

日本基礎老化学会  
第6回大会講演要旨集

# 6 基礎老化研究

## BIOMEDICAL GERONTOLOGY

1982

日本基礎老化学会

Japan Society for Biomedical Gerontology

# 基礎老化研究 第6巻

昭和57年(1982)7月

日本基礎老化学会第6回大会講演要旨集

(昭和57年7月23~24日 東京・順天堂大学)

## 目次

特別講演	加齢と免疫	
	白井俊一	1
1.	Wistar およびF344 ラットの寿命と形態所見—通常および制限食餌における観察 (2) 組織の加齢病変	
	蟹沢成好, 井上 達, 倉本和直, 太田邦夫	2
2.	Wistar およびF344 ラットの寿命と形態所見—通常および制限食餌における観察 (3) 自然発生腫瘍の頻度と年齢分布	
	井上 達, 蟹沢成好, 倉本和直, 太田邦夫	4
3.	ミトコンドリアの超微形態像と機能についての年齢的検討	
	佐藤秩子, 田内 久	6
4.	老年らしいにみられる唾液腺の変化	
	佐々木紀典	8
5.	ラット・マウスの下垂体—甲状腺系と老化	
	大岡 宏, 藤田佐織, 吉本恵美子	10
6.	ラットのタンパク尿症に対する食餌制限時期の影響	
	藤田美明, 市川みね子, 栗本文子, 力丸 徹	12
7.	食餌制限の時期と, その後の体重変化—とくに脂肪組織について	
	木村修一, 辻川宗男	14

8.	ラット及びヒト腸内細菌叢の加齢による変動 — streptococci を中心として — 河合康雄, 末柄信夫, 矢沢一良 .....	16
9.	末梢神経ミエリン蛋白の加齢に伴う変化 内田洋子, 朝長正徳 .....	18
10.	加齢に伴う中枢神経膜系の変化に関する研究 II マウスミエリンへの脂質の取り込み速度 安藤 進, 小野百合子, 田中康一 .....	20
11.	加齢に伴う末梢無髄神経線維の機能的変化 佐藤優子, 中村はる江, 伊藤憲一, 佐藤昭夫 .....	22
12.	培養老化マウス神経細胞の電気生理学的性質 福田 潤, 山口和彦 .....	24
13.	雄ラット視床下部弓状核のシナプス形態の加齢に伴う変化の解析 小林 悟, 松本 明, 新井康允 .....	26
14.	老齢雌ラットの視床下部神経回路網の可塑性とエストロゲン 松本 明, 新井康允 .....	28
15.	加齢による脳萎縮と知能 (X線コンピューター断層装置に依る研究) 武田俊平, 松沢大樹, 伊藤久雄, 伊藤正敏, 山浦玄嗣 .....	30
16.	加齢による脳萎縮と脳血流量—X線CTと <sup>133</sup> Xe クリアランス法による定量的研究— 山口龍生, 窪田和雄, 阿部由直, 藤原竹彦, 畑沢 順, 松沢大樹 .....	32
17.	喫煙の脳血流に及ぼす影響について —喫煙と脳の老化の関係— 窪田和雄, 山口龍生, 畑沢 順, 阿部由直, 藤原竹彦, 松沢大樹 .....	34
18.	妊娠期・授乳期のたん白質欠乏による仔ラットの脳DNA, 行動および生存日数に及ぼす影響 梶本雅俊, 佐々木敦子 .....	36
19.	正常マウスの随意活動量の生涯変化 野間口隆 .....	38
20.	「老化促進モデルマウス (SAM)」にみる老化アミロイド (ASsam) の免疫組織 化学的研究 樋口京一, 松村敦子, 本間篤子, 竹下修史, 橋本研二, 細川昌則, 安平公夫, 竹田俊男 .....	40

21.	「老化促進モデルマウス (SAM)」の老化度判定基準—Grading Score System— について (第Ⅱ報)	
	細川昌則, 笠井隆一, 樋口京一, 清水克時, 竹下修史, 本間篤子, 入野美香 戸田佳代子, 松村敦子, 松下 睦, 竹田俊男 .....	42
22.	溶原性バクテリア紫外線誘導後の寿命に関する理論的考察	
	矢後長純, 立浪 忍, 福田信男 .....	44
23.	カイコガ成虫のアルギナーゼ活性における性的二型と加齢による変化	
	相垣敏郎, 小山内実 .....	46
24.	昆虫ホルモンのカイコガ成虫の寿命とアミノ酸プールの及ぼす影響	
	小山内実 .....	48
25.	蛋白質合成異常変異種蚕蛾 (Nd) の寿命とアミノ酸プールの加齢的变化	
	米沢由美子, 小山内実 .....	50
26.	メダカ系統間に見られる放射線感受性; スーパーオキシドディスムターゼ 活性と寿命の相関について (予報)	
	加藤邦彦, 島田敦子, 江上信雄 .....	52
27.	脂肪酸合成系酵素の誘導の加齢による変動	
	入谷信子, 福田ひとみ, 桂田昭彦, 池田由美子 .....	54
28.	皮膚粘膜リンパ節症候群の生化学的研究	
	大津英二, 瀬長良三郎 .....	56
29.	リボゾームの構造変化; マウス及びラットの老化に伴うリボゾーム蛋白質と リボゾームRNAの量的質的变化	
	森 望, 野谷悦子, 飯田裕之, 阿部幹夫, 後藤佐多良 .....	58
30.	ラット肝の加齢に伴うセルロースアセテート膜2次元電気泳動蛋白質展開像の変化	
	藤田敬子, 戸田年総, 大橋望彦 .....	60
31.	ウエルナー培養細胞の継代に伴うDNAポリメラーゼ忠実度の低下	
	田口隆彦, 福田 貢, 大橋望彦 .....	62
32.	Werner 症候群細胞のDNA複製異常について	
	竹内二士夫, 宮本昭正, 花岡文雄, 山田正篤 .....	64
33.	ヒト二倍体老化細胞のDNA合成再開	
	井出利憲, 辻 良明, 三井洋司 .....	66

34.	ウシ血管内皮細胞の分裂加齢 山本清高, 山本満里, 松岡耕二, 三井洋司 .....	68
35.	ヒト2倍体細胞のクローン培養と増殖因子 黒田行昭 .....	70
36.	細胞老化と細胞成長因子 I. WI-38 細胞の細胞老化に伴う無血清培地下における細胞 成長因子の応答 加治和彦, Paul D. Phillips, Vincent J. Cristofalo .....	72
37.	異なった年齢のヒト皮膚繊維芽細胞へのハイドロコルチゾンの効果とその 特異的結合 近藤 晃, 春日博子, 能村哲郎 .....	74
38.	培養細胞の老化にともなう細胞体積変化に及ぼす高圧酸素の影響 本田修二, 松尾光芳 .....	76

# BIOMEDICAL GERONTOLOGY

Vol. 6

July 1982

## Contents

IMMUNOLOGY OF AGING T. Shirai	1
LIFE SPANS AND MORPHOLOGICAL FINDINGS OF WISTAR AND F344 RATS BRED WITH STANDARD OR RESTRICTED FEEDING (2) AGE-ASSOCIATED HISTOLOGICAL FINDINGS M. Kanisawa, T. Inoue, K. Kuramoto and K. Oota	2
LIFE SPANS AND MORPHOLOGICAL FINDINGS OF WISTAR AND F-344 RATS BRED WITH STANDARD OR RESTRICTED FEEDING (3) LONGEVITY AND INCIDENCE OF SPONTANEOUS TUMORS T. Inoue, M. Kanisawa, K. Kuramoto and K. Oota	4
AGE CHANGES IN STRUCTURE AND FUNCTION OF THE MITOCHONDRIA T. Sato and H. Tauchi	6
CHANGES IN THE TISSUE OF SALIVARY GLAND IN AGED LEPROSY PATIENTS N. Sasaki	8
PITUITARY-THYROID AXIS AND AGING IN THE RAT AND THE MOUSE H. Ooka, S. Fujita and E. Yoshimoto	10
THE EFFECT OF THE TIME TO START DIETARY RESTRICTION ON PROTEINURIA IN RATS Y. Fujita, M. Ichikawa, F. Kurimoto and T. Rikimaru	12
THE RELATIONSHIP BETWEEN THE PERIOD OF DIETARY RESTRICTION AND THE ADIPOSE TISSUE CELLULARITY S. Kimura and M. Tsujikawa	14

AGE-RELATED CHANGES OF INTESTINAL MICROFLORA IN RATS AND HUMANS WITH SPECIAL REFERENCES TO STREPTOCOCCI Y. Kawai, N. Suegara and K. Yazawa	16
AGE-RELATED CHANGES OF MYELIN-ASSOCIATED PROTEINS IN THE RAT PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM Y. Uchida and M. Tomonaga	18
STUDIES ON AGE-RELATED CHANGES IN CENTRAL NERVOUS MEMBRANE SYSTEMS II. INCORPORATION RATES OF LIPIDS INTO MOUSE MYELIN S. Ando, Y. Ono and Y. Tanaka	20
PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF PERIPHERAL UNMYELINATED NERVE FIBERS IN ADULT AND OLD RATS Y. Sato, H. Nakamura, K. Ito and A. Sato	22
ELECTROPHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF TISSUE-CULTURED NERVE CELLS FROM THE AGED MICE. J. Fukuda and K. Yamaguchi	24
MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF AGE-RELATED SYNAPTIC CHANGES IN THE HYPOTHALAMIC ARCUATE NUCLEUS IN THE MALE RAT S. Kobayashi, A. Matsumoto and Y. Arai	26
NEURONAL PLASTICITY IN THE HYPOTHALAMUS OF OLD FEMALE RATS AND ITS ENHANCEMENT BY ESTROGEN TREATMENT A. Matsumoto and Y. Arai	28
BRAIN ATROPHY AND INTELLIGENCE DETERIORATION IN AGING PROCESS S. Takeda, T. Matsuzawa, H. Ito, M. Ito and H. Yamaura	30
REDUCTION IN CEREBRAL BLOOD FLOW AND AGE-RELATED BRAIN ATROPHY --- A QUANTITATIVE STUDY WITH COMPUTED TOMOGRAPHY AND <sup>133</sup> Xe CLEARANCE METHOD --- T. Yamaguchi, K. Kubota, Y. Abe, T. Fujiwara, J. Hatazawa and T. Matsuzawa	32

EFFECTS OF SMOKING ON REGIONAL CEREBRAL BLOOD FLOW --- SMOKING AND BRAIN AGING ---	
K. Kubota, T. Yamaguchi, Y. Abe, T. Fujiwara, J. Hatazawa and T. Matsuzawa	34
EFFECT OF PROTEIN NUTRITION THROUGHOUT GESTATION AND LACTATION ON BEHAVIOR, BRAIN DNA CONTENT AND LIFE SPAN IN THE RAT PROGENIES	
M. Kajimoto and A. Sasaki	36
CHANGES IN VOLUNTARY RUNWHEEL ACTIVITY DURING LIFE OF THE HOUSE MOUSE, <i>Mus musculus molossinus</i>	
T. A. Nomaguchi	38
SYSTEMIC SENILE AMYLOID IN SENESCENCE ACCELERATED MOUSE (SAM): A UNIQUE FIBRIL PROTEIN (AS <sub>SAM</sub> ) DEMONSTRATED IN TISSUES FROM VARIOUS ORGANS BY THE UNLABELED IMMUNOPEROXIDASE METHOD	
K. Higuchi, A. Matsumura, A. Honma, S. Takeshita, K. Hashimoto, M. Hosokawa, K. Yasuhira and T. Takeda	40
THE GRADING SCORE SYSTEM IN SENESCENCE ACCELERATED MOUSE (II)	
M. Hosokawa, R. Kasai, K. Higuchi, K. Shimizu, S. Takeshita, A. Honma, M. Irino, K. Toda, A. Matsumura, M. Matsushita and T. Takeda	42
LIFE-SPAN OF ULTRAVIOLET-INDUCED LYSOGENIC BACTERIA <i>Bacillus megaterium</i> 899A	
N. Yago, S. Tatsunami and N. Fukuda	44
SEXUAL DIMORPHISM AND AGE-ASSOCIATED CHANGES IN ARGINASE ACTIVITY OF THE SILKMOTH, <i>Bombyx mori</i>	
T. Aigaki and M. Osanai	46
EFFECTS OF INSECT HORMONES ON THE LIFESPAN OF SILKMOTH, <i>Bombyx mori</i> , AND THE AGE-RELATED CHANGES IN AMINO ACID POOLS	
M. Osanai	48
LIFESPAN AND AGE-RELATED CHANGES IN AMINO ACID POOL SIZES OF N <sub>d</sub> , A SILKWORM MUTANT HAVING NO ABILITY TO SYNTHESIZE FIBROIN	
Y. Yonezawa and M. Osanai	50



PRELIMINARY REPORT ON THE CORRELATION BETWEEN RADIOSENSITIVITY, SUPEROXIDE DISMUTASE ACTIVITY AND LIFE SPAN OF DIFFERENT STRAINS OF THE FISH <i>Oryzias latipes</i>	
K. Kator, A. Shimada and N. Egami	52
AGE-DEPENDENT ALTERATIONS OF LIPOGENIC ENZYME INDUCTION	
N. Iritani, H. Fukuda, A. Katsurada and Y. Ikeda	54
BIOCHEMICAL STUDIES ON MUCOCUTANEOUS LYMPH NODE SYNDROME	
E. Ohtsu and R. Senaga	56
STRUCTURAL CHANGES OF HEPATIC RIBOSOMES DURING AGEING OF MOUSE AND RAT	
N. Mori, E. Notani, H. Iida, M. Abe and S. Goto	58
A NOVEL METHOD OF TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORETIC SURVEY OF PROTEINS AFFECTED BY AGING IN RAT LIVER	
T. Fujita, T. Toda and M. Ohashi	60
DECREASED FIDELITY OF THE DNA POLYMERASE ISOLATED FROM THE LATE PASSAGE CULTURED FIBROBLASTS OF WERNER'S SYNDROME	
T. Taguchi, M. Fukuda and M. Ohashi	62
THE ABNORMAL DNA REPLICATION IN WERNER'S SYNDROME FIBROBLASTS	
F. Takeuchi, T. Miyamoto, F. Hanaoka and M. Yamada	64
REINITIATION OF DNA SYNTHESIS IN SENESCENT HUMAN DIPLOID CELLS	
T. Ide, Y. Tsuji and Y. Mitsui	66
CELLULAR AGING OF BOVINE AORTIC ENDOTHELIAL CELLS	
K. Yamamoto, M. Yamamoto, K. Matuoka and Y. Mitsui	68
EFFECT OF GROWTH FACTORS ON HUMAN DIPLOID CELLS IN CLONAL CULTURE	
Y. Kuroda	70

CELL AGING AND GROWTH FACTORS I. CHANGES IN RESPONSE TO GROWTH FACTORS IN SERUM-FREE CONDITIONS DURING THE <i>IN VITRO</i> AGING OF WI-38 CELLS	
K. Kaji, P. D. Phillips and V. J. Cristofalo	72
EFFECTS OF HYDROCORTISONE ON HUMAN SKIN FIBROBLASTS AT VARIOUS AGES AND ITS SPECIFIC BINDING	
H. Kondo, H. Kasuga and T. Noumura	74
EFFECT OF HYPERBARIC OXYGEN ON THE CELL SIZE CHANGES OF HUMAN DIPLOID FIBROBLASTS DURING AGING <i>IN VITRO</i>	
S. Honda and M. Matsuo	76

# 特 別 講 演

## 加 齢 と 免 疫

白 井 俊 一

順天堂大学医学部病理学第二講座

## IMMUNOLOGY OF AGING

Toshikazu SHIRAI

Department of Pathology  
Juntendo University  
School of Medicine

1. 免疫系のしくみ
2. 加齢とリンパ組織
3. 加齢と免疫機能
4. 加齢と自己免疫
5. 加齢と腫瘍免疫

Wistar および F344 ラットの寿命と形態所見——通常および制限食餌における観察

2) 組織の加齢病変

蟹 沢 成 好<sup>\*,\*\*</sup>、井 上 達<sup>\*\*</sup>、倉 本 和 直<sup>\*\*</sup>、太 田 邦 夫<sup>\*\*</sup>

\* 横浜市立大学医学部病理学教室

\*\* 東京都老人総合研究所

LIFE SPANS AND MORPHOLOGICAL FINDINGS OF WISTAR AND F344 RATS BRED WITH STANDARD OR RESTRICTED FEEDING

(2) Age-associated histological findings

Masayoshi KANISAWA,<sup>\*,\*\*</sup> Tohru INOUE,<sup>\*\*</sup> Kazunao KURAMOTO,<sup>\*\*</sup> and Kunio OOTA<sup>\*\*</sup>

\* Yokohama City University School of Medicine, Dept. of Pathology

\*\*Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

一昨年来、Wistar および F344 ラットの加齢病変の多様性と高ひん度自然発生腫瘍の発現について指摘し、げっ歯類動物を用いた老化の実験的研究に対する見なおしとより適当なモデル系の開発あるいは飼育法の検討の必要性につき述べた。ことに昨年は食餌制限飼育が実験中途段階ながら、一部の組織病変の発現抑制と腫瘍発生率の低下ないし遅延を来す可能性を推測して述べた。本年は、制限食飼育群がようやく寿命の終末期に近づき、それらの剖検成績も集積されてきたので、通常飼育群と制限食餌飼育群を比較する形で組織学的に検索した成績について述べてみたい。なお、この報告は、全身臓器の一般病変につき主として述べ、次の演題で寿命の問題と自然発生腫瘍につき検索の結果を報告する。

1、材料および方法

材料と方法については昨年度に詳しく述べたので、今回はその概略を以下に記す。動物は、Wistar/Slc および F344/DuCrj 両系の SPF ラットで、自由摂取群両系雌雄各 90 匹と制限食餌 (7.5g/日) 群雄各 90 匹の 6 群より成る。飼育は Semi-SPF 条件下で行われ、検索は原則的には死亡後になされたが、死期の迫ったことが明らかな場合にはエーテル麻酔下にしゃ血死せしめ剖検した。早期死亡例と死後変化の著しい例を除き全身諸臓器ことに腫瘍については病理組織学的検索を行った。

2、結 果

1) 体 重：表 1 に F344 雌雄ラットの平均体重の推移を示した。雄では生後 100 週前後を境いに体重減少が目立ってくるが、雌は緩やかな減少に留まり両者の体重差は小さくなる。これは Wistar でも全く同様である。

2) 老衰死：ヒトと同様ラットに老衰死があるか否か問題であるが、それに近い状態が観察された。そのようなラットでは顔に著明な浮腫が現われ、剖検すると胸水、腹水、心嚢水の貯留があり、しばしば左心房に血栓の形成をみる。しかし、その他には死因となるべき炎症や腫瘍等の病変を認めず萎

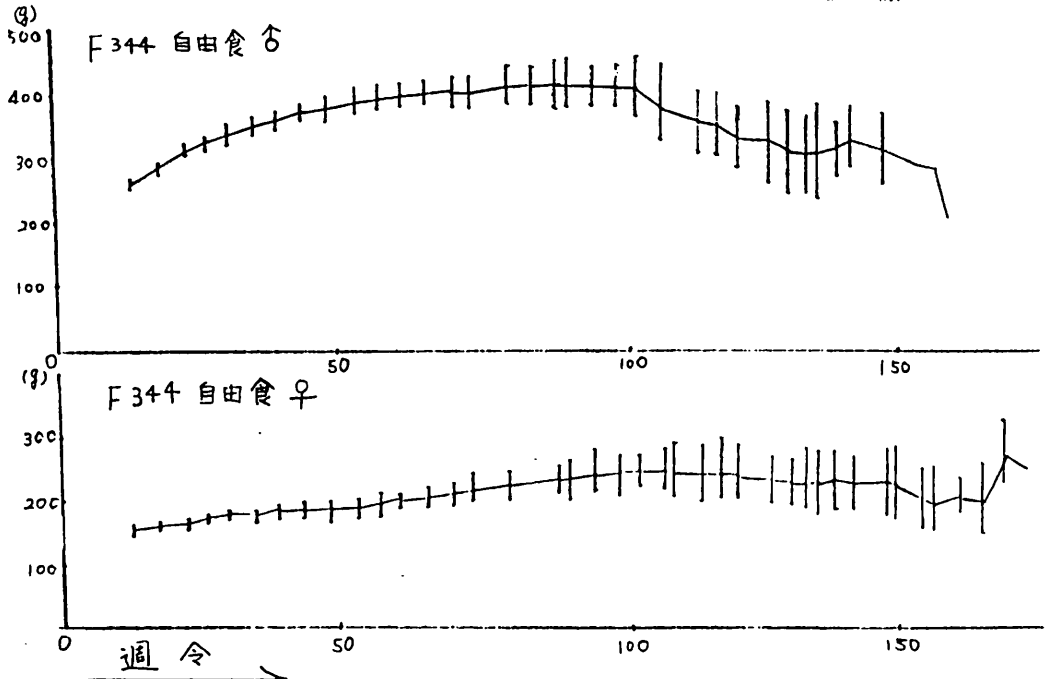
縮のみが目立つのが特徴である。

3) 組織所見：前回、前々回に述べたように通常飼育群にみられる加齢に伴い増強を示す顕著な病変として、心筋の線維化、雄肝の胆管増殖と胆管線維症、雌肝の好塩基性細胞巣状増殖、腎系球体壁、Bowmann 嚢等の肥厚、尿細管上皮細胞質への褐色果粒沈着、著明な尿細管内硝子円柱貯留等があげられるが、これら変化は今回の検索でも確認された。これに対し、制限食餌群では心筋線維化と尿細管上皮の褐色果粒沈着については普通食餌群との間に明らかな差を認め難く、一方肝の胆管病変は全く認められず、腎系球体、Bowmann 嚢の肥厚性病変、硝子円柱形成は著しく軽微となった。また今回認められた所見として肺動脈壁の石灰化、胃の腺上皮の多発性びらん、左心耳の血栓形成があげられる。これらは食餌の投与形成にかかわりなく出現した。

### 3、考察

病変の中に食餌制限の影響を受けないものと受けるものが見出された。前者は、その発生機序が明らかでないこともあり慎重を要するが、加齢と結びついた病変とみなすか、少くとも後者とは発生機序を異にする変化と考えられる。一方、後者の肝、腎の変化は食餌制限で著明な改善を示したことよりみて、おそらく飽食に伴う臓器への過剰代謝負荷に起因するとの推測が可能と思われ、真の加齢変化とは区別されるべきもののように思われた。

図 1 F344 ラット 体重曲線



Wistar および F-344 ラットの寿命と形態所見 — 通常および制限食餌における観察 —

(3) 自然発生腫瘍の頻度と年齢分布

井上 達<sup>\*</sup>, 蟹沢成好<sup>\*\*\*</sup>, 倉本和直<sup>\*</sup>, 太田邦夫<sup>\*</sup>

\* 東京都老人総合研究所

\*\* 横浜市立大学医学部病理学教室

LIFE SPANS AND MORPHOLOGICAL FINDINGS OF WISTAR AND F-344 RATS BRED WITH STANDARD OR RESTRICTED FEEDING

(3) Longevity and incidence of spontaneous tumors

Tohru Inoue<sup>\*</sup>, Masayoshi Kanisawa<sup>\*\*</sup>, Kazunao Kuramoto<sup>\*</sup>, and Kunio Oota<sup>\*</sup>

\* Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

\*\* Yokohama City University School of Medicine, Pathology Dept.

一昨年以來、本大会において我々はラット飼育に関する基礎的標準データを集積する一環として、飼育寿命と形態所見の面から一連の検索結果を報告してきた。今回はこれまで行ってきたWistar およびF-344ラットの通常および食餌制限飼育下での自然死と自然発生腫瘍の経時的年齢分布の観察がF-344系食餌制限飼育群の10%余りを残すのみとなり、他のすべての実験が終了したので、これらについてのこれまでの総括的報告を行う。

自然発生腫瘍を除く加齢ラットの臓器、組織所見の詳細については前演題にて別に述べる。

【材料と方法】

材料と方法については、昨年度第5回大会抄録に述べた通りであり、また前演題にも略述されているので省略する。

尚、実験群はWistar およびF-344の両系について、通常飼料飼育の雌、雄および食餌制限飼育の雄の3群ずつ計6群からなるが、組織学的検索を充分行ない得なかったWistar系雌の通常飼育群の腫瘍関係のデータを割愛した。

【結果】

1) 寿命曲線 図1にWistarおよびF-344の生存率曲線を示した。両系とも雄は雌より寿命が短かく、一方食餌制限群で対照の自由摂食群に対して顕著な延命効果が認められた。主な基準死亡率に到達した日数を示した表1に明らかな通り、食餌制限群では50%死亡点のみならず、75%死亡点および最長寿命についても延長し、Wistar, F-344それぞれで平均23および24%の延長を見た。

日齢別死亡数の分布を観察すると、F-344についてはいずれの群も正規型と考えられる分布型を示し、このモードより得られる平均( $\mu$ )は50%死亡点とほぼ一致した。Wistar系については正規型の複合型が示唆された。

Gompertz 表現による1日当りの死亡率を各群について求めると、Wistar系では片対数尺上で、相関係数0.93~0.96の直線関係を示したが、F-344では死亡分布の正規性とあいまって直線をなさず年を経るに従って緩やかな勾配へと変化した。それぞれを強いて直線回帰した際の勾配は各群で有

意に異なり、食餌制限群での勾配は両系とも最も小さかった。

2) 自然発生腫瘍 各群より得られた主な腫瘍の発生頻度を表2に示した。既に知られている通り両系とも高頻度の内分泌器官由来の腫瘍ならびに皮下軟部組織腫瘍および白血病を生じた。とくに睪丸の腫瘍については両系とも極めて高頻度に発症し、組織学的対象となる比較的小型のものを含めると精上皮腫および間質細胞由来の腫瘍を合わせた頻度は、通常飼料飼育群では8~9割にも達した。またこれら内分泌器官由来腫瘍相互、更に、皮下軟部腫瘍や白血病などは、しばしば合併して発症し腫瘍が数ヶ所に及ぶことも稀でなかった。食餌制限飼育群での腫瘍発生頻度は、対照より低い傾向が認められた。更に各種腫瘍の大きさにおいて全般的に小型化の傾向を示した。睪丸腫瘍などでは、両側発生の頻度が減少し、片側性小型化の傾向が顕著であった。

腫瘍発生の日齢分布をおもな腫瘍について食餌制限群と対照とで比較すると、食餌制限群では腫瘍発生のピークが、同群の寿命の延長とあたかも平行して遅延していることが明らかとなった。

尚、食餌制限群には、この群の長命化と関連してその晩期に発生する性質をもつものと推測される若干の種類の腫瘍(例えば前胃乳頭腫)がほぼ対照群の死後に発症した。

【考 按】

発生した腫瘍のうち死因に直結したと考えられるものと、随伴腫瘍とに区別し、寿命決定要因と寿命曲線の変化などを考察する。

本研究にあたって長期技術面で御協力いただいた東京都老人総合研究所基礎病理部・久保幸穂、森泉栄子、宇津山正典の各氏に深謝いたします。

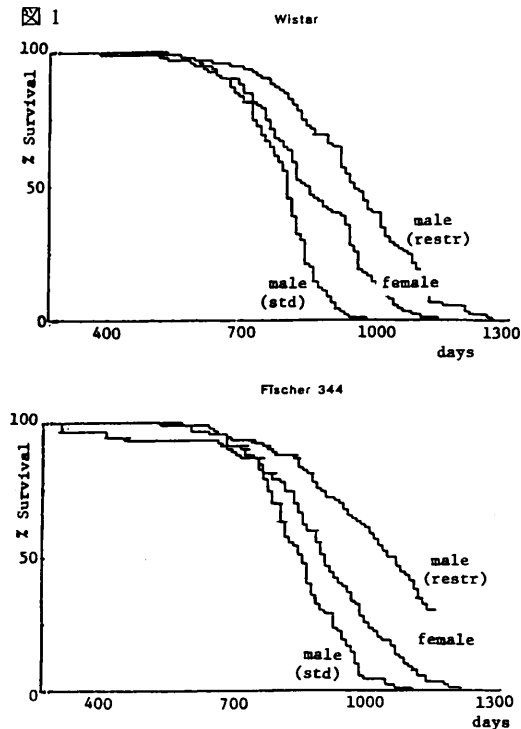


Table 1. MORTALITIES OF WISTAR AND F-344 RATS(days)

Mortality (Z)	Wistar			F-344		
	male (std)	male (restr)	female	male (std)	male (restr)	female
25	728	836	758	778	905	818
50	804	956	848	853	1049	901
75	846	1089	962	927	1179	1005
100	979	1262	1147	1113	1490*	1211

\* Expectancy based on the gaussian probability probit.

Table 2. TUMOR INCIDENCE IN WISTAR AND F-344 RATS (Z)

Effective No. of Rats Examined	Wistar		F-344		
	male (std)	male (restr)	male (std)	male (restr)	female
Pituitary gl.	18.4	7.8	21.1	15.0	43.5
Thyroid gl.	2.0	1.6	15.8	8.3	4.8
Adrenal gl.	8.2	7.8	10.5	11.7	9.7
Testicular gl.	83.7	43.8	93.0	55.0	(—)
Prostate gl.	4.1	4.7	3.5	8.3	(—)
Uterine&Ovarial.	(—)	(—)	(—)	(—)	11.3
Mammary gl.	(2.0)	(0)	(3.5)	(1.7)	16.1
Subcut.&softpart	18.4	3.1	22.8	8.3	11.3
Hemopoietic	30.6	28.1	36.8	33.3	32.3
Brain	0	3.1	1.8	1.7	0
Lung	0	0	3.5	3.3	0
Forestomach	0	9.4	0	10.0	1.6
Liver	8.2	6.3	5.3	1.7	4.8
Others*	6.1	1.6	3.5	10.0	4.8

\*Salivary gl. pancreatic, bone tissue, etc.

REFERENCES: Yu, B.P. et al. Life span study of SPF Fischer 344 male rats fed *Ad Libitum* or restricted diets: Longevity, growth, lean body mass and disease. *J. Gerontol.* 37:130-141, 1982. J.D. Burek: Pathology of Aging Rats, CRC Press, 1978.

## ミトコンドリアの超微形態像と機能についての年齢的検討

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

## Age changes in structure and function of the mitochondria

Tsuneko SATO - Department of Pathology and Clinical Laboratories,  
 Aichi Cancer Center Hospital, Nagoya  
 Hisashi TAUCHI - Department of Pathology, Aichi Medical University,  
 Aichi

組織、細胞の老性変化研究の一環として、実質細胞のミトコンドリア（以下ミトと略）の加齢変化について、ヒト、実験動物の肝細胞を中心に検討を進めてきた。昨年からのラット腎尿細管主部上皮細胞ミトの検索とともに、数年前報告したコーチゾン投与後マウス肝細胞ミトの成績にクリステの微計測成績を追加し、クリステの消長とミトの機能との関連に及ぼす加齢の影響を検討した。

(A) 昨年の本学会で生後60日、12か月、25～29か月の無処置近交系ドンリュウ雄ラットの腎皮質尿細管主部上皮細胞ミトの年齢差について超微計測的検討成績を報告した。その後12か月の10例、18か月の7例を加え、腎重量、最大前額面における皮質面積、主部尿細管数、尿細管主部上皮細胞数とも併せ超微計測成績を検討した。

電顕像でみられる細胞あたりのミトの断面数は12か月をピークとし、25～29か月では有意な減少がみられた。またミト断面の細胞あたりの総面積、面積比始めミト周の細胞あたりの全長、細胞の一定面積内の長さともに25～29か月の老群に有意な減少がみられた。細胞あたりのクリステの全長は、18か月で有意に短く、周の全長との和は12か月にピークがみられ、他の3群との間に有意差をみた。ミトの一定面積内のクリステの長さは何れの大きさの断面のミトにおいても同様の傾向で、小～中型と大型のミトの間で傾向を異にした肝細胞の場合とやゝ趣きを異にし、主部尿細管上皮細胞ミトが一連のもので、電顕像では分岐の断面をみているに過ぎないという点が示唆された。何れにしてもすべての大きさのミトの断面で、平均して18か月でクリステの全長は最も短く疎で、25～29か月の老群で最も長く密であった。またミトの一定面積内のクリステと周の全長も18か月群で他3群の何れに比しても有意に短かった。



腎重量，皮質面積，主部尿細管数，上皮細胞数，すべて成熟群に比して減少のみられる25～29か月の老群では，ミトの断面数も総面積も減少し，ひとりクリステのみが最も密な配列を示し，ミトの量的減少に対する機能代償の形態表現と考えた。重量，皮質面積，主部尿細管数，上皮細胞数すべてがピークにある18か月の群では，ミトの断面数，総面積，周の全長，何れも細胞あたりで最大値を示す一方，ミトの一定面積あたりのクリステの全長は最も短く疎であったのと好対照であった。

(B)生後70日(若年群)，12か月(中年群)および2年(老年群)のSMA雌マウス合計103匹を用い，醋酸コーチゾン1mg/25g体重を水性懸濁注射液として6日間連続筋注射し，処置終了後の2日，9日，16日群と無処置の肝組織についてすでに行ったミトの超微計測成績にクリステの計測成績などを追加検討した。すなわち各実験例の肝組織の14,000倍拡大電顕写真を用い，各例30個のミトについて，面積，周の長さ，クリステの全長を計測した(画像解析装置KONTRON MOP AMO-1を使用)。

各例におけるミトの面積，周の長さの平均，各群における平均値を算出するとともに，クリステについて各群ごとにまとめ，ミトの面積を0.21～0.40 $\mu m^2$ ，0.41～0.60 $\mu m^2$ ...と0.2 $\mu m^2$ の間隔でクラス分けを行い，各面積群の中央値に相当するミト内クリステの平均全長を求めた。また各群における検索ミトのクリステの全長と細胞あたりのミト数から，細胞あたりならびに一定面積あたりの計算上のクリステの全長を求めた。クリステと周の長さの和についても同様に分け，集計を行った。

すでに報告したように，肝細胞・核の大きさは，老>中年>若年の順で，処置後2日(以下2日と略)で細胞の大きさは老，中年群で減少する。肝細胞数は中年群に多く，若，老年群に少なく，2日で老年群にのみ顕著な減数がみられ，中年群ではほとんど変わらない。細胞あたりのミト数は3群とも2日で減少し，のち回復するが，この減数は中年群に最も軽い。ミト周の長さは，2日において，若，老年群で顕著に増加するが，中年群ではほとんど変らなかった。

今回の追加検討で，ミトの面積は，ミト減数のつよい2日で各群とも増加するが，老年群に最も強く，中年群では軽かった。各々のミトの各面積毎のクリステの消長は，一般に中年群で最も疎，老年群で密であった。ミトの平均面積が増加する2日において，中年群ではクリステの密度は大差なく，老年群では一般にクリステの密度の増加の傾向がみられ，若年群では何れの大きさのミトでもクリステの顕著な密度増加がみられた。細胞あたり，ならびに一定面積あたりの計算上のクリステの全長は，クリステの密度が増加しているにも拘らず，ミトの減数の顕著な2日ではすべての群で減少という結果になり，その減少はクリステの密度の疎な中年群において最も強くみられた。電顕酵素細胞化学的検索により，この密度の増したクリステには，cytochrome-c-oxidase活性があきらかにみられているが，光顕レベルでみた肝細胞における酵素組織化学的検索成績では，SDH活性は2日で軽度な減衰をみており，これらの所見は，クリステの超微計測成績を裏づける。

何れにしても，ミトの減数に伴うクリステの増加が老群に顕著で，肝細胞数，ミト数ともに多い中年群では，ミト減数に対してクリステの増加が顕著でない点が見られ，老群に比して予備力に富んでいることが裏づけられた。このことは静止期のラット腎皮質尿細管上皮細胞ミトのクリステの動向における18か月群と25～29か月の老群との比較成績と軌を一にしており，クリステの消長がミト機能の重要な形態表現の一つであることを物語っている。

## 老年らいにみられる唾液腺の変化

佐々木 紀 典 国立多摩研究所

Changes in the Tissue of Salivary Gland in Aged  
Leprosy Patients

Norisuke Sasaki National Institute for Leprosy Research

現在わが国のらいの在園患者の平均年齢は60才以上と高令化を示し、死亡年齢も60才、70才代に高いピークを示している。らい病型のうちらい菌の細胞内増殖が旺んでらい腫を形成し、細胞性免疫が低いとされるらい腫型(L型)の男と、細胞性免疫がL型よりも高く、一方菌の増殖が抑制されている類結核型(T型)の男女ならびにL型女と死亡年齢平均値を過去7年間にわたる推移で比較すると、L型男は他に比し明らかに低く、それはらい感染の増悪と免疫機能の低下によることが示唆された。現在菌の増殖を示している例は少なく、再燃例がほぼ10%位あるに過ぎない。らいはよく吸収され終末期的様相を呈しているが、かつてはらい菌の侵襲により組織障害を引き起こし、それが機能障害として長く残存していることに問題があり、これが老化と深く関連して死亡を早める一因をなしているように思われる。

唾液腺については国の内外を問わず、らいでは余り関心が払われていなかったが、われわれは緒方の間葉系異栄養の問題から検索を進めており、症例の集積を重ね、現在らい菌染色に再現性の高い過ヨ-素酸前処理パラロザニン法を用いて漸やくその全貌を明らかにし得た。今回65才以上の老令者剖検例の唾液腺の変化について老化との関連の上で検索したので報告する。

T型例における変化は老化との関連をみる上で適しており、L型例はらい菌の侵襲に

より生じた病変（耳下腺内のリンパ節および神経を主体としている）が老化を一層加速しているように思われ老化と炎症との関係を考慮して検索を進める必要がある。

形態学的に腺組織、導管の変化は腺細胞の萎縮、細胞内顆粒出現、導管上皮剥離、拡張、蛇行などの諸変化を示し、高度に達すると腺および導管は破壊消失し脂肪変性へと進行する例が多く、これに加えて血管病変、（血管内膜肥厚閉塞性動脈炎など）間質の軽度増殖を来たすが、一般に高齢者では組織脆弱性を思わせるものが多い。

以上の諸変化と老化との関係を検討した。

## ラット・マウスの下垂体-甲状腺系と老化

大岡 宏、藤田佐織、吉本恵美子  
(東京都老人総合研究所生物学部)

## PITUITARY-THYROID AXIS AND AGING IN THE RAT AND THE MOUSE

Hiroshi OOKA, Saori FUJITA and Emiko YOSHIMOTO  
(Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute  
of Gerontology)

出生後10日間に多量のチロキシンを注射することによって、甲状腺機能を低下させたウイスターラットを約100頭作り、その寿命を測定した。雄ラットの平均寿命は対照より約4カ月延長した(図1)。雌は雄より軽度ではあるが寿命の延長がみられた。甲状腺機能低下ラットの死亡率は24カ月齢までは対照と差がないが、その後死亡率が低下し、最長寿命も延長した。この出生時T4処理ラットの下垂体の変化をしらべるため、まず正常老化ラット(ウイスター、フィッシャー344)及び老化マウス(C57BL、BDF1)の下垂体TSH細胞を抗ラットTSHを用いて酵素抗体法で染色して観察した。22月齢以上のマウス下垂体前葉にはTSH細胞の異常増殖集団(Hyperplastic nodule)がみられ(図2)雌マウスではこの集団が大きくなって腫瘍化すると思われる像がみられた(図3)。このTSH産生細胞腫瘍は抗ラットLHでは染色されず、核中にTSH抗体で染色される陥入体様の構造がみられるものもある(図4)。老ラットの下垂体にも頻度は低いTSH細胞の増殖集団がみられた。26月齢以上のラット下垂体では神経葉中にTSH細胞の集団が存在する個体があることが観察された。これらの現象について、出生時T4処理ラットにおける変化を研究中である。

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。

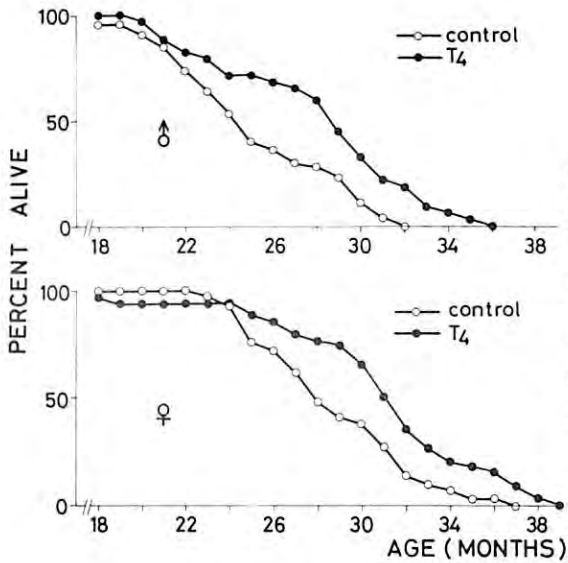


Fig. 1. (left) Survival curves of control and neonatally T<sub>4</sub>-treated Wistar rats. Numbers of rats per group were 47 (male,cont.), 34 (male,exp.), 29 (female,cont.), and 34 (female,exp.).  
 Fig. 2. (right) A hyperplastic nodule of TSH cells in an anterior lobe of the pituitary gland in a 24-month old C57BL male mouse. x 50.

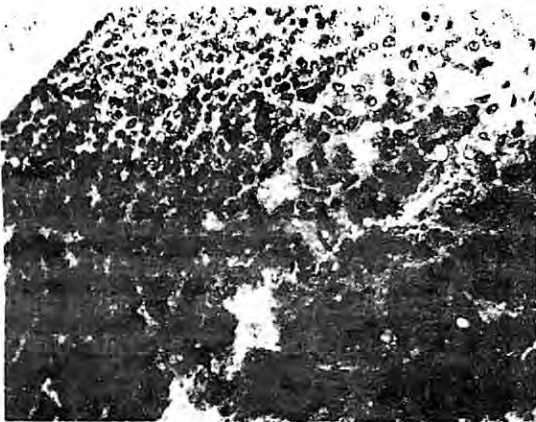


Fig. 3. (left) A thyrotropic tumor in an anterior lobe of the pituitary gland in a 24-month old C57BL female mouse. x 100.  
 Fig. 4. (right) Thyrotropic tumor cells with cytoplasmic invaginations in the nuclei. x 200.

ラットのタンパク尿症に対する食餌制限時期の影響

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

The effect of the time to start dietary restriction on proteinuria  
 in rats

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

飼料を自由摂取しているラットにおけるタンパク尿症の発現と加齢にともなうその重症化はよく知られている。しかし，離乳期より食餌制限（自由摂取群の50%相当量）を受けたラットでは，その尿中タンパク排泄量は，1200日齢までの生涯を通じて平均 $5.8 \pm 2.6$ mg/日の生理学的正常範囲内に抑えられた。ところが，離乳時よりこのような食餌制限を受けたラットは，発育遅延により体位は劣り，代謝機能の低下も示唆される。そこで本研究においては，成長期以降からの食餌制限の開始によっても尿タンパク排泄をコントロールできうるかどうかを検討した。

（方法）

Wistar系雄ラット8匹を1群とした。グループ1では，急激な成長のみられる生涯の初期80日齢までは飼料を自由摂取させ，その後50%制限を投与し，離乳時よりの食餌制限と同様の尿タンパク排泄抑制効果がみられるかどうか観察した。グループ2では，飼料の自由摂取により病的な尿タンパク排泄のみられるようになった430日齢より食餌制限を開始し，中等度に進行したタンパク尿症に対する食餌制限効果の有無を調べた。グループ3では，制限食摂取により1年以上に渡って尿タンパク排泄のみられなかったラットを自由摂食法に戻し，尿タンパク排泄が始ま

るかどうかを観察した。最後にグループ4では、80日齢より食餌制限を受け、600日齢現在タンパク尿症の発現をみないラットに、総エネルギー摂取量は50%制限群と同じだが、タンパク摂取量は自由摂取群のそれと同様になる飼料を投与し、食餌制限による尿タンパク排泄抑制効果が、エネルギー制限によるものか、又はタンパク制限によるものかを検討した。

### (結果)

自由摂食を続けた対照群の尿タンパク排泄量は、75日齢での $64 \pm 3.1$  mg/日から600日齢には $250.8 \pm 62.6$  mg/日まで加齢にともなって著増した。これに比べ80日齢から食餌制限を受けたグループ1ラットの尿タンパク排泄量は、780日齢現在まで10 mg/日以下の正常値を維持することができた。一方、430日齢まで自由摂取を続け120 mg/日の尿タンパク排泄の観察されているラットでも、食餌制限の開始とともに排泄量は減少し、食餌制限開始200日後には $20.2 \pm 12.2$  mg/日まで激減した。しかしこの時の尿タンパク電気泳動パターンは、タンパク尿症ラットのそれと類似し、正常ラットのそれとは異った。これに対して制限食摂取により430日齢現在尿タンパク排泄の認められなかったラットを自由摂取に戻した時、尿タンパク排泄は直ちに増加し始めた。最後にグループ4ラットでは、食タンパク量を増大させても尿タンパク排泄の有意の増加は観察されず、食餌制限によるタンパク尿症発症抑制効果は、主にエネルギー制限によりもたらされたものであることが示唆された。

### (まとめ)

1. 食餌制限(自由摂食群の50%相当量)によりWistar系雄ラットの加齢にともなうタンパク尿症の発現は抑制された。
2. 離乳直後からのみならず、3ヶ月齢からの開始でも同様の効果が得られた。
3. タンパク尿症ラットに対する食餌制限は尿タンパク排泄量の減少をもたらしたが、その電気泳動パターンは正常でなかった。
4. 食餌制限による尿タンパク排泄抑制効果は主にエネルギー摂取制限によるものであった。

## 食餌制限の時期とその後の体重変化 ——とくに脂肪組織について

東 北 大 農 業 学 木 村 修 一  
東 北 大 医 学 部 細 菌 辻 川 宗 男

The relationship between the period of dietary restriction and the adipose tissue cellularity

Shuichi KIMURA and Muneo TSUJIKAWA\*

Laboratory of Nutrition, Faculty of Agriculture, Tohoku University

\* Department of Bacteriology, Tohoku University School of Medicine

1) 2) Mccay Berg らの有名な実験によって、食餌制限がラットの Life span を延長させるということが示され、一般的に制限食が個体の Life span をのばすのではないかと考えられるようになった。しかしながら、制限の時期が成熟後のばあいは効果がないとか、極端に制限すれば Life span は短縮するとか実験動物の種類や age あるいはまた制限食の内容によってその効果が異なるなど、実験条件によって異なる結果がえられることも分ってきた。われわれも、これまで、制限食が無菌条件と同様に、小腸上皮細胞の Life span をのばすことを見出し、その細胞動態について検討し、報告してきた。<sup>3) 4)</sup>

今回 加会研究にしばしば用いられる食餌制限ということについて、その行われた時期が以後の体重増加にどのように関係するかを検討したので報告する。とくにラットの発育初期の食餌制限が、以後の脂肪組織の発達にいかなる影響をもつかということに焦点を絞ったものである。

### < 実験方法 >

実験動物と食餌組成：ウイスター系ラットを実験動物として用い、食餌組成はデンプン69%、カゼイン20%、大豆油5%、Harper 塩混合4%、水溶性ビタミン混合1%、脂溶性ビタミン混合1%である。

摂食方法：(1)離乳後食餌制限実験では生後3週目に離乳させ、自由摂食群 (control) と制限群 (Restrict) とに分けた。制限群には自由摂食群の摂食量の50%を与えるようにした。(2)授乳制限実験では、生れて直ちに仔を4匹だけつけた母親ラット群 (Litter size 4) と20匹つけた母親ラット群 (Litter size 20) に分け、3週間これら母親ラットの下で授乳飼育させた。3週間後はいずれの群のラットも上に述べた実験飼料を自由摂食させた。(3)母親ラットの食餌制限実験では、成熟雌ラットに雄ラットを mate させ、妊娠ラットに自由摂食させた群 (control) および、自由摂食ラット群の摂食量の40%を与えた制限食餌 (Restricted) をもうけた。

これらすべての動物は9週目および12週目に殺して、体重および組織——とくに脂肪組織——についての cellularity を検討した。



脂肪組織中の脂肪細胞の細胞数とサイズの測定法について：Hirsch<sup>5)</sup>の方法で脂肪組織をとり、コラゲナーゼで脂肪細胞を遊離させ、それらの直径を測定、また脂肪量を定量し、Renkonen<sup>6)</sup>の方法で、脂肪細胞の数とサイズを測定した。

### ＜結果と考察＞

#### (1) 離乳期における食餌制限の影響

離乳期に食餌制限したラットはその期間中体重増加は低く、食餌制限の最後すなわち3週目では、自由摂食のControlの約半分の体重しかなかったが、食餌制限が解除されて自由食になると直ちに体重増加がはじまり、Controlに追いつく傾向がみられた。そして9週目、12週目における脂肪組織重量およびその脂肪の数とサイズをみると、制限群でやや小さい傾向がみられたが統計的に有意の差はみられなかった。

#### (2) 授乳期の食餌制限の影響

授乳期における制限は1母獣あたり乳仔数を20匹にすることで行われたが、このばあい授乳期3週目における体重には大きな差がみられた。この差は9週目、12週目になっていぜんとして認められた(Fig)。副睪丸脂肪組織の重さは12週後においても1.8倍と有意にたかく、これはその脂肪細胞数にもサイズの大きさにも明らかであった(Table)。

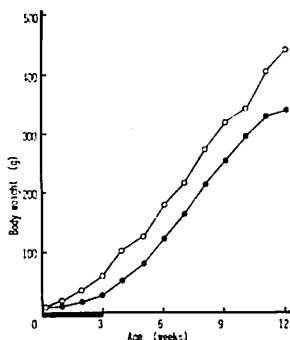
#### (3) 妊娠母体の食餌制限の出生仔への影響

妊娠中の母獣に対する食餌制限は、出生にたいして複雑な影響をもち、一部には脂肪仔の吸収があり、また出生しても授乳不能のものもあった。出生した幼動物の体重もほぼControlと同じ位のものとい低いものがあり、これもまちまちの成績がみられた。体重の低いものについてみると副睪丸脂肪およびその脂肪細胞の数をサイズの上でも劣る傾向がみられた。

これらの結果から、脂肪細胞の数やサイズの大きさを決定する上で初期の摂食量が大きく関与していることが明らかになった。

### 文 献

- 1) McCay, C.M., et al., Arch. Biochem. 2 469 (1943)
- 2) Berg, B., and H.S. Simms, J. Nutrition 71 242, 255 (1960)
- 3) Koga, A., and S. Kimura, J. Nutr. Sci. Vitaminol., 24 323 (1978) 26 33 (1980)
- 4) Kimura, S., et al., The 2nd Radiation Biology Center International Symposium "Perspective in the Modification of the Rate of Aging" (Kyoto) Abstract p.32 (1978)
- 5) Hirsch, J., and Gallian E., J. Lipid Res. 9 110 (1968)
- 6) Renkonen, O., Biochem. Biophys. Acta. 54 361 (1961)



Effect of litter size on body weight of rats. ○, 4 siblings; ●, 20 siblings.

Effect of litter size on epididymal adipose tissue weight and cellularity.

Age (weeks)	Litter size	Pad weight (g)	Cell volume (μg lipid/cell)	Cell number (× 10 <sup>6</sup> )
9	4 (6)	2.21 ± 0.20	0.2459 ± 0.0094	7.53 ± 0.54
	20 (8)	1.10 ± 0.07*	0.1626 ± 0.0048*	5.47 ± 0.52*
12	4 (8)	3.47 ± 0.21	0.3129 ± 0.0109	9.46 ± 0.37
	20 (7)	1.93 ± 0.09*	0.2553 ± 0.0097*	6.52 ± 0.21*

Values represent means ± SEM. Significantly different from litter size 4\* ( $p < 0.01$ ). The number of animals is indicated in parenthesis.

ラット及びヒト腸内細菌叢の加齢による変動— streptococciを中心として—

河合康雄, 末柄信夫, 矢沢一良  
(アドバンス医科研)

Age-related changes of intestinal microflora in rats and humans  
with special references to streptococci

Yasuo Kawai, Nobuo Suegara, and Kazunaga Yazawa  
( Institute of Medical Science, Advance R&D Company )

〔目的〕

腸内細菌叢は感染症、消化器及び肝臓疾患、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する一要因と考えられる。従って、腸内細菌叢の宿主における意義を明らかにすることは老化の問題を考える上で重要と思われる。今回は、ラットとヒトの腸内細菌叢の加齢にともなう変動を比較し、特に乳酸球菌 streptococci (str) を中心に定着性と加齢の関係を species レベルで調べた結果を報告する。

〔方法〕

ラット：Fischer 344/Yit (雄) 通常ラットを用いた。0日令は生後1時間以内にと殺し、10日令までは胃とそれ以外の腸管(小腸・大腸)に分け、常法により菌叢を検索した。

ヒト：新生児20名(生後から5～6日)、幼児25名(2～6才)及び成人26名(25～51才)の新鮮糞便の菌叢を検索した。

streptococci の分離：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用いた。出現したコロニー数を形態ごとに分け、すべての形態のコロニーを比例配分的に分離した。

streptococci の同定：分離株を0.1%メチレンブルー還元性、pH9.6での増殖性、NH<sub>3</sub>生産性及び胆汁酸耐性を調べ、4群に分けた。各群をそれぞれ前報<sup>1)</sup>のごとき性状検査により species を同定した。

〔結果〕

1) ラットの腸内細菌叢の定着：出生直後の消化管からは細菌が全く検出されなかった。生後1日目に胃(10<sup>6</sup>/g)、小腸及び大腸(10<sup>5</sup>/g)で細菌が検出され、2日目以後は両部位とも lactobacilli (lact) が最優勢であった。21日目には胃で enterobacteriaceae (enterobac)、

小腸及び大腸で enterobac と streptococci (str) が  $10^3 \sim 10^6/g$  で定着した。嫌気性菌である bacteroides は 14 日目になってはじめて検出され盲腸でのレベルが高かった。離乳期 (3 週令) になると胃で enterobac、盲腸で enterobac、str、staphylococci が高く、各部位とも lact が最優勢であった。回腸では str の菌数レベルが加令につれて高くなった。40 週令では十二指腸での lact、str の増加が特徴的であった。str の species レベルの分布を調べると、8 週令では *S. faecalis* しか検出されなかったが、40 週令では他に *S. faecium* 及び *S. mitis* が、80 週令では *S. faecalis* と *S. faecium* が検出された。

2) ヒトの str の定着：str の定着は生後 1 日目から始まった。生後 5～6 日までの str の菌数レベルの推移には個体差がみられ、4 タイプに分けられた。幼児及び成人の菌数レベルは  $10^8/g$  と比較的高かった。

species レベルで検索してみると、ヒト糞便からは *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinus*, *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. MG-intermedius* 及び *S. sanguis II* の 10 species が分離された。新生児 (0～6 日令) では *S. faecalis* と *S. mitis* が高い検出率を示した。乳児 (30～90 日令) では *S. avium* の検出率が高いことが特徴的であり、*S. faecalis* と *S. faecium* も高かった。幼児 (2～6 才) では *S. bovis* と *S. avium* の検出率が最も高く、次いで *S. faecalis* と *S. faecium* が高かった。成人 (25～51 才) では、*S. salivarius* と *S. faecium* が高頻度に分離され、*S. faecalis* も比較的高かった。幼児に特徴的な *S. bovis* が低下し、特に *S. avium* は 1 株も分離されなかった。逆に *S. salivarius*, *S. mitis*, *S. MG-intermedius* などの viridans group が高頻度であった。

#### 〔考察〕

ラットの腸内細菌叢においては、出生直後から細菌の定着がはじまり、lact を主にいわゆる通性嫌気性菌群がはじめて定着し、次いで bacteroides などの偏性嫌気性菌群が盲腸以下の消化管に定着した。一般に離乳期までに嫌気性菌を含む菌叢形成が完了すると言われているが、本実験でも同様の結果であった。しかし、species レベルで検索すると加令とともにその分布が変化した。すなわち、str に関しては、分離される species が多くなり、腸内細菌叢が加令にともない複雑になることを示唆している。このことはヒトにおいても同様と考えられるが、ヒト糞便での str の species を調べるとラットにおけるよりもはるかに複雑であり、年齢層によって著しく異なる分布を示すことが明らかとなった。すなわち、幼児型 (*S. bovis*, *S. avium*)、成人型 (*S. salivarius*, *S. mitis*, *S. MG-intermedius*) 及び普偏型 (*S. faecalis*, *S. faecium*) に分けることができた。このように、腸内細菌叢の加令にともなう変化を適格に把握することは、その変化がいかにして老化に関わるのかを考える上で重要であると思われる。

#### 〔文献〕

- 1) Watanabe, T. et al (1981), Microbiol. Immunol. 25:257-269.

## 末梢神経ミエリン蛋白の加齢に伴う変化

内田洋子, 朝長正徳 (東京都老人総合研究所臨床病理学部)

Age-related changes of myelin-associated proteins in the rat peripheral nervous system

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

末梢神経の老化に伴う変化として、有髄神経線維数の減少が知られており、その原因の一つに髄鞘(ミエリン膜)の変化が考えられている。

末梢神経のミエリン膜には、P1 (18K), P2 (14K) の塩基性蛋白や、P0(28K), PASII(14K)の糖蛋白、X(21K), Y(25K)蛋白と、28K 以上の高分子量蛋白が存在すると言われている。これらの蛋白のうち、P0 以下の低分子量の蛋白は、ミエリン膜自体に分布すると考えられ、脱髄や老化に伴った変化についても、数多く報告されている。しかし、高分子量蛋白に着目したものはほとんどなく、その分布、役割についても不明である。今回我々は、末梢神経ミエリン膜の高分子量蛋白の加齢変化について検討したので報告する。

## (方法)

ミエリン膜の調製: Fischer 系の雄ラット (6, 12~14, 18~20, 24~26 カ月令) の坐骨神経と spinal root を取り出し、Uyemura ら(1972)の方法により調製した。

SDS- ポリアクリルアミド電気泳動: 試料を 8M urea-1%SDSで可溶化し、Laemmli (1970)の方法に準じ、5~15% linear gradient ポリアクリルアミドを用いて行なった。

二次元電気泳動: alkaline-urea solution (Horstら, 1980)で試料を可溶化し、O'Farrell (1975)の方法を用い、銀染色 (Switzer, 1979)または fluorographyを行なった。

頸部交感神経節 (SCG)の蛋白ラベル: 新生ラットのSCGを、90%MEM-10%FCS-6 mg/ml glucose-10

ng/ml 2.5S NGF-25 mg/ml rat brain extractで培養し、培養4日目より3日間、 $^{14}\text{C}$ -glycineを取りこませた。

#### (結果と考察)

調製したミエリン膜を、エーテル-エタノールで脱脂し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で解析した結果、加齢に伴って、P0, P1蛋白の減少とともに、190K蛋白の減少と105K蛋白の増加が認められた。Mickoら (1978)の方法に従い、myelin-free axonとミエリンとに分画すると、105K蛋白は最初の0.85M sucrose homogenate中にも含まれたが、大部分はミエリン分画に存在し、axon分画には認められなかった。また、この蛋白は、末梢神経のurea-SDS homogenate中にも認められることから、ミエリン調製の際の蛋白変性によるものではないと思われる。一方、190K蛋白は、axon分画中のneurofilament蛋白の一つである200K蛋白と分子量が近いため、neurofilament蛋白からのcontaminationが疑われるが、二次元電気泳動の結果、190K蛋白は pI 7.3~7.8、200K蛋白は pI 5.9~6.2であり、両者は異なる蛋白であった。さらに、 $^{14}\text{C}$ -glycineでラベルされたSCG (無髄神経のみから構成されている)を、ラベルされていない若令ラットの spinal rootと混ぜてミエリンを調製したが、ミエリン蛋白中にほとんどラベルは認められなかった。また、ラベルされたSCG蛋白を二次元電気泳動し、fluorographyを行なったが、分子量190Kで pI 7.3~7.8の位置にスポットは見られなかった。

以上のことから、190K蛋白はaxonや axolemmaからの contaminationではなく、ミエリン膜自体に分布していることが示唆され、また、105K蛋白もaxon分画には存在しないことから同様に考えられ、これらの蛋白が、老化過程におけるミエリン膜の変性に何らかの関わりを持っていると思われる。

加齢に伴う中枢神経膜系の変化に関する研究 II.

マウスミエリンへの脂質の取り込み速度

安藤進・小野百合子・田中康一

(獣) 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 central nervous membrane systems  
II. Incorporation rates of lipids into mouse myelin

Susumu ANDO, Yuriko ONO and Yasukazu TANAKA

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, 35-2 Sakaecho,  
Itabashiku, Tokyo-173

It has been believed that myelin membranes are rapidly formed in an early stage of development and then turn to be metabolically inactive in adult ages. Such rigid myelin membranes, however, are deemed to undergo slow turnover throughout the life of an animal. We reported in the last Meeting that turnover of cholesterol was very slow but definitely occurred in myelin of the adult mouse brain(1).

Myelin is the most lipid-rich biomembranes, and it contains an abundance of galactocerebroside as a specific component as well as cholesterol and phospholipids. In this study, we have examined the incorporation rates of these lipids into myelin of mice of various ages to infer age-related changes in myelin turnover.

In order to accurately measure such a slow turnover rate as in myelin, contributions of fractions derived by reuse of tracers have to be excluded. We have developed a method using deuterium labeling and mass fragmentography which provides a determination

of primarily synthesized molecules to be separated from the fractions formed by recycling of tracers(2). This method has some advantages superior to methods using radio isotopes.

Three age-groups of C57BL/6 mice, 36, 197 and 471 day-old, were used. Thirty mice of each group were given 30% deuterium oxide as drinking water. Three from each group were killed at intervals of two weeks. Myelin was isolated and purified from the cerebellum by the method of Norton and Poduslo(3). Total lipids were extracted from the myelin fraction, and applied to a DEAE-Sephadex column. Aliquots of the neutral lipids obtained were applied to a Nanoplate(E.Merck) to be separated into individual lipids. The amounts and molar distribution patterns of deuterated cholesterol, fatty acids of phosphatidylcholine and galactose moiety of cerebroside were determined by mass fragmentography.

Replacement rates of myelin lipid pools with newly formed molecules were employed to represent turnover rates of the myelin lipids. Cerebroside was still appreciably incorporated just after active myelination period(at 36 days of age) with a replacement rate of 20% per 10 days. The incorporation rate was revealed to be decreased with advancing age. On the other hand, the incorporation of phosphatidylcholine was supposed to take place with a constant rate irrespective of aging.

#### References

1. Ando, S., Ono, Y. and Tanaka, Y. (1981) *Biomed. Geront.* 5, 60-61
2. Tanaka, Y. and Ando, S. (1981) *Biomed. Res.*, 2, 404-412
3. Norton, W.T. and Poduslo, S.E. (1973) *J. Neurochem.*, 21, 749-757

## 加齢に伴う末梢無髄神経線維の機能的変化

佐藤 優子, 中村はる江, 伊藤 憲一, 佐藤 昭夫  
(東京都老人研, 基礎第2生理)

Physiological properties of peripheral unmyelinated nerve fibers in adult and old rats

Yuko Sato, Harue Nakamura, Kenichi Ito, Akio Sato  
(Department of Physiology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

### 目 的

末梢神経線維は軸索がミエリンで囲まれた有髄神経線維とミエリンを持たない無髄神経線維とに分類される。有髄神経線維の加齢に伴う機能的変化に関しては、最大伝導速度を測定した多くの報告がなされている(Norrisら, 1953)(Burkeら, 1974)。

我々は末梢神経線維のうち、特に研究の進んでいない無髄神経線維を対象として、その機能的加齢変化について、最大伝導速度、 $Q_{10}$ (温度係数)及び不応期を指標として調べた。

### 方 法

実験には若令群として生後100ないし150日、老令群としては生後850ないし970日のウイスター系雄ラットを用いた。皮膚神経としてN. suralis(腓腹皮神経)、筋神経としてN. gastrocnemius and soleus(腓腹筋及びヒラメ筋を支配する筋神経)、副交感神経としてN. vagus(迷走神経)、交感神経としてN. splanchnicus major(大内臓神経)を各々生体から摘出し、流動パラフィンの中で以下の測定を行った。

- 1) 伝導速度; 摘出した神経を電極にのせ、一方の端に電気刺激を加え、他方の端から導出した活動電位の波形を増巾器、加算平均装置に通した後、XYレコーダーに記録した。活動電位の潜時と神経の刺激から記録までの電極間距離から無髄神経線維の伝導速度を算出した。
- 2)  $Q_{10}$ ; 同様な方法を用い、37℃及び27℃の環境温度における活動電位の潜時を各々測定し、両者における伝導速度の変化率、すなわち $Q_{10}$ を算出した。
- 3) 不応期; 前置刺激と条件刺激の間隔を漸次せばめ、条件刺激に対する活動電位が全くみられなくなる刺激間隔、即ち絶対不応期を測定した。

なお、1), 3)における環境温度は $38 \pm 0.2^\circ\text{C}$ に保った。

若令群と老令群との比較検討には、Student t testを用いた。



## 結果

1) 伝導速度 各々7例の若令及び老令ラットを用いた。

N. suralis の無髄神経線維の伝導速度は若令群及び老令群で各々  $1.3 \pm 0.1$  m/秒,  $1.2 \pm 0.2$  m/秒 (mean  $\pm$  S.D) となった。同様に N. gastrocnemius and soleus の場合各々  $1.2 \pm 0.1$  m/秒,  $1.1 \pm 0.1$  m/秒, N. vagus の場合  $1.6 \pm 0.2$  m/秒,  $1.5 \pm 0.1$  m/秒, N. splanchnicus の場合  $1.6 \pm 0.2$  m/秒,  $1.5 \pm 0.2$  m/秒 となった。いずれの場合にも若令群と老令群との間に統計的に有意な差を認めることができなかった ( $P > 0.05$ )。

2)  $Q_{10}$ ; 各1例ずつの若令及び老令ラットで比較した。

環境温を  $37^{\circ}\text{C}$  から  $27^{\circ}\text{C}$  に下げたときに得られる伝導速度を N. vagus を用いて比較した。

若令群では  $37^{\circ}\text{C}$  で  $1.5$  m/秒,  $27^{\circ}\text{C}$  で  $0.8$  m/秒 となり  $Q_{10}$  は  $1.9$  となった。老令ラットでもほぼ同様の結果が得られた。但し未だ一例のみの結果であり、今後例数を重ねる必要がある。

3) 不応期; 各6例ずつの若令及び老令ラットで比較した。

N. vagus の場合、絶対不応期は若令群で  $1.7 \pm 0.6$  ms, 老令群で  $1.5 \pm 0.4$  ms となった。

N. suralis では各々  $2.7 \pm 0.8$  ms,  $3.2 \pm 0.8$  ms となった。いずれの場合にも統計的に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。

## 結論

無髄神経線維の最大伝導速度および絶対不応期を若令及び老令ラットで比較した。いずれの場合にも両者間に統計的に有意な差を認めることができなかった。今回の結果から、末梢神経の無髄神経線維の機能は生体の他の機能に較べ、加齢による影響が非常に少ない例の一つであると結論される。

## 培養老化マウス神経細胞の電気生理学的性質

福田 潤, 山口和彦  
 東京大学医学部第一生理学教室

Electrophysiological properties of tissue-cultured nerve cells from the aged mice

Jun Fukuda and Kazuhiko Yamaguchi,  
 Department of Physiology, Faculty of Medicine, University of Tokyo,  
 Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan

老化にともなって神経細胞自身にどのような変化が生じているかを調べる目的で、老化マウスの神経細胞を培養するとともに、その生理学的性質をガラス管微小電極法によって調べた。老化マウス(C57 BL/6, 雄, 98-99週)から脊髄神経節(C<sub>2</sub>-S<sub>3</sub>)を無菌条件下で摘出した後、コラゲナーゼ(3 mg/ml)を含むL-15液中37℃で約2時間インキュベートした。次いで、液に振盪を加えて神経細胞を神経節より単離させた。弱い遠心(1500 r.p.m., 5分)によって神経細胞を収集した後、培養液と混合し、コラゲン被覆したプラスチック皿上、5% CO<sub>2</sub>を含む空気とともに37℃で培養した。培養液の組成は、75%イーグル液、15%胎児仔牛血清、9%ニワトリ胚抽出液、1%抗生物質液であった。コントロールとして、成熟マウス(C57 BL/6, 雄, 4-8週)の神経細胞を同じ方法、同じ培養液を用いて培養した。

老化マウス神経細胞は、若いマウスの神経細胞にくらべ、培養条件下での生存数が1/4~1/10と、低かった。神経突起の成長は、神経細胞間の個体差が非常に大きく、老化マウスと成熟マウスとの差を検出することは出来なかった。細胞内にガラス管微小電極を刺入して、静止膜電位、-30 mV~-50 mVを記録した。神経細胞は静止膜電位においては活動電位を生じなかったが、微小電極から細胞内に電流を流す方法で、細胞膜をいったん過分極の状態にしておくと、活動電位を生ずる能力を回復した。このようにして生じた活動電位の性質を更に細かく解析した結果、この活動電位は、Na依存性活動電位とCa依存性活動電位より成っていることが判明した。Na依存性活動電位の一部は、フグ毒TTX耐性であることも判明した。これら生理学的諸性質について、老化神経細胞と若い神経細胞との間に、特に大きな差は認められなかった。

#### REFERENCES

- 1) Fukuda, J. and Yamaguchi, K. Electrophysiological properties of tissue cultured nerve cells from senescent mouse. Neuroscience Letters 26, 263-268 (1981).
- 2) Nerve cells of senescent mouse grown in tissue culture. Neuroscience Letters 28, 331-335 (1982).
- 3) Tissue-cultured nerve cells from aged mice: Alteration of physiological properties of the nerve cells associated with aging. Neuroscience Letters (in the press).

## 雄ラット視床下部弓状核のシナプス形態の加齢に伴う変化の解析

小林 悟 ( 東京都老人総合研究所生物学部 )

松本 明 ・ 新井 康允 ( 順天堂大・医学部・第二解剖学教室 )

## MORPHOLOGICAL PARAMETERS OF AGE-RELATED SYNAPTIC CHANGES IN THE HYPOTHALAMIC ARCUATE NUCLEUS IN THE MALE RAT

Satoru Kobayashi<sup>o</sup>, Akira Matsumoto\* and Yasumasa Arai\*<sup>o</sup> Dept. Biol., Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

\* Dept. Anat., Juntendo Univ. Sch. Med.

加齢に伴い神経内分泌系に変調が見られることが知られている。視床下部弓状核 (ARCN) は下垂体前葉ホルモン、主として、ゴナドトロピンとプロラクチンの分泌調節に重要な役割を果たしていると考えられ、Matsumoto 達 (1981) は老化に伴って、弓状核のシナプス数が有意に減少することを報告している。この結果は、この神経核の加齢に伴う情報処理能力の変動と神経内分泌機能の変調との関連性を考えるのに興味深いものである。

今回、私達は、弓状核のニューロピル、主として、軸索終末の微細構造の加齢変化に関する有効な形態学的パラメーターを見出すのを目的として、電子顕微鏡レベルで定性的・定量的な解析を行った。

動物は Wistar 系雄ラットを用い、若齢 (90~100 日齢) と老齢 (720~930 日齢) におけるニューロピルの微細構造を比較し、各個体当たり ARCN 18000  $\mu\text{m}^2$  の面積について、軸索終末の定量的解析を行った。

老齢ラットの軸索終末の形態に関する一般的所見は次のようなものであった。

1) 老齢ラットでは、軸索終末の大きさが若齢のものよりもやや不ぞろいであり、かつ、その形態が不規則であった。

2) 軸索終末のシナプスの形態が、老齢ラットではシナプス膜の肥厚が薄くなり、肥厚部分の長さが短く断続的であるものの出現頻度が高くなった。

3) 軸索終末の内部構造に普通に見られる直径約50nmの無芯性シナプス小胞 (small spherical vesicles, SSV) だけでなく、大型の中空性小胞 (large spherical vesicles, LSV: 直径約 100 nm) を多数含む軸索終末の数がふえる傾向にあった (図1)。

4) 直径が 100~300 nm の大型有芯性顆粒 (large granular vesicles, LGV) をもつ軸索終末の数もまた、老齢ラットで増加する傾向が認められた (図2)。

5) 老齢ラットでは、軸索終末及び樹状突起で dense inclusion body や、内に小胞をもった multivesicular body が多く観察された。

上記の形態的諸変化の中で、樹状突起シナプスのシナプス前部に、LGV、LSV を含むシナプスの出現する頻度を調べた。

その結果、SSV のみで、LGV を含まないシナプスの数は、老齢ラットにおいて有意に減少していた ( $p < 0.05$ )。LGV を1個以上有するシナプスの数は、老齢と若齢の間で差異を見出せなかった。しかしながら、老齢ラットの樹状突起シナプス数が全体としては減少していた ( $p < 0.05$ ) ことを考慮すると、この結果は LGV を含むシナプスの割合が増加していることを意味している。さらに、シナプス終末内に含まれる LGV の数は増加する傾向が認められた。すなわち、4個以上の LGV を含むシナプスの割合は、若齢では 13.1% であったが、老齢では 15.6% の値を示した。

LSV (直径約 100 nm) を含まないシナプスの数に関しても、老齢ラットでは有意に減少しており ( $p < 0.05$ )、反対に3個以上の LSV を含むシナプスの数は、老齢のもので有意に増加していた ( $p < 0.05$ )。

以上の結果から、加齢とともに軸索終末の形態的变化とシナプス小胞の質的量的変動が、視床下部弓状核ニューロピルの老化の形態的パラメーターとして意味をもつのではないかとと思われる。神経内分泌機能との関連については、研究をさらに進める必要がある。

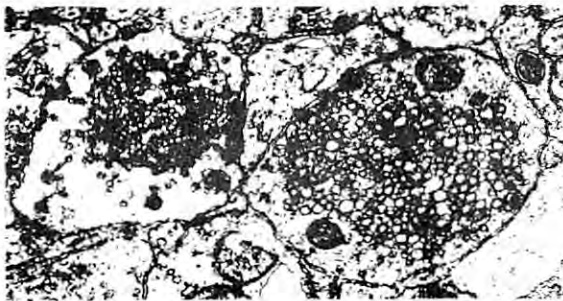


図1 LSV を含む軸索終末 (右)

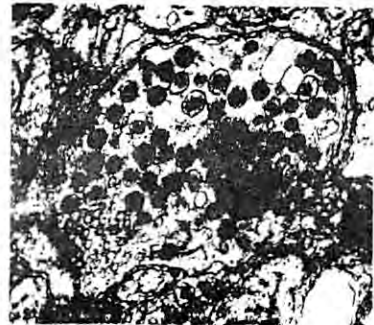


図2 LGV を多数含む軸索終末

## 老齡雌ラットの視床下部神経回路網の可塑性とエストロゲン

松 本 明 (順天堂大学医学部第二解剖)

新 井 康 允 (順天堂大学医学部第二解剖、東京都老人総合研究所生物学部)

Neuronal plasticity in the hypothalamus of old female rats and its enhancement by estrogen treatment

Akira Matsumoto

Department of Anatomy, Juntendo University School of Medicine

Yasumasa Arai

Department of Anatomy, Juntendo University School of Medicine and  
Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

### 目 的

新生期及び若齡哺乳類動物の中樞神経系は脳損傷後著しい可塑性を示し、シナプスの再生が起るが、加齡すると損傷後のシナプスの再生能は低下すると予測される。視床下部弓状核 (ARCN) の神経細胞はエストロゲン受容体を豊富に含有し、若齡雌ラットの ARCN の神経細胞の場合は脳損傷後エストロゲンに対して著しく可塑的に反応して、ARCN のシナプスの再生が促進される (Matsumoto and Arai, 1979, 1981)。今回は老齡雌ラットについて、損傷後の ARCN のシナプス形成に及ぼすエストロゲンの効果を調べた。

### 材料及び方法

老齡 (720-930日齡) の Wistar 系雌ラットの内側底部視床下部 (MBH) に投射する全神経線維を Halasz knife で切断し、ARCN を島状に孤立させると同時に卵巣を摘出し、3週間 estradiol benzoate (EB, 2 $\mu$ g/日) を連続注射した。EB 注射終了後電頭固定し、ARCN 18,000 $\mu$ m<sup>2</sup> 当りの軸索樹状突起シナプス数を数えた。電頭固定する前に第III脳室に5-ヒドロキシドーパミン (5-OHDA, 560 $\mu$ g) を注入し、カテコールアミン (CA) 性シナプスと非 CA 性シナプスを分別した。

### 結 果

脳手術をしてから3週間後の MBH の損傷部には、層板状に配列した多数のグリアの突起と多数のグリアの細胞体が観察された。これらのグリア成分は島状に孤立した ARCN の内外の神経線維の連絡を遮断していると考えられる。ARCN の非 CA 性シナプスを形成する軸索終末は直径 40-60nm の無芯小胞を多数含有する。一方、CA 性シナプスを形成する軸索終末は 5-OHDA でラベルされた直径 40-60nm の有芯小胞を多数含有する。ARCN の軸索樹状突起シナプスは非 CA 性シナプスが主で、CA 性シナプスの出現頻度は極めて低い。

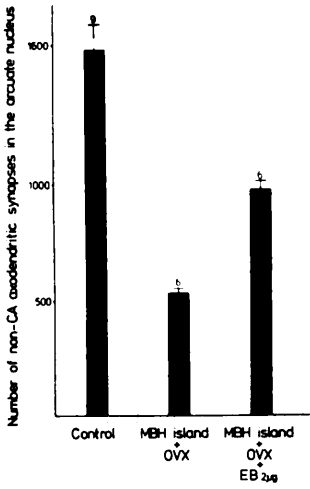


図 1. 非 CA 性シナプス数

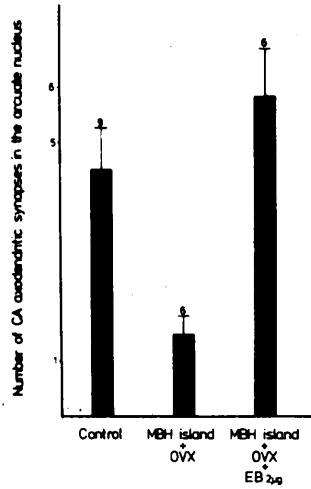


図 2. CA 性シナプス数

神経線維切断-卵巣摘出群 (MBH island+OVX) の非 CA 性シナプス (図 1) と CA 性シナプス数 (図 2) ( $541 \pm 22$ ,  $1.50 \pm 0.34$ ; 6 匹) は、対照群 (Control) のもの ( $1584 \pm 115$ ,  $4.55 \pm 0.75$ ; 9 匹) に比べて有意な減少を示した。 ( $P < 0.001$ )。一方、神経線維を切断して EB 処理を施した神経線維切断-卵巣摘出-EB 処理群 (MBH island+OVX+EB 2 $\mu$ g) の非 CA 性シナプス (図 1) 及び CA 性シナプス数

(図 2) ( $974 \pm 33$ ,  $5.83 \pm 0.87$ ; 6 匹) は、入力神経線維を切断したにもかかわらず神経線維切断-卵巣摘出群に比べると有意な増加を示した。 ( $P < 0.001$ )。EB 処理群の非 CA 性及び CA 性シナプス数は対照群のそれぞれ 61%、128% の回復を示した。

### 考 察

老齢雌ラットの ARC N に投射する全神経線維を切断しても、ARC N に正常な形態を示す非 CA 性及び CA 性シナプスが存在することから、ARC N 自身の中に核内神経回路を形成する線維連絡があることが判る。脳手術後エストロゲン処理により、ARC N のシナプス数はエストロゲン無処理群に比べて著しい増加を示した。このシナプス数の増加は、ARC N の外部にある神経細胞の軸索がエストロゲンによって伸展し損傷部の厚いグリア成分を貫通して ARC N の神経細胞とシナプス形成した結果と考えるよりも、エストロゲンが神経線維切断後の ARC N 内の無傷の神経細胞の軸索や軸索側副枝の発芽を促し、核内神経回路を構成するシナプスの形成が促進されることに由来すると考えるのが妥当であろう。720-930 日齢といった老齢雌ラットの ARC N の神経細胞は損傷後エストロゲンに対し可塑性を示し、シナプス再生能を有することが判った。これは、エストロゲンが老化に伴う弓状核の核内神経回路の修復過程に重要な要因として働いていることを示すものかもしれない。しかし、脳手術を受けた 150 日齢の若齢雌ラットでは、軸索樹状突起シナプスはエストロゲン処理により対照群の約 90% の回復を示した (Matsumoto and Arai, 1979, 1981) のに対し、老齢雌ラットでは約 60% と回復率が低下していることが判った。これは、老化にしたがって神経細胞の可塑性は低下し、その完全な消失が神経細胞の老化の最終段階に相当するものではないかという可能性を示すものと思われる。

### 引用文献

- Matsumoto, A. and Arai, Y. (1979) Cell Tiss. Res., 198, 427-433.  
 Matsumoto, A. and Arai, Y. (1981) J. Comp. Neurol., 197, 197-205.

加齢に依る脳萎縮と知能

(X線コンピューター断層装置に依る研究)

武田俊平、松沢大樹、伊藤久雄、伊藤正敏、山浦玄嗣

東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門

Brain atrophy and intelligence deterioration in aging process

Shumpei Takeda, Taiju Matsuzawa, Hisao Ito, Masatoshi Ito,  
Harutsugu Yamaura

Dept. Radiol. & Nucl. Med., Res. Inst. Tbc & Cancer, Tohoku Univ.

1) 脳体積の計測方法

ジェネラルエレクトリック社のCT/T全身用コンピューター断層装置を用い、脳の断層面でCT値が19から100までの画素の平均CT値Xに対し脳のCT値の下限は $0.572X - 1.8$ で、上限を100として、その間に入るCT値を持つ画素数から脳体積を計測し、頭蓋腔体積に対する%で表わし脳体積指数BVIとする。

2) 加齢に依る脳体積の変動

脳の断層写真上、明らかな病変を認めない309例(男144例、女165例)について上記方法に従いBVIを計測した。男女共に40才台以上において脳の萎縮が有意に進行した。但しその萎縮度は一様ではなく以下の興味ある変化を示した。男性の場合、40才台に急にBVIが減少しバラツキも大きくなるが、50才台でのBVIは有意の減少を示さず、かえってバラツキが小さくなった。60才台以降一貫してBVIの平均値が減少しバラツキも大きくなった。女性の場合、40才台以降一貫してBVIの低下を認めバラツキも大きくなった。男女差を見ると、40才台では男性のBVIが低くバラツキも大きく、50才台では女性のバラツキが大きく、



60才台では男性のバラツキが大きく、70才台以降男性のBVIの方が低くバラツキも大きかった。

### 3) 脳体積と知能

脳の断層写真上、明らかな病変を認めない58例（男30例、女28例）についてWAIS成人知能検査の内、動作性検査を施行し知能指数を測定し脳体積指数との関係を調べた。脳が萎縮して充実度が低下するにつれて、その集団の最高知能指数が直線的に下降し高い知能を持った人がいなくなり、BVIが90%以下の脳萎縮を起している人は知能指数が60周辺に収束する傾向が見られた。

## 加齢による脳萎縮と脳血流量

— X線CTと<sup>133</sup>Xeクリアランス法による定量的研究 —

山口龍生、窪田和雄、阿部由直、藤原竹彦、畑沢順、松沢大樹

東北大学抗酸菌病研究所 放射線医学部門

Reduction in Cerebral Blood Flow and Age-related Brain Atrophy  
— A quantitative study with computed tomography and <sup>133</sup>Xe  
clearance method—

T.Yamaguchi, K.Kubota, Y.Abe, T.Fujiwara, J.Hatazawa, T.Matsuzawa

Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research  
Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University

加齢に伴う脳萎縮については、剖検時の多くの報告がなされている。我々は、X線CTを用いた定量的方法により、生きた脳でも同様に、加齢とともにその体積が減少することを認めている。さらに、脳体積の減少は、40代より始まり、年齢が進むにつれ、個人差が激しくなることが明らかになっている。

一方、加齢による脳血流量の変化についても、多くの研究がなされ、一般に、脳血流量は加齢とともに低下するとされている。

今回、<sup>133</sup>Xe吸入法により求めた脳血流量とX線CTにより評価した脳萎縮の程度との関係について検討した。

対象は、26才から81才までの男女43人、(男20人、女23人)である。これらは頭部CT及び神経学的諸検査にて異常所見を認めず、呼吸機能障害、心不全、心房細動を除外した例である。又、拡張期血圧110mmHg以上、若しくは、収縮期血圧180mmHg以上の高血圧例も除外した。

脳萎縮の評価は、山浦、伊藤らの方法により、脳体積指数(BVI)を用いた。これは、骨のCT値を500以上、脳のCT値を19以上499以下、脳脊髄液のCT値を18以下とし、第3脳室より頭側のスライスについて、各部分の画素数を求め、以下の式により算出した。

### 頭蓋脳指数

$$= \frac{\Sigma \text{総画素数} - \Sigma \text{骨の画素数} - \Sigma \text{脳脊髄液の画素数}}{\Sigma \text{総画素数} - \Sigma \text{脳脊髄液の画素数}} \times 100 (\%)$$

### 脳体積指数 (BVI)

$$= \frac{\text{各人の頭蓋脳指数}}{20 \sim 39 \text{才の平均頭蓋脳指数}} \times 100 (\%)$$

脳血流量は、 $^{133}\text{Xe}$ クリアランス法により求めた。 $1.25\text{mCi/l}$ の $^{133}\text{Xe}$ ガスを1分間吸入させ、その後10分間の安静呼吸にて、頭部の $^{133}\text{Xe}$ クリアランスカーブを得て、これよりイニシャルスロープインデックス (ISI) を求め、脳血流量の指標とした。

平均ISIは、加齢とともに低下し、従来 of 報告と一致した。

平均ISIと脳体積指数は、有意の正の相関を示した。(r=0.43、 $p < 0.005$ )

40才以上について、各年代の平均BVIを上まわる群を非萎縮群、下まわる群を萎縮群とし、両群の平均ISIを比較した。非萎縮群では、左側平均 $56.6 \pm 8.9$ 、右側平均 $57.2 \pm 9.0$ 、萎縮群では、左側平均 $46.1 \pm 5.0$ 、右側平均 $45.9 \pm 4.8$ であり、両群間には、左右とも有意の差がみられた。(p<0.001)

脳萎縮に伴い、有意に脳血流量が低下することが明らかとなった。又萎縮を示さない例でも、低い脳血流量を示す例があり、脳萎縮の前段階として、血流の低下する状態が示唆された。

## 喫煙の脳血流に及ぼす影響について

## — 喫煙と脳の老化の関係 —

窪田和雄、山口龍生、畑沢順、阿部由直、藤原竹彦、松沢大樹

東北大学抗酸菌病研究所放射線医学部門

Effects of smoking on regional cerebral blood flow

--- Smoking and brain aging ---

K.Kubota, T.Yamaguchi, Y.Abe, T.Fujiwara, J.Hatazawa, T.Matsuzawa  
Department of Radiology and Nuclear Medicine, The Research  
Institute for Tuberculosis and Cancer, Tohoku University

(要旨) 喫煙の脳血流に及ぼす慢性効果を $^{133}\text{Xe}$ ガス吸入法により104人について調べた。喫煙者では非喫煙者に比べて有意に脳血流が低かった。加齢に伴い脳血流は低下した。喫煙者の脳血流は、同じ年令の非喫煙者の脳血流よりも47人中44人で低下していた。喫煙は脳の老化を促進すると考えられる。

(はじめに) アメリカで百万人を対象に行なった疫学調査では55才から64才の男性では喫煙者は非喫煙者の1.4倍脳血管障害が多いと言われ、フラミンガムで行なわれた研究、又日本の平山らによる27万人を対象とした研究でも喫煙者に脳血管障害が多いという結果が出ている。しかし喫煙が脳循環にどのような影響を及ぼすかについては一致していない。Wechsler(1958)は喫煙は脳血流を変化させない、Skinhøj(1973)はニコチン負荷、CO負荷共に脳血流を増やすと言われ、危険因子に関して苦しい議論を行なっている。しかしこれらはすべて、喫煙の前後で脳血流を測定した急性効果についての研究であり、危険因子としての慢性効果については研究されていない。我々は長期大量喫煙者と非喫煙者の脳血流を $^{133}\text{Xe}$ 吸入法で測定し更に血中脂質のデータと共に、喫煙の脳血流に対する慢性効果について調べたので報告する。

(方法と対象) 局所脳血流量を $^{133}\text{Xe}$ 吸入法による測定機(アロカ社RRG-526システム)で計測した。マスクより吸入された放射性キセノンガスは血液脳関門を通過し脳実質内へ拡散する。投与を中止すると脳組織中から血液による洗い流しが始まる。頭部にあてた検出器で $\gamma$ 線を外部計測し洗い流しの状態をクリアランスカーブとして得る。クリアランスカーブの最初の2分から3分の間を単一指数関数に近似した時の傾きから算出するイニシアルスロープインデックスInitial Slope Index (ISI)法により脳血流を測定

した。検出器は左右半球各7個、計14個である。また血清コレステロール、トリグリセライド、HDL-コレステロールも測定した。対象はCTスキャン、神経学的に異常のないコントロール52人（ボランティア5人、他は外来・入院の患者）発作後平均10ヶ月の陈旧性脳梗塞患者32人、9ヶ月の陈旧性脳出血患者20人、計104人、これらを喫煙者と非喫煙者の2群に分けた。喫煙者は（1日に吸うタバコ本数）×（喫煙年数）が200以上の者とした。肺機能検査および胸部X線写真上異常のある者は除外した。

（結果） 非喫煙者の左右両半球の平均ISIを縦軸に、横軸に年齢を取りプロットすると、ISIは年齢とともに低下し、加齢に伴い脳血流量が有意に低下していることがわかった。（ $r=0.464$ ,  $y=67.06-0.21x$ ,  $p<0.001$ ）また喫煙者のISIはこれより明らかに低く、年齢に対応する非喫煙者の平均ISIよりも、47人中44人で低下していた。コントロール群のみを取り出しても全く同様な結果であった。次に各群毎の平均ISIを比較したところ、コントロール群では喫煙者のISIが非喫煙者よりも右半球で15%、左半球で14%低下していた。脳梗塞患者の健測では喫煙者が16%低下、脳出血では22%低下し、いずれも  $p<0.001\sim 0.002$  で有意差が認められた。また群全体の比較ではコントロールに比べて脳梗塞、脳出血のいずれも平均ISIは有意に低かった。また、コントロール非喫煙者、脳梗塞非喫煙者のそれぞれで男女差を比較したが性差はなかった。次にコントロール群について、各検出器毎に喫煙者と非喫煙者の平均を比較したところ、各々の検出器で一様に喫煙者の脳血流は有意に低下しており、脳の特定の領域に対応する特別な変化は見られなかった。また左右差もなかった。

血清の脂質を測定したところ、総コレステロール、トリグリセライドでは有意差が見られなかったが、HDL-コレステロールはコントロール男、コントロール男女、脳梗塞+脳出血男女の各々において喫煙者は非喫煙者よりも有意に低かった。

（考察） 喫煙の急性効果は脳血流を増やすとか一定であるとか言われ、これらはニコチンやその他タバコに含まれる物による脳血管に対する薬理学的な効果と思われる。しかしこれは心疾患や脳血管障害の危険因子としての役割とは一致しない。我々は喫煙の急性効果と、年月をかけて集積されてゆく慢性的な影響とは別のものであり、後者が脳血流に対して、また広く健康に対しより重大な意味を持っていると考えた。HDL-コレステロールは動脈硬化性疾患を予防する因子と言われ、これが喫煙者で有意に低下していることから、喫煙者では非喫煙者より動脈硬化が進みやすいと思われる。脳血管の動脈硬化が喫煙者では非喫煙者より進行し、血管径が細くなり、血流抵抗が増大し、脳血流が低下していると考えられる。本研究で、喫煙は脳血流を減少させるような慢性効果を持つことが明らかとなった。これは見方を変えれば、喫煙は脳の老化を促進していると考えられる。

妊娠期・授乳期のタンパク質欠乏による仔ラットの脳DNA、行動および生存日数に及ぼす影響

梶本 雅俊、 佐々木 敦子  
(国立公衆衛生院・栄養生化学部)

Effect of protein nutrition throughout gestation and lactation on behavior, brain DNA content and life span in the rat progenies

Masatoshi Kajimoto and Atsuko Sasaki  
Institute of Public Health, Department of Nutrition and Biochemistry

「目的」我々は蛋白質栄養がラットの長期飼育でどのように影響するかを観察している。今までの結果、低蛋白群は短命であり、高蛋白群の雌は乳腺腫が多発することがわかった。今回は妊娠・授乳期を通じて低蛋白食で飼育された仔の脳総DNAは少なく、離乳後、高蛋白食でリハビリテーションを行っても回復しないことからこれを長期飼育し行動や生存日数を観察した。

「方法」(実験I) 離乳後ドンリュ-系雌ラットを用い (表1)

表1に示す組成の飼料を用いて10、18、27、36%カゼイン群に同腹の仔を各群24匹割りつけた。飼料投与は15g/日(等カロリー)とし、自然死するまで観察した。

(実験II) フイッシャ-系ラットを妊娠3日目より3群に分け妊娠・授乳期を通して10、18、36%カゼイン食を与え、生後3週で離乳し各群同腹の仔をさらに10、18、36%カゼイン食の計9群に分け、自然死するまで観察した。また生後7、15、50週に脳DNA(STS変法)を測定した。

(実験III) フイッシャ-系ラットを妊娠3日目より10、18%カゼイン食を与え、出生直後10%と18%の仔を互いに交換し3週間授乳させた。離乳後は授乳期と同じカゼイン食を与えた。

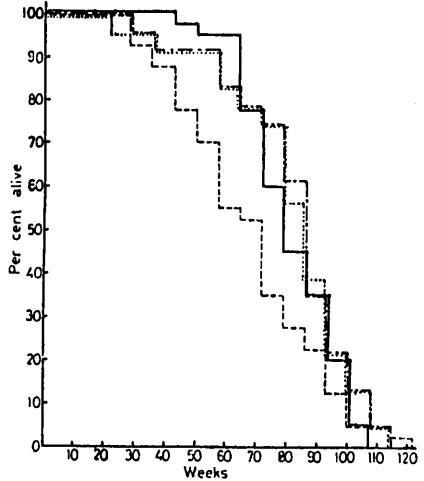
行動は回転車つき飼育かご及び誘導電波感応方式(NATUME KN-70)を用いて測定した。実験I、II、IIIとも全て1ケージ1匹で飼育した。 「結果」実験I: 体重は10%群が他の群に比べ最も成長が悪く、27%群が最も良好であった。生存日数は10%群が他の群に比べて最も短かった(図1)。 実験II: 妊娠・授乳期を通じ10%の母獣より生まれた仔は、18、36%の母獣より生まれ離乳後10%に切り換えられた仔に比べてさえ体重は少なく、脳重量・脳DNAは低かった(表2・図2)生存日数は離乳後10%群が短かく特に36%の母獣からの仔が離乳後10%に

実験I (各群24匹)	飼料中カゼイン%			
離乳後仔	10	18	27	36
実験II (各群6匹)				
母親(妊娠・授乳期)	10	18	36	
仔(離乳後)♀	10   18   36	10   18   36	10   18   36	10   18   36
実験III (各群6匹)				
母親(妊娠期)	10	18		
仔(授乳期以後)♀	10	18	10	18

	10	18	27	36
Casein	10	18	27	36
Corn oil	10	10	10	10
Cornstarch	75	67	58	49
Salt mixture <sup>1</sup>	5	5	5	5
Vitamin mixture	g/100 g			

切り換えられた群が最も影響が大きかった (13)。実験 III：行動については授乳後 10% を与えられた群の方が活発であった。老齢化にともなう尿中蛋白排泄量は、高蛋白食ほど多く、10% 群の短命の原因は老齢化による感染免疫抵抗の減弱と考えられた (図 4)。

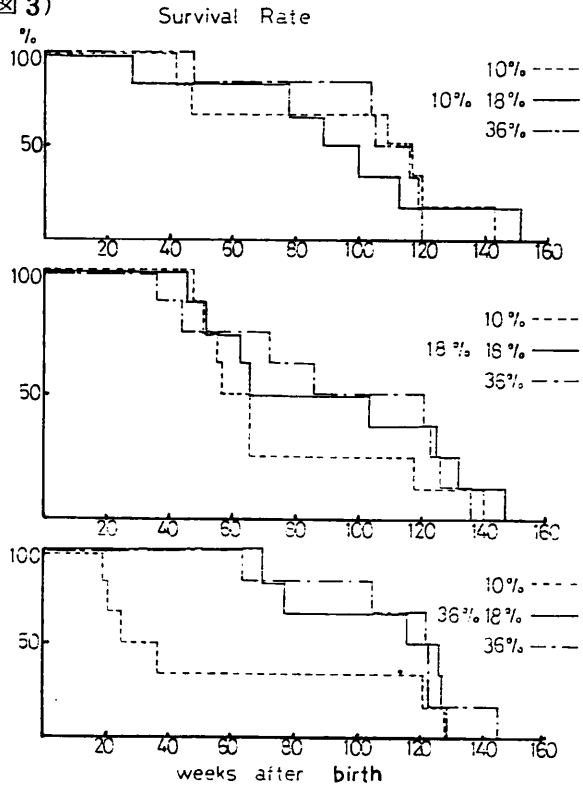
(図 1)



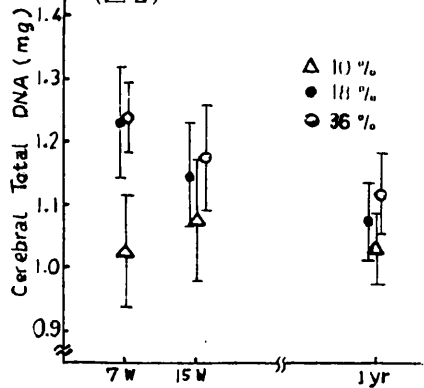
Effect of the dietary level of protein on the survival rate of rats.

----- 10%, - - - 18%, — 27%, ····· 36% casein

(図 3)



(図 2) Brain DNA Content

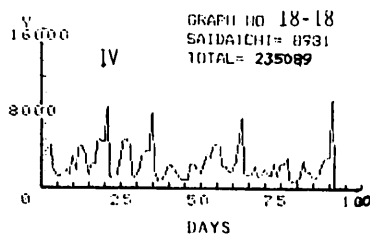
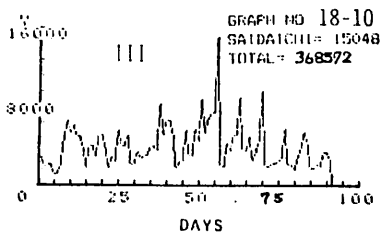


(表 2)

Cerebellum				
Group	No.	weight (mg)	mg/wet g	Total (mg)
I (10-10)	5	165 + 10	6.48 + 0.50	1.07 + 0.13
II (10-18)	5	203 + 7	6.67 + 0.47	1.36 + 0.13
III (18-10)	5	161 + 8	6.16 + 0.35	0.99 + 0.09
Iv (18-18)	3	217 + 2	7.36 + 0.40	1.60 + 0.09

(図 4)

CHANGES OF LOCOMOTOR ACTIVITIES IN RATS ( 4 to 16 weeks after birth )



## 正 常 マ ウ ス の 随 意 活 動 量 の 生 涯 変 化

野 間 口 隆

(東 京 都 老 人 総 合 研 究 所 生 物 学 部)

Changes in Voluntary Runwheel Activity during Life of the House Mouse,

Mus musculus molossinus

T a k a s h i A. N O M A G U C H I

(Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

ABSTRACT Voluntary runwheel activity was measured by allowing the animals access to wheels of 0.65 m a circumference. The animals maintained as an inbreeding colony marked with Tokyo/PK sign were found no spontaneous tumor and no special disease, showing  $5.0 \pm 2.5$  m-olds in primiparity,  $17.3 \pm 2.9$  m-olds in final parturition,  $28.1 \pm 6.1$  m-olds for female and  $27.8 \pm 6.6$  m-olds for male in mean lifespan. The mean maximal activity showed  $20,447 \pm 5,139$  counts/day at 7.5 m-olds for female and  $17,599 \pm 5,388$  counts/day at 3 m-olds for male. The activity declined markedly during aging process after final parturient period, but the circadian rhythm was constant throughout animal life.

基礎老化研究に用いられるマウスの標準的な生涯を設定する目的で、近交系マウスC57BL/6と交配可能な本邦産マウスを観察すると、自然発生腫瘍の認められない集団の初産齢は $5.0 \pm 2.5$ 月齢、終産齢は $17.3 \pm 2.9$ 月齢、平均寿命 $28.1 \pm 6.1$  (♀)、 $27.8 \pm 6.6$  (♂) 月齢、最大寿命は $37.2$  (♀)、 $41.2$  (♂) 月齢であった。これらのデータに基づいて生涯過程を区分し、その生理的加齢変化の概略を知るために、生涯の種々の時期にある任意の個体の随意活動量を調べた。

(材料と方法) 本邦産マウスのTokyo/PK系集団の任意個体の活動量を回転式随意運動量測定装置で連続 5 日間測定した。回転車の円周は 0.65 m、回転数は 30 分毎に自動記録した。飼育および測定は室温 20~27 °C、間接自然光による明暗条件下で行った。

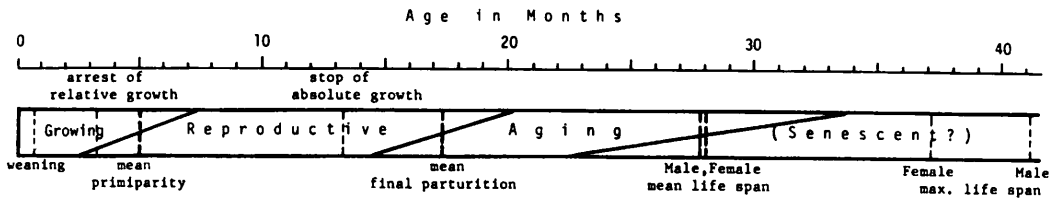
(結 果) マウスは 1 日の中、16:30~07:00に8.5~14.5時間回転車をまわし、その活動量は 3~5 日目に最高値を示した。マウスを装置内に入れることによる環境変化を考慮して、1 日の平均活動量を測定の日 2~第 5 日の 4 日間の平均および 5 頭の値から求めた。測定した月齢の中、雌は 7.5 月齢に  $20,447 \pm 5,139$  counts の最高回転数を示し、1, 5, 10, 25, 31 月齢の活動量はそれぞれ最高値の 45, 68, 48, 46, 21 %であった。雄は 3 月齢に平均回転数が最高値 ( $17,599 \pm 5,388$  counts) を示し、1, 11, 23, 35 月齢ではそれぞれ最高値の 67, 75, 58, 35 %であった。また、1 日の活動時間は雌では成長につれて短くなり、加齢過程



では長くなるのに対して、雄では加齢に伴って短縮する傾向がみられた。

随意活動量を同一個体の種々の月齢について調べると、大きな個体差を認めるが、たとえば、雌の成熟期の 10 月齢は  $(22.9 \pm 2.9) \times 10^3$  counts, 終産齢を過ぎた加齢過程において 20 月齢では  $(19.1 \pm 1.1) \times 10^3$  counts, 24, 32 月齢ではそれぞれ  $(7.6 \pm 3.1) \times 10^3$ ,  $(2.1 \pm 0.5) \times 10^3$  counts で、加齢過程で活動量の著しい低下が認められた。すなわち、終産齢前後に活動量の変化が少いか、ほとんどないのに対して、加齢過程における減退の著しい傾向が認められた (FIG. 1.)。

(考 察) マウスの随意活動量は個体内外の種々の環境要因に支配されるものとみられ、同一齢で個体差が認められる。これは、近交系マウスの場合でも同様で、病的な個体の活動量は著しく低下する。一方、個体は生涯を通じて日周活動リズムを獲得、維持しているものとみられ、回転車活動を定まった時間帯に連続して行い、日中の照度や年間日照時の長短にほとんど影響されない。終産齢をすぎた加齢過程で、随意活動量が著しく低下して行くのは全身的な生理機能の減損を反映しているものとみられるが、この過程において臓器にみられる顕著な変化は生殖器官のみに明らかな退縮が認められた。



Animal No.	Sex	Month - Olds					Lifespan Month-olds
		g - 11	14 - 16	19 - 21	23 - 25	Examined 29 - 30	
22029	F	22.9 ± 2.9		19.5 ± 1.1	7.6 ± 3.1		34.3
09030	F	21.4 ± 2.4			9.3 ± 0.9		25-
16089	F		22.6 ± 2.6	17.8 ± 2.5	13.4 ± 3.0		30-
17108	F		15.5 ± 2.0			4.4 ± 1.3	37.2
08089	F		14.1 ± 1.5	14.8 ± 5.1	6.6 ± 1.5		28.4
12129	F				7.5 ± 0.8	3.1 ± 1.5	30-
14080	M	18.8 ± 3.7		13.8 ± 2.2			20-
16089	M		23.7 ± 5.3		16.6 ± 2.5		30.9
08089	M		16.0 ± 0.5	17.9 ± 0.6	12.5 ± 1.8	2.1 ± 0.5	33-
18050	M		15.5 ± 2.7		8.3 ± 1.4		25-
22029	M			13.4 ± 3.9	12.6 ± 0.6	2.3 ± 0.7	33.7
07108	M				11.0 ± 2.3	2.6 ± 0.9	35.7
29088	M				13.1 ± 3.5	4.9 ± 0.1	38.2

\*(Mean Counts ± SD) x 10<sup>3</sup>

FIG. 1. Longitudinal study on voluntary runwheel activity during life of the house mouse, Mus musculus molossinus.

The value was shown as mean counts per day in revolution from the second throughout the fifth day in trial.

「老化促進モデルマウス (SAM)」にみる老化アミロイド (ASSAM) の免疫組織化学的研究

樋口京一, 松村敦子, 本間篤子, 竹下修史, 橋本研二  
細川昌則, 安平公夫, 竹田俊男  
京都大学結核胸部疾患研究所 病理学部門

Systemic Senile Amyloid in Senescence Accelerated Mouse (SAM): A Unique Fibril Protein (AS<sub>SAM</sub>) Demonstrated in Tissues from Various Organs by the Unlabeled Immunoperoxidase Method

Keiichi Higuchi, Atsuko Matsumura, Atsuko Honma, Shuji Takeshita, Kenji Hashimoto, Masanori Hosokawa, Kimio Yasuhira and Toshio Takeda  
Department of Pathology, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606, Japan

SUMMARY: Specific antiserum was raised against a novel amyloid protein (AS<sub>SAM</sub>) deposited in SAM. The PAP method using the antiserum stained amyloid deposits observed in various organs and tissues except for brain and bone medulla in SAM and aged R series. The amyloid observed in most of the P-1 series was AS<sub>SAM</sub> and in the P-2 series, protein AA frequently coexisted with

the AS<sub>SAM</sub>.  
INTRODUCTION: A murine model of accelerated senescence, termed "Senescence Accelerated Mouse (SAM)" was developed in our laboratory most recently (1). Spontaneous age-associated amyloidosis is one of the most characteristic findings in these mice (1-4). A unique amyloid fibril protein (AS<sub>SAM</sub>) has been isolated from livers of the P-1 series (5). We have now used specific antisera against AS<sub>SAM</sub> and against murine protein AA induced by casein injection into CBA mice to identify amyloid protein in tissue sections of SAM and R series, by PAP methods.

MATERIALS and METHODS: Isolation and fractionation of amyloid fibrils Mice of the P-1 series were killed and amyloid fibrils were isolated from livers according to the methods of Pras et al. (6). The amyloid fibrils extracted from the mice as water soluble fractions were dissolved in 6M guanidine HCl, 1N acetic acid and chromatographed on Sepharose 6B column. The 2nd peak (Peak-II) of 3 major peaks contained protein AS<sub>SAM</sub>. The amyloid fibrils isolated from livers and spleens of casein treated CBA/St mice were fractionated in a similar way. Antisera Anti-AS<sub>SAM</sub> antisera were produced in rabbits by injection of Peak-II protein into foot pads. Following the booster dose which consisted of a subcutaneous injection of the same antigens two and three weeks later, the rabbits were bled 1 week after the last dose. By double immunodiffusion

test anti-AS<sub>SAM</sub> antisera showed a single precipitation line with purified AS<sub>SAM</sub>, and did not react with murine protein AA. Antisera against crude protein AA were produced in rabbits in a similar way. Anti-AA antiserum formed a single precipitation line with purified protein AA and did not react with AS<sub>SAM</sub>, in the double immunodiffusion test. Histological examination Tissues excised from the sacrificed 18 mice of the P series and 9 mice of the R series were fixed in ten per cent neutral buffered formalin at the time of autopsy and embedded in paraffin. Four  $\mu$ m sections were prepared and stained with H-E, Congo red and the PAP method. PAP method The unlabeled antibody peroxidase-antiperoxidase (PAP) method of Sternberger (7) with minor modification by Fujihara et al.(8), were used. In some section, two antigens (AS<sub>SAM</sub> and protein AA) were stained on the same slides using the PAP method (double staining).

RESULTS and DISCUSSION: Anti-AS<sub>SAM</sub> antisera reacted with amyloid tissues of SAM and aged R series, but not with normal tissues and amyloid tissues with protein AA. These positive reactions disappeared after absorption of antisera with purified AS<sub>SAM</sub>. Surveys of the amyloid deposition in SAM and R series using the specific antiserum disclosed anti-AS<sub>SAM</sub> stained positively amyloid deposits in various organs and tissues except for brain and bone medulla, in SAM as well as in the R series. The amyloid deposited in gonads, papillary layer of dermis and perineurium was exclusively AS<sub>SAM</sub>. The amyloid observed in most of P-1 series was AS<sub>SAM</sub> and in the P-2 series, protein AA frequently coexisted with the AS<sub>SAM</sub>. Preferential location for each amyloid was evident in the liver, spleen and gastrointestinal tract. It is conceivable that the amyloid protein detected in SAM may be a unique protein to "senile systemic amyloidosis" which occurs in mice. Frequent deposition of AS<sub>SAM</sub> in the aged R series supports the theory. AS<sub>SAM</sub> may indeed be the counterpart of the amyloid protein (ASc) of human senile amyloidosis.

#### References

1. Takeda, T. et al., *Mech. Age. Devel.* 17:183-194, 1981.
2. Takeshita, S. et al., *Mech. Age. Devel.* (in press)
3. Shimizu, K. et al., *Arthritis Rheum.* 24:1540-1543, 1981.
4. Shimizu, K. et al., *Arthritis Rheum.* (in press)
5. Matsumura, A. et al., *Lab. Invest.* (in press)
6. Pras, M. et al., *J. Exp. Med.* 130:777-795, 1969.
7. Sternberger, L.A. *Immunohistochemistry*, ED2, p104, 1979.
8. Fujihara, S. et al., *Lab. Invest.* 43:358-365, 1980.



Figure: PAP stained heart of a 14-month-old female mouse with anti-AS<sub>SAM</sub> antiserum showing fern leaf-like positive reactions of amyloid deposits. x 300

「老化促進モデルマウス (SAM)」の老化度判定基準 - Grading Score System - について (第 I 報)

細川昌則, 笠井隆一\*, 樋口京一, 清水克時\*, 竹下修史, 本間篤子, 入野美香,  
戸田佳代子, 松村敦子, 松下 睦\*, 竹田俊男  
京都大学結核胸部疾患研究所病理部門  
\*京都大学医学部整形外科学教室

The Grading Score System in Senescence Accelerated Mouse ( I )

Masanori Hosokawa, Ryuichi Kasai\*, Keiichi Higuchi, Katsuji Shimizu,\*  
Shuji Takeshita, Atsuko Honma, Mika Irino, Kayoko Toda, Atsuko Matsumura  
Mutsumi Matsushita\*, Toshio Takeda  
Dept. of Pathology, Chest Disease Research Institute and Dept. of Ortho.  
Surg. Faculty of Medicine, Kyoto University

我々は促進した老化現象を示す, 「老化促進モデルマウス; Senescence Accelerated Mouse (SAM)」を開発した。<sup>1)</sup> 行動性, 外観から, これらマウスの老化の程度をより客観的に評価する為, 我々の考案した老化度判定基準 (Grading Score System)を用いている。<sup>1), 2)</sup> 各系統のマウスにおける, 生後8カ月以後, 4カ月毎の各項目の頻度を検索し, 大部分の項目において, 各系統での頻度が, 暦齢とともに不可逆的に増加し, その増加の程度は, 対照(R series)と比較し, SAM に著しい事を報告した。<sup>2)</sup> 今回我々は, 各項目の頻度及び評点の月齢による推移を, 生後2カ月齢より観察し, 又P-1 (8カ月齢), R-2 (12カ月齢)の各評点, 総評点, 余命の統計的解析を行い, 各項目の老化への寄与を調べ, 判定項目を再検討し, 又, 老化度判定基準の評点から, 余命を予測する事を試みた。

〔方 法〕

1, 月齢ともなり頻度及び評点の推移の検索

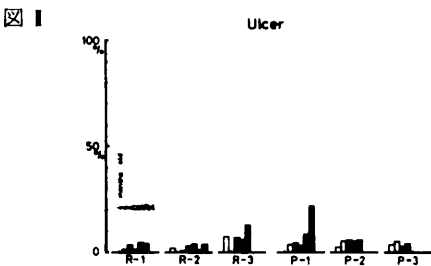
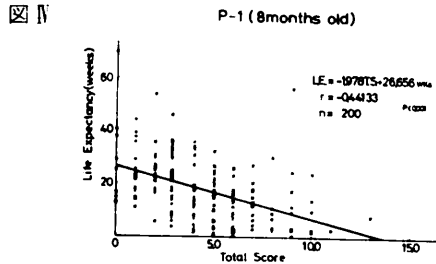
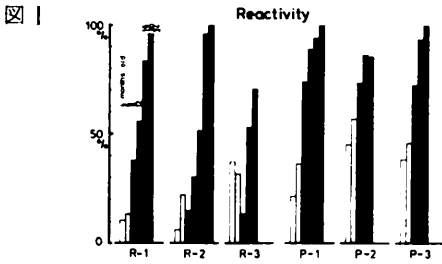
生後2カ月以後, 8カ月まで2カ月毎, 以後4カ月毎に, SAM, R-seriesの各系統のマウスについて, 老化度判定基準を用いて, 老化度を採点した。各項目の評点0を変化(-), 1以上を変化(+)として, その頻度を求め, 暦齢による推移をみた。次に, 各月齢で, 個々のマウスの各項目の評点, 総評点から, 同腹内での夫々の平均値を求め, さらにそれらから, 同系統内での平均値を算出し, 系の当該項目の評点とし, 暦齢による推移をみた。

2, 統計的解析

それぞれの項目の暦齢による, 頻度, 評点の不可逆的増加を, Spearman's coefficient of rank correlationを用いて検定した。又, 8カ月齢のP-1, 12カ月齢のR-2, 雌雄夫々100匹の各項目の評点, 総評点, 判定後余命との相関を検討した。

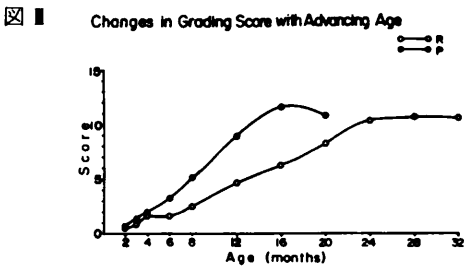
〔結果及び考按〕

各系統とも、ほとんどの項目にて、頻度、評点は、生後6カ月前後より加齢とともに増加し、最終の頻度はReactivity(図Ⅰ)の様に、80~100%に達する項目もあるが、潰瘍(図Ⅱ)、P-3系以外での眼の4項目の様に50%に達しない項目がある。さらに総評点の加齢ともなり増加の型は、S字型であり、(図Ⅲ)、多くの項目がこの型をとる。しかし潰瘍の評点の増加は、加齢とは有意な関係にない。従って、老化度判定項目の持つ条件を、(1)最終的な頻度が50%以上となる。(普遍性) (2)加齢による、頻度、評点の増加の関係の、Spearman's coefficient of rank correlationが有意になる。(不可逆的増加)とすれば、潰瘍及び、眼の4項目は、1)、2)をともには満足せず、判定項目として、普遍化する事が不適当と考えられる。しかし眼の項目は、白内障を自然発症する、P-3系には有用である。次に8カ月齢P-1、12カ月齢R-2において、ほとんどの項目の評点と総評点、余命との間には、相関がみられた。(表Ⅰ) 特に総評点と余命の間には、有意な負の相関と直線回帰性が得られた。(P-1; 余命(週) = -1.978 × 総評点 + 26.656  $r = -0.4413$   $F = 4.789$  (図Ⅳ) R-2; 余命(週) = -2.498 × 総評点 + 36.561  $r = -0.5539$   $F = 8.761$  夫々  $P < 0.001$ ) これは多変量解析を用いて、判定基準の評点から余命を予測し、判定基準による、個体の暦数を表現し得る可能性を示唆している。



表Ⅰ

	Correlation			
	P-1 (8 months old)	R-2 (12 months old)		
	Total Score	Life Expect.	Total Score	Life Expect.
Plasma	0.8072	-0.3172	0.8057	-0.3306
Reactive	0.8022	-0.3040	0.7002	-0.4778
Glass	0.8191	-0.3034	0.7157	-0.3940
Cocaine	0.8451	-0.3163	0.8713	-0.3781
H. Loss	0.3208	-0.1162*	0.2077	-0.0344*
Ulcer	0.3246	-0.1628	0.2843	-0.2087
P.L.	0.4803	-0.1325*	0.7007	-0.3480
Cataract	0.0702*	0.0148*	0.3034	-0.1294*
Opac. Cor.	0.1865	-0.0702*	0.4697	-0.2044
U. Cor.	0.3439	-0.1466	0.3175	-0.1069*
L. hyp.	0.4584	-0.1625	0.4117	-0.2198
T. Score	—	-0.4413	—	-0.5538
L. Expect.	-0.4413	—	-0.5538	—



文 献

1. Takeda, T. et al. ;Mech. Ageing Develop. 17; 183, 1981
2. 細川昌則, 樋口京一, 竹下修史, 清水克時, 竹田俊男 ;基礎老化研究 5 ; 82, 1981

## 溶原性バクテリア紫外線誘導後の寿命に関する理論的考察

矢後長純\*, 立浪 忍\*, 福田信男\*\*

( 聖マリアンナ医大・附属研究施設\*, 放射線医学総合研究所\*\* )

LIFE-SPAN OF ULTRAVIOLET-INDUCED LYSOGENIC BACTERIA  
BACILLUS MEGATERIUM 899ANAGASUMI YAGO\*, SHINOBU TATSUNAMI\*, AND NOBUO FUKUDA\*\*  
ST. MARIANNA UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE (KAWASAKI)\* AND  
NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES (CHIBA)\*\*

## I. まえがき

溶原性バクテリア *Bacillus megaterium* 899A は 1931 年, den Dooren de Jong によって分離され, 1949 年以降, ロックフェラー大学で J. S. Murphy が実験材料として用いている<sup>1)</sup>。1973 年 Murphy は, 対数増殖期にあるこの菌に一定量の紫外線を照射するとそのポピュレーションが, 恰かも一定の寿命を付与されたかの如くに振舞い, 高等生物にみられる死を記述するゴンパーツの法則に従って死滅することを発見した<sup>2)</sup>。すなわち, 時刻  $t$  における死亡率  $r(t)$  は, 初期値を  $r(0)$  とすれば,  $m$  を定数として,

$$r(t) = r(0)e^{mt} \quad (1)$$

対数増殖期にある菌に紫外線を照射するとファージの生産が開始され, 菌は(1)式に従って死滅するとすれば, 時刻  $t$  における菌数  $B(t)$  の変化率は,  $k$  を分裂の速度定数として,

$$\frac{dB(t)}{dt} = kB(t) - B(t)r(0)e^{mt} \quad (2)$$

である。初期値を  $B(0)$  として積分すると,

$$B(t) = B(0) \text{Exp} \left( kt - \frac{r(0)e^{mt}}{m} + \frac{r(0)}{m} \right) \quad (3)$$

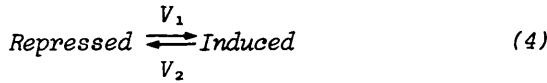
Murphy の実験結果 (文献(2)の "Basic obserbation") は, (3) 式に極めて良い精度でフィットした<sup>2)</sup>。

一方, われわれは 1974 年以來, 生体高分子の存在様式に関する 2 コンパートメント準平衡理論によって老化の基礎理論を研究して来た (例; 3)~7)。Murphy の実験とその現象論的解釈は, われわれの理論によって分子生物学的に基礎づけ得ることが明らかとなったので, ここに報告する。

## II. 理 論

[ 仮定 1 ] 菌 DNA に溶原化しているファージ DNA のオペレータ・ジーンは, 通常は特異的レプレッサ分子によって抑制されており, 紫外線照射等の外因によって抑制が解除されればファージ DNA

の転写が開始される<sup>8)</sup>。従って、フェージのオペレーター・ジーンの状態には、抑制と誘導の2状態があり、その間には速度定数  $V_1$  および  $V_2$  による推移と動的平衡が成立していると仮定する。



誘導状態にあるオペレーター・ジーンの分率  $f_i(t)$  およびその初期値  $f_i(0)$  は、それぞれ、

$$[1 - f_i(t)]V_1 = f_i(t)V_2, \quad f_i(0) = (1 + \frac{V_2}{V_1})^{-1} = (1 + e^a)^{-1} \quad (5)$$

〔仮定2〕紫外線照射によりレプレッサ分子の不活性化が進行し<sup>9)</sup>、 $V_2$  は指数関数的に小さくなると仮定すれば、 $b$  を定数として、

$$f_i(t) = (1 + e^{a-bt})^{-1} \quad (6)$$

〔仮定3〕フェージの生産は、誘導状態にあるオペレーター・ジーンの状態に比例して行われ、これに伴って菌の溶解がおこるのであるから、介在する諸因子を集中化して  $\alpha$  とおけば、時刻  $t$  における菌数の変化率は、

$$\frac{dB(t)}{dt} = kB(t) - \alpha f_i(t)B(t) \quad (7)$$

〔仮定4〕(7)式の比例定数  $\alpha$  を(6)式の  $b$  に比例するものとし<sup>4)</sup>、

$$\alpha = \beta b \quad (8)$$

とおき、 $\beta$  を1に規格化する。

〔解析解〕以上により、(7)式を積分すれば、 $C$  を積分定数として、

$$B(t) = \frac{e^{c-a}}{1 + e^{-(a-bt)}} e^{kt} \quad (9)$$

を得る。式中のパラメータ  $a$ 、 $b$  および  $k$  は、Fletcher-Powell 法により算出した。

### III. 結果と考察

Murphy の実験結果について(9)式を計算した結果、 $a = 30.9358$ 、 $b = 0.3009$ 、 $k = 0.01324$  を得た。また、刻々の  $B(t)$  については、理論値と実験値は良く一致した。高等生物の平均寿命に相当する平均溶菌時間その他の特性も算出された。このように、紫外線照射後の溶原性バクテリア・ポピュレーションの動態を分子生物学レベルの老化の問題として取扱うことが可能である。すなわち、(4)式で表わされる2コンパートメントの平衡は、長期的には、(6)式のように定数  $b$  を以て、不可逆的に推移する準平衡であり、これがポピュレーションにおける菌の寿命を決定すると考えられる。定数  $b$  は、老化定数と呼ぶことが出来よう。

### IV. 文献

- 1) J.S. Murphy, J. Exp. Med., 100, 657 (1954).
- 2) J.S. Murphy, Mech. Ageing & Develop., 2, 125 (1973).
- 3) N. Fukuda & N. Yago, J. theor. Biol., 46, 21 (1974).
- 4) N. Fukuda & N. Yago, *ibid.*, 58, 131 (1976).
- 5) 矢後・池田・市川・福田, 基礎老化研究, 1, 68 (1977).
- 6) 矢後・池田・市川・福田, *ibid.*, 2, 10 (1978).
- 7) 矢後・池田・市川・福田・渡辺・岡部, *ibid.*, 3, 74 (1979).
- 9) J. Roberts & C. Roberts, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 72, 147 (1975).

カイコガ成虫のアルギナーゼ活性における性的二型と加齢による変化

相垣 敏郎 小山内 実 東京都老人総合研究所 生物学部

Sexual dimorphism and age-associated changes in arginase activity  
of the silkmoth, Bombyx mori

Toshiro Aigaki and Minoru Osanai

Department of Biology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology

一般に動物の生殖期間は種に固有であり、ある動物の最大寿命と生殖期間の間には強い相関関係が存在することが知られている。生殖に関連した形質の老化は、必ず個体の寿命に先がけておこり、確かな老化指標になりうるものと考えられる。生殖機能は、生殖細胞の形成以外にも様々な形でとらえ得る。受精時にその個体の遺伝子によって性決定がなされた後、発生プログラムの展開に従って、生殖器官の形成をはじめ、性的特徴を示す種々の形質発現がなされる。成熟後一定の期間、生殖活動が行なわれた後、加齢に伴って生殖能力は低下し、最終的には完全に消失するに致る。成熟期に顕著にあらわれた特徴的な性的二型も加齢と共に減退する。私達は、カイコガ成虫のアルギナーゼ活性において、成熟による性的二型の出現と加齢に伴う活性の減退を見出したので報告する。

米沢と小山内 (1980) は、高温下飼育のカイコガ成虫で、適温下飼育では見出せない尿素的体内蓄積が起こることを報告した。その機構を解明するために、直接尿素的の生成に関与する酵素アルギナーゼの活性測定を行なったところ、尿素的蓄積とアルギナーゼ活性の間に正の相関関係がないという結果を得た。しかしながら、酵素活性の加齢的变化を検討した際に、老化と関連した新しい知見を得ることができた。

アルギナーゼ活性の測定には、二種の異なる方法を用いた。一つは、Brown & Cohen(1959)に従って酵素反応によって生成された尿素的を 1- Phenyl- 1,2 - Propanedione- 2- oxime で発色させ、比色定量する方法で、初期の研究に使用した。もう一つは、基質として放射性アルギニンを用い、生成された放射性尿素的をさらにウレアーゼで分解し、放出された CO<sub>2</sub> の放射活性から算出する方法で、基本値が低く、微量の試料の活性測定に適するので、単離された組織等、現在ではほとんどこの方法を採用している。この方法は私達によって開発された。酵素標本としては、カイコガ1個体あるいは切り出された組織を 0.1 % Cetyltrimethyl



ammonium Bromide 中でホモジナイズし、遠心した上清を用いた。飼育温度は、卵から羽化までを 25°C、羽化後は、適温下飼育では 25°C、高温下飼育では 35°Cとした。

生涯を 25°Cで飼育された個体について、发育段階を追って測定したところ、卵及び幼虫期では、アルギナーゼ活性は雌雄ともに低く雌雄差は認められない。雌では、蛹期以後成虫期を通じて、幼虫期とほぼ同水準の活性を維持する。一方雄では、蛹期以後急激な活性の上昇が起こる。羽化後もアルギナーゼ活性はさらに高まり、2日目の雄成虫は最大の活性を示す。しかし、それ以降は加齢に伴い徐々に低下する。当然、活性の雌雄差も羽化後2日目に最大となり、この時雄は雌に比し約5倍の活性を有する。

雌雄差を生ずる原因を探るために、羽化後2日目成虫雌雄の諸器官をとり出し、その各々の器官について活性を測定した。筋肉、マルピギー管、中腸及び後腸では、雌雄ともにアルギナーゼ活性は認められなかった。雌雄の脂肪体と雌内部生殖器官にある程度の活性が認められ、雄内部生殖器官が極めて高い活性を示した。活性の詳細な分布をさらに調べるために、雄内部生殖器官を構成する精巣、貯精のう、射精管、附属腺について活性測定を行なった。精巣にわずかな活性が認められたが、最も高い活性を示したのは貯精のうであった。他の射精管及び附属腺では全く活性は認められなかった。貯精のうの活性は、含有蛋白質あたりの Specific activity でも諸器官中最大の活性値を示した。

形態学的関連を見ると、アルギナーゼ活性が上昇する蛹期中期から精巣重量の減少がおり、それと対照的に貯精のうでは重量の増加がみられる。これらのことから、アルギナーゼ活性は精子形成以後の生殖機能と密接な関係にあると推定される。

一方、成虫期を 35°Cの高温下で飼育されたカイコガ雄では、最大活性は適温下飼育のそれとほぼ同水準であるが、羽化後1日目に最大となり、以後加齢に伴う低下が見られる。この事実は、高温下飼育により、生涯寿命の短縮（平均寿命で適温下飼育時の約半分となる）と共に、アルギナーゼ活性の加齢による変化が促進されることを示している。アルギナーゼ活性を老化の指標とするならば、高温環境におかれた生体では、老化の促進と寿命の短縮が同時にもたらされたことになり、ショウジョウバエの研究から Pearl (1928) によって提唱された Rate of living theory をよく支持するようになる。

#### 「謝辞」

実験に供したカイコガ中、標準商業品種「芙蓉×東海」は東京都蚕糸指導所、蚕業試験部の楠野正夫部長、限性品種「支137号」は農林水産省蚕糸試験場、蚕育種第二研究室の衛生卓磨室長の御好意により、夫々飼育、提供されたものを用いた。ここに感謝の意を表す。

## 昆虫ホルモンのカイコガ成虫の寿命とアミノ酸プールに及ぼす影響

小山内 実 (東京都老人総合研究所生物学部)

Effects of insect hormones on the lifespan of silkmoth, Bombyx mori, and the age-related changes in amino acid pools

Minoru OSANAI

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo

昆虫はホメオスタシス維持に関わる諸機構の一つ、液性相関系が、哺乳動物より遙かに単純である。脱皮ホルモン、幼若ホルモンの他には、ペプチッド系の、脳及び神経節から分泌される、いわゆる神経分泌物質だけで営まれているのに過ぎない。従って、体細胞がpostmitoticsより構成され、極めて短命である点をも考慮すれば、老化と寿命のモデル研究に甚だ適する材料といえる。ここでは脱皮ホルモンと幼若ホルモンを蚕蛾に投与して、寿命と深い関連を有する、蛋白質合成の原料供給源たるアミノ酸プールの加齢的变化を追求し、内分泌機構調節による寿命老化制御の可能性を探った。

蚕蛾は、Bombyx moriの商業品種、芙蓉×東海の成虫雌雄を用いた。アミノ酸は、虫体ホジネートより1%ピクリン酸で除蛋白、抽出し、Dowex-1カラムによって、ピクリンを完全に除去した後、分析に供した。アミノ酸の定性及び定量には、日本電子株式会社製、JAL-200A型アミノ酸自動分析機を使用した。これは、6種類のpH及びイオン強度を変えた酢酸リチウム緩衝液を連続使用することにより、75種類以上のニンヒドリン陽性物質の分離能を有する。ここでは便宜上、分析されたすべてのニンヒドリン陽性物質を“アミノ酸”として取扱う。蚕蛾に含有されるアミノ酸の種類は約45種類であったが、常時定量可能で、その加齢的变化を確実に把握できたものは約25種類に過ぎなかった。

脱皮ホルモンの働らきは、概念的に脊椎動物の甲状腺ホルモンの働らきと類似の生理的作用を有し、一般に昆虫の体内代謝率を高めるが、幼若ホルモンは、反対に低める作用があると見做されている。脱皮ホルモン(エクジソン)を注射された蚕蛾は、概して、短命の傾向を有し、殊に高濃度では著しい。幼若ホルモン(JH)投与の場合には、感受性、或いは体重の相違によるためか、雌雄間に寿命の差異が見られ、高濃度では、脱皮ホルモン同様、短命となるが、低濃度ではかえって、寿命を延長せしめ、20%にも達した。これら両ホルモンが、蚕蛾の寿命に及ぼした影響は、上記の作用を斟酌すれば、良くrate of living説に適合する。

脂肪族必須アミノ酸で、比較的転化し難いアミノ酸、ロイシン、イソロイシン、バリンはお互に類似の加齢的変動を示し、そのアミノ酸プールのレベルの低下は、これらのアミノ酸が蛋白質合成に使用されたことを示唆した。雌ではホルモン投与による大きな影響はみられないが、雄では、いずれのホルモンによっても、アミノ酸プールは増大した。幼若ホルモンでは生涯中、高いレベルを維持し続けるが、脱皮ホルモンでは、老化と共に激減する。他のアミノ酸でも、この加齢的パターンをとるものが多い。

フェニルアラニンとチロジン等の芳香族アミノ酸は、必須アミノ酸か否かによる相違があるものの、両ホルモンに対して、イソロイシンの必須アミノ酸と似た加齢的变化をとる。代謝され易いアミノ酸であるアラニン及びグリシンも、お互に類似の加齢的フリーアミノ酸プールの

変動を示し、幼若ホルモンは高レベルを、脱皮ホルモンは低レベルを保つ。雌雄による加齢的変動は大きく異なるが、ホルモンに対する反応の傾向は似る。

カイコガでは、含硫アミノ酸の代謝が活発である。これらのうち、フリーのシステイン、シスチンは全く検出されない。メチオニンも量的には少く、雄よりも、雌の加齢的变化の方が大きい。雄では、JHも、エクジゾンも、共に無処理群より高いレベルを保つ。エクジゾン処理群は老化すると低下する。雌でも、ホルモン処理群は、いずれも、無処理群よりも高いレベルを保持する。エクジゾン処理のレベル上昇効果はJH処理のものより大きい。特殊な含硫アミノ酸、シスタチオニンとランチオニンは雄の含量は雌よりも遙かに少く、お互に類似の加齢的プル変化を示す。雌の方がホルモンに対する反応性も大きい。雄では、エクジゾン処理群は、3つの実験群中、最も高いレベルを示し、JH、無処理群の順に低レベルを保つが、後者2群には大きな差異が見出されない。雌では、JH処理がエクジゾン処理群より高いが、両ホルモン共、高プルレベルを維持する効果を表わした。タウリンについては、雌のホルモンに対する反応性は、シスタチンにおいて雄が示すプールの加齢的变化と類似する。雄では、JHのが最も高いレベルで、対照群よりも常に少し高レベルを維持するが、脱皮ホルモン処理群ではかなり低く、羽化時のプルレベルを老化まで保持する。

一般に幼若ホルモンは、無処理群蚕群よりも、フリーアミノ酸プールを高レベルに保ち、主として蛋白質合成のためのアミノ酸利用を抑制している傾向を示すが、脱皮ホルモンによるアミノ酸の加齢的変動は、遙かにダイナミックであって、必ずしも蛋白質合成促進のみに作用はしていないように思われた。しかしながら、概して言えば、やはり、JHは代謝率低下による寿命延長の、そしてエクジゾンは代謝率昂揚による寿命短縮の傾向があると言える。エクジゾンの働きが蛋白、合成に関してだけでも多岐多様にわたるため、アミノ酸種によるプル変動の特異性が表出されたのではないかと思惟される。幼若ホルモンによる寿命の延長化を、尚も詳細にみれば、最大寿命の延長はそれ程顕著ではなく、加齢過程の途中で死亡する個体数の減少に基く、平均寿命の延長であることがわかる。すなわち、幼若ホルモンは、代内代謝の変化を緩和して、その代謝の変化に対応できなかった個体の死亡するのを防ぐ役割を果しているように思われる。強いてあげるならば、昆虫におけるエクジゾンに対応する、哺乳類の甲状腺ホルモンに対して、幼若ホルモンに対応すべきものは未だ詳かではない。もしも、哺乳類一ヒトの加齢に影響を及ぼす代謝速度を低下せしめるようなホルモンが見出されるならば、それは、寿命の制御も必ずしも夢ではない。

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。

#### 「謝辞」

本実験に使用されたカイコガは秋川市東京都蚕糸指導所より分譲されたものである。同所蚕業試験部長楠野正夫氏の御厚意と御援助に対して、厚く感謝の意を表する次第である。

蛋白質合成異常変異種蚕<sup>サナバト</sup>(Nd) の寿命とアミノ酸プールの加齢的变化

米 沢 由 美 子 ・ 小 山 内 実 (東京都老人総合研究所生物学部)

Lifespan and age-related changes in amino acid pool sizes of Nd,  
a silkworm mutant having no ability to synthesize fibroin

Yumiko Yonezawa and Minoru Osanai

Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Tokyo

蚕<sup>サナバト</sup>は羽化後全く摂食せず、代謝上不完全閉鎖系であるため、各種の物質代謝、特に含窒素有機化合物の代謝の解析に好適である。

今回は蛋白質合成変異種について、その寿命とアミノ酸プールの変化を検討し、遺伝子が蛋白質合成を通じて及ぼす寿命規定の発現機構解明の一端を得ようとした。

「材料と方法」

蚕<sup>サナバト</sup>のまゆの生糸はフィブロインとセリシンの二種の蛋白より成る。フィブロインは後部絹糸腺より分泌され、セリシンは中部絹糸腺で分泌されて、既に分泌されたフィブロインを包囲し、生糸を形成する。

カイコガには、このフィブロインを合成できない遺伝的変異種が幾つか知られている。裸蛹(Nd)は中部と後部絹糸腺が退化し、吐糸不能でまゆが出来難い。セリシン蚕(Nd-S)はセリシンのみを含むまゆを作り、吐糸不能蚕の発現率は前者より低い。DES-Ndは、diethyl sulfonate投与で誘導されたNd-Sに似た優生遺伝子をもつ、フィブロイン合成不能変異種である。

これら3変異種の寿命を測定し、NdとNd-Sについて、アミノ酸プール値の変動を調べた。

「結果と考察」

フィブロイン合成異常の3変異種の寿命は、Ndでは雌雄とも極めて短かく、他の2変種の半分しかない。

一方、DES-Ndは正常種よりやや短命であるが、あまり変りない。

Nd-Sは、DES-Ndより少しく短命で、Ndと比較した場合にはかなりの相違を示し、DES-Ndに準ずると言える。又、この変異種では、雄の方が雌より有意に長命である。

一般に閉鎖系昆虫では、アミノ酸は、蛋白質の分解並びに他のアミノ酸からの転換により供給され、蛋白合成に利用される他、異化作用や他のアミノ酸への転換のために消費される。

同定されたニンヒドリン陽性物質47のうち、特徴ある変化を示したものについて検討してみると次のようであった。

(1) Leu, Ile, Val, Lys等の必須アミノ酸に代表される加齢のパターン。

第4回大会で既に報告したように、これらのアミノ酸は、正常種(大造)では雌は雄よりわずかに高いレベルを維持し、雌雄いずれも加齢と共に漸減する。Ndでは、雌で羽化直後(0日目)

のレベルがかなり高く、正常種に比し約2倍の値を示した。このレベルは加齢に伴い急速に減少し、正常種の約1/2にまで低下した。死の直前にはわずかに再び増加する傾向がある。雄では0日のレベルが正常種雄の約1.5倍で、加齢と共に漸減する。

一方、Nd-Sは、アミノ酸プールの大きさに関して、正常種とNdとの中間型ともいえるパターンを示し、雌の0日値は正常値の約1.3倍で以後序々に減少する。雄では、0日目のレベルも正常種とほとんど相違がなく、加齢に伴う減少傾向も顕著ではない。

(2) 必須アミノ酸ではない、Ala, Gly, Ser, Arg, Proも同様のパターンを示す。

(1) の結果と総合的に考察すれば、これらのアミノ酸プールの変動は、Nd, Nd-S等フィブロイン合成不能変異種における、主として、蛋白質代謝を反映していると考えられる。

(3) 例外的にThrのみは、Nd, Nd-Sとも、雌雄双方で、羽化直後のレベルが正常値よりも低く、加齢に伴う減少も緩やかである。

同じ必須アミノ酸でもThrのレベルは上記アミノ酸群と対照的で、代謝様式が他のものと異なっていることが示唆され、興味深い。

(4) 含硫アミノ酸で重要な働きを有するMetは正常種、Nd, Nd-Sのいずれも、雌雄共に低い値を示し、加齢変化も少ない。これに対して、その異化物と考えられるMSOは、Ndでは、0日のレベルが雌は正常値の12倍、雄は6倍と異常に高い値を示すが、加齢に伴って激減する。Nd-Sでも、同様のパターンであるが、Ndより常に低いレベルを保つ。

(5) 含硫アミノ酸の最終代謝物であるTauは、既に報告したように、正常種で加齢に伴って、体内に蓄積し、カイコガ老化の極めて好適な指標であった。フィブロイン合成不能変異種各種でも、全く同様に加齢と共に増加する。雌では、正常種と、ほとんど同レベルに達するのに過ぎないが、雄では3~4倍の極めて高い蓄積濃度を示す。

この傾向はNdの方が、Nd-Sより顕著である。

(6) 最後に非常に興味深いのはNdに於ける尿素の生成である。

既に報告したように、尿素は、25°C飼育の正常蚕<sup>♀</sup>では、尿中にわずかに検出されるのみであり、35°Cの高温飼育においてのみ、寿命の短命化とともに、体内での急激な蓄積がみられた。

ところが、変異種Ndでは、25°Cの適温飼育にもかかわらず、雌雄とも羽化直後より体内での蓄積がみられ、特に雄では生体中の濃度の20倍以上の尿素を尿中へ排せつする。

他方、U, Nd-Sでは尿素は、ほとんど検出されなかった。

### 「結論」

カイコガを寿命と老化の研究の材料に供する理由の1つとして、その短命なことと共に、様々な遺伝品種が発見、保存されていることがあげられる。既に報告したように、トリプトファン代謝異常変異各種は寿命が正常種のそれと大差ないが、フィブロイン合成不能変異種は、多少の程度こそあれ、正常種との寿命の相違を示し、Ndが最も大きく、Nd-S, DES-Ndの順で正常蚕の寿命に近ずき、DES-Ndでは、ほとんどその差違が認められなかった。フィブロインの形成は老熟幼虫の絹糸腺で行われるから、成虫においては、その合成不能の影響は一応及ばないはずである。私達は、寿命に影響が現われていることから、幼虫絹糸腺のフィブロイン合成のみならず、これら変異種では蛋白質代謝の異常が起きていると見なし、それが敏感なアミノ酸プールの大きさに反映されるかもしれないと考えた。予期したように、最も短命なNdは、正常蚕との相違がアミノ酸プールで最も大きく、Nd-S, DES-NdはNdと正常蚕との中間型で、或いはNdに近く、或いは正常蚕に類似したアミノ酸の加齢の変動を示した。このことは、寿命の長さの傾向と全く一致していて、蛋白質代謝が如何に寿命維持に大切な役割を果しているかを示すものである。

その他、Tauの蓄積が、用いられた異常変異各種にも見出され、これが少くともカイコガ老化の確実な指標たりうる事が確認された。

蛋白フィブロイン合成異常変異種の中で、最も異常が大きく、最も短命なNdで特異的に尿素が生成されることは、高温飼育により、短命化と尿素形成がひきおこされる事実と考えあわせて、非常に興味深い。

### 「謝辞」

本実験に使用された3種のフィブロイン合成不能変異種は、すべて茨城県筑波郡谷田部町農林水産省蚕糸試験場、蚕育種法第二研究室より分譲されたものである。同室室長、蒲生卓磨博士の御厚意と御援助に対して、感謝の意を表する次第である。

メダカ系統間に見られる放射線感受性、スーパーオキシドディスムターゼ活性と寿命の相関について (予報)

加藤邦彦、島田敦子、江上信雄 (東京大学 理学部 動物学教室)

Preliminary Report on the Correlation between Radiosensitivity, Superoxide Dismutase Activity and Life Span of Different Strains of the Fish Oryzias latipes

Kunihiko Kator, Atsuko Shimada and Nobuo Egami

Zoological Institute, Faculty of Science, University of Tokyo

放射線被ばくあるいは酸素呼吸などにより生成する活性酸素が、老化因子の一候補として注目されて来た。中でもスーパーオキシドは、それ自身の反応性は他の活性酸素より必ずしも高くないにもかかわらず、活性酸素群全体の生体内レベルの調節に密接に関与しているとして、その重要性が指摘されている。1980年にTolmasoffらは、寿命の異なる哺乳類、特に、各種霊長類の脳・肝・心臓などを用いて、スーパーオキシドの分解酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の活性を測定し、比代謝率当りの SOD活性の高い動物ほど長寿であることを報告したが、以後、老化制御因子としての SODが注目されている。ところで、近年、田口 (放医研) の努力によって、実験動物としての近交系メダカがいくつか確立されたが、その内の一つ HB1-2は短命であることがわかった。更に、 $\gamma$ -線に対しても、HB1-2は非常に高感受性であることが判明しつつある。イオン化放射線による傷害の誘発には、それにより生じる活性酸素が主要な役割を果たしていると考えられるので、HB1-2におけるその調節に興味を持たれる。そこで、今回は、雑系ヒメダカ及び近交系メダカの HB1-2を用い、それらにおける放射線感受性・SOD活性・寿命の関係を調べた。

放射線感受性の測定には、両メダカを 250R/min の線量率で  $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -線による全身照射を行ない、 $24 \pm 3^\circ\text{C}$  で飼育し、30日間の生残率を観察した。SOD活性の測定は Tolmasoffら (1980) の方法に従った。取り出した脳及び肝臓を3倍量の蒸留水でホモジナイズし、遠心後、その上清の SOD活性をピロガロールの自動酸化の阻害度として求めた。又、比較のため、メダカより長寿である金魚の脳組織の SOD活性測定も行なった。

雑系ヒメダカの最大寿命は5年であるが、近交系メダカ HB1-2の寿命は1年前後であり、現在その詳しい生存曲線の作成作業を続けている。 $^{137}\text{Cs}$   $\gamma$ -線に対するヒメダカ及び HB1-2の  $\text{LD}_{50\%}$  は、それぞれ 2.5KR 及び 1.5KR となり、HB1-2の放射線高感受性が示された。SOD活性については、ヒ

メダカに比しHB1-2では脳で低い値を示した。肝臓のSOD活性については、血液混入の影響が無視できないと思われたので、血中のSOD活性の測定による補正を試みている。

以上の結果より、メダカにおけるSOD活性と放射線感受性・寿命の密接な関係が示唆された。今後は更に、これらの関係を詳しく調べるとともに、加齢に伴うSOD活性の変化の有無についても明らかにしたい。

(本研究の一部は、文部省科学研究費補助金及び理化学研究所ライフサイエンスプロジェクト研究費によって、行なわれた。)

## 脂 肪 酸 合 成 系 酵 素 の 誘 導 の 加 齢 に よ る 変 動

入谷信子、 福田ひとみ、 桂田昭彦、 池田由美子

(帝塚山学院短大)

## AGE-DEPENDENT ALTERATIONS OF LIPOGENIC ENZYME INDUCTION

Nobuko Iritani, Hitomi Fukuda, Akihiko Katsurada & Yumiko Ikeda  
Tezukayama Gakuin College

When 1-, 2- and 9-month-old rats previously adapted to a commercial stock diet were fed a fat free diet, the rates of synthesis and degradation of lipogenic enzymes in liver were measured by following time courses for the change of the enzyme activities. The magnitudes of induction of glucose-6-phosphate dehydrogenase, malic enzyme and acetyl-CoA carboxylase were very high in young rats and decreased with aging. The rates of synthesis of the enzymes were also markedly decreased with aging as compared to those of the enzyme degradation. The Ouchterlony double-diffusion analysis showed that the enzymes from livers of different age rats are immunologically similar to each other. In addition, the immunochemical titrations clarified this information. The  $K_m$  of the enzymes for substrates were not altered by aging. These results suggest that the impairment in the enzyme forming system during the induction caused the decrease in the rise in enzyme protein quantities in aged rats. On the other hand, the capacities of insulin binding to hepatic plasma membrane, erythrocyte and adipocyte of rats were significantly reduced with aging, whereas the dissociation constants were not changed. The insulin binding capacities correlated



the magnitudes of induction of lipogenic enzymes. It is suggested that insulin binding is implicated as a possible cause of the age-dependent modifications of lipogenic enzymes.

## 「皮膚粘膜リンパ節症候群の生化学的研究」

大津 英二

瀬長良 三郎

(北里大学、医学部)

(済生会神奈川県病院)

## Biochemical Studies on Mucocutaneous Lymph Node Syndrome

Siji Ohtsu (Kitasato University)

Kyoaburo Senaga (Saiseikai Kanagawa Hospital)

Introduction

"Inflammation should be a teacher so as to keep our creativeness basically young." Mucocutaneous lymph node syndrome (MCLS) invades into the developing heart of Japanese infants to cause coronary aneurysms. The mechanism of coronary complications is quite unknown. We have already clarified in the first place that MCLS with aneurysms (Type II) was characterized not only by the  $\text{Ca}^{+2}$ -supersensitive thrombocytic leukotriene ( $\text{LTB}_4$ ) biosynthesis (around 104.4 ng/min/mg) but also the moderate and  $\text{Ca}^{+2}$ -sensitive thrombocytic increase of prostaglandin ( $\text{PGE}_2$ ) formations (24.4 ng/min/mg) both from 5.0  $\mu\text{g}$ /tube (0.5 ml) of arachidonic acid (E.Ohtsu, R.Senaga & M.Sakanoue: The International Symposium on leukotriene and lipoxygenase products, 1981, Firenze). Subsequently we have found that even the less amount of leukocytic  $\text{PGE}_2$  formations (max. 2.4 ng/min/mg) in both type II and MCLS without aneurysms (Type I) at their onset, if combined with a concomitant increase of  $\text{LTB}_4$  biosynthetic specific activity to the level of max. 736.0 ng/min/mg, were suggested to cause such a typical hard edema as demonstrated in the animal skin by Ford-Hutchinson et al (E.Ohtsu & K.Yashiro: The 1st Kawasaki Disease Conference - Pediatric Internal Medicine, May, 1982). We describe here that only the lymphocytes of type II pathognomically biosynthesize  $\text{LTB}_4$  to the corresponding degree of leukocytic formations in the early stage.

Methods

Lymphocytes of infants were collected by separating them with Ficoll-Hypaque (d=1.078). 50  $\mu\text{g}$  of arachidonic acid was incubated with the proportional range (50-1000  $\mu\text{g}$ , protein) of the frozen and thawed cell lysates for 10 min at 37°C. The ether extracts were passed through SEP-PAK and  $\text{LTB}_4$  as a main isomer III (6, 14 cis-8, 10 trans-5, 12 dihydroxyeicosatetraenoic acid)

was quantitated by the method of Bokoch and Reed (J. Biol. Chem. 256(11), 5317). The isolated LTB<sub>4</sub>, which had such submaximal peaks or shoulder, as described, around 281, 258 and 265 nm was identified by gas/liquid chromatography mass spectrometry and chemotactic activity also was confirmed using polymorphonuclear leukocytes and macrophages.

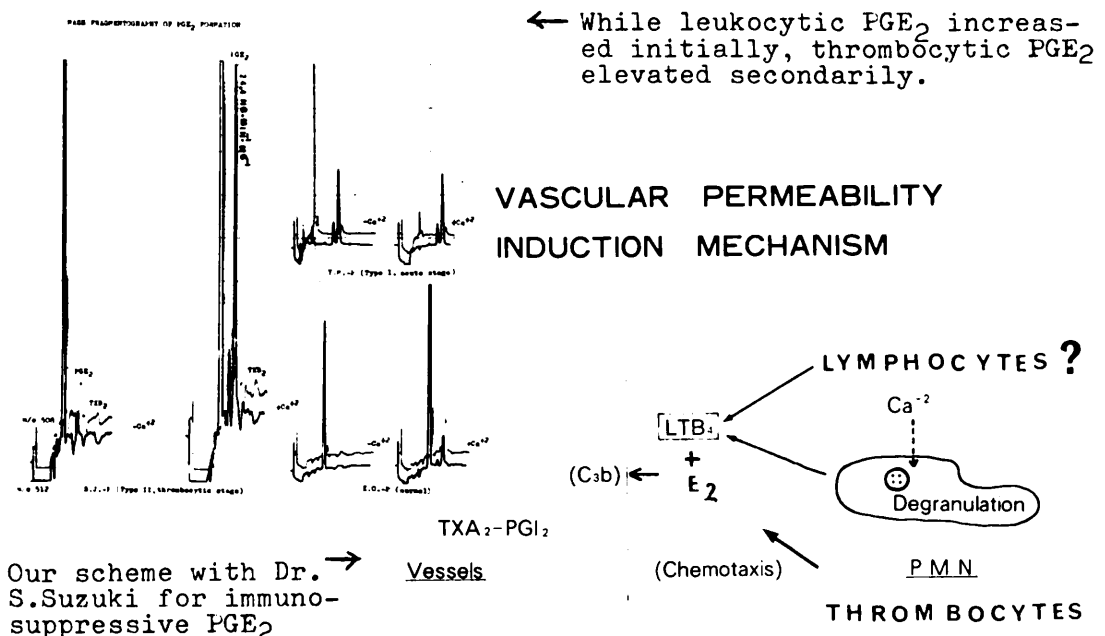
Results

The LTB<sub>4</sub> biosynthesis in the initial stage of type II was elucidated to be 10 times higher (141.3 ± 75.7 ng/min/mg, n=8) than those of type I (10.3 ± 4.3 ng/min/mg, n=7) and the controls including other infectious diseases (8.5 ± 5.6 ng/min/mg, n=7).

Discussions

Aspirin administration has nothing to do with the main difference. Such symptoms as gallop-rhythm and sustained fever, which represented heart inflammation of MCLS, were thought equivalent to the biosynthetic LTB<sub>4</sub>-forming capacity (E.Ohtsu & H. Shirai; Kanagawa Pediatric Congress, April, 1982). Since lymphocytic LTB<sub>4</sub> will attract leukocytes to the inflammatory area and elevate vascular permeability to form aneurysms in case vascular or thrombocytic PGE<sub>2</sub> formations concomitantly enhanced, prognostic value of lymphocytic LTB<sub>4</sub> biosynthesis will be expected. The role of lipoperoxide also will be discussed while some years-long abnormalities remain to be watched. Meanwhile, the thrombocytic leukotriene B<sub>4</sub> biosynthesis in some obesity has been elucidated to be Ca<sup>2+</sup>-insensitive (Vth International PG Conference, 1982).

Heart-felt gratitude should be paid to Dr. Tomisaku Kawasaki who has given the first author valuable suggestions and samples. Thanks should be given to Mr. N. Akimori of Hitachi Applied Center, Miss. E. Saito and Miss. K. Abe for their technical assistance.



リボゾームの構造変化：マウス及びラットの老化に伴うリボゾーム  
タンパク質とリボゾームRNAの量的質的变化

森 望，野谷悦子，飯田裕之，阿部幹夫，後藤佐多良  
(東邦大学薬学部生化学教室)

Structural changes of hepatic ribosomes during ageing of  
mouse and rat

Nozomu MORI, Etsuko NOTANI, Hiroyuki IIDA, Mikio ABE and Sataro GOTO  
Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,  
Toho University

老化に伴って蛋白質を作る能力が低下することは様々な動物においてよく知られている。この数年，我々は蛋白質合成装置の機能の加齢変化について検討してきた。その結果，リボゾームの蛋白質合成活性が低下すること<sup>1,2)</sup>，特に，リボゾーム小サブユニットの開始複合体形成能が下がっていること<sup>3)</sup>を明らかにした。また，このようにリボゾームの活性は低下するが，mRNAの情報を読みとる忠実性は年をとっても低下しないことを見た<sup>4)</sup>。

リボゾームに関しては，今日，その構成成分はもちろん，その分子集合形態についてもかなり詳しく知られている。機能の低下は，微細であろうとも必ず，構造上の何らかの変化として捕えられるべきものであろう。蛋白質合成装置の機能は老化により明らかに低下している。では，そこにはいったいどのような構造上の変化が見られるだろうか。本研究では，リボゾーム蛋白質，リボゾーム附着蛋白質，リボゾームRNA，それぞれの量と質に加齢に伴う変化があるか否か検討した。

#### 材料と方法

動物は ddY雄マウス(4~27月齢)とWistar系雄ラット(5~22月齢)を用いた。その肝臓，脳等の組織よりポリソームを抽出し，これをピューロマイシン処理して，リボゾームとポリソーム附着蛋白質とに分離した。さらに，リボゾームからリボゾーム蛋白質とリボゾームRNAとを調製した。種々の月齢の動物由来のそれぞれの標品について定量を行ない，一次元，あるいは，二次元の電気泳動による比較を行なった。

#### 結果と考察

- (1) リボゾームRNA：28S, 18S, 5SrRNA以外にいくつかの微量成分があるが，加齢による変化は認められなかった(Fig.1)。鎖切断もニックも等しく差はないように見える。

- (2) リボソーム蛋白質：約70種のリボソーム蛋白質のうち塩基性のものを二次元の電気泳動により50個程のスポットに分離した。ラット肝臓の場合、このすべてのスポットに加齢変化はなかった (Fig.2)。
- (3) リボソーム蛋白質/RNA 比：Woolらによれば、ラット肝臓のリボソーム蛋白質とRNAの重量比はほぼ0.99であるが、我々の標品では1.08~1.20となり蛋白質含量が若干高い。この値の誤差はリボソーム付着蛋白質によるものと考えられるが、加齢との相関はなかった。
- (4) ポリソーム付着蛋白質：ポリソームをピューロマイシン処理することにより遊離する蛋白質はリボソームの3.7~5.2%に相当した。その蛋白質の主なもの伸長因子と考えられるが、一次元の電気泳動で見ると蛋白質分子種に加齢による有意差はなかった。

以上のように、リボソーム蛋白質、付着蛋白質、リボソームRNAの定量的比較、並びに、それぞれの電気泳動による分子種の比較を行なったが、今のところ加齢過程で有意な変化を示すものは見つかっていない。現在、リボソームの酸性蛋白質とポリソーム付着蛋白質について、二次元電気泳動によるさらに詳細な解析を行なっている。しかし、リボソームにおける加齢変化の主なもの、最近、いわゆる“変異酵素”の実体として指摘されているように、そのコンホメーション変化にあるならば、ここで用いた手法では変化として捕えることはできない。今後、物理化学的手法による比較をすることが必要であろう。

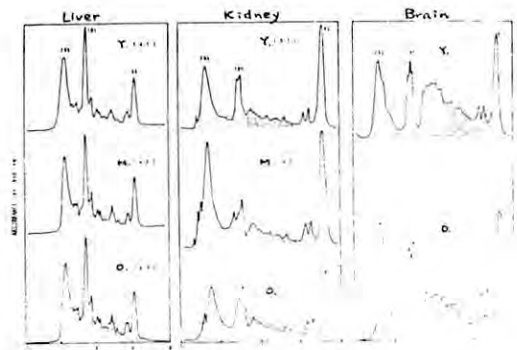
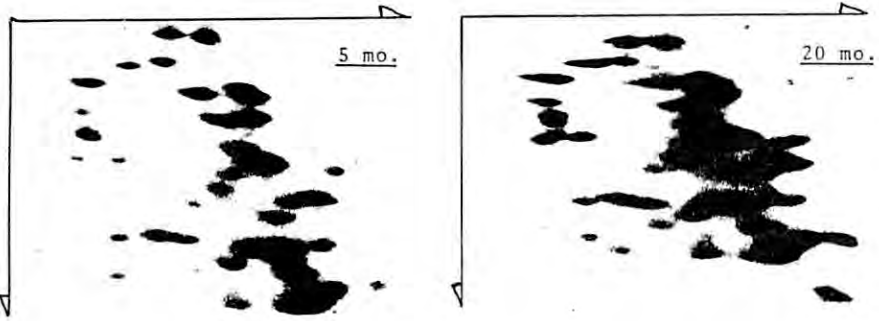


Fig.1 Polyacrylamide gel electrophoresis of r-RNA prepared from the liver, kidney and brain of mice of various ages.

Fig.2 Two-dimensional PAGE of the hepatic ribosomal basic proteins of young and old rat.



1) 森,水野,後藤：“加齢に伴うマウス肝臓リボソームの機能的変化”. 基礎老化研究,2,36~37 (1978)  
 2) 中沢,森,後藤：“老化マウスリボソームの翻訳活性：グロビンmRNA依存の蛋白質合成” *ibid.*, 4,96~97 (1980)  
 3) 中沢,森,後藤：“老化マウス肝臓リボソームの機能変化：40Sサブユニットの翻訳開始複合体形成能” *ibid.*, 5,60~67 (1981)  
 4) 森,松津,塩田,後藤：“老化マウスリボソームの機能変化：プロタミンmRNAによる翻訳忠実度の解析” *ibid.*, 5,64~65 (1981)

ラット肝の加齢に伴うセルロース・アセテート膜 2次元電気泳動  
蛋白質展開像の変化

藤田 敬子・戸田 年総・大橋 望彦

〒 東京都老人総合研究所・生化学部・基礎第二研究室

A novel method of two-dimensional electrophoretic survey of  
proteins affected by aging in rat liver

Toshiko Fujita, Toshifusa Toda, and Mochihiko Ohashi

Department of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of  
Gerontology

われわれにより新らしく開発された2次元電気泳動法を用いて、加齢に伴うSPFラット肝の水抽出性蛋白質展開像の変化を検討した。ここで用いた2次元電気泳動法はセルロース・アセテート膜2次元電気泳動法で、その特徴は、支持体にセルロース・アセテート膜を使用する事により操作が非常に簡便となっている事である。一度に8検体の分析ができ、蛋白質の染色完了までの全行程を5時間以内で実施できる。また、SDS等の蛋白変性剤を使用しないために、蛋白質をnativeな状態で分離でき、分離後の酵素活性等の解析も可能である。電気泳動は、1次元目に濃縮泳動法を伴う通常のセルロース・アセテート膜電気泳動を行ない、2次元目にはセルロースアセテート膜上での等電点電気泳動を行なう。2次元目の膜は重ねて泳動が行なえるため、一度に何枚ものコピーをとることができる。例えば、1枚目を蛋白質染色、2枚目を酵素染色、3枚目を免疫学的分析、4枚目を糖染色・・・等の同時解析が行なえる。現在までにわれわれは、ヒト血清蛋白質について応用し、約77スポットを分離検出し、このうち74スポットについて免疫学的に同定することができている。

一方、老化の機構を知る上で、近来特に重視されてきている蛋白質の2次的修飾に関して、精度の良い解析法が必要とされている。そこで前記の2次元電気泳動法の適用を試みた。

今回用いた S P F ラットは、1.5 , 6 , 12 , 24 月齢の Wistar 系および Fisher 系の雌雄である。肝の一部約 0.1 g を摘出し、水で 10% ホモジエネートとし、10,000×g 上清をサンプルに供した。サンプルは膜 1 枚当り 5  $\mu$ l (蛋白質量: 70  $\mu$ g) を使用した。2 次元目の等電点電気泳動には広域 pH range (3.5 ~ 9.5) の Ampholine を用いたが、約 80 の蛋白質スポットが検出された。詳細なスポットについての分離には pH range を変える等のさらに詳しい解析法を必要とするが、主なスポットについては加齢に伴う大きな変動は認められず、むしろ生体恒常性が良く保持されている様子であった。しかし、他のスポットから離れて存在する等電点 8.5 付近に、加齢に伴い大きく変動するスポットが認められた。濃度的に、6 , 12 月齢で濃く、1.5 月齢では淡く、24 月齢ではマイナースポットとして観察された。このスポットは Wistar , Fisher 共に雄に特徴的で、雌には月齢と関係なく観察され得なかった。よってこのスポットは何らかの形で性差に関与し、かつ加齢を反映している蛋白質ではないかと推察される。さらに詳しい検討をこの蛋白質について進めている。

従来、2 次元電気泳動展開像について、定性的判断が行なわれてきたが、本実験において、試作的ではあるが、展開像の画像処理による定量化プログラムを作製し、定量的濃度変化を測定することが可能となった。

ウエルナー培養細胞の継代に伴う DNA ポリメラーゼ忠実度の低下

田口隆彦, 福田 貢, 大橋望彦 (東京都老人総合研究所 生化)

Decreased fidelity of the DNA polymerase isolated from the late passage cultured fibroblasts of Werner's syndrome

Takahiko TAGUCHI, Mitsugu FUKUDA and Mochihiko OHASHI  
(Dept. of Biochemistry, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

### 序論

生後20カ月までのラット正常肝並びに再生肝から抽出・分離した DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の忠実度(鋳型 DNA に対する読み取り精度)は高いが, 生後23カ月以後のラット肝 DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  の忠実度は低下している事, および老令ラット再生肝 DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  分画中には忠実度の高い酵素と忠実度の低い酵素が存在し, 低忠実度酵素は熱にも不安定である事を我々はすでに報告してきた。

また Linn 等により培養細胞でも同様の研究がなされ, ヒト2倍体繊維芽細胞(MRC-5)からの DNA ポリメラーゼの忠実度は培養後 19 PDL の細胞より 56 PDL の細胞で数倍低下している事が報告されている。

一方, 若令でありながら老令でみられる現象を示す, いわゆる progeroid が知られている。ヒトの progeroid の一つであるウエルナー症候群患者では, 平均寿命は約40才で, 20才から35才という若さで白髪, 皮膚萎縮, 頭髪の脱落, 白内障, 糖尿病等の症状が見られている。またヒト正常2倍体繊維芽細胞に比べ, ウエルナー患者からの細胞は低い継代数で増殖が停止すると報告されている。

そこで我々は, 低い継代数で増殖が停止するウエルナー細胞で, 細胞の継代数と DNA ポリメラーゼの忠実度変化について検討した。

### 方法

実験に用いたウエルナー細胞は65才の患者皮膚より得たものである。細胞は10%牛胎児血清を含む MEM 培養液中で培養した。通常細胞は confluent になった段階でトリプシン処理により, 1:4 split の継代培養を行なった。DNA ポリメラーゼを抽出し忠実度を調べる場合は, confluent に達した細胞を 1:2 に split し, 24時間後回収して用いた。



DNA ポリメラーゼは約  $1 \times 10^7$  個の細胞を超音波処理して抽出した。DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  はホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより分離精製した。通常 DNA ポリメラーゼ活性は activated DNA を鋳型とし、 $^3\text{H-dTMP}$  の酸不溶分画中への取り込みで測定した。忠実度の測定は poly dA-dT<sub>10</sub> または poly dC-dG<sub>10</sub> を鋳型とし、鋳型に対して非相補的に取り込まれたヌクレオチド 1 モル当りの、相補的に取り込まれたヌクレオチドのモル数比で示した。

## 結果

この実験で用いたウエルナー細胞は 10 PDL 頃より増殖が急速に低下し、23 PDL 以降の継代は不能であった。

DNA ポリメラーゼの活性は実験に用いた最も継代数の少ない 4 PDL の細胞でも高く、継代数の増加にしたがって低下する傾向がみられた。特に 14 PDL 以降の低下が著しかった。

各継代数の細胞からの DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の分離・部分精製をホスホセルロースカラムクロマトグラフィーにより行った。

poly dA-dT<sub>10</sub> を鋳型とし、これに非相補的ヌクレオチドである dCMP の取り込みを測定すると、4, 12, 14 PDL 各細胞から得られる DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  では全く dCMP の取り込みが認められず、忠実度はいずれも  $1/4,600$  以下であった。しかし 17 PDL の細胞の酵素でわずかに dCMP の取り込みがみられ、19 PDL 細胞から得られる DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  ではその量が増加し、忠実度は  $1/440$  であった。一方、約 70 PDL まで分裂・増殖するヒト胎児肺由来 TIG-1 細胞（標準細胞）の 48 PDL 細胞から得られる DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  では、dCMP の取り込みが全くみられず、忠実度は  $1/11,000$  以下であった。また同じ鋳型で非相補的ヌクレオチドを dGMP とした場合でも、14 PDL までのウエルナー細胞由来 DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  では全く dGMP は取り込まれず、忠実度は  $1/4600$  以下であるが、19 PDL のものでは dGMP の取り込みがみられ、その忠実度は  $1/770$  であった。

さらに poly dC-dG<sub>10</sub> を鋳型とし、非相補的ヌクレオチドとしての dAMP と dTMP の取り込みを各継代数の細胞から得られた酵素で測定した結果も poly dA-dT<sub>10</sub> を鋳型とした場合とほぼ同じであった。

## 考察

ウエルナー細胞を培養系に移した場合、増殖は 23 PDL で停止した。TIG-1 細胞等良く知られている他の正常 2 倍体繊維芽細胞よりウエルナー細胞では増殖能の点で寿命は明らかに短い。この増殖能の停止直前（19 PDL）の細胞から得た DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の忠実度は低下しており、忠実度の低下と細胞増殖の停止とは何らかの関連を示す事と思われる。このようにウエルナー細胞は短期の継代培養しか出来ないことを除いて、培養継代数の末期に忠実度の低い DNA ポリメラーゼが出現する事は、MRC-5 等正常 2 倍体繊維芽細胞の継代末期の状態と似ている。さらに、すでに我々が報告したように老令ラットの肝から得られる DNA ポリメラーゼの忠実度も低下しており、このような忠実度の低い DNA ポリメラーゼ出現を加齢現象の指標に用いた場合、ウエルナー細胞も老化亢進性であることが認められた。

## Werner 症候群細胞の DNA 複製異常について

たけうちふじお<sup>1)</sup> みやもとてるまさ<sup>1)</sup> はなおかふみお<sup>2)</sup> やまだまさあつ<sup>2)</sup>  
 竹内二士夫, 宮本昭正, 花岡文雄, 山田正篤

1) 東京大学・医学部・物療内科 2) 東京大学・薬学部・生理化学

## The abnormal DNA replication in Werner's syndrome fibroblasts

Fujio Takeuchi,<sup>1)</sup> Terumasa Miyamoto,<sup>1)</sup> Fumio Hanaoka,<sup>2)</sup> Masa-atsu Yamada<sup>2)</sup>

1) Department of Internal Medicine and Physical Therapy, Faculty of Medicine, University of Tokyo 2) Department of Physiological Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo

Werner syndrome (WS) は、思春期以降に発症し、特徴的な臨床像を示す早老症として知られている。この疾患は、日本において高頻度に発生し、常染色体劣性遺伝を示す。本症患者由来の fibroblast では、life-span の短縮、S 期の細胞数の減少、DNA 複製速度の減少など、DNA の合成能の異常が報告され、老化との関連が論議されている。今回我々は、donor age の異なる 5 人の同症患者、3 人の正常人由来の early passaged fibroblasts を用いて、DNA-fiber autoradiograph と、alkaline sucrose density gradient の方法で、replicon level での DNA 複製速度、replicon initiation の頻度を比較した。DNA-fiber autoradiograph は、Huberman and Riggs の方法によった。DNA 複製速度は、FUdR で 30 分前処理後、10、20、30、60 分間の label より、initiation 頻度は、同様に前処理して、10 分 pulse 後、20 分又は 60 分 chase した sample より測定した。各々の条件で sample は、4 枚作成し、複製速度の測定には、tandem array の両端を除いて、各 300 個以上計測し、その平均を求めた。Initiation 頻度は、各 sample につきできる限り多く計測し、平均を求めた。尚、測定には blind procedure を用いた。同じ sample を 3 分間 label し、10 分、30 分、120 分間 chase して、5~20% の alkaline sucrose density gradient にかき、 $9.0, 100 \times g$  で 120 分間遠心し、複製された DNA の平均分子量を求めた。尚、FUdR 処理は同様に行ない、マーカーには、<sup>14</sup>C-labeled T4D phage DNA を用いた。前法による replicon の DNA 複製速度は、正常 fibroblast で、 $0.38 \pm 0.08 \mu m / min$ 、WS で、 $0.39 \pm 0.007 \mu g / min$  となり、差を認めなかった。又、donor age による差、各 sample 間の distribution pattern の差も認めなかった。Initiation 頻度は、20 分と 60 分 chase の間で差がなかったので、両者をまとめて平均を求めた。WS では 53.9

$\pm 2.04$ ,  $58.1 \pm 2.04$ ,  $56.1 \pm 1.90$ ,  $51.1 \pm 2.36$ ,  $56.5 \pm 2.21$ , 正常では  $35.8 \pm 1.52$ ,  $33.4 \pm 1.25$ ,  $32.0 \pm 1.47$  となり  $P < 0.01$  で、両者に差があった。又、分布パターンにも違いがあった。この分布は、対数正規分布によく一致した。Donor age による差は、認めなかった。アルカリ性ショ糖密度勾配遠心による DNA 複製速度の測定でも各 point での DNA の平均分子量は WS と正常との間で差を認めず、ともに 120 分 chase の sample では  $MW = 178 \times 10^6$  となった。又 donor age による差もなかった。以上より、WS では、initiation の頻度が低下しており、これが、overall の DNA synthesis の低下をひきおこしているものと考えられる。

## ヒト二倍体老化細胞のDNA合成再開

井出利憲<sup>1)</sup>・辻良明<sup>1)</sup>・三井洋司<sup>2)</sup>  
 (広島大学医学部<sup>1)</sup> 東京都老人研<sup>2)</sup>)

## Reinitiation of DNA synthesis in senescent human diploid cells

Ide, Toshinori, Tsuji, Yoshiaki and Mitsui, Youji

(Hiroshima University School of Medicine, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

ヒト二倍体線維芽細胞は、継代を重ねるにつれて増殖能力が低下し、やがて増殖を停止する。この現象を培養細胞レベルにおける老化のモデルとして多くの知見が集積しているが、何故一定の継代数の後に増殖を停止するかについては一致した見解をみるに至っていない。我々は単に老若の細胞を比較するのではなく、老化細胞を再び増殖させること(もし可能なら)を通じて、増殖停止(老化)の機構を探ろうと考えた。同様の試みとして、トランスホーム細胞(HeLa, SV80)を老化細胞と細胞融合すると、老細胞核へのチミジンとりこみが起るという報告があるが、この方法ではトランスホーム細胞のどのような機能がこの効果をもたらしたかについて、分子レベルで解析することは甚だ困難と思われる。我々は、もっと単純な物質によって老化細胞の増殖再開、少なくともDNA合成再開が起らないかと考え、様々な増殖誘導因子、ホルモン等を試みたが、調べた限りではすべて強い効果を持たなかった。

本実験では、DNAウイルスであるSV40、およびヒトサイトメガロウイルス(HCMV)の感染により、老化細胞における細胞DNA合成の再開が誘導された。

## 〔材料および方法〕

ヒト胎児肺由来線維芽細胞TIG-1(60-62代で増殖停止する)を用いた。最終的なまき込みののち培地交換を週1回ずつ行ない、3~4週後に実験を開始した。

## 〔結果および考察〕

老化細胞であることの示標として以下の条件を満たす細胞を実験に用いた。

- a) 60-62 PDL に達していること。
- b) 形態が典型的な“老化”細胞であること。
- c) 細胞増加が3週間くらい認められないこと。  
(58-59 PDL までは1:8 split で4-5日でconfluent に達する)。
- d) 細胞の分布がまばらであること(contact inhibition が起らない)。

1) これらの細胞の<sup>3</sup>H-チミジン(<sup>3</sup>H-TdR)オートラジオグラフィによる標識率は5~40%の牛胎児血清存在下でも2%以下であった。

2) 野生株SV40感染後、24時間ずつ<sup>3</sup>H-TdRで標識し、DNAをHirt法によって上清(ウィルスDNA)と沈澱(細胞DNA)に分けて、とりこみを測定した。図1に示す如く、細胞DNAへのとりこみは8~10倍に上昇した。

3) この結果はオートラジオグラフィによる標識細胞数の増加とも一致した。

4) <sup>3</sup>H-TdRのかわりに<sup>3</sup>H-GdRを前駆体として用いても同様の結果が得られたから、とりこみ上昇は単にチミジンキナーゼ活性の上昇によるものではない。

5) BUdRをとりこませた後、精製DNAをCsClの平衡密度勾配遠心で分析した結果、修復DNA合成ではなく、複製DNA合成であった。

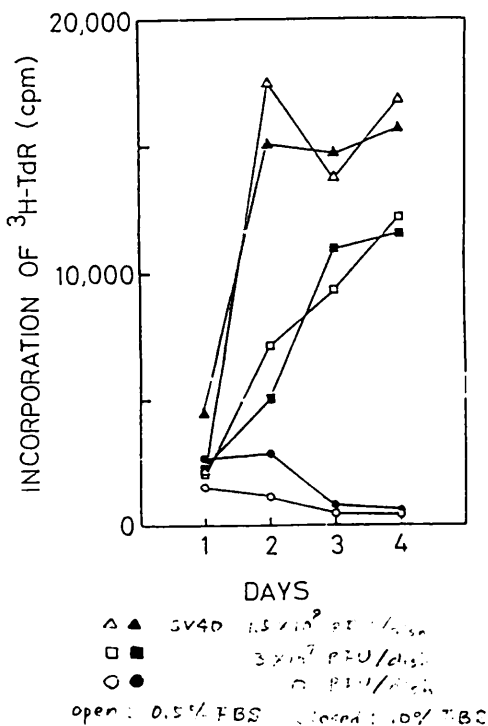
6) SV40の産生する2種のタンパク質T-抗原とt-抗原のうち、t-抗原を産生し得ない欠損変異株d<sub>2</sub>940(東大医科研山口博士より)を用いても野生株と同様の結果が得られたのでt-抗原は老化細胞DNA合成誘導に不要である。

7) T-抗原に関する温度感受性変異株tsA900(東大医科研山口博士より)を感染すると、高温、低温ともにDNA合成誘導がみられた。tsA900はトランスホーメーションやウィルス増殖の機能に関しては温度感受性であるが、細胞DNA合成誘導については温度感受性ではないことと矛盾しない。

8) SV40のT抗原を核内に有する細胞と、核内にチミジンをとりこんだ細胞をそれぞれ数えると表に示す如くT抗原を有する細胞の80%がDNA合成をしていた。T抗原が存在すればDNA合成は可能になるのであれば若い細胞と変わらない。むしろ若い細胞との大きな違いは、感染後T抗原を産生できる細胞頻度が低いことにある。

以上の結果は、血清によってはDNA合成し得ない老化細胞が、SV40の感染によってDNA合成を再開しうることを示す。又、老化細胞でDNA合成が停止しているのは、DNA合成の機構そのものの破壊、欠陥が生じているためではなく、T抗原(おそらくスイッチ的役割を果す)によって容易にonされる様な抑制状態にあるに過ぎないことを示唆している。

	Grains	T-antigen	
		positive	negative
SV40 infected	positive negative	120 29	43 446
mockinfected	positive negative	0 0	24 710



## ウシ血管内皮細胞の分裂加齢

山本清高、山本満里、松岡耕二、三井洋司（東京都老人総合研究所・生物・薬理）

## CELLULAR AGING OF BOVINE AORTIC ENDOTHELIAL CELLS

Kiyotaka YAMAMOTO, Mari YAMAMOTO, Kozi MATUOKA, Youji MITSUI (Dept. of Biology and Dept. of Pharmacology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

Dr. J. R. Smith、Dr. Y. Mitsui により、ウシの大動脈由来の内皮細胞の単離と培養技術が確立された。しかもこの培養系内皮細胞は、生体内の内皮細胞の特異機能であるプロスタサイクリン（強い抗血栓効果をもつ）産生能と、アンジオテンシン転換酵素（血管収縮作用を導く）の両活性を有することが確認された。それ故、このような特異機能を有する培養系内皮細胞は、培養系の分裂加齢変化が正常な生体内細胞老化に伴っておこる変化とどのように関連するかを、解析するのに好適な系である。今回は、内皮細胞を継代培養し、細胞の分裂限界、分裂加齢に伴ういくつかのパラメーターの変化、および、上記の特異機能が、分裂加齢に伴ないどのように変化するか、等について調べた結果を報告する。

内皮細胞は、イーグルMEM に10%牛胎児血清を添加した培養液で、37°C、5%CO<sub>2</sub> -95% air で培養した。細胞は、7日後（ほぼ定常状態に達する）に、0.25% トリプシン+0.02% EDTA で処理し、split ratio 1:8 で継代培養した。

この条件下で、比較的若い時期の細胞（PDL33）の集団倍加時間は約21 時間であった。細胞は、PDL 90を過ぎるところから増殖能が低下し始め、分裂寿命（限界）はPDL 110 であった。継代時の細胞数（細胞密度）はPDL 33 では $4.5 \times 10^5 / \text{cm}^4$  であるのに対し、PDL 110 では  $4.5 \times 10^3 / \text{cm}^2$  と大きく低下していた。特に終末期の細胞は巨大化し、そのために細胞密度も急激に低下するものと思われる。一方、飽和細胞密度は、分裂加齢とともに

ほぼ直線的に減少していた。

内皮細胞の倍数性 (polyploidy) の変化については、プロピジウムヨードで処理後、488nm でアルゴンレーザーを用い、FACS III で測定した。PDL 33の細胞では、大部分は2Cであり(95%)、4Cは4.5%、8Cは0.1%、の出現率であった。PDL 75までは4Cの出現率は10%以下であるが、その後増殖能の低下に伴ない多倍体細胞の割合が増加し、PDL 105では、4Cが約35%、8Cも7.4%出現していた。

次に、内皮細胞の特異機能のうち、プロスタサイクリン産生能と、アンジオテンシン転換酵素の活性変化について調べた。分裂休止期の細胞のプロスタサイクリン産生能は、加齢に伴ない上昇する。これに対し、アンジオテンシン転換酵素活性は、分裂加齢の初期から急激に低下する。これらの結果は、分裂加齢が分化の一過程であるという説に対してむしろ否定的である。

最後に、内皮細胞の細胞表面変化について、細胞電気泳動法により測定した。継代後7日の細胞(大部分はG<sub>1</sub>期の細胞で占められている)をEDTAで処理し、電気泳動度を測定した。内皮細胞の電気泳動度は、PDL 42では $-1.086 \pm 0.058$ であった。その後分裂加齢が進行しても、電気泳動度は余り変化せず(例えば、PDL 84では $-1.056 \pm 0.056$ )、終末期の細胞でも、 $-0.960 \pm 0.039$ (PDL 110)であった。このように、PDL 42からPDL 110までの間に、電気泳動度はわずか0.12低下するにすぎなかった。以前報告したヒト胎児由来線維芽細胞は、表面荷電も高く、また表面荷電の加齢変化も大であった(例えば、肺由来のTIG-1では、PDL15で $-1.658$ 、最終PDL 67では $-1.173$ であった)のに対し、内皮細胞は、表面荷電が低く、分裂加齢に伴ない表面荷電の変化の程度も非常に少ないことが明らかとなった。内皮細胞の表面荷電が赤血球のそれに近い値を示すこと、そして、特異機能を有する細胞の表面が、表面荷電値でみるかぎり、分裂加齢に対してその変化率が少ないこと、などある面ではもっともらしい。現在、細胞膜の質的变化、分化機能変化の原因、等について研究中である。

## ヒト 2 倍体細胞のクローン培養と増殖因子

黒 田 行 昭

( 国 立 遺 伝 学 研 究 所 ・ 形 質 遺 伝 部 )

## EFFECT OF GROWTH FACTORS ON HUMAN DIPLOID CELLS IN CLONAL CULTURE

Yukiaki KURODA

(Department of Morphological Genetics, National Institute of Genetics)

細胞レベルにおける老化の機構やその制御に関する研究には、ヒト胎児由来の正常 2 倍体細胞がそのモデル系としてよく使用される。この細胞は Hayflick の報告以来、約 50 回の細胞集団倍加を経て死滅することは多数の研究者により追試、確認されている。ところでこの 50 回の細胞集団倍加を行なう集団内の個々の細胞は、この期間どのような分裂・増殖様式をとるのか。また、最近各種の細胞の増殖や分化に対する影響が知られている表皮性増殖因子 (EGF) や、繊維芽性増殖因子 (FGF) が、ヒト正常 2 倍体細胞の増殖様式に対してどのような影響を与えるのか。これらの点を明らかにするため、ヒト胎児肺由来の細胞数倍加の少ない“若い細胞”と、細胞数倍加の多い“継代細胞”とを用いて、単一細胞からのクローン培養を行ない、集団を構成する個々の細胞について、その増殖様式や、これにおよぼす増殖因子の影響を検索した。

## (方 法)

三島市内の産院の協力を得て、人工流産した 10 週令のヒト胎児より分離した肺由来の細胞を用いた。この細胞は正常 2 倍体の核型を保持し、20% 牛胎児血清を含む Leibovitz の L15 培養液で培養した。継代はトリプシン処理により細胞を分散し、1:2 分割法によって継代した。“若い細胞”としては継代 6 代目 (6 PDL に相当) の細胞を、“継代細胞”としては継代 18 代目 (18 PDL に相当) の細胞を用いた。細胞のクローン培養は、分散した細胞を  $3 \times 10^3$  個ずつ多数の 60 mm プラスチックシャーレに播種し、3% CO<sub>2</sub>、97% 空気の気相中で重複培養し、24 時間おきに 3 枚のシャーレを固定、染色して、各 150 個の細胞について、分裂・増



殖してコロニーを形成して行く過程でのコロニー当りの細胞数の増加を継時的に観察した。また、培養液にEGF、またはFGFを1, 10, および100 ng/mlの各濃度に加え、上記と同様にクローン培養した細胞の増殖に与える影響を検索した。

#### (結果)

##### (1) “若い細胞”と“継代細胞”の増殖様式の比較

“若い細胞”では、増殖直後にはすべて単一細胞であったものが、培養が進むにつれて、2個、4個、8個と同調的な分裂を行なうもののほか、分裂後の2個の娘細胞の中の1個のみが次の分裂を行なうもの、数日間の培養期間中1度も分裂しないで単一細胞のまままでとどまるものもあった。これに対して“継代細胞”でも、基本的にはこれと同様な分裂様式をとるものの、全体としては増殖速度がおそくなることが分った。

##### (2) 細胞の増殖様式に対する増殖因子の作用

細胞の増殖様式に対する各種濃度のEGFおよびFGFの作用は、“若い細胞”に対しては、EGFおよびFGFいずれも、細胞の基本的増殖様式には変化を与えないで、細胞の分裂速度を著しく促進させた。しかし、“継代細胞”に対しては、EGFおよびFGFは、その増殖様式や分裂速度にはほとんど影響を与えないことが分った。

#### (考察)

ヒト正常2倍体細胞のクローン培養によって、細胞集団を構成する個々の細胞は、数日間の培養期間中1度も分裂せずに単一細胞のまま存在するものから、予想以上の速い速度で分裂するものまで、種々異なった速度で分裂する細胞の混在していることが明らかになった。集団としての細胞数倍加が起り、コロニー当りの平均細胞数が2倍になる期間に、ある細胞はすでに3回の分裂をして8個の細胞になっていた。

この現象は“若い細胞”にも、また“継代細胞”にもみられることから、ヒト2倍体細胞の約50回という細胞数倍加の中には、その数倍もの分裂を重ねている細胞が存在することが推察された。

このような細胞の増殖様式に対するEGFおよびFGFの作用は、基本的な増殖様式には変化を与えることなく、全体として細胞分裂の速度を変化させるもので、その効果は、“若い細胞”では著しく、“継代細胞”ではこれらの増殖因子に対する反応性が失なわれていることを示した。

細胞老化と細胞成長因子 I. WI-38 細胞の細胞老化に伴う無血清培地下における細胞成長因子の応答

加 治 和 彦 ( 東京都老人総合研究所 アイソトープ研究室 )

Paul D. Phillips, Vincent J. Cristofalo ( The Wistar Institute, Philadelphia, PA )

Cell aging and growth factors I. Changes in response to growth factors in serum-free conditions during the in vitro aging of WI-38 cells

Kazuhiko Kaji ( Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology )

Paul D. Phillips, Vincent J. Cristofalo ( The Wistar Institute, Philadelphia, PA )

動物細胞の培養には、既知物質からなる基礎培地に10%前後の血清あるいは動物体からの抽出物を加えた培地が広く用いられている。種々の低分子、高分子から成る体液成分の添加は、細胞の増殖機構、老化機構を研究する上で障害になっている。近年、G. Sato 等は、血清の細胞維持、増殖能は、その中に含まれるいくつかのホルモンにあると断じ、基礎培地に数種のホルモンを加えた完全合成培地を発表した。一方、R. Ham 等は、主に基礎培地に改良を加え、細胞株ごとに成分を異にする多くの基礎培地を報告した。現在、幾つかの研究室でヒト線維芽細胞の完全合成培地が発表されている(1)。細胞成長因子は、上記ホルモン・カクテルのうち、細胞の増殖に関する最も重要な成分であると思われる。各種の細胞成長因子と細胞老化の報告はまだ多くはなく、興味ある未知の分野として残されている。我々は、WI-38 細胞を用い、無血清培地下における各種細胞成長因子の作用を、細胞の倍加時間および細胞飽和密度をパラメーターとして観察した。なお血清添加における細胞増殖因子の作用は先に報告した(2)。

(材料と方法) ヒト胎児肺由来線維芽細胞、WI-38 細胞を MEM-10% FBS 下でストック培養した。この細胞を、無血清条件下で、 $1 \times 10^4$  細胞数/cm<sup>2</sup> の細胞密度で播種し、基礎培地として MCDB-104 を用い、これに各種ホルモンを加えて細胞の増殖を測定した。細胞成長因子は、EGF、FGF、MSA、h- $\alpha$ -thrombin (精製, CR社), brain-FGF (部分精製, KOR社), PDGF (演者等による部分精製, CM-セファデックスによる) を用いた。

(結果) ① WI-38 細胞の無血清培地 Table I に示すように、細胞はインスリン (5  $\mu$ g/ml), トランスフェリン (1  $\mu$ g), デキサメサゾン (55 ng) に、細胞成長因子である EGF (25 ng) あるいは、FGF (200 ng), PDGF (1  $\mu$ g), brain-FGF (200 ng) を加えることにより著しい増殖を示し

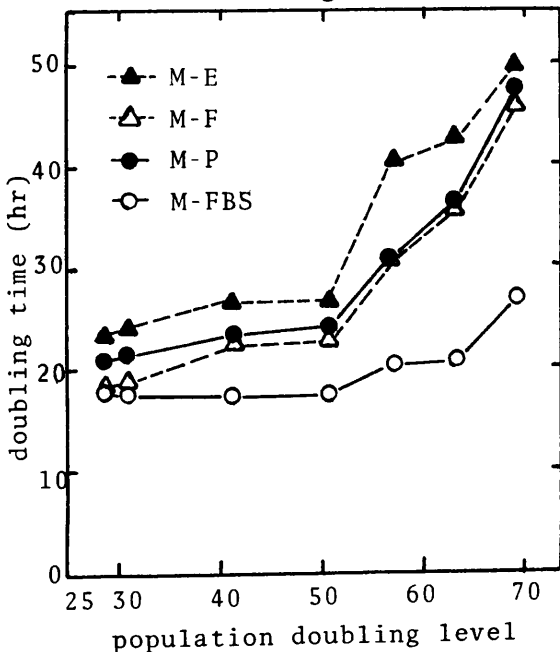
た(3)。MSA ( $\leq 1.6 \mu g$ ), h- $\alpha$ -thrombin ( $\leq 1 \mu g$ )は効果がみられなかった。細胞飽和密度は、いずれの無血清培地でも血清(10%)添加細胞の50%あるいはそれ以下であった。2種の成長因子を同時に加えても、著しい相加効果は認められなかった。

②細胞老化に伴うホルモン要求量の変化 各ホルモンの至適要求濃度は、細胞老化に伴って変化しなかった(4)。

③無血清培地における細胞集団倍加時間と細胞飽和密度の細胞老化に伴う変化 Fig.1に示すように、いずれの無血清培地においても、細胞老化に伴ない倍加時間は上昇した。一方、細胞飽和密度は減少した。

(考察) これまでに報告されたヒト線維芽細胞の無血清培地には、いずれも EGF が含まれていたが、ここでは、FGF, PDGF, 又は brain-FGFが EGFと同様の作用を示すことが明らかになった。特に、PDGF, FGFは、倍加時間でみるかぎり EGFよりも短縮し血清添加群に匹敵した。in vivo でいずれの細胞成長因子が働いているのか現在のところ未データであるが、興味のあるところである。各ホルモンの至適濃度が、細胞加齢に伴って一定に保たれており、その至適条件下においても細胞の増殖能が減少することは、老化した細胞は、今回テストしたホルモンでは大量投与しても増殖能が回復しないことを示している。継代培養に耐える合成培地および技法の確立が残された課題である。

Fig.1



MCDB-104, insulin(5 $\mu$ g/ml)  
transferrin(1 $\mu$ g/ml)  
dexamethasone(55ng/ml) Table I

medium	growth factor (ng/ml)	doubling time (hr)	saturation density (10 <sup>4</sup> cells/cm <sup>2</sup> )
M-E	EGF (25)	23.1	14.8
M-F	FGF (200)	18.4	13.8
M-P	PDGF (1000)	20.7	13.5
M-bF	*b-FGF (200)	23.8	8.5
M-E-F	EGF+FGF	18.4	13.8
M-F-P	FGF+PDGF	17.9	13.3
M-E-P	EGF+PDGF	18.7	15.3
M-E-bF	EGF+bFGF	20.7	16.3
M-F-bF	FGF+bFGF	not tested	
M-P-bF	PDGF+bFGF	not tested	
M-FBS	FBS (10%)	18.1	32.0
M- $\emptyset$	-	58.5	-

WI-38; 29 PDL, \*brain-FGF,

1. Phillips P D & Cristofalo V J, Exp cell res 134 (1981) 297, Yamane I, Kan M & Minamoto Y, Exp cell res 134 (1981) 470, Bettger W J, Boyce S T, Walthall B J & Ham R G, Proc natl acad sci USA 78 (1981) 5588 2. Kaji K & Matsuo M, Biomedical gerontol 3 (1979) 42, Kaji K, J Japan med assn, 85 (1981) 803, 3. Kaji K, Phillips P D & Cristofalo V J, In vitro 17 (1981) 257, Kaji K, Phillips P D & Cristofalo V J, In vitro (1982) in press, 4. Phillips P D, Kaji K & Cristofalo V J, J gerontol (1982) in press

異なった年齢のヒト皮膚繊維芽細胞へのヒドロコルチゾンの効果とその特異的結合

近藤 昊、春日博子（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 hydrocortisone on human skin fibroblasts at various ages and its specific binding

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

ヒト胎児肺繊維芽細胞に対するヒドロコルチゾンの効果と細胞へのヒドロコルチゾンの特異的結合部位数が *in vitro* aging で低下することは、すでに明らかにされている。個体を構成する繊維芽細胞が、ステロイドの効果に関して、老化に伴ない変化するかどうかについての報告は、ほとんどされていない。そこで、異なった年齢からえたヒト皮膚繊維芽細胞の増殖に対するヒドロコルチゾンの効果と、細胞へのデキサメサゾン（合成グルココルチコイドで、血清と結合しないことよりヒドロコルチゾンのかわりに結合実験によく用いられる）の特異的結合について検討した。

（ 材料と方法 ）

細胞及び細胞培養： この実験では、胎児 (TIG-3S)、成人 (ASF-5、21years old : ASF-4、36years old)、老人 (ASF-2、65years old : ASF-3、77years old) からのヒト皮膚繊維芽細胞を用いた。胎児繊維芽細胞は Dr. Y. Mitsuiより、また、成人・老人のものは Dr. K. Kaji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、5%CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。confluent になった細胞は、0.25%トリプシン液でシャーレ (Falcon, 3002) からはがして、split ratio 1:4 で継代培養した。

ヒドロコルチゾンの処理実験： 0.25% トリプシン液ではがした confluent の細胞を培養液に懸濁し、細胞数を測定した。2倍濃度のヒドロコルチゾン又はエタノール（対照として）を含む培養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、8 cm<sup>2</sup> シャーレあたり  $2 \times 10^5$  細胞で培養した。その後、継時的に又は16日後に、細胞数を測定した。

デキサメサゾンの特異的結合実験： <sup>3</sup>H-デキサメサゾンの monolayer binding は Griffinらの方法 (1976) にもとづいておこなった。confluent の細胞を0.25%トリプシン液でシャ

ーからはがし、培養液に懸濁し、細胞数を測定した。8 cm<sup>2</sup> の培養孔を6 つもつクラスターシャーレに、1 培養孔あたり  $7.5 \times 10^4$  細胞をいれ、37°C で培養した。4 日目と6 日目に、活性炭処理血清 (10%) を含んだ培養液で液替えをした。7 日目に monolayer の細胞を、25 mM HEPES (pH 7.4) を含むイーグル BME で2 回洗浄し、1 ml の同じ液を加えた。その monolayer の細胞に 10 μM 非標識デキサメサゾンの有無で異なった濃度 (2 - 60 nM) の <sup>3</sup>H・デキサメサゾンを加えて、37°C で45 分間インキュベートした。その後、0.2% 牛血清アルブミンを含む冷ハンクス液で5 回と、冷0.9% NaCl 液で2 回洗浄し、0.05 N NaOH 液で細胞を溶かした。この一部分より蛋白質量の測定と液体シンチレーションカウンターによりカウントの測定をした。細胞数は sister culture より測定した。

#### ( 結果と考察 )

現在の実験での培養条件下で細胞の in vitro の寿命を測定すると、TIG-3S は集団倍加数 69 (PD 69) で増殖を停止した。又、ASF-5 は PD 66 で、ASF-4 は PD 78 で、ASF-2 は PD 54 で、ASF-3 は PD 43 で増殖を停止した。これらの結果は、胎児と成人由来の皮膚繊維芽細胞の in vitro の寿命は変わらないが、老人からのものでは短いことを示し、今までの報告とおおむね一致した。

細胞増殖に対するヒドロコチゾンの効果を比較すると、TIG-3S だけがヒドロコチゾンで増殖が抑制された、他の 4 strain では増殖が促進された。濃度依存曲線から、これらは全て生理的濃度から高濃度の広い範囲で効果を表わしており、肺繊維芽細胞の場合と同じように、ヒドロコチゾンの特異的効果であると思われる。TIG-3S はヒドロコチゾンで抑制されるので比較から除外し、成人由来の繊維芽細胞 (ASF-5、ASF-4) と老人由来のもの (ASF-2、ASF-3) を比較すると、ヒドロコチゾンの増殖への効果は両者とも対照と比べて細胞数を約 20 - 35% 増し、両者の差は観察できなかった。ヒト皮膚繊維芽細胞はヒドロコチゾンで増殖が促進されるものと、増殖が抑制されるものがある、すなわち、heterogeneity が存在するので、その効果を比較するのは難しい。そこで、細胞へのホルモンの特異的結合量を比較した。

細胞に対する <sup>3</sup>H・デキサメサゾンの解離定数は、TIG-3S で  $4.4 \times 10^{-9}$  M であり、成人 ( $4.5 \times 10^{-9}$  M) ・老人 ( $4.4 \times 10^{-9}$  M) 由来の繊維芽細胞と変わらない。10<sup>6</sup> 細胞あたりのデキサメサゾンの結合部位数は、ASF-5 (PD 21) は 345 fmol、ASF-4 (PD 19) は 390 fmol、ASF-3 (PD 17) は 315 fmol であり、老人由来の繊維芽細胞は成人のものに比べてあまり低くない。mg 蛋白質あたりの結合部位数は、老人からの繊維芽細胞は細胞が成人のものより大きいので、成人のものより有意に低くなる。これらの測定は、ある集団倍加数時期のみで比較しているので、別の時期で比較すれば、両者間の差はより顕著になるのかもしれない。TIG-3S に対するデキサメサゾンの結合部位数は顕著に少なく (105 fmol / 10<sup>6</sup> 細胞)、この意味をあきらかにするためには、異なった集団倍加数時期でのホルモン結合部位数を測定することとともに、より多数の細胞株について検討を加えることが必要であると思われる。

培養細胞の老化に伴う細胞体積変化に及ぼす高圧酸素の影響

本田修二，松尾光芳（東京都老人総合研究所）

Effect of hyperbaric oxygen on the cell size changes of human  
diploid fibroblasts during aging *in vitro*

S. Honda and M. Matsuo (Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)

＜序論＞ ヒト二倍体線維芽細胞は細胞老化に伴って体積が増大し，各世代に特徴的な細胞体積分布を示すことが知られている。しかし，細胞老化に伴う細胞体積増大の機構は明らかでない。われわれは前に高圧酸素がヒト二倍体細胞の老化を促進することを見出している<sup>1)</sup>。高圧酸素処理によりヒト二倍体細胞の加齢に伴う体積変化が加速されることが予想される。細胞老化に伴う細胞体積増大の機構解明の手掛りを求めて，細胞体積分布の加齢変化に及ぼす高圧酸素の影響を調べた。

＜材料と方法＞ ヒト胎児肺由来線維芽細胞（TIG-1）を10%ウシ胎児血清添加イーグル基礎培地で継代培養した。細胞の高圧酸素処理はパールの容器中で行なった。細胞の体積分布はコールターカウンターモデル ZBI およびコールターチャナライザーモデル C-1000 を用いて調べた。

＜結果と考察＞ 細胞老化に伴う細胞体積分布の変化が観察された：すなわち継代とともに細胞体積の最頻値が増大し，続いて細胞体積分布が広くなり，ついにピークが消失した（図1）。

各世代の細胞の体積変化に及ぼす高圧酸素（50気圧，1時間処理）の影響を調べた。継代前期の細胞（32細胞集団倍加数：PDs，培養寿

命：64 PDs）の体積は酸素処理により若干増大するが，数日後，対照細胞と同様の体積分布に戻った。一方，継代後期の細胞（55 PDs）に酸素を処理すると体積が増大し，体積分布が広がった。その後，継代を続けても対照細胞の体積分布に戻らず，加齢に伴う変化を続け，対照細胞の細胞集団倍加数（63 PDs）よりも少ない細胞集団倍加数（59 PDs）で終末像（図1，曲線④）を与えた。

この結果は高圧酸素による継代後期の細胞の老化促進を示唆し，高圧酸素が細胞老化を促進するという前報の結論<sup>1)</sup>を支持する。われわれは既に継代後期のヒト二倍体細胞における高圧酸素感受性の上昇を観察しており<sup>2)</sup>，このことは細胞老化過程で活性酸素に対する防御機構に障害が生じることを示唆する。細胞の酸化的障害が細胞老化に伴う細胞体積増大の原因になっている可能性がある。

1) 本田修二，松尾光芳；基礎老化研究，2，68（1978）

2) 本田修二，松尾光芳；基礎老化研究，1，26（1977）

S.Honda and M.Matsuo；Mech. Ageing Dev.，12，31  
（1980）

