

厚生科学研究研究費補助金

長寿科学総合研究事業

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

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 田中 愼

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告

田中 慎

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

### II. 研究成果の刊行に関する一覧表

### III. 研究成果の刊行物・別刷

### IV. 添付資料

# I. 総括研究報告

田中 慎

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

平成12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

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

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 長寿科学を研究レベル推進するうえで欠くことのできない有用な加齢モデル動物の有効な開発を目的に加齢個体を育成し、生存率を指標として比較する系の確立を試みた。ラットやマウスといった実験動物では生存率が系統差を明確に検出し、加齢過程で生じる系統に特異的（specific）な変化が疾病によって大きく修飾されることを明らかにした。特にラットでは亜系統間マイクロサテライトマーカーでも検出できない差を指摘した。白血病の遺伝背景を抛り所に亜系統の派生に伴う特性の変化として過程を推定し、commonからspecificへの細分を説明した。哺乳動物の副腎皮質にのみ共通（common）する形態学的特徴である層構成では明瞭な系統差と亜系統差をラットで認め、種・系統・性の違いを検出するには有効と考えられた。

限られた系統数ではあるが、長寿科学研究で頻用されるいわゆる“F344”においては亜系統を詳細に検討し、加齢特性の情報も整理し、使用にあたっての注意や利便性をcommonないしspecificに指摘し、注意を喚起した。加えて肺でラットに共通する可能性とヒトへの外挿（common）に期待が持てる加齢変化を捕捉し、実験動物を加齢育成することが新たな加齢モデル系の開発に貢献できる途を拓いた。

A. 研究目的

長寿科学分野で研究を推進し、加齢の実態と機構を知り、解明していくうえで、  
動物モデル系は、

1) 個体を扱う

2) 実験的な証明を行なえる

といった点から必須のアイテムである。しかし長寿科学分野では、必ずしも適正な動物モデル系が育成され、利用されているとはいえない。

本研究は、寿命の短さを利用し、小型げっし目で育成された実験動物を対象に、生存率を指標として、

- i) 実験動物の加齢過程の特定、
- ii) 加齢個体の育成、

と

iii) 新しい動物モデル系の開発に関する研究に取り組む。

得られた結果を common (指標についてヒトとあるいは大きい集団と共通) のものと specific (指標について系に特異) のものに分け、長寿科学に適し、資する確率がより高い動物モデル系を推奨し、標準化と外挿に対応できる系の特定と開発を試みた。

小型げっし目を中心とした実験動物は、研究での利便性が高いとはいえ種の障壁が大きい。ハツカネズミとドブネズミからそれぞれ実験動物とされたマウスやラットで高度な遺伝学的ならびに微生物学的統御の下で育成された近交系は、20 世代の兄妹交配を経て、99.6%の遺伝子座をホモ接合とすることで個体間の遺伝的ばらつきがない(遺伝学的統御)ようにされており、現時点の手段では検出できる微生物叢を全く有さない(微生物学的統御)動物の作出に到達している。このため種々の変化は、遺伝制御の下にあればあるほど、飼育環境の微生物統御が高ければ高いだけ(無菌動物は必ずしもこの限りではないが)再現性良く、差がクリアカットに捕捉出来、系統特性として認識出来るようになってくる。

しかしながら実験動物に加えられ

た統御の中で時間に関わるものは、育成に要する期間以外全くなく、顧慮されることすらなかった。他方、加齢や老化を実験生物学的に研究する所謂実験老年学にあっては固有の動物モデル系を探索したり、開発することが全くなかった。癌研究のために開発され、育成された実験動物を流用するにすぎなかった。

研究分野の目的にっていない動物モデル系は、実験生物学の進歩を障害し、実験動物科学と実験老年学が乖離するきっかけになろうとさえしている。

実験動物は、個体レベルで現象を扱うという点で貢献度が極めて高いにも拘わらず、戦略や認識の悪さから、特に長寿科学分野ではほとんど顧みられてこなかった。

端的な例として、長寿科学分野での最も基本的な実験動物の貢献である加齢動物育成が挙げられよう。

実験動物を順次加齢させ、飼育環境に特異な種や系統の寿命(範囲、最長あるいは平均)、群で最も長く生存した10個体の平均生存日齢や生存率(75%、50%、25%、10%)を取得した後、月齢縦断あるいは横断的に加齢変化を common あるいは specific に捉え、ヒトへの外挿の可否を考察するという当然の過程や基準さえ全く経ていないし、確立されていない。

実験動物から得られる情報を common あるいは specific に捉え、系統だてて加齢変化を特定し、確立するためには良好な指標が必須なだけでな

く、情報源が広くなくてはならない。

このような見地から、実験動物を広範に長期飼育し、詳細な生存曲線を得ることで実験動物の時間に関わる特性を開発し、解析することが極めて重要である。

国立療養所中部病院長寿医療研究センター（以下 NILS）は実験動物施設棟に加齢動物育成施設：Aging Farm を設け、ラット（*Rattus* : F344/N）とマウス（*Mus* : C57BL/6）2 つの実験動物種、SAM 群の 3 系統（SAMR1TA、SAMP6/Ta、SAMP8/Ta）を含む 7 つの近交系（C57BL/6/Jah、DDD/Jah）でこれを実践している（Table 1）。5 年目を迎えて取得し得た中途結果は、種の少なさと系統による極端な偏りであった。

本研究は、当センターで実験動物の加齢育成において良好な再現性をもたらした NILS Aging Farm Guide (Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 215-223, 2000 に公表) に則り、施設以外の飼育条件を可能な限り同一にして NILS Aging Farm と同様なモニターシステムを適用することで偏りの是正を図り、より広範なデータの集積を行って NILS Aging Farm との比較を目的として遂行された。また従来とは異なる指標から新たな動物モデル系の探索も行った。

## B. 研究方法

### B-1 生存率

NILS Aging Farm では、NILS Aging Farm Guide に則って加齢動物の育成を行っている（Table 1）。

株式会社日本エスエルシーへは A/J、AKR/N、BALB/c、C57BL/6、CBA/N と DBA/2 の 6 系統の加齢育成と生存曲線の取得を業務委託した（Table 1）。

これら 6 系統を選択したのは、対照として NILS Aging Farm でも加齢育成を行っている C57BL/6 を対照に、NILS Aging Farm では加齢育成しておらず、自家繁殖による加齢育成を行っている SAMR1、SAMP6 と SAMP8 の 3 系統の近交系マウスの成立に AKR/N と sibling の AKR/J ならびに A/J が関わっているとされているからである。同じく NILS Aging Farm で自家繁殖し、加齢育成している DDD/Jah も SAM の成立に関わったとされているので比較に加えた。さらに対照が C57BL/6 のみでは非特異系統が手薄なため起原や育成経過や目的が異なる BALB/c、CBA/N と DBA/2 を加え、6 系統とした（Table 1）。

生存率は、

- 1) ブリーダーから群で定期的に購入し、加齢育成している F344/N ラットと C57BL/6 マウスでは死亡、ないしは飼育管理者が瀕死と判断し共同利用室が解剖を行うことで、構成個体数が減少していく過程を、
- 2) 自家繁殖しているマウス系統では同様な死亡日齢を積算することで算出した。

生存範囲（各誕生日群で最初の死亡

例を認めた日齢から最後の個体が死亡した日齢まで)、平均生存日齢、75%-、50%-、25%-と10%-生存率となった日齢ならびに各系統各群で最も長く生存した10個体の平均生存日齢を性ごとに取得した。

F344/NとC57BL/6で得られた各指標は、誕生日の異なる群間で比較し、生存率を加齢特性として比較した。特にF344/Nについては、国内外の機関から報告された結果と比較した。

B-2 副腎皮質層構成 (H10-長寿-118の報告書をも参照)。

National Institute on Aging (NIA: Baltimore, USA) のコントラクト Aging Farm (Harlan Sprague Dewley: HSD, Indianapolis, USA) から購入した F344/NHsd, BN ならびに (F344/N x BN) hybrid F1 ラットを両性で用いた。F344/N の加齢変化が顕著ではなかったため別の目的で NIA から購入した個体や当 A/F で加齢育成した個体をも用いて結果の再現性に留意した。

①3-4、②10-12、③20-24、④28-32 か月齢の4群でそれぞれ6例以上となるよう回次を重ねて購入し、形態学的に副腎皮質を比較した。

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はほぼ等割し、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 $\mu$ 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。

B-3 肺の加齢変化

加齢実験動物の新たなモデルとしての特性開発を目指して、組織学的にF344/Nラットの肺を検索した。

B-2と同様NIAのコントラクト Aging Farm から購入した F344/NHsd ないし NLS Aging Farm で加齢育成した F344/N を用いた。

9か月齢で9例(♂3、♀6)、11か月齢で3例(♂3)、12か月齢で15例(♂8、♀7)、20か月齢で♂1例、21か月齢で♂3例、22か月齢で♀3例、24か月齢で15例(♂8、♀7)、27か月齢で♀3例、28か月齢で♂1例、29か月齢で3例(♂1、♀2)、30か月齢で♀2例、31か月齢で♂1例、35か月齢で9例(♂3、♀6)、36か月齢で♀1例の合計68例(♂32、♀36)を用いた。

肺は4%パラホルムアルデヒド液に

よる血管ならびに気管かん流固定ないしは、気管に挿入したカニューレから Bouin 液をかん流し、肺が胸腔に密着するまで膨らむよう固定した。

組織標本の作成は、B-2 とほぼ同様な方法でパラフィンに包埋し、4 $\mu$ の連続切片とし、HE 染色、レゾルシンフクシン染色と免疫染色を施し、弾性線維の変化に注目した。

肺胞終末部や気管周囲の平滑筋については免疫染色による解析も加えた。

形態学的な解析を目指した組織学的検索に用いた個体の内、9-12 か月齢、21-24 か月齢、27-30 か月齢の各月齢群で雌雄各 6 例については呼吸機能の面から加齢変化の特定を試みた。

動物をウレタンで深麻酔した後、気管を切開し、人工呼吸下で換気量および換気回数を変化させたときの動肺コンプライアンスと肺抵抗の測定した。動肺コンプライアンス、肺抵抗は呼吸気流速度、一回換気量、肺内圧より換算した。また、人工呼吸停止後、肺圧容量曲線より静肺コンプライアンスも測定した。

#### B-4 マイクロサテライトマーカー

F344/N と BN/SsN ラットは日本 SLC から、F344/Du は日本チャールスリバーから各々 4 週齢で購入した。

耳介から DNA を抽出し、21 個のラット染色体、1 番から 20 番と性染色体 X につき、5cM でほぼ等間隔に全ゲノムをカバーできるよう 309 個のマイク

ロサテライトマーカーを購入した (Research Genetics, Huntsville, USA) 。鋳型 DNA とプライマーを PCR で増幅したのち、Ethidium bromide を溶解したアガロースゲル中で電気泳動し、紫外線で可視化することで泳動距離の違いを塩基長の多型の指標とした。

### C. 研究結果

#### C-1 生存率

##### C-1-1 F344/N ラット (Table2, Fig.1)

NILS Aging Farm における F344/N ラットの生存率は、Table 2 に示すように明確な性差を示した。生存曲線で見ると雄の減衰が雌より早期に出現した (Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 215-223, 2000、同誌 in press, 2001) 。

6 群の平均生存日齢は、雄で 742.4 から 764.5 日、雌で 835.6 から 880.0 日であった。雌の範囲は、雄より約 100 日大きかった。

6 群の 75% 生存率に達した日齢は、雄で 646-678 日の範囲であったのに対し、雌では 743-800 日であった。この指標でも雌がほぼ 100 日大きい値を示した。

6 群の 50% 生存率に達した日齢は、雄で 728-752 日、雌で 847-882 日だった。雌雄の開きは 100 日以上だった。

6 群の 25% 生存率に達した日齢は、雄で 833-860 日、雌で 920-983 日だった。

た。性差はほぼ100日であった。

6群の10%生存率に達した日齢は、雄で886-940日、雌で1014-1075日であった。性差は150日程度であった。

6群の最も長く生存した10個体の平均生存日齢は、雄で907.6-985.5日、雌で1034.4-1100.8日であった。性差はほぼ100日を越えていた。

死亡や異常の最も多い原因は、雌雄に関係なく白血病（単核球型）であったが、雄でより早期に発症した。2番目の原因は下垂体腫瘍であったが、雌の頻度が約10倍であった（Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 161-172, 2000）。

この解析の中で赤血球大小不同症を特徴とし、左心房血栓を伴い前白血病もうかがえる新たな血液性疾患を見出した（Archives of Gerontology and Geriatrics, 31, 107-113, 2000）。

#### C-1-2 ラット生存率の比較（Table 4）

NILSでは実験動物の加齢育成において生存曲線を重視し、これをシュミレートできるように、生存範囲、平均生存日齢、75%-、50%-、25%-、10%-生存日齢、最長生存10個体の平均日齢を求めるようにしている（Table 2、Table 6、Table 8）。しかしながら加齢育成を行う総ての機関がこれらを指標として公表している訳ではない（Table 4）。加齢育成上の経過を公開することなく実験動物を使用している機関の方が遥かに多い。このような反

省に立って、NILSでは生存曲線の取得とその再現性の確認を第一の目的とした。

F344/Nラットで得られた6群の生存曲線極めて再現性が良く、これを基準とした比較が可能であることを指摘した（Archives of Gerontology and Geriatrics, in press, 2001）。

公表した生存曲線の再現性は、6群間での最大差が、  
平均生存日齢：雄25.6、雌44.4、  
75%-生存率：雄で32、雌で92、  
50%-生存率：雄で47、雌で35、  
25%-生存率：雄で27、雌で63、  
最長生存10個体の平均：雄で77.9、  
雌で65.6日であった。

すなわち取得した指標の6群間でのばらつきは最大でも92日と100日以内に納まった（Table 3）。

これをもとに再現性があると判断し、加齢育成において指標とし得ることをArchives of Gerontology and Geriatricsに提唱した。併せて、NILSが採用しているAging Farm Guideの適正さも主張した。他機関が主に報告している平均生存月齢ないしは週齢と比較したところ興味深い知見が得られた。

NIAは雌雄でNILSと類似の平均生存月齢を報告していた。しかし東京都老人総合研究所（TMIG）は雌雄で当センターより大きな値、特に雄では4か月隔たった値を報告していた（Table 4）。雄のみを報告した東邦大学の値も同じく隔たっていた。逆にTexas大学のHealth Science Center at San Antonio

からの雄の結果は当センターとほぼ同様であった (Table 4)。

雄の平均生存月齢では、東邦大学 (29 か月) = TMIG (28.18 か月) > NILS (24.29-25.13 か月) = NIA (23.70 か月) = San Antonio (23.05-25.32 か月) という日米間での大きな違いとなった。

この問題については、近交系のいわゆる“F344”ラットの亜系統差で説明できる可能性を臨んでいる。

#### C-1-3 マイクロサテライトマーカーによる亜系統比較 (Fig. 3, Fig. 4)

309 個設定したマイクロサテライトマーカーの内、F344/Du と F344/N の間では 289 個のプライマーセットで、F344/Du と BN/SsN の間では 288 個のセットで PCR 産物を得た。

F344/Du と F344/N の間ではどのセットの PCR 産物でも塩基長多型が認められなかった。これに対して、F344/Du と BN/SsN の間の 288 セットの PCR 産物では 156 個で多型が見られた。割合としてはほぼ半分であった (54.2%、156/288、Fig. 4)。

#### C-1-4 C57BL/6 マウス (Table 6, Table 7)

NILS Aging Farm における C57BL/6 マウスの生存率は、Table 6 に示すように F344/N ほど顕著ではないが 75%-と 25%-生存率の間で 50 日程度の性によ

る隔たりを示した (一部は Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 215-223, 2000 に公表)。

6 群の平均生存日齢は、雄で 850-901 日、雌で 765-800 日であった。6 群間での最大差は、雄で 51 日、雌で 35 日だった。F344/N とは逆に雄が約 60-100 日大きい値であった。

6 群の 75%生存率は、雄で 758-798 日、雌で 662-713 日であった。群間の最大差は雄で 40、雌で 51 日だった。

6 群の 50%生存率は、雄で 850-916 日、雌で 722-819 日だった。群間の最大差は雄で 48、雌で 97 日だった。

6 群の 25%生存率は、雄で 939-1017 日、雌で 864-904 日だった。群間の最大差は雄で 78、雌で 49 日だった。

6 群の 10%生存率は、雄で 990-1064、雌で 947-987 日であった。群間の最大差は雄で 74、雌で 40 日だった。

各群で最も長く生存した 10 個体の平均生存日齢は、雄で 1015-1116 日、雌で 976-1045 日であった。群間の最大差は雄で 101、雌で 40 日だった。

6 群間での各指標のばらつきは、100 日以内に納まった F344/N より少し大きいものの再現性を主張するに足るものと判断した。特に平均生存日齢は、雄で 2 か月弱、雌で 1 か月強と高い収斂がうかがえた。

F344/N と対照的であったのは性差で、何れの指標でも雄が 60-100 日大きかったことである。

死亡や異常の最も多い原因は、雌雄に関係なく特に腸間膜リンパ節の著しい腫脹を伴うリンパ腫であった。

### C-1-5 自家繁殖系統 (Table 7)

SAM の 3 系統を含む自家繁殖している 7 系統における結果は、系統、性、個体数、生存範囲、平均生存日齢±標準偏差、75%-、50%-、25%-、10%-生存率時日齢、最長生存 10 個体の平均日齢±標準偏差、主な疾病の順で、SAMR1、雄、160 例、202-1062、635±178、503、612、681、837、985±51 日、リンパ腫と下痢であった。SAMR1、雌、197 例、217-955、621±129、541、630、708、796、866±40 日、リンパ腫と下痢であった。SAMP6、雄、224 例、175-1107、544±187、414、546、665、776、957±76 日、大腸肥厚を伴う下痢であった。SAMP6、雌、200 例、255-1000、540±164、405、504、656、779、920±53 日、大腸肥厚を伴う下痢であった。SAMP8、雄、244 例、162-831、474±148、360、457、581、677、778±29 日、リンパ腫であった。SAMP8、雌、265 例、200-760、461±125、364、448、540、634、717±25 日、リンパ腫であった。DDD/Jah、雄、189 例、196-974、539±169、412、520、664、764、886±42 日、リンパ腫と胸腔出血であった。DDD/Jah、雌、179 例、183-928、582±164、482、580、689、803、875±36 日、リンパ腫と胸腔出血であった。C57BL/6/Jah、雄、172 例、333-1301、854±216、704、863、1018、1134、1233±40、リンパ腫であった。

C57BL/6/Jah、雌、176 例、244-1172、766±176、652、769、886、985、1109±34 日、リンパ腫であった。

### C-1-6 コントラクト系統 (Table 9)

A/J、C57BL/6、CBA/N と DBA/2 では全く死亡を認めていないのに対して BALB/c では少数の死亡例（雄 287、雌 539 日齢以降）を認めた。

一方、AKR/N では全例が死亡し、主な死亡原因はリンパ腫であった。AKR/N、雄、50 例、224-530、336±73、284、322、371、440、452±38 日であった。

AKR/N、雌、50 例、210-409、283±44、245、271、313、336、352±28 日であった。

### C-2 副腎皮質層構成 (Fig. 5、H10-長寿-118 の報告書を参照)

#### C-2-1 F344/N

ラットの副腎皮質については、比較動物学的な立場から行ってきた 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（結果は未提示）。NIA のコントラクト Aging Farm から購入した加齢 F344/NHsd でも全く同様であった。F344/NHsd での所見は、NILS ないし TMIG の Aging Farm で加齢育成している F344/N ないしは F344/Du とほぼ同

様であった（結果は未提示）。ところが今年度に入って、F344/N の 900 日齢を越える雌の一部でのみ、主に束状層に宮胞を伴う細胞が巣状に結集して出現することを認めた。従来これらの変化は白血病個体に特有な、全層空胞化の前段階と判断してきた。しかし白血病的浸透度を調査すると、これとは明らかに関連なく出現するものであることが判明した。この変化は以下で述べる雌雄の BN や Donryu 雄のものより規模が小さく束状層に限局傾向のあることが特徴である。F344/Du 雌の副腎を F344/N ほど例数多く見ていないので、最終的な結論を下すには時期尚早であるが、F344/N の雌には空胞細胞巣の出現するものがあるという所見は、注目している F344/Du と F344/N の亜系統差に新たな形態学的特性を加えることになる。可能な限り加齢 F344/Du 個体の収集に努めたい。しかしこの系統で雌までを加齢育成しているのは世界でも TMIG のみであり、同機関でも当センターと同様機関外への加齢個体供給を行っていないで相当困難な企画である。

また皮質全体の加齢変化としてみた時、F344/Du よりも F344/N の方が保全において劣って見えるのも興味ある所見である。

加齢しても網状層の存続し、結合組織の増加もマウスほど顕著でなかった。F344/N 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。

## C-2-2 BN ラット

雌雄の BN と雄の 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。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。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。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 両性の全層で、大型の空胞を伴う細胞とその巣状集団は、雌雄 BN の全層と (F344/N x BN) hybrid F1 雌の網状層に出現した。

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 雄には出現しなかった。

F344/N では空胞を含む細胞が皮質全層に亘って出現することがある。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、貧血や黄疸、肝臓と脾臓の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。

## C-2-3 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。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。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。

### C-3 肺の加齢変化

#### C-3-1 形態学変化

HE 染色標本の所見では、加齢に伴った肺胞管と肺胞腔の拡張が見られた (添付資料参照)。しかしレゾルシン-フクシン染色では肺胞壁と気管支の弾性繊維ならびに肺胞壁と血管基底膜のコラーゲンに顕著な変化を認めなかった。

12 と 24 か月齢の個体では、気管支平滑筋細胞が緻密に配列していたのに対して 30 か月以降では、平滑筋細胞の間に結合組織が入り込み、平滑筋細胞の配列はまばらであった。

気管支平滑筋の  $\alpha$  平滑筋アクチンに対する染色性は加齢に伴って減少していた。一方肺胞中隔先端部平滑筋数は 30 か月以降増加していた。

またこの月齢に達した個体では、肺

胞腔の辺縁部に結節様小体が多数出現していた。この変化は雄に偏って顕著であった。

#### C-3-2 生理学的変化

一回換気量増加時 (3ml 以上) および換気回数増加時 (120 回/min 以上) に 27-30 か月齢の群は 24 か月齢までの群に比較して、動肺コンプライアンスの有意な低下が認められた。この時期は、形態学的な変化では肺胞に拡張を認めるものに一致した。

肺抵抗には月齢間の差は認められなかった。静肺コンプライアンスは 27-30 か月齢の群で有意な増加が認められた。

### D. 考察

#### D-1 生存率

##### D-1-1 生存率の再現性

NILS Aging Farm で加齢育成した F344/N ラットと C57BL/6 マウスの生存率を平均生存日齢、75%-、50%-、25%-、10%-生存率に達した日齢、最も長く生存した 10 個体の平均生存日齢の 7 つの指標について性毎に比較すると、両種の 6 群間でのばらつきは、ラットで雌の 75%-生存時日齢での 92 日 (3.03 か月)、マウスで雄の最も長く生存した 10 個体の平均生存日齢での 101 日 (3.32 か月) であった (Table 2、Table 3、Table 6、Table 7)。平均生存

日齢にいたっては、ラットの雄で 25.6 日と 1 か月未満、雌で 44.5 日と 1.5 か月、マウスの雄で 51 日と 2 か月弱、雌で 35 日と 1 か月強であった。NIA や TMIG といった先行の Aging Farm では平均生存月齢を公表はしているものの再現性までは見ていない。単発の結果を施設の基準として毎回引用している。当 Aging Farm は生存曲線の再現性を求め、生存曲線全体をモニターし、比較することを目的に 7 つもの指標を基準に取った。

30 か月齢の個体を育成することを目標として Aging Farm Guide を設け、7 つの指標で結果をモニターしたがほとんどが 1 割以内のばらつきに 6 群でも納まったという結果は、生存曲線に再現性を得たと結論するに足るものであろう。

ばらつきが 1 割までの良好な再現性は、NILS Aging Farm Guide による運用が適切であったことをも証明したといえよう。しかし Guide が如何に完璧でも実験動物施設棟管理室職員が履行できないほどでは意味がない。遂行でき、これによって飼育環境がまもられたからこそ再現性が達成されたいえよう。ほぼ 2 か月間隔で定期的に行っている微生物モニタリングでは一度も汚染が検出されていない。これも Guide が忠実に履行され、Aging Farm の育成に貢献したことを示すものである。

#### D-1-3 指標としての生存率の利用

F344/N ラットの生存率の再現性は雄で特に良好で、6 群の平均生存日齢での最大の開きが 25.6 日と、1 か月以下であった。このように再現性の高い生存率は系統に specific な特性の一環として扱うことも可能ではないかと考えられる。加えて指標として加齢個体の育成をモニターするうえで利用できるかと判断し、成果を報告する際の基準とした。

しかし、第 22 回日本基礎老化学会でこの基準に基づいて結果を発表したところ、他機関から発表されたものと大きく異なっていた。平均生存月齢では東邦大学と 4 か月以上、以下で詳述する白血病の発症率では TMIG のほぼ倍であり、取り扱い易さでは長崎大と対照的であった。当 Aging Farm の成績と再現性からは予想だにできない機関間差であった。

このような F344 ラットの生物学的特性のばらつきは、別の原因があるのではないかと考え、詳細に生存率を調査した。

機関間の違いを比較するうえで、NILS がとっている指標と同様のレベルで行うことは既述のように不可能であった。最大公約数を尋ねると、雄の平均生存月齢がほとんど唯一の指標であった。

#### D-1-4 平均生存月齢と亜系統

NILS の F344/N 雄の平均生存月齢は 6 群で 24.29-25.13 (平均 24.77) か月(738.9-764.5 日)であった(Table

Table 4)。雄の平均生存月齢を記載した報告を original まで尋ねると、NILS と同様 24 か月齢辺りのもの (NIA、San Antonio、Harvard) と 30 か月齢辺りのもの (TMIG、東邦) に大別できた。しかし 31 か月との記載については引用された報告に該当する記載を確認できなかった (Table 4)。

平均生存月齢を得た系統に関する記載は、指標よりさらにまちまちであった。使用動物の記載を丹念に original 報告上で追跡し、動物に関する記載で参考になりそうなものを総て拾い出し、ブリーダーのカタログや教科書に記載されている F344 のペディグリーに書き加えた (Table 4、Fig. 6)。この調査過程の一部は Experimental Animals、49、141-145 に公表した。

平均生存月齢が短い NILS では F344/N を用いているのに対し、長い TMIG と東邦では F344/Du であることが判明した。F344/N は NIH (National Institutes of Health、Bethesda) で、F344/Du は CRJ (Charles River Japan、Yokohama) が種親を導入した CRL (Charles River Laboratories、Wilmington) で各々もとの F344 が亜系統となったことを示すものである。

ここでは、今後の調査を考慮して国内外に大別し、亜系統差まで注目して使用系統特定の経過を述べる。

先ず国内の調査では、平均生存月齢における長短が F344 ラットの主たる亜系統である F344/N と F344/Du と明らかに相関していた。短かった NILS

は F344/N であり、長かった TMIG と東邦大は F344/Du であった。ために平均生存月齢の違いは亜系統に specific かと思われた。しかし、調査の対象を世界まで広げたところ、国内とは異なって、亜系統だけでは説明できないブリーダー間の違いも見られた。NILS と NIA ではともに F344/N 用い、ほぼ同様な平均生存月齢を報告していた (Table 4)。しかし F344/Du の平均生存月齢は日米間で大きく異なっており F344/N に近い値であった (Table 4)。すなわち日本では F344/DuCrj の平均生存月齢が 29 ないし 28.18 か月であったのに、米国の F344/DuCr1 では 23.05-25.32 か月であった。

この違いの背景については、以下でマイクロサテライトマーカーと白血病の結果をまとめて詳細に考察したい。

今後も亜系統に注目した特性解析に努め、加齢モデル動物としての近交系ラット、特に当該分野での使用がポピュラーな“F344”ラットの資質ならびに有用性の向上に努めたい。

#### D-1-5 亜系統とマイクロサテライトマーカー

長寿科学や実験老年学の研究分野ではこれら“F344”ラットの 2 大亜系統である、F344/N と F344/Du を厳密に区別して使用するという習慣はおろか認識もなかった。ために今年度の本研究費で行う実験に亜系統差を検出できるような指標の導入について検

討し、先ずマイクロサテライトマーカーで両亜系統を比較した。

近交系の亜系統間で特性の違いが検出された際、最も留意しなくてはならないのが他系統との交雑による遺伝的汚染 (genetic contamination) である。微生物汚染と同様、実験動物の特性を著しく変化させるからである。遺伝的汚染を最も有効に検出する方法がマイクロサテライトマーカーによる比較である。ヒトでは HLA 型による近縁鑑定にとってかわろうとしている。現時点で最も検出感度の優れたマイクロサテライトマーカーでラットの全ゲノムを 5cM 間隔で調査できるように309のマーカーを購入し (Fig. 3) 、感度と精度の検証も含めて F344/Du、F344/N、BN/SsN の3系統を比較した。

F344/Du と BN/SsN の間では 309 マーカーの内 288 マーカーで PCR 産物を得、156 で多型を検出した (Table 5) 。しかし F344/Du と F344/N の間では PCR 産物を得られた 296 マーカーの何れでも多型を検出できなかった。従って両亜系統とも他系統による遺伝的修飾 (遺伝的汚染) を受けていないことが推断された。こうして、両亜系統間で何らかの遺伝的な違いが検出されれば遺伝子部分に突然変異のような何らかの変化が生じたことに原因すると推定できるようになった。このマーカーの有用性は極めて高いので、国内の亜系統差のみならず、日米間ならびに米国内のブリーダーによる違いにも注目し、本研究費で個体

を輸入して比較検討し、“F344” 群の亜系統差の原因究明に当る予定である。

#### D-1-6 生存率と白血病

F344/N では 75%-生存率に達する少し前から重篤な白血病の発症が頻繁となり生存率の減衰に関わっているようにみえた。生存曲線の形状は加齢に伴って生ずる致命的な疾患ないし異常によって著しい修飾を受けるものと考えねばならない。F344/N に specific に高頻度で生ずる白血病は、単核球型と分類されるものである。残念ながらヒトの白血病にはない病型とされている。これもこの病態を F344/N に specific と判断する根拠である。

F344/N で白血病が高頻度に発生することは、健常に加齢した個体をこの系統で得ることが容易でないことを意味する。この特性を認識して加齢育成し、使用し、使用に当たっては疾病の有無を確認しなくてはならない。また、行った実験の結果が白血病によって修飾を受けないことを証明しなくてはならない。この対応策として加齢育成途上で血液の塗抹標本を作成して診断し、群内での白血病の浸透率を捕捉する試みを考慮し、飼育管理の一環に取り込む方法を試行している。

白血病の侵襲を調査する過程で、病態の異なる貧血症が注目された。著しい貧血を呈するので、瀕死の状態を捕らえるのが困難であった。しかし剖検時に必ず血液塗抹標本を作製して追

跡したところ、壊れかかった赤血球を認める個体と遭遇した。症状としては貧血ながら、白血病の進行は顕著でなく、比較的高齢の個体の高発した。詳細に解剖を行ったところ心房に巨大な血栓を認めた。貧血と黄疸を呈するが、白血病の特徴である肝臓や脾臓の腫脹が顕著でなく、心臓に異常があつて、高齢の個体を解剖記録から選抜し、心房を調査したところ良く重複して血栓を確認した。F344/N ではこれまでに報告がない病態であるため、加齢育成の効率へ影響を及ぼす、F344/N に specific な新たな特性として Archives of Gerontology and Geriatrics 誌へ報告した。

例え外見上何の異常を認めなくても、加齢 F344/N ラットの健康状態に疑義を覚えた場合は、血液塗沫標本を残し、これを病理学者に診断してもらうことで相当のリスクが軽減されよう。

#### D-1-7 亜系統と白血病

F344/N では白血病が高率に発症し平均生存月齢が短い。これに対して平均生存月齢が長い F344/DuCrj での白血病発症率は低かった (Table 4, Fig. 7)。この病率と生存率の逆相関は、白血病が生存率を修飾するという推定を良く支持する。NILS では、F344/N の生存率における再現性と同様この近交系に発生する白血病発症にも再現性がある。事実白血病の発症を制御する遺伝子座が性染色体 X 上にあつ

て発症率の性差を指摘する報告もある。NILS でも生存率に性差があり、雌が長く生存し (Table 2, Fig. 1)、雄に比べて白血病の発症率が低く、下垂体腫瘍が多い。

マイクロサテライトマーカーでは生存率や白血病の発症率を修飾するような他系統からの遺伝的混入はなく、亜系統差は遺伝子の違いによるものであることが示された。従つて白血病の発症を制御する遺伝子座に突然変異が起き、生存率を修飾したことが亜系統差として検出されたと仮定すれば、生存率、白血病の発症率、マイクロサテライトマーカーでの比較を矛盾なく説明できる。また近交系と育成された当時の“F344”は、白血病の発症率が低く、生存率が長かったと推定される (Fig. 7)。即ち、このような生物学的特性有していたもともとの“F344”が F344/N として分離した後のラインで突然変異が生じ (Fig. 9, 赤アステリスク左)、白血病の発症率が上昇し、生存率が短くなったのに対し F344/Du のラインではこのような突然変異が生じなかったと推定される。

この突然変異が生じてという仮定を F344/Du の日米差にも持ち込めば (Fig. 9, 赤アステリスク右)、F344/DuCrj での 1970 年には白血病の発症率が 30%と低かったのに 1982 年には平均生存月齢が 23.05-25.32 か月と短いという矛盾 (Table 4, Fig. 8) も説明できる。即ちこの間に突然変異が生じたと仮定するものである。現時点でこの仮定を証明するためには日米

間で F344/DuCrj と F344/DuCrI のブリーダー差を検証すれば良い。マイクロサテライトマーカーによる確認は企画している。Aging Farm でこれらを比較するのも容易ではない。しかし米国での F344/DuCrI のユーザーの中には、この系統で脾臓や肝臓の腫大を高発するようになったことを認めたものがある。また San Antonio で F344/DuCrI を、現在日本で F344/DuCrj を用いているユーザーも後者で前者よりも白血病発症率が低いことに注目している。

“F344” 群を有効に使い、日米間での比較に耐える結果を得るためには F344/Du と F344/N の亜系統差、日米間での F344/Du のブリーダーによる F344/DuCrI と F344/DuCrj の違いを十分に承知して用いなくてはならない (Table 10)。

このような亜系統差は、従前には極めて注意を要するものであるという指摘は多かった。しかし時間に関わるものは実験動物において実績が少なく、現実的な指摘は今回の研究が端緒であろう。時間の経過を十分意識し、common と specific に特性を割り振って考えるという前提が加齢モデル動物での特性開発によく貢献できるものであったと考えられる。

動物実験や実験動物から得られる情報は極めて多様であるが、総てがヒトへ外挿できるものではないことをよく認識して実践されなくてはならない。

#### D-1-8 マウスの加齢特性

C57BL/6 マウスは SAM を含むどのマウス系統より長期に生存した。ために C57BL/6 はマウスに common な特徴を示したのではなく、系統に specific な結果と解釈すべきである。生存はしていても、必ずしも健全な状態が維持されている訳ではなく、腸間膜リンパ節が著しく肥大した個体が多数見られた。specific と考える根拠でもある。6 群を比較した際の生存率の再現性は F344/N の場合と同様良好であった (Table 7)。

C57BL/6 は乳癌の発生率が低い方へ育種されたという育成背景を有している。従って乳癌と機序を類する癌に対して抑制性の背景を持っているものと見なさねばならない。

加齢育成したり、使用する際に腸間膜リンパ節腫脹を予見するには、体重と体型の変化が良い指標となろう。加えて C57BL/6 の生存率が、亜系統となる C57BL/6/Jah との間では 10%-生存率と最も長く生存した 10 個体の平均生存日齢で差を示したことは (Table 6、Table 8) “F344” 群の亜系統差と同様注目される。

SAMR1、SAMP6、SAMP8 は明らかに 3 系統とも C57BL/6 より短期間しか生存出来なかった (Table 6、Table 8)。すなわち SAM 間では短い生存期間が common であったが、マウスとしては系統で specific であると考えねばならない。何故なら 30 か月齢を越えた C57BL/6 で、比較的リンパ腫の侵襲が

少ない個体に共通する所見、すなわちマウスの健常加齢を早期に提示しているといった所見は全く得られなかった。瀕死で解剖した総ての個体で診断がつき、副腎皮質でも結合組織の増成や層構成の崩壊（結果は未提示）が早期に起こることはなかった。

SAM は短命であることも指標に加えて選抜されたという背景を有するが、その生存率は、全く加齢モデルとして挙げられたことのない DDD/Jah と近い値を示し (Table 8)、AKR/N よりはるかに長期に生存した (Table 8、Table 9)。短命であることは確かに加齢のモデル動物としての資質であるが、死に至る間に例え specific であっても種ないし系統の全時間経過が凝縮されていなければならない。AKR/N が短命であっても加齢モデルに挙げられないのは、胸腺をはじめとする胸腔のリンパ組織に癌化がおり、肺や気管を圧迫することで個体の死を誘起するからである。リンパ腫をおこして腫大したリンパ節を外科的に除去するとより長期に生存する。SAM の 3 系統は何れもリンパ腫を高発し、SAMP6 に specific と思われた大腸肥厚と下痢の原因にもリンパ腫が下敷きにあるように推定している。このため SAM で specific な加齢特性を捕捉するためにはリンパ腫の修飾を除かねばならない。これは加齢モデルとしての資質の不足を意味する。

SAM で注目すべきは、50%-生存率が SAMR1>SAMP6>SAMP8 となるのに対して、本研究事業で、平成 11 年

度にハンガリー Debrecen 大老年学講座から招へいして共同研究を行った同大教授 Imre Zs.-Nagy 博士の FRAP 法による測定結果では、SAMR1>SAMP8>SAMP6 となった (Archives of Gerontology and Geriatrics, 印刷中, 2001) ことである。コントラクトした AKR/N の 50%-生存率は SAMP8 より更に短かった。従って SAM は標榜している老化促進というより AKR が他の系統から遺伝的寄与を受けて表現型を多様化させたもの、すなわち死に直結する型のリンパ腫の発症時期が修飾されたと考える方が現時点では妥当であろう。マウスの老化がどのような表現型を示すのか common な特徴が特定される前に系統の名として specific な老化促進動物が存在することは理解に難い。加えてこれが老化モデル動物があると喧伝されることには疑問が持たれる。

“F344” ラット群におけるように、マウスが種ないしは specific な系統グループに common な疾病としてリンパ腫を選択したか負荷されたと考えると、その発症時期が系統の遺伝背景で修飾を受け、系統に specific な生存率が演出されたと推定できる。

SAM は興味深い特性を有し、関連近交系群という位置付けで、系統群として存在している。わが国で開発された系統群でもあり、加齢学と異なる分野では明らかに利用価値の高い特性を秘めている。従って、正しく、目的に沿って再評価されるような機会を得るべ

べきであり、この日が近からんことを願って止まない。

#### D-2 副腎皮質層構成 (Fig. 5、H10-長寿-118 の報告書を参照)

加齢に伴いマウスでは消失し、ラットでは残存していた網状層は、マストミス (げっし目) でも残存し、ヒトやこれまでに検索した一部のサル類 (コモンマーモセット、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る。哺乳動物では、加齢で網状層が消失しないことが common で、マウスでは specific に消失と考えられる。

この指標ではマウスの特異さが目立った。しかし加齢にともなって緩やかに進行す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ろう。

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この指標から考えている。加えてこの指標は、遺伝背景をも検出出来るので、実験動物種、系統や性による違いを時間に関わる軸でモニターする上では良い手段となろう。

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生存率とともに示していることである。

#### D-3 肺

肺の加齢変化を特定しようと試みたのは、ヒトの加齢変化におけるモデル系を臨むうえで実験動物の呼吸器系を研究しようとする試みが少なく、加齢変化に注目したものは殆どなかったからである。12 から 24 か月齢への経過ではさしたる変化を特定できなかった。しかし 30 か月齢以降では、気管支平滑筋の構造変化や染色性の変化や肺胞中隔先端部の平滑筋の増加が注目された。

形態学的解析と同一個体を用いて行った生理学的解析では、肺胞に拡張を認める時期に一致して肺コンプライアンスの増加や一回換気量の低下を認めた。

気管支ではその収縮力の低下を、肺胞では残気量の増加に伴って肺胞にかかる張力の増大に対する生体反応の可能性を示唆する。

加齢に伴って肺胞では組織の破壊を伴うことなく弾性収縮力を失い、換気量等機能の低下を生ずるものと考えられた。

総じて今回の F344/N における肺胞の拡張はいわゆる老人肺と呼ばれる所見と相似性があるばかりでなく、機序の上からも類似性があり、長寿科学