セレン関連化合物に関する研究 (第2報¹⁾)
セレン酸 ($\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$) の生体運命について その1²⁾

中室克彦, 佐谷戸安好, 外村正治,^{3a)} 小瀬洋喜^{3b)}
国立衛生試験所,^{3a)} 岐阜薬科大学^{3b)}

Studies on Selenium Related Compounds. II.¹⁾
The Metabolic Fate of Selenate ($\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$). (1)²⁾

KATSUHIKO NAKAMURO, YASUYOSHI SAYATO,
MASAHARU TONOMURA^{3a)} and YOUKI OSE^{3b)}
National Institute of Hygienic Sciences^{3a)} and
Gifu College of Pharmacy^{3b)}

(Received July 26, 1972)

Whole body turnover, excretion and time-distribution of selenium in rats were examined after administration of $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$. It was found that 60 % of the selenium administered was absorbed through the intestine and excreted mainly in urine. The excretion of ^{75}Se -containing metabolite in the respiratory was confirmed. Selenium was rapidly accumulated in the liver as the first target organ, and subsequently moved into various organs through the blood. The biological half life of the C period was found to be 22.44 days which indicates that excretion of selenium in various tissues is comparatively rapid. Studies on the behavior of selenium in blood using $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ demonstrated that selenium passes through the membrane of red blood cells and combines with hemoglobin.

緒 言

毒劇物としてのセレンの安全処理対策の確立と水道水質基準の設定は, 我が国の複雑化する環境汚染制御における対策の一環として, 衛生化学的見地から看過し得ない問題である。

セレンについて, その人体に与える影響を研究するための基本的態度として著者らはすでにセレンを4-クロロ-オルトフェニレンジアミンと反応させ, その反応生成物である5-クロロピアセレンールをガスクロマトグラフィーにより定量する方法を研究し, セレンの代謝物あるいは臓器に蓄積するセレンの微量定量法を確立した。¹⁾

セレンの環境汚染による動植物への影響については,

すでにアメリカにおいて, 地質に由来するセレンが牧草中に蓄積し, 馬, 牛等が摂取することによって発生した Alkali-disease^{4), 5)} として, その毒性が知られている。著者らは, まずセレンの生体内における挙動を認識するため, 今回は $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ を用い, ラットに経口投与した場合の体内残留ならびに呼気, 尿, ふん中への排泄, 生体および血液内分布について観察し, セレンの生体運命に関する基礎的知見を得たので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬 ① 投与試料溶液—— $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ を 0.1 mg/ml Na_2SeO_4 水溶液を担体として 5×10^6 cpm/ml および 1.5×10^6 cpm/ml の投与試料溶液を調製した。

② 吸収液——飽和塩化第二水銀溶液。

1) 中室克彦, 佐谷戸安好, 外村正治, 小瀬洋喜, 衛生化学, **18**, 237 (1972).

2) 日本薬学会第92年会, 大阪, 1972年4月発表。

3) Location: a) Kamiyōga, Setagaya-ku, Tokyo (東京都世田谷区上用賀); b) Mitahora, Gifu (岐阜市三田洞)。

4) O. H. Beath, J. Amer. Pharm. Assoc., **23**, 94 (1934).

5) K. W. Franke, J. Pharm. Exper. Therap., **61**, 89 (1937).

③ ヘパリン溶液——ヘパリンを生理食塩水に溶解し 2.00 unit/ml の活性を有する溶液とする。

④ ゲルろ過用担体——Sephadex G-25.

2. 試験方法 a. 残留, 排泄実験——体重 150g のウィスター系雌ラット 5 匹を 1 群として, 1 匹ごとに糞尿分離型ケージに入れ, 水および固型飼料を実験 2—3 日前より自由に与えて飼育したものについて, 5×10^6 cpm/ml 試料溶液 1 ml を胃ゾンデを用いて 1 回の強制経口投与したものをそのまま飼育した。ラットを連日一定時刻に合成樹脂容器 ($\phi 8$ cm, 長さ 20 cm) に入れて被検動物とした。排泄物のふん, 尿は糞尿分離型ケージによって自動的に分離されるものを 24 時間ごとに採取してポリパックに入れ, これを測定試料とした。また, 呼吸中 ^{75}Se は糞尿分離型ケージを密閉容器中に入れ, アスピレーターで吸引しながら飽和塩化第二水銀溶液 20 ml を入れた 2 個の吸収ビン中を通過させ, 24 時間ごとに吸収液を交換し, この吸収液を測定試料とした。

b. 体内分布実験——体重 150 g のウィスター系雌ラット 3 匹を 1 群とし, その 10 群につき 1 匹ごとに糞尿分離型ケージに入れ, 水および固型飼料を自由に与えて飼育したものを被検動物とした。すなわち, これらラットに 1.5×10^6 cpm/ml 試料溶液 1 ml を胃ゾンデを用いて, 1 回経口投与したものを投与後 4, 8, 12 時間 1, 2, 3, 4, 5, 9, 12 日目にエーテル麻酔し, 心臓穿刺により, ヘパリンでぬらした注射器でできるだけ多量の血液を採取した。その後, 各臓器を摘出し, 重量測定および臓器蓄積測定用試料とした。対象とした臓器類は血液, 心臓, 肺臓, 肝臓, 胃, 腸, 脾臓, 膵臓, 脳, 生殖器, 眼球, 筋肉およびふん, 尿で, 胃と腸は内容物を含めたままのものである。

また, 血液中における ^{75}Se の分布を測定するため, ヘパリンを加え凝固を阻止した血液 1 ml を 3000 rpm で 10 分間遠心分離し, 血漿と赤血球に分割する。赤血球はさらに 3 倍量の水を加え溶血させ, 3000 rpm, 10 分間の遠心分離により沈殿部分の硬質部 (赤血球膜部分) と上清の非硬質部 (内容物, 主としてヘモグロビン) に分割し測定試料とする。

c. 血液の Sephadex G-25 を用いたゲルろ過—— ^{75}Se の生体における血液中の挙動を測定するため $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ 投与ラットの血液を心臓穿刺により採血し, 遠心分離により得られた非硬質部を分離する。この上清 1 ml を Sephadex G-25 を充填した径 1.5 cm, 長さ 100 cm のガラスカラムを用い 0.9 % 生理食塩水を溶出液とし, 36 ml/min の流量で 1 fraction について 3 ml ずつを捕集しカラムクロマトグラフィーを行なった。各溶出液につき放

射能のカウントおよび 415 m μ の吸光度を測定した。また, ^{75}Se の血液中における挙動を *in vitro* において測定するため, $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ を投与していないラットの血液を心臓穿刺により採血し, この血液 1 ml に 1.5×10^6 cpm/ml を 0.5 ml を加え, 37°, 4 時間水浴中で incubate する。その後, ただちに遠心分離により非硬質部を分離する。この上清 1 ml を *in vivo* の時と同様な条件でカラムクロマトグラフィーを行なう。

3. 装置 a. 呼吸中 ^{75}Se 捕集装置——呼吸中 ^{75}Se の捕集装置を Fig. 1 に示す。

Fig. 1. Apparatus for Collection of ^{75}Se in Respiratory Excretion

① 密閉容器: 塩化ビニール製円筒 (内径 31 cm, 高さ 55 cm) 型密閉容器。

② 糞尿分離型ケージ。

③ 吸収ビン: 内容 300 ml のもの。

④ アスピレーター。

b. Animal Counter——Packard, Armac Scintillation Detector. Model 440.

c. Well-type Scintillation Counter——Aloka Model P-100.

結 果

1. ^{75}Se の体内残留

$\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ 溶液 1 ml (5×10^6 cpm/ml) をウィスター系ラット 5 匹に胃ゾンデを用い強制経口投与を行なった。すなわち, 投与直後の whole body count に対する各経過日数における whole body count の百分率を片対数グラフにプロットした結果は Fig. 2 のごとくで, 3 段階の排泄状態を示している。まず, ^{75}Se は投与 4 日目までの A の期間において約 80 % の排泄を示すのがみられる。また, これ以後 12 日目までの B の期間においては比較的すみやかな排泄を示し, 12 日目においてなお投与量の 8 % の ^{75}Se が残留することを示した。さらに 16 日目から 45 日目までの C の期間では排泄が緩徐となり, 45 日目において, なお 2.5 % の体内蓄積量を示した。

Fig. 2. Retention of ^{75}Se in Rats after Peroral Administration of Labelled Sodium Selenate

A, B and C are indicated biological half life in rats after peroral administration.

つぎに、この体内残留曲線から得られたA, B, Cの期間における各生物学的半減期を求めるため、各期間の測定値について分散分析を行ない、その直線性の検定を行なった結果は Table I のごとくである。すなわち、これらは、いずれも5%の有意水準で直線性が認められるとともにそれぞれの回帰方程式が得られた。これら結果より生物学的半減期はAの期間において1.54日、Bの期間は7.84日、さらに最も排泄の緩徐なCの期間において22.44日であることを示した。

2. 排泄系における ^{75}Se の排泄

a. ふんおよび尿 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ の経口投与時のふん、尿について、その ^{75}Se 排泄量を経日的に測定した積算値と1日当りの排泄量を投与後の whole body count に対する百分率で示した結果は Fig. 3 のごとくである。すなわち、投与第1日目において投与量の40%が尿に、11%がふんに排泄され、6日目付近まで増加の傾向を示した。これ以後のふん、尿中への排泄は緩徐で20日目まで

Fig. 3. Daily Excretion of ^{75}Se in Rats after Peroral Administration of Labelled Sodium Selenate

に尿に60%、ふんに20%の ^{75}Se が排泄されることを示した。

d. 呼吸すでに Hofmeister, F.⁶⁾ Challenger, F.⁷⁾ Schultz, J.⁸⁾ K. P. McConnell⁹⁾ らは亜セレン酸ナトリウム、セレン酸ナトリウムなど、無機セレン化合物を用い、生体内での代謝において特徴的なパターンとして呼吸排泄の存在することを認めているが、その事実を認識するため、つぎのごとき検討を行なった。すなわち、ラットの呼吸中に含有すると考えられる ^{75}Se を飽和塩化第二水銀溶液に吸収させたものを Animal Counter で測定した結果は Fig. 4 のごとくである。すなわち、呼吸中 ^{75}Se は、投与後2日目までに約4%が排泄され、これ以後呼吸中への排泄は微弱となり、投与15日目までに約5%の呼吸排泄を示した。

3. 各臓器における ^{75}Se の蓄積

セレン酸ナトリウムの体内臓器への蓄積を検討するに、 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ の経口投与後4時間、8時間、12時間、

TABLE I. Analysis for Linearity on the Excretion of $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ Dosed Peroral

	A	B	C
Time after Administ.	from 0 to 4 days	from 4 to 12 days	from 16 to 45 days
Number of rats	5(rats) × 10(times) = 50	5(rats) × 8(times) = 40	5(rats) × 8(times) = 40
Result of analysis of variance	F = 0.0585 $F_{80}^8 = 2.10(5\%)$ $Y = -0.1949x + 1.8766$	F = 0.3222 $F_{40}^7 = 2.25(5\%)$ $Y = -0.0384x + 1.2194$	F = 0.0815 $F_{40}^7 = 2.25(5\%)$ $Y = 0.0134x + 0.8025$
Biol. half life	1.54 days	7.84 days	22.44 days

6) F. Hofmeister, *Arch. Exp. Path. u. Pharmacol.*, **33**, 198 (1893—1894).

7) F. Challenger, *Chem and Ind.*, **1935**, 657.

8) J. Schultz, H. B. Lewis, *J. Biol. Chem.*, **133**, 199 (1940).

9) K. P. McConnell, O. W. Portman, *J. Biol. Chem.*, **195**, 277 (1952).

Fig. 4. Daily Respiratory Excretion of ^{75}Se in Rats after Peroral Administration of Labelled Sodium Selenate

1日, 2日, 3日, 4日, 5日, 9日, 12日後における臓器分布は Fig. 5 のごとくである. すなわち, 蓄積の比較的多い肝臓, 腎臓, 肺, 血液についてみると, 肝臓において投与4時間後において27%の蓄積がみられ, 8時間後には最高30%の蓄積を示し, それ以後, 次第に減少する傾向を示している. また, ^{75}Se の各臓器への媒体としての血液においては, 24時間後に最大の6.7%の蓄積を示す. 腎臓, 肺においては, それぞれ12時間後, 8

Fig. 5. Time-Distribution of ^{75}Se in Various Tissues after Peroral Administration of Labelled Sodium Selenate

Activity of total blood was calculated in the ratio of 6.7 g of blood per 100 g of body weight.

TABLE II. Relative Specific Activity of ^{75}Se in Rat Tissue after Peroral Administration of Labelled Sodium Selenate

	4 hr	8 hr	12 hr	1 day	2 bay	3 bay	4 day	5 day	9 day	12 day
Blood	0.82	0.71	0.96	1.01	0.84	0.54	0.65	0.55	0.44	0.39
Eye	0.10	0.10	0.09	0.15	0.15	0.11	0.13	0.09	0.19	0.10
Brain	0.05	0.11	0.14	0.15	0.12	0.06	0.10	0.13	0.07	0.07
Lung	1.01	1.13	0.77	0.90	0.56	0.43	0.54	0.32	0.26	0.16
Heart	0.59	0.80	0.46	0.56	0.33	0.28	0.19	0.32	0.22	0.15
Liver	6.11	5.20	4.97	5.27	1.79	1.35	1.33	1.14	0.73	0.55
Spleen	0.29	0.53	0.56	0.79	0.68	0.53	0.62	0.37	0.42	0.28
Pancreas	0.51	0.77	0.58	0.57	0.35	0.26	0.24	0.17	0.13	0.10
Kidney	3.55	4.44	5.88	5.46	3.89	1.25	2.22	1.20	0.77	0.65
Stomach	24.11	11.63	0.93	0.88	0.15	0.14	0.36	0.10	0.03	0.06
Intestine	2.18	1.82	1.20	0.94	0.41	0.29	0.23	0.19	0.10	0.08
Blind gut	1.80	1.20	3.30	2.12	0.35	0.26	0.14	0.13	0.07	0.05
Sexual organ	0.21	0.29	0.28	0.42	0.37	0.28	0.29	0.18	0.18	0.13
Muscle	0.10	0.13	0.10	0.12	0.09	0.08	0.08	0.06	0.06	0.06

Relative Specific Activity (R.S.A.) values were means of three value.

Relative Specific Activity (R.S.A.) was calculated as below:

$$\text{R.S.A.} = \frac{\frac{\text{activity in the organ (cpm)}}{\text{organ weight (g)}}}{\frac{\text{total dose (cpm)}}{\text{body weight (g)}}}$$

so that values represent the accumulation or dilution of ^{75}Se in organ, namely, values greater than 1 represent concentration of radioactivity greater than in the body as a whole.

時間後にピークを示し、いずれの臓器においても投与後24時間以内に最大蓄積量を示した。さらに、各種臓器に対するセレン酸ナトリウムの親和性を検討するため、各臓器の相対的比放射能 (R.S.A 値) について示すに、Table II のごとく肝臓において投与4時間後に6.11と大きな値を示し、これ以後減少の傾向を示した。これに反し、腎臓においては投与4時間目に3.55と肝臓より低い値を示すが、12時間後に増大し、肝臓の4.97より高い5.88を示し、その後減少する傾向を示した。

4. 血液構成物における ^{75}Se の蓄積

^{75}Se 蓄積が比較的高い血液において、その構成物としての血漿、非髄質部、髄質部中への ^{75}Se の分布について検討を行ない、Fig. 6 の結果を得た。すなわち、*in vivo* の実験において投与4時間後、血漿中に大部分存在する ^{75}Se は経時的に減少する傾向を示した。これに反し、赤血球を水で溶血させたのち、遠心分離により得た髄質部、非髄質部は、いずれも経時的に増加することを認めた。また、これと同様の方法で *in vitro* の実験を行なった結果、血漿中 ^{75}Se は経時的に減少し、髄質部、非髄質部中 ^{75}Se は増加し、*in vivo* と同様の傾向を示した。これら結果より、さらに ^{75}Se の存在する非髄質部中においてヘモグロビンと結合しているか否かの検討を *in vivo*, *in vitro* について行ない Fig. 7 の結果を得た。すなわち、Sephadex G-25 を用い、非髄質部のカラムクロマトグラフィーを行なうに、*in vivo* においては $415\text{ m}\mu$ の吸光度で表わさるヘモグロビンのピークと ^{75}Se のカウントのピークが一致することを示した。一方 *in vitro* の実験においてはヘモグロビンと ^{75}Se のピークは一致せず、 ^{75}Se のカウントのピークは無機セレンのピークに一致する結果を得た。

考 察

1. ^{75}Se の体内残留

セレンの体内残留については C. Blincoe,¹⁰⁾ M.K. Yousef¹¹⁾ らが亜セレン酸ナトリウムを用いラットの腹腔内投与による観察を行なっているが、セレン酸ナトリウムの経口投与による報告はなされていない。そこでセレン酸ナトリウム (Na_2SeO_4) の強制経口投与による ^{75}Se の体内残留の検討を行なうに、Fig. 2 に示すごとく3段階の排泄状態を示す結果を得た。すなわち、Aの期間は投与後4日目までには投与量の80%を排泄することが認められた。この結果は ^{75}Se がふん、尿などを介して速やかに排泄される時期であると考えられる。また、Bの

Fig. 6. Distribution of ^{75}Se in Blood Constituents. S.F.H. means the stroma free hemolyzate of erythrocytes.

Fig. 7. Gel Filtration of Stroma-Free Hemolyzate of Erythrocytes through Sephadex G-25.

condition; column size: 1.5x100 cm
flow rate: 36 ml/min, 3 ml/fraction
carrier: 0.9% saline
—: 415 $\text{m}\mu$ OD
.....: ^{75}Se count/min

期間においては、相当程度に体内残留している状態において比較的速やかに排泄することを示す時期であると考えられ、投与12日目においても、なお8%の残留を示すのがみられる。さらに、Cの期間においては排泄状態が最も緩徐であり、45日目において2.5%の体内蓄積を示

10) C. Blincoe, *Nature*, **186**, 398 (1960).

11) M.K. Yousef, W.J. Coffman, *Nature*, **219**, 1173 (1968).

している。このC期間は Table I で明らかなごとく、生物学的半減期がA, B, C, 3つの期間のうち最も長い22.44日を示し、いったん体内に吸収された ^{75}Se が緩徐に排泄して行く状態を示すものと考えられる。

2. 排泄系における ^{75}Se の排泄

$\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ の排泄に関してふん、尿への排泄を検討するに Fig. 3 に示すごとく、投与後1日目にすでに尿に40%, ふんに11%, 20日目までに尿に60%, ふんに20%が排泄されることを示している。この結果より、尿とふんへの ^{75}Se の排泄量比は3:1を示し、尿への排泄量が非常に多いことを示している。すなわち、相当量の体内吸収を示すと同時に、いったん体内吸収された ^{75}Se はその排泄も大であり、肝臓→腎臓→尿への移行する経過の速いことが推定される。

また、 $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ を経口投与した場合の呼気中への排泄を検討した結果は Fig. 4 のごとくである。すなわち呼気中の ^{75}Se は投与後2日目までに約4%が排泄され、これ以後、呼気中への排泄は微弱となり、15日目までに約5%の排泄を示した。この結果は K. P. McConnell⁹⁾らが呼気中代謝産物としてジメチルセレンを確認したことに一致することを認めた。しかしながら、いまだセレン代謝に関与するメチル化の機構は明らかではない。

3. 各臓器における ^{75}Se の蓄積

セレン酸ナトリウムの経口投与における体内分布は Fig. 5 に示すように肝臓において投与4時間後にすでに27%を示し、8時間後において30%と他の臓器に比較して最も高い蓄積量が認められ、漸次減少することを示した。また、血液、腎臓、肺などは肝臓において最大蓄積を示す時間よりやや遅れ、それぞれ24時間、12時間、8時間後に最大蓄積量を示した。これら結果より、 ^{75}Se の最大蓄積部位である肝臓において投与後初期の急速な蓄積を示すと同時に血液を介し各臓器に迅速に移行し、投与後24時間以内にそれぞれの臓器において最大蓄積量を示し、その後、いずれの臓器からも比較的速かに排泄され、K. P. McConnell¹²⁾が報告した皮下注射によるセレン酸ナトリウムの経時的な体内分布変動と類似した現象を示すことを認めた。また、Table II で明らかなごとく、各臓器の親和性を R. S. A 値についてみるに、肝

臓での親和性が最も大きく、経時的に腎臓の蓄積量も増加する現象を示す。このことから ^{75}Se の体内親和性は肝臓が第1決定臓器、腎臓が第2決定臓器であると考えられる。

4. 血液構成物における ^{75}Se の蓄積

^{75}Se が各臓器へ移行する場合、その媒体として重要な血液構成物中の ^{75}Se 分布は Fig. 6 に示すごとく、*in vivo*, *in vitro* いずれの実験においても髄質部、非髄質部中 ^{75}Se が増加することより、 ^{75}Se は赤血球膜を透過して非髄質部中に存在することおよび赤血球膜と結合を起こして存在することが考えられる。さらに膜透過した ^{75}Se が非髄質部中に存在するヘモグロビンと結合しているか否かを検討するために、血球内漿を Sephadex G-25 を用いてゲルろ過を行なったところ Fig. 7 に示すごとく、*in vitro* においてはヘモグロビンのピークと ^{75}Se のカウントのピークが一致しないことより、 ^{75}Se とヘモグロビンが*in vitro*における実験では結合状態を示して存在することを認め得ないが、*in vivo*において ^{75}Se のカウントのピークはヘモグロビンと同一位置に溶出し、赤血球膜を透過した ^{75}Se はヘモグロビンと結合して存在することは明白であることを認めた。

結 論

以上の結果より、つぎのごとき結論を導きうるものと考えられる。

- 1) $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ の経口投与における主たる排泄経路は尿であり、60%以上の ^{75}Se が体内吸収されることが考えられる。
- 2) $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_4$ の経口投与において、呼気中に ^{75}Se が排泄されることを確認した。
- 3) ^{75}Se の体内挙動は第1決定臓器と認めた肝臓に速かな蓄積を示すと同時に血液を介し、各臓器へ ^{75}Se が迅速に移行することが認められ、Cの期間の生物学的半減期が22.44日を示すごとく、排泄も比較的速かであることが考えられる。
- 4) ^{75}Se の赤血球膜透過性および膜結合性が*in vivo*, *in vitro*において認められるが、 ^{75}Se とヘモグロビンとの結合は*in vivo*においてのみ認められる。

12) K. P. McConnell, *J. Biol. Chem.*, **141**, 427 (1941).