

関西実験動物研究会会報

Kansai Journal of Laboratory Animals

平成3年5月 9号

関西実験動物研究会

Kansai Laboratory Animal Research Association

目 次

〈第 2 1 回研究会〉

講演会

癌原性試験における統計解析

菅野 純 (東京医科歯科大学) 1

質疑応答 55

〈第 2 3 回研究会〉

講演会

1. 臓器移植研究における動物実験について

門田 守人 (大阪大学・医・外科学第二) 60

2. ステロイド応答機構と実験動物

佐藤 文三 (大阪大学・医・内科学第三) 72

〈第 2 4 回研究会〉

会員の研究発表 84

〈その他〉

関西実験動物研究会だより 91

総会・評議員会議事概要 92

会員名簿 93

編集後記

<第 2 1 回 研 究 会>

講 演 会

1. 毒性試験における統計解析

吉 村 巧 名古屋大学工学部（前号に掲載）

2. 癌原性試験における統計解析

菅 野 純 東京医科歯科大学

日 時：平成元年 3 月 3 日（金）

場 所：三和化学研究所 大阪メディカルホール

2. 癌原性試験における統計解析

菅 野 純 （東京医科歯科大学）

宮嶋宏彰（武田薬品）： 菅野先生は東京医科歯科大学医学部を御卒業後、大学院へ進まれ、学位取得後は国立衛生試験所の林裕造病理部長のもとで癌原性試験における病理学的ならびに統計学的評価に携わっておられました。現在は母校の東京医科歯科大学の病理学教室で教鞭をとっておられます。林先生との御関係はその後も続いておられまして、厚生省林班で実施された癌原性試験の統計学的評価にも関与されています。癌原性試験の統計解析法にはいろいろの方法がありますが、今日の御講演は日本の厚生省やアメリカのFDAなどで推奨しておりますPetoの方法を中心にその実際と問題点などについて御紹介いただけるものと思います。それでは菅野先生よろしくお願ひします。

菅野 純（東京医科歯科大学）： 菅野と申します。何分力不足ですので、まだ、欠陥があるかと思ひます。お見受けしますところ何人かの先生方には先日お話を聴いて頂いた方もいらっしゃるようです。ほとんどその時と同じ内容なんですけれども、よろしくお願ひ致します。統計学的にもしこれはおかしいというところがあればその場で是非御指摘願ひたいと思ひます。と申しますのは、このスライドも、まだとうてい完成品とは申し上げられないのでもう少し改良させて頂きたいというのが本意でございます。

スライドお願ひします。

癌原性試験の統計解析について

1. 発癌促進作用の有無を評価する = 定性的評価

(発癌性の強さの評価ではない)

→ null hypothesis

2. WHOの基準

- ・ 対照群に発生なく、処置群に発生をみる
- ・ 対照群に発生をみ、処置群に発生の増加をみる
- ・ 対照群に発生をみ、処置群に発生までの期間の短縮をみる

私は病理屋なものですから、その面からはほとんど数式なしでやらせて頂きます。癌原性試験の統計解析についてということですが、ここではその発癌促進作用の有無を評価する定性的な評価だけを扱います。当然、null hypothesis として処置群との間に差がないということになります。WHOの基準では、発癌促進作用があるということはこういうことである。即ち、① 対照群に発生なく処置群に発生をみる、② 対照群に発生をみ、処置群に発生の増加がある、そして、③ 対照群に発生をみ、処置群に発生までの時間の短縮をみるというものです。この3つを定性評価でみるということになると思います。次お願いします。

長期発癌性試験の特徴

1 : 計画時の注意事項

事前に得られた情報を基に、実験者の意図によって処置、観測項目、対照が決められ、実験開始前に結果の予想がなされる。

2 : 評価時の注意事項

蓄積したデータを前にして考察が後から加えられる。即ち、「今までの常識」を基にした「データを眺めた時の直感」が必要である。

長期発癌性試験においては、先ず、普通の実験同様、計画するときの注意事項が挙げられます。事前に得られた情報を基に実験者の意図によって処置と観測項目と対照が決められるわけです。長期発癌性試験の際のもう一つの特徴は評価時の問題であります。蓄積したデータを前にして考察が後から加えられるということです。即ち、「今までの常識」を基にして「データをみたときの直感」が必要であるということになると思います。剖検したデータをながめて、何か思い当たることがあるというのが大事だということになります。次お願いします。

1：計画時の注意事項

前駆病変・関連病変

用量相関（傾向検定）

2：評価時の注意事項

「処置によって病変が引き起こされているようだ」という実験者の

直感が大事である。

統計はその判断にどれだけ正当性があるかを検証するものである。

問題点

A. 統計学以外の知識が判断に影響する。

B. 統計学の知識が判断に影響する。

すこし、具体的に言いかえますと、計画時の注意事項としては、前駆病変、関連病変として
どういうものが生じうるかを、一応想定しておく必要があるであろうということ、又、用量相
関を見るための傾向検定にかけられる様な実験を組むのか、そうでないのかを考える必要があ
るということです。即ち、閾値があると思われるのか、途中で飽和してしまうのか、あるいは
低用量では抑制、高用量では促進するのかといった様々な可能性はあるわけですが、それらも
考えておくのが望ましいと思います。

評価時の注意事項としましては、「処置によって病変が引き起こされているようだ、とい
う実験者の直感が大事であり、統計はその判断にどれだけ正当性があるかを検証するものであ
る」ということになると思います。その時の「直感」ですが、それを左右するものに、非統計
学的な知識と、統計学の知識の2つがあると考えるのであります。

次お願いします。

A. 統計学以外の要因

Historical control (文献上のデータ・各研究施設固有のデータ) :
自然発生病変の 種類
頻度
頻度の実験間での変動幅

1. 対照群が本当に陰性対照になっているか？

(自然発生率の高い腫瘍)

2. 今までにこんな腫瘍を見たことがあるか？

(非常に稀な腫瘍)

3. 動物の全身状態の把握

非統計学的要因、即ち、統計処理をする前に気を付けなければならないのは、先ずhistorical control がどうなっているかということです。もちろん文献上の過去のデータもそうですが、各研究施設固有のデータも必要になると思います。自然発生病変の種類、頻度、実験間での変動の幅であります。Historical controlを実験データと比較すると第1に対照群が本当に陰性対照になっているかどうか、第2に、今までにこんな腫瘍を見たことがあるか、という2点についての直感を与えることになるわけです。

次お願いします。

HISTORICAL CONTROLの変動幅:

Site and tumor type	Total incidence (Ranges of tumor rates)	
	1975 - 1981 ^a	1982 - 1988 ^b
Male		
Pituitary: adenoma	9.7 (2.0-17.6)*	9.2 (6.0-12.0)
Thyroid: C-cell adenoma	11.1 (6.4-15.7)	21.4 ⁺⁺ (10.4-38.0)**
Adrenal: pheochromocytoma	18.9 (12.2-27.7)	25.0 (22.0-27.1)
Pancreas: islet cell tumor	8.4 (4.3-13.0)	9.2 (8.0-12.5)
Testis: interstitial cell tumor	99.0 (91.5-100)	98.0 (95.8-100)
Prostate: adenoma	—	6.6 (0-18.8)**
Mammary gland: fibroma	13.0 (6.0-23.4)*	8.2 (6.0-12.0)
fibroadenoma	8.8 (4.0-14.9)	12.2 (4.0-16.7)*
Hematopoietic organs: mononuclear cell leukemia	23.6 (13.2-40.4)**	24.5 (16.0-31.3)
Liver: neoplastic nodule	7.1 (0-17.0)**	4.6 (2.1-6.3)
Lung: alveolar/bronchiolar adenoma	6.1 (0-12.2)**	5.6 (4.0-6.3)
Preputial gland: adenoma	8.4 (3.8-14.9)	8.7 (4.2-16.7)*
Female		
Pituitary: adenoma	26.9 (14.0-40.8)**	21.4 (16.0-28.6)
Thyroid: C-cell adenoma	6.7 (4.0-11.8)	8.2 (2.0-14.9)**
Uterus: endometrial polyp	21.2 (12.2-32.7)*	25.5 (10.6-38.8)**
Mammary gland: fibroadenoma	18.5 (3.9-46.9)**	10.2 ⁺ (8.0-12.2)
Hematopoietic organs: mononuclear cell leukemia	21.9 (9.8-29.8)*	18.4 (14.9-22.0)

* p<0.05, ** p<0.01 (Significant heterogeneity)

⁺ p<0.05, ⁺⁺ p<0.01 (Significantly difference from previous data)

a; Maekawa A. et al. Gann 74:365-372. 1983

b; Todate A. et al. unpublished data

これは、衛生試験所の固有のhistoricalデータの表です。例えば雄のPituitary adenomaは1975年から1981年までの実験では、平均約1割に生じ変動幅は2～17%ぐらいです。82年から88年までの実験でもだいたい同じです。

特に変動幅が大きいのが、ThyroidのC-cell adenomaで、2割±1割ぐらいです。もう1つが、historicalデータの解釈の例として次にお話しするのがUterusのendometrial polypなのですが、これも2割5分位生じて、変動幅は、1割から4割ぐらいです。何も処置をしなくてもこれだけ自然発生するというこの様な基礎的なデータが、先ず実験者や病理学者の頭の中にイメージとして存在することがとても重要であると考えます。

次お願いします。

1. 自然発生率の非常に高い腫瘍が、対照群で少なく、処置群で多く発生し、統計学的に有意差が認められる。

例: Lack of carcinogenicity of tartrazine (FD & C Yellow No. 5) in the F344 rat
Fd Chem Toxic 25:891-896, 1987

A. MAEKAWA et al.

894

Table 2. Sites and types of tumours in F344 rats given tartrazine in the drinking-water for up to 2 yr

Site and type of tumour	No. of rats with tumours†					
	Males given tartrazine doses (% in drinking-water) of:			Females given tartrazine doses (% in drinking-water) of:		
	0	1	2	0	1	2
Effective no./group...	48	49	49	47	50	49
Endocrine system						
Pituitary: Adenoma	5	4	4	12	12	7
Adenocarcinoma	0	0	0	0	1	0
Thyroid: C-cell adenoma	9	8	5	7	8	1*
C-cell adenocarcinoma	2(1)	2	1(1)	2(1)	1	0
Follicular adenoma	1	1	2	0	1	0
Adrenal: Pheochromocytoma	13	8	6	4	10	2
Malignant pheochromocytoma	0	1	0	0	0	0
Cortical adenoma	0	0	0	2	0	0
Ganglioneuroma	1	0	0	0	0	0
Malignant ganglioneuroma	1(1)	0	0	0	0	0
Pancreas: Islet cell adenoma	6	3	7	1	1	0
Genital system						
Testis: Interstitial cell tumour	46	46	49	-	-	-
Prostate: Intraductal adenoma	2	1	2	-	-	-
Uterus: Endometrial stromal polyp	-	-	-	5	13*	10
Adenoma	-	-	-	1	0	0
Adenocarcinoma	-	-	-	2(1)	0	1
Leiomyoma	-	-	-	0	1	0
Endometrial stromal sarcoma	-	-	-	1	0	0

これがその事例ですが、自然発生率の非常に高い腫瘍が、対照群で少なく、処置群で多く発生して、何らかの統計処理をしたら有意であったという例です。衛生試験所の前川先生のやられました黄色5号の実験なのですが、ここで endometrial stromal polypが、5、13、10と出てこの13というのが5と比較して、Fischer検定で $p < 0.05$ で有意になったわけです。次お願いします。

低用量群♀のendometrial stromal polyp → $p < 0.05$ で有意に増加

(Fisher's exact test)

しかし、

- ・発生腫瘍のバリエーションと頻度＝国立衛試のhistorical controlとほぼ同じ
 - 今までのラットと極端に異なった性格のラットではない
 - 検体物質は発癌性が強くはなさそうだ
- ・対照群＝10.6% 処置群＝26% / 国立衛試historical control＝25.5% (10.6%～38.8%)
 - 変動幅内
 - 対照群に発生が少ない＝処置が発生を促進した根拠に乏しい
- ・p値が非常に小さいわけではない
 - 有意差を否定することを躊躇させる様な強力なp値ではない。
- ・Petoの検定（傾向検定）では有意差は無い、即ち用量作用関係がない。
 - 処置が原因でない可能性が大きい。
- ・Endometriumの過形成性変化や前駆病変に有意な差が見られない（Fisher、Petoの両方で検定して）。
 - 処置が発生を促進した根拠に乏しい。

結論：この病変の低用量群における増加は処置によってもたらされたものではない。

本実験における全体の腫瘍の発生状況をみると、今までの衛生試験所で見たのとはほとんど同じですから、今までのラットと極端に異なった性格のラットではないことがわかります。また、このことから被験物質は、発癌性は強くなさそうだということにもなります。次に対照群で $5/47 = 10.6\%$ 、低用量群で $13/50 = 26\%$ 出たわけですが、先ほどお示したようにこれは両方ともすっぱりHistorical controlの変動幅に入っています。さらに、その幅のなかでも対照群は、下限に近い値であるということは、処置が発生を促したという根拠に乏しいとも考えられます。P値が非常に小さいわけではない、即ち、これを否定する

のに躊躇する程強力ではありません。3群間での傾向検定を行ってみると用量作用関係がない。念のためにendometriumの過形成性病変などの前駆病変と考えられるものをみると、2群間でのFischer検定でやっても、Petoの方法でやっても有意差がない。ということで処置が発生を促した根拠に乏しいということから、このendometrial stromal polypは処置によって増えたものではないと結論したわけです。

次お願いします。

2. 統計的に有意差はないが、非常に稀な腫瘍が処置群にだけ生じている場合に、有意の所見と解釈する。
但し、一般に、傍証を要する。

例：国立衛生試験所には今までに該当例無し

もう1つ、よく挙げられるのが、統計学的に有意ではないが、非常に稀な腫瘍が出ている場合に有意とする、という考え方があります。但し一般的には前駆病変等の傍証が必要だろうと思います。可能性としてはあるけれども、実際にはなかなかお目にかかるものではないと思います。というのは今までに衛生試験所で、これに該当する例がないのです。

次お願いします。

A. 統計学以外の要因

3. 動物の全身状態の把握：

- a. 極端な体重増加抑制状態では腫瘍発生は抑制される
- b. ホルモン減少状態でのホルモン依存性臓器の腫瘍発生は抑制される
- c. ホルモン増加状態でのホルモン依存性臓器の腫瘍発生は促進される

判断材料：体重曲線・ホルモン依存性臓器の異常な萎縮、腫大等

上記の事態が起こっていると思われる時は、必要に応じて適切な追加実験を行い、そのことを確認・考慮した上で評価を慎重に行う

最後に、統計学以外の要因で考えなければならないことには、「動物の全身状態の把握」が挙げられています。よく知られているのは、極端な体重増加の抑制の状態では、腫瘍はできないということです。あと注意を要するのは、ホルモンの減少した状態では、その依存臓器の腫瘍の発生は一般に抑制される、あるいは逆にあるホルモンの増加でその標的臓器の腫瘍は促進されるということがあります。内分泌臓器においては、こういう状況がないかどうか確認する必要があります。ホルモン依存臓器の異常な萎縮や腫大等がないかを確認するわけです。検体の毒性が強くて最高用量群だけ体重が増えなくて、腫瘍が全然出なかった場合、データの解析は非常に難しくなるわけですが、そのデータを全部捨ててしまうわけにもいきませんので、必要に応じて、何か追加的な実験を加えるなり、補助的な事項を確認して、慎重に評価をすることになると思います。

B. 統計学

<正しい直感 ↔ 正しい検定法（バイアスの除去）>

<例>

50匹に処置を、50匹は対照、80週間観察した。

動物は白血病または肝癌で死んだ。甲状腺に腺腫を認めた。

	週	…12・16・20・24・28・32・36・40・44・48・52・56・60・64・68・72・76・80	80	計
処	生存匹数	50 49 48 47 45 43 39 35 29 23 17 12 6	0	50
置	肝 癌 死	0 1 1 1 2 2 3 4 5 6 5 5 6		4
群	白血病死			46
	甲状腺腺腫			2
対	生存匹数	50 49 48 47 46 45 44 43 40 36	34	50
照	肝 癌 死	0 1 1 1 1 1 1 2 2 2		13
群	白血病死			3
	甲状腺腺腫		11	12

最終結果のみを表にすると

	処置群	対照群
白血病死	46 / 50	3 / 50
肝 癌 死	4 / 50	13 / 50
甲状腺腺腫	2 / 50	12 / 50

ここから直観的に導かれる結論は、

1. 処置は白血病を誘発した
2. 処置は肝癌発生を抑制した
3. 処置は甲状腺腺腫を抑制した

統計学的に有意に示することができる

1. はFisher's exact test で $p < 0.001$
2. はFisher's exact test で $p < 0.05$
3. はFisher's exact test で $p < 0.001$

key word : 時間軸・致死腫瘍・偶発腫瘍・生存数・剖検数

次に統計学的な知識を正しく持っていないと判断がうまく行かない場合があるという方の話に入らせて頂きます。

直感を正しく働かせるためには正しい統計学的知識をもっている必要があるという考えかたでとらえております。例といたしましては50匹に処置をして50匹を対照、80週間観察したところ動物は白血病または肝癌で死んだという実験を考えます。ここで問題とする甲状腺の

腺腫は剖検によってしか認められないのですが、処置群では白血病が40週あたりから非常に多く出まして72週で全部死んでしまった。そしてその間に肝癌で死んだ動物が4匹みられました。解剖してみたら白血病または肝癌で死んだもののうちの2匹に甲状腺の腺腫がみられた。対照群には白血病で死んだのは3匹だけで肝癌は13匹でした。解剖したところ甲状腺の腺腫は1匹にしか見つかりませんでしたが、最後の計画屠殺34匹中では11匹に甲状腺の腺腫があったとします。こういう場合に、最後の結果だけを表に表わしますと、当然処置群で白血病はうんと多く、対照群で肝臓の腫瘍がかなり多く、甲状腺腺腫は対照群で多くなる。こういう事になる訳ですがこの表だけを見て直感を働かせますと処置は白血病を誘発し、かつ、肝癌発生を抑制し、かつ甲状腺の腺腫を抑制したとなります。この表だけでFischerのexact testをやれば当然全部有意になりますからこの表だけを見て統計解析をすれば、この結果は全て正しい事になってしまう訳です。ここでの問題は当然、時間的な経緯を無視しているという事と死に至らしめる腫瘍とそうでない偶然の腫瘍とを区別していないから結果が変なものになるという事です。甲状腺腺腫の計算のベースとなるべき数は解剖された動物の数であるはずなのに分母とすべき数字が白血病や肝癌の計算のものとごっちゃになっているところに問題があります。当然『Fisher 検定でやれば良い』という直感の働かせ方は間違っているし、それを検証したこの統計方法も適応方法が間違っているという事になります。

<例>

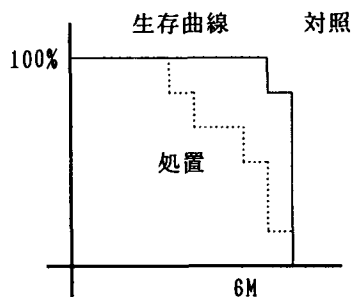
30匹に処置を、30匹は対照、24週間観察した。

処置群は肝癌で多くが死亡した。

対照群は25週目にほぼ全数が屠殺・解剖され、多くに微小な肝癌が認められた。

肝癌を持っていた動物の頻度：

	処 置	対 照
肝 癌	30 / 30	25 / 30



上記の表を単に群間で検定すれば有意差無し。

	週	0 5 10 15 20	25	計	
処 置 群	生 存 数	30	29 28 27 25 22 17 13	5	
	肝 癌 死		1 1 1 2 3 5 4 8	0	25
	中間死亡（肝癌+）			5	5
対 照 群	生 存 数	30		29	28
	肝 癌 死			1 1	0 2
	中間死亡（肝癌+）			23	23

key word：時間軸・同一腫瘍の発見の状況

次に、今度は同じ1種類の肝癌についても似た問題が生じる例を示します。処置群では肝癌で死んだ動物が7週目あたりから出てきて最終的には25匹が肝癌で死んでいます。対照群は最後のほうで2匹だけ肝癌で死んで、のこりのほとんどは計画屠殺時に小さな肝癌が見つっています。中間死亡というのは注目する腫瘍とは別の原因で死んだという定義なのですが、それを無視して結果だけを見ますと30 / 30、25 / 30で有意差は出ないと思います。しかし明らかにこの処置群と対照群との間には差があります。この表だけを見て直感を動かしてしまふのは誤りということです。先の事例は違った種類の腫瘍で致死的なものと、偶発的なものをごっちゃにした時に生じた問題ですし、この例は同じ肝癌であっても肝癌で死んだものと解剖してみたら見つかった肝癌とを一緒にした場合に生じた間違いです。どちらも Fisher 検定

の表を見て直感を働かせてしまつては誤りであるという事です。

B. 統計学

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
理想的観測項目	腫瘍の発生日 (発見日ではない)			
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	なし	殆どなし	不定(死 ² +隠 ¹)	不定(偶然)

処置群と対照群の間になんら差がない場合は、両群の「理想との隔たり」も差がなく、検定の際に相殺されるので、バイアスが生じない

処置群と対照群の間に種々の差がある場合は、両群の「理想との隔たり」にも差が生じ、検定の際に相殺されないで、バイアスが生じる

<例> ① 皮膚乳頭腫 ② 白血病 ③ 肝癌・下垂体腫瘍 ④ 精巣間細胞腫

統計学的にみますと多分、腫瘍の種類というのはこの4つに分けることになると思います。表在性の腫瘍、急速に増殖してすぐに動物を殺す腫瘍、徐々に増殖して動物を殺す腫瘍、これは2年間のうちには死んでしまわない場合も含まれる。そして滅多に動物を殺されない腫瘍。その例として1番目は皮膚の乳頭腫の様なもの、2番は白血病の様なもの、3番目は肝癌、下垂体腫瘍、4番は精巣の間細胞腫の様なものが当てはまると思います。この4つの腫瘍を統計学的に解析しなければならないのですが、いずれも理想的には腫瘍の発生日を知りたいわけです。これは発見日ではないというところがミソでして、発生日を知りたい、発生が早いとか多いとかいうのは全てこの発生日でケリをつけたい。ところが、実際に観測できるのは①番は外表所見ですが、あとは剖検をされた時なのです。現実の観測点というのは全て発見日ですが、理想的な観測事項との隔たりがどの位あるかという事をみてみますと、この表在性腫瘍は理論的に出来た日にみつかるという事で隔たりは無い。急速に動物を殺す白血病みたいなものは出来たと同時に死んだというふうに2年間の実験では見なせるから殆ど理想との差は無い。ところが偶然にしかみつからない腫瘍の場合、剖検がその腫瘍のためでない別の原因で行なわれるため、剖検で見つかるという発見日は発生日と全く関連がありません。見つかるということが

全くの偶然におこるため理想との隔たりが「不定」な訳です。さらに徐々に動物を殺すような発育の遅い腫瘍の場合はその腫瘍のために死んで見つかる場合と、偶然他の原因で解剖されて見つかる場合の2つが混ざっているという事になります。

処置群と対照群とのあいだに何らの差の無い、この差というのは抽象的な差ですが、差の無い場合は両群の隔たりもキャンセルされてしまうので何も気にしないでFisher 検定でも何でもよいのですが、問題は処置群と対照群とのあいだに種々の差がある場合にはこの隔たりの差にもアンバランスが生じるところにあります。その場合のアンバランスは相殺されないで統計計算後も残ってしまうので、判定結果にバイアスが生じることになります。そこでこのバイアスを何とか減らす為に色々な工夫が必要だという事になります。

バイアスの原因とバイアスの現れ方

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	なし	殆どなし	不定($D^D + I^I$)	不定(偶然)
処置によって 処置群だけに...				
他の腫瘍発生率 が上昇すると	①→①' (-)	②*→①' (+)	③ ^D →①' (+)	④→①' (-)
	①→②' (-)	②→②' (+)	③ ^D →②' (+)	④→②' (-)
	①→③' (-)	②→③' (+)	③ ^D →③' (+)	④→③' (-)
	①→④' (-)	②→④' (+)	③ ^D →④' (+)	④→④' (-)
非腫瘍死が増加 (腫瘍の有無と 独立に)	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少(③ ^D の) 増加(③ ^I の)	観察頻度 減少 又は増加
処置が腫瘍の 成長を早めた	影響無し	≡ 影響無し	③ ^D の観察が増す	影響無し
処置が担癌動物 を選別的に死亡 させた場合の影 響	影響無し	≡ 影響無し	観察が早まる、 頻度が増加する 可能性がある	観察が早まる、 頻度が増加する 可能性がある

例えば表在性腫瘍ができて別の表在性腫瘍の評価に影響するかということこれは動物を殺しませんので全然影響しないという意味のマイナス（－）です。ところが急に死ぬ白血病がたくさん出来ると、この②* ですね、そうしますと①’ の皮膚腫瘍の評価に影響を及ぼす、つまりどういう事になるかと言うと白血病でたくさん死んでしまうと皮膚腫瘍が出来る前に動物を殺すから皮膚腫瘍はその群では減って見えてしまうという事ですね。同じ様に白血病が他の致死性腫瘍の頻度にも見かけ上影響を与えてしまうという事を表わしています。この徐々に動物を殺す中途半端な腫瘍は、それによって死がもたらされた時だけ生存匹数を減らすという意味で他の腫瘍の評価に影響してくる。非致死性の場合は、この表在性と同じでいくらできようが動物は死にませんから、他の腫瘍を計算する上でじゃまにはならないという事になります。又、腫瘍以外、例えば肺炎でも何でもいいんですが、そういう事態が処置群でだけ起きるといづれの腫瘍の頻度も見かけ上減ってくる傾向にあります。即ち、腫瘍が出来る前に動物を殺してしまう様な何かがあればその群だけ腫瘍が減った様に見えるという事です。しかし、逆にすでに出来ている偶発腫瘍の場合は、早くみつかることになり、頻度がかえって増したように見えることもある。処置が腫瘍の成長を早めた場合とか、癌の出来た動物を処置が選択的に早く殺す場合の影響も当然出てくる訳です。

バイアスを相殺させる、あるいは感度を上げる為の各種の統計手法：			
相 殺 →			
感 度 ↓		Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method Age-adjusted Prevalence method
	群間比較	分 割 表 カイ 2 乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meier図 分割表の複合化 Log-rank test (Mantel-Haenszel) intervalを設ける 分割表の複合化 Log-rank test (Mantel-Haenszel)
	用量相関	分 割 表 Cochran-Armitage test for trend	Context of Observation に基づく表 Peto's Method

統計学的方法の観点からは、生じたバイアスを相殺させる為の方法と感度を上げる為の方法とがあります。二次元的に書きますと、何もしないのが群間でカイ自乗やFisher's exact testを1番最初にお見せした様な表から計算する方法なのですが、途中で死んだ動物の分を計算に入れる為の手だてとしてAge-ajusted method というのがあります。これは動物を死に至

らしめる腫瘍に関してはDeath rate methodを、偶然見つかるものに関してはPrevalence methodを使うとバイアスを相殺させることができます。もう一方の、感度を上げる方のテクニックとしては群間比較よりも用量相関の方がいい、特に3群以上ある場合はTrend test で傾向を見た方が感度が上がるわけです。そしてPeto の方法というのが私がここで最終的に行きつく所なのですが縦軸と横軸を同時にやってバイアスの相殺と感度を上げる2つをうまく組み合わせるといふ一番いい所にすわっている方法な訳です。

1. バイアスの原因とバイアスの現れ方

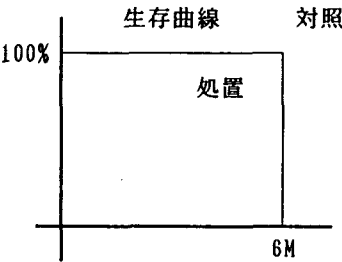
腫瘍の種類	① 表在性腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し動物を殺す腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し動物を殺す腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定(耽 ² +耽 ¹)	不定(偶然)

まず一番簡単な、バイアスの要因のない状態の説明ということで、皮膚腫瘍ができたという例を、基本としてお見せしますと、次お願いします。

30匹に処置を、30匹は対照、6ヶ月後に全匹生存しており、全身状態に差がない。
皮膚に乳頭腫を生じた。

結 果 :

	処 置	対 照
乳 頭 腫	8 / 30	1 / 30



直感 = 有意差あり
 Fisher's exact test(one tail) = $P < 0.02$ 有意
 これは正しい。
 key word : 生存曲線・Fisher's exact test

30匹処置、30匹対照、6カ月後に全員生きていて全身状態に差がなく、皮膚に乳頭腫を生じています。処置群には30匹中8匹、対照群には30匹中1匹です。これは、直感的に有意であり、Fisher でやって有意差ありで、結果的に正しいのですが。次お願いします。

統計：

60匹中の9匹に乳頭腫が生じた。

仮定 = 処置は乳頭腫発生に影響なし → 期待値 = 4.5 / 30

単なる偶然で8 / 30と1 / 30に分かれる確率は0.02以下 (Hypergeometric distribution)。

「このような稀な事象が起こったのは仮定が正しくないからである」と言い切って誤りを冒す確率が0.02以下である

∴ 処置が乳頭腫発生に影響したと結論して誤る確率が少ない。

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表 カイ2乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meier図 分割表の複合化 Log-rank test (Mantel-Haenszel)	intervalを設ける 分割表の複合化 Log-rank test (Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表 Cochran-Armitage test for trend	Context of Observation に基づく表 Peto's Method	

key word：差の有無・仮定の否定

基礎的な考え方としましては、30匹中8匹と30匹中1匹ですから、60匹中9匹に乳頭腫が生じたことになります。仮定としまして、処置は乳頭腫の発生に影響しないとすると、両群30匹中4.5個発生してしかるべきだった、となります。ところが、単なる偶然で30匹中8匹と30匹中1匹に分かれる確率は、0.02以下と計算される。ここからは確率の問題ですが、このようなまれなことが起こったのは仮定が正しくないからだと言って誤りを冒す確率が0.02以下という訳です。それをひっくりかえして、処置が乳頭腫に影響したと結論して誤る確率は非常に少ないという結論で、ゆえにこの処置は乳頭腫の発生に影響したという結論になるわけです。それが群間比較で、年齢によるAdjustを必要としないケースです。次お願いします。

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定($\text{D}^D + \text{D}^1$)	不定(偶然)
処置によって 処置群だけに...				
他の腫瘍発生率	①→①' (-)	②→①' (+)	③ ^D →①' (+)	④→①' (-)
が上昇すると	①→②' (-)	②→②' (+)	③ ^D →②' (+)	④→②' (-)
影響なし (-)	①→③' (-)	②→③' (+)	③ ^D →③' (+)	④→③' (-)
影響あり (+)	①→④' (-)	②→④' (+)	③ ^D →④' (+)	④→④' (-)
非腫瘍死が増加 (腫瘍の有無と 独立に)	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少
処置が腫瘍の 成長を早めた	影響無し	≠ 影響無し	③ ^D の観察が増す	影響無し
処置が担癌動物 を選択的に死亡 させた場合の影 響	影響無し	≠ 影響無し	観察が早まる、 頻度も増加する 可能性がある	観察が早まる、 頻度も増加する 可能性がある

次に急速に動物を殺す、たとえば白血病みたいなものを考えます。白血病が処置群に生じると、そのとき同時におきていた別の腫瘍の統計処理に影響を及ぼすから、これをキャンセルしなければいけないという話をしていきます。次お願いします。

<例>

50匹に処置を、50匹は対照、80週間観察した。

動物は白血病または肝癌で死んだ。

	週	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	56	60	64	68	72	76	80	80	計
処 置 群	生存匹数	50						49	48	47	45	43	39	35	29	23	17	12	6	0	50
	肝 癌 死	0									1		1		1		1		1		4
	白血病死		1		1	1	2	2	3	4	5	6	5	5	5	5	6				46
対 照 群	生存匹数	50							49	48			47	46	45	44	43	40	36	34	50
	肝 癌 死	0				1		1	1			1	1	1	1	2	2	2			13
	白血病死															1	2				3

最終結果のみを表にすると

(80週で計画屠殺)

	処置群	対照群
白血病死	46 / 50	3 / 50
肝 癌 死	4 / 50	13 / 50

直観的に導かれる結論は、

1. 処置は白血病を誘発した
2. 処置は肝癌発生を抑制した

この結論は統計学的に有意に示することができる

1. はカイ2乗検定 (Yates 補正) で $p < 0.001$
2. はカイ2乗検定 (Yates 補正) で $p < 0.05$

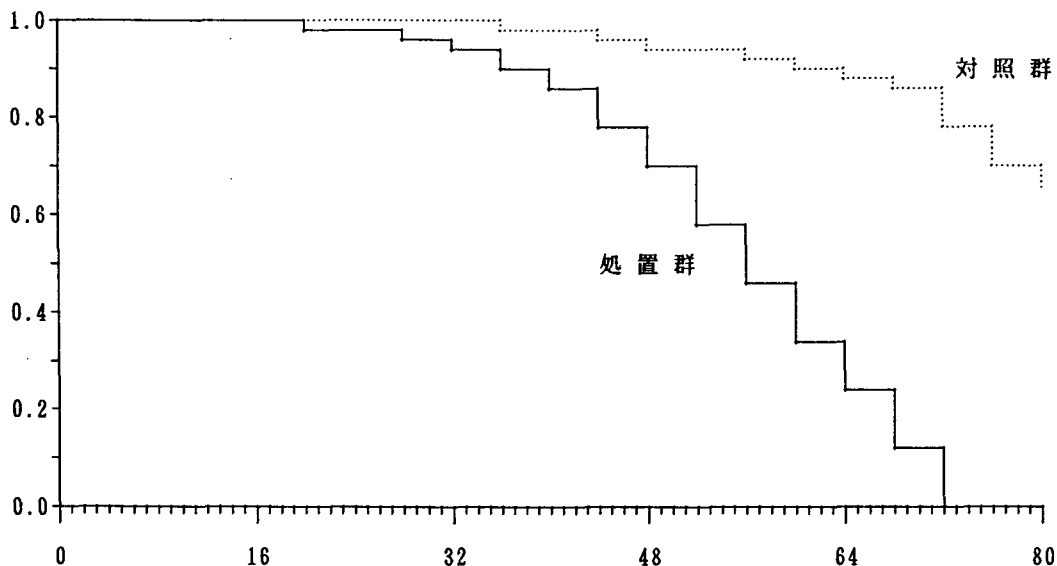
処置群では肝癌が生じる前に若くして死んでいる → AGE-ADJUSTED METHOD が必要

例は、50匹処置群、50匹対照群で、動物は白血病又は肝癌で死んでいます。処置群は早期から白血病が多く生じまして、72週で全部死んで、その比率が46 / 50であります。その間に肝癌で死んだのは4匹。対照群は白血病ではほとんど死なず、肝癌が後半に少しできまして、肝癌13対白血病3。この場合の統計は結果だけを表に書くと先ほどと同じで、50分の46、50分の3で白血病が増えて、肝癌で死んだのは50分4、50分の13で、かえって処置によって肝癌の死亡が減ることになります。これをそのままカイ2乗でやってしまうと、その結果が有意と出てしまうけれど、これは当然誤りだということです。では何が正しい判定に必要かというと、Age-adjust methodが必要なわけです。処置群では肝癌が生じる前に若くして白血病のために死んでるから見かけ上肝癌が減っているのだということになるわけですが、次をお願いします。

図：生存曲線

処置群では肝癌が生じる前に若くして動物が死んでいる → AGE-ADJUSTED METHOD

生存率



Kaplan-Meier法による生存率曲線

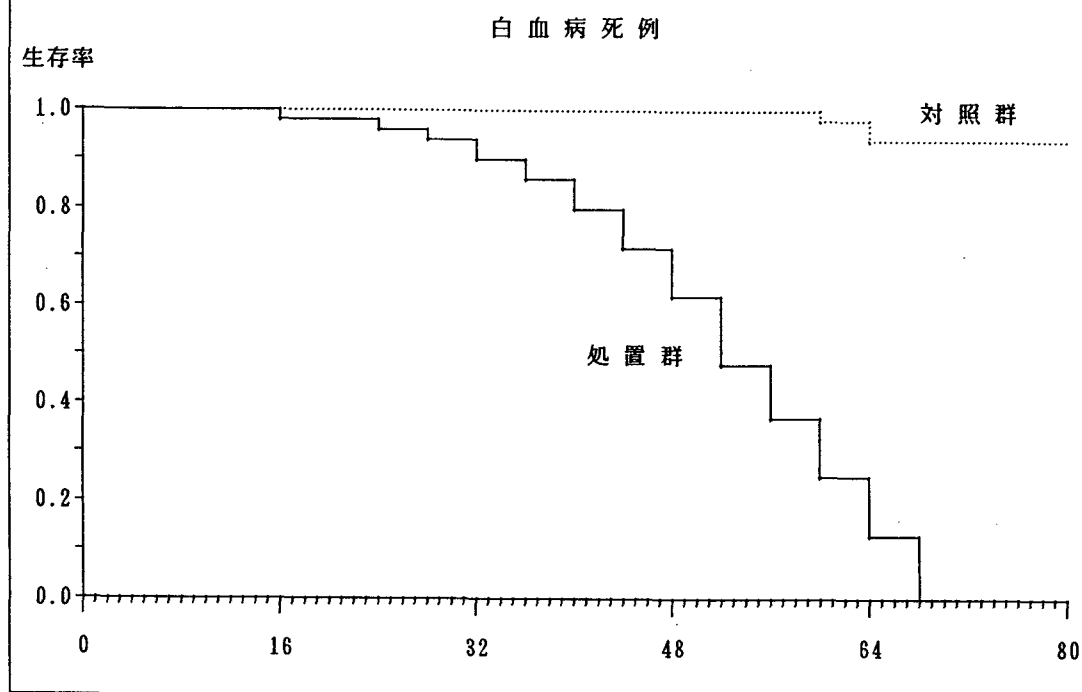
両群の生存率曲線を書いてみます。Kaplan-Meierで書いたわけです。処置群でこの様に死んでいて、対照群で生きのびている。この差が肝癌の解析に影響しているということになるわけですが。次お願いします。

図：白血病に着目したKaplan-Meier図。

「白血病以外で死亡した中間死亡動物は、白血病になる前に観察不能となった」と考える。

中間死亡 = 注目する腫瘍以外の原因で死亡

この場合の中間死亡 = 肝癌死

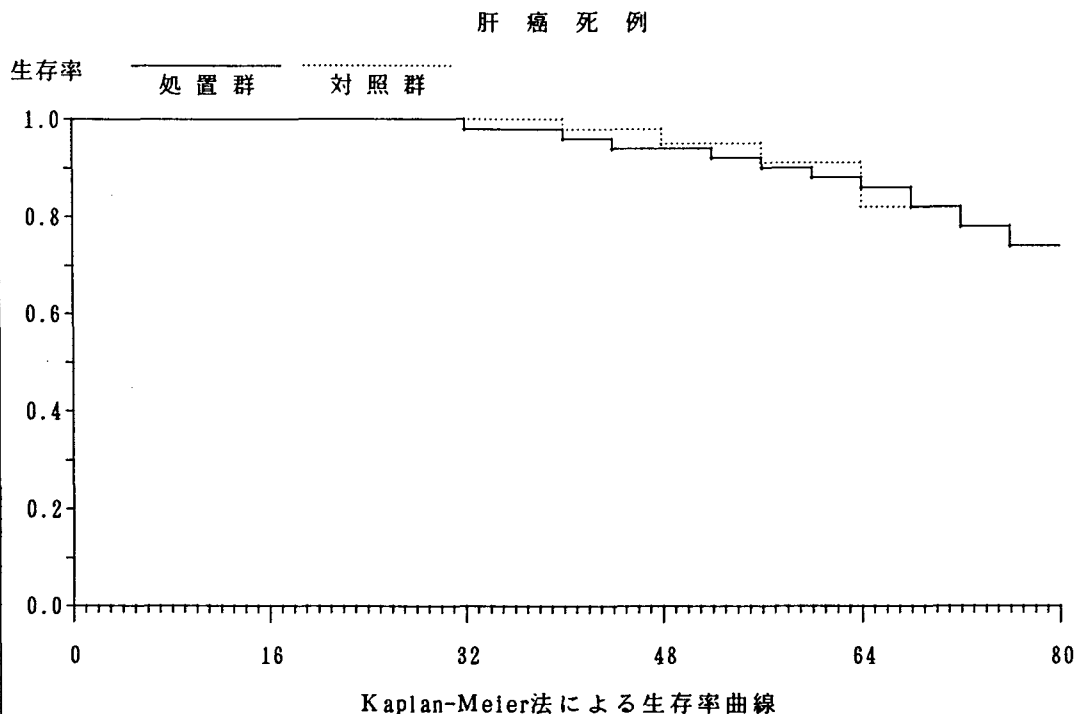


白血病に着目したKaplan-Meierというのが書けるわけです。これは白血病以外で死亡した中間死亡動物は白血病になる前に観察不能になったということで、どんどん生存率計算からはずして行ってグラフを書いたわけです。この場合中間死亡といいますのは、自動的に肝癌死になるわけですが、そうしますと、処置群では白血病でこれだけたくさん死んだけれど、対照群では白血病でほとんど死ななかったというグラフになります。これは直感どおりでよいわけですが。次お願いします。

図：肝癌に着目したKaplan Meier図

「肝癌以外で死亡した中間死亡動物は、肝癌になる前に観察不能となった」と考える。

この場合の中間死亡 = 白血病死



今度は肝癌についてのKaplan-Meierを書きますと、肝癌以外で死んだ中間死亡動物は、肝癌になる前に観察不能になったという考えのもとに書けばいいわけです。そうしますとこの場合の中間死亡は白血病ですから、白血病で死んだ動物はどんどん生存率計算から落としていきます。そしてグラフを書くと、対照群も処置群も重なっている訳です。これが正しい直感に訴えるための正しいデータ解析になるわけです。次お願いします。

2本のKaplan-Meier生存率曲線の比較検定

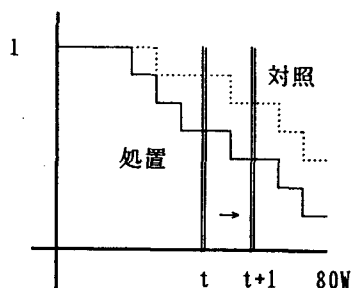
AGE-ADJUSTED METHOD (LOG-RANK or MANTEL-HAENSZEL TEST)

第 t 日の状況 (分割表)

第 t 日の朝の生存匹数

第 t 日のうちに肝癌で死んだ動物数

肝 癌	処 置 群	対 照 群
観 察 数	1	1
生 存 匹 数	17	45



第 t 日 62匹中 2匹が肝癌で死亡した。

仮定 = 処置が肝癌発生に影響しない。

$$\frac{2}{62} \times 17 = 0.55 \quad \text{と} \quad \frac{2}{62} \times 45 = 1.45$$

ずつ生じると期待される (期待値)。

統計量 T = どれだけ期待からかけ離れた事象が起きたかを現わす

$$T = \frac{(\text{処置群観察数} - \text{処置群期待値})^2}{\text{処置群期待値}} + \frac{(\text{対照群観察数} - \text{対照群期待値})^2}{\text{対照群期待値}}$$

観察数 $\approx$ 期待値 $\rightarrow T$ は小、 観察値 $\neq$ 期待値 $\rightarrow T$ は大

第 t 日目のデータを

$t = 1 \sim 560$ の間について複合する。

この場合 : 肝癌に関して有意差無し

key word : 期待値・分割表・複合分割表

この2本のKaplan-Meierのグラフの間の差を検定することになるわけで、Long-rank testあるいはMantel-Haenszel testを用います。それは第 t 日目から $t+1$ 日目の間におこったことを表にしてそれを積分するという形になるわけです。たとえば t 日目の朝の生きていた動物の数とその日のうちに肝癌で死んだ動物の数をもとに第 t 日目の分割表を書く。これについての統計量を求めて、それをすべて0日から80週までたし合わせて最終的に統計をするということになります。そうしますと、この場合肝癌に関しては有意差なしという、Kaplan-Meierで書いた図から得た直感と同じ結果が出るわけです。次お願いします。

この場合の注意点

中間死亡 = 注目する腫瘍以外の原因で死亡する事。肝癌にとっては白血病死も中間死亡。

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表	Kaplan-Meier図	intervalを設ける
	カイ自乗検定	Log-rank test	Log-rank test
	Fisher's exact test	(Mantel-Haenszel)	(Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表	Context of Observation に基づく表	
	Cochran-Armitage test for trend	Peto's Method	

今のが、Death rate methodにおけるAge adjustmentを示したことになるわけです。次をお願いします。

	①	②	③	④
腫瘍の種類	表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
理想的観測項目	腫瘍の発生日			
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定(貯 ^D +隠 ^I)	不定(偶然)

不定(偶然) → 中間死亡した動物を剖検して偶然発見される。

次に、③はめんどくさいので最後に回しまして、④にいきます。非致死性、偶然発見の腫瘍についてです。定義としましては中間死亡した動物を剖検して偶然発見されるという腫瘍になります。次をお願いします。

中間死亡に差がない場合：

<例>

30匹に処置を、30匹は対照、12ヶ月間観察、中間死亡に差はない。

甲状腺に腺腫を認めた。

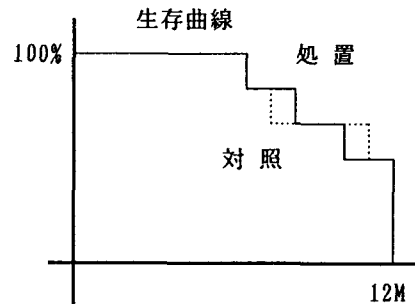
結果：

	処置	対照
甲状腺腺腫	8/30	1/30

直感的に有意差あり

Fisher's exact test = $P < 0.02$ 有意

これはほぼ正しい (Ade-adjustment 必要ない)



中間死亡に差がない、つまり両方の群の生存曲線に差がない場合は、たとえば甲状腺腺腫が30匹中8匹、30匹中1匹という、これはほぼ正しいことなのですが。次お願いします。

中間死亡に処置群と対照群の間で差がある場合

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定(死+體 ¹)	不定(偶然)

処置によって

処置群だけに...

他の腫瘍発生率	①→①' (-)	②→①' (+)	③ ^D →①' (+)	④→①' (-)
が上昇すると	①→②' (-)	②→②' (+)	③ ^D →②' (+)	④→②' (-)
影響なし (-)	①→③' (-)			④→③' (-)
影響あり (+)	①→④' (-)	②→④' (+)	③ ^D →④' (+)	④→④' (-)
非腫瘍死が増加 (腫瘍の有無と 独立に)	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少
処置が腫瘍の 成長を早めた	影響無し	≠ 影響無し	③ ^D の観察が増す	影響無し
処置が担癌動物 を選択的に死亡 させた場合の影響	影響無し	≠ 影響無し	観察が早まる、 頻度も増加する 可能性がある	観察が早まる、 頻度も増加する 可能性がある

これに、②とか③の腫瘍が、つまり白血病ないしはそれに類似した腫瘍がからんでまいりますと、この偶然発見、非致死性の腫瘍の統計が影響をこうむることになるという例をお示します。次お願いします。

甲状腺に腺種を認めた。

	週	・・・12・16・20・24・28・32・36・40・44・48・52・56・60・64・68・72・76・80	80	計
処	生 存 匹 数	5049 48 47 45 43 39 35 29 23 17 12 6	0	50
置 群	肝 癌 死	01112234565556		4
	白 血 病 死			46
	甲 状 腺 腺 腫			2
対	生 存 匹 数	5049 4847 46 45 44 43 40 36	34	50
照 群	肝 癌 死	0111111222		13
	白 血 病 死			3
	甲 状 腺 腺 腫		11	12

例として５０匹処置群、５０匹対照群、動物は白血病または肝癌で死んで、甲状腺に腺腫を認めた。今度の場合、甲状腺腺腫が注目の対象になるわけですが、結果的に処置群では白血病で大半が死んで甲状腺腺腫が剖検で見つかったのが２例。対照群では逆に計画屠殺の最後のときに１１例見つかっているという状況です。次お願いします。

最終結果のみを表にすると

	処置群	対照群
白血病死	46/50	3/50
肝癌死	4/50	13/50
甲状腺腺腫	2/50	11/50

直観的に導かれる結論は、

1. 処置は白血病を誘発した
2. 処置は肝癌発生を抑制した
3. 処置は甲状腺腺腫を抑制した。

この結論は統計学的にも有意にできる

1. はFisher's exact test で $p < 0.001$
 2. はFisher's exact test で $p < 0.05$
 3. はFisher's exact test で $p < 0.001$
- 2, 3は誤りである。

この場合、結果だけを見れば、甲状腺腺腫は処置によって減ったという結果になるわけですが、これはまちがいだということになるわけです。次お願いします。

④ 非致死性腫瘍 → 中間死亡した動物を剖検して偶然発見される。

統計 = PREVALENCE METHOD インターバルを設ける。

	週	0-19	20-39	40-59	60-79	80	計
処 置 群	剖 検 匹 数	0	5	23	23	0	50
	甲状腺腺腫		0	1	1	0	2
対 照 群	剖 検 匹 数	0	1	3	10	36	50
	甲状腺腺腫		0	0	0	11	12

(80週で全数屠殺)

第40-59週の分割表

	処 置 群	対 照 群
剖 検 総 数	23	3
甲状腺腺腫	1	0

このような分割表を集計 → Log-rank test

有意差無し (Mantel-Haenszel)

このように実験期間を一番単純に等間隔のインターバルに区分してみます。非致死性腫瘍は中間死亡した動物を剖検してみつかるわけですから、Prevalence methodを行うこととなります。ある区間の中で剖検された動物の数をまず問題にします。40～59週の間では23匹解剖して1個だけ甲状腺腺腫があった。このような表を区間ごとに5つ書きまして、それを複合して検定するのが、この場合正しい方法になります。次お願いします。

PREVALENCE METHOD の注意点 :

1. 分母は剖検総数
2. 大前提 = 中間死亡は対照群・処置群に平等に起こる (独立事象)

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表 カイ2乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meier図 Log-rank test (Mantel-Haenszel)	intervalを設ける ML図(ad hoc run) Log-rank test (Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表 Cochran-Armitage test for trend	Context of Observation に基づく表 Peto's Method	

計算方法自体は先ほどと同じ考えなんですが、要はインターバルに区切りまして、各インターバルの中で、解剖検索された総数が分母になるということになります。

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定(耽 ^D +融 ^I)	不定(偶然)

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表 カイ2乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meier図 Log-rank test (Mantel-Haenszel)	intervalを設ける ML図(ad hoc run) Log-rank test (Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表 Cochran-Armitage test for trend	<u>Context of Observation</u> に基づく表 Peto's Method	

同じ組織型

不定(死亡) → 腫瘍死動物にその死因として発見される

不定(偶然) → 中間死亡動物に偶然発見される

一番問題なのは、③になるわけですが、これは死んでみつかると偶然みつかるとがチャンボンになって問題になる場合です。最終的にはこの Context of observation というものがどうしてもかかわってくることになります。同じ組織型でも、死因として発見されるものと偶然みつけたものを区別しなければ正確に解析できないということです。次お願いします。

<例>

30匹に処置を、30匹は対照、24週間観察した。

処置群は肝癌で多くが死亡した。

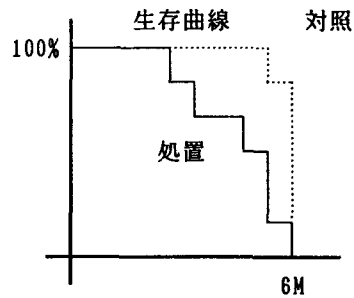
対照群は殆ど死なず、25週目にほぼ全数が屠殺・解剖された。

対照群には微小な肝癌が認められた。

肝癌を持っていた動物の頻度：

	処 置	対 照
肝 癌	30/30	25/30

群間で検定すれば有意差無し



30匹に処置、30匹が対照で、処置群は肝癌で多くが死に、対照群は死ななかつたけれども屠殺してみたら小さな肝癌が大多数にあった、という結果です。この結果だけで検定してはいけないということになるんですが。次お願いします。

	週	0. . . . 5. . . . 10. . . . 15. . . . 20. . . .	25	計	
処置群	生 存 数	30	29 28 27 25 22 17 13	5	
	肝 癌 死		1 1 1 2 3 5 4 8	0	25
	中間死亡（肝癌+）			5	5
対照群	生 存 数	30	29	28	
	肝 癌 死		1 1	0	2
	中間死亡（肝癌+）			23	23

同じ肝癌でも、どのように発見されたか？

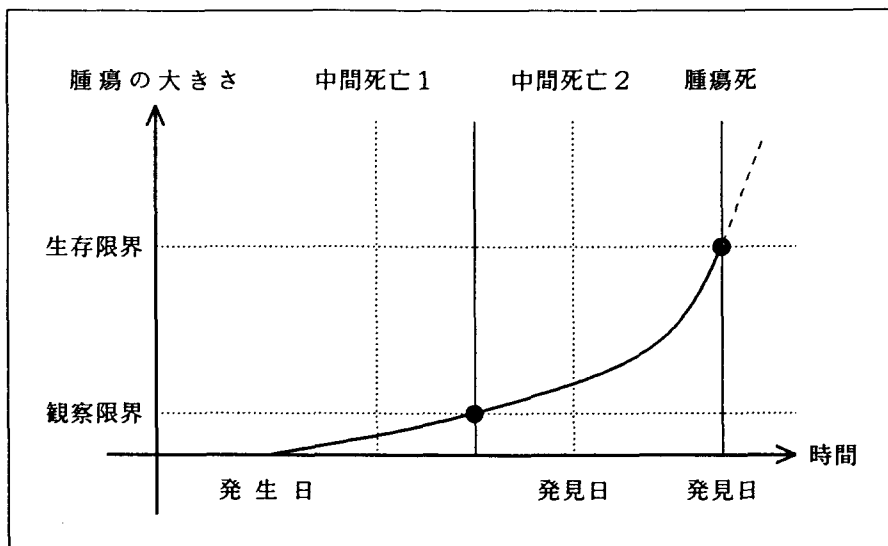
死因となっていたか？

= 発見の状況 CONTEXT OF OBSERVATION (PETO検定)

PETO検定 = 病理学的観察データが統計処理に組み込まれた

まず、肝癌死例同志の検定、次に肝癌を偶然に発見した中間死亡例同志の検定、そして最終的に両者を合せた評価をしなくてはなりません。そのためにContext of observation というものが、どうしても必要となります。剖検時にどういう発見のされ方をしたか、というのが問

題になるということです。次お願いします。



ちょっと概念的な図ですが、腫瘍がここ（発生日）で発生しまして、小さいうちはみつからないけれど（中間死亡1）、これ（生存限界）以上大きくなると動物は死んでしまうと考えます。腫瘍死した動物が剖検される時の腫瘍はすべてこの付近の腫瘍です。偶然他の原因で殺されてみつかると腫瘍というのはこの部分（中間死亡2）であります。この2つのもの（中間死亡2と腫瘍死）をいっしょにして計算するとまずいということが直感的に理解いただけるかと思います。次お願いします。

あらゆる種類・状況の腫瘍に対する統計学的解析を行うには、

1. 剖検日はいつか
 2. 腫瘍の組織分類はなにか
 3. その腫瘍が①～④のどれに当てはまるか、すなわちその腫瘍が動物の死因であるか、ないか（発見状況）
- というデータを動物一匹一匹について揃えなければならない。

計算の方法は最後にいたしまして、今、先のスライドまでの①から④まで示したすべての腫瘍を何とか統計学的に解析するには最低この3つのことがわからないといけないということになります。すなわち、剖検日はいつか、腫瘍の組織分類はなにか、次にその腫瘍が①から④のどれにあてはまるか、すなわち表在性であるのか、致死性であるのか、偶然みつかったものなのかということです。いいかえるとそれが動物の死因であるかどうか。これが非常に大事になってくるわけです。病理学的な判断、当然主観が入ってきますが、これがわからないとなかなかこの先の解析ができないということになると思います。

TREND TEST

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表 カイ2乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meire図 Log-rank test (Mantel-Haenszel)	intervalを設ける Log-rank test (Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表 Cochran-Armitage test for trend	Context of Observationに基づく表 Peto's Method	

正の用量相関 (Positive Trend)

統計量 T = 'TREND TEST STATISTIC'

各群の担癌動物数 = O

期待値 = E

用量 = D

$T = \sum D (O - E)$

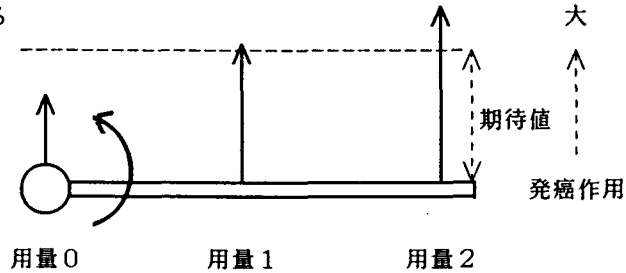
$T = 0 \times (5 - 10) + 1 \times (10 - 10) + 2 \times (15 - 10) = +10$

D	用 量 0	用 量 1	用 量 2
生存匹数	100	100	100
○担癌匹数	5	10	15
E期待値	10	10	10
差	-5	0	+5

Age-adjusted methods に組み込める → 複合分割表にできる

ここで、すこし Trend test について紹介いたしますと、Trend test というのは用量 (D) に担癌動物数 (O) から期待値 (E) をひいたものにかけたものの和 ($\sum D (O - E)$) というもので非常に単純な統計量なのです。

傾向検定量 $T =$
 モーメントを計算し
 ている



Null hypothesis: 用量相関が全く無いと仮定したときの
 T [trend test statistic] は
 平均値 0 (零)
 分散 V
 の正規分布に従う。
 標準化: $Z = T / SD = T / \sqrt{V}$

直感的に言いますと、たて軸に担癌動物数を、横軸に用量を取りまして、用量0を軸としたモーメントを計算していると考えるとわかりやすいと思います。ただし、期待値分を引いていますから、用量2が小さくて用量1が大きいと用量2の部分のモーメント計算は負となります。この様に用量と相関のないような場合はモーメントはあまり大きくなりません。いいかえるとそういう時は感度が悪いといえます。逆にすべての群で群間の差は小さくてもちょっとずつ用量相関をもって増加している時には非常に強いモーメントになり、分散が小さくなります。そのため、傾向を表わすのにこの T は非常に良いということになります。もしも、すべての群に差が無いと仮定いたしますとこの棒はほとんど振れないということになります。水平の所からある偶然の幅をもって振れるだけだということです。null hypothesis で用量相関が無いと仮定した時にはこの T (trend test statistic) というモーメントは平均値が0で、ある分散 V の正規分布に近似的に従うといわれています。ですから、 T を $\sqrt{V}$ 、すなわち、標準偏差で割って、標準化すれば、正規表からすぐに P 値を読みとることができるわけです。

腫瘍の種類	① 表在性腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性腫瘍 腫瘍 (非致死腫瘍)
-------	----------------------	----------------------------------	----------------------------------	------------------------------

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分割表 カイ2乗検定 Fisher's exact test	Kaplan-Meire図 Log-rank test (Mantel-Haenszel)	intervalを設ける ML図 (ad hoc run) Log-rank test (Mantel-Haenszel)
用量相関	分割表 Cochran-Armitage test for trend	Context of Observation に基づく表 Peto's Method	

PETO検定 = ①②③④に対処している。
= 傾向検定を用いて感度を上げている。

利点：計算が簡単
中間屠殺を必要としない。

最後に Peto の検定の話しになりますが、Context of observation、すなわち腫瘍がどう
いう状態で発見されたかということに基づく分割表を書いた上にtrend testを組みあわせて、
①から④の腫瘍をすべて考慮して結果を出すというものと位置づけられます。Peto 以外にも
こういうものを考慮する方法はあるわけですが、まず計算が簡単であるということと、ことさ
らに中間屠殺を要求しないという大きな利点があるわけです。

PETO 検定	Context 5	Context 3 + 4		Context 0 + 1 + 2
腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍 (表在腫瘍)	② 急速に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (急性腫瘍)	③ 緩徐に増殖し 動物を殺す 腫瘍 (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫瘍 (非致死腫瘍)
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	= 0	≠ 0	不定 (死 ² + 隠 ¹)	不定 (偶然)
	Onset rate method	Death rate method		Prevalence method

Context of Observation: 観察時の腫瘍の状況

- ☆ CONTEXT 0 (状況0) = SCHEDULED SACRIFICE CONTEXT (計画屠殺状況) :
- ☆ CONTEXT 1 (状況1) = OTHER INCIDENTAL CONTEXT (その他の偶然発見状況) :
- ☆ CONTEXT 2 (状況2) = PROBABLY INCIDENTAL CONTEXT (多分偶然発見状況) :
- ☆ CONTEXT 3 (状況3) = PROBABLY FATAL CONTEXT (多分致死状況) :
- ☆ CONTEXT 4 (状況4) = FATAL CONTEXT (致死状況) :
- ☆ CONTEXT 5 (状況5) = MORTALITY-INDEPENDENT CONTEXT (死亡に無関係な状況) :

2つの大前提に基づいている。

- 中間死亡の起こる率は群、担癌の有無によらない。
- Context 3 + 4 は ② 急性腫瘍として計算される。
(=context 0 + 1 + 2 は ④ 非致死腫瘍として計算される)

ただし、Peto の検定が本当にこの4つ (表中の腫瘍の種類①～④) を分類しているかという、そうではなくて、急速に動物を殺すものと、この肝癌のようにじわっと殺すようなもののうち、そのために死んだものとを一緒にせざるを得ないというところがあります。絶対に宿主を殺さないようなものと、偶然にみつかった小さな肝癌のようなものとを統計上、同種のものとして解析しているという欠点というか仕様がないうか、そういうところがあります。Peto の検定のためには表中の3つの枠にすべての腫瘍を分類すればいいんですが、病理学的に標本をのぞいていれば当然いろいろ迷うような難しい病変があるということもPeto は考慮しておりまして、Contextを0から5までの6段階に分けております。Context0というのは計画屠殺時に偶然みつかったもの、1というのは計画屠殺以外の解剖で偶然みつかったもの、2と3はとばしまして、4は明らかにそれが原因で死んだような致死的な腫瘍で、5は表在性

の腫瘍などのように剖検によらずにその発生がわかるものです。2というのはたぶん偶然、3というのはたぶん致死性であろうという腫瘍ということになります。この0と1と2をたして偶然のものとして計算し、3と4を致死性のものとして計算するということになります。

P E T O 検定を行うには、

1. 剖検日はいつか
2. 腫瘍の組織分類はなにか
3. その腫瘍の観察時の状況 (context of observation) はどれか、すなわち、その腫瘍が動物の死因であるか、ないか (発見時の状況)
4. 用量のデータ

というデータを動物一匹一匹について揃えなければならない。

実験 A A	ラット No. 1 2 3	((Moribund), Dead, Scheduled)	Date 1988.11.18
腫瘍	1. Pituitary adenoma	- context 4	
	2. Thyroid adenoma	- context 1	
	3. Adenoma of the liver	- context 1	
死因	Pituitary adenoma による脳の圧迫と頭蓋内出血		

もう一度くどいようですが Peto の検定を行うには測定日はいつで、腫瘍の組織型は何で、その腫瘍が Context 0 から 5 のどれで、死因は何であるか、たとえばラットの 1 2 3 番に関しては腫瘍として pituitary adenoma と thyroid adenoma と肝の adenoma がある。死因としては pituitary adenoma による脳の圧迫と出血である。これは adenoma なのに Context 4、すなわち致死性として登録されている。この 2 つは偶然発見されてますからこの liver の adenoma が仮に hepatoma でも小さければ Context 1 になります。

補 足：

1. 一種類の腫瘍が一臓器に多発したとき：totalで1つの腫瘍と考える。
2. 状況3か4の腫瘍は一匹について一個が原則
3. 死亡例に状況3や4の腫瘍が見当たらない場合は「無し」のままにする。
4. 良性腫瘍でも重要器官を傷害し致死적であれば3や4とする。
5. 腫瘍の組織学的悪性度を考慮して判定して良いのは状況2と状況3との間で迷った時のみである。
6. 状況5は、触診で判定してはいけない。

補足といたしましては、1種の腫瘍が1つの器官に多発した時はトータルで1つの腫瘍と考える。トータルで考えてやはり死因ならばContextは4の致死性となりますし、トータルで考えてそれでもやはり死因ではなさそうだという時には偶然発見の腫瘍として考えられるわけです。ここでもやはり病理学者の主観が入ります。又、Context3か4、すなわち、致死性かというものは1匹について1個が原則です。2つの癌で同時に殺されたというのはめったにないことだからやめなさいということです。当然死因がわからずに死んでしまったというものもあるわけで、そういう場合は無理してContext3や4はつけなくて、仕方が無いから「死因なし」と処理します。さきほどの下垂体の腫瘍もそうですが、病理的に良性腫瘍でもそれによって死んでいればその腫瘍はContext3か4、すなわち致死性のもだったということになります。組織型の悪性度を考慮して判定してよいのはContext2と3で迷った時だけです。すなわち、小さいんだけど悪性でまわりに浸潤していて、たぶんこのままほっとけば、近々、そのために死んだであろうと思われるものはContext3に入れるとか、かなり大きいけれども良性腫瘍でたぶんこのままほっといても大丈夫だったんだろうという場合はContext2に入れるとか、です。状況5というのは剖検に依存せずみつかるというもので、皮膚の腫瘍はこれに入るわけですが深いところのものを触診で判定してはいけないということがいわれています。たとえば乳癌を指でさわって判定してはいけないということです。

- Context 5 : MORTALITY-INDEPENDENT CONTEXT (表在性腫瘍) の場合 :

発生率法 (ONSET RATE METHOD)

仮定 = 処置が腫瘍発生に影響を与えない。

本日中に腫瘍が発生する確率はどの群でも等しい。 = 分母は生存匹数

- Context 3 + 4 : FATAL CONTEXT (致死性腫瘍) の場合 :

死亡率法 (DEATH RATE METHOD)

仮定 = 処置が腫瘍発生に影響を与えない。

本日中に致死腫瘍で死亡する確率はどの群でも等しい。 = 分母は生存匹数

- CONTEXT 0 + 1 + 2 : INCIDENTAL CONTEXT の場合 :

有病率法 (PREVALENCE METHOD)

仮定 = 処置が腫瘍発生に影響を与えない。

適当に短い期間* に中間死亡した動物に、解剖によって注目する腫瘍が見つかる確率はどの群でも等しい。 = 分母は剖検匹数

(* 100日程度 / ad hoc run (ML図))

くどくなりますが Context 5 というのを判定する場合は仮定として『処理が腫瘍発生に影響しない」とすると本日中に腫瘍が発生する確率はどの群でも等しい』ということで、今日生きている生存匹数が分母になるわけです。ですから 1 群が 50 匹、2 群が 40 匹いた場合に 50 匹中の何匹が今日腫瘍ができるか、40 匹中の何匹が今日できるかがデータの基本になるわけです。致死性腫瘍の場合も処置が影響を与えないと仮定した時に言われることは『本日中に致死腫瘍で死亡する率はどの群でも等しい』ということですので今朝生きていた匹数が分母になって計算されるわけです。ところが Incidental context、すなわち偶然みつける様なものは『適当に短い時間に中間死亡した動物に剖検によってみつける率はどの群でも等しい』ということになります。この場合の分母は剖検匹数になります。ここが他の 2 つと違うところで、これをまちがえると大きな統計的な誤りがおきます。適当な期間にというのは、ad hoc run を用いたり、便宜的に 100 日程度で切ったりして決めますが、とにかくある期間を設けてその中で剖検された数をベースに考えるということになります。

2. 生存動物数を表にする

実験 B B ♀

週	対 照 数	用 量 1 生 存 数	用 量 2 生 存 数
1	50	50	50
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10	(0)	(0)	(0)
11			
2			
3		49	
4			
5			49
6			
7			
8			
9			
20	(0)	(1)	(1)
21			
2			
3			
4			
5			
6			48
7			
8			
9			
30	(0)	(0)	47 (2)
31			
2			
3			
4		48	
5			46
6			
7			
8			
9			
40	(0)	(1)	(1)

41			
2			
3			45
4			
5			
6		47	
7			
8			
9			44
50	(0)	(1)	(2)
51			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			43
9		46	42
60	(0)	(1)	(2)
61			
2			
3			41
4			
5			
6			
7			
8			
9			
70	(0)	(0)	(1)
71			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			40
9			
80	(0)	45 (1)	39 (2)

Peto の計算の一例を示します。用量 0, 1, 2 で 50 匹ずつの実験の時の生存数をずっと書いたものです。ここでは便宜上 10 週間の interval として、右下すみにその間に死んだ数を書いてあります。(43, 44, 45)

81			38
2			37
3			
4			36
5		44	
6			
7			35
8			
9			
90	(0)	43 (2)	(4)
91		42	34
2	48	41	32
3			
4		40	
5		39	
6			
7		38	
8		37	
9			
100	(2)	36 (7)	30 (5)
101	47	35	29
2	46		
3	45	33	28
4	44		
5	42		27
6	41	32	
7			26
8	40	30	25
9	39	29	
110	(9)	(7)	(5)
110*	0 (39)	0 (29)	0 (25)

* 計画屠死

110週で全部計画屠殺したわけですが、ここだけは特別な区間にします。

3. 腫瘍毎に、発見匹数とその発見状況を記入する

<例> Uterus. endometrial sarcoma

81	(50)	(45)	38
2			37
3			
4			1[1] 36
5		44	
6			
7			35
8			
9			
90	(0)	1[4] 43 (2)	(4)
91		42	1[4] 34
2	48	1[3] 41	32
3			
4		40	
5		39	
6			
7		38	
8		37	
9			
100	(2)	36 (7)	30 (5)
101	47	35	29
2	46		
3	45	33	28
4	44		
5	42		27
6	41	1[2] 32	
7			26
8	40	30	1[4] 25
9	39	29	
110	(9)	(7)	(5)
110	0(39)	0(29)	0(25)

endometrial sarcoma を例に取りますと、81週より前には、この病気で死んだ動物は居なかったんですが、84週目に最高用量群で1匹死んだ時に解剖してみたら偶然にContext1の腫瘍がみつかりました。次に90週目に低用量群で1匹死んでいるんですが、それは解剖してみたら、endometrial sarcoma が有りまして、それはどうもこの動物を殺していたと判定されました。つまり、Contextは4である、と便宜的にこう1〔4〕書きます。次に91週目に、1匹死んでいて、それを解剖してみたら、もちろん病理組織学的な判定までもちこす場合も当然あるわけですが、死因であったということでContext4となります。

3. 腫瘍毎に、発見匹数とその発見状況を記入する

<例> Uterus, endometrial sarcoma, context
3 and 4

81	(50)	(45)	38
2			37
3			
4			1[1] 36
5		44	
6			
7			35
8			
9			
90	(0)	1[4] 43 (2)	(4)
91		42	1[4] 34
2	48	1[3] 41	32
3			
4		40	
5		39	
6			
7		38	
8		37	
9			
100	(2)	36 (7)	30 (5)
101	47	35	29
2	46		
3	45	33	28
4	44		
5	42		27
6	41	1[2] 32	
7			26
8	40	30	1[4] 25
9	39	29	
110	(9)	(7)	(5)
110	0(39)	0(29)	0(25)

まずContext3と4すなわち死因になったであろうというものについて統計処理を行うわけですが、90週目の低用量群では43分の1というデータになります。この時、対照群では50分の0、高用量群では35分の0というデータになります。同様に、91週目では50分の0、42分の0、34分の1というデータで、このようなデータの組合せが4個所から取れるわけです。

4. Context 3 + 4 (致死状況) の Endometrial sarcoma を拾い上げ、検定する。

<分母 = 生存数>

WEEK	DOSE = 0			DOSE = 1			DOSE = 2			VAR
	NO	OBS	EXP	NO	OBS	EXP	NO	OBS	EXP	
90	50	0	0.391	43	1	0.336	35	0	0.273	0.650
91	50	0	0.397	42	0	0.333	34	1	0.270	0.651
92	48	0	0.397	41	1	0.339	32	0	0.264	0.644
108	40	0	0.421	30	0	0.316	25	1	0.263	0.659
TOTAL		0	1.606		2	1.324		2	1.070	2.604

$$T_{(3+4)} = 0 \times (0 - 1.61) + 1 \times (2 - 1.32) + 2 \times (2 - 1.07) = 2.54$$

$$V_{(3+4)} = 2.60$$

$$Z_{(3+4)} = 1.57$$

not significant

.....
 $Z > 1.64$ then $p < 0.05$

$Z > 1.96$ then $p < 0.025$

$Z > 2.33$ then $p < 0.010$

Context 3 + 4つまり致死状況で見つかった endometrial sarcomaのデータをもとに計算すると、さきほど言った傾向検定量が + 2.54である程度の右上りの傾向があります。分散も計算出来まして、それが2.60です。それからZ値は1.57で $p < 0.05$ に足りないということになります。

3. 腫瘍毎に、発見匹数とその発見状況を記入する

<例> Uterus, endometrial sarcoma, context

0 and 1 and 2

81	(50)	(45)	38	
2			37	
3				
4	(0)	(0)	(1[1]) 36	
5		44		
6				
7			35	
8				
9				
90	(0)	1[4] 43 (1)*	(4)	* 2-1[4]-1
91		42	1[4] 34	
2	48	1[3] 41	32	
3				
4		40		
5		39		
6				
7		38		
8		37		
9				
100	(2)	36 (7)	30 (5)	
101	47	35	29	
2	46			
3	45	33	28	
4	44			
5	42		27	
(6)	(0) 41	(1[2]) 32	(0)	
7			26	
8	40	30	1[4] 25	
9	39	29		
110	(9)	(7)	(4)*	* 5-1[4]-4
110	0 (39)	0 (29)	0 (25)	

今度は、偶然に見つかったものの計算をします。81週からの区間では解剖された動物の数がこの区間の計算の分母になります。ただし、分母からはEndometrial sarcomaで死んだ匹数は除きます（*）。

5. Context 0 + 1 + 2（偶然発見状況）のEndometrial sarcomaを拾い上げ、検定する。

<分母=剖検数-（context 3または4があった臓器数+検索されなかった臓器数）>

WEEK	DOSE = 0			DOSE = 1			DOSE = 2			VAR
	NO	OBS	EXP	NO	OBS	EXP	NO	OBS	EXP	
81	0	0	0.000	1	0	0.200	4	1	0.800	0.160
101	9	0	0.450	7	1	0.350	4	0	0.200	0.588
TOTAL		0	0.450		1	0.550		1	1.000	0.748

$$T_{(0+1+2)} = 0 \times (0 - 0.45) + 1 \times (1 - 0.55) + 2 \times (1 - 1.00) = 0.45$$

$$V_{(0+1+2)} = 0.75$$

$$Z_{(0+1+2)} = 0.52$$

not significant

Context 0 + 1 + 2、つまり、偶発的状況でみつかったEndometrial sarcomaのデータをもとに、計算するとこのようになります。

6. Context 0 + 1 + 2 + 3 + 4のEndometrial sarcoma全体としての検定を行う。

$$T_{(3+4)} = 0 \times (0 - 1.61) + 1 \times (2 - 1.32) + 2 \times (2 - 1.07) = 2.54$$

$$V_{(3+4)} = 2.60$$

$$T_{(0+1+2)} = 0 \times (0 - 0.45) + 1 \times (1 - 0.55) + 2 \times (1 - 1.00) = 0.45$$

$$V_{(0+1+2)} = 0.75$$

$$T_{Total} = T_{(0+1+2)} + T_{(3+4)} = 2.99$$

$$V_{Total} = V_{(0+1+2)} + V_{(3+4)} = 3.35$$

$$Z_{Total} = T_{Total} / \sqrt{V_{Total}} = 1.634$$

このとき、 $p < 0.05$

☆ 独立な標本の分散の加算性：

幾つかの標本を足し合わせたとき、その分散はもとの分散の和に等しい。

傾向検定量も加算的である。

最終的に Context 0, 1, 2, 3, 4 すべての endometrial sarcoma の全体の検定を行うにはどうしたらよいかというこの傾向検定量を全部足して、分散もおのおの足しまして、その結果から Z 値を出します。そうすると $Z = 1.634$ で、有意になります。すなわち Context 0 から 4 まですべてのものについて計算をする時には、まず 3 と 4、0 と 1 と 2 と別々に計算したのを最終的に足してそれから正規分布に当てはめるということをしななければならないわけです。Context 0 + 1 + 2 も Context 3 + 4 も各々は $p > 0.05$ なのに全体が $p < 0.05$ となるのは、合計したために、対照となる動物の数が増した分、感度が良くなったためです。

ま と め：

1. 定性的評価
2. 計画時の注意事項 前駆病変・関連病変 用量相関（傾向検定）
3. 評価時の注意事項 実験者の直感が大事

A. 統計学以外の知識

Historical control（文献上のデータ・各研究施設固有のデータ）
動物全体の状態の把握

B. 統計学の知識

正しい直感 $\leftrightarrow$ 正しい検定法（バイアスの除去）
PETO検定の正しい運用の為に

4. PETO検定に必要なデータ（各動物）

剖検日・腫瘍の組織分類・発見状況・用量のデータ
<病理学全般の知識が要求される>

5. 正しい運用のための知識

発 見 状 況	Context 5	Context 3 + 4	Context 0 + 1 + 2
腫 瘍 の 種 類	① 表 在 性 腫 瘍 (表在腫瘍)	② ③ 急速に増殖し 緩徐に増殖し 動物を殺す 動物を殺す 腫 瘍 腫 瘍 (急性腫瘍) (緩徐腫瘍)	④ 非致死性 腫 瘍 (非致死腫瘍)
発 見 日	=発生日	≡発生日 不定(死 ^D +隠 ¹)	不定(偶然)
	Onset rate method	Death rate method	Prevalence method

	Non-adjusted method	Age-adjusted Death rate method	Age-adjusted Prevalence method
群間比較	分 割 表 Fisher's exact test	Kaplan-Meier図 Log-rank test	intervalを設ける Log-rank test
用量相関	分 割 表 Trend test	Context of Observation に基づく表 Peto's Method	

大 前 提 ・中間死亡の起こる率は群、担癌の有無によらない。

・Context 3 + 4は②急性腫瘍として計算される。

(=context 0 + 1 + 2は④非致死腫瘍として計算される)

6. 多い間違い=Prevalence method の分母を生存匹数にしてしまう。

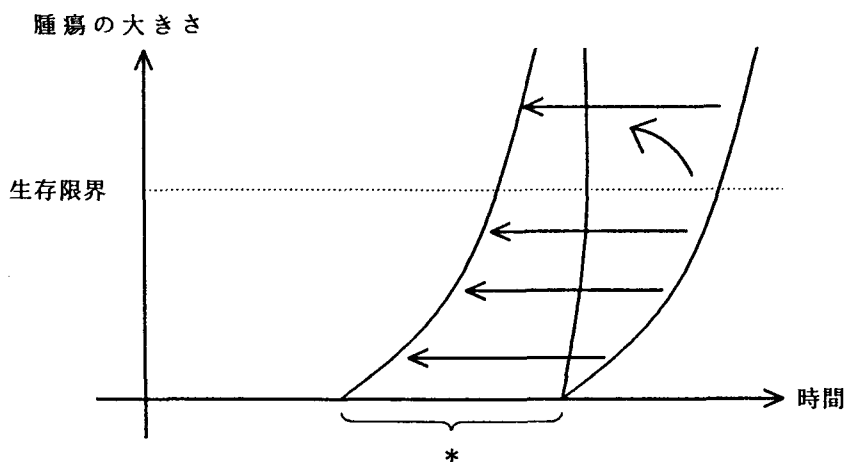
=Prevalence method の分母から同一組織型のcontext 3, 4の例の数を除くのを忘れる。

長くなりましたが、まとめてみますとまず定性評価であるからnull hypothesisとしては『処置による効果に差がない』ということです。計画時の注意としては、前駆病変とか関連病変とかを考慮する、傾向検定が使える系なのかどうか、そういうことまで考えなければほんとはいけない。測定時の評価の注意事項としては、とにかく実験者の直感が大事なんです。第1にはHistorical control が大事で、これを直感を働かせる時のbaseにしなければいけない。また動物全体の状況の把握がちゃんと出来ていないといけないという事です。その例としては体重が増えない時は腫瘍はできないんだという事と、ホルモンが異常の時にはホルモン臓器は影響されるんだという2つの例を示しました。また、統計学的な知識が正しくないと間違った検定をしてしまうということです。本日はPeto の検定に最後はもっていくように解説させていただきました。この検定に必要なデータとしては、1匹、1匹について剖検時と組織診断時の所見から腫瘍がどうゆう状況で発見されたかということ、いいかえると動物の死因は何だったかという情報が必要です。最終判断のところでは統計学で有意差が出たとしてもそれを否定するなり肯定するなりの関連病変が見落されていないかということにも注意が必要かと思えます。あと、ここは大前提が1つ2つ隠れているという事があります。ほんととは4つに分けなければいけないものがPeto は3つにしか分けていないということが1つ、もう1つは、重要な前提ですが、中間死亡の起こる率は、担癌の有無、群のちがいに影響されないということです。これについては、次にすこし言及いたします。

腫瘍の種類	① 表在性 腫瘍	② RAPIDLY LETHAL TUMOR	③ SLOW-GROWING LETHAL TUMOR OR TUMOR OF INTERMEDIATE LETHALITY	④ NON-LETHAL TUMOR
現実の観測法	外表観察	剖検	剖検	剖検
現実の観測点	発見日	発見日	発見日	発見日
理想との隔たり	=発生日	≠発生日	不定(死 ^D +隠 ^I)	不定(偶然)
処置が処置群だけに...				
	他 自	他 自	他 自	他 自
他種の腫瘍発生	①→①' (-)	②→①' (+)	③ ^D →①' (+)	④→①' (-)
を上昇させた場	①→②' (-)	②→②' (+)	③ ^D →②' (+)	④→②' (-)
合の影響	①→③' (-)	②→③' (+)	③ ^D →③' (+)	④→③' (-)
	①→④' (-)	②→④' (+)	③ ^D →④' (+)	④→④' (-)
	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少 又は増加
処置が非腫瘍死を増加させた場合の影響(腫瘍の有無と独立)	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少	観察頻度 減少 又は増加
処置がその腫瘍の成長を早めた場合の影響	影響無し	≡ 影響無し	③ ^D の観察が増す	影響無し
処置が担癌動物を選択的に死亡させた場合の影響	影響無し	≡ 影響無し	観察が早まる 頻度が増加する 可能性がある	観察が早まる 頻度が増加する 可能性がある

今、申しました大前提にからんだ話ですが、まず、処置が腫瘍の発生時期を早めたのか、発生後の成長を早めたのか、という点と、次に処置が選択的に担癌動物を死亡させたということが検出できるかという点について簡単にのべます。次、お願いします。

* 処置が腫瘍の成長を早めた場合の影響：



* 処置により担癌動物が選択的に中間死する場合：

中間屠殺：

モデル関数の想定：

横軸が時間で、縦軸が腫瘍の大きさに、この線（生存限界の大きさ）を越えると動物が死ぬとしますと、処置がこの曲線を平行移動させたのか、この傾斜をきつくしただけなのかを判断するデータというのはPeto にしろ、何にしろ普通は得られないという問題があります。これをもし正確にやるには中間で多数の動物を殺していったデータを取らなければならない、即ち、ここら辺（*）の腫瘍の状況を知りたいがために動物をかなり増やさなければいけないのです。モデル関数を想定する場合も、これは多分、指数関数的に大きくなるはずだという仮定のもとに検定出来るわけですが、そうすると今度は、関数がほんとに合っているかどうかを検定するのにやはり中間的に動物を殺さなければいけないということが生じます。どちらにせよPetoの検定には、この事は少なくとも他の普通の検定と同様に考慮されていない事があげられます。

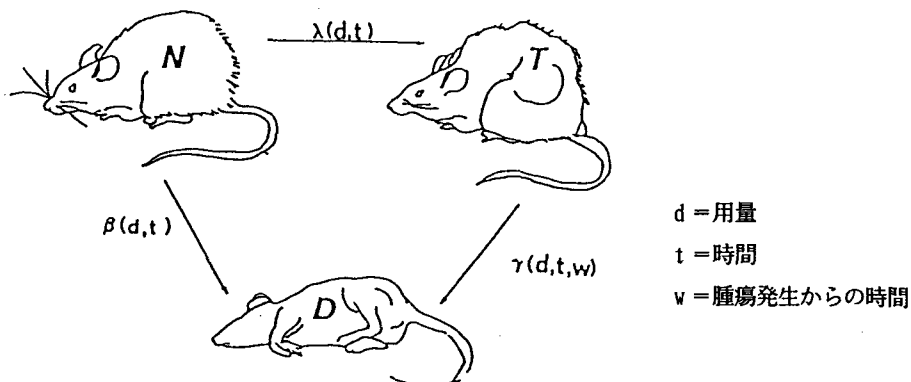


FIG. 1. A multiple decrement tumor incidence model. (ref.3から引用)

- 通常の検定における仮定 $\beta = \gamma$
- λ 、 β 、 γ をパラメトリックに求める
 - 多数の中間屠殺で確認 (McKnight et al.)
- γ をパラメトリックに、 β 、 γ をノンパラメトリックに求める
 - 小数の中間屠殺で確認 (Portier)
- 腫瘍は指数的に増加する (ad hoc) と仮定して β と γ の関係を単純に現わし、単純な分割表計算に補正を加えるだけ
 - 簡単 (Bailer et al.)

これは最近の論文から引いた図ですが、一般的に腫瘍の無い動物Nから腫瘍の有る動物Tに行く過程は λ と書いてありますが、こよう関数で表わせる。Nがそのまま死んでしまうのを β という関数で表わせるし、担癌動物Tが死ぬというのを γ で表わせる。その中で d は用量、 t は時間、 w は腫瘍が発生してから死ぬまでの時間という事なんですが、こようdoseと時間の関数でこの3つをすべて表わせるだろうと仮定いたしますと、Petoを含む普通の検定においては $\beta = \gamma$ が当然のごとく仮定されています。例えば腫瘍が精巣の間細胞腫だったら、腫瘍の有無にかかわらずほぼ死ぬ確率は同じであろうという仮定が自然に思えます。しかしこれが肝癌だったらどうでしょうか。白血病だった場合は相対的には $\beta = 0$ と考えられる場合もあるでしょう。このすべての3つの関数を几帳面に計算して求めるための実験もほんとは組めるわけで、それを提唱している人も何人かはいるようですが、その場合、多分、中間屠殺が大量にいるだろうという事が言われています。ある程度、parametricな関数を想定すれば中間屠殺をすくなくしていけるのではないかという話もありますが、やはり関数の妥当性の確認のためには、かなりの中間屠殺が必要だといわれています。全然別の考え方として、腫瘍は指数関数的

に増加するんだというふうにわり切ってしまうとPetoみたいに難しい事はいっさいしないで、とにかく簡単にやったら意外と合ったなどといっている論文もあるわけなんです、その統計計算はPeto 検定にくらべて、ずっと難解で、検出力もかなり悪いようです。とにかく中間屠殺を全然せずにいままで通りの方法から100%データを引き出すにはやはり、今のところPeto しかないんじゃないかというのが私の印象であります。以上で終らせていただきます。どうもありがとうございました。

文 献 :

1. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, Peto J, Richards S and Wahrendorf J (1980).
Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments. In long-term and short-term screening assays for carcinogens: A critical appraisal, pp.311-426. International Agency for Research on Cancer (IARC monographs suppl. 2).
2. Gart JJ, Krewski D, Lee PN, Tarone RE and Wahrendorf J (1986).
Statistical methods in cancer research, volume III: The design and analysis of long-term animal experiments. IARC Scientific Publications No.79. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
3. McKnight B (1988).
A guide to the statistical analysis of long-term carcinogenicity assays. Fundamental and Applied Toxicology 10:355-364.

＜ 質 疑 応 答 ＞

宮 嶋： 先生どうもありがとうございました。癌原性試験の評価は大変複雑で御苦労の多い分野だと思いますが、私共のように統計学にあまりなじみのない者にとっても、大変わかり易く解説いただきましてとても参考になりました。今日御参加の方々の中で、実際に癌原性試験を実施されておられる方は少ないかもしれませんが、せっかくの機会でありますので菅野先生に御質問のある方ございましたらどうぞお伺いになって下さい。

黒 沢： 大阪大学医学部の黒沢でございます。非常に癌原性の低い物質の癌原性を動物実験でどのように実施するかという問題についてお伺いします。昔は癌原性があまり問題にならなかったような物質、例えば Prosthesis のようなものを生体に入れた後で、長寿社会を迎えた今日、何十年も生体内に留まるようなことがおこると癌原性が発現するかもしれない。このような場合に動物実験でどのように検索したらよいかという問題です。この場合、好発癌性の系統の動物を各種多数用意しまして、それぞれの系統の動物の差をもって発癌の程度を推測できないかということです。その際ある種の関数を用意する必要があると思うのですがその辺をどのように考えたらいでしょうか。

菅野先生： 私はその方面は詳しくないので何とも申し上げられません。最終屠殺を待たずに中間屠殺で微細な変化を評価するという方法も考えられます。

黒 沢： 低癌原性物質の発癌性を正面からとり上げるということがないのでいろいろな方法を探していかなければならないと思います。中間屠殺で評価するというのは確かに1つの方法だと思います。

菅野先生： 中間屠殺を行うという実験は、具体的には今までの癌原性試験に同じような規模の実験を追加することなので大変な作業になると思います。

非常に弱い癌原性物質の検出法についても Peto の方法もある程度、応用がきくと思います。つまり、現在の2年間にわたる癌原性試験では被験物質に発癌性があるかないかという二者択一の議論になってきていますが今までにでてきた腫瘍や病理組織診断の中でいままでは捨ててしまっていたような微細な data も拾い集めて複合

の許されるものは複合して統計処理にもちこんで癌原性評価の感度あるいは、それに関連性のありそうな変化の検出感度を上げることは出来ると思います。またさらに感度を上げるとなると initiator を用意して、promotor としての作用をみるとか copromotor 的な見方をする必要があると思います。

黒 沢： 私はプロテアーゼのような物質の癌原性の検出法を考えているのです。今日参加されておられるのは製薬会社の人が多いと思いますが剤型の発癌性に及ぼす影響なども考慮に入れないといけないと思います。例えば被験物質が固体の場合、どこに埋め込みどこの臓器を病理検索したらよいのでしょうか。

菅野先生： どの臓器に埋めたら良いのか、私も、分かりません。ご存知のことかと思いますが、一般的には、固体の癌原性評価には異物発癌という大きな問題がありまして正しい評価の妨げになっている問題がございます。どうみても発癌性のないものでもある大きさ以上の板 (plate) を埋め込みますとその周囲に sarcoma ができます。例えば生理活性のないガラス板のようなものです。しかし、この板にも小さな穴を多数あけておけば腫瘍はできないのです。従って被験物質が固体の場合は、このような多数の非常に細かい穴あきのものを異物発癌の negative control として置く必要があると思います。この件に関しては、本当に分かりません。

宮 嶌： 先生のお話の中で統計解析よりも研究者の直感が大切であるというお話がありました。私のように統計学になじみのない者にとっては大変意を強くいたしました。先程先生は Peto の方法にはいろいろな仮定がかくされているというお話をされましたがどのようなことなのでしょう、実際に林班などでの御経験を通してお話いただけるとありがたいのですが。

菅野先生： 正しくは、Peto にも、他の方法と同様の前提があって、それが正しいかどうかを確認するのは、非常に手間だといういみです。たとえば、下垂体腫瘍のある動物の方が、どうしても、体重が軽いとか、軽い動物の方が、別の原因で死にやすいのではないかとか、いろいろ先にのべた大前提に合わない可能性が見えてくる場合があります。この様な部分が問題になった場合は、もう一度病理標本にもどったり、関連病変を洗い直したり、血液 data を見直すなどの裏づけをとって考え直すという方法がとられております。これら細い考察についても統計処理が必要かどうかは、私

には、わかりません。通常はいらないと思いますが。それに、これを統計処置しようとしたら、その分だけ新たに動物を多数殺す必要が生じるのではないかと思います。

羽 室： 武田薬品の羽室です。癌原性試験の評価の場合に統計解析をするかしないかを判断するときの考え方についておたづねします。例えば、死亡率やある臓器の腫瘍発生頻度などに投薬群と対照群との間に差がないとします。一見して投薬の影響がないという場合に統計解析をしないということが許されるのでしょうか。現実に国立衛試で行われている癌原性評価では明らかに差がない場合は統計解析はしないという方法をとっておられるのか、それともそのような場合でも一応統計解析を実施しておられるのでしょうか。

菅野先生： 現実にはほとんど全部統計解析を行っております。regulationとしてお役所がからむとどうなるか知りませんが。論文投稿の場合は、統計解析をしなくても一目瞭然というときにrefereeは何も文句をつけないと思います。

宮 嶋： しかし、実際問題として、明らかに統計処理の必要がないという場合は多いと思いますが。

菅野先生： そう思います。

宮 嶋： そのほかどなたかご質問ございませんか。

米 川： 小野薬品の米川です。今日は癌原性試験における統計学的解析ということでPetoの検定をわかり易くおうかがいした訳ですが、Petoの検定の海外での評価はいかなもののでしょうか。

菅野先生： ヨーロッパではかなり浸透しており、高い評価を得ていると思います。アメリカでは若干軽視されているようで、NTPなどでは、Petoが癌原性試験における統計解析法を発表したのが1980年ですが、1983年頃にはすでに他の方法の方がよいのではないかと論文を出しております。日本では、おおむねPetoの方法でいこうという方向にあると思います。論文投稿の際にも生存曲線に差があったり

するとreferee がPeto の方法でやり直すように指示があったりします。

米 川： Peto の検定の場合、例えば良性腫瘍の場合でもそれが致死性かどうか非常に問題になるというお話でしたが、G L Pで癌原性試験を実施している以上、ミクロで生dataを記載する訳ですが、その時にこの腫瘍は致死性であるとか致死性ではないということを示すという意味で、生data上に腫瘍の周囲への浸潤性の度合いとか周囲正常組織への影響などを詳しく書かないといけないのでしょうか。

菅野先生： 発生した腫瘍が死因であったかどうかを判定する材料はとれるだけとっておいた方がよいと思います。それが、G L Pとかregulationにどのように関係するかという問題になると困るのですが、とにかく後になって、発生した腫瘍がcontext 3だったのかcontext 2だったのか迷わないようなdataをとるのが基本です。見慣れている人が肉眼でみれば判断できる場合もあるでしょうし、病理標本を弱拡大してみわかる場合もあると思います。迷った場合にはじっくり見直すということが生ずるわけですが、そういう意味で多少状況や個人差はあると思いますが、とれるだけdataを集めておいた方がよいと思います。

羽 室： 只今の討議の中でG L Pに関する部分についてコメントしたいと思います。G L PではPeto の方法を用いてどの位詳細に書くかということに関しては全く関与いたしません。外国においてPeto の方法を使って評価した例をみても、とにかくfinding を固定化したものが病理の生dataです。従って、その上にそのfinding がcontext 1から5までのどれにあたるかということの後で追記したものはもはや生dataではないと思っています。

平 川： 鐘紡の平川です。癌原性の解析における病理診断の重要性についておたずねします。例えば肉眼でみられた組織でみて、それが腫瘍であるかどうかを診断するといわれましたが、G L P上は全臓器をみることになっており、その上肉眼病変も組織をとってみることになっておりますがその点に関する先生のお考えを教えてください。

菅野先生： 誤解を招いていると思います。皆さんどなたも全臓器に何も肉眼的に病変がない場合の切り出す場所はきまっておりますし、病変があった場合にどう切るかもきめられていると思います。そういう訳で全部切るという大前提の上で話をしております。

平 川： 肉眼病変が重要であるということは事実ですか。

菅野先生： それはそうです。肉眼観察で重要な変化を見落としてはいけないということです。

宮 嶋： ただ今の討議でG L Pのことが話題になりましたが、少し気になることがあります。G L Pでは検索臓器の特定はしておりません。ガイドラインにはありますがこの点ははっきり区別して理解していただきたいと思います。

他にどなたかご質問ありませんか。ないようでございます。それでは先生、長時間にわたりまして、私共のために大変わかり易く、このように広範な癌原性試験の複雑な統計解析について御説明いただきありがとうございました。それでは皆様拍手をもって先生に感謝の気持ちをささげたいと思います。菅野先生ありがとうございました。

(拍 手)

〈第 2 3 回研究会〉

講演会

1. 臓器移植研究における動物実験について

門田 守人（大阪大学・医・外科学第二）

2. ステロイド応答機構と実験動物

佐藤 文三（大阪大学・医・内科学第三）

日時：平成元年9月22日（金）

場所：大阪大学工業会館

臓器移植研究における動物実験について

門田 守人（大阪大学・医・外科学第二）

今日は実験動物について何か話をするよう黒澤努助教授から依頼がありました。改めてなにお話できるかと考えてみても、これといったこともなく、強いてできるとすれば、今何をやっているか、またどんなことをやってきたのかを紹介させて頂き、先ほど山田先生がおっしゃいましたように、なにか御注文、あるいは御意見があれば、逆にお教えいただきたいと思います。そういう気持ちでしゃべらせていただきます。さっそくスライドお願いします。

これは、実際われわれがどういう実験をしているかを示したものであります。まず、移植研究チームですから大きなウェイトは免疫学にあります。その免疫学の中には免疫抑制剤の研究、あるいは特異的な免疫の抑制方法(tolerance)という言葉がありますが、そういうものをやったり、拒絶反応を確実に診断するということ、もう一つは移植免疫学というものを勉強するということで実験動物が使われています。

ANIMAL EXPERIMENTS IN ORGAN TRANSPLANTATION

1. IMMUNOLOGY

1) IMMUNOSUPPRESSION

SPECIFIC IMMUNOSUPPRESSION

(IMMUNOLOGICAL TOLERANCE)

NON-SPECIFIC IMMUNOSUPPRESSION

(DRUGS, RADIATION, THYMECTOMY ETC)

2) DIAGNOSIS OF REJECTION

3) EVALUATION OF TRANSPLANTATION IMMUNOLOGY

2. ORGAN PRESERVATION

1) CELLS, TISSUES

2) ORGAN PERFUSION

3) TRANSPLANTATION

SMALL ANIMAL

LARGE ANIMAL

3. SIMULATION OF HUMAN ORGAN TRANSPLANTATION

4. TECHNICAL TRAINING OF TRANSPLANTATION

その次にやっておりますのが臓器の保存の研究です。やはり免疫と同時に保存ということが、重要な課題となります。特に肝臓は腎臓と違いまして保存期間が短い。今までですと8時間位までしか保存できなかった訳ですが、腎臓が60時間位までは保存可能ですので、その位まで延ばすことができれば、移植医療もっと定着する可能性があるのではないかと思います。そういう観点から、臓器保存の研究をしています。その保存の研究の中に移植をしなければ確かめられないということから小動物、大動物の移植実験をやっております。

そして3番目としてあげておりますのが、人間の移植をやるときのシミュレーションという考え方で移植実験を行っております。

最後にあげておりますのが、若い外科医の移植外科医としてのテクニカルなトレーニングであります。あらゆる角度で我々がやっています臓器移植という面では、非常に大きなウェートをこの動物実験に置いているということでもあります。こういう内容のことにつつま

して我々がやっていることを紹介して行きたいと思います。次のスライドをお願いします。

まず最初に出てきましたのは、免疫の仕事であります。何を行っているかと言いますと、雑種動物を使っていたのではどうにも解析が進まないということで、これは純系ラットを用いて心臓移植をやっているところです。これがラットの大動脈でこちら側に下大動脈が見えておりますが、それをこの黒く見えている糸で結紮し、今この血管鉗子をはずしますとしわくちゃんになっている心臓がふくれてきます。このように血流が再開されピンク色になり、今まで止まっていた心臓が動き出します。こういう実験で、純系動物を使ってその純系同士の抗原の差がどういうふうに影響があるか、あるいは免疫抑制をした場合にどうなるか。あるいは先ほど出ておりました specific な免疫抑制 (tolerance) という表現になりますが、そういうものを誘導するのにはどうするか、というあたりの研究が進んでおります。次のスライドをお願いします。

HOST HEART → HOST AORTA → DONOR AORTA → CORONARY ARTERY →
HEART TISSUE → CORONARY VEIN → DONOR RT. ATRIUM → DONOR RT.
VENTRICULUM → DONOR PULMONARY ARTERY → HOST VENA CAVA → HOST
HEART

今の移植は、ご存知の方も多いとは思いますが、心臓のドナー側の大動脈をレシピエント側の大動脈に、それからドナー側の肺動脈をレシピエント側の下大動脈に吻合します。そうしますと、ホストの心臓から AORTA に血液が流れていく。そしてドナーの AORTA に血液が行って、ドナーの CORONARY ARTERY、冠状動脈から移植した心臓に血液が流れる。そうして心筋を通過して、今度は CORONARY VEIN からドナーの右心房に返ってきて、右心室に行く、それから肺動脈に流れて回っていくという、こういうサイクルで心臓がおなかの中で動き続けるわけです。このモデルでは、ふつう皮膚移植では拒絶反応がわかりにくいということがありましたが、心臓が動く限りこの心臓は function があり、それが止まった状態が拒絶反応だということになり、まあ非常に実験しやすいモデルであるということが言えると思います。次をお願いします。

その結果を1例示しておきます。

これは実は私が昔、学位論文に使ったものでありますけれども、この1群、2群、3群、4群、5群とこれは移植心の生存率を書いています、1群、コントロールですと大体1週間から10日間ぐらいで拒絶されるものに、前もってドナーの脾臓の細胞を投与して、

それから3日目、1週間目、2週間目、3週間目、5週間目に移植をしております。そうしますと不思議なことに1週間目、2週間目の移植心の生存率が、このように延びる。普通ならば免疫しているのだから急性拒絶反応が起きてもいいものが、こういう風に延びるということ、15年くらい前になりますが証明しました。その頃は新しい仕事として認められてたんですが、その後輸血というものを臨床にまで応用するようになっていきます。前もってドナーの血液を輸血しておけば移植臓器は付き易くなるという実験がなされているし、臨床でもやられている。その初期の頃にやっていた仕事です。このメカニズム云々という出しますと切りがありませんので、こういう現象として紹介しておきますが、免疫すれば拒絶反応が抑制されるということも起こり得るということでもあります。

心臓移植は隣の第一外科の仕事でありますのでそのくらいにしておいて、その次に私たちがやっております肝臓移植についてお話しします。この肝臓移植もまたいろんな動物でやっておりますけれども、免疫学的なことを最終的に追求しようと思えば、このようにin-bredの動物が使えるものでなければ困るわけです。これはラットの肝臓であります。ラットの肝臓はみなさんがご存知のように、このように分葉しています。そしてこの血管にはカフというものを付けて、吻合というよりも接合して移植をする、というやり方をやっております。胆管には細い管を入れています。

これは移植の最中の図ですが、少しわかりにくいかもしれませんが、こちらが頭で、こちらが足の方で、ここにすでに肝臓が入っています。肝臓が入っていますが、肝臓の色は悪い。それはどうしてかと言うと、まだ門脈の吻合が終わっていない。門脈はここにありますが、門脈にはカフが付いていまして、これをレシピエント側の門脈の中に滑り込ませて、ここをくくったら、吻合が終わりと言う、非常に簡単な術式です。これは、今、国立小児病院に帰ってきておられる KAMADA 博士が考案した方法なんです。このようにラットにおいても同所性肝移植が非常に簡単にできるようになっています。17年ほど前のことですが、私はラットの肝移植をこういうテクニックを使わないで、手で全部の血管を縫ってやったことがあります。1年間やって何百匹か動物を殺したんですが、生きたのは一匹が3日間だけです。これが1年間の仕事でありました。その後こういうものができて、今ではうちの若い人たちはいくらでも、1日に2～3例、一人でやります。

そこで門脈をつなぎまして、門脈の血流が再開されますと、肝臓はこんな色になってくる。そうしますと、胆管の中に入っていた細いチューブの中から胆汁がポタッと落ちそうになっている。そしてこのチューブをレシピエント側の胆管の中に入れこれをくくってし

まえば、肝移植が終了、ということになります。その次お願いします。

Survival Rats of Skin, Heart and Liver Allografts(ACI-Wistar)

それで、肝移植がどんなにおもしろいかと言うことを少しだけ紹介しておきたいと思います。これはACIと言う黒ネズミです。もう一つレシピエントになったのは、Wistarラットです。これは塩野義製薬の方で維持されている純系の Wistar ですが、その組み合わせで移植しますと、皮膚移植ですとこのように、1週間で拒絶される。心臓もほぼ一緒です。ところが肝臓移植をするとこのように、拒絶されることがありません。ポツポツと落ちておりますが、これはそのほかのトラブル、特にトラブルが多かったのはあの細い総胆管の中にいれましたチューブがうまく行かないということから死亡したものもありますけれども、拒絶反応で死亡するものは全然いません。同じ組み合わせ、同じ抗原性を持っているはずですが心臓と皮膚は拒絶されるが肝臓はされない。非常におもしろい現象があります。

今度は肝臓を移植した状態で次に皮膚を移植しました。肝臓のドナーと一緒に黒ネズミの皮膚を移植しますと、この関係のない白ネズミの皮膚は拒絶されるけれども、肝臓と一緒にドナー黒ネズミからのものは拒絶されない。ですから皮膚は皮膚だけでは拒絶されるけれども、肝臓を移植してから皮膚を移植すると生着は延びるということがわかりました。その次のスライドお願い致します。

Survival of Skin Grafts on Wistar Rats Bearing ACI Liver Grafts

Weeks Following Liver Grafting	ACI Skin	F344 Skin
Control	MST=6.7±1.3(n=6)	MST=11.6±0.9(n=4)
0	23*, 28, 39, 59	16, 18
1	21, 25, 25, 26, 29	13, 16, 17
2	23, 27, 30, 50*	10, 11, 18
4	14, 15*, 18*	10, 11
>5	6, 6, 6, 7, 7, 9, 12	9, 12

* rat died with intact skin graft

皮膚移植で、ドナーの皮膚、それから第3者の皮膚、と言う形で比べてあります。ドナ

一の皮膚は移植して生着は延びることは延びるけれども、最後まで生着することではなく、どこかで拒絶されます。ところがまた不思議なことに、皮膚は拒絶されるけれども、肝臓は拒絶されません。肝臓は拒絶されないものですから動物は死にません。と言うわけで、まだまだ解析は不十分ではありますが、肝臓移植に伴う免疫学的な現象というものは非常におもしろいものが中に含まれていることがわかります。次のスライドお願い致します。

Suppression of Antibody Response of BUF Rats by Intraportal
Injection of ACI Spleen Cells

もう一つおもしろい話をしますと、今度は肝臓が関係する現象の一つとして、門脈の中に抗原を流し込んだらどうなるか。門脈に抗原を流し込む。それから静脈に抗原を流し込む、と言うやり方をとる。これはもうその次のステップで、門脈の中に抗原を流し込んでその後に、静脈に抗原をいれたときの抗体の反応です。門脈の中に抗原を入れずに普通に免疫しますとこのように抗体が産生されます。ところが前もって門脈の中に抗原を投与してその後こういうことをすると免疫反応が抑制される。このことは考えていただければわかるように、非常に各種多様な物質を口から食べるわけです。それについて全部アレルギー反応を起こさないわけです。ところがもし皮内に注射すれば、反応をおこすわけです。ですから、門脈の中を抗原が通過するということはその後の免疫反応を抑制する可能性がある。そこで、そのテクニックを使ったらどうなるか。門脈の中に抗原をいれておいて、その後肝臓移植をしたらどうなるだろうか、ということをやってみました。その次のスライドお願い致します。

Hepatic Grafts Survival Following Donor Spleen Cell Injection (from ACI to BUF)

Route of Injection	Graft Survival
Control (n=10)	9, 9, 10, 10, 10, 10, 10, 11, 11, 11 days
Intravenous (n=8)	4, 7, 8, 9, 10, 10 hours, 3, 273 days
Intraportal (n=5)	110, 129, 129, 159, 202 days

コントロール群で、ACI からバッファローラット (BUF)、ここでは Wistar ではなく、この系を使いました。BUF に移植しますとこのように急性的に拒絶される。静脈内に投与し

てからやりますと hyperacute rejection で、数時間で拒絶されてしまう。ただまちがって1匹だけ長期に生着したのがあります。ところが門脈の中に抗原を入れてそれから肝移植をしますと、ほとんど100日以上生着しました。先ほどの抗体産生が抑制されたと同じように、移植された肝臓も生着するということがわかりました。このように肝臓に関わる免疫というものには、まだ非常におもしろい領域が残っております。みなさんもいろんな研究にタッチしておられると思いますが、この領域はいろんな現象がまだまだあるのではないかと思います。

今度は非常に情けないラットが2匹出て参りました。この情けないラットは、実は世界で初めての動物です。これはどういうことかと言うと、このラットはラットの肝臓じゃなくてハムスターの肝臓をもらっています。すでにもう5日程経っています。ですから動物種を越えて肝臓を移植しても動物は生き延びる、と言うデーターであります。その次お願い致します。

Xenograft Survivals(Hamster-Rat)

	Non treated	Immunized with whole blood
Heart	4, 4, 4 days	15, 20, 30 minutes
Liver	7, 7, 7 days	180, 300, 540 minutes

これは肝臓と心臓とを比べて見ていますけれども、何も処置してない動物に肝臓を移植してきますと一週間、心臓ですと4日間。このあたりでもどうも肝臓になにか特異的なものがある、と言うことがわかるかと思えます。

次に、大動物の方に移りたいと思います。ラットが非常に簡単にできるという話をしました。けれども、犬での肝移植では、別の問題が出現してきます。肝臓を取るときに下大静脈を切断しなきゃならない。門脈を遮断しなきゃならない。と言う状態で、犬はこういう状態に15分以上置きますと必ず死にます。移植が成功しようとすまいと、こういう状態に耐えられなくなって犬は死んでしまいます。そういうことを避けるために先人達は、こういうふうに通管を入れて、心臓より上に返す。門脈の血液はここに PC shunt をして門脈の血液を全部こちらに回して返す。こういうやり方をしてはじめて肝移植は成功するということになっています。ところがいろんな実験をする意味でこんな複雑なことを

してたんでは、特に日本のイヌを使いますとたいてい死んでしまいます。先ほど紹介していただきましたけれども、アメリカで働いているときには20キロ級のすべてコンディションの整ったものが手に入りました。そういうものを使いますと、少々のに耐えるんですが、日本でこんなことをしてもとっても耐えられません。何とか安定した手術手技を使わない限りいくら実験したくっても実験になりません。10頭移植しても5頭くらいはテクニカル上の問題で、今のような手術手技で死んでしまって、残ったものでコントロール取ってやってみたところで何が正しいのかわかりません。とにかく8割近い成功率をあげる術式を考えなきゃならないということで、先ほどラットで応用されたテクニックを大動物にも応用できないかということでやったのがこれであります。先ほどカフ、カフと言いましたが、こういうチューブを持ってきましてその中に血管を通してここで反転するわけです。外翻してこういう格好にする。そしてここをくくってしまう。そして相手側の血管の中にスポッととはめ込んで外側からくくる、というやりかたをしますと、血管の内皮は全然ほかのものと触れない。血栓ができないということで、手術手技が非常に早い。これをイヌに応用した訳です。その次のスライドお願い致します。

Change in Arterial Pressure During Liver Transplantation

肝臓の下上、門脈をボンと血管鉗子でかみます。そしてそれぞれの血管をスポン、スポンとはめ込んで行くわけです。まず上の下大静脈にはめ込んで、その次に門脈にはめ込む。はめ込んだとたん門脈の鉗子ははずします。そうしますと門脈の血液は肝臓を回って心臓の方に返るわけです。そしてその後おもむろに下の下大静脈を吻合する。そうしますと血圧を見ていただいてわかりますように、確かに遮断しますと下がってきます。いろいろやっているうちにどんどん下ります。そして一端血流を再開しますと少し上がります。そして完全に下大静脈をオープンしますと、このような形で血圧がすぐ戻ってくる。この時間を見ていただきますとせいぜい10分そこそこです。それで全部終わります。先ほど15分遮断してたら危ないと言いましたが、こういうやり方をすればまず失敗することはない、ということがわかりました。その次のスライドお願い致します。

Survival Time of Liver Allografts in Dogs

その応用の一つとしてやりましたのが、イムランによる免疫抑制です。これは少し昔のデータですけども、日本で開発されました、ブレデリンというものを使って生存率を見

ました。また情けない汚いイヌですが、これも世界で1例目です。肝臓が8時間くらいしか保存できないと言う時代に、このイヌは48時間、このイヌは24時間保存した肝臓を移植して1週間ほど経ったところです。とにかくこのテクニックを使えば、非常に安定した成績が得られると言うことになった訳です。テクニックがいいだけではなく、この実験では、プロスタグランジンを使って長期保存に成功致しました。

次に、ここまでの話と少し見方を変えたいと思います。今、プロスタグランジンを使って48時間も長期保存したものが、生着したと言う話をした訳ですが、ところが困りましたのは、なぜそういうことになったのですかと言う問題が出てきました。動物実験の一番弱いところです。生きる、死ぬ、と言うことは結果として出やすいんですが、その中にあるメカニズムについては答えようがない。動物実験はそういう意味では非常に雑で、全体的な結果としては非常にいいものですが、メカニズムを解析するということになれば、やはりまた動物から一転しなければなりません。これは肝細胞ですが、肝細胞レベルまで戻ってここで解析を進めないことには結局はわからないということになりました。動物実験というものもやはり見方が二つある。そういうトータルなものと同時に、こういうふうなベーシックな研究無しに動物実験だけを進めるには危険があるのではないかと感じてきています。

今のような肝臓の細胞を培養しますとこのように、一層にくっついてきます。そしてそれを電子顕微鏡でのぞきますと、きれいに敷石状に肝臓の細胞が並んでいます。倍率を上げますとその表面に microvilli がこのように見えます。これに障害を加えますと、非常に大きな破ける寸前の microvilli が見られます。

動物は動物実験のある程度の範囲の中でやられているもので、飛び越えることのできない点、すなわちほかの実験でカバーしなきゃならないこともない。動物実験をやったら、細胞を扱うという実験系を考えてなければならない。その次に今度は動物実験の一つの目的であります、臨床のシュミレーションと言う形で考えたものであります。これはサルを用いた肝移植実験であります。なかなかこういう機会はないんですが、ごく最近経験がありましたのでご紹介しておきます。使いましたのはカニクイザルで、非常に小さい3キロ前後のものです。これが肝臓で70~80gです。ラットの肝臓よりは大きいのですが非常に手術操作が難しくなります。

これが横隔膜で、これが肝臓です。もう血管吻合は終わっていますが、比較してわかりますように非常に小さなものです。

肝臓の下の方、下大静脈、門脈の吻合が終わっていますが、少し狭窄気味です。これはすべて手縫いで行いました。

これが動脈ですが、とても細くてつなげないので、大動脈を用いて、大動脈大動脈の吻合をやっています。

最後に胆管とレシピエントの十二指腸を吻合すれば手術は完了し、スライドで見ただいてわかりますように、これが移植した肝臓かというほど非常にきれいな色をしています。サルは、今まで用いた実験動物の中で一番肝臓移植に適している動物じゃないか、という感じがします。

これが一週間目です。少し皮膚は黄色味を帯びてはいますが、健康です。

これはすべて終わって300日経った頃のものですが、何の異常もありません。

実は15回の移植をやってきたんですが、まったくの予備実験無しで、15回のうち3回は1日で亡くしました。そのほかのいくつかのトラブルがあるということは、何回かやってきてだんだんと解消されてきました。ここでおもしろいのは、このように免疫抑制剤を100日ほど投与してやめた3頭が300日頃、何の異常もなく平気で生存し続けていることです。これもまた肝臓の特異的なものかも知れません。免疫抑制剤が肝臓ではない、という結果がでてまいりました。

これはすべてに応用できるわけではありませんが、カニクイザルの肝移植で免疫抑制剤を投与すると、投与中止後も拒絶が来ません。Tolerance が起きてるということです。これはその一例ですが、黄疸も全然でておりません。GOT も手術によって最初上がったのがありますが、後は異常はありません。それから免疫抑制剤の血中濃度を書いておきますけれども、ここで投与を中止して、0になりましたが、体重は増える一方で健康に元気になっています。非常におもしろい現象です。

一番最初のスライドの最後のところに、トレーニングという話をしたわけですが、トレーニング用に一番いいと思いますのがやはりブタであります。これは阪大病院の屋上で1年何ヵ月か生存して最終的に100kgくらいの大きさになってもう手におえなくなったんですが、これもまた免疫抑制剤なしに肝移植後、ずっと生きつづけていたわけです。かわいそうなことに、最終的に腸閉塞で死んでしまいました。肝移植したブタは簡単に拒絶がこない、肝移植をしたラットはなにもしなくとも生存する、肝移植したサルは免疫抑制剤を最初の100日ほど投与したらあとはなににもいなくなる。なんとも肝臓移植というのは、免疫に関する限りなにか非常にメリットがあるという感じがしてきております。ま

あヒトでは死亡している方がおりますから、すべてこれが通用するとはいいませんが、そういう現実があるということでもあります。最後のスライドお願い致します。

PROBLEMS IN THE ANIMAL EXPERIMENTS FOR TRANSPLANTATION

SUPPLY

UNSTABLE SUPPLY OF ANIMALS

UNCONDITIONED ANIMALS, ESPECIALLY LARGE ANIMALS

EXPENSIVE

FACILITY TO KEEP ANIMALS

PROFESSIONAL TECHNICIAN

CLEAN ROOM

FACILITY TO DO EXPERIMENTS

PROFESSIONAL TECHNICIAN

CLEAN OPERATION ROOM

"NECESSITY OF CONTROL CENTER AT NATIONAL LEVEL"

この最後のスライドでは、私達が移植あるいは動物実験をやっているときになにに困っているかということを挙げてみました。一番大きい問題は、動物の供給です。移植実験に適した動物種、しかも系統が限定されてきますと、なかなか安定した供給が得られません。それは特殊な動物を使うということもありますけれども、そういうことでわれわれは困っています。もう一つは入ってはくるけれども、たとえば私どもが移植に使っているイヌを例にとると、入ってはくるけれども実験用の動物ではない。まったくコンディショニングされていない動物を、我々はやむをえず入手していますが、それをあたかも実験動物のごとく考えて、誤解してやっている若い研究者もおります。従って私どもの最大の望みは、なんとか安定した、しかも実験動物にふさわしいものの供給であります。次にそんなものを作ってくださいなんていうと高いものができるんじゃないかと思うんですが、高いもので実験はなかなかできません。ですから安く安定した供給で実験に適したものが、夢ばかり言っているのかもわかりませんが、私達の希望としてぜひ聞いていただきたいと思います。そういうことが一番大きな問題でありまして、あとはたいしたことではあり

ません。一応挙げておきましたけれども動物を飼う設備の問題、また歴史的に軽くみられてきたと思いますが、みなさんの中に Professional の人がいないというわけではありませんが、現場において Professional な、資格がいるいらないは別といたしまして医者ではない、別の立場の、医者あるいは研究者の下テクニシャンではなくて、独立したテクニシャンとしてアイデアを出し、協力していくパートナーとしての人がいてほしい、そういう感じがいたします。動物実験を実際する場合においても、今と同じようなことで動物のことについてほとんど知らない臨床家そのほかの研究者がみようみまね、あるいは臨床の手術の延長のようなかたちで実験をしているということでは、本当の研究ではないのではないか、という感じがいたします。最後にフォーテーションで囲んでおきましたけれどもやはりなにか、わたしは全然わかりません、勝手に書いておきましたけれども、国全体の立場からのなにかコントロールするものがあってそして規律を細かくしろというのでは決してありません、そうではなくてある全体的なレベルでのコントロールが必要なのではないかという感じがいたします。それともう一つ私達が反省しなければならないことは、今回の講演の中にもありましたけれども、異種の動物を使って移植をして、異種の動物からの臓器でもって人間が生きよう、という発想自体も少し反省しなければならないものがあるのではないか、異種の他の動物をたくさん使って研究を進めているということにも反省が必要なのではないか、やはり最低の数で実験は必要なだけでいいんであって、先ほどいいましたようにたくさんの動物を殺してわずかのデータということに強い反省をしなければならないという時期にきているのではないかと考えております。ただ、しかし、考えているだけでなかなかいい方法がありませんので是非、皆様方に改善をお願いして今日のお話を終わらせていただきたいと思います。

ステロイド応答機構と実験動物

佐藤 文三（大阪大学・医・内科学第三）

ご紹介に預かりました佐藤です。

今日は内分泌学と実験動物の関わりについて、私の研究の一端をご紹介させていただきます。我々の分野で実験動物がどういうふうに使われているのかご理解いただければ幸いです。

（スライド1）

私は、20年近くステロイドホルモンの研究を続けています。ステロイドホルモンについてあまりポピュラーでない方もいるかと思われますのでここではまずその概略について説明したいと思います。ヒトの場合は、ステロイドホルモンは5種類に分かれます。糖質コルチコイド（グルココルチコイド）は、糖代謝を調整するところからその名前がありますが、それ以外にも色々な役割が知られており糖質コルチコイドが存在しないと生命の維持はできません。同じく副腎からでてくる鉱質コルチコイド（ミネラルコルチコイド）は電解質を主に調整するところからその名があるわけです。性ホルモンは男性ホルモン（アンドロジェン）、女性ホルモン（エストロジェン）そしてその中間に位置する黄体ホルモン（プロゲステロン）とに分かれます。これらホルモンは、生命の維持に重要である一方で、発ガンおよびガンの増殖に密接な関係があることが昔から知られております。

（スライド2）

このレントゲン写真は乳ガン患者の肺の転移巣を示しています。この患者をエストロジェンの作用を抑える拮抗薬で治療しますとこの転移巣が消えて参ります。言い替えれば乳ガンは、女性ホルモンによってかなり増殖が支配されていることを示しているわけであり、また卵巣を摘出した女性の乳ガンの発生が正常婦人の100分の1程度というところから発ガンにも密接に関与しています。同じことが前立腺ガンにもいえるわけです。つまりこう丸を摘出した男性では前立腺ガンはほとんどみられません。このように性ホルモンとガンについては疫学的な証拠がありますが、分子生物学的な方面から研究を進めるにはどうしても実験動物が必要なわけであり、

（スライド3）

実験動物の話に入ります前にステロイドホルモンの作用機構がどのように考えられているのかについて説明して参りたいと思います。ステロイドホルモンは、その標的臓器に達し

まずと細胞膜を通過いたします。ペプチドホルモンと違うところは、ペプチドホルモンは細胞膜表面にレセプターを持ちますが、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモンのレセプターは細胞内にあるわけです。ステロイドホルモンレセプターは、ステロイドホルモンと結合する前は、オリゴマー構造をとっていると考えられています。ステロイドホルモンがレセプターと結合しますとそのオリゴマー構造が解離します。解離してレセプターとホルモンの結合物が裸になります。裸になったホルモン・レセプター結合物が直接、DNAと結合します。そしてその支配下にある遺伝子を活性化し、メッセンジャーRNAの誘導をもたらして機能性蛋白を作らせます。この機能性蛋白はそのまま細胞内で生物活性を示すこともありますし、いったん細胞外に分泌されて近傍の細胞に作用してホルモン作用を示したり、あるいは遠隔の細胞に作用しホルモン作用を発現することもあります。

(スライド4；付図参照)

我々が使っている動物実験のシステムは2つあります。そのひとつをこのスライドに示します。BALB/c マウスにエストロジェンのペレットを皮下に植え込むと3日目には睾丸のライディッヒ細胞のDNA合成の増加がピークに到達いたします。そのままエストロジェンを投与し続けると24週目にライディッヒ細胞に増殖性の結節がみられてきます。ついで28週目には明かにライディッヒ細胞の腫瘍化が起こってきます。形成されたライディッヒ細胞腫はBALB/c マウスに移植可能で、その早期の継代におきましてはその増殖はエストロジェンに依存しています。これを3代ほど継代しますとその腫瘍の性格が分かれてきます。エストロジェンが存在しないと増殖しない株、エストロジェンの存在によって増殖が抑制される株、そしてエストロジェンの影響を受けない株であります。言い替えますと *in vivo* で比較的簡単に細胞のクローニングが可能ということであります。このクローニングした腫瘍を継代しているわけであります。これらはかなり古くからあるシステムでありまして1950年位だったと思いますがコーネル大学のガードナーという人が作ったものであります。

(スライド5；付図参照)

その一例をお見せいたします。これは、3つのサブライン、現実には2つのサブラインのホルモン依存性のガン増殖を *in vivo* でみているわけです。これら細胞をBALB/c マウスに移植してやります。合成エストロジェン(DES)の存在化でT124958-Rはその増殖を著明に増大いたします。エストロジェンがない場合には、細胞は死にませんけれどもその増殖は非常にゆっくりしています。いっぽうT22137というサブラインはエストロジ

エンが存在するとまったく増殖できませんが、エストロジェンがないと増殖いたします。エストロジェン処置を中止いたしますと細胞の増殖がみられてまいります。言い替えれば女性ホルモンは細胞を死滅させることはできませんけれども、眠らせることは可能であるという腫瘍でございます。これが BALB/c マウスにエストロジェンを投与して作成したガンの性質でございます。

(スライド6 ; 付図参照)

もう一つの系は塩野義製薬研究所で確立されたアンドロジェン依存性の乳ガンの系でございます。これはシオノギ・カルシノーマ115というふうによばれている世界的に有名なガンでございます。どういう乳ガンかといいますと動物を去勢したならばこのガンは増殖いたしません、正常オスでは増殖いたします。一方、去勢をしておいて大量のテストステロンを投与いたしますと増殖はさらに加速されます。阪大の松本圭史先生らのグループが最近見いだしたことですが、大量のテストステロンにグルココルチコイドを同時に投与いたしますと大量テストステロン投与時にみられた増殖が少し抑制されてまいります、グルココルチコイド単独では腫瘍は増殖するという少しややこしい現象がみられます。これがなぜ起こるのかということについてはあとでお話をさせていただきます。この系はアンドロジェンと腫瘍ということに関しては世界で一番良い系だと思います。

(スライド7)

この図は、ステロイドホルモンがガン細胞増殖を促進させる機構の可能性を示しています。その可能性は4つあります。

1. 機能性蛋白が直接クロマチンに働きかける。それはfosであるとかmycであるとかオンコジーンの可能性もあります。
 2. ホルモン刺激が増殖因子のレセプターを誘導する可能性があります。
 3. 一時もてはやされた考えであります、ホルモン刺激がなんらかのプロテアーゼを誘導し不活性型の増殖因子を活性型にかえるという考えがあります。
 4. もっと単純にステロイドホルモンが直接、増殖因子を誘導するとの考えもあります。
- 今現在は4の考え方が有力であります。

(スライド8)

前にお話ししました2つの動物系におきましてなぜステロイドホルモンがガン増殖を調整するのかということに関しまして我々が行っている2、3の実験を紹介したいと思います。その前に、今現在どういう理論がステロイドホルモンとガン増殖との関係で考察されてい

るか大ざっぱにお話させていただきます。グルコルチコイドはリンパ系の悪性腫瘍の治療薬の1つと考えられております。グルコルチコイドがリンパ系の細胞増殖を抑制する機構について、グルコルチコイドにより誘導されるDNaseがヒストンコアの間のDNAをずたずたに切断し、アポトーシスという現象を起こさせるという考えがあります。他の考えはグルコルチコイド誘導のリボモジュリンがLTB₄の産生を抑制し、LTB₄依存性のIL2産生が生じないためリンパ系の細胞の増殖が抑制されるというものであります。このようにグルコルチコイドは、リンパ系細胞の増殖抑制機構が研究課題になっております。エストロジェン、アンドロジェンは、乳ガンとか前立腺ガンの増殖機構との関係で研究されています。NIHのリップマンらのグループはエストロジェンがTGF- α を誘導し抗エストロジェンはTGF- β を誘導することにより乳ガン細胞の増殖と抑制を制御していると提唱しております。アンドロジェンがどういう増殖機構をもっているのかはほとんどわかっていません。

(スライド9)

in vivoの実験系は非常に大事ですけれどもそれだけでは、解析的な実験ができません。そこで解析的な実験を行う目的で先ほど話しました2つの実験系から細胞をクローニングして参りました。どういう細胞をクローニングしたかと申しますと血清無添加の状態ホルモンの影響が見られるような、とくに細胞増殖におよぼす影響が見られるような細胞です。このスライドは、先ほど示しましたin vivoでエストロジェンにより細胞増殖が著明に促進されるライデッヒ細胞腫をクローニングした成績を示します。すなわち血清無添加でエストロジェンにより細胞増殖が増大する細胞をクローニングしてきた訳であります。

(スライド10)

一方、同じく先ほどお話いたしました塩野義製薬で確立されたアンドロジェン依存性乳ガン細胞もホルモンの影響を見られるような系の確立を目的に細胞をクローニングしました。スライドにわれわれがクローニングした細胞、これをSC3細胞と呼んでますが、その性質を示しています。これらクローニングしてきた細胞は、血清無添加の状態テストステロンを添加しますと添加していないものにくらべてシャーレあたりの細胞数で1から2オーダー高い値を示します。つまり100倍位加速されるわけです。この細胞にデキサメサゾンすなわち合成グルコルチコイドを添加いたしますとやはり数倍増えてまいります。このように血清無添加で著明なホルモンの影響を観察できる細胞がクローニングできたということです。そこでこのような細胞を使ってステロイドホルモンが標的細胞とくにガン

細胞を増殖させる過程を検討したわけです。

(スライド11)

その前にステロイドホルモン学の最近の進歩について少し述べておきます。これは生物学の進歩といってもいいくらいです。即ちステロイドホルモンのレセプターの1次構造が Evans と Chambon のグループによって決定されたわけであります。Zinc finger 構造をしておりまして erbA というオンコジーン由来であることがわかってまいりました。Zinc finger 構造というのは亜鉛のまわりにシステインが配列している特異な構造をさします。すべてのステロイドホルモンレセプターが2つの Zinc finger をもっております。これが基本的な骨格です。すべてのステロイドホルモンレセプターがクローニングされましてその一次構造が決定されました。そのアミノ酸配列をシングルレターコードでスライドに示してありますがよく類似しているところがあります。そのよく類似しているところは Zinc finger 構造のところと一致しており、さらに詳細に見て参りますと甲状腺ホルモンレセプターとエストロゲンレセプターは非常によく似ております。さらに甲状腺ホルモンレセプターは2種類あるということがわかって参りました。ビタミンDレセプター、これはニワトリのものです、ステロイドホルモンレセプターと一次構造は非常に良く似ております。言い替えますとステロイドホルモンレセプター、甲状腺ホルモンレセプター、ビタミンDレセプターは一つのファミリーを形成しております。そして最近クローニングされたビタミンAレセプターも同様の構造を持っております。そのもともとの由来がここに示しました erbA というオンコジーンであります。そこから由来してきて分かれたと考えられます。これら示しましたレセプターは非常に良く似ているのですがその中でもグルコルチコイド、アンドロゲンレセプター、ミネラルコルチコイド、プロゲステロンレセプターはさらに良く似ているのがおわかりと思います。またエストロゲン、甲状腺ホルモン、ビタミンDおよびAレセプターは良く似ております。言い替えますとこれらレセプターは、グルコルチコイド系およびエストロゲン系の2つのファミリーにわかれるわけです。

(スライド12)

これらレセプターがどういうDNAシーケンスを認識して遺伝子に結合していくのか詳細に検討していきますとまたおもしろいことがわかってきました。グルコルチコイド、プロゲステロン、アンドロゲン、ミネラルコルチコイドのレセプターが結合する部位(これをレスポンシブルエレメントという)には必ずGGTACAnnnTGTCTCという配列があるということがわかりました。すなわちレセプターに結合する遺伝子側にも

特徴があることがわかったわけです。最初のGはいらないという意見もありますけれども、とにかく6つの配列とその真ん中に3つのヌクレオチドが配列する形、パリンδροームシーケンスを認識すると考えられております。また先ほど御説明しました様にステロイドホルモンレセプターは2つの大きなファミリーに分かれますがエストロジェンレセプターのDNA結合部位は、AGGTCAnnnTGACCTとグルココルチコイド系とは多少異なります。それではエストロジェン系に分類されます甲状腺ホルモンレセプターはどうであろうかと申しますとAGGTCATGACCTでnnnを除いて全く同じであります。いずれにいたしましてもレセプターのサブファミリーとそれらが結合する遺伝子の配列にはかなりの相関性があることがはっきりしたわけです。

(スライド13)

このスライドに示しますように、甲状腺のレスポンスブルエレメントをCATという酵素の遺伝子に結合させた Reporter Plasmid をCOS-7細胞に入れてやります。ビタミンAレセプターもCOS-7細胞に放り込んでやります。そうしてCAT Assay をするわけがあります。すなわちビタミンAをいれた細胞と入れない細胞に、同時に甲状腺のレスポンスブルエレメントも入れてやります。各々の細胞をビタミンAで刺激してやります。そうしますとCAT活性がビタミンA依存性で、しかもビタミンAレセプター依存性が増えてまいります。すなわち、甲状腺ホルモンレスポンスブルエレメントとビタミンAのレスポンスブルエレメントが同じであることを示しているわけであります。しかし、これらのことが一般的に言えるのかといいますとそういうわけにはまいりません。

(スライド14)

COS-7細胞は有名な細胞でございますが、これらの実験を我々の細胞でやってみたわけであります。エストロジェンレセプターと甲状腺ホルモンレセプターのレスポンスブルエレメントを我々の細胞に導入してやります。一方、MMTVのLTRにはグルココルチコイドレスポンスブルエレメントあるいは、アンドロジェンレスポンスブルエレメントのシーケンスが入っております。これらをわれわれが確立した細胞に導入いたします。我々の細胞はどういうレセプターをもっているかといいますと、B1細胞はBALB/cマウスより確立されたエストロジェンによって細胞増殖が促進される細胞であります。エストロジェンレセプター(ER)、アンドロジェンレセプター(AR)陽性、ビタミンAレセプター(RAR)も陽性であります。SC-3には、グルココルチコイドレセプター(GR)、ER、AR、甲状腺ホルモンレセプター(T3R)は存在しますが、プロジェステ

ロンレセプター (P g R) は持っていません。そして R A R については検討しておりません。

(スライド 15)

この B 1 細胞のもう一つの特徴は、先ほどエストロジェンによって増殖すると申しましたが、ビタミン A によっても増殖促進が起こることです。ビタミン A というのは、一般的に分化誘導因子ということで分化の方向に傾くわけですが、この細胞に関しては分化というよりガン増殖の方向に傾くようです。こちらのグラフは細胞数を時間経過でやったものですが、対照に比べましてビタミン A を入れてやりますと細胞増殖は増えてまいります。

(スライド 16)

この細胞はノーザンブロットによってビタミン A レセプターの存在を証明したものです。またこの図は、E R のバインディングアッセイでありまして [3 H] エストラジオール (E_2) の結合をコールドのステロイドがどの程度抑制するか示しております。エストラジオール合成をエストロジェンは抑制しますが、ビタミン A は抑制いたしません。このことは、この細胞はエストロジェンレセプターとレチノイックレセプターを保有するわけですが、これらは独立した系で生物活性を出していることになるかと思います。

(スライド 17)

この細胞にエストロジェンレスポンスブルエレメントを 2 つタンデムに連結した Reporter plasmid をいれてやります。エストロジェンレスポンスブルエレメントは E R に非常に特異的であると言われております。一方、ビタミン A レスポンスブルエレメントは先ほどお話いたしましたように甲状腺ホルモンとおなじ構造で真ん中の n n n があるとレスポンスブルエレメントになれないと考えられております。しかし、このガン細胞では、(ERE)2-tk-CAT の活性は E_2 で刺激しましてもビタミン A でもこのように促進されます。これは何を意味しているのかと申しますとこの細胞ではエストロジェンレセプターと、さらにビタミン A レセプターは、各々結合するホルモンは別々であるが complex を作ったレセプターは、同一の遺伝子を刺激し得ることを示しております。即ち、まったく異なったホルモンを結合するレセプターが同じ遺伝子を支配しているといえるわけです。

(スライド 18)

それを定量したのがこのスライドです。(ERE)2-tk-CAT で 10 倍近い増強がございまして、ビタミン A でも同じように CAT 活性が増強されるわけです。

このようにがん化によりレセプターによる遺伝子特異性が変化したことになります。

(スライド19)

塩野義製薬研究所で樹立されたアンドロジェン依存性乳ガンから確立されたSC-3細胞でも同じようなことが起こるわけです。まえにお話しましたようにこの細胞は *in vivo* でも *in vitro* でもアンドロジェン、グルココルチコイド両方によって増殖が促進されます。はたしてこれらは同じ遺伝子を支配しているのか検討したのがこのスライドでございます。テストステロンで刺激されたSC-3細胞ではいろいろなタンパクが新生されてきますが、それらをSDS-PAGEで分析しますと対照では見られない24kタンパクがみられます。この誘導物は抗アンドロジェンでブロックされます。このバンドはデキサメサゾン(グルココルチコイド)でも検出されます。またこれらも抗グルココルチコイド(RU38486)でブロックされます。両者の24kタンパクは同じものであることは確かめられております。ですから同じ遺伝子をアンドロジェンでもグルココルチコイドでも支配していることが示唆されたわけです。

(スライド20)

もしそうであるなら2つのホルモンを同時に与えたらどうなるかということが問題になるわけです。 $[^3H]$ サイミジンの取り込みを指標にしたときの実験ですが横軸に示しましたようにテストステロンを入れておいてやりますとテストステロン濃度に依存してサイミジンの取り込みは増加します。次にテストステロン存在下にデキサメサゾンをいれてやります。そうしますとテストステロンが存在しないか、低い濃度のときはデキサメサゾンによって取り込みが促進されます。しかし、テストステロンで促進が最大のところではデキサメサゾンは逆に抑制してくるわけであります。このことは、デキサメサゾンはアンドロジェンに対して部分的なアゴニストであり、アンタゴニストであるということです。おそらく、アンドロジェンレセプター・テストステロン結合物は遺伝子をより強く刺激することができる、しかしグルココルチコイドレセプターも一定限の刺激はできるがその能力は低いことが予想されます。アンドロジェンレセプター、グルココルチコイドレセプターが共存する場合はアンドロジェンレセプターの強力な遺伝子活性化能が活性の弱いグルココルチコイドレセプターが同一部位に結合することにより部分的に抑制されるのであろうということです。

(スライド21)

この細胞のグルココルチコイドレセプターは非常に奇妙な性質をもっておりまして、通

常グルコルチコイド（デキサメサゾン）は 10^{-8} Mで最大の作用を示すのが普通でございますけれども、この細胞では 10^{-7} ~ 10^{-6} Mなければ十分な作用を発揮いたしません。SC-115（SC-3）細胞のなかに先ほど言いましたMMTV-CATをいれてやりますとDHTによってCAT活性が誘導されます。これは 10^{-8} Mくらいの濃度です。一方、デキサメサゾンの場合には、 10^{-7} Mでは誘導されません。 10^{-6} Mで初めて誘導されます。グルコルチコイドレセプター、アンドロジェンレセプターもMMTVすなわち同じ遺伝子を活性化することができる、しかしデキサメサゾンの場合は非常に大量のステロイドが必要なわけです。アンドロジェンの場合は比較的生理的濃度でいいわけです。そうするとこのグルコルチコイドレセプターは、なにかミューテーションしているのではないかということになるわけです。それで最近報告がでたわけですが、Zinc finger 構造に1つの余分のアミノ酸配列が入っているわけです。その余分な配列が異常なホルモンの依存性を引き起こしているわけです。この2つの例でおわかりいただきますようにレセプターがどの遺伝子を活性化するかは、特異性はいままで考えられていたほど高くない、ときにはお互いの遺伝子の活性化を遺伝子レベルのところでステロイドホルモンレセプターがアンタゴニスティックないしはアゴニスティックに調節しているということがこの一連の実験でおわかりになっていただけることと思います。

（スライド22）

かんじんのステロイドホルモンによってなぜ増殖がおこるのかということにつきましてはよくわからないわけでございますけれども私どものところでは、ある増殖因子を出させているのだらうということを推測しているわけでございます。これは塩野義ガン由来の細胞を血清無添加の状態調べますと、インスリンだとかEGFを入れて培養しても細胞増殖には全く影響しません。しかし、このときにbFGFだとかaFGFを入れておいてやりますと細胞増殖は増加いたします。それはテストステロンよりは多少低いのですがよく似たところまで増殖します。

（スライド23；付図参照）

このスライドが基本的な結論となると思います。このガン細胞をテストステロンで刺激してやまして、そのときの増殖を100%といたします。そしてテストステロンで刺激するとき同時に抗bFGF抗体を入れておいてやります。そうしますとテストステロン依存性の増殖は部分的にブロックされます。これはどういうことを意味しているかと言いますと仮説としては、テストステロンがbFGFないしは類似の増殖因子を分泌させる、そ

して分泌させた増殖因子が抗体によりブロックされるということが考えられるわけです。現実に血清無添加、タンパク質フリーの培養液でテストステロンによって刺激しますと、増殖因子が分泌されていることがわかります。それはあるエピトープで部分的にbFGFとホモロジーをもっていると考えております。しかし、bFGFはセクレタリーポーションを持っていなくて一般には分泌タンパクとは考えられていないのですが、われわれの細胞からテストステロン依存性に分泌される増殖因子というものは細胞のなかにはほとんど留まることなく合成されればすぐに分泌されるという性質をもっているわけです。今私どもの研究室ではこの増殖因子の遺伝子をとろうと実験計画を組んでいるところでございます。

今日お話しさせていただきましたのは、ステロイドホルモンを中心にして細胞増殖、ガン増殖はどのようにして起こるのか、それはレセプターレベルの仕事もありますし、遺伝子活性化の仕事もございますし、増殖因子の仕事もあるということになると思います。この実験系はホルモン学でいうとそれほど新しいテクニックでもなんでもないわけで、このような実験腫瘍、実験系をつくられた日本の先生方、あるいはアメリカのガードナー等の努力におうところが大きいです。このような実験系を作っていただいて、今現在、分子生物学的な解析に非常に役に立っているわけです。これらの実験動物の開発ということについてこれらの先生方にお聞きしますと、アメリカ人でも日本人でも共通しております。非常に詳細な観察が重要であるということにつきますのであります。このような先生方の恩恵を得て、これらの実験系を現在内分泌学のツールとして使わせていただいているというのが現状でございます。

PROPERTIES OF MOUSE LEYDIG CELL TUMOR

Strain(BALB/c)-specific tumor formation by
chronic estrogenization

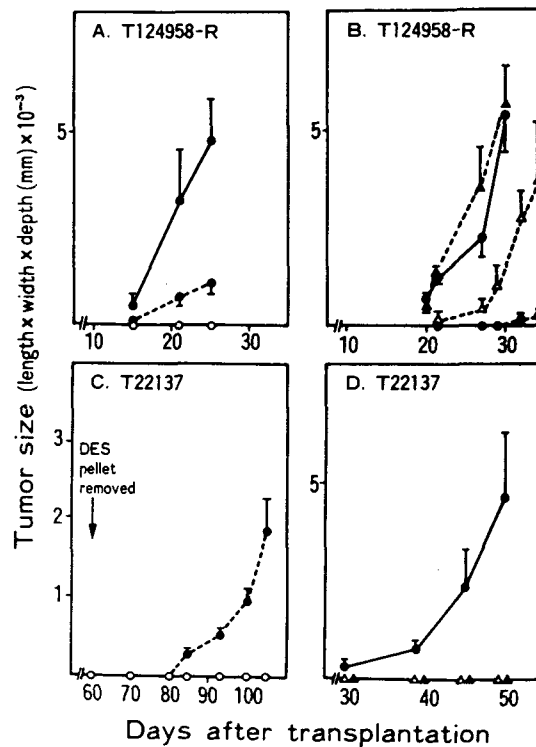
Transplantable tumor

Estrogen-dependency of tumor growth

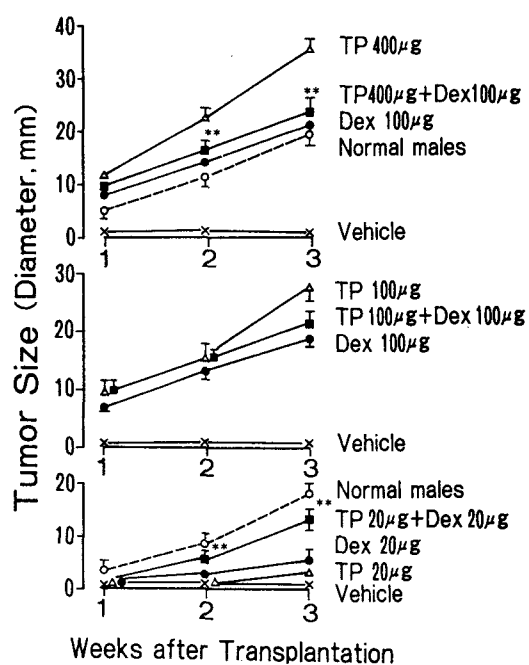
Good correlation of tumor growth with ER status

Estrogen-induced protein(s) ?

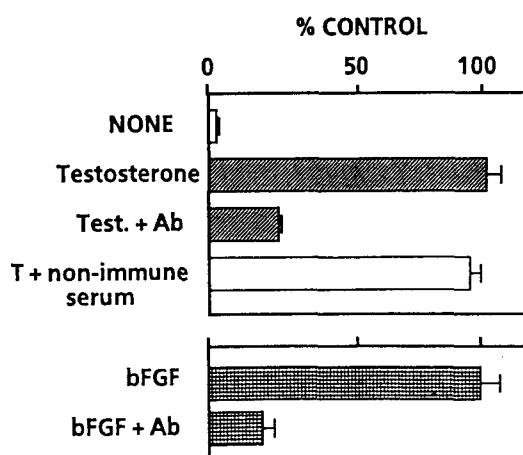
スライド 4



スライド 5



スライド 6



Anti-bFGF antibody markedly suppresses the growth-promotive effect of testosterone and bFGF.

スライド 23

〈第 2 4 回研究会〉

会員の研究発表

日時：平成元年12月2日（土）

場所：京都市国際交流会館

1. 医科系大学動物実験施設における *Pneumocystis carinii* 汚染調査
2. ネコの寄生虫について
3. 各種病態モデルラット（Tremor, Zitter 及び自然発症てんかんラット）における聴性脳幹反応（ABR）
4. カフェインによって誘発されたニワトリ胚の心血管奇形
5. 食塩及び妊娠の高血圧自然発症のラットに及ぼす影響
6. ラットの切歯に及ぼす薬剤の影響

○北田一博、芹川忠夫、村口武彦、山田淳三（京大・医・動物施設）

ニューモシスチス・カリニ（P.c）は、様々な哺乳動物の呼吸器に寄生する重要な日和見感染病原体である。従って、ヌードマウスやSCIDマウスの様な免疫機能不全を伴うミュータントを用いる実験や動物に免疫抑制をかける実験では、P.c を排除することが不可欠と考えられる。ヌードマウスでの P.c 汚染例は、我国と米国で数例報告されてはいるが、広範な P.c の汚染調査はまだ行われていない。今回、我々は全国の医科系動物実験施設における P.c の汚染調査を実施したので、その結果を報告する。

〈材料と方法〉 全国の医科系動物実験施設 44 施設について調査を行った。それぞれの施設の同一管理領域に対し、日本エスエルシー株式会社より購入した 4 週齢の雌 KSN ヌードマウスをモニター動物として分配した。なお、この業者のコロニーが P.c に汚染されていないことは、実験開始時と終了時の検査において確認した。各動物実験施設に分配されたモニター動物は、それぞれの飼育管理方法に従って 6 カ月間飼育された。返送された動物の肺に対し、病理学的検査

（HE、PAS、グロコット染色）と寄生虫学的検査（スタンプ法、集シスト法）を実施した。スタンプ法とは、肺の Imprinting Smear に対し Diff Quick 染色、トルイジンブルー-O（TBO）染色を施したもので、集シスト法とは、全肺を生理食塩水でホモジナイズ後、0.1% コラゲナーゼで肺組織を消化し、遠沈した沈渣の塗抹標本に対し TBO 染色を施したものである。以上の検査の後、各被験施設に対し、飼育管理方法に関するアンケートを実施した。

〈結果と考察〉 調査した 44 施設中 12 施設（27.1%）から、また、回収できたモニター動物 449 匹中 89 匹（19.9%）から P.c が検出された。調査した飼育室を、市販 SPF マウスを維持するのみの部屋、利用者が SPF マウスとして自家繁殖している部屋、CV マウス、ラット等を飼育している部屋の 3 群に分類して集計したところ、P.c 陽性率はそれぞれ 8.6%、30.4%、58.3%であった。また、エアーフローラックを使用している部屋と、コンベンショナルのラックを使用している部屋の 2 群に分類したところ、P.c 陽性率はそれぞれ 18.1%、43.8%であった。以上の結果は、自家繁殖による P.c 汚染誘発の危険性と、P.c 汚染防止に対するエアーフローラックの有効性を示唆するものと考えられる。また、潜在感染している胸腺動物が、P.c の汚染源として働き得る可能性が推定される事例がみられた。P.c フリーのヌードマウスをモニター動物として一定期間飼育し、その肺中に増殖した P.c を検出する方法が、現在のところ、P.c のモニタリング法として最も実用的と考えられる。しかしながら、今後、短いモニタリング期間で P.c が検出できるような、また、胸腺保有動物における潜在感染をも検出できるような高感度な検査法を開発する必要こと、さらに、消毒法を始めとする、効果的な P.c のコントロール法を確立することが必要である。

2

ネコの寄生虫について

Parasites in laboratory cats

及川 弘、三日月幸治、神田政典(塩野義・油日)

ネコは神経生理学や薬理学の研究、そして向精神薬の開発にとって最も重要な実験動物の一員で、さらに近年睡眠や夢の研究、てんかんの病因と治療の研究の面でも重視されている。

日本で医学研究に使用されるネコの数には1981年の調査では約15,000頭であったが、回答率(55%)や検疫中のロスを考慮すると約3万頭が実験用として調達されたものと推測される。

これらのネコの多くはノラネコなどの由来不詳(random source)であり、アメリカでも1980年に使用された55,000頭のうち92%を占める。一方実験用として繁殖された(bred for research)ネコの使用は世界的に低率である。

ネコの総頭数は正確に把握できないが、1981年の調査によると、日本で460万頭、アメリカで4,000万頭と推測され、夫々その0.3%と0.14%が実験に使用されたと推測される。

由来不詳ネコの殆ど全てが何れかの寄生虫の感染をうけており、しかも人獣共通のものが多いので、感染の実態を把握しておくことはネコの健康管理のみならず、飼育者の健康管理の面からも必要であり、さらに虫卵が糞便と共に排泄され環境汚染につながることを考えれば、公衆衛生上からも関心がもたれる。

寄生虫の感染様式は水平感染と垂直感染に大別されるが、前者では中間宿主をとるものととらないものがある。由来不詳ネコでは殆ど全ての感染様式をとる可能性があるが、閉鎖普通条件下で繁殖されたネコでは中間宿主をとらないものや垂直感染するものが主となる。寄生虫の成虫の寄生部位から外部寄生虫と内部寄生虫に分けられる。内部寄生虫は腸管などの腔内寄生と体組織内寄生に分けられる。また成虫と幼虫で寄生部位が異なったり、複雑な生活環を示すものもある。

1983～'89年に動物商から購入した由来不詳ネコ952頭の糞便検査により、猫回虫(19%)、マンソン裂頭条虫(13%)、猫鉤虫(10%)、壺形吸虫(7%)、Isospora(5%)、瓜実条虫(2%)、猫鞭虫(1%)、Giardia、毛細線虫、肝吸虫、猫条虫などが検出された。Toxoplasma(以下T.g.)の検査では141頭中オーシストは1頭、血清中抗体は70頭(50%)陽性であった。他に外部寄生虫は約80%陽性、心臓糸状虫は少数例検出された。ネコはPneumocystisとCryptosporidiumのCarrierとしても警戒を要する。

由来不詳ネコから健康動物を選抜して、普通(コンベンショナル)条件の閉鎖環境下に繁殖した集団ではI. felis、I. rivolta、Giardia、猫回虫が検出されたが、投薬と検査の繰返しにより、検出率は低下した。T.g.抗体陽性の母ネコから生まれた子ネコでは移行抗体が消失すると、抗体陰性となりオーシストも検出されなかった。

普通環境でminimal parasite colonyを確立するには各寄生虫の生活環を理解し母親の体組織内に潜入した幼虫やシストなどの駆除対策が重要となる。寄生虫の垂直感染経路としては、妊娠ネコがT.g.に感染した場合に起る胎盤感染、猫回虫に感染した母ネコからの介乳(経乳房)感染が知られているが、本調査によりI. felisについてもそのどちらかの感染経路が想定される。

3

各種病態モデルラット(Tremor,ZitterおよびSER)

における聴性脳幹反応(ABR)

久世博, 浅野裕三, 乾俊秀, 堀正樹, 岡庭梓(田辺製薬・安全研)

芹川忠夫, 山田淳三(京大・医・動物実験施設)

方法: Tremorラット, SERおよび同腹仔(Zitter表現型)ならびに対照として, Kyo:Wistarラットを用い, 2, 3, 5, 7, 9, 11および13週齢の時点で, 1群5匹ずつ, ABRの記録を行った(Zitterラットは5週齢のみ検索)。記録はペントバルビタール麻酔下で行い, 体温は保温器で38℃に保った。刺激音としてクリックを使用し, インナータイプのヘッドホンを通して適用した。電極は針電極を用い, 以下の条件で記録した。刺激頻度を20Hzとし, 1000回の加算を行った。刺激音圧は60, 80および100dB SPLとして, 8および2kHzの刺激周波数を用い, 周波数特性を50Hz~3kHzとした。各動物のABRについて, 各波の潜時時間, 頂点間潜時時間および電位を測定した。

成績: Kyo:Wistarラットでは, ABRにおいて2週齢から潜時時間10ms以内に3~4個の波を認め, 5週齢では5個となり, 各波の電位は増高し, 潜時時間は短縮した。この時点でI, IIおよびIII波の潜時時間および電位はほぼ安定し, 5週齢以降13週齢まで殆ど変化はなかった。SERおよび同腹非SERでは生後2週からI波が認められたが, その後に続くII, IIIおよびIV波は不明瞭で, 3~13週齢まで発育に伴う変化は観察されなかった。また, Zitterラットにおいても, SERと同様にI波を認めたのみであった。

Tremorラットでは, 2~3週齢まで対照と同様の波形を示し, 3~4個の波を認めたが, 4~6週齢では, I, II, III波の頂点潜時時間および頂点間潜時時間は対照と比較して延長を示した。また, 各波の頂点および頂点間潜時時間は加齢とともに延長した。

考察および要約: SERおよび同腹非SERでは, コルチ器ならびに聴神経に由来するI波のみが2週齢から認められたが, 潜時時間はKyo:Wistarラットに比し遅れ, 電位も低かった。II波以降の波は不明瞭であり, 成熟に伴った各波の発達は認められず, 生後早期からの脳幹未熟あるいは脳幹障害が推測された。Tremorラットでは, I波に続いてII, III波を認めたが各波の潜時および頂点間潜時は発育に伴い延長したことから, 生後4~5週齢からの脳幹の発育障害が推測された。聴器に由来するI波の電位は, Kyo:Wistarラットに比し, Tremorラット,ZitterラットおよびSERともにやや低く, 潜時時間も遅かったことから, 聴覚機能の低下が窺われた。なお, 戻し交配の結果から, ABRの異常はZitter遺伝子によるものと推測された。

黒川あかね、子林孝司、西田敦之、有行史男、岡庭 梓（田辺製薬 安全研）

鶏胚は、発生学および奇形学の領域において古くから用いられており、最近では哺乳動物に替わる実験動物として注目されている。我々は、催奇形実験における鶏胚の有用性を検討するために、催奇形因子として広く使われているカフェインを心血管系の器官形成期の鶏胚に投与し、投与時期と発現した心血管奇形の型との関係を調べた。

材料と方法：有精卵は、温度37-38℃で十分な湿度の孵卵器内で孵卵を開始し、投与と観察を容易にするため、孵卵1日に3-4 mlの卵白を抜き取った。孵卵3-5日に卵殻に窓を開け、Hamburger and Hamilton (1951)にしたがって胚の発生ステージを判定し、生理食塩液に溶解したカフェイン0.2 mlを直接胚（発生ステージ17-26）の上に投与した。窓をシールして、心血管系の分化がほぼ終了する孵卵12日（発生ステージ37-38）まで再孵卵した。鶏胚は孵卵12日に外表観察後、心臓と胸部大血管を10%ホルマリン液で灌流し、ブアン液で固定後、顕微解剖によって、異常の有無を詳細に調べた。カフェインの投与量は、予備検討（1.0、2.5 および 5.0 mg/egg）を行った結果、生存率が高くかつ奇形の発現頻度が高かった2.5 mg/eggを採用した。なお、対照には0.2 mlの生理食塩液を投与した。

結果：鶏胚の生存率は発生ステージ19前後に投与した胚で高く、心血管奇形の発現頻度もこの時期に高かった。発現した心血管奇形は、心室中隔欠損（VSD）、両大血管右心起始ならびに大血管の異常である肺動脈形成不全、腕頭動脈欠損および左大動脈遺残などであった。このうち最も多くみられたのはVSDで、各発生ステージにおいて高頻度に発現した。VSDを大動脈弁に近い膜性部にみられる孔の小さなものと、筋性部にみられる比較的大きな孔のものとに分類すると、相対的に発生ステージの早い時期に投与した胚には筋性部のVSDが多くみられ、遅い時期では膜性部のVSDが多くみられた。また、肺動脈形成不全など大血管の奇形と合併しているVSDは、早い時期に投与した胚で多かった。大血管の奇形は投与ステージが遅くなると少なくなる傾向にあった。

以上の結果から、カフェインは鶏胚の心血管系の器官形成に、発生段階特異的な影響を及ぼすことがわかり、カフェインがもつ細胞への直接作用（cAMPの濃度上昇など）やhemodynamicな作用が複合して、奇形が誘発されたことを示唆していると思われる。このように、鶏胚は特定の器官形成に及ぼす薬物の影響を調べる上で、有用であることが示唆された。

5

食塩及び妊娠の高血圧自然発症のラットに及ぼす影響

加藤仁五, 松田拓男, 藤平司郎*, 藤井登志之*(藤沢薬品・実験サービス, *安研病理)

目的: SHRSPラットを用い, 妊娠時に過剰の食塩を摂取させ, 動物 (F₁動物を含む) の機能的あるいは機質的变化についての基礎的な成績を得る。

材料と方法:

1. 動物及び飼育: 動物は近大の岡本教授より分与され, 当社でSPF化したSHRSPバージンラットを用いた。すなわち, 生後10週齢の動物を対照群 (通常の飲水摂取) 及び試験群 (1%食塩水摂取) に分け, 最終的に妊娠の確認ができた対照群6匹, 試験群8匹を使用した。飼育は1ケージ1匹とし, 温度 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度 $55 \pm 5\%$ に調節した飼育室で行った。

2. 試験方法: 試験期間は13週間の予定で行った。一般状態の観察は1日2回, 午前と午後に行い, 血圧 (収縮期圧) の測定は, 非観血的ラット用尾動脈圧測定装置 (夏目製作所) を用い, 試験期間中毎週行なった。また, 屠殺直前には, 採尿用代謝ケージを用いて新鮮尿を採取し, テストペーパー (藤沢薬品製) で判定した。対照群は試験開始後13週で, 試験群は衰弱が著しく, 生存が危ぶまれた時点 (試験開始後6~8週) で屠殺し, 血液学的検査 (テクニコン社製ヘマログ8) 及び血液生化学的検査 (テクニコン社製SMCAシステム) を行なった。その後剖検し, 脳, 心臓, 肝臓, 腎臓, 脾臓, 副腎を摘出し, 10%緩衝ホルマリン液にて固定し通常通りの処理を行った後, H&E染色を施し鏡検した。なお, 脳については前頭部, 頭頂部, 後頭部の3ヶ所鏡検した。

結果:

1) 生存率: 試験群では6週目頃より貧血を伴って衰弱あるいは死亡する動物が目立ち, 切迫屠殺例を含めた平均生存日数は試験開始後54日であった。対照群では試験開始後13週まで死亡例は全くみられなかった。

2) 平均血圧変動: 対照群では, 妊娠期間前期より徐々に上昇し, その後は試験終了まで200mm Hg前後を推移した。一方, 試験群では妊娠期間中は対照群と同様に推移するものの, 出産以降急激に上昇し, 短期のうちに死に至った。3) 血液学的検査及び血液生化学的検査: 試験群では対照群に比べ, ヘマトクリット値, ヘモグロビン量及び赤血球数があきらかな減少, ならびに総蛋白質量, 鉄の減少, コレステロール, トリグリセライド, GOT, GPT, 尿素窒素量の明らかな上昇がそれぞれ認められた。4) 尿検査値: 対照群に比し, 試験群で尿蛋白量, 尿糖及び潜血の強陽性を示す例が, 明らかに多く認められた。5) 病理組織学的所見: 試験群の6例の脳で炎症反応を伴わない出血巣が認められた。また, 心臓では心筋の線維化及び小出血が各1例に認められた。さらに, 腎臓で細小動脈硬化性腎硬化症が, 副腎で皮質部の壊死を伴った出血巣がそれぞれ全例及び半数例に認められた。

阿部敏男、宮脇宏彰（武田薬品・薬剤安全性研究所）

フッ素化合物が歯牙の形成障害を引き起こし、切歯に白色変色巣を発現させることはラット等の実験的研究で知られている。我々は、ピリミジン代謝拮抗作用をもつ抗癌剤で5-fluorouracil (5-FU) 誘導体のTegafur および同じく開発中のTAC-278 をラットに経口投与している過程で、切歯の白色変色巣が多発するのを観察し、これらの変化について病理学的に検索した。

実験方法：Ⅰ）切歯の組織学的検索；4週齢のWistar系雌ラットにTegafur 200 mg/kg およびTAC-278 500 mg/kg を8週間連日強制経口投与し、動物を10% 緩衝ホルマリン液で灌流固定後、切歯について、脱灰標本の組織学的検索および研磨標本（厚さ50 μ m）の顕微X線検索（Softex-CMR）を行った。Ⅱ）切歯中のフッ素濃度の測定；3週齢のWistar系雄ラットにTegafur, TAC-278 およびNaF をいずれもフッ素換算で等量になるようにそれぞれ 100, 140 および 21mg/kgを8週間連日強制経口投与し、摘出した下顎切歯について、微粉化後、フッ素を分離し、La-Alizarin Complexone method で測定した。

結果および考察：Tegafur およびTAC-278 の両投与群では、病理組織学的に基質形成期の後半から退縮期におけるエナメル芽細胞の変性・壊死、同細胞層の配列不整と嚢胞形成、エナメル基質の異常な産生、鉄色素沈着障害、乳頭層細胞の変性・壊死、象牙芽細胞の変性・萎縮および象牙質の石灰化不全等が認められた。顕微X線法では両投与群のエナメル質に基質形成期の障害を示す石灰化不全線および成熟期の障害を示す石灰化不全帯が認められた。また、切歯中のフッ素濃度はTAC-278 < Tegafur < NaF の順で高く、それぞれ無処置対照群の2.4, 7.5および10倍の値を示し、切歯の肉眼病変も同様の順で強く認められた。

以上、Tegafur およびTAC-278 投与群の切歯には、いずれもエナメル芽細胞および象牙芽細胞の障害に起因したエナメル質および象牙質の形成不全が認められた。病理組織学的検査および顕微X線法で認められたこれらの変化は、フッ素化合物を投与したラットで報告されているフッ素症の変化と類似しており、また、切歯中のフッ素濃度と切歯の肉眼病変の程度もよく相関していることから、病変の発現にはTegafur およびTAC-278 に含まれるフッ素の関与が示唆された。両化合物から遊離したフッ素がエナメル芽細胞や象牙芽細胞を傷害し、基質形成や石灰化の不全を引き起こしたものと推察される。

＜その他＞

関西実験動物研究会だより

関西実験動物研究会会報 8 号に掲載した第26回研究会以後、以下の研究会が開催された。

1) 第27回研究会 (平成 2 年9月29日 大阪府立大学学術交流会館)

講演会

1. 輸入サルにおけるエボラ様ウイルス感染をめぐる問題について

山内一也 (東京大学医科学研究所)

2. 遺伝性の形態形成異常を示すニホンウズラ
ー耳房 (ET) および喉房 (TT) 系統についてー

都築政記 (大阪府立大学農学部)

3. WHHL rabbit の開発と現況

渡辺嘉雄 (前神戸大学医学部)

2) 第28回研究会 (平成 2 年12月14日 京都教育文化センター)

会員の研究発表会 13 題

特別講演: 実験動物マニュアル

山内忠平 (鹿児島大学医学部)

3) 第29回研究会 (平成 3 年 3 月 9 日 大阪大学医学部)

講演会

1. 生殖細胞の分化

西宗義武 (大阪大学微生物病研究所)

2. ラット血液のレオロジー

志賀 健 (大阪大学医学部)

講演会後、大阪大学医学部附属動物実験施設の見学

総会・評議員会議事概要

1) 第8回 総会 概要 (平成3年3月9日 於 大阪大学医学部)

- (1) 平成2年度 事業報告(含 会誌発行)が行われた。
- (2) 平成2年度 決算が報告された。監事の監査の結果適正であった事が報告された。
- (3) 平成3年度 事業計画が報告され承認された。
- (4) 平成3年度 予算が報告され承認された。

2) 第9回 評議員会議事概要 (平成3年3月9日 於 大阪大学医学部)

出席：山田、江角、阿部、及川、内海、宮嵐、宮本、松村、海野、三日月、
石川、黒澤、佐々木、佐藤、山本、新谷、森岡、山中、高木(19名)

1. 議 事

(1) 平成2年度 事業報告

黒澤幹事(集会)及び新谷幹事(編集)よりそれぞれ平成2年度事業報告が行われた。

(2) 平成2年度 決算報告

山田会長より平成2年度決算報告が行われ、監事の監査の結果適正であった事が報告された。

(3) 平成3年度 事業計画案について

黒澤幹事より第29回、第30回、第31回、及び第32回の研究会について計画案が提出され、承認された。新谷幹事より本年度会誌の発行を2回予定していることが報告され、承認された。

(4) 平成3年度 予算案について

山田会長より平成3年度予算案について説明が行われ、承認された。

関西実験動物研究会会員名簿

○ 会 長 ☆ 評議員
★ 監 事

あ 荒木 宏昌 秋元 博一 青野 皆基 安東 正則 秋山 潔 東 文男 ☆阿部 敏男 安藤 孝夫 赤羽 行武 青木 泰啓 史男 裕三 浅野 保男 安部 純二 青木 純二 浅野 英俊	扶桑薬品工業 研究開発 大阪府農林技術センター 武田薬品工業 中央研究所 塩野義製薬 神崎研究所 愛知医科大学 動物実験 紀和実験動物研究所 武田薬品工業 薬剤安全研 武田薬品工業 中央研究所 ラボリック・サービス 大日本製薬 総合研究所 田辺製薬 安全性研究所 田辺製薬 安全性研究所 日本エスエルシー アニマルケア 日本チャールスリバー	大森 吉明 大江 治 織田 茂 奥田 敏明 小川 保直 大谷 晃 大和田 恭子 岡本 宗裕	武田薬品工業 藤沢薬品工業 武田薬品工業 安全性研究所 科研製薬 安全性研究所 摂南大学薬物安全科学研究所 日本ベーリンガーインゲル 和歌山県立医科大学 大阪大学医学部動物実験施設
い 伊藤 隆 猪 貴義 乾 俊秀 飯塚 三喜 岩井 克巳 今井 正彦 ☆飯田 晶敏 池田 克巳 石井 純一 今西 るみ 石田 貢 岩城 秀治 ☆石川 尚明 今井 章浩 伊藤 隆康 糸賀 鋭治 石川 隆司 岩田 四郎	神戸大学医学部動物実験施設 岡山大学農学部 田辺製薬 安全性研究所 日本ベーリンガーインゲル 日本シェーリング ミドリ十字 安全性研究所 大日本製薬 総合研究所 島根難病研究所疾患モデル 東洋紡績 総合研究所 日本ベーリンガーインゲル 日本医薬品工業 総合研究 塩野義製薬 油日ラボ 藤沢薬品工業 中央研究所 ケーエーシー 武田薬品工業 中央研究所 塩野義製薬 摂津工場 大日本製薬 総合研究所 金城学院大学	か 仮家 公夫 片山 泰人 川合 是彰 加藤 仁五 梶山 松生 河井 祥一郎 川畑 好之康 ☆川俣 順一 川崎 浩之進 川西 和夫 加藤 鋭二 神田 政典 金田 平八郎 加堂 洋一	神戸学院大学薬学部 岡山大学医学部脳代謝研究 田辺製薬 安全性研究所 藤沢薬品工業 中央研究所 山口大学医療短大 フナイ 薬品工業 ミドリ十字 安全性研究所 関西鍼灸短期大学 国立衛生試験所 大阪支所 科研製薬 製剤研究所 日本クレア 大阪営業所 塩野義製薬 油日ラボ ラビトン研究所 藤沢薬品工業
う ☆海野 隆 ☆内海 健二朗 浦谷 衛 上島 育二 植木 礼子	鐘紡 安全性研究所 大日本製薬 総合研究所 石原産業 中央研究所 藤本製薬 中尾 B.M.S.R 研究所	き 木原 隆英 岸本 嘉夫 北山 博章 経田 ひろみ	近畿大学医学部第1解剖学 塩野義製薬 油日ラボ 北山ラベス 田辺製薬 安全性研究所
え 江馬 真 圓入 克介 ☆江角 吉造 江見 明雄 ☆江崎 孝三郎	国立衛生試験所 藤沢薬品工業 医療関連研究所 日本シェーリング 開発部 藤沢薬品工業 中央研究所 大阪府立大学農学部	く 倉林 譲 久世 博 桑原 智恵美 ☆黒澤 努 久保 政美	岡山大学医学部動物実験施設 田辺製薬 安全性研究所 京都大学医学部法医学 大阪大学医学部動物実験施設 富山医科薬科大学
お ☆及川 弘 奥村 正直 大神 弘 ☆岡庭 梓 大野 周三 大原 忠雄 沖本 一夫 奥田 誠治 小木 曾敏吉 大石 裕司	塩野義製薬 油日ラボ 愛知県衛生研究所 大日本除虫菊 中央研究所 田辺製薬 安全性研究所 藤沢薬品工業 研究開発 塩野義製薬 油日ラボ 大日本製薬 総合研究所 堺化学工業 医薬事業部 総合産業開発 藤沢薬品工業	こ 小林 嘉代 児玉 直巳 甲田 彰 米田 友彦 小西 喬郎 小谷 猛夫 ☆小嶋 明廣 近藤 靖 神山 八郎 小森 彰 小松 正美 ☆後藤 信男 香山 一之 龍谷 泰伸	近畿大学 ライフサイエンス 日本シェーリング 研究部 住友化学工業 生物環境科学 武田薬品工業 中央研究所 塩野義製薬 油日ラボ 大阪府立大学農学部 田辺製薬 基礎生物研究所 田辺製薬 安全性研究所 環境保健生物研究センター 科研製薬 中央研究所 日本農薬 安全性研究所 神戸大学農学部 大鵬薬品工業 安全性研究所 東洋紡績 総合研究所
		さ ☆笹川 祐成 ☆佐々木 弘 佐幸 誠一 ☆佐藤 良夫 鮫島 秀暢 佐治 久江 佐藤 公道	近畿大学医学部 日本チャールスリバー 帝国製薬 研究開発部 大阪大学歯学部中央研究室 新日本科学 塩野義製薬 油日ラボ 京都大学薬学部薬理学

坂本 雄三	千寿製薬	寺田 芳規	大日本製薬 総合研究所
し 塩田 恒三	京都府立医科大学	と 富田喜久雄	塩野義製薬 油日ラボ
東海林隆次郎	発達障害研究所	堂前嘉代子	大阪大学微生物病研究所
☆城 勝哉	兵庫医科大学	徳本 和弥	塩野義製薬 摂津工場
嶋川 幸三	武田薬品工業 中央研究所	土井 安	ケアリー
☆志村圭志郎	三重大学医学部動物実験施設	東條 英昭	富山医科大学
清水 英男	清水実験材料	☆鳥居 隆三	滋賀医科大学動物実験施設
清水 雅良	日本バイオリサーチセンター	☆戸田 昇	滋賀医科大学薬理学
嵐本 薫	東レ 安全性研究室		
柴生田正樹	武田薬品工業 中央研究所		
嵐田 好文	日本クレア 石部生育場		
す 鈴木 靖郎	小野薬品工業福井安全性研究	な 中島 文博	大日本製薬 総合研究所
菅原 努	国立京都病院	☆中川 八郎	大阪大学蛋白質研究所
鈴木 靖幸	小野薬品工業福井安全性研究	中山 亮	武田薬品工業 中央研究所
杉谷 順康	武田薬品工業 中央研究所	長澤 久充	日本新薬 中央研究所
杉村 幸治	日本メジフィジックス	中村 公章	科研製薬 京都研究所
☆鈴木 秀作	島根医科大学動物実験施設	永江 裕輔	日本チバガイギー
須田 浩	参天製薬 中央研究所	中尾 嘉孝	石原産業 中央研究所
		中口 武	武田薬品工業
		中島 健博	ケアリー
		中川 和年	大鵬薬品工業
		中尾 博之	塩野義製薬 油日ラボ
		中村 哲也	オリエンタル酵母工業
		中井 伸子	日本新薬 中央研究所
せ☆芹川 忠夫	京都大学医学部動物実験施設		
た 武田 篤彦	体質研究会	に 丹羽 皓二	岡山大学農学部畜産学
武居 秀夫	塩野義製薬	☆二階堂浩子	金沢大学医学部動物実験施設
竹下 崇	日本新薬 山科植物研究所	西村 正彦	浜松医科大学動物実験
☆高折 修二	京都大学医学部薬理学	西川 哲	日本エス・エル・シー
田倉 進	日本チャールスリバー	☆新谷 聰	国立循環器病センター
武下 政一	田辺製薬 安全性研究所	西村 孝義	環境保健生物研究センター
田代 茂年	マルホ 大淀研究所	西端 良治	日本臓器製薬 生物活性
田中 達也	栗津神経サナトリウム	西川 健志	日本新薬 中央研究所
辰巳 光義	藤沢薬品工業 研究部門	西田伊久男	環境保健生物研究センター
竹之下洋司	ケアリー	西田 敦之	田辺製薬 安全性研究所
☆谷村 孝	近畿大学医学部解剖学	西山 秀志	武田薬品工業
多田 憲市	福井県家畜保健衛生所		
★高木 貞明	日本エスエルシー		
☆高島 俊行	藤沢薬品工業 中央研究所	ぬ 沼沢 拓身	日本臓器製薬
谷本 純一	藤沢薬品工業 中央研究所		
多賀谷 修	エーザイ 安全性研究センター	の☆野澤 謙	京都大学霊長類研究所
竹之下美恵	ケアリー	野村 彰	日本新薬 中央研究所
玉田 尋通	大阪府立大学農学部	野方 勝	日本農薬 安全性研究所
高橋 哲哉	石原産業 中央研究所		
多田 輝典	日本農産工業		
樽見 千利	三共 安全性研究所	は☆早川純一郎	金沢大学医学部動物実験施設
竹下 修史	メレル・ダウ製薬	橋野 秋彦	塩野義製薬 摂津工場
田島 優	大阪大学医学部動物実験施設	林 幸之	塩野義製薬 油日ラボ
		伴野 高彦	新日本ラボラトリー
		林 新茂	武田薬品工業 中央研究所
		橋本 岩雄	メレル・ダウ薬品工業
		浜田 佑二	成和実験動物研究所
		林 敏夫	日本チバガイギー
ち 千葉 胤孝	一宮女子短期大学		
つ☆辻 繁勝	和歌山県立医科大学	ひ 平松 保造	摂南大学薬物安全科学
☆堀良 義彦	日本チバガイギー	東野 浩司	日本製薬 大阪営業所
塚原 清志	塩野義製薬 油日ラボ	東 徳広	日本シェーリング
坪田 裕司	和歌山県立医科大学	平川 公昭	鐘紡 薬品研究所
都築 政起	大阪府立大学農学部	平沢 勉	塩野義製薬 油日ラボ
		正田 精一	科研製薬 安全性研究所
て 寺島 幸男	科研製薬 京都研究所		
出口 隆志	協和醸酵工業 安全性研究所		

ふ ☆古河 恵一
藤平 司郎
古川 学
☆藤村 一
藤波不二雄
藤井登志之

ほ 朴木 進
干場 純治
堀 孝司
本田 良也

ま ☆松下 宏
松林 清明
松浦 稔
☆牧野 進
☆増岡 通夫
前田 勝弘
政本 浩二
★増田 恭造
前田 敏宏
松田 拓男
増田 実
松本 耕三
萬野 賢児
松田 庄司
☆松村理一郎

み 宮本 誠
☆宮崎 宏彰
☆宮脇 茂樹
☆三日月勝見
宮本 照男
三日月幸治
☆宮本 政樹

む ☆村上 宏
村口 武彦

も 森本 純司
森 純一
☆森岡 宏至
☆森井 外吉
森島 英喜
森 聖
森 浩志

や ○山田 淳三
柳本 行雄
☆家森 幸男
☆山本 好男
山中 照明
山村 英樹
安田 正秀
☆山中 久
山本 淑子
☆山之内孝尚

近畿大学医学部
藤沢薬品工業 中央研究所
石原産業 中央研究所
生産開発科学研究所
田辺製薬 マルゴ・リサーチ
藤沢薬品工業 安全性研究所

御木本製薬 研究開発部
岡山大学医学部動物実験
オリエンタル酵母
参天製薬 動物管理課

和歌山県立医科大学
京都大学霊長類研究所
塩野義製薬 油日ラボ
塩野義製薬 油日ラボ
武田薬品工業 中央研究所
大日本製薬 総合研究所
湧永製薬 中央研究所
日本クレア 大阪営業所
大日本製薬 安全性研
藤沢薬品工業 研究開発
大鵬薬品工業
徳島大学医学部動物実験施設
摂南大学薬物安全科学研
環境保健生物研究センタ
日本ベーリンガー

大阪大学医学部病理学
武田薬品工業 中央研究所
日本新薬 山科植物研究所
塩野義製薬 油日ラボ
ラボス
塩野義製薬 油日ラボ
日本チバガイギー

神戸大学医学部衛生学
京都大学医学部動物実験施設

奈良県立医科大学
大阪府立大学農学部
大阪府立大学農学部
関西医科大学病理学
武田薬品工業 中央研究所
塩野義製薬 油日ラボ
大阪医科大学実験動物

京都大学医学部動物実験施設
生活科学研究所
島根医科大学病理学
滋賀医科大学法医学
大正薬品工業 研究開発
三重大学医学部解剖学
大阪薬科大学実験動物
ラビトン研究所
京都大学医学部法医学

山北 修
山田 明男
柳澤 宏樹
山本 保信
山下 浩文
山本 孝史
山下 武夫
山田 嘉美
山田 純子
山本三千夫

ゆ 湯浅 啓史

よ ☆吉田 幸雄
吉田 豊彦
吉田 博次
吉岡 正八
吉船 伸一
吉村 章子

わ 渡辺 信介

大鵬薬品工業 研究部
大阪市立環境科学研究所
船橋農場 京都営業所
小野薬品工業福井安全性研究
塩野義製薬 油日ラボ
不二製油 生物化学研究所
塩野義製薬 油日ラボ
ビュア・アムール
ビュア・アムール
オリエンタルバイオサービス

田辺製薬 安全性研究所

京都府立衛生公署研究所
塩野義製薬 油日ラボ
日本新薬 中央研究所
積水化学工業 総合研究所
日本商事 医薬研究所
ラボリック・サービス

近畿大学 ライフサイエ

平成3年2月

《 関西実験動物研究会 維持会員名簿 》

平成3年度

1. オリエンタル酵母(株) 大阪営業所
2. 鐘紡(株) 薬品研究所
3. (株)大塚製薬工場 研究開発部
4. (株)ケー・エー・シー
5. (株)ケアリー
6. (株)船橋農場 京都営業所
7. (株)ミドリ十字 安全性研究所
8. 北山ラベス(株)
9. 塩野義製薬(株) 油日ラボラトリーズ
10. 大日本製薬(株) 総合研究所
11. 武田薬品工業(株) 実験動物管理室
12. 日本クレア(株) 大阪営業所
13. 日本商事(株) 医薬研究所
14. 日本チャールス・リバー(株)
15. 藤沢薬品工業(株)
16. 扶桑薬品工業(株)
17. 丸石製薬(株) 中央研究所
18. 日本エスエルシー(株)
19. (株)ラビトン研究所
20. 田辺製薬(株) 研究統括センター
21. (株)夏目製作所
22. 加商(株)

編集後記

湾岸戦争にも一応の終止符が打たれ、戦後処理に数多くの問題を残しながらも、世界の平和が再び戻ってきた。

このような戦争を目の当たりにする時、平和の大切さとありがたさを感じないわけにはいかない。我々は平和で自由で豊かな日本に暮らし、それぞれの立場で自らの仕事を継続し、たとえ少しずつであろうとも、そしてたとえ地味であろうとも、成果を積み上げていくことができるのである。何物にも邪魔されることなく、自らの夢の実現をめざすことができるのである。何とすばらしいことであろう。

- S. M. 記 -

平成 3 年 5 月 25 日 印 刷
平成 3 年 5 月 31 日 発 行

編集兼発行者 山 田 淳 三
発 行 所 関西実験動物研究会
〒606 京都市左京区吉田近衛町
京都大学医学部附属動物実験施設
印 刷 所 関西ナショナル印刷株式会社
〒532 大阪市淀川区十三本町 3-4-23