

生殖にかかわる必須微量栄養素としてのニッケルの生理作用

横井 克彦^{1)†}

¹⁾聖徳大学大学院人間栄養学研究科*

(受付 2022 年 9 月 12 日, 受理 2022 年 10 月 7 日)

Physiological function of nickel as an essential trace nutrient for reproduction

Katsuhiko YOKOI¹⁾

¹⁾Department of Human Nutrition, Seitoku University Graduate School

Summary

Physiological function of nickel as an essential nutrient for reproduction is discussed. Nickel deficiency induces abnormality in reproduction. In goats, nickel deficiency decreases the success rate of the first insemination and increases the abortion rate. In minipigs, nickel deficiency causes a retardation in pregnancy and delivery of offspring. In rats, nickel deficiency causes a decrease in epididymal sperm density, spermatozoa motility, epididymal transit time, and testicular sperm production rate, as well as weights of seminal vesicles and prostates. Since cyclic nucleotide-gated (CNG) cation channel subunits A3 and B1 distribute in the sperm flagellum, potentiation of CNG channels by Ni²⁺ may be responsible for reproductive abnormality induced by nickel deficiency. Since Ni²⁺ stabilizes the C3-convertase C3b-Bb complex in the alternative pathway of the complement system and seminal plasma contains a relatively high level of nickel, nickel may have a role in preventing male reproductive tract infection.

ニッケルは米国・カナダの Reference Dietary Intakes では、必須ミネラルとして各種摂取基準の策定対象となっているが、実際には上限値のみ定められているだけであり¹⁾、必須ミネラルとしての生理作用はあまり知られていない。本総説では、生殖にかかわる必須ミネラルとしてのニッケルの生理作用について論ずる。

精子機能に係わる

環状ヌクレオチド作動性陽イオンチャンネル

精子の鞭毛運動は Ca²⁺ イオンの流入によっておこるが、精子には多種多様なカルシウムを通すチャンネルが存在し²⁾、重層的な仕組みで鞭毛運動が調節されている。その中でも特にニッケルとの関係が注目されるのは、環状ヌクレオチド作動性陽イオンチャンネル (cyclic nucleotide-gated cation channel, CNG チャンネル) である。

CNG チャンネルは、視覚と嗅覚の情報伝達を含む広範な機能を担っている³⁾。網膜杆体に含まれる CNGA1 サブユニット 4 つから作製された人工的な CNG チャンネルも環状ヌクレオチドの結合によって開放するが、ニッケルイオン (Ni²⁺) が共在すると、この開放状態を安定化し、チャンネル

のイオン透過性を高めること (Ni²⁺ による増強) が知られていた⁴⁾。網膜杆体の本来のチャンネルは、A1 が 3 つ、B1 が 1 つのヘテロテトラマーからなり、従来知られていた複数のサブユニットで形成する 1 段目のイオン孔とは異なる 2 段目のイオン孔を B1 単独で形成することが最近わかった⁵⁾。また、A1 サブユニットを改変し、Ni²⁺ が結合できないようにしても、B1 が元のアミノ酸配列のままであれば、Ni²⁺ による増強が生ずる⁶⁾。すなわち、Ni²⁺ による CNG チャンネルの増強は、B1 サブユニットへの Ni²⁺ の結合に起因するものである。

Wiesner ら⁷⁾ は、牛の精子には、mRNA の分析から CNGB1 が発現していること、並びに、免疫染色によって CNGA3 タンパクが鞭毛全体に分布し、CNGB1 タンパクが鞭毛主部の近位のみ分布することを明らかにした。さらに、フラッシュフォトリシスを用いて CNG を cGMP で刺激することにより Ca²⁺ イオンが流入し、鞭毛運動が生ずることを明らかにした。

マウスの精子を用いた Cisneros-Mejorado らの研究⁸⁾ では、CNG の特異的阻害薬である 1-cis-diltiazem によって 8Br-cGMP が惹起する精子細胞膜のイオン電流の発生が阻止されることにより、精子細胞膜における CNG の存在が

*所在地：千葉県松戸市岩瀬550 (〒271-8555)

†連絡先 (Corresponding Author), Tel: 047-365-1111, E-mail: yokoi@wa.seitoku.ac.jp

確認された。マウスの精子において、CNGをl-cis-diltiazemで阻害することにより、Ca²⁺イオンの流入と精子の受精能の獲得が阻止される。

精子鞭毛にはCNGA3とCNGB1が発現していることから⁷⁾、精子鞭毛のCNGチャネルは網膜錐体型^{3,9)}ないし、それに類似の構造である。精子鞭毛のCNGチャネルはCNGB1サブユニットを持つため、網膜杆体のCNGチャネル同様にニッケルの充足によって増強して精子の運動能が高まり、逆に、ニッケルの不足によって精子の運動能が低下する可能性がある。

ニッケル欠乏動物で見られる生殖障害

ニッケル欠乏による動物の生殖障害に関する報告は、ニッケルの必須性研究の初期に遡る。ニッケルは超微量元素であり、その飼育実験には、空気中の塵や飼育ケージ、飲み水からのニッケルの混入を除去した超微量元素飼育システムを用いる必要がある¹⁰⁾。Nielsenらは、ニッケル欠乏飼料で飼育したラットの交配実験では、第1世代から第3世代に至るまで周産期の死亡率が上昇し、仔ラットの発育不良を招くことを報告している¹⁰⁾。しかしながら、交配への影響は検討されなかった。

Ankeらは、ニッケル充足飼料(10 mg Ni/kg)とニッケル欠乏飼料(<100 µg Ni/kg)で動物を飼育し、交配への影響を調べた。ニッケル欠乏飼料による飼育は、ヤギの1回目交配における受精成功率の低下と、ミニブタにおける妊娠・分娩の数日間の遅延発生率の上昇を招いた¹¹⁾。Ankeらは、さらにニッケル欠乏ヤギの交配実験を15回繰り返した結果を集計した。ニッケル充足ヤギ89頭とニッケル欠乏ヤギ96頭を比較した結果、ニッケル欠乏ヤギの交配では、1回目の受精と受胎の成功率が低下し、妊娠させるために必要な交配の回数と流産率が上昇することを発見した¹²⁾。これらの結果から、ニッケル欠乏が、受精障害ならびに妊娠障害、子宮内での胎児の発育不良を招くことが明らかである。しかしながら、それ以上の詳細な検討はなされなかった。

Yokoiらは、男性生殖機能に着目し、ラットを用いた動物実験を実施した。その結果、ニッケル欠乏飼料(27 µg Ni/kg)による飼育は、精嚢と前立腺の重量の低下、精巢上体中の精子総数と精子密度の低下、精子の運動率の低下、精巢での精子産生の低下、精子の精巢上体通過時間の短縮を招くことを発見した¹³⁾。また、精子の運動率は、生理食塩水中よりもCa²⁺を含むmedium 199中の方が高かった。メカニズムは必ずしも明らかではないが、ニッケル欠乏による精子の運動率の低下はCNGの分子機構に適合する。精子は精巢上体内に一定期間留まることにより成熟するので、通過時間の短縮は精子の成熟を阻害する。なお、精巢上体管には、ナトリウムチャネルであるENaCやクロライドチャネルであるCFTRが分布し、精子の精巢上体通過を調節している¹⁴⁾、ニッケルがこれらのチャネル機

能に関与している可能性がある。

また、Lucacらが、牛の精子をニッケルとともに孵置して精子の運動能を調べたところ、直線前進速度が、低濃度のニッケルでは上昇し、高濃度のニッケルでは低下したことから¹⁵⁾、精子の運動能を高めるのに適切なニッケル濃度範囲のあることが明らかとなった。

ヒト精子におけるニッケルの生理機能

イラクのPalaniとAlshatteriは、男性不妊106名(内訳：乏精子無力症38名、精子無力症27名、正常精子性状41名)と妊娠能のある男性25名の精漿中金属濃度を測定した¹⁶⁾。妊娠能のある男性の精漿に比べて、男性不妊かつ乏精子無力症と男性不妊かつ正常精子性状の男性の精漿では、ニッケル濃度とモリブデン濃度が低下していたが、他の金属(カルシウム、マグネシウム、亜鉛、銅、鉄、セレン)濃度には差がなかった¹⁶⁾。なお、Palaniの論文のTable 2のデータ¹⁶⁾を見ると、妊娠能のある男性の精漿中ニッケル濃度と、男性不妊かつ精子無力症の男性の精漿中ニッケル濃度をt検定で比較した結果、両側確率は0.018であった。PalaniとAlshatteriの研究は、妊娠能のある男性の精漿を対照として、男性不妊かつ乏精子無力症の精漿、男性不妊かつ精子無力症の精漿、男性不妊かつ正常精子性状の精漿を比較した1対3の対比較すなわち総計3対の比較である¹⁶⁾。最も保守的な多重比較として上記のt検定の結果にBonferroniの補正を適用して危険率を3倍しても0.054であった。また、Scheffé法で敢えて全対比較しても危険率は0.027であった。したがって、妊娠能のある男性の精漿中ニッケル濃度に比べて、男性不妊かつ精子無力症の男性の精漿中ニッケル濃度は有意に低下していたと判断するのが妥当である。

さらに、PalaniとAlshatteriの研究では、精漿中ニッケル濃度と不動性精子の割合および精子の尾部異常の割合の間には、それぞれ有意な負の相関関係があった。著者らは、これらの結果からヒトにおいてニッケルには、精子運動と正常な精子の産生を高める機能があると推測している¹⁶⁾。

Bianら¹⁷⁾は、中国揚子江デルタに在住する男性205人の精液・精子の性状と精漿中ミネラル濃度を分析した。精子の運動能が40%以上の男性103人に比べて、精子の運動能が40%未満に低下していた男性102人では、精漿中ニッケル濃度が有意に低かった(10.22±3.83対5.69±1.93 µg/L, mean±SD)。なお、精子の運動能が低下していた男性の精液中精子数、精子の前進能およびその他の精子運動能指標はすべて低下していた。ニッケル以外には、精子の運動能の低下に、精漿中濃度の低下を伴うミネラルはなく、むしろ精子の運動能が低下していた男性の精漿中マグネシウム、硫黄、亜鉛、ヒ素濃度は有意に上昇していた。

Bianらの調査¹⁷⁾は横断研究であり、交絡因子の影響の

除去は困難で、因果関係の推定はできない。そこで、彼らは、運動能が低下していた男性の精液から精子を分離濃縮し、生理食塩水に硫酸ニッケルを加えて孵置し、精子の運動能を調べた。その結果、精子の運動能および前進能は Ni^{2+} 濃度が $1 \mu\text{mol/L}$ までは用量依存性に上昇し、それ以上の濃度では低下した。ヒトにおいても、正常な精子運動能の発現には、適切な精漿中ニッケル濃度範囲があることを示唆する結果である。

Rodriguez-Diaz らが、不妊外来を受診したカナリア諸島在住の男性 102 名の精漿中金属濃度を調べた結果、精子性状が正常の男性 61 名に比べて乏精子症の男性 13 名の精漿中ニッケル濃度は低下傾向 (t 検定で $P=0.070$) であった¹⁸⁾。その他の金属 (アルミニウム, ストロニウム, バナジウム, 鉛) 濃度には差がなく、精子性状と精漿中金属濃度の間の関連はなかった¹⁸⁾。

候補が複数あり、どのタンパクがその機能を担っているのか必ずしも明らかではないが、精子には卵子の透明帯と結合する受容体があり、この結合が通常ないし自然な受精に必要な過程である¹⁹⁾。透明帯を構成するタンパクはマンノースを含む糖鎖を持っており、これがリガンドとなって精子の受容体に結合するので、これに似せたマンノース化牛血清アルブミンと精子の結合の程度が、精子の透明帯結合能力の指標となる²⁰⁾。Benoff らは、Modified HAM's F-10 培地中で培養したヒト精子とマンノース化牛血清アルブミンの結合が、低濃度のニッケルで上昇し、高濃度のニッケルでは低下することを明らかにした²¹⁾。すなわち、受精の際に適量の低濃度のニッケルが存在すると、精子の透明帯への結合能が高まることを示唆する。Palani と Alshatteri らは、上に記載した男性不妊かつ正常精子性状の男性でも精漿中ニッケル濃度が低下していたことから、マンノース結合能を持った精子受容体の機能の発現にニッケルが必要であり、その不足が受精率の低下を招き、精子の運動能が性状であっても男性不妊を来たすことがあると推定している¹⁶⁾。

これらの結果はいずれもニッケル欠乏に関する動物実験の結果¹¹⁻¹³⁾と一致するものである。

なお、ニッケルの過剰な曝露は、ヒトにおいても精子数の低下や運動能の低下を招く可能性があるが²²⁾、疫学調査では、精子異常にニッケル以外の金属濃度の上昇も伴っていた。Dabadevi らは、ニッケルとクロムに曝露されたインドの溶接工が、年齢・ライフスタイル・経済状況をマッチングした非曝露者に比べて、精漿中のニッケルとクロム濃度 ($\mu\text{g/L}$) が、それぞれ 16.7 に対して 123.3, 17.4 に対して 131.0 と大幅に上昇し、精子数が約 4 分の 1、精子の前進運動能が約 2 分の 1 に低下していたことを報告している²³⁾。Zafar らもパキスタンにおいて同様の現象を報告している。精子性状が正常に比べて、乏精子症と無精子症の精漿中のニッケルとカドミウム濃度が有意に高値をとり、バナジウム、マンガン、錫濃度が高値傾向 ($0.05 < P < 0.10$) であった²⁴⁾。

補体系におけるニッケルの役割

ヒトの補体系副経路で殺傷される菌は、ほぼ *Neisseria* 属、すなわち、淋菌 *Neisseria gonorrhoeae* と髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* に限られるが^{25, 26)}、補体系副経路はこれらの菌に対する自然免疫として重要な働きを持っている。

ニッケルによって副経路の C3-convertase である C3b-Bb 複合体が安定化される²⁷⁾。また、同量の C3b-Bb の形成に必要な濃度は、ニッケルがマグネシウムの 40 分の 1 であり、C3b-Bb (Ni^{2+}) 複合体の半減期は Mg^{2+} が結合したものの 7.5 倍²⁸⁾ ないし 5 ~ 6 倍²⁹⁾ と長くなる。 Mg^{2+} を用いた場合と同じ補体活性 (溶血能として計測) を生ずるのに必要な各種基質の量は、基質の種類によるが、 Ni^{2+} の場合には 3 分の 1 から 66 分の 1 で済む²⁹⁾。なお、古典経路の C3-convertase である C4b2a もニッケルによって安定化され、補体活性に必要な基質の量も少なくて済む²⁹⁾。*in vitro* で淋菌を補体によって殺菌する際、補体反応溶液中のマグネシウムをニッケルに代えると、殺菌数自体には差がなかったが、Factor B の消費が減り、Factor B の菌体への結合が増強される³⁰⁾。

ヒトの血清中のニッケルは、アルブミンおよび α_2 -マクログロブリンと結合している³¹⁾。 α_2 -マクログロブリンは、あらゆるタイプの活性化された endopeptidase を結合して不活化する巨大なタンパク質分子である³²⁾。したがって、 α_2 -マクログロブリンに結合したニッケルは、 α_2 -マクログロブリン補体系の C3b-Bb (Ni^{2+}) の不活化を反映している可能性がある。

精子の運動能低下は、男性付属腺 (精囊、前立腺等) の感染と関連している³³⁾。ニッケルが感染防御に果たす役割は調査されておらず明らかではないが、精漿中ニッケル濃度は、血漿中ニッケル濃度よりもかなり高く^{17, 31)}、男性生殖器における補体系を介した感染防御にニッケルが役立っている可能性がある。

結語

必須栄養素は不足すれば欠乏症を起し、過剰であれば過剰症を招くが、欠乏でも過剰でも機能低下を招く³⁴⁾。典型例が、ヨウ素であり、欠乏、過剰ともに甲状腺腫と甲状腺機能低下を招く³⁵⁾。ニッケルの不足によっても過剰によっても精子異常を招くので、ニッケルは必須栄養素の反応パターンに合致する。しかしながら、正常な精子機能を維持するのに必要なニッケルの摂取量は不明であり、今後の研究課題である。

参考文献

- 1) Institute of Medicine (2001) Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron,

- chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc (2000). National Academy Press, Washington, DC, USA.
- 2) Darszon A, Acevedo JJ, Galindo BE, Hernandez-Gonzalez EO, Nishigaki T, Trevino CL, Wood C, Beltran C (2006) Sperm channel diversity and functional multiplicity. *Reproduction* 131: 977-988.
 - 3) Kaupp UB, Seifert R (2002) Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev* 82: 769-824.
 - 4) Biel M, Michalakakis S, Ludwig A, Hofmann F (2009) Cyclic nucleotide-gated and hyperpolarization-activated channels, In "Squire LR ed., *Encyclopedia of Neuroscience*". Academic Press, Oxford, p 279-284.
 - 5) Barret DCA, Schertler GFX, Kaupp UB, Marino J (2022) The structure of the native CNGA1/CNGB1 CNG channel from bovine retinal rods. *Nat Struct Mol Biol* 29: 32-39.
 - 6) He Y, Ruiz M, Karpen JW (2000) Constraining the subunit order of rod cyclic nucleotide-gated channels reveals a diagonal arrangement of like subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 895-900.
 - 7) Wiesner B, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998) Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca^{2+} entry into sperm. *J Cell Biol* 142: 473-484.
 - 8) Cisneros-Mejorado A, Hernandez-Soberanis L, Islas-Carbajal MC, Sanchez D (2014) Capacitation and Ca^{2+} influx in spermatozoa: Role of CNG channels and protein kinase g. *Andrology* 2: 145-154.
 - 9) Weitz D, Ficek N, Kremmer E, Bauer PJ, Kaupp UB (2002) Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron* 36: 881-889.
 - 10) Nielsen FH, Myron DR, Givand SH, Zimmerman TJ, Ollerich DA (1975) Nickel deficiency in rats. *J Nutr* 105: 1620-1630.
 - 11) Anke M, Partschefeld M, Grun M, Groppe B (1978) [Nickel-an essential trace element. 3. Effect of nickel deficiency on reproductive performance in female animals]. *Arch Tierernahr* 28: 83-90. (in German)
 - 12) Anke M, Groppe B, Krause U (1988) Further data on the biological essentiality of nickel. In "Hurley LS, Keen CL, Lonnerdal B eds. *Trace elements in man and animals 6*". Plenum, New York, p 467-469.
 - 13) Yokoi K, Uthus EO, Nielsen FH (2003) Nickel deficiency diminishes sperm quantity and movement in rats. *Biol Trace Elem Res* 93: 141-154.
 - 14) Sharma S, Hanukoglu I (2019) Mapping the sites of localization of epithelial sodium channel (ENaC) and CFTR in segments of the mammalian epididymis. *J Mol Histol* 50: 141-154.
 - 15) Lukac N, Bardos L, Stawarz R, Roychoudhury S, Makarevich AV, Chrenek P, Danko J, Massanyi P (2010) In vitro effect of nickel on bovine spermatozoa motility and annexin V-labeled membrane changes. *J Appl Toxicol* 31: 144-149.
 - 16) Palani A, Alshatteri AH (2017) Impact of trace elements in the seminal plasma on sperm quality in infertile men. *ZJPAS* 29: s150-s156.
 - 17) Bian J, Shi X, Li Q, Zhao M, Wang L, Lee J, Tao M, Wu X (2019) A novel functional role of nickel in sperm motility and eukaryotic cell growth. *J Trace Elem Med Biol* 54: 142-149.
 - 18) Rodriguez-Diaz R, Alcaide-Ruggiero L, Rodriguez-Fiestas S, Hess-Medler S, Gonzalez-Perez J, Gutierrez AJ, Hardisson A, Rubio C, Paz S, Gonzalez-Weller D, Blanes-Zamora R (2021) Associations of semen quality with seminal non-essential heavy metals in males from the Canary Islands. *Biol Trace Elem Res* 199: 4525-4534.
 - 19) Tumova L, Zigo M, Sutovsky P, Sedmikova M, Postlerova P (2021) Ligands and receptors involved in the sperm-zona pellucida interactions in mammals. *Cells* 10: 133.
 - 20) Varghese AC, Sinha B, Bhattacharyya AK (2005) Current trends in evaluation of sperm function: In vitro selection and manipulation of male gametes for assisted conception. *Indian J Exp Biol* 43: 1023-1031.
 - 21) Benoff S, Cooper GW, Centola GM, Jacob A, Hershelag A, Hurley IR (2000) Metal ions and human sperm mannose receptors. *Andrologia* 32: 317-329.
 - 22) Chen C, Li B, Huang R, Dong S, Zhou Y, Song J, Zeng X, Zhang X (2022) Involvement of Ca^{2+} and ROS signals in nickel-impaired human sperm function. *Ecotoxicol Environ Saf* 231: 113181.
 - 23) Danadevi K, Rozati R, Reddy PP, Grover P (2003) Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. *Reprod Toxicol* 17: 451-456.
 - 24) Zafar A, Eqani SAMAS, Bostan N, Cincinelli A, Tahir F, Shah STA, Hussain A, Alamdar A, Huang Q, Peng S, Shen H (2015) Toxic metals signature in the human seminal plasma of Pakistani population and their potential role in male infertility. *Environ Geochem Health* 37: 515-527.
 - 25) Janeway J, Charles A., Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001) *Immunobiology: The immune system in health and disease*, 5th edition. Garland

- Science, New York.
- 26) Heesterbeek DAC, Angelier ML, Harrison RA, Rooijackers SHM (2018) Complement and bacterial infections: From molecular mechanisms to therapeutic applications. *J Innate Immun* 10: 455-464.
 - 27) Fishelson Z, Pangburn MK, Müller-Eberhard HJ (1983) C3 convertase of the alternative complement pathway. Demonstration of an active, stable C3b, Bb (Ni) complex. *J Biol Chem* 258: 7411-7415.
 - 28) Pangburn M, Müller-Eberhard H (1986) The C3 convertase of the alternative pathway of human complement. Enzymic properties of the bimolecular proteinase. *Biochem J* 235: 723-730.
 - 29) Fishelson Z, Müller-Eberhard HJ (1982) C3 convertase of human complement: Enhanced formation and stability of the enzyme generated with nickel instead of magnesium. *J Immunol* 129: 2603-2607.
 - 30) Densen P, McRill CM, Ross SC (1988) Assembly of the membrane attack complex promotes decay of the alternative pathway C3 convertase on *Neisseria gonorrhoeae*. *J Immunol* 141: 3902-3909.
 - 31) Nomoto S, FW S (1988) Presence of nickel in alpha-2 macroglobulin isolated from human serum by high performance liquid chromatography. *Ann Clin Lab Sci* 18: 78-84.
 - 32) Vandooren J, Itoh Y (2021) Alpha-2-macroglobulin in inflammation, immunity and infections. *Front Immunol* 12: 803244.
 - 33) Calogero AE, La Vignera S, Condorelli RA, D'Agata R, Vicari E (2011) Effects of male accessory gland infection on sperm parameters. In "Zini A, Agarwal A, eds. *Sperm Chromatin*". Springer New York, New York, NY, p 375-394.
 - 34) Mertz W (1981) The essential trace elements. *Science* 213: 1332-1338.
 - 35) Cui SL, Liu P, Su XH, Liu Sh J (2017) Surveys in areas of high risk of iodine deficiency and iodine excess in china, 2012-2014: Current status and examination of the relationship between urinary iodine concentration and goiter prevalence in children aged 8-10 years. *Biomed Environ Sci* 30: 88-96.