

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。国立長寿医療研究センター（NCGG）で加齢育成しているエイジングファーム動物（自然老化動物、以下 AF 動物）における C57BL/6 マウス系統の加齢変化を把握するために、飼育動物の個体レベルの生理的基礎データを蓄積した。

また長期育成では、加齢に伴う自然発症病変（癌、白血病等）が多く観察されるが、NCGG と他の研究機関における AF マウスの比較から、病態の発症（認知能力含む）や寿命に大きな差（約 4 ヶ月）があることが明らかになった。このことから動物の長期的な飼育下における社会性（動物間のファイティング、単飼育または群飼育、ストレス）、環境的要因（エンリッチメント等の有無、ハンドリング）が生体内の生理的変動に影響する可能性が高いと示唆された。研究用動物の飼育環境を統御することは、実験動物福祉（Reduction, Refinement）にもつながると考えられた。

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）

分担研究者

木村 透 山口大学（教授）

(2020年4月1日～2021年3月31日)

研究期間 2018年4月1日～2020年3月31日

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）
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(Rota-rod 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パラフィン組織切片を作製し、一般染色 (HE 染色)、特殊染色 (PAS 染色、アミロイド染色)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 (ENZO 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で承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. 生理学的解析

加齢に伴う体重変化、摂餌量および摂水量については既に前年度に詳細に報告しているが、加齢変化に伴う体重の特徴として 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 雄マウスでは大きな変動は見られなかった。

生存率について、B6N 雄マウスが 15 ヶ月齢頃から、B6N 雌マウス及び B6J マウス（雌雄）では 18 ヶ月齢前後で減少傾向を示した。B6N 雌マウスは 20 ヶ月齢頃から、B6J 雄マウスは 22 ヶ月齢頃、B6J 雌マウスは 24 ヶ月齢を越える頃から急激に減少した。23 ヶ月齢の雄について、B6N と B6J の生存率が逆転する現象が観察された。また、B6N マウスは雌雄ともに生存率の減少傾向は類似しているが、B6J マウスは雌雄が著しい差が認められた（例、27 ヶ月齢の生存率雄 13%、雌 68%）。両系統ともに搬入する Lot によるばらつき（夏の時期に生まれた個体の生存率はやや減少）が見られた。（図 1）。

体温（肛門部の皮膚温）は、両系統ともに 12-18 ヶ月齢頃から徐々に体温が減少傾向を示した。18 ヶ月齢を越える頃からばらつきも観察された。B6J 雄マウスについては、B6J 雌マウスおよび B6N マウス（雌雄）と比較して体温が低かった。（図 2）

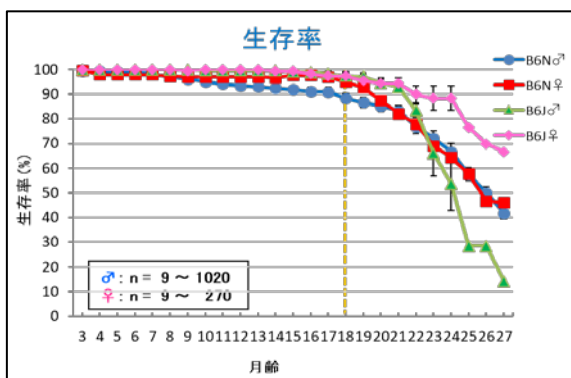


図 1 B6 マウスの生存率

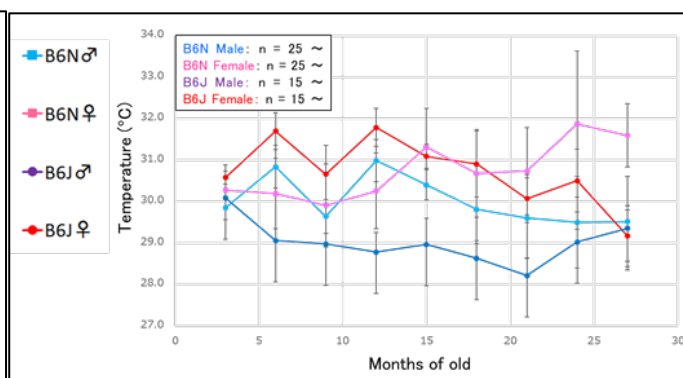


図 2 B6 マウスの体温変化

2. 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する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、B6J 雌マウスにおいて、3 ヶ月例頃から顕著に観察された。

3. 病理・形態学的解析（組織）

B6N マウスにおける自然死（雄 329 匹、雌 138 匹）による剖検から、雄では精嚢腺肥大（貯留）の 76.6%をはじめとした肝臓退色（44.1%）、肝臓腫大（38.3%）および脾臓腫大（17.3%）、雌では肝臓退色（30.4%）、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。その他、血管炎や皮膚炎、腎炎等も若干例認められた。しかし、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。この解剖結果から、亜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（図 3）。

主要臓器の組織作製から、腎臓において 24 ヶ月齢のマウスから B6J マウスの糸球体の全体にアミロイド沈着が観察された（図 4）のに対して、B6N マウスは確認できなかった（図 5）。

| B6N (n: 48) | | B6J (n: 48) | |
|-------------|---------------|-------------|---------------|
| 所見 | 発生率 (%) | 所見 | 発生率 (%) |
| 脾腫 | 33.3% (16/48) | 脱毛 | 54.2% (26/48) |
| 肝腫大 | 18.8% (9/48) | 精嚢腺貯留 | 25.0% (6/24) |
| 精嚢腺貯留 | 12.5% (3/24) | 腹膜炎 | 2.1% (1/48) |
| 脱毛 | 4.2% (2/48) | 肝腫大 | 2.1% (1/48) |
| 腹腔内腫瘍 | 2.1% (1/48) | 副腎肥大 | 2.1% (1/48) |

図 3 解剖時に高頻度に観察された病変

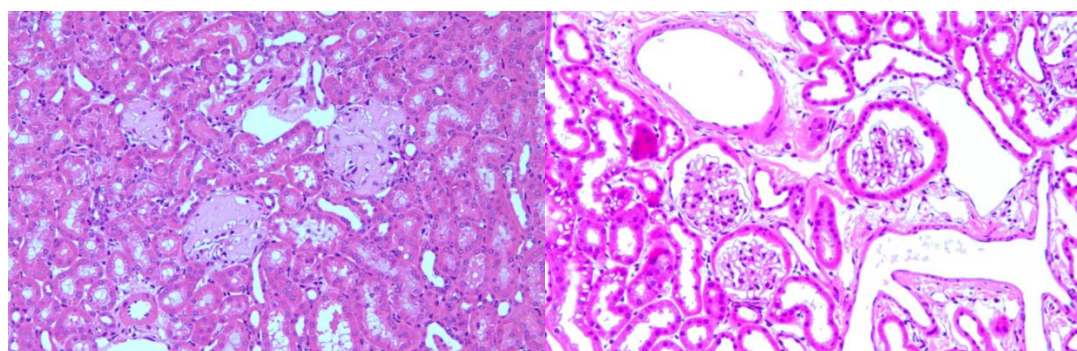


図 4 B6J マウス腎組織像（×200）

図 5 B6N マウス腎組織像（×200）

4. 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 マウスおよび B6J マウスにおいて雄よりも雌の方に濃度が高く、月齢によるばらつきが大

きく観察された。雄については、B6N マウスは 18 ヶ月齢頃から、B6J マウスは 24 ヶ月齢頃に急激に濃度が上昇した。加齢に伴い上昇傾向にあった。

5. 血液学的解析

B6N マウスおよび B6J 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 (図 5)。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。

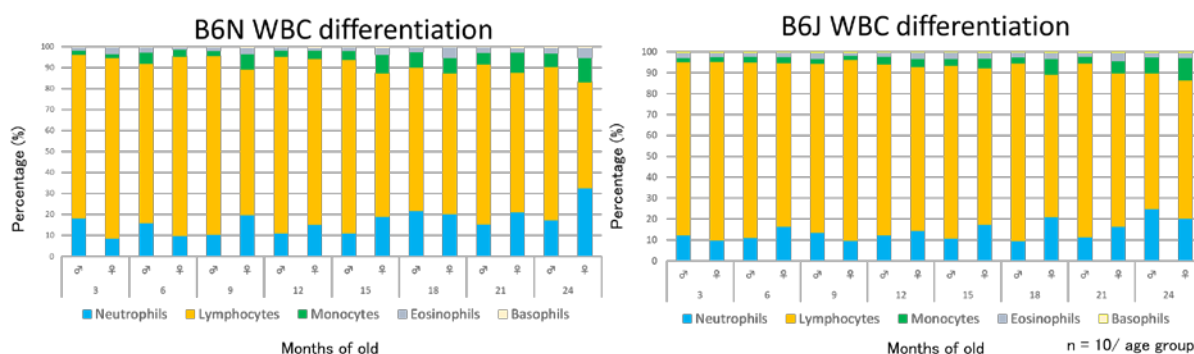


図 5 B6 マウスの白血球分画

D. 考察・まとめ

複数の解析結果から、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) は、形態学的な関連についても新たに解析する必要がある、ヒトのサルコペニアまたはフレイルのモデル動物として期待される。

病理形態学 (解剖) および血液学的な結果から、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。

今回の結果では、腫瘍や炎症の発生が加齢変化によるものか、環境変化 (例. 個体間のファイティング等による長期的なストレス) によるものか明らかにできなかった。しかし、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社会貢献に繋がる。

今後、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。また、外部研究機関にも AF 動物を供給できる体制を作り上げていきたい。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2018 年度

なし

2019 年度

- 1) Ohka F, Deguchi S, Katsushima K, Shinjo K, Kato A, Yamamichi A, Suzuki H, Aoki K, Matsui Y, Shimamura T, Maruyama R, Sato S, Takahashi S, Ogiso N, Suzumura A, Kimura H, Wakabayashi T, Zong H, Natsume A, and Kondo Y. Important Roles of EZH2 during IDH wild-type Grade III Glioma Formation. , Cancer Res. 79:4814-27 (2019)

2020 年度

- 1) Ueta R, Sugita S, Minegishi Y, Shimotoyodome A, Ota N, Ogiso N, Eguchi T, Yamanashi Y
DOK7 gene therapy enhances neuromuscular junction innervation and motor function in aged mice. iScience 23, 101385, (2020)
- 2) Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, and Matsushita K
Effect of Brazilian green propolis extracts on experimental aged gingival irritation *in vivo* and *in vitro*, J. Oral Bio.63, 58-65,2021

2. 学会発表

2018 年度

- 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, 2018, Baltimore , USA
- 2019 年度
- 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
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
- 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
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
- 3) 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
- 4) 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

- 5) 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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

2020 年度

- 1) 小木曾昇
実験動物福祉に配慮した自然老化マウスの育成から分かったこと
第 67 回日本実験動物学会総会・シンポジウム 4 2020 年 5 月 23 日 大阪市
- 2) アルムニアフリオ、富田耕平、高野一路、田村慎哉、河崎晴香、小木曾昇
自然老化マウスの人道的エンドポイント設定に関する老化マーカーの検索
第 67 回日本実験動物学会総会 2020 年 5 月 23 日 大阪市
- 3) 高野一路、野間聡子、谷井駿一、富田耕平、アルムニアフリオ、小木曾昇
ラットの自然老化モデル作製に向けた基礎データの蓄積と解析について
第 67 回日本実験動物学会総会 2020 年 5 月 23 日 大阪市
- 4) 小木曾昇
長寿医療研究の実験動物飼育管理を支える、気相式核酸分解技術による革新的高水
準消毒システムの紹介
第 67 回日本実験動物学会総会・ランチョンセミナー 2020 年 5 月 24 日 大阪市
- 5) Noboru Ogiso, Kohei Tomita, Kazumichi Takano, Shinya Tamura, Haruka
Kawasaki, Nobuko Morikawa, Julio Almunia,

Identification of Humane Endpoint Markers in Naturally B6 Aged Mice
71th AALAS National Meeting (Virtual), October, 2020 , 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