

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 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 田中 慎

平成 14 (2002) 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（研究成果の発表抄録）

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 13 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) な変化は疾病によって大きく修飾されることを明らかにした。マイクロサテライトマーカ―では多型がないことから、白血病発症制御遺伝子の突然変異という前提で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亜系統差をマウスで認め、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、加齢研究に相応しい近交系マウス系統についても注意を喚起した。併せて、実験動物の繁殖機能の加齢変化に注目して発情周期や卵巣の形態を検討し、この指標はヒトへの外挿 (common) が果たせない加齢変化と考え、加齢実験動物育成で加齢モデル系としての資質特定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。

研究分野の目的に適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）。6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として、マウスの間脳-下垂体系の加齢変化やラットの発情周期に対する加齢修飾からも新たな動物モデル系の探索や特性開発を行った。

加えて、2年間の研究遂行を踏まえて、健康加齢個体を育成することの

重要さを踏まえ、愛知医科大学から発表されていたクローズドコロニーラット、Donryu の生存曲線修飾効果の解釈を試みた。何故ならば、げっし目実験動物とサル類において、現時点で唯一寿命伸延効果についてコンセンサスを得ているのが制限給餌による栄養制御だからである。

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。

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。

これら 6 系統を選択した理由は、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関わっているとされる、AKR/J と sibling の AKR/N ならびに A/J、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。さらに対照の 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)。

今年度は、さらに segregating inbred である SM/J を加え、特定遺伝子座の構成がホモであるかヘテロであるかという点が生存性に及ぼす影響についても注目した (Table 1)。しかし SM/J の生存曲線は平成 16 年度に至らないと完成できない。

併せて、生存性と文献調査から亜系統差を認めた F344/DuCrj と

F344/NSlc の間で作出した正逆 hybrid F1 についてもその生存性を検討した (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

National Institute on Aging (NIA: Baltimore, USA) のコントラクト Aging Farm (Harlan Sprague Dewley: HSD, Indianapolis, USA) から数次に亘って購入した C57BL/6J マウスを両性で用いた (Table 1)。

Hungary の Debresen 大老年学教室

教授の Imre Zs. Nagy 博士が来日し、FRAP 法で C57BL/6J マウスを解析した際、ならびに次項 B-3 での実験に用いた C57BL/6J マウスの副腎を用いた (Table 1)、以前に刊行した C57BL/6J マウスの副腎と比較した。

今回は特に、弱齢 C57BL/6J マウスの副腎皮質を形態学的に比較した。本来加齢モデルに資することを目的としているが、C57BL/6J マウスは世界の実験老年学で最も標準的に使用されている近交系マウス系統であり、日米で癌細胞の生着や薬物に対する反応等で同じ名称の近交系マウスながら種々の特性で違いがあることを指摘する声があったためである。

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、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、皮質内側を構成する細胞核の集積程度を確認し、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との関連を検索した。

Scandentia に属する、キタホソツパイ (*Dendrogale murina*) と、Primates に属する、コモンマーモセット (

Callithrix jacchus) の固定副腎標本を得、それらの皮質層構成をこれまでに得たげっし目実験動物ないしはカニクイザルやアカゲザルといった *Macaca* 属のサルの副腎皮質層構成と比較した (Table 1)。

B-3 C57BL/6J マウス間脳-下垂体系の加齢変化

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、免疫組織化学的に C57BL/6J マウスの間脳-下垂体-生殖腺系を視床下部ソマトスタチンニューロンの加齢変化に注目して検索した。

下垂体より分泌される成長ホルモン (GH) は、加齢により顕著な減少を示すことが既に知られている。同様に、加齢に伴う性腺機能の低下により、性腺からの性ホルモン (アンドロジェンおよびエストロジェン) の分泌が減少することも周知の事実である。性ホルモンは、中枢に作用して、生殖機能 (視床下部 - 下垂体 - 性腺軸) の制御を行うのみならず、視床下部 - 下垂体 - 体細胞軸の中枢機能の性分化や老化などにも重要な役割を持つものと近年注目されている。加齢に伴う体細胞や性腺の機能低下は、医学及び獣医学の分野では極めて重要な課題であるにも関わらず、体細胞の老化研究は、性腺のものに比して少なく、特にその中枢についてはほとんどなされていない。下垂体の GH の合成、分泌は、主

に視床下部弓状核からの成長ホルモン放出ホルモンによって刺激を受け、室周囲核 (PeN) のソマトスタチン (SS) によって抑制される。加齢に伴うこれらの中枢の変化を明らかにすることが、複雑な体細胞の老化の仕組みを解明するための基礎データとなり、さらにはその応用として、効率的な老化防止プログラムへと繋がると考えられる。そこで今回は、SS ニューロンの加齢変化を性腺の加齢変化との関係から時間的経過を追って形態学的に明らかにすることを目的とした。

B-3-1 実験動物

動物は、NIA のコントラクト Aging Farm から購入した 4、12、20、23 ないし 24 か月齢の雌雄 C57BL/6J を用いた (Table 1)。

B-3-2 実験方法

視床下部および性腺は、Bouin 液で固定後、常法に従い、パラフィン切片を作成した。その後、視床下部についてはマウス SS に対する抗体を用いて ABC 法による免疫染色を施し、PeN の陽性ニューロンを形態計測学的に検討し、性腺については、H-E 染色を施し、その形態学的変化に注目したところ、以下の結果が得られた。

B-4 F344/N ラットの繁殖特性に対す

る加齢の修飾

B-4-1 実験動物

日本 SLC から 29 日齢で 20 例、1 と 2 か月齢と繁殖リタイアでそれぞれ 3 例ずつ購入した近交系ラット F344/N♀、NILS Aging Farm で加齢育成した、3 から 26M の 8 月齢群 (各群 3 例) の F344/N♀計 24 例、日本クレアから 2 か月齢で購入したクローズドコロニーラット Wistar-Hannover ♀3 例を用いた (Table 1)。

B-4-2 飼育環境

飼育条件は、NILS Aging Farm Guide に準じ、室温 23℃、照明条件 12 時間 (8:00 A.M.-20:00 P.M.) 明、12 時間暗に制御した環境下で、MR ストック (総タンパク量 18%) とろ過滅菌水を自由摂取させた。

B-4-3 性周期の特定

膣垢検査法で性周期の特定を図った。膣垢の採取は一定時刻 (9:00-11:00 A.M.) に行った。

性周期は、

- a) 有核細胞と少量の角化細胞を、
- b) 角化細胞のみを、
- c) 白血球と変性した有核細胞をそれぞれ認める相と、
- d) 細胞数が減少し白血球とわずかに有核細胞と角化細胞が混在する相に注目して判定した。これら膣垢像

の変化は構成細胞により、

- a) 発情前期、
- b) 発情期、
- c) 発情後期、
- d) 休止期

と定義されており、卵巢の機能をよく反映するとされている。

まず、性周期の開始時期を特定するため、膣開口をしていない 20 匹の外部生殖器を毎日観察した。膣の開口を確認できた日から膣垢観察を開始した。これらについては、最初の b) 発情期を確認後、d) 休止期を認めた午後に解剖し、各臓器を秤量し、一部は固定して組織学的観察に供した。

残りの F344/N (33 例) と Wistar-Hannover (3 例) は、加齢による性周期の存続に注目して、3-4 か月間にわたって膣垢を観察した。周期の長さは発情期から次回発情期の前日までとし、個体毎に平均値を求めた。b) 発情期が連続して観察された場合は、最初の日とした。組織採材は前述と同様とした。

B-5 Donryu ラットでの有効な制限給餌効果の解釈

愛知医科大学加齢医科学研究所で行われた制限給餌実験で、クローズドコロニーラット雄 Donryu で認められた生存曲線に対する修飾作用を古典的な遺伝学的手法により解釈することを試みた。

B-5-1 実験動物

日本 SLC から 4 週齢で購入されたクローズドコロニーラット Donryu 雄を用い (Table 1)、対照群と制限給餌群に分けた。

愛知医科大学の動物実験施設のバリアシステム内で、単独でポリカーボネート製のケージで動物を飼育した。温度のような飼育環境制御レベルや微生物制御レベル等の清浄度は NILS Aging Farm Guide とほぼ同等のものであった。

飼料は放射線滅菌したものを、給水はろ過滅菌の後紫外線を照射したものをそれぞれ与え、自由に摂取させた。

B-5-2 飼料給餌方法

飼料の制限方法は、対照群が前週に摂取した飼料の量を正確に測定しその 60%量を翌週制限給餌群に与えるという手段を採った。

B-5-3 飼料組成 (Table 2)

対照群の飼料は、NILS Aging Farm Guide におけると同様、粗蛋白含量を 18%とした低蛋白飼料とした。

制限給餌群に与えられた飼料は、粗蛋白成分を始め粗脂肪、粗繊維、粗炭水化物については対照群の飼料と同様とした。しかし粗灰分、ミネラルやビタミンについては 60%に用

量制限を加えても対照群の相当成分濃度と同様になるよう設計された飼料 (Table 2) を用いた。

C. 研究結果

C-1 生存率

C-1-1 F344/N ラット

NILS Aging Farm における F344/N ラットの生存率と再現性は、

Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 215-223, 2000、

Arch. Geront. Geriat., 32, 139-150, 2001 に公表した。

加齢特性の一部は、

Archives of Gerontology and Geriatrics, 30, 161-172, 2000、

Archives of Gerontology and Geriatrics, 31, 107-113, 2000

に公表した。

C-1-2 “F344”ラット生存率の比較

Exp. Anim., 49, 141-145, 2000、

Arch. Geront. Geriat., 32, 139-150, 2001、

Arch. Geront. Geriat., 34, 19-28, 2002、

に公表した。

C-1-3 (F344/Du, F344/N) 正逆 hybrid F1 (Fig. 1)

F344/N の生存曲線では、明確な性差が見られた。加えて F344/N の生存性は F344/Du よりも悪かった。そこで F344/DuCrj と F344/NSIc の間で正逆の交雑第一代を作出し (reciprocal

hybrid F1)、それらの生存曲線取得を試みた。予算の関係からコントラクトできた規模にはかなり制約があり、各群の雌雄はそれぞれ 30 例ずつであった。

しかも 2 年目で、やっと構成個体の減衰を認め始めたに過ぎず、生存率も 90%を下った群が出現したところである。しかしながら F344/N の生存曲線と比較すると傾向は明瞭で、F344/Du を父親とした 60 例の雌雄で、わずか雄 1 例のみの死亡例しか認められていないのに、F344/N を父親とした群では、雄で 5 例、雌で 1 例の死亡例を認めている。しかも F344/N を父親とした群の雌雄の生存曲線は F344/N 雌雄の生存曲線の後を追っているように見える。

C-1-4 C57BL/6 マウス

(Table 3, Table 4, Fig. 2)

NILS Aging Farm における C57BL/6 マウスの生存率は、Table 3 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 日、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 66 日、雌で 97 日だった。

6 群の 25%生存率は、雄で 939-1017 日、雌で 864-913 日だった。群間の最大差は雄で 78 日、雌で 49 日だった。

6 群の 10%生存率は、雄で 990-1064 日、雌で 947-987 日であった。群間の最大差は雄で 74 日、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 979-1045 日であった。群間の最大差は雄で 101 日、雌で 66 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 SAM マウスと自家繁殖マウス (Table 5)

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、219 例、202-1062、653 ±170、563、668、752、839、996 ±38 日、リンパ腫と下痢であった。

SAMR1、雌、284 例、265-1052、636 ±126、547、640、717、801、922 ±59 日、リンパ腫と下痢であった。

SAMP6、雄、296 例、192-1107、568 ±197、424、569、706、820、1009 ±64 日、大腸肥厚を伴う下痢であった。

SAMP6、雌、251 例、255-1072、581 ±179、442、552、715、832、959 ±54 日、大腸肥厚を伴う下痢であった。

SAMP8、雄、285 例、192-831、483 ±143、365、472、589、678、778 ±29 日、リンパ腫であった。

SAMP8、雌、340 例、207-760、473 ±123、380、473、559、644、733 ±15 日、リンパ腫であった。

DDD/Jah、雄、243 例、151-974、530 ±179、408、523、664、761、898 ±45 日、リンパ腫と胸腔出血であった。

DDD/Jah、雌、238 例、152-958、570 ±171、472、573、680、788、888 ±40 日、リンパ腫と胸腔出血であった。

C57BL/6//Jah、雄、238 例、333-1301、856±211、700、876、1015、1128、1242±31、リンパ腫であった。

C57BL/6//Jah、雌、221 例、244-1172、758±171、643、758、881、960、1112±30 日、リンパ腫であった。

C-1-6 コントラクト Aging Farm

(Table 6, Fig. 3)

後発の SM/J を除く 6 系統で死亡例を認めた。AKR/N では全例が死亡しており、主な死亡原因はリンパ腫であった。他の系統の主な死亡原因については、NILS Aging Farm におけるような詳細な解析は行っていない。しかしながら、何れの系統においても死後解剖所見では脾臓の肥・腫大を始めとし、リンパ浸潤を認めており、リンパ腫と判断できるものが最も多かった。

各系統の生存性を、系統名、性、個体数、生存範囲、平均生存日齢±標準偏差、75%-、50%-、25%-、10%-生存率時日齢の順で示すが、結果を得ていない項目については未定とする。

A/J、雄、50 例、563-941+、未定、687、791、371、826、902

A/J、雌、50 例、714-937+、未定、794、830、907、未定、

AKR/N、雄、50 例、224-530、336±73、284、322、371、440、452±38 日、

AKR/N、雌、50 例、210-409、283±44、245、271、313、336、352±28 日、

BALB/c、雄、50 例、292-899+、未定、715、783、815、864、

BALB/c、雌、50 例、545-927+、未定、673、732、823、872、

C57BL/6、雄、50 例、707-958+、未定、820、889、959、未定、

C57BL/6、雌、50 例、693-938+、未定、770、826、871、未定、

CBA/N、雄、50 例、682-920+、未定、774、787、837、891、

CBA/N、雌、50 例、766-940+、未定、849、921、未定、未定、

DBA/2、雄、50 例、662-941+、未定、703、773、818、872、

DBA/2、雌、50 例、690-950+、未定、763、805、882、940、

C-2 副腎皮質層構成

C-2-1 C57BL/6J マウス (Fig. 4)

平成 10 年度と平成 14 年度に NIA のコントラクト Aging Farm から購入した C57BL/6J マウスの副腎皮質 (Fig. 4、Hsd: U S) と東京大学医科学研究所実験動物研究施設で維持されており、Tanaka S, Matsuzawa A, 1995, Comparison of adrenocortical zonation in C57BL/6J and DDD mice. Exp. Anim., 44, 285-291. で使用された C57BL/6J

マウスの副腎皮質 (Fig. 4, Jms: Japan) を比較した。

1995 年の所見では、70 日齢での C57BL/6J マウスの副腎皮質、特に X 層・網状層・束状層内側を含む内側皮質の構成細胞では、空胞を伴う細胞が全く出現しないことが形態学的特徴であった。この所見は、空胞を伴う細胞が X 層にこの日齢で多数出現する DDD と際だった系統差として認識された。

空胞を伴う細胞の出現は、細胞が脂質変性を生ずるか否かを形態学的に判断できる基準となる。予備的に行った交配試験では、この系統差の背景に存在する遺伝的制御には、3 つ以上の遺伝子座が関与していることが示唆された。内側皮質構成細胞の形態学的な違いは、系統の遺伝子組成の違いを検出できるものと考えられた。

NIA から購入された 2 か月齢の C57BL/6J マウスの副腎皮質の内側皮質では、網状層に空胞を伴う細胞が散見された (Fig. 4, 矢印)。この所見は、平成 10 年度と 14 年度で共通しており、年度をまたいで再現性があった。

C-2-2 キタホソオツパイ

長寿科学に資するモデル動物としてげっし目実験動物の不足が指摘されており、新たな動物モデル開発の必要性が叫ばれている。この中で動物分類学的な位置がヒトに近いサル

類からの開発が挙げられている。そこで最も下等なサル類とされるツパイの一種、キタホソオツパイの副腎皮質を検討した。

詳細は、Tanaka S, Miyaishi O, Tamaya N, Ohno T, J. Yamada J, 2001, Adrenal glands in small smooth-tailed tree shrew (*Dendrogale murina*). *Exp. Anim.*, 50, 451-454. を参照されたい。

タイ王国、トラート県で捕獲された野生のキタホソオツパイ、従って年齢や繁殖経歴等は不明である、の副腎を検索したところ、副腎の形状、位置、特に皮質の最内側に特異な細胞が出現する点など、これまでに収集したサル類の副腎皮質よりは、げっし目実験動物の副腎皮質に近い所見であった。

皮質は細胞の形状、配列、結合組織の染色性から 3 つの層に区分するのは容易であった。この点は他のほ乳動物と同様であった。また第二層が厚く、第三層が薄いことはマウスと類似していた。皮質の最内側には細胞質が暗調に染色される細胞が見られ太。このような特異な細胞が皮質と髄質の境界部に出現するのもマウスと類似していた。

従って得られた結論は、動物分類学的な位置ではサル類よりネズミ類に近いというもので、学名の *murina* にふさわしいものがあった。

C-2-3 コモンマーモセット

ツパイより頻用されるマカカ属に

近いとされる、小型のサル類であるマーモセットの中から、わが国のブリーダーが自家繁殖し、基礎特性の捕捉を試みているコモンマーモセットの副腎皮質を検索した。

実験室繁殖された個体であり、年齢や繁殖経歴も、以前に所見をとったマカカ属のサル類より寧ろ詳細に、特定されたものを用いた。

副腎全体では、性による違いが大きさにあり、げっし目実験動物と同様雌の方が大きいようであった。皮質層構成は、3層に区分するのは容易で、第一層と第二層の区分は特に明瞭であった。この第二層は良く発達して充実しており、縦断面上では、皮質の中で最も大きい部分を占めていた。第三層は薄かった。小型げっし目実験動物で種によって見られる皮質第四層や移行部（球状層と束状層の間）や境界部（束状層と網状層の間）あるいは皮質と随質の間などに特異な層を認めることはなかった。

これらは、マカカ属のサル類と類似性が高く、動物分類学的な位置と一致した。しかしながら、内側皮質はマカカ属といえどもヒトとは異なっており、これと類似していることはヒトと離れていることを示唆した。

C-3-1 C57BL/6J マウス間脳-下垂体系の加齢変化 (Fig. 5)

C-3-1-1 視床下部 SS 陽性ニューロン

の加齢変化

雌では、4 か月齢より、加齢に伴って、SS 陽性ニューロン数は、減少していた。一方、雄の SS 陽性ニューロン数は、4 か月齢から 12 か月齢にかけて僅かに増加が見られたが、24 か月齢では、4 か月齢のものと同等であった。

C-3-1-2 性腺の加齢変化

4 および 12 か月齢の卵巢では、多数の卵胞、黄体が認められたが、20 か月齢では卵胞のみが、認められただけであった。さらに、23 か月齢では卵胞も黄体も認められなかった。精巣においては、24 か月齢で精細管内の精細胞が若干減少していたものの、精子形成は認められた。

C-4-2 F344/N ラットの繁殖特性に対する加齢の修飾 (Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8)

C-4-2-1 膣開口と性周期の回帰 (Fig. 7, Fig. 8)

膣開口は 40.6 ± 2.9 日齢で確認され、体重は 97.6 ± 6.9 g であった。膣開口時の膣垢像は 20 匹中 8 例が b) であり、12 例が白血球の混在する c) 発情後期か d) 休止期であった。最初の b) 発情期は膣開口から 0-10 日後の 44.7 ± 4.7 日齢で確認され、体重は 105.7 ± 7.2 g であった。

1 か月齢群 3 例の初めての発情周期の回帰は 46.7 ± 4.2 日齢で、以後 3-6 日周期で回帰は繰り返された。膣垢像の周期的変化は通常、b) 発情期は 1-2 日間、その後 c) 発情後期-d) 休止期が 3-4 日間であった。a) 発情前期は b) 発情期の前日にみられたが、確認されない日や有核細胞に白血球が混在した像が観察されることもあった。5-13 か月齢では、b) 発情期が 3-4 日間続くこともあった。

C-4-2-2 性周期の消退と停止 (Fig. 8)

加齢に伴い、 489.3 ± 49.4 (429-549) 日齢 (16.0 か月齢) に至って、b) 発情期の後、c) 発情後期または d) 休止期が連続し、周期長が 10 日を超える個体が出現した。以降、連続して白血球が出現し、c) 発情後期または d) 休止期の期間が続いた。不定期に b) 発情期が出現したが、その間隔は加齢にしたがい長くなる傾向にあった。 818.0 ± 14.4 (802-830) 日齢 (26.8 か月齢) 以降は b) 発情期は見られなくなり、c) 発情後期または d) 休止期の膣垢像のみが観察された。

C-4-2-3 性周期の長さ

各月齢の周期長の平均を求めた。観察開始から終了まで周期が回帰した 1-13 か月齢の周期長は平均 4.9 ± 0.3 日であった。周期長は 1 か月齢で最も長く 5.4 ± 0.3 日であり、6 か月齢で

最も短く 4.5 ± 0.3 日であった。14-17 か月齢にかけて周期長は 4-12 日とばらつき始め、周期長が長くなり回帰が消失した。

C-4-2-4 卵巢組織の所見

卵巢重量は加齢とともに増加し 21 か月齢で最も重く、1 か月齢の卵巢重量 37.6 ± 6.4 mg に対し 222%まで増加した。その後、徐々に減少傾向を示し、30 か月齢では 1 か月齢の 150%となった。(30 か月齢は 21 か月齢から 68%減少した。)

卵巢では一貫して卵胞と黄体が見られた。回帰しなくなった後でも胞状卵胞があり、膣垢の変化が停止した後でも卵胞が消失することはなかった。26 か月齢までは、1 断面に複数の卵胞がみられたが、30 か月齢では 1-3 個であった。

C-4-2-5 Wistar-Hannover における発情周期

Wistar-Hannover において、観察された 2-6 か月齢の周期長は 4.1 ± 0.2 日であった。Wistar-Hannover では 3 匹とも b) 発情期が 1-2 日間であった。しかし、うち 1 匹は観察中、c) 発情後期および d) 休止期の短縮と延長がみられ、2-11 日間と幅広い発情周期長を示した。この個体を除くと Wistar-Hannover の平均発情周期長は 4.0 ± 0.0 日であった。

6 か月齢での卵巢重量は、F344/N

の 57.2 ± 2.2 mg に対し、 98.9 ± 7.9 mg であった。また、組織標本では複数の卵胞と黄体が観察された。

C-5 Donryu ラットにおける制限給餌効果の解釈 (Table 7, Table 8, Fig. 9)

本解釈については、Tanaka S, Ohno T, Miyaishi O, Itoh Y, 2002, Survival curve modified through dietary restriction (DR) in male donryu rats. として Arch. Geront. Geriat. で印刷中である。

要旨は、クローズドコロニーラット Donryu において制限給餌を行うと全体的に生存曲線が右側へ移動して寿命が伸延する。最も顕著な生存曲線の修飾は、制限給餌群の一部が寿命を大きく伸延するというものである。

C-5-1 対照群の生存性

454 日齢で最初の死亡例を認め、最後の死亡例 853 日齢であった。平均生存日齢は、 679 ± 82 日、75%-生存率は 634 日齢、50%-、25%-、10%-生存率はそれぞれ、671 日齢、714 日齢、784 日齢であった。

C-5-2 制限給餌群の生存性

530 日齢で最初の死亡例を認め、最後の死亡例 1360 日齢であった。平均生存日齢は、 900 ± 240 日、75%-生存率は 758 日齢、50%-、25%-、10%-生

存率はそれぞれ、788 日齢、890 日齢、1333 日齢であった。

C-5-3 生存率の伸延

制限給餌群 29 例のうち 6 個体、21% の生存性が著しく伸延した。この割り合いを残りの 79% と 1 対 3 の分離という仮定で χ 二乗検定したところ棄却されなかった。

C-5-4 F344/N との比較

F344/N 雄は白血病で、雌は白血病と下垂体腫瘍で 90% 以上が死亡するのに対して、Donryu ではほぼ全個体が下垂体腫瘍で死亡した。しかしながら、この病変は対照群でより早期に発症するのに対して、制限給餌群では遅れて出現した。

平均生存日齢を始め、各生存率ポイントに至った日齢を F344/N と比較すると、全項目において、対照群 Donryu < F344/N < 制限給餌群 Donryu という関係となった。

- D. 考察
- D-1 生存率
- D-1-1 生存率の再現性
- D-1-2 指標としての生存率の利用
- D-1-3 平均生存月齢と亜系統
- D-1-4 亜系統とマイクロサテライトマーカー
- D-1-5 生存率と白血病
- D-1-6 亜系統と白血病
- 1) S. Tanaka, N. Tamaya, K. Matsuzawa and O. Miyaishi
Differences in survivability among F344 rats.
Exp. Anim., 49, 141-145 (2000)
- 2) O. Miyaishi, S. Tanaka, R. Kanawa, K. Matsuzawa and K. Isobe
Anisocytosis precedes onset of the large granular lymphocyte leukemia in aged F344/N rats.
Arch. Geront. Geriat., 30, 161-172 (2000)
- 3) S. Tanaka, T. Segawa, N. Tamaya and T. Ohno
Establishment of an aging farm of F344/N rats and C57BL/6 mice at National Institute for Longevity Sciences (NILS).
Arch. Geront. Geriat., 30, 215-223 (2000)
- 4) O. Miyaishi, K. Matsuzawa, R. Kanawa, K. Isobe and S. Tanaka
The diagnostic significance of left auricular thrombus in F344/N rats.
Arch. Geront. Geriat., 31, 107-113 (2000)
- 5) S. Tanaka, T. Segawa, N. Tamaya, O. Miyaishi and T. Ohno
A group of five parameters as a new biological marker on F344/N rats.
Arch. Geront. Geriat., 32, 139-150 (2001)
- 6) S. Tanaka, A. Shito, N. Tamaya, O. Miyaishi, M. Nishimura and T. Ohno
Difference in average survival between F344/Du and F344/N rats is not due to genetic contamination.
Arch. Geront. Geriat., 34, 19-28 (2002)
- D-1-1 から D-1-6 に関わる考察は首記 6 遍の論文を参照されたい。
- D-1-7 (F344/Du, F344/N) 正逆 hybrid F1 (Fig. 1)
- F344/N の生存曲線には明瞭な性差があり、雌の方が長命であった。生存曲線上、F344/N より長期に生存する F344/Du や BN/Bi では性差は明確でなかった。そこで F344/N の特に雄を短命化している白血病の発症には性染色体の関与がある可能性を推理し、これを検討することとした。
- 性染色体の関与は、Donryu の常染色体上にあると推定される遺伝子に

起因する表現型の解析とは異なるので、立案時に検討が必要である。しかしながら F344/N と F344/Du のように sibling な近交系間で性染色体が関与する場合には寧ろ明確な表現型分離も期待される。

そこで最も単純な試みとして正逆の hybrid F1 を両亜系統の間で作出しこれらを長期飼育した。数個体が死亡したに過ぎない状態ではあるが、今後の展開に期待を持たせるようなパターンが描かれており、F344/N を父方とした hybrid F1 の方が F344/N に近い生存曲線を描こうとしており F344/Du を父方とした hybrid F1 では死亡例が出ていない群（雌）さえある。この結果は、F344/N の系統特性ともいべき早期に発症する白血病の原因が、性染色体に関与しており F344/N の X 染色体上にある可能性を強く示唆している。

F344 の後代の系譜をみて、生存性における違いとその原因となった表現型の違いは、白血病の発症時期である。Donryu の制限給餌による修飾も 1 遺伝子座で説明できる可能性があることを考慮すれば、F344/N の特性変貌の原因として性染色体 X に注目しておくことは大きく外れたものとは考えにくい。

D-1-8 マウスの加齢特性

D-1-8-1 C57BL/6 マウス (Fig. 2)

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、必ずしも健常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。

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 F344 の後代の亜系統差と同様注目される。

D-1-8-2 SAM マウス群

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。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