

原 著

生体内ニッケルの測定とその病態生化学的研究

第一編 原子吸光分析法によるニッケル定量法の検討と ヒト血清中ニッケルの正常値について

野 本 昭 三

信州大学医学部附属病院中央検査部 (部長: 金井正光教授)

DETERMINATION AND PATHOPHYSIOLOGICAL STUDY OF NICKEL IN HUMAN AND ANIMALS I. DETERMINATION OF NICKEL IN HUMAN SERUM BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY AND ITS NORMAL VALUE

Shozo NOMOTO

Central Clinical Laboratories, Shinshu University Hospital
(Director: Prof. Masamitsu KANAI)

Key words: ニッケル (nickel), 原子吸光分光分析 (atomic absorption spectrometry),
微量金属 (trace metal)

緒 言

ニッケルの生化学的研究については1920年代すでに食物や動物組織中のニッケル測定に関する報告があり¹⁻⁵⁾, 1930年以後にはマンガン, コバルトなどとともに種々酵素の活性に対するニッケルイオンの影響, 核酸やリン脂質, 低分子化合物との結合などに関する研究がすすめられて来ている⁶⁻¹⁷⁾。一方ニッケルと疾病の関係については英国の Clydach (Wales) におけるニッケル精錬工場に多発した呼吸器系の癌に関する報告 (1932年)^{18, 19)}が最初のものと考えられるが, その後同様なニッケル工場の呼吸器癌の発生が世界各国から報告されている²⁰⁾。これに関連して不溶性のニッケル化合物と発癌についての実験的研究や発癌機構に関する研究報告は数多い²⁰⁾。

これらとは別に, 放射性ニッケル (⁶³Ni) を用いる生体内ニッケルの代謝についての研究がおこなわれているが²¹⁻²³⁾, 1963年 D'Alonzo らが心筋硬塞発作時に血清ニッケルの上昇をみとめた報告^{24, 25)}は生体試料

中のニッケル含量と疾患の関係を具体的な測定値をもって示し, ニッケルに対する病態生化学的関心を高めるひとつの契機となった。

筆者ら²⁶⁻³¹⁾は, 人及び各種動物の血清ニッケル濃度を測定し, 各種疾患における血清ニッケルの変動を追究した。またウサギ血清からのニッケル結合性マクログロブリン (Nickeloplasmin) の分離やニッケル欠乏の動物実験などについても報告した。このようにニッケルに関する研究報告は半世期にわたってその数も決して少なくないが, 生体内におけるニッケルの代謝の詳細や生理学的役割などについてはいまだに不明な点が多い。このように解明をおくらせている原因はいくつか考えられるが, ニッケルの生体内レベルが極めて低く, 十分な感度と精度をもつ測定手段を見出すことが困難であることが大きな要因と考えられる。

生体内ニッケルの測定にはニッケルを diethylthiocarbamate (DEDTC)³² 化合物として分光光度計で測定する方法³²⁻³⁴⁾, 原子発光分光光度計を用いる方法³⁵⁻⁴²⁾, 原子吸光分光光度計による法^{26, 43)}等がす

でに応用されている。他に蛍光分光光度法⁴⁴⁾、原子蛍光分光法⁴⁵⁻⁴⁶⁾、原子放射化分析法^{35, 47)}、赤外分光光度法⁴⁸⁾等も応用の可能性があり特殊な面では試みられているが、それぞれに問題があり、いまだ一般に用いられるには至っていない。

すでに生化学の分野で用いられているものうち、分光光度法は、試料中のニッケルを DEDTC 化する前に試料中に共存する阻害物質を除去することが必要で、Cluett ら³⁹⁾はイオン交換樹脂を用いて鉄イオン (Fe^{III})、銅イオン (Cu^{II}) 等を除去し、Kincaid ら³²⁾はニッケルをいったん dimethylglyoxime 化してクロロホルムに抽出し、再び酸性水溶液に転溶して純化したのち DEDTC 化して比色する方法を發表している。これら分光光度法は操作段階が複雑で汚染をうけやすく、また他金属イオンの干渉の除去などにかなり高度の技術を要する方法である。筆者ら²⁰⁾も先にパーキンエルマー 403 型原子吸光分光光度計によるニッケル測定法と、Kincaid ら³²⁾の分光光度法との比較検討をおこなったが、後者は操作が煩雑で一定の再現性 (C. V. 30% 以内) を得るにはかなりの熟練が必要であった。

蛍光分光光度法は共存イオンの干渉という面では、分光光度法よりすぐれているが、炎の中に試料を噴霧する一般的な炎光分析法では必要な感度が得にくいために、spark emission spectrography 法を用いている³⁵⁻⁴²⁾。この方法は濃縮した少量の試料を短時間に一気に発光させ、その発光スペクトルを写真乾板上に撮影して分析する方法で、高い感度がえられ一度に多種類の金属の分析に応用できるので、目的によっては極めて有利な手段となる。しかし、臨床的に用いるためには再現性や定量性についての問題が多い。

原子吸光分光光度法は1953年オーストラリアの物理学者 Walsh⁴⁹⁾により原理が提示され、開発がすすめられたもので、基底状態 (ground state) にある原子にその原子に特有の波長の光をあてると光の吸収がおこり、光の吸収量と目的原子の数が比例することを利用して定量する方法で、発光法と異なり、遷移の励起

エネルギーに関係せず、温度変化および他の放射線あるいは原子間のエネルギー交換による妨害をうけることが少ないなどの利点があり、また一般に発光法より著しく感度が高く、微量定量が可能であり、目的元素の純化のための前処理が不要な場合が多いことなどから臨床化学分析に適しており、すでに生体試料中のマグネシウム、銅、鉛、水銀、カドミウム、金、コバルト、クロミウム等の測定に広く用いられている⁵⁰⁾。筆者ら²⁰⁾は先にパーキンエルマー 403 型原子吸光分光光度計を用いる血清、尿、組織中のニッケル測定について報告したが、本報告では測定法の詳細を含めて基礎的検討結果の一部と国産の原子吸光分光光度計の使用経験および正常者の血清ニッケル測定値について記述する。

実験方法

原子吸光分析によるニッケル測定の原理は血清にトリクロル酢酸 (TCA) を加え蛋白あるいは低分子化合物などと結合しているニッケルをすべて遊離させ同時に蛋白を凝固させて除蛋白上清をとり、ニッケルを pyrrolidone dithiocarbamate 化 (Ni-PDC) して methylisobutylketone (MIBK) に抽出し、MIBK 中のニッケルの濃度を原子吸光法で測定するものである。また、全血、尿、臓器中のニッケルは、強酸を加えて湿性灰化した後に上と同様に PDC 化して MIBK に抽出し、原子吸光法で測定することができる。

試 薬

水はすべて脱イオン再蒸留水を用い、試薬のうち各種の酸、アンモニア、MIBK、APDC は和光純薬の製品を用いた。

ニッケル標準液

保存液 (50 μ g Ni/ml) : 50mg の細粒ニッケルを 50 ml ビーカーに採り、50% の硝酸 10ml を加えて静かに加熱して溶解し、これを 1l のメスフラスコに定量的に移し水で 1l にした。

使用標準液 (0.05 および 0.1 μ g Ni/ml) : 保存液 1ml をそれぞれ水で 1000ml、500ml に希釈した。

15% TCA 溶液 : 結晶トリクロル酢酸 150g を水に溶かして 1l にし、褐色ガラスビンに入れ氷室に保存した。

ベースライン調整用 MIBK : 15% TCA 溶液約 100 ml をアンモニア水で pH を 2.5 にし、1l 分液漏斗に移して約 500ml の MIBK と振盪混和してから、MIBK 層を分離して密栓保存した。

(註) 以下試薬について次の略語を用いた。

diethyldithiocarbamate : DEDTC
 ammonium pyrrolidone dithiocarbamate :
 APDC
 pyrrolidone dithiocarbamate : PDC
 methylisobutylketone : MIBK
 トリクロル酢酸 : TCA

2% APDC 溶液: 1g の APDC を 50ml の水に溶解し, 混在する微量の金属を 3ml の MIBK で 2 回抽出して除去した。調整してから 24 時間以内に使用した。

アンモニア水原液: 25g/dl

2.5% アンモニア水: アンモニア水原液を水で 10 倍に希釈した。

測定機器

原子吸光分光光度計はパーキンエルマー 403 型と日立-208 型を使用した。前者の測定条件は既に報告したが²⁰⁾, 日立-208 型の場合には, ニッケルホローカソードランプと three slot acetylene-air burner を利用し, 日立 QPD-53 型レコーダーと接続して使用した。測定波長は 232nm で, ニッケルランプの電流は 16mA, アセチレン流量は毎分 0.9~1.2ℓ, 空気流量は毎分 14ℓ, 入射ロスリット・ダイヤル 1, 出射ロスリット・ダイヤル 1, スケール拡大 3 倍, response notch は check の位置に, バーナーヘッド中央部上面から入射光ビームまでの高さは約 24mm にそれぞれセットして用いた。なお試料吸引速度は毎分約 5ml である。表 1 はパーキンエルマー 403 型と日立-208 型の測定条件を比較して示したものである。

器具

採血には真空採血器 (仁丹テルモ) を用い, 除蛋白, pH 調整, MIBK 抽出等の一連の操作には硬質ガラス製 50ml 共栓付き遠心管を用いた。

実施方法

血清試料, 標準液, ブランクなどの測定はすべて二重測定でおこなった。

血清試料 10ml, 各標準液 1ml と水 9ml, 水 10ml (ブ

ランク用) をそれぞれ 50ml 容目盛付き有栓遠心管に採り, 各遠心管に TCA 溶液 20ml を絶えず攪拌しながら加え, 振盪器にかけて 30 分間ゆるく振盪した後, 3500 回転 (900g) で 15 分間遠心した。この上清 20ml を別の 50ml 容遠心管に移し, pH がおよそ 2 になるまでアンモニア水を加え, さらに希釈アンモニア水で pH 2.5 に調整した。ついで APDC 溶液 2ml を加えて混和し, MIBK 3ml を加えて 30 秒振盪混和してから 3500 回転, 5 分間遠心し, 上部の MIBK 層を水層と混じらないよう注意して小試験管に分取した。

原子吸光分光光度計の調整にはまず MIBK を吸引させながらバーナーの上端から約 5mm 上までは還元炎 (明るい青色), その上部は酸化炎 (やや暗い青色) になるよう注意してアセチレンガスの流量を調整し, 10~15 分間そのまま維持した後, ベースライン調整用 MIBK にかえて更に 10 分間ベースラインの安定状態を観察し, 必要により更にフレームの調節を行なった。アセチレン流量は毎分 0.9~1.1ℓ が適当であった。MIBK 抽出試料の測定はブランク, 標準液, 血清試料の順におこない, 最後に再びブランクと標準液を吸引測定した。

試料中ニッケル濃度は, 記録紙の各試料のピークの高さを標準液のピークと比較して算出し, ブランク値を差し引いてもとめた。

実験結果

上述の測定法について, フレームの調整とベースラインレベルの変動および感度の関係, MIBK 層の含水量によるベースラインの変動, 他元素の影響, PDC

表 1 2 種類の原子吸光分光光度計の測定条件の比較

	日立-208 型	パーキン・エルマー 403 型
光源	ニッケルホローカソードランプ	ニッケルホローカソードランプ
電流量	16 mA	16 mA
波長	232 nm	232 nm
バーナー	スリースロット, 水冷式	"Boling" スリースロット
光路長	100 × 2 mm	100 mm
フレーム	アセチレン, 空気	アセチレン, 空気
アセチレン流量	0.9~1.2 ℓ/min* 3.6 ℓ/min**	2.0~2.3 ℓ/min* 4.2 ℓ/min**
空気流量	14 ℓ/min	23 ℓ/min
スケール拡大	3 倍	4 倍

*: MIBK 試料を吸引した場合

**: 水試料を吸引した場合

化と MIBK 抽出時の pH 調整と回収率の関係、本法の検知限界、再現性などの測定上重要な因子についての基礎的検討と、本法による正常人血清のニッケル測定の結果について述べる。

1. フレーム調整とベースラインレベルの関係

原子吸光光度計の分光波長を 232nm に合わせ、バーナーの位置をバーナーヘッド中央において入射側ビームまでの高さが 24mm になるように調節し、空気の流量を毎分 14ℓ に保ちながら、アセチレンの流量を変化させた場合のフレーム自体による吸光度の変化を測定した。図1のようにアセチレンの流量が毎分 3.7ℓ (ベースライン調整用の MIBK を噴霧するときは毎分 1.1ℓ) のときにフレームの吸光度はもっとも小さく、高燃料炎側、低燃料炎側ともに著明な吸光度の上昇が見られた。この際のノイズの大きさは、図中に点線で示したようにアセチレン流量毎分 3.7ℓ (含水 MIBK では毎分 1.1ℓ) から若干低燃料炎側に傾いたところで小さくなる傾向を示した。またアセチレン流量とベースラインレベルの関係は、バーナーヘッドの高さや試料の吸引速度によっても左右されることがわかった。

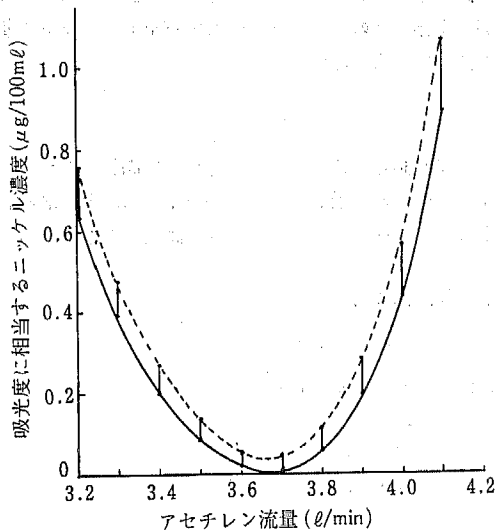


図 1 アセチレン流量によるフレーム調整とベースラインの変動及びノイズレベルの関係

水を試料として日立-208型原子吸光光度計に吸引させ、空気流量を毎分 14ℓ にし、アセチレン流量を変化させた場合に見られるベースライン(吸光度)の変化(実線)とノイズの大きさ(実線と点線の間)を図示した。

2. フレームの調整と感度の関係

1の実験と同様にしてフレームの条件を変化させ、 $5\mu\text{g Ni}/100\text{ml}$ の標準液を順次吸引させた場合のピークは図2に示すようにアセチレン流量毎分 3.6ℓ (含水 MIBK 噴霧時は毎分 1.0ℓ) でもっとも高く、かつ安定しており、高燃料炎に傾くと急にノイズが大きくなり、従って測定感度の実質的な低下をきたすことがわかった。

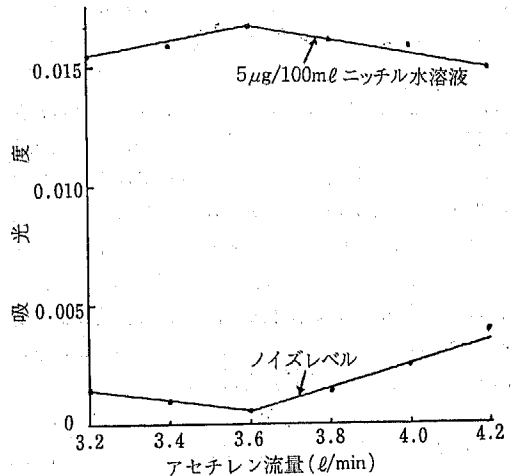


図 2 アセチレン流量によるフレーム調整と感度の関係

$5\mu\text{g}/100\text{ml}$ のニッケル水溶液を日立-208型原子吸光光度計に吸引させ空気量を一定にした上でアセチレン流量を変化させて、それぞれの条件における吸光度とノイズレベルの大きさを図示した。

3. MIBK 層の含水量とベースラインの変動との関係

MIBK に水を添加して種々の含水濃度の MIBK を作り、 0.5% の含水 MIBK を噴霧したときにフレームが最適状態(吸光度がもっとも小さい)になるようにアセチレン流量を調節し、順次含水量の異なる MIBK をバーナーに噴霧してそのベースラインレベルの変動をみたのが図3である。図の中央部 0.5% の点から含水量が増えても減っても吸光度は増加し、その含水量の差と吸光度の変化の大きさは中央部から離れるほど著明になる。すなわち、ベースライン調整に使用する MIBK と試料を抽出した MIBK の間に含水量の差がある場合は正または負の測定誤差となり、

また誤差の程度はフレイム調節の適否によっても大きく影響をうけた。

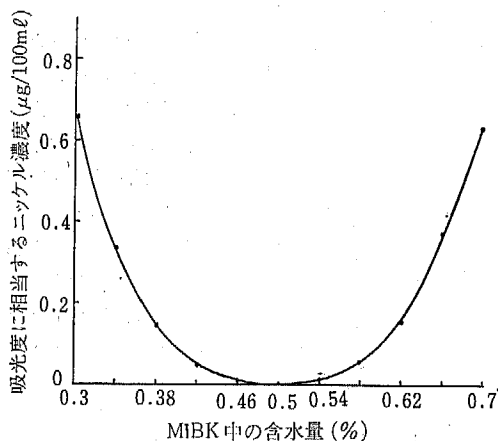


図3 MIBK中の含水量の変化によるベースラインの変動

含水量0.5%のMIBKを試料として日立-208型原子吸光分光光度計に吸引させながら、アセチレン流量を調節してフレイムの条件を最適にし(図中0.5%の点)、次いで種々含水量の異なるMIBKを吸引させた場合のベースラインの変動を图示した。

4. 他元素の影響-I

遷移金属のうち生体内に比較的多量に存在する鉄、銅、亜鉛についてニッケルの原子吸光測定に与える影響を検討した。まず、ニッケルの5μg/100ml標準液に鉄、銅、亜鉛の塩化物水溶液をそれぞれ100倍量添加した試料を作り、各試料の原子吸光度を無添加のニッケル標準液のそれと比較した。

その際、フレイムの状態を低燃料炎から高燃料炎へと徐々に変化させてフレイムの状態による干渉度の変化を検討した。図4に示すように、鉄と銅では高燃料炎側で3~8%の明らかな正誤差を示したのに対し、アセチレン流量が毎分3.7ℓ以下の低燃料炎側ではほとんど干渉がみられなかった。また亜鉛の場合には高燃料炎側でわずかに負の干渉の傾向がみられたが、著明なものではなかった。

5. 他元素の影響-II

本法のPDC化と抽出過程でおきる化学的干渉を含めて他元素の影響をみるために、多数の金属及び陰イオンの添加実験をおこなった。添加した元素は表2に示すごとくで、表示量を5μg/100mlのニッケル標準液に添加してその10mlを採り、実施操作に従ってpHを

表2 原子吸光分析によるニッケル測定干渉実験(図5)に用いた元素およびイオンの種類とその添加濃度

元素またはイオン	添加濃度*
Na, K, Cl	200 mEq/L
Ca, Mg, HCO ₃ , CO ₃ , PO ₄ , SO ₄	10 mEq/L
Al, As, Bi, Cr, Co, Fe, Pb, Li, Mn, Hg, Mo, Ag, Sr, U, V, Zn, Pt, BO ₃ , Br, CN, F, NO ₃ , NO ₂ , SO ₃ , Cu	1 mg/100ml
Cd, Au	0.5 mg/100ml

*: 各種物質をそれぞれ右側の濃度になるよう5μgNi/100ml溶液に添加した。

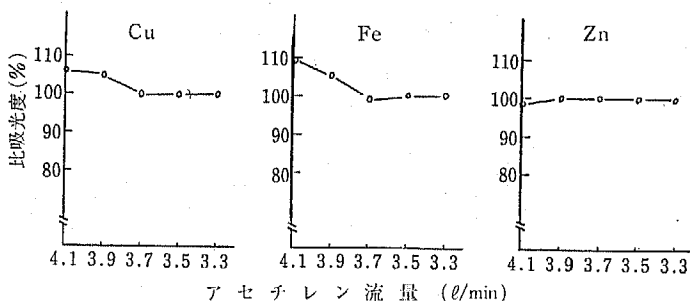


図4 遷移金属による干渉とフレイム調整の影響

5μg/100mlニッケル水溶液に銅、鉄、亜鉛の塩化物をニッケルの100倍濃度添加した試料を作り、これを日立-208型原子吸光分光光度計に吸引させ、アセチレン流量を変化させながらその吸光度を無添加の5μg/100mlニッケル水溶液の吸光度(100とする)と比較した。なお銅、鉄、亜鉛の塩化物のみの吸光度も測定してブランクとして差し引いた。

調整し、APDC を加え、MIBK で抽出して原子吸光度を測定した (図 5)。金属のうちカドミウム、金、白金、銅では著明な負の干渉がみられたが、これらの金属について更に種々添加量を変えて検討した。図 6 の上の図のように、カドミウムは $250\mu\text{g}/100\text{ml}$ の濃度で約30%、金、白金は $250\mu\text{g}/100\text{ml}$ の濃度で約15%の負の干渉を示した。銅の場合は、 $1000\mu\text{g}/100\text{ml}$ の濃度で40%以上の負の干渉を示したが、 $500\mu\text{g}/100\text{ml}$ の濃度ではほとんど干渉がみられなかった。なおカドミウム、金、白金の塩化物水溶液をニッケルの水溶液に混和してそのまま原子吸光度計のフレームに噴霧した場合は図 6 の下の図に示すように全く干渉を示さ

なかった。

6. PDC 化と MIBK 抽出時の pH 調整と回収率

ニッケルの PDC 化の反応の至適 pH は 3~6 といわれているが、本法の操作過程で除蛋白上清にアンモニア水を加え、pH を 2.5 に調整して APDC を加え、ついで MIBK を加えて抽出を行うと、各試薬の添加ごとに pH がアルカリ側に変化する。はじめの pH 調整と、その後の pH 変化の関係を実験によって確かめたのが図 7 で、横軸は APDC 添加前の pH をあらわし、縦軸は APDC ついで MIBK を添加した場合に移行したそれぞれの pH をあらわしている。はじめに pH 2 に調整した試料は APDC の添加で pH 2.4 とな

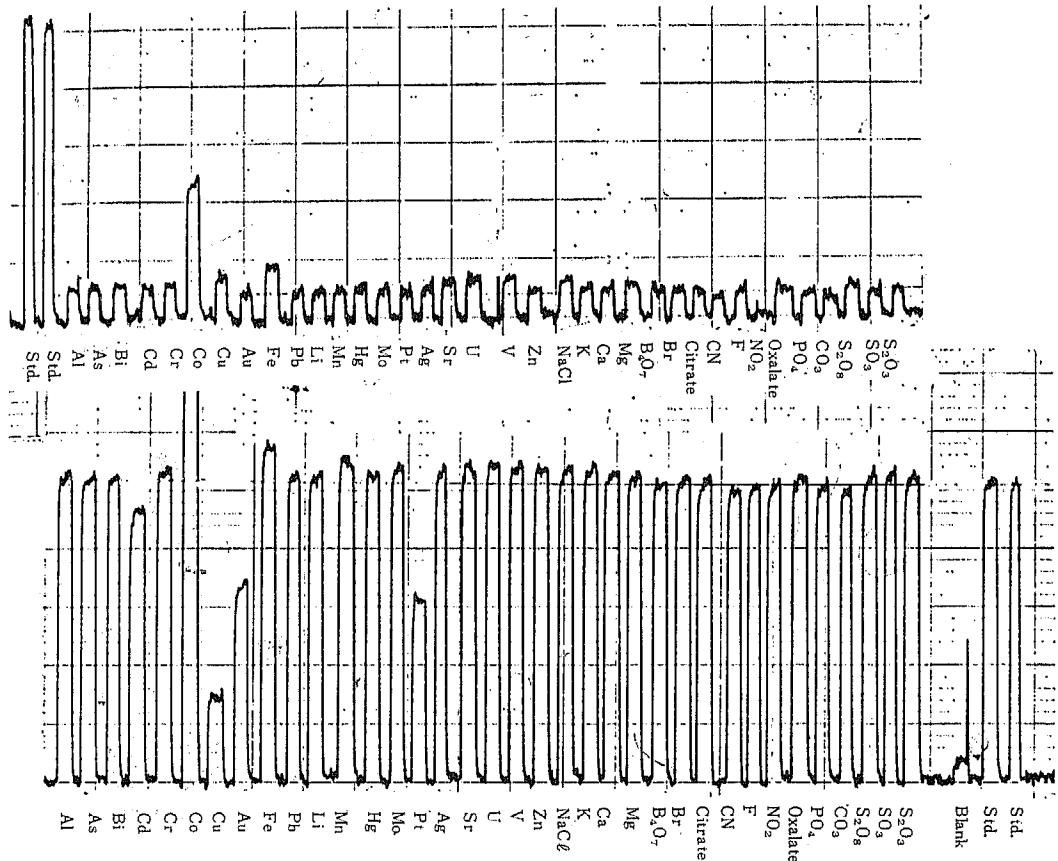


図 5 各種の元素およびイオンの本法に及ぼす影響

$5\mu\text{g}/100\text{ml}$ のニッケル標準液 (Std.) に表 2 の各種元素およびイオンを表に示した濃度に添加して測定した。図の上半がブランク (添加物自体の原子吸光度)、下半が添加実験の成績である。

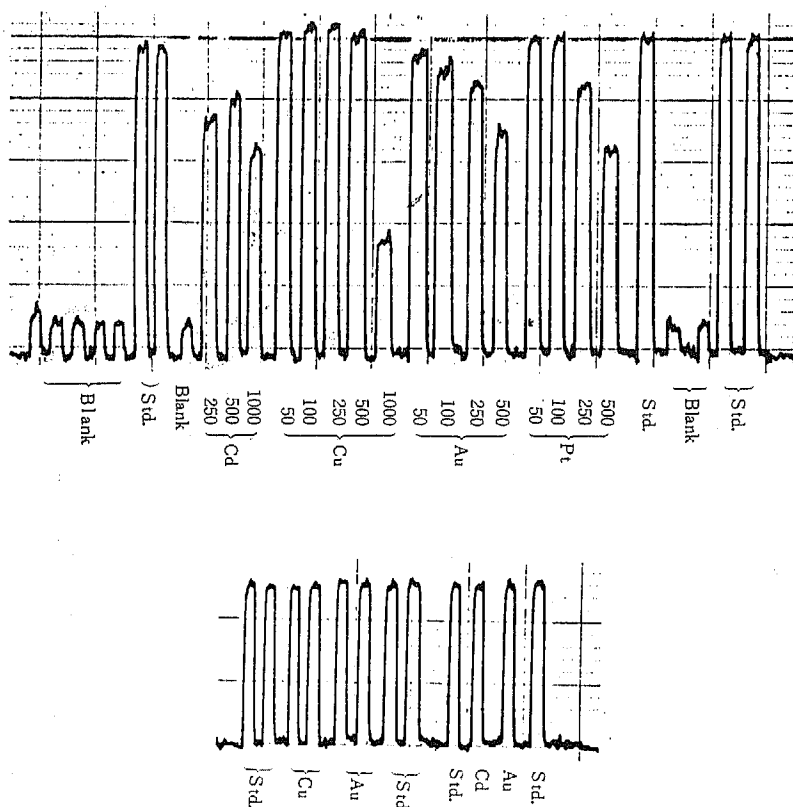


図6 各種濃度のカドミウム、銅、金、白金の本法に及ぼす影響

図の上半は5µg/100mlのニッケル標準液(Std.)およびこれにCd, Cu, Au, Ptを图中数字の濃度(µg/100ml)に添加した試料についてPDC化, MIBK抽出を行ない比較したもので, 下半はニッケル標準液および添加試料を水溶液のまま原子吸光分析したものである。

り, さらに MIBK の添加で pH 4 近くまで上昇している。またこのときの回収率は図の上部に示すごとくはじめの pH 調整が 2.4~2.8 で MIBK 添加後の pH が 4.5~5 のときにもっとも高い回収率を示すことがわかった。

7. APDC の必要量

本法では2% APDC 溶液を2ml 加えることになっているが, その添加量と回収率の関係は1.5ml から3ml の間で全く変化がみられなかった。

8. 血清ニッケル濃度の検知限界(最小検出濃度)と本法の再現性

図8の実測記録図に示すように, 日立-208型原子吸光光度計を用いて本法に従って血清中のニッケル濃

度を測定した場合の検知限界(ノイズレベルの2倍の信号を与える血清ニッケル濃度)はおおよそ1µg/lであり, パーキンエルマー303型または403型で得られた検知限界²⁰⁾0.5µg/lと比較して1/2の感度であった。

また本法による血清ニッケル測定の再現性は表3に示すように23例の血清についておこなった二重測定の結果から計算した変動係数(C.V.)は26.5%であった。

9. 本邦における正常人の血清ニッケルの測定

松本市周辺在住の成人男子10名, 女子14名について測定した血清中のニッケル濃度の範囲は, 2.1±1.1µg/lで, 筆者が先にアメリカ(コネチカット州)でお

こなった調査結果の $2.6 \pm 0.8 \mu\text{g}/\ell$ とほぼ一致する値がえられた。

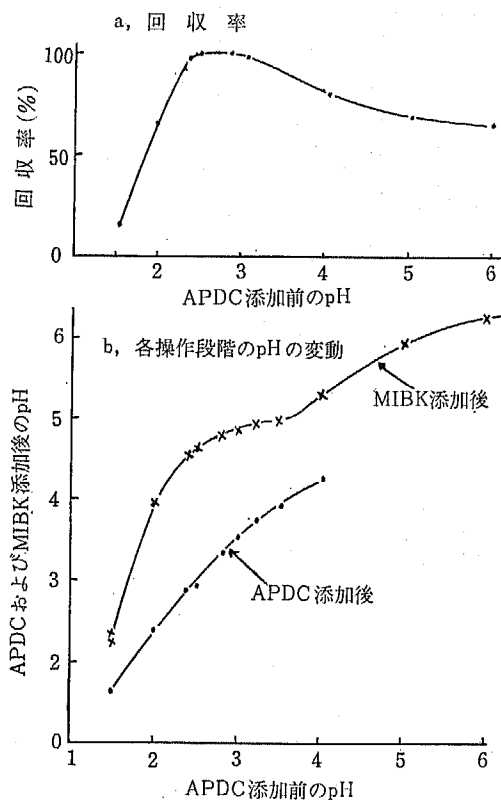


図 7 試料の各種前処理段階における pH の変動と回収率の関係

表 3 松本市および周辺住民の血清ニッケル濃度

試料 No.	実測値 ($\mu\text{g}/\ell$)	平均値 ($\mu\text{g}/\ell$)	試料 No.	実測値 ($\mu\text{g}/\ell$)	平均値 ($\mu\text{g}/\ell$)
1	3.0	2.7	13	1.6	1.6
	2.4				
2	1.5	2.0	14	0.8	0.6
	2.5				
3	5.0	4.8	15	0.9	0.9
	4.6				
4	2.5	2.5	16	0.9	0.9
	2.5				
5	1.4	0.9	17	1.7	2.0
	0.3				
6	2.1	1.9	18	2.1	2.2
	1.7				
7	0.3	0.3	19	1.1	1.6
	0.3				
8	2.6	1.7	20	1.5	1.8
	0.8				
9	4.2	3.6	21	2.6	2.3
	2.9				
10	1.3	1.4	22	4.3	4.1
	1.5				
11	2.6	2.1	23	1.7	2.6
	1.5				
12	4.1	2.9	24	2.8	2.9
	1.6				

平均値 2.1
標準偏差 1.1
二重測定の変動係数 26.5%

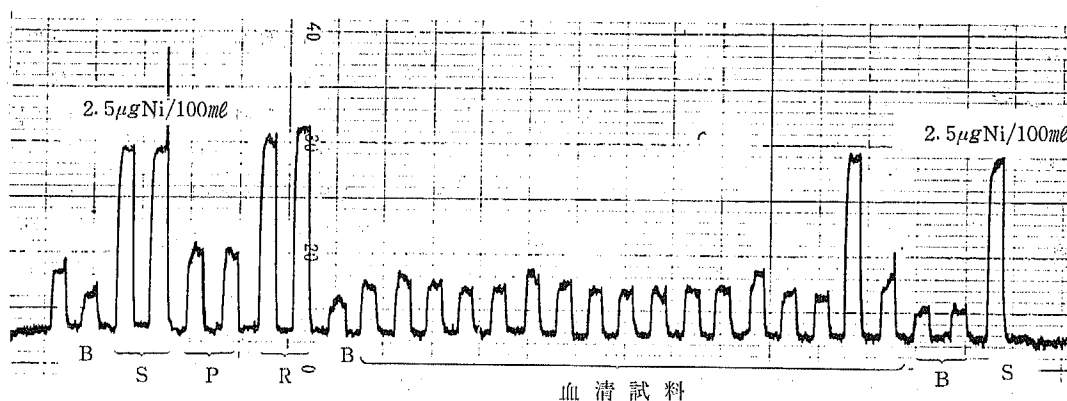


図 8 原子吸光光度法による血清ニッケルの実測記録図

測定は日立-208型原子吸光分光光度計によった。図中 B: ブランク, S: 標準液, P: プール血清, R: プール血清にニッケル $2 \mu\text{g}/100\text{ml}$ 添加した試料 (回収試験) である。

考 察

筆者はニッケルの原子吸光分析における他元素の干渉について生体内に比較的多く存在する鉄、銅、亜鉛のフレイム内でおこる干渉を検討したが、鉄と銅は高燃料炎においてわずかに正の干渉を示し、低燃料炎ではほとんど干渉を示さなかった。このことはおそらくフレイム内でのニッケルの原子化 ($\text{NiO} \rightleftharpoons \text{Ni} + \text{O}$) と他の金属酸化物 (MO) の原子化 ($\text{MO} \rightleftharpoons \text{M} + \text{O}$) の間の競合によるもので、フレイムの温度、共存金属酸化物の自由エネルギーの大きさなども密接な関係をもつものと考えられる。またこれらの元素の干渉はフレイム調整の如何によって変化することをみとめたが前述したように実質的な感度を高めるためにもニッケルの測定におけるフレイムは幾分低燃料炎例を選ぶことが適当であると思われる。

また、本法の化学的処理過程における干渉を多種類の元素やイオンについて検討した結果、カドミウム、金、白金等が $100\mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上存在する場合は著明な負の干渉を示すことを認めた。これらの金属は APDC と反応して PDC 化物になると MIBK にも難溶な沈澱を生じ、その際 Ni-PDC が一部抱合されて沈澱し、抽出されにくくなるために低い値を示すものと考えられる。これらの金属の水溶液をニッケルの水溶液に混和して、そのままフレイムに噴霧した場合には全く干渉を示さなかった。また銅の場合は $1\text{mg}/100\text{ml}$ 濃度の添加で約 40% の負の干渉を示しながら、 $0.5\text{mg}/100\text{ml}$ 濃度の添加では全く干渉がみられないことから、多量の Cu-PDC が生成された場合は抽出時に MIBK が Cu-PDC で飽和に達し、不溶解の Cu-PDC の中に Ni-PDC が抱合されるものと思われる。カドミウム、金、白金については生体試料中に $50\mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上存在することは極めてまれであるから問題はないと思われるが、銅が多量に存在することが予想される試料の場合は抽出に用いる MIBK の量を多くするなどの対策が必要となる。また鉄については実際に全血や臓器中のニッケルを測定する際に脱鉄処理の操作を省略すると著しく回収率が低下することを経験しているが、MIBK 抽出時に Fe-PDC による黒色不溶性残渣がみとめられたことから銅と同じような現象がおこるものと考えられる。

APDC を添加する前の試料の pH 調整は測定操作のうちでもっとも煩雑でかつ汚染されやすい部分であるが、図 7 からも明らかなように測定精度と重要な関係

にあることから慎重に行う必要がある。

パーキンエルマー 303 型または 403 型原子吸光分光々度計と日立-208 型原子吸光分光々度計を用いて血清ニッケルを測定した場合に検出感度の差がみられたが、両者の機構上の主な相異点は、前者の複光束型、光路長 100mm に対して後者が単光束型、光路長 $100\text{mm} \times 2$ (フレイム中光 2 回通過型) であることで、その他の仕様では前者の分散 (逆線分散度) $18\text{\AA}/\text{mm}$ 、スペクトル幅 3.2\AA に対して後者がそれぞれ $6.5\text{\AA}/\text{mm}$ 、 2.4\AA で光学系に若干差がある他はほとんど変化はないと考えられる。複光束型は光源ランプのノイズを打ち消してベースラインをより安定させることができるのに対し、単光束型は光源ランプのノイズがそのままベースラインに現われ、光路長が 2 倍という比較的有利な条件をもつにもかかわらず実質的な感度では劣ることになったものと考えられる。したがって単光束型の場合は複光束型に比較して測定感度が光源ランプの良否に依存する度合いが大きいことから、光源ランプのチェックや選択について十分な配慮が必要である。

つぎに表 4 は過去 17 年間の血清中ニッケルの正常値に関する報告^{26, 33-34}) をまとめたもので、正常値は測定原理と方法の変遷に従って次第に変動巾が小さくなっていることがわかる。もっとも多く用いられている発光分光分析法 (Emission Spectrography)³⁵⁻⁴²) では検知限界が血清中のニッケル含量にようやく達するレベルにあり、共存元素の干渉を除くことが容易でないと考えられることから、正常範囲の広がりも主として測定誤差に由来するものと考えられる。また比色分析法 (Spectrophotometry)³³⁻³⁴) の場合は複雑な操作過程中的ニッケルの汚染と、最終段階で溶媒に抽出したブランクと試料間に透明度の差が生じやすいことなどから、この方法による測定値については若干問題があると考えられる。

しかしながら同じ原子吸光分析法を用いている Shaller らの報告⁴³) と先の筆者らの報告²⁶) および今回の結果の間に表 4 に示すごとく平均値で約 10 倍の差が生じていることは注目すべき点である。原因の一つとして対象となった住民の地域差、すなわちドイツとアメリカ (ニューイングランド地方) または日本の間の生活環境のちがいに由来する血液中ニッケルレベルの変動の可能性が考えられる。しかし McNeely ら⁵¹) がニッケル鉱山のあるカナダの Sudbury (オンタリオ州) の住民とアメリカのニューイングランド地方の住民との血清および尿中のニッケルレベルを比較測定

表 4 各報告者による血清（血漿）ニッケルの正常値

発 表 者	年代	方法	地 域	例数	血清ニッケル濃度 ($\mu\text{g}/\ell$)	
					平均 (SD)	範 囲
Cluett ³³⁾	1956	S	アメリカ	1	12	
Kock ³⁵⁾	1956	E S	〃		30 \pm 19	10 ~ 85
Monacelli ³⁶⁾	1956	E S	〃	12	40	10 ~ 60
Paixao ³⁷⁾	1959	E S	〃	39	23	0 ~ 180
Herring ³⁸⁾	1960	E S	〃	109	60	0 ~ 270
Gofman ³⁹⁾	1964	E S	〃	39		0 ~ 180
Butt ⁴⁰⁾	1964	E S	〃	48		53 ~ 62
Zhernakhova ⁴²⁾	1966	E S	ロシア	154	♂ 55 \pm 28 ♀ 52 \pm 32	
Sunderman ³⁴⁾	1967	S	アメリカ	23	22 \pm 18	1 ~ 73
Schaller ⁴³⁾	1968	AA	ドイツ	26	21 \pm 9	6 ~ 31
Mertz ⁴¹⁾	1968	E S	〃	59	7.8	0.6 ~ 46
Nomoto ²⁶⁾	1970	AA	アメリカ	40	2.6 \pm 0.8	1.1 ~ 4.6
本 報 告	1974	AA	日 本	24	2.1 \pm 1.1	0.3 ~ 4.8

S : spectrophotometry

E S : emission spectrography

AA : atomic absorption spectrometry

し、Sudbury の住民の尿中レベルが約 3.2 倍、血清中レベルは約 1.8 倍であったと報告していることから、生活環境によって血清中ニッケルのレベルがそれほど大きく変動することは考えにくい。一方測定法の原理、実施法などには大きな相異は見出せないが、本報告で検討したように原子吸光光度計のフレームの調整とベースライン用 MIBK の処理の影響などのこまかな操作面にも誤差の要因が存在することがわかる。すなわち図 3 のごとくベースライン用 MIBK と試料を抽出した MIBK の間に含水量の差がある場合はかなり大きな測定誤差を生ずる可能性があり、その程度はフレーム調整の良否に関係する。かりにベースライン調整に使用する MIBK 中の含水量が 0.1%、試料を抽出した MIBK の含水量が 0.4% であり、測定時のフレームの調整が図 3 の中央にあわせてあったとすると 0.8 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ をこえる正の測定誤差を生ずる。また同じ試料でもフレームの調整を図 3 の右端にあわせた場合には測定誤差は逆に負となっておよそ 0.8 $\mu\text{g}/\text{dl}$ に達する。図 3 の実験は単純に MIBK に水を添加して色々な含水量の MIBK 試料を作って行ったものであるが、実際に血清試料の場合にはこれに血清中の塩類やその他の化合物、操作過程で添加した試薬などが溶解し、いっそう複雑な影響を与えることが考えられる。

つぎに本法の化学的操作過程についてはすでに報告した²⁶⁾ように、血清を灰化处理する原子吸光法や比色分析法との比較、回収試験などから、測定法として不適当な点を見出すことができなかった。以上のことから血清中のニッケルはその含量が極めて低く、測定法としてもっとも適していると思われる原子吸光分析を用いても検出限界に近いために、測定法のわずかな相異が結果に大きく影響して、報告者による正常値のくいちがいを生じたものと思われる。測定感度および精度の向上について今後更に慎重な検討が必要である。

総 括

原子吸光分析法による生体試料中のニッケル測定の基礎的条件について検討するとともに松本市周辺住民についてニッケルの正常値を測定し次の結果をえた。

1. 原子吸光分光光度計におけるバーナーの調節は、他金属元素の干渉をさけ、実質的な感度を高めるためには幾分低燃料炎を選定することが必要であった。

2. MIBK 抽出試料を用いる場合はベースライン調整用 MIBK と試料 MIBK との含水量の差が大きな誤差の原因となることがわかった。

3. 試料中ニッケルを PDC 化し、MIBK に抽出す

際の際の pH は回収率に影響し、APDC 添加時 2.4~2.8 の場合が最適であった。

4. 多数の原子やイオンの干渉について検討したが、試料中に金、白金、カドミウムが $100\mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上、銅は $500\mu\text{g}/100\text{ml}$ 以上の濃度に存在する場合は化学的操作過程における干渉により負誤差を生ずることをみとめた。

5. 日立-208 型原子吸光度計を用いた場合の血清ニッケルの検知限界は $1\mu\text{g}/\ell$ で、パーキンエルマー 404 型原子吸光度計の場合に比し感度は約半分であり、血清ニッケル測定の再現性は変動係数で 26.5% であった。

6. 本法により測定した松本市周辺在住の成人男子 10 名、女子 14 名の血清ニッケル濃度は、 $2.1 \pm 1.1\mu\text{g}/\ell$ であり、先に筆者が測定した米国人正常者の場合とよく一致した値がえられた。

7. 以上の結果にもとづいて 1956 年以後の各種の測定法による血清ニッケル濃度の正常値に関する報告と今回の結果との相違について考察を加えた。

文 献

- 1) Berg, R. : Occurrence of unusual elements in foods and human excreta. *Biochem.*, 2, 165 : 461, 1925
- 2) Bertrand, G. and Macheboeuf, M. : Presence of nickel and cobalt in animal tissues. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 180 : 1380-1383, 1925
- 3) Bertrand, G. and Macheboeuf, M. : The relatively high content in the pancreas of cobalt and nickel. *Bull. Soc. Chem.*, 32 : 1646, 1926
- 4) Rathway, F. and Levina, L. : Influence of the salts of nickel and cobalt on certain diabetics. *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 183 : 326, 1926
- 5) McHargue, J. S. : Occurrence of copper, manganese, zinc, nickel and cobalt in soils, plants and animals and their possible function as vital factors. *J. Arg. Research*, 30 : 193, 1926
- 6) Hellerman, L. and Perkins, M. E. : Activation of enzymes. III. The role of metal ions in the activation of arginase. The hydrolysis of arginine induced by certain metal ions with urease. *J. biol. Chem.*, 112 : 175, 1935
- 7) Stock, C. C., Perkins, M. E. and Hellerman, L. : Activation of enzymes. IV. The Jack bean argininolytic enzyme. *J. biol. Chem.*, 125 : 753, 1938
- 8) Hellerman, L. and Sotck, C. C. : Activation of enzymes. V. The specificity of arginase and the non-enzymatic hydrolysis of guanidino compounds. Activating metal ions and liver arginase. *J. biol. Chem.*, 125 : 771, 1938
- 9) Sugai, K. : Studies on protease. VI. The effect of the addition of various salts on the tryptic activity. *J. Biochem. (Tokyo)*, 36 : 91, 1944
- 10) Speck, J. F. : The effect of cations on the decarboxylation of oxaloacetic acid. *J. biol. Chem.* 178 : 315, 1949
- 11) Webster, L. T., Jr. : Studies of the acetyl coenzyme A synthetase reaction. III. Evidence of a double requirement for divalent cations. *J. biol. Chem.* 240 : 4164, 1965
- 12) Nechaev, E. N., and Soroka, V. R. : Correlation between trace elements and enzymic activity of pancreatic juice. *Lab. Delo.*, 6 : 334, 1967
- 13) Cornane, R. H., Spruit, D. and Kuiper, J. P. : Stimulation of enzyme activity in the uterus of the guinea pig by nickel ions. *Acta Physiol. Pharmacol. Neer*, 14 : 443, 1967
- 14) Dixon, H. B. F. : Transamination of protein in the presence of acetate, glyoxylate, and nickel ions. *Biochem. J.*, 103 : 38, 1967
- 15) King, M. V. : Structural role of the metal in crystalline complexes of ribonuclease. *Nature (London)*, 20 : 918, 1964
- 16) Wacker, W. E. C. and Vallee, B. L. : Nucleic acid and metals. I. Chromium, manganese, nickel, iron and other metals in ribonucleic acid from diverse biological sources. *J. biol. Chem.*, 234 : 3257, 1959
- 17) Tol, M. : Role of zinc and nickel ions in ribosome structure. *Biochim. biophys. Acta.* 169 : 564, 1968

- 18) Stephenus, G. A. : An important factor in the causation of industrial cancer. Medical Press, 136 : 194, 1933
- 19) Bridge, J. C. : Annual Report of the Chief Inspector of Factories for the Year 1932. His Majesty's Stationery Office, London, 1933, p. 103
- 20) Sunderman, F. W., Jr. : Nickel carcinogenesis. Dis. Chest, 54 : 41-48, 1968
- 21) Sunderman, F. W., Jr., Selin, C. E., : The metabolism of nickel-63 carbonyl. Toxicol. appl. Pharmacol. 12 : 207, 1968
- 22) Wase, A. W., Goss, D. M. and Boyd, M. J. : The metabolism of Nickel. 1. Spatial and temporal distribution of Ni-63 in the mouse. Arch. Biochem., 51 : 1, 1954
- 23) Smith, J. C. and Hackley, B. : Distribution and excretion of Nickel-63 administered intravenously to rat. J. Nutri. 95 : 541, 1968
- 24) D'Alonzo, C. A. and Pell, S. : A study of trace metals in myocardial infarction. Arch. environm. Hlth., 6 : 381, 1963
- 25) D'Alonzo, C. A., Pell, S., Fleming, A. J. : The role and potential role of trace metals in disease. J. occup. Med., 5 : 71, 1963
- 26) Nomoto, S., Sunderman, F. W., Jr. : Atomic absorption spectrometry of nickel in serum, urine and other biological materials. Clin. Chem., 16 : 477, 1970
- 27) Sunderman, F. W., Jr., Nomoto, S., Pradhan A. M., Levine, H., Bernstein, S. H. and Hirsch, R. : Increased concentrations of serum nickel after acute myocardial infarction. New Engl. J. Med, 283 : 896, 1970
- 28) Sunderman, F. W., Nomoto, S. and Nechay, M. : Nickel metabolism in myocardial infarction : II. Measurements of nickel in human tissues. D. D. Hemphill, Ed. 4 : 325-536, 1971. Univ. of Missouri Press. Columbia, Mo.
- 29) McNeely, M. D., Sunderman F. W., Jr. and Nechay, M. W. : Abnormal concentrations of serum nickel in myocardial infarction, cerebral stroke, burns, hepatic cirrhosis, and uremia. Clin. Chem. 17 : 1123, 1971
- 30) Nomoto, McNeely, M. D., and Sunderman, F. W., Jr. : Isolation of a nickel α_2 -macroglobulin from rabbit serum. Biochemistry 10 : 1647, 1971
- 31) Sunderman, F. W., Jr., Decsy, M. I., Nomoto, S. and Nechay, M. W. : Isolation of a nickel α_2 -macroglobulin from human and rabbit serum. Fed. Proc., 30 : 1274 (Abstr. 1294), 1971
- 32) Kincaid, J. F., Sunderman, F. W., Stanley, E. L. and Beckworth, C. H. : Nickel poisoning III. Procedures for detection, prevention and treatment of nickel carbonyl exposure including a method for the determination of nickel in biological materials. Amer. J. clin. Path., 26 : 107, 1956
- 33) Cluett, M. L. and Yoe, J. H. : Spectrophotometric determination of submicrogram amounts of nickel in human blood. Anal. Chem, 29 : 1265, 1957
- 34) Sunderman, F. W., Jr., : Spectrophotometric measurements of serum nickel. Clin. Chem., 13 : 115, 1967
- 35) Koch, H. J., Jr., Smith, E. R., Shimp, N. F. and Connor, J. : Analysis of trace elements in human tissues. 1. Normal tissues. Cancer, 9 : 499, 1956
- 36) Monacelli, R., Tanaka, H. and Yoe, J. H. : Spectrochemical determination of magnesium chromium, nickel, copper, and zinc in human plasma. Clin. chim. Acta, 1 : 577, 1956
- 37) Paixao, L. M., and Yoe, J. H. : Spectrochemical determination of magnesium, chromium, nickel, copper, and zinc in human plasma and red cells, Clin. chim. Acta, 4 : 507, 1959
- 38) Herring, W. B., Leavell, B. S., Paixao, L. M., Yoe, J. H., : Trace metals in human plasma and red blood cells. Amer. J. clin. Nutr. 8 : 846, 1960
- 39) Gofman, J. W., de Lalla, O. F., Kovich, E. L., Lowe, O., Martin, W., Piluso, D. L. and Upham, F. : Chemical elements of the blood of man, Arch. environm, Hlth., 8 : 105, 1964

- 40) Butt, E. M., Nusbaun, R. E., Gilmour, T. C., Didio, S. L. and Sister Mariano, : Trace metal levels in human serum and blood. Arch. environm. Hlth., 8 : 52, 1964
- 41) Mertz, D. P., Koschnick, R., Wilk, G. and Pfeilsticker, K. : Untersuchungen über den Stoffwechsel von Spurenelementen beim Menschen. 2. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6 : 171, 1968
- 42) Zherenakhova, T. V. : The content of nickel and the Fe/Ni, Cu/Ni, and Ni/Mn coefficients in blood sera of healthy subjects. Lab. Delo. 3/1, 184, 1966
- 43) Schaller, K. H., Kuhner, A. and Lehnert, G. : Nickel als Spurenelement in menschlichen Blut. Blut, 17 : 155, 1968
- 44) Schenk, G. H., Dilloway, K. P. and Coulter, J. S. : Determination of nickel (II) by quenching of the fluorescence of aluminum-1-(2-Pyridylazo)-2-naphthol and direct fluorometric determination of cobalt. Analytical chemistry, 41 : 510, 1969
- 45) Winefordner, J. D. and Vickers, T. S. : Atomic fluorescence spectrometry as a means of chemical analysis, Anal. Chem. 36 : 161, 1964
- 46) Matousek, J. and Sychra, V. : Atomic fluorescence study on iron, cobalt and nickel. Anal. Chem. 41 : 518, 1969
- 47) Holmes, A., Morgan, A. and Sandalls, F. J. : Determination of iron, chromium, cobalt, nickel, and scandium in asbestos by neutron activation analysis. Amer. Ind. Hyg. Assoc. J. 32 : 281, 1971
- 48) McDowell, R. S. : Metal carbonyl vapors ; Rapid quantitative analysis by infrared spectrophotometry. Amer. Ind. Hyg. Assoc. J., 32 : 621, 1971
- 49) Walsh, A. : The application of atomic absorption spectra to chemical analysis. Spectrochem. Acta, 7 : 108, 1955
- 50) 竹内次夫, 鈴木正巳 : 原子吸光分析 (改稿新版), 1972, 南江堂
- 51) McNeely, M. D., Nechay, M. W. and Sunderman, F. W., Jr. : Measurement of nickel in serum and urine as indices of environmental exposure to nickel. Clin. Chem. 18 : 992, 1972

(1974. 5. 9 受稿)