

日本基礎老化研究会

第5回大会講演要旨集

基礎老化研究

BIOMEDICAL GERONTOLOGY

5

1981

日本基礎老化研究会

Japan Society for Biomedical Gerontology

日本基礎老化研究会

第5回大会

会 期 昭和56年5月15日(金), 16日(土)

会 場 愛知医科大学病院第1講義室
愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21

世話人 田 内 久
愛知医科大学病理学教室
〒480-11 愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21
電話 (05616) 2-3311 内線 2502
(連絡に関しては 内線 2503)

参会の皆様へ

1. 受付では参会費1,500円お支払いのうえ、参加証を受けとり、所属とお名前をご記入下さい。
2. 第1日午後6時10分より、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、愛知医科大学内にて懇親会を行います。ふるって御参加下さい。(会費無料)
4. 一般講演は、原則として15分以内、討論5分です。(時間を厳守して下さい。)
5. スライドプロジェクターは1台・スライド(35mmサイズ)は、早めに受付へお渡し下さい。
6. 昼食は、愛知医大病院11階の食堂を御利用下さい。

会場案内

玄関ロビー (3F)	会員休憩室(第1会議室) 運営委員会会場(第2会議室) 公衆電話、タクシー専用電話、両替機
会場受付 (2F)	エレベーターで2階に降りて下さい。
喫茶店 レストラン (11F)	A.M.10:00~P.M.6:30 (昼食時は1F及び別館にも食堂があります。)
自動販売機 (1F)	タバコ、ジュース、その他
なお、御来場の節は病院正面玄関よりお入り下さい。	

日本基礎老化研究会 第5回大会プログラム

第1日 5月15日(金)

10:00~11:05 開 会 挨 拶

愛知医大・病理 田 内 久

~~~~~ 一 般 講 演 ~~~~~

10:05~11:25

座長 埼玉大・理・生体制御 能 村 哲 郎

1. ハツカネズミの生殖寿命
都老研・生物 野間口 隆
2. Wistar及びF-344ラットの寿命と形態所見
都老研・基病理・実験動物・臨生理 蟹沢 成好 倉本 和直
木谷 健一 太田 邦夫
3. 食餌制限と適応反応
(2) 寿命及び老齢マウスの臨床病理所見について
都老研・実験動物 奥木 実 倉本 和直
太田 邦夫
4. ラットにおける尿タンパク排泄に対する食餌制限の影響
都老研・栄養 藤田 美明 力丸 徹
市川みね子 栗本 文子

11:25~12:45

座長 都老研・基病理 田 中 康 一

5. 魚類遺伝性メラノーマの発生における年齢依存性
京大・教養・生物 尾里健二郎 若松 佑子
6. マウスの寿命と自然発生腫瘍
都老研・生物・基病理 太田 邦夫 野間口 隆
蟹沢 成好
7. 老齢マウスにおける形態計測的検索
都老研・基病理・生物 宇津山正典 野間口 隆
蟹沢 成好
8. 加齢に伴うヒト肝二核細胞の形態学的変化
養育院・内科 渡辺 俊允
都老研・基病理 田中 康一

12:45~13:45 昼 食

運営委員会

13:45~14:40

座長 東海大・医・分子生物 鈴木 堅之

9. クロシヨウジョウバエの生殖機能における老化と成虫寿命
都立大・理・生物 相垣 敏郎 大羽 滋
10. クロシヨウジョウバエにおける成虫寿命の系統間変異と環境要因
都立大・理・生物 大羽 滋 山本 明彦
曾根 和海
11. ゴウリムシのクロナルエイジングと子孫生存率 — 核移植を用いたアプローチ
東北大・理・生物 狩野 節子 樋渡 宏一

14:40~16:00

座長 遺伝研・形質遺伝 黒田 行昭

12. 培養細胞老化の系図学
東大・医科研 松村外志張 小西 隆二
明治薬大・薬 升田 清文
東大・医 村上 善則
13. ヒト胎児線維芽細胞のDNA量と細胞老化
都老研・アイントープ 松尾 光芳 加治 和彦
癌研・細胞生物 宇多小路正 細田 恵子
14. ヒト2倍体細胞の老化とDNA修復能の変化
東大・薬・生理化学 長谷川伸彦 花岡 文雄
山田 正篤
15. 早老症(Werner)の細胞"Contact Stimulation"の能力は正常細胞と変わらない
放医研・薬 大野 忠夫
東大・医科研 松村外志張
東大・医・物療 後藤 真

16:00~16:10 休 憩

16:10~17:10

座長 東北大・抗酸菌研・生物 山根 績

16. 加齢と細胞膜, フリーズフラクチャー法による観察(予報)
東歯大・病理 下野 正基
都老研・基病理・薬理 久保 幸穂 田中 康一
三井 洋司
17. ヒト胎児肺線維芽細胞の増殖と分裂寿命に及ぼす各種ステロイドの効果
都老研・生物 春日 博子 近藤 昊
埼玉大・理・生体制御 能村 哲郎
18. 無血清培地におけるヒト2倍体線維芽細胞の長期継代培養とハイドロコートゾンの効果
東北大・抗酸菌研・生物 星 宏良 管 幹雄
源 良樹 山根 績

17:10~18:10

座長 広島大・理・動物 川島 誠一郎

19. 蚕蛾の寿命に及ぼす昆虫ホルモンの影響

都老研・生物

小山内 実

20. 出生時チロキシン処理ラットの下垂体, 甲状腺機能と老化

都老研・生物

大岡 宏

21. 雄ラットにおける神経分泌活性と α -bungarotoxin結合のエイジングにともなう上昇

広島大・理・動物

川島誠一郎

Calgary大・医・薬理

小林 裕太

18:10~18:55 研究会 総会

19:00~ 会員懇親会

第2日 5月16日(土)

~~~~~ 一般講演 ~~~~~

9:00~9:40

座長 名大・医・病理 星野 宗光

22. マウスのネフロン形成期の放射線照射による糸球体の数と構造の加齢変化の促進

放医研・障害基礎

佐々木俊作 佐藤 文昭

川島 直行

23. ラット腎の老性変化についての超微計測的研究 — 尿細管上皮ミトコンドリアを中心として —

愛知県がんセンター・臨床検査

佐藤 秩子

愛知医大・病理

田内 久

9:40~10:30

座長 都老研・生化 大橋 望彦

24. 腸内細菌叢と老化: ヒト消化管における streptococci 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

務台 方彦

25. 腸内細菌叢と老化: 無菌及び通常ラットにおける脳の酵素活性と肝臓のステロイドホルモン代謝の加齢による変化

ヤクルト研

矢沢 一良 河合 康雄

26. 加齢に伴う中枢神経膜系の代謝回転速度の変化に関する研究

1. 重水素ラベル法 — マスフラグメントグラフィーによるミエリン構成成分の代謝回転の測定

都老研・生化・中央機器

安藤 進

小野百合子

田中 康一

10:30~10:40 休 憩

10:40~11:45

座長 ヤクルト研 河合康雄

27. マウスの老化に伴う各種臓器のリボゾーム及びメッセンジャーRNAの細胞内分布変化  
東邦大・薬・生化 安西借二郎 高橋 邦彦  
後藤佐多良
28. 老化マウスリボゾームの機能変化：プロタミンmRNAによる翻訳忠実度の解析  
東邦大・薬・生化 森 望 船津 佳子  
蛭田 邦子 後藤佐多良
29. 老化マウス肝臓リボゾームの機能変化：40Sサブユニットの翻訳開始複合体形成能  
東邦大・薬・生化 中沢 俊 森 望  
後藤佐多良
30. 老若マウス由来の初代培養肝実質細胞のタンパク質代謝回転  
東邦大・薬・生化 池田 忠男 安西借二郎  
後藤佐多良

~~~~~ 特 別 講 演 ~~~~~

11:45~12:30

座長 都老研 太田邦夫

老化と過酸化脂質

名大・医・生化

八木 國夫

12:30~13:30 昼 食

~~~~~ 一 般 講 演 ~~~~~

13:30~14:30

座長 名大・医・老年科 葛谷文男

31. フィッシャー344ラットにおけるアミノピリン脱メチル化反応に対する加齢の影響  
都老研・臨生理 木谷 健一
32. 自然発症高血圧ラット(SHR)における脂質過酸化反応に及ぼす加齢の影響について  
— 脳を中心として —  
東北大・抗酸菌研・放医 伊藤 久雄 武田 俊平  
松沢 大樹
33. コレステロール食による実験的高コレステロール血症家兔赤血球膜脂質及び脂肪酸に及ぼすビタミンEの影響  
東医大・老年病 石垣 吉春 今村 敏治  
小山 徹 勝沼 英宇

14:30~15:10

座長 愛知県がんセンター・臨床検査 佐藤 秩子

34. 頭がい骨骨塩分布の加齢変化 — CTによる定量 —

東北大・抗酸菌研・放医

山田 健嗣 遠藤 敏  
松沢 大樹

35. 高血圧, 心房細動と脳萎縮

東北大・抗酸菌研・放医

畑沢 順 伊藤 正敏  
山浦 玄嗣 松沢 大樹

15:10~15:20

休 憩

15:20~16:40

座長 都老研・基病理 蟹沢 成好

36. 老化モデル動物系統樹立の試み(第II報)

京大・胸研・病理, 京大・医・整外

竹田 敏男 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

37. 「老化モデルマウス」の老化度判定基準 — Grading Score System — について

京大・胸研・病理

細川 昌則 樋口 京一  
竹下 修史 清水 克時  
竹田 俊男

38. 「老化モデルマウス」に見られる心血管系の変化について(第I報)

京大・胸研・病理

竹下 修史 細川 昌則  
入野 美香 樋口 京一  
安平 公夫 竹田 俊男

39. 「老化モデルマウス」に見られる筋骨格系の変化について(第II報)

— 椎間板のアミロイド沈着 —

京大・胸研・病理, 京大・医・整外

清水 克時 石井 正治  
細川 昌則 樋口 京一  
入野 美香 山室 隆夫  
竹田 俊男

40. 「老化モデルマウス」に見られるアミロイドの生化学的特性(第I報)

京大・胸研・病理

松村 敦子 樋口 京一  
清水 克時 細川 昌則  
竹田 俊男

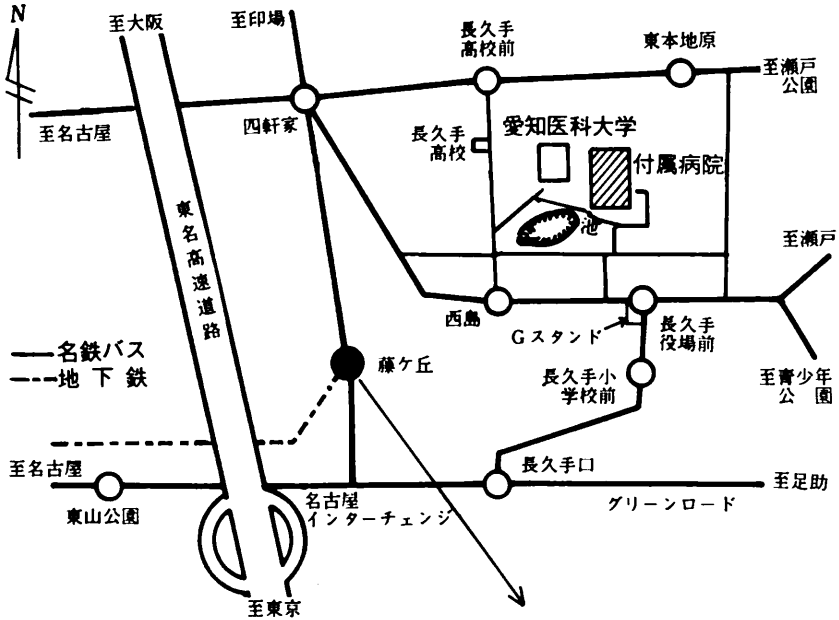
16:40 閉会あいさつ

愛知医大・病理 田内 久



# 大会会場の案内図

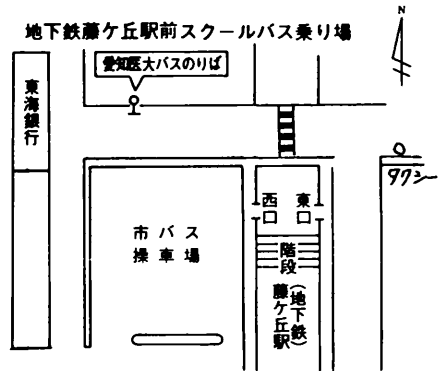
愛知県愛知郡長久手町大字岩作字雁又21  
〒480-11 TEL (05616) 2-3311(代)



スクールバス運行表

| 時間    | 病院発 |     |     |    | 藤ヶ丘発 |     |     |    |
|-------|-----|-----|-----|----|------|-----|-----|----|
| 7     | 30  | 40  | 50  |    | 45   | 55  |     |    |
| 8     | 10  | 15  | 20  | 25 | 5    | 10  | 15  | 25 |
|       | 30  | 45  |     |    | 30   | 35  | 40  | 45 |
| 9     | 00  | 15  | 30  | 45 | 00   | 15  | 30  | 45 |
| 10    | 00  | 15  | 30  | 45 | 00   | 15  | 30  | 45 |
| 11    | 00  | 15  | 30  | 45 | 00   | 15  | 30  | 45 |
| 12    | 00  | 15  | 30  | 45 | 00   | 15  | 30  | 45 |
| 13 平日 | 00  | 15  | 30  | 45 | 00   | 15  | 30  | 45 |
| 13 土曜 | 00  | 20  | 40  |    | 15   | 35  | 55  |    |
| 14    | 00  | *15 | 30  |    | *00  | 15  | *30 | 45 |
| 15    | 00  | *30 |     |    | 15   | *45 |     |    |
| 16    | 00  | *30 |     |    | 15   | *45 |     |    |
| 17    | 00  | *20 | *40 |    | 15   | *35 | *55 |    |
| 18    | 00  |     |     |    | 15   |     |     |    |
| 19    | 00  |     |     |    | 10   |     |     |    |
| 20    | 30  |     |     |    | 40   |     |     |    |
| 21    | 30  |     |     |    | 40   |     |     |    |

\*印は土曜日運休



## 名古屋駅から本学への交通機関

「名古屋駅」から地下鉄東山線に乗り、  
「藤ヶ丘駅」下車。

1. スクールバス (無料) 15分
2. タクシー 13分

# 講演要旨

## 特別講演

老化と過酸化脂質

名大・医・第一生化 八木 國夫

### AGING AND LIPID PEROXIDE

Kunio YAGI (Institute of Biochemistry, Faculty  
of Medicine, University of Nagoya)

1. 過酸化脂質の定義
2. 過酸化脂質の急性並びに慢性毒性  
(16 mm映画供覧)
3. 過酸化脂質による血管の障害
4. 過酸化脂質と加齢との関係
5. 過酸化脂質の生成と分解

## ハ ツ カ ネ ズ ミ の 生 殖 寿 命

野 間 口 隆

(東 京 都 老 人 総 合 研 究 所 生 物 学 部)

Expectancies of Reproductive Life  
in the Mouse, Mus musculus molossinus.

Takashi A. NOMAGUCHI

(Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

大抵の哺乳類では，生存の終末点にかなり先立って，生殖の終了時期が設定されていて，生存を阻害するように仕組まれた遺伝素因や特定の環境要因が作働しない限り，個体は生殖終了後の一定の期間内に漸次死滅して行くものとみられる．このような観点から，基礎的な老化過程を究明する上で個体の生殖終了時期を基準にして研究を進めることは意義のあることのようにである．そこで，ホンシュウハツカネズミの生殖期間について調べ，それに基づいて老化の基礎研究に用いられているマウスの生涯における老化期の位置について考察した．

## (方 法)

ホンシュウハツカネズミ (Mus musculus molossinus, Tokyo/PK) を兄妹間で自然交配させた．すなわち，雌乳した雌雄を同一ケージ内で生育し，出産日，出産回数などを記録し，雌雄のいずれかが死ぬまで飼育を続けた．飼育は室温で行い，夏期の最高温度 33°C，冬期の最低温度 9°C であった．飼料はオリエンタル固型 CRF-1 を与え，給水には水道水を用いた．飼育ケージの交換作業は毎週 1 回行った．また，任意の個体についてネンプタル麻酔を施し，体重，体長，頭長，頭幅，尾長を測定した．

## (結 果)

飼育したホンシュウハツカネズミ，Tokyo/PK，の生涯で 4 回以上の出産が確認された個体について初産日齢を調べると，最少齢は

59日、最高齢は301日であり、平均初産齢は $177.3 \pm 88.8$ 日であった。また、終産の最短路は385日、同じく最長齢は681日で、平均終産齢は $513.3 \pm 81.7$ 日であった。この結果、生殖可能期間は $326.5 \pm 109.2$ 日間と計算され、この期間に平均 $7.1 \pm 2.9$ 回の経産を数えた。一方、生存期間における生殖寿命の長さについてみるために、終産後も飼育を続けた個体について調べると、平均終産齢 $510.3 \pm 83.3$ 日に対して平均寿命は $893.3 \pm 205.9$ 日で、生涯に占める生殖期間の比は36.5%であり、個体は終産後もそれまでの生存期間とほぼ同じ長さだけ生きられる可能性があることが確かめられた。

生殖寿命に関して初産齢や生殖期間の長さに比較的大きな個体偏差が認められるが、その長短と経産回数に因果関係は存在しないようである。また、繁殖には季節性があり、確認した212回の出産についてみると、最高出産回数は8月で全体の20%、最低出産回数は1月の2%であり、これを季節毎に総めると夏季が最も多く(44%)、秋季(31%)、春季(18%)、冬季(8%)の順であった。けれども、出産回数と親の生年月日との間にも明確な相違は認められなかった。

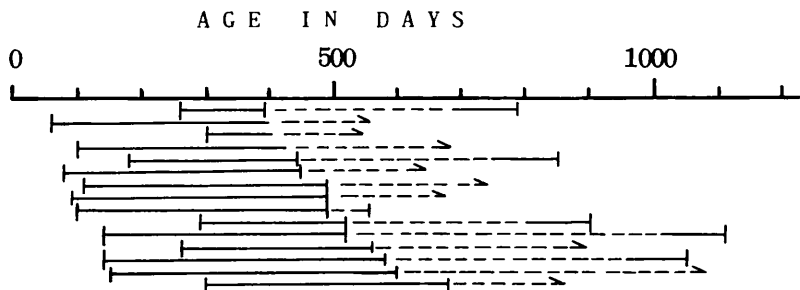
さらに、この種の生殖期間における外部形態の変化を調べると、離乳期にはすでに頭幅は一定の大きさに達し、尾長/体長比も変らなくなるのに対して、出産を開始する100日齢前後に体長/頭長、頭長/頭幅及び体長/体重比が一定となる。けれども、体重、体長、頭長は終産の近づく400日齢付近まで、さらに増加し続けた。

(考察)

哺乳類の種間の比較から、種の寿命は進化学的なレベルで設定されていると考えられ、各々種特異的である。一方、長期飼育実験で見られる動物集団の生存曲線の傾きはこの種特異的寿命に遺伝素因及び環境要因が付加されて種々の様相を示す。動物の老化過程を哺乳類に限って見たとき、概念的に生殖終了時点を生涯における老齢期の開始の基準とすることは妥当のようである。長寿命系マウスC57BL/6を環境制御の下で飼育してもその50%生存期はせいぜい830日齢であり、生存曲線の下降も、ハツカネズミで調べた終産齢である、500日齢前後から認められるようになる。

FIG. Reproductive Life and Life Span in the Mouse, *Mus musculus molossinus*.

A solid line between vertical bars shows the reproductive duration and a dotted line is the remained life after final parturition.



## Wistar および F-344 ラットの寿命と形態所見

蟹沢成好、倉本和直、木谷健一、太田邦夫

東京都老人総合研究所基礎病理学部、実験動物研究室、生理学部臨床研究室、所長

## LIFE SPANS AND MORPHOLOGICAL FINDINGS OF WISTAR AND F-344 RATS

Masayoshi KANISAWA, Kazunao KURAMOTO, Kenichi KITANI and Kunio OOTA (Department of Pathology, Laboratories of Experimental Animals and Clinical Physiology, and the Director, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

老化研究のためのモデル動物として齧歯類はまだ多くの問題を抱えている。ラットに関して基礎的データを確立する一環として、形態学的観点からの検索を行いつつある。昨年度、F-344 加齢ラットの組織所見と自然発生腫瘍を中心に検索し、腫瘍の多発と、心、肝、腎に種々の病的変化が性差をもって発生することを述べ、老化研究モデルとしての可否の再検討の必要性を指摘した。

今回は、Wistar および F-344 ラットの通常および制限食餌飼育による寿命曲線を得ることを主眼とした飼育を行い、併せて、剖検により腫瘍を主体に検索した成績(未完)につき報告し、若干の考察を行う。

## 1. 材料および方法

Wistar / Slc および F-344 / DuCrj SPF ラット雌雄を Semibarrier 室 (22 ± 2°C, 60 ± 8%, 12 時間明暗、9 / hr 換気、all fresh) に設置したクリーンラック内にて 3 匹 / cage 収容し飼育した。飼料は、放射線滅菌 CRF-1 を、飲水は初め水道水を、生後 140~640 日の間に塩素・塩酸滅菌水 (PH 2.8 ~ 3.0) 投与に変えた。飼料投与の形式から両系ラットとも 2 群に分けた。第 1 群は、雌雄各 90 匹で、飼料、水とも自由に摂取させた。第 2 群は、雄のみ各 90 匹で、Wistar 系は生後 32 日より、F-344 は 34 日より、1 日当り 7.5 g 相当量を週 2 回、3 または 4 日分ずつ一括投与した。

体重測定は 4 週ごとに行い、原則として死後剖検したが、生存率 50% 以降は、死期の迫ったものについて組織検索のため犠牲死せしめ剖検に附した。

## 2. 結 果

1) 平均体重の推移 第 1 群の両系雄あるいは雌間にきわだつた差はないが、Wistar 系では雌雄とも生後 450 日前後から再び体重増加が生じ、このため最高体重は雌雄とも Wistar が高値を示した。そして体重減少が、Wistar 雄では 650 日、雌では 720 日前後から、F-344 では、雌雄とも 730 日前後から、雄では急激に雌では緩やかに始まった。この時期は、いずれも 85~90% 生存率の時点に相当する。

体重減少が加齢に伴う本質的なものであるか否かを検討するため、死亡率75%の時点で生存するラットの体重推移と全体を比較してみたが両系雄に関して全く差はなかった(図1)。制限食群の体重増加は、両系とも200日前後まではそれぞれの雌とほぼ同じ推移を示したが、その後その体重を保ったまま推移し、生後700~800日の段階では明確な減少傾向は現われていない。

2) 生存率 図2にWistarラットの生存率グラフを示した。また表1にそれぞれの死亡率25、50、75%到達日数を示した。両系ラットで、雄、雌、制限食雄の順に寿命は短かく、雄の75%死亡と雌の50%死亡がほぼ同じ日齢を示した。WistarとF-344の比較では、Wistarが雌雄とも50日前後短寿命に推移し、Wistar雌とF-344雄、Wistar制限食群とF-344雌がほぼ同寿命となっている。

3) 死因 死因の同定は必ずしも容易でなかった。原因不明の脾腫と雌では両系とも脳下垂体腫瘍への出血による死亡の頻度が高かった。

4) 自然発生腫瘍 両系とも雄の睪丸腫瘍と雌雄の脳下垂体腫瘍の頻度が高い。次で乳腺腫瘍を含む皮下腫瘍の発生が多く見られた他は、散発的発生をみた(表2)。症例数が少くなお今後の推移によるが、制限食群では、腫瘍発生率が低下しており、頻発する睪丸腫瘍もWistarで1/11例を認めただに留まる。

5) 組織学的所見 肝、腎、脾、心等に肉眼的に病的所見を認めているが、目下検索中である。

3. 考察およびまとめ

1) 寿命に系統差、性差および制限食餌による延長が認められた。その理由は今後の解析課題である。制限食群については生殖能力や活動性等の検討、至適制限量等の検討が必要である。

2) 老化がいつから始まるかについては尚定まっていないが、体重が群として持続的に低下を始める時期がラットでは見出された。死亡率では10%程度であるがこの時点をお化の始まりとできるかは今後検討を要する。

Table 1. Mortalities of Wistar and F-344 Rats(days)

| Mortality (%) | Wistar |     |           | F-344 |     |           |
|---------------|--------|-----|-----------|-------|-----|-----------|
|               | M      | F   | M (rest.) | M     | F   | M (rest.) |
| 25            | 728    | 758 | 836       | 778   | 813 | -         |
| 50            | 804    | 848 | -         | 853   | 906 | -         |
| 75            | 846    | -   | -         | -     | -   | -         |

Table 2. Incidence of Spontaneous Tumors in Rats - Autopsy Cases -

|               | No. cases | Pitu. | Testi. | Subc. | Thyr. | Others |
|---------------|-----------|-------|--------|-------|-------|--------|
| <b>Wistar</b> |           |       |        |       |       |        |
| M.            | 54        | 11    | 33     | 8     | 2     | 3      |
| F.            | 25        | 11    | -      | 16    | 1     | 4      |
| M(restr.)     | 11        | 1     | 1      | 0     | 0     | 1      |
| <b>F-344</b>  |           |       |        |       |       |        |
| M.            | 42        | 9     | 39     | 7     | 3     | 3      |
| F.            | 32        | 12    | -      | 4     | 1     | 5      |
| M(restr.)     | 5         | 0     | 0      | 0     | 0     | 0      |

Fig. 2. Life Span Curve of Wistar Rat

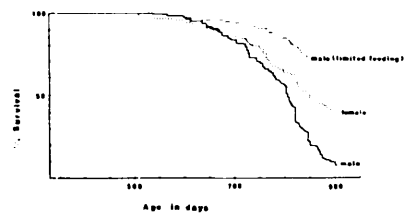
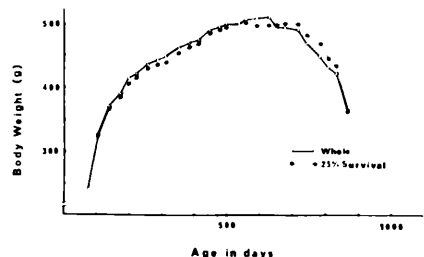


Fig. 1.

Body Weight Gain of Male Wistar Rats - Comparison Between Whole and 25% Survival Rats -



## 食餌制限と適応反応

### (2) 寿命及び老令マウスの臨床病理所見について

奥木 実, 倉本和直(東京都老人総合研究所実験動物研究室)  
太田邦夫(東京都老人総合研究所)

STUDIES ON THE MECHANISM OF ADAPTATION IN RESTRICTED FEEDING CONDITION  
(2) LIFESPAN AND CLINICAL PATHOLOGICAL FINDINGS IN THE SENESCENCE MICE

Minoru OKUGI, Kazunao KURAMOTO(Animals Laboratory, Tokyo Metropolitan  
Institute of Gerontology), Kunio OTA(Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology).

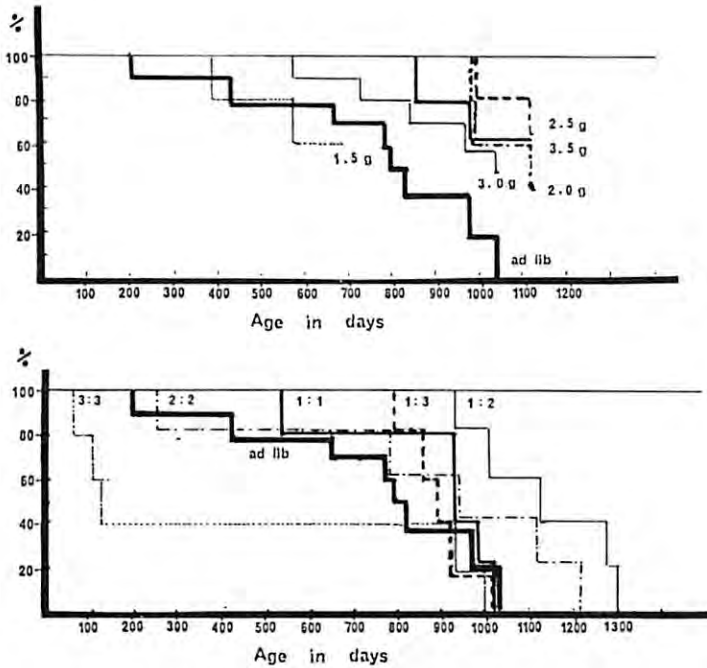
(目的) 動物は食餌制限によって寿命延長することはよく知られている。しかし、それは本来動物が持っている生きられるべき寿命であるのか、明らかではない。そこで、われわれは食餌制限により寿命を延長したと考えられる3年令から3年7カ月令の老令マウスについて臨床病理所見を観察し、老化現象を検討した。

(方法) SPFのC57BL/6雄に蛋白含有量約20%の市販固型飼料1.5g, 2.0g, 2.5g, 3.0g, 3.5g/日の制限食給与実験と絶食日と給食日の割合を1:1, 1:2, 1:3, 2:2, 3:3の食餌間隔で給与の制限食実験を約4年間にわたり長期飼育し寿命を比較した。マウスはクリーンラック棚, 個別ケージに収容, ケージは週2回交換した。検索は体重, 水飼料摂取量を週1回計測, 一般状態, 行動, 死亡時には剖検, 各種臓器の病理変化, 骨格及び歯列などを観察した。

(成績) ① 体重は制限量に対応した成長曲線を描くが, 自由食群の50gを越える肥満発現に対して, 3.5g群が40gを越えた以外はいづれも著しく体重抑制を示した。食餌間隔実験では各群間に差がみられたが1000日以後有意の差はみられず, ② 飼料総摂取量は, 自由食>1:3>1:2・1:1>2:2, 3:3となり, 体重と相関していたが, ③ 寿命は1:2が最も長く, ついで2:2で, 3:3を除いてはいづれも自由食群より長寿命であった。④ 一般状態のなかで, 被毛は立毛, 粗毛, 脱毛, 変色, 白髪, 外傷が目立った。耳殻の炎症,

肥厚，かゆみは睡眠を妨げ，夜行性の行動パターンは著しく乱れた。1日の行動時間は拡大した。呼吸はしばしば激しく，胸カク全体を拡張した。外形は体全体が萎縮し背を上部に突出。歩行は緩慢，後肢を上げガニマタとなり，上体を左右に振り，S字状に行進した。歯牙は著しく摩滅，下顎骨が変形，大型固型飼料の採食が困難となり，粉碎した飼料，軟い食物を好む。糞は固く正常，⑤ 肝，睪丸の萎縮は著しく，脊椎，腰椎の湾曲屈折，歯牙の摩滅は老令マウスに共通した変化であった。脾，腎など肺の腫瘍が多くみられた。組織変化については検索中である。

(考察) 以上の成績が示すように3年を経過した老令マウスの臨床病理所見は老人に類似しているが僅か10数例に過ぎず今后は更に例数を増すと共に食餌制限の影響との関係を併せ検討を行なう。



Survival rates in restricted feeding of C57BL/6 male mice



背椎彎曲



## ラットにおける尿タンパク排泄に対する食餌制限の影響

藤田美明，力丸徹，市川みね子，栗本文子  
(東京都老人総合研究所・栄養学研究室)

EFFECT OF RESTRICTED FOOD INTAKE ON THE EXCRETION OF URINARY PROTEINS  
BY THE RAT DURING AGING

Yoshiaki FUJITA, Toru RIKIMARU, Mineko ICHIKAWA and Fumiko KURIMOTO  
(Nutrition Research Laboratory, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

## (目的)

市販固型飼料を自由摂取させたラットでは，加齢にともない腎糸球体基底膜の肥厚等の組織学的変化が徐々に進行し，それにもなって尿中へのタンパク質排泄が増加し始めることが定性的には既に報告されている。ところが，これら尿タンパク排泄の認められた動物がその後かなり長期に渡って生存し，その尿タンパク発現率は500日齢以上のラットで100%にも達するため，これは，生理的現象の1つではないかとも考えられていた。しかし，その後の報告で，加齢にともなう腎の組織学的変化と尿中へのタンパク質排泄の発現率は摂取栄養条件と密接に関係することが示唆され，必ずしも，加齢にともなう必然的現象ではないことが示された。それ故，加齢にともない100%のタンパク尿発現をもたらす自由摂食法による老化ラットの開発は，検討の余地を持っている。一方，種々の栄養条件下での，加齢にともなう尿タンパク排泄の量的質的变化を定量的に観察した報告は極めて少い。そこで本研究では，加齢にともなう腎障害及び尿中タンパク排泄の認められない，代謝研究用の実験動物として利用可能な老化ラットを開発するための栄養条件を明らかにする目的でなされた。ここでは，今までに得られた結果の一部を報告する。

## (方法)

実験Ⅰでは離乳後直ちに(3週令), 実験Ⅱでは成熟後(12週令)から, それぞれ標準食を自由に摂取し続ける Ad lib 群と, その80%及び50%量に制限した量を投与する80%群及び50%群に分けた。そして50日間隔で代謝実験を実施し, N出納試験, 排泄N分画, 尿タンパク排泄総量及びその電気泳動分画を実施した。又実験Ⅱにおいては, その食事条件を430日令より更に種々に変更し, 尿タンパク排泄抑制に対する食事の影響を観察した。

## (結果)

離乳直後より標準食を自由摂取させたラットでは, 加齢にともない尿中へのタンパク排泄が増加し, 850日令では1日尿中排泄総N量のほぼ20%がタンパク性Nで占められていた。一方, 離乳直後より食事投与量を自由摂取群の50%量に制限した群では尿タンパク質の有意の排泄は認められず, 50%生存率も自由摂食群の700日齢に比べ制限群では1000日齢に及んだ。そして80%群は両群の中間の値を示した。また, 排泄尿タンパクの主成分は Ad lib 群及び80%群では Alb. が70%以上を占め, その他  $\gamma$ -Glb,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , の順に多かった。一方50%群では, 排泄量は痕跡程度ではあったが, その分画をみると,  $\alpha_2$ -Glb が50%以上を示め, あと, Alb,  $\gamma$ -Glb が続いた。

このように離乳直後よりの50%制限食の投与は, 尿タンパク排泄を抑制すると同時に寿命の延長効果が観察された。しかし50%群ラットの体格は極めて貧弱であった。これに対し, 制限食の投与を成熟後より開始した実験Ⅱの50%群は, 体格も実験Ⅰの50%群より優れ, 430日齢現在, Ad lib 群及び80%群でそれぞれ  $19.2 \text{ mgN/日}$  及び  $8.9 \text{ mgN/日}$  の尿タンパク排泄が観察されたが, 50%群では認められなかった。

尾里 建二郎, 若松 佑子 (京都大・教養・生物)

Age-specific incidence of hereditary melanomas in the *Xiphophorus* fish hybrids.

Kenjiro Ozato and Yuko Wakamatsu, Biological Lab., Yoshida Col., Kyoto Univ., Kyoto.

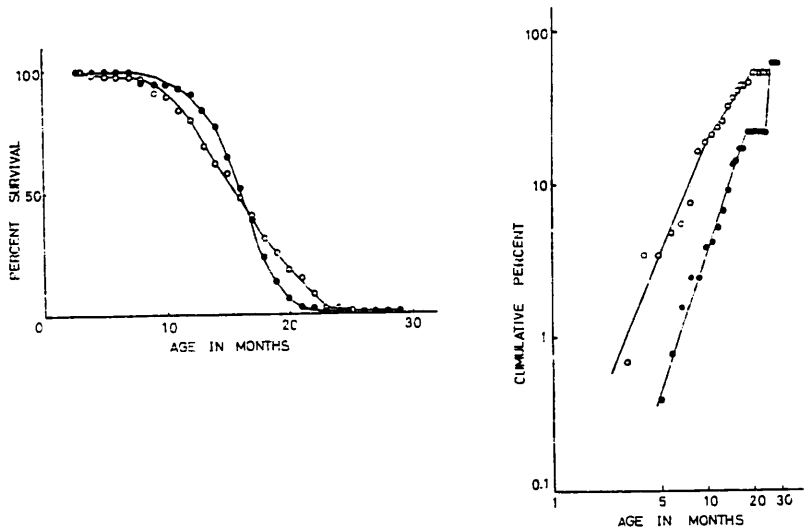
卵胎生メダカのプラティ (*Xiphophorus maculatus*) でマクロメラノホア遺伝子を持つものと、同じ属のソードテール (*Xiphophorus helleri*) を交配すると、この遺伝子を持つ種間雑種個体に特異的にメラノーマが生じる。腫瘍の発生に年齢依存性があることは、哺乳動物では広く認められている。例えば、多くのヒト癌の累積発生率は、簡単なべき関数であって、年齢の5乗から7乗に比例する。このような腫瘍の年齢依存性が下等脊椎動物にも存在するかどうかについては、これまで断片的な知見はあるものの、これを統計的に示したものは未だない。今回プラティとソードテールのF<sub>1</sub>世代の種間雑種個体に生ずるメラノーマについて年齢依存性が明らかになったので報告する。

マクロメラノホア遺伝子 Sp を持つプラティと野性型又はアルビノソードテールを用いて F<sub>1</sub> の二つの個体集団を得た (Sp x 野性型, Sp x アルビノ)。一般に集団の老化の過程は生存曲線によって評価されるので、この二つの集団について生存曲線を求めた。生後10ヶ月位までは死亡する個体はほとんど認められない。最も高い死亡率は13~18ヶ月頃に見られる。90%, 50%, 10%の生存率を示す月令はそれぞれ10~12ヶ月, 16ヶ月, 19~20ヶ月であった。性成熟は6~7ヶ月, 平均寿命は約15ヶ月であった。最長寿命は, Sp x 野性型で29ヶ月, Sp x アルビノで25ヶ月であった。左図に見られるように、二つの集団は同様の生存曲線を示し、形はシグモイド様であっ

た。これらの生存曲線を用いて腫瘍の発生率と老化の関係を考察した。

Sp x 野生型では5ヶ月令までは腫瘍の発生は見られなかった。累積発生率はその後、月令と共に上昇し19ヶ月令(10%の生存期)には22%に達した。腫瘍の80%は10ヶ月令以後に発生した。10ヶ月令と云うのは、集団中に死亡する個体が目立ち始める最初の時期である。累積発生率を月令に対して両対数グラフにとると、これら二つの間に直線関係が見られた。直線の勾配は2.9であった。このことから累積発生率は月令の約3乗比例することが明らかにされた。同様のことは、Sp x アルビノにおける発生率についても見られるが、この集団では、腫瘍はより早い時期から、高い率でもって発生する。直線の勾配は2.3~1.3であってやや小さい。90%生存期以後は両者の集団に共通して腫瘍の発生が低下する傾向が見られるが、この時期は生存個体も少なく統計的な有意性に疑問が残る(右図)。

この研究を通じて、最も注目されたのは、両対数グラフ上の直線のパターンが、ヒト癌の場合と非常に良く似ていることであって、この研究は腫瘍の年令依存性が、下等脊椎動物においても例外でないことを示したものである(図中—●— Sp x 野性型, —○— Sp x アルビノ)。



## マウスの寿命と自然発生腫瘍

太田 邦夫・野間口 隆・巖沢 成好  
(東京都老人総合研究所基礎病理学部, 生物学部)

Expectancies of Life and Frequencies of Spontaneous Tumors  
in C57BL/6 CrSlc Female Mice.

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

老化の基礎的研究に用いられているマウスの寿命の長短はその系統に基づいて様々である。また、生涯を通じて老化の根元的な様相を探究しようとするとき、できるだけ遺伝的な疾患や腫瘍の出現のない系統を選択しようとする<sup>1)</sup>。そのような系統は概して長寿命系統であるが確立されている近交系統で最終的に腫瘍を発症しないものはないといっても過言ではないようである。マウスの寿命に関する報告されているデータを再確認するために、C57BL/6系の雌マウスを飼育し、その寿命曲線を作成するとともに自然発生腫瘍の発症頻度と発症部位を検索し、老化過程の探究にマウスを如何に供用することが可能か考察した。

(方法) 4週齢のSPF、C57BL/6CrSlc、雌マウスを静岡県実験動物農業協同組合より購入し、プレファブ飼育室内に設置したクリーンラックで飼育した。標準飼育温度、相対湿度は各々22°C、55%とし、照明は14時間-10時間の明暗条件であった。飼料はオリエンタルNMF及びCRF-1の固型飼料を使用し、給水は過塩素酸-塩酸添加酸性水を与えた。ケージ当りの収容頭数は5頭で週2回のケージ交換を行った。また、2週間毎に個々の体重を測定した。寿命曲線を作成するための集団としてNMF投与群では標準集団104頭、やせ型集団20頭、肥満集団24頭を抽出し、寿命曲線に合せて適当な頭数の剖検及び組織検索を行った。CRF-1投与群の寿命曲線の作成は100頭の集団で行った。

(結果) 1) 生存率の推移 NMF飼料を与えた群で生涯において体重が30gを越え50g以下の104頭の標準集団の生存は427日齢を過ぎると低下し、集団が4分の3(生存率75%)になる時期は707日齢、同様に2分の1(同50%)時期は826日齢、4分の1(同25%)時期は925日齢であった。生涯を通じて体重が30g以下のやせ型集団と肥満集団の生存の推移をみると、やせ型集団では290日齢以後に死亡する個体が現れ、生存率4分の3(75%)、2分の1(50%)、4分の1(25%)は各々548、574、625日齢であった。一方、肥満集団の生存低下は490日齢から現れ、標準集団の生存曲線に沿って減衰し、50%生存時期は858日齢であった(図1)。CRF-1飼料投与群の標準集団の生存率はNMF群とほぼ同じ422日齢以後に低下し始めるが、生存曲線は約30日間左へ移動して推移した。

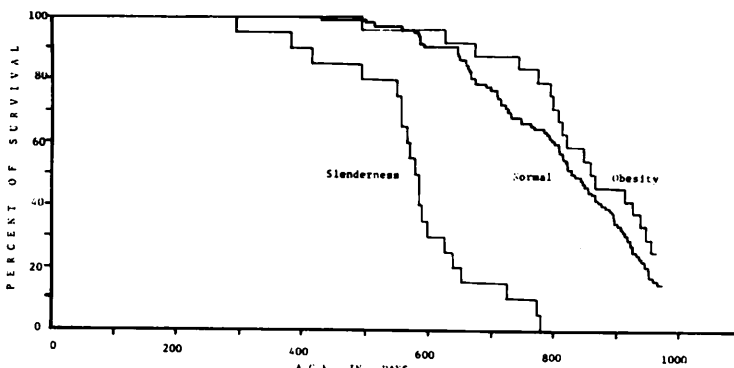
2) 体重の増減 NMF群の標準集団の体重は400日齢（生存率100%）まで増加を続け、その後も微増するが、860日齢（同45%）前後から低下が認められた。やせ型集団の体重増加は300日齢で停止するのに対して、肥満集団は200日齢を過ぎると増加が顕著となり、470日齢まで急激な増加を示したが、750日齢（生存率83%）以降に低下する傾向が認められた。CRF-1群の体重増加はNMF群に較べ350日齢前後までは顕著であったが、加齢とともに両者間の相違はほとんど認められなくなった。

3) 自然発生腫瘍 NMF標準集団の生存曲線に合せて生存率75%、50%、25%の時期に各々12、22、8頭の動物を剖検し、発生腫瘍部位と頻度を調べた。腫瘍発生部位は調べた日齢によって異なるが、肝、肺下垂体、腎、網内皮系など広範囲に認められ、主要な腫瘍はリンパ腫であった。75%生存期における腫瘍はリンパ腫、腎腫瘍が1例づつ認められたのに対して、50%生存期では下垂体腫瘍が4例、リンパ腫8例で肝、肺にも各々3例発症し、腫瘍発生率は集団の16例（72.7%）にも達した。25%生存期になると集団の87.5%の個体が腫瘍を発症させ、複合発症も認められた。

(考察) 長寿命系マウスC57BL/6CrSlc雌を飼育すると個体間に体重の著しい相違が認められる。生涯体重が30~50gの個体を標準にすると、やせ型及び肥満個体の寿命に伸縮が認められ、とりわけやせ型集団の寿命は著しく短い。その原因は飼育条件にあるとは考え難く、この系統は出生時において無眼症、小眼症などの形態異常が25%もみられることから、遺伝的な異常を内在した個体の存在の可能性がある<sup>2)</sup>。また、この系統から肥満系統C57BL/6-obが分離されていることから、遺伝的に肥満傾向を示す個体の存在もうなづける。なお、この両集団の母集団に対する出現比率は各々10%程度であった。2種類の異なる飼料投与群の生存曲線にみられる有意差は明らかでないが、両飼料の原料は同一で、配合比が異なっていて、化学成分組成はたんぱく含量はNMFで27.3%、CRF-1で23.2%、糖質は各々48.9%、53.8%であり、単位カロリー量もほぼ同じである。両集団の成長過程における体重の相違が両者間に認められなくなることから、生存の長さには有意差はほとんどないと考えられよう。

この長寿命系マウスも生存の終了に近づくにつれて各種の腫瘍を発症させることはマウスを老化の研究に用いる上で十分考慮せねばならなくなる。すなわち、生涯において所定の機能を測定し、若齢期と老齢期とを比較するとき、50%生存時期のものを老化個体として用いるならば、比較されたデータは健康な若齢個体と腫瘍をもった病的な老化個体との間で論議される恐れが十分にある。一方、適当であると考えられる時間の経過を経て生存を終了するマウス集団で非特異的な腫瘍を発症するならば、老化と癌化を考察する上で興味ある対象として処理でき、遺伝的に特定の腫瘍を発症する系統との比較研究も必要とならう。

Fig. 1. Survival curves in C57BL/6 CrSlc femal mice.



Normal, obese and slender groups were divided by their body weights during life: 30~50 g, over 50 g and under 30 g, respectively.

- 1) 野間口 隆, 蟹沢 成好, 太田 邦夫 : 遺伝 32 (9), 57-61. (1978)
- 2) 江崎 孝三郎, 他 : 免疫実験操作法 B, 863-864. (1978)

## 老齡マウスにおける形態計測的検索

宇津山 正典・野間口 隆・蟹 沢 成 好  
 (東京都老人総合研究所・基礎病理学部、生物学部)

MORPHOMETRIC OBSERVATION, AT PERIODS OF ADVANCED AGE IN  
 C57BL/6 CrSlc FEMALE MICE

Masanori UTSUYAMA, Takashi A. NOMAGUCHI and Masayoshi KANISAWA  
 (Department of Pathology and Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology.)

マウスを老化の実験に用いる時、Walfordは、用いるマウス集団の生存曲線を描き、集団が減衰を始める時期から50%生存期までを加齢期、その後の死滅するまでを老化期と便宜的に定めることを提唱した<sup>1)</sup>。標準的な老化過程を追求しようとする時、集団の生存曲線に沿って研究を進めることは確かな方法であるに違いない。そこで、集団の生存曲線の下降に伴って、個体にどのような形態的变化が認められるのか、長寿命系マウスC57BL/6CrSlc雌についてその外部形態及び臓器重量につき計測を行ない解析を試みた。

### (方法)

SPF雌マウスC57BL/6CrSlcをオリエンタルNMF飼料、酸性水で飼育した。104頭の集団で生存曲線を作成し、集団が3/4(生存率75%)、1/2(同50%)及び1/4(同25%)に達したとき、同一条件で飼育した別の群から適当な頭数を任意に選び、種々の形態的測定を行なった。測定は、体重、体長、頭長、頭幅、尾長について行ない、また剖検時に脳、心臓、肺臓、肝臓、脾臓、腎臓などの主要臓器の重量を測定した。実験に用いた個体の実際の生存曲線上の位置は各々生存率74%(711日齢)、49%(833日齢)、26%(928日齢)であった。このようにして得られた測定データに基づいて加齢過程における形態上の推計学的解析を行なった。

### (結果)

生存曲線上の3群、すなわちA群(生存率74%)、B群(同49%)、C群(同26%)の検索数は各々12、22、8頭であった。

1)外部形態 測定方法が最も容易で、変化が期待できると思われた体重はA群、B群ではその平均値が33g台で有意差は認められなかったが、C群では明らかに低下を示した。吻端上より肛門前縁ま

での長さで表わした体長、吻端一後頭骨縁間の頭長、両耳基部間の頭幅及び肛門後縁より尾骨端までの尾長について各群を比較すると、体長はA群平均9.23mm、B群平均9.54mmであるが、両群とも個体差が大きいのに対してC群では背柱がわん曲し、個体差も小さく、平均9.27mmであった。頭長、頭幅はA群よりB群、C群で有意差をもって大きい傾向が見られたが、B群とC群に相違は認められなかった。尾長は各群間で異なり日齢の進行とともに増加する傾向を示したが、個体差も大きくなった。一方これらの実測値に基づいて形態変化を比で表わすと、体長/頭長、頭長/頭幅、体長/体重比は各々3.5~3.6、2.0、2.9~3.2で群間に有意差は認められなかった。

2) 臓器重量 表1に剖検時における各群動物の平均体重ならびに主要臓器平均重量、標準偏差を示した。

この基本統計量は肉眼的に種々の異常所見を認めるものが、A群6/22例、B群18/22例、C群8/8例あり、肉眼的に正常と認める個体のみをもって解析をすることが出来ないため、各群各臓器の統計量より $\bar{x} \pm \sigma$ の範囲内の値を用いて再計算したものである。なお $\bar{x} \pm \sigma$ の範囲外には肝腫瘍等肉眼的に強度の病変があるものが該当した。

t検定を用いた推計学的解析(P<0.05とする)の結果、脳、左右腎重量ではA群とB群間に、肺、肝、脾においてA群とB群及びC群間に有意差をもって重量の増加を認めた。各臓器重量においてはB群とC群間に有意差を認めなかった。しかし脾重量は増加の傾向があった。同時に体重比で比較検討を行なった結果、すべての臓器においてA群とB群及びC群間に有意差をもって増大を認めた。

#### (考察)

集団が減衰を示す生存曲線上の3点すなわち3/4(A群)、1/2(B群)、1/4(C群)生存期における外部形態及び臓器重量の測定から老化過程における個体の様相変化について若干の知見を得た。動物の成長の指標として使われる体重は加齢に伴って個体差が大きくなり、集団の寿命の終末点に近づくC群でやや低下する傾向があるのに対して、体長、頭長、頭幅、尾長の実測値の変動は皮下及び筋層の状態に左右されるらしく、各数値間の比では3群間に相違を認めなかった。臓器重量に関してB群とC群間に差が表われるものが少ないのに対しA群とB群及びC群に差が表われることから生存率が75%から50%にいたる期間に生体になんらかの異常の発生がみられた可能性があり、肉眼的に明確な病変として認められはしないが、主要臓器重量の変化として影響が表われであることを推測させた。そしてそれが更に病変として顕在化し計測上の大きなふれとなるものと思われる。

#### (むすび)

形態計測的検索の結果からはWalfordの言う50%生存期以後を老化過程とする仮説はほぼ妥当と考えられるが、一方、この時期には種々の自然発生腫瘍の高率な発生があり、本来の老化期の変化にいろいろな影響が投影されることが予測される。老人期の腫瘍をどのように理解するかにもよるが腫瘍発生の少ない系統の開発が、老化研究上重要なカギとなるものと考えらる。

1) Walford, R.L. : When is a mouse "old" ? J. Immunol., 177, 352-353 (1976).

Weights of Whole Body and Various Organs in C57BL/6 CrSlc Female Mice

| Group | % Survival | Body weight | Brain    | Heart    | Lung     | Liver    | Kidney(R) | Kidney(L) | Spleen   |
|-------|------------|-------------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|
| A     | $\bar{x}$  | 33.76(g)    | 0.456(g) | 0.135(g) | 0.153(g) | 1.431(g) | 0.228(g)  | 0.213(g)  | 0.097(g) |
|       | S.D.       | 2.27        | 0.010    | 0.018    | 0.013    | 0.175    | 0.027     | 0.028     | 0.021    |
| B     | $\bar{x}$  | 33.29       | 0.469    | 0.180    | 0.199    | 1.755    | 0.249     | 0.254     | 0.140    |
|       | S.D.       | 3.61        | 0.013    | 0.026    | 0.031    | 0.141    | 0.026     | 0.026     | 0.044    |
| C     | $\bar{x}$  | 29.90       | 0.468    | 0.151    | 0.188    | 1.637    | 0.249     | 0.236     | 0.184    |
|       | S.D.       | 4.25        | 0.012    | 0.021    | 0.022    | 0.182    | 0.029     | 0.027     | 0.078    |



## 加齢に伴うヒト肝二核細胞の形態学的変化

渡 辺 俊 允      東京都養育院付属病院内科  
 田 中 康 一      東京都老人総合研究所病理

### AGE-RELATED ALTERATIONS OF NUCLEAR AND CELLULAR SIZES OF BINUCLEATE HUMAN HEPATOCYTES

TOSHIMITSU WATANABE \*                      YASUKAZU TANAKA \*\*  
 Department of Medicine, Tokyo Metropolitan Geriatric Hospital \*  
 Department of Pathology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology \*\*

#### 目 的

肝の二核細胞は、従来から肝の老化過程における一指標として議論されてきたが、その形態学的研究では主として出現頻度が論じられている程度である。私どもはヒト肝の組織標本、裸核及び分離細胞塗抹標本を用いて単核細胞の核と細胞の大きさや核DNA量の測定を行ってきたが、今回、同様の検討を二核細胞について行ない、その成績を単核細胞のそれと比較しながら検討しいくつかの新知見を得たので報告する。

#### 材料と方法

##### A 分離肝細胞

部検で得られたうっ血以外著変のみられない10例(30~90才、男5、女5例)の肝右葉から組織切片を採取し、未固定のまま0.025%トリプシン液を用いて細胞単位に分離しその塗抹標本をつくりメタノール固定後ギムザ染色を行った。更に塗抹標本の600倍ポラロイド顕微鏡拡大写真を撮影し、細胞質、核ともに健在な細胞を半透明紙にトレースし自動映像計測装置(QTM 720)で核及び細胞面積を測定した。一症例につき二核細胞は50~60個、単核細胞は100~150個について核・細胞を測定した。一部の標本はホルゲン染色を行ない核DNA量と核面積を自動顕微分

光測光計（SMP）で測定した。

**B 組織標本：**

剖検で得られたうっ血以外著変のみられない急死35例（16～100才。男17、女18例）の肝組織標本を顕微鏡を用いて観察し、一症例につき小葉周辺部にある1000～1500個の細胞の核の大きさとその中に存在する二核細胞の数を検索した。  
〔以下、二核細胞は（ $a + b$ ）で表わす〕

**成績及び結論**

**A 核：**

① 単核細胞と同様にPolyploidizationがみられ加齢とともに高いクラスのPloidyが増加する。②殆どの二核細胞は（ $2c + 2c$ ）、（ $4c + 4c$ ）、（ $8c + 8c$ ）の型で存在する。③同一細胞にみられる二核は大きさ、DNA量で差はなく、又同一クラスの単細胞核のそれとも差はない。④まれに（ $2c + 4c$ ）、（ $4c + 8c$ ）とPloidyの異なる核の組合せがみられた。⑤今迄確認し得た最高のPloidyは（ $8c + 8c$ ）である。

**B 細胞：**

①細胞面積は、核面積（二核の和）と密接な相関がある。②（ $2c + 2c$ ）、（ $4c + 4c$ ）、（ $8c + 8c$ ）の核をもつ細胞面積は、それぞれ単核細胞の $4c$ 、 $8c$ 、 $16c$ の核をもつ細胞面積と同じである。③加齢に伴う巨大細胞の増多は核のPolyploidizationと関連する。

**C 出現頻度：**

①加齢に伴い増加するが、それは主に（ $4c + 4c$ ）、（ $8c + 8c$ ）の増加による。出現頻度に男女差はない。②各症例にみられる単核のPolyploidizationの程度と二核細胞の出現頻度には明瞭な関連は認められない。③各年代層にみられる全二核細胞数中に占める（ $2c + 2c$ ）、（ $4c + 4c$ ）、（ $8c + 8c$ ）の割合とその増減は、同年代層の全単核細胞数中に占める $2c$ 、 $4c$ 、 $8c$ の割合と非常に類似する。

## クロショウジョウバエの生殖機能における老化と成虫寿命

相垣 敏郎<sup>2</sup>, 大羽 滋 (東京都立大学 理学部 生物学教室)Senescence in reproductive function of *Drosophila virilis* and longevity of adult flies.

AIGAKI, TOSHIRO &amp; OHBA, SHIGERU

Department of Biology  
Faculty of Science  
Tokyo Metropolitan University

老化の基本的原因は細胞内にあるものと考えられるが、高等生物の個体の老化には、体内の諸器官の機能が複雑に影響していることが予想される。ある機能が個体の老化や寿命といかに関係しているかを定量的に測定するためには、数量化しやすい材料が好適である。本研究はクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) を材料として、生殖機能の老化を数量化してとらえ、さらに生殖機能あるいは生殖活動と個体の寿命との関係を分析することを目的とした。生殖機能は個体の生命維持に直接関係するものではないが、すべての生物にそなわる本質的機能であり、その活動は個体の生存力と生理的に密接な関係にあるであろうという予想のもとに研究を進めた。

## 方法と結果

実験はすべて25°C, 恒明条件下で、標準培地皿を用いて行った。

結果 1 生殖機能の老化 図1に雄の生存個体数、及び週ごとに調べた雄の交尾能力の変化を示した。羽化後20日目までは交尾能力は高いが、以後徐々に低下する。雌についても週ごとに交尾回数、産卵数、羽化個体数を調べて生殖機能の指標とした。雌の産卵数は20日目以後徐々に低下し、最も長く産卵を続けたものでも70日で終了した。

結果 2 各個体ごとの生殖機能の諸データと寿命との相関関係を分析した(表1)。寿命との間で最も高い相関を示すものは、雄では交尾終了後の期間、雌では産卵終了後の期間であった(図2及び図3)。

結果 3 飼育瓶内の環境(雌雄別個体数)の変化は雌雄の寿命に影響した。各条件における諸要因と寿命との相関の分析から、雄個体数の増加により雌雄ともに有意に短命になることが判明した。

さらに、雄個体数が異なる条件や、異なる系統の雄を共存させた場合の産卵数と寿命を調べ、相関関係を分析した。各条件ごとに産卵数及び寿命のどちらも変化するが、産卵数と寿命との間に有意な相関は成立しなかった。

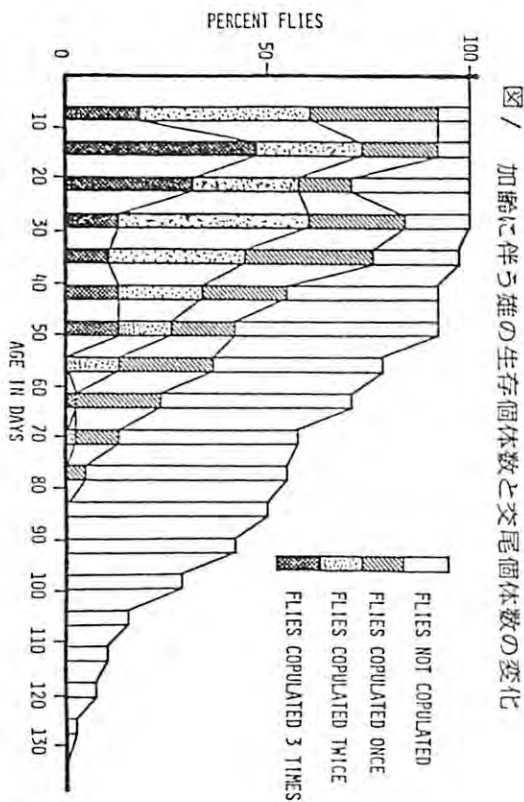


図1 加齢に伴う雄の生存個体数と交尾個体数の変化

表1 生殖機能と寿命との間の相関係数

|                                           | LONGEVITY |          |
|-------------------------------------------|-----------|----------|
|                                           | MALE      | FEMALE   |
| CUMULATIVE NO. OF COPULATIONS             | .1488     | .0887    |
| CUMULATIVE NO. OF EGGS                    | .1395     | .3038    |
| CUMULATIVE NO. OF PROGENY                 | .0133     | .0357    |
| CUMULATIVE NO. OF COPULATION(4 WEEKS)     | -.1067    | .0644    |
| CUMULATIVE NO. OF EGGS(4 WEEKS)           | -.0837    | .0229    |
| CUMULATIVE NO. OF PROGENY(4 WEEKS)        | -.1373    | .0244    |
| FINAL AGE OF COPULATION                   | .5383***  |          |
| FINAL AGE OF EGG-LAYING                   |           | .6042*** |
| RATE OF COPULATION (NO. OF COP./WEEK)     | -.3860*   |          |
| RATE OF EGG-LAYING (NO. OF EGGS/WEEK)     |           | -.3088   |
| REMAINING DAYS AFTER THE FINAL COPULATION | .8168***  |          |
| REMAINING DAYS AFTER THE FINAL EGG-LAYING |           | .8596*** |

図3 雌の産卵終了後の期間と寿命

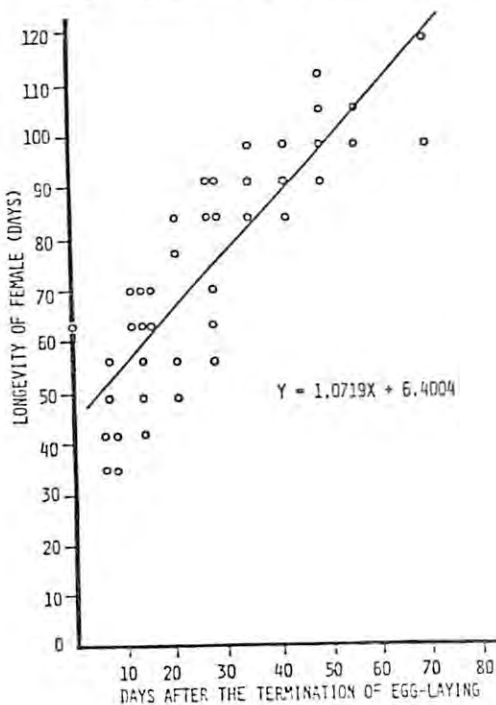
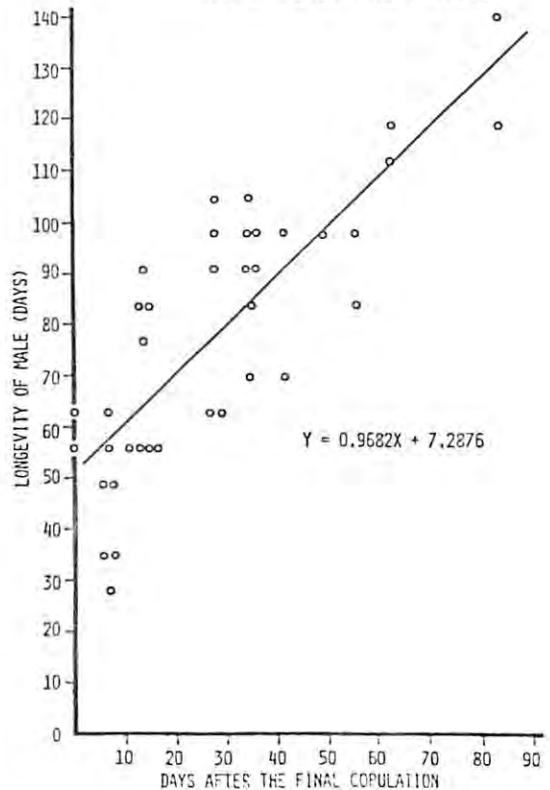


図2 雄の交尾終了後の期間と寿命



## クロショウジョウバエにおける成虫寿命の系統間変異と環境要因

大羽 滋<sup>1</sup>・山本明彦・曾根和海 (東京都立大学理学部生物学教室)Interstrain variation in adult longevity of *Drosophila virilis* and effects of environmental factors

Shigeru OHBA, Akihiko YAMAMOTO and Nagomi SONE

Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University

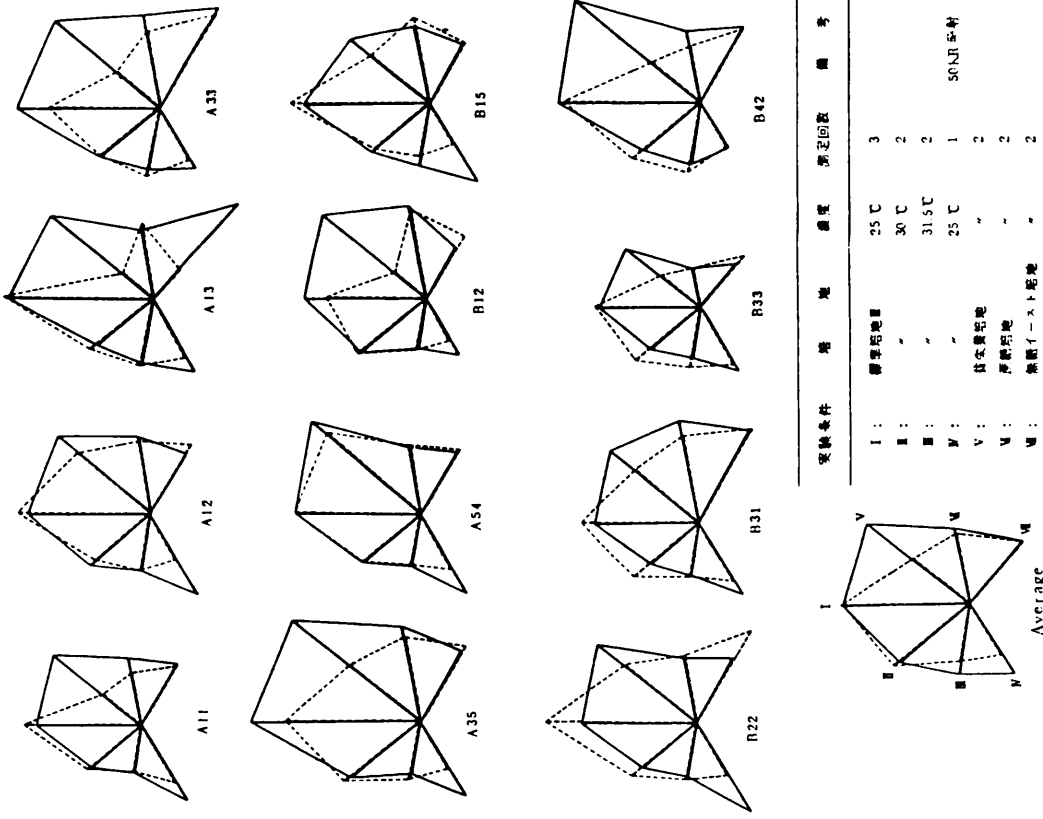
ショウジョウバエは生物の老化機構の研究に好適なモデル動物の一つとして、これまでも多くの研究がなされているが、その成虫の寿命は、遺伝的・環境的要因によつて著るしく左右されるので、老化の研究に使用するにあつては、さまざまな配慮が必要である。本研究の目的は、ショウジョウバエ成虫の生存曲線および寿命を、種々の遺伝的・環境的要因との関連の中で検討し、老化機構研究のための基礎的資料を確立することにある。

研究材料としてはクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) が用いられた。本種はこれまで老化の研究によく使われてきた、*Sophophora* 亜属のキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) や *D. subobscura* とは異なる *Drosophila* 亜属に属する大型のショウジョウバエで、飼育管理が容易であり、また栄養条件や温度などの環境要因に対する反応が敏感であるなどの点で、寿命や老化機構の解析に好都合な点が多く、さらにこれまでのキイロショウジョウバエやイエバエについての多くの知見と比較検討することによつて、双翅目昆虫についての一般的結論を得る上で非常に有用である。

ショウジョウバエの同一種内における寿命の遺伝的変異についてのくわしい研究はまったくなされていない。本研究では、愛媛県松山市郊外の貯木場で昭和48年10月下旬に採集された約60の単一雌由来の系統を素材として、これから無作為に抽出された12系統を用いた。これらの単一雌系統は、毎世代20個体前後の小集団で維持されており、昭和52年の実験開始時まで、近交係数Fの値は0.9以上に達しているものと推定される。実験に用いた成虫は、すべて適当な幼虫密度の下で標準培地を用いて25°Cで育て、14日目に羽化したものだけを使用した。羽化当日に雌雄各10対を1本の飼育瓶に入れ5本1組を測定単位とした。2日毎に飼育瓶を更新して死亡個体を取除き、生存曲線および平均寿命を求めた。次頁に記した7種類の環境条件の下で行つた実験結果のまとめは、図と表に示してあるが、さらにくわしい検討を加えた結果について発表する。

標準培地：/ 0 0 ml中に、エビオス粉末 8 g、蔗糖 / 0 g、粉末寒天 / g を含む。

松山中葉12系統の平均寿命の環境要因に対する反応



松山中葉12系統の種々の環境条件下における平均寿命の変化

| Lines   | Experimental conditions |          |          |          |           |          |          |      |
|---------|-------------------------|----------|----------|----------|-----------|----------|----------|------|
|         | I                       | II       | III      | IV       | V         | VI       | VII      | VIII |
| Female  |                         |          |          |          |           |          |          |      |
| A 11    | 8312±159                | 4032±087 | 2973±063 | 5476±145 | 6946±1370 | 4313±085 | 4440±211 |      |
| A 12    | 7369±146                | 4840±100 | 3507±051 | 3768±194 | 7388±219  | 4808±080 | 4280±117 |      |
| A 13    | 8759±157                | 4435±107 | 3980±110 | 5080±097 | 8104±350  | 4364±074 | 7918±230 |      |
| A 33    | 8683±157                | 4700±106 | 3873±082 | 4328±113 | 8334±254  | 5788±102 | 7102±187 |      |
| A 35    | 10197±210               | 5400±129 | 3263±057 | 5436±206 | 9994±287  | 6018±049 | 5034±265 |      |
| A 34    | 7520±163                | 4600±114 | 3193±057 | 5604±187 | 8690±278  | 4158±078 | 4410±144 |      |
| B 12    | 7368±185                | 5096±110 | 3073±031 | 3956±156 | 8129±412  | 5874±109 | 3654±140 |      |
| B 15    | 7589±169                | 4616±166 | 3967±063 | 5708±229 | 6186±228  | 4830±192 | 4114±141 |      |
| B 22    | 6995±138                | 4312±161 | 3393±046 | 6440±169 | 7764±191  | 4130±060 | 4616±161 |      |
| B 31    | 6316±161                | 3870±088 | 3287±054 | 5816±174 | 6910±225  | 6282±101 | 6458±127 |      |
| B 33    | 6088±115                | 3984±148 | 3127±094 | 4516±131 | 5738±253  | 2454±055 | 3452±144 |      |
| B 42    | 8653±178                | 4600±137 | 3920±084 | 3268±069 | 9950±278  | 4478±073 | 5450±197 |      |
| Average | 7654                    | 4540     | 3463     | 5116     | 7944      | 4791     | 5077     |      |
| Male    |                         |          |          |          |           |          |          |      |
| A 11    | 7111±205                | 4228±107 | 2920±062 | 4152±087 | 3004±227  | 3386±054 | 4364±238 |      |
| A 12    | 8004±182                | 4368±144 | 3493±074 | 3172±101 | 5828±299  | 4534±076 | 4952±117 |      |
| A 13    | 9063±209                | 4895±210 | 4153±121 | 4060±115 | 2452±176  | 4812±084 | 2482±234 |      |
| A 33    | 6771±154                | 4632±130 | 4327±080 | 3712±070 | 3410±186  | 4738±087 | 6624±168 |      |
| A 35    | 8079±238                | 5876±181 | 3640±088 | 3360±078 | 5502±296  | 5352±060 | 5492±217 |      |
| A 34    | 7612±173                | 4544±145 | 3120±055 | 3740±097 | 7540±349  | 4282±065 | 4630±112 |      |
| B 12    | 6052±170                | 5332±180 | 3200±042 | 2896±070 | 2433±260  | 5636±111 | 4578±151 |      |
| B 15    | 8484±216                | 4372±254 | 3327±122 | 3292±087 | 4550±249  | 5404±138 | 4322±204 |      |
| B 22    | 9197±184                | 5164±139 | 3600±070 | 3716±112 | 5650±268  | 4254±059 | 6682±177 |      |
| B 31    | 7159±221                | 5175±212 | 3380±058 | 4152±077 | 5002±288  | 5316±087 | 6570±148 |      |
| B 33    | 6363±111                | 5120±201 | 3773±063 | 4040±108 | 4012±198  | 2488±044 | 4222±150 |      |
| B 42    | 8348±210                | 5476±142 | 4474±104 | 3160±094 | 3820±169  | 3584±075 | 5312±190 |      |
| Average | 7687                    | 4932     | 3617     | 3621     | 4434      | 4482     | 5019     |      |

ゾウリムシのクローナルエイジングと子孫生存率 一核移植を用いたアプローチ

狩野 節子 樋渡 宏一  
(東北大学 理学部 生物学教室)

Clonal aging and death after conjugation in  
*Paramecium caudatum*

Setsuko KARINO , Koichi HIWATASHI

(Biological Institute, Faculty of Science, Tohoku University)

単細胞真核生物であるゾウリムシ (*P. caudatum*) のクローンには寿命があり、分裂速度の低下、有性生殖後の子孫生存率低下など種々の老化現象を示すことがよく知られている。一方、この生物は栄養核である大核と生殖核である小核の二種の核を持ち、細胞レベルで老化と若返りを観察できる極めてユニークな系と言える。また、大核は一代限りであるが、小核は種が存続するかぎり世代を超えて分裂を繰り返す。

ゾウリムシのクローンに起こる老化現象の多くは培養二倍体細胞のそれらと類似している。しかし、ゾウリムシのクローンにだけ見られる老化の示標として有性生殖後の子孫生存率低下がある。この原因はまだ解決されていないが、小核に老化による damage が蓄積するからだと考えられてきた。この問題について、今回小核移植を行なってアプローチした。

用いた 27aG3, St29 の二つのストックは対照的な老化過程を示した。27aG3 はクローンの分裂速度があまり変化しないにもかかわらず、子孫生存率だけが早期から低下した。一方、St29 では子孫生存率低下は分裂速度低下とはほぼ同時に起った。この二つのストックについて、子孫生存率が低下した時点でそれらの小核を若い細胞中に移植した。その結果、27aG3 では子孫生存率の回復が見られなかったが、St29 を用いた場合には子孫生存率の回復が起った。即ち、ストック 27aG3 において、子孫生存率低下は小核の damage で説明でき、St29 の場合は小核ではなく、大核あるいは細胞質に老化による damage が蓄積したためと考えられる。以上より、老化に伴う子孫生存率の低下は単に小核にエイジに伴う damage だけが原因ではないということが明らかになった。しかし、このような生殖核の老化という点での差異がなぜ起るのか、ある

いは生植核に起る変化とはどのようなものかという点が今後の問題として残った。



## 培養細胞老化の系図学

松村外志張,<sup>1</sup> 升田清文,<sup>2</sup> 村上善則,<sup>3</sup> 小西隆二<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>東大・医科研・癌細胞, <sup>2</sup>明治薬大・薬・薬剤科  
<sup>3</sup>東大・医・医学科

## THE GENEALOGY OF CELLULAR AGING IN CULTURE

T. MATSUMURA<sup>1</sup>, K. MASUDA<sup>2</sup>, Y. MURAKAMI<sup>3</sup>, and R. KONISHI<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Dept. Pathobiochem. Cell Res., Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo  
<sup>2</sup>Dept. Hygienic Chem., Meiji Col. Pharmacol. and  
<sup>3</sup>Univ. Tokyo Sch. Med.

正常組織由来の増殖性体細胞集団を培養したとき分裂増殖能に限界があるという事実、ならびに腫瘍由来細胞集団の多くにはこのような限界を認めないという対照的な事実は、老化と腫瘍化の培養水準における代表的なモデル的表現である。両事実は細胞集団を継代培養する間に明らかとなって来た。しかしその機構解明にいたる研究の発展をはばんでいる要因の1つはおそらく体細胞集団の不均化現象である。細胞集団を継代培養する通常の培養法によっては不均化現象の詳細を把握することは相当困難であろうと演者らは考えている。

有限増殖と無限増殖、ならびにその転換の機構解明を目ざして演者らは培養体細胞の不均化—特に増殖能に関する—の特長づけを行っている。培養系として人線維芽細胞、ならびにそのSV40転換細胞、マウス線維芽細胞、人ならびにラット肝細胞を検討して来た。増殖の指標として、コロニー形成能、コロニー形成細胞の増殖曲線、オートラジオグラフィによるチミジン標識率、ならびに顕微鏡映画による細胞系図を用いている。

細胞系図から読みとることのできる諸指標—細胞分裂間期や細胞の生死等—は不均化現象を把握する上で有力である。これらの指標を細胞集団水準で観察されて来た増殖能の有限と無限との関連に於て論ずることは、しかし必ずしも簡単ではない。特に

微少な視野において観察された細胞系図を集団を代表するものと見なし得るかどうかについて十分な検討が必要である。これら諸問題の解決を含め、実験系の確立過程を述べ、時間が許せば培養細胞老化に伴う細胞系図上の諸指標の変化と相互関係について述べたい。はなはだ抽象的な要旨で失礼であるが、比較的時間を要する研究の中間報告である点を考慮していただき御許容願いたい。

本研究を支持いただいている永井克孝教授、安藤俊夫教授、研究の初期段階で協力を得た新田啓子、宮下茂代両技官、ならびに培養材料の収集、保存を通じて援助を受けている理化学研究所ライフサイエンス推進部に感謝する。

## ヒト胎児線維芽細胞の DNA 量と細胞老化

松尾光芳，加治和彦（東京都老人総合研究所）

宇多小路正，細田恵子（癌研究会癌研究所）

MEASUREMENT OF DNA CONTENT IN HUMAN EMBRYONIC FIBROBLASTS DURING  
THEIR IN VITRO LIFESPAN

Mitsuyoshi MATSUO and Kazuhiko KAJI (Tokyo Metropolitan Institute  
of Gerontology) Tadashi UTAKOJI and Keiko HOSODA (Cancer  
Institute, Tokyo)

ヒト胎児線維芽細胞の集団内に存在する倍数体細胞の割合は，細胞老化の最終段階において増加すると云われている。Saksela と Moorhead によれば，ヒト胎児肺線維芽細胞 (WI-26) の四倍体の割合は継代数によらず 1.6～4.5% であったが，寿命の末期にのみ 16% に増加した<sup>1)</sup>。しかし，ヒト倍数体細胞に関する既報データは，細胞周期上の分裂期の細胞だけを観察している点と観察細胞数が比較的少ない点に検討の余地を残している。また，これまでに継代培養初期の細胞についての観察は報告されていない。

我々は，流動微少蛍光測定法を用いて，飽和密度に達しているヒト胎児線維芽細胞 (TIG-3) の DNA 量を測定し，継代初期から末期に至る期間内に生ずる TIG-3 細胞核 DNA 量の変動を観察した。同時に核型分析を行い，分裂期細胞の倍数体の割合を調べた。ヒト胎児線維芽細胞においては，継代培養の初期 (< 10 細胞集団倍加数: PDs) と末期 (> 78 PDs) に倍数体細胞の割合が増加していることが明らかになった。

〔方法〕ヒト胎児肺線維芽細胞 TIG-3 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により培養した。継代は，毎週，分割比 1:4，0.25% トリプシン処理により行った。核型分析<sup>2)</sup>および飽和密度に達している細胞を対象とした流動微少蛍光測定 (FACS-Ⅲ，アルゴン・レーザー 488 nm，プロビジウムヨード使用)<sup>3)</sup> は常法に従って行われた。倍数体化指数 (PI) は次のように定義された<sup>4)</sup>： $PI = \frac{\sum}{n=1} (\text{細胞集団中の } 2^n \text{C 細胞の百分率}) \times n / 100$ 。

〔結果および考察〕 TIG-3細胞の総細胞集団倍加数は84（総継代数46，培養日数334日）であった。倍加時間は，70PDs以前にはほぼ一定で18～24時間であったが，以後急激に延長された。継代数の異なる細胞のDNA量に関する流動微少蛍光測定の結果を表に示す。継代初期（7.0PDs，倍数体化指数：PI 1.11）と末期（81.9PDs，PI 1.19）には，4C以上のDNA量を持つ細胞核の割合が明らかに増加している。中期（18～67PDs，PI 1.01～1.02）には，集団中の95%以上の細胞核が2C核であり，典型的な二倍体細胞になっている。これらの結果は核型分析からも支持される。継代初期に倍数体細胞が存在する理由は不明であるが，これら細胞が生体内にあった状態を反映しているのか，または細胞が分離された過程で生じた環境の激変に原因があるのかのどちらかであろう。ニワトリ胚線維芽細胞の場合には，継代初期における倍数体細胞の増加は観察されていない。<sup>4)</sup> ヒト細胞とニワトリ細胞の相異は興味深い問題である。継代初期にみられたヒト細胞の倍数体は，継代に伴って減少する。おそらく，倍数体細胞の増殖速度が二倍体細胞のそれより遅いため選別されるものと思われる。継代末期においては，二倍体細胞の増殖速度が低下するので細胞老化により生ずる倍数体が蓄積されると考えられる。

| 細胞集団中の異なるDNA量をもつ細胞核の割合 |                   |       |       |      |
|------------------------|-------------------|-------|-------|------|
| 細胞集団                   | 1                 | 2     | 3     |      |
| 測定核数                   | 19783             | 17197 | 28440 |      |
| 細胞集団倍加数                | 7.0               | 26.9  | 81.9  |      |
| 寿命達成率(%)               | 8.4               | 32.1  | 97.1  |      |
| 倍数体化指数                 | 1.11              | 1.01  | 1.19  |      |
|                        | 異なるDNA量をもつ核の割合(%) |       |       |      |
| DNA量 {                 | 2C                | 85.2  | 95.9  | 81.3 |
|                        | 4C                | 11.3  | 2.7   | 16.6 |
|                        | 8C                | 0.7   | —     | 1.1  |
|                        | 16C               | <0.1  | —     | <0.1 |

- 〔文献〕
- 1) Saksela, E. and Moorhead, P. S.; Proc. N. A. S., 50, 390 (1963).
  - 2) Ohashi, M. et al.; Exp. Gerontol., 15, 121 (1980).
  - 3) Kaji, K. and Matsuo, M.; Exp. Cell Res., 119, 231 (1979).
  - 4) Kaji, K. and Matsuo, M.; Exp. Cell Res., in press (1981).

## ヒト2倍体細胞の老化とDNA修復能の変化

長谷川 伸彦、花岡 文雄、山田 正篤  
(東京大学 薬学部 生理化学教室)

REEVALUATION OF AGE-RELATED CHANGES IN ULTRAVIOLET-INDUCED DNA REPAIR SYNTHESIS  
IN HUMAN DIPLOID CELLS

Nobuhiko HASEGAWA, Fumio HANAOKA, Masa-atsu YAMADA (Department of Physiological  
Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo)

Human diploid fibroblasts undergo a limited number of cell divisions *in vitro* after which they stop growing and degenerate. This phenomenon has gained wide acceptance as an *in vitro* model system for the study of cellular senescence. Since a reduction in lifespan by exposure to irradiation at low dose and age-related changes in the genetic material have been described in higher organisms, the idea that aging in mammalian cells is related to an accumulation of the damage on the genome caused by an age-associated decline in the ability of DNA repair mechanisms in the cell seems reasonable.

There have so far been many studies on the changes in the ability of DNA repair in the aging process of human diploid fibroblasts. They have utilized various model systems and have resulted in conflicting conclusions. In order to reevaluate the relationship between *in vitro* lifespan and the repair capability, we examined the ultraviolet-induced repair synthesis in human diploid fibroblasts arrested in an essentially non-mitotic state.

Human diploid fibroblasts (IMR-90 cells) were incubated at 37°C to reach con-

fluence. Then the cells were arrested in an essentially non-mitotic state by incubation with the medium containing low serum for 48h. After ultraviolet irradiation, the incorporation of  $^3\text{H}$ -thymidine into DNA was measured. In the absence of FUdR, which is an inhibitor of *de novo* synthesis of dTMP, old cells incorporated more  $^3\text{H}$ -thymidine than young cells. In order to examine this point further, the uptake of  $^3\text{H}$ -thymidine in acid-soluble fraction was assayed. Old cells showed higher uptake than young cells. This result explains that the observed elevation in repair synthesis was due to an increased availability of precursor from the soluble pools. In the presence of FUdR, young cells incorporated slightly more  $^3\text{H}$ -thymidine into DNA than old cells. This result favoured the idea that the changes in the ability to perform DNA repair synthesis may be related to an *in vitro* cellular aging.

早老症(Werner)細胞の "Contact Stimulation" の能力は正常細胞と変わらない

大野忠夫、松村外志張\*、後藤真<sup>#</sup> 放医研・薬、\*東大・医科研、<sup>#</sup>東大・医・物療

Normal ability of "contact stimulation" of growth  
in Werner fibroblasts.

Tadao Ohno, Toshiharu Matsumura\* and Makoto Goto<sup>#</sup>  
Div. Pharmaceut. Sci., Nat. Inst. Radiol. Sci., \*Dept. Pathobio-  
chem. Cell Res., Inst. Med. Sci., Univ. Tokyo and <sup>#</sup>Intern. Med.,  
Facul. Med., Univ. Tokyo

遺伝性早老症のうち、Werner症候群は比較的ゆっくり症状が進行し、正常人の老化に近いといわれる。患者生検材料より培養した線維芽細胞は、正常人のそれに比べて増殖能が低く、in vitroでしばしば用いられる研究材料となっている。我々は、早くから、Werner細胞を培養した培地の色の黄変の程度が、正常細胞のものよりも強いことに気づいていたが、それが何によるものかは未検討であった。最近、Werner患者尿中にはヒアルロン酸量が多いこと（後藤ら、結合組織 8:112, 1976）、 $^{35}\text{SO}_4^{--}$ の線維芽細胞へのとり込みが高いこと（田島ら、結合組織 10:195, 1978）、線維芽細胞培養液中へのムコ多糖の放出が多いこと（藤原、私信）が知られてきた。一方、正常線維芽細胞WI-38の培地中にヘパリンを添加すると増殖が抑制され（Weverら、Mech. Age. Dev. 14:89, 1980）、また老化した細胞表面には増殖を抑制するヘパラン硫酸が多い（松岡ら、基礎老化研究 4:74, 1980）という報告がなされた。

これらの観察から、Werner細胞の増殖能力が劣るのは、自ら生成放出するムコ多糖その他の物質によって、増殖阻害をうけるためであるという仮説が生ずる。この可否を、我々は、細胞間相互作用、特に、正常線維芽細胞にみられる「contact stimulation」（Ohno & Yamada, 投稿中）の能力によって検討したので報告する。

臨床的所見から典型的Werner症候群と診断された患者皮膚片より培養した線維芽細胞 KUWS-a は、正常皮膚線維芽細胞 305M のような整列性を培養中で示さず、増殖速度も遅い。Confluentになったこれらの細胞に、 $^3\text{H}$ -glucosamine、 $^{14}\text{C}$ -leucineを添加し、2日間に培地中及び細胞層中に蓄積される非透析性物質の量をみた。細胞層の蛋白当りで計算すると、KUWS-aは 305Mの 2~3倍の蓄積量を示し、そのうち $^3\text{H}$ については約2/3を、 $^{14}\text{C}$ については約1/2を培地中に放出した。多糖~蛋白の総量でみて、合成量・放出量ともに増加していることは明白である。また、これらの細胞にX線5500rad

を照射した後、feeder細胞としてまき、その中にヒト正常線維芽細胞IMR-90を添加して、コロニーを形成させた。もし、KUWS-aによって産生される物質中に、細胞増殖を阻害するものがあれば、コロニー形成率は低下するはずである。しかしながら、305Mをfeederとした場合とほとんど変らなかった。KUWS-aと同様なWerner細胞である305Wをfeederとしたときには、IMR-90のコロニー形成率はむしろ増加した。KUWS-aのconditioned medium中にも、IMR-90の増殖を阻害する活性は検出できなかった。

KUWS-aの培養皿から細胞をかき取ると、IMR-90のコロニー形成率が低下すること、IMR-90とKUWS-aの両者が接触できる距離にいないと、コロニー形成率が増大しないことなどから、KUWS-aによるIMR-90のコロニー形成の促進作用は、大部分、「contact stimulation」によるものであり、その能力は、上述の結果から、305Mと差がないと考えられる。従って、我々は、前述の仮説は成立せず、Werner細胞の増殖能力が劣るのは、自らの生産する物質による増殖阻害をうけるためではないと考える。



## 加齢と細胞膜、フリーズ・フラクチャー法による観察（予報）

下野正基，久保幸穂，田中康一，三井洋司（東京都老人研・基礎病理，素理，東京歯科大・病理II）

## AGING AND CELL MEMBRANE. A FREEZE-FRACTURE STUDY ON TIG-1 CELLS

Masaki SHIMONO, Sachiho KUBO, Yasukazu TANAKA and Yoji MITSUI

( Department of Pathology and Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology : Department of Pathology, Tokyo Dental College )

一般に、細胞膜の分化は細胞の分化に対応し、その特殊化したものが細胞間結合装置であると考えられており、細胞の機能と細胞膜とは密接な関係のあることが示唆されている（Packer, 1974; Staehelin, 1974）。従つて、加齢に伴なう細胞の代謝やタンパク合成能などの変化が老化細胞の細胞膜にも反映していると想像される。Kelley & Skipper (1977)はヒト胎児由来の培養線維芽細胞を用い、フリーズ・フラクチャー法により、培養初期と後期における細胞の膜内粒子の分布密度を検索し、加齢により膜内粒子の流動性が変化することを示唆した。今回、我々は東京都老人総合研究所で確立されたヒト胎児肺由来の培養線維芽細胞（TIG-1）を用いて細胞膜内粒子の分布密度と大きさを測定し、細胞加齢との関連について検討を試みた。

## （材料および方法）

細胞は10%FCSを含むEagleのMEM中、37°C、5%CO<sub>2</sub>下で培養したヒト胎児由来の線維芽細胞（TIG-1）を用いた。プラスチック・カバー上に培養したTIG-1のlate early stageに相当する22PDLとterminal stageに相当する66PDL（ともにconfluentの状態）を0.1M 磷酸緩衝1%グルタールアルデヒド（pH7.4）にて固定した。10～30%グリセリンにて凍結防止を施し、液体窒素で冷却したフレオン22および液体窒素で凍結し、フリーズ・エッチング装置（Millitore社製）にて-100°CでPauli, et al. (1977)の方法に従つて切断し、白金とカーボンを蒸着してレプリカを作製した。レプリカはJEM 100C電子顕微鏡で観察、撮影し、80,000倍に引き伸ばした印画紙上で膜内粒子の分布密度と粒子の直径を計測した。

## （結果）

全ての細胞膜で、EF面よりPF面に分布する膜内粒子が多く、また両切断面とも22PDLに比し66PDLの方により多くの膜内粒子が分布していた。1平方ミクロンあたりの膜内粒子の数は22PDLではPF面が677±86（

n=50)、EF面が $398 \pm 116$  (n=50)、66PDLではPF面が $962 \pm 104$  (n=50)、EF面が $550 \pm 98$  (n=50)であつた。分布する膜内粒子の大きさは直径6~19nmで7.5~10nmの粒子が最も多く観察され、また66PDLに比し22PDLに大きな粒子が多くみられた。すなわち16nm以上の粒子は22PDLのPF面では9.7%、EF面では4.7%であり、66PDLのPF面では2.3% EF面では1.4%であつた。逆に直径7.5nm以下の膜内粒子が占める割合は、22PDLのPF面は5.3%、EF面は13%であつたのに対し66PDLのPF面は14.9%、EF面は26%であつた。22、66PDLともEF面よりPF面に大きな粒子が観察できた。

(考察)

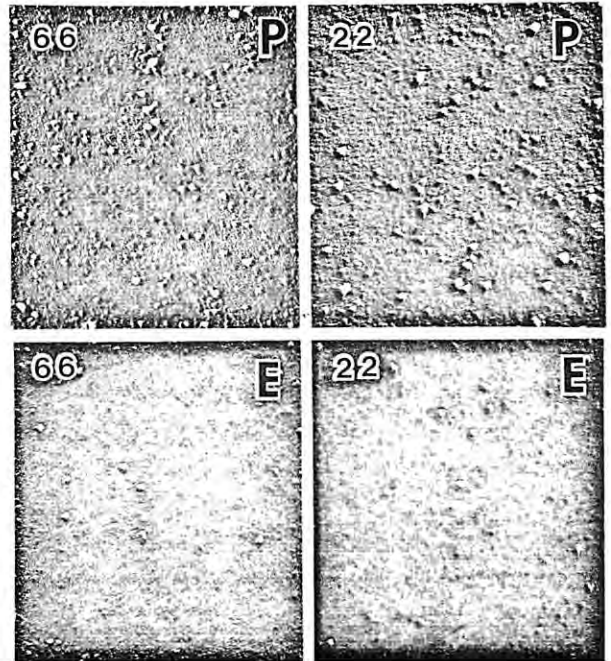
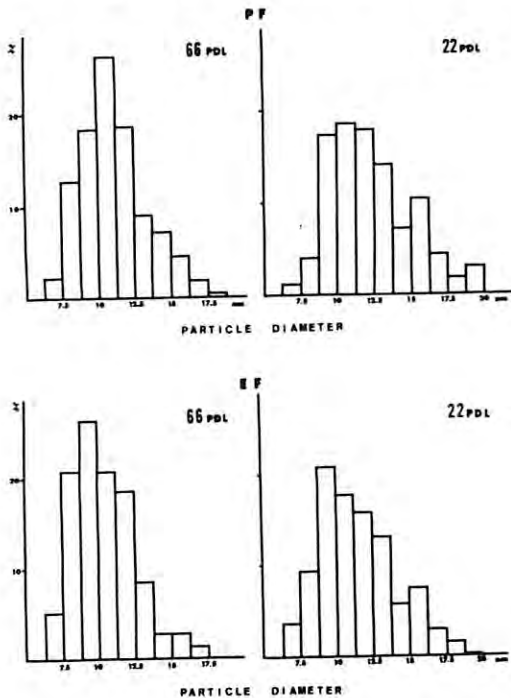
以上の結果から(1)加齢に伴つて膜内粒子の分布密度は高くなるが、構成する膜内粒子が小さくなること、(2)細胞膜の非対称性は加齢によつても失なわれないこと、(3)膜内粒子の分布密度よりも構成する膜内粒子の大きさが加齢と関連のあることが示唆された。今回の我々の結果は、PF面では若い細胞に膜内粒子が多いというKelley & Skipperの報告と一致しないが、その一因として、用いた細胞種が異なること、Population doubling (PDL)が異なることが示唆された。

1 平方ミクロン当りの膜内粒子の数

|                | 66 PDL        |              | 22 PDL       |               |
|----------------|---------------|--------------|--------------|---------------|
|                | P-face        | E-face       | P-face       | E-face        |
| ranging        | 800-1272      | 352-824      | 520-896      | 184-616       |
| means $\pm$ SD | $962 \pm 104$ | $550 \pm 98$ | $677 \pm 86$ | $398 \pm 116$ |
| n              | 50            | 50           | 50           | 50            |

膜内粒子の直径と分布密度

フリーズ・フラクチャー・レプリカ像



## ヒト胎児肺繊維芽細胞の増殖と分裂寿命におよぼす各種ステロイドの効果

春日博子, 近藤 翼 (東京都老人総合研究所生物学部), 能村哲郎 (埼玉大学理学部生体制御学教室)

Effects of steroids on cell growth and in vitro lifespan of human fetal lung fibroblasts (WI-38)

Hiroko Kasuga, Hiroshi Kondo ( Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology ), Tetsuo Noumura ( Department of Regulation Biology, Faculty of Science, Saitama University )

ハイドロコルチゾン処理により, ヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI-38) は, 増殖の促進と分裂寿命の延長が誘起される。我々もヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI-38, IMR-90, TIG-1) で, 同じ現象がみられることを報告した。今まで, ヒト胎児肺繊維芽細胞を用いて, 細胞の増殖に対する効果をきちんと調べた報告は, 各種ステロイドホルモンのうちハイドロコルチゾンだけである。それ故, WI-38細胞を用いて, ハイドロコルチゾンを含む各種ステロイドホルモンの細胞増殖と分裂寿命におよぼす効果を系統的に検討した。これらの研究は, 各種ステロイドホルモンがヒト胎児肺繊維芽細胞に特異的に作用をするかどうかをあきらかにするとともに, 短期間処理効果 (増殖への効果) と長期間処理効果 (分裂寿命への効果) の関係をあきらかにすることが期待される。

## ( 材料と方法 )

ヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI-38) は, 米国のIMRよりいただいた。細胞はイーグルBMEに10%牛胎児血清と抗生物質を含んだ培養液で, 37°C の炭酸ガスインキュベーター中で培養した。培養シャーレにいっぱいになった細胞を0.25% trypsin 液ではがし, split ratio 1:4 で Falcon (21cm<sup>2</sup>, 3002) の培養シャーレの中で継代培養した。細胞数はコールターカウンターで測定した。ハイドロコルチゾン, コルチゾン, テストステロン, ジヒドロテストステロン, 17β-エストラジオール, プロジェステロン, デヒドロエピアンドロステロン, コレステロールは, エチルアルコールに溶かし, 培養液には 1/1000 容のエタノール溶液として添加した。

短期ステロイド処理実験: 0.25%トリプシンではがした PD35-39 の monolayer の細胞を培養液に懸濁し, 細胞数を測定した。2倍濃度の各種ホルモン, 又はエタノール (対照として) を含む増殖液を前もってシャーレに用意し, これに等量の2倍濃度の細胞懸濁液を加えて, 8cm<sup>2</sup> シャーレ (3001) あたり  $1 \times 10^5$  細胞で培養した。その後, 継時的に, 又は16日後のみに細胞数を測定した。

長期ステロイド処理実験: 集団増加数31 (PD31) から, 処理群には 5 μg/ml と 0.5 μg/ml のステロイドを添加し, 対照群にはエタノールを添加して培養した。split ratio 1:4 で継代培養し, 細胞数

の増加がみられなくなった時に寿命がおわったものとした。

( 結果と考察 )

I, 細胞の増殖に対する各種ステロイドホルモンの効果

検討した7種類のステロイドホルモンと1種類の前駆体のうち、ヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI-38)の増殖を促進したのは、コルチコイド (ハイドロコルチゾンとコルチゾン) だけである。ハイドロコルチゾンは特に効果があり、今まで主に用いられた  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1.4 \times 10^{-5} \text{M}$ ) の濃度でも効果がえられた (17%の増加) が、最大の効果は  $0.05 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1.4 \times 10^{-7} \text{M}$ ) でみられた (31%の増加)。又、 $0.005 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1.4 \times 10^{-8} \text{M}$ ) でも効果がえられた。これらの結果は生理的濃度で増殖促進効果がみられることを示し、Cristofalo (1979) の報告を支持した。コルチゾンはハイドロコルチゾンより増殖促進効果が少なかった。他方男性ホルモンのテストステロンは、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で細胞増殖を抑制した (10%)。しかし、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ より低い濃度では、抑制効果が観察されなかった。同様の結果はジヒドロテストステロンでもえられた。女性ホルモン (17 $\beta$ -エストラジオール) の細胞への効果は、男性ホルモンの効果と同じ傾向を示した。 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  17 $\beta$ -エストラジオールは、細胞の増殖を23%抑え、テストステロンより多少強い抑制効果を持つ。黄体ホルモン (プロジェステロン) は、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では細胞増殖を抑制しないが、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ では強く抑制した (44%)。他方  $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ よりわずい濃度では、ごくわずか増殖を促進するかもしれない。この点については検討を必要とする。ステロイドホルモンの前駆体のコレステロールは、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度まで増殖の抑制を引きおこさない。これらの結果は、ヒト胎児肺繊維芽細胞は生理的な濃度のグルココルチコイドにより細胞増殖が促進されること、および、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  ( $1.6-1.7 \times 10^{-5} \text{M}$ ) より濃い濃度の性ステロイドホルモンの増殖抑制されることを示した。

II, 細胞の寿命に対する各種ステロイドホルモンの効果

$5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ハイドロコルチゾンは、さきに示したように WI-38 細胞の増殖を促進するだけでなく、分裂寿命の延長を引きおこした (6%)。 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ハイドロコルチゾンは、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のものより、より強い効果を示した (8%)。他方、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ テストステロンは、継代時の細胞密度をはじめは低下させるが、分裂寿命をほとんど短縮しなかった。 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ テストステロン添加では、予想されたように細胞密度も分裂寿命も対照と同じであった。同様の結果はジヒドロテストステロンでもみられた。 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ プロジェステロンは、継代時の細胞密度をおおきく低下させるとともに、分裂寿命も短縮した (9%)。 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ プロジェステロンの効果は、対照と変らなかつた。これらの結果は、短期間処理で増殖効果をもたらしたハイドロコルチゾンが長期間処理でも寿命を延ばし、又、短期間処理で抑制効果を引きおこしたプロジェステロンが長期間処理でも寿命を短縮したことを示した。しかし、テストステロンやジヒドロテストステロンの例では、短期間処理で効果を引きおこしても、長期間処理ではほとんど効果をもたらさないことがみられた。

無血清培地におけるヒト二倍体線維芽細胞の長期継代培養と  
ハイドロコチゾンの効果

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

Long-termed Serial Cultures of Human Diploid Fibroblasts  
and Effect of Hydrocortisone to them in a Serum-free Hormone-supple-  
mented medium.

Hiroyoshi Hoshi, Mikio Kan, Yoshiki Minamoto and Isao  
Yamane (Department of Cell Biology, Institute for Tuberculosis and  
Cancer, Tohoku University).

Previously we developed serum-free medium, RITC 78-6 (m-EGF, Insulin, transferrin,  $T_3$  containing) for short-termed cultures of human embryonic lung fibroblasts (HEL). Under the condition of the low serum medium (RITC 78-6 supplemented with 0.5% FBS), it was found that human fibronectin (hFN, 20 $\mu$ g/ml) stimulated the cell growth on both young (PDL-21) and senescent cells (PDL-48). Further, the addition of bovine serum albumin (BSA, 5g/l) made HEL cells to proliferate in a completely serum-free medium as well as in BME-10% FBS control. However, the long-termed serial cultures failed in this serum-free medium supplemented with both hFN and BSA. As a result, we found that thymidine, hypoxanthin, and vitamin B<sub>12</sub> were required for the long-termed culture. Finally, RITC 80-7 (RITC 78-6 plus these organic compounds) containing hFN and BSA proved to be excellent for the long-termed culture. hFN increased the cell adhesion and spreading to tissue culture plastic substrate and stimulated hormonal

growth factors action. BSA was found to play an important role as a carrier protein of various lipids in the reconstitution experiment with defatted BSA added with lipids.

It has been known that a corticosteroid hormone, hydrocortisone (HC) significantly increased life span of the cultured cells. However, the effect of HC was serum dependent in the culture of human diploid fibroblasts and therefore, HC appeared to be an amplifier of the serum stimulation of cell proliferation. Employing our serum-free culture conditions, it would be able to postulate and discover so far undefined hormonal growth factors in serum which can react with HC. HC stimulated cell proliferation and DNA synthesis in the presence of hormonal growth factors in the case of young cell culture. However, HC had no stimulatory effect in the absence of them. These results suggest that HC stimulation of cell growth and DNA synthesis were "permissive" effect for hormonal growth factors. We are now proceeding for identifying responsible growth factor which can stimulate the cell growth due to HC and modifying in vitro life span in our serum-free culture.

蚕の寿命に及ぼす昆虫ホルモンの影響

小山内 実 (東京都老人総合研究所生物学部)

Effects of insect hormones on the life span of silkworm moth,  
Bombyx mori

Minoru OSANAI

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo

哺乳動物では、生命のホメオスタシス維持のため、少なくとも、3つの重要な生理学的機構が知られている。神経系、液相協関係、及び免疫系である。系統発生的にみると、神経系は、腔腸動物に既に存在するが、再生不能の中樞神経系は、袋形動物より始まり、寿命の確然とした限定化も、ほぼ平行して起こる。ステロイドホルモンは、軟体動物にも発見されているが、明確な液相協関係は節足動物、殊に昆虫類と脊椎動物に存在する。免疫系を有する動物群は脊椎動物に限られており、進化の過程で、神経系、液相協関係に続いて、新たに追加充足された、高等動物のホメオスタシス維持のための機構とみなしうる。動物の寿命が、遺伝子によって決定されるとしても、これらの機構の作用如何によって左右されることは疑いない。

昆虫は発達した中樞神経系と液相協関係を有するが、後者の構成は比較的単純で、性ホルモンを欠き、主要なものは、神経分泌物質と脱皮ホルモン及び幼若ホルモンである。蚕蛾は、羽化後、全く摂食を行わない閉鎖系で、寿命も短かく、簡単な内分泌系を有することと相まって、ヒトあるいは哺乳動物の老化モデルとして甚だ適している。蚕蛾で分泌される脱皮ホルモンは、 $\alpha$ - と  $\beta$ - エクジソンの二種が知られ、雌蛾は卵巣内に、更に数種の脱皮ホルモンを有する。いずれもステロイドホルモンに属する。体内濃度は、羽化直後は比較的高いが、加齢と共に減ずる。幼若ホルモンは、テルペンに属し、JH- I、II 及び III の3種が昆虫で知られているが、その中カイコガには、JH- I と II の存在が知られている。成虫での体内濃度についての報告は未だなされていない。初期の昆虫内分泌学では、その名の如く脱皮ホルモンは脱皮を惹き起こし、幼若ホルモンは昆虫の幼形化をもたらすものとして理解されていた。最近では、これらのホルモンは、単独で、あるいは両者が共同、又はお互いに拮抗して、DNA、RNAの合成を通じて、蛋白質の合成を調節し、発生、脱皮、生殖、産卵の他、体色変化、水分調節、呼吸、休眠等、ほとんどあらゆる昆虫の生理学的現象に関与し、多大の影響を及ぼしていることが分ってきている。生理学的現象の総決算である寿命も、当然影響を受けるものと考え、この実

験が企画された。

羽化直後、太平×長安 (F<sub>1</sub>) 蚕蛾にβ-エクジソンを注射すれば、雄では、一匹当たり0.01 μg~1.0 μg の範囲で投与した濃度の如何によらず、寿命の短縮化を示した。大きな卵巣を有し、体重も雄の二倍近くもある雌では、対照群との差をほとんど見出すことが出来なかつた。他方、JH-I は、雄での高濃度投与では、寿命の短縮化を惹き起したが、低濃度では、逆に若干の延命効果を表わした。雌に与えたJH-I の寿命に及ぼした効果は、明確な延長を示し、平均寿命のみならず最大寿命も増加した。雌雄による効果の相違は、恐らく卵巣の有無に起因するものであろう。

摂食を行わない蚕がでは、体重が羽化した後加齢と共に減少する。β-エクジソンが、体重の経日的減少変化に及ぼす影響は、雌雄を問わずほとんどみられない。JH-I 投与でも、体重の減少度は、未処理群の蚕がに比し、あまり変らない。一般に、エクジソンは体内代謝を促進し、幼若ホルモンは緩慢化させるといわれているが、各種体内代謝に及ぼした両ホルモンの影響は、体重の変化としてはそれ程鋭敏には現われなかつたことになる。

しかしながら、測定された幾つかの個体の体重の標準偏差を指標にとり、その経日的変化を調べてみると、ホルモンの代謝の変化が、標準偏差の変化として、或る程度まで把握することができた。通常は、体重のある時期における標準偏差値が大きい場合には、その時期における代謝の変化も大であることを反映していると思なされよう。未処理群の雄では、羽化直後に大きな標準偏差値をとるが、急激に低下した後、しばらくやや安定するに至る。後期では、再び激減した値を示すが、再度、少しく安定するという経過をとる。

β-エクジソンを注射された蚕がは、低濃度では、ほぼ一定の値に終始するが、高濃度では、後期の始まりに、大きなピークを生ずるように変化する。JH-I 投与の場合も、羽化直後の高いレベルの時期を欠き、高濃度では、中期に急激なレベルダウンを惹き起こす。これらと対照的に、中、低濃度の投与の場合には、羽化直後より終期まで、ほぼ一定したレベルを保ち、およそ、横軸に平行に走る。このことは、代謝の変化が生涯中、安定して、急激な変化を伴わないからであろうと考えられる。

雌では、産卵のため、羽化直後の標準偏差は、あまり高くないが、初期の中ごろには、大きく顕著なピークを生ずる。中期には激減し、後期では再び小さな増加を示し、第二のピークを形成する。β-エクジソン投与では、ほぼ、未処理群雌と同様の経過をとるが、第一の中期のピークはわずかながら、時期的に早い方にずれ、このピークの下りは、未処理群より比較的高いレベルに留まる。雄が同様、雌がでも、代謝がエクジソンによって促進されているように思われる。JH-I の投与では、高濃度の場合、ピークの位置が後方にずれ、しかも、ピークの幅は広がる。低下のレベルは未処理群のそれよりは高いが、エクジソン投与よりは低い。この傾向は、ピークの位置を除外すれば、低濃度投与の場合でも同様である。これらの結果は、このホルモンが、エクジソンとは反対に、代謝速度を小さくするように働いていることを示すものであろう。JH-I の延命効果と、β-エクジソンの短命効果は、rate of living 説にのっとり、それぞれ、代謝速度の低下と促進で惹き起こされることとして説明しうる。

本研究の一部は、理化学研究所ライフサイエンス・プロジェクト研究の受託研究費によって行われた。



## 出生時チロキシン処理ラットの下垂体-甲状腺機能と老化

大岡 宏 (東京都老人総合研究所生物学部)

PITUITARY-THYROID AXIS AND AGING IN NEONATALLY T<sub>4</sub>-TREATED RATSHiroshi OOKA (Department of Biology, Tokyo Metropolitan  
Institute of Gerontology)

個体の老化速度に全身の内分泌調節機能の変動が与える影響をしらべるため、人工的に甲状腺機能を低下させたラットを作り、これを長期飼育して老化速度を観察した。低甲状腺機能ラットを生産する方法としては、甲状腺摘出あるいは抗甲状腺剤投与などの方法が考えられるが、いずれも甲状腺ホルモン濃度がほとんど0にまで低下し、また動物に与える傷害、副作用が強い。そのため、この研究では出生直後に甲状腺ホルモンを大量に注射することによって成長後の甲状腺機能が低下するという現象を利用して実験を行なった。ウイスター系ラットを用いて、生れた日を1日目として、2、4、6、8、10日目に、体重1g当たり0.5、1、2 $\mu$ gのチロキシン (T<sub>4</sub>) を腹腔内注射した。対照群にはアルカリ性食塩水 (溶媒) を注射した。

T<sub>4</sub> 処理ラットの体重は対照の約80%で、雌雄とも成長速度が遅く、最高体重に達する時期も対照群より遅れる。T<sub>4</sub> 処理ラットの血中T<sub>4</sub>、T<sub>3</sub> (3、3'、5-トリヨードチロニン) を市販の臨床検査用ラジオイムノアッセイキット (科研化学アマレックス) を用いて測定した結果、T<sub>4</sub> は若いラットでは対照の3分の1、生後1年を経たものでは3分の2に低下し、T<sub>3</sub> もT<sub>4</sub> に比して軽度ではあるが低下を示した。米国NIAMDD製下垂体ホルモン及び抗体を用いてラジオイムノアッセイによって測定した血中TSH濃度はT<sub>4</sub> 処理群でわずかな低下を示したが、抗甲状腺剤プロピルチオウラシルを生後35日のラットに2週間飲料水を通じて投与した後は、血中TSHの上昇はT<sub>4</sub> 処理群では対照群の約2分の1に止まった。これらの結果は、出生直後のT<sub>4</sub> 処理によって下垂体

のTSH細胞の機能低下を生じていることを暗示する。正常およびT<sub>4</sub>処理ラットの下垂体をペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ法によって染色したところ、生後10日までは正常ラットのTSH細胞が急速に増加する時期であり、T<sub>4</sub>処理によってTSH細胞の増加は完全に抑制され、T<sub>4</sub>処理終了後に増加が始まるが、TSH細胞が最高密度近くに達する時期は乳離れ期以後まで遅延した。成長後のTSH細胞数は正常ラットと差がなかったため、このTSH細胞増殖の遅れがTSH分泌機能低下の原因と思われる。

現在までのところ最も加齢した群は25カ月齢であるが、この齢での雄ラットの死亡率は対照群の59%に対してT<sub>4</sub>処理群では33%に低下し、現在のデータからは、生存曲線が下り始める時期は対照と変わらないが低下の勾配が緩やかになる傾向がみられる。雌ラットでは25カ月齢での死亡率は10%以下で、T<sub>4</sub>処理による差はみられない。雌ラットの性周期を15カ月齢で測定した結果、対照群の平均6.67日に対し、T<sub>4</sub>処理群では4.55日で、老化とともに起る周期の延長が遅れることが示された。これらのラットは12時間明、12時間暗の光条件で飼育されているが、明期と暗期の食餌量比は生後1.5カ月で最大となり（約1:10）、その後は加齢とともにこの食餌量の日周性が減少していく。雌は雄に比して、より大きな明暗差を示す。食餌量の明暗差を12カ月齢のT<sub>4</sub>処理ラットについて測定したが、この指標については対照群との差はみられなかった。

(この研究の一部は文部省科学研究費および理化学研究所プロジェクト研究「老化制御」  
受託研究費による)

雄ラットにおける神経分泌活性と  $\alpha$ -bungarotoxin 結合のエージングにともなう上昇

川島 誠一郎 (広島大学・理学部・動物学教室) ・小林 裕太 ( Calgary 大学・医学部・薬理学教室)

Enhancement of neurosecretory activity and  $\alpha$ -bungarotoxin binding in male rats according to aging.

Seiichiro KAWASHIMA (Zoology Laboratory, Faculty of Science, Hiroshima University), Yuta KOBAYASHI (Division of Pharmacology and Therapeutics, Faculty of Medicine, The University of Calgary, Canada)

水・電解質代謝が加齢にともなって変化することが哺乳類で知られている。Turkington and Everitt<sup>1)</sup> は、下垂体後葉の抗利尿ホルモン (ADH) 分泌低下がこの変化の主な原因であると報告した。しかし、加齢にともなう水・電解質代謝の変化と視床下部・下垂体後葉系の機能変化との関連については、これまでに充分調べられているとはいえない。我々は第4回大会で、Wistar/Tw 系雄ラットが17月齢で多飲多尿となることを報告した。今回は、多飲多尿を示す中年雄ラットの視床下部・下垂体後葉神経分泌系と視索上核の  $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BGT) 結合能のエージングによる違いについて報告する。

組織学的観察には、多飲多尿が発現する Wistar/Tw 系雄ラットと同一条件で飼育している Sprague-Dawley/Tw (SD) 系雄ラットを用いた。一方、最近視索上核からの ADH 放出にニコチン性コリン作動系の入力に関与していること<sup>2)</sup>、また、脳内のニューロンのニコチン性受容体に対して  $\alpha$ -BGT が親和性を持つこと<sup>3)</sup> が報告された。そこで、視索上核組織をホモジェネートにし、 $I^{125}$ - $\alpha$ -BGT の結合量を測定した。動物は、3、9、17-19月齢の雄ラットを用いた。

組織学的観察に用いた Wistar/Tw および SD 系雄

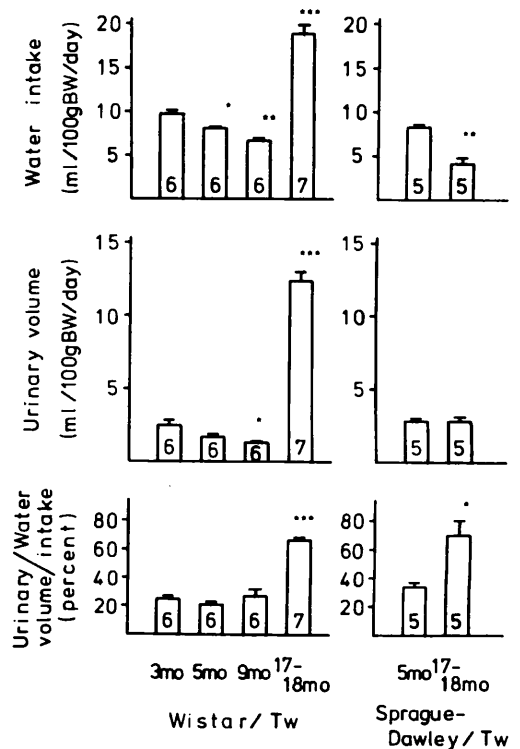


Fig. 1. Water intake and urinary volume during aging. Vertical bars represent the standard errors of the means. Numbers of rats are given in each column. Difference from 3-month-old rats in the Wistar/Tw strain and 5-month-old rats in the Sprague-Dawley/Tw strain: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

ラットの飲水量、尿量および水代謝率（尿量／飲水量）を  
図1に示す。SD系ラットに見られた変化は従来の報告<sup>1, 4, 5)</sup>  
と一致していた。すなわち水代謝率は17-24月齢で増  
加するが、多飲多尿は認められない。これに対しWistar/  
Tw系雄ラットでは水代謝の変化がより早期に、より明確に  
発現するといえる<sup>6)</sup>。

正中隆起と下垂体後葉のアルデヒド・フクシン好性神経  
分泌物質は、Wistar/Tw系雄ラットでは加齢にともない  
徐々に減少していた（表1）。下垂体後葉のpituicyteは  
大型化し、脱水処理を受けた動物の後葉に見られるのと同  
様の組織学的変化を示した。後葉そのものの体積も著しく  
増大していた。ADH産生細胞の分布する視索上核と室傍  
核の背側部で神経分泌物質の減少傾向が見られた。逆に室  
傍核腹側部では、若齢では染色性が弱いのが、17-18月齢になると染色性の増加が認められた。SD系  
雄ラットではこの様な差はなかった。Wistar/Tw系雄ラットの3月齢と17-18月齢を形態計測学的に  
比べると、ニューロンの核の長径の増大や、神経核の体積の増大が認められた。ニューロン数は室傍  
核では減少していたが、視索上核では差が認められなかった。以上の結果は、Wistar/Tw系の多飲多  
尿ラットでは、視床下部・下垂体後葉神経分泌系は機能昇進していることを示唆しており、下垂体後  
葉の神経分泌物質の減少は放出増大によるものと考えられる。Turkington and Everitt<sup>1)</sup>の結論とは  
逆に、神経分泌系は活性増大を示したのであるが、この活性増大は尿として失われる水分量の増大に  
ともなってADH分泌の刺激が起こったためと考えられる。

<sup>125</sup>I- $\alpha$ -BGTのオートラジオグラフで、視索上核に $\alpha$ -BGTの結合を示す多数のグレインの  
分布を確認した。ホモジェネートに対する $\alpha$ -BGTの総結合量は、図2の様に17-19月齢では3・  
9月齢に比べ有意に増加していた。一方、タンパク量当たりの結合量では有意な差はなかった。上述  
した様に視索上核の体積の増加に比例してタンパク量も増加したもので、結合部位の密度はほとんど  
変わらず、総量が増加したと考えられる。この結果は、ADH産生細胞のコリン様物質に対する感受  
性が17-19月齢ラットでは増加していることを示唆する。

謝辞。 <sup>125</sup>I- $\alpha$ -BGTのオートラジオグラフィ  
および結合量の測定に御指導・御援助を頂いた  
三菱化成生命科学研究所・脳神経化学研究室の有  
松靖温・天野武彦両氏に深謝します。本研究の一  
部は理化学研究所プロジェクト研究「老化制御指  
標の設定に関する研究」の受託研究費による。

文献。

- 1) Turkington, M.R. and Everitt, A.V. (1976) Hypothalamus Pituitary and Aging C.C. Thomas Publ. pp.123.
- 2) Sladek, C.D. (1980) Antidiuretic hormone Japan scientific societies press pp.117.
- 3) Lowy, J., McGregor, J., Rosenstone, J. and Schmidt, J. (1976) Biochemistry 15 1522
- 4) Everitt, A.V. (1958) Gerontologia 2 21
- 5) Friedman, S.M., Friedman, C.L. and Nakashima, M. (1967) Endocrines and Aging C.C. Thomas Publ. pp.142.
- 6) Kobayashi, Y. and Kawashima, S. (1980) Proc. Japan Acad. 56 Ser B 643

Table 1. General neurosecretory index in the median eminence and the pars nervosa

| Strain            | Age (months) | No. of rats | Median eminence | Pars Nervosa |
|-------------------|--------------|-------------|-----------------|--------------|
| Wistar/Tw         | 3            | 6           | 2-3             | 3-4 F, H     |
|                   | 5            | 6           | 2               | 2-3 F, H     |
|                   | 9            | 6           | 1-2             | 2 C, HH      |
| Sprague-Dawley/Tw | 17-18        | 7           | 0-1             | 1 C, h       |
|                   | 5            | 5           | 2-3             | 3-4 F, H     |
|                   | 17-18        | 5           | 2-3             | 3-4 C, H     |

Indices : Dense accumulation of maximum amount of neurosecretory material (NSM) : 4, pars nervosa and 3, median eminence. 0, almost total absence of NSM. The general neurosecretory index does not give information concerning variations among the different regions and layers. Morphological type of NSM : F, mostly fine granules; C, mostly coarse granules and globules plus small amount of fine granules; H, presence of a few strongly AF-stained Herring bodies; HH, a number of strongly AF-stained Herring bodies; h, a few lightly AF-stained Herring bodies.

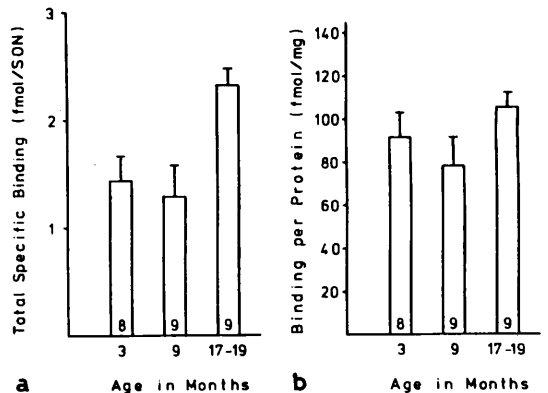


Fig. 2 a and b. Age-related changes of <sup>125</sup>I- $\alpha$ -bungarotoxin ( $\alpha$ -BGT) binding sites in the supraoptic nucleus (SON) of Wistar/Tw strain males. Vertical bars represent the standard errors of the means. Numbers of rats are given in each column. Fig. 2a. Total  $\alpha$ -BGT binding activity of the SON. Statistical comparisons : 3-month-old vs 9-month-old; n.s., 3-month-old vs 17-19-month-old, p < 0.01. Fig. 2b.  $\alpha$ -BGT binding activity per mg protein in the SON. No significant changes among groups.

## マウスのネフロン形成期の放射線照射による糸球体の数と構造の加齢変化の促進

佐々木 俊作、 佐藤 文昭、 川島 直行 (放射線医学総合研究所)

ACCELERATION OF AGE-ASSOCIATED CHANGE IN NUMBER AND STRUCTURE OF THE RENAL GLOMERULI BY EXPOSURE TO IONIZING RADIATION AT NEPHROGENIC STAGE IN MICE

Shunsaku SASAKI, Fumiaki SATO, and Naoyuki KAWASHIMA  
( National Institute of Radiological Sciences )

〔目的〕 胎生後期や新生期に放射線を照射された老令期のマウスには高度の糸球体硬化が認められる。第1回大会において、対照および胎生後期照射マウスにおける糸球体構造の加齢変化の定量形態学的測定の結果を述べた。今回報告するのは、(1)糸球体数と体積の加齢変化、(2)糸球体構造の測定の若令側への延長、(3)ネフロン形成期の照射と成体期の照射による影響の相違についてである。

〔方法〕 (1)糸球体の数と体積： 胎生17日令にX線300Rを照射された60日令および600日令代のB6WF<sub>1</sub>雌マウス、ならびにそれぞれの日令の対照マウスについて測定した。等間隔連続切片を用いて、Bachの方法によった。(2)糸球体構造： 胎生17日令300R照射マウスおよび対照について、糸球体単位体積当りの濾過表面積(FSD)、同じく毛細血管長(CLD)、ならびにメサンギウムの体積比(MVF)を測定した。(3)照射時のageの効果： B6C3F<sub>1</sub>雌マウスを用いた。胎生17日令、生後0日令、7日令、または100日令にX線300Rを照射し、800日令において糸球体構造と体積を測定した。これらについては血中尿素窒素(BUN)をも測定した。

〔結果〕 (1)糸球体数と体積： Table 1に60日令における測定値を、Table 2に600日令代における測定値を示す。照射群の60日令における数は対照の38%である。対照群の600日令代の糸球体数は60日令のそれよりも小さいという結果になった。注目されるのは、照射群の糸球体数がこの期間に半数以下に減少するという測定結果である。加齢による数の減少に伴って体積が著明に増加していた。(2)糸球体構造の加齢変化： 照射群は対照群に比べてFSDとCLDが小さくMVFが大きい。この変化は60日令において早くも認められることが明らかになった(Fig. 1)。この結果は、照射によりネフロン形成が抑制されて少ない数の糸球体を持つ腎となるばかりでなく、形成された糸球体にも異常があることを意味する。老令期におけるFSDは著しく小さいので、体積の増加にかかわらず全濾過表面積は著しく減少

していた。(3)照射時の age の効果： 100 日令の照射によっても糸球体構造の加齢変化は促進されていた。しかしネフロン形成期の照射の方がはるかに影響が大きい。

これらの結果から、ネフロン形成期の放射線照射による老令期における高度の糸球体硬化の主因は、少数の糸球体が形成されることならびに不完全な糸球体が形成されることであろうと推察される。

Table 1

VOLUME AND NUMBER OF GLOMERULI  
( 60 DAYS OF AGE )

|                         | CONTROL           | 17 DPC, 300 R          |
|-------------------------|-------------------|------------------------|
| RADIUS ( $\mu$ )        | $31.2 \pm 0.2$    | $35.7 \pm 1.1^*$       |
| VOLUME ( $10^5 \mu^3$ ) | $1.45 \pm 0.04$   | $2.19 \pm 0.11^*$      |
| No./MM <sup>3</sup>     | $174.5 \pm 0.4$   | $97.0 \pm 8.9^{**}$    |
| WEIGHT OF KIDNEY (MG)   | $175.5 \pm 4.0$   | $123.7 \pm 4.4^{**}$   |
| No./KIDNEY ( $10^4$ )   | $2.976 \pm 0.213$ | $1.158 \pm 0.064^{**}$ |

MEAN  $\pm$  STANDARD ERROR, \* 0.01 < P < 0.05, \*\* P < 0.01

Table 2

VOLUME AND NUMBER OF GLOMERULI  
( 601 - 700 DAYS OF AGE )

|                         | CONTROL           | 17 DPC, 300 R          |
|-------------------------|-------------------|------------------------|
| RADIUS ( $\mu$ )        | $39.0 \pm 0.4$    | $57.7 \pm 2.0^{**}$    |
| VOLUME ( $10^5 \mu^3$ ) | $2.63 \pm 0.08$   | $9.43 \pm 0.65^{**}$   |
| No./MM <sup>3</sup>     | $80.2 \pm 7.7$    | $31.6 \pm 7.0^{**}$    |
| WEIGHT OF KIDNEY (MG)   | $289.3 \pm 25.2$  | $167.7 \pm 16.5^{**}$  |
| No./KIDNEY ( $10^4$ )   | $2.231 \pm 0.270$ | $0.473 \pm 0.069^{**}$ |

MEAN  $\pm$  STANDARD ERROR, \*\* P < 0.01

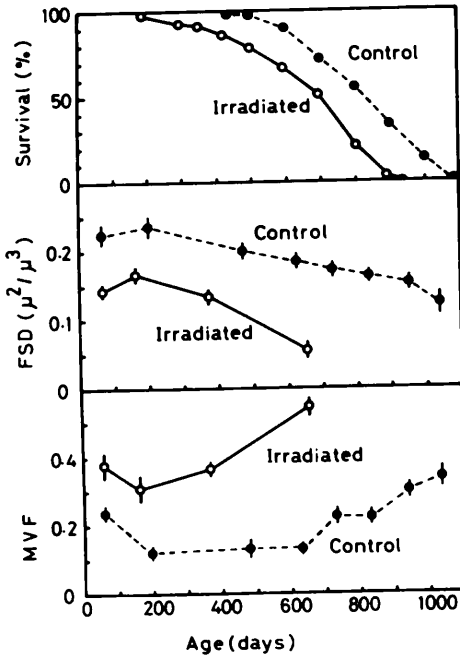


Fig. 1. Survival curve and age-associated change in structure of renal glomeruli in female B6WF<sub>1</sub> mice irradiated at fetal stage of 17 days post coitum with 300 R of X rays. Data on percent survival, glomerular filtration surface density (FSD) and mesangial volume fraction (MVF) are shown as a function of age.

ラット腎の老性変化についての超微計測的研究—尿細管上皮ミトコンドリアを中心として—

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

Morphometric studies on the age changes of mitochondria in the proximal tubules of the rat kidney

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

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

組織・細胞の老性変化研究の一環として、細胞内小器官の逐齡的消長をヒトならびに動物の肝について検討を続けて来た。すなわち個体の老化に伴つて肝細胞数の減少がみられるが、それと相前後して肝細胞内ミトコンドリアの数も減少する。ミトコンドリアの減数がはじまると、まずクリステが密になつてその機能を補い、ついで減数に対する代償的な肥大像と考えられるミトコンドリアの増容が逐齡的に増強する点を認めた。また、実験動物(スウスマウス)におけるコーチゾン投与、ならびにその後の恢復過程においても、老マウスでは傷害による減数に対する増容、恢復の遅延などが認められた。

今回は腎における小器官、とくに尿細管主部上皮細胞内ミトコンドリアの逐齡的消長についての超微計測的検索成績を中心として報告したい。

無処置の近交系ドリュウラット雄の生後60日(5匹)、12か月(5匹)、25~29か月(15匹)を用い、無麻酔、断頭、脱血後新鮮な腎を剔出した。10倍フォルマリンで固定後、腎門のほぼ中央を通る額面断のパラフィン切片について、型のごとくH-E染色を行ない、次の計測を行なつた。

腎皮質の厚さ：光学顕微鏡の接眼レンズにマイクロメーターを挿入、接眼×10、接物×4の拡大で腎皮質の厚さを、各例につき6か所づつ計測しその平均値を求めた。

尿細管主部上皮細胞ならびに核の面積：最終倍率600倍の光顕写真により、各例それぞれ30個の尿細管主部上皮細胞・核の面積を測定した。

皮質の一部を2%パラフォルムアルデヒド(磷酸緩衝液でpH 7.4に調整)+2.5%グルタルアルデヒドで1時間固定、24時間後緩衝液で洗い、1%オスミウム酸にて再固定、脱水、エボンに包埋した。厚切り切片で尿細管主部上皮を確認してトリミングを行なつて、超薄切片を作製、醋酸ウラニルとクエン酸鉛重染色を施し、HU-11B日立電子顕微鏡にて2000倍(ミトコンドリア数算定のため)、10,000倍(ミトコンド

リアの大きさ測定のため)の写真を撮影,それぞれ最終倍率4,000倍,20,000倍に引き伸ばした写真について超微計測を行なった。

エボン包埋の数例の厚切り切片について,最終倍率600倍の顕微鏡写真により,細胞ならびに核の面積を測定し,H-E切片におけるそれぞれの数値との比率を求め,H-E切片による面積値からエボン切片での細胞・核の面積を算出した。

ミトコンドリアの数については,細胞質の一定面積(合計 $5,000\mu^2$ )内の総数を求め,さきに求めた各例の細胞質の面積から,細胞1個当りの数を算出した。

20,000倍の写真の任意の面積内にみられる全ミトコンドリア(約100個)の個々について面積,周の長さ,クリステ長を測定し,80mm×80mmの枠5区画内におけるミトコンドリアの総面積を求め,その面積比を算定した。

以上の微計測,超微計測には,画像解析システムKONTRON MOP-AMOIを用いた。

#### 検索成績

腎重量(左右の合計):12か月に比し,25~29か月の方が有意に重い。

腎皮質の厚さ:60日 $\ll$ 12か月>25~29か月で,60日と12か月の差は $P < 0.001$ で有意,その他の間には有意差はない。

尿管管主部上皮細胞の大きさ:細胞体は,60日 $\ll$ 12か月 $\gg$ 25~29か月で, $P < 0.001$ の有意差があり,60日<25~29か月の間には有意差はない。核は,60日 $\ll$ 12か月 $\gg$ 25~29か月で,前2者間には $P < 0.001$ で,後2者間には $P < 0.05$ で有意差があり,60日<25~29か月の間には有意差は認められない。

細胞当りのミトコンドリア数:60日<12か月 $\gg$ 25~29か月で,前2者間には有意差はなく,後2者間には $P < 0.001$ で,60日>25~29か月間には $P < 0.005$ で有意差がみられ,25~29か月の老ラットにおける減数は顕著であつた。

ミトコンドリアの総面積比:60日<12か月>25~29か月であるが,その差は僅かで,何れの2群間にも有意差はみられなかつた。

クリステの総長:ミトコンドリアをその面積によつて $0.21\sim 0.40\mu^2$ ,  $0.41\sim 0.60\mu^2$ ,  $0.61\sim 0.80\mu^2$ ,  $0.81\sim 1.00\mu^2$ ,  $1.01\sim 1.20\mu^2$ ,  $1.21\sim 1.40\mu^2$ のそれぞれの大きさの群に分け,各面積群の中央値に相当するミトコンドリアのクリステの全長,及び周の長さを算出した。 $0.21\mu^2$ から $0.80\mu^2$ の間におよそ60%のミトコンドリアが含まれるが,この間の各面積群毎のクリステの総長値は,25~29か月の群では12か月の群に比して常に大でクリステは密であつた。

#### 総括:

腎尿管管主部上皮細胞内のミトコンドリアは25~29か月の老ラットでは有意な減数を示した。腎尿管管主部上皮細胞のミトコンドリアは肝細胞におけるのと異なり,その形状は桿状で,切片上での形態は極めて多彩で,個々ミトコンドリアの面積の比較検討は困難であるが,総面積比にはほとんど有意な年齢差が認められない点から,老ラットにおける個々ミトコンドリアの増容が推定される。

12か月の群に比して老群ではミトコンドリア内のクリステが密である点も,増容の機序と同様に減数に対する代償性のもので考えたい。



腸内細菌叢と老化：ヒト消化管における streptococci の  
定着とその加齢による変化

渡辺次男，河合康雄，務台方彦  
( ヤクルト研究所 )

Intestinal microflora and aging : colonization of streptococci and  
its changes with aging in the human intestinal tracts.

Tsugio Watanabe, Yasuo Kawai and Masahiko Mutai  
( Yakult Institute for Microbiological Research )

### 目的

腸内細菌叢は感染症、消化器病、肝臓疾患、免疫機能、消化吸収など宿主機能と広範囲に関わっているため老化の過程に影響を及ぼす一要因と考えられる。一方腸内細菌叢は種々の外因性（食餌など）および内因性（宿主側の諸機能）要因によって変動することが知られている。これらの要因は加齢によっても変化すると考えられているから、腸内細菌叢も対応するかたちで加齢変化をされると考えられる。

我々は昨年の本研究会において、ヒトに関するコントロール実験として、0日令から80週令までのラットについて、加齢にともなう腸内細菌叢の変化を報告した。今回はヒトを対象にし、回腸部以下で優勢といわれる乳酸球菌 streptococci に注目して、定着性と加齢との関係を species レベルで調べた結果、若干の知見を得たので報告する。

### 材料と方法

i) 対象。新生児20名（慶応大学小児科で出生。このうち10名に対しては生後すぐ Bifidobacterium breve 4006 を $10^9$ 個経口投与した。）、幼児25名（2～6才）、および成人26名（25～51才）の新鮮糞便を検査対象とした。新生児については生まれてから退院まで（5～6日）はできるだけ毎日、その後は30日と90日目の糞便について検査を行った。

ii) Streptococci の分離。Streptococci の選択培地として KMN、SF、TATAC を、非選択培地として血液寒天培地を使用した。適当数のコロニーが出現した稀釈段階の寒天平板を実体顕微鏡下で観察しコロニー形態ごとに数を記録した。すべての形態のコロニーを比例配分的に分離した。

iii) Streptococci の同定。分離株を同じ寒天平板で純化した後、0.1% メチレンブルー還元性、pH 9.6 における増殖性、NH<sub>3</sub> 生産性および胆汁耐性を調べて4群にわけた。各群についてそれぞれ前に報告<sup>1)</sup>したように別々の性状検査をし species を同定した。

## 結果

新生児から1525株、幼児および成人から1442株、計2967株の streptococci を分離した。今回はこれらのうち Bifidobacterium を投与した新生児からの分離株を除いた2209株について同定した結果を以下に示す。

i) Streptococci の定着性。出生後最初の糞便はほぼ無菌であった。Streptococci の定着は生後1日目から始まり、3日後にはほぼ全個体にみられた。出生から退院までの streptococci の菌数レベルの推移には個体差がみられた。すなわち、A)高いレベルで定着するタイプ、B)除々に菌数レベルが高くなるタイプ、C)高いレベルで定着はするが急に菌数が低下するタイプ、D)定着はするが菌数レベルが低いタイプにわけられた。幼児および成人における菌数レベルはそれぞれ $10^8/g$ 、 $10^7/g$ と比較的高いレベルであった。

ii) 各 speciesの検出率。ヒト糞便からは Streptococcus faecalis, S. faecium, S. durans, S. avium, S. bovis, S. equinus, S. salivarius, S. mitis, S. MG- intermedius, および S. sanguis II の10 speciesが分離された。以下に各年令層における species別の検出率を示す。

A) 新生児 (0~6日令児)。 S. faecalis は全個体から分離された。 S. mitis も高い検出率であった (10例中9例)。その他の speciesとしては S. faecium (2例)、 S. avium (1例)が検出された。

B) 乳児 (30~90日令児)。 S. faecalis が全個体に存在していた。新生児において高頻度に存在していた S. mitis は90日令児からは分離できなかった。 S. avium の分離率が高い (50%) のが特徴であった。また S. faecium も高かった (50%)。

C) 幼児 (2~6才)。幼児からは S. sanguis II を除く 9 species が分離された。 S. bovis と S. avium の分離頻度が最も高かった。次いで S. faecalis および S. faecium が多く分離された。他の species は前記の 4 species に比較し、分離頻度は低かった。

D) 成人 (25~51才)。 S. salivarius と S. faecium が高頻度に分離された。 S. faecalis も比較的高い割合で存在していた。幼児に特徴的であった S. bovis の分離率が低下した。特に S. avium は成人の糞便からは1株も分離されなかった。逆に viridans group といわれる S. salivarius, S. mitis, S. MG- intermedius などが高頻度に存在していた。

## 考察

腸内細菌叢の宿主における意義を解明するうえでそれらの消化管内における生態的状况を把握することは重要と思われる。<sup>2)</sup>

今回の実験によって streptococci が年令層によって異なった分布をすることが示唆された。すなわち、streptococci は各年令層における分布の違いから幼児型 (S. bovis, S. avium)、成人型 (S. salivarius, S. mitis, S. MG- intermedius) および普遍型 (S. faecalis, S. faecium) にわけることができると思われる。新生児において、 S. mitis が多く分離されることは母親をはじめとする周囲からの感染が考えられる。生後90日目頃には S. avium の分離頻度が高くなることは幼児型への移行を考えさせる。今回の実験で得られた streptococci の株を使用して、腸内細菌叢の加齢による変化や宿主 (ヒト) に対する影響を in vivo および in vitro の実験を通して調べて行くことを計画している。

## 文献

- 1) Watanabe, T. et al (1981), Microbiol. Immunol. Vol 25 (in press).
- 2) Kawai, Y. et al (1980), Am. J. Clin. Nutr. 33: 2458- 2461.

腸内細菌叢と老化：無菌および通常ラットにおける脳の酵素活性と  
肝臓のステロイドホルモン代謝の加齢による変化

矢沢一良、河合康雄（ヤクルト研究所）

Intestinal microflora and aging : changes in enzyme activity in the  
brain and metabolism of steroid hormones in the liver of aged conventional  
and germfree rats.

Kazunaga Yazawa and Yasuo Kawai  
( Yakult Institute for Microbiological Research )

### 目的

腸内細菌叢は消化管内で ecosystem を形成し、宿主の脂質代謝やアンモニア代謝あるいは免疫機能に  
関与し、また、消化管や肝臓などの臓器疾患や感染症等に深く関わっていることが知られている。

この様に腸内細菌叢は、多方面にわたって、宿主機能に影響を与えているので、老化の過程に影響  
を及ぼす一つの要因と考えられている。

そこで我々は、腸内細菌叢の宿主における意義を検討しながら、老化との関わり合いを取りあげ、  
検討を行っている。

我々は、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<sup>5)</sup>および第4回<sup>6)</sup>の本研究会において、8および40週令の無菌ラット(GF)と  
通常ラット(CV)および80週令のCVラットを用い、消化管および肝臓機能<sup>7)</sup>あるいは脂質代謝<sup>8)</sup>に  
及ぼす腸内細菌叢と加齢の影響について報告した。

今回は、脳における monoamine 代謝、adenylate cyclase 活性と cyclic AMP、および in vitro  
における肝臓 homogenate によるステロイドホルモン代謝について、腸内細菌叢と加齢の影響を調べ  
若干の知見を得たので報告する。

### 材料と方法

動物は Fischer 344ラット(♂)を各群5匹使用した。CVラットは、8, 40, 80週令を、GFラッ  
トは、8, 40週令を用いた。脳 monoamine oxidase は serotonin と dopamine を基質として、酵  
素活性を測定し、また、脳 adenylyl cyclase 活性と cyclic AMP を測定した。肝臓は環流後0.15  
M KPB(30m M nicotinamideを含む、pH 7.4)で均一化した。肝臓 homogenate(蛋白量25mg)を用い、Chap  
と Bedrak の方法<sup>9)</sup>に従い、17 $\alpha$ -Hydroxyprogesterone (17 $\alpha$ -OH- Prog.)の変換能を標識化合物を  
用いて、in vitro において測定した。反応終了後、等量のエーテル：クロロホルム(4:1 v/v)で

2回抽出した。抽出物を濃縮後、二次元薄層クロマトグラフィーにて展開し、各 steroid metabolite への放射能のとりこみを測定した。

### 結果

脳 monoamine oxidase 活性 : serotonin を基質とした場合8週令では、specific activity(s.a.)、total activity(t.a.)とも GF の方が CV より活性が高かった。40週令では、逆に s.a.、t.a.とも CV の方が GF より活性が高かった。加齢により GF の場合 s.a.、t.a.とも著しく減少し、CV の場合 s.a.、t.a.とも40週令まで増加したが80週令では減少傾向を示した。dopamine を基質とした場合8、40週令で CV の方が GF より活性が高かった。加齢により GF の場合 s.a.、t.a.とも著しく減少し、CV の場合 s.a.が40週令で減少し、80週令では40週令とほぼ同レベルを示した。

脳 cyclic AMP : 8週令では GF、CV ともほとんど変わらないが、40週令では GF の方が、CVより高い傾向を示した。加齢により CV の場合40週令で減少し、80週令では40週令と同レベルを示したが、GF の場合変化がみられなかった。

脳 adenylate cyclase 活性 : 8週令では s.a.は GF の方が CV より高かったが、40週令では GF と CV に差がみられなくなった。加齢により CV の場合 s.a.、t.a.とも40週令では増加したが、80週令では40週令に比べて減少した。

肝臓 homogenate による $17\alpha$ -Hydroxyprogesterone の in vitro での変換 :  $17\alpha$ -OH- Prog. の放射能の消失量は、8週令の CV に比べて40、80週令の CV の方が多かった。また、Hydrocortisone 及び、Corticosterone への放射能の取り込みは、8週令の CV で、それぞれ、全放射能の1.7%、0.6%と少ないのに比べ、40週令では、それぞれ25.1%、9.4%であった。また、80週令では、Hydrocortisone へ1.6%、Corticosterone へ9.1%、Cortisone へ14.1%、Aldosterone へ4.7%の放射能が取り込まれた。8週令の GF は同週令の CV に比べて、 $17\alpha$ -OH- Prog.の放射能の消失量が多く、また Hydrocortisone 及び Corticosterone への取り込みは、それぞれ15.3%、9.2%と高かった。

### 考察

脳 monoamine oxidase 活性の加齢変化は、基質により異なるように思われる。また、腸内細菌叢は脳 monoamine oxidase 活性の加齢変化に影響を及ぼしている可能性が示唆された。脳におけるcyclic AMP 量あるいは、adenylate cyclase 活性は、加齢による変化があると思われる。in vitro での肝臓 homogenate による $17\alpha$ -OH- Prog.の変換能は、加齢による変化あるいは、腸内細菌叢の関与している可能性が示唆された。

### 参考文献

- 1) Kawai, Y. (1980), Microbiol. Immunol. 24:753.
- 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, P42.
- 5) 石井ら(1979), 第3回日本基礎老化研究会, P68.
- 6) 河合 (1980), 第4回日本基礎老化研究会, P52.
- 7) Kawai, Y. et al.(1981), submitted to Mech. Ageing Develop.
- 8) Kawai, Y. et al.(1981), Mech. Ageing Develop.(in press).
- 9) Chap, Z. and E. Bedrak.(1977), Exp. Geront. 12:43.

加齢に伴う中枢神経膜系の代謝回転速度の変化に関する研究 I. 重水素ラベル法  
 — マスフラグメントグラフィーによるミエリン構成々分の代謝回転の測定

○安藤進、小野百合子、田中康一

東京都老人総合研究所・生化学部・中央機器室

Studies on age-related changes in metabolic turnover rates of the  
 central nervous membrane systems I. Determination of turnover rates of  
 myelin constituents by deuterium labeling and mass fragmentography

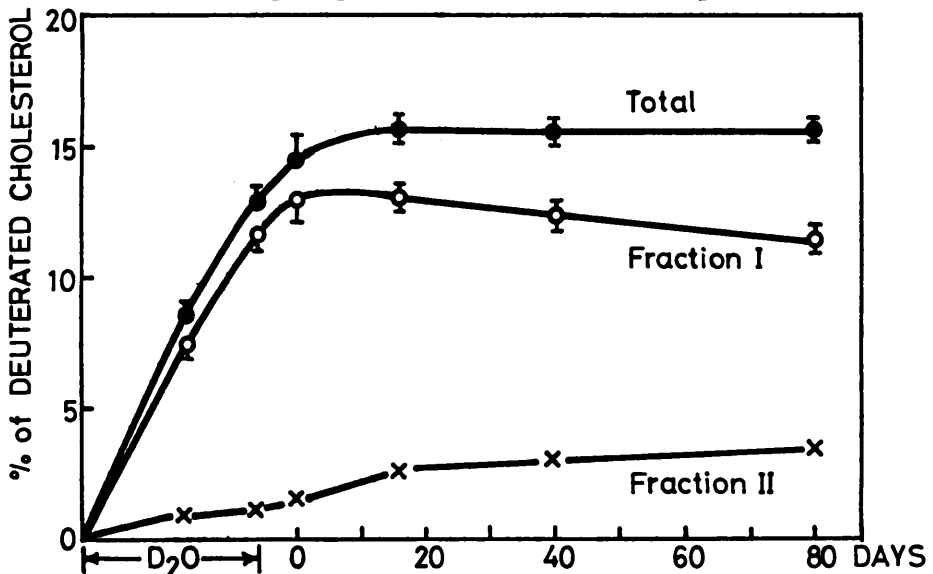
Susumu ANDO, Yuriko ONO and Yasukazu TANAKA

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Sakaecho, Itabashiku, Tokyo-173

It is commonly assumed that myelin, once formed, remains relatively inert during the postnatal period. Oligodendroglial cells are known to regenerate myelin in the adult brain(so-called remyelination). Sun and Samorajski(1) reported that an age-dependent difference in wet weight of mouse brain was not found, but the amount of myelin yielded per brain increased about threefold between 3 and 26 months. Rand and Ansari(2) found that myelin basic protein increased significantly in the 29 month-old mice as compared to the 6 month-old group while the total protein was unchanged. Thus, myelin is thought to be an unique compartment in the nervous system which gradually expands throughout the life of an animal. The question of interest is how the metabolic turnover rate of myelin changes with advancing age. We have developed a method using deuterium labeling and mass fragmentography to determine the long-term turnover of myelin constituents. We will present the methodology and data on myelin turnover of young adult mice.

C57BL/6 mice(5 week-old) were given 30% deuterium oxide in drink-

ing water. Animals were killed at arbitrary intervals. Myelin was isolated and purified from the cerebellum by the method of Norton(3). Total lipids were extracted from the myelin fraction, and applied to DEAE-Sephadex column and thin-layer chromatographies to be separated into individual lipids. The amounts and molar distribution patterns of deuterated cholesterol and fatty acids of phospholipids were determined by mass fragmentography. The figure shows the incorporation of deuterated cholesterol into myelin and disappearance of the cholesterol. The present method could isolate the fraction consisting primarily synthesized cholesterol(Fraction I) from the fraction(Fraction II) which was derived from degradation products of deuterated compounds by recycling. Half-life for myelin cholesterol was found to be as long as about 240 days, while that for phospholipids was 15-20 days.



Fraction I, deuterated cholesterol primarily synthesized by using D<sub>2</sub>O; Fraction II, cholesterol synthesized by using degradation products of other deuterated compounds; Total, Fraction I + II.

References:

1. Sun,G.Y., & Samorajski,T.(1972) J.Gerontol.,27,10-17
2. Rand,A., & Ansari,K.A.(1980) Gerontol.,26,76-81
3. Norton,W.T., & Poduslo,S.E.(1973) J.Neurochem.,21,749-757

マウスの老化に伴う各種臓器のリボソームおよびメッセンジャーRNAの  
細胞内分布変化

安西 偕二郎, 高橋 邦彦, 後藤 佐多良

(東邦大学薬学部生化学教室)

ALTERATIONS WITH AGE OF CYTOPLASMIC LOCATION OF RIBOSOMES AND POLY(A)(+) mRNA IN VARIOUS TISSUES OF MOUSE

Kaijiro ANZAI, Kunihiro TAKAHASHI and Sataro GOTO  
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Toho University

SUMMARY

We examined the distribution of ribosomes and poly(A)(+)mRNA in the cytoplasm of the liver, kidney and brain of young and old mice. Relative amount of ribosomes in polysome fractions decreased with age, while cytoplasmic free RNP containing poly(A)(+)mRNA tend to increase in the old animals, suggesting decrease in protein synthesis in the old tissues.

INTRODUCTION

In eukaryotic cells a part of messenger RNA in the cytoplasm is known to be inactive and present in the form of ribonucleoprotein complexes (mRNP)(1). Although little is known about function of the free mRNP, it has been suggested that they may be storage forms of mRNA which is in an equilibrium with mRNA activity engaged in protein synthesis on polysomes.

In view of the facts that translational activities of cells decrease with age (2) it seems interesting to examine if there are any changes in polysomes and mRNA during aging of animals. In the present work, we studied cytoplasmic location of ribosomes and poly(A)(+)mRNA in tissues of mice of various ages.

MATERIALS AND METHODS

Animals: Male ddY mice of the age of 4 and 22 month-old were used.

Polysome analysis: The liver, kidney and brain were excised and homogenized with a Tefron-glass homogenizer in an appropriate buffer in an ice bath. Post-mitochondrial supernatant was mixed with sodium deoxycholate and the mixtures were applied on linear gradients. After centrifugation,

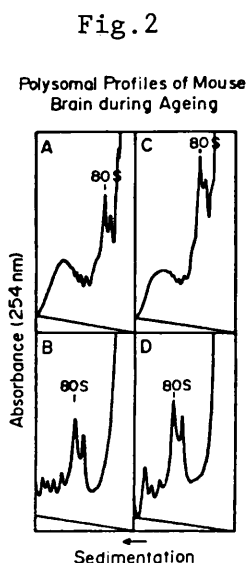
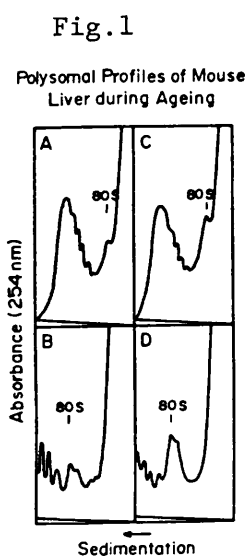
polysomal profiles were recorded with a UV monitor equipped with a flow-cell. Fractions were then collected for the analysis of poly(A)(+)mRNA (see below).

Determination of poly(A)(+)mRNA: Fractions of polysomal gradients were digested with Pronase P(nuclease-free) in the presence of SDS at 37°C 60 min and the amount of poly(A) in each fraction was determined by hybridization with <sup>3</sup>H-poly(U).

## RESULTS AND DISCUSSION

Fig 1 and 2 show typical polysomal profiles of young (A,B) and old (C,D) mouse liver and brain, respectively. Since it was not possible to distinguish clearly polysomes, monosomes and mRNP on the same gradient by a single centrifugation, samples were centrifuged under two different conditions; one for a short time for the general polysome analysis of subcellular distribution of poly(A)(+)mRNP and monosomes. Relative amount of polysomes tended to diminish in these tissues of old animals with concomitant increase of monosomes (compare B and D). Poly(A)(+)mRNA in RNP fractions as detected by <sup>3</sup>H-poly(U) hybridization tended to be greater in old animals than in young animals in these tissues studied (data not shown), in accordance with polysomal disaggregation in these animals.

These observations suggest less amount of mRNA is associated with polysomes in old animals, possibly causing the reduction of protein synthetic activity in these tissues of old animals.



## REFERENCES

1. J.Greenberg; J. Cell Biol., 64 (1975) 269
2. Ricca et al.; J. Cell. Physiol., 97 (1978) 137





Val, Ser, Pro, Ala and Gly),  $^{14}\text{C}$ -Arg and  $^3\text{H}$ -Lys or  $^3\text{H}$ -His. Reaction was performed for 90 to 120 min at  $37^\circ\text{C}$ .

Measurement of infidelity level (IFL): After incubation, the reaction mixtures were centrifuged in sucrose gradients and fractions were collected. Hot acid insoluble materials in each fraction were collected on a glass fiber filter and the radioactivity was measured. From the radioactivity of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  recovered in the 80S region IFL was calculated as the molar ratio of Lys ( or His ) and Arg incorporated.

## RESULTS AND DISCUSSION

Validity of the assay system for the translational fidelity: Fig 2 shows the sedimentation profiles of the reaction mixtures with or without protamine mRNA. Radioactivity of  $^3\text{H}$ -Lys and  $^{14}\text{C}$ -Arg was found in monosome region only in the case with mRNA, observations being consistent with the idea that the mRNA is translated on monosomes because of its small size. Possibility of contamination of other mRNAs in the mRNA preparation was excluded by gel electrophoresis of translation products.

Comparison of ribosomal fidelity among aging mice: The translational fidelity of ribosomes from liver of aging mice is shown in Table 1. The IFL was in the range of 2 to 4  $\times 10^{-4}$  in all the animals studied regardless of age. The level is in good agreement with that in vivo reported by other investigator (3), but lower than that in our previous study (1,2) with poly(U) template by one order of magnitude. Thus it is concluded that fidelity of decoding does not change with age in mouse. The conclusion does not support error catastrophe theory of aging.

ACKNOWLEDGEMENTS : We thank Mr. Mimura of Tokyo Suisan Shiken-jo for generous supply of rainbow trouts.

Fig.2

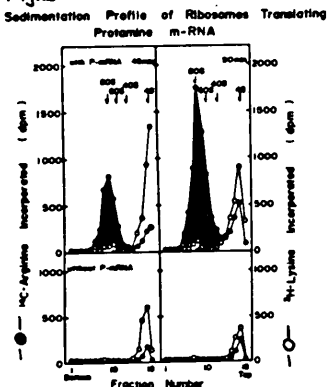


Table 1

The Translational Fidelity of Ribosomes from Liver of Ageing Mice

| Age of mice  | $^{14}\text{C}$ -Arg incorporated in 80S region | $^3\text{H}$ -Lys incorporated in 80S region | Infidelity level (Lys/Arg) $\times 10^{-4}$ |
|--------------|-------------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 2 months     | 5711 dpm                                        | 7.12 pmol                                    | 477 dpm                                     |
|              | 4856                                            | 6.05                                         | 377                                         |
| 12 months    | 3674                                            | 4.58                                         | 188                                         |
|              | 3178                                            | 3.96                                         | 146                                         |
| 18 months    | 5972                                            | 7.45                                         | 338                                         |
|              | 4944                                            | 6.16                                         | 170                                         |
| 22-29 months | 4688                                            | 5.85                                         | 299                                         |
|              | 3816                                            | 4.76                                         | 249                                         |

## REFERENCES

1. N.Mori, D.Mizuno and S.Goto, Conservation of ribosomal fidelity during ageing, *Mech.Ageing Dev.*, **10**, 379-398 (1979)
2. 森 望, 水野 仁, 佐藤 佳子, 加齢に伴うマウス肝臓リボソームの構成的変化, 若くは老化研究 **2**, 36-39 (1978, 京都)
3. R.B.Loftfield and D.Vanderjagt, The frequency of errors in protein biosynthesis, *Biochem.J.* **128**, 1353-1356 (1972)

老化マウス肝臓リボソームの機能変化：

40 S サブユニットの翻訳開始複合体形成能

中 沢 俊, 森 望, 後 藤 佐多良

(東邦大学薬学部生化学教室)

FUNCTIONAL ALTERATION OF MOUSE LIVER RIBOSOMES DURING AGING:  
DECREASED FORMATION OF THE INITIATION COMPLEX OF 40S SUBUNITS OF  
OLD ANIMALS

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

#### SUMMARY

Activity of 40S ribosomal subunits of old and young mouse livers was measured in terms of the formation of initiation complex in vitro. The activity of the subunits derived from old mice ( 21 month-old and over ) was found to be lower than those of young ones by 15 to 20%.

#### INTRODUCTION

In previous reports we have demonstrated that ribosomes derived from old mouse livers had lower translational activity in a cell-free system where poly(U) (1) or globin mRNA (2) was employed as template. It is conceivable that initiation or elongation process of the translation is affected with old ribosomes. Therefore we asked if the initiation process is affected.

#### MATERIALS AND METHODS

Animal: Male ddY mice of the age of 2 to 27 month-old were used.

Preparation of 40S ribosomal subunits: Mouse liver 40S ribosomal subunits were obtained by dissociating purified ribosomes in a buffer containing 0.3M KCl, followed by separation of large and small subunits by sucrose gradient centrifugation.

Assay of the formation of the initiation complex: Reaction mixtures consisting of 40S ribosomal subunits, <sup>3</sup>H-Met tRNA, initiation factors from rabbit reticulocytes and energy mixtures were incubated at 37°C for 10 min. Initiation complexes formed were then separated from the original components by sucrose gradient centrifugation. The radioactivity found

in 47S region was regarded as indication of the formation of an initiation complexes ( see below ).

## RESULTS AND DISCUSSION

Fig 1 shows sedimentation patterns of 40S ribosomal subunits and initiation complexes. Radioactive peak with 47S sedimentation coefficient was regarded as an initiation complex because of the following reasons. First, the radioactive peak disappeared when either initiation factors or energy mixture was omitted from the standard reaction mixtures. Second, molecular weight of a complex with sedimentation coefficient of 47S was approximately the same as a calculated value assuming that the complex is consisting of a equimolar mixture of the 40S subunit, eukaryotic initiation factors 2 and 3, and Met tRNA.

By using the method characterized above the activities of young and old subunits were compared (Fig.1). Results of two experiments are summarized in Table 1. Specific activity per unit amount of subunit was calculated by dividing mole of  $^3\text{H}$ -Met tRNA in 47S peak by mole of the subunit employed. Activities of old subunits was lower than those of young ones by about 15 to 20%. It is therefore likely that decreased translational activity of old ribosomes are due to the decrease in the rate of initiation complex formation of the subunits. But other possibilities are not excluded.

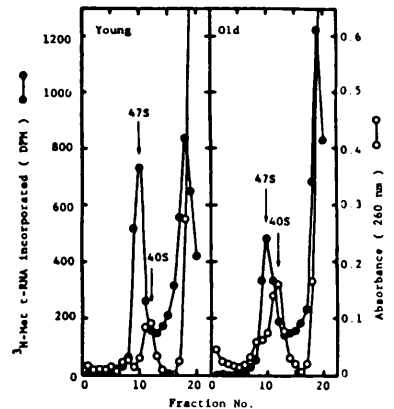
Table 1. Summary of the activity of 40S ribosomal subunit in the formation of the initiation complex.

|        | age of mouse | 40S subunit applied (A) (pmole) | $^3\text{H}$ -Met-tRNA in 47S peak (B) (fmole) | (B)/(A) ( $10^{-6}$ ) | relative activity (%) |
|--------|--------------|---------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Exp.1  | young 4 mon. | 70.0                            | 63.2                                           | 9.03                  | 100                   |
|        | old 27 mon.  | 70.0                            | 50.9                                           | 7.27                  | 80.5                  |
| Exp.2* | young 5 mon. | 70.0                            | $188.9 \pm 0.4$                                | 27.0                  | 100                   |
|        | old 21 mon.  | 70.0                            | $162.8 \pm 0.9$                                | 23.2                  | 85.9                  |

\* Exp.2 was performed in duplicate.

one  $A_{260}$  unit of 40S ribosomal subunit : 70.0 pmole.

Fig.1. ANALYSIS OF INITIATION COMPLEXES FORMED FROM "YOUNG" OR "OLD" 40S RIBOSOMAL SUBUNITS ON SUCROSE GRADIENT CENTRIFUGATION



## REFERENCES

1. N.Mori, D.Mizuno and S.Goto; Conservation of ribosomal fidelity during ageing, *Mech. Ageing Dev.*, 10, 379-398 (1979)
2. T.Nakazawa, N.Mori and S.Goto; Translational activity dependent on natural m-RNA of ribosomes from young and old mouse livers, *Biomedical Gerontology*, 4, 96-97 (1980)

## 老若マウス由来の初代培養肝実質細胞のタンパク質代謝回転

池田 忠 男, 安 西 偕二郎, 後 藤 佐多良

(東邦大学薬学部生化学教室)

## TURNOVER RATES OF PROTEINS IN CULTURED HEPATOCYTES DERIVED FROM YOUNG AND OLD MICE

Tadao IKEDA, Kaijiro ANZAI and Sataro GOTO

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Toho University

## SUMMARY

Primary culture of parenchymal cells of mouse liver was established which allowed survival of the cells over 5 days excreting proteins apparently specific to liver. Turnover rate of intracellular proteins was found to be significantly lower in the cultured cells derived from old animals than in young ones.

## INTRODUCTION

Altered and inactive protein molecules tend to accumulate in old animals (1) which would lead to the reduction of general cellular activities occurring during aging. The accumulation of altered proteins should be results of either increased production and/or reduced degradation of such proteins. The latter possibility has not been studied in detail except in nematodes where "old" enzymes were shown to have lower degradation rate (2,3). In the present work we studied the rate of protein degradation of cultured hepatocytes derived from young and old mice.

## MATERIALS AND METHODS

Cell culture: Parenchymal cells were isolated from young (4 to 6 month-old) and old (20 to 21 month-old) mouse (ddY) livers by perfusion via portal vein with collagenase solution essentially as described by Seglen (4). Cells were cultivated in medium 199 supplemented with 10% calf serum, insulin and dexamethasone in Linbro multi-dishes (4.5 cm<sup>2</sup> per well).

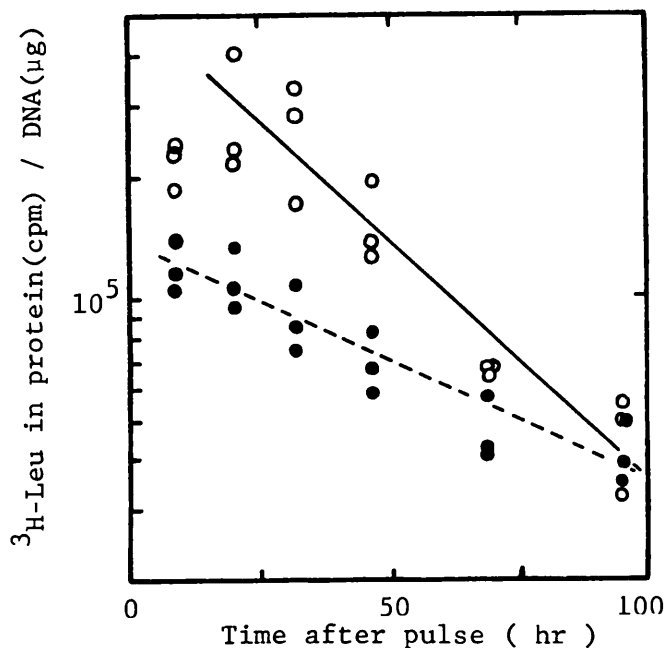
Pulse-chase experiments: One day after the beginning of culture, cells were labelled with  $^3\text{H}$ -Leu for 2 hr and chased in a cold medium. At appropriate times radioactivity of hot acid insoluble materials in the cells was measured. Amount of cellular DNA was determined by diamino benzoic acid method.

#### RESULTS AND DISCUSSION

Cell culture: Viability of the hepatocytes was usually 30 to 40% soon after isolation. They were mostly binucleated (over 70% in both young and old animals) and remained attached on the dishes for at least 5 days. The cells synthesized and secreted liver specific proteins (though not yet identified) as revealed by 2D gel electrophoresis and autoradiography of the culture media after labeling with  $^{35}\text{S}$ -methionine.

Degradation of intracellular proteins: A typical result of turnover experiments of intracellular proteins is shown in the Fig. Each point represents specific radioactivity of proteins per  $\mu\text{g}$  of cellular DNA. Clearly the rate of degradation was slower in the cells from old animals than those from young ones. Thus it appears that rate of protein degradation decreases with age. These observations are consistent with the idea that accumulation of altered proteins in the old animals is at least partly due to lowered rate of degradation.

Fig. Degradation of intracellular proteins in cultured hepatocytes from young (○) and old (●) mice.



#### REFERENCES

1. D.Gershon, Mech.Ageing Dev., 9, (1979)189
2. H.K.Sharma et al. A.B.B., 194(1979)275
3. A.Z.Reznick and D. Gershon, Mech.Ageing Dev., 11, (1979)403
4. P.O.Seglen, Meth. Cell Biol., 13, (1976)29

フィッシャー344ラットにおけるアミノピリン脱メチル化反応に対する  
加齢の影響

木谷健一 東京都老人総合研究所 第一臨床生理

N-DEMETHYLATION OF AMINOPYRINE IN YOUNG AND OLD MALE AND FEMALE FISCHER 344  
RATS. AN IN-VOVO KINETIC STUDY

K. Kitani, First Laboratory of Clinical Physiology, Tokyo Metropolitan  
Institute of Gerontology

Aminopyrine N-demethylation was indirectly determined in-vivo in unanesthetized young (6-8 month old) and old (29-30 month old) Fischer 344 rats of both sexes. After an ip injection of  $^{14}\text{C}$ -aminopyrine (4-dimethyl- $^{14}\text{C}$ -aminoantipyrine), the velocity of appearance of  $^{14}\text{CO}_2$  in the exhaled air was monitored for 30 min. At the smallest dose of  $2\ \mu\text{mol}/100\text{g}$  aminopyrine, the  $\text{CO}_2$  production velocity was two times lower in old male rats compared with young counterparts, while in female rats, the difference was very little. With the increase of the dose of aminopyrine the velocity increased in a non-linear fashion with the dose. Kinetic analysis yielded a 5 times lower  $V_{\text{max}}$  value in old male rats compared with young counterparts ( $70.38 \pm 8.81$  nmoles/min/g liver in young rats;  $14.72 \pm 2.40$  nmoles/min/g liver in old rats, mean  $\pm$  S.E.). In contrast, the decrease in  $V_{\text{max}}$  value with age was only 35% in female rats ( $26.58 \pm 14.72$  nmoles/min/g liver in young and  $17.90 \pm 0.93$  nmoles/min/g liver in old rats). Apparent  $K_d$  values (the dose yielding  $V_{\text{max}}/2$ ) also decreased with age but the decrease was more prominent again in male (50%) than female rats (27%). It was concluded that the  $V_{\text{max}}$

for N-demethylation of aminopyrine decreased with age in both male and females but that the degree of decrease was markedly sex dependent. Furthermore, it was suggested that the decrease in  $K_d$  (and possibly  $K_m$ ) value worked to moderate the reduction in hepatic clearance of the drug caused by the decrease in the  $V_{max}$  value.



自然発症高血圧ラット (SHR) における脂質過酸化反応に及ぼす加齢の影響  
 について —— 脳を中心にして ——

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

The Influence of Aging with SHR on Lipidperoxidation.

Hisao Itho, Shumpei Takeda and Taiju Mtsuzawa.  
 Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute  
 for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.

緒言

脳の過酸化脂質は一般的に加齢に伴い増加することが知られる。又、脳の血流量は加齢により低下の傾向を示す。さて、SHRは、両側頸動脈の結さつにより、脳虚血を起こし易いことが知られている。我々は、脳血流の低下と脂質過酸化反応の進展の関連性に及ぼす加齢の影響を調べるために、SHRを用いて以下のような実験を行なった。

方法

7ヶ月齢及び22ヶ月齢の雌のSHRを用いて、ペントバルビタール麻酔後、両側頸動脈を30分間シャ断した。結さつ直前(0分)、再開直後(30分)、60分、90分、150分に腹部大動脈より採血し、直ちに八木氏の方法で過酸化脂質(MDA値)を測定した。一方、22ヶ月齢のSHRを30分間同様に血流シャ断後、断頭し、直ちに脳のホモジネートの発光量を測定した。

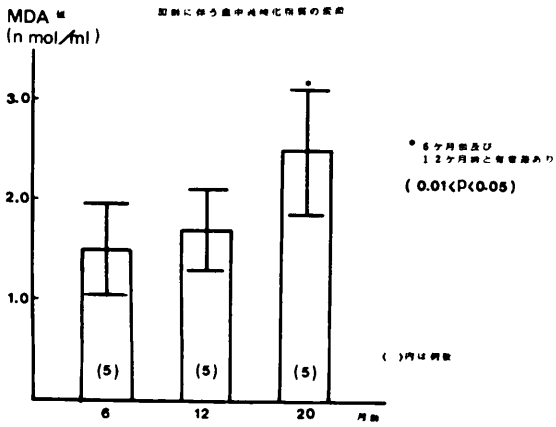
結果

7ヶ月齢、22ヶ月齢共に30分結さつ直後に、血中過酸化脂質は一過性に低下する傾向がみられた。しかし、22ヶ月齢では、150分後に上昇が認められた。又、30分の脳血流シャ断後に脳の発光量を測定した結果、対照群の非シャ断群に比較して、有意の増加を認めた。

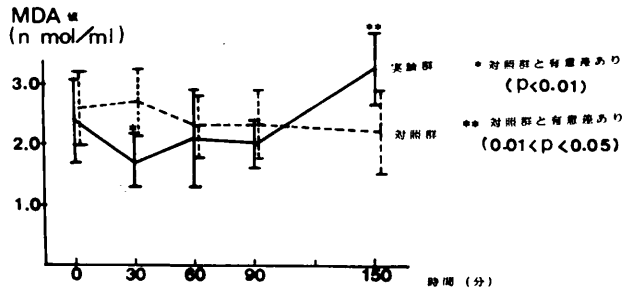
考察

SHRの加齢度の相違により、血中過酸化脂質に及ぼす、両側頸動脈結さつの影響に差がみられた。これは加齢に伴い脳血流の低下がより大きくなることと関連があるものと考えられる。又、結さつ30分後の脳の発光量の増加は、脂質過酸化と何らかの関連があるものと考えられ、今後検討すべき課題である。

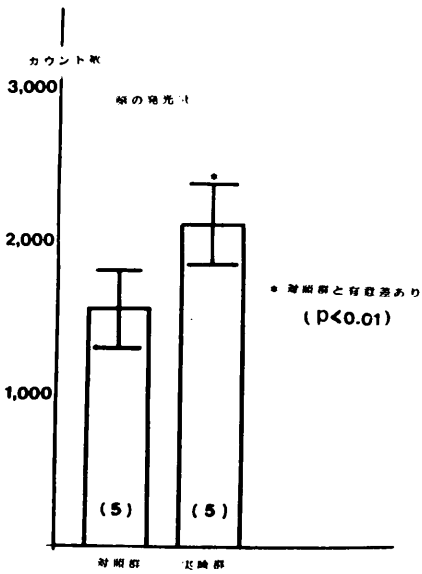
☒ 1



☒ 2



☒ 3



コレステロール食による実験的高コレステロール血症家兎赤血球膜脂  
質及び脂肪酸に及ぼすビタミンEの影響

東京医科大学老年病学教室  
石垣吉春, 今村敏治  
小山徹, 勝沼英宇

The Effect of Vitamin E on Lipid Compositions and  
Fatty Acids of Erythrocyte Membrane with Hypercholes-  
terolemic Rabbit Induced by High-cholesterole Diet.

Dep. of Geriatric Medicine Y. Ishigaki, T. Imamura  
Tokyo Medical College T. Koyama, H. Katsunuma

目的：ビタミンEは生体膜を脂質過酸化から防止して，生体膜を保持する作用があると言われている。一方，老化現象と過酸化脂質との関係を示す実験結果も多数発表されており，ビタミンEの老化防止作用が期待されている。我々は，家兎をコレステロール添加食で飼育するとハイツ小体含有赤血球が増加し，赤血球膜内リン脂質構成脂肪酸は飽和脂肪酸の増加，不飽和脂肪酸の減少等脂質構成に変動をきたすことを発表してきた。今回は，家兎をコレステロール食，及びビタミンE含有コレステロール食で飼育して赤血球膜機能特に脂質の変動について検討した。

対象及び方法：正常雄性家兎5羽(N群)，コレステロール添加食飼育家兎5羽(C群)，ビタミンE含有コレステロール添加食飼育家兎5羽(E群)の各々について，血漿総コレステロール，血漿HDL-コレステロール，血漿ビタミンE，血漿HDL-ビタミンE，赤血球膜内ビタミンE(HPLC法)，赤血球膜内遊離コレステロール，赤血球膜内総リン脂質構成脂肪酸(GLC法)の分析を行なった。さらに，N群及び10週飼育時で，赤血球をMurphy法で幼若赤血球と老化赤血球に分離して分析も行なった。

結果：血漿総コレステロールは，N群  $57 \pm 30.27 \text{ mg/dl}$ ，4週飼育C群  $490 \pm 267$ ，E群  $548 \pm 251$ ，10週飼育C群  $1256 \pm 1160$ ，E群  $929 \pm 662$  で，HDL-コレステロールは，N群  $24.5 \pm 3.87 \text{ mg/dl}$ ，4週飼育C群  $11.8 \pm 3.2$ ，E群  $15.5 \pm 2.6$ ，10週飼育C群  $22.4 \pm 5.2$ ，E群  $20.5 \pm 6.2$  であった。血漿ビタミンE量は，N群  $0.33 \pm 0.12 \text{ mg/dl}$ ，4週飼育C群  $0.14 \pm 0.05$ ，E群  $0.96 \pm 0.96$ ，10週飼育C群  $0.41 \pm 0.31$ ，E群  $1.73 \pm 0.64$  であった。HDL-ビタミンEは，N群  $0.09 \pm 0.01 \text{ mg/dl}$ ，4週飼育C群 0.04 以下，E群  $0.088 \pm 0.022$ ，10週飼育C群 0.02 以下，E群  $0.315 \pm 0.096$  であった。

赤血球膜内ビタミンE量は，N群幼若赤血球  $5.68 \times 10^{-9} \text{ ng/cell}$ ，老化赤血球  $4.48 \pm 0.83$  であり，4週飼育ではC群  $5.45 \pm 2.57$ ，E群  $6.23 \pm 1.24$ ，10週飼育C群幼若赤血球  $6.59 \pm 1.58$ ，老化赤血球  $6.24 \pm 2.48$ ，E群幼若赤血球  $8.19 \pm 2.10$ ，老化赤血球  $9.62 \pm 4.89$  であった。

赤血球膜内リン脂質構成脂肪酸の変動をみると，4週飼育ではE群は，C群に比べ  $C_{14=0}$ ， $C_{16=0}$ ， $C_{18=0}$ ， $C_{20=0}$  の減少傾向， $C_{18=1}$ ， $C_{20=4}$  の増加傾向がみられた。4週飼育と10週飼育とを比較すると，C群では $C_{18=1}$ の増加， $C_{18=2}$ の減少がみられたが，E群では $C_{18=1}$ ， $C_{18=2}$ の増加傾向がみられた。

考察：本実験より，コレステロール負荷に対してビタミンEは，血漿コレステロールの増加を防止して，HDL-コレステロールの減少を抑制する。又，HDL中のビタミンEが増加して赤血球膜中のビタミンEが増加し，赤血球老化に伴う膜内リン脂質構成脂肪酸中の飽和脂肪酸の増加をおさえている可能性が示唆された。

## 頭がい骨骨塩分布の加齢変化

—— CTによる定量 ——

山田健嗣、遠藤 敏、松沢大樹

東北大学抗酸菌病研究所 放射線医学部門

AGE-RELATED CHANGES OF THE CRANIAL BONE MINERAL:  
A QUANTITATIVE STUDY WITH COMPUTED TOMOGRAPHY

Kenji Yamada, Satoshi Endo and Taiju Matsuzawa.

Dept. of Radiology & Nuclear Medicine, The Research Inst. for  
Tuberculosis & Cancer, Tohoku Univ., 4-1 Seiryomachi Sendai,  
980, Japan.

血清カルシウムイオンは、生体にとって非常に重要な役割を演じている。Ca濃度のわずかな変動も生体に対して致命的な影響を与えることは臨床的にもよく知られている。このように重大な血清カルシウム濃度の恒常性には、種々のホルモン、ビタミンが関与しているが、今回我々はカルシウム貯蔵庫としての骨組織に注目し、骨カルシウム濃度の加齢による変化をコンピュータトモグラフィを用いて検討した。

(方法) 頭部CTスキャンを施行した患者より男270名、女225名について以下の測定を行った。

頭がい骨を十分に含む関心領域を設定し骨組織に対応するCT値と画素数のヒストグラムを求める。ほとんどの場合、骨組織に対応するヒストグラムの最大値及び最ひん値のCT数は、400-1600 Hounsfield Unit.(これはX線吸収係数に比例する)の間に含まれるのでこの範囲のCT値と画素数のヒストグラムについて検討した。測定は、眼か上縁と外耳孔を結ぶ面より約65mm上のスライスで行った。頭がい内に異常な石灰化を含む症例は除外した。ヒストグラムの分布パターンを表わす特性値としては、以下の測定値を選んだ。

- 1) 最ひん値のCT数 (PEAK)
- 2) 最ひん値の画素数 (PPNT)
- 3) 全画素数 (HPNT)

なお使用したCT装置は、Delta Scan 50 FSである。

(結果) 最ひん値のCT数 (PEAK) と年齢との関係を見ると男性では400-1400 (H) あたりに一様に分布して年齢による変化が認められなかった。一方女性では、30~40代をピークとする形の分布を示し同年代では、男性より個人差が小さい。各年代毎の平均値では男性と比較して女性の20、30、40代は有意に高く60、70代では逆に有意に低くなった。

女性においては、30代以降PEAKと年齢とは相関係数-0.77と強い相関を認めた。回帰直線 $y = -14.4x + 1652$ から考えると10才あたりPEAKで144低下すると言え

る。一方最小値の画素数 (PPNT) は、40代までは男女差を認めないが50代以降女性では、男性に比較して有意に高くなる。男性では変化は認められなかった。又、全画素数 (HPNT) は、男女間に違いはなく女性においても加齢による変化はなかった。

(考察) 頭がい骨CT値分布の加齢による変化は男女間にきわだった相違を認めた。男性ではPEAKは20代以降加齢による変化はないが女性では、20代~40代では男性より高値を示し加齢とともに急速に低下する。

従来、骨密度の測定は骨X線像を利用したりガンマー線によるスキャン法によって上腕骨、大たい骨、つい体等で測定されている。我々は支持装置としての骨組織というよりカルシウム貯蔵庫という観点から骨組織をとらえ頭がい骨骨塩分布をCT値で検討した。頭がい骨は長管骨と異なり主として海綿骨よりなり血清カルシウム濃度の変化に対応して骨塩溶出、沈着といったカルシウム貯蔵庫としての役割に適している。又、重力による影響も最少限である。

今回我々の測定したデータでは、PEAKは成長老化機転に伴い、男性と女性では非常に異っていた。これは緻密には骨カルシウム濃度とはむすびつかないがPEAK、HPNTの変動を考慮すると間接的にカルシウム濃度を反映していると考えられる。女性においては、妊娠出産に備えて男性以上にカルシウム蓄積が20代、30代になされるものと思われる。成長老化に伴う女性の変動パターンは卵巣重畳と酷似していることも興味深い。そして男女を問わず加齢による骨塩の変動からの極端な偏位は血清カルシウム濃度や尿カルシウム排せつ量ではうかがい知ることのできない長期間のカルシウムバランスの偏りを反映するものとして重要な意味を有する。又、女性での30代以降のPEAKと年齢の強い相関から考えると個人の加齢の指標としても利用できるであろう。

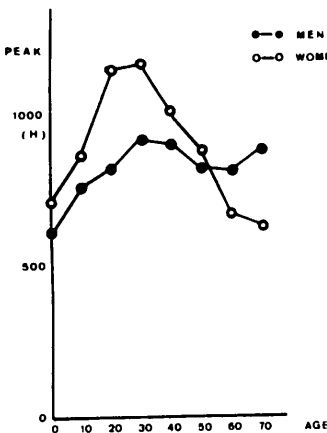


Fig.1.Changes in PEAK with age.

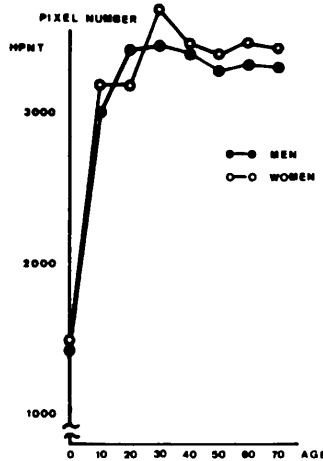


Fig.2.Changes in HPNT with age.

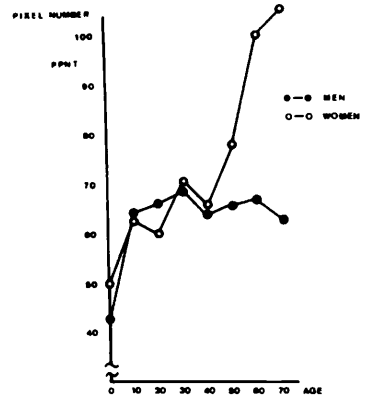


Fig.3.Changes in PPNT with age.

畑沢 順、伊藤正敏、山浦玄嗣、松沢大樹  
 東北大学抗酸菌病研究所 放射線医学部門

The influence of hypertension and atrial fibrillation with brain atrophy.

Jun Hatazawa, Masatoshi Ito, Harutsugu Yamaura and Taiju Matsuzawa.  
 Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research Institute  
 for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan.

CTによる定量的脳体積の測定によって、生体における加齢に伴う脳萎縮の様相が明らかにされてきた。40才台以降、脳萎縮は徐々に進行すること、高齢者では脳萎縮の程度に非常に大きな個人差があることがわかった。我々は、このような個人差がどのような生体の因子によって生じるのかを明らかにするために、対象となった患者の種々の臨床データについて検討を行なった。今回、脳血流量に影響を与えると考えられる血圧と脳萎縮の関係、心拍出量の低下をひきおこす心房細動と脳萎縮の関係について報告する。また、正常血圧で心電図上異常を認めなかった患者群についての加齢に伴う脳萎縮について報告する。

#### 方法

対象となったのは、宮城県北部の農村地帯に住む外来患者、および入院患者である。頭部CT検査で、脳の器質的疾患を認めなかった者300人の中から以下の条件の患者を選んだ。

- I. 正常群：外来初診時最低血圧90mmHg以下、最高血圧160mmHg以下、心電図上異常を認めない者。
- II. 高血圧群：外来初診時最低血圧100mmHg以上の者。
- III. 心房細動群：心電図上心房細動の認められた者。

脳萎縮の程度を評価するために、対象のBrain Volume Index (BVI) を測定した。BVIは、20才から39才の対象の頭がい容積に占める脳体積の比が何%にあたるかを示している。

#### 結果

1. 正常群の各年代のBVIは、40才台で $99.6 \pm 0.8$  (n=18)、50才台 $98.9 \pm 0.8$ 、60才台で $99.0 \pm 0.5$  (n=8)、70才以降 $97.7 \pm 1.2$  (n=12)であった。尚、20才から39才までの平均BVIは、 $100 \pm 0.6$  (n=60)であった。20才から39才までの群と40才台の間、40才台と50才台の間、60才台と70才以降の間に有意の差を認めた。血圧、心電図上正常の群では、40才台以降、脳萎縮がはじまり、

ほぼ加齢に伴って進行するが、種々の疾患をもつ患者を含む全対象の各年代の平均BVIに比べて平均BVIが高い傾向にあった。

2. 正常群と高血圧群のBVIをFig 1 に示す。高血圧群のBVIは、40才台で $98.1 \pm 0.8$  (n=10)、50才台で $97.4 \pm 1.2$  (n=8)、60才台で、 $96.6 \pm 1.1$  (n=6)、70才以降 $95.7 \pm 2.2$  (n=9)であった。各年代とも、正常群と比べて有意の差を認め、高血圧群のBVIが低下していた。

3. 正常群と心房細動群のBVIをFig2に示す。心房細動群の平均BVIは、60才台で、 $95.6 \pm 1.1$  (n=8)、70才以降 $95.7 \pm 2.2$  (n=4)であった。いずれも正常群と比べて有意の差を認め心房細動群のBVIが低下していた。

### 考察

心房細動患者における心拍出量の低下、脳血流量の低下については、すでに報告されているが、このような循環動態の変化が脳萎縮に極めて大きな影響を及ぼしていることが、今回明らかとなった。また、動脈硬化性血管病変を促進する高血圧も、脳血流量を介して、脳萎縮に影響を与えていると考えられる。

Fig.1.

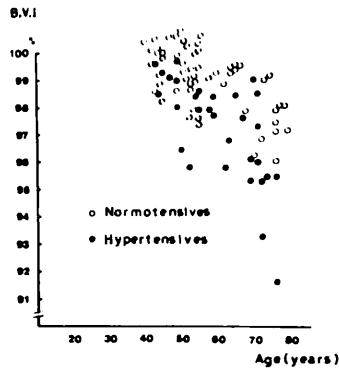
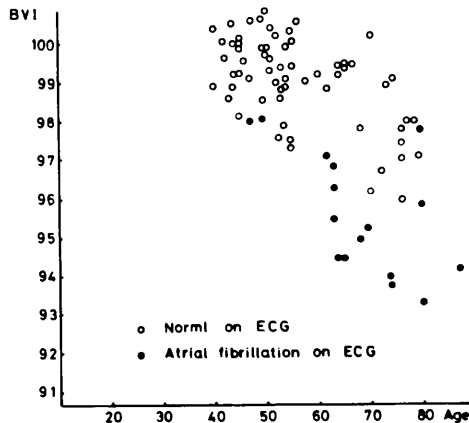


Fig.2.





## 老化モデル動物系統樹立の試み(第Ⅲ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 (III)

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 University

## 序論および方法

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にて比較的緩徐な老化を示すと考えられる3腹を選びこれらに由来する系統をR-1, 2, 3とし比較検討した。

実験動物の老化度を客観的に評価する方法として, 従来老化と関連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)眼所見 ① periophthalmic lesion ② corneal opacity ③ ulcer of cornea ④ cataract (4)脊椎所見 lordkyphosis 等について生后8ヶ月より4ヶ月毎に各個体の観察を行い, 上記各項目についてその強弱の程度に応じて0, 1, 2, 3, 4の grading score (以下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出し, さらに系統毎の平均値を求めた。またこれらのマウスの平均寿命を腹毎に算出し, さらに系統毎の平均値を求めた。成長曲線を得るためにP-1, R-1系で雌雄を分離して飼育し, 毎週体重を測定し加齢に伴う体重の推移を観察した。一方RおよびP系における生存率およびGompertz 函数を算定し集団としての加齢過程を検討した。

## 結果および考按

(1) 1980年12月までに得られた生后8ヶ月のGSはR-1, 2, 3系統で夫々203腹900匹, 142腹688匹, 71腹288匹, P-1, 2, 3, 4, 5系統で夫々176腹759匹, 82腹312匹, 39腹143匹, 19腹16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

1.22, 1.53, 1.73を示すのに対し、P-1, 2, 3, 4, 5系統で夫々3.76, 4.71, 3.75, 3.98, 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づけた。また生后12ヶ月のGSはR-1, 2, 3系統で夫々2.85, 2.99, 3.43, P-1, 2, 3, 4, 5系統では夫々7.47, 8.13, 9.60, 8.40, 11.0を示し、其の後もR, P系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 7.72, R-2 11.19 R-3 8.00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。(2)体重曲線は雄においてR, P系共に生后28週頃までは差なく成長を続け其の后P系で減少し始めRとPとの差が明かになる。雌では雄にみられたより早く生后16週頃よりRとPの差が現れ始め生后32週頃よりP系の体重が減少し始める。(3)各系の平均寿命はR-1, 2, 3系統の夫々245, 82, 50腹について、P-1, 2, 3, 4, 5系統の254, 151, 47, 30, 11腹について観察されたがR-1, 2, 3系統で夫々12.4, 16.1, 12.8ヶ月平均13.9ヶ月、P-1, 2, 3, 4, 5系で夫々10.3, 8.8, 10.0, 10.2, 8.4ヶ月平均9.8ヶ月を示しP系統で明かな平均寿命の短縮(30%)をみとめた。(4)生存曲線はR, P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すと共に、P系ではR系に比し生后一定期間の後、急速に生存率が低下していくことを示している(図1)。またGompertz 函数は、R, P系共に直線に回帰し、勾配は明かに $P(0.107) > R(0.054)$ であった(図2)。以上体重曲線、生存曲線、Gompertz 函数の示す結果より、P系統にみられる老化は accelerated senescence と規定することができる。この意味でこれらP系統を Senescence Accelerated Mouse (SAM), 「老化モデルマウス」と名づけた。

以上昨年の報告にひきつづき、系統樹立を試みている「老化モデルマウス」Senescence Accelerated Mouse (SAM) 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15, 17, 17, 14, 6世代、R-1, 2, 3系統で夫々12, 12, 12世代をかぞえている。今后更に世代を重ね老化モデル動物としての系統樹立を期するものである。

図 1

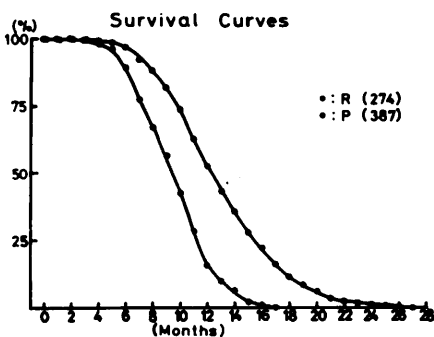
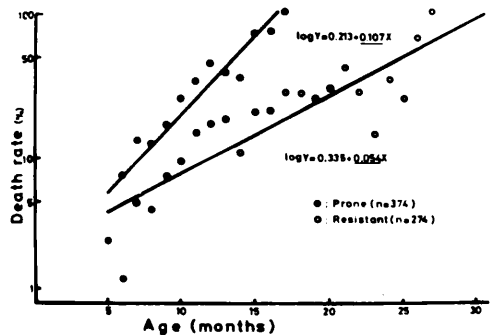


図 2



## 「老化モデルマウス」の老化度判定基準

-Grading Score System- について

細川昌則, 樋口京一, 竹下修史, 清水克時, 竹田俊男

京都大学結核胸部疾患研究所病理部門

## The Grading Score System in Senescence Accelerated Mouse

Masanori Hosokawa, Keiichi Higuchi, Shuji Takeshita,  
Katsuji Shimizu and Toshio TakedaDepartment of Pathology, Chest Disease Research Institute,  
Kyoto University

## 〔緒言〕

既に本会で述べた様に、我々は現在マウスにおいて、老化モデル動物の開発を行なっている。この「老化モデルマウス」は、促進した老化過程を示す、prone系5系統（P-1, P-2, P-3, P-4, P-5）と、自然な老化過程を示す、resistant系3系統（R-1, R-2, R-3）よりなる。我々はこれらの系統を確立するにあたり、これらのマウスの示す老化の程度を、客観的に判定し、数量化する為に、老化度判定基準が必要と考えた。しかし今の所、この様な判定基準の確かなものを知らない為、我々は老化度判定基準を作成し、用いて来た。今回我々は、判定基準を出来るだけ客観性を持つ型式になる様に明文化する事を試みた。

## 〔老化度判定基準〕

老化度判定基準における判定項目としては、種々の項目が考えられるが、それらを定める為に次の条件をもうけた。 1, 暦齡的に老齡のマウスにおいて普遍的に認められる事。 2, 退行性変化で、一見、生体には不利な変化と考えられる事。 3, 暦齡とともに、不可逆的に頻度、程度が増加する事。 4, 特殊な器具を用いず、短時間に簡単に判定出来る事。 5, マウスに何ら強い侵襲を加えずに判定出来る事。 6, 判定者において、特殊な技能を必要としない事、等 以上の点を考慮し、マウスの老化過程で、行動様式、外観におこる変化において、〔表1〕に示したものを選んだ。次に夫々の項目において、評点を定めた。基本的には、0～4点の5段階評価を行なった。評点は変化の程度が進み、範囲が広がるに従い上昇する。即ち、 0:まったく変化の認められないもの。 1;変化の傾向はみられるが、明らかでないもの。 2;明らかな変化が認められるが、程度の軽いもの。 3;変化の程度の進行したもの。 4;変化のもっとも進行したものと定めた。

〔老化度の判定〕

すべてのマウスにつき、生後8カ月以後4カ月毎に、〔表Ⅰ〕に示す項目について、各々評点をつけ、Score Paper〔表Ⅱ〕に記載した。各項目の点を加算し、そのマウスの総点とした。この総点をもとにして、各 litter における平均評点を算出し、さらにこれをもとにして、各系統の評点を算出し、各系統間の差異、各系統毎の暦齢による推移を検討した。又、各項目において、評点0を変化(-)、評点1以上を変化(+)とし、各系統における、その月令での変化の頻度を算出し、各月齢における各系統間の頻度の差、同一系統において、月毎の変化の頻度の推移を検討した。

〔結果及び考察〕

各系統における、月毎の評点の推移をみると、8カ月R系；1.41(R-1:1.22, R-2:1.53, R-3:1.73)P系；4.01(P-1:3.76, P-2:4.71, P-3:3.75, P-4:3.98, P-5:2.50),12カ月R系；2.99(2.85, 2.99, 3.43)P系；7.95(7.47, 8.13, 9.60, 8.40, 11.0),16カ月R系；5.27(4.76, 7.95, 5.35)P系；10.80(10.41, 12.21, 11.29, 11.67, 14.0),20カ月R系；7.17(6.60, 7.95, 5.35),24カ月R系；9.65(7.72, 11.19, 8.00),28カ月R系；11.0(9.0, 11.40, 11.0)となる。この様に各月齢において、P系の評点は常にR系より高く、R系、P系ともに、評点は月齢とともに次第に増加する。しかも8カ月齢のP系の評点は、16カ月齢のR系の評点と、又16カ月のP系の評点は、28カ月齢のR系のそれに対応する。次に各々の項目の各系統における頻度及び、月齢によるその推移をみると、例えば行動様式における受動性は、8カ月、12カ月、16カ月において、R(R-1, R-2, R-3)で、P(P-1, P-2, P-3, P-4)で各々、R, 8, (10.8%, 8.3%, 17.9%)P, 8, (3.49%, 37.0%, 87.5%, 41.7%), R, 12, (17.4%, 28.6%, 28.6%)P, 12, (77.3%, 70.0%, 100%, 71.4%)R, 16, (45.5%, 93.3%, 57.1%)P, 16, (88.9%, 77.8%, 100%, -)となる。この様に頻度も月齢に従い増加し、P系において常に頻度は高い、この傾向は他の項目においても同様にみとめられる。

以上の様に、これらの項目はマウスの老化の過程と非常によく相関する。しかもこれらの項目は、P系統のみ認められる特殊な資質ではなく、R系統の老齢のものにも、かなり普遍的に認められる変化である様にみえる。さらにP系の12カ月齢での各項目の頻度が、各々、R系20カ月齢の頻度と大体対応する事は、P系の平均寿命9.5カ月が、R系の平均寿命12.8カ月に比べ短縮している事を考えると大変興味深い点である。

〔結語〕

現在の所、この判定基準には、なお種々の解決せねばならない点が残されている。例えば、

1. これらの項目は老化過程にどの程度関連しているのか。
2. 他の、より適当な老化の指標となる項目は、どの様なものであるか。
3. 各々の項目の評点が、総合評点の中で占める割合は妥当であるか。等々である。しかし我々は、この様な老化度判定基準が、老化の程度を、ある程度客観的に判断するのに、一つの尺度を与える事と考え、上記の問題等につき解析を行なっている。

〔表Ⅰ〕

| CRITERIA FOR GRADING SCORE OF SENESCENCE IN MICE |                           |
|--------------------------------------------------|---------------------------|
| (1) BEHAVIOR                                     | (2) EYES                  |
| 1. REACTIVITY                                    | 1. PERIOPHTHALMIC LESIONS |
| 2. PASSIVITY                                     | 2. CORNEAL OPACITY        |
| (11) APPEARANCE                                  | 3. ULCER OF CORNEA        |
| (3) SKIN AND HAIR                                | 4. CATARACT               |
| 1. GLOSSINESS                                    | (3) SPINE                 |
| 2. COARSENESS                                    | LORDOKYPHOSIS OF SPINE    |
| 3. LOSS OF HAIR                                  | (111) OTHERS              |
| 4. SKIN ULCERS                                   |                           |

〔表Ⅱ〕

| PROTOCOL FOR GRADING SCORE |                       |    |    |    |    |    |
|----------------------------|-----------------------|----|----|----|----|----|
| Animal No.                 | 8                     | 12 | 16 | 20 | 24 | 28 |
| Age (Month)                |                       |    |    |    |    |    |
| Body Weight                |                       |    |    |    |    |    |
| Behavior                   | Reactivity            |    |    |    |    |    |
|                            | Passivity             |    |    |    |    |    |
|                            | Glossiness            |    |    |    |    |    |
| Skin                       | Coarseness            |    |    |    |    |    |
|                            | Hair Loss             |    |    |    |    |    |
|                            | Ulcer                 |    |    |    |    |    |
| Eye                        | Periophthalmic Lesion |    |    |    |    |    |
|                            | Corneal Opacity       |    |    |    |    |    |
|                            | Ulcer of Cornea       |    |    |    |    |    |
|                            | Cataract              |    |    |    |    |    |
| Spine                      | Lordokyphosis         |    |    |    |    |    |
| Others                     |                       |    |    |    |    |    |
| Total                      |                       |    |    |    |    |    |

## 「老化モデルマウス」に見られる心血管系の変化について

(第I報)

竹下修史, 細川昌則, 入野美香, 樋口京一, 安平公夫,

竹田俊男 京大胸部研病理

## Cardiovascular Changes in Senescence Accelerated Mouse (I)

Shuji Takeshita, Masanori Hosokawa, Mika Irino, Keiichi Higuchi,  
Kimio Yasuhira and Toshio TakedaDep. of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto  
University

## 序 論

従来から竹田らが報告して来た老化モデルマウスにおける脳の細動脈並びに冠動脈血管壁の厚さを様々な月令について組織学的に計測し、Prone系とResistant系とで比較検討した。

## 材料と方法

動物はと殺例並びに死後比較的新鮮なものを選び、E.V.染色を行って、両臓器の細動脈血管について写真撮影を行った。撮影に供した血管は少なくとも光顕レベルではアミロイド沈着をみないものであった。測定方法としては、血管のほぼ中心付近で短径を示している箇所を長径に対し直角に線を引いて、外径と内径を測定し $\frac{\text{外径} - \text{内径}}{\text{外径}} \times 100(\%)$ を算出した。両臓器共平均7コ以上の血管を測定し、各動物の血管壁の厚さの割合の平均値を算出した。測定した脳動脈で直径 $20\mu$ 以上のもの、冠動脈で直径 $30\mu$ 以上のものは除外した。

## 結 果

## (1)脳動脈について

加齢に伴う血管壁の厚さの割合の平均では、生後10ヶ月令までを比較すると、P系50.8%、R系46.9%と約4%P系の方が高く、これは生後11~20ヶ月令で比べてみてもほぼ同程度の差を維持しながらゆるやかに増加した。R系はその後も更に上昇が続いた。各動物個体の平均値をプロットし、これらのP系とR系との差を調べてみると、50%以上のものはP系で11/17(64.7%)、R系では8/25(32%)と割合にして約半分の開きがあった。従って50%ラインの上下の例数について $\chi^2$ 検定を行うと、5%の危険率で有意にP系の方が高値を示すことが証明された。

## (2)冠動脈について

冠動脈壁の厚さの割合について生後10ヶ月令までを比べてみると、P系46.5%、R系40.3%であり約

6% P系の方が高値を示した。生後11~20ヶ月令ではやはり4%近くP系の方が高値を示した。Fig. 2に示す如く、P系、R系共に冠動脈壁の厚さの割合は脳動脈に比べ増加度が急であった。

各動物の血管壁の厚さの平均値をプロットし、両系統の回帰直線を求めてみると、いずれも有意な回帰直線が得られた。両直線の勾配はP系が0.844に対しR系0.491であり、P系統の方が直線の傾きが大きい傾向にあった。更にP系R系全例を用いて、月令と厚さの割合とで回帰直線を求め、その上下にある例数で $\chi^2$ 検定を行うと、P系R系の差は危険率1%で有意な差が認められた。

脳動脈、冠動脈いずれの場合も内膜の明らかな肥厚は認められなかった。

### 考 按

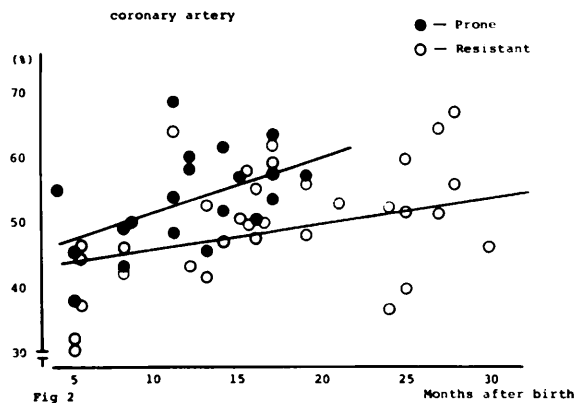
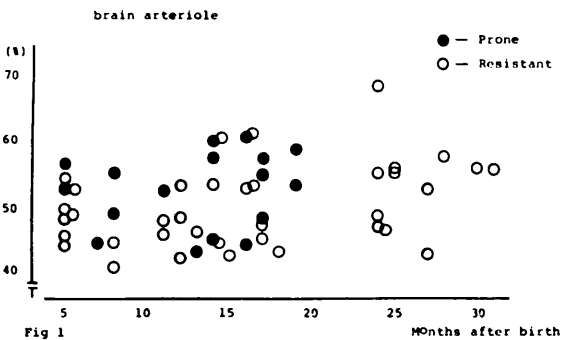
人で加齢に伴って惹き起こされる様々な病的変化のうち、心血管系の変化は老化と密接な関係にある。特に心筋梗塞の原因となり得る冠動脈硬化あるいは脳梗塞、脳出血をもたらす脳動脈硬化は老令になるに従い著しく進行して来ると考えられている。

また、人間の早老症として有名なWerner症候群やProgeriaにおいても血管変化が著明であり、動脈硬化症を伴っている。

我々が維持している老化モデルマウスの弊死例について組織学的に観察していくうち、僅かではあるが脳血管に石灰化を伴う動脈硬化を認めた例があるため、これらのマウスでも人間で見られるような血管変化が認められるか否かを判断する手初めとして、まず脳の細動脈並びに冠動脈について、その血管壁の厚さを組織計測的に検討した。得られた結果から推測すると

- (1) 生後10ヶ月令、20ヶ月令でのP系とR系との平均値を比較してみると、脳動脈、冠動脈いずれもP系の方が常に高値を示した。
- (2) 冠動脈において回帰直線から得られる勾配はP系の方がR系に比べ倍近くの値を示した。
- (3) 冠動脈で、P系R系の全例から求めた回帰直線を境にした $\chi^2$ 検定では、P系とR系との差は極めて有意であり、P系の方が冠動脈壁の肥厚が認められた。

更に、P系R系共脳動脈においては、加齢に伴って血管壁の厚さが進行する度合が極めて緩慢であることや、脳動脈に比べ冠動脈では進行度が、急激であること、血管の肥厚状態が主に中膜の変化であろうと考えられること等は興味深い所見である。



「老化モデルマウス」にみられる筋骨格系の変化について  
 (第Ⅱ報) — 椎間板のアミロイド沈着 —

清水克時, 石井正治, 細川昌則, 樋口京一, 入野美香,  
 山室隆夫\*, 竹田俊男  
 京都大学胸部疾患研究所, 病理学部門, 京都大学整形外科\*

Musculoskeletal changes of Senescence Accelerated  
 Mouse (II) — Amyloid deposition in the intervertebral  
 disc —

Katsuji Shimizu, Masaharu Ishii, Masanori Hosokawa,  
 Keiichi Higuchi, Mika Irino, Takao Yamamuro\* and  
 Toshio Takeda  
 Dept. of Pathology, Chest Disease Research Institute and  
 Dept. of Orthopaedic Surgery, Faculty of Medicine\*,  
 Kyoto University

関節のアミロイド沈着は、古くから知られているアミロイド関節症以外に、加齢に伴って高頻度におこる現象であることが知られてきた。Ladefogedらは30例の剖検で股関節を組織学的に検索し、関節軟骨では93%に、関節包では43%にアミロイド沈着を認め、年齢と頻度の間には有意の相関があることを述べている。<sup>(1)</sup> また内野らは115例の剖検例で胸鎖関節を検索し、若年者では沈着がなく、年齢と共に頻度が増加し、50才台以上では77例全例にアミロイド沈着を認めている。<sup>(2)</sup>

この様に加齢と密接な関係を持つ関節のアミロイド沈着を実験動物において調べた報告はない。現在系統を確立中の老化モデルマウスには加齢に伴い高頻度に滑膜性関節にアミロイド沈着が起こることを報告してきた。関節のアミロイド沈着は関節軟骨や半月板の表面、半月板の関節包付着部, transition zone での関節包や関節軟骨に見られる。膝関節が最も沈着しやすく、末梢関節には沈着が見られない。6ヶ月齢以前の発症はなくP系では月齢と頻度との間には有意の相関がある。またR系の2例の老齢マウスに組織学的には同様のアミロイド沈着を認める。<sup>(3)</sup>

この老化モデルマウスは加齢に伴って脊柱の矢状面での彎曲 lordokyphosis の増強がおこる。lordokyphosis は頻度、量共各系で月齢に従い増加するが、P系ではR系に比べより早期より高値を示す。この傾向は胸腰椎部での後彎よりも、頸椎の前彎でより著明である<sup>(3)</sup>。今回この lordokyphosis の発現に

重要な役割を持つと考えられる椎間板を組織学的に検索したところ、高頻度にアミロイド沈着を認めた。

P系51例，R系23例の斃死マウスの脊柱（頸椎～仙椎）を採取し，固定，包埋後，中心矢状面及び傍中心矢状面で2枚の切片を作り，HE，コンゴ赤，チオフラビンTの各染色を行い，コンゴ赤染色標本で偏光顕微鏡下に緑色偏光を示す場合にアミロイド陽性と判定した。

その結果，椎間板のアミロイド沈着は線維輪にのみ見られ，大多数では頸椎及び上部胸椎の数椎間に局限していた。これは lordokyphosis のうちで著明な変化のみられる高位とはほぼ一致する。各系共6ヶ月齢以前の沈着はなく，P系では月齢と頻度とは有意の正の相関を示す。P1(10/10)，P3(8/8)では12ヶ月齢以上で100%の頻度になる。またR系でも高齢の3例に同様の沈着がみられた。

老化とアミロイドとの関係は古くから心のアミロイドや脳の老人斑等で研究されており(4)，動物のアミロイド沈着も加齢と密接な関係を持つことが報告されている(5)。前述した様に関節のアミロイド沈着も人体例では加齢に関係して起る現象であることが報告されはじめてきているが，椎間板のアミロイド沈着を系統的に研究した報告は見当らない。老化モデルマウスにおいて観察した結果では，関節及び椎間板のアミロイド沈着の頻度は月齢と有意の相関を持ちながら増加し，かつ対照のR系でも頻度は少いが高齢になると同様の沈着が認められる。椎間板と滑膜性関節との類似性を考えると，椎間板のアミロイド沈着も老化と密接な関係を持つことを示唆する。

- (1) Ladefoged, C., Christensen, H. E. : Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A 88:55, 1980
- (2) Uchino, F., Nakamura, H., Kamei, T., Nagasawa, T., : Amyloid & Amyloidosis Ed. by Glenner, G. G., Costa, P. P., Freitas, A. E. Excerpta Medica, 1980 pp55-59
- (3) Shimizu, K., Hosokawa, M., Takeshita, S., Matsushita, T., Kasai, R., Yamamuro, T., Takeda, T., : Biomed. Gerontol. 4:18, 1980
- (4) 塚越 廣，田幸健司：  
日本臨床 37:3187, 1979
- (5) Thung, P. J. : Gerontologia 1:234, 1957



「老化モデルマウス」にみられるアミロイドの生  
化学的特性（第1報）

松村敦子, 樋口京一, 清水克時, 細川昌則, 竹田俊男  
京都大学胸部疾患研究所, 病理学部門

Biochemical features of amyloid in Senescence  
Accelerated Mouse (I)

Atsuko Matsumura, Keiichi Higuchi, Katsuji Shimizu,  
Masanori Hosokawa and Toshio Takeda  
Department of Pathology, Chest Disease Research  
Institute, Kyoto University

老化モデル動物として系統樹立を試みている「老化モデルマウス」の Prone系に、高頻度にかつ大量の amyloid沈着がみられることは、既に報告した<sup>(1)</sup>。今回我々はマウスの組織に沈着した amyloid 蛋白の単離精製を行ない、その性質について分析を行ったので報告する。

材料と方法

amyloid 蛋白は P-1 系マウスの肝臓より Pras<sup>(2)</sup>, Glenner<sup>(3)</sup> らの方法に準じて水可溶性画分として抽出し、5 M グアニジン塩酸・1 M 酢酸を用いた Sephadex G-100 のゲル濾過によって精製した。抽出した amyloid 蛋白はゲル濾過の前に電子顕微鏡で細線維構造を確認した。精製後は SDS urea polyacrylamide gel electrophoresis により分子量と均一性を検討し、アミノ酸分析を行った。さらに Edman 法による N 末端アミノ酸の検討も行った。

結果

水可溶性画分として得られた amyloid 蛋白の shadowing 法による電子顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。写真に示される様に分枝しない特徴ある細線維構造が確認される。この蛋白を Sephadex G-100 でゲル濾過を行った時の溶出パターンは Fig. 2 の如くで、得られた画分（以下 A X と略す）を SDS-Urea-PAGE を行ったものが Fig. 3 である。その結果は得られた画分が単一であり、分子量は約 6,000 であることを示している。またこの画分のアミノ酸分析の結果は Table 1 に示した如くで、既に報告されているマウスの AA 蛋白<sup>(4)</sup>とは異っていた。Edman 法による N 末端アミノ酸分析を行ったところ、HPLC, GLC で PTH

アミノ酸は検出されず、またHCl層にもPTH-アミノ酸は検出されなかった。

### 考察

以上の結果から「老化モデルマウス」P-1系の肝臓に沈着した amyloid 蛋白は、カゼイン処置などによって沈着するAA蛋白とは違い分子量も小さく、アミノ酸組成も異なり、むしろ human senile cardiac amyloidosis<sup>(5)</sup> や家族性アミロイドーシスに沈着する amyloid<sup>(6)</sup> に似ている。またこれらのマウスには形質細胞の増殖像はみられず、Plasma cell dyscrasiaに伴った amyloid (AL)とも異っていることが予想されたが、このことはALのアミノ酸組成<sup>(7)</sup> が我々の結果と異っていることで裏づけられた。加えてEdman法によるN末端分析によって生じるPTH-アミノ酸が検出されなかったことは、この amyloid のN末端が block されていることが考えられ、このことからAA, ALとは異っていると考えられる。

### 文献

1. 竹下修史, 細川昌則, 入野美香, 樋口京一, 松村教子, 松下隆寿, 安平公夫, 竹田俊男: 基礎老化研究 4: 114, 1980
2. Pras, M., Schubert, M., Franklin, D. Z., Rimón, A., and Franklin, E. C.: J. Clin. Invest. 47: 924, 1968
3. Glenner, G. G., Cuatrecasas, P., Iserky, C., Bladen, H. A., and Eanes, E. D.: J. Histochem. and Cytochem. 17: 769, 1969

4. Eriksen, N., Ericsson, L. H., Pearsall, N., Lagunoff, D., and Benditt, E. P.: Proc. Natl. Acad. Sci. 73: 964, 1976
5. Westermak, P., Natvig, J. B., and Johansson, R.: J. Exp. Med. 146: 631, 1977
6. Araki, S., Kurahara, T., Tamura, S., and Kuribayashi, T.: Amyloid & Amyloidosis 67, 1980
7. Benditt, E. P., and Eriksen, N.: Proc. Natl. Acad. Sci. 55: 308, 1966



Fig. 1 Electron micrograph x40,000

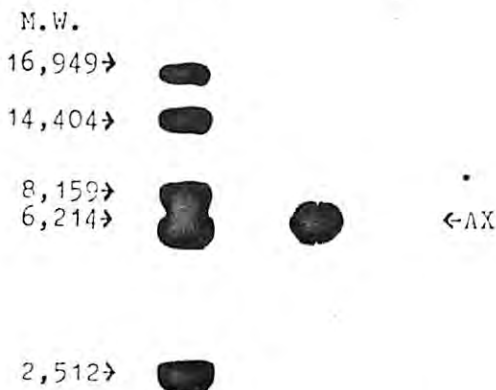


Fig. 3 SDS-Urea-PAGE

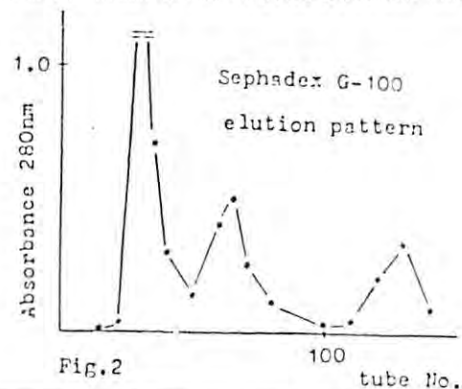


Fig. 2

Table 1 Amino acid composition of amyloid protein. (residue/100 residues)

| Amino acid | Amyloid AX | Mouse AA | Human senile cardiac amyloid |
|------------|------------|----------|------------------------------|
| Lys        | 7.0        | 6.0      | 4.2                          |
| His        | 2.3        | 2.8      | 3.1                          |
| Arg        | 5.1        | 6.1      | 4.3                          |
| Asp        | 9.0        | 10.8     | 8.1                          |
| Thr        | 5.5        | 2.7      | 8.1                          |
| Ser        | 6.4        | 5.2      | 9.0                          |
| Glu        | 15.8       | 12.6     | 12.4                         |
| Pro        | 3.3        | 1.9      | 5.4                          |
| Gly        | 8.7        | 14.8     | 8.5                          |
| Ala        | 11.2       | 13.2     | 8.7                          |
| Cys(1/2)   | -          | 0.6      | 0.7                          |
| Val        | 4.3        | 1.7      | 7.8                          |
| Ile        | 2.8        | 3.3      | 0.7                          |
| Ile        | 2.8        | 2.8      | 4.6                          |
| Leu        | 6.6        | 1.3      | 6.7                          |
| Tyr        | 3.5        | 4.1      | 4.3                          |
| Phe        | 5.9        | 8.3      | 3.4                          |
| Trp        | -          | -        | -                            |

## 正 誤 表

基礎老化研究第4号(1980)38頁

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

本文 第6、14、25行

誤

$\alpha$ -トコフェロール

正

トコフェロール