

## マウスを用いた時間栄養学視点からの塩分摂取と排泄機構の研究

柴田 重信, 青木 菜摘, 濱口 雄太郎, 原口 敦嗣

早稲田大学先進理工学部電気情報生命工学科

**概要 【研究目的】** 腎臓には体内時計機構がそなわり、尿の産生やナトリウムイオンの排泄の日内リズム形成を司っている。シフトワークなど体内時計が不調な状態では、塩分摂取や排泄機構に異常が見られる可能性がある。そこで本研究は、塩分摂取や排泄に体内時計がどのようにかかわっているかを時間栄養学の観点で明らかにする。すなわち、(1)塩分摂取が体内時計の位相変化に及ぼす影響、また(2)体内時計が塩分摂取や排泄に及ぼす影響の2つの視点で研究を進めた。

### (1)塩分摂取が体内時計の位相変化に及ぼす影響

**【研究方法】** 8%の塩化ナトリウムを含む高塩分餌と通常食を用意した。マウスに昼間の4時間と夜間の4時間のみ給餌可能な時間帯を設定した。実験には以下の4群を作製した。①昼間に高塩分食で夜間に通常食、②昼間に通常食で夜間に高塩分食、③昼間に高塩分食で、夜間も高塩分食、④昼間に通常食と夜間も通常食である。摂食量と摂水量、活動リズム、インビボイメージングを用いて腎臓の体内時計の位相変化を調べた。

**【研究結果と考察】** 1日当たりの摂餌量は4群間でまったく差は見られなかったが、昼間に通常食で夜間に高塩分食の群のみ、昼間の摂餌量が多く、他の3群はいずれも夜間の摂餌量が多かった。インビボイメージングによる体内時計の位相は、①の群では、通常食の自由摂食群とほぼ同じ位相を示し、②の群は、体内時計の位相が顕著に前進した。高塩分食を摂取する時刻が2次的に体内時計の位相に影響を及ぼす可能性が示された。

### (2)体内時計が塩分摂取や排泄に及ぼす影響

**【研究方法】** Clock<sup>-/-</sup>マウス(変異マウス)を用い通常食飼育下に、水ボトルと塩分や糖分、あるいはその組み合わせを含むボトルを2本用意し、マウスがどちらのボトルを選択して飲水するかを調べた。以下の7群を用意した。10%砂糖水、30%砂糖水、1%塩化ナトリウム水(食塩水)、10%もしくは30%砂糖水と1%もしくは2%食塩水である。排尿については、1%食塩水もしくは2%食塩水を2ml経口投与した。投与後直ちに代謝ケージに入れ、5時間の尿量、また尿に含まれるNaイオン量も測定した。

**【研究結果と考察】** 水ボトルに対して10%砂糖水+2%食塩水もしくは、30%砂糖水+2%食塩水の組み合わせを行った。10%砂糖水+2%食塩水の選択ではワイルドマウスが25%の嗜好性を示し、変異マウスは10%程度の嗜好性を示した。30%砂糖水+2%食塩水の選択においては、ワイルドマウスは約70%の嗜好性を示したが、変異マウスはわずかに20%程度の嗜好性を示すのみであった。2%食塩水を与えた群は、ワイルド、変異いずれのマウスも昼間の投与では尿量はわずかに増大した。一方、夜間の投与は、ワイルドマウスでは尿量が顕著に増大したが、変異マウスでは尿量増大がわずかであった。変異マウスは食塩の排泄機構が低下しており、そのことが飲水の選択性で食塩が嫌悪的に作用している可能性が示唆された。

## 1. 研究目的

腎臓には体内時計機構がそなわり、尿の産生やNaイ

オンの排泄の日内リズム形成を司っている<sup>1-2)</sup>。シフトワークを行う人は、肥満・高血圧などのメタボリックシンドローム

になりやすいことが知られている<sup>3-5)</sup>。塩分の過剰摂取が高血圧の要因になることから、シフトワークなど体内時計が不調な状態では、塩分摂取や排泄機構に異常が見られる可能性がある。そこで本研究は、塩分摂取や排泄に体内時計がどのようにかかわっているかを時間栄養学の観点で明らかにすることを目的とする。すなわち、(1)塩分摂取が体内時計の位相変化に及ぼす影響、また(2)体内時計が塩分摂取や排泄に及ぼす影響の2つの視点から研究を進めた。

## 2. 研究方法

### (1)塩分摂取が体内時計の位相変化に及ぼす影響

1日2回の食塩含有食が行動リズムに与える研究方法について述べる。8%の食塩を含む高塩食(S)と、0.5%の食塩を含む通常食(N)を用意した。マウスに昼間の4時間(人の夜食に相当)と、夜間の4時間(人の昼食に相当)の合計8時間のみ給餌可能な時間帯を設定した。実験には以下の4群を作製した。①昼間に高塩食(S)で夜間に通常食(N)、②昼間に通常食(N)で夜間に高塩食(S)、③昼間に高塩食(S)で夜間も高塩食(S)、④昼間に通常食(N)で夜間も通常食(N)である。これらの摂餌条件を3週間実施した。測定項目は、体重増加率、摂餌量と摂水量、活動リズムで、これらの項目を1週間毎に3週間測定した。活動リズムは、マウスが発する赤外線量を測定し、単位時間の変化として捉え、1日の活動リズムとしてアクトグラムで示した。

また、1日2回の食塩含有食が時計遺伝子発現リズムに与える研究方法について述べる。*Per2::luc* KIマウスを用意し、体内時計遺伝子*Per2*が活発になるとルシフェラーゼを産生し、基質のルシフェリンと反応し、生物発光が盛んになることを利用するインビボイメージングを用いて腎臓の体内時計の位相変化を調べた。4時間おきにルシフェリン15 mg/kgを皮下に投与し、10分後に生物発光を1分間計測した。1日6回分のデータの中で最大値と最小値を求め、100%表示の振幅とした。データ解析やリズムの解析方法の詳細は最近発表した<sup>6)</sup>。ピーク時間の変化を位相前進・後退として表した。また、インビボイメージングによる腎臓の体内時計の位相変化は種々の条件の餌投与3週間後に一度だけ行った。

### (2)体内時計が塩分摂取や排泄に及ぼす影響

水ボトルと砂糖水+食塩水含有ボトルの嗜好性に関する研究方法について述べる。本研究では、ICR系統にバッククロスした*Clock*<sup>-/-</sup>マウス(変異マウス)と、ICR系マウス(ワイルドマウス)を用い、体内時計の異常が塩分摂取や排泄にどのようにかかわるかを調べた。マウスは個別飼育とし、通常食飼育下で水ボトルと塩分や糖分、あるいはその組み合わせを含むボトルを2本、各ケージに設置した。その後1週間にわたり、マウスがどちらのボトルを嗜好して飲水するかを調べ、マウスの体重増加、摂餌量ならびに摂水量を測定した。また、偶然の嗜好性を避けるため、3-4日経過したのち、2本のボトルの位置を左右交代した。嗜好率(%)は、対象としているボトルの摂水量を全体の摂水量で割り、百分率に変換した値で表した。2本のボトルについては、一方は水とし、他方を色々な組成の組み合わせとした。以下の7群を用意した。⑤10%砂糖水、⑥30%砂糖水、⑦1%塩化ナトリウム(食塩水)、⑧10%砂糖水+1%食塩水、⑨30%砂糖水+1%食塩水、⑩10%砂糖水+2%食塩水、⑪30%砂糖水+2%食塩水である。

さらに、排尿量の測定方法について述べる。明暗もしくは逆転明暗条件で飼育したマウスを24時間絶水させ、その後、1%もしくは2%食塩水を2 ml経口投与した。投与後直ちに代謝ケージに入れ、5時間の尿量、また尿に含まれるNaイオン量を測定した。

## 3. 研究結果

### (1)塩分摂取が体内時計の位相変化に及ぼす影響

昼間も夜間も高塩食を摂餌したマウスは、他の3つの実験群と比べて体重増加が低めであった。したがって、常に高塩食の摂餌は他の栄養成分、例えばでんぷん質やタンパク質の分解・吸収などに悪影響を及ぼし、結果的に昼間も夜間も高塩食を摂餌したマウスの成長抑制が起こった可能性が考えられる。1日当たりの摂餌量は4群間でほとんど差は見られなかったが、昼間と夜間の摂餌量には4群間で大きな差が見られた(図1A)。すなわち、昼間に通常食で夜間に高塩食の群(②)のみ、昼間の摂餌量が高く、他の3群はいずれも夜間の摂餌量が高かった。摂水量については、昼間・夜間に高塩食群、昼間に正常食で夜間に高塩食群、昼間に高塩食で夜間に正常食群、昼

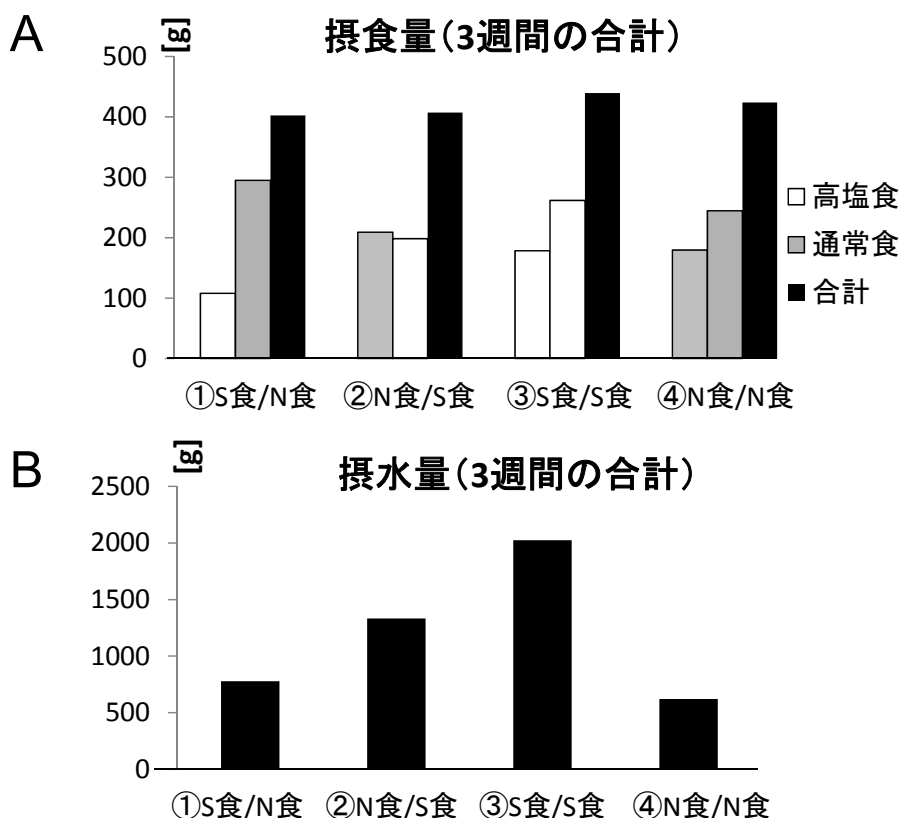


図 1. 高塩食と通常食の与え方による摂食量の差(A)と摂水量の差(B)。S:高塩食、N:正常食 最初の食(S or N)が昼間の4時間、次の食(S or N)が夜間の4時間を意味する。

間・夜間に正常食群の順番であった(図 1B)。この順番は、4群の中で高塩食の摂餌量の順番と同じであった(データ未掲載)。すなわち、高塩食の摂餌に伴う飲水を反映したものになっていた。活動リズムについて調べてみると、昼間に通常食で夜間に高塩食を摂餌したグループ(②)は、夜間の高塩食の摂餌を避けるため、昼間の通常食をより多く摂餌し、この摂餌活動を反映して行動リズムの昼間の活動が昼間に高塩食で夜間に通常食群(①)に比較して多かった(図 2)。

次に、インビボイメージングにより、腎臓の *Per2* 遺伝子発現のリズムの位相を、摂餌パターンの差が顕著であった①昼間に高塩食で夜間に通常食、②昼間に通常食で夜間に高塩食の2群で調べた。腎臓の体内時計の位相は、①の群では、通常食の自由摂餌群とほぼ同じ位相を示した。一方で、②の群は、腎臓の体内時計の位相が顕著に前進し、昼間にのみ餌を与える群に類似していた(図 3)。

### (2)体内時計が塩分摂取や排泄に及ぼす影響

まず、ワイルドマウスと変異マウスを用いて、水ボトルと他のボトルとして砂糖水や食塩水の単独の嗜好性について調べた。その結果、ワイルドマウス、変異マウスはいずれも10%あるいは30%の砂糖水が入ったボトルを嗜好し有意差は認められなかったが、変異マウスはより砂糖水を嗜好する傾向が認められた(図 4)。つぎに1%食塩水の嗜好性について調べると、ワイルドマウス、変異マウスはいずれも1%食塩水の嗜好性が低かった。やはり有意差は認められなかったが、変異マウスの方がより1%食塩水の嗜好を避ける傾向があった。

次に、水ボトルと他方が砂糖水と食塩水の組み合わせについて調べた。⑧10%砂糖水と1%食塩水もしくは⑨30%砂糖水と1%食塩水を選択させた。ワイルドマウスでは、水と⑧の嗜好率はほぼ50%であった。一方、変異マウスでは、⑧の嗜好率は20%程度に低下した。すなわち、変異マウスは⑧を避けることが分かった。次に、水と⑨の

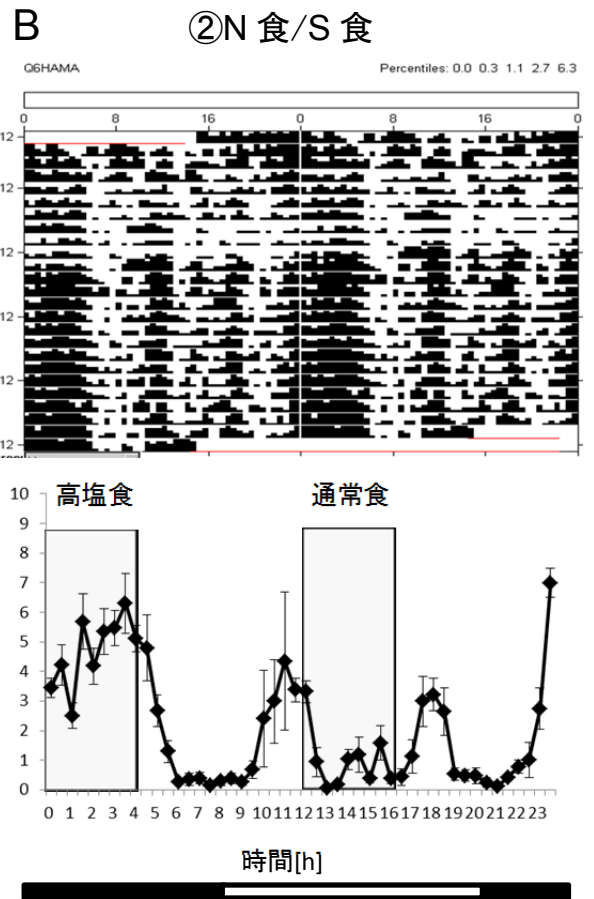
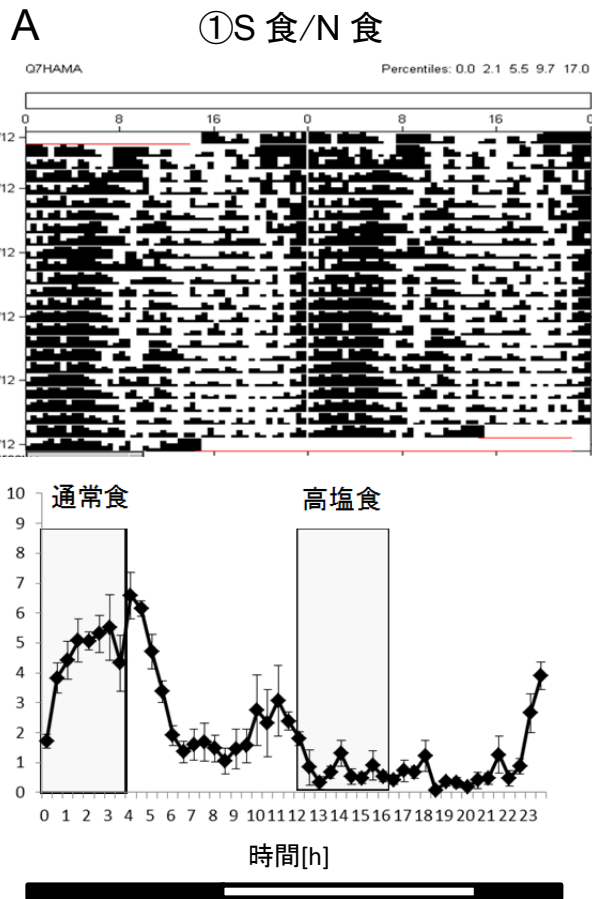
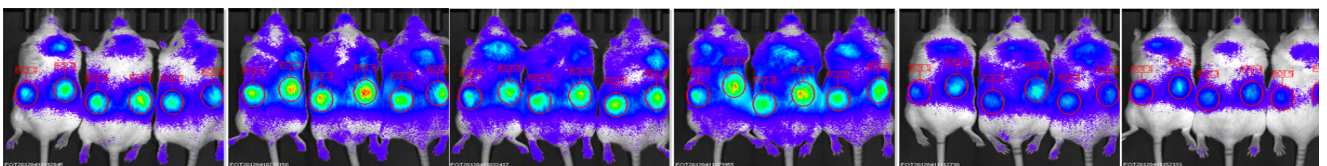


図 2. 摂食パターンの違いによる行動リズム差異。昼間に通常食を与えるとその時間帯が活動的になる(B)。白黒バーは昼と夜を示す。上図:アクトグラム、2日分をプロットする縦軸は経日を示す。下図:1時間ごとの活動量を1日の総活動量の割合で示す。

①S食/N食



②N食/S食

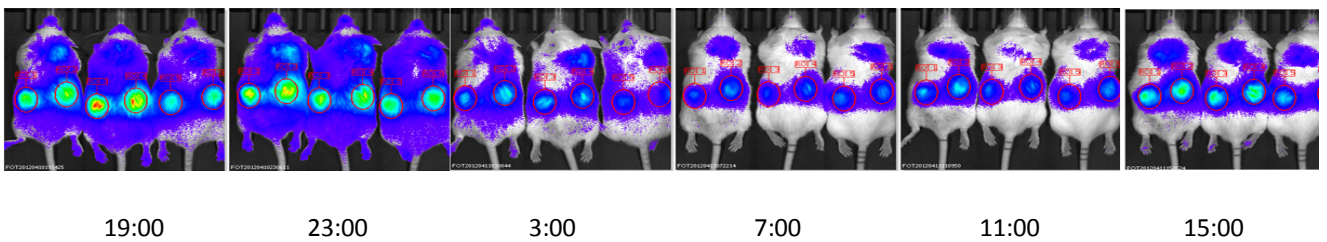


図 3. マウスの腎臓の時計遺伝子(Per2)の発現変化を生物発光リズムで示す。①の食パターンはピークが3時ごろに見られるが、②では19時にみられる。腎臓は○で囲った部分を示す。

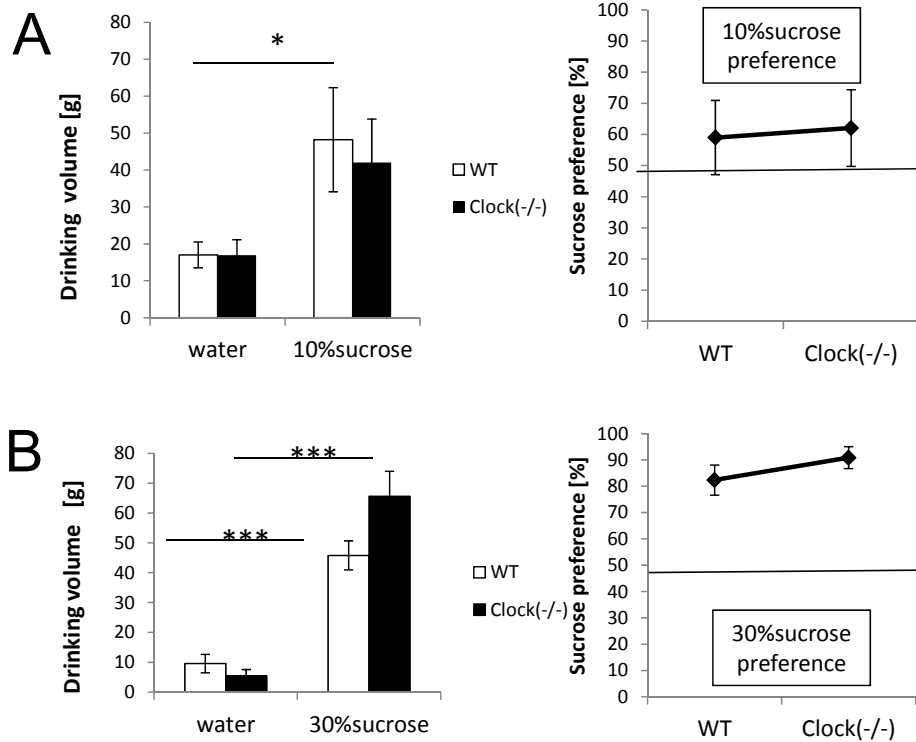


図4. マウスの水と砂糖水のボトル嗜好性に対するClock変異の影響。変異マウスはワイルドと比較し砂糖水ボトルの嗜好性が高い。

嗜好性実験を行った。この場合は、⑨の嗜好率がワイルドマウス、変異マウス、いずれも70%に達した。すなわち、砂糖水の濃度が高いために、そちらを嗜好する可能性が高かった。次に水ボトルに対して、⑩10% 砂糖水と2% 食塩水もしくは、⑪30% 砂糖水と2% 食塩水の組み合わせを行った。先の実験と比べて塩分を濃くしたため、⑩や⑪の砂糖水を嗜好する割合が減った。⑩の条件では、ワイルドマウスが25%の嗜好性を示し、変異マウスは10%程度の嗜好性を示した(図5A)。⑪の選択においては、ワイルドマウスは約70%の嗜好性を示したが、変異マウスはわずかに20%程度の嗜好性を示すのみであった(図5B)。以上の結果から、水ボトルと砂糖水+食塩水ボトルとの嗜好性実験において、ワイルドマウスと比べて、変異マウスは食塩水に対する嫌悪性が高いことが分かった。

次に砂糖水のボトルと砂糖水+食塩水のボトルの嗜好性実験を行った。10% 砂糖水と⑧、30% 砂糖水と⑨の選択とした。ワイルドマウス、変異マウスはいずれも⑧の嗜好性が低かった。ワイルドマウスの嗜好率が30%程度に対して、変異マウスは15%程度と低下した。また、30% 砂糖水と⑨の選択では、ワイルドマウス、変異マウスのいずれも

⑨の嗜好率は50%程度であった。このことから、30%の高濃度の砂糖水では、1% 食塩水の効果はマスクされるものと考えられる。

排尿量については、1% 食塩水では、昼夜あるいはワイルドマウスと変異マウスの間で、差は認められなかった。一方、2% 食塩水を与えた群は、ワイルド、変異いずれのマウスも昼間の投与では尿量がわずかに増大した(図6A)。一方、夜間の投与では、ワイルドマウスは尿量が顕著に増大したが、変異マウスは尿量増大がわずかであった(図6A)。Naイオン量を測定した結果、尿量の変化に類似した変動を示した(図6B)。以上、変異マウスは食塩の排泄機構が低下している可能性が考えられた。

#### 4. 考察

1日の中で8%の食塩含有食と通常食をそれぞれ昼間(マウスの非活動期)および夜間(マウスの活動期)に4時間与える実験を行ったが、昼間に通常食を夜間に高塩食を与えたマウスの摂餌量は昼・夜でほとんど同じ量であった。一方、それ以外の群(昼間に高塩食で夜間に通常食、昼間・夜間ともに高塩食、昼間・夜間ともに通常食)は、す

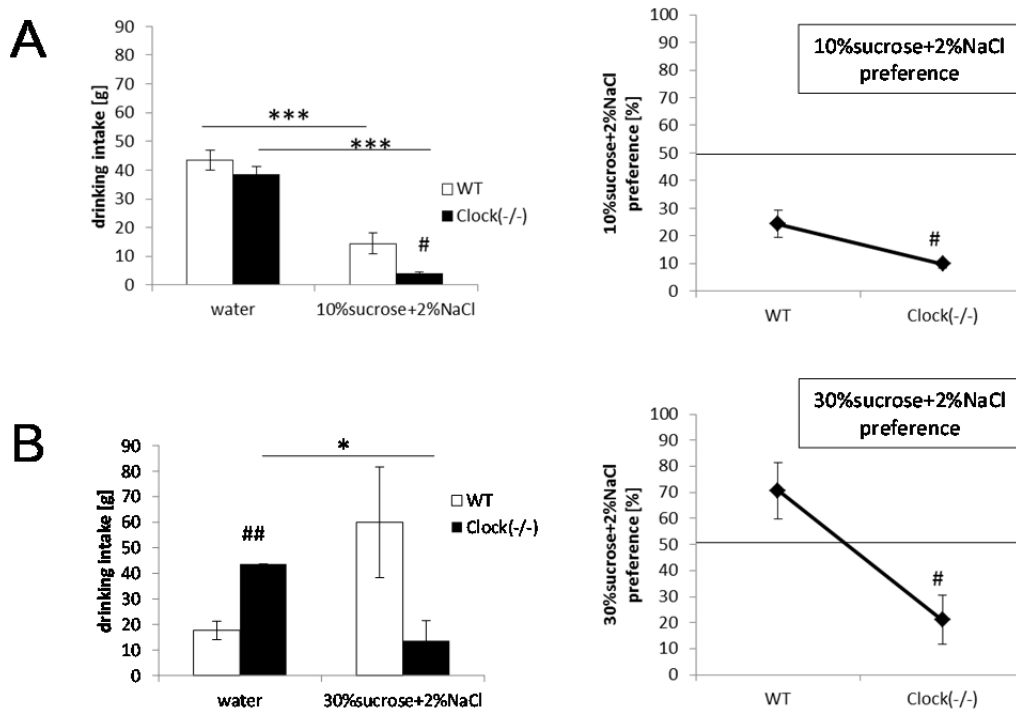


図5. マウスの水と砂糖水+食塩水のボトル選択に対するClock変異の影響。変異マウスはワイルドと比較し塩水ボトルの選択性が有意に低下する。

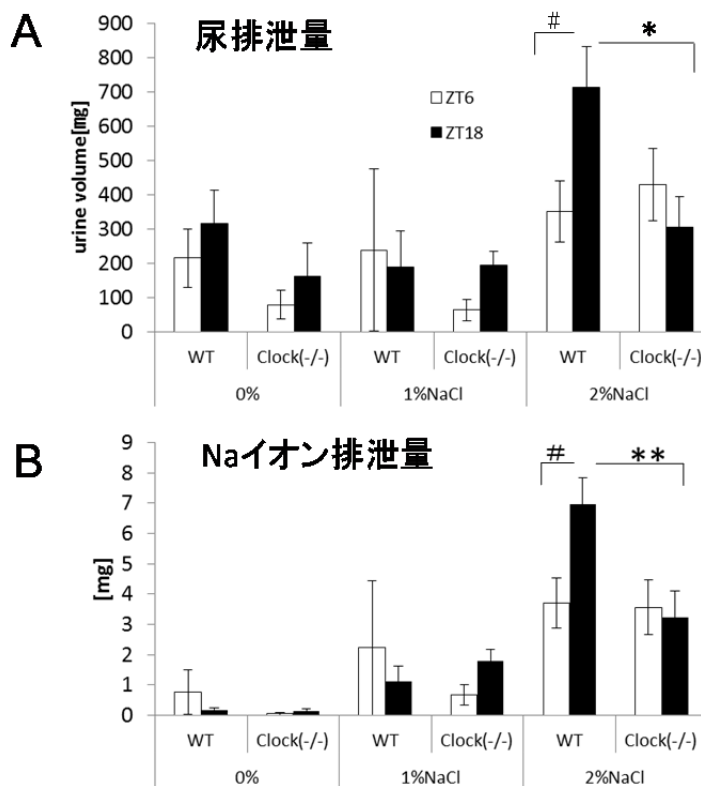


図6. マウスの尿およびNaイオン排泄に対するClock変異の影響。Clock(-/-)の夜間の尿・Naイオン排泄が阻害されている。

べて夜間の摂餌量が昼間の摂餌量より多かった。摂水量の変化は、摂取した塩分に比例して、昼夜に高塩食を取ったマウスが一番大きかった。昼間は非活動期でありマウスの摂餌行動は低下する時期だが、この時期に通常食が提示されると、それを食べ、夜間に高塩食が提示されても、それを避けている可能性が高い。すなわち、体内時計の時差ボケ状態が生じている可能性が考えられる。実際、活動リズムを調べると昼間の活動量が増大していた。時差ボケが生じるような摂餌条件の下で、末梢の体内時計、特に腎臓のリズムがどのように変化しているかについて、インビボイメージングで調べた。その結果、昼間に通常食で夜間に高塩食を与えたマウスの腎臓の *Per2* 遺伝子発現リズムの位相は 19-23 時にピークが見られた。一方、昼間に高塩食を夜間に通常食を与えたマウスの腎臓のリズムのピークは 23-3 時であった。つまり、昼間の摂餌が体内時計の位相を変えるという報告<sup>7)</sup>のように、高塩食による摂餌パターンの変化が行動や末梢臓器のリズムに影響を与えることが分かった。一方、昼夜のいずれも高塩食を提示された場合は、昼夜に通常食を提示されているのと同じように、体内時計に従った摂餌パターンを示した。嗜好食や嫌悪食の摂食は、摂食時刻により摂食量そのものを変化させ、結果的に体内時計を狂わせる可能性があることがわかった。例えば、朝食に嫌いな食べ物があるとそれを避け、夕食に好きなものを過食すると、体内時計が遅れてしまうということである。

本研究では、体内時計の異常マウスとして変異マウスを用いた。変異マウスは砂糖水の嗜好性が少し高く、1% 食塩水の嗜好性が少し低かった。水ボトルと砂糖水+食塩水の選択では、変異マウスは食塩水に対して嫌悪反応が強く出た。また、2% 食塩水の投与による尿と Na イオン排泄量を調べたところ、変異マウスはワイルドマウスと比べて、排泄量が低かった。変異マウスは尿排泄や Na イオン排泄に問題があり、そのことが嗜好性実験で、食塩水に嫌悪反応を示した可能性が考えられる。

## 5. 今後の課題

高塩食は、その摂餌時刻により、食パターンに影響を与え、そのことが体内時計の位相を変える可能性がわかった。しかしながら今回用いた塩分濃度は 8%であり、低

塩分濃度での実験で追試を行うべきであろう。高塩食を嫌悪食とした場合、高脂肪食は嗜好食であるので、この両者の組み合わせによる位相変化も追及すべきであろう。また、2つの飲水ボトルの嗜好性実験で、今回は *Clock*<sup>-/-</sup>マウス(変異マウス)を用いたが、シフトワークモデルマウスを用いることにより、より人への応用が可能になるだろう。体内時計の異常時は、塩分摂取を控えることが、循環器系や泌尿器系の疾患予防に寄与するかもしれない。

## 文献等

- 1) Stow LR, Gumz ML. (2011) The circadian clock in the kidney. *J Am Soc Nephrol.* 22: 598-604.
- 2) Firsov D, Tokonami N, Bonny O. (2012) Role of the renal circadian timing system in maintaining water and electrolytes homeostasis. *Mol Cell Endocrinol.* 349: 51-55.
- 3) Cornélissen G, Halberg J, Halberg F, Sanchez de la Pena S, Nelson W, Schwartzkopff O, Stoynev A, Haus E. (2008) Schedule shifts, cancer and longevity: good, bad or indifferent? *J Exp Ther Oncol.* 7: 263-273.
- 4) Virkkunen H, Härmä M, Kauppinen T, Tenkanen L. (2007) Shift work, occupational noise and physical workload with ensuing development of blood pressure and their joint effect on the risk of coronary heart disease. *Scand J Work Environ Health.* 33: 425-434.
- 5) Padilha HG, Crispim CA, Zimberg IZ, Folkard S, Tufik S, de Mello MT. (2010) Metabolic responses on the early shift. *Chronobiol Int.* 27: 1080-1092.
- 6) Tahara Y, Kuroda H, Saito K, Nakajima Y, Kubo Y, Ohnishi N, Seo Y, Otsuka M, Fuse Y, Ohura Y, Komatsu T, Moriya Y, Okada S, Furutani N, Hirao A, Horikawa K, Kudo T, Shibata S. (2012) In Vivo Monitoring of Peripheral Circadian Clocks in the Mouse. *Curr Biol.*, in press
- 7) Shibata S, Tahara Y, Hirao A. The adjustment and manipulation of biological rhythms by light, nutrition, and abused drugs. *Adv Drug Deliv Rev.* 62: 918-927. 2010 Review.

## Chrono-Nutrition Study on Salt Intake and Excretion in Mouse

Shigenobu Shibata, Natsumi Aoki, Yutaro Hamaguchi, Atsushi Haraguchi

School of Advance Science and Engineering, Waseda University

### Summary

Circadian rhythm in our body can control many physiological functions including feeding behavior, absorption of nutrition and excretion of urine/sodium ions. In this research we examined whether food intake of salt containing food can reset peripheral circadian clock. Mice can take food 4 hrs during daytime and 4 hrs during nighttime. Four different experimental conditions were prepared; (1) 8% salt containing diet (SD) during day + normal diet (ND) during night, (2) ND during day + SD during night, (3) SD during day and night, (4) ND during day and night. No (2) mice showed almost same amount food during day and night, but other groups (1), (3), (4) showed high food intake during night than day because of control of circadian rhythm. Mice of (2) took more ND during day to avoid the SD during night. No (2) mice showed the advance of phase of kidney circadian clock compared to No (1) mice evaluated by bioluminescence rhythm of *Per2::luc* KI mice. These data suggest us that food intake of unpreferred food may affect circadian rhythm.

Some paper demonstrated that sweet sensitivity is controlled under circadian system. In the next experiment, we examined whether clock mutation can affect the preferred selection of bottle from two bottles (water vs sucrose/salt, water vs sucrose + salt). Both wild and *Clock*<sup>-/-</sup> mice preferred the sugar bottle (60% preference for 10% sucrose, 90% for 30% sucrose). *Clock*<sup>-/-</sup> mice showed the avoidance salt containing bottle in comparison to wild mice, when two bottles (water vs 10% or 30% sucrose + 2% salt) were presented. Salt water (1% or 2%) was orally administered to mice, and then urine and sodium ions volume were measured for 5-hr up. *Clock*<sup>-/-</sup> mice showed the lower level of urine and sodium ions than wild mice. These data suggest that *Clock*<sup>-/-</sup> mice possess the abnormality of salt excretion, therefore they avoid taking salt in two bottles preference test. Not only clock gene mutation but shift-work may affect the preference of salt and salt excretion, and may result in salt-induce hypertension.