

解 説

ストレスのない世界はないー細胞ストレス生物学入門ーその 1

大塚健三

中部大学応用生物学部細胞ストレス生物学教室

はじめに (プロローグ)

この論文は、ストレスについての内容ですが、人間社会におけるいわゆる精神的ストレスの話ではありません。論文のタイトルの副題に「細胞ストレス生物学」とあるとおり、細胞レベルでのストレス応答に関する論文です。ストレスといっても、おもには熱ストレス(熱ショックともいう)のことであり、その熱などのさまざまなストレスに対して細胞はどのように反応するのかを研究するのが、細胞ストレス生物学です。本書で取り上げるストレスは、熱ストレスが中心ですが、そのほかに放射線などの物理的ストレス、エタノールや重金属などの化学的ストレス、ウィルスなどの生物的ストレスも含まれます。約 38 億年前といわれている生物の起源については、さまざまな観点から研究されておりいろいろな学説がありますが、いまだに謎です。しかし、生物はその起源から、生物をとりまくさまざまな環境ストレスに対してうまく対処し、変化する環境に対して巧みな防御機構を獲得しながらうまく適応し、子孫を生み出して進化してきました。そういう意味で、生物はストレスの充満する世界で生き延びてきたことになります。生物は、したがって、ストレスに対抗できる驚異の防御機構を細胞のなかに持っていることになります。また、別の観点からみると、生物にとって「ストレスのない世界はない」ということができます。

筆者が大学に入って生物学を学び始めたころに読んだ本に次のような文章がありました。「心配のない世界でストレスもひずみもない生活を想像するのは心楽しいかもしれないが、これは怠けものの夢にすぎない。人間生活は動的プロセスなのに、楽園は静的概念だから、地球上に楽園を見いだそうとしても、むだである。――地球はエデンの園ではない――」[1]。陸上にも水中にも生物に満ちあふれている

この地球は、生物にとって楽園などではなくストレスの充満する世界だというのである。当たり前といえば当たり前ですが、確かにそのとおりだとの思いを強くした記憶があります。

さて、細胞ストレス生物学という言葉はなじみのない方も多いのではないのでしょうか。じつは、これは筆者が勝手に作った学問分野の名前です。同じ研究分野の仲間たちのあいだでもまだ一般的には使われておりません。なぜこのような名称を使うようになったかを、筆者自身の経歴も含めてここにかいつまんで紹介したいと思います。

筆者は理学部生物学科の大学院博士課程を終了後、身分が不安定な研究生として医学部の生化学教室にお世話になっていましたが、1981 年 4 月、31 歳のときに縁があって、愛知県がんセンター研究所の放射線部に正式に研究員として採用していただきました。そのときの部長が中村弥(なかむらわたる)先生(故人)であり、マウスを用いたがんの温熱療法の基礎研究をやっていました。筆者もしばらく中村先生と一緒に研究していましたが、2 年ほどで中村先生は退職することになりました。研究室名は放射線部なので、もともとは放射線によるがん治療の基礎研究を目的とした部門です。1970 年代から 80 年代にかけて、がん細胞は放射線でなくても、43~45℃という人間にとっては少し熱めの温度で処理すると殺すことができることから、温熱によるがん治療の研究が盛んになりつつありました。これが、がん温熱療法、いわゆるハイパーサーミア(hyperthermia)の始まりです。熱というも波長はちがうけれども放射線とおなじ電磁波ということもあり、世界中の放射線生物学の研究者たちの多くが、培養細胞やマウスを用いてがん温熱療法の基礎研究を始めていました。中村先生もそのうちの

お一人でした。

培養細胞を用いた熱による細胞死の研究でまもなくわかったのは温熱耐性という現象です。たとえば、細胞を 45℃で 15 分間処理すると、一部の細胞は死にますがまだ多くの細胞は生き残っています。それらの細胞を 37℃で数時間おいてから、ふたたび 45℃で 60 分処理するとします。細胞を最初から 45℃で 60 分間処理すると、ほとんどの細胞は死にますが、あらかじめ 45℃で 15 分間の処理を受けた細胞は死ににくくなるのです。つまり、あらかじめ軽い熱ストレスを受けた細胞は、しばらく後にくる強い熱ストレスに対して抵抗性になるのです。これを温熱耐性 (thermotolerance) といいます。がん治療によく使われる抗がん剤や病原性微生物に対する抗生物質の場合も、かならず薬剤耐性の細胞や病原菌が発生してきて治療の妨げになっています。温熱の場合も耐性が生じるので、がん治療には向かないのではないかと当初は考えられていましたが、しかし、この温熱耐性は、軽く熱処理した細胞を 37℃で 3~4 日培養しておく、その耐性が消滅することがわかったのです。つまり、温熱耐性は一過性の現象だったのです。したがって、実際の臨床では、繰り返し治療を行うとしても、1 週間に 2 回程度の温熱療法であれば温熱耐性は消滅しているので、問題にならないだろうということで、臨床応用が始まりました。それにしてもこの温熱耐性という現象は、細胞の中で何が起きているのか、分子レベルではどのように説明できるのか、など不明な点が多くありました。しかし、この温熱耐性という現象は、細胞をさまざまなストレスから護るすぐれた防御機構であることがわかってきたのです。

このがんの温熱療法の基礎研究とはべつに、もう一つの研究の流れが熱ショックタンパク質 (heat shock proteins, HSPs と略、通常複数形の s を付ける) に関する分野です。これは、最初 1960 年代に、モデル動物のショウジョウバエで見つかった現象ですが、1970 年代後半から 80 年代にかけて、すべての細胞や個体で、それこそ、大腸菌からヒトまで、それぞれの正常な生育温度から 5~10℃の高い温度で短時間処理すると、それまでは合成していなかった新しいタン

パク質が合成されてくることがわかってきたのです。熱ショックによって合成されてくることから、熱ショックタンパク質 (HSPs) と呼ばれるようになりました。この HSPs もまた、軽い熱ショックのあと 1~2 日ほどで多く合成されますが、3~4 日もすると次第になくなっていきます。1980 年ころには、先に述べた温熱耐性と HSPs がどうも関係しているらしいということが、いくつかの研究グループから報告されていました。

1982~83 年当時、中村弥先生が愛知県がんセンターを退職することになりましたので、筆者は独立した研究者としてその後どのような研究をしていくか迷っていましたが、基礎の研究者ということもあり、生物学的に興味のある研究で、しかも将来性のある分野として HSPs の研究を開始したのです。それは、がん温熱療法の基礎研究、特に温熱耐性の分子メカニズム解明という意味合いもありました。手始めは、すでに報告されていた HSP70 について、哺乳類細胞から精製して抗体を作製し、その細胞内局在などを調べていました。1986 年から 2 年間は、アメリカ・セントルイスにあるワシントン大学で、アンドレイ・ラツロー (Andrei Laszlo) 博士と一緒に、おもに培養細胞を用いてさまざまな加温条件下での HSP70 の細胞内局在の研究をしました。ラツロー博士は、チャイニーズハムスター由来の細胞から熱に抵抗性の変異細胞株を最初に単離した方です。筆者は帰国後に、哺乳類の新しい HSP として HSP40 を発見し、HSP40 遺伝子の単離、HSP40 の機能解明、など、多くの仲間や共同研究者に支えられながら、苦しいながらも楽しい研究三昧の生活を送っていました。愛知県がんセンター研究所というところは、大学とちがって教育活動や雑用などがほとんどなく、研究一筋に打ち込むことができましたので、ささやかながらもオリジナリティーのある研究成果を残すことができました。

その後、また縁があつて、2001 年 4 月に中部大学応用生物学部創設と同時に赴任することになりました。大学では自分の研究室に名前を付けることができます。大学からは特に指示はなかったので、細胞レベルでのストレス応答を研究する分野ということで、「細胞ストレス生物学教室 (Laboratory of Cell & Stress

Biology)」と名付けることにしたのです。これが、この論文の副題の由来です。教室といっても、教員は筆者 1 人、スタッフも学生もゼロからのスタートでした。

筆者が HSPs の研究を始めてから 30 数年になります。その間、がん温熱療法と HSPs の研究分野は大いに発展しました。特に HSPs については、分子シャペロン(介添えタンパク質)*¹ の概念、タンパク質折りたたみにおける役割、タンパク質の品質管理機構、細胞内の防御因子としての機能、免疫系での役割、神経変性疾患との関わりなど、つぎつぎと新しい機能などが報告され、筆者に取っては驚きの連続でした。また最近では、HSPs ががんの発生や進展に重要な役割を持っていることがわかってきており、HSPs を標的としたがんの治療法の研究も進められています。

近年、生物は「ロバストネス(頑強)」である、とか、また「レジリエンス(回復力、復元力)」を持っている、という表現がときどき専門の論文にも出てくることがあります。筆者は、HSPs による細胞の防御機構そのものが、ロバストネスやレジリエンスの分子レベルでの実体の一つではないかと考えています。この点についても本論文で若干考察したいと思います。

われわれ研究者の社会では、研究分野の近い人たちが集まって研究会や学会などで、年に 1 回自分の研究成果を発表し、お互いに議論しあいます。がん温熱療法の分野では、日本ハイパーサーミア学会があり、HSPs 関連では、臨床ストレス応答学会(日本)があります。筆者もこの両方の学会に所属し、2008 年には日本ハイパーサーミア学会、2011 年には臨床ストレス応答学会の大会長として、いずれも名古屋の地で学会開催のお世話をさせていただきました。また、これらの学会の世界的な組織もあり、定期的に国際会議が開催されており、筆者もたびたび参加する機会がありました。そういう意味で、これらの研究(ハイパーサーミアと HSPs)の初期の頃からこの分野に身を置いていた現場証人の一人として、これらの分野の研究の歴史や成果などをかいつまんで紹介したい、また記録に残しておきたい、というのがこの論文の執筆の最大の動機です。あくまでも筆者個人の目からみた、それも微管(細い管)をとおしてみた研

究分野の紹介です。若干のかたよりや誤解もあるかもしれません。本書では、おもにがんの温熱療法の基礎研究と、熱ショックタンパク質(HSP)および分子シャペロンのことを中心に紹介したいと思います。最初に本論文は人間社会の精神的ストレスのことは含まないと述べました。しかし、この分野の研究からわかってきた教訓的なことの一つは、「細胞や生体にあらかじめ適度な軽いストレスを与えておくと、次ぎにくる強いストレスに対して抵抗性になる」ということです。まさに、「鉄は熱いうちに打て」、「若いときの苦労は買ってでもせよ」という、人生一般にも通じる内容です。

本書はおもに、高校生や大学学部生を念頭に書いたつもりです。したがって、専門分野の研究者にとってはすこし退屈な内容も多いかもしれません。本書で紹介する研究分野からみた生物の巧妙なからくりをとおして、生物学の面白さに興味を持っていただければ望外の喜びと思っています。なお、若干難しい専門用語、また遺伝子やタンパク質の名前がでてきますが、なるべくわかりやすい解説を心がけたつもりです。高等学校での「生物基礎」および「生物」程度の知識があればかなり理解できるのではないかと思います。

なお、本論文はかなり長くなることが予想されるので、この紀要に連載する形で掲載していきたいと考えています。

*¹ 分子シャペロン:介添えタンパク質と訳される。他のタンパク質の折りたたみや複合体形成などの世話をするタンパク質のこと。多くの熱ショックタンパク質(HSPs)が分子シャペロンの機能をもっている。本論文で詳しく述べていく。

第 1 章 がん温熱療法の基礎

1-1 「温熱」や「熱ショック」の温度は？

本論文で取り上げる「温熱」や「熱ショック」というのは、基本的には 40℃から 45℃ほどの温度のことです。これは、恒温動物であるヒトを念頭においた温度であり、正常な体温(36～37℃)からは数℃～10℃前後の

高い温度です。お風呂の温度(41～42℃)も軽い熱ショックということになります。もっと高温、つまりやけどをしたり、ゆで卵になるような温度は、対象外です。がん温熱療法で使う温度はヒトのがんの治療に有効な温度であり、また熱ショック応答では、哺乳類細胞が死なない程度の温度で処置することによって熱ショックタンパク質(HSPs)が合成されてきます。したがって40℃から45℃ほどの温度が対象になります。

なお、変温動物では、通常その生物が生育している温度より5～10℃高い温度が熱ショックになります。たとえば、ショウジョウバエは通常25℃で飼育されていますが、30～35℃の温度が熱ショックになるし、興味あることに、温泉などの高温(～90℃)で生きている細菌(好熱細菌)にとってはそれより10℃ほど高い100℃が熱ショックになります。この点については、本論文で若干触れることにします。

1-2 高体温でがんが退縮

がんの熱による治療法は古代から行われていたようです。紀元前2000年ころの古代インドの長編叙事詩「ラーマヤナ」にも記述されており、紀元前400年ころのヒポクラテスや、おなじく紀元前200年ころのガレンも、熱した鉄によるがんの焼灼法について記載しています。これらはいずれも高温でがんを焼き殺す方法です。これは体の表面にできたがんにはしか適用できないものです。ルネッサンス期以降では、天然痘や結核などの感染症になった患者のがんが、高体温が数日間続いた後に自然退縮したという症例報告が多くあるようです[2, 3]。

19世紀半ばになって、体温が少し上昇することでヒトのがんが消滅したという科学的な最初の記述はドイツ人医師 Busch によるとされています(Busch, 1866)。彼は、顔に肉腫が発生した患者が、たまたま丹毒(溶血性連鎖球菌による急性の炎症性皮膚疾患で発熱をともなう)に感染し、二度発熱を繰り返したところ、その肉腫が消滅したことを観察しました。体温がどの程度上がったのかの記載はありませんが、現代の医学的観点からすると、40℃ほどだったと推定されます。このことから Busch は、正常体温より数℃高

い温度が、がんの治療に使えるかもしれないと提案しています。19世紀から20世紀にかけては、Busch の考え方を応用して、がんの患者に丹毒や他の細菌の毒素を人為的に注射して体温を上昇させることによるがんの治療法が試みられています。また、がんの患者の全身を42～44℃のお湯に長時間浸すことも行われています。1950年代に、アメリカとドイツでがんの自然退縮の例を集めた報告があり、それぞれ百数十例のうち、約1/3は発熱していたとされています[2, 3]。このようなことから、体温が上昇すると、ときにはがんが消滅することもある、ということは経験的に知られていました。この場合、40℃前後の温度そのものが、がん細胞を殺しているのか、また、少しの体温上昇によって免疫系が活性化されて二次的な効果なのかどうかは、わかりませんでした。

1-3 がん温熱療法の実験的研究の進展

1960年代になってようやく、温熱(40～45℃)によるがん治療の基礎的研究が始まりました。実験方法としては、放射線によるがん細胞死を定量的に測定する方法がマウスの移植腫瘍や培養細胞を用いてすでに確立されていたので、放射線を温熱に代えて、また放射線と温熱を組み合わせるとどのような治療効果が得られるのか、など詳しく調べられるようになったのです。

1-3-1 マウスの移植腫瘍を用いた研究

まず、マウスの移植腫瘍を用いた実験方法を紹介します。ヒトやマウス由来のがん細胞は無限に増殖できるので、シャーレで培養したり、マウスに移植したりして、継代維持ができます。また凍結保存(通常はマイナス196℃の液体窒素中)すれば半永久的に保存が可能です。このような研究用に開発されたがん細胞株が数多くあります。遺伝的に均一な細胞集団(いわゆるクローン)を細胞株(cell strain, または cell line)と呼びます。研究用のマウスもまた純系の系統が多く維持されています。これらはいずれも市販されているので専門の業者から購入できます。がん細胞株と移植する宿主マウスの組み合わせがうまくないと、

移植したがん細胞は宿主マウスの免疫系によって拒絶されてしまいます。したがって、通常は同系マウス由来のがん細胞を用いることになります。しかし、ヒトのがん細胞をマウスに移植して研究したいときにはどうしたらいいのでしょうか。なんとヒトのがん細胞を移植しても拒絶されないマウスの系統がいるのです。それはヌードマウスといって体毛が全くありません。まさにヌード(裸)のマウスです。じつはこのマウスは、ある遺伝子(FOXN1)に変異があって免疫系の細胞を作り出す胸腺が全く発達しないので免疫応答ができなくなっているのです。したがって、他の種の細胞を移植しても拒絶されることなく増殖することができます。このヌードマウスは免疫力がなくなっているので完全に無菌的な環境で飼育しなければなりません。

ともあれ、がん細胞株と移植する宿主マウスが決まったら、一定数のがん細胞を注射器に吸い込んで、通常はマウス下肢の大腿部皮下に注入(移植)します。数日もたつと手でさわってもわかるくらいに腫瘍の組織が大きくなってきます。腫瘍細胞が固まりを形成することからこれを固形腫瘍と呼びます。腫瘍の直径が3~4 mm程度になったら、腫瘍の体積の測定を開始します。そして無処置の対照(コントロールともいいます)のグループと、治療的処置を施すグループに分けます。統計的処理(平均値や有意差検定)のために、各グループは通常5匹のマウスとします。したがって、治療的処置の条件の数が多いとそれだけ

多くのマウスが必要となります。

治療的処置としては、放射線、抗がん剤、温熱などがあります。温熱の場合は、マウスを麻酔薬で眠らせ、板の上に腹ばいに寝かせて手足をガムテープで軽く固定します。腫瘍を移植した下肢は少し引っぱって下向きの板に血流が損なわれない程度にテープで固定し、そのまま大腿部の腫瘍組織が一定の温度の恒温水槽に浸るようにセットします。処置温度は恒温水槽の温度としますが、実際に腫瘍組織の温度を測定すると、0.2~0.5℃低い温度となります。

腫瘍の体積をどのように測定するかというと、腫瘍組織を軽く手でつまんで、ノギス(caliper)という測定器で腫瘍の縦(a)、横(b)、高さ(c)の3つの径を計ります。体積は経験的に次の式で計算します。

$$(\pi/6) \times a \times b \times c$$

これを毎日、または2日に一度計測し、横軸に腫瘍を移植してからの日数、縦軸に腫瘍体積をとってグラフを描くと腫瘍の増殖曲線が得られます(図1)。

(注:楕円体の体積は、正確には $(4\pi/3) \times a \times b \times c$ ですが、実験動物での移植腫瘍の場合は、皮膚の厚さも測定値に含まれることから、経験的にこの式が用いられています。)

この図1において、無処置の対照マウスでは徐々に腫瘍の体積が大きくなっていき、しまいには腫瘍細胞の内臓への転移などによって死にいたりします。途中で(図1では6日目)治療的処置(処置1)をすると、一時的に腫瘍の増殖は抑えられますが、ふたたび腫瘍は大きくなっていきます。これが、ヒトのがんの「再発」に対応し、無処置よりは増殖が遅くなりますが、最終的にはやはり死にいたりします。このときの腫瘍増殖の遅れが処置1の「効果」ということになります。処置1よりもさらに強い処置3(放射線の場合はより高い線量、温度の場合はより高い温度、もしくはより長時間の処置、抗がん剤の場合はより高濃度の薬剤)を施すと、腫瘍は次第に小さくなってしまいには退縮してしまうこともあります。これが完全治癒になります。

次に、処置2について考えてみましょう。処置2は処置1よりも弱い処置の場合に得られる増殖曲線です。しかし、処置1と同じ強さの処置でも処置2の曲

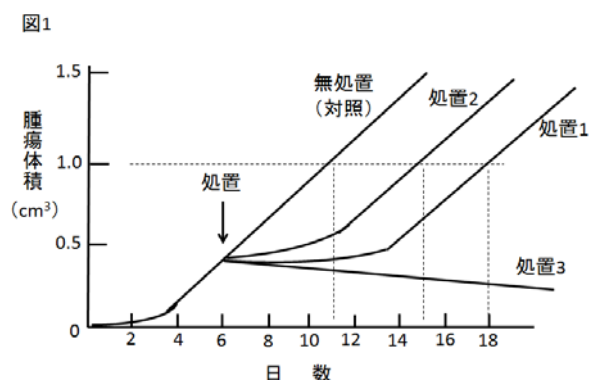


図1 マウスに移植した腫瘍の増殖曲線。無処置(対照)の腫瘍は次第に大きくなっていく。治療的処置(放射線、抗がん剤、熱など)をほどこすと、処置条件によって腫瘍の増殖がさまざまな抑制される。

線が得られることがあります。それは、6 日目の処置 1 の前に、たとえば 5 日目に腫瘍の増殖にはほとんど影響を与えないような弱い処置(前処置)をあらかじめ与えておくと、処置 2 のような曲線が得られます。つまり、処置 1 の効果が減弱したことになります。言い換えると、腫瘍は処置 1 に対して抵抗性になった、または耐性になったことになります。この実験で、処置が「温熱」の場合には「温熱耐性」がが発現したことになります。

移植腫瘍におけるさまざまな処置の効果を定量的に表すには、腫瘍増殖遅延(tumor growth delay, TGD)という値を取ることがあります。たとえば、図 1 では無処置の対照では腫瘍体積が 1 cm^3 になるのに 11 日かかりますが、処置 1 では 18 日かかっています。その差 7 日が処置 1 の増殖遅延効果となります。処置 2 では 15 日なので、4 日の増殖遅延です。処置 3 では増殖遅延が無限大となります。つまり増殖遅延が大きいほど治療効果があることになります。これを図 2 に示しています。このような実験をすることによって、放射線、熱、抗がん剤、またその他のさまざまな処置のがんに対する治療効果を判定する判断材料とします。

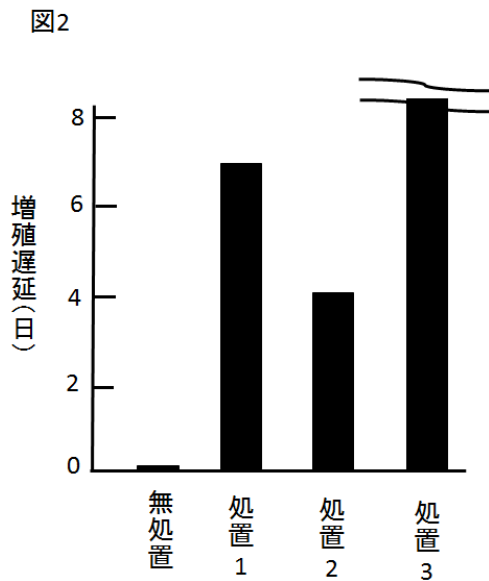


図 2 図 1 で示した各処置(処置 1~3)の増殖遅延効果。無処置の増殖遅延を 0 日とする。増殖遅延の値が大きいほど治療効果があることを意味する。

1-3-2 マウスの移植腫瘍に対する温熱処置の効果

1960 年代の前半、Crile は、マウス移植腫瘍に対する温熱処置のデータから、その後のがん温熱療法の基礎研究にとって重要な結果を報告しています[4]。たとえば、 43°C の温度で 70 分処置するとあるがんは完全に退縮してしまうが、正常組織は若干の障害はあるもののあまり影響を受けないこと、つまり正常組織に比べて腫瘍組織の方が熱に対する感受性が高いことです。 42°C から 46°C の範囲の温度では、温度が 1°C 上がると同じ治療効果を得るのに必要な処置時間が半分ですむこと、つまり、温度が高いほど治療効果が大きいことも見いだしています。また、血流を遮断して温熱処置を施すと、より大きな治療効果が得られることも見えています。さらに、あらかじめ軽い温熱で前処置しておくと、腫瘍組織のみならず正常組織にも温熱耐性が誘導されるという結果を得ています。たとえば、移植腫瘍を 44°C 30 分の加温で 47% の腫瘍が治癒したのに対し、1 日前にあらかじめ 44°C 10 分だけ加温しておくと 44°C 30 分の加温でも 3% の腫瘍しか治癒しませんでした。つまり 44°C 30 分の治療効果が 44°C 10 分という前処置によって減弱したことになります。一方正常組織では、マウスの片方の足を 44°C 90 分加温すると、95% のマウスでその足が障害を受けて失われますが、その 1 日前に 44°C 30 分の軽い加温を与えておくと、 44°C 90 分加温でも足の障害はたった 13% のマウスでしか生じませんでした。このように温熱耐性の現象は早くから知られていました。

さて、1960 年代から 70 年代にかけて多くの研究者が、マウスの移植腫瘍を用いて、温熱単独の効果だけでなく、温熱と放射線との組み合わせや、または温熱と抗がん剤との併用効果、温熱も局所的な加温ではなく、マウスの全身を加温したり、加温方法もお湯ではなく、電磁波による加温法なども開発されるようになり、1980 年代半ばには実際にヒトの腫瘍の治療にも応用されるようになりました[3]。

1-4 培養細胞を用いた研究

放射線や温熱、抗がん剤などは、いずれもがんの

治療が第一の目的の治療方法です。これらの治療的処置による殺細胞効果の詳しいメカニズムを解明することは、より有効な治療法の開発に寄与することになります。そのためにはなるべく単純な実験系で解析を行う必要があります。それが培養細胞を用いた研究です。

ある治療的処置が細胞に対してどのような影響を与えるのかを研究するためには、まず細胞の数を正確に数え、一定数の細胞をシャーレに播き、ある処置によって細胞がどの程度生き残ったのか、または死んだのかを測定しなければなりません。

1-4-1 細胞をどうやって数えるか？

医学生物学分野野研究で使われる培養細胞は、通常、栄養豊富な培養液の入ったシャーレに播き、そのシャーレを 37℃ の恒温槽（湿度は 100%，CO₂ 濃度は 5%）に入れて培養しています。余談になりますが、CO₂ 濃度が空気中では 0.3～0.4% なのに、細胞を培養するときに 5% なのは不思議に思われるかもしれません。これは、体内では細胞の回りの体液や血液の CO₂ 濃度が約 5% になっているからです。つまり体内の環境に近い状態で培養しているのです。

図3

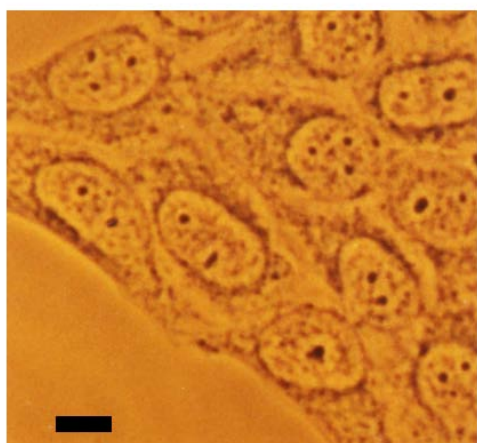


図 3 シャーレで培養した HeLa 細胞（ヒーラーさいぼう、と発音）。位相差顕微鏡で 200 倍の倍率。10 個ほどの細胞が見える。各細胞には丸い形の核が見える。その中の数個の黒く見える斑点が核小体である。黒いバーは 10 ミクロンの長さ(1/100 ミリメートル)。

細胞はシャーレの底にへばりついた状態になっていますが(図 3)、分裂するときには底から少し離れて丸みを帯びた形態になります。細胞の種類にもよりますが、1 個の細胞はだいたい 1 日に 1 回分裂して 2 個となり、倍々で増えていきます。細胞がシャーレー杯近くに増えてきたときには、植え継がなければなりません。そのとき細胞をシャーレからはがすために消化酵素であるトリプシンと Ca²⁺ イオンを除去する EDTA という試薬で数分間処理します。トリプシンは細胞とシャーレの間、および細胞と細胞の間の結合に関わるタンパク質を消化し、EDTA は細胞間結合に必要な Ca²⁺ イオンをキレートして除きます。そのあとピペットで吸ったり吐いたりして(この操作をピペッティングといいます)少し物理的な力を加えて細胞をバラバラにします。この細胞浮遊液の一部は継代用として 1/5 か 1/10 の数の細胞を新しいシャーレに播いて培養していきます。また実験に使うときには細胞数を計測し、必要な細胞数を実験用のシャーレに播きます。なお、細胞をしばらく実験に使わないときには、保存用の培養液と容器に入れて液体窒素中、マイナス 196℃ で凍結保存します。この状態だとほぼ半永久的に保存できます。

ところで、凍結保存といえば、映画「スターウォーズ（エピソード 5）」でハリソン・フォード演ずるハン・ソロが凍結保存され、エピソード 6 で解凍されて無事生き返るシーンがあります。これはあくまで SF の世界の話で現実には不可能です。細胞のレベルでは、培養細胞だけでなく卵子や精子、受精卵なども凍結保存が可能です。多細胞生物を個体のままで凍結し、しばらくしてから解凍して生き返らせることは現在の科学ではできないと考えられています。ただ、アメリカでは将来科学が発達して凍結した個体でも生き返ることができるかもしれないという希望のもと、人体冷凍保存研究所が設立され、すでに 100 体以上の遺体が凍結保存されており、人間の遺体だけでなくペットも数十体凍結保存されているそうです(2016 年 3 月現在, Wikipedia)。しかし、地球上には奇妙な生き物がいるもので、北アメリカ大陸(アメリカ北東部からカナダ全域にかけて)に生息するアメリカアカガエル(Rana

sylvetica, 通称 wood frog) は、冬になると冷凍状態となり、心臓の拍動が止まり、呼吸や血流も完全に停止して冬眠するということです。そして春になって気温が上昇してくると凍結から回復し生き返ることができます。このカエルは気温が下がってくると血液中の尿素やグルコース濃度を高くし、また特殊なタンパク質を分泌して細胞内に氷の結晶ができないようにして、氷結による細胞の破壊を防いでいると考えられています。これが将来、哺乳類にも応用できるようになるかもしれません。

少し横道それてしまいましたが、ここで細胞の数え方を紹介しましょう。シャーレからはがして丸くなった細胞の大きさは直径が約 20 ミクロン(1/50 mm)なのでもちろん肉眼では見えません。液体中に浮遊している粒子状の物体の数を、自動的に計測する装置は

多くのメーカーから発売されています。しかし伝統的にはヘモサイトメータ(血球計算盤)という、もともとは赤血球を数えるスライドガラス状のものを 사용합니다。図 4 に示すように、両側に土手があり、中央部分は土手より 0.1 mm だけ低くなっています。中央部分には 2 か所に目盛りが刻まれており、刻み方にはいくつかの方式があります。よく用いられるのが Burkel-Turk 型で、3 x 3 mm の面積が 12 x 12 の小区画に刻まれています(図 4c)。3 x 3 mm の一番外側の上下左右の辺は 3 本線になっており、中央の線が正確に 3 mm を表します。細胞数を数えるにはまず、カバーガラスを両側の土手に密着させます(図 4a)。つぎに、中央部分と両側の土手との間には溝があるので、そこに細胞浮遊液を流し込みむと目盛りのある部分に細胞が侵入してきます。それを顕微鏡で覗いて 3 mm 四方にある細胞を数えます。数えるときには外側 3 本線の中央の線の内側の細胞を数え、細胞が線上にあるときには、上の線を数えたら下の線上の細胞は除き、右の線上の細胞を数えたら左の線上のものは除きます。1 回に数える細胞数は 3 x 3 mm の中に 50-200 個程度になるようにします。しかし細胞数が多すぎる場合は、もとの細胞浮遊液を希釈してふたたび数えます。また、1 x 1 mm の範囲を数カ所数えて平均値を取ることもあります。ここでもう一つ大事な操作があります。計測する細胞浮遊液にトリパンブルーという色素を少量加えます。この色素は死んだ細胞に入り込んで染めますが、生きた細胞には入らないので、計算盤で数えるときにはトリパンブルーで染色されている細胞(死んだ細胞)は除外します。たとえば、1 x 1 mm の範囲に 35 個の生きている細胞があったとすると、0.1 x 0.1 x 0.01 cm(10⁻⁴ cm³)の中に 35 個なので、1 cm³(ml)に換算すると、35 x 10⁴、つまり 3.5 x 10⁵個/mlとなります。この細胞浮遊液を適度に希釈し、実験用のシャーレに一定数の細胞を播いていきます。これでようやく実験の準備ができたことになります。

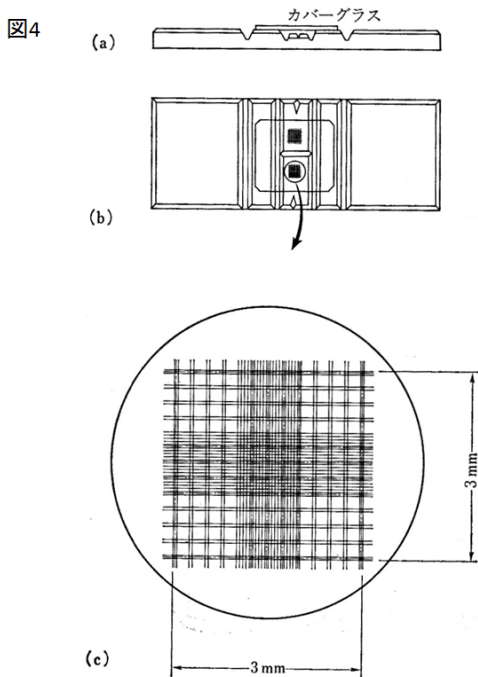


図 4 ヘモサイトメータ(血球計算盤)の見取り図。

(a)横から見た図。中央部分の目盛りのある部分とカバーガラスの間のすき間は 0.1 mm になっている。目盛りのある部分とカバーガラスが乗っている土手の部分の間には溝があり、そこから細胞浮遊液を流し込む。

(b)上から見た図。目盛りは 2 か所に刻まれている。(c)目盛りを拡大した図。この目盛りの範囲に 50~200 個程度の細胞が見えるように細胞浮遊液を調整し、溝から流し込む。

(文献 6 より)

1-4-2 細胞の生死をどのように測定するのか？生きていても死んでいる？

細胞の生死を簡便に判定するには、上で述べたト

リバンブルーなどの色素を使ってもできますが、がん治療に用いる処置(放射線など)によって細胞がどの程度生き残っているのか、または死んだのかを調べるには、細胞が単に機能を持って生きているという指標だけでは不十分です。なぜなら、がん治療にあたっては、腫瘍細胞が増殖能力をもっているかどうかの問題なのであり、たとえ腫瘍細胞が生存していても増殖しなければ宿主にとってはほとんど差し障りありません。つまり、増殖能力を持った細胞がどの程度あるのかことが最も大事なことです。この判定法は、古典的な放射線生物学で明確に定義されており、1 個の細胞が増殖して遺伝的に均一な細胞集団(いわゆるクローン)を形成できる能力を持つ細胞、つまり、**clonogenic**(クローン形成能を持つ)な細胞だけが生きていると見なすわけです。言い換えると、単に生きているだけで増殖できなければ生きていない(死んでいる)と判断することになります[5]。この定義は、あくまでも細胞レベルのことであって、個体レベルでの適用はふさわしくありません。近年日本では、晩婚化、少子高齢化がすすんでおり、子供を持たない人が男

女ともに増えています。研究者仲間では、冗談まじりに「子供を持たない人は死んでいると見なされるよ」と言うことがあります。誤解のないようにお願いします。

たとえば、図 5 に示すように、生きている細胞 100 個をシャーレに播いたとして、1 週間から 2 週間ほど培養すると、個々の細胞は分裂増殖してコロニー(細胞集団)を形成しますが、100 個の細胞すべてがコロニーを形成するわけではありません。たとえば、80 個のコロニーができたとする、コロニー形成率(plating efficiency, PE)が 80%ということになります。このとき顕微鏡で観察して 1 個のコロニーにある細胞の数が 50 個以上の場合を、伝統的にコロニーとして数えることになっています。50 個以上という、1 個の細胞から始まって 5 回以上は分裂していることになります(5 回の分裂で細胞は 32 個になる、 $2^5=32$)。最初に播いた 100 個のうち残り 20 個は全く分裂しなかったか、分裂したとしても 2-3 回程度だったので、死んでいると判定されたこととなります。コロニー形成率 80%というのがこの場合の比較対照のコントロールになりますので、この値を生存率 100%として換算します。

つぎに、治療的処置をするシャーレにはどの程度の細胞を播けばいいのでしょうか。治療的処置によって増殖能を持つ細胞の割合が減少するので、シャーレに 50-100 個程度のコロニーができるように、経験的にある程度予想できるので、最初にそれだけ多くの細胞を播くようにします。図 6 には、ある細胞(NRK 細胞)を 45℃で加温したときの生存率を示してあります(通常、細胞の生存率は、縦軸は対数で表し、横軸は処置の時間や線量、濃度などを表す)。45℃15 分の加温では生存率が約 0.2 になっていますが、これはシャーレに 100 個の細胞を播くと 20 個ほどのコロニーが形成され、1,000 個播くと約 200 個のコロニーが形成されることを表しています(ここではすでに、対照のコロニー形成率を 100%として換算してあります)。また、45℃30 分の加温での生存率が約 1×10^{-2} ですが、これは 100 個の細胞を播いても 1 個ほどしかコロニーが形成されないことを表しています。それだけ細胞が死んだ(増殖能を失った)ということです。また

図5

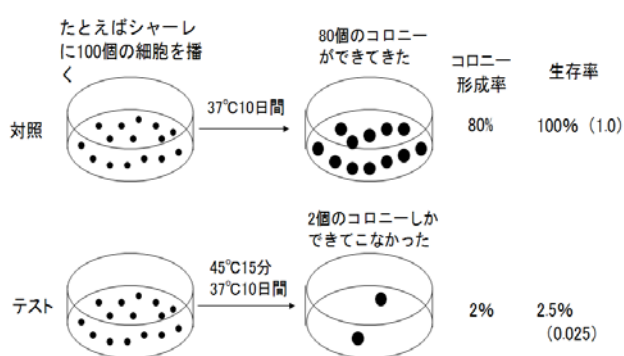


図 5 コロニー形成による細胞生存率の測定方法。例えば細胞 100 個をシャーレにまいて 10 日間ほど培養してコロニー(細胞集団)が 80 個形成されたとする、コロニー形成率は 80%となり、これを対照の生存率 100%(または 1.0)とする。またテストで、45℃15 分処理で 100 個の細胞のうち 2 個しかコロニーが形成されなかったとすると、生存率は 2.5%(0.025)となる。生存率が低くなるような処置の場合は、最初にまく細胞数を多くする。生きていてもコロニーを形成しない(分裂しない)細胞は生存しているとは見なさない。

45℃45 分では生存率が 3×10^{-4} になり, 10,00 個のうち 3 個ほどしか生き残ることができません. このようにして治療的処置の殺細胞効果を調べていきます.

上に述べたコロニー形成能による生存率の測定には手間と時間がかかります. 実際の実験では正確を期すために, グラフの一つの点, たとえば 45℃30 分の加温での生存率が約 5×10^{-4} の場合, シャーレに播く細胞の数を 3 段階に変えてそれぞれ 3 枚ずつのシャーレ(計 9 枚)を用います. そしてコロニーが形成されるまで 1~2 週間培養した後, それぞれのシャーレにあるコロニーを数え, 平均値を求めます. したがって図 6 に示した生存率曲線を 1 本描くのに 39 枚のシャーレ(加温時間 0 のところは 3 枚のシャーレ)が必要になります. 他の条件での生存率曲線を求めるためにはまた同じ枚数のシャーレが必要になります. 実験条件が多くなると 37℃の恒温槽がシャーレでいっぱいになってしまいます. さまざまな実験条件で生存率曲線を求めたいときには恒温槽の大きさ(容量)が実験のネックになることもあります.

このようなことから, 近年では, 簡便な色素法により細胞の生死を判定することが多いようです. 特に, 数多くの化合物について濃度を変えて効果を調べようというスクリーニングでは, 簡便な MTT アッセイがよく

用いられています. これは MTT という黄色のテトラゾリウム塩が代謝的に活性のある(つまり生きている)細胞のなかでフォルマザンという化合物に変換され赤色に発色することを利用したものです. いろいろなメーカーから MTT アッセイ用のキットが発売されています. よく使うのは 96 ウェル(穴)細胞培養プレートで, それぞれのウェル(穴)に一定数の細胞を播いて, さまざまな条件で細胞を処理した後, アッセイ溶液を添加し, 専用の装置を用いて 96 ウェルの吸光度を一斉に測定します. これでスクリーニングの効率が飛躍的に増大します. ただし, この MTT アッセイはあくまでもそのときに細胞が生きているかどうかを判定するものであって, 増殖能まではわかりません. したがって, この MTT アッセイを求めるべき化合物をスクリーニングによっておおまかに目処をつけて選択するのに使い, さらに詳しく調べるときにはコロニー形成能による生存率を求めなければなりません.

ここまで, 温熱療法の若干の歴史と, 実験方法の説明を少し詳しく述べてきましたが, 次からは, 温熱を中心にしたストレスの細胞へのさまざまな影響を見ていきましょう. (2016 年 3 月 31 日脱稿)

引用文献

ルネ・デュボス「健康という幻想」, 紀伊國屋書店, 1964.

Storm FK. (Ed) Hyperthermia in Cancer Therapy, GKH Medical Publishers, 1983.

菅原努, 阿部光幸編著, 「ハイパーサーミア〈癌治療の新しい方法〉」, マグロス出版, 1984.

Crile G. The effect of heat and radiation on cancers implanted the feet of mice. Cancer Res. 23: 372-380, 1963.

Hall EJ.「放射線科医のための放射線生物学第 4 版」, 篠原出版, 1995.

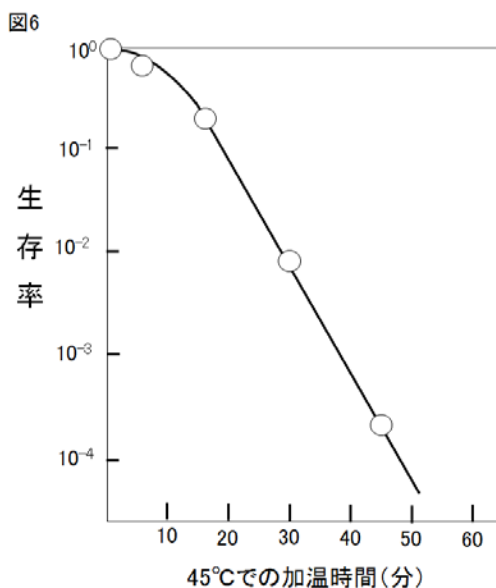


図 6 NRK(normal rat kidney)細胞を 45℃の温度で加温したときの生存率。(文献 7 より改変)

黒田行昭編,「培養細胞遺伝学実験法」,共立出版,
1981.

Ohtsuka K, Liu YC, Kaneda T. Cytoskeletal thermo-
tolerance in NRK cells. *Int. J. Hyperthermia*
9:115-124, 1993.