

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・老年疾患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、老年疾患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。基礎老化研究の材料として自然加齢させた老化動物（自然老化動物またはエイジングファーム：AF動物）を用いて研究を行う場合、遺伝要因や長期飼育に伴う環境要因（例. 飼料、給水、照度、騒音や振動、ハンドリング、ファイティング等）の影響によって生じる可能性のあるばらつき（加齢にともなう病気の発症時期や症状、行動や寿命等）を考慮に入れる必要がある。しかしながらある程度適正に管理された環境下で自然老化動物を多数維持している研究機関は非常に少なく、それらの動物の個体レベルで生じる加齢性変化に関する解析はほとんどなされていない。

そこで、本課題ではまずはじめに加齢動物を育成するための動物の系統特性（C57BL/6N, C57BL/6J）を正確に把握し、適正な環境条件（例. 環境エンリッチメントやLED照明の導入）の設定して検討を行う。具体的に、現状の実験動物施設棟の飼育室は、一般飼育管理基準（150～300lux）の3倍程度の照度があり、長期飼育への影響が懸念されているので、早急に長期飼育に最適の照明基準も独自に検討する必要がある。

合わせて加齢に伴う生体现象や老化マーカーをとらえるべく生理学、行動学、病理・形態学、血液学、微生物学、免疫学的に網羅的な解析を行い、加齢変化に関する基礎データの蓄積とともに長寿研において維持されている自然老化動物の加齢・老化モデルとしての有用性の検証を進めている。

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)

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』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：ペーパークリーン等）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 20 匹、雌 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以下のような網羅的な解析を計画し解析を進めた。（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、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（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(Rotarod 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、及び処分についても苦痛の軽減等、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

a) 生理学的解析

加齢に伴う体重変化について、B6Nマウスでは雄が16~18ヶ月齢（16ヶ月齢（ 44.4 ± 6.5 g））、雌は20~22ヶ月齢（20ヶ月齢（ 37.8 ± 6.5 g））、B6Jマウスで雄が13~15ヶ月齢（14ヶ月齢（ 37.2 ± 3.5 g））、雌は22~23ヶ月齢（22ヶ月齢（ 30.1 ± 2.5 g））においてピークとなり、系統（由来）の差が明らかとなった。一方、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雄マウスでは体重の大きな変動は見られなかった（図1）。

摂餌量については、B6NマウスおよびB6Jマウスの雌雄ともに24ヶ月齢まで加齢に伴う変化は観察されなかったが、両系統ともに22~23ヶ月齢以降で食べこぼしが散見された。

摂水量では、B6NマウスおよびB6Jマウスの雄で加齢に伴い増加傾向を示したのに対して、両系統の雌マウスには変動は観察されなかった。

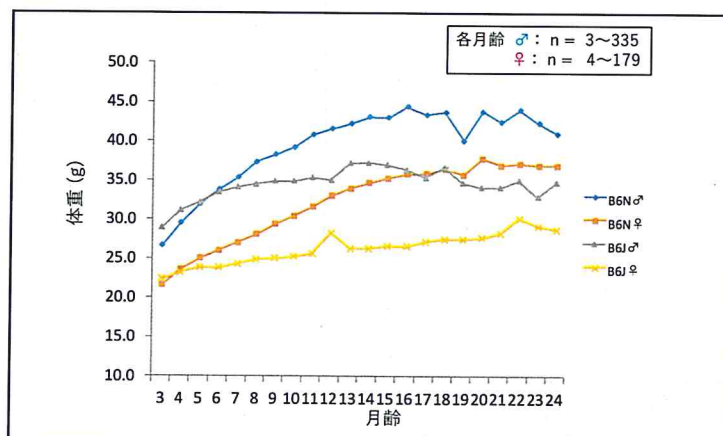


図1 加齢に伴うマウスの体重変動

生存率について、B6N マウスでは雌雄間で大きな差はなく、ともに 18 ヶ月齢前後で減少した。具体的には、28 ヶ月齢では雄 $69.1 \pm 13.5\%$ 、雌で $63.5 \pm 1.6\%$ であり、搬入する Lot によるばらつきが見られた。B6J マウスでは、例数を増やして検討している。

b) 行動学的解析

ロータロッド試験 ($n=5\sim 20$) 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。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 ($n=5\sim 27$) 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 (図 2, 3)。

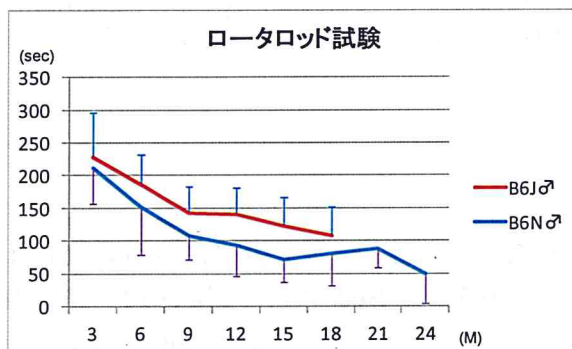


図 2 ロータロッド試験における系統比較

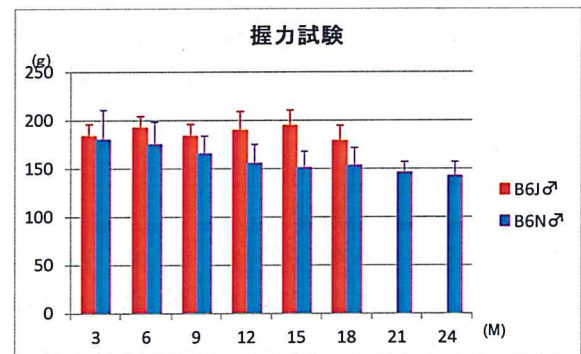


図 3 握力試験における系統比較

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、B6N マウスと B6J マウスを月齢毎に比較したところ、特に雌マウスにおいて系統による差が確認された (図 4)。

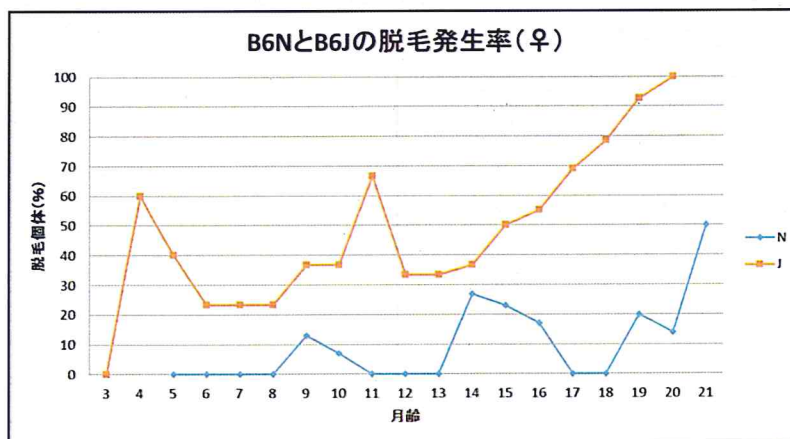


図 4 B6 マウスの脱毛発生率の系統(由来)比較

c) 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

B6N マウスにおける 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、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。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)。

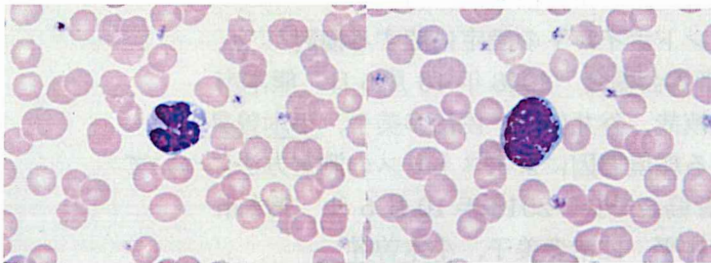


図 5 21 ヶ月齢に観察された白血病と疑われるリンパ球形態

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解析結果から、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) 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

- 1) Fumiharu Ohka, Shoichi Deguchi, Keisuke Katsushima, Keiko Shinjo, Akira Kato, Akane Yamamichi, Hiromichi Suzuki, Kosuke Aoki, Yusuke Matsui, Teppei Shimamura, Reo Maruyama, Shinya Sato, Satoru Takahashi, Noboru Ogiso, Akio Suzumura, Hiroshi Kimura, Toshihiko Wakabayashi, Hui Zong, Atsushi Natsume, and Yutaka Kondo
Important Roles of EZH2 during IDH wild-type Grade III Glioma Formation
JCI, (Submitted)

2. 学会発表

- 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, Bartimore, USA (2018)

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