

低濃度揮発性硫化物のヒトに与える影響について： *in vitro* 研究から

八重垣 健 鴨田 剛司 村田 貴俊

日本歯科大学生命歯学部衛生学講座

Toxicities of volatile sulfur compounds against connective tissues and mucus membrane

Ken Yaegaki Takeshi Kamoda Takatoshi Murata

Department of Oral Health, Nippon Dental University

要約

揮発性硫化物 (VSCs; Volatile Sulfur Compounds) は数百 ppm で致死性を有する。ところが、VSCs の人に対する作用についてはあまり知られていない。粘膜は種々の病原因子に対しバリアーとなり、疾患から生体を防御しているが、VSCs は粘膜透過性を大きく増加させ PGE₂ など病原性物質の透過性を高めた。また線維芽細胞では、VSCs 存在下で、合成後30分以内の分泌前コラーゲンが約40%分解した。さらに上皮基底膜の損傷や合成阻害も確認された。代表的な VSCs である硫化水素は、低濃度では細胞死を招かず、細胞を低酸素状態にする。この低酸素状態により、Ras/MAPK 細胞内情報伝達系が活性化され、発癌につながるとの仮説が提唱された。一方、強い発癌性のある活性酸素をスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) が除去する。しかし、VSCs は SOD を強く阻害し、活性酸素を介した VSCs の病原性が示唆された。

《キーワード》揮発性硫黄化合物、硫化水素、口臭、歯周病、癌

Abstract

Volatile Sulfur Compounds (VSCs) are lethal toxic gases. Mucus membrane is the barrier against the invasion of pathogenic compounds into the human tissues, then the barrier acts to prevent from pathological conditions. The effects of VSCs on the mucus membrane were investigated. VSCs increased the permeability of the mucosa, and the penetration of some pathogenic compounds, such as Prostaglandin E₂ or lipopolysaccharides was increased markedly. VSCs also increased the degradation of newly synthesized collagen in human fibroblasts, and damaged the basal membrane. Therefore, VSCs were implied to play an important role in some pathologies. Besides, carcinogenicities of VSCs were suggested. Hypoxia caused by VSCs stimulated Ras/MAPK signal transduction which related

受付: 平成17年11月4日 採用: 平成17年12月16日

別刷請求宛先: 八重垣 健

〒102-8159 千代田区富士見1-9-20 日本歯科大学生命歯学部衛生学講座

Received: November 4, 2005 Accepted: December 16, 2005

Reprint Requests to Ken Yaegaki, Department of Oral Health, Nippon Dental University, 1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159 Japan

to the carcinogenic process. Furthermore, it was demonstrated that VSCs inhibit superoxides dismutase (SOD). Since SOD scavenges superoxides, it has been postulated that VSCs may amplify the carcinogenic activity of superoxides.

《Key words》 Volatile Sulfur Compounds, hydrogen sulfide, oral malodor, periodontitis, cancer

I. はじめに

悪臭物質の多くは環境汚染物質でもある。そのような化合物の一つに揮発性硫化物 (VSCs; Volatile Sulfur Compounds) がある¹⁾。VSCsには多くの化合物が含まれるが、硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルスルフィドが悪臭物質として良く知られている。これらの臭いは濃度によって若干性質が異なる。硫化水素は低濃度ではゆで卵の臭いに近く、高濃度では硫黄温泉臭を強くした悪臭となる。メチルメルカプタンは腐ったタマネギの臭いと比喻されることが多い。ジメチルスルフィドはメチルメルカプタンに近いが、ppbレベルでは焼き海苔の臭いに近く、日本人にとって悪臭とは言い切れない¹⁾。

一方、火山性ガスや浄化槽内の有毒ガスにより時々死亡事故が引き起こされるが、VSCsの硫化水素が原因と考えられている。すなわち、硫化水素・メチルメルカプタンの中毒量あるいは致死量は青酸ガスに近く、その作用機序も青酸ガスに類似する¹⁾。VSCsは下水処理場・し尿処理場・ごみ処理場そして廃棄物処理場などで産生されることが多く、杉並病のように住宅地でもVSCs被害が起こりうる²⁾。一方、生体内ではVSCsは口臭原因物質として口腔で生成される。大腸内でも大量に生成されるが通常は全身症状を惹起することは無い。VSCsには、多くの生化学的代謝系あるいは細胞機能に為害作用があると考えられるが、VSCsのこのような為害作用の詳細についての研究は少ない。そこで、本稿では著者らグループの研究を中心にVSCsのヒトに与える影響を概説する。

II. 環境におけるVSCsの産生

自然界では硫化水素が火山性ガスあるいは硫黄温泉などから産生される。一方、種々の産業にお

いても、硫化水素が産生される。石油の精製過程では脱硫工程で大量に産生される。また、水酸化ソーダなどの化学物質からも発生し労働災害の原因となることがある³⁾。

その他、動植物・食物・廃棄物などの腐敗によりVSCsは大量に産生される。すなわちタンパクの腐敗の過程で、含硫アミノ酸からVSCsが産生される。細菌のL-cysteine lyaseやL-methionine γ -lyaseの関与により、システインから硫化水素が、メチオニンからメチルメルカプタンが産生される。しかし、含硫アミノ酸の代謝経路は複雑で一概に説明できない。たとえば、メチオニンから一旦ホモシステインが生成されるとメチルメルカプタンではなく硫化水素が産生される (図1)⁴⁾。

これらの細菌の関与や代謝系については不明な点が多いが、タンパク・含硫アミノ酸の腐敗により産生される。しかも、このようなVSCsの産生は人々の生活環境の中、あるいは非常に近い場所で発生していると考えられ、注意を必要とする。

III. VSCsの人への影響

VSCsの硫化水素はシアンと同様に、ミトコンドリア中のチトクロームオキシダーゼのFe³⁺と結合して、呼吸鎖を強く阻害する。その結果、細胞内窒息を起こす。VSCsについては、硫化水素が一般に知られている。ヒトが700ppmの硫化水素を吸入すると即死する可能性があり、300~500ppmの濃度でも1時間吸入すると死亡の危険がある⁵⁾。

また通常の口臭濃度である0.3ppmの低濃度でも、長時間曝露されると悪心、不眠、呼吸障害などが発生するが生命の危険はないと考えられるが、長期曝露についてのデータは無い⁵⁾。アメリカ政府機関の調査では「さらに低濃度の硫化水素でも以上のような全身症状が現れる」と報告されてい

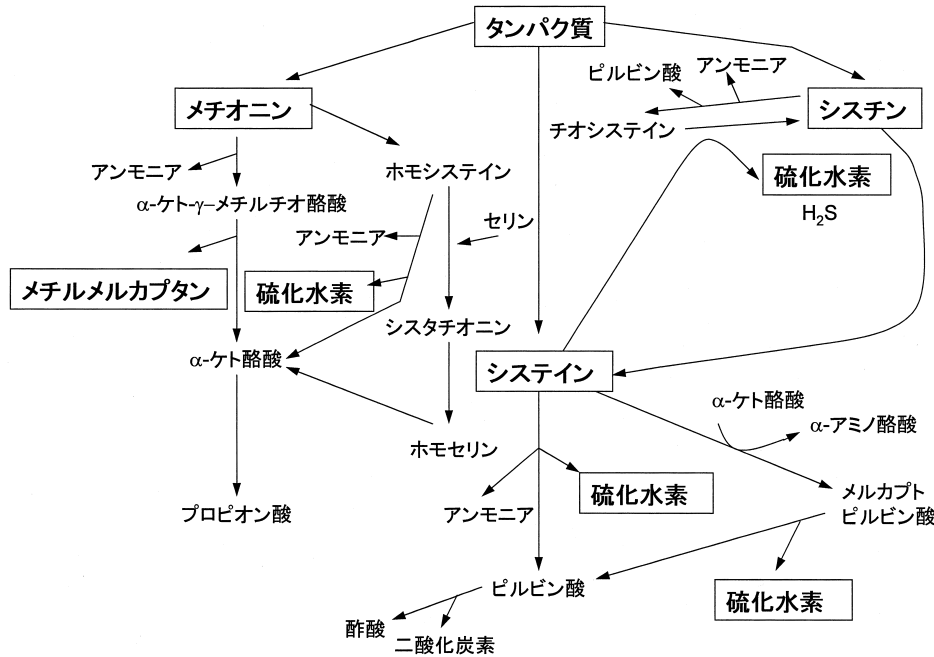


図1 VSCsの産生機序

Kleinberg et al.⁹⁾より改変。

る⁷⁾。ちなみに、悪臭防止法による「敷地境界における規制基準」の指定範囲は0.02~0.2ppmである。

IV. 粘膜透過性への影響

粘膜組織内に種々の有害物質が進入すれば、継発する反応、すなわち病原微生物であれば感染症、起炎物質であれば炎症反応あるいは抗原物質であれば抗原抗体反応などが惹起される。これらの反応により生体は何らかの影響を受ける。具体的な例を挙げると、歯肉溝の細菌が産生した Lipopolysaccharides (LPS) が歯肉溝粘膜内へ侵入すれば、歯周病発生の可能性が随分高まり、続いて病原性細菌の侵入が始まる。そこで、これらの有害な物質の侵入を防ぐため粘膜上皮にはバリアー効果があり、疾病や異常の発生を未然に防止している。

ところが、VSCsは粘膜透過性を強く亢進させる。ブタ口腔底粘膜に硫化水素やメチルメルカプタンを作用し、 $[^{35}\text{S}]\text{-Na}_2\text{SO}_4$ の透過量の変化から粘膜透過性を検討した。その結果、VSCs濃度に依存的に、また曝露時間依存的に粘膜透過性が

増加した。メチルメルカプタンと硫化水素の効果を比較すると、前者の方が強く、15ng/ml (11 ppm)の120分曝露で100%以上の透過性亢進が認められた⁷⁾。透過性亢進の直接的原因は、細胞外マトリックスであるプロテオグリカンなどの変性によると示唆されている。同様に、 PGE_2 やLPSの透過性も亢進したことから、口腔内では、VSCsにより歯周病発病の危険性が高まると考えられた¹⁾。

一方、実験に供した口腔底粘膜は角化の無い重層扁平上皮であることから、扁平上皮以外でも同様の透過性亢進が惹起されると考えられる。以上の結果から、VSCsにより起炎物質など種々の病原性物質の進入が容易になり、各種疾患の誘因となると示唆された。

VSCsによる粘膜透過性亢進は特に発癌性物質の浸潤促進や抗原抗体反応に関与する可能性が高く、現在著者らは検討を行っている。

V. 種々の細胞に及ぼす影響

線維芽細胞は恒常性維持や生体構造維持のために重要な細胞である。結合組織成分、とくにコラー

ゲンを多く産生する。たとえば、歯肉においてコラーゲン量が減少すると歯周疾患の原因の一つとなる。そこで著者らは、15ng/ml (11ppm) VSCs と線維芽細胞の関係を検討した。VSCs はヒト歯肉線維芽細胞の DNA 合成を強く阻害し、タンパクの合成を阻害した^{7,8)}。さらに、合成後30分以内のコラーゲン、すなわち分泌前の新生コラーゲンの細胞内分解を検討した。すると、対照群では26%の分解が見られたのに対し、メチルメルカプタン曝露群では42%が分解された⁹⁾。さらに合成開始から12時間経過すると、対照群で6%分解されたのに対し、53%と莫大なコラーゲンが分解された⁹⁾。さらに VSCs がコラーゲンの易溶化を引き起こすことも明らかになった¹⁰⁾。また、健全な結合組織の維持に必要なフィブロネクチンをモノマー化させることも明らかになっており、VSCs の作用は結合組織の不安定化につながる¹¹⁾。以上より、VSCs は生体の恒常性の維持に必須の新生コラーゲンを著しく減少させると結論された。

一方、組織の構築に重要な細胞内骨格に対する検討では、アクチンやインテグリンの分布が大きく変化して不均一な分布となった。すなわち、細胞膜周辺部に強く分布する傾向を示した。さらに、細胞内 pH もメチルメルカプタン存在下で低下し、細胞機能全般の低下が疑われた¹¹⁾。

in vivo 実験にてラット皮膚の創傷治癒過程に及ぼす VSCs の影響を調べると、コラーゲンの

合成阻害のほか、基底膜の新生が著しく阻害され、創傷治癒が著明に遅れた¹²⁾。すなわち、生体では口腔のように組織損傷が恒常的に発生しているが、VSCs が存在すると自己治癒能力が著しく低下する可能性が示された。次に VSCs の作用を LPS と対比して検討したところ、LPS と同じくサイトカイン・IL-1の合成やプロスタグランジン産生を大きく増加させた(図2)¹³⁾。PGE₂ は破骨細胞を活性化させ、MMP レベルを高め結合組織の破壊に結びつく。以上の結果より、VSCs は結合組織に与える影響が非常に大きく、口腔のみならず呼吸器などにも障害を与える可能性が否定できなかった。VSCs のこれらの臓器に対する影響についての研究が待たれる。

VI. VSCs の発癌性

発癌研究において、発癌遺伝子・癌抑制遺伝子についての研究が近年目覚しく進歩している。VSCs は大腸内で高濃度に存在し、硫化水素と大腸癌の関係が臨床的に論じられてきた。Kanazawa et al.¹⁴⁾ は大腸癌の再発あるいは再発を繰り返す患者と、再発を起こさない対照群の大腸内の各種ガス成分を比較した。その結果、大腸癌のハイリスク群では5種の腸内ガスのうち硫化水素のみが優位に高値を示し、6倍以上の差が見られた(図3)。一方、*in vitro* 実験から、硫化水素による発癌の機序も徐々に明らかになりつつある。前述の

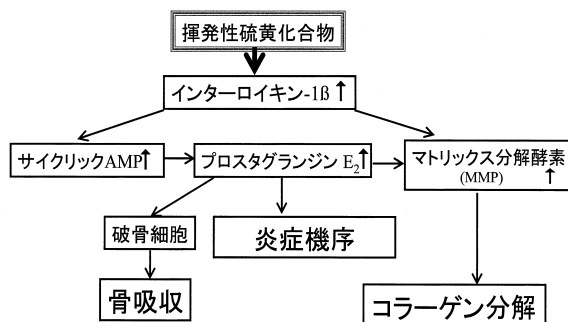


図2 VSCs の病原性の特徴¹²⁾

VSCs はインターロイキン-1βを増加し、一連の病原性物質を活性化させる。その結果、コラーゲン分解や骨吸収が惹起される。

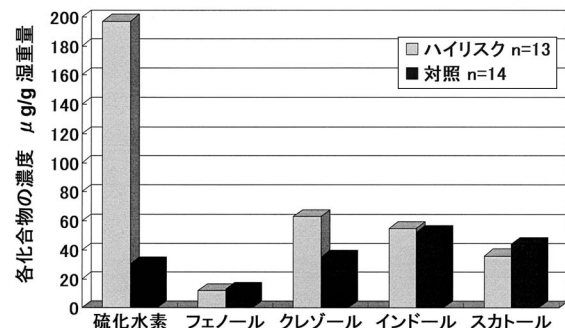


図3 大腸癌リスクと腸内ガス濃度

(Kanazawa et al.¹³⁾より改変) 大腸癌を再発するハイリスク者の大便中ガス5種類の内、硫化水素濃度が異常に高い。

ように硫化水素は呼吸鎖を阻害するが、一定濃度では細胞死を引き起こさず、細胞内を低酸素状態とするだけにとどまる。そのため、MAPキナーゼにいたる細胞内情報伝達機構が活性化され発癌過程が始まるとの仮説が提唱されている(図4)¹⁵⁾。しかし、この研究では培養液に水酸化ソーダを添加して、硫化水素ガスの代用としたため、曝露する硫化水素濃度を一定に保つことができなかった。すなわち、本研究は *in vivo* をシミュレーションできたとは言いがたい。一方MAPキナーゼの動態について著者らは、この仮説と一致しない結果を得ており(未発表)、この発癌仮説には十分な追試が必要と思われる。そこで、著者らは、培養液中の硫化水素濃度を一定に保つ培養装置を自製し、現在検討を行っている。

活性酸素は強い発癌性・老化促進作用を有する。細胞内では恒常的にミトコンドリアから大量に産生される活性酸素を、スーパーオキシドディスムターゼ(SOD)が消去して、癌や老化を予防する。ところが最近著者らは、VSCsがSOD活性を阻害しDNAを損傷する可能性を明らかにした^{16,17)}。さらに、ミトコンドリアにおける酸化ス

トレスの増加やコメット分析によるDNA損傷を確認している(未発表)。現在、DNA損傷過程を分子生物学的に解析中である。

一方、多形核白血球は食食の際、活性酸素を大量に発生する。この活性酸素の組織障害性のため、歯肉溝で大量に発生すれば歯周疾患の原因となる。そこで、歯周病原菌の刺激によるヒト多形核白血球の活性酸素発生を検討した。その結果、VSCsの存在下で活性酸素生成が1.5倍に増加した¹¹⁾。この結果は活性酸素による組織障害の可能性を示唆した。さらに、活性酸素によるDNA損傷の可能性も否定できないと思われる。

現在までに示唆されているVSCsによる発癌促進過程を図5に示した。この中で、粘膜透過性の亢進と発癌の関係は、現時点のデータから最も注目すべき発癌機序と考えられる。

粘膜透過性の亢進は、癌誘発において重要な働きをする。たとえば、カナダ癌協会は口腔癌発生リスクの自己診断票で「アルコールを含む洗口剤を毎日使いますか?」との質問を記載している。これはアルコールの脱水作用で粘膜透過性が亢進し、種々の発癌性化学物質の浸透が容易となり、

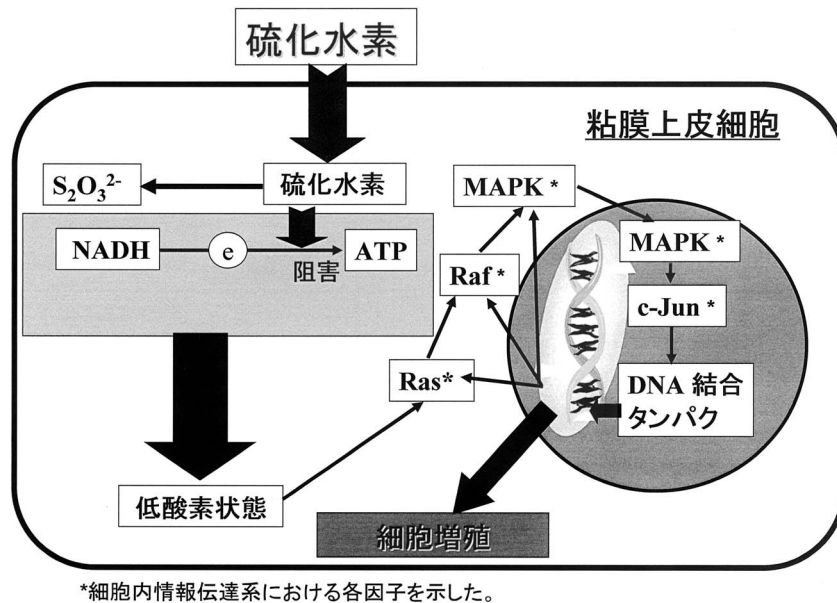


図4 硫化水素と大腸での発癌過程における細胞内情報伝達
Deplancke et al.¹⁴⁾より改変。

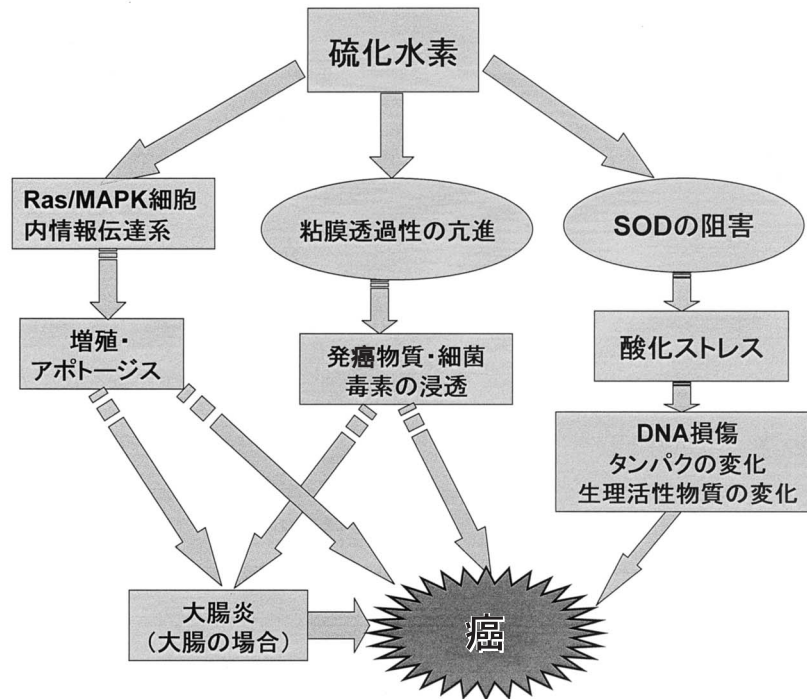


図5 硫化水素による発癌過程

発癌リスクが高まるとの理論に基づく。ところが、前述のように VSCs が粘膜透過性を増加させることから、VSCs は癌発生促進のリスクファクターと考えられる。

癌の増殖・転移に対し、上皮・血管・リンパ管の基底膜がバリアーとなっている。しかし、前述したように VSCs は基底膜の進展・増殖を阻害する上、基底膜を直接損傷する。したがって、VSCs は癌の増殖転移機構でのマトリックス分解酵素と同じく、癌の増殖・転移を助長する可能性が示唆された。

VII. まとめ

VSCs のヒトに及ぼす影響について、その概略を報告した。硫化水素は火山性ガスのように自然界の中で産生されることも多い。しかし、現代社会では杉並病に見られるように思いがけないところで VSCs が発生し生活の場に侵入することもある。しかし、一般社会は VSCs に対し、多くの場合、単に悪臭物質としての対応しか取っていないのかもしれない。タンパク・含硫アミノ酸を

含む廃棄物や汚泥などが存在するところに VSCs は産生される。言い換えれば、VSCs は生活と密着した環境汚染物質であり、生体への影響の面から VSCs を見直すべきである。

硫化水素やメチルメルカプタンは 11ppm 程度の濃度で、また曝露時間が 120 分と非常に短いが、粘膜の透過性を亢進する。また、LPS や PGE₂ の粘膜浸透性を高めた。さらに、コラーゲンの合成阻害や分解促進も認めたことから、VSCs による、なんらかの病原性が示唆された。

硫化水素により MAP キナーゼに至る細胞内情報伝達機構が活性化されて発癌につながるとの仮説が報告された。また、ヒト白血球を使った実験では、活性酸素の産生が増加した。さらには SOD 阻害もあり、VSCs が発癌性を有する可能性が示唆された。

文献

- 1) 八重垣健：臨床に必要な口臭の科学. 八重垣健(編) 臨床家のための口臭臨床のガイドライン、クインテッセンス出版、2000、pp13-26

- 2) 国立環境研究所 EIC ネット : <http://www.eic.or.jp/ecoterm/?act=view&serial=1405>, 平成17年11月1日アクセス
- 3) 広島海難審判庁事件広報 : 事件名 ケミカルタンカー興和丸乗組員死傷事件、広島海難審判庁、2005年11月18日発行
- 4) Kleinberg I, Westbay G: Oral malodor. Crit Rev Oral Biol Med 1: 247-59, 1990
- 5) 環境汚染物質の生体への影響15 : 硫化水素 National Research Council(編) 東京化学同人、1982, pp23
- 6) Ng W, Tonzetich J: Effect of hydrogen sulfide and methyl mercaptan on the permeability of oral mucosa. J Dent Res 63: 994-997, 1984
- 7) Tonzetich J: Effect of volatile sulphur compounds on periodontal tissues and cellular metabolism: an Overview, van Steenberghe D, Rosenberg M(eds): Bad Breath. A Multi-disciplinary Approach, Leuven Univ Press, 1996, pp217-224
- 8) Johnson PW, Yaegaki K, et al: Effect of volatile thiol compounds on protein metabolism by human gingival fibroblasts. J Periodont Res 27: 553-561, 1992
- 9) Johnson PW, Yaegaki K, et al: Effect of methyl mercaptan on synthesis and degradation of collagen in human gingival fibroblasts. J Periodont Res 31: 323-329, 1996
- 10) Johnson PW, Tonzetich I: Sulphur uptake by type I collagen from methyl mercaptan/ dimethyl disulphide air mixtures. J Dent Res 12: 136-141, 1985
- 11) Johnson PW, Lancero H: Function of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells in the presence of methyl mercaptan. Quintessence In 30: 343-9, 1999
- 12) Yaegaki K: Oral malodor and periodontal disease. Rosenberg M(ed) BAD BREATH. Research Perspectives Ramot Publishing, Tel Aviv Univ, 1995, pp87-108
- 13) Ratkay LG, Tonzetich J, et al: Antibodies to extracellular matrix proteins in the sera of MRL-Ipr mice. Clin of Immunopath 59: 236-245, 1991
- 14) Kanazawa K, Konishi F, et al: Factors influencing the development of sigmoid colon cancer. Bacteriologic and biochemical studies. Cancer 77: 1701-1706, 1996
- 15) Deplancke B, Gaskins HR: Hydrogen sulfide induces serum-independent cell cycle entry in nontransformed rat intestinal epithelial cells. FASEB J 17: 1310-1312, 2003
- 16) Lee W, Choi D, et al: Oral Malodorous compound inhibits superoxide scavenger in human gingival fibroblasts. J Dent Res 82 (Special Issue): 288, 2003
- 17) Yaegaki K, Qian W, et al: H₂S inhibits O²⁻ scavenger and causes oxidative damages *in vivo*. International Association for Breath Odor Research (ed) The Abstracts of the 6th International Conference of Breath Odour, University College London, London, 2004, pp34