第12回日本老年学会総会

<シンポジウム>

寿命決定因子

司会 太田 邦夫* 江上 信雄**

はじめに

太田 邦夫

生体が発現するすべての生活現象は、その生体種のもつ遺伝要因と、その個体のおかれた環境要因に依存していると言って差支えない。生理的老化現象の中軸となるものが、自然死であることは、老化のいろいろな定義を検討しても、現在のところ誤りでないと思われるが、自然死に到達するまでの物理的時間、即ち寿命もまた、遺伝要因と環境要因の双方に関係した函数である。

遺伝要因が寿命決定の主体であることは、種の最長寿命が略々固定したかの如く見えることから誤りでないであろう。しかし実は、理想に近い実験哺乳動物ですら、真の最長寿命は決定されていない。野外動物では正確な評価は不可能といってよい実状である。これは寿命における遺伝要因の発現に環境要因が支配的な役割をもつことを意味するのであろう。種における変異の中には、明かに寿命を制限するものが知られている。それらの中で、各種の老化の parameters と呼ばれるものが生理的老化と重り合うことの多いものは、ヒトでは progeroid と呼ばれ老化研究の一焦点となっている。しかし、一義的に寿命を決定する遺伝因子は同定されていないし、又将来の同定も困難が予想される。反対に通常経験される変異の中で、寿命を延長するものは殆どないと言えよう。しかしこのような変異が、極めて稀に起こる可能性は示唆される。個体のおかれる環境、生態系全体のおかれる環境の中で、このような寿命の延長をふくむ変異体が、如何に選択されて残りうるか、もまた極めて興味のある問題である。

他面、生体はいろいろの程度にその直接環境を変革しながら生活するが、ヒトは生体の中ですぐれて環境を支配する能力をもっている。今日先進国の住民の生存曲線が、理想に近い環境におかれた実験動物のそれに近いことは興味深い点である。このような外環境の支配が、個

体の内環境にいかに変化を及ぼし、又それが新しい種の変異と関連しうるかも、将来重要な課題となると考えられる。

老年学研究の基礎面では、ヒトについて得られた、極めて貴重な知見が甚だ重要な役割をもっているが、同時に自由に広く生物界を見渡して、新しい実験的研究の素材を求めることが出来る。現在までに、これらの利点をつかって、様々の新しい知見が得られているが、今のところ、ある一断面での知見をそのままに拡充して行つて、個体の寿命の決定につながるものを同定しうるところまでですんでいない。殊に生体の一部、例えば個体から得られた細胞そのものの示す老化や極限寿命の示すものが、数次の階層や横のつながりをもつ個体の老化や寿命と如何にかかわるかについては、暗中摸索の中にあるというべきであろう。

分析的研究は現在分子水準にまで達しているが、老年学の中で寿命の決定という、中心的ではあるが限られた主題にとっても、全く視点を変えると、地上の生態学、即ち広義の社会学的な解析と展開が必要であり、かつて基礎的物理学が経験した大きな問題にもつながりうるのである。

この symposium では、生体構造の重要な単位である細胞、極めて簡単であるが個体として種の life cycle をしめす下等動物の寿命決定の問題に如何なる approach がなされつつあるかを紹介し、他方、外環境中、最も端的に分子水準まで到達し得、しかも定量的に研究出来る放射線の影響を及び、生体の寿命決定に関与すると思われる条件の考え方を、出来るだけ simplify して、広く老年学の枠の中にある同僚にお示めしたい。

勿論、上にもふれた如く、寿命決定因子の解析は、極めて困難な問題であって、それに関する重要知見のすべてにふれることさえも不可能事に属するので、この試みは広い façade の極めて限られた面に、浅くふれるに止ることは、御諒解を得ておきたい。

* K. Oota : 東京都老人総合研究所

** N. Egami : 東京大学理学部

1. In vitro 細胞老化と寿命決定因子

三井 洋司

序

In vitro での細胞老化における寿命決定因子を論ずるに当って、本稿では以下の3項目に重点を置く、即ち、先ず、① in vitro 細胞老化とは基本的に何をさすのか、それが生体の老化と如何に関わると考えるのか、次いで、② 寿命決定因子の各水準からの考え方を述べ、細胞の分裂寿命を決定する遺伝因子と、修飾する環境因子の諸例を挙げたうえ、細胞の寿命を強く規定している主要な加齢変化について言及する。そして最後に、③ こうした老化細胞に、特異なウイルス（産物）を感染させることにより再び DNA 合成を誘導する実験から、老化細胞の本質的な欠陥因子、ひいては寿命決定因子を追求するという新しい研究を報告する。以上を通じて、基礎の老化学から、老人病学、更に老年社会学に至る多くの研究者に、我々の立場と研究内容の一端を紹介し、老年学という interdisciplinary な領域に必須な協同研究のきっかけになればと念願する。

I. 生体老化と in vitro 細胞老化

1) in vitro 細胞老化とは、細胞の分裂加齢（分裂寿命）である。

生体の組織片、例えば皮膚や血管から細胞を単離して生体外で増殖させ得る。細胞数密度が高くなり増殖停止する毎に、細胞数を一定の比率で希釈して継代培養すると、再び分裂増殖する。この反復によって細胞集団としての分裂回数（PDL）を算出できる。多くの基礎的研究から、本稿で述べる細胞老化とは、絶対時間や代謝の維持される期間の函数ではなく、一定の分裂回数で分裂能力を失うという分裂加齢（分裂寿命）であると、解析された。これは又、細胞は分裂する毎に、その性質（たとえば表現形質の変化が検出されなくとも、内在的に clock が進んだ）が変化する、という基本理念を生み、細胞生物学に強いインパクトを与えた。

2) 生体内細胞にも分裂加齢がある。

乳腺細胞の一部を別の個体に移植し、充分分裂増殖したら又一部を移植するという実験を反復することにより、生体内の細胞にも分裂加齢（分裂寿命）があると判明している。皮膚或るいは骨髄細胞の移植実験でも同様のことが報告されている。

3) 高齢者に由来する細胞は、in vitro で分裂寿命が短い。

若年者に由来する細胞に比べて、高齢の人から得られた細胞は、in vitro での分裂寿命の短いことが、皮膚の繊維芽細胞（図1）、大動脈の平滑筋細胞、目のレンズ上皮細胞、等種々の細胞を用いて証明されている。

4) 分裂加齢は老人病の基盤をなすかも知れない。

生体の中、例えば大動脈血管の局所で傷害がくり返されると、血管内皮細胞の修復性増殖がおこり、分裂加齢の進行することは多いにあり得る。そうして細胞の機能低下、又は分裂寿命の限界に達した部位で、細胞の剝離、血小板付着、肥厚等、病的過程の進行する基盤が生じ、動脈硬化等老人病を誘発するかも知れない。こうした可能性を追求する研究が既に進行中である。

II. 寿命決定因子

1) 個体の寿命

個体の寿命を規定する要因として、基本的に、細胞の加齢（又は分裂寿命）が基盤にあると考えられる。勿論、細胞加齢の発現は個々の細胞レベルで容易に検出されるとは限らず、細胞ネットワークの協調の乱れとして発現するかも知れない。cell to cell interaction に関する事象が分子レベルで分析できるようになれば、細胞加齢との関連が明らかになろう。細胞のうちでも、増殖停止した神経細胞におけるリポフクシンの蓄積を指標にした、分裂終了細胞群の加齢研究もあるが、我々が主に扱っているのは、分裂余力をまだ保持している細胞群の分裂加齢である。どちらの細胞群が個体寿命の律速因子になっているかまだ不明である。脳出血、心筋梗塞、成人型糖尿病等典型的な老人病がいずれも上記した内皮細胞の障害と無関係でなさそうだ。高齢者脳細胞の減数も、神経細胞の直接的な老化によるのか、内皮細胞からなる

	Young donors (21~36yr)	Old donors (63~92yr)
Successful cell outgrowth from explants	23/34	24/39
Cell cultures that senesced before 10CPD	0/23	3/24
Explant outgrowth at 1 week (units)	2.44 ± 0.30 (26) * †	1.44 ± 0.15 (29) †
Onset of senescent phase (A) (CPD)	35.2 ± 2.1 (23)	20.0 ± 2.0 (24) 22.5 ± 1.7 (21) †
Onset of senescent phase (B) (CPD)	41.6 ± 2.4 (23)	26.3 ± 2.6 (24) 29.6 ± 2.1 (21) †
In utero lifespan (CPD)	44.6 ± 2.5 (23)	29.8 ± 2.9 (24) 33.6 ± 2.2 (21) †
In utero lifespan (days)	273 ± 11 (23)	218 ± 14 (24) 236 ± 12 (21) †

* : Values are expressed as mean ± standard error of the mean. Numbers within parentheses indicate the number of individual cell cultures examined.
† : Includes several measurements of outgrowth from two explants taken from the same donor.
‡ : If only cultures with >10CPD included.

Onset of cell culture senescence (in cumulative cell population doublings) defined as failure to reach confluency 1 week after subcultivation.

図1 Characteristics of skin explants and cell cultures derived from young and old human donors

毛細血管の障害による二次的なものか判っていない。いずれにしても、我々は、個体の寿命を左右する因子として細胞加齢が基盤にあるとの仮説に立っている。

2) 細胞の寿命決定
それでは、こうした細胞の寿命を決定する因子は何であろうか、培養したヒト繊維芽細胞ばかりでなく、乳腺細胞の生体内継代移植を用いた系でも、細胞の分裂回数こそが、クロックの役割をしており、分裂を遅延させれ

表1 細胞の寿命決定因子

寿命決定因子

環境因子	遺伝子情報因子
放射線	細胞種
光線	ヒト年齢
温度	遺伝疾患
酸素	生物種
血清, 増殖因子	
ホルモン	

細胞の寿命決定説

1. プログラム説
2. エラー破綻説
3. 突然変異説
4. 遊離基説

ばその期間だけクロックも停止して chronological な寿命が延長すると判っている。その意味で、「分裂」が、再生型細胞の寿命を決定しているとも云える。

分裂がどのような機構で細胞寿命を規定しているか、まだ明確に判っていない。分裂する毎に娘細胞に起こる第1次加齢変化が何か、結論が下されていないのである。細胞の分裂寿命を遺伝情報機構が規定する場合、遺伝的早老症や生物種による細胞寿命の違いは、おそらく分裂からクロックへの変換が量的、質的に変化したことが関係し、ヒトの年齢とか、扱う細胞種による細胞寿命の違いは、細胞の分化の程度、又は生体内での過去の分裂回数が関係したかも知れない。一方、細胞の培養環境因子を考えた場合、第1次加齢変化を直接誘発するものは希で、温度、酸素、光線、血清（増殖因子）ホルモン等、寿命に影響する因子は、二次、三次変化に作用し、間接的にのみ寿命を修飾すると思われる。例えば、37℃より高温すぎても、低温すぎても分裂寿命が短縮するとか、種々の増殖因子を含有する血清の、製品品質の低下で寿命短縮したり、コルチゾールの添加を続けると、寿

図 2 A) Effect of GA and PCA-fixed cell sheets on cell growth. The cells at PDL 53 were inoculated at concentration of $5.2 \times 10^3 \text{ cm}^{-2}$ onto plastic substrates in 30mm dishes without cell sheets (open circle), with GA-fixed cell sheets (closed circle) or PCA-fixed cell sheets (triangle). Fixed cell sheets were prepared from confluent cultures of cells at PDL 52. Each point represents the mean of three dishes.

B) (a) Change in the growth-inhibiting effects of GA-fixed cell sheets with in vitro age. The effects of cell sheets on cell growth, given Fig. 6, were plotted against the percentage life span of the fixed cells (life span : PDL 60). (b) Change in the relative amount of heparan sulfate to the total glycosaminoglycans in the cell layer with in vitro age. Cells at PDL 19, 43 and 63 were inoculated in the split ratio of 1 : 5 into 90mm dishes. Nine days after inoculation the glycosaminoglycans in the cell layers were isolated for the assays of the heparan sulfate and total uronic acid contents as in Materials and methods. Parallel cultures were incubated with [³H] glucosamine ($5 \mu\text{Ci/ml} \times 10 \text{ ml/dish}$) for 48h, on the 7th day after inoculation. Labeled glycosaminoglycans were analyzed as in Materials and methods. The relative amount of heparan sulfate to the total glycosaminoglycans (net amount : open circle ; newly synthesized : closed circle) was plotted against the percentage life span (life span : PDL 79). (c) Change in saturation density with in vitro age. Cells at PDL 19, 43 and 63 were inoculated in the split ratio of 1 : 5 into 90mm dishes. Cell numbers were counted 9 days after inoculation.

表2 細胞寿命を規定する主要な加齢変化

膜表面の変化

ホルモン等レセプターの欠落

膜流動性の低下

プロテアーゼの低下

ヘパラン硫酸の露出

変異酸素の出現

突然変異

処理能力の低下

翻訳・転写のミス

翻訳後の修飾

クロマチンの変化

酸性タンパクの消長

ヒストンの修飾

ヒストンH1の欠落

架橋形成

DNAの変化

突然変異

複製酵素の異常

Rearrangement

塩基の修飾

DNA鎖の切断

反復DNAの欠落

グリコサミノグリカンのうち、ヘパラン硫酸の占める比率が高くなっており、そうした細胞表面に他の再生型細胞が接触すると、その細胞増殖が阻害されると判明した。その細胞表面をヘパリチナーゼとか亜硝酸処理によ

図3 Abscissa: slice no.; ordinate: (left) radioactivity of [14 C] lysine incorporated, dpm $\times 10^{-2}$ /slice; (right) radioactivity of [3 H] lysine incorporated, dpm $\times 10^{-2}$ /slice.

(a) Synthesis of histones during culture. Young cells (22 PDL) and senescent cells (57 PDL) were labeled with $\bullet$ — $\bullet$, 0.33 μ Ci/ml [14 C] lysine; $\circ$ — $\circ$, 2.2 μ Ci/ml [3 H] lysine, respectively, in lysine-depleted BME supplemented with 10% FBS for 1h. Immediately after incubation with isotope, young and senescent cells were collected by scraping and mixed. Histones were electrophoresed as described in fig. 3.

(b) Degradation of histones during culture. After incubation with isotope, the parallel cultures were replaced with fresh culture medium without radio active lysine and further incubated for 96h. Histones were extracted from the mixed cells of young and senescent cultures.

命が20~30%延長すると、報告されている。ところで、放射線、化学発癌、癌ウイルス等による処理は、時に、細胞を無限増殖化させる。この場合は、分裂がクロックと連動しなくなったものと考えられ、第1次加齢変化に密接する部位が作用点と思われる。

3) 寿命を規定する主要な加齢変化

第1次加齢変化から、2次、3次と、カスケード的に加齢変化が生じ、これらが次々に引き起こす結果の終末として、分裂終了老化細胞があると考えられる。従って老化細胞に多数の形質変化が生じている筈であるが、中でも第1次加齢変化に近いもの程、寿命を規定する波及効果が大きい。そこで、細胞増殖と機能に波及効果が大きいと思われる主要な加齢変化を以下に記す(表2)。

細胞膜表面の加齢変化のうち注目すべきものは、ホルモンレセプターの変化と、増殖の接触阻害に関わる因子の変化であろう。高齢者に由来する細胞の表面では、インスリンのレセプターとの結合親和性が低下すると報告された。同様のことが各種の増殖因子に対するレセプターについて見られるかどうか興味深い。一方、我々は、正常細胞が増殖して互いに密接した時に分裂停止する機構には、膜表面にヘパリン硫酸の露出することが関連することを報告した。分裂加齢の進行した細胞表面には、

ってヘパリン硫酸をとり除くと、増殖阻害が外れて、分裂しやすくなると判った(図2)。こうしたヘパリン硫酸比率の増大には、合成量の絶対的な増加というより、表面膜へのくみ組みの多くなることが重要らしい。これに関わる酵素の変動はまだ不明である。加齢に伴う酵素変動はいくつかあるが、変異酵素の出現は極めて注目され、上記した可能性が検討された。現在では、転写、翻訳のミスが普遍的におこり、変異酵素が蓄積して老化するというエラー破綻説は殆んど否定されたと考えられる。一部に、翻訳後の修飾を主張する報告がまだ続いている。最近ではクロマチンや遺伝子レベルの変動を重視する老化説が有力である。図3は、クロマチンのヒストン分子種分布を調べた結果である。分裂加齢が進むと、ヒストン HI の比率が低下することを示す。その原因として、新しく合成されクロマチンに結合するヒストン HI の量が、他のヌクレオソームヒストンに比べて、正常より減少してしまうことが見いだされた。老化細胞におけるヒストン HI 量の減少は、その抗体を用いて、細胞化学的蛍光抗体法によって確められた。γ線照射で無限増殖能を獲得した細胞は、200回以上の分裂回数でも HI の減少はない。クロマチン上の HI 欠落の結果として考えられることは、遺伝情報発現の抑制がランダムに解除され、種々の m-RNA が転写されるところから、特異機能が低下するのではないか、ということ、更に、ヌクレオソームをつなぐリンカ-DNA 部位が露出すれば、DNase 等の接近が容易になり、DNA の切断が起こりやすくなるのではないかということである。これらの実証は将来に待たなければならない。

DNA の変化に関しては、最近、アルカリ蔗糖密度勾配法を用いて、DNA 分子サイズの分布が調べられ、老化細胞では DNA の切断(のされやすさ)が増加していると報告された。どのような部位が切断されやすいのか興味深いところである。もう一つ極めて注目すべき事柄は、分裂加齢と共に、反復 DNA のゲノム数が減少しているということである。これが真実なら、分裂のクロッ

クとしても働くかも知れないし、リボゾーム RNA gene やヒストン gene の減少を予想することができ、今後の発展が期待される。

以上、主要な加齢変化をかなり主観的にしぼって紹介した。種々の環境因子がこれらに作用点を持てば、寿命を規定する大きな要因となるだろう。

III. 老化細胞の活性化

分裂寿命の末期にある老化細胞は、十分な血清や増殖因子を加えても、大部分の細胞は DNA 合成を再開できない。このような細胞に、通常の Go 期細胞の DNA 合成を再開させ得るウイルスを感染させたらどうなるであろうか。井出利憲氏(広島大、医)との共同研究を紹介する。Human Cyto Megaro virus (HCM) を感染させたところ、スベルミン、スベルミジンの上昇に引き続き、細胞 DNA への ^3H -TdR とり込みが急激に上昇した。これは、ウイルス DNA 複製の分を差し引いたもので、又、修復性 DNA 合成でないことも、確認された。これは、血清等では DNA 合成を再開できなかった細胞が、再開できるようになった結果である。同様のことは、別の DNA ウイルスである、SV-40 を用いても確認された。この際、small T-Antigen を産生できない突然変異 SV-40株を用いても同様に DNA 合成を再開できた。又、温度感受性変異株 SV-40 で、T-Antigen を産生できるが、transformation 能力を持たないウイルスを用いても DNA 合成を誘導できた。このように、ウイルスの gene プロダクト T-Antigen によって、老化細胞の DNA 合成を再開させ得ることが推測された。老化細胞でも DNA 合成の machinery が完全には破壊されていないと結論される。今後、DNA 複製酵素の誘導や核分裂の有無を追跡しようとしている。分裂加齢の機構として、突然変異の集積、エラータンパクの蓄積よりも、プログラム説に有利な知見である。こうした研究を発展させて、寿命決定因子を解析できるものと期待している。

2. 無脊椎動物の老化と寿命

—実験動物としてのネマトーダ—

鈴木 堅之 石井 直明

1) 老化研究における原因と結果—モデル動物系の選択

がんの研究の歴史は長い。しかしながらいまだに「なぜがんができるか」という命題は解けていない。最近では多くの物質のがん原性と突然変異原性、あるいはがんウイルスからのアプローチなどその昔からみれば異った立場からの研究でかなり目標に近づいたかにみえるがまだその本質はなぞである。この長い歴史をふり返えてみると、そこに大きな問題があるのに気付くと思われる。それは、がん細胞（組織）を正常の細胞（組織）と比較しても、それなりの結果はでもがんの本質に関しては何も得られなかったことである（といってこれらの研究がすべてむだであったとは思わないが）。この本質はがんになったために起こる諸現象を集めてみればその原因がわかるであろうという順序のとりちがえにあったとすることができよう。

老化研究も同様であると考える。老人になれば免疫能が低下するためにいろいろな医学的症状が現われることはあっても、それが老化の本質的原因であるとは考えられない。なぜならば免疫機能を持たない動物でもりばに老化し定まった寿命をもっているからである。同様に動脈硬化症はひとつのあらわれではあってもそれが老化の本質であるとはとても考えられない。それならばどう考えるのであろうか。

すべての生物はそれ自体のなかに時間と空間の情報をもっている。これらは遺伝的に支配されており、寿命の長さも例外ではありえない。あるネマトーダは半年も生きることができるのに、大きさも何もよく似た別種のネマトーダは同条件下にひと月も生存しない。すなわち寿命に関連して遺伝的背景を調べることは第一義的に重要で意味のあることと考えられる。この意味ではヒトにH.-G.-プロジェリア症候群やワーナー症候群のような早老を主体とする遺伝疾患が存在することや、高血圧症の

ネズミ突然変異が見付かったことは、その内容がすべての老化現象をカバーするものではなくても将来に問題解決への希望を含めて有意義なことと思われる。ただ寿命を支えている遺伝子は決してひとつやふたつではなくポリジーン的な関係にあるであろうから、遺伝子の解析はおそらく容易ではないと想像される。

このような点から考えると、この種の研究に用いるモデル動物に課せられる性質には、まず突然変異体を見付けることができ、さらにその遺伝解析が可能であるという条件が必要となる。さらに環境因子の影響も調べることができるうえ、体制や生活環が簡単であり、飼育が容易でかつ安価に行える等の諸条件を満たす生物はそう多くは見付からなかった。そこで最終的に選んだのがネマトーダであった。

2) ネマトーダ（線虫）

ネマトーダは上記の諸条件を満たすほかにつぎのような特質をもっている。第1に卵も成虫も透明であるから、切片をつくったり染めたりしないでも体内の様子を生きたままで観察することができる。おそらくこれは他の生物に類例をみない特性で、卵割から胚発生の状況なども含めて観察が可能である。事実C. エレガンスという株については、発生から幼虫、成虫に到るまでの細胞の系列がほぼ完全に解析されている。第二に通常の条件下では寿命の長さが適当で実験に適している（後述）。

われわれが現在主として用いている株は *Rhabditidae tokai* と呼び、6年前に東海大学病院裏の田土から分離したものである。主要な性質はつぎの通りである¹⁾（写真）。

なお飼育はニュートリエント・ブロスや塩類を含む寒天培地上で行い、大腸菌を餌として用いた。この培地上にごく少量のM9緩衝液を加えその中を泳がせているが、成熟までは活発に体を動かして運動するがその後老化するにしたがって動きは次第に鈍くなる。また腸管の周囲に黒い色素顆粒が増加する等の老徴を示す（光顕および電顕による形態的観察は文献2、5—フルオロウラ

写真. ネマトーダ (*R. tokai*) 幼虫と卵もみえる。

大きさ: 雌の平均長 830 μ m, 雄は 580 μ m, 太さは50 μ m ていど。

生活環: 卵は20°Cで24時間後に孵化し幼虫となり5日後には成熟する。雌雄異体で雌は1週間位かけて1匹あたり100箇の卵を生む。集団中の雌雄比は約15:1。産卵後も生き続け150日ていどの最長寿命を示す。

シルを用いて生殖機能の阻害を調べた研究は文献3)。

3) 環境要因とネマトーダの寿命

R. tokai は寿命の研究には他国でよく用いられている

*C. エレガンス*よりも適当である。それは雌雄異体であるためで、雌雄同体の *C. エレガンス* の場合には一匹で

も次世代が生まれるため同じ培地上におくと世代が混合してしまうから、卵が生まれるごとに親虫を別の容器に移す必要がある。この点 *R. tokai* では始めに雌だけまたは雄だけを拾っておけばかかる世代混合の心配はない。そこでこの種の実験においては直径15mm ていどの小さいシャーレに寒天培地をつくり、その1箇に5匹くらいの雌または雄を入れて飼育し日を追って生存虫数を数えた。

飼育温度の未交尾の雌に対する影響を図1に示す。*R. tokai* の至適飼育温度はいちおう20°Cとされているが、30°C、35°Cとなると生存率が落ち始めるまでの期間がいちじるしく短縮されることがわかる。しかしS字曲線の形には大きな変化がない。また35°Cでは生殖が不能となる。ところが孵化後10日目に雄を与えて交尾させると平均寿命は2/3に短縮された。おそらくは産卵が大きな負担となるためであろう。また未交尾の雄は雌に比べて短寿命であった。

ネマトーダは環境毒物などに対する影響の研究にも用いられる可能性がある。図2にこの数年社会的な問題となった6価クロムとカドミウムの寿命に対する影響を示してある。どちらの場合も 10^{-6} Mでその効果が認められた。

4) 放射線の影響⁴⁾

成虫はX線に対しかなり抵抗性が大きく、60krad 照射でも目立った寿命への影響はなかった。ただし幼虫に

図1 ネマトーダの寿命に及ぼす飼育温度の影響。未交尾の雌。20°Cの結果は25°Cとほとんど相異がない。

図2 ネマトーダの寿命に対する Cr^{6+} , Cd^{2+} , および Co^{2+} の影響.

図3 X線照射卵から孵化したネマトーダの寿命. 60 krad 照射により卵の孵化率は70%程度に減少する. 同量のX線照射を成虫に行ってもいちじるしい寿命短縮効果はない. X線: 10MeV リニアック.

図4 紫外線高感受性突然変異体の寿命 (C. エレガンス) ○, 野性体; △, UVS¹; □, UVS²

照射した場合成熟すると多くの形態異常がみられた。しかしながら興味のあることには、照射卵から孵化した虫の寿命を調べたところ正常の虫に比べいちじるしく短縮されることがわかった (図3)。図にみられるように 60 krad 照射により卵の孵化率は非照射卵の71%に低下したにすぎないが、照射卵から孵化した虫の平均寿命は正常の虫の25%に短縮されてしまっている。すなわちX線は個体の影響よりは卵に照射した場合の後影響がいちじるしいことがわかる。

紫外線 (254nm) も卵に照射すると孵化率を低下させるが、X線の場合と異なりひとたび孵化した虫の寿命にはあまり大きな影響を与えなかった。そこで孵化率を低下させることにおいてはX線も紫外線も類似の現象をひき起こすようにみえるが、その障害の本質は両者でかなり異なることが明らかになった。

なお卵発生の一時期に紫外線に対しとくに高感受性を示すこともわかった。

5) 紫外線高感受性突然変異体と寿命

C. エレガンスから数株の紫外線高感受性突然変異体を分離した (UVS¹, UVS²)。この変異体は成虫も卵も野性体に比し数倍高感受性である。ところでこの変異体の寿命を測定したところ、平均寿命が野性体の約50%しかないことがわかった (図4)。すなわちネマトーダの紫外線抵抗性を支配している遺伝子が同じ虫の寿命をも支配している可能性が大きいことが示された (遺伝解析はまだ行っていない)。

この変異体の他の薬剤への感受性 (cross sensitivity)

を調べてみると、X線と MMS (メチルメタンサルホネート) に対しては野性体とほぼ同じ感受性を示したが、興味あることに4-ニトロキノリン-1-オキシド (4NQO) に対しても野性体とあまり変わらない感受性を示した。大腸菌や色素性乾皮症細胞等では紫外線高感受性突然変異体は4NQOに対しても高感受性であるのに対しこのネマトーダ変異体が野性体と変わらないのは予期しなかったが、薬に対する透過性などの問題もあるのでまだ検討の余地は残っている。

6) まとめ

以上のようにネマトーダは遺伝的背景の研究にもまた環境因子の影響の研究にも、老化研究におけるモデル動物として有用なもののひとつと考えることができる。成熟したネマトーダは生殖細胞を除いては全部がいわゆる非分裂細胞で構成されており、この意味では神経や心筋等ヒトの非分裂細胞組織の老化モデルに近いともいえるかもしれない。

文 献

- 1) Suzuki K, Hyodo M, Ishii N, Mariya Y: Properties of a strain of free-living nematode, *Rhabditidae* sp.: Life cycle and age-related mortality. *Exp Geront* 13: 323-333 1978.
- 2) Suzuki K, Yanagisawa F, Akatsuka A: Photo- and electron microscopic studies of a strain of free-living nematode, *Rhabditidae tokai*. *Tokai J Exp Clin Med* 4: 149-157, 1979.

3) Suzuki K, Moriya Y, Ishii N : Effect of 5-fluorodeoxyuridine on reproduction and aging in a strain of free-living nematode, *Rhabditidae tokai*. Tokai J Exp Clin Med 4 : 159—164, 1979.

4) Ishii N, Suzuki K: The killing effects of ultraviolet light and X-rays on free-living nematode, *Rhabditidae tokai*. J Radr Res 21 : 137—147, 1980.

3. 放射線と寿命

松平 寛通 山口 武雄 中沢 透 江藤 久美

生体に放射線が照射されると直接またはラジカルを介し間接に生体を構成する分子や細胞の微細構造が損傷をうける。たとえば、細胞核 DNA の鎖切断や塩基の損傷がそれで、修復や複製過程を経て、細胞の致死、突然変異、がん化等につながると思われる。

動物に比較的大線量の放射線を全身に1回照射すると、500～1,000ラドではほぼ数週で、数千ラドではほぼ1週内で、数万ラドでは2～3日で動物は死亡する。その原因はそれぞれ骨髄、小腸の幹細胞の致死および中枢神経系の障害と考えられる。これを放射線の急性死という。

放射線による急性骨髄障害による死亡をまぬかれるか、急性死がおこらない程度の放射線を全身に1回にうけると、動物は1～2年生存するが、それでも放射線を全くうけなかった対照群に比較すると、はや死をする。このような動物では白内障やしらがなど老齢動物に起こる変化がみられることから、放射線は加齢を促進しその結果動物の寿命を短縮させるのではないかという考えが生れた。

その後全身1回および低線量率連続全身照射による哺乳動物の寿命の変化の解析がすすめられ、線量と照射後または照射開始からの生存期間 (mean after survival, MAS) との関係がもとめられた。寿命短縮 (S) を下式

$$S = T_0 - T_R \text{ または,}$$

$$S = (T_0 - T_R) / T_0 \times 100$$

で表わす。T₀ は非照射動物の MAS, T_R は照射動物の MAS である。寿命短縮の単位は日または平均生存期間のパーセントである。全身1回照射の結果の寿命短縮はたとえばマウスでは100ラド当り35日、連続照射では4日といわれる。パーセントで表わすと100ラド当たりほぼ5パーセント、0.7パーセントとなる (図1、国連科学委員会1981年ドラフト、NCRP 報告 No. 64)。

この様な研究と平行して寿命短縮の原因がしらべられた。はじめ、寿命短縮にはがんによる特異的寿命短縮と

A) マウス (点線), ラット (R), ハムスター (C), 犬 (D) に全身1回照射を行ない、放射線による寿命短縮を寿命のパーセントとして表したものの、横軸の線量は Gy (グレイ単位, 1グレイ=100ラド)。

B) マウスが死ぬまで図中の線量率 (1日当たりの線量, ラド単位) で照射したときの寿命短縮と総線量との関係。線量率がますとカーブが逆向きになるのは低線量率のときと死因 (標的臓器) がかわることをしめす。

(国連科学委員会1981年ドラフトより)

図1 寿命短縮と線量及び線量率との関係

がん以外の原因による非特異的寿命短縮とが考えられていたが、研究がすすむに従って全身1回照射にして数百ラドの線量では寿命短縮の原因はほとんどがんであることがわかった。

一方、いろいろの原因で放射線に被曝した人の集団について疫学調査が進められた。代表的なのは広島・長崎の原爆被爆の追跡調査である。放射線影響研究所の1950～1978年までの調査によると被曝者79,856人 (男42%,

平均被曝線量27.2カーマド)の中,全死亡23,499人,白血病死179人,白血病以外の癌死4,575人で,放射線によると思われる過剰は白血病90.6人,癌160人であり,悪性腫瘍以外の原因による死亡は対照集団とくらべ増加していない。加齢とともに変化するいろいろな示標(たとえば握力等々の生理学,生化学的検査)について放射線の影響が調べられたが,結果はマイナスであった。つまり,急性死ではなく放射線の晩発性影響が問題となる放射線量の範囲では,放射線による寿命短縮の原因は発がんであるといつてよい。

加齢に伴って生体に起る変化については当研究部でも多少データがえられつつある。

キンギョの皮膚には5年以後色素性腫瘍(Erythrophoma)が発生し以後11年まで,発生率(個体当たりの腫瘍数)は年齢とともに増加する。発生率と年齢の関係を解析した結果,

$$\text{発生率} = \text{年齢}^{2.7}$$

となった。この種の解析は人の癌について多く行なわれており,年齢別発生率と年齢(30歳位からの)とを両対数目盛りでプロットすると直線となる癌が多く,そのスロープは4~5であるという。これらの結果から,癌は体細胞に3~4~5コの突然変異が起った結果であると解釈される。これに対し Knudson らは最近,突然変異の数は2コでよく,発生率と年齢との関係のスロープはむしろ第1の突然変異を起した細胞の増殖と(分化能をまだもっているために起こる)死の比率によるという説を提唱している。

加齢とともにわれわれの身体の細胞に染色体異常をもつ細胞や突然変異を起こした細胞が徐々にふえていることは最近末梢血中のリンパ球を用いる研究からどうも確からしい。その原因が外因によるのか,内因によるのかは不明である。内因のひとつとしてあげられるのが,生体が生きている過程(たとえば酵素反応)で生ずすラジカルや過酸化物である。これらが加齢や発がんとは何かの関連をもつ可能性は放射線の生物作用とのアナロジーから充分考えられる。

一方,生体にはこれらのラジカルや過酸化物の生成を防いでいる機構があることが実験的に確かめられた。モデル生体膜に放射線を照射すると脂質過酸化物が生成される。放射線照射の前にいろいろの細胞からえた細胞質上澄を加えておくと過酸化物の生成が抑制される。この抑制因子はタンパク性の成分とグルタチオンを含む低分子成分とからなっている。興味深いのはマウス白血病由来

の培養細胞の突然変異株の中で,放射線に高感受性をもつ変異株にのみ,この抑制因子がみられなかったことである。この種の抑制因子が加齢とともにどの様に変化するかは将来の問題である。

生体の組織には細胞増殖の統御機構が存在する。種々の成長促進因子が同定されている一方,組織特異的増殖抑制因子—キャロンがいろいろの組織から分離されている。マウスの皮膚には,表皮の増殖細胞に対し,細胞周期の G_1 期と G_2 期に作用して細胞増殖を統御するキャロンが存在する。キャロンの生理学的意義についてはいろいろの説がある。ともかく,マウスでは皮膚のキャロン含量が生存曲線にほぼ平行して減少する。とくに G_1 キャロン含量の減少は年齢に伴うマウスの生存率の減少に先立っており,創傷治癒過程などからみた加齢に伴う個体の細胞増殖統御機構の衰退をよく反映している様にみえる(図2)。

● G_1 キャロン, ○ G_2 キャロン

図2 マウスの年齢と皮膚キャロン含量との関係

細胞から比較的好い条件下で DNA を分離し,超遠心法でその分子量を測定すると DNA の切断を検出することができる。この際,分離した DNA に S_1 ヌクレアーゼを作用させるとある種の DNA 損傷 (S_1 ヌクレアーゼ感受性部位)を定量できる。また,分離した DNA をテンプレートとして Klenow 酵素存在下で DNA ポリメラーゼ反応を行ない, $[^3H]$ dTTP のとりこみをみると, DNA 分子上の $3'OH$ 末端の数を測定できる。幼若マウスと老齢マウスの脳から分離した DNA について,上記2つの測定を行なった結果,加齢にもなって脳細胞に DNA 損傷が蓄積するという結果はえられなかった。また,放射線によって脳細胞 DNA 上に生じた切断の修復をいろいろな方法で検討したが,個体の加齢によって鎖切断の修復,たとえば生じた $3'OH$ 末端の減

ガンマー線11000ラド照射後のマウス脳 DNA 上の 3'OH 末端数 (便宜上の単位) の時間的経過。○ 2—3 カ月齢, ● 31カ月齢。

図3 マウス脳における DNA 損傷 (3' OH 末端) の修復

少, には何ら変化がみられなかった (図3). かんたんにはおとろえない (ことを望む) といいたいので
つまり, からだは年とともにおとろえても, 脳はそう です。

シンポジウムを終えて

江 上 信 雄

老化に関する基礎的な研究といっても、とり上げるべき課題は広く、アプローチの方法も多様である。たとえば老化は単に個体としておこるだけの問題ではなく、社会としての老化の問題も存在し、これについては生態学の立場から基礎的な研究がすすめられている。しかし基礎老化の研究者が最も多く従事している研究は、個体の老化が何故おこるかを解くために、いろいろな臓器や、細胞、さらにはそれらを構成する分子の水準で行なわれる解析的な医・生物学的アプローチである。

ところで個体の老化を支配するものは、遺伝的および環境的要因であろうから、この両方をにらんで、(1) 細胞水準、(2) 簡単なモデル動物を用いた個体水準および(3) 哺乳類、人類の水準でのお話をうかがったわけである。

薬学・理学・医学出身の御三人はそれぞれの御立場で、個性豊かにかつ極めて多くのデータにもとづいてお話し下さった。持時間の少ないためもあるが、内容が盛

り沢山にすぎた感もなきにしもあらずで、御専門を離れた方々に充分御理解いただく事ができたかどうかは自信はないが、少なくとも現在の基礎老化研究の最前線でどんなことが問題になっているかの片鱗は十分に御想像いただけたと感じている。この点最新の、そして質の高い多くのデータを出し、背景を含めて御説明いただいた3人の演者に御礼申し上げる。

(1) 人間にみられる複雑な老化現象を、バラバラにした細胞や目にも見えない程微少な下等動物を使って研究して何程の役に立つかという疑問、(2) 生物体にとって有害な物質や放射線など寿命を縮める要因の存在はわかるが、長寿をもたらす秘薬はあるのかないのかという質問、(3) 高齢化社会を目前にして一体基礎老化の研究はどう役に立つのか(具体的に)という攻撃などに対し、直接的なお答えにはなり得なかったことについては、オーガナイザーの一人としてちょっぴり反省もし、将来何かの機会に討論してみたい気持ちが残っている。