

長寿医療研究開発費 2023年度 総括研究報告（総合報告）

エイジングファーム育成動物の生体機能変化の情報の蓄積と飼育環境の標準化
(21-25)

主任研究者 小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室（研究員）

研究要旨

国立長寿医療研究センター（NCGG）で加齢育成しているエイジングファーム動物（自然老化動物、以下 AF 動物）における各種系統の加齢変化を把握するために、飼育動物の個体レベルから遺伝子・タンパクレベルまでの生理的基礎データを取得し、その情報を公開する（カタログ化）。昨今の遺伝子組換え動物を用いた動物実験の隆盛と呼応して、自然老化動物の有用性・重要性が再認識されており、有用性が高い。またファーム保有動物の基礎データの公開は施設としての負荷価値を高めることにつながる。

また長期飼育による育成では、加齢に伴う自然発症病変（癌、白血病等）が多く観察されるが、NCGG と他の研究機関における AF マウスの比較から、病態の発症（認知能力含む）や寿命に大きな差（約4ヶ月）があることが明らかになった。このことから動物の長期的な飼育下における社会性（動物間のファイティング、単飼育または群飼育、ストレス）、環境的要因（エンリッチメント等の有無、ハンドリング）が生体内の生理的変動に影響する可能性が高いと考えられる。そこで、AF 動物(マウス中心)の加齢変化による生理・生体変化を正確に把握する（生理的老化を目指す）とともに、正常な加齢を妨げない飼育環境を統御するための条件設定（環境エンリッチメントの種類と嗜好性等）について検討を行った。研究用動物の飼育環境を統御することは、実験動物福祉（Reduction, Refinement）にもつながる。

主任研究者

小木曾 昇 国立長寿医療研究センター 実験動物管理室（研究員）

分担研究者

木村 透 山口大学(教授) (2021、2022年度のみ)

研究期間 2021年4月1日～2024年3月31日

A. 研究目的

本研究では、研究者に提供することを前提として飼育される AF 動物の 1) 適正な飼育管理下における動物の個体レベルで生じる加齢性変化に関するデータを取得する。同時に、2) 正常な加齢を妨げないための飼育環境を統御する条件設定(飼育環境の標準化)について検討を行う。

B. 研究方法

4 週齢の C57BL/6NCrSlc (B6N) マウスおよび C57BL/6J (B6J) マウス について、雄 10~20 匹、雌 10~20 匹 を 3~6 ヶ月ごとに導入し、生涯飼育することにより老齢化させて生理・生体に関する網羅的な解析を行った。血液・生化学データについては、ファイティング等の影響による炎症や腫瘍等を除いた正常個体のみを抽出した。

(生存率や剖検所見等の一部の解析には、①研究者向けに供給している AF マウス、②基礎老年学研究拠点の育成・連携強化(課題番号 19-1、主任研究者：丸山光生)で育成したマウスを使用した。)

1. 生理学的解析(寿命(生存率)、体重測定、体温等)
2. 血液学的解析(血球カウント、血液形態学検査等)
3. 生化学・免疫学的解析(ストレス性ホルモン(コルチコステロン)、血清や尿を用いた臨床化学検査等)
4. 病理・組織学的解析(解剖所見、組織像等)
5. 行動学的解析(ロータロッド試験、脱毛率、Y字迷路等)

(倫理面への配慮)

すべての研究に関わる動物実験に関しては、実験動物の福祉(5Rs)を順守し、動物愛護上の配慮を踏まえ、的確に管理を行った。さらに一部、実験動物の使用、及び処分に関しても苦痛の軽減等、倫理上の問題はすべて、動物愛護管理法、厚生労働省基本指針、日本学術会議ガイドライン、および国立研究開発法人国立長寿医療研究センター動物実験取扱規程、国立大学法人動物実験施設協議会指針等に基づき、当該研究施設の倫理委員会で承認を受けて実施した。

C. 研究結果

1. 生理学的解析

生存率について、B6N 雄マウスが 15 ヶ月齢から、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。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 マウスは雌雄が著しい差が認め

られた（例、27ヶ月齢の生存率雄13%、雌68%）（図1）。両系統ともに3ヶ月毎に搬入するLotによるばらつき（夏の時期に生まれた個体の生存率はやや減少）が見られた。

体重の加齢変化では、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が、B6N雌マウスおよびB6J雄マウスでは大きな変動は見られなかった（図2）。

体温の加齢変化についてB6N雄マウスおよびB6J雌雄マウスでは12ヶ月齢頃から、B6N雌マウスでは15ヶ月齢頃から低下傾向を示した。21ヶ月齢を超える頃から両系統ともに体温の上昇やばらつきが観察された。

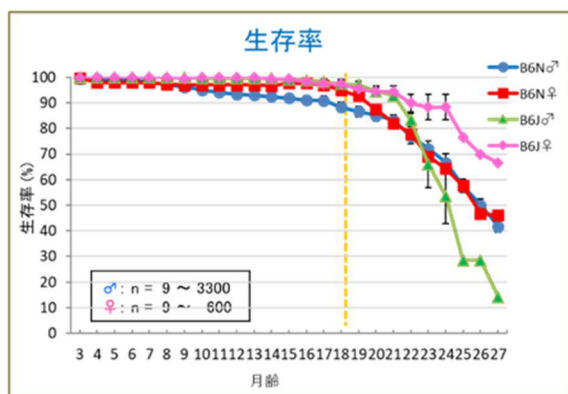


図1 B6マウスの生存率

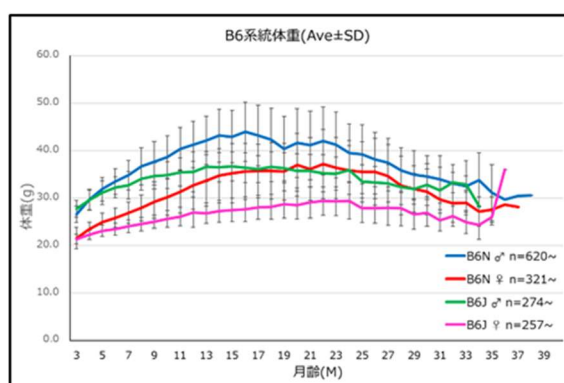


図2 B6マウスの体重変化

2. 血液学的解析

B6マウスの環境要因による炎症や腫瘍等を除く正常な個体を用いた3~24ヶ月齢の血液検査結果から、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、赤血球の異形成が観察された。

3. 生化学・免疫学的解析

B6マウスの環境要因による炎症や腫瘍等を除く正常な個体を用いた3~24ヶ月齢の生化学検査では、ALPやLIPではB6雄マウスの系統差が認められたが、加齢に伴う顕著な変動は見られなかった。

4. 病理・組織学的解析

B6Nマウスにおける自然死または安楽死による剖検から、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が、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。特に脾臓の腫大に関係して、血液学的にも白血病の細胞が確認された。その他、血管炎や皮膚炎、腎炎等も若干例認められた。

しかし、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。本系統で3ヶ月毎に解剖したところ、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、亜系統の加齢に伴う病気の発症時期の差が明らかになりつつあった。

組織学的には、B6N マウスの19ヶ月齢において雌雄ともに腎糸球体のヒアリン(硝子質)、軽度アミロイド様物質の沈着や間質へのリンパ球浸潤が観察された(図3)。一方、B6J マウスの19ヶ月齢の雄では、腎糸球体に重度のアミロイド様物質の沈着の他、糸球体線維症が認められた(図4)。同月齢の雌マウスでは軽度のアミロイド様沈着、メサングウム基質がやや増加傾向であった。

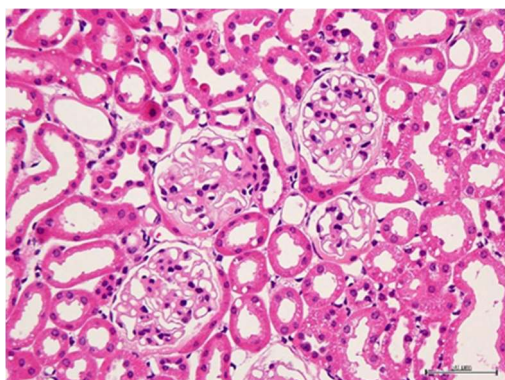


図3 B6N 雌マウス腎臓の HE 像 (×40)

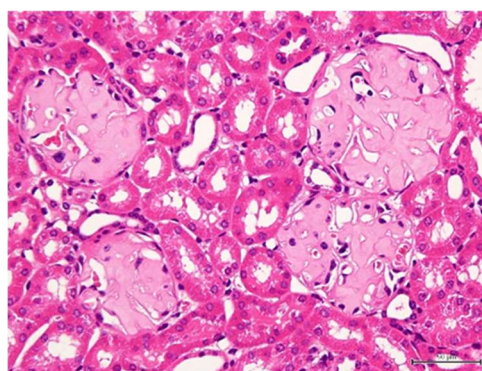


図4 B6J 雄マウス腎臓の HE 像 (×40)

5. 行動学的解析

ロータロッド試験では、B6 マウス両系統の雌雄ともに加齢に伴って走行時間が減少し、雄では加齢よりも体重の影響を強く受ける傾向が認められた。Y字迷路試験では、加齢に伴い新しいアームへの入室回数が減少傾向を示すと共に、マウス亜系統の差が見られた。

D. 考察・まとめ

複数の解析結果から、加齢に伴う体重減少、解剖所見(病気の発症時期)、白血球組成の変化など、個体レベルでの老化マーカーの候補となる加齢変化の他、マウス系統の特性だけでなく環境要因(例、ファイティング等によるストレス)による病態との区別が複数の項目で認められた。

血液および生化学の正常値については、さらにN数を増やすことで適正な評価ができると考えられた。生化学検査において現在の検査項目数では、全身状態の把握が困難であり、BUNやTP、CRTN等の項目を増やす必要があり検討を考えている。

病理形態学（解剖）および血液学的な結果から、脾臓の腫大が必ずしもリンパ腫ではなく、貧血による影響も血液形態から示唆された。組織学的解析から、B6NよりもB6Jマウスの方が特に腎臓の加齢変化が顕著に観察されたが、さらに例数を増やして検討することが考えられた。

行動学的解析から複数の試験から加齢変化が確認できた。

今回の結果から、動物種や系統によって加齢に伴う老化の進行、自然発症する疾患の種類が異なることがわかりつつあり、実験を行う場合はその実験系に適した動物種や臓器等のサンプルを選択する必要がある、AF動物における基礎データは加齢動物を用いて研究を行う上で非常に有益な情報となり得る。

今後、AF動物を炎症や腫瘍等の病変のないできる限り正常な個体を研究者に提供するには、定期的な個体の健康チェック（特に血液・生化学的検査）が重要であると考えられた。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

2021 年度

- 1) Furukawa M, Wang J, Kurosawa M, Ogiso N, Shikama Y, Kanekura T, Matsushita K., Effect of Brazilian green propolis extracts on experimental aged gingival irritation in vivo and in vitro., J.Oral Bio.63,58-65,2021
- 2) Kimura T, Inaka K., Ogiso N., Demonstrative Experiment on the Favorable Effects of Static Electric Field Treatment on Vitamin D3-Induced Hypercalcemia., Biol., 10(11),1116; 2021 ※分担研究者と重複

2022 年度

- 1) Furukawa M, Tada H, Wang J, Yamada M, Kurosawa M, Satoh A, Ogiso N, Shikama Y, Matsushita K., Molar loss induces hypothalamic and hippocampal astrogliosis in aged mice. Sci.Rep.,12(1)6409 , 2022

2023 年度

- 1) Kawaguchi K., Asai A., Mikawa R., Ogiso N., Sugimoto M., Age-related changes in lung function in National Center for Geriatrics and Gerontology Aging Farm C57Bl/6N mice. Exp.Anim.,72(2) 173-182, 2023
- 2) Tsuji S., Brace C., Yao R., Tanie Y., Tada H., Rensing N., Mizuno S., Almunia J., Kong Y., Nakamura K, Furukawa T., Ogiso N., Toyokuni S., Takahashi S., Wong M., Imai S., Satoh A., Sleep-wake patterns are altered with age, Prdm13

signaling in the DMH, and diet restriction in mice. Life science alliance 6(6)
2023

- 3) 小木曾昇, 特集：“老いと死”老化に関わる最新研究 自然老化マウスの長期飼育による環境統御と表現型解析システムの構築について, 日本実験動物学会 実験動物ニュース Vol. 72 No. 2 2023
- 4) 小木曾昇, 特集『健康長寿を目指すモデル動物研究』 動物実験におけるフレイル、サルコペニアの基礎研究から最新知見, 実験動物情報交流会, オベリスク, Vol.28 No.1 2023

2. 学会発表

2021 年度

- 1) 小木曾昇, 富田耕平, 森川信子, 河崎晴香, 高野一路, 坂本千夏, アルムニアフリオ, 自然老化マウスの亜系統における血液・病理形態学的な加齢変化の特徴, 第 68 回日本実験動物学会総会, 2021 年 5 月 19 日～21 日 東京 (Web 開催)
- 2) アルムニアフリオ, 富田耕平, 高野一路, 坂本千夏, 河崎晴香, 森川信子, 小木曾昇, 自然老化マウスにおける終末期の臨床症状と人道的エンドポイントの設定, 第 68 回日本実験動物学会総会, 2021 年 5 月 19 日～21 日 東京 (Web 開催)
- 3) 高野一路, 野間聡子, 坂本千夏, 富田耕平, アルムニアフリオ, 小木曾昇, 健康的な自然老化ラット作製に向けた基礎データの蓄積と加齢変化について, 第 68 回日本実験動物学会総会, 2021 年 5 月 19 日～21 日 東京 (Web 開催)
- 4) 小木曾昇, 老齢マウスの育成から加齢変化 - 亜系統の比較からエンドポイント設定 BPNP2021 サテライトシンポジウム - B6J Age d 研究会 第 3 回講演会 (ハイブリッド開催, 日本チャールス・リバー主催) 2021 年 7 月 13 日 京都
- 5) 小木曾昇, 富田耕平, 高野一路, 坂本千夏, 河崎晴香, 森川信子, アルムニアフリオ, 自然老化マウスにおける人道的エンドポイントの設定 - 適正な自然老化モデル研究を目指して -, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会, 2021 年 10 月 15 日 岐阜 (Web 開催)
- 6) 澤田浩秀, 小木曾昇, 腸内環境の変化がパーキンソン病における神経変性に及ぼす影響について - Rotenone モデルにおける検討 -, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会, 2021 年 10 月 15 日 岐阜 (Web 開催)
- 7) 澤田浩秀, 小木曾昇, 六車香織, 高野聡美, 腸内環境の変化がパーキンソン病における神経変性に及ぼす影響について - MPTP モデルにおける検討 -, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会, 2021 年 10 月 15 日 岐阜 (Web 開催)

- 8) 坂本千夏,野間聡子,高野一路,富田耕平,アルムニアフリオ,小木曾昇, 自然老化ラット作製に向けた基礎データの蓄積と加齢変化について, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会,2021 年 10 月 15 日 岐阜 (Web 開催)
- 9) アルムニアフリオ,富田耕平,高野一路,坂本千夏,河崎晴香,森川信子,小木曾昇, 加齢育成マウスにおける環境エンリッチメントの有用性, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会,2021 年 10 月 16 日 岐阜 (Web 開催)
- 10) 野間聡子,坂本千夏,高野一路,富田耕平,アルムニアフリオ,小木曾昇, 自然老化ラットを用いた加齢による血液パラメーター変化について, 第 55 回日本実験動物技術者協会総会,2021 年 10 月 16 日 岐阜 (Web 開催)

2022 年度

- 1) 小木曾昇, 教育講演 2 (老年医学研究シリーズ) 自然老化マウスの育成と加齢変化 – 亜系統の比較からエンドポイント設定 –, 第 64 回日本老年医学会学術集会,2022 年 6 月 2 日,大阪 (教育講演オンデマンド配信)
- 2) アルムニアフリオ, 富田耕平, 高野一路, 野間聡子, 河崎晴香, 森川信子,小木曾昇, 自然老化ラットの血液学・病理形態学的な加齢変化について–長期飼育に適正な環境の標準化を目指して–,第 69 回日本実験動物学会総会 2022 年 5 月 19 日,仙台
- 3) 高野一路, 坂本千夏, 富田耕平, アルムニアフリオ, 河崎晴香, 小木曾昇, 自然加齢育成マウスを用いた生理的老化を知るための基礎データの蓄積と加齢変化について, 第 69 回日本実験動物学会総会, 2022 年 5 月 19 日,仙台
- 4) Ogiso N, Tomita K, Sakamoto C, Takano K, Kawasaki H, Morikawa N, Almunia J., Utility of Environmental Enrichment in Naturally-Aged Mice Breeding. 15th FELASA Congress, Marseille (France) 2022 年 6 月 13-16 日 (Hybrid 開催,Web 参加)
- 5) アルムニアフリオ,河崎晴香,高野一路,山田聖士,山田祐輝,森川信子,小木曾昇, 加齢育成マウスにおける適切な飼育環境の標準化に向けた試み 1, 第 56 回日本実験動物技術者協会総会,2022 年 10 月 14 日,松本
- 6) 河崎晴香,アルムニアフリオ,山田聖士,高野一路,森川信子,小木曾昇, B6 系ハイブリッドマウスにおける老化モデル動物の有用性, 第 56 回日本実験動物技術者協会総会,2022 年 10 月 14 日,松本
- 7) 小木曾昇,河崎晴香,高野一路,山田聖士,山田祐輝,森川信子,アルムニアフリオ, 加齢育成マウスにおける適切な飼育環境の標準化の試み 2, 第 56 回日本実験動物技術者協会総会,2022 年 10 月 14 日,松本
- 8) Ogiso N, Tomita K, Sakamoto C, Takano K, Kawasaki H, Morikawa N, Almunia J., Utility and Evaluation of Environmental Enrichment in

Naturally-Aged Mice Breeding, AALAS 73rd National Meeting, 25 October
2022, Louisville USA

- 9) 小木曾昇, 自然老化マウスの長期飼育による環境統御と表現型解析システムの構築について, 令和4年度日本実験動物学会維持会員懇談会, 2022年11月11日, 川崎 (ハイブリッド開催)

2023年度

- 1) 木村透,小木曾昇, 高齢スunksの実験的脂肪肝: 血中遊離アミノ酸の変化が及ぼす脂肪肝の誘導と回復, 第166回日本獣医学会学術集会(Web開催), 2023年9月5-8日 (分担研究者と重複)
- 2) 茅原千聖, 高野一路, 島田俊雄, アルムニア フリオ, 河崎晴香, 森川信子, 小木曾昇, 自然老化マウスのエンドポイント時における状態異常と血液・血清検査の相関性について, 第57回日本実験動物技術者協会総会, 2023年10月20日, 福島
- 3) アルムニア フリオ, 角野隆志, 茅原千聖, 島田俊雄, 河崎晴香, 森川信子, 野間聡子, 小木曾昇, 加齢マウス育成における適切な飼育環境の標準化の試み, 第57回日本実験動物技術者協会総会, 2023年10月20日, 福島
- 4) Ogiso N, Kakuno T, Kayahara C, Satoko N, Kawasaki H, Morikawa N, Almunia J., An Attempt to Standardize Appropriate Rearing Environment by Introducing Environmental Enrichment in Naturally-Aged Mice, AALAS 74rd National Meeting, 24 October 2023, SaltLakeCity USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし