

特別講演

老化の形態学 — 私どもの研究の回顧と今後の展望

田内 久 (愛知医科大学病理学教室)

今日、日本基礎老化研究会の第1回例会が開かれて、そこでこのような題目でお話する機会があるなどということは、私が老化の研究を始めた30数年前には夢想だにしなかったことである。 といつて今さら回顧に値するほどの重大な業績があがっているわけでもないが、終戦前後貧弱な設備と予算の下で始められた仕事として私および投同研究者の老化研究の歩みを、ささやかな成績を紹介しつつふりかえり老化の基礎的研究に対する今後の展望への示唆にもつながれば幸である。

1. 老化研究のきっかけ
老年者における疾患の形態的特徴
臓器組織の萎縮 — 栄養障害と老性萎縮
2. 本質的な老性変化の抽出
3. 老化過程における細胞の量的、質的特徴 — 細胞の増殖能と機能の形態表現
4. 老化標相に影響する環境因子
5. 老若パラビオーゼによる研究

一般講演

1

培養液中へのビタミンEの可溶化方法

坂上 宏 山田正篤 (東大・薬)

ビタミンE (VE) の生理的な機能を解明するためには、VEを培養液中に、出来るだけ生理的な状態が反映するように可溶化することが必要である。筆者らは、ここに述べるVEの可溶化方法を採集して、ヒト二倍体線維芽細胞の試験管内での寿命に及ぼすVEの効果を検討してきた¹⁾。結果は不幸にして、VEは無効であつたが、培養細胞を用いて、VEの生体内での機能を探索する上で、本可溶化方法は、十分に用に耐え得るものと思われる。

<材料と方法>

VE (dl- α -トコフェロール) は、シグマ社がエーザイ社製、血清はFlow社製、培地は、Eagle's MEM (minimum essential medium) を使用した。VEの定量は阿部らの開発した蛍光定量によつた。

VEの可溶化は、有機溶媒を使用せず、直接培養液と混合した。VEは、オートクレーブによる高圧滅菌 (120°C, 2atm, 40min) で分解される²⁾ ことがIRスペクトルにより示されたので、VEをメデイウム瓶に入れ、高圧滅菌した。10% 仔牛血清を含むMEM (培養液) を加え、メデイウム瓶の底にハバリついているVEが浮上するまで攪拌を続ける。液は、VEのセル形成により濁ってくる。一昼夜放置後、ポアサイズ0.3 μ mのミリポアフィルターを通過させ、セルを完全に除去する。このミリポアフィルター通過液を実験に使用した。

<結果>

表1に示すように、42.7%のVEがミリポアフィルターを通過した。これに対して、コントロールのヒト血清中のVEは、99%ミリポアフィルターを通過した。通過したVE含有培養液をヒト血清と、HatchとLeaの超速心によるリポタンパクの浮上分画法により分画を行つた。溶液の比重は、大瓶により調整した。表2に示すように試験管内で可溶化したVEは、仔牛血清中のリポタンパクにほぼ均等に分布し、コントロールのヒト血清中のVEの分布と、ほぼ一致した。free VEはH-VEを含む培養液を、同様に分画し、各画分の一定量をアガロースゲル電気泳動にかけ、原点に滞留したカウントを、電気泳動にapplyしたカウントを割つた%を示した。HDL分画中の% of free VEは、最も低いので、VEはHDL

Table 1

| Solution | VE conc. | % of VE passed through Millipore filter |
|-------------|-------------------------------|---|
| Human serum | 11.2 \pm 1.7 μ g/ml (5) | 99.3 (2) |
| Calf serum | < 0.02 | (1) - |
| VE-solution | 44.1 ~ 185 | (40) 42.7 \pm 2.5 (8) |

() の数字は実験例数を示す

Table 2

| Fraction | Human Serum | VE solution | H-VE solution (free VE) |
|----------------|-------------|-------------|-------------------------|
| VLDL | 3,269 | 9.49 | 16,260cpm (16.6%) |
| LDL | 4,70 | 15.7 | 7,2168 (38.5) |
| HDL | 4,27 | 13.2 | 14,6928 (9.8) |
| Other proteins | 1,59 | 1.5 | 4,7520 (16.5) |
| | 13,82 | 39.8 | 28,2876 (100) |
| Recovery | 44.0% | 46.4% | 59.2% |

と最も強い結合を有することが示唆された。厚に、このことを確認するために、超遠心法により血清タンパクをVLDL, LDL, HDL, other proteinsに分離し、タンパク濃度を一定にして、VEと混合し、その結合の強さを、先の電気泳動にかけて測定すると、VEはVLDLやHDLに結合しやすく、アルブミンとは殆んど結合しないことが分かった。次に、一度ヨリポアフィルターを通過させて調整したVEを培養液に、数日放置後、もう一度同じヨリポアフィルターを通したところ、83%のVEが通過した。ヨリポアフィルター上にtrapされた17%のVEは、培養液中の過剰に存在するVEがヨリポタンパクから遊離したものである。なお、血清中のヨリポタンパクは、ほぼ全部がヨリポアフィルターを通過した。

表3に示すように、VEは酸化を受けると、VEの発光が消失するので、発光定量は、VEの活性形のみを測定していることが分る。表3より、CO₂-インキュベーター内のペトリ皿の中では、経時的にVEの分解が進行し、3日目には、残存するVEの発光は、25%しかなかった。これに対し、培養瓶のような密閉系では、VEは比較的安定で、4日目でも、86%の発光が認められた。

Table 3 Stability of vitamin E

| Treatment | Recovery of fluorescence | |
|--|--------------------------|----------------|
| Oxidation with FeCl ₃ | 0.08 % | (1) |
| Autoclave (120°C, 40min) | 96.7 ± 2.4 | (4) |
| Incubation in CO ₂ -incubator | | |
| for 3 hrs | 86.7 ± 0.5 | (3) |
| | 37 | 35.2 ± 1.2 (2) |
| | 66 | 25.1 ± 3.2 (2) |
| Incubation in culture bottle for 4 days | 86.2 ± 13.0 | (8) |

<考察>

本実験では、培養液中へのVEの可溶化方法を検討した。以上述べた方法で調整されたVE溶液は、VEの油滴あるいはミセルを含まないため非常にhomogeneousである点、β₂ミグロブリン、血清タンパクへの分布の仕方が生理的狀態に近いという点で、生化学の実験には、十分使用に耐えると思われる。また、この際、VEは比較的安定な密閉系で実験を行うことが望ましいと思われる。

1). Sakagami, H., & Yamada, M., Cell Structure and Function. 2 (3) 1977, accepted

松村外志張（東大，医科研，癌細胞）

人正常組織由来線維芽細胞が組織培養内で分裂増殖の限界に達する現象（細胞老化）が個体の老化と関係があるのではないかという仮説（L. Hayflickら，1961）は老年学，組織培養細胞学の両面から検討されて来た。この仮説にはいくつかの状況証拠が与えられている。即ち，1) 短命なある種の遺伝病患者から由来する線維芽細胞が培養内で分裂増殖する回数（分裂余命）が正常人由来の相同な細胞のそれより少ない（G. M. Martinら，1965），2) 人の平均余命と，その人に由来する線維芽細胞の平均分裂余命に正の相関がある（G. M. Martinら，1970），3) 例外はあるが，一般に寿命の長い哺乳動物の若い個体から得た線維芽細胞の分裂余命は寿命の短い哺乳動物のそれよりも長い。しかし細胞老化の分子的機構は不明であり，個体の老化と相関の基礎は明らかとはいえない。

細胞老化を老化の一つの模型として，その機構解明を試みるという純粋科学的な接近法は老年学の立場からは宇遠のようであるが，上記のような背景からも稔りが多いことが期待される。この観点に立って細胞増殖性（J. R. Smithら1974，G. S. Merzら，1969），細胞形態（E. Robbinsら，1970），DNA合成能（V. J. Cristofaloら，1973），RNA合成能（A. Macieira-Coelhoら，1966），酵素活性（Hollidayら，1972）等を指標とする培養線維芽細胞の加齢過程の性質が研究されて来た。しかしここにおいても基本的な問題がいくつか不明のまま残されている。即ち I) いわゆる細胞老化が基本的に個々の細胞の（遺伝的又は後成的な）内因に還元できる問題なのかそれとも組織培養に移されてからの細胞集団に対する人工的環境要因によるものなのかが明らかでない。II) 組織培養細胞にはみかけ上限りなく増殖し続けるような細胞集団（寿限無細胞）があるが，寿限無細胞と老化を示す細胞（寿限有細胞）との本質的な違いが明らかでない。

人線維芽細胞の培養内加齢の過程で細胞のDNA合成能の減少は顕著な変化をたどる指標の一つであり，上記 I) II) の問題を解決する糸口の一つであるかもしれない。人線維芽細胞（WI-38株）をトリチウム標識チミジン（ H^3TdR ）の存在下24～30時間保温し，オートラジオグラムを作ると，標識された核を有する細胞の割合（Cristofaloの指標）は細胞の分裂令とともに減少する（Cristofaloら，1973）。このことは加齢に従って細胞集団内にDNA合成をする能力を失った細胞が増加して来ることを示唆している。しかし一方，Cristofaloの実験と異った条件下でA. Macieira-Coelho（1974）は平均分裂令の高い細胞集団でも長期間 H^3TdR と保温することによりほとんど全ての細胞が標識されることを認めた。この実験はCristofaloの実験で示唆されたDNA合成能の集団内不均一性が実は細胞集団の不均一性によるものではなく，他の要因，例えば加齢に伴う細胞増殖の接触阻害性の増加によって間接的に引き起される可能性を示唆している。以下演者がスタンフォード大学医学部出張中に行った，人線維芽細胞（WI-38株）のDNA合成能をオートラジオグラフ法によって検討

する実験の結果を引用して上記の諸問題につき考察したい。この実験は Dr. L. Hayflick, Dr. S. Raffel に対する NIH の援助, 演者に対する文部省の援助, Mrs. E. Pfendt, Mrs. Z. Zerrudo の技術協力を得て行なわれ大部分の実験結果は投稿準備中 (T. Matsumura, E. Pfendt, L. Hayflick) である。結果の要点は次の通りである。A) Cristofalo の指数を求める実験の追試では定性的な指数と平均分裂令の相関は認められたが定量的な値にはかなりばらつきがあり, 分裂令の指標としてこの指数を用いることに困難が認められた。B) Cristofalo の指数は細胞の分裂令のみでなく, H^3TdR の濃度, 保温時間, 保温中の細胞増殖, 培地の更新によって著しく影響を受けることが明らかとなった。これらの要因が Cristofalo の指数にばらつきをもたらしたと考えられる。C) B) の要因の影響を受けることの少ない指数として新しく非標識細胞指数

$$\left(= \text{標識されない細胞の割合} \times \frac{\text{標識終了時の細胞濃度}}{\text{標識開始時の細胞濃度}} \right)$$

を定義した。標識されなくて残る細胞が分裂増殖せず, しかも減少もせず保たれ, また H^3TdR のアイソトープ効果も受けないと仮定したとき, この指数は H^3TdR で標識される細胞の増殖, アイソトープ効果の如何にかかわらず値が一定に保たれる性質を有していた。平均分裂令 30 の WI-38 細胞について非標識細胞指数は H^3TdR による標識開始後約 1 日間のうちに急減し, その後きわめて緩やかに 6 日目まで減少した。平均分裂令の高い細胞では初日の減少は少ないが引続くゆるやかな減少はみられた。E) 充分低い細胞濃度ではこの指数は細胞濃度の影響, 培地更新の影響をほとんど受けなかった。F) この指数と細胞の分裂令は正の相関を示した。

以上, 実験結果を従来得られて来た人由来培養線維芽細胞の DNA 合成能, 分裂能についての知見と比較すると次のようなことが考察される。1) 人線維芽細胞の培養内加令の過程で, 集団としての DNA 合成能の低下が認められる。2) DNA 合成能の低下は集団内に (少くとも) 2 つの DNA 合成能の異なる亜集団があると仮定するとき容易に説明される。即ち分裂増殖を行ない速やかに S 期に入る亜集団と分裂増殖をほとんど行なわず, 非常にゆるやかに S 期に入る亜集団である。3) Cristofalo の実験結果と Macieira-Coelho の実験結果は 2) によって矛盾なく説明出来る。4) 2) に仮定された二つの亜集団は培地の更新や細胞濃度によってほとんど影響を受けない。しかし細胞の分裂令に依存する。5) 非標識細胞指数は Cristofalo の指数からの発展として, 細胞分裂令の指標としてより再現的であることが期待し得る。

1. Hayflick, L. & Moorhead, P.S., *Exp. Cell Res.* (1961) 25, 585.
2. Martin, G.M., Gartler, S.M., Epstein, C.J. & Motulsky, A.G., *Fed. Proc.* (1965) 24, 678.
3. Macieira-Coelho, A., Ponton, J. & Phillipson, L. *Exp. Cell Res.* (1966) 42, 673.
4. Merz, G.S., Jr. & Ross, J.D., *J. Cell Physiol.* (1969) 74, 219.
5. Martin, G.M., Sprague, C.A. & Epstein, C.J., *Lab. Invest.* (1970) 23, 86.
6. Robbins, E., Levine, E.M. & Eagle, H., *J. Exp. Med.* (1970) 131, 1211.
7. Holliday, R. & Tarrant, G.M., *Nature* (1972) 238, 26.
8. Cristofalo, V.J. & Sharf, B.B., *Exp. Cell Res.* (1973) 76, 419.
9. Macieira-Coelho, A., *Nature* (1974) 248, 421.
10. Smith, J.R. & Hayflick, L., *J. Cell Biol.* (1974) 62, 48.

菅 幹 雄, 山 根 績 (東北大 抗研 微生物)

はじめに, 生物の老化を細胞の老化の面より進及する場合, ヒトの正常二倍体細胞(HEL)は寿命(一定の分裂回数)があるため, モデルとして一般に考えられている。Hayflick の仮説以来, この方面の研究は数多くみられる。一方, 現在, 試験管内で細胞を増殖させるためには, 動物血清を10%内外添加した培地を用いるのが通常である。しかし, このことは細胞増殖の物的環境の正確な解析を妨げる重大な原因となっている。すでに, 山根らは腹水分離直後の吉田肉腫細胞の増殖を指標として無血清培地を開発し, 報告している。今回, われわれは, この無血清培地をヒト胎児肺由来の二倍体繊維芽細胞の培養に応用した。

材料, 方法, 細胞はヒト4ヶ月胎児肺を0.25%トリアンソ(Difco:250)液で分散して得た繊維芽細胞を血清培地中で4~9代継代して使用した。培養方法は表1のような方法で分散, 調製した細胞を直径3.5cm のdishに植えこみ, $N_2-95\%$, $CO_2-5\%$ の混合が入中で $37^\circ C$ 一定期間培養した。細胞数は, EDTA-アロナーゼ液で分散した後, 東亜(株)のマイクロセルカウンターで全細胞数を測定した。無血清培地は表2のような組成の100倍濃度液をあらかじめ調製し, $-20^\circ C$ に分注保存しておく。

Eagle のMEM培地に添加して使用した。培地は使い捨てにした。

表1 定常期細胞

↓ 0.02% EDTA(-PBS)液で洗滌
 ↓ 600u/ml 2回結晶トリアンソ
 ↓ 液(Miles)で洗滌
 分散
 ↓ MEM血清10%培地で洗滌
 ↓ Hanks 液で洗滌(3回)
 ↓ 無血清培地で洗滌(1回)
 無血清培地で細胞数を調製

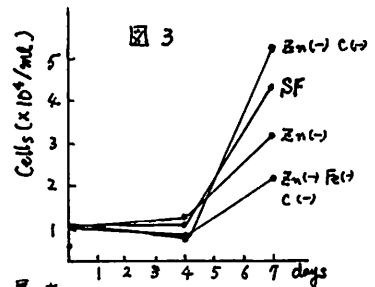
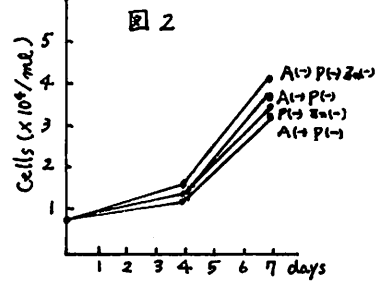
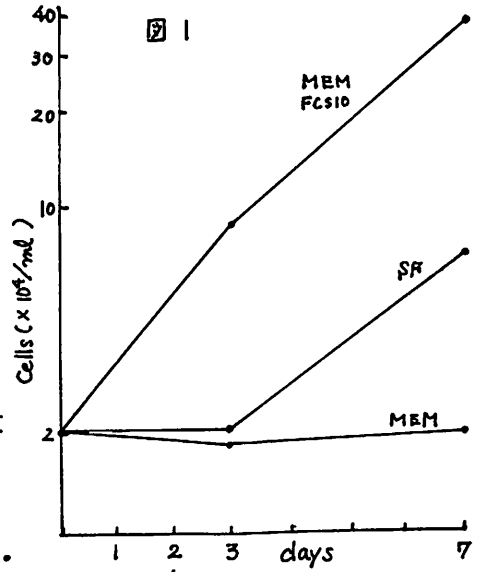
表2 Glucose 20g

Sodium pyruvate 1100mg
 Glycine 75mg
 Serine 105mg
 Glutamine 2920mg
 Thymidine 20mg
 Deoxycytidine 0.3mg
 Deoxyadenosine 10mg
 6-8 dihydroxy purine 3mg
 Leucovorine 10mg
 Inositol 120mg
 Choline chloride 160mg
 putrescine-Hcl 1mg
 Insulin 10mg
 FeSO₄·7H₂O 8mg
 ZnSO₄·7H₂O 0.29mg

結果, 最初にMEM血清無添加培地および血清10%添加培地をコントロールとしてこの無血清培地の増殖曲線を検討した。(図1)。植え込み3日後の細胞数は植え込み数とほとんど変わりなかったが, 7日後には4倍近い細胞数の増加が認められた。しかし, 胎児牛血清10%添加培地には及ばなかった。このことから本培地の間

題点として、I, 培養初期に増殖が認められな
 い。II, その後の分裂時間が血清の場合の約2
 倍長い。ことが考えられた。次に、培養初期の
 問題点を検討するため、植之込み24時間後の付
 着細胞数を測定した。血清添加MEM培地>
 SF培地>血清無添加MEM培地の順に附着率
 は下がるが、細胞数の絶対値に大きな差はなく
 , lag phaseの長短が培養初期の細胞数の差を反
 映しているものと考えられた。附着率を改善す
 る目的で塩化カルシウム0.1mg/ml, または、PEI
 0.0005mg/ml を培地に添加したが、24時間後の
 細胞数に差は認められなかった。次に本培地添
 加物中の成分の増殖におよぼす影響を検討した。
 図2はデオキシアデノシン, およびアトレシン,
 亜鉛について検討した増殖曲線で、これらはむ
 しろ増殖阻害的に作用していることが判明した。
 図3は硫酸鉄, 酒石酸ユリン, 硫酸亜鉛につ
 いて検討した増殖曲線で、鉄が増殖に必須であ
 ることが判明した。ユリンは阻害的に作用し、
 亜鉛はユリンの阻害効果を相殺するように思われ
 た。さらに、表1と同様な方法、および、血清
 の原血清のかわりにオボムコイド20Mg/ml を使
 用してSF培地からSF培地への継代を試みた。
 現在、3代まで継代中で継代培養は可能である。
 参考、無血清、無蛋白培地でヒト二倍体繊維芽
 細胞の培養および継代が可能であった。

この培地での初期の増殖率の低さは主としてlag phaseの長さ
 によるものと思われた。この原因はトリアノンで障害を受けた細胞の修復に関係す
 ると考えられるが、これ以上トリアノン濃度を下げると分散が困難なため、今後検
 討の余地があるものと思われる。アトレシンの細胞に対する影響は一般には増殖促
 進的に働くと考えられている。本培地でも、より低濃度では促進的に働くように思
 われ、血清(蛋白)がかなり影響を与えるように思われる。酒石酸ユリンが阻害的
 に働く原因も現在検討中である。今後、さらに改良を続ける予定であるが、現在の
 培地でも充分実用に供しうものと思われる。



4 ヒト胎児線維芽細胞の metabolic age と doubling potential

○加治和彦 松尾光芳 (東京都 老人総合研究所 アイソトープ研究室)

Ⅳ-38をはじめ、ある種の99細胞動物由来の線維芽細胞をガラス器内で培養すると、一定の培養条件下で一定回数に継代のうち、細胞の分裂能力が失われることが観察されている。これを、生体内細胞老化のガラス器内における再現と解釈し、老化モデルとしてこの系を使用した多くの実験が行われている。しかし、ガラス器内の細胞は、一定培養条件下である定まった生存時間の間だけ分裂能力を有しているのか、細胞の総分裂回数が決まっているのかという基礎的宿事を検討する必要があると思われる。これまで、この問題に関して相矛盾する結果がいくつか報告されている。我々は、この矛盾を除くべく、三種のヒト胎児線維芽細胞を材料にして、分裂速度の異なる培養系を用いて、生存時間と分裂回数(1)すなわち細胞の加齢にとってより重要であるかを検討した。

(実験) ○細胞(1) TIG-1, TIG-1(6131-L), (1)すれも培養細胞の老化プロジェクト(老人研)により、同一個体より分離されたヒト胎児肺由来の線維芽細胞である。その性質の詳細は近く発表される予定である。給細胞集団倍加数は約65回である。(2) IMR-90, (3)Ⅳ-38, (1)すれもヒト胎児肺由来の線維芽細胞。○培養条件(1)培養液: 10%牛胎児血清 Eagle Basal Medium (Diploid) に Streptomycin (100µg/ml), Penicillin (100 units/ml) を添加。(2)培養器; Falcon 60mm dish (21cm²)。 (3)培養; 5% CO₂-95% 空気, 飽和湿度, 37℃, 3~4日毎に培養液交換。継代時, 0.25% トリプシン(1:250) 15~30分処理。

(結果) ○TIG-1 細胞集団倍加数11.1の細胞を6群に分け、その2群ずつを表Iの条件で継代培養を行ない、細胞が分裂を停止するまでに要した日数およびその間の総細胞集団倍加数を求めた。結果を表IIおよび図1に記す。①と②③を比較すると分裂能力を有する期間、低細胞濃度で播種した場合の方が約半分になっており早期に老化する。一方、細胞集団倍加数は、実験を始めた細胞(倍加数11.1)以後の倍加数で比較すると、①に対して②③はそれぞれ28%, 46%の増加がみられた。③は②に較べて約2倍の継代を行なったにもかかわらず、老化に関して相似したパターンを示した。又、③の一部を途中から標準の条件で継代する(図1④)と、細胞の飽和密度が低くなっていることがみられ、このことから③が短時間のうちに老化したことが示唆された。以上の培養条件で分裂能力を失った細胞群は(1)すれも類似した形態的変化を示し、大型細胞、大型核の出現が多くなった。○IMR-90細胞

表I 細胞培養系

| 系 | 細胞 | 条件 | 操作 |
|---|---------------|------------|--|
| ① | TIG-1 | 標準 | 7日目に継代 分割比 1:4 |
| | TIG-1(6131-L) | | |
| | IMR-90 | | |
| | Ⅳ-38 | | |
| ② | TIG-1 | 低濃度一定 | 播種細胞数 1.0 × 10 ⁴ 個/dish 14日目に継代 |
| | IMR-90 | 細胞数播種 | |
| | Ⅳ-38 | | |
| ③ | TIG-1 | 低濃度一定細胞数播種 | 播種細胞数 1.0 × 10 ⁴ 個/dish 7日目に分割比1:1で継代 次の7日目に播種細胞数 1.0 × 10 ⁴ 個/dishで継代 |
| | IMR-90 | トリプシン処理 | |

集団倍加数23.2の細胞を6群に分け、その2群ずつをTIG-1と同じ3種の条件で継代培養した。低い細胞濃度で播種した群では早期に分裂能力を失ったが、TIG-1と異なり、総細胞集団倍加数が多少減少しているのが認められた。④と③の向には大きな差は認められなかった。標準の条件で継代した細胞群の一部を途中で45日 *confluent* の状態で維持したのち再増殖をさせたものでは、対象群との総細胞集団倍加数の差異はなく、この条件下での分裂停止期

表II. TIG-1の細胞集団倍加数と分裂可能日数

| 系 | 実験 | 日数 | 継代数 | 総倍加数 | PDL 11.1以上の倍加数 |
|---|------|-----|-----|------|----------------|
| ① | I | 217 | 29 | 63.1 | 52.0 |
| | II | 216 | 29 | 65.7 | 54.6 |
| | III* | 235 | 32 | 74.3 | 63.2 |
| ② | I | 119 | 8 | 78.5 | 67.4 |
| | II | 119 | 8 | 81.2 | 70.1 |
| ③ | I | 126 | 18 | 85.9 | 74.8 |
| | II | 126 | 18 | 92.0 | 81.9 |

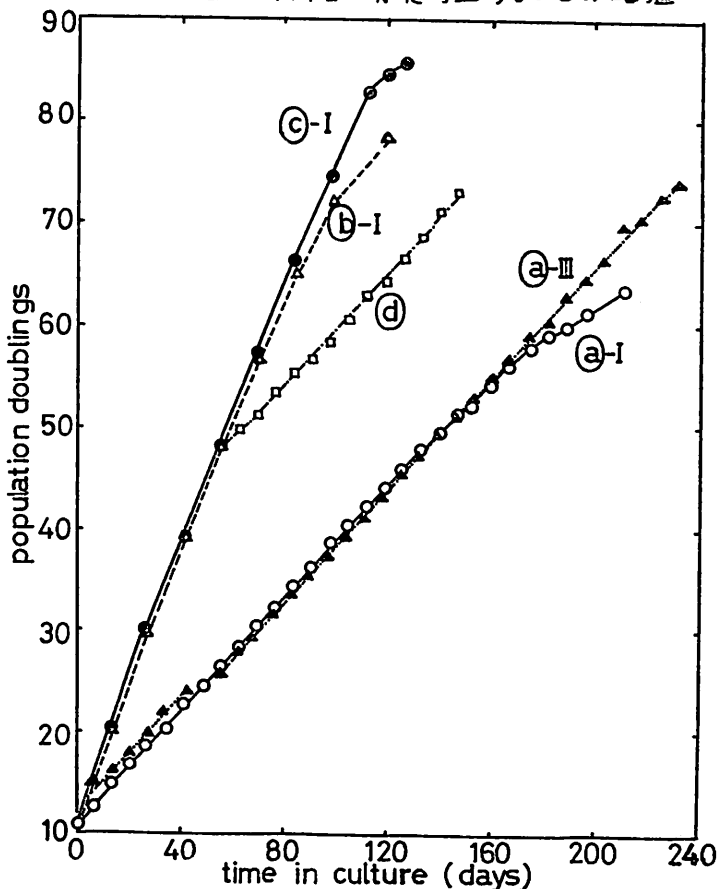
* TIG-1 (6131-L)

向中老化が進行していきなりことが示唆された。○ W-38 細胞集団倍加数27.0の細胞を4群に分け、その2群ずつを、表Iの①および②の条件で継代培養を行なった。低い細胞濃度で播種した群では早期に分裂能力を失い、TIG-1と同様に総細胞集団倍加数が増加しているのが観察された。

〔考察〕 metabolic age

実験に用いた3種の細胞いずれもが、低細胞濃度で播種すると早期に分裂能力を失うことが認められた。この向の細胞集団倍加数が著しく減少することが観察されなかったことから、この現象は、低細胞濃度播種によって細胞集団倍加がより早く進行したことに対応していると考えられ、細胞分裂能力は、metabolic age よりも細胞集団倍加数に依存していることが示唆された。○ doubling potential

図1 TIG-1 分裂停止するまでの増殖



TIG-1, W-38 では、低細胞濃度播種の場合に倍加数の増加がみられた。これは、低細胞濃度の時の細胞あたりの血清中の未知因子の量が多いことに原因する可能性がある。○ 継代数の影響 TIG-1とIMR-90の実験(共に②と③)から、継代数(トリプシン処理回数)を多くすることによって、特に老化が促進することは認められなかった。

相沢 稔一、三井 洋司、粟本文子、(東京都老人総合研究所)

従来、細胞の加齢に伴う細胞膜表面の変化についてはいろいろな示唆がなされてきているにもかかわらず、現在までのところあまり報告がない。我々は、コンカナバリンA (ConA) を介して赤血球が線維芽細胞に結合することを利用し、細胞の加齢に伴う膜表面系の変化を検討した。

用いた細胞は、都立老人総合研究所のプロジェクトチームにより培養された人胎児肺由来の線維芽細胞 (TIG) で、その性格については別に発表される予定である。

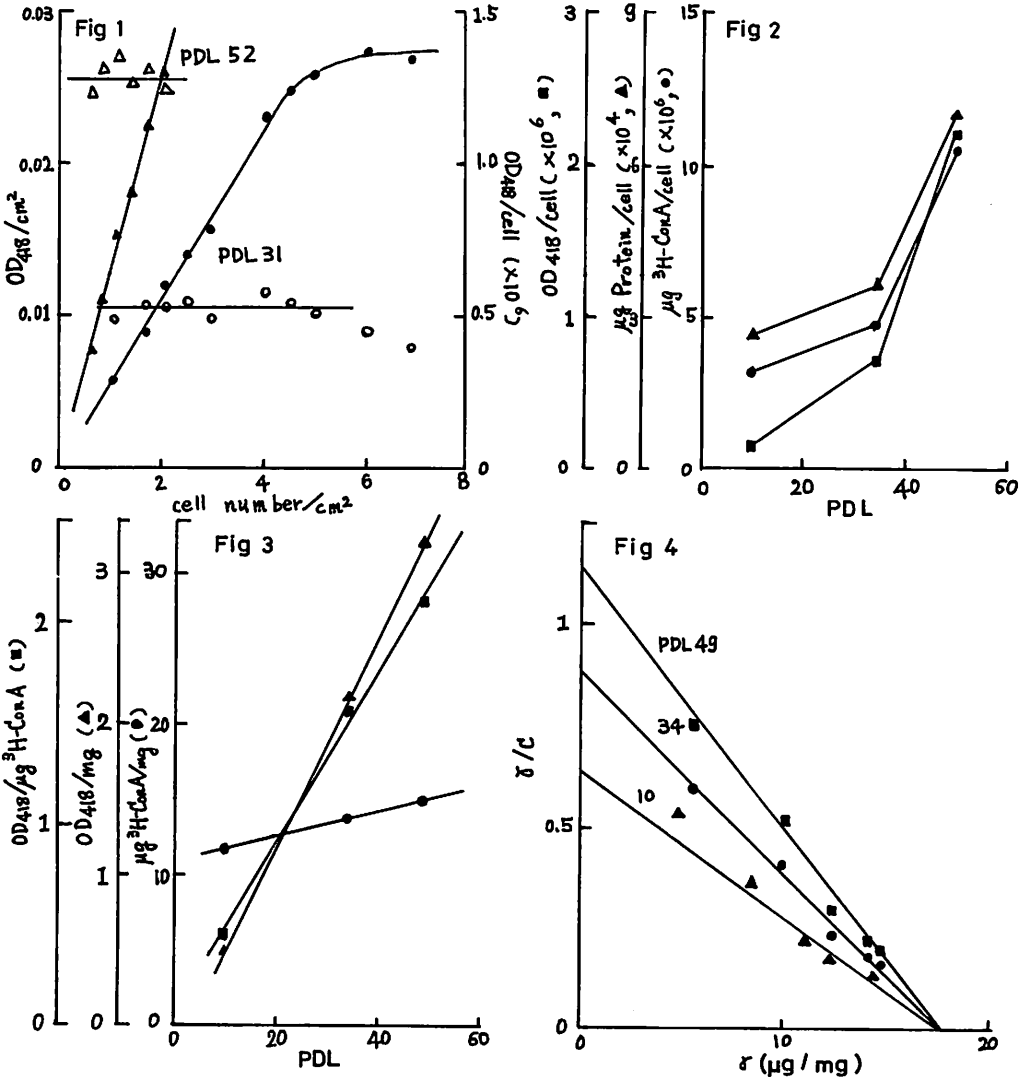
ConAを介する赤血球の細胞への結合を測定する方法は、ConAによる細胞の凝集を観る方法に比し、EDTA、トリアシン等で細胞を懸濁することなく、単層培養のまま観察することができ、かつ結合した赤血球量はそのハモグロビン量を測定することにより容易に定量化できるという利点がある。細胞の重なりを無視する範囲内では細胞密度の増加とともに結合する赤血球の数はほぼ直線的に増加し、細胞1ヶ当りの赤血球結合量は細胞数によらず一定である (Fig 1)。この範囲ではまた、細胞当りの蛋白量及び細胞への³H-ConAの結合量もほぼ一定である。更に、このConAを介する赤血球の結合は α -Me-mannosideでほぼ完全に阻害され、また一度結合した赤血球も α -Me-mannosideと処理することにより遊離することから、反応はConAの糖鎖を認識する部位で起る特異的結合と考えられる。なお2価のConAによっては、赤血球のTIG細胞への結合は全く起らない。

予めConAをコートした赤血球の細胞への結合を、細胞の継代数に対して比較してみると図2のごとくなる。細胞当りの赤血球結合量は、いわゆるphase IIIに入るとともに著しく増加する。同時に³H標識のConAを用いてその細胞への結合量を比較してみると、同様にphase IIIに入るとともに著しい増加が認められた。すでに三井らにより報告されているように、phase IIIに入るとともに細胞容積の著しい増加が起り、細胞当りの蛋白量も同様の変化を示す (Fig 2)。そこで細胞蛋白量当りの変化でみると (Fig 3)、³H-ConAの結合量は継代数によらずほぼ一定であるのに対し、蛋白量当りの赤血球結合量は継代数とともに直線的に増加している。図4に結合実験の結果を示すが、図より明らかなように細胞の蛋白当りのConAリセプター数は細胞の加齢によらずほぼ同一である。図5に細胞のリセプター数当りのConAを介する赤血球の結合量の変化を示す。図の結果は、ConAを介する赤血球の結合が、細胞膜上のリセプターの数とは直接対応せず、細胞表面の別の変化を反映していることを示している。細胞の容積、蛋白量、ploidy、更にはpopulation doubling time等の変化はphase IIIに入るとともに急激に起るが、lectinを介する赤血球の結合はこれとは異り、継代とともに初期より徐々に起る細胞表面の変化を反映しているものと考えられる。このことは継代数に伴うsaturation densityあるいは細胞電気泳動度の変化と対応する。

そこで次に、このような方法で認められる細胞表面の変化の原因を検討した。レ

クタンレセプターを介する現象は、細胞膜内側の cytoskeletal な構造によって調節されることが知られている。TIG細胞への赤血球の結合も温度の著しい影響を受け、4°Cでは殆ど結合は起らない。温度を上げるとともに結合量はほぼ直線的に増加し、20°C程でほぼプラトゥーに達し、40°Cまで一定である。しかし colchicine, cytochalasin B, dibucane, NaN₃ 更には細胞のグルタルアルデヒド処理等の効果を検討したが、いずれの場合も上述の継代に伴う赤血球結合の変化を説明するような結果は得られなかった。

これに対し、細胞膜表面を collagenase, trypsin, neuraminidase, hyaluronidase, chondroitinase ABC 等で処理した場合は、いずれも赤血球の ConA を介する細胞への結合が著しく増大し、かつ若い細胞程その効果が著しいという結果が得られた。細胞表面物質の、ConA を介する赤血球の結合に対する役割、又培養系加齢に伴う変化については更に検討中である。



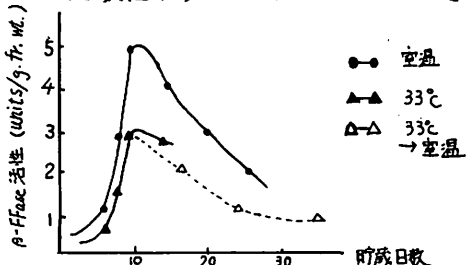
トマト果実の追熟老化に伴う β -Fructofuranosidase 及び Polygalacturonase の変化

千葉大農化 小倉長雄, 平田大登 中川弘毅 竹花秀太郎

「目的」 青果物の収穫後の経時的変化を解析する事は単に青果物貯蔵の基礎的情報を提供するにとどまらず、植物のagingの機作を解明する基本的な課題へと近づく為にも重要な研究であると考えられる。このような視点から私共は、収穫後のトマト果実の糸を用いて、追熟に伴う果実の呼吸量の変化、エチレン発生、成分変化および種々な酵素活性変化などの点からその生理について研究を続けて来た。この研究中トマト果実を33℃に貯蔵すると追熟が抑えられ、特に緑白熟期収穫の果実を33℃に約10日貯蔵後室温で貯蔵した果実は比較的硬く保たれ、6ヶ月以上貯蔵が可能であった興味ある現象を見出した。そこで果実の軟化に働くと考えられ、細胞壁に結合して存在している酵素 β -Fructofuranosidase (β -FFase) および Polygalacturonase (PG) についての活性レベルの変動、酵素的性格などにつき、免疫化学的手法を用いて検討した結果について報告する。

〔実験方法〕 緑白熟期に収穫したトマト果実を、室温および33℃に貯蔵し、貯蔵日数に応じて取出し試料とした。完熟したトマト果実の果肉部分から、 β -FFase および PG をそれぞれ抽出し、硫酸分画、カラムクロマトを用いる事により精製し、Disc電気泳動的に均一な酵素標品を得た。この標品を抗原として、兔に免疫し、抗血清画分を得た。この抗血清は抗原である酵素蛋白に対し、mono-specificな沈降反応を示した。試料トマト果実から β -FFase および PG の酵素液をそれぞれ調製し、Radioimmunoassay および Single radial immunodiffusion 法により β -FFase および PG 蛋白量を定量し、果実中の酵素活性と酵素蛋白量を求めた。又 Ouchterlony の Double diffusion analysis を用いて試料果実から得られた粗酵素液と抗体との沈降線を比較観察した。

〔実験結果〕 (A) β -FFase について



オ/図 追熟に伴う β -FFase の活性変動

| Stage | Act. (Units/g fr. wt.) | Protein (μ g/g fr. wt.) | Specific Act. (Units/ μ g protein) |
|--------------|------------------------|------------------------------|--|
| Mature green | 0.27 | 6.78 | 0.040 |
| Turning | 0.50 | 8.40 | 0.059 |
| Red ripe | 1.29 | 25.90 | 0.050 |

オ/表 β -FFase 活性・含有レベル

① 緑白熟期の果実では殆んど活性の見られなかった β -FFase 活性が果実の追熟につれて増加し、完熟期に最大値に達し以後過熟期に入ると活性低下が見られた。33℃貯蔵果実では貯蔵日数の経過に伴い活性上昇が見られるが室温区のものに比してゆるやかである。また33℃に7~10日貯蔵後室温で貯蔵した果実では活性が徐々に低下した。(オ/図)

② 追熟に伴う β -FFase 活性と β -FFase 蛋白質を Radio-immunoassay で測定した結果(オ/表)、熟度が進行するにつれて、比活性の同じ β -FFase 蛋白質の増加がみられた。

③ 完熟期から過熟・老化期に入った果実の β -FFase 活性と β -FFase 蛋白質を Single radial immuno-

diffusion法で測定した。結果(オ2表)β-Ffase蛋白質量は変化がないが、活性低下が見られ、β-Ffaseの比活性の低下が生じている事を認めた。

④ 33℃貯蔵果実中のβ-Ffaseは、室温区のものと同じ比活性をもつが、室温に出して貯蔵したものは比活性が減少した。

⑤ 各熟度の試料からの酵素抽出液と抗体とのOuchterlony反応の沈降線は全て先端が融合し免疫化学的に同質な酵素蛋白質であると考えられた。(オ2図)

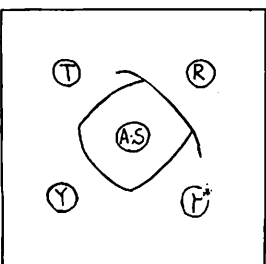
⑥ 室温及び33℃貯蔵中に生成されるβ-Ffaseは、分子量やOpt. pHなどの酵素化学的な性質および免疫滴定などからも同じ酵素蛋白質であろうと思われた。

以上の結果から追熟に伴うβ-Ffase活性の増大は同じβ-Ffase蛋白質の増大によるものであり、老化期に入ると免疫化学的には同質なβ-Ffase蛋白質が存在するが、その一部は変性され活性を持たなくなった事を示す。尚33℃貯蔵中でもβ-Ffase蛋白質の増加は認められるがその速度は遅く、これを室温に出して貯蔵した時の活性低下は、比活性の低いβ-Ffaseに変化し、老化期にみられた現象と似た現象がみられた。

(B) PG について ① 緑白熟期には活性のみられないPG活性は追熟に伴い急激に増大した。33℃では活性が殆んど認められないが、室温に戻して貯蔵すると活性は徐々に増大した。(オ3図)

② 追熟に伴うPG活性とPG蛋白質をSingle radial immuno-diffusion法で測定した結果、完熟期に於て著しいPG蛋白質が認められた。(オ3表)

③ 各熟度および33℃処理後室温で貯蔵した果実からの酵素抽出液と抗体とのOuchterlony反応とみると、33℃処理のものは沈降線が弱くしかも完熟した果実のものとの先端が融合がみられない。この事33℃処理のPGは完熟PGと免疫化学的に部分的に共通な構造をもつ蛋白質が作られると考えられる。(オ4図)



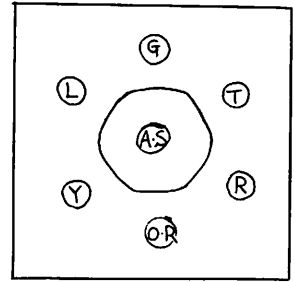
オ4図 各熟度段階におけるオウテロニー反応

以上の結果から追熟に伴ってPG蛋白質が合成され、軟化に働いていると思われる。33℃ではPG蛋白質が合成されないが室温に移すと活性上昇が徐々に起こる。このPGは、緑白熟期のPGと免疫化学的に類似の蛋白質と考えられる。

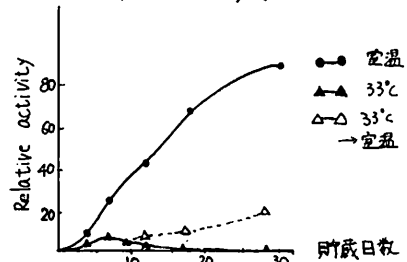
↑* 33℃→室温

| Stage | Activity (Units/g fr. wt.) | Protein (μg/g fr. wt.) | Sp. Act. (Units/μg protein) |
|-------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|
| Red ripe | 4.8 | 97.9 | 0.049 |
| Yellow ripe | 2.80 | 54.9 | 0.051 |
| Over ripe | 1.80 | 82.8 | 0.022 |
| Long-life | 1.06 | 51.5 | 0.021 |

オ2表 完熟・老化期におけるβ-Ffase活性および含有レベル



オ2図 各熟度段階における粗酵素液のオウテロニー反応



オ3図 追熟に伴うPGの活性変化

| Stage | Activity (Units/g fr. wt.) | PG protein (mg/g fr. wt.) |
|-----------|----------------------------|---------------------------|
| Green | 0.00083 | 0 |
| Turning | 0.00125 | 0 |
| Half Pink | 0.00185 | 0 |
| Red | 0.25567 | 0.027 |

オ3表 PG活性・蛋白質の変化

はPG蛋白質が合成されないが室温に移すと活性上昇が徐々に起こる。このPGは、緑白熟期のPGと免疫化学的に類似の蛋白質と考えられる。

7 ゴウリムシ *Paramecium caudatum* のクローンの寿命とクローンエイジング

高木由臣・吉田美知子(奈良女子大・理・生物)

有性生殖を終えたゴウリムシは、二分裂のみで増殖する限り死滅をまぬがれえない。すなわちクローンとして有限の寿命をもつ。クローンの一生は、一般に、未熟期、成熟期、老衰期に区分され、非可逆的なさまざまな変化が、予測可能な順序で、予測可能な時期に起こる。クローンエイジングの進行に伴って起こる変化についての報告は数多いが、クローンの寿命そのものについての報告はきわめて乏しく、*P. aurelia* と *P. jenningsi* についての報告があるのみである。分裂回数で数えたクローンの最高寿命は、*P. aurelia* の *ayngon* 1 で約350回、*ayngon* 2 で約300回、*ayngon* 4 で約200回、また *P. jenningsi* では約300回とされている。そこでわれわれは、*P. caudatum* , *ayngon* 3 についてのクローンの寿命を調べ、上記2種の最高寿命のおよ1.5~2倍という値を得た。

接合後のゴウリムシを過剰のエサの中で分裂させ、2日後、娘細胞の1つを新しいエサの中に単離するという操作を繰返し、2日毎の分裂回数を記録した。1つのクローンについて、2日毎の連続単離系からなる3つのライン(のちに6ライン)をつくり、あるラインが絶えたときは残りのラインからの単離によって補充した。いかなる補充も不可能となったとき、最も分裂の進んだラインの分裂回数をそのクローンの寿命とした。一方単離後に残ったゴウリムシには、エサを加えて数百匹にまで増殖させ、(残存培養)、各クローンエイジにおける形態異常の出現の有無、接合能の有無などの観察、およびラインの補充に用いた。

2種類のかけあわせによってえたF₁クローンのうち、大核再生を起こすことなく接合後150回以上分裂した6クローンについて、それぞれの寿命を表に示した。最大寿命はM18aにおける527回であった。16a、17a、D6a、M18aの4クローンは、各クローンを3ラインで代表させた場合に比べ、6ラインで代表させた場合には、約50回分裂ほど寿命が延びた。これはクローンの一生の後半では、分裂によって生じた娘細胞間に、分裂能に関して不均一なものが生ずるため、ラインの数が多ければ、単離によって分裂能の高いものを選択する確率が高くなるためであると解される。

| かけあわせ | クローン | 接合型 | 寿命(分裂回数) | |
|-------------------|------|-----|----------|---------|
| | | | 3ラインの場合 | 6ラインの場合 |
| Ksg(♂) × dN14a(♀) | 16a | ♂ | 337 | ≥ 389 |
| | 17a | ♂ | 157 | 213 |
| | 7a | ♂ | 192 | 192 |
| S4a(♂) × S9a(♀) | D6a | ♂ | 402 | 402 |
| | D6b | ♂ | 445 | 480 |
| | M18a | ♂ | 478 | 527 |

クローンの生涯を通じての分裂速度の変化の様子をみると、いずれのクローンでも初期には分裂速度が徐々に高くなり、未熟期から成熟期への移行の頃、もしくは成熟期の始めの頃にピークに達した。その後の分裂速度の変化には2つのタイプがみられた。1つは、ピークまたはそれに近い状態を長期間維持し、死の直前に急激に低下するタイプで、16a、D6a、D6cがこれに属した。もう1つは、ピークの状態からクローンの死まで、分裂速度が次第に低下してゆくタイプで、17a、7a、M18aがこれに属した。しかしこの區別は、分裂速度の低下の割合がきわめてゆるやかなものから急激なものへの連続的な変異とみることもできる。

接合能の無い状態から接合能のある状態への移行、すなわち未熟期から成熟期への移行は、M18aが46回分裂時で、他の5クローンは、70~79回分裂時の間に起こった。M18aを除き、成熟期への移行は、分裂速度がピークに達する頃とほぼ一致した。

クローンエイジの進行に伴って、分裂様式が均等分裂から不均等分裂へと変化した。このことは、初期には必要としなかったライン間のおきかえがある時期以後必要となり、また初期にはみられなかった残存培養中の分裂異常体が、ある時期以後出現するようになることで示された。ラインの補充が最初に必要となった時期と分裂異常体の最初の出現時期とは、16aを除き、各クローンについてほぼ一致した。ただしその時期は、17aとD6aでは未熟期間中であり、7a、D6cでは成熟期への移行の頃であり、M18aでは、成熟期間中での分裂速度が低下し始めた頃であった。ラインの補充は、初期には散発的でその頻度も比較的低いのに対し、クローンの一生の終り頃には連続的かつ高頻度になった。分裂異常体については、正常体の選択的な単離によって、生涯散発的にしか出現させなくしておくことができた。

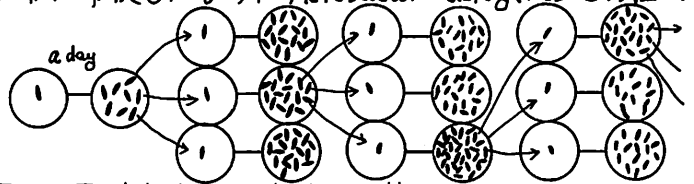
福島 晋一 (近畿大・医・衛生)

動物の寿命に対する温度の影響については主に昆虫や魚類などの変温動物についての実験が報告されている。それらの結論を総合すると、発生の過程では適当な高温下で飼育され、成体になってからは低温で飼育されたものが最も寿命が長くなる。変温動物の場合低温に置かれると、環境温度の低下に伴って体温も低下する。従って体内での様々な生化学反応の速度も低下していると考えられる。動物が一生で行う総代謝量がある環境温度内で不変だとすれば、低温で飼育されれば代謝速度が低下しただけ寿命が長くなるのは当然ともいえる。この場合の延命効果は生物学的な意味はもたない。多細胞動物を材料とした実験からは、低温飼育が生物学的に意味のある延命効果をもつか否かについての結論を引出すことは不可能に思える。

Paramecium aurelia は単細胞生物であり、クローンに寿命があることは比較的早く明らかにされている。分裂回数で表わされたクローンの寿命は、1回分裂当りの代謝量が環境温度にかかわらずほぼ一定とみなせば、多細胞動物では得られない寿命に対する温度の影響が明らかになると考えられる。

方法

実験材料は *Paramecium aurelia*、Stock 51 を使った。培養液はジュースerによって得たレタス原液ジュースを30倍に希釈したものに *Aerobacter aerogenes* を接種し25℃で1日あるいは2日置いて使われた。培養液は、菌を接種するまえにリン酸ナトリウム緩衝液2mM濃度でpH 6.8に調整されてから



加圧滅菌して用いられた。細胞は長径約100μmで、10倍の奥体顕微鏡下でマイクロピペットを使って1細胞を取り出す操作が可能である。

自家生殖を行った細胞を25℃で4日間 Daily Isolation Culture (DIC) を行い、4日目に、前日1細胞から5回分裂を経た32細胞から18細胞を取出し、各々6細胞づつを低温(19.5℃~21.5℃)、中温(25℃~26.5℃)、高温(29℃~32℃)で培養を始めた。低温では途中2週間20℃~23℃に置かれた期間があった。細胞系を植継ぐ操作は20℃~27℃の室温で行われた。培養液は中温に置かれていたものを使ったため、低温・高温のグループは毎日の植継ぎ時から20~30分は新しい培養液温度の影響を受けたことになる。細胞系の維持は1系列を維持するため毎日3細胞を植継ぐ方法(Fig 1)で行った。途中自家生殖を起した可能性のあるものは除外し、異常な形態の細胞が出現した細胞集団からの植継ぎはできる限り避けた。系の維持が不可能になった場合は他の5系の一つから補って可能な限り6系の維持を続けた。

結果と考察

Fig 2に示されるように3つの温度グループに別けられた細胞の分裂速度は1日当

り約1回の差がある。高温では46日、中温では82日、低温では160日でクローンに属する全ての細胞が死滅した。置換え操作を行わなかった各6系の分裂回数で表わした寿命(Table 1)は、統計的に有意の差はみられない。置換え操作を行って死滅する

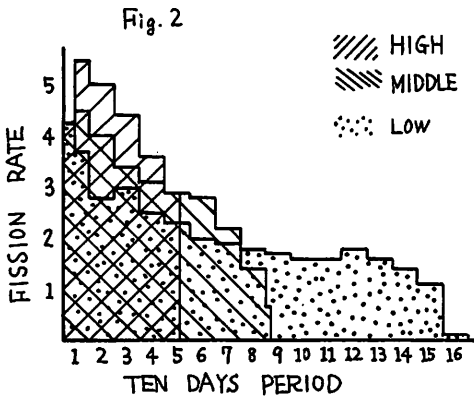


Table 1 Clonal life span cultured in different temperature

| Temperature | Life span | | | | | | Mean±S.D. |
|-------------|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|
| High | 133 | 165 | 168 | 170 | 181 | 198 | 169±21 |
| Middle | 93 | 94 | 126 | 140 | 155 | 206 | 137±42 |
| Low | 126 | 153 | 168 | 210 | 217 | 234 | 185±42 |

までに最も多く分裂を行ったのは高温200回、中温244回、低温310回であった。置換え操作を行った最多分裂回数と、行わなかった系の最多分裂回数との差は、高温で2回、中温で39回、低温で77回である。低温で分裂速度の遅いもの程置換え操作の効果が大きくなる傾向がみられる。また置換えを行わなかった6系間のばらつきは高温で比較的少ない。これらの現象は次のように解釈される。植継ぎから植継ぎまでの1日の分裂回数は高温で多く低温で少ない。従って両者では植継ぎ細胞を選択する細胞群の大きさが異なる。形態的な異常を生じた細胞の植継ぎをできるだけ避けて系の存続を計った選択効果は、選択される細胞群の大きさが大きくなる程大きい。従って高温では、系間の寿命のばらつきは比較的小さく、系の置換えを行った効果も現われない。低温ではこの選択効果が低く、系の置換え操作で不十分な選択効果が補われていると考えられる。

最多分裂回数を示す系がDICの途中で自家生殖を起していれば、寿命は長く評価されることになる。自家生殖が起ると一時的な分裂速度の低下とそれに続く急激な増加が起る。これは細胞を染色すると旧大核の破片が存在することや、系の自家生殖誘導率の急激な低下によって確認された。このような方法で、各グループの最多分裂を行った細胞系には自家生殖によるクローンの若返りは起っていないことが確認された。低温では置換えを行わなかった系の寿命に関しても、6系中3系は200回を越えており、長寿の傾向がみられる。Parameciumのクローンの消長は、実際にはあり得ないが、無限に給餌されたとすると次のようにならう。性生殖を行った細胞は急速に増殖し始める。この急激な増殖は分裂を停止して死滅する細胞が増加してくるまで続く。死滅する細胞数と分裂する細胞数がつり合った時点を経て、クローンに属する細胞数は急激に減少し全ての細胞が死滅するに到る。クローンの寿命は増殖を始めてから全ての細胞が死滅するまでとするならば、置換え操作を行った最多分裂の系をクローンの寿命の代表値として採った方が妥当と考えられる。またこの場合のように実験操作が結果に影響を与える可能性のある場合、その操作の影響の少ない結果に重みをもたせる必要がある。

以上のことから、低温培養におけるクローンは、単に物理的な時間の延長だけでなく、生物学的な意味をもつ分裂回数で表わされた寿命が延長されるといえる。

哺乳類細胞の試験管内寿命と老化に伴う生物学的諸活性の変化。

二階堂修(京大・放射研), 伴貞幸, 菅原努(京大・医・放射)

ヒト胎児の各種臓器由来細胞を培養した結果、下記のように伝乗倍加数(PDN)に到達後細胞は死滅した。

| 臓器 | PDN |
|---------|------------|
| ヒト胎児 脾臓 | 46.2 ± 5.1 |
| 〃 肝臓 | 14.8 ± 5.0 |
| 〃 心臓 | 9.4 ± 2.3 |

一方、C57BLマウス胎児由来細胞では、12.6 PDNに到って細胞の増殖が一時停止するが、つづいて急激な増殖を示す培養系に変換する結果が得られた。さらにヒト胎児脾および肝臓由来細胞の培養各期に低線量(50, 100R)のX線を照射したところ、脾由来細胞では試験管内寿命の短縮--- PDNの低下---がみられたが、肝由来細胞の培養開始期に50RのX線照射を行くと5〜30%のPDNの増加がみられた。

これらの各種臓器由来細胞が、おのおの異なるPDNを与えること、およびX線照射によって寿命の短縮、延長がみられる結果を解析することによって、哺乳類細胞における老化機構の解明を行いたいと考えて、以下に述べる細胞の生物学的諸活性について現在検討を行っている。

- ①: 培養各期のヒト胎児脾、心臓とX線の照射を受けた脾臓由来細胞を³H-TdRで24時間処理した後、得られた標識細胞率の変化と新生DNA鎖の延長速度の比較。
- ②: 培養各期のヒト胎児の各種臓器由来およびマウス胎児由来細胞において、紫外線照射によって誘起される不定期DNA合成能(UDS)、宿主回復能(HCR)の比較。

を行い、細胞老化にあらざる放射線の影響、および老化に伴うDNA損傷修復能の変化について講演する

東京都老人総合研究所 ○本田修二, 松尾光芳

生体に対して酸素が毒性をもつことはよく知られている。酸素呼吸を行なっている細胞は常に酸素の有害な作用にさらされることになる。活性酸素種の一つであるスーパーオキシド・ラジカル (O_2^-) は種々の生体系 (例えば, フラビン酵素や単離ミトコンドリア, ミクロゾーム, 核など) において生成し, また O_2^- および O_2^- に関連する活性酸素は DNA の切断, 酵素の不活化あるいは脂質の過酸化などを引き起こす。従って O_2^- は酸素の毒性発現に関する重要な因子の一つであろうと考えられている。細胞は活性酸素による障害に対して, スーパーオキシド・ディスムターゼ (SOD) やグルタチオン・ペルオキシダーゼなどによる防御機構を備えていると考えられている。しかし, 防御できなかった活性酸素による障害で完全に修復できなかったものが, 長期間, 生体に蓄積し, 老化の原因となる可能性 (老化のフリーラジカル説) が考えられている。老化の基礎的機構を解明するために, この酸素毒性と老化の問題は十分検討する価値があると思われる。

培養ヒト正常2倍体細胞は約50代の細胞分裂を経て死滅し, 細胞レベルでの老化のモデルになっているが, 細胞老化における活性酸素の関与についての知見は非常に少ない。

われわれはヒト (WI 38細胞) およびニフトリの培養細胞において, O_2^- による障害, 高圧酸素の毒性発現における O_2^- の関与, 細胞における O_2^- の生成等, 細胞と O_2^- との相互作用について調べた。また細胞老化と O_2^- とのかかわりを知るため, 細胞の外側からの O_2^- の攻撃と細胞の内側からの O_2^- の攻撃に対する細胞の感受性の, 老化にともなう変化を調べた。

《実験結果》 ニフトリ胚細胞 O_2^- 生成系 (FMN, EDTA, 光照射) を培地に10~30分間与えると, O_2^- 生成量に応じて, ニフトリ胚線維芽細胞の増殖阻害が見られた。 O_2^- の不均化を触媒するSOD, H_2O_2 を分解するカタラーゼ, ヒドロキシル・ラジカル ($HO\cdot$) を捕捉する安息香酸やエタノールを系に加えると, 増殖阻害が見られなくなった。従って, Haber-Weiss 反応 ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow HO\cdot + OH^- + O_2$) により生成された $HO\cdot$ が直接の増殖阻害因子と考えられる。 O_2^- 生成系を与えた後, 細胞を還元剤 ($NaBH_4$) で5分間処理すると増殖阻害が見られなくなったので, 培地に生成した O_2^- から $HO\cdot$ を生じ, 細胞はこの強力な酸化力をもつ $HO\cdot$ により外側から酸化的障害を受けた結果, 増殖が阻害されると考えられる。

ニフトリ胚線維芽細胞を継代培養すると約16代で増殖が低下し, 継代が不可能となった。この細胞のいくつかの継代時期における, O_2^- 生成系に対する感受性を調べた。15代以後から細胞の感受性が低下した。

高圧酸素 (15~90気圧) を1~2時間, ニフトリ胚線維芽細胞に与えると, 細胞致死作用が圧力・曝露時間に応じて見られた。SODと前もって37°Cで1分

キユベーションした細胞は高圧酸素致死作用に対して抵抗性を示した。しかし 0% で SOD 処理をした細胞はこの抵抗性を示さなかったことなどから、細胞内に取りこまれた SOD が、高圧酸素処理によって細胞内に生成した O_2^- を除去したためにこの抵抗性が生じたものと考えられる。すなわち、高圧酸素を細胞に与えると、細胞内に O_2^- を生成すること、この O_2^- は細胞に障害を与えて、細胞を死に致らしめることが明らかとなった。

ヒト胎児細胞 (WI 38 細胞) FMN-光照射による O_2^- 生成系を WI 38 細胞に与えると、 O_2^- 生成量に反応してコロニー形成の低下がみられた。また高圧酸素を曝露すると圧力、曝露時間に反応してコロニー形成の低下がみられた。SOD とインキュベーションした細胞では高圧酸素の毒性に対する抵抗性が認められた。WI 38 細胞においても高圧酸素毒性の発現における O_2^- の関与が明らかとなった。

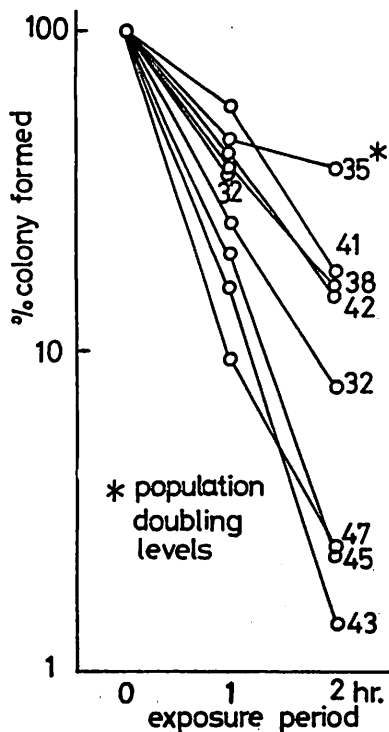
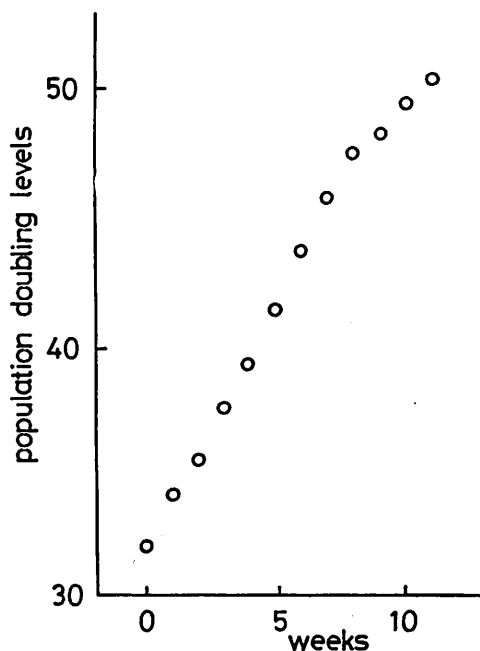
WI 38 細胞を BEM 培地 (10% fetal calf serum) で約 32 代から 1:4 の split ratio で継代培養すると約 50 代を過ぎると細胞増殖が低下し、継代が不可能となった (Fig 1)。この細胞の各継代時期における、 O_2^- 生成系 (FMN, 光照射) と、高圧酸素に対する感受性を調べた。43 代以後から、高圧酸素に対する感受性が上昇した。(Fig 2)

このことは、WI 38 細胞においては、増殖の低下を示す老化した世代 (phase III) に達する数代以前に、細胞が、細胞の内部における O_2^- の攻撃に対して感受性の高い状態になることを示す。

Effect of 50 atm O_2 on the colony formation of WI 38 cells at various age Fig 2

Fig 1

Cumulative cell growth of WI 38 cells



○ 若田 修造 竹鼻 真 (名城大学薬学部生体物理化学研究部門)

水晶体が混濁化する病態を白内障 (CATARACT) と呼称し、その成因追求が種々の病態モデルを用いて進められている。ヒトにおいては老化にともなう発生頻度が高くなる老人性白内障 (SENILE CATARACT) がその主流を占め、老化と水晶体混濁化との相関関係の有無がこの疾病の成因追求の鍵とも思われる。

そこで、今回は水晶体混濁化の基礎的知見を得るためにマウス、ラットなどにおける実験的白内障水晶体を供試材料として、Ca⁺⁺イオンの水晶体に対する挙動を検討した。まず、水晶体の白濁化にともなう水晶体内部に異常なるCaの蓄積がみられた。例えば図1に示す如く、遺伝性の白内障マウスでは生後約24日目より白内障が発現するが、その発現時間より早くにCa⁺⁺イオンの蓄積がみられ、生後100日目では正常に比して約10倍の蓄積度であった。このCa⁺⁺イオンの蓄積の傾向はラットを用いたガラクトース白内障、ウサギを用いたアフタリン白内障においても同様であり、さらにヒトにおける老人性白内障水晶体200個を測定した結果も同様であった。

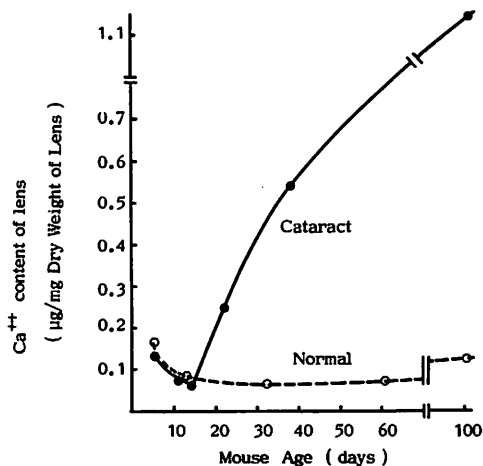


図1. 遺伝性白内障マウス水晶体におけるCa⁺⁺イオンの蓄積度

次に水晶体膜に対するCa⁺⁺イオンの影響を検討するため、培養水晶体に対する外部環境、すなわち培養液中に種々なる濃度のCa⁺⁺イオンを添加して、一定時間後における水晶体中のK、Naイオンを測定した。その結果、図2に示す如くラットの水晶体では、 $1.5 \times 10^{-3}M$ 以下のCa⁺⁺イオン濃度では、K、Naイオンの濃度比が正常に維持されるに、水晶体内部からKのleak out、Naのleak inが認められた。これは水晶体混濁化の要因の一つであることが認められており、ヒト老人性白内障水晶体においても同様の結果が観察された。

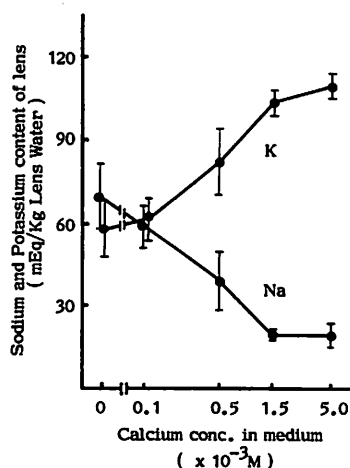


図2. ラット培養水晶体に対するCa⁺⁺イオンの影響とK、Naイオンの変動

以上の検討結果から、白内障惹起に関係するCa⁺⁺イオンの複雑なる挙動を種々なる観点から考察することになる。

12 加齢にともなうラット肝臓のグルココルチコイドレセプターの変動について

森田育男, 藤原康子, 川村美枝子, 室田誠逸 (都老人研 薬理)

グルココルチコイドをラットに投与すると、肝臓において *tyrosine amino-transferase (TAT)* と *phenylalanine hydroxylase* 等の酵素活性の誘導が顕著に行われる。その機構に関しては、ステロイドが細胞質中に存在するグルココルチコイドレセプターと結合し、その複合体が核へ移行し、クロマチンと結合することにより形質発現を行うことで説明づけられている。また、その複合体が核へ移行する際には活性化という段階が必要であり、その活性化には温度と塩濃度が大きな因子として関与している。

最近、G. Roth によってラットの種々組織におけるグルココルチコイドレセプターの加齢にともなう変動についての報告がなされた。その報告の中で彼は、肝臓のみが加齢によってもグルココルチコイドレセプターの量的減少が認められる唯一の組織であることを明らかにした。

そこで我々は、加齢にともなう肝臓のレセプターの量的変動ばかりでなく質的変動にも注目し、細胞質レセプターの結合 site の数と解離恒数を調べることにし、さらにレセプターの活性化及び複合体の核への移行及び結合に関して詳細に検討した。

【実験方法】

若令(2ヶ月令)及び高令(16ヶ月令)ラットの副腎を摘出して4日後、各々の肝臓から、細胞質並びに核を分離抽出した。グルココルチコイドとしてはデキサメサゾンを用いて実験を行った。細胞質中に存在するレセプターの測定は、フィルターアッセイ法を用い、ステロイドレセプター複合体の活性化並びに核への移行の測定は、核に結合したデキサメサゾンの量により検討した。

【結果並びに考察】

細胞質中のデキサメサゾンレセプターの加齢にともなう変動を表 I に示した。この表から加齢にともないレセプターは、量的には変動しないが質的に変動することがわかる。このことは、

表 I

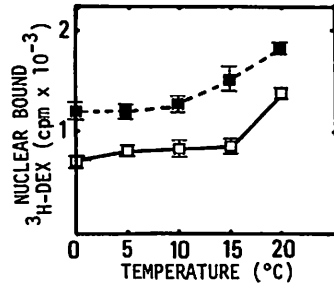
| Cytosol | $K_d \times 10^8 \text{ M}$ | Rt (pmole/mg protein) |
|---------|--------------------------------------|-----------------------------|
| Young | 2.138 ± 0.479 | 0.118 ± 0.012 |
| Old | 4.132 ± 0.367 ($p < 0.005$) | 0.110 ± 0.011 (N.S.) |

次に若令の核と若令及び高令のデキサメサゾンレセプター複合体、高令の核と若令及び高令のデキサメサゾンレセプター複合体、この4者をそれぞれ組合せ、4通りの再構成系で複合体の核内への移行を調べた。その結果、20℃の反応条件下では若令ラットの複合体の方が高令のそれと比べて核への移行速度が速いことが、高令、若令いずれの核を用いた場合にも見られた。さらに高令、若令それぞれデキサメサゾンレセプター複体の温度による活性化の変動を検討したところ、高令ラットの複合体は若令のそれと比べてより高い温度で活性化されることが判明した。(図)

また表Ⅱに示すように核の結合 site の数は、若令ラットのほうが高令のそれより多い傾向が認められた。しかし解離定数には有意の差がなかった。

表Ⅱ

| Cytosol | Nuclei | $K_d \times 10^9$ M | R_t (pmole/mg DNA) |
|---------|--------|---------------------------|----------------------------------|
| Old | Old | 1.87 ± 0.02 | 2.85 ± 0.17 |
| Young | Young | 2.38 ± 0.13 (N.S.) | 3.36 ± 0.14 ($p < 0.1$) |



図

〔結論〕

高令ラットの肝臓が若令ラットの肝臓よりグルココルチコイドに対する反応性が低いことは、従来から良く知られている。この原因を、以上述べた我々の結果から次のように推定することが出来る。① グルココルチコイドとレセプターとの間の親和性は加齢により低下する。② 加齢にともなうグルココルチコイド・レセプター複合体の温度による活性化の低下及び活性化速度の減少。③ 加齢にともなう核内の結合 site の数の減少。

核内の結合に関しては、最近になって、複合体と核との結合を抑制する物質が細胞質中に存在するという報告がなされた。目下、その物質の加齢にともなう変調について検討中である。

長崎結明 石井佐奈江 入来正躬 (東京都老人総合研究所・生理学部)

近年、変性酵素と加齢の相関をみる研究によって、加齢に伴って7-10%の高次構造における変性が原因で酵素活性が減少する事が見出された。これと同様の現象がハモグロビンに生じているかどうかを検討した。

方法 ラット(ウイスター、♂)4週、11週、22月、36月齢のものを用いた。麻醉後心臓採血し、血液は生食ハモグロビンで4°Cに保存し、2-3週間以内に使用した。実験に先立ち10%のハモグアイリゼイトにし、ハイドロサルフィドを12-2還元型の血液にし、透析して過剰のハイドロサルフィドを除去、37°Cでインキュベーションして、経時的に PO_2 、 PCO_2 、 pH を測定した。図1に示すように透析直後の吸収スペクトルは555nmに極大値があり、時間を経ると541nmと576nmに吸収極大が変り、酸素型に移行したことがわかる。この方法を用いて酸素ハモグロビンの量を間接的に測定した。経時的に酸素分圧を70ロットすると、分圧の増加曲線は、酸素分圧を増加させて得られる酸素解離曲線と近似しているが、ハモグロビンの酸素親和性を示すものを見つけた。

結果 1.種々の年令の動物より得たハモグアイリゼイトにおける酸素分圧の経時的増加。(酸素ハモグロビンの経時的増加) 図2, 図3.

酸素ハモグロビンの増加を経時的に各年令と比較すると、アルカリ側(pH 7.4-7.6)では22月齢、36月齢のハモグアイリゼイトの方が4週齢、11週齢のもの比較して、立ち上り時間早い。この結果は、若い動物のハモグロビンの方が最初の酸素を捕捉する捕捉能が高いことを示唆する。特に22月齢、36月齢の方がアトムの値が低い事から、最後の酸素は捕捉し難いと思われ。この理由を検討するためには酸素結合サイトを変性させた場合と、アロステリックインヒビター2,3-diphosphoglycerate(DPG)を作用させた場合の酸素親和性を測定した。

2. 熱処理後の酸素親和性

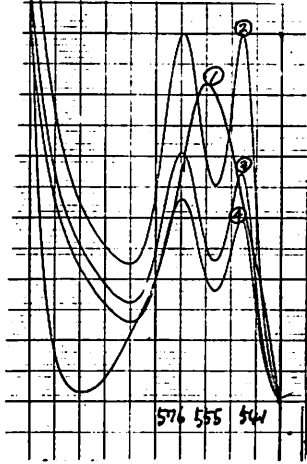
55°C、10分間の熱処理後では、酸素親和性は良くなり、立ち上り時間は対照と比較して早くなる。さらに高温(65°C)では、立ち上り時間が対照(37°C)と比較して遅くなる。一般に酸素解離曲線は温度が高いほど右にシフトするので、この結果は溶液の温度効果はなく、ハモグロビンの高次構造における変性の効果があると思われる。特に55°Cの場合、酸素結合サイトは結合し易くなり、65°Cでは結合し難くなると思われる。

3 DPGの効果

アロステリックインヒビターDPGをあらかじめ(インキュベーション0分)扱った後、酸素ハモグロビンの経時的増加を測定した。3週齢のものではDPGの阻害効果が明らかであるが、22月齢のものでは阻害効果は見られなかった。この結果インヒビターサイトは、3週齢のハモグロビンでは結合しやすいが、22月齢のものでは結合し難いことが推察される。

考察結論 加齢の進むにハモグロビンがアロステリックな変性が生じており、酵素との結合し易く、インヒビターとの結合し難くなるというと考えられる。今後、ハモグロビンの各々の酵素結合能を測定して、赤性酵素の場合と比較する予定にある。

図1. ハモグロビンのアノグラム



①還元型 ②③④ 酸化型

図3. 酵素親和性に対する加齢の効果

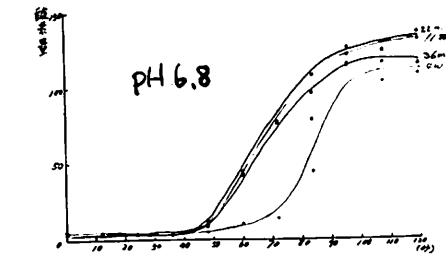
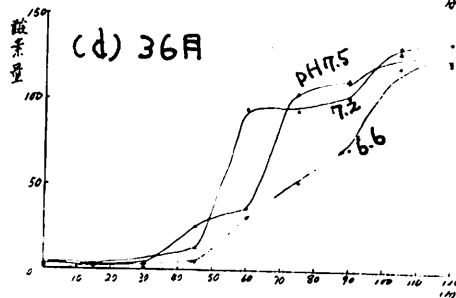
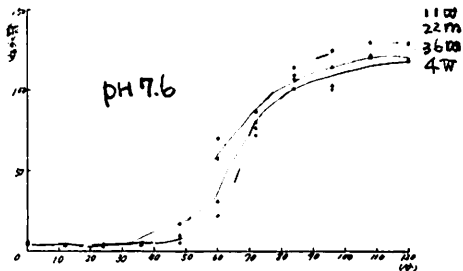
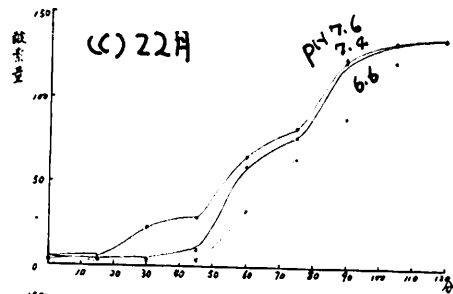
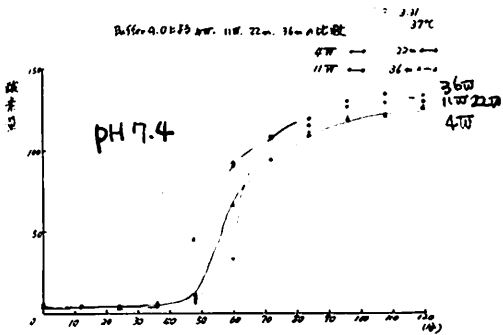
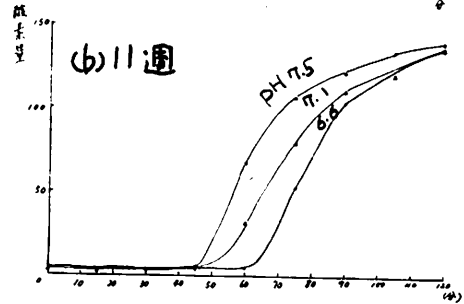
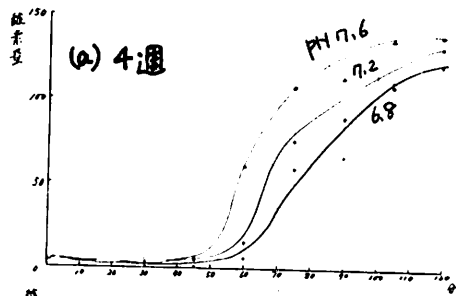


図2. 種々の年齢の動物より得たハモグロビンに対する酵素活性の経時的変化。



久保木芽徳, 高橋光良, 佐々木哲

(東医歯大・歯・生化)

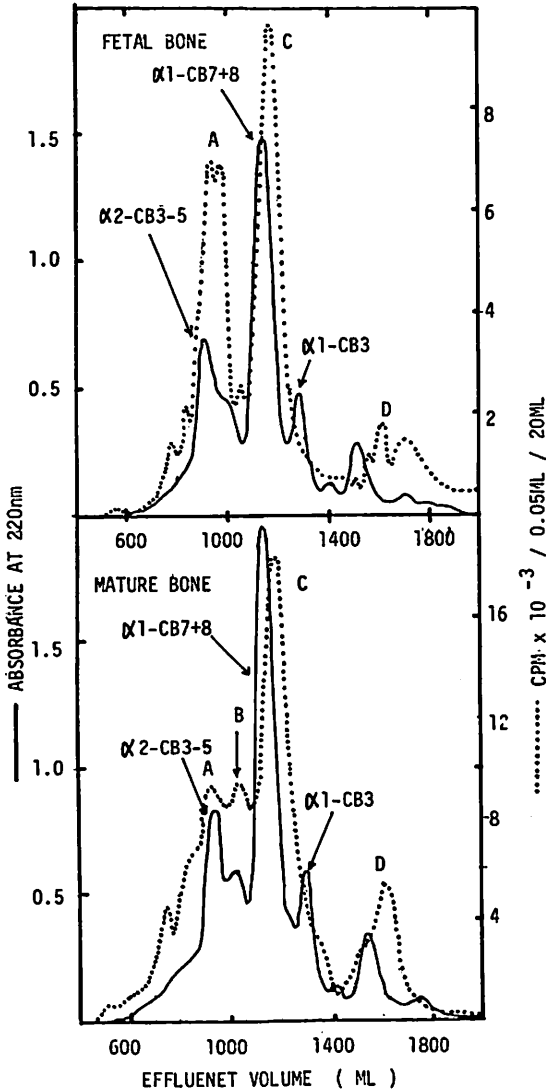
〔目的〕コラーゲンは生合成後、細胞外で線維を形成し、その後しだいに分子間架橋結合を生じ、予溶性と化学的安定性を獲得していく。この過程は一般に動物の加齢と共に進行していくと考えられ、これに伴って結合組織の代謝的不動化が進むとされている。この架橋結合の化学的本体は1967年のBailey, Tanzerの発見以来、現在までに7種類が確認されている。^{1,2)}しかし、その後Schiff塩基型の架橋は、通念とは逆に加齢とともに減少することがわかったため、⁶⁾Schiff塩基型架橋は中間産物であり、これが更により複雑な、非還元性の多穀鏝同架橋結合に変化していくものと予想された。しかし非還元性の架橋に変化する過程、非還元性架橋の本体ならびに、その線維内の位置については現在なお、明らかにされていない。われわれは、この点の

の解明をめざし、年齢の異なるウシの骨コラーゲンの架橋結合の変化を、架橋結合を含むペプチドを分析することによって追求した。

〔実験方法〕胎生8カ月ならびに生後3歳のウシの大腿骨を既に報告した方法により、³⁾液体窒素中にて粉碎し、0.5M EDTA (0.05M Tris-Cl pH7.4)にて脱灰後、1M NaClおよび0.5M 酢酸にて可溶性画分を除去し、不溶性のコラーゲンを実験材料とした。これを既報にしたがって⁴⁾[H]-NaBH₄にて還元、一部は加水分解後、Aminex A4クロマトグラフィーにより、架橋結合の分析を行なった。他はCNBrで特異的に切断し、CNBr peptideをBio-Rad, Agarose A1.5mのカラム(5.1×91cm)にて分析した。⁵⁾

〔実験結果および考察〕

還元骨コラーゲンの架橋結合を分析した結果、胎児、成年とも主な分子間架橋結合はdihydroxylysinox-leucine (DHLNL) と hydroxylysinox-leucine (HLNL) であることがわかった。次に、還元



骨コラーゲンのCNBrペプチドのA1.5mクロマトグラフィーによる分析ではFig.1のような結果を得た。胎児、成牛の場合とも、220nmで測定した場合には、ほぼ同じであり、成牛の場合に溶出量1000ml付近の肩がより顕著になっている点以外には、ほとんど差はみとめられない。しかるに放射能のパターンで比較すると、 $\alpha 1$ -CB7+8のピークの直後に大きな放射能ピークが存在する点では成牛、胎児とも共通しているが、 $\alpha 2$ -CB3-5付近の放射能ピークには顕著な加齢による変化があることがわかった。すなわち、胎児においてみとめられた $\alpha 2$ -CB3-5付近の高い放射能ピーク (Fig.1中のA) が成牛では減少し、その代りに溶出量1000ml付近の、 $\alpha 2$ -CB3-5の肩の部分に新しい放射能ピーク (Fig.1中のB) が出現した。

現在、確認されているコラーゲンの分子間架橋結合の線維内位置は、1972年Kang⁸⁾による $\alpha 1$ -CB6と $\alpha 1$ -CB1との間の架橋のみであるが、最近Scottら⁷⁾は、象牙質のように極端に不溶性の強いコラーゲンにおいて、Agaroseクロマトグラム上、 $\alpha 2$ -CB3-5のピークの肩の部分から、 $\alpha 2$ -CB4と $\alpha 1$ -CB6とのhelix部分同士が架橋していると推測される架橋ペプチドを分離した。今回のデータは象牙質のみならず、骨コラーゲンでも加齢の進んだ場合、そのような位置に架橋が形成されることを示唆しているのが興味深い。これらの架橋結合を含むペプチドの精製と諸性質について検討中である。

〔文献〕

- 1) Tanzer, M. L. : Science 180, 561 (1973).
- 2) Bailey, A. J. et al : Nature 251, 105 (1974).
- 3) Kuboki, Y., Shimokawa, H., Ono, T. and Sasaki, S. : Calc. Tiss. Res. 12, 303, (1973).
- 4) Kuboki, Y., Tanzer, M. L., and Mechanic, G. L. : Arch. Biochim. Biophys. 158 106, (1973)
- 5) 久保木芽穂, 下川仁弥太, 佐々木哲, 小口春久, 高木亨: 齒界展望 44 97, (1974).
- 6) Fujii, K., Kuboki, Y. and Sasaki, S. Gerontology 22 363, (1976).
- 7) Scott, P. G., Vets, A. and Mechanic, G. L. : Biochemistry 15 3191, (1976).
- 8) Kang, A. H. : Biochemistry 11, 1828 (1972).

佐々木俊作, 佐藤文昭 (放医研・障害基礎)

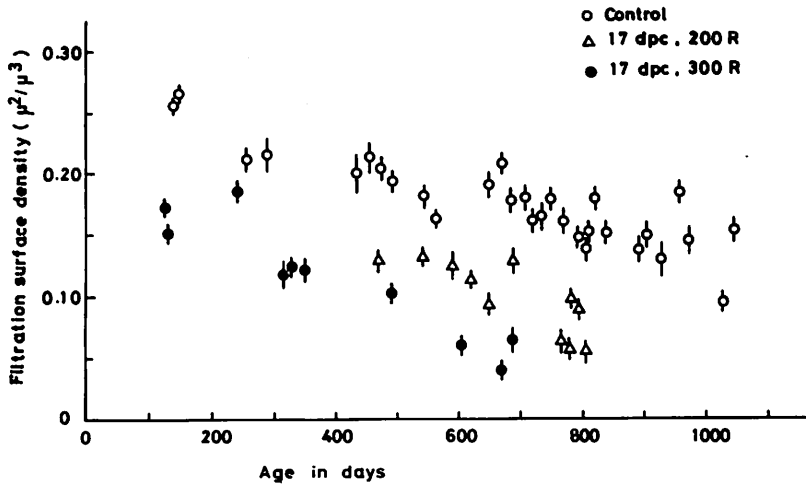
(目的) 加齢に伴ない腎機能が低下する現象は広く知られている。生理機能に
 関係する構造である糸球体濾過表面積, 糸球体毛細血管長, および糸球体の
 mesangium の体積比が加齢に伴ないどのように変化するかを知ることを第一の
 目的である。周生期の動物への放射線照射により糸球体硬化が晩発性に引き起さ
 れ, もたらされる腎疾患は死因の中でも重要な位置を占めることがマウス, ラット
 , ハムスター, イヌ, ヒトにおいて認められており, 動物種を越えた共通性が存
 在するらしい。しかし糸球体構造の変化の表現法は記述的ないし半定量的なもの
 であり, 客観性と精度の点で不十分であると思われる。立体計測法を導入す
 ることにより, 糸球体形成時の組織構築の放射線による攪乱, および加齢性構造
 変化の促進を客観的に把握して, 研究を進展させるための糸口を得ることを第二
 の目的とする。

(材料と方法) (C57BL/6 × WHT/Ht)F₁ マウスの雌を用いた。平均寿命は
 798日。腎は常法により2μの切片とし, Mowry's colloidal iron - PAS - Hematoxylin
 の三重染色を施した。1個体について10個の糸球体を500倍で撮映し, 最終倍率約
 1500倍にプリントした。eye-piece中の格子状のtest linesを同時に撮映し, 正確
 な最終倍率はtest linesによって求めた。組織標本作製プロセスの間に長さ
 について0.93に収縮したので, これにより補正した。プリント上でperipheral basement
 membraneとmesangiumの部位にマークを付し, test linesを用いて測定した。

morphometrical parametersは次の3種類である。(1) mesangial volume fraction
 (MVF): 糸球体中に占めるmesangiumの体積比, (2) filtration surface
 density (FSD): 糸球体単位体積当りの濾過表面積, (3) capillary line den
 sity (CLD): 糸球体単位体積当りの毛細血管長。この他に少数の個体について
 糸球体数と体積を測定した。X線の影響については交尾後17日の胎仔に照射
 した場合を中心に述べる。

(結果と考察) 1. 対照動物における構造変化: 図にFSDの加齢に伴う変化
 を示す。ほぼ直線的にゆくりと減少している。CLDもほぼ同様の変化を示した。また
 MVFは加齢につれて漸増し, 600日令以後の増加が大きかった。これらの構造変化
 は全ての個体に起るものであり, 糸球体硬化へと向う退行性構造変化と考
 えることができる。しかし1000日を越える個体においても軽度～中等度の糸球体
 硬化にすぎず, life spanの間にcriticalな意味を持つことはないと思われる。

2. 胎生後期のX線照射の影響: 交尾後17日令にX線を200Rまたは300R
 照射されたマウスにおけるFSDの加齢変化を図に示した。約100日令において既に明ら
 かに対照との間に差がある。これは放射線により糸球体形成過程が影響されて
 毛細血管の発達の悪い単純な構造の糸球体が形成されたことによると考えられ,
 CLDが小さくMVFが大きいことはこれを裏付けていた。令が進むとFSDは



更に減少する。その減少速度は対照のそれよりもやや大きい。600日令を過ぎた個体の糸球体は著しい硬化を起していた。この時期には細尿管の拡張や atrophy, 内腔中の cast の存在なども認められた。次に600日令代の個体について調べた糸球体数と体積は次の通りであった。対照群(3個体)の糸球体数は1腎当り 2.23×10^4 であったのに対し、17日令胎仔300R照射群(3個体)のそれは 0.47×10^4 と著しく少なかった。糸球体体積は対照群 $2.63 \times 10^5 \mu^3$ に対し、17日令胎仔300R照射群では $9.43 \times 10^5 \mu^3$ であった。この大型化は糸球体の数が少ないことに対する代償性肥大と思われる。前述の如令に伴う退行性構造変化がやや加速されることに、糸球体数が少ないことが一因となっている可能性がある。以上の結果から後期胎仔のX線照射は糸球体数の減少と発達の悪い単純な構造の糸球体をもたらし、これに如令に伴う退行性構造変化が加わることにより高度の糸球体硬化へと導くことが明らかとなったといえる。

3. 放射線感受性の age-dependency: この系統のマウスでは交尾後12日令に後腎原基が出現し、nephrogenic zoneは出生後10日令まで認められる。(ヒトでは出生後は nephrogenic zone は認められないといわれている。) 胎生期および出生後の種々の時期にX線を照射し、FSD, CLD, MVFを指標として影響の大きさを相互に比較した。胎生中期よりも胎生後期の方が明らかに感受性が高かった。新生期も高感受性であったが、生後3週令以後の照射では影響が小さかった。新生期への照射では外層の糸球体と内層の糸球体とでは影響の大きさが異なり、構造の単純な糸球体は外層にのみ認められた。

胎生後期や新生期の放射線照射によっては通常肉眼的奇形は起らないので今まであまり重要視されなかった。しかし、少なくとも腎臓では、顕微鏡レベルの組織構築の攪乱に関してはこの時期が最も感受性が高く、この変化は令の進行に伴う退行性構造変化へと進展する。この観点から他の臓器についても検討したいと考えている。

河合康雄(ヤクルト研究所)

目的: 腸内細菌叢は、感染症はもとより、消化器病、肝臓、脾臓等の臓器疾患、アレルギー疾患、動脈硬化、胆才酸やコレステロールの代謝、薬物代謝、アミン代謝等に関係している事が知られている。最近では特に、大腸ガンも腸内細菌叢の関与が疑われている。このように腸内細菌叢は、人間の病気や生体内の変化の重要部分に関与していると考えられている。

従って、腸内細菌叢の生体における意義を追求する研究は、近年、重要視されつつあるが、腸内細菌叢の生体における意義は明らかでない部分が多い。

演者は数年来、腸内細菌叢の生体における意義を目的として研究を進めてきているが、加齢と共に人間の諸機能が変化し、それと密接に関連しつつ或は原因となりつつ、腸内細菌叢が加齢により変化し、その腸内細菌叢の生体に対する影響の仕方が加齢によって違ってくる事は十分に予想されることである。しかし、このような観点から老化の研究を進めようとしている研究者はいまだに少ない。

そこで演者は、このような観点から老化の研究を進めようと考え、その第一歩として、通常ラット(CONV)、人工菌叢ラット(GB)及び無菌ラット(GF)の3種類の実験動物を使って、腸内細菌叢と加齢の影響を腸管及び臓器の酵素活性により調べたので、その一部を報告する。

方法: CONV.及びGFラットは、ともしアメリカのChales River Breeding Lab. から輸入して当研究所で繁殖させたものを使用した。GBは、GFにCONV.由来のE. coli N-1, Staphylococcus epidermidis N-1, Streptococcus faecalis var. liquefaciens Y-5, Bacteroides fragilis GAM-8, fusi form bacteria EG-1及びlactobacilli (18株)の6種の細菌を経口投与したものである。

投与方法は最初4種類の細菌を4週令のラットに投与して2週間後、さらに18株のLactobacillus (L. acid, L. ferm., L. murini)を投与し、8週令で解剖した。解剖した腸管と臓器は酵素活性を測定するまでの間、シャーレに入れて、密閉し-70℃に保存した。測定時にテフロンホモゲナイザーで組織を破砕し、低速で遠心し、その上清を粗酵素標品として使用した。

酵素活性の測定は既知の方法に従った。

アルカリホスファターゼ: Acta chem Scand 19; 817 (1965). 二糖類分解

酵素: Anal. Biochem. 7; 18 (1964). ビルビン酸キナーゼ及び乳酸脱水素酵素: B. B. A. 334; 24 (1974).

結果: 測定した全酵素を通じて、酵素活性は小腸上部で最も高く、次いで中部、下部の順であった。

アルカリホスファターゼ活性: 腸内細菌叢の影響はどの加齢でも、GFが最も高く次いでGB、さらにCONVでは著しく活性が抑制されていた。加齢の影響は、GF, GB, CONV共に35日令が最も高く次いでGFの順であり、GBでは100日令

で少し活性が上昇し、250日令では逆に減少しているが、CONVでは55日令、100日令、250日令の順で徐々に活性が減少している。肝臓では、どのラットにも殆んど活性が見られなかった。腎臓では腸内細菌叢及び加令の影響は共に明確でなかった。

ピルビン酸キナーゼ活性：腸内細菌叢は25日令位までは抑制的に働くが、35日令以降ではむしろ活性を上昇させ、100日令ではGBの活性が著しく高まった。加令の影響はGFでは活性が上昇し、GB、CONV.ではむしろ活性を低下させた。肝臓では、常にGFの活性が高く又加令の影響も一定の傾向がみられなかった。腎臓では55日令が最も高く100日令以降は殆んど変化なく腸内細菌叢の影響はみられなかった。

シュウクラゼ活性：腸内細菌叢の影響は55日令までは抑制的に働きそれ以降もCONVでは抑制的であったがGBでは、上昇効果があった。

加令の影響は、GF、GB、CONV共に加令につれて、変化しないかもしくは、いくぶん上昇傾向がみられた。肝臓では、GB、CONVは加令につれて、活性は減少した。GFは活性の上下が著しかった。腎臓では活性は殆んどみられなかった。

マルターゼ活性：腸内細菌叢の影響はCONVでは常に抑制的に働いていたが、GBではむしろ上昇させる傾向があった。加令の影響はGF、GBでは減少CONVではやや上昇の傾向にあった。肝臓では、加令により著しく活性は減少し、特にCONVでは100日令以降は活性は殆んどみられなかった。腎臓では、かなり高い活性がみられた。腸内細菌叢及び加令の影響はみられなかった。

乳酸脱水素酵素活性：腸内細菌叢の影響は、傾向的にみられなかった。加令の影響は、徐々に活性を減少させる傾向がみられた。肝臓、腎臓でも殆んど同様の傾向がみられた。

考察：このように腸内細菌叢は消化管及び臓器における酵素活性に、大きな影響を与えている事がわかった。特に小腸上部において腸内細菌叢は酵素活性に対して抑制的に作用する事がわかった。また加令においても殆んどすべての酵素活性に影響を受けている事がわかった。今後さらに加令の進んだ動物を使って、腸内細菌叢と老化の研究を追求したいと考えている。

生体反応から見た老人性(老化)現象

○ 山中太木, 西里枝 久子 (大阪医科大学微生物学教室)

微量の細菌内毒素(LPS)の2相性乃至多相性投与による生体反応の経時的観察によつて, 眼球性反応, 聴器性反応, 神経性反応, 皮膚性反応, 消化管性反応, 生殖性反応, その他の広汎なる全身性反応, 並に局部的反応の諸相を詳細に観察し, これらが一般に見らるる所謂老化現象と云われるものとよく一致する概念に至つて基礎生物学的解析を加えたり。

また16mm 映写による実験の動的映像が虫尋ならぬのでスライドによる説明を加える。マウスにおける生体反応は同じ体重(20g)のDDO系マウスに対し同じShwartzman濾液0.2mlを投与するにしろも注射のルートと皮内, 皮下, 腹腔内と區別して注射すると, 例えはその右における経時的排便回数と含有菌数を測定するに表1の如くその観察の時間帯によつて全く正反対の關係が指摘される。即ち腹腔内注射の場合には最初の90分間内に5匹に22回の排便が見られ, しかも軟便が多く, 特に下痢傾向が強いのに對し, 皮下注射の場合には140分内に5匹に2回しか排便せず, 240分乃至480分間には5匹に6回の排便が見られ, 腹腔内注射のものは同時区内に僅か2回の排便を見るのみである。是れを皮内注射のものは兩者の中間的排便数を示している。

同時に表2の成績と對比してRogosa寒天平板上に培養する菌数と遠藤寒天平板上に培養する菌数との向には全く異つた変動を示すことが指摘せられる。

これらの本態的関係の追及は更に今後詳細に検討されねばならない興味深い問題の一つである。

次に同じLPSにしろも *E. coli*, *S. marcescens*, *Sh. flexneri*, などの菌種の相違によつても Fig. 1に見られるように先づ種々異つた体重減少を指摘することが出来る。

更にその右に現われる全身並に局部的生体反応の広がりや経過の推移はこれを概括して表示すると Fig. 2に示すが如くである。

表1 Rogosa plate count after injection of Shwartzman filtrate (0.2 ml per mouse, 1:100)

| Time (min) | Time (min) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 0 | 5 | 10 | 20 | 30 | 35 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 120 | 150 | 180 | 240 | 300 | 360 | 480 | |
| 1 | 21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 120 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 272 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 272 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 272 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 271 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 16 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 202 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 202 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 202 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 204 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 200 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 199 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 194 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 202 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

表2 RNDa plate count after injection of Shwartzman filtrate (0.2 ml per mouse, 1:100)

| Time (min) | Time (min) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| | 0 | 5 | 10 | 20 | 30 | 35 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 120 | 150 | 180 | 240 | 300 | 360 | 480 | |
| 1 | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 100 (1:10) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 200 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 120 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 110 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 100 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

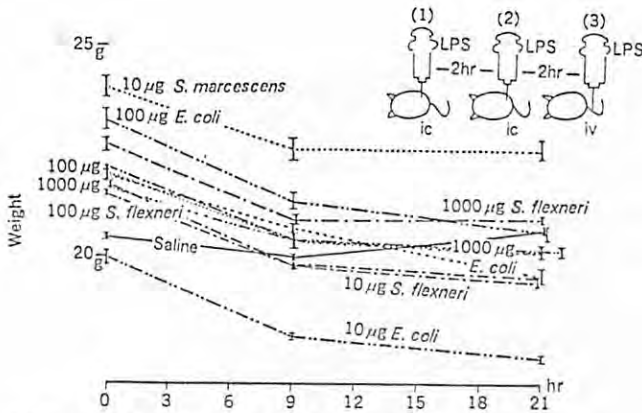


Fig. 1. Curves of body weight reduction (C3H/He-(N) Mouse).

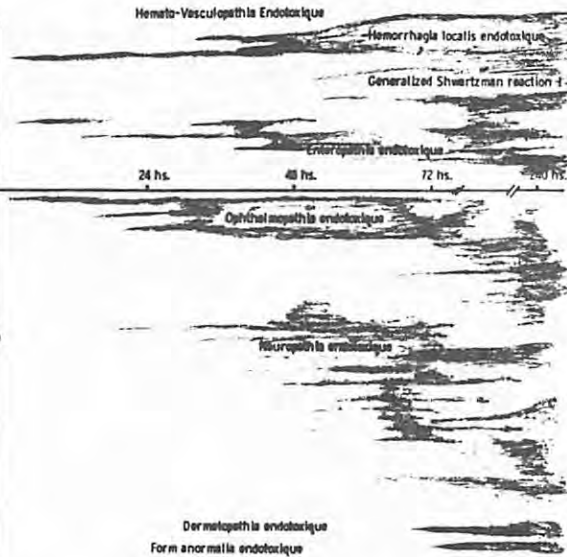
要するに LPS 注射に
 基く生体反応は所謂
 Schwartzman 反応を
 代表される Hemato-
 Vasculopathia と
 して認めるものがある
 が、局所出血反応の
 強いものには他の病
 状を起す傾向が少く、
 局所の反応のないもの
 には腸管系反応や
 眼症状、神経症状
 の外、皮膚反応(白髪

の急増、皮膚炎、脱毛など)、鼠背や斜頸などの出現が強く指摘
 せられたことは注目に値する。上述の夫々の局所における局所血管系
 の変化に關しては透過電顕観察や走査電顕写真による追及試験
 み多くの結果を挙げてゐる。就中聴覚の内耳性の細胞変化に
 關しては Hair cell の変化に極めて興味深い知見を加えてゐるの
 で肝肉の許す範囲内からその多数結果の上報告したい。

Figure 2.

Biological Responses of the Bacterial Endotoxin (LPS)

- Hyperemia
- Hemorrhagia et petechen
- Ischemia
- Renal hemorrhagia (nephritis?)
- Marrow hemorrhage(myelitis?)
- Silmy diarrhoea
- Constipation
- Bloody diarrhoea
- Ano-Colon paresis et Paralysis
- Shed tears
- Eye mucus (eye gum)
- Closing eye et eyes
- Subsidence of eyes (atrophia?)
- Exophthalmia
- Irruocytitis
- General blow (exhaustion et dullness)
- Caput tremor
- General tremor
- Skin spasm
- Staggering walk
- Settle down
- One side leg paralysis
- Walk on lip tue
- Excitement
- Gyratation by tail hanging
- Circulative motion
- Hunchbacked kyphose
- Leuco-trichosis
- Torticollis (wry-neck)



角膜混濁、難聴、トレモール、斜頸、よたよた歩き、腸管麻痺、肛門麻痺、
 白髪、皮膚炎、脱毛、鼠背、四肢中側麻痺、眼球陥凹、或は突出、皮膚瘡
 瘍、昂奮疾走、うすくまり、回旋運動等々は多く老人性現象といふ程目
 するもので実験的に惹起し得る点と内毒毒との関連から興味は深い。

鈴木撃之, 兵頭昌雄, 石井直明, 守矢容子 (東海大学医学部)

老化現象の解明に関してはいろいろなレベルでのアプローチが考えられるが、一般に哺乳動物は体制が複雑に分化し、多くの器官や組織から成っており、その間の相互作用などを考えると解析が困難である。また寿命が短いマウスでも数年と比較的長いために、一定条件で老化した個体を得ることも容易ではない。そこでわれわれは体の構造がはるかに簡単な下等無脊椎動物である線虫を老化研究において実験動物として使用するべく開発を行っている。

線虫は線形動物門(Nemathelminthes)または袋形動物門(Aschelminthes)に属している。広く地球上に分布し、その種類および個体数はともに最も大きい動物であるとされている。線虫には動物や植物に寄生するものと、寄生せずに自由生活を送るもの(free-living)とがあり、後者は草原や森林の土壌1g中に平均1000匹といはるといわれている。線虫は老化研究の実験材料として以下の利点が考えられる。

1) 体を構成する細胞数や種類が少く(600~1000箇)構造が簡単である。全体は固いクワクラにおおわれており、主として消化系、神経系、生殖系、筋肉系に分化している。神経の機能的発達については明らかではないが、chemotaxisやphototaxisを示す。

2) 孵化後生殖細胞以外の細胞は分裂しないとされている。したがって線虫は非分裂系組織のモデルとなる可能性がある。また組織の再生はないといわれている。

3) 飼育が容易で大がかりな施設や器械を必要としない。

4) 一世代の長さが比較的短かいから大量培養ができ、その反面寿命は数か月で実験に適当な長さである。

5) 液体要素中で株の保存が可能であるといわれている。

われわれは昭和50年の夏に伊勢原市の水田から一種を分離し継代飼育を続けている。分類学上はRhabditis目に属するが種名は未同定である。雌雄異体で、雄は集団中の6~7%にすぎない。受精した雌は100~150箇の卵を産む。卵は透明な卵殻に包まれており、1時間にはぼ1回の割で卵割をくり返し、20°Cで約30時間で孵化する。幼虫は体長180μで3~4回の脱皮ののち4~5日で成熟し次の世代の卵を産む。成虫の雄は体長530μ、雌は850μで産卵後も生き続けるが受精しない雌ははるかに長く生きようである。現在餌には大腸菌を与えているが、寒天培地上で径9cmのプレート1枚から約10万匹の個体を得ることができている。

われわれはまず虫令と生存率との関係を明らかにすることが重要であると考へ、この1年間主としてそれに関連した研究を行ってきた。1例によると受精させない雌は20°Cではほぼ2か月間一定の生存率を保っているが、その後比較的早い速度で死に始める。しかし一部の虫は4か月を経た現在もまだ生き続けている。飼育温度を25°Cに上げるとカタストロフはより早い時期に訪れるようである。現在反復実験

を行うほか 30°C での実験を行っている。またビタミンEを培地に添加しまたは放射線の影響についての実験をも予定している。照射後7日目(寿命の $1/20$ くらい)の生存率を見ると幼虫は成虫の2倍ほど紫外線に高感受性で、孵化率を目安にすると卵はさらに高感受性であった。

つぎに老化のていどを測る基準となるべき性質の検討を行った。その一つは運動性で、若い虫は体をくわらせて活発に動くが、老化するととみに動きが鈍くなる。またこのように動きの鈍った虫に振動または光の刺激を与えると動きが良くなるが、これらの刺激に対する反応性も老化に伴って低下することを確認した。

以上のほか雌の食と産卵能力や産卵した雌の寿命等についても研究を行っており、予備的な結果を報告できる予定である。

細野隆次 (金沢大. 医. 生化)

HENRY F. EPSTEIN (Stanford Univ.)

〔要約〕

Caenorhabditis elegans の age synchrony の可能性を検討した。この線虫は 5-Fluorodeoxyuridine で不妊化され、monoxenic な条件では 2×10^{-3} M, axenic では 2×10^{-5} M で不妊となり 成長はほとんど影響されない。この方法で得られた aged nematode を用いて摂食行動を調べた。体長が最大になるより早く食物としての Escherichia coli の酸不溶性分画へのとりこみは低下した。然し E. coli の分泌物に対する attraction potency の低下はみられなかった。また myosin の SDS-acrylamide gel 上での変化も観察されなかった。

線虫は細胞非再系個体の老化の研究に使用されている。線虫の一種 C. elegans は S. BRENNER によって神経系の研究材料としてとり上げられ、その過程で神経細胞や行動学的側面だけでなく、後胚発生に於ける細胞系統、遺伝子地図等も詳細に判明しつつある。C. elegans は細胞数も 1,000 以下であり、培養も容易で、life-cycle も短く、特に遺伝学的操作が容易であることから、老化の研究に適していると言える。ここでは、Fluorodeoxyuridine (FdUrd) による age synchrony の方法を確立し、この方法で得た nematode を用いて摂食行動の age に伴う変化について報告する。

〔実験方法〕

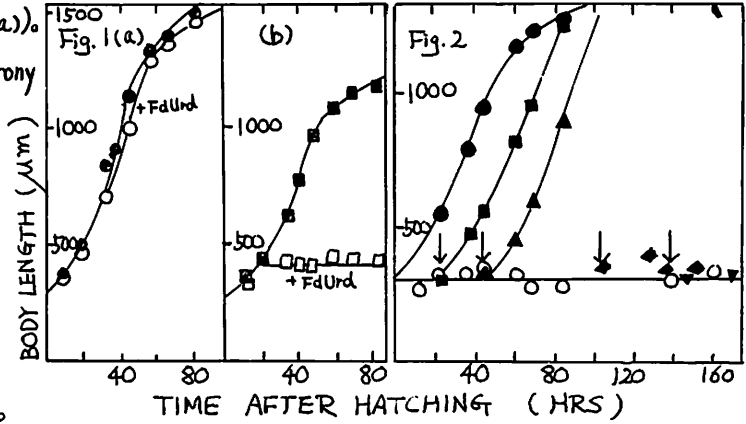
C. elegans strain N2 は S. BRENNER (MRC, Cambridge) より得た。通常は 20℃, 寒天培地上に E. coli OPSO を餌として培養した。FdUrd による不妊化は、monoxenic では栄養源を除いて増殖不能な E. coli を (intact bacteria), axenic では熱処理によって殺した E. coli を (heated bacteria) とそれぞれ与えた。E. coli の分泌物に対する nematode の attraction は、petri plate (直径 8.6 cm.) の周辺に E. coli をおき、中心に nematode を置いて周辺への accumulation rate から測定した。 ^{35}S の nematode の label は ^{35}S -E. coli を与えて行なった。酸不溶性分画へのとりこみは、 ^{35}S -nematode を 4% SDS で 2 分間沸騰水に接触させたのち TCA 処理した。Myosin の検出は、 ^{35}S -nematode を 5% 及び 10% SDS-acrylamide gel で展開、2 週間 X-ray film と接触して行なった。

〔結果と考察〕

1) FdUrd による C. elegans の不妊化と成長阻害

20℃ では C. elegans は孵化後約 50 時間で産卵を始め、70 時間ほど産卵を続ける。産卵されてから 12 時間以内にほとんどの胚は孵化する。Monoxenic な状態で 2 mM FdUrd を与えると、産卵はほぼ正常に行われるが、孵化能力がない。成長はほとん

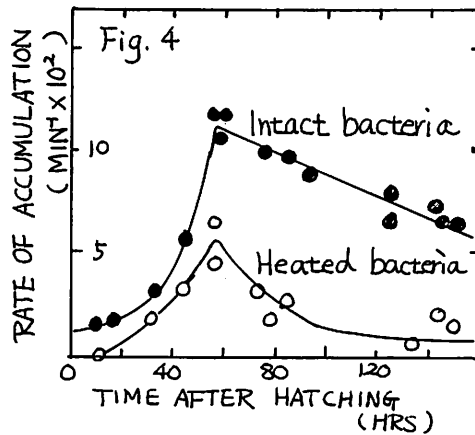
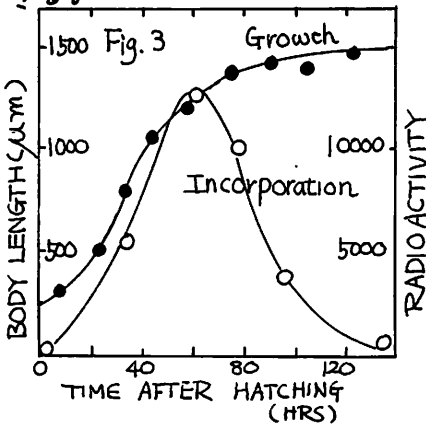
ど抑えられない (Fig. 1(a)).
 以下に述べる age synchrony
 はこの方法で行なった。
 E. coli 存在下では当然
 FdUrd が分解されること
 が予想される。そこで
 heated bacteria
 に FdUrd (2 mM) を加
 えた。この条件では
 成長は完全に抑えられた。



Heated bacteria では 1×10^{-4} M でも抑えられたが、intact bacteria では 1×10^{-2} M でも部分的に抑えられたにすぎない。次に FdUrd による成長阻害からの回復能力について調べた。孵化以来 FdUrd においておくと、時間と共に回復能力は低下し、100 時間以上 FdUrd に接触させると完全に失われた。然しこのような成長阻害はオス幼虫以降ではみられなかった (Fig. 2)。

2) 老化に伴う摂食行動の変化

上の方法を用いれば任意の発生段階の nematode を得ることが可能である。C. elegans は E. coli の分泌物に対して強くひかれる。行動は生体の特定の刺激に対する反応が integrate された結果であり、老化の解析の手段となることが期待できる。



Feeding behavior の活性を知る指標として、³⁵S-labelled bacteria を 3 時間だけ与え、acid insoluble fraction へのとりこみを見た (Fig. 3)。ほぼ growth に並行して取込みは増す。体長は 80~100 時間で最大に達する。これに対し ³⁵S のとりこみは孵化後 60 時間で急速に低下した。一方 intact 及び heated bacteria への accumulation rate も 60 時間で低下した (Fig. 4)。これらのことは、孵化後 60 時間で、代謝を含む生理的变化が生じたことを意味する。然し、heated bacteria に対する intact bacteria の accumulation rate の比は age に関係なく高い値に保たれていることから、attraction potency は低下していない。Myosin 量の変化はクロマト的には孵化後 200 時間で初めて観察された。

嶋 昭 結 (滋賀医大・放射線基礎医学教室), 江上信雄 (東大理学部動物学教室)

動物の暦年令に依存する形質の一つとして, 私達は肝実質細胞核の PLOIDY の変化に注目してきた。私達はさきに, 正常な C57BL/6 雄マウスの肝細胞核では個体の加齢にともなって POLYPLOIDIZATION が進行し, POLYPLOID 核と DIPLOID 核の相対数の比を P.I. (POLYPLOIDIZATION INDEX) と定義すると, $P.I. = 0.393 \times \text{AGE (MONTH)}^{0.881}$ なる関係がえられ, P.I. の対数と月令の対数との間の相関係数は (+)0.892 であること, さらにマウスに 2 ヶ月令で 500R の X 線を全身一回照射することによって POLYPLOIDIZATION が加速されること (SHIMA & SUGAHARA, 1975, 1976) を報告した。加齢にともなうこのような POLYPLOIDIZATION の機構については, 特に細胞核物質の損傷と修復という観点から現在研究を進めている。

一方, 比較生物学的視点からは, 変温動物であり, いわゆる INDETERMINATE GROWTH タイプの成長をするといわれ, 遺伝学的基礎にたった実験動物化が進んでいる魚類に関してマウスと同様の検索を試みることは大変興味あることなので, 私達は生命表 (EGAMI & ETOH, 1969; EGAMI, 1971) や 遺伝学的背景 (YAMAMOTO, 1975) の明確なメダカ (ORYZIAS LATIPES) を用いた研究を開始した。

その第一歩として, 正常な若, 中, 老令雄ヒメダカの肝細胞核 DNA 量を肝スミア標本について DNA 顕微蛍光測光法 (FUJITA ET AL., 1973, 1974) によって定量し, PLOIDY クラスの変動をしらべた。その結果, 標準 DIPLOID DNA 量を相対値 10 とした場合, 若, 中, 老令メダカのすべてにおいて肝細胞核 DNA 量は 6 から 22 に至る連続的な分布を示した。ただし, 測定された DNA 量の平均値は若, 中, 老でそれぞれ 11.1 ± 2.9 , 10.8 ± 2.7 , 10.0 ± 2.8 であった。この結果はマウスの場合とは著しくことなり, メダカの肝細胞核では加齢にともなって, 少なくとも体系的な POLYPLOIDIZATION は起っていないことを示している。

さらに中, 老令個体でも DNA 量が連続的な分布を示すこともメダカ肝細胞核の特徴といえる。そこで ^3H -THYMIDINE (1 μC /FISH) を腹腔内投与後 2 時間で肝スミア標本を作成し ARG によって調べた結果, 標識細胞核の割合は若, 中, 老令メダカでそれぞれ 11.9, 3.2, 0.34 パーセントであり, しかも INTERMEDIATE DNA 量を持つ核が選択的に標識されたわけではなかった。今後は CUMULATIVE LABELLING も試み, 細胞周期の解析等, メダカ肝細胞の特性の解明も試みたい。

なお, 加齢にともなう変化ではないが, JACOB 是古く 1925 年に, 両せい類の PROTEUS と最も下等な哺乳類である ECHIDNA の成獣では肝細胞核のサイズはそれぞれ一種類しか存在しないことを報告しており, 私達の今回の結果とあわせて, 肝細胞核の POLYPLOIDIZATION は比較的高等な哺乳類に限られた現象である可能性を示唆している。

中西 和夫・藤田 哲也 (京府医大・病理)

加齢に伴う細胞核DNA量の変化を精確に調べることは、加齢の機構を知るためのアプローチの一つとして意義あるものと思われる。新生児から老人および新生ラットから老令ラットを対象として、加齢に伴う細胞核DNA量の変化を以下の臓器について調べた。

材料と方法

人およびラットの心筋細胞(左心室), 肝細胞を用い塗抹標本を作製し, Feulgen染色(1N HCl, 60°C, 5分間加水分解の後7°CでSchiff反応10分)を行ない, 後照射法-落射式蛍光顕微測光法⁽¹⁾により, 細胞核DNA量を測定した。

結果

I. 心筋細胞: (i) 人: 生後1日目の人の心筋細胞核DNA量は図1aに示す様に4cが3.8%でこの4cを越えた値はなく, 全細胞が2n-populationであるが, 6才(図1b)では4cが17.5%と増加し, 4c-8c(1.3%), 8c(3.0%)が新たに出現しproliferating 4n-populationの存在即ち polyploidization がみられた。

68才例(図1c)では, 4c以上の値が更に増加し(4c:21.4%, 8c:8.1%) polyploidization がより著明となっていた。また, 特発性心筋症で心肥大を呈し死亡した12才の心筋細胞(図1d)では, 68才例よりもploidyの高い16c細胞もみられた(写真1)。

(ii) ラット: 生後1日(図2a), 2ヶ月(図2b), 2年(図2c)のラット心筋細胞核はいづれも2n-populationからなり加齢と共にS期の細胞(2c-4c)は4.3%(1日目)→1.9%(2ヶ月)→0.5%(2年)と減少傾向を示すが, 加齢に伴う polyploidization はみられなかった。唯, 生後1日目ラット心筋細胞核の大きさは比較的均一で核分裂像も散見するが(写真2a), 生後2年ラットでは核の大小不同がみられた(写真2b)。

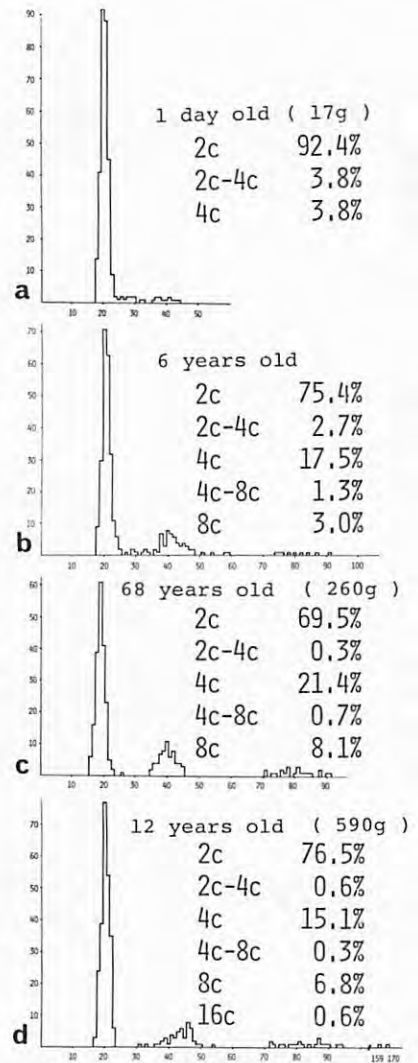


図1. 人心筋細胞核DNA量

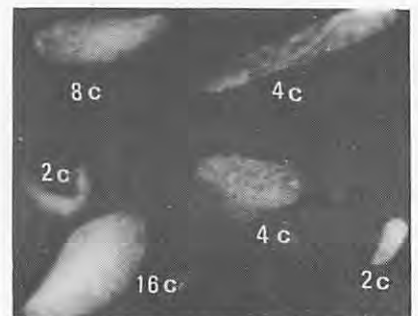


写真1. 特発性心筋症の心筋細胞核

Ⅱ. 肝細胞：人およびラットの肝臓において加齢と共に着実に polyploidization の進行を認めた。ここでは、人の生後1日と90才例、ラットの生後8日と1.5年例を図3に示したが、polyploidization は人よりもラットの方が顕著であった。また、胆道閉塞症で死亡した生後2ヶ月の人肝細胞核では、同年令の正常肝に比べて polyploidization が進行していた。(図4)。

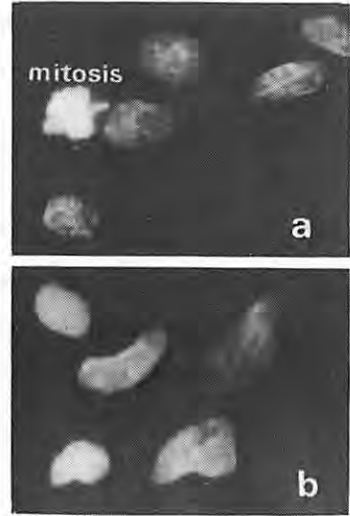
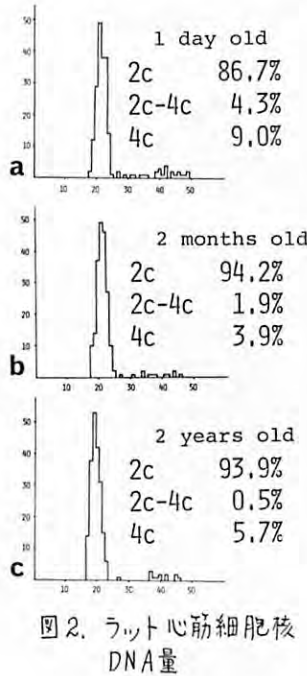


写真2. ラット心筋細胞核。
a: 1 day old
b: 2 years old
bで大小不同を認めるが全て2nである。

以上、加齢に伴うDNA量の変化には、臓器差、種属差がみられたが、疾患に際して polyploidization が更に顕著となる例のあることは興味をもたれる現象である。我々は既に、polyploidization のメカニズムとして「DNA二重鎖間に cross-link の障害を有する細胞が DNA 合成を介して polyploid cell になる」という仮説を報告したが、

この仮説に基づけば、上記にみられた polyploidization の差異は、cross-link の障害と DNA 合成能の2つの因子が関与した結果であると考えられる。この点を検索するためには、cross-linking 剤等の DNA 損傷物質の各臓器に対する親和性の強弱およびその損傷に対する各臓器細胞の修復能力の差異を調べると共に、各臓器の DNA 合成能力の差異をそれぞれの因子として加齢と共に調べていく必要があると思われる。

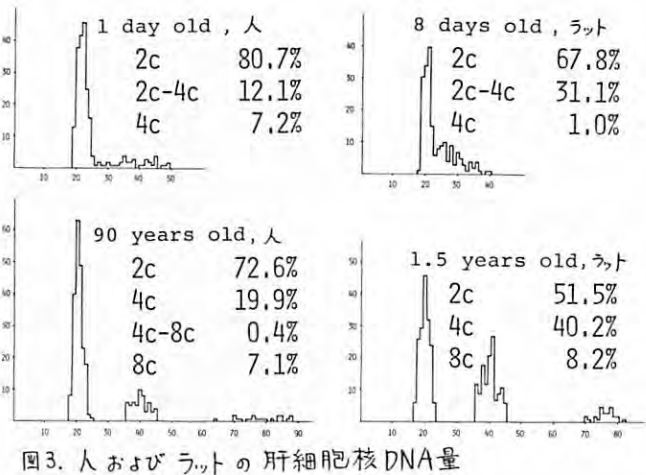


図3. 人およびラットの肝細胞核DNA量

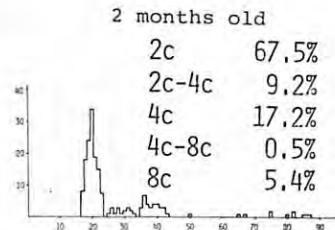


図4. 胆道閉塞症の生後2ヶ月の人肝細胞核DNA量

文献 (1) Fujita, S. & Fukuda, M. : Histochemistry. 40: 59-67, 1974.

帝京大学医学部生化学教室 島崎 弘幸、植田 伸夫
Minnesota大学Hormel研究所 O.S. Privett

ヒトや動物の加齢に伴って、生体の組織にリポフスケン (Lipofuscin Pigment) あるいは老化色素 (Age Pigment) 等と呼ばれる黄褐色色素の沈着がみられる。リポフスケンの産生機序には、生体の脂質の過酸化反応が関与しているといわれ、"Free Radical Theory on Aging" を求明するうえにも興味深い物質である。脂質過酸化物は、in vitro で生体成分のタンパク質、核酸、あるいはアミノ酸らと反応してケイ光物質となるが^{2,5)} 組織内に沈着するリポフスケンも紫外線の照射下にケイ光を発生する。このリポフスケンのケイ光特性を用いて、老化組織のリポフスケンの定量が近年盛んに試みられており、我々もその研究の過程でリポフスケン由来と思えるケイ光物質をとらえることができた⁶⁾。今回はそのケイ光物質 (Age Related Fluorescent Substances, ARFS と略す) のラット腎臓組織への蓄積について、加齢および高脂肪食餌の影響を検討した。

(実験方法)

動物及び飼育 体重約50gの幼若ラットを、①普通食餌、②必須脂肪酸欠乏食餌、③②で飼育後①に切り替え、④高脂肪食餌(10%コーン油)、⑤高脂肪食餌(10%コーン油7とメンバードン油3の混合)の5グループに分け、それぞれ30匹を飼育した。今回の実験には11ヶ月令(一部は20ヶ月)のラットを用いた。

ARFSの抽出 ラットをエーテル麻酔下に採血し、臓器を摘出して生理食塩水で洗じようしたのち、-20℃に凍結保存(2週間以内に実験に使用)した。組織0.5gに6mlの2,2-ジメトキシプロパン(DMP)と10 μ lの酢酸を加えてホモジナイズし、それを4mlのDMPで洗いながら試験管に定量的に移した。水とDMPの反応完結のためN₂ガス気流下に1時間置き、3000rpm, 10分遠心分離して上澄を得た。その上澄の溶媒をN₂ガス気流下に徐々、最終的に100 μ lのCM(2:1)溶液として薄層クロマトグラフィー(Silica Gel H)により、ARFSを単離した。展開溶媒の系は、一次をC:M:酢酸:水(95:5:1:0.3)、二次をC:M:NH₄OH(90:10:1)で行い使用前に、TLCをC:M:酢酸(75:25:1)で展開してシリカゲルに含れている微量のケイ光物質を除いた。

ケイ光スペクトルの測定 TLC展開後、紫外線照射下でARFSの周辺にマークし、その部分のシリカゲルをかきとってエタノール:エーテル(3:1)1mlを加えVortex Mixerで1分間振とうした後、3000rpm, 5分遠心分離して上澄のケイ光強度を測定した。

測定には Aminco-Bowman ケイ光測定器を用い、Slit 3-3-5, Meter Multiplier 0.01, Sensitivity 50で行った。

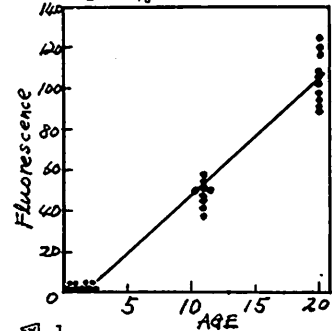
脂肪酸の測定 血清0.1ml、組織約10mgにDMPを加えて脱水後、乾燥組織に直接5%塩酸メタノールを加えてメケル化し、⁷⁾ TLC分析を行った。

〔結果〕

食餌のラットに与える影響 初期の6週では、ラットの体重の増加にみられる食餌の影響はほとんど無かったが、その後②③のグループで成長が遅くなり、ラットの皮膚等に必須脂肪酸欠乏症状が現れた。血清中の脂肪酸組成をみると、4週目には血清中のリノール酸量が5%（コントロール25%）、アラキドン酸量16%（30%）となり、その後も徐々に減少して必須脂肪酸の欠乏が確認できた。また、これに対し高脂肪食餌グループではやや肥満の状態がみられた。

ARFSの抽出について 50週目に各グループのラット4-5匹を殺し、その腎臓組織のARFS（ケイ光強度）と脂肪酸組成を測定した。ARFSの抽出には、前報に変えてDMPを用いたが、試料の数が多い場合この方法が特に有効であった。

ARFSの蓄積と加齢 ラットの年齢が2ヶ月以下の場合には腎臓組織中にARFSの蓄積は認められなかった。同様にその組織には、組織学的所見でもリボフスチンの沈着は確認できなかった。11ヶ月令のものではARFSをTLC上でも、ケイ光スペクトルでも検出できた。また組織学的にリボフスチンの沈着が認められた。唯、我々の初期の目的の一つであった高脂肪食餌、あるいは不飽和脂肪酸含量の高い食餌グループ



と普通食餌、必須脂肪酸欠乏食餌グループとの間に、ARFS沈着の有意の差が認められなかった。11ヶ月令と20ヶ月令のグループではARFSのケイ光強度に大きな差があり（図1）、幼若ラットにはそれが全く認められないことから、ARFSは加齢に伴って生体内に蓄積されるリボフスチン様物質であることが示唆された。

〔考察〕

過酸化脂質が生体の加齢を押し進めているかどうか、現時点で結論づけることはできない。しかし、我々も生体の持つ種々の抗酸化機構を経験しており⁹⁾¹⁰⁾、それらは有害な過酸化脂質の生体への蓄積を防御する機構と思える。リボフスチンがどのような過程を経て生体内に沈着するのか明らかでないが、それも生体の持つ一つの“Adaptation”あるいはその結果であるかも知れない。Tappel¹¹⁾は腎臓組織にリボフスチンが多くみられるのは、高度不飽和脂肪酸の含量が高いためと考えたが、今回の実験では食餌中の脂肪含量とARFSとの間に相関性はみられなかった。我々はむしろ素材としての高度不飽和脂肪酸量よりも、各臓器の持つ物質代謝およびその活性の違いが、老化色素の蓄積に関与するのではないかと考えている。

- 1) 植田、老年学（太田ら編）1976、218-233.
- 2) Chio, K.S., A.L.Tappel; Biochemistry 8 (1969) 2821-2827, 2827-2832.
- 3) Malshet, V.G., A.L.Tappel; Lipids 8 (1973) 194-198.
- 4) Hara, I., H.Shimasaki, J.Sato; Lipids 8 (1973) 623-626.
- 5) Shimasaki, H., O.S.Privett, I.Hara; J.Am.Oil Chem.Soc., 54 (1977) 119-123.
- 6) Shimasaki, H., T.Nozaawa, O.S.Privett, W.R.Anderson; Arch.Biochem.Biophys. in press.
- 7) Shimasaki, H., O.S.Privett, W.F.Keane, W.R.Anderson; 投稿中
- 8) Shimasaki, H., F.C.Phillips, O.S.Privett; J.Lipid Res., 18 (1977) in press.
- 9) Shimasaki, H., O.S.Privett; Arch.Biochem.Biophys. 169 (1975) 506-512.
- 10) Shimasaki, H., et al.; Biochem.Biophys.Res.Commun. 68 (1976) 1256-1262.
- 11) Reddy, K., B.Fletcher, A.Tappel, A.L.Tappel; J.Nutr., 103 (1973) 908-915.

佐藤 秩子，田内 久（愛知県がんセンター臨床研究部，愛知医科大学病理）

主として postmitotics の細胞質内に沈着する消耗性色素——リポフスチンと呼ばれる——は age pigment とも呼ばれ、老個体にみられる重要な一所見とされて今日に到った。Strenler のヒト心筋におけるこの色素量の逐齡的增加の報告（1959）は有名である。脳の神経細胞にも加齡にもなってこの色素沈着の増加がみとめられているが、脳の部位による増加速度、沈着様相の差の報告もある。（Nanda & Getty, 1973）。私どもは最近ヒト生検肝細胞におけるリポフスチン沈着様相の年齢的消長を検討し、この色素が必ずしもすべての細胞にみられるわけではなく、又、小葉内の発現も不均一で、一方細胞内での沈着は永久的なものでない点を示唆した。（1976）今回はヒトの肝細胞内におけるこの色素沈着様相の量的分析を試みた。

検索材料は特記すべき病変のみられないヒト肝組織（すべて男性例）で、在日日本人生検例（21才から81才，59例），在日日本人剖検例（21才から100才，89例），在ハワイ日本人剖検例（36才から98才，153例），米国白人剖検例（22才から89才，97例）で、フォルマリン固定、パラフィン包埋の4 μ 薄切未染色封入標本で、肝小葉中心層、辺縁層のそれぞれについて、オリンパス落射螢光顕微鏡による写真を撮影（ダイクロックミラーV，励起フィルターUG5，BG3，吸収フィルターY455，フィルム面倍率220倍のを数枚宛），黄色の自家螢光を発する色素顆粒について数量的検索を施した。すなわちこれらの写真について“ミクロビデオマート（Zeiss）”，（顕微鏡像自動分析装置）のマクロ像測定装置を用い、細胞内の色素顆粒数，顆粒の占める面積（色素量），粒度分布などを求める一方，さらに顆粒を含む肝細胞数の比率を求めた。これらの検索値の各年代毎（49才以下，50～59才，60～69才，70～79才，80才以上——生検例のみ70才以上——）の平均値について，各々年代間，各々群間の有意差の検定を行った。主な検索成績を，図および表に示す。

在日日本人と米白人の両剖検例の比較では，色素量，色素含有細胞数ともに後者に有意に多く，又共にリポフスチン量の逐齡的增加がみられる。しかし同じ日本人でありながら，在ハワイ日本人剖検例では，その沈着の絶対量がこれら2群に比し有意に多い上に年齢差に乏しく，在日日本人生検例にも年齢差が少い。すべての肝細胞の年齢は，心筋や神経細胞とは異り均一ではなく，リポフスチン沈着様相がすべての肝細胞に均一でない点を一応諒解したとしても，すべての年代で，極めて沈着の僅かなものがみられ，高齢者群ではとくに個体差がつよく，又環境（特に栄養環境）によって年齢差以上のものがみとめられた点は注目すべきである。

以上ヒト肝細胞内のリポフスチン沈着の加齡にもなり消長を，人種別，生活環境別などによって比較したが，同一材料によってすでに検討した肝内動脈硬化像の消長，肝細胞の微計測値所見をはじめ，これら各群の生活環境ことに栄養環境の差などとも比較検討して，リポフスチン沈着の，本質的な老化の形態像としての意義についても考えてみたい。

Table 1

リポフスチン沈着様相の各年代間の有意差検定成績

| | | 年齢別 | 40 | 50-59 | 60-69 | 70-79 | 80+ |
|---------------------|----------|-----|----|-------------|-------------|-------------|-----|
| 色素含有肝細胞数 | 在日日本人剖検例 | | | $P < 0.001$ | | $P < 0.01$ | |
| | 中心層 | | | | | | |
| | 辺縁層 | | | $P < 0.01$ | | | |
| 肝細胞あたりの顆粒の総面積 (色素量) | 在日日本人剖検例 | | | $P < 0.01$ | $P < 0.001$ | | |
| | 中心層 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |
| | 辺縁層 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.01$ | $P < 0.001$ | |
| 在日日本人剖検例 | 中心層 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |
| | 辺縁層 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |
| | 在日日本人剖検例 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |
| 在ハワイ日本人剖検例 | 中心層 | | | $P < 0.01$ | $P < 0.01$ | | |
| | 辺縁層 | | | $P < 0.01$ | $P < 0.001$ | | |
| | 在日日本人剖検例 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |
| 在日日本人剖検例 | 中心層 | | | $P < 0.01$ | $P < 0.01$ | | |
| | 辺縁層 | | | $P < 0.01$ | $P < 0.001$ | | |
| | 在日日本人剖検例 | | | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | $P < 0.001$ | |

男子例

Table 2

肝小葉中心層と辺縁層におけるリポフスチン
発現の有意差検定成績

| | | |
|---------------------|------------|-------------|
| 色素含有肝細胞数 | 在日日本人剖検例 | $P < 0.05$ |
| | 在日日本人剖検例 | NS |
| | 在ハワイ日本人剖検例 | $P < 0.05$ |
| | 米白人剖検例 | $P < 0.05$ |
| 肝細胞あたりの顆粒の総面積 (色素量) | 在日日本人剖検例 | $P < 0.005$ |
| | 在日日本人剖検例 | $P < 0.005$ |
| | 在ハワイ日本人剖検例 | $P < 0.001$ |
| | 米白人剖検例 | $P < 0.001$ |

男子例

Fig. 1 リポフスチン保有肝細胞
発現頻度の年齢的消長 中心層

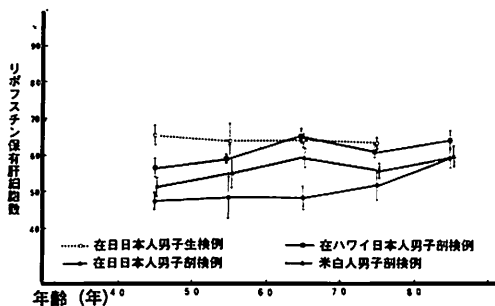


Fig. 2 肝細胞内 リポフスチン量の年齢的消長 中心層

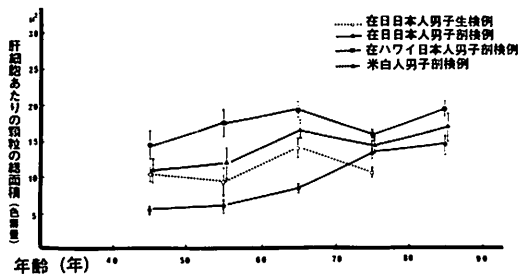


Table 3

リポフスチン沈着様相の

人種(群)差の有意性検定成績

| | | 在日日本人 生検例 | 在日日本人 剖検例 | 在ハワイ 日本人 剖検例 | 米白人 剖検例 |
|---------------------|-----|--------------|--------------|--------------------|-------------|
| 色素含有肝細胞数 | 中心層 | $P < 0.001$ | NS | $P < 0.001$ | $P < 0.005$ |
| | 辺縁層 | $P < 0.001$ | NS | $P < 0.001$ | $P < 0.05$ |
| 肝細胞あたりの顆粒の総面積 (色素量) | 中心層 | $P < 0.05$ | NS | $P < 0.001$ | $P < 0.05$ |
| | 辺縁層 | NS | $P < 0.001$ | $P < 0.005$ | NS |

男子例

24 神経系線維構造の組織化学的研究。(1)アクチン蛋白の中脳神経分布—蛍光抗体法による研究

石井 毅(東京都精神医学総合研究所)

神経系の老化, 変性過程には, 神経細胞内の線維構造の病変を示すものが多い。たとえば, アルツハイマー-神経原線維変化は特有のねじれ構造である, *twisted tubule* より成り, また *torpedo*, *spheroid* あるいは *axonal swelling* 等の病変の際にも *neurofilament* の異常蓄積が見出されてくる。一方, 正常神経細胞の線維構造としては 60 \AA の *microfilament*, 約 100 \AA の *filament*, あるいは $200 \sim 240 \text{ \AA}$ の *microtubule* が区別されている。

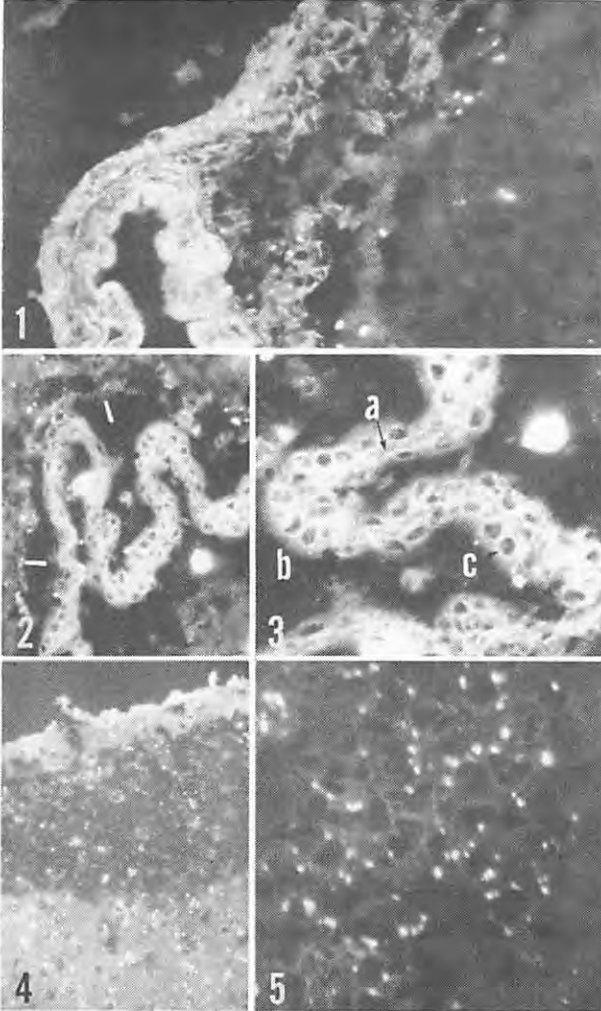
それぞれの研究の目的はこゝろ正常線維構造と病的のものとの関係を, 構成蛋白の個から追求するにある。

アクチンは周知のように筋蛋白であるが, 一般の細胞にも広汎に分布し, 細胞運動機能の化学的基礎となっている。神経細胞におけるアクチンの局在と機能は必ずしも明確ではないが, 細胞およびその突起自体, およびその内部の物質移動等の運動機能に關与していると思像される。われわれは蛍光抗体法を用いて, マウス脳内のアクチン蛋白の分布を調べた。アクチン抽出には, 1) 筋アセトン・パウダー製造, Straub の変法により, 新鮮鶏砂囊を10倍の冷水で *homogenize* し, 上清を $15000 \text{ rpm} \cdot 15$ 分遠沈, 沈澱を冷水に *suspend* し, $15000 \text{ rpm} \cdot 15$ 分遠沈を5回繰返し, 沈澱を冷アセトンで振盪, 口過, 乾燥した。2) アクチンの精製にはアセトン・パウダーを40倍の冷 *buffer* に *suspend* し, 0°C で一時間攪拌後, $10,000 \text{ rpm}$, 15分遠沈, 上清を *SDS polyacrylamide gel electrophoresis* にかかり, *slab* を切り取り, *homogenize*, 遠沈, 上清を3日間 *dialyze* して *SDS* を除き, 凍結乾燥, 4°C に貯蔵。3) 抗アクチン抗体の作製。2mgの *SDS* 変性アクチンを 1ml 生理食塩水に溶かし, 1ml の *Freund complete adjuvant* を混じり, 1回 1mg を腹腔下数ヶ所に注射, 2W 間隔で3回繰返し, 沈降反応が8倍以上に達したとき採血, 抗血清を分離する。FITC標識抗体は *Marshall* 法(村妻法)を用いた。アクチン抗体の抗原性の弱さ, *contaminant* の存在による特異性の問題は *Lazarides (1974)* により, *SDS* 変性アクチン抗原を用いることにより回避できることが分った。蛍光抗体法のコントロールとしては, 非標識抗体で前処理すると大巾な蛍光減弱がみられ, 標識正常のグロブリンで処理しても特異蛍光は陰性であることが分った。

中脳神経で最も強い蛍光は *plexus chorioideus* の上皮細胞にみられる(図2, 3)。ここでは細胞核周囲のアクチン蛍光が最も強く(図3c), *brush border* の蛍光はむしろ弱い(図3b)。脳室上皮細胞の蛍光が非常に強く(図2), また蜘蛛膜, 脳軟膜にも蛍光が顕著である(図1)。動脈壁では筋層のほか, 内皮細胞, 蓋膜にもアクチン蛍光が見られる(図1)。*neuropil* にもよからい蛍光が認められるが白質には陰性である(図4, 5)。

考察

plexus chorioideus 上皮細胞および ependym 上皮細胞のつよりアクチン管束は、おそらく同細胞のリコール分泌機能、イオンの active transport 機能と無縁ではな
いと想像されるが、アクチン管束が何故細胞核周囲に特に強いかは不明である。同
様のことは軟脳膜、蜘蛛膜のアクチン管束についても想像されるが、具体的に細胞
内のどの小器官に結びついているかは、超微レベルの研究にまたねばならぬ。
neuropil のアクチン管束があるも示していても不明であるが、最近 Puzkin らは
シナプスよりアクチン蛋白を分離し、neuronin または neurin と名付けた。わ
れわれのみたアクチン管束があるのは Puzkin のいうシナプスのアクチン蛋白の
存在を示すの可能性も考えられ、今後検索を進めたい。



Legends for figures

Fig. 1. Positive green fluorescence in an artery, arachnoidea, and neuropil of frontal cortex. Endothelial lining (not clearly visible here), muscle layer and adventitia of artery are positive. Negative blue fluorescence is rather prominent in lamina elastica interna of artery.

Fig. 2. Positive green fluorescence in epithelial cells of plexus chorioideus and ependymal cells of 3rd ventricle.

Fig. 3. Enlargement of Fig. 2. Fluorescence in a: capillary wall, in b: brush border apical membrane, and c: a particularly intense one in perinuclear region.

Fig. 4. Fluorescence in leptomeninge and neuropil. Note the contrast between neuropil of grey matter and the dark white matter.

Fig. 5. Fluorescence in neuropil of granular layer of hippocampus.

都老人研 生化 猪股光司 上野邦弘
 帝京大. 医 生化 石塚橋夫

加齢にともなうて組織中に存在する脂質が蓄積, 減少あるいは構造的変化をきたすことが知られている。哺乳動物の精巣, 精子には臓器特異的な硫酸基を有する

THE STRUCTURE OF SULFATED GALACTOSYL GLYCERIDES FROM THE BRAIN OF RAT

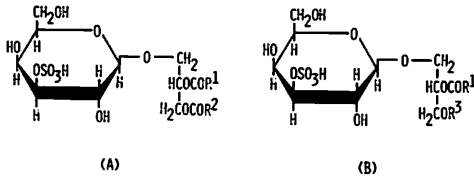


図 1

糖脂質, いわゆるセミノリピド(SL)が存在し(図1, B) さうに最近ではラット脳においてもSLに近い硫糖脂質が存在することが明らかとなっている。そこでわれわれは今回, ヒト精巣およびラット脳に存在する硫糖脂質を中心として, それら脂質の加齢にともなう合成, 含量, 分子種の変動について検討し興味ある結果を得たので報告する。

実験, 方法

各年齢のヒト精巣から脂質を抽出し, Folchの分配法により上層に得られるガングリオシド分画は酸加水分解後, TBA法でシアル酸を測定し定量した。一方下層に含まれるSLはDEAE-セルロースカラムで精製後, シリカゲル薄層クロマト(TLC)をおこなひ, スポットを抜き取りて酸加水分解し, ガラクトースデヒドロゲナーゼによる蛍光法で測定した。またスルファチド(CSE)はアセチル化後, フロリジル, Whatman DE-32 カラムで精製し, TLC後スポットを抜き取りて酸加水分解し, フルオレスカミンによる蛍光法で測定した。コレステロールはZlatkis法で定量した。

ラット脳の硫糖脂質については, 腹腔内に³⁵S-硫酸を投与後, 脳より脂質を抽出し, フロリジル, DEAE-セファテックスおよびヤトロビーズカラムで, 分離, 精製した。CSEはアントロン硫酸法, SLはジオキサニウム脱硫酸後, メタノール性アルカリを用いて脱アシル化し, TMS誘導体としてガスクロ法により分析, 定量をおこなった。

結果, 考察

まずヒト精巣の各年齢層における分析値を示したものが表1である。ガングリオシドを除いて, 総脂質, SL, CSE, コレステロールなどは老年者において減少傾向を示している。特に精子産生機能との関係が興味をもたれているSLは, 幼児期, 少年期においては, 全く検出されず, 成人期に高濃度となり, 老年期では著し

| Age group | Age(yrs) | Total lipid mg/g tissue | Ganglioside nmol/g | SL nmol/g | CSE nmol/g | Cholesterol μmol/g |
|-----------|----------|----------------------------|-----------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| Infant | 2 | 19.9 | 82.5 | n.d. | 20.1 | 4.80 |
| Child | 9 | 14.9 | 82.9 | n.d. | 12.1 | 4.09 |
| Adult | 40-50 | 39.0 | 67.4 | 158.7 | 22.6 | 6.83 |
| Aged | 60-90 | 25.6 | 163.8 | 25.3 | 7.4 | 2.66 |

表 1

い減少が認められた。このように精子産生能の低下が見られる老年期においてSL含量も急激な減少が認められることから、精巣におけるこの硫糖脂質は精細管上皮細胞の分化において重要な役割をもちことが示唆された。一方ガングリオシドが逆に老年期に最も高濃度となつてゐることは老化にともなう精巣組織の線維化の進行と一致するものと考えられた。しかしSLと異なり幼児期、少年期においても相当量存在している。この事実はFishman, Bradyの説にしたがえばLH, FSHなどの性ホルモンの受容機構に関係していることも考えられる。

INCORPORATION RATE OF H^3SO_4 INTO SEMINOLIPID AND SULFATIDE OF RAT BRAIN

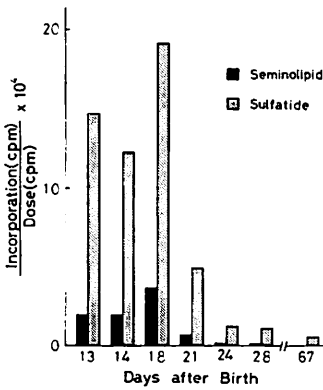


図2

型とアルキルアシル型の混合物として存在する。(図1, A, B) この二種類の硫糖脂質は、ブタ精巣のSL(アルキルアシル型)、植物のMGDG(ジアシル型)を標準物質としてガスクロ法により分別定量が可能である。そこでラット脳におけるSLの両型およびCSEの加齢による変動を図3に示す。両型ともミエリン形成期と一致して増加傾向を呈すが、加齢にともなう変動は必ずしも一致しない。ジアシル型は量的にアルキルアシル型と22日令において逆転し、25日令をピークとして以後加齢とともに減少する。一方アルキルアシル型は19日令以降急激に増加し、48日令以後マレベルオフする傾向が見られた。またCSEは加齢とともに急激に増加し、68日令以降についてもさらに増加することが予想される。68日令以降についても現在なお検討中である。

この様に発育および加齢とともにアルキルアシル型が増加傾向を示すことは、ミエリン形成あるいは、その他の神経組織の分化と関係があることを示唆するものがある。その他脂肪酸、アルキルグリセリルエーテルなどの加齢にともなう分子種の変動についても報告する予定がある。

次に各日令のラット脳CSE, SL分画への³⁵S硫酸の取り込み率を図2に示す。CSEについて見るとラットミエリン形成が極大となる18日令において最大の取り込み率を示し、以後加齢とともに急激な減少が認められる。一方SLについても18日令に合成のピークが見られ、以後減少する傾向はCSEと良く一致する。このことからSLもCSEと同様にミエリンの構成成分であることが示唆された。また全放射活性のうちSLの占める割合は18日令を最高に加齢とともに減少傾向を示した。したがってCSEより代謝回転が速いことが予想された。

ラット脳におけるSLの構造はすでに報告したように(50, 51年度生化学会, 脂質生化学研究会)ジアシル

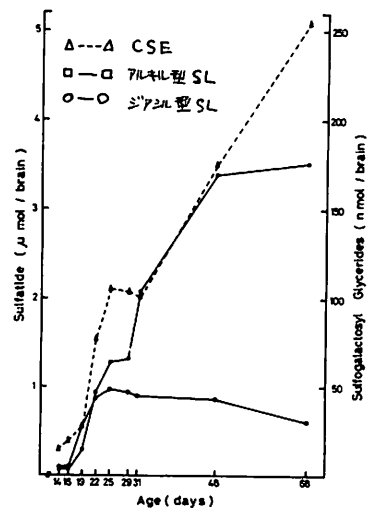


図3

大岡 宏 (東京都老人総合研究所生物学部)

ラットの食餌量を制限することにより寿命が延長されることは以前から研究されているが、最近飼料中のトリプトファン量を制限することにより生長を抑制すると、生殖能、体温調節能などの老化がおくれることが報告されている。本研究においては、栄養制限が老化をおくれさせる機構をしらべる目的で、生後21日のLong-Evans系ラットを一定期間トリプトファン制限食その他の条件で飼育した後、脳の各部分のモノアミン含量、血中TSH、チロキシン(T₄)、トリヨードチロニン(T₃)の定量、脳下垂体組織像の観察を行なった。図1は正常食(Purina Rat Chow)の約15%のトリプトファン(34 mg/100g)を含む制限食を ad libitum に与えた場合(T-)の毎日の摂食量および体重変化、T-と同量の正常食を毎日与えた場合(Pair fed)の体重変化を示す。T-ラットの摂食量および体重は正常のものよりはるかに少なく、2ヶ月間ほぼ一定値を保つ。Pair fedラットの体重もほとんどT-と同じレベルに止まる。T-ラットに正常食を与えると摂食量、体重とも急激に増加して正常のものに近づく。トリプトファンは脳モノアミンの一種セロトニンの前駆物質であるので、トリプトファン制限、食餌量制限、およびセロトニン合成の阻害剤であるp-クロロフェニルアラニン(PCPA)経口投与(700 mg/100g 飼料)を1ヶ月行なったラットの大脳半球、中脳+間脳、脳橋+延髄のセロトニン(5-HT)、ノルエピネフリン(NE)、ドーパミン(DA)を蛍光法により定量した。トリプトファン制限食に正常レベル(234 mg/100g)までトリプトファンを添加した飼料を与えた場合は食餌量、生長、脳モノアミンレベルにPurina Chowを与えたものとの差は認められなかったため、それらの測定値を含めて対照群とした。その結果、表1に示したようにトリプトファン制限食は脳のすべての部分でセロトニンを減少さ

表 1

Levels of monoamine neurotransmitters in discrete brain areas of 51 day old rats (µg/g wet weight)

| | Cerebral hemisphere | | | Mesencephalon Diencephalon | | | Pons Medulla oblongata | | |
|----------|---------------------|--------|-----|-------------------------------|--------|--------|---------------------------|--------|-------|
| | 5-HT | NE | DA | 5-HT | NE | DA | 5-HT | NE | DA |
| Control | 0.33 | 0.22 | 2.3 | 1.2 | 0.80 | 0.33 | 0.84 | 0.76 | 0.24 |
| T- | 0.20** | 0.24 | 2.5 | 0.32** | 0.79 | 0.35 | 0.47** | 0.77 | 0.23 |
| Pair fed | 0.41* | 0.23 | 2.3 | 1.2 | 0.80 | 0.31 | 0.79 | 0.81 | 0.23 |
| PCPA | 0.16** | 0.15** | 2.2 | 0.25** | 0.55** | 0.22** | 0.31** | 0.55** | 0.18* |

*p<0.01, **p<0.001 Control vs. Experiment

せ、また PCPA 処理ラットでは脳の全部分で 5-HT、NE、大脳半球を除いた部分で DA が減少し、同時に体重増加が抑制された。しかし単なる食餌量制限 (Pair fed) によつては T- のものと逆に大脳半球のセロトニンが増加するので、これらの処理による老化の抑制とセロトニンレベルとの直接の関係づけは困難である。これらの処理を 1 ヶ月続けた後に正常食にもどして 23 日後に再び測定を行なうと、脳のすべての部分でモノアミンレベルは同日齢の対照群と差がなかった。生後 21 日から 1 ヶ月間 T-、Pair fed、PCPA の処理をしたラットの脳下垂体切片を PAS 染色して観察すると、細胞の縮小、核の部分的凝縮、前葉細胞内顆粒の減少がみられ、好塩基性の消失が著しく、前葉ホルモン特に TSH、生殖腺刺激ホルモンの減少を示している。図 2 は血中 TSH、 T_4 、 T_3 のラジオイムノアッセイによる定量的結果を示す。正常ラットにおいて TSH は生後 21-51 日には変化なく 51-81 日に増加し、 T_4 は 21-81 日の間ほぼ一定値を保ち、 T_3 は 21-51 日に減少を示し 51-81 日には一定となる。このことは 51-81 日において甲状腺の TSH に対する反応性が低下し、また 21-51 日に組織における T_4 から T_3 への脱ヨード反応が減退することを暗示する。これら 3 種のホルモンレベルは食餌量制限の場合は 1 ヶ月、トリプトファン制限では 2 ヶ月続けた後の測定で顕著な低下を示す。トリプトファン制限を 2 ヶ月続けた後の正常食にもどした実験では 2 日後にホルモンレベルは正常値にもどるが、以後再び減少し、正常食を 2 ヶ月続けた後の測定においても T_3 、 T_4 濃度は対照群より著しく低かった。栄養制限による寿命延長は前半生に処理を行ない後半解除する方法が最も有効であることが知られているので、この時期における甲状腺系の機能低下が栄養制限動物の老化抑制に重要な意味をもつ可能性が考えられる。

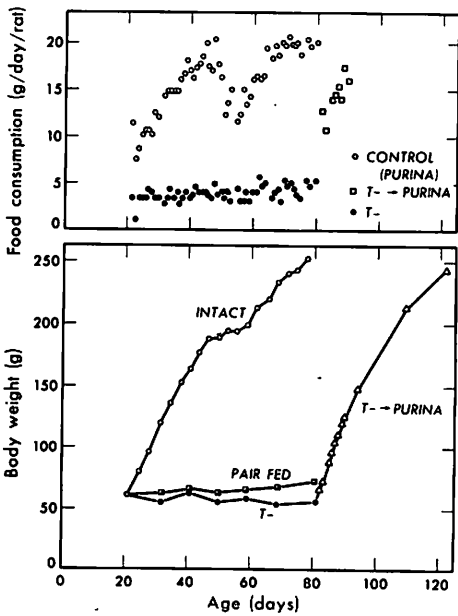


図 1

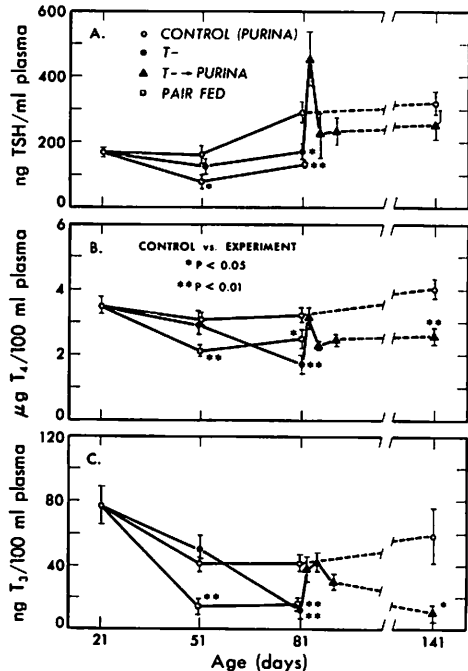


図 2

土山 秀夫 (長崎大学医学部病理学第二教室)

研究目的：副腎皮質を通して老化の現象を追究する場合、形態学的には2点を指標とするのが適当と思われる。1つは皮質に生じる結節形成であり、他の1つは主に皮質内層の細胞に沈着するリポフスチン顆粒の問題である。このうち本報告では、皮質結節の形成とその細胞学的変化をとりあげ、生理的な加齢現象に近いものと、ストレスなどの病的条件下における結節の比較を中心として検討を行った。

材料と方法：ヒトにおいては、各種疾患剖検例約800例（副腎の原発性病変や高血圧症例を除く）を用いて、副腎頭部、体部、尾部の何れのパラフィン切片にも結節化をみとめ得たものの頻度を、各年代別に求めた。またラット副腎における皮質結節化の推移をみるために、Wistar系ラットの生後12~24ヶ月例を用いて観察した。またストレス実験としては、同月令のラットを24°C、湿度60%に1年間飼育した後、夏は30°C、冬は5°Cの室内で飼育したものをを用いた。

ヒト、ラットの副腎皮質ともに、パラフィン切片についてはhematoxylin-eosin染色、Gomori氏鍍銀染色を、クリオスタット切片についてはoil red O脂肪染色および 3β -hydroxysteroid dehydrogenase (3β -HSD) 活性の如何を検索した。電顕標本は、1.0%グルタルアルデヒドによる灌流固定後、1.0%オスミウム酸で再固定、アセトン脱水、エポン812包埋を行って後作製された。

成績と考察：ヒトおよびラットの何れも、皮質結節の大きさとしては、主として束状帯外半部を足場とする小結節 (micronodule) から、しだいに皮質内層の細胞をもまきこみつつ、皮質ぜんたいの厚さをこえる腺腫状結節 (adenomatous nodule) までのものがみとめられた。これら各種の結節形成について、ヒトの剖検例では30才代で28.6%であるのに対して、40才代34.0%、50才代43.3%、60才代47.8%、70才代44.4%という結果を示した。すなわち、ヒトにおける皮質結節化と老化との間には、かなり密接な相関性のあることがうかがわれた。

いついラットにおいても、一般に老化に伴って結節の増数する傾向が観察された。ただ腺腫状の大型結節は、出現頻度の低いこともあって必ずしも明らかでないが、高令ラットにやや目立つようである。脂肪や酵素組織化学的反応は、ラットの個体別のみでなく、たとえ同一個体であっても結節別に、各段階の動態を示した。

電顕的には比較的少数の観察例ではあるが、同じく結節によって小器官の性状に種々の差異がみられる。その形態学的特徴からは、

- (1) vesicular なクリスタをもつ細長形のミトコンドリアが密在する過形成細胞群より成るもの
- (2) "fenestrated cisterna"の像を伴う滑面小胞体の網工に充たされた肥大細胞群より成るもの
- (3) 多数の大型脂肪滴をふくみ、しばしば渦巻状のクリスタや、ミトコンドリア内沈着物を伴うミトコンドリアに特徴づけられた細胞群より成るもの

の3型に大別できるようである。もちろん、これら相互間の移行型ないし混合型とみなされる結節も存在する。そして脂肪染色の所見をも加えて考えると、前2者と異なつて(3)に属する結節は、長期間持続した機能亢進の結果、一種の疲憊期にあるものとも推測された。ただ、老化ラットの副腎皮質にこの型の増加があるか否かは、今後の検索にまつべき点を残している。

さらに寒冷と高温に交互にさらされたラットでは、比較的早期から結節の出現が促された形を示すものが多かった。しかし、結節じたいの性状は、とくに対照と異なる所はなかつた。したがつて、或る種のストレスの負荷は、副腎における適応現象の促進、持続化の果てに臓器老化へとつながる可能性を否定し難い面があるように思われた。

日医大老研 基礎部 杉山 誠

老化の研究は、「老化」の定義を以てはじめられようが、現在なお混迷している。また何を老化の指標とするかは、老化の機序を究明する上に重要な問題であるにもかかわらず、その決め手に欠けるのが現状である。ある生命現象について、それを、若年個体と、ある一定時期で区切った経年個体とを比較しても、各々の群で差異は出ても、何故その時点で区切ったか、その根拠を説明しなければならぬ、という問題が依然として残る。その生命現象をきたす変換点を把握しなければ、機序の究明につながらぬことが多いからである。しかしまた、仮にある現象が、生後何時頃より出現するか、ということが確認できたとしても、その時期は、他の生命現象にあてはまらないことがあり、これが、研究対象を総合的に把握することを困難にしている。いささか表現が抽象的になったが、結局老化の機序を究明するには、可及的多くの老化徴候の指標ともいへきものを設けて、単に、ある一定期間で区切って老若を比較するのではなく、入念に経時的にその出現時期を追求し、反面、類似現象を実験的に作成し、現象に再現性をもたせて類推するしか方法はないであろう。演者は、Wistar系ラットを用い、無数にあると想定される生命現象のうち、種々の刺激に対する個体の抵抗性の変化する時期を追求することにより、老化の機序究明に対象を選ぶための一つの方向づけをしようとして試みている。今回は、このような立場から、①外来抗原に対する抗体産生能、②内因性因子によると思われる腫瘍の自然発生を許容する時期、③慢性非特異的刺激による肉芽腫形成を許容する時期、の三要素より、ラットは、内外の刺激に対して、いつ頃より個体に変化を来すかを見た。

外来抗原に対する反応態度をみるには、異種皮膚移植による液性抗体産生能の検出によった。すなわち、ICR系マウスの全層皮膚を月令別にしたWistar系ラットの背部に移植した。そして、その抗ICR抗血清を erythrocyte macrohaeagglutination test で検索した。その結果、抗体価 2700 倍以上の値を示すものの割合は、月令 14 ヶ月までは 75~80% であるが、20 ヶ月では 50%、24 ヶ月では 33% に減少した。また、生後 5 ヶ月で第 1 次皮膚移植をしたものの抗体価は、21 ヶ月では高々 300 倍で大部分のものは 10~100 倍と減少している。しかしこの時点で第 2 次移植を行なうと、大部分のものは、第 1 次移植時よりも 3~9 倍の抗体価をみる。このことは、生後 21 ヶ月でもラットは self-recognition と異種抗原に対する反応態度が強いことを示している。しかし、一方同じ生後 5 ヶ月のラットで第 1 次移植を行ない抗体価を、check 後 1 ヶ月の休止期間をいって第 2 次移植を行なった。いわば第 2 次移植若年群では、2 次移植による抗体価は予想に反し、老令群よりも高値ではない。これら老若各群における第 2 次抗原刺激に対する反応態度の差異は、なお検討を要する興味深い問題を残している。

・腫瘍の自然発生頻度とその発生時期；外来抗原に対する抗体産生態度の他に、老

個体では内因性因子に對する態度についても関心がもたれている。臨床的にも、自己抗体、アミロイドーシス、免疫監視機構の被弊と腫瘍発生などの觀察より研究がすすめられている。Wistar系ラットでは、しばしば自然発生腫瘍を見ることはすでに報告している。外来抗原に對する抗体産生能の検査とあわせて、腫瘍の自然発生頻度、組織像及びその発生時期をみた。その結果、24ヶ月の觀察では雄はおよそ30%とあるが、雌は80%の腫瘍発生をみ、そのうち16〜24ヶ月に頻発する。また組織像は、雄は頻度は低いながらも比較的多彩な像を呈すが、雌の大半(81%)は乳腺のfibroadenoma也、それに退行変性を思わせる濃縮した乳汁様の体液の貯溜をみるcystadenomaが、それらの混合像である。

慢性非特異的刺戟によるラット足蹠に肉芽形成を許容する時期と、その形態学的変化の觀察には、次の方法をとった。すなわち、ラットを太さ800 μ 、meshの大きさ 1cm^2 のcageで飼育すると、目重によりその蹠部に常に刺戟が加わり、ついに褥創に類似した潰瘍を伴う肉芽腫の形成を惹起する。これらの病変を許容する時期と、その形態学的変化を、骨格標本、硬軟X線による単純撮影、動脈造影とその立体觀察、血管鑿型、Densitometry、病理組織検査などで觀察し、併せてその誘因の追求を行なった。その結果、基本的には線維性結合織の増生と、血管の新生を伴う非特異的炎症性肉芽を、病変が進むと、石灰沈着、骨の破壊及び反応性増殖、ついに骨髓炎の像をみる。これらの肉芽の増殖経過を血管造影の実体顕微鏡下、立体觀察、あるいはDensitometryで見ると、血管は潰瘍部を中心に後脛骨動脈本幹より肉芽を取り巻くように陵線つたいに発達し、中枢側へと上向性に進み、潰瘍底では、組織の壊死と骨の破壊へとつながる。これらの変化をしたら主要因としては、細菌感染症とは異なり、雌ではおよそ14ヶ月以上に及ぶ反復せる刺戟を要し、この突発時期的変化である。この他に体重や頭蓋内病変による平衡覚失調などは足に對する加重負担、さらに足関節の解剖学的特徴が大きく関与している。また今回の長期觀察ラットでspontanに両下肢末梢の神経麻痺に血行障害をきたしたものを例み見た。しかし臨床的にいう褥創の成因には、脊損などの神経麻痺、糖尿病などの代謝性疾患、また末梢血管閉塞などによる循環障害が関与しているといわれている。これらへを考慮して、現在実験的に、坐骨神経切断による末梢神経麻痺ラットの作成とその神経再建、アロキサン糖尿ラット、石松子による末梢動脈閉塞ラットの作成を試みている。そして二記と同様の刺戟を加えた場合の個体の反応態度の觀察と、単に経時期的変化によって招来した病変との比較を行なっているのをこれについても触れる。

以上、老化に関する基礎的研究にあたって、最も基本となるべき研究対象としての時点におくべきか、という命題から出発し、主として個体の刺戟に對する抵抗性の経時期的変化という觀察から、その変化の出現する時期と病態像について追求した。その結果、ラットでは、およそ16ヶ月から20ヶ月の間に変換英のあることを思わせこの時点を中心に、多角的に加齢兆候を追求することにより、実験対象の限定化と掘り下げた研究が可能となろう。

動物の行動は明暗、温湿度、食欲などと関連して日周リズムを形成しているが、なかでも光の変化は最も影響力が大きい。マウス・ラットなど夜行性の動物は昼間は主として休眠の状態にあるが、夜間には活発に活動し、1日の行動に一定の規則正しい周期性を示すことはよく知られており、それに関する報告は多い。しかし、彼らの生存過程において、生涯にわたり光の影響について追求した知見はみられない。われわれはマウスについて、光と加齢、老化、寿命との関係を、特に老化促進または延長の効果を究明することを企図した。今回は先づ、マウスの行動にみられる日周リズムの加齢変化と、さまざまな光刺激に対する行動の変化を検討した。

用いたマウスはddy-SLCの♂、成熟令のものから600日令のもの。飼育温度20~27℃、湿度50~70%。飼料は市販固型飼料を自由採食させた。マウスの運動量は実験動物運動量測定装置ANIMEXを用い、ポリカーボネート製ケージ(300×355×175)に1匹ずつ収容し測定した。測定時の照明は白色蛍光灯、20W・300Lux。行動のパターンは1日24時間の総カウント数を/00とし、2時間ずつ集計して各時刻のカウント数の百分率を求め図示した。

1) マウスの行動の日周リズムと加齢変化。自然気象下における24時間の/00日マウスの行動は、日没から薄暮にかけて運動を開始し、夜間から翌日昇後7~8時までの夜行型行動パターンを示す。しかし、300日令のものは/00日令とはほぼ同様のパターンを示したが、24時前後を休眠時とする谷間が現われ、前夜半と後夜半の2つの行動の山に別れた。600日令になると、この2つの山はささにくき、行動のリズムは乱れ、午後2時前後から翌日/0時の間に延長し、全日型に近いパターンを示すようになった。

2) 連続照明下の行動リズム。24時間照明すると/00日令の行動のパターンは右方向移動し、200日令では5~6日右方向移動後にリズムは乱れ、全日型行動パターンを示した。600日令になると照明曝露当日からリズムは著しく乱れ、全日型行動パターンを示した。200日令の長期連続照明下でのマウスの行動のリズムは著しく乱れ、ほぼ全日型のパターンを示すが、右方向移動の傾向がみられた。

3) 連続暗黒下の行動リズム。マウスを24時間光から遮断すると、/00日令では当初行動のリズムが乱れるが、6~7日目頃より自然気象下のリズムに近いパターンを示すようになった。300日令では自然気象下のリズムより僅か運動時間を延長し、600日令になると、連続照明600日令のものと同様、行動のパターンは著しく乱れ、全日型を示すが、8~/0日目頃から行動リズムは自然気象下の状態に戻った。250日令の長期連続暗黒下でのマウスの行動時間は、19時より翌日の12時、約16時間延長したが行動パターンに移動はみられない。

4) CC(自然気象)・LL(照明)・DD(暗黒)のくりかえしによる行動リズム。/00日令のマウスについてみると、CC→LL転換は行動のパターンの右方向移動を促進させ、CCに戻しても僅か移動を減速する程度、LLをくりかえすことにより行動パ

ターンの右方向移動は一度促進した。しかしDDに転換すると転換時の時刻より移動は停止した。しかし、CC→DDの転換は一時的には行動のリズムを乱すが、運動時間延長し、くりかえしによって全日型に近づく。DDからLLに転換すると行動は右方向移動を始める。

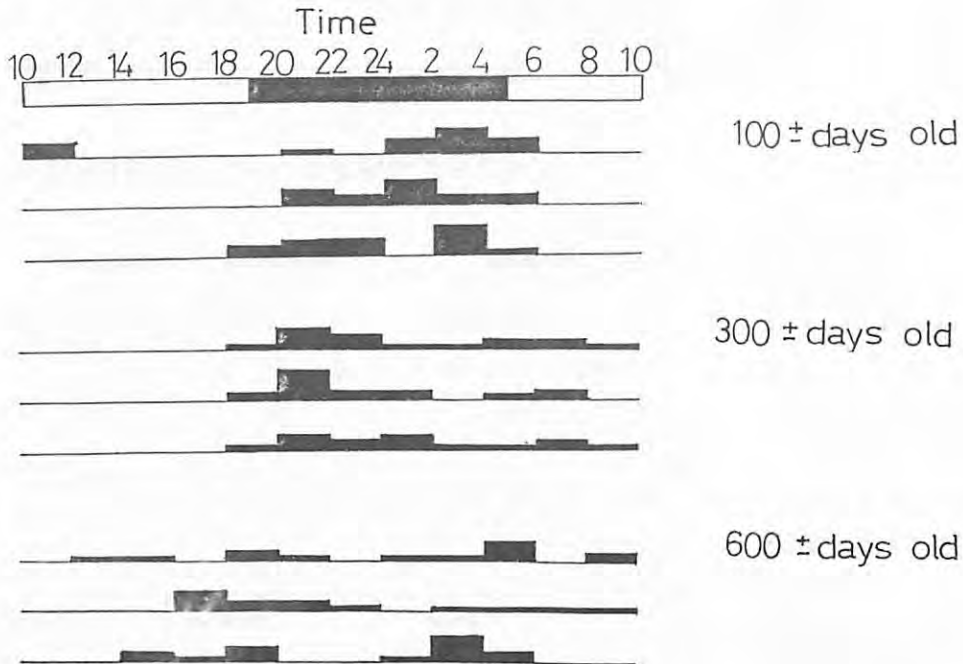
5) 明暗サイクルの短縮と行動のパターン

地球の自転によって現われる夜と昼・明(LL)と暗(DD)のサイクルを人工的に照明時間を変えて短縮し、光と行動の関係についてマウスの運動・摂食・飲水行動をしらべた。LL:DDの時間を12:12, 8:8, 6:6, 4:4とした。8:8は12:12と同様光と運動・摂食・飲水などの行動とはよく一致するが、6:6と4:4は動物に個体差があり、光に対して同調するものとならないものがみられた。

8:8は1サイクル/6時間, 1年に547.5回のサイクルを回転する計算になる。

以上の成績から,

- 1) 600日令マウスの行動の自然日周リズムの乱れは、早朝の覚醒、早晩の睡眠昼間のうたたね、浅眠など老人の行動に似たパターンを示しているように思われる。
 - 2) 連続長期間の光および暗黒は高令のマウスにとってストレスとして作用し、行動のパターンを乱す。光の刺激は行動のパターンを右方向移動つまり、サイクルの延長を促進している。
 - 3) 加齢の進んでいないものは、暗黒は250日令の長期であっても、地球の時刻を記憶し、行動のパターンを乱さない。
 - 4) 明暗のサイクルの短縮は、運動・摂食・飲水行動ばかりでなく、代謝リズムが伴わなければならないであろう。
- これらの問題については、今後検討を進めたい。



町田武生・能村哲郎(東京都老人総合研究所 生物学部)

加齢・老化を集団のレベルで考えると、ある生物集団が一時的に大発生しながら急速に衰退する過程や、種がどこり地質学的な年代を経て繁栄しやがて絶滅に至る過程などが、個体の一生に比較して思いうかぶ。これらの例としては、ハタネズミやトビバツ、恐竜やマンモスなどがあげられるが、近年爆発的な人口増加により大発生の様相を呈しているヒトも例外とはいえない。人口統計学的には、集団の加齢とは集団中に占める高齢者の比率が上昇することをいうが、わが国は集団や種の衰退、絶滅も集団の加齢・老化と考え、実験室内におかれたマウス集団について、集団の衰退をひきおこす主に内的な要因を調べている。ここでは、限られた空間内におかれたマウス自然増殖集団の加齢と、このような加齢集団中の個体の行動について報告する。

はじめに、ICR系マウス2対を34cm x 46cm x 18cmの大型飼育ケージに入れ、光、温度条件など一定の環境下で、飼料、飲料水を十分に与えて自由に繁殖させ、人口統計学的な視点から集団の加齢を調べた。こうして得られた7例の集団は、いずれも実験開始後

100日までは急速な個体数増加を示したが、以後増加はやや緩慢となり、ロジスチック曲線を描いて300日迄にはほぼプラトーに達し、集団あたり全個体数74-93となった。その後これらの集団は徐々に個体数を減じ、600日では24-47に減少、以後個体数の減少のみが進行し、800-1000日にかけて次々に集団の死滅がおこった(図1)。各時点での年齢構成、分娩率、繁殖

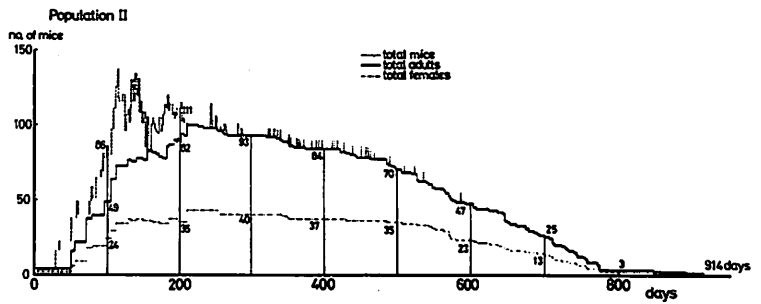


図1. マウス自然増殖集団における個体数の変化

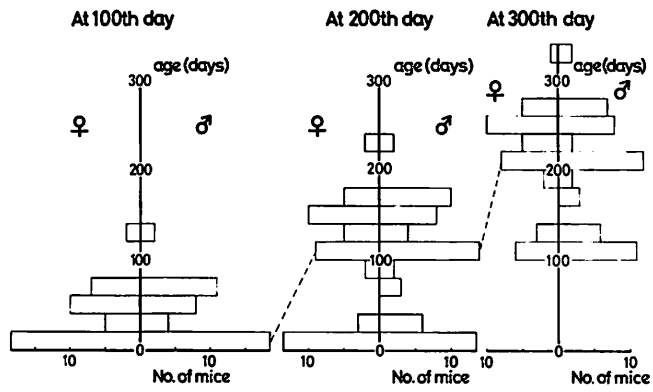


図2. マウス自然増殖集団における年齢構成の変化

率などから、これらの集団が集団として加齢していることが知られる(図2)。このように、一定容積中のマウス自然増殖集団は、個体数がピークを経て減少しはじめると再び増加することなく死滅に至り、集団としての加齢・老化の典型を示す。

ここで、集団がピークに達する200日前後に出生した個体は、それ以前にくまなく動物より幼若期の成長が劣り体重が小さい。しかし、これらも100日齢までには体重を回復する。ところが、寿命を比較すると、雌雄とも前者は後者より短命の傾向がみられる(図3)。

一方、個体数増大期(100日前後)、ピーク期(200-300日)、減少期(400-500日)のそれぞれにおいて70日齢の雄マウスについて、オープン・フィールド・テストにより行動を比較した。その結果、探索行動(歩行および立ちあがり)、情動のいずれも、集団の加齢・老化が進むと共に低下することが知られた(図4)。通常の飼育条件下では、ICR系雄マウスのオープン・フィールド行動は加齢と共に低下する傾向がみられるが、このような加齢集団中の個体は、行動の上では個体自身の暦年齢より更に老化した様相を呈するようである。

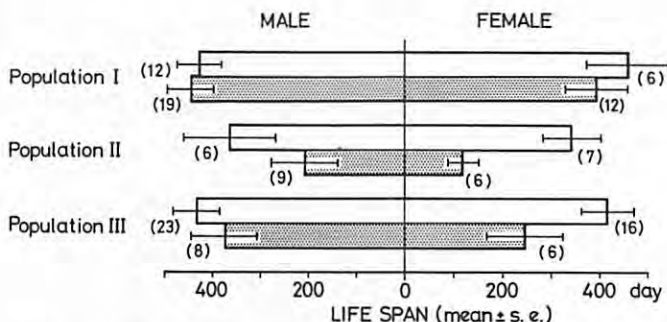


図3. 個体数増大期(白抜き)とピーク期(黒塗り)に出生したマウスの寿命。

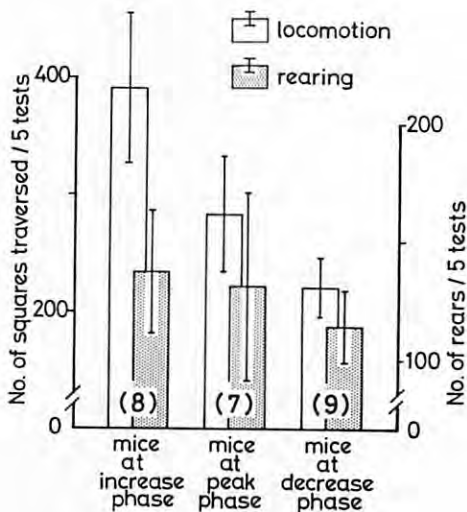


図4. 集団の加齢に伴う構成個体の行動の変化。70日齢雄マウスのオープン・フィールドにおける探索行動を示す。

○矢後長純^(*), 池田忠男^(**), 市川隆男^(**), 福田権男^(**)

^(*)聖マリアンナ医大, ^(**)青山学院大, ^(**)放射線医学総合研究所

健康, 老化および死は, 個体と環境との複雑な相互作用にもとづくものであって, システムとしての生物の動的特性である。とくに人類にあっては, 個人の環境としては, 社会の動的特性としての生活水準, 医療水準および衛生状態等が重要なものとなっている。そして, これらは, さらに生産と消費, 政治体制, 公共投資, 科学技術, 教育その他, 広い意味での文化と相互作用をしている。したがって, おそらく人類の出現とともに社会化された健康, 老化および死は, 地域的に, 時代的に, 歴史的に限定されつつ推移しているものと考えられる。

このような複雑な要因が集中している動的特性であっても, 老化や死は現象的には確率論的な特性を示し, 故障物理学的なアプローチも可能である。しかし, 大数の期待値としては, 決定論的な変化を示すから, 微分方程式による記述が可能である。われわれは, さらに集中化と等価変換⁽¹⁾も基本的な方法論とし, 生体高分子やオルガネラの老化の基礎理論⁽²⁾を拡張して, 細胞増殖に因する非定常スコンパートメントモデルを記述する微分方程式を導出した。ついで, このモデルとその環境との相互作用を表わす死力方程式を求めた。そして, これらの方程式の解として, 人類生命表の諸関数をシミュレートした。ここに得られた各種のシステムパラメータの値は, 人類の生物学的な特性を表わすものと, 社会学的な環境要因を表わすものとに分け得ることとなった。^(3,4)

われわれは, 先づ, 1891年から1970年までの日本の生命表, 1973年のアメリカ合衆国の生命表および1985年ごろに到達すると予想される20世紀先進国の国際最良生命表をシミュレートし, 各種のパラメータ値を取り出した。しかも, これらの生命表は, 産業革命や科学技術革命という大きな生活の急変を経験し, 近年に至り, いわゆる20世紀先進国を形成した一部の人類集団についてのものである。そして, 日本やアメリカ合衆国はもとより, 国際最良生命表についても, その作成のための資料には一部に東欧社会主義諸国のものを含むが, 主として, 高度資本主義先進国のものである。したがって, これらの生命表のシミュレーションから得られるパラメータ値の意義は, 産業革命に入る前の人類の動態と比較すれば, 一層, 明らかになると思われる。

一方, 菱沼徒尹博士(日本アクチュアリー会会長)は, 1976年10月, 第20回国際保険数理会議(東京)の会長特別講演において, *Historical Review on the Longevity of the Human Beings* と題し, 石炭時代以降の人類生命表に関する詳細な研究を発表, 内外保険数理学者の賞讃を博した。⁽⁵⁾ この講演で発表された数々の重要な生命表のうち, われわれは, とくに同博士が, ズースミルヒの「神の秩序」⁽⁶⁾のデータにより作成された18世紀前半のプレスラウおよびウィーンの5才階級別生命表に注目した。当時, これら両都市は, 同時期のロンドンとは異なり, まだ絶対主義体制下にあり, 資本主義生産様式へ移行していなかったからである。

そこで、われわれは、養沼博士にお願いし、シミュレーションの精度を確保するために、両都市の生命表を各別別生命表に拡張して頂いた。この計算のために、同博士、前田行雄統計調査官、伏見恵文技官（厚生省大臣官房統計情報部）らは、それ自体が重要な業績となった新しいアルゴリズムを用意された。ここに初めて、われわれは、生命表のシミュレーションから得られる各種パラメータ値を、より深い意味において把握出来ることになった。ここに上記三氏に厚く御礼申し上げる次第である。本研究の計算結果の一部と結論を以下に記す。

| 都市名又は 国名 | 早期死亡 | | 主集団 (サイズは, $(1-\rho)$) | | | | | 全集団 | |
|--------------------------|----------------|---------------|-------------------------|----------------|--------------------------|-----------------|-----------------------------|-----------------------------|------------|
| | サイズ β | 死亡率 ℓ | 成長飽和 定数 a | 生活速度 定数 b | 老化定数 $fb \times 10^2$ | 環境要因 | | 平均寿命 $\langle t \rangle$ | 寿命の モード |
| | | | | | | $K \times 10^2$ | $\gamma/\alpha \times 10^2$ | | |
| ブレスラウ(男女) (1722~1724) | 0.5923 | 0.6751 | 3.799 | 0.300 | 4.720 | 30.16 | 13.78 | 22.3 | 58.3 |
| ウィーン(男女) (1728~1739) | 0.5790 | 0.7670 | 3.404 | 0.446 | 3.586 | 61.18 | 19.02 | 21.5 | 49.3 |
| 日本 (男) | 0.2537 | 0.3596 | 3.981 | 0.3288 | 6.558 | 7.629 | 4.165 | 41.7 | 67.9 |
| (1891~1898) (女) | 0.2314 | 0.2923 | 4.095 | 0.3377 | 6.572 | 6.853 | 4.183 | 44.2 | 69.4 |
| 日本 (男) | 0.0204 | 0.5089 | 3.102 | 0.3517 | 8.694 | 0.986 | 0.229 | 72.0 | 78.0 |
| (1970) (女) | 0.0159 | 0.5476 | 3.417 | 0.3295 | 9.172 | 0.459 | 0.145 | 77.4 | 82.9 |
| アメリカ合衆国(男) | 0.0229 | 1.163 | 3.161 | 0.8634 | 7.433 | 2.402 | 0.591 | 67.2 | 77.2 |
| 白人 (女) | 0.0174 | 1.249 | 4.646 | 0.7023 | 7.961 | 0.923 | 0.970 | 73.3 | 84.9 |
| 国際最良 (男) | 0.0154 | 1.149 | 2.170 | 0.4262 | 9.130 | 0.753 | 0.074 | 72.4 | 77.8 |
| 生命表 (女) | 0.0119 | 1.251 | 2.328 | 0.3344 | 9.476 | 0.386 | 0.043 | 77.4 | 82.4 |

注) λ は、環境から侵襲が加わる速度； α は、生命力の初期値； $K = \frac{\lambda}{\alpha} \cdot \frac{1}{1+e^{\alpha}}$ ；
国際最良生命表は、厚生省人口問題研究所 研究資料第208号、1975 による。

計算結果は、次のような特徴を果している。①当時のウィーンとブレスラウでは、生活、衛生状態が大きい K 値に示されるように、著しく悪く、その影響は、大きい早期死亡と極めて短い平均寿命となって表われている、②成長飽和定数と生活速度定数が、過去300年間、ほぼ一定であることから、この期間に人類の生物としての特性は、大きい変動を受けていないようである、③当時の両都市で、早期死亡を免れた人たちの老化定数 fb が、20世紀先進国の国民のものより大きくはないことは注目されるが、悪い生活、衛生状態の影響を受けて、寿命のモードが著しく若年がわら偏っている。

文献：1) 杉田文宜：「生物科学」29(1), 1(1977) 2) N. FUKUDA & N. YAGO: J. Theor. Biol., 58, 131(1976) 3) 福田信男, 矢後長純：「医学のあゆみ」97(9), 492(1976) 4) 福田信男, 矢後長純：「綜合臨牀」26(1), 137(1977) 5) Shigeo Kojima HISHINUMA: The 20th International Congress of Actuaries, Tokyo, 1976 6) J. P. Süßmilch 著 高野若二郎・森戸辰男訳：「神の秩序」(1741年初版, ベルリン) 栗田出版会, 東京。