

長寿医療研究を支える 実験動物技術 (I)

老化・老年病研究における 自然老化動物の有用性

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター研究所

小木曾 昇

1. はじめに

高齢化は先進国のみならず発展途上国においても急速に進行しており、より健康で長生きできる社会の実現は、国際社会における重要な課題の一つである。近年、老化の遅延、老年病の発症や老化に伴う機能低下の抑制に関するヒト老化メカニズムの解明・制御につながる研究開発が推進している。本号から2回に分けて、日本の老化・老年病研究の中心となっている国立長寿医療研究センター、および東京都健康長寿医療センターで行っている老化モデル動物を用いた基礎老化・老年病研究について連載させていただく。

ヒトの老化や老年病のメカニズムを解明するための研究や、老化過程を制御することによる健康寿命を延伸する研究では、線虫、ショウジョウバエ、マウス、ラットをはじめとする様々なモデルが用いられており、0.5年と最も短命なキリフィッシュから28年と長命なハダカデバネズミはよく知られている。老化・老年病研究に主として用いられる実験動物は、遺伝学および生理学的にヒトに

似ていること、繁殖ならびに遺伝子組換え動物の作製が容易であること、平均寿命が3年程度であること、データベースが整備されている等の理由から、マウスが広く使用されている。一方、老化に関する研究に関連したマウスとヒトとの類似点と相違点もいくつか報告¹⁾されている。また、加齢・老化に関する研究を実施する際には、研究期間が長期になることや、限られた資源であるために、系統やブリーダーの選択はもちろん、実験動物福祉に配慮した適正な飼育環境を考慮した綿密な実験計画を立てる必要がある。特に、遺伝子組換えマウスやミュータントを使用した研究には、背景となる非遺伝子組換え（自然老化）マウスの正常な加齢に伴う病態や生理変化を知っておく必要がある。国立長寿医療研究センター（長寿研）では、加齢・老化のメカニズム、認知症（アルツハイマー病）や骨粗鬆症、フレイル等の老年病の研究に用いる遺伝子組換え動物の他、自然加齢（老化）動物（マウス、ラット）を加齢育成（エイジングファーム）し、

研究者に提供している。そこで、加齢および老化・老年病研究を行うための基礎知識、当センターで加齢育成したマウスを中心とした育成方法からマウスの加齢・老化特性について紹介する。

マウスとヒトの加齢の比較

自然老化マウスの加齢・老化、老年病研究に適する月齢、すなわち「老齢」の月齢はあまり明確にされていない。ジャクソン研究所のHarrisonらの研究チームがC57BL/6Jマウスを用いたコホート研究により、マウスの生涯とヒトの生涯の対応について、生涯の段階を①成熟個体、②中年個体、③老年個体の3つのグループに分けた（図1）。ヒトの20-30歳頃を示す成熟個体は、3-6ヶ月齢頃の発育段階を過ぎていて、老齢の影響をまだ受けない時期である。中年個体は、10-14ヶ月齢でヒトの38-47歳頃に相当し、一部の加齢バイオマーカーにおける加齢変化が見られる時期である。また、ヒトの56-69歳に相当する老年個体は、18-24ヶ月齢であり、ほとんど全てのバイオマーカーにおいて老齢変化が検出される²⁾。

加齢育成マウスにおける動物実験の再現性に関わる因子

マウスの平均寿命は2-3年であるため、SPF環境下において長期的に飼育する場合、生物学的因子（遺伝学および微生物学的素因）や環境的因子（物理的および化学的因子）により加齢にともなう病気の発症時期や症状、寿命等が異なる（図2）。その中でも環境的因子（または社会的因子）、例えば飼育方法（単飼育または同居（複数飼育）、ケージサイズとその収容匹数）、特異行動（ファイティング、バーバリング）、動物間コミュニケーション、飼育者（ハンドリング）、環境エンリッチメントの有無等）等も生体・生理学的な反応に影響することから研究を推進する

上で見逃せない重要な因子になる。それらの因子を把握した上で自然老化動物の生理・行動等を的確に知ることが動物実験の再現性だけでなく、適正な飼育環境あるいは自然老化動物の飼育管理の標準化に繋がる。

長寿研では、離乳直後の3-4週齢のC57BL/6NCrSlc（B6N, 日本エスエルシー）マウスおよびC57BL/6J（B6J, 日本チャールス・リバー）マウスを3ヵ月ごとに導入し、生涯飼育を行っている。また、ブリーダーにおいて、ケージ内で出産した個体を他のケージの個体と混ぜることなく、長寿研に導入することを条件としている。

加齢・老化マウスの遺伝的背景の重要性と有用性

一般的には近交系が用いられることが多い。マウス系統の利点は、ゲノムが定義されている、安定した表現型である、および多くの研究成果が公開されていることや「マウスゲノム情報学（mouse

genome informatics, MGI）」、「マウス・フェノーム・データベース（The Mouse Phenome Database, MPD）」などのデータベースから様々なマウスの系統の標準的なデータがまとめられている^{3) 4) 5)}。

マウス系統の表現型は、特性が詳細に明らかにされているが、特定の対立遺伝子変異体に起因する表現型もあることを知っておく必要がある。具体的には、C57BL/6JマウスにおけるCdh23変異の対立遺伝子変異体は、難聴の発症を遅らせることがある⁶⁾。また、ニコチンアミドヌクレオチドトランスヒドロゲナーゼ（Nnt）が欠失していることでブドウ糖負荷試験⁷⁾に影響する報告がある⁸⁾。代謝と老化の間には密接な関係があることも重要で知っておく必要がある⁹⁾。

一方、マウスの加齢に伴う表現型のプロセスについて研究を進める上で考慮する必要がある。Yuanらは、31系統の近交系を用いてコホートを縦断的研究で調べ、生涯の様々な時期の表現型を報告している¹⁰⁾。この研究の中で、IGF-1レベルと寿命、腎機能の変化、免疫細胞、歩行、および心機能などの他の加齢との関連性を示した。

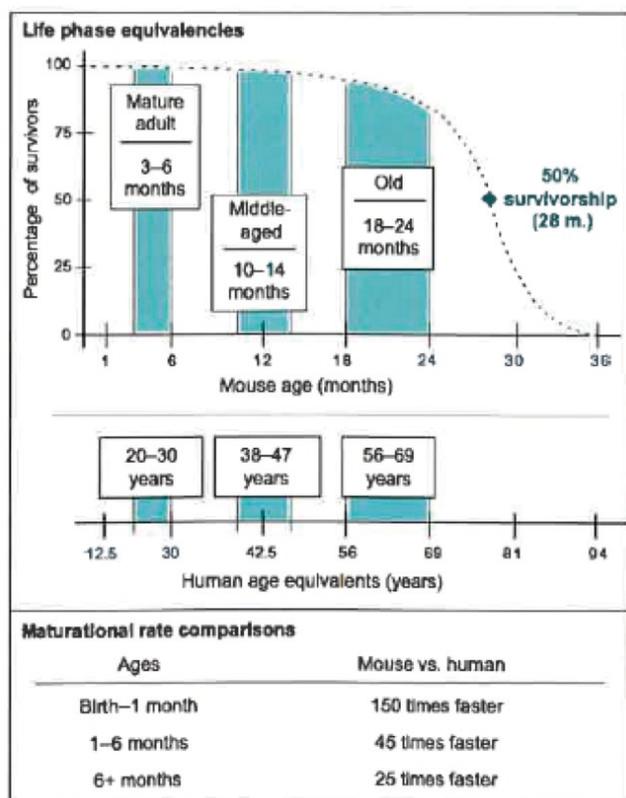


図1 C57BL/6Jマウスにおける生涯の典型的な段階とヒトとの比較
Flurky, Currer, and Harrison, 2007, 「医学生物学研究におけるマウス」, 「研究に使用される老齢C57BL/6Jマウス 考察、応用、ならびに最善の実践」(The Jackson Laboratory) より引用

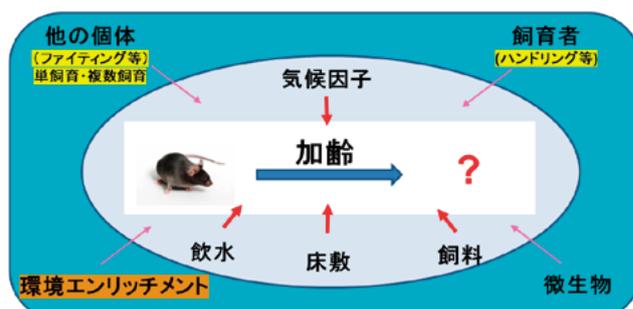


図2 加齢育成マウスにおける動物実験の再現性に関わる因子

加齢に伴う自然老化マウスの表現型を明確に知る

(1) 加齢に伴う正常な外観

被毛は、加齢に伴い薄くなり、黒色を維持するまたは茶褐色や灰色（白色含む）になることがある。また、眼周囲、背部・尾部等の部分的な脱毛が観察される場合がある。脱毛の原因は、飼料による影響の報告もあるが明確にされてなく、むしろマウス固有の社会的な行動である自身または同種他個体による過剰な毛繕い（バーバリング (barbering)）とも呼ばれている）、まれに喧嘩（ファイティング）によるものと考えられる。さらに、バーバリングによっては、鼻口部の触毛が抜けること、縮毛に類似する状態が観察される。

(2) 加齢に伴う健康状態

加齢に伴う筋力の低下により運動量や行動量が少なくなるだけでなく動作も鈍くなる傾向が見られる。具体的には、背中を丸めたり粗毛（毛繕いの回数が減少）、触れても反応が鈍い、触れても（若月齢と比較して）体が冷たい、エンリッチメントの嗜好性が減少する等である。そのため、通常（若月齢）の動物

実験のエンドポイントの設定とは異なるために注意が必要である。

加齢に伴う臨床症状では、B6J マウスでは①直腸脱、②脱毛および皮膚炎、③眼病変、④触知腫瘍が報告されている¹¹⁾。

(3) 長寿研で飼育している自然加齢 B6 マウスの特徴

(a) 生存曲線：B6N 雄マウスは 15 ヶ月齢頃から、B6N 雌マウス及び B6J マウス（雌雄）では 18 ヶ月齢前後で減少傾向を示した。B6N 雌マウスは 20 ヶ月齢頃から、B6J 雄マウスは 22 ヶ月齢頃、B6J 雌マウスは 24 ヶ月齢を越える頃から急激に減少した（図 3）。23 ヶ月齢の雄について、B6N と B6J の生存率が逆転する現象が観察された。また、B6N マウスは雌雄ともに生存率の減少傾向は類似しているが、B6J マウスは雌雄に著しい差が認められた。両系統ともに搬入する Lot やケージ単位によるばらつきが見られた。

(b) 体温：体温（肛門部の皮膚温）は、B6N マウスおよび B6J マウスの両系統ともに 12 - 18 ヶ月齢頃から徐々に体温が減少傾向を示した。18 ヶ月齢を越える頃からばらつきが観察され、スト

レスやがん、炎症または加齢による影響と考えられた。

(c) 体重：加齢に伴う体重変化について、B6N マウスでは雄が 16 ~ 18 ヶ月齢、雌は 20 ~ 22 ヶ月齢、B6J マウスで雄が 13 ~ 15 ヶ月齢、雌は 22 ~ 23 ヶ月齢においてピークとなり、亜系統の差が明らかとなった。一方、B6N 雄マウスは 23 ヶ月齢から、B6J 雌マウスでは 24 ヶ月齢から減少傾向を示した。（図 4）

(d) 摂餌量・摂水量：摂餌量については、B6N マウスおよび B6J マウスの雌雄ともに 24 ヶ月齢まで加齢に伴う変化は観察されなかった。

摂水量では、B6N マウスおよび B6J マウスの雄で加齢に伴い増加傾向を示したのに対して、両系統の雌マウスには変動は観察されなかった。

(e) 運動試験：運動機能を評価するためのロータロッド試験について、B6N マウス雄では 3 ヶ月齢、雌では 6 ヶ月齢、B6J マウス雌雄ともに 3 ヶ月齢をピークとして、加齢に伴う体重増加に依存して運動機能（走行時間）が低下した（図 5）。また、雌の方が全体的に走行する時間が長

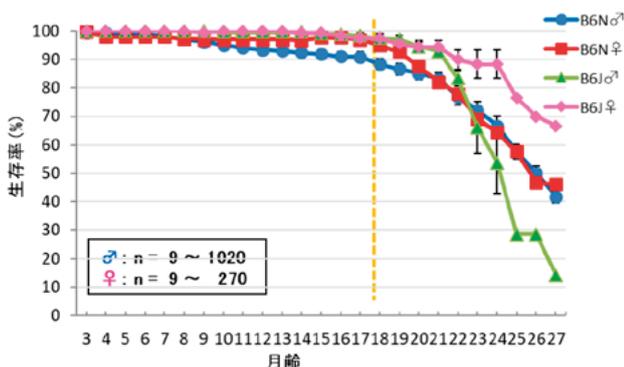


図3 加齢育成マウスの生存率

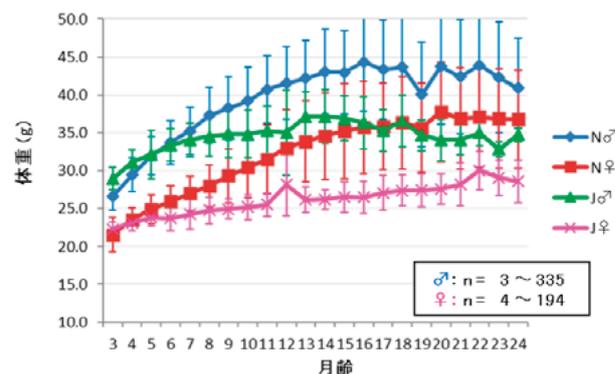


図3 加齢に伴う体重変化

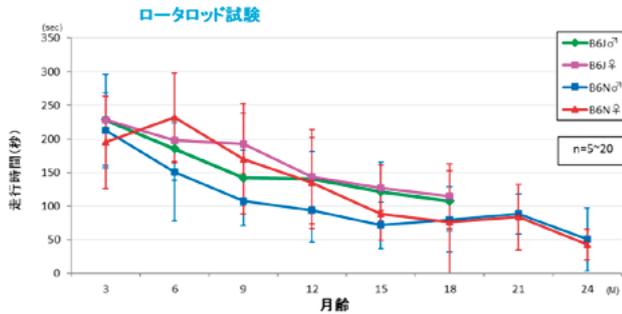


図5 加齢に伴う運動機能の変化

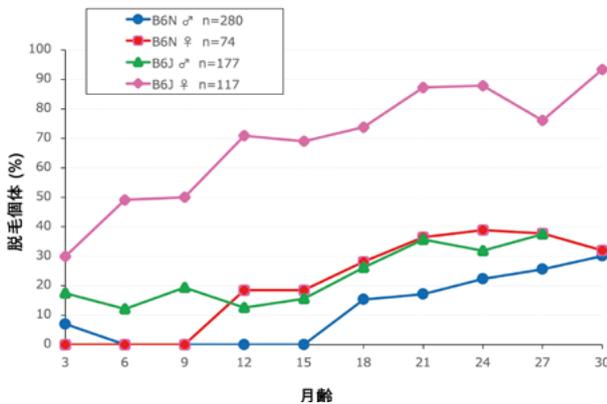


図6 加齢に伴う脱毛の発生率

い傾向が見られたが、B6N マウスにおいて18ヶ月齢以降は明瞭な雌雄差は認められなかった。この結果から、フレイルモデルとしての有用性が期待される。

(f) 外観：老化度判定の行動観察の一つである脱毛の発見された個体数の発生率について、B6N マウスと B6J マウスを月齢毎に比較したところ、B6J 雌マウスで最も早く生後5-6週齢頃から散見し始め、3ヶ月齢頃から顕著に脱毛が確認された。B6N 雌マウスでは9ヶ月齢、B6N および B6J 雄マウスは15ヶ月齢を越える頃から脱毛が見られた。特に両系統共に B6 雌マウスの脱毛が顕著であった(図6)。

(g) 血液形態所見：B6N マウスを用いた血算結果から、加齢に伴い18ヶ月齢頃から白血球数は

減少し、好中球の割合が増加する一方、リンパ球については減少する傾向が見られた。赤血球についても加齢に伴い血球数が減少する傾向が認められた。形態学的には、18ヶ月齢を越える頃から好中球やリンパ球、赤血球の幼弱や異形成が観察された。両系統ともに若月齢の環境(ファイティング等のストレスや炎症)に起因

するリンパ球数の増加から、加齢に伴う免疫機能の抑制または低下によるリンパ球数の減少にともなう好中球数の増加も示唆された。

(h) 病理解剖の所見：B6N マウスにおける自然死による剖検から、雄では精嚢腺肥大(貯留)をはじめとした肝臓退色、肝臓腫大および脾臓腫大、雌では肝臓退色、肝臓腫大および脾臓腫大が比較的多くの個体で観察されたが、生理学的な老化の所見となる臓器の顕著な萎縮等は認められなかった。B6N マウスを3ヶ月毎に安楽死させて解剖したところ、6ヶ月齢頃より胃の中から毛玉が観察され、9ヶ月齢で脾臓の腫大や肝臓の病変、18ヶ月齢で腎臓の病変、24ヶ月齢で雄の精嚢腺の病変が認められた。

一方、B6J マウスにおいて24ヶ月齢より脾臓や肝臓の病変が観察され始めた。この解剖結果から、垂系統の加齢に伴う病気の発症時期の差が見られた。

以上の解析結果や所見から、B6 マウス垂系統でも加齢・老化や生理・生体変化が異なることが明らかとなった。

おわりに

老化・老年病研究のモデル動物を使用した基本となるべき自然老化マウスの有用性について紹介した。昨今では遺伝子組換えマウスを用いた研究が主体であるが、自然老化マウスの加齢変化を知った上で、背景となる系統の特性はもとより、長期飼育することにより様々な環境因子が動物実験の再現性に影響することを考慮し実験を進めることが重要である。

参考文献等

- 1) Vanhooren and Libert, Ageing Res. Rev., 12:8-21,2013
- 2) Flurkey, Curren, and Harrison, A.College.Lab.Anim.Medicine, Vol III:637-672,2007
- 3) Eppig et al. Mamm.Genome, 26:272-284, 2016
- 4) Bogue et al. J.Gerontol. A Biol.Sci.Med. Sci, 71:170-177, 2016
- 5) <http://phenome.jax.org/>
- 6) Henry and Chole. Audiology, 19: 69-383, 1980
- 7) Freeman et al. Diabetes, 55:2153-2156, 2006
- 8) Toye et al.Diabetologia, 48:675-686, 2005
- 9) Newgard and Pessin, J.Gerontol.A.Biol. Sci.Med.Sci., 69:S21-S27, 2014
- 10) Yuan et al., Aging Cell, 8:277-287, 2009
- 11) Pettan-Brewer et al., Pathobiol Aging Age Relat Dis, PMID: 22953032

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)