

原 著

生体内ニッケルの測定とその病態生化学的研究

第三編 放射性ニッケルによるニッケロプラスミンの
生体内標識とその分離・同定について

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

III. IN VIVO LABELLING AND SEPARATION OF NICKELOPLASMIN
IN RABBIT SERUM WITH ITS IMMUNOLOGICAL STUDY

Shozo NOMOTO

Central Clinical Laboratories, Shinshu University Hospital

(Director: Prof. Masamitsu KANAI)

Key words: ニッケル (nickel), α_1 -マクログロブリン (α_1 -macroglobulin), 金属結合蛋白 (metalloprotein), ニッケロプラスミン (nickeloplasmin), 放射性ニッケル (radioactive nickel, ^{63}Ni)

緒 言

筆者ら¹⁾は先に血中ニッケルの存在形式を明らかにするために、血中ニッケルの濃度が高く手頃な実験動物としてウサギを用い、原子吸光分光光度法によるニッケル測定を指標として分析し、ウサギ血清中ニッケルは低分子性(透析性)ニッケル、アルブミン結合性ニッケルとマクログロブリン結合性ニッケルの3種類の形で存在することを明らかにした。またニッケル結合マクログロブリンについては各種の蛋白分画法によってほぼ単一成分にまで分離精製し、これをニッケロプラスミン (Nickeloplasmin) と命名した。その後 Sunderman ら²⁾はほぼ同様の方法で人血清からニッケロプラスミンの精製を試み、その存在を確認している。

ウサギ血清中のニッケロプラスミンは分子量約70万で α -マクログロブリン分画に属し、Schiff 反応陽性で glycoprotein の一種である。また本蛋白は一分子当りニッケルを約 1g 原子結合している。ニッケロプ

ラスミンは Himmelhoch ら³⁾によってはじめてヒト血清中に存在をみとめられたニッケル含有金属蛋白と同一のものと考えられ、また Parisi ら⁴⁾により分離されたヒト Zn- α_2 -macroglobulin と似ているが、これとは別種の金属蛋白である¹⁾。

ニッケロプラスミンはウサギおよび人血清中ニッケルのそれぞれ44%, 26%をしめ^{1,5)}血中ニッケルの運搬や生理的機能に重要な役割をもつものと考えられる。従って放射性ニッケルを利用してニッケロプラスミンの代謝回転を明らかにすることは重要な意義もっている。

Van Soestbergen ら⁶⁾は $^{63}\text{NiCl}_2$ の静脈内一回大量投与後の血中および尿中ニッケルの動態を追及し、血中 ^{63}Ni は大部分アルブミンと結合し、一部透析性ニッケルとして存在するが、ニッケロプラスミンにはほとんど標識されないことを報告している。

今回筆者は $^{63}\text{NiCl}_2$ をウサギ静脈に連日投与し、ニッケロプラスミンの標識化を試み、またニッケロプラスミンの分離・同定などについても2, 3の知見を加

えたので報告する。

実験方法

4匹のニュージールランド産白ウサギ(体重3.4~3.6 kg)を Purina laboratory rabbit chow と新鮮野菜により飼育し、比放射活性 5.96 mCi/mg Ni (New England Nuclear Corp.) を体重 kg 当り 1日 4.5 μg Ni (2.6 μCi) ずつ 4羽のウサギにそれぞれ14日間(2羽)、16日間(1羽)、21日間(1羽)連日投与した。投与法は $^{63}\text{NiCl}_2$ の必要量を生理食塩水 (pH 7.0) (1ml 前後) に加え耳静脈より注入した。

最終の $^{63}\text{NiCl}_2$ 静注後24時間して反対側の耳静脈から約20ml採血して直ちに血清を分離し、各ウサギ血液について別々に以下の実験を行なった。なお採血から蛋白の分画終了まではコールドルーム内で3日以内に行なった。実験に使用した水、各種試薬、ガラス器具、透析膜などについてはニッケルの汚染をさけるために前報¹⁾と同様の処理を行なったものを使用した。

Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー: Sephadex G-200 (medium mesh, Pharmacia Fine Chemicals Inc.) を内径 2.5cm, 高さ 75, 85cm の A, B 2本のカラムに上向きにセットし、溶出には 0.1M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4 を使用した。各カラムは Sephadex G-200 の充填時および再使用前には溶出緩衝液で一昼夜洗浄を行なった。血清添加量は 3ml, 流速は毎時 12~14ml で、溶出液は Gilson 社の分光光度計で 280nm の吸収をモニターしたのち 3ml ずつ分画採取した。カラム A によるクロマトグラフィーは ^{63}Ni のピークの所在部位を知るためのパイロットとして使用し、これを指標としてカラム B によるクロマトグラフィーの溶出液中 ^{63}Ni の最初のピークに相当する部分をプールした (9~12ml)。これを PM-10 セルロースメンブランをつけた Amicon 社限外濾過装置 MC-8 型により約 1.5ml に濃縮した。

DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィー: DEAE-セルロース (fine mesh, 吸着容量 0.95 meq/g, Sigma Chem. Co.) を 1.5×22cm (bed volume 39ml) のカラムに充填し、0.25M Tris-HCl 緩衝液 pH 8.6 で 2 昼夜洗浄して用いた。また再使用前は 1M Tris-HCl 緩衝液 pH 8.6 で 18 時間ついて 0.25 M Tris-HCl 緩衝液で 6 時間洗浄した。Sephadex G-200 クロマトグラフィー後のプールの濃縮試料 1.5 ml を添加し、Tris-HCl 緩衝液, pH 8.6 を 0.25M から 1.0M までの直線的濃度勾配により総量 200ml を用

いて溶出した。流速は毎時 16ml で、4ml ずつ分取した。

ポリアクリルアミドディスク電気泳動: 装置は Canalco 社製品を使用し、4% および 5% ゲルを用いて行なった。緩衝液は 0.025M Tris-glycine, pH 8.6 で、電圧 100V, 泳動時間 1 時間とした。染色は comassie blue による Weber-Osborn の方法²⁾を用いた。

免疫電気泳動: スライドガラス法により 1% Noble agar を用いて行なった。緩衝液は 0.05M バルビタール緩衝液, pH 8.6 を使用した。抗血清には抗ウサギ全血清ウマ血清 (Kallstadt Lab. Inc.), 抗ウサギ ($\alpha_1 + \alpha_2$) マクログロブリン ヤギ血清 (Dr. B. H. Berne より供与), 抗ウサギ α_2 マクログロブリン ヤギ血清 (同上) を用いて行なった。

^{63}Ni の放射能測定: Beckman 社のシンチレーター (1ℓ 中に butyl-PPD [2-(4-t-butylphenyl)-5-(4-biphenyl) 1, 3, 4-oxadiazole] 8g と "Biosolve No. 3" 150ml を溶解したもの) 12ml 入りのバイアル瓶に原血清の場合は 0.1ml を、クロマトグラフィー分画液の場合は 2ml を加え、22°C の室温に 10 時間放置後、Beckman 社の液体シンチレーションスペクトロメーター LS-100 型により測定した。計数効率³⁾は $^{63}\text{NiCl}_2$ 内部標準法で測定した。計数誤差は ±5% である。

実験結果

1. $^{63}\text{NiCl}_2$ の血中濃度: $^{63}\text{NiCl}_2$ 4.5 μg/kg/日を 14~21 日間連日静脈内投与し、24 時間後のウサギ血清中 ^{63}Ni 濃度を ^{63}Ni の比放射活性から計算した値は 1.9~3.3 μg/l, 平均 2.4 μg/l で先に報告した¹⁾ウサギの平均血清ニッケル濃度 9.3 μg/l の約 1/4 であった。

2. Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィーによる血清 ^{63}Ni 含有成分の分離: 図 1 に示すように ^{63}Ni 含有成分は 3 分画に分離され、第 1 分画はカラムの void volume に近い第 70 番目から 76 番目のフラクションに存在するマクログロブリンに結合している成分で、血清の ^{63}Ni 総放射活性の 0.8~1.4%, 平均 1.2% に相当している。第 2 分画は第 96 番目から 140 番目のフラクションにみとめられる成分で、アルブミン結合性 ^{63}Ni によるものであり、血清総放射活性の 88~95%, 平均 92% に相当している。第 3 分画はカラムの bed volume のあとに溶出する成分で、第 192 番目から 216 番目のフラクションにみとめられる。これは限外濾過性の ^{63}Ni の含有分画で、血清総放射活

性の4.1~10.5%, 平均6.5%に相当している。

3. DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製: Sephadex G-200 クロマトグラフィーの第1分画を濃縮後 DEAE-セルロースカラムクロマトグラフィーで分離した結果は図2のごとくで、 ^{63}Ni の含有分画は1つのピークとして第17番目から20番目のフラクションにみとめられた。このうち第18番目の

フラクションのディスク電気泳動所見は図3に示すごとくで、先に報告したニッケロプラスミンと同様に単一の蛋白帯としてみとめられた。

4. 精製ニッケロプラスミンの免疫電気泳動による分析: 精製ニッケロプラスミンの各種抗血清による免疫電気泳動所見は図4に示すごとくで、抗ウサギ($\alpha_1 + \alpha_2$) マクログロブリン抗体との間に単一の沈

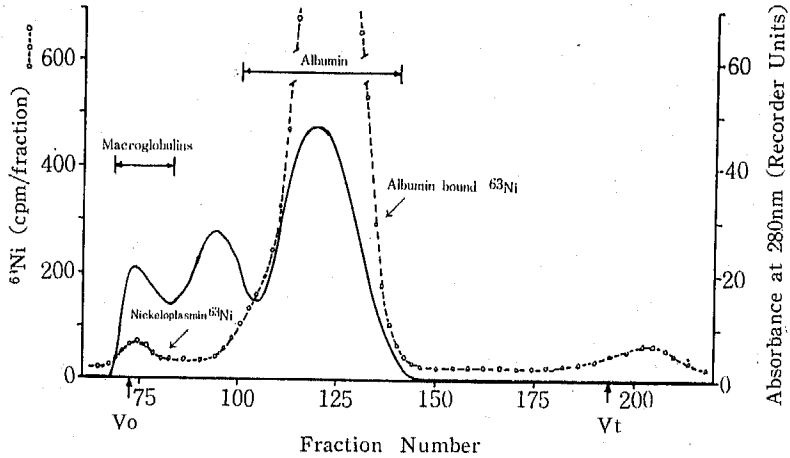


図1 セファデックス G-200 カラムクロマトグラフィーによるウサギ血清の分画と放射能測定による ^{63}Ni の分布

Vo: void volume
Vt: bed volume

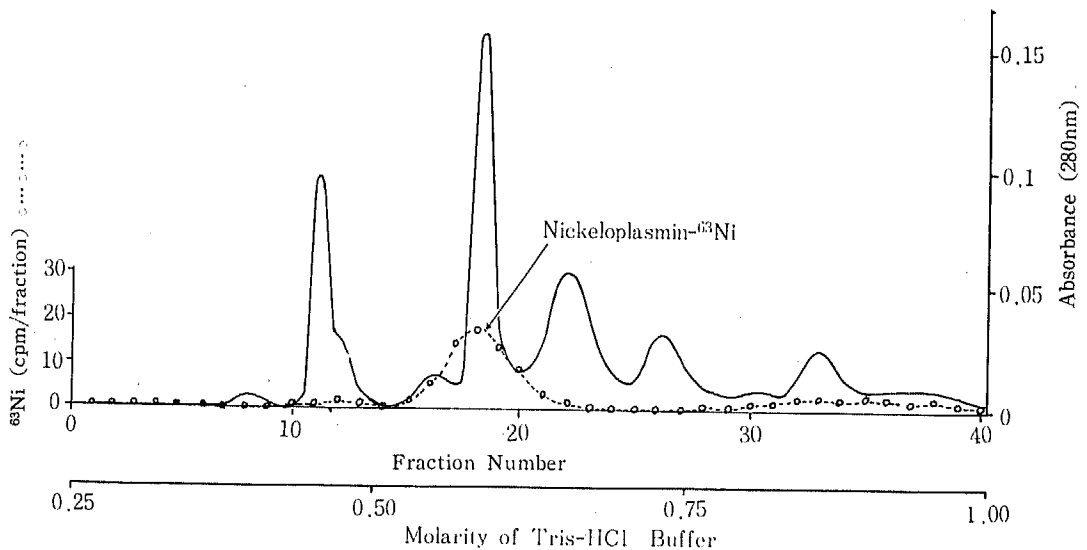


図2 DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーによるニッケロプラスミンの分離および放射能測定による各分画中の ^{63}Ni の分布

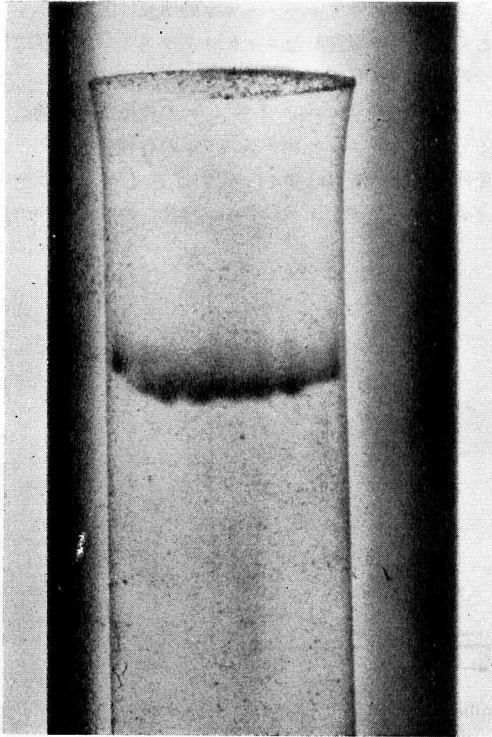


図 3 ニッケロプラスミンのディスク電気泳動像

DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーにより分離したニッケロプラスミン分画(図2フラクション18)をディスク電気泳動により分析した。

降線を形成し、抗 α_2 -マクログロブリン抗体とは全く反応していないことから、ウサギ血清中のニッケロプラスミンは α_1 -マクログロブリンに属するものと判定された。

考 案

さきに筆者ら¹⁾が行なったニッケロプラスミンの分離精製においては各種の分画試料中のニッケルを原子吸光分析法により測定したが、検出感度と試料中ニッケル含量の関係から1回の実験に約 150ml のウサギ血清が必要であった。今回の ^{63}Ni の放射能測定を指標とした分離操作では血清量は 6ml で十分であり、したがって個々のウサギからの採取試料について別個に実験を行なうことができ、また精製操作の簡易化が可能であった。以下本実験の結果から、ニッケロプラスミンを中心とした生体内ニッケルの動態について考察してみよう。

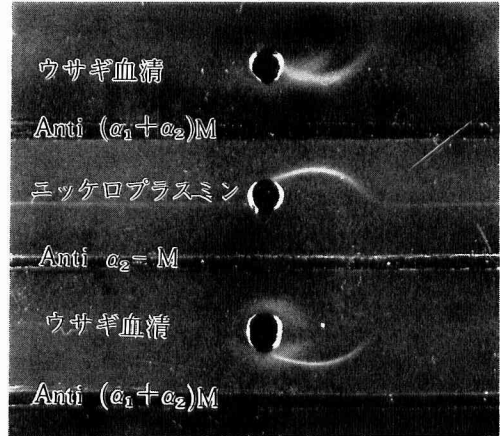


図 4 ニッケロプラスミンの免疫電気泳動像

写真の右側が陽極で、上と下の穴はウサギ血清、中央の穴はニッケロプラスミン分画 (DEAE クロマトのフラクション18)、上と下の溝に抗 ($\alpha_1 + \alpha_2$) マクログロブリン血清、中央の溝には抗 α_2 マクログロブリン血清を加えた。

1. ニッケロプラスミンの標識と体内ニッケル代謝について：ウサギおよびヒト血清中のニッケルの存在様式は前述のごとく透析性ニッケル、アルブミン結合性ニッケルとニッケロプラスミン結合ニッケルの3成分に分けられ、これらはウサギでは血清ニッケルのそれぞれ16%、40%、44%に相当し¹⁾、人血清では40%、34%、26%に相当している⁵⁾。したがってニッケロプラスミンは血中ニッケルの主要な担体の1つとしてニッケルの運搬や生理活性に重要な役割をもつものと考えられる。筆者ら¹⁾は血清に *in vitro* で NiCl_2 を平衡透析により添加した場合は大部分アルブミンと結合し、ニッケロプラスミンには全く結合しないことをみとめた。また Van Soestbergen ら⁶⁾ はウサギに $^{63}\text{NiCl}_2$ を 0.24mg/kg 一回静脈内投与し、経時的に ^{63}Ni の動態を追及し、24時間後の血中には投与量の2%のみが存在し、この90%がアルブミンと結合し、約10%が透析性であるが、ニッケロプラスミン分画にはほとんどみとめられないことを報告している。今回の 4.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 毎日2~3週間連続静脈内投与実験でも最終投与後24時間後の血清中の ^{63}Ni は 2.4 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ でウサギの生理的ニッケル濃度 9.3 $\mu\text{g}/100\text{ml}$ の 1/4 程度であり、また血中 ^{63}Ni の大部分がアルブミン結合性で、ニッケロプラスミンには約1%が検出されたのみである。これを分子量70万のニッケロプラスミン1分

子中のニッケルとして計算すると、 ^{63}Ni としては $8 \times 10^{-3}\text{g}$ 原子であり、ニッケロプラスミン1分子の結合ニッケル量0.829原子の約1%にしかすぎない。なおこの計算に当ってニッケロプラスミン量は280nmの吸光度から求め、ニッケロプラスミン中の総ニッケル含量についてはこの場合試料が微量で原子吸光分析による直接測定が不可能なため、さきに筆者ら¹⁾が報告したニッケロプラスミンのニッケル結合比をそのまま用いた。このように ^{63}Ni によるニッケロプラスミンの生体内標識化が困難である原因を体内ニッケル代謝と関連して考察してみよう。

ヒトおよび各種動物に溶解性のニッケル塩として投与されたニッケルはすみやかに、きわめて能率よく体外に排泄されることが知られている。すなわち、Sundermanら⁸⁾はラットに $1\text{mg}^{63}\text{NiCl}_2/\text{kg}$ 静脈内投与し、24時間に尿中に87%、4日間に尿中に平均90%、糞中に平均3%が排泄されたとしている。Smithら⁹⁾は体重平均218gのメスラットに $0.74\mu\text{g}^{63}\text{Ni}$ および $1.47\mu\text{g}^{63}\text{Ni}$ を塩化物として静注し、経時的に血中、尿中、各種臓器中の ^{63}Ni の動態を追及し、3日間に尿中に60%以上、糞中に6%以下が排泄され、48時間後には血中に放射活性をみとめず、また72時間後には腎以外の諸臓器中に有意の放射能の残存をみとめず、腎の放射活性は含有尿に由来するものであろうとしている。

Van Soestbergenら¹⁰⁾はウサギに $0.24\text{mg}/\text{kg}$ 静脈投与後約80%が1日尿中に、数%が胆汁中に排泄されることを報告している。ヒトにニッケルを経口投与した場合はほとんど吸収されず、90%は糞中に6%が尿中に排泄され¹⁰⁾、また人の生理的条件では糞中排泄がニッケルの体外排泄の主なルートをなしている¹¹⁾。以上の体内投与ニッケルのすみやかな体外排泄はニッケロプラスミンの標識化のむずかしい1つの理由であろう。

つぎに血中ニッケル濃度は動物種によりかなり異なるが、それぞれの動物種では比較的狭い範囲内にあり、またヒトでは出生より老人にいたるまで変化が少なく、性差や妊娠による変動もみられない¹²⁾が、その恒常性の機序にはニッケロプラスミンが重要な関係をもっていると考えられる。現在ニッケロプラスミンの代謝についてはほとんど解明されていないが、 ^{63}Ni の連続投与によっても標識化の少ないことから、血中のニッケロプラスミンに結合したニッケルと投与した ^{63}Ni の交換がおこらないとすればニッケロプラスミン

はturn-over rateのきわめてゆるやかな蛋白と考えるか、あるいはその合成にさいして利用されるニッケルの供給源(プール)と血中ニッケルとの交換がきわめておそく複雑な機序が関係するものと考えられる。この点について極めて興味ある報告としてVan Soestbergenら⁸⁾はウサギ血清中の透析性ニッケルはSephadex G-25で5分画に分離されるニッケル低分子複合体として存在し、遊離のニッケルはほとんどなく、そのうち3分画は尿中にも排泄されることから、低分子性のニッケル複合体は血液から細胞外液へのニッケルの運搬や尿中排泄に重要な役割をもつものと考えている。今後これらニッケル低分子複合体の構造、性質、機能などの研究によってニッケロプラスミンへの血中ニッケルの取込の機序が明らかになるものと期待している。

生体内ニッケルの生理的意義については現在不明の点が多いが、Nielsenら¹²⁾によりニワトリによるニッケル欠乏症の実験が行なわれ、踝関節の腫脹、脚部の皮膚炎、肝脂質の減少とトレーサーとして投与した ^{63}Ni の肝、脾、大動脈への蓄積がおこるとされている。Sundermanら¹³⁾の追試では脚症状はおこらないが、血中および肝のニッケル濃度の有意の低下と肝細胞の粗面小胞体の拡張がみられている。このようなニッケル欠乏動物を利用して ^{63}Ni の再投与によるニッケロプラスミンの標識化を試みることは極めて興味ある問題である。

最後にニッケロプラスミンの結合ニッケルは2価のニッケルと考えられるが、3価のニッケルの可能性についても今後追及すべきものと思われる。

2. ニッケロプラスミンの性質と生理的意義について：ニッケロプラスミンの性質の一部についてはすでに筆者ら¹⁾が報告したが、当時ウサギ α_1 -または α_2 -マクログロブリンの特異抗体がえられなかったためにウサギ全血清に対する抗体を用いる免疫電気泳動により、ニッケロプラスミンの沈降線の性状とその位置から α_2 -マクログロブリンと考えたが、今回ウサギの($\alpha_1 + \alpha_2$)マクログロブリンおよび α_2 -マクログロブリンに対する2種類の特異抗体を使用することにより、ニッケロプラスミンが α_1 -マクログロブリンに属す蛋白であることが判明した。

Picardら¹⁴⁾、Knight-Dray¹⁵⁾、Vonneら¹⁶⁾の報告によればウサギ血清中には α_1 -および α_2 -マクログロブリンが存在し、 α_1 -マクログロブリンはヒトの α_2 -マクログロブリンに相当するもので、炎症性反応におい

て両者は類似した動態を示す。ウサギ α_2 -マクログロブリンは α_1 -マクログロブリンと似た性質をもつが、炎症性反応には関与しないとされている。Sunderman ら⁵⁾はウサギのニッケロプラスミンは tosyl-arginine methyl ester の水解におけるエステラーゼ作用に関係し、ヒト Zn- α_2 -macroglobulin と似た性質をもつことをみとめている⁴⁾。しかしヒト血中のニッケル値の上昇は心筋硬塞で高頻度にみられ¹⁷⁾、脳血管障害や火傷でも増加傾向を示すが¹⁸⁾骨折と筋挫傷をともなった重症の外傷などの場合に正常値にとどまることから、血中ニッケル値の上昇の機序は複雑で、ニッケロプラスミンは単なる急性相反応物質ではないと考えられる^{5, 18)}。

以上のごとくニッケロプラスミンは生理活性をもった血漿蛋白の1つと考えられるが、その生体内の動態についてはほとんど不明であり、今後本蛋白の構造、turnover rate、生成機序などの研究は生体内ニッケル代謝とその病態を明らかにする1つのキーポイントとなるものと思われる。

総 括

ウサギに $^{63}\text{NiCl}_2$ を静脈内に連続投与し、血中ニッケロプラスミンの標識化について検討し、つぎの結果をえた。

1. $^{63}\text{NiCl}_2$ の $4.5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ 、14~21日間連続静注後24時間後の血中 ^{63}Ni は大部分アルブミンと結合し、一部透析性ニッケルとして存在するが、ニッケロプラスミン中の ^{63}Ni は血中総放射活性の約1%にとどまった。

2. ニッケロプラスミンをウサギ血清から分離精製し、特異抗体による同定を行ない、 α_1 -マクログロブリンに属す血漿蛋白の一種であることが判明した。

3. 以上の実験結果にもとづいて、ニッケロプラスミンを中心とした生体内ニッケル代謝とその生理的意義などについて考察を加えた。

謝 辞

本実験の実施にあたって御協力いただいた F. W. Sunderman Jr. 教授 (コネティカット大学医学部) に深謝する。また貴重な特異抗血清を供与していただいた B. H. Berne 博士 (インディアナ大学) に感謝する。

文 献

- 1) Nomoto, S., McNeely, M. D. and Sunderman, F. W., Jr.: Isolation of a nickel α_2 -macroglobulin from rabbit serum. *Biochemistry*, 10: 1647, 1971
- 2) 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
- 3) Himmelhoch, S. R., Sober, H. A., Vallee, B. L., Peterson, E. A. and Fuwa, K.: Spectrographic and chromatographic resolution of metalloprotein in human serum. *Biochemistry*, 5: 2523, 1966
- 4) Parisi, A. F. and Vallee, B. L.: Isolation of a zinc α_2 -macroglobulin from human serum. *Biochemistry*, 9: 2421, 1970
- 5) Sunderman, F. W., Jr., Decsy, M. I. and McNeely, M. D.: Nickel metabolism in health and disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 199: 300, 1972
- 6) Van Soestbergen, M. and Sunderman, F. W., Jr.: Ni complexes in rabbit serum and urine after injection of $^{63}\text{NiCl}_2$. *Clin. Chem.*, 18: 1478, 1972
- 7) Weber, K. and Osborn, M.: The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. biol. Chem.*, 244: 4406, 1969
- 8) Sunderman, F. W., Jr. and Selin, C. E.: The metabolism of nickel-63 carbonyl. *Toxicol. appl. Pharmacol.*, 12: 207, 1968
- 9) Smith, J. C. and Hackley, B.: Distribution and excretion of nickel-63 administered intravenously to rat. *J. Nutr.*, 95: 541, 1968
- 10) Tedeschi, R. E. and Sunderman, F. W.: Nickel poisoning. V. The metabolism of nickel under normal conditions and after exposure to nickel carbonyl. *Arch. Indust. Health*, 16: 489, 1957
- 11) Horak, E., Sunderman, F. W., Jr.: Fecal nickel excretion by healthy adults. *Clin.*

- Chem., 19 : 429, 1973
- 12) Nielsen, F. H. and Sauberlich, H. E. : Evidence for a possible requirement for nickel by the chick. Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.), 134 : 845, 1970
 - 13) Sunderman, F. W., Jr., Nomoto, S., Morang, R. and Nechay, M. W. : Nickel deprivation in chicks. J. Nutr., 102 : 259, 1972
 - 14) Picard, J. J., Roels, H. A., Carbonara, A. O. and Heremans, J. F. : in "Protides of the biological fluids" (H. Peeters, ed.), Vol. 12 : 353. Elsevier, Amsterdam, 1964
 - 15) Knight, K. L., and Dray, S. : Identification and genetic control of two rabbit α -macroglobulin allotypes, Biochemistry, 7 : 1165, 1968
 - 16) DeVonne, T. L., Gutman, N. and Mouray, H. : Rabbit α -macrogloblins during inflammatory reaction. Clin. chim. Acta, 30 : 603, 1970
 - 17) D'Alonzo, C. A. and Pell, S. : A study of trace metals in myocardial infarction. Arch. environm. Hlth., 6 : 381, 1963
 - 18) 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

(1974. 5. 9 受稿)