

長寿医療研究委託事業
総括研究報告書

21指-23 長寿医療研究のための実験動物（哺乳類）における有効性と外挿可能範囲に係る研究

研究代表者（所属施設）：田中 慎（国立長寿医療センター）

研究要旨 長寿医療研究のための実験動物（哺乳類）における有効性と外挿可能範囲を検討するため、種々の動物種、実験動物・家畜・ペット・ヒトなどを、研究班員・研究支援者やさまざまな共同利用研究システムに依頼・利用し、構成成分や機能で最も共通性が高い骨に着目し、その特性から相同の組織における違いに注目し、大腿骨を比較した。げっし目だけに注目すると、下顎骨・環椎・第二腰椎・大腿骨で計測の再現性では、下顎骨が最も良好であった。下顎骨には歯牙があり、齲蝕・歯周病・咬耗・下顎頭・下顎角や筋突起なども指標として利用できるという利点はあったが、マウスでは小さすぎて椎骨が測定できず、ヒトへの外挿を考えると大腿骨しか対象とならなかった。体内最大の長骨である大腿骨でも、マウスでは検出限界に近いめか、唯一、体毛・皮膚・筋といった骨周囲組織の影響を受けた。骨塩量（Bone Mineral Contents: BMC）と骨塩率（Bone Mineral Ratio: BMR, BMC/Bone Weight）で大腿骨の測定結果をプロットすると、骨塩量を対数とすることでマウスからヒトまでを一枚の表に描出でき、測定した総ての動物種は、BMCのX軸で10 mgから1,000,000mgの、BMRのY軸では0.38から0.63の0.25の間に総て納まった。この図表は俯瞰にも部分的な拡大にも対応でき、同じ構成成分のものを大きさや割合、そして機能との関与を考察する上で、極めて有用で、世界初のものである。

A. 研究目的

長寿科学・長寿医療研究が目指すものは、高齢者のQOL維持向上に資する生物学的研究と非生物学的研究、そして社会学的研究である。生物学的研究の目的は、老年病の打開・解析と老化機構の解明である。ここにやっとな動物実験や実験動物に需要が立ってくる。しかしながら、これらのヒトへの貢献、外挿、を考えると、動物種、性、品種、系統などによる違いは、必ずしも実のある貢献に至らないことを考えねばならない。では、この隔たりはどのくらいであろうか。

げっし目に属するマウスやラットを加齢モデル動物として用いた見識ある基礎老化研究者たちは、これらの外挿の可能性と制約を考え、寿命での相関と同様とする提案があった。これには、動物種の平均寿命と最高寿命の何れが妥当かという論議が大きかったが、飼育環境の違い、サル類などでは微生物が統御されたものがないので、は大きな要因ではあったが、平均寿命と考えられるもの、というのがゆるやかな合意となった。この提案の妥当性を検討するには、動物種の寿命を調査するより、ヒトから見て節目の動物種が具体的に知られているかどうかの方が容易と見え、順に当てはめてみると、ヒトはほぼ80年であるから、半分の40年には真猿のアカゲザルやカニクイザルがある。20年には、ウシとカイヌが序せられるときがある

。10年にはカピバラのような大型のげっし目が、5年も同じくヌートリアのようなげっし目が序せられて、2.5年のマウス・ラットへ至る。しかしながら、人類は、食虫目のような共通祖先からげっし目や真猿と類似のものを経、節目で共通祖先から分かれて進化したと考えられている。またげっし目や真猿内の違いには小進化が、種を越えるものには大進化が貢献したと考えられている。このような倍々変化は、一遺伝子座の作用でも説明されている。最近われわれは、体重がラットと等しい、小型真猿であるコモンマーモセットが、人工飼育環境下で20年生存できる事が特定された。

本研究では、動物種の多様性を利用し、先人の寿命からの推定と同じく骨の特性から外挿の可能性を検討することとした。晒骨標本とした骨を骨塩量（BMC: Bone Mineral Contents）と骨塩率（BMR: Bone Mineral Ratio、BMCを骨重量で除したもの）でラットの第一頸椎（環椎）・下顎骨・第二腰椎・大腿骨を試すと、下顎骨での再現性や最も良好でBMRが高かった。しかし、椎骨がマウスで測定できず、下顎骨が左右に分かれない種への外挿が目的であるため、BMCが最も高く、体内最大の長骨といわれる大腿骨と比較する事とした。

本研究事業では、課題に応じて分担研究者を選抜依頼できるが、今回は2つの新規設定を行った。一方は、分担研究課題に加え、長寿医療

センターでは得がたい(実験)動物種や系統を供給できる研究者の、他方は本研究を自己評価できる研究者の参画であった。

新飯田俊平・辻尾祐志(国立長寿医療センター、骨の変化の生化学的指標と測定上の検討)、高橋良哉(東邦大学、ラット)、阪口雅弘(麻布大学、イヌ)、吉田高志(独立行政法人医薬基盤研究所、カニクイザル)、塩谷恭子(国立循環器病センター、ミニブタ)、重茂浩美(文部科学省科学技術政策研究所、自己評価)を分担研究者とし、佐賀大学総合分析実験センター生物資源開発部門(ウサギ)、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所(ノックアウトマウスなど)と日本クレア(コモンマーモセット)からは支援を、京都大学霊長類研究所(ニホンザル)からは標本の貸与を受けた。

B. 研究方法

ヒトと実験動物

比較に用いたのは総て晒骨とされ右側の大腿骨全体とした。供給源は、国立長寿医療センターの加齢動物育成施設: Aging Farm で加齢育成した近交系マウス(C57BL/6CrSlc)と近交系ラット(F344/NSlc)に加えクロズドコロニーラットSlc: SD、近交系マウス、A/J、AKR/N、BALB/c、C3H/He、CBA/N、DBA/2のリタイア個体、21指-23の班員や研究協力者の支援を得て、東邦大学薬学部で加齢育成した近交系ラット:F344/DuCrICrlj、地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター研究所で開発されたSMP30/GNL-KOマウス、近交系マウス、BALB/c、C3H/He、CBA/J、DBA/2、C57BL/6J、C57BL/6N、クロズドコロニーマウス、ddYとICR、佐賀大学総合分析実験センター生物資源開発部門で飼育されたStd:JW/CSKウサギ、麻布大学で所蔵されているイヌの大腿骨標本とビーグル犬から作成されたことがわかっている、国立循環器病センターで飼育された、Clawnミニブタ・Göttingenミニブタ・マイクロミニブタ、日本クレア中動物部門で加齢育成されたコモンマーモセット、独立行政法人医薬基盤研究所霊長類医科学研究センターで飼育されたカニクイザル、京都大学霊長類研究所で飼育されたニホンザル、さらには、愛知医科大学・兵庫医科大学・地方独立行政法人東京都健康長寿医療センターが所蔵するヒトの標本を用いた。

標本作製法

当センターで晒骨標本を作成する時は、0.5% パパイン(ED3.4.22.2, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)液に浸漬し、37°Cで一晩振盪培養し、風乾した。

ブタやウサギでは、この処理だけでは銜色の標本となるだけで、紙に脂がしみ出てきた。そこでエタノールとクロロホルムの等量混液に浸漬して脱脂した。脱脂の前後でDXA測定を行うとBMCにほとんど変化はなく、骨重量が20%程度減少し、BMRが増加した。

これは、DXA測定の正確さと脱脂の必要さを支持した。

測定方法

BMC、骨面積(Area)および骨密度(BMD)の測定や算出はアロカ(東京)のDXA(DCS600 EX-III)で行なった。

(倫理面への配慮)すべての動物実験は、分担研究者が所属する機関の定める「動物実験取扱規程」に則り動物実験計画書を作成し、それぞれの動物実験(倫理)委員会で承認を得て実施した。

C. 研究結果

大腿骨の分布

C57BL/6NマウスはBMRで0.38から0.48の間へ、BMCで20mgあたりへプロットされ、動物種単独で0.48以下なのはこの系統だけであった。

ラットは系統に関係なくBMRで0.53、BMCで400mgあたりへプロットされた。

コモンマーモセットでは、BMCがラットとほぼ同じ位置に集積したのに対して、BMRが0.58から0.38の間に広がっていた。平均値を求めると、雌雄とも0.48より大きい値となったが、BMRの広がりはずしも年齢だけとは関連しておらず、余程の若齢でなければ低値ではなかった。

幼若なウサギだけが、BMCが800、BMRが0.5のあたりにプロットされ、BMCで1,000以下なのはここまでであった。

BMCの10,000から100,000の間では、BMRで0.48より上位にヒト以外の動物が総てプロットされた。

BMCの低い側から、ウサギ、マイクロミニブタ、カニクイザル、ビーグルのような小型犬、中型犬、大型犬と並んで、中型犬と同じあたりにニホンザルとマイクロミニブタが、大型犬と同じあたりにゲッチングミニブタとクラウンミニブタがプロットされた。

0.60といった最大のBMR値はこのゲッチングミニブタの右脚で見られた。この高値は左脚が低値であることから、かばったための代償性ではなかったかと推定された。

BMCが100,000を越えた領域にはヒトだけが入り、BMRは0.61から0.56であった。

他のマウス

ノックアウトマウスでは、対照よりBMCとBMRの両指標で低値であったが、ノックアウトを代償する処理の後には対照と同じ値にまで回復していた。

ノックアウトマウスの骨は、極めて粗鬆性が高く、下顎骨は薄く、周辺部は壊れており、歯根部では歯と下顎骨の間に間隙が見られた。大腿骨ももろく、骨頭部で折れたり、骨幹部が裂けていたりした。

測定した、いくつかの近交系ならびにクロズドコロニーマウスでは、平均値で、下顎骨がBMCで9と23の、BMRで0.42と0.52の間にほぼプロットされ、大腿骨がBMCで15と30の、BMRで0.42と0.49の間にプロットされた。

これは、C57BL/6Nの大腿骨より、0.4ほど高い値であった。

D. 考察

マウスからヒトまでの大腿骨を、BMCとBMRで展開して比較し、いくつかのマウス系統の大腿骨と下顎骨を同様に比較した。

動物種や系統の大腿骨は類似の領域にプロットされ、今回の提示方法では、種差とこれを現出しているのが骨塩量とそれが骨重量に占める割合であったので、極めて骨の実態、構成成分の量や性質を反映した比較が出来ていたといえる。従来骨は構成成分上の相同性は主張されて久しかったのに対して、これをうまく表示する事ができなかった。しかし、DXAによる測定結果を骨重量で除すると極めて狭い範囲に総ての動物種の情報が遺伝学的な制御とか年齢によって集積する、すなわち狭い範囲でありながら系統差や年齢差を検出し、動物種間の比較を可能にした。これからはさまざまな用途での貢献が期待される。

先ず、げっし目実験動物とヒトの距離、外挿の可否であるが、マウスとヒトの間には、BMCで100、1,000、10,000、100,000という4つの不連続な境界があり、BMRでも同じく0.48という不連続境界があった。これは基礎老化学者が、寿命から外挿の可否を図った時と全く同様の隔たりであり、1/2の5乗の隔たりと考えられた。これは1/32の確率となるので、外挿での有効性は3%程度と算出される。しかし、寿命からはマウスと同程度の外挿貢献度しか期待されなかったラットは、骨のプロファイルでみると、ヒトとの距離は、BMCでの1,000、10,000、100,000の3つの境界ということとなり、貢献度は1/2の3乗、1/8で、12.5%と跳ね上がった。骨特性に関しては、ラットの方が大きな貢献度が期待できるようである。

マウスでは、系統差が大きく、これを選抜する事で、C57BL/6Nより大きな外挿貢献度が期待できるような系統がある。基礎情報を取

集し、少しでも役に立つ系統を得る努力をすることは大切であろう。併せて、大きなマウスの骨特性における系統差の背景を調査しておく事は、更に重要な課題となる。

ノックアウトマウスでの機能喪失の補填であるが、この補填と同じ処理を健常マウスに施すと骨特性に影響を持つ事がわかった。この機構を解明することも重要な課題となる。

イヌやサル骨の骨特性解析は、いわゆる品種や異なる類の特定にも貢献した。イヌの大腿骨に混入していたヒツジと思われる種の大腿骨を、イヌとは全く異なる部位にプロットしたことも今回の測定・提示方法の適正さを支持していると考えられる。

BMCとBMRによる展開は、探索したいプロットエリアの伸縮が自由である事もこの方法の優れたところといえるだろう。 μ CTでの確認は、骨密度がBMRに近似する値である事を確認している。DXA測定とはいえ、BMCが正確に計測されているという事実は重要である。

また、ウサギやブタの大腿骨では、正確な骨重量を得るためには脱脂が必須であった。この処理は、おおよそ20%程度の骨重量減少に結果したが、BMCの値は全くこの処理の影響を受けていなかった事もDXAの利点や正確さが証明されたものとも言え、今後の利用や応用に大きな弾みとなる事が期待される。

しかしながら、2系統のラットで、骨特性の加齢変化と、骨代謝マーカーの加齢変化が全く一致しなかった事は、種差を含めた慎重且つ詳細な検討の必要性を示唆した。これには外挿の可否だけでなく、実際に動物の骨の加齢変化を捕捉できような有用な指標に需要を生ずる。生理学的な指標にあっても、ヒト用、動物用、共用とあって、特に最後のものの開発や整備が待たれるところである。更に、動物とヒトの相異が慎重に、且つ広範に検討・探索されなければならない。

E. 結論

さまざまな動物種の加齢様態を、骨という化学的構成と生体機能で脊椎動物での共通性が最も高いと考えられる組織で評価し、外挿の可能性を図るとともにこのような試みを自己評価した。

骨塩量：BMCと骨塩率：BMRで大腿骨を展開するとマウスからヒトまでの一覧が可能となり、不連続線の数から相互の隔たり、外挿の有効度が推定できた。ここではマウスは3%程度の貢献度しか期待されないが、ラットでは12.5%と数多の指標の中でこれらを区別した。併せて、骨特性でのマウスの多様性は予想以上に大きく、使用に当たっては十二分の注意と認識が必要である事も示された。

- F. 健康危険情報
分担研究報告書参照。
- G. 研究発表
分担研究報告書参照。
- H. 知的財産権の出願・登録状況
分担研究報告書参照。