

R-04-2020

MFRI Research Report

山梨県富士山科学研究所研究報告書

第42号

基盤研究

「血漿および細胞内のバナジウム結合タンパク質の分析
ならびにその特徴を明らかにするための基礎的研究」

令和1年度

山梨県富士山科学研究所

はじめに

富士山の地下水には微量元素バナジウムが他の地域に比べ多く含まれている。これは富士山を形作った溶岩・火砕物が玄武岩質であることに起因している。玄武岩には、流紋岩などよりバナジウムが多く含まれている。一方、富士山には常時流れている河川は存在していない。山麓に降った雨水や雪解け水の一部は蒸発するが、残りは地下に浸透し玄武岩質の溶岩・火砕物の中を流れ地下水となる。地下水が何年も掛けて玄武岩質の溶岩・火砕物の隙間を流れている間にバナジウムが溶け出し、麓で井戸からくみ上げた地下水ではバナジウム濃度が高くなっている。そして、この富士山の地下水を、富士北麓地域では水道水の原水として利用している。従って、地域住民は水道水から毎日バナジウムを摂取し、あるいは利用して生活を営んでいる。バナジウム水の安全性や健康との関連性に関する研究は、当研究所の前身の環境科学研究所時代から行っている重要な研究課題の一つである。

本研究課題では、富士北麓地域住民の血液サンプル中のバナジウム量やその存在形態（タンパク質との結合性）を明らかにし、さらに、実験動物を用いて富士山地下水の安全性に関しても新しい視点で研究を行った内容となっている。これらの成果が、地域住民や富士山地下水を幅広く利用している方々に活用されることを期待する。

山梨県富士山科学研究所

所 長 藤 井 敏 嗣

目 次

はじめに

概要編

I 研究の概要

I-1	研究テーマおよび研究期間	1
I-2	研究体制	1
I-3	研究目的	1
I-4	研究成果の概要	1
I-4-1	血漿中のバナジウム微量分析法ならびにバナジウム存在形態分析法の確立	1
1)	血漿中バナジウム測定条件の検討	1
2)	バナジウム結合タンパク質の分析条件の検討	2
I-4-2	血漿中バナジウム結合タンパク質の同定ならびに タンパク脂質へのバナジウムの親和性の検討	3
1)	バナジウム結合タンパク質の同定	3
2)	バナジウム結合タンパク質へのバナジウム親和性の検討	3
I-4-3	富士北麓地域住民の血漿中バナジウム存在形態の検討	4
I-4-4	バナジウム水連続投与マウスの血漿中バナジウムの存在形態の検討	5
I-4-5	赤血球中のバナジウムの存在形態の検討	7
1)	赤血球へのバナジウム取り込み量の経時変化	7
2)	赤血球中バナジウムの存在形態分析	8
I-5	まとめ	10
I-6	研究成果の発表	11

本編

II 研究成果報告

II-1	血漿中バナジウムの測定条件の検討	13
II-1-1	目的	13
II-1-2	方法	13
II-1-3	結果	14
II-1-4	結論	14

II-2	バナジウム結合タンパク質の分析条件の検討	15
II-2-1	目的	15
II-2-2	方法	15
II-2-3	結果	15
II-2-4	結論	17
II-3	血漿中のバナジウム結合タンパク質の同定	17
II-3-1	目的	18
II-3-2	方法	18
II-3-3	結果	18
II-3-4	結論	19
II-4	バナジウム結合タンパク質へのバナジウム親和性の検討	19
II-4-1	目的	19
II-4-2	方法	19
II-4-3	結果	20
II-4-4	結論	20
II-5	富士北麓地域住民の血漿中バナジウム存在形態の検討	21
II-5-1	目的	21
II-5-2	方法	21
II-5-3	結果	21
II-5-4	結論	22
II-6	バナジウム水連続投与マウスの血漿中バナジウム存在形態の検討	23
II-6-1	目的	23
II-6-2	方法	23
II-6-3	結果	23
II-6-4	結論	25
II-7	赤血球中のバナジウムの存在形態の検討	26
II-7-1	目的	26
II-7-2	方法	26
II-7-3	結果	27
II-7-4	結論	30
II-8	まとめ	30

概 要 編

I 研究の概要

I-1 研究テーマおよび研究期間

研究テーマ：

血漿および細胞内のバナジウム結合タンパク質の分析ならびにその特徴を明らかにするための基礎的研究

研究期間

平成 28 年度 ～ 30 年度（3 年間）

I-2 研究体制

研究代表者：長谷川 達也（山梨県富士山科学研究所 環境共生研究部）

共同研究者：三浦 伸彦（横浜薬科大学）

助手：遠藤 淳子（山梨県富士山科学研究所 環境共生研究部）平成 30 年 6 月まで

：矢野 安曇（山梨県富士山科学研究所 環境共生研究部）平成 30 年 7 月から

I-3 研究目的

富士北麓地域の水道原水である富士山の地下水にはバナジウムが $80\mu\text{g/L}$ 前後（ $60\sim 100\mu\text{g/L}$ ）含まれており、地域住民は水道水を介して毎日バナジウムを摂取している。我々は以前の研究において、この地域住民の血液サンプル中のバナジウム量を測定した。その結果、血液中のバナジウムが対照地域（水道水にバナジウムが含まれない地域）の住民と比べ有意に高いことを報告した。一方、富士北麓地域住民において、バナジウム摂取に起因すると考えられる健康被害は知られていない。これは血液中のバナジウムが、亜鉛、銅、鉄などが体内に取り込まれた場合と同様に、血漿中に存在するタンパク質と結合し、各臓器に運ばれ代謝を受けた後、排泄されるためと考えられる。従って、血漿中のバナジウム量の測定と共にバナジウムが結合するタンパク質の種類の解明が、地域住民の健康を裏付けるために必要な知見となる。

本研究では、血漿中でのバナジウムの輸送に関与するバナジウム結合タンパク質を明らかにし、飲料水からのバナジウム摂取量が異なる富士北麓地域住民と甲府地域住民の血液サンプル中のバナジウム結合タンパク質の分析を行う。さらに、動物を用いて、中毒レベルのバナジウムを与えた場合の血漿中バナジウム結合タンパク質の挙動についても検討を行い、バナジウム投与レベルの違いによって、バナジウム結合タンパク質が異なるのか明らかにする。これらの検討結果を、飲料水からバナジウムを摂取している富士北麓地域住民の健康への影響を裏付けるための一つの基礎資料とする。

I-4 研究成果の概要

I-4-1 血漿中のバナジウム微量分析法ならびにバナジウム存在形態分析法の確立

1) 血漿中バナジウム測定条件の検討

当研究所に 2016 年に設置されたコリジョンセル搭載の ICP-MS (Agilent 7900) を用いて、塩化物が高濃度含まれる血漿サンプル中のバナジウム測定に関する条件および測定感度について検討を行った。コリジョ

ンセルのリアクションガスにヘリウム (He) を使い、バナジウムを 51 m/z で測定した。なお、内標準元素にはイットリウム (Y) を用いた。その結果、バナジウム測定に干渉する塩化物を 100 mEq/L 共存させても、0.01 μ g/L から 100 μ g/L までの範囲で、バナジウムが理論値と同じ値として検出できた (図 1)。なお、塩化物 100 mEq/L は、血漿中に存在する塩化物の濃度である。従って、血漿をサンプルとしてもバナジウムが正確に測定できると判断できた。

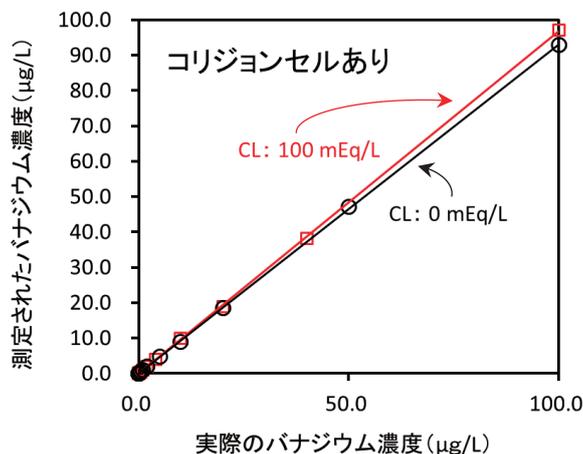


図 1 バナジウムの検量線 (コリジョンセルあり条件)

2) バナジウム結合タンパク質の分析条件の検討

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と ICP-MS をオンラインで繋げたシステム (HPLC-ICP-MS) を構築し、これを用いた場合のバナジウム結合タンパク質の分析条件を検討した。なお、バナジウム結合タンパク質の分析用サンプルとして、マウスの体重 1kg 当たり 4 mg の投与量でバナジウム水を経口投与して 1 時間後の血漿を用いた。タンパク質を分離させるカラムとして代表的なゲルろ過カラム 3 種類 (担体が異なる) を選び、移動相の pH 条件をそれぞれのカラムで検討した。その結果、カラムにはシリカゲルを担体とする G3000SW (東ソー) を使い、移動相には 50 mM Tris-HNO₃ buffer の pH を 7.0 の条件で分析を行うと、図 2 に示すごとくバナジウムの二つのピークが観察された。なお、図中の赤線は 280 nm の吸光度 (OD) でモニターしたタンパク質である。

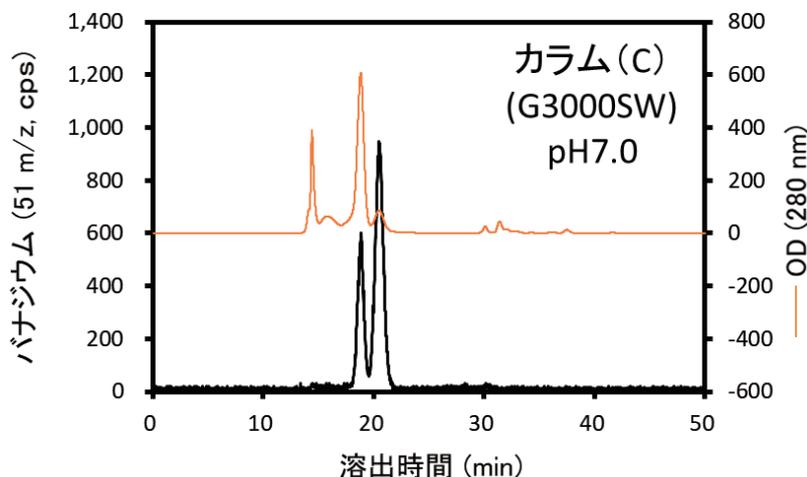


図 2 バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム (カラム : G3000SW、移動相の pH : 7.0)

I-4-2 血漿中バナジウム結合タンパク質の同定ならびにタンパク質へのバナジウムの親和性の検討

1) バナジウム結合タンパク質の同定

前節 I-4-1 2) で分離できた二つのバナジウム結合タンパク質を明らかにするため、ICP-MS 装置の利点である多元素同時測定を行い、これらのタンパク質に含まれる金属元素の分析を行った。さらに、ゲルろ過カラム (G300SW) とは分離特性の異なる陰イオン交換カラム (IEC QA-825) を用いて、同様の検討を行った。その結果、どちらのカラムを用いても (図3および図4)、一方のバナジウム結合タンパク質には鉄が結合していることが示された。もう一方のバナジウム結合タンパク質は硫黄を高濃度含んでいることが示された。血漿中で鉄を含むタンパク質はトランスフェリンであることが知られており、鉄の輸送を担っている。さらに、このトランスフェリンはバナジウムとも結合することが報告されている。硫黄を高濃度含んでいるタンパク質はアルブミンである。アルブミンは多数の金属イオンを輸送する働きがある。これらの事実とタンパク質の分子量を考え合わせると、鉄と結合しているバナジウム結合タンパク質はトランスフェリンであり、硫黄を多く含んでいるバナジウム結合タンパク質はアルブミンであると結論づけることができた。

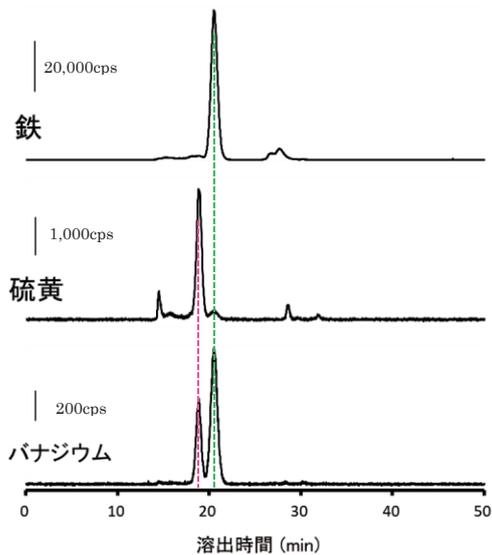


図3 ゲルろ過カラムでの分離

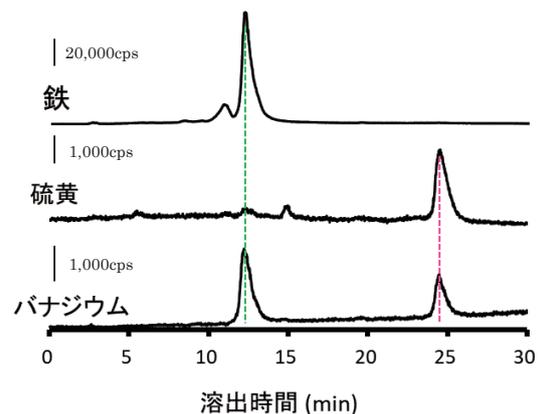


図4 陰イオン交換カラムでの分離

2) バナジウム結合タンパク質へのバナジウム親和性の検討

血漿中のバナジウム結合タンパク質として明らかとなったトランスフェリンとアルブミンについて、どちらがバナジウムとの親和性が高いか検討した。マウスの体重1 kg 当たり 4 mg、0.4 mg、0.04 mg の投与量でそれぞれバナジウム水を経口投与し、1時間後の血漿をサンプルとしてバナジウム結合タンパク質を分析した。その結果、4 mg/kg を投与した場合、バナジウムはトランスフェリンとアルブミンに結合していた (図5 上段)。0.4 mg/kg 投与においても、バナジウムはトランスフェリンとアルブミンに結合していたが、その量は共に少なくなっていた (図5 中段)。0.04 mg/kg 投与においては、バナジウムはトランスフェリンにのみわずかに結合するだけであった (図5 下段)。従って、バナジウムはアルブミンに比ベトランスフェリンとの親和性が高いことが示された。

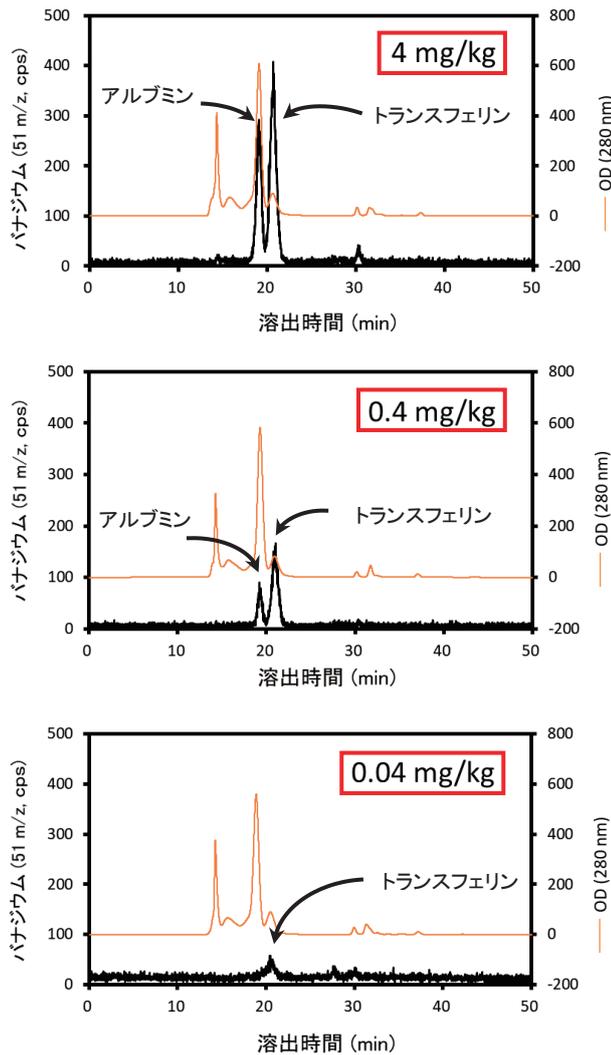


図5 バナジウム投与量の違うマウス血漿中のバナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

I-4-3 富士北麓地域住民の血漿中バナジウム存在形態の検討

バナジウムを含む水道水で生活している富士北麓地域住民と、水道水にバナジウムを含まない甲府地域住民とで、血漿中バナジウムの量ならびに存在形態に違いがあることが予想される。この仮説を検証するため、富士北麓地域および甲府地域からボランティアを集い（各地域 10 名ずつ）検討した。その結果、富士北麓地域住民の血漿中バナジウム濃度は、甲府地域と比べて有意に高いことが確認できた（図 6）。甲府地域住民の血漿中バナジウム濃度がゼロでないのは、食品中にもバナジウムが含まれているためと考えられた。

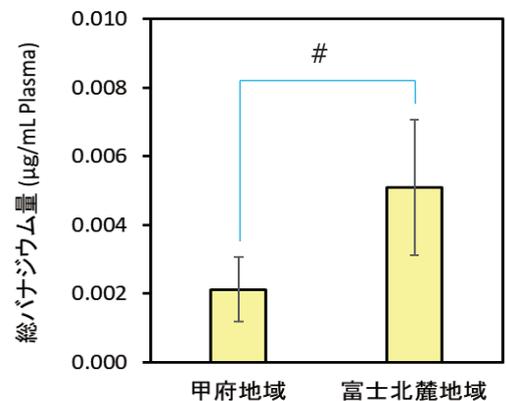


図6 富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中総バナジウム量（平均値±SD）

甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質を測定した結果（図7 上段）、バナジウムはトランスフェリンにわずかに結合していることが明らかとなった。富士北麓地域住民においても、バナジウムはトランスフェリンにのみ結合していた（図7 下段）。これらの結果から、富士北麓地域の水道水に含まれるバナジウム濃度（約0.1 mg/L）は、トランスフェリンに結合するが、アルブミンには結合する量ではないと考えられた。

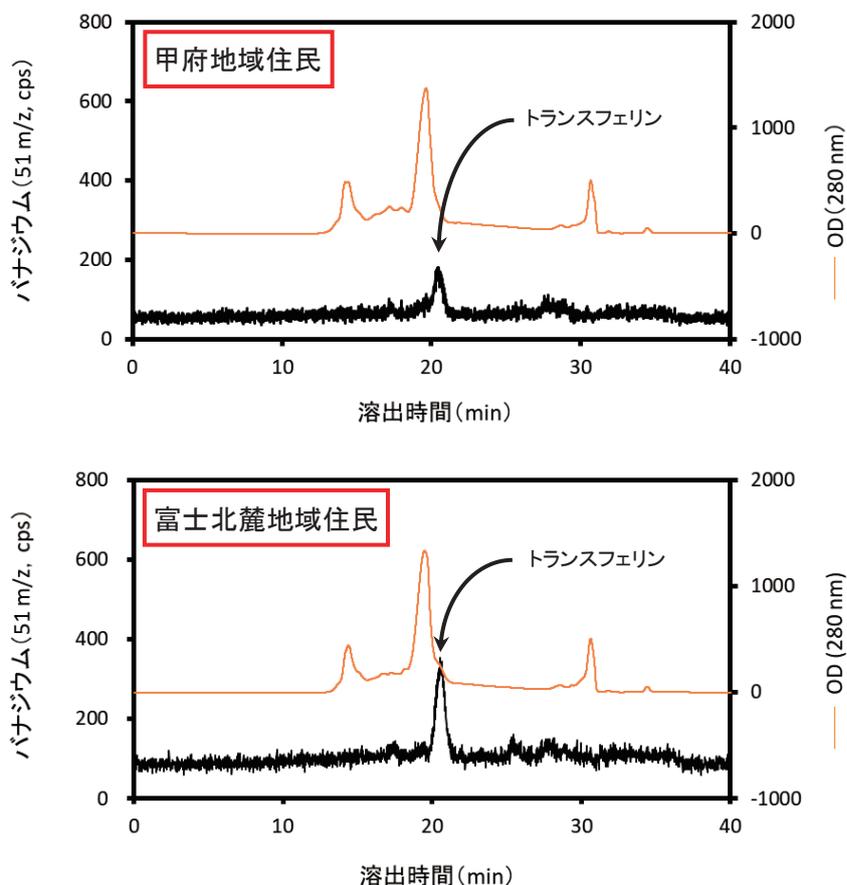


図7 富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

I-4-4 バナジウム水連続投与マウスの血漿中バナジウムの存在形態の検討

富士北麓地域の水道水に含まれるバナジウム濃度である0.1 mg/Lの摂取では、バナジウムはトランスフェリンにしか結合しない。そこで、段階的に濃度を変えたバナジウム水を6か月間摂取させた場合、バナジウムがアルブミンに結合する濃度について検討を行い、さらに毒性との関連性についても検討を行った。なお、ヒトを対象にする実験は安全性に問題があるので実験動物で行った。

各種濃度のバナジウム水を6か月間与えてマウスを飼育し、毎週体重を測定した。図8左に示すごとく、0.1 mg/Lおよび2 mg/Lのバナジウム水を与えたマウスの体重は、コントロール群（0 mg/L）と差は認められなかった。図8右に示すごとく、10 mg/Lのバナジウム水を与えたマウスの体重も、コントロール群（0 mg/L）と差は認められなかった。しかし、50 mg/Lのバナジウム水を与えた場合、体重の増加抑制が認められた。

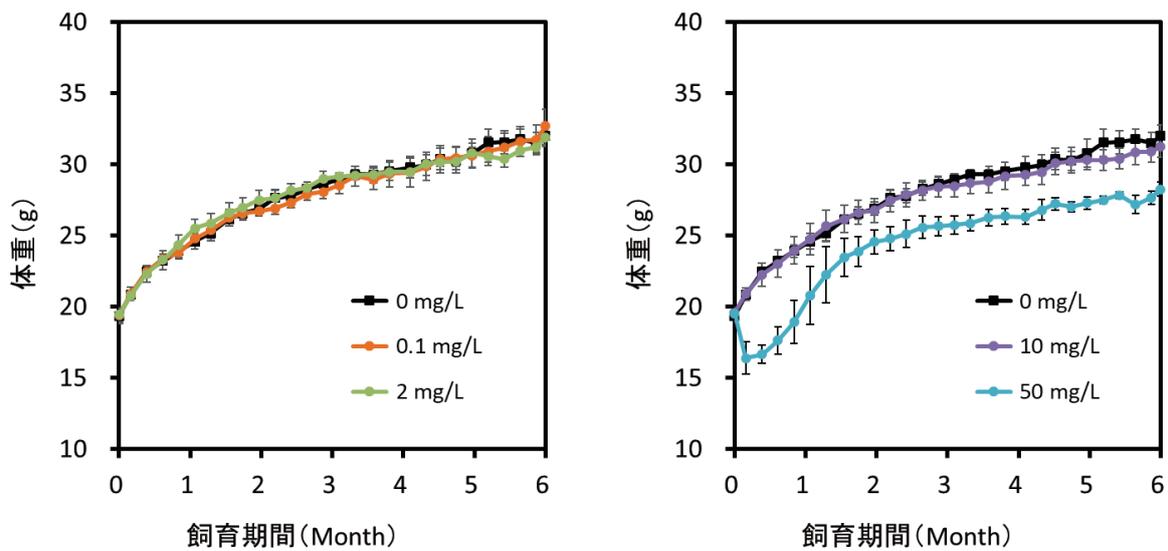


図8 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの体重変化（6か月間）

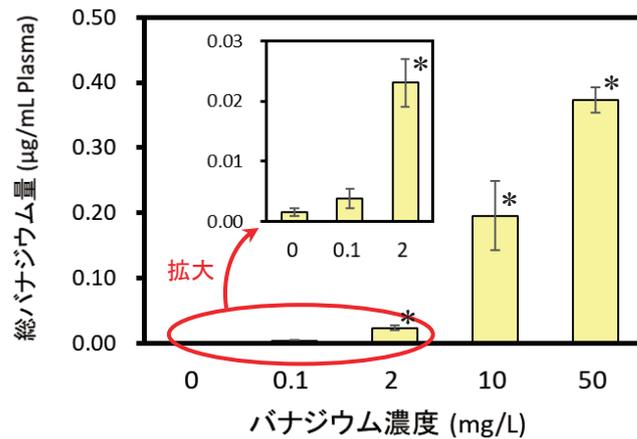


図9 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中総バナジウム濃度（平均値±SD）

*バナジウム濃度 0 mg/L との有差： $p < 0.05$

図9に示すごとく、6か月後に血漿中総バナジウム量を測定した結果、マウスに与えたバナジウム水の濃度に依存して増加していた。

図10に各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラムを示す。0.1 mg/L 投与群の血漿中バナジウム結合タンパク質を分析した結果、バナジウムはトランスフェリンにのみ結合することが確認された。2 mg/L 投与群ではトランスフェリンへの結合量が増加し、わずかにアルブミンに結合していることが確認された。10 mg/L 投与群では、バナジウムはトランスフェリンに大量に結合しており、アルブミンにも結合していることが示された。体重増加抑制を示した 50 mg/L 投与群では、10 mg/L のバナジウム水を与えた場合に比べ、アルブミンへの結合割合が増加した。

これらの結果から、血漿中でバナジウムはトランスフェリンへの結合が飽和した場合、アルブミンに結合し、さらに投与量が増えるとアルブミンへの結合も飽和し、反応性の高いフリーのバナジウムが血漿中に認められるようになり毒性発現に至る可能性が考えられた。

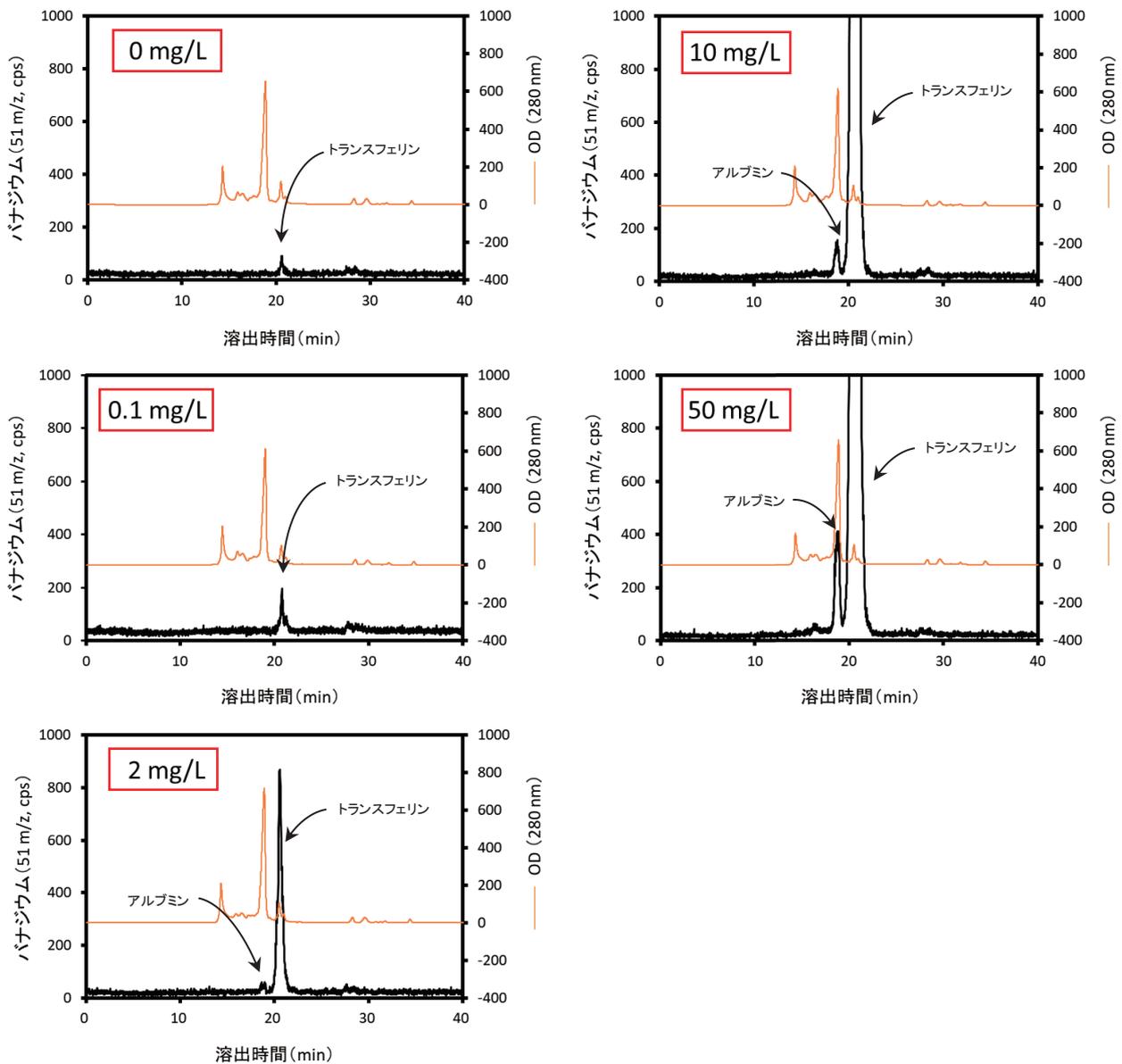


図 10 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

I-4-5 赤血球中のバナジウムの存在形態の検討

赤血球中へのバナジウム取り込み量ならびにその経時変化を明らかにした後、赤血球中のバナジウムの存在形態の分析を行う。

1) 赤血球へのバナジウム取り込み量の経時変化

マウスにバナジウムを 0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg の割合でそれぞれ 1 回経口投与した。投与 0.5, 1, 2, 4 および 24 時間後にそれぞれ採血を行い、総バナジウム量の測定を行った。その結果、図 11 ならびに図 12 に示すごとく、どちらの投与量においても、血漿では投与 1~2 時間後に最大値を示した。赤血球では 2 時間後が最大値となりすぐに減少することが明らかとなった。特に、赤血球中のバナジウムは 24 時間後には投与前 (0 時間) と同じ値を示した (図中の緑点線)。また、4 時間後から 24 時間後の間での測定は行っていないが、2 時間後から 4 時間後までの傾きを延長すると (図中の赤色点線) 6~10 時間後には赤血

球からバナジウムが消失している可能性も考えられた。したがって、赤血球中でのバナジウムの消失速度（ターンオーバー）は血漿中のバナジウムに比べ速いことが予想された。

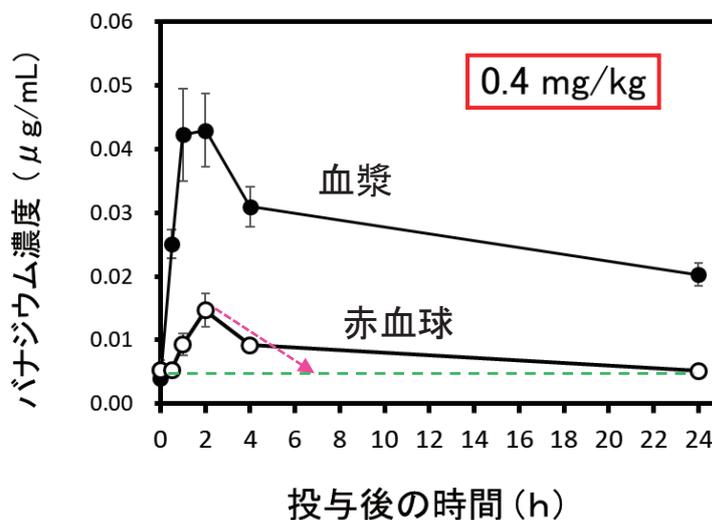


図 11 バナジウム水投与 (0.4 mg/kg) 24 時間後の血漿ならびに赤血球中のバナジウム量 (平均値±SD)

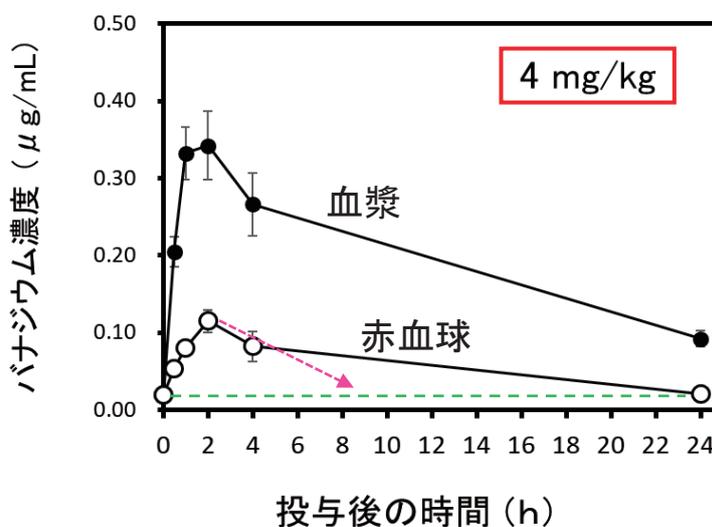


図 12 バナジウム水投与 (4 mg/kg) 24 時間後の血漿ならびに赤血球中のバナジウム量 (平均値±SD)

2) 赤血球中バナジウムの存在形態分析

マウスに 0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg の割合でバナジウムをそれぞれ投与し、1 時間後の赤血球中のバナジウムの存在形態を分析した。図 13 左に示すごとく、0.4 mg/kg のバナジウム水を投与した場合、バナジウムは 27 分にわずかに溶出することが認められた。この溶出位置は赤血球に大量にあるヘモグロビンの溶出位置と一致した。図中の青線はヘモグロビンの溶出位置を 540 nm の吸光度 (OD) で測定した結果である。マウ

スに 4 mg/kg の割合でバナジウムを投与した場合(図 13 右)、ヘモグロビン画分のバナジウムは大きくなり、溶出時間 20 分にもわずかなバナジウムの溶出が認められた。従って、赤血球に取り込まれたほとんどのバナジウムはヘモグロビンに結合する可能性が考えられた。そこで、多元素分析による検討を行った。

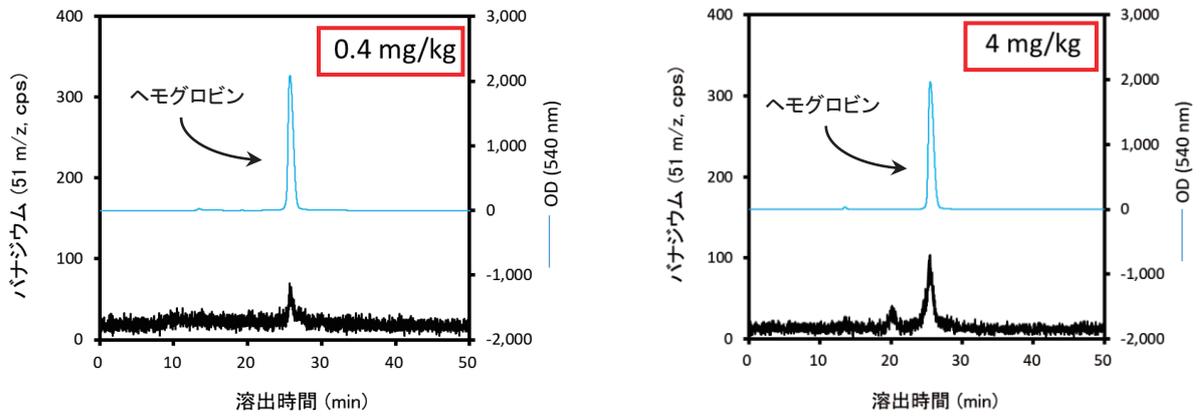


図 13 バナジウム水投与 1 時間後の赤血球中のバナジウムの存在形態

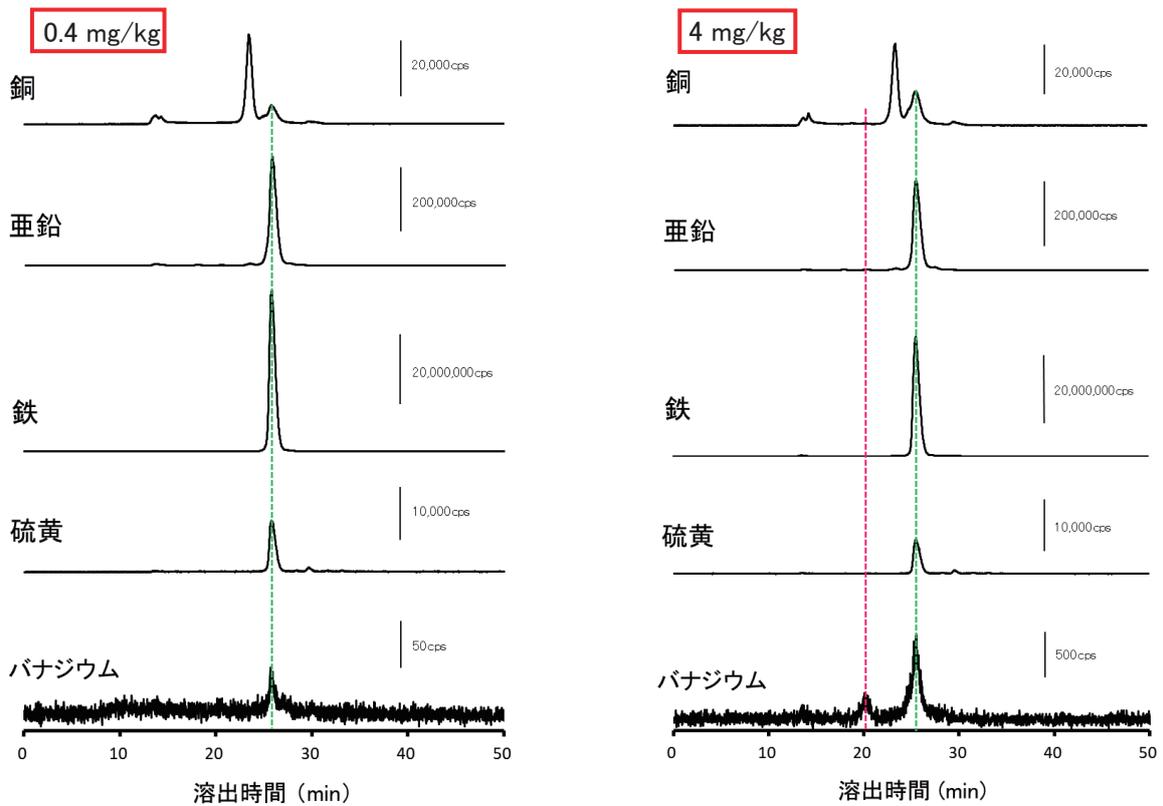


図 14 バナジウム水投与 1 時間後の赤血球中のバナジウムの存在形 (多元素同時測定)

図 14 に多元同時分析を行った結果を示す。0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg のバナジウム水を投与した場合に、バナジウムが共に認められたヘモグロビン溶出画分に硫黄、鉄、亜鉛、銅が検出された。ヘモグロビンはポルフィリン環をもち、その中心に鉄が配位している。従って、鉄の検出は予想通りである。また、ヘモグロビンの構成アミノ酸に、硫黄を含むシステインおよびメチオニンが特に多いことはない。しかし、赤血球一つにヘモグロビン分子が 2 億 5 千万個、重量比で 95% 含まれていることから、ヘモグロビン画分に硫黄が検出されてもおかしくない。しかし、ヘモグロビンには亜鉛や銅は含まれないため、亜鉛の大きなピークと銅の小さなピークが検出されたことは想定外であった。これらのことから、ヘモグロビン溶出画分には、ヘモグロビン以外のタンパク質が含まれる可能性が考えられ、バナジウムがそのタンパク質に結合していることも考えられた。また、4 mg/kg 投与マウスに認められた溶出時間 20 分のバナジウムの小さなピークには、他の金属元素は検出されず、このタンパク質を明らかにするための手掛かりを得ることができなかった。しかし、赤血球中のバナジウム濃度は、血漿中の濃度に比べ少なく、さらに、赤血球中に維持されない（速やかに赤血球の外に放出されると考えられる）ため、赤血球中のバナジウムが生体に影響をおよぼすことは少ないと考えられた。

I-5 まとめ

- 血漿中でのバナジウムの輸送に関与するバナジウム結合タンパク質はトランスフェリンとアルブミンの二つあることを明らかにした。
- トランスフェリンとアルブミンを比べた結果、バナジウムはトランスフェリンとの親和性が高いことが示された。
- 富士山周辺の地下水に含まれるバナジウムと同様の濃度レベル 0.1 mg/L の飲料水を 6 か月間マウスに与えて飼育した場合、血漿中バナジウムはトランスフェリンにのみ結合していることが明らかとなった。
- 中毒レベルに準じる高濃度のバナジウム水で飼育したマウスでは、血漿中バナジウムはトランスフェリンとアルブミンに結合することが示された。
- 血漿中でバナジウムはトランスフェリンへの結合が飽和した場合、アルブミンに結合し、さらに投与量が増えると毒性発現に至る可能性が示された。
- バナジウムを含む水道水で生活を行っている富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質を分析した結果、どちらの住民もトランスフェリンにのみバナジウムが結合していた。しかし、富士北麓地域住民の方が結合しているバナジウムの量が有意に多かった。
- 赤血球中でのバナジウムはヘモグロビン画分に溶出するタンパク質（ヘモグロビンを含む）とヘモグロビンより分子量の大きなタンパク質に結合することを明らかにした。
- 赤血球にはバナジウムは取り込まれにくく、取り込まれた少量のバナジウムは 6~10 時間後には赤血球の外へ放出されることが示された。
- バナジウムを摂取した場合、血漿中でバナジウムはトランスフェリンと結合し、臓器や組織に輸送される。今後、組織への取り込み機構や組織中でのバナジウムの存在形態を分析し、バナジウムの生体内での作用に関する研究を進める必要がある。

I-6 研究成果の発表

- 1) 長谷川達也 (2017) バナジウム結合タンパク質の分析方法の検討. 第6回 重金属毒性機構解明に関する研究会 (十和田)
- 2) 長谷川達也 (2018) バナジウム水を経口投与したマウスの血漿中バナジウムのスペシエーション. 第7回 重金属毒性機構解明に関する研究会 (青森)
- 3) 長谷川達也 (2019) 血漿タンパク質のバナジウム結合能に関する研究. 第8回 重金属毒性機構解明に関する研究会 (函館)

I-7 謝辞

本研究の遂行に当たり、採血のボランティアとして協力いただいた山梨県産業技術センターの所員の皆様、山梨県富士山科学研究所の所員の皆様、さらに、採血を行っていただきました富士吉田市立看護専門学校の教員の皆様に感謝致します。

本 編

II 研究成果報告

II-1 血漿中バナジウム測定条件の検討

バナジウムの測定は一般的に ICP-質量分析計 (ICP-MS) で行われる。研究所に設置されていた ICP-MS は研究所開設時 (1997 年) に整備された機種で、塩化物 (CL) が共存するサンプル中の微量バナジウムの分析が困難であった。しかし、2016 年に研究所に新型の ICP-MS が設置された。この機種は塩化物の妨害を除去する装置 (コリジョンセル^{脚注 1)}) を搭載している。塩化物は血漿中に高濃度 (100 mEq/L) 存在するため、血漿中のバナジウムの分析にはコリジョンセルが必須である。そこで、新型の ICP-MS を用いて、血漿中のバナジウムの分析条件を検討する必要がある。

II-1-1 目的

コリジョンセル搭載の ICP-MS を用いて、塩化物が高濃度含まれる血漿サンプル中のバナジウム測定に関する条件および測定感度を確かめる。

II-1-2 方法

1) 分析装置

ICP-MS は Agilent 7900、オートサンプラーは SPS 4 を用いてペリポンプでサンプルを導入した。内標準元素には 1% 硝酸溶液で調製した 0.5 mg/L のガリウム (Ga), イットリウム (Y), インジウム (In) 混合液をオンラインで繋げて、71, 89, 115 m/z でそれぞれ測定した。

2) コリジョンセル条件

リアクションガスにはヘリウム (He) を用いた。

3) バナジウム測定条件

バナジウムは 51 m/z で測定した。

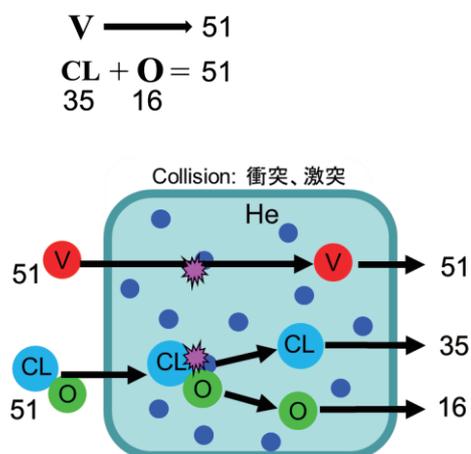
4) バナジウム溶液

バナジウム溶液 ; バナジウムの最終濃度が 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 μ g/L となるように 1% 硝酸溶液で調製した。

塩化ナトリウム添加バナジウム溶液 ; バナジウムの最終濃度は 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 4, 10, 20, 40, 100 μ g/L とし、全ての溶液において塩化ナトリウムの最終濃度が 100 mEq/L となるように 1% 硝酸溶液で調製した。

脚注 1) コリジョンセル

ICP-MS は、元素の質量数を測定して、元素の定量を行う測定機械。バナジウム (V) の質量数は 51 である。塩化物 (質量数 35) と酸素 (質量数 16) が結びつくと質量数が 51 となり、バナジウムと同じになってしまう。コリジョンセルは、セル内にヘリウム (He) を充填させることができる。バナジウムがコリジョンセル内で He と衝突しても変化は無い。しかし、塩化物と酸素が結びついた分子 (ClO) が He と衝突すると塩化物と酸素に分解する。この原理で、塩化物の妨害が取り除かれ、塩化物が共存していてもバナジウムの正確な測定が可能となる。



II-1-3 結果

コリジョンセルなしの条件で、各種濃度のバナジウム溶液 (0.01~2.0 $\mu\text{g/L}$) を測定した結果を図 1 に示す。黒線で示すように、サンプルに加えた実際のバナジウム濃度と同じ値が測定された (例; 緑色点線のごとく 1.0 $\mu\text{g/L}$ のサンプルを測定すると、1.0 $\mu\text{g/L}$ が測定される)。しかし、赤線で示すように、塩化物 (CL) を 100 mEq/L 加えた場合、実際のバナジウム濃度とは異なる値が測定された (例; 黄色点線で示すように 1.0 $\mu\text{g/L}$ のサンプルを測定すると、2.5 $\mu\text{g/L}$ が測定された)。

図 2 はコリジョンセルありの条件で各種濃度のバナジウム溶液 (0.01~2.0 $\mu\text{g/L}$) を測定した結果である。サンプルに塩化物を加えても (赤線)、塩化物を加えない場合 (黒線) と同様に、実際のバナジウム濃度と同じ値が測定された (例; 緑色点線で示すように 1.0 $\mu\text{g/L}$ のサンプルを測定すると、1.0 $\mu\text{g/L}$ が測定されている)。

さらに、バナジウム濃度を 100 $\mu\text{g/L}$ まで測定した結果、図 3 に示すごとく、塩化物添加に関係なくコリジョンセルありの条件で良好な直線が得られた。

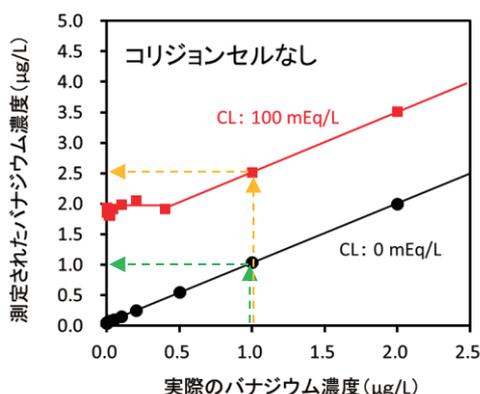


図 1 コリジョンセルなし条件での測定

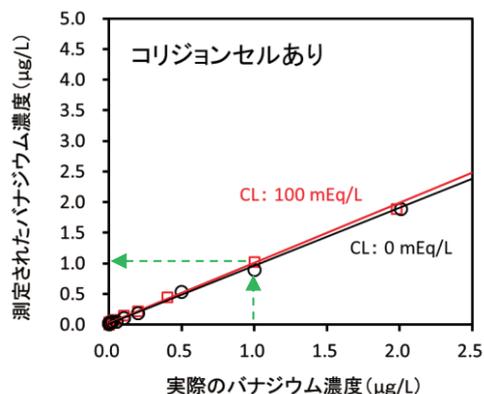


図 2 コリジョンセルあり条件での測定

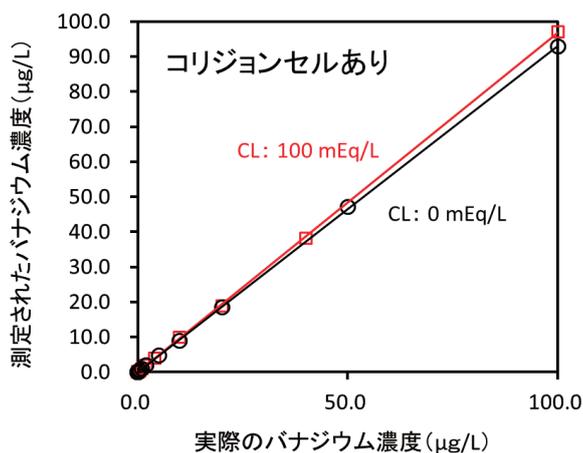


図 3 バナジウム測定の直線性の検討 (コリジョンセルあり条件)

II-1-4 結論

各種濃度のバナジウム溶液に血漿と同程度の塩化物 (100 mEq/L) を添加し、コリジョンセル搭載の ICP-MS で測定を行った。その結果、バナジウムは 0.01~100 $\mu\text{g/L}$ まで広いダイナミックレンジで精度良く測定できることが確認できた。

II-2 バナジウム結合タンパク質の分析条件の検討

体内に取り込まれた金属元素は血漿中では、金属元素に特異的なタンパク質と結合して各種臓器に輸送される。バナジウムも他の金属元素と同様にタンパク質と結合すると考えられる。ICP-MS による分析だけでは、バナジウムが結合すると考えられるタンパク質を明らかにすることができない。バナジウム結合タンパク質の分析には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と ICP-MS をオンラインで繋げたシステム (HPLC-ICP-MS) を用いた分析が必要である。

II-2-1 目的

HPLC-ICP-MS システムを構築し、血漿中のバナジウム結合タンパク質の分析条件を検討する。

II-2-2 方法

1) 分析装置

HPLC は HP1100 を使い、280 nm の吸光度を測定後、オンラインで ICP-MS に繋げ、コリジョンセルありの条件でバナジウム (51 m/z) を測定し、1 秒毎のカウント (CPS) で示した。なお、HPLC の流速は 1 mL/min とした。

2) カラム

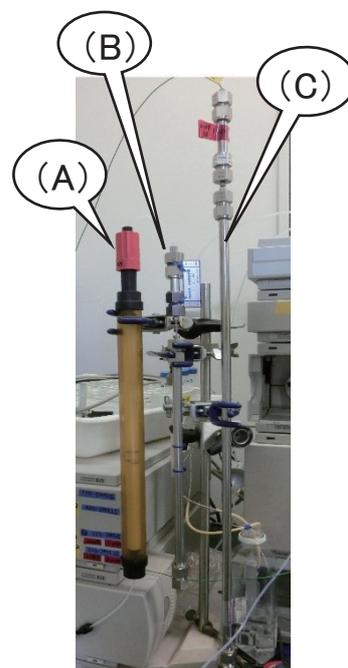
担体の異なる 3 本のカラムについて検討し、バナジウム結合タンパク質を分離できるカラムを選んだ。カラム (A) ; アガロースデキストランを担体とする Superdex200 (ファルマシア)。カラム (B) ; ポリビニルアルコールを担体とする GS520 (昭和電工)。カラム (C) ; シリカゲルを担体とする G3000SW (東ソー)。

3) 移動相

50 mM Tris-HNO₃ buffer を使い、pH を 6.4, 6.6, 6.8, 7.0, 7.4, 7.8, 8.0, 8.2 および 8.4 までそれぞれ調整して検討した。

4) サンプル

マウスの体重 1 kg 当たり 4 mg の投与量でバナジウム水を経口投与し、1 時間後の血漿をサンプルとした。



検討した 3 種類のカラム

II-2-3 結果

バナジウム投与 1 時間後の血漿をサンプルとして、カラムの種類 (3 本) と、移動相の pH (6.4~8.4) を組み合わせて分離のよい条件を検討した。表 1 において、検討した組み合わせを青色で示す。

図 4 に 3 本のカラムでそれぞれ分離したクロマトグラムを示す。(移動相の pH は全て 7.4)。カラム (A) においてバナジウムは一つのピークとして検出された。カラム (B) では 15 分前後にピークが二本観察された。カラム (C) においては、20 分付近にきれいな二つのピークが観察された。カラム (A) の担体であるアガロースデキストランはイオン交換能が期待できない

表 1 検討した 3 種類のカラムと移動相の pH の組み合わせ

	移動相の pH								
	6.4	6.6	6.8	7.0	7.4	7.8	8.0	8.2	8.4
カラム (A) Superdex2000									
カラム (B) GS520HR									
カラム (C) G3000SW									

め、これ以上の分離は期待できないと判断した。カラム (B) ならびにカラム (C) は、移動相の pH を選べば、バナジウム のピーク の分離が期待できると判断した。

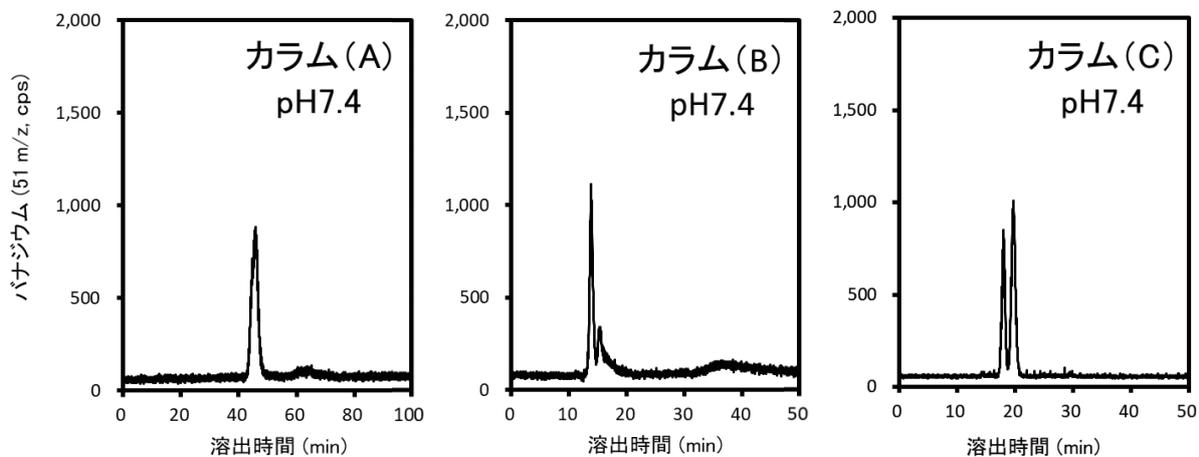


図 4 3種類のカラムの検討 (移動相 pH 7.4)

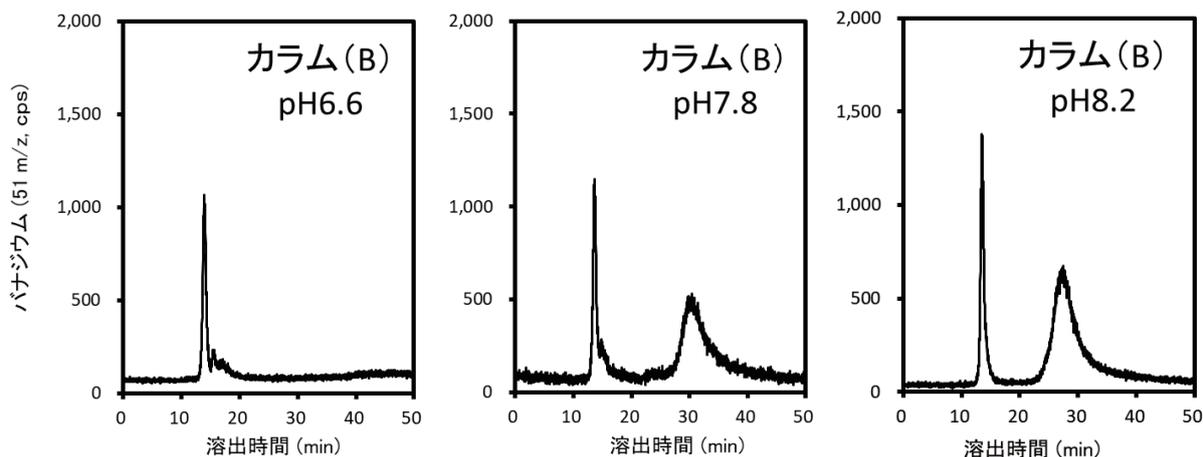


図 5 カラム (B) における移動相 pH の検討

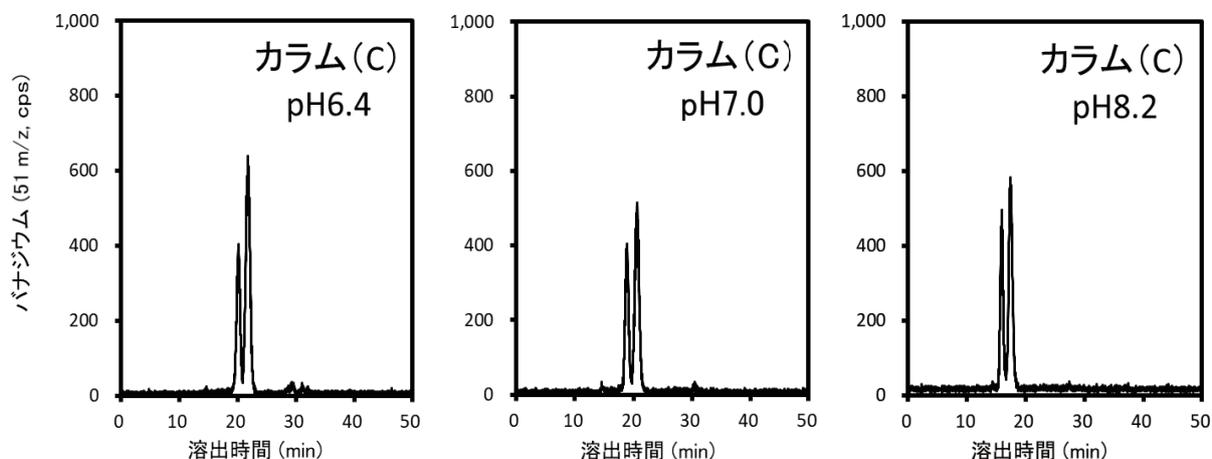


図 6 カラム (C) における移動相 pH の検討

図5はカラム(B)の移動相pHを変化させた場合のクロマトグラムである。図4に示した中央のカラム(B) pH 7.4と、図5の中央pH 7.8を比べると、pH 7.8では15分前後に観察された二つのピークの一つは小さくなり、32分前後において大きなテーリング(ピーク後部がすそを引いている現象)を伴うピークが出現した。さらにpHを8.2にすると(図5右)、このテーリングを伴うピークの溶出時間が28分前後に早まった。一方、15分前後に認められた複数のピークは一つになった。pH 6.6においては(図5左)、15分前後に認められた2本のピークのうち片方がほとんど消失した。アルカリ性側で出現した大きなテーリングを伴うバナジウムイオンのピークは、タンパク質から遊離したバナジウムイオンの可能性が考えられた。

図6はカラム(C)の移動相のpHを変化させた場合のクロマトグラムである。どのpHにおいてもピークの形状に違いは認められない。しかし、pH 6.4では溶出時間が遅く、pH 8.2では早くなることが明らかとなった。

移動相pH条件を極端にアルカリ性や酸性にすると、タンパク質の変性や、タンパク質からのバナジウムの遊離が考えられる。そこで、pH 7.0で二つのバナジウムのピークが分離可能なカラム(C)がバナジウムタンパク質の分離に適していると判断した。図7は最適と考えられるカラム(C)を用い、pH 7.0の移動相で、再度バナジウムを投与したマウスの血漿を分析した結果である。黒線で示すようにバナジウムが溶出時間18分と22分にピークとして検出できた。図中の赤線はタンパク質の溶出を検知する280 nmの吸光度(OD)である。

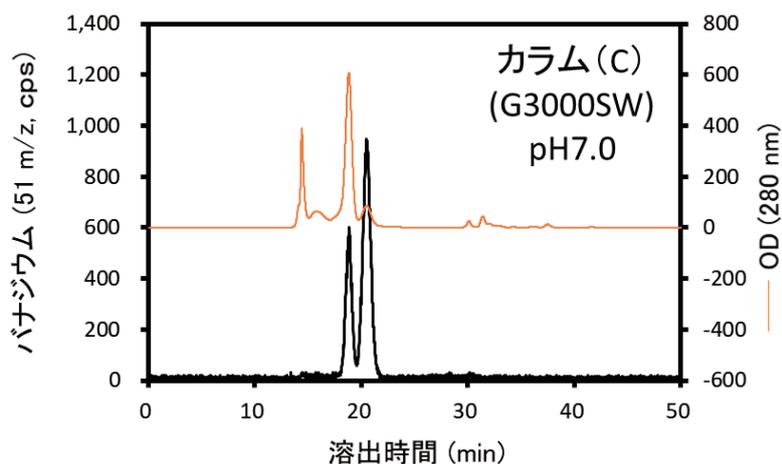


図7 バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム(カラム: G3000SW、移動相のpH: 7.0)

II-2-4 結論

マウスに4 mg/kgの投与量でバナジウムを経口投与し、1時間後の血漿をサンプルとしてバナジウム結合タンパク質の分析条件を検討した。その結果、カラム(C)、シリカゲルを担体とするゲルろ過カラム(G3000SW)を用いて分析すると、バナジウムの結合したタンパク質が二つ分離でき、タンパク質への負荷を考慮して移動相(50 mM Tris-HNO₃ buffer)のpHを7.0とするのが最適であると判断した。

II-3 血漿中のバナジウム結合タンパク質の同定

タンパク質は分子量の違いや、イオン性の違いにより分離することができる。G3000SWはタンパク質の分子量の違いを利用して分離するカラム(ゲルろ過カラム)である。次に、タンパク質のイオン性の違いを利用してタンパク質の分離を行うことにした。また、ICP-MSはバナジウム以外の金属元素を同時に分析することができる。そこで、鉄、硫黄についても分析を行いタンパク質の特徴を明らかにする。

II-3-1 目的

II-2 で分離された血漿中のバナジウム結合タンパク質を同定する。

II-3-2 方法

1) ICP-MS による多元素同時分析

II-2-2 1) と同様の条件で、バナジウムを測定した。なお、鉄は 56 m/z で、硫黄は 34 m/z で測定した。

2) ゲルろ過カラムによる分離

II-2 で結論づけられた条件、カラムに G3000SW、移動相として 50 mM Tris-HNO₃ buffer pH 7.0 を用いて分離を行った。

3) イオン交換カラムによる分離

イオン交換カラムは血漿中のタンパク質の分離に良く用いられる、強陰イオン交換樹脂（第4級アンモニウム塩）を官能基とする IEC QA-825（昭和電工）を使用した。移動相は(A); 20 mM Tris-HNO₃ buffer (pH 8.6), (B); 20 mM Tris-HNO₃ buffer (pH 8.6) + 0.25 mM NaCl とし、リニアグラジュエント [0 min A・B (100:0) → 25 min A・B (0:100)], 流速は 1 mL/min とした。

4) サンプル

マウスの体重 1 kg 当たり 4 mg の投与量でバナジウム水を経口投与し、1 時間後の血漿をサンプルとした。

II-3-3 結果

タンパク質の分子量の違いを利用して分離するカラム（ゲルろ過カラム）で分離し、多元素同時測定を行った（図8）。その結果、18分に溶出したバナジウム結合タンパク質には硫黄が検出された。21分に溶出したバナジウム結合タンパク質には鉄が検出された。

タンパク質のイオン性の違いを利用して分離するカラム（陰イオン交換カラム）で分離し、多元素同時測定を行った（図9）。その結果、12分に溶出したバナジウム結合タンパク質には鉄が検出された。24分に溶出したバナジウム結合タンパク質には硫黄が検出された。カラムの種類の違いにより、バナジウム結合タンパク質の溶出順序が逆転した。

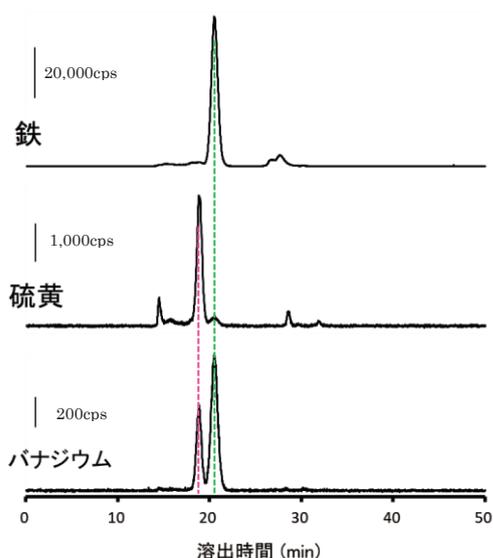


図8 ゲルろ過カラムによるバナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

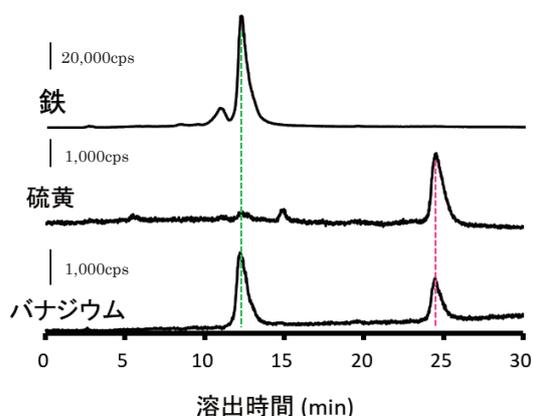


図9 陰イオン交換カラムによるバナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

II-3-4 結論

性質の異なる二つのカラムを用いてバナジウム結合タンパク質を分離した結果、どちらのカラムを用いても、一方のバナジウム結合タンパク質には鉄が結合していることが示された。もう一方のバナジウム結合タンパク質は硫黄を高濃度含んでいることが示された。血漿中で鉄を含むタンパク質はトランスフェリン^{脚注 2)}であることが知られている。硫黄を高濃度含んでいるタンパク質はアルブミン^{脚注 3)}である。鉄の輸送を担っているトランスフェリンはバナジウムとも結合することが報告されている。アルブミンは多数の金属イオンを輸送する働きがある。これらの事実とタンパク質の分子量を考え合わせると、鉄と結合しているバナジウム結合タンパク質はトランスフェリンであり、硫黄を多く含んでいるバナジウム結合タンパク質はアルブミンであると結論づけることができた。

II-4 バナジウム結合タンパク質へのバナジウム親和性の検討

マウスに 4 mg/kg^{脚注 4)} の割合でバナジウム水を 1 回経口投与した場合の血漿中のバナジウム結合タンパク質はトランスフェリンとアルブミンであることが明らかとなった。これら二つのタンパク質へのバナジウムの親和性（結合能）が異なることが考えられる。

II-4-1 目的

トランスフェリンとアルブミンのどちらがバナジウムとの親和性が高いか検討する。

II-4-2 方法

1) バナジウム結合タンパク質の分析

II-2 で結論づけられた条件、カラムに G3000SW、移動相として 50 mM Tris-HNO₃ buffer pH 7.0 を用いて分離を行い、II-2-2 1) に示す条件で、バナジウムを測定した。

2) サンプル

マウスの体重 1 kg 当たり 4 mg、0.4 mg、0.04 mg の投与量でそれぞれバナジウム水を経口投与し、1 時間後の血漿をサンプルとした。

脚注 2) トランスフェリン

血漿に含まれるタンパク質の一種で、鉄(Fe)イオンと結合しその輸送を担っている。鉄以外にもいくつかの金属イオンと結合するが、その結合は可逆的である。特に Fe(III) に対する親和性は極度に高い (pH7.4 で 10²³ M⁻¹)。トランスフェリンは血漿中にある鉄分の約 3 倍量と結合できる能力がある。従って、血漿中の鉄分はほとんどがトランスフェリンに結合している。(生化学辞典より一部改変)

脚注 3) アルブミン

アルブミンは血漿中で一番多く存在するタンパク質で、血漿タンパク質の約 50~65%を占めている。585 個のアミノ酸から成り、そのうち 41 個が硫黄を含むアミノ酸である。アルブミンは血液の浸透圧調整の役割を担っている。また、血漿中存在する脂肪酸やビリルビン、金属イオンあるいは酸性薬物などの外来物質と結合し、それらの保持や運搬の機能がある。(生化学辞典より一部改変)

脚注 4) バナジウム投与量

4 mg/kg は最小致死量の 1/5 に相当する量。

最小致死量：22 mg/kg、50%致死量：79 mg/kg、100%致死量：138 mg/kg (著者の実験データより)

II-4-3 結果

4 mg/kg のバナジウム水をマウスに1回投与し、1時間後の血漿中のバナジウムはトランスフェリンとアルブミンに結合していた (図10 上段)。0.4 mg/kg 投与において、バナジウムは4 mg/kg の場合と同様にトランスフェリンとアルブミンに結合していたが、その量は共に少なくなっていた (図10 中段)。0.04 mg/kg 投与においては、バナジウムはトランスフェリンにのみわずかに結合するだけであった (図10 下段)。図中の赤線はタンパク質をモニターするための280 nmの吸光度である。どの投与量においてもパターンの大きさに違いはないことから、タンパク質の量に変動は無いと考えられる。

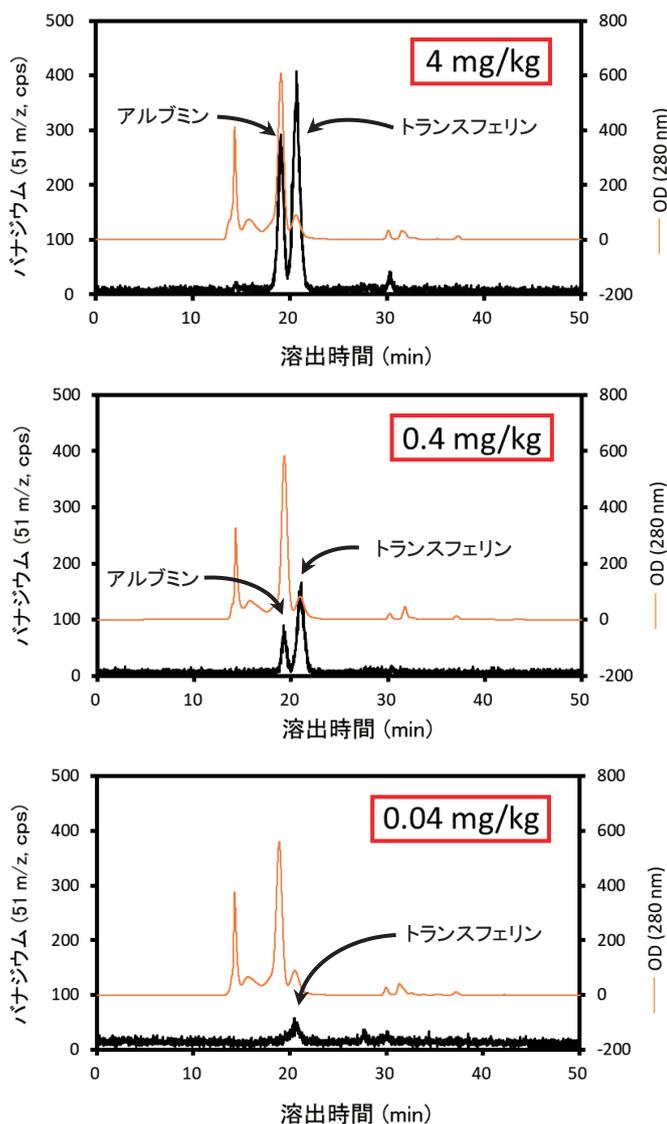


図10 バナジウム投与量の違うマウス血漿中のバナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

II-4-4 結論

バナジウムの投与量を段階的に少なくしていくと、血漿中のトランスフェリンとアルブミンに結合するバナジウムの量は減少した。そして、アルブミンに結合するバナジウムがほとんど検出できない条件においても、トランスフェリンにはバナジウムが結合していた。これらの結果から、血漿中においてバナジウムはアルブミンに比ベトランスフェリンとの親和性が高いことが明らかとなった。

II-5 富士北麓地域住民の血漿中バナジウム存在形態の検討

バナジウムを含む水道水で生活している富士北麓地域住民と、水道水にほとんどバナジウムを含まない甲府地域住民とで、血漿中バナジウムの量ならびに存在形態に違いがあることが予想される。この仮説を検証するため、富士北麓地域および甲府地域からボランティアを集い検討する必要がある。

II-5-1 目的

富士北麓地域住民および甲府地域住民の血漿中バナジウムの量ならびに存在形態を分析する。

II-5-2 方法

1) 採血ボランティア

水道水にバナジウムが含まれている富士北麓地域に在住している山梨県富士山科学研究所の職員をボランティアとして募集した。水道水にバナジウムが含まれていない甲府地域に在住している山梨県産業技術センターの職員をボランティアとして募集した（表2）。なお、この実験は富士山科学研究所倫理委員会の承認を得て開始した。

表2 採血ボランティアの属性

	甲府地域 住民	富士北麓 地域住民
人数	10	10
性別	男	男
平均年齢	44.4	43.7

2) 血漿中総バナジウム量の測定

ボランティアから得られた血液に抗凝固剤（ヘパリン）を加え、遠心して血漿を分離した。得られた血漿0.1 mLに硝酸2 mL、過酸化水素水0.5 mLを加え、120℃で加熱して湿式灰化を行った後、2 mLにメスアップして総バナジウム測定用サンプルとした。ICP-MSによる総バナジウムの測定はII-1-2で検討を行ったコリジョンセルありの条件で測定を行った。

3) 血漿中バナジウム結合タンパク質の分析

II-2で結論づけられた条件を用いてタンパク質の分離を行い、II-2-2 1)と同様の条件で、バナジウムを測定した。

4) 有意差検定

有意差検定は一元配置の分散分析を行い、有意と認められた場合（ $p < 0.05$ ）、 t -検定を行った。

II-5-3 結果

図11に示すごとく、水道水にバナジウムが含まれている富士北麓地域住民の血漿中バナジウム濃度は、甲府地域と比べて有意に高いことが確認できた。甲府地域住民の血漿中バナジウム濃度がゼロでないのは、食品中にもバナジウムが含まれているためと考えられた。

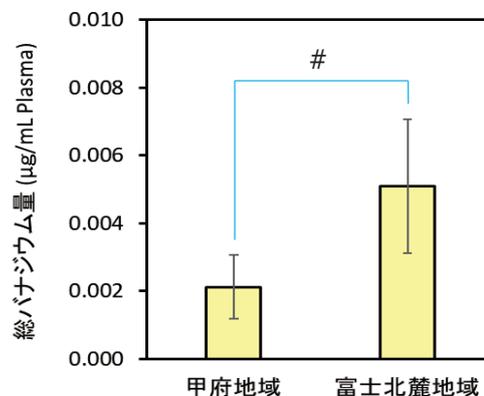


図11 富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中総バナジウム量（平均値±SD）

甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質を測定した結果（図 12 上段）、バナジウムはトランスフェリンにわずかに結合していることが明らかとなった。富士北麓地域住民においても、バナジウムはトランスフェリンにのみ結合していた（図 12 下段）。図中の赤線はタンパク質をモニターするための 280 nm の吸光度である。どちらの住民においてもパターンの大きさに違いはないことから、タンパク質の量に違いは無いと考えられる。

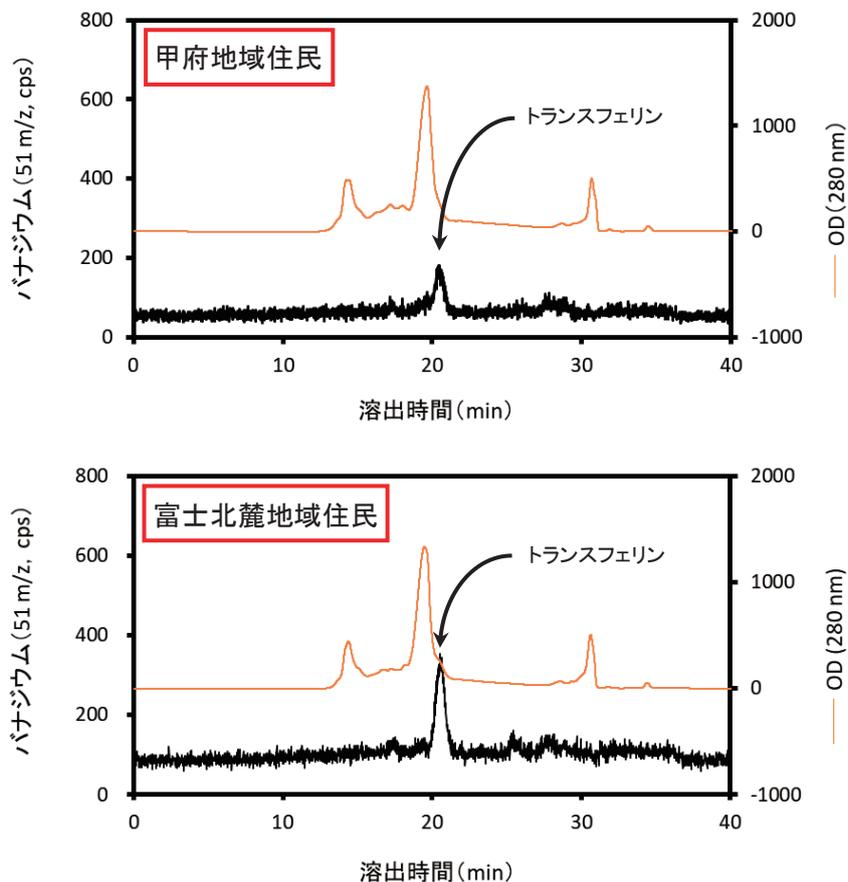


図 12 富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

II-5-4 結論

富士北麓地域住民の血漿中総バナジウム量は、甲府地域住民より有意に高いことが示された。甲府地域住民の血漿において、バナジウムはわずかにトランスフェリンに結合していた。また、富士北麓地域住民の血漿においても、バナジウムはトランスフェリンにのみ結合した。しかし、その量は甲府地域住民より多いことが示された。これらの結果から、富士北麓地域の水道水に含まれるバナジウム濃度（約 0.1 mg/L）は、トランスフェリンに結合するが、アルブミンには結合する量ではないと考えられた。

II-6 バナジウム水連続投与マウスの血漿中バナジウム存在形態の検討

富士北麓地域の水道水に含まれるバナジウム濃度である 0.1 mg/L の摂取では、バナジウムはトランスフェリンにしか結合しない。そこで、高濃度に調製したバナジウム水を摂取した場合、バナジウムがアルブミンに結合するか検討し、毒性との関連性を確認する必要がある。なお、ヒトを対象とした実験は安全性に問題があるので実験動物で行う必要がある。

II-6-1 目的

各種濃度のバナジウム水 (2, 10 および 50 mg/L) を 6 か月間飲料水として与えたマウスの血漿中バナジウム存在形態を分析し、毒性との関連性を検討する。また、0.1 mg/L のバナジウム水を与える実験群も設定し、II-5 で示されたヒトの結果が、マウスで再現されるか検討を行う。

II-6-2 方法

1) 動物

C57BL/6J マウス、オス 4 週齢を日本エスエルシー株式会社より購入して実験に用いた。

2) 飼育条件

5 匹ずつプラスチックケージに入れて、温度、湿度、照明、空調を 24 時間管理された SPF ルームで飼育した。毎週、動物の体重ならびに飲水量の測定を行った。

3) エサ

ミルクカゼインとコーンスターチをタンパク源、結晶セルロースを繊維源とし、ビタミン混液 (CLEA 精製) ならびにバナジウムを含まないミネラルミックス (AIN-76) を加え、コーン油でカロリー量を 350 kcal/100g に調製した特殊飼料 (日本クレア株式会社) を自由摂取させた。

4) 飲料水

0.1 mg/L、2 mg/L、10 mg/L ならびに 50 mg/L に調製したバナジウム水を飲料水として自由摂取させた。なお、コントロール群にはイオン交換水 (0 mg/L) を与え、同様に飼育した。

5) 血液検査

血漿をサンプルとして、富士ドライケム 3500 (富士メディカル株式会社) を用いて、肝障害の指標として ALT (アラニンアミノトランスフェラーゼ) を、腎障害の指標として BUN (血中尿素窒素) を測定した。

6) 血漿中総バナジウム量の測定

II-5-2 2) と同様の方法で測定した。なお、血漿は 0.05 mL を用いた。

7) 血漿中バナジウム結合タンパク質の分析

II-5-2 3) と同様の方法で分析した。

8) 有意差検定

有意差検定は一元配置の分散分析を行い、有意と認められた場合、Dunnet の多重比較を行った。なお、有意水準は 0.05 とした。

II-6-3 結果

各種濃度のバナジウム水を 6 か月間与えてマウスを飼育した。図 13 左に示すごとく、0.1 mg/L および 2 mg/L のバナジウム水を与えたマウスの体重は、コントロール群 (0 mg/L) と差は認められなかった。図 13 右に示すごとく、10 mg/L のバナジウム水を与えたマウスの体重も、コントロール群 (0 mg/L) と差は認められなかった。しかし、50 mg/L のバナジウム水を与えた場合、体重の増加抑制が認められた。

6 か月後に血液検査を行った (図 14)。ALT ならびに BUN は共にコントロール群と有意な差は認められな

かった。従って、肝臓および腎臓に毒性は認められないと考えられた。

図 15 に示すごとく、6 か月後に血漿中総バナジウム量を測定した結果、マウスに与えたバナジウム水の濃度に依存して増加していた。

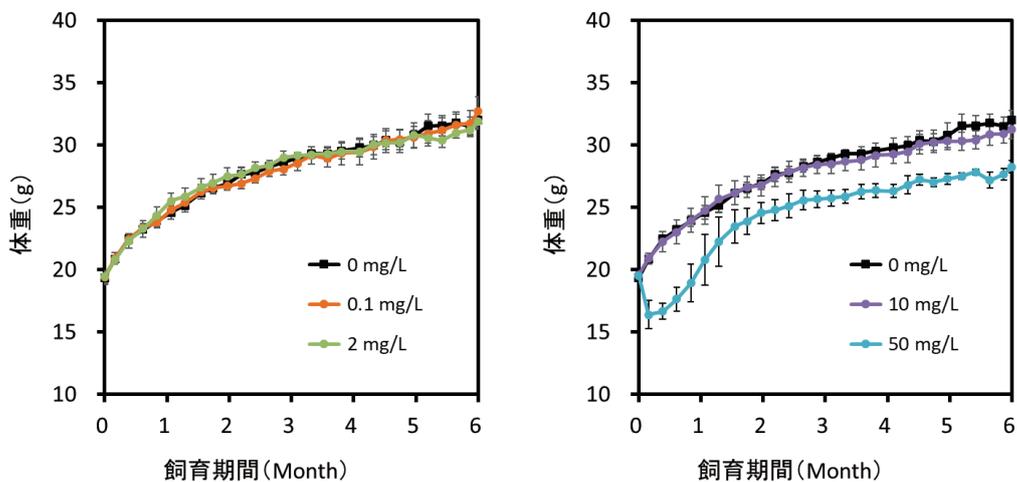


図 13 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの体重変化（6 か月間）

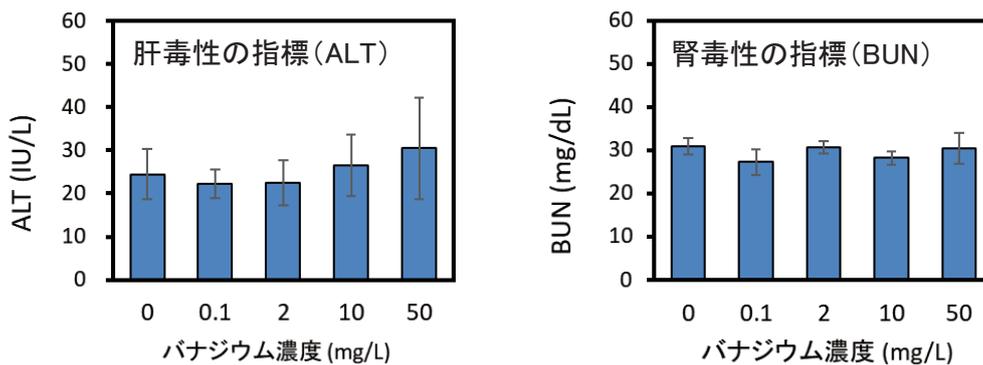


図-14 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血液検査（平均値±SD）

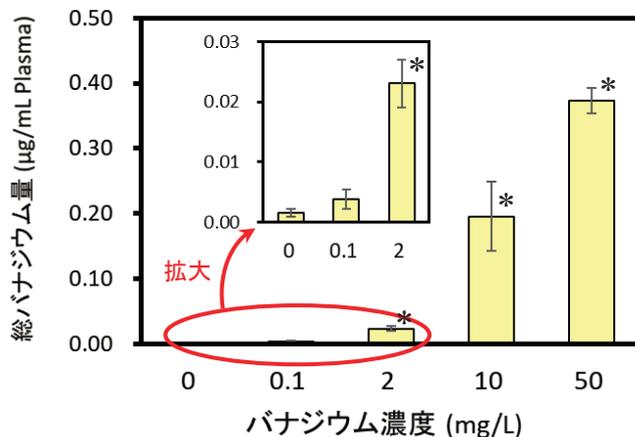


図 15 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中総バナジウム濃度（平均値±SD）

*バナジウム濃度 0 mg/L との有意差 : $p < 0.05$

図 16 に各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラムを示す。0.1 mg/L 投与群では0 mg/L 投与群と同様にトランスフェリンにのみバナジウムが結合していることが認められた。2 mg/L 投与群ではトランスフェリンへの結合量が増加し、わずかにアルブミンに結合している痕跡が認められた。10 mg/L の投与群において、バナジウムはトランスフェリンに大量に結合し、アルブミンにも結合することが示された。50 mg/L 投与群では、10 mg/L の投与群に比べアルブミンへのバナジウム結合が増加していた。

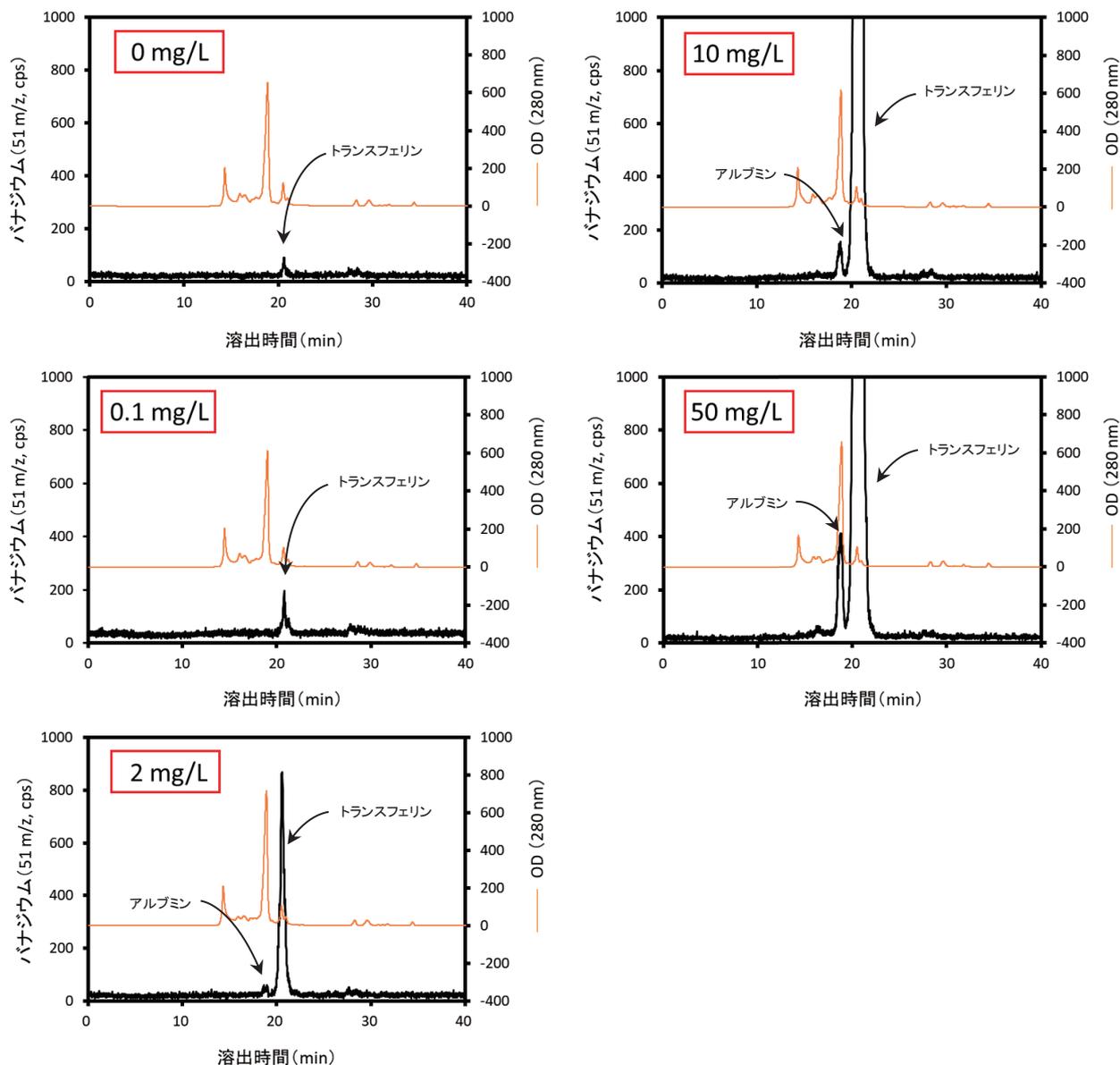


図 16 各種濃度バナジウム水で飼育したマウスの血漿中バナジウム結合タンパク質のクロマトグラム

II-6-4 結論

6 か月間マウスの体重を測定した結果、50 mg/L のバナジウム水を与えたマウスは体重の増加が抑制された。しかし、血液検査の結果においては、肝臓および腎臓に毒性発現は認められなかった。血漿中の総バナジウム量は投与量依存的に増加した。

0.1 mg/L 投与群の血漿中バナジウム結合タンパク質を分析した結果、バナジウムはトランスフェリンにのみ結合することが確認された。2 mg/L 投与群ではトランスフェリンへの結合量が増加し、わずかにアルブミンに結合していることが確認された。10 mg/L 投与群では、バナジウムはトランスフェリンに大量に結合しており、アルブミンにも結合していることが示された。体重増加抑制を示した 50 mg/L 投与群では、10 mg/L のバナジウム水を与えた場合に比べ、アルブミンへの結合割合が増加した。

これらの結果から、血漿中でバナジウムはトランスフェリンへの結合が飽和した場合、アルブミンに結合し、さらに投与量が増えるとアルブミンへの結合も飽和し、反応性の高いフリーのバナジウムが血漿中に認められるようになり毒性発現に至る可能性が考えられた。

II-7 赤血球中のバナジウムの存在形態の検討

血漿中のバナジウム結合タンパク質に関してはいくつかの成果が認められた。次に、赤血球中のバナジウムに関する検討を行う。

II-7-1 目的

赤血球中へのバナジウム取り込み量ならびにその経時変化を明らかにし、次いで赤血球中のバナジウムの存在形態の分析を行う。

II-7-2 方法

1) 血漿ならびに赤血球中のバナジウム量の測定

(1) マウス

C57BL/6J マウス、オス 4 週齢を日本エスエルシー株式会社より購入して実験に用いた。

(2) 実験プロトコール

マウスにバナジウム水を体重 1 kg 当たり 0.4 mg ならびに 2 mg の割合で 1 回経口投与した。投与 1 時間後および 24 時間後にそれぞれ腹部大静脈から採血を行い、血漿ならびに赤血球サンプルを調製した。なお、マウスはそれぞれ 5 匹ずつとした。コントロール群にはイオン交換水を投与し同様に採血を行った。

(3) 総バナジウム量の測定

血漿ならびに赤血球 0.05 mL に硝酸 2 mL、過酸化水素水 0.5 mL を加え、II-5-2 2) と同様の方法で分析した。

2) 血漿ならびに赤血球中のバナジウム経時変化の測定

(1) マウス

C57BL/6J マウス、オス 4 週齢を日本エスエルシー株式会社より購入して実験に用いた。

(2) 実験プロトコール

マウスにバナジウム水を体重 1 kg 当たり 0.4 mg ならびに 2 mg の割合で 1 回経口投与した。投与 0.5, 1, 2, 4 および 24 時間後にそれぞれ腹部大静脈から採血を行い、血漿ならびに赤血球サンプルを調製した。なお、マウスはそれぞれ 5 匹ずつとした。コントロール群にはイオン交換水を投与し、同様に採血を行った。

(3) 総バナジウム量の測定

II-7-2 1) (3) と同様の方法で測定を行った。

3) 赤血球中のバナジウム存在形態の分析

(1) マウス

C57BL/6J マウス、オス 4 週齢を日本エスエルシー株式会社より購入して実験に用いた。

(2) 実験プロトコール

マウスにバナジウム水を体重 1 kg 当たり 0.4 mg ならびに 2 mg の割合でそれぞれ 1 回経口投与した。投与 1 時間後に採血を行い、赤血球サンプルを調製した。マウスはそれぞれ 5 匹ずつとした。

(3) 赤血球中のバナジウム存在形態の分析

赤血球サンプルに等量の蒸留水を加え、超音波ホモジナイザーを用いて溶血させた。遠心して膜画分を取り除いて、存在形態分析用サンプルとした。これを II-5-2 3) と同様の方法で分析した。なお、カラムには血漿の場合と同様に G3000SW を用い、移動相は 50 mM Tris-HNO₃ (pH 6.8) とした。

8) 有意差検定

有意差検定は二元配置の分散分析を行い、有意と認められた場合、Dunnet の多重比較あるいは t-Test による 2 群比較を行った。なお、有意水準は 0.05 とした。

II-7-3 結果

バナジウム投与 1 時間後の血漿ならびに赤血球中のバナジウム量の測定を行った (図 17)。血漿も赤血球もバナジウムの投与量の増加に伴いバナジウム量が増加した。しかし、赤血球のバナジウム量はいずれの投与量においても血漿の 25% 前後で有意に少なかった。

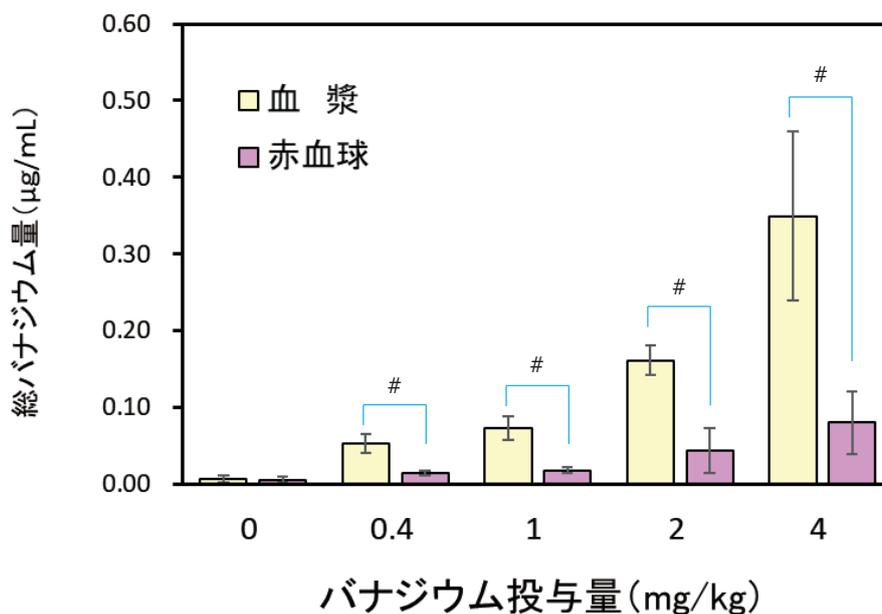


図 17 バナジウム水投与 1 時間後の血漿ならびに赤血球中の総バナジウム量 (平均値±SD)
#血漿中バナジウム量と赤血球中バナジウム量との有意差 : $p < 0.05$

図 17 に示された結果より、血漿に比較して赤血球へのバナジウム蓄積量が少ないことが示された。そこで、取り込み速度と排泄速度を検討するため、0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg 投与後の血漿と赤血球中のバナジウムを経時的に測定した。図 18 ならびに図 19 に示すごとく、血漿では投与 1~2 時間後に最大値を示した。赤血球では 2 時間後が最大値となりすぐに減少することが明らかとなった。特に、赤血球中のバナジウムは 24 時間後には投与前 (0 時間) と同じ値を示した (図中の緑点線)。また、4 時間後から 24 時間後の間での測定は行っていないが、2 時間後から 4 時間後までの傾きを延長すると (図中の赤色点線) 6~10 時間後には赤血球からバナジウムが消失している可能性も考えられた。したがって、赤血球中でのバナジウムの消失速度 (ターンオーバー) は血漿と比べ速いことが予想された。

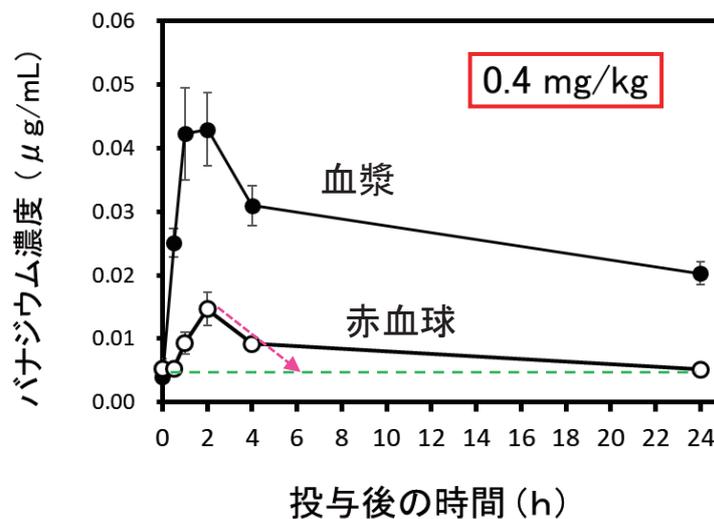


図 18 バナジウム水投与 (0.4 mg/kg) 24 時間における血漿ならびに赤血球中のバナジウム濃度変化

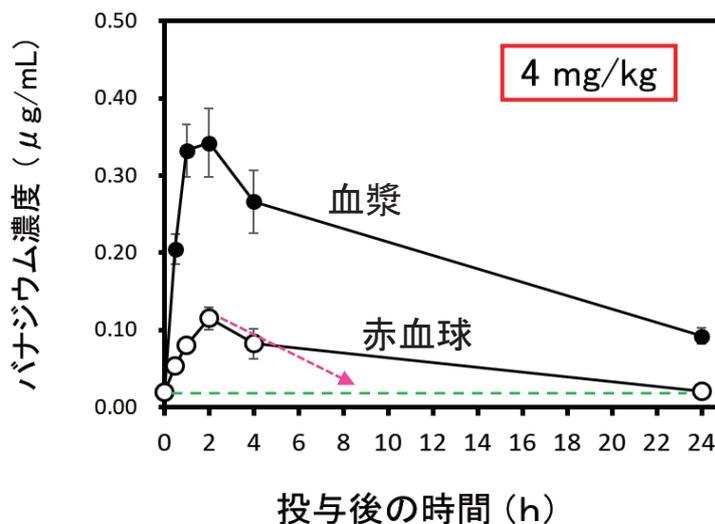


図 19 バナジウム水投与 (4 mg/kg) 24 時間における血漿ならびに赤血球中のバナジウム濃度変化

マウスに 0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg の割合でバナジウムをそれぞれ投与し、1 時間後の赤血球中のバナジウムの存在形態を分析した。図 20 左に示すごとく、0.4 mg/kg のバナジウム水を投与した場合、バナジウムは 27 分にわずかに溶出することが認められた。この溶出位置は赤血球に大量にあるヘモグロビンの溶出位置と一致した。図中の青線はヘモグロビンの溶出位置を 540 nm の吸光度 (OD) で測定した結果である。マウスに 4 mg/kg の割合でバナジウムを投与した場合 (図 20 右)、ヘモグロビン画分のバナジウムは大きくなり、20 分にもわずかなバナジウムの溶出が認められた。従って、赤血球に取り込まれたほとんどのバナジウムはヘモグロビンに結合する可能性が考えられた。そこで、多元素分析による検討を行った。

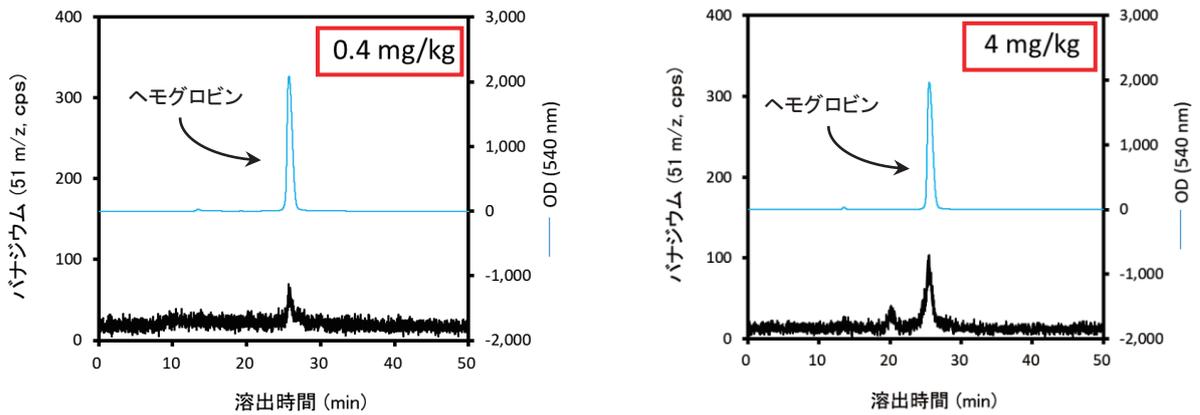


図 20 バナジウム水投与 1 時間後の赤血球中のバナジウムのクロマトグラム

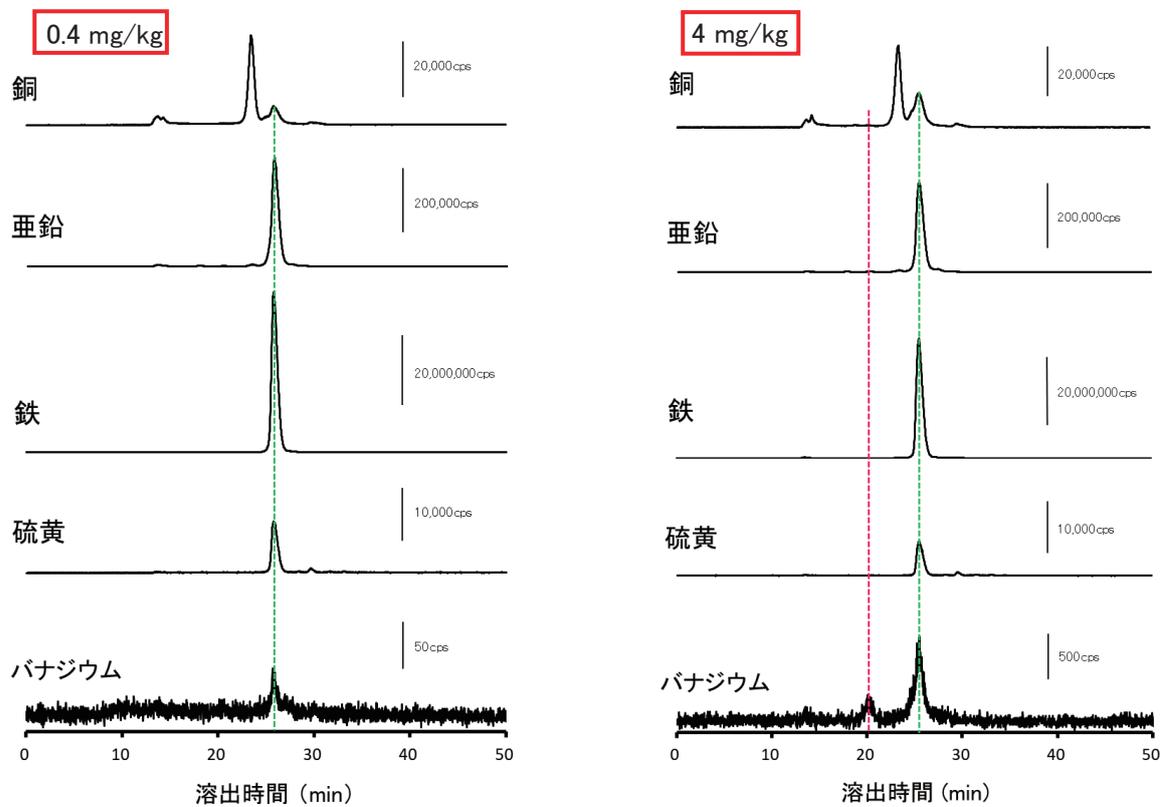


図 21 バナジウム水投与 1 時間後の赤血球中のバナジウムのクロマトグラム (多元素同時測定)

図 21 に多元同時分析を行った結果を示す。0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg のバナジウム水を投与した場合に、バナジウムが共に認められたヘモグロビン溶出画分に硫黄、鉄、亜鉛および銅が検出された。ヘモグロビンはポルフィリン環をもち、その中心に鉄が配位している。従って、鉄の検出は予想通りである。また、ヘモグロビンの構成アミノ酸に、硫黄を含むシステインおよびメチオニンが特に多いことはない。しかし、赤血球一つにヘモグロビン分子が 2 億 5 千万個、重量比で 95% 含まれていることから、ヘモグロビン画分に硫黄が検出されてもおかしくない。しかし、ヘモグロビンには亜鉛や銅が含まれないため、亜鉛の大きなピークと銅の小さなピークが検出されたことは想定外であった。これらのことから、ヘモグロビン溶出画分には、ヘモグロビン以外のタンパク質が含まれる可能性が考えられ、バナジウムがそのタンパク質に結合していることも考えられた。また、4 mg/kg 投与マウスに認められた 20 分のバナジウムの小さなピークには、他の金属元素は検出されず、このタンパク質を解明するための手掛かりを得ることができなかった。

II-7-4 結論

血漿ではバナジウム投与 1~2 時間後に最大値となり、赤血球では 2 時間後に最大値を示した。赤血球中の濃度は血漿中に比べ少なかった。また、24 時間後には赤血球中にはバナジウムの蓄積は認められなかった。もっと早い時間（6~10 時間後）にし消失している可能性も考えられた。

赤血球中のバナジウムの存在形態を分析した結果、バナジウム水を 0.4 mg/kg ならびに 4 mg/kg の投与量で投与した場合、バナジウムはヘモグロビン溶出画分に認められた。しかし、このバナジウムがヘモグロビンに結合しているのか、ヘモグロビン溶出画分にある別のタンパク質に結合しているのか結論づけることはできなかった。また、4 mg/kg を投与した場合に認められた 20 分の小さなバナジウムのピークについては、今回の検討では存在形態を推測する情報を得ることができなかった。

しかし、赤血球中のバナジウム濃度は、血漿中の濃度に比べ少なく、さらに、赤血球中に維持されない（速やかに赤血球の外に放出される）ため、赤血球中のバナジウムが生体に影響をおよぼすことは少ないと考えられた。

II-8 まとめ

- 血漿中でのバナジウムの輸送に関与するバナジウム結合タンパク質はトランスフェリンとアルブミンの二つあることを明らかにした。
- トランスフェリンとアルブミンを比べた結果、バナジウムはトランスフェリンとの親和性が高いことが示された。
- 富士山周辺の地下水に含まれるバナジウム濃度レベル 0.1 mg/L を 6 か月間マウスに与えて飼育した場合、血漿中バナジウムはトランスフェリンにのみ結合していることが明らかとなった。
- 中毒レベルに準じる高濃度のバナジウム水で飼育したマウスでは、血漿中バナジウムはトランスフェリンとアルブミンに結合することが示された。
- 血漿中でバナジウムはトランスフェリンへの結合が飽和した場合、アルブミンに結合し、さらに投与量が増えると毒性発現に至る可能性が示された。
- バナジウムを含む水道水で生活を行っている富士北麓地域住民と甲府地域住民の血漿中バナジウム結合タンパク質を分析した結果、どちらの住民もトランスフェリンにのみバナジウムが結合していた。しかし、富士北麓地域住民の方が結合しているバナジウムの量が多かった。
- 赤血球中でのバナジウムはヘモグロビン画分に溶出するタンパク質（ヘモグロビンを含む）とヘモグロビンより分子量の大きなタンパク質に結合することを明らかにした。

- 赤血球にはバナジウムは取り込まれにくく、取り込まれた少量のバナジウムは6～10時間後には赤血球の外へ放出されることが示された。
- バナジウムを摂取した場合、血漿中でバナジウム結合はトランスフェリンと結合し、臓器や組織に輸送される。今後、組織への取り込み機構や組織中でのバナジウムの存在形態を分析し、バナジウムの生理作用に関する研究を進める必要がある。

R-04-2020

令和1年度
山梨県富士山科学研究所研究報告書
第42号

MFRI Research Report

2020年発行

編集・発行
山梨県富士山科学研究所

〒403-0005 山梨県富士吉田市上吉田剣丸尾 5597-1
電話：0555-72-6211
FAX：0555-72-6204
<http://www.mfri.pref.yamanashi.jp/>
