



Title	天然 $\beta$ -カロテンによる腹部照射マウスにおける小腸の放射線障害の防護
Author(s)	倉部, 輝久; 伊藤, 要子; 松村, 英仁 他
Citation	日本医学放射線学会雑誌. 2002, 62(14), p. 822-831
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/15632">https://hdl.handle.net/11094/15632</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

# 天然 $\beta$ -カロテンによる腹部照射マウスにおける小腸の放射線障害の防護

倉部 輝久 伊藤 要子 松村 英仁 中村 篤史 綾川 良雄

愛知医科大学放射線医学講座

## Radioprotective Effects of Natural $\beta$ -carotene on Villi and Crypts in Abdominally Radiated Mice

Teruhisa Kurabe, Youko Itoh, Eijin Matsumura, Atsushi Nakamura, and Yoshio Ayakawa

The protective effect of  $\beta$ -carotene against radiation injury to the small intestine of abdominally radiated mice (15 Gy) was examined with administration given pre-radiation, during (pre- and post-) radiation, and post-radiation. In the  $\beta$ -carotene group, the ratio of villus length to crypt was significantly greater in comparison with the radiation only group at 2 days after radiation. At 7 days after radiation, the ratio of necrotic cells in the crypt vs. the total was significantly lower, and the ratio of necrotic cells in the villus vs. the total was significantly greater with  $\beta$ -carotene administration, which indicated that  $\beta$ -carotene accelerated recovery from radiation injury. Each group administered  $\beta$ -carotene showed a significant radioprotective effect, with pre-radiation administration yielding a smaller effect than administration during radiation and post-radiation.

It is concluded that pre-, during, and post-radiation administration of  $\beta$ -carotene protected against radiation injury of the small intestine and accelerated recovery from it.

## 緒 言

外科療法、化学療法と並んで放射線療法は悪性腫瘍の有力な治療手段である。しかし、放射線治療において、照射野に含まれる消化器に対する副作用が治療の継続に障害となることはしばしば経験される。特に腹部照射においては、小腸は放射線感受性が高い<sup>1), 2)</sup>ことから、吸収低下、腹痛、下痢、脱水などの副作用は避けられない。これらの不快な症状の軽減は患者の栄養状態の改善につながり、予後の向上に貢献する。また、これらの急性障害のみでなく放射線の晩発障害<sup>3)</sup>として治療後数カ月以降に発症する放射線性腸障害は治療困難となることが多く、患者のQOLを著しく障害する<sup>4)</sup>。

一方、近年、抗酸化ビタミンであるビタミンC、E、 $\beta$ -カロテンやリコピンなどのカロテノイドがサプリメントとして、また様々な生体反応におけるフリーラジカルの消去に対して適用が検討<sup>5)-7)</sup>されている。特に、 $\beta$ -カロテンなどのカロテノイドは、一重項酸素の効果的な消去分子<sup>8)</sup>であり、植物におけるこれらの存在意義は光障害からの防護といわれている。

そこで、抗酸化ビタミンの1つである $\beta$ -カロテンによる放射線障害の防護効果を腹部照射マウスの小腸障害から検討し、日常的にも経験される放射線治療における消化管障害に対する $\beta$ -カロテンの有効性を検討した。また、放射線照射に対する $\beta$ -カロテンの投与時期と防護効果との関連についても検討し、効果的な投与方法を検討した。

## 実験材料および方法

### 1. $\beta$ -カロテンの投与および投与時期

$\beta$ -カロテンは、緑藻類に属する*Dunaliella bardawil*の乾燥粉末((株)日建総本社より供与)をマウス粉末飼料(MF飼料：オリエンタル酵母工業(株))に $\beta$ -カロテンとして0.01%または0.1%となるよう混和し、5g/マウス/日として適量の水を加えて粘土状にし、毎日新しい飼料を与えた。

$\beta$ -カロテンの投与時期については、照射前2週間投与した前投与群(Pre)，照射前2週間と照射後解剖日まで投与の

Research Code No.: 408

Key words: Radioprotection,  $\beta$ -Carotene, Villus, Crypt, Apoptosis

Received June 5, 2002; revision accepted Nov. 6, 2002

Department of Radiology, Aichi Med. Univ.

別刷請求先

〒480-1195 愛知県愛知郡長久手町21  
愛知医科大学放射線医学講座  
倉部 輝久

中投与群(Continuous: Con), 照射直後から解剖日まで投与の後投与群(Post)の3群について比較検討した。無処置の対照群(Control: Cont)および照射のみの照射群(Rad)については、 $\beta$ -カロテンを混和せず同様にして投与した。総数156匹のマウスを対照群24匹、照射群48匹(前投与照射2日後n=8, 前投与照射7日後n=8, 中投与照射2日後n=8, 中投与照射7日後n=8, 後投与照射2日後n=8, 後投与照射7日後n=8), 0.01% $\beta$ -カロテン群36匹(前投与0.01% $\beta$ -カロテン照射2日後n=6, 前投与0.01% $\beta$ -カロテン照射7日後n=6, 中投与0.01% $\beta$ -カロテン照射2日後n=6, 中投与0.01% $\beta$ -カロテン照射7日後n=6, 後0.01% $\beta$ -カロテン投与照射2日後n=6, 後0.01% $\beta$ -カロテン投与照射7日後n=6), 0.1% $\beta$ -カロテン群48匹(前投与0.1% $\beta$ -カロテン照射2日後n=8, 前投与0.1% $\beta$ -カロテン照射7日後n=8, 中投与0.1% $\beta$ -カロテン照射2日後n=8, 中投与0.1% $\beta$ -カロテン照射7日後n=8, 後0.1% $\beta$ -カロテン投与照射2日後n=8, 後0.1% $\beta$ -カロテン投与照射7日後n=8)に分けて使用した。

## 2. 実験動物と放射線照射

実験動物は、ddY, 7週齢の雄マウス(日本エスエルシー(株)より購入)を使用した。マウスはネンブタールで軽度麻酔し、仰臥位に固定した。放射線照射は、マウス剣状軟骨より下2.5cmの腹部とし、コバルトグラフィーにて照射野を確認後前方一門にて60Co  $\gamma$ 線を15 Gy照射した。照射条件は、Out put: 0.21Gy/min, Depth: 2.0 cm, SCD: 80cmであった。

なお、実験動物は気温; 23±1°C, 湿度; 50±10%, 照明: 12時間照明, 換気; 16回/時間の条件の動物実験室にて飼育し、愛知医科大学医学部動物実験に関する指針に従い実施した。

## 3. 採血および病理標本の作製

解剖は照射2日後および7日後とし、エーテル麻酔下で死亡させ、下大静脈よりヘパリン加で採血後、小腸(回腸部)をおよび肝臓を摘出し、小腸はホルマリン固定し、常法に従い、組織をパラフィン包埋後、薄切切片としHE染色した。肝臓は-80°Cで保存した。血液については、4°C, 3,500 rpm, 15分間遠心後の血漿を-30°Cで測定まで保存した。

血液生化学検査としては、アルブミン(ALB), 尿素窒素(BUN), クレアチニン(Cre), アスパルテイトアミノトランスフェラーゼ(GOT), アラニンアミノトランスフェラーゼ(GPT), 乳酸脱水素酵素(LDH), アルカリ fosfataze(ALP), アミラーゼ(AMY), コリンエステラーゼ(ChE), 血糖(Glu), C反応性蛋白(CRP)についての肝、腎機能を測定した。 $\beta$ -カロテン投与による放射線障害の防御効果の評価については、照射群に対する有意差検定から評価した。

なお、照射線量、解剖日については予備実験を実施し、放射線障害の最も顕著な照射2日後と放射線障害の回復が

観察される照射7日後とした。

## 4. 小腸絨毛と腸陰窩の長さ比(小腸絨毛/腸陰窩)の測定

小腸HE染色像にて、小腸絨毛と腸陰窩の長さを実測し、小腸絨毛/腸陰窩を算出した。

総数156匹の標本について小腸絨毛頂部から腸陰窩底部まで連続して測定可能なすべてについて測定し、各マウス標本内の絨毛1本あたりの平均値を算出し、これを各群のマウスのmean±SDで表示した。

## 5. 小腸絨毛、腸陰窩の壊死細胞の割合(小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数、腸陰窩壊死細胞数/総壊死細胞数)

小腸HE染色像にて、小腸絨毛壊死細胞数および腸陰窩壊死細胞数を実測し、これらの和(総壊死細胞数)に対する小腸絨毛壊死細胞数の比(小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数)および総壊死細胞数に対する腸陰窩壊死細胞数比(腸陰窩壊死細胞数/総壊死細胞数)を総数156匹の標本について小腸絨毛頂部から腸陰窩底部まで連続して測定可能なすべてについて計測し、各マウス標本内の絨毛1本あたりの平均値を算出し、これを各群のマウスのmean±SDで表示した。

なお壊死細胞の判定は、核濃縮、核融解、核崩壊のいずれかが明らかなものとし、明らかにアポトーシスを起こしたもの、判定の紛らわしいものは除外した。なお、特に、照射2日後の腸陰窩ではアポトーシス、アポトーシス様所見が認められたが、これらは壊死細胞数には入れず、明らかな壊死細胞のみを測定した。Fig. 1に腹部照射マウス小腸の典型的な壊死細胞(N)とアポトーシス細胞(A)を示した。

## 6. アポトーシスの検出

薄切切片をTUNEL法で染色(ApopTag: INTERGEN Co.)後、メチルグリーンにて核染色をし、アポトーシスを検出した。

## 7. 肝臓中の $\beta$ -カロテン測定

-80°Cで凍結保存しておいた肝臓について、既にわれわれの報告した方法<sup>9)</sup>に従い、凍結乾燥した肝臓50mgに0.5% HClを加えてよく攪拌し、アセトンおよびヘキサンで抽出後ヘキサン層をHPLCで分析した。

## 8. 実験結果の統計処理

各群の測定値はmean±SDで表示し、各群間の有意差はt-検定(対のない検定)にて検討し、p<0.05以下を有意差とした。

## 実験結果

### 1. 肝臓中の $\beta$ -カロテン濃度

各 $\beta$ -カロテン投与時期による照射2, 7日後の肝臓中に蓄積された $\beta$ -カロテン濃度をFig. 2に示した。肝臓中 $\beta$ -カロテン濃度は、中投与-7日後>中投与-2日後>前投与-2日後

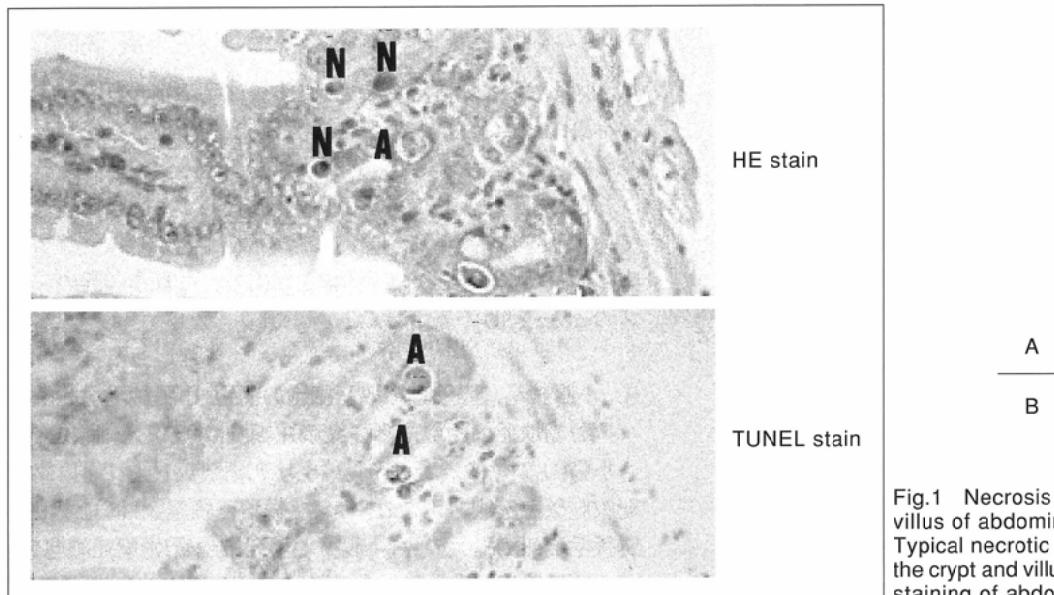


Fig.1 Necrosis and apoptosis in the crypt and villus of abdominally radiated mice. Typical necrotic cells (N) and apoptic cells (A) in the crypt and villus are shown by HE and TUNEL staining of abdominally radiated mice.

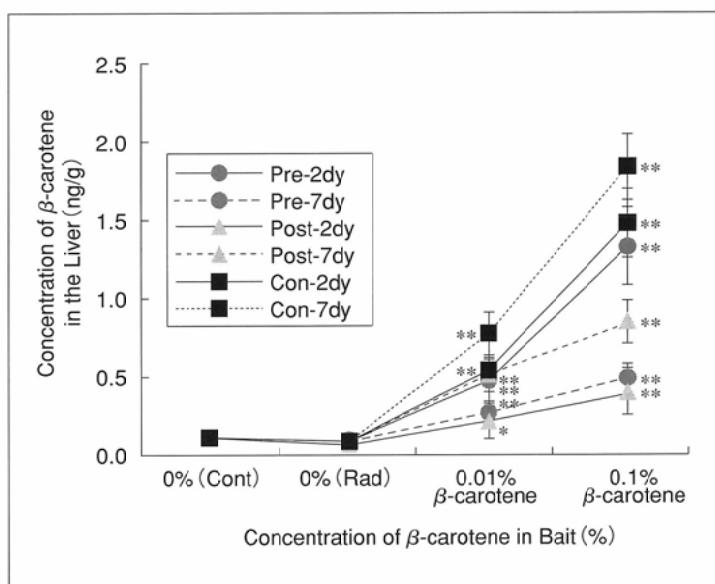


Fig. 2 Concentration of  $\beta$ -carotene in the liver of abdominally radiated mice with  $\beta$ -carotene administration pre-, during, and post-radiation.  $\beta$ -Carotene was administrated to the mice pre-, during, and post-radiation. Concentration of  $\beta$ -carotene in the liver of abdominally radiated mice was measured 2 and 7 days after radiation.

Data represent the mean  $\pm$  SD.

\*p<0.05, \*\*p<0.01 compared with the control group.

>後投与-7日後>前投与-7日後>後投与-2日後の順に高値を示し、餌中の $\beta$ -カロテン濃度(0.01%, 0.1%)に依存して肝臓中 $\beta$ -カロテン濃度も増加した。また、後投与-7日後は前投与-7日後より有意に高値であり、後投与-2日後は前投与-7日後と有意な差を認めず、照射終了後から $\beta$ -カロテン投与を開始しても十分肝臓中に $\beta$ -カロテンが蓄積されることが示された。さらに、対照群に対しても、後投与-2日後( $p < 0.05$ )および前投与-7日後( $p < 0.01$ )ともに有意に高値を示した。

## 2. 血液生化学検査(肝および腎機能検査)

15Gy腹部照射マウスでの前・中・後 $\beta$ -カロテン投与群の照射2, 7日後における肝、腎機能検査を含む血液生化学検査測定結果をTable 1に示した。

照射群では照射2日後、 $\beta$ -カロテン前・中・後投与のGOTおよび前投与のGPTで対照群に比し有意に高値を示し、放射線障害を認めたが、照射7日後には正常域まで低下していた。BUNについては、照射7日後に有意に高値を示した。Table 1のごとく、前投与群では照射7日後のGPTで、中投与群では照射2日後のBUNで、後投与群では照射2日後のBUN, GPT, GOT、照射7日後のGOTで $\beta$ -カロテン投与により有意な低下を示した。

## 3. $\beta$ -カロテン投与による腹部照射マウスの小腸 絨毛/腸陰窩

腹部照射マウスの照射2, 7日後における小腸絨毛の長さと腸陰窩の長さ比(小腸絨毛/腸陰窩)をFig. 3に示した。

腹部15Gy照射により、照射2日後的小腸絨毛/腸陰窩は、対照群( $7.7 \pm 1.6$ )に比し照射群( $5.6 \pm 1.2$ )は有意な低下を認め、小腸絨毛の障害が明かであった。これに対し、 $\beta$ -カロテン投与群では前・中・後のいずれの投与群においても小腸絨毛/腸陰窩は照射群に比し有意に高値を示した。また、投与 $\beta$ -カロテン量については、0.1%は0.01%に比し高値の傾向にあるものの有意な差を認めず、 $\beta$ -カロテン0.01%で十分な効果を示した。

照射7日後では、各照射群自体が対照群と有意差を認めず、放射線障害から概ね回復したことが示された。 $\beta$ -カロテン投与は、後投与を除き、照射群に対して有意に高値を示した。また、0.01%, 0.1%の投与量の差異は認めなかった。

Table 1

		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.16±0.08	17.2±1.7	0.36±0.08	63.3±33.1	5.1±1.6	491±277	150±34	3120±478	18.1±3.7	286±81	0.06±0.03	
0.01% β-Carotene	1.22±0.08	18.1±3.7	0.34±0.05	66.2±30.2	4.8±0.4	555±351	209±55	3186±919	21.2±2.3*	386±64	0.10±0.06	
0.1% β-Carotene	1.17±0.08	16.7±2.4	0.30±0.00	79.4±29.7	4.7±2.7	668±288	185±75	2672±618	18.3±2.7	414±124	0.07±0.02	
		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.26±0.09	21.8±2.9	0.30±0.00	33.5±7.0	2.1±0.9	251±90	147±48	2866±515	16.9±4.0	309±63	0.06±0.02	
0.01% β-Carotene	1.32±0.08	19.1±2.9	0.30±0.00	32.3±2.0	1.0±0.1**	226±71	180±40	2865±680	17.0±2.2	326±29	0.05±0.01	
0.1% β-Carotene	1.23±0.09	17.6±1.3	0.29±0.06	28.8±3.7	1.2±0.5*	167±69	168±44	2664±847	15.5±1.7	279±58	0.05±0.02	

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 compared to Radiation

		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.01±0.05	20.9±2.8	0.33±0.06	49.3±11.8	2.3±1.2	203±27	154±54	2858±170	14.8±1.0	245±27	0.06±0.04	
0.01% β-Carotene	1.10±0.06	15.4±4.2*	0.30±0.00	46.2±13.0	2.0±1.1	208±80	226±26**	3170±336	17.5±3.4	277±49	0.07±0.02	
0.1% β-Carotene	1.09±0.12	16.7±2.6*	0.25±0.05	37.4±10.6	2.4±1.5	155±61	162±39	2856±361	15.6±2.6	256±29	0.06±0.01	
		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.16±0.09	24.6±1.2	0.35±0.05	33.1±3.7	3.0±1.5	212±48	176±42	2708±379	14.8±1.2	245±27	0.05±0.01	
0.01% β-Carotene	1.13±0.08	24.0±4.3	0.38±0.04	35.3±5.8	3.2±1.4	243±110	142±19	2653±463	14.8±1.3	277±49	0.07±0.02	
0.1% β-Carotene	1.20±0.11	26.1±3.2	0.31±0.04	31.1±7.2	2.0±0.8	179±65	180±46	2746±538	14.9±1.1	256±29	0.07±0.02	

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 compared to Radiation

		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.08±0.10	20.1±4.5	0.31±0.06	46.0±11.4	3.3±1.6	254±162	183±48	2864±354	17.8±2.1	287±34	0.06±0.02	
0.01% β-Carotene	1.07±0.12	14.5±4.7*	0.30±0.06	37.8±10.8	1.3±0.6**	188±108	194±45	2436±320*	15.8±1.5	261±22	0.06±0.01	
0.1% β-Carotene	1.05±0.12	12.7±1.1**	0.28±0.05	33.9±6.9*	1.6±0.8*	145±76	180±35	2370±161**	15.0±1.6	274±36	0.08±0.04	
		ALB (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	ALP (IU/l)	AMY (IU/l)	ChE (IU/l)	Glu (mg/dl)	CPR (mg/dl)
Cont	1.18±0.13	22.4±4.0	0.31±0.06	32.6±7.5	2.7±1.3	239±102	245±70	2993±621	16.6±2.5	271±90	0.07±0.02	
Radiation	1.20±0.09	29.6±7.3	0.30±0.00	33.9±4.9	2.4±0.5	125±47	167±51	2780±563	14.4±0.7	236±41	0.06±0.02	
0.01% β-Carotene	1.17±0.12	29.2±7.1	0.35±0.05	31.7±3.4	2.3±0.8	147±48	175±54	2682±556	14.2±0.4	267±37	0.05±0.01	
0.1% β-Carotene	1.25±0.14	30.8±9.6	0.36±0.05	28.0±2.4*	2.1±0.9	129±47	169±25	2771±504	16.0±2.3	238±33	0.06±0.01	

\*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01 compared to Radiation

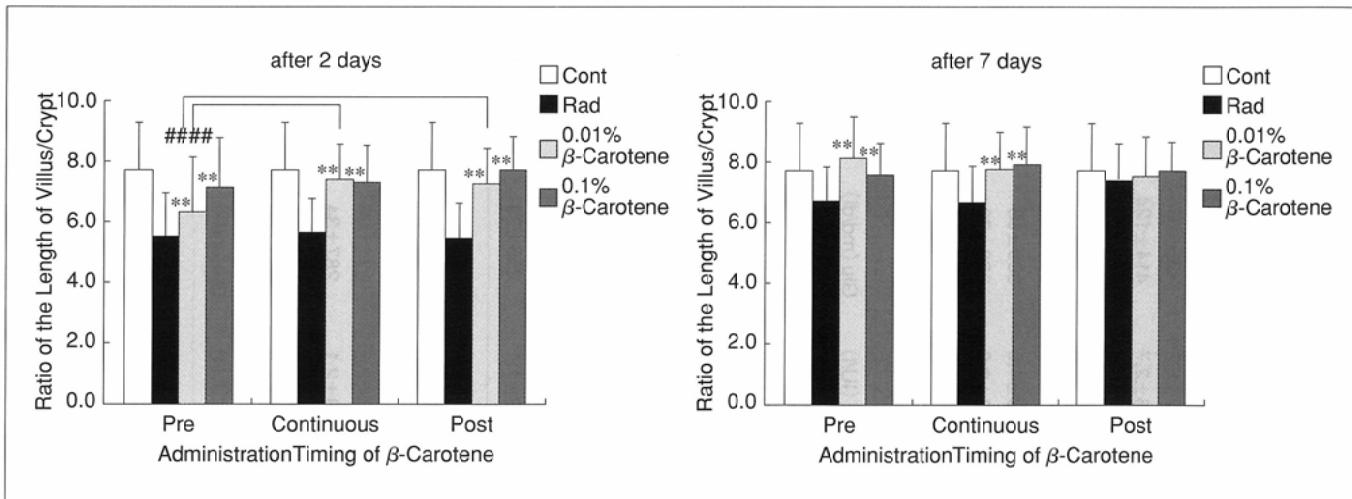


Fig. 3 Protection against small intestinal injury of abdominally radiated mice by  $\beta$ -carotene administration pre-, during, and post-radiation. Villus length was decreased by abdominal radiation of mice. The ratio of the length of villus/crypt was significantly greater with  $\beta$ -carotene administration in comparison with no  $\beta$ -carotene administration.

Data represent the mean  $\pm$  SD.

\*\*p<0.01 compared with radiation only.

The timing of  $\beta$ -carotene administration, at pre-, during, and post-radiation, was examined for its effect on the ratio of length villus/crypt in abdominally radiated mice.

##p<0.01 compared with the pre-radiation group.

#### 4. 病理組織像による腹部放射線照射マウスの小腸障害と $\beta$ -カロテン投与によるその防護効果

腹部照射による小腸の絨毛障害と $\beta$ -カロテン投与による照射障害からの防護効果を $\beta$ -カロテン中投与群マウスのHE染色像で示した。Fig. 4上段は照射2日後的小腸HE像で、照射群では明らかに小腸絨毛の丈が低く扁平化していた。 $\beta$ -カロテン投与群ではその障害は軽度であった。下段の照射7日後的小腸HE像は、上段の2日後に比べ照射群においても絨毛の再生と増殖が明らかであった。また、 $\beta$ -カロテン投与によりさらにこの傾向は良好であった。挿入図は矢印部位の強拡像であり、特に、照射2日後における照射群と $\beta$ -カロテン群の小腸絨毛の長さの差異が明かであった。

#### 5. $\beta$ -カロテン投与による腹部照射マウスの小腸絨毛、腸陰窩の壊死細胞の割合

##### 1) 腸陰窩壊死細胞数/総壊死細胞数

腹部照射マウスの総壊死細胞数に対する腸陰窩壊死細胞数の割合をFig. 5上段に示した。上段左図の照射2日後では、腸陰窩壊死細胞数/総壊死細胞数は、照射群は対照群に比し有意に増加し、照射による腸陰窩壊死細胞の増加を示した。この照射による腸陰窩壊死細胞数/総壊死細胞数の増加は、 $\beta$ -カロテン投与により若干軽減したが有意な差を認めなかった。しかし、上段右図の照射7日後では、 $\beta$ -カロテン投与により、前・中・後投与群とも照射群に比し有意に低下した。 $\beta$ -カロテン濃度に関しては、前・中・後投与のいずれにおいても0.1%の方が0.01%投与より低下していたが、両群に有意差は認めなかった。

なお、小腸絨毛1本当たりの平均腸陰窩壊死細胞数と(平

均総壊死細胞数)とを対照群/照射群/0.01% $\beta$ -カロテン群/0.1% $\beta$ -カロテン群の順で表示すると、後投与群2日後では1.5/2.4/2.5/2.6(4.3/6.3/6.9/6.0)、後投与7日後では1.3/3.0/1.9/1.3(3.7/8.2/7.0/6.9)、中投与群2日後では1.9/3.9/3.9/3.6(5.2/7.5/7.6/7.1)、中投与7日後では2.4/3.3/2.2/2.1(7.7/8.7/8.6/9.9)、前投与2日後では1.0/3.3/3.2/3.4(2.9/6.6/8.2/7.2)、前投与7日後では2.1/2.4/2.5/1.7(5.3/6.3/7.8/6.2)であった。

##### 2) 小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数

Fig. 5下段に示した小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数は、腸陰窩とは逆の結果で、下段左図に示した照射2日後では、照射群は有意に低下した。この小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数の低下は、 $\beta$ -カロテン投与により増加傾向を認めたが、有意差は認めなかった。しかし、下段右図の照射7日後では、 $\beta$ -カロテン投与により、照射群に比し前・中・後投与群ともに有意に増加した。 $\beta$ -カロテン濃度に関しては、各投与群とも0.1%の方が0.01%投与より増加していたが、両群に有意な差を認めなかった。

これらの腸陰窩・小腸絨毛における壊死細胞の割合の変動は、照射2日後放射線障害により腸陰窩の壊死が増加し、照射7日後には放射線障害から回復しつつ絨毛上皮の壊死に移行するという小腸の放射線による障害と回復の状況を示す。よって、 $\beta$ -カロテンは照射による腸陰窩の壊死細胞の小腸絨毛への移行(障害の回復)を促進した。

#### 6. 病理組織像における腹部照射マウスの腸陰窩および小腸絨毛壊死に対する $\beta$ -カロテンの影響

放射線照射による腸陰窩、小腸絨毛の壊死とそれらの $\beta$ -カロテン投与による影響をFig. 6の小腸HE強拡像で示した。対照群に比し照射群は照射2日後(Fig. 6上段)明らかに

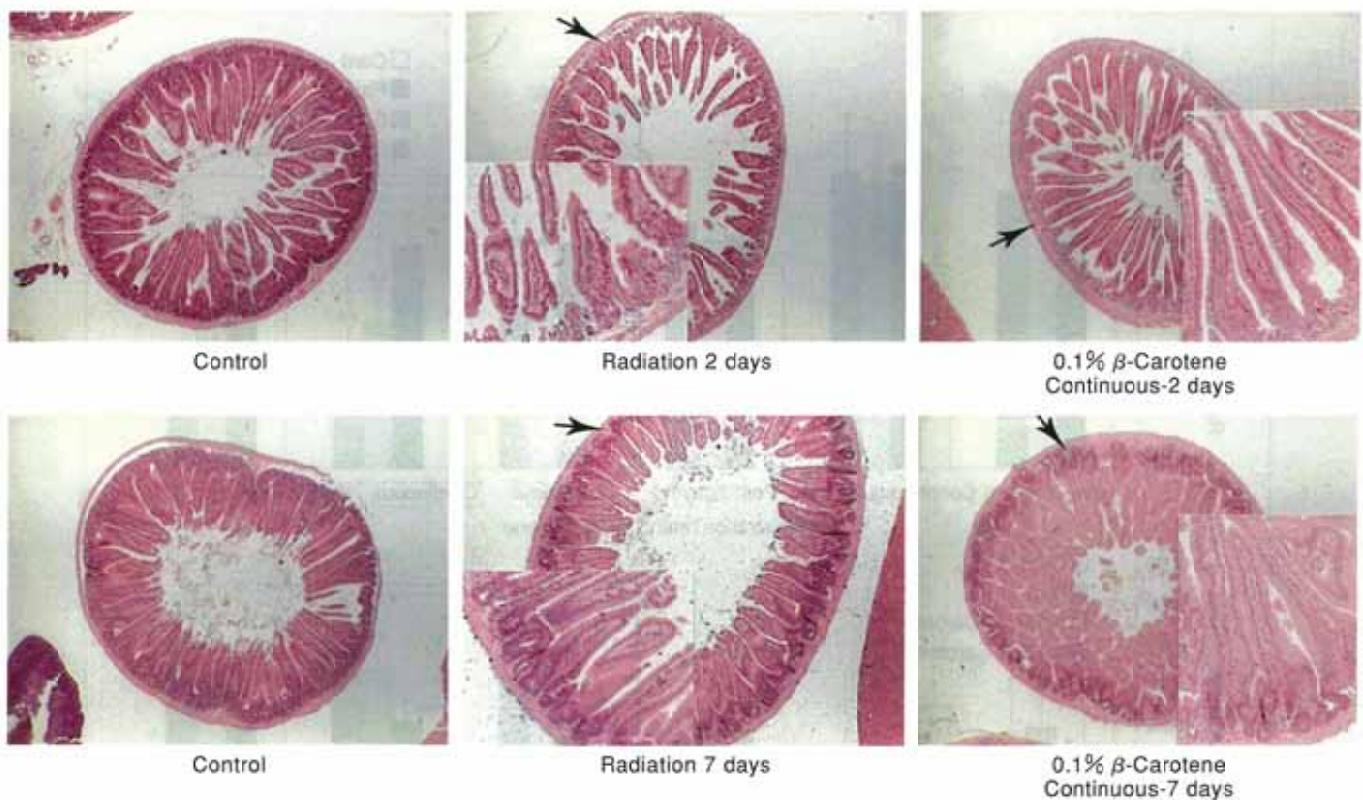


Fig. 4 Morphological changes of small intestinal injury of abdominally radiated mice given  $\beta$ -carotene administration. (HE:  $\times 40$ )  
The morphological change occurring with radiation and  $\beta$ -carotene administration is seen with HE staining of the villus.  
Typical damage to the villus ( $\rightarrow$ ) was magnified and inserted in the photo.

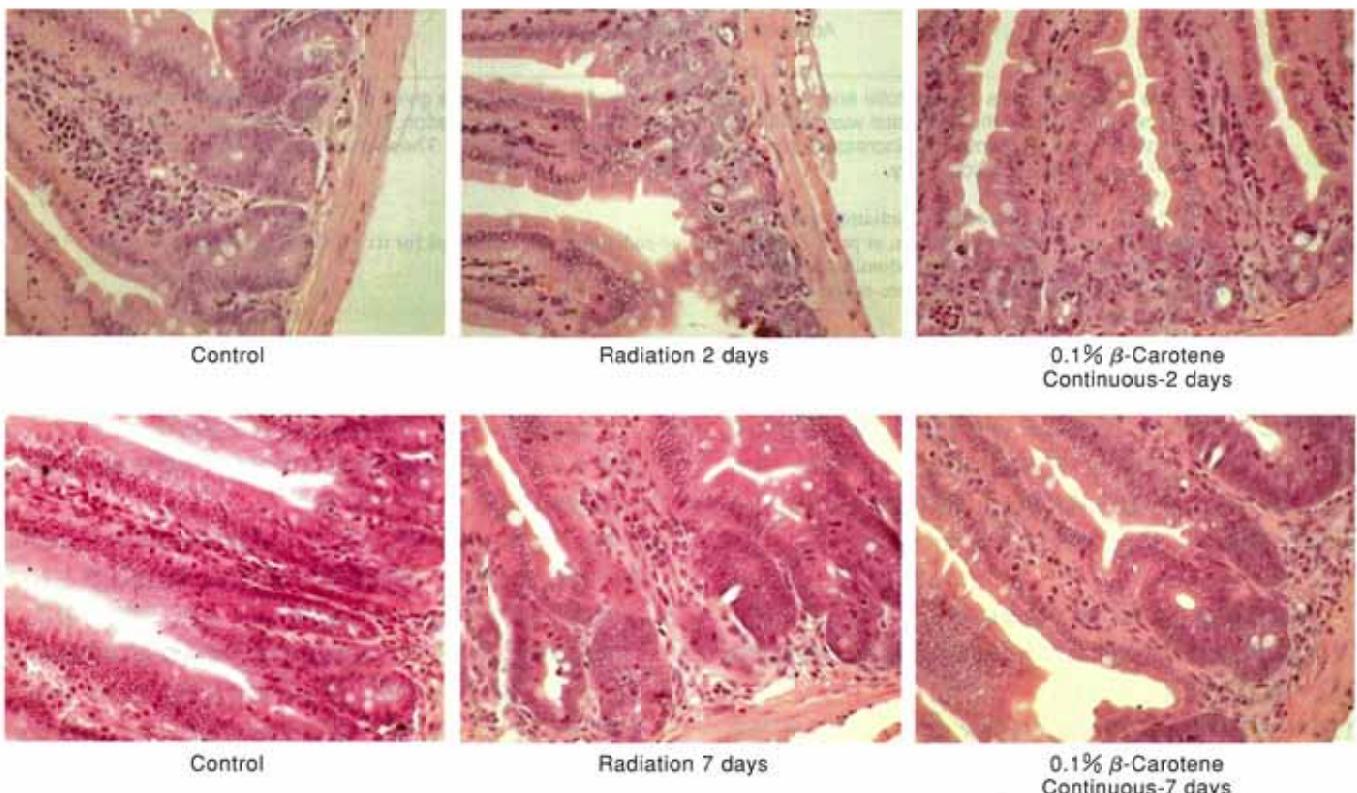


Fig. 6 Morphological changes of necrotic cells in crypt and villus of abdominally radiated mice according to  $\beta$ -carotene administration. (HE:  $\times 400$ )  
Two days after radiation, necrotic cells in the crypt were increased by radiation. Seven days after radiation, necrotic cells in the crypt had decreased more in the  $\beta$ -carotene administration group than in the radiation-only group.

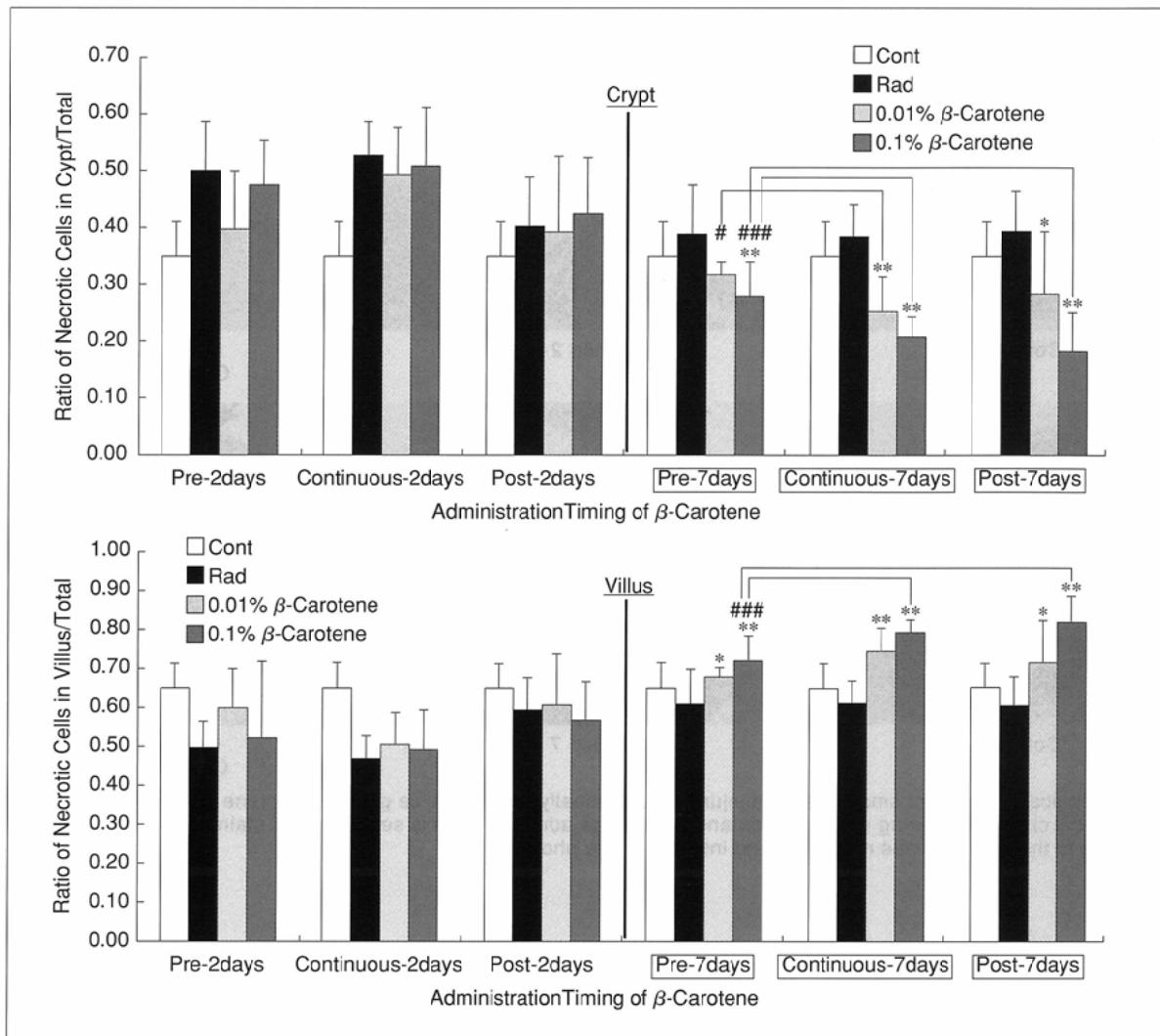


Fig. 5 Ratio of necrotic cells in crypt/total and villus/total of abdominally irradiated mice given  $\beta$ -carotene administration. The ratio of necrotic cells in the crypt/total was significantly increased 2 days after radiation.  $\beta$ -Carotene decreased the ratio of necrotic cells in the crypt/total and increased it in villus/total 7 days after radiation. These data indicate that  $\beta$ -carotene promoted recovery from radiation injury.

Data represent mean  $\pm$  SD.

\* $p$ <0.05, \*\* $p$ <0.01 compared with the radiation-only group.

The timing of  $\beta$ -carotene administration, at pre-, during, and post-radiation, was examined for its effect on the ratio of necrotic cells of crypt/total and villus/total in abdominally irradiated mice.

# $p$ <0.05, ## $p$ <0.01 compared with the pre-radiation group.

腸陰窩の壊死細胞が多数認められた。そしてこの壊死細胞の割合は、 $\beta$ -カロテン投与によっても有意な変化を認めなかつた。しかし、照射7日後(Fig. 6下段)においては、 $\beta$ -カロテン投与により、腸陰窩の壊死は照射群より減少し、小腸絨毛(底部)への移行が良好であった。

## 7. 放射線照射と $\beta$ -カロテン投与時期

放射線照射に対する $\beta$ -カロテン投与時期と放射線防護効果との関連を検討した。

### 1) $\beta$ -カロテン投与時期が腹部照射マウスの小腸絨毛/腸陰窩に及ぼす影響

$\beta$ -カロテンの前・中・後投与における小腸絨毛/腸陰窩の変化をFig. 3に示した。0.01% $\beta$ -カロテン前投与の2日後(上段)においてのみ、小腸絨毛/腸陰窩が中・後投与群に比

し有意に低下していることが示された(## $p$ <0.01)。しかし、他は投与時期による有意な差異を認めなかつた。

### 2) $\beta$ -カロテン投与時期が腹部照射マウスの腸陰窩、小腸絨毛壞死細胞数に及ぼす影響

Fig. 5上段右図に示した如く、前投与群の照射7日後は中・後投与に比し、腸陰窩壞死細胞数/総壞死細胞数が有意に高値であった(## $p$ <0.01, # $p$ <0.05)。また、前投与群は、下段右図の照射7日後的小腸絨毛壞死細胞数/総壞死細胞数についても中・後投与群に比し有意に低値であった(## $p$ <0.01, # $p$ <0.05)。他の中・後投与群においては、有意な差異を認めなかつた。即ち、 $\beta$ -カロテン投与は照射7日後、照射群に対しては前・中・後投与群とも腸陰窩では有意な低下を、小腸絨毛では有意な増加を認めたが、投与時期での比較では、一部前投与のみ、中・後投与群に比しこれら

の低下、増加の割合が有意に低下していた。

## 考 察

われわれは、従来より $\beta$ -カロテンの生理作用について検討し、 $\beta$ -カロテンのストレス潰瘍防御作用<sup>10)</sup>、血管内皮細胞の酸化障害の抑制<sup>11)</sup>、ストレス防御<sup>12)</sup>、抗高脂血症作用<sup>13-17)</sup>、抗腫瘍作用<sup>18)</sup>など報告してきた。

近年、 $\beta$ -カロテンを含むカロテノイドや抗酸化ビタミンについて、フリーラジカルの消去、一重項酸素のスカベンジャー、UV防御<sup>19)</sup>、脂質の酸化防止<sup>20)</sup>そして老化防止<sup>21)</sup>など多くの抗酸化作用が報告されている。

日常的な放射線治療、特に腹部照射による下痢、腹痛、嘔吐、脱水などの副作用が上記の抗酸化栄養素によって防護できれば照射に伴う副作用が軽減され、予後の改善にもつながり栄養学的価値も高まる。そこで、 $\beta$ -カロテンによる腹部照射マウスの小腸放射線障害に対する防護効果および $\beta$ -カロテンの投与時期について検討した。

小腸は放射線感受性が高く、比較的形態変化が観察しやすいことなどから、放射線障害の指標とし、小腸絨毛・腸陰窓の変化を測定した報告が多い<sup>22), 23)</sup>。Indranら<sup>24)</sup>は、15Gy全身照射マウスの放射線障害を“grid score method(小腸絨毛の形の崩壊度を0~8.5で評価)”で表示した。Erikssonら<sup>25)</sup>は、腹部照射ネコの小腸障害を腸粘膜の13種の組織学的变化(腸陰窓の異常、絨毛の形成不全、線維化、絨毛の萎縮など)を計測し全体のスコアから評価している。われわれも放射線による小腸の障害を小腸絨毛と腸陰窓の形態(長さ比)と組織障害(壊死細胞数比)から評価した。

小腸絨毛と腸陰窓の長さ比は種によって一定であり、これをもとに障害をうけた小腸絨毛の長さとの比(小腸絨毛/腸陰窓)を放射線障害の指標に適用した<sup>26)</sup>。小腸絨毛/腸陰窓は、対照群に比し腹部15Gy照射により、有意に低下し、小腸絨毛の照射による障害が示された。これに対し、 $\beta$ -カロテン投与群は、前・中・後投与群ともに小腸絨毛/腸陰窓は照射群より有意に高値を示し、照射による障害が $\beta$ -カロテン投与により防護された(Fig. 3)。また、照射により、有意に小腸絨毛の丈は低く扁平化し放射線障害が認められたが(Fig. 4)、 $\beta$ -カロテン投与群の障害は軽度であり、前・中・後投与群ともに0.01%の低濃度でも十分に有意な防護効果を認めた。

また、腸陰窓壊死細胞のみの測定でなく、腸陰窓壊死細胞数/総壊死細胞数と小腸絨毛壊死細胞数/総壊死細胞数の両比を計測し、照射によって障害された腸陰窓の壊死細胞が放射線障害からの回復とともに腸陰窓から小腸絨毛に移行していく経過を最も障害の強い照射2日後と回復期の7日後の計測結果から評価した。照射2日後、照射群では腸陰窓壊死細胞数/総壊死細胞数は対照群に比し有意に増加し放射線障害が認められたが、この2日後の照射による障害に対し $\beta$ -カロテンは有意な防護効果を認めなかった。しかし、照射7日後では、照射群の腸陰窓壊死細胞数/総壊死細

胞数は対照群にはほぼ回復していたが、 $\beta$ -カロテン投与により、腸陰窓壊死細胞数/総壊死細胞数は照射群に比し有意に低下し、小腸絨毛では総壊死細胞に対する小腸絨毛壊死細胞数は有意に増加した(総壊死細胞のうち腸陰窓の壊死細胞を小腸絨毛へより移行させた)。よって、本測定法は小腸(腸陰窓)の障害のみでなく、小腸の障害からの回復過程を観察・測定するに優れた測定法であることが示された。

ビタミンAについては、成長作用、上皮細胞の増殖促進作用が既に知られている<sup>27), 28)</sup>。Beyadeogluら<sup>29)</sup>は、VビタミンAの術中照射における小腸粘膜の防護・回復促進作用を報告している。Redlichら<sup>30)</sup>は、15Gyマウス胸部照射後4~5週間ビタミンAを投与することにより間質性肺炎を抑制すると報告し、Seifterら<sup>31)</sup>はビタミンAや $\beta$ -カロテンが全身照射マウスの死亡率を低下させると報告している。 $\beta$ -カロテンは生体内で開裂酵素によりビタミンAに変換されるプロビタミンAであることから、照射7日後の回復促進効果はビタミンAとして作用している可能性も示唆された。

$\beta$ -カロテンの投与時期の検討により、前投与において一部放射線障害の防護効果が中・後投与に比し低下していた。しかし、中・後投与では有意な差を認めなかつた。前投与の防護効果の低下については、照射後の摂取中止により肝臓中 $\beta$ -カロテン濃度が低下したためと思われる。中投与群については照射前および照射後と継続した摂取により肝臓中で高い濃度が保持され優れた防護効果が得られた。後投与群については、照射中 $\beta$ -カロテンは投与されておらず、照射群と同様照射中に産生されるラジカルに対する防護効果はない。よって、後投与群の放射線障害の防護効果は照射後投与された $\beta$ -カロテンによる。

放射線による生体障害の多くは放射線によって誘発される反応性の高いラジカル(ROS)が、DNAおよび細胞内高分子物質に損傷を与えることによって生じる<sup>32), 33)</sup>。よって、前・中投与による放射線障害の防護に関しては放射線照射により誘発されたROSによるDNA損傷、細胞膜傷害などに対する $\beta$ -カロテンの防護作用によるとと思われる。Sarmaら<sup>34)</sup>はビタミンC、Eの $\gamma$ -線による染色体損傷の防護効果を、EL-Nahasら<sup>35)</sup>は放射線防護効果をUmegakiら<sup>36)</sup>はX-線照射マウスの骨髄細胞における染色体損傷に対するビタミンEの影響を報告している。 $\beta$ -カロテンについては、Salvadoriら<sup>37)</sup>のマウス体細胞、生殖細胞に対する $\gamma$ -線照射による染色体損傷への防護効果の報告がある。また、Konopackaら<sup>38)</sup>はビタミンC、E、 $\beta$ -カロテンのマウスの $\gamma$ -線誘発DNA損傷に対する防護効果を報告している。本研究と同様の $\beta$ -カロテンをチャルノブイル事故で被曝した子供たちに投与し(40mg/day)，増加していた酸化型共役ジエンが減少したとの報告<sup>39)</sup>もある。

近年、放射線により細胞内に半減期が20~24時間におよぶ長寿有機物ラジカル(LLR)が生じることが報告<sup>40)</sup>された。このLLRはビタミンCなどの抗酸化ビタミンによって効率よく消去<sup>41)</sup>され、特に遺伝子突然変異に関与すると報告<sup>42)</sup>されている。よって、V.C同様抗酸化ビタミンの1つ

である $\beta$ -カロテンも照射後長時間生体内に残存するLLRが誘発する放射線障害を防護している可能性は大きい。また、照射後、生体物質とROSとの連鎖反応の数時間内の反応に対する防護に関しては効果を示すと思われる。 $\beta$ -カロテンの安全性についてはラットへの長期投与(0.01, 0.1%を1年間)実験<sup>43)</sup>、ヒトにおける200mg/day、1週間摂取での安全性<sup>44)</sup>など確認されている。ラット、マウスでは $\beta$ -カロテンの吸収能が低いこと、2週間以上の長期摂取の実施により、ヒトではさらに低い摂取量での効果が期待され、日常的サプリメントとしての摂取での腹部放射線障害の防護が期待される。なお、臨床的には分割照射における検討が望まれる。

放射線誘発アポトーシス<sup>45)</sup>は、放射線による障害細胞や生体に危険となる変異細胞を除去する重要な生体防御機構である。小腸は細胞増殖が盛んで、特に異常細胞や不要細胞の除去のためアポトーシスが誘発されやすい<sup>46)</sup>。本研究では、照射による壊死細胞のみ測定・検討したが、アポトーシス像(TUNEL染色)も散見され(アポトーシスおよびアポトーシス様細胞など紛らわしいものは除外し、壊死細胞のみ測定した)、 $\beta$ -カロテン投与群では、照射群に比しアポトーシスの減少傾向を認めた(未発表データ)。Ushakovaら<sup>47)</sup>も抗酸化ビタミンの照射前・後の投与により放射線誘発アポトーシスが抑制されたと報告している。

以上の結果より、 $\beta$ -カロテンは、照射中・前投与のみでなく照射後の投与においても有意な放射線防護効果が得られた。また、照射後の回復促進効果が明らかとなった。よって、照射後の下痢、嘔吐、腹痛などの消化管の副作用に対し、 $\beta$ -カロテンは抗酸化栄養素として臨床的にもその適用が期待された。

## 文 献

- 1) Rotten CS: Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and  $\gamma$ -irradiation. *Nature* 269: 518-521, 1977
- 2) Withers HR, Elkind MM: Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. *Int J Biol* 17: 261-267, 1970
- 3) 堀江良秋、三島好雄、原宏介、他：放射線治療後の消化管障害について。外科学 37: 261-269, 1975
- 4) 柴忠明、谷島聰、佐藤雅彦、他：著しくQOLを傷害された放射線性腸管障害の2手術例。臨床と研究 73: 2290-2292, 1996
- 5) Krinsky NI: Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7: 617-635, 1989
- 6) Bohm F, Edge R, Burk M, et al: Dietary uptake to lycopene protects human cells from singlet oxygen and nitrogen dioxide -Ros components from cigarette smoke. *J Photochem Photobiol* 64: 176-178, 2001
- 7) Terao J: Antioxidant activity of  $\beta$ -carotene-related carotenoids in solution. *Lipids* 24: 659-661, 1989
- 8) Rousseau EJ: Protection by  $\beta$ -carotene and related compounds against oxygen-mediated cytotoxicity and genotoxicity: Implications for carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 13: 407-466, 1992
- 9) 伊藤要子、鶴見亮、仁田正和、他：HPLCによる $\beta$ -カロテン測定における従来法と新測定法との比較。愛知医大誌 28: 223-229, 2000
- 10) 伊藤要子、伊藤ユキ：天然 $\beta$ -カロテンのストレス潰瘍抑制効果—ラットの水浸拘束ストレス実験による検討—ビタミン72: 267-271, 1998
- 11) 伊藤要子、小栗隆：血管内皮細胞の酸化障害に対する天然 $\beta$ -カロテンの抑制作用。ビタミン 71: 357-363, 1997
- 12) 伊藤要子、仁田正和：天然 $\beta$ -カロテンはストレス蛋白(HSP 70)を誘導する。医学のあゆみ 189: 919-920, 1999

## 結 語

$\beta$ -カロテン投与による腹部15Gy照射マウスの小腸放射線照射障害に対する防護効果を $\beta$ -カロテン投与時期とともに検討し下記の結論が得られた。

1. 照射後の $\beta$ -カロテン投与においても肝臓中に放射線防護、回復促進に十分量の濃度が認められた。
2.  $\beta$ -カロテン投与により腹部照射による肝・腎機能障害の一部が防護された。
3.  $\beta$ -カロテン投与により小腸絨毛/腸陰窩は照射群に比し有意に抑制され、放射線障害の防護効果が認められた。
4.  $\beta$ -カロテン投与により照射7日後の腸陰窩壞死細胞数/総壞死細胞数は照射群に比し有意に低下し、小腸絨毛壞死細胞数/総壞死細胞数は有意に増加し、壞死細胞の腸陰窩から小腸絨毛への移行の促進効果(傷害からの回復促進効果)が認められた。
5.  $\beta$ -カロテンの前・中・後投与群ともに有意な放射線防護効果を認めたが、前投与は、照射中・後投与に比し、一部放射線防護効果が低かった。中・後投与には差異を認めなかった。
6. 0.1% $\beta$ -カロテン投与群の方が高い放射線防護効果を示したが、0.01%群と有意な差を認めなかった。

以上の結果より、 $\beta$ -カロテンは照射前・中・後投与とともに、腹部照射マウスの放射線障害を有意に防護するとともに障害からの回復をも促進することが明らかとなった。

## 謝 辞

本研究にあたり、病理所見に関する御指導、御助言いただきました愛知医科大学動物実験センター管理長伊藤美武講師に深く感謝致します。また、本研究に際して $\beta$ -カロテン(*Dunaliella bardawil*)を御提供頂きました(株)日健総本社に深く御礼申し上げます。

- 13)高橋英博, 伊藤要子, 塩見卓也, 他:コレステロール負荷マウスにおけるドナリエラの血漿コレステロール低下作用. 愛知医大誌 28 : 249-255, 2000
- 14)伊藤要子, 鶴見亮, 高橋英博, 他:外因性高脂血症(コレステロール負荷)モデルマウスに対する*Dunaliella bardawil*より抽出した天然β-カロテンの脂質低下作用. 日本臨床生理学会誌 29 : 91-99, 1999
- 15)伊藤要子, 鶴見亮, 野口里恵, 他:*Dunaliella bardawil*より抽出したβ-カロテン(β-カロテン・ドナリエラ)による脂質低下作用-Triton誘導内因性高脂血症ラットの脂質合成・排出過程に及ぼす影響-. 愛知医大 28 : 263-271, 2000
- 16)伊藤要子, 西崎友保, 西崎保, 他:*Dunaliella bardawil*より抽出した天然β-カロテン(ドナリエラβ-カロテン)の高脂血症患者に対する脂質低下作用. 日本臨床生理学会誌 30 : 115-124, 2000
- 17)伊藤要子, 西崎友保, 西崎保:高脂血症に対するドナリエラパウダーの脂質低下作用. 日本臨床生理学会誌 30 : 217-226, 2000
- 18)梶原顯彦:肝動脈塞栓療法における塞栓補助物質としての天然β-カロテンオイル, 乳剤の検討. 愛知医大誌 28 : 199-210, 2000
- 19)Biesalski HK, Obermueller-Jevic UC: UV light, beta-carotene and human skin-beneficial and potentially harmful effects. Arch Biochem Biophys 389: 1-6, 2001
- 20)Dawes E, Wills ED: Effect of dietary antioxidants on lipid peroxide formation in animal tissues after whole body irradiation. Int J Radiat Biol 22: 23-40, 1972
- 21)The Roche European American cataract Trial (REACT): a randomized clinical trial to investigate the efficacy of an oral antioxidant micronutrient mixture to slow progression of age-related cataract. Ophthalmic Epidemiol 9: 49-80, 2002
- 22)Carr KE, Hamlet R, Nias AHW, et al: Lack of correlation between villus and crypt damage in irradiated mouse intestine. Br J Radiol 52: 485-493, 1979
- 23)Carr KE, Hamlet R, Nias AHW, et al: Damage to the surface of the small intestinal villus: an objective scale assessment of the effect of single and fractionated radiation dose. Br J Radiol 56: 467-475, 1983
- 24)Indran M, Carr KE, Gilmore RSC, et al: Mucosal changes in mouse duodenum after gamma-irradiation or reserpine treatment. J Submicrosc Cytol Pathol 23: 267-278, 1991
- 25)Eriksson B, Johnson L, Rubio C: A semi-quantitative histological method to estimate acute and chronic radiation injury in small intestine of cat. Scand J Gastroenterol 17: 1017-1024, 1982
- 26)伊藤信行:最新毒性病理学 137-149, 1994. 中山書店, 東京
- 27)Rogers WE, Bieri JG, McDaniel EG: The fat-soluble vitamins. 241, 1969, the Univ. Wisconsin Press, USA
- 28)Wong YC, Buck RC: An electron microscopistic study of metaplasia of the rat tracheal epithelium in vitamin A deficiency. Lab Invest 24: 55-66, 1971
- 29)Beyadeoglu M, Balkam M, Demiriz M, et al: Protective effect of vitamin A on acute radiation injury in the small intestine. Radiat Med 15: 1-5, 1997
- 30)Redlich CA, Rokwell S, Chung JS, et al: Vitamin A inhibits radiation-induced pneumonitis in rats. J Nutr 128: 1661-1664, 1998
- 31)Seifter E, Rettura G, Padawer J, et al: Morbidity and mortality reduction by supplemental vitamin A or β-carotene in CBA mice given total-body gamma-radiation. J Nutr Cancer Inst 73: 1167-1177, 1984
- 32)山本修:放射線障害の機構 山本修編. 集学会出版センター, 1982
- 33)Scholes G: Radiation effects on DNA. Br J Radiol 56: 221-231, 1983
- 34)Sarma L, Kesavan PC: Protective effect of Vitamin C and E against gamma-ray-induced chromosomal damage in mouse. Int J Radiat Biol 63: 759-764, 1993
- 35)El-Nahas SM, Mattar FE, Mohamed AA, et al: Radioprotective effect of vitamins C and E. Mutat Res 301: 143-147, 1993
- 36)Umegaki K, Itoh T, Ichikawa T, et al: Effect of vitamin E on chromosomal damage low dose of X-ray irradiation. Int J Vit Nutr Res. 64: 249-252, 1994
- 37)Salvadori DMF, Ribeiro LR, Xiao Y, et al: Radioprotection of beta-carotene evaluate on mouse somatic and germ cells. Mutat Res 356: 163-170, 1996
- 38)Konopaka M, Widell M, R-Wolny J: Modifying effect of vitamins C, E and beta-carotene against gamma-ray-induced DNA damage in mouse cells. Mutat Res 417: 85-94, 1998
- 39)Ben-Amotz A, Yatziv Y, Sela M, et al: Effect of natural β-carotene supplementation in children exposed to radiation from the Chernobyl accident. Radiat Environ Biophys 37: 187-193, 1998
- 40)Yoshimura T, Matsumoto T, Miyazaki H, et al: Electron spin resonance studies of free radicals in gamma-irradiated golden hamster embryo cells; radical formation at 77 and 295 K and radioprotective effect of vitamin C at 295 K. Radiat Res 136: 361-365, 1993
- 41)Matsumoto M, Miyazaki T, Kosugi T, et al: Reaction of long-lived radicals and vitamin C in gamma-irradiated mammalian cells and their model system at 259 K. Tuning Radiat Phys Chem 49: 547-551, 1997
- 42)Kyoyama S, Kodama S, Suzuki K, et al: Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. Mutat Res 421: 45-54, 1998
- 43)伊藤要子:ドナリエラパウダーウィルより抽出したβ-カロテンのラットに対する長期投与における影響. ビタミン 74: 212, 2000
- 44)伊藤要子, 鶴見亮, 倉部輝久, 他:健常者に対するドナリエラパウダー・クッキーの大量摂取による影響. 健康・影響食品研究 3: 1-6, 2000
- 45)Yamada T, Ohtama H: Radiation-induced interphase death of rat thymocytes is internally programmed (apoptosis). Int J Radiat Biol 53: 65-75, 1988
- 46)Potten CS, Merritt A, Hickman J, et al: characterization of radiation-induced apoptosis in the small intestine and its biological implications. Int J Radiat Biol 65: 71-78, 1994
- 47)Ushakova T, Melkonyan H, Afanasyev L, et al: Modification of gene expression by dietary antioxidants in radiation-induced apoptosis of mice splenocytes. Free Radic Biol Med 26: 887-891, 1999