

# 亜セレン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

尾関源<sup>\*1</sup> 石井陽子<sup>\*1</sup> 夏堀雅宏<sup>\*1</sup> 伊藤伸彦<sup>\*1</sup> 世良耕一郎<sup>\*2</sup> ニツ川章二<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup> 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

<sup>\*2</sup> 岩手医科大学サイクロトンセンター  
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

<sup>\*3</sup> 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトンセンター  
020-0173 岩手郡滝沢村字留が森 348-58

## 1. はじめに

セレン(Se)は高い毒性を持つ反面，哺乳動物の必須微量元素である。Se は肝臓で合成されるグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)の主要成分として存在し，その抗酸化作用により細胞をフリーラジカルによる傷害から保護する。家畜や人において Se 欠乏症が知られているとともに，最近では，Se 化合物の制ガン作用について疫学的な証拠が得られている。

Se 欠乏症やその予防的見地からセレンの生体への投与が必要とされる場合 Se は生体に対する毒性発現と欠乏症発現の濃度域が極めて狭く，また，吸収された Se の組織分布や排泄は，食餌中 Se 総量および Se 投与量やその化学的形態によって異なることから，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。本研究では市販の固形普通飼料または Se 欠乏飼料給餌ラットに亜 Se 酸ナトリウムを経口投与し，その後の血漿および臓器中 Se 濃度を PIXE 法で測定し，Se の体内動態について検討した。

## 2. 方法

7 週齢の Wistar ラット(日本エスエルシー，雄  $155 \pm 14$ g，雌  $122 \pm 6$ g(mean  $\pm$  SD))雄雌それぞれ 40 匹を用いた。まず，Se 欠乏状態の評価用として，雄雌共に 4 匹それぞれ無作為に，市販普通固形飼料給餌群 (control M 群，control F 群)，Se 欠乏飼料 2 週間給餌群 (SD2wM 群，SD2wF 群)，Se 欠乏飼料 6 週間給餌群(SD6wM 群，SD6wF 群)の 3 群に分けた。更に残りのラットは，Se 欠乏状態における亜 Se 酸ナトリウム投与用として，雄雌それぞれ 14 匹ずつ SD2wM 群，SD2wF 群，SD6wM 群，SD6wF 群に分け，金子らの研究データ<sup>1)</sup>と比較した。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 日間飼育し，馴致した。このラットには，市販固形普通飼料 (CE-2，日本クレア)および水道水を自由摂食させた。この飼料中 Se 含量は放射化分析により  $0.44 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$ <sup>2)</sup>であった。

馴致後の Se 欠乏食給餌群(SD 群)のラットに，代謝ケージ内で Se 欠乏飼料 (粉末飼料，オリエンタルバイオサービス)を，SD2w 群には 2 週間，SD6w 群には 6 週間給餌した。飼料および水道水は自由摂食させた。動物の体重，飼料摂取および飲水量，尿および糞量は毎日測定，記録した。

## 2.1 亜セレン酸ナトリウム溶液の作製とラットへの投与

亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite, sigma chemical co., St. Louis Mo) 22mg (Se 含量 10mg) を生理食塩水 10ml に溶解させ 2.2mg/ml (Se 1mg/ml) 投与溶液とした。Control 群は馴致後, SD 群は Se 欠乏飼料給餌期間終了後に, 調整した亜セレン酸ナトリウム溶液を約 2ml/kgB.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, control 群で 9 週齢, SD2w 群で 9 週齢, SD6w 群で 13 週齢である)。Se 投与後も引き続き, control 群には普通固形飼料, SD 群には Se 欠乏飼料を自由摂取させた。

## 2.2 試料の採取

各群, 投与前に雄雌共に 4 匹ずつ, 投与後 control 群(雌のみ)は, 12, 24, 72, 120, 240 の各時間に, SD 群は 6, 12, 24, 72, 96, 120, 240 の各時間に雄雌共に 2 匹ずつ割り当てた。また, 血漿中 Se 濃度のモニター用として雌のみ, 各投与群に 4 匹ずつ割り当て, 投与前から投与後 240 時間まで経時的(12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240 時間)に尾静脈より採血した。

血漿モニター以外のラットはそれぞれ, ペントバルビタール麻酔下(ネンブタール注射液, 大日本製薬, 0.5mg/kg i.p.)で開腹し, 5%ヘパリン加生食水で内筒をリンスした注射器を用い腹大動脈から約 5~8ml 採血した。採血した血液から 1ml を分取し, 2,000g × 5 分間遠心分離後血漿を採取し, マイクロチューブに入れ, 凍結保存した(20 )。

脳, 心臓, 肺, 腎臓, 肝臓, 脾臓, 子宮, 精巣, 精巣上体, 前立腺および精嚢(但し control 群は雌のみ, 子宮, 精巣, 精巣上体, 前立腺, 精嚢は SD 群のみ)をそれぞれ採取し, 生理食塩水で表面のみ洗浄した後軽く拭取り, 重量を正確に測定後凍結乾燥した。解剖時のラットは, control 群で 9 週齢, SD2w 群で 9 週齢, SD6w 群で 13 週齢であった。

## 2.3 試料の調整と測定・動態解析

血漿試料は全て 50 $\mu$ l に対し, 内部標準としてインジウム標準液(1,000ppm 原子吸光分析用標準液, 和光純薬工業)を 5 $\mu$ l 加え(終濃度約 100ppm), メノー皿を用いてよく攪拌した後, 5 $\mu$ l をマイラー製ターゲットホルダーに貼付した 4 $\mu$ m 厚のポリプロピレン膜上に滴下, 乾燥させ分析試料とした。臓器試料は凍結乾燥後, 重量を記録し, その全量をメノー皿で均一にすりつぶし, それぞれ 50mg をテフロン容器内に量りとり, ニツ川ら<sup>3)</sup>の方法により, 硝酸 250 $\mu$ l を加え湿性灰化处理した。それらの全量をメノー皿にあげ, そこに内部標準としてインジウム標準液を 50 $\mu$ l 加え(終濃度 1000ppm)よく攪拌した後, その 5 $\mu$ l を血漿と同様にマイラー製ターゲットホルダーに貼り付けたポリプロピレン膜上に滴下, 乾燥させて分析試料とした。但し, 亜 Se 酸ナトリウム投与後の分析試料は血漿, 脳, 肝, 腎, 子宮および精巣に限定した。これらの試料を PIXE で測定し, 得られた X 線スペクトルを SAPIX<sup>4,5)</sup>で解析して各試料中 Se 濃度を求めた。

臓器中 Se 濃度の動態パラメータ解析は, 一次吸収過程を伴い定常状態に収束する 1-コンパートメントオープンモデルで解析した。動態解析には非線形最小自乗法プログラム (MULTI)<sup>6)</sup>を用い, さらに薬物動態学的各パラメータを算出した。また, 血漿中および臓器中 Se 濃度-時間曲線から, 曲線下面積(Area Under Concentration-time curve: AUC)を求めた。実際には, 亜 Se 酸ナトリウム投与前の臓器中に含まれる平均 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に戻るまでの範囲として正味の AUC(AUCnet)を求めた。

# 3 . 結果

## 3.1 臓器中 Se 濃度における性差と Se 欠乏飼料給餌による影響

各群における Se 投与前の臓器中 Se 濃度を雄雌それぞれ Fig.1, 2 に, 血漿中 Se 濃度を Fig.3 に示す。control 群における臓器中 Se 濃度において脳, 心臓, 腎臓, 脾臓は雄雌ともと同様な値を示したが, 雄

では精巣が雌の最高値である腎臓の値の約2倍を示し、雌の肝臓、腎臓は雄の約2倍の値を示した。Se 欠乏食給餌後に大きな変化がみられたものとして雄は肝臓、腎臓で、雌では肝臓で欠乏が進むにつれ Se 濃度の減少が見られた。また雄では精巣、精巣上部において、雌では腎臓、脾臓において control 群よりも SD6w 群で高い Se 濃度が認められた。また、各群における体重 1g 当たりの臓器中 Se 総量を雄雌それぞれ Fig.4, 5 に示す。体重当たりの臓器中 Se 総量は control 群では雄は精巣で、雌は肝臓で高値を示した。欠乏食給餌後の変化は、Se 濃度と同様に、雄は肝臓・腎臓で、雌では肝臓で減少傾向を示し、雄では精巣・精巣上部が control M 群より SD6wM 群で上昇した。

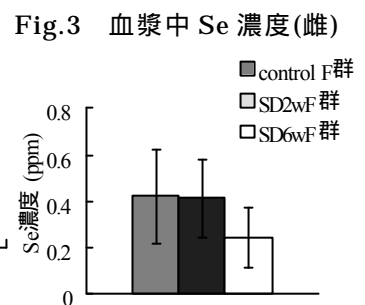
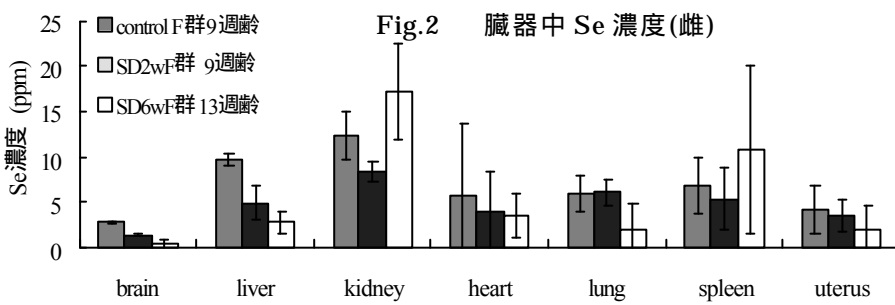
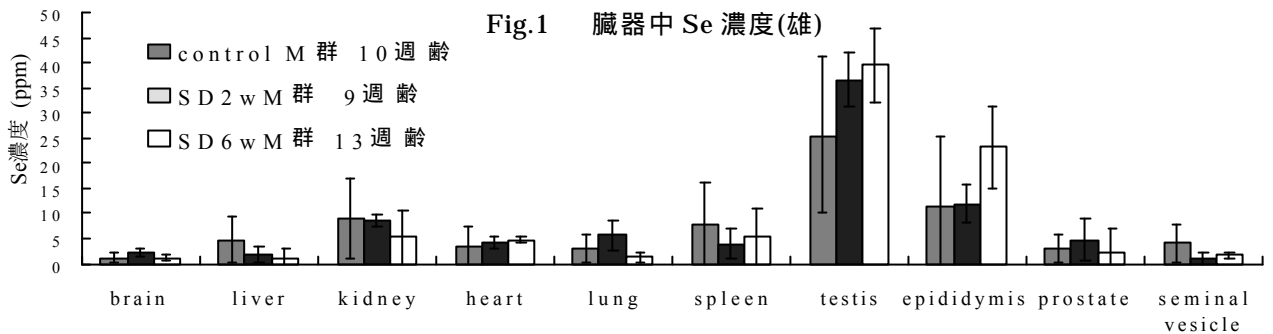


Fig.4 体重 1g 当たりの臓器中 Se 総量(雄)

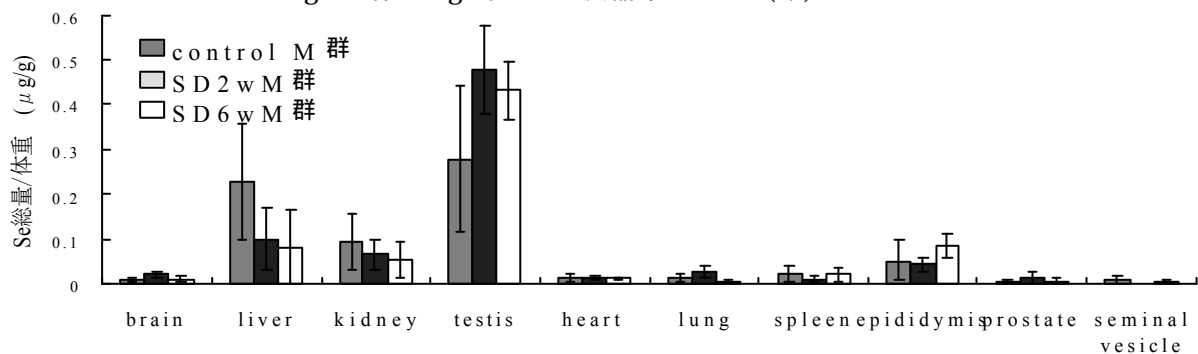
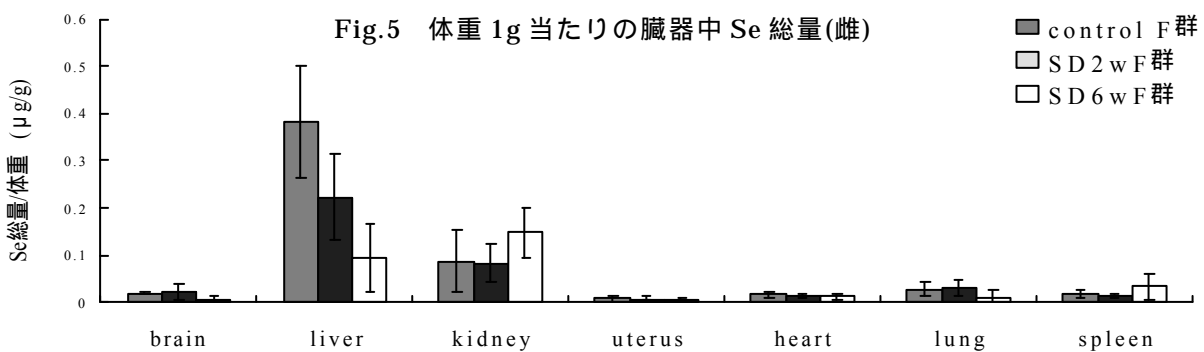


Fig.5 体重 1g 当たりの臓器中 Se 総量(雌)



### 3.2. 亜 Se 酸ナトリウム投与後の臓器中 Se 濃度の経時的変化

control F 群, SD2wF 群, SD6wF 群の亜 Se 酸ナトリウム投与後 240 時間までの血漿(雄は除く)および臓器中 Se 濃度の推移をそれぞれ Fig.6 に示す。control F 群の血漿および臓器中 Se 濃度は, 腎 > 肝 > 脳 > 血漿の順に Fig6, SDF 群では腎 > 肝 > 子宮 > 脳 > 血漿の順に, 各臓器は血漿とほぼ一定の濃度比で推移した。

雌ラットの臓器中 Se / 血漿中 Se 比は control F 群のおよそ 8 ~ 9.5 (脳), 49 ~ 67 (肝), 107 ~ 120 (腎) に対し, SD2wF 群では 0.8 ~ 14.5 (脳), 14 ~ 22.5 (肝), 23 ~ 24.5 (腎), 3 ~ 3.6 (子宮), SD6wF 群では 3.5 ~ 6.2 (脳), 50 倍 (肝), 122.5 ~ 163 (腎), 9.7 ~ 14 (子宮) を示した。また, 血漿および臓器中 Se 濃度の推移において,  $C_{max}/C_0$  比は control F 群では約 2 (血漿: 24 時間後, 脳: 72 時間後), 3 ~ 4 (肝, 24 時間後), 3 ~ 9 (腎, 24 時間後) に対し, SD2wF 群では 4 (血漿, 12 時間後), 5 ~ 17 (脳, 72 時間後), 14 ~ 18 (肝, 6 時間後), 9 ~ 28 (腎, 24 時間後), 1.5 ~ 2.7 (子宮, 120 時間後), SD6wF 群では 6 (血漿, 24 時間後), 7 ~ 46 (脳, 12 ~ 120 時間後), 15 ~ 35 (肝, 24 時間後), 8 ~ 11.5 (腎, 72 時間後), 2.7 ~ 21 (子宮, 48 時間後) であった。その後は緩やかな消失プロフィールを示し, control F 群では血漿, 脳, 肝では 120 ~ 240 時間までにほぼ投与前の値に戻ったが腎臓は 240 時間経過しても投与前の値の約 2 倍を示した。一方 SD2wF 群では脳, 肝臓, 腎臓は投与後 240 時間経過しても投与前の値のそれぞれ約 2 倍, 1.5 倍, 2.6 倍を示し, SD6wF 群では脳, 肝臓, 腎臓, 子宮は投与後 240 時間経過しても投与前の値のそれぞれ 10 倍, 5 倍, 2 倍, 5 倍を示した。

実測値から台形公式を用いて得た 240 時間までの AUCnet を Table. 1 に示す。control F 群に対する SDF 群の AUCnet は血漿・臓器とも全て上昇していた。雌雄を比較すると, 同じ欠乏群同士では, 雄の脳, 肝臓, 腎臓全ての AUCnet の値が雌よりも小さく, 更に, 欠乏期間の増加がにつれて AUCnet は大きくなる傾向であるが, 一方で SD6wM 群の値は SD2wF 群よりも脳・肝臓・腎臓すべて低値であった。

Fig.6 Se 欠乏食給餌期間と Se 投与後の臓器中 Se 動態

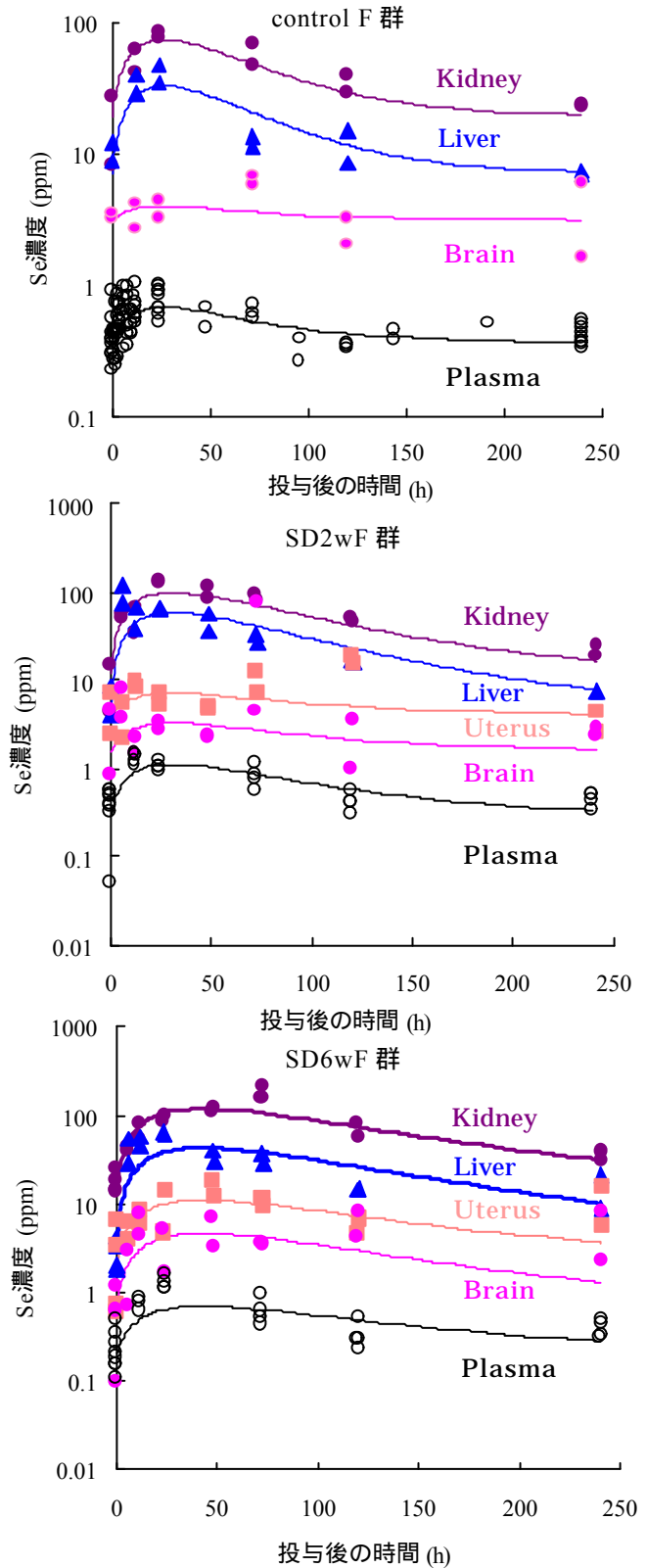


Table.1 血漿中および臓器中 Se 濃度の動態パラメータ

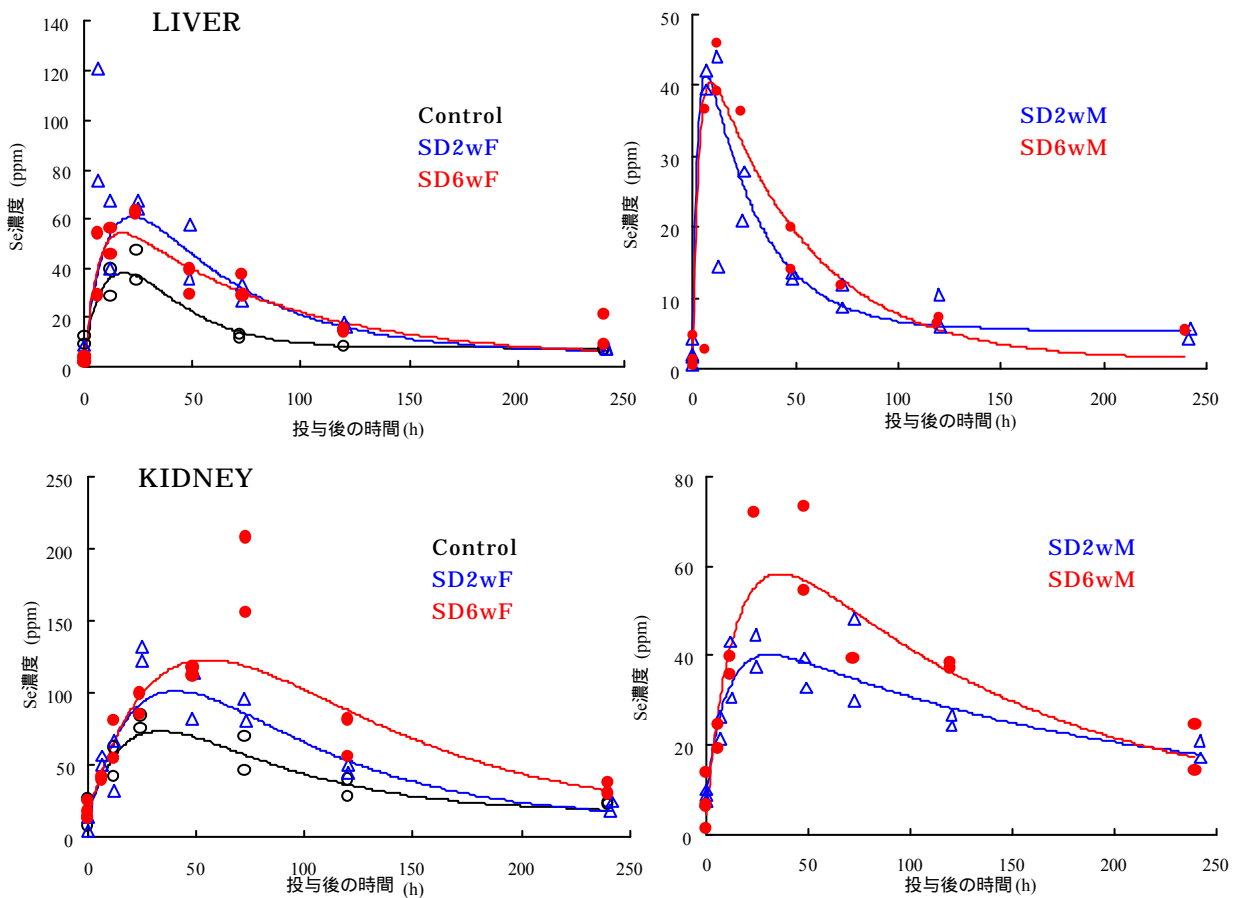
同時解析		control(雌)群 mean±SD	SD2w(雌)群 mean±SD	SD6w(雌)群 mean±SD	SD2w(雄)群 mean±SD	SD6w(雄)群 mean±SD
Ka	(/h)	0.057±0.035	0.062±0.034	0.044±0.020	0.008±0.003	0.01±0.003
Kel	(/h)	0.024±0.012	0.015±0.007	0.011±0.005	0.200±0.089	0.08±0.029
T <sub>1/2</sub>	(h)	29.32	46.54	64.82	3.46	8.68
Tmax	(h)	26.33	30.14	42.53	16.51	30.06
個別解析		control(雌)群 mean±SD	SD2w(雌)群 mean±SD	SD6w(雌)群 mean±SD	SD2w(雄)群 mean±SD	SD6w(雄)群 mean±SD
<b>brain</b>						
Ka	(/h)	0.018±0.853	0.003±0.018	0.093±0.088	0.025±0.957	0.0001±0.003
Kel	(/h)	0.015±0.731	0.07±0.321	0.0004±0.003	0.028±1.045	0.214±0.517
C	(mg/ml)	2.814±1.503	1.172±1.95	0.378±0.512	0.869±1.008	0.943±0.814
T <sub>1/2</sub>	(h)	45.32	9.85	1878.05	24.96	3.25
Tmax	(h)	60.41	45.07	59.88	37.65	26.30
Cmax	(mg/ml)	3.93	3.24	4.26	2.67	1.99
AUCnet	(mg・h/ml)	240.28	1681.31	899.26	245.97	225.08
<b>liver</b>						
Ka	(/h)	0.046±0.108	0.089±0.059	0.157±0.085	0.396±0.543	0.334±0.242
Kel	(/h)	0.067±0.182	0.019±0.0086	0.013±0.005	0.037±0.013	0.02±0.004
C	(mg/ml)	7.855±2.923	5.454±2.48	3.542±2.222	5.499±1.487	1.181±0.535
T <sub>1/2</sub>	(h)	10.29	36.01	52.96	18.71	34.05
Tmax	(h)	17.86	22.00	17.24	6.60	8.93
Cmax	(mg/ml)	38.29	60.75	54.08	41.37	40.43
AUCnet	(mg・h/ml)	1358.83	5141.81	5374.16	2231.34	2562.66
<b>kidney</b>						
Ka	(/h)	0.049±0.042	0.038±0.034	0.018±0.041	0.096±0.024	0.067±0.03
Kel	(/h)	0.017±0.012	0.015±0.013	0.019±0.042	0.006±0.001	0.008±0.00328
C	(mg/ml)	16.255±4.223	11.017±7.106	15.897±9.142	8.375±1.587	4.742±3.344
T <sub>1/2</sub>	(h)	41.73	45.44	37.21	115.72	88.92
Tmax	(h)	33.30	40.29	55.26	30.75	36.31
Cmax	(mg/ml)	73.75	101.64	123.05	40.17	58.29
AUCnet	(mg・h/ml)	7444.25	12010.00	15488.11	5405.81	7787.95
<b>uterus/testis</b>						
Ka	(/h)		0.017±0.21	0.079±0.074	0.017±0.182	0.029±9.522
Kel	(/h)		0.023±0.284	0.002±0.004	0.017±0.186	0.024±8.111
C	(mg/ml)		3.405±1.866	1.748±1.365	33.058±3.938	36.727±27.563
T <sub>1/2</sub>	(h)		29.63	309.55	40.53	28.61
Tmax	(h)		49.42	46.23	59.40	38.01
Cmax	(mg/ml)		7.01	9.85	44.49	42.04
AUCnet	(mg・h/ml)		1589.81	1706.86	1250.52	610.18
<b>plasma</b>						
Ka	(/h)	0.069±0.105	0.4±4.176	0.038±0.738		
Kel	(/h)	0.034±0.05	0.019±0.017	0.039±0.767		
C	(mg/ml)	0.37±0.031	0.398±0.174	0.228±0.035		
T <sub>1/2</sub>	(h)	20.49	36.35	17.93		
Tmax	(h)	20.31	7.99	26.25		
Cmax	(mg/ml)	0.63	1.31	1.06		
AUCnet	(mg・h/ml)	25.58	51.16	76.71		

Ka : 吸収速度定数, Kel : 消失速度定数, C : 終濃度  
T<sub>1/2</sub> : 半減期, Tmax : 最大濃度時間, Cmax : 最大濃度  
AUCnet : 240 時間までの正味の濃度 - 時間曲線下面積

### 3.3 臓器中 Se の動態パラメータ

1-コンパートメントモデルによる血漿および各臓器中 Se 濃度推移の薬物動態学的パラメータを Table.1 に示す。このパラメータによるシミュレーション曲線は実測値とよく一致した (Fig.6)。吸収速度定数( $K_a$ )は SD6wF 群 < control F 群 < SD2wF 群となり、一方、消失速度定数( $K_{el}$ )では SD6wF 群 < SD2wF 群 < control F 群となった。また、 $C_{max}$ となる時間 ( $T_{max}$ ) および半減期( $T_{1/2}$ )は SD6wF 群 > SD2wF 群 > control F 群となった。肝臓および腎臓中 Se 動態の雌雄の比較を Fig.9-12 に示す。雌ラット肝臓では、欠乏期間が進むにつれ  $K_a$  の上昇、 $K_{el}$  の減少、半減期の上昇が示され、一方で腎臓では欠乏期間が進むにつれ  $K_a$  が下降し、 $K_{el}$  はほとんど変化せず、 $T_{max}$ 、 $C_{max}$  は上昇する傾向がみられた。雄ラットでは肝臓の SD2wM 群、SD6wM 群の大きなパラメータの変化はなかったが、腎臓では SD6wM 群で  $C_{max}$  の大きな上昇が見られた。また、脳、子宮、精巣は測定誤差が大きくシミュレーション曲線がうまく描けなかったが、いずれも平坦なシミュレーション曲線を描き、吸収がきわめて緩徐におこなわれることが示された。他の臓器より誤差の少なかった SDF 群と SDM 群の肝臓、腎臓について比較すると、SD 群ではいずれの臓器でも雄では雌より  $K_a$  が大きく、 $K_{el}$  (肝臓は除く)、 $T_{max}$ 、 $C_{max}$ 、 $AUC_{net}$  が小さかった。

Fig.7 Se 欠乏食餌期間と肝臓および腎臓中 Se 動態の雌雄差



## 4. 考察

### 4.1. 亜 Se 酸ナトリウム投与前のラットにおける Se 欠乏状態の評価

Se 欠乏食給餌後の変化として肝臓の Se 濃度は大きく減少し、精巢はほとんど減少しないことが知られている<sup>9,10)</sup>が、今回の結果では、肝臓では雌雄共に Se 濃度の減少傾向が見られた(Fig.1, 2)一方、精巢中 Se はむしろ増加するという特徴的な現象が観察された。正常臓器中 Se 濃度は、ラットの成熟により 55 日齢以降は肝臓と筋肉の場合、ほとんど変化が見られないが、精巢中の Se 濃度はその後 120 日齢までも大きく増加することが知られ<sup>10)</sup>、また 10 週間 Se 欠乏食を給餌した雄ラットの臓器中 Se 濃度は対照群と比べて、肝臓・腎臓の濃度はそれぞれ 91%、65%減少したが、精巢の濃度は殆ど変化しないと報告されている<sup>7)</sup>。この Se 欠乏食の給餌にもかかわらず精巢中 Se 濃度が上昇したことは、他の臓器とは異なる精巢の Se 集積性として注目される現象である。

### 4.2. Se 欠乏状態における亜 Se 酸ナトリウム投与後の血漿および臓器中 Se 動態

Se 欠乏後の亜 Se 酸ナトリウム投与後の変化として、実測値から得られた雌ラットの organCmax/Cp, Cmax/C<sub>0</sub> および AUCnet を各群比較すると、organCmax/Cp は、SD6wF 群 > control F 群 > SD2wF 群となり、Cmax/C<sub>0</sub> と AUCnet は、SD6wF 群 > SD2wF 群 > control F 群となる傾向が大半の臓器で見られた。organCmax/Cp でどの臓器も SD2wF 群が他の群よりも小さな値を示したのは、SD2wF 群は、control F 群よりは Se 吸収能が亢進し、血漿中 Se 濃度が著しく上昇したものの、欠乏期間が短いため臓器中への Se の吸収は血漿中ほど上昇せず、一方 SD6w 群が大きな値を示したのは、血漿中と同様に臓器中への Se 分布も大きくなったためと考えられる。SD 群における Se 吸収能の上昇は Cmax/C<sub>0</sub> と AUCnet の結果からも示唆される。SD6wF 群では、臓器中での Se 欠乏も大きかったため、organCmax/Cp, Cmax/C<sub>0</sub> および AUCnet どれもが各群のなかでもっとも大きくなったと考えられた。

得られた動態パラメータに Ka, Kel の明確な変化は認められなかったものの、Tmax, や半減期(T<sub>1/2</sub>) が欠乏期間の延長に伴い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保持する傾向となることが明らかになった。これは、SD 群において、実測値から得られた AUCnet が control 群よりも上昇したことからも同じ解釈が可能で、低 Se 状態の血漿および臓器中に Se を保持しようとする、何らかの機構が働いた可能性が考えられる。

## 5. 文献

- 1) 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.
- 2) 江尻剛. 1995. リンパ腫と食餌中 Se 含量に関する研究. 北里大学獣医畜産学部獣医学科卒業論文.
- 3) ニツ川章二. 2000. Bio-PIXE その理論と応用 第 2 章 (1) 生体試料のための電子レンジを用いた硝酸湿式灰化法. RADIOISOTOPES, 49: 447-450.
- 4) Sera, K. and Futatsugawa S. 1996. Personal computer aided data handling and analysis for PIXE, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 109/110, 99-104.
- 5) 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.
- 6) 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.

- 7) Behne, D., Höfer, T. 1982. Selenium in the Testis of the Rat: Studies on Its Regulation and Its Importance for the Organism. *Journal of Nutrition*, 112(9): 1682-1687.
- 8) Behne, D., Wolters, W. 1983. Distribution of Selenium and Gultathione Peroxidase in the Rat. *Journal of Nutrition*, 113: 456-461.
- 9) Behne, D., Höfer, T. 1984. Effects of a Low Selenium Status on the Distribution and Retention of Selenium in the Rat. *Journal of Nutrition*, 114: 1289-1296.
- 10) Behne, D., Scheid, S., Hilmert, H., Gessner, H., Gawlik, D. and Kyriakopoulos, A. 1990. Combination of Neutron Activation Analysis, Tracer Techniques, and Biochemical Methods in the Investigation of Selenium Metabolism. *Biological Trace Eliment Research Editor*, 26-27: 439-447.