

# AMCoR

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

旭川医科大学研究フォーラム (2015.2) 15,1:66-67.

平成24・25年度「独創性のある生命科学研究」個別研究課題 13) 食品中に含まれるホルムアルデヒドが消化管免疫および発がんに及ぼす影響

中木 良彦

# 13) 食品中に含まれるホルムアルデヒドが消化管免疫および発がんに及ぼす影響

研究代表者 中木 良彦

## 【目的】

ホルムアルデヒド (FA) 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。また、FA は劇物であるために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 は蛋白質と結合しやすいことから様々な条件のもとで食品に残留している可能性があり、また、自然食品中にも含まれる安全性の上で無視できない物質である。また、2012年5月には利根川系の浄水場で取水した水から工場排水と塩素が反応して発生したと考えられる FA が検出され、意図しない FA の産生による生体への曝露の危険性の考慮が必要となった。

一方で、従来の FA の経口曝露による毒性に関する研究は、急性中毒に関する報告が中心であったが、我々は低濃度 FA を添加した飼料を実験動物に与えた時に消化管、特に下部消化管において消化管内残渣から高濃度の遊離 FA を検出し、さらに遊離した FA が下部消化管の大腸菌の減少をもたらす事を既に報告した。他方で、FA の発がん性に関する研究は、吸入曝露による鼻咽腔がんの危険因子として注目されている反面、経口曝露による消化管やその他の臓器の発がん性についての検証は不十分であった。

以上のことから食品中に含まれる FA の消化管への影響について、免疫異常および発がん性の2点について、FA 添加食品を用いた経口曝露実験から FA の安全性を評価すること目的に研究を実施した。

## 【方法】

B6C3F1 雌性マウスを FA 曝露群とコントロール群各 8 匹にランダムに分け、FA 曝露群には曝露量が 100 mg/kg/day になるように調整した FA 添加飼料を、コントロール群には通常飼料 (FA 無添加) を与えた。

曝露期間は50日とした。FA投与実験期間終了後、屠殺1時間前に2mg/kg lipopolysaccharide (LPS) を腹腔内投与したマウスから肝臓を摘出し、M.I.Luster等<sup>1)</sup>の肝薄切培養法に基づき摘出した肝臓を直径8mm、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、10 $\mu$ g/dl牛膵臓インシュリン、100U/mlペニシリン、100mg/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミンを添加したRPMI1640培養液2ml中にて、酸素95%二酸化炭素5%の雰囲気、37°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ELISAにて測定し、肝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腹腔内に投与し、同様の操作を行い培養上清について測定した。

一方で、FAの長期経口曝露による発がんへの影響をみるためにB6C3F1雌性マウスをFA曝露群とコントロール群に各8匹にランダムに分け、FA曝露群には同様のFA添加飼料を6か月および12ヶ月与えた。曝露期間終了後、マウスを安楽死させ脾臓の摘出を行い、摘出した脾臓から脾リンパ球を抽出し、PI染色後にフローサイトメトリーを用いて細胞周期の解析を実施した。各々の結果はFA曝露群、コントロール群間で、Mann-Witney U検定を行い、検定において $p < 0.05$ を有意な差があると判断した。また、消化管、肝臓等の器官について肉眼的、および組織標本で観察した。

## 【結果】

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。各群のLPS投与マウスから肝臓を得て作成した薄切肝の培養上清中のTNF- $\alpha$ 濃度(pg/ml)は、非LPS投与マウスに比べてそれぞれ高値を示し(Control:  $39.2 \pm 17.0$ ,  $106.5 \pm 18.0$ , FA:  $45.1 \pm 18.1$ ,  $75.7 \pm 9.0$ ) 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FA曝露群で $75.7 \pm 9.0$  pg/mlとコントロール群 $106.5 \pm 18.0$  pg/mlより有意差がないものの減少傾向を示した。

FA添加飼料による6ヶ月間の長期曝露では、Peyer

板を中心とした小腸および大腸のHE染色による組織像では、今回の曝露条件では明らかながん細胞や異型細胞を認めなかった。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、Peyer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できた。脾細胞リンパ球の細胞周期の解析では、DNA aneuploidyと考えられる2つの独立したG0/1ピークが観察された。FA添加飼料による12ヶ月間の長期曝露については研究期間内で曝露が終了しないため結果は別途報告とする。

## 【考察】

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り減少傾向を示した。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事が報告されている。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た。

電子顕微鏡像でPeyer板リンパ球のアポトーシスを示唆する変化が認められた。一般に消化管細胞のアポトーシスの制御(抑制)には酪酸の存在が関与していると考えられ、酪酸は経口摂取された食物繊維が腸内細菌により産生されることから、FA曝露による下部消化管の大腸菌などの減少による腸内細菌叢の変化、つまり酪酸を産生する細菌類が増加した可能性が考えられた。脾リンパ球の細胞周期の解析においてDNA aneuploidyが観察されたことはFAの発がん性を示唆するものであった。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。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連の精査に加えて、12か月曝露マウスの細胞周期および組織標本の結果から発がん性について再度確認が必要である。

## 【文 献】

- 1 ) M.I.Luster, et al:Endotoxin-induced Cytokine Gene Expression and Excretion in the Liver. HEPATOLOGY 19: 480-488,1994.