

加齢育成動物の適正な飼育環境の検討と加齢変化に伴う基礎データの収集と解析
(30-9)

主任研究者 小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

研究要旨

老化・老年病における基礎老化及び発症機序となる研究は、これまで主に分子や細胞レベルを対象にモデル動物を用いて進められてきた。しかし、その一方では、老化の定義となる生体现象だけでなく、老年病と明確に関連性のあるエビデンスは基礎研究においていまだ明らかにされていない。基礎老化研究の材料として自然加齢させた老化動物（自然老化動物またはエイジングファーム：AF動物）を用いて研究を行う場合、遺伝要因や長期飼育に伴う環境要因（例、飼料、給水、照度、騒音や振動、ハンドリング、ファイティング等）の影響によって生じる可能性のあるばらつき（加齢にともなう病気の発症時期や症状、行動や寿命等）を考慮に入れる必要がある。しかしながらある程度適正に管理された環境下で自然老化動物を多数維持している研究機関は非常に少なく、それらの動物の個体レベルで生じる加齢性変化に関する解析はほとんどなされていない。

そこで、本課題ではまずはじめに加齢動物を育成するための動物の系統特性（C57BL/6N, C57BL/6J）を正確に把握し、適正な環境条件（例、環境エンリッチメントやLED照明の導入）の設定して検討を行う。具体的に、現状の実験動物施設棟の飼育室は、一般飼育管理基準（150～300lux）の3倍程度の照度があり、長期飼育への影響が懸念されているので、早急に長期飼育に最適の照明基準も独自に検討する必要がある。

合わせて加齢に伴う生体现象や老化マーカーをとらえるべく生理学、行動学、病理・形態学、血液学、微生物学、免疫学的に網羅的な解析を行い、加齢変化に関する基礎データの蓄積とともに長寿研において維持されている自然老化動物の加齢・老化モデルとしての有用性の検証を進めている。

主任研究者

小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室 (室長)

A. 研究目的

国立長寿医療研究センターで育成しているエイジングファーム動物（AF 動物）の老化のメカニズムと加齢に伴う老化・老年疾患の老化モデルとしての有用性の検証と長期飼育に適切な飼育環境を検討するとともに、その検証を確立する中で自然発症の『フレイル』等の老年病モデル動物開発のための検討を行う。また、モデル動物の長期飼育（1年以上）における Refinement(苦痛の軽減)に配慮した適正な飼育環境を設定するためのエビデンス集積に努め、ヒトへの外挿を含め、遺伝子からタンパク、細胞、個体レベルでの網羅的な解析による老化メカニズムを総合的に評価することを目的とする。

B. 研究方法

日常の動物飼育環境が長期飼育によって寿命だけでなく老年病疾患の症状や発症等に起因し、動物実験に影響していることが示唆されるため、現在の飼育管理基準（飼料：CE-2（照射滅菌済み）、飲水：RO 水、床敷き材：ペパークリーン等）と比較するために複数の環境条件(①床敷き材、②飲水、③飼料、④環境エンリッチメント、⑤動物ケア)を設定し、タンパクから個体レベルについて、4 週齢の C57BL/6NCrSlc (B6N) マウスおよび C57BL/6J (B6J) マウスについて雄 10~20 匹、雌 10~20 匹 を 3~6 ヶ月ごとに導入し、生涯飼育することにより老齢化させて網羅的な解析を計画し以下の解析を進めている。今回は現在の飼育管理基準における解析結果を報告する。（生存率や剖検所見等の一部の解析には、研究者向けに供給している AF マウスを使用した）

1. 生理学的解析（体重、摂餌量、摂水量、生存率、体温等）
2. 行動学的解析(ロータロッド試験、前肢握力試験、行動観察（脱毛）等）
3. 病理・形態学的解析（剖検、解剖、組織学的観察、MRI 撮像）
4. 生化学・免疫学的解析（ストレスホルモン（尿中 CORT））
5. 血液学的解析（血算、白血球の形態）

a) 生理学的解析

生後 3 ヶ月齢より定期的（毎月）に体重、摂餌量や摂水量、体温の測定を行った。また、生存率については死亡時に記録を残した。

b) 行動学的解析

運動機能を評価するため 3~24 ヶ月齢(3 ヶ月毎)にロータロッド試験および握力試験(前肢)を実施した。ロータロッド試験はマウス用ロータロッド装置 (MK-610A, Muromachi) により行い、条件設定等は理研 BRC のマウス表現型解析プロトコル(Rotarod test v1) に従った。握力試験は小動物握力測定装置 (GPM-100B, MELQUEST) を用いて行った。行動観察として、定期的（月齢毎）にケージ内のマウス個体の脱毛状態を観察した。

c) 病理・形態学的解析（組織）

飼育中に死亡した個体を剖検し、各臓器の病変の肉眼的観察を行った。また、18~24 ヶ月齢のマウスを使用して解剖所見を取るとともに 4% PFA/0.1M PB による灌流固定を行った。合わせて常法に従って主要臓器の組織切片を作製し、HE 染色を行った。

d) 生化学・免疫学的解析

飼育環境によるストレスおよび加齢に伴うホルモン動態を調べるため、3~24ヶ月の雌雄から採尿し、ストレスホルモン（コルチコステロン（CORT））をELISA法（ストレスホルモン定量キット（ARK Checker）、アークリソース社）により測定を行った。

e) 血液学的解析

3~27ヶ月齢の尾静脈より採血を行い、一般血液検査（赤血球数、白血球数、白血球分画）を実施した。

（倫理面への配慮）

主任研究者を含むすべての研究に関わる動物実験に関しては実験動物の福祉（5Rs）を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理を行った。さらに一部、実験動物の使用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、動物愛護管理法、厚生労働省基本指針、日本学術会議ガイドライン、および国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程、国立大学法人動物実験施設協議会指針等に基づき、当該研究施設の倫理委員会にて承認を受けて実施した。

C. 研究結果

a) 生理学的解析

加齢に伴う体重の変化において、B6Nマウスでは雄が16~18ヶ月齢（16ヶ月齢（ 44.4 ± 6.5 g））、雌は20~22ヶ月齢（20ヶ月齢（ 37.8 ± 6.5 g））、B6Jマウスで雄が13~15ヶ月齢（14ヶ月齢（ 37.2 ± 3.5 g））、雌は22~23ヶ月齢（22ヶ月齢（ 30.1 ± 2.5 g））においてピークとなり、系統（由来）の差が明らかとなった。一方、B6N雄マウスは23ヶ月齢から、B6J雌マウスでは24ヶ月齢から減少傾向を示したが、B6N雌マウスおよびB6J雄マウスでは体重の大きな変動は見られなかった（図1）。

摂餌量については、B6NマウスおよびB6Jマウスの雌雄ともに24ヶ月齢まで加齢に伴う変化は観察されなかったが、両系統ともに22~23ヶ月齢以降で食べこぼしが散見された。

摂水量では、B6NマウスおよびB6Jマウスの雄で加齢に伴い増加傾向を示したのに対して、両系統の雌マウスには変動は観察されなかった。

生存率について、B6Nマウスでは雌雄間で大きな差はなく、ともに18ヶ月齢前後で減少した。具体的には、28ヶ月齢では雄 $69.1 \pm 13.5\%$ 、雌 $63.5 \pm 1.6\%$ であり、搬入するLotによるばらつきが見られた。B6Jマウスでは例数を増やして検討している（図2）。

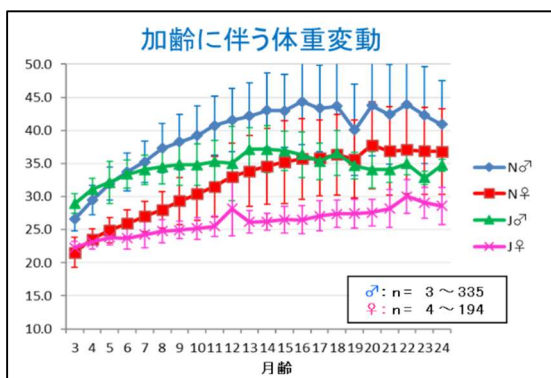


図1 B6マウスの体重変動

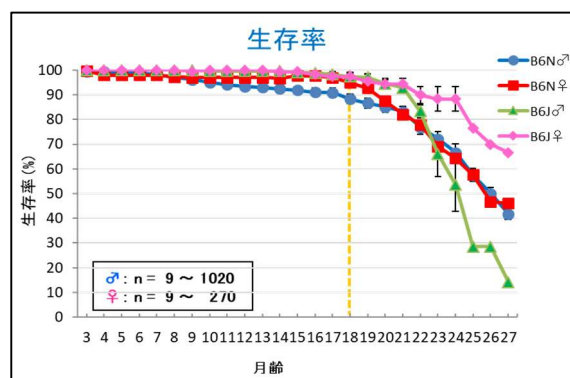


図2 B6マウスの生存率

B6N マウスにおける体温について、19 ヶ月齢（雄 30.4℃、雌 31.4℃）をピークとして加齢に伴い減少傾向を示した（図 3）。

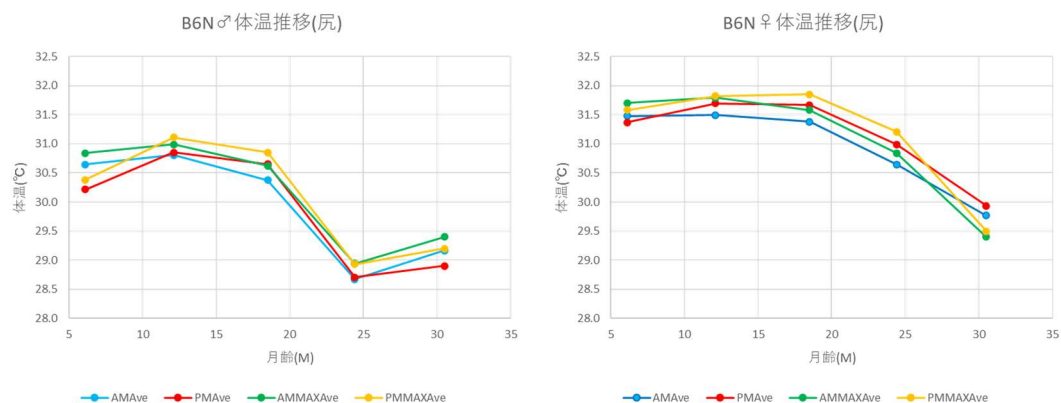


図 3 B6N マウスの日内体温変化

b)行動学的解析

運動機能を評価するためのロータロッド試験(n=5~20)について、B6N マウス雄では 3 ヶ月齢 (212.7±56.3 sec)、雌では 6 ヶ月齢 (232.0±66.1 sec)、B6J マウス雌雄 (雄 228.4±67.9 sec、雌 228.4±35.0 sec) とともに 3 ヶ月齢をピークとして、加齢に伴う体重増加に依存して運動機能（走行時間）が低下した。また、雌の方が全体的に走行時間が長い傾向が見られたが、B6N マウスにおいて 18 ヶ月齢以降は明瞭な雌雄差は認められなかった。

握力試験(n=5~27)では、B6N マウス及び B6J マウスの両系統ともに加齢に伴う筋力に大きな変動は認められなかった。ロータロッド試験および握力試験の結果から、特に雄において系統差が認められた。

老化度判定の行動観察の一つである脱毛の発見された個体数の発生率について、B6N マウスと B6J マウスを月齢毎に比較したところ、特に雌マウスにおいて系統による差が確認された（図 4, 5）。



図 4 B6N マウス加齢に伴う脱毛の推移

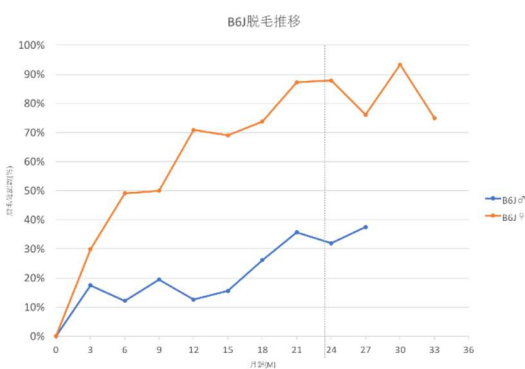


図 5 B6J マウス加齢に伴う脱毛の推移

c)病理・形態学的解析（組織）

B6N マウスにおける自然死（雄 167 匹、雌 56 匹）による剖検から、雄では精嚢腺肥大（貯留）の 73.7%をはじめとした肝臓退色（32.9%）、肝臓腫大（28.1%）および脾臓腫大

(12.0%)、雌では肝臓退色(44.6%)、肝臓腫大(22.5%)および脾臓腫大(18.8%)が比較的多くの個体で観察されたが、生理学的な老化の所見となる臓器の顕著な萎縮等は認められなかった。本系統で3ヶ月毎に解剖したところ、6ヶ月齢頃より胃の中から毛玉が観察され、9ヶ月齢で脾臓の腫大や肝臓の病変、18か月齢で腎臓の病変、24か月齢で雄の精嚢腺の病変が認められた。一方、B6Jマウスにおいて24ヶ月齢より脾臓や肝臓の病変が観察され始めた(図6,7)。この解剖結果から、垂系統の加齢に伴う病気の発症時期の差が明らかになりつつあった。両系統においてさらに例数を増やして検討を行っている。

解剖して摘出した主要臓器については、一般染色(H.E.染色)をはじめとした抗リン酸化αシヌクレイン抗体染色の他、関連標識(例. Sirtuin、Mitoracker、Merge、p53)等、加齢に伴う脳の萎縮や加齢に伴う病変(神経細胞萎縮や変性)、細胞増殖等について解析を進めている。

Male (n = 167)		Female (n = 56)	
lesions	Incidence (%)	lesions	Incidence (%)
Enlarged Seminal Vesicles	73.7% (123/167)	Discoloration of Liver*	44.6% (25/56)
Discoloration of Liver*	32.9% (55/167)	Enlarged Spleen	41.1% (23/56)
Enlarged Liver	28.1% (47/167)	Enlarged Liver	28.6% (16/56)
Lung Inflammation	18.0% (30/167)	Lung Inflammation	26.8% (15/56)
Enlarged Spleen	12.0% (20/167)	Discoloration of Kidney**	16.1% (9/56)

図6 B6Nマウス剖検所見

Male (n = 13)		Female (n = 18)	
lesions	Incidence (%)	Lesions	Incidence (%)
Enlarged Seminal Vesicles	76.9% (10/13)	Discoloration of Kidney**	44.4% (8/18)
Discoloration of Kidney**	69.2% (9/13)	Enlarged Spleen	38.8% (7/18)
Discoloration of Liver*	38.4% (5/13)	Discoloration of Liver*	38.8% (7/18)
Lung Inflammation	30.7% (4/13)	Enlarged Liver	22.2% (4/18)
Enlarged Liver	23.1% (3/13)	Thymus hiperplasia	16.6% (3/18)

図7 B6Jマウス剖検所見

d)生化学・免疫学的解析

3~24ヶ月齢の尿中コルチコステロン(ストレスホルモン)の解析結果から、B6Nマウスにおいて雄よりも雌の方に濃度が高く、加齢に伴い上昇傾向にあった。一方、B6Jマウスでは、21ヶ月齢まで雌雄ともに加齢に伴う大きな変化は観察されなかったが24ヶ月齢においてB6Nマウスと同レベルの高濃度の結果になった(図8)。

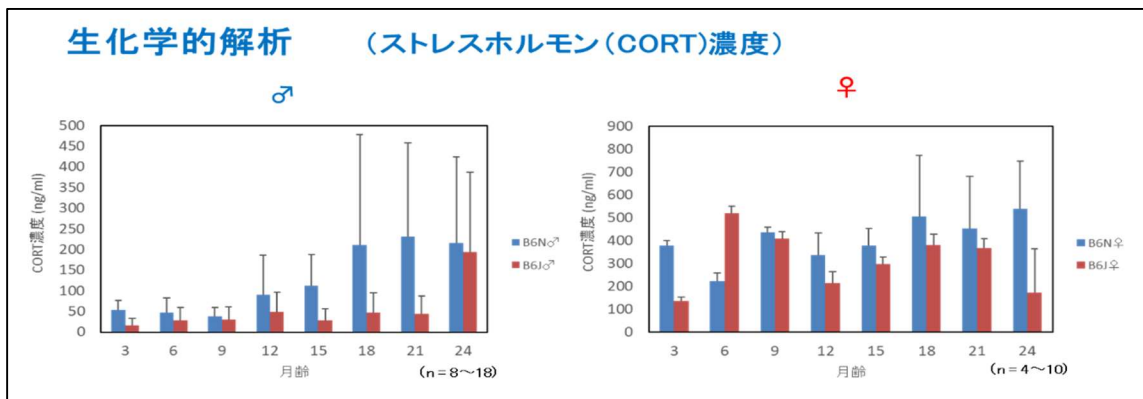


図8 B6 マウスの尿中コルチコステロンの加齢変化

e)血液学的解析

B6N マウスを用いた血算結果から、加齢に伴い 18 ヶ月齢頃から白血球数は減少し、好中球の割合が増加する一方、リンパ球については減少する傾向が見られた。赤血球についても加齢に伴い血球数が減少する傾向が認められた。形態学的には、18 ヶ月齢を越える頃から好中球やリンパ球、赤血球の異形成が観察された。

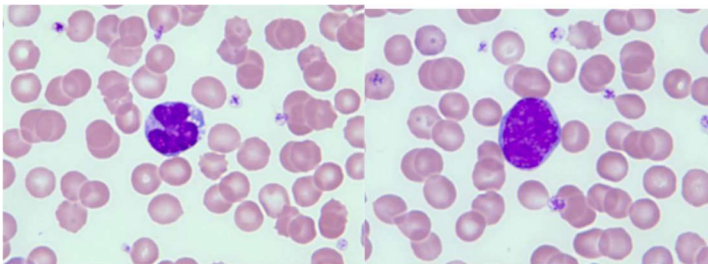


図9 21 ヶ月齢に観察された白血病と疑われるリンパ球形態

D. 考察と結論

本研究結果から加齢に伴う体重減少、運動機能低下、解剖所見（病気の発症時期）、ストレスホルモン、白血球組成の変化など、個体レベルでの老化マーカーの候補となる加齢変化の他、マウス系統の特性がいくつか認められた。

行動学および生理学的な解析結果から、月齢に伴う運動量の減少が 3 ヶ月齢から顕著に示すのに対して体重および前肢握力試験との相関が弱い結果となり、ヒトの加齢に伴う変化と異なるものであった。加齢に伴う運動量の減少（後肢の筋力低下）と形態学的な関連について新たに解析する必要がある。

病理形態学（解剖）および血液学的な解析結果から、脾臓の腫大が必ずしもリンパ腫ではなく、貧血による影響も血液形態から示唆された。

今回の結果から個体レベルでの明瞭な加齢変化は認められなかったが、若齢個体を含めた月齢単位に例数を増やして多面的な解析を行うことにより新たな老化の指標となるパラメーターの探索を行う計画である。また、動物種や系統によって加齢に伴う老化の進行、自然発症する疾患の種類が異なることから、実験を行う場合はその実験系に適した動物種や臓器等のサンプルを選択する必要がある。AF 動物における基礎データは加齢動物を用いて研究を行う上で非常に有益な情報となり得る。現在のところ、マウスにおいては免疫系の実験で汎用されている BALB/c マウスを、ラットにおいては従来加齢育成している

F344(Fischer)ラット以外に Wistar ラットおよび SD ラットにおいてもマウスと同様な解析を進めていることから、将来の老化・老年病モデル動物のバイオリソースとして今後もこれらのデータを蓄積し、外部へ向け発信し続けることが今後の課題である。

現在のところ、AF 動物は外観上健康と認められる個体を研究者に提供している。実際に実験時において開腹した際に臓器の炎症や腫瘍等が発見されることが多い。そのような理由から、AF 動物を炎症や腫瘍等の病変のないできる限り正常な個体を研究者に提供するには、定期的な個体の健康チェック（特に血液・生化学的検査）が重要であり、微量の血液で測定する検査機器の導入も検討する必要がある。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fumiharu Ohka, Shoichi Deguchi, Keisuke Katsushima, Keiko Shinjo, Akira Kato, Akane Yamamichi, Hiromichi Suzuki, Kosuke Aoki, Yusuke Matsui, Teppei Shimamura, Reo Maruyama, Shinya Sato, Satoru Takahashi, Noboru Ogiso, Akio Suzumura, Hiroshi Kimura, Toshihiko Wakabayashi, Hui Zong, Atsushi Natsume, and Yutaka Kondo
Pathogenic Epigenetic Consequences of Genetic Alterations in IDH-Wild-Type Diffuse Astrocytic Gliomas. *Cancer Res.* 79:4814-27 (2019)

2. 学会発表

- 1) 富田耕平, 田村慎哉, 山口一路, 福田梨恵, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
飼育環境がラットの長期飼育に及ぼす影響
第 65 回日本実験動物学会総会 2018 年 5 月 16 日 富山市
- 2) 小木曾昇, 六車香織, 高野聡美, 富田耕平, 山口一路, 松井直美, 丸山光生
自然老化マウスを用いた老化マーカーの検索
第 65 回日本実験動物学会総会 2018 年 5 月 18 日 富山市
- 3) Noboru Ogiso, Kaori Muguruma, Satomi Takano, Kohei Tomita, Kazumichi Yamaguchi, Naomi Matsui, Mitsuo Maruyama
Search for definitive senescence biomarkers in naturally – aged mice
第 41 回日本基礎老化学会大会 2018 年 5 月 31 日 野田市
- 4) 小木曾昇, 佐治多美子, 山口一路, 田村慎哉, 富田耕平
自然老化マウスにおけるエンドポイントの設定に関する検討
第 52 回日本実験動物技術者協会総会 2018 年 10 月 5 日 熊本市
- 5) 富田耕平, 山口一路, 田村慎哉, 谷井俊一, 佐治多美子, 小木曾昇
マウスおよびラットにおける環境要因によるストレスの測定方法について
第 52 回日本実験動物技術者協会総会 2018 年 10 月 5 日 熊本市
- 6) 田村慎哉, 山口一路, 富田耕平, 佐治多美子, 小木曾昇
電子機器を活用した飼育管理業務効率化の紹介
第 52 回日本実験動物技術者協会総会 2018 年 10 月 6 日 熊本市
- 7) Noboru Ogiso, Kaori Muguruma, Satomi Takano, Tamiko Sazi, Kohei Tomita, Kazumichi Yamaguchi, Shinya Tamura, Mitsuo Maruyama
Search for definitive senescence biomarkers in naturally – aged mice. What changes will occur in mice phenotype?

- 69th AALAS National Meeting, 30 October, Bartimore , USA (2018)
- 8) 富田耕平、谷井駿一、松原聡子、アルムニア・フリオ、小木曾昇
 ラットにおける加齢に伴う血液および尿中パラメータ変化について
 第 66 回日本実験動物学会総会 2019 年 5 月 16 日 福岡市
 - 9) 小木曾昇、松原聡子、アルムニア・フリオ、山口一路、田村慎哉、富田耕平
 国立長寿研における自然老化動物の有用性について
 第 66 回日本実験動物学会総会 2019 年 5 月 16 日 福岡市
 - 1 0) Noboru Ogiso, Satoko Matsubara, Almunia Julio, Tamiko Sazi, Kohei Tomita,
 Kazumichi Yamaguchi , Shinya Tamura, Mitsuo Maruyama
 Utility of aging farm mice to use for geriatrics in NCGG
 14th felasa Congress, 11 June, 2019, Prague , Czech
 - 1 1) 富田耕平、谷井駿一、松原聡子、アルムニア・フリオ、小木曾昇
 F344 ラットにおける加齢に伴う血液および尿中パラメータ変化について
 第 91 回東海実験動物研究会 2019 年 6 月 29 日 名古屋市
 - 1 2) 小木曾昇、松原聡子、アルムニア・フリオ、山口一路、田村慎哉、富田耕平
 自然老化マウスの亜系統の比較について
 第 91 回東海実験動物研究会 2019 年 6 月 29 日 名古屋市
 - 1 3) アルムニア・フリオ、松原聡子、佐治多美子、山口一路、田村慎哉、富田耕平、
小木曾昇、自然老化マウスを用いた血液学・病理形態学的な加齢変化について
 第 53 回日本実験動物技術者協会総会 2019 年 10 月 26 日 松山
 - 1 4) 大麻孝志、藤原智子、田村慎哉、富田耕平、松原聡子、アルムニア・フリオ、
小木曾昇
 マウスにおけるストレスマーカーと状態異常の関連性について
 第 53 回日本実験動物技術者協会総会 2019 年 10 月 26 日 松山
 - 1 5) 富田耕平、田村慎哉、山口一路、松原聡子、アルムニア・フリオ、小木曾昇
 マウスにおける亜系統差が加齢変化に及ぼす影響について
 第 53 回日本実験動物技術者協会総会 2019 年 10 月 26 日 松山
 - 1 6) 小木曾昇、松原聡子、アルムニア・フリオ、谷井駿一、富田耕平
 自然老化ラットを用いた加齢に伴う生体パラメータの変化について
 第 53 回日本実験動物学会総会 2019 年 10 月 26 日 松山
 - 1 7) Noboru Ogiso , Satoko Matsubara , Almunia Julio , Tamiko Sazi , Kohei Tomita,
 Kazumichi Yamaguchi , Shinya Tamura, Mitsuo Maruyama
 Search for characteristic change of the strain and definitive senescence
 biomarkers in C57BL/6 (naturally -aged) mice.
 70th AALAS National Meeting, 15 October,2019, Denver, USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし