



乳酸菌の放射線防護効果および免疫能活性

門前 一, 具 然和*, 長谷川武夫*, 結城留実夫

大津赤十字病院放射線部

520-8511 滋賀県大津市長等 1-1-35

* 鈴鹿医療科学大学大学院保健衛生学研究科

510-0226 三重県鈴鹿市岸岡町 1001

2002年11月 8 日 受理

Key Words : enterococcus faecalis, C3H mouse, immunological activation, radiation protection effect, radiotherapy

1. 緒 言

放射線防護に関する研究分野における注目課題は、放射線治療患者や放射線業務従事者等に対して、放射線の人体への影響を最小限に抑え、嘔吐等の副作用のない薬剤の開発である。しかし、副作用をはじめ多くの問題を抱えその薬剤の確立には至っていない。最近の研究ではプロポリス^{1),2)}、マクログルカン³⁾⁻⁵⁾、ビタミン等⁶⁾⁻⁸⁾の無毒性で副作用がない食品を投与、摂取による放射線防護研究が数多く発表され注目されている。一方、冠拡張剤、抗血小板剤として用いられる臨床で頻繁に使われる薬剤による放射線防護効果の研究も盛んであるが、未だ放射線防護剤としての確立には至っていない⁹⁾⁻¹³⁾。

乳酸菌を用いての放射線防護に関する実験は未だないが、その製剤投与での Tumor Necrosis Factor の活性や免疫能増進による感染予防効果は報告されている¹⁴⁾⁻¹⁶⁾。

本研究では、乳酸菌の一種である腸球菌 *Enterococcus Faecalis* (以下 Ef) の製剤である EF2001 を用いて、投与後のマウスによる放射線照射に対する放射線防護効果および投与時の natural killer cells (以下 NK 細胞) の活性度測

定による免疫能活性を検討した。

2. 実験方法および材料

2.1 投与物質

実験に用いた EF2001 は、日本 BRM (株) 研究センターで製造された乳酸菌製剤で、わずかに褐色をおびた淡白色粉末である。

2.2 使用動物および飼育条件

日本エスエルシー (株) から C3H/Hej マウス (雄) を 7 週齢で購入し、1 週間の予備飼育期間中体重増加が順調で健康な動物を選択し、体重が約 25-27 g のものを実験に供した。動物は、温度 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60.0 \pm 5\%$ 、照明 12 時間 AM 6:00-PM 6:00 の環境条件とし、動物舎にて飼育。飼料は日本クレア (株) の固形飼料 CE-2 を、水はフィルタ濾過された水道水を自由摂取させた。

2.3 照射方法

フィリップス社製放射線照射装置 (200 kV, 9 mA, 0.2 mmCu, 1.12 Gy/min) を用い、LD 50(10), 8 Gy をマウスに全身照射した。マウスの全身に均等照射できるように、アクリル製の容器に各群 10 匹を閉入、容器を一定速度で回転

しながら照射した。

2.4 放射線防護効果実験

放射線防護効果の判定は、生存率、体重変化、大腸、小腸の粘膜変化で行った。EF2001はPBS 0.3 mLに溶解し12 mg/kg, 24 mg/kgに調製し、2週間隔日に計8回腹腔投与した。生存率の測定では、各群10匹とし、投与量12 mg/kg, 24 mg/kg, 未投与の各グループ群にX線を照射した後、飼料、水は自由摂取させて放射線照射後からの各群の生存日数を観察した。体重変化の測定についても各群10匹とし、投与量12 mg/kg, 24 mg/kg, 未投与の各グループにX線を照射した後、各群の体重減少の割合を照射した日の各群の平均体重を1としてその減少割合を計測した。また、各実験群の死亡直後のマウスから大腸（肛門部から約1 cm付近の腸管組織）と小腸（胃-小腸接合部から2 cm付近）の組織を摘出、粘膜の病理組織標本をHE染色で作製し、観察した。統計上の有意差はStudentのt検定を用いて検定した。

2.5 ^{51}Cr 標識 YAC-1 細胞による NK 細胞測定法

EF2001をPBS 0.3 mLに溶解し12 mg/kg, 24 mg/kgに調製し、2週間隔日、計8回腹腔投与した。実験は各群3匹とし、EF2001の投与量12 mg/kg, 24 mg/kgの2群とコントロール群（0 mg/kg）の3群とした。本実験ではNK細胞が好んで攻撃するリンパ腫の一種である指数増殖期のYAC-1細胞を、放射性核種 ^{51}Cr （半減期27.7日, EC）で標識し、NK細胞が破壊することによって、これより遊離する ^{51}Cr の放射能を測定する方法によりNK細胞の活性度を測定した。EF2001を投与したマウスおよび無投与のマウスから摘出した脾臓を、ステンレスメッシュ（100メッシュ）において注射器内筒先端ゴム部分で軽くすりつぶし、PBS10 mLを加え遠心分離（900 RPM, 10分）した。細胞分離された上澄み液を除去し、溶血バ

ッファ（0.16 M NH_4Cl 溶液 90 mLと0.17 M トリス溶液（pH 7.65）10 mLを混合し、HClでpH 7.2に調整）を入れ攪拌し、赤血球を取り除くため遠心分離した。その後溶血バッファを取り除き、得られた白血球（NK細胞）に血管細胞用培地（RPMI1640）を加え1時間放置した。 ^{51}Cr で標識したYAC-1細胞は2時間培養後96穴プレートに 10^4 個/ $100\mu\text{L}$ 入れ、さらに 1.25×10^6 , 2.5×10^6 , 5.0×10^6 , 10.0×10^6 , 20.0×10^6 の白血球（NK細胞）を加え、6時間 37°C で反応させたのち、96穴プレートごと遠心分離し、各穴の上澄み液 $100\mu\text{L}$ 採取し ^{51}Cr の放射能をウェル型シンチレーションカウンタ（Beckman社製）にて測定し、無投与コントロール群の活性を1と規格化して、各群のNK細胞活性度を比較検討した。なお、統計上の有意差はStudentのt検定を用いて検定した。

3. 結果

照射後のマウスの生存率をFig. 1に示した。コントロール群ではマウスのすべての死亡は照射後6日目であるのに対し、EF2001投与群両者では、その全死亡は照射後10日目であり、コントロール群に比べ4日間の生存延長が見られた。また、コントロール群がすべて死亡した照射後6日目では、Ef 12 mg/kg投与群では100%、Ef 24 mg/kg投与群では80%の生存があった。Ef 12 mg/kg投与群とEf 24 mg/kg投与群との生存率を比較してみると、死滅した日数が照射後10日目と同じであるが、7日目では前者の生存率は60%、後者は70%と明らかな差はなかったが、8日目ではそれぞれの生存率は20%、70%と、本実験の中で一番大きな生存率の差が見られた。50%生存率の日数は、コントロール群では5日であるのに対し、Ef 12 mg/kg投与群では8日、Ef 24 mg/kg投与群では9日目でありEF 2001投与群では明らかな50%生存率の延長を認めた。

放射線照射後の体重減少の割合をFig. 2に示した。照射していないコントロール群は順調

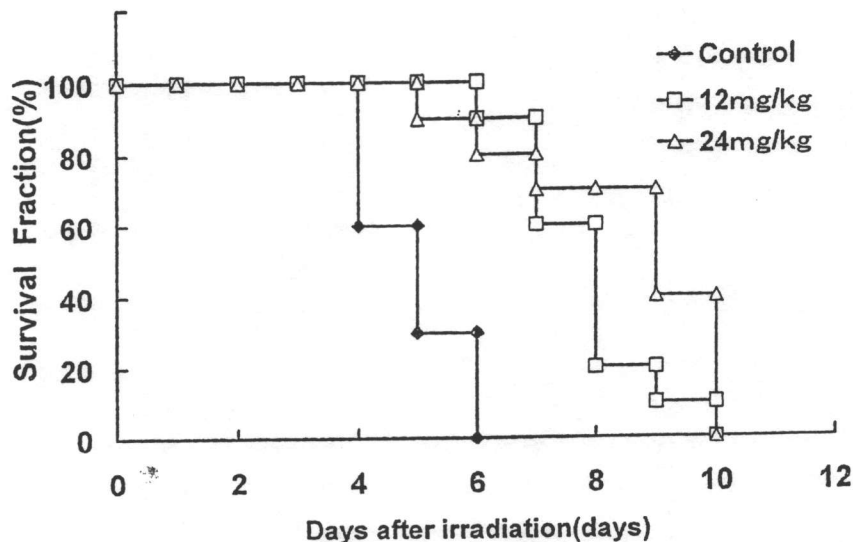


Fig. 1 Effects of EF2001 on survival fraction after irradiation. Each value represent from 3 separate experiments ($n = 10$). Heat-killed Ef at 12 mg/kg and 24 mg/kg were injected into intraperitoneally for 2 weeks every other day.

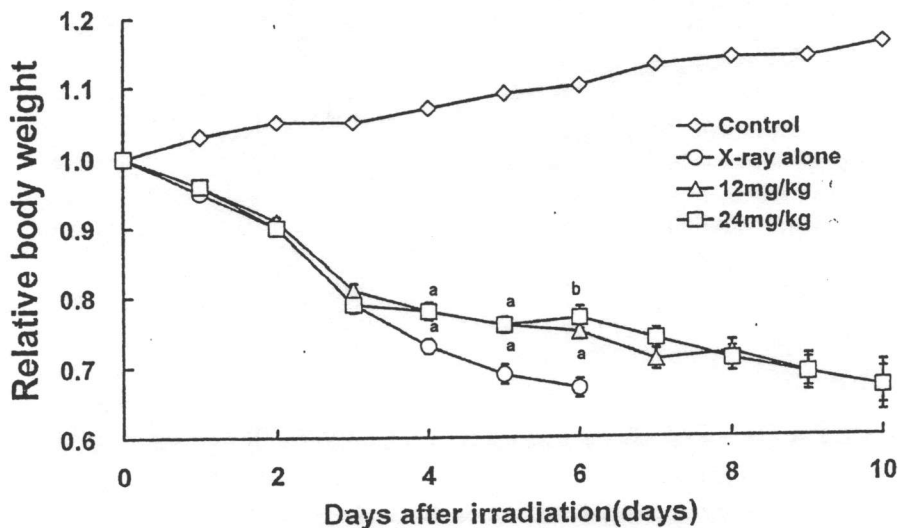


Fig. 2 Effects of EF2001 treatment on less of body weight induced by X-ray irradiation. Each data is average weight ± 1 SE for 10 mice. Normalized the initial body weight as one for reduces the variation of the body weight loss. We used *t*-test for relative body weight to the between each treatment groups and significantly different from control group.
 a: Significantly different from X-alone control group at $P < 0.05$
 b: Significantly different from X-alone control group at $P < 0.01$

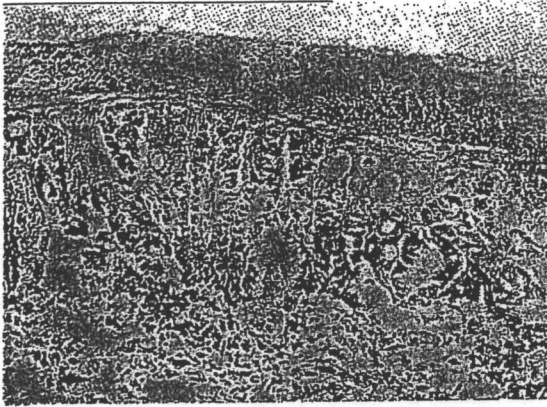


Fig. 3a Control large intestine.

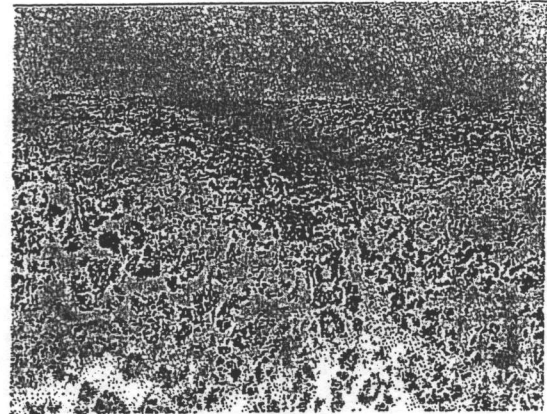


Fig. 3b Control small intestine.

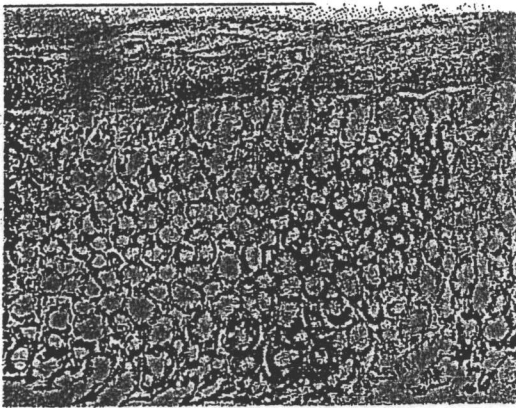


Fig. 3c Ef 12 mg/kg large intestine.

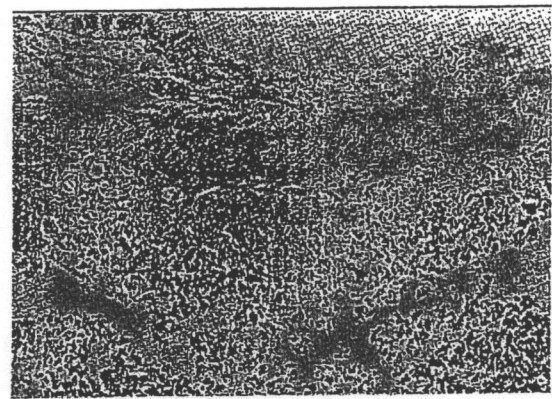


Fig. 3d Ef 12 mg/kg small intestine.

な体重増加が見られるのに対し, その他の群では体重減少が日に1g-2g程度見られた。体重減少が見られる三つの群の中でも体重減少の割合に有意差が生じたのは, 照射後4日目からであった。4日目の照射単独群での体重減少の割合は, 最初の体重の27%減であったのに対し, Ef 12 mg/kg 投与群では21%減に抑制されていた ($P < 0.05$)。5日目, 6日目では, 前者は31%, 34%減であるのに対し後者は23%, 25%減に抑えられていた ($P < 0.05$)。また, Ef 24 mg/kg 投与群では, 4日目, 5日目の体重減少の割合は Ef 12 mg/kg 投与群とほぼ一緒であるが, 6日目は, 22%減に抑えられており単独照射群に比し12%の体重減少が抑制されていた ($P < 0.01$)。Ef 12 mg/kg 投与群と Ef 24 mg/kg 投与群で体

重減少では有意な差はなかった。

それぞれ照射した3群のマウスの死亡直後に摘出した大腸, 小腸の粘膜標本と正常粘膜標本を Fig. 3に示した。X線を照射したコントロール群では大腸において, 細胞上皮の変性, 壊死, 脱落, 核の減少が (Fig. 3a), 小腸においては完全壊死が観察された (Fig. 3b)。その損傷は大腸よりも小腸の方が大きかった。Ef 12 mg/kg, Ef 24 mg/kg 投与群両者において大腸粘膜の損傷は少なく, 正常組織の存在が確認でき, 主に粘液を作る杯細胞が残存していた (Fig. 3c, e)。一方, 小腸粘膜の損傷所見としては, Ef 12 mg/kg 投与群ではコントロール群同様の変性, 壊死が見られたのに対し (Fig. 3d), Ef 24 mg/kg 投与群ではパネート細胞, 杯細胞

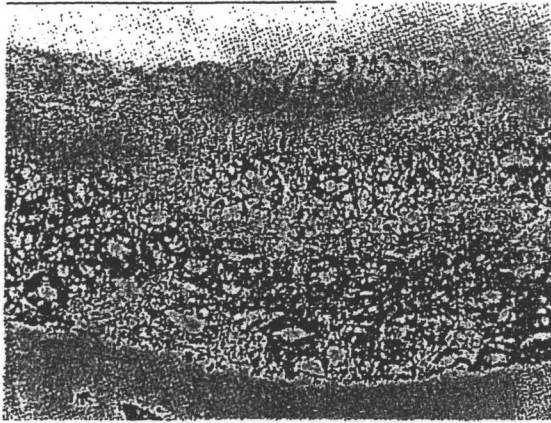


Fig. 3e Ef 24 mg/kg large intestine.

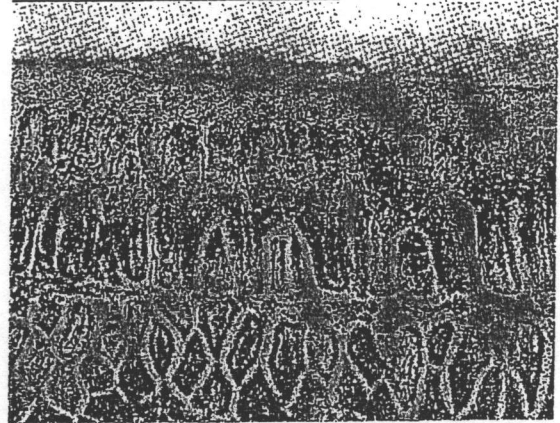


Fig. 3f Ef 24 mg/kg small intestine.

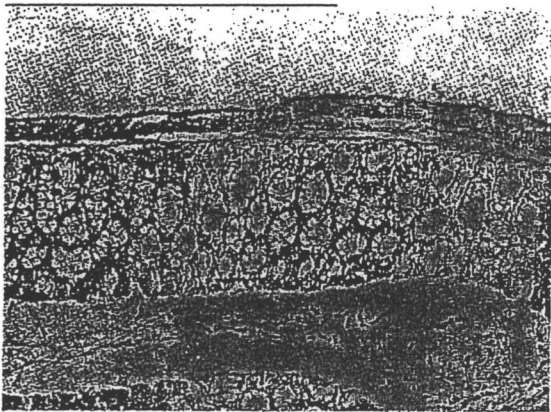


Fig. 3g Normal large intestine.

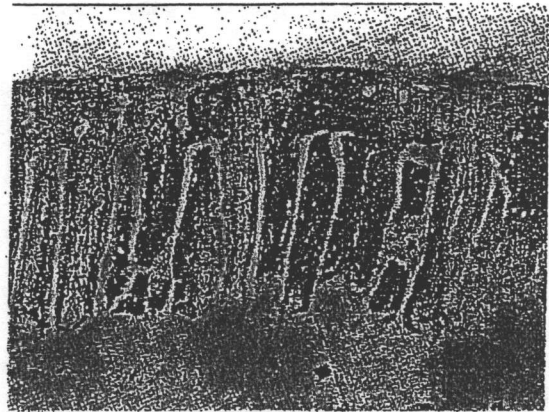


Fig. 3h Normal small intestine.

Fig. 3 Section of the intestine under microscope $\times 100$.

a: Control large intestine, b: Control small intestine, c: Ef 12 mg/kg large intestine, d: Ef 12 mg/kg small intestine, e: Ef 24 mg/kg large intestine, f: Ef 24 mg/kg small intestine, g: Normal large intestine, h: Normal small intestine.

Results of the section of the intestine obtained immediately after the death of the mice is demonstrated in Fig.3. In the control group, prominent degeneration and necrosis of the mucosa were observed in both large and small intestines. The change of small intestine was greater than that of large intestine. In the large intestine, mucosal damage was protected in both Ef 12 mg and Ef 24 mg groups. The tendency that a damage was few included an one of Ef 24 mg group in the small intestine. These findings seem to reflect radioprotective effect of Ef.

の生存, 固有構造の残存が確認でき (Fig. 3f), 損傷が少なかった。一方, 大腿骨の骨髄の標本も作製したが, 明らかな防護効果を示す所見は得られなかった。Fig. 4 は, NK 細胞の活性度

を示したもので, Ef 12 mg/kg 群ではコントロール群に比べ, 1.46倍 ($P < 0.1$), Ef 24 mg/kg 群では1.94倍 ($P < 0.05$)と, コントロール群に比し有意に上昇した。

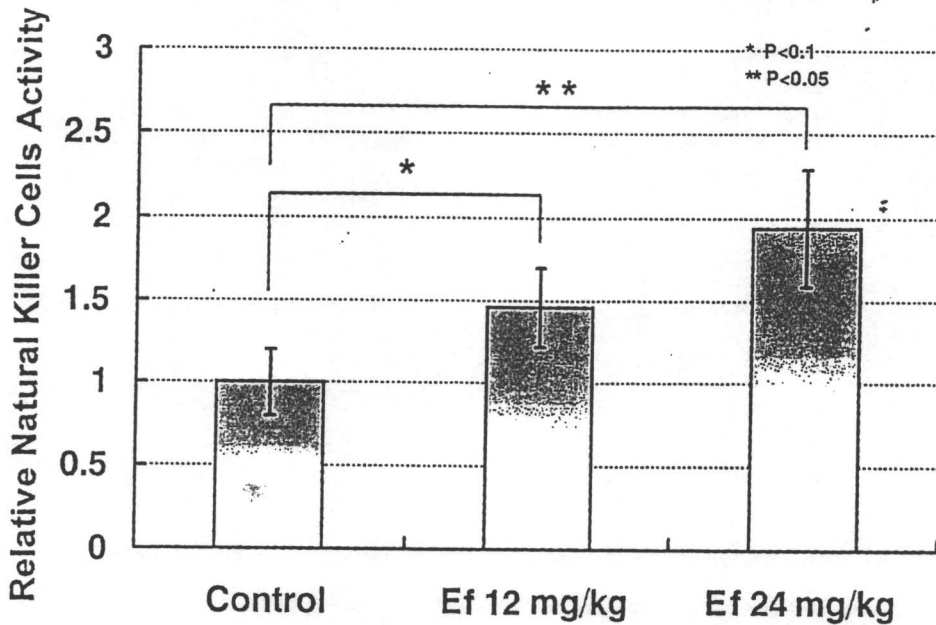


Fig. 4 The concentration of the spleen cells were adjusted to be 2×10^7 cells/mL. Then, 1×10^7 cells of the spleen cells were added to 1×10^4 of YAC-1 cells which were labeled with ^{51}Cr (37 MBq) and incubated in a 96 well plate for 6 h. Only the liquid component of each well was measured with gamma counter. Each point represents the mean of 15 to 20 individual cells with 1 SE. We normalized the initial NK Cell activity as one, for reduce the variation of each activity levels. E: T = $10^7 : 10^4$

4. 考 察

コントロール群が照射後6日目まで全死亡して居ることと、照射した線量が8 Gyの全身照射であることから、造血臓器の損傷と、腸管への放射線損傷が現れる線量であるため、死亡の直接の原因は腸管死と白血球全般機能が障害を起し感染による死亡が考えられる。この線量で、EF2001投与群はコントロール群より4日も生存日数が延び、有意に体重減少が抑制されたことから放射線防護効果があると推察できる。この効果は病理所見でもあるように、腸管壁の損傷が少なく、腸管出血や穿孔が抑制されたことが大きな要因であると考え。次の要因として、NK細胞の活性度が薬剤投与後、有意に上昇していることから、EF2001が白血球機能亢進を促し、感染予防効果があがったためであると考

える。また、この有意な活性度の上昇は免疫能活性効果があることも示唆している。

放射線防護の要因として、フリーラジカルの除去によるものや、抗酸化作用による、消化管臓器保護によるものといった報告があり、本研究も抗酸化作用によって消化器系が放射線による傷害から保護され餌食摂取に差が出た可能性を示唆したが、その後の追跡研究で抗酸化作用は確認できなかった^{1), 5), 7)}。すなわち、EF2001投与によって、大腸、小腸の損傷が抑えられ、栄養摂取能が温存されたためと、NK細胞の活性度が有意に高くなったことから、免疫能増強による感染予防により、生存率の延長や体重減少が抑制され放射線防護効果を示したと考える。また、EF2001の放射線防護効果の特徴として、腸管や消化管臓器のみ特異的に保護する可能性が示唆された。

5. 結 論

放射線照射したマウスの体重減少割合の低下、生存日数の延長、大、小腸の粘膜保護効果の3点から、EF2001は放射線防護効果が確認できた。また、NK細胞の活性度が有意に上昇したことから感染予防効果、免疫能増強効果があり、発癌抑制等も期待できる。今後、副作用のない放射線防護薬剤、特に腸管を保護する作用があるため、骨盤腔病変の放射線治療中患者に頻発する、下痢等の症状を改善する有効な薬剤である。

文 献

- 1) Matuno, T.: The anti-tumor of propolis, the anti-oxidization action science, propolis health reader series health, *J. Orient Med.*, 3, 55-60(1996)
- 2) Yosio, N.: Activity Physiology water solubility propolis and acute toxic examinatio, *Jpn. Propolis Conf.*, 16, 29-46(1996)
- 3) Patchen, M. L.: Stimulated hemopoiesis and enhanced survival following glucan treatment in sublethally and lethally irradiated mice, *Int. J. Immunol.*, 7(6), 923-32(1983)
- 4) Patchen, M. L.: Glucan, mechanism involved in its radioprotective effect, *J. Leuk. Biol.*, 42(2), 95-105(1987)
- 5) Yoshimura, A., Monzen, H., Hasegawa, T., Y, Gu, and Moribe, R.: The anti-tumor effect, radiation protection of β -1.3 D glucan from yeast, *The Korean Association for Radiation Protection*, 273-279(2000)
- 6) Blumenthal, R. D., Lew, W., Reising, A., Soyne, D., Osorio, L., Ying, Z. and Goldenberg, D. M.: Anti-oxidant vitamins reduce normal tissue toxicity induced by radio-immunotherapy, *Int. J. Cancer*, 86(2), 276-80(2000)
- 7) Ushakova, T., Melkonyan, H., Nikonova, L., Afanasyev, V., Gaziev, A.I., Mudrik, N., Bradbury, R. and Gogvadze, V.: Modification of gene expression by dietary antioxidants in radiation-induced apoptosis of mice splenocytes, *Free Radic. Biol. Med.*, 26(7-8), 887-91(1999)
- 8) Vernia, P., Fracasso, P. L., Casale, V., Villotti, G., Marcheggiano, A., Stigliano, V., Pinnaro, P., Bagnardi, V., Caprilli, R. and Cattedra, D.: Topical butyrate for acute radiation proctitis randomised, crossover trial, *Lancet*, 356(9237), 1232-1235(2000)
- 9) Elizabeth, A. D.: Effects of dietary antioxidants on lipid peroxide formation in animal tissues after hole body irradiation, *Int. J. Radiat. Biol.*, 22, 23-40(1972)
- 10) Russanvou, E.: X-irradiation effect on lipid peroxide and super oxide dismutase and copper loaded rat liver, *Acta. Physiol. Pharmacol. Bulg.*, 5, 73-78(1979)
- 11) Alena, S.: The effect of gamma irradiation and diet on superoxide dismutase activity in some tissues of rat, *Radio. Biol. Radiother.*, 29, 157-164(1998)
- 12) Rejholcova, M.: Time course of lopolytic activity and on lipid peroxidation after whole body γ irradiation of rats, *Radiat. Res.*, 117, 21-25(1989)
- 13) 清野哲孝: 加齢マウスにおけるジピリダモールの放射線防護効果, 昭医学会誌, 55, 45-50(1995)
- 14) 佐藤 薫, 一政満子, 宮原研三, 西村義一, 鈴木佐枝子, 塩見正衛, 一政祐輔: マウスにおけるタングステン酸ナトリウムの放射線防護効果, *Radioisotopes*, 49, 199-203(2000)
- 15) 大橋一智, 上田浩史, 山崎正利, 木村貞夫, 安部 茂, 山口英世: Enterococcus faecalis FK-23株加熱死菌体の Biological Response Modifire 活性, 薬誌, 112(2), 919-925(1992)
- 16) 大橋一智, 里中勝人, 山本哲朗, 山崎正利, 木村貞夫, 安部 茂, 山口英世: Enterococcus faecalis FK-23株加熱死菌体のマウス同系腫瘍に対する抗腫瘍効果, 薬誌, 113(5), 396-399(1993)

Abstract

Effects of Lactic Bacteria on Immunological Activation and Radiation Damage.

Hajime MONZEN, Yeunhwa GU*, Takeo HASEGAWA* and Rumio YUKI: Department of Radiology Otsu Red Cross Hospital, 1-1-35 Nagara, Otsu-shi, Shiga

Pref. 520-8511, Japan, *Department of Radiological Technology, Graduate school of Suzuka University of Medical Science, 1001 Kiishioka-cho, Suzuka-shi, Mie Pref. 510-0226, Japan

Although some studies have suggested that certain substances, such as vitamins and glucan, found in natural food products may have protective effect against radiation injuries, no substance is used practically as radioprotectors. Safe radioprotectors without side effects are, however, yet to see. Enterococcus faecalis (Ef) in intestines is known to enhance immunity of the host as a biological response modifier. In this report, we have examined the radiation protection effect of Ef using C3H mice and assessed the

effect of Ef on the natural killer cells activity of the splenic cells in the mice. Less body weight losses after irradiation were observed among Ef injection groups, in comparison with control groups. Our data showed a strong tendency to prolong the surviving fraction among the groups with the Ef injection. Hence, the Ef treatment appeared to have protected mucosal damage caused by the X-ray irradiation. The NK cells activities were markedly enhanced after the Ef injection as well. With the evidence mentioned above, we conclude that the Ef may have positive effect on patients who undergo a radiotherapy.

(Received November 8, 2002)