

〔総 説〕

血液から加齢制御を考える

木 村 修 一

Regulatory Studies of Aging Focusing on Blood Cells

Shuichi KIMURA

It is well-known that the liquid component of blood can be an important marker for assessing health conditions. But the cellular components of blood also convey to us various other information. This paper explains the knowledge obtained from the author's experiments examining blood cells, and how this knowledge elucidates regulational functions of aging.

For example, from the facts that: 1. the life span of germfree mice was longer than that of conventional mice, 2. the life span of normal mice with restricted diet (60%) was longer than that of non-restricted normal mice, and that, as the author's experiment revealed, 3. the length and life of their small intestinal epithelial cells were also greater than those of each control group, the author surmises that small intestinal epithelial cells might be a marker for detecting the situation of the regulation of aging. Experiments designed to measure the life span of red blood cells lead the author to find that the number of T-cells in mice on restricted diets increased and immune responses were accelerated. And finally, the author explains experiments examining platelets of laboratory mice to determine the function of EPA (Eicosapentaenoic acid) in the blood coagulation system.

Key words: *germfree mouse* (無菌マウス), *conventional mouse* (普通マウス), *dietary restriction* (食餌制限), *red blood cell* (赤血球), *lymphocytic cell* (リンパ球), *platelet* (血小板), *EPA* (エイコサペンタエン酸), *small intestinal epithelial cell* (小腸上皮細胞)

はじめに：

栄養による加齢制御の研究に、血液中の血漿成分が重要なマーカーを提供していることは言うまでもない。加齢による様々な機能低下はこれらの分析によって知ることが多い、血漿中コレステロールの上昇あるいは血清アルブミンの低下などがそうである。しかし、血液は血漿と細胞からなりたっており、液成分からの情報だけでなく、赤血球やリンパ球などの血液中細胞からの情報も重要な要素である。血液の血漿成分とは異なる重要な知見が得られるからである。加齢に関する栄養学の基礎的研究には実験動物を用いることが多い。これまでのこの領域の研究の歴史から、実験動物で寿命を延ばすことが確実に再現できる方法として認められていることが二つある。その一つは実験動物の無菌化である。アメリカの Gordon ら⁽¹⁾は 1960 年代に、帝王切開で取り出して、腸内細菌を含むあらゆる

微生物を取り除いた無菌マウス (germfree mouse) を作出した。この無菌動物を用いて加齢に関する研究も行っており、無菌動物の寿命は通常のマウス (conventional mouse) よりも長く、1.5 倍も長生きすることを示した。興味があるのは、哺乳動物では雌は雄よりも長生きすることが一般的であるが、無菌動物では、これとは全く逆で、雄のほうが雌よりも長生きであることを示したことである (図1)。

もう一つの寿命を延ばす条件は制限食である。これには、多くの研究があり、何パーセント制限にすればよいかを検討されてきた。人間でも「腹八分は長生き」と言われているが、マウスでは40%の制限、すなわち自由食条件で摂食した60%を与える方法が採用されている。Bergら⁽²⁾の研究も60%に制限した実験であるが、その結果を見ると、制限食のマウスは自由食のマウスに比較して、雄では20%、雌では30%寿命が延びている (表1)。著者は、この二つの方法を用いて研究を行ってきたが、個体の寿命を延ばす制限食が小腸上皮細胞の寿命を延ばすことを見出し、個体の寿命とその体細胞の寿命が密接に関連していることを示した。そこで、体細胞ではない赤血球細胞の寿命を測ったところ、赤血球ではむしろ寿命は短縮し、赤血球は小型化し、数が増え、省力型で酸素を運ぶ能力が強いことが分かった。そこで、血球の一つで、免疫担当細胞でもあるリンパ球が、制限食でどのような変化が起こるのか、について検討した結果、T-リンパ球の数を増やし、活性も上昇させること

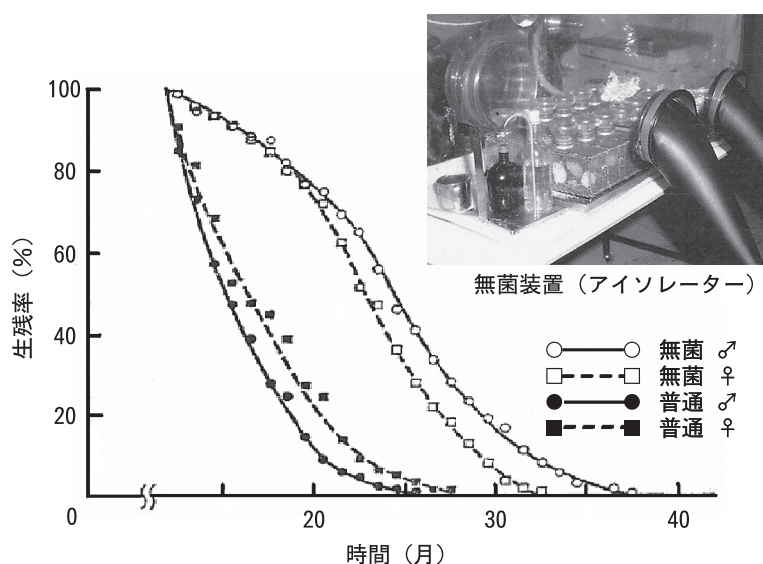


図1. 普通マウスおよび無菌マウスの自然死 (Gordon et al., 1966)

表1. 制限食の影響 (Berg et al., 1960)

白ネズミ		自由食	制限食
体 重	♂	400 g	260 g
	♀	260 g	163 g
寿 命	♂	800 日	1,000 日
	♀	1,000 日	1,300 日
血管・腎などの障害 (800 日齢で)	♂	100%	24%
	♀	60%	0%
腫瘍発生 (800 日齢で)	♂	58%	26%
	♀	41%	12%

が分かった。さらに化学発癌に対してもこれを抑制することを示した。さて、適度の血液凝固は必要であるが、強すぎれば血栓の原因となることはよく知られている。血小板も一つの血液中細胞であるが、この凝固反応を抑制する ω -3 脂肪酸の意義についても言及した。

以上、血液を介して行われた加齢制御に関する研究から得られた知見について小さな概説を行った。

(1) 小腸上皮細胞の寿命と個体の寿命との関連

動物個体の寿命が延びた場合、この動物を構成している体細胞の寿命はどうなるか、という疑問は、単純ではあるが、個体の寿命と生体を構成する体細胞の寿命との関係を知る上で重要な問題である。無菌動物研究ではアメリカのノートルダム大学の松沢ら⁽³⁾の報告はこの領域で、先駆的なものである。すなわち寿命が長くなることが分かっている無菌動物の小腸の表面にある上皮細胞（絨毛の表面に一層に並ぶ細胞群）の寿命が、普通の動物のそれと比較して約2倍ほどに延長することを示したのである。著者ら⁽⁴⁾は、早速この報告の実験方法を参考にして、無菌動物を用いた研究を行い、無菌マウスで明らかに小腸上皮細胞の寿命が延びることを再現することができた。ここに、無菌マウスと普通マウスの絨毛の顕微鏡写真を示すが、無菌マウスでは絨毛が細く長いことが分かる（図2）。小腸上皮細胞が生まれるのは絨毛と絨毛の間の谷間部分にある陰窩（crypt）と呼ばれる部分に存在する幹細胞（stem cell）からである。生まれた細胞は絨毛上皮の一番下に入り込むので、つぎつぎと生まれてくる新たな細胞に押し上げられていく。先に生まれた細胞は次第に上部に押し上げられ先端部分に移動し、最先端まで押し上げられた細胞はついにはアポトーシスにより死滅して一生を終る。マウス個体の寿命に比べて、小腸上皮細胞の寿命がわずか2~3日と短いことから、この方法を用いて個体の寿命を延ばすことのできる制限食においても同じような結果が出る可能性を確かめる実験を試みた。方法としては、新しい細胞ができるときにDNAの合成が先行するが、このDNAの合成の材料となる³H-チミジン（トリチウム・チミジン）という放射性同位元素をマウスに注射すれば、これが新しいDNAに組み込まれる。この放射能でラベルされた細胞の挙動を、顕微鏡切片のラジオオートグラフィーで観察し、上皮細胞の寿命を測定した（図3）。個体の寿命測定は、ラットやマウスを用いたとしても2~3年はかかり、繰り返しの実験ともなれば数年かかる。しかし小腸上皮細胞での寿命の測定は2~3日でできるので、この方法は、加齢に関する研究を迅速に進める一つの有力な手段である。制限食の場合にも、小腸上皮細胞の寿命を延ばすのではないかという予想のもとに行ったものである。

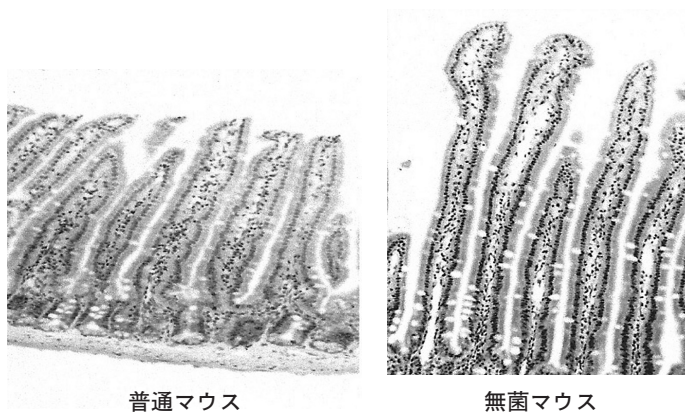


図2. 普通マウスと無菌マウスの小腸微絨毛

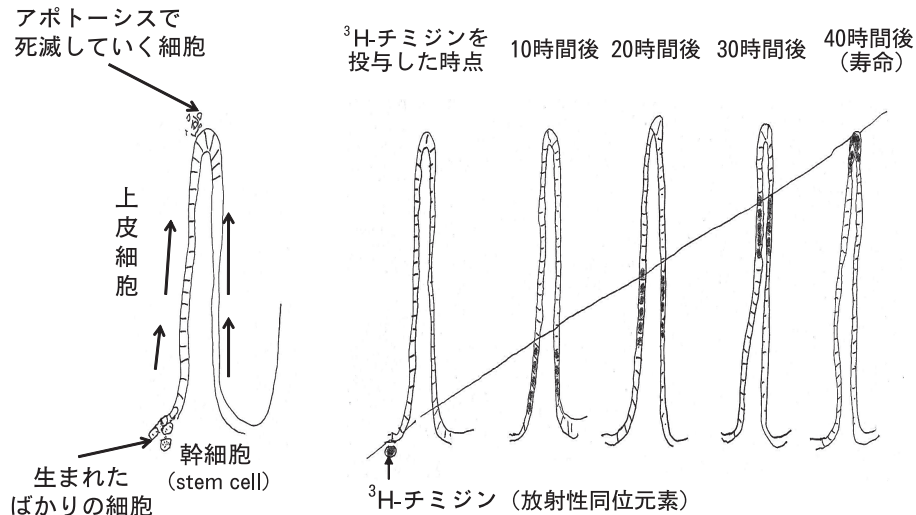


図3. 小腸上皮細胞の寿命の測定法

その結果、制限食の場合でも無菌動物と同様に、明らかに小腸上皮細胞の寿命を延ばすことを初めて証明することができた⁽⁵⁾。つまりこの方法を使えば、短時間で寿命を延ばす栄養条件を見究めることができる可能性が高いことになる。

(2) 赤血球の寿命は制限食でどうなるか？

個体の寿命と個体を形成している体細胞の寿命との関係については、古くから何らかの関係があると考えられていたが、上に述べた著者らの実験もこれを強く示唆する結果となった。これを決定的なものにしたのがアメリカのウイスター研究所の Hayflick 博士である。彼は生命維持に欠かせない活動である体細胞分裂の回数は無限ではなく、ヒトの場合 60 回位しか起こらないことを示し、この回数を越えると、その後体細胞は死滅することを証明したのである⁽⁶⁾。胎児の心臓からとった細胞をシャーレで培養すると、50~60 回ほど分裂すると、もはや分裂ができず、細胞の形も変形してきて死滅するのである。体細胞に分裂回数に限りがあることを示したことは重要な発見である。さらに寿命の長い動物ほど、この回数が多いことも分かってきた。現在ではこのメカニズムとして染色体の末端にあるテロメアと呼ばれる DNA 鎖が短くなることで説明されている。この鎖がなくなると死滅するというテロメア説が確立され、癌細胞はテロメアを延ばす酵素を持っているために死なないことも分かり、これを阻害すれば癌の制圧が可能かもしれないことなどが期待され、興味ある研究が進められている⁽⁷⁾。

著者らは、ついで個体の寿命を延ばす制限食の影響を、小腸上皮細胞以外の細胞で検討することにした。選んだのは赤血球である。赤血球は1個の細胞として生理的機能を果たしているので、体細胞とは言えないが、体にあまり侵襲を与えずに生体の状態に関する情報を出してくれる細胞として利用できると思ったからである。赤血球の寿命はヒトで 120 日位と言われている。したがって、ある時点で血液を採取すると、その中にある赤血球は生まれたばかりの新鮮な若いものから 120 日前に生まれたよぼよぼの老赤血球までの新旧混合の赤血球ということになる。著者らが行った、若ラットと老ラットの赤血球の低張食塩水に対する抵抗性を比較した成績を表 2 に示す。月齢 2 ヶ月、6 ヶ月、20 ヶ月のラットから採取した血液を用いて、食塩水濃度の濃いものから薄いものまで準備して溶血率を求

めてみた。加齢に伴い低張食塩水に対する抵抗が低下していることが分かる⁽⁸⁾。ここには載せないが酸化ストレスに対する抵抗性も測定したがほぼ同様の結果であった。

著者らが行った方法を次に示した。若い個体の血液中にも若赤血球と老赤血球があり，老いた個体にも若赤血球と老赤血球があるので，これらを選り分ける必要がある。まず採取した新旧の赤血球を若いものと老いたものに分ける方法として，赤血球の比重が老若で異なることを利用するというのがある。つまり，若い赤血球ほど軽く，老いてくると重くなる。そこで遠心分離器を用いて分けることにした(図4)。また，赤血球のヘモグロビンは鉄を含んだポリフィリン化合物であり，マウスに放射性鉄(⁵⁹Fe)を注射すれば，それ以後生まれる赤血球には放射性鉄が入るので赤血球は放射性鉄によ

表 2. 老若動物から得られた赤血球の低張食塩水に対する抵抗性

食塩水濃度 (%)	月齢	溶血度*		
		2ヶ月	6ヶ月	20ヶ月
0.30		100.0	109.1	105.7
0.38		93.0	106.1	98.5
0.46		48.4	86.9	83.9
0.50		22.2	70.7	86.6
0.54		5.6	33.3	66.4
0.58		0.0	11.6	24.8
0.62		0.0	6.1	24.2
0.66		0.0	0.8	32.1

* 溶血度は蒸留水溶血を 100 としてそれに対する%で表わす

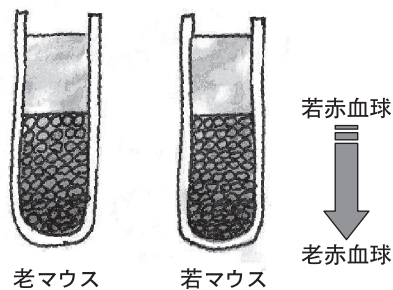


図 4. 遠心分離による老若赤血球の分離

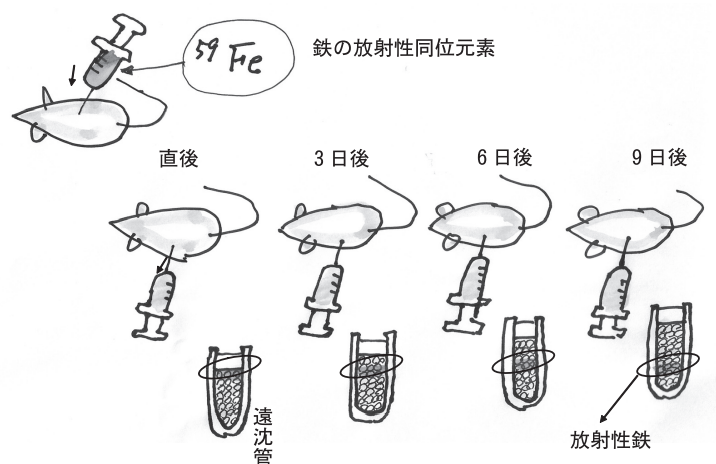


図 5. 赤血球の寿命を測る方法

ってラベルがされることになる。遠心分離器による老と若の分離と鉄の放射性能同位元素によるラベルという方法を組み合わせることにより、赤血球の寿命を測定することにした(図5)。すなわち、ある時点でマウスに放射性鉄を与え、その後経時的にマウスから血液を採取して遠心分離すれば、最初は血球層の最上部に放射活性が検出され、時間を追って下層に移動するはずである。最初は中層や下層には放射活性はないはずである。時間を追って、遠心分離層の上層、中層、下層の放射能を測れば、放射活性を持つ層は次第に下に移動する。上層と下層の放射活性が交差する点が赤血球の寿命の半数であるから、その数値の倍数が求める寿命となる。この結果が図6⁽⁸⁾である。赤血球細胞の寿命の半数は自由食群約18.9日に対して制限食群は約15.4日ということになる。小腸上皮細胞の場合と異なり、自由食群に比して制限食群の方が寿命が短いことが示された。そこで、さらに詳しく検討すると、制限食のマウスから得られた赤血球は形が小さく、数が多いことが分かった。また、ヘマトクリット値やヘモグロビン値も高いことが示された(表3)。自由食群に比べれば、いわば省エネルギー型の、しかも若い赤血球の集団になっていることが分かった。臓器などの体細胞の幹細胞(stem cell)と異なり、血球を生み出す骨髄の幹細胞の分裂能ははるかに高いものと考えられているが、この実験結果もそれを支持するものとなった。

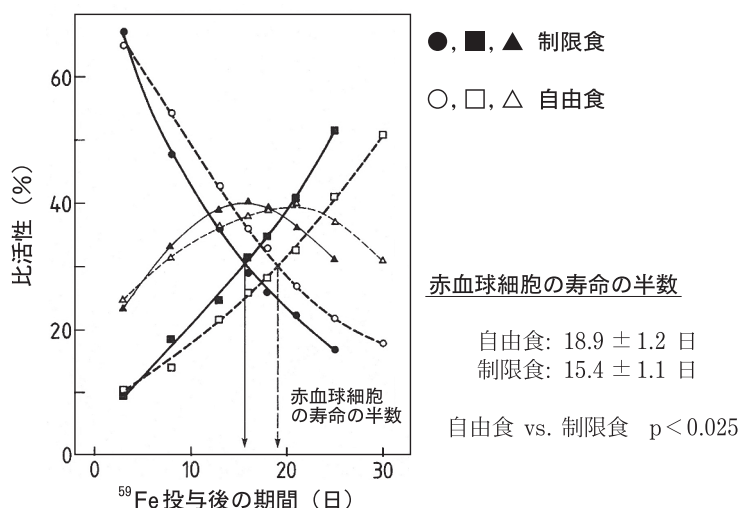


図6. 制限食マウスと自由食マウスにおける⁵⁹Fe投与後の経時的な赤血球細胞分画(上・中・下層)の比放射活性

表3. 制限食における赤血球細胞指標への影響

指 標	自由食	制限食
赤血球細胞数 ($\times 10^6 / \mu\text{l}$)	7.90 \pm 0.24	10.75 \pm 0.12 ^a
ヘマトクリット値 (%)	39.60 \pm 0.61	44.13 \pm 0.21 ^a
ヘモグロビン濃度 (g/100 ml)	13.16 \pm 0.26	14.18 \pm 0.17 ^b
平均赤血球容積 (fl)	50.26 \pm 0.95	41.06 \pm 0.39 ^a
平均赤血球ヘモグロビン量 (pg)	16.72 \pm 0.44	13.19 \pm 0.13 ^a
平均赤血球ヘモグロビン濃度 (%)	33.26 \pm 0.65	32.13 \pm 0.24

値は、マウス6匹の平均 \pm SE。通常食と比較して、^ap < 0.001, ^bp < 0.025

(3) リンパ球（免疫担当細胞）に対する制限食の影響

血液中の細胞の一つ赤血球が制限食で活性化することから、赤血球以外の細胞ではどうなるかに関心を持ち、特に免疫担当細胞を含むリンパ球について制限食の影響を見ることにした。Berg らの実験結果が、制限食により個体の寿命が延びるだけでなく、癌発生率を下げ、動脈硬化を抑制することを示していることは加齢制御を示唆している。そこで免疫担当細胞に与える制限食の影響を検討することにした。これまでと同様の 40% の制限を課し、C3H/He マウスを 8 週間飼育して、免疫担当細胞（リンパ球）の数と活性を測定⁽⁹⁾した。その結果、コントロールの自由食群と比較して、明らかに脾臓の Thy1.2⁺T 細胞、Ly1⁺、L3T4⁺T 細胞の増加が見られた。Ly2⁺ では変化がなかった（図 7）。またアロ抗原や IL-2 に対する免疫応答も高く、免疫活性の上昇が示され⁽¹⁰⁾免疫能を亢進することを確認することができた。そこで、化学物質による癌の発症に対する影響を検討した。すなわち、発癌物質であるメチルコラントレンによる化学発癌実験を行った。その結果、癌の発生が遅れ（図 8）、発生した癌の生育をも抑制することが観察された（図 9）。このときの末梢血の免疫能を測定してみると、明らかに制限食で増強されていることが示された（図 10）⁽¹¹⁾。制限食が癌の発生を遅らせることはよく知られていたが、それを説明する有力なメカニズムを提供することができた。

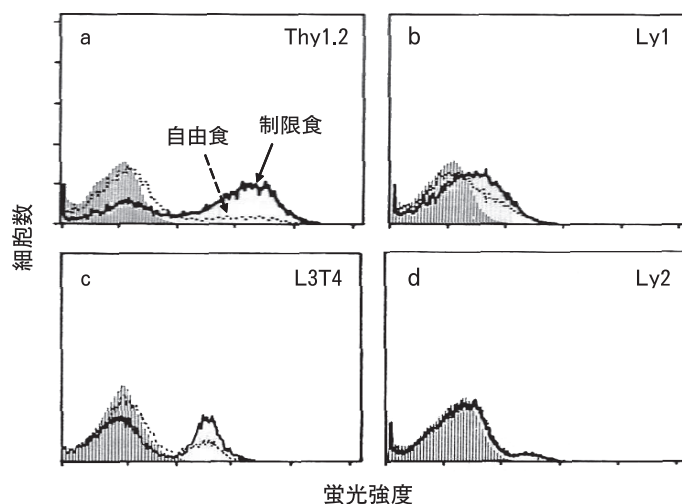


図 7. 制限食による T 細胞の増加

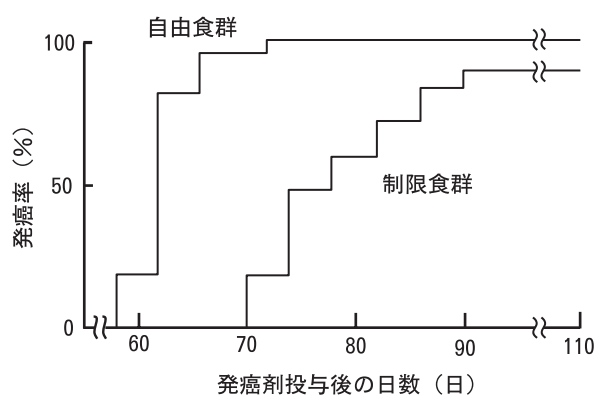


図 8. 発癌剤（メチルコラントレン）投与後の発癌率

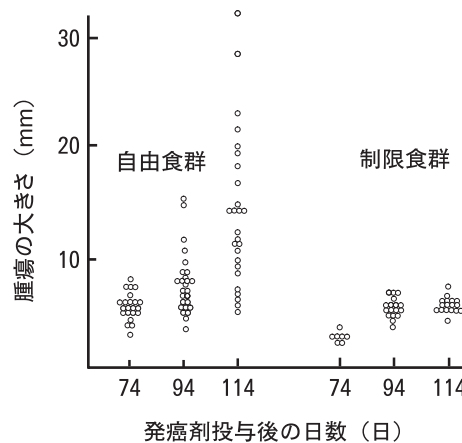


図 9. 発癌剤による腫瘍の増殖の速さ

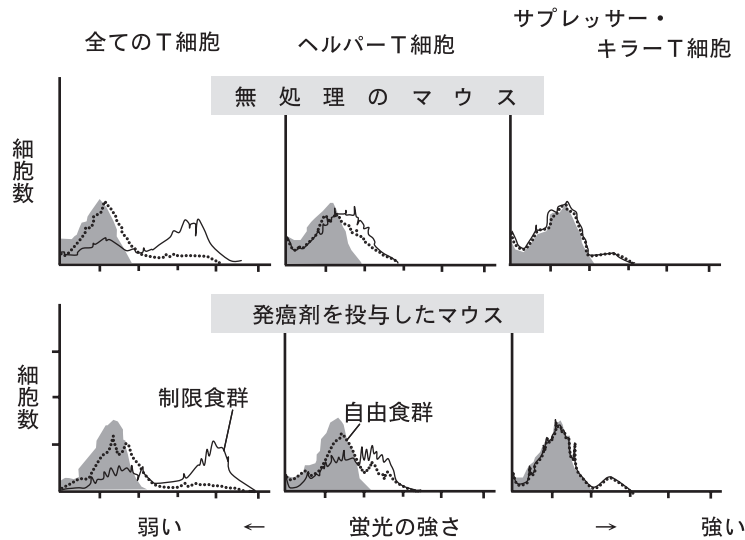


図 10. フローサイトメトリーによる脾臓細胞のパターン

(4) 血小板による血液凝固に対する ω -3 脂肪酸の抑制効果

高齢者の死因としては、癌が第一位であるが、心筋梗塞や脳梗塞など血液凝固と関連する疾患による死亡率も高い。血小板は血液中細胞の一つであり、ヒトの場合血液 1 mm^3 当たり 15 万~40 万個存在しており、その寿命は約 11 日の無核の細胞である。血小板は傷害された血管内皮細胞に接触すると、そこで粘着、凝固反応を起こす。この反応は止血機序にとって重要である。しかし種々の因子によって血液凝固の様相は異なり、血栓の形成にも関与するので、過剰な血液凝固を防ぐ研究が様々な角度からなされている。疫学調査で、エスキモーの人たちが血漿中のトリグリセライド、コレステロール、特に LDL や VLDL が低く、出血すると血が止まりにくいなどの性質があるのは ω -3 脂肪酸の多い水産物の摂取が多いためと考えられている。心疾患が少ないのも同様の理由で考えられている。著者らは ω -3 脂肪酸の一つである Eicosapentaenoic acid (EPA) の血小板による血液凝固反応および血圧などに対する影響を検討した。また、この研究で、食餌組成のなかのタンパク質の差によって応答が著しく異なることを見出した⁽¹²⁾。タンパク質源として動物タンパク質であるカゼインと植物性大豆タンパク質 (soybean protein isolate; SPI) の 2 種類を用い、実験動物としては正常血圧を示す Wistar Kyoto 系ラット (WKY) および遺伝的高血圧・脳卒中ラット (SHR-SP) を用いて行った。その結果、SHR-SP では EPA により血圧抑制効果が見られたが、正常な血圧をもつ WKY では効果は見られなかった。またこの場合、カゼインをタンパク質源とした群では EPA 添加で著明な血圧低下が見られたが、SPI をタンパク質源とした群では、顕著な差が見られなかった。しかし大豆に不足している必須アミノ酸であるメチオニンをこの食餌に添加すると血圧低下の割合が強くなることが見られ、タンパク質の栄養価の高い食餌の場合に血圧低下効果のあることが示された (図 11)。なお、タンパク質源が SPI の場合はカゼインの場合よりも血圧が低く、EPA の効果が低いのはそのせいでもあったと考えられた。また血小板凝集反応では、血圧の場合と異なり、WKY の方が応答が強く、SHR-SP では弱かった。しかしいずれの場合においてもカゼイン食群のほうが SPI 食群よりも効果が強く、また SPI 食群にメチオニンを添加した方が効果が強く出ることが示された (図 12, 図 13)。このように食餌中のタンパク質の栄養価が EPA の効果に大きく関与することは、サプリメント

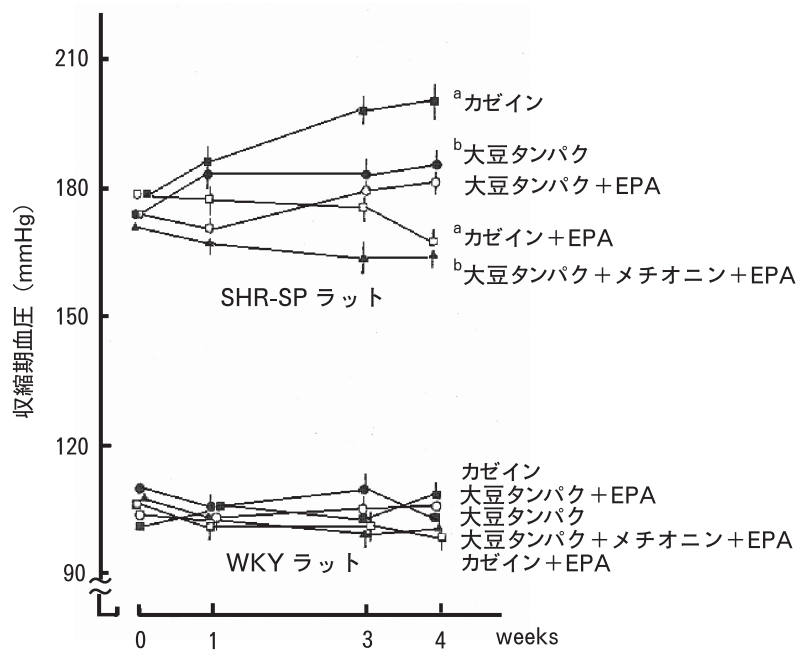


図 11. タンパク質源の違いによる収縮期血圧に及ぼす影響

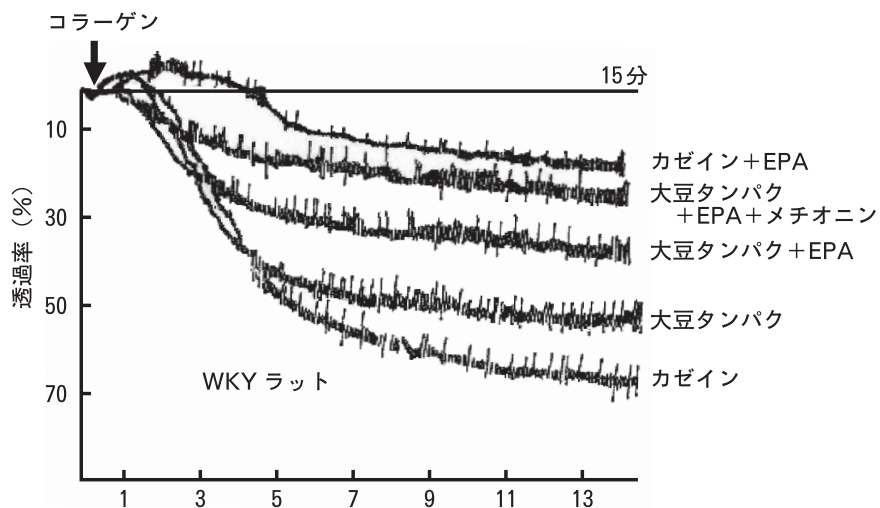


図 12. WKY ラットにおけるタンパク質源の違いによる血小板凝集への影響

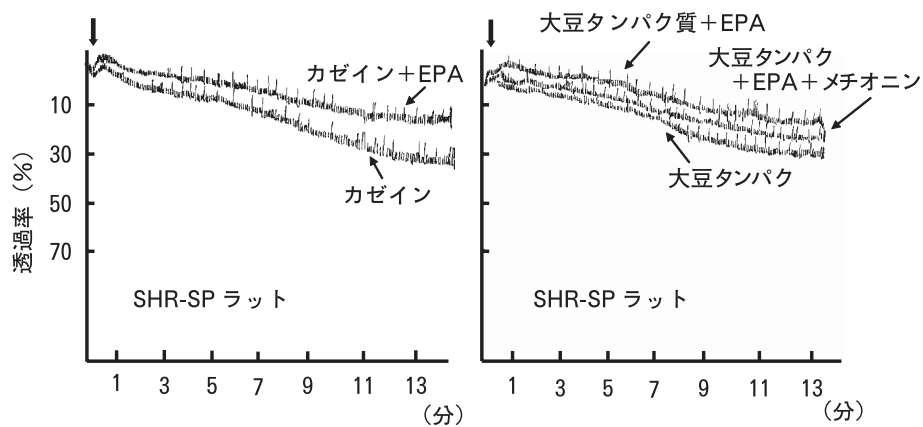


図 13. SHR-SP ラットにおけるタンパク質源の違いによる血小板凝集への影響

トの使用の場合の効果判定には基本食餌，特にタンパク質の内容が大きく影響することを示唆している。

文 献

- (1) Gordon H. A., Bruckner-Kardos M. T. & Wostman B. S.: *J. Gerontol.*, 21, 380 (1966)
- (2) Berg B. N. & Simms H. S.: *Am. J. Physiol.*, 238, E 253 (1960)
- (3) Matsuzawa T. & Wilson R.: *Rad. Res.*, 25, 15 (1965)
- (4) Komai M. & Kimura S.: *J. Nutr. Sci. Vitamonol.*, 25, 213 (1979)
- (5) Komai M. & Kimura S.: *J. Nutr. Sci. Vitamonol.*, 25, 87 (1979)
- (6) Hayflick L.: *Exp. Cell Res.*, 37, 614, (1965)
- (7) Allsopp R. C., et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10114 (1992)
- (8) 小山恵子, 木村修一: ビタミン, 42 (5), 271 (1970)
- (9) Hishinuma K. & Kimura S.: *J. Vit. Nutr. Res.*, 59, 406 (1989)
- (10) Hishinuma K., Nishimura T., Konno A. Hashimoto Y. & Kimura S.: *Immunology Letters*, 17, 351 (1988)
- (11) Konno A., Hishinuma K., Hashimoto Y., Kimura S. & Nishimura T.: *Cancer Immunol. Immunother.*, 33, 293 (1991)
- (12) Kimura S., Chiang M. T. & Fujimoto H.: *Monographs on Atherosclerosis*, 16, 26 (1990)

(きむら しゅういち 管理栄養学科)