亜セレン酸ナトリウム投与マウスにおける セレン代謝産物（メチル化セレン）の生体内挙動

The Behavior of Metabolites, Methylated Selenium, in Mouse after Oral Administration of Sodium Selenite

順天堂大学医学部衛生学教室

小山田 則 孝

Noritaka Oyamada

Department of Hygiene, Juntendou University School of Medicine, Tokyo

The behavior of the metabolites of selenite, dimethyl selenide (DMSe) and trimethylselenonium ions (TMSe), administered to mice was studied. There were 2 groups of mice; one was used for single administration and the other was used for 10 repeated administrations. The selenium compound, sodium selenite, was injected into the stomach at the dose of 4 mg Se/kg/day.

The results are as follows:

1. The largest amounts of methylated selenium in mice were found to be TMSe within 6 h after single administration of sodium selenite and were excreted in urine rapidly.
2. The respiratory excretion of DMSe reached a maximum 6 h after single administration and contained 1.6% of the administration dose of Se. When selenite was continuously administered, the amounts of exhaled DMSe increased according to the number of administrations and reached a plateau after 4 administrations.
3. The Se concentrations as TMSe were determined in water soluble fraction in liver and kidney, and 6 h after single administration, corresponded to 1.31% and 0.16% of the administered dose of Se in liver and kidney, respectively.
4. TMSe excretion in urine reached a maximum 6 h after single administration that was 78.9% of total Se concentration in urine. TMSe was measured every 24 h after continuous administration. The amounts of TMSe in urine ranged from 63.7 to 68.1% of total Se concentration in urine and ranged from 20.1 to 21.0% of the administered dose. TMSe was found to be the major form of selenium metabolite in urine.
5. TMSe was also determined in water-soluble fraction of feces and amount of selenium as TMSe was observed to be 1.9% of total Se concentration in feces until 24 h after single administration.

Key words: Dimethyl selenide, trimethylselenonium ion, oral administration of selenite in mice, excretion of selenium in urine, feces, and expired air.

ジメチルセレン, トリメチルセレンニウムイオン, マウス亜セレン酸の経口投与,
セレンの尿, 糞および呼吸排泄

緒 言

セレンはグルタチオンペルオキシターゼの構成成分であり¹⁾, 生体必須元素の一つであるが²⁾, 過剰摂取した場合, 強い毒性を発現したり, また水銀化合物等の毒性発現に抑制作用を示すことから^{3,4)}, 生化学的, 衛生学的に

興味ある元素として注目され, その生体内挙動が広く研究されている。これらの研究のうち, 無機セレン化合物がメチル化されてできるジメチルセレン (DMSe) が呼気中に, トリメチルセレンニウムイオン (TMSe) が尿中に存在することが確認され⁵⁻⁷⁾, セレンのメチル化がセレンの解毒機構の一つと考えられるようになり, その生体内

挙動が注目され興味が持たれている⁸⁻¹¹⁾。

これまで著者は、セレンの尿中代謝産物とされている TMSe の炭素炉原子吸光法による測定法^{12,13)}、呼吸中へのセレンの代謝産物とされる DMSe のガスクロマトグラフィーによる簡易測定法を確立し報告した¹⁴⁾。

そこでこれらの方法を用いて、セレンの代謝物とされる上記のメチル化セレン化合物の挙動を明らかにする目的で、マウスに亜セレン酸ナトリウムを経口投与し、尿中および糞中に排泄される TMSe と呼吸中への DMSe の排泄量や、セレンの標的臓器とされる肝臓と、主な排泄経路とされる腎臓における TMSe の濃度の経時的推移を検討した。

動物および試薬

実験動物は ddY 雄性マウス（日本生物材料センター、東京）4週令のものを購入し、実験前1週間以上、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $50 \pm 10\%$ で飼育し、体重 30 g 前後のものをを用いた。飼料（CE-2、日本クレア、東京）と水は自由に与えた。

投与試料液は亜セレン酸ナトリウム（半井化学、京都） 172.94 mg を水に溶かして 100 ml としたものを用いた ($789.6\text{ }\mu\text{gSe/ml}$)。これの 0.15 ml をマウスに経口投与 (4 mg Se/kg) した。

DMSe 標準液は DMSe (トリケミカル研究所、神奈川) を二硫化炭素で希釈し、TMSe 標準液は TMSe Cl (トリケミカル研究所、神奈川) を水に溶解して使用した。セレン標準液は原子吸光用標準液（和光純薬、東京）を用時適宜希釈して用いた。

その他の試薬は市販特級品又は原子吸光用を用いた。水は蒸留した後、イオン交換樹脂を通したものをを用いた。

装 置

DMSe 捕集装置は、代謝ゲージ（杉山元医理器メタボリカ AP 型）を用い Fig. 1 に示した装置を作製して用いた。

ガスクロマトグラフは、日立163型 F1D 付きを使用した。原子吸光光度計は、日立170-50型に、重水素ランプによるバックグラウンド同時補正装置および日立フレームレスアトマイザーを装着して用いた。ホロカソードランプは、浜松トニクスセレンランプを用いた。

高圧分解ルツボは、内容 23 ml のユニシール（アムコ、東京）を用いた。

実験方法

Fig. 1 Apparatus for collection of DMSe in expired air. A: metabolic cage, B: drying tube packed with 5 g of activated charcoal granules, C: gas washing bottle containing 60 g of calcium chloride (anhydrous), D: a charcoal column ($0.9 \times 10\text{ cm}$) packed with 2 g of activated charcoal granules, E: flow meter.

1. セレンの投与量と投与方法

本実験において、セレンの主なメチル代謝産物 DMSe と TMSe とを同時に測定する目的から、セレンの投与量はセレンとして 4 mg/kg/日 を胃ゾンデを用いて、経口投与した。

一方、実験に用いた飼料中のセレン濃度は既報の方法¹²⁾ で測定したところ、平均 $0.34\text{ }\mu\text{g/g}$ ($0.30 \sim 0.39\text{ }\mu\text{g/g}$, $n=6$) であり、マウスの飼料からのセレン摂取量は、体重 30 g のもので、1日の平均摂取量から換算すると平均 $1.70\text{ }\mu\text{g/日}$ ($1.36 \sim 2.04\text{ }\mu\text{g/日}$) となり、本実験のセレン投与量の $1/70$ に相当する。連続投与期間中に死亡したマウスはないが、その期間中の体重変化は $29.7 \sim 32.1\text{ g}$ であり、対照群では $30.0 \sim 36.7\text{ g}$ であるので、体重の増加はやや抑制されている。

1回投与群は、マウス（1群10匹）に投与試料液 0.15 ml を経口投与し、直ちに1群毎にメタボリカに入れ、投与後3, 6, 12, 18, 24時間毎に、それ以降は24時間毎に7日目まで尿、糞を別々に採取した。呼吸中に排泄される DMSe は、試料液投与後尿、糞の採取を行うときに、活性炭カラムを同時に交換して採取した。

連続投与群（1群10匹）は、上記と同様の方法で、1日1回、10回連続投与し、投与後24時間毎に尿、糞および呼吸中の DMSe の試料を採取した。

1回投与、連続投与とも同一スケジュールの実験を3回繰返し、平均値と標準偏差値をグラフ中に示してある。

肝臓および腎臓中セレン化合物の経時変化を検討するために、マウス(1群10匹, 20群)に上記と同様にセレンを経口投与し, 1回投与群は, 投与後0.5, 1, 3, 6, 12, 18, 24, 48, 72, 96時間に, また連続投与群は, 投与後24時間毎に10回, 断頭して放血死させ, 直ちに肝臓および腎臓を摘出した。これらの臓器は2匹分ずつ合せて分析し, 測定結果は5組の平均値と標準偏差値を示した。

2. 呼吸中 DMSe の測定法

呼吸中 DMSe の捕集は, Fig. 1(D) の活性炭カラムを用い, 流速1.8 l/min で Fig. 1 の装置内の空気を吸引して DMSe を捕集した。活性炭から DMSe の抽出は, 既報の方法で二硫化炭素を用いて行った¹⁴⁾。

3. 尿, 糞および臓器中総セレンの測定法

尿, 糞および臓器中総セレン量を測定するための前処理法は, 尿はガラスウールで濾過後, その0.5~1.0 ml, 糞および臓器は20~100 mg を高压分解ルツボに採り, これに5N 硝酸4 ml を加えた後, 既報に準じて灰化, 抽出操作を行った¹²⁾。

4. 尿, 糞および臓器中水溶性画分中総セレンと TMSe の測定法

尿はガラスウールで濾過後, その1~5 ml を陽イオン交換樹脂カラム (Dowex50W-X8) にかけた。糞および各臓器中 TMSe は, TMSe が水溶性であるので¹⁵⁾, 糞および臓器の水抽出操作を行った。すなわち糞は0.5 g に水6 ml を加えて1分間振とう後, 臓器は0.5~1.0 g に水6 ml を加えてホモジネートした後, 4°C, 18000 rpm, 20分間遠心分離して得た上清を水溶性画分とし, これを二分して総セレンと TMSe を既報に準じて測定した¹³⁾。

結 果

1. 呼吸中 DMSe

1回投与実験: 呼吸中に排泄された DMSe 量は, 投与後0~3時間目には検出されず, 3~6時間目に2.65 $\mu\text{g}/\text{匹}$ に達し, 以後急速に減少し, 投与後12時間目以降は検出されなかった (Fig. 2(a))。

連続投与実験: Fig. 2(b)に示すごとく, 投与開始から4日目まで, 投与回数の増加とともに DMSe の呼吸中への排泄量も増加し, 投与後4日目でプラトーになり, 日間変動はみられるもののほぼ一定の排泄量を示すようになった。投与後4~10日目までの DMSe 排泄量は, マウス1匹当たり7.65~10.13 $\mu\text{g}/\text{日}$ であった。

2. 肝臓中総セレン量および TMSe 量

Fig. 2 The respiratory excretion of DMSe. (a) Single injection: selenite (4 mg Se/kg) was administered orally. (b) Continuous injection: selenite (4 mg Se/kg/day) was administered for 10 consecutive days. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=3).

1回投与実験: 肝臓中総セレン量は, 投与時間の経過に伴って増加し, 投与後6時間目に最高値6.77 $\mu\text{g}/\text{g}$, 肝臓全量に換算すると, 11.35 μg に達した。以後徐々に減少し, 投与後18, 24時間目には一定の値を示し, 投与後48時間目には急激に減少し, 投与後72時間目以降は対照群 (1.25 $\mu\text{g}/\text{g}$) と差はなかった (Fig. 3)。水溶性画分中総セレン量は, 投与後0.5~24時間目までは1.41~3.36 $\mu\text{g}/\text{g}$, 平均2.48 $\mu\text{g}/\text{g}$ を示し, 肝臓中総セレン量の42~77%が水溶性画分に存在していた。また水溶性画分中 TMSe としての存在量は, 投与後0.5時間目ですでに対照群の値 (0.037 $\mu\text{g}/\text{g}$, Seとして0.024 $\mu\text{g}/\text{g}$) よりも高い値を示し, 投与後6時間目に最高値1.45 $\mu\text{g}/\text{g}$ (Seとして0.92 $\mu\text{g}/\text{g}$), 水溶性画分中総セレン量の28%を示

Fig. 3 Concentration of total-Se in liver, and total-Se and TMSe in water soluble fraction in liver of mice after single administration of selenite (4 mg Se/kg) orally. (○) Total-Se in liver, (△) Total-Se in water soluble fraction in liver, (□) TMSe in water soluble fraction in liver. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=5).

し、以後急速に減少し、投与後48時間目以降では対照群と殆ど等しい値を示した。

連続投与実験：連続投与群における総セレン量およびTMSe—Se量の測定は、投与後24時間毎に行い、肝臓中セレン量の経時推移をみた。その結果、肝臓中総セレン量は、10回投与後までの値が2.23~3.73 $\mu\text{g/g}$ であった (Fig. 4)。投与後24時間毎の水溶性画分中の総セレン量は、1.17~2.25 $\mu\text{g/g}$ であり、肝臓中総セレン量の52.6~57.6%を示した。また水溶性画分中TMSeとしての存在量は0.11~0.25 $\mu\text{g/g}$ (Seとして0.07~0.16 $\mu\text{g/g}$)であり、水溶性画分中総セレン量の5.5~11.8%であった。一方、対照群の肝臓中総セレン量、水溶性画分中総セレン量および水溶性画分中TMSe量は、それぞれ1.14~1.26 $\mu\text{g/g}$ 、0.70~1.07 $\mu\text{g/g}$ 、および0.03~0.04 $\mu\text{g/g}$ であった。

Fig. 4 Concentration of total-Se in liver, and total-Se and TMSe-Se in water soluble fraction in liver of mice administered selenite (4 mg Se/kg/day) orally for 10 consecutive days. (○) Total-Se in liver, (△) Total-Se in water soluble fraction in liver, (□) TMSe-Se in water soluble fraction in liver. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=5).

3. 腎臓中総セレン量およびTMSe量

1回投与実験：腎臓中総セレン量は、肝臓と同様に、投与後6時間目に最高値2.20 $\mu\text{g/g}$ 、腎臓全量に換算すると0.92 $\mu\text{g/organ}$ になり、以後急速に減少して投与後48時間目以降では対照群 (1.05 $\mu\text{g/g}$)と殆ど等しい値を示した (Fig. 5)。水溶性画分中の総セレン量は、Fig. 5に示すように投与後1時間目以降経時的に大きな変化はみられなかった。水溶性画分中のTMSeとしての存在量は、時間の経過に伴って僅かながら増加し、投与後6時間目に最大値0.71 $\mu\text{g/g}$ (Seとして0.45 $\mu\text{g/g}$)、水溶性画分中総セレン量の44.6%であった。また投与後24時間

Fig. 5 Concentration of total-Se in kidney, and total-Se and TMSe in water soluble fraction in kidney of mice after single administration of selenite (4 mg Se/kg) orally. (○) Total-Se in kidney, (△) Total-Se in water soluble fraction in kidney, (□) TMSe-Se in water soluble fraction in kidney. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=5).

目では、0.21 $\mu\text{g/g}$ (Seとして0.13 $\mu\text{g/g}$) 水溶性画分中総セレン量の16.7%であった。

連続投与実験：Fig. 6に示すごとく、投与後1日目から4日目までの腎臓中総セレン量は、投与回数に伴って増加する傾向を示したが、投与後4日目以降は変動が大きく1.14 $\mu\text{g/g}$ から2.56 $\mu\text{g/g}$ の範囲を示した。水溶性画分中総セレン量は0.33~1.05 $\mu\text{g/g}$ であり、腎臓中総セレン量の17.8~85.3%であった。水溶性画分中TMSeとしての存在量は0.067~0.152 $\mu\text{g/g}$ (Seとして0.043~0.097 $\mu\text{g/g}$)であり、水溶性画分中総セレン量の

Fig. 6 Concentration of total-Se in kidney, and total-Se and TMSe-Se in water soluble fraction in kidney of mice administered selenite (4 mg Se/kg/day) orally for 10 consecutive days. (○) Total-Se in kidney, (△) Total-Se in water soluble fraction in kidney, (□) TMSe-Se in water soluble fraction in kidney. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=5).

5.0~27.2%, 腎臓中総セレン量の1.9~14.8%であった。対照群の腎臓中総セレン量, 水溶性画分中総セレン量および TMSe 量はそれぞれ0.94~1.25 $\mu\text{g/g}$, 0.37~0.41 $\mu\text{g/g}$, および0.011~0.027 $\mu\text{g/g}$ (Seとして0.007~0.017 $\mu\text{g/g}$) であった。

4. 尿中総セレン量および TMSe 量

1 回投与実験: 投与後24時間目までに尿中に排泄される総セレン量の経時変化を見ると, 投与後3~6時間目, 6~12時間目にそれぞれ平均で9.13 $\mu\text{g}/\text{匹}$, 10.05 $\mu\text{g}/\text{匹}$ と高い値を示した (Fig. 7)。また投与後24時間目まで, 24~48時間に尿中に排泄された総セレン量は, それぞれ31.98 $\mu\text{g}/\text{匹}$, 20.86 $\mu\text{g}/\text{匹}$ であり, 投与量のそれぞれ27.0%, 17.6%に相当する値であった。48時間目以降尿中に排泄される総セレン量は急速に減少し, 投与後6日目までに排泄された総セレン量は56.97 $\mu\text{g}/\text{匹}$ で, この値は投与量の48.1%相当であった。また投与後0~3, 3~6, 6~12, 12~18, 18~24時間目の尿中 TMSe-Se 量は, 尿中総セレン量のそれぞれ33.8, 78.9, 61.4, 56.2, および25.6%を示し, 総セレン量中に占める

Fig. 7 The amounts of total-Se and TMSe-Se in urine of mice singly administered selenite (4 mg Se/kg) orally. (○) Total-Se, (□) TMSe-Se. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=3).

TMSe-Se 量は投与後3~6時間目に最大となり, 以後経時的に減少した。投与後24時間目, 24~48時間目までに TMSe として排泄されたセレン量は, 尿中総セレン量のそれぞれ62.5%, および6.2%であった。投与後72時間目以降尿中に排泄された TMSe の排泄量は対照群 (0.04 $\mu\text{g}/\text{匹}$) と差がなかった。

連続投与実験: 尿中総セレン量および TMSe-Se 量を経日的に Fig. 8 に示す。尿中に排泄された総セレン量

Fig. 8 The amounts of total-Se and TMSe-Se in urine of mice administered selenite (4 mg Se/kg/day) orally for 10 consecutive days. (○) Total-Se, (□) TMSe-Se. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=3).

は, 投与1~10日目までの総投与量の29.7~32.2%に当る値を占めていた。また TMSe の排泄量は1匹当たり, 33.87~41.94 $\mu\text{g}/\text{日}$ (Seとして21.55~26.69 $\mu\text{g}/\text{日}$) であり, TMSe-Se 量としては, 尿中総セレン量の63.7~68.1%, 総投与量の20.1~21.0%に相当する値であった。

5. 糞中総セレン量および TMSe 量

1 回投与実験: 投与後24時間目までに排泄された総セレン量の経時変化をみると, 投与後12~18時間目に最高値6.88 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を示した (Fig. 9)。水溶性画分中総セレン量も, 投与後12~18時間目に最高値0.63 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を示し, この期間の糞中総セレン量の9.2%に相当した。水溶性画

Fig. 9 The amounts of total-Se in feces, and total-Se and TMSe-Se in water soluble fraction in feces of mice singly administered selenite (4 mg Se/kg) orally. (○) Total-Se in feces, (△) Total-Se in water soluble fraction in feces, (□) TMSe-Se in water soluble fraction in feces. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=3).

分中 TMSe の存在量は、投与後 3～6, 6～12, 12～18, 18～24 時間目と時間の経過に伴って徐々に増加する傾向を示し、水溶性画分中総セレン量のそれぞれ 66.7, 19.4, 17.5, および 28.3% であった。投与後 48 時間以後糞中への排泄は、急速に減少した。投与後 24 時間目まで、0～48 時間目までの TMSe-Se 量は、水溶性画分中総セレン量のそれぞれ 22.7% および 23.4%, 糞中総セレン量の 2.3%, および 2.5% であった。

連続投与実験：投与後 24 時間毎に糞中に排泄される総セレン量は、投与回数とともに徐々に増加し、投与後 6 日目でプラトーになり、ほぼ一定した排泄量を示すようになった。投与後 6～10 日目までの糞中総セレン量は、1 匹当たり 27.39～35.44 $\mu\text{g}/\text{日}$ であった (Fig. 10)。投与後 10 日目までの水溶性画分中総セレン量は 1.76～2.40 $\mu\text{g}/\text{日}$ を示し、糞中総セレン量の 7.5～9.6% であった。水溶性画分中 TMSe の存在量は 0.67～1.88 $\mu\text{g}/\text{日}$ (Se として 0.43～1.20 $\mu\text{g}/\text{日}$) を示し、水溶性画分中総セレン量の 24.4～43.0% であった。

Fig. 10 The amounts of total-Se in feces, and total-Se and TMSe-Se in water soluble fraction in feces of mice administered selenite (4 mg Se/kg/day) orally for 10 consecutive days. (○) Total-Se in feces, (△) Total-Se in water soluble fraction in feces, (□) TMSe-Se in water soluble fraction in feces. Bar graph represents mean $\pm$ SD (n=3).

考 察

1. 呼気中 DMSe の排泄

呼気中に排泄される揮発性セレン化合物については、多数の報告がある¹⁶⁻²⁰⁾。McConnell ら⁵⁾は揮発性セレン化合物の一つが DMSe であることを示した。また Ganther²¹⁾は、マウス肝臓ホモジネートを用いて、亜セレン酸塩から DMSe が生成されることを明らかにした。本

実験において、亜セレン酸ナトリウムをマウスに経口投与した際の、呼気中 DMSe 濃度の時間的推移について検討した結果、1 回投与実験において投与後 3～6 時間目に最高値を示し (Fig. 2)、投与後 12 時間目以降は検出されなかった。これは Hirooka ら²²⁾が、ラットで観察した投与後 24 時間目までに排泄される DMSe 総量の 90% が、投与後 6 時間以内に排泄されるという結果と一致し、マウスにおいても類似的挙動を示すことが明らかとなった。また連続投与実験において、投与後 4 日目まで DMSe の排泄量が増加傾向を示し、以後ほぼ一定の排泄量を示すことが明らかとなった。

2. 臓器中 TMSe の経時変化

呼気以外に存在する DMSe については、セレン酸塩を経口投与したラットの肝臓から単離同定されている²³⁾。著者も投与後 6 時間目の被験動物の解剖時に DMSe 特有の臭気を感じたことから、呼気のみならずマウスの臓器内にも存在すると考えられるが、DMSe が揮発性であることから今回同時に測定することは出来なかった。一方、これまで臓器中の TMSe 濃度について測定した報告はなく、従ってその経時的推移も明らかでない。今回著者が測定を試みた結果は、1 回投与実験、連続投与実験で肝臓および腎臓のいずれの臓器中にも TMSe は存在することが確認できた。また臓器中 TMSe 濃度は投与後 6 時間目に最高値を示すことが明らかとなった (Fig. 3)。また投与後 0.5, 1, 3, 6 時間目の肝臓と腎臓中 TMSe の濃度比は、それぞれ 10.5, 1.8, 1.5, および 2.0 を示し、TMSe 総量比ではそれぞれ 42.5, 8.1, 6.1 および 8.2 であり、セレンの TMSe 化は、特に投与直後には、主に肝臓で行われることが推察された。また連続投与において、肝臓および腎臓中水溶性画分中 TMSe の存在量は、投与回数の増加にかかわらず一定濃度を維持し、尿中や糞中の TMSe 排泄量も変化せず一定範囲を維持している。これは投与セレンの一部は TMSe として、すみやかに排泄されることを示唆している。マウスにおいて、セレンを腹腔内投与すると、血中セレン濃度は投与後 18～20 時間目には対照群と同じ程度にまで低下していることなどからも²⁴⁾、セレンの代謝が速やかであることが裏付けられる。

3. 尿中総セレン量および TMSe 量の経時変化

尿中へ排泄される総セレン量および TMSe-Se 量は、1 回投与実験では、投与後 6～12 時間目に最大となり (Fig. 7) 肝臓や腎臓における総セレンや TMSe の経時推移とほぼ同じような傾向を示した。投与したセレンの尿中排泄に関しては、内因性セレンとの区別が出来な

いことから厳密には言えないが、今回の実験では経口 1 回投与で、投与後 24 時間目までに投与量の約 27% に相当する量が、また投与後 48 時間目までに 45% に相当する量が尿中に検出されている。この 45% という値は、Hansen ら²⁵⁾ がマウスに ^{75}Se を腹腔内に 1 回投与して得た値 (投与量の約 41%) とほぼ一致している。また今回の連続投与実験の結果では、24 時間毎に測定した尿中総セレン量は 1 日の投与セレン量の 30.7% に相当し、この値は投与をくり返しても大きな変動はみられず、1 回投与の 24 時間目までの投与量に対する排泄割合 27% とほぼ一致している。一方、マウスにセレンをくり返し皮下投与した報告²⁶⁾ に於いても、投与量の約 43% のセレンが速やかに尿中に排泄されるという事からも、体内に摂取されたセレンの 30~40% が、速やかに尿中へ移行することは確かである。尿中に排泄されるセレンのうち TMSe として排泄される量をみると、ラットについては Palmer ら²⁷⁾ が亜セレン酸塩を腹腔内に投与した場合、尿中総セレン量の 52.7% が、また Nahapetian ら²⁸⁾ は亜セレン酸塩の経口投与例で、投与量の 20% が TMSe として排泄されることを報告している。マウスについてはこれまでに報告はない。今回のマウスでの実験結果から、セレン投与後すみやかに尿中 TMSe 排泄の増加が観察され、連続投与においては、尿中セレン量のうち常に 60% 以上が TMSe として存在していることが判明したことから、亜セレン酸塩の生体内挙動はラットとマウスとは大きな差は無く、尿中の主たる代謝産物は TMSe であると言える。

4. 糞中総セレン量および TMSe 量の経時変化

これまでに明らかにされていなかった糞中への TMSe 排泄について検討した結果、1 回投与実験では、糞水溶性画分中 TMSe の存在量は、投与後 6 時間目から徐々に増加する傾向を示した。水溶性画分に占める TMSe の割合は、投与後 6 時間目までが最も高い値 (総セレンの 66.7%) を示し、12 時間目以降は水溶性画分中セレン量の 20% 前後に低下した。このような糞中に排泄されるセレンの動きをみると、TMSe 以外の化学形態のセレン化合物としての排泄量が増加しているのではないかと考えられるが、どのような形態かは不明である。

連続投与実験では、投与後 24 時間毎に糞中へ排泄される総セレン量は、投与後 6 日目まで徐々に増加する傾向を示した。また糞中 TMSe-Se 量は、投与量に対して一定の割合 (平均 0.6%) で排泄されることが明らかとなった。投与セレンの糞中への排泄は投与中止後もしばらく続くと考えられるが、今回の実験では測定していない。セレンの尿中/糞中排泄量比をみると、それぞれの総セレン

量で比較した場合、平均 1.6 (1.3~2.0) の割合であり、TMSe ではこの比は平均 32.7 (27.1~55.3) と、いずれも尿中への排泄の割合が高く、特に TMSe のそれは顕著に大である。なお糞中 TMSe 量は尿中のそれに比し僅かであることから、糞試料採取時に尿による汚染が疑えるので、セレン投与マウスの腸内から直接採取した糞と、メタボリカ内に排泄された糞中 TMSe 値とを比較したが両者間に差は認められなかった。

5. セレンの生体内メチル化に関する考察

マウスに亜セレン酸塩を経口投与した後、呼気中 DMSe、肝臓および腎臓中総セレン量、水溶性画分中総セレン量と TMSe-Se 量、尿中総セレン量および TMSe-Se 量、糞中総セレン量および水溶性画分中総セレン量と TMSe-Se 量を測定し、経時変化を観察してきた。上記測定値の推移から、投与したセレンの生体内での代謝過程を追跡してみると、まず呼気中の DMSe の著明なピーク (投与後 3~6 時間) が注目される。その時期の尿中セレン量をみると、TMSe 量はピークに達しているが、総セレン量のピークは幾分遅れて投与後 6~12 時間目にある。糞中セレン量は更に少し遅れて投与後 12~18 時間目に総セレンのピークが現れ、糞中 TMSe のピークは更に後にずれ、投与後 18~24 時間目に現れている。この時間的な推移は、セレンの生体内メチル化の状況を如実に物語っていると考えられる。この間の肝臓、腎臓中セレンの動きをみると、総セレン量は投与後 0.5 時間目には両臓器共に対照群のそれより有意に高いセレン量が検出され、肝臓では投与後 6 時間目をピークに、以後徐々に減少し、腎臓では投与後 6 時間目に突出した高値を示した後、24 時間目まで高レベルを維持している。投与後 24 時間目以降は、両臓器においてセレン量の速やかな減少が観察され、中室ら²⁹⁾ が報告したラットの経口投与によるセレン酸塩の経時的な体内分布変動と類似した現象を示すことが認められた。セレンのメチル化は、マウスの臓器を用いた *in vitro* の実験で、酵素的に行われることが報告されており²¹⁾、亜セレン酸塩から DMSe の合成能は肝臓が最も高く、ついで腎臓である。本実験においても TMSe の挙動をみたが、その結果からも投与直後は主に肝臓で TMSe 化が行われるものと考えられる。

生体内でのセレンのメチル化は、解毒機構の一つであり、メチル化合物 DMSe、および TMSe 量は摂取後 6 時間目までに最大となることが明らかとなったが、他の解毒機構が存在することも考える余地が残されている。

結 論

セレンの生体内挙動について、メチル化を中心に検討するため、著者が開発したガスクロマトグラフィーによる DMSe の測定法およびイオン交換クロマトグラフ法と炭素炉原子吸光法の組合せによる TMSe の測定法を利用して、マウスに亜セレン酸塩（4 mg Se/kg）を1回および10日間連続経口投与した際の呼気中 DMSe、尿中および糞中に排泄される総セレン量、水溶性画分中の総セレンおよび TMSe の経時変化を観察するとともに、セレンが主要な代謝を受ける臓器とされる肝臓および腎臓中の TMSe についても、総セレン量とともに測定し検討した。

その結果

1. 生体内でメチル化されるセレンの大部分は、投与後6時間以内に TMSe となり、主に尿中に速やかに排泄された。

2. 亜セレン酸塩を1回経口投与されたマウスにおいて、投与後6時間以内に呼気中 DMSe 濃度は最高値を示し、投与セレンの一部は速やかに呼気中へ排泄された。連続投与実験において、投与後4日目まで DMSe の排泄が増加し、以後はほぼ一定の排泄量を示した。

3. 肝臓および腎臓水溶性画分中 TMSe は、両臓器共に投与後6時間目に最高値を示し、セレンとして臓器中総セレン量のそれぞれ13.6および20.5%であり、1回投与量のそれぞれ1.31、および0.16%に相当した。

4. 尿中総セレン量は、1回投与実験では投与後6～12時間目に最高値を示し、その平均排泄量は10.05 μg /匹であった。尿中 TMSe 量は投与後6時間目に最高値を示し、TMSe-Se は尿中総セレン量の78.9%を占めていた。

連続投与実験では、尿中 TMSe-Se 量は、投与回数に関係なく尿中総セレン量の63.7～68.1%を占め、TMSe は尿中に排泄されるセレンの主要な代謝産物であると考えられた。また10日間に尿中から排泄されたセレンは、呼気および糞尿中へ排泄された総セレン排泄量の56.2%に相当した。

5. 糞中総セレン量は、投与後12～18時間目に最高値6.88 μg /匹を示し、その中の TMSe-Se 量は1.6%であった。

連続投与実験では、糞中総セレン量は18.39～35.44 μg /日、匹であり、糞中 TMSe-Se 量は、糞中総セレン量の3.2%であった。また10日間に糞中から排泄された糞中総セレン量は、呼気および糞尿中へ排泄された総セレン排泄量の36.5%であった。尿中/糞中排泄量を比較した場合、

1回投与群で投与後48時間目までの合計で1.6であったが、TMSe 量では、1回投与群では36.3、連続投与群では32.7といずれも尿への排泄の割合が高く、特に TMSe としての尿への排泄量は顕著に多かった。

謝 辞

本論文作成にあたり、終始、御懇篤なる御指導をいただきました順天堂大学医学部衛生学教室菊池正一教授に深甚なる謝意を表します。

また本研究の機会を作っていただきました茨城県衛生研究所環境保健部長石崎睦雄博士ならびに御校閲をいただきました順天堂大学医学部衛生学教室千葉百子講師に深謝致します。

また、種々、御便宜を図っていただきました茨城県衛生研究所生活環境部長高橋元新氏に深謝致します。

文 献

- 1) Rotruck, J.T., Pope, A.L., Ganther, H.E., Swanson, A.B., Hafeman, D.G. and Hoekstra, W.G.: Selenium: Biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, **179**, 588-590 (1973).
- 2) Thompson, J.N. and Scott, M.L.: Role of selenium in the nutrition of the chick. *J. Nutr.*, **97**, 335-342 (1968).
- 3) Parizeck, J. and Ostadalo, I.: The protective effect of small amounts of selenite in subacute intoxication. *Experimentia*, **23**, 142-143 (1967).
- 4) Ganther, H.E., Goudie, C., Sunde, M.L., Kopecky, M.J., Wagner, P. and Hoekstra, W.C.: Selenium: Relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science*, **175**, 1122-1124 (1972).
- 5) McConnell, K.P. and Portman, V.E.: Excretion of dimethyl selenide by the rat. *J. Biol. Chem.*, **195**, 227-282 (1952).
- 6) Byard, J.L.: Trimethyl selenide. A urinary metabolite of selenide. *Arch. Biochem. Biophys.*, **30**, 556-560 (1969).
- 7) Palmer, I.S., Fisher, D.D., Halverson, A.W. and Olson, O.E.: Identification of a major selenium excretory product in rat urine. *Biochem. Biophys. Acta*, **177**, 336-342 (1969).
- 8) Tsay, D.T., Halverson, A.W. and Palmer, I.S.:

- Inactivity of dietary trimethylselenonium chloride against the necrogenic syndrome of the rat. *Nat. Rep. Int.*, **2**, 203-207 (1970).
- 9) Kiker, K.W. and Burk, R.F.: Protection of urinary selenium metabolites in the rat following $^{75}\text{SeO}_3^{2-}$ administration. *Am. J. Physiol.*, **227**, 643-646 (1974).
- 10) Hsieh, H.S. and Ganther, H.E.: Effects of stock or purified diet on rat liver enzymes involved in the synthesis of dimethyl selenide. *J. Nutr.*, **106**, 1577-1582 (1976).
- 11) Ganther, H.E. and Bauman, C.A.: Selenium metabolism I. Effects of diet arsenic and cadmium. *J. Nutr.*, **77**, 210-216 (1962).
- 12) 小山田則孝, 石崎睦雄: 炭素炉原子吸光法による尿中トリメチルセレンニウムイオン及び全セレンの定量法, 分析化学, **31**, 17-22 (1982).
- 13) Oyamada, N. and Ishizaki, M.: Fractional determination of dissolved selenium compounds of trimethylselenonium ion, selenium(IV), and selenium(VI) in environmental water samples. *Anal. Sci.*, **2**, 365-369 (1986).
- 14) Oyamada, N., Kikuchi, M. and Ishizaki, M.: Determination of dimethyl selenide in the breath air of mice by gas chromatography. *Anal. Sci.*, **3**, 373-376 (1987).
- 15) Wynne, K.J. and George, J.W.: Lewis-base behavior of selenium(IV) halides. II. Methylselenium trichloride and trimethylselenium chloride. *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1649-1652 (1970).
- 16) Shultz, J. and Lewis, L.B.: The excretion of volatile selenium compounds after the administration of sodium selenite to white rats. *J. Biol. Chem.*, **133**, 199-207 (1940).
- 17) McConnell, K.P.: Respiratory excretion of selenium studied with the radioactive isotope. *J. Biol. Chem.*, **145**, 55-60 (1942).
- 18) McConnell, K.P. and Roth, D.H.: Respiratory excretion of selenium. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **123**, 919-921 (1966).
- 19) Ganther, H.E., Levander, O.A. and Bauman, C.A.: Dietary control of selenium volatilization in the rat. *J. Nutr.*, **88**, 55-60 (1966).
- 20) Jiang, S., Robberecht, H. and Berge, D.V.: Elimination of selenium compounds by mice through formation of different volatile selenide. *Experientia*, **39**, 293-294 (1982).
- 21) Ganther, H.E.: Enzymic synthesis of dimethyl selenide from sodium selenite in mouse liver extracts. *Biochemistry*, **5**, 1089-1098 (1966).
- 22) Hirooka, H. and Galambos, J.T.: Selenium metabolism I. Respiratory excretion. *Biochim. Biophys. Acta*, **130**, 313-320 (1966).
- 23) Nakamura, K., Sayato, Y. and Ose, Y.: Studied on selenium related compounds VI. Biosynthesis of dimethyl selenide in rat liver after administration of sodium selenate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **39**, 521-529 (1977).
- 24) Chiba, M., Fujimoto, N., Oyamada, N. and Kikuchi, M.: Interaction between selenium and tin, selenium and lead, and their effects on ALAD activity in blood. *Biol. Trace Element Res.*, **8**, 263-282 (1985).
- 25) Hansen, J.C. and Kristensen, P.: The kinetics of ^{75}Se -selenium in relation to dose and mode of administration to mice. *J. Nutr.*, **109**, 1223-1233 (1979).
- 26) Chiba, M., Kamiya, N. and Kikuchi, M.: Experimental study on interactions between selenium and tin in mice. *Biol. Trace Element Res.*, (in press).
- 27) Palmer, I.S., Gunsalus, R.P., Halverson, A.W. and Olson, O.E.: Trimethylselenonium ion as a general excretory product from selenium metabolism in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, **208**, 260-266 (1970).
- 28) Nahapetian, A.T., Janghorbani, M. and Young, V.: Urinary trimethylselenonium ion excretion by the rat: Effect of level and source of selenium-75. *J. Nutr.*, **113**, 401-411 (1983).
- 29) 中室克彦, 佐谷戸安好, 外村正治, 小瀬洋喜: セレン関連化合物に関する研究 (第2報), セレン酸 ($\text{Na } ^{75}\text{SeO}_4$) の生体内運命について, その1, 衛生化学, **18**, 368-373 (1972).

(受付 1987年11月16日 受理 1988年1月28日)