セレン化合物の衛生化学的研究 (第4報¹⁾)
血液分画中のセレンの分布について

長谷川 明
国立衛生試験所²⁾

Hygienic Chemical Studies on Selenium Compounds. IV.
Distribution of Selenium in the Fractions of Blood

AKIRA HASEGAWA
National Institute of Hygienic Sciences²⁾

(Received March 15, 1975)

Distribution of ^{75}Se in whole blood, serum, and erythrocytes, after subcutaneous injection in the form of L-selenocystine and sodium selenite to rabbits was examined. During the first 4 hr after the injection of both selenium compounds, ^{75}Se appeared in greater concentration in the serum than in erythrocytes but after 10 days, concentration in the serum decreased to roughly equal level as that in erythrocytes. Biological half life of ^{75}Se , calculated from the result of successive measurement of radioactivity, 7 and 6 days in whole blood, and 6 and 3 days in serum, respectively, for L-selenocystine and sodium selenite. Distribution of ^{75}Se in whole blood, serum, and erythrocytes was examined with sampled from a rat 30 min after intravenous injection of sodium ^{75}Se -selenite (*in vivo*), and with rat blood incubated with sodium ^{75}Se -selenite at 37° for 30 min (*in vitro*). A higher radioactive concentration was found in erythrocytes in *in vivo* experiment than that in *in vitro* experiment. Results of dialysis of sera obtained *in vivo* and *in vitro* experiments suggested that there was some difference between the two sera in the manner of affinity of selenium to serum protein. Concerning the distribution in erythrocytes, most of selenium was detected in hemoglobin, especially in globin. Globin tagged with ^{75}Se obtained by *in vivo* experiment was hydrolyzed and separated by two-dimensional paper chromatography. The autoradiogram of this paper indicated that the hydrolyzate contained at least 4 different compounds bearing ^{75}Se , two of these seemed to be methionine and cystine or cysteine.

緒 言

著者らは前報¹⁾までに、ラットにおける亜セレン酸ナトリウム投与後の体内分布、排泄および生物学的半減期について報告した。すなわち、亜セレン酸ナトリウムを投与後、セレンは長期間体内に残留し、血液にも高濃度に分布し20日の生物学的半減期（以下 B. H. L. と略す）を示した。また ^{75}Se -セレンシスチンの投与後2ヵ月後³⁾においても血液中に高濃度で ^{75}Se が認められた。これ

らのことから血液に着目し、ウサギおよびラットにつき2種の ^{75}Se 標識化合物を用い、セレンの血液内における動態について検討した。その結果を報告する。

実験方法

1. 動物 ウサギ（雄）およびラット（ウイスター系、雄）を飼料（オリエンタル酵母工業製、ウサギにGC-4、ラットにNMFを用いた）、水を自由に摂取させ、飼育し、ウサギは体重 $2.48 \pm 0.3\text{kg}$ 、ラットは $226 \pm$

1) 第3報：長谷川 明，浦久保五郎，衛生化学，**20**，341（1974）。

2) Location：1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo（東京都世田谷区上用賀1-18-1）。

3) 長谷川 明，衛生化学，**18**，70（1972）。

46 g に達した動物を用い実験した。

2. 薬物 ^{75}Se -L-セレンシスチン (The Radiochemical Centre 製) および ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム (New England Nuclear Corp. 製) を下記のように各担体で希釈し、投与液とした。

^{75}Se -L-セレンシスチン 溶液——40 μCi /0.05 mg, L-selenocystine/ml.

^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム 溶液——25 μCi /0.01mg, Na_2SeO_3 /ml.

3. 血液中濃度 ウサギに上記2種の ^{75}Se 標識セレン化合物溶液を皮下注射し、投与直後から14日目までの血液中の ^{75}Se の濃度分布の推移を観察した。すなわち、上記投与液をウサギ、一群2匹の背部皮下に1ml/kgの割合で投与し、各時間に耳朶静脈から採血し、全血液、血清および血球についてそれぞれ ^{75}Se の放射能を測定した。

4. 血液中の ^{75}Se の分布 ラット2匹に ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム溶液1ml/kgを股静脈に注射し(以下 *in vivo* 群と略す)、30分後に採血した、この血液を以下のように分画した。すなわち、血液を遠心分離して血球と血清に分画し、血球部分については Suzuki ら⁴⁾の方法によりヘモグロビンを取り出し、これを White ら⁵⁾の方法に従い、ヘムとグロビンに分画した。さらにグロビンを一般的方法により6N塩酸で一昼夜加水分解した。この加水分解物につき、二次元ペーパークロマトグラフィーを行ない、さらにクロマトグラム上の ^{75}Se の放射能分布をオートラジオグラフィーで確認した。

また別に、ヘパリン処理したラット血液約10mlを共栓フラスコにとり、これに ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム溶液0.1mlを加え37°、30分間 incubate (以下 *in vitro* 群と略す)した。その後、上記方法により、血球と血清に分画し、血球部分をヘムとグロビンにまで分画した。

血清分画については、*in vivo*, *in vitro* 両群の血清1mlに対し、200倍容量の蒸留水を用いて、セロファンチューブ(8/32型 visking Company 製)を使用し、5°で12日間透析を行なった。透析期間中、外液を24時間毎に交換し、外液の ^{75}Se の放射能を測定した。

5. ペーパークロマトグラフィー ラット *in vivo* 群の血液を4.に示す方法により分画して得たグロビンの加水分解物をろ紙(Whatman No. 3mm)にスポットし、第I展開溶媒、*n*-ブタノール-水-ギ酸(70:30:1)、第II展開溶媒、フェノール-水-アンモニア水(80:20:

1)で二次元展開し、ニンヒドリンスプレー(東京化成)で発色させた。

6. 放射能測定 各分画の試料はプラスチック製試験管に入れオートウエルシンチレーション測定装置(日本無線医理学研究所製, JDC-751型)により測定した。

クロマトグラム上の放射能スポットは、X線フィルム(さくら, Xレイ工業用ノンスクリン, Type N)を使用し、露出時間は3ヵ月として検出した。

結 果

1. 血液中の ^{75}Se 濃度

Fig. 1, 2にウサギにおける血液、血球および血清中の ^{75}Se の経時的濃度変化を示す。2種のセレン化合物

Fig. 1. Time-distribution of ^{75}Se in Whole Blood, Serum and Red Cells of Rabbit after Single Subcutaneous Injection of ^{75}Se -L-selenocystine

—●—: total blood
—○—: serum
—×—: red cell

Fig. 2. Time-distribution of ^{75}Se in Whole Blood, Serum and Red Cells of Rabbit after Single Subcutaneous Injection of Sodium ^{75}Se -selenite

—●—: total blood
—○—: serum
—×—: red cell

4) M. Suzuki, A. Kajita, *J. Biochem.* (Tokyo), **43**, 401 (1954).

5) A. White, P. Handler, E. Smith, "Principles of Biochemistry," 5th ed. McGraw-Hill Book Co., 1973, p. 171.

TABLE I. Result of Statistical Analysis for Biologicall Half Life (B. H. L.) of ^{75}Se in Total Blood and Serum of Rabbit after Subcutaneous Injection of ^{75}Se -labelled Compounds

Compound	B. H. L. (day)	Duration (day) ^{a)}	Regression equation ($Y = \log Y$)	Correlation coefficient
Selenocystine (in blood)	7.01	1—11	$Y = -0.0988X + 9.3030$	0.9509
(in serum)	6.34	1—11	$Y = -0.1092X + 9.4879$	0.9817
Sodium selenite (in blood)	6.59	1.2—14	$Y = -0.1052X + 9.6544$	0.9722
(in serum)	3.03	0.9—14	$Y = -0.2291X + 10.3727$	0.9979

a) days after single administration.

ともに血液中における ^{75}Se の濃度変化のパターンは同じような傾向を示しており、最高血中濃度は投与 2—4 時間後にあらわれ、以後はゆるやかに減少した。

血清中の ^{75}Se 濃度は全血液同様ゆるやかに減少した。投与直後から 10 日目くらいまでは血球中より血清中の方が ^{75}Se 濃度が高い。すなわち、血清では最高濃度時においてその時の血球の放射濃度に比べ、 ^{75}Se -L-セレンシスチン投与の場合 39.3 倍、 ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム投与の場合は 29.8 倍の高濃度を示したが、時間の経時と共にその比率は小さくなり、投与 10 日目以後では、血清中の濃度はほぼ血球中のそれと同程度に減少することを示した。Fig. 1 および 2 から、全血液、血清中の ^{75}Se の減少の回帰方程式を求め、その式から血液および血清中に残留する ^{75}Se の B. H. L. を求め、Table I に示した。その結果、血液における B. H. L. は 2 種のセレン化合物とも 7 日と同じ値を得た。しかし、血清における B. H. L. は、 ^{75}Se -L-セレンシスチン投与の場合は 6 日であったが、 ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウム投与の場合は 3 日であった。

2. 血清中の ^{75}Se

ラット血清を蒸留水で透析した結果を Fig. 3 に示す。Fig. 3 には透析期間中の透析膜内に残っている ^{75}Se の放射能を透析前の放射能濃度に対する百分率であらわしてある。*in vivo* 群の血清においては、透析後 1 日目で 25% が、4 日目で 50%、10 日目で 85% と、 ^{75}Se はゆるやかな曲線を描きながら徐々に透析されることを示した。*in vitro* 群の血清においては 1 日目で 48% が透析されたが、2 日目以後はほとんど透析されないことを示した。

3. 血液中の ^{75}Se の分布

実験方法 4. に示すように、*in vivo* 及び *in vitro* 群の血液を分画し、放射能を測定した結果を Table II に示す。すなわち、*in vitro* 群では *in vivo* 群に比べ血球分画における ^{75}Se の存在が少なく、さらに血球分画においてもほとんどの放射能は内容物に存在し、この内容物の分画においても *in vivo* 群にくらべ *in vitro* 群は 1/3

Fig. 3. Behavior of Rat Serum Containing ^{75}Se during Dialysis

Serum was dialyzed, using dialyzing cellophane tube, against distilled water at 5° for 12 days.

The outer solution were exchanged every 24 hours.

—○—: *in vivo* group
—●—: *in vitro* group, see the legend for Table II

TABLE II. Distribution of ^{75}Se in Fractions of Rat Blood

Fraction	Radioactivity of ^{75}Se (%)	
	<i>in vivo</i> ^{a)}	<i>in vitro</i> ^{b)}
Total blood	100.00	100.00
Serum	81.90	93.22
Red cell	18.10	6.75
Stroma	0.37	0.69
Endosoma	17.64	5.97
Hemoglobin	17.60	5.90
Hem	0.73	0.40
Globin	16.87	5.50

a) *in vivo* group: distribution of ^{75}Se in fractions of rat blood sampled at 30 minutes after intravenous injection of sodium ^{75}Se -selenite

b) *in vitro* group: distribution of ^{75}Se in fractions of rat blood incubated with sodium ^{75}Se -selenite at 37° for minutes.

以下の百分率を示した。また、血球内容物よりヘモグロビンを結晶化し、さらにヘムとグロビンに分画すると、ヘムの分画には ^{75}Se 放射能はほとんど認められなかった。

4. 加水分解物のペーパークロマトグラフィー

In vivo 群のグロビン加水分解物の二次元ペーパークロマトグラフィーおよびそのオートラジオグラフィを行ない。得られた結果を Fig. 4 に示す。Fig. 4 のオートラジオグラム上でニンヒドリン呈色陽性で、かつ ^{75}Se の放射能陽性スポットは4個以上あり、そのうち、これらのスポットに相当するアミノ酸としては(B)のセレノメチオニン、(C)セレノシスチンまたはセレノシステインであることを、別にセレノメチオニンおよびセレノシスチンを二次元ペーパークロマトグラフィーにより展開し位置を比較して確認した。

考 察

1. 血液中の ^{75}Se の濃度

^{75}Se -セレノシスチンおよび ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウムの両化合物投与後、 ^{75}Se の血液中の濃度推移について Fig. 1 および 2 についてみると両化合物ともに、同じ様なパターンを示し、無機セレン、有機セレン化合物における相異は認められなかった。しかし、血清中の ^{75}Se の B. H. L. は亜セレン酸ナトリウム投与群の3日に対し、セレノシスチン投与群は6日と2倍の開きを示した。この様に血清からの消失は、有機セレン(セレノシスチン)の方が無機セレン(亜セレン酸ナトリウム)にくらべておそいという結果が得られた。また前報⁶⁾で報告したラットにおける B. H. L. は全血液として表わしてあるが、今回の実験から推察すると、投与後10日目以後は血清の放射能が血球のそれ以下となるので、全血液中の ^{75}Se は赤血球の B. H. L. に従って減少していくものと推察される。また有機セレン化合物であるセレノメチオニンについて Lathrop ら⁷⁾は人に静注した時の血液中の ^{75}Se の濃度変化を報告しているが、このデータを使用し、血清中の ^{75}Se 濃度の B. H. L. を計算すると、投与後1—12日の間で6—8日になり今回のウサギにおける B. H. L. の結果と同様な値を得た。また Jenkins ら⁸⁾は鶏の血清中における ^{75}Se はグロビン分画に多く分布し、その B. H. L. は5—6日であると報告している。投与方法、動物種差等、実験方法に差はあるが、著者の得た B. H. L. の値はこれらとほとんど同様の値であった。

2. 血清中の ^{75}Se

Fig. 4. Autoradiogram of Two-dimensional P. P. C. of Selenium Metabolites in Rat's Globin Hydrolyzate

Filter paper is Whatman No. 3mm (400×400mm).

All spots (marked with pencil) show the purple colour, with ninhydrin spray and shaded parts indicate radioactivity.

Spot (A) and (D): unknown, (B): identified to be selenomethione, (C): identified to be selenocystine or selenocysteine.

生体における ^{75}Se の血液への取り込みの対照として、 ^{75}Se 標識化合物の血液に対する直接的な作用をみるために *in vitro* の実験を *in vivo* の実験に平行して行なった。血清については Fig. 3 に示した透析実験の結果では *in vivo* 群における血清中の ^{75}Se は10日以上経過しても透析されるのに対し、*in vitro* 群では1日間に多く透析され2日以後は少量しか透析されないことを示している。従って *in vivo* と *in vitro* 群における ^{75}Se との結合様式が異なるものと推察される。

3. 血液中の ^{75}Se の分布

Fig. 1, 2 に示すように、 ^{75}Se は投与初期に血清中に高濃度に存在するが、血球においては、初期は低いが時間が経つにしたがい ^{75}Se の濃度が高くなり、この結果は血球内に ^{75}Se が長期間存在することを示すものと思われる。すなわち、Lathrop ら⁷⁾のヒト赤血球中における ^{75}Se は長期間残留する (B. H. L.=100—120日) という報告と合致するような結果を得た。また ^{75}Se の血液

6) 長谷川明, 鈴木康雄, 浦久保五郎, 衛生化学, **20**, 67, (1974).

7) K. A. Lathrop, R. E. Johnston, M. Blau, E. O. Rothschild, *J. Nuclear Medicine* **13**, Suppl., **6,7** (1972).

8) K. J. Jenkins, M. Hidioglou, J. F. Ryan, *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **47**, 459 (1969).

の各分画への取り込みに関する *in vivo*, *in vitro* 両群間における結果の比較では、血清と血球へのとりこみの比には若干の差がみられたが、血球の各分画への ^{75}Se の取り込みに差がないという結果であった。なお、 ^{75}Se が血球中のどのような成分と結合しているかということについては、今回の実験からは血球中の ^{75}Se 大部分の放射能がグロビン分画に認められた。McConnell ら⁹⁾ はイヌに ^{75}Se セレン酸ナトリウムを皮下注射して得た血液を用いた実験で、ヘモグロビンを分画し、ヘミン中の ^{75}Se 濃度はグロビン中の濃度に比べ6—8倍であったと報告している。著者の結果では分画総量の放射能を求めているので、McConnell ら⁹⁾ の報告した結果と直接比較はできないが、ヘムとグロビンの分子量を精製重量と見做して濃度を類推すると McConnell の得た結果と近似した結果であった。

グロビン加水分解物の二次元ペーパークロマトグラムでは ^{75}Se の放射能スポットが4個以上認められた。これらの内2個については、セレノメチオニン、セレノシスチンまたはセレノシステインのスポットであることが判明した。

Peterson ら¹⁰⁾ は ^{75}Se -セレノメチオニンのペーパークロマトグラフィーについて実験を行ない、 ^{75}Se -セレノメチオニンは不安定で、実験中に酸化物を生成すると報告している。従って、上記2化合物以外の放射能陽性スポットについてはこれらの化合物の誘導体たとえば、セレノメチオニンオキシドのような化合物が実験操作中の artifact として生成し、呈色しているものとも考えら

れる。

結 語

1. ウサギに ^{75}Se -L-セレノシスチン、 ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウムを皮下注射し、血液における ^{75}Se の B. H. L. を求めたところ、両化合物投与において全血液では約7日を示したが、血清中の ^{75}Se の B. H. L. は ^{75}Se -L-セレノシスチン投与の場合の6日に対し、 ^{75}Se -亜セレン酸投与の場合は半分の3日であった。

2. ラットに ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウムを静注して30分後の血液 (*in vivo*) およびラット血液に ^{75}Se -亜セレン酸ナトリウムを添加し、30分 incubate した血液 (*in vitro*) 中における ^{75}Se の分布について比較検討したところ、血清中における ^{75}Se の結合様式は *in vivo* と *in vitro* の場合では若干異なることが透析実験で認められた。また血球中の ^{75}Se の大部分はヘモグロビンのグロビン分画に存在した。

3. *in vivo* におけるグロビン中の ^{75}Se の化学形について、その加水分解物のペーパークロマトグラフィにより追究した。 ^{75}Se 標識されたアミノ酸のスポットは4個以上存在し、その内2個はセレノメチオニン、セレノシスチンまたはシステインであることを認めた。

謝辞 本実験に際し、御指導ならびに御意見をいただいた静岡薬科大学教授 山本丈夫博士、同教授、為政脩博士ならびに国立衛生試験所放射線化学部長 浦久保五郎博士に謝意を表する。

9) K. P. McConnell, B. J. Cooper, *J. Biol. Chem.*, **183**, 459 (1950).

10) P. J. Peterson, G. W. Butler, *J. Chromatog.*, **8**, 70 (1962).