時間) よりも有意な低値を示した。 C_{max} は $1.44 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{ml}$ と亜 Se 酸 Na 投与群の $0.62 \mu\text{g}/\text{ml}$ の約 2 倍であった。同様に、Se 酸 Na 投与群の実測値から出した最大濃度の平均値は $1.76 \pm 0.57 \mu\text{g}/\text{ml}$ と亜 Se 酸 Na より高値を示した。いずれの群においても PIXE による実測値と得られたパラメータによるシミュレーション曲線はよく一致した。

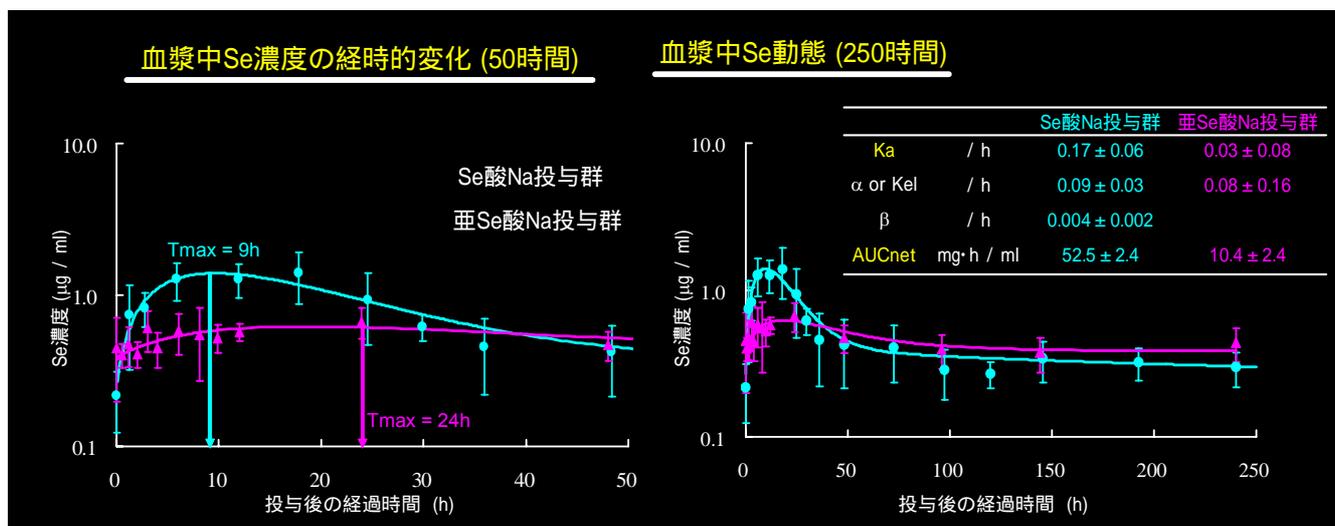


Fig.1 Se 酸ナトリウムおよび亜 Se 酸ナトリウム投与後の血漿中 Se 動態

3-2. 尿中 Se 排泄量

各群の尿中 Se の経日的排泄量および累積排泄量を Fig.2 に示す。尿中 Se 排泄の経時的変化は亜 Se 酸 Na 投与群では、どの個体も、投与 2 日後に、Se 酸 Na 投与群はどの個体も投与翌日(1 日後)に最大値を示した。各投与群での排泄量の最大値は Se 酸 Na 投与群では $247 \pm 87 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、亜 Se 酸 Na 投与群では $150 \pm 74 \mu\text{g}/\text{kg}$ で、Se 酸 Na 投与群は亜 Se 酸 Na 投与群の約 1.6 倍であった。しかし、個体差による変動も大きく、統計的有意差は認められなかった。各群ともに、投与後 5 日目まで Se の排泄は減少し続け 5 日目以降にはほぼ投与前の排泄状態に戻った。正味の累積尿中 Se 排泄量の経時的変化はどちらの投与群も大差なく投与後 5 日目までは急激に増加し、それ以降は投与前の平均 Se 排泄量により個体差があったが大半は飽和した。投与後 5 日目までの正味の累積尿中 Se 排泄量は、亜 Se 酸 Na 投与群で $410 \pm 87 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、Se 酸 Na 投与群は $450 \pm 120 \mu\text{g}/\text{kg}$ でほぼ同様と考えられた。投与後 10 日目の累積排泄量は、亜 Se 酸 Na 投与群で $418 \pm 81 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、Se 酸 Na で $481 \pm 121 \mu\text{g}/\text{kg}$ となった。この時点における累積尿中 Se 回収率は亜 Se 酸 Na 投与群で $20.8 \pm 4.0\%$ 、Se 酸 Na 投与群で $24.0 \pm 6.1\%$ であった。

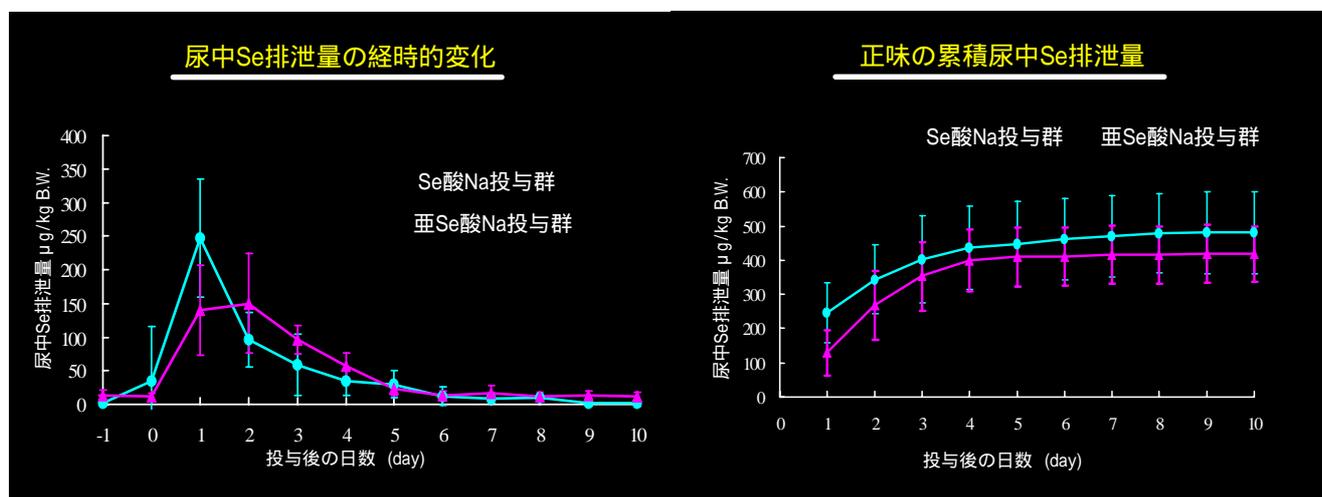


Fig.2 Se 酸ナトリウムおよび亜 Se 酸ナトリウム投与後の尿中 Se 排泄

4. 考察

Se 酸 Na 経口投与群の血中 Se 動態は定常状態を考慮した一次吸収過程を含む 2-コンパートメントモデルが実測値に対し最もよく当てはまった。Tmax は 9.3 時間と亜 Se 酸 Na 投与群の約 24 時間に対して極めて短時間であった。一方 Cmax は $1.44 \mu\text{g}/\text{ml}$ と亜 Se 酸 Na 投与群 ($0.62 \mu\text{g}/\text{ml}$) の約 2 倍高値であり、Ka は亜 Se 酸 Na 投与群の約 6 倍と極めて高い値であった。このことは Se 酸の消化管から血漿中への移行が亜 Se 酸に比べ極めて速いことを示す。セレン酸は強酸で、亜セレン酸は弱酸であり経口で摂取された場合は消化管内での溶解度の相違が著しく異なると予想され、これが腸管の吸収速度に差が出たのか、またはトランスポーターを介する吸収経路の有無による違いによることが吸収速度定数とその後の消失に違いを与えたのではないかと考えられた。静脈内投与の場合、Se 酸塩は血漿中に入った後、尿にそのまま排泄されるか、肝臓で代謝、還元され亜 Se 酸塩になってからセレニドになり SeCystRNA を経て Se タンパク質に取り込まれ血漿中に移行する¹⁷⁾。一方、亜 Se 酸塩は赤血球中に取り込まれ還元されてセレニドとして血漿中に放出され SeCystRNA を経て Se タンパク質に取り込まれる。以上のように、血流中の代謝過程は亜 Se 酸塩と Se 酸塩は全く異なることが明らかとなっている。今回の実験は経口投与で

あり、したがって消化管から吸収された Se は門脈を通り必ず肝臓を通過することになるので、亜 Se 酸の生体内利用率が低いのは、肝臓の初回通過効果が大きい可能性も考えられる。しかしながら、肝の初回通過による代謝の影響を具体的に知るためには血漿中 Se の化学形を明らかにする必要があると思われる。

尿中 Se 排泄は、単胃動物や人における主要な排泄経路で、大半の食餌状態や投与量下では最も重要な経路であり、Se ホメオスタシス維持の主要なシステムの一つである¹⁾。今回の実験では、尿中 Se 排泄量に有意差は認められなかった。主要な排泄はどちらの投与群とも、5 日目までに終わり、投与前の排泄状態に戻るまでの濃度推移のパターンもほぼ同様になった。結果として、累積の尿中 Se 排泄量および尿中 Se 回収率ともに有意差は認められなかった。従って投与量が同じであり、尿中排泄が同じであるにもかかわらず、血中動態に大きな差が認められたことは、その消化管吸収速度の違いから、Se 酸と亜 Se 酸の経口投与後では糞中排泄に有意な違いが認められるのかもしれない。生体試料中 Se 化合物の化学形の微量定量解析が可能であれば、今回の現象のメカニズムが得られるのかもしれない。

文献

1. Bopp, B.A., Sonders, R.C. and Kesterson, J.W. 1982. Metabolic Fate of Selected Selenium Compounds in Laboratory Animals and Man. *Drug Metabolism Reviews*, 13(2): 271-318.
2. 石井陽子, 磯村綾子, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 2001, Se 欠乏食給餌ラットの Se 排泄 / 臓器中 Se 濃度と亜 Se 酸ナトリウム投与後の体内動態, NMCC 共同利用研究成果報文集 8 (2000), 143-150.
3. 磯村綾子, 金子恵, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 2000, 亜セレン酸ナトリウム投与後のラット肝臓中セレン分布, NMCC 共同利用研究成果報文集 7 (1999), 180-186.
4. 金子恵, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 1999, ラットにおける亜 Se 酸ナトリウム投与後の Se の臓器動態, NMCC 共同利用研究成果報文集 6 (1998), 228-233.
5. Kaneko, M., Natsuhori, M., Ito, N., Sera, K. and Futatsugawa, S. 1999. Tissue Concentration-Time Profile of Selenium after Sodium Selenite Administration to Rats. *International Journal of PIXE*, Vol.9, Nos.3&4, 315-323.
6. 古川意, 副島妙子, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 1997, ラットにおける亜 Se 酸ナトリウム投与後の血漿中 Se の動態, NMCC 共同利用研究成果報文集 4 (1996), 61-67.
7. 長岡たまえ, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 1998, ラットにおける亜 Se 酸ナトリウム投与後の Se の体内動態, NMCC 共同利用研究成果報文集 5 (1997), 77-83.
8. Natsuhori, M., Nagaoka, T., Ito, N., Sera, S. and Futatsugawa, S. 1998. Pharmacokinetics of Selenium after Sodium Selenite Administration to Rats. *International Journal of PIXE*, Vol.8, Nos.2&3, 89-97.
9. 夏堀雅宏, 金子恵, 磯村綾子, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 2000, 亜セレン酸ナトリウム投与後のラット臓器中セレン動態の同時解析, NMCC 共同利用研究成果報文集 7 (1999), 187-195.
10. 夏堀雅宏. 2000. ラットにおける Se の体内動態. *Radioisotopes*, 49(11): 17-24.
11. 夏堀雅宏. 2000. Bio-PIXE その理論と応用 第 4 章 基礎医学への応用 (2) ラットにおける Se の体内動態. *Radioisotopes*, 49 (11):543-550.
12. 尾関源, 石井陽子, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 2002, 亜 Se 酸ナトリウム投与後の Se 欠乏食給餌ラット臓器中 Se 動態, NMCC 共同利用研究成果報文集 9, 77-85.
13. 世良耕一郎・ニツ川章二. 2000. Bio-PIXE その理論と応用 第 1 章 (1) 緒言. *Radioisotopes*, 49: 409-410.

14. 世良耕一郎. 2000. Bio-PIXE その理論と応用 第3章 生物試料の測定・定量法. *Radioisotopes*, 49: 494-504.
15. Sera, K., Yanagikawa, T., Tsunoda, H., Futatsugawa, S., Hatakeyama, S., Suzuki, S. and Orihara, H. 1992. The Takizawa PIXE Facility Combined with a Baby Cyclotron for Positron Nuclear Medicine. *International Journal of PIXE*, Vol.2, No1, 47-55.
16. 副島妙子, 古川意, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二. 1997, ラットにおける亜セレン酸ナトリウム投与後のセレンの尿中排泄, *NMCC 共同利用研究成果報文集 4 (1996)*, 68-72.
17. 鈴木和夫. 2001. 生体微量元素の機能を化学形体から探る. *ファルマシア*. Vol.37, No.6, 487-489
18. Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T. 1981. A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, Vol.4, No.11, 879-885.