

セレンウム欠乏ラットにおける機能障害発現に関する検討

安本 教傳・鈴木 鐵也・金 天浩

(京都大学食糧科学研究所*)

Studies on Disorders Caused by Selenium Deficiency in Rats

Kyoden YASUMOTO, Tetsuya SUZUKI and Cheon Ho KIM
The Research Institute for Food Science, Kyoto University

Effect of selenium deficiency on hematological parameters of male Wistar rats was examined for the period of 3 months. Glutathione peroxidase (GSH-Px) in blood serum from rat fed Se-deficient diet ($\text{Se} < 0.01\text{ppm}$) dropped to 36% of the selenium adequate rat at 2 weeks on the experimental diet, whereas GSH-Px in erythrocytes dropped to 2% after 3 months. Selenium contents in liver, kidney and heart also remarkably decreased in Se-deficient rats. Serum malondialdehyde level was found significantly increased in Se-deficient rats. However, no significant difference was observed in hematocrits and some enzyme activities: glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase, lactic acid dehydrogenase, and creatine phosphokinase.

Although a few abnormal erythrocytes containing Heinz body and acanthocytes were observed in the blood from Se-deficient rats, no significant difference was detected in the ascorbic acid-induced hemolysis test and phospholipid composition of erythrocytes between Se-deficient and Se-adequate animals.

* 所在地：京都府宇治市五ヶ庄（〒611）

セレンウム (Se) は生体内で過酸化物の消去に關与するグルタチオンペルオキシダーゼ (GSH-Px) の構成成分として重要性が古くから注目され^{1,2)} トコフェロール (Toc) がペルオキシドラジカルの消去に働く³⁾ のに対し、GSH-Px は生成した有機ペルオキシドの消去に關与する⁴⁻⁶⁾ 他、ヒドロキシラジカルや $Fe^{2+}O_2$ イオンの不均化も行っているとの説もある⁷⁾ Se と Toc とは相互に密接に関わり合っていることは良く知られており⁸⁾ Se 欠乏による障害が Toc の欠乏下で強く発現することから両者の關係は古くから研究の対象とされてきた。また、Se のみの欠乏によって障害が起きるのかという論議も古くからなされている^{9,10)}。

Se 欠乏に起因する障害としては、肝臓障害¹¹⁾、白筋症などの筋肉障害¹²⁾、克山病などに見られる心筋障害^{13,14)} Kaschin-Beck 氏病における骨組織障害¹⁵⁾ さらに浸出性素質などの血管透過性障害¹⁶⁾ が知られている。一方、Morris らは Se 欠乏土壤で生育した牧草を長期間摂取した家畜が Heinz 小体性貧血を發現する事を報告している¹⁷⁾。

筆者らは、Se の単独欠乏条件下で飼育した動物が *in vivo* でどの様な影響を与えるかを調べると共に、*in vitro* での溶血も検討した。

実 験 方 法

1. *in vivo* 長期飼育実験：

実験に用いたのは離乳直後から Se 欠乏飼料 (表 1) で約 3 ヶ月間飼育した Wistar 系雄ラットで、欠乏飼料で飼育したラット (以下 Se 欠ラット) と Se 充足食で飼育したラット (以下 Se 充足ラット) との間で比較検討した項目は、血清、赤血球中の GSH-Px 活性、主要臓器中の Se 含量、Heinz 氏小体、肝機能、筋肉異常判定の為の血液検査、酸化的溶血試験、赤血球膜構成主要リン脂質組成および脂肪酸組成である。

Table 1. Composition of basal diet

Ingredient	% of the diet
Torula Yeast	36
Sucrose	44
Soybean oil	13
Mineral mixture	4
Vitamin mixture	1
Cellulose powder	2
Methionine	0.3

All diets contained 5 mg α -tocopheryl acetate per 100 g, and the selenium adequate diet 0.1 ppm Se as sodium selenite.

2. *in vitro*での酸化的溶血試験：

Se と Toc の溶血防止に対する関与を調べる目的で、Se 欠ラットおよび Se 充足ラットの尾静脈から 1 ~ 2 ml 採血し、赤血球を単離後、等張食塩—リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で水溶性ラヂカル発生剤、2,2'-azobis (2'-diamidino-propane) dihydrochloride (AAPH)¹⁸⁾を加えて酸化的溶血を起こさせ、Se 欠ラット、Se 充足ラットにおける溶血率を GSH-Px 活性および Toc 含量との関係から比較した。

結 果 と 考 察

1. Se 欠ラットにおける血中 GSH-Px 活性、Se 含量の推移ならびに血中 諸診断指標酵素活性：

GSH-Px 活性は、飼育実験開始後、血漿では 2 週間で Se 充足ラットの同時期の 36% に、また赤血球では 3 ヶ月で、Se 欠ラット 2 週間目の 2% にまで低下した (表 2)。また、Se 含量は、赤血球および主要臓器 (心臓、肝臓、腎臓) でも、Se 欠ラットでは低下した (表 3)。

Se 欠乏食給餌開始後 3 ヶ月あるいは、それ以上経過すると、Se 欠ラットでは毛艶の劣化、脱毛、運動能力の低下などが観察された。また、心電図の異常も散見された。しかし、白筋症、浸出性素質などで報告されているような重篤な障害は我々の Se 単独欠乏食の給餌では発現し

Table 2. Glutathione peroxidase activity in plasma and erythrocytes of Se-adequate and Se-deficient rats

	Plasma		Erythrocyte	
	units ^{a)}	(%)	units ^{a)}	(%)
Se-Adequate				
2 weeks	0.014 ± 0.002	(100)	0.175 ± 0.010	(100)
3 months	0.016 ± 0.001	(114)	0.135 ± 0.017	(81)
Se-Deficient				
2 weeks	0.005 ± 0.001	(36)	0.170 ± 0.004	(97)
3 month	0.001 ± 0.0002	(7)	0.004 ± 0.0007	(2)

a) GSH-Px activity expressed by units/mg protein. The activity was determined by measuring decrease of NADPH at 340 nm¹⁹⁾. Values are expressed as mean ± SEM for n = 4. The values given in parentheses represent the GSH-Px activity in % relative to those of Se-adequate rat after 2 weeks on the experimental diets.

Table 3. Selenium contents in major organs of rats fed Se-adequate and Se-deficient diet for 3 months

Organ	Se-Adequate	Se-Deficient
	$\mu\text{g/g}$	$\mu\text{g/g}$
Erythrocyte	1.750 ± 0.351	0.089 ± 0.018
Liver	0.645 ± 0.077	0.017 ± 0.008
Kidney	1.592 ± 0.116	0.192 ± 0.027
Heart	0.293 ± 0.036	0.024 ± 0.010

Selenium content was determined by wet digestion and subsequent fluorometric method according to Watkinson²⁰⁾
 Each value represents mean \pm SEM for n = 4.

なかった。Se 欠乏食給餌実験開始後3ヶ月以上経過すると、GSH-Px 活性や組織中の Se 含量は Se 欠ラットでは顕著な低下を示すにも拘らず、機能検査を判定する為の諸指標酵素活性などの測定結果は、Se 欠ラットの血漿 MDA 値の上昇が認められた以外は、GOT, GPT, CPK, LDH, ヘマトクリット値などに Se 欠ラットと Se 充足ラットとの間に有意差は認められなかった(表4)。

Table 4. Comparison of hematologic value of Se-adequate and Se-deficient rats

Item	Se-Adequate	Se-Deficient
Hematocrit (%)	40.1 ± 0.3	40.0 ± 0.7
TBA ^{a)}	2.43 ± 0.17	4.89 ± 0.48
GOT ^{b)}	37.1 ± 0.6	38.0 ± 1.9
GPT ^{b)}	17.5 ± 1.3	21.1 ± 1.5
CPK ^{b)}	25.6 ± 3.9	26.1 ± 3.2
LDH ^{b)}	90.0 ± 8.3	99.8 ± 6.3

Each value represents mean \pm SEM for n = 4.

a) TBA value represents nmol MDA/ml plasma. Difference between 2 groups is significant at $p < 0.05$.

b) Each value is given in the international units per liter.

2. Se 欠ラットの溶血性、赤血球異常と膜脂質組成：

Se 欠乏食で3ヶ月間飼育したラットの赤血球を Nile Blue Sulfate で染色して顕微鏡観察したところ、ヘモグロビンの異常に起因する Heinz 氏小体を含む異常赤血球が若干増加していた。また、走査型電子顕微鏡による観察でも、細胞表面構造が明らかに異常な有刺赤血球

(acanthocytes) が、Se 欠ラットの赤血球中に散見されたが、その数は Kaschin-Beck 氏病患者の赤血球について報告されている異常^{21, 22)} に比べると極く僅かであった。更に、アスコルビン酸-Tween 20 を用いた溶血試験でも、Se 欠ラットと Se 充足ラットとの間に有意差は認められなかった(表5)。赤血球膜脂質を構成するリン脂質組成を比較したところ、phosphatidylethanolamine (PE) と sphingomyelin (SM) 含量にわずかに差が認められたものの、有意とは言えなかった。また、主要リン脂質 PE と phosphatidylcholine (PC) の高度不飽和脂肪酸含量が Se 欠ラットの方が低い傾向が認められた。

以上の様に、Se 単独欠乏のみでは、Se 充足ラットとの間には GSH-Px 活性、組織中の Se 含量及び血清中の TBA 値などに有意な差が認められるものの、顕著な障害は発現しなかった。同様の結果は Spallholtz らの研究グループ⁹⁾ や李ら²⁰⁾ によっても得られており、Se の単独欠乏で長期間飼育しても Toc やリン脂質などの栄養素が充足状態にあれば、重篤な Se 欠乏障害は発現しにくいと思われる。しかしながら、動物個体には明確な障害として発現しなくても細胞レベルで GSH-Px 系とはまったく異なる代謝障害がおきている可能性は充分にある。

Table 5. Susceptibility to hemolysis of erythrocytes from Se-adequate and Se-deficient rats.

	Se-adequate	Se-deficient
Hemolysis (%)	13.4 ± 0.1	12.7 ± 0.8

Hemolysis test was carried out by the ascorbic acid-Tween 20 method²³⁾ using erythrocytes collected from rats fed Se-adequate or Se-deficient diet for 3 months. Each value represents mean ± SEM for 4 rats.

3. *in vitro* での Se 欠ラット赤血球と Se 充足ラット赤血球の薬剤投与による酸化的溶血に対する感受性の変化:

Se が赤血球の酸化的溶血の防止に対して果たしている役割を明らかにする為に、Se 欠乏および充足ラットの赤血球を単離して、等張食塩-リン酸かん衝液中、GSH, NADPH, NaN₃, KCN の存在下、AAPH (10 mM) を加え、37°C で前培養後、0.2 mM t-BuOOH による酸化的溶血の度合を、GSH-Px 活性、α-Toc 含量との関係で調べた。その結果、Se 充足ラットの赤血球では t-BuOOH による 4 時間の溶血反応でも AAPH の添加による α-Toc の減少にも拘らず、溶血は 20% 台に留まり、GSH-Px 活性の低下もみとめられなかった。しかし、GSH を反応系に添加しない場合は Se 充足ラットの赤血球でも著しい溶血が起こった。

一方、Se欠ラットの赤血球ではAAPHの添加の如何に関わらず著しい溶血が起こった。以上の結果は、カタラーゼ、スーパーオキシドジスムターゼが阻害された条件下でのt-BuOOHによる酸化的溶血の防止、換言すれば膜の安定化にGSH-Px系、特にGSHが極めて重要な防禦作用を担っている事が明らかになった。

文 献

1. THOMPSON, J. N. and M. L. SCOTT (1969) *J. Nutr.* 97:335
2. ROTRUCK, J. T., A. L. POPE, H. E. GANTHER, A. B. SWANSON, D. G. HAFEMAN and W. G. HOEKSTRA (1973) *Science* 179:588
3. NIKI, E., T. SAITO, A. KAWAKAMI, and Y. KAMIYA (1984) *J. Biol. Chem.* 259:4177
4. LITTLE, C. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 284:375
5. CHRISTOPHSEN, B. O. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 164:35
6. NUTGREN, D. H. and E. HAZOLHOF (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 326:448
7. MCCAY, P. B., D. D. GIBSON and K. L. FONG (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 431:459
8. YANG, N. Y. J. and I. D. DESAI (1978) Gluthathione peroxidase and vitamin E interrelationship in oxygen and biomembranes (deDuve, C. and O. Hayaishi eds.) Elsevier, North-Holland Biochemical Press, p. 233
9. HU, M-L., C. CHUNG and J. E. SPALLHOLTZ (1984) *J. Inorg. Biochem.* 22:165
10. ROTRUCK, J. T., A. L. POPE, H. E. GANTHER and W. G. HOEKSTRA (1972) *J. Nutr.* 102:689
11. SCHWARTZ, K. and C. M. FOLTZ (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79:3293
12. FROST, D. V. (1975) *Ann. Rev. Pharmacol.* 15:259
13. Keshan Disease Research Group of the Chinese Academy of Medical Sciences (1979) *Chinese Med. J.* 92:471
14. GODWIN, K. D. and F. J. FRAZER (1966) *Quart. J. Exp. Physiol.* 51:94
15. 李崇正 (1979) *中華医学雑誌* 59:169
16. NOGUCHI, T., A. H. CANTOR and M. L. SCOTT (1973) *J. Nutr.* 103:1502
17. MORRIS, J. G., W. S. CRIPE, H. L. CHAPMAN, Jr., D. F. WALKER, J. B. ARMSTRONG, J. D. ALEXANDER, Jr., R. MIRANDA, A. SANCHEZ, B. SANCHEZ, J. R. BLAIR-WEST and D. A. DENTON (1984) *Science* 223:491
18. YAMAMOTO, Y., E. NIKI, J. EGUCHI, Y. KAMIYAMA and H. SHIMASAKI (1985) *Biochim. Biophys. Acta* 819:29
19. PAGLIA, D. E. and W. N. VALENTINE (1967) *J. Lab. Clin. Med.* 70:158
20. WATKINSON, J. H. (1966) *Anal. Chem.* 38:92
21. 楊福愉, 黄芬, 林治瑛, 張克, 史宝生, 傅一工, 李生廣, 孫珊, 陳建文, 張蘭乎, 郭倍奇,

沃維漢, 張日清, 形青如, 陳文雯, 周 建, (1984) 永壽大骨節病科学考察文集 (1979 - 1982),
p. 366

22. 李芳生 (1958) 微量元素研究 2 : 9

23. HAMADA, T., M. FURUYA and K. HODATE (1982) *Experientia* 38:462