

添付資料

H-11-長寿-011 の申請に基づいて長寿科学振興財団により招へいされた、ハンガリー・デブレセン医科大学・老年学教室教授・Imre Zs.-Nagy 博士との当 A/F で繁殖・育成された SAM を用いた共同研究に関わる研究実績報告書（書式 8、1-5 頁）と Research Report（レポート 1-24 頁）を添付する。

(別紙 8)

研究実績報告書

1. 招へいされた外国人研究者
所属・職名 : University Medical School of Debrecen、Professor of Department of Gerontology. (デブレセン医科大学、老年学教室、教授)
氏 名 : Imre Zs.-Nagy MD, Ph. D. (イムレゾルナイナジー 博士)
2. 受入研究者
所属・職名 : 国立療養所中部病院長寿医療研究センター・共同利用室長
氏 名 : 田中 慎
3. 招へい期間
平成12年1月5日～平成12年2月3日 (29日間)
4. 共同研究課題
細胞表面膜の加齢による物理化学的変化の検討…特に加齢促進マウス (SAM) の検討
5. 研究活動の概要
本招へい研究活動は、平成11年度厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)で厚生省に採択された「実験動物の加齢解析、加齢個体育成と新モデル開発に関する研究(H11-長寿-011)」で、国立療養所中部病院長寿医療研究センター・共同利用室長・田中 慎により推薦された研究者に対してなされた。課題中の、実験動物の加齢解析ならびに新モデル開発に各々一部相当する。
1月5日の来日から2月4日の離日までセンター長・木谷健一と共同利用室長・田中 慎と常に意見を交換しながら国立療養所中部病院長寿医療研究センター・実験動物施設棟内に創設されている加齢実験動物育成施設(Aging Farm)で育成された加齢実験動物を用いて研究を遂行した。実験の遂行にあつては長寿科学振興財団のリサーチレジデント、松澤香織博士と実験動物施設棟管理室の支援を、実験結果の統計処理にあつては長寿医療研究センター・疫学研究部の流動研究員、甲田道子博士の支援を受けた。
2月3日には、長寿科学セミナーを開催し、「FRAP Analysis of Liver Cells on Various Strains of SAM」という演題名のもと13名の聴衆を得て研究成果を公表し、討論した。討論はImre Zs.-Nagy博士が主張する膜老化説(Membrane Hypothesis of Aging)の是非論にまで及ぶ活発なものであつた。
滞在期間中学会聴講・発表等の出張はなかつた。
本滞在中に得られた研究成果は、1997年に予備的に行われた研究の成果とともに、J. Gerontology 誌への掲載を求め、投稿規程に沿った原著として投稿する予定である。
6. 共同研究課題の成果

(別紙 8)

本研究の目的は、招へいした Imre Zs.-Nagy 博士が独創的に開発した、細胞膜の機能を測定するシステム、Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 法で Senescence Accelerated Mice (SAM) と称される近交系マウス群の肝細胞を測定し、既に得ている C57BL/6 マウスの結果と比較検討し、SAM の加齢特性を生物学的に捕捉・解析することである。

FRAP 法により肝細胞で検出される膜たんぱく質の側方散乱光での変化が、実験動物の加齢を直接反映しているか否かを確認することや田中が加齢実験動物育成過程 (NILS Aging Farm Project) で得ている生存率との比較をも目的とした。何故なら実験動物の加齢変化は、動物種・系統・性により著しい修飾を受け、結果の解釈を困難にしており、標準化の必要性が指摘されているからである。方法としての FRAP 法の普遍性は、種々の実験動物の肝細胞のみならず、神経細胞や筋細胞でも膜たんぱく質の側方散乱光で加齢変化で個体の経時経過を良く検出して確認を済ませている。

本研究が SAM を対象としたのは、京都大学で開発された一連の SAM 群が通常環境下での飼育とはいえいくつもの他のマウス系統より、種々の異常を伴って短期間で死亡することから老化促進モデルマウスを標榜したことによる。当センターでもこの主張に注目し、SAM 委員会承認の下 Aging Farm の育成開始に遅れること 2 か月で 3 系統の SPF (Specific Pathogen Free) SAM (SAMR1TA、SAMP6/Ta、SAMP8/Ta) 種動物を導入し、自家繁殖しながら生存曲線の取得を含む特性の捕捉と解析を行っている。

SAMR1TA (96♂ : 123♀)、SAMP6/Ta (172♂ : 157♀)、SAMP8/Ta (156♂ : 168♀) で得ている 50% 生存月齢を既報の値と比較すると以下のものであった。

	Males at NILS A/F SPF	Females at NILS A/F SPF	: Published : Conventional
SAMR1TA	20.1	20.0	: (18.9)
SAMP6/Ta	17.1	15.3	: (8.1)
SAMP8/Ta	15.6	14.7	: (10.0)

当センターが導入した種動物は、クリーンアップした武田薬品で亜系化したもので刊行されたものとは飼育条件とともに異なっている。50% 生存率に達した月齢でも当センターの結果では、

SAMR1 > SAMP6 > SAMP8 であるのに対して、京都大学からの刊行では SAMR1 > SAMP8 > SAMP6 であった。

FRAP 法による SAM の解析は、1997 年にも予備的に行われた。'97 年の結果が今回の実験で得られた結果と比肩し得るものか否かの検討も併せて行った。各系統のマウスの月齢を一致させての比較から、前回と今回の結果を一括して扱うことに不足はないと判断されたのでまとめて使用した。

'97 年には 35 例、今回は 80 例の計 115 例の SAM を用いた。内訳は、SAMR1TA (25♂ : 22♀)、SAMP6/Ta (18♂ : 17♀)、SAMP8/Ta (17♂ : 16♀) であった。

115 例の SAM の月齢内訳は、SAMR1TA (♂ : 1.7-26.8 か月、♀ : 1.7-27.0 か月)、SAMP6/Ta (♂ : 2.4-21.7 か月、♀ : 2.7-21.7 か月)、SAMP8/Ta (♂ : 2.4-19.8 か

(別紙 8)

月、♀：2.8-18.4 か月) であった。

SAM3 系統の新鮮肝臓細胞を 2 枚のスライドガラスのフロスト部分に 50 μ 厚で塗抹し、37°C で 1mM の H₂O₂ を含む pH7.2 の Krebs-Henseleit bicarbonate buffer で培養し、いわゆる Peroxide induced autofluorescence (PIAF) で細胞膜蛋白をラベルした。興味深いことに SAM は以前に測定した C57BL/6 より 3-5 倍強い自家蛍光を示した。

カバーガラスをかけて乾燥に因る細胞の死亡を防ぐためパラフィンで周囲を封じた後顕微鏡下で 30-40 個の単独細胞を検出し、各々にレーザービームを照射した。総ての過程は予めプログラムされたコンピューターシステムでモニターした。1 個の細胞で行う一連の操作は、Figure 1 に示された通りで、単独細胞を 25 秒間測定し、これに 1/150 秒間アルゴンレーザービームを照射することで細胞膜に穴を開け、細胞が穴を修復して閉じるのに必要な時間と経過を 100 秒間に渡って測定した。

求め、注目した係数は、側方散乱定数 (D) と分画回収値 (FR%)、両者を乗じた FR% \times D 値であった。

これら 3 係数について得られた総ての結果は、3 SAM 系統の性毎に Table 1 から 6 にまとめた。

FR% \times D 値は、同様に 3 SAM 系統の性毎に Figure 3-8 に回帰直線とともに示した。

Table 7 には SAM3 系統の性毎に Figure 3-8 で得た回帰直線を、 $y = B + Ax$ (ここで x は動物の月齢) に変換し、定数 A と B を算出したものを示した。比較のために C57BL/6 の値も併記した。性毎に系統差も比較した。

C57BL/6 σ^7 : $y = 6.390 - 1.652x$, ♀ : $y = 2.669 - 2.000x$ (単位は $E-10 \text{ cm}^2/\text{sec}$)

SAMR1 σ^7 : $y = 2.843 - 3.312x$, ♀ : $y = 2.793 - 4.474x$

SAMP6 σ^7 : $y = 2.720 - 4.687x$, ♀ : $y = 2.519 - 5.036x$

SAMP8 σ^7 : $y = 2.761 - 4.179x$, ♀ : $y = 2.554 - 4.242x$

C57BL/6 と SAM3 系統の回帰直線を性毎に Figure 9 と 10 に示した。

回帰直線の傾きに当たる A 値は、♂で C57BL/6>SAMR1>SAMP8>SAMP6 の順に、♀で C57BL/6>SAMP8>SAMR1>SAMP6 の順に各々なった。

C57BL/6 で得られた結果は以前に Imre Zs.-Nagy 博士が東京都老人総合研究所 (TMIG) の Aging Farm で育成された個体で測定したものである。当センターの Aging Farm でも TMIG と同じ由来の C57BL/6 を加齢育成しており、50%生存率では♂で 27.9-30.7 か月、♀で 25.4-26.9 か月という結果を得ている。FRAP 法の結果を待つまでもなく C57BL/6 が SAM3 系統が長期に亘って生存できることは確認している。また NILS Aging Farm の病理学的特性捕捉においても C57BL/6 で特徴的に発生するリンパ腫が SAM3 系統ではより早期に且つ致死的に発生することと C57BL/6 ではほとんど見られない (病的) 変化が系統特異的に出現することに注意して生存率との関連に注目している。内容は C57BL/6 のリンパ腫が腹腔内のリンパ節を腫脹させるのに対して、SAMP8 のリンパ腫は胸腔内のリンパ節を腫脹させ、SAMP6 は下痢を伴う大腸肥厚を示し、SAMR1 は卵巣腫瘍や

(別紙 8)

下痢、胸腔内リンパ節の腫脹を示すといったものである。これら SAM3 系統の病理学特性は、これらが C57BL/6 より早期に生存曲線を減衰させていくことを合理的に説明し、SAM では老化が加速化されていることを必ずしも保証していない。SAMP6 の変化が DDD と、SAMP8 と SAMR1 のそれが各々 AKR と A に類似していることに注目している。加えて我々は、マウスに老化という相があるか否かも、これに対する明確な定義・基準・コンセンサスが未だ確立されていないこと基に否定的な立場をとっている。

今回の FRAP 法による解析では、我々が生存率と病理学的解析から得ている性差のない C57BL/6 > SAMR1 > SAMP6 > SAMP8 という順とは異なり、♂で C57BL/6 > SAMR1 > SAMP8 > SAMP6、♀で C57BL/6 > SAMP8 > SAMR1 > SAMP6 の順となり異なる系統差とともに僅かとはいえ性差をも検出した。我々の生存率は以前刊行された SAM の生存率と一致していないのに対して、FRAP 法による♂の結果はこれと一致していた。Imre Zs.-Nagy 博士は、飼育環境が Conventional から SPF へかわったことが重要と指摘した。即ち Conventional では SAMP6 の生存日齢を特異的に強く修飾していた微生物条件等が SPF で改善されたとみなすものであった。しかし飼育環境の中から、特定の系統にだけ感受性を持って作用するような要因を捕捉することは容易ではない。加齢モデルが特定困難な要因で修飾されるとするような考え方は標準化を困難にする。このような複雑な説明より、生存曲線や FRAP 法が何を検出しているのかを特定することの方がはるかに重要であろう。

加齢に対する考え方、特に基準の設定にあっては各々が持論を主張するだけで全く合意に至っていない。げっし目実験動物を用いるグループでも使用系統名・月齢・性の明記を主張する傍ら使用系統をフィッシャーという 1920 年代の米国の一ブリーダーの名で統括するような愚を犯している。加齢実験動物の育成では指導的な立場にある米国の NIA ですら同様な誤りを公式のアニマルリソースカタログで犯している。

我々は、実験動物の加齢変化を、動物の種による特異性は伴うであろうが、系統や性による修飾は取り払われたものと考えている。即ち生存曲線は、種に共通するものは唯一で、これが系統や性により致死に至るような病気で修飾される場合は原因が総て説明できるものでなくてはならないという考えに立っている。このため生存曲線を、加齢実験動物の育成を目指す上で系統や性による修飾を検出するうえで有効な方法と考えている。しかしながら系統や性に修飾されない絶対的な加齢の指標としては浮動性の大きさから十分ではないと考え、相応しい補足的な指標をも求めている。生理学的な指標としての種々の酵素や血清成分や免疫関連成分に加え、肝細胞核の形状や大きさあるいは副腎皮質の層構成といった形態学的な指標にも等しく注目している。このような背景にあつて FRAP 法のような細胞を対象とした物理化学的手法による細胞生理学的な解析法は生理と形態を繋ぐものとして大きな期待をもって見ている。結果として FRAP 法は種々の実験動物種と系統で加齢とパラレルとなっている。加えてその回帰直線上で系統差も検出している。しかしながらこの回帰直線の Y 切片と X 切片が意味するものについては検討が必要である。Y 切片は、生存曲線と同じ

(別紙 8)

く同一種内で一定となることが期せられねばならない。しかしながらここには分散があるため、相対値へ置き換えてから比較することを考慮せねばならない。X 切片は測定した系統に対して特異な生存余命を指すことが期待される。しかしこれも X 軸を相当 Y 軸正方向へ移動させないと具体的な数値としては利用できない。これまでに測定した系統の中で最も回帰直線の傾きが小さかった C57BL/6 を基準として X 軸を移動して X 切片を得れば二つの点で測定行うことで C57BL/6 のほぼ何%の生存能力が期待されるかという指標に利用できるかもしれない。しかしながら確固たる概念を加齢に対して有する研究者が、傍らに Aging Farm を置いて加齢動物の育成が果たされているような環境がないと成果を期待しにくい研究手段であることも明らかである。

今回の SAM を用いた FRAP 法による解析でも、SAM の何が C57BL/6 に比べて短期生存にしているのかとか FRAP 法が検出するものの本体が何であるかについては明らかな答を得ることが出来なかった。すなわち FRAP 法は加齢をモニターするうえで十分な手段ではあるものの必要な手段であるとは結論できないことが示唆された。

特に今回使用した SAM にあって FRAP 法はその特性捕捉において、SAM3 系統の系統差の検出まで成功したものの何故 SAM が C57BL/6 より短い寿命に固定しているのかを考察できるような結果を得ることはできなかった。即ち SAM の特性に関わる背景の解析にまでは踏み込めなかった。生存率と FRAP 法が各々モニターしている本体を特定するにはまだまだデータの蓄積と加齢に対する概念の確立を必要としている。即ち H11-長寿-011 の課題内容でいえば、実験動物の加齢解析では有効な手段であるが、加齢個体の育成や新モデルの開発へ直接貢献する手段というより育成されるか開発された系を評価する手段と位置付けられよう。

実験動物とはいえ、個体レベルで加齢変化を捉え、加齢の研究により広範に貢献できる動物モデル系を開発して、その利用を提唱していくためには多くの指標が測定され、多くの仮説に照らした吟味が繰り返され、より確率の良い系が求められなければならない。この際病理学的な解析を伴って取得された生存曲線を軸に置き、今回の FRAP 法で得た結果を比較したようなスタンスを採ることが重要である。

今回 Imre Zs.-Nagy 博士を招へいし、FRAP 法によって従前の実験動物と同様に SAM を解析できたことで、自然科学の根本的な鉄則である、測定機器を開発した同一の研究者による一貫性のある測定を可能にできた。信頼度の高い測定と測定者との討論は、当センターが得ている生存率との比較検討をも容易にした。何れも再現性の確認された手段ではあったが、能動的に SAM の個性を解析したり、新たな加齢モデル動物系を育成するうえで有効であるというより提唱されたモデル動物系を既存のものと比較したり、評価するうえで有効であると考えられた。

7. 外国人研究者のレポートは別添のとおりです。

RESEARCH REPORT

by

Prof. Dr. Imre Zs.-Nagy

Department of Gerontology (VILEG Hungarian Section),
University of Debrecen, Medical Faculty,
Debrecen, H-4012, Hungary

for the period of 5th January - 3rd February 2000,

spent in the
National Institute for Longevity Sciences (NILS)
Obu-shi, Aichi 474-8522, Japan

as a guest scientist

supported by the grant of the
Japan Foundation for Aging and Health

Obu, 3rd February, 2000.

THE AIMS AND SCOPE OF THE STUDY TRIP

The study trip was organized by Prof. Dr. Kenichi Kitani, (Director General, NILS) and Dr. Shin Tanaka (Chief of LARF-NILS) (in frame of the research project H11-Chouju-011), supported by a grant of the Japan Foundation for Aging and Health, for a period of 1 month. The main purpose of it was to perform further systemic experiments on the age-dependent alterations of the lateral diffusion of membrane proteins in hepatocytes, by means of the fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) technique. Since already in 1997 preliminary experiments were performed on the senescence accelerated mice (SAM) (Takeda et al., 1994), with promisingly interesting results, it seemed to be worth of completing those studies, all the more so, because since that time the NILS-LARF has grown those animals in greater number under SPF conditions at the NILS Aging Farm. The following sub-strains of SAM were examined:

I. SAMR1 subclone of both sexes (25 males and 22 females)

II. SAMP6 subclone of both sexes (18 males and 17 females)

III. SAMP8 subclone of both sexes (17 males and 16 females)

totalling 115 mice. This figure includes the 37 animals studied already in 1997. Because of the nature of these experiments, at maximum 4 animals per day can be examined (supposing 10-12 working hours), therefore, the available working days (21, including Saturdays, of which 2 days were lost at the beginning with the repair of a computer breakdown of the system) of the present study trip had to be and were maximally utilized.

The main question to be answered was whether the SAM subclones, all displaying shorter medium life span than the normal counterparts of mice, and being also of different longevity between each other, will show characteristic differences in the protein lateral mobility of the hepatocyte surface membranes. This question gains a certain significance in the light of our former studies, performed since 1982, always in cooperation with Prof. Dr. K. Kitani, using the same FRAP technique. The main observation was that all rodent species studied so far have shown very strong negative linear age-correlation of the protein (and also lipid) lateral mobilities in liver cells, but also in skeletal muscle and brain cortical cells. Methodological descriptions as well as details of those results can be found in a series of our publications listed in the Appendix of this Report.

SURVIVAL DATA OF THE SENCENCE ACCELERATED MICE (SAM)

SAM mice derive from particular phenotypic selection of AKR/J, with genetic contribution from A, DDD and other mice, as a result of which they display an accelerated aging process. There are numerous types of SAM mice: the less quickly aging type is called "resistant" (SAMR1, SAMR4, etc) where this term indicates only a relatively longer survival as compared to the so-called "aging-prone" types (SAMP1 - 11), which display seriously reduced life spans. Unfortunately, the available published data on the survival times were obtained in conventional animal housing conditions (Takeda et al., 1994), while in SPF animal farms, they show longer survival times. This type of difference in survival is known also for the normal mice and rats.

The following types of SAM mice were available, of various ages per type, of both sexes in the SPF aging farm of the NILS-LARF, displaying the indicated medium life spans for male (M) and female (F) mice (in parentheses, the mean life span data under conventional conditions, are reported, averaged for both sexes published by Takeda et al., 1994).

	M	F		
<u>SAMR1/Ta:</u>	20.1	20.0	(18.9)	months.
<u>SAMP6/Ta:</u>	17.1	15.3	(8.1)	months.
<u>SAMP8/Ta:</u>	15.6	14.7	(10.0)	months.

In any case, all the 3 subclones of SAM animals have a significantly shorter medium life span than the normal C57BL mice reported in the literature (usually approaching or above 30 months).

ON THE NATURE OF PIAF IN SAM MICE

The livers of the above listed animals were removed immediately after decapitation. Two liver smears of 50 micrometer thickness were prepared and incubated at 37°C under Krebs-Henseleit bicarbonate buffer of pH 7.2, containing 1 mM H₂O₂. This resulted in the so-called peroxide induced autofluorescence (PIAF) labeling of the cell membrane proteins. The SAM subclones displayed particularly intense autofluorescence (3-5-times higher intensities could be seen) of this type, as compared to the normal C57BL mice. On the one hand, this fact rendered the FRAP measurements very easy and more noise-free, than usual in normal mice strains, but on the other hand, it represented also some problems as detailed below in this report.

EXPERIMENTAL RESULTS

FRAP measurements were carried out in 30-40 liver cells per animal. The whole process was followed on computer monitor as shown by Figure 1, then the results have been stored in properly organized sequential data files on floppy disks, and printed out also for each cell. Particular interest was dedicated to the lateral diffusion constant of the proteins (D), the fractional recovery value (FR%), and the FR%xD value representing the diffusion constant averaged for all the membrane proteins including the relatively immobile ones, too.

The distribution of the measured D values per animal was evaluated statistically by using a properly constructed computer program. This program was able to show the goodness of fitting of the data to the Gaussian (normal) distribution, and to show eventual results falling out of such a normal distribution: these latter cells have been omitted from the cell population, because they represented most probably cells in early autolysis in which the D values became already unrealistically high. An example of this type of correction is shown on Figure 2. The numbers of omitted cells were in the most cases less than 10 % (Tables 1-6).

The results obtained separately for male and female SAM subclones are listed in Tables 1-6, whereas linear regression analyses of D values are presented in graphic form in Figures 3-8. It is evident from the Figures 3-8 that the average D values of the animals display a strong negative age-correlation in each subclone and sex: as a matter of fact, the correlation coefficients (R) were at least 0.975 or higher. Statistical evaluation summarized in Table 7 revealed that the slopes of all regression lines are very significantly different from zero.

As regards the individual average FR% values, they are usually in the 80-100 % range (Tables 1-6). However, in some cases we obtained also higher than 100 % values, in average up to 109.9 %. This may be due to the very intense development of the PIAF in these animal strains, mentioned above, resulting in a sort of "overlabeling" of the membrane proteins. Even if the development of PIAF intensity seems to be finished, as shown by the stability of the fluorescence during the observation period (Figure 1), sometimes it may apparently be restarted under the effect of the bleaching impulse. In any case, this fact should be considered if one is going to analyze further SAM animals.

At last, Figures 9 and 10 compare the regression lines of various subclones in a graphic way, whereas Table 7 gives also the significance levels of a pairwise comparison by means of the Student's "t" test. These analyses revealed that the age-dependent decay of the lateral diffusion constant of proteins in the hepatocyte plasma membrane is of different speed in various mouse strains. The most important differences can be summarized as follows:

1. All the three SAM subclones display a faster age-dependent decay rate of D , than the respective sex of the normal C57BL/6 mice (Table 7, Figures 9 and 10).

2. Among the SAM subclones, the longer surviving SAMR1 shows less steep age-dependent decay, than the shorter surviving SAMP6 and SAMP8 in the males, but not in females (Table 7, Figures 9 and 10).

3. There are significant differences in both the absolute values and also in the decay rates between the SAMP6 and SAMP8 subclones in both sexes (Table 7, Figures 9 and 10). It should be noted, however, that these differences between the SAMP6 and SAMP8 subclones better correspond to the medium life span differences of these mice under conventional conditions, i.e., when the SAMP8 animals survived somewhat longer, whereas under SPF conditions of NILS-LARF, both subclones displayed considerably longer survivals and these differences tended to disappear, or became slightly more favorable for the SAMP6 subclone (see page 3 of this Report).

INTERPRETATION OF THE RESULTS

The author of this Report interprets these data in terms of the membrane hypothesis of aging (MHA) (Zs.-Nagy, 1994), in spite of the criticism expressed during the recent years against this interpretation by Professor K. Kitani. The last paper of Kitani (1999) listed his arguments regarding the age dependent decline of the enzyme activities (measured in test-tubes), and he claims that because not all enzyme activities decrease with aging, "... the interpretation of our FRAP studies must be limited and should not be extrapolated to support the MHA" (Kitani, 1999, p. 319).

The disagreement of the Author of this Report with the cited statements of Kitani (1999) are based very briefly on the following facts:

(text continued on page 20)

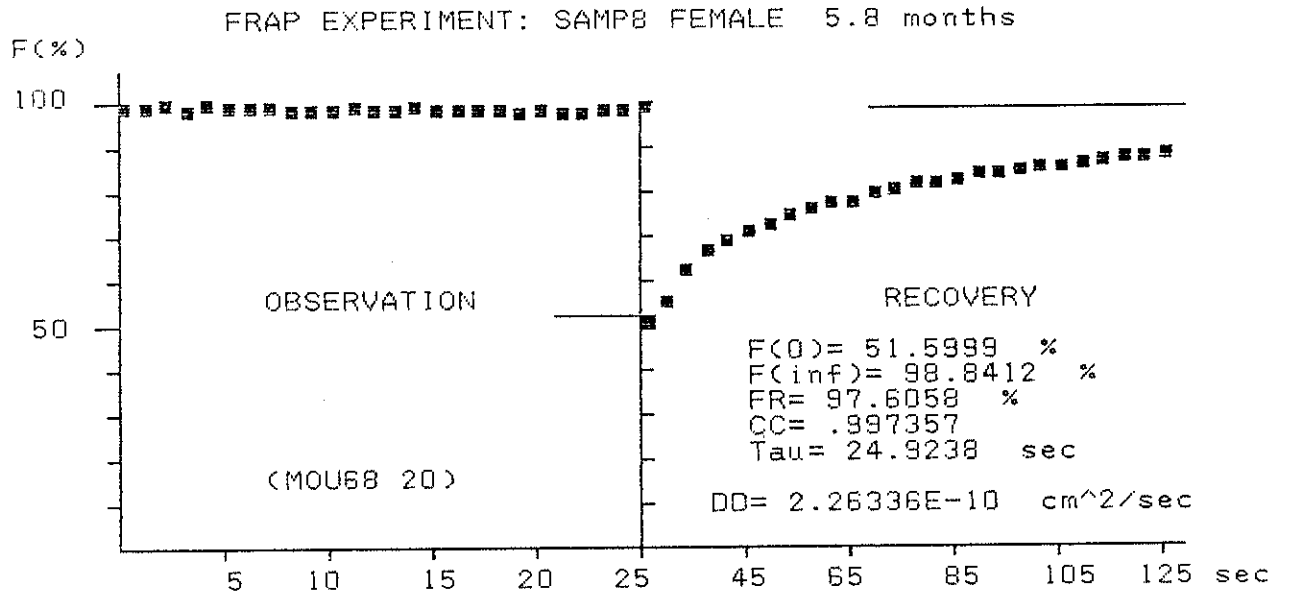


Figure 1. Demonstration of the FRAP measurement as seen on the computer screen. A 25 second observation of the fluorescence is followed by the bleaching impulse, then by the recovery period of 100 second. The most relevant calculated parameters are printed out below the recovery curve, where $F(0)$ = fluorescence at zero postbleach time, $F(\text{inf})$ = the reached maximum recovery value, FR = the fractional recovery %, CC = the correlation coefficient of the fitting the curve to the reciprocal equation, Tau = the computed characteristic diffusion time, DD = the protein diffusion constant as a mean of two different ways of calculation.

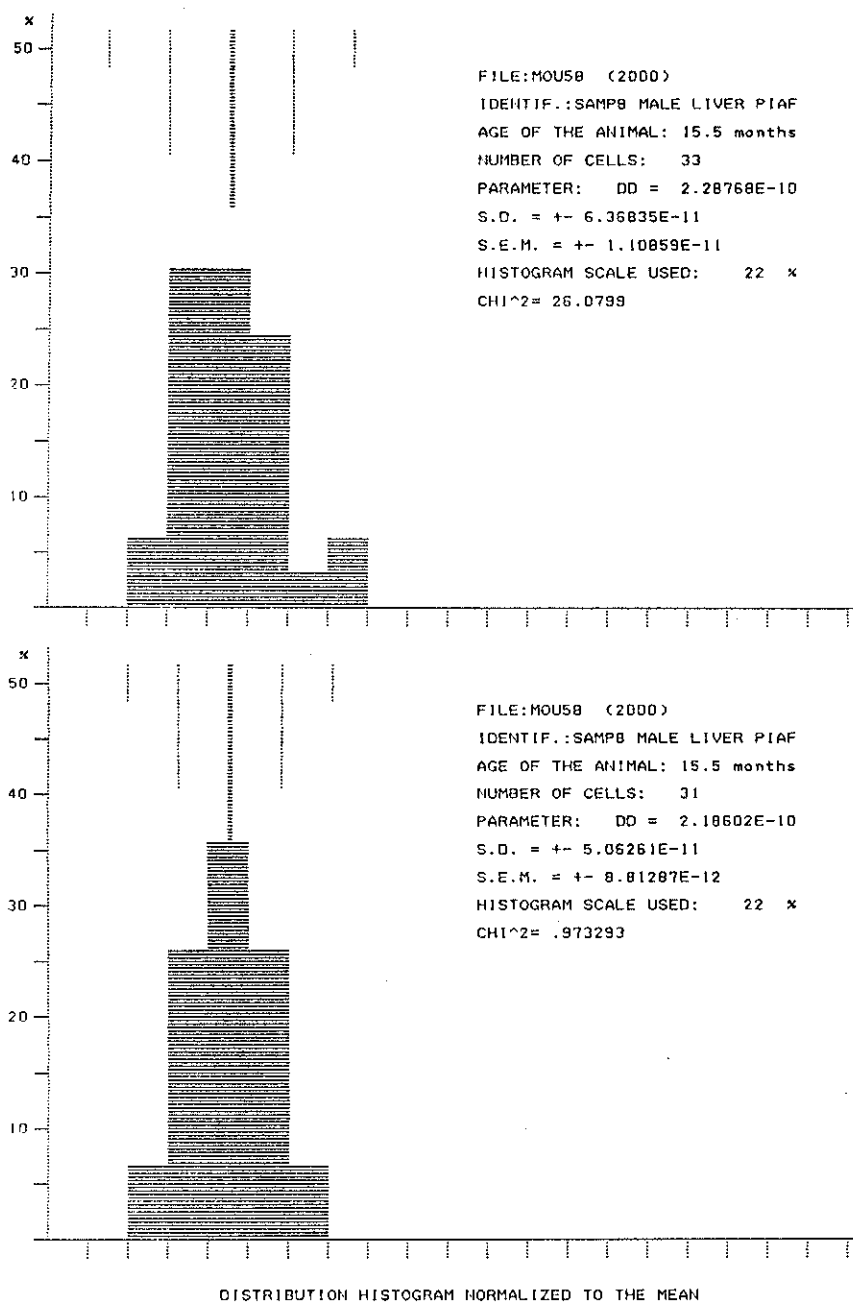


Figure 2. Demonstration of the distribution analysis of the values of D obtained in one animal. The upper part shows the rough histogram normalized to the mean (± 2 S.D.) in which 2 cells are out of the normal distribution at the right side ($CHI^2= 26.0799$), while the lower part is the histogram after the omission of those 2 cells ($CHI^2= 0.973293$). The changes in the goodness of fitting are not always so dramatic, but if CHI^2 value falls below 6.5, one can accept the fitting the Gaussian distribution. This analysis proved to be very helpful.

Table 1
 INDIVIDUAL AVERAGES (\pm S.D.) OF D, FR% and DXFR MEASURED IN THE LIVER
 OF MALE SAMR1/Ta MICE BY PIAF

Gen. number	Age (months)	D ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)	Number of cells/omitted	FR %	FRxD ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)
F102	1.7	2.8628 \pm 0.7809	34/2	85.78 \pm 12.74	2.4685 \pm 0.7965
F102	1.7	2.6298 \pm 0.6124	29/1	92.71 \pm 19.60	2.4658 \pm 0.8713
\$ F91	2.3	2.7598 \pm 0.7458	33/2	96.45 \pm 19.63	2.6179 \pm 0.7483
\$ F91	2.3	2.8348 \pm 0.6682	37/3	89.48 \pm 18.69	2.5045 \pm 0.6999
\$ F91	2.3	2.7538 \pm 0.6913	35/3	89.21 \pm 18.15	2.4379 \pm 0.7245
\$ F91	2.3	2.7788 \pm 0.7731	35/3	91.44 \pm 18.57	2.4879 \pm 0.7117
\$ F91	2.3	2.7901 \pm 0.7592	36/2	89.87 \pm 17.74	2.4555 \pm 0.6664
F103	2.9	2.7806 \pm 0.6298	34/1	90.44 \pm 13.16	2.4853 \pm 0.5870
F103	2.9	2.8034 \pm 0.6977	33/1	101.4 \pm 16.43	2.7973 \pm 0.6616
F102	3.2	2.6593 \pm 0.5415	31/1	103.3 \pm 7.47	2.7288 \pm 0.5129
F102	3.2	2.7283 \pm 0.7988	33/1	89.36 \pm 17.59	2.3726 \pm 0.7069
\$ F89	8.2	2.5352 \pm 0.7736	38/2	97.10 \pm 21.45	2.3727 \pm 0.6933
\$ F89	8.2	2.6049 \pm 0.6255	39/1	92.83 \pm 14.99	2.3760 \pm 0.5568
\$ F89	8.2	2.5811 \pm 0.8406	38/2	93.14 \pm 13.17	2.3636 \pm 0.7270
F99	12.9	2.4624 \pm 0.6375	33/2	102.2 \pm 18.11	2.5183 \pm 0.7872
F99	12.9	2.3891 \pm 0.6704	33/3	96.21 \pm 22.50	2.3436 \pm 0.8820
F99	12.9	2.2917 \pm 0.5810	33/3	109.9 \pm 15.21	2.5426 \pm 0.7807
F99	12.9	2.5000 \pm 0.7364	31/3	101.9 \pm 17.73	2.5594 \pm 0.8287
F98	17.7	2.2493 \pm 0.6647	33/0	103.3 \pm 14.73	2.3147 \pm 0.6912
F98	17.7	2.2648 \pm 0.5122	33/2	98.19 \pm 12.73	2.2350 \pm 0.5879
F98	17.7	2.2637 \pm 0.5087	33/2	102.8 \pm 11.69	2.2998 \pm 0.4372
F93	26.1	1.9584 \pm 0.4564	33/2	97.50 \pm 18.75	1.8628 \pm 0.4224
F94	26.7	1.9708 \pm 0.5458	33/2	103.0 \pm 12.52	2.0418 \pm 0.6381
F94	26.7	1.9884 \pm 0.4904	33/2	101.2 \pm 12.62	1.9730 \pm 0.3792
F93	26.8	1.9349 \pm 0.4972	33/2	87.32 \pm 21.20	1.6715 \pm 0.5688

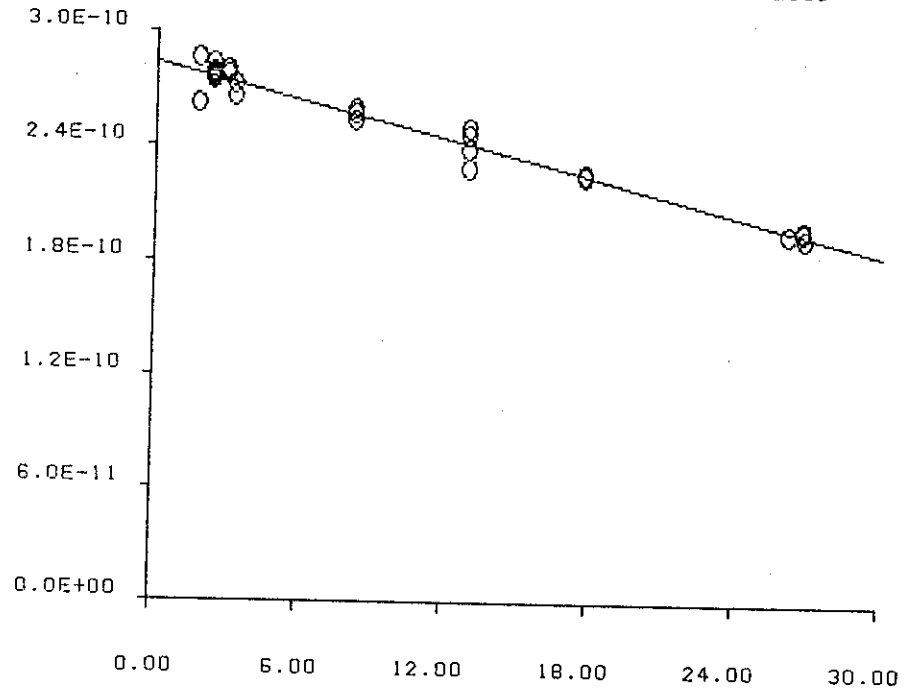
Note: \$ indicates mice analyzed in 1997.

Table 2
 INDIVIDUAL AVERAGES (+ S.D.) OF D, FR% and DxFR MEASURED IN THE LIVER
 OF FEMALE SAMR1/TA MICE BY PIAF

Gen. number	Age (months)	D ($\times 1E-10$) (cm ² /sec)	Number of cells/omitted	FR %	FRxD ($\times 1E-10$) (cm ² /sec)
F102	1.7	2.7944 + 0.6193	32/3	101.2 + 9.90	2.8388 + 0.6974
F102	1.7	2.8191 + 0.7208	26/5	85.22 + 20.81	2.3727 + 0.8017
\$ F91	2.7	2.6162 + 0.6172	38/2	95.92 + 14.56	2.5216 + 0.7204
\$ F91	2.7	2.5960 + 0.7521	37/3	92.46 + 17.43	2.3960 + 0.8108
\$ F91	2.7	2.6443 + 0.6664	36/4	96.18 + 18.36	2.5540 + 0.7894
F103	2.9	2.7494 + 0.5733	33/2	89.92 + 15.46	2.4682 + 0.7058
F103	2.9	2.6934 + 0.6406	33/1	92.65 + 15.23	2.4393 + 0.5039
F102	3.2	2.6571 + 0.5834	34/1	96.49 + 17.00	2.5844 + 0.7294
F102	3.2	2.5158 + 0.6137	33/1	90.00 + 14.34	2.2461 + 0.5825
\$ F89	8.5	2.4180 + 0.6698	36/4	101.5 + 15.16	2.4004 + 0.5939
\$ F89	8.5	2.4442 + 0.6981	37/3	95.19 + 12.60	2.3192 + 0.6981
\$ F89	8.5	2.3994 + 0.6293	39/1	89.52 + 16.65	2.1312 + 0.6564
F99	12.9	2.2727 + 0.6789	33/1	93.78 + 18.76	2.0996 + 0.6861
F99	12.9	2.1364 + 0.5013	35/0	99.69 + 18.61	2.1262 + 0.6266
F99	12.9	2.2207 + 0.6867	33/2	100.6 + 23.06	2.2060 + 0.7763
F99	12.9	2.1741 + 0.4835	33/2	93.48 + 18.58	2.0170 + 0.5519
F98	17.7	1.8504 + 0.5065	33/2	94.13 + 27.27	1.7298 + 0.6640
F98	17.7	1.9137 + 0.5791	33/2	95.65 + 18.42	1.7965 + 0.5573
F98	17.7	2.0497 + 0.4212	33/1	103.5 + 10.39	2.1062 + 0.4026
F98	17.7	2.1794 + 0.6099	33/3	98.26 + 12.95	2.1358 + 0.6477
F94	27.0	1.5325 + 0.4118	33/2	107.8 + 19.32	1.6302 + 0.5184
F94	27.0	1.6718 + 0.3461	34/3	92.97 + 17.20	1.5472 + 0.4173

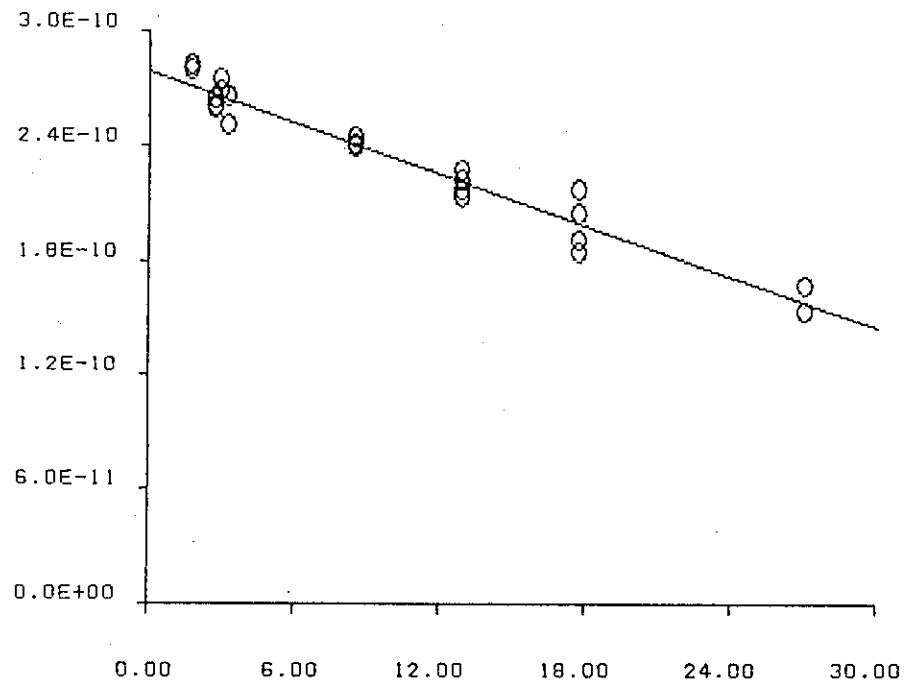
Note: \$ indicates mice analyzed in 1997.

NAME OF THE EXPERIMENT: LIVER PIAF SAMRIMALE NILS 2000



A=-3.3123E-12 B= 2.8431E-10 R=-.98256

NAME OF THE EXPERIMENT: LIVER PIAF SAMRIFEM NILS 2000



A=-4.47373E-12 B= 2.79279E-10 R=-.975004

Figures 3-4. The age-correlation of D values in male (upper part) and female (lower part) of SAMR1 mice. A= the slope, B= the intercept point, R= the correlation coefficient of the linear regression analysis. Detailed numerical data can be found in Tables 1-2, and 7 respectively.

Table 3
 INDIVIDUAL AVERAGES (\pm S.D.) OF D, FR% and DxFR MEASURED IN THE LIVER
 OF MALE SAMP6/TA MICE BY PIAF

Gen. number	Age (months)	D ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)	Number of cells/omitted	FR %	FRxD ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)
\$ F91	2.4	2.5831 \pm 0.8161	38/2	91.71 \pm 21.63	2.2882 \pm 0.7059
\$ F91	2.4	2.6210 \pm 0.6887	39/1	92.89 \pm 21.39	2.3793 \pm 0.6728
\$ F91	2.4	2.6046 \pm 0.7270	37/3	92.19 \pm 14.28	2.3598 \pm 0.6144
\$ F91	2.4	2.6264 \pm 0.6452	40/0	88.55 \pm 17.93	2.3577 \pm 0.8225
F100	7.0	2.3827 \pm 0.6374	33/3	98.17 \pm 19.45	2.3054 \pm 0.7664
F100	7.0	2.3231 \pm 0.5751	33/2	96.34 \pm 15.84	2.2582 \pm 0.6637
F100	7.0	2.4981 \pm 0.7227	33/3	99.03 \pm 19.75	2.4924 \pm 0.8433
F100	7.0	2.3852 \pm 0.7003	33/1	102.7 \pm 13.30	2.4498 \pm 0.7381
\$ F89	8.7	2.3133 \pm 0.6437	39/1	98.24 \pm 14.87	2.2142 \pm 0.5270
\$ F89	8.7	2.2787 \pm 0.6341	38/2	95.65 \pm 14.09	2.1205 \pm 0.5013
F97	14.6	2.0633 \pm 0.5150	33/1	98.69 \pm 9.36	2.0211 \pm 0.4713
F97	14.6	1.9922 \pm 0.5805	33/3	108.3 \pm 16.04	2.1284 \pm 0.6246
F97	14.6	1.9834 \pm 0.5936	33/2	103.2 \pm 20.07	2.0244 \pm 0.6214
F97	14.6	2.0983 \pm 0.4498	33/2	93.82 \pm 18.21	1.9412 \pm 0.4728
F96	21.7	1.6650 \pm 0.4330	33/3	108.0 \pm 14.92	1.7662 \pm 0.3947
F96	21.7	1.6956 \pm 0.3799	33/3	105.7 \pm 17.55	1.7913 \pm 0.4513
F96	21.7	1.7097 \pm 0.4102	33/3	102.9 \pm 14.30	1.7359 \pm 0.3757
F96	21.7	1.7480 \pm 0.3477	33/3	85.98 \pm 18.91	1.4883 \pm 0.3941

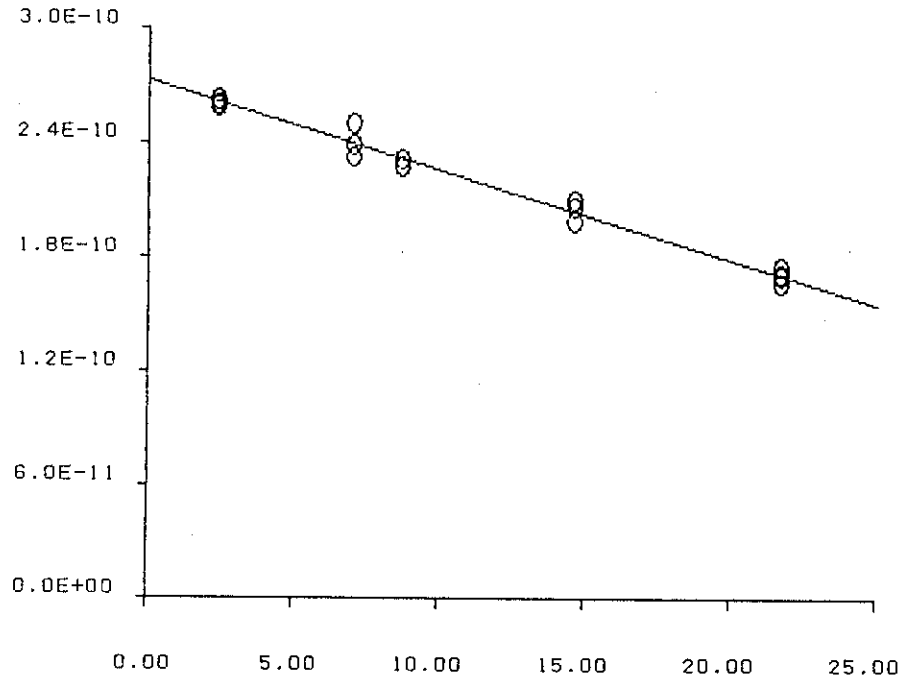
Note: \$ indicates mice analyzed in 1997.

Table 4
 INDIVIDUAL AVERAGES (+ S.D.) OF D, FR% and DXFR MEASURED IN THE LIVER
 OF FEMALE SAMP6/TA MICE BY PIAF

Gen. number	Age (months)	D ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)	Number of cells/omitted	FR %	FRxD ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)
\$ F91	2.7	2.3937 ± 0.7345	38/2	94.98 ± 18.90	2.1999 ± 0.6211
\$ F91	2.7	2.4328 ± 0.5798	36/4	94.81 ± 11.16	2.2996 ± 0.5677
\$ F91	2.7	2.3523 ± 0.7028	38/2	92.47 ± 16.64	2.1425 ± 0.6875
F100	6.9	2.1272 ± 0.5134	33/2	106.2 ± 13.47	2.2541 ± 0.5548
F100	6.9	2.1684 ± 0.5716	33/2	92.41 ± 16.95	2.0264 ± 0.6455
F100	6.9	2.2539 ± 0.5499	33/1	97.30 ± 21.07	2.1717 ± 0.6721
F100	6.9	2.1420 ± 0.6007	33/2	95.56 ± 21.60	2.0165 ± 0.6666
\$ F89	9.0	2.0583 ± 0.5554	38/2	93.17 ± 20.91	1.8708 ± 0.5417
\$ F89	9.0	2.0248 ± 0.5142	38/2	98.79 ± 16.78	1.9454 ± 0.3887
\$ F89	9.0	2.0938 ± 0.6239	38/2	98.77 ± 19.50	2.0031 ± 0.5595
F97	14.6	1.6416 ± 0.4762	33/2	103.4 ± 20.87	1.6755 ± 0.5418
F97	14.6	1.7791 ± 0.4622	33/1	105.0 ± 14.71	1.8485 ± 0.4749
F97	14.6	1.7428 ± 0.3948	33/3	100.5 ± 16.70	1.7447 ± 0.4758
F97	14.6	1.9241 ± 0.4390	33/3	97.07 ± 17.82	1.8558 ± 0.4747
F96	21.7	1.4864 ± 0.4087	33/2	101.6 ± 25.29	1.4644 ± 0.4100
F96	21.7	1.4634 ± 0.2905	37/0	107.1 ± 27.12	1.5168 ± 0.3371
F96	21.7	1.3661 ± 0.3900	31/0	92.02 ± 24.09	1.2560 ± 0.4674

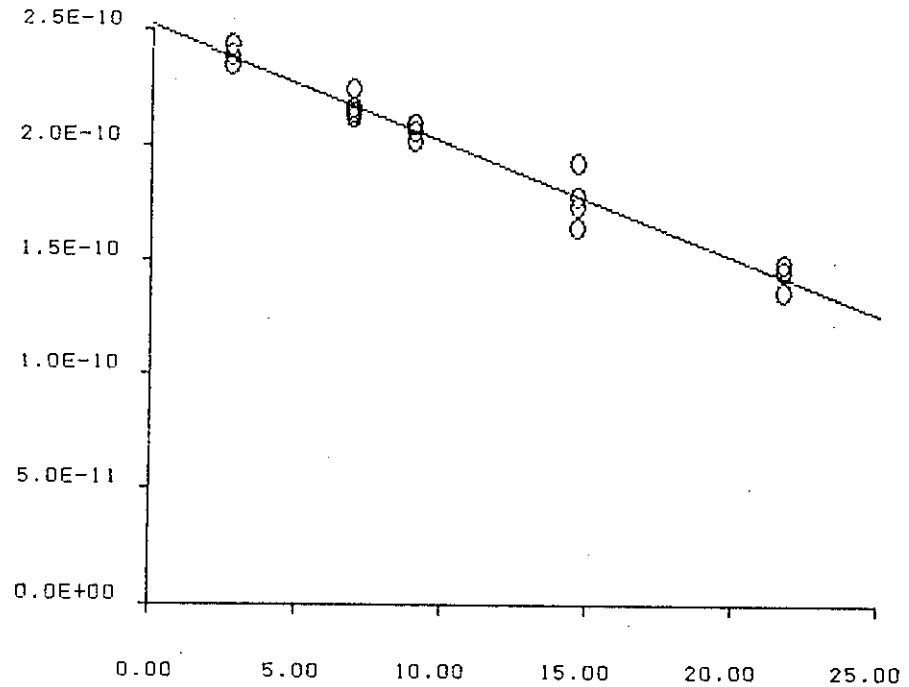
Note: \$ indicates mice analyzed in 1997.

NAME OF THE EXPERIMENT: LIVER PIAF SAMP6MALE NILS 2000



A=-4.68738E-12 B= 2.71977E-10 R=-.992006

NAME OF THE EXPERIMENT: LIVER PIAF SAMP6FEM NILS 2000



A=-5.03585E-12 B= 2.51926E-10 R=-.981452

Figures 5-6. The age-correlation of D values in male (upper part) and female (lower part) of SAMP6 mice. A= the slope, B= the intercept point, R= the correlation coefficient of the linear regression analysis. Detailed numerical data can be found in Tables 3-4, and 7 respectively.

Table 5
 INDIVIDUAL AVERAGES (+ S.D.) OF D, FR% and DXFR MEASURED IN THE LIVER
 OF MALE SAMP8/Ta MICE BY PIAF

Gen. number	Age (months)	D ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)	Number of cells/omitted	FR %	FRxD ($\times 10^{-10}$) (cm ² /sec)
\$ F96	2.4	2.6258 + 0.6778	37/1	86.66 + 20.73	2.2250 + 0.6785
\$ F96	2.4	2.7488 + 0.7405	37/3	102.9 + 15.33	2.8043 + 0.8073
\$ F96	2.4	2.6652 + 0.8630	39/1	98.74 + 11.21	2.5946 + 0.7686
F107	5.6	2.5101 + 0.5928	33/1	90.52 + 22.23	2.2085 + 0.5706
F107	5.6	2.5123 + 0.6492	33/1	93.53 + 20.57	2.3106 + 0.6936
F107	5.6	2.4544 + 0.6801	36/0	103.7 + 11.09	2.5593 + 0.7772
F107	5.6	2.5634 + 0.6023	33/2	93.69 + 19.61	2.4380 + 0.7876
\$ F95	8.2	2.4047 + 0.5798	38/2	102.8 + 19.09	2.4117 + 0.5499
\$ F95	8.2	2.4089 + 0.7475	39/1	94.02 + 22.39	2.1823 + 0.6595
\$ F95	8.2	2.4562 + 0.6769	38/2	92.01 + 18.28	2.2198 + 0.6587
F106	13.6	2.2127 + 0.5897	33/1	102.2 + 17.33	2.2487 + 0.6878
F106	13.6	2.1286 + 0.5874	33/1	91.98 + 15.04	1.9496 + 0.5651
F104	15.5	2.0526 + 0.3844	32/0	98.87 + 11.40	2.0237 + 0.3725
F104	15.5	2.1860 + 0.5063	33/2	99.11 + 20.27	2.2005 + 0.7330
F103	19.7	1.9285 + 0.5776	33/3	99.01 + 20.87	1.9096 + 0.6760
F103	19.8	1.9366 + 0.4879	33/1	109.1 + 18.81	2.1141 + 0.6177
F103	19.8	1.9663 + 0.4344	33/1	108.5 + 12.87	2.1030 + 0.3949

Note: \$ indicates mice analyzed in 1997.