

日本基礎老化研究会

第3回大会講演要旨集

基礎老化研究

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

3

1979

日本基礎老化研究会

Japan Society for Biomedical Gerontology

日本基礎老化研究会

第 3 回 大 会

会 期 昭和 54 年 7 月 20 日(金), 21 日(土)

会 場 東京都養育院講堂
東京都板橋区栄町35-2

世話人 太 田 邦 夫
東京都老人総合研究所
〒173 東京都板橋区栄町35-2
電話 (03) 964-1131 内線 3001
(連絡に関しては 内線 3060)

参 会 の 皆 様 へ

1. 受付では参加費 1,000 円をお支払いのうえ、参加証をうけとり、所属とお名前をご記入下さい。
2. 第 1 日午後 5 時半より、大会会場にて日本基礎老化研究会総会を行います。
3. 第 1 日午後 7 時より、孔雀苑にて懇親会を行います。参加ご希望の方は受付で会費 1,500 円をお支払い下さい。
4. 一般講演の講演時間は15分です(なお、討論時間は別に用意されます)。
5. スライド・プロジェクターは 1 台です。スライド (35mm サイズのみ) はお早めにスライド受付へお渡し下さい。
6. 会場入口に用意しました飲物は、ご自由におのみ下さい。
7. 昼食には、大山駅附近にある食堂を御利用下さい (8 頁の地図参照)。

日本基礎老化研究会第3回大会プログラム

第1日 7月20日(金)

10:00～10:05 世話人あいさつ 太田邦夫(都老研)

《一般講演》

10:05～12:00 座長 鈴木撃之(東海大・医・分子生物)

A-1. 生存曲線からみた線虫 *Caenorhabditis elegans* の老化過程

- 細野隆次(金沢大・医・生化), 佐藤佳子,
相沢慎一(都老研・栄養), 三井洋司(都老研・薬理)

A-2. 加齢による蚕蛾アミノ酸プールの変化

- 小山内実(都老研・生物), 菊田純子(岡山中央病院)

A-3. クロショウジョウバエの寿命における系統間変異と環境要因

- 大羽 滋(都立大・理・生物)

A-4. 生態的条件(性比, 密度)のショウジョウバエ寿命に及ぼす影響

- 相垣敏郎, 大羽 滋(都立大・理・生物)

A-5. クロショウジョウバエにおける産卵数および孵化率の加齢にともなう変化

- 山本明彦, 大羽 滋(都立大・理・生物)

12:00～13:00 昼 食

《特別講演》

13:00～13:50 司会 吉田俊秀(遺伝研・細胞遺伝)

特-I. 哺乳動物卵の Microsurgery による新しい実験動物の作出

- 大沢 仲昭(東大・医・内科)

13:50～14:00 休 憩

《 一 般 講 演 》

14:00～15:00 座 長 鶴 藤 丞（東北大・薬・生化）

B-1. 雄マウスの血中アンドロジェン値および行動の加齢変化

◦米沢由美子（都老研・生物），町田武生（鹿児島大・理・生物），小山内 実，能村哲郎（都老研・生物）

B-2. 加齢に伴う軟骨プロテオコンドロイチン硫酸の低硫酸化機構について

◦本多 厚（東薬大・生化），安部みどり，室田誠逸（都老研・薬理），森 陽（東薬大・生化）

B-3. 老年者の脂質代謝に関する研究．血清リポ蛋白画分脂質値から見た老年女性と中年女性の差異について

◦中島信治，中野祥子（日医大・老研・生化），見須 宏（下谷保健所）

15:00～15:15 休 憩

15:15～17:15 座 長 山 科 郁 男（京大・薬・生物化学）

C-1. ヒト2倍体細胞の加齢と表面変化；レクチンによる違い

◦相沢慎一，栗本文子（都老研・栄養）

C-2. ヒト2倍体細胞の加齢と表面変化；由来組織による違い（II）

◦栗本文子，相沢慎一（都老研・栄養），三井洋司（都老研・薬理）

C-3. 細胞表面ムコ多糖のヒト2倍体線維芽細胞における加齢変化

◦松岡耕二，三井洋司（都老研・薬理）

C-4. 培養細胞の老化と膜糖脂質

◦大沢多加子，永井克孝（都老研・生化）

C-5. 赤血球膜の θ -Toxin感受性；個体老化のパラメーターとしての可能性

◦永井克孝，安藤 進，田中康一（都老研・生化・中央機器），長谷純一（富山医薬大・薬）

17:15～17:30 休 憩

17:30～18:30 研 究 会 総 会

19:00～20:30 懇 親 会

（会場：孔雀苑）

第 2 日 7 月 2 1 日 (土)

《 一 般 講 演 》

9:00～12:00 座 長

二階堂 修 (京大・放生研)

山田正篤 (東大・薬・生理化学)

- D-1. ヒト 2 倍体細胞における老化機構の解析；無血清培地培養における細胞増殖因子の反応性について
◦星 宏良, 菅 幹雄, 山根 續 (東北大・抗研・細胞生物)
- D-2. EGF および FGF を投与されたヒト胎児線維芽細胞 (TIG-1) の細胞加齢
◦加治和彦, 松尾光芳 (都老研・アイソトープ)
- D-3. ヒト肺線維芽細胞の増殖に対する血小板増殖因子の効果
大野忠夫 (放医研・薬学)
- D-4. ヒト 2 倍体細胞 (TIG-1) の *in vitro aging* に伴うプロスタグランジン合成酵素活性の質的変動
◦室田誠逸, 三井洋司, 川村美枝子 (都老研・薬理)
- D-5. ヒト胎児肺線維芽細胞の細胞凍結；加齢と増殖の影響
◦近藤 晃, 山本清高 (都老研・生物)
- D-6. キンギョ由来培養細胞は“老化”するか？
◦嶋 昭紘 (滋賀医大・放基), 二階堂 修 (京大・放生研),
篠原茂生 (滋賀医大・放基), 江上信雄 (東大・理・動物)
- D-7. 培養されたヒト由来細胞における細胞寿命の不均一性
◦伴 貞幸, 菅原 努 (京大・医・放基)
- D-8. ニワトリ胚線維芽細胞の細胞加齢に伴う倍数体細胞の蓄積
◦松尾光芳, 加治和彦 (都老研・アイソトープ)
- D-9. 発生と加齢に伴う, マウス脳抽出液の培養癌細胞に対する増殖抑制効果の変動
◦遠藤由美子, 武田俊平, 松沢大樹 (東北大・抗研・放医)

12:00～13:00 昼 食

《 特 別 講 演 》

13:00～13:50 司 会 岸 本 進 (熊本大・医・内科)

特一Ⅱ. 加齢と免疫

佐 渡 敏 彦 (放医研・生理病理)

13:50～14:00 休 憩

《 一 般 講 演 》

14:00～15:20 座 長 堀 川 正 克 (金沢大・薬・放射薬品)

E-1. ウェルナー症候群の免疫学的側面 (続報)

後 藤 真 (東大・医・物療内科)

E-2. 老化機構研究へのアプローチとしての遺伝的早老症の研究と意義

。藤原美定, 加納良男, 巽 真理子 (神戸大・医・放基)

E-3. ヒストンH1の減少を伴うヒト細胞の加齢

。三井洋司, 坂上 宏, 室田誠逸 (都老研・薬理),
山田正篤 (東大・薬・生理化学)

E-4. 加齢によるラット肝H1ヒストン小分画ならびにクロマチン構造の変化

新藤恵子, 森川明信, 大場義樹 (金沢大・薬・生物薬品)

15:20～15:35 休 憩

15:35～18:15 座 長 藤 田 哲 也 (京府医大・病理)

松 沢 大 樹 (東北大・抗研・放医)

F-1. 老若パラビオーゼ白鼠肝細胞のミトコンドリア

。佐藤秩子 (愛知がんセンター・臨床検査),
田内 久 (愛知医大・病理)

F-2. 腸内細菌叢と老化; 無菌及び通常ラットの消化管及び肝臓の酵素活性の加齢による変化

。石井孝彦, 河合康雄, 務台方彦 (ヤクルト・中研)

F-3. 加齢に伴うBSP肝機能の変化; 顕微蛍光測光法による定量的解析

。中西和夫, 福田 優, 藤田哲也 (京府医大・病理)

F-4. 加齢に伴う軸索ディストロフィー; 軸索終末肥大の形態学

藤澤浩四郎 (都神経研・神経病理)

F-5. 老化モデルによるヒト血小板寿命曲線の解析

。矢後長純, 池田忠男 (聖マリアンナ医大・研究・放基),
市川隆男 (青山大・理工), 福田信男 (放医研・臨床),
渡辺勇四郎, 岡部和彦 (聖マリアンナ医大・内科)

F-6. 老化モデル動物系統樹立の試み

- 竹田俊男, 細川昌則, 竹下修史, 入野美香, 松下隆寿,
富田由美子, 安平公夫, 浜本 肇, 清水克時, 石井正治,
山室隆夫(京大・胸部研・病理・整形外科)

F-7. 加齢に伴う脳萎縮のコンピュータトモグラフィーによる研究(第2報)

- 伊藤正敏, 山浦玄嗣, 佐藤多智雄, 松澤大樹(東北大
・抗研・放医)

18:15~18:30 閉会の辞

太 田 邦 夫 (都 老 研)

大会会場と懇親会会場の御案内

いずれの会場も東武東上線大山駅（始発池袋駅から3つ目、急行、準急は停車しませんので御注意下さい）下車、または地下鉄都営6号線板橋区役所前駅下車。



大 沢 仲 昭 (東京大学 医学部 第三内科)

老化の研究を含めて、医学の研究における実験動物の重要性は明らかであるが、ここでは未来の実験動物を開発する全く新しいアプローチとして、哺乳動物の卵に種々の顕微鏡的手術操作を加え、これを里親マウスの子宮にもどして遺伝的に、また先天的に新しい実験動物を作出する方法を述べ、その応用について紹介する。

この方法の具体的な技術としては以下の如きものがある。

1) 異形質人工キメラマウス (allophenic mouse)

Mintz の方法に従い 2 頭のマウスの受精卵 (δ 細胞期) を試験管内にて融合せしめ一個の胚盤胞に発育させた後、里親マウスの子宮内に移植してキメラマウスを作成する。遺伝的に異形質をもった 2 種の細胞の相互関係を分析する有力な方法である。

2) 細胞キメラマウス

正常のマウス受精卵に、マウス正常細胞、ラット細胞、マウス悪性腫瘍細胞 (テラトーマ細胞) などを注入し融合させ、一個の胚盤胞まで発育させてキメラマウスを作出する。

3) 完全遺伝的ホモ型マウス (マーカート法)

マウスの受精卵をとり、雄核と雌核の融合前に微小ピペットにて一方の核を抜き取り、サイトカラシン B 処理にて 2 倍体 (完全ホモ型) となし、これを胚盤胞にまで発育せしめ、異種マウス子宮内に移植して作出する。

4) 人工単位生殖マウス

マウス未受精卵を自然発育させる。又一倍体と二倍体の卵のキメラマウスを作出する。

以上のほか、成体細胞核の卵への移植 (核移植)、染色体の卵への注入、などの操作もある。これらの動物は、自然界には存在しない、全く新しい実験動物であり、遺伝、発生、老化、免疫、腫瘍の研究をはじめとして、その有用性は極めて大であると考えられる。

佐 渡 敏 彦 (放射線医学総合研究所・生理病理)

免疫機構が生体の老化に果たす役割を理解するためには、まづ生体の中で免疫機構が果たす役割が本来的に如何なる性格のものであるかをはっきりととらえておく必要がある。

長い間、生体にとって免疫機構が果たす第一義的な役割は、微生物の感染から身をまもる、いわゆる生体防衛にあると考えられてきた。しかし、免疫学の発展と共に、生体の免疫学的恒常性維持および免疫監視という 2つの重要な機能が考えられるようになった。さらに最近では、抗イデオタイプ抗体に関する研究を基礎にして Jerne によつて提唱された免疫応答のネットワーク説、あるいは Zinkernagel らによつて見出されたリンパ球の自己認識機構の確立過程における胸腺上皮の主要組織適合抗原系の果たす役割についての研究、の急展開によつて、免疫学に新しい conceptual な変化が起りつつあるように見える。このような免疫学の concept の展開如何によつては、免疫機構発生の進化学的意義を一義的に生体防衛に求める concept を根本的に考え直さざるを得ない時期が来つつあるように見える。そういう意味で、第一部では免疫学の新しい動向にたつて簡単な総説を試みる予定である。

次いで、第二部では、免疫機能の加齢変化を 2つの異なったアプローチで解析した結果について述べる。その 1つは、T細胞機能の加齢速度に関する遺伝要因の解析に関するもので、ここでは T細胞機能の加齢変化を系統間差異及び主要組織適合抗原系の差異という面から解析したものである。今 1つは、物理化学的刺激による免疫機能の加齢促進のモデル実験として、若年期の放射線被曝が免疫機能の加齢に及ぼす効果を解析したものである。

最後に、これらの実験から得られた結果の免疫学化学的意義について考察したい。

○細野隆次（金沢大），佐藤佳子，相沢慎一，三井洋司（老人研）

C. elegans の体細胞は 1,000 以下で生きた状態で全て同定できる¹。我々はこの線虫の分裂終了細胞の運命を追跡することを当面の目標にしている。今回はその基礎資料として行なった異なる条件下での生存曲線の解析に基く 2,3 の知見を報告する。

(1) 飼育条件。 C. elegans は寒天培地に， E. coli を餌として与え，通常は 20℃ で，温度感受性株（ts）は 16℃ で孵化させた後 25℃ に移して飼育した。 C. elegans は両性生殖体で 300 前後の子孫が生じ， age synchrony にはこれらの除去が問題となる。更に，生殖腺が腹部のかなりの部分を占めるようになるため体細胞の検索に障害となる。そこで雄， ts の生殖腺欠損株（gon）あるいは両性生殖体に DNA 合成阻害剤である 5-Fluorodeoxyuridine (FdUrd) を与えた場合の生存曲線を比較検討した。雄の 50% 生存期で見た平均寿命は両性生殖体とほぼ一致した。しかし，雄は動きが複雑で観察に時間を要する上，事故死などのため老衰で死ぬ個体の収率が低く，この方法では良好な材料とは言えない。 FdUrd の濃度を変えることによって C. elegans を不妊にしたり，成長を抑えたりできる²。孵化直後に成長を抑制する濃度の FdUrd を与えると第 1 期幼虫の状態で生き続け寿命は正常より 30% ほど短くなったにすぎない。 K5 (ts, gon) は低温では野生型と変わらないが， 25℃ で飼育すると，生殖腺が未発達となる。この突然変異体は平均寿命が野生型と変わらないだけでなく，老令線虫の体細胞の観察に向いていた。

(2) 寿命の検討。このように C. elegans の平均寿命は，性，不妊，あるいは成長阻害によってもそれ程大きな差がない。また変温動物であり， 25℃ から 16℃ では低温になるほど比例的に長寿になるが， 50% 生存時期を規準にすると集団が減少する時期（死亡期）とそれ以前（加令期）における生存曲線の様子はよく一致する。死亡期に入る前に摂食を中止するか調べた。咽頭運動は体長増加に比例して活発になり成虫になって間もなく最高になる。その後低下し始めるが健全な虫体では死亡期に入っても最高値の 2/3 程度の咽頭運動を維持している。また成虫期まで正常に飼育したのち絶食すると，産卵能力を失い，体内で孵化した幼虫のため大部分が 2 日以内に死亡する。こうしたことから， C. elegans ではある種の昆虫に見られるように，成虫になって間もなく摂食を中止することはない。しかし，死亡期に入った線虫は個体差が著しく，運動能力が低下した個体は咽頭運動も失い，やがて死亡する。死亡期に入る原因を探るため，次に飼育温度の遷移実験を行なった。はじめに 16℃ で飼育してから 25℃ へ移すと死亡期の減少初速度は速くなった。逆に 25℃ から 16℃ へ移すと初速度はおそくなり平均寿命も長くなった。しかし，何れの場合も最大寿命は変わらなかった。このように平均寿命で調べると， C. elegans の寿命の変更は小さいが，集団を構成する個体には著しい差があると思われる。

寿命の可塑性が小さいのは，正常な成熟過程より孵化時の生存能力が寿命決定の大きな要因になっているのかも知れない。こうした研究に ts 株を用いて FdUrd によ

って発生を停止させる方法は極めて有利である。更に、生存曲線から老化を推定するには、ある特定の指標によって老化の段階性を明らかにする必要があることを上の結果は指摘している。

1. Sulston, J.E. and Horvitz, H.R. (1977) Develop. Biol. 56 110 - 156。
2. Hosono, R. (1978) Exp. Geront. 13 369 - 374。

○小山内 実 (東京都老人総合研究所・生物学部)

菊田 純子 (岡山中央病院)

蚕蛾は、羽化後、全く摂食を行わないので、寿命が凡そ3週間と極めて短かく、老化のメカニズムを追求するのに好適の材料である。死亡数の増大を、経日的に調べたところ、前期、中期、後期と3つのピークが見出された。このことは、多分、生体内代謝の変化を反映しており、その激しい代謝の変化に適応できなかった個体が死に、それが死亡数の増大を惹き起こすものと推定された。この推定を確かめるため、寿命に重要な影響を及ぼす蛋白質代謝に着目し、蚕蛾が生化学的にみて、殊に窒素化合物代謝の上では、一種の肉鎖系であるので、体全体のアミノ酸プロールの加齢による変動を通じて、蛋白質代謝を解析しようとした。亦、このアミノ酸プロールの変動を追求することにより、老化に重要な意義を有する、異化作用の結果生ずる、最終窒素化合物の解析も、合わせて行うことができた。材料として、大造×宝鐘のF₁を用い、羽化後1匹ずつ、25℃で分籠飼育したものを使用した。各個アミノ酸の定性及び定量の測定には、アミノ酸自動分析機(日本電子株式会社製、JEO JLC-6AH)を使用し、2-カラム-1-ラインシステムを適用した。用いた緩衝液は、第1のカラムに、pH 2.73, 3.15と3.90のクエン酸リネウム緩衝液と、第2のカラム用に、pH 4.3と5.1のクエン酸ナトリウム緩衝液である。蚕蛾ホモジネートは、1%ピクリン酸心除蛋白した後、Dowex-1カラムでピクリン酸を除去し、6N HClで加水分解したものとし、試料として、分析値を比較検討した。貴重な蚕を御提供下さいました、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。

54種の標準試薬を用いて、アミノ酸自動分析機のケマートに現われた蚕蛾の35のフリーのニンヒドリン陽性物質が同定された。未だ同定されないもう1個の物質は、塩酸による加水分解で消失するので、ペプチッドと考えられる。Try, Cys, β -Alaは検出されなかつたか、或いは僅少であった。GluとAspも少く、アミンの型で存在している。全生涯を通じて、明瞭にその存在を確認でき、量的にも多い22のニンヒドリン陽性物質のうち、加齢に伴い増加するのは、Tau(タウリン)とNH₃である。NH₃は、中期までは略一定のレベルを保つが、後期で急激に増加する。このことは、老齢期では、蛋白質の合成、分解のバランスと共に、窒素最終生産物を合成する異化の代謝系が変化することを示唆するものかもしれない。Tauは、生涯を通じて、絶對的に増量する。この現象は、他の昆虫の加齢に伴う現象として知られており、加齢の一般的特徴の1つかもしれない。Hisは、雌においてのみ、多少のふれはあるが、日齢に伴う増加を示した。以上のアミノ酸等について、Tyrは、生涯中、絶對量的低下の傾向を示した。殊に、雌における加齢的減少は著しい。

Val, Isol, Leu, Phe, Ala, Gly, Thr, Aspn, Lys, Arg, Glun, Metそして恐らくはPro, Ser, Cysta(シスタチオン), Lan(ランタチオン), PEA(フォスフォエタノールアミン)は、お互に類似の加齢的变化を示した。初期には、成虫成熟化のために、蛋白質の合成が盛んで、レベルは低下し、中期では、多少の変動を認

められるものの、やや安定したレベルを保つが、後期(老齡期)では、一旦レベルが急
に上昇した後、低下する。これらの3つの時期は、死亡数の増大で区分された3つの
時期と全く一致し、死亡数増大が、体内代謝の変化に適應できなかった個体の増加
に基づくことと裏附けた。殊に、老齡期での多くのアミノ酸の急激なプールサイズ
の変化は、蛋白質の合成と分解の平衡が、この時期で急激に変化したことを示す。

大抵のアミノ酸の加齢による変動は、大きな雌雄差を示した。しかも、Cysta,
Lan, PEAのように、量的のみならず、質的な差異を示すものも多い。これら雌雄
の差は、卵巣の成熟化と産卵を終了した中期の半ば以降にも明瞭に存在し、性ホル
モンを保有しないカイコがでは、性染色体上の遺伝子、又は遺伝子群が、直接アミノ
酸レベルの調節に関与している可能性がある。

フリーのCysは幸じて検出される程度であるが、他の含硫アミノ酸プールは、加
齢と共にかなり変動する。その中Tauのみが継続して増加する。これらの事実は、
体外から含窒素物質の補給が全くない蚕蛾でも、含硫アミノ酸として蛋白質のturn-
overがかなり盛であることと示唆するものであろう。

昆虫では、アミノ酸や蛋白質の異化作用の結果生ずる最終含窒素化合物として、
NH₃, 尿素, グアニン, 尿酸, フテリン, オモクローム(Tryより), ユーメラニン
(Tyrより)等があげられるが、本実験で、蚕蛾では尿素の存在は全く認められず、
アラントイン酸及びアラントインも検出されなかった。尿素サイクルのメンバー、
シトルリンマアルギニノ琥珀酸は全然存在せず、オルニチンの量も極めて少い。フ
リーのアルギニンの量的変化も、他のアミノ酸プールの変動に比べれば小さく、特
に雄では著しい。即ち、蚕蛾における尿素サイクルの働きは余り活発ではなく、恐
らく、完全には動いてはいないように思われる。合目的にみれば、水溶性の尿素
と窒素最終生産物として生産する必要は、25°Cで飼われた通常条件下の蚕蛾にはな
い。雄のProのレベルが加齢に伴って上昇する一因は、オルニチンからの形成によ
るものかもしれない。

肉鎖系である蚕蛾のフリーアミノ酸レベルを、絶えず餌を摂取し、かつ排泄も行
う開放系の双翅目昆虫のレベルと、個々のアミノ酸の配分率で比較すれば、大抵の
アミノ酸については、良く値が一致する。このことは、鱗翅目及び双翅目と云う、
かなり相異なる完全変態昆虫に共通した機構で、齢依存のアミノ酸プールの維持が
行われていることを強く示唆する。前記の加齢に伴う3つの区分、特に後期におけ
るアミノ酸プールの変化は、他の開放系昆虫では見出されてはならず、双翅目昆虫
の一生を通じて、有意義のレベル変化を認めないと云う報告もあった。蚕蛾と云
う肉鎖系の利用によって、アミノ酸プールの加齢的変動が、明瞭に把握、確認でき
たことと云う。亦、他の昆虫では、 β -Alaの経日的増量が見出されたが、蚕蛾に
おけるこのアミノ酸の絶対量は少く、かつ、初期の成虫にのみ検出されたので、 β -
Alaのレベル変動は、昆虫における加齢及び老化の、一般的な指標にはなり得ない
ように思われる。

大 羽 滋 (東京都立大学理学部生物学教室)

研究室で長年月維持されたクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) 成虫の寿命は、一定の飼育条件下ではきわめて安定である。例えば標準培地皿 (乾燥酵母 5.0g 8%, 蔗糖 10%, 寒天 1%) を用いて、飼育瓶あたり 10 対の雌雄で維持したときの TK (Tokyo) 系統の平均寿命は

	30°C	25°C	20°C
雌	51.12 ± 1.05 日	74.63 ± 1.17 日	103.41 ± 2.15 日
雄	49.85 ± 1.38 日	59.58 ± 1.06 日	95.45 ± 1.72 日

で、各温度とよ雌が長命であるが、30°C では有意差はない。生存曲線 (図 1) に

みるように、ほとんど死亡のおこらない一定期間 (30°C で約 20 日, 20°C で約 50 日) を経たつて死亡が始まるが、最長寿命個体は 30°C で 90 日, 20°C で 170 日以上生存した。死亡期間での曲線は正規分布を示し、平均寿命を O として時間軸に対しては、3 段階の温度における雌雄各々の生存曲線は互いに一致する (図 2, 3)。

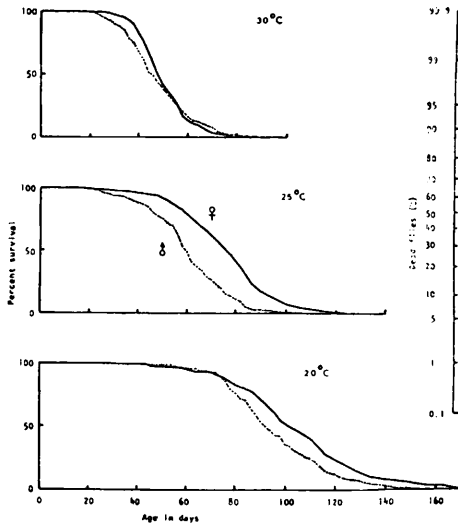


図 1 3段階の温度におけるTK系統の生存曲線

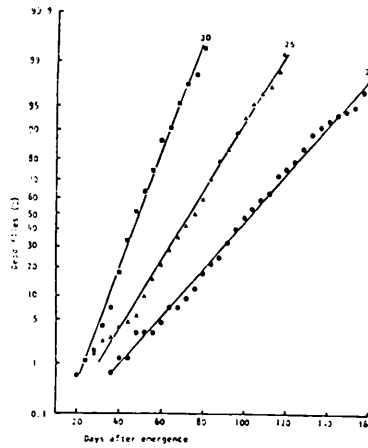


図 2 死亡曲線の正規化 (TK, 20°, 25°, 30°C)

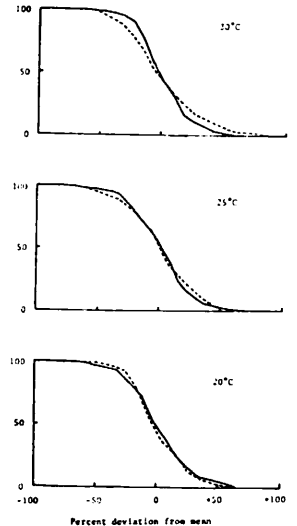


図 3 TK系統の相対生存曲線と温度

昆虫の寿命における遺伝的変異の重要性は周知の通りであるが、その役割の程度あるいは環境要因との相互作用についてはほとんど知られていない。クロショウジョウバエは生存曲線が安定しており、また環境要因の影響が受けやすいので、この目的の研究には好適な実験材料と思われた。

寿命の遺伝的差異 — 標準培地での系統差

クロショウジョウバエの自然集団中に、どの程度寿命についての遺伝的差異が存在するかを知らずため、1973年秋に板山町の所木場で採集された、以後毎世代 10~20 個体で維持されてきた多数の単一系統の中から任意に抽出した 26 系統について、標準培地皿、25°C での平均寿命を調べたところ、雌: 56.24~105.88 日 総平均 71.44 日 変異係数 27.2% とになり、かなりの系統間差異が認められた。雄: 57.82~90.12 日 " 76.75 日 " 28.5% となり 26 系統の中から再び無作為に 12 系統を選んで再調査したところ、2 回の平均寿

命はよく一致し (r=0.965), 系統差は遺伝的母因によることを示唆している。2回の結果をまとめた表Iに示すように、総平均寿命では雌雄差はないが、個々の系統についてはTKと逆に雄のほうが長命な系統(B22)や、雌雄ともに長命な系統(A13, A35)などが存在する。

飼料培養培地での寿命

同じ松山由来の12系統について、酵母含有量を1/4に減らした低リンバクテリウム培養培地での寿命は表2のようになり、全系統平均では雌は標準培地より長命だが、雄では著しく短命になり、しかも系統差が著しく、標準培地同様の寿命を示す系統(A54)もあり。

高浸透環境での寿命

本種の生存限界に近い30°C, 31.5°Cでの寿命を調べた。30°Cでの結果(表3)に明らかなるように、標準培地にもおなじみの寿命は著しく短縮され、雌雄間にも系統間にもほとんど差が認められる。

放射線照射による寿命の短縮

羽化後2日の成虫に50 KRのγ線照射を行い、標準培地、25°Cでの寿命を比較した結果は表4の通りで、12系統のすべてで雄は雌より短命となり(総平均で雌51.16日、雄34.21日)。TK系統の場合もこの平均に近い。

アミノ酸欠乏培地における寿命

蔗糖10%, 寒天1%のみを含む、アミノ酸、タンパク質を全く欠く培地においても、40日前後の平均寿命が保たれるが、雌は雄にくらべてやや長命である。この培地では産卵は全くおこらない。

以上明らかなるように、温度、栄養、放射線等の環境要因と寿命との関係は、系統によってさまざまに異なる。このことは、別の機会にのべた交雑実験の結果と相まって、遺伝的母因の多様性を物語す。

表1 松山集団由来の単一雌系統における寿命の系統間変異(25°C, 標準培地)

Line	Female			Male		
	Mean ± SE	SD	CV	Mean ± SE	SD	CV
A 11	58.88 ± 1.83	18.3452	31.2%	68.34 ± 2.33	23.2758	34.1%
A 12	80.70 ± 1.68	16.8128	20.8	85.82 ± 1.99	19.9080	23.2
A 13	84.56 ± 2.11	21.0743	24.9	89.36 ± 2.64	26.4036	29.6
A 33	66.36 ± 1.95	19.5446	22.6	70.00 ± 1.99	19.9128	28.5
A 35	101.94 ± 2.57	25.7176	25.2	81.74 ± 2.80	27.9623	34.2
A 54	71.02 ± 1.97	19.6845	27.7	73.40 ± 1.79	17.8684	24.3
B 12	70.72 ± 2.06	20.5913	29.1	58.42 ± 1.74	17.4454	29.9
B 15	68.84 ± 1.73	17.3767	25.2	86.50 ± 2.36	23.5939	27.3
B 22	66.68 ± 1.77	17.6657	26.5	85.94 ± 1.92	19.1592	22.3
B 31	56.50 ± 1.81	18.0762	32.0	60.08 ± 1.96	19.5723	32.6
B 33	62.10 ± 1.53	15.2509	24.6	64.66 ± 1.46	14.5988	22.6
B 42	86.96 ± 2.07	20.6959	23.8	85.80 ± 2.39	23.9098	27.9
Average	74.61	19.2325	26.1	75.01	21.1342	28.0

表2

Line	Female			Male		
	Mean ± SE	SD	CV	Mean ± SE	SD	CV
A 11	69.46 ± 3.70	37.0220	53.3%	30.04 ± 2.27	22.6707	75.5%
A 12	73.88 ± 2.19	21.9241	29.7	58.28 ± 2.39	29.8510	51.2
A 13	81.04 ± 3.50	35.0234	43.2	24.52 ± 1.76	17.6298	71.9
A 33	83.34 ± 2.54	25.4229	30.5	34.10 ± 1.86	18.5804	54.5
A 35	99.94 ± 2.87	28.7186	28.7	55.02 ± 2.36	29.5547	53.7
A 54	86.90 ± 2.78	27.7523	31.9	75.40 ± 3.49	34.9170	46.3
B 12	81.29 ± 4.12	39.0698	48.1	24.33 ± 2.60	25.9778	106.8
B 15	61.86 ± 2.28	22.7969	36.9	45.50 ± 2.49	24.8763	54.7
B 22	77.64 ± 1.91	19.1162	24.6	56.50 ± 2.68	26.8498	47.5
B 31	69.10 ± 2.25	22.5182	32.6	50.02 ± 2.88	28.7757	57.5
B 33	57.38 ± 2.53	25.2962	44.1	40.12 ± 1.98	19.7814	49.3
B 42	99.50 ± 2.78	27.8056	28.0	38.20 ± 1.69	16.9068	44.3
Average	79.44	27.7055	36.0	44.34	24.6976	59.4

表3

Line	Female			Male		
	Mean ± SE	SD	CV	Mean ± SE	SD	CV
A 11	40.32 ± 0.87	6.1758	15.3%	42.28 ± 1.07	7.5567	17.9%
A 12	48.40 ± 1.00	7.0479	14.6	43.68 ± 1.44	10.2029	23.4
A 13*	44.35 ± 1.07	6.7693	15.3	48.95 ± 2.10	13.2857	27.1
A 33	47.00 ± 1.06	7.4724	15.9	46.32 ± 1.30	9.1661	19.8
A 35	54.00 ± 1.29	5.0914	16.8	58.76 ± 1.81	12.7880	21.8
A 54	46.00 ± 1.14	8.0535	17.5	45.44 ± 1.45	10.2323	22.5
B 12	50.96 ± 1.10	7.7669	15.2	53.32 ± 1.80	12.6901	23.8
B 15	46.16 ± 1.56	11.7532	25.5	43.72 ± 2.54	17.9330	41.0
B 22	43.12 ± 1.61	11.4474	26.5	51.64 ± 1.79	9.8432	19.1
B 31*	38.70 ± 0.58	5.5940	14.5	51.75 ± 2.12	13.3796	25.9
B 33	39.24 ± 1.43	10.4512	26.2	51.20 ± 2.01	14.2012	27.7
B 42	46.22 ± 1.37	9.7080	21.1	54.76 ± 1.42	10.7662	18.4
Average	45.42	8.4426	18.7	49.32	11.7708	24.0

表4

Line	Female			Male		
	Mean ± SE	SD	CV	Mean ± SE	SD	CV
A 11	54.76 ± 1.45	10.2829	18.8%	41.52 ± 0.87	6.1254	14.8%
A 12	57.68 ± 1.94	13.7476	23.8	31.72 ± 1.01	7.1686	22.6
A 13	50.80 ± 0.97	6.8363	13.5	40.60 ± 1.15	8.1115	20.0
A 33	43.28 ± 1.13	7.9592	18.4	37.12 ± 0.70	4.9390	13.3
A 35	54.36 ± 2.06	14.5543	26.8	33.60 ± 0.78	5.4847	16.3
A 54	56.04 ± 1.67	11.8373	21.1	37.40 ± 0.97	6.8809	18.4
B 12	39.56 ± 1.56	11.0364	27.9	28.96 ± 0.70	4.9732	17.2
B 15	57.08 ± 2.29	16.1824	28.4	32.92 ± 0.87	6.1539	18.7
B 22	64.40 ± 1.69	11.9198	18.5	37.16 ± 1.12	7.9163	21.3
B 31	58.16 ± 1.74	12.3029	21.2	41.52 ± 0.77	5.4332	13.3
B 33	45.16 ± 1.31	9.2744	20.5	40.40 ± 1.08	7.6479	18.9
B 42	32.68 ± 0.69	4.8548	14.9	31.60 ± 0.94	6.6302	21.0
Average	51.16	10.8990	21.1	36.21	6.4554	18.0
TK	52.48 ± 1.43	10.1403	19.3	35.60 ± 1.18	8.3422	23.4

○相垣 敏郎 大羽滋 東京都立大学 理学部 生物

クロショウジョウバエ(*Drosophila virilis*)には、寿命に関して遺伝的な変異が存在し、各系統固有の寿命を示す。それらのうちのいくつかの系統においては、雌雄の寿命に差がみられる。この雌雄差は、標準飼育条件(25°C、恒明、飼育瓶あたり雌雄各10匹、2日毎に培地の交換)の下で、標準培地(乾燥ビール酵母8%、Sucrose 10%)で測定した結果である。性による寿命の差は、飼育条件とどのような関連があるかを調べる目的で、生態的條件ともいえる性比、密度の2つの項目について実験を行った。

材料としては、30年以上にわたって東京都立大学遺伝学研究室で維持されてきたクロショウジョウバエの標準系統(Tokyo 略号TK)が用いられた。このTK系統は、標準飼育条件において雌が約70日、雄が約55日の寿命を持ち、この雌雄差は、くり返しの測定において安定なものであった。

方法と結果

雌雄それぞれ未交尾のまま隔離して維持した場合、標準条件(♀10,♂10)で維持した場合に較べて、雌の寿命は10%以上長くなり、逆に雄においては、10%以上短くなる。よって単純に生殖活動と寿命との関連を見いだすのは困難である。

従って、単一の性で維持し、雌雄について別々に、個体密度と寿命との関連について検討した。雌雄それぞれ飼育瓶[直径3cm×高さ10cm]あたり、2~20個体の範囲にわたって寿命の測定を行った。1個体あたりの占める領域の相対値を密度の逆数としてプロットすると、高密度になるにつれて短命化するという密度依存傾向が、雌雄ともに見られた。雄の方が密度に対して受ける影響がわずかに大きいようである。

雌雄共存の条件の場合については、性比を(♀:♂=1:1)の一定に保ち、総個体数を4~20個体の範囲で変動させ、雌雄の寿命を測定した。結果は、各条件での雌雄の各寿命は、総個体数にほとんど依存することなく、この範囲においては、ほぼ一定の寿命(♀約70日、♂約55日)を示した。

さらに雌雄共存条件は、密度、性比の両方の要因を含むので、一方の性の個体数を一定とし、他方の性の個体数を変化させるというやり方で測定した。この方法だと、性比(♀/♀+♂)が増大かつ総個体数増大、あるいは性比が減少して総個体数増大という相反する組み合わせが可能である。その結果、雌雄の反応を見ると、それらの寿命は総個体数に依存するのではなく、飼育瓶内の個体数の増加が、雌によるものであるか、あるいは雄によるものであるかに依存している。雌の個体数が一定であれば、雄の個体数の増加に伴い、雌の寿命は短くなる。雄はこの条件で、顕著な変化は見られない。また、雄の個体数が一定であれば、雌の個体数の増加に伴い、雌雄ともに寿命は長くなる。総個体数20として、性比を変化させた場合(♀/♀+♂: 0, 0.1, 0.5, 0.9, 1.0)、雌雄めづかにその影響は異なっているが、♀の

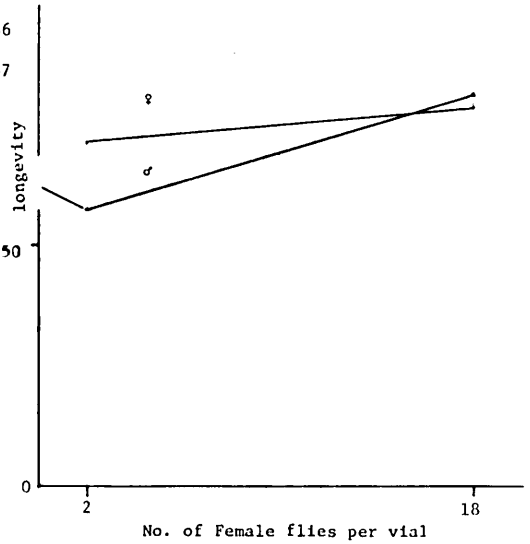
個体数増加, ♀/♂値の増加に伴い, 雌雄と子の寿命がのびる傾向がみられる。

興味深い着目は, 雄が雌と同等の長寿を示していることである。 性比, 密度の変化に伴い, 各個体の生殖活動(産卵, 交配行動)及び, その他の行動に当然変化が起こることが考えられるが, 現在の data では, その関連は明らかではない。

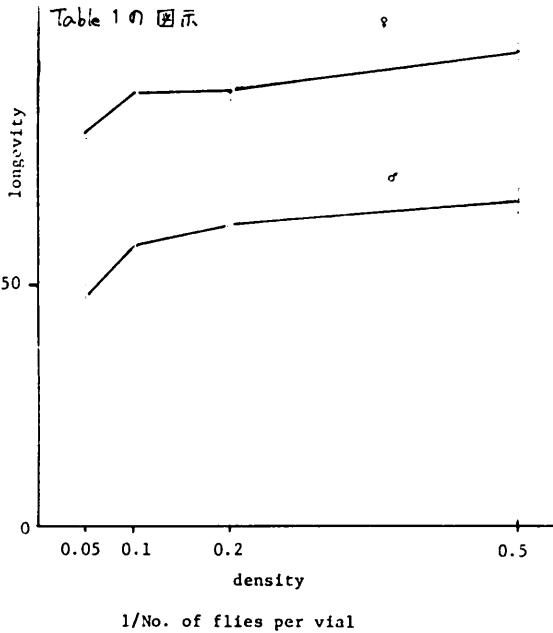
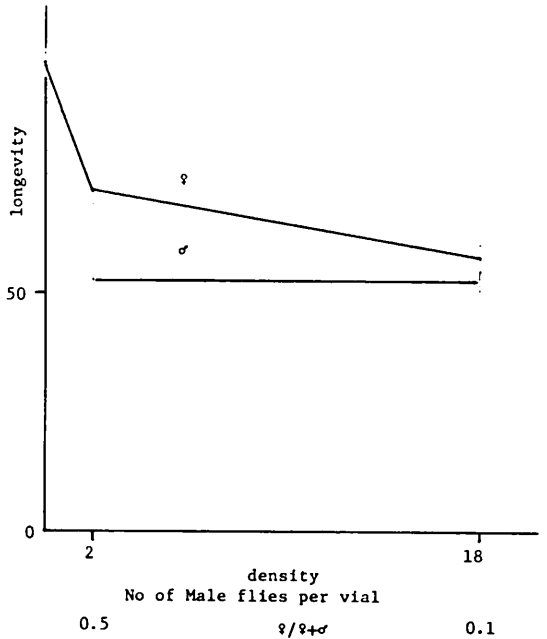
Table 1 雌雄別個体数増加時の寿命

Female/vial	Mean ± S.E.	Male/vial	Mean ± S.E.
20 (0.05)	81.18 ± 1.38	20 (0.05)	47.40 ± 2.12
10 (0.1)	89.84 ± 2.44	10 (0.1)	57.95 ± 2.77
5 (0.2)	90.40 ± 1.82	5 (0.2)	62.60 ± 2.36
2 (0.5)	98.25 ± 1.81	2 (0.5)	67.60 ± 2.37

各2個体比で 母の個体数を変化させた時の寿命
Longevity (2-18 females + males)



母2個体として 父の個体数を変化させた時の寿命
Longevity (2 females + 2-18 males)



性比(1:1)で 密度を変えた時の寿命

	♀	♂
♀10♂10	70.05 ± 2.01	57.70 ± 1.90
♀5♂5	70.65 ± 2.46	55.10 ± 1.47
♀2♂2	71.50 ± 2.99	57.85 ± 1.98

総個体数20として 性比を変えた時の寿命

longevity	# of flies	longevity
♀	♀ : ♂	♂
Mean ± S.E.		Mean ± S.E.
	0 : 20	47.40 ± 2.12
57.40 ± 2.96	2 : 18	52.85 ± 1.18
70.05 ± 2.01	10 : 10	57.70 ± 1.90
79.32 ± 1.09	18 : 2	81.80 ± 3.04
81.18 ± 1.38	20 : 0	

○山本明彦・大羽滋(都立大・理・生物)

寿命についての研究は多し、が集団遺伝学的には適応力と寿命の關係が最も興味をそそぐ点である。今回適応力の代表的な尺度として生殖能力と生存力に注目し、それらの物質と寿命との関連をクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) 用いて調べたので報告する。クロショウジョウバエの加齢現象については大羽らによって数多くの貴重なデータが累積されている。よって本研究では同一材料を用いて大羽らのデータと対比できるように考察した。

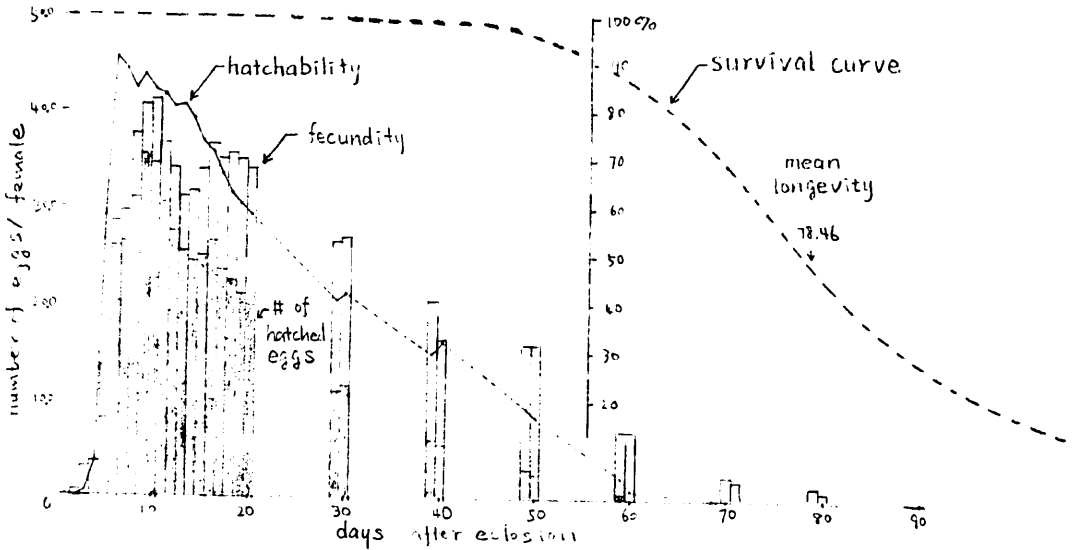
材料は1972年に松山で採集されたクロショウジョウバエの単性由来する12系統(NY)と東京産ですでに30年以上実験室内で維持されてきたもの(TK)の計13系統である。これらは現在ではかなり近親交配が進んでおり、遺伝的に安定しているものも考えられる。生殖能力の尺度として孵化したての成虫を1瓶当り雌雄5匹ずつを入れ(径3cm×高10cm)、雌親がすべて死亡するまでの産卵数およびその孵化率を記録した。各系統で2親ずつ用意し合計雌親10匹の産卵を調べた。生存力としては孵化後6~10日のハエに産ませた卵の成虫に至る率を計し、1回の実験はすべて25±1°C、全明条件で行った。

得られた結果を表にまとめ下に示す。産卵力(fecundity)および孵化卵(hatched

	longevity (days)		fecundity		hatched eggs		hatch-ability (%)	develop-mental time (hrs)	egg-to-adult viability (%)
	♀	♂	# eggs	mean age (days)	# eggs	mean age (days)			
NY A11	71.6±3.2	76.7±3.9	1352	26.0±1.1	825	20.1±1.1	61.0	287.5±0.7	79.5
A12	59.7±1.4	69.5±1.9	1663	29.2±1.1	1298	25.3±1.1	77.4	321.4±1.5	82.7
A13	73.6±1.8	93.2±3.3	1155	34.9±1.2	304	16.8±2.2	26.3	302.0±1.2	67.0
A33	87.8±2.6	63.1±2.2	1819	30.0±1.1	934	20.4±1.1	51.4	306.9±0.4	86.2
A35	102.0±3.7	78.2±4.4	920	32.5±1.2	322	16.3±2.2	35.0	293.9±0.7	86.7
A54	83.6±2.5	81.6±3.7	1743	28.7±1.1	656	22.7±2.2	37.6	296.1±0.9	85.4
B12	79.6±2.6	64.7±3.7	845	20.2±1.1	217	11.1±1.1	26.9	290.5±1.0	33.5
B15	90.2±2.8	84.7±4.4	1520	27.3±1.1	740	18.1±1.1	48.7	306.0±1.1	86.3
B22	76.5±1.8	104.0±3.4	1471	30.7±1.1	800	23.4±1.1	54.4	289.8±0.5	80.2
B31	76.5±2.2	94.6±3.6	1712	35.2±1.1	768	23.1±1.1	44.9	331.2±1.0	57.3
B33	58.4±1.5	61.6±1.6	1505	25.0±1.1	904	19.3±1.1	60.1	310.6±0.6	64.5
B42	85.7±3.4	78.8±4.0	1131	27.4±1.2	481	16.5±2.2	42.5	302.2±0.6	67.7
TK	69.2±1.7	58.8±1.8	1340	23.6±1.1	713	15.3±1.1	53.2	293.4±0.6	88.9
mean	79.6	77.4	1398	28.5	689	19.1	49.3	302.4	74.8

eggs)の項の卵数(# eggs)とは雌1匹当りの一生の総産卵数であり、mean eggとは産卵時の親の平均日命を表わす。孵化率(hatchability)は雌親の一生を通じての総産卵数当りの孵化卵数である。また寿命(longevity)は大羽のデータによる。この表より産卵数は系統ごとに850~1820まで2倍の差があり、孵化卵数に至るとは220~1290まで6倍ほどの差があることがわかる。また孵化率は26~77%、さらに日命6~10日の親に産ませた卵の成虫に至るまでの生存率は34~89%でやはり大きな系統差がみられる。孵化率は13系統を平均すると49%となりほぼ半分である。これは次に示す図からわかるように加齢とともに、その孵化率が著しく低下する点で、ど

7時には80~90%とかなり高い値を示す。生存率に70%以下からかなり低い値を示す系統(B12)があるがこれは近親交配により劣悪な遺伝子の固定を引起したためと考えられる。B系統を平均した産卵数、孵化卵数、孵化率の日令にともなう変化を標準化した生存曲線(survival curve)と共に図に示す。これより70シヨウジ



ヨウバエで雌性のある卵を産み始めるのは孵化後4~5日目、これに続く6~13日目は孵化率は80%を越えて100%となる。この時期の雌は1日平均30前後の性のある卵を産んでいる。この後は孵化率・産卵数ともに減少していくが後者の減少はやや遅れて現われる。またハエが死に始める40日目ごろには孵化卵の大部分は産み終わっている。産卵自体は少数ではあるが死の直前まで続く。このように70シヨウジヨウバエの事実上の生殖活動は寿命のつまるかなり以前に終了するところがあるが、寿命と生殖能力の関連の有無を考察するために先、表に示した諸形質間の相関を計算した。まず雌の寿命と産卵時の平均日令の間には $r=0.4151$ 、また雌性のある卵を産む時の平均日令との間には $r=-0.3433$ の相関係数となり共に有意ではなかった。このことは生殖の時期(もしくは期間)が寿命とはかなり独立した形質であることを示唆している。しかし雌の寿命と孵化卵数の間には $r=-0.6811$ と5%レベルの“負”の有意な相関があり、長命の雌の子の数が少ないという結果が得られた。これに付随して孵化率と雌の寿命の間にも $r=-0.7434$ という1%レベルの“負”の相関が得られ、長命のほど一生を通じて孵化率が低いこととなる。また雌の寿命は産卵総数との間でも有意では無いが負の相関を示した。これらのことは雌の寿命には産卵過程はむしろこの、授精過程(再交尾等)も関与している可能性を示している。

また生存率を卵期、幼虫期、蛹期に分けて各々の生存率の全体への貢献度をみるに、相関係数では幼虫期の生存率のみが $r=0.8779$ と1%レベルでの有意性を示し、この時期の重要性がうかがわれる。しかし全死亡の半分は卵期に起っており集団遺伝学的には大きな役割を果たしている。

○米沢由美子、町田武生※、小山内実、能村哲郎（都老人総合研究所 生物学部）

（※鹿児島大学理学部 生物）

動物の行動や活動の加齢に伴なう変化については、様々な研究がなされてきた。われわれも、雄マウスの探索行動および活動量が、齢と共に減少することを、オープンフィールド・テストを用いて明らかにした。これに関連して、これら探索行動や活動が精巣ホルモン（アンドロジェン）の支配を受けていることが知られている。すなわち、去勢により精巣ホルモンの影響を除くと探索行動は著しく低下するが、これに精巣ホルモンのテストステロンを投与すると、探索行動は回復する。これらの知見から、マウスにおける加齢に伴なう探索行動の低下には、血中アンドロジェン・レベルの低下が関与しているのではないかと考えられる。ここで血中アンドロジェン値は、ヒトでは年齢と共に低下するといわれ、ラットでは低下するという報告と、変化しないという報告があるが、マウスでは十分な知見はない。そこで、われわれはマウスの血中アンドロジェン量を年齢を追って測定した。また、得られた値に個体間のバラツキが大きくあらわれたが、その原因について検討した。

CD-1 (ICR) 系雄マウスを用い、ケージあたり5匹前後収容し、14時間照明、室温22°C、湿度55%の条件下で飼育した。われわれの用いたコロニーの生存曲線は図1に示され、最大寿命は雌908日、雄730日、50%生存日数は雌512日、雄450日であった。従って、450日を越えた雄を老齢マウスと見なした。

アンドロジェン測定には、30日齢より680日齢まで、計140匹のマウスを用い、頸静脈より全採血し、血漿からステロイドを抽出し、遊離のテストステロン (T) をラジオイムノアッセイにより測定した。

140匹の測定値の大半は15 ng/ml plasma 以下であったが、個体差が大きく、同一齢の動物でも数100 pg から数10 ng までバラツキが見られた。しかし、これらを高い値のもの、中間のもの、低値を示すものと区分してみると、いずれも年齢と共に減少の傾向がみられた (図2)。T の測定値にこのような大きな幅がみられる原因について、検討を重ねたところ、i) 測定技術に大きな問題はなく、ii) 血中の他のアンドロジェン、例えばDHT、アンドロステンジオンとの量的な比に一定の相関は得られず、また、iii) 標的器官のT結合能力にも原因を帰することができなかった。

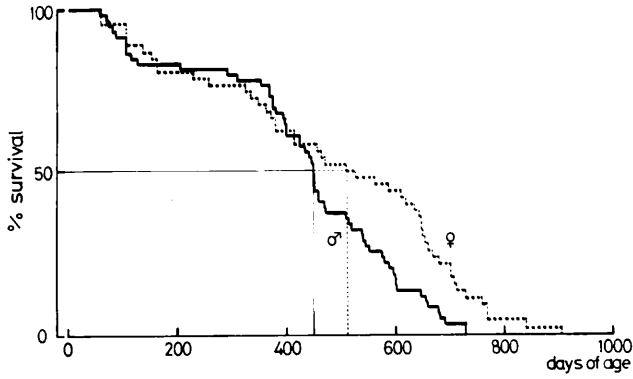
ところが、非常に高いT値を示す個体は各齢とも、おおむね1ケージに1匹ずつ存在することが知られた。そこで、ケージ中でのマウスの社会的な優劣とT値との関係を調べた。210、315、及び679日齢の各ケージについて、優位の個体はT値が高く、劣位の個体のTは低値であることが知られた。(図3)。

以上の結果から、雄マウスの血中T値は、年齢と共に低下すること、また、各齢ともT値に大きな幅があり、これは動物の社会的順位を強く反映することが知られた。

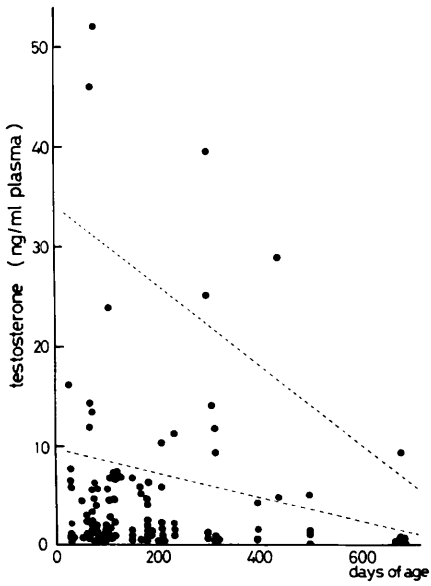
図 1. 東京都老人総合研究所における CD-1 (ICR) 系マウスの生存曲線。

図 2. 雄マウスの加齢に伴う血中テストステロン値の変化。

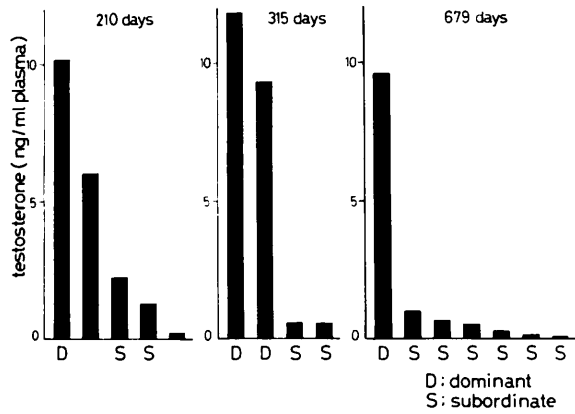
図 3. 雄マウスの社会的優劣と血中テストステロン値。



(図 1)



(図 2)



(図 3)

○本多厚*,** 安部みどり* 室田誠逸* 森陽**

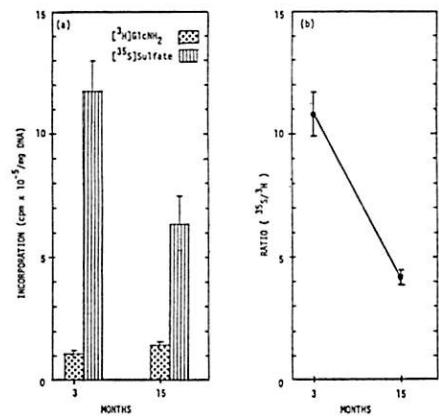
(*都老研・薬理, **東葉大・生化)

一般に年をとると組織はしだいに弾力性を失い固くなっていく。これは生化学的には、加齢とともに組織中のヘキソサミン含有物質が減少し、不溶性コラーゲンの量が逆に増えるためであるとされている。しかし、これらはすべて組織含量についてあてはまることで、その原因が何に基づくのかはまだ不明である。

そこで演者らは、SD系の雄ラットの肋軟骨を材料として、ヘキソサミン含有物質、とくにグリコサミノグリカン(GAG)を中心に、その組織含量の加齢による変動、その生合成の加齢による変動、硫酸転移酵素の加齢による変動、コンドロイチン硫酸鎖の硫酸化の程度と分子サイズの加齢による影響に関して検討を加えた。

その結果、

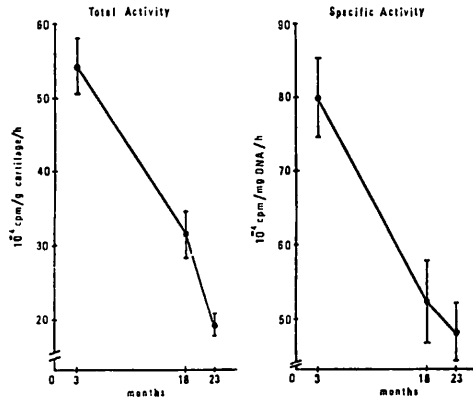
- (1) 加齢とともに、単位細胞当りのGAG量はほとんど不変であるが、総細胞数が減少してくるため単位乾燥重量当りのGAG量はほぼ直線的に減少した。
- (2) また、ラット肋軟骨のGAGをセルロースアセテート膜電気泳動で同定すると、若齢(3ヶ月)、中齢(15ヶ月)、老齢(23ヶ月)とも、ほとんどコンドロイチン四硫酸(C4S)のみであった。このことは、ヒト肋軟骨、ウサギ肋軟骨で、加齢とともにC4Sの割合が減少し、C6Sの割合が増大するという報告とは異なる。
- (3) 加齢に伴うGAG生合成活性の変動は、若齢から中齢にかけて急激に減少するが、とくに $[^{35}\text{S}]$ sulfateの取り込み活性が $[^3\text{H}]$ GlcNH₂の取り込み活性に比べて著しく減少しているのが特徴的であった。しかもこの傾向は単位細胞(≡ DNA)当りでも同様な結果であった。[Fig. 1] また、糖ペプチド(GP)への取り込み活性は加齢によりほとんど影響をうけていない。



[Fig. 1]

- (4) 硫酸転移酵素活性は、若齢から中齢、老齢にかけて、総活性および≡ DNA(単位細胞)当りの比活性ともに有意に減少した。[Fig. 2]

Changes in Sulfotransferase Activity with Aging



[Fig. 2]

- (5) [³H]GlcNH₂を用いて生合成させたGAGをコンドロイチナーゼABCで消化後、二糖マッピングを行うと、若齢から老齢にかけて4Di-OSへの取り込みが7.7%から13.6%と有意に増大した。
- (6) 若齢と老齢のGAG標品をBio-Gel A-1.5 m のゲル濾過にかけ、コンドロイチン硫酸鎖の分子サイズを比較したところ、著しい差はみとめられなかった。

以上の結果を総合すると、加齢とともに、ラット肋軟骨細胞のグリコサミノグリカン(コンドロイチン四硫酸)生合成過程の中で硫酸化に低下が起きていることが示唆された。この硫酸化の低下機構には、硫酸化酵素群(硫酸活性化酵素、硫酸転移酵素)の低下、あるいは、脱硫酸酵素の上昇等が考えられる。本研究では、加齢に伴う硫酸転移酵素活性の減少が、ラット肋軟骨プロテオコンドロイチン硫酸の低硫酸化に直接関与することを示している。

文献： Honda, A., Abe, M., Murota, S-I., and Mori, Y. (1979) J. Biochem. 85, 519-528

老年者の脂質代謝に関する研究 (血清リポ蛋白成分脂質値から見た 老年女性と中年女性の差異について)

日本医大 老人病研究所生化学, ○中島信治, 中野祥子
台東区下谷保健所 見須 宏

各種臓器組織の老化は自身の動脈の硬化によって促進されるに似せしめらば、従つて動脈の硬化現象を追及するにこそは臓器や個体の老化現象や、その本質解明とに関連する重要な課題と云える。著者は今回純化人βリポ抗血清による人血清リポ蛋白成分法(日本医大発法)を用いて血清と分離し、①TC ②TG、③PL、④α-リポ蛋白コレステロール(αLpC ≡ HDLコレステロール) ⑤αリポ蛋白トリグリセライド(αLpG) ⑥αリポ蛋白脂質(αLpL) ⑦βLpC、⑧βLpG、⑨βLpL、⑩必要によっては各々の遊離コレステロール及び9~12種について測定又は算出し、老年期の脂質代謝の特性を明らかにすべく試みた。

[研究方法] ①人血清リポ蛋白成分法および各脂質の測定: 人血清0.3mlに抗人βリポ抗血清(ヤギ、化血研と共同開発)0.3mlを加え、よく攪拌する。5~7分後にハマトクリット用毛細管10~11本に吸い上げ、ハマトクリットの要領で11000rpm 3分遠心する。(著者はプラスチック製小遠心管を用い、9~12°C, Singing Kolar, 12000rpm 10分の条件で遠心管を用いてゐる。)遠心終了後ハマトクリット管をハサミで切断し上清と分離し、又小型遠心管使用の場合は毛細管ピペットで上清を採取する。上清各々0.1mlを用い、コレステロール、トリグリセライド及びα脂質と酵素法(TCキット、TGキット、PLキット、日本商事製)にて測定した。上清成分中のαリポ蛋白成分の定量的残存とβリポ蛋白の完全な除去が既に実証されているので血清に含まれるコレステロール値はαリポ蛋白コレステロール(≡HDLコレステロール)でありαLpCのように表記する。同様にαLpG, αLpL, αLpL(α蛋白内総脂質)と表現する。また、TC値よりαLpC値と差し引いてβLpCを求め、同様にβLpG, βLpLを求める。

②測定対象: ①) 中年女性群(平均年齢39.6才)台東区全曾木小学校PTAの中年女性42名その他24名について朝食後5~5.5時間後に採血し、室温放置、血清分離後3000rpm 10分遠心し、血清を採取した。②) 老年女性群(平均年齢60.8才)下谷保健所管内老年女性29名その他7名について中年群と同様に行った。③) 心筋梗塞、股動脈硬化症、川崎病患者—日本医大集中治療室、下谷市民病院、埼玉医大へ入院の患者より、空腹時に採血した。④) 所謂正常者(男子)—埼玉医大外未患者および中核職員、平塚胃腸病院人間ドック入院者その他より採血し、SMA 12/60 又はCentrif-Chem 400を用いてGOT, GPT, LDH, ALP, Amylase, BUN, 尿酸, ビリルビン、クレアチニン, Ca, 無機P, 総蛋白を測定し、異常者を除外した。

(研究成績)

中年女性66例中血清脂質の正常者は42例(56.1%)で老年者15例(41.7%)よりも高い。又TG正常者は中年72.7%に対し、老年は58.4%と差がある。TC正常者は中年75.7%に対し、老年58.4%と低い。TC或はTGの単独異常例は老年は双方とも16.7%に対し、中年TC異常9.1%, TG異常12.1%であった。同様の分類に従つてαLpC量と表示すると、中年群ではTC量の増加と共にαLpC値の上昇がみられ、老年群にはこの傾向が

1. 高TG血症例では α LDL値の低下が起るが、この傾向は中年群に著しい。脂質脂質係数の有効性をエックする目的を念め、Normolipemia例に比べてリポ蛋白質成分脂質量がよくなる比較について年齢との関連をみるに、 β LDL/ α LDL比は中年群老年群と比べて増加してともに平均年齢が上昇してゆく。即ち中年では1.0以下36才、1.5以上42才老年群の1.0~1.5では56.5才、1.5以上では61.5才と平均年齢が増加した。ATLP/ α TLP比、 β LDL/ α LDL、 α LDL+G/ α LDL、 β LDL+G/ β LDL、 β LDL+G/ α LDL+G比はともに老年群で高い。又両群とも α TLPの減少例及び β TLPの増加例の平均年齢が高い。

測定例をNormolipemia群、HyperTC群、HyperTG群、HyperTC+TG群に分け、それぞれ α TLP、 β TLP、 β TLP/ α TLP比をみる。TLP量は老年群ではNormolipemia 234.8mg/dl、HyperTC群は231.5mg/dlと殆んど変化なく、HyperTGは260.5、HyperTC+TG 278.3と増加するので特異がある。これに反して中年群ではHyperTC群では296mg/dlと、Normolipemiaの252.5より高く、HyperTG群では207.8と明らかに低い。TLP量は老年群ではNormolipemia 241.0mg/dlであり、HyperTC群で352.8と大幅に高い。HyperTCではこれに反して311.0と、HyperTCより軽度の上昇であった。中年群ではNormolipemia 209.8mg/dl、HyperTC 295.7、HyperTG 371.6と、HyperTGのTLP増加効果が目立ちた。TLP/ α TLP比を上記の変化を反映して、中年者ではHyperTG群で高く、老年者ではHyperTC群で高い。以上結果は中老年者同様に高TC又は高TGに対する反応性の相異が存在するらしきことを示している。

(リポ蛋白質成分脂質指数(仮称)の意味および指数作成時の意図した事項)

- β TLP/ α TLP比、TLPとリポ蛋白質量と相関するところを前提に立ち、又これを動脈硬化の促進因子の一つと看做す。TLPも同様に蛋白質量と相関するものという前提で、抑制因子と看做す。
- β LDL/ α LDL比、近時汎く用いられている。 α LDL/ β LDL、TC/ α LDLなども用いられている。
- β LDL/ α LDL比、Nascent HDLとの関連がありとうに考えられる指数である。
- α LDL+G/ α LDL比は組織内に於けるNascent HDLとコレステロール及びアトリグリセライドとの関連をうかがうための指数である。
- β LDL+G/ β LDL比、動脈壁への脂質沈着の主役であるリポ蛋白質に含まれる脂質とpolenおよびnon p.cenを分ける。

[総括]

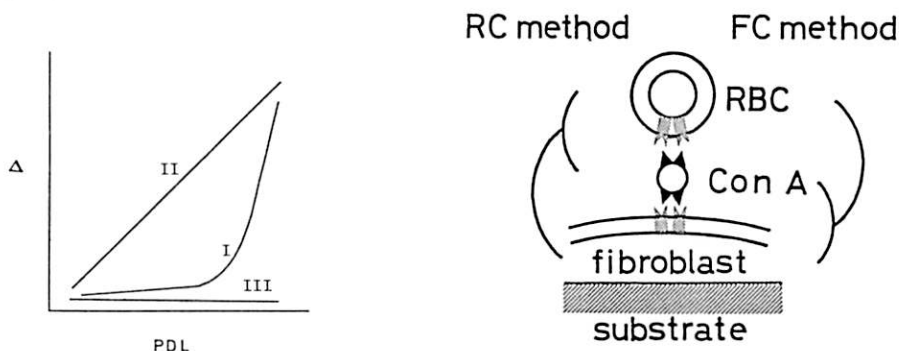
I) Normolipemiaの場合: 1) α LDL値は中老年群で差がある。2) α TLPは中年群に多く、TLPは老年群に多い。3) 老年群の α LDLの低値と、 β LDLの高値が目立つ。4) β TLP/ α TLP、 β LDL/ α LDL、 β LDL+G/ α LDL+G、 α LDL+G/ α LDL、 β LDL+G/ β LDL、 β LDL+G/ α LDL+Gなどの指数は、中年群間で明らかに差がある。又両群内のそれぞれにおいて、各指数の高低と年齢分布とも明らかに傾向が認められた。

II) Hyperlipemiaの場合: 1) 中年高TC群の α TLPの低値と、TLPの高値が目立つ。2) 老年高TG群で α TLP値が高いこと、TLP値の高値が程度は、並に高TC群ではTLP値の著明な高値が特徴的。

(附) 動脈硬化の病的に促進される疾患(心筋梗塞、脳動脈硬化症、川崎病患者の血清リポ蛋白質成分脂質を測定しageingによる生理的変化と対比させた。

○ 相 沢 慎 一、 栗 本 文 子 (都老人研栄養)

我々は先に、ヒト2倍体繊維芽細胞のコンカナバリンAを介する赤血球結合能が、細胞の加齢とともに変化することを報告した。即ち、Con A でコートした赤血球の繊維芽細胞への結合(RC法)は、継代初期より継代後期へとほぼ連続的に増加する。これに対して赤血球のCon A でコートした繊維芽細胞への結合はphase I Iの細胞には起らずphase I I Iでのみ起る。



一般にレクチンを用いて示される細胞表面の性質は用いるレクチンの種類により異なることが知られている。細胞加齢に伴う表面変化の実体及びRC法、FC法の差を明らかにする目的でCon A以外のいくつかのレクチンについて検討を行った。

グループ	FC法	RC法	レクチン
A	I	II	Con A
	I	II	PHA-L
	I		RCA-120
B	II		PHA-E
	II		WGA
C	?		SBA
	?		BPA
D	III		LcH
	III	III	PWM
	III		DBA
	III	III	Lotous A
	III	III	LPA
	III	III	Succinyl-Con A

Con A同様FC法でI型、RC法でII型の赤血球結合変化を示すレクチンとしてRCA-120、PHA-L(グループA)があり、Con Aと異なりFC法でもII型の変化を示すレクチンとしてWGA、PHA-E(グループB)、赤血球結合を誘起するがその量が少く変化のタイプの訳らないものにSBA、BPAがある。その他の調べたレクチンはいずれの継代数の細胞にも赤血球結合を全く引き起すことが出来ない。

このようなレクチンによる赤血球結合誘起能の違いは、レクチンの糖特異性、糖鎖選択性、リンパ球活性化能、血液型特異性、赤血球凝集能等と対応しない。赤血球結合の量に、赤血球及び繊維芽細胞表面での各レクチンに対するレセプタ

一数、その親和性が重要な因子であることはいうまでもない。同時に赤血球と繊維芽細胞を橋渡すためにはレクチンの価数も重要因子の一と考えられる。2 価のC o n A 及びL c II がグループD に属することはこの理由によるのであろう。興味のあることにグループA に属するレクチンはすべて、その赤血球上のレセプターがB a n d III たん白であり、これに対してグループB に属するレクチンのレセプターはすべてグリコフォリンである。

我々はすでに細胞表面L E T S たん白がp h a s e III で減少すること、また種々の酵素、薬剤を用いた結果よりC o n A についてL E T S たん白の存否とF C 法での赤血球結合がよく対応することを報告した。L E T S たん白はグループA に属するC o n A 、R C A のレセプターであることが知られている。グルタルアルデヒド固定の効果等の結果を含め、レクチン及びF C 、R C 法による違いについて考察する。

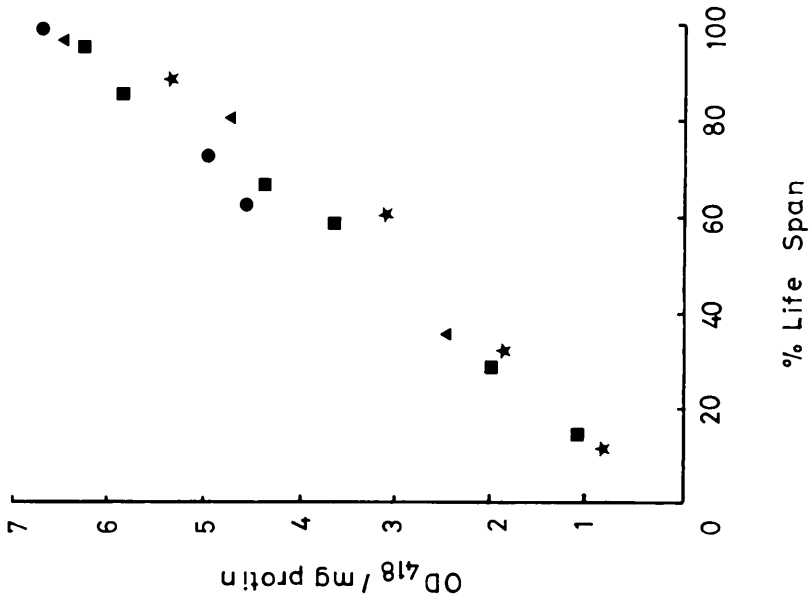
○栗本文子，相沢慎一，三井洋司 (東京都老人研 栄養 薬理)

ヒト女性胎児肺由来の繊維芽様細胞 TIG-1 について，細胞の加齢に伴う細胞表面変化を，コンカナバリン A を介する赤血球の結合をみることにより明らかにできることはすでに報告した（前演題参照）。細胞加齢に対して FC 法で示される I 型，RC 法で示される II 型の変化の一般性を検討する目的で，由来組織の異なるいくつかの胎児由来繊維芽様細胞について検討を行った。

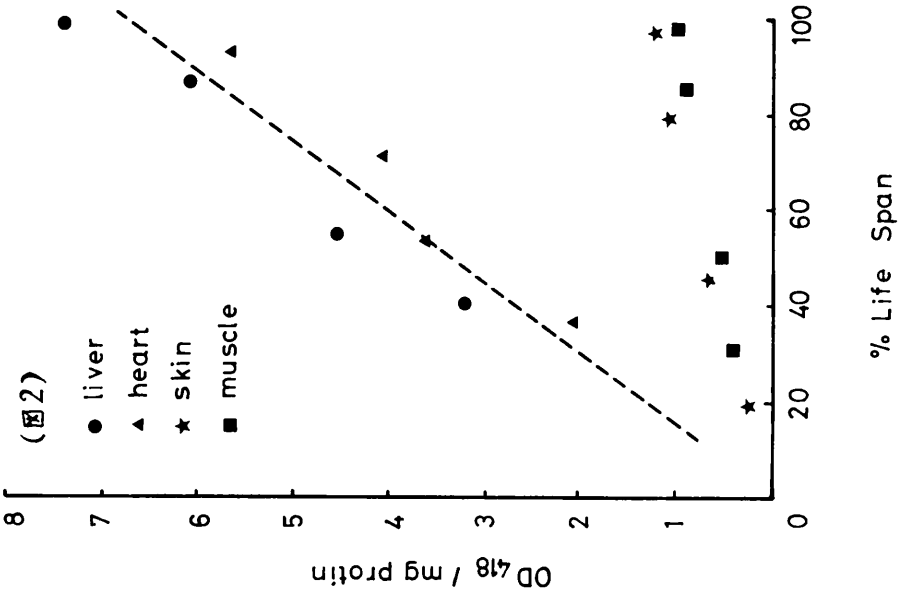
1. ヒト胎児肺由来の細胞は，人種，性別，個体差，あるいは初代培養の条件等によらず % life span で表す時極めてよく一致した細胞加齢に伴う細胞表面変化を示す（図 1）。
2. いずれの細胞も細胞加齢に伴い，EC 法で I 型，RC 法で II 型の変化のパターンを示す。しかし赤血球結合量からみると，心臓，肝臓由来の細胞（グループ A）は肺由来の細胞とほぼ同じ量の赤血球結合量を示すが，皮フ，筋肉由来の細胞（グループ B）は赤血球結合量が低い（図 2）。
3. グループ A の細胞と，グループ B の細胞は増殖速度，細胞飽和密度，細胞サイズにおいてもはっきり異っており，これらの点でグループ B の細胞は一見老化した細胞の特徴を示す。しかしその寿命には著しい差は認められない。
4. 成人皮フ由来の細胞も，胎児皮フ由来の細胞と同様の細胞加齢に伴う赤血球結合能変化を示す。かつこれら赤血球結合量の低い皮フ由来細胞についても加齢に伴う I 型，II 型の細胞表面変化は，コンカナバリン A 以外のレクチンを用いる等により増感して表すことができる。

従来皮フ由来の細胞が，胎児肺由来の細胞とともに広く老化研究に用いられてきた。しかし両者の細胞を用いて得られた結果の関連については考慮を払う必要があるように思われる。また，以上の結果をもとにドナーエイジによる違いについて現在検討中であり，一部報告する。

(图1)



(图2)



○松岡耕二, 三井洋司(東京都老人総合研究所 薬理)

ヒト2倍体線維芽細胞は, 培養系内で継代をくりかえすうちに種々の変化を示す。この現象を培養系内細胞加齢としてとらえ, 解析がすすめられてきた。これまで主に細胞増殖に関連した指標に焦点があてられ, それらが終末期に顕著に変化することが示された。一方, いくつかの指標は継代数に対して直線的に変化し, しかもこれらは細胞膜ないし細胞表面に関連していることがあきらかになった。

細胞表面の性質は, 細胞の増殖に深いかかわりを持ち, さらに細胞間相互作用とも関係していることが知られている。したがって, 細胞表面の加齢変化を解析することは, 培養系内細胞加齢の基本的変化である増殖能力低下の機序の解明にも役立つと考えられる。

ムコ多糖あるいはプロテオグリカンは, これまで細胞間物質としての側面のみが注目されており, 細胞表面物質としてのプロテオグリカンについての知見は多くない。そこで我々は, 細胞表面ムコ多糖の加齢変化を検討した。

細胞を³H-グルコサミンを含む培地中で48時間培養し, 標識されたムコ多糖を, ①培地, ②トリブシンで細胞からはなれる細胞表面分画, ③トリブシン処理後の残渣細胞, の各々から分離し, 2次元電気泳動で各ムコ多糖の量を調べた。合成量はヒアルロン酸が多く, コンドロイチン-6-硫酸, コンドロイチン-4-硫酸, デルマトタン硫酸, ヘパラン硫酸も合成された。合成された各ムコ多糖の多くは培地中に放出されたが, ヘパラン硫酸は細胞表面分画に相当量蓄積していた(表1)。したがって, ヘパラン硫酸は細胞表面物質のひとつとして合成されている意味が強いと思われる。

次に, 同様の方法で種々の継代数の細胞によって合成された

ムコ多糖を分離し, 加齢にともなう変化を調べた。ムコ多糖合成量および細胞表面ムコ多糖量は細胞の増殖状態により異なった変化を示した。confluent cultureでは継代にともない減少し, preconfluent cultureでは逆に増加した(表2)。これは, 線維芽細胞の機能のひとつであるムコ多糖合成が, 細胞の状態によって調節されていることを示唆している。

さらに, 細胞表面分画中の各ムコ多糖量を, ヒアルロニダーゼ, コンドロイチナーゼABC, および亜硝酸処理により調べた

ところ, ヘパラン硫酸の量および割合が継代にともない顕著に増加することがあき

(表1) production distribution into cell surface
(% of total GAG) (% of total production)

	production (% of total GAG)	distribution into cell surface (% of total production)
HA	73.6	2.8
C6S+C4S	3.4	8.6
DS	7.7	2.5
HS	6.6	25.9

(表2) PDL total GAG surface-accumulated GAG
(dpm/cell) (dpm/cell)

	total GAG (dpm/cell)	surface-accumulated GAG (dpm/cell)
preconfluent culture		
16	0.59	0.06
34	1.34	0.10
45	1.63	0.18
60	1.23	0.28
confluent culture		
16	1.29	0.26
34	0.79	0.24
45	0.38	0.08
60	0.26	0.10

らかになった(表3)。

その原因を調べ (表3) PDL	amount of surface HS (dpm/cell)	relative proportion of HS (% of total GAG on cell surface)
るために、細胞表	preconfluent culture	
面上のヘパラン硫	16	0.006
酸の蓄積および代	34	0.020
謝回転の速度を調	45	0.077
べたが、早期細胞	60	0.094
と後期細胞の間で	confluent culture	
基本的には差がな	16	0.020
	34	0.027
	45	0.031
	60	0.045

かった。一方、ヘパラン硫酸の総合成量は継代にともなって増加していないにもかかわらず、細胞表面上のヘパラン硫酸は増加しており、したがって、合成されたヘパラン硫酸のうち細胞表面に結合するものの割合は著しく増加した(表4)。

以上の結果から、

1. 継代にともない、ヒト2倍体 (表4) PDL

細胞の表面はヘパラン硫酸に富んでくる、

2. このことは、ヘパラン硫酸の合成や代謝回転の変化によるものではなく、合成されたヘパラン硫酸がより多く細胞表面に結合するようになることによる、

	total HS (dpm/cell)	surface-accumulated HS (dpm/cell)
preconfluent culture		
16	0.033	0.006 (18)*
34	0.210	0.020 (10)
45	0.187	0.077 (41)
60	0.257	0.094 (37)
confluent culture		
16	0.130	0.020 (15)
34	0.094	0.027 (29)
45	0.089	0.031 (35)
60	0.059	0.045 (76)

* % of total HS

ことがわかった。

2.の機序として、プロテオヘパラン硫酸のコアタンパク質の質的変化および他の細胞表面の加齢変化との関連を考慮しなければならないだろう。

ヘパラン硫酸は他の培養動物細胞でも表面に分布し、細胞の増殖に関係している可能性が示唆されているので、今後、培養ヒト2倍体細胞の加齢変化におけるヘパラン硫酸の蓄積の意味を解析していきたい。

○大沢多加子, 永井克孝 都老人研 生化学

Hayflickの系を用いて、細胞老化と細胞膜の関係を解析しようとするのが本研究の目的である。糖脂質は細胞膜脂質2分子層の外層に局在し、細胞の分化、増殖、悪性化、行動、識別などに重要な役割を演じていることが知られている。この膜糖脂質の機能を、老化との関係において解析することによって、老化に関して重要な情報が得られるものと予想される。細胞膜機能が細胞老化と密接な関係を持っていることは、老化に伴う膜流動性の変化、膜脂質不飽和度の変化の解析によって、既に報告した。これらの変化は培養の後期に見られるものであった。培養に伴い見られる細胞の変化には、培養の早期から見られるものと、培養後期に成って始めて見られるものがあるようである。培養の早期から見られる細胞膜変化の一つとして、Bosmann (1976)⁽¹⁾によりWI-38細胞の電気泳動度が減少するという報告がある。これに関連して、同じく1976年にMiloら⁽²⁾は、培養後期のWI-38細胞の細胞膜のシアル酸は、タンパク量当たりでは顕著に減少すると報告した。これらの報告は、細胞老化に伴う細胞膜表面シアル酸の減少を示唆するものであった。シアル酸を有する物質には、糖脂質と糖タンパクとがあるが、糖脂質は細胞増殖にも密接な関連があることが明らかにされつゝあることから、今回は糖脂質、特にシアル酸含有の糖脂質(ガングリオシド)について検討した。

〔実験材料及び方法〕

ヒト胎児肺由来線維芽細胞株WI-38は、0.25% Trypsin (Difco 1:250)を用いて(1:4)のsplit ratioで継代し、10% Fetal Calf Serum添加のEagle Basal Mediumで、5% CO₂ インキュベーター中で培養した。

(1) 糖脂質の定性及び定量

Population doublings (PDL) が異なる細胞を、それぞれ2~5×10⁷個づつについて、クロロホルム-メタノール(1:1, V/V)で3回繰り返して抽出を行った。抽出した全脂質はDEAE-Sephadex A25のカラムを用いて、酸性脂質(ガングリオシド)分画と中性脂質分画に分けた。中性脂質分画は、アセチル化を行ってからフロリジルカラムを用いて、中性糖脂質分画を得た。ガングリオシド分画は、レゾルシノール法に従い、全リビド結合シアル酸の定量と、薄層クロマトグラフィーを行って、ガングリオシド分子種構成を、二波長クロマトスキャナーを用いて調べた。タンパク量の定量は、クロロホルム-メタノール抽出残渣についてLowry法に従って行った。

(2) [U-¹⁴C] ガラクトースの糖脂質への取り込み

[U-¹⁴C] ガラクトース(比活性95 mCi/mmol)を1 μCi/mlの割合で培養液に加え、細胞を37°C、24時間インキュベートしたのち、培養液を除き、PBS⁻で数回洗った。クロロホルム-メタノール(1:1, V/V)で全脂質を抽出し、キャリアーリビドを加えてからアセチル化を行った。次に、フロリジルカラムを用いて糖脂質分画を

得た。得られた糖脂質分画は脱アセチル化を行い、DEAE-Sephadex A25 のカラムで、中性糖脂質分画とガングリオシド分画とに分けた。両分画は、それぞれ薄層クロマトグラフィーを行い、各分子種のスポットをかき取り、液体シンチレーションカウンターにて取り込み量の測定を行った。

〔結果〕

右図に示すように、タンパク量当たりのリビド結合シアル酸量は、培養後期に成るに伴い、減少していることがわかった。

薄層クロマトグラフィーの結果では、GM₃ガングリオシド分子種がほとんど大部分であり、培養後期でも、分子種構成にはほとんど変化は見られなかった。従って、培養後期のリビド結合シアル酸の減少は、GM₃の減少

であるともいえる。[U-¹⁴C]ガラクトースの取り込み実験では、タンパク量当たりの各ガングリオシド分子種への取り込み量を求めると、ほとんど大部分のものがGM₃に取り込まれ、又、培養後期に成るに従い、取り込み量が減少していることがわかった。

〔考察〕

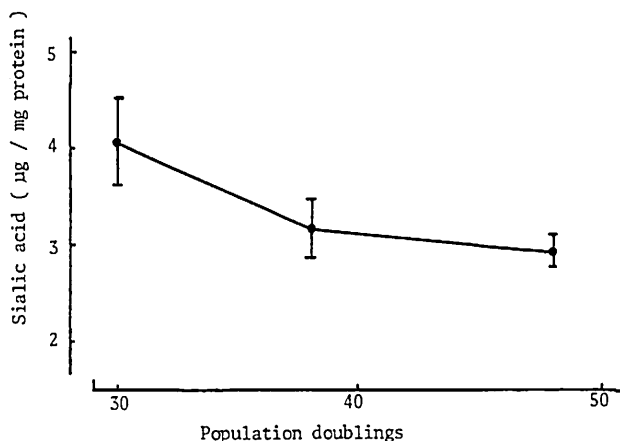
ヒト胎児肺由来線維芽細胞株WI-38は、培養後期に成るに従い、リビド結合性シアル酸、あるいはGM₃ガングリオシドが、タンパク量当たりで求めると減少することが、定量的に、又、[U-¹⁴C]ガラクトースを用いた実験から確かめられた。この減少が、培養のかなり早期から見られるものであるかどうかについては、PDL-30以前の若い細胞を調べる必要がある。増殖期の細胞ではGM₃が増加するが、休止期の細胞ではGM₃が減少するという報告があることから、今回得られた結果をもとに、GM₃の減少のメカニズムと、細胞老化機構の関連について検討していく計画でいる。

〔文献〕

- (1) Bosmann H.B, R.L. Gutheil, Jr & R. Case, *Nature*, 261 499~501 (1976)
- (2) G.E. Milo & R.W. Hart, *Arch. Biochem. & Biophys.* 176, 324-333 (1976)

〔謝辞〕

本研究の一部は文部省科学研究費の援助によってなされた。



○永井克孝, 安藤進, 田中康一(老人総合研究所生化学, 中央機器室)
長谷純一(富山医科薬科大学)

動物個体の加齢に伴う変化は全ての臓器と細胞に反映されてくるはずである。常に新生されている赤血球においてもその例外ではなく、例えば適当なブローブを用いることによって赤血球膜の変化がとらえられると予想される。従来、赤血球の老化と題する研究は赤血球細胞自身の流血中における加齢変化あるいは寿命に関するものが大部分であり、個体の老化とは切り離された次元のものであった。著者らは個体の加齢現象は赤血球膜構造にも反映するものと考え、膜コレステロールに特異的に結合して溶血をおこす *Cl. perfringens* の溶血性細菌毒素 θ - toxin (M.W. 53,000) を異った週令のマウスから得た赤血球に作用させてみた。赤血球膜の θ - toxin に対する抵抗性はマウスの週令が高くなる程減弱していることが明らかとなった。このことは θ - toxin で検出される変化が個体の加齢によく相関したパラメータとなりうることを示唆するものである。

(実験) 半合成食で飼育した C57BL/6 (SPF), 26, 52, 78 週令の雌各10匹より心臓穿刺により採血(ヘパリン加)した。1試験管当り 5 μ l の血液を PBS で3回洗ってから 1 ml PBS に浮遊させて用いた。 θ - toxin は *Cl. perfringens* より単離精製された標品(1)を用い、ヒツジ赤血球0.5%浮遊液を30分で50%溶血させる毒素量を1単位とした。 θ - toxin の希釈系列をつくり、被検血球浮遊液に加えて攪拌し、37°, 30分インキュベート後 2500 rpm 5分間遠心した上清について 545 nm における吸光度を測って50%溶血をおこす毒素の単位数を決めた。浸透圧抵抗性は 80 - 106 mM 間で 2 mM 間隔で調べた。各塩溶液 2 ml に 5 μ l の血液を加えて攪拌し、25°, 5分間静置後 2000 rpm 5分間遠心した。その上清 1 ml に 1 ml 0.3% NaOH 溶液を加えて攪拌し 540 nm における吸光度を測った。赤血球膜の流動性はケイ光ブローブを用いてケイ光偏光度を測定し、P値で表わした。装置は Elscint MV-1 Microviscometer を用いた。4 μ l の血液をグルコース添加 PBS で2回洗って 2 ml グルコース加 PBS に浮遊させ 37° に保温した。血液浮遊液を激しく攪拌しつつ 2 μ l 4×10^{-3} M 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) の無水エタノール溶液を注入し、37° 20分間インキュベート後 37° でケイ光偏光度を測定した。

Table 1. Osmotic Fragility in Aging of Mouse RBC

Age(week)	X ₅₀ (mM NaCl)	
	Control diet	Cholesterol diet
26	97.7 ± 3.7	96.0 ± 2.2
52	95.5 ± 0.3	95.6 ± 0.9
78	97.9 ± 2.6	98.3 ± 2.0

(結果および考察)

ヒトの赤血球については個体の加齢とともに浸透圧抵抗性が低下してくるとの報告(2)があるが、マウスについて26-78週令で調べたところ、Table 1 に示すように、週令による変化は全くみられなかった。膜の軟らかさの一つの指標と考えられる流動性が加齢とともに変化するのではないかと予想したが、DPHで測定されたP値には何ら変化が認められなかった(Table 2)。ところが膜コレステロールに特異的に結合すると考えられている *Cl. perfringens* の θ -toxin を作用させてみたところ、老化マウスほど感受性が高まって溶血しやすくなっていることがわかった(Table 3)。この θ -toxin の赤血球溶血単位は個体の加齢によく相関したパラメータとなりうるものと考えられる。尚 θ -toxin とステロールの結合様式については、ステロールの構造上の要求性から右図のように想像されている(3)。

(文献)

1. Mitsui, K., Mitsui, N. and Hase, J., *Japan. J. Exp. Med.* **43** (1973) 377-391
2. Detraglia, M., Cook, F. B., Stasiw, D. M. and Cerny, L. C., *Biochim. Biophys. Acta*, **345** (1974) 213-219
3. Hase, J., Mitsui, K. and Shonaka, E., *Japan. J. Exp. Med.*, **46** (1976) 45-50

(謝辞)

この研究の一部は東京都老人総合研究所課題研究費及び文部省科学研究費の援助によってなされた。

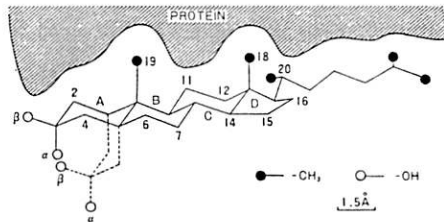
Table 2. Degree of Fluorescence Polarization(P) of RBC Membrane in Aging of Mouse

Age(week)	P value	
	Control diet	Cholesterol diet
26	0.272 ± 0.002	0.281 ± 0.002
52	0.272 ± 0.001	0.275 ± 0.002
78	0.277 ± 0.002	0.274 ± 0.002

Table 3. Changes in Sensitivity of Erythrocytes to θ -Toxin

Age(week)	θ -Toxin(unit/ml) required for 50% hemolysis	
	Cotrol diet	Cholesterol diet
26	7.85 ± 1.06	6.57 ± 1.20
52	5.15 ± 1.27	4.86 ± 1.62
78	3.36 ± 1.23	2.24 ± 0.47

Fig.1. A supposed binding model of θ -toxin to cholesterol(—) or coprostanol(---)



ヒト二倍体細胞における老化機構の解析

—無血清培地培養における細胞増殖因子の反応性について—

○ 櫻 茂彦, 菅 幹雄, 山根 積 (東北大, 抗研, 細胞生物)

細胞老化の機構を知るうえで、長期継代培養における細胞の生物学的諸活性の比較検討は重要な鍵となる。従来培養環境を変えること(例えば、ハイドロコージンの添加(Cristofalo, 1970; Macieira-Coelho, 1966)、Epidermal Growth Factorの添加(Rheinwald & Green, 1977)、ビタミンEの添加(Packer & Smith, 1974)、添加血清のロットの吟味(Poiley, et al, 1978)などにより、継代回数が延長されるという報告はある。しかしこれらの実験には、10%内外の血清が添加されているため、血清中の未知成分との相互作用で、老化修飾因子の正確な解析が困難をきためる。さらには血清自身のロットの違いにより継代回数が変化するという問題が老化の機構を知るうえで障害になっている。こうした理由から、本研究では無血清培地もしくは微量血清添加培地での長期継代培養に於ける細胞老化における増殖因子(その手始めとしてEpidermal Growth Factor)の反応性変化について調べた。

〈細胞および培養方法〉

細胞は、3~4ヶ月令のヒト胎児肺を0.25%トリプシン(Difco 1:250)で分散して線維様肺細胞(HEL)を用いた。細胞分散は2回結晶トリプシン(300U/ml, マイルス社製)を4°Cの条件で使用した。培養は硬質塩化ニール製の箱を用い酸素濃度約5%と低酸素分圧条件下で培養を行なった。(このような低温トリプシン処理、低酸素分圧での培養は無血清培地培養の細胞増殖を良好にすることはすでに報告している。(菅 幹雄&山根 積, 1979; 山根 積&菅 幹雄, 1979)。継代培養は1:4 split ratioで行ない、細胞数はブレットルーチェルク式血球計算盤で測定した。増殖因子の細胞増殖の検定は、 2×10^4 個の細胞を3.5cmシャーレ(Lux社製)におき、各々1.5mlの培地を加えて7日間培養後細胞数を測定した。

〈結果と考察〉

私井の研究室でヒト二倍体線維様細胞の無血清培地として開発したRITC 98-6培地(以下RITC培地と省略)を用いて、長期継代培養を試みた。対照培地(BME添加10%胎児牛血清)に対し、RITC培地に0.5%という微量胎児牛血清(初代培養細胞の増殖率はこの条件では対照培地と同様の促進効果をもつ)を添加して比較すると、両者にはほとんど違いは認められなかった。(対照培地63PDL, RITC培地51PDL)。しかし各継代期でのコロニー形成能をみると、RITC培地(対照培地)に比べて有意に低いことがわかった。ともあれmass cultureにおいて、RITC培地に微量血清添加することにより長期継代培養が可能になった。この一因として「培養液中の血清の役割は細胞にホルモンを供給することにある。」(G. Sato, 1975)と述べているように、私達の開発した無血清培地の中で、ホルモン(細胞増殖因子)が長期継代に重要な役割を果たしていることが示唆されたので、この点について調べた。

細胞増殖因子の老化修飾作用解析の手始めとしてEGFの各継代期における反応性について調べた。ホルモンをぬいた無血清培地(以下TF-RITC培地と省略)にEGF(10ng/ml)を添加して各継代期の細胞増殖をみると、EGFの増殖促進効果はみられなかった。しかし血清10%添加した培地中では継代初期に著しい増殖促進効果がみられたが、継代が進むにつれて、その効果はみられなくなった。

EGFは血清因子との協同作用により増殖促進作用を示すことが示唆されたわけであるが、この点についてさらに無血清培地にCohnの血清分画を添加して詳しく調べた。Cohnの血清分画Fraction IへTまでのEGFに対する増殖促進効果を調べると、Fraction Iが最も高いことがわかった。そこで各継代期のFraction Iに対するEGFの増殖促進効果を調べると血清添加培地と同様に、継代初期には著しい効果があり、その後その効果が減少していくことがわかった。さらに細胞飽和密度に与えるEGFの影響について各継代期を調べると、BME添加10%胎児牛血清に対しRITC添加10%胎児牛血清添加培地EGF(10ng/ml含む)では継代初期では約2倍の飽和密度になった。しかし継代後期の細胞では両者共に同様の飽和密度になることもわかった。

以上の結果より、EGFはその増殖促進作用には血清因子が必要であり、その因子はCohnのFraction Iに含まれていることが示唆された。又EGFの細胞増殖促進作用は、継代初期において著しく、後期になるにしたがってその作用が減少して行くことがわかった。EGFと協同して作用する血清因子の同定、細胞老化につれてEGFに対する反応性がいかなる機序で鋭感になってゆくのか。又、このようなホルモンに対する感受性の相違が細胞老化の指標になりえるかどうか今後の課題である。

EGFおよびFGFを投与されたヒト胎児線維芽細胞(TIG-1)
の細胞加齢

○加治和彦 松尾光芳 (東京都 老人総合研究所)

培養の諸条件を変えることにより、ヒト線維芽細胞の分裂終了細胞集団に到るまでの総細胞集団倍加数を変化させることがある程度可能である。先に我々は低濃度播種により総倍加数が10~30%増加するのを観察した(1, 2)。エピダーマル・グロースファクター(EGF)およびファイブロblast・グロースファクター(FGF)が上皮細胞、血管内皮細胞、ならびに成骨細胞の分裂終了細胞に到るまでの総倍加数を著しく増加させることが近年報告されてきた。一方、ヒト皮ふから得られた線維芽細胞の微量のEGF添加による、倍加時間の短縮および細胞飽和密度の上昇も報告されている。我々は、TIG-1細胞に、EGFならびにFGFを添加して培養し、細胞増殖と総細胞集団倍加数におよぼす効果を観察した。

〔I〕細胞増殖におよぼすEGFとFGFの効果 標準法(分割比; 1:4, 毎週継代)で得られた集団倍加数(PDs)の異なる細胞集団を1-グルベール培地、10%牛胎児血清添加を基本培養液とし、これに①EGF(5 ng/ml), ②EGF(0.5 ng/ml), ③FGF(10 ng/ml), ④FGF(1 ng/ml)および⑤EGF(0.5 ng/ml), FGF(5 ng/ml)を加えて培養し、倍加時間と細胞飽和密度を測定した。倍加時間は、Fig. 1に示すように、グロースファクターを添加した集団でも対象群との差はほとんど認められなかった。一方、細胞飽和密度は、①EGF(5)および⑤EGF(0.5)+FGF(5)添加培地で有意に増加しているのが観察された(Fig. 2)。又、その効果は加齢が進むにつれて小さくなる傾向が認められた。⑥EGF(0.5), ③FGF(10), ④FGF(1)でも同様の傾向を示したが、対象群との差はわずかであった。

〔II〕総細胞集団倍加数におよぼすEGFとFGFの効果 TIG-1(7PDs)細胞を、上記〔I〕の5種の培養液およびグロースファクター無添加培養液で低濃度播種法(1)による継代培養を行なった。プラスチックシャーレ(8.6 cm²)に 8.6×10^3 細胞数(10³細胞数/cm²)の播種濃度で7日間隔で継代した。この条件下で細胞集団は、末期を除き、7日間に5~7回の細胞倍加を示した(Fig. 3)。いずれのグロースファクター添加群も対象群と同時に倍加能力を失なった(Table 1)。①EGF(5)と⑤EGF(0.5)+FGF(5)の培養液で、わずかに総倍加数の増加が認められた。又、⑥FGF(10)添加群では、増加はほとんど認められなかった。Fig. 3で示すように、倍加能力を失なってゆく過程は、いずれの培養液下でも同様のパターンを示した。

〔I〕, 〔II〕から、細胞飽和密度を高めるグロースファクター添加培養液が、総細胞集団倍加数も増加させる傾向が認められた。しかし、これらの効果は上皮細胞や血管内皮細胞の場合に較べて非常に小さかった。現在、同様の実験をIMR-90およびTIG-2S(胎児皮ふ由来)で進めており、この結果もTIG-1と比較しつつ報告する予定である。

Fig.1 Doubling Time

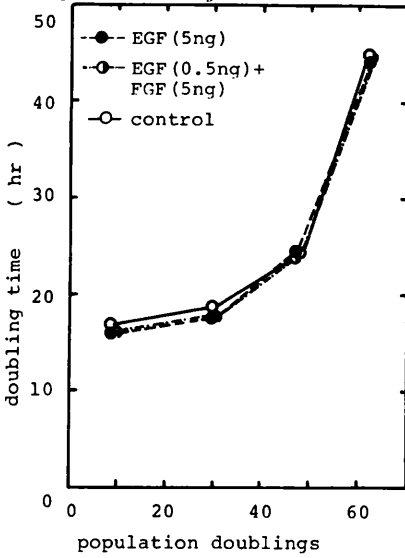


Fig.3 Doubling Potential

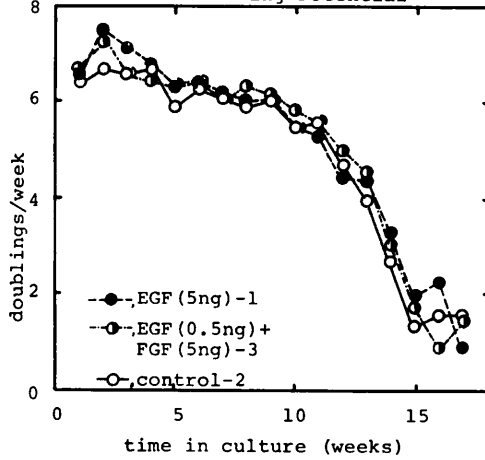


Fig.2 Saturation Density

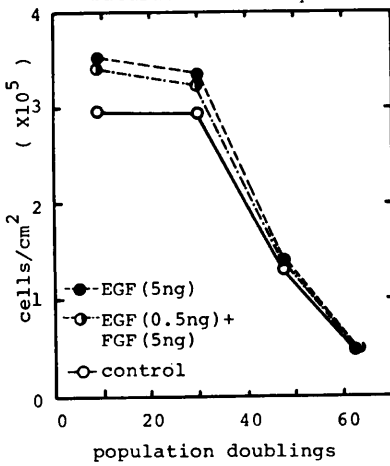


Table I

exp.No.	passages	total PDS	start, 7.0 PDS		lifetime (days)
			mean	% increase	
EGF (5ng/ml)	1	15	94.5		119
	2	15	93.3	94.9	5.0
	3	15	97.0		119
EGF (0.5ng/ml)	1	15	94.7		119
	2	15	90.2	91.6	1.3
	3	15	90.0		119
FGF (10ng/ml)	1	15	88.5		119
	2	15	93.6	91.7	1.4
	3	15	93.0		119
FGF (1ng/ml)	1	15	90.1		119
	2	15	88.5	89.1	-1.4
	3	15	88.6		119
EGF (0.5ng/ml)	1	15	92.2		119
	2	15	96.0	94.0	4.0
	3	15	93.9		119
control	1	15	88.6		119
	2	15	90.8	90.4	-
	3	15	91.9		119

- (1) K. Kaji & M. Matsuo, Biomedical Gerontol., 1, 14 (1977)
- (2) K. Kaji & M. Matsuo, Exp. Gerontol. (in press)

大野 忠夫 (放射線医学総合研究所・薬学研究部)

昨年の本研究会において、演者はヒト肺線維芽細胞 (IMR-90) の増殖速度は血清中の増殖因子濃度に依存し、細胞の集団倍化回数 (PDL) が進むにつれて、一定の増殖速度を示すのに必要な透析血清 (d-FBS) 濃度が急激に増大していくことを報告した (1)。従って、細胞は分裂するにつれて増殖因子に対する反応性を失っていくと考えられ、これは *in vitro* における細胞の総分裂回数 (寿命) が透析血清濃度によって規定され得ることを強く示唆している。今回は、この予測を確認するとともに、この細胞の増殖は血清中の cationic protein 分画 (C 分画) に依存すること、その作用の大部分は血小板増殖因子に帰属することを報告する。

方法 10000 コの細胞を 35 mm のシャーレにまき、d-FBS を含む TOM-H 培地 2 ml を加えて培養した。培地は 3~4 日毎に交換し、7 日毎に継代した。C 分画は 0.15 M NaCl で平衡化した Dowex 50W-X8 カラムに FBS を通し、吸着したタン白を 0.1 N NH_4OH で溶出、PBS に透析して調製した。DNA 合成は、細胞を無血清で 2 日間培養後、 ^3H -thymidine を加え 30 時間のとりこみによって調べた。

結果 d-FBS 濃度を変えて各 PDL の細胞の増殖速度を測定し、4 日間でも増殖がみられない最大 d-FBS 濃度を求め、これを PDL に対してプロットして得たカーブから、細胞の寿命は 0.3 % d-FBS ならば 58 PDL、10 % d-FBS では 80~85 PDL、それ以上 d-FBS 濃度を上げてはわずかな増加しかないものと予測された。実際の培養結果 (図 1) は、0.3 %、10 %、30 % d-FBS では、それぞれ、54.0 PDL、75.6 PDL、79.4 PDL であった。どれも予測よりはやや少いが、継代時の悪影響を考慮すれば、ほぼ予測と合っている。低濃度血清で培養した場合、細胞の増殖が止るのは、単に quiescent になるだけであって老化したためではないとも考えられるが、0.3 % d-FBS で培養した細胞は、54 PDL に至ると、10 % d-FBS で培養した細胞が phase III に達したときとほとんど同じ顕微鏡像を示した。また、この時点より、d-FBS 濃度を 30 % に上げると、増殖は一時回復するが、当初から 30 % d-FBS で培養した細胞の寿命のレベルにははるかに及ばずに増殖は停止した。従って、0.3 % d-FBS で培養した場合でも、細胞は老化し短い寿命を示したものと考えられる。

一方、この結果から、演者が用いている培養条件下では、細胞の増殖速度と寿命には高い相関々係があると考えられる。そこで、この細胞の増殖を律速している増殖因子について検討した。IMR-90 細胞は無血清の TOM-H 培地に、hydrocortisone、insulin、transferrin、epidermal growth factor (EGF)、及び血清 C 分画を加えて培養すると、10 % d-FBS の場合に比べ、70~80 % の増殖速度を示すが、これらの増殖因子の組合せのうち、血清 C 分画をヒト血小板 C 分画に置換すると、置換前に比べて 74 %、10 % d-FBS の場合に比べても半分以上の増殖速度を示した。このことから、血清中の各種増殖因子のうち、血小板増殖因子がこの細胞の増殖を律速する因子の一つであると考えられる。さらに、各 d-FBS 濃度下で血小板増殖因子の効果調べてみると (図 2)、血清中の増殖阻害因子が有効濃度に達すると思われる 100 % d-FBS の場合を除いて、全濃度域で増殖を促進した。また老化した細胞 (68 PDL) に対しても、弱いながらも有効に作用した。このような効果は EGF ではみられなかった。また細胞

脳の DNA 合成誘導に必要な因子を、上記増殖因子の組合せのうちで調べてみると、insulin と血清 C 分画が相加的効果を示し、しかも、10% d-FBS 相当量の C 分画のみで 10% d-FBS と同等の ^3H -thymidine のとりこみを示した。

考察 以上の結果から、IMR-90 細胞の増殖は、血清中の塩基性増殖因子に依存し、そのうち血小板増殖因子が大きな役割をはたしているものと考えられる。血清 C 分画のうち、血小板増殖因子で置換できない部分は何か、また、実際に血小板増殖因子が細胞の寿命をも規定しているかという点については、現在検討中である。

(1) Ohno, T. : Biomedical Gerontol. 2, 64-65, 1978.

図 1

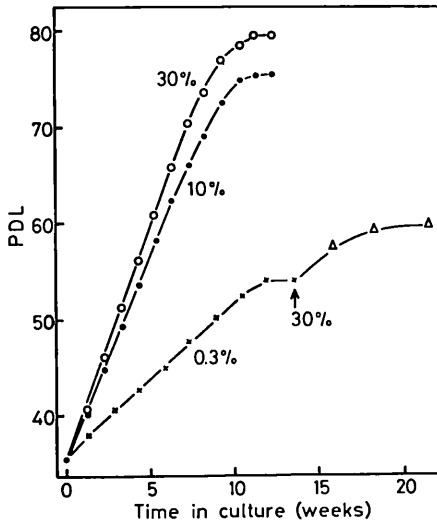
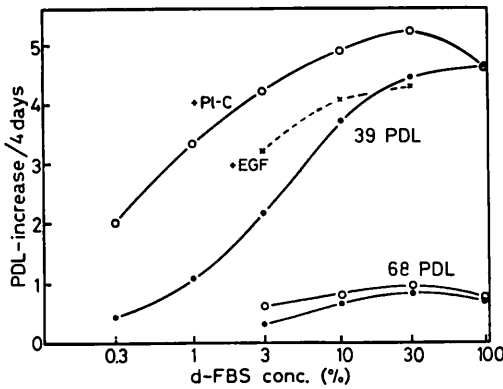


図 2

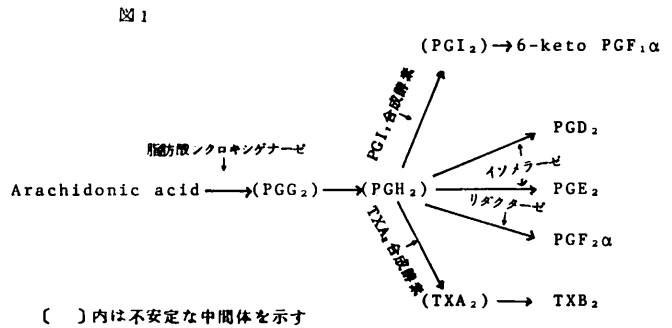


D-4 ヒト2倍体細胞(TIG-1)のin vitro agingに伴うプロスタグランジン合成酵素活性の質的変動

○室田誠逸, 三井洋司, 川村美枝子(東京都老人総合研究所 薬理学部)

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(PG)はそうした化学物質の中で最近とくに注目を集めているものである。PGは五員環をもつ炭素20の不飽和モノカルボン酸を基本骨格とする一連の高級不飽和脂肪酸の総称であり, 現在までに20種ほどが天然に発見されている。第2群に属するPGの生合成経路を第1図に示したが前駆体であるアラキドン酸は細胞膜の重要な構成成分である

リン脂質と結合して存在し, 常時細胞膜中に貯えられている。そこへホルモンや神経等による刺激が加えられると, ホスホ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小胞体に存在する一連のPG合



成酵素によって図1に示すような各PGへと変化して行く。PG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PGを合成し細胞外へ放出する。PGは極く微量で著明かつ多彩な生物活性を示し, また種々の薬理作用も合わせもっている。その生成→作用→分解は非常に短時間で行われ, また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ことがPGの特徴となっており, そのことからPGはオートコイドまたは局所ホルモンとも呼ばれている。PGは更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大重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考えられている。このことからPG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に大変重要な役割を演じている物質であるとして注目をあびている。我々は今回, 加齢のモデルとして約67PDLの寿命をもつヒト胎児肺由来の培養線維芽細胞を用い, 加齢に伴うPG合成の変動を検討した。

実験方法 ヒト胎児肺由来の培養線維芽細胞(TIG-1)をteflon sheetでdishから剝離し, sonicate後そのホモジネートを酵素源として使用した。このホモジネートと¹⁴C-アラキドン酸を37°C, 15分間インキュベートした後pH3.0にして反応を止め, 酢酸エチルを加え振盪した。上層のみをとり authenticのPGF_{2α}, 6-keto PGF_{1α}, トロンボキササンB₂(TXB₂), PGE₂を加え蒸発乾固後この残渣を少量のエタノールに溶かして薄層クロマトグラフィーで分析し, オートラジオスキャナーで検出した。さらにオートラジオグラフィー, 再クロマトグラフィーも行い合成されたPGを分析した。

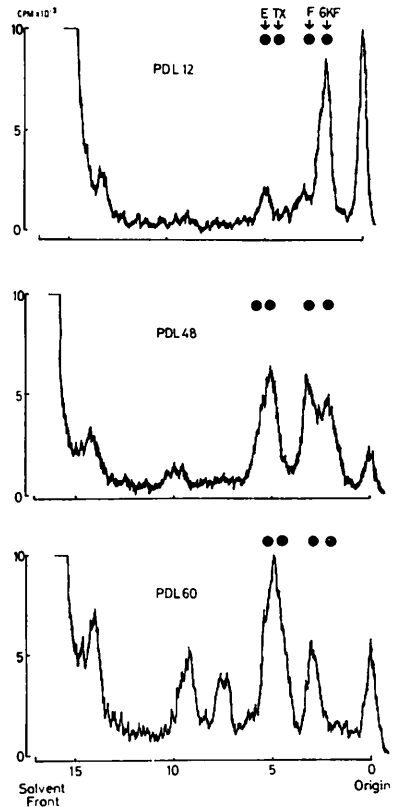
実験結果 12PDLの細胞のホモジネートはアラキドン酸から主として6-keto PGF_{1α}を産生した。この物質が6-keto PGF_{1α}に間違いないことは再クロマトグラフィー,

オートラジオグラフィー、及び特異的合成阻害剤 (15-hydroperoxy-5, 8, 11, 13-eicosatetraenoic acid) を用いた実験により確認した。48PDL及び60PDL細胞のホモジネートについても同様の条件で実験を行ったところ、アラキドン酸からの生成物が量的、ならびに質的に違ってくる事が判明した。即ちPDLが増加するにつれ6-keto PGF_{1α}の生成量は次第に減少し、60PDLではほとんど検出出来ない程に生成は抑えられた。これに反し、12PDLでは非常に僅かしか存在しなかったPGF_{2α}, E₂, TXB₂の量が増加した(図2)。

考察 アラキドン酸から合成されるPGがPDLの増加に伴って質的に変動することがin vitroの加齢とどの様な関係をもっているのかについては現時点では想像をたくましくするしかない。先づその原因について、最初に気づく素朴な疑問、即ち「ヒト由来細胞集団は異った細胞群から構成され、若い時期には6-keto PGF_{1α}をつくる細胞群が多いが、これらは早く

淘汰され、逆に他のPGをつくる細胞群が後期に優性になってくるのではないか」、この疑問は、1つのクローンから出発した集団でもすべてのPGがつくられることから否定出来るのではないかと思われる。図1に示したようにアラキドン酸からつくられるPGはすべて共通の不安定な中間体PGG₂, H₂を経て合成される。従って老化に伴ってPGH₂からのいろいろな方向への経路の太さが変わることが考えられる。PGI₂に関しては細胞内のcAMP産生を高める作用のあることが分っている。cAMP産生を引き金にして細胞内のいろいろな酵素系が始動し、細胞が賦活化されると考えるならば、年をとるにつれてPGI₂合成量が減少し、細胞の活性が衰えてくるとも考えられる。逆にTXB₂は炎症やアナフィラキシー、抗原抗体反応など病的状態において産生される事が知られている。若い時期には存在しないが年をとると次第に生成されるようになってくる事実は老化を一種の病的状態と見る観点からは面白い現象である。PGの前駆体であるアラキドン酸は細胞膜にリン脂質としての姿で存在し、そこからのアラキドン酸の遊離がPG合成の律速段階である。細胞膜構成成分は加齢と共に質的に変化することが報告されており、又PG合成酵素の存在しているマイクロソームの加齢変化についても種々の報告がある。従ってこの様な、細胞の側の変化が逆にPG産生を規制していることも考えられる。

図 2



○ 近藤 貞、山本 清高 (東京都老人総合研究所、生物)

東京都老人総合研究所プロジェクトチームにより老化研究用細胞として、ヒト胎児肺繊維芽細胞 (TIG-1) が樹立された。その細胞の長期保存のために比較的初期継代培養の細胞を用いて細胞凍結条件を検討し、我々は前大会で最善条件 (改良法) を報告した。ヒト肺繊維芽細胞は培養下で加齢変化するので、細胞凍結の影響が加齢過程で変化することが推定される。老化研究用の細胞を凍結保存する場合には、継代数を進ませないで細胞凍結することが必須なので、加齢に伴う細胞凍結の影響が検討された。また便宜上だけでなく、凍結による damage が細胞の加齢で変化するかどうかの興味からも研究がなされた。

(材料と方法)

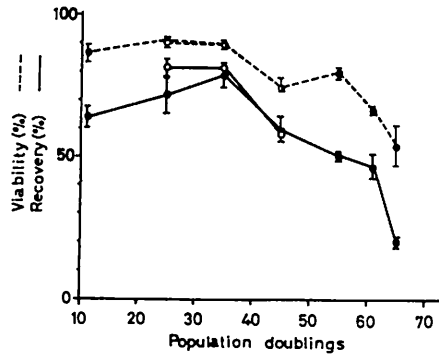
東京都老人総合研究所で開発されたヒト胎児肺繊維芽細胞 (TIG-1) は、10%牛胎児血清 (FCS) と抗生物質を添加した Eagle's basal medium (BME) (増殖液) を用い、37°C、5%CO₂-95%air 湿潤空气中、Falcon dish (60 mm径) で単層培養された。細胞は 0.25%トリプシンで処理され、split ratio 1:4 で 1 週間毎に継代された。マイコプラズマは初期と後期継代培養の細胞で混入していないことが確かめられた (国立予防衛生研究所の奥村秀夫・木原光城両博士の御厚意に感謝いたします)。細胞の凍結融解実験は、2 種類の凍結液と融解後の接種方法の違いにより 4 つの方法が用いられた。第 1、2 は Hayflick の方法に準じた (これを基本法とする)。1、トリプシンで処理され、増殖液に分散された細胞は、1 ml の凍結液 (BME-10%FCS-10%Glycerin) に分散され、1.2 ml ガラスアンプルに封入された。アンプルには dish 1 枚あたりの細胞が含まれ、その時の細胞数が測定された。アンプル封入後、4°C、3 時間静置したのち、スローフリジングシステム (日本ユースサイエンス社製) で、1°C/min の速度で、-35°C まで冷却凍結し、その後液体窒素中で保存した。融解のためには、アンプルを 40°C 温水中に浸して細胞を融解した。37°C、15 分静置後、細胞は増殖液で 10 倍希釈され、遠心でグリセリンを除いた後、5 ml の増殖液に分散された。そのうちの 1 部分を用いて、細胞生存率がニグロシンの色素排出試験をもちいて測定された。残りは dish に接種し、16 時間後に dish に付着した細胞数を測定し、細胞付着率 (回収率) とした (遠心法)。2、融解した細胞を遠心することなく、5 倍希釈してその 1 部分で細胞生存率を測定し、残りを dish に接種し回収率を測定した (希釈法)。第 3、4 は改良法である。3、凍結液が BME-30%FCS-15%Glycerin におきかえられた以外は、前と同じように細胞を凍結し、液体窒素中に保存した。凍結した細胞は、40°C 温水中で振りながらすばやく融かされた。37°C、15 分静置された後、細胞は 10 倍の増殖液に希釈され、15 分後に遠心された。前と同じように細胞生存率と回収率が測定された (遠心法)。4、融解された細胞は、5 倍に希釈して細胞生存率と回収率が測定された (希釈法)。細胞数はコールターカウンターで測定された。

(結果と考察)

この実験に用いられた TIG-1 細胞は、PD65 ないし PD67 で継代不可能になった。どれも継代時の細胞数は連続的に低下しているのが観察された。凍結しなかった場合の細胞生存率と付着率を測定すると、細胞生存率は継代おわりの PD65 と PD67 が多少低いを除いて、約 98% で、加齢ではほとんど変化しないようである。また付着率も多少低いのはほぼ同じような傾向を示した。

基本法を用いて、細胞の加齢に伴う細胞凍結の影響をしらべた。細胞生存率は PD35 にピークをもち、その後連続的に低下した。遠心法と希釈法は PD55 まではほとんど同じ値をとるが、それ以後は遠心法が希釈法より有意に低下した。遠心による damage が後期継代培養細胞で生じやすいことを示しているかと推察される。回収率の測定結果は、細胞生存率の結果と比較して、PD35 のピークをより明らかに示した。遠心法でも、値の低いことを除いて、ほぼ同じようなパターンを示した。しかし、細胞生存率でみられた PD61 以後の顕著なおちこみは観察されなかった。次に、条件のよい改良法の場合をしらべた。細胞生存率の測定結果は、PD35 でピークを示さず、基本法を少し良くしたパターンを示した。希釈法の回収率の結果は PD35 にピークをもち、さきほどの基本法から得られたパターンの結果に似ていた (図の黒丸を参照)。しかし、PD65 を除いて加齢過程のどの点をとっても、基本法より 6~19% よく、この細胞の凍結には改良法が基本法より良い方法であることがさらに確認された。改良法の希釈法を用いれば、PD61 でも回収率は 47% であり (基本法では 30%)、2 dish の細胞を 1 アンプル分として凍結するならば、継代数をかえることなく保存できることが判明した。

ヒト肺繊維芽細胞の加齢の各種パラメーターで、PD35にピークを持つパラメーターは我々の知るかぎりでは報告されていない。我々の実験では split ratio 1:4 で1週間に1度継代する方法をとったことにより、細胞の状態（増殖、細胞密度、等）が継代数により異なっていることが推察され、この点を考慮しなかったためにこのような結果が得られたと思われる。split ratio 1:4で培養し、経時的に細胞数の増加と細胞凍結の影響（改良法の希釈法で）との関係を検討した。PD25では4日目に高いピーク（回収率の）が観察され、PD35では4日目のピークはゆるやかになり、さらに、PD45では7日目を中心によりゆるやかなピークが観察された。上記の結果から最大値をとって比較すれば、PD35までは細胞凍結後の回収率はほとんど同じで、それ以後急激に低下した（図の白丸を参照）。



で、PD35以後に細胞凍結による生存率および回収率が急激に悪くなる理由については今後の問題として残された。

キンギョ由来培養細胞は“老化”するか？

○嶋 昭雄¹⁾, 二階堂修²⁾, 篠原茂実¹⁾, 江上信雄²⁾

1) 滋賀医科大学・放射線基礎, 2) 京大・放射線センター, 3) 京大・理・動物

エイジングの研究材料としての魚類の有用性は, Comput (1956年)や1969年に
 かけの論文, Wolford (1969) をはじめとして, 最近では Woodhead (1978) や江上
 (“生体老化の基礎的研究”- 社内研修報告, 理研ライフサイエンス “実験材料の標準
 化の研究”- 社内研修報告) によって紹介されている。勿論, マウスやラットにくら
 べれば, 死因分析等の分野では, 今後の研究にまつ果が無く残されていることは,
 否定しがたい。さらに, 二年前従前の研究は, 個体, 臓器レベルに限られており,
 培養系での研究は今のところ, 我々の知る限りでは見受けられない。

そこで我々は, 培養系に移植した魚類細胞が, どのような経時変化を示すか
 を, 増殖曲線, plating efficiency, DNA量, 標識率, 染色体数等を指標として, 一年以
 上においた検討し, 基礎的な知見を得たので, 二年前にこの報告する。

[材料, 方法]

約2年令のキンギョ (*Carrasius auratus*) の尾ヒレの骨率分を切断し, 70% EtOH 中
 で滅菌処理し, 組織片を Eagle's MEM + 15% FBS + SM (300 μg/ml) + PC (300 unit/ml) 中で17日間
 37°C で培養。0.1% trypsin + 0.02% Na₂-EDTA で細胞を遊離分散させ, 1ラスコあたり 2.5 × 10⁵ 細胞
 (5 ml) を接種。1ラスコを二群に分け, 一群は37°C に, 他は30°C に保温し, near
 confluence (5~7日) で, 同様の細胞数で接種。各世代ごとに, growth ratio, Population
 Doubling Number (PDN) を算出。いくらかの PDN で ① plating efficiency, ② 染色体数分布,
 ③ Feulgen-DNA cytofluorometry により, 細胞数別の DNA 量を, 3H-TdR 標識及び非標識細胞
 に関して測定した。さらに, PDN > 200 の細胞 (37°C で継代した者の - RBCF1 line)
 で, colony formation による survival curve を, X線及びUV照射細胞に関して検討した。

[結果]

① 37°C 継代細胞 (RBCF1) は, doubling time ≒ 36 hr で最初からさかんな exponential growth を示
 し, 培養310日目には PDN ≒ 200 に達した。② 30°C 継代細胞 (RBCF2) は, 80~160日におけ
 て一時的増殖低下を示したが, その後 doubling time ≒ 40 hr の exponential growth を示し, 310
 日目の PDN は約160であった。③ Plating efficiency は, RBCF1 で, PDN の増加と共に上昇
 し, 183 PDN では約15%であった。④ RBCF1 細胞の DNA 量/細胞は, 1.3, 58, 113 各
 PDN で基本的には大差が無く, 3H-TdR による標識率 (48時間) は, PDN の増加と共に上昇
 し, 113 PDN で約83%に達した。RBCF2 細胞に関しても同様であったが, 91 PDN
 における標識率は90%であった。なお, 非標識細胞の DNA 量に関して, 一定の規則
 性は認められなかった。

[結論]

37°C で継代するかぎり, キンギョ由来培養細胞は, ヒト培養細胞でいわれている
 ところの“老化”に相当する変化を示さなかった。

(本研究の一部は, 文部省, 理研ライフサイエンスの研究補助金によって, おこな
 われた)

○伴 貞幸, 菅原 賢 (京大・医・改基)

ヒト胎児肺より分離した細胞を体外培養条件下で培養した場合、試験管内で増殖する線維芽細胞は有限の寿命を持つ。その細胞寿命は、細胞集団のほぼ一定の分裂回数後に細胞は増殖能を失うことに規定されている。しかし、集団内の細胞個々の寿命は極めて不均一であることは、ラベルされたチミジンの取り込み、顕微鏡映写撮影法により示唆されくいた。即ち、分裂能で判定した細胞集団の寿命は、極めて不均一な細胞個々の寿命の平均値であり、この平均値がほぼ一定であることから、細胞寿命の不均一性が安定した特性であることが予測される。

さて、ヒト胎児肺由来線維芽細胞の試験管内寿命は50回前後の集団分裂回数に相当するということは、上述の意味から、その集団内に少なくとも60回以上の分裂能を持つ細胞群が含まれていなければならぬ。正常ヒト由来培養細胞の最長寿命を評価するには、ラベル化合物の取り込み、あるいは顕微鏡映写撮影法では、容易ならぬ困難が考えられる。

我々は、ヒト由来培養細胞の最長寿命を評価する目的で、次のような実験を試みた。即ち、ある時期の集団細胞でコロニーを形成させ、コロニー当たりの細胞数から、増殖細胞の平均分裂回数を計算する。コロニー細胞はトリプシンで単個細胞にしてから、次のコロニー形成を行なう。以上の操作を連続的に繰り返す、コロニー細胞が次のコロニー形成をしなくなるまで続ける。最後に、コロニー形成の各段階での平均分裂回数を加算して、集団分裂回数と比較する。このような方法で得られた結果の一例として、60回の集団分裂後に死滅する細胞の4回目、および54回目からコロニー形成を行なわせた場合、いずれも、70回以上の分裂能が検出された。

ただし、コロニー形成間の分裂回数を計算する上で、コロニーサイズの不均一性の問題がある。コロニー形成の各段階において、コロニー当たりの細胞数、コロニーの占める面積、コロニー中の細胞の大きさ等は非常に不均一である。

○松尾光芳, 加治和彦 (東京都老人総合研究所)

細胞老化研究のモデル系となっているニワトリ胚線維芽細胞は、ガラス器内継代培養において20～30回分裂後に死滅する細胞であり、またもっとも細胞形質転換を起しにくい細胞と考えられている。さきに、継代にともなってニワトリ線維芽細胞に現われるいくつかの変化について報告した(1)。ニワトリ線維芽細胞は細胞老化の過程で倍数体細胞を蓄積することが見出されている(2)。本研究において、細胞老化にともなって出現する倍数体細胞の組成と、倍数体細胞蓄積の経時的変動を定量的に観察した。

〔方法〕細胞は、白色レグホン13日胚の脚部(骨は除去)を0.5%トリブシン処理して得た。継代は、0.5%トリブシン、37°C、3分間処理により細胞を分離し、培養容器当たり 1×10^6 細胞の播種濃度で、60mmラックス・プラスチックプレートを用い、一週間間隔で行った。培地は、10%ウシ胎児血清、10%トリプトース、ペニシリン(250U/ml)、ストレプトマイシン(50 μ g/ml)添加テミン変法イーグル培地を使用した。培養は、37°C、5%炭酸ガス・95%空気中で行い、継代後1日置に培地を交換した。細胞の計数にはクーラー・カウンターD型を用いた。細胞核の倍数性は、飽和密度に達した細胞について培地を交換して3日間放置後に、培地を除去し、0.005%プロビジウム・ヨード、0.2%ノニデットP-45含有0.1%クエン酸ナトリウム溶液を加え、ビベット操作して得られる裸核について、蛍光細胞選別装置FACS-Ⅲを用いて調べられた。

〔結果〕異なる胚(A, B)から得られた細胞をそれぞれ3分して6細胞集団(A1, A2, A3, B1, B2, B3)をつくり、各細胞集団の寿命を調べた(表1)。平均総細胞倍加数は、A細胞系23.3, B細胞系28.9であった。ニワトリ線維芽細胞は、用いる胚により、初代培養後数世代の細胞倍加率が一定しているものと、指数関数的に低下するものがあることは、既に報告したが(3)、A細胞系は前者に、B細胞系は後者に相当するものであった。第1図から明らかのように、継代にともなって生成する倍数体は、2C, 4C, 8Cなどいづれも 2^n C型のものであった。また検出されたもっとも大きい倍数体は64Cであった。細胞老化にともなう倍数体細胞蓄積の経時的変動を第2図に示す。初代培養時には、ほとんどが2C細胞で、数%の4C細胞を含むだけであるが、その後4C細胞がじょじょに増加し、50%寿命終了時には、約20%、最終的には、約35%を占める。8C以上の細胞は少数であるが、培養末期に顕著に増加する。したがって、倍数体全体としては培養末期に急激に増加している(第3図)。なお、FACS-Ⅲを用いた測定においては、G2期にある二倍体核とG1期にある四倍体核とを区別できないが、飽和密度に達して増殖を中止している細胞を使用しているため、観察された細胞核はほとんどG1期にあるものと思われる。

〔考察〕ニワトリ線維芽細胞の細胞老化にともなう倍数体細胞の蓄積は、培養末期に顕著になる現象であり、細胞老化による二次的な結果と考えられるが、4C細胞

核が培養初期から増加するという事実は注目される。ニワトリ線維芽細胞は、培養初期から倍数体細胞を蓄積するという点で、ヒト線維芽細胞と異なるように見える。ヒト線維芽細胞においても倍数体細胞の生成が観察されているがその出現頻度は非常に低い。ニワトリ細胞核は比較的的不安定になっているものと思われる。倍数体生成の機構は不明であるが、倍数体として2ⁿC型のみが現れることや、マウスミエローマの4倍体が2核細胞からできること(4)などから核の融合による倍数体生成が示唆される。一方、マウス肝細胞の生体内倍数体化においても、2ⁿC型の倍数体のみが観察されており(5)、倍数体細胞の生成機構は、インビヴォ、インビトロを問わず同一である可能性があり興味深い。

表 ニワトリ胚線維芽細胞の寿命

細胞系	継代数	倍加数	寿命(日)
A 1	16	23.0	102
A 2	19	24.0	123
A 3	16	22.8	102
平均	17	23.3	109
B 1	19	28.1	123
B 2	19	28.2	123
B 3	23	30.4	151
平均	20	28.9	132

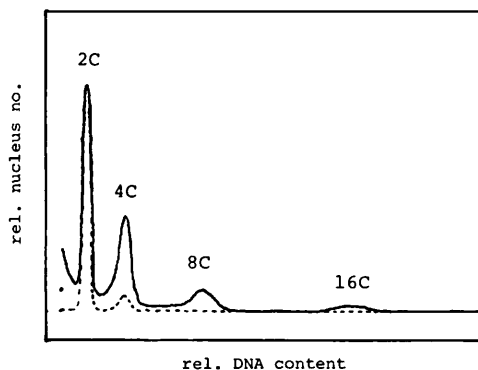


Fig.1 Flow microfluorometric analysis on ploidy pattern (--- the young cells at the 3rd p., — the old cells at the 19th p.)

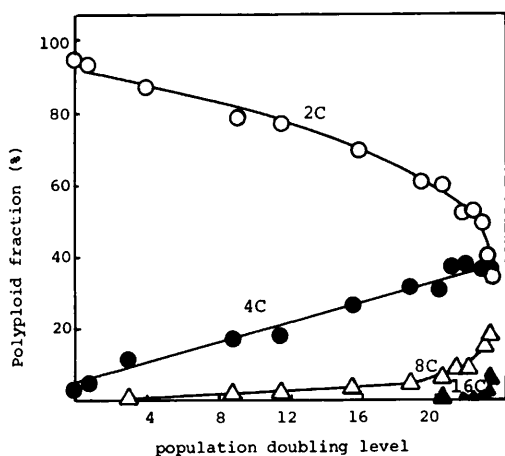


Fig.2 Changes in relative frequency of each nuclear ploidy class

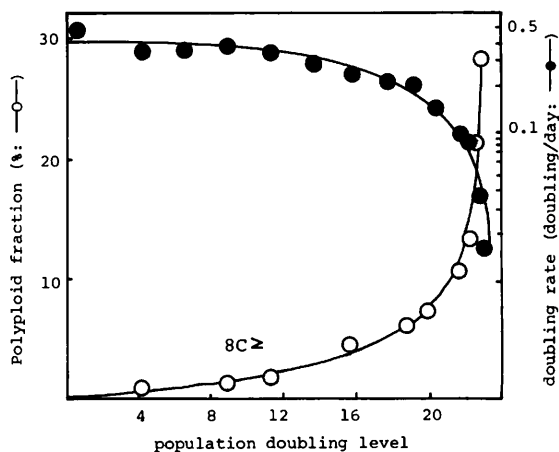


Fig.3 Accumulation of polyploid cells and changes in doubling rate

- (1) M. Matsuo and K. Kaji; Biomedical Gerontol., 2, 56 (1978)
- (2) K. Kaji and M. Matsuo; Exp. Cell Res., 119, 231 (1979)
- (3) K. Kaji and M. Matsuo; Exp. Gerontol., 13, 439 (1978)
- (4) K. Moriwaki and H.T. Imai; Exp. Cell Res., 111, 483 (1978)
- (5) A. Shima and T. Sugahara; Exp. Gerontol., 11, 193 (1976)

D-9 発生と加齢に伴う、マウス脳抽出液の培養癌細胞に対する増殖抑制効果の変動

○遠藤由美子, 武田俊平, 松沢大樹(東北大, 抗研, 放射線医学)

〔緒言〕発生過程においては細胞死 cell death が起こり、形態形成に積極的に関与している。これは神経系の発生に関して例外でなく、発生過程の脳においては、盛んな細胞の増殖と分化に伴い、大量の細胞の死が起こることが知られている。本研究では、このような脳における細胞死の機構を知るため、*in vitro* で各年齢のマウスの脳の抽出液を種々の培養癌細胞に作用させた。その結果、脳抽出液に癌細胞の増殖及びコロニー形成を抑制する効果があることが明らかとなり、またマウスの胎仔年齢及び加齢に伴いその活性が変動することがわかったのでこれを報告する。

〔材料及び方法〕①動物及び細胞：各年齢の ddY, 竹系マウス, 及び Wistar 系ラットの脳を用いた。培養癌細胞は主にマウス神経芽腫細胞 N-18 を用いた。更に、マウス乳癌細胞 FM3A 及びラットグリソマ RBT₂C₂ も使い、N-18 の結果と比較した。②脳からの抽出法：脳を缺血で細切し、血清不含の培地で 2 時間培養した後培地を除去した。ここに新たに脳重量の 20 倍量の培地 (ダルベコ MEM, 10% FCS) を加え、75% CO₂, 92.5% air, 37°C で 18 時間培養した培養上清を 2000 rpm で 10 分間遠心し、得られた上清を脳抽出液として以下の実験に用いた。また別に、脳ホモジェネートの 105000g 上清も調整し、上記の脳抽出液と活性を比較した。③活性の測定法：脳抽出液を添加した時の培養癌細胞の増殖曲線と寒天中でのコロニー形成率について調べた。

〔結果〕①増殖曲線に対する効果：脳抽出液を添加した培養液で N-18 細胞を培養すると、脳抽出液の添加量に比例して N-18 の増殖が抑制され、高濃度に添加した場合は細胞死が見られた。②コロニー形成率に対する効果：N-18 細胞のコロニー形成率も脳抽出液の添加量に比例して低下した。③年齢による活性の変動：上記のような活性は、出生前後のマウスの脳で最も高く、その後加齢と共に活性は低下した。④種々の癌細胞及び動物による活性の比較：脳抽出液は FM3A 細胞, RBT₂C₂ 細胞に対しても N-18 細胞と同様のコロニー形成抑制効果を示し、cell line による特異性はみられなかった。また ddY, 竹系マウス, Wistar 系ラット共に同様の抑制効果を示し、動物種, 系による特異性も認められなかった。

〔考察〕上記の結果より、マウス脳を *in vitro* で培養した培養上清には、培養癌細胞の増殖、コロニー形成を抑制し、高濃度では細胞障害を引き起こす活性があることがわかった。この効果は、マウス、ラットの脳でみられ、またマウスの系及び障害される癌細胞の cell line による特異性は認められなかった。また、このような活性は特に出生前後の機能分化の旺盛な時期のマウスの脳で最も高く、その後加齢と共に活性は徐々に低下した。このことから、上記の脳抽出液の効果が発生期の脳における機能分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆される。このような効果の発現する機構についてはまだ不明であるが、上記の脳抽出液はいわゆる conditioned medium に類すると考えられ、脳ホモジェネートの 105000g 上清に比較して非常に高い活性が得られた。このことから我々は、脳を培養することにより、脳の細胞から

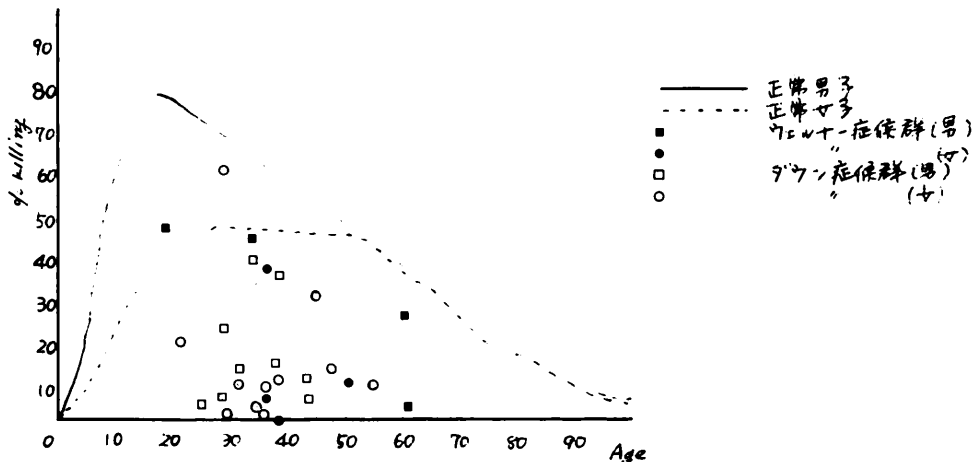
細胞外液に何らかの活性物質が分泌されたものと予想している。現在、活性の安定性について検討中であり、脳抽出液の効果と脳における細胞分化との関連性、及び活性物質の生化学的解析等についても検討を加えたい。

後藤真 東京大学物療内科

前回の研究会で報告した如く、早期老化症候群の一つとして知られるウエルナー症候群は、腫瘍の発生の高く、また、いくつかの免疫異常が知られている(1,2,3)。

近年、腫瘍免疫の分野で、natural cell-mediated cytotoxicityという現象が注目されてきている。これは、予の感作されること等くひき起すされるin vitroにおける培養腫瘍細胞に対するリンパ球のkilling activityをシステムとして観察されるが、このシステムがin vivoでimmune surveillanceの一部を担当していると考えられる。最近では、この担当細胞であるnatural killer細胞がin vivoで腫瘍発育を抑制することも観察されている(4)。

動物では、このnatural killer細胞のkilling activityは、年齢に大きく左右される。ヒトでは、腫瘍発生が高い先天性免疫不全症のうち、severe combined immunodeficiencyのkilling activityが低下が知られている(5)。高腫瘍発生、免疫異常という点に注目してウエルナー症候群、さらに、早期老化症候群に含まれるダウン症候群におけるnatural killer細胞のactivityをヒト慢性骨髄性白血病由来のcell lineをtargetにして、回帰的興味ある知見を得た。即ち、対象に比し、両症候群とも、著しいkilling activityの低下が見られた。また、両症候群の血清中には、対象のnatural killer細胞のactivityを阻害する物質の検出はできないが、両症候群におけるnatural killer細胞活性の低下は、natural killer細胞そのものの異常に由来すると考えられた。



<文献>

1. M. Goto, et al J. Clin. Invest. (In press)
2. M. Goto, et al J. Am. Geriatrics Soc. 26: 341-347, 1978.
3. 按藤 真. 感染・炎症・免疫 8: 79-89, 1978
4. D. Haller, et al Nature 270: 609-611, 1977.
5. H. S. Koren et al J. Immunol. 120: 796-799, 1978

老化機構研究へのアプローチとしての遺伝的早老症の研究と意義

○藤原美定，加納良男，巽真理子（神戸大・医・放基）

老化の病態生物学的現象の列挙は可能でも、老化の基本機構は Cytoogerontology の進歩にもかかわらず依然模索的である。Cytoogerontology の分野でも Hayflick limit 現象と関連して、プログラム説，体細胞突然変異説，エラー説等数多い老化仮説もまた相反するデータとともに適切に立証されるに至っていない。老化の遺伝学が真剣に考えられる必要がある。

遺伝的早老症とは多数の主要老化形質を多く重複して chronologic age に比して遺伝的背景下で早く発現するものである。従ってすべて部分早老症候群を呈し、正常老化とは不一致点をもつことは当然のことなのである。上位にランクされる早老症は単一遺伝子の遺伝病か染色体異常症が多く、前者の場合、特定遺伝子と主要老化形質スペクトラムとの関係及び老化機構の今後の研究に重要な役目を果たすであろう。ここでは主要老化形質とは病態生物学的指標と細胞・分子・生化学的指標形質を意味する。

本研究では第一段階として上位ランクの Werner 症候群，(WS) Hutchinson - Gilford progeria 症候群 (HGPS)，Cockayne 症候群 (CS) の分子・細胞学的研究から得た知見から testable な広域老化形質スペクトラム発現に共通する細胞要因を探ることを目的とした。研究結果の要約は次の通りである。

(1) Age-and site-matched biopsy からの培養細胞の集団倍加能は WS (近親関係のない 10 系) と HGPS (1 系) では正常 (45-48 PDS) の約 50% 程度以下であり、クローニング効率も早期低下する。即ち単一遺伝子変化は有意な老化効果をもつ。

(2) Non-cycling (S 期へ入れない) 細胞頻度の PD 依存性増加が WS と HGPS で高く、クローン終末分化を暗示する。

(3) Go 化と共に、WS と HGPS (Ⅱ期) では分子 DNA 複製能も低下しているが、DNA 修復能は正常であり、UV と X 線感受性も正常である。

(4) CS は分子 DNA 修復正常であるのに UV 致死高感受性を示し、DNA 複製再開始に必要なクロマチン回復ができない。

(5) Ⅱ期では HGPS, WS とともに自然 SCE 頻度が統計学的に有意に高い。

その他の知見も考慮して上位ランク早老症の比較医生物学的観点から病態生物学的及び細胞分子生物学的な広域老化形質発現に共通する第一近似要因は、①染色体クロマチンの構造変化、および②関連タンパク因子(群)の変化とまずいえよう。今後遺伝子変化とリンクする一つ一つの要因の解明が老化形質発現とその機構に重要となろう。

○三井洋司¹⁾, 坂上 宏^{1,2)}, 室田誠逸¹⁾, 山田正篤²⁾
 老人総合研究所, 薬理学部¹⁾, 東京大学, 薬学部²⁾

< 目的 >

個体老化の機序の一つとして, 構成細胞の量的, 機能的変化に原因を求める細胞老化説に立った場合, ヒト由来培養 2 倍体細胞は, 1) 固有な分裂寿命をもつこと 2) 分裂回数が進むにつれ, 発現する形質が変化すること 3) 細胞供与者のヒト年齢を反映した細胞変化が認められること 等から, 細胞レベルの加齢を解析する有効なモデルと考えられる。

細胞の genetic system の変化 — 情報の変化 — 表面膜の変化 という関連の中で, 細胞核と表面膜のどちらが, 細胞老化の primary event であるか未知であるが, 我々は, 今まで報告してきた様に, 分裂寿命がつきものに伴う, 細胞核の変化, 及び表面膜の変化の, 両側面から event を掘り起こし, その接点をつなげる, という戦略で研究を進めており, 本報告は, genetic system の変化の面から, 核タンパク, 特にヒストンの加齢変化を, 解析したものである。

< 実験方法 >

細胞は, ヒト胎児肺由来の線維芽様細胞 (TIG-1) を主に用い, 1:4 分割で継代して, 平均 67 Population Doubling Levels (PDL) の培養系寿命を示した。テフロンシートで細胞を剝離し, ホモゲナイズ後, 遠心法により, 粗核, 又は精製核を得た。核から, 0.15 M 食塩水可溶蛋白 (主に核質蛋白), 0.4 N 硫酸可溶蛋白 (主にヒストン), 残渣の酸不溶性蛋白 (主にノンヒストン蛋白) を分画した。ヒストンは, acidic urea polyacrylamide gel electrophoresis によって細分画し, 染色又は放射性リジンのカウントによって, 分析した。

< 結果 >

(1) 核タンパクの量的変化

核内の総タンパク量は, 細胞加齢と共に末期破綻型に増加していた。これは DNA 合成能の衰退した細胞における核サイズの拡大が, 核タンパクの蓄積に基づくことを示す。この核タンパクを更に分画したところ, 0.15 M 食塩不溶性のノンヒストン酸性蛋白が 60% を占め, 加齢に伴って, 主にこの蛋白が増量することに因って, 総核タンパクの増加がもたらされたと云える。

(2) ヒストン分画の変化 (図 1)

0.4 N 硫酸可溶蛋白の, DNA 量との比率は, 加齢変化が認められないが, そのうちヒストンに注目して, 電気泳動による分離パターンを調べた。図に示すように, ヒストン H₁ の比率が, 加齢と共に減少することが判明した。この結果は更に, 早期及び末期細胞を, ³H-又は ¹⁴C-lysine と 48 時間インキュベートした直後, 同時に採取して混合し, 二重標識したヒストンを抽出して電気泳動で分析した場合でも, 再現性よく確認された。従って, 加齢に伴うヒストン H₁ の減少は, 末期細胞に多く含まれる蛋白分解酵素に因るものではない。

(3) ヒストン分画の合成と代謝回転の変化 (図2)

ヒストンH₁の加齢に伴う減少が、合成速度の低下に因るのか、代謝回転の亢進に因るのかを追求した。早期(22 PDL)及び末期(57 PDL)細胞を、各々、¹⁴C-, ³H-lysine と1時間インキュベートした直後、細胞を採集又は、放射性リジンを含まない培養液で、4日間、培養を続けて、chase を行った細胞を採集し、二重標識したヒストンを抽出して、電気泳動法により、ヒストンの合成速度と代謝回転を検索した。その結果、加齢と共に、相対的にヒストンH₁の合成速度が低下すること、更に、代謝回転もいくらか亢進していること、が明らかとなった。

<考察>

細胞核内のクロマチン基本構造である nucleosome core は、ヒストン H_{2a}, H_{2b}, H₃, H₄の各2分子からなり、比較的安定であるが、ヒストンH₁は、その継ぎ目となっているリンカーDNAに結合し、その量は、癌化、発生、細胞分化の過程で、変動する例が報告されている。ここで示された老化細胞におけるヒストンH₁の減少は、1) 遺伝子発現の変動、2) DNA傷害の促進 等を引き起こすことが、充分考えられる。今後、ヒストンH₁に対する蛍光抗体法を活用し、個々の細胞レベルからも解析して、ヒストンH₁減少の、細胞学的意義を、明らかにしていきたい。

図 1.

Electrophoresis of Histones

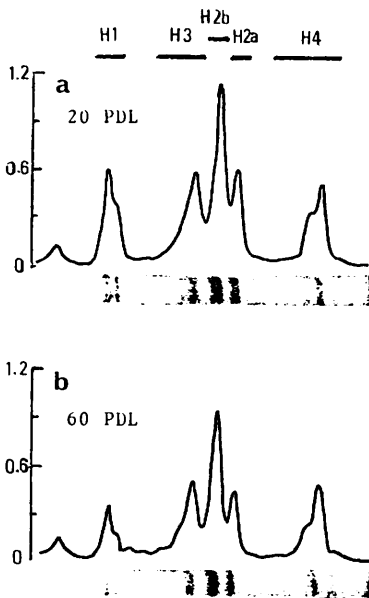
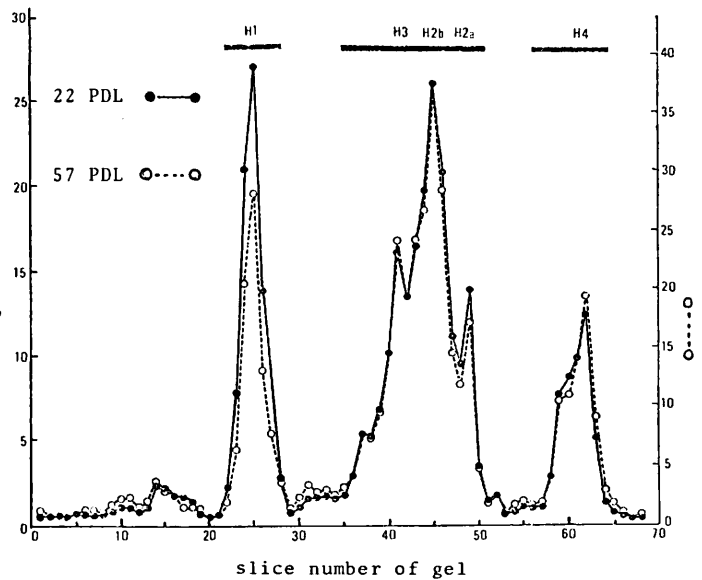


図 2

Co-electrophoresis of Labeled Histones



References:

1. Y. Mitsui, K. Matuoka, S. Aizawa and K. Noda, New approaches to characterization of aging human fibroblasts at individual cell level, in K. Oota and T. Makinodan (ed) Aging phenomena: Relationships among different levels of organization, Plenum, New York, 1979, in press
2. Y. Mitsui, S. Aizawa and K. Matuoka, The relation of cell nuclei and surface membranes to the capacity of cell proliferation in human diploid fibroblasts Proc. XIth International Congress of Gerontology, Excerpta Medica, The Netherlands, 1979, pp 149 - 151.

E-4 加齢によるラット肝H1ヒストン小分画ならびにクロマチン構造の変化

新藤恵子, 森川明徳, 大場義樹 (金沢大・薬学部・生物薬品化学)

クロマチンはH1ヒストン以外の4種のヒストン(H2A, H2B, H3, H4)がヒストン8量体を形成しDNA/40塩基対とともにヌクレオソームコアを形成している。コアとコアの間は約60塩基対のDNA(リンカーDNA)によって架橋され、H1ヒストンおよび大部分のノンヒストン蛋白質がリンカーDNAと結合している。

加齢に伴い細胞は種々の変化を遂げるが、細胞核遺伝形質の変化も重要な要素の一つであると考えられる。この場合蛋白質とDNAの結合(クロマチン高次構造)の変化が想像される。そこで加齢によるラット肝におけるクロマチン構造の変化について検討した。動物はウイスター系雄ラットを用いた。

〔1〕H1ヒストン小分画の変化

ラット肝H1ヒストンはイオン交換カラムクロマトグラフィーにより4つのピーク(I, II, III, IV)に分けることが出来る。6週令と16月令のラットではH1ヒストン小分画間の相対量は変化しないが20月令を過ぎるとIIのピークが相対的に増加する。このとき核内の平均DNA量を見ると、6週令から16月令までは 12 pg/Nuclei で変わらないが24月令においては 16 pg/Nuclei であった。H1ヒストンと他の4種のヒストンの比は加齢に関係なく0.21と一定である。したがって加齢とともにH1ヒストン小分画のIIのピークが増加すると考えられる。IIのピークへの1時間での³H-リジンの取込は6週令でも24月令でも相対的に変化しなかった。またそれぞれラットの単離核について超音波処理LCD(円二色性)スペクトルを得ると、加齢により280nmのモル楕円率が低下した。

〔2〕クロマチン内在性エンドヌクレアーゼ活性の変化

ラット肝細胞核内には内在性のカルシウム、マグネシウム依存性エンドヌクレアーゼの存在が知られている。この活性について加齢による変化をみると、6週令のラットと比較して24月令のラットでは約20%ほど上昇している。エンドヌクレアーゼ活性の上昇とクロマチン構造との関係については現在検討中である。

老化がアロプログラミング説でおこるにしても自然損傷の蓄積によっておこるにしても、クロマチン構造形成に重要であるH1ヒストン小分画において変化が認められること、またLCDスペクトルにおいてDNA高次構造に変化が認められることは興味深い点である。また、加齢に対してエンドヌクレアーゼ活性の変化も有力な指標となることが示唆される。

○ 佐藤 秋子（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）

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白鼠のパラビオーゼによる実験研究を行って来て居り、その肝臓における光顕レベルでの検索成績についてはすでに長谷川，田内らによって報告されている。

肝細胞内小器官レベルにおいて、ヒトならびに白鼠では、すでに老化に伴うミトコンドリアの減数とこれに伴う増容ならびにクリステの密度の増加などをみとめているが、老若パラビオーゼ動物肝細胞における消長について検討を加えた。

検索材料： 年齢の異なる呑竜白鼠（4か月と16か月）にパラビオーゼ手術を施し、健康で8か月を経過したもの（若側12か月，老側24か月）13対、年齢の等しい（4か月）白鼠をパラビオーゼさせ8か月経過したもの7対を中心に、単独老（24～29か月12匹），単独若（12か月，10匹）を対照として肝細胞ミトコンドリアの超微計測的検索を行った。

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、 O_3O_3 再固定、脱水後エポキシに包埋したものの超薄切片に、醋酸ウラニールおよびクエン酸鉛重染色を施し、日立HU-11B電子顕微鏡により2000倍（数を算するため）、10,000倍（大きさの測定のため）の写真撮影、最終倍率4000倍，20,000倍の写真について微計測を行った。

ミトコンドリア数については細胞質について合計 $5000\mu^2$ 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個のミトコンドリアについて夫々面積，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、ミトコンドリアをその面積により $0.21\mu^2$ から $1.40\mu^2$ まで $0.20\mu^2$ 毎に6群にわけ、各面積群の中央値に相当するミトコンドリアのクリステの全長を算出して、各群間の有意差検定に供した。

単独老白鼠肝細胞ミトコンドリアは、単独若に比し、数は少なく、大きさは有意に大である。又各面積群毎にみたミトコンドリア内クリステは単独老に密で、その全長は有意に大である。

若同志のパラビオーゼ群では、単独若に比し、ミトコンドリア数に差はないが大きさは大。しかしクリステの密度に差はなくむしろ疎でさえあった。

老若パラビオーゼ群において、若側パートナーは、数，大きさ，クリステの密度の何れにおいても単独老に近く、老側パートナーではむしろ単独若に近く、単独の場合に比して老若の関係が逆転している点のみとめた。

これらの超微計測的検討成績は、すでに報告された同一材料における細胞学的検討、すなわち肝細胞数，2核肝細胞数，核および細胞容積などにみられた成績と全く軌を一にしている。加齢に伴うミトコンドリアの減数，増容は細胞レベルにおけると同様、分裂を抑制された状と、これに伴う機能の代償によるものと理解した。老若パラビオーゼにより、若側パートナーは、老側肝細胞からの分裂抑制因子の影響を体液を通じて受け、又一方老側肝細胞の機能の過重を代償していると推定し、老側の老化が若干抑制されているかと考えられた。

Fig. 1

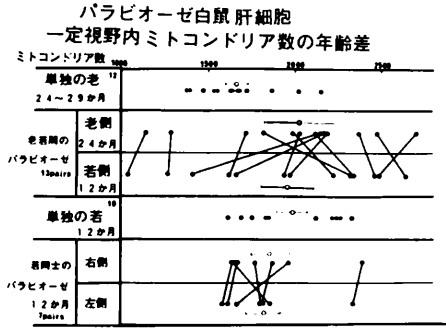


Fig. 2

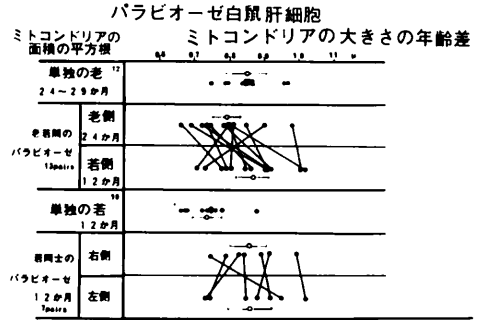


Fig. 3

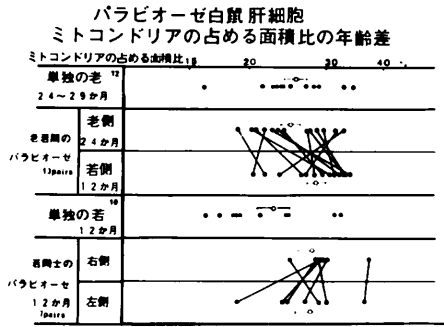
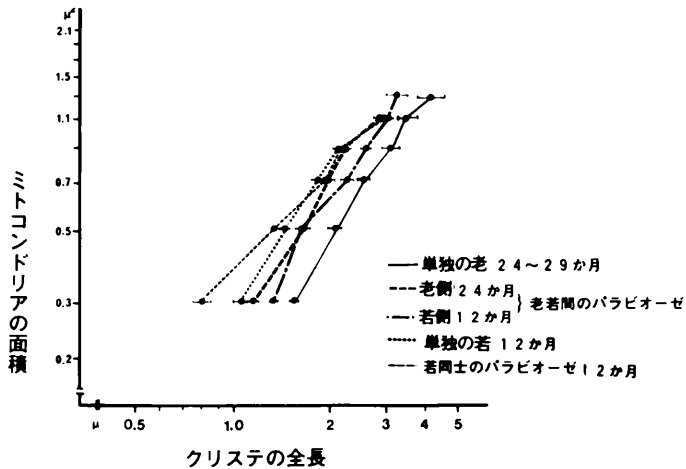


Fig. 4

パラビオーゼ白鼠肝細胞におけるミトコンドリアの
大きさとクリステの長さとの関連性



* パラビオーゼ動物はすべて結合手術後8か月のもの

腸内細菌叢と老化 — 無菌及び通常ラットの消化管及び肝臓の
酵素活性の加齢による変化

○石井孝彦・河合康雄・務台方考 (ヤクルト本社中央研究所)

〔目的〕 腸内細菌叢は宿主の感染症や消化器、肝臓疾患、免疫応答、胆汁酸代謝やアミノ酸代謝など広範囲に関わっているので、腸内細菌叢の宿主における意義を明らかにすることは老化との関係、更に老化の制御の立場から意味があると考えられる。

著者らは、生態学的に腸内細菌叢の宿主における意義を解明しようと研究を進めている。その一つの指標として、消化管及び肝臓、腎臓における種々の酵素活性を測定した。¹⁾ その中で十二指腸粘膜 Alkaline phosphatase (ALP) が腸内細菌叢と加齢により、量的²⁾ 質的³⁾ に変化を受けることを示した。

今回は、8週令と40週令の無菌ラット (GF) と通常ラット (CV) を用いて酵素活性を指標として、消化管機能と肝臓解毒機能に及ぼす腸内細菌叢と加齢の影響を調べたので、その結果の一部を報告します。

〔方法〕 動物は、Fischer 344/Yit (♂) を各群5頭使用した。CVについては、消化管内容物の菌叢検索を行なった。以下の酵素活性と血清 Triglyceride (TG)、Cholesterol (Chol) を測定した。

〔結果〕 CVの腸内細菌叢はどの部位でも、Lactobacilli が高いレベルであり、40週令でもそのレベルを維持していた。胃内容物では、Streptococci と Enterobacteriaceae が 10^5 レベルで維持され、Bacteroides、Staphylococci の増加傾向がみられた。十二指腸内容物では、Lact. 以外の菌が増加傾向を示した。回腸内容物では、Strept., Staph., Bact. が増加傾向を示し、Entero. が低下傾向を示した。盲腸内容物では、Bact., Strept., Entero. は変わらないが Staph. が増加傾向を示した。

Lipase (Lip.): 8週令の膵臓の Lip. 活性は Specific activity (SA) Total activity (TA) とともに GF の方が CV より高かった。消化管内容物では GF、CV とともに SA は回腸、盲腸で高く、TA は盲腸で高かった。40週令の膵臓 Lip. 活性は、SA、TA とともに GF の方が CV より著しく高かった。消化管内容物では GF の SA が十二指腸で、TA が盲腸で高かった。CV では、SA、TA とともに空腸が高かった。GF の内容物の TA は全ての部位で、CV の TA より高かった。加齢の影響は CV ではほとんどみられなかったが、GF では 40週令の方が 8週令より高い活性を示した。

脂肪組織 Lipoprotein Lip. (LP Lip.): 8週令、40週令の SA、TA とともに CV の方が GF より高い傾向を示した。加齢に伴ない、活性は増加傾向を示した。

Hormone sensitive (HS) LP Lip.: 8週令、40週令の SA、TA とともに CV の方が GF より高い傾向を示した。加齢に伴ない、活性は減少傾向を示した。

血清TG量: 8週令ではGFとCVは同レベルであるが、40週令ではGFがCVより高い値を示した。加齢により増加する傾向を示した。 血清Chol量: 8週令、40週令ともGFの方がCVより高い傾向を示した。加齢に伴ない、減少傾向を示した。

十二指腸絨毛ALPとMaltase (Mal): 8週令、40週令のSA、TAともGFの方がCVより高かった。加齢に伴ない、SAは減少を、TAは増加を示した。 Lactase (Lac): 8週令、40週令のSA、TAともGFの方がCVより高かった。加齢に伴ないSAでは急激な減少を、TAでは低いレベルのままであった。

肝臓 Lysosome β -glucuronidase (β -glu): 8週令のTAではGFの方がCVより高かったが、SAと40週令のSA、TAともCVの方がGFより高かった。加齢に伴ない活性の増加がみられた。 Acid phosphatase (ACP): 8週令のSA、TAともGFとCVは同レベルであったが、40週令のGFでは活性を維持し、CVでは活性の増加を示した。

肝臓 Microsome Nitroreductase (NR): 8週令、40週令のSA、TAともGFの方がCVより高かった。加齢に伴ない活性は全て増加を示した。

Aniline hydroxylase (AH): 8週令ではSA、TAともGFの方がCVより高かったが、40週令ではSA、TAともCVの方がGFより高かった。加齢に伴ないGFではSA、TAとも減少を示し、CVではSAを維持、TAで増加を示した。 UDP-glucuronyl transferase (UDP-GT):

8週令ではSA、TAともGFとCVで同レベルであったが、40週令ではSA、TAともCVの方がGFより高かった。加齢に伴ないGFではSA、TAとも減少傾向を示しCVではSAを維持、TAでは増加傾向を示した。

肝臓細胞質 Argininosuccinate synthetase (ASS): 8週令、40週令のSA、TAともCVの方がGFより高かった。加齢に伴ないGF、CVともSAで減少傾向を示しTAでは維持を示した。

[考察] GFの消化管内容物のLip.がCVより高いことは、TGの消化吸収がGFで高いことを示すのかもしれない。脂肪組織の酵素活性から、加齢によりTGが蓄積する傾向を示した。40週令のGFはCVより高TG血であった。これはGFでTGの消化吸収が高く、しかも脂肪組織によるTGの取り込みが少ないことに起因あると思われる。腸内細菌叢は加齢に伴ない血中TGの増加を抑える機能を果していると思われる。

十二指腸ALP、MalのSAで、CVの方がGFより低下割合が高いため、腸内細菌叢は加齢に伴ない消化管機能を低下を増加させる傾向があると思われる。肝臓AH、UDP-GT、ASSで示されたように、腸内細菌叢は肝臓の解毒機能を維持するように働いていると思われる。

- 1) Kawai Y. et al: Infect. Immun. 19 771 (1978) 2) Kawai Y. et al: Appl. Env.rom. Microbiol. 36 381 (1978) 3) Ishii, T. et al: Infect. Immun. (1978) Submitted 4) 石井ら: 第3回日本基礎老化研究会要旨集 p42 (1978) (京都)

生体で数多くの機能をいとなむ肝臓において、加齢に伴う機能的変化を研究することは意義あるものである。この目的のためには、種々の肝機能検査の中で、BSP (Bromosulfophthalein) 色素排泄試験が軽微な肝機能変化を把握できる点で最もよく用いられている。そして、加齢に伴ってBSPの血中停滞が増加する（肝機能が低下する）ことが諸家により報告されており¹⁾²⁾、これはBSPの肝細胞への摂取率、貯蔵能が加齢に伴って低下するため、BSPの肝細胞から胆道系への排泄率は加齢に伴って変化しないとされている²⁾。しかし、これらに相反する報告もみられ³⁾、また加齢に伴うBSP摂取率、貯蔵能低下の理由については全く不明である。

今回、加齢に伴う肝機能低下のメカニズムを検討する目的で、ラットに *in vivo* でBSPを投与し、細胞レベルでのBSPの摂取・貯蔵の状態を調べた。

〔材料及び標本作製〕

1年ラット（体重500g）にBSP 50mgを静脈内投与し、30分後にエーテル麻酔下でエタノール灌流固定し肝臓を摘出した。摘出肝をcollagenase処理した後に、ホモゲナイザーを用いて肝細胞を単離し、肝細胞塗抹標本を作製した。

〔染色〕

肝塗抹標本を5N-HCl, 25°Cで5分間加水分解後、acriflavine-Schiff試薬でFeulgen核染色を行なった。同一標本を更にpH 10.6のSÖRENSEN-グリシン-塩化ナトリウム-水酸化ナトリウム緩衝液で処理することによりBSPを蛍光色素に変換した。

〔重染色標本の観察〕

肝細胞核DNAは励起光405nm、蛍光520nmで観察し（写真1a）、肝細胞内BSPは励起光543nm、蛍光610nmで観察した（写真1b）。

〔結果〕

acriflavine-Feulgen核DNA定量により2倍体細胞と同定した細胞においては、BSPの強い特異蛍光がみられ、BSPの摂取・貯蔵が大きいことが示された。一方、4倍体細胞及び2核細胞では、2倍体細胞に比べBSPの蛍光が弱く、BSP貯蔵量が低下していることが示唆された（写真1）。

〔考察〕

加齢に伴うBSP色素排泄試験の変化に関する報告は、研究者により成績が異なり一定していない。その理由として、週齢（体重）の異なるラット間でBSP投与量を同等にするのが困難であること、またBSP摂取率、貯蔵能、排泄率の測定法が異なることなどが挙げられる。いづれにせよ、加齢に伴う肝機能低下は諸家により指摘されているが¹⁾²⁾、しかしその大部分は肝全体の臓器としての機能的変化が観察されており、細胞レベルでの研究は殆んどない。この臓器の機能低下を

単に加齢に伴う肝全体の細胞数減少にのみ理由を求めるだけでなく、比較的寿命の長い肝細胞においては、個々の細胞における加齢に伴う機能的変化を検討することが必要であると思われる。

今回用いた全く新しい方法は、個々の肝細胞において核DNA量とBSP貯蔵量を同時に測定することが可能であり、同一ラットにおける細胞レベルでのBSP貯蔵能を知るには適していると思われる。この方法により得た——2倍体細胞よりも多倍体細胞(2核細胞を含む)においてBSP貯蔵量が低下している——という結果から、加齢に伴う肝機能低下は多倍体細胞の増加が重要な要因であると解釈される。またこの結果と解釈は、ラット肝細胞においては加齢に伴って多倍体化が進行する事実⁴⁾、また多倍体化は生体にとって有利な現象ではなくDNA損傷の結果として出現するというcross-linking仮説⁵⁾、および多倍体細胞では損傷DNAが蓄積されているという実験結果⁶⁾⁷⁾などとも一致するものである。

尚、今回の核DNA-BSP重蛍光染色法を用いて、幼若ラット肝細胞と老齢ラット肝細胞におけるBSP貯蔵能の差異を調べることは、BSP投与量の因子が加わるための困難であるが、現在種々の投与量について両者を検討中である。

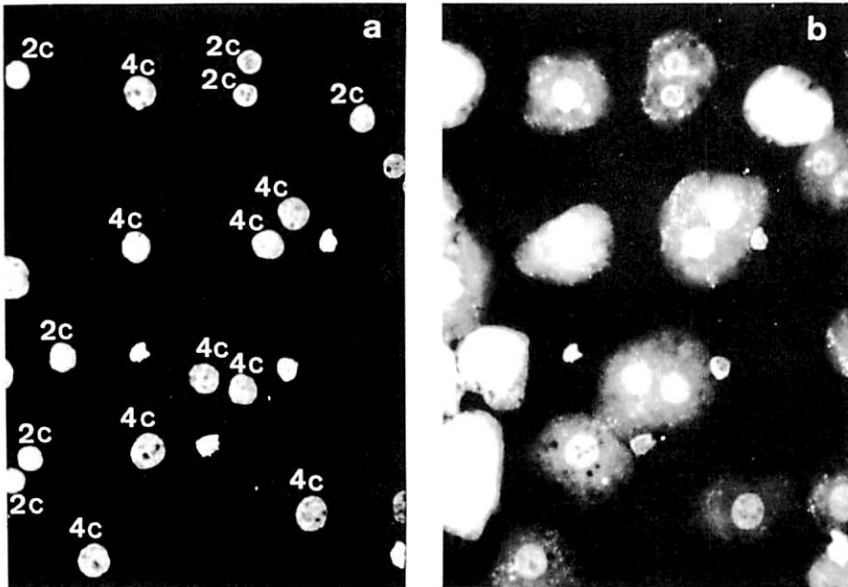


写真1. a: acriflavine核蛍光写真。 b: BSP蛍光写真。 aとbは同一視野。2倍体細胞(2cの1核)ではBSP蛍光が強く、4倍体(4c)では弱い。

1. Thompson, E.N., Williams, R. : Gut 6, 266-269, 1965
2. de Leeuw-Israel, F.R., Hollander, C.F., Arp-Neefjes, J.M. : J.Gerontol. 24, 140-142, 1969
3. Koff, R.S., Garvey, A.J., Burney, S.W., Bell, B. : Gastroenterology 65, 300-302, 1973
4. 中西 和夫, 藤田 哲也 : 才1回日本基礎老化研究会, 東京, p48-49, 1977年8月
5. Nakanishi, K., Fujita, S. : Cell Structure and Function 2, 261-265, 1977
6. Nakanishi, K., Shima, A., Fukuda, M., Fujita, S. : Mech. Ageing and Development 10, 273-281, 1979
7. 中西 和夫, 福田 優, 藤田 哲也 : 才68回日本病理学会, 東京, p117, 1979年4月

加齢に伴う軸索テレストロフィー。

—軸索終末肥大の形態學—

東京都神経科学総合研究所 神経病理學研究室
藤澤浩四郎

軸索テレストロフィー (Axonal Dyatrophy, 以下ADと略記する) とは神経細胞軸索終末に初発する「特異性」の腫大現象を指す言葉である。「特異性」という意味は、例えは軸索の機械的増傷と云ふことによりのではなく、腫大の原因が一次的に軸索自身の側にあり、と云ふことである。そして腫大そのものが極度の異常な程度のものである。本来直径約2 μ m以下の過長の軸索終末が直径数 μ mの巨大球状物にまで腫大する、即ちその軸索の起始細胞細胞体そのまゝ自体を浸潤するまで腫大する、という異常な現象、この現象の特異的性格が最も明瞭に表現される。軸索終末という=2つの代謝中継の最も前部と後部との間に生じた代謝中継の間の異常な亢進という現象は、神経細胞の細胞質凝縮による最も基本的な別題の一つを形づくものである。ADのもう一つの重要な性格はそれが成熟期以後に生じ、開始の上出現し進行するという加齢現象の一つである。今回は加齢に伴うラット後脳核に出現するADを対象に、その病理形態学を詳述する。この病変の病理形態学的性格が、即ち肥大過程の主要な点と確定することを目的とした。近接後脳核(就中薄核)に出現するADは、ラットに限り、すこゝと含め、非常に多核細胞の哺乳類に発生する他の2種類の神経系加齢現象である。

Wistar-金道系雄ラットを産乳期より實際室で飼育し、100日及び800日を過ぎたこの種の日本産純血種(国産ラット)を屠殺し、翌日午前10時ごろに2種本を作製する。ラットは150日齢に達するまで飼育する。100日齢、154日齢の2種本は2-12日齢のラットを産乳期から飼育する。204日齢のラット薄核は2-12日齢のラットに於いて異常な軸索終末が出現する。ラットの腹背中の大型終末(これは腫大の形態学的に最も好ましい、滑細胞体から神経細胞質細胞の中継細胞軸索終末に同じである)の肥大は2-3 μ mに達し(正常の2-4 μ mに5.5-6 μ mに達する)、その終末内部に系統体・滑細胞体・線粒体・微細管・神経細胞質、至るは過剰の軸索形態(これはラットの腹背中の大型軸索終末の主要な構成要素である)が厚く存在する。場合によっては、この増大する要素は要素として層状の膜を形成する(いわゆるmembranes dense bodies)がある。これは後述の正常大型軸索終末中の散在するものと同じである。ラットのdense bodies(その多くは成体神経細胞を主として含む)は一種のcytosegregations/autophagic vacuolesと云ふことができる)が変態して出現するものはAD形成の比較初期のPBSと云ふ、高度に腫大したAD(即ちspheroidsと云ふべき)の中にも見られる。これは、そのdense bodiesは細胞増大と成熟の一過性現象として出現するものである。腫大軸索の二次的変化の発現は、

巨大なspheroidsの構成要素もその主成分は上述した発達期と本質的に異なる

老化モデルによるヒト血小板寿命曲線の解析

○矢後長純^{*1)}, 池田忠男^{*1)}, 市川隆男^{*2)}, 福田信男^{*3)},
渡辺勇四郎^{*4)}, 岡部和考^{*4)}

*1) 聖マリアンナ医科大学附属研究施設, *2) 青山学院大理工学部

*3) 放医研臨床研究部, *4) 聖マリアンナ医科大学第2内科学教室

我々は、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、人類および動物の寿命をシミュレート、成長、成熟、老化および死に関する各種のパラメータを求め、老化の丁度的および進化論的な意義を研究してきた(2-5)。今回は、上記の理論を血球の老化に応用し、従来、経験式によって解析されてきた血球の寿命曲線および半減期等を理論的に導出した結果を述べ、ヒト血小板寿命曲線を解析した結果を報告する。

血球には、安定型(S)と不安定型(L)とがあり、不安定化の速度係数は血球年齢に依存しないが、安定化の速度係数は血球の老化に伴い、指数関数的に減少していくと仮定する。そして、図1と示すSとLの相互移行について、短期的には平衡が成立すると仮定し、Lの占める分率 f_L を

$$S \xrightleftharpoons[V_2 e^{-bt}]{V_1} L$$

年齢(t)依存性とすれば、

$$f_L(t) = (1 + e^{a-bt})^{-1} \quad (1)$$

図1。SおよびLの非定常平衡 $t \rightarrow \infty$ とし、

$$a = \ln\left(\frac{V_2}{V_1}\right).$$

血球の老化に伴う崩壊速度係数が、 $b f_L(t)$ で與えられると仮定すれば cohort の生存曲線 $S(t)$ は、

$$S(t) = \frac{1 + e^{-a}}{1 + e^{-(a-bt)}} \quad (2)$$

と與えられる。血球を放射性同位元素その他の物質で標識し、in vivoにおける標識の減衰を測定して得られる寿命曲線には(2)式を直接適用することは出来ない。それは、in vitroで標識される血球が、図1のダイナミクスにより規定される年齢分布を有しているからである。そこで、標識効率を年齢に依存しないと仮定すると、標識血球の循環血内の生存曲線 $P(t)$ は、

$$P(t) = \int_0^{\infty} S(t') dt' / \int_0^{\infty} S(t') dt' = \frac{a - bt + \ln(1 + e^{a-bt})}{a + \ln(1 + e^{-a})} \quad (3)$$

によって與えられる。標識血球の生存曲線のシミュレーションから、パラメータ a および b を推定すれば、(2)式により cohort labelling の場合の生存曲線 $S(t)$ を計算することが出来る。従って、真の半減期 $T_{1/2}$ および真の平均寿命 $\langle t \rangle$ もそれぞれ下記の式により計算可能になる。

$$T_{1/2} = \frac{1}{b} \{a + \ln(1 + 2e^{-a})\} \quad (4), \quad \langle t \rangle = \frac{1}{b} (1 + e^{-a}) \{a + \ln(1 + e^{-a})\} \quad (5)$$

血小板を ^{51}Cr で標識して得られた *in vivo* の血小板寿命曲線⁶⁾の解析例を図2に示す。被験者の血液約450 mlより血小板を分離し、 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ で標識、被験者に注入する(赤血球および血小板血漿は被験者へ返却)。注入後1時間および24時間ごとの一週間のわたり採血し、血小板 10^8 あたりの放射能を測定しデータ(図2の黒丸)について、Fletcher-Powellの regression algorithmを用いて、 $P(t)$ × 初期値の最適フィット理論曲線を求める。ついで、このと主得られパラメータ(ここでは $a=1.742$, $b=0.453$)より $S(t)$ を(2)式より求める(図2の白線)。仮想Eの cohort labellingの場合の $T_{1/2}$ および $\langle t \rangle$ は、それぞれ4.94日および4.51日。

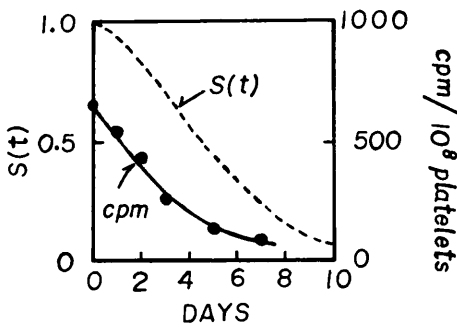


図2. ヒト血小板寿命曲線の解析

一般に血球が老化により一定の寿命を終えて破壊されるならば、全血球の生存曲線は時間に対して直線的に下降し、反対に血球寿命とは無関係に at random に破壊がおこれば、指数関数的に下降するといわれている。赤血球については前者による破壊が主であり、 ^{32}P -diisopropyl fluorophosphate (DF ^{32}P) 標識赤血球は直線的に減少するとされてきた。一方、血小板の破壊では両者がともに関係しているとして解析が行われている。しかし、これらの経験式は $t \rightarrow \infty$ では $-\infty$ となってしま

まい不合理である。明らかに、これらの式はより合理的な式の近似式と見做される。しかし、何等かの老化モデルにもとづく血球生存曲線理論式は、未だその報告を見ない。

上記のわかれわかれの式では、 $t \rightarrow \infty$ でゼロになり合理的である。しかも $e^{-a+bt} < 1$ の時には、正の減衰指数関数と負の線形項という従来の経験式を再現する形になっている。

ここに述べた血球老化の理論は、臨床的にも有用な情報を提供するべきであると思われる。

文献

- 1) 福田・矢後: *J. Theor. Biol.*, **58**, 131 (1976)
- 2) 矢後・池田・市川・福田: *基礎老化研究*, **1**, 31 (1977)
- 3) 矢後・池田・市川・福田: *基礎老化研究*, **2**, 1 (1978)
- 4) 福田・矢後: *The XIth International Congress of Gerontology (Abstracts for Sectional Sessions)* p.14 (1978)
- 5) 矢後・福田: *ibid.* p.31 (1978)
- 6) 岡部・渡辺: *血液と血管*, **9**, 436-439 (1978)

(京大胸部研病理)[○]竹田俊男・細川昌則・竹下修史・入野美香・松下隆寿・富田由美子・安平公夫(京大整形外科)浜本肇・清水克時・石井正治・山室隆夫
 1968年Jackson Labより入手したAKRマウスを京大胸部研病理にて兄妹交配により維持していたところ、1973年頃よりlitterにより急速に老化現象を示すものがあるのに気づき、老化が著しく進行していると思われる代表的な5腹を選び、これらに由来する系統をP-1, 2, 3, 4, 5とした。対照として同じAKRにて自然な老化を示すと考えられる3腹を選びこれらに由来する系統をR-1, 2, 3とし比較検討した。

実験動物の老化度を客観的に評価する方法として、従来老化と関聯があると考えられている(1)行動性 1) passivity 2) reactivity (2)皮膚所見 1) glossiness 2) coarseness 3) hair loss 4) ulcer (3)骨格所見 kyphosis (4)眼所見 1) periophthalmic lesion 2) cataracta 等について生后8、12ヶ月において肉眼的観察を行い、上記各項目についてその程度の弱強に応じて0, 1, 2, 3, 4の評点(grading score 以下GSと略す)をつけた。各項目のGSの総計をその個体のGSとし、更にlitter毎に平均値を算し、さらに系統毎の平均値を求めた。またこれらマウスの平均寿命をlitter毎に算出すると共に弊死マウスについて病理組織的観察を行った。

以上の結果 1) 現在(1979年4月)までに生后8ヶ月のGSはR-1, 2, 3系統で夫々71腹295匹、26腹133匹、11腹46匹、P-1, 2, 3, 4, 5系統で夫々53腹237匹、21腹75匹、5腹22匹、6腹19匹、2腹4匹について観察されたがR-1, 2, 3系統で夫々平均GS 0.54、0.36、0.74を示すのに対し、P-1, 2, 3, 4, 5系統で夫々2.72、3.83、1.90、2.46、2.50を示しR系統に比しP系統は著しく高いGS値を示し、明瞭な老化促進があることを裏付けた。また生后12ヶ月のGSはR-1, 2, 3系統で夫々1.41、1.79、1.92を示しP-1, 2, 3, 4, 5系統では夫々6.19、6.57、7.50、3.84、11.0を示し、R、P系統共に生后8ヶ月後の4ヶ月間に著明なGSの増加を示した。2) 腹ごとの平均寿命はR-1, 2, 3系統の夫々82、10、16腹について、P-1, 2, 3, 4, 5系統の91、92、19、13、6腹について観察されたが、R-1, 2, 3系統で夫々10.9、12.6、13.0ヶ月、P-1, 2, 3, 4, 5系統で夫々9.5、8.6、9.3、9.8、8.9ヶ月を示し、P系統で明かな平均寿命の短縮をみとめた。一方月令8ヶ月マウスの4ヶ月後の生存率を検討したところ、R-1, 2, 3系統で夫々73.5、83.6、76.9%の高率を示すのに対し、P-1, 2系統で夫々43.2、43.2%を示し、明瞭に生存率の低下を示した。3) 弊死マウス(R系統25匹、P系統88匹)について病理組織学的観察を行ったところ、R系統で i) 肺・肝・腎等の腫瘍 ii) 脾・肝・腎・心・副腎・性腺等のアミロイド沈着 iii) 胸腺腫に代表される腫瘍 iv) 間質性肺炎等が夫々32.0、12.0、24.0、8.0%、P系統では夫々37.5、76.1、13.6、18.2%観察され、P系統でアミロイド沈着、間質性肺炎の頻度がR系統に比し高いことが判った。

○伊藤正敏, 山浦主嗣, 佐藤多智雄, 松澤大樹
(東北大学, 抗酸菌病研究所, 放射線医学部門)

1973年にHounsfieldにより開発されたコンピュータ断層装置(CT)¹⁾は医療器具としての優れた特性のためにめざましい普及を見ている。これを用いると, 何等の前処置を必要とせずに, 脳の横断断層像を得ることができる。この像から脳萎縮の程度を測ることができる。

CT画像は, 一定数の構成要素(画素)から構成されている。画素の大きさは, 既知であるので, ある物体が断層内で占めている体積は, その物体に相当する画素数を計測することによって求めることができる²⁾。

X線減弱度(CT値)から頭の構成要素は次の4つに区分される。1. 頭皮及び筋, 2. 頭骨 3. 脳実質 4. 脳脊髄液 である。1と3は分離が困難なので, 計測対象を頭骨より内部と限定することによって, 頭皮及び筋を除去した。残る3者は, それぞれ特有のCT値を有している。従ってCT値から, 各組織に相当する画素を選出し, 集計することで, 各組織の体積を計測できるようになった。但し, X線を大きく減弱する骨組織に影響され, 骨に近い部位の解像力は良くない。従って, くも膜下腔の容積の正確な定量はできない³⁾。ここでは, 骨周辺のくも膜下腔を脳実質に含め, 定量した。

〔計測対象〕

20~79才の男68名, 女53名, 計121名を測定対象とした。これらは1977年8月~1979年1月間に頭のCT撮影を行なった1,012名の中で, CT像上, 明らかな脳血管性病変, 脳腫瘍, 先天性病変の存在が否定された症例である。主として宮城県古川市, 一部は宮城県北部, 山形県に居住する人々で, 職業では農民が大部分を占める。

〔頭の断層法〕

眼窩上線と外耳道を結ぶ線(Glabella-Mental line)に平行に断層を行なった。外耳孔より22mm頭側で断層を開始し, 8mmの断層幅で10枚の断層像を得た。この断層角度を用いれば, 最も少ないX線曝射回数で, 大脳の断層像を得ることができる。頭頂部, 頭蓋底の一部の断層は省いた。

〔測定結果〕

20~79才121例の頭蓋容積^を測定した結果は, 男女間に1%の危険率で有意差があったが, 年齢差は認めなかった。既に述べたように頭頂部と頭蓋底が計測されていないので頭蓋容積は実際よりも過小評価されている。人体骨格標本を使用して容積測定範囲を調べたところ, 実際の約80%に相当していた。髄液腔容積は, 20~49才で比較的安定(男 39 ± 13 ml, 女 29 ± 11 ml)していたが, 60才からは明らかに(5%の有意水準)増加が認められた。(図1-A)。標準偏差は20~49才まで殆んど変化しなかったが70才台に急激に増大した。

頭蓋容積には性差, 個体差が明らかに存在する。頭の大きい人間の方が, 脳室も当然大きい。これらの人々の髄液腔容積を相互に比較するために, 髄液腔容積と頭

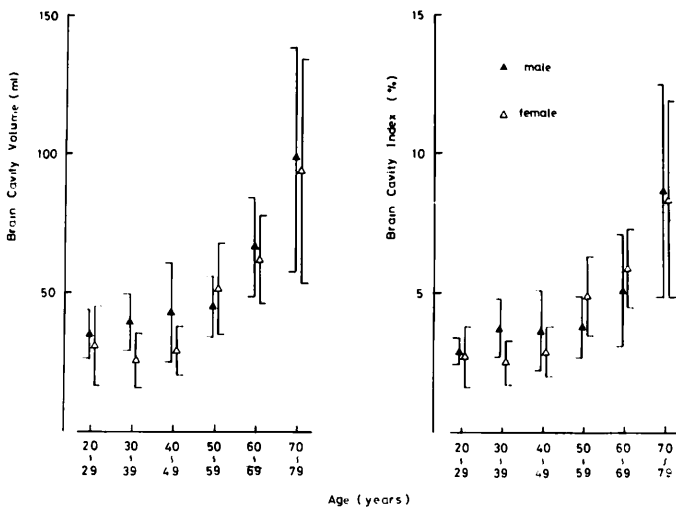
蓋容積に対する比率で表わしたものを(図1-B)に示した。

[考察]

島田⁴⁾によれば、成人屍体10体で計測した側脳室容積は、 $10.2 \pm 1.3 \text{ ml}$ であった。脳脊髄液全量は60-200 mlとされている。従って、我々が測定した髄液腔の範囲を考慮すると、20~59才の平均脳腔容積、男29, 女28 mlは妥当な値である。病理学的検索によると、脳重量は20才で最大となり、以後漸減し、60才頃に急激な減少を始めるという⁴⁾。CTを使用した今回の計測結果は、丁度、脳重量と負の相関をし、60才台後半に急激な脳腔の拡大を見た。この急激な拡大の原因として、加齢に伴なう神経細胞の脱落を60才頃より始まる微小梗塞⁵⁾が促進している⁶⁾であろうと考えている。

[引用文献]

1. Hounsfield, G.N.: Computerized transverse axial scanning; Part 1, Description of system. Brit. J. Radiol. 46:1016-1022, 1973.
2. 伊藤正敏 他: CTによる脳室縮の定量的計測 I. 映像情報 11:312-316, 1979
3. 伊藤正敏 他: CTによる脳室縮の定量的計測 II. 映像情報 11(5) 印刷中
4. 林自苗: 日本人並に日本産実験動物の解剖学及生理学計量 84-99, 1956
5. Tomlinson, B.E. et al.: Observations on the brains of non-demented old people. J. Neurol. Sci. 7:331, 1968



A 図 1 B