連載総説

Bio-PIXE その理論と応用

第4章 基礎医学への応用

(2) ラットにおける Se の体内動態[†]夏堀雅宏^{††}

北里大学獣医畜産学部獣医学科獣医放射線学講座
034-8628 青森県十和田市東23番町 35-1

Key Words: selenium, pharmacokinetics, rat, PIXE

1. はじめに

PIXE (粒子励起 X 線分光) 分析法は、あえて繰り返すまでもなく、複雑な前処置を必要とせずに微量試料で多元素同時分析が可能である。この特徴により、生体試料の PIXE 分析が年を追うごとに盛んに行われてきた。最近では医学や生物学を初め、環境科学、考古学や人文科学など幅広い分野で応用され、Bio-PIXE という新たな分野が誕生した。昨年11月に開催された第3回国際 Bio-PIXE シンポジウム(京都)では、17か国より合計 100 名を越える参加者による活発なディスカッションが行われたことも記憶に新しい¹⁾。PIXE 分析技術もマイクロ化が進み、試料表面上または組織や細胞内の二次元分布を知ることが可能になってきた。したがって Bio-PIXE 技術は単なる試料分析の枠を越え、今後ますます応用・発展が期待される。本総説では、1996年から現在に至るまで、仁科記念サイクロトロンセンター(NMCC)で

の共同利用により、ラットにおける Se の挙動(体内動態)について得られた成果を中心に解説する。

2. セ レ ン

セレン(Se)は生体必須微量元素であり、その化学的性質は硫黄に類似し多価化合物として存在する。生体は食物より無機 Se 化合物あるいは蛋白質を構成するセレノアミノ酸の形態で Se を摂取する。生体内での Se の動態は、生物種、Se の化学形および摂取量によって異なるが、主に十二指腸から吸収され、速やかにほとんどすべての臓器に分布し、主として糞、尿から排泄される²⁾。高用量の Se 摂取では呼吸からも排泄されると言われる²⁾。Se は生体内では硫黄化合物よりも還元性、反応性が高く、硫黄と置換反応を起こすため毒性も強い²⁾。食餌中 Se 含量と血中 Se 濃度との間には非常によい直線相関が認められている²⁾。

Se 欠乏と最も関係が深いのはグルタチオンペルオキシダーゼ(GSH-Px)活性であり、人の血液中 Se 濃度と GSH-Px 活性に直線的な相関が認められている³⁾。血中 Se 濃度の低下による GSH-Px 活性の低下と、Se 欠乏症状が還元剤で軽減されることから、Se 欠乏による GSH-Px 活性低下とそれに引き続くグルタチオン利用能低下による脂質過酸化亢進が強く示唆

[†] Bio PIXE, Theory and Applications. Chapter 4 Application to the Basic Medicine. (2) Selenium Pharmacokinetics in Rats. Masahiro NATSUHORI: Kitasato University School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Towada-shi, Aomori Pref. 034-8628, Japan.

^{††} Tel: 0176-23-4371(ext. 488), Fax: 0176-23-8703, e-mail: natsu@vmas.kitasato-u.ac.jp

される²⁾。また、Se 欠乏の程度により肝チトクロム P450 (CYP) が合成阻害され CYP 含量が減少する。その結果 Se 欠乏時には薬物代謝活性が減少することも知られている²⁾。ところが、この状態のラットに Se を投与すると GSH-Px 欠乏が改善する前に CYP 合成が改善することより、Se 欠乏による CYP 合成阻害は GSH-Px 活性低下と異なった機序で起こると考えられている²⁾。これらの背景より、Se 欠乏では GSH-Px 活性や薬物代謝活性が低下する。結果として、ラジカススカベンジャーとしての能力低下に伴うフリーラジカルの増加が起こるので細胞内 DNA・RNA の損傷と遺伝子突然変異の誘発や発癌との関係が注目されている。

Se 欠乏土地地域に在住する人々ならびに家畜および野生動物の欠乏症状の緩和やその予防的見地から、Se の生体への投与が必要とされることがある。この場合ヒトでは血中 Se 濃度が 0.1 ppm 程度であれば十分な GSH-Px 活性を得られると考えられている²⁾。しかしながら、Se は生体に対する毒性発現と欠乏症発現の濃度比が数倍～十数倍程度ときわめて狭いため、Se の使用においては、直接的な毒性の他、その遅い消失のため慢性的な中毒の発生も考慮した投与形態や投与方法を選択あるいは改善する必要がある。このためには薬物動態学的手法による Se の体内動態の理解が不可欠である。

3. 薬物の体内動態

薬物や化学物質の体内動態を把握することは、それぞれの物質に対する生体側の ADME (吸収 absorption・分布 distribution・代謝 metabolism・排泄 excretion) と呼ばれる因子を理解することであり、これによって個々の動物に最適な投与計画の立案が可能になる⁴⁾。きわめて安全性の高い薬物を除き、一般に薬物はそれ単独の単回用量で中毒量以下であっても、反復投与によって薬効が増強したり、副作用や中毒などの有害作用を起こしたり、または逆に薬効が減弱する場合がある。このため、特に毒

性を発現しやすい薬物では最適な投与計画を立案することが求められる。この薬物投与計画立案のための基礎となるデータから、生体内での物質の挙動を理解し、その現象論上の体内動態パラメータを求め、ADME に与える影響を予測し、薬物の最適な処方を求める分野がいわゆる薬物動態学である。

薬物動態パラメータに基づくシミュレーションより、TDM (therapeutic drug monitoring) による最適な投与方法や、食用動物に至っては、体内蓄積・残留の立場から、食物に含まれる化学物質の MRL (maximum residue level) や、最終的にヒトが食物を摂取する際の許容量である ADI (acceptable daily intake) が推定される。

近年、パーソナルコンピュータの演算能力の著しい向上と解析ソフトウェアの普及に伴い、薬物動態解析技術が容易に利用できる環境が整備されてきた。このことにより、薬物動態パラメータから標的薬物の体内挙動をシミュレーションし、比較的短時間で最適な投与計画を立案することが可能となってきた。

本研究⁵⁾⁻¹²⁾では NMCC での共同利用 (PIXE) により、亜セレン酸ナトリウム投与後のラットにおける血中・臓器中 Se 濃度および Se の尿・糞中排泄の経時的变化を測定してきた。これらのデータを用いて、解析プログラム“MULTI”¹³⁾によるコンパートメントモデルに基づく多臓器同時解析を行い、Se の薬物動態パラメータを求めた。この結果、異った投与経路による Se の血漿中動態および尿・糞中排泄、各臓器分布、および血液と臓器中濃度の関係について考察する。また、モデル非依存性のノンコンパートメント解析 (モーメント解析) も行い、Se の投与経路の違いによる Se の吸収・分布・消失という体内動態特性について明らかにされた知見を紹介したい。

4. PIXE による生体試料中 Se 濃度の測定

PIXE 分析による実測値の精度を保証するた

め、ラット血漿および尿に一定量の亜セレン酸ナトリウムを添加し、設定値と実測値の関係を求めた。この際内部標準として In 標準溶液を添加し、PIXE 測定に供した。この結果、血漿中平均 Se 添加回収率は、添加濃度 0.005 - 50 ppm の範囲において $79 \pm 6\%$ (CV 7.6%) であり、良好な直線性 (相関係数 $R^2 = 0.9998$) を示した⁵⁾。尿中 Se の添加回収率も同様に、添加濃度 0.005 - 50 ppm の範囲において $99 \pm 18\%$ (CV 17.7%) で良好な直線性 (相関係数 $R^2 = 0.9998$) を示した⁶⁾。Se の BG 濃度は、血漿で $0.21 \pm 0.07 \mu\text{g/g}$ (mean $\pm$ sd, $n=6$) であり、尿で $0.11 \pm 0.04 \mu\text{g/g}$ ($n=6$) であった⁶⁾。これらのことから、生体試料中 Se 濃度の PIXE 分析値を用いた解析が有効であり、その後の動態解析に問題となることはない判断された。

5. Se の投与経路依存性の血漿中動態と排泄

5.1 Se の血漿中動態の解析

ラットにおける Se の動態パラメータを把握するため、給与形態上最もよく利用される亜セレン酸ナトリウム (4.4 mg/kg : Se 含量で 2 mg/kg) を静脈内および経口投与し、その後の血漿中 Se の経時変化を PIXE にて測定した⁷⁾ (図 1)。

静脈内投与後の Se 濃度は投与後 2 時間目までは急速に (生物学的半減期 : 約 0.33 時間) 減少し、その後 50 - 100 時間までは緩徐 (生物学

的半減期 : 約 7 時間) に 2 コンパートメントモデルに従って消失し、その後は投与前の濃度 (約 0.3 - 0.4 $\mu\text{g/ml}$) を維持した。

一方で経口投与後では Se 濃度の上昇が比較的緩徐であり、血漿中最大濃度到達時間 ($T_{\max}$) は約 20 時間、そのときの最大血漿中濃度 ($C_{\max}$) は 0.6 $\mu\text{g/ml}$ と計算された⁸⁾。このことから、消化管からの Se の吸収は非常に遅く、血漿中の消失プロファイルは消化管からの吸収速度に律速された消失であり、薬物動態学的にはいわゆる “flip-flop” 現象と考えられた。このことは、コンパートメントモデル解析による吸収速度定数 (k_a : 0.03/h) が消失速度定数 (k_{el} : 0.08/h) の約半分であることで確認された⁸⁾。したがって、今回用いた Se の用量は静脈内投与で急性毒性を示さない用量であったが、この用量ですでに消化管からの Se 吸収速度が飽和していたと考えられた。

5.2 Se の尿・糞中排泄

Se を静脈内および経口投与したラットの尿中および糞中 Se 排泄プロファイルを図 2 および図 3 に示す。これらの図より明らかなように、Se の投与経路によって尿中排泄量に差は認められず、いずれも投与した Se の約 20% が尿中に排泄された。にもかかわらず経口投与後の糞中 Se 排泄量は、静脈内投与に対して 4 倍程度高く、投与量の約 35% が糞中に排泄された。静脈内投与後の糞中排泄は投与量の約 9

図 1 亜セレン酸ナトリウム (4.4 mg/kg) 静脈内 (iv) および経口 (po) 投与後の血漿中 Se プロファイル (文献 8 より引用)

図 2 亜セレン酸ナトリウム (4.4 mg/kg) 静脈内 (iv) および経口 (po) 投与後の尿中 Se 排泄プロフィール (文献 8 より引用)
定常的な Se 排泄 (BG) 量は差し引いていない。

図 3 亜セレン酸ナトリウム (4.4 mg/kg) 静脈内 (iv) および経口 (po) 投与後の糞中 Se 排泄プロフィール (文献 8 より引用)
定常的な Se 排泄 (BG) 量は差し引いていない。

%であった。また経口投与では最高排泄量を示した日が尿中・糞中いずれも静脈内投与に対して1日遅れていた。このことは、前述のように T_{max} が約 20 時間であり、消化管からの吸収に要した時間だけ排泄ピークが遅延したと考えられる。

それでは、Se の経口投与では静脈内投与に対して 4 倍もの糞中排泄量と、それに対して投与経路にかかわらず同様な尿中排泄量は何を意味するのであろう。この投与経路による糞中排泄量の大きな格差は単純に、消化管での未吸収の結果と考えられそうであるが、それでは尿中排泄量に違いが認められなかったことが説明できない。また、投与量に対する尿および糞中排泄量の合計が静脈内投与で約 30%，経口投与

で約 56% (いずれも投与後 10 日間) であったことから投与経路間での未回収 Se の格差も問題になった。これらの疑問を解決するべく、同様な実験系でラットの諸臓器中 Se の経時変化を追った。

6. Se の臓器分布

6.1 多臓器同時解析

静脈内投与および経口投与後の各臓器に認められた Se 濃度-時間変化を図 4 に示す。図 4 における各臓器のシミュレーション曲線は、用いた臓器データすべてをまとめてコンパートメントモデルに当てはめた多臓器同時解析^{10), 12)}により得られたパラメータより描いたものである。この解析モデルは図 5 に示されるように、

図 4 亜セレン酸ナトリウム (4.4 mg/kg) 静脈内 (iv) および経口 (po) 投与後の臓器中 Se プロフィール (文献 9 より引用)

図 5 動態パラメータ解析モデル (文献 12 より改変・引用)

静脈内投与群は 2 コンパートメントモデル, 経口投与群は一次吸収を伴う 1 コンパートメントモデルを用いた^{10,12)}。図 4 に認められるように, このモデルによる多臓器同時解析によって, 実測値と非常によく一致するパラメータが得られた。

静脈内投与群の血漿中濃度は前述のように, 投与後 2-3 時間は生物学的半減期約 0.6 時間で急速に減少したが, この間各臓器ではそれぞれ固有の最大濃度までの上昇が認められた。その後は血漿中濃度と分布平衡に達し, 片対数グラフ上で血漿中濃度とほぼ平行に, すなわち一定の分布比で減少し, 投与後 100 時間ほどではそれぞれ投与前の濃度へ戻った。肝臓が最も高濃度であり, 次いで腎>心・肺・脾>血漿>脳という分布パターンが得られた。

一方、経口投与群では血漿中濃度上昇から消化管吸収速度に律速された消失速度と推定されたように、他の臓器も血漿中濃度推移と同様緩徐に上昇し、投与後約24時間後に最大値を示した。その後は片対数グラフ上で血漿中濃度とほぼ平行に減少した。しかしながら、Se 濃度の臓器分布パターンは静脈内投与群とは様相が変化した。つまり静脈内投与群に比べ経口投与群では、腎臓中 Se 濃度の有意な上昇が確認され、これによって腎臓中 Se 濃度は肝と同程度に高く、次いで心・肺・脾・血漿と4組織がほぼ同程度の濃度分布を示し、脳が最も低いパターンとなった。

したがって、Se の臓器分布が投与経路によって異なることが明らかとなった。これは特に腎臓中 Se 濃度で顕著であった。この経口投与後の腎臓 Se 濃度の上昇は、Se の吸収・分布過程での消化管内および肝内初回通過効果によって起こった亜セレン酸の化学形の変化を強く示唆するものと考えられた。また、腎を除く他の臓器では経口投与の方が低濃度傾向であったのに対し、腎の Se 濃度-時間曲線は静脈内投与と経口投与とで同様であった。このことから、両投与経路において尿中 Se 排泄が同様であったのは、腎臓への Se 分布が同様であったためと示唆された。また、血漿を始め肝など他

の臓器では経口投与群の方が低濃度傾向であることと、先ほどの糞中排泄量の有意な差から、相当量の Se が未吸収のまま消化管から糞中に排泄されたと考えられた。

Se の臓器分布と排泄が投与経路によって異なることは、経口投与では Se の遅い腸管吸収速度とこれによって律速された消失速度、消化管における未吸収 Se の存在、腸管吸収過程または吸収後の初回通過効果による代謝過程の相違の結果であると判断された。

尿・糞中排泄で未回収の Se について、Se が長期間蓄積するような臓器の特定はできなかった。この未回収の Se は、おそらく呼気などの経路を通して排泄²⁾されたか、あるいはまた、臓器組織全体にわたり正常値よりもわずかに高い濃度で長期に分布したために認められたのかも知れない。

6・2 相対的臓器生物学的利用率

図6に相対的臓器生物学的利用率を示す。これは、まず図4より得られた諸臓器の濃度-時間曲線下面積 (AUC) から投与前のバックグラウンドの寄与分を差し引いた正味の AUC を算出し、臓器それぞれの静脈内投与群の正味 AUC に対する経口投与群の正味 AUC の割合を示したものである。この手法は、一般に静脈

図6 経口投与による Se の臓器相対的生物学利用率 (文献9より引用)

内投与に対する他の投与経路による各臓器への到達度や、同じ投与経路でも異なった剤形の臓器への到達度を示す指標に用いられ、特に血漿中の AUC を比較したものは全身循環への到達度の指標として生物学的利用率 (bioavailability) と呼ばれる。生物学的利用率と相対的臓器生物学的利用率は、同じ薬剤の場合はどの臓器で求めても原則として一定である。つまり血漿の生物学的利用率 (全身循環の指標) が 50% であれば、このときの相対的臓器生物学的利用率も 50% と仮定される。これは同じ薬物 (化合物) であれば、分布平衡時において血漿-臓器間濃度比は投与経路に依存せず一定となるためである。

経口投与による Se の相対的臓器生物学的利用率は、図 6 のように意外にも臓器によりその値が著しく異なっていた^{11), 12)}。腎臓の相対的臓器生物学的利用率は、比較的最大・最小の変動幅が大きなものの、平均して投与後 24 時間ですでに 100% に達していた。このことは、経口投与後の Se の腎臓への集積が静脈内投与後の腎臓への集積とほぼ変わらず、したがって Se の尿中排泄に差がなかったことを裏付けるものと考えられた。一方で、腎臓以外の臓器で経口投与後の相対的臓器生物学的利用率が低いことは、消化管からの未吸収の Se の存在を強く示唆すると考えられた。

以上のように、相対的臓器生物学的利用率が臓器によって異なり、かつ静脈内投与群に比べ低いことは、経口投与による吸収の不完全さと、吸収の前後で代謝による化学形の変化によって臓器分布が著しく異なることを示唆する。したがって、異なる投与経路では、臓器中の Se 利用率が異なるために、血漿中濃度から臓器中濃度が予測できないことが明らかになった。今回の結果のような異なった臓器中 Se 分布は、おそらく先述した初回通過効果を含めた代謝過程による異なった化学形の発生により異なった臓器分布となり、それを PIXE 分析によ

り化学形に関係なく臓器中 Se 濃度として測定した結果、と考えられた。

7. まとめと今後の展望

Bio-PIXE により求めた Se 投与後の Se のラット体内挙動をより精度よく測定できた。この結果、薬物動態学的、速度論的手法により、ラット血漿中濃度-時間曲線、尿・糞中排泄プロフィールおよび多臓器 (肝、腎、脾、心、肺、脳) 中 Se 濃度-時間プロフィールを得た。血漿および臓器中データについては、対応するモデルを設定し、多臓器同時解析することで、血漿と各臓器間で共有/固有の体内動態パラメータを一挙に解析することができた。これにより実測値とよく一致する非常に良好なシミュレーション曲線とより精度のよい動態パラメータが得られた。

PIXE という元素分析の応用でこれら一連の Se の ADME が明らかになった。将来的なマイクロ PIXE 技術により、組織、細胞、オルガネラレベルでより詳細な局在化情報が得られるようになると、より詳細な元素の挙動が明らかにされるであろう。しかしながら今後に解決されなければならない課題として、やはりその局在する元素の具体的な化学形の推定が挙げられよう。これは、元素の特定化学形の存在を推定することで、特定化合物と生体とのより密接な相互作用が理解されるためである。特に今回のテーマでは化学形の相違が強く示唆されるだけに、Se 研究の将来的な展開にはその重要性を痛感せざるを得ないが、それは今後の測定技術の進歩に委ねざるを得ない。

謝 辞

稿を終えるに当たり、世良耕一郎先生 (岩手医科大学サイクロトロンセンター) へその多大な試料数の PIXE 測定に対しこの場をお借りして謝意を申し添えます。

文 献

- 1) Kasahara, M., Ektessabi, A. M. and Tohno, S. : Preface, *Int. J. PIXE*, **9**, 5 (1999)
- 2) Levander, O. A. : Selenium "Trace Elements in Human and Animal Nutrition Vol. 2", (W. Mertz ed.), pp. 209-279, Academic Press Inc., New York (1986)
- 3) Thomson, C. D., Rea H. M., Doesburg V. M. and Robinson, M. F. : Selenium concentrations and glutathione peroxidase activities in whole blood of New Zealand residents, *Br. J. Nutr.*, **37**, 457-460 (1977)
- 4) 高田寛治 : 薬物動態学的 1-コンパートメント・モデル "薬物動態学—基礎と応用—", (高田寛治著), pp. 3-49, 薬業時報社, 東京 (1987)
- 5) 古川 意, 副島妙子, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : ラットにおける亜セレン酸投与後の血漿中 Se の動態, (株)日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター NMCC 共同利用研究成果報文集 4, 1996, 61-67 (1997)
- 6) 副島妙子, 古川 意, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : ラットにおける亜セレン酸ナトリウム投与後の Se の尿中排泄, 同上, 4, 1996, 68-72 (1997)
- 7) 長岡たまえ, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : ラットにおける亜セレン酸ナトリウム投与後の Se の動態, 同上, 5, 1997, 77-83 (1998)
- 8) Natsuhori, M., Nagaoka, T., Ito, N., Sera, K. and Futatsugawa, S. : Pharmacokinetics of selenium after sodium selenite administration to rats, *Int. J. PIXE*, **8**, 89-97 (1998)
- 9) 金子 恵, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : ラットにおける亜セレン酸ナトリウム投与後の Se の臓器動態, (株)日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター NMCC 共同利用研究成果報文集 6, 1998, 228-233 (1999)
- 10) Kaneko, M., Natsuhori, M., Ito, N., Sera, K. and Futatsugawa, S. : Tissue concentration-time profile of selenium after sodium selenite administration to rats, *Int. J. PIXE*, **9**, 315-323 (1999)
- 11) 磯村綾子, 金子 恵, 夏堀雅宏, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : 亜セレン酸ナトリウム投与後のラット臓器中セレン分布, (株)日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター NMCC 共同利用研究成果報文集 7, 1999, 180-186 (2000)
- 12) 夏堀雅宏, 金子 恵, 磯村綾子, 伊藤伸彦, 世良耕一郎, ニツ川章二 : 亜セレン酸ナトリウム投与後のラット臓器中セレン動態の同時解析, 同上, 7, 1999, 187-195 (2000)
- 13) Yamaoka, K., Tanigawara, Y., Nakagawa, T. and Uno, T. : A pharmacokinetic analysis program (MULTI) for microcomputer, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **4**, 875-885 (1981)