

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460795

研究課題名(和文) 野菜成分を利用した皮膚感作性物質の作用軽減

研究課題名(英文) Effects of cruciferous vegetable elements in sensitizer-induced ear edema

研究代表者

谷井 秀治 (Tani, Hideji)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：90110618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：環境中には多くの感作性物質が存在するにもかかわらず、最も有効な予防は暴露防止である。暴露が避けられないのであれば他の予防法が期待される。我々はアブラナ科野菜(キャベツ、白菜、ブロッコリー等)由来アリルニトリルに注目した。このニトリルは大量投与(日常生活では起こりえない)では行動異常を引き起こし、低用量では抗酸化物質・第二相解毒酵素の誘導をもたらす。繰り返し低用量投与は感作性物質をもたらすアレルギー反応を抑制した。抑制はアリルニトリルがもつ抗酸化作用と関連していた。しかしアリルイソチオシアネートにはこのような作用は認められなかった。このことはアリルニトリルのアレルギー反応への関与を示している。

研究成果の概要(英文)：There are numerous sensitizers in the environment. It is possible that individuals in the environment are at a risk of exposure to sensitizers. To prevent allergic reactions due to sensitizers, we focused on allyl nitrile derived from cruciferous vegetables. This chemical has the ability to induce antioxidant/phase II detoxification enzymes. Repeated low dose exposure to allyl nitrile decreased sensitizer-induced ear edema, suggesting its capability of reducing allergic reactions. But allyl isothiocyanate showed no anti-allergic reactions. Additionally, isothiocyanates other than allyl isothiocyanate from cruciferous vegetables reportedly decrease dermal allergic reactions.

研究分野：産業衛生学

キーワード：アリルニトリル 感作性物質 炎症

1. 研究開始当初の背景

化学物質等による職業性皮膚病全体の約半数は皮膚又は眼への障害で占められ、皮膚疾患は30%ほどを占める。皮膚疾患の特徴は、感作により当該化学物質による反応閾値の低下、類似化学物質への交差感作の可能性などである。皮膚刺激による障害に比較して業務に与える影響は大きくなるのが想定されるので、化学物質の作業環境管理を十分に行い、皮膚感作の予防と軽減を図ることは重要である。動物実験に限れば、日本産業衛生学会でリストアップされていない感作性物質が国内外の研究室から多く報告されているので、現場では皮膚感作性化学物質への曝露のリスクが残ったままである。このリスクを低減するためには既知の皮膚感作性化学物質に対して徹底した作業環境管理をすることに加え、既知および想定外の皮膚感作性化学物質に対して反応閾値を高めること(感作の軽減)が有意義と考えられるものの、この後者の観点に立った研究は極めて少ない。皮膚感作性化学物質に対して反応閾値を高めるとは、当該化学物質の作用機序に関わることである。これまでの研究から、感作性化学物質に曝露されると表皮を構成する角化細胞や樹状細胞で cytokines や活性酸素種(ROS)が産生され、特に ROS のレベルが感作成立に重要な役割をしていることが示されている。生体内 ROS のレベル調節に大きく関わっているのは転写因子 nrf2 であるから、我々がこれまで研究してきた野菜に含まれる nrf2 活性化剤の応用を考えるに至った。アブラナ科野菜は日常的に摂取されているが、我々はこれら野菜成分アリルニトリルが皮膚や消化管を含むいろいろな組織で nrf2 を活性化することによって、第二相抗酸化・解毒酵素を誘導することを示し、職業性化学物質曝露後のその排泄に有効であることを示唆してきた。同じアブラナ科野菜成分で同様の生物活性を示すアリルイソチオシアネートは皮膚で第二相解毒酵素である Quinone reductase を誘導することが示されているものの抗酸化酵素への影響は知られていない。アブラナ科野菜由来両成分が皮膚で nrf2 の活性化をもたらしているようではあるものの、皮膚での第二相抗酸化・解毒酵素誘導は詳細に研究されておらず、また皮膚感作性化学物質に対する作用軽減作用の有無について知られていない。野菜成分がもつ抗酸化・解毒作用は、一方では各種疾患モデルに対し症状の軽減をもたらす。我々はすでに、アリルニトリル小量繰り返し投与が nrf2 を活性化することによって、アリルニトリル大量投与がひきおこす行動異常を軽減すること、また急性炎症性クロトン油がもたらす炎症反応を抑制することを認めた。特に後者の結果は皮膚感作性化学物質のひきおこす炎症を軽減できることを示唆している。本研究は野菜のこれまで知られている健康への有益性に抗皮膚炎症作用

を追加する。

2. 研究の目的

化学物質等による職業性皮膚病全体の約半数は皮膚又は眼への障害で占められ、皮膚疾患は30%ほどを占めるが、本研究は皮膚感作の軽減に焦点を当てる。化学物質による皮膚感作成立には曝露後に生成される活性酸素種の関与が知られるようになってきたが、生体中では活性酸素種は転写因子 nrf2 によって調節されている。我々がこれまで明らかにしたように、野菜成分アリルニトリルとアリルイソチオシアネートが nrf2 活性化剤であることは、これら両成分の前処理(普段の摂取)は化学物質がもたらす皮膚感作の軽減をもたらすことを示唆する。皮膚での炎症、nrf2 活性化の程度、酸化ストレスを評価することによって皮膚感作性化学物質に対する両成分の前処理効果の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 既知の感作性化学物質を用いてマウス耳介腫脹テストの有効性を確かめ、野菜成分アリルニトリルの抗炎症作用の有無を検討した。

炎症(耳介腫脹)の誘導。1-chloro, 2,4-dinitrobenzene, glutaraldehyde, formaldehyde(各々0-10%溶液、溶剤はアセトン/オリーブ油混合液)を片側の耳介に40μL、同量の溶剤を反対側の耳介に塗布する(1回/日、3日間)、4日目に両耳介から一定面積をパンチアウトし、試料とした。量反応関係は耳介の重量差、病理学的検査(試料をHE染色およびmyeloperoxidase免疫染色)で検討した。

アリルニトリルの抗炎症作用の評価。マウスを次の5群作成した。1:対照(蒸留水, P.O.), 2:アリルニトリル(10μmol/kg, P.O.), 3:アリルニトリル(50μmol/kg, P.O.), 4:アリルニトリル(100μmol/kg, P.O.), 5:アリルニトリル(200μmol/kg, P.O.)。これらの処理は8日間行った。5,6,7日目に既知の感作性物質 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene, glutaraldehyde, formaldehyde を耳介に塗布し8日目に、述べた方法で炎症を評価した。なお既知の感作性物質の塗布量は腫脹(重量差)が10mgとなるように決定した。各感作性物質について5群を比較することによってアリルニトリルの抗炎症作用を評価した。

(2) アリルイソチオシアネートの抗炎症作用の評価。マウスを次の5群作成した。1:対照(olive oil, P.O.), 2:アリルイソチオシアネート(10μmol/kg, P.O.), 3:アリルイソチオシアネート(50μmol/kg, P.O.), 4:アリルイソチオシアネート(100μmol/kg, P.O.), 5:アリルイソチオシアネート(200μmol/kg, P.O.)。これらの処理は8日間行った。5,6,7日目に既知の感作性化学物質 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene, glutaraldehyde, formaldehyde を耳介に塗布し8日目に炎症を評価した。感作性化学物質の塗布量はアリルニトリルで用いた量とした。5群を比較することによって抗炎症作

用を評価した。

(3) 野菜成分が有する抗炎症作用メカニズムを nrf2 経路および酸化ストレスに関して検討した。野菜成分を繰り返し投与したマウス耳介、および野菜成分の繰り返し投与後感作性化学物質を塗布した耳介での抗酸化酵素と抗酸化物質の測定を行った。測定対象は superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 活性、および thiobarbituric acid reactive substances レベルであった。

(4) 野菜成分が有する抗炎症作用メカニズムを NF- κ B 経路に関して検討した。アリルニトリル前処理群5群の5日目と8日目のマウス耳介を試料とした。炎症マーカーとして、IL-1, IL-6, TNF を ELISA 法で評価した。各感作性物質について5群を比較することによって NF- κ B 経路を介した抗炎症作用の有無に関する情報を得た。

4. 研究成果

(1) 感作性物質の塗布量

同程度の耳介の腫脹(重量増加)をひきおこす濃度(3日間)は、1-chloro, 2,4-dinitrobenzene は1.5%, glutaraldehyde は5%, formaldehyde は20%であった。これらの濃度を以下の実験に用いた。

(2) 野菜成分処理マウスでの感作性物質がもたらす耳介腫脹反応

アリルニトリルは 50 μ mol/kg/day で glutaraldehyde に、100 μ mol/kg/day で 1-chloro, 2,4-dinitrobenzen に対して腫脹抑制効果を認めたものの、formaldehyde に対しては無効であった。アリルニトリルと同様の作用が期待されたアリルイソチオシアネートにはいずれの感作性物質にも効果は認められなかった。

(3) 感作性物質耳介塗布後の酸化ストレス(thiobarbituric acid reactive substances)レベル

アリルニトリルは 50~200 μ mol/kg/day で glutaraldehyde と 1-chloro, 2,4-dinitrobenzen に対して thiobarbituric acid reactive substances レベルを抑制したが、formaldehyde に対しては無効であった。

(4) 感作性物質耳介塗布後の superoxide dismutase レベル

アリルニトリルは 200 μ mol/kg/day で formaldehyde、glutaraldehyde と 1-chloro, 2,4-dinitrobenzen がもたらした superoxide dismutase レベルの減少を抑制した。

(5) 感作性物質耳介塗布後の catalase レベル

アリルニトリルは 100 μ mol/kg/day で 1-chloro, 2,4-dinitrobenzen が、200 μ mol/kg/day で formaldehyde がもたらした catalase レベルの低下を抑制したが、glutaraldehyde に対しては無効であった。

(6) 感作性物質耳介塗布後の glutathione peroxidase レベル

アリルニトリルは 50 μ mol/kg/day で

glutaraldehyde 処理マウス耳介の glutathione peroxidase レベルの低下をもたらし、100 μ mol/kg/day および 200 μ mol/kg/day で 1-chloro, 2,4-dinitrobenzene および formaldehyde 処理マウス耳介の glutathione peroxidase レベルの増加をもたらした。

(7) NF- κ B 経路への影響

アリルニトリルは 50~200 μ mol/kg/day で、炎症マーカー IL-1, IL-6, TNF に有意の影響を与えなかった。

(8) 考察

アリルニトリルの繰り返し投与が glutaraldehyde、1-chloro, 2,4-dinitrobenzene の示す炎症反応を抑制するものの formaldehyde には無効であったことは、このニトリルがもつ抗炎症性を示唆するが必ずしも全ての感作性物質に有効とはいえないことも示している。そしてこの有効性の差は、NF- κ B 経路に差がみられなかったことからアリルニトリルのもつ抗酸化作用と感作性物質の酸化作用のバランスに依存しているように思われた。さらに nrf2 活性化剤であるアリルイソチオシアネートに抗炎症作用が認められなかったことは、同じ野菜成分 sinigrin 加水分解産物であることは共通するものの炎症に対する有効成分はアリルニトリルであることを示している。

アブラナ科野菜は日常的に摂取されているが、積極的なこの野菜の摂取は感作性物質に起因する炎症を含むアレルギー反応を軽減する可能性を示している。これまでアブラナ科野菜の摂取といろいろながん(消化器、前立腺、膀胱、腎臓、結腸、卵巣、すい臓、乳、肺)の発症リスクの間に逆相関関係が認められている。さらに全死亡率と心臓血管病による死亡率との間にも逆相関関係が認められている。本研究はアブラナ科野菜ががん等に有効であることに加え、感作性化学物質がもたらす炎症反応にも有効である可能性を示唆した。

(9) アリルニトリルに関する情報発信

アリルニトリルが有する抗炎症作用を次のように機会を設け広く発信した。第19回産業衛生技術研修会「職業アレルギー」、シンポジウム「環境と健康」の開催を企画し、総説、意見を学会誌で発表した。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計3件)

Tanii Hideji, Allyl nitrile: Toxicity and health effects, Journal of Occupational Health, 査読有, 59巻, 2017, 104-111

Tanii Hideji, Sugitani Kayo, Saijoh Kiyofumi, Anti-inflammatory and antioxidant effects of repeated exposure to cruciferous allyl nitrile in sensitizer-induced ear edema in mice, Medical Science Monitor Basic Research, 査読有, 22巻, 2016, 22-26

DOI:10.12659/MSMBR.897771

谷井秀治、皮膚感作性物質の作用は軽減

できるか?、産業衛生学雑誌、査読有、
57巻, 2015, 144-145

〔学会発表〕(計 2 件)

谷井秀治、アリルニトリル：環境からの
生成、毒性、健康との関係、シンポジウ
ム「環境と健康」、2016年12月18日、
河鹿荘ロイヤルホテル(石川県・加賀市)
谷井秀治、佐藤一博、皆本景子、土橋邦
生、職業アレルギー、第19回産業衛生技
術専門研修会、2014年09月25日、金沢
市文化ホール(石川県)

〔図書〕(計 1 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 1 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷井 秀治 (TANII, Hideji)
金沢大学・医学系・准教授
研究者番号：90110618

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

杉谷 加代 (SUGITANI Kayo)
金沢大学・保健学系・助教
研究者番号：20162258

(4) 研究協力者

()