

亜セレン酸またはセレノメチオニンの栄養有効性に及ぼす投与期間の影響

廣瀬 侑太郎, 北川 怜子, 下川 真由子, 細見 亮太,
福永 賢治, 吉田 宗弘
(関西大学化学生命工学部栄養化学・食品化学研究室*)

Effect of Administration Period on Nutritional Availability of Selenite or Selenomethionine in Rats

Yūtarō HIROSE, Reiko KITAGAWA, Mayuko SHIMOKAWA, Ryōta HOSOMI,
Kenji FUKUNAGA and Munehiro YOSHIDA
*Laboratories of Nutritional Chemistry and Food Chemistry, Faculty of Chemistry, Materials
and Bioengineering, Kansai University*

Summary

To examine an effect of administration period on nutritional availability of selenite or selenomethionine (SeM) as selenium (Se) source, both Se compounds were administered to rats with a low-Se state for 1 or 4 weeks and measured tissue Se content and glutathione peroxidase (GPX) activity. Male 4-week Wistar rats were fed a casein-based low Se basal diet (Se content, 0.061 mg/kg) for 3 weeks and then divided into three groups. One group was fed the low-Se basal diet continuously and other two groups were fed the basal diet supplemented with Se (0.2 mg/kg) as sodium selenite or L-SeM for further 1 or 4 weeks. Dietary Se-supplementation caused an increase of Se content and GPX activity in the serum, liver and kidney. Effect of selenite exceeded that of SeM in the kidney Se, liver GPX and kidney GPX after the 1-week supplementation. After the 4-week supplementation, effect of SeM exceeded that of selenite in the liver Se and the difference among Se compounds in the liver and kidney GPX observed in the 1-week supplementation disappeared. The serum GPX was not increased by the 1-week Se supplementation and was increased only by the selenite-supplementation for 4 weeks. These results indicate that a nutritional availability of selenite exceeds that of SeM at a short-term administration but the availability of SeM becomes to be comparable to that of selenite at a long-term administration.

セレン (Se) はグルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) をはじめとする特異的な含 Se タンパク質中においてセレノシステイン (Sec) 残基の形態で存在し、様々な生理機能を示している。食事から摂取された Se は、セレナイド (Hse⁻) に還元され、セレノリン酸、Sec-tRNA を経由して、タンパク質のペプチド鎖中の Sec 残基に取り込まれる。Sec-tRNA がタンパク質に組み込まれるには特異的な塩基配列が必要である。この特異的な塩基配列をヒトゲノム中で検索することにより、ヒトにおいて Se を Sec 残基として含有する特異的な含 Se タンパク質は 25 種類であることが明らかにされている¹⁾。

Se に関する栄養試験や毒性試験においては無機の亜セレン酸塩がよく用いられるが、食品から摂取する Se の多くはタンパク質のペプチド鎖中に非特異的に取り込まれたセレノメチオニン (SeM) もしくは特異的な含 Se タンパ

ク質中の Sec である²⁾。とくに通常の土壌で生育した穀物や豆類中の Se の多くは SeM であり³⁾、穀物や豆類を多く摂取する食事においては SeM が主要な Se の摂取形態といえる。SeM が、一般のタンパク質に非特異的に取り込まれること⁴⁾、直接メチルセレノールへ代謝されること⁵⁾、さらにメチオニンと同じ系によって効率良く吸収されること⁶⁾ を考えると、SeM の含 Se タンパク質への取り込みの速度や効率は亜セレン酸塩とは異なると予想される。亜セレン酸塩と SeM の Se 供給源としての有効性を比較した研究は相当数あるが、その結果にはばらつきが認められる⁷⁻⁹⁾。このような結果のばらつきの要因としては、投与量、投与期間、他の成分の摂取状態などが考えられる。本研究では、亜セレン酸と SeM の Se 供給源としての有効性 (以下、栄養有効性と呼ぶ) に及ぼす投与期間の影響を検討する目的で、あらかじめ低 Se 飼料で飼育したラット

*所在地：大阪府吹田市山手町3-3-35 (〒564-8680)

に両 Se 化合物を 1 または 4 週間投与し、臓器 Se 濃度と GPX 活性の変化を比較した。

実験方法

4 週齢の Wistar 系雄ラット 36 匹 (平均体重, 91 g) に AIN93G 飼料からセレン酸塩 (Se として 0.14 mg/kg) を除いた低 Se 基本飼料 (Se 濃度, 0.061 mg/kg) を 3 週間投与した。その後, 12 匹ずつ 3 群に分け, 1 群にはそのまま低 Se 飼料, 残り 2 群には基本飼料に亜セレン酸ナトリウムまたは L-SeM を Se 濃度として 0.2 mg/kg 添加した飼料を投与した。Se 添加飼料投与開始から 1 週間および 4 週間後に各群とも 6 匹ずつを処理して, 血清, 肝臓, 腎臓を採取した。

血清, 肝臓, 腎臓は, その約 1 g を濃硝酸 (約 10 mL) と 60% 過塩素酸 (約 2 mL) を用いて湿式灰化した。灰化後の溶液は純水で 10 mL にメスアップし, 含有される Se を誘導結合プラズマ質量分析 (ICPMS) により定量した。ICPMS の分析では, 装置として島津 ICPMS-2030, 分析質量数として 82, 内部標準としてテルル (質量数 128) を用いた。

一方, これとは別に肝臓と腎臓の約 1 g を 9 倍量の生理食塩水を用いて 10% のホモジネートとした。肝臓と腎臓のホモジネート, および血清中の GPX 活性は, t-ブチルヒドロペルオキシドを基質に用い, グルタチオンレダク

ターゼ反応とカップリングさせたときに消費される NADPH 量を 340 nm の吸光度減少を追跡する方法によって測定した¹⁰⁾。GPX 活性の表示においては 1 分間に消費される NADPH の μmol 数を 1 unit とした。肝臓と腎臓のホモジネート中のタンパク質は Folin 法で測定した。

なお, 本研究は関西大学化学生命工学部動物実験委員会の承認を得て実施した。

結果

血清, 肝臓, 腎臓の Se 濃度の測定結果を Table 1 にまとめた。亜セレン酸添加飼料を 1 週間投与したラットの血清, 肝臓, および腎臓 Se 濃度はいずれも基本飼料を投与したラットのそれを有意に上回った。SeM 添加飼料 1 週間投与ラットにおいても, 血清と肝臓 Se 濃度は基本飼料投与ラットのそれを有意に上回ったが, 腎臓 Se 濃度は基本飼料投与ラットと差がなかった。一方, 4 週間投与後の Se 濃度は, 飼料への Se 添加とは無関係に, すべての組織で 1 週間後よりも高い値を示した。Se 添加食を与えた 2 群は, いずれの組織でも基本食群よりも高値を示した。Se の投与化学形態の影響について見ると, 血清と腎臓では差がなかったが, 肝臓では SeM 添加が亜セレン酸添加を有意に上回った。

血清, 肝臓, 腎臓の GPX 活性の測定結果を Table 2 にまとめた。1 週間の Se 添加食投与は血清 GPX 活性を上昇

Table 1 Selenium content in serum, liver and kidney of rats fed selenium-supplemented diets for 1 or 4 weeks

Se added	Serum (ng/mL)		Liver (ng/g)		Kidney (ng/g)	
	1 week	4 week	1 week	4 week	1 week	4 week
None	226 \pm 4 ^a	318 \pm 15 ^a	372 \pm 23 ^a	517 \pm 36 ^a	767 \pm 30 ^a	825 \pm 49 ^a
Selenite	287 \pm 8 ^b	400 \pm 08 ^b	580 \pm 29 ^b	713 \pm 35 ^b	976 \pm 31 ^b	1142 \pm 35 ^b
SeM	294 \pm 8 ^b	380 \pm 13 ^b	615 \pm 21 ^b	876 \pm 36 ^c	777 \pm 21 ^a	1180 \pm 44 ^b
Two-way ANOVA						
Se source	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
Period	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
Source x period	NS		$p = 0.006$		$p = 0.001$	

Values are means \pm SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$) in the Turkey-Kramer multiple range test.

Table 2 Glutathione peroxidase activity in serum, liver and kidney of rats fed selenium-supplemented diets for 1 or 4 weeks

Se added	Serum (unit/mL)		Liver (unit/g protein)		Kidney (unit/g protein)	
	1 week	4 week	1 week	4 week	1 week	4 week
None	2.30 \pm 0.49 ^a	4.71 \pm 0.39 ^a	266 \pm 49 ^a	430 \pm 38 ^a	175 \pm 17 ^a	269 \pm 18 ^a
Selenite	2.03 \pm 0.11 ^a	7.22 \pm 0.83 ^b	427 \pm 46 ^c	734 \pm 38 ^b	347 \pm 28 ^c	517 \pm 98 ^b
SeM	1.66 \pm 0.42 ^a	4.68 \pm 0.37 ^a	377 \pm 20 ^b	767 \pm 45 ^b	283 \pm 19 ^b	412 \pm 25 ^b
Two-way ANOVA						
Se source	$p = 0.014$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	
Period	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p = 0.001$	
Source x period	$p = 0.019$		$p = 0.029$		NS	

Values are means \pm SEM (n = 6). Means in the same column not sharing a common superscript differ significantly ($p < 0.05$) in the Turkey-Kramer multiple range test.

させなかったが、肝臓と腎臓のGPX活性を有意に上昇させた。亜セレン酸添加とSeM添加を比較すると、いずれの臓器でも亜セレン酸添加がSeM添加を有意に上回った。一方、4週間投与後のGPX活性は、Se濃度と同様に、飼料へのSe添加とは無関係に、すべての組織で1週間後よりも高い値を示した。飼料へのSe添加の影響をみると、肝臓と腎臓のGPX活性では、Se添加食を与えた2群が基本食を与えた群よりも高値であったが、1週間後とは異なり亜セレン酸添加とSeM添加の間に差はなかった。これに対して血清GPX活性では、亜セレン酸添加飼料を与えた群のみが基本食投与群よりも高値を示し、SeM添加群は基本食群とほぼ同じ水準の値を示した。

考 察

今回の各群ラットの組織中Se濃度とGPX活性値はこれまで著者らが報告してきた同様の実験^{7, 10-12)}に比較して全体に高い値となった。その理由としては、今回用いたカゼインをベースにした低Se基本飼料のSe濃度がやや高い値であったこと(過去の実験では0.05 mg/kg未満だったが、今回は0.061 mg/kgだった)、および用いたラットにおいて飼育開始時(低Se基本飼料投与開始時)の体重が平均で90 gを上回っており、実験に用いるまでに体内に相当量のSeを蓄積していたことが考えられる。ただし、組織Se濃度とGPX活性に及ぼすSe添加食投与の効果は十分に生じていたので、これらの全体的な高値が結果の解釈に与える影響はないと判断する。

Se添加食投与期間を1週間から4週間に延長すると、飼料中Seの濃度および形態とは無関係に組織中のSe濃度とGPX活性値は上昇した。ラットの体重に群間の差はなく、基本食投与群を含めた平均体重は、Se添加食投与1週間後が288 g、4週間後が390 gであった。すなわち、今回の実験期間はラットの成長期に相当しており、その間、Seは組織に蓄積し、GPX活性値は上昇し続けたことになる。この傾向が成熟ラットでも継続するのかわからないが、少なくともラットの成長期では、飼料中Se濃度が0.2 mg/kgを超えていても含Seタンパク質の合成は飽和していないことになる。したがって、今回のように、成長期に飼料へのSe添加0.2 mg/kgまでの範囲で、食事SeやSe化合物の栄養有効性の判定を行うことは妥当だと思われる。

低Se飼料の投与を継続した場合も組織SeとGPX活性は上昇し、4週目の低Se群の値は1週目のSe添加群の値に匹敵した。Se摂取量が少ない場合には、Seの尿への排泄を調節することで、体内Seを保持したものと思われる。ただし、今回は尿へのSe排泄は測定していないので、これ以上の考察は不可能である。

亜セレン酸の投与とSeMの投与を比較すると、1週間後では、腎臓Se濃度、肝臓GPX活性、腎臓GPX活性において、亜セレン酸がSeMを上回った。これに対して4

週間後では、肝臓Se濃度においてSeMが亜セレン酸を上回り、1週間後に認められた腎臓と肝臓GPX活性の差は消失していた。また、血清GPX活性は、1週間後においてSe添加の効果がなく、4週間後で亜セレン酸投与のみ基本食を上回った。これらのことは、短期間の投与では亜セレン酸の栄養有効性がSeMを上回るが、投与期間が延長されるとSeMの効果は亜セレン酸に追いつくことを意味している。亜セレン酸がダイレクトにセレナイドに還元されるのに対して、SeMの一部がメチルセレノールに代謝されて速やかに排泄されることや、一般のタンパク質に非特異的に取り込まれることを反映したものと思われる。すなわち、SeMは消化管での吸収速度は大きいですが、含Seタンパク質中のSec残基への変換の効率が低いため、短期間の投与ではSe供給源としての効果が現れにくいといえよう。しかし、投与期間が延長されれば、一般のタンパク質に非特異的に取り込まれた分が利用されるため、Se供給源として亜セレン酸投与と同程度の効果を示すことになると思われる。投与期間をさらに延長すれば、組織への蓄積の程度は、今回の4週目の肝臓で認められたように、亜セレン酸を上回ることになると推察されるが、この点はさらに検討を要する。なお、血清GPXの応答が肝臓と腎臓に比較して明らかに遅かったのは、血清GPXが糖タンパク質のGPX3であって、肝臓と腎臓のGPXの大半を占めるGPX1とは異なるタンパク質である¹⁾ことが関係するのかもしれない。いずれにしても、今回の結果は血清GPX活性がSe濃度とは異なり、短期間のSe摂取に対して応答しにくいことを意味している。Se栄養状態の指標として、血清Se濃度とGPX活性値を用いる場合に考慮すべき点といえる。

最後に、肝臓と腎臓を比較すると、腎臓ではSe濃度が相当な高値になるにもかかわらず、GPX活性値が肝臓を下回っていた。このことは、腎臓において、SeがGPX以外の含Seタンパク質(たとえばセレノプロテインP)として存在している、あるいは非タンパク質の不活性な形態で蓄積していることを示唆している。腎臓におけるSeの存在形態について、今後、検討する必要があると思われる。

参考文献

- 1) Sunde RA (2006) Selenium. in Present Knowledge in Nutrition 9th ed, ed by Bowman BA, Russell RM, ILSI Press, Washington DC: pp 480-497.
- 2) 児玉浩子, 浅桐公男, 位田忍, 恵谷ゆり, 小山洋, 曹英樹, 田中芳明, 高柳正樹, 船越政史, 吉田宗弘 (2015) セレン欠乏症の診療指針2015. 日臨栄会誌 37: 182-217
- 3) Yasumoto K, Suzuki T, Yoshida M (1988) Identification of selenomethionine in soybean protein. J Agric Food Chem 36: 463-467.
- 4) Ochoa-Solano A, Gitler C (1968) Incorporation of

- ⁷⁵Se-selenomethionine and ³⁵S-methionine into chicken egg white proteins. *J Nutr* 94: 243–248.
- 5) Okuno T, Kubota T, Kuroda T, Ueno H, Nakamuro K (2001) Contribution of enzymic alpha, gamma-elimination reaction in detoxification pathway of selenomethionine in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 176: 18–23.
 - 6) McConnell KP, Cho GJ (1967) Active transport of L-selenomethionine in the intestine. *Am J Physiol* 213: 150–156.
 - 7) Yoshida M, Tashiro H, Iwami K, Yasumoto K, Iwai K (1983) Bioavailability of selenite, selenomethionine and selenocystine in rats with silver loading. *Agric Biol Chem* 47: 807–813.
 - 8) Wen HY, Davis RL, Shi B, Chen JJ, Chen L, Boylan M, Spallholz JE (1997) Bioavailability of selenium from veal, chicken, beef, pork, lamb, flounder, tuna, selenomethionine, and sodium selenite assessed in selenium-deficient rats. *Biol Trace Elem Res* 58: 43–53.
 - 9) Robinson MF, Rea HM, Friend GM, Stewart RD, Snow PC, Thomson CD (1978) On supplementing the selenium intake of New Zealanders. 2. Prolonged metabolic experiments with daily supplements of selenomethionine, selenite and fish. *Br J Nutr* 39: 589–600.
 - 10) Yoshida M, Iwami K, Yasumoto K, Tashiro H (1981) Distribution of selenium in bovine milk and selenium deficiency in rats fed casein-based diet, monitored by lipid peroxide level and glutathione peroxidase activity. *Agric Biol Chem* 45: 1681–1688.
 - 11) Yoshida M, Iwami K, Yasumoto K (1984) Determination of nutritional efficiency of selenium contained in processed skipjack meat by comparison with selenite. *J Nutr Sci Vitaminol* 30: 395–400.
 - 12) Sugihara S, Fukunaga K, Nishiyama T, Yoshida M (2005) Effect of intermittent supplementation with selenate on selenium status of rats fed selenium-deficient diet. *J Nutr Sci Vitaminol* 51: 478–481.