

ラクトフェリンの投与は放射線照射に伴う マウス腸内細菌叢の異常変動を軽減する

角田 出^{*1}・高野 佳奈^{*1}・亀山 貴一^{*1}・高瀬 清美^{*1}・

柿沼 隼人^{*1}・西村 義一^{*2}・武田 志乃^{*2}

Lactoferrin Reduces Deleterious Effects of X-ray Irradiation on Mouse Intestinal Environment

Izuru KAKUTA^{*1}, Kana TAKANO^{*1}, Takakazu KAMEYAMA^{*1}, Hayato KAKINUMA^{*1},
Kiyomi TAKASE^{*1}, Yoshikazu NISHIMURA^{*2} and Sino TAKEDA^{*2}

^{*1}*Department of Bioengineering, Faculty of Science and Engineering, Ishinomaki Senshu University,
Miyagi 986-8580*

^{*2}*National Institute of Radiological Sciences, Chiba 263-8555*

Abstract

In this study, we investigated the effect of bovine lactoferrin (LF) on the survival rate and the intestinal microflora of sub-lethal X-ray irradiated mice. In control mice fed a commercial diet, the survival rate of 50% lethal X-ray (6.8 Gy) irradiated mice was 60% on day 30. On day 10, elevated levels of *Corynebacterium* sp. and Enterobacteriaceae and decreased value of *Bacillus* sp. were found in the control intestine. In LF-administered mice orally (LF: 200 mg/kg BW/day), on the other hand, the survival rate was 80% on day 30. The level of *Lactobacillus* sp. in the intestinal microflora of LF-treated mice was higher than that of the control. Although increased level of *Corynebacterium* sp. was observed, the ratios of the other bacteria including Enterobacteriaceae were unchanged in the irradiated mice from LF-treated group on day 10. Little significant changes in the total bacterial counts in the intestine of irradiated mice were observed in both control and LF-treated groups. The survival rate of 25% lethal X-ray (5.0 Gy) irradiated mice in control group was 80% on day 30. Thirty days after the irradiation, the mortality of LF-treated mouse was 0%. The increase in the number of intestinal bacteria was found in control group on days 10 and 30. In LF-treated mice, the counts increased significantly on day 30. Large fluctuations in the composition of the intestinal microflora have been observed in control group after the irradiation. Elevated level of Enterobacteriaceae in the intestine from control mice, for example, was found 10 days after the irradiation. In LF-treated mice, on the other hand, the proliferation of intestinal *Bacillus* sp., *Corynebacterium* sp. and Enterobacteriaceae was suppressed after the X-ray irradiation. These findings suggest that LF reduces deleterious effects of X-ray irradiation on mouse intestinal environment.

Key words : lactoferrin (LF), mouse, x-ray irradiation, intestinal microflora

1. 緒論

放射線は、健康診断や腫瘍治療等を目的とした医学領域のみならず、工業、エネルギー産業等の多方面に利用され、今や科学全体の進歩に必須となっている。しかし、放射線利用が普及するにつれて人と放射線の接する機会も増え、放射線障害

が問題となる場面も急増していることから、同障害を軽減する方法が強く求められるようになってきた。

放射線障害の軽減には、被曝線量を減らすことが最優先事項であるが、障害の発現を抑制する努力も必須である。原発事故、オゾン層破壊に伴う

^{*1}石巻専修大学 理工学部 生物生産工学科（〒986-8580 石巻市南境新水戸1）

^{*2}独立行政法人 放射線医学総合研究所（〒263-8555 千葉県稲毛区穴川4-9-1）

紫外線等照射量の増加、宇宙での長期滞在に伴う宇宙放射線被爆への対処等、化学的・生物学的な放射線防護の必要性はますます高くなっている。放射線の影響は、放射線の種類、強さや方向、受け手側の年齢、時期、性別、部位等によって大きく異なるが、皮膚、毛根、腸上皮、骨髓等の盛んに分裂を繰り返す細胞に強く表れる⁽¹⁾。特に腸は、全身にあるリンパ球の50～60%が集中しているヒト最大の免疫器官である⁽²⁾ため、放射線照射により腸管上皮細胞や上記免疫担当細胞が障害されると、腸内に存在していた細菌が体内に侵入して、敗血症を引き起こし、個体の死につながる事が多い。

これまでも放射線防御剤の探索は行われてきたが、実用化されている薬剤は極めて少なく、有効で入手しやすい放射線防護物質に至っては無いに等しかった。ラクトフェリン (LF) は、鉄の吸収調整、体内の非特異的生体防御機構の賦活化、抗酸化、抗腫瘍、腸管内での *Enterobacteriaceae* の過剰増殖抑制による腸内細菌の体内への侵入抑制、化学療法剤の副作用軽減、ストレス軽減等の様々な効果を有することが報告⁽³⁻⁹⁾されている食品成分であり、入手も容易である。しかし、放射線防護分野の研究は見当たらない。

本研究ではマウスに放射線を照射し、その影響および LF の放射線防護効果を調べる一環として、LF の投与がマウス腸内細菌叢の異常変動を軽減し得るかを検討した。

2. 材料および方法

2. 1 実験動物

6 週齢のオス C3H/He マウス (*Mus musculus*) を使用した。マウスを 2 群に分け、一方には完全精製飼料 (AIN/93) を与えて対照群、もう一方には同飼料に 0.1 % になるように LF を添加した餌を与えて LF 群 (LF の日間投与量: 200 mg/kg 体重) とし、それぞれ、4 週間飼育した。飼育に用いたケージ (縦 350 mm × 横 400 mm × 高さ 160 mm: 5 匹ずつ収容) には、毎日、清浄な水道水を給水容器 (全容量 300 ml) で自由摂取させた。

マウスの飼育および放射線の照射は独立行政法

人放射線医学総合研究所で行った。なお、照射後も、それぞれの群には、照射前と同じ飼料を与えた。

2. 2 実験 1 (照射後 30 日以内に 50 % が致死に至る量の放射線照射試験)

対照群と LF 群のマウスに、30 日間での LD₅₀ (LD_{50/30}) に相当する X 線 (6.8 Gy)^(10,11) を 1 回、全身照射し、30 日間にわたり生残率の変化を調べるとともに、照射から 10 日後にマウス 5 匹を取り上げ、腸内細菌の数および組成の変化を調べた。

2. 3 実験 2 (照射後 30 日以内に 25 % が致死に至る量の放射線照射試験)

対照群と LF 群のマウスに、30 日間での LD₂₅ (LD_{25/30}) に相当する X 線 (5.0 Gy)^(10,11) を 1 回、全身照射し、30 日間にわたり生残率の変化を調べるとともに、照射から 5 日後、10 日後、30 日後に、それぞれ、マウス 5 匹を取り上げ、腸内細菌の数および組成の変化を調べた。

2. 4 腸内容物の採取および腸内細菌の培養

マウスをエーテル麻酔により不動化後、大腸 (結腸、直腸) を取り出した。大腸部分の内容物 (糞) をピンセットで搾り出し、9 倍量の滅菌生理食塩水 (0.9 % NaCl) を加えドリル型ホモナイザーでホモナイズした。開腹から培養までの操作は、30 分以内に行った。また、内容物の搾り出しからホモナイズまでの操作は、CO₂ を充満させた箱中で行った。

上記懸濁液を試料原液とし、常法に従って 10 段階希釈液を作り、ヘム鉄を加えたトリプトソイ寒天培地および BL 寒天培地表面に塗抹し、それぞれ好気、嫌気状態で培養 (37 °C) し、培養開始から 24 時間後に発生コロニー (集落) 数を計測した。生菌数は、腸内容物 1 g あたりの数で示した。

2. 5 腸内細菌の同定

ヘム鉄入りのトリプトソイ寒天培地および BL 寒天培地から、TSI 寒天培地、LIM 寒天培地へと釣菌し、コロニーの形態、グラム染色、各性状

試験などを行い、Bergey's Manual⁽¹²⁾に従い同定を行った。嫌気性細菌の場合、TSI 寒天培地、LIM 寒天培地での培養試験は、試験管を嫌気条件下におき、37℃で、24時間行った。

偏性嫌気性細菌の確認は、嫌気培養を行った BL 寒天培地から新たな BL 寒天培地へと 20 個のコロニーを白金耳で釣菌し、好気条件下におき、37℃で、24時間培養することにより行った。

2. 6 統計

J M P (米国 SAS インスティテュート社、バージョン 5) を使用し、統計処理を行った。交互作用があったものは、最小 2 乗平均差の Tukey の検定にかけて比較を行った。危険率 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果

マウス腸内からは、*Bacillus* sp.、*Bacteroides* sp.、*Corynebacterium* sp.、*Lactobacillus* sp.、*Staphylococcus* sp.、*Streptococcus* sp.、Enterobacteriaceae など 1 科 6 属の細菌が検出された。

3. 1 実験 1 (50%致死量放射線照射試験)

Fig. 1 に 6.8 Gy の全身照射に伴うマウス生存率の変化を示す。対照群および LF 群の生存率は、10 日後ではともに 100 %、30 日後ではそれぞれ 60 % と 80 % であった (実験開始時の匹数は各群 25 とした)。

Fig. 2 に対照群と LF 群の照射前および照射後の腸内細菌数を示す。腸内細菌数は平均で 5×10^5 CFU/g 腸内容物湿重量程度であり、対照群と LF 群の間、照射の前後で、腸内細菌数に有意な差は認められなかった。

Fig. 3 に対照群と LF 群の照射前および照射後の腸内細菌組成を示す。LF の投与によって *Lactobacillus* sp. の検出率が有意に上昇した。照射前と照射後の比較では、対照群では、*Corynebacterium* sp. および Enterobacteriaceae の検出率が上昇し、*Bacillus* sp. の検出率は低下した。一方、LF 群では、*Corynebacterium* sp. の検出率は上昇したが、*Bacillus* sp. や Enterobacteriaceae を含め他の細菌の検出率に

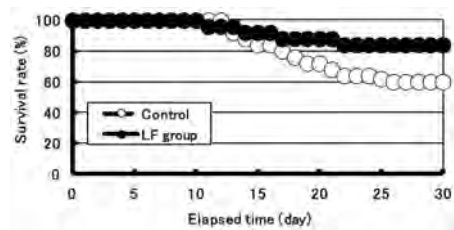


Fig. 1 Radioprotective effect of lactoferrin pre-administered orally in 50% lethal X-ray (6.8 Gy) irradiated mice. In LF group, LF of 200 mg/kg/ body weight/day was pre-administered orally for 4 weeks before whole body irradiation. Each group has 25 mice at the experimental start (0 h).

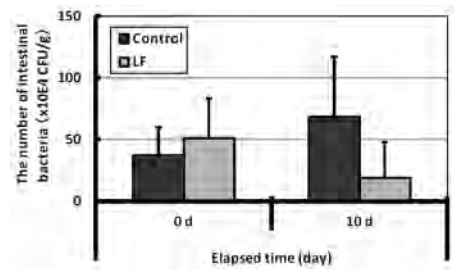


Fig. 2 Changes in the number of intestinal bacteria of 50% lethal X-ray (6.8 Gy) irradiated mice. In LF group, LF of 200 mg/kg/ body weight/day was pre-administered orally for 4 weeks before whole body irradiation. Data are given as mean $\pm$ SD, $n=5$.

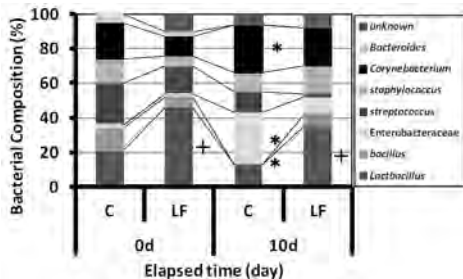


Fig. 3 Changes in the intestinal bacterial composition of 50% lethal X-ray (6.8 Gy) irradiated mice. C ; Control group, LF ; LF-treated group In LF group, LF of 200 mg/kg/ body weight/day was pre-administered orally for 4 weeks before whole body irradiation. Data are given as mean values ($n=5$).
+ : Significant difference to the control ($p < 0.05$)
* : Significant difference to the initial (0 d) group ($p < 0.05$)

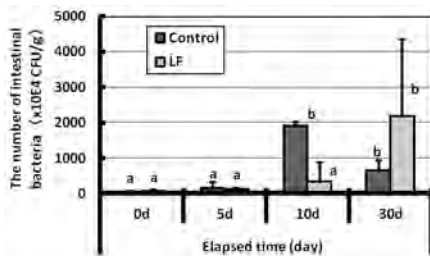


Fig.4 Changes in the number of intestinal bacteria of 25% lethal X-ray (5.0 Gy) irradiated mice. In LF group, LF of 200 mg/kg/ body weight/day was pre-administered orally for 4 weeks before whole body irradiation. Data are given as mean±SD, n=5. a,b : The different superscript indicates a significant difference ($p<0.05$).

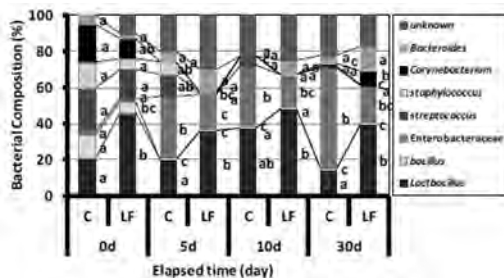


Fig.5 Changes in the intestinal bacterial composition of 25% lethal X-ray (5.0 Gy) irradiated mice. In LF group, LF of 200 mg/kg/ body weight/day was pre-administered orally for 4 weeks before whole body irradiation. Data are given as mean values (n=5). a-c : The different superscript indicates a significant difference ($p<0.05$).

有意な変化は認められなかった。すなわち、LF投与は照射後も腸内細菌に占める *Lactobacillus* sp. の割合を高く維持するとともに、対照群で照射後にみられた *Enterobacteriaceae* の割合の上昇や *Bacillus* sp. の低下を抑制した。

3. 2 実験2 (25 %致死量放射線照射試験)

5.0 Gy の全身照射に伴う対照群および LF 群のマウスの生残率は、照射から 10 日後ではともに 100 %、30 日後ではそれぞれ 80 %と 100 %であった (実験開始時の匹数は各群 25 とした)。

Fig. 4 に対照群と LF 群の照射前および照射後の腸内細菌数の変化を示す。対照群および LF 群の照射前の腸内細菌数は平均で 5×10^5 CFU/g 腸

内容物湿重量程度であった。対照群では、照射から 10 日後から菌数が有意に増加した。なお、10 日後と 30 日後の間には有意な差は認められなかった。LF 群では、照射から 10 日後に対照群に比べて有意に低い菌数を示したが、30 日後では菌数は有意に増加し、対照群との間に差はなくなった。

Fig. 5 に対照群と LF 群の照射前および照射後の腸内細菌組成の変化を示す。照射前と照射後の比較では、対照群では、照射の 5 日後から *Bacillus* sp. の検出率低下と *Enterobacteriaceae* の検出率上昇が認められた。*Enterobacteriaceae* の検出率は 30 日後にはさらに高くなった。LF 群では、*Lactobacillus* sp. の検出率が高く維持されており、*Bacillus* sp. の検出率低下、および *Corynebacterium* sp. と *Enterobacteriaceae* の検出率上昇が認められたが、*Enterobacteriaceae* の検出率は対照群に比べて常に有意に低かった。*Staphylococcus* sp. は、対照群、LF 群ともに、照射前および照射から 5 日後では検出されたが、その後には検出されなかった。対照群、LF 群ともに、その他の細菌の検出率には有意な変化は認められなかった。

4. 考察

放射線照射は、盛んに細胞分裂する細胞により強い影響を与えるが、4 Gy 以上の線量受けると腸管死が起こる⁽¹³⁾。すなわち、腺窩の肝細胞が分裂不能により腸細胞の増殖ができなくなり、粘膜上皮細胞の破壊・消失がみられるようになる。その結果、体液の流失、電解質バランスの喪失、タンパク質の漏出、栄養分の吸収不良に加え、腸内細菌による感染惹起により、死亡個体が出始める。なお、この線量下では、骨髓や脾臓、リンパ節等の造血組織にも影響が及び、再生不良性貧血や悪性腫瘍、白血病を引き起こし死に至るものもある (造血臓器死)⁽¹⁴⁾。

マウスの LD_{50/30} に相当する 6.8 Gy の X 線を全身照射した場合、その主な影響は腸管死や造血臓器死である。今回の実験では、照射から 10 日後の個体についてのみの調査であるため、その後には生死が分かれる個体の腸管細菌の数や組成に関するデータが一括りにされた状態で提示されている。

る。そのため、数値上に大きなばらつきが含まれる結果となり、また、消化管の各種機能や管腔内部環境の変化、腸内細菌叢の変動を如実に捉えるには至っていない。しかしながら、LF の投与は、照射によって引き起こされる Enterobacteriaceae の腸内細菌に占める割合上昇や *Bacillus* sp. の同低下を抑制した。また、LF 群では、*Lactobacillus* sp. の検出率が高く維持されていたことから、経口的に投与された LF は、腸内細菌の数や組成の安定化を含めた腸内環境の維持、有害細菌の消化管からの漏出や体内侵入の抑制等に有効であったものと考えられる。この推測は、LF 群の生残率が高く維持されていたことに加え、LF の経口投与が、(1) 腸管内における Enterobacteriaceae 等の有害細菌の過剰増殖を抑制して腸内環境を安定化させる^(4,9)、(2) 体内の非特異的生体防御機構を賦活化する^(3,5,8,9)、(3) 化学療法剤の投与により低下したマウスやキンギョの小腸上皮細胞における障害を軽減したり、消化管から体内への細菌の侵入を阻止したりする^(7,9)等の効果を有することが報告されていることによって支持されよう。

マウスの LD_{25/30} に相当する 5.0 Gy の X 線を照射した場合、腸内細菌の数や組成に大きな変化が認められたのは照射から 10 日後を経過してからであった。これは、放射線による腸管への影響は、照射から 7~8 日後を過ぎてから認められるようになるという報告⁽¹³⁾と矛盾しない。腸内細菌数の変化では、対照群で照射から 10 日後から 30 日後にかけて高い値を示したのに対し、LF 群では 30 日後にのみに同様の変化が認められた。両群間にみられた腸内細菌数増加に至る時間差や細菌組成の違いは、照射によって粘膜上皮細胞の破壊や消失に伴う消化管の生体防御機能低下が惹起されている時期に、LF 群では、LF の静菌や殺菌作用に加え、*Lactobacillus* sp. 等の有用細菌を増やすことで Enterobacteriaceae 等の有害細菌の過剰増殖が抑制され、腸内環境の安定化が保たれていたことを暗示する。すなわち、LF 群の生残率の高さには、消化管における防御障壁の脆弱期に腸内細菌の体内侵入や同細菌による有害物の生産等が抑制されたことが大きく関係していると考えられる。

放射線抵抗性は、一般に、(1) 活性酸素の発生抑制・捕捉・除去、(2) 生体防御機構の活性化、(3) 損傷した部位の修復機構の活性化等によって生ずる⁽¹³⁻¹⁵⁾。本報告は、照射後の生残率変化および腸内細菌の数と組成の変化に限ってのものであるが、LF には静菌・抗菌作用に加え、体内の非特異的生体防御機構の賦活化^(3,5,8,9)、腸内環境安定化^(4,9)、化学療法剤投与に伴って生じる小腸の酸化障害⁽¹⁶⁾や消化管壁筋層の脆弱化を防ぐ⁽⁹⁾等の作用がある。さらに、炎症の改善に有効である⁽¹⁷⁾との報告もある。すなわち、LF は放射線抵抗性に必要な上記全ての障害軽減効果を有する、あるいは、有する可能性があり、それらが共同して作用することで生残率の向上につながったものと考えられる。

LF の作用機序には不明な点が多く、今後、詳細な検討が必要であるが、上記結果は、LF の投与が医学や工学を含む多量な領域における放射線照射（通常および事故）に伴う生理障害軽減に有効であることに加え、照射線量を増やすことで放射線による腫瘍治療のさらなる成績向上につながる可能性を示すものとして注目される。

文献

- (1) 増田康治 (2002) 放射線生物学. 細胞に対する放射線の作用. 南山堂. 東京: 40-53
- (2) 光岡知足 (1996) 腸内細菌の宿主との関係. 株式会社学会出版センター. 東京: 14-32
- (3) 大谷 元、鶴田文三郎 (1987) 乳清中の感染防御関連たんぱく質の科学. 乳技協資料, 37: 10-23
- (4) 尾形朋宏、寺口 進、早澤宏紀 (1997) ウシラクトフェリンのマウス腸内細菌叢調節作用. Milk Science, 46: 233-238
- (5) 角田 出 (1998) ラクトフェリンによるストレス軽減および生体防御活性増強. バイオインダストリー, 15: 23-33
- (6) Kakuta I (1998) Reduction of Stress Response in Carp, *Cyprinus carpio* L., Held under Deteriorating Environmental Conditions by Oral Administration of Bovine Lactoferrin. J Fish Dis, 21: 161-167
- (7) van't Land V, van Beek NMA, van den Berg JJM, M'Rabet L (2004) Lactoferrin reduces methotrexate-induced small intestinal damage, possi-

ラクトフェリンの投与は放射線照射に伴うマウス腸内細菌叢の異常変動を軽減する

- bly through inhibition of GLP-2-mediated epithelial cell proliferation. *Dig Dis Sci*, **49** : 425-433
- (8) 角田 出 (1997) ラクトフェリンの投与がニジマスの非特異的生体防御活性に及ぼす影響. 石巻専修大学研究紀要, **8** : 53-57
- (9) Takase K, Kakuta I (2007) ラクトフェリンによる化学療法剤処理魚のストレス軽減. *Yakugaku zasshi*, **127** : 1449-1460
- (10) Frölen H, Luning KG, Rönnbäck C (1961) The Effect of X-Irradiation on Various Mouse Strains Due to Their Genetic Background I. Lethality after Acute Irradiation, *Radiation Res*, **14**: 381-393
- (11) DiCarlo AL, Maher C, Hick JL, Hanfling D, Dainiak N, Chao N, Bader JL, Coleman CN, Weinstock DM (2011) Radiation Injury After a Nuclear Detonation: Medical Consequences and the Need for Scarce Resources Allocation, *Disaster Med Public Health Preparedness*, **5**: S 32-S 44
- (12) 山本正和 (1986) 微生物の分離法. R & D プランニング. 東京 : 259-291
- (13) 増田康治 (2002) 放射線生物学. ヒトおよび動物個体に対する放射線の影響. 南山堂. 東京 : 82-86
- (14) 増田康治 (2002) 放射線生物学. 組織. 南山堂. 東京 : 70-75
- (15) 湯川修身 (1992) 放射線抵抗性の誘導 (色田幹雄、山田 武編). 放射線医学総合研究所. 千葉 : 5-13
- (16) Miyazono Y, Gao F, Horie T (2004) Oxidative Stress Contributes to Methotrexate-induced Small Intestinal Toxicity in Rat, *Scand J Gastroenterol*, **39**: 1119-1127
- (17) Sato R, Inanami O, Tanaka Y, Takase M, Naito Y (1996) Oral administration of bovine lactoferrin for treatment of intractable stomatitis in feline immunodeficiency virus (FIV)-positive and FIV-negative cats. *Am J Vet Res*, **57** : 1443-1446