

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22510070

研究課題名（和文）環境化学物質の生体影響に関する時間生物学的研究

研究課題名（英文）Effect of light and dark dosing time on biological response to environmental chemicals in mice

研究代表者

下位 香代子 (SHIMOI KAYOKO)

静岡県立大学・環境科学研究所・教授

研究者番号：10162728

研究成果の概要（和文）：環境化学物質の生体影響について時間生物学的な視点から検討するために、明期（ZT3）または暗期（ZT15）に、8～9週齢の雄性C3Hマウスにベンツ[a]ピレン（BaP）またはN-エチル-N-ニトロソウレア（ENU）を投与したところ、BaPは明期でも暗期でも末梢血中の小核誘発に関しては影響しなかったが、暗期に投与すると肝臓において脂質合成に関与する*Fasn*遺伝子の発現が促進した。ENUは明期に投与する方が小核誘発頻度が低く、p53標的遺伝子である*Cyclin G1*の発現が亢進し、DNA修復能力が高まっている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Any differences in the frequencies of micronucleus induction in peripheral blood reticulocytes(MNRETs) of mice exposed to BaP between light and dark dosing times were not observed. However, the expression of lipid metabolism related genes such as *Fasn* in liver was dramatically increased in treatment group at ZT15(dark phase). On the other hand, MNRETs of mice treated with ENU at ZT15 were significantly higher than those in mice treated at ZT3 (light phase). The expression of p53-responsible genes such as *Cyclin G1* in the bone marrow cells was higher in treatment group at ZT3 than that at ZT15. DNA repair might be promoted at light phase. These results suggest that toxic sensitivity to chemicals is different between the light and dark phase.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：生体リズム、遺伝子発現、脂質代謝、遺伝毒性、ベンツ[a]ピレン、ENU

1. 研究開始当初の背景

現代社会は、経済のグローバル化に伴って24時間型社会となり、労働時間や勤務形態の

多様化が進み、交代制工場勤務者、医療従事者、航空関連業務者だけでなく、サービス業や小売業においても夜間の照明に曝露され

ることを余儀なくされる深夜交代勤務従事者の数が増加の一途をたどっている。深夜交代勤務は、生体リズムと外界の昼夜リズムの同調を乱れさせ、睡眠障害、慢性的な疲労、精神的ストレス、さらにはこれらに起因した乳がんや前立腺がんなどのホルモン依存性がん、肥満、虚血性心疾患などの疾病発症リスクが増大することが報告されている。国際がん研究機関（IARC）が定める基準では、深夜交代勤務が、“ヒトに対しておそらく発がん性がある”グループ2Aに加えられている。

ところで、生体は、サーカディアンリズムと呼ばれる約24時間周期の体内時計をもっている。中枢および末梢組織に内臓されている体内時計により、様々な遺伝子の発現リズムが約24時間周期を示し、それとともにホルモン分泌、体温、血圧、脂質代謝など多くの生理機能も24時間周期を示す。紫外線の曝露がほとんどない夜間にDNA複製を行い、通常は食事をとらない深夜に自身の脂質をエネルギーとして利用しているのである。環境化学物質や脂質、ホルモンなど内因性物質の解毒・代謝に重要な働きをするチトクロームP450(CYP)も体内時計により制御されていることが報告されている(O. Froy, *Current Drug Metabolism*, 10, 104-115, 2009)。

しかしながら、今までに環境化学物質を明期（睡眠期）と暗期（活動期）にそれぞれ投与した場合、DNA損傷や脂質代謝にどのような影響をもたらすのか、ほとんど報告がない。また、環境汚染物質、食品成分や食品中に残留する有害物質の安全性評価や健康影響評価を行う際、その多くは明期に被験物質を投与することが多く、時間生物学的な検討はほとんどなされてこなかった。そこで、上述したような現代社会の勤務形態や社会状況、約24時間周期の体内時計の存在とそれに制御されている多くの遺伝子の発現リズムを考えると、生体への環境化学物質の影響について、「何に」、「いつ」曝露されたのかということとを考慮し、「一個体内における変動」という視点も含めた時間生物学的なアプローチを行うことが必要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究では、環境中に広く分布している代表的な多環芳香族炭化水素類の一つであり、

日常的に曝露される可能性が高く、国際がん研究機関（IARC）によりヒトに対して発がん性があると報告されているベンツ[a]ピレン（BaP）と変異・がん原性物質の陽性対照として使用されるアルキル化剤の*N*-エチル-*N*-ニトロソウレア（ENU）をモデル化合物として、マウスに明期（睡眠期）と暗期（活動期）にそれぞれ投与し、(1)染色体異常の指標となる小核誘発頻度（遺伝毒性）、(2)投与後の解毒代謝、DNA修復、細胞周期に関連する遺伝子の発現、(3)肝臓における時計遺伝子および時計遺伝子の制御下にある遺伝子の発現リズム、(4)血中の生化学マーカーや脂質代謝などに関連する遺伝子の発現がどのように変化するかを明らかにし、環境化学物質の生体影響について時間生物学的な視点から検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス飼育方法

雄のC3H/HeSlcマウス4週齢（日本SLC株式会社、静岡）を搬入後、1ケージあたり、5匹で飼育を行った。マウスは12時間ごとの明暗サイクル（ZT0-12: 明期、ZT12-24: 暗期）で飼育した（温度：23±1℃、湿度：55±5%）。で飼育した。暗期における作業を安全かつ効率的に行うために、赤色ランプ（装飾電球PSタイプ40W 赤：東芝、東京）を2ルクスの照度で常に点灯させた。飼料及び水道水を自由摂取させた。順化期間は4週間行い、マウスが8~9週齢になった後、実験に供した。なお、本研究は静岡県公立大学法人静岡県立大学動物実験指針に従い実施した。

(2) 小核試験

ENUは12.5または25 mg/kgの用量でZT0（動物飼育室の照明点灯時刻、8:00）、3、6、12、15、18に腹腔内投与した。ENUの投与直前、投与24、36、48、60および72時間後に尾静脈から末梢血を採取し、アクリジンオレンジ染色標本を作製した。1標本あたり1000個の網状赤血球（RET）を観察し、小核を有する網状赤血球（MNRET）の出現頻度（小核誘発頻度）を算出した。BaPは50 mg/kgの用量でZT3またはZT15に腹腔内投与した。BaPの投与直後（0）、48、72、96時間後に解剖し、以下の試験のために断頭した際に得た末梢

血を用いて小核試験を実施した。

(3) 肝臓中の RNA 試料調整とリアルタイム

RT-PCR を用いた定量的遺伝子発現解析

RNAlater に保存した肝組織より Quick Gene RNA tissue Kit S II [FUJIFILM、東京] を用いて total RNA の抽出を行った。Prime Sscript RT reagent kit に添付のプロトコールに従い、Takara PCT Thermal Cycler Dice mini を用いて RNA の逆転写を行った。得られた cDNA を、Applied Biosystems Real Time PCR 7500 System で、各標的遺伝子の Taq Man プライマー・プローブを用いて遺伝子発現を解析した。

(4) 血液生化学試験および組織中のトリグリセライドの定量

得られた血清中の血液生化学指標を、TBA-120FR 自動分析装置（東芝）を用いて測定した。トリグリセライド(TG)の定量は、トリグリセライドE-テストワコー（和光純薬）を用いて行った。

4. 研究成果

(1) マウス肝臓における各種遺伝子の日内発現変動

代表的な時計遺伝子である *Per1* の測定を行い、*CYP1* ファミリーの遺伝子と *Ugt1a1* や *Gstm1* 等の解毒に関与する遺伝子、*Gadd45b* や *Cyclin D1* 等の細胞周期や DNA の修復に関与する遺伝子の肝臓内での 1 日の日内発現変動を調べた。*Per1* は、明確な日内変動を示した。その他の遺伝子については、ほとんどが弱いながら日内変動を示していた (Fig. 1)。

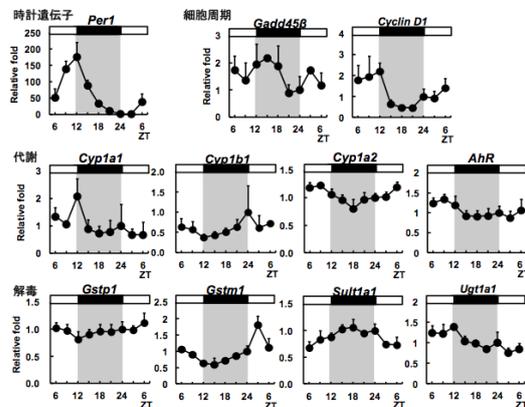


Fig. 1 肝臓中の各種遺伝子発現の日内変動

(2) BaP による小核誘発頻度への影響

明期 (ZT3)、暗期 (ZT15) に BaP を 50 mg/kg 投与したところ、いずれの場合も投与時刻からの時間の経過と共に小核誘発頻度が上昇し、48 時間後にピークを迎え、その後減少した。投与時刻による差は見られなかった。

(3) BaP による肝臓における脂質代謝および時計遺伝子発現への影響

BaP 投与後の肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現について検討したところ、分解系に関わる *Ppara* の発現は明期投与でも暗期投与でも 48 時間後に低下し、96 時間後までに回復した (Fig. 2)。この遺伝子発現に対応するかのよう、血中の脂質代謝産物であるアセト酢酸や OHBA も同様に 48 時間後に低下し、96 時間後までに回復した。一方、合成系に関わる遺伝子については、*Fasn* 等の発現は暗期投与の方が亢進していた (Fig. 2)。肝臓および脂肪組織中の TG 量は、明期投与では脂肪組織で、暗期投与では肝臓組織で増加する傾向がみられた。このように BaP は脂質代謝に影響を与えることがわかったが、合成系が特に暗期で影響を受けやすいことが明らかになった。時計遺伝子の *Clock* の発現には影響しなかった。

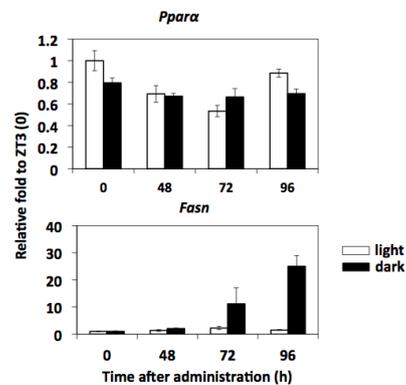


Fig. 2 BaP 投与後の肝臓中の脂質代謝関連遺伝子の発現に対する投与時刻の影響

Mean ± SE (n=5) で表示 *P<0.05 (Student's t-test)

(4) ENU による小核誘発頻度への影響とその作用機序

ENU では、ZT3 (11:00) 投与と ZT15 (23:00) 投与で投与後の小核誘発頻度がピークを示す時間 (投与 48 後) は変わらないものの、小核誘発頻度は ZT3 投与よりも ZT15 投与の方が有意に高値を示した。また、投与時刻を

変えて実施した結果、明期 (ZT3、6、12) の投与よりも暗期 (ZT0、15、18) の投与の方が高い小核誘発頻度を示した。本結果から、マウス骨髄中において ENU に対する感受性が昼夜で異なる可能性が示唆された (Fig. 3)。

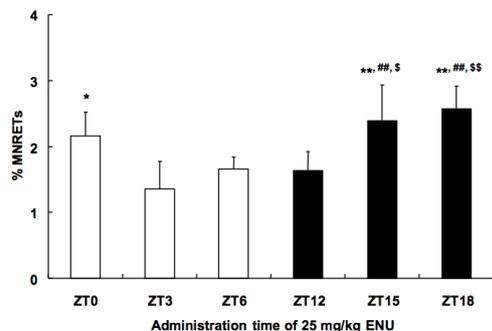


Fig. 3 ENU 誘発小核誘発頻度におよぼす投与時刻の影響

Mean ± SD (n=5) で表示

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: compared with the ZT3 value. # $P < 0.01$: compared with the ZT6 value. \$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$: compared with the ZT12 value. (Turkey test)

その機序を明らかにするために、DNA アルキルの修復に関わる酵素の遺伝子や p53 標的遺伝子の発現を RT-PCR を用いて検討した。DNA のアルキル化に対する修復酵素 O₆-methylguanine-DNA methyltransferase (*Mgmt*) およびミスマッチ修復蛋白遺伝子 MutL protein homolog 1 (*Mlh1*) の発現では、投与後に遺伝子発現量が増加し、明期投与で暗期投与よりも高値傾向を示したことから、明期投与では DNA 修復能力が高まっている可能性が示唆された。また、p53 標的遺伝子である *p21*、*Bax*、*Cyclin G1* の 3 つの遺伝子のうち特に *Cyclin G1* の発現がより誘導されていた。*Cyclin G1* は、DNA 損傷後 24 時間以内の p53 の蓄積を増大させるよう制御していると報告されている。フローサイトメトリーによる細胞周期に関する解析が必要であるが、明期は、暗期に比べ DNA 修復が促進されるような生体環境にあるのではないかと思われる。

(5) まとめ

以上の結果から、化学物質に対する感受性は投与時刻により異なることが明らかとなり、化学物質の毒性評価に時間生物学的な視点を考慮することが重要ではないかと思われる。今後、さらに投与時刻における作用機

序の違いを種々の化学物質を用いて検討することが必要だと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Effects of Animal Care Procedures on Plasma Corticosterone Levels in Group-housed Mice during the Nocturnal Active Phase, Sakakibara H., Koyanagi A., Suzuki T., Suzuki A., Lin L., Shimoi, K., *Exp. Animals*, 59(5), 637-642 (2010) 査読有
DOI: org/10.1538/expanim.59.637
- ② Differences in micronucleus induction in peripheral blood reticulocytes of mice exposed to N-ethyl-N-nitrosourea at light and dark dosing times, Itoh K, Masumori S, Nakajima M, Hayashi M, Sakakibara H, and Shimoi K., *J. Toxicol. Sci.*, 37, 427-430 (2012) 査読有
DOI: org/10.2131/jts.37.427
- ③ Tsurusaki T., Sakakibara H., Aoshima Y., Yamazaki S., Sakono M. and Shimoi K., Diurnal rhythmicity in biological processes involved in bioavailability of functional food factors, *J. Clin. Biol. Nutr.*, 52(3), 208-214 (2013) 査読有
DOI: 10.3164/jcbn.12-127

[図書] (計 1 件)

- ① 榊原啓之、小柳顯陽、青島良輝、鈴木敬明、木村昌由美、下位香代子、外部刺激に対する生体応答を評価するために一夜行性のマウスを用いた時間生物学的アプローチ、谷本学校毒性質問箱 13 号、サイエンティスト社 (東京)、116-123 (2011)

[学会発表] (計 6 件)

- ① 原のりこ、榊原啓之、小柳顯陽、青島良輝、山崎隼輔、下位香代子、環境化学物質の代謝に関与する遺伝子の日内発現リズム、富士山麓アカデミック&サイエン

- スフェア 2010、2010 年 12 月 15 日、キラ
メッセぬまづ (沼津)
- ② 原のりこ、榊原啓之、小柳顯陽、青島良
輝、山崎隼輔、下位香代子、化学物質に
対する生体応答は投与時間によって異なる
か？第 12 回静岡ライフサイエンスシ
ンポジウム、2011 年 3 月、静岡県立大学
(静岡)
- ③ 原のりこ、榊原啓之、小柳顯陽、青島良
輝、山崎隼輔、下位香代子、サーカディ
アンリズムと遺伝毒性—ベンゾ[a]ピレ
ンによる小核試験に対する投与時刻の影
響—、日本環境変異原学会第 40 回大会、
2011 年 11 月、学術総合センター (東京)
- ④ 伊藤圭一、原のりこ、大塚好美、榊原啓
之、益森勝志、中嶋 圓、林 真、下位香
代子、化学物質の毒性発現に関する時間
生物学的アプローチ、変異機構研究会・
第 25 回夏の学校、2012 年 7 月 (名古屋)
- ⑤ 大塚好美、原のりこ、山崎隼輔、伊藤圭
一、下位香代子、ベンゾ[a]ピレンの投与
時刻の違いによる脂質代謝への影響、富
士山麓アカデミック&サイエンスフェ
ア 2012、2012 年 12 月 (富士)
- ⑥ Itoh K., Masumori S., Nakajima M.,
Hayashi M., Sakakibara H., Shimoi K.,
Different micronucleus induction in
mice exposed to *N*-ethyl-*N*-nitrosourea
at light and dark dosing times, 52nd
Society of Toxicology, 2013 年 3 月 (San
Antonio, Texas, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下位 香代子 (SHIMOI KAYOKO)
静岡県立大学・環境科学研究所・教授
研究者番号：10162728

(2) 研究分担者

榊原 啓之 (SAKAKIBARA HIROYUKI)
宮崎大学・農学部・准教授
研究者番号：20403701