

長寿医療研究開発費 平成28年度 総括研究報告

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
(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

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) について、老化メカニズムの解明に向けた老化や老年病モデル動物としての有用性の検証および長期飼育に適した飼育環境の検討を行った。

マウス (C57BL/6N) を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、生存率)、行動 (ロータロッド試験、握力試験)、病理・形態 (剖検含む)、血液 (特に白血球) の他、環境の指標となるストレスホルモン (コルチコステロン (CORT)) について経時的に測定し解析を行った。その結果、生理学的解析から体重は 24 ヶ月齢までは雌雄ともに大きな変化は見られなかったが、雄では 26 ヶ月齢以降急減した。全体的な生存率に雌雄差はなく、米国 NIA よりも良好であった。行動学的解析によるロータロッド試験では、雌雄ともに加齢に伴って走行時間の減少が確認され、雄については加齢よりも体重の影響を強く受ける傾向が見られた。形態学的解析から死亡個体による剖検所見として、雄では生殖器の異常の他、雌雄に関係なく肝臓の退色や脾臓のリンパ腫瘍等が多く認められた。血液学的解析から、加齢に伴い白血球数が減少し、好中球数の割合が増加する一方でリンパ球数が減少する傾向が見られた。今回、生理学、行動学、血液学的解析の一部で個体レベルでの老化マーカーの候補となる加齢変化が認められ、さらなる解析により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 (併))

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・老年病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』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、4週齢の C57BL/6NCrSlc マウス（雄 90 匹、雌 30 匹）を 3 ヶ月ごとに導入し、生涯飼育（エイジングファーム動物、AF マウスと略す）することにより老齢化させて以下のような網羅的な解析を計画し解析を進めた。

1. 生理学的解析(生存率、体重等)
2. 行動学的解析(ロータロッド試験、前肢握力試験、行動観察等)
3. 病理・形態学的解析（剖検、MRI 撮像、組織学的観察）
4. 生化学・免疫学的解析（腸内細菌叢、ストレスホルモン（CORT））
5. 血液学的解析（血算、白血球の形態）

a) 生理学的解析

AF マウスを用いて、月齢ごとに体重の測定を行った。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, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 ヶ月齢の個体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。

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。一部の個体（3～36 ヶ月齢）については、加齢変化の組織学的データ蓄積のため、小動物用 MRI 装置 (PharmaScan, Bruker BioSpin) によって脳の MRI 撮像を実施した後、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ヶ月齢の雄個体頸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

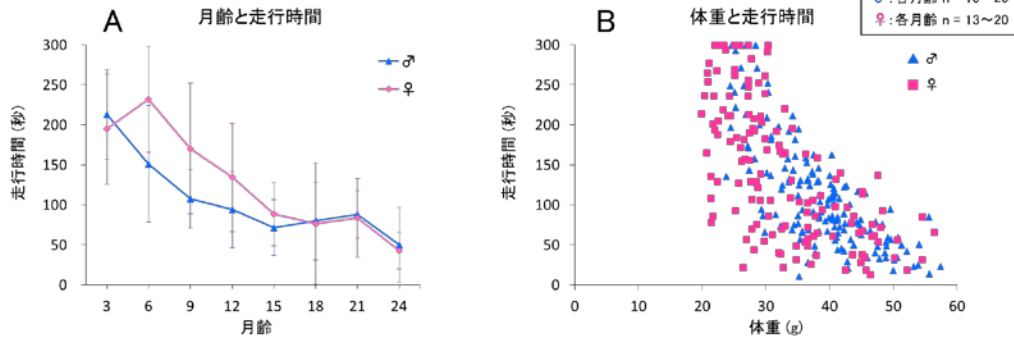
a) 生理学的解析

体重（n=7~129）は雄が18~19ヶ月齢、雌は16~17ヶ月齢においてピークとなり、雄は23ヶ月齢（44.1±7.7g）から24ヶ月齢（41.3±6.5g）に減少傾向を示したのに対し、雌は24ヶ月齢（36.7±6.5g）まで減少は見られなかった。摂餌量および摂水量については3~24ヶ月齢まで加齢に伴う変化や雌雄差は観察されなかったが、26ヶ月齢で一時的に摂餌量が雌雄ともに増加した。一方、加齢に伴って脱毛や脱色が目立つ個体が増加する傾向にあった。生存率（n=503~1,509）は、雌雄ともに18ヶ月齢以降減少傾向が見られ、28ヶ月齢で雄47.4±10.9%、雌53.1±4.7%であった。

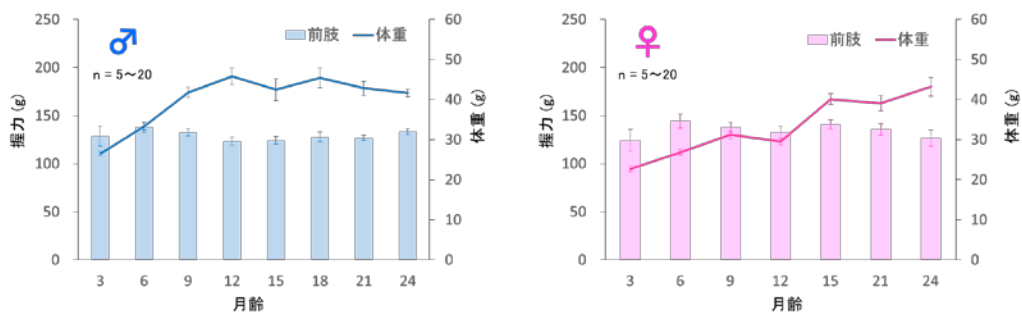
b)行動学的解析

ロータロッド試験（n=13~20）では、雄では3ヶ月齢、雌では6ヶ月齢をそれぞれピークとして、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。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、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=7~27）では、25ヶ月齢まで加齢に伴う筋力に大きな変動は認められなかった。

① ロータロッド試験



② 前肢握力試験



c) 病理・形態学的解析 (組織)

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%)、脾腫 (28.1%) および肝腫瘍 (18.0%)、雌では肝臓退色 (44.6%)、脾腫 (41.1%) および肝臓腫大 (28.6%) 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。

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、関連標識 (例. Sirtuin、Mitoracker、Merge、p53) 等について解析を進めている。

d) 生化学・免疫学的解析

3~24 ヶ月のストレスホルモンの解析結果から、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。

e) 血液学的解析

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。

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、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雄は 3 ヶ月齢、雌は 6

ヶ月齢頃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。

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。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) 六車香織, 高野聡美, 富田耕平, 山口一路, 小木曾昇
加齢雌マウスを用いた体外受精における超過剰排卵誘起法の効果について
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25 日 郡山市
- 2) 富田耕平, 田村慎哉, 谷井駿一, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
ラットにおける老化バイオマーカーの探索
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25 日 郡山市
- 3) 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
国立長寿研における自然老化マウスの基礎データの蓄積
第 64 回日本実験動物学会総会 2017 年 5 月 25 日 郡山市
- 4) Noboru Ogiso, Kaori, Muguruma, Satomi Takano, Kohei Tomita, Kazumichi Yamaguchi, Naomi Matsui, Mitsuo Maruyama
Age-related changes found in naturally-aged mice in NCGG
第 40 回日本基礎老化学会大会 2017 年 6 月 15 日 名古屋市
- 5) 小木曾昇, 高野聡美, 六車香織, 田村慎哉, 谷井駿一, 富田耕平
老化モデルラット作製に向けた加齢に伴う生体パラメーター変化について
第 51 回日本実験動物技術者協会総会 2017 年 10 月 14 日 山形市
- 6) 谷井駿一, 山口一路, 富田耕平, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
糖尿病モデルマウスの長期飼育に適した床敷きの検討
第 51 回日本実験動物技術者協会総会 2017 年 10 月 14 日 山形市
- 7) 富田耕平, 田村慎哉, 山口一路, 高野聡美, 六車香織, 小木曾昇
マウス長期飼育における微酸性次亜塩素酸水の有用性について
第 51 回日本実験動物技術者協会総会 2017 年 10 月 14 日 山形市

- 8) Kaori Muguruma, **Noboru Ogiso**, Kohei Tomita, Satomi Takano, Kazumichi Yamaguchi, Naomi Matsui, Mitsuo Maruyama
Search for definitive senescence biomarkers in mice: What changes will occur in naturally-aged mice?
68th AALAS National Meeting, 17 October, Austin, USA (2017)
- 9) **Noboru Ogiso**, Kaori Muguruma, Kohei Tomita, Satomi Takano, Shinya Tamura, Shunichi Tanii, Mitsuo Maruyama
Development of naturally-aged rats and elucidation of aging mechanism
68th AALAS National Meeting, 17 October, Austin, USA (2017)

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