

日本基礎老化研究会

第4回大会講演要旨集

# 基礎老化研究

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

4

1980

日本基礎老化研究会

Japan Society for Biomedical Gerontology

# 日本基礎老化研究会

## 第 4 回大会

会 期 昭和 55 年 7 月 24 日(木), 25日(金)

会 場 仙台市民会館  
電話 (0222) 62—4721

世話人 松 沢 大 樹  
東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門  
〒980 宮城県仙台市星陵町 4 — 1  
電話 (0222) 74—1111 内線 3416, 3417

## 参会の皆様へ

1. 受付では参会費 1,500 円お支払いのうえ、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 45 分より、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、ホテル紅陽にて懇親会を行います。参加ご希望の方は受付で会費 3,000 円をお支払い下さい。
4. 一般講演の講演時間は 10 分です(なお、討論時間は 5 分です)。
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)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、御自由におのみ下さい。
7. 昼食には、会場内の食堂を御利用下さい。

# 日本基礎老化研究会 第4回大会プログラム

第1日 7月24日(木)

8:40~9:00 モーニングコーヒー

9:00~9:05 開会の挨拶 松沢大樹

○○○○○○○○○○○○○○○一般講演○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

9:05~10:05 老化モデルⅠ 座長 佐々木 俊 作

1. 老化モデル動物系統樹立の試み(第Ⅱ報)  
京大・胸部研・病理  
竹田 俊男 細川 昌則  
竹下 修史 入野 美香  
樋口 京一 松下 隆寿  
富田由美子 安平 公夫  
京大・医・整形 清水 克時 石井 正治  
山室 隆夫
2. 老化モデルマウスにみられる形態学的変化について  
京大・胸部研・病理  
竹下 修史 細川 昌則  
入野 美香 樋口 京一  
松村 敦子 松下 隆寿  
安平 公夫 竹田 俊男
3. 老化モデルマウスにみられる眼所見について  
京大・胸部研・病理  
細川 昌則 竹下 修史  
竹田 俊男
4. 老化モデルマウスにみられる筋、骨格系変化について  
京大・医・整形  
清水 克時 笠井 隆一  
山室 隆夫  
京大・胸部研・病理 細川 昌則 竹下 修史  
松下 隆寿

10:05~10:50 老化モデルⅡ 座長 黒田 行 昭

5. ホンシュウハツカネズミの加齢：出産と日齢  
都老研・生物 野間口 隆

6. Fischer F-344 加齢ラットの病理形態学的観察

都老研・基病理

蟹沢 成好

7. ラットによる成人病類似疾患モデルの作成

—主として脈管系・神経系を中心として—

日本医大・老人病研

杉山 誠

10:50~11:00 休 憩

11:00~11:45 中枢神経と老化 I

座長 能 村 哲 郎

8. ラットの加齢にともなう多飲多尿現象と視床下部-下垂体後葉系の変化

東大・理・動物

小林 裕太

川島誠一郎

9. 老動物における坐骨神経の軸索流について

都老研・臨病理

朝長 正徳

内田 洋子

10. 脳梗塞の実験的研究 — 脳腫脹の発現と薬剤による抑制 —

東北大・脳研・脳神経外科

吉本 高志

田中 悟

関 博文

鈴木 二郎

11:45~12:15 中枢神経と老化 II

座長 鈴 木 二 郎

11. 脊髄後索線維の加齢性変化の性質について, ニューロン加齢の一実験モデル

都神経研・神経病理

藤沢浩四郎

12. 加齢による脳萎縮(CTによる測定)と眼底の変化

東北大・抗研・放医

畑沢 順

伊藤 正敏

山田 健嗣

遠藤 敏

吉岡 清郎

山浦 玄嗣

松沢 大樹

佐々木病院

佐々木雄一郎

12:15~13:30 昼 食

12:30~13:30 運営委員会

13:30~14:45 脂質と老化

座長 金 田 尚 志

13. 食餌制限と適応反応 — (1)マウスにおける臓器重量, 血液の生化学的性状  
及びプロスタグランディン合成活性への影響

都老研・実験動物

奥木 実

倉本 和直

都養育院病院

岡部 紘明

都老研・薬理

森田 育男

室田 誠逸

14. 自然発生高血圧ラットの加齢と脂質代謝異常  
東北大・抗研・放医  
伊藤 久雄 武田 俊平  
松沢 大樹
15. 過酸化脂質と老化  
東北大・農・食化  
宮沢 陽夫 金田 尚志
16. 生体超微弱発光の臨床応用  
東北大・医・第三内科  
依田 敏行 平田 徹  
芹沢 健 山田 憲一  
小野寺博義 菅原 啓  
後藤 由夫  
宮沢 陽夫 金田 尚志
17. 動脈硬化による動脈壁化学組成の変化  
東北大・医・第二内科  
佐藤徳太郎

14:45~15:30 代謝と老化 I

座長 木村 修一

18. BSP代謝からみたラット肝の加齢による機能変化  
都老研・臨生理  
木谷 健一  
C. F. A. Van Bezooijen
19. ヒト肝の加齢変化に及ぼす栄養環境  
愛知ガンセンター・臨床検査  
愛知医大・病理  
佐藤 秩子  
田内 久
20. 加齢による腹部臓器の大きさの変動(CTによる測定)  
東北大・抗研・放医  
山田 健嗣 遠藤 敏  
畑沢 順 吉岡 清郎  
松沢 大樹  
佐々木病院  
佐々木雄一郎

15:30~15:40 休 憩

15:40~16:40 代謝と老化 II

座長 本宮 雅吉

21. 腸内細菌叢と老化:無菌および通常ラットの肝機能と脂質代謝の加齢による変化  
ヤクルト研  
河合 康雄 務台 方彦
22. 腸内細菌叢と老化:ラット消化管における腸内細菌叢の定着とその加齢による変化  
ヤクルト研  
渡辺 次男 河合 康雄
23. 無菌および通常マウス腸上皮細胞の life span に及ぼす食餌性セルロースの影響  
東北大・農・栄化  
駒井三千夫 木村 修一
24. 小腸上皮細胞の life span に及ぼす制限食の影響  
東北大・農・栄化  
古賀 彰子 木村 修一



11:00~11:30 細胞膜の変化と老化 I

座長 永井 克孝

29. ヒト水晶体タンパク質における  $Ca^{2+}$  による凝集反応の加齢変化

東理大・理工・応用生物

佐藤 健士

東理大・理工・物理

山下 俊保

30. 培養細胞の老化と硫酸

京大・薬・生化

福井 成行

吉田 博明

山科 郁男

11:30~12:15 細胞膜の変化と老化 II

座長 山科 郁雄

31. ヒト 2 倍体線維芽細胞の加齢と細胞表面変化

都老研・生物

山本 清高

山本 満里

大岡 宏

32. ヒト 2 倍体線維芽細胞の加齢にともなう細胞密度の低下における  
ヘパラン硫酸の役割

都老研・薬理

松岡 耕二

三井 洋司

室田 誠逸

33.  $\theta$ -Toxin で検出される個体老化に伴なう赤血球膜の変化

都老研・生化

斉藤 恵美

安藤 進

田中 康一

東大・医科研

永井 克孝

富山医薬大・薬

長谷 純一

12:15~13:30 昼 食

13:30~14:15 2 倍体細胞と老化 I

座長 山田 正篤

34. 細胞老化と増殖因子

東北大・抗研・細胞生物

星 宏良

菅 幹雄

山根 績

味の素中央研

源 良樹

35. Go 期は分裂寿命決定に関与しない —— 血小板由来増殖因子 (POGF) の  
作用からの一考察

放医研

大野 忠夫

36. カエル黒色素胞の長期継代培養 —— 細胞老化と自然形質転換

都老研・生物

近藤 昊

東北大・理・生物

井出 宏之

14:15~15:00 2倍体細胞と老化Ⅱ

座長 菅原 努

37. ヒト線維芽細胞で作製された Feeder layer のヒト腫瘍細胞のコロニー形成率におよぼす効果 — 細胞株種の相違とその加齢の影響 —

川崎医大・病理

難波 正義

38. 低濃度血清による培養ヒト2倍体細胞の障害 — 継代数にともなう変化

都老研・アイソトープ

本田 修二

松尾 光芳

39. 低濃度播種法により継代培養されたヒト2倍体細胞の寿命

都老研・アイソトープ

松尾 光芳

加治 和彦

15:00~15:45 核酸、クロマチンの変化と老化Ⅰ

座長 藤原 美定

40. 大核 DNA 量の減少パターンからみたゾウリムシのクローンエイジング

奈良女大・理・生物

高木 由臣

金沢 修子

41. Paramecium tetraurelia のクローンの寿命に対する致死影響

近畿大・医・衛生

福島 晋一

42. 老齡ラット正常肝にみられる DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の読みとり誤差

都老研・生化

田口 隆彦

大橋 望彦

15:45~15:55 休 憩

15:55~16:40 核酸、クロマチンの変化と老化Ⅱ

座長 鈴木 肇之

43. 老齡マウスリボゾームの翻訳活性: グロビン・メッセンジャー RNA 依存のタンパク合成

東邦大・薬

中沢 俊

森 望

後藤佐多良

44. 老齡マウスの細胞核 DNA 中の一本鎖部分の割合 — 特に脳 DNA 中の一本鎖領域について —

東邦大・薬

森 望

後藤佐多良

45. 加齢に伴なう胃粘膜細胞の DNA 量の変化

京府医大・第二病理

中西 和夫

藤田 哲也

福井医大・病理

福田 優

16:40~17:25 核酸、クロマチンの変化と老化Ⅲ

座長 大橋 望彦

46. 遺伝的早老症 Cockayne 症候群細胞の核機能

神戸大・医・放基

後藤 薫

藤原 美定

47. ヒト細胞ヒストン H<sub>1</sub> の欠落: その老齡ターゲット説

都老研・薬理

三井 洋司

昭和医大・医・生化

坂上 宏

48. ヒト脳に加齢に伴なうグロビン m-RNA 量の変化

東大・理・動物

加藤 邦彦

Gerontology Research Center, NIA R.G. Cutler

17:25~17:55 腫瘍, 結合組織と老化

座長 山 浦 玄 嗣

49. マウス奇形腫増殖に及ぼす宿主加齢の影響について

東北大・抗研・放医

窪田 和雄

窪田 朗子

武田 俊平

松沢 大樹

50. 肺の老化と結合組織の生化学

東北大・抗研・内科

荒井 秀夫

富樫 秀生

佐藤 研

伊藤 正幸

永井 宏美

大泉耕太郎

佐藤 博

本宮 雅吉

今野 淳

17:55~18:00 閉会の挨拶

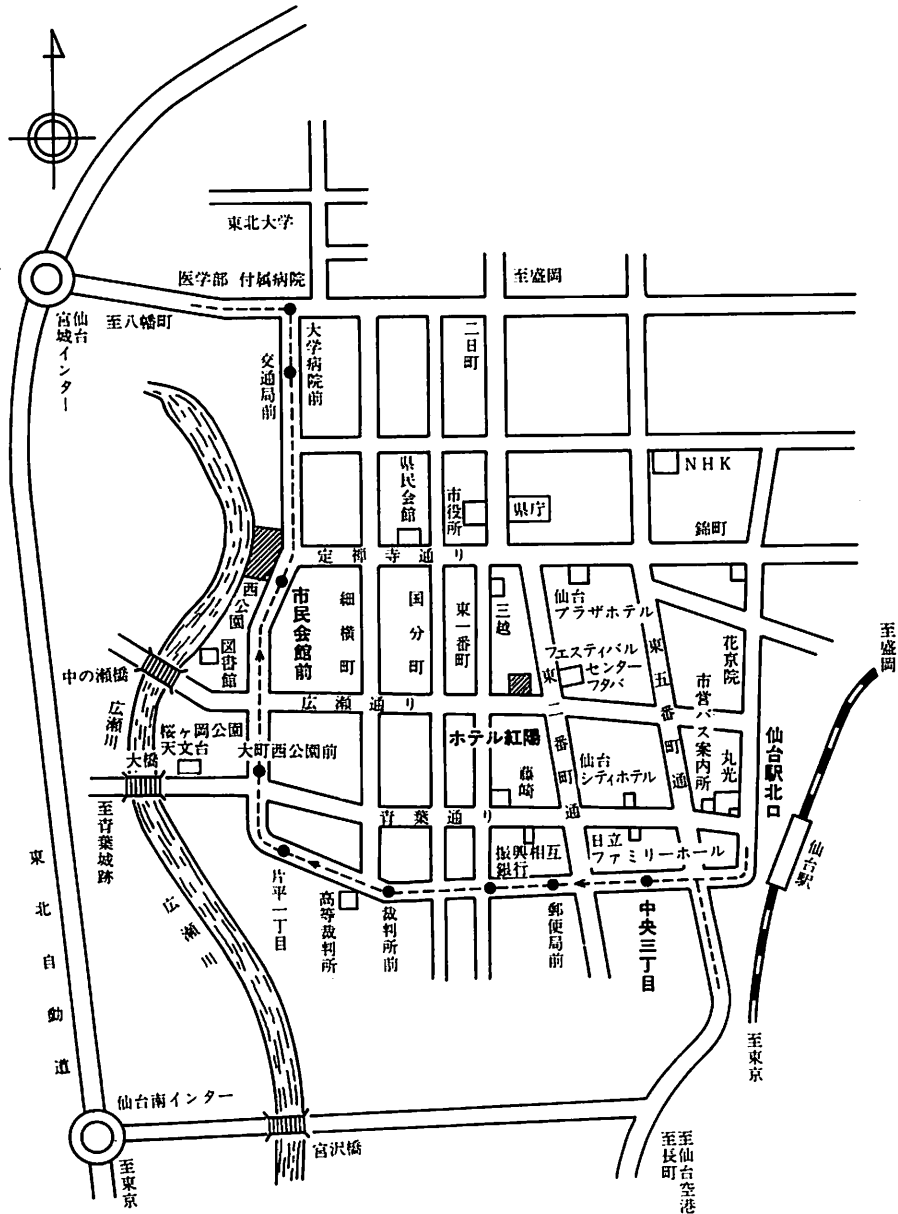
太 田 邦 夫

# 会場附近地図

## 仙台市中心部略図

(仙台駅より市民会館)

1. タクシー利用の場合：会場まで約8分、500円位
2. バスを利用する場合：グリーンバスをご利用下さい（路線は点線で図示） 駅前からお乗りになる場合は仙台駅北口もしくは中央三丁目停留所で矢印方向行きのバスにお乗り下さい。（約15分、料金100円）



# 講 演 要 旨

老化モデル動物系統樹立の試み(第Ⅱ報)

竹田俊男, 細川昌則, 竹下修史, 入野美香, 樋口京一, 松下隆寿, 富田由美子, 安平公夫,  
清水克時\*, 石井正治\*, 山室隆夫\*  
京大胸部研病理 京大整形外科\*

An animal model of senescence being developed with mice (II)

Toshio Takeda, Masanori Hosokawa, Shuji Takeshita, Mika Irino, Keiichi Higuchi, Takatoshi Matsushita,  
Yumiko Tomita, Kimio Yasuhira, Katsuji Shimizu\*, Masaharu Ishii\* and Takao Yamamuro\*  
Dept. of Pathology, Chest Disease Research Institute and Dept. of Ortho. Surg\*, Faculty of Medicine, Kyoto Univ.

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 にて比較的緩やか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。なお、効率よく純系化をはかるため、生后 8 ヶ月における grading score (GS) 値(後述)が 2 世代つづいて P 系で 2.0 以下、R 系で 4.0 以上を示す腹は、それ以後の繁殖を中止した。

実験動物の老化度と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 lordokyphosis (4)眼所見 ① periophthalmic lesion ② corneal ulcer ③ cataract 等について生后 8, 12, 16, 20, 24, 28 ヶ月において各個体の肉眼的観察を行い、上記各項目についてその程度の強弱に応じて 0, 1, 2, 3, 4 の GS をつけた。各項目の GS の総計をその個体の GS とし、更に腹毎に平均値を算し、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腹毎に算出し系統毎の平均値を求めた。一方両系における生存曲線を作製し夫々の系統の集団としての加齢過程を観察した。

以上の結果(1)現在(1980年4月)までに生后 8 ヶ月の GS は R-1, 2, 3 系統で夫々 175 腹 786 匹, 106 腹 507 匹, 43 腹 161 匹, P-1, 2, 3, 4, 5 系統で夫々 153 腹 659 匹, 49 腹 182 匹, 25 腹 88 匹, 16 腹 47 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 1.12, 1.35, 1.36 を示すのに対し, P-1, 2, 3, 4, 5 系統で夫々 3.67, 4.47, 3.45, 4.28, 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 2.64, 2.57, 2.58, P-1, 2, 3, 4, 5 系統では夫々 7.42, 8.38, 8.21, 8.90, 11.0 を示し、其の後も R, P 共に加齢に伴い不可逆的な GS 値の増加をみた。このため R 系も生后 24 ヶ月では R-1 7.75, R-2 11.64, R-3 8.50 となり P 系における生后 12 ヶ月の値にはほぼ匹敵する GS を示した。これら P 系統にみられる高い GS 値は主に行動性 passivity, reactivity の低下, glossiness の悪化, coarseness の増強, hair loss, lordokyphosis, periophthalmic lesion のより早期の出現とその重症化によるものと考えられる。また P-3 系では他の系に比し passivity の低下がより早期に起り、生后 13 ヶ月頃より cataract を高率に発症するという特徴を示している。(2)腹毎の平均寿命は R-1, 2, 3 系統の夫々 191,

51, 32腹について、P-1,2,3,4,5系統の187, 130, 32, 27, 11腹について観察されたがR-1,2,3系統で夫々12.0, 15.8, 12.9ヶ月平均13.6ヶ月、P-1,2,3,4,5系統で夫々10.0, 8.7, 9.8, 10.2, 8.4ヶ月平均9.4ヶ月を示し、P系統で明かな平均寿命の短縮(31%)をみとめた。また両系の生存曲線を作製し検討したところ、両系共に質的に同一のパターンを示し、R系、P系共に加齢過程によって死亡する均質な集団であることを示している。

以上昨年ひきつづき系統樹立を試みている「老化モデルマウス」について其の後の進展の概要を報告した。現在世代はP-1,2,3,4,5系統で夫々14, 15, 15, 13, 6世代、R-1,2,3系統で夫々12, 11, 11世代をかぞえている。今後更に世代を重ね老化モデル動物としての純系確立を期するものである。

## 「老化モデルマウス」に見られる形態学的変化について

竹下修史, 細川昌則, 入野美香, 樋口京一, 松村敦子, 松下隆寿, 安平公夫, 竹田俊男  
京大胸部研病理

## Pathological Changes in the "Animal Model of Senescence".

Shuji Takeshita, Masanori Hosokawa, Mika Irino, Keiichi Higuchi, Atsuko Matsumura,  
Takatoshi Matsushita, Kimio Yasuhira, Toshio Takeda  
Dept. of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

現在老化モデル動物として系統を樹立しつつある A K R マウスにおける全身臓器の形態学的な変化をと殺例並びに弊死例について, Prone 系と Resistant 系 (昨年報告) とで比較検討した。

病理学的所見としての主なものはアミロイド沈着, 腫瘍, 炎症, 中枢神経の異常等であった。アミロイド沈着に関しては, 摘出臓器を H E 染色, コンゴ-赤偏光法, チオフラビン T 蛍光法を用い, チオフラビン T 染色で黄緑色, 黄色, 黄褐色のいずれかを呈し, かつコンゴ-赤染色にて緑色偏光を呈するものをアミロイド陽性として判定した。現在我々は Prone 系を P-1, 2, 3, 4, 5 の 5 群に Resistant 系を R-1, 2, 3 の 3 群に分けているが, P 系 (計 215 例), R 系 (計 144 例) 検索した中でアミロイド沈着の発現頻度は P 系統ではそれぞれ P-1 (72.2%), P-2 (88.9%), P-3 (58.6%), P-4 (82.4%), P-5 (77.8%) であるのに対し, R 系統では R-1 (16.7%), R-2 (55.9%), R-3 (45.0%) であり, P 系統の方が明らかに高値を示した。特に P-2 では生後 6 ヶ月を越えると, 検索例全例にアミロイド沈着が認められた。アミロイドの発現頻度を月齢毎にみると, P 系統では生後 4 ヶ月目で既に 60% の発現率を示しており, その後も上昇し続け, 生後 10 ヶ月以降は 90% の発現率を下回らなかった。一方 R 系統では生後 19 ヶ月頃までは 40% の域を出ず, その後は発現率が漸増し, 25 ヶ月齢で 70% にまで達した。

アミロイド陽性を示した臓器は肝, 腎, 脾, 肺, 心の主要臓器の他に精巣, 卵巣, 皮膚, 副腎, 消化管, 甲状腺, リンパ節, 関節, 眼瞼, 唾液腺, 涙腺等の間質結合織, それに第三脳室脈絡膜血管及び全身の小血管に認められた。アミロイド沈着を高頻度に, しかもより強度に示した臓器は, 肝, 脾, 皮膚であり, これらに続いて腎, 消化管, 心, 副腎等であった。沈着初期像と思われる部位は, 肝ではグリソン氏鞘の血管, 脾では濾胞周辺部と考えられたが, 諸臓器に全くアミロイドが観察されず皮膚表皮直下や消化管粘膜固有層に認められる例もあった。なお, 電顕的観察を行った肝, 皮膚, 関節軟骨においてアミロイド線維の存在を確認した。

腫瘍はリンパ系統の腫瘍 (thymoma, lymphoma) が P 系 (7.0%), R 系 (18.4%) 共に認められ, その他乳癌, 肺の腺腫, 尿管の腺癌等も見られた。

炎症は化膿性炎症が主で, 肝, 腎, 心, 肺の臓器の他に皮膚, 腸間膜, 生殖器などにも観察された。これらの組織変化は P 系統 (41.9%) でも R 系統 (34.9%) でも共に同程度に認められ, 両者間の差はなかった。

中枢神経の検索例数は P 系 62, R 系 23 であるが, それらの組織変化での特徴的なものは①神経細胞の萎縮, 変性およびピクノ-シス, ②神経細胞内 eosinophilic body の存在, ③海綿質状態 (status spongiosus) であった。

神経細胞の萎縮変性は小脳のプルキンエ細胞や海馬の錐体細胞に認められ、中でも海馬錐体細胞はピクノージスに陥り、細胞の局所的な脱落を見た。神経細胞内 eosinophilic body は視床に見られ、加齢と共に増加の傾向をとった。海綿質状態は小脳髄質、大脳皮質の一部を含む髄質に認められた。中枢神経の変化はP系R系共同様に見られ、病変発現による差は明らかでなかった。

以上の事から、この老化モデル動物であるP系統は、我々が老化の指標の1つとして考えている外観からのgrading score（昨年報告）の早期の上昇、アミロイド沈着を若齢期から高頻度に有することなどから、老化が早期に進行する系統のマウスとして貴重であると考えられる。ただ中枢神経の組織変化がこれらの月齢変化に伴わないのは検用例数が少ないためであろう。今後例数を増して検索する予定である。

“老化モデル動物”にみられる眼所見

細川昌則, 竹下修史, 竹田俊男  
京都大学結核胸部疾患研究所病理部門

Ophthalmologic findings in the "animal model of senescence"

Masanori Hosokawa, Shuji Takeshita, Toshio Takeda  
Department of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University

A K R系マウスにおいて老化モデル動物の系統樹立の試みがなされている事を既に報告した。前回の報告において、その眼所見としては、(1)眼周囲病巣 (periophthalmic lesion) は prone 系 (p-1,2,系) では 8 カ月 33%, 77.8% と高頻度におこるのに対して Resistant 系 (R-1,2,3,系) では各々 2.2% 5% 3.6% と低い事、又 P, R 両系で加齢とともに頻度が増加する事、(2) 白内障の頻度は P-3 系で特に高く 12 カ月で 75% に及ぶ事を報告した。又 P 系ではアミロイド沈着が全身性に高頻度に見られ、その頻度は加齢で増加し、高令においては R 系においてもかなりの頻度で見られる事も述べた。今回我々は(1) 白内障の好発する P-3 系で肉眼的眼所見を検索した。(2) P, R 系の弊死マウスの眼組織学的検索を行なった。(3) 白内障マウスを屠殺し、その眼組織学的検索を行なった。以上により興味ある知見を得たので報告する。(1) P-3 系マウス生後 1 カ月~15 カ月 390 匹を用い、眼周囲病巣 (眼周囲糜乱及び眼瞼腫張)、流涙、角膜潰瘍 (角膜白濁し表面粗なもの)、角膜混濁 (角膜白濁し表面滑なもの)、白内障 (網膜反射光のないもの)、について 0~4 の 5 段階評価 (grading score, GS) を行なった。GS は雄、雌とも 8 カ月より上昇し、加齢とともに増加した。しかしその増加傾向及び、評点については雌雄の差を認めなかった。白内障は 11 カ月以降増加を示し、13 カ月以降では 50% 以上となった。この白内障は 2 カ月で 5% にみられたが、9 カ月まで頻度は増加せず高令まで片眼性である。これらの事実は P-3 系にみられる白内障は先天的なものではなく、加齢現象に関係したものである事がうかがわれる。角膜混濁は生後 2 カ月から 10~20% の頻度で見られ 8 カ月頃より増加をはじめ。眼周囲病巣は 7 カ月頃より出現し加齢とともに増加する。角膜潰瘍は生後 13 カ月以降頻度が増加する。これら後二者は他の P 系と比べ、頻度は同程度であるが、その程度は軽くなかなか進行しないのが特徴的である。(2) P 系, R 系の弊死マウス 63 例における眼組織学的検索を行なった。眼球は摘出後中性ホルマリンで固定後 H.E 染色を行なった。又アミロイド検索の為コンゴ赤、チオフラビン T 染色を行なった。角膜病変としては、角膜上皮の変性、角化傾向、潰瘍形成、角膜固有層への多核白血球浸潤と血管新生を P 系 R 系に認めた。これらの例ではデズメ膜、前眼房は障害されていなかった。網膜、水晶体には特徴ある所見は得られなかった。アミロイドはコンゴ赤陽性、緑色偏光を示し、かつチオフラビン T で黄白色~黄緑色の蛍光を発するものを陽性とした。P 系では 69% R 系では 19% に陽性であった。主な沈着部位は眼瞼表皮基底膜直下結合織、毛のう及び眼瞼腺周囲、眼瞼結膜基底膜直下にみられた。角膜、神経線維、水晶体、網膜、強膜は陰性であった。(3) P-3 系, R-1 系の白内障マウス眼球を摘出し(2)と同様に組織学的検索を行なった。R-1 系では特徴ある所見は得られなかったが、

P-3系では2例に角膜固有層から前眼房にかけて、リンパ球、プラズマ球、巨細胞を含む組織球様細胞の浸潤、水晶体では明らかな皮質の変性及び、水晶体上皮の過形成、重層化という様な他の系統の白内障にはみられない特徴的な所見をみた。以上の様にこの老化モデルマウスの眼所見は加齢と密接な関係があり、G.S.はP,R系で加齢とともに上昇する。しかしP系にその増加が著しく、特にP-3系では白内障の評点が増加する。眼及び周囲組織もアミロイド沈着の部位となり、全身性にみられるのと同じ様にP系に頻度が高い。P-3系にみられる白内障は加齢に関係していると推定される事などをうかがい知る事が出来る。

## 「老化モデルマウス」にみられる筋骨格系の変化について

清水克時, 細川昌則, 竹下修史, 松下隆寿, 笠井隆一, 山室隆夫, 竹田俊男\*  
京大整形外科, 京大胸部研病理\*

## Musculoskeletal changes of the "animal model of senescence"

Katsuji Shimizu Masanori Hosakawa\* Shuji Takeshita\*

Takatoshi Matsushita\* Ryuichi Kasai Takao Yamamuro Toshio Takeda\*

Dept. of Ortho. Surg. Faculty of Medicine and Dept. of Pathology\* Chest Disease Research Inst., Kyoto Univ.

老化モデルマウスの筋骨格系の変化として(1)四肢関節, 腰椎, 骨格筋のアミロイド沈着の組織学的検索, (2) lordokyphosis の観察, (3) 膝関節の退行性変化の組織学的検索を行った。

## (1) 関節, 腰椎, 骨格筋のアミロイド沈着

P系48例R系38例の弊死マウスの四肢関節, 腰椎をホルマリン固定, 脱灰後, コンゴ赤, チオフラビンT染色を行い, コンゴ赤に染まり緑色偏光を示しかつチオフラビンTで黄色蛍光を示すものをアミロイド陽性とした。四肢関節としては足根間, 膝, 股, 肩, 肘, 手根間の各関節を選んだ。関節での沈着は関節周囲の血管の他, 関節軟骨表面, 半月板表面, 半月板の関節包付着部, transition zoneの軟骨や関節包にみられた。腰椎では頻度は高くないが, 椎間関節及び黄色靭帯に沈着があった。関節固有組織のいずれかに沈着のあるものを関節アミロイド陽性とする。6ヶ月齢以前の発症はなく, P-1, P-2では月齢と共に頻度が増し, P-2の8ヶ月以後で7/8(88%) P-1の9ヶ月以後で10/12(83%)の陽性率を示したが, R系ではR-2の16ヶ月例, R-3の20ヶ月例のみ陽性で特にR-1では24例全例陰性であった。全身の関節の分布では膝関節で最も高頻度におこり, 股・肩・肘では中等度, 末梢関節では沈着がなかった。性差は特に認めない。関節陽性例のP-2の3例において関節又は腰椎周辺の骨格筋にアミロイド沈着を認めた。

## (2) lordokyphosis について

lordokyphosisとは脊柱の矢状面での彎曲で老化に伴って胸腰椎移行部の後彎, 頸椎の前彎の増強がおこる。視診及び触診による観察を行い lordokyphosisを認めないものをGS-0 (GS=grading score 以下同様), 視診により認めるがストレスを加えることにより消失するものをGS-1, ストレスによっても消失しないものをGS-2とした。8ヶ月, 12ヶ月, 16ヶ月でのGS-1以上の頻度はR-1(0.71%→8.7%→6.1%), P-1(26.4%→54.5%→66.7%)のごとくP系ではいずれの時期にも高頻度を示した。P-1 66匹, R-1 47匹のマウスにつき各個体での lordokyphosis の推移を調べた。R-1ではGS-1が8ヶ月, 10ヶ月に各1例出現するのみでP-1では8ヶ月でGS-1が8例, GS-2が6例ありGS(0→2)又はGS(0→1→2)のごとく進行するものは11例あった。一方GS(0→1→0)のごとくGS-1の中には時期により消失するものがあり lordokyphosis の中には rigid な変形だけでなく flexible な変形もあると考えられる。軽いエーテル麻酔下に脊柱側面のX線撮映を行い胸腰椎部, 頸部の彎曲を測定するとP系ではR系よりも強い彎曲を示した。彎曲の成因には神経, 筋, 関

節等の変化が要因となると考えられるが、筋、椎間関節等へのアミロイド沈着はその一因となるであろう。

### (3) 膝関節の退行性変化について

老齢マウスの関節に退行性変化がみられるという Sokoloff の報告にもとずき、最も顕著に起るといわれる膝関節につき、関節アミロイド沈着を検索したのと同じ、P系48例(3ヶ月~23ヶ月齢)R系38例(3ヶ月~30ヶ月齢)のHE標本を検索した。P系では2+以上の変化はみられなかったがR系では14ヶ月以上の4例に2+、1例に3+の変化がみられた。このことは関節のアミロイド沈着が、関節の退行性病変に伴って起るものではなく逆に8ヶ月以降に現われる沈着病変によって身体活動性が低下し軟骨に対する強いストレスがなくなるため退行性変化が抑制されるとも考えられる。

## ホンシュウハツカネズミの加齢：出産と日齢

野間口 隆

(東京都老人総合研究所生物学部)

AGING OF THE WILD MOUSE, MUS MUSCULUS MOLOSSINUS : PARTURITION AND AGE.

Takashi A. NOMAGUCHI

(Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

老化の基礎的研究にその実験系としてマウスやラットが好んで利用されているが、多くの実験系統は癌研究や疾患モデルとして特異的な疾患や突然変異を指標にして遺伝的に純化、開発されたものが多く、寿命が特定の疾患に支配されていて種の本来の生存に関する原型が不明なことも多い。一方、老化の基礎的機構を解明するためには実験系がより短寿命で、生存過程における種々の客観的指標が十分な成長過程や加齢及び老化過程を示すことが有利である。

そこで、老化の基礎的研究の背景となる種々のデータが豊富なマウスの原型的な生存過程を調べるために、野外で採取した野性種を飼育し、継代繁殖させた。ここに、現在までに得た若干の知見を報告する。

## (方法)

関東地方の数ヶ所でシャーメントラップにより採取されたホンシュウハツカネズミ (Mus musculus molossinus) を採取地毎に各々雌雄を同一ケージ内で飼育した。そのうち、1978年1月に2ヶ所で採取したもの (Tokyo/PK, Tokyo/PM) の雌雄各1対を起源とした継代繁殖を試みた。継代繁殖は同時出産同腹の雌雄間で行い、自然交配で出生した同腹群は生後21~30日目に新しいケージに収容した。また、各世代毎に出生日を記録し、母系の継代家系表を作成した。

飼育はアルミ製の5匹用マウスケージで行い、通常のマウス飼育方法に従って市販のペレット型固型飼糧及び床敷を使用した。巣作り用に少量の脱脂綿を与えた。

## (結果)

継代繁殖中の種は既存の近交系マウスの原型であるヨウシュハツカネズミ (Mus musculus musculus) に非常に近縁であり、互いに交配可能である。継代飼育は最初の第1世代の出生後からTokyo/PK系は2年2月、Tokyo/PM系は1年7月を経過し、前者では第6世代、後者では第4世代に達している。

Tokyo/PK系は8回の第1世代群を出産し、第1世代の3つの同腹群が第2世代群を合計

26回出産した。第2世代では9同腹群が66回の第3世代群を形成し、同じく第3世代の9同腹群が27回の第4世代群を作ったが、第2世代を起源とした継代繁殖で第5世代に至っているものは4同腹群系であり、第6世代に達しているものは1同腹群系である。第2世代のA~Iの9同腹群系のうちE群系が第6世代に達し、A, D群系及びB群系が第5世代に、F群系が第4世代まで継代しているが、C, G, H及びI群系は第3世代で止まっている。継代速度は各世代の出産日齢の長短に依存し、E群系では第2世代の出生から第5世代の出生まで301日であるのに対して、A, D, B群系では各々462, 496, 628日を要し、いずれかの世代で継代に遅延がみられた。けれども、出産日齢が継代に本質的な影響を与える証拠は認められない。一方、Tokyo/PM系は前者に較べ繁殖力が弱く、第1世代は11回、第2世代は27回、第3世代は16回の出産回数を数え、第4世代に達している同腹継代系は1系のみである。

母系継代家系表からTokyo/PK系について出産と日齢に関するデータを整理すると表1に示す如く、この系の最小出産日数は第1世代では134日、第2世代では62日、第3世代では57日であった。また、最小出産日数は第1, 第2, 第3世代で各々20, 19, 19日であることから、この種の性的成熟は38日齢前後と計算される。さらに出産最高日齢は第1世代では576日、第2世代では555日であった。平均出産間口数は5回以上出産した雌についてみると、第1世代では36.3, 第2世代では42.4, 第3世代では26.6日であり、全出産個体の平均出産日齢は第1世代では初産が184.1日齢であり、2回目出産196.0日齢、第3回目258.3日齢で、第2世代では各々183.6, 250.8, 279.4日齢、第3世代では110.7, 158.0, 118.3日齢であった。

Matters	Generation		
	F 1	F 2	F 3
Minimal Primiparous Age (Day-old)	134	62	57
Maximal Primiparous Age (Day-old)	370	298	301
Maximal Parturient Age (Day-old)	576	555	(376)
Minimal Days Between Parturitions	20	19	19
Maximal Days Between Parturitions	253	317	(75)
Maximal Parturient Numbers	13	(8)	(7)
Mean Days Between Parturitions	36.3±16.5	39.8±19.0 42.3±27.2 45.2±19.9	26.6±7.1

Table 1. Parturient records, between August 1978 and May 1980 in the wild mouse, *Mus musculus molossinus* Tokyo/PK.

この種の成長と加齢について体重の変化を調べると、出生時の体重は0.9gであり、離乳時期である3週齢では4~5gで、5週齢まで急激な増加を示し、10g前後になる。けれども、その後の体重の増加は緩慢となり、15週齢では14~15gになるが、それ以後の増加は停止して80週齢に至ってもほとんど変わらない。成長に伴う体重の変化は継代世代を異にしても変わらない。また、雌雄の体重差は雄の方が大きい傾向がみられる。この種の寿命については未だ飼育期間が十分でなく不明であるが、採取したのも、その第1世代群も生存しており、880日齢を越えている。また、死亡率についてみると、20週齢ごろから死亡するものがあり、48週齢までに雄では26.9% (18/67)、雌では15.1% (8/53)の死亡率を示したが、以後80週齢まで死亡するものはみられない。48週齢までの死亡の原因は食殺によるもので、各臓器や組織に異常は認められず、他の原因は今の所不明である。

( 考 察 )

近交系マウスでは小型であるC57BL/6系、雌の体重は出生時では1g、3週齢では13g、5週齢では17gであり、15週齢では26gで、体重の増加はさらに進行し、80週齢ではおよそ40gに達するから、これと比較してホンシュウハツカネズミTokyo/PK系がいに小型であるかが判る。また、両者間に性的性熟期や受胎期間に相違はなく、後者は550日齢を過ぎても出産可能であることなどから、意外に長寿命であることがうかがえる。

蟹沢成好 (東京都老人総合研究所基礎病理学部)

HISTOPATHOLOGICAL OBSERVATIONS OF AGED F-344 RATS

Masayoshi KANISAWA (Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

老化研究モデルとして実験動物を利用するには、その動物の老化の指標ないしは加齢変化の実態を形態・機能の両面から把握する必要がある、ことに形態学的所見の把握が基本となる。しかし、良質な加齢動物が従来は得難かつたこともあり、研究に汎用されるマウス、ラットでも十分な情報に欠けている現状である。その一方で老化研究の目的で加齢動物が正常な個体とみなされて、個体として、あるいは臓器、組織、細胞レベルで盛んに利用されているが、それら動物の形態学的吟味を欠く場合が少なく成績評価の上で問題なしとしない。

本研究は、長期毒性試験や発がん実験、あるいは老化研究にも適した系統と目されている Fischer F-344 ラットの諸臓器に現われる加齢変化と自然発生腫瘍の実態につき病理形態学的に検索することを目的に行われた。成績の一端につき述べる。

### 1. 材料および方法

F-344/DuCrj SPFラットの月齢差6か月の3群、各群雌雄各15匹を、滅菌CRF-1飼料で飼育し、3群の月齢が(1)29、(2)23、(3)17か月に達した時点で一斉に剖検し、全身臓器、組織と発生腫瘍をブアン固定、パラフィン切片を作り組織学的に検索、一部組織については電顕的にも検索した。動物は、剖検5か月前までは日本チャールズリバー社のバリアー内で、その後剖検時までは老人研動物舎(Clean Conventional)で飼育維持された。剖検時動物数は(かつこ内数字は老人研受入時の動物数)、(1)♂:9(12)、♀:10(14)、(2)♂:11(11)、♀:13(15)、(3)♂:14(15)、♀:14(15)である。なお自然発生腫瘍の検索には、老人研で飼育中の死亡例が含まれている。剖検時を除き体重測定は行われなかつた。

### 2. 検索結果の概要

1) 体重、臓器重量 Table 1および2に、各群動物の平均体重、臓器重量および臓器重量体重比を示した。体重増減にみる雌雄差や臓器重量にみる加齢に伴う一般的増加傾向その他指摘すべき問題点が多数認められる。

2) 組織学的所見 加齢に伴なつて組織学的に顕著な異常を認めたのは、肝、腎、心と内分泌臓器を母地

とする腫瘍性病変であつた。肝では著るしい小胆管増殖と胆管線維症（雄に顕著）、過形成結節の形成、好塩基性小型細胞増殖巣の多発（雌に顕著）が認められ、腎では、糸球体係蹄、Bowmann囊、尿細管各基底膜の肥厚、間質の線維化、メザンギウムの肥厚、尿細管主部上皮細胞への褐色顆粒の沈着が、心では間質の線維増生、巣状の線維化巢ないしはん痕性変化の発生が雄でより強く認められた。

3) 自然発生腫瘍 Table 3に自然発生腫瘍の頻度を示した。睪丸のLeydig細胞腫の顕著な発生を中心に内分泌臓器由来腫瘍の発生が広汎に認められること、転移を示す悪性腫瘍の発生をみたこと、加齢と共に増加すること等が注目される。また、肝では腫瘍の発生はなかつたが、過形成結節や小型好塩基性細胞の巣状増殖の多発等の、前腫瘍性変化が認められることから、さらに高齢での肝腫瘍の発生の可能性が示唆された。

### 3. 考 察

精しい考察の余地はないが、主要臓器での上述の変化が加齢変化として正常ラットで出現するのか、感染巣は全く認めなかつたものの依然として何らかの非生理的過程の存在を考えなければならないのか、より良い条件の動物での再確認が必要と思われる。その上で老化研究に対する適性の評価を行う必要がある。

Table 1. Body and Organ Weight and Organ-Body Weight Ratio in Male F344 Rats

Age(month)	29		23		17	
	Organ weight	Organ-B.W. ratio	Organ weight	Organ-B.W. ratio	Organ weight	Organ-B.W. ratio
Body weight	392.75±29.40		443.84±23.10		456.62±30.45	
Brain	2.10±0.09	0.53±0.04	2.14±0.07	0.47±0.02	2.16±0.02	0.47±0.03
Heart	1.17±0.11	0.29±0.03	1.07±0.06	0.23±0.01	1.13±0.14	0.24±0.02
Liver	13.44±1.65	3.44±0.53	13.68±1.30	3.07±0.18	15.12±1.21	3.30±0.15
Kidneys	2.71±0.15	0.68±0.06	2.71±0.22	0.60±0.05	2.67±0.15	0.57±0.04
Spleen	2.18±2.22	0.57±0.63	1.27±0.21	0.28±0.05	0.83±0.07	0.17±0.01
Testes	6.92±2.17	1.76±0.60	6.35±1.02	1.42±0.25	4.02±0.62	0.88±0.18

Table 2. Body and Organ Weight and Organ-Body Weight Ratio in Female F344 Rats

Age(month)	29		23		17	
	Organ weight	Organ-B.W. ratio	Organ weight	Organ-B.W. ratio	Organ weight	Organ-B.W. ratio
Body weight	266.44±30.69		262.22±37.91		225.35±24.27	
Brain	1.88±0.05	0.71±0.06	1.91±0.03	0.74±0.11	1.92±0.03	0.85±0.09
Heart	0.81±0.10	0.30±0.02	0.76±0.05	0.29±0.03	0.67±0.04	0.29±0.01
Liver	8.47±1.07	3.19±0.37	8.03±1.22	3.07±0.35	6.92±0.73	3.06±0.19
Kidneys	1.89±0.40	0.70±0.16	1.69±0.12	0.64±0.09	1.51±0.09	0.66±0.04
Spleen	0.78±0.25	0.29±0.11	0.62±0.08	0.23±0.03	0.46±0.04	0.20±0.02
Ovaries	1.10±0.26	0.41±0.11	1.15±0.41	0.46±0.10	0.77±0.06	0.33±0.03

Table 3. Incidence of Spontaneous Tumors Observed in Aged F344 Rats

Age (month)	No. of rats	Hypophyseal adenoma	Thyroid tumor	Mammary tumor	Adrenal tumor	Testicular Leydig cell tumor	Others ( Site of tumor)
29	M	12	3(25.0%)	4*(33.3%)	1( 8.3%)	0	12(100%)
	F	14	6(42.9)	3*(21.4)	3(21.4)	2(14.3)	-
23	M	11	2(18.2)	3(27.3)	0	1( 9.1)	11(100)
	F	15	6(40.0)	1( 6.7)	1( 6.7)	0	-
17	M	15	1( 6.7)	3(20.0)	0	0	15(100)
	F	15	2(13.3)	0	0	0	-

Number with \* indicates number includes malignant tumor(s)

ラットによる成人病類似疾患モデルの作成

—主として脈管系・神経系を中心として

杉 山 誠 ・ 日医大老研

Animal models of so-called adult diseases in rats' circulatory and nervous systems

Research Institute of Gerontology Nippon medical school

### §はじめに

老個体を考える場合、それが、いわゆる正常の老化か、病的老化かは、しばしば問題となるところである。老化のメカニズムと、加齢にともなう疾患の分析とは、自ら区別されなければならないであろう。しかし我々は、時に老化の徴候を、ある種の疾患がもたらす症状として認知することがよくある。見方をかえれば、加齢とともに頻発する疾患が多いことも、临床上よく経験するところである。従って、これらの病因、病態を分析することは、加齢にともなって罹患しやすい疾患という観点から、老化のメカニズムを浮き彫りにすることも可能になる。人体の老化、疾患の分析を行うには、勿論ヒトを対象とするのが、最も望ましく、それだからこそ、例えば毎年開かれる老年医学会で発表される演題の多くも、いわゆる臨床データの分析に重きがおかれているのであろう。しかし、臨床的研究には、種々の制約があり、また科学に最も要求される再現性という面からは、動物実験が不可欠であることは、今さら論をまたない。実験動物を利用した疾患モデルには、自然発症系を利用する場合と、人為的に誘発される場合とに大別されよう。SHRなどは前者の代表的なものといつてよからう。演者は主として、後者の立場にたち、老令者に多い種々の疾患モデルを作成し、老個体の特徴の分析を行おうとしている。実験動物のうち、とりわけラットは、近交系動物が得られやすく、データの再現性が高く、飼育取扱いが容易である、などの利点がある。しかし、反対象が小さく、手技的に困難である場合が多い。演者は、これらの隘路を克服し、ラットを中心に、種々の疾患モデルの作成を試みているので、今回はこのうち、主として神経系、脈管系を中心に、時間の許すかぎり供覧する。そして、これらが、老化の機序究明あるいは、個体の抵抗性の加齢による変化を研究する上で、どのような意味があるかについて、ふれようと思う。

### §疾患モデルの一覧

これまでに作成している神経系、脈管系疾患モデルの主なものは、次の通りである。

- A. 慢性機械的刺激による足底部褥創様肉芽腫形成ラット
- B. 脊髄損傷による骨盤臓器のマヒと、潰瘍形成ラット
- C. 両坐骨神経損傷による支配骨格筋の萎縮と、長期刺激によるものと類似病変の短期作成
- D. 脳、下肢分布主要動脈の結紮切断と、側副路形成
- E. ヒカゲノカズラの孢子（石松子）の選択的股動脈注入による趾先末梢動脈閉塞動物の作成

F. 脳軟化動物の作成

G. 石松子の選択的腎動脈注入による腎硬塞動物の作成

H. 上腸間膜動脈閉塞による腸管循環障害

### § 疾患モデルの作成経過

内外の刺激に対する個体の抵抗性の加齢による変化を追求している演者は、メタルメッシュ上で、ラットを長期間飼育観察していると、高頻度に足底に潰瘍形成性肉芽の発症をみた(A)。実はこの現象は、長期にラットを飼育している研究者は、しばしば経験するところであり、むしろ招かざるごとくといつてよからう。しかし、翻つて、これと類似の現象を、何らかの実験手技を用いて発症さすとしたら、大変な労力を要することは、容易に想像出来る。そこで演者は、何故このような病変がこの部に起るかを追求めた。その結果、それは刺激期間の他に、特に加齢ともない末梢神経の、とりわけ節性変化と密接な関係にあることを知った。またこのような加重負担の大きい部の潰瘍形成は、臨床上神経麻痺患者でしばしば遭遇し治療に難渋する褥創を想起させる。そこで、末梢神経障害と刺激との観点より、腰髄損傷による類似疾患の短期作成を試みた(B)。この結果、尾部を中心に、潰瘍形成をみるも、当然予想され限膀胱直腸障害など重篤な合併症が起る。これら臓器の機能麻痺は、疾患モデルとしてそれなりに意義はあるが、長期生存は望めない。そこで次に、選択的に両坐骨神経切断を試み、極めて短期に、長期刺激の場合と類似の潰瘍性病変を発症さすことができた(C)。しかもそれは、刺激をうけないものは、萎縮に陥りうけたものは、過形成病変を来すことがわかった。一方臨床的に、四肢末端の潰瘍性病変は、動脈硬化、血栓塞栓など、血液血管病変の他に、特に本邦に多いとされているRaynaud病、Burger病などにもみられる。これら後二者では、血管の他に、神経の関与がとよく示唆されているが不明の点も多い。実験上、下肢における股動脈、脳における両頸動脈結紮などでは、支配領域の循環障害は決して起らない(D)。短期間で、標的臓器の循環障害を来すには、分布動脈より塞栓子を注入することが不可欠である。演者はその塞栓子として石松子を選び、股動脈より注入することにより、足先の壊死性病変をつくりえた(E)。その量を増減することにより病変の程度をさまざまにしうる。またこれに、神経麻痺や糖尿病など代謝性病変を加味させることにより、種々の合併症をつくりえた。それでは老令者の疾患として臨床上重要な位置を占める脳軟化症動物の作成は可能か？これは、内頸動脈よりの石松子注入により可能である。この手法により、spongioseから軟化のう胞を形成するものまでみた(F)。しかし、生命に直接関与する臓器だけに合併症も起しうる。その一つに網膜に分布する血管の閉塞があるも、これは見方によっても、眼球の血行障害の視察にも供しうる。それでは、他にどのような器官の循環障害をラットで起しうるか？これまでのところ、内径0.28mmのポリチューブを腎動脈、上腸間膜動脈挿入により、腎硬塞、腸管の末梢循環障害(G、H)を起さすことができる。

### § 個体の抵抗性を検索する上の意義

これらの疾患モデルは、老個体の研究上どのような意味を有しているか？脳軟化動物、四肢の潰瘍循環障害など、老令者に多い疾患の実験モデルとしてヒトとの対比も可能である。さらに、末梢神経麻痺、末梢循環障害と刺激に対する個体の反応態度に興味もたれる。末梢神経は、単に遠心性求心性の刺激の伝達という機能の他に、個体があるべき形に保持するという点で、極めて重要な機能を有している。神経麻痺を来すとその被支配組織は確実に萎縮する。そして、さらにそこに何かの刺激が加わると組織は急激に破壊へと導かれる。すなわち末梢神経は個体の保持上、刺激に対して強烈な防禦機能を有しているといえよう。一方血管は神経とは関係なく、刺激に対し、旺盛な自己増殖能を有す。その他骨、線維性結合組織などいわゆる間葉系組織も同様で、過形成性の態度をとり、遂には個体を斃死させる。この意味では、これらの組織は状況によっては「寄生組織」的な性格を見備しているといえようか？そしてこれらの組織がいずれもいわゆるmitoticな組織であることを思う時、個体は正常の状況を維持するためには、mitoticなものと、postmitoticなものとのバランス関係で成り立っているといえまいか？それではこのバランスを統禦するものは何か？このものを追求することは、永久に個体があるべき姿に維持するための原動力を求めることにならないか？

小林裕太、川島誠一郎 (東京大学理学部動物学教室)

## THE DEVELOPMENT OF POLYDIPSIA AND POLYURIA IN OLD RATS, AND ITS RELATION TO THE HYPOTHALAMO-NEUROHYPOPHYSIAL SYSTEM

Yuta KOBAYASHI, Seiichiro KAWASHIMA (Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo)

ラットにおける、加齢にともなう水・電解質代謝の変化は、24月齢以上の個体で認められると報告されている (Friedman et al.: 1967, Turkington and Everitt: 1976)。彼らは、飲水量はほぼ同様または減少するのに対して尿量は増加するかまたはほぼ同様であるので、飲水量あたりの尿量は明らかに増加すると結論している。これに対して、我々の研究室で飼育しているWistar/TW系ラットでは16月齢を越えるころから多飲・多尿を示す個体が多数現われることを見出し、いくつかの実験を行ったのでその結果を報告する。

実験に用いたラットはさまざまなエイジの雄で、12時間明期・12時間暗期の照明下で、水とエサを自由に与えて飼育した。1日、または2時間あたりの飲水量、摂食量および尿量は、メタボリックケージを用いて測定した。ネズミを3日おきに24時間メタボリックケージに入れて測定したが、1~4回目の間に有意な差は認められなかった。そこで最初の2回の測定の平均値を各個体の数値とした。採取した尿中の成分について、陽イオンは原子吸光法、塩素イオンはクロライドメーター、ブドウ糖はglucose-UV法によって測定した。抗利尿ホルモン (ADH) として lysine- vasopressin を体重100gあたり2,5mU皮下注射した。対照群にはADHを溶かした溶媒を注射した。

17- 19月齢のラットを5- 7月齢のものと比較すると (本実験ではそれぞれを若若とよぶ)、体重100gあたりの飲水量は1,7倍、尿量は3,5倍に増加していた (表1)。従来の報告と比べ、我々のラットにおいては、多飲・多尿がきわめて強調されているといえる。摂食量と飲水量との間には相関関係があると考えられるが、摂食量は若齢の方が逆に多かった。飲水量あたりの尿量は、7- 9月齢では $31 \pm 2\%$  (n=6)、17- 19月齢では $65 \pm 2\%$  (n=6) であり、従来の報告と一致した傾向を示すだけでなく、変化はより顕著であった。

加齢にともなう飲水量の変化を図1で示した。1日あたりの飲水量の絶対値は、加齢にともなって増加していたが、体重100gあたりの飲水量と比較すると、1月齢では $23, 2 \pm 0, 8$ mlと最高値を記録し、以後漸減して5- 11月齢では10ml前後であった。ところが14月齢以後、著しく増加し、16- 18月齢では20mlを越えた。

多飲を示す老齢ラットと対照の若齢ラットとの飲水量の日内変動を示したのが図2である。若若ラットとも明期には飲水量が少なく、暗期に増加する。飲水量は明期・暗期ともに、老齢ラットの方が多量傾向にあった。若齢ラットでは、明期の12時間の飲水量は (点燈直後および消燈直前はかなり増加する時期を含んでいるにもかかわらず) 全飲水量の約21%であり、老齢ラットでは約30%であった。したがって、老齢ラットによる日間飲水量増加の一因は暗期の飲水量増加だけではなく、明期の飲水量増加にもあると考えられる。

表1 老若ラットにおける飲水量、摂食量、尿量、尿成分の分析および体重100gあたりの腎臓重量

	Young (5-7M)	Aged (17-19M)
Water Intake (ml/day)	12.5±0.6 (6)	20.7±0.9 (6)
Food (g/day)	8.7±0.4 (6)	6.0±0.3 (6)
Urine (ml/day)	3.8±0.2 (6)	13.5±0.7 (6)
Na <sup>+</sup> (mEq/l)	131.2±20.4 (7)	29.1±3.3 (6)
K <sup>+</sup> (mEq/l)	306.3±21.7 (7)	59.0±5.5 (6)
Ca <sup>++</sup> (mEq/l)	1.4±0.1 (7)	0.5±0.1 (6)
Mg <sup>++</sup> (mEq/l)	33.8±7.6 (7)	15.0±1.6 (6)
Cl <sup>-</sup> (mEq/l)	175.2±9.6 (6)	38.5±4.0 (6)
Glucose (mg/l)	18.2±0.6 (3)	5.8±1.7 (6)
Kidney (mg/100gBW)	908±29 (5)	1168±34 (5)

平均値±標準誤差  
カッコ内は個体数を示す。

尿中のイオン濃度はいずれも、多飲を示す老齢ラットでは、若齢ラットに比べ、有意に低かった(表1)。しかし、1日あたりの各イオンの総排出量を求めると、明らかな差は認められなかった。またブドウ糖についても、老齢ラットでは若齢ラットに比べて著しく濃度が低く、1日あたりの総排出量では差が認められなかった。以上のことは、この多飲・多尿現象が腎臓の遠位尿管で行われる水分の再吸収の低下によることを示唆していると思われる。その原因としては、腎臓における再吸収機能の低下と、ADHの分泌の低下が考えられる。

多飲を示す老齢ラットでは、腎臓が白味を帯び、つまんだ時の弾力性も低下しており、体重100gあたりの重量が増加していた(表1)。腎臓組織の切片を見ると、腎小体の変性像が多数観察された。集合管では立方上皮細胞の丈が低くなり、細胞質のエオシン好性が著しく低下したものが多数出現していた。また大きなう胞構造も多数認められた。結合組織が増加し、皮質と髄質の境界が不明りょうになっていた。以上のことは、腎臓においても変性が進行しており、多飲・多尿の一因となっている可能性を示唆しているが、一方では、組織学的に正常と考えられる腎小体、細尿管、集合管も多数存在しているので、腎臓にどの程度の責任があるかについてはなお検討を要する。

次にADHを投与したところ、多飲を示す老齢ラット、若齢ラットともに顕著な飲水量の低下を示した(図3)。多飲を示していたラットの飲水量が若齢ラットのレベルまで低下することから、老齢ラットの腎臓はADHに十分に反応することができ、多飲・多尿の原因として、下垂体神経葉からのADH分泌の低下を考慮しなければならない。なお、若齢ラットでは、飲水量は翌日にはもとのレベルに回復したが、老齢ラットでは回復が遅れる傾向が見られた。この理由は不明である。ラットでは一般的に老化にともなって、下垂体神経葉のゴモリ染色陽性物質の減少、血中ADHの減少等が知られており、水・電解質代謝の老化にともなう変化には、ADHの変化が関与することが示唆されている(Turkington and Everitt: 1976)。我々の結果はこれらの知見と一致している。そこで、多飲・多尿現象と下垂体神経葉またはより上位の中脳の加齢との関係を追うのは意義があると考えられる。

ADHなどの後葉ホルモンの主な生産源である視察上核と室ほう核においては、ホルモンの産生および分泌にアセチルコリンが関与しているといわれている。今回、アセチルコリンエステラーゼ(AChE)の活性を6月齢と21月齢のSprague-Dawley系雄ラットで比較した。酵素組織化学的に染色した切片をマルチ測光顕微鏡によって測定したところ、視察上核における吸光度は若齢では $0,206 \pm 0,010$  ( $n=4$ )、老齢では $0,186 \pm 0,007$  ( $n=4$ )で有意( $p < 0,05$ ; 対応2試料t検定)にAChE活性の低下が認められた。さらに、視察上核の各細胞における吸光度の最大値を細胞の活性とみなして、若若それぞれ約1000個の細胞について吸光度の分布を調べると、老齢ラットの細胞の活性は有意( $p < 0,01$ ; F検定)に分布範囲の拡大があった。このことは、細胞ごとの活性のばらつきが、若齢ラットにおけるばらつきに比べてより大きいことを示している。この様な視床下部における加齢にともなう変化が多飲・多尿現象の発現と関連していると考えられる。

(文献)

Friedman, S.M., Friedman, C.L. and Nakashima, M. (1967) In "Endocrines and Aging" (Gitman, L. ed) p.142 Thomas, Springfield.  
 Turkington, M.R. and Everitt, A.V. (1976) In "Hypothalamus, Pituitary and Aging" (Everitt, A.V. and Burgess, J.A. eds) p.123 Thomas, Springfield.

図3 老若ラットに対するADH投与の飲水量におよぼす効果  
 実線は0日の測定後(暗期の1時間前)、体重100gあたり2,5mUのLVPを皮下注射。点線は同時刻に溶媒を注射。飲水量のレベルの高いのが16-18月齢、低いのが5月齢。

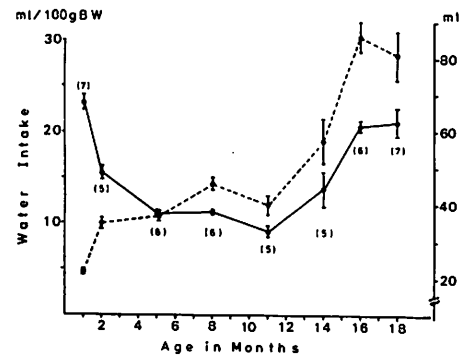


図1 加齢にともなう飲水量の変化  
 実線は体重100gあたりの相対値、点線は絶対値を示す。縦棒は標準誤差、カッコ内の数値は個体数を示す。

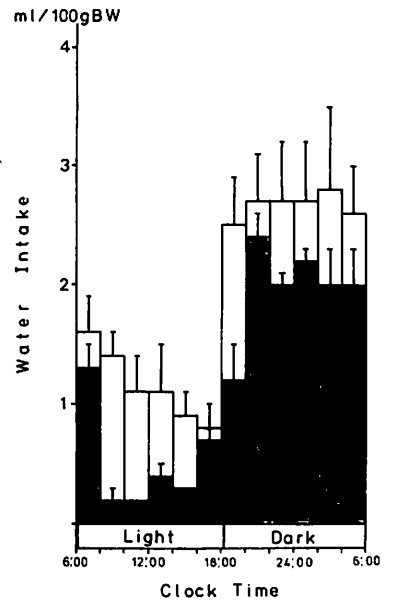
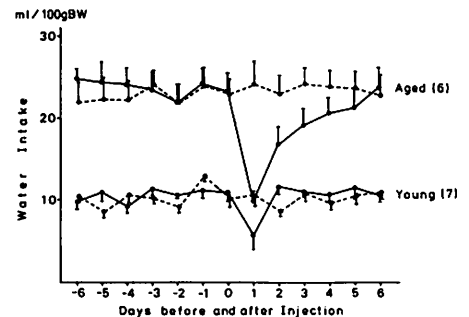


図2 老若ラットにおける飲水量の日内変動  
 明期: 06:10~18:10、暗期: 18:10~06:10  
 : 17月齢 (6個体)、 : 5月齢 (7個体)



老ラットにおける choline acetyltransferase の軸索流について

内田 洋子, 朝長 正徳  
(東京都老人総合研究所臨床病理学部)

EFFECT OF AGEING ON THE AXOPLASMIC TRANSPORT OF CHOLINE  
ACETYLTRANSFERASE ACTIVITY IN RAT SCIATIC NERVES

Yoko UCHIDA, Masanori TOMONAGA (Department of Clinical  
Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

老化とともに、ヒトでは筋線維の減数及び萎縮、末梢神経線維数の減少、軸索変性などの形態学的変化が現われることが知られている。これらの変化に伴って軸索流の障害が考えられ、今までのところ、acetylcholinesterase 及び軸索内線維系蛋白(ニューロフィラメント蛋白, 微小管蛋白, アクチン様蛋白)の軸索流の減少が報告されているが、acetylcholine (Ach)の合成酵素である choline acetyltransferase (CAT)の軸索流については不明である。

そこで老令(24カ月令)ラット坐骨神経のCATの軸索流を測定し、このときの脊髄におけるCATレベル、及び坐骨神経内線維系蛋白の構成比と比較検討した。

[方法] 1) CATの軸索流: ウィスター系の雌ラット(3カ月令, 6カ月令, 24カ月令)を用い、ネブター麻酔下に右肢坐骨神経の腓骨神経と脛骨神経との分岐部直前を結紮した。結紮後24時間で断頭し坐骨神経をとり出し、結紮部手前15mmを5mmの小片に切断し、Fonnum(1975)の方法に従ってCAT活性を測定した。

2) 坐骨神経内線維系蛋白の定量: コルヒチン結合活性は、0.1M KCl, 0.1mM GTP, 1M sucroseを含む67mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH 6.8)でホモジナイズし、遠心後上清をBorisy(1972)の方法で測定した。またSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動はLaemml(1970)の方法に準じ、5~15% linear gradient ポリアクリルアミドゲルを用い、ファーストグリーン-FCFで染色後デンストメトリーを行い、解析した。

[結果] 1) CATの軸索流

結紮をほどこしていない坐骨神経でのCAT活性は、5mm小片あたり、3カ月令で $51.33 \pm 0.78$  (p moles Ach/min), 6カ月令で $67.79 \pm 4.51$  (p moles Ach/min), 24カ月令で $103.6 \pm 3.17$  (p moles Ach/min)と加令とともに増加していたが、蛋白あたりの活性に差はなかった。また結紮後24時間でのCAT活性の蓄積は結紮部手前の5mm断片に限局していた。CAT活性の100%が輸送されるものと仮定してCAT活性の流速及び流量を計算すると、流速は3カ月令で $5.61 \pm 0.67$  (mm/day), 6カ月令で $2.60 \pm 0.58$  (mm/day), 24カ月令で $2.47 \pm 0.70$  (mm/day)であり、6カ月令では3カ月令に比し有意に減少するが、24カ月令は6カ月令と差がなかった。また流量には3群の間に差は認められなかった。

脊髄におけるCAT活性は、6カ月令と24カ月令の間に差が認められなかった。

## 2) 坐骨神経内の線維系蛋白

コルヒチン結合活性は、6カ月令で $39.64 \pm 1.78$  (cpm/ $\mu$ g of protein), 24カ月令で $27.76 \pm 1.60$  (cpm/ $\mu$ g of protein)と減少した。また SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動での微小管蛋白(分子量: 55000)は、6カ月令で9.33%, 24カ月令で9.15%であったが、ニューロフィラメント蛋白(分子量: 200000, 160000, 68000)は6カ月令で13.39%, 24カ月令では6.93%と著明に減少した。従ってニューロフィラメント蛋白と微小管蛋白の比は、1.52から0.83へと減少した。

[考察] コリン性ニューロンの神経伝達物質である Ach は主として神経終末で合成され、その合成酵素である CAT は神経細胞体内でつくられ、軸索流により終末部に運ばれる。このため、CAT の軸索流は生理的には重要である。しかし軸索内における存在様式が解明されておらず、ここでは軸索内に存在する CAT 活性の 100% が、同一速度で輸送されるものとして流速を計算した。

我々の実験では、24カ月令までは、老化に伴った CAT の軸索流の減少は認められず、また、脊髄における CAT 活性レベルも減少していなかった。しかしながら、坐骨神経内の線維系蛋白には、コルヒチン結合活性の減少、及びニューロフィラメント蛋白の著明な減少などの変化が認められ、線維系蛋白などの輸送の減少が推定される。CAT の軸索流は老化によって変化しないのか、AChE や線維系蛋白の輸送よりも遅れて変化するのかについては、更に検討する予定である。

吉本 高志・田中 悟・関 博文・鈴木 二郎

(東北大学 脳研 脳神経外科)

## Experimental cerebral infarction

—— Brain-swelling and its suppression ——

Takashi YOSHIMOTO, Satoru TANAKA, Hirobumi SEKI and Jiro SUZUKI

(Division of Neurosurgery, Institute of Brain Diseases, Tohoku University School of Medicine)

**目的:** 近年、脳血管閉塞症に対し、外科的に血行再建術を行ない、梗塞巣への血流を改善させる治療方法が開発されてきた。この方法は、TIA や RIND の症例に対しては有効であるが、completed stroke に対しては、ほとんど効果がなく、さらに、脳梗塞急性期における本法の施行は、臨床症状を悪化させるのみならず、死を招来するとの報告もある。これらの悪化の要因としては、急性期脳梗塞巣への血行再開に伴なう脳腫脹や、出血性梗塞等の発現があげられてはいるが、それらの病態生理や治療方法は、ほとんど解明されていない。本報では、実験動物、犬の脳底部血管の遮断、解除により作製した脳腫脹に対し、脳圧下降剤として用いられている、マンニトールおよびグリセロールを、血管遮断後計画的に投与し、脳腫脹の発現の抑制が可能か否かについて検討した。

**実験方法:** 脳梗塞の実験モデルとして、我々が独自に開発した、大脳半球広範囲不完全梗塞モデル犬を用いた。このモデルは、犬の脳底部血管の、一側前大脳動脈 A<sub>2</sub> 部、前大脳動脈 A<sub>1</sub> 部篩骨動脈分岐部、内頸動脈、後大脳動脈後交通動脈分岐部および前小脳動脈の 5 カ所を遮断することによって作製した。まず、無処置遮断群として、2 時間および 6 時間の血流遮断を行ない、遮断中および遮断解除後 3 時間にわたり、骨窓部より脳腫脹の有無その程度を観察した。次に、治療群として、遮断開始後より、マンニトール、グリセロールを計画的に投与し、2 時間、4 時間および 6 時間の遮断を行ない、無処置遮断群と同様に遮断解除後 3 時間にわたり脳腫脹の観察を行なった。さらに、全例剖検 30 分前に Evans' blue を経静脈的に投与し、Evans' blue の漏出に示される脳血液関門の破壊についても検討した。

**実験結果:** ① 2 時間遮断群では、マンニトールおよびグリセロールの投与は、脳腫脹の発現を抑制し得た。しかし、4 時間および 6 時間遮断群では、マンニトールの投与によっても脳腫脹の発現を抑制し得なかった。② Evans' blue の漏出については、2 時間遮断群では、マンニトール投与例は、無処置群と比べ、漏出は軽微であった。一方、6 時間遮断群では、マンニトール投与例、無処置群とも漏出は著明であった。なお、脳腫脹の程度と Evans' blue の漏出は、ある程度相関関係を示していたが、グリセロール投与例では、脳腫脹が軽度であるにもかかわらず、Evans' blue の高度の漏出を認めた例が存在した。

脊髄後索線維の加齢性変化の性質について，ニューロン加齢の一実験モデル。

藤澤 浩四郎

(東京都神経科学総合研究所 神経病理学研究室)

ON THE NATURE OF AGE-RELATED CHANGES OF POSTERIOR TRACT FIBRES. A MODEL OF AGEING NEURONS.

Kohshiro FUJISAWA (Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences)

Nerve fibres in the posterior tract of spinal cord (axons of spinal ganglion neurons) undergo degeneration and loss as the individual (both human and other mammals) grow older. This fact has not been so well-documented as it is well-known. The precise nature of this 'involutive' process is yet to be determined and its understanding will contribute substantially to the knowledge of ageing of neurons in general. We used Wistar-Imamichi rats for experimental material, which were reared from weaning to various days of age upto over 800 days. Animals were fixed by perfusion through ascending aorta, embedded in Epon, and studied both lightmicroscopically (semithin sections) and electronmicroscopically. Spinal cords were dissected and studied systematically in various levels together with posterior roots. The following were the cardinal results.

(1) Morphologically two distinct changes are distinguished: one is involutive degeneration of myelinated axons and the other axonal dystrophy. They affect different axons separately within the same fibre tract (the gracile and the cuneate tracts).

(2) Involutive degeneration starts early in the life of the animals, even as early as before 100 days of age when animals are still developing into full maturity. Its incidence increases linearly with the age of the animals. The incidence and severity are always and significantly higher in the gracile than in the cuneate tract. Difference in incidence and severity between cervical (distal) and lumbosacral (proximal) is always insignificant, although it is always more manifest in the former. This seems to mean that the involutive degenerative process of posterior tract axons does not take place in the form of so-called dying-back type; rather that axons get atrophic all through their full length at the same time within the posterior tract.

(3) To look into the matter more deeply, some quantitative studies were done on the degeneration of the gracile tract fibres at the level of upper cervical cord, and the following were found: a Absolute number of nerve fibres progressively decreases, especially precipitously after 700 days of age. b Preceding this loss of fibres, mean diametre of myelinated axons begins to show a decline after 500 days of age, in the dorsal part of the tract. c Apparently in connection with these a and b, the cross sectional area of the gracile tract becomes smaller than the mean value after 600 days of age. d That the decline in mean diametre of axons was observed only in the dorsal third of the tract seems to sug-

gest that axonal atrophy involves predominantly nerve fibres originating from spinal ganglions of lumbosacral spinal cord. e This atrophy is not a general phenomenon over all of the axons, but only a portion of axons are involved in the process at one time or other. Those involved axons are thought to grow progressively thinner in diameter until they reach a critical stage in which they can not continue to survive any more and they can do nothing but disintegrate. Age-related atrophy and disintegration of axons is, therefore, a selective process among nerve fibres of the posterior tract, and there remain a great number of nerve fibres even in old age which are quite free from any morphologic abnormality.

(4) As described above, degeneration of nerve fibres in ageing posterior tract is primarily axonal; myelin sheath remains long after disruption of axons. However, outside the spinal cord, i.e. in the posterior roots, nerve fibres show another kind of change; this time it is unequivocally a myelin sheath change, i.e. hydropic swelling of myelin sheath with relative preservation of inside axons. The causal relationship between the change in the posterior tract and that in the spinal roots cannot be hastily determined at present.

(5) Concerning axonal dystrophy in the posterior tract nuclei, we have reported several times before. It is a change involving terminal portion of some of the posterior tract fibres. We report here that axonal dystrophy is not limited to the terminal axons, but that it tends to progress retrogradely and proximally and to affect axons within the posterior tract. Axonal dystrophy of the posterior tract fibres become more manifest as the animals get older in the upper cervical cord but less manifest in lower levels of spinal cord, so that it may be called as a dystrophying-back process. Axonal dystrophy has another characteristic feature; i.e. selective vulnerability among spinal ganglion neurons. Axonal dystrophy is always definitely more intense in the gracile than in the cuneate nuclei in ageing brains; not only so, it is always severer in the posterior horn of lumbosacral spinal cord than in the cuneate nucleus to say nothing of the posterior horn of cervical cord. Axonal dystrophy in the posterior horn is most probably the pathology of terminal part of collateral spinal ganglion axons, and the collaterals of lumbosacral spinal ganglion axons are definitely shorter than the ascending axons of cervical ganglion neurons which terminate in the cuneate nucleus. Therefore, the preference of axonal dystrophy in the lumbosacral posterior horn as compared with that in the cuneate nucleus cannot be explained by the length of affected axons (the longer, the more vulnerable), but the preference can be more easily explained by the selective vulnerability of the lumbosacral spinal ganglion neurons as compared with the cervical.

(6) It can be hardly supposed that the parallel discrepancy in the involvement of axons between the gracile and the cuneate systems observed not only in the involutive degenerative process but also in the axonal dystrophic process is coincidental. One group of neurons show definitely stronger inclination not only towards simple atrophy but also towards active dystrophy, than the other functionally and phylogenetically very similar group of neurons. This conflicting duality of pathology as well as differential vulnerability as seen in spinal ganglion neurons in ageing animals is one of the most intriguing neurocytological problems of ageing.

(7) These findings and conclusions will be presented with supporting evidences in figures and tables in the coming meeting. Findings of spinal roots and spinal ganglion neuron somata will be reported separately in the future.

加齢による脳萎縮 (CTによる測定) と眼底の変化

畑沢 順, 伊藤正敏, 山田健嗣, 渡辺 敏, 吉岡清郎, 山浦玄嗣, 松沢大樹。(東北大学抗感染病研究所・放射線医学部門)・佐々木雄一郎(佐々木病院)

Arteriosclerosis and Brain Atrophy during Aging — Quantitative Study with CT.

Jun HATAZAWA, Masatoshi ITOH, Kenji YAMADA, Satoshi ENDOH, Seiro YOSHIOKA, Harutsugu YAMAURA, Taiju MATSUZAWA. (Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University.) Yuichiro SASAKI (Sasaki Hospital)

(目的) 加齢に伴って脳萎縮が進行することは、既に山浦ら (J. Gerontol, 印刷中)、伊藤ら (映像情報 11: 439, 1979) によってCTによる定量的研究がなされている。40才代以上では加齢に伴って統計的有意性をもって、脳萎縮が進行することが明らかにされている。この機序をさぐるために、動脈硬化と脳萎縮の相関を調べたので報告する。

(方法) 1977年8月から、1980年5月の間に頭部CT検査を受け、CT上異常所見のなかった症例84例について、頭蓋脳指数 (脳体積÷頭蓋腔体積×100) を求めた。このうち眼底写真による動脈硬化の判定を行ない、網膜動静脈交叉現象が高度にみられる者19例と、硬化性の所見が全く見られなかった者46例の頭蓋脳指数を求めて検討した。用いたCTはOhio Nuclear社製Delta50FS型、眼底カメラはCanon無散瞳眼底カメラCR-45NMである。

(結果) 動脈硬化の有無にかかわらず測定した頭蓋脳指数は、20才代で平均 $98.7 \pm 0.5$ 、30才代で $98.9 \pm 0.4$ 、40才代で $98.1 \pm 0.8$ 、50才代で $96.8 \pm 1.0$ 、60才代で $96.1 \pm 1.3$ 、70才代で $93.6 \pm 2.2$ であった。各年代ごとに動脈硬化の有無のはっきりしている症例をこれらの平均値に対して比較すると、動脈硬化群では各年代を通じ頭蓋脳指数が平均 $0.3 \pm 1.3$ 低く、動脈硬化のない群では平均 $0.3 \pm 0.7$ だけ高かった。両者の間には危険率0.01で有意差がみとめられた。

(考察) 以上の結果から、動脈硬化のある群では、ない群にくらべて、各年代を通じ脳萎縮が有意に進行していることが明瞭である。注目すべきは、動脈硬化群では20才代、30才代で既に脳萎縮の著しい例があることがある。動脈硬化が脳の萎縮にはっきりした相関をもつことが明らかである。ただ、既に70才の高齢で、動脈硬化が著しいにもかかわらず、脳萎縮の全く見られない症例もあり、脳萎縮と動脈硬化がかならずしも一元的には結びつかない事を示している。

## 食餌制限と適応反応

(1) マウスにおける臓器重量, 血液の生化学的性状及びプロスタグランジン合成活性への影響

奥木 実, 倉本和直(東京都老人総合研究所実験動物研究室), 岡部 紘明(東京都養育院附属病院生化学), 森田育男, 室田誠逸(東京都老人総合研究所薬理学部)

STUDIES ON THE MECHANISM OF ADAPTATION IN RESTRICTED FEEDING CONDITION.  
(I) ORGAN WEIGHT, BIOCHEMICAL CONSTITUENTS OF BLOOD AND PROSTAGLANDIN SYNTHESIZING SYSTEM.

Minoru OKUGI, Kazunao KURAMOTO (Animals Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Hiroaki OKABE (Division of Clinical Biochemistry, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital.), Ikuo MORITA, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

McCay, Berg, Ross らはラットに食餌制限して寿命延長を認め, その理由を肺炎, 腫瘍, 肥満等疾病の抑制, 空腹による活動性, 生殖行動の高揚によると説明しているが, その機構については明らかにされていない。われわれは, マウスについて食餌制限した結果, 明らかに自由食群より生存日数が長いことを観察した。しかし, 自由食の約 $\frac{1}{2}$ 量以上を給与しなければ寿命延長の効果はないことがわかったが, 自由食の約 $\frac{1}{2}$ の厳しい減量でもなお, 自由食とほぼ同等の生存日数を持ち, 生命を維持しうることはきわめて興味深い問題である。そこで, 食餌制限による生命維持及び寿命延長の機構を解明する目的で, 今回は, 食餌制限の①各種臓器の重量に及ぼす影響, ②代謝機能の生化学的指標に与える影響, ③肝におけるPG合成活性の与える影響等について調べた。

方法は, 動物はマウス, C57BL/6, 雄, 各種市販固型飼料(蛋白含有約20%)を1.5~3.5g/日給与, その他の条件は前回の報告と同様である。

## 1) 臓器重量に及ぼす食餌制限の影響

食餌制限の形態的变化として臓器重量を調べた。その結果, ①各臓器重量は食餌制限量に比例して減少するが, ②減少率でみると臓器により異なり, Seminal Vesicle が最も大きく, ついでLiver, Spleen, Kidney, Heart であるが, Brain 及びTestis は小さく, 食餌制限による影響の違いがみられた。③これを比体重値でみると, 食餌制限に影響されない Liver

kidney Spleen と、食餌制限量の増大に伴ない比体重値が増大する Testis·Brain·Heart にわかれることが認められた。以上の成績から、食餌制限によって各臓器相互のバランスに変化を来すことが明らかであるが、とくに、代謝系器管と神経・生殖・循環系器管の違いによるバランスが生命維持との関係を意味するものであることを示唆している。このことについては更に細胞構造や機能的な面からの検討が重要であると考え。そこでつぎの検討を行なった。(奥木、倉本)

## 2) 食餌制限によるマウス血液生化学的成分の変動

無麻酔下採血後血清分離し、各種生化学的成分を検索した。その結果、血中総蛋白は食餌量による大きな変動は認められなかったが、蛋白分画では、食餌量が減少に伴って globulin に比し Albumin が増加し、未同定の Albumin と  $\alpha 1$ -globulin の間に認められる蛋白が減少し、全体として globulin の減少が認められた。プリン体代謝産物と関係する尿酸は、2.5~3.0 g (5.2~5.5 mg/dl) で低値を示したが、3.5 g 以上と 2.0 g 以下では血中尿酸の増加を認めた。一方、脂質系では、カロリー源となる TG は 3.0~2.5 g (32~36 mg/dl TG) で低く、食餌量と運動量のエネルギーバランスの取れていることが示唆され、Cholesterol は食餌量の制限と共に血中濃度は低下し、リポ蛋白では食餌量に比例して  $\gamma$ -リポ蛋白 (HDL) の  $\beta$ -リポ蛋白 (Pre  $\beta$ -リポ蛋白含む LDL+VLDL-) に対する比率が増加していた。これは、ヒトの変動とは一致しないが、食餌量によって細胞内での蛋白代謝のバランスがとれていることを示唆していると思われる。(岡部)

## 3) 肝臓におけるプロスタグランジン合成活性に対する食餌制限の影響

演者らは先回本大会(1978年)において、ラット肝における PG 合成活性は、加齢に伴い減少することを報告した。今回は食餌制限したマウスの寿命延長効果が、肝臓における PG 合成活性にも反映しているかどうか調べることにした。実験結果は、2 g 及び 3 g 給与群では、1.5 g 及び ad lib 群に比較して PG 合成活性が有意に高いことが明らかとなった。このことは、寿命延長群では肝の PG 合成活性が若い状態に保たれていることを示し、今後更に老化に対する PG の関与を追求していく上で興味ある知見と思われる。(森田、室田)

## Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) の加齢の脂質代謝異常

伊藤久雄, 武田俊平, 松沢大樹.

(東北大学抗酸菌病研究所・放射線医学部門)

## Aging and abnormal lipid metabolism in SHR.

Hisao ITOH, Shumpei TAKEDA, Taiju MATSUZAWA. (Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai)

(目的) ヒトの本態性高血圧モデルであるSHRを用いその加齢と脂質の変動について調べ、老化と脂質との関連について検討を加えた。

(方法) 岡本耕造博士より供与されたSHR-SRを当研究所で繁殖して実験に用いた。水は自由に摂取させ、オリエンタルMFで飼育した。3ヶ月令と15ヶ月令Ratを実験対象にした。血中コレステロール、中性脂肪、リン脂質は、それぞれ酵素法で、また、HDL-コレステロールは、沈澱法、超遠心法、電気泳動法で測定した。更に、各臓器ごとの過酸化脂質、 $\alpha$ -トコフェロールを八木法及びTappelの方法で調べた。

(結論) 1. SHRの中性脂肪は、コントロールラットより高かった。しかし、リン脂質、コレステロールについては、有意差がみられなかった。

2. HDL-コレステロールは、3ヶ月令ではコントロールに比べて低いが、15ヶ月令では差がなかった。また、老令群のHDL-コレステロールは低かった。

3. 老化ラットの過酸化脂質は、脳、睾丸などで高かった。臓器別にみても、SHRがコントロールに比べて高い傾向を示した。

4.  $\alpha$ -トコフェロールは、老化ラットにおいても脳や睾丸で有意の低下がみられなかった。

(考察) SHRの脂質代謝異常の特質が高血圧そのものに由来するのか、あるいは別個のものかについては、一定していない。いずれにしても中性脂肪の増加がみられることは、SHRの特征と考えられる。一方、HDL-コレステロールの測定結果では、老令群ではその値が低かった。ヒトと同様にラットにおいても、加齢に伴い、HDL-コレステロールが低下することがうかがわれる。生きのこった老令群では、SHRとコントロールラットとの間で、HDL-コレステロールに差がみられなくなった。一方、若年群では、総コレステロールも低い傾向にあり、同時にHDL-コレステロールも低下していた。この時期にHDL-コレステロールが低いことが、寿命に関与するとは、ただちに結論できないが、これが何らかの形で関与している可能性は否定できない。次にSHRの臓器ごとの過酸化脂質を測定した結果老令群では、脳や睾丸などで高い値を示した。これは老化に伴い過酸化脂質が臓器に蓄積することを示すものと考えられる。過酸化脂質は、全体的にSHRの方が高い傾向にあった。又、過酸化脂質が高い臓器の $\alpha$ -トコフェロールを測定したところ、予想に反してあまり減少がみられなかった。脂質

宮沢陽夫, 金田尚志  
(東北大学農学部食糧化学科)

## LIPID PEROXIDES AND AGING

Teruo MIYAZAWA, Takashi KANEDA

(Tohoku University, Faculty of Agriculture, Department of Food Chemistry)

生体組織の各種老人性障害や老化現象を誘発する一原因として、生体内での過酸化脂質の生成が注目されている。我々は生体組織が酸化する際に発する極微弱な化学発光 (Chemiluminescence) を単一光電子計数方式により測定して、組織の酸化度を判定する方法を考案し、脂質過酸化物や四塩化炭素の投与あるいは紫外線照射処理によりラット各組織の酸化を亢進させた際の抗酸化力の低下と発光量の増大を見出した。さらには Fig. 1 に示すように、ラットの加齢によっても発光量の増大する臓器のあることを見出した。これらの結果は、生体発光現象が生体脂質過酸化と深く係り合うことを示すとともに、組織老化過程への脂質過酸化反応の関与を強く示唆した。ちなみに、生体抗酸化剤であるトコフェロールを組織酸化の進行したラットに投与すると組織発光強度の抑制が認められ、生体発光量の測定によりトコフェロールの抗酸化効果を確認した。In vitro の実験においてこれらの組織発光は、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) のクエンチャーであるトコフェロールと  $\beta$ -カロチンで消光された。さらに生体発光種を明らかにするため、肝ホモジネート・脂質過酸化物モデル系での発光スペクトル分析を試みた (Fig. 2)。

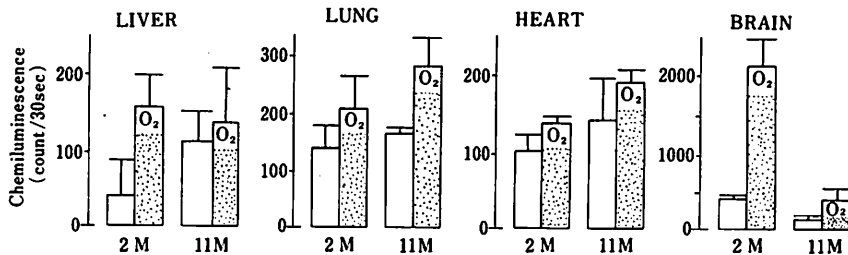


Fig. 1. Change of Tissue Chemiluminescence Intensity with The Degree of Aging. 10ml of 5% tissue homogenates from 2 months and 11 months old rat (n=5-8) were applied to Chemiluminescence Analyzer OX-1 equipped Hamamatsu R-374 Photomultiplier (spectral response range : 185-850nm). O<sub>2</sub>: 酸素通気測定

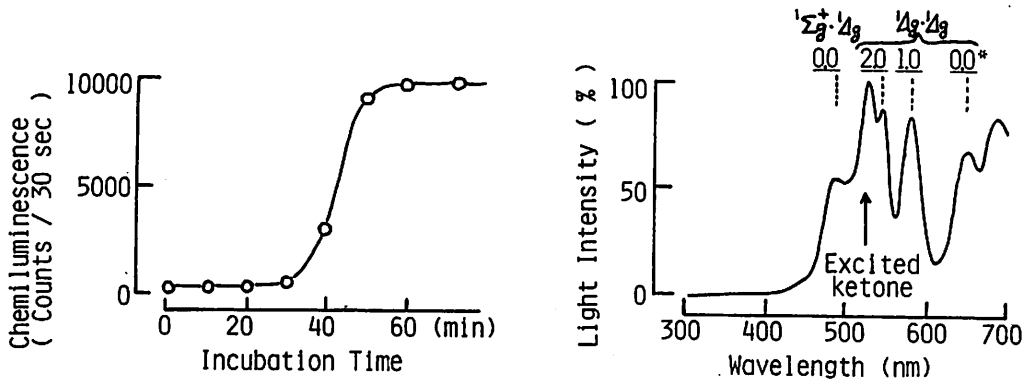


Fig. 2. Chemiluminescence of Rat Liver Homogenate / Autoxidized Linseed Oil Model System ( Left ) and The Chemiluminescence Spectrum ( Right ). 5ml of 20% liver homogenate contained 1% Na-choleate was incubated at 37°C and added with 0.1ml of autoxidized linseed oil ( POV 1000 ) at 30min. \* Express the electron upper state and vibrational transition of  ${}^1O_2$  to ground state  ${}^3\Sigma_g^- \cdot {}^3\Sigma_g^-$ .

その結果、主な発光本体は一重項酸素と一部励起カルボニルであり、主に  ${}^1O_2$  の 2 分子発光 ( ${}^1A_g + {}^1A_g \rightarrow {}^2^3\Sigma_g^- + h\nu$ ,  ${}^1A_g + {}^1\Sigma_g^- \rightarrow {}^2^3\Sigma_g^- + h\nu$ ) 反応に由来することがわかった。又、本モデル系の発光量はラジカル阻害剤である diphenyl-phenylene diamine や t-butylphenol, OH-Scavenger である mannitol により消光されたことから、 ${}^1O_2$  の他に水酸ラジカルも生体発光に関与すると考えられた。従来、生体酸化に係る活性酸素種としてスーパーオキシドアニオンが知られているが、以上の成績からすると、さらに一電子還元された一重項酸素やヒドロキシルラジカルも生体脂質過酸化反応に重要な役を演じていると考えられた。活性酸素と過酸化脂質および老化の相関性について考察する。

#### 参 考 文 献

- 宮沢、金田ら：脂質生化学研究，21 366 (1979)，同，22 (1980)。  
 宮沢、金田ら：ビタミン，53 299 (1979)。  
 宮沢、金田ら：油化学講演予稿集，18 70 (1979)。  
 miyazawa, Kaneda: J. Am. Oil Chemists' Soc., 57 A128 (1980)。

## 生体超微弱発光の臨床応用

依田敏行, 平田 徹, 芹沢 健, 山田憲一, 小野寺博義, 菅原 啓, 後藤由夫 (東北大学医学部第三内科学教室), 宮沢陽夫, 金田尚志 (東北大学農学部食糧化学科)

## CLINICAL APPLICATION OF ULTRAFINE CHEMILUMINESCENCE

Binkoh YODA, Toru HIRATA, Ken SERIZAWA, Kenichi YAMADA, Hiroyoshi ONODERA, Hiraku SUGAWARA, Yoshio GOTO (IIIrd Dept. of Med., Tohoku Univ. School of Med.) Teruo MIYAZAWA, Takashi KANEDA (Dept. of Foodchemistry, Facult. of Agricul., Tohoku Univ.)

最近のエレクトロニクスの発展は従来検出不可能であった超微弱光を安定して検出計数することを可能にし、一秒当り一光子またはそれ以下の超微弱光でも測定できるようになった。このような技術的進歩をふまえ、東北大通信研究所の稲場により $10^{-15}$ Wの超微弱光を油脂や生物材料を用いて測定する装置が開発された。この装置により生体試料を用いて諸種の酸化反応などに伴って発生する活性酸素を、その分子状態の遷移に際して生ずる超微弱光を検出計数することにより、測定できるようになった。これまでも一重項酸素やスーパーオキシドなどの活性酸素は老化や諸疾患における組織障害因子として注目を集めていたが、その直接的測定は困難で、わずかに過酸化脂質がTBA法などにより測定され老化度などと対比されていたに過ぎない。加うるに過酸化脂質の測定は実際上の試料が血清か血漿にほぼ限られる傾向があった。今回用いた超微弱光測定装置は各種試料での発光を測定することが可能で、血液を用いた測定では全血、血漿、赤血球分画、白血球分画のいずれにおいても超微弱発光を認めている。そこで、これまでに諸疾患における血中の活性酸素の状態を全血を用いて超微弱発光として測定したところ、癌、糖尿病、高脂血症の患者より得られた血液で対照群のそれと比べて高値を示すことが認められた。癌患者では、進行したもので超微弱発光が正常の数倍の高値を示す群が認められた。早期癌では差はあまり認められず、また管腔臓器の癌では比較的進行した癌でも差の著明でないものがあつた。糖尿病では全体の平均として数倍の高値を示したが、正常値に近い値を示す患者もあつた。糖尿病の重症度、コントロールの良否、あるいは合併症の有無などと発光量の間には必ずしも一定の関係は認められなかつた。高脂血症患者ではほとんどの患者で超微弱発光が高値を示し、治療により血清脂質が正常化していると考えられる患者でも超微弱発光は依然として高値を示すものが認められた。

これらの疾患には全身衰弱や血管障害、神経障害などの組織障害が見られ、その中のいくつかは従来から血清過酸化脂質値との関連において興味をひかれていたが、今回血液超微弱発光の高値としてとらえることができたことは、今後障害発生因を考える上において一助になることと思う。しかしながら、生体試料における超微弱発光の測定はまだ始つたばかりであり、装置の改良、試料の調製、測定方法など今後検討せねばならぬ点が多々あり、努力し解決して行きたいと考えている。

## 動脈硬化による動脈壁化学組成の変化

佐藤 徳太郎 (東北大学 第二内科)

## Changes of chemical compositions of the aorta by atherosclerosis

Tokutaro Sato (The Second Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tohoku University)

**目的:** 動脈硬化による動脈壁の化学組成の変化を検討することにより、動脈硬化の最も適切な指標を決定することを目的として本研究を進めた。

**方法:** 19例の剖検例の胸部大動脈から内・中膜をとり、乾燥後粉碎し、クロロホルム：メタノール（1：1）混合液によって総脂質を抽出した。抽出液のコレステロール、中性脂肪、リン脂質、糖脂質、遊離脂肪酸を測定した。抽出残渣の酸水解物についてヒドロキシプロリン、デスモシン、カルシウムを測定した。

**結果:** ①年令による変化 — 60才未満と60才以上の群の動脈硬化の程度は後者において明らかに高度であった。動脈壁のコレステロールおよびヒドロキシプロリン含量も高令群において高値であった。

②動脈病変と動脈壁脂質含量の関係 — plaque や潰瘍の有無によって動脈硬化の程度を判定した際に、動脈硬化が高度なほど総脂質含量は増加し、コレステロール、中性脂肪、リン脂質、糖脂質、遊離脂肪酸などの脂質組成も増加していた。しかし、総脂質に対する各脂質含量の割合では、コレステロールが動脈硬化とともに増加するのに対して他のすべての脂質成分は減少していた。

単位面積当りの動脈壁乾燥重量を動脈硬化の指標として各脂質含量との相関を調べたところ、各脂質含量との間に正の相関を示した。しかし、総脂質に対する各脂質含量の割合との間ではコレステロールについては正の相関を示し、他の脂質成分については負の相関を示した。

③動脈病変と動脈壁コラーゲン、エラスチン、カルシウム含量との関係 — ヒドロキシプロリン含量は動脈病変の高度なもので増加し、コレステロール含量との間に有意の正の相関を示した。カルシウム含量は潰瘍形成のあるもので著しい高値を示すが、plaque 形成の有無による差は認められなかった。一方、デスモシン含量は動脈病変による変化を示さなかった。

④糖尿病による動脈壁脂質含量の変化 — 非糖尿病群と年令、性をマッチさせた19例の糖尿病群において動脈壁のいずれの脂質組成含量とも増加していた。

**まとめ:** 動脈壁のコレステロール含量は加齢や糖尿病により増加し、肉眼的動脈病変の程度ともよい相関を示しており、動脈硬化の指標として最も適したものと判定された。ヒドロキシプロリンもコレステロールと良い相関を示して変動していたことから動脈硬化の指標となりうると思われる。

## BSP代謝からみたラット肝の加齢による機能変化

木谷健一 ( 東京都老人総合研究所 生理第一臨床研究室 )

C.F.A. van Bezooijen ( Institute for Experimental Gerontology, The Netherlands )

## FUNCTIONAL ALTERATION OF RAT LIVER AS ASSESSED BY THE METABOLISM OF SULFOBROMOPHTHALEIN (BSP)-----INTER-STRAIN AND INTER-SEX COMPARATIVE STUDY-----

Kenichi KITANI (First Laboratory of Clinical Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology) C.F.A. VAN BEZOOIJEN (REP Institute for Experimental Gerontology, The Netherlands)

Many biochemical and pharmaco-physiological parameters have been reported with respect to age using rat liver as an experimental material. However, rat liver is well known to be subject to age associated pathologies as well as environmental variables during aging process. Strain and sex associated differences are also considerably wide. In the previous paper, the authors reported that the maximal biliary excretion rate of sulfobromophthalein (BSP) decreased to 50 to 60 % of young adult (3-month-old) values at the age of 24 months in Wistar derived male rats (Wistar S, Shizuoka JikkenDobutsu) while relative storage capacity (S) was unchanged. On the other hand, DeLeeuw Israel reported that BSP Tm does not differ between 3-month-old and 24-month-old RU female rats. In man, two past reports concluded that BSP Tm is unchanged with age. These previous reports also documented a considerable decrease in (S) value in man as well as in rats. In order to clarify the cause of the discrepancy between the authors' experience and those of others, we determined BSP Tm, S and related physiological parameters in rats of different strains and sexes up to 30 months.

Materials and Methods. Five different rat groups, Fischer 344 (Charles River) and Wag/Rij of both sexes, and BN/Bi (Rijswijk) females rats were studied. The youngest age group was 3-month-old and the oldest was 30-month-old for each group. Under Nembutal anesthesia, BSP Tm defined by Wheeler et al. was determined by a single infusion rate method by directly determining Tm from bile samples collected through a common bile duct cannula. Relative storage capacity of the liver for BSP (S) was calculated according to the formula,  $HR = Tm + (dp/dt)S = I - (dp/dt)PV$ , where HR is the hepatic removal rate for BSP from plasma, I is the infusion rate of BSP, dp/dt is the rate of increase in BSP concentration in plasma during the period of Tm, and PV is the circulating plasma volume

which was determined after Tm determination was completed by Evance Blue dilution method. Bile flow and bile salt excretion rate in the base-line period before BSP infusion and BSP conjugates in the bile were also determined.

Results. BSP Tm values expressed as mg/min/g liver were highest in the young adult groups (3-or-6 month old) in all rat groups studied as compared with the respective older age groups. The 30-month-old value ranged from 50 % (Fischer male) to 70 % (BN female) of respective young control values. On the other hand, (S) stayed unchanged (BN) or even increased (Wag/Rij) as the age advanced, but in any rat group S value did not decrease with age. Bile flow rate showed the tendency of gradual decrease with age in most of the rat groups. Bile salt excretion rate which is known to influence the BSP Tm either stayed unchanged (Fischer male) or decreased (Fischer female) with age and did not account for the general decrease in Tm value with age. The percentage of conjugated BSP in the bile (mostly glutathione conjugate) slightly decreased (Fischer male and female) or essentially unchanged (BN female, Wag/Rij male and female) with age and also did not appear to account for the age dependent decrease in Tm.

Discussion and Conclusion. The results of the present study clearly demonstrated that BSP Tm value expressed per unit liver weight decreases with age in rat regardless of the strain and sex of rats, while (S) dose not. This finding is in agreement with the previous observation of the authors (Kitani 1978) on Wistar male rats. However, the results are at variance with reports by Skaunic et al. (1970) and Thompson et al. (1965) for man, and by De Leeuw-Israel for RU female rat (1971). As one possible explanation for the discrepancy between the previous reports and the present one, a difference in the methodology can be taken into account. In those studies reporting the decreased (S) and unchanged Tm, two or three different infusion rates for BSP were used to obtain correspondingly different dp/dt values, thus allowing the indirect determination of both Tm and S values without bile duct cannulation, while, in the present study and in the previous study by the authors, only one infusion rate was used and the Tm value was determined from the bile samples obtained by a bile duct cannula. Although the principle of the calculation of (S) value is the same for all studies, McIntyre et al. (1972) recently reported that this conventional indirect method gives (S) value erroneously influenced by hepatic blood flow, although (S) should be theoretically independent of blood flow. Since it is known that hepatic blood flow is considerably decreased with age, the authors believe that the discrepancy between the present results and past reports stems from this methodological difference and that the age actually reduces the BSP Tm, at least in rats, regardless of the sex and strain, and probably also in man: however, the human case remains to be reinvestigated. Underlying mechanism(s) for the observed alteration of liver function with age remains to be elucidated.

## ヒト肝の加齢変化に及ぼす栄養環境

佐藤 秩子 - 愛知県がんセンター病院臨床検査部  
田内 久 - 愛知医科大学病理学教室

Nutritional effect on the age changes in human liver

TSUNEKO SATO - Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya (Japan)

HISASHI TAUCHI - Department of Pathology, Aichi Medical University, Aichi (Japan)

著者らはすでに在米白人、コスタリカ人、在ハワイ日本人、在日日本人（1950年～1960年剖検）の男子剖検例肝について、本質的な形態学的特徴の一としている肝細胞数の逐齡的減数を老化の指標として、栄養環境、人種差が老化様相に及ぼす影響を分析検討して来た。

これらの検討により肝臓は发育成長過程における肝細胞の増数と増容によつて臓器としての成熟のピークを迎え、その後加齢にともなつて減数を示すが、この経過様相に影響する因子として遺伝的要因のほかは栄養環境の果す役割の大である点をもとめた。

すなわち、成熟のピークにおける細胞数は发育成長過程における栄養条件によつてある程度規制されるとともに、この成熟のピークの細胞数を規準としてその後の老性減数が始まると考えた。従つて成熟後の栄養条件が改善されても肝臓の場合、肝細胞の大きさは増大し肝重量の加齢に伴う減少は軽減されても、減数を緩徐にすることは出来ないと考えて来た。

今回は約15年のちに剖検された各年代の在日日本人群（在日B群）の肝についての微計測的成績を得たのでこれまでの在日日本人群（在日A群）ならびに在ハワイ日本人群などにおける老化様相をその生活環境を考慮に入れて比較検討を施した。

肝重量に影響するものは主として肝細胞数と肝細胞の大きさであるが、これらの計測値の各年代における消長には種々興味ある様相の差がみられる。

肝重量はすべての年代において在ハワイ群に大で、在日B群がこれにつき、在日A群では最も小である。50歳代を除いて、多くの年代では在日B群は在ハワイ群にむしろ近い値を示している。肝細胞数についてみると、49歳以下の例では、在日B群は在ハワイ群に比してわずかに少ない傾向があるのみで、在日A群に比して明かに多いが、50歳以上の例では在日B群はむしろ在日A群に近く、ことに70歳代では在日A群よりも少ない傾向にある。いずれにしても50歳以後では在日A・B群とも在ハワイ群に比して細胞数は明かに少ない。

一方、肝細胞の大きさについてみると49歳以下では、在日B群と在日A群との差はわずかで若干在日B

群に大きい傾向をみるのみであるが、在ハワイ群に比して明かに小さい。一方60歳以上では、在日B群の肝細胞の大きさは在日A群に比してはるかに大きく、その差は加齢にともなつて顕著になり、在ハワイ群に類似の傾向にある。

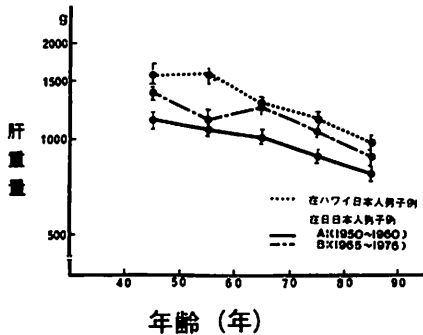
以上の徴計測的成績から在日日本人についてもその生存時期によつて肝細胞レベルでの年齢差の様相に若干の差がみとめられ、49歳以下の群では肝細胞数において、また60歳以上の群では肝細胞の大きさにおいて在ハワイ群に類似する傾向がみられた。

肝細胞核の大きさにはすべての年齢層において在日A・B両群の間に殆ど差をみず、ともに在ハワイ群に比して小さい。また、2核肝細胞数の逐齡的消長でも在日A・B群の間に若干の様相の差をみたが有意ではなかつた。

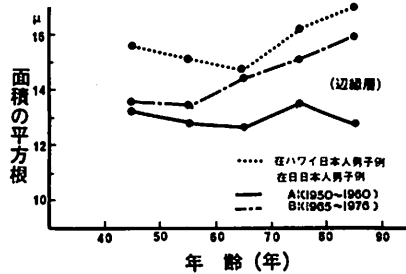
肝内動脈の硬化度の逐齡的消長についても在日A・B両群の間に特に差をみとめず、若年層ですでに高い硬化度をみた在ハワイ群との間の差が目された。

在日日本人の生活環境ことに栄養環境が過去数十年の間に種々変遷している点是否定出来ない事実である。遺伝的に同様な日本人においても肝細胞の加齢変化に対して生活環境ことに栄養条件による差をみとめるとともに、これらの環境差が個体の発育、成長、成熟あるいは老化の何れの時期にあらわれるかによつて種々興味ある様相の差をみとめた。

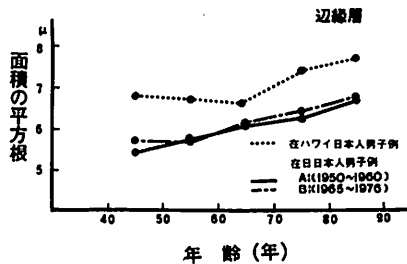
肝重量の逐齡的消長



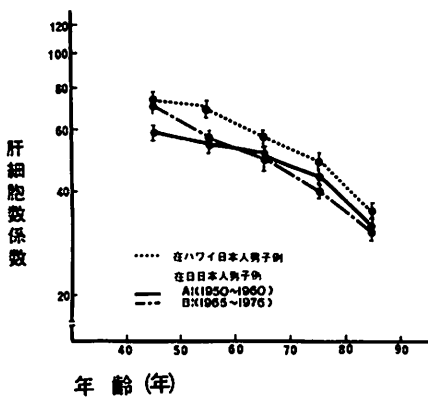
肝細胞の大きさの逐齡的消長



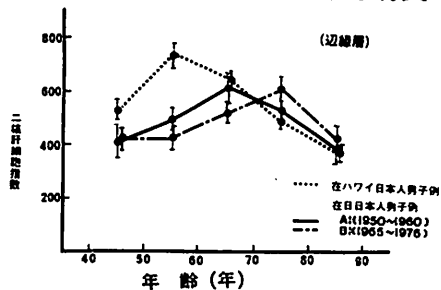
肝細胞核の大きさの逐齡的消長



肝細胞数の逐齡的消長



二核肝細胞数の逐齡的消長



加齢による腹部臓器の大きさの変動 (CTによる測定)

山田健嗣, 遠藤 敏, 畑沢 順, 吉岡清郎, 松沢大樹.<sup>1)</sup> 佐々木雄一郎<sup>2)</sup>.  
 東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門<sup>1)</sup>. 佐々木病院<sup>2)</sup>

Size of Abdominal organs during ageing as weasured with CT.

Kenji YAMADA, Satoshi ENDOH, Jun HATAZAWA, Seiro YOSHIOKA, Taiju MATSUZAWA.<sup>1)</sup>  
 Yuichiro SASAKI.<sup>2)</sup> (Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute  
 for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University<sup>1)</sup> Sasaki Hospital<sup>2)</sup>.)

我々はコンピュータトモグラフィーを利用して加齢にともなう腹部臓器最大断面積の変化を調べた。肝胆道系疾患を有しない症例において、肝最大断面積の各年齢群の平均値は60代より減少の傾向を示した。しかし個人によるばらつきが大きく各群間の有意差は認められなかった。肝最大断面積と身長、体重、体表面積及び腹腔断面積との相関を調べたところ腹腔断面積との相関が最も高かった。従って個人の体格による肝最大断面積の違いの補正としては、腹腔断面積によるのが適当と考え、補正値の加齢による変化を調べた。肝最大断面積は補正値では各年齢群に違いを認めなかった。また各年齢群の分散は補正前後で有意に低下した。以上より腹部最大臓器である肝臓は最大断面積でみるかぎり加齢による影響は認められなかった。

腸内細菌叢と老化：無菌および通常ラットの肝機能と脂質代謝の加齢による変化

河合 康雄

(ヤクルト研究所)

INTESTINAL MICROFLORA AND AGING : CHANGES IN LIVER FUNCTION AND  
LIPID METABOLISM OF AGED CONVENTIONAL AND GERMFREE RATS.

Yasuo KAWAI

(Yakult Institute for Microbiological Research)

目的 腸内細菌叢は感染症、消化器あるいは肝臓などの臓器疾患、免疫機能、および胆汁酸、コレステロール、アンモニア代謝など人間の生理、代謝、吸収等に深く関わっていることが知られて来ているので老化の過程に影響を及ぼす後天的因子の一つと考えられる。

そこで我々は腸内細菌叢と宿主とのかかわり合いの面から老化および老化の制御を取りあけて来ている。

演者らは、これまでに指標の一つとして消化管および肝臓、腎臓における種々の酵素活性を測定し<sup>1), 2)</sup> 十二指腸粘膜 Alkaline Phosphatase が腸内細菌叢と加齢により、量的<sup>3)</sup>、質的<sup>4)</sup>に変化を受けることを示した。また第3回の本研究会<sup>5)</sup>において、8および40週令の無菌ラット(GF)と通常ラット(CV)を用い、消化管および肝臓機能に及ぼす腸内細菌叢の影響について報告した。

今回は宿主機能のうち特に肝臓機能と脂質代謝に注目し、腸内細菌叢と加齢の影響を80週令まで調べたのでその結果について報告する。

方法 動物は Fischer 344/Yit(♂)を各群5匹使用した。CVラットは8、40、80週令を、またGFラットは8、40週令ラットを用いた。いずれの動物へも同一飼料(滅菌NMF)を与えた。測定項目としては以下に示す種々の酵素活性のほかに、コレステロール(Chol)、トリグリセライド(TG)、ヒドロコチソン、および胆汁酸(BA)を測定した。

## 結果

### I. 肝臓機能

肝臓 Lysosome  $\beta$ -glucuronidase ( $\beta$ -glucu) : 8週令ではCVとGF間に顕著な差は認められなかったが、40週令では Specific activity(SA)、Total activity(TA)ともCVの方が高く加齢にともなって活性が増加した。80週令の値はSAがほぼ40週令と同じであったのに対しTAは減少した。

Acid Phosphatase (ACP) : 両動物における活性はSAおよびTAとも8週令から40週令にかけて増加した。80週令

(C V)ではS Aが増加したがT Aは減少傾向を示した。

肝臓 Microsome Nitroreductase (N R): 8 および 40週令のS A、T AともG Fの方がC Vより高く、加令にともない活性が増加した。Aniline hydroxylase (A H): 8 週令ではS A、T AともG Fの方が高かったが、40 週令ではC Vの方が高かった。加令にともないG Fでは減少し、C Vでは40 週令のT Aが高い傾向を示した。UDP - glucuronyl transferase (U D P - G T): 8 週令では両動物間で同レベルであったが、40 週令ではC Vの方が高かった。加令にともないG Fでは減少傾向を示した。80 週令(C V)の値は40 週令にくらべ減少傾向を示した。

肝臓細胞質 Argininosuccinate synthetase (A S S): 8、40 週令のS A、T AともC Vの方が高かった。80 週令(C V)の値は40 週令よりS Aが高い傾向を示した。

## II. 脂質代謝

Lipase (L i p): 脾臓における活性は8 週令において、S A、T AともG Fが高かった。加令にしたがいG Fでは活性が増加したがC Vでは明らかな変化は認められなかった。また消化管内容物における活性はC Vでは加令にともなう変化が小さかったのに対し、G Fでは十二指腸と空腸、結直腸において増加した。

脂肪組織 Lipoprotein Lip. (L P-L i p): 8 週令における活性はS A、T AともC Vの方が高かった。加令にともない両動物においてT Aは増加したが、S Aは維持傾向にあった。また80 週令(C V)における活性は40 週令とほぼ同じ値を示した。

Hormon sensitive Lip (H S-L i p): 8、40 週令のS A、T AともC Vの方が高い傾向を示した。加令にともない活性は減少傾向を示した。

血清 T G: 8 週令ではC VとG Fは同レベルであった。40 週令ではG Fが高い値を示した。80 週令(C V)の値は40 週令のそれとほぼ同じであった。血清 Chol: 8、40 週令ともG FがC Vより高く、40 週令では減少傾向を示した。しかし80 週令(C V)では8 週令の値とほぼ同じであった。盲腸内容物 Chol: 8、40 週令ともG Fの方が高く、加令にともなって増加傾向を示した。

80 週令(C V)の値は40 週令とほぼ同じであった。盲腸内容物 B A: C Vでは遊離型だけが、G Fでは抱合型だけが検出された。C Vでは8、40 週令間に明らかな差は認められなかったが、80 週令では総胆汁酸量が減少傾向を示した。G Fでは加令にともなって胆汁酸量が減少した。

血清ハイドロコチゾン: 8、40 週令ともG Fの方が高い傾向を示した。G Fは加令にしたがい増加傾向を示したが、C Vは80 週令まではほぼ同じ値を維持した。

考察 肝臓 A H、U D P - G T、A S Sの結果が示すように、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。G Fの消化管内容物のL i pがC Vより高いことはT Gの吸収がG Fで高いことを示すのかも知れない。40 週令のG Fにおいて血清T Gが高い値を示したが、消化管内容物L i p活性あるいはハイドロコチゾンの変化との関連も考えられる。また盲腸内容物中のC h o l、あるいは胆汁酸等の変化から、腸内細菌叢は宿主の脂質代謝の加令変化に何らかの影響を与えていることが示唆された。

- 1) Kawai. Y. (1980). Microbiol. Immunol 24:
- 2) Kawai. Y. et al. (1978). Infect. Immun. 19: 771.
- 3) Kawai. Y. et al. (1978). Appl. Environ. Microbiol. 36: 381.
- 4) 石井ら(1978). 第2回日本基礎老化研究会, P. 42
- 5) 石井ら(1979). 第3回日本基礎老化研究会, P. 68

## 腸内細菌叢と老化：ラット消化管における腸内細菌叢の定着とその加齢による変化

渡辺 次男, 河合 康雄,  
(ヤクルト研究所)

INTESTINAL MICROFLORA AND AGING: COLONIZATION OF INTESTINAL  
MICROFLORA AND ITS CHANGES IN AGED CONVENTIONAL RATS

Tsugio WATANABE, Yasuo KAWAI

(Yakult Institute for Microbiological Research)

目的 無菌マウスの平均寿命が通常マウスの1.5倍に近いこと、通常マウスでは老化に伴い体重が減少するのに対し無菌マウスでは顕著な体重減少がみられず、体重減少を老化の指標としてみると通常マウスに比べ無菌マウスの老化が遅れて起ることが知られている。

腸内細菌叢は感染症、消化器、肝臓疾患、免疫機能、胆汁酸、アンモニア代謝など広範囲に宿主機能と関わっているため老化の過程に影響を及ぼす要因の1つと考えられる。したがって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の問題を考える上で重要と思われる。今回は出生から80週令までの通常ラットの消化管における腸内細菌叢の定着とその変化について調べ、若干の知見を得たので報告する。

方法 実験に使用した動物は当研究所で系統維持している Fischer 344/Yit 雄ラットである。0日令ラットは出生後1時間以内にと殺し実験に供した。10日令ラットまでは消化管が小さく部位の区別が困難なため、胃およびそれ以外の腸管(小腸、大腸)の2部位にわけて、常法により腸内細菌叢の検索を行った。また lactobacilli (lact)<sup>1)</sup> と streptococci (str) については species 別の分布を検索した。適当なコロニー数が認められた選択培地平板から無作為に株を分離し、それらをすべて同定して species 別の生菌数レベルを算出した。なお離乳後のラットには飼料として滅菌 NMF を与えた。

### 結果

1) 新生仔ラットにおける腸内細菌叢の定着：出生直後のラットの消化管からは細菌が全く検出されなかった。生後1日目になると、胃で  $10^6/g$ 、小腸および大腸で  $10^5/g$  の細菌が検出された。2日目以後は両部位とも、lactobacilli がもっとも優勢な菌種として定着した。胃においては21日目に enterobacteriaceae (enterobac) が比較的高い菌数レベルに達した。小腸および大腸においては enterobac と str が変動の幅はあるが  $10^3 \sim 10^6/g$  のレベルで定着した。嫌気性菌である bacteroides は14日令ラットで初めて検出され盲腸においてそのレベルが高かった。

2) 離乳後ラットの消化管における腸内細菌叢の加齢にともなう変化：3週令ラット胃における enterobac および盲腸における

enterobac, str, staphylococci (staph) が高い傾向を示した。各部位とも lact が最も優勢な菌種として定着していた。

bacteroides は盲腸において lact とともに高い菌数レベルであった。

回腸における str の菌数レベルが加齢とともに高くなった。40 週令ラットの腸内細菌叢としては十二指腸における lact、str の菌数増加が特徴的であった。enterobac および staph は比較的低い菌数レベルを維持していた。80 週令ラットにおいては str が胃、十二指腸、回腸で減少傾向を示した。

3) 8, 40 および 80 週令ラットにおける lact, str の species レベルの分布: ラット消化管に常在する Lactobacillus species の分布を 8, 40 および 80 週令ラットで比較した。8 週令ラットにおいては L. acidophilus が消化管各部位において優勢であった。また L. fermentum は上部消化管で、L. murini は下部消化管で菌数レベルが高くなる傾向を示した。40 週令ラットでは 3 species 間に明らかな差は認められなかった(盲腸)。80 週令ラットでは胃、十二指腸において L. fermentum の菌数レベルが高くなる傾向を示した。

一方 str については、8 週令ラットにおいて S. faecalis しか検出されなかったのに対し、40 週令ラットではその他に S. faecium, S. mitis が検出された。また 80 週令ラットにおいては S. faecalis と S. faecium が検出された。

### 考察

腸内細菌叢は出生直後(1日以内)から定着し始め、それは離乳期までに嫌気性菌を含むほぼ全菌種の定着が完了するといわれている。今回の実験でもほぼ同じ結果を得た。すなわち lact を主にいわゆる通性嫌気性菌群が最初に定着し次いで bacteroides 等の偏性嫌気性菌群が特に嫌気度の高い盲腸以下の消化管に限って定着した。

老化と腸内細菌叢の関連を考えるにはむしろ離乳期以後の腸内細菌叢の変化が重要と思われる。

加齢にともなう腸内細菌叢の変化の1つに十二指腸における菌数レベルの増加があげられる。この現象は宿主機能の変化と何らかの関係があるのかも知れない。また species レベルの分析を行うと(lact, str)、いずれも加齢によってその分布が変化した。すなわち、lact の分布は 3 species 間に差がなくなり(盲腸)、str に関しては検出される species が多くなった。これらの現象はともに腸内細菌叢が加齢にともなって複雑化することを示唆しているとも考えられる。

1) Watanabe, T. et al (1977). Microbiol. Immunol. 21:183.

駒井三千夫・木村修一

(東北大学農学部栄養化学教室)

EFFECT OF DIETARY CELLULOSE ON THE LIFE SPAN OF EPITHELIAL CELLS IN CONVENTIONAL AND GERM-FREE MICE INTESTINE

Michio KOMAI, Shuichi KIMURA

(Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University)

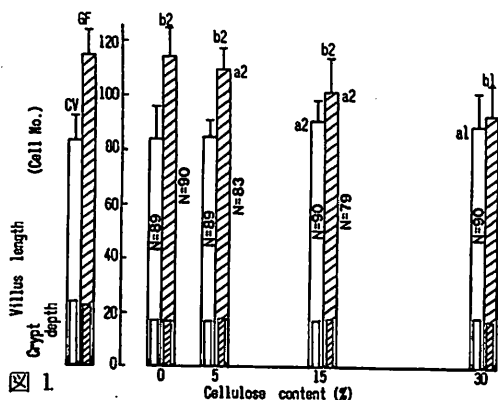
小腸粘膜上皮のような、細胞再生系のエイジングの研究が重要であることは、寿命の長い無菌動物の腸管上皮細胞の life span が長いということや、給餌制限をした動物では寿命が長く、またその小腸上皮細胞の life span も長くなるということなどからも示される。細胞再生系における細胞の死は、その機能と関連しており、この系の細胞の死を通して個体の生命が確保されているという見方もできる。疫学的な研究データから、大腸癌や、循環器系疾患等の成人病に対して防御効果があるといわれている食餌性繊維が、この腸上皮細胞の life span に影響を与えているのではないかという想定のもとから、今回、食餌中セルロース含量を変えてマウスに与えてモデル実験を行った。常在腸内細菌その関与をみるために、腸内細菌その存在する場合と、存在しない場合の両方の condition で腸上皮細胞の life span を測定したものを報告する。

<実験方法> 実験に用いた無菌及び通常マウスは ICR 系の雄、2ヶ月令のもので金網個別ケージで飼育した。食餌条件としては、セルロースを全く含まない Basal diet (B), 5% Cellulose diet (5C), 15% Cellulose diet (15C) そして 30% Cellulose diet (30C) の4群を無菌と通常マウスの両方に設けて合計8群として行なった。4週間食餌条件に馴化させた後に、<sup>3</sup>H-チミジンを腹腔内投与し、経時的に屠殺して空腸と結腸を摘出して常法通りのマイクロオートラジオグラフィを行ない、これら腸管上皮細胞の life span を測定した。

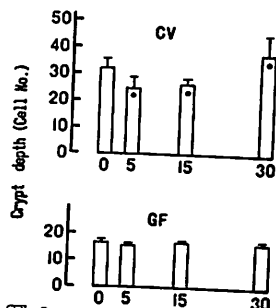
<結果> 腸内細菌その存在する場合の通常マウスでは空腸上皮の絨毛の長さは高セルロース食によって長くなる傾向にあったが(図1)、細胞の life span はセルロース含量の違いによってほとんど変動がみられなかった(図2)。これに反して腸内細菌その存在しない場合の無菌マウスでは、空腸上皮細胞の life span はセルロース含量が多くなるにつれて life span は短くなるということが観察された(図2)。この際の上皮の絨毛の長さはセルロース含量が多くなるにつれて短くなり(図1)、細胞の移行速度を計算すると高セルロース食では著しく速くなっていることが判明した。

一方、結腸上皮腺窩の cell population に対する影響をみると、空腸上皮絨毛の cell population に対する影響とは異なっていることが注目される(図3)。そして、結腸上皮細胞の life span に

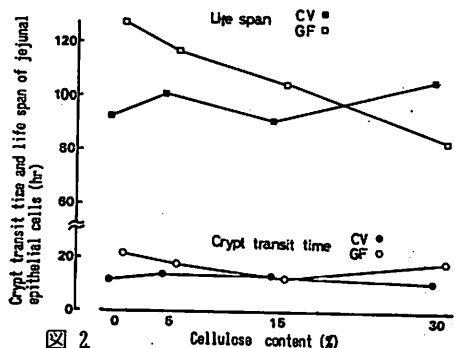
ついでに空腸上皮細胞の life span の結果と同じように通常マウスでは、セルロース含量の違いによって影響を受けず、無菌マウスではセルロース含量が多くなるにつれて、短くなるということが観察された(図4)。ただ、空腸上皮とは異なっているのは、無菌の15C群ですでに30C群と同じ程度に life span が短縮していることであつた。このようなことから、常在腸内細菌その存在が、セルロース食を与えた場合の腸上皮細胞の life span の応答のしかたに著しい影響を与えるということと、無セルロースのような極端に繊維質が少ない食餌を与えた場合に腸内細菌その因子を除外した条件では上皮細胞の life span が著しく伸びているということなどがわかつた。こうした結果に考察を加える。



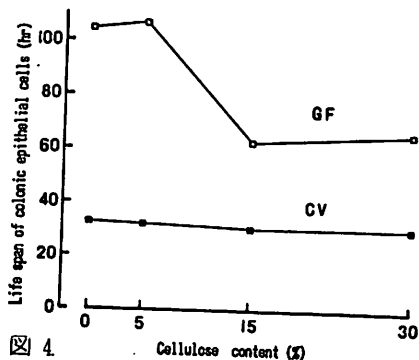
1. Villus length and crypt depth of jejunal epithelium in four dietary groups of CV and GF mice. a1:  $P < 0.01$ , a2:  $P < 0.001$ , compared with 0% cellulose group. b1:  $P < 0.05$ , b2:  $P < 0.001$ , compared with CV of each group.



3. Cellulose content (%) Epithelial cell populations per crypt column in mice descending colon. Results are means  $\pm$  SD. \*:  $P < 0.001$ , compared with non-cellulose group.



2. Life span of jejunal epithelial cells in CV and GF mice on diets containing graded amounts of cellulose



4. Life span of colonic epithelial cells in CV and GF mice on diets containing graded amounts of cellulose.

古賀 彰子, 木村 修一 (東北大学農学部栄養化学研究室)

INFLUENCE OF RESTRICTED DIET ON EPITHELIAL RENEWAL AND MATURATION IN THE MICE SMALL  
INTESTINE

Akiko KOGA, Shuichi KIMURA (Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku  
University)

ある種の栄養条件が、生体の加齢によってもたらされるいわゆる老化現象を抑制し、寿命の延長に貢献するという知見は、古くから知られている。生体の調節因子として機能する栄養条件(質、量及び摂食パターン)が、加齢を制御する因子ともなることは充分考えられるものの、加齢と栄養条件との関連性を体系的に追究した実験・研究は散見するにすぎない。演者らは、生体内の細胞再生系組織に属する小腸上皮細胞を加齢する系として選定した。そして、個体の寿命延長をもたらすことが認められている制限食が、この系で個体の場合と同様に延命効果があるか否かを確認するとともに、それが、どのような機構に基づくものかを明らかにしようとした。さらに、上皮細胞としての機能を発現してゆく加齢過程が、制限状態では如何に制御されているかを明らかにすることを目的とした。

### 1 小腸上皮細胞の寿命と制限食の影響

ddY系マウス、二カ月令の雄を実験に供した。20%カゼインを含む合成飼料を用い、午前9時から午後3時までの6時間給餌を行なった。非制限食群には、この時間内に採食を自由に行なわせ、制限群には非制限群の60%量をこの時間内に与えた。マウス空腸のマイクロオートラジオグラフィを行ない、成熟追跡法で空腸上皮細胞の寿命を求めた。その結果、制限群では、非制限群に比較して、約20%、寿命が延長していた。さらに、これは、絨毛の長さ依存したものではなく、移行速度すなわち単位時間当りに陰窩から絨毛にかけて移動する細胞数の減少に起因したものであることがわかった。(Table 1)

### 2 陰窩における分裂活性

十二指腸、空腸、回腸とも、陰窩細胞数には顕著な差は認められなかった。しかし、コルヒチンを用いて測定した分裂活性では、制限群、非制限群間に有意差が認められた(Table 2)。

### 3 陰窩における分裂細胞周期と増殖細胞プールサイズ

十二指腸、空腸、回腸陰窩の分裂細胞について、FLM curveを描き、half-height法で細胞周期の各期の長さを求めた。一方、<sup>3</sup>H-thymidine投与後1時間での標識指数(LI)を求めた。制限群の十二指腸、空腸ではG<sub>1</sub>期が若干延長してT<sub>c</sub>が延長していたが、回腸では全くその傾向が認められなかった。LIは、いずれの部位でも制限群で低下しており、増殖プールサイズの縮小が示唆された。(Table 3)

以上の結果より、制限状態では増殖細胞プールサイズが縮小し、部位によってはさらに細胞周期の延長が若干生じており、そのことがひいては絨毛上の移行時間の延長をもたらすものであると結論された。

#### 4 小腸上皮細胞機能の成熟とそれに及ぼす制限食の影響

このような動態を示す場合に、上皮細胞の成熟過程がどのような影響を受けるものかを知るために、成熟した小腸上皮細胞の指標酵素である maltase, leucyl-naphthylamidase 活性を測定した。その結果、maltase は、制限、非制限とも、絨毛の中間から先端寄りに活性のピークがあり、LNA は、非制限群では絨毛の中間付近に活性のピークがあるが、制限群では先端部が最も高くなることが明らかになった。両酵素とも、制限群において、絨毛の全過程で活性が非制限群より高い傾向にあった。(Fig. 1)

これらの結果より、制限状態下で上皮細胞の移行時間が延長し、細胞がより長く絨毛上にとどまっているときには、同時に、それらの細胞の成熟度が非制限のものより進んでいると考えられた。

Table 1 Kinetics of cellular renewal in the jejunum of mice fed unrestricted or restricted diet.

Parameter	Villus height (cell no.)	Transit time Crypt (hr)	Villus (hr)	Life span	Migrating speed (cell no./hr)
Unrestricted	71.5	8.5	49.2	57.7	1.45
Restricted	66.6*	10.2	64.2	74.4	1.03

The value of villus height is the mean of 50 villi.

\* Significantly different from unrestricted group at  $p < 0.01$ .

Table 2 Parameters of mitotic activity in unrestricted and restricted mice.

	Duodenum	Jejunum	Ileum
	Villus Size		
UR	94.4±9.0	79.8±11.1	40.8±5.6
R	87.7±9.9	81.1±10.2	34.0±4.6
	Crypt Size		
UR	39.7±8.4	30.5±4.9	33.1±7.4
R	31.1±3.9	29.0±4.4	27.2±3.9
	Mitotic Number		
UR	13.1±4.3	9.3±2.5	8.7±3.9
R	2.6±2.4*	3.0±1.7*	2.4±1.8*
	Mitotic Activity(%)		
UR	34.5±8.1	29.8±7.4	26.1±8.9
R	8.3±6.9*	10.5±5.7*	8.7±6.3*

The villus size and crypt size are mean±S.D. of the cell number for 30-80 villi and crypts.

\* Significantly different from unrestricted group at  $p < 0.001$ .

Table 3 Summary of cell cycle parameters and labeling index of unrestricted and restricted mice.

	$T_C$	$T_S$	$T_{G2+T_M}$ (hours)	$T_{G1}$	Initial labeling index(%)	
Duodenum	UR	14.0	8.6	2.4	3.0	50.5
	R	15.0	8.6	2.2	4.2	36.7
Jejunum	UR	15.2	8.0	3.2	4.0	45.6
	R	16.6	8.4	2.8	5.4	38.5
Ileum	UR	17.4	8.8	3.6	5.0	44.2
	R	17.4	9.2	3.0	5.2	28.1

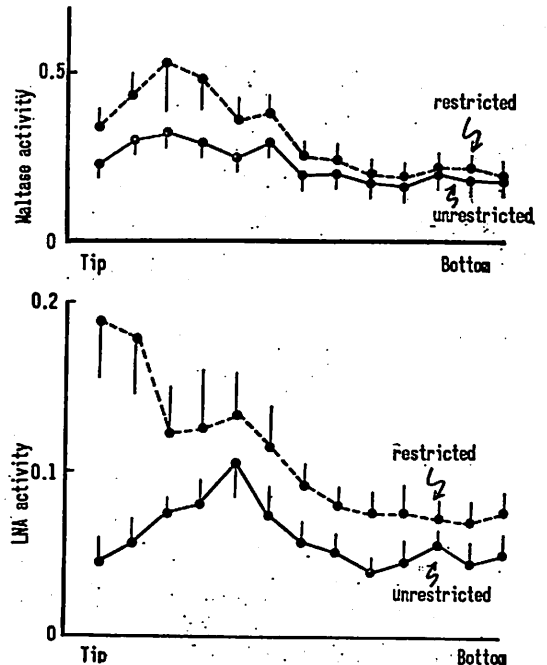


Fig.1 Distribution of enzyme activities from the crypt to the villus of the jejunum. LNA activity=μmoles product/mg protein/min. Maltase activity=μmoles disaccharide hydrolyzed/mg protein/min. Each point is the mean value ± S.E. of eight animals.

ネマトーダの胚発生における放射線照射と寿命

石井直明, 鈴木肇之 (東海大学医学部分子生物学教室)

EFFECT OF IRRADIATION IN EMBRYOGENESIS ON THE LIFE SPAN OF NEMATODES.

Naoaki ISHII, Kenshi SUZUKI (Department of molecular biology, School of Medicine, Tokai University)

X線照射した線虫 (*Rhabditidae tokai*) の卵は線量に依存して卵孵化率が低下し、70kradsで50%に減少した。照射卵の集団中で卵孵化した幼虫を調べたところ線量に依存して寿命が著しく減少した。これは卵孵化後も何らかの形で放射線の影響が残っているからと考えられる。

*Rabbitidae tokai* の卵は産卵後30°Cで約15時間後に卵孵化する。そこで各発生、分化の段階での放射線感受性を調べるために産卵から卵孵化までのいろいろな時間に紫外線を照射した。その結果産卵後5時間目の卵が一番感受性が高く、卵孵化率が最も低下した。またこの時未卵孵化の卵の集団中に多くの形態異常が見られた。

現在 *Caenorhabditis elegans* をエチルメタンスルホン酸で処理し、短寿命の突然変異体を分離し解析中である。

マウスの各種腫瘍および退行性疾患の年齢分布と放射線照射によるその早期移行

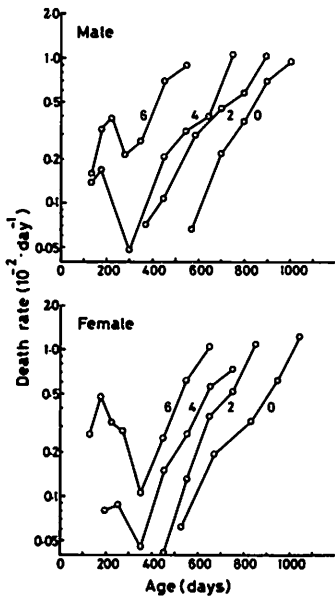
佐々木俊作(放射線医学総合研究所障害基礎研究部), 春日孟(東京医科歯科大学病理学教室), 佐藤文昭(放射線医学総合研究所障害基礎研究部)

ACCELERATED DEVELOPMENT OF NEOPLASTIC AND DEGENERATIVE DISEASES AFTER RADIATION EXPOSURE  
IN MICE

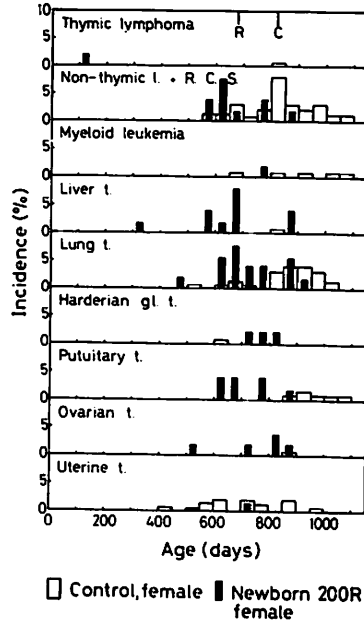
Shunsaku SASAKI (Division of Radiation Hazards, National Institute of Radiological Sciences),  
Tsutomu KASUGA (Department of Pathology, Tokyo Medical and Dental University),  
Fumiaki SATO (Division of Radiation Hazards, National Institute of Radiological Sciences)

放射線による寿命短縮は腫瘍性ならびに退行性疾患の発生率増加と早期発生によることが知られている。放射線による腫瘍発生は長い潜伏期を伴うものが多いので、その発症には細胞内、細胞間、体液性の制御機構の加齢による変化が関与している可能性が大きい。この点を検討するための基礎データとして、長寿命のマウスであるB6WF<sub>1</sub>の新生期または5週間令のX線照射後の疾病スペクトラムの変化について述べる。右ページの図は新生期照射群において得られた結果である。

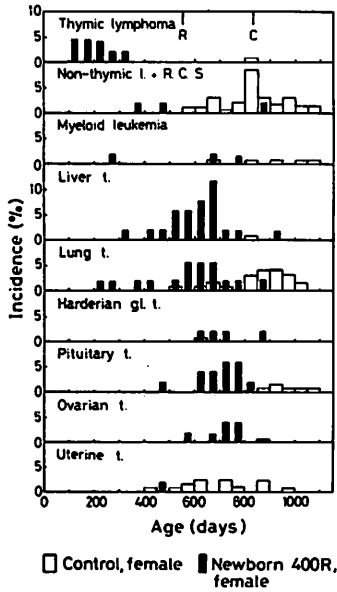
[1] 寿命短縮：平均寿命は線量に比例して短縮した。しかし年齢別死亡率曲線は単純に平行移動するのではない(Fig.1)。[2] 腫瘍発生スペクトラム(Fig.2,3,4)：対照群ならびに照射群において高率(70~98%)に腫瘍の発生が認められ、そのスペクトラムが線量と照射時年齢によって変化した。照射群において最も早く発生したのは胸腺性リンパ腫であり、発生時期は線量に依存せず一定であった。細網肉腫の年齢別発生率は照射により変化せず、累積発生率は寿命短縮のために減少した。この他の多くの腫瘍では線量に依存しての早期移行が起り、腫瘍のタイプにより早期移行率が異なっていた。[3] 退行性疾患：高線量群では死因ともなり得る程度の腎糸球体硬化が認められた。程度の差はあっても、照射を受けた全個体に腎糸球体の構造変化が起っていた。



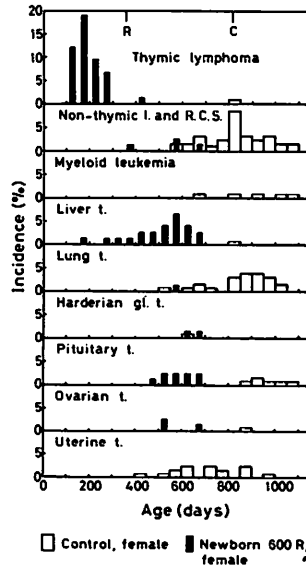
( Fig. 1 )



( Fig. 2 )



( Fig. 3 )



( Fig. 4 )

## 蛋白質代謝異常変異種カイコガ成虫の寿命

小山内 実 (東京都老人総合研究所生物学部)

Protein metabolism-depending life span in the several mutants of silkmoth,  
Bombyx mori

Minoru OSANAI (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of  
Gerontology)

閉鎖系動物に属するカイコガ成虫は、限定された寿命との関連で、各種の物質代謝、特に含窒素有機化合物の代謝の解析に好適の材料といえる。この昆虫では、生命活動とその維持に欠くべからざる蛋白質合成と異化作用の実体を、各種アミノ酸プールの加齢的変動を追求し、解析することによって、ある程度はあくすることができた。羽化以後、老化死亡するまでに、蚕が中の、大多数のフリーのアミノ酸の変動は、3つの時期に区分できる。これらの時期は、個体死亡増大の3つの時期と完全に一致し、蚕がの生涯では、少くとも3つの活発な蛋白質代謝の変化を行う時期のあることが示唆された。これら、アミノ酸及び蛋白質代謝の変化は、当然遺伝子の支配を受けていることが推定され、最大寿命が一定であることと共に、成虫の生命活動が、プログラムによって進行し、寿命が遺伝子によって規定されていることを支持するものであろう。これまで、カイコガでは、様々な遺伝品種が発見、確立されている。今回は、そのうち、幾つかのアミノ酸代謝、並びに蛋白質合成の遺伝的異常変異種をとりあげ、正常種と比較検討して、遺伝子が、蛋白質合成を通じて及ぼす、寿命規定の発現機構解明の一端を得ようとした。

昆虫におけるトリプトファン代謝異常は、トリプトファン系色素-オモクロームを形成するべき過程の酵素を、遺伝的に欠損し、複眼及び卵膜中の色素欠除のため、容易に識別発見される。カイコガでは、第一白卵(W1)と、第二白卵(W2)、第三白卵(W3)、及び赤赤(rb)等が遺伝的変異種として知られている。トリプトファン代謝の遺伝的抑止部位も、第三白卵を除き、既に解明されている。このうち、赤赤は、他の白卵種と異なり、眼色並びに卵色は正常であるが、キヌレニナーゼの欠損により、体液中に3-ヒドロキシキヌレニンの多量の蓄積を惹起する。この変異種の雄の寿命は、正常種との差異が認められないが、雌の寿命は雄の約半分に過ぎない。雌の寿命が雄より短かく、著しいものは半分であるという現象は、蚕がの正常品種でも、幾つかに見出された。3白卵種の寿命値は、いずれも正常蚕と等しいか、或いは、近似の値を示した。第三白卵では、寿命の雌雄差はないが、第一白卵と第二白卵では、雌の方が雄より短命で、殊に後者では顕著であった。一般に、アミノ酸の異常は、余り強く寿命に影響を及ぼさないように思われる。

蚕によって生産される生糸は、フィブロインとセリシンの2種の蛋白質より構成されている。裸蛹(Nd)、セリシン蚕(Nd-S)、及びデオエチルズルホン酸誘導裸蛹(DES-Nd)等は、フィブロイン合成能を欠除したカイコガの遺伝的変異種である。列記した順で、前の異常品種程、絹糸腺が強度に退化し、それに伴って機能も低下し、吐糸不能に陥り易く、まゆ不生産蚕の蛹、すなわち、裸蛹を生ずる発現率が高い。遺伝子座は、NdとNd-Sが、夫々第23と第14の染色体に分布を示すが、DES-Ndのは未詳である。寿命は、DES-Ndでは、ほとんど正常品種との差異を見出せないが、Nd-S、Ndの順で、すなわち、吐糸不能蚕の発現率の高い、フィブロイン合成が強く抑制されている変異品種、より短命となる。Ndの寿命は極めて短かく、他の2変異種の半分に過ぎない。

これら3種のフィブロイン合成不能蚕のうち、一見正常蚕と同じ寿命値を示したDES-Ndを、1. 吐糸不能蚕、2. 薄く、かつ破れ易いまゆを作るもの、3. 厚いが、未だまゆは破れ易い、4. 一層厚いまゆで、破れ難いもの、とまゆの完成度に従って、4つの実験群に形態学的に分類し、その各々の寿命を測定した。第1群の個体は、既に蛹期で大なる死亡率を記録し、羽化後の成虫も極めて短命で、全て5日以内でへい死した。その他のまゆ製作群に属する個体は、略正常品種と同じ寿命値を示したが、第2群は、その他の実験群より、少しく短命であった。雌は雄に比し短命の傾向がみられ、殊に第2群では顕著であった。まゆの完成度が高い群程、長命であることが分る。

更に、これらまゆ製作群のまゆのアミノ酸組成の配分比を、既知のフィブロインとセリシンの標準値、及び正常蚕（大造）のまゆの内外層と、まゆを包む綿状糸の組成配分比と比較した。正常蚕のまゆでは、最もフィブロイン量が少ないと予想された綿状糸ですら、標準フィブロイン類のアミノ酸組成を有することが明らかになり、DES-Nd中で、最もフィブロインに近い成分比を示した第4群と比較しても、確然たる相違のあることが判明した。反対に、実験群の数字が減る程、セリシン度は益益増加する。全蛋白質代謝という観点にたてば、末端に位置するアミノ酸代謝の異常では、蚕の寿命に余り影響が現われないが、蛋白質、そのものの代謝異常の場合には、生命の維持と寿命に、かなりの影響が現われ、異常の強さと短命度とは、よく対応する傾向があるように思われる。

貴重な操蛹の3遺伝変異種と赤赤の蛹を提供されました、鹿林水産畜蚕糸試験場、蒲生卓磨室長、並びに、3白卵変異種の蛹を提供されました、東京都蚕糸指導所、楠野正夫部長に、厚く感謝の意を表します。

高温下飼育における雌蚕がの寿命と、アミノ酸プールの変化

米沢由美子, 小山内実 (東京都老人総合研究所生物学部)

Life span and aging changes in amino acid pools in female silkmoth, *Bombyx mori*  
kept at high temperature

Yumiko Yonezawa and Minoru OSANAI (Department of Biology, Tokyo Metropolitan  
Institute of Gerontology)

一般に生物は、高温では短命となり低温では長命となる。図1は蚕がの寿命曲線であるが、高温になるほど短命になることがわかる。この現象は、高温により代謝速度が高まるためと考えられ、温度による寿命の変化を対数値でプロットすると直線となり、酵素反応速度に及ぼす温度要因の影響を表わしたアレニウスの式と一致することが知られている(図2)。今回は、この寿命の温度効果のメカニズムを詳しく追求するため、蚕がを25℃(適温)と35℃で飼育し、アミノ酸プール値の変動を調べた。

蚕がは羽化後、全く摂食せず、排尿も羽化直後短期間行うのみで、代謝上、不完全閉鎖系と見なしうる。従って、生体及びガ尿、それに雌では卵中のアミノ酸値を併せ調べれば、アミノ酸代謝の動態や最終窒素化合物の解析も出来ると考えられる。ここでは、産卵のため代謝系がより複雑な雌について報告する。

(材料と方法)

材料として蚕原種、大造の雌ガを用い、羽化後25℃(適温)、及び35℃で1匹ずつ分離飼育した。羽化直後より老衰に至る各日齢のガを1%ピクリン酸でホモジナイズし、Dowex-1カラムにかけた後、凍結乾燥し残しをパフューに溶かし2部に分け、1部はそのまま分析試料とした。他の1部は、6N-HClで加水分解し、両者の値を比較検討した。

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JLC-6AH)を使用し、1カラム-2ライン方式を適用した。用いた緩衝液は、それぞれPH 2.73, 3.15, 3.90, 4.55のクエン酸リチウム緩衝液である。

(結果と考察)

閉鎖系昆虫では、アミノ酸は、蛋白質の分解並びに他のアミノ酸からの転換により供給され、蛋白合成に利用される他、異化作用や他のアミノ酸への転換のために消費される。

同定されたニヒドリン陽性物質35のうち、明らかにその存在を確認でき、量的にも多い22の物質を、その供給、利用のダイナミズムから、5つのグループに分類し考えてみたい。

(1)のグループには、Leu, Ileu, Val, Thr, Lys等の必須アミノ酸が含まれる。生体中のこれらフリーのアミノ酸量は、25℃, 35℃とも加齢と共に減少し、かつ、35℃では25℃より明らかに大きな値を示す。これは、高温では蛋白質からの分解が増加するのに、新たな蛋白質への合成が抑えられているためと考えられる。一方、卵は25℃では8日まで、35℃では6日まで産出されており、アミノ酸量は35℃の方が低い。この現象は後述するTauを除いて全てのアミノ酸に共通しており、卵へのとりこみが、高温下では阻害されているためと思われる。又、ガ尿は25℃で6日まで、35℃では3日まで排せつされるが、グループ(1)の必須アミノ酸はほとんど検出されない。

(1') 必須アミノ酸ではないが、Tyr, Alaも同様の傾向を示す。又、Gly, Serも同様であるが、35℃における濃度が非常に高いのが特徴である。

(2) 次にが尿中に比較的多量に検出された異化物としてのHis, MSO (メチオニン・スルホキシド), Tau である。His は, 25 °Cで加齢に伴い一旦減少して増加するが, 35 °Cでは減少傾向にあり, 全体に25 °Cより低い値を示す。一方, MSO は35 °Cの方が高く, Met からの異化作用が昂進していることを示唆する。His, MSO ともが尿中にかなり多量, 排泄されている。しかし, 他のアミノ酸の尿中濃度は極めて低いので, 生理的な腎機能が高温処理で低下したとは考えられない。

体内の Tau は, 加齢と共に25 °C, 35 °Cとも継続的に増加する。この現象は, 後述するNH<sub>3</sub>の加齢的傾向が余り判然としないのに比べ, 明確であり, 昆虫の老化指標の一つと考えてもよいと思われる。又, 35 °Cの方が多量に存在が認められ, Cys からTau 合成系が盛んに働いていることを示している。

(3) 含硫アミノ酸の重要な物質であるMet では, 温度による量的変化がほとんどみられない。他方, Cysta, Lan は, 35 °Cでは減少する。Cys は25 °C, 35 °Cとも全く検出されなかった。高温により, 蛋白質分解によるMet への供給が抑えられる一方, Met からのLan, Cysta への合成経路も抑えられるように思われる。

(4) 最終生産物のNH<sub>3</sub>は, バラツキが大きく加齢による変動は明らかでない。35 °Cでは一旦減少し再び増加するようである。高温下では適温下より常に低いアンモニア濃度を見出したが, これは, 高温により, アミノ酸の異化作用が機能的に低下したためであろう。

(5) 最後に尿素の生成が非常に注目される。25 °Cでは, 体内では検出されず, 辛うじてが尿中のみ見いだされた尿素が, 35 °C下では, 1日目より生体内に急激に生成されている。尿素サイクル中で尿素合成の基質となるアルギニンは, 35 °Cで増加が認められ, 基質としての供給量が高まったためと一応解釈される。高温により尿素サイクルが活性化した可能性については現在検討中である。蚕の幼虫では, 完全な尿素サイクルの存在は否定されており, アルギナーゼの活性もほとんど確認されていない。

高温下における動物の寿命短縮については, これまでは, 高温により代謝率が高められたためであると, 比較的単純に考えられていた。蚕ガの場合も, 一応この考えが適合すると思われたが, 精しく解析すれば, 代謝率のみではなくて, かなり本質的な質的变化が高温によって生じ, その結果, 寿命が短命化することが明らかになった。個々のアミノ酸プールの加齢的变化が, 25 °Cと35 °C飼育の雌蚕がでこのようになり相違することは, 例えば, 或る酵素は高温により, その働きが活発になるのに, 別の或る酵素は温度に敏感で, 高温下では容易に変性して活性を低下せしめ, これらの総合的帰結として, 体内代謝系のバランスが崩れ, 個体寿命の短命化を惹き起こすものであろう。

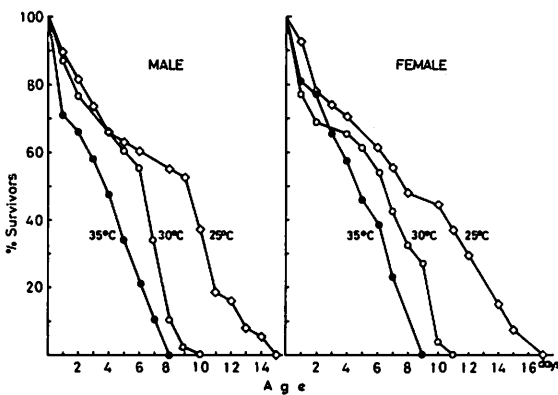


図1. 高温下における蚕の生存曲線

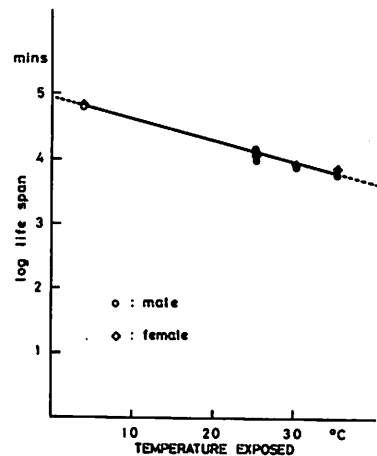


図2. 温度と蚕が寿命の関係

ヒト水晶体タンパク質における  $\text{Ca}^{2+}$  による凝集反応の加齢変化

佐藤 健士 (東京理科大学理工学部応用生物科学科) 山下 俊保 (東京理科大学理工学部物理学科)

CHANGES WITH AGE IN CALCIUM-INDUCED AGGREGATION OF HUMAN LENS PROTEIN

Kenshi SATOH (Department of Applied Biological Science, Faculty of Science & Technology, Science University of Tokyo) and Shumpo YAMASHITA (Department of Physics, Faculty of Science & Technology, Science University of Tokyo)

Relative rate of the calcium-induced aggregation of the urea-deaggregated water insoluble protein derived from human lens at different age was investigated by a simple light scattering method.

It is revealed that in the same age group the lens protein isolated from the central portion of the lens is much more active in the aggregation as compared to the protein from the cortex, the activity of which is scarcely ever, and that the aggregation rate increases with age, especially after age of 60s, the increment is remarkable.

The observations suggest the possibility that the isolated lens protein becomes labile to the calcium-induced aggregation during aging of human lens, in which the structural protein continues to accumulate throughout life.

## 培養細胞の老化と硫酸

福井成行、吉田博明、山科郁男

(京都大学薬学部生物化学教室)

## AGEING OF CULTURED FIBROBLASTS - EFFECT OF SULFATE

Shigeyuki FUKUI, Hiroaki YOSHIDA, Ikuo YAMASHINA (Department of Biological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University)

Patients with a genetic disease called Lowe's syndrome have some characteristics of the aged. They excrete undersulfated chondroitin sulfate in urine and the cultured fibroblasts have a larger size than those from normal control (1).

Mucopolysaccharide biosynthesis in fibroblasts was investigated by determining the incorporation of  $^3\text{H}$ -glucosamine and  $^{35}\text{S}$ -sulfate. Sulfate incorporation into chondroitin sulfate was much depressed in Lowe's fibroblasts compared to that in normal fibroblasts suggesting that a mechanism working in sulfation of chondroitin sulfate is primarily impaired in Lowe's fibroblasts.

We have studied the molecular mechanism of the undersulfation of chondroitin sulfate using the homogenates of the cultured fibroblasts and found that the undersulfation is a result of the decreased level of intracellular concentration of an active sulfate (3'-phosphoadenosine-5'-phosphosulfate, PAPS) which is caused by an elevation of its enzymatic degradation (2). Subsequent studies to characterize the PAPS-degrading enzyme led us to discover that there are two different enzymes degrading PAPS of which one has higher activity towards PAPS than towards APS (adenosine-5'-phosphosulfate) and the other has much higher activity towards APS than towards PAPS. These two enzymes differ in tissue and subcellular distributions (3). These two enzymes were tentatively designated PAPSase and APSase, respectively. To see if there is any age-dependence in intracellular level of the active sulfates, PAPS and APS, we followed the changes of the activities of these active sulfate-degrading enzymes as a function of cellular ageing. It was found that the specific activity of PAPSase increased after serial passage of the fibroblasts whereas that of APSase decreased. The procedures used to obtain these results are summarized as follows.

Normal and Lowe's fibroblasts had a similar doubling time, but differed in some respects. Lowe's fibroblasts had a lower saturation density and a larger cell volume ( $5.52 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and  $6.19 \times 10^3$   $\mu\text{m}^3$ /cell, respectively) than normal fibroblasts ( $7.84 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> and  $3.82 \times 10^3$   $\mu\text{m}^3$ /cell, respectively), determined at the passage of 5.

PAPSase and APSase activities were assayed by determining the released inorganic sulfate after the incubation of the cell homogenates with the <sup>35</sup>S-labeled substrates.

Lowe's fibroblasts had about 10-fold and 2-fold higher specific activities (activity per protein) of PAPSase and APSase, respectively, than normal fibroblasts. The PAPSase activity increased about 20 % in Lowe's fibroblasts as the cell passage proceeded from 11 to 16. A similar increase was also found for normal cells during the same period.

In contrast, the APSase activity decreased in both Lowe's and normal fibroblasts. During the same period as above, the activity in Lowe's cells decreased from 16 to 12 mU/mg protein and that in normal cells from 6 to only a marginal level.

Elevation of PAPSase activity in Lowe's fibroblasts seems to be correlated with the degree of sulfation of urinary chondroitin sulfate (2). For a patient who excretes more undersulfated chondroitin sulfate in urine, PAPS degradation in fibroblasts were more elevated. Thus, it is tempting to speculate that PAPS degradation resulting in decline of intracellular PAPS level increases as a function of in vitro as well as in vivo ageing. In this connection it may be worth mentioning that undersulfated chondroitin sulfate appears in urine of the aged (4) and activity of enzymatic sulfation of mucopolysaccharide declines as a function of the ageing (5).

Biological significance of APS degradation is at present unknown. It might reflect alteration of cellular membranes since APSase is localized in plasma membranes of cells.

#### [References]

1. Akasaki, M., Fukui, S., Sakano, T., Tanaka, T., Usui, T. and Yamashina, I. (1978) Clin. Chim. Acta 89, 119 - 125
2. Yoshida, H., Fukui, S. and Yamashina, I. in preparation
3. Fukui, S., Yoshida, H. and Yamashina, I. in preparation
4. Ohkawa, S.-I., Hata, R. and Nagai, Y. (1972) J. Biochem. 72, 1495 - 1501
5. Honda, A., Abe, M., Murota, S. and Mori, Y. (1979) J. Biochem. 85, 519 - 529

## ヒト2倍体線維芽細胞の加齢と細胞表面変化

山本 清高、山本 満里、大岡 宏（東京都老人総合研究所生物学部）

## Age-related changes in cell surface of human diploid fibroblasts

Kiyotaka Yamamoto, Mari Yamamoto, Hiroshi Ooka (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

正常2倍体細胞は培養下で、その増殖能力がしだいに低下し、有限の寿命を示すことが知られている。一方、細胞表面は細胞の増殖制御と密接に関係しており、ガン化と細胞表面との関係については既に数多くの議論がなされている。老化と細胞表面の関係についても最近大いに注目されている。我々は、培養細胞の老化過程での細胞表面の変化について、ヒト胎児由来の線維芽細胞（TIG細胞）を用い、細胞電気泳動法により検討した。

TIG細胞は1:4 split ratioで継代し、7日後（ほぼ定常状態）の細胞を実験に使用した。細胞の電気泳動度（EPM）は、円筒型泳動管（杉浦研究所製）を用い測定した。基本的には、EDTAで処理後、得られた遊離細胞をM/15 PBS + 5.4%グルコース（PH 7.3）（ $\mu = 0.167$ ）溶液中で、25°Cの条件下で電気泳動し、その泳動度を算出した。

最初に肺由来の線維芽細胞、TIG-1細胞、を用いて表面荷電変化を調べた。実験に用いられたTIG-1細胞の寿命は67代であったが、上記の条件下では電気泳動後も常に90%以上の生存率を示した。TIG-1細胞は継代数15代で $-1.66 \pm 0.11$  ( $\mu\text{m}/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ )の電気泳動度を示した。その後泳動度は45代までゆっくり減少し、それ以後はすみやかに減少した。各細胞の電気泳動度の分布状態は、15~25代の細胞では、 $-1.60 \sim -1.65$ にピークをもつほぼ正規分布型であった。その後45代までピークの位置はほとんど変わらないが、55代ではピークが $-1.40 \sim -1.45$ に移り、さらに63代の細胞では $-1.25 \sim -1.30$ に移った。TIG-1細胞は集団倍加時間が55代以後急速に遅くなり、一方、cell volume（平均値）が増加する、いわゆるphase IIIに入る。それ故、この細胞表面荷電の変化は細胞の増殖能力と相関しているらしい。

phase IIIの細胞は、大きさが平均値として増加すると同時に、大きさの面でも、また形態的にも多様化してくる。そこで次にcell sizeと電気泳動度の関係を調べた。35代の細胞では、直径約8~29  $\mu$ の大きさの細胞が観察されたが、いずれの大きさの細胞も、その泳動度（平均値）は、集団の電気泳動度（ $-1.53 \pm 0.11$ ）とほぼ同じ値を示し、大きさの違いによ

る相違は観察されなかった。63代の細胞も同様に、各細胞の大きさ(直径 $8 \sim 46 \mu$ )とも集団の平均値( $-1.30 \pm 0.14$ )付近の電気泳動度を示した。このように、各集団の細胞は、細胞の大小にかかわらずほぼ一定の電気泳動度を示し、他方、同じ大きさでも継代数が違えば泳動度が異なることが示された。この結果は、表面荷電で見ると、各集団の細胞は大小にかかわらず、同じ年齢であることを示している。

次に、各酵素処理後の表面荷電の変化より、細胞表面の加齢変化について調べた。若い細胞(15代)の細胞表面にはヒアルロン酸が多く存在するが、加齢とともに減少していた。コンドロイチン硫酸もヒアルロン酸より量的には少ないが、同様に加齢とともに表面から減少していた。細胞表面のシアル酸は15~35代では余り変化せず、45代から65代にかけては減少していた。一方、トリプシン処理後の細胞は継代数にかかわらずほぼ一定の電気泳動度を示した。これらの結果から、細胞の加齢にともなう細胞表面の変化は、トリプシンで分解されずに残っている基本的な細胞膜部分は余り変化せず、トリプシン処理で除かれてしまうようなその外側の cell coat 部分が主に変化しているらしい。

TIG-1細胞と同様なヒト胎児肺由来の線維芽細胞であるTIG-2、TIG-3細胞について、その表面荷電を調べた。TIG-2細胞(最終継代数71代)は全体的にTIG-1細胞より泳動度が低く、23代以後55代まではほとんど同じ値( $-1.42 \sim -1.45$ )を示した。55代以後はTIG-1細胞よりむしろ高い泳動度を示すが、それでもやはり急速に泳動度は低下した。一方、TIG-3細胞(最終継代数83代)は7代( $-1.52$ )から19代( $-1.61$ )まで泳動度は上昇し、19代~31代ではTIG-1細胞とほぼ同じ(若干低い)泳動度を示した。35代以後は、TIG-1細胞では電気泳動度がしだいに低下するのに対し、TIG-3細胞では65代までほとんど変わらず、35代~45代ではTIG-3細胞の泳動度がTIG-1細胞のそれよりむしろ高くなり、55代以後はずっと高い値を示した。しかし、TIG-3細胞も65代以後は他の2つの細胞と同様、急速に泳動度が低下した。このようにTIG-3細胞の表面荷電は継代の初期では上昇し、中期は変わらず、後期に低下するといった特異的な加齢変化を示した。このように同じヒト胎児肺由来の線維芽細胞でありながら、phase IIIに急速に泳動度が低下することを除けば、それぞれ特有の泳動度を示し、しかも加齢にともなう変化の様式も異なることは興味深い。

ヒト胎児肝、および心臓由来の線維芽細胞(それぞれ、TIG-1L、およびTIG-1H)の表面荷電は上記の肺由来線維芽細胞とは全く異なる加齢変化をすることが観察された。すなわち、TIG-1LおよびTIG-1Hとも、その表面荷電は若齢細胞から継代の進行とともに、ほとんど直線的に低下した。

ところが、これらの細胞の細胞密度(実験時の)は、継代の進行にともない、電気泳動度で観察された変化とよく似たパターンを示していた。そこで、電気泳動度と細胞密度の相関性について調べたところ、いずれの細胞ともよく相関しており、さらにこれら5種類の細胞ともほとんど同じ直線上に乗ることが判明した。すなわち、細胞の表面荷電はその細胞の増殖しうる能力を示唆しているらしい。

ヒト2倍体線維芽細胞の加齢に伴う細胞密度の低下におけるヘパラン硫酸の役割

松岡耕二, 三井洋司, 室田誠逸 (東京都老人総合研究所 薬理学部)

INVOLVEMENT OF CELL SURFACE HEPARAN SULFATE IN THE DENSITY-DEPENDENT INHIBITION OF CELL PROLIFERATION IN CULTURED HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS

Kôzi MATUOKA, Youji MITSUI, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

In order to investigate the involvement of cell surface substances in the density-dependent inhibition of cell proliferation, growths of TIG-1 (human diploid fibroblasts derived from embryonic lung) cultured on glutaraldehyde-fixed cell sheets were examined. The cell growth was inhibited about 40% with glutaraldehyde-fixed cell sheets of late passage cells (PDL 52), while perchloric acid-fixed cell sheets did not exhibit the inhibitory effect on the cell growth. The effect of the glutaraldehyde-fixed cell sheets might not be due to artifact or toxicity of glutaraldehyde fixation, since perchloric acid-fixed and then glutaraldehyde-treated cell sheets inhibited the cell growth to a little extent (glutaraldehyde-fixed sheets: -44%, PCA-fixed and glutaraldehyde-treated sheets: -17%).

Experiments on the glutaraldehyde-fixed cell sheets subjected to glycosaminoglycan-degrading treatments revealed that heparan sulfate might play a critical role in the inhibitory effect of the cell sheets on the cell growth (heparitinase-treated sheets: -12%, nitrous acid-treated sheets: -11%). When cells were grown on the sheets of early (PDL 12), middle (PDL 31) or late passage cells (PDL 47), late passage cell sheets exhibited a larger inhibition of the cell growth (-45%) than early and middle passage cell sheets (-16% and -35%, respectively). The inhibitory effect of the glutaraldehyde-fixed cell sheets on the cell growth could be correlated to the heparan sulfate content on the cell sheets, since the later passage cell sheets contained the larger amount of heparan sulfate. The growths of cells with different PDL grown on the same sheets, however, were inhibited to the same extent (PDL 18: -32%, PDL 48: -33%, PDL 59: -39%).

These results might indicate that heparan sulfate (or its complex) on the cell surface is involved in the density-dependent inhibition of cell proliferation and that the progressive decrease in the saturation density of human diploid fibroblasts with PDL is attributed not to an increased susceptibility to the cell contact but to an increase in heparan sulfate content on the cell surface during the in vitro aging.

Acknowledgement: We would like to thank Dr. Ikuo YAMASHINA, Kyoto University for the generous gift of purified heparitinase.

θ-toxin で検出される個体老化に伴う赤血球膜の変化

斉藤恵実、安藤 進、田中康一（東京都老人総合研究所生化学部、中央機器室） 永井克孝（東京大学医科学研究所癌細胞研究部） 長谷純一（富山医科薬科大学薬学部）

CHANGES IN THE SUSCEPTIBILITY OF ERYTHROCYTES TO θ-TOXIN WITH AGING IN INDIVIDUALS

Megumi SAITO, Susumu ANDO, Yasukazu TANAKA (Department of Biochemistry, Instrument Analysis Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology) Yoshitaka NAGAI (Department of Patho-biochemical Cell Research, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo) Junichi HASE (Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Toyama Medical and Pharmaceutical University)

*Cl. perfringens* の産生する θ-toxin (perfringolysin O) は赤血球膜コレステロールに特異的に結合して溶血を引き起す。昨年の本研究会で我々は、マウス赤血球の θ-toxin に対する感受性が個体の加齢に伴って変化することを報告した(1)。そこで赤血球の θ-toxin に対する感受性の変化が膜コレステロール含量とどのように関連しているかを知る目的で以下の実験を行った。

- ①高コレステロール食を投与したラットの赤血球について θ-toxin 感受性の変化を調べた。
- ②前回の報告(1)よりも広い年齢範囲のマウスの赤血球について toxin 感受性をみると共に、赤血球膜のコレステロール含量との関係を検討した。

(方法)長谷らの方法(2)に従って精製した θ-toxin 標品を用いた。ラットは、1%コレステロール及び0.25%コール酸ナトリウムを含む食餌で2週間飼育したものをコレステロール負荷群(8匹)

Table 1. Susceptibility of rat erythrocytes to θ-toxin and cholesterol contents of the membranes

	No. of animals	plasma cholesterol (mg/100 ml plasma)	membrane cholesterol (g/g protein)	HD <sub>50</sub> (HU*)
Control diet	3	48.81 + 9.57**	0.153 + 0.041	1.50 + 0.11
Cholesterol diet	8	104.34 + 12.7	0.188 + 0.053	0.73 + 0.13

\* One hemolytic unit (HU) = θ-toxin preparation required to cause 50% hemolysis of sheep erythrocytes for 30 min. at 37°.

- References: 1. Nagai, Y., Ando, S., Tanaka, Y. and Hase, J. (1979) *Biomed. Geront.*, **3**, 38-39  
 2. Mitsui, K., Mitsui, N. and Hase, J. (1973) *Japan. J. Exp. Med.*, **43**, 377-391  
 3. Ando, S., Kon, K. and Tanaka, Y., in "Control of Membrane Fluidity" (Kates, M. and Kukusis, A. eds.) pp. 43-55, 1980, Humana, N.J.  
 4. 永井健一郎, 佐伯好子, 長谷純一, (1978) 脂質生化学研究, **20**, 201-204

とし、コレステロール及びコール酸ナトリウムを除いた食餌で飼育したものをコントロール群(3匹)とした。マウスはC57BL/6雄の5週令(5匹)、14週令(5匹)、42週令(4匹)、66週令(5匹)、113週令(2匹)の5群を用いた。

$\theta$ -toxinの溶血活性は長谷らの方法(2)を多少変更を加えて行った。各種濃度の $\theta$ -toxinを含む0.5%赤血球浮遊液を37°30分インキュベート

し、得られた溶血率より50%溶血に要する毒素量(HD<sub>50</sub>)を求めた。測定系に最終濃度0.1mg/mlのBSAを加えることにより従来の方法に比べ精度の高い測定が可能となった。毒素量は同一条件で測定した羊赤血球のHD<sub>50</sub>を1溶血単位(HU)として表わした。膜コレステロールは、ラットでは赤血球ゴーストを用いてZak-Henly法にて定量し、マウスではTLC-Densitometryの方法(3)で測定した。

(結果)表1にラットのコレステロール負荷実験の結果を示す。血清コレステロールはコレステロール負荷により、コントロール群に比べて著明な増加を示したが、赤血球膜コレステロールの増加は軽度であった。一方コレステロール負荷群の赤血球のHD<sub>50</sub>はコントロール群の約2分の1であり、明らかに感受性の亢進を示した。

各週令マウスの赤血球のHD<sub>50</sub>値及び膜コレステロール含量を図1に示した。14週令から66週令のマウスの赤血球はほぼ一定の $\theta$ -toxin感受性(HD<sub>50</sub> = 4.64 ~ 4.96 HU)を示したが、最も若い5週令では感受性の低下(HD<sub>50</sub> = 7.31 HU)を、113週令の老化マウスの赤血球は感受性の亢進(HD<sub>50</sub> = 3.17 HU)を示した。一方赤血球膜コレステロール含量は $\theta$ -toxin感受性に対応するような変化を示さなかった。

(考察)従来 $\theta$ -toxinは赤血球膜コレステロールに作用して溶血を起すと言われており、膜コレステロール含量が赤血球の $\theta$ -toxin感受性を決める一つの因子と考えられる。三井らはレンチンリポゾムを用いて赤血球膜コレステロールの引き抜き実験を行い、膜コレステロール含量の減少に伴い赤血球の $\theta$ -toxin感受性が低下することを報告した(4)。我々のコレステロール負荷実験からも膜コレステロールが赤血球のtoxin感受性を決める因子となっている可能性を示している。

一方、個体の加齢に伴いマウス赤血球の $\theta$ -toxin感受性は図1のように明らかな変化を示したが、膜コレステロール含量はそれに対応するような変化を示さなかった。このことは、加齢に伴う $\theta$ -toxin感受性の変化が膜コレステロールの変化よりもむしろ他の膜脂質あるいは膜蛋白質などの変化を反映している可能性を示唆するものと思われる。

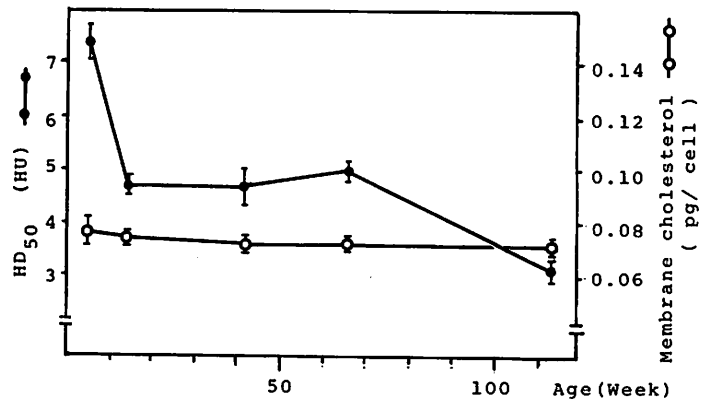


Fig.1. Changes in the susceptibility to  $\theta$ -toxin of mouse erythrocytes and membrane cholesterol contents

Each value represents the mean  $\pm$  S.E.

## 細胞老化と増殖因子

星 宏良, 菅 幹雄 (東北大学抗酸菌病研究所細胞生物部), 源 良樹  
(味の素中央研究所), 山根 績 (東北大学抗酸菌病研究所細胞生物部)

## CELLULAR AGING AND GROWTH FACTORS

Hiroyoshi HOSHI, Mikio KAN (Department of Cell Biology, Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University), Yoshiki MINAMOTO (Central Research Laboratories, Ajinomoto Co., Inc.), Isao YAMANE (Department of Cell Biology, Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University)

細胞老化の機構を知るうえで、血清を添加された培地を用いた場合にはその中に含まれる未知成分の相互作用のため、また血清自身のロットの違いによる継代回数の変化などのため、老化過程の正確な把握が困難を極める。

昨年の本研究会で、①私共の開発した無血清用培地 (RITC78-6) に 0.5% 微量血清添加により充分長期継代が可能なる事、②増殖因子 (EGF) に対する感受性は継代初期には強く、後期になるにつれて急激に鈍感になること、③EGF の増殖促進作用には血清因子が必要であること、を報告した。今回は増殖因子 (EGF, T, Insulin, Transferrin) の反応性が細胞老化のパラメーターになり得るか、又無血清培地培養法により増殖因子と協同して作用する血清因子の同定について報告する。

## &lt;結果と考察&gt;

継代回数の厳密化をはかるため 1:2 分割法に変えて、6 cm シヤレに  $2 \times 10^5$  個の細胞を植え込んで継代回数を算出した。この系を用いると SF (増殖因子添加) 培地に 0.5% 微量血清添加では、対照培地 (BME-10% FBS) に比べて早く分裂が停止した。BME-10% FBS, SF-0.5% FBS, HF (増殖因子無添加) - 10% FBS, SF-10% FBS の 4 種の培地による継代各期の細胞老化過程を細胞飽和密度、細胞倍化時間、細胞容積の分布、平均細胞容積について調べた。細胞飽和密度は、増殖因子添加培地の場合継代初期には高いが、後期では低くなり増殖因子の作用がなくなつた。細胞倍化時間については増殖因子の作用はそれほどみられなかつた。細胞容積の分布を見ると、継代が進むにつれ大きな細胞群の占める割合が増え、分裂終期では著しく平均細胞容積が増加し、

同時に赤血球より小さい微小細胞や細胞破片物も急激に増加した。

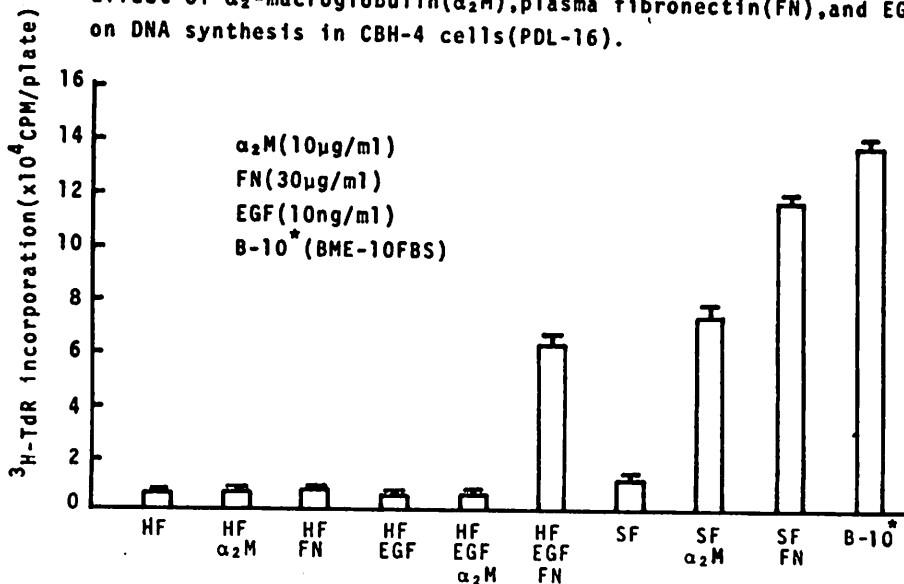
EGFと血清因子が相互に密接に関係していることを昨年の本研究会で報告したが、EGF添加無血清培地にCohnの血清画分 Fraction Iを加えて培養するとDNA合成が著しく促進した。Cohnの血清画分 Fraction Iの主成分はfibrinogen(EGFと反応示さず)であるが他に $\alpha_2$ -macroglobulin( $\alpha_2$ M), fibronectinも含まれていることがわかった。そこでこれら2種の血清タンパク質に対するHF培地, SF培地での細胞増殖及びDNA合成に与える影響を調べた。増殖因子の添加してあるSF培地で、 $\alpha_2$ M, fibronectinに対してDNA合成及び細胞増殖促進作用がみられた。

以上の結果より増殖因子の反応性は細胞老化の各種のパラメーター(細胞飽和密度, 細胞容積分布, 細胞倍化時間)と密接な関連性あることが示唆された。又増殖因子は血清中に比較的少量に含まれる $\alpha_2$ Mやfibronectinと協同作用示すこともわかった。増殖因子の細胞老化による感受性喪失の機構, 増殖因子と協同作用示す $\alpha_2$ M, fibronectinの細胞増殖作用機序の解明が今後に残された課題である。

#### In Vitro lifespan of human embryonic lung fibroblasts supplemented with various media.

culture series	lifespan, population doubling level			
	BME-10FBS	SF-0.5FBS	HF-10FBS	SF-10FBS
CBH-2	52.7	27.2	55.6	56.3
CBH-3	47.3	24.0	50.1	55.4
CBH-4	50.1	25.5	55.7	62.3
mean $\pm$ s.d	50.1 $\pm$ 2.2	25.6 $\pm$ 1.3	53.8 $\pm$ 2.6	58.0 $\pm$ 3.1

Effect of  $\alpha_2$ -macroglobulin( $\alpha_2$ M), plasma fibronectin(FN), and EGF on DNA synthesis in CBH-4 cells(PDL-16).



$G_0$  期は分裂寿命決定に関与しない

血小板由来増殖因子 (PDGF) の作用からの一考察

大野 忠夫 (放射線医学総合研究所薬学研究部)

UNINVOLVEMENT OF  $G_0$  PHASE IN DETERMINING THE REPLICATIVE LIFE  
SPAN ——— A SUGGESTION FROM THE ACTION OF PLATELET-DERIVED  
GROWTH FACTOR (PDGF)

Tadao OHNO (Division of Pharmaceutical Sciences, National Institute  
of Radiological Sciences)

血小板由来増殖因子 (PDGF) は、広汎な哺乳類培養細胞に作用し、最近細胞周期における作用点が明らかにされた増殖因子の一つである。演者はこれまでに、ヒト胎児肺線維芽細胞 IMR-90 の培養系においては、

(1) 分裂寿命は培地中の透析血清濃度によって規定される<sup>1)</sup>

(2) 増殖速度と分裂寿命には相関々係がある<sup>2)</sup>

(3) PDGFはこの細胞の増殖律速因子の一つとして作用している<sup>2)</sup>

ことを報告してきた。しかし、最近、PDGFがこの細胞の増殖速度は促進するが分裂寿命は延長しないという、(2)にそぐわない実験結果を得、標題の如く考察するに至ったので報告する。

方法 IMR-90細胞は、TOM-H培地<sup>1)</sup>に透析ウシ胎児血清(d-FBS)10%を加えて継代培養した。d-FBSから極力PDGF活性を除くため、d-FBSをCM-Sephadexカラムにかけ、吸着しない分画をNC-d-FBSとして対照実験に用いた。PDGFはヒト血小板より熱水抽出し、CM-Sephadexカラムの段階まで部分精製した標品を、毎継代翌日、培地に添加した。一処理群につき、独立した2系統の継代培養を行い、結果は平均した。

結果 d-FBSより塩基性蛋白を除去したNC-d-FBS10%濃度下で培養された細胞は、24%の増殖速度の減少を示した(図1)。しかしながら、分裂寿命の減少は9%にすぎなかった。PDGFを添加すると、増殖速度の減少分は補償されたものの、分裂寿命は全く回復せず、NC-d-FBS群に比べ3週間早く分裂を停止した。同様の傾向は10%d-FBSにPDGFを添加した群でも見られた。

考察 最近明らかにされたPDGFの細胞周期における作用は、

(i)  $G_0$ 期にある細胞を $G_0$ 期から引き出し、DNA合成に対してcompetentな状態とする<sup>3)</sup>

(ii) 分裂直後の細胞が $G_0$ 期に入りこむの防止する<sup>4)</sup>

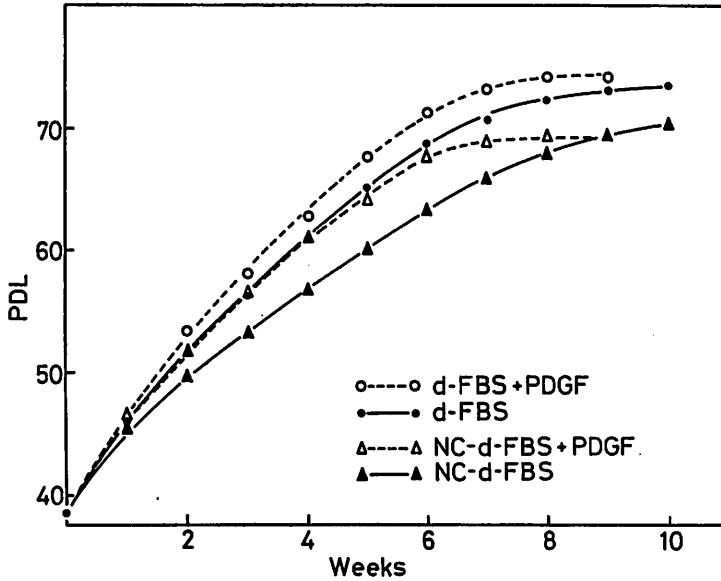


図1. IMR-90細胞の増殖速度と分裂寿命に対するPDGFの効果

の2点である。従って、PDGFの存在下では、細胞は $G_0$ 期に入って休息することを許されない。図1でも、IMR-90細胞は、PDGFによって $G_0$ 期に存続し難い状態におかれたために、細胞周期の回転を続け、増殖速度が増加したものと解釈される。しかしながら、それでもなお、分裂寿命に影響を与え得なかったことは、 $G_0$ 期は細胞の分裂寿命決定機構に関与しないことを示唆している。

正常細胞の増殖の調節機構には、 $G_0$ 期への出入りを制御する機構の他に、 $G_1$ 期からS期に至る transition probability の変化による制御機構が考えられるが、分裂齢の進んだ正常線維芽細胞の世代時間が長くなるのは、細胞が $G_0$ 期に入りこんで出てこないというよりも、 $G_1$ 期のどこかで停滞しているためであろうと思われる。

#### References

1. Ohno, T.: Mech. Age. Dev. 11, 179-183, 1979.
2. Ohno, T.: Biomedical Gerontol. 3, 44-45, 1979.
3. Pledger, W. J., Stiles, C. D., Antoniades, H. N. & Scher, C. D.: Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 4481-4486, 1977.
4. Scher, C. D., Stone, M. E. & Stiles, C. D.: Nature 281, 390-392, 1979.

近藤 晃 (東京都老人総合研究所生物学部), 井出 宏之 (東北大学理学部生物学教室)

LONG-TERM CULTIVATION OF AMPHIBIAN MELANOPHORES — IN VITRO AGING AND SPONTANEOUS TRANSFORMATION

Hiroshi Kondo (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology),

Hiroyuki Ide (Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University)

ヒト肺繊維芽細胞は、有限な分裂寿命をもつことから、細胞老化のモデルとして提案され、多くの研究がなされた。他方、分化形質を明確に保持した細胞で、細胞老化のモデル系を開発することが必要とおもわれた。分離し、培養したウシガエル黒色素胞は、メラニンカ粒をもち、加えて、黒色素胞刺激ホルモン (MSH) 投与により誘起されるメラニン拡散能力を保持しつつ増殖するので、この系が細胞老化のモデル系になりうるかどうかを検討した。又、変温寄つ動物の細胞をもちいた細胞老化の研究例が少ないことから、カエル色素胞が細胞老化のモデル系になりうるかどうかの興味からこの研究がなされた。

(材料と方法)

黒色素胞は、ウシガエル幼生 (*Rana catesbeiana*) の尾皮膚から、トリプシン処理後 Picoll の濃度勾配遠心法をもちいて、分離された。分離された細胞は、ニワトリ胚網膜細胞を培養してえた conditioned medium (L15medium + 10% FBS) に最終濃度が 20% になるように FBS を添加し両生類用に希釈した増殖液を用いて、フールコンの培養シャーレで、25℃、空気中で培養された。初代培養で、約  $10^3$  -  $10^4$  細胞からなる数十個の黒色素胞のクローンが、トリプシン処理で集められ、増殖液で分散され、細胞がシャーレにプレートされた。その際、その一部分から血球計算盤により細胞数が測定され、集団増加数 (PD) が計算された。その後、シャーレにいっぱいになった細胞は、split ratio 1:2 又は 1:4 で継代培養された。初代培養をおこなうごとに、その細胞で使用する conditioned medium を大量に調整し、凍結して使用した。

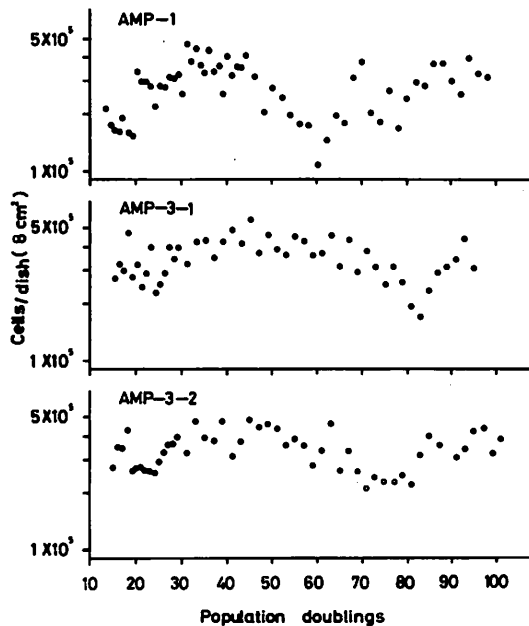
(結果と考察)

ウシガエル黒色素胞は、長期継代培養することにより、培養シャーレあたりの細胞数が除々に低下し、それに伴ない細胞の大きさの増加が観察された。AMP-1 では (図参照)、細胞増殖が大変おそくなった後 (PD 60)、再び速く増殖する細胞が観察された。この現象は、増殖停止がおきる時期とその程度に差こそあれ、AMP-3 でも、同様に観察された (図参照)。又、途中から新しく調製した conditioned medium を使用しても、non-conditioned medium を使用しても、増殖停止とその後の回復が観察された。継代によるこの増殖の変化は、単一細胞 (クローン) の増殖を調べた実験からも明らかにされた。継代初期の細胞 (PD 10) では、培養シャーレに付着した細胞の大部分は盛んに増殖するが、さらに継代培養された細胞 (PD 26) では、盛んに増殖する細胞が少なくなり、ゆっくり増殖する細胞と増殖しない細胞からなっていることが観察された。PD 56 では、盛んに増殖する細胞は観察されず、ゆっくり増殖する細胞と増殖できない細胞からなっていることが観察された。しかし、PD 70 では、盛んに増殖する細胞の割合が、再び増加した。細胞容積の測定より、盛んに増殖する継代初期の細胞集団 (PD 18-31) は、平均細胞容積が小さく、増殖停止がみられた時期の細胞集団 (PD 60) では、平均細胞容積が大きいたことが観察された。増殖停止後、増殖が回復した細胞集団 (PD 82) では、再び小

さな平均細胞容積をもつことがみられた。これらの観察は、カエル黒色素細胞は継代培養することにより、phase III 弱象（老化現象）が観察されることを示した。しかし、その後細胞は死なずに自然形質転換をし、無限の寿命をもつようになるらしい。染色体分析の結果より、AMP- 1の場合において、増殖の回復した集団の染色体は、 $2n=30$ で変化しているが、AMP- 3- 1の場合には、染色体は $2n=26$ （正常）で、変化がみられないことが観察された。

メラニンカ粒は、初代培養とともに、継代が進んだ大型細胞にも観察された。また、形質転換した細胞でも、メラニンカ粒は観察された。継代初期の細胞も、継代が進んだ細胞でも、MSH の投与によるメラニンカ粒の拡散速度には、変化がないことが観察された。しかし、継代を重ねた細胞では、メラニンカ粒が拡散したままになる細胞が増すことが観察された。今後は、継代に伴うメラニンカ粒の質的、量的変化について検討する予定である。

ウシガエル黒色素細胞の継代にともなう細胞濃度の変化



ヒト線維芽細胞で作製された Feeder layer のヒト腫瘍細胞のコロニー形成率におよぼす効果  
 —細胞株種の相違とその加齢の影響—

難波 正徳

川崎医科大学, 病理

Effects of feeder layers prepared from human diploid fibroblasts on plating efficiency of transformed human cells.

Masayoshi Namba Department of Pathology  
 Kawasaki Medical School, Kurashiki 701-01, Japan

3000 ラドのコバルト 60 ガンマー線を照射したヒト 2 倍体線維芽細胞を単層培養にして、これを Feeder layer とした。そして、この Feeder layer のヒト細胞のコロニー形成率 (PE) に対する効果を検討した。

〔実験方法〕

1. 培地：ダルベッコウ変法イーグル培地 + 10% 牛血清 + 100  $\mu$ g/ml カナマイシン
2. 細胞：Feeder layer 作製用の細胞として、ヒト胎児肺由来の線維芽細胞 (WI-38, IMR-90) と成人由来皮膚線維芽細胞とを用いた。皮膚由来細胞は、正常人由来のものと癌好発系遺伝病患者由来の細胞とを用いた。PE をみるための細胞としては、次の 2 種類の細胞を用いた。1) コバルト 60 ガンマー線で培養内で悪性化した WI-38 (WI-38, CT-1), 2) ヒト胃癌培養細胞株 (HGC)
3. コロニー形成法：F75 内で confluent になった時期の細胞を 3000 ラド照射した後、トリプシンで細胞を浮遊させ、55 mm のシャーレにまき Feeder layer を作った。24 時間後、100 ~ 500 個程度の WI-38 CT-1 か HGC 細胞を Feeder 上にまき 2 週間培養し、固定、ギムザ染色し、50 個以上の細胞をもつコロニーを実体顕微鏡で数えた。培地の更新は、1 週間目に 1 度行った。PE は、1 枚のシャーレに生じた平均コロニー数 (普通 3 枚のシャーレを使用) / 1 枚のシャーレへのまき込み細胞数  $\times$  100 で計算した。

〔結果〕

1. PE は Feeder 細胞数に依存した。細胞数が多くても少くても PE は低下した。至適細胞数は 2000 ~ 10000 /  $\text{cm}^2$  であった。

2. 皮膚由来線維芽細胞のほうが肺由来線維芽細胞より高い PE を示した。
3. Feeder細胞の PE におよぼす効果は、その細胞の加齢に無関係であった。
4. 正常人と癌好発系遺伝病患者とに由来する皮膚線維芽細胞とでは PE に差がなかった。すなわち、好発癌系のヒトに由来する線維芽細胞が特にがん細胞の PE を高めることはなかった。
5. WI-38 CT-1 細胞のコロニー形態は、WI-38 と IMR-90 上に生じたものと、皮膚線維芽細胞とでは異なっていた。肺線維芽細胞上では円形の皮膚線維芽細胞上では星状のコロニー形態を示す傾向があった。
6. CT-1 に対する Feeder 効果はヒト細胞を Feeder として使用する場合がもっともよく、マウス由来の 3T3, 10T1/2, あるいは胎児 2 倍体線維芽細胞やハムスター胎児性 2 倍体線維芽細胞などではあまり高い PE は得られなかった。HGC の場合は、ハムスター細胞がもっとも PE がよく、ヒトとマウスとでは PE は同程度であった。しかし、動物細胞を Feeder とした場合、コロニーの大きさが小さかった。

低濃度血清による培養ヒト2倍体細胞の障害  
—継代数にともなう変化

本田修二，松尾光芳（東京都老人総合研）

A reduction in the ability to survive  
in a limited serum concentration  
in "senescent" human diploid cells

Shuji Honda and Mitsuyoshi Matsuo  
(Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

〈序論〉

老化にともなって脾や肝の実質細胞や神経細胞などの細胞数が減少することはよく知られている。老化と細胞死との関連については，老化による細胞死の原因，また生体内で繰り返された細胞分裂の回数と細胞死の起こりやすさとの関係などの未解決の問題が残されている。細胞の生存を保障する外部因子と細胞との相互作用が老化にともなってどのように変化するかを研究することは興味あることである。培養マウス3T3細胞では血清中の“生存因子”によって細胞が死から免れていることが知られている。そこでヒト2倍体細胞を用いて，無血清，または低血清濃度の培地で培養を行なったときの細胞死を調べ，その起こりやすさが培養における老化にともなってどのように変化するかを研究した。培養系における細胞加齢と細胞死の関係を調べるのが今回の実験の目的である。

〈材料と方法〉

ヒト胎児肺由来線維芽細胞（WI-38）を用いた。培養液はEagle基礎培地，血清は牛胎児血清を用いた。

〈結果〉

$5 \times 10^4$ （または  $4 \times 10^4$ ）細胞を3.5cm径のプラスチックシャーレ（Lux）に播種し3日間10%血清培地で培養，その後無血清培地に変えて培養し，経時的に細胞数を測定した。総集団倍加数（PDs）が35では細胞数の減少は7日間ほとんど観察されなかった（Fig. 1）。45 PDsでは細胞数の減少がみられ（Fig. 2），52 PDs（最終のPDsは53）では細胞数の著しい低下がみられた（Fig. 3）。この細胞数の減少は血清濃度（0～0.25%）に依存し，播種後無血清培地に変えるまでの日数（1～8日）にはよらなかった。

無血清培地中で1～7日培養し，再び10%血清培地に戻したところ35 PDsでは，10%血清培地で培養したものとほぼ同様の細胞飽和密度まで増殖した。また52 PDsでは10%

血清培地に戻した後、高い増殖率を示した。いずれの場合も無血清培地での培養中に、シャーレ表面からはがれなかった細胞には、障害が残されなかった。

《考察》

細胞分裂回数（集団）の多い“老”細胞は“若”い細胞よりも、無血清あるいは低血清濃度の培地において障害を受けやすく、細胞の生存にとって血清中の“生存因子”を必要とすることが示唆された。

cell number / dish

Fig. 1

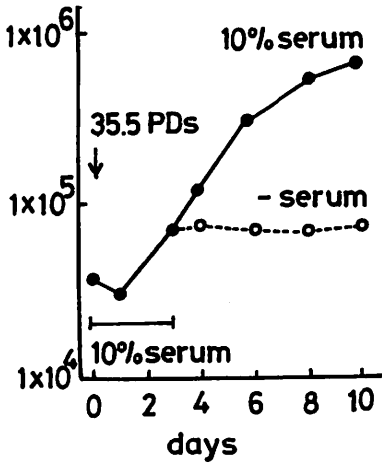


Fig. 2

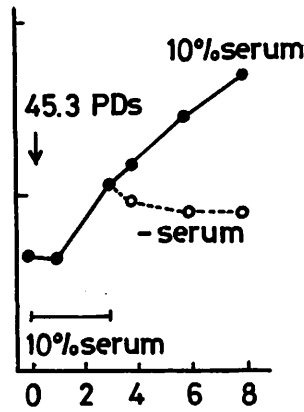
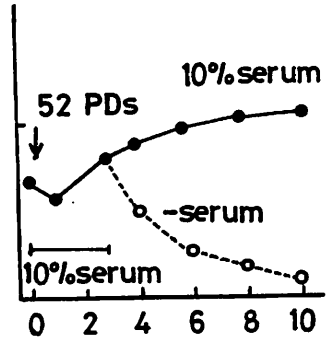


Fig. 3



## 低濃度播種法により継代培養されたヒト二倍体細胞の寿命

松尾光芳, 加治和彦 (東京都老人総合研究所)

## THE LOW-DENSITY INOCULATION METHOD OF THE SERIAL SUBCULTIVATION OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS: AN EFFICIENT MODEL SYSTEM FOR THE STUDY OF CELLULAR AGING

Mitsuyoshi MATSUO, Kazuhiko KAJI (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

細胞老化のモデル系として繁用されているヒト二倍体細胞は、通常分割比 1:2 で 3 ~ 4 日毎、または分割比 1:4 で毎週継代する方法によって培養されている。しかし、これらの方法では、細胞系の寿命終了を見届けるまでに 6 ヶ月以上培養を続けねばならない。ヒト二倍体細胞の培養寿命は培養時間によらず総細胞集団倍加数に依存していることがわかっているので、総細胞集団倍加数を変えることなく培養時間を短縮できる条件を設定できれば、研究能率および経済性の両面で有益であろう。我々は、細胞播種濃度を約  $10^3$  細胞/cm<sup>2</sup> の水準にして毎週継代することにより、継代時以外には細胞を対数増殖期の状態に維持できることを見出した。その結果、約 3 ヶ月で寿命を終了する細胞系を得た。

〔方法〕ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-1 を、37°C、5% 炭酸ガス・95% 空気雰囲気下、10% ウシ胎児血清、ペニシリン、ストレプトマイシン添加イーグル基礎培地 4 ml を入れた 50 mm<sup>2</sup> フェルコン培養皿中で培養した。継代は、特別な場合を除き 0.25% トリプシン、15 分間処理により毎週行われた。実験には、細胞集団倍加数 4 または 11 の細胞を用いた。継代時の播種濃度は、分割比 1:4、および  $5 \times 10^2$ 、 $1 \times 10^3$ 、 $5 \times 10^3$  細胞/cm<sup>2</sup> である。継代時に生ずる死細胞の比率を調べるために、細胞播種後一定時間放置した時点で培地を捨て、基底面に接着している細胞をリン酸緩衝液で洗浄した後トリプシン処理して、接着細胞数を計数した。

〔結果および考察〕表 1 に示すように、低細胞濃度で播種された細胞は急速に成長し、標準的な分割比 1:4 (以下標準法という) によって播種されたものよりはるかに短時間で寿命を終る。播種濃度  $5 \times 10^2$  細胞/cm<sup>2</sup> で継代された細胞の総培養時間は、標準法によるその約 1/3 であった。この場合、総細胞集団倍加数に 10~20% の増加が見られたことは興味深い。しかし、低濃度播種法 ( $1 \times 10^3$  細胞/cm<sup>2</sup>) によって継代された細胞の対数増殖期における増殖速度は、標準法による場合 (細胞集団倍加数 18~58 の範囲において 20~25 時間) と同一であった。細胞倍加時間は、細胞集団倍加数 10~50 まではほぼ一定であり、50 以後急激に延長される (図 1)。低濃度播種法によ

って培養された若細胞の倍加率は、7~9倍加/週(5×10<sup>2</sup>細胞/cm<sup>2</sup>), 6~8(1×10<sup>3</sup>)および5~6(5×10<sup>3</sup>)であった。形態や増殖能に関して、低濃度播種法によって培養された細胞と標準法によって培養された細胞との間に相違は認められなかった。低濃度播種法を用いると、標準法に比較してトリプシン処理の回数が減少する。したがって、細胞の寿命に対するトリプシンの影響を調べる必要がある。播種濃度1×10<sup>3</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で2週間毎に継代する系Aと、同一条件下継代後1週間目に分割せずに行うトリプシン処理を加えた系B(後者のトリプシン処理回数が、前者のそれのほぼ二倍になる)とを作り、寿命を比較したが両者の間に有意の差は認められなかった(表2)。トリプシン処理は細胞の寿命にほとんど影響を与えないと考えられる。一般に継代時に細胞死が起ることが知られている。細胞の損失は当然細胞集団倍加数の減少につながるの、継代時の死細胞の比率を定量的に見積る必要がある。継代時における基底面への接着細胞数を経時的に調べることにより、死細胞の比率を推定した。培養皿を満たしている状態の若細胞が1×10<sup>3</sup>細胞/cm<sup>2</sup>または1:4分割で播種されたとき、11時間後の細胞接着比率はそれぞれ95%と86%であった(図2a)。また対数増殖期の若細胞が、1×10<sup>3</sup>細胞/cm<sup>2</sup>で接種されたときの11時間後の比率は89%であった(図2b)。もし、老若細胞の接着率に大きな差がないとすれば、継代時における死細胞の比率は10%以下と見積られるので、継代時の細胞損失による総細胞倍加数への影響は少いであろう。結論として、ヒト二倍体細胞の継代培養に低濃度播種法を用いることは種々の点で有利と考えられる。

Table I

Inoculation (cells/cm <sup>2</sup> )	Passages	PDs	Time (days)
5 × 10 <sup>2</sup>	12	68.6	84
	12	65.1	84
1 × 10 <sup>3</sup>	12	65.4	91
	12	65.1	91
5 × 10 <sup>3</sup>	15	67.9	105
	16	68.3	112
(1:4)	32	55.0	231
	32	58.9	245

Table II

Sub-line	Exp. No.	No. of Trypsin.	PDs	Time (days)
A	1	11	75.8	154
	2	11	80.0	154
	3	11	79.7	154
	4	11	79.4	154
	5	11	75.8	154
	6	11	77.2	154
			m. 78.0	
B	1	22	78.4	154
	2	22	81.5	154
	3	22	79.9	154
	4	24	84.0	168
	5	22	80.9	154
	6	22	77.6	154
			m. 80.4	

Fig. 1

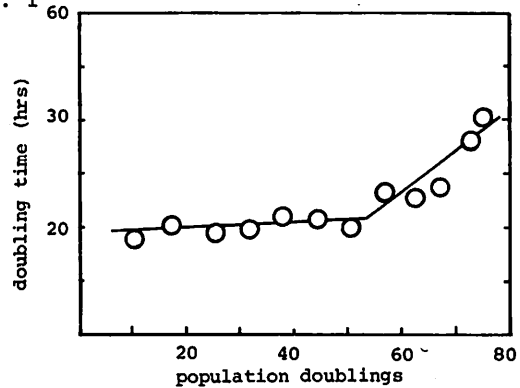
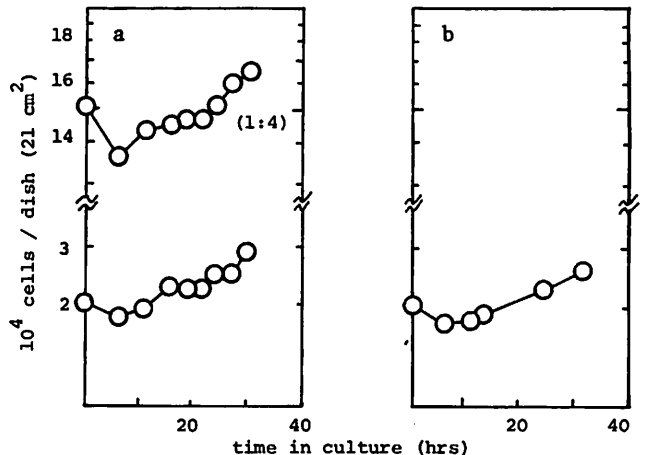


Fig. 2



## 大核DNA量の減少パターンからみたゾウリムシのクローンエイジング

高木由臣, 金澤修子 (奈良女子大学理学部生物学教室)

## CLONAL AGING IN PARAMECIUM: DECREASE IN MACRONUCLEAR DNA CONTENT

Yoshiomi TAKAGI, Naoko KANAZAWA (Department of Biology, Nara Women's University)

有性生殖(接合・自家生殖)後, 無性生殖(二分分裂)のみでゾウリムシを増殖させると, 未熟期・成熟期・老衰期を経て死滅する。このクローン発生またはクローンエイジングの過程で, 大核DNA量が減少することが *Paramecium aurelia* (Pa) について報告されている<sup>1,2)</sup>。その減少パターンは, クローン発生初期の約100回分裂令までに, 大核DNA量がほぼ半減し, 以後はゆるやかに減少・もしくはほとんど変化しないというものである。Paの100回分裂令は, ほぼ老衰期の開始期に相当すると思われる。我々は *P. caudatum* (Pc) について, 大核DNA量の変動パターンを調べるとともに, 大核の倍数性, 分裂時の大核DNAの分配様式, 細胞全体に対する大核の大きさの比の変動について調べた。これらの結果をもとに, ゾウリムシのクローンエイジングについて考察する。

## 〔材料と方法〕

*P. caudatum* syngen 2, ストックM18aを使用。これは約350回分裂令から老衰期が始まり, 約530回分裂の寿命をもつことがわかっている<sup>3)</sup>。DNA量の測定は, フォイルゲン染色・顕微測光法によった。測定に先立ち, プレパラート作製法, 染色法, 測光法などについて十分検討した。大核の細胞全体に対する大きさの比は, 顕微鏡写真をとって細胞と大核を切り抜き, それぞれの重量測定をする方法で推定した。

## 〔結果〕

(1)大核DNA量は接合後約330回分裂令まではゆるやかに減少し, 以後急激に低下して初期の約1/5量になった (Fig. 1)。ゆるやかな減少期には, 一回の分裂で親細胞DNA量の約0.04%を失い, 急激な減少期には0.4~2%を失うと試算される。(2)大核DNA量の小核DNA量に対する割合を, 162回分裂令以前の若令期細胞18例について測定し, 204±81という値を得た。ゾウリムシの小核はheteroploidyを示すことが多いが, これを $2n$ として計算する従来の方法に従うと, 大核の倍数性は平均 $408n$ となる。この値は従来Pcについて報告されている値<sup>4)</sup>の約4倍に相当する。(3)分裂直後の一見等しい大きさの二娘細胞で, 大核DNA量を測定し, 均等分配の理論値からのズレを調べた。136回分裂令の若令期細胞ではこのズレは約5%, 436回分裂令の老令期細胞では約26%であった。(4)細胞全体および大核のそれぞれの大きさは, 測定時の分裂令によってかなり変動したが, 両者の比はクローン発生を通じてほぼ一

定であった (Fig. 2)。

〔考察〕

一般に、分裂の前後で大核DNA量が減少する原因として、不完全なDNA複製、またはDNAの一部消失が考えられる。後者の例とみなしうる chromatin extrusion body がテトラヒメナで観察されているが、ゾウリムシでは例をみない。一方、不完全なDNA複製の積み重ねが、Fig. 1の結果を招いたとも考えにくい。なぜなら、大核の無糸分裂時の、娘細胞へのDNA分配の不均一性が、DNA複製の不完全さよりも100倍以上もの割合で、DNA量の変動に効いているからである(結果2,3)。従って大核DNA量変動の主要な原因は、無糸分裂に伴う大核DNA量の不均等分配にあると考えられる。しかし5%もの不均等分配が続けば、その集団のDNA量測定値は、分裂とともに次第に標準偏差値が大きくなってゆくはずであるが、実際には Fig. 1にみるように必ずしもそうはならない。これは細胞集団内で、極端な偏りをもつ細胞が選別除去されていることを思わせる。

PcとPaの大核DNA量減少パターンの違いを説明するため、大核DNA量の減少はプログラムされた事象で、プログラムのされ方が両者で異っていると考える。栄養核である大核DNA量の極端な減少は、何らかの生活機能障害をもたらすと思われるが、クローン発生の中で、次代をつくる有性生殖が行なわれるのは、そのような障害の起る前でなくてはならない。クローン発生後半(前半)に大核DNA量が急減するPc(Pa)でのパターンは、大核のploidyがPa(Pc)の約半分(2倍)であり、outbreeder(inbreeder)で、長い未熟期をもつ(未熟期は無いかあってもきわめて短い)という種としての特徴に適ったプログラムではなかろうか。

〔文献〕 1) Schwartz, V. & Meister, H. (1973) *Z. Naturforsch. Mikrosk. Anat.* 28c: 232. 2) Klass, M. & Smith-Sonneborn, J. (1976) *Expl. Cell Res.* 98: 63-72. 3) Takagi, Y. & Yoshida, M. (1980) *J. Cell Sci.* 41: 177-191. 4) Raikow, I. B. (1968) In "Research in Protozoology. Vol. 3" (Chen, T. T., ed.) pp. 1-128. Pergamon Press, New York. 5) Cleffmann, G. (1968) *Expl. Cell Res.* 50: 193-207.

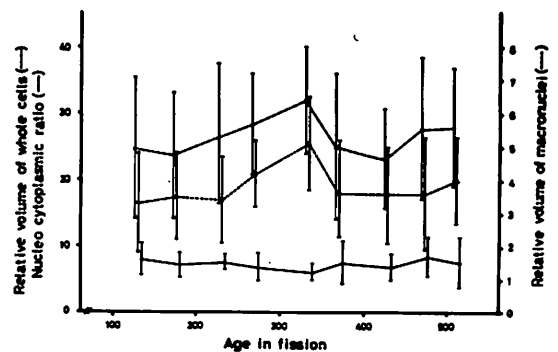
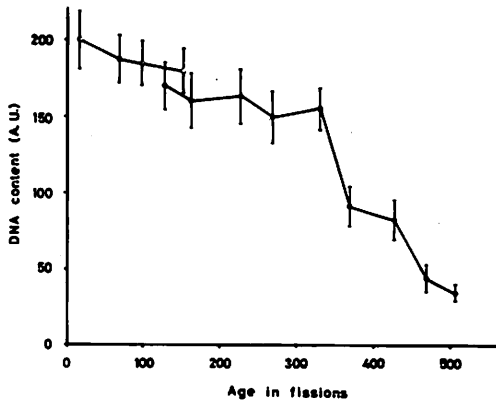


Fig. 1. Change in macronuclear DNA contents with clonal age in M18a (open circle) and in NK (closed circle).

Fig. 2. Change in relative volume of macronuclei to whole cells.

福島晋一 (近畿大学医学部衛生学教室)

## THE EFFECT OF LETHAL MUTATIONS ON THE CLONAL LIFE SPAN IN PARAMECIUM TETRAURELIA

Shinichi FUKUSHIMA ( Department of hygiene, School of medicine, Kinki University )

ソウリムシは単細胞動物であるが、無性的な二分増殖を無限に繰り返すことなく一定条件下で増殖速度が徐々に低下して死に到る。細胞クローンの老化の過程では、形態的な異常を示す細胞の頻度が増加すること、栄養核である大核の DNA 量が減少すること、性生殖後の子孫の生存率が低下すること、紫外線に対する感受性が増すことなどが知られている。クローンの寿命に関しては、老化した細胞の子孫の寿命が短いこと、X線や紫外線の照射や、変異原物質の処理によって寿命が短縮されることなどが観察されている。演者は先にX線照射の寿命短縮効果の実験結果から、いくつかの仮定を置いて計算した結果、polyploidである大核のある遺伝子座に突然変異が蓄積することによりクローンの寿命が限定されているとする考え方が妥当性を持つことを示唆した。もしこの作業仮説が正しければ、クローン形成初期に細胞分裂に関する致死突然変異を導入すればクローンの寿命は明らかな短縮を示すに違いないと考えられる。

## ( 実験材料と方法 )

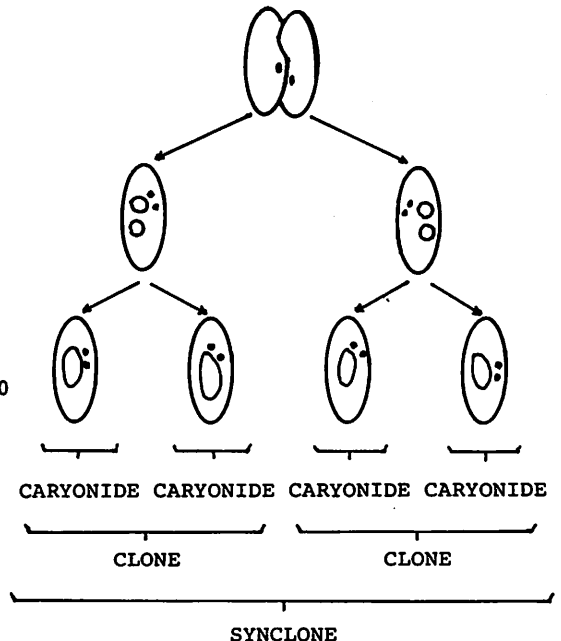
Paramecium tetraurelia, stock51, hr<sup>d</sup> の接合型 7 と接合型 8 の細胞を用いた。培養方法は従来からの方法に従った。

あらかじめ両接合型の細胞を繰り返し自家生殖をおこなわせて、自家生殖後の生存率が 100% のものを用いた。

自家生殖をおこなった接合型 7 の細胞が 1 回目の分裂をおこなって生じた 2 個の細胞のうちの一つが 2 回目の分裂をおこなって生じた一方を 4NQO で処理し、他方を対照として用いた。処理した細胞の自家生殖後の生存率が充分低いことを確かめ、各々を接合型 8 の細胞と混じて接合対を得た。4NQO は培養液に 8.8 μg/ml に溶かし生殖核である小核の DNA 合成期である細胞周期の中期に 15 分間処理した。接合対は接合型 7 と接合型 8 の細胞から成っていることを確かめ、処理群の接合対の両細胞クローンの自家生殖後の生存率が充分に低いこと、即ち haploid の小核の交換を行ったことを確かめて実験群として用いた。実際上は文脈の手順を踏むことは不可能なので、多数の細胞を用いて実験を進め、求める条件に適したものを拾い出して一組の実験系を得ることができる。接合後の細胞は 7-10 日後に 10 の cell lines にして daily reisolation culture と呼ばれる方法で細胞の継代を続けた。途中で分裂速度の増加が続いたものは自家生殖を起したものとみなしてデータから除いた。

## ( 実験結果 )

二つの実験結果が表に示してまとめてある。同一の syncloones の clones 間には統計的に有意の差は認められなかった。Syncclone CI-1 は接合後に自家生殖をおこなわせて観察した生存率は両クローンと



The effect of lethal mutations on the clonal life span

Experiment I											Experiment II							
Synclones	Experiment				Control						Experiment				Control			
	EI-1		EI-2		CI-1		CI-2		CI-3		EII-1		EII-2		CII-1		CII-2	
Clonal Life Span	235	226	227	213	222	221	225	263	243	200	220	198	25	259	200	207	173	254
	233	211	207	206	192	210	220	246	240	191	182	198	25	227	196	202	171	215
	232	208	180	188	187	210	201	188	239	188	158	192	25	223	184	197	168	214
	224	207	158	184	182	174	190	175	212	181	142	166	24	184	173	194	164	201
	215	197	141	180	168	164	184	164	204	175	130	163	24	171	169	185	118	191
	180	197	140	180	145	155	172	A	171	173	125	148	23	167	167	183	117	172
	176	158	128	178	120	114	155	A	168	171	50	143	22	166	155	177	117	162
	169	156	123	149	117	108	153	A	167	162	46	128	22	153	143	156	116	132
	153	150	120	135	84	79	150	A	156	158	44	119	22	146	A	155	92	113
A	136	96	134	67	A	A	A	148	A	39	99	21	A	A	140	92	67	
Mean	202	185	152	175	148	159	183	207	195	178	114	155	23	188	173	180	133	172
±S.D.	32	31	41	27	50	50	28	44	37	14	65	34	1	39	19	22	33	56
Longest	241	226	251	213	288	221	251	263	243	226	235	232	25	278	208	239	224	254

A: autogamy, S.D.: standard deviation

もほぼ 50% であった。これは接合過程において接合対のどちらかの細胞の haploid の核に裂性致死突然変異が起つたものとみなすことができる。従つて CI-1 は対照群でなく、実験群と同様にクローン形成の初期から致死突然変異を荷つていたと考えられる。EII-2 は小核の交換をおこななかつたもので、接合型 7 のクローンは典型的な自家生殖死を示しており、接合型 8 の細胞は自家生殖を経たクローンの寿命を観察したことになる。t 検定をおこなうと有意水準 5% で、EI-1・CI-2・CI-3 の間、EI-2・CI-3 の間には差がみられなかつたが、この両群の間には差が認められた。また CII-1・CII-2 の間には差が認められないが、EII-1 は両対照群より寿命が短い。

(( 考 察 ))

この実験結果は、細胞の 2 分裂に関する致死突然変異が大核の同一遺伝子座位に蓄積した場合にクローンの寿命が短くなることを示唆するものと思われる。CI-1 にみられるように、分裂に関する遺伝子であれば、単一遺伝子座における劣性致死突然変異の蓄積は、複数の場合と同様な効果がみられる。しかし EII-1 は致死突然変異がクローンの初期から存在するにもかかわらず寿命の短縮が全くみられなかつた。これは、接合時に残つた haploid の小核上の致死変異が性生殖過程に関わるもので、細胞の 2 分裂増殖に関与するものではなかつたと理解することもできる。ソウリムシの核の 2 型性は、多細胞生物の細胞集団の細胞膜が取払われ生殖細胞核が小核として、体細胞核が大核としてまとまつたものとみなすこともできる。このような類推が可能ならば、diploid の細胞集団の老化も、致死突然変異の蓄積による細胞数の減少あるいはある種の機能に関わる突然変異の蓄積による細胞集団の機能低下という現象として理解される部分があるのではなからうか。表の最下段に示した数字は、早く死んだ cell clone を他の分裂を続けている cell line の subline で補つて 10 cell line を維持した結果、最も長い寿命を持つものの分裂回数を表わしたものである。これには実験群と対照群とに著しい差がみられない。これは突然変異以外の要因がクローンの寿命の決定に関与していることを示唆していると考えられる。

老令ラット正常肝にみられるDNAポリメラーゼ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の読み取り誤差

田口隆彦, 大橋望彦 (東京都老人総合研究所生化学部)

ALTERATION OF TEMPLATE-READING FIDELITIES OF DNA POLYMERASES,  
 $\alpha$ ,  $\beta$ , AND  $\gamma$ , IN NORMAL LIVER OF AGED RAT.

Takahiko TAGUCHI, Mochihiko OHASHI (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan  
Institute of Gerontology)

目的:

老化現象の一つとしてDNAポリメラーゼの忠実度(鋳型読み取りの正確度)の低下が報告されている。Linn等は培養継代数56代のヒト正常2倍体繊維芽細胞, MRC-5, から抽出・分離した2種のDNAポリメラーゼI, IIとも, 19代の細胞より分離したそれぞれの酵素に比べ忠実度が低下している事を示した。また我々も, 生後20カ月以後のラット再生肝より抽出・分離した2種のDNAポリメラーゼ $\alpha$ ( $\alpha$ -B,  $\alpha$ -C)及び1種のDNAポリメラーゼ $\beta$ 共, 若令ラットからのそれぞれに比べ忠実度が低下している事を示した。同時に我々は, 45°Cの熱処理により急激に失活するDNAポリメラーゼが一部存在し, この熱に不安定なポリメラーゼが忠実度を低下させている事も報告してきた。しかし培養細胞及び再生肝ともに多くの細胞は増殖系となっており, DNAポリメラーゼの誘導は盛んである。このように細胞が増殖性であり, DNAポリメラーゼが多量に誘導されるという特殊性が忠実度の低いDNAポリメラーゼを産生する要因になる可能性も考えられる。そこで無処置正常肝中のDNAポリメラーゼの忠実度について調べた。

材料及び方法:

材料としては生後4カ月及び26カ月のラットを用いた。ラット正常肝から抽出されたDNAポリメラーゼの分離・精製はポリエチレングライコール沈澱, DEAE-セルロースカラムクロマト, ホスホセルロースカラムクロマト法等で行った。DNAポリメラーゼの忠実度は, poly dA·dT<sub>10</sub>及びpoly dC·dG<sub>10</sub>を鋳型とし, それぞれのDNAポリメラーゼによるDNA合成で取り込まれた相補的<sup>3</sup>H-ヌクレオチド量と非相補的<sup>3</sup>H-ヌクレオチド取り込み量の比より求めた。各酵素分画中へのDNAの混入はジフェニルアミン反応で検出できず, またプライマーのみを必要とするターミナルトランスフェラーゼの混入は, この酵素が胸腺に限局して存在する事が知られていることから一応否定できる。しかしながら, 非常に微量のDNAの混入やターミナルトランスフェラーゼ活性の混入が, 非相補的ヌクレオチド取り込みを増加させる結果, DNAポリメラーゼの忠実度の測定に大きな影響を及ぼす。そこで, 鋳型を含まない反応系で混入DNAの影響を, また鋳型に相補的なヌク

レオチドを除いた反応系でターミナルトランスフェラーゼの活性の影響も合わせて測定した。

#### 結果：

1. DNAポリメラーゼは3種の $\alpha$  ( $\alpha$ -A,  $\alpha$ -B,  $\alpha$ -C), 及び $\beta$ ,  $\gamma$ と5種に分離された。若令, 老令からのそれぞれ5種の酵素活性, クロマトパターンの上での変化は認められなかった。
2. DNAポリメラーゼ標品は, 比活性として3種の $\alpha$ でそれぞれ1,000~2,000倍に,  $\beta$ は40,000~50,000倍に $\gamma$ は5,000~10,000倍に精製された。
3. 3種のDNAポリメラーゼ $\alpha$ の忠実度は, 若令からのものでそれぞれ $1/20,000$ 以下であるのに, 老令からのものでは $1/4,000 \sim 1/300$ と低下していた。同様に $\beta$ では若令で $1/1,000,000$ 以下のものが老令で $1/40,000 \sim 1/1,500$ に,  $\gamma$ では若令で $1/200,000$ 以下が老令で $1/13,000 \sim 1/1,000$ と忠実度の低下がみられた。
4. これら忠実度の測定ではpoly dA·dT<sub>10</sub>とpoly dC·dG<sub>10</sub>が鋳型として用いられたが, 鋳型特異性は認められなかった。またそれぞれの鋳型に対して非相補的な2種のヌクレオチドの取り込みでの差は認められなかった。
5. 本実験で用いた酵素標品中の微量DNAならびにターミナルトランスフェラーゼの混入は否定できた。

#### 考察：

老令ラット正常肝のように非増殖系の細胞からのDNAポリメラーゼ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ともその忠実度は若令からのものに比べ低下が認められ, この低下の比は再生肝からの酵素での低下の比とほぼ同じであった。この事は, 細胞が増殖系におかれた事や酵素産生が高められたために忠実度の低いDNAポリメラーゼが誘導されたという事ではなく, 生後26カ月老令ラットの正常肝細胞中ではすでに忠実度の低い変異DNAポリメラーゼをつくる何らかの素地のある事を示している。

忠実度の低いDNAポリメラーゼは, 正常ラット肝からの $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ いずれの型にも認められるので, 核, ミトコンドリアでのDNA複製に限らず, repair replicationでもDNA上に変異が起る可能性を示すものである。そしてrepair replicationでもDNA上に変異を起す可能性は, 非増殖系の分裂終了細胞群でもそのDNA上に変異が出現する可能性を示唆するものである。

#### 結論：

老令ラット正常肝中では忠実度の低い変異DNAポリメラーゼ $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ が出現する。

(本研究の一部は理化学研究所プロジェクト研究「老化指標の設定に関する研究」の受託研究費による)

老化マウスリボソームの翻訳活性：グロビン・メッセンジャーRNA依存のタンパク合成

中 沢 俊, 森 望, 後 藤 佐多良  
(東邦大学, 薬学部, 生化学教室)

TRANSLATIONAL ACTIVITY DEPENDENT ON NATURAL mRNA OF RIBOSOMES FROM YOUNG AND OLD  
MOUSE LIVERS

Takashi NAKAZAWA, Nozomu MORI and Sataro GOTO  
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Toho University

SUMMARY

Translational activity of ribosomes from young and old mouse livers was examined in the assay system dependent on rabbit globin mRNA. Old ribosomes were shown to have 30 to 40% lower activity than young ribosomes. This observation together with our previous findings indicates functional alterations of ribosomes in old animals.

INTRODUCTION

There have been a number of reports which suggest that translational activity of various cells and tissues decreases with age of animals. But it has not been studied in detail which components of the translational apparatus are primarily responsible for the decline of the activity.

We have previously reported that purified liver ribosomes from old mouse had 10 to 40% lower translational activity than those from young animals in the poly(U) dependent poly-phenylalanine synthesis in vitro (1). In this assay system, however, synthetic mRNA was used which lacks a correct initiation codon, a specific binding site for ribosome and other primary and secondary structure required for the efficient translation, so that the observed changes in the activity might not be a true reflection of the situation in vivo.

In the present study purified rabbit globin mRNA was employed as a natural template to examine age related functional alterations of mouse liver ribosomes.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Male ddY mice of the age of 2 to 27 months was used. The median and maximum life span of the animal under our breeding conditions were 18 and 28 months respectively.

Preparation of ribosomes: Mouse liver ribosomes were purified by the method reported previously (1) which involved puromycin treatment in a solution containing a high concentration of KCl in order to remove contaminating mRNA and tRNA.

Assay conditions: The conditions of translation were essentially the same as those reported previously (1) except that rabbit globin mRNA instead of poly(U) and magnesium acetate of lower concentration were added in the reaction mixture.

## RESULTS AND DISCUSSION

Control experiments on the assay conditions: The incorporation of  $^3\text{H}$  leucine into hot acid insoluble materials was almost entirely dependent on the added rabbit globin mRNA, translational factors from rabbit reticulocytes and tRNA from mouse livers. Thus the contamination of these components in the ribosomes was negligible. The incorporation was linear up to at least 40 min. Magnesium concentration required for the maximum incorporation was found to be 3.0 to 3.5 mM.

Changes of translational activity of ribosomes during ageing: Under the standard assay conditions translational activity of ribosomes of old animals was significantly lower than that of young animals in two independent experiments performed so far (Fig 1 and Table 1). The extent of decrease (30 to 40%) was similar to that in the previous experiment where poly(U) template was used. These findings suggest that either initiation or elongation step of translation might be affected in the ribosomes of older animals. We are currently examining these possibilities.

Size of the products of translation: In order to see if the translation was terminated prematurely on the template in old ribosomes, the products of translation were analysed by electrophoresis on polyacrylamide gel containing SDS. In preliminary experiments, the distribution of the products synthesized with old ribosomes were indistinguishable from that with young ribosomes. Thus the decrease in the activity of old ribosomes cannot be ascribed to the premature termination of translation.

## REFERENCE

- (1) N.Mori, D.Mizuno and S.Goto: Mech. Aging and Devel., 10 (1979)379-398

TRANSLATIONAL ACTIVITY OF "YOUNG" AND "OLD" RIBOSOMES WITH GLOBIN mRNA

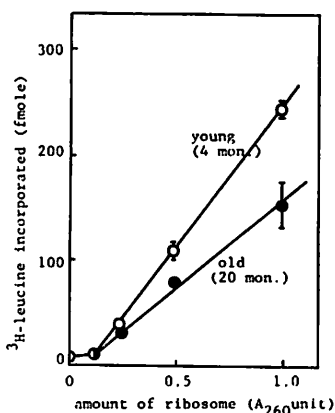


Fig 1

SUMMARY OF TRANSLATIONAL ACTIVITY OF "YOUNG" AND "OLD" RIBOSOMES WITH RABBIT GLOBIN m-RNA

	age of mouse	$^3\text{H}$ -leucine * incorporated	average $\pm$ S.D.	relative activity (%)
Exp.1	young 2 mon.	73.8	69.0	100
	2 mon.	64.1		
	mid- 16 mon.	42.7	52.1	76
	die 16 mon.	61.4		
old 27 mon.	43.1	53.1	77	
	27 mon.			63.1
Exp.2	young 4 mon.	235	231 $\pm$ 7.3	100
	4 mon.	221		
	4 mon.	238		
	old 20 mon.	129	146 $\pm$ 24.7	63
		128		
		181		

\*fmole/ A<sub>260</sub> unit of ribosome/ 40 min.

Table 1

老化マウスの細胞核 DNA 中の一本鎖部分の割合  
特に脳DNA 中の一本鎖領域について

森 望, 後藤 佐多良  
(東邦大学薬学部生化学教室)

SINGLE-STRANDED REGIONS IN THE NUCLEAR DNA OF MOUSE TISSUES DURING AGEING  
WITH SPECIAL REFERENCE TO THE BRAIN

Nozomu MORI and Sataro GOTO ( Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical  
Sciences, Toho University )

SUMMARY

Single-stranded regions of DNA from mouse tissues of various ages was estimated by the treatment of the DNA with nuclease S1. No significant changes was observed in most tissues studied except the brain where slight but significant increase was detected in old animals.

INTRODUCTION

Structural alterations in the nuclear DNA during ageing would result in the deterioration of gene expression in cells, which would in turn lead to the gradual and irreversible loss of functional activity of tissues. Since Price et al.(1) first suggested the increase in strand-breaks in DNA in post-mitotic tissues of aged mouse, several biochemical investigations have been reported on the changes in the size and nuclease S1 sensitivity of DNA from young and old animals. Chetsanga et al.(2,3) reported that the proportion of single-stranded regions of DNA (ssDNA) increased with age up to 25% in the liver and 14% in the brain of senescent mouse. The values appeared to be much too high if it would reflect the situation in vivo. In contrast to their results, Dean and Cutler who repeated the experiments carefully found that the proportion of ss DNA in mouse liver did not change significantly during ageing(3-6%).

In this report we reexamined the possibility of age-dependent accumulation of ssDNA of various tissues of mouse with special reference to the brain using a different method of extraction and nuclease S1 digestion of DNA.

MATERIALS and METHODS

Animals; Male ddY mice (mean life span:18 months and maximum life span:28 months in our colony) were used. Animals were grouped as follows for statistical analysis; young:2-11 months, middle-aged:12-16 months, and old:17 months and over.

Extraction of DNA; Tissues from fasted mice were excised and homogenised in an appropriate buffer. Nuclear pellets were washed and pronase-digested in 1.5% sarcosyl solution. Clude DNA was precipitated in CsCl solution( $\rho=1.3$ ) and the precipitate was treated with RNase A and pronase. DNA in the mixture was extracted with SDS/phenol/chloroform mixture and then with chloroform. The purified DNA was precipitated with ethanol and dissolved in

a suitable solution for analysis.

**Nuclease S1 digestion;** Forty µg of DNA was incubated with or without nuclease S1(100units/ml) at 45°C for 30 min. The reaction was terminated by adding perchloric acid. The absorbance at 260nm of the original and acid soluble fraction was measured to calculate percentage nuclease S1 sensitivity.

**RESULTS and DISCUSSION**

(1) Controle experiments on nuclease S1 digestion of DNA ; In our standard assay conditions, 97 to 100% of heat-denatured DNA was digested. Native DNA was rendered acid soluble by 2 to 7% depending on the DNA samples derived from the different kind of tissues, but not more even after extensive digestion with nuclease S1. Contamination of RNA in the DNA preparation appeared to be negligible since less than 1% of the DNA was rendered acid soluble by the treatment with pancreatic RNase A. So the apparent nuclease S1 sensitivity cannot be ascribed to contaminating RNA which would be digested by the enzyme as well.

(2) Single-stranded regions of DNA from mouse tissues of the various ages ; Nuclease S1 sensitivity of the DNA extracted from the liver, kidney, brain, heart and spleen of young and old mice was compared in pairs. Although percentage nuclease S1 sensitivity of DNA ranged mostly between 2 and 4.5% except heart (-7%), no significant difference was detected between young and old tissues(Table 1). We therefore concluded that there was little, if any; change in the proportion of ssDNA in all tissues examined during ageing of mouse.

(—But see below on the brain.)

(3) Single-stranded regions of DNA from mouse brain of various ages ; To examine the proportion of ssDNA in the brain DNA in detail three independent experiments were performed using more than 16 mice aged from 3 to 27 months. Table 2 summarizes the results obtained so far. The same values were plotted as a function of age in Fig.1. Although the difference in the nuclease S1 sensitivity among three age groupes was small, there seems to be a slight increase in the ssDNA in this tissue during ageing.

Our results on the liver DNA agreed essentially with those of Dean and Cutler(4). As to the brain DNA there appears to be a slight but significant increase in the percentage of ssDNA in older animals. We are currently performing further study on this particular tissue.

Table 1

Nuclease S-1 Sensitivity of DNA Extracted from Various Tissues of Young and Senescent Mice

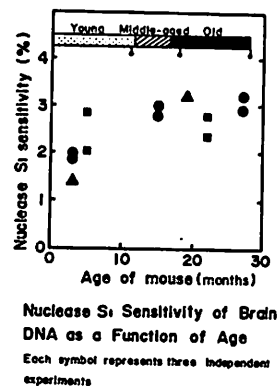
Tissue	Age (months)	Percent of acid-soluble A <sub>260</sub> with Nuclease S <sub>1</sub>	Percent of acid-soluble A <sub>260</sub> without Nuclease S <sub>1</sub>	Sensitivity for Nuclease S-1 (%) (average)
Liver	3	7.18 ± 0.62	2.58 ± 0.52	4.72
	5	7.40 ± 0.06	3.69 ± 0.35	3.85 (4.29 ± 0.64)
	22	7.69 ± 0.15	3.65 ± 0.38	4.19
	22	8.53 ± 0.11	3.97 ± 0.17	4.75 (4.47 ± 0.28)
Kidney	5	9.48 ± 0.32	5.84 ± 0.29	4.08
	5	9.67 ± 0.05	5.31 ± 0.30	4.40 (4.34 ± 0.26)
	22	10.39 ± 0.79	8.17 ± 0.72	2.42
	22	9.63 ± 2.07	6.56 ± 1.12	3.29 (2.86 ± 0.64)
Brain	5	7.26 ± 0.31	5.35 ± 0.03	2.02
	5	9.04 ± 0.51	6.41 ± 0.24	2.83 (2.43 ± 0.41)
	22	10.24 ± 0.13	7.64 ± 0.34	2.79
	22	10.21 ± 0.58	8.04 ± 1.24	2.36 (2.58 ± 0.22)
Heart	5	14.22	7.35	7.21
	5	13.68 ± 0.02	7.40 ± 0.18	6.56 (6.89 ± 0.33)
	22	14.26 ± 0.64	9.01 ± 0.28	5.77
	22	13.67	9.78	4.31 (5.04 ± 0.73)
Spleen	5	5.89 ± 0.50	2.52 ± 0.21	3.46
	5	5.76 ± 0.52	3.62 ± 0.19	2.22 (2.84 ± 0.62)
	22	6.33 ± 0.33	3.11 ± 0.43	3.24
	22	6.71 ± 0.64	4.89 ± 0.37	1.91 (2.58 ± 0.67)

Table 2

Nuclease S<sub>1</sub> Sensitivity of DNA Extracted from Ageing Mouse Brain

Age (months)	No. of mice (n)	% A <sub>260</sub> of acid-soluble material with Nuclease S <sub>1</sub>	% A <sub>260</sub> of acid-soluble material without Nuclease S <sub>1</sub>	Nuclease S <sub>1</sub> Sensitivity (%) (average)
3	3	5.72 ± 0.18	3.54 ± 0.19	1.95
3	3	5.45 ± 0.09	3.63 ± 0.18	1.89
3	3 (3)	6.53	5.20	1.60
5	5	7.26 ± 0.31	5.25 ± 0.03	2.02
5	5	9.06 ± 0.51	6.41 ± 0.24	2.83 (2.02 ± 0.52)
15	15	6.48 ± 0.14	3.80 ± 0.21	2.79
15	15	6.59 ± 0.13	3.71 ± 0.09	2.87 (2.88 ± 0.13)
19	19 (3)	8.22	5.20	3.19
22	22	10.24 ± 0.13	7.66 ± 0.34	2.79
22	22	10.21 ± 0.58	8.04 ± 1.24	2.36
27	27	7.05 ± 0.05	3.99 ± 0.16	3.19
27	27	7.00 ± 0.30	4.24 ± 0.23	2.88 (2.88 ± 0.34)
11-14 (7)	7	98.12	4.95	96.02
(denatured)	7	97.72	7.45	97.54 (97.8 ± 0.24)

Fig.1



REFERENCES

1)Price,G.B. et al., Science,171,917-920(1971)  
 2)Chetsanga,C.J. et al., Nature,253,130-131(1975)  
 3)Chetsanga,C.J. et al., B. B. A.,474,180-187(1977)  
 4)Dean,R.G. and R.G.Cutler, Exp.Geront.,13,287-292(1978)

中西和夫、藤田哲也（京都府立医科大学病理学教室）、福田 優（福井医科大学病理学教室）

## AGE DEPENDENT CHANGES IN DNA CONTENTS OF GASTRIC MUCOSAL CELLS

Kazuo NAKANISHI, Setsuya FUJITA (Department of Pathology, Kyoto Prefectural University of Medicine), Masaru FUKUDA (Department of Pathology, FUKUI University, School of Medicine)

ヒトの肝細胞、心筋細胞において、加齢に伴って polyploid cell が増加することを既に報告してきた<sup>1)</sup>。今回は加齢に伴う、胃粘膜細胞の核DNA量の変化を顕微蛍光測光法により調べた。胃粘膜組織像と対比しつつかつ胃粘膜上皮細胞と間葉系細胞を鑑別するために、パラフィン切片から得た単離細胞の塗抹標本を用いて細胞形態を確認しつつ核DNA量を定量した。一方、単離細胞の Feulgen 染色において生じる非特異反応を除去するために、Azocarmin G染色によるブロック法<sup>2,3)</sup>を用いた。

### <材料および標本作製>

ヒトの外科的切除胃のパラフィンブロックから100 $\mu$ の厚切り切片と4 $\mu$ の薄切り切片を作製した。HE染色をした4 $\mu$ 切片の組織像を確認しつつ、それに相当するヘマトキシリン染色100 $\mu$ 切片から胃粘膜の目的部分を顕微鏡下で取り出した。この採取試料を0.05% callagenase で37 $^{\circ}$ C、60分間処理し更に2% 2 Na-EDTA溶液中で37 $^{\circ}$ C、120分間処理した後に、ultrasonicator を用いて細胞を単離し、塗抹標本を作製した。Azocarmin G染色(0.02% Azocarmin G染色液、25 $^{\circ}$ C、90秒)の後、Feulgen 染色(5N-HCl、25 $^{\circ}$ C、18分間加水分解の後7 $^{\circ}$ CでAcridine -Schiff 反応10分間)を行なった。

### <DNA定量>

後照射法-落射式蛍光顕微測光法により細胞核DNA量を測定した。Green 励起( $\lambda=543\text{nm}$ )により細胞質の Azocarmin G 蛍光( $\lambda_{\text{max}}=600\text{nm}$ )を観察し細胞質の形態から粘膜上皮細胞と間葉系細胞を区別した(図2.a)後に同一視野でBlue 励起( $\lambda=437\text{nm}$ )に変換しAcridine - DNA 蛍光( $\lambda_{\text{max}}=520\text{nm}$ )を定量した(図2.b)。

### <結果>

いずれの年齢においても胃粘膜上皮の核DNA量は2c から4c の範囲内にあり、4c の値を越える polyploid cell の出現は全くみられなかった(図3)。一方、胃粘膜間葉系細胞では時として8c のDNA量を有する polyploid cell が出現した。

### <考案>

reverting postmitotic cell に属する肝細胞、あるいは心筋細胞では、加齢に伴って polyploid cell が出現するが、vegetative intermitotic cell に属する胃粘膜上皮細胞においては polyploid cell が出現しないという結果を得た。このことは、胃粘膜上皮ではたとえ polyploid cell が出現しても、細胞交代が速いために polyploid cell が胃粘膜中に長くとどまり得ないという理由によると思われる。

胃癌細胞では polyploid cell、aneuploid cell が出現することが報告されているが、一方、正常では polyploid cell は加齢に伴っても出現しないという今回の結果から polyploid cell あるいは aneuploid cell 出現をマーカーとしてより確実な胃癌の客観的診断が可能であることが示された。

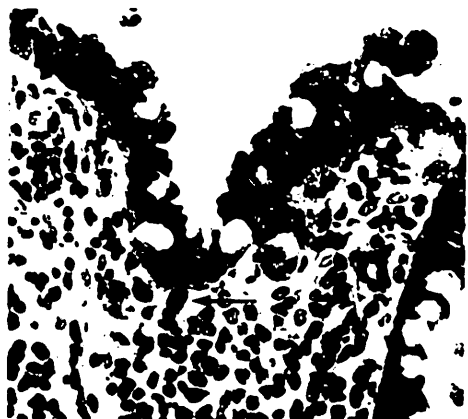


図1. 胃粘膜4 $\mu$ 切片の  
HE染色。  
大きい核を有する間  
葉系細胞(矢印)が  
みられる。

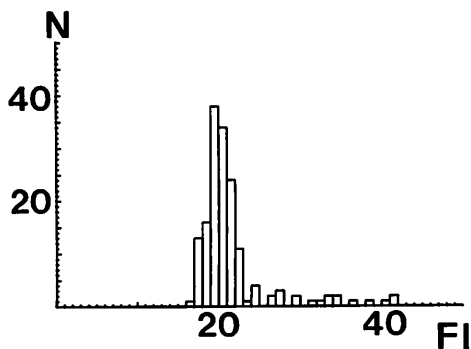


図3. 図2の標本における胃  
粘膜上皮細胞の核DNA  
量の分布のヒストグラム。  
N:細胞数  
FI:DNA蛍光量。

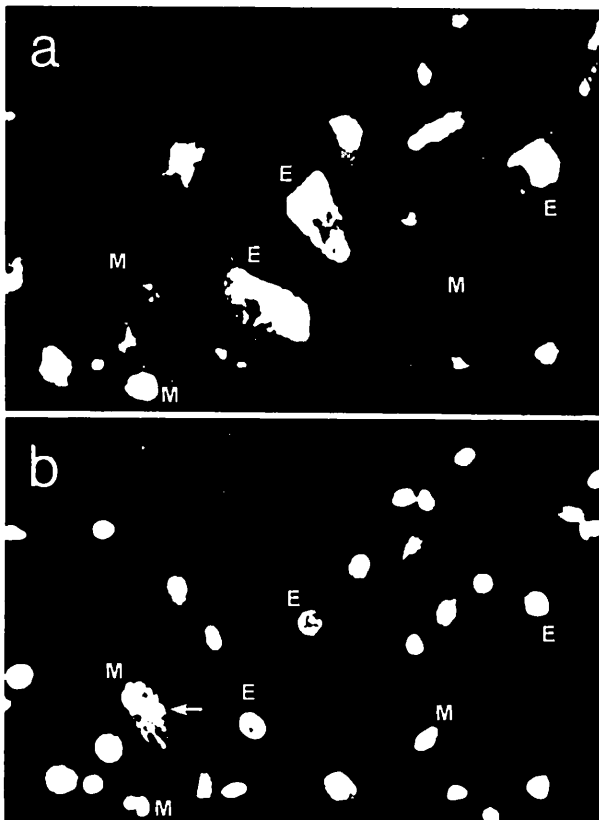


図2. (a、b) 胃粘膜100 $\mu$ 切片より得た単離  
細胞の塗抹標本(Azocarmine G細胞質-  
Acriflavine Schiff DNA重染色)。E:胃  
粘膜上皮細胞。M:間葉系細胞。  
a:Azocarmine G蛍光で細胞質を観察。  
b:Acriflavine 蛍光でDNAを観察(aと同  
一視野)。矢印の間葉系細胞は8cのDN  
A量を有していた。

#### 文献

- 1) 中西和夫、藤田哲也: 第1回日本基礎老化研究会、東京、p48-49、1977
- 2) 高松哲郎他: 京府医大誌、88(11)、1273-1283、1979
- 3) Takamatsu, T. et al.: Histochemistry, in press
- 4) Fujita, S. and Fukuda, M.: Histochemistry, 40: 59-67、1974

遺伝的早老症 Cockayne 症候群細胞の核機能

後藤 薫, 藤原 美定 (神戸大学医学部放射線基礎医学教室)

DEFECTIVE NUCLEAR FUNCTION IN COCKAYNE'S SYNDROME CELLS OF A HUMAN GENETIC PROGEROID MUTANT.

Kaoru GOTO, Yoshisada FUJIWARA (Department of Radiation Biophysics, Kobe University School of Medicine)

Cockayne's syndrome (CS) is one of classical segmental progeroid syndromes. The patient with CS manifest the 2nd-year onset of clinical symptoms such as senile appearances, an extreme sunlight sensitivity of the skin, cachectic dwarfism, retinitis pigmentosa and so on.

Our previous study demonstrated that CS fibroblasts exhibited the high susceptibility to cell killing induced only by the UV-type agents, but normal levels of excision repair and "postreplication repair" of UV damage in their DNA. Also, we have suggested that CS cells may be defective in the recovery of damaged chromatin structure which is prerequisite for the initiation of replicon clusters.

We are now attempting to search a factor essential for the defective recovery in a typical CS (IMR GM 739) strain using a typical DNA damaging agent, predominantly 254 nm UV. Our results thus far obtained are as follows:

(1) DNA synthetic rate, as determined by a 30-min pulse-labelling at various times after  $5 \text{ J/m}^2$ , followed the time-dependent changes in a way of the initial decline up to 2 h and the subsequent gradual increase (recovery of mainly the initiations) to control level by 6 h in normal human cells, but no such definite recovery in CS cells.

(2) The NAD addition induced its concentration-dependent recovery of DNA synthesis in  $5 \text{ J/m}^2$ -irradiated CS cells. As expected, however, the co-presence of excess nicotinamide (10 mM) as the inhibitor of poly ADP-ribosylation resulted in the effective prevention from the NAD-induced recovery of DNA synthesis.

(3) By the NAD treatments of irradiated CS cells, their originally UV-sensitive survival curve became partially resistant towards the normal cell sensitivity.

(4) The NAD contents, by an estimation using the method of Nisselbaum and Green, were

0.35  $\pm$  0.05 and 0.21  $\pm$  0.04 nmcles per 1  $\mu$ g DNA for normal human and CS cells, respectively, thus indicating approximately 40% less NAD content in CS cells. The time-lapsed changes in the NAD content after UV irradiation followed the similar kinetic curve to that of the DNA synthetic rate in normal cells, but remained at the original low level in CS cells.

Taken together, our present results strongly suggest that CS cells, though tested in a single strain, possess a reduced amount of the cellular NAD, and further that NAD as the obligatory substrate of the intranuclear ADP-ribosylation may be an essential factor at least for the chromatin recovery to trigger the initiations of inhibited replicons.

ヒト2倍体細胞のHistone H1の欠落： その細胞老化ターゲット説

三井 洋司 (東京都老人総合研究所 薬理学部)

坂上 宏 (昭和大学 医学部 生化学)

DEPLETION OF HISTONE H1 IN SENESCENT HUMAN FIBROBLASTS IS NOT DUE TO THE ACCUMULATION OF G1 ARRESTED CELLS

Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

Hiroshi SAKAGAMI (Department of Biochemistry, School of Medicine, Syowa University)

SUMMARY

Histone H1 synthesis and content in G1 arrested, senescent and transformed human fibroblasts were examined by biochemical and immunocytological procedures in order to pursue the mechanisms of in vitro cellular aging. The results indicated that progressive decline in content and synthesis of histone H1 relative to nucleosomal histones with passage number was not simply due to the increased proportion of resting cells, but reflected age specific changes in cycling cells or whole populations in the senescent cultures.

INTRODUCTION

Although the five major species of histones ( H1, H2a, H2b, H3 and H4 ) were believed to be present in chromatin in a molar ratio of 0.5:1:1:1:1, respectively, a decrease in the amount of histone H1 was recently reported with altered genetic activity or proliferation capacity. Our previous report demonstrated that there was a decrease in histone H1 relative to nucleosomal histones with in vitro cellular aging of human diploid fibroblasts and that it was due to the declined synthetic rate and elevated degradation rate of histone H1 ( 1 ).

However, an uncoordinate synthesis among the major histones respect to each other in G1 arrested cells was reported in BHK cells and lens epithelial cells. Most of the aging indexes simply reflect the accumulation of non-dividing cells in the aging cultures, but rapidly dividing cells in aging cultures also have short lifespan in spite of their resemblance to young cell populations. Therefore, age specific characteristics of cycling cells or whole populations rather than growth related cell changes are more important for the elucidation of the mechanisms of cell aging. Thus, a crucial question was asked whether the relative decrease in histone H1 synthesis in senescent human cells was simply due to the accumulation of G1 arrested cells in which synthetic rate of histone H1 might be lower than that of nucleosomal histones.

MATERIALS AND METHODS

Young ( 16 - 20 PDL ) and senescent ( 45 - 60 PDL ) TIG-1 cells ( human diploid fibroblasts established at the Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology ) and <sup>60</sup>Co-transformed WI-38 cells ( established by Dr.Namba ) were cultured in Eagle's Minimum Essential Medium with 10 % fetal bovine serum. Growing cells cultivated in 0.1, 1.0 or 10 % serum medium or cells at various phases of growth were incubated with radioactive lysine or thymidine for one or 24 hours. Histones were extracted with 0.4 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as described before ( 1 ), and analysed on acid urea polyacrilamide gel electrophoresis or two dimensional gel electrophoresis ( acid urea/ SDS ) according to the methods of Panyim and Chalkley, and O'Farrell, respectively. For the determination of the molar

ratio of histone H1 synthesis, the total radioactivities of each areas of histone H1, ( H2a + H2b + H3 ) and H4 were divided by their lysine contents. Immunocytological studies were carried out by an indirect method using anti-histone H1 serum and FITC conjugated anti-rabbit IgG ( a gift from Dr Sekimizu ).

### RESULTS AND DISCUSSION

Histone synthesis was found to decrease in contact inhibited and serum depleted cultures as expected from the tight coupling of DNA and histone synthesis. However, as shown in Fig. 1 ( Histone H1 synthesis as a function of DNA synthetic activity ), the extrapolated values of histone H1 synthesis to zero point of DNA synthesis activity revealed that there were some turnover synthesis of histone H1 in G1 arrested cells.

Furthermore, the relative synthetic rate of histone H1 over the other nucleosomal histones became higher with decrease in DNA synthetic activity ( Fig. 2 ). Therefore, the declined synthesis of histone H1 in senescent cultures ( Fig. 2, Table 1 and ref. 1 ) was not simply due to the accumulation of G1 arrested cells in aging cultures.

The amount of histone H1 among the total histones in young and senescent cultures with various DNA synthesis capacities demonstrated that senescent cultures had less amount of histone H1 than young cultures at any stages of cell growth.

Immunocytological studies of histone H1 contents performed on mixcultures of young and senescent cells, and hydroxyurea treated cultures also indicated that the decrease in histone H1 in senescent cells was not due to the temporary retardation of DNA synthesis.

Histone H1 synthesis of  $\gamma$ -ray transformed human fibroblasts with unlimited life span was found to be identical with that of young diploid fibroblasts in spite of their high population doubling levels.

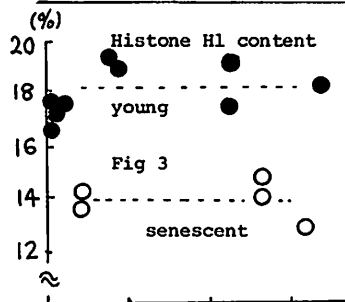
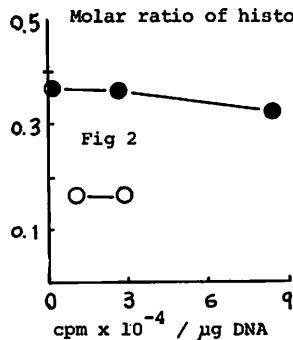
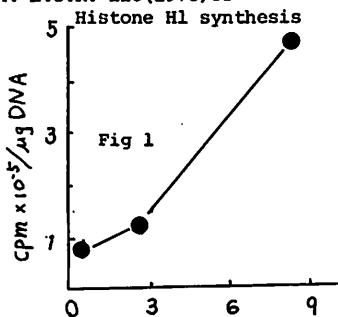
Cytological significances of lack of histone in chromatin remain to be investigated. We speculate, however, two possible results from the lack of histone H1 in senescent cells. One is an increase in susceptibility of linker DNA to nuclease or any other factors leading to DNA strand breakage. In facts, Beaupain et al ( 2 ) recently reported that number of alkaline sensitive sites of single-stranded DNA from human cells increased with in vitro aging. In addition, the accumulation of more DNA strand breaks than the cells could repair would results in death of cultured cells ( 3 ). The other possible result is the relaxation of gene repression leading to disorder of cell function. Histone H1 has been found to be absent in transcriptionally active chromatin from human cells and that increased RNA synthesis and basal transcription activity ( 4 ), but declined collagen synthetic activity in senescent human cells have been reported.

The hypothetical role of histone H1 as a target of cell aging certainly need to be tested by further investigation. We consider, however, that the possibility should be noted that lack of histone H1 might cause dysfunction and death of senescent human cells through above mentioned mechanisms.

Table 1. Cell strain

H1	H2a + H2b + H3	H4
0.46	3	1.15
0.26	3	1.27
0.47	3	1.18

- References
1. E.C.R. 126(1980)289
  2. B.B.A. 606(1980)251
  3. B.B.A. 564(1979)90
  4. E.C.R. 116(1978)63



## ヒト脳の加齢に伴うグロビン mRNA 量の変化

加藤邦彦 (東京大学理学部動物学教室), R. G. Cutler (Gerontology Research Center, N. I. H., U. S. A.)

## AGE-DEPENDENT CHANGE IN THE CONTENT OF GLOBIN mRNA IN HUMAN BRAIN

Kunihiko KATOR (Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo), Richard G. Cutler (Gerontology Research Center, N. I. A., N. I. H., U. S. A.)

個体の発生は遺伝的なプログラムに従って進み、やがて成熟に到達する。老化はその後ゆるやかに始まる。この成熟状態、つまり、正常に分化した状態を維持できなくなることが老化の本質であるとするなら、遺伝子調節のレベルではどのような説明が可能であろうか。成熟時の分化状態が正常に維持されている細胞では、そこで本来発現されるべき適正な遺伝子のみが発現され他は抑制されており、発現される遺伝子数に比し抑制されている遺伝子数の方がはるかに多い、とするなら、この抑制状態の維持は正常な分化状態の維持、つまり、不老に不可欠であろう。老化過程ではこの抑制が徐々にゆるむ可能性がある。

そこで、正常にはその発現が期待されない特定の遺伝子が加齢とともに発現されてくるか否か、つまり、derepress されるか否かを調べた。具体的にはヒト脳より RNA を抽出し、ヒト脳中にはその存在が期待されないグロビン mRNA の有無及び加齢に伴うその変化を見た。

(方法) ヒト脳は事故死した個体に求めた。脳又は造血組織の異常を疑われた個体は対象外とした。用いた16個体の年齢は、1.5月, 7週, 8月, 19才, 19才, 21才, 37才, 37才, 43才, 48才, 49才, 56才, 61才, 64才, 64才 と胎児 (4月) である。まず、大脳灰白質より、しょう糖処理法により細胞核を単離し、次に、SDS-フェノール-クロロホルム法で核より RNA を抽出した。抽出した RNA の分解の程度を知るにはしょう糖密度こう配遊心を用いた。

RNA中のグロビン mRNA を定置するのに RNA-cDNA ハイブリダイゼーションを利用し、 $S_1$ -nuclease法を用いた。cDNA を合成するためのグロビン mRNA は sickle-cell anemia の患者の血液より得られたものである。ハイブリダイゼーションは、50%ホルムアミド、下53°C で約2週間行ない、その間の RNA の分解はみられなかった。

(結果) 精製したヒト脳核 RNA 中、分解が著しいのは4試料のみで、他の試料はほとんど分解もみられず、以後のハイブリダイゼーション実験に用いるに十分であった。死後、剖検までの時間が長いにもかかわらず、核 RNA はかなり安定である。一方、細胞質 RNA の方は分解がかなり進み、その分画への血球、つまり、血球中のグロビン mRNA の混入を排除できないこともあまって、本実験で用いるには適当ではなかった。

ハイブリダイゼーション実験の結果、非造血性組織であるヒト脳より抽出した核 RNA 中にグロビン RNA (グロビン mRNA の cDNA とハイブリッドを形成する RNA) が検出された。その量は胎児期および乳児期初期で非常に高く、8月令ではすでに減少し、19才の脳ではまったく検出されなかった。しかし、以後、それは加齢とともに再度増大して行き、64才では乳児期初期の値近くまで達した。

(考察) 今回の研究は、ヒト脳組織という特殊な材料を用いているため、必ずしも例数がまだ十分でないかもしれない。しかし、マウスを用いて行なわれ、個々に発表された二つの研究報告—AKRマウスでは、2月令の脳 RNA 中にかんがりの量のグロビン RNA が検出されるが、10月令ではその量が著しく低下する (Deanら)。C57BL/6Jマウスでは6月令に比し27月令の脳 RNA 中のグロビン RNA 量は2倍以上に増大している (Onoら)。一を統合し、それと比較すると、今回ヒトで得られたのと同様の傾向をマウスにも見る。

胎・乳児期の脳で示されているグロビン RNA 量の高い値はバラつきが無い。これは、遺伝的プログラムに従って、この時期に、この遺伝子が、発現されているのを示すのであろう。脳にグロビン RNA とは奇異であるが、予定された結果らしい。一方、成年に達した後、加齢に伴ないグロビン RNA が増大してくる場合は、これと異なり、測定値が個々に大きく分散している。これを、実験誤差が大きいと見るより、むしろ、老化過程の特性を如実に示していると考えるのは無理であろうか。適正な制御機構から、徐々に見放されるのが老化であるのなら、以後の変異は、個々にバラつきを伴ってこそ、然りであろう。

## マウス奇形腫増殖に及ぼす宿主加齢の影響について

窪田和雄, 窪田朗子, 武田俊平, 松沢大樹

(東北大学抗酸菌病研究所・放射線医学部門)

## Host aging and growth of mouse teratocarcinoma OTT6050.

Kazuo Kubota, Rhoko Kubota, Shumpei Takeda, and Taiju Matsuzawa.

(Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai.)

マウス Terato Carcinoma は、分化する腫瘍として Stevens が樹立して以来、多くの研究が行なわれている。Mintz らによりこの腫瘍細胞がマウス妊娠子宮胚盤胞の中に置かれると完全な一個体を形成する分化能力があることが証明された。また多くの研究者により in vitro でも種々の条件により、ある程度分化することが調べられている。しかし、産制圧のための産研究という目的を考えると、個体に形成された腫瘍をコントロールし、その増殖を止め、分化させ、個体を死からまねがれさせることが最も重要である。また産化した一つの細胞が目に見える腫瘍に成長する過程は、宿主の体内環境により支配されている。そこで基礎的研究として、固形腫瘍の奇形産腫が宿主の加齢という生理的条件によりどのような分化と増殖を示すかについて調べてみた。

我々は、129/Sv マウス背部皮下にテラトカルシノーマ OTT 6050 を接種して固形腫瘍をつくり、その増殖と分化が宿主の年齢によりどうちがうかを調べた。腫瘍の大きさはノギスで計り、三直径の積で表わし、さらに解剖時の体積重量をチェックした。増殖曲線を描いてみると、離乳直後のオス・メスでは腫瘍の成長が早く、10週から30週令までは一定であり、50週・70週では成長が遅くなる傾向があった。腫瘍の増殖は腫瘍が小さい時は、指数関数に近いが、腫瘍が大きくなるにつれて成長のスピードはどんどん遅くなり倍加時間は腫瘍の大きさと相関があることがわかった。生存日数を調べてみると週令が進むにつれて長くなった。さらに生存日数は宿主の体重と強い相関があった。また長期生存すればする程、腫瘍も大きくなった。腫瘍が小さい時には未分化胚細胞が非常に多いが、大きくなるにつれて分化した様々の組織と共に、腫瘍の中心部より壊死が出現して来る。分化した組織の出現の状況と年齢、性別については目下検討中である。

腫瘍の増殖は、血液中のホルモンなどの増殖因子、腫瘍間質特に血管新生能力等により支配される細胞の増殖停止と細胞死、奇形腫では未分化胚細胞から終末機能細胞への分化、といったような種々の現象の総和である。現在その機構の解折のため、 $^{125}\text{I}$ -ヨードデオキシウリジン、 $^3\text{H}$ -サイミジンなど使用した細胞動態解析が進行中である。また予備的にホルモンの定量も行った。これらの結果の一部も報告したいと考えている。

荒井秀夫, 高橋秀生, 佐藤研, 伊藤正幸, 永井宏美, 大泉耕太郎, 佐藤博, 本宮雅吉, 今野淳.

(東北大学抗感染病研究所内科)

A Biochemical study of the age-related changes of lung connective tissue.

Hideo ARAI, Hideo TOGASHI, Ken SATOH, Masayuki ITO, Hiromi NAGAI, Kotaro OIZUMI, Hiroshi SATO, Masakichi MOTOMIYA, Kiyoshi KONNO. (Department of Internal Medicine, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University.)

実験動物(ラット, ウサギ等)の肺組織の結合織成分(コラーゲン, エラスチン, グリコサミノグリカン=GAG)の加齢に伴う変動に関する知見は敬見されるが、ヒト肺組織については未だ検討がなされていない。今回剖検ヒト肺で加齢の影響を検討するとともに、特に加齢と密接な関係を有する肺気腫肺について検討した。材料は剖検により得られた正常所見肺37例を年齢群にわけ、また気腫肺4例について生化学的検査をおこなった。

(方法) 剖検肺より可及的に末梢肺組織をとり、細片化し冷却還流下にエタノールで脱ホルマリンし更に、アセトン、エーテルで脱脂乾燥組織を得、出発材料とした。GAGはプロナーゼで徹底的に消化後、TCAで除タンパク、エタノール沈澱、CPC分画により粗GAG画分をえた。GAGの分子種については、ギ酸-ピリジン緩衝液(PH 3.0)中での電気泳動とムコ多糖分解酵素消化試験の結果により同定した。各種GAGの組成比の定量は、児島-中村らの方法に従いストレプトミセスヒアルロニダーゼ、コンドロイチナーゼAC及びコンドロイチナーゼABCを個別に作用させた後、未消化画分をCPC沈澱により回収し、そのウロン酸の発色率より計算により求めた。コラーゲンは肺末梢組織を粉粒とし、熱アルカリ(0.1N水酸化ナトリウム, 95°C)抽出される画分のヒドロオキシプロリンの定量値より、またエラスチンは熱アルカリ処理残渣を酸酵エラスターゼで消化し、可溶化される画分のヒドロオキシプロリンの定量値から換算により求めた。

(結果) GAGの総量は加齢に伴って減少する傾向が認められた。GAG分子種としてはヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ペパラン硫酸が検出されたが、その組成比には各年齢群間で有意の差は認められなかった。また気腫肺では同年令の正常肺に比し、GAG総量は増加していたが、ヒアルロン酸の組成比は有意の減少を示した。しかし、コラーゲン、エラスチンでは、加齢および気腫に伴う著明な変動は認められなかった。

## 中枢神経系の老化

山浦玄詞、伊藤正敏、畑沢 順、松沢大尉。

(東北大学抗酸菌病研究所・放射線医学部門)

## Senile deterioration of the central nervous system.

Harutsugu YAMAURA, Masatoshi ITOH, Jun HATAZAWA, Taiju MATSUZAWA.

(Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai.)

社会の高齢化に伴ない老人痴呆の発生が社会的重大事となってきた。人格の悲惨な荒廃を未然に予防する具体的手段の発見は今日の社会にとって急務である。我々は脳の老化を、生きている人間において正確に診断し、これを予防する手段を樹立するため、以下の研究を行なった。

コンピューター断層撮影装置 (CT) によると、何らの侵襲を与える事なく生きている人間の頭部の断層像を得ることができる。断層像は8mm厚切片においては1×1×8mmの画素から構成され画素内の組織の平均X線吸収値をCT値によって表示している。CT値18以下は脳脊髄液、19から500までは脳、500以上は骨であることが我々の基礎的計測によって明らかにされている。そこで、これらのCT値を有する画素数をCT付属のコンピューターによって数えさせ、これによって脳の体積をはかった。脳の大きさの個人差をなくして相互に比較可能にする為、頭蓋腔の体積を100とした場合の脳の体積を頭蓋脳指数として求めた。また、20才台の頭蓋脳指数が最も高かったので、この平均値を100とした場合の脳体積指数を求め、脳萎縮の指標とした。

用いた症例は、CT上頭部に脳萎縮以外の異常を認めなかった症例131例である。脳体積指数は20才台 $100 \pm 0.6$ 、30才台 $99 \pm 0.6$ 、40才台 $99.3 \pm 0.8$ 、50才台 $98.0 \pm 1.2$ 、60才台 $97.5 \pm 1.2$ 、70才台 $94.7 \pm 2.9$ で、40才台から有意の差 ( $P < 0.001$ ) をもって脳の萎縮が進行することが明らかになった。

この脳萎縮が、老人痴呆と関係があるかどうかを調べる為に、40才以上の64人について長谷川式簡易老人知能スケールによる知能テストを行なった。その結果、長谷川スケールによる点数 (知能の程度を示す) と、脳体積指数の間には $r = 0.434$ 、 $P < 0.01$ で有意の相関があることが明らかにされた。脳の萎縮は知能の低下と有意の関係がある。

脳萎縮の原因のひとつとして動脈硬化が考えられる。我々は、眼底動脈に高度の交叉現象のある者19例と、軽度または正常な者35例について脳体積指数を測定した。この結果、高度に動脈硬化症のある者では、脳体積指数が各年代毎の平均値よりも小さいものが多く、軽度変化あるいは正常者では平均値より大きいものが多かった。これらの2群間の分布には有意の差 ( $P < 0.05$ ) が認められた。動脈硬化は脳萎縮と有意の関係がある。

## 老人における脳の変化と機能に関する 2, 3 の問題について

朝 長 正 徳

東京都老人総合研究所臨床病理

Topics on the morphology and function of the aged human brains

Masanori Tomonaga

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Department of Clinical Pathology (Neuropathology)

脳はおそらく人類の最後の研究標的であり、Neuroscience は脳の老化の問題にも多くの寄与をもたらしているが、高度に分化し、また個体差の大きいヒトの脳の老化の本態解明への道は、まだ五里霧中の状態である。

Bourlière によれば、老年変化は "decrease in viability and an increase in vulnerability of the organism with a decreased adaptation to environmental condition" と、Comfont も、老年期は "deterioration process that whatever one might measure one would be measuring simply a decrease in viability and an increase in vulnearability" と悲観的であり、これは常識的な結論でもある。一方、田内は、老化の中心は "細胞の減数であり、老人ではこれらの数の減少した基本単位個々はむしろ機能亢進、過労の状態にあって、予備力の低下を示している。老化機構の究明は、これらの機序の解明であって、ひいては老化制御の希望にもつながるものであろう" と前向きの姿勢を示している。

この様な先人の結論を考慮に入れながら、老人の脳について以下の点を、自験例を中心に最近の知見を含めて検討する。

- 1) 肉眼的レベルでの変化(脳重, 灰白質, 白質, 脳動脈硬化など)および"呆け"との関係
- 2) 局在 - 老化する部分としない部分
- 3) 細胞レベルでの変化および予備力の問題

細胞の老化，ゾウリムシの場合

樋 渡 宏 一 （東北大学理学部生物学教室）

CELLULAR AGING IN PARAMECIUM

Koichi HIWATASHI (Biological Institute, Tohoku University)

A clone of *Paramecium caudatum* has a limited life span from 300 to 700 fissions after conjugation, which is different in different stocks. Features of cellular aging are observed as decrease in fission rate, increase in abnormal cells and decrease in survival after conjugation. In this study, survival after conjugation was mainly used as the parameter of cellular aging. In some stocks, survival after conjugation decreased in parallel with decrease in fission rate, but in some other stocks, decrease in post-conjugational survival comes earlier than the decrease in fission rate. To analyse the mechanism of postconjugational mortality in aged clone, we used nuclear transplantation technique. Transplantation experiments of micronuclei (germ nuclei) from aged cells to younger ones suggest that the micronucleus is in some way protected against aging.

ヒト細胞の分裂加齢 - その誤解と真実 -

三井 洋司

( 東京都老人総合研究所、薬理学部 )

DIVISION AGING OF HUMAN CELLS - PROBLEMS AND THE TRUTH -

Youji MITSUI

( Department of Pharmacology, TOKYO METROPOLITAN INSTITUTE OF GERONTOLOGY )

ヒトを含め、実験動物から得られた細胞の、*in vitro*における細胞老化について、その著しい研究発展に関わらず、意外に過少評価と過大期待の落差が大きい。老化研究を別のアプローチから進めている研究者だけでなく、この系を使っているプロ自身にも、誤解が無いとはいえない。一度は、公開の場で、この系そのものの是非を含めて、老化研究における位置付けを充分討議しておくことは有意義であろう。

従って、具体的な研究の枝葉や細胞加齢の機序については、一般演題で議論をつくすこととし、本演題では、この系全体の *introduction* をかねながら、以下の諸点について話題を提供し、会場から多くの批判、コメントをいただくことを目的とする。

- 1、ヒトの加齢依存死はあるか？
- 2、ヒト老化 (*in vivo*) と細胞分裂加齢 (*in vitro*) との関係は？
- 3、細胞分裂寿命は動物種特異的か？
- 4、分裂加齢は線維芽細胞だけにあるか？
- 5、細胞分裂加齢研究の見取り図？

**Contents of vol 1~3  
(1977—1979)**

# Volume 1 (1977)

## MORPHOLOGY OF AGING: SUMMARY AND PROSPECT

Hisashi TAUCHI (Department of Pathology, Aichi Medical University).....6

## A METHOD FOR SOLUBILIZATION OF VITAMIN E INTO CULTURE MEDIUM

Hiroshi SAKAGAMI, Masa-atsu YAMADA (Department of Physiological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo).....8

## A STUDY ON THE CRITERIA OF AGING IN CULTURED FIBROBLASTS

Toshiharu MATSUMURA (Department of Pathobiochemical Cell Research, Institute of Medical Science, University of Tokyo).....10

## GROWTH OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS IN A SERUM-FREE MEDIUM

Isao YAMANE (Department of Cell Biology, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....12

## METABOLIC AGE AND DOUBLING POTENTIAL OF HUMAN EMBRYO FIBROBLASTS

Kazuhiko KAJI, Mitsuyoshi MATSUO (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....14

## AGING OF CELL SURFACE MEMBRANES IN CULTURED HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS

Shinichi AIZAWA, Fumiko KURIMOTO (Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....16

## CHANGES IN $\beta$ -FRUCTOFURANOSIDASE AND POLYGALACTURONASE ASSOCIATED WITH RIPENING OF TOMATO FRUIT AFTER HARVEST

Nagao OGURA, Hiroto HIRATA, Hiroki NAKAGAWA, Hidetaro TAKEHANA (Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Horticulture, Chiba University).....18

## CLONAL LIFE-SPAN AND AGING IN PARAMECIUM CAUDATUM

Yoshiomi TAKAGI, Michiko YOSHIDA (Department of Biology, Faculty of Science, Nara Women's University).....20

## EFFECT OF TEMPERATURE ON THE CLONAL LIFE SPAN OF PARAMECIUM AURELIA

Shinichi FUKUSHIMA (Department of Hygiene, Kinki University School of Medicine).....22

## LIFE SPAN OF MAMMALIAN CELLS IN VITRO AND THEIR AGE-RELATED CHANGES IN BIOLOGICAL ACTIVITIES

Osamu NIKAIDO (Radiation Biology Centre, Kyoto University), Sadayuki BAN, Tsutomu SUGAHARA (Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University)...24

VARIATIONS IN SENSITIVITY TO ACTIVE OXYGEN SPECIES DURING IN VITRO AGING OF CHICK AND HUMAN EMBRYO FIBROBLASTS	
Shuji HONDA, Mitsuyoshi MATSUO (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	26
OPACITY-RELATED CALCIUM ION LEVEL IN LENS	
Shuzo IWATA, Makoto TAKEHANA (Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University).....	28
AGE RELATED CHANGE IN GLUCOCORTICOID RECEPTOR IN RAT LIVER	
Ikuo MORITA, Yasuko KOSHIHARA, Mieko KAWAMURA, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	30
DIFFERENT KINETICS OF OXYGEN-UPTAKE OF HEMOLYSATE FROM YOUNG AND OLD RAT	
Hiroaki NAGASAKI, Sanae ISHII, Masami IRIKI (Department of Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	32
AGE-RELATED CHANGES IN COLLAGEN CROSS-LINKING	
Yoshinori KUBOKI, Mitsuyoshi TAKAHASHI, Satoshi SASAKI (Department of Biochemistry, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical Dental University).....	34
AGE-RELATED CHANGES IN THE STRUCTURE OF MOUSE GLOMERULI AND THE ACCERELATION BY IONIZING RADIATION	
Shunsaku SASAKI, Fumiaki SATO (Department of Radiation Hazard, National Institute of Radiological Sciences).....	36
INTESTINAL MICROFLORA AND AGING; CHANGES IN ENZYME ACTIVITIES IN THE DIGESTIVE TRACT AND OTHER ORGANS OF AGED CONVENTIONAL, GNOTOBIOTIC, AND GERMFREE RATS	
Yasuo KAWAI (Department of Intestinal Microbiology, Yakult Institute).....	38
GERONTOLOGICAL SIGNS IN THE BIOLOGICAL RESPONSES TO BACTERIAL ENDOTOXIN (LPS)	
Motoki YAMANAKA, Kikuko NISHIZATO (Department of Microbiology, Osaka Medical College)...	40
STUDY OF AGING IN A STRAIN OF FREE-LIVING NEMATODE, RHABDITIDAE TOKAI	
Kenshi SUZUKI, Masao HYODO, Naoaki ISHII, Yoko MORIYA (Department of Molecular Biology, School of Medicine, Tokai University).....	42
AGING OF THE NEMATODE: (1) AGE SYNCHRONY (2) AGE-RELATED CHANGES IN BEHAVIOR	
Ryuji HOSONO (Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University), H. F. EPSTEIN (Stanford University).....	44
AGING AND NUCLEAR POLYPLOIDIZATION IN HEPATIC CELLS OF THE TELEOST, ORYZIAS LATIPES	
Akihiro SHIMA (Department of Experimental Radiology, Shiga University of Medical Science), Nobuo EGAMI (Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo)...	46
AGE-RELATED CHANGES IN NUCLEAR DNA: 1. HEART AND HEPATIC CELLS	
Kazuo NAKANISHI, Setsuya FUJITA (Department of Pathology, Kyoto Prefectural University of Medicine).....	48

STUDIES ON THE LIPOFUSCIN-LIKE FLUORESCENT SUBSTANCES

Hiroyuki SHIMASAKI, Nobuo UETA (Department of Biochemistry, Teikyo University School of Medicine), O. S. PRIVETT (Hormel Institute, University of Minnesota).....50

AGE-RELATED CHANGES IN THE DEPOSIT OF LIPOFUSCIN IN HUMAN HEPATIC CELLS

Tsuneko SATO (Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital), Hisashi TAUCHI (Department of Pathology, Aichi Medical University).....52

HISTOCHEMICAL STUDIES ON THE FIBRILLARY STRUCTURES IN NEURON: (1) DISTRIBUTION OF ACTIN IN CENTRAL NERVOUS SYSTEM---EVIDENCE FROM FLUORESCENT ANTIBODY STAINING

Tsuyoshi ISHII (Department of Fundamental Research, Psychiatric Research Institute of Tokyo).....54

CHANGES OF SULFATED GLYCOGLYCEROLIPIDS METABOLISM WITH AGING IN RAT CENTRAL NERVOUS SYSTEM AND HUMAN TESTIS

Mitsushi INOMATA, Kunihiro UENO (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Ineo ISHIZUKA (Department of Biochemistry, Teikyo University School of Medicine).....56

SUPPRESSION OF AGING AND CHANGES IN THE BRAIN-THYROID SYSTEM IN NUTRITION-RESTRICTED RATS

Hiroshi OOKA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....58

NODULE FORMATION ON ADRENAL CORTEX AND AGING

Hideo TSUCHIYAMA (Department of 2nd Pathology, Nagasaki University School of Medicine)..60

AGE-RELATED CHANGES IN RESISTANCE AGAINST INTERNAL AND EXTERNAL STIMULI TO THE RAT

Makoto SUGIYAMA (Department of Fundamental Medicine, Research Institute of Geriatrics, Nippon Medical School).....62

EFFECT OF LIGHTING CONDITIONS ON THE PATTERNS OF MOVEMENT IN AGING MICE

Minoru OKUGI, Toshiaki SUZUKI, Kazuko KOJIMA (Animals Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....64

BEHAVIORAL CHARACTERISTICS OF MICE IN AN AGING POPULATION

Takeo MACHIDA (Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University), Tetsuo NOUMURA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....66

COMPARISON OF AGING BETWEEN URBAN EUROPIANS IN THE 18TH CENTURY AND PEOPLE IN ADVANCED COUNTRIES IN THE 20TH CENTURY

Osazumi YAGO, Tadao IKEDA (Laboratory of Fundamental Radiology, Department of Research, St. Marianna Ika Daigaku), Takao ICHKAWA (Faculty of Science and Technology, Aoyama University), Nobuo FUKUDA (Department of Clinical Medicine, National Institute of Radiological Sciences).....68

# Volume 2 (1978)

## AGING AND ENDOCRINE FUNCTION

Hiroo IMURA (2nd Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University).8

## THE SIGNIFICANCE OF AGING IN ADAPTATION AND EVOLUTION---AN APPROACH BY THE SIMULATION OF LIFE TABLE

Osazumi YAGO, Tadao IKEDA (Laboratory of Fundamental Radiology, Department of Research, St. Marianna Ika Daigaku), Takao ICHIKAWA (Faculty of Science and Technology, Aoyama University), Nobuo FUKUDA (Department of Clinical Medicine, National Institute of Radiological Sciences).....10

## MULTIVARIABLE ANALYSIS OF AGING

Toshiyuki FURUKAWA, Hiroshi TANAKA, Sei-ichi TAKASUGI, Kazuyoshi YAJIMA (Institute of Medical Electronics, Faculty of Medicine, University of Tokyo).....12

## REVIEWING SURVEY OF THE LITERATURES ON STRAINS OF MICE USED IN THE AGEING RESEARCHES

Takashi A. NOMAGUCHI (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Masayoshi KANISAWA (Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Kunio OOTA (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....14

## TESTING THE CLOSED LIFE CYCLE IN PARAMECIUM CAUDATUM

Michiko YOSHIDA, Yoshiomi TAKAGI (Department of Biology, Faculty of Science, Nara Women's University).....16

## CHANGES IN THE VISUAL EVOKED POTENTIALS OF THE RABBIT WITH AGE

Takeru MINAMISAWA (Division of Radiational Hazards, National Institute of Radiational Sciences), Takehiko TSUCHIYA (Department of Radiation Biology and Health, University of Occupational and Environmental Health).....18

## CHANGES OF CATION LEVEL IN AGED HUMAN LENS

Shuzo IWATA, Makoto TAKEHANA, Yumiko HAYASHI (Department of Biophysical Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Meijo University).....20

## IMMUNOLOGICAL ABNORMALITIES OF WERNER'S SYNDROME

Makoto GOTO (Department of Internal Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo).....22

## PATHOLOGY OF THE CENTENARIANS; INVESTIGATION OF 23 CASES

Toshiharu ISHII (Department of Pathology, School of Medicine, Keio University).....24

COMPUTED TOMOGRAPHY OF BRAIN ATROPHY DURING AGING

Masatoshi ITOH, Harutsugu YAMAURA, Satoshi ENDOH, Fumio SHISHIDO, Kenji YAMADA, Hisao ITOH, Taiju MATSUZAWA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....26

AGE-RELATED CHANGES OF AXONS---MORPHOLOGICAL FEATURES---

Kohshiro FUJISAWA (Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences).....28

STUDY OF ANGIOGENESIS DURING AGING

Harutsugu YAMAURA, Taiju MATSUZAWA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....32

AGE-RELATED CHANGES IN CELLS OF VARIOUS ORGANS IN THE MOUSE

Taiju MATSUZAWA, Fumio SHISHIDO, Tachio SATO, Sachiko HAMASHIMA, Akiko KAWAMURA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....32

A MORPHOMETRIC STUDY OF AGE-DEPENDENT CHANGES IN RAT LIVER

Tsuneko SATO (Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital), Hisashi TAUCHI (Department of Pathology, Aichi Medical University).....34

AGE-RELATED FUNCTIONAL CHANGES IN HEPATIC RIBOSOMES OF THE MOUSE

Nozomu MORI, Den-ichi MIZUNO, Sataro GOTO (Division of Microbial Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo).....36

AGE-RELATED CHANGES IN 5'-NUCLEOTIDASE IN CELL MEMBRANE

Shigenobu NAKAMURA, Masakuni KAMEYAMA (Department of Geriatric Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University).....38

EFFECT OF AGING ON PROSTAGLANDIN BIOSYNTHESIS IN RAT LIVER

Ikuo MORITA, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....40

INTESTINAL MICROFLORA AND AGING; QUALITATIVE ALTERATIONS OF DUODENAL MUCOSAL ALKALINE PHOSPHATASE IN AGED CONVENTIONAL AND GERMFREE RATS

Takahiko ISHII, Yasuo KAWAI, Masahiko MUTAI (Department of Intestinal Microbiology, Yakult Institute).....42

AGE-RELATED CHANGES IN LDH ISO-ENZYMES ON THE RATS

Takeshi NOZAWA (Department of Internal Medicine, Hira National Hospital), Hiroyuki SHIMASAKI (Department of Biochemistry, Teikyo University School of Medicine), Seiichi KAWAKITA (Department of Internal Medicine, Shiga Medical college), O. S. PRIVETT (Hormel Institute, University of Minnesota).....44

AGE-RELATED CHANGES IN THE ACTIVATION OF THYROID HORMONE BY RAT TISSUES

Hiroshi OOKA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....46

STUDY OF LIPID PEROXIDE AS A RISK FACTOR OF OBESITY Eiji OHTSU, Satoshi ENDOH, Atsushi OHKI, Yoshiko HATANO, Hisao ITOH, Taiju MATSUZAWA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....	48
LONGEVITY AND BODY WEIGHT LOSS OF SILKWORM MOTH, BOMBYX MORI, VARIED BY DIFFERENT TEMPERATURE TREATMENTS Minoru OSANAI (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	50
STUDIES ON THE MECHANISM OF ADAPTATION IN RESTRICTED FEEDING CONDITIONS Minoru OKUGI, Toshiaki SUZUKI (Animals Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	52
PRESERVATION OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS BY FREEZING Kiyotaka YAMAMOTO, Hiroshi KONDO (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Mochihiko OHASHI (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	54
AGING PARAMETERS OF CHICK EMBRYO FIBROBLASTS IN CULTURE Mitsuyoshi MATSO, Kazuhiko KAJI (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	56
AGE-RELATED CHANGES IN SURFACE MEMBRANES OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS Shinichi AIZAWA, Fumiko KURIMOTO (Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	58
LIFE SPANS AND CHARACTERIZATION OF FRACTIONATED HUMAN DIPLOID CELLS Koji MATSUOKA, Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	60
SATURATION DENSITY AND IN VITRO AGING OF CHICK AND HUMAN EMBRYO FIBROBLASTS Kazuhiko KAJI, Mitsuyoshi MATSUO (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	62
AGE-RELATED CHANGES IN THE CELLULAR RESPONSE TO GROWTH FACTORS Tadao OHNO (Division of Pharmaceutical Sciences, National Institute of Radiological Sciences).....	64
EFFECTS OF HYDROCORTISONE ON THE CULTURE LIFESPAN OF HUMAN FETAL LUNG FIBROBLASTS--- SPECIFICITY AND SPECIFIC BINDING Hiroshi KONDO, Hiroko KASUGA, Tetsuo NOUMURA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	66
LIFESPAN SHORTENING OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS IN CULTURE DUE TO HYPERBARIC OXYGEN Shuji HONDA, Mitsuyoshi MATSUO (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	68

STUDY FOR AGING MECHANISMS USING CULTURED MAMMALIAN CELL; ACCELERATION OF AGING BY EXPOSURE TO RADIATION

Sadayuki BAN, Tsutomu SUGAHARA (Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University), Osamu NIKAIDO (Radiation Biology Centre, Kyoto University).....70

ANALYSIS OF AGING PROCESS IN CULTURED HUMAN EMBRYONIC FIBROBLAST---INJURY AND REPAIR IN DNA

Fumio SUZUKI, Masakatsu HORIKAWA (Division of Radiation Biology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University), Sadayuki BAN (Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University).....72

# Volume 3 (1979)

NEW EXPERIMENTAL ANIMALS PRODUCED BY MICROSURGERY OF MAMMALIAN EGG Nakaaki OSAWA (Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo).....	10
AGING AND IMMUNE SYSTEM Toshihiko SADO (Division of Physiology and Pathology, National Institute of Radiological Sciences).....	12
AGING PROCESS OF A NEMATODE, CAENORHABDITIS ELEGANS---AN APPROACH BY THE SURVIVAL CURVE Ryuji HOSONO (Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University), Yoshiko SATO, Shinichi AIZAWA (Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	14
CHANGES IN THE SIZE OF AMINO ACID POOLS IN THE AGING SILKWORM MOTH, BOMBYX MORI Minoru OSANAI (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Sumiko KIKUTA (The Central Hospital of Okayama).....	16
LIFE SPAN OF THE FRUIT FLY, DROSOPHILA VIRILIS: VARIATION AMONG STRAINS AND DIFFERENT ENVIRONMENTAL CONDITIONS Shigeru OHBA (Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University).....	18
EFFECT OF ECOLOGICAL CONDITIONS (SEX RATIO, DENSITY) ON THE LIFE SPAN OF THE FRUIT FLY Toshiro AIGAKI, Shigeru OHBA (Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University).....	20
AGE-RELATED CHANGES IN THE EGG PRODUCTION AND HATCHING RATE OF THE FRUIT FLY, DROSOPHILA VIRILIS Akihiko YAMAMOTO, Shigeru OHBA (Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University).....	22
EFFECTS OF AGING ON PLASMA TESTOSTERONE LEVELS AND BEHAVIORAL MEASURES IN MALE MICE Yumiko YONEZAWA, Minoru OSANAI, Tetsuo NOUMURA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Takeo MACHIDA (Department of Biology, Faculty of Science, Kagoshima University).....	24
LOW SULFATION MECHANISM OF PROTEO-CHONDROITIN SULFATE IN RAT COSTAL CARTILAGE WITH AGING Atsushi HONDA, Yo MORI (Department of Biochemistry, Tokyo College of Pharmacy), Midori ABE, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	26

A STUDY ON THE LIPID METABOLISM IN THE AGED: THE DIFFERENCE IN THE CONTENT OF LIPIDS OF SERUM $\alpha$ AND $\beta$ -LIPOPROTEINS BETWEEN MIDDLE-AGED AND SENESCENT WOMEN Shinji NAKAJIMA, Shoko NAKANO (Department of Biochemistry, Research Institute of Geriatrics, Nippon Medical School), Hiroshi MISU (Shitaya Public Health Office).....	28
AGE CHANGES IN CELL SURFACES OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS: DIFFERENCES DEPENDING ON LECTINS USED Shinichi AIZAWA, Fumiko KURIMOTO (Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	30
CELL SURFACE CHANGES ACCOMPANYING AGING IN HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS: TISSUE DIFFERENCES AND DONOR'S AGE Shinichi AIZAWA, Fumiko KURIMOTO (Department of Nutrition, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	32
CHANGES OF CELL SURFACE GLYCOSAMINOGLYCANS IN HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS DURING IN VITRO CELLULAR AGING Kozi MATUOKA, Youji MITSUI (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	34
GLYCOSPHINGOLIPIDS DURING THE AGING OF CULTURED HUMAN FIBROBLASTS Takako OHSAWA, Yoshitaka NAGAI (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	36
SUSCEPTIBILITY OF RED BLOOD CELL MEMBRANES TO $\theta$ -TOXIN---A POSSIBLE PARAMETER OF AGING IN INDIVIDUAL Yoshitaka NAGAI, Susumu ANDO (Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Yasukazu TANAKA (Instrumental Analysis Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Junichi HASE (Toyama Medical and Pharmaceutical College, Faculty of Pharmaceutical Science).....	38
AN ANALYSIS OF AGING MECHANISM OF HUMAN DIPLOID CELLS: EFFECTS OF GROWTH FACTORS ON THE CELLS IN A SERUM-FREE MEDIUM Hiroyoshi HOSHI, Mikio KAN, Isao YAMANE (Department of Cell Biology, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....	40
CELLULAR AGING OF HUMAN EMBRYO FIBROBLASTS (TIG-1) TREATED WITH EGF OR FGF Kazuhiko KAJI, Mitsuyoshi MATSUO (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	42
EFFECT OF THE PLATELET GROWTH FACTOR ON THE PROLIFERATION OF HUMAN LUNG FIBROBLASTS Tadao OHNO (Division of Pharmaceutical Sciences, National Institute of Radiological Sciences).....	44
AGE RELATED QUALITATIVE CHANGE IN PROSTAGLANDIN SYNTHETASE ACTIVITIES IN HUMAN DIPLOID LUNG FIBROBLASTS WITH IN VITRO AGING Sei-itsu MUROTA, Youji MITSUI, Mieko KAWAMURA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	46

CELL FREEZING OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS---EFFECTS OF IN VITRO AGING AND CELL GROWTH Hiroshi KONDO, Kiyotaka YAMAMOTO (Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	48
DO THE CULTURED TELEOST CELLS AGE? Akihiro SHIMA, Shigeo SHINOHARA (Department of Experimental Radiology, Shiga University of Medical Science), Osamu NIKAIDO (Radiation Biology Centre, Kyoto University), Nobuo EGAMI (Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo).....	50
HETEROGENEITY IN THE LIFE SPAN OF CULTURED HUMAN DIPLOID CELLS Sadayuki BAN, Tsutomu SUGAHARA (Department of Experimental Radiology, Faculty of Medicine, Kyoto University).....	52
ACCUMULATION OF POLYPLOID CELLS DURING IN VITRO AGING OF CHICK EMBRYO FIBROBLASTS Mitsuyoshi MATSUO, Kazuhiko KAJI (Laboratory of Isotopes, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).....	54
CHANGES IN GROWTH INHIBITION EFFECT OF MOUSE BRAIN EXTRACT ON CULTURED CANCER CELL ASSOCIATED WITH DEVELOPMENT AND AGING Yumiko ENDO, Shumpei TAKEDA, Taiju MATSUZAWA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....	56
IMMUNOLOGICAL ABNORMALITIES OF WERNER'S SYNDROME (II) Makoto GOTO (Department of Internal Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo).....	58
STUDY OF INHERITED SEGMENTAL PROGEROIDS: AN APPROACH TO THE MECHANISM OF AGING Yoshisada FUJIWARA, Yoshio KANO, Mariko TATSUMI (Department of Radiation Biophysics, Kobe University School of Medicine).....	60
AGE-RELATED DECLINE IN H1 HISTONE FRACTION IN HUMAN DIPLOID FIBROBLAST CULTURES Youji MITSUI, Hiroshi SAKAGAMI, Sei-itsu MUROTA (Department of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology), Masa-atsu YAMADA (Department of Physiological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo).....	62
CHANGES IN H1 SUBFRACTION OF HISTONES AND CHROMATIN STRUCTURE IN HEPATIC CELLS OF THE RAT DURING AGING Keiko SHINDO, Akinobu MORIKAWA, Yoshiki OHBA (Department of Biopharmacology, Faculty of Pharmacology, Kanazawa University).....	64
CHANGES IN HEPATIC CELL MITOCHONDRIA DURING PARABIOSIS BETWEEN OLD AND YOUNG RATS Tsuneko SATO (Department of Pathology and Clinical Laboratories, Aichi Cancer Center Hospital), Hisashi TAUCHI (Department of Pathology, Aichi Medical University).....	66
INTESTINAL MICROFLORA AND AGING; CHANGES IN ENZYME ACTIVITIES IN THE DIGESTIVE TRACT AND THE LIVER OF AGED CONVENTIONAL AND GERMFREE RATS Takahiko ISHII, Yasuo KAWAI, Masahiko MUTAI (Department of Intestinal Microbiology, Yakult Institute).....	68

<b>EFFECT OF AGE ON BSP HEPATIC FUNCTION: A QUANTITATIVE STUDY BY CYTOFLUOROMETRY</b> Kazuo NAKANISHI, Masaru FUKUDA, Setsuya FUJITA (Department of Pathology, Kyoto Prefectural University of Medicine).....	70
<b>AGE-ASSOCIATED AXONAL DYSTROPHY: "HYPERTROPHIC" CHANGE OF TERMINAL AXONS</b> Kohshiro FUJISAWA (Department of Neuropathology, Tokyo Metropolitan Institute for Neurosciences).....	72
<b>AN ANALYSIS OF HUMAN PLATELET SURVIVAL CURVE BY MEANS OF AN AGING MODEL</b> Osazumi YAGO, Tadao IKEDA (Laboratory of Fundamental Radiology, Department of Research, St. Marianna Ika Daigaku), Takao ICHIKAWA (Faculty of Science and Technology, Aoyama University), Nobuo FUKUDA (Department of Clinical Medicine, National Institute of Radiological Sciences), Yushiro WATANABE, Kazuhiko OKABE (Department of Internal Medicine, St. Marianna Ika Daigaku).....	74
<b>AN ANIMAL MODEL OF SENESCENCE BEING DEVELOPED WITH MICE</b> Toshio TAKEDA, Masanori HOSOKAWA, Shuji TAKESHITA, Mika IRINO, Takatoshi MATSUSHITA, Yumiko TOMITA, Kimio YASUHIRA (Department of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University), Hajime HAMAMOTO, Katsuji SHIMIZU, Masaharu ISHII, Takao YAMAMURO (Department of Orthopedic Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University).....	76
<b>COMPUTED TOMOGRAPHY OF BRAIN ATROPHY DURING AGING (II)</b> Masatoshi ITOH, Harutsugu YAMAURA, Tachio SATO, Taiju MATSUZAWA (Department of Radiology and Nuclear Medicine, Research Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University).....	78

# Author index

- Abe, M. (3)26  
Aigaki, T. (3)20  
Aizawa, S. (1)16, (2)58, (3)14  
30,32  
Ando, S. (3)38, (4)76  
Arai, H. (4)110  
  
Ban, S. (1)24, (2)70,72, (3)52  
  
Cutler, R. G. (4)106  
  
Egami, N. (1)46, (3)50  
Endo, Y. (3)56  
Endoh, S. (2)26,48, (4)34,50  
Epstein, H. F. (1)44  
  
Fujisawa, K. (2)28, (3)72, (4)32  
Fujita, S. (1)48, (3)70, (4)100  
Fujiwara, Y. (3)60, (4)102  
Fukuda, M. (3)70, (4)100  
Fukuda, N. (1)68, (2)10, (3)74  
Fukui, S. (4)70  
Fukushima, S. (1)22, (4)92  
Furukawa, T. (2)12  
  
Goto, K. (4)102  
Goto, M. (2)22, (3)58  
Goto, S. (2)36, (4)96,98  
Goto, Y. (4)42  
  
Hamamoto, H. (3)76  
Hamashima, S. (2)32  
Hase, J. (3)38, (4)76  
Hatano, Y. (2)48  
Hatazawa, J. (4)34,50  
Hayashi, Y. (2)20  
Higuchi, K. (3)76, (4)12,16  
Hirata, H. (1)18  
Hirata, T. (4)42  
Hiwatashi, K. (4)115  
Honda, A. (3)26  
Honda, S. (1)26, (2)68, (4)86  
Horikawa, M. (2)72  
Hoshi, H. (3)40, (4)78  
Hosokawa, M. (3)76, (4)12,14,16,18  
Hosono, R. (1)44, (3)14  
Hyodo, M. (1)42  
  
Ichikawa, T. (1)68, (2)10, (3)74  
Ide, H. (4)82  
Ikeda, T. (1)68, (2)10, (3)74  
Imura, H. (2)8  
Inomata, M. (1)56  
Iriki, M. (1)32  
Irinno, M. (3)76, (4)12,14  
Ishii, M. (3)76, (4)12  
Ishii, N. (1)42, (4)60  
Ishii, S. (1)32  
Ishii, T. (1)54  
Ishii, T. (2)24  
Ishii, T. (2)42, (3)68  
Ishizuka, I. (1)56  
Ito, M. (4)110  
Itoh, H. (2)26,48, (4)38  
Itoh, M. (2)26, (3)78, (4)34  
Iwata, S. (1)28, (2)20  
  
Kaji, K. (1)14, (2)56,62  
(3)42,54, (4)88  
Kameyama, M. (2)38  
Kan, M. (1)12, (3)40, (4)78  
Kanazawa, N. (4)90  
Kaneda, T. (4)40,42  
Kanisawa, M. (2)14, (4)22  
Kano, Y. (3)60  
Kasai, R. (4)18  
Kasuga, H. (2)66  
Kasuga, T. (4)62  
Kator, K. (4)106  
Kawai, Y. (1)38, (2)42, (3)68,  
(4)52,54  
Kawakita, S. (2)44  
Kawamura, A. (2)32  
Kawamura, M. (1)30, (3)46  
Kawashima, S. (4)26  
Kikuta, S. (3)16  
Kimura, S. (4)56,58  
Kitani, K. (4)46  
Kobayashi, Y. (4)26  
Koga, A. (4)58  
Kojima, K. (1)64  
Komai, M. (4)56  
Kondo, H. (2)54,66, (3)48, (4)82  
Konno, K. (4)110  
Koshihara, Y. (1)30  
Koshima, K. (1)64  
Kuboki, Y. (1)34  
Kubota, K. (2)26, (4)108  
Kubota, R. (4)108  
Kuramoto, K. (4)36  
Kurimoto, F. (1)16, (2)58, (3)30,32  
  
Machida, T. (1)66, (3)24  
Matsumura, A. (4)14  
Matsumura, T. (1)10  
Matsuo, M. (1)14,26, (2)56,62,68  
(3)42,54, (4)86,88  
Matsuoka, K. (2)60, (3)34, (4)74  
Matsushita, T. (3)76, (4)12,14,18  
Matsuzawa, T. (2)26,30,32,48,  
(3)56,78, (4)34,38,50,108  
Minamisawa, T. (2)18  
Minamoto, Y. (4)78  
Misu, H. (3)28  
Mitsui, Y. (1)16, (2)58,60, (3)14,  
32,34,46,62, (4)74,104,116  
Miyasawa, T. (4)40,42  
Mizuno, D. (2)36  
Mori, N. (2)36, (4)96,98  
Mori, Y. (3)26  
Morikawa, A. (3)64  
Morita, I. (1)30, (2)40, (4)36  
Moriya, Y. (1)42

Motomiya, M. (4)110  
 Murota, S. (1)30, (2)40, (3)26  
 46, 62, (4)36, 74  
 Mutai, M. (2)42, (3)68  
  
 Nagai, H. (4)110  
 Nagai, Y. (3)36, 38, (4)76  
 Nagasaki, H. (1)32  
 Nakagawa, H. (1)18  
 Nakajima, S. (3)28  
 Nakamura, S. (2)38  
 Nakanishi, K. (1)48, (3)70  
 (4)100  
 Nakano, S. (3)28  
 Nakazawa, T. (4)96  
 Nanba, M. (4)84  
 Nikaido, O. (1)24, (2)70, (3)50  
 Nishizato, K. (1)40  
 Nomaguchi, T. A. (2)14, (4)20  
 Noumura, T. (1)66, (2)66, (3)24  
 Nozawa, T. (2)44  
  
 Ogura, N. (1)18  
 Ohashi, M. (2)54, (4)94  
 Ohba, S. (3)18, 20, 22  
 Ohba, Y. (3)64  
 Oñki, A. (2)48  
 Ohno, T. (2)64, (3)44, (4)80  
 Ohsawa, N. (3)10  
 Ohsawa, T. (3)36  
 Ohtsu, E. (2)48  
 Oizumi, K. (4)110.  
 Okabe, H. (4)36  
 Okabe, K. (3)74  
 Okugi, M. (1)64, (2)52, (4)36  
 Onodera, H. (4)42  
 Ooka, H. (1)58, (2)46, (4)72  
 Oota, K. (2)14  
 Osanai, M. (2)50, (3)16, 24,  
 (4)64, 66  
 Privett, O. S. (1)50, (2)44  
  
 Sado, T. (3)12  
 Saito, M. (4)76  
 Sakagami, H. (1)8, (3)62, (4)104  
 Sasaki, S. (1)34  
 Sasaki, S. (1)36, (4)62  
 Sasaki, Y. (4)34, 50  
 Sato, F. (1)36, (4)62  
 Sato, H. (4)110  
 Sato, K. (4)68  
 Sato, K. (4)110  
 Sato, T. (1)52, (2)34, (3)66  
 (4)48  
 Sato, T. (2)32, (3)78  
 Sato, T. (4)44  
 Sato, Y. (3)14  
 Seki, H. (4)30  
 Serizawa, T. (4)42  
 Shima, A. (1)46, (3)50  
 Shimasaki, H. (1)50, (2)44  
 Shimizu, K. (3)76, (4)12, 18  
 Shindo, K. (3)64  
 Shinohara, S. (3)50  
 Shishido, F. (2)26, 32  
 Sugahara, T. (1)24, (2)70, (3)52  
 Sugawara, H. (4)42  
 Sugiyama, M. (1)62, (4)24  
 Suzuki, F. (2)70  
 Suzuki, J. (4)30  
 Suzuki, K. (1)42, (4)60  
 Suzuki, T. (1)64, (2)52  
  
 Taguchi, T. (4)94  
 Takagi, Y. (1)20, (2)16, (4)90  
 Takahashi, M. (1)34  
 Takasugi, S. (2)12  
 Takeda, S. (3)56, (4)38, 108  
 Takeda, T. (3)76, (4)12, 14, 16  
 Takehana, H. (1)18  
 Takehana, M. (1)28, (2)20  
 Takeshita, S. (3)76, (4)12, 14  
 16, 18  
 Tanaka, H. (2)12  
  
 Tanaka, S. (4)30  
 Tanaka, Y. (3)38, (4)76  
 Tatsumi, M. (3)60  
 Tauchi, H. (1)6, 52, (2)34  
 (3)66, (4)48  
 Togashi, H. (4)110  
 Tomita, Y. (3)76, (4)12  
 Tomonaga, M. (4)28, 114  
 Tsuchiya, T. (2)18  
 Tsuchiyama, H. (1)60  
  
 Uchida, Y. (4)28  
 Ueno, K. (1)56  
 Ueta, N. (1)50  
  
 Van Bezooijen, C. F. A. (4)46  
  
 Watanabe, T. (3)74, (4)54  
  
 Yago, O. (1)68, (2)10, (3)74  
 Yajima, K. (2)12  
 Yamada, K. (2)26, (4)34, 50  
 Yamada, K. (4)42  
 Yamada, M. (1)8, (3)62  
 Yamamoto, A. (3)22  
 Yamamoto, K. (2)54, (3)48 (4)72  
 Yamamoto, M. (4)72  
 Yamamuro, T. (3)76, (4)12, 18  
 Yamanaka, M. (1)40  
 Yamane, I. (1)12, (3)40, (4)78  
 Yamashina, I. (4)70  
 Yamashita, S. (4)68  
 Yamaura, H. (2)26, 30, (3)78,  
 (4)34, 112  
 Yasuhira, K. (3)76, (4)12, 14  
 Yoda, B. (4)42  
 Yonezawa, Y. (3)24, (4)66  
 Yoshida, H. (4)70  
 Yoshida, M. (1)20, (2)16  
 Yoshimoto, T. (4)30  
 Yoshioka, S. (4)34, 50