

## 1,2-ジメチルヒドラジンによるキンギョ腸への前がん病変誘発及び 5-フルオロウラシルとラクトフェリンの発がん抑制効果

高瀬清美, 角田 出\*

### Chemopreventive Effects of 5-Fluorouracil and Lactoferrin on Goldfish Intestinal Carcinogenesis Induced by 1,2-Dimethylhydrazine

Kiyomi TAKASE and Izuru KAKUTA\*

Department of Biological Engineering, Senshu University of Ishinomaki,  
1 Shinmito, Minamizakai, Ishinomaki, Miyagi 986-8580, Japan

(Received November 24, 2010; Accepted July 22, 2011; Published online July 25, 2011)

The present study was carried out to examine the chemopreventive effects of 5-fluorouracil (5-FU) and lactoferrin (LF) on goldfish intestinal carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH). DMH was given to fish by intraperitoneal injection in a dosage of 15 mg/kg body weight once a week for 6 weeks. Eight weeks after the initial DMH injection, fish were randomly divided into 2 groups, control and LF-treated groups. Control fish fed a commercial diet. LF-treated fish fed a commercial diet with bovine lactoferrin (oral administration at 200 mg/kg body weight/day). Ten weeks after the initial DMH injection, each was divided into 2 groups, saline- and 5-FU-treated groups. Physiological saline for freshwater fish (0.75% NaCl solution) in the saline-treated fish and 5-FU dissolved in 0.75% NaCl solution in the 5-FU-treated (75 mg/kg body weight) fish were injected intramuscularly three times every other day, respectively. The mean number of precancer cell foci (PCF) per intestine was 2.7 in DMH treated fish. PCF showed broader distribution in the entire intestine derived from DMH-treated fish. LF-only-treatment has no effect on the number of PCF. Mean number of PCF in 5-FU-only-treated fish decreased in comparison with that of the saline-treated control group, though no statistically significant reduction in PCF was found. But if 5-FU treatment was added to LF pretreatment, a statistically significant reduction in the number of PCF was observed. Pretreatment with LF for 2 weeks also reduced the deleterious side effects of 5-FU.

**Key words**—5-fluorouracil (5-FU); lactoferrin (LF); precancer crypt foci (PCF); 1,2-dimethylhydroazine (DMH); biochemical change; side effect

## 緒 言

腫瘍は、ヒトのみならず、愛玩動物でも主要な死因である。魚類においても、腫瘍形成が卵巣、皮膚、肝臓等で認められている。<sup>1-3)</sup> ヒトや愛玩動物における腫瘍治療は、化学療法や切除療法、放射線療法等により行われている。化学療法は局所治療ができない散在型の腫瘍の治療や微細な腫瘍細胞及びその関連物質の根絶に用いられるほか、腫瘍の縮小や延命効果を目的とした治療にも重要な役割を果たす。<sup>4-6)</sup> また近年では、早期腫瘍に対する切除療法や局所型の腫瘍に対する放射線療法等の根治率の向上にも寄与することがわかり注目を集めている。

しかし、化学療法剤の投与には副作用を伴うため、投与量等を制限する必要がある。十分な効果を得ることができない場合も多い。それゆえ、化学療法剤の投与により引き起こされる副作用を軽減する目的で、種々の支持療法が確立されてきた。しかし、その効果はいまだ不十分である場合も多く、副作用軽減法の一層の向上・発展が望まれている。

また、平成17年の「動物の愛護及び管理に関する法律」の改正に伴い、ほ乳類を用いた動物実験では、その使用数や実験内容等は制約され始めている。その一方で、魚類は実験動物としての規制は受けていない。加えて、メダカやゼブラフィッシュでは、多くの突然変異体が見つかっており、ヒトの疾患モデルとしても期待されている。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。上

石巻専修大学理工学部生物生産工学科

\*e-mail: kakuta@isenshu-u.ac.jp

記の点を考慮すると、魚類は実験動物としての利用価値は高く、哺乳類に代わる実験動物としての重要性は今後ますます高まるといっても過言ではないであろう。

われわれは、これまで魚類を対象に各種化学療法剤の影響を調べるとともに、それらの副作用を軽減し得る物質の探索を行い、ラクトフェリン (LF) が化学療法剤の副作用軽減に有効であることを報告した。<sup>7)</sup>しかしながら、これまでの実験は、健常な魚に対して化学療法剤を投与し、その副作用を調べるとともに、LF による同副作用の軽減効果を検討するものであった。そのため、LF の投与が化学療法剤の副作用を軽減することはわかっていても、その投与が化学療法剤の抗腫瘍効果に及ぼす影響を及ぼすかについては不明であった。LF の投与により化学療法剤の副作用が大きく軽減されたとしても、化学療法剤の主作用である抗腫瘍効果までも抑制されたとなると、本末転倒になりかねない。すなわち、LF の併用投与を化学療法剤の副作用軽減法 (化学療法剤投与時の救済療法) として利用するためには、実際に腫瘍を持つ、あるいは形成させた魚を対象とした、化学療法剤と LF の併用投与効果の検証が必須である。

ほ乳類に対して、化学発がん剤である 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH) やその代謝産物であるアゾキシメタン (AOM) を投与すると、腸管内に前がん病変である異常陰窩巣 (Aberrant crypt foci: ACF) が発生する。<sup>8-19)</sup>そこで、本報では、DMH を投与することによって腸管に前がん病変を誘起した魚に、5-フルオロウラシル (5-FU) 及び LF を単独又は併用投与することによって、LF が 5-FU の抗腫瘍効果を低下させることなく、その副作用のみを軽減することができるか否かを検討した。ただし、魚類の腸は、ほ乳動物のように明確な区分がなされておらず、一般には前部・後部、頭部・前部・中部・後部あるいは前部・中部・後部等と大まかな区分がなされていない。<sup>20,21)</sup>また、魚類の腸においては陰窩の存在が確定していない。それゆえ、ここでは、ほ乳類において腸管前がん病変の生物学的指標として用いられている ACF に代わり、前がん病変細胞巣 (Precancer cell foci; PCF) と表記し、その数を以って 5-FU による治療効果の指標となし、DMH を用いて魚類の腸管に PCF の形成を誘導後、LF が

5-FU の投与によってもたらされる PCF 数の減少 (抗腫瘍) 効果を抑えることなく、5-FU の副作用を軽減できるか否かを調べた。

## 材料及び方法

**1. 供試魚** 供試魚として、業者から購入し、前報<sup>7)</sup>に述べた方法により予備飼育した、体重 20 g 前後のキンギョ *Carassius auratus* 200 尾を用いた。

**2. 前がん病変誘起処理** キンギョには市販のキンギョ用飼料を毎日体重の 2% 量投与し 6 週間飼育した。同飼育期間中、腸管前がん病変誘起物質である 1,2-ジメチルヒドラジン (DMH; シグマ社製) を 0.75% 生理食塩水に溶解し、1 週間に 1 回の頻度で、6 週間連続して腹腔内投与した。DMH の一回あたりの投与量は 15 mg/kg 体重とした。

**3. DHM 処理魚に対する化学療法剤 5-フルオロウラシル (5-FU) とラクトフェリン (LF) の投与試験** 6 週間の前がん病変誘起処理期間の後、さらに 2 週間を経た時点、すなわち、前がん病変処理開始から 8 週間後に、同処理を経たキンギョ 80 尾を無作為に取り上げ、20 尾ずつ 4 つの水槽に分け、それぞれ、水温を 20°C に調節した容量 60 l の循環濾過式水槽に収容した。2 つの水槽に前述の市販飼料 (対照区: C 区)、残り 2 つの水槽には同飼料に牛由来天然ラクトフェリン (LF: 15% 鉄結合型: 森永乳業株式会社製) を 1% になるように添加した餌 (LF 投与区) を、それぞれ、毎日、体重の 2% 量を投与し 6 週間飼育した。LF の日間投与量は 200 mg/kg 体重となる。

上記飼育開始から 2 週間を経過した時点、すなわち前がん病変誘起処理開始から 10 週間後に、対照区と LF 投与区のキンギョのそれぞれ一方に 0.75% 生理食塩水を、他方には化学療法剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) を溶解した 0.75% 生理食塩水を、それぞれ筋肉内に投与して (市販の餌で飼育し、生理食塩水を投与した群; C-S 群, LF 添加餌料で飼育し、生理食塩水を投与した群; LF-S 群, 市販の餌で飼育し、5-FU を投与した群; C-FU 群, LF 入りの餌で飼育し、5-FU を投与した群; LF-FU 群), 4 週間の飼育試験を行った。生理食塩水あるいは生理食塩水中に懸濁した 5-FU の投与は、1 日おきに 3 回行った。なお、1 回あたりの 5-FU 投与量は 75 mg/kg 体重とした。

#### 4. 生理指標の調査

**4-1. 血球数の計測** 化学療法剤の投与開始から2週間後及び4週間後に、各群より5尾の魚を取り上げ、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5,000個あたりの顆粒球数とリンパ球数を計測した。

**4-2. 顆粒球の貪食率及びニトロテトラゾリウム(NBT)還元活性の測定** 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後、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、風乾した後、メイグリュンワルド・ギムザ染色を施して検鏡した。貪食率は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。

顆粒球のNBT還元活性は以下のようにして測定した。ニトロブルーテトラゾリウム(和光純薬社製)が2 mg/mlの濃度になるように0.75% NaClを含む1/30モルのリン酸緩衝液(pH 7.2)で溶解した液と全血を、2:1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し、スライドグラス上で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)を調べることにより求めた。

**4-3. 腸管に形成された前がん病変細胞巣(PCF)数の計測** 採血を終えた個体より腸管全体を採取し、中性緩衝10%ホルマリン溶液で24時間固定した。固定した腸管は0.05%メチレンブルー溶液で染色後、実体顕微鏡下で腸管全体の粘膜組織に形成された前がん病変細胞巣(PCF)数を計測した。

**5. 統計** 各種生理指標の結果については、二元配置分散分析により解析し、交互作用のあったものはTukeyの検定にかけて比較を行い、 $p < 0.05$ 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( $n=5$ )で表した。

## 結 果

**1. 前がん病変誘起(ジメチルヒドラジン:DMH)処理に伴う斃死と行動変化** DMH処理に伴い、5週間後から死亡個体が見られるようになり、6週間の同処理終了時の生残率は約60%であった。その後、LFと化学療法剤の併用投与試験を始めるまでの2週間に死亡する魚は認められなかった(後述したごとく、その後の化学療法剤とLFの併用投与試験でも、生理食塩水を投与したC-S群及びLF-S群に死亡魚は認められていない)。また、生残魚については、餌食い行動は良好で、魚の外見や行動にも異常は認められなかった。

### 2. DMH処理魚に対する化学療法剤5-FUとLFの投与試験

**2-1. 生残率** 5-FU及びLFの単独あるいは併用投与がDMH処理魚の生残率に及ぼす影響をFig. 1に示す。5-FU投与試験の開始から4週間後まで、生理食塩水を投与したC-S群及びLF-S群に死亡個体は認められなかった。C-FU群では、5-FU投与の8日後から死亡する個体がはじめ、4週間の試験期間中に3尾の魚が死亡した(4週間後の生残率は約80%)。一方、LF-FU群では、5-FU投与の12日後に1尾の魚が死亡したのみ(4週間後の生残率は約95%)であった。

**2-2. 血球組成** 5-FU及びLFの単独あるいは併用投与がDMH処理魚の血球組成に及ぼす影響をTable 1に示す。赤血球数及びリンパ球数につい

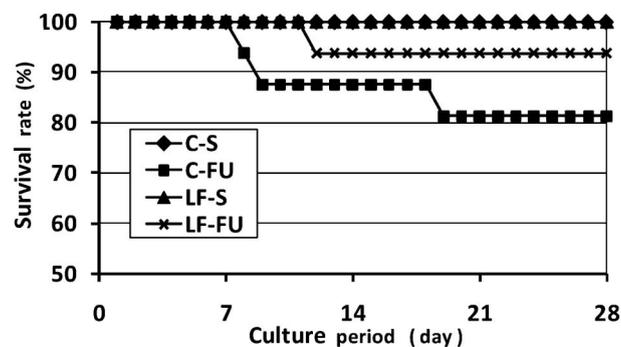


Fig. 1. Changes in the Survival Rate of Goldfish Treated with a Chemotherapeutic Agent, 5-Fluorouracil (5-FU: 75 mg/kg BW/day)

In LF-group, goldfish were fed LF for 3 weeks before the agent treatment. C-S=control with saline, C-FU=control with FU, LF-S=lactoferrin (200 mg/kg BW/day) with saline, LF-FU=lactoferrin (200 mg/kg BW/day) with 5-FU.

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

	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> )
On week 2			
Control group			
C-S*	1.24 $\pm$ 0.11	4.68 $\pm$ 0.46 a	2.37 $\pm$ 0.32 a
C-FU**	1.22 $\pm$ 0.11	3.95 $\pm$ 0.22 ab	2.27 $\pm$ 0.34 b
Lactoferrin-treated group			
LF-S	1.32 $\pm$ 0.06	5.29 $\pm$ 0.83 b	2.63 $\pm$ 0.47
LF-FU	1.23 $\pm$ 0.07	5.98 $\pm$ 1.02 a	2.73 $\pm$ 0.28 ab
On week 4			
Control group			
C-S	1.23 $\pm$ 0.06	5.04 $\pm$ 0.48 a	2.10 $\pm$ 0.42 ab
C-FU	1.29 $\pm$ 0.05	4.28 $\pm$ 0.53 abc	2.36 $\pm$ 0.28
Lactoferrin-treated group			
LF-S	1.28 $\pm$ 0.06	5.47 $\pm$ 0.62 b	2.78 $\pm$ 0.43 a
LF-FU	1.27 $\pm$ 0.09	5.78 $\pm$ 1.11 c	2.75 $\pm$ 0.52 b

5-Fluorouracil (5-FU), a chemotherapeutic agent, was administered intramuscularly three times every other day. In this experiment, goldfish were administered orally lactoferrin (LF) for 3 weeks before the agent treatment. \* S=saline. \*\* FU=5-fluorouracil (75 mg/kg BW/day). Data are given as mean $\pm$ S.D.,  $n=5$ . a-c; The same superscript in the same period indicates a significant difference ( $p<0.05$ ).

ては、5-FU 投与から 2 週間後、4 週間後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。顆粒球数では、5-FU 投与から 2 週間後、4 週間後ともに、C-FU 群は C-S 群に対し有意に低い値を示したが、LF-S 群と C-S 群の間及び LF-FU 群と LF-S 群の間に有意な差は認められなかった。なお、LF-FU 群は C-FU 群に対し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** 5-FU 及び LF の単独あるいは併用投与が DMH 処理魚の顆粒球貪食率に及ぼす影響を Fig. 2 に示す。5-FU 投与試験開始から 2 週間後では、LF-S 群は C-S 群に対して、LF-FU 群は C-FU 群に対して、それぞれ有意に高い値を示した。ただし、C-S 群と C-FU 群及び LF-S 群と LF-FU 群の間に有意な差は認められなかった。5-FU 投与試験開始から 4 週間後では、C-FU 群は C-S 群に対して有意に低い値を示したが、LF-FU 群と LF-S 群との間には有意な差は認められなかった。なお、LF-FU 群は C-FU 群に対して有意に高い値であった。

5-FU 及び LF の単独あるいは併用投与が DMH 処理魚の顆粒球 NBT 還元活性に及ぼす影響を Fig. 3 に示す。5-FU 投与開始から 2 週間後、4 週間後ともに、C-FU 群は C-S 群に対し有意に低い値を示したが、LF-FU 群と LF-S 群の間には有意差は認めら

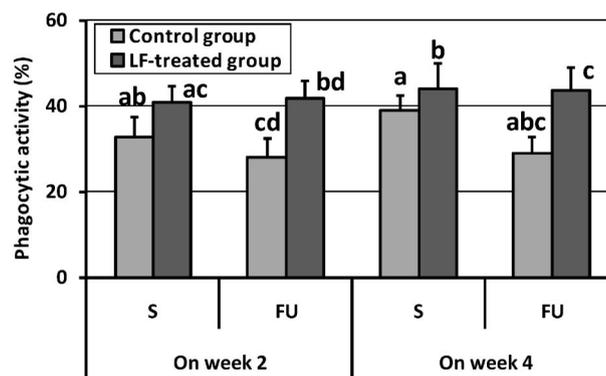


Fig. 2. Changes in the Phagocytic Activity of Granulocytes from Goldfish Treated with a Chemotherapeutic Agent, 5-Fluorouracil (5-FU: 75 mg/kg BW/day)

In LF-group, goldfish were fed LF (200 mg/kg BW/day) for 3 weeks before the agent treatment. S=fish injected intramuscularly saline, FU=fish injected intramuscularly 5-FU. Data are given as mean $\pm$ S.D.,  $n=5$ . a-d; The same superscript in the same period indicates a significant difference ( $p<0.05$ ).

れなかった。また、LF-S 群は C-S 群に対し、LF-FU 群は C-FU 群に対し、それぞれ、有意に高い値を示した。

**2-4. 前がん病変細胞巣 (PCF) 数** Figure 4 に、PCF を形成した腸管粘膜組織の実体顕微鏡像を示す。DMH 処理魚では、腸管粘膜にみられる規則正しい畝構造内に、直径 1 mm 程度の PCF 形成部位が散在していた。形成された PCF は、肉眼的

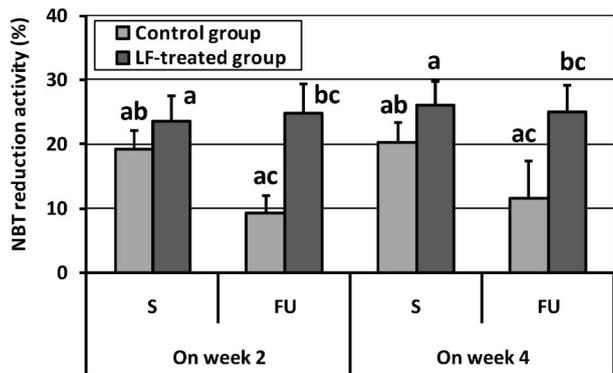


Fig. 3. Changes in the NBT Reduction Activity of Granulocytes from Goldfish Treated with a Chemotherapeutic Agent, 5-Fluorouracil (5-FU: 75 mg/kg BW/day) In LF-group, goldfish were fed LF (200 mg/kg BW/day) for 3 weeks before the agent treatment. S=fish injected intramuscularly saline, FU=fish injected intramuscularly 5-FU, Data are given as mean ± S.D., n=5. a-c; The same superscript in the same period indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

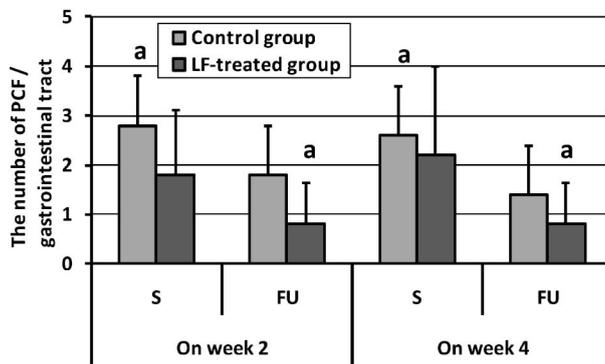


Fig. 5. Changes in the Number of Precancer Cell Foci (PCF) Formed in the Gastrointestine of Goldfish Treated with a Chemotherapeutic Agent, 5-Fluorouracil (5-FU: 75 mg/kg BW/day) In LF-group, goldfish were fed LF (200 mg/kg BW/day) for 3 weeks before the agent treatment. S=fish injected intramuscularly saline, FU=fish injected intramuscularly 5-FU, Data are given as mean ± S.D., n=5. a; in the same period indicates a significant difference ( $p < 0.05$ ).

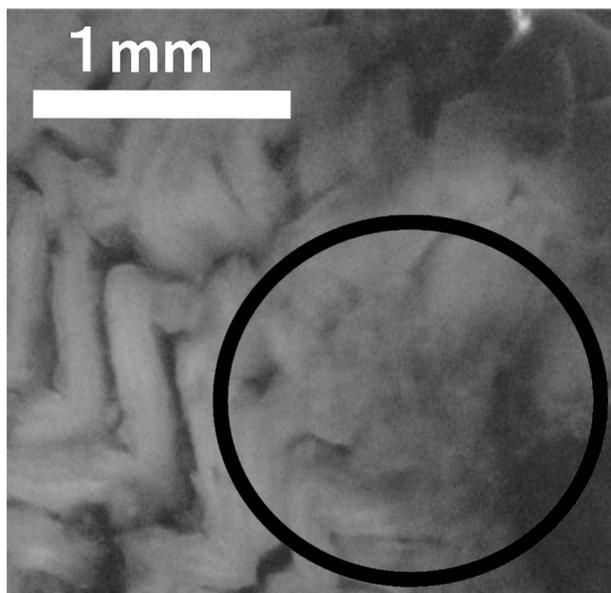


Fig. 4. Precancer Cell Foci (PCF: circled) Formed in the Gastrointestine of Goldfish Treated with a Carcinogen, 1,2-Dimethylhydrazine (DMH) DMH (15 mg/kg BW) was administered intraperitoneally once a week for 6 weeks.

に隆起として認められるものがほとんどであり、陥凹状のものは認められなかった。なお、複数個の PCF が認められる場合も、その部位別分布に偏りはなく、腸全体に散在していた。

5-FU 及び LF の単独あるいは併用投与が DMH 処理魚の腸管全面積あたりの PCF 数に及ぼす影響を Fig. 5 に示す。試験開始から 2 週間後及び 4 週

間後ともに、C-S 群における腸管全面積あたりの平均 PCF 数は 2.7 前後であった。腸管全面積あたりの平均 PCF 数は、5-FU 投与から 2 週間後及び 4 週間後ともに、C-FU 群は C-S 群に対して、また、LF-FU 群は LF-S 群に対して、それぞれ大きく減少した (C-FU 群は C-S 群の約 60%、LF-FU 群は LF-S 群の約 50% に減少)。ただし、各群における個体差が大きく、これらの数値については、両群間に統計的な有意差は認められなかった。一方、LF-FU 群における腸管内 PCF 数は、5-FU 投与開始から 2 週間後及び 4 週間後ともに、C-S 群に比べて有意に減少 (平均値では約 30% に減少) した。

### 考 察

1. 前がん病変誘起 (DMH) 処理の影響 マウスやラット等ほ乳類の皮下や腹腔内に、DMH やその代謝物である AOM を、週 1-2 回の頻度で数-10 週間程度投与すると、腸管内に ACF が発生する。<sup>8-19)</sup> ほ乳類に DMH を投与して、発がんの過程やその促進・抑制に係わる因子の調査を行う場合、1 回あたりの DMH 投与量を 15-40 mg/kg 体重に設定することが多い。<sup>8-19)</sup> そこで、本実験でも、キンギョの腹腔内に、週 1 回の頻度で 6 週間にわたり、15 mg/kg 体重量の DMH を注射し、実験魚の腸に PCF の形成を誘起した。

DMH 処理に伴うマウスやラットの死亡率や腸内に形成される ACF の数については、以下のような

報告例がある：①マウスの皮下に、5-15 mg/kg 体重 (1 週目, 2 週目, 3 週目以降, それぞれ, 5, 10, 15 mg/kg 体重) の DMH を, 週 1 回の頻度で, 6 週間投与した場合の死亡率は 40%, ACF 数は 12 週間後で 7 個, 同 42 週間後で 16 個前後。<sup>18)</sup> ②マウスの皮下に, 20 mg/kg 体重の DMH を, 週 1 回の頻度で, 6 週間にわたり投与した場合, 8 週間後の ACF 数は 25 個前後。<sup>12)</sup> ③ラットの臀部皮下に, 40 mg/kg 体重の DMH を, 週 1 回の頻度で, 10 週間にわたり投与した場合の死亡率は 10% 程度。<sup>10)</sup> ④ラットの皮下に, 20 mg/kg 体重の DMH を, 週 1 回の頻度で, 5 週間投与した場合, 10-30 週間後の ACF 数は 300-350 個。<sup>14)</sup> ⑤ラットの皮下に, 20 mg/kg 体重の DMH を, 週 2 回の頻度で, 3 週間投与した場合, 12 週間後の ACF 数は数十個。<sup>15)</sup> キンギョを用いた今回の試験では, 15 mg/kg 体重の DMH を, 週 1 回の頻度で, 6 週間投与したところ, 14 週間の死亡率は約 40% となり, ほ乳類での上記報告値と比べて, 顕著な差は認められなかった。しかし, DMH 処理によって腸内に形成される PCF (あるいは ACF) の分布及び数については, マウスやラットとキンギョで大きな違いがみつかった。すなわち, マウス<sup>12,15,18)</sup> やラット<sup>10,14,15)</sup> では腸の肛門側半分に選択的に誘導されるのに対し, キンギョでは腸全体に, 偏りなく散在した。また, キンギョでの PCF 数は平均 2.7 個であり, マウスやラットと比べて, 著しく少なかった。

ヘテロサイクリックアミン等の多くの環境変異原物質は, 体内の薬物代謝酵素 (チトクロム P-450) 系の中でも CYP1A2 の発現を誘導し, その作用を受けて活性化 (代謝的活性化) される。<sup>22,23)</sup> DMH は, 第 II 相薬物代謝酵素群に属する CYP2E1 により代謝的活性化を受ける。<sup>24)</sup> 魚類の薬物代謝関連酵素群の活性はほ乳類に比べると極めて低い。<sup>25,26)</sup> さらに, 魚類の体内温度は飼育水温にほぼ等しいため, 体温差が腸上皮細胞の分裂速度, DMH の代謝的活性化の速度や DMH 投与による前がん病変の進行速度に影響し, 既出動物における PCF (あるいは ACF) 数の違いにつながった可能性が高い。

ほ乳類を用いた実験では, DMH 処理に伴う ACF 数は, 実験動物の餌組成の影響を受け, ドコサヘキサエン酸,<sup>8)</sup> カロテノイド,<sup>15)</sup> セレン化合物<sup>12)</sup> 等は同形成数の削減 (抑制的) に働くことが報

告されている。DMH 処理に伴う ACF 数は, 腸内細菌の数や組成に左右されるという報告<sup>13,27)</sup> もある。魚類には, ドコサヘキサエン酸やカロテノイドが多く含まれている。腸内細菌の数や組成に関しても, ほ乳類では, 大腸の内容物 1 g あたりに生息する細菌数は  $10^8$ - $10^{11}$  個にものぼり, そのほとんどが偏性嫌気性菌である<sup>27-29)</sup> のに対し, キンギョの腸内では内容物 1 g あたりの細菌数は  $10^4$ - $10^7$  個程度と少なく, 全菌数に対する偏性嫌気性菌の割合も著しく低い。<sup>7,30)</sup> したがって, これらも DMH 処理によるキンギョの PCF 形成を抑制する方向に作用していた可能性がある。

また, DMH の作用発現には腸内滞留時間が関係するとの報告<sup>31)</sup> があるが, 魚類の同時間はほ乳類に比べて一般的に小さい。すなわち, 口から入った餌が消化管を通過し終えるまでの時間 (消化管通過時間) は, イヌの 14-16 時間<sup>32)</sup> を除くと, ラットの 14-51 時間<sup>33)</sup>, ヒツジの 12-83 時間<sup>34)</sup> に対し, キンギョ (水温 25°C) で 8-24 時間,<sup>35)</sup> ティラピア (水温 25°C) では 7-15 時間程度<sup>36)</sup> と短い。加えて, 魚類の腸は, 現状では, 形態的にほ乳動物のように明確な区分がなされておらず,<sup>20,21)</sup> コイの腸では後部においても高いグリコシダーゼ活性を示す<sup>37)</sup> 等の報告がある。

それゆえ, 魚類とほ乳類における, DMH 処理による PCF (あるいは ACF) の形成誘起状況の違いについては, 今後, 投与された DMH 及びその代謝物の動態や同薬剤の代謝関連酵素の活性を比較するとともに, 消化管のマクロ及びミクロな形態や機能, PCF 形成抑制物質や腸内細菌の組成や量, 腸上皮細胞の分裂速度等の違いが, DMH 投与によって生じる PCF の形成部位や数に及ぼす影響を詳しく調査する必要がある。

**2. DMH 処理魚に対する 5-FU と LF の投与効果** DMH 処理によってキンギョの腸内に形成された PCF 数には, 大きな個体差がみられ, 生理食塩水 (C-S) 群と 5-FU (C-FU) 群の間に統計的な有意差は認められなかった。しかし, 両者の平均 PCF 数では, 5-FU 群は C-S 群に比べると著しく低い値を示した。すなわち, 5-FU 群の PCF 数は, 試験開始から 2 週間後で C-S 群の約 60%, 4 週間後では同約 50% の低い値となった。5-FU は大腸 (直腸・結腸) がん, 胃がん, 膵臓がん, 乳がん等の緩

和的治療に対してよく用いられる化学療法剤であるが、特に大腸がんの治療には中心的な役割を果たしている。今回の結果は、DMH 処理に伴うキンギョ腸の PCF 形成過程において、5-FU が抑制的に作用したことを示唆する。ただし、ほ乳類の ACF には陰窩数の異なるものや可逆性のものと不可逆性のものがあることが報告されている<sup>14)</sup>ことから、今後、魚類の PCF についても類似の事象があてはまるか否かの検討は必要である。

LF の単独投与 (LF-S 群) は、DMH 処理によるキンギョ腸内の PCF 形成に対し、抑制効果を示さなかった。上述したように、DMH は、チトクロム P-450 系の中でも、CYP1A2 ではなく、CYP2E1 により主に代謝的活性化を受ける。<sup>24)</sup> LF の投与は、CYP1A2 の発現を抑制するが、CYP2E1 等の第 II 相薬物代謝酵素群の発現には影響を及ぼさないことが報告されている。<sup>22,23)</sup> ただし、化学発がん剤に曝露されたラットへの LF 投与は、ACF の形成の初期段階に作用してその数を有意に減少させたり、<sup>38)</sup> 大腸、肺、食道、膀胱、舌における発がんを抑制し、がんの転移も減少させたりする<sup>39)</sup>との報告がある。LF の投与は、動物の生体防御能を高めたり、各種生理状態を改善したり、腸内細菌の数や組成を調整 (有害微生物群の増殖を抑制等) したりすることが報告されている。<sup>40-47)</sup> そのため、LF が DMH や AOM 等の発がん誘起物質の投与に引き起こされる腸内での PCF あるいは ACF の形成過程において、間接的にはあるが、抑制作用を有している可能性は高い。ただし、本研究の結果は、LF が発がん物質によるイニシエータ作用の抑制効果を有する可能性は高いものの、プロモーション期間においては、PCF 数を減少させるほどの著しい能動的 (治療) 効果を持たないことを示唆している。

一方、5-FU と LF の併用投与では、腸管全面積あたりの PCF 数が、併用投与開始から 2 週間後及び 4 週間後ともに、生理食塩水投与 (C-S) 群に比べて有意に減少し、その平均値は後者の約 30% にまで低下した。この結果は、LF は 5-FU の主作用を妨害することなく、逆に、協調的に作用して、キンギョの腸内に形成された PCF 数を減らす方向に働いたことを示している。すなわち、LF は化学療法剤の作用を高めたことを意味する。

### 3. LF による 5-FU の副作用軽減並びに効果増

強 　ほ乳類への 5-FU 投与は、激しい下痢や出血性腸炎等の消化器症状とそれに伴う脱水症状等の重篤な副作用に加えて、高度の骨髄抑制や間質性肺炎、肝機能や腎機能の障害等を引き起こすことが知られている。<sup>48,49)</sup> 健常魚への 5-FU 投与 (50 mg/kg 体重量を 1 日おきに 3 回、筋肉内投与) は、腸内の全細菌数や大腸菌群数を有意に増加 (2 週間後) させたものの、それ以外には血液組成、顆粒球の貪食活性や NBT 還元活性、腸管・肝臓・腎臓の光学顕微鏡レベルでの組織像に大きな変化をもたらさなかった。<sup>7)</sup> しかし、DMH 処理魚に対する 5-FU 投与 (前報<sup>7)</sup> で使用した 1.5 倍量の 75 mg/kg 体重量を 1 日おきに 3 回投与) は、生残率の低下に加え、2 週間後には顆粒球数の減少や同 NBT 還元活性の低下を、4 週間後にはそれらに加えて顆粒球の貪食活性低下を導いた。今回の実験では腸管・肝臓・腎臓等における組織変化や腸内細菌の数や組成に関する調査を行っていないため、各臓器の生理機能障害に直接言及することはできない。しかし、前報<sup>7)</sup> の結果を加味すると、少なくとも DMH 処理によって、生理的負荷を被っている魚への 5-FU 投与が、その造血機能のみでなく、腸内環境等にも負の影響 (副作用) を及ぼしていた可能性は高い。

これに対し、LF と 5-FU の併用投与魚では、上記 5-FU の副作用が著しく軽減されていた。すなわち、DMH 処理魚への LF 投与はその後の 5-FU 投与に伴う副作用を有意に軽減した。

本稿の結果は、DMH 処理により腸に前がん病変細胞巢 (PCF) の形成を誘導した魚への 5-FU と LF の併用投与が有意に PCF の数を減少させる (LF の経口投与は 5-FU の発がん抑制効果を促進すること、LF の投与は 5-FU の副作用を軽減することを示すものである。LF は、5-FU 以外にも、MTX 等別種の化学療法剤の投与に伴って生じる種々の副作用軽減効果を持つ。<sup>7)</sup> 今後、調査対象種の範囲を拡げるとともに、抗がん剤の種類や量を変えた試験を行う必要はあるが、この結果は、LF の化学療法剤との併用投与が、化学療法剤の副作用軽減に有効であるばかりでなく、化学療法剤の主作用である抗腫瘍効果を増強する、すなわち、LF ががん治療において有効な治療補助物質となる可能性の高いことを示すと考える。

謝辞 本報の作成にあたり、有益な助言を頂いた、石巻専修大学理工学部の鈴木 均博士と大越健嗣博士に厚くお礼申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Itou M., Fujimaki Y., Hatai Y., Isoda M., *Bull. Nippon Vet. Zoo. College*, **33**, 151–155 (1984).
- 2) Vogelbein M. S., van Veld P. A., Huggett R. J., Fourin J. W., *Cancer Res.*, **50**, 5978–5986 (1990).
- 3) Okihiro M. S., Groff J. M., Hinton D. E., Whipple J. A., *Cancer Res.*, **53**, 1761–1769 (1993).
- 4) Nitta K., *Yuki Gosei Kagaku Kyokai Shi*, **49**, 968–979 (1991).
- 5) Fausel C. A., *Oncology*, **23**, 88–90 (2009).
- 6) Shewach D. S., Kuchta R. D., *Chem. Rev.*, **109**, 2859–2861 (2009).
- 7) Takase K., Kakuta I., *Yakugaku Zasshi*, **1279**, 1449–1460 (2007).
- 8) Takahashi M., Minamoto T., Sugimura T., Esumi H., Yazawa K., *J. Jpn. Res. Soc. Gastroenterol. Carcinog.*, **4**, 73–76 (1992).
- 9) Yamamoto J., *Nippon Daicho Komonbyo Gakkai Zasshi*, **38**, 809–818 (1985).
- 10) Nakao K., *Jpn. J. Gastroenterol. Surg.*, **28**, 17–24 (1995).
- 11) Takahashi M., Fukutake M., Isoi T., Fukuda K., Sato H., Yazawa K., Sugimura T., Wakabayashi K., *Carcinogenesis*, **18**, 1337–1342 (1997).
- 12) Okada T., Fukunaga K., Nishiyama T., Yoshida M., *Trace Nutrients Res.*, **23**, 17–21 (2006).
- 13) Onoue M., Kado S., Sakaitani Y., Uchida K., Morotomi M., *Cancer Lett.*, **113**, 179–186 (1997).
- 14) Fujimitsu Y., Koyanagi Y., *J. Jpn. Soc. Coloproctol.*, **50**, 429–439 (1997).
- 15) Kim J. M., Araki S., Kim D. J., Park C. B., Takasuka N., Toriyama H. B., Ota T., Nir Z., Khachik F., Shimidzu N., Tanaka Y., Osawa T., Uraji T., Murakoshi M., Nishino H., Tsuda H., *Carcinogenesis*, **19**, 81–85 (1998).
- 16) Aida K., Kinoshita M., Tanji M., Sugawara T., Tamura M., Ono J., Ueno N., Ohnishi M., *J. Oleo Sci.*, **54**, 45–49 (2005).
- 17) Miyamoto S., Kohno H., Suzuki R., Sugie S., Murakami A., Ohigashi H., Tanaka T., *Oncol. Rep.*, **15**, 1169–1173 (2006).
- 18) Hosomi R., Matsuda Y., Ishimaru A., Takemura S., Hukunaga K., Yoshida M., *Trace Nutrients Res.*, **24**, 71–75 (2007).
- 19) Begleiter A., Sivananthan K., Lefasi G., Maksymiuk A., Bird R., *Oncol. Rep.*, **21**, 1559–1565 (2009).
- 20) Harder W., “Anatomy of Fishes, Part I, Text,” E. Schweizerbart’sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart, 1975, pp. 128–186.
- 21) Bridget S. G., McCormik M. I., *Environ. Biol. Fish.*, **61**, 73–83 (2001).
- 22) Fujita K., Tsuda H., *J. Clin. Exp. Med.*, **204**, 101–104 (2003).
- 23) Lee H.-S., Yang M., *Environ. Health Prev. Med.*, **13**, 84–93 (2008).
- 24) Okamura M., Sasaki H., Takahashi N., Inagami A., Tsukamoto T., Yamamoto M., Shirai N., Iidaka T., Yanai T., Masegi T., Tatematsu M., *J. Toxicol. Pathol.*, **15**, 95–102 (2002).
- 25) Nabba D. L., Mingoiaa R. T., Yanga C.-H., Han X., *Aquatic Toxicol.*, **80**, 52–59 (2006).
- 26) Yu L. Z., Yang X. L., Wang X. L., Yu W. J., Hu K., *Fish Physiol. Biochem.*, doi: 10.1007/s10695-009-9342-6 (2009).
- 27) Brady L. J., Gallaher D. D., Busta F. F., *J. Nutr.*, **130** (Suppl.), 410–414 (2000).
- 28) Morishita Y., *Jpn. J. Vet. Sci.*, **42**, 581–586 (1980).
- 29) Ley R. E., Hamady M., Lozupone C., Turnbaugh P. J., Ramey R. R., Bircher J. S., Sdhlegel M. L., Tucker T. A., Schrenzel M. D., Knight R., Gordon J. I., *Science*, **320**, 1647–1651 (2008).
- 30) Sugita H., Fukumoto M., Deguchi Y., *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 1641–1645 (1988).
- 31) Burkitt D. P., *J. Natl. Cancer Inst.*, **54**, 3–6 (1975).
- 32) Itoh T., Higuchi T., Gardener C. R., Caldwell L., *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 801–806 (1986).
- 33) Egashira Y., Namiki H., Ohta T., Sanada H., Ayano Y., Numayama K., *Tech. Bull. Fac. Hort. Chiba Univ.*, **48**, 37–43 (1994).
- 34) Ohshita T., Kyuma T., Kondo T., *Grassland Sci.*, **43**, 293–297 (1997).

- 35) Rozin P., Mayer J., *Am. J. Physiol.*, **206**, 1430–1436 (1964).
- 36) Moriarty D. J. R., *J. Zool.*, **171**, 25–39 (1973).
- 37) Kawai S., Ikeda S., *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **37**, 333–337 (1971).
- 38) Sekine K., Ushida Y., Kuhara T., Iigo M., Baba-Toriyama H., Moore M. A., Murakoshi M., Satomi Y., Nishino H., Kakizoe T., *Cancer Lett.*, **121**, 211–216 (1997).
- 39) Tsuda H., Fukamachi K., Xu J., Sekine K., Ohkubo S., Takasuka N., Iigo M., *Proc. Jpn. Acad., Ser. B*, **82**, 208–215 (2006).
- 40) Arnold R. R., Brewer M., Gauthier J. J., *Infect. Immun.*, **28**, 983–988 (1980).
- 41) Kakuta I., Kurokura H., *Fish Pathol.*, **30**, 289–290 (1995).
- 42) Ogata T., Terao S., Hayasawa H., *Milk Science*, **46**, 233–238 (1997).
- 43) Kakuta I., *J. Fish Dis.*, **21**, 161–167 (1998).
- 44) Kakuta I., *Bioindustry*, **15**, 23–33 (1998).
- 45) Brock J. H., *Biochem. Cell Biol.*, **80**, 1–6 (2002).
- 46) Kakuta I., Takano K., *Bull. Soc. Sea Water Sci., Jpn.*, **62**, 278–285 (2008).
- 47) Adlerova L., Bartoskova A., Faldyna M., *Vet. Med.*, **53**, 457–468 (2008).
- 48) Hirano T., Miyazaki K., *Gekkan Yakuji*, **40**, 867–872 (1993).
- 49) Yamamitsu S., Hirada K., Shirasaki T., *Hematology & Oncology*, **49**, 485–490 (2004).