

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790540

研究課題名（和文） 食品に含まれるホルムアルデヒドの検出定量法と生体影響

研究課題名（英文） Determination of detection and biological effect of formaldehyde exposure in food

## 研究代表者

中木 良彦（NAKAGI YOSHIHIKO）

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90322908

研究成果の概要（和文）：食品に含まれるホルムアルデヒド（FA）を想定した FA 添加飼料をマウスへの経口投与により、消化管内の大腸菌数の減少および消化管粘膜を中心とした免疫系への影響が認められた。FA 含有食品は従来の抽出方法では検出が過小評価される可能性があることを考慮すると、低濃度であっても長期曝露では腸内細菌や腸管関連リンパ組織の変容に影響することが示唆されたことから、食品中の FA に対する一層の安全性評価の必要性が示された。

研究成果の概要（英文）：Oral administration of formaldehyde via chow that were intended to be contained in the food caused reduction of number of E. coli in the gastrointestinal tract of mice and the disturbance the immune system of the gastrointestinal mucosa. Since formaldehyde-containing foods in the conventional extraction method of detection is likely to be underestimated and long term exposure to low level of formaldehyde to adversely affect the gastrointestinal tract immunity, the need for further safety assessment for the formaldehyde in foods has been shown.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：食品衛生

## 1. 研究開始当初の背景

近年、違法な食品添加物や食品の偽装表示などの問題が報道機関に取り上げられ、国民の食に対する安全性への関心が高くなり、安全性を示す正確な情報が重要となった。2006年にはポジティブリスト制度が施行され、食品中の残留農薬や家畜動物に使用する医薬

品に対する規制が厳しくなった。こうした状況の中で食品添加物としての使用が禁止されている劇物のホルムアルデヒド（FA）は、様々な条件のもとで食品に含有され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。実際に実験動物への低濃度 FA 水溶液を用いた長期経口曝露により上部消化管の粘膜異常

(過形成・潰瘍)が発生することが報告されている (Til HP: Food and Chemical Toxicology, 1989)。一方で、わが国では過去に養殖魚の寄生虫駆除目的で FA を養殖魚の生け簀に混入して使用する薬浴をマニュアルで推奨していた。そのため、FA 薬浴の全面禁止後 (環境の問題による) も養殖フグへの不正使用が続けられ、2003 年に長崎県下のトラフグ養殖業者の過半数が、養殖過程で FA を使用していたとの調査結果が報道され問題となった (2003 年 4 月 22 日長崎県知事発表)。魚介類を大量に消費する日本では近隣諸国から多くの養殖魚を輸入し、輸出国の養殖技術の多くは日本の過去の養殖マニュアル (薬浴を推奨したもの) を参考にしている。つまり海外では未だに FA の薬浴が行われ、その養殖魚を輸入している可能性がある。他方、北米の一部地域などでは家畜の飼料そのものに FA を添加し、与えている (Petit HV, J Dairy Science, 2003)。このことから FA が添加された飼料を摂取した家畜の体内に多量の FA が残留することが考えられる。さらに 2008 年 10 月、南京日報が中国の太湖産シラウオから高濃度の FA が検出され、「保存がきかない水産品に FA を使うのが業界の暗黙のルールになっていた」と報道した。

以上のように FA 添加の疑いがある輸入食品の存在が無視できない中、従来の抽出法を用いた食品中 FA 分析法の限界が疑われた。過去のトラフグ養殖マニュアルによれば生け簀一つあたり年間に約 1 トンもの FA を使用する指導内容が記載されていた。そのため養殖魚には自然界に存在するよりも高濃度の FA が残留している疑いがあったが当時の検査では FA はほとんど検出されなかった。

FA は蛋白と強く結合する性質を持つために、従来の FA 抽出定量法 (平成 9 年 2 月 5 日付衛乳第 44 号厚生省生活衛生局乳肉衛生課長通知: 魚介類中のホルムアルデヒド分析法) では、魚介類の蛋白と強く結合した FA は遊離せず十分な抽出が出来ていない為、FA が検出されなかったのではないかという仮説に至った。我々の過去のデータでは実験動物に FA 添加飼料 (FA は従来の抽出法で殆んど検出されない状態にある濃度に設定) を与えた際、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 を検出したことから、消化管内で FA が遊離する現象を確認している。つまり、消化管内を通過している間に飼料中の蛋白に結合していた FA が遊離したことから、下部消化管内の環境に存在する何らかの因子が FA の遊離に作用する可能性が考えられた。さらに、遊離した FA が消化管細菌叢の構成菌の減少をもたらす事も確認した。

このような状況の中で下部消化管内の環境を再現する FA の遊離抽出を試み新たな食

品中 FA 定量法の確立、および、ヒトが摂取すると想定される濃度の FA 経口曝露実験による影響評価の必要性があった。

## 2. 研究の目的

食品中に含まれる FA (FA) の検出、定量は、食品の安全性評価のために正確性が求められる。しかしながら、従来の定量法では十分に検出できず、過小評価になるなど安全性評価が不十分である可能性があった。無添加の自然食品にも含まれる FA 濃度や、危険な FA 添加食品の含有量を正確に抽出定量することは安全性評価のためにも必須のことである。一方で、FA を含む食品を摂取した際に生じる毒性を評価し、我々が日常摂取する食品の安全性を確認することも急務である。本研究の目的は、食品中に含まれる FA を正確に定量する方法を確立し、さらに FA 添加食品の経口曝露実験から FA の安全性 (危険性) を検討することである。

## 3. 研究の方法

### (1) FA 添加飼料からの抽出定量実験

マウス用粉末飼料に人工的に複数の含有量となるように FA を添加して作成した飼料 (FA として 0.1~1.0mg/g 相当) を用いて、従来法による単純抽出で得られた試料および抽出条件を変えて得られた試料各々を AHMT 法にて FA 濃度を測定した。

### (2) FA 添加飼料を経口投与したマウスの生体影響評価

B6C3F1 雌性マウスを用いて、食品中の FA 濃度を参考に 100 mg/kg/day の曝露量になるように調整した FA 添加飼料を 50 日間与え、通常の飼料を与えたコントロール群と比較した。投与期間終了後、糞便中の大腸菌数を計測し、腸管関連リンパ組織について組織学的解析および免疫学的解析を実施した。一方で、FA 曝露による影響が FA の直接の毒性によるものか、或いは腸内細菌の減少を介したものであるかを確認する目的で、30 mg/kg/day の摂取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たポジティブコントロール群を設定し、曝露期間後に粘膜免疫の中心となる IgA 抗体について、新鮮糞便、血清中の IgA 量を ELISA 法にて測定した。また、脾細胞、パイエル板および小腸上皮間リンパ球のサブセットを解析した。

統計解析には、2 群間の比較では Mann-Whitney 検定を、多群間では Kruskal-Wallis 検定を実施した。Kruskal-Wallis 検定で有意差が認められた

場合には、各群間について Bonferroni 法で補正した Mann-Whitney 検定を行った。検定において  $p < 0.05$  を有意な差があると判断した。

#### 4. 研究成果

##### (1) FA 添加飼料からの抽出定量実験

FA 添加飼料の抽出液から得られた FA の測定値は、理論値に対して  $51.2 \pm 3.1\%$  (平均値  $\pm$  標準偏差,  $n=20$ , 最小値 44.6%, 最大値 55.1%) であり、実際の含有量を十分反映した値ではなかった。水溶液では 95% 以上検出されていることから材料による差が生じることが明らかとなった。さらに抽出条件 (温度、時間、pH、消化酵素の添加など) を変えて抽出量の差を比較したが、今回の条件下では単純抽出 (水蒸気蒸留) との差は得られなかった。

##### (2) FA 添加飼料を経口投与したマウスの生体影響評価

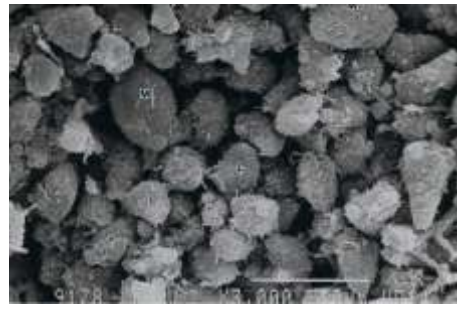
FA 曝露群では糞便中の大腸菌が有意に減少した ( $p < 0.05$ )。消化管のパイエル板リンパ球の subpopulation 解析では、CD4/CD8 比が曝露群で有意に増加した ( $p < 0.05$ )。消化管免疫の中心的な役割を担う IgA は、コントロール群に比較して曝露群の血清中で有意に低下 ( $p < 0.01$ ) し、糞便中においても低下傾向 ( $p < 0.1$ ) を示した。電子顕微鏡像において曝露群ではコントロール群に比較して腸絨毛の表面が滑らかな構造を呈した (写真 1a, 1b)。さらにパイエル板の微細構造を観察すると曝露群ではリンパ球の密度が低くなり、アポトーシスを呈する細胞が数多く観察された (写真 1c, d)。



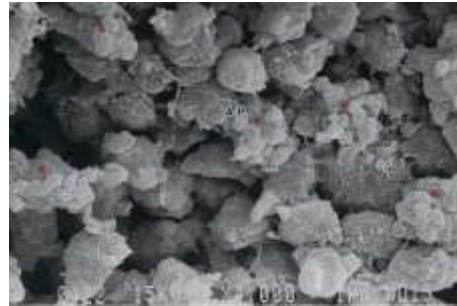
a



b



c



d

写真 1 パイエル板・腸絨毛の電子顕微鏡像  
a, c : コントロール群, b, d : FA 曝露群  
P : パイエル板 IV : 腸絨毛  
M : マクロファージ L : リンパ球  
AP : アポトーシス細胞

##### (3) ポジティブコントロール群を用いた毒性発現機序の解析

糞便の培養では、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大腸菌数の減少が認められた ( $p < 0.05$ , および  $p < 0.01$ ) (図 1)。

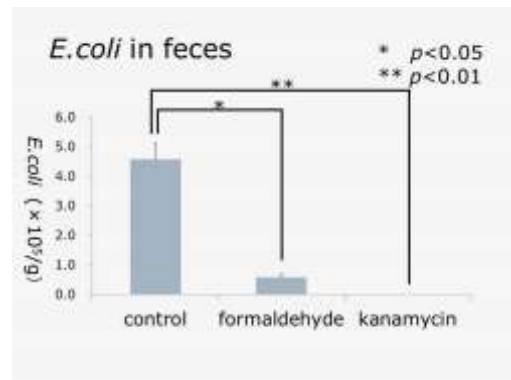


図 1 新鮮糞便中の大腸菌数

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 (図 2)。

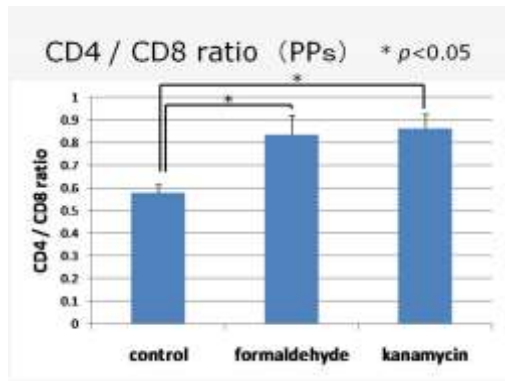


図2 パイエル板リンパ球の subpopulation 解析による免疫応答の変容 (CD4/CD8 比)

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 ( $p < 0.01$ ) (図3)。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- $\gamma$  においては有意差を認めなかった。

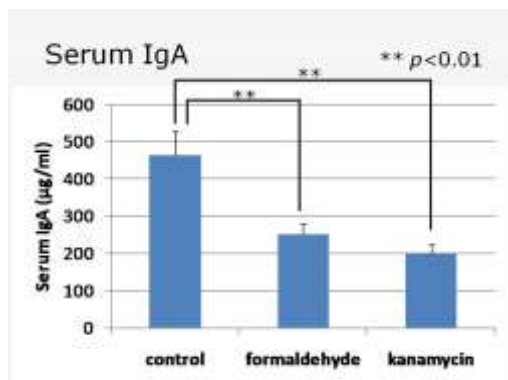


図3 FA およびカナマイシン投与による血清中の IgA の減少

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- $\gamma$  や IL-4/IFN- $\gamma$  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変容状態を示した。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。

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る。

研究開始当初は FA により汚染された輸入食品などを想定していたが、国内においても 2012 年 5 月 19 日に浄水場で取水した水から FA が検出され、水道が止まるという大きな問題が発生した。様々な分野で使用されている FA は、今後も国内外を問わずに食品や河川を汚染する可能性がある。日本国内では高濃度曝露による中毒より、低濃度の FA が含まれる飲料や食品による曝露の問題が起こる可能性が高いことから、低濃度曝露における生体評価を行った本研究は意義のあるものとする。

(3) 今後の展望

我が国の FA に関する水質基準や食品の安全性基準は、未だに 1989 年の Ti1 らの飲料水を介した動物への FA 曝露実験データが基になっている。摂食の形態の違いによる下部消化管での遊離 FA 濃度の差、および腸内細菌数の差から、食品添加の経口曝露の場合には従来の投与方法による実験とは異なる結果が得られる事が予想される。具体的には、問題ないと考えられていた低濃度の FA を含んだ食品で、消化管粘膜免疫の異常や発がんが起る可能性がある。低濃度長期曝露による消化管での免疫異常に加えて、発がん性の評価が次の課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

中木良彦、食品中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、旭川医科大学フォーラム、査読無、11 巻、2011、58-59

[学会発表] (計 1 件)

中木良彦、食品中に含まれるホルムアルデヒドの腸内免疫系への影響、第 19 回日本臨床環境医学会、2010 年 7 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

中木 良彦 (NAKAGI YOSHIHIKO)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：90322908

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：