

6) ホルムアルデヒド含有食品摂取によるパイエル板を中心とした粘膜免疫系への影響

研究代表者 中木 良彦

[研究背景と目的]

ホルムアルデヒド (FA) は、自然界に広く存在し、安価であるために古くから様々な用途に使用されてきた物質である。一方でFAは劇物であり、発がん性が示唆されていることから食品添加物としての使用が禁止されている。しかしながら、FAは自然食品に含まれる以外に、国外ではビールや水産品に添加されていたことや国内においても養殖魚の寄生虫駆除目的にFAの薬浴が不正に行われていたことが報道された。従来のFAの経口毒性に関する動物実験は、飲料水にFA水溶液を用いて長期経口曝露した場合、胃粘膜の過形成、潰瘍、炎症等上部消化管の傷害を観察したが下部消化管では明らかな病変を認めなかったと報告している。一方で我々は、低濃度FA添加飼料を用いた経口曝露マウスより、下部消化管において消化管内残渣から高濃度の遊離FAを検出、および腸内細菌数の減少という下部消化管への影響を発見し、投与方法の違いにより毒性の発現が異なることを明らかとした。腸内細菌減少により免疫系など様々な全身影響を与えることが示唆されることから、食品の安全性確保のためにFA含有食品の毒性(若しくは安全性)についての研究の必要性が高まっていた。そこで、我々はFA含有食品を想定したFA添加飼料を実験動物に投与し、腸内細菌数減少による影響を明らかにすることを目的に、腸管の粘膜免疫の中心であるパイエル板リンパ球への影響を中心に解析した。同時に、FA添加飼料の経口曝露による腸内細菌の減少と免疫機構への影響が、腸内細菌の減少による間接的なものか、FA自体による直接的なものかを検討した。

[研究方法]

B6C3F1 雌性マウスをFA曝露群、ポジティブコント

ロール群、およびコントロール群各8匹に分け、曝露群には100mg/kg/dayの曝露量になるように調整したFA添加飼料を、ポジティブコントロール群、およびコントロール群には通常飼料(FA無添加)を与えた。また、ポジティブコントロール群には30mg/kg/dayの投与量になるように調整したカナマイシン溶液を飲料水として与え、FA曝露群、およびコントロール群には蒸留水を与えた。曝露期間は50日とした。曝露期間終了後、新鮮糞便中のIgA量を測定し、糞便の培養により糞便中の大腸菌数を比較した。その後、マウスを安楽死させ採血、消化管、脾臓の摘出を行い、パイエル板細胞、および脾細胞の浮遊液を調整した。脾細胞およびパイエル板のリンパ球は、蛍光抗体で染色し、フローサイトメトリーを用いてリンパ球のサブセットを解析した。パイエル板細胞にmitogenを加えて72時間培養後、培養上清中のIgA、IL-4、IFN- γ をELISA法で測定し、IgAの産生能、およびHelper T cellのtype 1/type 2バランスについてIFN- γ /IL-4比で評価した。血液サンプルからは、血清中の免疫グロブリン、IL-4、IFN- γ をELISA法で測定した。各々の結果をFA曝露群、ポジティブコントロール群、およびコントロール群間で、一元配置分散分析またはKruskal-Wallis検定を行い、有意な場合($p < 0.05$)には、さらにBonferroni検定を用いて比較した。

[研究成果と考察]

糞便中の大腸菌数は、FA曝露群、ポジティブコントロール群ともコントロール群に比較して有意に減少した($p < 0.05$ 、および $p < 0.01$)。新鮮糞便中のIgAに差を認めなかったものの血清IgAは、FA曝露群、ポジティブコントロール群とも有意に減少した(それぞれ $p < 0.01$)。また、血清IgEもFA曝露群において有意に減少し($p < 0.01$)、ポジティブコントロール群においても減少傾向を認めた($p < 0.1$)。血清中のIgG、IgMは有意差を認めなかった。血清中のサイトカイン量は、ポジティブコントロール群でIL-4が有意に減少したが($p < 0.05$)、FA群やIFN- γ においては有意差を認めなかった。脾リンパ球のsubpopulation解析では、CD4陽性リンパ球、CD8陽性リンパ球、B220陽性リンパ球、およびCD4/CD8比の何れも各群間に有意差を認めなかった。パイエル板リンパ球では、FA曝露群とポジティブコントロール群において

CD4/CD8 比の有意な高値を認めた($p < 0.05$)。B220 陽性リンパ球は各群間で差を認めなかった。パイエル板リンパ球の mitogen 刺激後の培養上清中のサイトカイン量、および IgA 量は、各群間に差を認めなかった。

免疫グロブリンの評価のため粘膜免疫において重要な IgA を、初期に影響を受けると想定されるパイエル板、パイエル板から全身に移行する血液、Homing 後に消化管内に分泌された量に近似した糞便の 3 サンプルについて定量、検討した。3 サンプルのうち血清 IgA 量が FA 曝露群とポジティブコントロール群で有意に減少した。糞便中の IgA が有意差を認めなかった点については消化管内に分泌された後、排便までの過程で様々な要因に修飾されて差が不明瞭になったことが示唆された。パイエル板で有意差を認めなかったことは、IgA 産生細胞からの増殖または分泌が主にパイエル板から移行後に起こることが主因であると考えられた。しかしながら、FA 曝露群とポジティブコントロール群で同様の変化を認めたことは、血清 IgA 減少の原因が FA の直接影響ではなく、腸内細菌の減少の結果起きたことが示唆された。血清 IgE においても同様の結果が得られ、この仮説を支持するものと考えた。

従来、腸内細菌の減少は Helper T cell が Type 2 側に傾き、I 型アレルギーを誘発すると報告されている。今回の研究では Helper T cell に関わるサイトカインバランスに曝露による影響は、ポジティブコントロール群で血清 IL-4 の減少を認めたもののその他のサイトカインでは有意差を認めなかった。血清 IL-4 の減少は、血清 IgE 減少の結果に関連するが、従来の I 型アレルギーを誘発しやすいとの報告とは相反する結果であった。IFN- γ や IL-4/IFN- γ 比では差を認めない点と FA 群ではコントロール群と差がないことから、一層の詳細データの収集が必要と思われた。

脾細胞とパイエル板細胞を用いて全身性免疫と消化管局所の免疫を比較したところリンパ球 subpopulation において、脾細胞では FA 曝露による変化を認めなかったが、局所の粘膜免疫の最前線であるパイエル板細胞では、FA 曝露群とポジティブコントロール群で免疫亢進状態を示した。この結果も FA 曝露群とポジティブコントロール群が同様の変化を示したことから、腸内細菌減少の結果起きた現象であることが示さ

れた。

以上のように、カナマイシンにより意図的に腸内細菌を減少させた場合においても、FA 経口曝露と同様の複数の結果が得られたことから、従来から得られている FA 添加飼料を用いた曝露実験の免疫影響の結果は、FA の粘膜に対する直接の傷害ではなく、腸内細菌の減少という現象を介して生じた影響であることが示唆された。

[まとめ]

我々が意図しない高濃度の FA を含有する食品の摂取を想定した動物実験において腸内細菌を介した粘膜免疫系への影響が示唆されたことから、FA 含有食品とともに同様の腸内細菌に対して影響のある食品や薬品に関する安全性評価の検討が望まれた。