

原 著

生体内ニッケルの測定とその病態生化学的研究

第二編 原子吸光分光光度法による人体諸臓器中の  
ニッケルの測定

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

II. MEASUREMENT OF NICKEL IN HUMAN TISSUES BY  
ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

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

1963年 D'Alonzo ら<sup>1)</sup>は emission spectrometry に  
より血清ニッケルを測定し, 心筋硬塞患者20例中19例  
に明らかな血清ニッケル値の上昇をみとめ, 高ニッケ  
ル血症が心筋硬塞の原因である可能性と心筋からニ  
ッケルの逸脱による可能性を示唆した。

1970年筆者ら<sup>2,3)</sup>は, 正常人および多数の患者につ  
いて血清中ニッケルを測定し, 心筋硬塞発作後12~36  
時間の間にもっとも高値 (正常の約2倍) を示し, 発  
作直後はむしろ正常者に近い値を示すことから高ニ  
ッケル血症の由来を心筋からの逸脱によるものと想定し  
て, 血清ニッケルの測定が心筋硬塞の診断に有用であ  
ることを報告した。

筆者ら<sup>4)</sup>はその後健常者で事故死した人の解剖例に  
ついて臓器中のニッケルを測定し, ニッケルの心筋中  
の含量は全量で平均1.8 $\mu$ g程度で, 全心筋中のニッケ  
ルが血中へ逸脱しても平均0.07 $\mu$ g/100mlの上昇を示  
すにすぎないことから, 心筋硬塞時の高ニッケル血症  
の原因を単純に心筋より由来すると考えることは困難

で, その他の可能性として, 1)心筋硬塞患者の心筋が  
正常者より著しく高いニッケル値を持ち, 発作に伴っ  
て血中に逸脱する, 2)他臓器 (肝, 肺など) 中のニ  
ッケルが血中に動員される, 3)治療による二次的な影響  
で血中にニッケルの上昇をきたすなどの機序を考え  
た。

その後 McNeely ら<sup>5)</sup>は, 心筋硬塞以外にも脳血栓,  
火傷の場合に高ニッケル血症がおこり, 慢性の尿毒症  
及肝硬変症では逆に低値を示すなどの事実を認め, 心  
筋硬塞時の高ニッケル血症は他臓器からの動員による  
と考えるにいたったが, 由来する臓器とその機序につ  
いては不明な点が多く残されている。今回筆者は血中  
ニッケルの動員源となる可能性を持つ臓器の検索を目  
的として, 先に筆者ら<sup>6)</sup>がおこなった心, 肺, 肝に加  
えて腎, 骨組織のニッケル含量を原子吸光法で測定し  
た。

試料および方法

試料は本学第一病理学教室および第二病理学教室の  
解剖例8例と第二外科学教室の手術材料である。

方法-I: 臓器中の総ニッケル含量の測定  
先に報告した筆者らの方法<sup>2)</sup>を若干改良して用いた。

### 試 薬

水はすべて脱イオン再溜水を用いた。硝酸、硫酸、塩酸、チモールブルー、アンモニア水、methyl isobutyl ketone (MIBK) および ammonium pyrrolidone dithiocarbamate (APDC) は和光純薬の試薬特級または微量金属測定用試薬を用いた。

0.1N 硝酸: 硝酸を水で160倍に希釈した。

硝酸・硫酸混液: 臨用時硝酸6容と硫酸1容を混和して作製した。

6N 塩酸: 塩酸を水で2倍に希釈した。

0.1% チモールブルー液: チモールブルー0.1gをエタノール15mlに溶解し、水を加えて100mlにした。

アンモニア水原液: 約30%

希釈アンモニア水: 原液を水で15倍に希釈した。

その他2% APDC液, ベースライン調整用 MIBK, ニッケル標準液などは第一編の血清ニッケルの測定に用いたものと同じである。

### 試料採取法

試料はすべて剖検時できるだけ金属の汚染を避けて採取し、肺、肝、心、腎はメスでそれぞれ4~8gを、骨は胸骨を6~7cm折り取り、プラスチックシャーレに入れ、昼間の場合は直ちに、夜間の場合は翌朝まで冷蔵庫に保存し、測定処理を開始した。

前処理: 骨以外の試料はまず0.1N硝酸を入れたビーカー内で約30秒間、ついで水で約30秒間洗浄した後、酸で脱金属処理したガーゼで水分をよくぬぐい取り、硬質ガラス片で2~4gの大きさに切って秤量し、200ml容三角フラスコに移した。骨試料は、まず約20倍量の水で2時間煮沸して脂肪分および骨周囲組織を除き、外面が乾燥するまで水分を切ってから秤量し、200ml容三角フラスコに移した。別にニッケル標準液0.1μg/mlを200ml容三角フラスコに10ml(2本)、20ml(2本)ずつ採りまた空の三角フラスコ3ケを用意し(盲検用)、これらを検量線用にした。

灰化処理: 各フラスコに硝酸・硫酸混液35mlを加え、キエルダール酸化装置(ガスバーナー式)でゆるやかに加熱した。加熱のはじめは発泡が盛んにおこるからあふれないよう十分注意して火力を調節した。10~20分で試料は溶解して褐色の液状になり次第に発泡がおさまるから、少しずつ加熱を強め液量が2~3mlになるまで濃縮した。この間フラスコ内容は褐色、黒

褐色を経て淡褐色または無色になる。ここで一旦加熱を止め、放冷してから硝酸・硫酸混液2mlを加えて再び加熱を続け、試料が淡黄色透明な液にいたってから更に15分間加熱を続けた。フラスコ内容が褐色または暗褐色の場合は硝酸・硫酸混液1mlの追加と加熱操作をくりかえした。灰化終了時の残存液量は約2mlである。

脱鉄処理: 加熱を止め放冷してから6N塩酸2mlを加え、ゆるく沸騰するまで加熱してから再び放冷し、第二鉄化合物を除くために3mlのMIBKで2回抽出してMIBK層をすて残部を25ml容ガラス製共栓遠心管に定量的に移した<sup>2)</sup>。

ニッケルの抽出: チモールブルー液2滴を指示薬として加え、アンモニア水でpHを2.5にしてから水を追加して液量を15mlにした。ここで上部に層をなしてわずかに残存するMIBKを毛细管ピペットで吸引除去した。APDC液2mlを加えて混和し、続いてMIBK3mlを加えて1分間振盪後約20分間静置して完全にMIBK層が分離してから毛细管ピペットでMIBK層を採取し、原子吸光用小試験管(7×50mm)に移した。この際下部の水層にピペットの先がわずかでも入らぬよう注意した。

原子吸光分析: 第一編の血清中ニッケルの定量的の場合と同一の操作でおこなった。

### 方法-II 骨組織中ニッケルの分画定量

#### 試 薬

方法-Iと同じ。

#### 試 料

脂肪肉腫で、手術により右股関節より切断された63才の女性大腿骨で、骨組織には病理組織学的に異常をみとめなかった。

前処理: 試料は図1に示すように大腿骨頭は半球状に(試料-1)、骨幹部は上部(試料-2)と下部(試料-3)よりそれぞれ約7cmの長さにステンレススチール製のノコギリで切り取り、切り口はノコギリからの金属の影響を少くする目的で直ちに硬質ガラス片でけずり落した。次いで試料-2, 3はポリエチレン製の袋に入れ、硬質のポリエチレン板の間にはさんでハンマーで打ち砕いて1~3gの小片にした。また別に骨髓液をピペットで吸引して採取した。

骨組織からのニッケルの分画抽出: 1, 2, 3の各試料を秤量し、200ml容のコニカルビーカーに移し、各々100mlずつの水で4回それぞれ異なる条件で抽出して各抽出液毎のニッケルと残りの骨組織中のニッケル

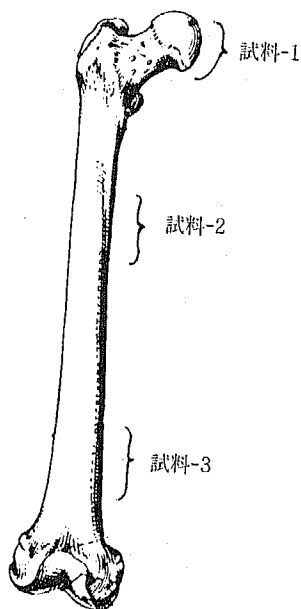


図 1 骨試料の採取部位

の定量をおこなった。すなわち、4°C 24時間 (抽出液-1)、50°C 24時間 (抽出液-2)、100°C 2時間 (抽出液-3)、更に100°C 4時間 (抽出液-4) の

4回で、各回ごとに抽出液を完全に採取し、新たに100mlの水を加えて抽出をくりかえした。以上の抽出操作の終了後残りの骨組織はよく水を切り、セロファンでおおって冷蔵庫内で乾燥してから秤量し、残存するニッケルの定量をおこなった。

ニッケルの定量：抽出液1, 2, 3, 4はそれぞれ約20mlまで加熱濃縮してから2分し、第一編血清ニッケルの測定法の操作によりニッケルを定量し、はじめの骨試料の100g当りのニッケル含量 $\mu\text{g}$ で表現した。残りの骨組織および骨髓液は、試料を2つまたは5つに分けて前述の臓器中ニッケルの定量法と同様の操作で重複測定し、はじめの骨重量100g当りの含量 $\mu\text{g}$ で表現した。

実験結果

各種組織中の総ニッケル定量は表1に示すごとくで、生組織重量100g当り肺は4.8~22.1 $\mu\text{g}$ 、平均11.9 $\mu\text{g}$ 、肝は0.71~1.09 $\mu\text{g}$ 、平均0.8 $\mu\text{g}$ 、心筋は0.44~0.93 $\mu\text{g}$ 、平均0.66 $\mu\text{g}$ 、腎は0.68~1.82 $\mu\text{g}$ 、平均1.05 $\mu\text{g}$ 、骨は19~64 $\mu\text{g}$ 、平均33 $\mu\text{g}$ で、骨にもっとも高くついて肺、腎、肝、心の順であった。

骨組織からのニッケルの分画抽出の結果は表2に示すごとくで、4°Cで水に溶出するニッケル化合物はい

表 1 人体各種組織中のニッケル量

試料 No.	剖検 No.	年 令	性	病 名	ニッケル量 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ 生組織)				
					肺臓	肝臓	心臓	腎臓	骨
1	2835	60	♀	結核性髄膜炎	10.4	0.88	0.72	1.1	34
2	2838	48	♂	食道癌	8.1	0.71	0.44	0.69	19
3	2839	46	♀	子宮頸部癌	4.8	0.73	0.58	1.48	27
4	2841	40	♂	筋萎縮性側索硬化症	13.2	0.58	0.67	0.92	36
5	2842	58	♀	胃痛	12.1	0.61	0.49	0.68	—
6	2843	55	♂	肝硬変・肝癌	13.4	1.09	0.86	1.82	64
7	2847	49	♀	肝癌	10.9	0.83	0.57	0.96	29
8	2855	72	♀	胆道癌	22.1	0.96	0.93	0.77	24
平均					11.9	0.80	0.66	1.05	33
1*		44	♂	刺傷	2.4	0.52	0.62		
2*		40	♀	バルビタール中毒	2.2	0.86	0.57		
3*		18	♂	絞首	0.81	0.76	0.43		
4*		22	♀	一酸化炭素中毒	0.96	1.32	0.83		
平均*					1.59	0.87	0.61		

\*: Sunderman-Nomoto-Nechay の報告<sup>3)</sup>による事故死例の測定値と平均値

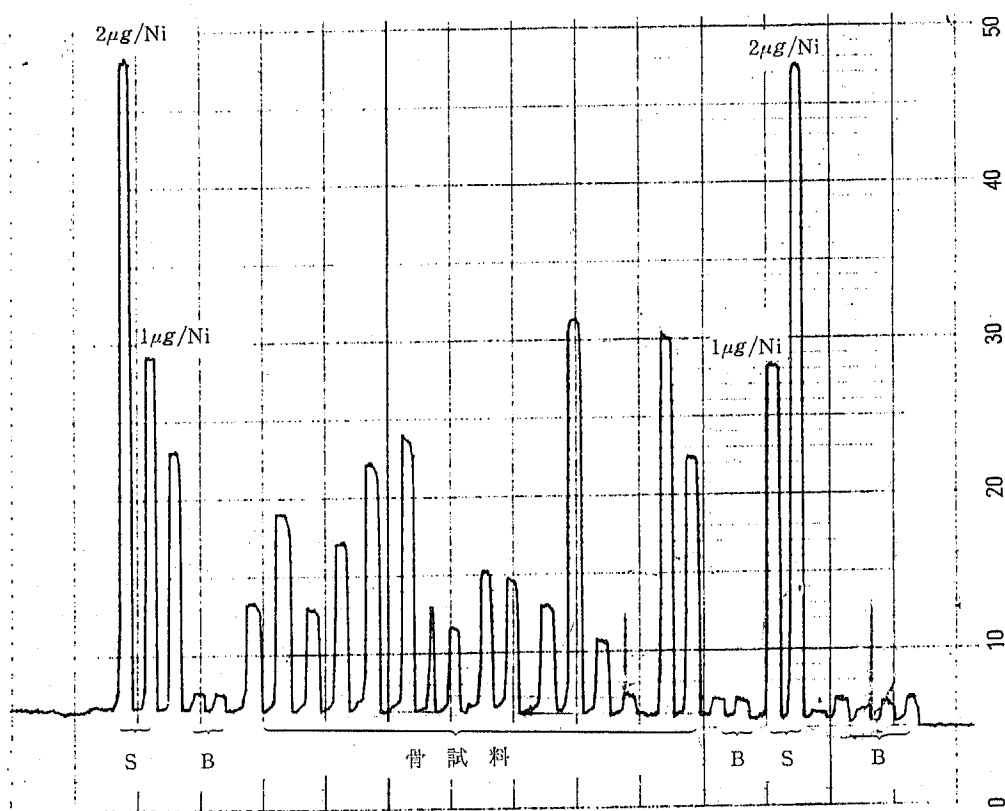


図 2 骨組織中ニッケルの実測記録図

測定は日立-208型原子吸光分光光度計によった。

B: ブランク, S: 標準液 (1 $\mu$ g, 2 $\mu$ g) である。

骨試料は方法-1 (割検例) によるもので、それぞれ重量の異なる試料を最終的に3mlのMIBKに抽出し測定した。

表 2 骨組織および骨髓液中のニッケル含量

試料採取部位 および重量 (g)	水による抽出処理液				残 部 (緻密骨部)	総 量
	4°C 24時間	53°C 24時間	100°C 2時間	100°C 4時間		
ニッケル $\mu$ g/100g 原骨試料						
骨 頭 部 (試料-1) 36 → 19*	0.2	1.4	2.1	4.4	11.5	19.6
骨 幹 部 (試料-2) 31 → 29*	0.2	0.3	0.6	0.3	30.0	31.4
骨 幹 部 (試料-3) 61 → 56*	0.3	0.6	0.4	0.4	26.8	28.5
骨 髓 液						9**

\*: 左側数字は原試料重量, 右側数字は抽出処理後の試料重量

\*\* :  $\mu$ g Ni/100ml 骨髓液

ずれの試料からもわずかであったが、50°~55°C および 100°C の抽出では骨頭部からの溶出が著明で合せて 8 $\mu$ g/100g であった。これに対して骨幹部試料からの溶出はわずかで、各抽出液を合せても 1.4~1.7 $\mu$ g にすぎなかった。しかしながら残りの骨組織中のニッケル量は骨幹部に多く 26.8 $\mu$ g または 30 $\mu$ g/100g であった。また水に溶出した部分と骨に残った部分を合せた場合は試料-2 がもっとも高く、31.4 $\mu$ g/100g で、骨頭部は 19.5 $\mu$ g/100g で、骨幹部のおよそ 2/3 であった。

骨髄液中含量は 9 $\mu$ g/100g で他組織、血液などに比較してかなり高い値が得られた。

### 考 察

ニッケルの測定時、血清中のニッケルを対象とする場合には試料採取時の金属汚染の可能性はそれほど大きなものではなく、採血針と容器だけの問題にとどまる。しかし解剖例からの臓器を試料とする場合は、金属汚染はかなり複雑であって解剖に当たった医師の理解と協力が必要である。今回の試料も金属汚染について十分な配慮のもとに採取されたものであるが、さらに 0.1N 硝酸による前処理(外面の洗浄)をおこなった。この操作によって一部組織表層部からの溶出やニッケルの存在様式の変化が考えられるが、外部からのニッケル汚染量の大きさと比較した場合、表層部での変化はやむをえないと判断した。

骨組織に水で煮沸する前処理を加えるようにしたのは、同一個体から採取した試料でも採取部位によって著しくニッケル値が異なり、その原因が試料に附着している骨周囲組織(筋肉組織等)および骨内部の脂肪含量の差異によることをみとめたため、この前処理によって重複測定の差を小さくすることができた。なおよく脱脂した骨試料を塩酸で加熱溶解し、PDC 化と MIBK 抽出をおこなった場合も完全な灰化処理による測定結果と有意の差をみとめなかった。したがって緻密骨を対象としてニッケルを測定する場合は、試料の 10 倍量の 6.5N 塩酸で加熱溶解して直ちに pH を調べ PDC 化と MIBK 抽出をする方法が利用できる。なおこの場合はヘモグロビンからの鉄の遊離がわずかであるため煩雑な脱鉄処理も不要である。本実験の結果を先に筆者らが健常者で事故死した例についておこなった結果<sup>9)</sup>(表 1・下)と比較してみると、心、肝については両者はほとんど一致しているが、肺については今回の方が高く平均値で先回の約 7.5 倍の値を示

している。今回の症例の大部分が癌による死亡例であることなどから肺における高ニッケル値の原因を何らかの病態生化学的要因と関連して考えることも必要であるが、表 1 のように、年齢に伴って高くなる傾向が見られることは外部からの吸入と蓄積による可能性をつよく示唆するものと思われる。なお肺のニッケル含量と他臓器のそれとの間には全く相関が見られなかった。

ついで腎に若干高い傾向が見られたことから生理的な機能を持ったニッケル化合物がより多く腎に存在している可能性が考えられるが、腎が血中ニッケル排泄のもっとも大きな経路になっていること<sup>10)</sup>と関連して考えることもできよう。他の金属では亜鉛、カドミウムなども腎皮質部に多く存在することが知られている<sup>11)</sup>。

今回の実験から骨組織に高いニッケル含量がみとめられ、またその存在様式についても興味ある成績がえられた。低温の水への溶出がほとんど見られなかったことから、骨組織中のニッケルは低分子のアミノ酸などと結合した透析性のものではないと考えられ、また骨頭部のように内部が海綿状構造を有し、骨髄液成分を多く保持している部分から、高温の水抽出で比較的少量のニッケルが溶出されたこと、骨髄液中にニッケルが比較的高濃度に存在することから、この部分に高分子の蛋白に結合した形で存在しているものと思われる。また緻密骨部のニッケルについては、他のミネラルと同様安定した形で蓄えられており、ここから必要に応じて骨髄へ供給される可能性も考えられる。

今回の実験目的は心筋硬塞などに見られる高ニッケル血症の原因を他臓器からの動員と仮定して、由来臓器と機序を検索しようとしたものであるが、前述のように骨組織にニッケル含量が著しく高いことをみとめ、骨髄液中にも血清のおよそ 20 倍量のニッケルが存在することがわかった。これを心筋硬塞、脳血栓、火傷などにみられる高ニッケル血症とただちに関連させることはむずかしいが、今後さらに各種臓器のニッケル含量とその存在様式を追及し、高ニッケル血症の解明への努力を続けたい。

### 総 括

心筋硬塞その他の高ニッケル血症の由来臓器の検索を目的として剖検例および手術材料より得た人体試料中肝、肺、腎、骨、骨髄について原子吸光分光分析によりニッケル含有量を測定し、次の結果を得た。

1. 臓器別では骨組織にもっとも高く (19~64  $\mu\text{g}/100\text{g}$ , 平均 33 $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), 次いで肺, 腎, 肝, 心の順であった。

2. 骨組織中のニッケル含量は緻密骨部に高く, 水に溶出され難い形で存在し, 骨髓液中には血清の約20倍量存在した。

3. 今回の結果を筆者らが先に報告した米国における急死例の分析と比べると, 肝, 心ではほとんど差がみられないが, 肺については明らかに高値であり, 年齢に従って高くなる傾向が見られた。

#### 謝 辞

本研究に際して各種臓器試料について御配慮いただいた河合博正教授 (第一病理学教室), 那須毅教授 (第二病理学教室), 降旗力男教授 (第二外科学教室), 丸山雄造助教授 (中央検査部) に謝意を表す。

#### 文 献

- 1) D'Alonzo, C. A. and Pell, S.: A study of trace metals in myocardial infarction. Arch. environm. Hlth., 6 : 381, 1963
- 2) Nomoto, S. and Sunderman, F. W., Jr.: Atomic absorption spectrometry of nickel in serum, urine, and other biological materials. Clin. Chem., 16 : 477, 1970
- 3) 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
- 4) Sunderman, F. W., Jr., Nomoto, S. and Nechay, M. W.: Nickel metabolism in myocardial infarction. II. Measurements of nickel in human tissues. in "Trace substances in environmental health", (D. D. Hemphill, ed.), 4 : 352, 1971
- 5) 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
- 6) Van Soestbergen, M. and Sunderman, F. W., Jr.:  $^{63}\text{Ni}$  complexes in rabbit serum and urine after injection of  $^{63}\text{NiCl}_2$ , Clin. Chem., 18 : 1478, 1972
- 7) Nomoto, S., McNeely, M. D., and Sunderman, F. W., Jr.: Isolation of a nickel  $\alpha_2$ -macroglobulin from rabbit serum. Biochemistry, 10 : 1647, 1971
- 8) Koch, H. J., Jr. and Smith, E. R.: Analysis of trace elements in human tissues. I. Normal tissues. Cancer, 9 : 499, 1956

(1974. 5. 9 受稿)