

明暗シフトがクロム、ニッケルの臓器蓄積量に及ぼす影響

三浦伸彦*1 大谷勝己*2

交代勤務に伴う夜間の光ばく露は、生体リズムを乱調し様々な健康障害を惹起する可能性が指摘されている。ばく露物質の取り込み・排泄に関わる因子の発現も生体リズムを示すことから、交代勤務によるこれら生体因子の発現リズム攪乱は、ばく露物質の臓器蓄積量変動を引き起こす可能性がある。我々はこの様な時間毒性学 (chronotoxicology) 的視点からの検討が必要と考えている。本研究ではクロムの肝臓中蓄積量が、明暗シフト (交代勤務モデル) によって通常明暗条件よりも有意に増加することをマウスを用いた実験で見出し、また他の金属化合物 (カドミウム) でも同様に体内蓄積量が増加することを確認した。この知見は交代勤務が蓄積性金属の体内蓄積量を増加させる危険性を示唆する。一方、交代勤務者は昼夜を問わず職場有害因子にばく露されることから、さらにばく露時刻と毒性発現強度についても調べ、金属化合物への感受性に日内変動が存在することを見出した。本研究により得られた結果は、精度の高いリスクマネジメントに結びつく可能性がある。

キーワード: 交代勤務, 時間毒性学, 生体リズム, クロム, カドミウム, 臓器蓄積性

1 はじめに

交代勤務は現代社会に欠かせない勤務形態であり、労働者は昼夜がシフト (明暗が変化) した状態で勤務することになる。明暗シフト、特に夜間の光ばく露は生体リズムを乱調させ、この乱調に伴うと考えられる健康影響憎悪が問題視されつつある¹⁻³⁾。多くの生理現象が日内リズムを示すことが知られているが、ばく露物質の取り込みや排泄に関わる細胞内輸送体や生体防御系の発現も日内変動を示す⁴⁾。従ってシフトワークにより生体リズムが変動し、取り込み・排泄系が乱れた場合に臓器蓄積量が変動する可能性が考えられるが、生体リズムの乱調とばく露物質臓器蓄積量という視点から検討した例は調べた限り存在しない。本プロジェクト研究で調査対象としたステンレス鋼製造工場労働者では交替制勤務が採用され、ニッケル・クロムへのばく露が昼夜を問わず生じていると考えられる。そこで本研究では交代勤務、すなわち明暗シフトがこれら金属の蓄積量に及ぼす影響を、マウスを用いて検討した。

一方で、交代勤務者は昼夜を問わず様々な化学物質にばく露されることになる。上述のように多くの生体防御因子群の発現量・活性が日内変動を示すことが報告⁴⁾されてきていることから、生体防御系の低下した時刻にばく露が生じた場合、他の時間帯よりも毒性が強くなる可能性がある。そこでさらに、ばく露時刻が金属化合物の毒性発現に及ぼす影響についても合わせて検討した⁵⁾。

2 研究方法

1) 使用動物

ICR マウス又は C57BL/6J マウスを用い、5 週齢の雄を日本クレア社から購入した。飼育環境条件は温度 22-24°C、湿度 60-70%、照明時間は 1 日 12 時間とした。飼育室は Light-Dark (LD) 室 (点灯時間 8:00-20:00) と

Dark-Light (DL) 室 (点灯時間 20:30-8:30) の 2 室を用意し、夜間に行う投与を昼間に行えるようにすると共に、30 分の時間差を設け投与時刻が重ならないようにした。さらに DL 室内に個別飼育ボックス (X 会社からの試作品レンタル) を用意し、マウス飼育ケージをその中に入れて個別の明暗制御を行うことで明暗シフト条件を変動させた (DL ボックスあるいはシフトボックスの 2 種)。餌は日本クレア社の CE-2 を与え、飲食は自由摂取とした。

2) ばく露方法

<明暗シフトと臓器蓄積量の関連>

5 日間ばく露系: C57BL/6J マウスを上記の個別飼育ボックス内で 2 週間馴化した後、3.2 mg/kg の塩化カドミウム (CdCl₂; 本実験系におけるリファレンスとして使用、和光純薬製) を 1 日 1 回、5 日間連続して腹腔内投与した。投与時刻は予備実験の結果から 14:00 とし、明暗シフトにより暗期 (照明オフ時) に当たる条件での投与は赤色ライト下で行った。最終投与 24 時間後にエーテル麻酔下で解剖し血漿及び肝臓を得た。得られたサンプルは分析まで -80°C で保存した。

4 週間ばく露系: ICR マウスを個別飼育ボックス内で 2 週間馴化した後、CdCl₂ (2.5 mg/kg; リファレンスとして使用)、重クロム酸カリウム (K₂Cr₂O₇; 10 mg/kg、和光純薬製) あるいは塩化ニッケル (NiCl₂; 15 mg/kg、和光純薬製) を 1 日 1 回、4 日間連続して定時に背部皮下投与し、これを 1 週単位として 4 週間繰り返し投与した。投与時刻は Cd, Ni については 14:00、Cr については 18:00 とした。これらは我々の実験結果から感受性 (肝障害を指標) が他の時刻よりも高く生じる時刻であり、生体リズムの変化が顕在化する時刻と考えられる。最終投与 48 時間後にエーテル麻酔下で解剖して血漿及び肝臓を得た。得られたサンプルは分析まで -80°C で保存した。

<ばく露時刻が毒性発現に与える影響>

C57BL/6J マウスを LD 室あるいは DL 室で 2 週間馴化飼育した。投与は投与当日の 10:00 から 4 時間おきに時刻をずらして行い、投与時刻の異なる 6 群について行

*1 (独) 労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ。

*2 (独) 労働安全衛生総合研究所 有害性評価研究グループ

った。毒性指標として致死率を用い、投与14日後までの死亡数から求めた。なお暗期(22:00, 2:00, 6:00)投与について、12時間半ずらした照明サイクルで馴化しているため、実際には実験者の生活サイクルでの10:30, 14:30, 18:30に投与することになるが、DL室飼育マウスの生活サイクルでは22:00, 2:00, 6:00に相当することから、便宜上22:00, 2:00, 6:00投与と表記する。

3) 金属定量

マウスの肝臓中金属量は、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)法を用いて定量した。まず肝臓を湿式灰化するために、正確に秤量した肝臓(最大100mg)を、予め硝酸(関東化学社;電子工業用)2mlを分注した15ml試験管に入れ、ホットプレート上で加熱・乾固させた。次に、硝酸分解した試料の脱炭を行うために、乾固させた試料に過酸化水素水(関東化学社;電子工業用)を2ml加え、さらに硝酸を0.5ml加えた後に同様に加熱・乾固させた。ここに内部標準液(Sc, Y, Inの20ppb混合液)を4ml加えてよく攪拌し、このサンプルをフローインジェクションICP-MS装置(ISIS-HP4500, ヒューレットパッカード社)を用いてCd, Cr, Niについて定量した。

4) 肝障害の解析

ばく露した金属による肝障害を、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)活性を指標として調べた。測定にはトランスアミナーゼCII-テストワーク(和光純薬製)を用いた。96穴プレートにALT用基質酵素液と発色試液を1:1の割合で混合させた溶液を50μl入れ、そこに採取したマウスの血漿を1μl加えて、37℃で20分間インキュベートした。反応停止液を100μl加えてよく攪拌した後、540nm波長で吸光度を測定した。

5) 統計学的処理

データは平均値±SDとして示した。統計解析は分散分析後、Tukey-Kramer多重比較検定を用いて行い、有意水準は0.05とした。

6) 動物実験倫理

本研究で行う動物実験は、独立行政法人労働安全衛生総合研究所・動物実験委員会の承認を受け、当該委員会の動物実験指針に従い必要とする実験動物の数や苦痛を最小限にするように考慮して行った。

3 研究結果

1) 明暗シフトが金属の臓器蓄積量に及ぼす影響

Cdは毒性発現機構が良く調べられている金属であり、また本実験系担当者の専門でもあることから現象を捉えた後の解析が行いやすい。さらにCr, Niの毒性修飾に関わる生体防御因子群とも共通する部分が多い。そこでCdを毒性影響のリファレンスとして用いた。

Cdは急性時には肝臓に蓄積することが知られている。そこで図1に示すように明暗条件を2日ごとに12時間逆転させ、明暗シフトの変動がCdの肝臓蓄積量に与える影響を調べた。なお本シフト条件は病院などの2交代勤務に近いモデルとしてデザインした。C57BL/6Jマウ

スを明暗シフト条件下あるいは通常明暗条件で2週間馴化飼育した後、投与時刻を14:00に固定して1日1回、5日間連続してCdCl₂(3.2mg/kg)を腹腔内投与した。最終投与24時間後に肝臓を摘出し、肝臓中Cd蓄積量をICP-MSを用いて定量した結果、対照群(通常明暗条件下飼育;生理食塩水投与)では肝臓中Cdは検出されなかったが、Cdの投与(通常明暗条件)により肝臓中に明らかなCd蓄積が観察された。興味深いことに、このCd蓄積量が、明暗条件をシフトさせることで通常明暗条件より有意に増加することを見出した(表1)。なお用いたCd投与量では肝障害の指標であるALT活性上昇は認められず(data not shown)、臓器障害を示す投与量ではないことを確認している。

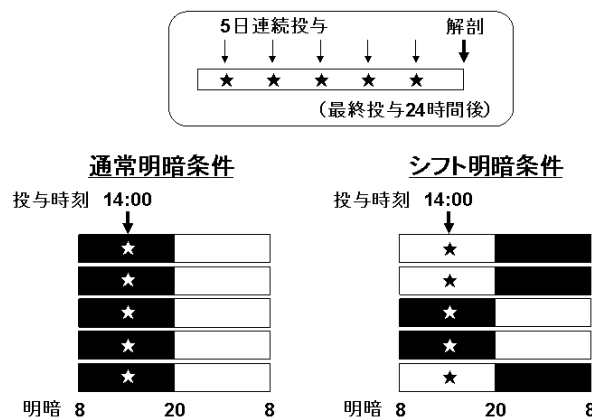


図1 投与スケジュール(5日間投与系)

表1 肝臓中Cd濃度(5日間投与系)

	Cd濃度(μg/g tissue)
対照	0.0 ± 0.0
通常明暗	55.1 ± 8.1
シフト明暗	71.1 ± 6.4

*: p<0.05 vs. 通常明暗

そこで次に、レアメタルについて検討を行った。実験は上記Cdの結果から亜急性ばく露とし、より低濃度ばく露で、かつ長期の投与期間で検討した。ICRマウスを明暗ボックス内(DL条件あるいはシフト条件:図2)で2週間馴化飼育後、CdCl₂(2.5mg/kg)、K₂Cr₂O₇(10mg/kg)あるいはNiCl₂(15mg/kg)を1日1回、4日間連続して背部皮下投与し、これを4週間繰り返し投与した(合計投与回数:16回)。最終投与48時間後に肝臓を摘出して金属量をICP-MSにより定量した。その結果、表2に示すようにCrの蓄積量は明暗シフトにより通常条件に比べて有意に肝臓中蓄積量が増加した。この結果は表1のCdを5日間短期ばく露した実験の結果と同様であり、Cr投与の場合も明暗シフトにより臓器蓄積量が増大することが確認された。Cdばく露では、有意差は検

出されなかったものの Cr と同様に明暗シフトによる増加傾向は観察された (表 2)。マウス系統が異なるため比較は難しいが、傾向だけを捉えれば亜急性ばく露でも短期ばく露と同様に、明暗シフトにより臓器蓄積量が増大する可能性がある。なお、Ni については対照群 (生理食塩投与群) と Ni 投与群で肝臓中蓄積量に有意差は認められず、投与量が低すぎたと思われる (表 2)。

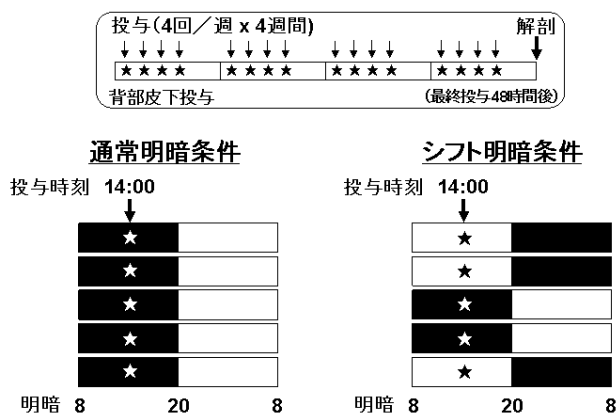


図 2 投与スケジュール (4 週間投与系)

表 2 肝臓中金属濃度 (4 週間投与系)

	金属濃度 (µg/g tissue)		
	Cr	Cd	Ni
対照	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.3 ± 0.2
通常明暗	18.0 ± 2.8	181.3 ± 29.4	0.6 ± 0.3
シフト明暗	25.0 ± 4.7	207.6 ± 27.3	0.6 ± 0.3

*: p<0.05 vs. 通常明暗

2) レアメタルのばく露時刻が毒性発現に与える影響

交代制勤務労働者は一日の中でばく露される時間帯が異なることになる。平常時には環境中濃度が抑えられ問題になることはないが、有事 (爆発や漏れ事故など) には規制値を大幅に超えたばく露が生じる可能性がある。そこで 3 種の金属 (Cr, Ni, Cd) の毒性発現にばく露時刻が与える影響を検討した。ICR マウスを LD 室あるいは DL 室で 2 週間馴化し、それぞれの金属化合物を単独で単回腹腔内投与した。投与群は 6 群 (10:00, 14:00, 18:00, 22:00, 2:00, 6:00 投与群) を設け、暗期に相当する 3 群 (22:00, 2:00, 6:00 投与群) の投与は赤色ライト下で行った。毒性指標として投与 14 日後までの死亡率を調べた。その結果、リファレンスとして入れた Cd 投与群では日内感受性の明らかな違いが認められ、明期ではマウスは感受性が高く (死亡率が高く)、逆に暗期では感受性が低い (死亡率が低い) ことを見出した (図 3-a) 5)。この日内感受性の違いはレアメタルでも観察され、Ni は Cd と同様の傾向にあった (図 3-b)。Cr も日内感受性の違いを示したが、感受性時刻が若干異なるように見える (図 3-c)。以上の結果から、金属化合物への感受性は一

日の中で明らかに異なることが示された (本項の Cd の致死毒性については、Miura et al, *J Toxicol Sci* 37(1), p.191-196, 2012 に報告した 5))。

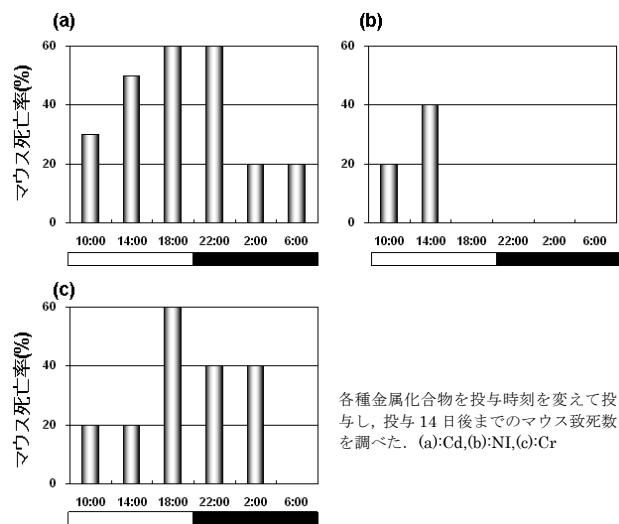


図 3 レアメタルのばく露時刻と致死毒性

4 考 察

本研究により、明暗シフトが Cr や Cd の体内蓄積量を増加させる可能性を見出した。明暗条件の変化が金属化合物の体内蓄積量に影響を与えるという知見は今までに無く、時間毒性学の視点を導入した新しい現象の発見と言える。そのメカニズムは今後の検討で明らかとするが、体内取り込みや体外排泄に関わる輸送体が関与する可能性がある。これら輸送体の発現量に日内変動がある、あるいは明暗条件の変化により発現量の変動が生じるならば興味深い。

金属化合物の臓器蓄積量をヒトで求める事は不可能であり、ヒトでは主に尿中 (糞中) 排泄を指標に検討されてきた。実際に健康人において、多くの金属の尿中排泄量に日内変動が認められる 6)。本プロジェクト研究では、製鉄工場で働く交代制勤務者におけるレアメタルの尿中排泄量が、特に夕勤で低下することを見出した (前項「勤務時間帯の違いが尿中クロム・ニッケル排泄量に及ぼす影響の検討」参照)。この排泄量の低下は、交代制勤務による生体リズムの攪乱が原因とも考えられる。一方、本項で行った動物実験からは、ヒトでは不可能な、金属の臓器中蓄積量に関する情報を得ることができる。その結果、クロムの肝臓蓄積量が明暗シフトにより有意に増加することを見出した。現時点では尿中排泄量と臓器蓄積量との関連は検討しておらず、またヒトとマウスとの隔たりを埋めることは複雑であるが、明暗シフトという一つのファクターが、種を超えて金属の排泄量・蓄積量に有意な変化を与えることは、例えば尿中金属排泄量の基準値 (Biological Exposure Indices 等) を考慮する上で重要な知見と考えられる。

本研究ではさらに、金属化合物に対する日内感受性の違いが少なくとも致死毒性に関して生じることを見出し

た⁵⁾。今後は投与量を下げ、臓器毒性を指標に検討していく必要があるが、このようなばく露物質に対する「感受性の日内変動」という視点は重要と考えられる。臨床分野では薬効の日内変動に古くから着目し、時間薬理学として発展させてきた。今後は毒性学に時間生物学を導入した「時間毒性学的」視点が重要であろう。すなわち、交代制勤務者は昼夜を問わず様々な化学物質にばく露されている。生体防御因子群の発現量・活性の日内変動が報告されてきていることから、生体防御系の低下した時刻にばく露が生じた場合、他の時間帯よりも毒性が強く生じる可能性がある。通常は規制値を基にばく露濃度が抑えられているが、事故などで規制値を大幅に超えたばく露が生じた場合、毒性発現増強の知見・知識があればばく露を最小限に抑えるなどの対策を取ることができる。従って労働衛生学分野へ時間毒性学を導入することで、より質の高いリスクマネジメントが可能になるものと期待される。

参 考 文 献

- 1) Stevens RG, Hansen J, Costa G, Haus E, Kauppinen T, Aronson KJ, Castano-Vinyals G, Davis S, Frings-Dresen MH, Fritschi L, Kogevinas M, Kogi K, Lie JA, Lowden A, Peplonska B, Pesch B, Pukkala E, Schernhammer E, Travis RC, Vermeulen R, Zheng T, Coglianov V, Straif K. Considerations of circadian impact for defining 'shift work' in cancer studies: IARC Working Group Report. *Occup. Environ. Med.* 2011; 68: 154-162.
- 2) Szosland D. Shift work and metabolic syndrome, diabetes mellitus and ischaemic heart disease. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health.* 2010; 23: 287-291.
- 3) Wang XS, Armstrong ME, Cairns BJ, Key TJ, Travis RC. Shift work and chronic disease: the epidemiological evidence. *Occup. Med.* 2011; 61: 78-89.
- 4) Zhang YK, Yeager RL, Klaassen CD. Circadian expression profiles of drug-processing genes and transcription factors in mouse liver. *Drug Metab. Dispos.* 2009; 37: 106-115.
- 5) Miura N, Yanagiba Y, Ohtani K, Mita M, Togawa M, Hasegawa T. Diurnal variation of cadmium-induced mortality in mice. *J. Toxicol. Sci.* 2012; 37: 191-196.
- 6) Yokoyama K, Araki S, Sato H, Aono H. Circadian rhythms of seven heavy metals in plasma, erythrocytes and urine in men: observation in metal workers. *Ind. Health.* 2000; 38: 205-212.