

## 高コレステロール摂取ラットの血清、肝臓及びリポタンパク中の 脂質濃度に及ぼすセレンの影響

飯塚幸澄,\* 櫻井栄一, 田中頼久  
東北薬科大学第一薬剤学教室

### Effect of Selenium on Serum, Hepatic and Lipoprotein Lipids Concentration in Rats Fed on a High-Cholesterol Diet

Yukisumi IIZUKA,\* Eiichi SAKURAI, and Yori-hisa TANAKA  
Department of Pharmaceutics I, Tohoku Pharmaceutical University,  
4-4-1, Komatsushima, Aoba-ku, Sendai 981-8558, Japan

(Received August 30, 2000; Accepted October 23, 2000)

The effects of Selenium (Se) on lipid metabolism was studied in male Wistar rats which were fed a high-cholesterol diet (HCD) containing 1% (w/w) cholesterol and 0.5% (w/w) cholic acid for 10 weeks. Se was orally administered at daily doses of 0.173 mg/kg in HCD into the test rats for 10 weeks. As compared with control groups, Se/HCD suppressed the amounts of triglyceride (TG), total cholesterol (CH) and free fatty acid in the serum. Se/HCD also decreased the amounts of low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in the serum. Further-more, Se/HCD inhibited the amount of liver TG and CH. The activity of fatty acid synthetase in the HCD fed group was higher than in the Se/HCD fed group. These results suggest that Se may have recuperative effects for hypercholesterolemia.

**Key words**—hypercholesterolemia; selenium; triglyceride; cholesterol; low-density lipoprotein cholesterol

#### 緒 言

高コレステロール血症は、動脈硬化症の主たる危険因子と考えられている。<sup>1)</sup>さらに、血中コレステロールのうち動脈硬化症の発現と密接に関係するのは低比重リポ蛋白コレステロール (LDL-C) 量の増加であるが、逆に高比重リポ蛋白コレステロール (HDL-C) 量は動脈硬化症の発生頻度に逆相関するとの報告がある。<sup>2)</sup>すなわち、脂質代謝改善剤に望まれる作用は HDL-C を上昇させることであり、LDL-C 又は HDL-C いずれかに作用するかが動脈硬化症予防に重要である。また、血中のトリグリセリドも LDL-C と同様に動脈硬化症の危険因子とされている。<sup>3)</sup>

一方、生体内必須微量元素であるセレンの低下は、脂肪の過酸化を促進し LDL-C 値を上昇させる。また、冠状動脈のアテローム性硬化度を増加させるか、あるいは虚血性心疾患を誘発するとの報告がある。<sup>4)</sup>これらの報告から、血液中で抗酸化作用を示すセレンの投与は、脂質代謝改善因子として作用する可能性がある。そこで本研究では、コレステロール負荷によるラットの血清及び肝臓中コレステロール、トリグリセリドさらに、リポ蛋白中コレステロール量の変動に対するセレンの影響を明らかにするため種々検討を加えた。

#### 実験の部

##### 実験方法

**試薬** 亜セレン酸は、ナカライテスク製を使用した。その他の試薬はいずれも市販の特級品を使用した。

**実験動物** 実験には5週齢のWistar系雄性ラット(日本SLC)を用いた。ラットは、個別ケージで飼育し、水及び飼料は実験前日まで自由に摂取させた。実験にあたっては、18—20時間絶食させたが、水は自由に与えた。

**コレステロール飼料(HCD)** コレステロール飼料は、普通飼育飼料(日本クレア社製粉末飼料F-2:標準食)に1%(w/w)コレステロールと0.5%(w/w)コール酸を添加して作製した。

**実験群** 動物を供与飼料の種類とセレンの投与により次の4群に分けた。対照群:標準食(F-2)、セレン群:標準食+セレン(1日1回0.173 mg/kgを経口投与)、HCD群:高コレステロール食、HCD+セレン群:高コレステロール食+セレン(1日1回0.173 mg/kgを経口投与)。各群には一定量の飼料を与え毎日それぞれの飼料摂取を測定し、最も摂取量の少なかった群にあわせて飼料量を決定し、10週間摂取させた。セレンは、精製水に用時溶解し、高コレステロール食の給与開始と同時に強制的

に経口投与した。対照及びHCD群には、同量の精製水を投与した。セレンの投与量は、既に報告してある著者らの実験より算出した。<sup>5)</sup> 実験期間は10週間とし、各群の動物の体重を1週間に1回測定した。

**血清及び肝臓中の脂質の測定** 血清中のトリグリセリドはアセチルアセトン法、コレステロールはイアトロリポTC (ヤトロン)、遊離脂肪酸は、NEFA テストワコー (和光純薬) を使用して測定した。血清中の低比重リポ蛋白質 (LDL-C) と高比重リポ蛋白質 (HDL-C) は、超遠心法<sup>6)</sup>により分画し、これらリポ蛋白質中のコレステロールを酵素法を用いて測定した。肝臓中のコレステロール濃度は Sperry-Webb 法<sup>7)</sup>にて行い、トリグリセリド濃度は、アセチルアセトン比色法<sup>8)</sup>により測定した。

**肝臓中のアセチル CoA カルボキシラーゼ活性及び脂肪酸合成酵素活性の測定** アセチル CoA カルボキシラーゼ活性は Tanabe ら<sup>9)</sup>の方法に従って、脂肪酸合成酵素活性は Nepokroeff ら<sup>10)</sup>の方法に従って測定した。

**統計処理** 統計学的有意差検定は、全群間の比較を Tukey の多重比較法により行い、 $p < 0.05$  (両側検定) の場合を有意な変化とみなした。

## 実験結果

**高コレステロール摂食ラットの血清及び肝臓中のトリグリセリド並びにコレステロール濃度に及ぼすセレンの影響**

HCD 群の血清中トリグリセリド及びコレステロール濃度は対照群と比較して血清及び肝臓のいずれにおいても有意な増加を示した。特に HCD 群の肝臓中においては、トリグリセリドが対照群の約4倍、コレステロールが対照群の約10倍にまで増加した。しかし、HCD 群にセレンを投与することによっていずれも顕著な低下を示し、ほぼ対照群のレベルまで回復した (Figs. 1, 2)。

**高コレステロール摂食ラットの血清中 LDL-C 及び HDL-C 濃度に及ぼすセレンの影響**

HCD 群の LDL-C 濃度は、対照群と比較して有

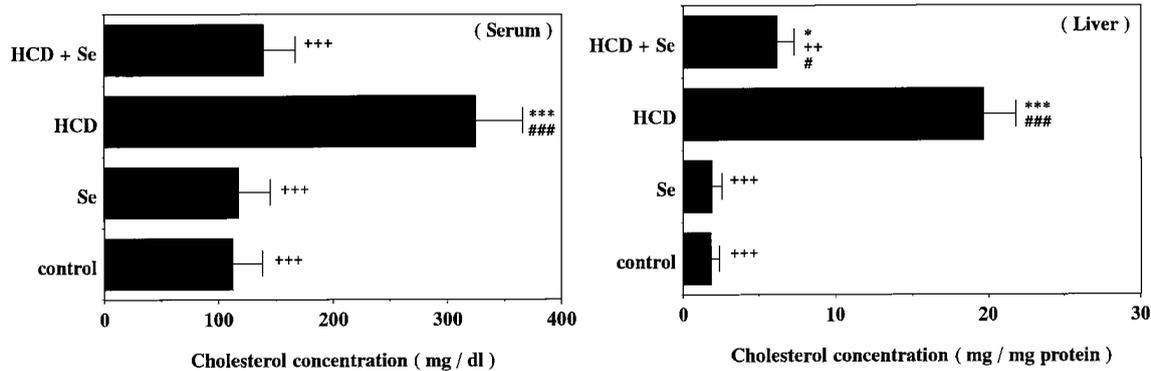


Fig. 1 Effect of Selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.) on Serum Triglyceride and Liver Triglyceride Concentrations in Rats after Feeding with Test Diets

Control: normal diet(F2), Se: normal diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.), HCD: high cholesterol diet, HCD + Se: high cholesterol diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.). Each result represents the mean  $\pm$  S.E. of test samples ( $n=8$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant differences from the control group. + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$ , significant differences from the HCD group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant differences from the Se group.

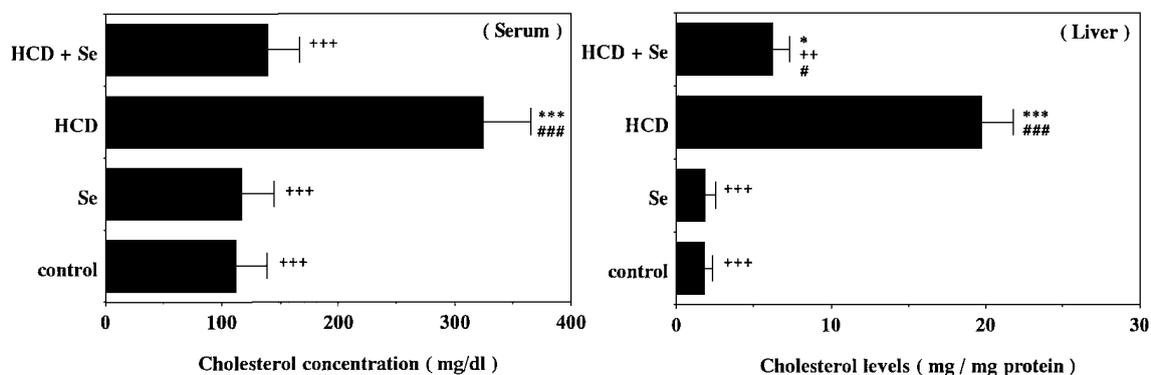


Fig. 2 Effect of Selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.) on Serum Cholesterol and Liver Cholesterol Concentrations in Rats after Feeding with Test Diets

Control: normal diet(F2), Se: normal diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.), HCD: high cholesterol diet, HCD + Se: high cholesterol diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.). Each result represents the mean  $\pm$  S.E. of test samples ( $n=8$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant differences from the control group. + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$ , significant differences from the HCD group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant differences from the Se group.

意な増加を示した。また、HCD群にセレンを投与したHCD+セレン群のLDL-C濃度は、HCD群と比較して有意な低下を示し、対照群レベルまで回復した。しかしながら、HDL-C濃度はいずれの群においても有意な変化は認められなかった (Fig. 3)。

高コレステロール摂取ラットの血清中遊離脂肪酸及び肝臓中のアセチル CoA カルボキシラーゼ活性と脂肪酸合成酵素活性に及ぼすセレンの影響

肝臓中のアセチル CoA カルボキシラーゼ活性は、HCD群において他の群と比較して低下する傾向を示したが、セレンの投与によってその活性は回復した。HCD群の肝臓中の脂肪酸合成酵素活性は、対照群と比較して有意な増加を示した。しかし、HCD群にセレンを投与したHCD+セレン群の脂肪酸合成酵素活性は、HCD群と比較して有意な低下を示した (Table 1)。また、血清中の遊離脂肪酸濃度は、対照群 ( $273.5 \pm 19.7 \mu\text{Eq/l}$ ) と比較してHCD群 ( $395.8 \pm 31.4 \mu\text{Eq/l}$ ) は有意 ( $p < 0.01$ ) な増加を示した。しかし、この増大したHCD群の遊離脂肪酸濃度はセレンの同時投与 (HCD+セレン

群:  $291.5 \pm 22.8 \mu\text{Eq/l}$ ) により有意 ( $p < 0.01$ ) に低下した。また、セレン単独投与群の遊離脂肪酸濃度 ( $278.8 \pm 21.8 \mu\text{Eq/l}$ ) は、対照群の濃度 ( $273.5 \pm 19.7 \mu\text{Eq/l}$ ) と変わらなかった。

Table 1. Effect of Selenium on the Activity of Fatty Acid Synthesizing Enzymes in Rats after Feeding Test Diets

Group	No. of rats	Acetyl-CoA carboxylase	Fatty acid synthetase
		(unit/mg protein)	(unit/mg protein)
Control	8	$0.55 \pm 0.07$	$0.18 \pm 0.05^+$
Se	8	$0.56 \pm 0.06$	$0.19 \pm 0.04^+$
HCD	8	$0.41 \pm 0.08$	$0.39 \pm 0.06^{*,\#}$
HCD+Se	8	$0.54 \pm 0.07$	$0.21 \pm 0.04^+$

HCD: high cholesterol diet. Each result represents the mean  $\pm$  S.E. for 8 rats. \*  $p < 0.05$ , significant differences from the control group, +  $p < 0.05$ , significant differences from the HCD group, #  $p < 0.05$ , significant differences from the Se group.

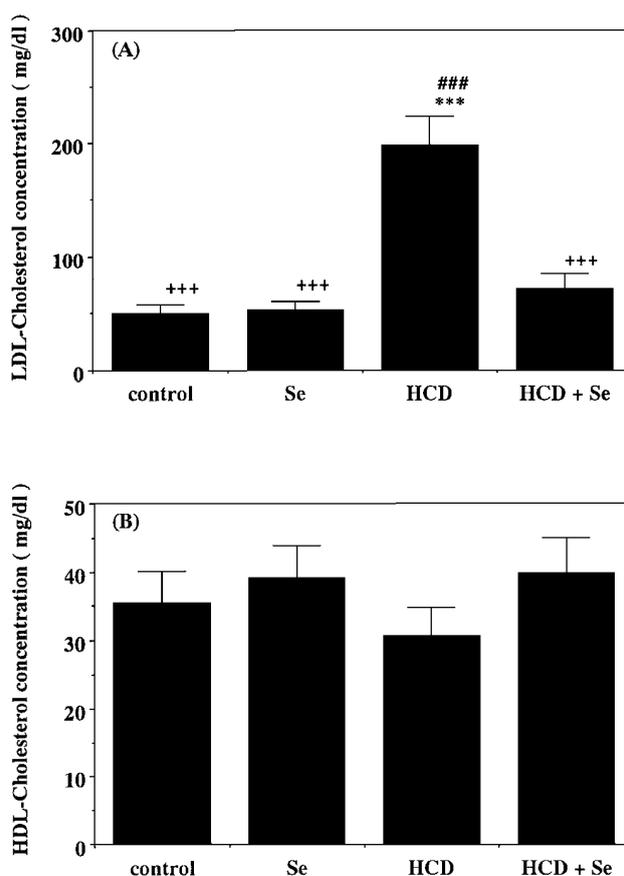


Fig. 3 Effect of Selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.) on Serum LDL-C(A) and HDL-C(B) Concentrations in Rats after Feeding with Test Diets

Control: normal diet, Se: normal diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.), HCD: high cholesterol diet(F2), HCD + Se: high cholesterol diet + selenium(0.173 mg/kg/day, p.o.), LDL-C: low-density lipoprotein cholesterol, HDL-C: high-density lipoprotein cholesterol. Each result represents the mean  $\pm$  S.E. of test samples ( $n=8$ ). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , significant differences from the control group. + $p < 0.05$ , ++ $p < 0.01$ , +++ $p < 0.001$ , significant differences from the HCD group. # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ , ### $p < 0.001$ , significant differences from the Se group.

## 考 察

高コレステロール血症誘発因子や成立機序は、現在でもなお不明な点が多い。しかし、コレステロール値が高コレステロール血症や動脈硬化の成立の1つのリスクファクターとして重要な役割を果たしていることは明白である。そこで今回著者らは、コレステロール負荷により高コレステロール血症ラットを作製し、これらラットの血清及び肝臓中コレステロールとトリグリセリド濃度さらに、血清中リポ蛋白コレステロール濃度に及ぼすセレンの影響について検討を行った。

今回データには示していないが、ラットの体重は、特にHCD群で対照群と比較し約30%の増加を示した。しかし、セレン群やHCD+セレン群では対照群に比べ有意な体重増加は認められなかった。ラットに高コレステロール食を与えると血清中コレステロール、トリグリセリド及びリポ蛋白コレステロール濃度は、対照群と比較して有意に増大することが示された。同様に、肝臓中コレステロール及びトリグリセリド濃度も、対照群と比較して有意に増大することが示された。そこで、高コレステロール摂食ラットにセレンを投与すると、血清中コレステロール、トリグリセリド及び肝臓中コレステロール、トリグリセリド濃度は、いずれも対照群のレベルまで低下することが認められた。<sup>11)</sup>一方、対照群にセレンを投与してもコレステロールやトリグリセリド濃度にほとんど影響を与えなかった。これらのことから、セレンの脂質動態に対する作用は正常では発現しにくく、過飽和状態になる外来性の脂質負荷が加わった場合においてのみ、脂質低下作用を示すものと思われた。さらに、高コレステロール摂食時に上昇するLDL-Cに対してもセレンの投与はその値を低下させた。<sup>4)</sup>しかし、セレン添加は、HDL-C濃度に対してはほとんど影響しなかった。また、脂肪酸合成系への影響を検討するため脂肪酸合成の律速酵素である肝臓中のアセチルCoAカルボキシラーゼ活性及び脂肪酸合成酵素活性を測定した。その結果、アセチルCoAカルボキシラーゼ活性は、HCD群において他の群と比較し低下する傾

向を示したが、セレンの投与によって活性は回復した。一方、高コレステロール摂食(HCD群)により脂肪酸合成酵素活性は、対照群と比較して有意な増加を示した。しかし、HCD群にセレンを投与したHCD+セレン群の酵素活性は、対照群レベルにまで低下した。したがって、高コレステロール摂食によって生じた肝における脂肪酸合成の上昇をセレンが抑制したものと思われた。<sup>12)</sup>この推察は、血清中の遊離脂肪酸の濃度変化からも支持された。

以上の結果から、セレンは肝臓に蓄積されたコレステロールやトリグリセリド並びに血清中のLDL-Cを速やかに減少させ、高コレステロール血症を改善させる効果を有する可能性があると思われた。セレンによるこれら効果の作用機序を、今後検討して行く必要があるであろう。

## REFERENCES

- 1) Ross R., Glomset J. A. N., *Engl. J. Med.*, **296**, 369-377 (1976).
- 2) Miller G. J., Grande F., *Annu. Rev. Med.*, **31**, 97-108 (1980).
- 3) Caste W. P., *Am. Heart J.*, **112**, 432-437 (1986).
- 4) Keys A., *Atherosclerosis*, **22**, 149-192 (1975).
- 5) Iizuka Y., Sakurai E., Hikichi N., *Yakugaku Zasshi*, **113**, 525-530 (1993).
- 6) Tsutsui M., Oohira M., *Igaku no ayumi*, **126**, 248-250 (1983).
- 7) Sperry W., Webb M., *J. Biol. Chem.*, **187**, 97-106 (1950).
- 8) Fletcher M., *Clin. Chim. Acta.*, **22**, 393-397 (1968).
- 9) Tanabe T., Nakanishi T., *Methods in Enzymology*, **71**, 5-16 (1981).
- 10) Carl M., Nepokroeff M., *Methods in Enzymology*, **35**, 37-44 (1975).
- 11) Kang B. P., Bansal M. P., Mehta U., *Gen. Physiol. Biophys.*, **17**, 71-78 (1998).
- 12) Piffeteau A., Gaudry M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **73**, 773-778 (1976).