

## ティラピア血液におけるセレンの存在状態

甲斐徳久\*<sup>1</sup>・井上 英\*<sup>1a</sup>・山元憲一\*<sup>2</sup>・境 正\*<sup>3</sup>・  
村田 寿\*<sup>3</sup>・浜田盛承\*<sup>1</sup>・田上保博\*<sup>1</sup>・永井 毅\*<sup>1</sup>

### The Existing State of Selenium in the Blood of Tilapia *Oreochromis niloticus*

Norihisa Kai, Suguru Inoue, Ken-ichi Yamamoto, Tadashi Sakai, Hisashi Murata,  
Moritsugu Hamada, Yasuhiro Tanoue, and Takeshi Nagai

The existing state of selenium in the blood of tilapia *Oreochromis niloticus* was presented in relation to the glutathione peroxidase activity, by comparing for that of the previously reported seawater fish. The selenium level of blood was lower than that of seawater fish. The low oxidation states of selenium, *i.e.*, selenide and selenite species were predominant in the blood. On the other hand, the glutathione peroxidase activity was extremely high compared with that of seawater fish and did not correlate with the concentrations of any oxidation states of selenium and also with fish growth. These results suggest that selenium in the blood of tilapia will mainly exist as a constituent of glutathione peroxidase and other protein-containing selenohydryl groups with a trace amount of heavy metals.

#### 1 緒言

セレンの動植物に対する生理的影響については、植物に関しては今のところ毒性および必須性は認められていないが、動物に対しては過剰・欠乏いずれにも疾病を引き起こすことが知られている。<sup>1)</sup>最近では、水銀、カドミウムおよびヒ素などの微量毒性元素と深い代謝的相互作用を持っていることが分かってきた。また、グルタチオンペルオキシダーゼ（以下 GSH-Px と略記する）はセレンを含有する酵素タンパク質（分子量80,000～90,000）で、セレンはその活性部位にセレノシステインの形で存在する。この酵素は、過酸化水素および脂質過酸化物の2電子還元を触媒し、生体内の過酸化物処理に重要な役割を果たしていることがよく知られている。<sup>2)</sup>また本酵素は、とりこまれた無機態および有機態いずれの水銀とも結合して失活するといわれている。<sup>3)</sup>したがって、この反応機構を明らかにするためには、酸化状態を異にするセレンと本酵素活性の関連についての情報が必要であると思われる。これまで、遠洋性大型魚としてマグロ・カジキ類、養殖魚として

ブリなどの海産魚類<sup>4,5)</sup>ならびに淡水産魚類としてコイ<sup>6)</sup>について、それぞれの血液におけるセレン分布<sup>7-10)</sup>を GSH-Px 活性と関連づけて報告してきた。そこで、引続き本研究では、淡水産魚類としてティラピアを用い、これまで供試した他魚種との比較生化学的観点から、その血液におけるセレンの存在状態について考察した。

#### 2 試料および実験方法

##### 2.1 試料

本校生物生産学科生物飼育実験水槽で7～8年間飼育されたティラピア *Oreochromis niloticus* 10尾を供試魚とした。それぞれの供試魚生存中に心臓から血液を採取し、-20℃で凍結保存後、解凍したのち分析に供した。

##### 2.2 分析方法

###### 2.2.1 セレンの定量

桐柴らの方法<sup>11)</sup>によった。ここでは、有機態および4価

2003年10月27日受付。Received October. 27. 2003.

\*1 水産大学校食品化学科 (Department of Food Science and Technology, National Fisheries University)

\*1a 現九州大学農学部 (Faculty of Agriculture, Kyushu University)

\*2 水産大学校生物生産学科 (Department of Applied Aquabiology, National Fisheries University)

\*3 宮崎大学農学部 (Faculty of Agriculture, Miyazaki University)

セレンを {Org.Se+Se(IV)}, 6価セレンを Se(VI)ならびに総セレンを T-Se とそれぞれ略記した。

## 2.2.2 GSH-Px 活性の測定

Cikrytらの報告<sup>12)</sup>に基づく酵素分析法に従って, NADPHの酸化速度より定量し, 1分間に1nmolのNADPHを減少させる酵素量を1U(ユニット)とし, U/mg hemoglobin(以下U/mgHbと略記する)で表示した。また, 基質過酸化物は, テトラブチルヒドロペルオキシド(*t*-butyl hydroperoxide)を使用した。

## 3 結果ならびに考察

### 3.1 セレン分布

ティラピア血液における各セレン濃度の分布範囲は, それぞれ {Org.Se+Se(IV)} 濃度で $0.228 \sim 0.454 \mu\text{g/g}$ (平均 $0.334 \pm 0.085 \mu\text{g/g}$ ), Se(VI)濃度で $0.101 \sim 0.503 \mu\text{g/g}$ (平均 $0.238 \pm 0.113 \mu\text{g/g}$ )およびT-Se濃度で $0.343 \sim 0.751 \mu\text{g/g}$ (平均 $0.572 \pm 0.136 \mu\text{g/g}$ )であった。

そこで, 本供試魚血液における各酸化状態のセレン濃度を海産魚類の既報値<sup>4,5)</sup>と比較すると, 先に報告した淡水産魚類のコイ血液<sup>6)</sup>の場合と同様, 著しく低いことがわかった。一方, 本供試魚血液において, {Org.Se+Se(IV)}濃度はSe(VI)濃度と比較して優位であり, T-Se濃度の約6割を占めていることがわかった。しかし, Se(VI)化学種の組成比(Se(VI)/T-Se)(約40%)を同様に海産魚類のそれ(約5~20%)と比較すると, 幾分高いことがわかった。このことについても, コイの場合(約35%)とほぼ同様であった。

次に, 本供試魚血液におけるセレン分布を, 今回同様に得られた普通筋, 肝臓, 腎臓, 心臓および生殖腺のそれとともに Fig. 1 に示した。これにより, 本供試魚血液の総セレン濃度は, 普通筋のそれより高く生殖腺のそれとほぼ等しいことがわかった。このことは, 海産魚類<sup>4,5)</sup>およびコイ<sup>6)</sup>の場合について得られた結果と異なった。

ここで, Org.Seの構成化学種は, タンパク質中のセレンヒドリル残基(-SeH)として, また, Se(IV)およびSe(VI)のそれは, それぞれ隣接する含硫アミノ酸の2つのチオール基の硫黄と結合したセレン酸化物( $\text{SeO}$ および $\text{SeO}_2$ )として存在することが報告されている。<sup>4,5,13)</sup>そこで, 本供試魚血液におけるT-Se濃度(y)と{Org.Se+Se(IV)}濃度(x)およびSe(VI)濃度(x)との一次相関を,

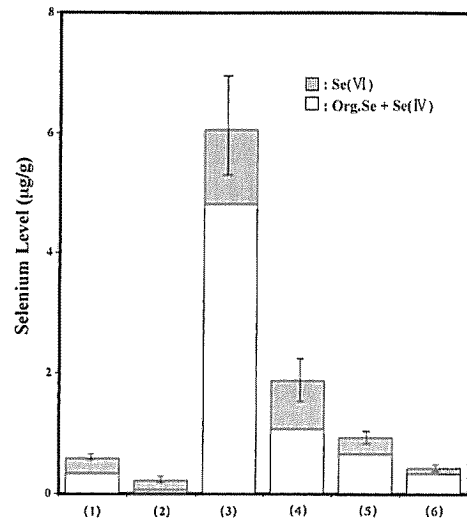


Fig. 1. The selenium distribution ((1) blood, (2) ordinary muscle, (3) liver, (4) kidney, (5) heart, and (6) gonad) in tilapia.

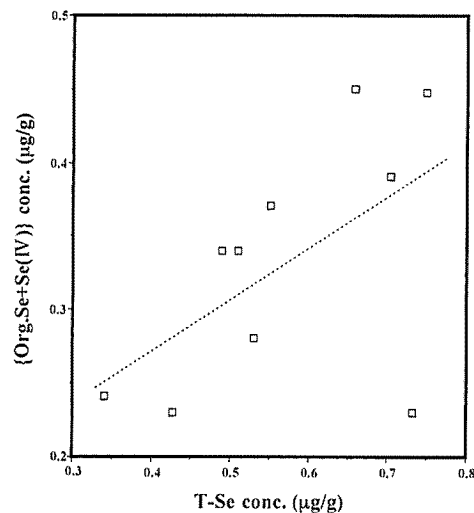


Fig. 2. Relationship between T-Se and {Org.Se+Se(IV)} in blood of tilapia.

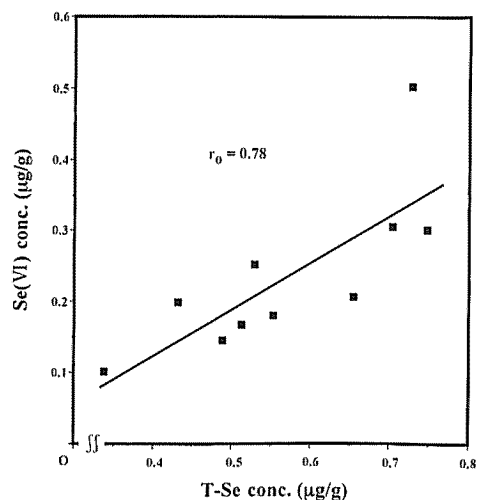


Fig. 3. Relationship between T-Se and Se(VI) in blood of tilapia.

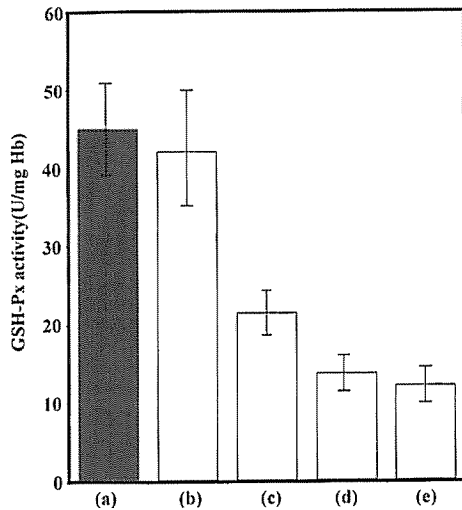


Fig. 4. GSH-P<sub>x</sub> activity in the blood of several species ((a) tilapia, (b) carp, (c) tuna, (d) marlin, and (e) cultured yellow tail) of fish.

それぞれFig. 2ならびにFig. 3に示した。その結果、T-Se濃度と|Org.Se+Se(IV)|濃度間で、有意な相関は認められなかったが、T-Se濃度とSe(VI)濃度間で、一次回帰式 $y = 0.65x - 0.14$ ,  $r_0 = 0.78$  [ $> r(8, 0.01)$ ]となり、両者間に有意水準1%以内で有意な正の相関が認められた。このことは、海産魚類およびコイの場合いづれとも異なつた。

### 3.2 GSH-P<sub>x</sub> 活性

GSH-P<sub>x</sub>活性の分布範囲は、30.8 ~ 60.7 U/mgHb (平均 $44.63 \pm 7.69$  U/mgHb)であった。Fig. 4より、本供試魚血液におけるGSH-P<sub>x</sub>活性は、海産魚類血液の既報値<sup>4,5)</sup>と比較して、先に報告したコイ血液<sup>6)</sup>の場合と同様、変動範囲も大きく、著しく高いことがわかった。

次に、本供試魚血液における|Org.Se+Se(IV)|濃度、Se(VI)濃度およびT-Se濃度とGSH-P<sub>x</sub>活性との一次相関を検討したが、いづれも有意な相関は認められなかった。さらに、GSH-P<sub>x</sub>活性と供試魚の成長度(尾叉長の対数値)との一次相関を検討したが、セレン分布同様、有意な相関は認められなかった。このことについてもコイの場合と同様であった。

## 4 総括

淡水産魚類である本供試魚は既報のコイ<sup>6)</sup>と同様に血液中のセレン濃度が、海産魚類のそれ<sup>4,5)</sup>と比較して著しく低かったことについて、次のことが推察される。一般に、海洋生態系においては、植物プランクトン→動物プランク

トン→小型魚→大型魚という食物連鎖があり、生体内で分解されず排泄されにくい金属元素は徐々に生物濃縮されていく。<sup>14)</sup>したがって、大型回遊魚では水銀のような重金属を無毒化するに足りうるセレンの備蓄が必要となってくる。すなわち、食餌中のセレンは胃腸管から吸収され血液に入り、血液によって体内循環している<sup>15)</sup>ので、セレンが何らかの要因で不足すると即座に各組織・器官に供給できるように、血液中に高濃度のセレンが保持されていることが考えられる。

一方、本供試魚は、本校生物生産学科生物飼育実験水槽(1.0×2.0×0.8 m<sup>3</sup>)において配合飼料のみを与えられ、飼育水も口過循環した水道水が使用された閉鎖環境の中で飼育されていた。既報のコイ<sup>6)</sup>についても、ほぼ同条件の環境下で飼育されたので、重金属による影響がほとんどなく、そのためセレンは必要最小限のレベルを血液に維持させておくと考えられた。ここでは、用いた配合飼料にはフィッシュミールが添加されていたが、原料がプランクトンフィーダーのイワシ、サバ等であること、また使用量がきわめて少量であることから、これに含まれる水銀のような重金属の影響はほとんど無視できるとの前提で議論を進めた。

次に、本供試魚の飼料や環境による影響を考えるために、配合飼料、水槽内に自然発生した植物プランクトン(ラン藻類)および飼育水における総セレン濃度に対するそれぞれのセレン濃度の組成比を比較すると、|Org.Se+Se(IV)|とSe(VI)との組成比は、配合飼料で56.2%と43.8%、植物プランクトンで76.4%と23.6%ならびに飼育水で61.7%と38.3%であった。血液におけるそれらの組成比は、それぞれ58.4%と41.6%であり、飼料や飼育水中のセレンの酸化状態が少なからず血液中のそれに影響を与えていると考えられた。次に、本供試魚血液におけるGSH-P<sub>x</sub>活性が既報のコイ<sup>6)</sup>と同様に海産魚類<sup>4,5)</sup>と比較して著しく高かったことについては次のように考察した。

一般に、体内にとり込まれた水銀等の有害重金属はセレンと直接結合して|Se/Hg(モル比)=1|形で無毒化し、血液から各組織・器官へと移動する。<sup>3)</sup>その結果、血液では微量の水銀と結合したセレンヒドリル基(-SeHg)を含むタンパク質が残り、GSH-P<sub>x</sub>活性の減少が認められてくるので、結果としてGSH-P<sub>x</sub>以外のセレンタンパクが多く存在することが報告されている。<sup>4,5)</sup>一方、実験で使用したティラピアおよび既報のコイ<sup>6)</sup>の棲息環境は、前述したようにもともとセレンおよび重金属がほとんど存在せず、なおかつ飼育水からの重金属の出入りもない状態で

あった。さらに、狭い水槽で重金属をほとんど含まない飼料により育成されているため、主にストレスに起因する魚体内での生理学的あるいは化学的变化が、自然環境下の種より、組織中の GSH-Px 活性変動に強く影響を及ぼすことが予測される。特に、Fig. 3 に認められたように血液中が優位でないが、Se(VI)濃度がT-Se濃度増大に大きく寄与していることが興味深い。このことは、コイ筋肉同様、本供試魚のティラピア筋肉でも Se(VI)が優位（コイ：92%；ティラピア：75%）であり、さらにその濃度がT-Se濃度と強い正の相関（いずれも  $r_s = 0.99$ ）を示したことと符合する。すなわち、ティラピア筋肉中においても、血液中で前述した諸々の変化から生成されるであろう活性酸素等によるセレン酸化の可能性をうかがわせた。

このことを考えあわせると、本供試魚血液におけるセレン濃度および GSH-Px 活性と成長度との間にいずれも有意な相関が認められなかったことが、より明白となろう。すなわち、前に報告したコイ同様、本供試魚は、水銀等の重金属が残留しない環境下で飼育されていたため、成長にともなう重金属の蓄積はほとんどないと考えられる。事実、血液中の水銀濃度は  $0.01 \mu\text{g/g}$  未満であった。これより、成長にともなう GSH-Px 活性の変動が認められなかったことが理解される。

一方、淡水産魚類血液のタンパク質含量は一般に海産魚類のそれよりも低い<sup>16,17)</sup>ことから、当然血液中のセレンタンパク質もまた同様に低いことが推測される。このことは、前述したように海産魚類に比べて著しく低いセレンレベルであったことと符合する。そこで、仮にこのタンパク質の主要構成種が GSH-Px あるとしても、ここでは示していないが、血液中のセレン濃度は魚体の成長にともなうほとんど変動しなかったこと、言い換えれば、セレンを含む GSH-Px についても、ストレス等の要因を無視すると、用いた本供試魚の成長期間中にはほぼ定常状態が保たれていたことと推察されるであろう。

今後、同種の天然魚や飼育下の魚類血液におけるセレン、水銀および GSH-Px 活性の測定を行い、以上のことが淡水魚の特性であるのか、あるいは飼育魚の特性であるのか否かを詳細に検討する必要があるであろう。それにより、水棲生物全般にわたってそれら血液中に存在するセレンの化学状態がより明確となろう。

## 文 献

- 1) J. N. Thompson and M. L. Scott: *J. Nutr.*, **97**, 335-342 (1969).
- 2) 高橋和彦: 代謝, **23**, 1097-1104 (1986).
- 3) H. Iwata, T. Matsukawa, H. Kito, and M. Hayashi: *Life Sci.*, **31**, 859-866 (1982).
- 4) N. Kai, T. Tsuda, T. Sakai, H. Murata, M. Hamada, Y. Tanoue, and T. Nagai: *Fish. Sci.*, **61**, 867-870 (1995).
- 5) N. Kai, T. Tsuda, T. Sakai, H. Murata, M. Hamada, Y. Tanoue, and T. Nagai: *Fish. Sci.*, **62**, 444-446 (1996).
- 6) N. Kai, S. Inoue, K. Yamamoto, T. Sakai, H. Murata, M. Hamada, Y. Tanoue, and T. Nagai: *ITE Letters on Batteries, New Technologies & Medicine*, **3**(3), 57-60 (2002).
- 7) N. Kai, T. Ueda, Y. Takeda, and A. Kataoka: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1981-1985 (1988).
- 8) 甲斐徳久・上田 正・武田靖昭・長友洪太: 水産大研報, **38**, 7-10 (1989).
- 9) 甲斐徳久・上田 正・長友洪太: 水産大研報, **38**, 11-16 (1993).
- 10) N. Kai, T. Ueda, Y. Takeda: *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1883-1886 (1988).
- 11) H. Uchida, Y. Shimoishi, and K. Toei: *Analyst*, **31**, 859-866 (1981).
- 12) P. Cikryt, S. Feuerstein, and A. Wendel: *Biochem. Pharmacol.*, **31**, 2873-2877 (1982).
- 13) W. J. Nikerson and G. Falcone: *J. Bacteriol.*, **85**, 763-771 (1963).
- 14) 山 登: 生物濃縮-環境科学特論-, 初版, 産業図書, 東京, 1978, pp. 43-64.
- 15) E. J. Underwood: 微量元素-栄養と毒性-, 丸善, 東京, 1975, pp. 323-367.
- 16) 齊藤 要: 日本水産学会誌, **20**, 196-201 (1954).
- 17) 尾崎久雄: 魚類生理学講座, **1**, 緑書房, 東京, 1968, pp. 1-99.