

シンポジウム

老化の基礎的研究 (第8回)

講演記録

文部省科研費特定研究「生体老化の基礎的研究」班

(代表者 田 内 久)

日本基礎老化研究会

(代表幹事 太 田 邦 夫)

昭和54年1月19日

於 東京都千代田区北ノ丸公園 科学技術館

シンポジウム

老化の基礎的研究（第8回）

——各水準における動向——

目 次

あいさつ	特定研究班代表者 田内 久	1
座長	田内 久・黒田行昭・中島輝之・井村裕夫 永井克孝・江上信雄・太田邦夫	
1. 老化研究への分子的いとぐち	鈴木 堅之	2
2. 培養細胞の老化	山田 正篤	11
3. 結合組織代謝と加齢	永井 裕	22
4. 老化研究の生化学的アプローチ	高井克治・早石 修	28
5. 老化の免疫学的パラメーター	成内 秀雄	33
6. ショウジョウバエの研究を中心として	大羽 滋	40
総合討論とまとめ	太田邦夫	51

あ い さ つ

愛 知 医 大

田 内 久

本日は朝早くから予定よりも沢山おいでいただきまして、ありがとうございました。

このシンポジウムは第8回となっていますが、今年度の特定研究のシンポジウムとしては第2回であります。日本基礎老化研究会もすでに総会を2回開いていますが、シンポジウムとしては、この題目につきまして特定研究と一しょに開いていただいております。研究班が出来ました最初の年から考えますと、3年で6回でございます。その前の菅原・太田先生のときの総合Bの文部省科学研究費でのシンポジウムをいたしましたときの2回を加えて今日で8回で、そのような歴史がございます。

今日は、特定研究もこのかたちでは本年度で最後でございます、ある意味では、しめくくりの意味でのシンポジウムとして、各グループの代表選手の方々に夫々の時間をおねがいし、皆様の活発な討論をおねがいする次第でございます。

1. 老化研究への分子的いとぐち

東海大・医

鈴木 肇 之

1. Price, Modak, Makinodan の実験結果はほとんど否定された

老化現象がDNAの何らかの損傷蓄積に由来するという考え方は、DNA情報が細胞の性格を決める根源でありまた老化現象が体のいろいろな部位で発現する実情から考えてごく妥当なものと思われる。事実1971年にPriceらはDNA鎖に切断が蓄積することを老ネズミの脳、肝臓、心筋等主として細胞分裂がないかもしくは乏しい組織について観察した¹⁾。しかしこの結果についてはこの3年間にいくつもの批判的データが得られ、ほとんど否定されたものと考えてよいと思われる。第一は前年も報告したNakamuraらの研究で、Priceらが採った方法はDNAの鎖切断そのものを検出することができず、DNAの分解により生じた2次的な傷を観察しているに過ぎないという結果で²⁾、第二は小野ら(東大・医)の研究で、マウス組織のDNAを直接しょ糖密度こう配中の沈降分析により大きさを解析したが、老化した動物でも脳、胸腺、脾臓では沈降速度の遅い小さなDNA断片が発見できず、鎖切断が蓄積したという証拠は得られなかった³⁾。第三は藤田ら(京都府立医大・病理)の巧妙な技法による結果である。すなわち組織切片についてまず核をFeulgen染色法により染めてから540nmの励起光で蛍光顕微鏡下に観察するとDNAが赤く見える。この方法でDNA量を測定することができまた核内外のDNAの状態をも観ることができる。たとえばマウスにマイトマイシンCを投与するとおそらくクロチン間のクロスリンクにより再生肝に2核細胞が現われるが、胃粘膜のように細胞分裂がごく盛な組織では逆にポリプロイデーションが観察されない。これは多分多核細胞が系から除外されるためと考えられた。このような多核化はニューロンでは当然観察されない。老化したマウスのニューロンにおいてはDNA全体の量が減少するらしいが、Priceらが観察したようなとりこみは組織をパラフィンに埋め込む時の加熱による2次的現象であることがはっきりした。しかしシチジンをハプテンとする抗原の抗体とDNAとの結合を蛍光抗体法で観察すると若いマウスの脳のニューロンと老マウスのそれとでは染まり方が異なることもわかった。したがってDNAに何らかの変化が起こることはわかるが単なる鎖切断ではないと思われる。

以上のような理由により、老化により神経細胞のような非分裂組織細胞のDNAに鎖切断が増加するというPriceらの研究結果は、日本の研究者によりほぼ完全に否定されたものと考えられる。

2. DNA には未確認の加齢生産物ができる

放射線照射を受けると動物の細胞 DNA に鎖切断が起こる。Price らが切断に目を向けたのはこの放射線生物学における既知事実が頭にあることと思われるが、鎖切断は一般にかなり効率良く修復される。放射線で末端に—OH が露出していないような不規則な切れ方をした場合にもそこを修復酵素が認知しうるように修正する酵素 (cleaning enzyme) が枯草菌で見付き⁴⁾、さらに Ataxia telangiectasia や Bloom 症候群のような放射線に高感受性の患者細胞ではおそらくこれと同類の酵素活性が正常人の細胞に比べ低いこともわかってきた⁵⁾。

ところで山本 (広島大・原医研) は最近驚くべき事実を見出した。別添報告書にある通り老化マウスおよびラット (それぞれ 28 週齢および 31 週齢) の肝臓 DNA を加水分解してクロマトグラフィで塩基の分析を行うと通常の 4 種類のほかにまったく新しい未知の塩基(?) 成分が見出された。若い動物ではこの成分はごく微量であった。しかもこの新しい成分はコウシ胸腺に γ 線照射を行った時に出現する新しい成分とクロマト的には一致しており、おそらくは塩基が酸化酵素で酸化されたものと考えられている。この成分の同定はまだされていないが、結果が事実であればその成分が化学的に安定であることと、修復されないという点で特異的である。

3. DNA 損傷修復能は老化しても衰えない

かりに DNA 損傷が老化動物で蓄積するならば、その原因は(1)損傷の生成速度が老化とともに高まるかまたは(2)その損傷が修復されにくい、あるいは(3)修復能自体が老化に伴い低下するためであろう。このうち(1)と(2)に関しては老化損傷の性格がまだ確立していないので何もわからないが、(3)については人易的に傷を作ってその修復を観察することができる。

たとえば紫外線照射により生成するピリミジン・ダイマーの除去修復能は老人になってもとくに低下しない。また Wheeler と Lett によるとビーグル犬の脳の DNA には老化すると沈降しにくい小さい分子が多くなるが、ガンマ線で生成する鎖切断をつなげる修復能は老化しても変化しない⁶⁾。同様の結果は松平 (放医研・生物) によっても得られている。すなわち 8 ~ 10 週の若いマウスと 31か月の老齢マウスの脳 DNA についてガンマ線照射後沈降測定により得られる一本鎖および二本鎖切断数、S₁ スクレアーゼ感受性部位の数の測定により得られる DNA 塩基の変化量、および Klenow 酵素を用いた dXTP のとりこみから得られる —3'OH 末端量、いずれも老若間に修復の差がみられなかった⁷⁾。すなわちどうやってみても動物が老化しても DNA 損傷の修復能が低下する事実は得られていない。

しかし実施した限りの方法では把えることのできない損傷があるかもしれない (事実山本はその可能性を示した)、まだ問題は残るであろう。なお松平らの研究でも Price らの結果は再現できな

った。

4. 早老症と DNA 修復とはあまり関係がない

Epsteinらがプロジェリア症候群患者の線維芽細胞ではガンマ線による DNA の鎖切断効率が悪いことを発表し⁸⁾、当時大きな反響を呼んだが、その翌年には Regan と Setlow が Epstein らの結果が再現できず、プロジェリア細胞でも鎖切断の修復は正常人と変わらないという反論を出している⁹⁾。

藤原(神戸大・医)は予備研究の段階ではあるがプロジェリア細胞の X 線および紫外線に対する感受性を測定したが、いわゆる D_0 値は正常人の細胞と同じでとくに高感受性ではなかった。しかし細胞としての挙動は正常と異り、集団倍加世代数 (population doubling) が少くしたがって早く phase III になるし、またプレート効率が悪い。さらに DNA 合成の速度も正常に比べて遅い等いくつかの異常が観察されている。

もうひとつの早老症として有名になったワーナー症候群の細胞に関しては藤原が多数の症例について研究を行った¹⁰⁾。この結果によるとワーナーの細胞は X 線に対しても紫外線に対しても特に高感受性でなく、X 線で生成する DNA 鎖の切断も正常どおり再結合され、したがってワーナーが DNA 損傷の修復欠損症とは考えられない。ただしプロジェリア細胞と似てプレート効率が低く、集団倍加世代数が少いこと、また DNA 合成の際の鎖の伸長速度が遅いなどの異常が認められる。二階堂(京大・放生研センター)のデータでもワーナーの細胞は集団倍加世代数が正常の 50~60 代に対したかだか 10 代と短いことを示している¹¹⁾。

老化症としては以上の 2 種の遺伝性疾患の他にダウン症もあげられているが、藤原によるとその細胞はやはり正常人の細胞に比べて生存力が弱くまた DNA 合成速度が遅い等の異常が観察される。Cockayne 症候群の細胞は紫外線、4-ニトロキノリン-1-N オキサイド (4NQO) 等に対し異常に感受性が高いがそれが修復欠損に由来するかどうかはまだわかっていない。

以上の議論を総合すると、早老症は必ずしも DNA 修復の欠損とは関係がないがしかし DNA の挙動に何らかの異常が示唆される場合が多くなお研究の余地が大きいと思う。

5. 個体でも細胞でも転写に加齢の影響がみられる

動物の発生過程における細胞の分化は遺伝子の発現抑制を含む調節の変化に由来するが、老化を発生に続く一連の現象と考えればここにも同様の調節変化が観察される可能性がある。Cutler はその主導者の一人である。Ono と Cutler はこの考え方を支持する実験結果を得ている¹²⁾。マウスの非造血性組織たとえば脳や肝臓には元来造血性組織に存在すべきグロビンの mRNA が存在する

ことが分っている。すなわち分化した細胞でも遺伝子の発現に関しては「リーキー」であるといえる。Onoらはこのリーキーの性質が老若のマウスで異なるかどうかを調べた。グロビンRNA (reticulocyte) に相補的なDNAを逆転写酵素を用いて作らせ、こんどは老若マウスの脳や肝臓から精製したRNAのなかでこのDNAとハイブリッドを形成する部分の量を求めた。その結果例えば脳の核RNAではグロビンシクエンス量が6か月の若いマウスでは15であるのに対し19か月のマウスでは32、26か月のマウスでは34となる。細胞質のRNAでは同じ量が282, 360, 515と増加した。同様の結果が肝臓でも得られており、要するにマウスが老化すると遺伝子の脱抑制が起こることが示唆された。

野瀬(富山医大・医)は正常人の線維芽細胞の単離核を培養し ^3H -CTPのとりこみを指標としてRNA合成能と細胞集団の加齢との関係を調べた¹³⁾。その結果29代と39代の細胞では60分に0.45 pmole/ μg DNAのとりこみがあったのに対し59代の細胞では0.17 pmole/ μg DNAと低下していた。すなわち細胞集団の老化に伴って転写活性が低下するのがみられた。また生成したRNAに含まれるpoly Aの量が若い細胞では1.7%であったのに老化した細胞では0.9%になった。このデータはまだ完全とはいえないが、Onoらの結果をも総合して考えるとin vivoでもin vitroでも量的もしくは質的な転写における変化が起こるようである。ただ転写の忠実さはこれらの実験では明らかではない。

6. ほん訳の忠実性も老化によりとくに低下することはなさそうである

ほん訳の機構は非常に複雑でまだ十分に解明されたとは言えず、かりにほん訳の量的もしくは質的な変化が認められたとしてもその主因を探るのはかなり努力を要することである。たとえばmRNAの読みまちがえ(または読み方の変化)は使用できるコドンによるであろうが、これはtRNAの量の分布やアミノアシルtRNA合成酵素の量や質に依存することもあるし、ペプチド合成に必要ないくつかの因子にも依存するであろう。そこで動物の材料を用いた分子水準での研究はまだ明確な形では行われていない現状である。

後藤(東大・薬)はマウスの肝臓、腎臓、脳などについてリボソームのサブユニットと老化の関係を調べたが18SRNAと28SRNAの比が老化すると大きくなる傾向があるのがわかった。すなわち老化動物では18S過剰となる。これはおそらく転写の抑制機構が両者不均等に变化したためであろう。さらにマウス肝のリボソームとウサギreticulocyteからの合成酵素ならびに諸因子およびtRNAを含むin vitroでのポリペプチド合成系を作り、ポリUをメッセンジャーとした時の ^3H -Leuのとりこみをエラーの指標としてミスコピーを測定した。その結果まだ確定的ではないが、正規のPheのとりこみに対するLeuのとりこみの比は老化動物でもとくに若い動物と変わりが

みられなかった。これに類する研究は他にも見られるが、どれをとっても老化することによりほん
訳水準でのエラーが増大するとは言えないようである。

7. 老化動物におけるタンパク質の変化は必ずしも一様ではない

老化動物におけるタンパク質が若い動物からのタンパク質と異なるかどうかに関して、酵素タンパ
ンパクでは主として2つの方向の研究が行われている。第一は酵素の熱不安定性部分の増加および
その原因の探索と、第二はDNA合成酵素の忠実性の低下である。第一の点については最近のRo-
thsteinの総説にみられるように必ずしもすべての場合に老化した動物の酵素に熱不安定部分が増
加するとは限らない。また老化動物からの酵素タンパク質を分析してもアミノ酸組成の相異が見当
らない^{14,15}。第二のDNAポリメラーゼの忠実性に関しては大橋(東京都・老研)その他の研究に
より老動物の再生肝DNAポリメラーゼはin vitroでの複製エラーが若い動物の場合に比べ何桁
も大きくなることが明らかにされている^{16,17}。したがって細胞分裂が定常的に起こる組織では、い
わば突然変異細胞ができるはずでこれが系外に排除されるのでなければ異常タンパク質ができる可
能性がある。しかしもしそうならばタンパクのすべてにアミノ酸組成の変化が起こってよいはずで
ある。しかし事実はそうになっていない。大橋はさらに重要な知見を得た。すなわち再生肝では老化
動物のDNAポリメラーゼの忠実度が悪いが、正常組織では老化しても忠実性の変化がないことと、
移植可能な腫瘍組織では忠実度は正常であるが、フレンドウイルス感染により誘発された脾臓の一
次腫瘍組織では忠実度が非常に悪いことである。この結果はがんの発生と老化に関しきわめて示唆
的である。

8. ヒト2倍体細胞の研究

動物個体の細胞はどの部分から採ったものでもその遺伝型は同一である。しかし分化した細胞で
は遺伝子のごく一部の表現に特徴がありそれで他から区別される。ところが同じ線維芽細胞でも肺
と心臓からのとではその平均集団倍加数が異なることが二階堂(京大・放生研センター)によって見
出された。それによると肺の細胞は約50代であるのに対し心臓からの細胞は約30代にすぎなか
った。³H-チミジンによるlabeling indexを調べても肺の細胞のほうが「長寿命」であった。
この相異が何によるかはまだわからないが、紫外線照射したHerpes simplex virusの宿主細胞
回復に関しては両者に相異がみられないから、少なくとも除去修復能の差によるものではないことが
わかる。ちなみに早老症といわれるWerner症の細胞でも宿主細胞回復は正常細胞のそれと同てい
どの活性を示した。

堀川(金沢大・薬)はDNA alkaline elution法によりDNAの鎖切断を敏感にキャッチする

技法を確立し、それを用いてヒト胎児肺の2倍体細胞を *in vitro* で継代培養中の老化とX線照射で生じるDNA鎖切断の修復能との関係を研究した。しかし若い細胞と老化した細胞との間に修復能の差は見出せなかった。しかしX線照射を行わなくても細胞が老化すると1本鎖切断量が増加する傾向が示唆され、修復不可能な切断が増加するのではないかと予想されている。

9. 新しい実験動物 —— ネマトーダ

近年老化現象に限らず行動や胚発生その他基礎生物学の研究にネマトーダが用いられるようになってきている¹⁸⁾。しかしわが国では主として農学の分野での研究が進んでいるが基礎生物学のための実験動物としては定着しておらず、研究者の数も数人でしかない。

石橋(佐賀大・農)はネマトーダ(*Caenorhabditis elegans*)を大腸菌等の生細胞を餌としないで飼育する方法およびその場合の培地の影響等について考察した。結果によると大豆ペプトンや牛肝臓抽出物等を加えた人工培地中では孵化後の成長もまた次期の産卵も大腸菌で飼育した時に比べ早く進行するが、同時に早く死ぬ。すなわち栄養の種類によりネマトーダの一生に大きな差異が現われた。またネマトーダの産卵を抑制して齡のそろった虫を多数集める方法を工夫し、プロカイン、アミノプテリン、アミノニコチンアミド、プロマイシン等の薬を用いてみたがまだ決定的な結果は得られていない。

細野(金沢大・医)は同じ *C. elegans* を用い虫に楊子を軽く当てた時の反応のし方で老化のていどを測る目安を調べた結果、反応のし方にいくつかの型があり、虫が老化する時には大体決まった順序でその型を移行することがわかった。

鈴木ら(東海大・医)は老化および放射線生物学研究のために自由生活をするネマトーダを新しく分離し、その性質の研究を行った。その結果 *C. elegans* とは異り雌雄異体でしかも同じ大腸菌を飼にした時に *C. elegans* よりはかなり長寿命(*C. elegans* が約14日、*R. tokai* は約150日、ともに20℃)であることがわかった¹⁹⁾。このほか電顕による形態の観察²⁰⁾および5-フルオロデオキシウリジンをを用いて同調培養の可能性を調べた²¹⁾。

10. ま と め

1) DNAまたはその修復に加齡の影響があるかどうかに関しては比較的傾向が固定されてきた感じがある。すなわち放射線生物学的なDNA修復が老化と関連することを支持する結果は何も得られなかった。しかし老化に伴い未知のおそらくは修復不能の損傷が増加するらしいことが *in vivo* でも *in vitro* でも示唆され、将来重要となる可能性がある。

2) DNAの転写量またはその忠実性が老化と関係があるかどうかはむずかしい問題であるが、転

写量は老化に伴って減少することもあるがOnoらのようにリーキーさが増加することもある¹²⁾。転写量の減少は酵素生活の低下であるよりは転写されるクロマチンの性質の変化に依存するらしく、ユニークシクエンスでも重複している部分でも不活性化したDNA部分が老化で増加するというCutlerの結果がある²²⁾。転写の忠実性の変化はまったくわからない。

3) 遺伝情報のほん訳エラーは後藤の結果を含めて老化とあまり関係はないようである。にもかかわらず一部のタンパク質に老化に伴う特徴が現われるのは mRNA の合成後のプロセッシング, ポリペプチドの合成後のプロセッシングあるいは修飾にあるのか、タンパク質分子自体について立入った研究が乏しいのでまだわからないことが多い。

4) 細胞の年齢と個体の老化とにはあるていどの関連性があるように見える。それは早老症の細胞でも観察される。しかしながら DNA の修復と関連するという結果は何も得られていない。強いて言えば色素性乾皮症の場合が例外である。

5) ネマトーダが新しく実験動物としてとりあげられており、生物学的に老化研究に有用なことは明らかになったが、分子生物学での研究材料となりうるには同調培養法その他の基礎研究が必要である。

文 献

- 1 Price G. B., Modak, S.P. and Makinodan, T. *Science*, 171 : 917-920 (1971).
- 2 Nakamura, H. and Morita, T. *Int. J. Radiat. Biol.*, 29 : 210 (1976).
- 3 Ono, T., Okada, S. and Sugahara, T. *Exp. Gerontol.*, 11 : 127-132 (1976).
- 4 Inoue, T. and Kada, T. *Biochim. Biophys. Acta*, 478 : 234-243 (1977).
- 5 Inoue, T., Hirano, K., Yokoiyama, A., Kada, T. and Kato, H. *Biochim. Biophys. Acta*, 479 : 497-505 (1977).
- 6 Wheeler, K. T. and Lett, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 71 : 1862-1865 (1974).
- 7 Matsudaira, H., Yoshizawa, K., Furuno, I. *The Xth Internatl. Cong. Geront.*, Tokyo (1978).
- 8 Epstein, J., Williams, J. R. and Little, J. B. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 70 : 977-981 (1973).
- 9 Regan, J. D. and Setlow, R. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59 : 858-864 (1974).
- 10 Fujiwara, Y., Higashikawa, T. and Tatumi, M., *J. Cell. Physiol.*, 92 : 365-374 (1977).

- 11 二階堂修, 伴貞幸, 菅原努, 第21回日本放射線影響学会大会, 札幌(1978).
- 12 Ono, T. and Cutler, R.G. Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 4431-4435 (1978).
- 13 野瀬清, 日本生化学会第51回大会(京都), 生化学, 50(9): 752 (1978) (抄録).
- 14 Rothstein, M. Mech. Aging Develop., 4: 325 (1975).
- 15 Rothstein, M. Mech. Aging Develop., 6: 241 (1977).
- 16 大橋望彦, 医学のあゆみ, 97: 447 (1976).
- 17 Linn, S., Kairis, M. and Holliday, R. Proc. Natl. Acad. Sci., 73: 2818 (1976).
- 18 Edgar, R. S. and Wood, W. B., Science, 198: 1285 (1977).
- 19 Suzuki, K., Hyodo, M., Ishii, N. and Moriya, Y., Exp. Geront., 13, 323 (1978).
- 20 Suzuki, K., Yanagisawa, F., and Akatsuka, A., Tokai J. Exp. Clin. Med. (in press).
- 21 Suzuki, K., Moriya, Y. and Ishii, N., Tokai J. Exp. Clin. Med. (in press).
- 22 Cutler, R. J. Geront., 10: 37 (1974).

討 論

○齊藤政樹(老人研): データをみてびっくりしたのですが, friend virus を感染させると infidelity 1: 161 になるとい成績ですが, 誰方のデータでしょうか。

□鈴木擘之(東海大・医): 大橋さん(老人研)のです。

○齊藤: そのデータは spleen の polymerase を isolated して測定したものです。

□鈴木: そうです。哺乳類の polymerase は精製が大へんむずかしいのです。完全に分画したわけではありません。私も大へんびっくりしました。

○黒田行昭(遺伝研): 分子レベルで aging による色々な変化をしらべるわけですが, 老化の原因というのが, DNA の変化によるものか, 色々な enzyme のような蛋白の変化によるものか, どちらが先かということで, にわとりと卵のような関係になってくる。

今の大橋さんの仕事ですと, polymerase, これは蛋白ですね, それが変わればそれによって出来る DNA は, 変なものが出来る。DNA の fidelity が低下することによってちがった蛋白, 即ち error によって変な蛋白が出来る。polymerase にしてもそのような変化が出てくるとすれば, そ

の polymerase を code する DNA 自体がおかしいのか、code したあとのプロセスで変な polymerase が出てくるのか、ということになって aging で変なものが出てくるポイントというのは一体どこにあるのか、ということになります。その辺についてどうお考えをおもちでしょうか。

□鈴木： 私も同じように考えて居まして、にわとりが先か卵が先か、どちらが先かよくわからないのです。とにかく DNA というのは、体中にあるものですから、それに傷がつけば体全体がおかしくなるであろうという極めて自然な考えだと思うわけです。計算してみればわかることですが、大橋さんの出されました polymerase の fidelity ですね、あの割合でミス、つまり間違っただけがあのような、酵素としての忠実性がなくなるとは考えられない。他の酵素だって軒並におかしくなって当然ではないか、と思うのです。他の酵素ではまだよく調べられてないのではないか、ということもあります。

repair のときに、忠実度の悪いポリメラーゼが誘発されることがあります。この場合も同様に一時的に、induce されるものだとしたら induce される原因は何か、というところに問題がある、それはさきほどのフレンドヴィールスかも知れないし、再生肝という一つの特異な状況によるかも知れない。induction そのものではなくて、induction という現象と老化という現象が一緒になって忠実度の悪い polymerase を induce する引き金になったのではないか。或いは friend virus を input したことによって何か引き金になったのではないか。

○山田正篤（東大・薬）： 大橋先生、もう少し、あのデータを御説明いただけませんか。

□大橋望彦（老人研）： 黒田先生の御指摘なんです、わからないと申し上げるのが正直なところで、わかったように説明しますと、あの数字自身が、本当にわからなくなってしまいます。実際に実験のやり方としましては、吾々が何か変化を見たい、ということで、データを amplify するということをして人工的にやっています。再生肝ということで変ってくる、という話が先ほど出ましたが、それではなく、正常な状態ではどうか、ということにこの一年かかりきりました。それで見ますと、さきほどスライドで鈴木先生がお示しになったのに、ちょっと、訂正したいところがあります。normal のところですが、young, old とあって両方とも high となって居ますが、実は、ごくごく最近出たデータで、old はやはり low となります。未確認情報としていただきたいのですが、もう少し追試しなければなりません、26か月のラットで low となっています。このようなものをみたのは、すべて DNA を鋳型として、よんでいるのとは話が違っているので、このデータを出すためには、人工的な DNA モデルの鋳型を使っている 鋳型特異性というのを考慮しなければなりません。酵素を精製することによって、その鋳型特異性に違った結果が出ています。あくまでも amplify されたものであります。但し、何かしら変化が aging の過程で正常肝の中にもあるということは現在のところの信念として持っています。

2. 培養細胞の老化

東大・薬

山田正篤

1. 老化に関するふたつの仮説

生物学にとって究極の研究対象である生とか死とかいう現象は、現在の知識で正確に定義することは極めて困難であるが、ある範囲の共通な感覚で直観的に捕えることができるものである。このような観点から老化現象を考えると、生物は死ぬべきもの—あるいは死ぬからこそ生きているという状態にあり、死への生理的過程が老化であるといいきることができる。人間のような多細胞生物を考えると、発生・分化の最終段階として老化が起り、それが生物個体の死へ直結している。

このような考え方が老化の発生的仮説と呼ばれるものである。あるいは老化のプログラム説といいかえられる。この考え方は決定論的 (deterministic) なニュアンスをもっていて、生物のゲノムの上に、老化から死まですべて記載されているような印象をうける。この仮説を証明することはかならずしも容易ではないが、はじめに述べたように、直観的には受け入れることができる考え方である。

一方、この考え方と反対の極にあるとされるものが推計学的仮説である。生物が生きている間に、その細胞構造あるいは生体分子にランダムに障害を受け、その蓄積が生物 (細胞) の機能を低下させ、死に導くという考え方で、分子障害説とか、Orgel の errorcatastroph 説とがこの範疇に属する。この考え方には蓋然論的 (probabilistic) なニュアンスが含まれており、決定的な仮説と二律背反するものといえよう。

しかし、生物現象では、その局面では蓋然論的な現象が目立ち、それが積分されると一見決定論的に見えることが多い。そこでこのふたつの仮説を二律背反と考えることには問題がある。すなわち、直観的にみれば老化はプログラム説で説明できるが、詳細に検討すれば個々の現象には蓋然論的な側面があるというのが正確であろう。

2. Hayflick のモデル

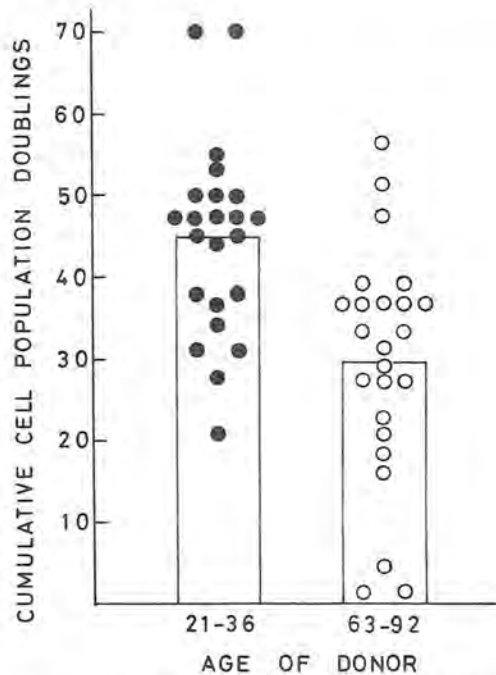
生体内の細胞はその増殖態度から分裂細胞群と分裂終了細胞群とにわけることができる。第6回のシンポジウムでこの点について考察したが、Hayflick の培養ヒト2倍体線維芽細胞系は前者の試験管内モデルである。

老若2年齢層の人の皮膚から取った線維芽細胞の培養内寿命が供与者の年齢を反映している(図1)。また、Werner症候群のような早老症患者の皮膚の線維芽細胞の試験管内寿命が、同年齢の健康者の細胞にくらべて著しく短い。なお、胎児齢による増殖度の変化を 10^5 個あたりの形成コロニー数の推移で調べたのが図2である。10~15週をピークにして、分裂細胞集団が減少してゆくことが判る。

このような実験結果から、Hayflickのヒト2倍体線維芽細胞系が細胞老化のモデルになると考えられている。現時点でこれが培養内の人工産物であってモデルとならないと主張する人は少ないであろう。しかし、逆に培養細胞で見られる現象がそのまま生体にはめこまれることは考えていない。実験には当然人工的な調味料が添加されている。そこで、培養細胞系をモデルに使うことの利点をこの際はっきりとさせておきたい。

生体内の細胞増殖を、赤芽球形成を例として考えてみる。図3にみられるように、腎および肝の共同作用によって作られるエリスロポエチンによって、赤芽球の細胞周期がまわりはじめる。数回の分裂を起した後、脱核して赤血球となり、末梢血管内へ移行する。血管内の赤血球の数、あるいは酸素保有

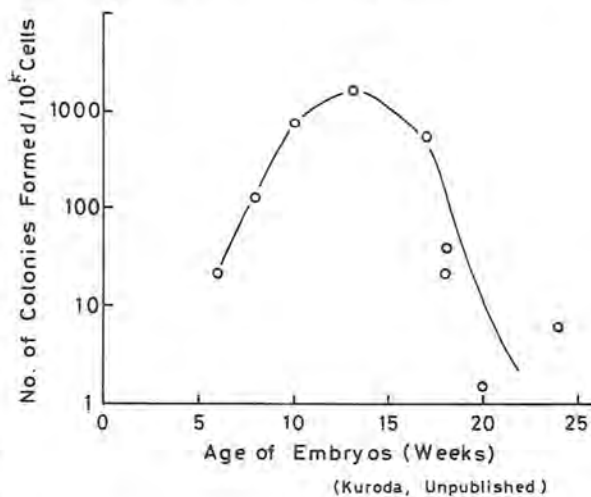
IN VITRO LIFESPANS OF SKIN FIBROBLASTS



(Schneider & Mitsui: Proc. Nat. Acad. Sci., 73, 3584, 1976)

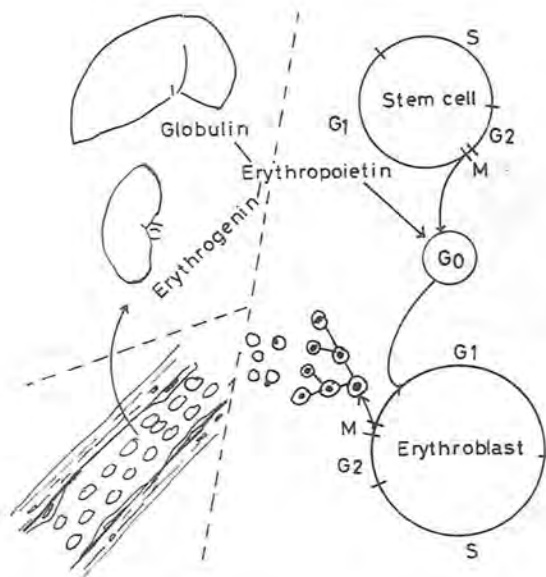
図1 ヒト皮膚線維芽細胞の試験管内寿命

Colony-Forming Activity of Human Embryonic Lung Cells in Primary Culture



(Kuroda, Unpublished)

図2 ヒト胎児肺細胞のコロニー形成率



REGULATION OF ERYTHROPOIESIS

図3 生体内における赤血球形成の制御

より単純な形で解析可能にしたのが細胞培養系である。その意味で、Hayflick の培養ヒト2倍体線維芽細胞系が細胞老化のよきモデルと考えられているのである。

3. 遺伝要因と環境要因

図4は培養環境内にある細胞の増殖におよぼす要因を示した概念図である。細胞はその内在的な遺伝要因に支配されて自己複製をしてゆくが、同時に環境要因によって支えられている。内因としての遺伝要因はもちろん遺伝子によるものであるが、真核生物にのみ老化(非増殖化)がおこることを考えると、クロマチンの構造と機能をつきつめて考えなければならない。また、代謝要因を内因のひとつとして独立させたのは、遺伝子によって規定されている形質が一義的に発現するのではなく、増殖、分化の機能に応じて生体分子の合成、および合成後修飾がその発現に深く関与していることを示したいからに外ならない。

一方、環境要因は、栄養と増殖因子とにわけられる。栄養とは別に、それ自体が細胞の構成成分ではなく、細胞の代謝機能、とくに増殖に係わる因子を増殖因子として独立させた。これは広義のホルモンであり、生体内の生理活性物質、すなわち制御因子に当る。ヒト2倍体細胞の試験管内寿命に内因と環境因子が両側面として働く様相を、放医研の大野忠夫君の実験によって以下に説明してみる。

量が低くなると、それがフィードバックされて、エリスロポエチンの合成がふたたび始まる。このように生体内の分裂細胞群は細胞自体の増殖能だけでなく、分裂終了細胞群から構成されている他臓器で産生される増殖(分化)因子の作用をうけて増殖させられている。赤芽球の場合、これを培養環境にもちこむことによってエリスロポエチンの増殖(分化)への制御作用の実態が明確になった。赤芽球の増殖にはなお他の血清高分子成分も必要とされており、それらの解析には培養系がよい実験手段を提供している。

このように、生体のなかでは複雑な要因がからみあっている分裂細胞群の増殖を、

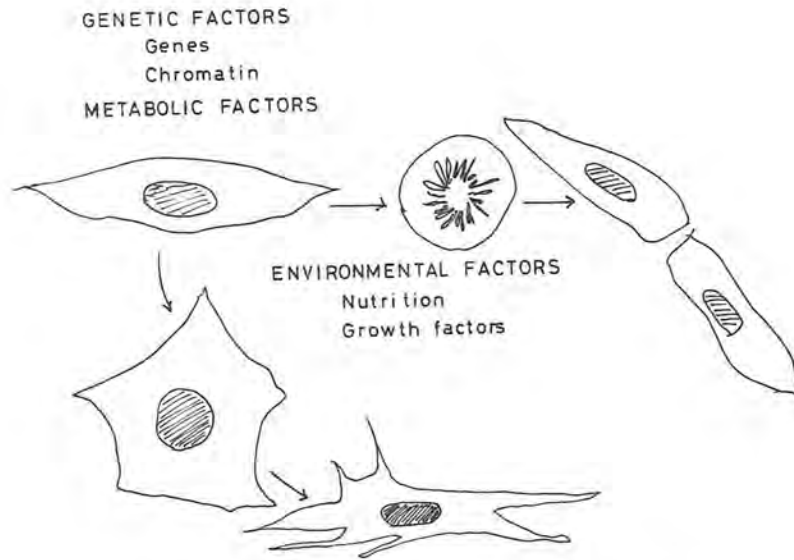


図4 培養細胞の増殖におよぼす内因と外因

試験管内の培養細胞の老化度は継代だけでは、正確に表現できない。そこで、各継代において細胞が2の何乗に増殖したかを計測し、これを累積して、細胞集団の倍化回数 (population doubling level, PDL) として表現する。ヒト2倍体細胞では非増殖細胞が継代初期から出現するので、倍化数は正しくは世代数と異なる。この点は前回のシンポジウムで説明した。大野君は、PDLの異なるヒト2倍体線維芽細胞 (IMR-90) を種々の濃度の透析ウシ胎児血清を添加した培養液で培養し、4日目までの増殖度—倍化回数、すなわち PDL—を調べた。図5に見られるように、10%

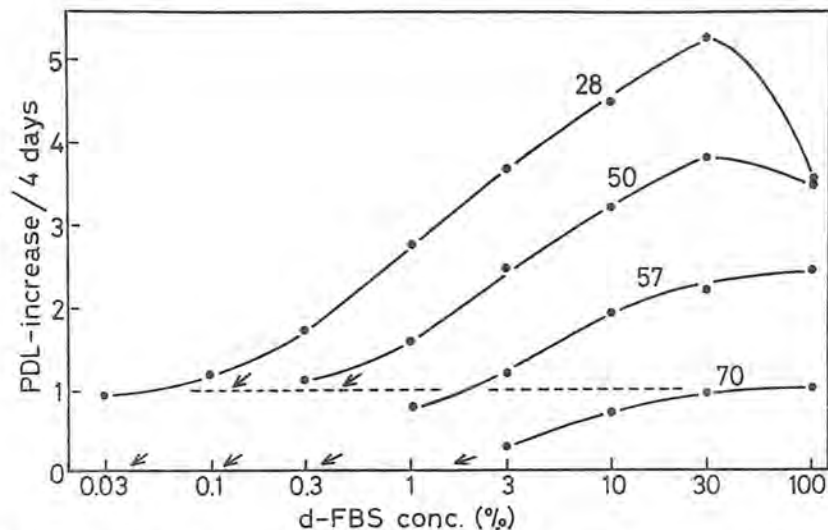


図5 透析ウシ胎児血清濃度に対するヒト2倍体線維芽細胞 (IMR-90) の増殖度の変化

の血清を使用した場合、28 PDLの細胞では4日目までに4回以上分裂・増殖できるが、50 PDLの細胞ではやく3回しか分裂できず、70 PDLでは1回しか分裂しない。すなわち、同じ血清濃度でもPDLの進んだ細胞は内在的な因子によって増殖能力がはっきりと低下していることが判る。

図5の各PDLの細胞の透析血清に対する反応曲線について、直線部、あるいはその外挿により、1回分裂させるのに必要な血清濃度(PDL 1の点線上の矢印)をPDLに対してプロットしたものが図6のカーブAであり、まったく増殖を停止する濃度(横軸上の矢印)をみたのがカーブBである。普通の培養に用いられている10%の透析血清で培養した場合、80 PDLはまったく増殖できなくなることがカーブBから求められ、IMR-90の試験管内寿命が 70 ± 10 PDLであることとよく対応している。すなわち、カーブBはある濃度の血清を用いた場合の試験管内寿命の推定曲線と考えられる。実際に低濃度の血清を用いた場合、この寿命がカーブBの推定値とほぼ一致することが実践的に確かめられ、その予測の正しいことが証明された。

以上述べた大野君の実験はヒト2倍体線維芽細胞の寿命に対して、内因と外因の関与を如実に示した好例である。

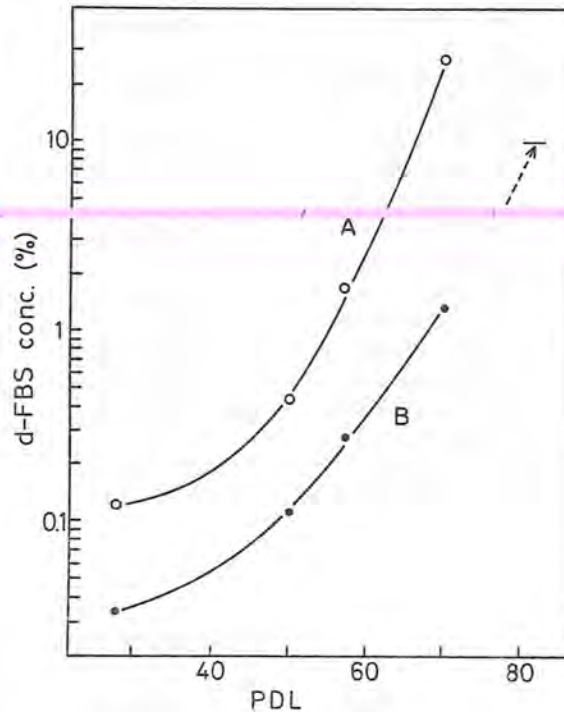


図6 細胞集団倍化回数と透析ウシ胎児血清濃度要求性

4. 環境要因の解析

ヒト2倍体線維芽細胞の増殖因子に関して、東北大抗研山根績教授が訳されたコロラド大学のDr. Hamの論文を引用させていただくと、その戦略は表1のとおりである。まず、ヒト2倍体細胞の培養液中の血清を透析血清に置きかえ、充分細胞が増殖するように但分子の基礎培地を改良する。透析血清で増殖が可能な培地ができたなら、つぎにその増殖が完全に停止するまで透析血清の濃度を下げる。ふたたび基礎培地を改良し、細胞増殖を可能にする。さらに透析血清濃度を下げ、基礎培地を改良する。その繰返しによって血清タンパク要求性をギリギリのところまで下げ透析血清を既存の増殖因子に置換えて増殖度を調べる。場合によっては未知の増殖因子の関与が必要になるかも

次のような研究法が正常二倍体細胞の血清蛋白要求性を最小限にするように用いられている。

1. 必要ならばコロニー様増殖を可能にするために必要な培養系を改変しつつ、被検成分が最も敏感に増殖を左右するようにコロニー様増殖の試験法を用いる。
2. 無処理血清（または組成不明培地添加物）を透析血清（または他の透析添加物）で置き代える。もし必要ならば培地が透析添加物を加えれば細胞増殖を支えるように基礎培地を改変する。
3. 血清蛋白量を細胞増殖が妨げられる程度まで減量する。
4. 血清蛋白を減量しても細胞増殖が改善されるような培地その他の変更を求めつつ、培地および培養条件を変える。
5. 細胞増殖が改善されるごとに、増殖が妨げられる程度まで血清蛋白濃度を減少する。
6. 増殖を改善し、血清蛋白の必要性を減少させるような他の変更条件をさがし求める。
7. 血清蛋白の要求性が培養条件を量的質的に変えても少なくならない場合には、血清その他の材料から未知の増殖促進物質を分離し、物性を明らかにする。

表 1 増殖因子解析の研究戦略

知れない。その場合には、血清または他の臓器から分離・精製してテストする。このような辛棒強い研究によって作られた基礎培地を表 2 の MCDB 105 である。微量成分など、必須量がなお完全に調べあげられていないところもあるが、ヒト 2 倍体細胞の基礎培地としてはおおむね完成されたといつてよいであろう。

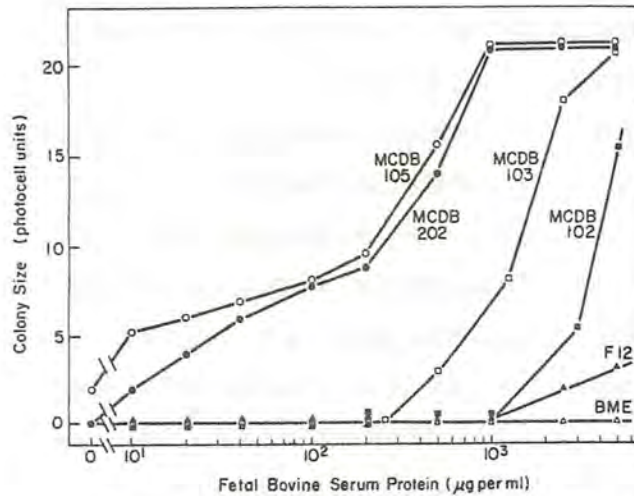
この MCDB 105 培地を用いた場合、WI-38 細胞の透析血清タンパクの必要量は 1mg/ml であった。ちなみに、Eagle の基礎培地を用いた場合には、透析血清では増殖させることができない。今後、ヒト 2 倍体線維芽細胞の増殖因子の解析が進むであろうが、見通しとしては、それほど複雑なものではないと思われる。

MCDB MEDIUM 105 for WI 38 CELLS

(McKeehan, W.L. et al., B.B.R.C., 20, 1013-1021, 1978.)

Essential amino acids	Vitamins	Major inorganic ions
Arg 1.0E-3	Biotin 3.0E-8	Ca 1.0E-3
Cys 5.0E-5	Folate 1.0E-9	Mg 1.0E-3
Gln 2.5E-3	Lipoate 1.0E-8	K 3.0E-3
His 1.0E-4	Niacinamide 5.0E-5	Na 1.3E-1
Ile 3.0E-5	Pantothenate 1.0E-6	Cl 1.2E-1
Leu 1.0E-4	Pyridoxine 3.0E-7	PO ₄ 3.0E-3
Lys 2.0E-4	Riboflavin 3.0E-7	SO ₄ 1.0E-3
Met 3.0E-5	Thiamin 1.0E-6	<u>Trace elements</u>
Phe 3.0E-5	Vitamin B ₁₂ 1.0E-7	Cu 1.0E-9
Thr 1.0E-4		Fe 5.0E-6
Trp 1.0E-5	<u>Purines, Pyrimidines</u>	Mn 1.0E-9
Tyr 3.0E-5	Adenine 1.0E-5	Mo 7.0E-10
Val 1.0E-4	Thymidine 3.0E-7	Ni 5.0E-10
		Se 3.0E-8
<u>Nonessential a.a.</u>	<u>Other organic compounds</u>	Si 5.0E-7
Ala 1.0E-4	Choline 1.0E-4	Ti 5.0E-10
Asn 1.0E-4	Glucose 4.0E-3	V 5.0E-9
Asp 1.0E-4	i-Inositol 1.0E-4	Z 5.0E-7
Glu 1.0E-4	Linoleate 1.0E-8	<u>Buffers, indicators</u>
Gly 1.0E-4	Putrescine 1.0E-9	CO ₂ 2%
Pro 5.0E-4	Pyruvate 1.0E-3	HEPES 3.0E-2
Ser 3.0E-4		Phenol red 3.3E-6

表 2 ヒト 2 倍体線維芽細胞 (WI-38) 用基礎培地—MCDB 105



改良培地の使用により WI-38細胞の透析牛胎児牛血清蛋白 (FBSP) の必要量が減少することを示す。図中に書かれている培地と FBSP量の入ったポリリジン表面処理の径60mmの組織培養用シャーレの各々に 100 個の冷トリプシン処理の WI-38細胞を接種した。14日間増殖させた後、コロニーの大きさは測光学的に定量された。F12およびMCDB培地については表2に記載されている。EagleのBasal Medium⁷⁾は無処理血清を添加してWI-38細胞の単層培養に広く用いられているが、FBSPを用いて同細胞のコロニー様増殖をさせることはできないが、この培地をBMEとして図示した。Ham and Mckeehanの文献²⁵⁾による。米国組織培養学会の許可を受けて転載した。

図7 各種基礎培地におけるWI-38細胞の透析ウシ胎児血清要求性

5. 細胞老化の内因の解析

東京都老人総合研究所では、ヒト2倍体線維芽細胞の標準株として、TIG-1細胞系を樹立した。同研究所内の多くの研究者によって、この細胞の試験管内寿命が繰返し調べられたが、その結果を総合して、動物の生存曲線のように表現したのが図8である。御覧のように、TIG-1細胞の試験管内寿命は70±10PDLで、細胞集団はかなり規則正しく死滅することが確かめられた。WI-38

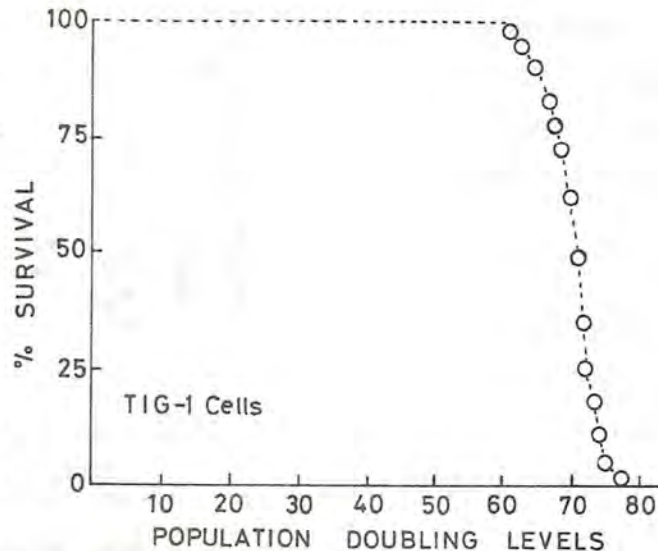


図8 ヒト2倍体線維芽細胞(TIG-1)の生存曲線

および IMR-90 細胞の試験管内寿命も、それぞれ 50 ± 10 PDL および 70 ± 10 PDL であり、倍化回数が細胞の寿命を決定しているように見える。

しかし、このように集団としては規則正しく死滅するにもかかわらず、個々のヒト2倍体線維芽細胞の増殖曲線、すなわちクローン性増殖曲線を詳細に調べた結果は、きわめてランダムに非増殖細胞化してゆくことが判る（第6回シンポジウム講演記録、75頁、図6）。いいかえると、個々の細胞ではランダムに起る非増殖細胞化現象が、集団としては一定の頻度として観察されるのである。このことは細胞増殖、あるいはDNA複製にともなう確率でおこる変化が、本モデルにおける細胞老化の基本機構であると考えられる。その変化はすべての細胞に広汎におこるものである。特定の酵素あるいは生体構成分子の変動が老化にともなう継時的に起ることがつかまったとしても、それ自体の変化が単独に老化の原因となるとは考えられない。多くの分子におこる変化を総合して惹起しうる基本機構を想定しなければならない。その意味で、細胞タンパク、とくに核内に存在するクロマチン・タンパクの構成および修飾をもう一度基本的に調べ直す時期にきていると思われる。

東京都老人研の三井洋司君は、ヒト2倍体細胞の老化にともなう変化を整理して、その変化が生体内の分裂終了細胞群の変化と同方向であり、それが誇張して表現されるものであることを考察している。WI-38細胞のPDLの増加による変化のなかで、細胞容積の増大が極めて著明であり、その推移は細胞増殖曲線の対数期における倍化時間の推移とよく一致することを認めている（図9）。

この細胞容積の増大をTIG-1細胞について調べたところ、図10のように、細胞タンパクの増量を反映しているものであり、核内クロマチン・タンパクについては、非ヒストン・タンパクがDNAの5倍量まで増量することを確認することができた。この変化の内容および各ヒストン分子種の変動に関してはあらためて発表することにしたい。

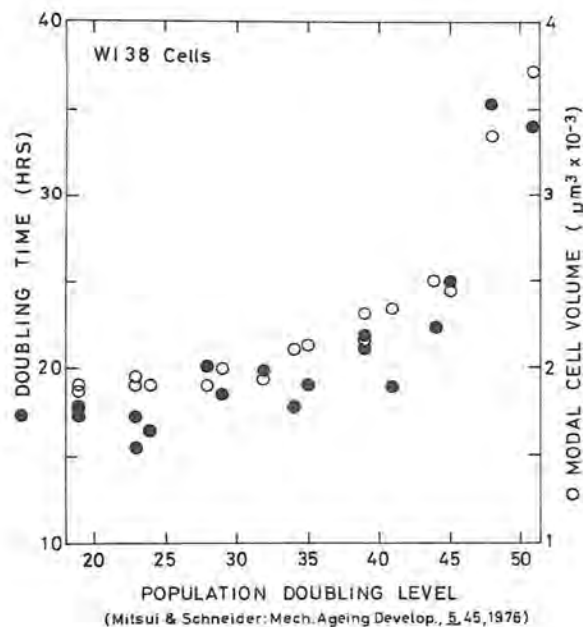


図9 細胞集団倍化回数による倍化時間および細胞容積の推移

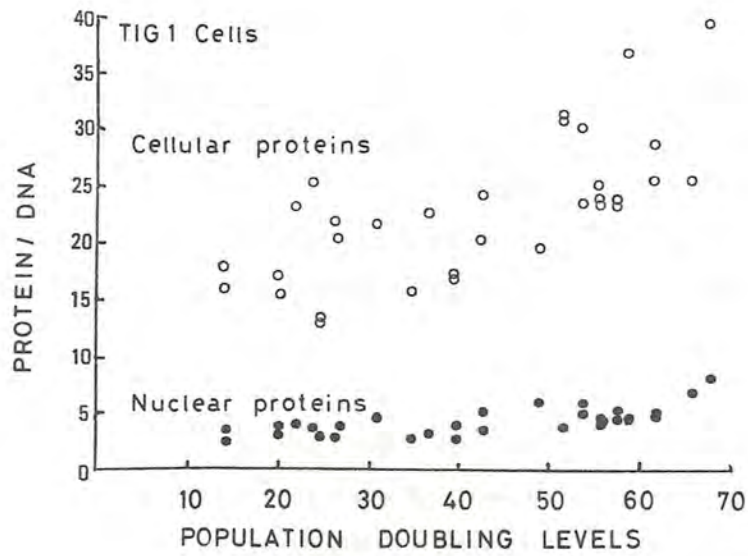


図 10 細胞集団倍化回数による細胞内および核内タンパク量の推移

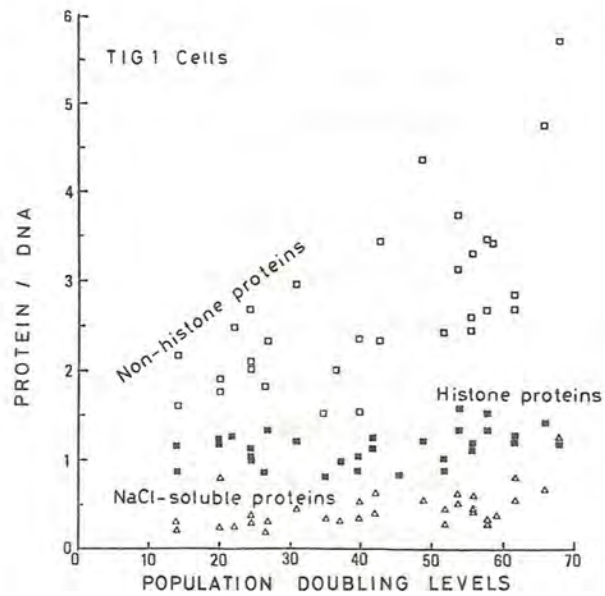


図 11 細胞集団倍化回数による各種クロマチン・タンパクの推移

討 論

○齊藤政樹（老人研）： Hayflick モデルに関連して、三井、Schneiderのデータをお示しになったが、あのような in vitro のデータは in vivo の状態を反映させるものかどうか、という点について現在の考え方、最近の情報は？

□山田正篤（東大・薬）： さきほどの DNA の polymerase の問題にしても、そのまま生体内に反映するとは思いません。そこで age によって違いがあるということが、何かの意味をもっていると考えております。

○齊藤： Fibroblast で in vivo で age の進んだものと若いものとを in vitro で培養しても実際には in vitro での aging pattern は変わらないという話も聞きます。

□山田： 何が変らないとおっしゃるのか、その意味がわかり兼ねますが、growth potency が小さくなっていくということはまず間違いないことです。

○齊藤： In vivo での aging を反映して in vitro の培養系でも 50 代と 30 代とかの life span の差を示されましたが、このようなデータを否定するような報告もあったように思うのですが。

□山田： 動物の種類が違えば life span も異なる。life span の長さに応じて培養 fibroblast の寿命が異っていないという反論かと思いますが、それは一つの実験条件の中で、一定の培地でやっていることなので、人の栄養と、動物の栄養の違いによって違って来て当然なのです。モデルとして、考えればよいのです。

□黒田行昭（遺伝研）： 今の質問についてはその通りでありまして、培養細胞では主に fibroblast を使っているのですが、実際の生体の中には実質細胞が多くあります。細胞の分化する過程で、fibroblast も実質細胞も出来る。培養条件では、fibroblast が大へんよく増殖するという事で、モデルとして使っているのです。しかしその fibroblast 自体も、普通 aging の指標として population doubling time という倍化する回数を指標としているわけですが、実際には 50 回ではなく、平均で中には 100 回も、500 回分裂したと思われるのがあります。実際に最後のが何回分裂したか調べてはないのであって、in vitro の場合には、50 回 doubling に達するのに 11 か月とか、1 年とかで来てしまう。in vivo の人間の寿命は 70 年とか 80 年とか、非常に長い。細胞の population doubling とどう結びつくか、ということについてもまだ充分わかっていない。その辺のところは、in vitro の条件というのは限られたある意味では厳密に規定した条件ですが、実際の体

の中の細胞とは違った条件であって、分析するには優れた方法であるが、検討を要する問題でもあるのです。

□山田： 説明不足の点がありましたが、mean の分裂回数が、細胞の死と関係があり、しかもそれが random におこってくる、ということになると、50回という回数が問題なのではなくて、一回毎に何か変化がおこってくる、それを一種の障害と考えるか、あるいは同時に一回の細胞の増殖ということにからんでおこる変化が、over all の寿命（培養細胞の）と関係がある。その cell cycle の中で増殖しなければおきて来ないもの、その典型的なものはヒストンです。non-histon は、大体自然なサイクルで合成されるといって居ります。そのようなヒストンの動きなどは、ずっと押さえて行かなければならないであろうと思っています。出来上った蛋白の問題なども機会があればお話ししたいと思っていました。

□黒田： 培養細胞は、細胞レベルでの老化のモデル系として使われますが、そのほかやはり蛋白の変化や DNA repair などを調べる場合にもよく実験系として使われます。そういう意味では分子レベルから動物全体の寿命を考える場合の橋わたしとしての実験系と考えられる。

○松村外志張（東大・医科研）： 先生がさっき、完全分裂と不完全分裂の 2 型を示されましたが、この区別はその後いろいろ追認されて来ていると思います。あの図をみますと、線維芽細胞で老化のモデルとっているものは、実は分裂型では筋肉細胞の分化などの場合と同様であり、増殖型としては同じものを、一方では分化として、一方では老化のモデルとして扱っていると思います。培養細胞としては、分裂が停止してもはっきりした分化の機能が現れないか、或ははっきりしていないか、わかっていないところを老化として扱っているように思います。その老化と、分化とに、培養細胞としてはっきりした形の違いがあるのでしょうか。

□山田： 分化というのを生体の中の問題として、増殖がらみで考える、これは当然のことですが、再生系の小腸粘膜の上皮細胞の増殖層の細胞についてみると、そこには一定の組織構想があって、細胞と細胞との関係、血管との関係、など全体の局在性が方向性を決めている。これが培養系との違いです。分化の中の細胞増殖ということだけみれば同じようであるかも知れない。

3. 結合組織代謝と加齢

医歯大・難治研

永 井 裕

結合組織は生体の支持組織としてのみならず、細胞環境として細胞活性を制御し、炎症、免疫反応にみられるように外因的刺戟に対する細胞防御の場として重要な機能を営むと考えられる。

加齢に伴い組織を構成する生体高分子に組換えを生じ、結果として組織機能に障害を来たすことは古くから知られている事実であるが、このような変化がどのような因子を主因として招来されるかについては多くの研究にも拘らず現在全く不明である。しかし、1978年までに蓄積された報告をもとに整理し、これまで提出されてきたいくつかの仮説との関連で問題点を明らかにすることは、本課題の現時点における道標として、また、今後の研究へ向けての手がかりとして必要と考える。

I 分子レベルにおける加齢変化

コラーゲン分子が生化学的研究の対象となって以来、加齢に伴う組織からのコラーゲンの可溶性の減少が指摘されてきた。その原因として組織中 lysyl oxidase によるコラーゲン分子中のアルデヒド形成、それに伴うアルドール縮合または Schiff 塩基形成によるコラーゲン分子間の架橋増加がコラーゲン不溶化を来すと解釈されてきた。しかし、この議論は組織ホモジェネートからのある一定条件下における可溶性コラーゲン量を見ているにすぎず、加齢に伴う組織沈着コラーゲン線維の太さの増大、マトリックス成分の組成変化などを考慮すると、余りに短絡した解釈と云わざるを得ない。事実、酸性、中性 pH 条件下で繰返し抽出を行うと組織コラーゲンの 90% 以上が可溶化される。また、コラーゲンの還元性（二重結合をもつ）架橋、さらに反応が進行したと考えられる非還元性架橋のひとつ pyridinoline の加齢変化をみると（浜松医大、藤本らによる）、ヒト肋軟骨、アキレス腱においてほぼ 20 歳代を境に減少することの報告がある。

II 細胞レベルにおける加齢変化

1) コラーゲン代謝： それではいったん組織に沈着したコラーゲンの代謝回転はどうか。その目安としてコラーゲン代謝の Key enzyme であるコラーゲナーゼ産生能を胎児および成人皮膚の組織培養で比較すると、胎児において成人の 10～20 倍の酵素産生能が見られる。このことはコラーゲン代謝回転を指標とした細胞活性は加齢とともに著しく低下することを示唆している。

2) コラーゲン分子種(型)： 近年、コラーゲン polymorphism の研究から、コラーゲンの老化の指標として型転換が提唱されている。この考えは鶏胚軟骨培養細胞(クローン化した)による産生コラーゲンが経代とともにⅡ型→Ⅰ型と変化し、senescence の stage で $\alpha_1[Ⅰ]_3$ 型に変化するという実験結果に基づいている(Mayne ら、1976)。このような現象は生体の同一組織におけるコラーゲンの加齢変化においてもみられる。たとえば、皮膚において胎児期から成人に至る過程でⅢ型コラーゲンの漸減に伴いⅠ型の増加がみられる。また、変形性関節症患者において関節軟骨がⅡ型コラーゲンから、修復に伴いⅠ型コラーゲンへと移行することが知られている。従来、コラーゲン産生能はないとされていた肝実質細胞において間質性成分であるコラーゲン、酸性ムコ多糖が合成されている可能性が強く示唆されるようになった。すなわち、クローン化した肝実質細胞(アルブミン合成能をもつ BB 細胞および BC 細胞)を用いた培養系でコラーゲン産生をみると、線維芽細胞と同レベルのコラーゲン量を合成し、その型分布はⅠ型、 $\alpha_1[Ⅰ]_3$ 型、Ⅲ型の比がほぼ 6 : 3 : 1 であった。トランスフォームした M 細胞(アルブミン合成能を有せず、 α -フィトプロテインを産生)でも同様にコラーゲン合成がみられたがⅢ型産生は減少した。以上の結果は加齢および疾病に伴う臓器線維化を考察する上で重要な因子と考えられる。

3) 酸性ムコ多糖の分子種： 加齢に伴い組織ムコ多糖の組成に変化がみられることはよく知られている事実である。つまり、皮膚において、ヒアルロン酸(HA)の減少に伴うデルマトン硫酸(DS)の増加、角膜において、コンドロイチン硫酸(CS)の減少に伴うケラト硫酸(KS)の増加等である。後者の場合、加齢に伴う酸性ムコ多糖合成細胞の UDP-GlcUA decarboxylase 活性の上昇によることとして説明される。モデル実験において UDP-Xyl 添加が KS 合成を上昇させることから上記の解釈が支持されている(Balduini ら、1970)。

発生、分化の過程において、酸性ムコ多糖構成成分であるヘキソサミン、ウロン酸の UDP-単糖レベルの転換酵素、epimerase, dehydrogenase 等の活性発現が産生される酸性ムコ多糖分子種の割合を決定するであろうことは容易に想像されるが、加齢に伴い、ムコ多糖合成担当細胞においてこのような現象がみられるであろうか。29 歳、68 歳ヒト皮膚組織培養によるムコ多糖合成能を比較した結果では、両者において全く差がみられず、ともに HA, 75-90% ; DS, 3% ; CS, 2-5% およびヘパラン硫酸(HS), 5-17% であった。つまり、酸性ムコ多糖合成能からみた老人皮膚細胞は若年者のそれと同様、“元気な”細胞といえる。従って、組織沈着したムコ多糖、すなわち、結合組織の老化を知るためには、さらに細胞活性に影響を与える諸因子 — ホルモンレベル、細胞環境変化を含め — 並びに代謝酵素レベルの変動解明へと研究を進める必要がある。この点に関して、鶏胚皮膚(16日胚)由来の培養細胞を用いた実験で、培養系における細胞の population, 細胞増殖過程で合成されるムコ多糖分子種の割合が著しく変動するという事実を指摘しておきたい。

すなわち、前者において population の低い状態で細胞あたりの HA 合成能が高く、細胞増殖に関しては、confluent 期まで細胞あたり HA 合成は一定であるにも拘らず、log phase で CS の急速な合成がみられ、confluent 期で低下、一方、DS, HS は漸増するという結果である。

Ⅲ 免疫と結合組織

この分野はまだ研究の緒についたばかりであるので討論の対象とするには時期尚早の感は免れないが、慢性経過を辿る結合組織疾患においてコラーゲンの抗原性の関与が指摘されるようになってきた。モルモットを用いた実験で一度感作したコラーゲンによる細胞性免疫が 200 日以上に亘って記憶され続けること、結合組織の場で起る免疫反応において、macrophage が collagenase を有すること等を考慮すると、結合組織中間代謝産物が免疫系を刺戟し、感作リンパ球による放出因子が結合組織細胞を刺戟するサイクルが作動するであろうことは十分考えられよう。このような過程が結合組織の老化において重要な働きをしていないかどうかは今後の命題であろう。

討 論

○大野忠夫（放医研）： 先生のお話の中で、哺乳動物の各組織の中の mucopolysaccharide のレベルは、老化と共に変わって来るのでしょうか、特に機能を果している実質細胞周囲の環境要因としての mucopolysaccharide について。

□永井 裕（医歯大・難治研）： 実質細胞については、厳密に定量したデータはないと思います。正常の動物において age とともにどう変化するかという詳しいデータはありませんが、一旦 damage をおこさせ、その修復時のムコ多糖をみますと、damage 以前のムコ多糖とは違った組成になっていることが多くの組織で確認されています。

○安藤 進（老人研）： 加齢と共に含水量が減る、ということがあると思うのですが、collagen で、如何でしょうか。

□永井： 含水量に関しては、ヒアルロン酸が一番大きな contribution をしています。加齢に伴うヒアルロン酸の割合の低下が、含水量の低下と関係すると考えられます。

collagen 自身は架橋が出来ても出来なくても collagen 分子を維持している水分の量は変わりません。

□長瀬すみ（佐々木研）： うちで今度報告しますが、胎児から 1 年半迄のラットの皮膚に関して、ムコ多糖の実験をしました。量的には wet weight でみると、dry weight でみると、傾向が

遅います。Wet weight で見た現りでは、ヒアルロン酸は胎児から3カ月位迄変らなくて、そのあと、下って来ます。Dry weight でみますと、胎児のときに断然高くそれから4週齢位まで急激に減少し10週齢から一年半まで徐々に減少します。コンドロチン硫酸B、デルマトン硫酸に關しましては、どちらでみてもあまり変わらず、胎児の時高く、ageと共に下ってまいります。水との関係でヒアルロン酸の量と水分量との相関関係を求めてみますと係数は0.9でヒアルロン酸の量と水との関係はあきらかだと思います。質的な問題から、ヒアルロン酸の分子量を各ageについてみますと、胎児から2週齢位迄は割合小さくて50万前後、3週以後大体一定で約80万、一年半では100万と老化につれ分子量が大きくなります。このような結果を得て居りますが、我々の現在までの実験結果からヒアルロン酸と水との有意な関係は言い切ってもよいと思われまます。

○小出 輝(順天堂大・医)： 教えていただきたいのですが、加齢ないし老化を研究するときおこった変化がどの程度加齢による本質的变化だと考えてよいか。たとえばコラーゲンのタイプが変化したときに、疾患でも同じような変化がおけるとしますと、加齢と疾患とはどの点でわかれるのか、つまり本質的な老化による変化をどう区別すればよいのか。

□永井： むずかしいですね、培養細胞系でみますと、コラーゲンのpattern の変化というのは、subculture の代数の変化だけでは到底決められない。どれだけ培養条件がいいか、ということが問題になるわけですが、よい条件のときはあまり著しい変化はおこらないのです。疾患の場合に、一番問題になるのは正常時と細胞の種類分布が変ることが問題で、老化を意識した場合の細胞集団の変化とは違うのではないかと思うのです。産生されたcollagenの分布からこれはdamageによる、これは老化による、とわかることは困難なように思います。

○金子 仁(日本医大・老研)： 先生のお話で、実質細胞がcollagenを作るということでしたが、肝であろうが腎であろうが、実質細胞はすべてcollagenを作ると考えてよいのでしょうか。

□永井： そのように考えております。現在、種々の細胞についてデータが集積されている段階ですがendothelでもepithelでもmesenchymalでも、collagenを作るというのが常識になってしまった、といった方がよろしいと思います。夫々の細胞のつくるコラーゲンのタイプに差がみられます。

○金子： すべての上皮細胞が全部作りうるということですか？

□永井： はい、ですから最近ではfibroblastという呼び方自身が問題になって来ております。

○中島輝之（久留米大・医）： Endothel, それから平滑筋あたりが collagen をつくることは常識となったといえますが、上皮細胞がつくるというのはまだ常識ではないように思いますが……

□永井： 結合織分野の研究者間では、常識になりつつありますが。

○中島： そりゃどうも……………

□永井： 組織の先生方の間では、まだかと思いますが……………

○竹内 純（名保衛大・医）： 先生がスライドにお示しになった 68 歳と 29 歳の人の skin の GAG の差に hyaluron 酸を main としており、両者に差異がみられなかったということですが、蛋白量あたり DNA 量あたりのウロン酸量を比較した場合にも変わらないのでしょうか。

□永井： さきほどのは組織の重量あたりで表示していますので、組織中の細胞の割合がどうかということとはたしかに問題であろうと思います。

○竹内： 大動脈等の血管に含まれている GAG の年齢による変化については如何でございましょうか。

□永井： 私自身データを持って居りません。

○竹内： 文献の上では？

□永井： 中島先生がおくわしいのでは？

□中島： 血管ではふえる、というのと減る、というのとありますね。病変部は少くともふえると思います。

□永井： 病変部ではデルマタン硫酸は増えるということは、存じていますが。

□中島： 加齢的には動脈全体としてみればへるという成績と、ふえるという成績とがあります。

□永井： Base にとるものが何かによって解釈が違ってきます。

酸性ムコ多糖合成能に注目して加齢変化を細胞レベルで見ますと 68 歳でも細胞は若年者と変わらないということが云えます。従って結合組織代謝の加齢変化を考える場合には細胞環境であるマトリックス（組織）の変化を促すような形である因子が全身的に結合織細胞に働き、その結果組換えられた細胞環境に規制されて細胞が対応すると考えられます。

○中島： In vivo と in vitro の成績が違うという点を示されましたが、collagen の type の加齢的な変化と、matrix の主成分であるムコ多糖の加齢変化と、その間に何か原因、結果的なも

のを、おみとめになりましたか。

□永井： 実はそれをみたくて、この2年間、collagenと同じ組織細胞を使って、collagenの産生するタイプとムコ多糖のタイプとがどう相関するか、しらべて来たのですが、同じ細胞を使っても培養のsystemが違えば産生されるムコ多糖の割合が違ってくるのです。細胞のpopulationによっても異なりますし、増殖と共にムコ多糖産生がふえるのですが、その内訳をみますとヒアルロン酸は細胞あたり、constantでありまして、コンドロイチン硫酸が急激にふえて来ます。デルマタン硫酸、ヘパラン硫酸は徐々にふえてきます。DNA合成とヒアルロン酸合成とは関係ないのではないか、という気がします。

同じstageのcellにつき細胞数だけ変化させ20時間serum中で安定化させたのちのムコ多糖合成をみますと細胞数を増すに従いヒアルロン酸合成能が下って参ります。組織の中のヒアルロン酸の合成能というのは、細胞がどの位密であるか、という点とも関係あることがわかって来ました。

○中島： いずれにしても今後の問題ということになりますね。

4. 老化研究の生化学的アプローチ

京大・医

高井克治・早石修

動物の寿命は種属によりほぼ一定で誕生から死までの時間経過に従い規則正しい変化が起る。「加齢」、即ち「時間に依存した整然たる変化」、は従って、各々の動物の持つプログラムの性質に、大筋は、従うと考えられる。しかし生物は外部環境との関連において成立する半開放系であり、「加齢」研究も、内部のプログラムと外部要因各々を追求し相互関連を明らかにする作業の一つである事は云う迄もない。

我々は、必須アミノ酸トリプトファンに関与する酵素、代謝、代謝調節の研究を続けて来たものであるが、本日は、この領域に含まれ、そして「加齢」の機構に重要な寄与を行うと考えられる、松果体のトリプトファン代謝とその生物時計による調節について、最近まで多くの研究者により明らかにされて来た点をまとめてみたい。

松果体は胸の最深部にある高々100 μ mほどの小さな臓器であるが、この小臓器が「加齢」現象の重要な部分、生殖器の成熟に関与する事は19世紀末に既にHeubnerにより記載されている、“9歳並みの身長を持ち外陰部の発育は成人同様の4歳を一寸過ぎたばかりの男の子を死後解剖すると、松果体の腫瘍が見出された”。以後性別を問わず、松果体腫瘍を持つ個体では、その由来により、生殖器の発達の促進又は抑制が見出されて来た。松果体摘出実験(Mottaら)は困難な実験であるが、その結果、雄ラット生殖器の2倍に及ぶ肥大が観察された。従い、松果体由来の因子が、抑制的に性成熟に関与すると結論が導かれた。最も有力な因子は、インドール核を持つメラトニンで、蛙皮膚の褪色作用をもつ本物質は松果体より単離同定されたが、同時にこの物質は、成長期に投与すると卵巣の発達を強く抑制した(Wurtmanら)。近縁物質にこの様な効果はなかった。以上述べた事実は、メラトニンが、年単位の時間経過を持つ「加齢」の一部を調節している事を示唆する。

メラトニンの生成は他の臓器では報告がなく、松果体での生合成経路とその調節機構はこの臓器に交感神経末端が存在することからも大きな興味を持って進められた。その結果(Axerlodら)メラトニンは必須アミノ酸でインドール核を持つトリプトファンより生合成される事が判明し、関与する酵素系も知られた。血中トリプトファンは松果体に入ると、第一に臓器分布の限定されているトリプトファン水酸化酵素によりインドール5位の水酸化を受けこの際5ヒドロキシトリプトファンを生じこれはすぐ、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素によりCO₂が離れ、重要な神経伝達物質、セロトニ

ン（5-ヒドロキシトリプタミン）を生ずる。セロトニンのアミノ基はどの臓器でも行われる様に、N-アセチル転移酵素（NAT）により、N-アセチルセロトニンに転換されるか、アミン酸化酵素等により5-ヒドロキシインドール酢酸となる。前者は、ヒドロキシインドールメチル転移酵素（HIOMT）によりメチル化されて、かくてメラトニンが生合成される。この最終段階を触媒するHIOMTは、松果体に特異な酵素であり、この理由で、メラトニンなるホルモンが、松果体でのみ生成される。

松果体のトリプトファン代謝の調節については、1962年にQuayが、セロトニンの日周リズムを発見した事が重要で、昼間は夜間の数倍高いレベルを示すセロトニンの意義と共にこの調節の機作が研究対象となった。NIHグループは、更にアセチルセロトニンとメラトニンのレベルがリズムを示し、先程と逆に夜間に高く昼間は検出限界程度に低く、それらの差は著しかった。これ等、松果体特有のトリプトファン代謝の著しい日周変動は、結局、セロトニンからN-アセチルセロトニンを生成する、NATの酵素活性の変動が原因である事が判明した。NATは、暗期つまり夜間には、明期の数十倍上昇しているが、夜明けと共にただちに減少する。セロトニンのリズムがメラトニンのそれを反転している理由も理解出来た。NATは他の臓器にも存在するが、この様に極端な昼夜変動を示すNATは他の臓器に見出されず、松果体特有の調節機作が考えられた。松果体が、脳の深部にあり交感神経支配をうけているので、この調節が、明暗の交替に伴う神経性のものか、それとも、内在性のリズムが松果体に存在するか或は上位の中枢より送られて来るか、この三種の機作が可能であった。1970年のKleinらの実験は、光により影響を受ける上位の中枢から伝達されたリズムが、松果体のNAT活性を調節し、周期的なメラトニン生合成をもたらす、という結論を導いた。ラット松果体のNAT活性の昼夜変動は、24時間暗闇の中でもやはり起る、盲目ラットでは、24時間真昼間の条件にしても、このリズムはほとんど変らない。光の刺戟がなければ、リズムの周期はほとんど24時間（詳しくは24時間10分、出口らによる）に等しい。これは、明暗がリズムを作るのではなく、リズムは内在性であることを示す。しかし、24時間明期にすると、リズムは消失し、NAT活性は極めて低いレベルに保持される。更に夜間或は暗期に、突然照明をつけると、NAT活性は極めて短い半減期で数十分の1に減少し、光は強力に内在リズムを打ち消すと考えられた。この24時間10分というfree runの周期は、驚くべき地球時間との一致であり、体温（25時間）（36時間、ヒト）や睡眠のfree run（暗黒中）のリズムとは、比べものにならない。

この間、NATの松果体内における生合成促進の分子機構が解析された。松果体を支配する交感神経の支配を上頸神経節の切除により断つとリズムはなくなりNATは低値を保ち松果体自身の内在リズムがない事が明らかにされ、同時に、 β -受容体のagonist, antagonistを使用して、明暗におけるagonistのNAT活性促進、暗期の高いNATレベルのantagonistによる低下が確か

められた。これらの実験により示された β -受容体の関与は、更に、器官培養した松果体に対するノルエピネフリンのNAT活性上昇作用で、更に確実になった(Kleinら)。But₂cyclic AMPが、ノルエピネフリンを代用する事実は、この松果体においても、他の多くの臓器におけるホルモンなどの作用機作と同様、receptor→アデニルサイクラーゼ→cyclic AMP→生物効果、の図式が成立する事を示唆した。

問題は、従って、NAT活性という忠実な指標を用い、より中枢の、光により干渉をうける、24時間周期の生物時計が何か、ということになった。主として、脳の各部位の切断、破壊実験とNATリズムの関係が追求され、技術的な困難と複雑なnetworkのため完成した結論ではないが、この24時間の生物時計は、視交叉上核或はそれよりやや上位の部分に存在する、と推定されている。視交叉上核よりの出力は無論松果体に到達する径路のみでなく、この核の破壊により、副腎コルチコステロン、体温、脳内温度などの日周リズムも同様に消失した。しかし、これ等は食餌条件などにより復帰せしめられた。その点で、松果体のNAT活性のリズムはユニークで、ただ光のみに影響され、暗期での高値は夜行昼行動物に依らず、開眼しない前のラットにも24時間の周期を示す。従い、メラトニンを生成する松果体のトリプトファン代謝は、今のところ“最も純粋な日周リズム”と表現されている。

視交叉上核は此様に、松果体との関係においては、抑制リズムを拮える“純粋な体内時計”の有候補であるが、この細胞群の24時間単位の活動、休止を生化学的に、つまり酵素や代謝の関連から、理解する事が強く望まれる。この点については未だ明確ではないが、しかし、Schwartzらは明期に、視交叉上核の活動は高く、暗期には低く、それはfree runでも約24時間周期を持つと考えて矛盾のない結果を、“¹⁴C-デオキシグルコースのとり込みをオートラジオグラフィーで、視交叉上核と対応せしめる”方法を用い示した。この興味ある“今後の問題”の解決には、様々の困難があるが、少くとも従来、神経伝達において生化学的実験法が面したミリ秒上の困難は、“hour単位”の揺動ということで本質的に近付き易くなった事は否めないと考えられる。

生物の時間に関しては様々の報告があるが、以上、地球時間に最も近い生物時間を刻む松果体のトリプトファン代謝が生化学的に理解された事を示した。この基礎に立って、更に上位の活動を、物質、代謝、酵素、から理解する試みは、当然の帰結である。現時点で、しかし、強調すべき点は、“1日を決める生物時計の厳密な支配下にある系が、メラトニンというホルモンを通して、同時に、長期にわたる「加齢現象」、生殖器成熟、を抑制的に調節している”事で、単純化すれば、“生物は一日の積算のもとに「加齢」のカレンダーを決めている”と考えて矛盾はない。生長と老化を「加齢」という言葉で結ぶことに、直観的な賛成は得難いであろうし、かつ「加齢」後半において、生物の種々のパラメーターの揺動の個体差が大変大きいのは事実としても、それを外部要因の支配

が圧倒的であると理解するより、個体にプログラムされた「代謝調節」の能力が極めて大きいと考
える立場をとりたい。

討 論

○井村裕夫（京大・医）： 老化に関する研究は、従来主として老化或いは加齢に伴って生体内
におこるいろいろな現象に関する知識を集め分析して行くというものでありましたが、その中から
老化の機構に関する研究方法を如何にして見出して行くか、それが大へんむずかしい研究課題でも
あります。今日は、生化学的に、老化にどのようなアプローチが出来るか、という意味で京大の早
石教授のところの高井助教授からお話を伺います。

○入来正躬（老人研）： ちょっと教えていただきたいのは、たとえば、成人と老人との *circadian rhythm* で、はっきりした差というものが出ているのでしょうか。たとえば *constant light*, *constant dark* というような条件で、*intrinsic* な一日のリズムが老人になるとのびると
か。

□高井克治（京大・医）： 現在正しく為された実験結果があるかどうかお答えできません。
この点に関しましては、光によってのみ変るリズムについてのデータがとれていれば意味があろう
と考えられますが、人間の場合、他のかなりの数の *circadian rhythm* は、複雑な外的要因による
制御が示されていて、結局はなかなかすぐには解決し難いと考えられます。

○井村： 今のお話は 24 時間の日周リズムでしたね。加齢によっておこる変化は人間などでは
年単位で長いものです。そのような長い時間が生化学的にどのように刻まれていると考えますか。

□高井： 大へんな命題で、無論お答えする内容の持ち合わせはございません。しかし、本日申
上げました様に 1 日を刻む時計を通じて年単位の性成熟が調節されている、つまり、例えばメラト
ニンが日々一定単位で放出されその効果が日々蓄積していく、ですからそのプログラムが *wear/tear*
しなくても効果は砂時計の様にたまって行く、それが代謝調節をいずれは変える……。
あとはどうなるかはわかりませんが……。

性腺刺激ホルモン増加にはじまり次々に *event* が起って性ステロイドの増加から性成熟に到る、
逐次的な変化について、先生がいつか討論されたかと、間違っていたらお許し下さい、存じますが、
この観点に関しては、私には、云う事はございません。

○井村： 全く別のことですが、過酸化脂質についてはどのようにお考えですか。

□高井： 蓄積説がこの様な場合当然ある訳ですが、個人的には、どの様なものの場合でも生物の利益に關与する働きが、必ず重複していても、あるのだという考えを持ちたいと思って居ります。過酸化脂質に關しましても、プロスタグランディンを思えば、反応がよくわかっているものの典型ですが、複雑な pathway がよく統制されていて、endoperoxide も hydroperoxide も生成されます。無論、プロスタグランディンの endoperoxide も hydroperoxide も生化学的生理的に重要な物質でなければ、過酸化脂質の毒性問題で片付けられてしまうものだと思います。プロスタグランディンの場合スケジュール通りで、他は、ないという事は考えられますが、lipoygenase という酵素も生物は用意していますし、所謂毒性のある反応だけが単独に現われて来るという事は滅多にないと考えています。

老化してからの詳しい比較は存じませんが、 O_2^- の場合もただ毒性ある分子として単に unscheduled に出て来るものでない場合があります。白血球の殺菌メカニズムは、系より漏出した偶発的な O_2^- や H_2O_2 ではなく、白血球の意図に沿って大量の O_2^- を出す訳です。この場合 O_2^- の大量生成がない場合は病気であるという報告があります。 O_2^- の生産を障害因子という目だけで見るのは当を得ていないと考えられ、この様な場合、生物はこの分子の性質をよく知っていてその使い方を心得ているということを強調したいと思います。

5. 老化の免疫学的パラメーター

東大・医科研

成内 秀雄

「老化とは何か」という定義が存在しない限り、老化のパラメーターを規定することは困難だという考えも存在するが、現時点でその議論をすることは実り少く、さらに「平均寿命」という言葉が意味を持つことから考えれば暦年齢と老化はかなり密接にあると云える。そこで暦年齢と共に免疫学的パラメーターがいかに変化するかを述べることにする。

血清免疫グロブリン等の変化

最も簡単に測定し得るために多くの報告があるが10～92歳にいたる計811名の健康人の血清免疫グロブリン濃度を測定した Buckley 等の報告¹⁾にあるように IgG, IgA, 共に年齢と共に増加するという報告がほとんどである。IgM についてはやや減少とする報告もあるが増加という報告が多い。Buckley 等はさらに年齢と共に個体間のバラツキが大きくなることを強調している。最近米増等は血清中 C₃、及び C₁q の濃度を見ているがこれらも高齢者に著明な変化は見られない²⁾。

では血中抗体はどうかと云うと、血液型抗体、細菌に対する自然抗体等は高齢者では減少している。さらにマウスにおける抗体産生能を見ると羊赤血球を抗原とした場合、明らかに加齢に伴う抗体産生の低下が見られる。ではこのような加齢に伴う抗体産生の低下は何故おこるのかを検討するために免疫担当細胞変化を見ることにする。

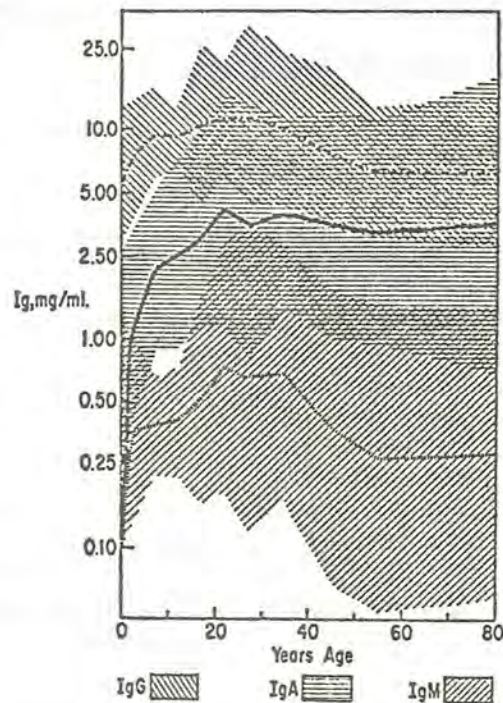


図1 ヒト血中免疫グロブリンの年齢による変化
— · — · — : IgG, — : IgA,
- - - - - : IgM の各平均値
(C. E. Buckley 等 1970)

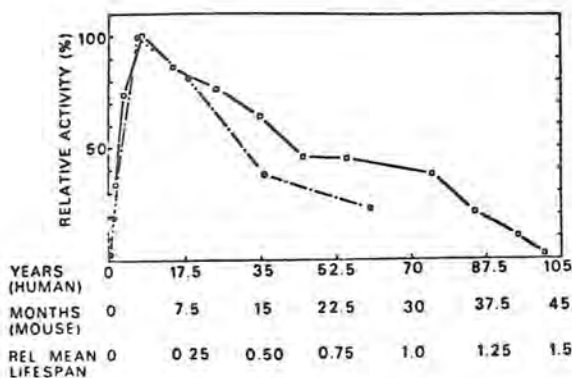


図 2

ヒト抗A型血球抗体：

—□—□—□—

マウス抗羊赤血球抗体：

—●—●—●—

(T. Makinodan 等 1975)

免疫担当細胞の変化

免疫担当細胞には大別して次の3種のものが知られている； 1) 大食細胞、 2) 胸腺由来細胞 (T細胞)、 3) 骨髄由来細胞 (B細胞)。

大食細胞については貪食能³⁾、in vitro 抗体産生の支持能⁴⁾共に老齡マウスと若齡マウスとの間に差は見られない。

Type and Preparation of Interacting Spleen Cells	Plaque-Forming Cells/Culture		
	Expt. 1	Expt. 2	Expt. 3
Young, unseparated	1276 ± 44		763 ± 88
Old, unseparated	260 ± 49		38 ± 13
Young, adherent + young, nonadherent	1225 ± 39	627 ± 63	433 ± 48
Old, adherent + old, nonadherent	226 ± 24	6 ± 4	20 ± 5
Young, adherent	100 ± 26		20 ± 14
Young, nonadherent	21 ± 7		13 ± 4
Old, adherent	70 ± 15		4 ± 4
Old, nonadherent	16 ± 5		1 ± 0.7
Old, adherent + young, nonadherent	1209 ± 86	489 ± 70	387 ± 11
Young, adherent + old, nonadherent	257 ± 30	36 ± 10	10 ± 4

表 1 マウス脾細胞の in vitro における抗羊赤血球抗体産生に及ぼす老齡及び若年マウス脾プラスチック附着細胞の影響 (H. L. Heidrik 等 1973)

次にT細胞について考えることとする。T細胞には特異的に刺激するマイトジェンがあるので、この内の pHA, ConA に対する反応を見ると、共に老齡マウスでは極度に反応性が低下する。一方、T細胞の表面マーカーである Theta 抗原陽性細胞の数を見ると老齡マウスでも減少しては

いないという報告が大部分である。では何故マイトジェンに対する反応性が悪いのかという疑問が出る。この疑問に対して Abraham 等の実験⁶⁾は次のように答えている。即ち、老齢マウス脾細胞を ConA で刺激した結果生じる芽細胞数は少ない。cell cycle 及び 1 回の分裂から次の分裂にうつ

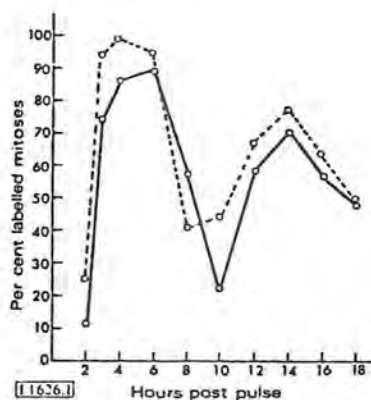


図 3 ConA 刺激マウス脾細胞の cell cycle
 ○-----○ 12ヶ月齢
 ○———○ 28ヶ月齢
 (C. Abraham 等 1977)

る時間については老若の間に差は見られない。従って、Theta陽性細胞の数としては老若の間に差は見られなくてもマイトジェンに反応し得る T細胞の数で考えると、老齢マウスでは減少している。

では B細胞についてはどうかというと、これも T細胞の場合と同様に、B細胞の表面マーカーとして知られる細胞表面免疫グロブリン、補体リセプター、Fcリセプターを持った細胞の数で数えると老若の間に差は認められない。しかし、T非依存性抗原に対する抗体産生は減少している⁶⁾。この減弱した反応性は老齢マウスの脾細胞を若いマウスに移入した場合にも回復せず、又抗 Theta抗体で処理しても変化がない所から、抑制性細胞が存在する為とか、老齢マウスの体内環境のためであるとは考え難い。彼等は抗原に

対するリセプターの密度や抗原結合細胞数についても検討しているが著明な差は認められない。

この場合にも抗原に反応している細胞数が減少していると考えれば説明がつくのではなからうか？

B細胞には、T細胞の場合と同様に LpS が特異的マイトジェンとして働くことが知られているが、LpS に対する反応性についても Andersson 等⁷⁾は limiting dilution 法を用いて実験し、LpS に反応する B細胞の数は年齢と共に減少することを見ている。我々も LpS 被刺激 B細胞の抗 DNP PFC は老齢マウスでは著明に減少することを見ており⁸⁾ Andersson 等の所見と同じように説明し得ると考えられる。

Source of donor spleen cells	Number of irradiated recipients	Direct anti-SIII PFC/spleen at 5 days
Old mice	8	1,500 ± 400 ^a
Young mice	8	18,300 ± 7,000

表 2 若年マウスに移入された若年又は老年マウス脾細胞の T非依存性抗原 (SIII) に対する抗体産生反応
 (R. E. Callard 等 1977)

Andersson 等の成績によれば LPS に反応して免疫グロブリンを産生するようになる細胞は生後 6~8 週でピークに達し、1 cell / 5~6 cells であるが、11~19 ヶ月では 1 cell / 1,000 cells に激減するという。

以上の所見より考えると T 細胞、B 細胞は表面に存在するマーカー（特に routine に検査されるようなマーカー）を用いてその数を数えると老齢マウスでも若年マウスでも著明な差はないように見えるが、刺激に対して反応する細胞の数は老化に伴って減少するものと考えられる。こう考えると刺激に対して反応する細胞の全細胞数に対する割合が免疫学的に見た老化のパラメーターになるように思える。概念的にはそうかも知れないが、具体的にはどういう刺激を用いればよいか問題になる。

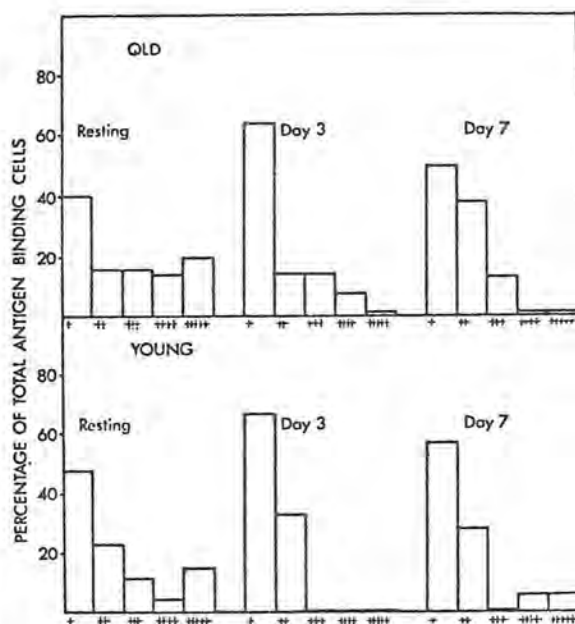


図 4 脾細胞上に附着した SIII の密度
Day は免疫後の日数を示し、+ は細胞当たりの grain の数を示す。
+ : 10 ~ 20, #: 21 ~ 30, #: 31 ~ 40,
###: 41 ~ 50, #### > 50,
(R. E. Callard 等 1977)

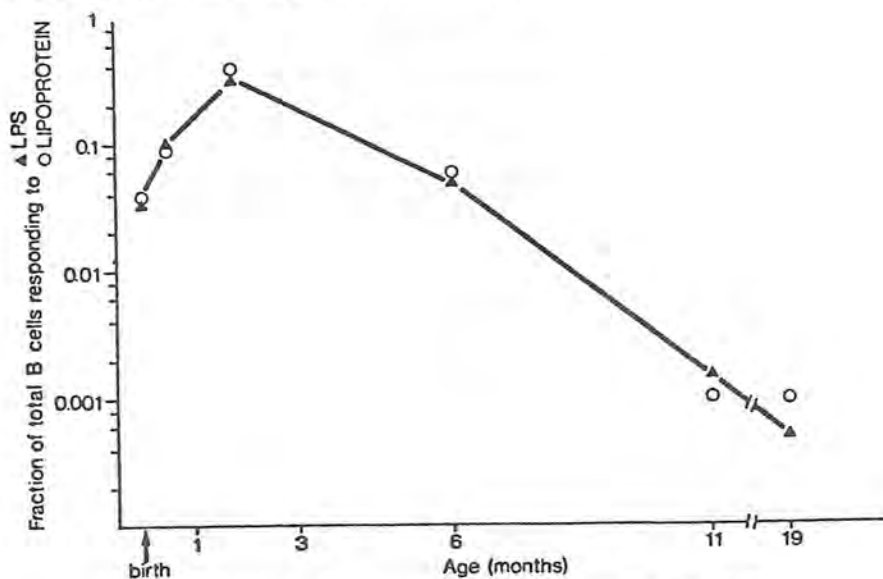


図 5 LPS 及び lipoprotein に反応するマウス脾細胞の頻度
▲ : LPS ○ : Lipoprotein, (J. Andersson 等 1977)

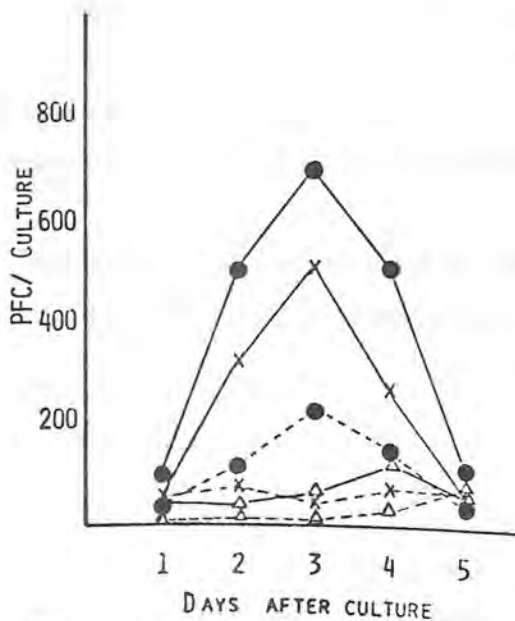


図6 LPS 刺激に反応した DNP-PFC
 ●—●: 若年マウス LPS 4μg/culture
 ×—×: 老年マウス "
 ●---●: 若年マウス LPS 0.4μg/culture
 ×---×: 老年マウス "

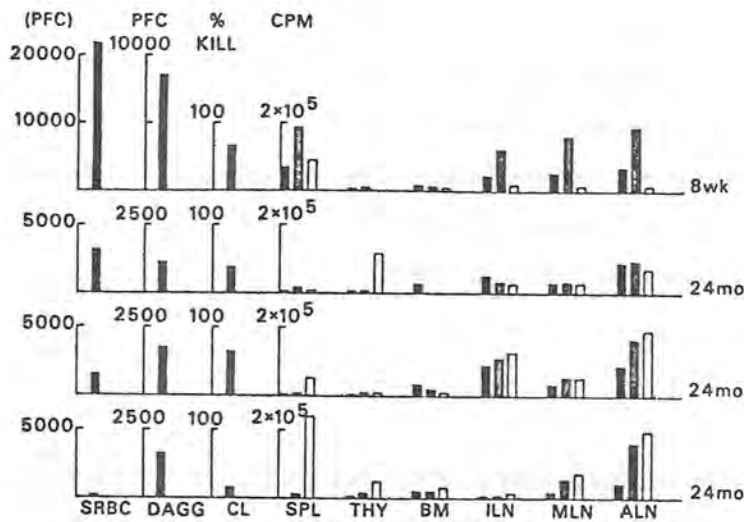


図7 同一個体から得られた脾細胞の各種免疫反応
 SRBC: 羊血球に対する抗体産生
 DAGG: DNP-Ficoll (T非依存性抗原) に対する抗体産生
 CL: Cytotoxic lymphocyte
 SPL: 脾, Thy: 胸腺, BM: 骨髄, ILN: 鼠径,
 MLN: 腸間膜リンパ節, ALN: 腋窩リンパ節, 各々の右から
 PHA ConA, LPS に対する反応 (CPm)

ここで、老化動物の特徴とも思えるバラツキの問題に直面する。即ち、同一個体の細胞を用いて各種の免疫反応を見ると図7に見るように同じT細胞の反応を見るに異なる assay 法を用いるとその反応の減弱度は著しく異なる場合を多く経験する⁽⁹⁾。この事はおそらく老化動物のリンパ臓器内の各種免疫担当細胞の sub set の割合が個体毎にバラツキていることを反映しているのではないかと想像される。ちなみに老齢動物の脾細胞を BSA gradient にかけて遠心して見ると比重の大きい細胞が減少し比重の小さい細胞がそれだけ増加していることが多い⁽¹⁰⁾。即ち免疫担当細胞をマーカーだけで数えると若年動物と変わらないように見える細胞構成も明らかに年齢に

よって変化している。このように前述のごとく概念的な意味において「免疫学的刺激に反応し得る細胞の数」が免疫学的老化のパラメーターになり得るとしても、具体的にどのような刺激に対する反応を見たらよいか、又はどのような複数の刺激に対する反応の比をとったら免疫学的のパラメーターになり得るのかが大きな問題である。

この問題を解決する

ためには免疫担当細胞の subsets を認識した上で同一個体から得られる細胞を用いて各種の免疫反応を平行してテストする必要がある。この為にはグループを組んで同一テーマで研究をすすめる必要がある。このような subset 毎の反応を検討することは、この稿の最初に見られる paradox、即ち、老齢動物では免疫反応が低下するにも不拘血清中の免疫グロブリンの低下が見られない理由を解明するのに役立つのではないかと思う。

さらに老齢動物におけるもう一つの paradox、即ち、外来性の抗原に対する反応は低下するが、内因性の抗原に対する反応は増加する。つまり自己免疫の頻度が高くなること、を解釈するにはさらに抑制性細胞の役割も重大なものであろう。

文 献

- (1) C. E. Buckley *et al.* *J. Immunol.* 105 : 964, 1970.
- (2) K. Yonemasu *et al.* *Immunol.* 35 : 523, 1978.
- (3) E. H. Perkina, *J. Reticuloendothel. Soc.* 9 : 642, 1971.
- (4) M. L. Heidrick *et al.* *J. Immunol.* 111 : 1502, 1973.
- (5) Carmella Abraham *et al.* *Eur. J. Immunol.* 7 : 301, 1977.
- (6) R. E. Callard *et al.* *Cell, Immunol.* 31 : 26, 1977.
- (7) J. Andersson *et al.* *J. Exp. Med.* 145 : 1511, 1977.
- (8) H. Nariuchi *et al.* *Cell, Immunol.* in press.
- (9) W. H. Adler *et al.* *Ageing and immune function, Recent advances in clinical immunology.* Edited by R. A. Thompson, Churchill Livingstone, 1977.
- (10) T. Makinodan *et al.* *Fed. Proc.* 34 : 153, 1975.

討 論

○永井克孝(老人研)：免疫の問題は老化の学説の中でも重要な地位を占めて居りますが、具体的データをもとにこれを考えてみますと、その内容は非常に複雑なものがあります。例えば、免疫監視機構の重要性がいわれていますが、これを解析する為にある一つのパラメーターをとってみる。すると個体間のレベルでも、純系動物を使っても異った結果が出るし、又これに関係する cell の heterogeneity によっても左右される。Total でみると一応はつきりした結果が出ているようにみえますが、ちょっと内容を深めて行くとわからなくなって来るのが現状ではないかと思えます。

○近藤 昊（老人研）： 同じ個体内からの免疫細胞で stimulant により違った結果がでると、臓器、例えば spleen, lymph node, 等による差が出てくるのは、そこに存在している細胞の状態が夫々異っているからとお考えでしょうか。

□成内秀雄（東大・医科研）： 状態が違っているかどうかわからないのです。同じような疑問をもって、私どもも胸腺の function が落ちるのは、culture で一定の細胞しかとっていませんから、細胞の population が young と old で違ってしまっていて、response してくる細胞が spleen から腋窩などに移動して来ているのではないかと考え、全身のリンパ節、脾臓と並べて assay したのですが、どうも spleen では年齢につれて下って来ますが、末梢の別の臓器に行くと response が上って来る事がたまにあるのです。ですからことによったら性質が変わっている、という以前に細胞が動きまわっていることを考えなくてはならないかな、と思って居ります。

○近藤： 私がこのような質問をしたのは細胞の heterogeneity について私どもの研究している培養細胞でも問題になっているからです。たとえば、fibroblast についても、同じ fibroblast でも、臓器によって違うことが最近報告されております。たとえば、hormone に対する態度等で。又、同一臓器の繊維芽細胞でも、heterogeneous な細胞からなっているらしいことがわかりつつあります。

□成内： aging と関係ないかも知れませんが、脾臓をとってその細胞を別の動物に注射します。その細胞は相手の脾に行くことが多く、リンパ節からとった細胞はリンパ節に行くことが多い、ということは経験しています。

○永井： バラツキの問題ですが、これは何も免疫学のみならず、老化のすべてにかかってくる根本的な問題であると思います。同じものをみていて、パラメーターを変えたとき全く逆の結果が出る、ということもあります。

ここに何か老化の基本構造とでもいうべきものにかかわる根本的な問題があるように私には思えます。

6. ショウジョウバエの研究を中心として

都立大・理

大羽 滋

ショウジョウバエ成虫の寿命については、1920年代のPearlとその共同研究者によるすぐれた個体群生態学的研究にはじまって、現在までに数多くの報告がある。とくに1950年代以降、生物における老化機構解明のための実験用モデル動物としての利点が注目されるようになって、ショウジョウバエ成虫の寿命あるいは加齢にともなう変化についての研究が飛躍的に増大し、研究者の視点も生理学、生化学、形態学、遺伝学と各方面にわたっている。

老化研究のモデル動物としてショウジョウバエを使用するには、一定条件の下で再現性のある安定した生存曲線が得られることが必要であるが、ショウジョウバエ成虫の寿命は多くの環境および遺伝的要因によって非常に影響を受けやすいので、これは必ずしも容易ではない。これまでの研究においても、同一系統を同一条件で用いているにもかかわらず、著しく異なる平均寿命が報告されている例も珍しくない。したがって老化研究の目的でショウジョウバエを使用するにあたっては、使用系統の遺伝的組成および飼育条件の両側面について、さらに一段の標準化をはかる必要があると考えられる。ここではまず純系のショウジョウバエについて、生存曲線、平均寿命を種々の条件下で検討し、ついで寿命についての遺伝的変異の側面について述べる。

A) 純系ショウジョウバエの寿命

この目的のためには、30年以上にわたって東京都立大学理学部遺伝研究室で維持されてきたクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の標準系統Tokyo (略号TK) が用いられた。本種はこれまで老化や寿命の研究に多用されてきたキイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) や *D. subobscura* とは異なる亜属に分類される大型のショウジョウバエであるが、飼育管理が容易でまた栄養等の環境条件に対する反応が敏感であるなど、寿命の解析に好都合な点が多い。

標準飼育培地での寿命

25℃、恒明、飼育瓶あたり雌雄各10匹、2日毎に瓶交換という標準飼育条件の下で、標準培地での寿命をくりかえし測定した。1回の測定は通常飼育瓶5本(雌雄各50匹)を単位としている。多少組成の異なる3種類の標準培地が用いられ、表1のようにほぼ同様な結果が得られた。

これらの標準培地では測定ごとのばらつきは非常に小さく、例えば培地Iでは5回の測定での平

Medium	No. of Experiments	Female			Male		
		Mean longevity	S.D.	C.V.	Mean longevity	S.D.	C.V.
I*	5	82.82	23.792	28.9 %	54.10	18.667	34.5 %
II*	6	86.93	21.552	24.9	53.67	18.010	33.5
III*	5	74.63	18.538	24.8	59.58	16.746	28.1

* Medium I : Baker's fresh yeast (Nitto) 20 % sugar 5 %
 II : Baker's fresh yeast (Nitto) 20 % sugar 10 %
 III : Brewer's dry yeast (Ebios) 8% sugar 10 %

表 1 標準飼育培地におけるクロシヨウジョウバエTK系統の平均寿命

均寿命は、雌 81.12～86.96 日、雄 49.12～58.13 日の範囲内にあり、変異係数も 20.2～32.8%(雌)、30.0～40.6%(雄)と安定している。培地 I に比べて 2 倍の糖を含む培地 II でも、I との間に有意差はみられない。I、II とともに雌は雄よりもはるかに長命で、その差は 30 日に達する。イーストの乾燥重量ではほぼ同じであるが、イーストの種類が異なる II と III を比べると、III において雌雄差がやや縮まっているが、依然として雌は雄より有意に長命である。

貧栄養培地での寿命

イースト含有量の少ない貧栄養培地（培地 II のイースト量を 1/4 に減らしたもの）では寿命の短縮がみられるが、その影響は特に雄で著しく、6 回の測定での平均寿命は 21.27 日にすぎない。雌では 47.32 日であるが、この場合のような悪い環境条件の下では、測定毎のばらつきがかなり大きくなる。

後述のように、TK 系統にみられる寿命の雌雄差は、クロシヨウジョウバエに普遍的にみられるものではなく、この系統固有の性質で、その原因の追求は興味深い課題と考えられる。また羽化直後から雌雄を分離して別個に瓶あたり 20 匹で飼育したとき、平均寿命は雌雄共存の場合と比べて雌では 85.54 日 → 99.42 日と増加し、雄では 53.63 → 41.18 日と逆に減少するが、これが系統固有の現象かどうか不明である。

飼育温度と寿命

標準培地 III を用いて、20°～30°C の範囲での 3 段階の恒温条件下で飼育したときの TK 系統の平均寿命は

	30°C	25°C	20°C
雌	51.12 ± 1.05 日	74.63 ± 1.17 日	103.41 ± 2.15 日
雄	49.85 ± 1.88 日	59.58 ± 1.06 日	95.45 ± 1.72 日

で、どの温度でも雌が長命であるが、30℃では有意差はない。各温度での生存曲線を図1に示す。ほとんど死亡のおこらない一定期間（30℃で約20日、20℃で約50日）を経過したのち死亡が始まる。1日あたり死亡率は僅かに上昇するが、最後まで10%に達しない。最長寿命個体は、30℃

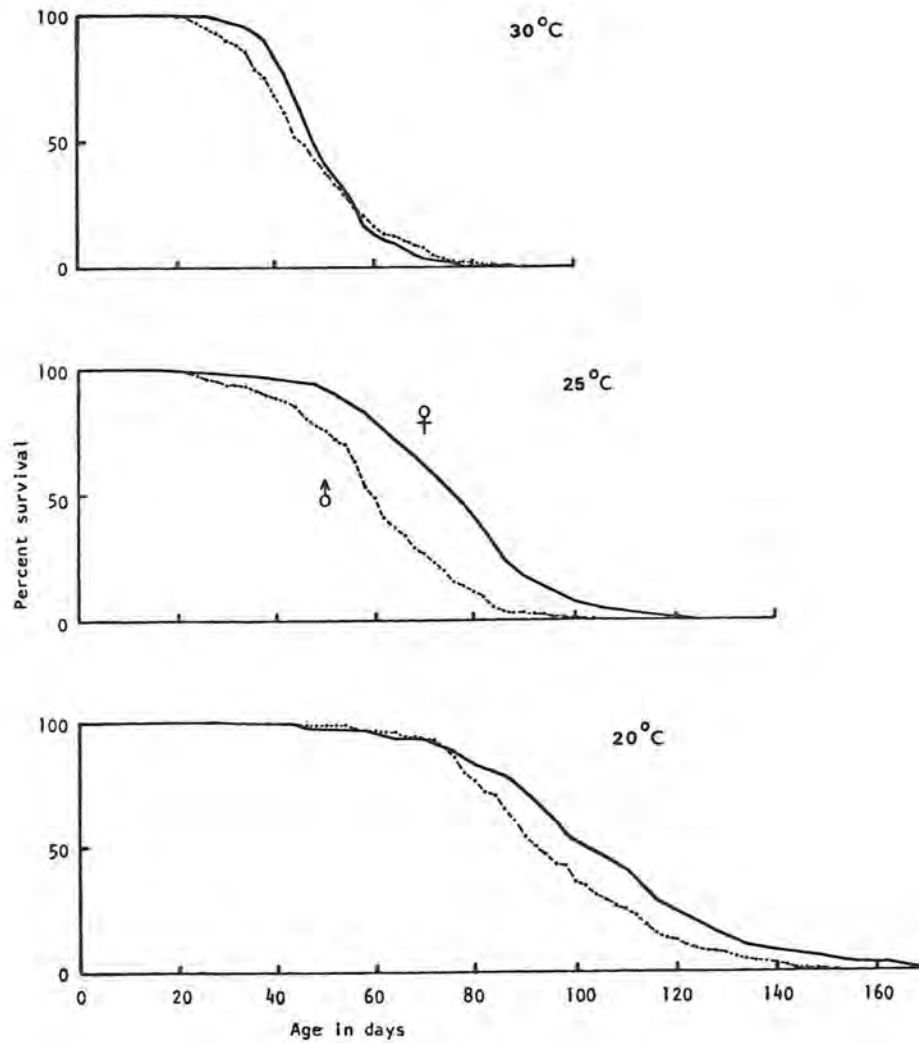


図1 3段階の温度におけるTK系統の生存曲線

で90日、20℃で170日以上生存した。死亡期間の曲線は正規分布を示し、正規確率紙上での直線の傾斜は温度によって異なる(図2)が、平均寿命を0とした時間軸に対しては、3段階の温度における雌雄の生存曲線は6本ともほぼ完全に一致し、死亡(生存)曲線がすべて同じ性質のものであることが判る(図3)。

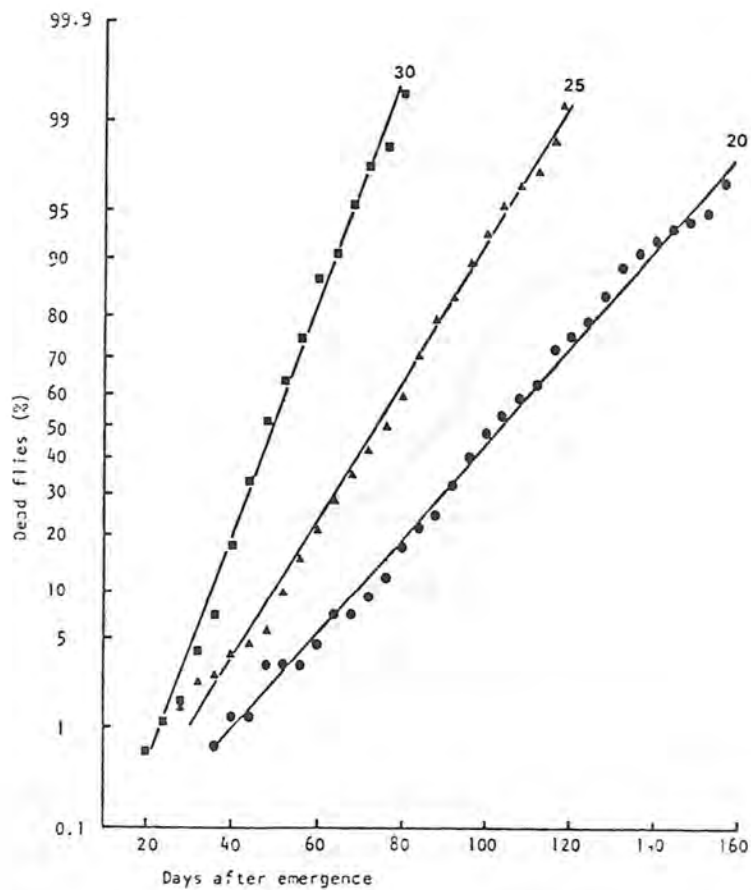


図2 死亡曲線の正規性(TK, 20°, 25°, 30°C)

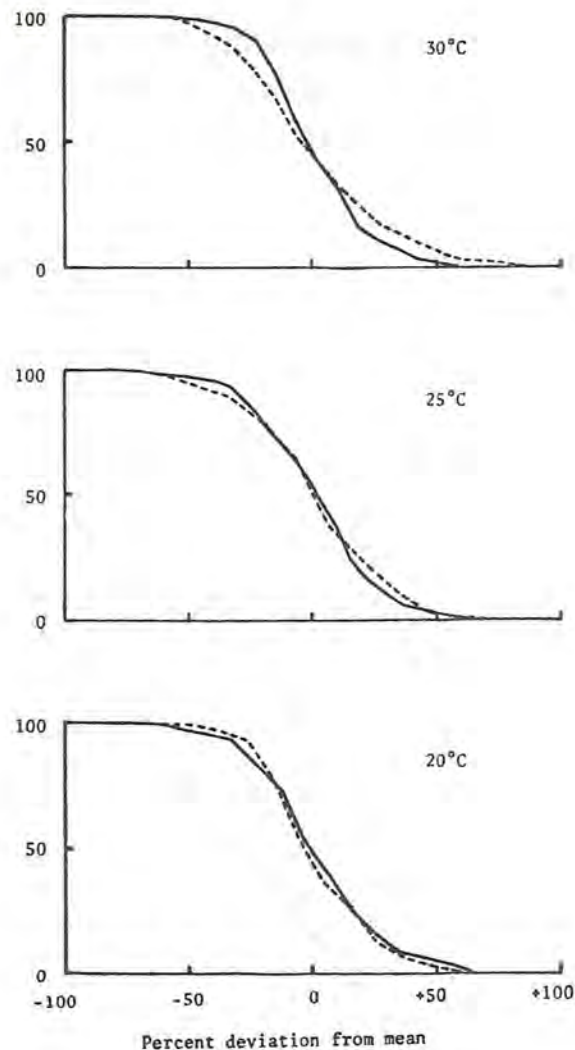


図3 TK系統の相対生存曲線と温度

水溶性合成培地における寿命

ショウジョウバエの飼育培地としてもっとも広汎に使われているのはトウモロコシ・糖蜜・寒天培地であり、老化あるいは寿命の研究にもこれを用いたものが多いが、この培地では栄養条件の制御が困難で、従来の資料が再現性が悪い原因の一つとなっている。著者の使用している標準培地は一定量のイーストと糖を含む殺菌培地で、老化研究も含めて定量的な研究によく適合した汎用培地であるが、老化機構解析の目的には、より成分組成の明確な完全水溶性合成培地の開発が望ましい。

今回試みられた培地は、アミノ酸、ビタミン等の組成が分析ずみの細菌培養用イーストエキス（和光純薬）と蔗糖のみを含む寒天培地（寒天濃度1%）で、両者の含有量を変えた14種類の培地

について、TK系統の25℃での平均寿命を比較した。結果は表2の通りで、イーストエキス1～2%、糖10%の濃度で従来の標準培地とほぼ等しい平均寿命が期待される。この培地の特色は、産卵がほとんど抑制されることで、したがって生殖活動と老化との関係や、いろいろな物質が寿命に及

Sugar	Concentration of yeast extract					
	0%	1.25%	2.5%	5%	10%	15%
0%	10.34 ± 0.10	28.90 ± 1.04	27.46 ± 1.08	25.66 ± 0.93	25.64 ± 0.90	21.94 ± 0.65
	8.30 ± 0.10	26.08 ± 0.81	25.58 ± 1.11	30.88 ± 0.98	26.04 ± 0.70	21.54 ± 0.49
5%	-	61.94 ± 1.15	-	48.28 ± 1.14	-	-
	-	55.06 ± 1.23	-	39.84 ± 1.13	-	-
10%	43.60 ± 0.52	75.14 ± 1.27	70.90 ± 1.56	53.62 ± 1.39	44.56 ± 1.12	27.02 ± 0.59
	36.94 ± 0.61	67.74 ± 1.46	54.40 ± 1.27	41.18 ± 0.95	40.58 ± 1.18	26.22 ± 0.52

表2 水溶性合成培地におけるイーストエキス、糖濃度と平均寿命（上段雌，下段雄）

ばす影響などを調べてみようという目的には、最適の培地と考えられる。なお10%の糖だけを与えてアミノ酸を全く欠く場合でも40日前後の平均寿命が保たれる点、糖が充分なときにはイーストエキス濃度の増加にほぼ反比例して寿命が短くなる点なども興味深い。

B) 寿命の遺伝的変異

寿命における遺伝的要因の存在は周知の事実であるが、その役割の程度あるいは環境要因との相互作用の様相についてはほとんど知られていない。そこでまずクロシヨウジョウバエ自然集団中にとどの程度寿命についての遺伝的変異が存在するかをみきわめ、ついでこれらの変異が寿命を左右する環境の変化にどのように影響されるかを知る目的で、同一集団から抽出した多数の系統について寿命の比較を行なった。用いた材料は愛媛県松山市の貯木場において1973年秋に採集された受精済みの雌1匹に由来し、以後3年以上毎世代10～20匹で維持されてきた単一雌系統で、近交係数は0.9以上に達していると推定され、それぞれかなり純系に近いものとみなすことができる。

標準培地における寿命の系統間変異

約60の松山由来単一雌系統から任意に抽出した26系統について、標準培地Ⅲにおける平均寿命を求めたところ

雌： 56.24 ～ 105.88日 総平均 71.44日 変異係数 27.2%

雄： 57.32 ～ 90.12日 // 76.75日 // 28.5%

となって、かなりの系統差があるように思われる。この差が遺伝的なものであることを確かめるた

め、26系統の中から再び無作為に12系統を選んで再調査したところ、2回の平均寿命はよく一致し($r=0.865$)、系統差が偶然のものではないことが明らかになった。2回の測定値をまとめた結果を表3に示す。12系統の総平均寿命でみる限り、雌74.61日、雄75.01日で全く差はないが、個

Line	Female			Male		
	Mean \pm SE	SD	CV	Mean \pm SE	SD	CV
A 11	58.88 \pm 1.83	18.3452	31.2 %	68.34 \pm 2.33	23.2758	34.1 %
A 12	80.70 \pm 1.68	16.8128	20.8	85.82 \pm 1.99	19.9080	23.2
A 13	84.56 \pm 2.11	21.0743	24.9	89.36 \pm 2.64	26.4036	29.6
A 33	86.36 \pm 1.95	19.5446	22.6	70.00 \pm 1.99	19.9128	28.5
A 35	101.94 \pm 2.57	25.7176	25.2	81.74 \pm 2.80	27.9623	34.2
A 54	71.02 \pm 1.97	19.6845	27.7	73.40 \pm 1.79	17.8684	24.3
B 12	70.72 \pm 2.06	20.5913	29.1	58.42 \pm 1.74	17.4454	29.9
B 15	68.84 \pm 1.73	17.3267	25.2	86.50 \pm 2.36	23.5939	27.3
B 22	66.68 \pm 1.77	17.6697	26.5	85.94 \pm 1.92	19.1592	22.3
B 31	56.50 \pm 1.81	18.0762	32.0	60.08 \pm 1.96	19.5723	32.6
B 33	62.10 \pm 1.53	15.2509	24.6	64.66 \pm 1.46	14.5988	22.6
B 42	86.96 \pm 2.07	20.6959	23.8	85.80 \pm 2.39	23.9098	27.9
Average	74.61	19.2325	26.1	75.01	21.1342	28.0

表3 松山集団由来の単一雌系統における寿命の系統間変異(25℃,標準培地)

々の系統では雌雄の寿命はさまざまである。例えばB22では前述のTKと反対に雄の方がはるかに長命で、また雌雄共に比較的長命な系統(A12, A13)、逆に共に短命な系統(B31, B33)も認められる。

貧栄養培地での寿命の系統間変異

同じ松山由来の12系統について、貧栄養培地での寿命を調べてみると、全系統を平均すれば雌の平均寿命は79.44日で標準培地の場合と大差ないか増大傾向にあるのに反して、雄の平均寿命は44.84日と半減に近い。しかも雄では系統によって反応が異なり、貧栄養培地でも標準培地Ⅲとほとんど寿命が変わらない系統(A54)から、TK同様に著しく短命になるもの(A13, B12)までさまざまである。

高温環境での寿命の系統間変異

同じ12系統を用いて、高温(30℃および31.5℃)での寿命を調べた結果は、

30℃

31.5℃

雌： 38.70 ~ 54.00 (平均 45.40 日) 29.73 ~ 39.80 (平均 34.63 日)

雄： 42.28 ~ 58.76 (// 49.32 日) 29.20 ~ 44.73 (// 36.17 日)

となって、いずれも雌雄差はほとんど認められない。

寿命における系統差と環境要因の相互作用

松山由来の 12 系統について、培地組成 (標準培地Ⅲと貧栄養培地)、温度 (25℃, 30℃, 31.5℃) と寿命との関係の概要を図 4 に示す。貧栄養化による寿命の短縮が雄のみで起っているのに反して、高温による寿命の短縮はすべての系統で例外なく、また雌雄同じレベルまで短かくなっていることが判り、両者における寿命短縮機構が異なることを示唆している。

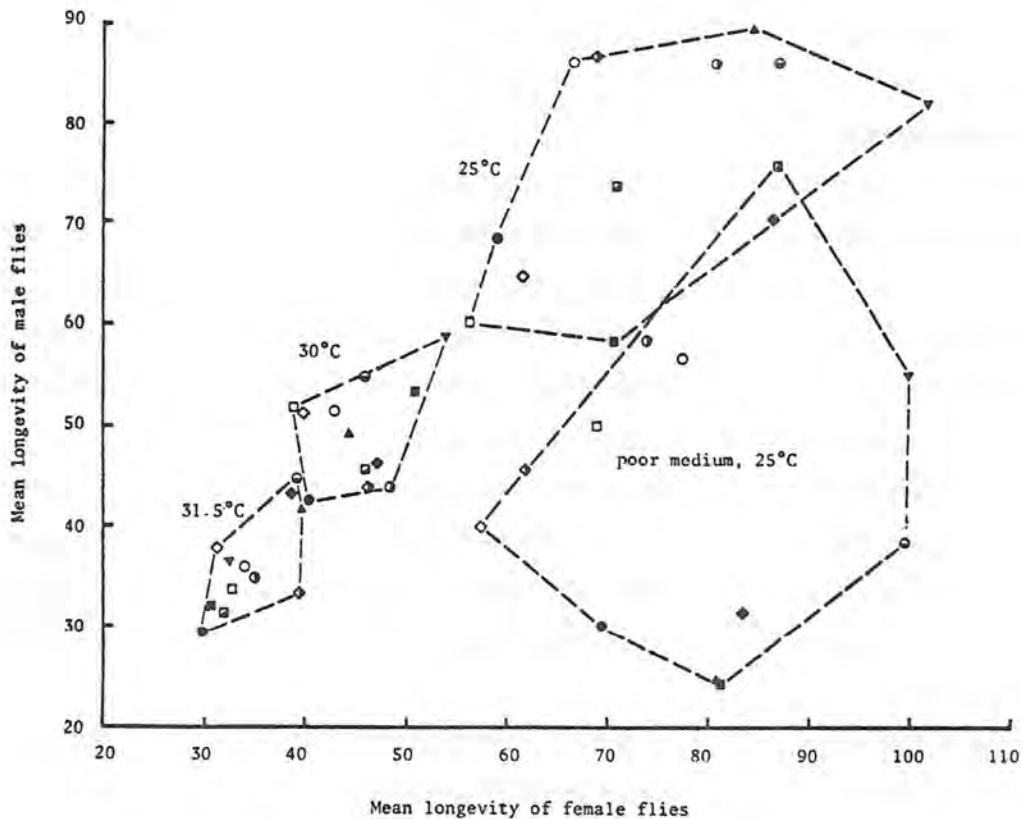


図 4 松山集団由来の 12 系統における平均寿命と環境要因との関係

25℃・標準培地、25℃・貧栄養培地、30℃・標準培地 の場合については、それぞれ同条件下の 2 回の測定値が得られているので、それについて分散分析を行なった結果が表 4 である。温度、栄養ともに好適な 25℃・標準培地では、系統差が顕著で、全体としての性差はないが系統によ

Source of Variation	d.f.	25°C Rich		25°C Poor		30°C Rich	
		M.S.	F	M.S.	F	M.S.	F
Strains	11	487.41	9.54 ^{***}	469.99	6.17 ^{***}	63.77	1.82
Sexes	1	25.76	—	13662.68	179.25 ^{***}	170.06	4.86 [*]
Strains x Sexes	11	155.18	3.04 [*]	345.49	4.53 ^{**}	31.45	—
Error	24	51.08		76.22		35.02	

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

表 4 松山集団由来の 12 系統の平均寿命についての分散分析

て雌雄の平均寿命の関係には有意な差が認められる。栄養条件の悪いときには、系統差は依然存在するが、性差の方がはるかに大きく、また系統×性の相互作用も顕著である。温度環境がきびしい 30°C・標準培地では、系統差は全く消失し、雌雄間に僅かな差がみられるだけにとどまる。

系統間雑種の寿命

松山由来の 12 単一雌系統および TK の中から、標準培地での雌雄の寿命の組み合わせの異なる系統を選んで総当り交配を行ない、F₁ 雑種の寿命を標準培地Ⅲおよび貧栄養培地で比較した。使用系統は A 12 (雌雄とも比較的長命)、B 22 (雌短命雄長命)、B 31 (雌雄とも短命)、TK (雌長命雄短命) の 4 系統ある、結果の要は表 5、6 の通りで、標準培地の場合 (表 5)、12 種類の F₁ 雑種の総平均でみると、雌の平均寿命は 77.34 ± 2.38 日、雄は 75.28 ± 2.48 日でその間に有意差なく、また使用 4 系統の平均および表 3 に示された 12 系統平均とほぼ同水準である。

他方貧栄養培地の場合 (表 6) には、F₁ 雑種の平均寿命は雌で 105.21 ± 4.18 日と 25°C では他に例をみないほど非常に長いのに反して、雄では 55.99 ± 3.97 日で、貧栄養培地での純系平均 44.34 日より長い、標準培地での F₁ 雑種の平均 75.28 日よりはるかに短い。すなわち寿命におけるヘテロシス効果は、栄養条件の良い培地では認められず、貧栄養培地において、雌に特に顕著にあらわれる。

F₁ 雑種の寿命について注目すべき他の点は、正逆交雑で結果が異なることである。例えば TK を母親にした交配から生じた F₁ 雄の貧栄養培地での平均寿命は、父親の如何にかかわらずすべて TK 雄同様著しく短命 (22.96 ~ 34.48 日) であるが、TK を父親にしたときの F₁ 雄の寿命は 50.96 ~ 67.68 日すべての例で 2 倍以上に達する。また B 22 を含む交配の F₁ 雑種では、標準培地で常に雄が雌より長命なのが特徴的である。これらの現象は、X 染色体上において寿命に関与する遺伝子群の組成が、系統によって異なると考えれば理解できる。

	Male parent	Female parent			
		A 12 Mean ± SE	B 22 Mean ± SE	B 31 Mean ± SE	TK Mean ± SE
Female	A 12	<u>74.96 ± 2.01</u>	84.12 ± 2.07	71.52 ± 1.74	81.68 ± 2.35
	B 22	79.20 ± 2.23	<u>66.60 ± 2.39</u>	68.24 ± 2.89	80.16 ± 3.17
	B 31	68.80 ± 1.64	72.20 ± 1.96	<u>56.76 ± 2.61</u>	88.40 ± 2.67
	TK	78.00 ± 2.63	72.08 ± 2.59	83.72 ± 2.64	<u>71.76 ± 1.59</u>
Male	A 12	<u>83.64 ± 2.51</u>	91.04 ± 2.04	58.56 ± 2.76	62.20 ± 1.70
	B 22	89.44 ± 2.50	<u>87.96 ± 2.83</u>	69.76 ± 2.71	96.04 ± 3.14
	B 31	76.24 ± 2.28	83.76 ± 2.21	<u>62.84 ± 2.77</u>	57.92 ± 1.87
	TK	75.56 ± 2.96	84.72 ± 2.60	58.08 ± 2.93	<u>58.08 ± 2.35</u>

表5 総あたり交配のF₁雑種における平均寿命（標準培地，25℃）

	Male parent	Female parent			
		A 12 Mean ± SE	B 22 Mean ± SE	B 31 Mean ± SE	TK Mean ± SE
Female	A 12	<u>72.48 ± 3.18</u>	96.92 ± 4.46	96.32 ± 4.48	110.24 ± 5.39
	B 22	94.72 ± 4.06	<u>79.28 ± 2.52</u>	98.32 ± 2.78	96.56 ± 5.07
	B 31	103.40 ± 3.57	108.52 ± 3.45	<u>61.84 ± 2.53</u>	105.84 ± 5.18
	TK	126.52 ± 3.70	110.60 ± 4.64	111.28 ± 3.38	<u>67.32 ± 3.53</u>
Male	A 12	<u>65.20 ± 4.09</u>	52.04 ± 4.30	77.48 ± 3.71	34.48 ± 2.83
	B 22	64.60 ± 5.05	<u>59.76 ± 3.66</u>	85.84 ± 4.81	23.56 ± 2.79
	B 31	73.80 ± 4.14	61.32 ± 4.93	<u>55.92 ± 4.57</u>	22.96 ± 1.31
	TK	50.96 ± 3.29	57.16 ± 6.05	67.68 ± 4.44	<u>20.24 ± 0.66</u>

表6 総あたり交配のF₁雑種における平均寿命（貧栄養培地，25℃）

討 論

○江上信雄（東大・理）： 私どものグループでは、この3年間、集団レベルの老化についてヒトの疫学や、人口問題の研究者や野生動物の専門家や生態学者から随分広汎に、お話を伺って勉強して来ました。そのうち実験的なことがよく行われて居りますのは昆虫についてでございますので、全体のとりまとめ、という意味ですべての話を網羅するよりは、昆虫、とくに遺伝的な background のはっきりしているショウジョウバエについて、いろいろ研究をして居られる大羽先生からお話を伺うことに致しました。

○江上： 果してショウジョウバエが老化実験のモデルとなるかどうか疑問をお持ちの方もあろうかと思いますが、モデルとしては suggestion は多いと思います。

○相沢慎一（老人研）： 先生の得られた、温度だとか栄養条件だとか、或いは strain によって寿命が長くなったり短くなったりするとき、大ざっぱに分けて、う化から成熟（卵を生みだす）迄、卵を産む期間、卵をうみ終って死ぬ迄と区分したとき、どの時期でも同じように長くなったり短くなったりするのでしょうか、それともある特定の時期が長くなるのか、どちらでしょうか。また条件によってのびる時期が違ってくるといったことがありますでしょうか。如何でしょうか。

□大羽 滋（都立大・理）： 成虫になってからの寿命が動くので、幼虫、蛹の時にはあまり動きません。産卵のピークに達してからが変化しうる期間です。

○江上： 都立大学でのこの仕事は、国際的にも、すぐれたお仕事であると思って居ります。今後の一層の御発展を祈ります。

総 合 討 論

○太田邦夫（老人研）： 本日の内容は方向が非常に多岐に亘って居ります。その内容をまとめてみてもそれでただちに老化の基礎的研究の現状がわかるというのでもございません。討論も全般にわたることは出来ませんので自由な発言をいただきたいと思えます。

○江上信雄（東大・理）： 今日話を伺いますと、今迄簡単に思っていたことも実はそう単純ではないという例が出て来ましたが、その例として、鈴木先生の分子生物学的にみた老化の話に関してうかがいます。先生はPriceの仕事とか、早老症の仕事とか、色々疑問点をお出しになったわけですが、Hart 達が、色々な動物から細胞をとって来て、細胞の repairの能力を比べると、寿命の長い動物からの細胞の repair 能力は高い、と面白そうなことを云い、それに対して反対論も出て居りますが、現状はどのようになっているのでしょうか。

□鈴木擘之（東海大・医）： 現状はあまり進歩していないのです。Hart はやはり自説を曲げず、あの結果は正しい、それをどう解釈するかは、別問題だ、つまり動物の life span とその除去修復能に関係があるということについてです。昨年亡くなられた遺伝研の加藤旌夫さんは、Hart 達がやった動物の species の例が少いというので動物の非常に沢山の種を集めてやってみられたところ、どうもあれにのっていないのがあるのです。私の記憶ではどうも「コウモリ」が外れているようです。「コウモリ」は life span の割に寿命が長い。加藤さんの説と Hart 達の話とは一致しないまま加藤さんが亡くなられてしまいましたので。

○江上： Hart が自分の説を曲げないとして、では、Price や Makinodan のは略々否定された、とききほどの話ではおっしゃいましたが、当人達は何とっているのでしょうか。

□鈴木： 聞いたことはありませんが、多分当人は肯定するより仕様がなんでしょう。只これは京府医大の藤田さんの話によりますと、細胞を染めたり、とって来て切片にしたりするとき、藤田さんのなさった大事な仕事の一つのポイントというのは、ゆり動かしたりせず、細胞を大事、大事にとり扱うことが成功のもとだといいます。恐らく Price 達は試験管でもガチャガチャとふたりのたのではないか、樹脂に埋めこむときに熱をかけたり、artifact が加った、クロマチンというのは大へん不安定なもので大切に扱わないとちゃんとしたデータは出て来ないそうであります。Price らの説自体は否定されて、それで終わりかというところではありませんで、まだ identify されていない product が出来てくるということがあります。細胞の方で、金沢大の堀川さんがなさ

いました培養細胞の (human diploid cell) phase 3 になった細胞をしらべると、やはり DNA の方に repair されないような product が出来て、そのために DNA が小さくなる、というような結果を出して居られます。やはりまだ何かあるのではないかと、思って居りますが、その辺はまだ詰めなければならないと思って居ります。大体 DNA の鎖が切れるとかいうことは、放射線生物の研究者がその枠内で調べればこのようなことになるので、その枠から出て考えると、新しい事実が生まれてくるのではないかと。

○田内 久 (愛知医大) : お聞きしたいのですが、鈴木先生のお話で Nematoda の寿命が食事で変る、又大羽先生のお話でショウジョウバエの life span と称するものが栄養条件で長くなったり、短くなったりする。それを細胞レベルなり、つまり個体レベルでなく、もう少し下のレベルでみると、どういふ変化があるかという点、どの位わかっているのでしょうか。細胞の数が減っているとか、という点などについて……。

○太田 : 両方とも中心は postmitotics の細胞ですね。

□鈴木 : Nematoda に関しては成虫ではほとんど postmitotics です。

○田内 : 私のお聞きしたいのは個体が死ぬというのは病気で死ぬのもありますし、本当の意味の老化、たとえば早く細胞がなくなっていくとかというのものもあるかもしれない。人間の真の老衰のような状態で死ぬのか。致死的な病変がおきやすくなるのか……。

□鈴木 : Nematoda を使って、金沢の細野さんが、プランを進めて居ります。個体の中の細胞の状態について……。

□大羽 滋 (都立大・理) : ショウジョウバエで life span をかえたとき life span の変化に平行して、細胞組織にどう変化がくるか、まだやってありません。寿命がつきるといふのには色々なものがあるので、さきほどの話の中でどれだけが本当の aging による変化なのか、どれだけがそうでない、たとえば餓死のようなものなのか case by case でしらべてみないとわからないと思って居ります。

□細野隆次 (金沢大・医) : 2 か月ほど前から Nematoda の一種であります *Caenorhabditis elegans* について個体の死と、細胞死について関係あるかどうか始めてみました。このネマトーダは、細胞数が非常に少なく、干渉顕微鏡で、ある程度これを同定することが出来ます。生きた状態で、年とった Nematoda で細胞が果して死んでいるかどうか調べることが出来るのですが、実際には中々困難で、顕微鏡の精度にも関係して来ます。現在は腸管の細胞に集中してやっています。腸管細胞は、個体によって異なりますが、大体 30 から 34 あります。第 1 幼虫期ですと、20 個、成虫になると 30 個になります。その後どうなるかをみています。最近漸く幼虫の細胞がみえるようにな

って来まして、年とってくると腸管が萎縮して来ます。そのくびれたところに核がみえないみたいである。本当に減っているのかわからないのですが、その辺をしらべたいと思っています。

○中川一郎（公衆衛生院）： 大羽先生そのお話に追加させていただきたい。

私の方でラットを300匹ほど使い、10年がかりで餌をかえて実験をしてみました。蛋白量だけをかえ、多い方は4倍位の量を与え、死ぬ迄飼い、同腹のものを10%、18%、27%、36%と蛋白の量だけかえてやってみました。4倍も違っても、生存日数には違いがなくて、むしろ腹の違いの方が影響があったようで、蛋白量を4倍もかえるということは、吾々の方面からいうと大きな違いであります。結果としては、あまり違いが出ませんでした。蛋白量が多いのは御承知のように成熟期が早く来ますが、36%のものは10%に比べ発育の速度は全然違います。しかし、600日位で、発育がとまる頃になりますと、10%も36%も有意差はなくなり（体重、尾の長さ）、只10%では、1年以内の死亡が多いのですが、全体としては10%でも36%でも差は小さいようでありました。

動物の種類によっても違うのではないかと思います。蛋白の多いのにはむしろ Krebs の出来る率が高いようでありました。申し上げたいことは寿命という言葉をお使いになって居られますが、寿命という言葉にはどうも抵抗がございますんで、と申しますのは、環境条件が非常に良くて、これ以上理想的な条件にあっても生きられないのが寿命であって、今のような交通事故だとか、病気だとか色々ありますときには、寿命という言葉よりも、生存日数という言葉を使った方がむしろ学問的ではないか、と考えて居ります。素人には寿命といった方がわかり易いかと思いますが、このような考え方について御指摘いただければ……。

□大羽： 寿命という言葉自体については先生のおっしゃる通りだと思います。普通 life span ということも寿命と訳して使っています。

蛋白の問題ですが、私も蛋白、アミノ酸の量を変えると影響があると思ったのですが、上げて行くとむしろ短くなってしまふ。又、子供を産まなくなってしまう。栄養学的にどういう意味があるかな、と思って居ります。私のねらいは、simple なやり方で maximum life span が得られるような medium を開発したいという所にあったのですが、予想よりずっと低い蛋白（アミノ酸）濃度のところにあり、それは糖とのかね合いで動く、ということを見つけたので、どうも厄介なことになったと思っています。

□鈴木： 人間の一生というのを考えてみますと、event のおこる精度の問題ですが、受精してから生まれるまでの間は相当精度の高い期間ではなかろうか、せいぜいエラーがおきても1%位。次に生まれてから成熟期迄だと少しふえて来て、± standard error は1割位になるのではないかと、成熟から死ぬ迄はもっと大きくなる。厳密に何かが制約されているのは受胎期間である。だんだん

その後になってくるといい加減でもよくなっていく、というように日頃考えて居ります。

□梶本雅俊（公衆衛生院）： 先の田内先生疑問の答にもなると思いますが我々も食物のレベルで寿命を調べている Ross の論文がありますが、動物（ラット）が一生に吐き出す酵素の量というのは決っていて、沢山食べさせると早く消費してしまうので寿命がすり減るであろう、死ぬ迄の酵素の分泌 capacity は一定しているという説です。私どもも追試しましたが結果は否定的であります。老化ラットにおける肝酵素活性は Ross の結果も我々の結果も老化するほど酵素レベルでは、エラーが大きい、現象としてはそうだが、capacity は十分あり決して、消費してしまっていない。

□能村哲郎（老人研）： 生物にとっては種を保存することが最も重要なことなので、その有効な手段として多細胞動物では有性生殖が発達したわけですが、ほぼ同時に成熟した雄と雌とが出あわないことにはうまくいかない。そこで、少くとも成熟して生殖する時期までは、ある程度の遺伝的な規制をうけている方が子孫を残す上で経済的で都合がよいわけで、また、そういうものだけが残ったと考えられます。ところが、正確さを保つためにはかなりのエネルギーを必要とする。そこで生殖がすめば無駄を省くために規制がゆるめられて、そのため個体のバラツキがめだってくる。つまり、バラツキが多くなるということが老化の一面を示すことになる。他のレベルでも同じことではないでしょうか。

○太田： さきほどの鈴木先生のお話では、ある時期迄は非常に精度が高く、エラーであるかないかは別としても、それ以後は次第に、精度が落ちてバラツキが多くなる。それが老化の本質であるとする、老化段階で種の保存に関する過程があるとすれば、種は甚だ危うい。精度即ち fidelity は種の保存に向けられている。又、今の種の保存とこの問題が老化の本質を示唆しているというわけですね。

□大橋望彦（老人研）： さきほどの fidelity の問題で、吾々の経験からしますとラットについて、生後からずっとはかっていますと、14～5か月迄は fidelity は忠実に保たれています。17か月から20か月迄は非常にふえます。fidelity がずっと悪くなった時には deviation も少くなって来ます。それがどれだけの意味をもつかわかりませんが、種族保存の話がありましたが、あまり年をとったものが子孫をつくると、fidelity が悪くて mutant が出来易い、ということは当たっていると思う。

○太田： さきほど成内さんのお話の中でも老化とは何だということがわからなければパラメーターも出せないということでしたが。

□成内秀雄（東大・医科研）： あんまりはっきりした考えはないのですが……。

すべての aging の問題は、バラツキの大きさに帰結するのではないか、と思っています。

青春期をすぎると(動物ですが)落ちるとはいい乍ら、免疫反応の低下以上にバラツキが急にふえて来ます。バラツキの大きさということ自体が aging の本質ではないか、とさえ考えて居ります。どうして、という点になるとわからないし、知りたい。私どもの仕事の中でバラツキが大きくなる点について、technical な問題があります。

年をとったマウスの臓器をバラバラにして行きますと、young に比して細胞の viability が低くなることが多いのです。このことを neglect した上で尚バラツキが多くなるのかどうかたしかめねばならない。

死ぬというのは大へん drastic な変化で、死に到らない迄も何か変化があるのではないか。年をとった細胞の viability を少しでもよくとり出す方法がないかどうか、又そのような人工的な手段を加えた場合に viability が悪くなるとか、細胞の機能が落ちるとかということが、免疫反応ばかりではなくて、他の領域についても普遍的にあるのかどうか、あるとすれば膜表面のどのような性質の変化によるものかかどうか。只バラツキについてのみにでなく、大きな suggestion を与える問題であると思うのですが。

○太田： 質問でシンポジウムを終えるのは不本意ですが、終了時間について厳命がありますので、終りましてから又個人的に話をつづけて下さることも、今後の研究の発展に寄与するにちがいないということにしてここでシンポジウムを終らせていただきます。

面白い重要な問題についての discussion をいただきましてありがとうございました。

田内班も、これで一応全体での協議会を終わりますが、田内先生の御指導により色々勉強させていただくことが出来ましたことを班員を代表して田内先生に厚く御礼申し上げます。

(拍手)