

## ラクトフェリンによる化学療法剤処理魚の副作用軽減

高瀬 清美, 角田 出\*

**Lactoferrin Reduces Physiological Dysfunctions of Goldfish Induced by Chemotherapeutic Agents**

Kiyomi TAKASE and Izuru KAKUTA\*

*Department of Biological Engineering, Senshu University of Ishinomaki, 1 Shinmito Minamisakai, Ishinomaki City 986-8580, Japan*

(Received January 12, 2007; Accepted June 8, 2007)

We investigated whether the deleterious side effects of chemotherapeutic agents on the physiologic functions of fish could be modulated by lactoferrin (LF). Goldfish, weighing about 25 g, were treated intramuscularly with methotrexate (MTX: 2.5 mg/kg body weight) and fluorouracil (FU: 15 or 50 mg/kg body weight) three times every other day. In control fish fed a commercial diet, MTX induced severe immunosuppression, increased the number of total bacteria and Enterobacteriaceae in the intestinal tract, and caused intestinal damage such as lowered and thickened mucosa and thinned muscularis externa, with moderate renal dysfunction. A few fish treated with MTX died. In fish injected with FU or FU plus MTX, the side effects were slightly less in comparison with those in the MTX group. Pretreatment with LF (oral administration at 200 mg/kg body weight/day) for 3 weeks reduced the deleterious side effects of MTX and FU. One intraperitoneal injection of LF (200 mg/kg body weight) immediately after the first MTX injection also reduced the side effects. These results show that LF reduces the physiologic dysfunction of fish treated with chemotherapeutic agents.

**Key words**—methotrexate; side effects; lactoferrin; immunity; intestinal damage; chemotherapeutic agents

## 緒 言

哺乳類において、腫瘍の治療は、化学療法剤の投与、切除手術、放射線照射等により行われている。近年、化学療法剤による治療は新薬を見出すことに加え、複数の化学療法剤を用いて治療効果を高める多剤併用療法の検討が行われ、その治療成績は日々向上している。しかし、強力な化学療法剤の投与は、強い副作用をも引き起こす。<sup>1)</sup> 高い効果を得るための投与量増加も、同様の結果を生む。化学療法剤は主に未分化の腫瘍細胞に作用するため、細胞分裂が活発である免疫担当細胞や消化管内膜等はその影響を受け易い。その他の臓器でも細胞分裂の亢進に伴い、様々な副作用が発現する。例えば、代謝拮抗作用を持つ化学療法剤であるメトトレキサート (MTX) は、プリンヌクレオチドの *de novo* 合成を阻害、dUMP から dTMP への変換阻害を行うことにより抗腫瘍性を示す。<sup>2)</sup> 副作用として、液性免疫

応答の阻害、<sup>3)</sup> 小腸の上皮細胞損傷<sup>4)</sup>が報告されている。また、MTX 投与時には、フルオロウラシル (FU) など、他の薬剤と併用することも多い。FU も重症腸炎を引き起こすことが報告されている。<sup>5)</sup>

化学療法剤の効果を十分に得るためには、同時にその副作用を軽減していく必要がある。化学療法剤の副作用軽減法としては、補助食品による免疫力の増強、他の薬剤投与による救済療法等の処置が採られてきた。しかしながら、従来の方法では十分な副作用軽減処置効果を得られていないのが実情である。

ラクトフェリン (LF) は、初乳中に特に高濃度に含まれる、鉄結合性蛋白質である。LF は体内の非特異的生体防御機構を賦活化することにより、抗菌、<sup>6)</sup> 抗ウイルス、<sup>7)</sup> 抗真菌、<sup>8)</sup> 抗寄生虫、<sup>9,10)</sup> 抗腫瘍作用<sup>11-14)</sup>などを示す。加えて、LF が抗腫瘍剤の副作用を軽減する効果についても、マウスにおいて、シクロヘキシミドによって生じるリンパ球数の減少を抑制したり、<sup>15)</sup> MTX の投与によって生じる小腸上皮細胞の障害を軽減したりすること<sup>16)</sup>が報告されている。

腫瘍形成は魚においても認められており、ニシキゴイには腹部が著しく膨大する“腸満”と呼ばれる疾病がある。腸満は、腹部の膨張、立鱗、背こげ等の症状を伴う、コイの卵巢腫瘍である。<sup>17)</sup> 罹病魚は遊泳が緩慢になり、衰弱し、死に至ることがある。魚類における腫瘍形成は、卵巢以外に皮膚や肝臓でも認められる。<sup>18,19)</sup> 魚の腫瘍は、早期発見ができれば、手術による治癒の望みがある。日頃から魚に触れることの多い業者等であれば、腫瘍の早期発見は可能である。しかし、手術には専門的な知識と技術が要求され、一般愛好者や業者ではほとんど不可能である。また、長時間に渡る空気中への暴露は個体に大きなストレスを与えるとともに、その術跡はニシキゴイを始めとする高級観賞魚にとって致命的である。よって、手術に代わる腫瘍の治療法として、化学療法剤の使用も検討されるべきである。その場合、化学療法剤による副作用の軽減法についての研究は必須である。

現在、実験動物としての魚類は、「動物の愛護及び管理に関する法律」による規制を受けていない。しかし、メダカ、ゼブラフィッシュでは、多くの突然変異体が見付かっており、ヒトの疾患モデルとして注目を集めている。また、これらの魚は小型で飼育が容易であり、世代交代が早い。よって、魚類は実験動物として利用価値が高く、哺乳類に代わる実験動物としても有望である。

そこで本研究では、キンギョに化学療法剤を投与し、その影響（副作用）を調査するとともに、LFの事前及び同時投与による副作用の軽減効果を調べた。

## 材料及び方法

**1. 供試魚** 供試魚として体重 25 g 前後のキンギョ *Carassius auratus* を用いた。キンギョは、水温 20°C に調整した、容量 2000 l の循環濾過式水槽内で 2 週間以上予備飼育したのち、実験に供した。予備飼育期間中は市販の餌を、一日当たり魚体重の 2% 量投与した。

### 2. 飼育試験

**2-1. 化学療法剤投与試験 A (LF の事前経口投与試験)** キンギョを 20 尾ずつ 8 群に分け、各群、水温 20°C に調整した容量 60 l の循環濾過式水槽に収容した。4 群に前述の市販飼料（対照区：C

区）、残りの 4 群には同飼料に牛ラクトフェリン (LF：森永乳業㈱製) を添加した餌 (LF 投与区) を、それぞれ毎日体重の 2% 量投与し 7 週間飼育した。LF の一日当たりの投与量は 200 mg/kg 体重である。

上記飼育開始から 3 週間を経過した時点で、対照区と LF 投与区のキンギョを、0.75% 生理食塩水を投与したもの (C-S 群と LF-S 群) と化学療法剤のメトトレキサート (MTX) を投与したもの (C-M 群と LF-M 群)、フルオロウラシル (FU) を投与したもの (C-F 群と LF-F 群)、MTX 及び FU を混合投与したもの (C-MF 群と LF-MF 群) の計 8 群に分け、4 週間の飼育試験を行った。なお、化学療法剤は 0.75% 生理食塩水中に懸濁し、一日おきに 3 回、筋肉内投与した。一日当たりの化学療法剤投与量は、単独投与群の場合は、MTX 2.5 mg/kg 体重あるいは FU 50 mg/kg 体重、混合投与群では MTX 2.5 mg/kg 体重及び FU 15 mg/kg 体重とした。なお、MTX と FU の混合投与群では、MTX を投与した一時間後に FU の投与を行った。

**2-2. 化学療法剤投与試験 B (LF の同時腹腔内投与試験)** キンギョを 15 尾ずつ 2 群に分け、ともに、水温 20°C に調節した容量 60 l の循環濾過式水槽に収容した。両群に前述の市販飼料を毎日体重の 2% 量投与し、4 週間飼育した。

上記飼育開始から 2 週間を経過した時点で、0.75% 生理食塩水あるいは MTX を、一日おきに 3 回、筋肉内投与した。化学療法剤の投与初日にのみ、キンギョの腹腔内に 0.75% 生理食塩水（対照群）あるいは LF を溶解した同食塩水 (LF 群) を投与し、2 週間の飼育試験を行った。なお、MTX の投与量は一日当たり 2.5 mg/kg 体重、LF 群への LF の投与量は 200 mg/kg 体重とした。

### 3. 生理指標の調査

**3-1. 血球数の計測** 実験 A、実験 B とともに MTX 投与後 1 週間目及び 2 週間目に各群より 5 尾を取り上げ、ヘパリンリチウム処理した注射器を用い、尾部血管より採血を行った。採血した血液を試料として、血球計算法により、赤血球数を測定した。また、血球塗抹標本にメイグリュンワルド・ギムザ染色を施し、赤血球 5000 個当たりの顆粒球数とリンパ球数を計測した。

**3-2. 顆粒球の貪食率の測定** ザイモザンに対

する顆粒球の貪食能を以下のようにして測定した。0.75%生理食塩水中にザイモザン（シグマ社製）を0.5 mg/mlとなるよう懸濁させたのち、超音波処理によって均一化した同液と全血を等量ずつ混合し、20°Cで20分間、振とう条件下で反応させた。反応終了後、均一化した反応液の一部をスライドグラスに滴下し、直ちに塗抹、風乾したのち、メイグリュンワルド・ギムザ染色を施して検鏡した。貪食能は250個の顆粒球を観察し、貪食率(%)=(ザイモザンを食した顆粒球数/観察した顆粒球数)×100として求めた。

**3-3. 顆粒球のニトロテトラゾリウム (NBT) 還元活性** 貪食反応終了後、同反応液の一部を、2 mg/mlとなるようにニトロブルーテトラゾリウム（和光純薬社製）を溶解した0.75% NaClを含む1/30モルのリン酸緩衝液（pH 7.2）と1:2の割合で混合し、20°Cで30分間反応させた。その後、反応液をスライドグラスに塗抹、風乾後、メイグリュンワルド・ギムザ染色を施して検鏡した。NBT還元活性は100個の顆粒球を観察し、ホルマザンを形成している顆粒球の出現率（陽性率）として表記した。

**3-4. 血漿中一価イオンの測定** 血漿中のNa, K, Clは電極法（富士ドライケム DRI-CHEM 800）により測定した。

**3-5. 組織学的観察** 化学療法剤投与試験A、化学療法剤投与試験Bともに、採血を終えた個体より腸管、肝臓、体腎を採取した。腸管については、肛門から20 mm程度離れた部位（腸後部）と、肛門から130 mm程度離れた部位（腸中部）をそれぞれ約10 mmの幅で採取した。各組織片はブアン液で固定し、常法に従って6 μmのパラフィン切片を作製し、HE染色後、検鏡した。なお、腸壁筋層の厚みは連続する5枚の切片について観察し、1枚の切片について無作為に3ヵ所を選び筋層（輪状筋+縦走筋）の厚みを計測し、その平均値を調査個体の値とした。

**3-6. 腸内細菌数の測定** 化学療法剤投与直前、化学療法剤投与後2週間目及び4週間目に、各群より取り上げた4尾の腸内容物を試料とした。肛門から30 mm程度離れた部分より前方約100 mmの長さで腸管を無菌的に切り出した。腸内容物を搾り出したのち、0.75%生理食塩水を加えてホモジナイズし、試料溶液を調製した。

腸内全細菌数の調査には、最終濃度で10 mg/lとなるようにヘミン（和光純薬社製）を加えたトリプトソーヤ寒天培地（日水製薬社製）とBL寒天培地（栄研器材社製）を用いた。トリプトソーヤ寒天培地は好気条件下、BL寒天培地は嫌気条件下で、それぞれ室温で5日間培養したのち、コロニー数を計測した。計数後、BL寒天培地に生育したコロニーについては形状観察を行うとともに、各群から無作為に33個のコロニーを新たなBL寒天培地に釣菌して好気条件下で培養し、好気条件下での生育の有無を調べ、偏性嫌気性菌である*Bacteroidaceae*を同定した。なお、好気性細菌数に偏性嫌気性細菌である*Bacteroidaceae*の数を加えたものを腸内全細菌数とした。

大腸菌群については、上記、計数後のトリプトソーヤ寒天培地より、無作為に33個のコロニーをESコリマーク寒天培地（栄研器材社製）に釣菌し、常法に従い37°Cで1日間培養後、赤色のコロニー数を計測し、大腸菌群数とした。

**3-7. 統計** 化学療法剤投与試験Aで得られた結果については、取り上げ時期毎に対照区及びLF投与区間ではTukeyの多重比較検定を、対照区とLF投与区の比較及び化学療法剤投与試験Bの結果についてはWelchの検定を、それぞれ行い、 $p < 0.05$ を有意の限界とした。また、本文中では、特記しない場合、平均値±標準偏差（腸内細菌数については $n=4$ 、それ以外は $n=5$ ）で表した。

## 結 果

**1. 化学療法剤投与試験A（LFの事前経口投与試験）** 化学療法剤の投与前では、対照区及びLF投与区とも、飼育期間中の餌の食いは良好であり、外見や行動に異常は認められなかった。両区の体重、体長にも有意な差は認められなかった。化学療法剤を投与した対照区の魚は、体表に損傷のみられる場合が多く、特に、MTX投与群では、取り上げ時に鱗が剥がれ易く、腸管も切れ易く脆かった。一方、LF投与区の魚には、上記の変化は認められなかった。

**1-1. 生残率** LFの事前の経口投与が化学療法剤投与魚の生残率に及ぼす影響をFig. 1に示す。化学療法剤投与試験開始から4週間目まで、C-S群及びLF投与区（4群とも）に死亡個体は認

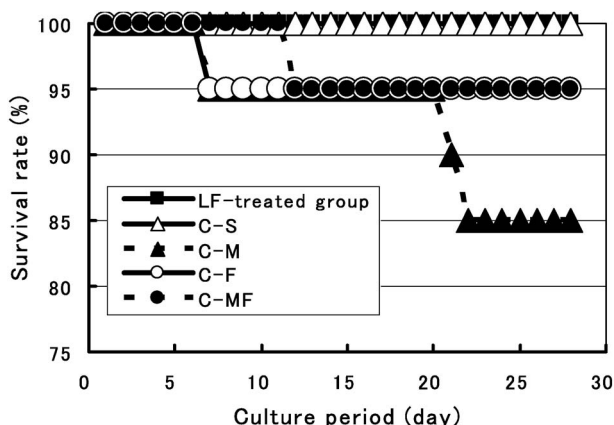


Fig. 1. Changes in the Survival Rate of Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. LF-treated group: LF-S, LF-M, LF-F and LF-MF groups.

められなかった。それに対し、化学療法剤を投与した対照区の各群では、死亡個体が認められ、4週間目におけるC-F群及びC-MF群の生残率は、ともに95%となった。特に、C-M群では、化学療法剤投与後1週間目当たりから死亡個体が出始め、4週間目では85%にまで低下した。

**1-2. 血球組成** 化学療法剤投与直前の対照区及びLF投与区の赤血球数 ( $10^6$  個/mm<sup>3</sup>), 顆粒球数 ( $10^4$  個/mm<sup>3</sup>), リンパ球数 ( $10^4$  個/mm<sup>3</sup>) は、それぞれ、 $1.14 \pm 0.36$  及び  $1.75 \pm 0.13$ ,  $1.52 \pm 0.46$  及び  $4.37 \pm 1.08$ ,  $0.38 \pm 0.09$  及び  $0.30 \pm 0.14$  であった。LF投与区の顆粒球数は、対照区に比べ、有意に高い値を示した。ただし、赤血球数とリンパ球数では、対照区とLF投与区の間には有意な差はみられなかった。

化学療法剤投与後2週間目、4週間目の対照区及びLF投与区の数値をTable 1に示す。赤血球数及びリンパ球数については、2週間目、4週間目ともに、すべての試験群間に有意な差は認められなかった。顆粒球数については、4週間目には、C-MF群がC-S群に対し有意に低い値を示した。上記を除く対照区内の比較では、取り上げ時期を問わず、各群間に有意な差は認められなかった。また、LF投与区内においても、各群間に差は認められなかった。

対照区とLF投与区との比較では、2週間目においてはLF-S群、LF-M群、LF-MF群はそれぞれ、C-S群、C-M群、C-MF群に対し、4週間目におい

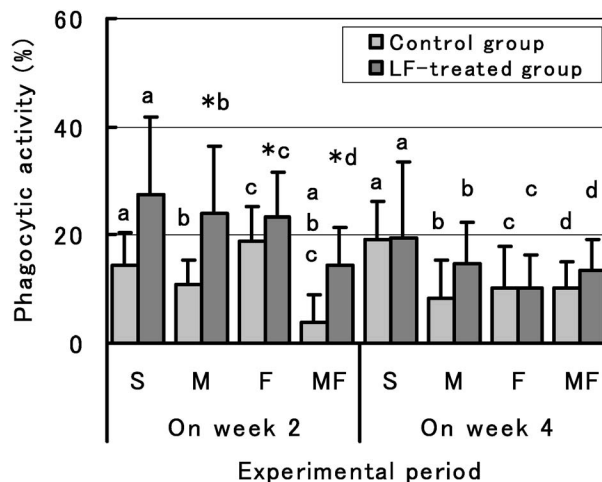


Fig. 2. Changes in the Phagocytic Activity of Granulocytes from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. S: saline, M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . a-d: The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ). \*Significant difference to the control ( $p < 0.05$ ).

ては、LF-S群、LF-M群、LF-F群、LF-MF群はそれぞれ、C-S群、C-M群、C-F群、C-MF群に対し有意に高い値を示した。

**1-3. 顆粒球の貪食率** 化学療法剤投与直前の対照区及びLF投与区における顆粒球の貪食率(%)は、 $29.9 \pm 9.78$  及び  $53.0 \pm 21.2$  であり、両区間に有意な差は認められなかった。

LFの経口投与が化学療法剤投与魚の顆粒球の貪食率に及ぼす影響をFig. 2に示す。2週間目には、C-MF群はC-S群、C-M群、C-F群に対し有意に低い値を示した。上記を除く対照区内の比較では、取り上げ時期を問わず、各群間に有意な差は認められなかった。また、LF投与区内においても、各群間に差は認められなかった。

対照区とLF投与区との比較では、2週間目には、LF-M群、LF-F群、LF-MF群は、それぞれ、C-M群、C-F群、C-MF群に対し有意に高い値を示した。

**1-4. NBT還元活性** 化学療法剤投与直前の対照区及びLF投与区のNBT還元活性率(%)は  $6.4 \pm 3.5$  及び  $27.8 \pm 12.5$  であった。LF投与区は対照区に対し有意に高い値を示した。

LFの経口投与が化学療法剤投与魚の顆粒球のNBT還元活性に及ぼす影響をFig. 3に示す。対照区、LF投与区ともに、同一区内の比較では、取り

Table 1. Changes in the Number of Red Blood Cells, Granulocytes and Lymphocytes from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

	Body weight (g)	RBC ( $\times 10^6$ cells/mm <sup>3</sup> )	Granulocyte ( $\times 10^4$ cells/mm <sup>3</sup> )	Lymphocyte ( $\times 10^4$ cells/mm <sup>3</sup> )
Experimental A (Oral administration)				
On week 2				
Control group				
C-S* <sup>1</sup>	25.0 $\pm$ 6.2 <sup>a)</sup>	1.96 $\pm$ 0.62 <sup>a)</sup>	0.95 $\pm$ 0.56 <sup>a)</sup>	0.14 $\pm$ 0.08 <sup>a)</sup>
C-M* <sup>2</sup>	27.0 $\pm$ 6.1 <sup>b)</sup>	2.39 $\pm$ 0.42 <sup>b)</sup>	1.47 $\pm$ 0.32 <sup>b)</sup>	0.19 $\pm$ 0.10 <sup>b)</sup>
C-F* <sup>3</sup>	31.5 $\pm$ 6.3 <sup>c)</sup>	2.47 $\pm$ 0.16 <sup>c)</sup>	0.89 $\pm$ 0.66 <sup>c)</sup>	0.28 $\pm$ 0.13 <sup>c)</sup>
C-MF* <sup>4</sup>	25.7 $\pm$ 4.4 <sup>d)</sup>	1.87 $\pm$ 0.58 <sup>d)</sup>	0.97 $\pm$ 0.27 <sup>d)</sup>	0.22 $\pm$ 0.09 <sup>d)</sup>
LF-treated group				
LF-S	23.6 $\pm$ 4.4 <sup>a)</sup>	2.16 $\pm$ 0.69 <sup>a)</sup>	1.95 $\pm$ 0.80 <sup>a)</sup> *	0.26 $\pm$ 0.08 <sup>a)</sup>
LF-M	24.3 $\pm$ 3.3 <sup>b)</sup>	2.33 $\pm$ 0.65 <sup>b)</sup>	1.67 $\pm$ 0.28 <sup>b)</sup> *	0.23 $\pm$ 0.05 <sup>b)</sup>
LF-F	25.9 $\pm$ 5.5 <sup>c)</sup>	2.39 $\pm$ 0.99 <sup>c)</sup>	1.79 $\pm$ 0.97 <sup>c)</sup>	0.22 $\pm$ 0.08 <sup>c)</sup>
LF-MF	25.7 $\pm$ 4.4 <sup>d)</sup>	2.49 $\pm$ 0.65 <sup>d)</sup>	1.56 $\pm$ 0.34 <sup>d)</sup> *	0.18 $\pm$ 0.04 <sup>d)</sup>
On week 4				
Control group				
C-S	32.6 $\pm$ 11.4 <sup>a)</sup>	2.33 $\pm$ 0.40 <sup>a)</sup>	0.99 $\pm$ 0.18 <sup>a)</sup>	0.28 $\pm$ 0.03 <sup>a)</sup>
C-M	30.6 $\pm$ 10.8 <sup>b)</sup>	2.17 $\pm$ 0.50 <sup>b)</sup>	0.77 $\pm$ 0.25 <sup>b)</sup>	1.23 $\pm$ 0.05 <sup>b)</sup>
C-F	26.0 $\pm$ 11.5 <sup>c)</sup>	1.42 $\pm$ 0.72 <sup>c)</sup>	0.81 $\pm$ 0.31 <sup>c)</sup>	0.30 $\pm$ 0.12 <sup>c)</sup>
C-MF	28.3 $\pm$ 11.3 <sup>d)</sup>	1.88 $\pm$ 0.53 <sup>d)</sup>	0.55 $\pm$ 0.30 <sup>d)</sup>	0.34 $\pm$ 0.15 <sup>d)</sup>
LF-treated group				
LF-S	28.2 $\pm$ 7.2 <sup>a)</sup>	2.56 $\pm$ 0.20 <sup>a)</sup>	2.12 $\pm$ 0.61 <sup>a)</sup> *	0.34 $\pm$ 0.09 <sup>a)</sup>
LF-M	26.3 $\pm$ 4.9 <sup>b)</sup>	1.80 $\pm$ 0.67 <sup>b)</sup>	1.50 $\pm$ 0.39 <sup>b)</sup> *	0.29 $\pm$ 0.08 <sup>b)</sup>
LF-F	31.9 $\pm$ 7.8 <sup>c)</sup>	1.55 $\pm$ 0.57 <sup>c)</sup>	1.99 $\pm$ 0.50 <sup>c)</sup> *	0.34 $\pm$ 0.14 <sup>c)</sup>
LF-MF	29.8 $\pm$ 8.7 <sup>d)</sup>	1.78 $\pm$ 0.34 <sup>d)</sup>	1.50 $\pm$ 0.23 <sup>d)</sup> *	0.21 $\pm$ 0.08 <sup>d)</sup>
Experimental B (Intraperitoneal injection)				
Control group				
	21.1 $\pm$ 3.2	1.14 $\pm$ 0.36	1.52 $\pm$ 0.46	0.56 $\pm$ 0.35
LF-treated group				
	24.1 $\pm$ 4.5	1.62 $\pm$ 0.32	4.56 $\pm$ 1.57*	0.96 $\pm$ 0.61

Chemotherapeutic agents were administered intramuscularly three times every other day. In the experimental A, goldfish were administered orally lactoferrin (LF) for 3 weeks before the agent treatment. In the experimental B, LF was injected intraperitoneally just after the agent treatment. \*<sup>1</sup> S: saline, \*<sup>2</sup> M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), \*<sup>3</sup> F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), \*<sup>4</sup> MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean $\pm$ S.D.,  $n=5$ . *a-d*) The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p<0.05$ ). \* Significant difference to the control ( $p<0.05$ ).

上げ時期を問わず、各群間に有意な差は認められなかった。

対照区と LF 投与区の比較では、2 週間目において、LF-C 群、LF-M 群、LF-F 群はそれぞれ C-S 群、C-M 群、C-F 群に対し有意に低い値を示した。4 週間目については、LF-M 群、LF-F 群、LF-MF 群はそれぞれ、C-M 群、C-F 群、C-MF 群に対し有意に高い値を示した。

**1-5. 血漿中の一価イオン濃度** 化学療法剤投与直前の対照区及び LF 投与区の血漿中の Na, K, Cl の濃度 (mEq/l) はそれぞれ 107 $\pm$ 21.1 及び 121 $\pm$ 24.1, 5.24 $\pm$ 2.52 及び 4.84 $\pm$ 4.13, 86.6 $\pm$ 14.1 及び

95.4 $\pm$ 14.3 であった。LF 投与区と対照区の間で、Na, K, Cl の値に有意な差は認められなかった。また、化学療法剤の投与後でも、調査した時期を問わず、すべての群間において有意な差は認められなかった。

**1-6. 組織学的観察** 腸管の上皮細胞については、C-M 群、C-MF 群では、粘膜ひだの肥厚及び顆粒球の粘膜上皮組織への浸潤が高い頻度で観察され、特に C-M 群の変化は大きかった。また、C-M 群の一部の個体では、粘膜ひだの高さの低下した像や陰窩が粘膜筋板にまで達している像も観察された。一方、LF 投与区では、上記の化学療法剤投与

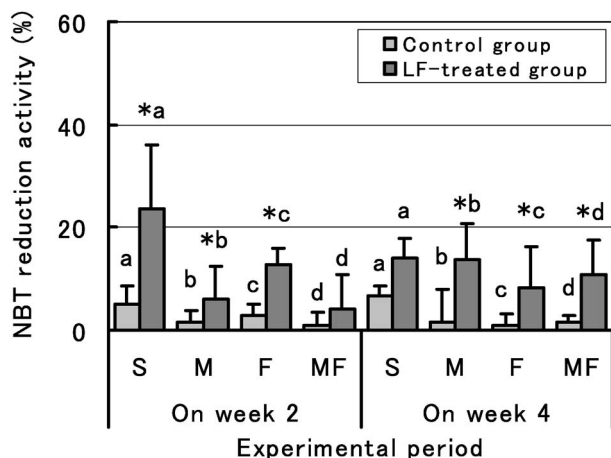


Fig. 3. Changes in the NBT Reduction Activity of Granulocytes from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. S: saline, M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . a-d: The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p<0.05$ ). \*Significant difference to the control ( $p<0.05$ ).

に伴う変化は少なかった。

化学療法剤投与直前の対照区及び LF 投与区の腸中部腸壁筋層の厚み ( $\mu\text{m}$ ) は、それぞれ、 $40.4 \pm 9.9$  及び  $57.8 \pm 11.2$  であり、LF 投与区は対照区に対し有意に厚かった。

LF の経口投与が化学療法剤投与魚の腸中部腸壁筋層の厚みに及ぼす影響を Fig. 4 に示す。2 週間目において、C-M 群は C-S 群に対し、C-M 群は C-F 群に対し、それぞれ、有意に低い値 (約 30% の低下) を示した。4 週間目については、対照区内の比較では、各群間に有意な差は認められなかった。また、LF 投与区内においても、2 週間目及び 4 週間目ともに、各群間に差は認められなかった。

対照区と LF 投与区の比較では、2 週間目、4 週間目ともに、LF-S 群、LF-M 群、LF-F 群、LF-MF 群はそれぞれ、C-S 群、C-M 群、C-F 群、C-MF 群に対し、それぞれ、有意に高い値を示した。

化学療法剤投与直前の対照区及び LF 投与区の腸後部腸壁筋層の厚み ( $\mu\text{m}$ ) はそれぞれ  $38.4 \pm 8.7$  及び  $41.3 \pm 11.9$  であった。LF 投与区は対照区に対し有意に厚かった。腸後部腸壁筋層の厚みについては、調査した時期を問わず、すべての群間に有意な差は認められなかった。

また、化学療法剤投与を行った対照区では、糸球体の萎縮像及び尿管腔中にエオジン好性の物質が

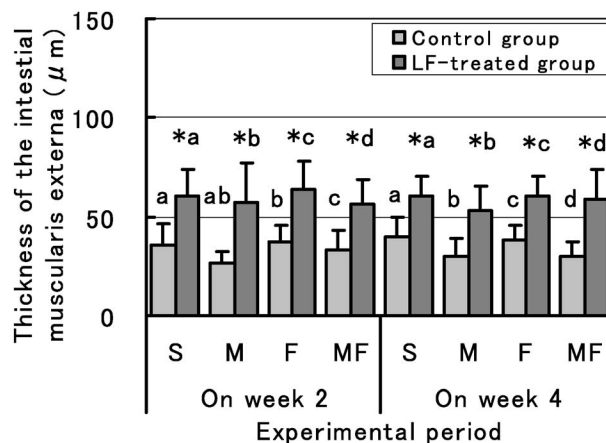


Fig. 4. Changes in Thickness of the Intestinal Muscularis Externa from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. S: saline, M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . a-d: The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p<0.05$ ). \*Significant difference to the control ( $p<0.05$ ).

高頻度で観察された。特に、C-M 群及び C-MF 群でその傾向は強かった。一方、LF 投与区では、同一処理をした対照区に比べ、腎組織の変化は著しく軽度であった。肝臓においては、全群間に顕著な差は認められなかった。

**1-7. 腸内細菌数** 薬剤投与直前の対照区及び LF 区の腸内全細菌数 ( $10^5$  CFU/g 内容物) はそれぞれ  $0.68 \pm 0.36$  及び  $0.43 \pm 0.26$  であった。LF 区と対照区の間有意な差はなかった。

LF の経口投与が化学療法剤投与魚の腸内全細菌数に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。LF 区の腸内細菌数は化学療法剤の投与によってほとんど変化しなかったものの、対照区の腸内全細菌数は、2 週間目といったんすべての群で有意に増加した。対照区内の比較では、2 週間目において C-M 群、C-F 群、C-MF 群は C-S 群に対して有意に高い値を示したが、各化学療法剤投与群の間に有意な差は認められなかった。LF 投与区内においては、各群間に差はなかった。4 週間目については、対照区の値は薬剤投与前のレベルに低下するとともに、対照区内の比較では、各群間に有意な差は認められなかった。LF 投与区内の比較でも、各群間に差はなかった。

対照区と LF 投与区の比較では、2 週間目において、LF-S 群、LF-M 群、LF-F 群、LF-MF 群は、C-S 群、C-M 群、C-F 群、C-MF 群に対し、それぞ

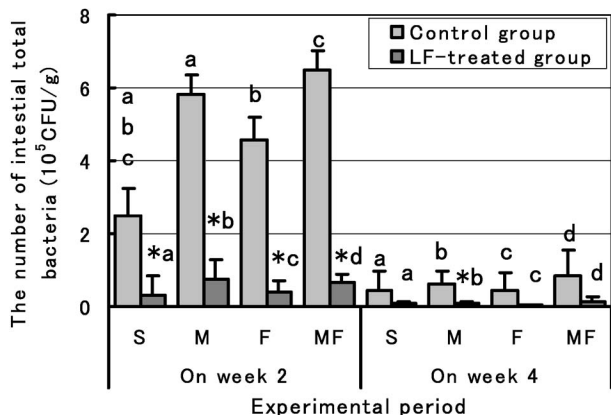


Fig. 5. Changes in the Number of Total Intestinal Bacteria from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. S: saline, M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean ± S.D., n=4. a-d: The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ). \*Significant difference to the control ( $p < 0.05$ ).

れ、有意に低い値を示した。4週間目については、LF-M群にのみ、C-M群に対し有意に低い値がみられた。

化学療法剤投与直前の対照区及びLF区の大腸菌群数 ( $10^5$  CFU/g 内容物) はそれぞれ  $0.28 \pm 0.14$  及び  $0.20 \pm 0.15$  であった。LF区と対照区の間には有意な差はなかった。

LFの経口投与が化学療法剤投与魚の腸内大腸菌群数に及ぼす影響を Fig. 6 に示す。対照区の腸内大腸菌群数は、2週間目にいったんすべての群で有意に増加した。対照区内の比較では、2週間目において、C-M群、C-F群、C-MF群はC-S群に対し有意に高い値を示したが、化学療法剤を投与した群の間に有意な差は認められなかった。LF投与区内においては、各群間に差はなかった。4週間目においては、対照区、LF投与区ともに、同一区内の各群間に差は認められなかった。

対照区とLF投与区の比較では、2週間目、4週間目ともに、LF-S群、LF-M群、LF-F群、LF-MF群は、C-S群、C-M群、C-F群、C-MF群に対し、それぞれ、有意に低い値を示した。

**2. 化学療法剤投与試験 B (LFの同時腹腔内投与試験)** 対照群及びLF群とも実験期間中、餌の食いは良好であった。両群の間において、体重、体長に有意な差は認められなかった。

**2-1. 生残率** LFの腹腔内投与が化学療法剤

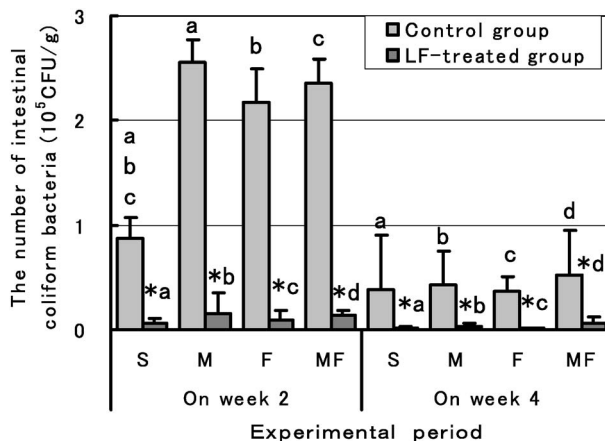


Fig. 6. Changes in the Number of Intestinal Coliform Bacteria (Enterobacteriaceae) from Goldfish Treated with Chemotherapeutic Agents

In LF-treated group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. S: saline, M: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day), F: fluorouracil (50 mg/kg BW/day), MF: methotrexate (2.5 mg/kg BW/day) and fluorouracil (15 mg/kg BW/day). Data are given as mean ± S.D., n=4. a-d: The same superscript in each group at the same period indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ). \*Significant difference to the control ( $p < 0.05$ ).

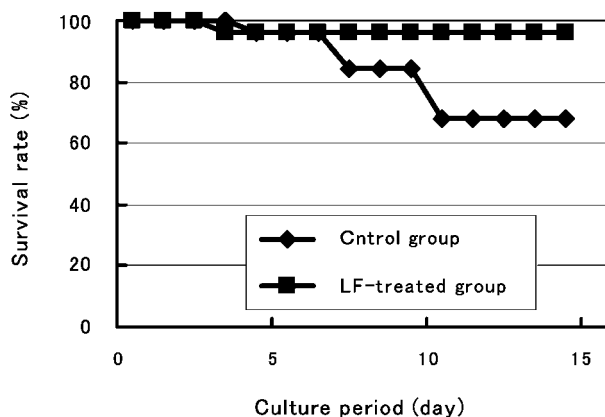


Fig. 7. Changes in the Survival Rate of Goldfish Treated with Methotrexate (MTX)

In LF-treated group, goldfish were injected intraperitoneally LF just after the agent treatment.

投与魚の生残率に及ぼす影響を Fig. 7 に示す。LF群では、2週間目までに1尾の死亡がみられたのみであった(生残率96%)。一方、対照群では、1週間目当たりから死亡個体が多く認められるようになり、2週間目における生残率は68%となった。

**2-2. 血球の計測** LFの腹腔内投与が化学療法剤投与魚の血球数に及ぼす影響を Table 1 に示す。赤血球数、リンパ球数において、対照群とLF群との間に有意な差は認められなかったが、顆粒球数はLF群で有意に高い値を示した。

**2-3. 顆粒球の貪食率及び NBT 還元活性** LF の腹腔内投与が化学療法剤投与魚の顆粒球の貪食率, NBT 還元活性に及ぼす影響を Fig. 8 に示す. 顆粒球の貪食率及び NBT 還元活性は, LF 群において有意に高かった.

**2-4. 血漿中の一価イオン濃度** 対照群及び LF 群の血漿中の Na, K, Cl の濃度 (mEq/l) はそれぞれ  $125.8 \pm 10.3$  及び  $131.0 \pm 6.8$ ,  $4.4 \pm 1.7$  及び  $3.3 \pm 1.2$ ,  $103.2 \pm 6.3$  及び  $102.0 \pm 2.3$  であった. 対照群と LF 群の間で, Na, K, Cl の値に有意な差は認められなかった.

**2-5. 組織学的観察** 腸管の上皮細胞については, 対照群には化学療法剤投与試験 A と同様の変化が認められた. 一方, LF 群では, 上記の化学療法剤投与に伴う変化は少なかった.

LF の腹腔内投与が化学療法剤投与魚の腸中部腸壁筋層の厚みに及ぼす影響を Fig. 9 に示す. LF 群における腸中部腸壁筋層の厚みは, 対照群に比べ, 有意に厚かった. また, 化学療法剤投与後 2 週間目における対照群及び LF 群の腸後部腸壁筋層の厚み ( $\mu\text{m}$ ) は,  $41.5 \pm 6.9$  及び  $44.6 \pm 5.8$  となり, 両者の間に有意な差は認められなかった.

体腎組織では, 対照群は LF 群に比べ, 糸球体の萎縮及び尿細管腔中にエオジン好性の物質が高頻度で観察された. 肝臓には, 対照群と LF 群の間に顕著な差は認められなかった.

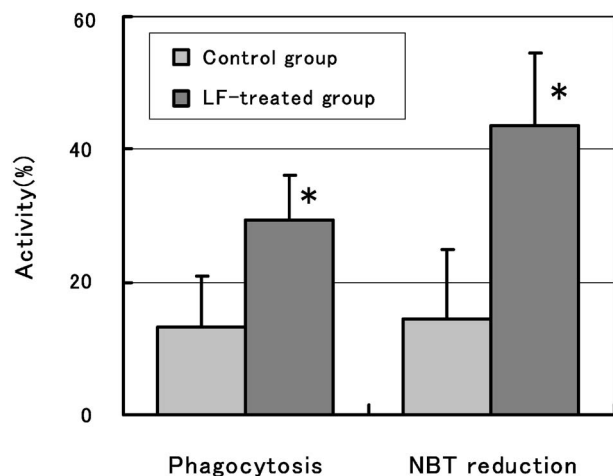


Fig. 8. Changes in the Phagocytic and NBT Reduction Activity of Granulocytes from Goldfish Treated with MTX

In LF-treated group, goldfish were injected intraperitoneally LF just after the agent treatment. Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . \*Significant difference of the control ( $p<0.05$ ).

**2-6. 腸内細菌数** LF の腹腔内投与が化学療法剤投与魚の腸内細菌数に及ぼす影響を Fig. 10 に示す. 化学療法剤投与後 2 週間目における LF 群の腸内全細菌数及び大腸菌群数は, 対照群に対し, 有意に低い値を示した.

## 考 察

MTX 及び FU は, ほ乳類の各種腫瘍や絨毛性疾患の治療等に広く使用されている化学療法剤であ

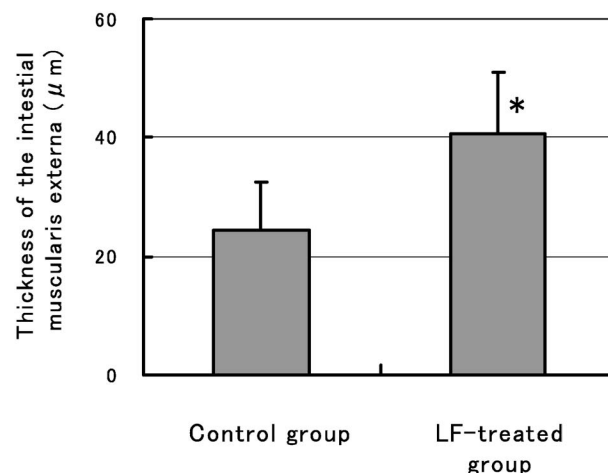


Fig. 9. Changes in the Thickness of the Intestinal Muscularis Externa from Goldfish Treated with MTX

In LF-treated group, goldfish were injected intraperitoneally LF just after the agent treatment. Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . \*Significant difference of the control ( $p<0.05$ ).

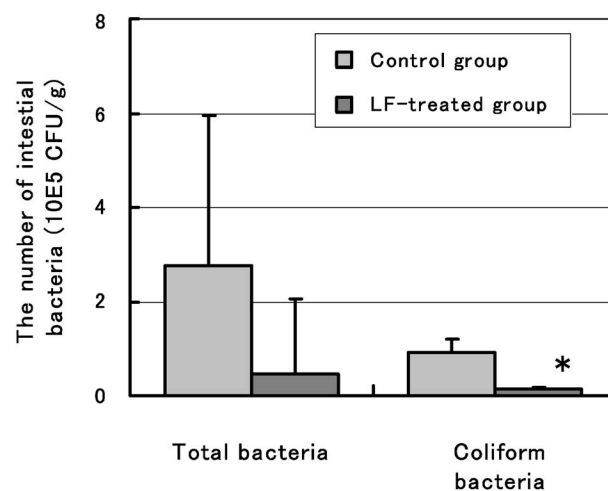


Fig. 10. Changes in the Number of Intestinal Total and Coliform Bacteria (Enterobacteriaceae) from Goldfish Treated with MTX

In LF-treated group, goldfish were injected intraperitoneally LF just after the agent treatment. Data are given as mean  $\pm$  S.D.,  $n=5$ . \*Significant difference of the control ( $p<0.05$ ).



る。両化学療法剤は分裂細胞に対し選択的に作用する。<sup>1)</sup>したがって、分裂速度の速い腸管上皮細胞や免疫細胞は強い影響（副作用）を受け、その増殖は抑制される。MTXの投与は、ほ乳類では、1-2日目に細胞性免疫活性に、<sup>3)</sup>4日目には小腸の上皮組織に<sup>4)</sup>それぞれ、最も強い傷害を与えることが報告されている。FUも、ほぼ同時期に、消化管及び口腔粘膜組織の異常等の副作用が表れる。<sup>5)</sup>そのため、本実験では、魚の代謝速度を考慮し（ほ乳類の体温36-39°Cに対し、今回使用した魚の体内温度は20°C前後であるため、 $Q_{10}=2-3$ より、化学療法剤の影響がでるまでの時間をほ乳類の4-9倍と推定した）、取り上げ時期を2週間目及び4週間目とした。また、両化学療法剤の投与量については、ヒトへの投与量を参考とした（MTX; 1.25-10 mg/kg/日; FU; 5-20 mg/kg/日）。

MTXの投与は、FU投与に比べて、高い死亡率を示すとともに、大きな生理障害を生じさせた。すなわち、MTXの投与は、血球の数や組成、血漿中の一価イオン組成（少なくとも浸透圧）等に影響を与えなかったものの、顆粒球の貪食率を低下させるとともに、腸中部の組織に以下のような著しい障害を生じさせた（2及び4週間目）：粘膜ひだの肥厚や高さの低下、粘膜上皮組織への顆粒球の浸潤、一部の陰窩は粘膜筋板に近接、腸壁筋層の厚みの著しい減少、機械的な切れ易さや脆さの増大。これらの結果は、MTXを投与したキンギョでは、非特異的な細胞性免疫活性の低下、腸中部における粘膜上皮の分裂と機能障害及び平滑筋の萎縮や薄層化による腸の保護・生体防御・運動等諸機能の障害が生じていた可能性を強く示唆する。さらに、MTX投与群の魚では、腎臓において、腎糸球体の萎縮や尿細管腔中のエオジン好性物質の存在等が認められており、糸球体腎炎に近い症状が現れている可能性がある。また、肝臓についても、光学顕微鏡による観察によって化学療法剤投与に伴う顕著な変化は認められなかったものの、一部個体では、血中のグルタミン酸ピルビン酸アミノ基転移酵素（EC 2.6.1.2 L-Alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, ALT）の活性上昇が観察されている（未発表）ことから、当該個体では軽度の肝障害が生じていた可能性が高い。なお、MTX投与群の魚では、鱗が剥がれ易くなっていたことから、体表構造にもなんらかの異常

が生じていた可能性が示唆されたが、今回は体表の組織学的観察を行っていないため、詳細は不明である。

腸内全細菌数については、化学療法剤の投与によって2週間目に、投与直前に比べて高い値がみられたものの、生理食塩水のみを投与したC-S群でも値の上昇が認められたことから、当該反応は化学療法剤投与の影響に加えて、投与操作に伴って生じたストレスが影響した結果であると考えられる。ただし、腸内の大腸菌群数は、MTXの投与により有意に増加（2週間目）した。魚類における善玉菌、悪玉菌は明らかになってはいないが、ほ乳類では腸内環境の悪化に伴って大腸菌群数が増加することが知られている<sup>20)</sup>ことから、この変化は、MTXの投与によって腸内環境の悪化が引き起こされていたことを暗示する。

一方、FUの単独投与では、腸内の全細菌数や大腸菌群数は有意に増加（2週間目）したものの、それ以外の調査項目に大きな変化は認められなかった。ほ乳類では、FUの投与により、腸管、肝臓等に重篤な副作用が現れるとされている<sup>5,21)</sup>が、今回の実験ではそれほど強い影響はみられなかった。

MTXとFUの混合投与は、MTXの単独投与時に比べ、生残率をわずかに高めた。ただし、他の調査項目については、MTX単独投与時と類似した副作用を示した。MTXとFUの混合投与は、FUの抗腫瘍効果増強のため使用される方法である。化学療法剤の混合投与により薬理動態が変化し、正常細胞に対する毒性が軽減されることが知られている。<sup>22)</sup>しかし、本研究においては、FUによる明確な副作用軽減効果を確認することはできなかった。今後、FU単独投与並びにMTXとFUの混合投与の影響（副作用の機序や軽減法）については、詳細な検討が必要である。

MTX及びFUの投与は、魚においても様々な副作用を誘起した。ただし、その発現時期については、当初の予測とは異なり、生体防御活性、腸管組織とともに2週間目からその影響は現れ、後者については影響が長く続く傾向にあった。また、化学療法剤を投与した対照群のキンギョには死亡個体が認められた。このことは、当該薬剤の魚への投与時には、ほ乳類に使用する場合に比べて、用量を減らす必要性のあることを示す。したがって、実際に化学

療法剤を魚の腫瘍治療に用いる場合には、魚種による感受性差や代謝速度等に関する検討が必要となる。

上述したように、化学療法剤の投与は様々な副作用を誘起した。特に、MTX 投与魚に認められた腸壁筋層の厚みの低下、腸管の脆さ・切れ易さ、腸内での大腸菌群数の増加、腎臓における組織異常、鱗の剥がれ易さ（体表構造の異常）等は、ほ乳類での報告もなく、初めての所見であるが、軽減すべき重要な事象である。

LF は、乳汁を含め分泌液中に含まれる、鉄結合性蛋白質であり、それ自体が静菌や抗菌活性を示すほか、1) 体内の非特異的生体防御機構を賦活化<sup>23,24)</sup>するとともに、2) 腸管内における *Enterobacteriaceae* の過剰増殖を抑制する（腸内環境を安定化させる）ことにより腸内細菌の体内への侵入を抑えること<sup>20,25)</sup>や、3) 化学療法剤を投与したマウスの細胞性及び液性免疫反応の抑制<sup>16)</sup>や小腸上皮細胞の障害を軽減すること<sup>17)</sup>等が報告されている。本研究の結果、LF の事前の経口投与は、化学療法剤を投与したキンギョの顆粒球の数、貪食率や NBT 還元活性を高く保つとともに、腸管内の全細菌数や大腸菌群数を抑制したり、腸中部の粘膜ひだの肥厚や高さの低下、顆粒球の粘膜上皮組織への浸潤等から予測される腸の各種機能障害を軽減したりすることが判った。すなわち、LF は、魚においても、上記 1), 2), 3) のすべての項目で、同様のポジティブ効果を示すことが明らかとなった（但し、今回の実験では液性免疫反応については検討していない）。加えて、従来の報告にはなかった化学療法剤による副作用の軽減効果、すなわち 4) 腎臓の障害軽減、5) 腸壁筋層の厚みの低下、腸管の脆さ・切れ易さ（平滑筋組織の障害）、6) 鱗の剥がれ易さ等に対して著しい改善効果を示すことも判った。

LF の生体防御効果の発現機序としては、(1) 消化管から吸収された LF あるいはその分解物による標的器官や細胞への直接作用、(2) 腸管内における静菌作用に伴う直接作用、(3) 腸内細菌の効用に伴う腸管免疫組織の活性化を介した間接作用、という 3 通りが考えられる。ただし、(2) と (3) は、腸内環境の安定化に負うところが多いという点では、似かよっている。

LF はそれ自身、強い抗菌活性を有するものの、

経口投与の場合、分子量約 8 万の LF 分子がそのままの状態では体内に容易に吸収され、各種作用を引き起こすとは考え難い。ただし、ウサギの抗牛 LF 血清から精製した IgG 分画を用いた ELISA のサンドイッチ法による測定では、牛 LF を投与したマダイの体表粘液から、未投与魚に比べて高い濃度の LF が検出されたこと<sup>23)</sup>から、経口投与した LF あるいは（上記抗体との反応部位を保持した）LF 分解物が体内に吸収された可能性を否定することはできない。加えて、顆粒球は LF を放出し、マクロファージの機能調節に関与しているとの報告がある。<sup>23)</sup>したがって、(1) については、魚においても、体内に吸収された牛の LF あるいは LF 分解物、及び牛 LF の投与により血中に増加した顆粒球が放出した LF が、標的器官や細胞に直接作用を及ぼした可能性はある。

LF の投与がマウスの消化管内において、*Enterobacteriaceae* の増殖を抑制したり、経口的に投与した *Clostridium* sp. の腸内増殖を抑制したりすることが報告されている。<sup>20,25)</sup>したがって、(2) については、魚においても、LF による腸内細菌の静菌作用の結果として、腸内細菌の腸管から臓器への侵入が著しく抑えられていた可能性が高い。ただし、LF を投与した魚では、化学療法剤の投与下でも、腸上皮組織の異常は少なく、腸中部における腸壁筋層の厚み減少もなく健常時に近い状態に保たれていたことなどから、腸内細菌の侵入阻止には、LF の腸壁保護効果、すなわち腸の物理的及び生物的障壁保守・増強作用も重要な役割を担っていたことが判る。

ほ乳類では、LF の投与が数種のサイトカイン産生を亢進させることが報告されている。<sup>26)</sup>しかも、このサイトカイン産生の亢進には小腸の上皮細胞が深く係わっており、そこで産生されるインターロイキン (IL)-15 や IL-18 というサイトカインはある種の T 細胞やナチュラルキラー (NK) 細胞の活性を高め、インターフェロンの産生を更新させることが知られている。<sup>26)</sup>魚類のサイトカイン産生やその役割、調節機構に関する研究は極めて少なく、<sup>27-29)</sup> 小腸の上皮細胞由来のサイトカインに関する情報も見当たらない。しかし、魚においても、LF の投与が NK 細胞の活性を高めることが報告されている。<sup>30)</sup>したがって、(3) についても、魚にお

いて、LFが腸管内の環境を安定化させるとともに、サイトカイン産生細胞を刺激し、生体防御活性を上昇させることで、化学療法剤投与に伴う生体防御活性の低下軽減あるいは補充に機能していたと考えることができる。

LFの腸管粘膜組織の障害軽減効果については、ラットにおいて、細胞増殖を刺激する作用を有するグルカゴン様ペプチド-2 (GLP-2)の分泌抑制を介して細胞の分裂速度を低下させることで、分裂速度の速い腸管上皮細胞等に対する化学療法剤の選択的障害を軽減させているとの報告がある。<sup>4)</sup> また、LFは腎組織に炎症性障害を生じさせるプロスタグランジン (PG) E2の分泌抑制作用<sup>31)</sup>や活性酸素除去活性<sup>32)</sup>を有することが報告されている。したがって、魚においても、LFが同様の作用機序により腸管粘膜組織や腎組織の障害軽減に働いているものと考えられる。

しかしながら、今回の実験でみつかったLFによる腸壁筋層の障害軽減や鱗の剥がれ易さの改善等については、今回調査した化学療法剤投与に伴う発生機序とともに、その作用機序は不明である。MTXのような化学療法剤の投与が腸管平滑筋の萎縮や薄層化を引き起こすとすれば、その影響は腸管中部に留まらず、(今回の調査では腸管後部に著しい障害は認められなかったが)消化管各部や血管壁等の全身に及ぶ可能性があることから、LFの影響軽減効果の機序については至急の調査が必要である。

ところで、今回の試験では、LFの同時腹腔内投与によっても同様の効果の得られることが判った。LFの事前投与のみでなく、同時投与によって化学療法剤の副作用を軽減できることは、LFのより実践的な使用につながり、今後、高級観賞魚や絶滅危惧種への化学療法剤による腫瘍治療等への応用も期待できる。

ただし、LFの腹腔内投与による化学療法剤の副作用軽減効果については、経口投与時とは作用伝播の方向や効果発現に至るまでの期間が大きく異なった。すなわち、牛LFは大型の異種蛋白質でありながら、体内に直接投与されても魚に過度の炎症反応を引き起こさなかったばかりか、経口時とは逆の方向(腹腔内から腸管壁や腸管内部等)への作用伝播を含め、効率よく上記軽減効果を表した。腹腔内に投与されたLFあるいはその分解物が直接的に、あ

るいは免疫担当細胞内、腸管壁や腸管内部等に取り込まれることによって間接的に、同様の作用を惹起した可能性はある。しかし、このようなLFの効果及びその発現機序については、これまで報告例がなく、今後、解明に至る詳細な研究実施が急がれる。

今回使用した化学療法剤であるMTXとFUは、ともに代謝拮抗剤(前者は葉酸拮抗剤、後者はピリミジン拮抗剤)であり、細胞中に取り込まれて核酸の代謝を阻害することにより癌細胞の分裂を防ぐものである。<sup>33)</sup> LFについては、これらの作用を阻害するあるいは作用と拮抗するような構造や働きはこれまで報告されていない<sup>34-38)</sup>ことから、LFの投与が当該化学療法剤の抗腫瘍性を消失あるいは軽減させることはないと考えられる。ただし、今後、腫瘍を持つ生物を対象として、当該化学療法剤や作用機序の異なった化学療法剤とLFの複合投与試験を実施し、上記問題について、その真偽を明らかにしていく必要があると考える。

最後に、今回の実験では、化学療法剤投与後2週間目及び4週間目の生理機能変化を指標として、その副作用を調べるとともに、LF投与による副作用軽減効果を調査した。しかしながら、化学療法剤の副作用にはより短期間に起こるものもあると考えられることから、今後、化学療法剤処理後1週間以内に生じる副作用やLFによるその軽減効果についての調査も必要であろう。

## REFERENCES

- 1) Nitta K., *Yuuki Gousei Kagaku Kyokai Shi*, **49**, 968-979 (1991).
- 2) Yamauchi A., Ichimiya T., Inoue K., Taguchi Y., Matsunaga N., Higuchi S., Ohdo S., Koyanagi S., Fukagawa T., Aramaki H., *J. Pharmacol. Sci.*, **99**, 335-341 (2005).
- 3) Artym J., Zimecki M., Kruzel M. L., *Anticancer Res.*, **24**, 3831-3836 (2004).
- 4) van't Land B., van Beek N. M. A., van Den Berg J. J. M., M'rabet L., *Dig. Dis. Sci.*, **49**, 425-433 (2004).
- 5) Yamamitsu S., Hirada K., Shirasaka T., *Hematol. Oncol.*, **49**, 485-490 (2004).
- 6) Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J., *Infect. Immun.*, **28**, 983-989 (1980).
- 7) van der Strate B. W., Beljaars L., Molema G., Harmsen M. C., Merjer D. K., *Antiviral Res.*,

- 52, 225–239 (2001).
- 8) Wakabayashi H., Yamauchi K., Taraguchi S., Hayasawa H., Uchida K., Yamaguchi H., *J. Antimicrob. Chemother.*, **46**, 595–601 (2000).
  - 9) Tanaka T., Omata Y., Saito A., Igarashi I., Suzuki N., Shimazaki K., *J. Vet. Med. Sci.*, **58**, 61–65 (1996).
  - 10) Kakuta I., Kurokura H., *Fish Pathol.*, **30**, 289–290 (1995).
  - 11) Lu L., Hangoe G., Oliff A., Chen L. T., Shen R.-N., Broxmeyer H. E., *Cancer Res*, **47**, 4184–4188 (1987).
  - 12) Bezault J., Bhimani R., Wiprovnick J., Furmanski P., *Cancer Res.*, **54**, 2310–2312 (1994).
  - 13) Yoo Y., Watanabe S., Watanabe R., Hata K., Shimazaki K., Azuma I., *Jpn. J. Cancer Res.*, **40**, 257–262 (1997).
  - 14) Sekine K., Watanabe E., Nakamura J., Takasuka N., Kim D. J., Asamoto M., Krutovskikh V., Baba-Toriyama H., Ota T., Moore M. A., Masuda M., Sugimoto H., Nishino H., Kakizoe T., Tsuda H., *Jpn. Cancer Res.*, **88**, 523–526 (1997).
  - 15) Artym J., Zimecki M., Kruzel M. L., *Med. Sic. Monit.*, **10**, BR 84–89 (2004).
  - 16) Bartal L., Padeh S., Passwell J. H., *Pediatr. Res.*, **21**, 54–57 (1987).
  - 17) Ito M., Fujimaki Y., Hatai Y., Isoda M., *Jpn. Vet. Stockbreeding Univ. Res. Rep.*, **33**, 151–155 (1984).
  - 18) Okihiro M. S., Groff J. M., Hinton D. E., Whipple J. A., *Cancer Res.*, **53**, 1761–1769 (1993).
  - 19) Vogelbein W. K., Van Veld P. A., Huggett R. J., Fourin J. W., *Cancer Res.*, **50**, 5978–5986 (1990).
  - 20) Ogata T., Terao S., Hayasawa H., *Milk Sci.*, **46**, 233–238 (1997).
  - 21) Hirano T., Miyazaki K., *Gekkan Yakuji*, **40**, 867–872 (1993).
  - 22) Sasaki T., *Jpn. J. Cancer Chem.*, **23**, 1907–1910 (1996).
  - 23) Lima M. F., Kierszenbaum F., *J. Immunol.*, **139**, 1647–1651 (1987).
  - 24) Kakuta I., Kurokura T., Nakamura H., Yamauchi K., *Suisanzoshoku*, **44**, 197–202 (1996).
  - 25) Crouch S. P., Slator K. J., Fletcher J., *Blood*, **80**, 235–240 (1992).
  - 26) Okamura H., Kashiwamura S., Tsutsui H., Yoshimoto T., Nakanishi K., *Curr. Opin. Immunol.*, **10**, 259–264 (1998).
  - 27) Kono T., Fuiki K., Nakano M., Yano T., Endo M., Sakai M., *J. Interferon Cytokine Res.*, **22**, 413–419 (2002).
  - 28) Wang T., Holland J. W., Secombes C. J., Bols N., *FEBS J.*, **272**, 1136–1147 (2005).
  - 29) Wen Yi., Shao J., Xiang L., Fang W., *Comp. Biochem. Physiol.*, **144B**, 159–166 (2006).
  - 30) Kakuta I., “Lactoferrin: Structure, Function and Applications,” eds. by Shimazaki K., Tsuda H., Tomita M., Kuwata T., Perraudin J. P., Elsevier, Amsterdam, 2000, pp. 429–441.
  - 31) Bartal L., Pedeh S., Passwell J. H., *Pediatr. Res*, **21**, 54–57 (1987).
  - 32) Cohen M. S., Mao J., Rasmussen G. T., Serody J. S., Britigan B. E., *J. Infect. Dis.*, **166**, 1375–1378 (1992).
  - 33) Chemotherapy drugs, <http://www.chemocare.com/> (Fluorouracil; <http://www.chemocare.com/bio/fluorouracil.asp>, Mrthotrexate; <http://www.chemocare.com/bio/methotrexate.asp>)
  - 34) Shimazaki K., Kiyasawa I., *Biosci. Ind.*, **151**, 25–27 (1993).
  - 35) Levary P. F., Viljoen M., *Haematologica*, **80**, 252–267 (1995).
  - 36) Kakuta I., *Bioindustry*, **15**, 23–33 (1998).
  - 37) Harada E., *Mansei toutsu*, **23**, 9–23 (2004).
  - 38) Wakabayashi H., Takakura N., Yamauchi K., Tamura Y., *Clin. Vaccine Immunol.*, **13**, 239–245 (2006).