

**9) 食品に含まれるホルムアルデヒドが腸内免疫機構に及ぼす影響**

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) は劇物に指定され、International Agency for Research on Cancer において Group 1 (ヒトに対する発がん性あり) に指定されている物質である。一方で、FA は食品添加物としての使用が禁止されているものの、様々な条件のもとで食品に含有している可能性があり、自然食品中にも含まれる物質である。しかしながら、FA は自然食品中に含まれる以外に、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。従来動物実験は、ラットへの低濃度 FA 水溶液を用いた長期経口曝露により、胃粘膜の過形成や炎症を観察したが下部消化管では明らかな変化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た。Mazmanian SK(2005) らは、腸内が無菌のマウスは IL-4 が増加し、IFN- $\gamma$  が減少し Helper T cell のバランスを乱すという報告をし、腸内細菌の減少する FA 曝露においても免疫機構への影響が懸念された。そこ

で、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について、小腸の Peyer 板の粘膜免疫機構を中心に解析した。さらに、抗生剤であるカナマイシンを経口投与して意図的に腸内細菌を減少させたマウスの結果と比較することにより、FA による免疫異常が FA の直接の影響か、腸内細菌減少を介した影響であるかを検討した。

#### [研究方法]

B6C3F1 雌性マウスを FA 曝露群、カナマイシン群、およびコントロール群各 8 匹に分け、FA 曝露群には 100 mg/kg/day の曝露量になるように調整した FA 添加飼料を、カナマイシン群、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、カナマイシン群には 30 mg/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。血液サンプルからは、血清中の免疫グロブリンを ELISA 法で測定した。各々の結果を FA 曝露群、カナマイシン群、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。一方で、消化管粘膜の組織標本を作成し、パイエル板の微細構造の変化を電子顕微鏡にて検討した。

#### [結果]

新鮮糞便の大腸菌の培養では、FA 曝露群、カナマイシン群ともコントロール群に比較して有意に大腸菌数の減少が認められた ( $p < 0.01$ )。血清 IgA は、FA 曝露群、カナマイシン群とも有意に減少した ( $p < 0.01$ )。パイエル板リンパ球の subpopulation 解析では、FA 曝露群とカナマイシン曝露群で CD4/CD8 比の有意な高値を示した ( $p < 0.05$ )。電顕像では FA 曝露群では、コントロール群と比して、腸絨毛の表面が滑らかな構造を呈した。さらに、パイエル板の微細構造を観察する

と FA 曝露群では、コントロール群と比して、リンパ球の密度が低くなり、アポトーシスを呈する細胞が数多く観察された。

#### [考察]

FA 添加飼料の経口摂取により、血清 IgA 濃度の減少やパイエル板リンパ球の CD4/CD8 比の増加及び電子顕微鏡像などから免疫異常を認め、消化管粘膜におけるアレルギーや経口免疫寛容への影響が示唆された。パイエル板リンパ球の subpopulation 解析において、FA 曝露群で特に CD8 陽性リンパ球数の有意な減少を認めたことから、電子顕微鏡像でのアポトーシスを呈する細胞は CD8 陽性のリンパ球である可能性が考えられた。つまり、FA の曝露により、CD8 陽性リンパ球のアポトーシスが誘導され、その結果としてリンパ球密度の低下と CD4/CD8 比の高値となったことが示唆された。この点については、実際にリンパ球のアポトーシスが起きていることを検証する必要がある。FA 曝露によって引き起こされた免疫異常は、今回測定した項目のうち有意差を認めた何れの項目においても、FA 曝露群、カナマイシン群の変化が一致したことから、FA 添加飼料の曝露で認められた血清中の IgA 減少などの免疫応答の変容は、FA の直接的な毒性の影響ではなく、腸内細菌数の減少の結果として二次的に起きたものと示唆された。我々は過去に FA 経口曝露により消化管内のエンドトキシン濃度が減少することを把握しており、今後は従来の報告を含めて腸内細菌が産生する物質と消化管の粘膜免疫機構との関係を精査する必要がある。