

実験医学方法論:

発がんやストレス反応において

再現性・客観性を追求した経験

教授 森 井 外 吉

明治鍼灸大学大学院鍼灸基礎医学科

実験医学方法論という大きな表題をかかげたが、これについて私が日頃考えていることの一端を先ず簡単に述べたい。ついで、得られる研究成果の再現性・客観性確保に努めた私の小さな経験の若干をご紹介します。多少でも、東西医学の融合を目指して日夜研鑽しておられる本学の皆様のお役に立てば、私の最も幸甚とするところです。

多くの一般の人々は、自然科学は宇宙とそこにある万物を客観的に理解するための終りなき探究だと考えている。確かに、科学は真理を追い続ける終りなき人類の営みの一つではあるが、研究者個人にとっては、自ら設定した作業仮説の真偽を確かめえたところで、実際にはその研究は終りと考えて、その成果を公表して世間の批判を受けるのが通常である。作業仮説というものは、それに続く研究による確認の対象となる仮定の命題である。多くの場合、自然界にみられる変数間の関係の実在について、研究者個人が抱いている予想である。それ故、自然現象における新しい発見というものは、自然現象を忠実に無心にみつめる研究者個人の脳における“ひらめき”によってまずみつけれられるものである、と私は考えている。その後の実験は、その予想、作業仮説の妥当性を吟味するための作業に過ぎない。また、作業仮説が研究で一応正しいようにみえても、それは絶対的なものと信じてはいけない。現在正しいようでも、将来の研究で否定されるかも知れない、とりあえず現在保留されただけのものである、と私は納得している。そこに、終りなき探究という自然科学の実態がある。

“あらゆる生命現象は正しい科学的実験の積み

重ねによって解明されるべきであって、方法論的には、生命体の科学も無機物の科学も変りがない”という信条から、クロード・ベルナールは前世紀中葉に「実験医学序説」を刊行した。自然界にみられる科学的原理は、生物でも無生物でも決して別のものでないだろう。その意味において、彼の著述は多くの人々に強い影響を及ぼし、その歴史的使命を十分に果たした。しかし、医学はホメオスターシスを示す多細胞生物であるヒトをあくまでも対象としているので、実験医学的研究では、生きている多細胞生物を利用すべきで、*in vitro*の単細胞生物の観察のみでは不充分である。そこに、野生動物・家畜を含む実験用動物の有用性がある。そのうちの実験動物Laboratory Animalsは、科学研究に重要であると飼いならされ、合目的に育成・繁殖・生産された動物である。それは実験医学に現今多用されているが、供試される実験動物の種属・系統・品質をよく吟味することが最も肝腎である。それに加えて、得られた研究成果のヒトへの外洩が可能で、有意義なものでなければならない。また、研究に要する経費・時間も忘れてはならない。以上のことから、小さな哺乳類で生産性の高い実験動物、例えばマウス・ラットのそれらが現在最も繁用されている。

動物実験にはいろいろあるが、すべての条件が同じに揃えられた供試動物の一群に一つの刺激(処置)を加え、それへの反応を数量的に吟味する形式のことが多い。この際、生命現象を可視的な対象として認識できるといふべし、数値的に表現しうる現象こそが自然科学の対象たりうるものとする立場を許さねばならないだろう。そして、

反応に関する観察データの客観性については、観察する人間の客観性に限度があるので、生物反応の再現性、客観性に多くを望むなら、次のことに心がけねばならない。なるべく同一条件下にあ実験動物をできるだけ多数使用し、なるべく単一の刺激（処置）とそれへの直接的反応（無処置群にはまったくみられず、すべての処置例にみられる簡明な現象）を直結させて検討できるのがよい。同じ条件下で飼育しつつある多数の実験動物を用い、投与処置のみに応じて発来する現象に注目するわけである。このような実験を日を変えて短期間に数回試み、無処置と処置の2群で得られたデータに、統計学的処理を施して統計学的有意差を確認しえたもののみを、再現性・客観性のある研究成果と考え、私個人はそれに甘んじている。

同一種属の実験動物には、①近交系（兄妹交配を20代以上継続しているもので、遺伝子型はほぼ均質となった集団）、②交雑系（近交系間の雑種で、F₁ 雑種などの特性がよく利用される）、③

ミュータント系（遺伝子記号で示しうる特性をもつものと、淘汰選抜によって特定の遺伝形質を維持するもの、とがある）、さらに④クローズドコロニーがある。④は、5年以上外部からの導入がない一定の集団内のみで繁殖しているもので、多数の供試動物生産が行なわれているコロニーである。生産業者によってこのようなコロニーから比較的容易に供給され、遺伝子型も比較的安定した特性をもつ実験動物は、多忙な医学研究者によって今日最もよく利用されている。とにかく、遺伝子型がほぼ同一な供試動物を多数揃えることが実験医学的研究の第一歩である。この遺伝子型に発育環境（妊娠・授乳などの母体条件と、乳仔数・哺乳期間・性や加齢、その他の生理的因子などの仔体条件から構成される）が影響して、その表現型が作成される。さらに、この表現型に近隣環境（表1）が関与して演出型が作成される。これらのタイプのすべてが同一で、品質特性（例えば特定病原微生物に接触したことがないSPF動物など）の一定の検査を経た実験動物を多く入手して、実験医学的研究の実際が開始しうる。

表1. 近隣環境の統御と適正な実験動物演出型をうる飼育室調節の目標値

I 気候の統御

気温（21～25℃）、気湿（46～65%）、気流（13～25cm/秒以内）、換気（10回/時間以上）、気圧（平圧、特別な目的で飼育室の内外で圧差をつくることもある）、照明（150～300ルクスの人工照明で、12時間毎あるいは14時間の明と10時間の暗と、自動的に明暗を変換）、騒音（40～50ホン以下）、臭気（アンモニア濃度20ppm以下）

II 食物・水の統御

吟味した合成飼料と水道水の自由摂取

III 住居の統御

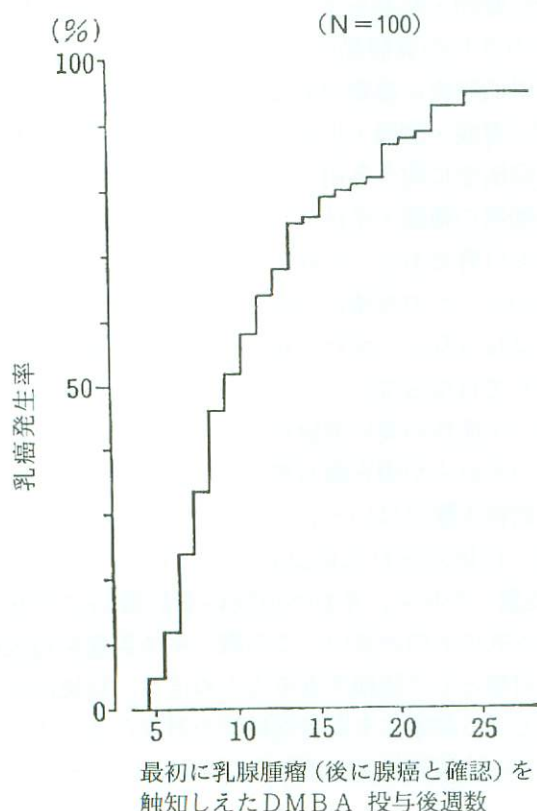
ケージ、床敷、給餌器・給水器、建物など

IV 生物社会的統御

同居動物の性ないし数、異種生物（研究者も含む）との接触

1950年前後から約10年間の戦後未だ貧しかった日本で、私は、遺伝子型も不詳なネズミ、ウサギで演出型をなるべく同じように揃えて購入しえた

図1 Sprague-Dawley 系メスラットにおけるDMBA 乳癌の発生率



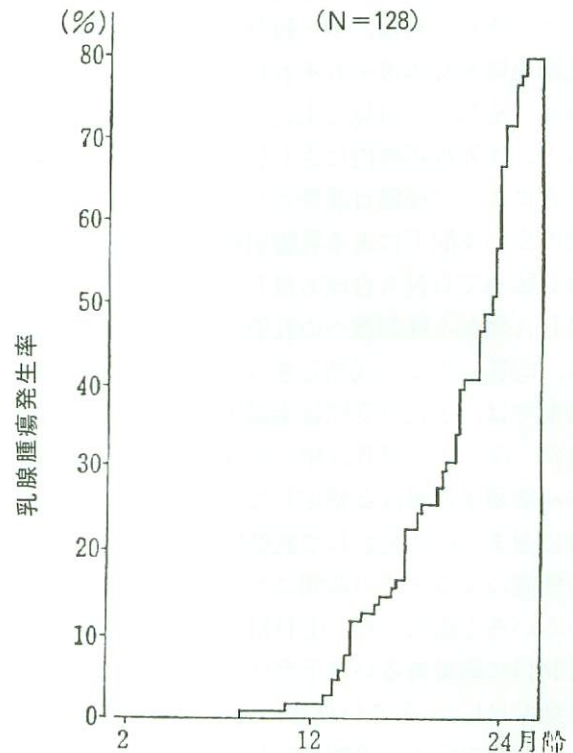
ものを、極めて劣悪な近隣環境で飼いながら、複雑多岐にわたる「腫瘍と内分泌」の課題で実験を続けた。その頃に得られた動物実験データのばらつきに非常に困惑したことを記憶している。当時、貧しい研究環境でもそのような悩みが少い組織化学的研究に、私の興味は移りがちであった。1960年代の良きアメリカへ留学し、シカゴ大学で2年間、さらに数ヶ月と2度も、上述したような哲学で着々と進められている実験医学的研究の実際に触れた私は、アメリカ経済の豊かさに感嘆し、実験を進める方法論に強く共鳴した。優れたエアコンで室内気候がよく調節されているので、一年中を通じていつでも同じような理想的な近隣環境で実験を進めることができた。帰国後、次第に豊かになった日本で、実験医学方法論についてアメリカで触発された私の信条を守ることにも次第に可能となり、多くを望まねば、質の高い実験的研究を重ねることが私にも出来た。

(I) DMBA単一投与によるラット乳癌誘発

前立腺癌の内分泌療法に成功したHuggins は、1950年にシカゴ大学に癌研を設立し、ホルモン依存性がんの研究に専心していた。

チャールズ・リバーという生産業者が供給するクローズトコロニーの Sprague-Dawley (SD) 系幼若ラットを購入し、体重170~180gの50日齢メスを選び、7,12-Dimethylbenz (a) anthracene (DMBA) という合成化学物質の20mgを、ゴマ油1mlに溶かしてからゾンデで胃内へ1回だけ注入し、この単一経口投与5週以後毎朝全供試ラットの乳腺領域を触診して乳腺腫瘍発見に努めると、投与後9~25週で極めて高率に乳癌（ほとんど腺管腺癌）を誘発しうることを、1959年にHuggins らは報告した。帰国後、日本クレアが供給するSD系ラットを、10時間の暗と14時間の明と変換する人工照明の室内（飼育中のラットのゴナドトロピン分泌が多くなる）で、蛋白と脂肪の質を吟味した合成飼料で飼養しつつ、アメリカでしたと同じことを再試した結果を図1に示す。毎朝の乳腺触診（プロラクチン分泌を促す）も根気よく続けると、アメリカでみたと同じような成績を得ることが出来た。同時に、DMBA非投与の対照SD系メスを、乳腺触診を施さないまま約3年間観察した。1年齢以上になると、自然発生下

図2 Sprague-Dawley 系メスラットにおける自然発生乳腺腫瘍（線維腺腫）の発生率



垂体巨大腫瘍や肺炎が直接死因で死ぬものもあったが、10ヶ月齢以上の弊死直前の断頭屠殺剖検例で、晩発性の自然発生乳腺腫瘍を多数みた（図2）が、そのすべては良性の線維腺腫であった。なお、2年齢以上生存した対照SD系メス剖検例から採取した乳腺腫瘍の数パーセントに、小範囲ながら髄様癌様の腺癌の組織像を示すところもあった。次に1960年にHuggins らは、DMBAを乳化剤とし、その1ml(DMBA 5mgを含む)を上記したような条件のSD系メスの尾静脈内へ1回だけ注入し、胃内注入群と同じような乳癌誘発を認めた。現在、DMBAの胃内注入ないし静注という全身投与を1~2回するだけで誘発されたラット乳癌はHuggins 乳癌と呼ばれている。従来の発がん実験では、動物に発がん性刺激を頻回に与えねばならなかったのが、発がん性刺激の単一全身投与で短時間に高率のがんが誘発されたことは、非常に驚くべきことであった。放射能でラベルされたDMBAの単一静注後のラットでDMBA体内クリアランスを検討した我々は、単一投与2週間以内をDMBAによる発がん起始過程と想定した。

DMBA投与オスや卵巣1週後DMBA単一投与メスでは、乳癌誘発はまったくみられなかった。また、25日齢あるいは90日齢でDMBAを単一投与されたメスでは、乳癌誘発が激減あるいは半減した。それで私は、単一投与時期のSD系メスの乳腺組織を帰国後それぞれ組織化学的に観察してみた。それらの所見と上述の乳癌誘発率を対比すると、①乳腺組織内に乏しい腺管のみでは、DMBAによって腺癌は誘発されない、②ホルモン環境の良い支配下にある乳腺組織内に腺葉がよく発育し始めてDNA合成も最高に達する時期で、DMBA発がん性刺激への乳腺の感受性は最高になる、③乳腺腺葉が成熟しきってDNA合成も減る時期では、上記感受性は半減する、などと結論された。次に、DMBA単一全身投与2週間以後をがん増殖促進過程と想定した、具体的には、投与後12週までに誘発されて乳癌細胞群が小豆大以上の腫瘤になるまでの期間について、乳癌増殖度をいろいろと追求した。①DMBA単一全身投与2週間目に卵巣あるいは下垂体を剔出すると、乳癌誘発率は1/3あるいは0に近い程激減した、②上記期間で宿主に過剰ないし不適当な卵巣ホルモン外来性投与を試みると、乳癌誘発率は非常に低下した、③スルビリドという血清プロラクチン値を上昇させる薬剤を上記期間中与え続けると、1匹当りの乳癌個数や総重量は有意に増加した、④上記期間中、DMBAを与えた被験ラットを3群に区分し、無脂肪食、8%コーン油食、20%コーン油食をそれぞれ調製して、それらで飼養したが、誘発乳癌の1ラット当りの個数や総重量は、無脂肪食群に比べて、20%コーン油食群で有意に大であった(表2)。ルーチンの合成飼料は約8%の脂肪を含んでいるもので、コーン油は長鎖不飽和脂肪酸がかなり多いものだが、8%コーン油食はルーチンのものに対比しうると考える。カロリーが多い20%コーン油食を与えられた群の1日摂餌量は少なく、そのためか、3実験群間の体重曲線などに著しい相違がないことも確かめえた。同じような実験デザインで、各実験群ラットのホルモン動態や誘発乳腺腫瘍のDNA合成能を生化学的に吟味した。20%コーン油食群の乳癌細胞のプロラクチン感受性が、宿主のプロエステルスで、無脂肪食群のそれに比べて、有意に強く亢進していた。以上から、Huggins乳癌はホルモン依存性

がんの優れた実験モデルであるといえよう。

表2 DMBA誘発乳癌増殖に及ぼす高脂肪食の影響

実験群 (担がん例 /有効例)	最終体重 (g)	DMBA投与後 乳癌を触知し始 めるまでの日数	誘発乳癌	
			個数/ラット	総重量(mg) /ラット
無脂肪 食群 (30/34)	256±15.9	75±13.3	2±1.5	1509±1579
8%コーン 油食群 (14/17)	253±14.5	74±10.4	4±2.7 *	2885±2600
20%コーン 油食群 (20/24)	266±16.7	64±11.8 *	7±4.0 * *	5672±5537 *

計測値は平均値±標準偏差で示す。無脂肪食群に対して、
* * 1%以下、* 5%以下の確率で有意差を認める。

1980年頃のアメリカで、近交系のSDとLong-Evans (LE) ラットやその交雑系を利用して、乳腺細胞のDMBA発がん性への感受性を支配している遺伝要因は、SD系に強くあると報告された。このような遺伝要因をSD系よりも強くもっているWistar/Furth (WF) 系、この要因をほとんどもたないCopenhagen (Cop) 系をそれぞれ入手し、これらの近交系の維持とその交雑系を作成してみた。遺伝要因にそれぞれ特性を示す近交系メスについて、DMBA単一全身投与を施して、それらの乳癌誘発率に関する特性を再チェックしえた。さらに、これらの近交系やその交雑系メスに、DMBA1回投与といっても、別形式になる局所発がん実験を試みた。すなわち、これらの30日齢メスで、片側鼠径部皮膚にメスで浅い切開を加えて同部乳腺を肉眼直視下に曝露し、この乳腺脂肪組織表面の一局部にDMBA粉末1mgを直接ふりかけ、すぐに同部皮膚を金属クリップで閉じた。術後2ヶ月頃からふりかけた局部に米粒大腫瘍単発を認め始めた。この実験では、連日の乳腺触診なしで観察し、指頭以上に増大して乳腺腫瘍外面が潰瘍化寸前になった被験例を剖検した。単一ふりかけ後約5ヶ月で全剖検を終えたが、剖検でも局所以外には腫瘍や転移巣をまったくみいだせず、全例で各例一つの腫瘤のみで、その組織像も腺癌、癌肉腫または肉腫と一つに診断しえた。(表3)。全体としては誘発腫瘍の組織像は多彩といえる。この局所発がん実験では、局所に残留しているDMBA粉末の傷害効果に、乳腺組織の腺上皮も間質もかなり長い間さらされている。それ

らにおける発がん性刺激への感受性は、WF系メスでは腺細胞で非常に高く、COP系メスではほとんど間質細胞のみにみられた。発がんにおける遺伝要因の強さが、組織像頻度にみられる系統差として理解できよう。また、両近交系のF₁雑種やそのバッククロスの子メスでの局所発がんには、COP系の遺伝要因が優勢のようで、肉腫形成反応が癌腫形成反応よりも強かった(表3)。ヒトでは、乳癌はよくみられるが、乳腺肉腫をほとんど

表3 近交系 Wistar/Furth および Copenhagen 系、それらの交雑系のメスラットにおけるDMBA粉末ふりかけによる局所発がんとその組織像の頻度

実験群		WF	Cop	(WF× Cop)F ₁	BC(F ₁ × WF)	BC(F ₁ × Cop)
担がん例/有効例		15/15	17/20	12/19	11/16	14/19
組織像	腺 癌	12	0	1	4	0
	癌 肉 腫	2	1	2	1	0
	肉 腫	1	16	9	6	14
腫瘍形成能(%)	癌腫形成反応	93	5	16	31	0
	肉腫形成反応	20	85	58	44	73

どみない。それで、乳腺へのDMBAふりかけ実験の成果をヒトに外捜しても余り意味がない。なおDMBAふりかけSD系メスを1年以上観察しえた少数例で、その1/3例に肉腫細胞の肺転移巣をみたことは興味深い。この場合、腺癌細胞の転移をまったくみなかった。なお、腫瘍そのものへの特別な手術操作なしで1年以上も観察しえたHuggins乳癌例でも、転移病変はまったく認めなかったことを私は追記したい。

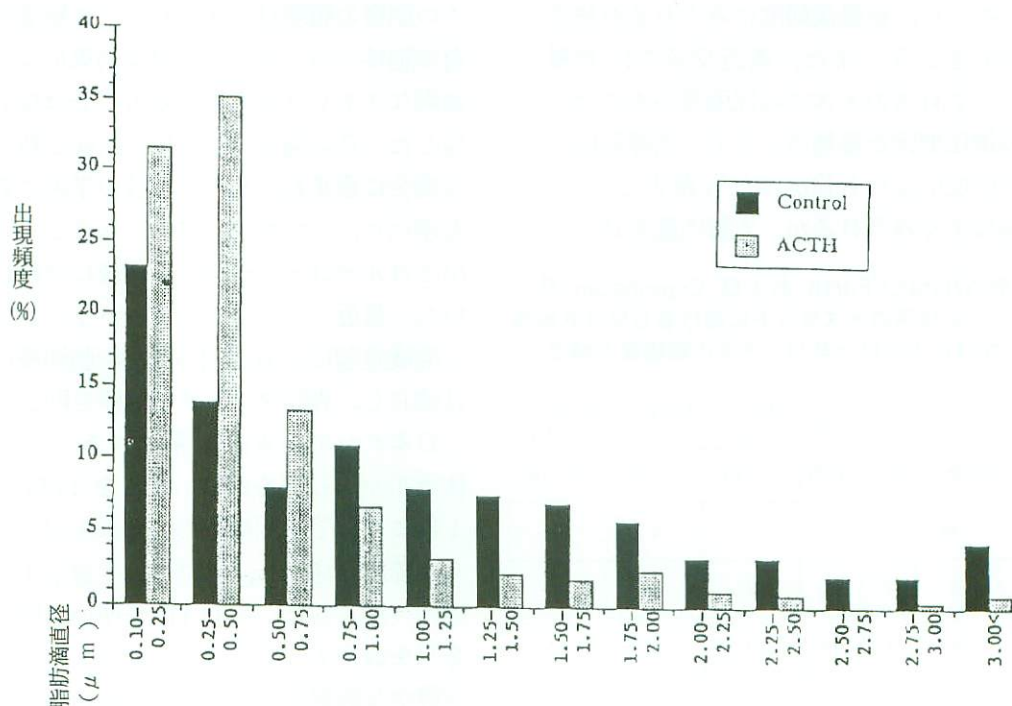
(II) ACTH1回投与1時間後にみられる副腎皮質細胞内脂肪滴の電顕的変動

私は研究を始めた1950年頃に流行していたSelyeのストレス学説に興味をもち、その中軸にある間脳下垂体副腎皮質系の形態学的変動を若干考究したことがある。渡米直後の私は、Huggins乳癌誘発実験の傍ら、DMBAの毒性を吟味していた。やや多いめのDMBAを全身投与すると、単一投与後2-3日で両側副腎皮質に広般な出血壊死が全被検ラットに発来することをみいだした。

この病変はDMBAそのものの化学構造やDMBA投与時ラットの副腎皮質細胞機能相ときわめて密接に関連して発現することを確認めた。それで、この副腎の病変は、ステロイドに感受性を示す皮質細胞核へのDMBAの直接効果によるもので、過剰なストレス反応によるものではないと私は推論した。この論文についてSelyeと親しく討論する機会に恵まれ、その折に彼の学説に若干の批判も述べた。いずれにしても、ACTHの急激な放出とコルチコイド分泌の形態像には私は注目していた。最近、イミダゾル・パラフェニレンジアミン混液処理による細胞内微小脂肪滴検出法を我々は確立し、表記タイトルの実験を再び試みてみた。

日本クレアのWistar系オスラットを購入し、体重200gの12匹を選び、それを2群に区分した。1群にACTH32単位を生食水1mlに溶かしてから腹腔内へ注入し、他群には生食水1mlのみを腹腔内へ注入した。毎回4匹を使い、同じ実験操作を日を改めて3回くりかえした。すなわち、早朝の静かな飼育室内で、午前8時から同じ実験者が少数ラットを慎重に取扱いながら、単一腹腔内投与後そのまま飼育ケージに一旦戻し、夫々を正確に1時間後にケージより再びとり出して直ちに断頭、放血で屠殺した。開腹して両側副腎を採取し、それを冷グルタルアルデヒド緩衝液に投入した。この前固定を続けながら、約20分後に副腎組織を約1mmの厚さにスライスし、約40分後に実体顕微鏡下でスライス面で皮質束状層に相当するところを選んで約1mm角に細分し、さらにそれら細片の2時間以上の浸漬固定を續けた。細片のすべては同じように、終夜洗浄後、オスミウム後固定と我々の混液処理を受けた後、エポンに包埋された。各ラットから最低4包埋ブロックを、各ブロックから0.08μm ぐらいの厚さの超薄切片の最低1枚をとって角孔グリッドにのせ、角孔の4隅部位から無作為に1万倍で電顕観察を夫々10回試み、各実験群240枚の2万倍電顕写真について形態計測を試みた。対照群に比べて、ACTH投与群で、断頭時採血の血清コルチコステロン値が有意に上昇し、副腎皮質束状層細胞内脂肪滴は光顕的には著減した。電顕像の形態計測では、皮質細胞内脂肪滴の平均直径や volume densityは、対照群と比較して、ACTH投与群で有意に減少したが、興味あることにACTH投与群では単位面積当り

図3 Wiatar系オスラット副腎皮質束状層細胞内の脂肪滴直径の変動



の脂肪滴数は逆に増加し、とくに微小なものの出現頻度が多かった(図3)。このような興味ある新知見が得られたのは、我々の手技を応用したために、2万倍に拡大された電顕写真で0.1 μmの直径をもつ微小脂肪滴までも計数できたからである。ACTHの急激な刺激を受けて、皮質細胞内でコレステロールエステルの急激な利用・動員ないし補給が進められるが、上記実験条件下では皮質細胞内脂肪滴が多数に分散・微小化される超微形態の変動を始めて確認できた。

拙い話しを終るに当たり、ご静聴を深謝するとともに、本学のご発展を心からお祈りします。

(追記) 第7回明治東洋医学院学術集談会(平成9年1月10日)で特別講演として発表した要旨である。

参考文献

- 1) Huggins, C., Briziarelli, G. & Sutton, H. Jr : Rapid induction of mammary carcinoma in the rat and the influence of hormones on the tumors. J Exptl Med 109 : 25-42, 1959.
- 2) Huggins, C. & Morii, S : Selective

adrenal necrosis and apoplexy induced by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. J Exptl Med 114 : 741-760, 1961.

- 3) (i) 森井外吉, 藤井登志之 : JCL Sprague-Dawley系ラットにおける自然発生乳腺腫瘍. 実験動物 22 : 127-138, 1973.
(ii) 森井外吉 : ヒト乳癌モデルとしてのラット乳癌. 日本医事新報2789 : 126-127, 1977.
- 4) Huggins, C.B : Experimental Leukemia and Mammary Cancer : Induction, Prevention, Cure. The University of Chicago Press, Chicago and London, 1979.
- 5) Oyaizu, N., Morii, S., Saito, K., Katsuda, Y. & Matsumoto, J : Mechanism of growth enhancement of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene-induced mammary tumors in rats given high polyunsaturated fat diet. Jpn J Cancer Res (GANN) 76 : 676-683, 1985.
- 6) Takahashi, H., Shoji, T., Tsubura, A., Morii, S : Neoplastic response to DMBA

- powder in mammary and interscapular tissues in Wistar/Furth and Copenhagen female rats. *Int J Oncol* 1 : 657-659, 1992.
- 7) Nakao, I., Okada, H., Senzaki, H., Nishimura, R., Fujita, N., Shikata, N. & Morii, S : A mixture of paraphenylenediamine and imidazole: its effect on the extraction of lipid droplets during electron microscopy staining. *Biotechnic Histochem* 67 : 217-223, 1992.
- 8) Morii, S., Nakao, I., Shikata, N. & Tsubura, A : Ultrastructural detection of minute lipid droplets with a mixture of imidazole and paraphenylenediamine in the adrenal cortex. *Proceeding of the Xth International Congress of Histochemistry and Cytochemistry*, 587-588, Kyoto, 1996.

**Methodology in Experimental Medicine, Especially Pursuit of
Reproduceability and Objectivity in Experimental Data on
Chemical Carcinogenesis and Stress Phenomenon**

MORII Sotokichi, MD, PhD

*Meiji University of Oriental Medicine.
Postgraduate Course.*

† To whom correspondence should be addressed.