

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

## 加齢動物モデルの評価系開発に関する研究

1999 年 3 月

主任研究者 田中 慎

国立療養所中部病院長寿医療研究センター共同利用室

平成 10 年度厚生科学研究費補助金

H-10-長寿-118

(長寿科学総合研究事業)

総括研究報告書

研究題目

加齢動物モデルの評価系開発に関する研究

主任研究者

田中 慎

国立療養所中部病院長寿医療研究センター

共同利用室

平成 10 年度厚生科学研究費補助金（長寿科学総合研究事業）  
総括研究報告書

加齢動物モデルの評価系開発に関する研究

主任研究者 田中 慎

国立療養所中部病院長寿医療研究センター共同利用室

研究要旨 加齢動物モデルの評価系開発を目的とし、哺乳動物の副腎皮質にのみ共通する形態学的特徴である層構成に着目し、ラット副腎皮質の加齢変化を組織学的に捕捉し、遺伝学的な解析も加えて加齢モデル動物評価系への組み込みを果たした。

A. 研究目的

哺乳類の加齢動物モデル系に共通する評価系の獲得を目的とし、NIA (National Institute on Aging) の加齢動物育成施設 (Aging Farm : 以下 A/F) より F344/N (F344/NHsd)、BN (BN/BiRijHsd) ならびに (F344/N x BN) hybrid F1 ラットを購入し、哺乳類にのみ共通する形態学的特徴である副腎皮質層構成：「球状層」、「束状層」、「網状層」の変化を、組織学的に、近交系マウス C57BL/6 ならびに C57BL/6J で得ている以下の経時変化、

- 1) 網状層の存続、
- 2) 結合組織の増加、
- 3) 明調細胞の巣状増成の有無、
- 4) 層構成の維持

に注目して月齢横断的に観察し、病理学的診断を加味して利用価値を検討する。系統特性の遺伝背景をも推定し Longevity Sciences ならびに Biomedical Gerontology で実験動物から得られる成果を適正に利用でき

る指標作りに貢献する。

B. 研究方法

F344/N、BN ならびに (F344/N x BN) hybrid F1 ラットは、両性とも① 3-4、② 10-12、③ 20-24、④ 28-32 か月齢の 4 群でそれぞれ 3 例以上ずつ購入し、形態計測学的手法を用いて画像取り込み装置で副腎皮質を比較する。

①と②の間で差を検出出来れば成長/成熟時の変化が、②と③の間では加齢による変化が、③と④の間では老化に依る変化が特定出来ることを期待した。

過量のクロロホルムで動物を屠殺し、両側の副腎を摘出し、秤量して腺萎縮の有無を確認し、腺を長軸に垂直な面でほぼ等割し、Bouin 液で 24 時間以上固定した。水洗後、ピクリン酸の色を 70%エタノールを繰り返し交換して抜き、定法に従ってアルコール系列で脱水し、パラフィンに包埋した。

2 μの連続切片として HE (ヘマト

キシリン、エオジン) 染色を施し、核の集積程度を確認し、異常な明調細胞の出現をモニターした。Azan (Mallory-Heidenhain) 染色で結合組織を染色し、結合組織の動態と層構成維持の程度を確認し、明調細胞の出現と出現部位並びに巣状化との関連を検索した。

## C. 研究結果

### 1. 副腎重量

NIA から購入し、観察に供した何れの系統のラットでも加齢に伴った副腎重量の減少は認められなかった (Table 1, Fig. 1)。

### 2. 皮質層構成

ラットの副腎皮質については、比較動物学的な立場からマウスやマストミスとの比較を目的に観察を行ってきた。Wistar 系の近交系 (WIET) やクローズドコロニー (W/M: Wistar/Mishima)、あるいは SD では 1 年未満の若齢時全く系統差や性差が検出できなかった。NIA から購入した加齢 F344/NHsd (F1/D) でも全く同様であった。F344/NHsd での所見は、NILS と TMIG の A/F で加齢育成している F344/NSlc (F1/A-C、F2/A-C) と同様であった。

1) 網状層の存続: マウスでは 8-12 か月齢までにこの層が消失した。しかしラットでは何れの系統においても 30 か月齢を超えても残存していた (F1/A-D、F2/A-D、F3/A、B、F4/

A、B、F5/A-C、F6/A-D)。

2) 結合組織の増加: マウスでは 8-12 か月齢頃から被膜直下ならびに束状層の内側で結合組織が増加し、加齢とともにより顕著となった。ラットでも 8-12 か月齢以降加齢とともに被膜直下、細胞索間と移行部 (球状層と束状層の間) や境界部 (束状層と網状層の間) ならびに皮髄間で結合組織の若干の増加がみられた (F1/D: 矢印)。

3) 明調細胞の巣状増成の有無: BN と♂の Donryu では 8-12 か月齢頃から細胞内に明るい大型の空胞を伴うものが出現し、加齢とともに巣状に増大した (F3/A: 矢頭)。これと相前後して染色性の異なる細胞集団が層構成を超えて出現した (F4/A: 矢頭)。形態的には網状層の細胞が球状層ないし束状層に迷入しているようにも見えたが、網状層の細胞とは染色性と索配列の形状が異なっていた (参照 F1/B: 矢頭)。空胞を伴う細胞群との間に移行型と推定される細胞も見られたが、完全な連続性を捕捉出来なかった。染色性を異にする細胞とその巣状集団は、BN と (F344/N x BN) hybrid F1 両性の全層 (F4/A: 矢頭、F/5B: 3 群矢印、F6/B: 矢印、F6/C: 3 群矢印) で、大型の空胞を伴う細胞とその巣状集団は、BN 両性の全層 (F3/A、B: 矢頭、F4/B: 矢頭) と (F344/N x BN) hybrid F1 ♀ の網状層に出現した (F6/C と D: 矢頭)。

これら二つの型の細胞集団のうち

空胞型のものは、ごく低い頻度で小さい規模でしか F344/N と(F344/N x BN) hybrid F1♂には出現しなかった (F2/C: 矢印、F5/B と C: 矢印矢頭セット)。

F344/N では空胞を含む細胞が皮質全層 (F2/D: 矢頭で各層を提示) に亘って出現することがある (F2/D)。従前のものとは違って巣状に集積しないことと均等に出現することが特徴である。全例、貧血/黄疸、肝臓/脾臓腫大を伴っているので白血病による修飾とみて区別している。

4) 層構成の維持: C57BL/6 ないし C57BL/6J マウスでは、X 層や網状層が消失した後、加齢とともに結合組織が増加し、層構成が崩壊する。F344/N や Wistar 系のラットではこのような変化が全く生じなかった。しかし BN では、明調細胞の不規則な巣状増成が層構成を崩壊させた (F3/B、F4/B)。この崩壊は、性差をもって、軽度ながら (F344/N x BN) hybrid F1 でもみられた (F4/C、D)。明調細胞の巣状増成の結果として生ずるものとみなせるので、C57BL/6 ならびに C57BL/6J マウスにおけると同様二次的な変化と考えられる。

#### D. 考察

副腎重量についてはマウスで得ている結果 (Table 1) と同様で、一部の家畜で見られたり (ウマ、ウシ: 私信)、加齢変化は腺として委縮を生じ

るといった先入観とは対照的であった。マストミスでは加齢とともに増加するので、げっし目全体の変化とみなすことも出来ない。実験動物での副腎重量の加齢に伴う変化の検索と解釈には注意を要することが明らかとなった。

網状層はマストミスでも残存し、ヒトやこれまでに検索した一部のサル類 (カニクイザルとアカゲザル) でも残存していた。この指標については、マウスよりラットの方が、特に F344/N がヒトに類似しているといえよう。

マストミス、ヒトやこれまでに検索した一部のサル類でも同様で、この指標においてもマウスの特異さが明らかとなった。しかし加齢にともなって緩やかに進行するとされる構成細胞数の減少を補い、腺全体の大きさや構築を維持するように作用するのであれば加齢の特定な相のモデルとして用い得る形質である。

F344/N の副腎皮質では 30 か月齢に達しても性差なく網状層の消失はおろか層構成の崩壊が生じず、結合組織の増加も明確ではない。この点は、ヒトやサル類 (カニクイザルとアカゲザル) と類似している。しかし同じ種で育成された BN では、1 年前後で細胞質が抜けたように明るく見える細胞が巣状に出現する。さらに月齢が進むとこの巣状細胞集団は大きさを増し、層構成の崩壊へと至らせた。BN でも網状層は残存する。BN と類似の変化は、クローズドコロニーの

Donryu (検索は♂のみ) や W/M でも見られる。従ってこれらの所見は、F344/NとBNの間ないしはF344/NとDonryuの間に存在する系統差と判断される。加えて(F344/N x BN) hybrid F1にも同様の変化が性に偏りをもって出現したことからBNでみられた明調細胞の巣状増成は遺伝学的に優性で、単独ではなく複数の遺伝子座の制御下にあり、性による修飾も受けていると推定される。BNとF344/N、何れの変化がラットという種に共通のものか明らかでない。系統間での偏りからはBN型が野生型と推定される。実験動物遺伝学的な推定に準じて優性の形質を野生型とすると、BNないしDonryuが一般的なラットで、F344/Nは多くの劣性遺伝子座を蓄積した特異なラットとなる。この推定は、例えば副腎皮質における形態学的な変化が見かけ上ヒトに類似していたとしても、抑圧条件下での特性を外挿に向けることが危険であることを意味し、F344/Nが加齢モデルとして適切でないことを示唆する。

系統差の背景を解析する定法はメンデルの遺伝の法則に従ったものである。BNとF344/Nの間で交雑実験を行い、Hybrid F1(交雑第一代)、Hybrid F2(交雑第二代)、Backcrosses(戻し交配)で得た個体を加齢させ、BNとF344/N何れの変化を辿るかからどちらの特性が遺伝学的に優性かを決めていく。この交雑実験がいくら有効で必須の過程であっても、時間の経過を早めることは出来ないの、世

界のどの施設を尋ねても実行不可能との判断しか得られないだろう。当然当実験動物施設棟においてもA/Fとの兼ね合いから不可能である。しかしながら偉大な思想の下で運営されているNIAのコントラクトA/FにおいてはHybrid F1まで加齢育成を行っている。ここから加齢個体を購入し、副腎皮質層構成の形態学的変化を、組織ならびに病理学的に、今回は、副腎皮質の層構成に注目し、月齢横断的に観察を進めた。加齢とともに層構成に出現する変化の背後には構成細胞そのものの加齢変化が存在するので今後は細胞構築学的な検討も加えて層構成での変化の解釈の助けとしたい。

これまでに検索したマウスやラットでは、仮定した時期に老化とみなせる明確な変化を捉えることが出来なかった。マウスでは、層構成の崩壊がこれに相当するとみなしてきたが、BNでは異なる過程で同様の変化へ至り、いずれも結合組織の増加あるいは巣状細胞集団の増大といった先行する変化に追随するものと考えられ、老化の指標とするには足りないものと判断された。これは小型げっし目で育成された実験動物が加齢はするものの老化へ至らないか、老化という相そのものがない可能性を示唆する。

実験動物の多くは哺乳動物で育成されている。このため哺乳類にだけ共通する特徴である副腎皮質層構成で経時変化を実験動物で追究した。マウスでは、成長や成熟を終えるとされる月齢までにかんがりの変化を示し、以後

それまでとは異なる相の変化へ至った。一方ラットでは、成長や成熟を終えるとされる月齢までほとんど変化を認めなかったのに対して、この月齢を境に顕著な変化を示す系統があることを見い出した。系統差という制限があるものの、これを利して差の背景解析にも途を拓いた。

実験動物の大多数は癌、特に乳癌と白血病を研究するために開発されてきた。このため高度に先鋭化された近交系始めさまざまなカテゴリーを有する実験動物が開発された。長寿科学を含め別の分野の研究者達は自ら独自の実験動物を開発することなくこれら癌の研究を目指した実験動物を流用してきた。また実験動物の開発に携わった者達は時間に対する十分な配慮を欠いてきた。

副腎皮質層構成の加齢変化から得られた情報は、見かけの特性や慣習に左右されることなく、育成の思想をも認識して実験動物を用い、その主体であるげっし目の利点と欠点を十分に把握して提示し、実験動物の可能性と限界を見極めることの重要性を示した。

#### E. 結論

副腎皮質層構成は、大多数の実験動物が育成されている哺乳動物にだけ共通する形態学的特徴である。この形質は、単に形態学的指標に留まるだけ

でなく、遺伝や内分泌といった個体の情報をも反映し、加齢を研究するうえで重要な時間の違いも反映していた。従って、加齢モデル動物を共通の物差で比較するうえで有用である。しかしながら同時に種、系統ならびに性の違いも感度良く反映するので注意を要する。寧ろ、哺乳動物にだけ共通する特徴であるにも拘わらず、種、系統ならびに性によって極端に修飾を受ける例として動物モデルの限界を視覚に訴えて喧伝するには良い手段となろう。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

形態学、加齢学、遺伝学ないしは実験動物学を扱う雑誌に投稿したいと考えている。

##### 2. 学会発表

第126回日本獣医学会

(江別：1998年)

第127回日本獣医学会

(相模原：1999年)

第128回日本獣医学会

(熊本：1999年)

第22回日本基礎老化学会

(東京：1998年)

第45回日本実験動物学会

(松本：1998年)

第46回日本実験動物学会

(船橋：1999年)

図版の説明 (F1-F6)

F1 : F344/N♂の副腎皮質 (総て 88 倍)

A : 12 か月齢 (Slc/TMIG)

B : 18 か月齢 (Slc/TMIG)

C : 24 か月齢 (Slc/TMIG)

D : 31 か月齢 (Hsd/NIA)

F2 : F344/N♀の副腎皮質 (総て 88 倍)

A : 12 か月齢 (Slc/TMIG)

B : 18 か月齢 (Slc/TMIG)

C : 24 か月齢 (Slc/TMIG)

D : 25 か月齢 (Hsd/NIA) : 白血病

F3 : BN♂の副腎皮質 (総て 88 倍)

A : 13 か月齢 (Hsd/NIA)

B : 30 か月齢 (Hsd/NIA)

F4 : BN♀の副腎皮質 (総て 88 倍)

A : 12 か月齢 (Hsd/NIA)

B : 31 か月齢 (Hsd/NIA)

F5 : (F344/N × BN) hybrid F1♂の副腎皮質 (A と C は 88 倍、B は 35 倍)

A : 12 か月齢 (Hsd/NIA)

B : 32 か月齢 (Hsd/NIA)

C : 32 か月齢 (Hsd/NIA)

F6 : (F344/N × BN) hybrid F1♀の副腎皮質 (A、B、D は 88 倍、C は 35 倍)

A : 12 か月齢 (Hsd/NIA)

B : 24 か月齢 (Hsd/NIA)

C : 31 か月齢 (Hsd/NIA)

D : 31 か月齢 (Hsd/NIA)

略号

g : 球状層、f : 束状層、r : 網状層、M : 髓質、矢印と矢頭 : 本文

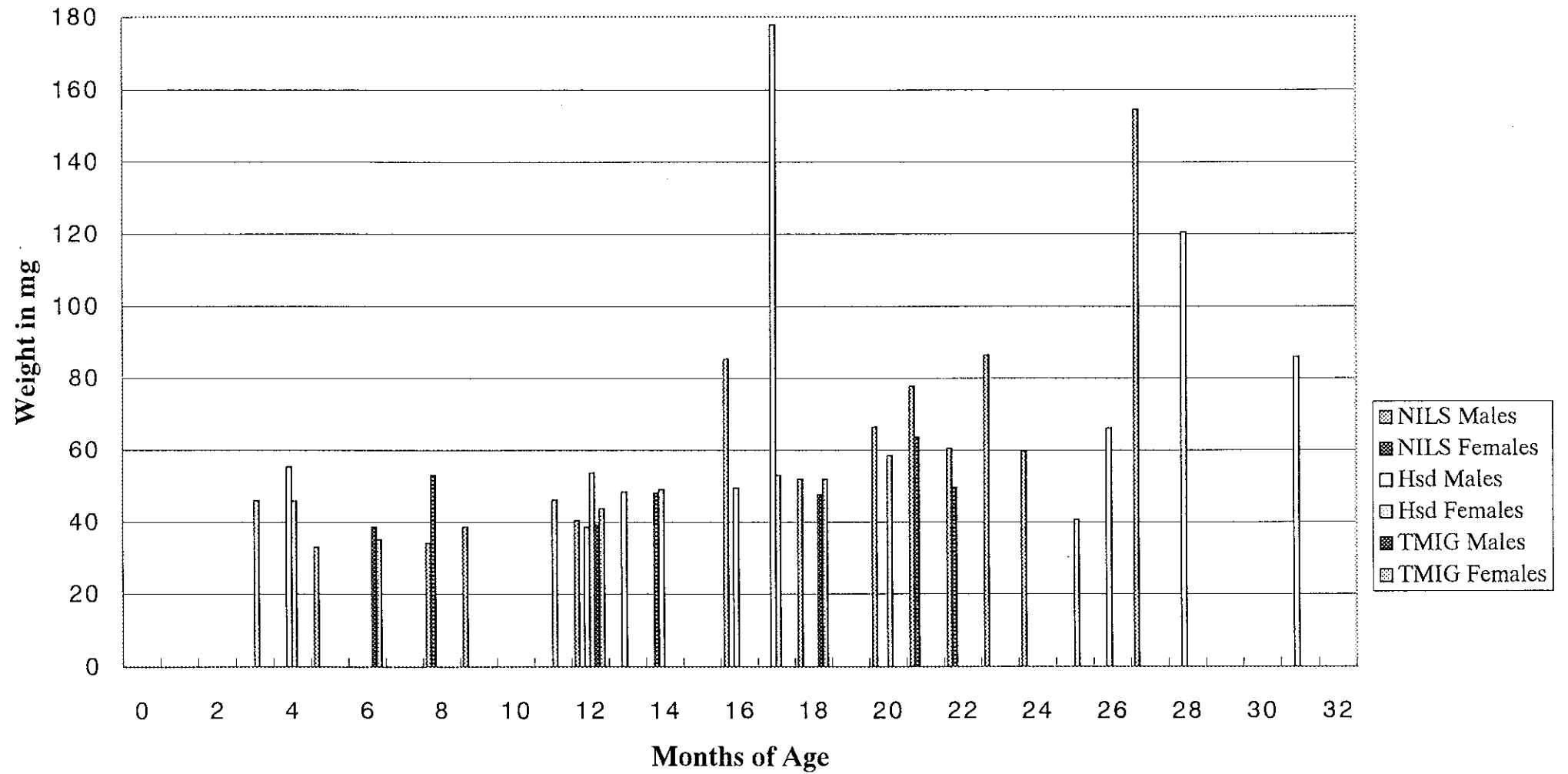


**Table 1. Body and Adrenal Weights in C57BL/6J Mice and BN/BiRij Rats**

|                |             | C57BL/6J     |              | NIA(CRL )     |  |
|----------------|-------------|--------------|--------------|---------------|--|
| months of age  | 2           | 10           | 22           | 26            |  |
| female(n)      | (5)         | (4)          | (5)          | (3)           |  |
| body weight    | 20.92±0.52* | < 23.95±0.12 | = 27.04±2.31 | = 23.36±1.58  |  |
| adrenal weight | 7.4±0.8     | < 9.1±1.2    | = 9.0±2.8    | = 9.3±0.9     |  |
| male(n)        | (3)         | (5)          | (4)          | (4)           |  |
| body weight    | 26.23±1.70  | < 32.92±1.94 | = 33.87±2.12 | = 33.05±2.17  |  |
| adrenal weight | 6.0±1.9     | = 5.9±3.9    | = 4.2±1.2    | = 5.8±2.6     |  |
|                |             | BN/BiRij     |              | NIA(Hsd )     |  |
| months of age  | 4           | 12           | 24           | 28            |  |
| female(n)      | (4)         | (4)          | (4)          | (3)           |  |
| body weight    | 173.3±7.5   | < 196.3±6.7  | < 221.8±8.4  | = 238.2±12.9  |  |
| adrenal weight | 57.3±6.5    | = 56.5±3.4   | = 51.9±4.7   | < 74.4±15.6   |  |
| months of age  | 4           | 10           | 24           | 30            |  |
| male(n)        | (4)         | (4)          | (4)          | (2)           |  |
| body weight    | 289.6±7.4   | < 411.2±15.1 | < 500.7±25.5 | = 467.5±13.1  |  |
| adrenal weight | 46.4±2.0    | < 56.6±5.0   | < 72.3±8.7   | = 550.7±674.4 |  |

\*mean±SD

*NILS-LARF*



**Fig. 1. Adrenal Weights in F344/N Rats**

