

血漿、赤血球および血小板中のセレン濃度およびグルタチオンペルオキシダーゼ活性の高感度測定法の検討ならびに健常成人におけるこれらの測定

松田晃彦¹⁾・木村美恵子¹⁾・糸川嘉則¹⁾・伊勢川順一²⁾・
片岡美紀子²⁾・佐藤誠²⁾

¹⁾京都大学大学院医学研究科社会医学系社会予防医学講座*, ²⁾森下ルセル(株)総合研究所**

Modified High Sensitive Determination Methods of Selenium Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in Plasma, Erythrocytes and Platelets, and These Determination in Healthy Japanese Adults.

Akihiko MATSUDA, Mieko KIMURA, Yoshinori ITOKAWA, Junichi ISEGAWA*, Mikiko KATAOKA*
and Makoto SATO*

Department of Social Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University.

**Research Laboratories, Roussel Morishita Co., Ltd.*

Modified high sensitive determination methods of selenium concentration and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity of plasma, erythrocytes and platelets were developed. The selenium concentration and GSH-Px activity of plasma, erythrocytes and platelets in 51 healthy Japanese adults were measured, and following results were obtained. The selenium concentration (mean \pm SD) of plasma, erythrocytes and platelets were $117.4 \pm 15.7 \mu\text{g/L}$, $0.954 \pm 0.159 \mu\text{g/gHb}$ and $4.93 \pm 1.52\text{ng/mg protein}$, respectively. The GSH-Px activity (mean \pm SD) of plasma, erythrocytes and platelets were $318 \pm 50\text{U/L}$, $18.0 \pm 5.0\text{U/gHb}$ and $0.142 \pm 0.035\text{U/mg protein}$, respectively.

セレンは生体内抗酸化酵素 glutathione peroxidase (GSH-Px)の構成成分として生体に必須な微量元素である¹⁾。近年、わが国でも高カロリー輸液や経腸栄養施行の増加に伴い、セレン欠乏症が報告されるようになり^{2,3)}、臨床栄養領域において本元素の必要性が注目されている。これまで、日本人の血液中または血液中成分別のセレン濃度⁴⁻¹⁰⁾、GSH-Px活性¹¹⁾などの単独測定の報告はあるが、同一人の血液中各成分別(血漿、赤血球および血小板)のこれらの同時測定値の報告は少ない^{7,10)}。一方、同一サ

*所在地：京都市左京区吉田近衛町

**所在地：滋賀県野洲郡野洲町大篠原1658

ンプルから血漿、赤血球および血小板中セレン濃度およびGSH-Px活性を同時測定するには、多量の血液を必要とする。

今回、セレン栄養状態の判定の目的で、これらの血液中成分別測定をするため、少量の血液で測定が出来るように、血漿、赤血球および血小板中セレン濃度およびGSH-Px活性の高感度・簡易定量法を検討した。また健常成人の同一サンプルの血漿、赤血球および血小板中セレン濃度およびGSH-Px活性を同方法を用いて測定したので報告する。

実験方法

1. セレン濃度およびGSH-Px活性の測定法の検討

セレン濃度の測定法については、関根ら¹²⁾および玉利ら¹³⁾の従来法に、Fig. 1に示すような改良を行った。

GSH-Px活性の測定法にはPaglia and Valentine¹⁴⁾の方法をTable 1に示すように工夫改良を加えた。

2. 日本人男女成人血漿、赤血球および血小板中セレン濃度およびGSH-Px活性の測定

健常成人51名 [男性28名 (25-44歳), 女性23名 (23-51歳)] を対象とした。早朝空腹時に3.2%クエン酸ナトリウム水溶液 2 mL を充填した20mLの注射筒を用いて、肘前静脈から末梢血を18mL採取した。採取後、血漿、赤血球および血小板を分離し、測定まで-80℃で凍結保存した。

上記方法を用い、各人の血漿、赤血球および血小板中セレン濃度およびGSH-Px活性を測定し、これまで報告されているデータと比較検討した。

Table 1. Difference between two methods

	Paglia et al. method	Present method
Phosphate buffer (pH7.0)	43mM	56mM
EDTA	4.3mM	1.12mM
NADPH	0.28mM	0.2mM
GSSG-reductase	1U/mL	1U/mL
NaN ₃	3.75mM	1mM
GSH	5mM	2mM
H ₂ O ₂	0.0733mM	0.1mM
Reaction temp.	20℃	37℃
Sample volume	0.1mL	0.25mL
Total volume	3mL	1mL
(Minimum dilution of sample)	1/30	1/4

実験結果および考察

1. セレン定量法の検討 (前処理操作の検討)

Fig 1に示すような改良を加えた。即ち、安定した分析結果を得るためには、分析を行う前に試料中の6価セレンを4価セレンに還元しておく必要がある。そこで還元剤として6N塩酸を用い、塩酸添加

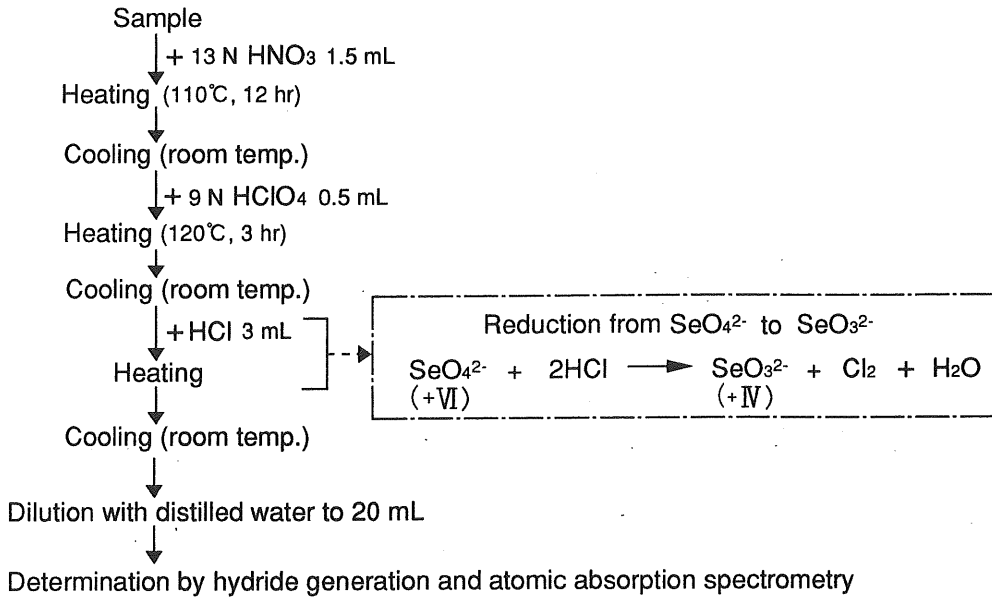


Fig. 1 Pretreatment procedure of samples

後の加熱時間について検討した。加熱温度を120℃とし、20、40、60分間加熱したところ、40分で再現性の高いセレンの分析値が得られた。そこで加熱時間を40分とし、加熱温度を90、100、120、130℃としたところ、120℃で再現性の高いセレンの分析値が得られた。以上の結果から、還元操作の条件を加熱温度120℃、加熱時間40分と設定した。

次にこの還元操作を取り入れた定量法の妥当性について検討した。その結果、セレンの検出下限は0.25 μg/Lであり、既に報告されている蛍光法の検出下限¹⁵⁾より約10倍の高感度が得られることが明らかとなった。またヒト血漿を用いて再現性（変動係数）および正確性（添加回収率）について検討したところ、それぞれ1.9%および96.0～102.0%であり満足すべき結果であった。更に生体標準試料（NIST, SRM1598, Bovine Serum）におけるセレンの分析値も42.5±0.74 μg/Lであり、保証範囲（40.0～47.2 μg/L）内にあり、本法は信頼性の高い分析法であることが明らかとなった。

2. GSH-Px 活性の測定法の検討

本酵素活性の測定に強い影響を与えるGSH、過酸化水素濃度および反応温度をTable 1に示すように変更した。その結果、サンプル添加容量を0.25mL、全容量を1mLにすることができ、サンプル希釈率を最小で1/4にすることができた（これは活性の低いサンプルの測定には有利である）。次にヒト血漿を用いてこの分析法の妥当性について検討した。その結果、直線性、再現性および正確性について満足の行く結果が得られ（Fig 2, Table 2, Table 3）、本法は信頼性の高い分析法であることが示された。

3. 健常成人のセレン濃度およびGSH-Px 活性の測定

上記改良法を用いて、健常成人男女における血漿、赤血球、血小板中のセレン濃度およびGSH-Px活性を測定した。それらの値をTable 4, Table 5に示した。各血液成分におけるセレン濃度および

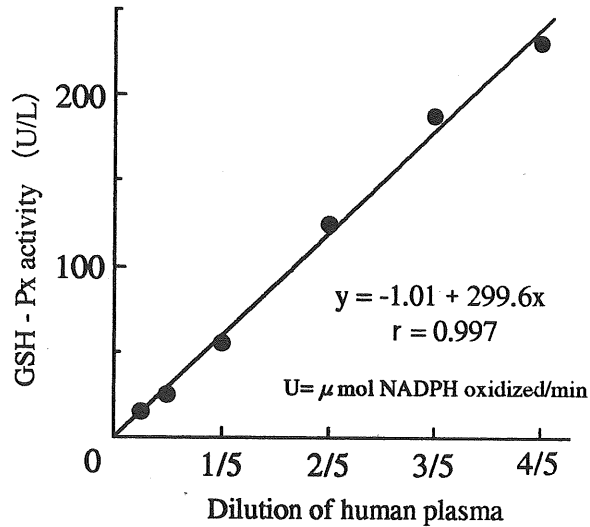


Fig. 2 Linear relationship between GSH-Px and sample dilution

Table 2. Coefficient of variation (C.V.)

Human plasma	300	308
Found	310	311
GSH-Px (U/L)	315	
Mean	309	
S.D.	5.0	
C.V. (%)	1.6	

U = μ mol NADPH oxidized/min

Table 3. Recovery rate of GSH-Px

	Added GSH-Px (mU)	Found GSH-Px (mU)	Recovery (%)
	0	305	—
Human plasma	150	447	94.7
1.0mL	300	596	97.0
	450	765	102.2

U = μ mol NADPH oxidized/min

GSH-Px 活性は男女間に有意な差はなく、且つ正規分布を示した。日本人の血漿あるいは赤血球中セレン濃度については、出口ら⁶⁾、吉田⁷⁾、今井ら⁸⁾、本郷ら⁹⁾、山東ら¹⁰⁾が報告しているが、今回我々の得た値は、彼らが報告した値に近いものであった (Table 6)。また血漿 (血清) 中セレン濃度はアメリカ¹⁶⁾、ノルウェイ¹⁷⁾、イギリス¹⁸⁾、ベルギー¹⁹⁾の報告値ともほぼ同じ値であった。

一方、GSH-Px 活性は測定法が統一されておらず研究者間の比較は困難であるという問題はあるも

Table 4. Selenium concentrations of plasma, erythrocytes and platelets in healthy Japanese adults

	n	Selenium concentration		
		Plasma ($\mu\text{g/L}$)	Erythrocytes ($\mu\text{g/g Hb}$)	Platelets (ng/mg protein)
Male	28	120.9 \pm 15.6	0.959 \pm 0.162	5.21 \pm 1.64
Female	23	113.1 \pm 15.0	0.949 \pm 0.159	4.70 \pm 1.42
Total	51	117.4 \pm 15.7	0.954 \pm 0.159	4.93 \pm 1.52

Each value represents mean \pm SD.

Table 5. GSH-Px activities of plasma, erythrocytes and platelets in healthy Japanese adults

	n	GSH-Px activity		
		Plasma (U/L)	Erythrocytes (U/g Hb)	Platelets (U/mg protein)
Male	28	329 \pm 41	17.0 \pm 5.0	0.140 \pm 0.034
Female	23	304 \pm 57	19.2 \pm 4.8	0.145 \pm 0.036
Total	51	318 \pm 50	18.0 \pm 5.0	0.142 \pm 0.035

Each value represents mean \pm SD. A unit of GSH-Px activity is expressed as 1 μmol of NADPH oxidized per minute.

Table 6. Selenium concentration of plasma, erythrocytes and platelets in Japanese in other reports

Author		Plasma ($\mu\text{g/L}$)	Erythrocytes ($\mu\text{g/g Hb}$)	Platelets (ng/mg protein)	Ref.
Deguchi	M	127	—	—	6)
	F	111	—	—	
Yoshida	M	122	1.55*	—	7)
	F	118	1.17*	—	
Imai	M	111	1.63*	—	8)
	F	107	1.57*	—	
Hongo	M	126	1.65*	—	9)
	F	130	2.15*	—	
Sando	M/F	118	1.01*	—	10)

* Value converted to the same unit.

M : male. F : female

の、今回我々の得た血漿および赤血球中の GSH-Px 活性は、吉田⁷⁾、山東ら¹⁰⁾、伊東¹¹⁾が報告した値に近いものであった (Table 7)。

日本人の血小板中セレン濃度については現在までのところ報告はなく、今回の報告が最初である。また日本人の血小板中 GSH-Px 活性については唯一、山東ら¹⁰⁾が 0.079U/mg protein と報告しているが、今回我々の得た値 (0.142U/mg protein) は彼らのものより高値であった。現在、更に健常成人などの例数を追加検討中である。

Table 7. GSH-Px activity of plasma, erythrocytes and platelets in Japanese in other reports

Author		Plasma (U/L)	Erythrocytes (U/g Hb)	Platelets (U/mg protein)	Ref.
Yoshida	M	270	20.7	—	7)
	F	260	19.3		
Sando	M/F	228	30	0.079	10)
Ito	M	375*	59.7	—	11)
	F	409*	60.9	—	

*Value converted to the same unit. M : male. F : female

A unit of GSH-Px activity is expressed as 1 μ mol of NADPH oxidized per minute.

参 考 文 献

- 1) Rotruck, J. T., Pope, A. L., Ganther, H. E., Swanson, A. B., Hafeman, D. G. and Hoekstra, W. G. (1973) *Science* 179 : 585
- 2) 松末智, 柏原貞夫, 友永轟 (1987) *日本外科学会雑誌*, 88 : 483
- 3) 小牧宏文, 岡田稔久, 木下裕俊, 平松美佐子, 折口美弘, 杉之原佳子, 東明正, 松田一郎 (1993) *Biomedical Research on Trace Elements* 4 : 77
- 4) Deguchi, Y. and Ogata, A. (1985) *Jpn. J. Hyg.* 39 : 924
- 5) Deguchi, Y. and Ogata, A. (1986) *Jpn. J. Hyg.* 41 : 559
- 6) Deguchi, Y. and Ogata, A. (1991) *Tohoku J. Exp. Med* 165 : 247
- 7) 吉田宗弘 (1990) *栄食誌*, 43 : 49
- 8) Imai, H., Suzuki, T., Kashiwazaki, H., Takemoto, T., Izumi, T. and Moji, K. (1990) *Nutr. Res.* 10 : 1205
- 9) Hongo, T., Watanabe, C., Himeno, S. and Suzuki, T. (1985) *Nutr. Res.* 5 : 1285
- 10) 山東勤弥 (1989) *外科と代謝・栄養*, 23 : 225
- 11) 伊藤敬三, 斉藤健, 蔵崎正明, 斉藤和雄 (1983) *日衛誌*, 38 : 581
- 12) 関根健二, 木村美恵子, 糸川嘉則 (1984) *日衛誌*, 39 : 807
- 13) 玉利祐三, 青木俊之, 高木晋, 茶山健二, 辻治雄, 日下讓 (1992) *分析化学*, 41 : T77
- 14) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. (1967) *J. Lab. Clin. Med.* 70 : 158
- 15) 河本裕子, 田中俊行 (1992) *臨床化学*, 21 : 179
- 16) Cohen, H. J. (1989) *Am. J. Clin. Nutr.* 49 : 132
- 17) Ringstadt, J., Jacobson, B. K., Tretli, S. and Thomassen, Y. (1988) *J. Clin. Pathol.* 41 : 454
- 18) Ellis, N., Lloyd, B., Lloyd, S. and Clayton, B.E. (1984) *J. Clin. Pathol.* 37 : 200
- 19) Neve, J., Vertongen, F. and Capel, P. (1988) *Am. J. Clin. Nutr.* 48 : 139