長寿医療研究開発費　２０２１年度　総括研究報告

エイジングファーム育成動物の生体機能変化の情報の蓄積と飼育環境の標準化に関する研究（２１－２５）

主任研究者　小木曽　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

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）における各種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から遺伝子・タンパクレベルまでの生理的基礎データを取得し、その情報を公開する（カタログ化)。昨今の遺伝子組換え動物を用いた動物実験の隆盛と呼応して、自然老化動物の有用性・重要性が再認識されており、有用性が高い。またファーム保有動物の基礎データの公開は施設としての負荷価値を高めることにながる。

また長期飼育による育成では、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考えられる。そこで、AF 動物(マウス中心)の加齢変化による生理・生体変化を正確に把握する（生理的老化を目指す）とともに、正常な加齢を妨げない飼育環境を統御するための条件設定（環境エンリッチメントの種類と嗜好性等）について検討を行った。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。

主任研究者

小木曽　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）

Ａ．研究目的

本研究では、研究者に提供することを前提として飼育される AF 動物の１）適正な飼育管理下における動物の個体レベルで生じる加齢性変化に関するデータを取得する。同時に、２）正常な加齢を妨げないための飼育環境を統御する条件設定(飼育環境の標準化)について検討を行う。

Ｂ．研究方法

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 ヵ月ごとに導入し、生涯飼育することにより老齢化させて生理・生体に関する網羅的な解析を行った。血液・生化学データについては、ファイティング等の影響による炎症や腫瘍等を除いた正常個体のみを抽出した。（生存率や剖検所見等の一部の解析には、①研究者向けに供給している AF マウス、②基礎老年学研究拠点の育成・連携強化（課題番号 19－1、主任研究者：丸山光生）で育成したマウスを使用した。）

１．生理学的解析（寿命（生存率)、体重測定、体温等）
２．血液学的解析（血球カウント、血液形態学検査等）
３．生化学・免疫学的解析（ストレス性ホルモン（コルチコステロン)、血清や尿を用いた臨床化学検査等）
４．病理・組織学的解析（解剖所見、組織像等）

（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

生存率について、B6N 雄マウスが 15 ヶ月齢から、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%）（図 1)。両系統ともに 3 ヶ月毎に搬入する 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。
体重の加齢変化では、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（図２)。

体温の加齢変化について B6N 雄マウスおよび B6J 雌雄マウスでは 12 ヶ月齢頃から、B6N 雌マウスでは 15 ヶ月齢頃から低下傾向を示した。21 ヶ月齢を超える頃から両系統と

もに体温の上昇やばらつきが観察された（図３）。

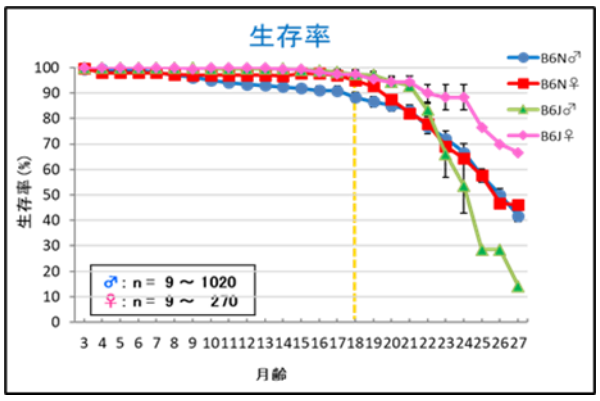


図１　B6 マウスの生存率

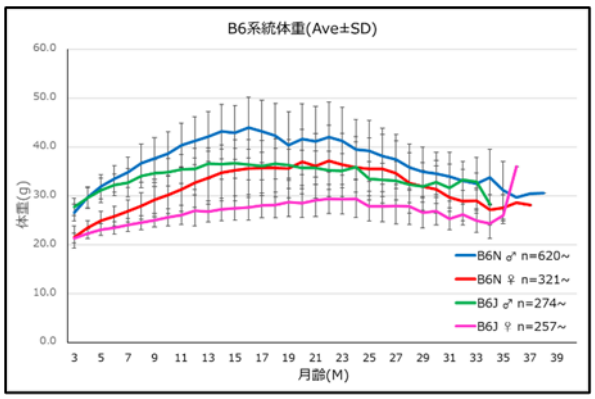


図２　B6 マウスの体重変化

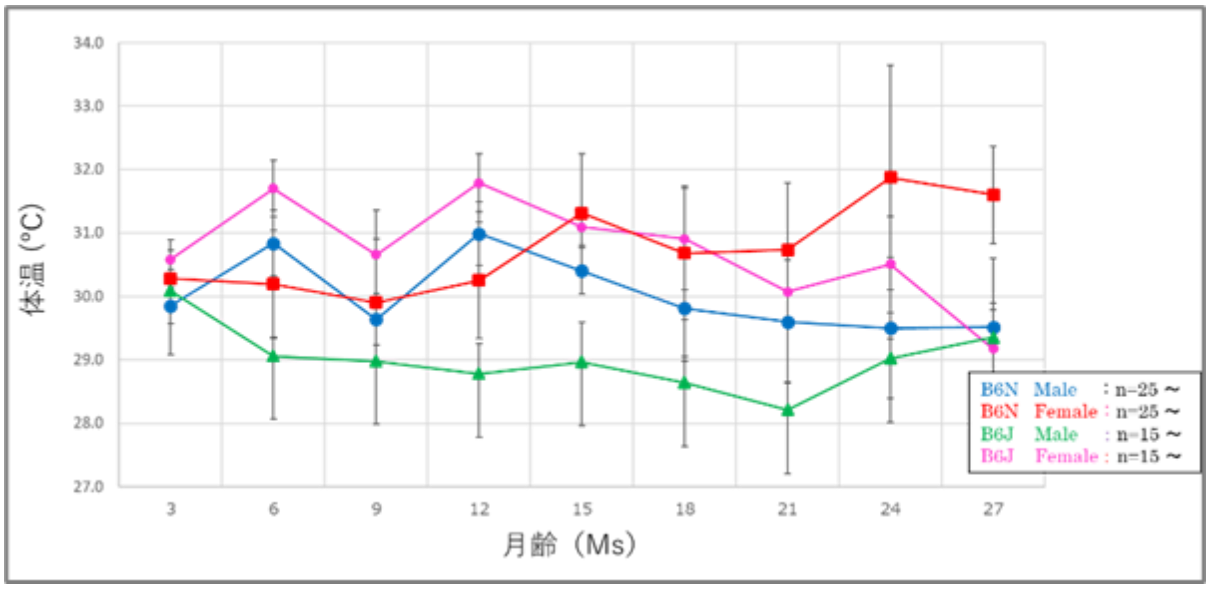


図３　B6 マウスの体温変化

２．血液学的解析

B6 マウスの環境要因による炎症や腫瘍等を除く正常な個体を用いた 3～24 ヶ月齢の血液検査値を図４に示した。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、６）。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。

エイジングファームマウス　血液正常値

	B6J				B6N				
	雄		雌		雄		雌		
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	単位
WBC	106.7	31.9	55.2	22.3	87.9	22.0	49.1	15.2	10^2/uL
RBC	952.9	96.8	999.0	66.5	968.2	54.4	958.0	69.6	10^4/uL
HGB	13.8	1.6	14.4	1.1	13.9	0.9	14.1	0.9	g/dL
HCT	40.9	5.1	43.7	2.9	41.9	2.7	42.3	2.7	%
MCV	43.9	1.0	43.7	0.5	43.3	0.6	44.2	0.7	fL
MCH	14.5	0.4	14.4	0.3	14.4	0.2	14.7	0.3	pg
MCHC	33.0	0.6	32.9	0.6	33.2	0.5	33.3	0.5	g/dL
PLT	234.8	86.9	164.2	23.2	185.5	32.3	131.1	23.7	10^4/uL
LYM	75.1	6.9	71.2	14.0	69.1	14.5	62.9	19.8	%
OTHR	24.9	6.8	29.0	13.8	30.9	14.5	37.1	19.8	%
LYM#	80.6	26.8	40.7	19.9	61.9	23.9	33.0	19.3	10^2/uL
OTHR#	26.1	8.6	14.5	6.1	25.6	10.0	16.1	5.8	10^2/uL
RDW-SD	29.6	0.5	28.6	0.8	29.9	1.2	28.3	0.6	fL
RDW-CV	15.9	0.5	15.5	0.8	17.1	1.1	15.4	0.4	%
PDW	7.4	0.2	7.5	0.2	7.7	0.3	7.8	0.3	fL
MPV	6.5	0.3	6.5	0.3	6.6	0.4	6.7	0.2	fl
P-LCR	3.9	1.3	3.6	0.8	3.9	1.6	4.6	0.7	%

3~24ヶ月齢（3ヶ月毎）の平均　各n=5

図４　B6 マウスの血液正常値

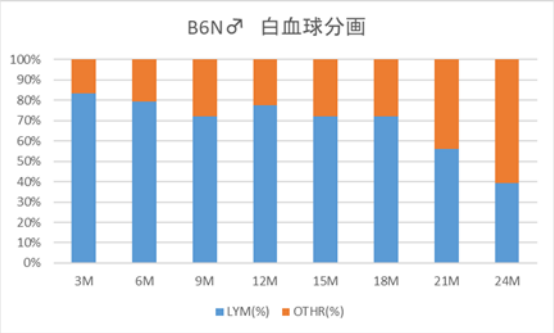


図５　B6N 雄マウスの白血球分画

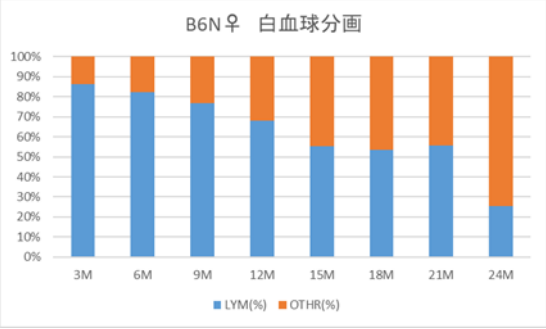


図６　B6N 雌マウスの白血球分画

３．生化学・免疫学的解析

B6 マウスの環境要因による炎症や腫瘍等を除く正常な個体を用いた 3～24 ヶ月齢の生化学検査値を図 7 に示した。検査の中でも ALP や LIP では B6 雄マウスの系統差が認められたが、加齢に伴う顕著な変動は見られなかった。

	B6J				B6N				
	雄		雌		雄		雌		
	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	単位
GOT/AST	41.9	8.2	44.3	5.5	46.2	8.4	47.3	8.8	U/L
GPT/ALT	25.7	5.9	26.6	4.9	25.6	4.6	26.1	5.2	
CPK	56.9	11.2	42.7	13.3	51.2	11.1	40.3	9.5	
LDH	323.7	95.3	295.0	142.6	322.2	122.2	251.6	105.4	
AMY	3588.3	1027.7	3009.6	815.5	3796.6	795.2	3592.2	808.5	
ALP	254.7	57.0	387.0	113.7	184.3	58.4	282.3	64.7	
LAP	33.8	7.6	38.9	4.6	33.4	0.7	39.5	5.5	
LIP	33.8	8.7	29.8	8.6	24.5	9.6	23.4	6.7	

3～24ヶ月齢（3ヶ月毎）の平均 各n=5～8

図７　B6 マウスの生化学正常値

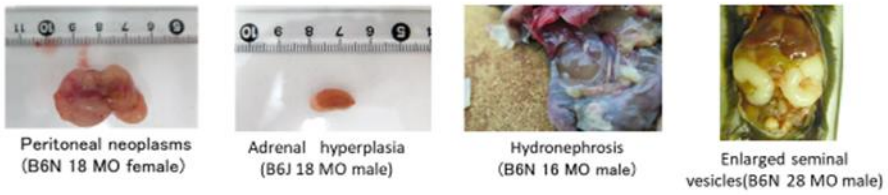
４．病理・組織学的解析

B6N マウスにおける自然死による剖検から、雄では精嚢腺肥大（貯留）をはじめとした肝臓退色、肝臓腫大および脾臓腫大が、雌では肝臓退色、肝臓腫大および脾臓腫大が比較的多くの個体で観察された。特に脾臓の腫大に関係して、血液学的にも白血病の細胞が確認された。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（図８）。

組織学的には、B6N マウスの 19 ヶ月齢において雌雄ともに腎糸球体の軽度アミロイド様物質の沈着や間質へのリンパ球浸潤が観察された(図９)。一方、B6J マウスの 19 ヶ月齢の雄では、腎糸球体に重度のアミロイド様物質の沈着の他、糸球体線維症が認められた(図10)。同月齢の雌マウスでは軽度のアミロイド様沈着、メサンギウム基質がやや増加傾向であった。

加齢動物剖検（死亡）時に高頻度に観察された病変

B6N（n：48）		B6J（n：48）	
所見	発症率（%）	所見	発症率（%）
脾臓腫大	33.3%（16/48）	皮膚炎	54.2%（26/48）
肝臓腫大	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）
皮膚炎	4.2%（2/48）	肝臓腫大	2.1%（1/48）
腹膜腫瘍	2.1%（1/48）	副腎過形成	2.1%（1/48）



Peritoneal neoplasms (B6N 18 MO female)　Adrenal hyperplasia (B6J 18 MO male)　Hydronephrosis (B6N 16 MO male)　Enlarged seminal vesicles(B6N 28 MO male)

図８　B6 マウスの剖検による所見

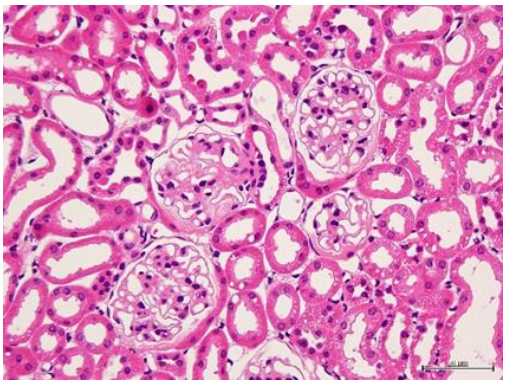


図９　B6N 雌マウス腎臓の HE 像（×40）

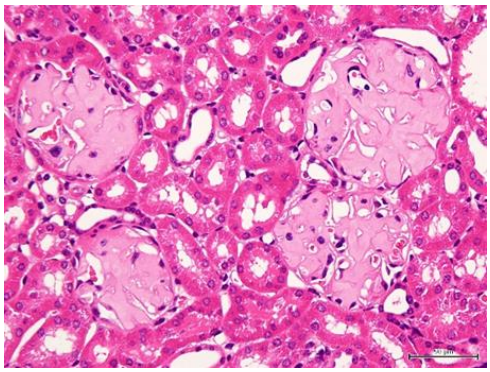


図 10　B6J 雄マウス腎臓の HE 像（×40）

D．考察・まとめ

複数の解析結果から、加齢に伴う体重減少、解剖所見（病気の発症時期）、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、マウス系統の特性だけでなく環境要因（例．ファイティング等によるストレス）による病態との区別がいくつか認められた。

血液および生化学の正常値については、さらに N 数を増やすことで適正な評価ができると考えられた。生化学検査において現在の検査項目数では、全身状態の把握が困難であり、BUN や TP、CRTN 等の項目を増やす必要があり検討を考えている。

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。組織学的解析から、B6N よりも B6J マウスの方が特に腎臓の加齢変化が顕著に観察されたが、さらに例数を増やして検討することが考えられた。

今回の結果から、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がわかりつつあり、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り、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

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）が重要であると考えられた。

Ｅ．健康危険情報

なし

Ｆ．研究発表

１．論文発表

１）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）Kimura T, Inaka Kengo, Ogiso N
Demonstrative Experiment on the Favorable Effects of Static Electric Field Treatment on Vitamin D3-Induced Hypercalcemia
Biology 2021, 10(11), 1116; https://doi.org/10.3390/biology10111116
※分担研究者と重複

２．学会発表

１）小木曽昇、冨田耕平、森川信子、河﨑晴香、高野一路、坂本千夏、アルムニアフリオ
自然老化マウスの亜系統における血液・病理形態学的な加齢変化の特徴
第 68 回日本実験動物学会総会（Web 開催） 2021 年 5 月 19 日～21 日 東京

２）アルムニアフリオ、冨田耕平、高野一路、坂本千夏、河﨑晴香、森川信子、小木曽昇
自然老化マウスにおける終末期の臨床症状と人道的エンドポイントの設定
第 68 回日本実験動物学会総会（Web 開催） 2021 年 5 月 19 日～21 日 東京

３）高野一路、野間聡子、坂本千夏、冨田耕平、アルムニアフリオ、小木曽昇
健康的な自然老化ラット作製に向けた基礎データの蓄積と加齢変化について

第68回日本実験動物学会総会（Web開催）　2021年5月19日～21日　東京

４）小木曽昇

老齢マウスの育成から加齢変化 －亜系統の比較からエンドポイント設定

BPNP2021サテライトシンポジウム －B6J Aged研究会 第３回講演会－（ハイブリッド開催、日本チャールス・リバー主催）2021年7月13日　京都

５）小木曽昇、冨田耕平、高野一路、坂本千夏、河崎晴香、森川信子、アルムニアフリオ

自然老化マウスにおける人道的エンドポイントの設定　－適正な自然老化モデル研究を目指して－

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月15日　Web開催

６）澤田浩秀、小木曽昇

腸内環境の変化がパーキンソン病における神経変性に及ぼす影響について

－Rotenoneモデルにおける検討－

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月15日　Web開催

７）澤田浩秀、小木曽昇、六車　香織、高野　聡美

腸内環境の変化がパーキンソン病における神経変性に及ぼす影響について

－MPTPモデルにおける検討－

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月15日　Web開催

８）坂本千夏、野間聡子、高野一路、冨田耕平、アルムニアフリオ、小木曽昇

自然老化ラット作製に向けた基礎データの蓄積と加齢変化について

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月15日　Web開催

９）アルムニアフリオ、冨田耕平、高野一路、坂本千夏、河崎晴香、森川信子、小木曽昇

加齢育成マウスにおける環境エンリッチメントの有用性

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月16日　Web開催

１０）野間聡子、坂本千夏、高野一路、冨田耕平、アルムニアフリオ、小木曽昇

自然老化ラットを用いた加齢による血液パラメーター変化について

第55回日本実験動物技術者協会総会、2021年10月16日　Web開催

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