

# AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

エム・オー・エー健康科学センター研究報告集 (2005.07) 10巻:69～77.

食品中に残存するホルマリンが摂取されて発現する健康影響に関する研究

吉田貴彦, 伊藤俊弘, 中木良彦

# 食品中に残存するホルマリンが摂取されて発現する健康影響に関する研究

吉田 貴彦<sup>1</sup> 伊藤 俊弘<sup>1</sup> 中木 良彦<sup>1</sup>

## 抄 録

アコヤ貝の大量斃死問題によって明らかになった養殖魚類へのホルマリン処理は、環境汚染問題とともに消費者が口にする食品へのホルムアルデヒド処理の問題をはらんでいる。魚などに処理されたホルムアルデヒドが食物にそのまま、あるいは形態を変えて残留し、経口的に長期に摂取される状況を想定し、ホルムアルデヒドを添加した飲料水、および処理した飼料をB6C3F1マウス（雌）に50日間投与した。高濃度飲水群、低濃度及び高濃度餌投与群で腸内の大腸菌及び嫌気性菌の有意な減少を認めた。ホルムアルデヒド処理飼料からはおよそ40分の1量の遊離ホルムアルデヒドしか抽出されなかった。このことは、飼料に添加したホルムアルデヒドが蛋白と結合しない形態を変えて残留し、消化管内でより強い毒性を発現した可能性を示している。その他の免疫応答には有意差を認めなかったものの、ホルムアルデヒドが免疫応答へ影響を与える可能性を示唆する結果が得られた。

## キーワード

ホルムアルデヒド、養殖魚、腸内細菌、免疫応答

## 1. 緒 言

ホルムアルデヒドは単純な構造を有し、土壌や水からも検出されるなど自然界に広く分布する物質である一方、化学工業において各種有機物質の合成の際の原料として用いられる物質でもある。また、蛋白質との結合力が強い性質があることから、古くから生物学、医療の現場に於いて組織の固定や消毒剤として用いられてきた。近年では家具・建材・壁紙接着剤に防腐剤として添加されたホルムアルデヒドが徐々に発散し室内空気を汚染し、シックハウス症候群や化学物質過敏症の原因となることが指摘されて注目を集めている。このホルムアルデヒドはその毒性の強さから、食品添加物としての使用が禁止されているが、過去にはホルムアルデヒドが尿素樹脂製食器から溶出することが判明し問題となったことがある<sup>1)</sup>。また無添加の自然食品である魚介類や干し椎茸にも微量のホルムアルデヒドが含まれている<sup>2)</sup>。

さて、我が国は国土が狭い上に人口密度が高い。そこで食料の確保のために様々な取り組みがなされてき

た。魚類資源に関しても、養殖が行われ、その効率を上げるため過密養殖の傾向が強くなっている。過密養殖では、飼育環境の劣悪さにとともに細菌感染や寄生虫感染が頻発する弊害がある。細菌感染症に対しては、飼料とともに生け簀への抗生物質の大量散布が日常的に行われている。寄生虫感染には、抗生物質が無効であり有効な駆除法が無かったが、70年代から農林水産省が養殖を推奨する際に、エラムシなど魚類の鰓などの体表に寄生する寄生虫駆除に対してホルマリン薬浴の有効性について紹介をした<sup>3)</sup>。そのためウナギ、ニジマス、ヒラメ、トラフグなどにホルマリン薬浴が頻繁に行われるようになった。1995年にトラフグ養殖生産高が1985年の100倍と飛躍的に伸びたのに符合するように、90年代半ばから真珠養殖のアコヤ貝が大量に斃死するようになった。真珠養殖業者らは、アコヤ貝養殖場に近接する魚類（特にフグ）養殖生け簀で使用され、そのまま海域に放流されるホルムアルデヒドが周辺海域の海藻なども死滅させるなど、環境破壊を起こしていることなどから、アコヤ貝の斃死の原因ともなっていると考えるに至った。

アコヤ貝の斃死の原因は、諸研究機関によって、原虫感染、ウイルス感染、栄養不良などとする報告もあ

<sup>1</sup> 旭川医科大学医学部健康科学講座

〒078-8510 旭川市緑が丘東2条1丁目1-1

り、未だ特定されていない。しかしながら、劇薬に指定されているホルムアルデヒドが環境中に放出され、生態系を破壊することへの非難、さらには、生き物の段階ではあるが食料となる魚類へのホルムアルデヒド使用に対する消費者からの反発が起こった。農林水産省はアコヤ貝斃死問題が起こる前の1981年に魚類へのホルマリン使用を禁止する通達を出しているものの法規制はなされていない。当時の環境庁も環境破壊の状況証拠が乏しいなどとして法規制に動かなかった。その後もホルムアルデヒドの使用中止が徹底されなかったことから、1997年に水産庁から成魚に対するホルムアルデヒドの全面使用禁止の通達が出され、ある程度の使用抑制効果が認められた。しかしながら、代替品として導入された過酸化水素の効果が思わしくないこともあり、一部の魚類養殖業者は未だにホルムアルデヒドの不正使用を続けていると言われており、2003年には長崎県下のトラフグ養殖業者の過半数が、養殖過程でホルマリンを使用していたとの調査結果が報道された。また2003年3月、全国有数の真珠生産地である愛媛県で、海域でのホルマリン使用と放流の禁止の全国初の罰則付き条例が制定されるに至っている。

以上が我が国における養殖魚類へのホルムアルデヒド使用の概要である。こうしたホルムアルデヒドの海域での使用による環境破壊問題は、我々住民にとって看過できないことであるが、ここで、ホルムアルデヒドの魚類への使用による我々人間の生体への直接影響について検討してみた。

元来ホルムアルデヒドは蛋白質と強固に結合することが知られている。魚類も生物であり、その生体は蛋白質から成り立っている。寄生虫駆除のための薬浴中にホルムアルデヒドが魚類の体表、鰓、消化管ないし魚肉などにホルマリンとしてそのまま残留、あるいは蛋白質と結合し形を変えて存在し続ける可能性があることは否定できない。そうしたホルムアルデヒド類が、魚類が食品となった後にも残存し、我々がそれらを摂取する可能性がある。一方、ホルムアルデヒドの食品への使用が禁止されていること、また劇物であるホルムアルデヒドが経口的に生体に摂取される状況は、常識的に考えられ難かったためか、飲食物を介してのホルムアルデヒドの慢性生体影響について研究され報告

されたものは無かった。そこで、微量のホルムアルデヒドが食物に作用し、形態を変えて残留し、飲食物を介し経口的に長期に摂取される状況を想定し、実験動物を用いたホルムアルデヒド投与実験系を設定し生体影響について検討することとした。模擬飼料としてホルムアルデヒド処理を行った動物飼料、および陽性対象としてホルムアルデヒドを添加した蒸留水をマウスに与えて、腸内細菌叢の変化、腸管から吸収された物質が最初に達し解毒の場ともなる肝臓への影響、および外来病原体から生体を防御する免疫機構への影響などを指標として、ホルムアルデヒドによる健康影響の評価について検討を試みた。

## 2. 実験方法

### 2-1 実験動物

実験動物はB6C3F1マウスの雌性を用いた。マウスは日本クレア株式会社（東京）から購入し、1週間の馴化後に6週齢時から投与実験を開始した。実験期間を通し、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、人工照明にて暗期19-7時、明期7-19時に管理した動物室内に設置したクリーンラック内のアルミニウムケージにて飼育した。コントロール群、ホルムアルデヒド水溶液投与群（低濃度群、高濃度群）、ホルムアルデヒド処理飼料投与群（低濃度群、高濃度群）の各群を設定し、各群において飲料水および飼料は自由に摂取させることとし、投与期間は50日間とした。各群は6ないし9匹とした。飼育期間中に経時的に体重、飲水量および飼料摂取量を飼育ケージごとに群として測定した。

### 2-2 ホルムアルデヒドの投与

#### 1) コントロール群

飲料水（drinking water; DW）として蒸留水、飼料として市販の動物飼育用固形飼料（CE-2、日本クレア株式会社）を与えた群をコントロール群（control）とした。

#### 2) ホルムアルデヒド水溶液投与群

飲料水として、ホルムアルデヒド（特級、37%ホルムアルデヒド溶液、和光純薬工業株式会社、大阪）を0.05%（低濃度、Low-DW-HCHO）及び0.10%（高濃度High-DW-HCHO）の濃度となるように蒸留水で調整したホルムアルデヒド水溶液を、飼料には無処置の通

常飼料を与えた。

### 3) ホルムアルデヒド処理飼料投与群

飲料水として蒸留水を与えた。1日のマウス1匹あたりの飲水量を4 ml、飼料摂取量を5 g (実験動物普通固形飼料およそ2ペレット分)と仮定し、ホルムアルデヒド水溶液での低濃度投与群および高濃度投与群の、ホルムアルデヒド摂取絶対量と同等量が飼料摂取によって摂取されるように調整したホルムアルデヒド水溶液を飼料ペレット全体にまんべんなく浸潤させた後、自然乾燥させホルムアルデヒド処理飼料 (experimented chow; EC) を調整した。実際には、0.2% 及び0.4%ホルムアルデヒド水溶液0.7mlを1つの飼料ペレットに浸潤させたものを、それぞれ低濃度 (Low-EC-HCHO) 及び高濃度 (High-EC-HCHO) ホルムアルデヒド処理飼料とした。

### 4) 投与ホルムアルデヒド量の測定

ホルムアルデヒド水溶液およびホルムアルデヒド処理飼料の残留遊離ホルムアルデヒド量について、ホルムアルデヒド水溶液は直接、ホルムアルデヒド処理試料は細かく粉碎し蒸留水にて抽出した後クロモトローブ酸法によって定量した。それぞれの添加量による存在理論値に対して定量されたホルムアルデヒド量は、水溶液のLow-DW-HCHOで500  $\mu$  g/mlに対し512  $\mu$  g/ml、High-DW-HCHOで1000  $\mu$  g/mlに対して1010  $\mu$  g/ml、飼料のLow-EC-HCHOで500  $\mu$  g/mlに対して12.7  $\mu$  g/ml、High-EC-HCHOの1000  $\mu$  g/mlに対して26.4  $\mu$  g/mlであった。ホルムアルデヒド水溶液では安定した遊離のホルムアルデヒドが検出され、なおかつ経時的な減少もみられなかった。一方、ホルムアルデヒド処理飼料では添加理論量に対して40分の1程度の遊離ホルムアルデヒドが検出されるにとどまった。

各群のホルムアルデヒド投与量は測定された含有量と摂取量とから求めた。

## 2-3 生体影響評価項目

### 1) 腸内細菌数

経口摂取された飲食物は消化管を通過することから、直接飲食物に遭遇する腸内細菌叢の変化について検討

するために、選択培地を用い主な細菌種について数値的に評価を試みた。

投与実験期間終了の前日にマウスを保持し下腹部を物理的に刺激することにより排便を促し、2個の糞便塊を採取した。これを滅菌生理食塩水2mlに混濁後に10倍希釈し糞便混濁液を調整した。大腸菌群を選択培養するためにDHL寒天平板培地 (栄研化学株式会社、東京) を定法に基づいて調整し、直径9 cm滅菌プラスチックシャーレ (旭テクノグラス株式会社、東京) に20mlずつ分注した。嫌気性菌群を選択培養するためにウマ脱線維血液 (日本バイオテスト研究所、東京) を5%添加したBL寒天平板培地 (日水製薬株式会社、東京) を同様に作成した。

調整した糞便混濁液100  $\mu$  lをそれぞれの寒天平板培地に塗布し、DHL培地は通常雰囲気中で37°Cにて24時間、BL培地は窒素で空気を置換した雰囲気中に37°Cで36時間培養した後、出現コロニー数を肉眼にて計測した。

### 2) 肝臓におけるエンドトキシン誘発性サイトカイン応答

経口的に摂取された物質は、消化管から吸収され門脈を介し肝臓に運ばれ解毒などの生体作用を受ける。そのため、経口摂取された物質が肝臓に直接作用し影響をおよぼす場合がある。また、腸内細菌が産生するエンドトキシンも肝臓にて処理され、体循環に入る前に無毒化される。過剰なエンドトキシンが消化管で産生された場合に肝臓にてサイトカイン応答が惹起される。こうした肝臓におけるエンドトキシン誘発性サイトカイン応答は消化管細菌叢の影響を受けることが知られている<sup>4)</sup>。そこで、肝臓でのエンドトキシンによるTNF- $\alpha$ 産生に始まるサイトカイン応答を検討した。

ホルムアルデヒド投与実験期間終了後、屠殺1時間前に2mg/kg lipopolysaccharide (LPS, E.coli, DIFCO, Laboratories Inc. Detroit, MI, USA) を腹腔内投与したマウスから肝臓を摘出し、M.I.Luster等<sup>5)</sup>の肝薄切培養法に基づき摘出した肝臓を直径8mmの円柱状に切り出しTissue Slicer (Vitron社, Tucson, AZ, USA) を用いてPBS中にて厚さ約200  $\mu$  mに薄切した。薄切肝2切片を、25mM-HEPES、10%非働化牛胎児血清 (三菱

化学、東京)、 $10 \mu\text{g/dl}$ 牛膵臓インシュリン (SIGMA CHEMICAL CO. Steinheim, Germany)、 $100\text{U/ml}$  ペニシリン、 $100\text{mg/ml}$  ストレプトマイシン、 $2\text{mM}$  L-グルタミン (GIBCO BRL. N.Y. USA) を添加したRPMI1640培養液 (GIBCO BRL.)  $2\text{ml}$ 中にて、酸素95%二酸化炭素5%の雰囲気、 $37^\circ\text{C}$ で1時間回転培養を行った。培養後、培養上清中のTNF- $\alpha$ を酵素免疫測定法 (TNF- $\alpha$  ELISA Kit, BIO SOURCE, Camarillo, CA, USA) にて測定し、肝臓でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答を調べた。サイトカイン応答を誘導しない対照群には事前に生理食塩水を同様に投与し、同様の操作を行い培養上清について測定した。

### 3) 免疫応答としての脾細胞幼若化応答

免疫応答の評価として、脾細胞のマイトゲン刺激による幼若化応答について検討した。

マウスから無菌的に脾臓を摘出し、 $25\text{mM}$ -HEPES、10%非働化牛胎児血清、 $100\text{U/ml}$  ペニシリン、 $100\text{mg/ml}$  ストレプトマイシン、 $2\text{mM}$  L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液にて脾細胞浮遊液を細胞濃度 $2.5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、1ウエルあたり $200 \mu\text{l}$ を96穴平底マイクロカルチャープレート (Corning, Corning, N.Y. USA) にて、マイトゲン無添加、 $5 \mu\text{g/ml}$ 濃度のLPSまたは、 $5 \mu\text{g/ml}$ 濃度のConcanavaleine A (ConA, DIFCO, Laboratories Inc, Detroit, MI, USA) を添加し、二酸化炭素5%雰囲気、 $37^\circ\text{C}$ にて48時間培養した。培養後、 $^3\text{H}$ -チミジン (Amersham Pharmacia Biotech, 東京) を加えてさらに4時間培養し、 $^3\text{H}$ -チミジンの取り込みをシンチレーションカウンタで計測し、細胞増殖活性をマイトゲン無添加対照培養系の値との比からStimulate indexとして計算した。

### 4) 抗体産生応答

外来抗原に対して惹起される免疫応答としてヒツジ赤血球を抗原として起こる抗体産生応答について検討した。

滅菌生理食塩水にて10%v/vに濃度調整したヒツジ赤血球 (デンカ生研株式会社、東京)  $0.2\text{ml}$ をマウスに腹腔内投与し、その4日後脾臓を摘出し、RPMI1640培養液 $10\text{ml}$ にて脾細胞浮遊液を調整し、さらに20倍に希

釈した。このうち $100 \mu\text{l}$ をシャーレに入れ、20%v/vヒツジ赤血球 $0.1\text{ml}$ を加えた後、RPMI1640培養液 $2\text{ml}$ で調整した0.7%アガロースを加えて $37^\circ\text{C}$ 、1時間培養した。培養後、生理食塩水にて10%補体結合反応用乾燥補体 (極東製薬工業株式会社、東京)  $1.5\text{ml}$ を加え、 $37^\circ\text{C}$ 、30分培養した。赤血球加アガロースに出現した溶血斑 (プラーク) を肉眼にて計測し、脾臓あたりのヒツジ赤血球特異的抗体産生細胞数を求めた。

### 5) フローサイトメーターによるリンパ球分画解析

免疫応答の変容をマウス脾細胞のリンパ球分画解析により検討した。リンパ球の表面マーカーは、CD4陽性細胞 (ヘルパーT細胞)、CD8陽性細胞 (細胞傷害性T細胞)、及びCD45R陽性細胞 (B細胞) について陽性率を解析した。

マウスから脾臓を摘出し、 $100\text{U/ml}$  ペニシリン、 $100\text{mg/ml}$  ストレプトマイシン、 $2\text{mM}$  L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液にて細胞濃度 $1.0 \times 10^7/\text{ml}$ に調整し、0.83%  $\text{NH}_3\text{Cl}/0.02\text{M}$  Tris · HCl (pH 6.8) にて溶血処理した脾細胞浮遊液 $50 \mu\text{l}$ にFITC-CD4 (Beckman Coulter Co. France)、FITC-CD8 (Beckman Coulter Co.)、FITC-CD45R (Beckman Coulter Co.) の各蛍光抗体を $10 \mu\text{l}$ 加え $37^\circ\text{C}$ 、30分培養した。0.1%  $\text{NaN}_3$ -PBSにて2回洗浄した細胞浮遊液を0.05%パラホルムアルデヒドPBS $100 \mu\text{l}$ にて固定後フローサイトメーター (EPICS ELITE, Beckman Coulter Co.) で各蛍光抗体陽性リンパ球を測定した。

## 3. 結果

### 3-1 飲水量、飼料摂取量およびホルムアルデヒド摂取推定量

コントロール群 (control)、ホルムアルデヒド水溶液投与群のLow-DW-HCHO、High-DW-HCHO、ホルムアルデヒド処理飼料投与群のLow-EC-HCHO、High-EC-HCHOの各群それぞれの1日1匹あたりの飲水量および飼料摂取量はcontrol:  $5.03\text{ml}$ 、 $4.71\text{g}$ 、Low-DW-HCHO:  $4.10\text{ml}$ 、 $4.50\text{g}$ 、High-DW-HCHO:  $3.96\text{ml}$ 、 $4.33\text{g}$ 、Low-EC-HCHO:  $4.80\text{ml}$ 、 $4.50\text{g}$ 、High-EC-HCHO:  $4.41\text{ml}$ 、 $3.96\text{g}$ であった。

それぞれの群におけるホルムアルデヒドの推定摂取

量は1日1匹あたり control: 0.00mg、Low-DW-HCHO: 2.05mg、High-DW-HCHO: 3.96mg、Low-EC-HCHO: 1.80mg、High-EC-HCHO: 3.16mgであった。飲水量と飼料摂取量はすべての飼育において測定を行い、推定摂取量に再現性を認めたため代表的なデータを示した。

### 3-2 成長および一般観察事項

各群の体重増加量には有意な差は認められなかった。その他、飼育期間中における行動等に注目すべき変化は無かった。また、肉眼的に外表に特記すべき変化は見られなかった。

### 3-3 腸内細菌数の変動

糞便中の大腸菌群に関して、Low-EC-HCHO、High-EC-HCHOの両ホルムアルデヒド処理飼料投与群及びHigh-DW-HCHO群でcontrol群に対して有意な菌数の減少 ( $p < 0.05$ ) を認めた (図1)。一方、嫌気性菌群では、Low-EC-HCHO、High-EC-HCHOの両ホルムアルデヒド処理飼料投与群及びHigh-DW-HCHO群でcontrol群に対して有意な菌数の減少 ( $p < 0.01$ ) を認めた (図2)。腸内細菌数は各回とも再現性を認め、そのうちの代表的なデータを示した。

### 3-4 肝臓におけるエンドトキシン誘発性サイトカイン応答の変容

各群のLPS投与マウスから肝臓を得て作成した薄切

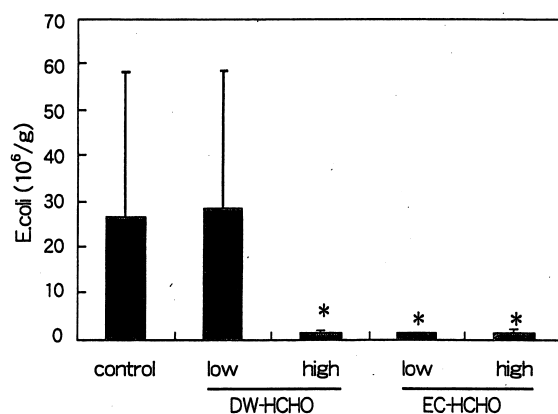


図1 マウス糞便中の腸内細菌数 (DHL 培地)

マウスの糞便を生理食塩水で混濁、希釈し、DHL 培地で培養後コロニー数を糞便重量 (g) にて換算した。

\*  $p < 0.05$  (control との比較) Mann-Whitney U 検定

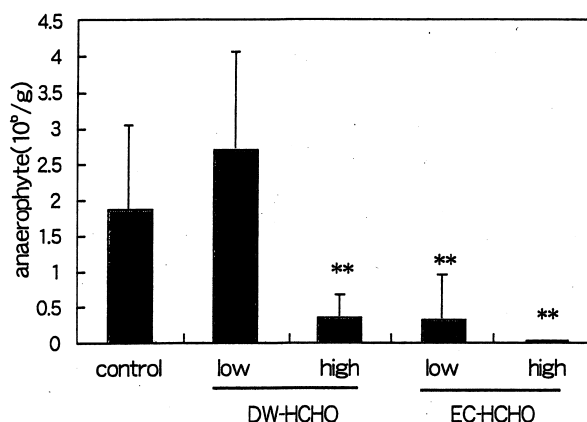


図2 マウス糞便中の腸内細菌数 (BL 培地)

マウスの糞便を生理食塩水で混濁、希釈し、BL 培地で培養後コロニー数を糞便重量 (g) にて換算した。

\*\*  $p < 0.01$  (control との比較) Mann-Whitney U 検定

肝の培養上清中の TNF- $\alpha$  濃度は、非LPS投与マウスでのそれに比べてそれぞれ高値を示しエンドトキシンによるサイトカイン応答が惹起されている事が確認された。

LPS 投与によって誘導され培養上清中に産生放出される TNF- $\alpha$  は、High-DW-HCHO および High-EC-HCHO 群でコントロール群より有意差がないものの、低下傾向を示した (図3)。

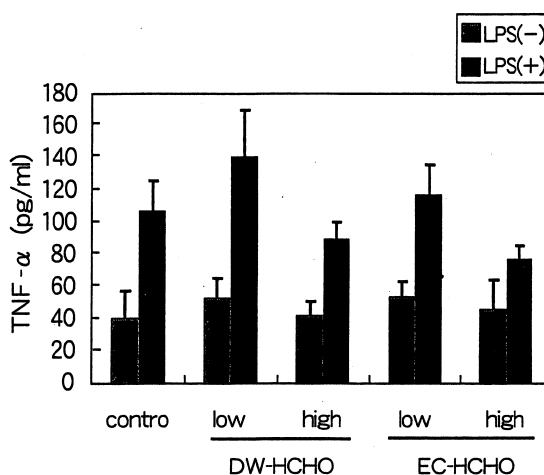


図3 薄切肝培養上清中 TNF- $\alpha$  濃度 (pg/ml)

事前に LPS を腹腔内投与した群 (LPS (+))、生理食塩水を腹腔内投与した群 (LPS (-)) の各マウスから抽出した肝臓の薄切片を回転培養し、上清を ELISA 法にて測定した。

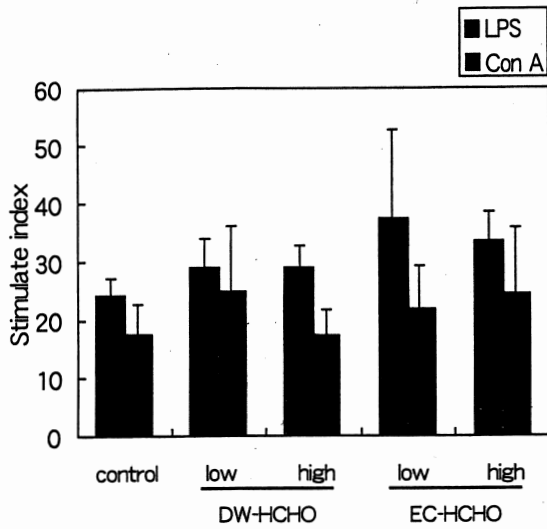


図4 マウス脾細胞を用いたリンパ球幼若化試験

培養液にて調整したマウス脾細胞を、マイトゲン無添加、5 μg/ml LPS または、5 μg/ml ConA を添加し、二酸化炭素5%雰囲気、37℃にて48時間培養後、3Hチミジンを加え、その取り込みをシンチレーションカウンタで計測し、細胞増殖活性をマイトゲン無添加対照培養系の値との比から Stimulate index として計算した。

3-5 脾細胞幼若化応答の変容

LPS および ConA の両マイトゲン刺激による脾細胞の幼若化応答では、ConA 刺激による High-EC-HCHO 群で有意差はないものの、Stimulate index の増大が見られた (図4)。

3-6 ヒツジ赤血球に対する抗体産生応答の変容

抗ヒツジ赤血球抗体産生応答試験では、脾臓あたりの溶血斑 (プラーク) 数に何れの投与群においてもコントロール群と有意な差は見られなかった (図5)。

3-7 リンパ球分画の変容

ホルムアルデヒド投与群はいずれも control 群に比較して CD4、CD8、CD45R 陽性細胞の割合に有意な差は見られなかった (図6)。

4. 考察

ホルムアルデヒドの使用目的は、蛋白質との結合性の強さを利用した医学・生物学領域での組織固定用溶液や繊維業界での形態保持加工、防腐剤としての性質を

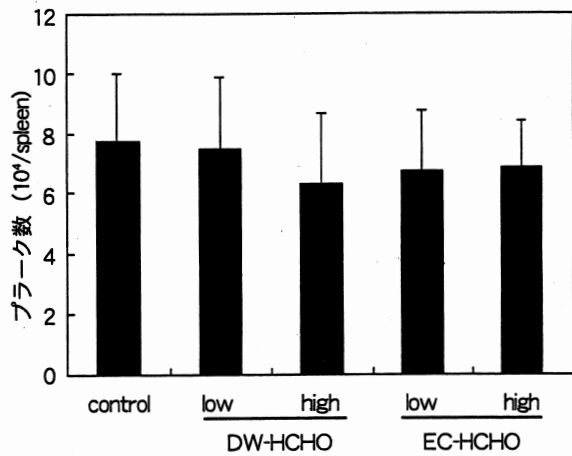


図5 ヒツジ赤血球刺激による抗体産生応答能

10% v/v ヒツジ赤血球 0.2ml をマウスに腹腔内投与し、その4日後摘出した脾臓から RPMI1640 培養液にて細胞浮遊液を調整した。このうち 100 μl を赤血球加アガロースの入ったシャーレに入れ、補体を加えて出現した溶血斑 (プラーク) を肉眼にて計測し、脾臓あたりの抗体産生細胞数を求めた。

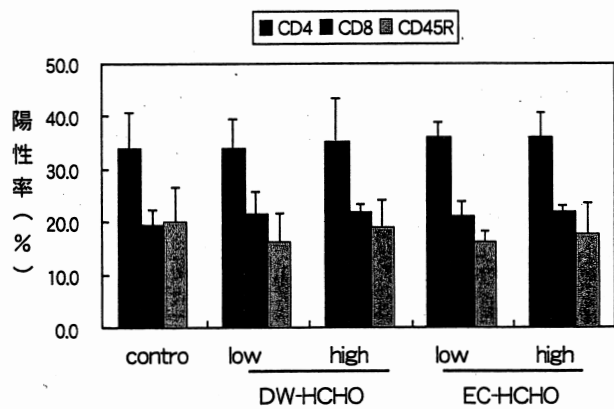


図6 マウス脾細胞リンパ球分画

マウスの脾細胞を FITC-CD4、CD8、CD45R の各表面マーカー蛍光抗体で染色しフローサイトメーターにて各表面マーカーの発現細胞を測定した。

利用した接着剤を用いた建材・家具製造業、また化学工業での原料としてなど多彩である。また、建具や壁紙の接着剤への使用は、室内空気質を汚染しシックハウス症候群の主な原因となるなど注目を集めている。前者にあつては ppm オーダーの高濃度に達し、粘膜刺

激症状をはじめ急性中毒や慢性中毒が産業保健領域で問題となっている。後者では、ppbオーダーの室内空気汚染が古典的な中毒学の常識があてはまらないシックハウス症候群を起こす原因となる<sup>6)</sup>。この様な例が示すとおり、日常我々がホルムアルデヒドに接する機会は空気中に存在するガス状物質であり、呼吸を介した曝露が起こる。また、一部に水溶液の皮膚への接触による刺激作用が起こる。一方、労働現場でホルムアルデヒドの経口曝露は通常起こりえず、またホルムアルデヒドの劇物としての特性により食品への使用が禁止されていることや、常識的に飲食物に混入して摂取される機会が考えにくいことから、毒性学領域において経口吸収は注目されてこなかった。そのため、従来のホルムアルデヒドによる生体影響は呼吸器系からの吸収後の生体作用、体表面への接触による刺激作用だけが注目され研究されてきた経緯がある。

アコヤ貝の大量斃死問題によって明らかになった養殖魚類へのホルマリン処理は、環境汚染問題とともに消費者が口にする食品へのホルムアルデヒドの残留の可能性をはらむ。ホルムアルデヒドが蛋白質と強く結合することから、魚類体表・消化管・鰓などに直接接触した、あるいは魚肉に移行したホルムアルデヒドがその場において蛋白質と結合した場合、通常の測定法による抽出ではホルムアルデヒドが遊離することなく検出されない可能性がある。事実、今回の研究においてホルムアルデヒド処理食品を想定して作成した、実験動物固形飼料のホルムアルデヒド処理の後に測定したホルムアルデヒド量は添加した量の40分の1程度に過ぎなかった。抽出されたホルムアルデヒドは、飼料中の水分中に遊離して存在しない固体となって存在していた分と思われるが、仮に一部ガス化して揮発消散したとしても相当量のホルムアルデヒドが飼料中の蛋白質と結合し、全く形態の異なる物として存在しているものと考えられる。今回の研究は、経口的に摂取されるホルムアルデヒドそのもの、及び蛋白成分と結合した形態による生体影響を比較評価した独創性に富むものである。

今回、ホルムアルデヒドの摂取量を飲水群と同等になるよう調整した飼料を作成し、投与したにもかかわらず、飲料水と餌のホルムアルデヒド低濃度群で腸内

細菌数に差が生じた事は、ホルムアルデヒドが餌中の蛋白と結合して生じた化合物が消化管内の腸内細菌叢に何等かの影響を与えたものと推測するが、詳細には今後の追試が必要である。

通常、我々はホルムアルデヒドを含む食品を経口摂取する際に、溶液で摂取するより魚介類や干し椎茸のような固形食物として摂取するので、餌群では低濃度でも腸内細菌に影響が観察された今回の結果は非常に興味深いものと考ええる。

また、肝臓でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答においてTNF- $\alpha$ 濃度は、ホルムアルデヒドの慢性曝露によってコントロール群と差が見られないか減少を示した。腸内細菌と肝臓でのエンドトキシン誘発性のサイトカイン応答の間に密接な関係があり、腸内に存在する大腸菌が少ない状況では肝臓でのサイトカイン応答が低くなることが報告されている<sup>4)</sup>。今回LPS投与により誘発されたサイトカイン応答がホルムアルデヒドの投与により抑制された事は、大腸菌等の腸内細菌の減少が惹起された為と考えられ、腸内細菌の減少が認められなかった低濃度飲水群においてTNF- $\alpha$ はむしろ軽度上昇している事とも符合する。

また、脾細胞を用いたリンパ球幼若化応答試験では、High-EC-HCHO群のみでConAによるマイトゲン応答の上昇傾向を認め、飲料水群と餌群に違いが生じた。

以上より、ホルムアルデヒド処理を行った実験動物固形飼料中でホルムアルデヒドが蛋白質と結合ないし化合して形態を変えて残留し、摂取された場合に、飲料水中に混入したホルムアルデヒドそのままを摂取させた陽性コントロールよりも強い生体影響が見られることが確認された。

こうした生体影響の原因として、蛋白質とホルムアルデヒドと結合ないし化合して生じた化合物が直接に遭遇する消化管内にて細菌叢の変化をもたらす事が大きく関与しているものと推察される。それらが肝臓におけるサイトカイン応答を変容させ、脾リンパ球幼若化応答などの免疫応答などの変容をも惹起したものと思われる。

## 5. 結論

ホルムアルデヒドが食品中の蛋白質と結合ないし化



合して形態を変えて食品中に残留し、これを摂取した生体に健康影響が現れる危険性があることがわかった。養殖魚類へのホルムアルデヒドの使用は、環境破壊の面からだけでなく、国民の健康維持のためにも早急に実効性のある使用禁止の措置がとられるべきである。

[参考文献]

- 1) 秋山晃一郎、他. 両眼性同心性視野狭窄様症状を伴った低視力小児の多数例の観察. 臨床眼科. 25, 1435-1454. 1970
- 2) 吉田政晴、他. 固層抽出法-HPLCによる自然食品のホルムアルデヒドの定量法について. 大阪府立公衆衛生研究所報. 37, 69-74. 1999
- 3) 水産庁編. 魚類等防疫指針1 寄生虫病巻. 53-37
- 4) T.Yoshida, et al. Influence of Alimentary Tract Flora on Cytokine Response in Liver induced by Endotoxin. Germfree Life and its Ramifications. 297-300. 1996
- 5) M.I.Luster, et al. Endotoxin-induced Cytokine Gene Expression and Excretion in the Liver. HEPATOLOGY. 19, 480-488. 1994
- 6) 西岡清. 化学物質過敏症の病態、症状、シックハウス症候群など(ホルムアルデヒドを中心に). アレルギー・免疫. 6(7), 984-989. 1999

## **The effect caused by formaldehyde on intestinal bacterial flora was larger in formaldehyde treated diet fed group than drinking water given group**

Takahiko YOSHIDA<sup>1</sup>, Toshihiro ITOH<sup>1</sup> and Yoshihiko NAKAGI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Health Science, Asahikawa Medical College

### **Abstract**

Treatment of the formaldehyde (HCHO) to a farmed fish in aquaculture industry causes the health problem with consuming of remained HCHO in fish meat along with the environmental pollution. Female B6C3F1 mice were exposed to given HCHO by feeding HCHO treated experimental diet or HCHO added drinking water at low/high doses for 50 days. Numbers of E.coli and anaerobic bacteria in feces were significantly reduced in the group of high concentration drinking water, low and high doses treated diet. The HCHO treated to diet pellets bound protein and changed its form, and remains in the diet, then around 1/40 amount of free HCHO was extracted from HCHO treated diet. The diet treated with HCHO may acquire more toxic affect on the flora of alimentary tract. Although another significant immunological modification was not detected, in mice fed HCHO treated diet, there are possibility to affect an immunity response.

### **Keywords :**

formaldehyde, farmed fish, bacterial flora in the intestine, immunity response