

長寿医療研究のためのモデル動物の開発と環境統御との総合評価に関する研究に関する研究
(27-13)

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

長寿研で育成しているエイジングファーム動物 (AF 動物) の加齢・老化モデルとしての有用性の検証を行った。C57BL/6NCrSlc マウスを用いて生涯飼育することにより老齢化させた。試験項目として、生理 (体重、摂餌量、生存率)、行動 (ロータロッド試験、観察)、形態 (剖検含む) の他、腸内細菌叢について経時的に測定し (27ヶ月齢現在) 解析を行ったところ、体重は雄が18~19ヶ月齢、雌は14~16ヶ月齢がピークとなり、27ヶ月齢まで減少は見られなかった。摂餌量について雌雄差は認められなかった。また、加齢に伴って脱毛や脱色が目立つ個体が増加傾向にあった。全体的な生存率に雌雄差はなかったが、ケージ単位に変化 (80~100%) が認められたことから、ケージ内の動物間の縄張り以外のコミュニケーションが存在すると推察された。ロータロッド試験では、加齢に伴う体重増加に依存して運動機能が低下する傾向であった。死亡個体による剖検から、雄では生殖器の異常の他、雌雄に関係なく脾臓のリンパ腫瘍等が多く認められた。腸内細菌は12ヶ月齢頃から細菌叢に変化が生じた。今後、例数を増やすこと、さらに生理学的、行動学的、形態学的、細菌学的に多面的な理解が必要であり、これらの結果から老化メカニズムの解明に向けたエビデンスの構築、フレイル等の老年病モデル動物の開発に役立つことが期待される。

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)

分担研究者

丸山 光生 国立長寿医療研究センター 副所長

老化機構研究部 (部長)

A. 研究目的

長寿研で育成しているエイジングファーム動物（AF 動物）の加齢・老化モデルとしての有用性を検証するとともに、検証を確立する中で自然発症の『フレイル』モデル動物の開発と遺伝子操作技術（CRISPR/Cas9 システム）を用いた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、複数の環境条件（①床敷き材、②飲水、③環境エンリッチメント、④動物ケア）を設定し、タンパクから個体レベルについて、エイジングファーム動物（マウス、ラット）を用いて以下のような網羅的な解析を計画し、特に平成27年度はマウスを中心に解析を進めた。

1. 行動学的解析（老化度判定、長期活動計測、行動観察等）
2. 生理学的解析（寿命、体重測定、テレメトリーシステムによる血圧、体温、心拍数計測等）
3. 病理・形態学的解析（Sirtuin や p53 等の加齢・老化遺伝子発現部位や発現量、MRI 撮影による観察）
4. 生化学・免疫学的解析（IL 等の炎症性サイトカイン、Bifidobacterium、Lactobacillus 等の腸内細菌叢）

a) 行動学および生理学的解析

AF マウス（C57BL/6NC r Slc、♂40 匹、♀40 匹）に床敷材（紙製 2 種類、木製 2 種類）を用いて、月齢ごとに運動量（ロータロッド試験）、体重、摂餌量（1 日の平均摂餌量）、生存率について検討を行った。

b) 病理・形態学的解析（組織）

エイジングファーム動物の飼育中に死亡した個体を剖検し、肉眼的な観察を行い、主要属（肝臓、脾臓等）をパラフォルムアルデヒド固定によるパラフィン切片を作製し、H.E 染

色を行った。また、8ヶ月齢および27ヶ月齢のマウスを用いて神経筋シナプスとその関連組織に関する形態学的に解析（蛍光染色）した。

c) 生化学・免疫学的解析

3, 12, 18, 21ヶ月齢のマウスの糞便から腸内細菌叢を次世代シーケンサーにより解析した。

（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、また、遺伝子改変動物の扱いについてはカルタヘナ条約を遵守した適切な拡散防止措置も施した上で、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けた後に各研究機関が定めた動物実験ガイドラインに則って実施した。

C. 研究結果

a) 行動学および生理学的解析

運動量は平均体重が大きい床敷き群では運動時間（走行時間）が短い傾向にあった（♂ 57.8 ± 32.2 sec、♀ 77.2 ± 8.6 sec）。雄については、生後6ヶ月齢を越えた頃から運動時間の減少傾向が観察されたが、18ヶ月齢頃（24ヶ月齢まで）からその傾向が停止した。一方、雌については12ヶ月齢を越えてから急激に運動時間が減少したが、15ヶ月齢から停止した。体重との比較から、30gを超える頃から運動時間が急激に減少する傾向が見られた。

体重は、雌雄ともに11ヶ月齢頃から床敷きによる顕著な差が認められはじめて、雄では19ヶ月齢（43-58g）、雌では14-16ヶ月齢（33-41g）でピークになった。26ヶ月齢において雄では、紙製で平均47.5gであったのに対して、その他の床敷材（紙製1種類、木製2種類）は平均40-41gであった。雌では床敷材による顕著な差は認められなかった。また、環境エンリッチメント（バイオトンネル）導入の有無による体重の差は、エンリッチメント導入による体重抑制の傾向はあるものの顕著な差は見られなかった。摂餌量（1日あたり）の雌雄差は認められなかった（♂ 3.5 ± 0.2 g、♀ 3.6 ± 0.3 g）ため、体重測定結果の比較か

ら雌の方が代謝量が多いことが考えられた。生存率では、床敷材や雌雄により差があることがわかった。さらに、ケージ単位による生存率の差も認められたため、ケージ内飼育匹数が減少することがマウス同士のコミュニケーションとの因果関係があると推察された。他研究機関（東京都健康長寿医療センター、NIA）との生存率の比較から、24ヶ月齢時点で雌雄ともに90%程度維持しており、良好な結果が得られた。

現在のところ、SAM (Senescence Accelerated Mouse; SAM) マウスの老化度判定（反応性、受動性、毛の光沢や目の状態、外傷等の外観）に使用される老化度スコアを用いて月齢ごとの評価を進めているところである。

b) 病理・形態学的解析（組織）

死亡個体を剖検した結果、25ヶ月齢以上の雄に精嚢腺貯留が多発した。雌については脾臓肥大（脾腫）が多く観察された。その他、肝臓肥大や肺のうっ血、腋窩リンパ節腫大が見られた。

8ヶ月齢および27ヶ月齢のマウスを用いて神経筋シナプスとその関連組織に関する形態学的な解析から、27ヶ月齢のマウスに神経シナプスの構造（脱神経、前シナプスあるいは後シナプスの断片化、軸索の膨潤）が認められた。行動（運動）機能解析による運動機能低下と神経筋シナプスの構造異常の相関性が確認できた。

その他、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）、細胞増殖を検出するための一般染色（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、関連遺伝子（例. Sirtuin、Mitoracker、Merge, p53）等について、MRI 画像を含めた解析を進めている。

c) 生化学・免疫学的解析

腸内細菌叢の解析結果から、12ヶ月齢から細菌叢の変化が見られることがわかった（明治乳業からの情報提供）。

D. 考察と結論

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ヶ月齢頃から顕著に示すのに対して体重との相関が弱い結果となった。また、形態学的な解析結果（神経シナプス構造異常）との比較から加齢に伴う運動量と加齢に伴う老化の現象を捉えることができなかった。この結果から加齢に伴う個体差（ばらつき）があるものと示唆された。腸

内細菌叢については12ヶ月齢頃からすでに変動が起きていたが、体重がピークに達する以外では運動量に大きく影響することはなかった。

摂餌量については加齢に伴う変化は認められなかった。ヒトの加齢に伴う食事量とは異なる現象であることから、加齢育成動物の長期飼育には飼料の成分についても今後検討する必要があると考えられた。

今回の結果では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が必要である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 小木曾昇

研究者と技術者が支える実験動物科学の柱を再考する—施設管理の立場から—
実験動物技術, 50 : 83-88, (2015)

2. 加藤恒雄, 小林英治, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇

動物実験施設内の耐震固定の問題点と対策：穴を開けない固定方法の提案, 静岡実験動物研究会会報, 40 : (2015) (印刷中)

2. 学会発表

1. 小木曾昇, 高野聡美, 山口一路, 富田耕平, 六車香織

光触媒技術導入による実験動物施設の環境衛生管理—老化動物育成における適正な飼育環境をめざして—

第62回日本実験動物学会総会, 2015年5月28-30日(京都)

2. 富田耕平, 小木曾昇, 高野聡美, 山口一路, 六車香織

マウスにおける長期飼育に適した床敷材の検討

第62回日本実験動物学会総会, 2015年5月28-30日(京都)

3. 小木曾昇

実験動物飼育の衛生管理における光触媒の応用事例について—長寿医療研究に用いる

モデル動物の長期飼育からー

第 62 回日本実験動物学会総会，ランチョンセミナー2015 年 5 月 28-30 日（京都）

4. **小木曾昇**，富田耕平，山口一路，高野聡美，六車香織

加齢・老化モデルマウスを用いた動物福祉に配慮した飼育環境の検討ー床敷材の観点からー

第 49 回日本実験動物技術者協会総会，2015 年 10 月 9-10 日（静岡）

5. 山口一路，富田耕平，高野聡美，六車香織，**小木曾昇**

加齢・老化モデルマウスを用いた動物福祉に配慮した飼育環境の検討ー給水瓶内の生菌数の変化についてー

第 49 回日本実験動物技術者協会総会，2015 年 10 月 9-10 日（静岡）

6. 富田耕平，**小木曾昇**，山口一路，高野聡美，六車香織

微酸性次亜塩素酸水を用いた施設内衛生管理方法および消毒効果について

第 49 回日本実験動物技術者協会総会，2015 年 10 月 9-10 日（静岡）

7. 加藤恒雄，小林英治，高野聡美，六車香織，**小木曾昇**

動物実験施設内の耐震固定の問題点と対策：穴を開けない固定方法の提案

第 45 回静岡実験動物研究会総会・第 43 回研究発表会，2015 年 10 月 9-10 日（静岡）

8. **小木曾昇**

動物実験に関わる法律と実験動物福祉

日本実験動物技術者協会実技講習会、2015 年 8 月 1 日（豊明）

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