

動 物 実 験

渡 辺 敦 光

筑 豊 博 物 第 37 号 (平成 4 年 12 月) 別 刷

Reprinted from NATURHISTORICA CHIKUHOANA No.37

December 1992

# 動物実験

渡辺 敦光

広島大学原医研癌部門

Animal experiment

Hiromitsu Watanabe

Department of Cancer Research,

Research Institute for Nuclear Medicine

and Biology, Hiroshima University,

Kasumi 1-2-3, Minami-ku, Hiroshima, 734.

はじめに

本誌で度々述べて来ましたが私達の仕事の大部分は動物を用いた研究ですし、それらを用いた多数の研究が世界中で行われて来ています。その結果多くの事が判明し、人々に還元されています。動物実験については昨年度も本誌で少し述べました事<sup>1)</sup>と一部重複しますが、今回は動物実験の有用性と、動物実験を通じて観察した事、並びに今行われている新しい実験動物の開発等について述べたいと思います。

動物実験の有用性並びに問題点

以前は種々の物質の安全性を検討する目的のためにマウスを用い、LD<sub>50</sub>(どれだけ量を投与すると半分の動物が死亡するか)値の算定のために多数の動物が使用されて来ましたが、しかし最近では培養細胞を用いる事によってそのLD<sub>50</sub>等の動物の死や病的状態を利用する研究の必要性は徐々に少なくなって来ています。培養技術革新により細胞レベルの試験は生体を用いる試験に比べてより詳細に、しかも弱い毒性が検出出来る様になりました。

しかしながら投与された物質の生体での反応は分子、細胞、個体の各々のレベルで種々の反応がお互いに連関して起こるために、生体内で起こる複雑な反応を再現予測するには

培養系のみでは今のところ不可能に近い状態です。動物実験ではある物質の曝露を行いその毒性がどのような組織器官に障害を引き起こすかという事(質的)のみならず、曝露用量と生体反応の相関関係を量的に明かにする事は動物を用いた実験でのみ可能です。

そこで培養細胞では出来なくて動物実験でのみ得られる研究を以下の様にまとめて見ました。

第一に不必要と言いつつも必要なLD<sub>50</sub>値を算定するための急性毒性試験(2週間から約1カ月で終了します)や、亜急性毒性(約3カ月で終了します)及び2年間の慢性毒性試験が行われます。この様な試験からある物質の致死量、毒性発現機構や標的臓器、毒性兆候、発癌性の有無等の情報を得る事が出来ます。

第二に生殖や発生に対して繁殖能力に対する影響、催奇形性としての発生異常の検出、化学物質の皮膚感作試験の様な免疫反応を介した影響、日光が化学物質を活性化し、皮膚刺激を増強する反応等を試験する事が出来ます。

第三に物質の体内への吸収、分布、代謝、蓄積、排泄等の生体内動態に関する研究や、又、神経及び行動毒性試験が可能で、ある物質を発生途上の胎児や成熟動物に曝露させ、

その識別能力を検討する事も出来ます。

第四に物質の安全性や効果を評価するためには1つの投与方法では不十分ですので投与経路(経口、経皮、吸入)の差による長期曝露の影響を検討する事が出来ます。

以上の様に動物実験を通して私達にとって多くの有用な情報を得る事が出来ます。

しかし動物実験の欠点は昨年も述べました様に時間と経費が掛かる事なのです。1つの物質の発癌性試験をするためには3年以上の年月と約3000万円の費用が必要です。又、特に注意しなければいけない事は動物間に存在する種差、系統差が有るという事です。それを知らないと実験は思わぬ結果を導きます。例えば強力な発癌物質でいつも出て来ますがN-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)は一般にラットで胃癌を誘発しますが、マウスの種々の系統で投与されましたが今まで胃癌の発生の報告はありません。一方ラットでもMNNG処理で胃癌が出来易いACIという系統と、出来難いBuffloと言う系統があります<sup>2)</sup>。私達の経験ではW/Fuと言うラットの系統にMNNG与えますと胃には癌は出来ず肺に癌が生じた<sup>3)</sup>。この様に種や系統の差によりMNNGの感受性や標的臓器が異なって来ます。

又、胃癌の特殊な型としてちょっと専門的になりますが印環細胞癌と言う悪性の胃癌があります。この癌は原爆被爆者に多く、一般には若い女性に多く、進展が早く、良く転移する予後の悪い癌です。「きょんきょん」と小泉今日子の出演する今年の正月映画「病は気から 病院に行こう2」は彼女がこの印環細胞癌であるスキルスという末期の胃癌にかかっていると言う想定です。その印環細胞癌です。私達は種々の系統のマウスを購入し放射線を照射し、この癌を作る試みをしましたが旨く行きませんでした。私達の研究室でカタラーゼの少ない特殊なマウスを維持しています。たまたま予定していた実験がキャン

セルになったため動物が余りました。そこでこのマウスの胃部にX線照射しますと待望の印環細胞癌が生じ昨年報告しました<sup>4)</sup>。これがマウスの胃における印環細胞癌の誘発の最初の報告になりました。この親系統のC3Hと言うマウスに照射しても印環細胞癌は生じませんでした。又、N-methyl-N-nitrosourea (MNU)と言う発癌物質があります。これをラットに与えますと胃癌を誘発します。しかしこの物質をC3Hマウスに経口投与をしますと印環細胞癌が生じる事を私の良き友人で仕事の上ではライバルである愛知県がんセンターの立松正衛先生達のグループにより今年の癌学会で報告されました<sup>5)</sup>。私達は同じ発癌物質をカタラーゼの少ないマウスを用い立松博士と同じ方法で投与しました。しかし胃癌は生じないで皮下に肉腫が多発する事を見だし<sup>6)</sup>、彼と同じ会場で同時に発表しました。悪い事には私達はカタラーゼの少ないマウスのみで実験を行い、C3Hマウスの実験を行っていなかったために彼に一步先を越されました。ものすごく頭の良い人は頭の中で実験を組立て結果を推察しますが、動物実験は頭で考えた通りの結果が得られる事は稀です。動物実験はやってみないと解らない事もあり、ひょんな事から面白い結果が得られる事が多々あります。この様な理由のため私達は肉体労働者と考えていますので、まず動物実験をやってその後考える事にしています。この様に種差、系統差を旨く使う事により今まで不可能だった癌が出来る様になりました。系統の選択がいかに大切であるかがお解り戴けるかと思います。

その上、生体反応は年齢に影響しますが、一般に若い動物程ある物質に対する感受性が高い事が知られています。先に述べました系統差にも関係しますが遺伝的な形質や、栄養状態や性によっても実験結果が異なります。そこで動物実験を行う上ではこれらの点も考慮しなければなりません。年齢について一つ

の例をあげますとACIラットは前述した様にMNNGに対し高感受性で胃癌を高率に誘発しますが、生後5日目に1回投与するだけで胃癌が生じます。一方生後28日目に同様に1回投与しても胃癌の発生率は減少します<sup>3)</sup>。これは週齢により感受性の変わる一例です。遺伝的な問題は多くの研究室で遺伝子の解析が行われていますがまだその遺伝子の解析は終了していません<sup>2)</sup>。次に栄養条件について少しお話しますと、C3Hマウスの雄は普通の餌と水でそれ以外何も処理しないで飼育しますと生後1年後頃より肝腫瘍が特に雄に生じます。しかし雌には殆ど起こりません。この肝腫瘍の発生には性差があります。餌の中に発癌物質が入っている可能性もあり本当の意味では自然発生ではないかもしれませんが、他の系統のマウスでは同様に飼育しても自然発生の肝腫瘍は生じませんが、他の癌が生じる場合があります。そこでこのC3Hマウスに味噌の入った餌を投与し続けると、自然発生の肝腫瘍が減少します。更に広島型の原爆と同じ線質の中性子を照射したマウスに味噌の入った餌や普通のマウス様の固形餌を制限して与えますと餌を自由に接餌させたマウスに比べて肝腫瘍は減少します<sup>7)</sup>。特に飽食は肝腫瘍を増加させ、制限餌即ち昔から言われている「腹八分目」餌では腫瘍が減少する事を見いだしました。昨年述べました様に<sup>1)</sup>食塩やエタノールも同様に癌の発生を修飾しますが、これらの事は栄養条件や性差で生体の反応が変わりうる事を示しています。

更に最近では動物倫理の面から色々と厳しい規制が来ています。特に犬や猫の様なペット用の動物を実験に使用した場合に、動物飼育条件、例えば散歩、餌、水等をどのように行ったかという条件や、虐待していないと言う証明書を添えて論文を投稿しませんが掲載してくれない雑誌が増えています。私達の広島大学は実験動物の取扱い基準を決め、その上更に私達の研究所の動物施設を使用する

場合の取り決めを文書にし、その線にそって実験を進める様にしていますし、論文に書くときにはその様に記載します。

動物実験は今まで述べた理由で必要ですので、必要最低限の動物実験は行わねばなりません。しかし無益な実験目的のためや、無駄な動物の屠殺のための動物実験は行うべきではありません。そこで実験の特に質のみならず、量の問題、特にLD<sub>50</sub>の実験で無駄な動物を消費していないかを正しく判断しなければなりません。現在では前述した様に培養細胞で毒性試験をまず行い、強い毒性のあるものはそこで実験が中止されます。弱い毒性のあるもののみが動物実験にまわされる様になっています。ある意味では無駄な動物実験は少なくなって来ている様です。又、私達の研究所の例を挙げますが、動物実験を行う場合、まず実験計画を書き、目的、何をどれくらい、何匹の動物を使用し、何時までに屠殺すると言う事を明記し、実験を始める様にしています。平成4年2月にはスイスで動物実験の是非が国民のレベルで問われましたが、動物実験の禁止は否決されました。Council for International Organization of Medical Science (CIOMS)は1985年に医学領域の動物実験に於ける3R即ち、replacement (代替)、reduction (屠殺動物数の減少)、refinement (実験処置の向上)の厳守を提唱しています。日本でも代替実験が可能ならば動物実験を行わずにその様な実験を行う様に指導されています。その線にそって「日本動物実験代替法学会」が発足し活発な活動が行われています。しかし、まだ動物実験に替わる全ての培養細胞を用いた実験方法は確立されていません。

#### マウスやラットの動物飼育室での習性

私達の実験動物の取扱う大原則は「動物愛護の精神に基づき動物に苦痛を与えない様に注意を払う事」となっています。即ち私達は

動物に手術とか種々の処理を行う場合や屠殺時には麻酔をし、動物に苦痛を与えない様に、して処理する事にしています。

ここではちょっと話題を変えて実験動物で私達がいつも使用しているネズミについて少し述べます。一言にネズミと言いましてもラットとマウスがあります。マウスはラットを小型にした様な形をしているためにラットの小型がマウスと思われるでしょう。でもいろんな意味で2種類はかなり異なっています。マウスの染色体数は40本ですがラットは42本です。マウスには胆嚢がありますがラットにはありません等々です。前述した様に物質の反応性や感受性がマウスやラットで異なります。又、雄と雌とでもかなり異なっています。繁殖については又の機会に述べる事にしますが、雌雄では体重に差があることに気が付きます。雄は皮膚が堅く注射を打ったり解剖する時には私達の手に肉刺が出来ます。雌の皮膚は大変柔らかく処理が大変楽です。雄の尿が臭いのは多分自分のテリトリーを示すためだと思いますが、雌に比べて臭いが強く、白いマウスより色の黒いネズミの方が臭いは強烈です。しかしラットはあまり臭いません。1ケージに仕切をして数匹飼いますと、その仕切のところにオシッコをします。だから犬の様にオシッコは自分のテリトリーを示すものだ確信しています。実験中に実験着を通して尿の1滴がシャツに付きますとその臭いが取れず困った事がありました。又、飼育室で長時間作業しますと毛糸のセーターには臭いがしみ込みます。しかしながら一般にネズミは意外と清潔好きです。例えば「おしっこ」は隅の方で行っています。赤ちゃんを生ませる場合には母親をいらつかせない様にケージを新聞紙等で覆い、ある期間ケージを交換しません。ケージが汚れてくると母親は自分の「うんち」をケージの外へ出し、清潔を心がけている様です。

ネズミは夜行性です。いつも私達が動物舎

に入って動物を観察する時は昼間ですので夜の事はあまり解りません。時々夜消灯後に行きますと、餌を食べている音、走り回っている音等で大変賑やかです。飼育室には窓がありませんし、室温や湿度は一定にし、尚12時間の明暗の調節を行っていますので季節が無い様に見えますが、やはり季節を感じている様です。例えば交配は春や秋が交配が旨くいく時期ですので、人に感じられない空気の匂いを嗅ぎ分けて季節を感じているのではと思います。

ネズミの顔つきは大変可愛いのですが、シッポがあるからどうも嫌いだと思っていられる人が大勢です。でもシッポはネズミにとってもいろんな所で役だっています。シャボをビリビリと震わせて威嚇に使ったり、壁を登る時の体の支えにしたり、狭いところに入れようとする入り口を尻尾で抑えて出ようとするのに使います。時には喧嘩をしたり、事故でシッポをケージと上蓋の間に挟まれ壊死を起こし時折シッポの無いネズミがいますがその様なネズミはネズミにとっても大変でしょうが、ケージを交換する時には私達にとっても大変困りものです。

体重を計って見ますと1匹だけ体重の重い物が1ケージに必ずいます。これがケージのボスでしょうが、私達はジョークで「牢名主」と呼んでいます。特に雄にこの傾向が強く、6~7匹マウスのいるケージに新しく1匹を入れますと直ちに喧嘩が始まります。すぐに喧嘩を止めずどちらかが負けるまでかなり長く続きます。激しい時にはシッポ、ペニスを噛まれて血を流していますし、時には尻部の皮膚を噛まれてしまいかかなり広く剥げ落ちる事があります。その逆で1匹の中に数匹を入れたり、新しいケージに異なったケージの動物を同時に入れた場合はそれ程激しい喧嘩は起こらない様で、やはり強い動物が幅をきかせている様です。ケージの中で政權闘争が行われていて、負けたボスは新しいボスに政權

を譲っている様に見うけます。人の社会とあまり変わらない様です。

又、認識番号を付けたり、色々な処理を行う時とか、毎月決まって体重を測定する時とか、その折にいつも始めの方に捕まるネズミは決まっているらしいとT嬢が教えてくれました。捕まり易いネズミとそうでないものがあるようです。これが例のボスなのか、人なつていのか、のんびりしている動物かは不明です。ある人が学会で話をした後で誰かが質問しましたが答が解らず「そんな難しい問題はネズミに聞いて」くれと迷答を出した人がいて、大笑いになりましたが、ドリトル先生ではありませんが本当に一度ネズミに色々な事を聞いてみたい気がします。

これも何時も不思議に思っている事でネズミに聞くべき事ですが、若い時から1ケージ内で動物を少ない数で飼育しますと多く飼っている動物に比べ体重が増大します。例えばラットの場合1ケージに4匹飼いをしますと1年後の1匹あたりの平均体重は750gですが、3匹飼いだと830g前後で、2匹飼いですと930gになります。合計の体重は $4 \times 750 = 3000\text{g}$ 、 $830 \times 3 = 2490\text{g}$ 、 $930 \times 2 = 1860\text{g}$ とケージ当たりの体重は減少します。しかし $3000\text{g} - 2500\text{g} = 500\text{g}$ 、 $3000\text{g} - 1860\text{g} = 1140\text{g}$ で $1140\text{g} \div 2 = 552\text{g}$ となりケージ毎では1匹がいないと約500gの空間が空く様です。筆者は趣味で熱帯魚を飼っていますが小さな水槽で飼いますとある程度まで大きくなりますがそれ以上大きくなりません。その魚をより大きな水槽に移しますと更に大きくなります。正常細胞を培養しますとシャーレいっぱいになりますと増殖が停止し、それ以上細胞は増えないと言う現象があります。その細胞の持つ性質 (contact inhibition) が細胞から個体まで存在する現象なのかも知れません。思い出しましたが、植物でも種を撒き、発芽させ良い苗を育てるためにはやはり間隔が必要で狭いと良い苗は育ちません。

この様に考えると大きくなるためにはある空間が必要であるという事は大変面白い現象で生物界にある一般的な現象かも知れません。でも無限に大きくなるかと言いましてもそうではなくマウスがラットの大きさに (後でお話するラットの成長ホルモンの遺伝子を入れたトランスジェニックマウスはラットの大きさになりました)、ラットが牛の大きさまで成長するのではなくその個体の持つ大きさ以上には成長しません。この現象をある人に話しますとすぐに「日本人が西欧人に比べて小さいのは日本人の家が西欧人の家に比べ小さいからじゃあないか」という答が返ってきました。そうなら大変面白いのですが、今の若い人はどんどん兎小屋で大きくなっていますので、そうではなく多分栄養的な要素が関与しているからでしょう。

ある時大鋸屑を止めて金網のケージにしました。住み心地が悪いのでしょうか餌入れの中に入って眠ったり、下に紙を敷いていたのを引き上げ巣を作ったりしていました。金網は冷たくて、居心地が悪いのだと思います。

数匹をまとめて飼いをしますとそれぞれ1匹1匹の性格は良く解りませんが1匹飼いをしますと各々のネズミに個性が有る事が解ります。いつもいらしているネズミ、逆に少々の音には動ぜず眠り続けているネズミ、こんな穴から入れると思う様な穴から潜ったり、逃げだそうとするネズミ、いつも跳ねているネズミ、大鋸屑を絶えず持ち上げると言う仕事をしているネズミ、餌でいつも遊んでいるネズミ等々がいます。

1匹飼いの場合時々原因不明でこつぜん死亡する場合がありますが、まとめて飼うと勿論ボスも出来ますが誰かを中心に集団を作っていて皆体を寄せ併せてあって集まります。肌を触れ合う事が安心感とストレスの防止に関与している様に思えます。仲間が体が弱った場合にはその群れから外されるのか、又は自分から群れから離れるのかは解りませんが

1匹で隅の方に居ます。死んだ動物はいつの間にか大鋸屑の中に埋め込まれてしまいます。

毎日動物を観察していますと色々面白い事に気がきます。この様にネズミを見ていると飽きが来ませんがこの話はこれ位にして次に進みましょう。

トランスジェニックマウスを使用しての研究

次に新しい実験動物の開発について少し述べたいと思います。バイオと言う言葉を一度はお聞きになっていると思いますが遺伝子操作により特定の遺伝子を微生物や細胞に導入し、大量の新しい機能を持つ蛋白質を始めとして多くの物質を作る事が可能となりました。ここでは用語等は専門的になりすぎるかもしれませんがあえてあまり詳しい解説は除きます。

微生物を用いて組み替え遺伝子を発現させた場合次の様な問題が生じています。①特に多くの蛋白質は一次構造とは別に糖鎖、アミド化、アシル化、磷酸化等翻訳後に修飾される場合が多く、大腸菌等はこのような修飾機能が無いため、大腸菌で作られる物質は生体内で働いている天然型とは厳密な意味では異なっています。②アミノ末端にはメチオニンが付加し、不溶性となる事が挙げられます。③大腸菌内に蓄積する蛋白質を菌外に分泌する機能が無いため、固有の蛋白分解酵素の影響を受け易いと考えられています。④S-S結合を持っていたり、分子量が大きく複雑な高次構造を有する蛋白質は大腸菌での活性の発現が難しい事等があげられています。微生物で行われて来た遺伝子操作はこの様に多くの問題をはらんでいる様です。

そこで組み替え遺伝子発現系が微生物の代わりに動物細胞を宿主として用いられてきています。しかし動物細胞を用いる実験には①微生物に比べ増殖速度が遅い事、②培養条件は細胞毎に異なる事、③高価な血清を用いるので生産コストが高価な事、④接着依存性の

細胞では大量培養や高密度培養のため培養装置の開発が必要な事、⑥宿主ベクター系の開発を含め、導入遺伝子が安定に保たれ、培養の特性の変わらない細胞株の作成等の問題があります。

最近ではマウスを用いた発生工学の手法が開発されて来ています。以前はマウスを始めとする哺乳動物等は発生物学の研究対象として不適当とされて来ました。しかしながら、最近の技術の開発により体外に取り出したマウスの未受精卵を胎盤胞まで発生させる事が出来る様になった事です。更にいったん体外に取り出された受精卵や胚は顕微鏡下で様々な操作を行い仮親のマウスの卵管や子宮に移植し子供を得る事が出来る様に成った事です。例えば、①2種類以上の胚を集合させ遺伝子の異なる細胞からなるキメラマウスを作る事が出来る様になりましたし、②上記で述べた組み替えDNA技術の進歩で遺伝子の導入や、核移植したりしてクローンマウスを実験的に作る事が出来、今ではかなり色々な遺伝子を導入されたマウスが開発されています。③更に多分化能を持つ胚幹細胞を未分化のまままで培養し遺伝子導入を行った後正常な胚盤胞に注入し、キメラマウスを作成が出来る様になりました。今ではカエルやニワトリと同様にマウスでも体外に一時的に産卵したと同様な状態となり、種々の操作を加える事が可能です。マウスは従来用いられた実験動物では比較的に近い事や、一度に多くの動物を飼育出来る事の長所があり、今ではマウスを用いたこの様な研究が盛んです。

組み替えDNAあるいは外来性のDNAを動物卵子内に組み込んで作り出されるトランスジェニックマウスは個体の全細胞に導入遺伝子を組み込んでいるため、生殖細胞にも当然の事ながら組み込まれているために、子孫に伝わります。このマウスを用いる事で受精卵から個体発生を経て成長、成熟、老化し、死ぬまで全ての時期で繰り返し導入遺伝子の機

能を調べる事が出来ます。この系は遺伝子の機能を個体レベルで解析出来る最も良いシステムとなっています。現在ではトランスジェニックマウスを用いてショウジョウバエに匹敵する様な研究が行われ様としています。今年の癌学会のシンポジウムでもこの話題が取り上げられました<sup>8)</sup>。又、最近Natureと言う雑誌には大きなトピックスとして次々とある遺伝子を導入したり、壊し働かないようにしたマウスが開発された結果が報告されています<sup>9,10)</sup>。その結果遺伝子の発生へ及ぼす影響が解明されてきています。更にこの様なマウスを用い薬物の安全性試験に用いられ様としていますので、毒性試験の結果が早く生じるかも知れません。アメリカではもうこの様なマウスを購入する事が出来ますが、日本ではアメリカから輸入する事を考えている様ですが、なに様1匹2~3万円しますので、ちょっと予算の少ない私達の研究にはまだ使えないと思います。でも近い将来いろんなトランスジェニックマウスが研究に使われる時期が来ると思います。

トランスジェニックマウスの作成に関しては原則的には明確な目的のもとで作り返さねばなりませんし、又、作り出されたコロニーの厳密な管理、維持、野外への逃亡防止を心がける事が基本条件です。しかしながら従来培養細胞で行われて来た研究とは次元の異なった意味を持つために上記で述べた様に個体を実験材料として使う要求度が高くなるものと思われまます。

おわりに

実験動物の有用性と新しい実験動物の開発について述べました。ネズミについてはもっと良く観察し又の機会に述べたいと思います。新しい動物が開発され益々実験動物の有用性が高まって来ています。既に色々な施設でこれらの動物を用いて実験が行われていますがこれも又の機会に述べたいと思います。

謝 辞

御校閲を賜った広島大学原医研伊藤明弘教授、実験を補助し、数々の観察結果を示してくれた谷崎みどり嬢に深謝します。

文 献

- 1) : 渡辺敦光 : 本誌, 36, 2-8, 1991.
- 2) : Ohgaki, H. 他, *Cancer Res.*, 48, 5275-5279, 1988.
- 3) : Watanabe, H. 他, *Carcinogenesis*, 9, 1317-1318, 1988.
- 4) : Watanabe, H. 他, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 1177, 1991.
- 5) : 渡辺敦光他, 日本癌学会総会記事, 51, 58, 1992.
- 6) : 山本昌美他, 日本癌学会総会記事, 51, 59, 1992.
- 7) : 伊藤明弘他 : 放射線科学, 35, 303-308, 1992.
- 8) : 井川洋三他, 日本癌学会総会記事, 51, 5-6, 1992.
- 9) : Shull, M. M. 他, *Nature*, 359, 693-699, 1992.
- 10) : Matzuk, M. M. 他, *Nature*, 360, 313-319, 1992.