

特別講演

加齢と内分泌機能

井村裕夫（京大・医・第2内科）

一般講演

1 生命表のシミュレーションから見た生物の適応と進化における老化の意義

○矢後長純^{*1)}, 池田忠男^{*2)}, 市川隆男^{*2)}, 福田信男^{*3)}
 *1) 聖マリアンナ医大, *2) 青山学院大, *3) 放射線医学総合研究所

我々は、すでに2コンパートメント非定常平衡理論(1976)¹⁾を細胞動態論的モデルに拡張し、人類生命表をシミュレート、成長、成熟、老化および死に關する各種のパラメータを求めた²⁾³⁾。とくに産業革命直前の18世紀前半ヨーロッパ都市住民の生命表のシミュレーション⁴⁾(図1)により、生物の成長飽和現象を表わす成長飽和定数 a および細胞分裂や代謝の速度を集中化した生活速度定数 b は、人類の場合、過去約200年間に亘り余り大きな変動はなかつたことが判った。すなわち、これらのパラメータは種としての人類を数理的に規定しているものであろう。これに対し、生活環境から有害な因子が個体に襲いかかる速度 k および環境の悪化の指標 λ/k は、同じ期間に著るしく減少した。この現象は、生活環境に対する人類の機能的な適応を示している。(表1に数値の一部を再録)。

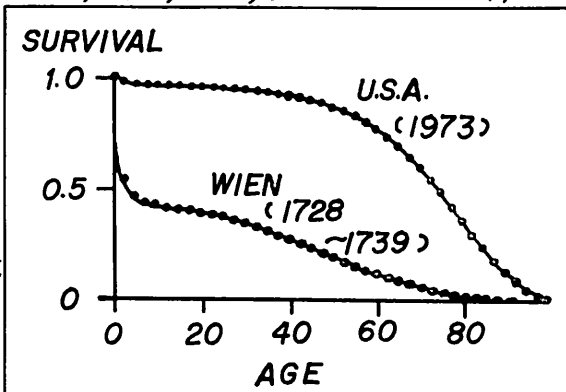


図1. 18世紀前半ウィーンと20世紀アメリカの比較

表1. 図1の生存曲線の各種パラメータの比較

	a	$b(\text{year}^{-1})$	fb	k	λ/k
WIEN(1728, 1739)	3.40	0.45	0.04	61.2×10^{-4}	0.19
U.S.A.(1973)	3.49	0.77	0.07	20×10^{-4}	0.0068

しかるに、老化速度定数 fb については、これが現代に向い、徐々に大きくなる傾向は認められたが、種と適応との関係における fb の意義は、いまだしく詳細な検討を要する問題であった。

我々は、厚生省発表の特定死因別死亡率表(厚生統計協会)に注目し、特定死因に係る環境への適応に際し、日本人の fb がいかなる変動を示しているかを調べ、 fb の特徴を検討するにこした。1940年以後の資料によれば、脳血管疾患、心疾患、肺炎気管支炎、全結核およびがんの特定死因の背景をなす環境定数は、がん以外については著明な低下を示した(図2)。 fb は、がん以外では、それぞれ一定の値に収斂するようである。19世紀以来の日

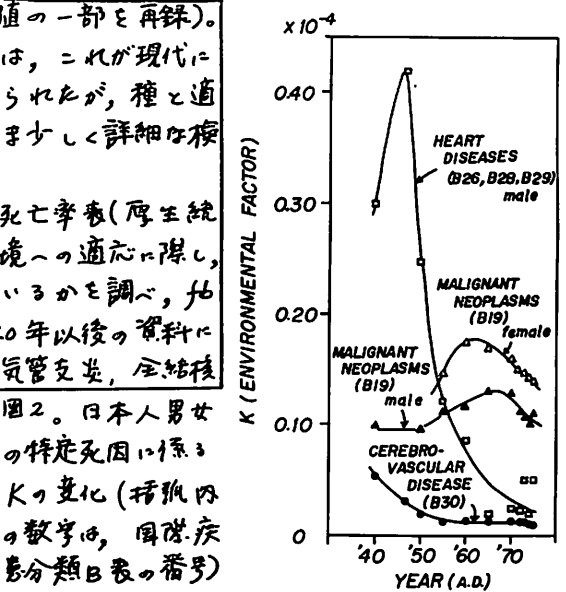


図2. 日本人男女の特定死因に係る環境定数は、がん以外については著明な低下を示した(図2)。 fb は、がん以外では、それぞれ一定の値に収斂するようである。19世紀以来の日

本人の生命表のシミュレーションによって得られた fb の推移は、種としてはずでに適応している人類が、さらに個体の適応を進めた結果、種がもつ一定の値へ収束する過程を示すものと考えられる(表1)。

Deevey の調査⁵⁾ にもとづく計算からは、鳥類は環境の大まな脅威に曝されており、その生存曲線は単一指数関数型であって、人類ではほぼ克服した早期死亡の型をとっている。野生ハタネズミ⁶⁾ は、同様に大まな早期死亡集団をもつけれども、ある程度の個体の適応が認められ、上述の各種パラメータの算出が可能である(図4)。ウイスター研究所で飼育したドブネズミ⁷⁾ では、早期死亡集団が小さくなっていること、先進国の人類に似た生存曲線をもつことが注目される。増井氏の調査⁸⁾ によれば、高崎山のニホンサルでは、まだ死亡法則が確立していないようであるが、 K と fb が大まかようである。

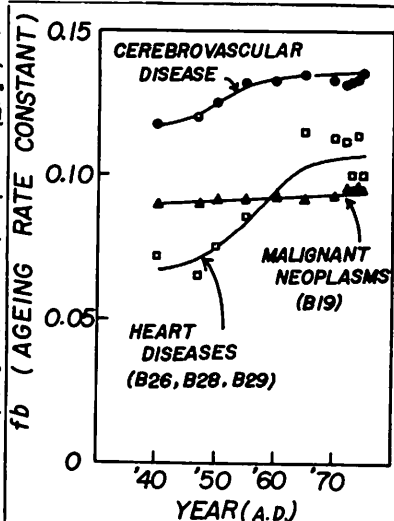


図3. 特定死因に係る老化速度定数 fb の推移

年齢(年)	fb 値
1891~1898	6.558
1899~1903	6.966
1909~1913	7.091
1921~1925	7.136
1926~1930	7.169
1935~1936	7.320
1947	7.177
1950~1952	7.774
1955	7.981
1960	8.521
1965	8.715
1970	8.694
1975	9.174
1976	9.184

(結論) 種の進化は、システムパラメータとしての個体の成長飽和定数 a 、生活速度定数 b および老化速度定数 fb を規定すると考えられる。個体の適応が進むに従い、これらのパラメータのうち、まず a と b が、ついで fb が解放される。老化は種の適応の終極した段階としての個体の適応しこもに表われる。

また、種の進化は、連続変数として各パラメータの組合せと環境要因との相互作用によっておこるものである。

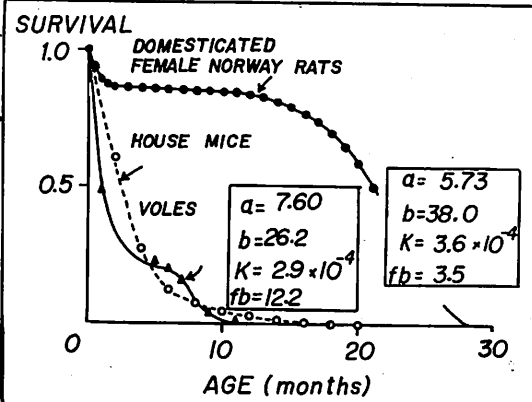


図4. 野生ハタネズミ、飼育ドブネズミの生命表のシミュレーション

(文献) 1) 福田・矢後 J. Theor. Biol., 58, 131 (1976); 2) 福田・矢後「医学のあゆみ」97, 492 (1976); 3) 福田・矢後「綜合臨牀」26, 137 (1977)
 4) 矢後・池田・市川・福田「日本基礎生化学研究会第1回講演」(1977)
 5) E. S. Deevey, Jr., Quart. Rev. Biol., 22, 283 (1947); 6) P. H. Leslie, D. Chitty and H. Chitty, Biometrika 40, 137 (1953); 7) P. H. Leslie, Biometrika 33, 183 (1945); 8) 増井豊一, 杉山幸丸, 西野顯彦, 大沢香行(1974) 牙スの生活史—ニホンサルと地域個体群の研究工(和田・東・杉山編) p.47

古川俊之、高杉成一、田中博、谷島一嘉
 東京大学医学部医用電子研究施設

1. はじめに

老化の臓器レベル・個体レベルの指標として健康者の生理機能検査値より暦年令を精度よく推定する重回帰式をもち、それが「生物学的年令」として利用しうる事を発表したが、[古川ら、1975]、本研究では、この資料を用いて加齢にともなう臓器レベルの機能変化の構造をいれりる外的基準を用いず、多変量解析の手法を用いて分析した。対象は前研究と同様、21才～83才までの健康男性計111名で検査項目は、身長、体重、拡張期血圧、収縮期血圧、PSP(15分値)、肝活量、左右視力(焦点調節機能)、左右振動覚の10項目である。年代別被検者数は、20代24名、30代38名、40代11名、50代12名、60代12名、70代9名、80代5名であった。分析方法は、主成分分析、varimax回転、正準分析である。

2. 結果

(1) 主成分分析、varimax回転

まず、年代群に層別化しない対象群について、生理機能検査値の主成分分析をおこなった。第1主成分は、加齢に対して直線的に変化している事が分った。(第1図)。さらに年代群別に層別化した対象群に本手法を適用した結果、第1主成分の固有値は、著明に変化した。このことから、第1主成分が、加齢による変化に対応している事が分った。(表1)。さらに第1主成分と第3主成分の成分得点をプロットすると、40代を境にして加齢に伴う変化の方向が変わる事が明らかになった。層別化しない対象群の主成分分析因子負荷量に、varimax回転を行った際の結果を表2に示す。第1因子は、体重、身長、肝活量に高い負荷量を示し、有効細胞数を表わすと考えられ、第2因子は、感覚、神経系機能を表わすと解釈できる。第1因子と第2因子の因子得点を各年代群ごとに計算すると20代から40代に

主成分分析における固有値に年齢による層別を加えた効果

(表1)

	全 群	年齢により層別
第1主成分	5.94	1.12
第2主成分	1.10	0.90
第3主成分	0.98	0.56
第4主成分	0.59	0.46

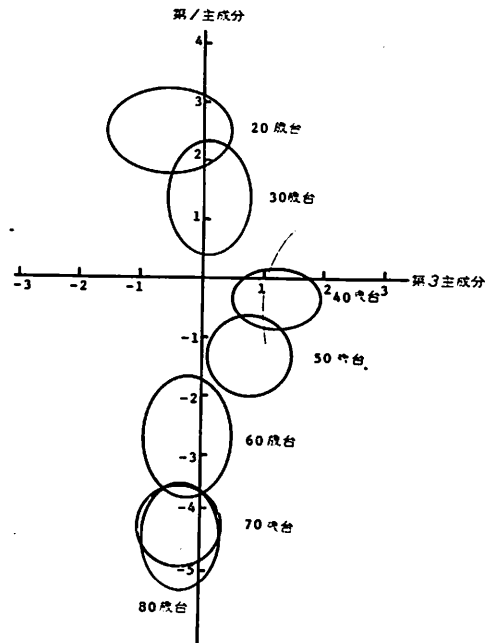


図1 主成分分析の得点分布

向かて、第2因子（感覚神経機能）の軸に沿った移行を示し、40代から80代では第1因子軸（総肥数）に沿った変化が主となり、

主成分分析で明らかになった。40代を境にした加齢方向の変化は、この両因子の加々による変化パターンに相長に基づくと解釈される。（図2）

(2) 正準分析

正準分析（重判別分析）では、各年代群（7群）に層別化し、これ5の群の判別を、最大にするように正準軸を定めた。この際、第1、第2正準変量の寄与率は74.7%であった。以上、いずれの分析においても40代を境にし、変化の様子が異なることが見出された。（図3）

3. 疾病による加齢の構造変化

疾病の存在は、加齢の促進をもたらすと考えられる。高血圧症患者群について上述の手法で解析を試みた所、加齢にlinearに対応する主成分が得られ、高血圧症患者群について生物学的年齢の重回帰式を用いる妥当性が明らかとなった。又、Varimax回転を行った第2因子には、高血圧症患者的病像を示める因子が得られた。（表3）

4. まとめ

生理機能検査値より多変量解析の手法を用いて、以下の事柄を明らかにした。

- i) 加齢に伴って直線的に低下していく第1主成分の存在が明らかになった。
- ii) 加齢に伴うデータ構造の変化にはi)で得られた傾向だけでなく40代を境にして変化方向が変わる傾向も内蔵している。

iii) 高血圧症患者群ではi)及びii)の病像を表わす因子が得られた。

表2

Varimax 回転における因子負荷量

	第1因子	第2因子	第3因子	第4因子	共通性
身長	0.967	0.128	0.083	-0.040	0.986
体重	0.756	0.282	0.099	-0.138	0.919
振動覚R	-0.256	-0.929	-0.106	0.106	0.974
振動覚L	-0.280	-0.922	-0.083	0.062	0.978
焦点深度R	0.363	0.768	0.168	-0.133	0.984
焦点深度L	0.361	0.765	0.189	-0.166	0.983
PSP (15分)	0.230	0.360	0.902	0.000	0.998
収縮期血圧	-0.165	-0.245	-0.334	0.881	0.983
肺活量	0.507	0.516	0.123	-0.234	0.945
拡張期血圧	-0.196	-0.359	-0.433	0.531	0.963
二乗和	2.287	3.569	1.227	1.195	
寄与率	0.229	0.357	0.123	0.119	

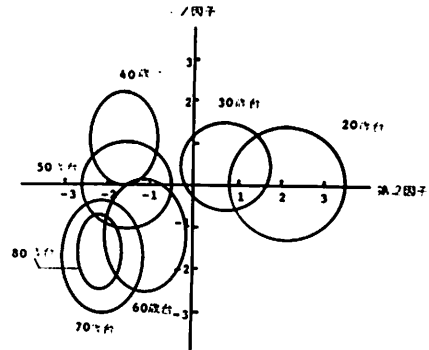


図2 因子得点分布 (Varimax回転後)

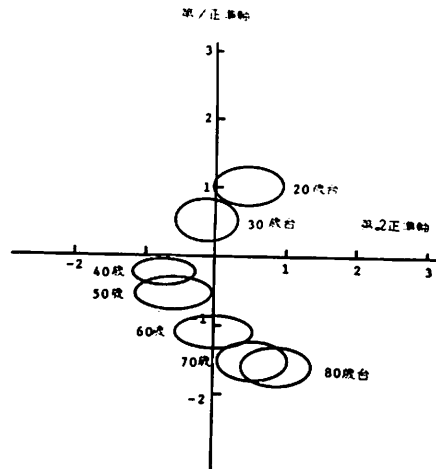


図3 正準分析

表3 高血圧患者の主成分分析

	全群	年齢により層別	年齢・収縮期血圧により層別
第1主成分	.49340	.25878	.48930
2.	.17843	.21833	.16821
3	.11874	.18377	.13157
4	.06179	.12308	.07280
5	.04654	.06510	.05550

°野間口 隆 蟹沢 成好 太田 邦夫

東京都老人総合研究所

老化の基礎的な機構を明らかにするための実験系としてより短い寿命をもつ動物種を用いることは種々の有利さがある。けれども、実験系としてその動物種の生存過程における種々の客観的指標が十分の成長過程や加齢および老化過程を示す必要がある。この点でマウスは実験動物として長い歴史をもち、遺伝的立場から純化され、数多くの系統がつくられているが、本来、癌研究や疾患モデルとして開発されて来たものが多いと考えられ、老化研究に適した系統は既存の中から探すか、あるいは新たに開発する必要があるかも知れない。

そこで、老化の研究に供する標準的な実験系として、どのようなマウスの系統が適当であるのか知るために老化研究の専門誌を検索することによりその手掛りを得ようと考えた。

「方法」

老化研究の主要雑誌である Experimental Gerontology (Vol. 1~12, 1966~1977), Journal of Gerontology (Vol. 9~32, 1954~1977) および Mechanisms of Ageing and Development (Vol. 1~6, 1972~1977) に掲載されたマウスを用いた論文を検索し、老化の研究に供された系統や研究対象などについて調べた。

検索した論文数は171件であったが、1960年以前については論文数が少く、実験に供された系統が不明のものも5件あった。

「結果」

1) 実験に用いられた系統

論文に記載されたマウスの系統は23系、43亜系、16交雑系を数え、その主要系統は表1に示す如くである。また、実験に供された系統別件数はC57系が73件で最も多く(31.3%)、Swiss系(8.6%)、C3H × C57BLの交雑第1代系であるBC3F1(6.0%)も多用され、以下にBALB/c、CBA、DBA系が続いている。

さらに、これらの詳細について表2でみると、C57系ではC57BL/6、C57BL/6Jがそれぞれ23および32件と圧倒的に多く、次いでSwiss(14件)、BC3F1(14件)が多用され、この4系で全体の35.6%を占めている。

2) 研究対象

検索した論文でマウスがどのような研究目的に供されたかについて調べた。論文によっては複数の研究目的と使用系統を記載したものもあり、論文数171件に対して使用件数は233件であった。

研究項目別にみた使用件数は免疫学的研究38件(16.3% — 論文数31)、酵素活性に関するもの20件(8.6% — 同19)、病理・組織学17

件(7.3% — 同13)、DNA、RNA、たんぱく生合成14件で、成分分析(12件)、内分泌器官(12件)、栄養および外的環境(12件)、代謝(11件)なども研究対象として比較的多い。また、寿命に関するものは35件(16.3%)もあるのに対して論文数はわずか5件であった。

次に、系統別使用件数を上記の主要な研究項目別にみると、表3に示すように、免疫学的研究対象にはC57系(特にC57BL/6、C57BL/6J)、BC3F1およびBALB/c系がよく用いられ、C57系は酵素活性、病理・組織学、生合成能の研究にも最も多く使用されている。

表1. 記載されたマウスの系統と使用件数

系統	亜系数	使用件数
C57	8	73 (31.3%)
Swiss	2	20 (8.6%)
BC3F1	-	14 (6.0%)
BALB/c	2	9 (3.7%)
CBA	1	9 (3.7%)
DBA	4	8 (3.4%)
Nude	-	7 (3.0%)
A	2	6 (2.6%)
C3H	2	6 (2.6%)
CD-1	-	5 (2.1%)
SM	1	4 (1.7%)
129	2	3 (1.3%)
AKR	1	3 (1.3%)
ddY	2	3 (1.3%)
ICR	1	3 (1.3%)
LAF	2	3 (1.3%)
RF	-	3 (1.3%)
その他	-	54 (23.2%)
合計		233

表 2. 多用された系統と使用件数

系統	亜系	使用件数
C57	C57BL	2
	C57BL/6	5
	C57BL/6	23
	C57BL/6aa	2
	C57BL/6J	32
	C57BL/6J.M	1
	C57BL/10	3
	C57BL/cdJ	1
Swiss	NHO (C57)	4
	Swiss/BNL	14
	Swiss-Webster	3
BC3F1		3
		14
BALB/c		5
	BALB/cJ	3
	BALB/cCrgl	2
CBA		8
	CBA/J	1
DBA		1
	DBA/1	1
	DBA/1J	1
	DBA/2	1
	DBA/2J	3

表 3. 主な研究目的と使用系統

系統	亜系	免疫・血液	酵素活性	病理・組織	生合成能
C57	C57BL	1		2	
	C57BL/6	5	6	1	1
	C57BL/6J	3	6	3	5
	C57BL/6J.M				1
Swiss			1	1	2
	Swiss-Webster		1		
BC3F1		9	3		
BALB/c		3	1		
	BALB/cJ			1	
	BALB/cCrgl	2			
CBA		1		1	1
DBA				1	
	DBA/1	1			
CD-1		1			1
ddY					
	ddY/F	1			
	ddY/SLC			1	
その他		11	2	6	3
合計		38	20	17	14

未だ探索の域にあり、確定していないためと考えざるを得ないが、また一方、研究者が必要とする系統が必ずしも容易に入手出来ないことにも原因がありそうである。記載された 82 系統についてみれば、C57BL/6, C57BL/6J, Swiss, BC3F1 の 4 種類が多用され、全体の 35.6% を占めているのが眼をひく。加齢に伴いマウスでは自然発生腫瘍の多発に悩まされるが、上記系統は比較的低率であることが関係するのかも知れない。その意味で BALB/c も低い腫瘍発生率と老化時に類殿粉症や心臓変、動脈硬化の発生をみるとの報告があり、興味をひく系統といえる。

3) 記載された系統の寿命

論文中で用いられた 82 系統 (23系, 43亜系, 16交雑系) のうち平均寿命や最大寿命が記載されているものは 32 系統であった。各系統の平均寿命を比較すると、AKR/J, C58/J, P/J, BDP/J などが雌雄共に短寿命系に分類され、LP/J, C57BL/6, C57BL/10, 129 などが比較的長寿命系である。けれども、長寿命系のもは交雑第 1 代系に顕著で、その平均寿命が 30 月齢を越えるものもあった。また、同じ系統であっても、例えば C57BL/6J のように、平均寿命が 22.5 月齢から 29.3 月齢といろいろ異っていることに注目される。これは、実験に用いたコロニーの違いや同じ実験室のデータでも飼育条件などが異っていることに起因し、一般に報告年代が後になるにつれて平均寿命は増す傾向がみられる。

「考察」

検索した論文に現われたマウスの系統は 82 系にのぼる多様さで、老化の研究が広範な領域に展開されていることを如実に示すものと判断される。老化という個体にとって不可避な現象の本態を明らかにする上で、個体に現われる機能形態の経時的変遷を探る研究が先ず広く展開されている一方、選択された系統のもつ特異的性質を利用して加齢～老化に伴う

病的な局面を探究する試みもなされている。この調査に用いた雑誌の性格上、老化の基礎的機構の解明に主題を置いた論文が大部分を占めたが、掲載論文の多くが取り扱った研究項目に限っても、用いられた主要系統は 8 系, 10 亜系, 16 種類にも違っている点は注目される (表 3.)。このことは、老化の研究に供すべきマウスの系統が既存のものの中にあるのか、新たに開発を試みるべきなのか、

吉田 美知子・高木 由臣 (奈良女子大・理・生物)

ゾウリムシの一種 *Paramecium aurelia* では、有性生殖後のクローンが最高 300 ~ 350 回分裂の有限の分裂能をもつことが知られている。しかし近縁の *Tetrahymena pyriformis* では、基本的にクローンの分裂能は無限とみなされる。また *P. caudatum* では、接合なしに 27 年間培養を続け、この間に 8704 回の分裂を数えたが、なお分裂能は衰えなかったという古い記録が、今日まで挑戦されないうまま残されている。われわれは昨年、*P. caudatum* の接合後のクローンが、有限の寿命を有することを示唆する結果を報告した。今回は、この結果の再現性についての検討を行なった。

〈材料と方法〉前回の報告で、527 回分裂という最高寿命を示したクローン M18a (V) は、様々な分裂令で、17°C の stock cultures として保存してきた。171 回分裂時に stock culture に移して 15 ヶ月経過した culture から、任意に 5 細胞をとり、分裂させて 5 clones とした。各 clone からさらに 6 細胞をとり、daily reisolation cultures を再開した。このときの推定分裂回数 240 回である。各 clone につき 3 lines ずつを筆者ら両名が別々に培養した。すなわち 6 lines からなる 5 clones は、3 lines からなる 10 subclones として維持した。各 line は分裂能が失われるまで培養を続け、以後は 3 lines 間での置き換えを行なって subclones の継続を計った。

〈結果と考察〉表 1 に daily reisolation cultures を開始してから死滅までの 30 lines と 10 subclones のそれぞれの分裂回数を示した。() 内の数字は接合後の分裂回数の推定値である。subclone の分裂回数は、置き換えを行なった 3 lines 間での最長再 line のそれと代表させた。30 lines の平均寿命は 420 回分裂、10 subclones の平均寿命は 478 回分裂であった。subclones の最大寿命は 540 回分裂で、もとのクローン M18a の最大寿命 527 回分裂とほぼ一致した。このことは、*P. caudatum* の接合後のクローンが有限の寿命をもち、その最大値はほぼ一定であること、低温下での長期間のゆっくりとした分裂のあしでも、分裂回数で表わした最大寿命には大きな変化を生じないことを示唆する。なお筆者らがそれぞれ独立に維持した 15 lines (5 subclones) ずつの寿命の比較(表 1 の Y グループと M グループ)で有意な差が生じなかつたことから、ここでみられた寿命の有限性は、培養技術による artefact とは考えにくい。

Table 1

	The number of fissions in		
	lines	subclones	
1Ya	173 (413)	} 273 (513)	
1Yb	230 (470)		
1Yc	231 (471)		
1Ma	123 (363)	} 236 (476)	
1Mb	181 (421)		
1Mc	235 (475)		
2Ya	131 (371)	} 290 (530)	
2Yb	204 (444)		
2Yc	281 (521)		
2Ma	211 (451)	} 258 (498)	
2Mb	221 (461)		
2Mc	249 (489)		
3Ya	30 (270)	} 195 (435)	
3Yb	88 (328)		
3Yc	172 (412)		
3Ma	149 (389)	} 300 (540)	
3Mb	188 (428)		
3Mc	300 (540)		
4Ya	173 (413)	} 294 (534)	
4Yb	185 (425)		
4Yc	269 (509)		
4Ma	136 (376)	} 181 (421)	
4Mb	146 (386)		
4Mc	178 (418)		
5Ya	173 (413)	} 193 (433)	
5Yb	183 (423)		
5Yc	193 (433)		
5Ma	104 (344)	} 161 (401)	
5Mb	111 (351)		
5Mc	143 (383)		
Mean	180 (420)	238 (478)	

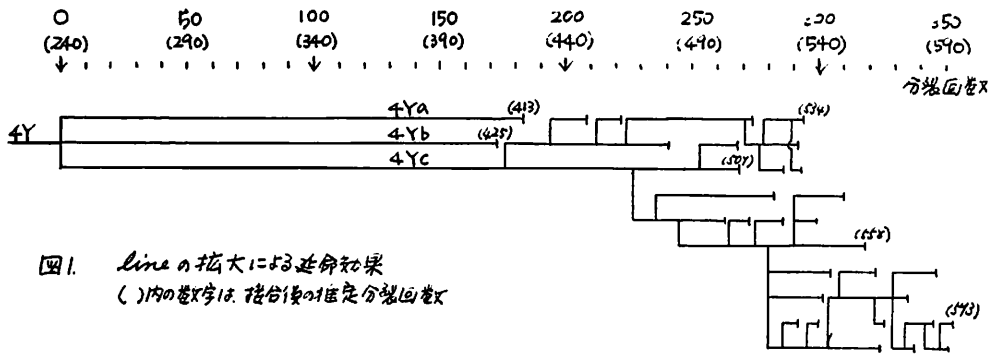


図1. lineの拡大による延命効果
()内の数字は、分裂後の推定分裂回数

最大寿命に再現性がみられたのに対し、各line及び各subcloneの寿命は相互に着しく異なり、寿命についてのクローン内変異の大きいことが注目される。分裂能の高い細胞を単離する確率は、linesの数をふやすことにより高められる。図1にsubcloneの1つ(4Y)について、lineの数を3倍にしたときの延命効果(最大寿命が約600回分裂にまで延長)を示した。

しかしこのような操作でクローンの寿命を無限に延長しようとは思えない。何故なら初期には置き換えなしに維持しえたlineが、後期にはひんばんに置き換えを要するようになり、クローン全体としての絶滅傾向が明白

だからである。また、生存lineの後期における急速な減少(図2)や、分裂速度の低下(図3)、さらに同調分裂の頻度の低下(図4a)や分裂停止細胞及び死細胞の出現頻度の上昇(図4b)などにも、クローンの全体としての衰退化の傾向がみられた。

以上の結果は、無限の増殖能をもつ cell lineage の存在を否定しうるものではないが、*P. caudatum* のクローン全体としての aging process の存在と、*P. aurelia* の最大寿命の約2倍と推定される寿命の有限性しを強く示唆する。

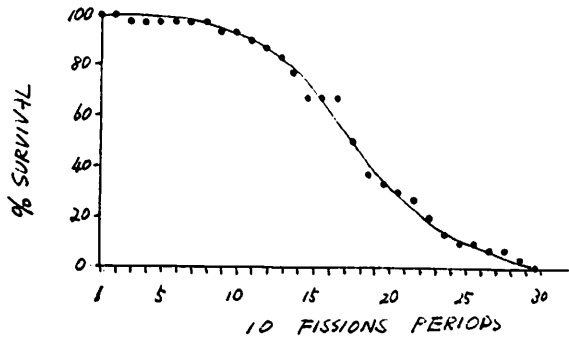


図2 10回分裂後の生存line数の変化

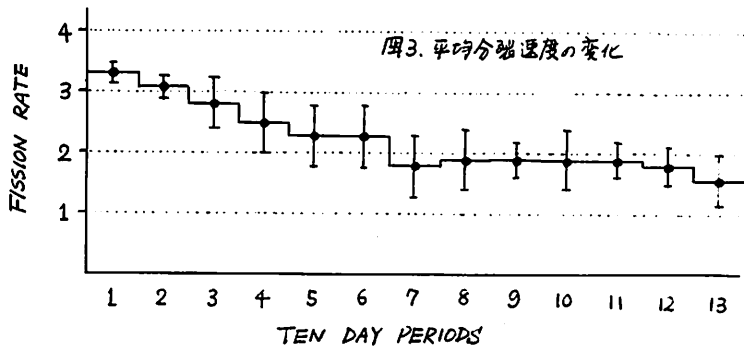


図3. 平均分裂速度の変化

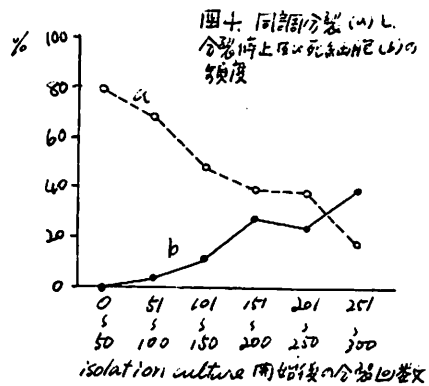


図4. 同調分裂(a)と、分裂停止及び死細胞の出現頻度(b)

isolation culture 開始後の分裂回数

ウサギの加齢と視覚誘発電位

○南澤 武 (放医研, 障基), 上屋 武彦 (産業医大, 放衛)

(目的) 加齢に伴う脳機能の変化に関する研究は、脳波や誘発電位を指標にしてヒトについて数多くなされているが、動物での基礎的な研究は極めて少ない。吾々は加齢に伴う脳機能の変化を明らかにするために、ウサギを用いその皮層脳波(EOG) 視覚誘発電位(AEP)を長期間記録し、分析を行った。今回は、5ヶ月令から18ヶ月令までの一ヶ月間連続記録した結果について報告する。

(方法) 船橋農場で生産、飼育されている日本白色種の雄ウサギ2羽を実験に用いた。購入時の年齢はNo. 676, No. 682, それぞれ3, 4ヶ月であった。購入後は放医研の哺乳動物舎の一匹用金網ケージ内で飼育し、水、500ccと固形飼料、150gを一日一回、午前中に与えた。購入1ヶ月後、Nembutalの麻酔下、左右の大脳皮層視覚領にEOG, AEPの記録用の銀球電極を埋設し、歯科用セメントで固定した。手術後約1ヶ月してから、EOG, AEPの記録を開始した。その後、一年間、毎週一回、EOG, AEPを記録した。記録は種動物を特殊な箱に入れ軽く拘束した状態に保ち、金網で遮蔽された防音装置の暗室内で行った。

EOGは毎秒1cmの速さのペーパー上に記録した。AEPの記録には電子計算器、CAT 400Bを用いた。光刺激を3~10秒に1回の頻度で200回行い、EOG上に現われるその反応の波をCATで加算、平均し、その波形をX-Yレコーダーに記録し、AEPとした。単一刺激によるAEPの外に、2発刺激(第一刺激、条件刺激、 R_1 と第二刺激、テスト刺激、 R_2)によるAEPを記録し、その回復周期(RC、 R_2/R_1)を求めた。 R_2 によるAEPはsubtraction methodを用いて記録した。即ち、最初2発刺激($R_1 + R_2$)によるAEPを、次に1発刺激(R_1)のみのAEPを、それぞれ求め、最後に($R_1 + R_2$)によるAEP - R_2 によるAEPの計算をCATで行い、 R_2 によるAEPとした。(図1)。2発刺激の間隔には、500, 750, 1000 msecの3種を用いた。AEPの記録はEOGが低電位速波を示している時に行った。

EOGの波形の分析は視察により行った。AEPとRCの場合には、各波の振幅、頂点潜時を測定し、分析した。

(結果) I. EOG, AEPのパターン。① EOGの波形は低振幅速波(覚醒波)と高振幅遅波(睡眠波)に二分される。② AEPは潜時約30msec後に生ずる3つの小さな波(I, II, III)とそれに続くゆっくりした波(IV, V)、および数個の小さな波(後発射)からなっている。全経過時間は約1secである。 R_2 によるAEPの波形は R_1 の場合に極めて類似しているが、I, IIの波と後発射は明確でない。従って、回復周期の分析には、IV, Vの波の振幅とIII-Vの波の頂点潜時を採用した。II. EOG, AEPと年齢。① EOG。覚醒波、睡眠波共、一ヶ月の観察期間中、著しい変化を示さなかった(図2)。特長のある波形も観察されなかった。② AEPのIVとVの波の振幅とI-Vの波の頂点潜時は記録時による変異が小さく、安定していた。これらの値は年齢が進んでも変化しなかった。I-IIIの波の振幅は記録時

により異なり、年齢との間に関係は見出せなかった。R₂によるAEPのIVとVの波の振幅とI-Vの波の頂点潜時の変異は小さかった。これらのRCの値(R₂/R₁)は、刺激間隔が500, 750, 1000 msecのいずれの場合も0.95~1.00で年齢が進んでも変化しなかった(図3)。

(結論) 以上の事実から、5~18ヶ月のウサギの脳機能、特に神経の電気活動は、18ヶ月による変化が少なく、かなり安定していることが示された。

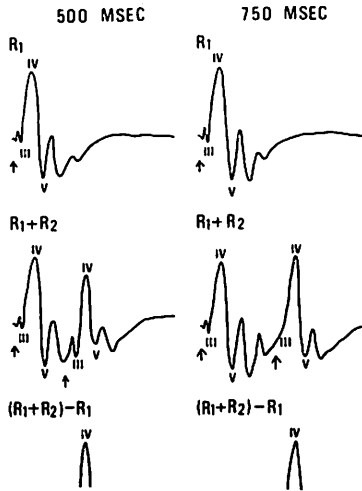


図1. 矢印: 光刺激時

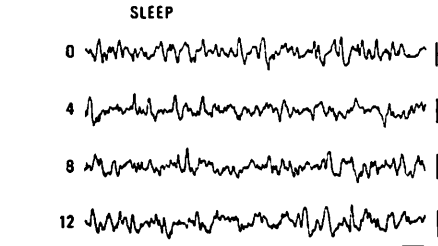


図2. 睡眠波の12ヶ月間の変化
500μV, 1 sec

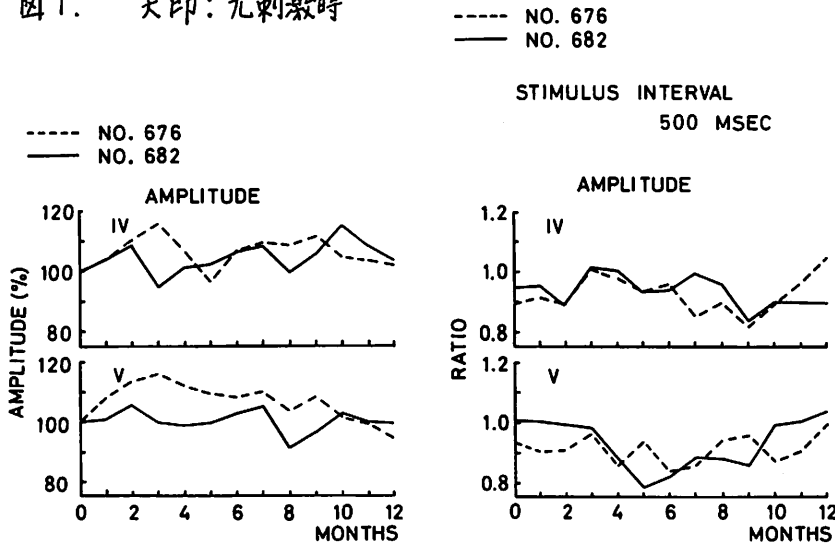


図3. (左) AEPのIVとVの波の振幅の12ヶ月間の変化。
(右) AEPのIVとVの波のRC値の12ヶ月間の変化。
刺激間隔: 500 msec

名城大・薬・生体物理化学 岩田修造, 竹鼻 真, 林 裕美子

視覚器官での透明屈折系において、水晶体は重要な器官でありその内部環境のイオンバランスは、水晶体の透明性維持機構に大きく関係していることが多くの研究から示唆されている。一般に動物の水晶体は成長が遅く、加齢とともに含水量の減少、イオンバランスの変化、特に Ca^{++} の蓄積がみられ、老化との関係が明確にされつつある現状であるが、ヒト水晶体については未だ多くの情報が提出されていない。Francis (1959) によるヒト水晶体の成長度合の測定では、いわゆる老化過程に入った70才以上においても水晶体は成長を続け、動物のそれとは明らかに異なることが示され、老化とともに発生頻度が高くなる老人性白内障 (Senile Cataract) の形態およびそのProcessを複雑化していることも示唆されている。

前回の第1回大会では、マウスおよびラット水晶体の混濁化に対する Ca^{++} の動態を報告したが、今回はヒト老化とともに発生する老人性白内障が、本質的な老化現象なのか、あるいは老化体上好発する付帯的な老化現象なのかを追求する1つのアプローチとして、種々なる混濁形態の水晶体とイオンバランスとの関係を検討し、その多様性を確認しての報告する。50~80才までのヒト水晶体を透明水晶体および群の混濁形態別に区分し、 Na^+ , K^+ , Ca^{++} の水晶体皮質、水晶体核部分での分布を測定し、さらにはATP、GSHの消失関係をも追求した。

老化とともに生ずる水晶体の混濁形態はFig.1の如くで、水晶体皮質が放射状に混濁するタイプ (Radial) と、水晶体核が濁るタイプ (Nucleus I)、そして水晶体全体が一様に濁るタイプ (Flocky) に大別される。さらにこれら3つのタイプについて、核の濁りをともなったRadial and Nucleus と Flocky and Nucleus、核混濁の症状の進むNucleus II が分類され、事実上6種類のタイプとなる。

次にこれら6つのタイプについて水晶体を水晶体皮質と水晶体核に分けて、それぞれ Na^+ , K^+ , Ca^{++} 含量を測定し、動物の病態モデルの場合と同様に Na^+ - K^+ 比を白内障進行の指標とすると、Fig.2 に示す如く左→右に進行してゆくことが判明した。また、透明水晶体をはじめ、前述の6タイプの白内障についていづれも水晶体皮質に比して、水晶体核の方が高イオン含量であるのが認められ、 Na^+ については成熟白内障になるほど核と皮質中の含量差が大きくなり、 K^+ についてはその逆の現象が認められた。さらに、 Ca^{++} は混濁の

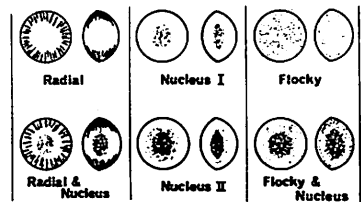


Fig.1. ヒト老人性白内障水晶体の混濁形態。

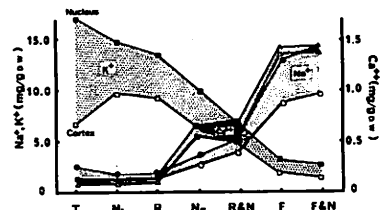


Fig.2. 老人性白内障の混濁形態別による Na^+ , K^+ および Ca^{++} の含量変化、その含量変化を水晶体皮質 (Cortex) と核 (Nucleus) とで比較して。

形態にかかわらず水晶体中に一様に蓄積してゆくことが明らかとなった。

イオンについては以上の様な知見が得られたが、エネルギー代謝に關与する物質についても検討を行なった。通常、実験的白内障ではATPとGSH含量が顕著に減少することが認められており、GSHについては成熟白内障時には皆無となる。ヒト水晶体でもこれらの減少度は白内障の進行と比較的よく相関し、ATP、GSH共に成熟白内障に至るほど顕著な減少傾向を示した。そしてこの傾向は水晶体上皮細胞と有する前部皮質で顕著であった (Fig. 3)。また、透明水晶体中のそれぞれの含有量を1として白内障進行に従っての変化率を算出すると、Fig. 4の如くになり、 Na^+ 、 K^+ が正常のレベルを保持している時点からGSH量の急激な低下が観察された。一方、ATPについては、正熟白内障に至るまでそれほど減少は認められなかった。

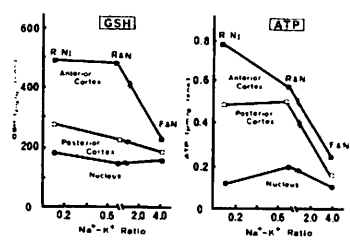


Fig. 3. 白内障進行度、すなわち Na^+ - K^+ Ratio に關する GSH、ATP レベルの変化

以上の結果は、病態モデルとしての実験的白内障においては Na^+ - K^+ 比の変化が水晶体混濁現象の顕著になる時期より前であるのに対して、ヒトでは視力低下となって発現する混濁が現われども白内障初期段階では Na^+ - K^+ 比は正常レベルであることが判明し、ヒト老人性白内障の多様性が示唆された。また、水晶体中のATPはほとんどが Na^+ - K^+ ATPase によって消費されること、そしてこのATPaseが色素に働くためのCo-Factorとして、GSHが必要であることを考え合わせると、白内障初期段階でのGSHの急激な低下は興味深い。

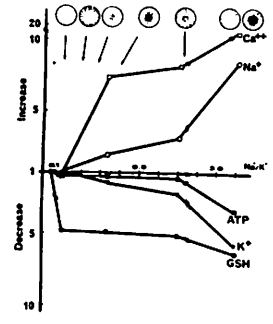


Fig. 4. 老人性白内障の進行度と代謝物質の変化率

今回、ヒト老化にともなう発現する老人性白内障水晶体を供試材料として、種々なる混濁形態のイオンバランスとATP、GSHなどの代謝物質を測定したが、ヒト水晶体は成長を続けるがために、イオンバランスに大きな乱れはなし、付随的な病的因子が加味されて始めてその変化が発現されるものと推察された。この変化の割合を培養ヒト水晶体についても論及したい、

○後藤 真 東京大学物療内科

Werner症候群は、比較的若年のうちから、老人様顔貌、両側性白内障、嚙声、白髪あるいは禿頭、軽症糖尿病、皮膚、皮下組織の萎縮、骨粗鬆症、など一般に老化に伴って出現することの多い諸症状の発現を見、早期老化症候群として、老化のモデルの一型と考えられている。

昨年、我々は、新しくWerner症候群患者16名を経験し、さらに、これまで本邦で報告された約100例の臨床症状をまとめ報告した(文献 1, 2)

本疾患は、家族内発生、患者両親の高頻度(約70%)な血族結婚などより、autosomal recessiveの遺伝様式をもつ遺伝性疾患と考えられていて、これまでの諸外国に比べて約150例の報告例と比較すると、注目すべきことだが、本邦では、Wernerの発生率が高く、その一因として、血族結婚の頻度の高いことがあげられよう。

この症候群の症状の多くは、免疫異常にもとづく自己免疫疾患と強く結びつけられるものではなく、また、これまでのところ、Werner症候群に関して、免疫異常を思わせるデータ等の報告は、全くみられていない。

今回、我々は、自己免疫疾患の一種といわれるProgressive Systemic Sclerosis (PSS: 全身性進行性強皮症)の類似疾患としてのWerner症候群、さらに、老化と免疫異常という観点から、Werner症候群に何らかの免疫異常の存在を疑い、Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)を用い、血清、リンパ球等の検索を行ない、共に興味ある知見を得た。

FACSの検索には、16例中、尿中Hyaluronic acidの排泄増加を証明しえた8例を用い、臨床的、ならびに生化学的に、まず確実にWerner症候群と言える症例である。(文献 3)

Werner症候群患者血清の異常: 免疫グロブリン(IgG, IgA, IgM, IgE等)の異常なく、RF, 抗核抗体, 抗DNA抗体等、陰性、補体(CH50)も正常であったが、白井らによって(文献 4)、NZBマウス、(NZB×NZW)F1マウスの血清中に発見され、SLE患者の血清中にも出現する抗リンパ球抗体(NTA: Natural Thymocytotoxic autoantibody)が、低力価ではあるが、8例中7例に検出された。NTAの陽性率の高さから言えば、これまでのところWerner症候群に比較されるものは知られていない。NTAの機能に関しては、これまで、NZBマウスにおいては、T細胞subpopulationのうち、特に suppressor T細胞と強く反応することが示され、自己免疫疾患の成立に関係する抗体と考えられている。ただし、正常若年者はもちろん、90歳以上の高齢者血清中にNTAは検出されない。

Werner症候群患者末梢リンパ球subpopulationの異常:

加齢に伴って変化するリンパ球のうちT-cellに注目し、特に、nylon wool を通過したT-cellについて、T-cellと反応する二種の抗体、即ち、ヒトの脳でウサギを免疫して得られた anti-Brain Associated T-cell antigen (anti-BAT) と、SLE患者血清のNTAを用い、染色し、FACSにおける蛍光のパターンを観察した。

これまでのところ、正常若年者と90歳以上の高齢者のT-cellをanti-BAT, NTAにより染色したFACSの蛍光パターンでは、高齢者は若年者に比し、明かなく染まる(bright)細胞の減少が知られている(文献5)。

Werner症候群では、anti-BAT, NTA、共に、明かなく染まる細胞の減少パターンが多くの症例で見られた。特に anti-BATによる染色では、8例中6例で、明かなく染まる細胞の著明な減少が見られ、逆に他の2例では、暗く染まる(dim)細胞の著明な増加という全く相反するパターンが得られた。NTAによる染色でも、同様な傾向がみられた。ただし、anti-BATによる染色パターンとNTAによる染色パターン間には相関はみられなかった(図1, 2)。

FACSによるリンパ球の染色パターンに従って、免疫学的にWerner症候群を大きく二つに分類することもできよう。そのうちのあるものは、免疫学的にも、従来言われてきたように、老化のモデルとなりうるものかもしれない。

図1. Two typical staining profiles by anti-BAT

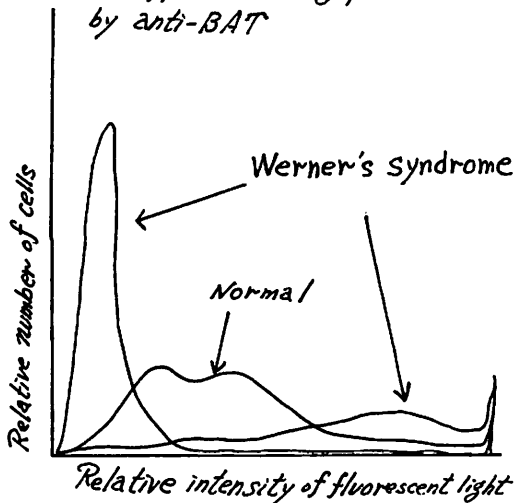
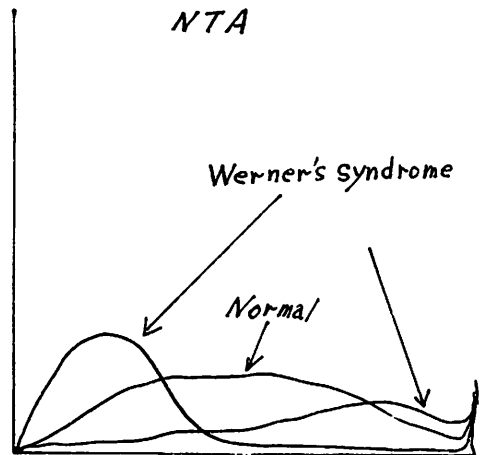


図2.



(なお、東大血清学教授 多田富雄、同助手 柳利郎 両博士の御指導、御助言に深く感謝致します。)

- 文献 1. 後藤 真 医学のあゆみ 103(2): 57-61, 1977.
 2. M. Goto et al. J. Am. Geriatrics Soc. (in press)
 3. M. Goto et al. Clin. Chim. Acta 85: 101-106, 1978.
 4. T. Shirai et al. P. N. A. S 68: 1412-1420, 1971.
 5. 奥村康. 感染・炎症・免疫. 7(4): 38-44, 1977.

石井壽晴(慶應義塾大学病理学教室)

ヒトの個体レベルでの老化の実態把握の上で、超高令者、特に100才老人の剖検例は稀ではあるが、重要な情報を提供することが期待される。100才老人の病理学的研究は、従来、1症例或いは少数例について、報告されてきた。今回、我々は、23剖検例について、検討する機会を得たので、各臓器について、病理組織学的に観察を試み、病変の多様性、生物学的輪廓について、些少なから、知見を得るので茲に、報告する。

材料及び方法。1966年から1975年の10年間に於ける、Sweden、Malmö市総合病院病理の連続剖検例中より得られた、男性7例、女性16例の総100才老人剖検例である。肉眼的な観察の後に、組織学的検索の為に、通常、心臓からは、左右各心室及び中隔、両肺全葉、肝左右葉、両側腎臓、脾臓、甲状腺、膵臓頭部及び尾部、胆嚢、膀胱、前立腺、精巣、卵巣、子宮頸部及び体部、脊髄から、常に、少くとも1箇所が切り出された。又、これら臓器に、肉眼的に病変が認められた時には、必要に応じて、更に追加切り出しが、行なわれた。なお、副腎、消化管組織については、肉眼的病変のある時のみ、切り出された。切り出し后、材料は、通常の方法に従って、光顕試料標本が作製され、必要に応じて、病変の性質に従って、特殊染色が施された。

結果。I. 体格及び臓器重量。男女共に心臓を除き、全般的に萎縮傾向をみた。身長169.5cm(女性150.0)、体重55.9kg(43.8)、心臓389g(317)、脳1238g(1005)、肝1095g(1033)、腎臓219g(192)、脾臓106g(108)。

II. 心血管系。大動脈及び諸動脈には、屢々合併病変を伴う、高度の動脈硬化症をみた。心病変のうち、最も多くみられたものは、心筋梁状線維化巣で、15例に認められた。その分布は、左室及び中隔に限局して分布し、冠状動脈の硬化が常に随伴していることから、梗塞性変化と解された。又、1例では、新鮮な梗塞の合併がみられた。同時に、8例に、心筋置換性或いは、冠状動脈内膜に、amyloid沈着をみた。

その他、大動脈弁及び心臓、線維輪に石灰沈着がそれぞれ4例にみられた。右室には、脂肪織の浸入傾向がみられ、5例はlipomatosisと判断された。

III. 肺。最も多くみられた肺病変は気管支肺炎で、15例にみられ、3例は、大葉性肺炎であった。又、3例には、器質性肺炎の合併をみた。一方、肺の組織構築上の変化として、肺胞壁断裂を伴う肺胞腔の拡張傾向が全般的にみられ、特に5例では、肉眼的所見と併せて、肺気腫の診断を下し得た。又、気管支に因しては、8例の慢性気管支炎がみられ、同時に気管支腺肥大、軟骨の石灰化、骨化傾向が目立った。

その他、肺血管には、血栓性塞栓が、屢々認められ、新鮮塞栓3例、陈旧性塞栓5例をみた。このうち、1例は、新鮮肺梗塞にて、死亡した。

IV. 消化器系。肝、全般的に死後期に生じたと考えられる小葉中心性瘀血及び脂肪変性がみられた。1例には分化型肝細胞癌の発生をみた。一方、5例には、明らか

な老性萎縮(因内)が認められた。胆道系には、胆嚢内に10例、総胆管内に2例の膽石形成とみたが、重篤な合併、転移性病変はなかつた。脾には、実質のlipomatosis傾向がみられたものの、腺房細胞、ラ氏島には、著変はなかつた。なお1例に転移を示さない、分化型腺癌、1例に良性囊胞腺腫の発生をみた。消化管では、S字状結腸と中心とろる憩室形成が11例にみられ、1例は、同破裂出血により死亡した。又、1例には遠隔転移を伴う分化型腺癌の発生をみた。

その他、3例の胃潰瘍、3例の小腸良性腫瘍、4例の大腸黒色症をみた。

V. 泌尿生殖器系。腎には、19例に肉眼的瘢痕形成を認めた。又、9例には、著明な多発性腎盂囊胞形成をみた。10例には慢性腎盂腎炎が認められた。この傾向は、屢々目立ったが、病変が比較的限局している場合には、微小梗塞と鑑別に、困難を伴った。又、血管系には、糸球体を含めて細小動脈硬化が顕著で、8例を良性腎硬化症と診断し得た。又、2例に、皮質表層と基底とろる楔状の陈旧性梗塞巣、1例に新鮮梗塞巣をみた。その他、2例に良性腫瘍、1例に腎結石形成をみた。

男性例7例の6例に腺性前立腺肥大を認め、3例には分化型腺癌の合併をみた。癌例の2例は、剖検時に見出され、浸潤及び転移はなかつたが、1例は転移を示していた。精巣には高度の萎縮をみた。子宮は、全般的に高度の萎縮を示していた。内膜は、内膜の腺留囊胞状拡張により、屢々内腔に突出し、溜血腫、溜膿腫をみた。

VI. 骨格系。骨は肉眼的に粗鬆傾向が目立ち、14例には、組織学的にも、骨梁萎縮、Havers氏管の拡張傾向が顕著で、骨粗鬆症の診断を下し得た。又、同時に、4例に亀背、2例に脊椎側弯を合併していた。なお、これらのうち、4例は、大腿骨病的骨折をおこしていた。

III. 悪性腫瘍。6名に総計8ヶの悪性腫瘍が見出された。即ち、前立腺癌3例、下行結腸癌、悪性リンパ腫、肝癌、肺癌、乳癌各1例であり、2例は重複癌の状態であり、~~前立~~これら8ヶの癌のうち、転移を示したものは3例であった(結腸、前立腺癌、リンパ腫)。又、前立腺癌2例、脾、乳癌各1例は、剖検時に、見出された。

おわりに。今回の100才老人の病理学的観察を通じて、その病変の多彩を改めて知ることとせ、心血管系病変、少数の癌を除き、実質系臓器に重篤な病変の乏しいことも知った。心筋病変は、病変分布、高度の動脈硬化症などから、梗塞性変化と考えられる。又、従来の報告も加味すると心アミロイド又は、超高令者に特徴的な病変といえよう。

脾に全般的に認められた多腫傾向、気管支腺肥大は、加齢に伴う免疫能の低下と共に、吸気、喀痰の腺留をもたらす可成性のあることから、肺炎発生の場を提供するものと考えられよう。

悪性腫瘍の発生は、散発的にみられたが、前立腺癌を中心とする潜在癌、重複癌の発生傾向が窮れた。我々のシリーズは、癌調査の上で、なお症例不足ではあるが、発生した癌の分化傾向と転移の傾向に乏しいことが窮れた。この内趣は、癌転移の生じる前に、他の原因で、患者が死亡した可能性は充分に考慮する必要は、あろう。

(文献, Ishii, T. and Sternby, N. H.: Pathology of Centenarians. I~III. J. Am. Geriatrics Soc. (in press))

伊藤正敏 山浦玄嗣 逢藤敏 窪田和雄 山田健嗣 松沢大樹
 (東大大学 抗癌菌病研究所 放射線医学部門)

成熟した個体の神経細胞は増殖能力を有さない。従って加齢に伴う神経細胞の変性萎縮及び脱落は必然的に脳容積の減少を来すこととなる。この変化を死後に病理学的に検討することは比較的容易であるが、生前には神経学的所見により類推する以外、定量的に把握することは著しく困難であった。最近新しいX線撮影装置である、コンピューター断層装置が登場して、人体の水平方向の断層像を細かく解像して得らるようになった。この装置を使用して加齢に伴う脳の変化の研究を行った。

(実験方法)

CTはOhio Nuclear社製のデlv950FS型全身用コンピューター断層装置を使用した。断層中は8mm乃至10mmであり、この厚みで人間を輪切りにした像を55536コの画素を使用してガラス管上に表示する。対象としたのは、20~80才の50名であり、脳出血、脳梗塞、脳腫瘍等の明らかな器質的疾患を有する患者は除外した。容積の測定は次の方法を行った。

頭蓋内容積 = (頭蓋全体の画素数 - 骨のX線吸収度を有する画素数) × 画素体積。

脳室・くも膜下腔容積 = (水のX線吸収度を有する画素数) × 画素体積。

脳実質容積 = 頭蓋内容積 - 脳室・くも膜下腔容積。

<結果>

頭蓋内で脳室・くも膜下腔の占める割合(容積%)は20~29才、6%、30~59才、7%、60~69才、10%、70~79才、13%、と上昇し、70才台は20才台の倍の容積を占めた。脳実質の容積は、これに逆相関を示して、60才台から減少を始めた。

<考察>

コンピューター断層装置(CT)とは、人体を体軸に垂直方向に輪切りにした断層像をコンピューターにより再構成する装置である。これを用いて、断層面の任意の点のX線吸収係数を得ることが可能である。X線吸収係数は物質の密度、原子番号に比例する故、X線吸収係数により、頭の場合、骨、脳実質、脳脊髄液などを容易に鑑別することが可能である。本研究によれば、加齢の結果として、脳実質容積の減少は、60才台に明らかとなることを判明した。更に症例を加え、検討する予定である。

藤澤 浩四郎 (東京都神経科学総合研究所)

細胞種としての神経細胞の形態的特徴の第一はその細胞体(pericaryon)に比して著しく長大且つ複雑多岐に亘る細胞突起(即ち樹状突起と軸索)の存在に求められる。神経細胞は分裂終止細胞であるから個体の成長と成熟更に老化の全過程を通じて世代の交代なく一貫して存在し続けしかも細胞の生命を維持するのみならずこれら長大なる突起をもその形態と機能との両面から維持してゆくという代謝的要請にも答えてゆくわけにならない。この要請がどれ程の大きさのものがあるかはこれら細胞突起の全容積はそれが起源する細胞体の容積に優に数百倍するという事実を知れば想像できる。加齢に伴い生じて来るであろう神経細胞(体)の代謝活動の衰退が、形態の面からも機能の面からも元来細胞代謝活動の中心(pericaryon)から最も遠隔な突起末端部に及ぶその効果を生じて来はせぬかと考えることは極めて当を得たことと考えられる。神経細胞突起は軸索と樹状突起とに大別され、これらは構造上からも機能上からも著しく異なるものであるからそれぞれ別個に検索と考察の対象とすべきものがある。今回は軸索をとり上げ検索した結果を報告する。

〔材料と方法〕

ウイスター・分道系ラット、離乳期より実験室にて飼育観察、餌料はオリエンタル製繁殖用M/F固型餌料を成熟完了(150日齢)まで飽食させ以後は飽食量の70%に摂取量を制限、700日齢を越える頃より再度飽食にともどす。100日齢より始めて最長700日齢に及ぶ種々の日齢段階で、全身灌流固定により屠殺、全身の末梢神経系並びに脊髄根、脊髄を各部に系統的に採取し、オスミウム再固定後エポキシ包埋し、100ミクロン薄切片標本の光顕的検索を先づ行い、次いで必要な部位について超薄切片を作製し電顕的に検索した。

〔検索結果〕

末梢神経：脊髄と出く神経叢を形成している近位部とこれより末梢の遠位部とは加齢に伴う神経線維変性所見に質的差が認められ、前者では髄鞘膨化を伴う節性脱髓が主体をなし軸索は比較的健在する傾向を見せるが、後者では節性脱髓は目立たず、軸索の濃縮と崩壊とが主体をなしている。前者での節性脱髓性病変は多くの線維で髄鞘再形成をも、く恢復するが、一部の線維では髄鞘の解体と共に軸索も崩壊(くしり)し、然し高日齢の動物ではしばしば Büngner's band の形成を思わせる所見が認められるので、この軸索崩壊線維の少くとも一部のものには軸索再生が起るとのことも想像される。いずれにせよ全体としてくは加齢の進むにつれて殊に遠位部で末梢神経線維数の減少が結果する。

脊髄根：に述べた末梢神経近位部と本質的には同じくあり、節性脱髓が主体で軸索は比較的健在している。但し前根と後根とを比較すると前根線維の方に明らかに病変は多く出現している。

脊髄内線維：に述べた二種の変性、即ち髄鞘膨化と軸索の濃縮の両変化が共に出

現するが、その程度や面変化の混在する割合は脊髄内白質の部位により異なる。即ち後索上行路では軸索退縮性機転が主体であるのに対して、側索と前索とでは髓鞘膨化性病変の方が前景にある。尚又軸索退縮機転を頸髓薄束と腰髓後索とでその出現開始の時期並びにその後、進行の様相を比べて見ると、頸髓と腰髓とで変性線維の総数には差を見出し難い、即ち後索上行性線維の退縮性機転は軸索末端部に始まり近位側に向け次第に病変が遡及するという、いわゆる dying-back 過程とは性質を異にしてゐるようであつて、軸索は少くともその脊髄内経路で見られる限りその走行の全長に至つて同時に濃縮変性が進行してゐるようには判断される。又脊髄内神経線維に見られる加齢性病変は汎発性ではあるが慢性性とは言い難く、病変を示す線維は概ね白質の表層に比較的近い位置にあるものが多く、深部白質には病変軸索は少く殊に後索深部を走る錐体路には殆んど病変線維は存在しない。

また脊髄内線維(軸索)の加齢性病変としては、上述したものを以外にもう一つ重要な病機が存在する、即ち軸索ディストロフィーであつて、これは脊髄後索上行線維殊に腰髓神経節由来線維終末に好発する軸索の局所的腫大であつて、その形状より類球体 spheroids と呼ばれてゐるものであるが大きさは直径 30~40 μ 以上に達する。延髄後索枝に好発するが、その他加齢の進むと共に脊髄の後角にも相当数出現して来ると共に次第に逆行性に後索内線維中にも出現して来る。電顕的にはミトプラス前軸索終末部での系粒体などの顆粒の増生、神経細線維や無構造軸索形質の増生を基盤に腫大機転が始まり、その後二次的に(恐らくは正常でも少量存在してゐる)滑面小胞体由来すると考えられる管状・胞状プロフィールの網目構造の出現と増生とが生じこれにより軸索は飛躍的に腫大する、それと共に細線維の稠密な凝集により生じたと思われる斑状の集塊や重畳する膜様プロフィールの出現と増生、系粒体膜間隙への顕しいグリコーゲンの沉着、いわゆる cutvilinear bodies や coiled tubular rings と名づけられた特異的構造物質の集塊の出現など内部構造に多種多様な形態分化を生じつつ軸索腫脹は巨大化し、究極的には spheroids の軸索形質内に生じた来た空胞が次第に大きくなり、spheroids は結局空胞変性の形で自己融解消失してしまう。周囲組織に喰細胞の動員を見ることは稀である。

〔考察と結論〕

私がここでとり上げたい向題点は二つある。一つは殊に末梢神経線維で顕著な、近位部軸索と遠位部軸索とで見られる病変の質的差であつて、病態発生の解釈としては近位部での節性脱髓機転が二次的に遠位部での軸索退行変性の原因であるとする考え方と逆に軸索の退行変性が一次機転であつて節性脱髓が二次的結果であるとする考え方が可能であり、目下の所いづれがより真実に近いか決論できない。二つ目には特に脊髄後索線維に於いて顕著な軸索退行変性と逆行性変化である軸索ディストロフィーとの共存の事実であつて、同一線維系に単純萎縮と積極的肥大という相反する二つの機転が(勿論線維を異にしてだが)同時に出現し進行し得るといふことは神経軸索の加齢に伴う変化が決して単純でも画一的なものでもないことを如実に示してゐて興味が尽きない。

○山浦玄嗣、松沢大樹（東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門）

老人の創傷治癒は、若年者に比して、遅れるものである。血管新生は、創傷治癒過程において、中心的役割を果たす。血管は、正常組織内では増殖せず、静止した器官である。損傷を受けると、増殖・成長して、損傷部分を修復する。老人では、創傷治癒における血管新生が遅いだろうと、推察される。

老人の癒は、若年者の癒に比べ、一般に成長が遅い。その理由のひとつに、老人の癒では、癒細胞の細胞周期が長いものが多いことがあげられる。このほか、同一種類の実験癌を、老若の動物に移植すると、老動物にうえられた癒の成長の方が遅いことも、知られている。この場合、成長のおくれの理由は、宿主の加齢にあるだろう。癒組織の成長は、間質、特に血管系の成長速度によって律せられるから、老動物における、癒のおくれ成長は、血管新生の加齢によるおくれを示唆するだろう。

血管の成長を、生体内で測定することは、なかなかむずかしいことで、この方面の研究は、殆どなされていなかった。我々は、ラット透明窓法によって、血管の成長を測定し、加齢が血管新生に及ぼす影響を、検討した。

〔実験方法〕用いた動物は、雄の香龍ラットで、週齢により、3群に分けた：(A) 5週齢、(B) 10週齢、(C) 56~80週齢。A群 11匹、B群 10匹、C群 9匹。山浦式ラット透明窓 (YAMAURA ET AL., GANN, 62: 177, 1971) は、2枚の透明なプラスチック板から成り、ラット背部に作られた皮弁に装着され、うすい皮下組織膜とその血管を保持、観察するものである。窓は、直径10 mm、厚さ0.1 mm。窓の表面には、1 mm 間隔の方眼が刻まれている。窓内の血管網を外科的に破壊し、血管欠損野を作ると、損傷部周辺の既存の血管が増殖、新生血管が進入して、この部を修復するのが見られた。新生血管の先端を結ぶ線を仮定し、これを血管新生前線と称す。

透明窓の方眼マス目を、毎日撮影し、スライドを作り、紙上に投映、血管を転写し、地図用距離計で、血管長さを測定した。個々のマス目のみならず、窓全体での血管長さを求めた。この方法は、非常な労力を要するので、B群の4例にとどめ、血管新生過程の血管系の内部的解析資料とした。

窓を2倍の倍率で撮影、紙上に投映し、血管新生前線を転写した。ある日の前線が、その次の日まで前線して修復した、組織の面積を測定、これを前線の長さで除して、その日の前線の平均前進距離を求めた。

〔結果〕損傷部分に接した血管は、拡張し、蛇行が著しくなった。屈曲蛇行する毛細血管が、局所的に膨隆し、ここから指状の突起、すなわち血管芽を生じ、これらが互いに吻合して、新しい血管を作っていた。新生血管は、櫛の歯のような配列をして、創傷部に進入、その前方には、常に出血をともなっていた。

窓内の1 mm 角のマス目内で、はじめから血管がある場合には、血管長さに変化はなかった。血管のないマス目には、血管新生前線の進入と共に、血管長さが増じ、20 mm ぐらいまで増え、後、減少し、10 mm のところで一定値を維持した。このよ

うに、前進する血管新生前線は、前線上に、幅約0.5mmの血管過形成帯を作ることが観察された。前線の前進とともに修復された、組織の面積と、窓全体での血管長さとは、日数を横軸にとったグラフ上、上に凸な放物線を描いて増加し、放物線の頂点に達して、修復を完了した。

前線の前進距離と時間とは、グラフ上、直線関係にあった。たとえば、B群で、最小二乗法によって、この関係を求めると、 $y = 0.018x$ ($y =$ 前線の前進距離 cm, $x =$ 日数, 相関係数 $r = 0.97$) であった。

各週齢群における、前線の1日前進距離は、(A) 0.0184 ± 0.0045 (標準偏差) cm, (B) 0.0188 ± 0.0066 cm, (C) 0.0134 ± 0.0041 cm。観察のべ日数は、(A) 73日, (B) 102日, (C) 47日。A・B間には、危険率1%で、有意差なし。A・C間には、有意差あり。B・C間には、有意差がなかった。これは、B群の標本にばらつきが大きかったためである。

この他、特に気づいた点をあげると、C群では、組織が硬く、手術がむずかしかった。A、B群では、窓内の傷は、完全に修復されたのに、C群では、修復に限度がある場合が多かった。この場合、前線は、2~3mm前進したあと、血管芽の形成を中止し、血管過形成帯は消失し、出血もなくなった。せっかく修復された組織が、萎縮、後退するのも見られた。

〔考察〕A群は、乳離れしたばかりの、幼いラットで、体重80gぐらい。人間にたとえれば、幼稚園児のような、幼若で、成長のはげしい時期のものである。B群は、体重170gぐらい。人間なら、小学校上級生か、中学生ぐらいであろうか。さかんに成長している。C群は、体重500gをこえ、既に老年である。A・B間には、有意差が認められなかったのは、共に旺盛な成長期にあるためであろう。A・C間には、明らかで有意差があり、老齢の動物では、血管新生が、若齢のもの約70%ぐらいに減少することが、示された。

この値は、B群と同年齢のラットの血管新生過程に、 γ 線1000radを照射した時に見られる抑制効果に、大へんよく似ている。前線の前進がとまる現象も、放射線による障害とそっくりである。加齢と、放射線障害との間には、どのような関係があるのか、明らかではないけれども、興味深い、類似である (Yamaura et al., INT. J. RADIAT. BIOL. 30: 179, 1976)。

12 マウスの加齢に伴う各種臓器の細胞動態

東大・抗研・放. 尖戸文男, 松沢大樹, 佐藤多智雄, 浜島幸子,
川村朝子.

加齢に伴う変化してゆく個体中のパームータとして種々のものが考えられているが、動物実験も行、て行く場合の指標としてどのようなものが最適かを検討する目的でいくつかの計測を行った。

まず、各種臓器の重量の変化を測定した。更に各種臓器の ^3H -Thymidine の標識率の変化、および細胞周期の変化を測定した。また細胞数の増加と細胞機能の発現との関係を age と連、て検討した。

使用した動物は C57BL/6j マウスである。種々の日令のマウスに、 ^3H -Thymidine $2.0 \mu\text{Ci}/\text{g}$ 体重を腹腔内に投与し、 ^3H -Thymidine 標識率および細胞周期を測定した。耳下腺については、DNA 量、 ^3H -Thymidine 標識率、 α -Amylase 活性を測定した。

脳の重量を測定してみると、100 日令では、平均値で、 217mg 、500 日令で、 251mg 、650 日令で 234mg である。大脳皮質の細胞数は、100 日令で、 $299 / 0.25 \text{mm}^2$ 、500 日令で、 $339 / 0.25 \text{mm}^2$ 、650 日令で、 $297 / 0.25 \text{mm}^2$ である。他の臓器では、現在検討中である。

^3H -Thymidine 標識率は、脳が、100 日令、500 日令、650 日令と、標識される細胞は認められるが、肝臓は 100 日令で、平均値で、 2.1% 、500 日令で、 4.0% 、650 日令で 3.4% であった。腸上皮細胞では、100 日令が 42.6% 、500 日令 31.7% 、650 日令 34.8% であった。腸上皮については、細胞周期を測定できたので、各期の長さを算出すると、60 日令で、全細胞周期が、 14.0 時間、S 期： 7.2 時間、 G_2 期： 1.6 時間、M 期： 0.9 時間、 G_1 期： 4.3 時間、420 日令で、全細胞周期： 15.2 時間、S 期： 7.3 時間、 G_2 期： 1.5 時間、M 期： 0.8 時間、 G_1 期： 5.6 時間、710 日令で、全細胞周期： 18.4 時間、S 期： 7.3 時間、 G_2 期： 1.5 時間、M 期： 0.9 時間、 G_1 期： 8.7 時間であった。

耳下腺の成長過程の DNA と α -Amylase との関係を検討すると、DNA は、生後 2 週目から 3 週目にかけて急激に増加し、4 週目には増加の割合がにじみよる S 形状のカーブを示す。 ^3H -Thymidine の DNA への取り込みは、2 週から 3 週目にかけて急増し、3 週目が最も高く 4 週目は下降を示した。Amylase 活性は 3 週目から出現し、4 週目まで急増するといふ関係を示した。

以上のことから、腸上皮のような細胞再生系では、 ^3H -Thymidine 標識率の変化および、細胞周期の変化が、aging の指標となるのではないかと考えられる。今回の結果では老化に伴い、標識率の低下、全細胞周期の延長、 G_1 期の延長が認められる。

細胞再生の少ない肝臓（肝）、および非細胞再生系では、 ^3H -Thymidine 標識率は明らかな変動が少なく、老化に伴う変動の指標とはならないと考えられる。

加齢の全過程を成長と老化という2つの時期に区分して考え、今日は耳下腺について、成長についてみてみた。分泌能発現には、細胞数の増加に伴う、とれることが明らかとなる、だが、老化による分泌能低下が細胞数の減少に依存するのか、細胞1個の分泌能低下によるのか、更に検討をかえねばならない、

○佐藤 秩子；愛知県がんセンター臨床検査部、 田内 久；愛知医科大学第1病理学教室

すでに私どもは、実験動物（ウイスター系ラット、4か月と24か月、6か月と24か月、Tauchi et al., 1964）、ヒト生検肝（Tauchi and Sato, 1968, Sato and Tauchi, 1975）について、その超微計測的検討により、肝細胞ミトコンドリア（以下“ミト”と略す）の老性減数と、個々ミトの機能代償によると考えられる容積増大を報告した。また各種実験処置（部分的肝切除-ラット、サイロキシシン投与-ラット、コーチゾン投与-マウス）後の老動物肝細胞ミトには若年動物に比して容積の増大、大小不同性、とくにサイロキシシン投与時には奇怪な形の巨大なミトの発現が顕著である点を報告している。

老化の本質究明への一手段として、田内らは、すでに過去十数年間に亘って老若ラットのパラビオーゼによる実験研究を行って来て居り、その成績の若干はすでに報告されている。その超微形態学的検索成績については、現在詳細をまとめつゝあるが、基礎データとして、生後12か月と24～29か月のドンリュウ雄ラット肝細胞ミトの超微計測的検索成績、とくに、今回は、ミト内のクリステの計測も行ったのでその老若の比較検討成績について述べてみたい。

検索材料

近交系ドンリュウ雄ラットで若としたのは生後12か月、老としたのは24～29か月の健康な動物で、夫々若10匹、老12匹、オリエンタル固型飼料MFによって同様な条件下で飼育されたものである。

断頭、脱血後剔出された肝組織片を型の如く、グルタルアルデヒド固定、OsO₄再固定、脱水后エポキシに包埋したものの超薄切片を、クエン酸鉛染色（Karnovsky、-佐藤変法）により染色、日立HU-11B電子顕微鏡により、2000倍（数を算するため）10000倍（大きさの測定のため）の写真撮影、最終倍率4000倍、20000倍の写真について微計測を行った。

ミト数については、細胞質の40～50視野で計5000 μ^2 の部分の数を算し、大きさその他については、画像解析システムKontron MOP-AMOIを用い、各例30個のミトについて、それぞれ面積、周、クリステの全長を計測した。

クリステの全長については、面積0.25 μ^2 以下、0.26 μ^2 ～0.75 μ^2 、0.76 μ^2 ～1.20 μ^2 、1.21 μ^2 ～1.70 μ^2 の夫々の大きさの群に分け、面積群毎に、クリステの全長を比較検討すると共に個々ミトについて、大きさと、クリステの全長との相関を観察した。

検索成績ならびに考按

図に示す如く、単位面積あたりのミト数は、老群で有意に減少、ミトの大きさは有意に増大するがこの成績は、4か月、6か月を若群とした過去の成績と同じ傾向である。

計算上の単位面積あたりのミトの総面積すなわちミトの占める面積比には有意な

年齢差がみられない。

ミト内クリステの全長の年齢差比較では、個々ミトにおける大きさとクリステ長との関連性は老群にバラツキが多く、平均値では大勢を占める $1.20\mu^2$ 以下の2群において、その全長は老群に有意に長く、平均値から離れた大型のミトについては数も少く有意な年齢差がみとめられなかった。

クリステの全長と、周の長さの和、すなわち膜系の全長の年齢差は、クリステについてほど顕著ではないが有意に老群に大であった。

これらの成績から、すでに静止期において、老ラット肝細胞にはミトの減数がみられ、これが容積の増加により代償され、容積比には略々老若に差がないものの、同一容積のミト個々ではクリステの全長の有意な増加から老ラット肝細胞個々のミトはむしろ機能亢進の状にある事が推測される。

Fig.1 ラット肝細胞一定視野内
ミトコンドリア数の年齢差

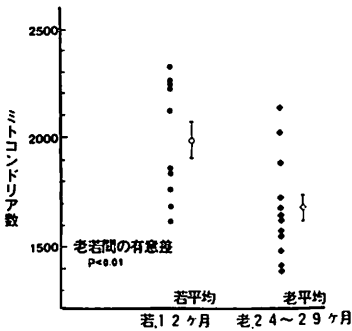


Fig.2 ラット肝細胞ミトコンドリアの
大きさの年齢差

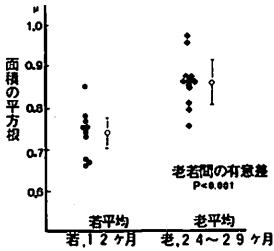


Fig.3 ラット肝細胞における
ミトコンドリアの占める面積比の年齢差

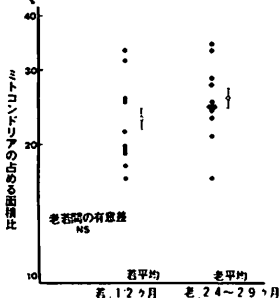


Fig4

ラット肝細胞ミトコンドリアの大きさとクリステの長さとの関連性

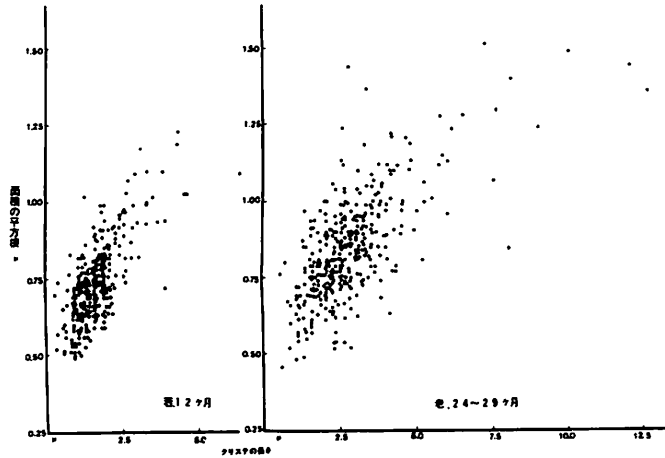
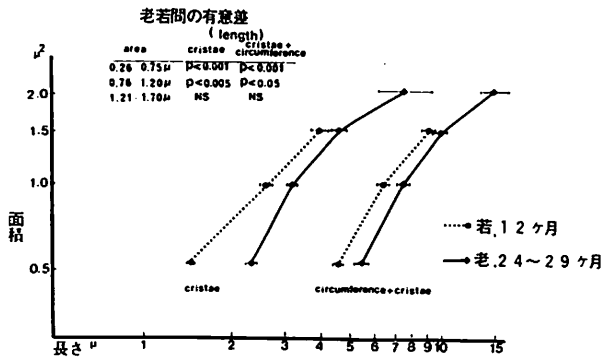


Fig5 ラット肝細胞ミトコンドリアの
面積とクリステおよび周の長さとの関連性



○森 望, 木野伝一, 後藤佐多良 (東大・薬・微生物)

我々は、さきに、マウスの老化に伴うリボゾームRNA (r-RNA) の変化に関して2つの点、即ち、1) r-RNA 鎖の損傷 (Open breaks と Hidden breaks) の様式と程度に差がないこと、2) 28S r-RNA に対して18S r-RNA が相対的に過剰に蓄積してくることを報告した¹⁾²⁾。その第2点は、大トリボゾームサブユニットの量的不均衡を示唆していると考えられたので、リボゾームの活性に興味を持たれた。老化に伴って蛋白合成活性が低下するという報告は多いが、それらはいずれもマイクロゾームあるいは粗リボゾーム画分を用いた研究であり、蛋白合成活性の低下の原因がリボゾーム自身にあるのか、付着性因子にあるのか不明確であった。また、近年、動物や培養細胞の老化した組織、細胞中に熱に不安定な酵素、いわゆる“変異酵素”の出現が相次いで報告されているが、このことは、老化に伴って遺伝情報の発現、特に、翻訳の忠実性が低下するためである可能性が考えられた。

これらの点を明らかにするために、我々は、リボゾーム自身の“活性”のみでなく、その“誤読率”の定量可能な、また、リボゾームサブユニットの活性の定量可能な *in vitro* 蛋白合成系を確立し、老若マウス肝臓のリボゾームの翻訳活性及び若干の性質について比較検討したので、その結果を報告する。

(1) 老化に伴う 40S リボゾームサブユニットの蓄積

我々は、すでに、マウスの肝臓と脳の細胞質中に 28S r-RNA に対し 18S r-RNA が若令で35%、老令で60~70%過剰に蓄積しており、その量的不均衡は老化と共に大きくなること (Fig. 1) を報告しているが、今回、マウス肝臓の細胞質中に存在するリボゾームサブユニットを蔗糖密度勾配遠心法により分離すると、実際に、60S サブユニットに対し40S サブユニットが過剰に存在し、その割合は老令のマウスの場合が大きいことを確認した。従って、Fig. 1 に現れた変化は、60S サブユニットに対する40S サブユニットの老化に伴う蓄積と解釈される。このリボゾームサブユニットの量的不均衡は、以下に述べる蛋白合成活

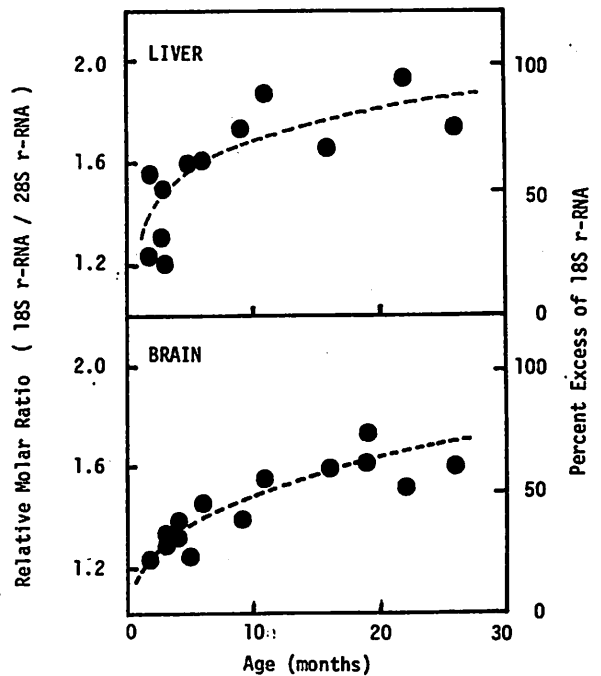


Fig. 1. The ratio of the amount of 18S and 28S r-RNA as a function of age of mice

性の低下と関連して興味深い。

(2) 翻訳におけるリボゾームの“活性”と“誤読率”

翻訳における誤りは、mischarging, miscoding 及び frame shift の種が考えられるが、我々の用いた測定系は、このうち miscoding のみを見ることが出来るものである。若令及び老令のマウスの肝臓よりポリソームを得、これをピューロマイシン処理することにより endogenous m-RNA, peptidyl t-RNA 及び可溶性因子を全く含まないリボゾームを調整し、これに、ウサギ網状赤血球リボゾームの可溶性因子、マウス肝 t-RNA, エネルギー再生系, Mg^{++} , Poly(U) 及びアミノ酸を加えたものを反応系とした。反応は、全因子について至適条件を求め、加えたりボゾーム量と反応時間に関して直線性のある範囲で活性の定量を行なった。この系で鋳型となる Poly(U) に依存してポリフェニルアラニンが合成されるが、同時に、ロイシンも熱酸不溶性として取込まれ、この両アミノ酸のモル比を、リボゾームの“誤読率 Infidelity level”とした。

即ち、

$$\text{Infidelity level} = \frac{{}^3\text{H-Leucine incorporated (Genetic code: UUA/UUG/CUX)}}{{}^{14}\text{C-Phenylalanine incorporated (Genetic code: UUU/UUC)}}$$

結果は、老令マウスのリボゾームの活性は若令に比べ、10~40%低い傾向にあるが、誤読は 10^{-2} のレベルで起こり、その頻度は老若いずれが高いとも低いとも言いがたかった (Table 1)。しかし、この系における蛋白合成の誤読は Mg^{++} 濃度に強く

依存し、老若のリボゾーム共、6 mM Mg^{++} において最も正確な翻訳を行ない、 Mg^{++} 濃度がそれより高くても低くてもしだいに不正確になる傾向には全く差がなかった。

(3) リボゾームサブユニットの活性

ポリソームを処理させた上清から、遊離の 60S 及び 40S のサブユニットをそれぞれ回収し、それらの再構成により各サブユニットの活性を測定した。結果は、60S, 40S 共、老令マウスのものの方が高い活性を示した。

1) 森, 水野, 後藤; 日本薬学会少98年会 (1978)

2) N. Mori, D. Mizuno and S. Goto; Mechanisms Ageing Develop. in press.

Table 1. Efficiency and Fidelity of translation

Age of mice	EFFICIENCY		INFIDELITY		
	(^{14}C)Phenylalanine incorporated*	(^3H)Leucine incorporated*			
Exp. 1 Young	2months	9.8±0.6	0.108±0.046	1/91	
	2months	13.5±0.1	0.124±0.003	1/108	
	2months	11.5±1.9	0.093±0.014	1/124	
	Old	21months	6.4±0.1	0.411±0.004	1/16
Exp. 2 Young	22months	10.2±0.1	0.096±0.003	1/106	
	22months	3.7±0.9	0.037±0.001	1/101	
	Old	15months	8.5±0.4	0.026±0.005	1/324
	19months	11.1±2.0	0.037±0.013	1/302	
Exp. 2 Old	19months	16.1±0.1	0.100±0.017	1/161	

* (p moles/ A_{60} units of ribosomes/40min)

○中村重信, 亀山正邦 (京都大学・医学部・老年医学)

〔目的〕 老化により外界の刺激に対する反応性の低下することはよく知られている事実である。ホルモンに対する receptor の感受性は老化により低下し、ツベルクリン反応の陽性率も減少する。リンパ球のフィトヘムアゲルチニンによる幼若化は老人では低下すると報告されている。¹⁾ 今回われわれは老化による細胞膜の変化を明らかにする手がかりとして、5'-nucleotidase を marker にして、細胞膜の糖蛋白質に対するフィトヘムアゲルチニンの影響を検討した。その結果、細胞膜画分ではフィトヘムアゲルチニンの一種である *Concanavalin A* (ConA) による 5'-nucleotidase 阻害度が老化により低下するが、精製酵素では若年と老年との差が認められないことを見出し、加齢により細胞膜上に糖蛋白質を mask する物質の存在を想定した。

〔方法〕 ウィスター系ラットを用い、老年ラットとしては27ヶ月令のものを使用した。肝臓を灌流した後、Song らの方法²⁾ と改良した蔗糖密度勾配法³⁾ により肝臓 bilecanalculi の細胞膜を得た。本標品には desmosomes, terminal bar が認められ、intact な plasma membrane である。人肝臓は剖検時のものを用い、病変のない部分を選び、上記の方法により細胞膜を分離した。5'-Nucleotidase の活性は既に述べた方法³⁾ に従って測定し、nonspecific alkaline phosphatase は 3'-AMP を基質にしたものと 5'-AMP を基質にしたものより差引くことにより消去した。5'-Nucleotidase は細胞膜を deoxycholate により可溶化し Widnell らの方法⁴⁾ と更に発酵させて精製した。⁵⁾ 可溶化した細胞膜を第一次硫酸処理 (0-45%), 50°C, 5分熱処理, 第二次硫酸処理 (28%~40%) と行い、Sepharose 4B, DEAE-cellulose, 5'-AMP sepharose カラムクロマトにより精製した。精製標品はディスク電気泳動にて単一のバンドを呈し、糖蛋白質であることが明らかになった。⁶⁾

〔結果〕 精製酵素は ConA により強い阻害を受けるが、Lens culinaris Hemagglutinin A, B, Ficol Binding Protein, Ricinus Communis Agglutinin-120, Soybean Agglutinin, Pork Weed Mitogen, Wheat Germ Agglutinin による阻害はほとんど認められなかった。精製酵素を α -mannosidase で処理すると失活するが、 α -glucosidase, β -glucuronidase, β -glucosidase, α -galactosidase, hyaluronidase による失活は認められなかった。 α -mannosidase による失活が α -methyl mannose 或いは ConA 添加により防げることから活性中心に mannose 残基が存在するものと考えられる。

ヒト細胞管細胞膜の 5'-nucleotidase 活性及び ConA 添加時 (20 μ g/ml) の活性を測定した。(図1) 年齢が高くなるに従って 5'-nucleotidase の活性は低下するが ConA による阻害は非常に低下する。ConA により逆に活性上昇を示すものも認められた。ラットの胎児、生後1日, 1ヶ月, 2ヶ月, 12ヶ月, 27ヶ月の肝臓細胞管細胞膜の 5'-nucleotidase に対する ConA 阻害度を調べたのが(図2)であ

る。胎児より生後1ヶ月でConA阻害が最大となり、12ヶ月、27ヶ月ではConAによる阻害が低下する。1年以後の肝細胞膜では低濃度のConAで逆に活性の上昇が認められた。1ヶ月と27ヶ月令のラット細胞膜について酵素のcatalytic propertyを比較した。58°C熱処理に対する失活の度合は(図3)に示すように、27ヶ月の方が易熱性を示した。5'-AMPに対する酵素の K_m は1ヶ月のものが、 $3.4 \times 10^{-5} M$ 、27ヶ月のものが $9.8 \times 10^{-5} M$ であり、老化により基質に対する親和性が低下することが認められた。(図4)これらの細胞膜より5'-nucleotidaseと上記の方法で精製した。精製過程における5'-nucleotidaseの0.1g wet weight当りのtotal activity(表1)を示す。第二次硫酸処理の段階で27ヶ月令の酵素のtotal activityが約3倍に上昇していることが認められた。この段階で恐らく、5'-nucleotidaseに対する阻害物質が除かれたのであろうと考えられる。第二次硫酸処理後の過程ではほぼ同じ酵素活性の強さが認められた。精製酵素を用いて、5'-nucleotidaseのcatalytic propertyと若令のものと若年のものとで比較した。 K_m は1ヶ月のものと27ヶ月のものでは、 $3.5 \times 10^{-5} M$ 、 $4.1 \times 10^{-5} M$ と大きな差は認められなかった。58°C熱処理でも1ヶ月と27ヶ月の標品にはほとんど差が認められなかった。ConAに対する阻害は(図5)に示すように1ヶ月と27ヶ月ではほとんど差が認められなかった。

〔考察〕 加齢による外来刺激に対する反応性の低下を反映して、肝細胞膜5'-nucleotidaseの5'-AMP濃度に対する親和性やConAによる阻害度は老化により低下することを明らかにした。しかし、精製した酵素自体には差は認められず、恐らく細胞膜上に阻害蛋白が存在するものと考えられる。阻害蛋白は5'-nucleotidaseの活性中心にあるmannose残基をcoverするように存在し、 K_m を上昇させ、ConAと競合するものと考えられる。酵素の精製過程(第二次硫酸処理)にて阻害物質は除かれ、同じ精製酵素が得られよと考えている。

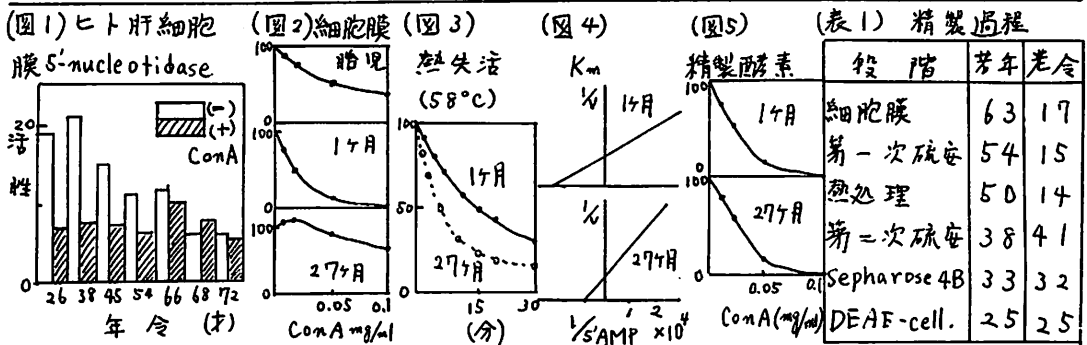
〔結論〕 肝細胞膜上5'-nucleotidaseは老化により5'-AMPの親和性、ConA阻害度の低下を来したが、精製酵素では老化による変化は認められなかった。細胞膜上に糖蛋白をmaskす形で阻害蛋白が存在する可能性を示唆した。

〔文献〕 1) Mathies, M.L., et al. J. Gerontol. 28, 425, 1973.

2) Song, C.S., et al. J. Cell Biol. 41, 124, 1969.

3) Nakamura, S. Biochim. Biophys. Acta, 426, 339, 1976.

4) Widnell, C.C. and Unkeless, J.C., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 61, 1050, 1968.



○森田育男・室田誠逸（東京都老人総合研究所 乗理）

生体には、その恒常性を維持するために、様々な化学物質が存在している。プロスタグランジンは、そうした化学物質の中で、最近特に注目を集めている物質である。プロスタグランジンは、生体組織に広く分布し、心血管系、内分泌系、神経系など生体内のほとんどのすべての臓器に対して、強い生理作用を及ぼしている。プロスタグランジンの前駆体であるアラキドン酸は、リン脂質に結合した状態で存在し、細胞膜中に常時貯えられていることが分っている。そのホルモンや神経等による刺激が加えられると、ホスホオリパーゼが働いてアラキドン酸が遊離し、それは更に細胞内のミクロソームに存在する一連のプロスタグランジン合成酵素によって種々のプロスタグランジンへと代謝されていく。プロスタグランジン合成酵素は、生体内のあらゆる組織に存在し、必要に応じて、直ちにプロスタグランジンを合成し、細胞外へ放出する。プロスタグランジンは、極く微量で著明かつ多様な生理活性を示し、また種々の薬理作用も合わせて持っている。プロスタグランジンの生成—作用—分解は、極めて短時間で終わられ、局所的に合成されて、局所的に作用し、その場で分解されるのが、プロスタグランジンの特徴となっている。

プロスタグランジンは、さらに生体における神経伝達物質の調節をも司っているといわれ、細胞膜を共通の媒体として情報伝達の2大主要経路であるホルモン経路と神経経路との接点に位置する物質といわれている。このことから、プロスタグランジンは、細胞機能の調節因子であり、生体の局所環境を整え、かつ生体の恒常性を維持するのに大変重要な役割を演じている物質である。

一方、生体は、老化するにしたがい神経やホルモンのバランスの失調が起こり、その結果、更に老化が促進される。

そこで、演者らは兩者の間に介在するプロスタグランジンに注目し、肝臓におけるプロスタグランジン合成能の加齢に伴う変動ならびに、プロスタグランジン合成酵素の誘導に及ぼす加齢の影響を調べることとした。

〔実験方法〕 動物：前日より絶食させたKSD系雄ラット（2～110週齢）を用いた。酵素源：肝臓をリン酸緩衝液（pH 8.2）でホモジナイズ（組織湿重量と緩衝液の比、1:2.5, W/V）し、そのホモジネート、およびミクロソーム分画（105000 Xg, 沈澱）を用いた。PG合成活性の測定：¹⁴C-アラキドン酸を基質として使い、酵素液と37°C、30分間振盪し、反応を行なわせた。反応終了後、塩酸で反応液のpHを3に下げたのち、酢酸エチルを用いて、¹⁴C-標識反応生成物を抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分離後、各生成物の放射能を測定した。

〔結果及び考察〕 ①実験系の確立：均一な組織として肝臓を選び、そのプロスタグランジン合成酵素活性を検討した。ミクロソーム分画をアラキドン酸と反応させると、2つの生成物が得られた。この物質を抽出し、メトキシ化—トリメチルシリル化を行ったのち、ガスクロマトグラフィー—マススペクトロメトリー

で分析した結果、1つは、プロスタグラン
 デインF_{2α}であり、他の1つは、プロスタ
 グランدينE₂ であることが同定された。
 また、その他のプロスタグテンインは生
 成されなかった。

Fig. 1

②ラット肝ミクロソームにおけるプロス
 タグランدين合成酵素活性の加齢による

変動: 種々の週令におけるラットの肝ミク
 ロソーム中のプロスタグランدين合成酵
 素活性を Fig. 1 に示した。本酵素活性は
 2週令より、72週令までは、ほとんど変
 動が認められなかったが、それ以降、徐々
 に、活性の低下することが認められた。しかし、プロスタグランدينF_{2α}とE₂が
 それぞれの生成率には、変動が認められなかった。

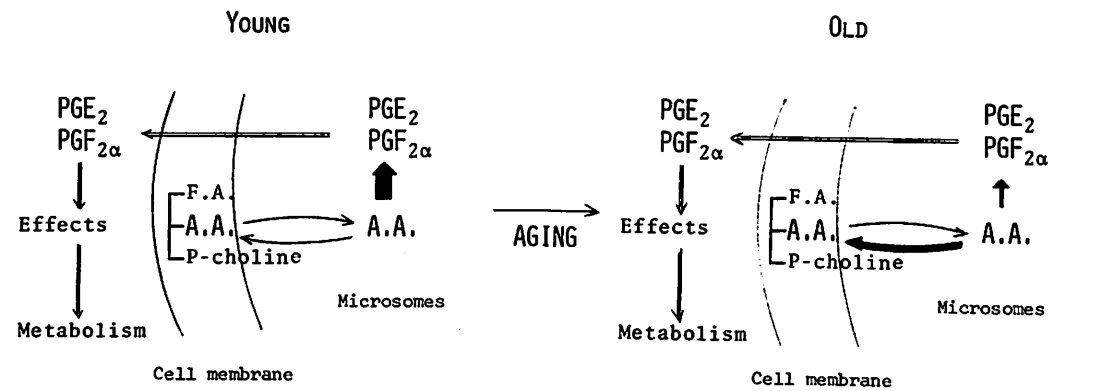
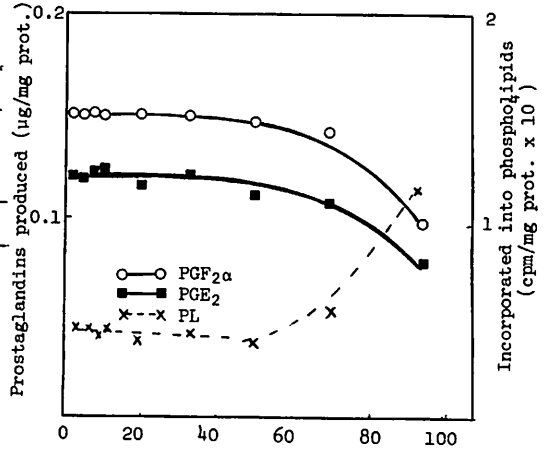
一方、アラキドン酸のリン脂質への取り込みを調べると、プロスタグレン
 合成酵素活性とは逆の傾向、すなわち加齢に伴い、リン脂質への取り込みが上
 昇することが認められた。

このことは、生体におけるプロスタグランدين合成の老化に伴う減少の原因が
 酵素活性の減少という直接的な原因の他に、基質が利用されにくくなるという間接
 的要因も、加味されているという事を示唆している。

③プロスタグテンイン合成酵素の誘導の加齢による変動:

薬物代謝酵素誘導物
 質を用いたプロスタグレン合成酵素の誘導に及ぼす加齢の影響を調べた。フェ
 ニバルビタール (8 mg/100g body weight, i.p.) 投与6時間後に肝臓からアラ
 キドン合成酵素活性を測定したところ、8週令のラットでは、フェニバルビタール
 処理により有意の活性上昇が認められたが、95週令のラットでは、ほとんど活性
 上昇は認められなかった。

このことは、老化するにしたがって、外から加えられる刺激に対する生体側のプロ
 スタグランدينを介した反応が、次第に、鈍くなる事を示唆する。



腸内細菌叢と老化 — 通常及び無菌ラットにおける十二指腸粘膜
アルカリホスファターゼの加齢による質的变化

○石井孝考・河合康雄・務台方考 (ヤクルト研究所)

〔目的〕 腸内細菌叢は胆汁酸やコレステロールの代謝、アミンやアンモニア代謝、薬物代謝等に関与し、ヒトの生体内の変化や病気例えば高脂血症、動脈硬化症、消化器、所臓、隣臓等の臓器疾患、感染症等に関係するといわれる。これらのことから、腸内細菌叢と生体の相互作用を、より深く理解するための研究が必要であり、その発展あるいは連続的問題として腸内細菌叢と老化ということがあらうと考え、何故なら、ヒトの諸機能の加齢による変化も、腸内細菌叢の生体に対する影響も唐突なものではなく徐々に進むと考えられるからである。即ち加齢と共にヒトの諸機能が変化し、それに密接に関係しつつあるいは原因とは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と、また腸内細菌叢が加齢により変化しなくても、その代謝産物の生体に対する影響の仕方が加齢によって違ってくることは十分に予想されることである。そこで従来ならば、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(CV)、人工菌叢ラット(GB)、及び無菌ラット(GF)を用いて、腸内細菌叢と加齢の影響を消化管及び臓器の酵素活性により調べ、昨年の本研究会で報告した。特に十二指腸アルカリホスファターゼ(ALP)活性はどの日令でもGFが最も高く、次いでGB、CVの順であり、CVで著しく活性が抑制され、腸内細菌叢の影響がみられた。加齢の影響はGF、CV、共に35日令が最も高く、GBでは25日令が最も高かった。GFと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った。CV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った。このように十二指腸ALPは腸内細菌叢によっても、加齢によっても量的に影響を受けていることがわかった。

本実験では十二指腸ALPが腸内細菌叢により、加齢により質的に影響を受けているかどうかを検討するために、8週令のGFラットとCVラットと40週令CVラットより十二指腸ALPを精製し、酵素序の性質を比較し、腸内細菌による変化と加齢による変化を考察する。

〔方法〕 Fischer/344 Yit (♂) 8週令(15匹)と40週令(10匹)のCVラットと8週令のGFラット(12匹)をAM 9:00-11:00の間に断頭屠殺した。小腸をとり出し、3部位にわけた。十二指腸をそれぞれに、氷冷した2.5% MgCl₂を含む50 mM Tris-HCl緩衝液中に入れ切り開き注意深く内容物を除いた。粘膜細胞をカミソリの背中で静かにかきとり、すぐに4倍量の氷冷緩衝液中に移し、テフロンホモゲナイザーで均一化した。ホモジネートを850×gで10分間遠心した。その上清に等量のn-ブタノールを加え、75分間振盪した。作らしたエマルジョンを15000×gで30分間遠心し、水層を得た。水層を18時間緩衝液中で透析した。次に硫酸分画を行ない40%-60%飽和画分を得、18時間緩衝液中で透析した。濃

縮後、セフアデックスG-200カラムにより、ゲルろ過を行な、E. 活性画分を濃縮後、DEAEセルロースカラムにかけ、0-0.2MのNaClでALPを溶出させた。

〔結果〕 8週令と40週令のCVラットからのALPは、セフアデックスG-200の精製段階で2本のピークに分かれた。(ALP-CV8 peak I, ALP-CV8 peak II, ALP-CV40 peak I, ALP-CV40 peak II)。対照的に8週令のGFラットからのALPは単一ピークであった(ALP-GF8)。ALP-GF8は60倍に、ALP-CV8 peak Iは60倍に、ALP-CV8 peak IIは103倍に、ALP-CV40 peak Iは29倍に、ALP-CV40 peak IIは80倍に精製された。精製したEの酵素標品をディスプレイ泳動により単一の蛋白バンドを示した。泳動度(Rf)は、ALP-GF8; 0.2, ALP-CV8 peak I; 0.16, ALP-CV8 peak II; 0.2, ALP-CV40 peak I; 0.16, ALP-CV40 peak II; 0.2であった。

基質特異性: ALP-GF8とALP-CV8 peak IIはphenylphosphateに対して、ALP-CV8 peak Iはglucose-1-phosphateに対して基質特異性が高かった。

アミノ酸添加効果: 5種の酵素標品とも種々のアミノ酸添加により活性に影響がみられた。L-cystine, L-cysteine, L-phenylalanineとL-leucineは強い阻害効果を示し、glycine, L-homoarginine, L-prolineの阻害効果はめだめらなかつた。

2価イオンの効果: ALP-CV8 peak Iは、0.2mMのMnCl₂, ZnCl₂, CuCl₂, CoCl₂, CaCl₂, により阻害をうけた。ALP-GF8は0.2mM MnCl₂により、ALP-CV8 peak IIはMnCl₂とZnCl₂により阻害をうけた。

K_m値: p-nitrophenyl phosphateに対するK_m値はALP-GF8; 0.10mM, ALP-CV8 peak I; 0.09mM, ALP-CV8 peak II; 0.16mMであった。

〔考察〕 このように十二指腸ALPは腸内細菌叢により加齢により量的に変化を受けると、また腸内細菌叢により質的な変化をうける。今後、40週令のGFラットのALPを精製し、酵素化学的性質を調べ、CVラットのALPと比較を行ない、80週、120週と更に加齢の進んだラットのALPの量的な変化、その他の酵素活性、代謝産物等の測定を行ない、腸内細菌叢と老化の研究を追求したいと考えている。

○野沢剛(国立療養所比良病院) 島崎弘幸(帝京大学医学部生化学科)
河北成一(滋賀医科大学一内科) O.S. Privett (Minnesota大学 Hormel研究所)

LDHは多分子型を持つ酵素としてこれ迄広く研究されて来た。亦この酵素は解糖及び酸化代謝経路の中央に位置を占め代謝変化に敏感に反応し反応する。加齢は組織のLDH活性に対して僅かに影響を及ぼすに過ぎないようであるが一方LDH Isoenzyme に対しては食餌組成、組織の酸素張力等、老化に重要である多くの因子が影響を及ぼすという報告はあり、LDH Isoenzyme の加齢による変化は当然予想される。今日はラット組織、心、肺、肝、脾、腎、大動脈、骨格筋、に於けるLDH Isoenzyme の加齢変化を調べた。次に腎臓にはH及びM subunit の Tetramer から成る5つの Isoenzyme に加えて、C subunit の Tetramer から成るもう一つの Isoenzyme, LDH_x の存在する事が明らかになつて来る。LDH_xは受精に際して特異な役割を演ずる。この事からLDH_xの加齢による変化は、当然考えられ、実陽にこの変化の存在を示した。亦この分画に及ぼす脳下垂体除去の影響を検討した。前記の如く、加齢が多くの組織に於いてLDH Isoenzyme pattern の変化を及ぼす事は考えられ、その変化が血清に影響を及ぼす事は予想される。本研究に於ける加齢変化は、3, 8, 46, 100週令の雄SDラット(Sprague-Dawley strain)を用いて検討された。

[実験方法]

動物飼育及び材料の作製: 体重約50gのSD系ラットを5匹づつ4群に分け、普通食餌にて、3, 8, 46, 100週令飼育後、エーテル麻酔下で採血し、臓器(心、肝、肺、腎、腎丸、脾、大動脈、骨格筋)を摘出し、沖生食で洗滌した後、 -20°C に凍結保存し、2週間以内に実験に用いた。血清は分離後直ぐに測定を行なった。組織サンプルは各組織の20~50mgを冷0.25M蔗糖と20% w/vに加え、ホモジナイズし、5000×g、 0°C で10分内遠心分離して、得た上清を用いた。上清は分離後直ぐに測定に用いた。脳下垂体除去(Hypophysectomy)実験では、5匹の脳下垂体除去ラット及び5匹のコントロールラット(何れも雄SD系)を用い、腎丸のLDH_xに及ぼす影響を検討された。ラットは3週令にて脳下垂体除去が行なわれ、更に3週間普通食を与え、エーテル麻酔下で臓器の摘出が行なわれた。(主後6週)その後の処置は加齢実験と同様に行なわれ、サンプルが作られた。

LDH Isoenzyme 分析: LDH Isoenzyme は Wiene の変法(吉田氏法)による寒天電気泳動法に準じて分離された。即ち、Barbital-HCl buffer, pH 8.4, ionic strength 0.05 と電気泳動の際の電極槽及び寒天ブロックと寒天板用の 4.8% Agarose-Agar gel (Sigma Agarose, a74g; Difco Agar Noble 0.06 g per 100 ml of buffer) を作る場合として用いた。寒天板は、25×75mm の microscope slide の上に2mmの厚に Agarose-Agar gel を塗布して作った。Whatman NO.1 口紙片(1.5×5mm)に組織抽出液を浸み込ませ、各寒天板の中央より、1. 陰極寄りには2枚並べて置き、更にその活性濃度に応じて量と調節して、マイクロシリンジにて浸み込ませた。組織抽出液では3~6 microliter の範囲となつた。血清の場合の口紙片は、2×12mm で、これに40 microliter の血清を浸み込ませた。その後、約30分 4°C の冷やう庫の中

に放置した浸泳動槽中に入れた。電気泳動はスライド4枚で、60 mA の足電流下で行な
った。60~90分を要した。染色は、15~60分間(血清の場合は120分間) 37°C のフラン
素中で、以下の染色液に浸した。Tris-HCl Buffer, pH 7.4, 0.05 M, 3.4 ml; KCN 0.06 M, 2.7 ml;
Sodium lactate 2 M, 2.2 ml; Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), 24 mg; Nitroblue tetra-
zolum (NBT), 18 mg; Phenazine methosulphate (PMS) 30 mg/dl, 3.0 ml。この後、固定脱
色、水洗、乾燥の処置を順次行なった。分離された各 LDH Isoenzyme 分画の割合は、Transdyne
RFT Scanning Densitometerにて、570 nm の波長で測定した。H 及び M subunit の割合は、
Helling-Larsen and Anderson に従って計算された。有意差検定は、Student's *t* test によ
り行なった。血清 LDH 活性は、Berger and Broida の比色法により測定された。

〔結果〕

組織 LDH Isoenzyme pattern は、4群に分れた。第1は肺に代表される如く、M subunit の割
合の高い群、第2は心の如く、H subunit の高い群、第3は H 及び M subunit の割合がほぼ同程
度の群、第4は前3群と異り、特異な経過をたどる組織で、大動脈がこれに属する。第1
群の M subunit 及び第2群の H subunit は、3週より46週迄増加し、100週で減少した。第
3群では H 及び M subunit の加齢変化は見られなかった。第4群に属する大動脈の加
齢変化は特異で、M subunit は、3週より8週迄増加し、46週ではすでに減少し始め、100週
では更に減少した。

腎臓の異常分画は、LDH₄とLDH₅の両に移動度を持ち、LDH_xと呼ばれよく知られてい
る。LDH_xの割合は、3週より46週迄増加し、100週で減少した。前脳下垂体除去は、LDH_x
の消失を示した。

ラット血清の LDH Isoenzyme pattern で特徴的なのは、3週令の幼若ラットの場合を除いて
LDH₅の割合が他の分画に比べて高い事である。LDH₅の割合が異常に高いので、各分画
の割合も出さずは不可能であった。しかし、Gymnogram から、加齢による LDH Isoenzyme の
変化は、明らかであった。LDH₁/LDH₂は、加齢により有意に増加を示した。前血清 LDH
活性の加齢による変化は認められなかった。

〔考察〕

組織 LDH Isoenzyme の加齢変化の第1及び第2群では、夫々の群に特徴的な subunit が成長
期に増加し、老年期に減少を示した。これは成長期には細胞の代謝活性が高く、夫
の臓器に重要な subunit の増加が必要となり適応反応を示したと考えられる。腎は、皮
質髄質、更に乳頭部で LDH Isoenzyme pattern が異なる。よって加齢による LDH Isoenzyme pattern の
変化は、この組織の質的機能変化を反映してはいる。大動脈では、M subunit が8週迄増加
し、46週では既に減少傾向を示している。これは、大動脈では、生物活性の頂点が他の臓
器と比べて早く到来する事を示しているのかも知れない。

LDH_xは期待された如く、46週迄増加し、100週で減少した。前脳下垂体除去ラットに於
いて消失した。老化動物に於ける生殖力の減退又は消失には、多くの要素が絡んでい
るが、前下垂体機能の減退→LDH_xの減少も原因の一つと考えられる。

血清 LDH Isoenzyme pattern は、加齢と共に変化した。特に LDH₂に対する LDH₁の割合が加齢
と共に増加した。この変化は、老化の parameter として、役立つかも知れない。

大岡 宏 (東京都老人総合研究所 生物学部)

甲状腺ホルモンの大部分は thyroxine (T_4) の形で分泌されるが、肝臓、腎臓等の組織では T_4 が脱ヨード反応によって triiodothyronine (T_3) に変る。 T_3 は T_4 に比べてはるかに活性が高いため、この反応は組織による甲状腺ホルモンの活性化反応であり、この反応の変動はその組織に対する甲状腺ホルモンの有効性の変化を示すと考えられる。本研究においてはラット肝臓、腎臓における *in vitro* での T_3 産生の活性が年齢とともにどのように変化するかを測定し、また寿命の延長に有効である食餌量制限を行なった場合のこの反応の活性をしらべた。

(方法) ウイスター系ラットを断頭によって殺し、肝臓、腎臓を氷冷して 0.1 M K-phosphate buffer (pH 7.4) 4 倍量を加えホモジエナイズし、その 0.5 ml に 0.01 ml の T_4 (10 μ g/ml), 0.03 ml の 125 I- T_4 (50 μ Ci/ml) を加え 37°C で 1 時間保温した。氷冷後 T_3, T_4 (0.5 mg/ml) を含むエタノール 1 ml を加え遠心し、上清のうち 0.05 ml をセルロース薄層クロマトグラフ (アビセル SF) で tert-アミルアルコール:2N NH_4OH =1:1 混合の上層を用いて展開し、ニンヒドリン発色後 T_3 のスポットを分離して放射能を測定し、展開しない遠心上清 0.05 ml の放射能との比をとり、ホモジエネートの代わりに buffer を用いて保温した値を差引いたものを T_3 産生活性とした。保温中に T_4 から生じる可能性があり、この系で T_3 に近い Rf をもつ tetraiodothyroacetic acid のスポットは T_3 のものと重ならないことを確かめた。各齢につき 3-5 個体の測定を行なったが、生後 6 日、13 日のものは全個体をまとめて一度に測った。

(結果) Fig. 1 に示されているように T_3 産生能は生後 13 日までは低い、乳離れ前に急激に上昇し 23 日前後に最高となり、その後は加齢とともに減少する。若いラットの血液を保温しても活性はほとんど認められないので、肝臓、腎臓の活性は血液貯留のためではない。23 日齢では肝臓の活性は雌雄で差がないが腎臓でははるかに雄の方が高く、成ラットでは肝、腎とも雄が雌よりやや高い活性を示す。ラット血液内 T_3 濃度の齢による変化は既に報告されているが、生後上昇して 20-30 日にピークとなるが加齢によって大きな減少を示さない。従って加齢とともに血中 T_3 のうち各組織によって生産されるものが減り、甲状腺から直接分泌されるものの割合が増加することが推論される。

生後 21 日の雌ラットを 1 日 3g の飼料 (正常の 1/3) で飼育すると体重はほとんど増加しない (Fig. 2)。1 月後に再び充分な飼料を与えると急激な成長が起る。このとき肝臓、腎臓の T_3 産生能を測定すると、食餌制限によっては対照と差がみられないが、制限を解除した時に急激な上昇がみられた (Fig. 3)。既に活性が低下している 3 月齢のラットを 1 月の間正常の 1/3 (6g/日) 給餌して再び充分な飼料を与えた場合には T_3 活性の上昇は起らない (Fig. 4, 5) ので、この現象は活性がまだ高い未成熟ラットに食餌制限を行なうことによっておこると考えられる。

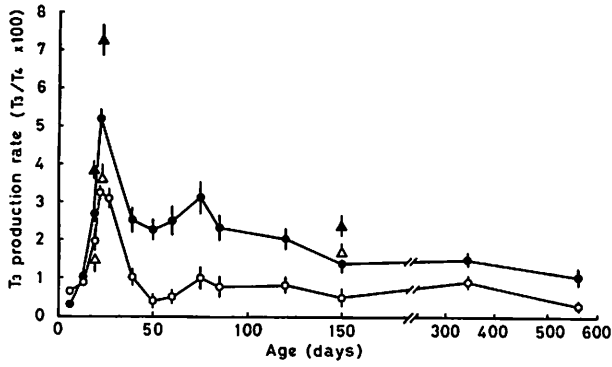


Fig. 1 ○ liver ● kidney ◻ liver ▲ kidney

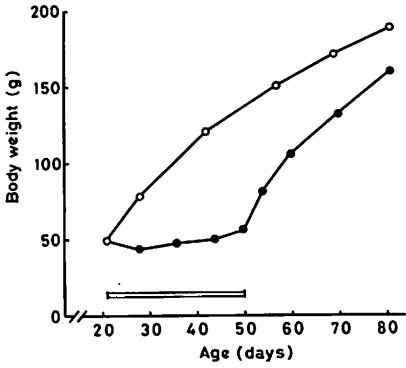


Fig. 2 ○ control ● food restricted (≡)

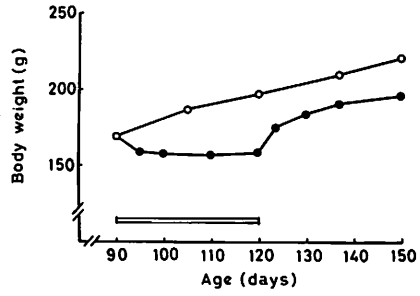


Fig. 4 ○ control ● food restricted (≡)

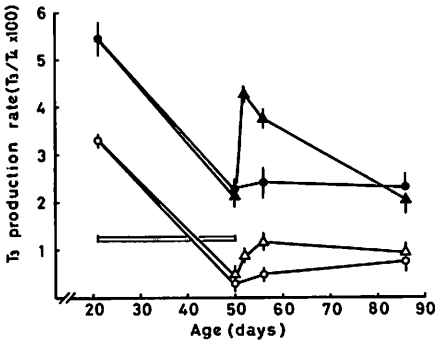


Fig. 3 control ○ liver ● kidney
food restricted (≡) ◻ liver ▲ kidney

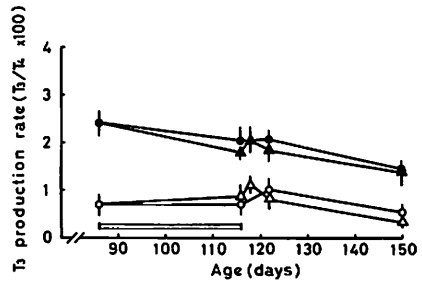


Fig. 5 control ○ liver ● kidney
food restricted (≡) ◻ liver ▲ kidney

遠藤敏 大津英二 大木厚 伊藤久男 松沢大樹

(東北大学 抗酸菌病研究所 放射線医学部門)

肥満は近年の経済成長に伴い急増しつつあり、資源、公害の問題とともに、人間の本質にまで立ち帰るべき問題をも含むように思われる。我々は、自家薬物とも呼ばれるプロスタグランディンE(PGE)系が脂質代謝変更機序を通じて肝がんの脂肪酸生合成制御や、M1細胞(コレステロール合成能の欠損する事象を見出した)の増殖制御及びFc抗原の発現にも寄与することを明らかにしてきた。同時に肥満でPGE系が低値を示すことを東北地方生化学会(一昨年)や「エイジングにおける生体保持機構の発達とその破綻」シンポジウム(日本晩発効果研究グループ主催昨年)でも発表して来た。

今回は、正常値を含めた中年女性についてのLP資料、57例(新八木法をKatsura-Broca Index、血圧、脂質分画等をふまえて適用)を紹介したい。LPは加齢と共に血漿中に蓄積し、肥満度にも比例して上昇した。高値を示したのは、高コレステロール及び高血圧合併群であった。肥満に高血圧が合併すると虚血性心疾患が著しく高頻度になるという我々の人間ドックデータは、恐らく代表的肥満減食療法パターンに伺えるように、LPの膜系殊にサイクリックヌクレオチドフォスホジエステラーゼに対する損傷作用により説明されることが知られてきた。LPの肥満動員パターンは劣性遺伝肥着ラット(fa-fa系)においても証明された。現在、高血圧や加齢モデルを導入して、PGE系とトロンボキサン合成系の分岐点の酵素探索をpH基、昇圧物質との関連で追求中である。

小山内 史

(東京都老人総合研究所・生物学部)

昆虫は、小型で、一般に飼育と取扱いが容易であり、遺伝品種も豊富である。その上、一時に多数の個体を取扱うことも可能で、統計学的処理を施し易いことや、寿命が短いことと共に、成虫が、脊椎動物等の分裂終了細胞モデルとして取り上げることができると云った、加齢と老化のための実験動物としての数々の長所と特色を具えている。こゝに扱った蚕の成虫は、以上の他、羽化後、口器の退化のため、全く摂食することはないので、寿命がとりわけ極めて短かく、しかも、生化学的にみて、ガス交換を除き、一種の閉鎖系と見做し得るので、生体の一つの極限化された形として、限定された量の蓄積物質で、どのように生存するのかわかることは大変興味深い。用いられた品種は日124 X 支124のF₁で春蚕と秋蚕の成虫を材料に供した。

春蚕成虫は大きく、その体重は秋蚕成虫の体重の1.4倍もあるが、適温(25°C)飼育では、寿命の季節の相違を余り示さず、平均寿命は、春蚕雄蛾で10.1±4.6日、雌蛾で9.0±3.4日、秋蚕雄蛾で9.9±4.5日、雌蛾で8.7±5.4日と、幾分か春蛾の方が長命の傾向が見られるのに留まった。最大寿命は、春蛾雄16日、雌17日、秋蛾では、雄15日、雌17日で、殆んど差がなく、雌の方がいずれも雄より1乃至2日長命であった。25°Cで飼われた蚕蛾に比して、高温下飼育では短命となり、35°Cでは、略50%まで平均寿命の短縮がみられた。これに反して、低温(4°C)に置かれた蚕蛾は、適温下飼育より約5倍の延命効果を示した。

生存曲線は適温から高温に在るに従い、勾配は急となり、35°Cでの曲線は極限に近い。最大寿命を示した個体の死亡時体重のレベルは、25°C及び35°Cまでの高温処理では変わらず、一定の値を示す。体重低下曲線も高温に在ればなる程、傾斜が急になり、35°Cで極限に近づく。以上の結果から、蚕成虫の全ての代謝や生活速度は、30°Cや35°Cの如き、40°Cを越えない生理学的高温条件下では、明らかに促進され、その結果、寿命の短縮化を惹き起していることが分る。しかし、低温条件下では、単純に代謝過程の緩やかな阻害という理由のみで、寿命の延長が行われるとは考之難い。低温下飼育での生存曲線は、日齢のスケールを1/5に縮尺すれば、適温下飼育のものと一緒に一致するように見えるが、最初に死亡する個体の出現時期は甚だしく遅れるし、又初期の体重の減量速度は低温下の方が適温下より小さい。これらの事実は、羽化直後の急激な代謝の変化の存在を示唆する。

最大寿命を示した個体のうち、4°Cで飼われた雄は、死亡時体重の減りのレベルが、羽化時体重の27.2%(A)、雌は57.2%(B)と夫々示し、適温下飼育のは、雄が56.1%(C)、雌が85.6%(D)であった。即ち、4°C飼育で死亡した蛾の最終体重のレベルは、雄雌共に、決して適温下の体重レベルにまで低下することがない。このことは、体重の経日的減少が、体内基質の酸化燃焼による物質の減少によるものと見做せば、低温下飼育による蛾は、体内に蓄積された全ての呼吸基質を消

費し尽す以前に死亡したことを意味する。云いかえりなら、基質を全て消費しなくとも、寿命が尽きて死に至ることを示した。尚、 4°C では、蚕蛾は殆んど運動しないにも拘らず体重の減量を未すが、体重の減りを体内エネルギーの消失と考れば、 4°C の雄の最終体重レベル(減った量としての)A、即ち、蚕の羽化時体重の約 $1/4$ は、蚕蛾の生存に必要最小限の代謝のために消費されたエネルギー相当の体重の減少、 $C-A=28.9\%$ 、及び $D-B=28.4\%$ 、即ち、全ての基質の量を含んでいる羽化時体重の約 $1/4$ 強は筋運動のために消費されるエネルギー相当の体重の減り、更に、 $B-A=30.0\%$ と $D-C=29.5\%$ 、即ち、やはり、羽化時体重の $1/4$ 強が、雌の産卵及びそれに附随した代謝のために消費されたエネルギーに相当する体重の減少量と見做すことができよう。つまり、蚕蛾は、少くとも、羽化時体重の $1/4$ に相当するエネルギーがありさえすれば、充分天寿を全うするまで生存することが可能で、 4°C では、 25°C における蚕成虫よりも、これだけのエネルギー消費で、約5倍も長生きすることができよう。

未交尾雌の産卵は高温によって促進され、産卵の初日と最終日は、いずれも早まり、全産卵日数も短縮するが、低温下では抑制され、産卵開始、終了共に遅延し、全産卵日数も著しく延長した。夫々の平均寿命当りの全産卵日数は、適温下飼育と高温下飼育とで、差異は殆んど見出せなかった。只低温においてのみ、これは適温下のものより小さな値を示した。蚕の成虫の生涯を群として揃えた場合、3つの死亡数の高まりが認められたが、才1のピークは羽化直後にあり、羽化直後に生ずる成虫成熟化のための急激な代謝の変化に適応できなかった個体の死に基づくものと考えられる。才2のピークは成虫の成熟に伴う死亡数によるもので、才3のピークが老衰に起因する死の増加によるものと考えられる。低温処理ではこれら各々のピークが明瞭に示されるが、適温下飼育では、好条件のため、死亡数が拡散して、3つのピークの存在は不明確になる。高温処理では、才2と才3のピークが融合して、全体として2つのピークを示す傾向がある。未交尾雌の産卵は、才2の死亡数増大のピークと一見関連あるかの如くに見えるが、低温飼育の場合では、産卵終了時より、才1の死亡数増大のピークが始まり、両者は全く完全に分離するので、産卵終了とそれに伴う死又は寿命の尽きに関する、直接の関係は認められなかった。

貴重な蚕を供与下さいました。東京大学農学部養蚕学教室、吉武成美教授に感謝の意を表します。

○ 奥木 実 鈴木利樹 (新老人研)

生体は与えられた環境に対して適応する能力を持ち、生体の機能に支障を来す要因が負荷を以てるときは、生体は恒常性を維持するために神経・内分泌・代謝などの内部環境を働かせて防衛反応を起すことができる。しかし、適応性は変化の現われ、恒常性が維持されなくなる場合には、さうさうな障害が現われる。これらの死生学的秩序解明の手がかりを得るために、食料制限によるストレスの条件と長期にわたって存続し、あるいは動物反復したときの生体への影響を追求した。

方法：動物はC57BL/6、飼育密度 22±2℃、湿度 60±5%、照明は18-20時、D 20-8時の12時間間隔の明暗とした。ケージはボリカーボネート製個別式、毎日一定時刻に給餌、飼料は市販固形飼料を3.5g、3.0g、2.5g、2.0g及び1.5gの大きさに成形し給与した。給与量はC57BL/6マウス1日の自由摂取量を4gとして、その87.5%の3.5g、75%の3.0g、62.5%の2.5g、50%の2.0g、37.5%の1.5gを制限給与した。各給与群の成長速度を比較した。3g制限群は3週令、4週令、5週令、6週令、7週令時にそれぞれ制限を行なった場合の成長への影響、更に3g制限食に成長した後、270日令において2g及び1.5gに制限し、380日令に至ると再び3g制限食に充てた場合、380日令の3g制限群を自由食に変更した場合の成長への影響を調べた。

各種制限食群において、体重、体長、尾長、尾太、水、飼料摂取量を計測、骨格については50from軟X線撮影を行ない、胸骨、肋骨、前肋骨、脊椎、肋骨(相圖)腹骨、肩胛骨、鎖骨、上腕骨、尺骨、大腿骨、脛骨及び尾椎を計測した。動物は無麻酔心臓位に固定、全身、四肢及び尾と直線下に伸ばす。照射条件は、27.5KVp、5mA、60sec、FFD 545cm、富士軟X線用フィルムF45を用いた。現像は20℃ 5min。

結論：成長の速度は食料制限量と相関する。自由食群は120日令まで急速な成長を示し、約40gに達し、以後体重の増加を続け、270日令には50gを超え明らかに肥満を現出したが、これに対して3.5g制限群は360日令において体内脂肪49.0g、ついで3.0g群は35.0gとなり、2.5g群は23.0g、2.0g群は20.5g、1.5g群は14.5gに止まった。3.5g群を除いてはいづれの制限群も成長は横ばい状態となり、群間の交叉はみられなかった。食料制限開始の時節を異なした場合、3週令のものは生体の体量を増加するが、それより成長の速さは4週令、5週令、6週令及び7週令のものは、いつたん体量を減少した後、再び体量を増加し、100日令には各群ともほぼ同値の20gの体量に達し、群間の差は消失した。270日令の3g制限群と2g制限に変更すると次第に体量を減少し、350日令までの80日間この3週令より2g制限した群と合流、32.5gから22.0gに至る。同時期に3g制限群と1.5gに制限すると、315日令の45日間この3gから19.0gに減少、両群共にそれ以上の体量を維持して横ばい状態を続けた。しかし、380日令

2.3g制限量に達した場合とは、肉が体重に上昇し、450日全には3g制限群に合流し2.5gに達するが、1.5gに制限した元のは完全には3g群の体重には及ばず、約2.0g位の体重を維持した。一方は、380日全に2.3g制限したものの自由食に誘受すると、次第に体重を増加し460日全までの80日間の約7g増加分、420gに達した加、以後減少し、380gとほぼ同程度の体重となり、自由食群の体重には到らなかった。自由食群の飼料摂取量は5週分以後480日全には全日元1日約4gを示した。水消費量は自由食群、3.5g及び1.5g群はほぼ安定しているが、2.0、2.5及び3.0g制限食群は著しく増加し、5日間の消費量は4~8ml、そのうち1は10~12mlに達した加、250日全以後安定した約4mlを示した。

骨幹制限による体形への影響をみると、自由食群の成体全の体長が10.01cmに達し、3.5g~2.5g制限群は9.32~9.44cm、次いで2.0g制限群の8.60cm、1.5g制限群は最も小さく7.92cm、群間の差が明らかなのであり、尾長は自由食群の9.40cmに達して2.0g群の8.95cm、1.5g群の8.60cm、尾長以外の自由食群の0.36mmに達して1.5g群の0.27mmが差を示した以外に明らかな違いはみられない。3.0g制限と2.5g制限及び1.5g制限に誘受して105日目(380日全)の体形をみると、尾長の量化はみられないが、体長は明らかに減少した。したがって、尾長/体長の比率は、尾長の体形を示した。

骨幹制限による骨格への影響をみると、骨格の部位による影響の受け方が異なる。最も著しいものは肋骨(胸骨)で自由食群の3.25cmに達して、3.5g~2.5g制限群は2.95~2.98cm、2.0g制限群2.28cm、1.5g制限群1.95cmを示し、次いで体高が明らかなので、群間の差は制限量と相関を示した。頭骨及び頸骨幅は2.0g及び1.5g制限の場合の工夫に制限量が著しいものの影響がみられないが、鎖骨、上膊骨、尺骨、大腿骨、跗骨の長さには明らかな量化はみられなかった。

考察: 各種食料量制限による成体は制限量と相関し、明らかな差異がみられ、しかも、僅かに体重の増加を示すものの殆ど個々の状態を示し、各量の間には完全に併存し縮まることはない。また、成体の初期における食料制限による一過性の体重減少と増加は、制限量に適應した成長によって、生活の構造・機能に恒常性が形成されることを推測し得るのである。しかし、3g制限群と2.5・1.5g制限に誘受した場合とは、肉が3g制限に達した場合に体重が優越する。しかも、その結果から一定の体重を維持する能力は、可塑性が不利、可塑性である複雑な生活反応を示すものとなるが、この点の問題は今後の進歩に待たなければならないと考える。

○山本 清高、 近藤 貞、 大橋 望彦※ (東京都老人研、 生物、 ※生化、)

東京都老人総合研究所のプロジェクトチームによりヒト胎児肺由来の繊維芽細胞 (老人研細胞: TIG細胞) が樹立された。 老化研究のために正常繊維芽細胞を用いる場合には正確な継代数を知ることが絶対必要である。 したがって、細胞の凍結融解条件の設定に際し、細胞生存率のみならず細胞の培養器への付着率を知ることが必須となるので、細胞の凍結保存法の確立が必要となった。 従来、細胞の凍結条件については、いろいろ示唆されており、細胞生存率についての報告はあるが、実際に培養器への付着率を調べた報告は少ないので、細胞の凍結融解条件を細胞生存率と培養器への付着率との両面から比較検討した。

TIG細胞は19~25代の若い細胞を接種し7日後 (定常状態となる) に使用した。 細胞の凍結融解条件は基本的にはHayflickの方法に従った。 すなわち、凍結のための培養液 (凍結液) はdiploid用のEagle basal medium (BME) に10%牛胎児血清 (FCS) と10%グリセリンを添加したものをを用いた。 凍結条件は1.2ml ガラスアンプルに1 ml 細胞懸濁液を入れ、4°C、3時間後にスローフリージングシステム (日本ユースサイエンス社製) を用いて1°C/分で-35°Cまで凍結した後、液体窒素に保存した。 融解条件は40°C液中で融解した後、37°C、15分後、アンプルカットを行ない、培養液 (BME-10%FCS) で希釈後、凍結液中に含まれているグリセリン (あるいはジメチルスルホキシド) を除くため遠心分離した。 培養液5 ml を添加し、細胞を懸濁し、一部分 (0.4 ml) を用い0.1%ニグロシン液で細胞生存率を計算した。 残りはFalcon dish (60 mm径) に移し、37°C、5% CO₂ - 95%湿度空気中で16時間培養した。 培養器に付着した細胞数を数え回収率 (細胞付着率) を計算した。

細胞凍結保存に影響を与える因子として 1. 凍結条件 (凍結液、および凍結速度) 2. 融解条件 3. 細胞濃度、および増殖状態 が考えられる。 最初に、細胞凍結液の検討をした。 グリセリン濃度は10%、15%、20%、30%で比較したところ、細胞生存率は10%~20%グリセリンで大差なく (82~85%)、30%グリセリンの時は52%と低下した。細胞付着率は15%グリセリンの時に最も高く (38%)、次いで20%、10%のグリセリンの順となり、30%では最低 (8.6%) を示した。 血清濃度も同様、10、15、20、30各%で比較した。 細胞生存率 (88.3~83.1%)、細胞付着率 (49.4~31.2%) とも血清濃度30、20、15、10各%の順であった。 ただし細胞生存率は最大5%の差であるのに対し、細胞付着率は約20%の差となって表われた。 凍結速度は1°C/分の方が2°C/分よりも細胞付着率は高かった。 融解の際の加温は、40°C液中でアンプルを振って、より早く融解することが、40°C液中で静止状態で融解する場合よりも生存率、付着率を高めることに役立った。 室温でゆっくり融解することや、低温 (4°C) 液中で融解することは細胞の生存率、付着率に大きな悪影響をもたらした。 融解後の希釈・遠心までの時間の影響を調べてみると、融解後15分後に希釈し、37°C、15分後に遠心する場合が最も高い細胞付着率を示した。 融解後すぐ希釈し、すぐ遠心、融解後、37°C、15分後に希釈すぐ遠心、および融解後すぐ希釈、15分後遠心、のいずれの場合もほとんど同じ付着率であった (細胞生存率はいずれの場合もほとんど同じであった)。

細胞の増殖状態 (log phase と stationary phase) の比較では、細胞生存率はlog phaseの方が低い (80%に対し72%) のにもかかわらず、付着率はlog phaseの方が高かった (20%に対し47%)。

上記の方法はいずれも凍結液中に含まれているグリセリン等を除くために遠心分離していたが、この場合、遠心による細胞の損傷と損失が考えられるので、希釈のみの場合と比較した。 アンプル中の1 ml 細胞懸濁液を、5、10、および30倍に培養液で希釈し、遠心せずに接種した (30倍に希釈する場合はFalcon flask:F-25を用いた)。 この結果は5倍希釈が最も高い細胞付着率を示した (遠心の場合の約2倍の58%)。次いで10倍希釈、30倍希釈となり、いずれも遠心法より付着率は高かった (この場合も細胞生存率はほとんど変らなかつた)。

以上の結果から細胞付着率を高める条件とし

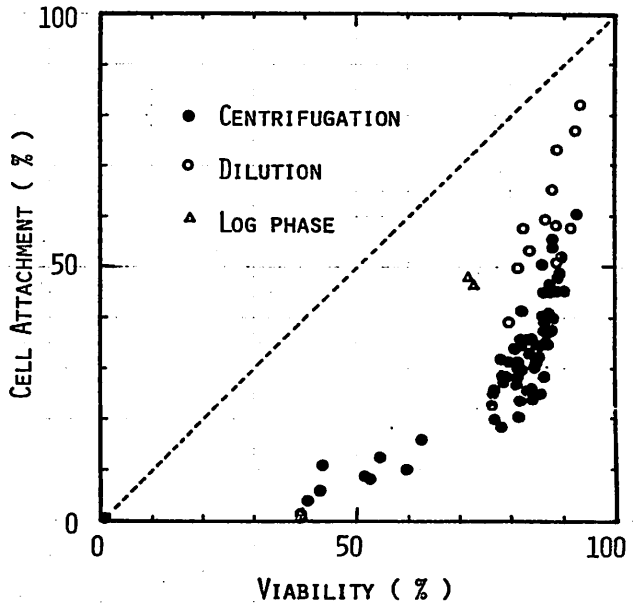
て、(1) 血清濃度 30% (2) グリセリン濃度 15% (3) 凍結速度 1°C/分 (4) 融解条件: 40°C 液中で振って、より早く融解し、融解後、37°C、15 分後に培養液で希釈し、15 分後に接種 (5) 希釈は 5 倍希釈 (6) 増殖状態は log phase (ただし log phase の条件は、いろいろな細胞周期にある細胞が混っており、凍結した細胞の継代数が不正確となる)。最後にこれらの好条件の組合せと、当初に用いた基本的な方法とを対比した。細胞付着率でみると選心法に比べ、希釈法がよく、基本的な方法より改良法の方がよかった。最高値は希釈法で、BME-30%FCS-15%グリセリンの時、約70%の付着率を示した(基本的な選心法では約30%であった)。--- 表参照。選心法でも BME-30%FCS-15%グリセリンの場合、約50%の付着率を示したので、2 dishes を1 アンブルに凍結すれば、継代数の変化は無視できる。細胞生存率でみると、希釈法で BME-30%FCS-15%グリセリンの場合のみ 90%を越えたが(91.5%)、それ以外は大差なかった。

以上のように、細胞の凍結融解条件を細胞生存率でみた場合、大部分は 80%台に入り大きな差は見い出せない場合が多かった。しかしなが

ら、細胞生存率がほとんど同じでも細胞付着率は有意差(20~70%)を示す場合があり--- 図参照、培養器に付着して増殖する正常2倍体繊維芽細胞の場合には、凍結融解の条件の設定に際し、培養器への付着率をみる必要がある。特に、老化研究に際しては、正確な継代数を知る必要から、細胞生存率のみで条件設定を行なうことは危険である。

	Viability(%)	Attachment(%)
Before freezing	98.2 ± 2.59	100
Centrifugation		
BME-10%FCS-10%Gly.*	83.1 ± 3.52	31.2 ± 7.73
BME-30%FCS-15%Gly.	88.8 ± 2.37	53.6 ± 4.69
Dilution		
BME-10%FCS-10%Gly.*	86.3 ± 2.49	59.7 ± 7.53
BME-30%FCS-15%Gly.	91.5 ± 1.74	68.8 ± 10.7

* According to Hayflick's condition



○松尾光芳, 加治和彦, 東京都老人総合研究所

培養ニワトリ胚線維芽細胞は, 培養ヒト二倍体線維芽細胞などととも, ガラス器内継代培養において一定の寿命を有し, 細胞老化のモデル系として, 種々の実験に使用できる可能性がある。しかも, ニワトリ細胞は, ニワトリ受精卵から得られるので, 何時でも安価に入手でき, その上培養も比較的容易であるという大きな利点を持っている。しかし, 培養ニワトリ細胞を, 老化モデルとして使用する場合に於いて, この細胞系について, 適切な老化パラメータを確立して行く必要がある。培養ニワトリ細胞の老化パラメータについては, 既に三つの報告があり, 細胞増加倍数, 細胞増加倍数, 細胞飽和密度, 細胞の大きさ, 若世代におけるDNA合成細胞の比率, 細胞サイズのDNA量, DNA量サイズの脂質量などの細胞老化にともなう変化が調べられているが, 未だ検討すべき問題も多く残している。我々は, 新たに, 細胞増加倍数, 多核細胞比率, 核の倍数性についての変化を観察した。さらに, 細胞飽和密度と細胞の大きさにについても調べ, 既報のデータと比較した。

〔方法〕細胞は, 白色レグホンの13日胚(頭部, 四肢, 内臓は除去)を0.2%トリプシン処理して得た。継代は, 一週一回隔, 0.02%トリプシン, 37°C, 5分間処理, 播種濃度 1×10^6 細胞/プレート, 60mmラックス・プラスチックプレートを使用している。培地は, 4%小牛血清, 10%トリプトース, 250 U/mlペニシリン, 50 µg/mlストレプトマイシン添加テミン療法イーグル培地を用い, 37°C, 5%CO₂-95%O₂中で培養した。培地交換は, 継代後3日目に行った。細胞数は, フォルマー・カウンタ型, 細胞溶積は, Z-17型により測定した。多核細胞は, ギムザ染色標品により, 投影型顕微鏡"Visopan"を用いて, 500倍に拡大して計数した。核のDNA量は, シッフ試薬処理細胞について, 走査顕微分光学分析を用いて, 核の大きさは, ギムザ染色核の投影面積を画像分析電算機"Quantimet 720"を用いて測定した。核の倍数性は, RNase, Pepsin処理による得られた核を, エチジウム・ブロミド染色し, パルス細胞光度計"ICP-11"による蛍光強度測定から求めた。

〔結果〕①細胞増加倍数; 異なる胚から得られた11細胞系の寿命を表に示す。各細胞系の増加倍数の変化の様相は, 初めの数世代の増加倍数が一定しているもの(A型)と初代以後増加倍数が指数関数的に低下するもの(B型)とに大別された。②細胞飽和密度; いづれの細胞系においても, 初代以後指数関数的に低下がみられた。このデータは, 若世代の飽和密度が一定しているとするMacieira-Coelho等(1972)の結果と異なり, ③細胞の大きさ; 細胞は, 継代が進むにつれて, 平均体積を増すが, 増加率は一定ではなく, 培養中期に急激に増大する。すなわち, 若細胞は, 等しく大きさを増すのではなく, 老細胞集団中にも, 若細胞と同様の小型細胞の割合が最も多い。④多核細胞; 細胞集団中には, 多核細胞の比率は, 細胞増加倍数の低下に比例して増大するようになり(図1)。オウ世代において約4%であった多核細胞は, 最終的に23%まで増大した。これは多核細胞のほとんどは二核細胞であった。⑤核の

倍散性；細胞のDNA量は、ガラス板上に固定された核の投影面積に、ほぼ比例することから明らかになったので、核の面積を測定することにより、細胞集団の核平均DNA量(核の倍散性)を決定した。平均DNA量は、初代から一定値を示したが、細胞倍加率が著しく低下した後には急激に増大した(図1)。この時期の細胞は、図2に示すように、2C, 4C, 8C, 16C(2ⁿ)の核を併存している。

[考察]調べられたニフトリ細胞の老化パラメータの中では、細胞飽和密度だけが、世代数に従って変化した。多核細胞の比率は、細胞倍加率の低下を反映して増大するようにみえる。核の倍散性と細胞体積の増大は、培養末期に急激に起こる。顕微鏡観察からも、巨大細胞は、多核や巨大核を併存することが認められるので、細胞体積の増大は、多核細胞や倍散体の増加に原因するものと考えられる。核の倍散性の増大は、多核細胞の増加に追随することや、老細胞集団の倍散性が2ⁿ型であることなどから、先づ多核細胞が生じ、ついで多核細胞中の核が融合することにより倍散体が生成する可能性が示唆される。最後に、細胞倍加率の变化について、A, Bの2つの型が見出されるという事実は、培養技術の不完全さを反映している可能性が考えられる。今後十分の検討が必要であろうと思われる。

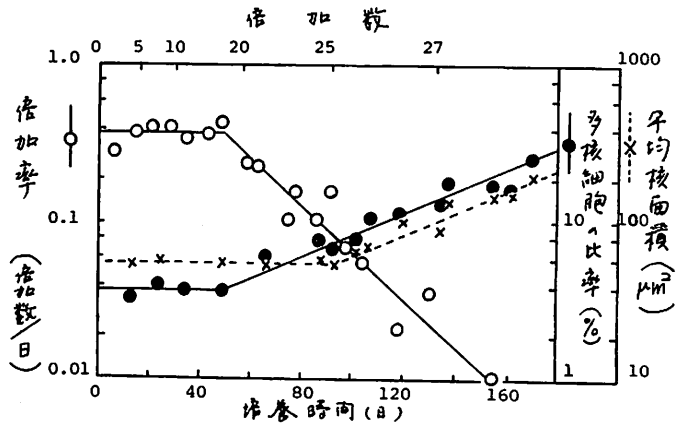
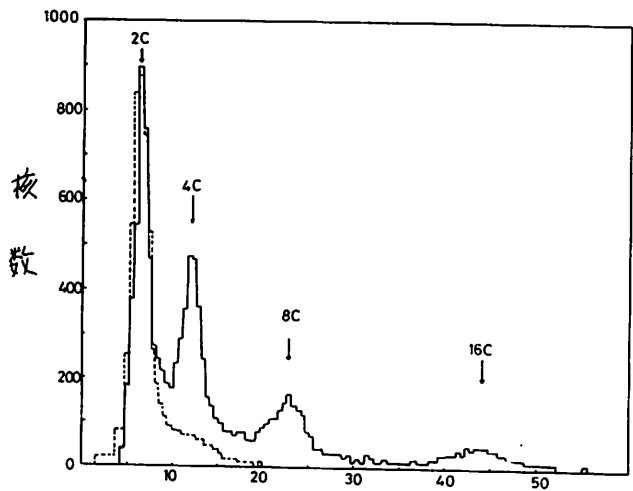


図1. ニフトリ細胞の増殖能, 多核細胞比率倍散性の変化

表. ニフトリ細胞系の寿命

型	細胞系	総代数	総倍加数	時間(日)
A	LC-1	18	27.0	131
	LC-3	17	27.9	160
	LC-4	14	20.3	105
B	LC-2	14	16.9	107
	LC-5	16	27.4	149
	LC-6	16	24.9	149
	LC-7	16	20.8	177
A	LC-8	14	17.2	132
	TK-11	16	20.3	127
A	TK-12	18	23.8	127
	TK-13	16	20.8	113

注: TK細胞系は、足の筋、厚みから得られた。



相対DNA含量
(-----若細胞, 17% PDC; ————老細胞, 100% PDC)

図2. ニフトリ細胞の倍散性の型

相沢慎一、三井洋司、栗本ま子、(東京都老人総合研究所)

先に我々は、ヒト2倍体繊維芽細胞の加齢に伴ない細胞表面で2種の変化の起ることを、コンカナバリンA (Con A) を介する繊維芽細胞への赤血球結合法により明らかにした。すなわち、繊維芽細胞表面のCon Aレセプター数には phase II及び phase IIIの期間を通して変化がなにも拘らず、予めCon Aでコートした赤血球の繊維芽細胞への結合(RC法)は、細胞の継代とともにほぼ直線的に増加し、図に示したI型の変化のパターンを示す。一方、未処理の赤血球の、Con Aでコートした繊維芽細胞への結合(cTR法)は、phase IIの期間を通して起らず、細胞集団が phase IIIに入るとともに起るII型の変化を示す。今日迄ヒト2倍体細胞の種々の性質について継代に伴なう変化が報告されているが、³H-TdR取り込み能、細胞サイズ、核サイズ、蛋白質量等々その大半は細胞集団の増殖速度の変化と対応するII型の変化を示すものである。これに対してI型の変化の例はこれ迄殆んど報告がなく、Bosman等による細胞胞気泳動度、中性蛋白分解酵素活性の変化が知られているのみである。しかしI型の変化を示す細胞の性質は、細胞老化の機構を考える上で、また細胞老化の指標としても極めて重要性が高い。今回我々は、ヒト2倍体細胞のRC法、cTR法による赤血球の結合能と、細胞の大きさ、細胞周期、分裂能力、metabolic ageとの関係を、異なる継代数の細胞集団中の個々の細胞の観察を中心に検討し、興味ある結果を得たので報告する。

(1)細胞サイズ：ヒト2倍体細胞は細胞サイズの面からみると不均一な集団であり、この不均一性は phase IIIに入ると著しく増す。細胞老化に伴う細胞サイズの増大は一般的な事柄があるが、個々の細胞の大きさが直接その細胞の老化度と対応しているかは未だ不明である。そこで我々は、同一細胞集団中の個々の細胞について、細胞表面積と細胞当りに結合する赤血球数の関係をRC法により調べてみた。その結果、継代初期の細胞集団中の大きな細胞は他の大部分の小さな細胞同様赤血球を結合せず、継代後期の細胞集団中の小さな細胞は他の大きな細胞同様赤血球をよく結合することが明らかとなった。即ち赤血球の結合量と細胞の大きさには直接の関係はない。

(2)細胞周期：細胞表面の性質は度々細胞周期により変化するこゝが報告されている。操作中に大部分のM期の細胞は天なわれるため、結果の解釈にM期の細胞の寄りは除外できるが、我々の結果も継代に伴い細胞周期の特定時期に止る細胞の頻度の増加にて、説明されるのかも知れない。PDL30の細胞集団について、1時間³H-TdR処理を行ひ、その後RC法により、標識された細胞とされなひ、その細胞について、赤血球結合能の差を調べてみたが、両者で殆んど差は認められなかつた。また細胞をcycloheximide, hydroxyurea処理しても、低血清培地(0.5% FCS)に40時間移しても、RC法での赤血球結合量に変化は起らない。PDL30の細胞集団にはcTR法での赤血球結合は前述の如く殆んど起らず、同様の薬剤処理等によつても赤血球

の結合は起らない。

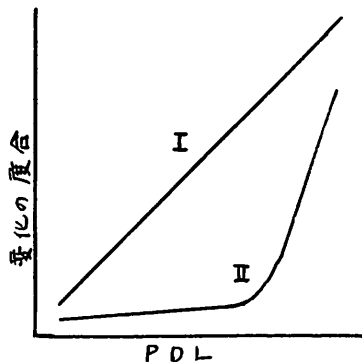
(3)細胞の分裂能：三井等によりヒト2倍体細胞はこの ^3H -TdR取り込み能の上から rapidly dividing cell, slowly dividing cell, nondividing cell の3つに区別し得ることが報告されている。しかし slowly dividing cell の意味、即ちこのような細胞はやがて nondividing cell に変わるべく運命づけられるか否かについては明らかでない。

①RC法：PDL30の細胞集団について、23時間 ^3H -TdR処理後RC法で個々の細胞について赤血球結合量を調べてみると、標識された細胞とされない細胞で殆んど差は認められなかった。PDL30の細胞集団中この条件下で標識されない細胞の大部分は slowly dividing cell と考えられる。従ってこの結果は、PDL30の細胞集団中の slowly dividing cell と rapidly dividing cell はRC法での赤血球結合能に差のないことを示している。PDL67の細胞集団についての同様の実験より、この集団中での nondividing cell と rapidly dividing cell にもRC法での赤血球結合能に差のないことが明らかにされた。

②CTR法：同様の実験をCTR法について行ってみると、PDL30の細胞集団中のごく少数のCTR法で赤血球結合能を有する細胞は、23時間 ^3H -TdRで標識されない細胞のある一部であることが示される。又PDL67細胞集団でCTR法での赤血球結合能を有する細胞は標識されない細胞であり、この条件下で ^3H -TdR取り込み能のある細胞には赤血球の結合は起らない。

(4) metabolic time：ヒト2倍体細胞の寿命は細胞が培養器内で通した時間 (metabolic time) によらず、細胞の分裂回数によることが知られている。トリアシン処理で継代することなく、週2日の液替で 37°C に10週維持し、細胞分裂の進行をおさえたPDL18の細胞について、この間にPDL38まで進んだコントロールの細胞とRC法での赤血球結合能を比較してみると、コントロールの細胞の赤血球結合能は増加しているのに対し、維持された細胞の結合能は低いままである。同様にPDL44の細胞を7週維持し、コントロールの細胞がPDL61に達した時、CTR法での赤血球結合能をみると、コントロールの細胞には赤血球結合が起るにも拘らず維持された細胞には起らない。

以上の結果はRC法による赤血球結合能の変化が細胞分裂毎に蓄積する細胞表面での変化を反映し、CTR法での赤血球結合が senescent cell に起ることを支持している。また、個々の細胞の大きさやその細胞の老化度には直接の相関はないこと。



ヒト2倍体細胞集団の老化は細胞周期の特定の時期に止る細胞の頻度の増加によ、これは説明されないこと、nondividing cell と異り slowly dividing cell は同一集団の rapidly dividing cell と細胞表面の性質からは区別できないこと、phase III の細胞集団中に含まれる rapidly dividing cell は継代初期の細胞集団中の rapidly dividing cell と細胞表面の性質が異、していること、更に細胞の寿命は metabolic time ではなく細胞の分裂回数によること等を示している。

○松岡耕二・三井洋司（東京都老人総合研究所 整理）

ヒト胎児肺由来2倍体線維芽細胞の培養系での増殖能力は有限であり、約60回の細胞数の倍化をくりかえすうちに、増殖速度が低下し、ついには継代不能となる。この現象を *in vitro* でみられる細胞レベルの加齢ととらえ、細胞の継代に伴う種々の変化が老化の指標として解析されてきた。

しかし、こうした指標が細胞の寿命と真に關わりがあるか否か、の検索が重要である。そのためには、ある特定の指標について均一な細胞群を分離、再培養し、その指標と細胞寿命との相関を求めなければならない。

我々は、ヒト由来細胞の加齢の進行につれて、細胞容積（あるいは細胞核面積）が増大すること、細胞容積と増殖速度に強い相関のあること、さらに終末期細胞群には、多くの巨大化した細胞とともに、早期細胞に類似した、容積の小きく増殖速度の早い細胞が存在すること、そしてこれらの細胞の性質をさきらかにしてきた。

今回は、終末期細胞群あるいは中期細胞群より、こうした細胞容積、TdRとりこみ能力の異なる細胞群を無菌的に分画、採集し、再培養を続けることにより、これらの性質と細胞寿命との相関を検索した。

細胞を血清濃度勾配のあるメディアウム中で沈降させ、沈降速度の差により、細胞容積の異なるいくつかの細胞フラクションを無菌的に分画、採集した。

あらかじめ³H-TdRとインキュベーションした細胞群（WI-38, PDL 41）を分画すると、大きい細胞のフラクションにラベルされない（増殖能の低い）細胞が多く、小さい細胞のフラクションではほとんどの細胞がラベルされていた（表1）。

終末期細胞群（WI-38, PDL 45）を分画し、培養系に移して³H-TdRでラベルしたところ、大きい細胞のフラクションはラベルされない細胞が多かった（表2）。したがって、分画直後には分画前

の増殖能を維持していた。これらの各フラクションの細胞群を培養し、うえついでいくと、ともに2回の継代の後、継代不能となる（PDL 48.5）。

これにより、寿命としては同一であることを示された。

この点をさらに確認するため、中期細胞群（IMR-90, PDL 29）を分画し、継代をすめた。PDL 45で³H-TdRをとりこませると、ラベルされる細胞の割合は、分画した細胞群および各分画細胞群ともほぼ等しかった（表3）。

さらに各フラクションの間で差はなくなり、分画細胞群の増殖能が変化し、分画しない母集団細胞群と同一の増殖能へ復帰したと考えられる。最終的に、分画しない細胞群の寿命がPDL 55であったのに対し、各細胞

表1

fraction	% labeled nuclei
1	51.6
2	68.9
3	81.1
4	89.1
5	93.4
6	94.9
7	98.2

表2

fraction	% labeled nuclei
1	18.6
2	18.1
3	20.5
7	32.1
8	40.2
9	44.2

表3

fraction	% labeled nuclei
control	69.7
1	73.7
2	72.0
9	70.3
10	71.2

群の寿命も PDL 55±20 の範囲内であった(表4)。

また PDL 29 で分画し継代培養を続けた後、両極端のフラクシオンだった細胞群を PDL 6 で再び分画して、種々の容積の細胞を再培養し、継代を続けた。その結果、これらの各分画細胞群の寿命も PDL 55±20 の範囲内

であった(表5)。したがって、培養細胞を細胞容積(または、一時的な TdR とりこみ能力)の異なる細胞群に分画することによって寿命の差があらわれないことがあきらかになった。

一方、ヒト肺由来 2 倍体線維芽細胞に対して増殖促進効果をもち、寿命をのばすといわれるヒドロコチゾンについて、分画後の種々の細胞群に対する作用を検討

した。終末期細胞(WI-38, PDL 51.5)を分画し、各フラクシオンの細胞群を 5 µg/ml のヒドロコチゾンを含む培地で培養し、無処理群と比較した。ヒドロコチゾンによって、小さい細胞のフラクシオン(はじめ増殖能の高かった細胞群)は増殖を促進されたのに対し、増殖能の低かった細胞群はむしろ抑制された(表6)。

このことは、各細胞群の増殖能の変化があらえられたためと考えられ、分画細胞群の母集団細胞群への復帰がヒドロコチゾンのような薬物により制御される可能性が示唆された。

以上のことから、

1) 個々の細胞のある時点における増殖能は固定的ではなく、さかんに増殖する細胞から増殖能の低い細胞が生み出され、またその逆もみこる。しかし、細胞群全体としては、加令に従って、増殖能の低い細胞のフラクシオンが増加するように変遷する。

2) 加令の指標としてポピュレーション全体の増殖能や細胞容積の変化は有効ではあるが、細胞寿命に直結するような加令の clock は別の形で刻みこまれていると思われる。

3) 各細胞分画の増殖能の変化は、薬物によって制御され、したがってそれが細胞寿命の延長を誘導する可能性がある。

4) ヒト 2 倍体線維芽細胞の培養系内に、いわゆる permanent cell が存在すると仮定しても、それは、細胞容積(核面積)、TdR とりこみ能力で示される、若い細胞の性質を持たないと考えられる。

表4

fraction	PDL completed
control	55
1	54
2	55
9	54
10	57

表5

fraction	PDL completed
1 + 1	53
1 + 2	55
1 + 3	56
9 + 9	54
9 + 10	55

表6

fraction	cell growth	
	control	hydrocortisone
4	2.7	1.4 (54)*
5	3.4	3.0 (89)
7	3.3	4.0 (121)
8	3.6	4.7 (130)

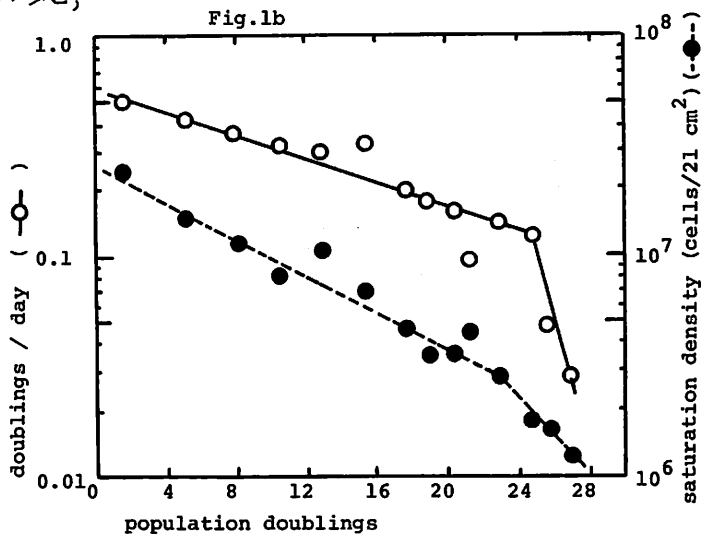
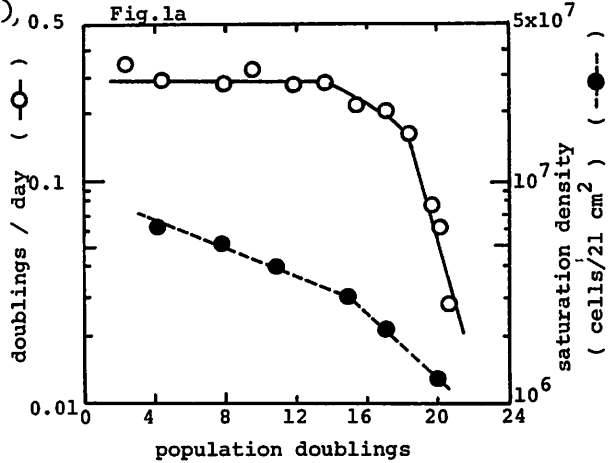
* % of control

○ 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)

ガラス器内で培養された99細胞動物の正常二倍体細胞が継代に伴いその倍加能力を失存、て行く現象が観察されて(いる)。我々はこれまでこの現象がガラス器内における人為的变化によるものではなく、99細胞動物の細胞集団が本来備えて(いる)性質によることを示唆する実験結果を得てきた(1,2)。この培養細胞の加齢に伴う細胞集団が示す顕著な変化の一つとして細胞飽和密度の減少が多くの研究者により報告されてきたが、その測定方法に問題を残して(いる)と思われる。我々は、ニワトリ胚線維芽細胞およびヒト胚の肺由来線維芽細胞について、細胞飽和密度の継代に伴う変化を観察し、従来の結果との比較を行(いた)新しい知見を得たので報告する。

(I)ニワトリ胚線維芽細胞 ニワトリ胚から得られた線維芽細胞をテミン変法イーグル培地、10%トリプトースホスフェートブロス、4%仔牛血清の培養液、播種細胞濃度 1×10^6 細胞数/マール(21cm²),

7日向隔の継代の条件で継代培養した。各継代ごとに細胞集団の生長曲線を求め、増殖が停止した状態における細胞濃度を飽和密度とした。飽和に達するまでに16日から21日を要した。ニワトリ胚線維芽細胞は、細胞株によって、初期の数継代の間一定の高い倍加能力を維持したのち急激にそれを減少させる場合(Fig. 1a [○], タイプA)と、継代初期から倍加能力の顕著な減少傾向を示す場合(Fig. 1b [○], タイプB)に分けられた。この2つのタイプは、同頻度で出現し、生存日数、総細胞集団倍加数の著しい差異は認められなかった。いずれのタイプにおいても、細胞飽和密度は、継代初期から減少して(いく)ことが観察された



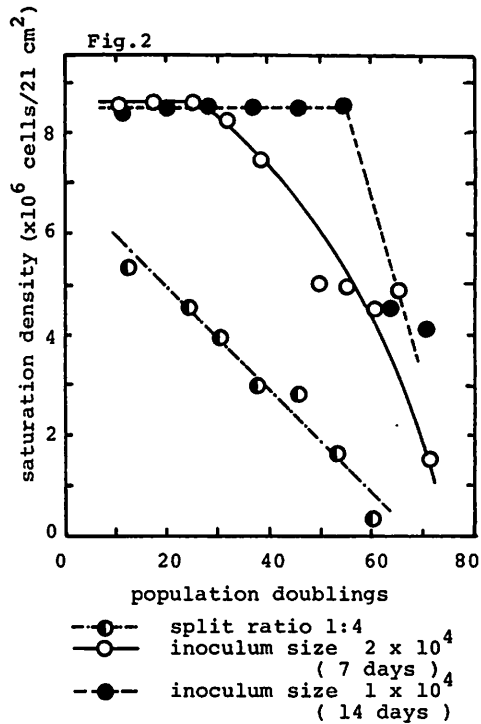
(Fig 1 a, b [●])。この結果は、播種後単層 confluent に達した状態を飽和とみなして測定した Lima と Macieira-Coelho の報告(3) と異なっている。我々の結果(4)によれば、倍加能に關する2つのタイプは、細胞集団中の99核細胞の増加傾向の差異に対応している。又、99倍体核の細胞の増加および大型細胞の蓄積は、細胞加令の後期に顕著に存する。細胞飽和密度は、こゝらとは異なっており、細胞集団の加令の初期から変化しており、加令度を倍加数に対応して示す老化のパラメーター存すると思ふ。

(II) ヒト胚の肺由来線維芽細胞

当研究所プロジェクトチームで確立したTIG-I細胞をイーグルバサル培地、10%胎児牛血清の培養液、分割比1:4、7日間隔の継代の条件で継代培養を行なった。4から6継代ごとに、細胞集団の一部を 2×10^5 細胞数/ 37×1 (21 cm^2)

に播種し、成長曲線を求め、成長の停止した状態(4から6週間を要する)を飽和密度とした。Fig 2 (---○) に示すように細胞飽和密度は、継代初期から減少することが観察され、Schneider と Mitsui (5) の M-38 を用いた結果と一致した。細胞集団中の99核および99倍体核の細胞の蓄積は、細胞加令の後期にみられた。以上のように二つとりとヒトの細胞で共通の現象が見られ、共通の要因の存在が期待された。

(III) ヒト胚の肺由来細胞—低濃度播種の場合— 低濃度播種による細胞加令(1)における細胞飽和密度と、標準法(分割比1:4)による飽和密度の差異をみた。播種数 1×10^4 / 37×1 、継代間隔14日(Fig 2 [●])では、最終の継代2回を除いて、飽和密度が高く一定に保たれ、標準法(Fig 2 [○])と著しい差異を示した。播種数 2×10^4 / 37×1 、継代間隔7日(Fig 2 [○])では、前二者の中間の傾向を示した。培養条件が異なることによるこの変化は非常に注目される。低濃度播種による成長速度の速い細胞の選択の可能性が考えられる。標準法および低濃度播種法によって得られる各継代令の細胞集団の構成成分の検討を行なっている。



- (1) K.Kaji & M.Matsuo, Biomedical Gerontol., 1, 14 (1977)
- (2) K.Kaji & M.Matsuo, Zoological Magazine, 86, 319 (1977)
- (3) L.Lima & A.Macieira-Coelho, Exp. Cell Res., 70, 279 (1972)
- (4) K.Kaji & M.Matsuo, Mech. Ageing Develop. (in press) (1978)
- (5) E.L.Schneider & Y.Mitsui, Proc. 10th Intern. Congr. Gerontol., 2, 140 (1975)

大野 忠夫 (放射線医学総合研究所・薬学研究部)

細胞老化の成因を考えていく際に、細胞のおかれている環境と細胞の相互作用の問題は重要である。In vivo では、老令マウスの環境下におかれた若令マウスの骨髓細胞はその増殖能の相当部分を失ってしまうことが知られている¹。In vitro では Hydrocortisone²や EGF³によって正常細胞の培養継代数の延長が示されており、ラット骨格筋細胞の初代培養でも、Donor の 齢に従って細胞の増殖能が成熟ラット血漿を含む培地中では低下していくが、多量の細胞増殖因子を含む FBS を血漿の代りに加えた培地では増殖能の低下がみられない⁴。これらの事実はいずれも細胞の老化(ここでは増殖能の低下ないし停止)が細胞外の因子によって制御されている可能性を示している。そこで、ヒト正常肺繊維芽細胞を用いて、in vitro における増殖能が

(1) 血清中の増殖因子濃度によって、どの程度規定されているか。

(2) それは主にどのような増殖因子によるものか。

の二点について検討を加えた。

((方法)) 10000 コの IMR-90 細胞を 35 mm のシャーレにまき、2 ml の下記培地を加えて培養した。MEM 培地に可欠アミノ酸、ビタミン、脂質、BSA、微量元素、HEPES 等を加えた培地 (TOM-H 培地) を調製し、FBS を PBS に対して透析した後さらにこの培地に対して透析した (d-FBS)。これを被透析培地 (TOM-H₀) に 10% 添加して用いた。培地は 3~4 日毎に交換し、細胞が confluent になる前に継代した。この条件下では 70 pdl 前後まで継代可能である。各 pdl の細胞を植込み後、6 時間または 18 時間後に付着した細胞を PBS で二度洗い、TOM-H₀ 培地に d-FBS または増殖因子の組合せを加えて 4 日間培養し細胞数を測定した。

((結果)) 細胞の増殖速度に及ぼす d-FBS の濃度の影響を各 pdl で調べてみると図 1 のようになった。図中のカーブの直線部分を外そうし、一定増殖速度 (1 pdl/4 days) を与えるのに必要な d-FBS 濃度を求めてみると、図 2 の如く pdl が上るにつれて幾何級数的に増大することがわかった。すなわち、細胞は分裂する毎に急激に血清中の増殖因子に対する反応性を失っていく。そこでこの細胞はどのような増殖因子に対する反応性を失なうのかを調べるために、この細胞の無血清培養を試みた。一般的に繊維芽細胞に増殖刺激的に働くと考えられる物質を組合せて投与してみると、Hydrocortisone (10^{-8} M)、Insulin (50 μ g/ml)、Transferrin (50 ng/ml)、EGF (5 ng/ml)、血清中の Cationic protein 分画 (C 分画: FBS の中で陽イオン交換樹脂に吸着する非透析性成分、10% 血清相当分) を加えたとき、31 pdl の細胞に対しては 2.8 pdl/4 days の増殖速度を与え、10% d-FBS 投与の場合の 64% となった。この値は 65 pdl では 46% となった。この組合せの中には必要な因子がまだ不足しているが、この組合せの範囲内で各成分を一つずつ抜いてみると、相対的に増殖速度に大きな影響を与えるのは C 分画であることがわかった。C 分画について Dose response を調べてみると (図 3)、各 pdl における最大増殖速度に達するのに必要な濃度は 65 pdl ではやや高濃度側にずれてはいるものの、31 pdl の場合との差は小さく、また 30% 血清相当量を投与した

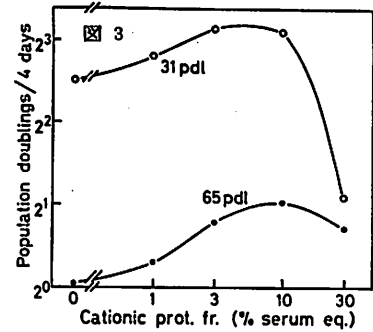
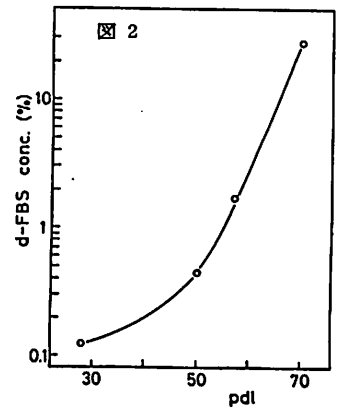
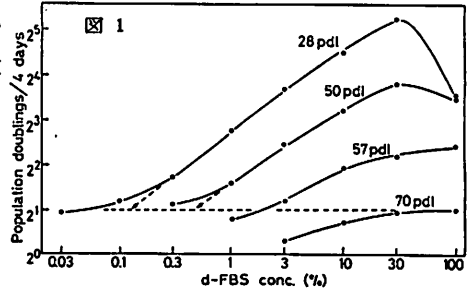
ときはむしろ増殖阻害的であった。他の成分に関しても、最大増殖速度に達するまでの濃度範囲は老若の細胞間でほとんど差がなかった。

((考察)) 図1、2にみられるように、この細胞の増殖速度は増殖因子濃度に依存し、かつ、分裂回数が進むにつれて急激に増殖因子

に対する反応性を失っていく。これは、一定の増殖因子濃度下におかれた細胞集団内では特定の細胞だけが多数回分裂して pdl を上昇させる可能性は少ないこと、並びに、*in vitro* における細胞の総分裂回数は増殖因子濃度によって厳しく規定されうることを示している。ここで調べた個

個の増殖因子の組合せの範囲内では、どの因子についても 31 pdl と 65 pdl の間で Dose response curve が高濃度側に大きく (10 倍以上) ずれ込むことはなかったので、増殖因子に対する細胞の受容体の親和性だけが減少して細胞が分裂する毎に反応性を失っていくことはないと考えられる。しかし、受容体数そのものが減少していて、そのために増殖能を失っていくという可能性は残されている。この点および上記組合せにない未知因子については検討中であるが、上記組合せ中 transferrin の濃度を上げると 65 pdl でも 10% d-FBS 投与の場合の 72% にまで増殖速度が上るので、上記組合せには主要増殖因子は含まれているものと考えられる。

一方、図1、3から、高濃度の血清中やC分画には増殖阻害因子も含まれている可能性があり、しかも、57 pdl 以上では増殖阻害効果がみられなくなっていること(図1)、高濃度のC分画による増殖阻害程度がよわまっていること(図3)などから、細胞は分裂するに従って、増殖阻害因子に対する反応性も失っていくと思われる。一般に正常細胞は分裂をくりかえし老化していくにつれて、外界からの刺激に対して「鈍感」になっていくと推察される。



1. Albright, J. W. and Makinodan, T. : J. Exp. Med. 144, 1204-1213, 1976
2. Grove, G. L. and Cristofalo, V. J. : J. Cell. Physiol. 90, 415-422, 1976
3. Rheinwald, J. G. and Green, H. : Nature 265, 421-424, 1977
4. Swierenga, S. H. H., Whitfield, J. F. and Boynton, A. L. : J. Cell. Physiol. 94, 171-180, 1978

近藤 眞・春日博子・館村哲郎 (東京都老人総合研究所・生物)

コルチゾンおよびハイドロコルチゾン (HC) がヒト胎児肺繊維芽細胞で飽和細胞密度の増加と寿命の延長をもたらすとの報告がなされ (Macieira-Coelho, 1966; Cristofalo, 1970)、寿命を延ばすということ、およびホルモン反応性が加齢で変化するのかどうかの点で興味もたれた。ここでは、まず、ヒト胎児肺繊維芽細胞の WI-38、IMR 90 をもちいて、HC の効果を追試することからはじめた。さらに、ヒト胎児肺繊維芽細胞における HC の反応性が特異的であるかどうかを明らかにするため、寿命延長効果の HC による特異性と、飽和細胞密度の HC の濃度依存性と、細胞への HC またはデキサメサゾン (DEX) の特異的結合について検討した。

(材料と方法)

細胞および継代培養: ヒト胎児肺繊維芽細胞の WI-38 および IMR 90 細胞は、米国の IMR よりいただいた。細胞は 10% 牛胎児血清を含んだ Eagle Basal Medium (Diploid) に 100 μ g/ml ストレプトマイシンと 100 units/ml ペニシリンを添加した培養液で、split 1:4 で継代培養された。細胞数はタタイの血球計算盤で測定された。HC、17 β -エストラジオール、テストステロン、プロゲステロンは、エチルアルコールにとかし、培養液に添加した。

細胞への ³H-HC および ³H-DEX の特異的結合: トリプシンではがし培養液に懸濁した confluent の細胞各 1 ml に、³H-HC (または ³H-DEX) のみと、および、それにさらに加刺の無標識ステロイド (1000 倍) を添加したものを、37 $^{\circ}$ C、30 分インキュベートした。反応を 0 $^{\circ}$ C でとめて、細胞を 3 回洗浄し、0.5N NaOH にとかした。一部分は中和して液体シンチレーションカウンターで放射能を測定し、残りでタンパク定量をした。細胞へのステロイドの特異的結合は加刺のホルモンの無添加でえられた値いから加刺のホルモンを添加したものの値いを差しひくことにより計算された。

(結果と考察)

population doublings 29 (PD29) の WI-38 細胞へ、5 μ g/ml の HC を添加して培養した場合は、植えつき時の細胞数の増加が観察された、また寿命が対照の PD47.6 から PD51.9 へと 9% 増加した。PD47 で添加したものでは寿命はのびなかった。IMR 90 細胞では PD22 で 5 μ g/ml の HC を添加して培養したものは、対照の PD59.6 から 65.6 へと 10% 増加した。

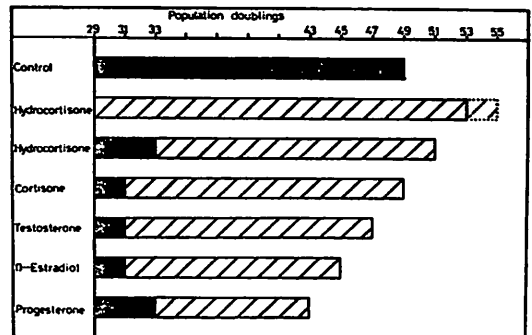
WI-38 細胞への HC 以外のステロイドの効果も 5 μ g/ml の濃度について調べると、HC の寿命延長効果と反対に、テストステロン、17 β -エストラジオール、プロゲステロンは寿命短縮効果を示した (図 1)。この場合は、コルチゾンでは延長効果は観察されなかった。

寿命延長効果には 5 μ g/ml の高濃度の HC が使用されているが、生理的濃度でも IMR 90 細胞が反応するかどうかの検討を、飽和細胞密度を指標にしておこなった (図 2)。

0.005 μ g/ml (1.4×10^{-8} M) の HC でわずかであるが飽和細胞密度を増加させ、生理的濃度内に入ると思われる 0.05 μ g/ml (1.4×10^{-7} M) の HC では最大値を示した。0.05~5 μ g/ml HC ではほぼ同じ高い効果をもつが、25 μ g/ml の HC ではわずかな効果しかもたなかった。前の結果とあわせると、ヒト胎児肺繊維芽細胞は HC に特異的に、かつ生理的濃度で反応することを示している。

WI-38 細胞は HC に特異的かつ生理的濃度で反応するので、HC (または DEX) の特異的結合があることが推定された。しかしながら、WI-38 細胞の DEX

Fig. 1 Effect of several steroids on the life span of WI-38 cells



の細胞質レセプターが少ないかないとの報告 (Croce, et. al., 1973) がなされたので、まず、HCとDEXの細胞への特異的結合を検討した。細胞への ^3H - HCの特異的結合を算出する際に加刺の無標識ステロイド量をきめる実験をおこなうと、500倍から1000倍の加刺のステロイドの添加でプラトーに達したので、多い量であるが1000倍量もちいることにした。PD33のWI38細胞への ^3H - HCの特異的結合の時間経過を測定すると、 37°C では30分ぐらいでプラトーに達した。他方 0°C では特異的結合は30分まで検出されず、その後徐徐にみられた。

次に、細胞へのHCの結合が特異的であるかどうかを、他のステロイドと競合するかどうかで調べた(表1)。 ^3H - HCの細胞への結合は加刺の無標識HCの添加により55%に低下した。DEXではより強く低下した。しかしながら、コルチゾン、 17β - エストラジオール、アンドロステンジオンの添加では ^3H - HCの結合は低下しなかった。WI- 38細胞へのHCの特異的結合がどのぐらいの濃度から生じるかを測定すると、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ HCのちかくから認められるのが観察された

(図 3)。この濃度は、 $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ HCで寿命の延長が認められるという最近の報告と一致するようである。 ^3H - DEXでも特異的結合がみられた。以上、WI- 38細胞ではHCとDEXの細胞への特異的結合の存在が、はっきりした。これらは、先述の細胞へのHCの効果の特異性をさらに示持するものである。HCの細胞内局在や作用機構については、今後の課題である。

Fig. 2 Effect of hydrocortisone on further growth of confluent IMR 90 cells

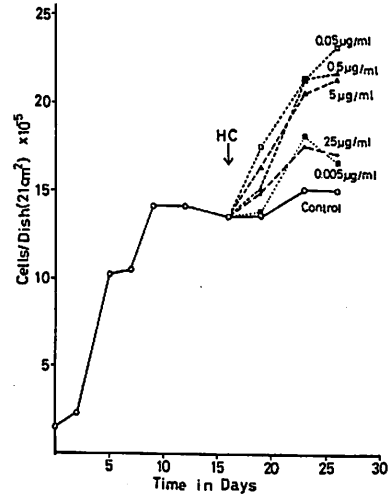
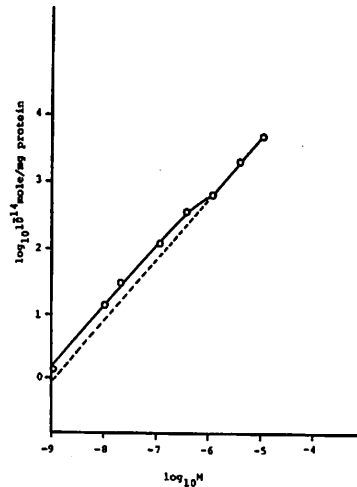


Fig. 3 Binding of hydrocortisone to WI-38 cells

Table 1 Effect of several steroids on specific hydrocortisone binding to WI-38 cells

Non-radioactive steroids added*	Bound HC (% of control)
None	100
Hydrocortisone	55
Dexamethasone	31
Cortisone	116
β -Estradiol	89
Androstenedione	120

* 1000-fold



東京都老人総合研究所 ○本田修二, 松尾光芳

《序論》 培養ヒト二倍体細胞は約 50 代の細胞増殖を経て死滅し、細胞レベルでの老化のモデルになっているが、この細胞老化の機構についてはよくわかっていない。一方、Harman (1956) は、老化の機構を説明するため、老化のフリーラジカル説を提唱した。この仮説では、細胞の代謝過程から生成されるフリーラジカルが、老化における種々の退行的変化を引き起こすのに重要な役割を演ずると考えられている。もしこの仮説が正しいとすると、生体におけるフリーラジカルの生成が増大すれば、老化の過程が加速されるはずである。高圧酸素は細胞に対して毒性を示す。Fridovich らの研究から、その毒性発現は、高圧酸素によって細胞内での生成が増大したスーパーオキシドラジカル、およびそれに起因する酸素ラジカル等による生体構成成分の障害に基づくと考えられている。われわれは、培養ヒト二倍体細胞の老化におけるフリーラジカルの関与を確かめるための基礎として、高圧酸素の培養ヒト線維芽細胞の老化に及ぼす影響を調べた。

《方法》 細胞はヒト胎児肺由来の線維芽細胞 (WI 38) を用いた。培養液は 10% fetal calf serum を含む Eagle's basal medium を用い、5% CO₂ - 95% air 中 37°C で培養した。細胞に対する高圧酸素の曝露は Parr の容器中で行ない、50 気圧 1 時間または 75 気圧 1.5 時間、1 週間ごとに行なった。対照実験では、同様な条件下で高圧窒素を用いた。

《結果》 1, WI 38 細胞を約 29 代から 1:4 split ratio で継代培養すると、約 56 代で細胞増殖が止まり、継代が不可能となった。しかし、各継代 3 日後に、細胞を 50 気圧の酸素に曝露してゆくと、約 51 代で細胞増殖が止まり、明らかに対照の細胞より早く継代が不可能になった。また酸素に曝露された細胞の方がより早く phase III の特徴 (細胞が confluent に達する能力の欠除、細胞の不規則な配列、および、巨大細胞の出現) を示した。高圧窒素を用いた場合には、このような効果はみられなかった。

2, 高圧酸素の曝露回数と寿命短縮効果との関係を調べた。すなわち、31 代の細胞に高圧酸素を曝露し始め、途中から順次、曝露を中止して、継代してゆき、曝露回数 (1 回から 13 回) の違いによる細胞の寿命への影響を比較した。6 回までは寿命短縮効果がみられなかったが、7 回から 13 回まで直線的に曝露回数に依存した寿命短縮がみられた。

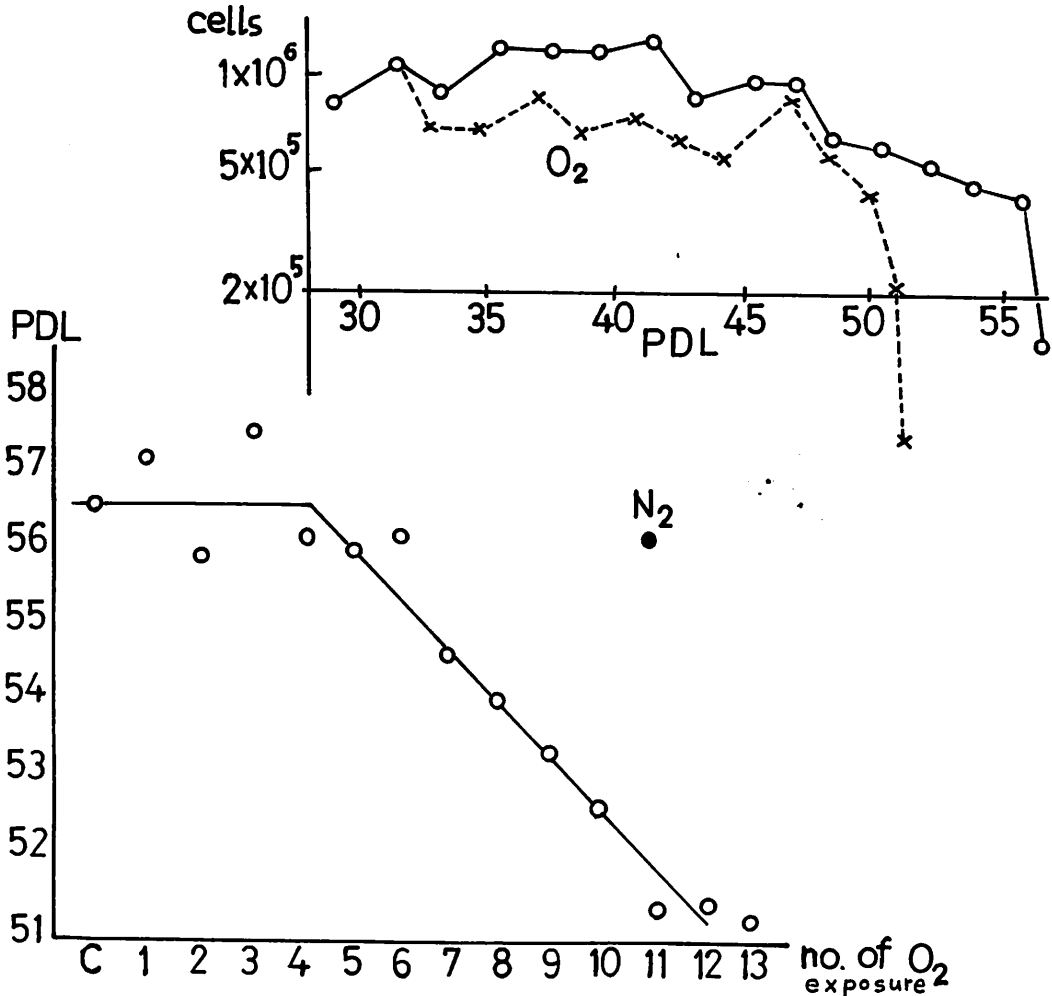
3, 1:4 split ratio で 1 週間に 1 度ずつ継代する場合、高圧酸素曝露により細胞増殖率が低下し、対照実験に比べて、播種細胞数が低下する。このような継代時の播種細胞数の低下によって、みかけ上の寿命短縮を示す可能性を考慮し、それを否定するため、3 つの異なる継代方法を用いて高圧酸素の影響を調べた。すな

わち、① 1:4 split ratioで1週間に1度継代する。② 1:4 split ratioで1週間に1度継代するが、老化にともなって増殖率が低下したら2週間に1度継代する。③ 1週間に1度、一定数の細胞を播種する。高圧酸素曝露による寿命短縮効果は継代方法によらず観察された。

4, 75気圧酸素の方が50気圧酸素よりも寿命短縮効果は大きい。

5, 高圧酸素による寿命短縮効果が、曝露時の細胞の継代数に依存するかどうかを調べた。継代回数の異なる細胞に、高圧酸素を1週間間隔で2回のみ曝露した後、継代し続け、細胞の寿命を調べた。継代が進んだ(老化した)細胞ほど、高圧酸素による寿命短縮効果が大きく、余命短縮率(酸素曝露時以後の処理群の世代数/同一時期以後の対照群の世代数)が増大した。

《考察》 培養ヒト二倍体細胞は、酸素毒性に原因する寿命短縮を起こすことが示された。培養ヒト細胞の加齢が進むに従って、酸素毒性による寿命短縮効果は増大するが、これは、前にわれわれが報告した、継代末期の培養ヒト細胞は酸素毒性に対する感受性が高いという結果から説明されよう。



伴 貞幸, 二階堂修, 菅原 努 (京大・医・放基, *京大・放生研センター)

近年, 老化という生物現象が生物学の対象としてとりあげられるようになったが, 老化という現象そのものが極めて複雑な現象であるがために, 生物の老化の機構に關してはいまだ何ら明らかにされていない。しかし, この機構を考へる上で, 生物の寿命と人為的に変えられるとしたら, これは機構解明のすばらしい糸口となりはすまいか。放射線の生物に及ぼす作用機構はまだ充分解明されたとはいへない。しかし, 照射を受けた生物には急性死以外の障害として, 種々の臓器に癌が誘発されるし, 発生途上に照射を受けた動物は突然変異とが奇形を伴うことは周知の如くである。ことに放射線が生物に非特異的寿命短縮を引き起こす可能性のある有力なものであることは要筆乃事である。ただし, こゝでの非特異的寿命短縮とは発癌などの特定の病変による寿命短縮を除いても寿命が短縮していると考えられるもので, ある意味では老化促進とも言い換へることが出来る。

比較的少量での放射線が動物の寿命を短縮するという事は, 非常に多く報告されている。しかし, 被照射動物群には高率の癌発生がみられることから, 放射線によるとされる非特異的寿命短縮を証明することは今なお問題のあるところである。こう言ふ意味から, 放射線による癌誘発が非常に困難なシステムを用いて, 放射線の晩発効果をみることは意義深いものであると思われる。さて, 培養された正常二倍体細胞が, 放射線あるいは化学発癌剤の処理によって容易に癌化しないことは衆知の事である。本研究においては, ヒト胎児の各種臓器より得られた細胞を培養し, これに放射線などの修飾因子を加へ, 細胞寿命とその他細胞の変化を測ることにより, 細胞老化の機構を追求することを目的とする。

今回は, ヒト胎児肝線維芽細胞に種々の線量のX線および熱中性子と照射した場合の, 細胞寿命に及ぼす影響について報告する。放射線照射による細胞寿命の短縮度を放射線による試験管内晩発性障害と考へ, コロニー形成法による各線量に對する生存率と試験管内急性障害と考へた場合, 急性致死障害と晩発性障害の各々の大きさから, 放射線照射によって誘発される非特異的寿命短縮の有無について論じる。更に, 急性障害および晩発性障害についての, 加齢に伴う感受性差についても検討した。

以上のような放射線による寿命短縮の機構を考へるには, 放射線障害修復能よりもむしろ, 修復可能でない損傷の誘発と蓄積とを抽出する糸の確立が望まれる。この意味で, 染色体レベルでの異常, 特に姉妹染色分体交換(Sister Chromatid Exchange: SCE)の誘発と晩発性障害との関連を測ることも有意義であると思われる。しかし, SCEの誘発機構およびその修復については今更明らかにされていないために, 今回はSCEと細胞老化との関連性について簡単に触れてみたい。

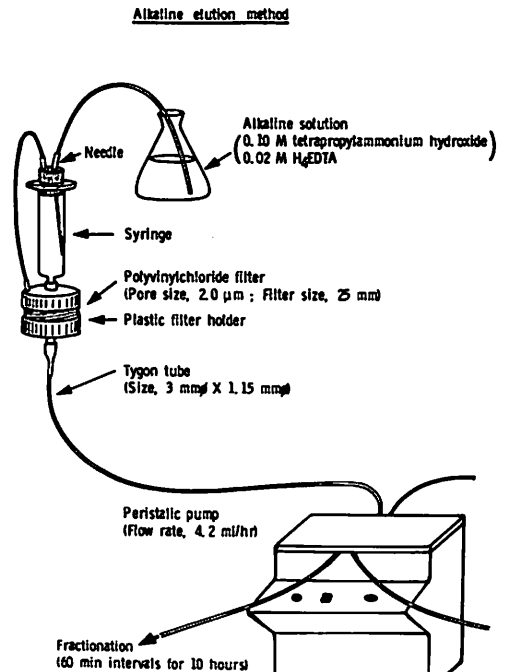
鈴木文男, 堀川正克 (金沢大・薬・放射), 伴 貞幸 (京大・医・放射)

1961年, Hayflick と Moorhead が, ヒト胎児の種々の器官から分離した細胞を培養した場合, 約50回の継代数を経た後死滅することを証明して以来, 多くの研究者により, 動物の寿命とそれらから得た細胞の継代培養可能数がよく対応するという報告がなされ, 細胞レベルでの老化機序の解析が可能となった。さらに近年, 老化の分子機序を知る目的でDNA損傷修復能を指標とした解析も試みられている。つまり, 生体内の非分裂細胞系では, 老化にともない修復不可能なDNA一本鎖切断が蓄積するという報告 (Price ら (1971)) や早老症 (*Hutchinson-Gilford progeria syndrome*) 患者由来の細胞はγ線照射により誘起されるDNA一本鎖切断の再結合能が低いという報告 (Epstein ら (1973)) 等がなされ, DNA損傷修復能の低下と細胞の老化および寿命の間には密接な関連性があることが示唆されるようになった。しかし, 培養細胞系においては, 若い細胞と老化細胞の間にこうしたDNA損傷修復能に顕著な差違は認められないとする報告もあり, 両者の関連性について未だ結論をくだす段階には至っていない。

こうした意味から本研究では, 最近 Kohn ら (1974) による, 2開裂された微量のDNA損傷およびそれらの修復をも鋭敏に検出できるDNAアルカリ性溶出法を用い, ヒト胎児2倍体細胞の老化にともなうX線誘起DNA損傷(一本鎖切断)とその修復能について解析を試みた。

図1

まず, 基礎実験として, あらかじめ¹⁴C-thymidine で標識したHeLa S3細胞に種々の線量のX線を照射後, 当研究室で確立したDNAアルカリ性溶出法(図1参照)を用いてDNA溶出曲線を求めた。その結果, X線照射されたHeLa S3細胞のDNA溶出速度は照射線量に依存して速くなり, 以前に Kohn ら (1974) が報告したように比較的 low 線量 (0~800R) のX線照射により誘起されるDNA損傷(一本鎖切断)を鋭敏に検出できることがわかった。さらに, 溶出DNAを直接けい光測定することにより得たDNA溶出曲線 (*fluorometric method*) は, ¹⁴C放射活性をもとにして得た結果 (¹⁴C-TdR labeling method) とよく一致しており, 非分裂細胞のDNA一本鎖切断を検出する方法としてこのDNAア

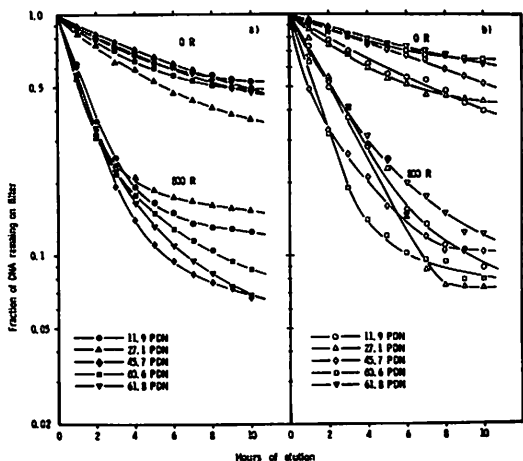


ルカリ性溶出法が適用できることがわかった。

その故、ヒト胎児肺由来の2倍体線維芽細胞を10%の胎児牛血清を含むイーグルMEM培養液中で継代培養することにより、継代各期の細胞をX線照射した際のDNA一本鎖切断とそれらの再結合能をこのアルカリ性DNA溶出法を用いて調べた。図2aおよび図2bは、 ^{14}C -TdR labeling method および fluorometric method を用いて得た継代各期の細胞に種々の線量のX線を照射した直後のDNA溶出曲線を示す。また、図3a、3bは継代各期の細胞に800 RのX線を照射した後種々の時間細胞を37°Cで培養した際のDNA一本鎖切断の再結合を調べた結果である。これらの図より未照射細胞および800 R照射細胞におけるDNA溶出速度は継代各期の細胞で大きな差はなく、しかも、老化した細胞でも若い細胞と同程度のDNA一本鎖切断の修復能を有することがわかる。また、これらの実験において、 ^{14}C -TdR labeling method と fluorometric method で得た結果の間に顕著な差は認められなかった。こうした結果は、細胞の老化現象を規定するのはDNA損傷修復能の低下であり、ひいては修復不可能な損傷が細胞内DNA中に蓄積することがヒト2倍体細胞の老化の主因であるとする考えを否定するように思われる。

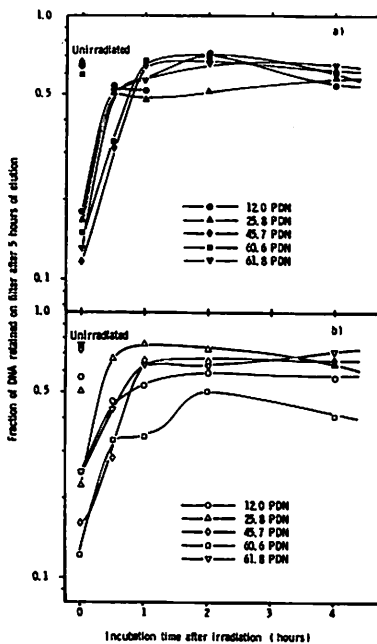
なお、今後の課題として、老化細胞集団中の非分裂細胞を特異的に集める方法の開発、さらには細胞老化に伴うDNA二本鎖切断の再結合能の検討といったことが残されている。

図2



Alkaline elution of DNA segments from X-irradiated (800 R) or unirradiated normal human lung fibroblasts at various passages in the cell life cycle, measured by the ^{14}C -TdR labeling method (a) and by the fluorometric method (b).

図3



Changes in alkaline elution of DNA segments from normal human lung fibroblasts at various passages in the cell life cycle, either immediately or after various times of incubation following irradiation with 800 R of X-rays. The amount of DNA eluted was determined by the ^{14}C -TdR labeling method (a) and by the fluorometric method (b).