



C57BL/6J at 63 weeks.

加齢 C57BL/6J マウスを 用いた研究

検討、応用、ならびに成功事例

翻訳：順天堂大学国際教養学部 久原 孝俊

要旨

加齢の研究は、必然的に長期間となり多くの資源を消費するため、用意周到な計画が必要となる。研究のタイムラインを短縮し、過剰な資源の準備を軽減できるよう、ジャクソン研究所（JAX®）は、90 週齢までの雌雄の C57BL/6J のコホートを提供している。これらの加齢マウスは、すぐに研究に使用することができる。本稿の目的は、このような加齢マウスを初めて使用する研究者、またはすでにこのような加齢マウスを使用している研究者を支援することであり、加齢表現型のモデルとしてマウスを利用するうえで、即理解可能で有用な資料を提供することである。本稿では、加齢マウスに関して収集されたデータをいかにして最大限解釈することができるかについて概説し、最善の実践法を特定して実行するためのリソースを紹介する。

加齢マウスを用いた研究のタイプ

加齢 C57BL/6J マウスの入手が容易になったことで、様々な研究分野で進展が見られている。

加齢 C57BL/6J マウスの使用により恩恵を得ている研究分野の例を以下に簡単に示す。

- ・マウスの寿命や健康寿命に関する基礎生物学
- ・認知、行動、ならびに睡眠
- ・骨密度、骨粗しょう症、骨減少症
- ・筋肉量、サルコペニア（筋肉減弱症）
- ・代謝
- ・身体組成、食事、運動
- ・心血管疾患
- ・生殖生物学
- ・免疫機能および創傷治癒の加齢に伴う変化
- ・加齢性難聴

雌雄の加齢マウスコホートを入手してすぐに研究に利用できるようになったことで、飼育ケージの維持にまつわる研究室の資源の節約が可能となり、実験結果を早く得られること、さらに不測の日和見感染や不規則な飼育の悪影響によるマウス消失のリスクを軽減できると同時に、実験の再現性を向上させることが可能となった。

雌雄両性のマウスを入手することができるということは、研究は雌雄両性の動物を使用して実施すべきであるという、米国国立保健研究所（NIH）の方針を支持するものである。米国連邦規制当局ならびに製薬企業の基準の大部分において、ヒトにおける反応を予測するためには、雌雄両性のデータが必要であることが規定されている（Clayton and Collins 2014; Bolon *et al.* 2010）。欧州医薬品庁（European Medicines Agency）の医薬品開発における動物実験ガイドラインのなかでも雌雄両性の動物を使用するべきであることが規定されている（<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/quality-design>）。

広範囲に及ぶ研究分野に関連する文献について記載することは、本稿の目的外である。加齢に関する生物学における研究費の申請については、下記の資料を参考にいただきたい。

The National Institute on Aging

<https://www.nia.nih.gov/>

American Federation for Aging Research

<https://www.afar.org/research/funding/>

European Medicines Agency Geriatric Medicines

<https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/medicines-older-people>

緒言：加齢（Aging）対老化（Senescence）

加齢は、さまざまな健康への悪影響と強く相関している。たとえば、がん、心臓病、関節炎、骨粗しょう症、あるいは認知機能低下などに悪影響をおよぼす。「加齢」と「老化」という用語は、ときに同じ意味で使われることがあるものの、それらの意味は異なる。「加齢」とは、広い意味においては、乳児期、小児期、青年期の発達段階から人生のもっと後の段階において起こる変化まで、生涯を通じて起こるあらゆる生物学的変化を意味する。「老化」とは、筋肉の萎縮、閉経、聴力 / 視力の低下、白髪、あるいは皮膚の弾力の喪失など、進行性で時間に依存し、高齢者に特徴的に起こる正常な障害を意味する。加齢にともなう変化のなかには、病原因子（たとえば、感染、重度のストレス、遺伝的素因など）との相互作用によって、異常な機能障害または加齢性疾患をひき起こすものもある。寿命の基礎をつくっている生物学的メカニズムの解明のみならず、健康寿命を延伸させるメカニズムへの注目がますます高まっている。健康寿命とは、生涯において健康であり、重篤な疾病や慢性疾患にそれほどかかっていない期間をいう。これらの意味論的なニュアンスは、仮説を立てたり、実験計画を立案したり、あるいは実験結果を解釈したりする場合にきわめて重要になる場合がある（Flurkey, Curren, and Harrison 2007）。

マウスはいつ「老齢」になるのか？ マウスとヒトの生涯の比較

ジャクソン研究所（JAX®）のテクニカルサイエンティフィックスタッフがよく受ける質問に次のようなものがある：

「マウスはいつ『老齢』になると考えられるのですか？」

図1は、マウスの生涯がどのようにヒトの生涯と対応しているかを示している。このデータは、ジャクソン研究所の研究メンバーである David Harrison 博士および彼の研究チームの研究にもとづいている（Flurkey, Curren, and Harrison, 2007）。このデータは、C57BL/6J マウスの雄 150 匹および雌 150 匹のコホートをを用い、生涯の段階を、成熟した個体、中間年齢の個体、ならびに老年の個体の3つの段階に分けて得られた。

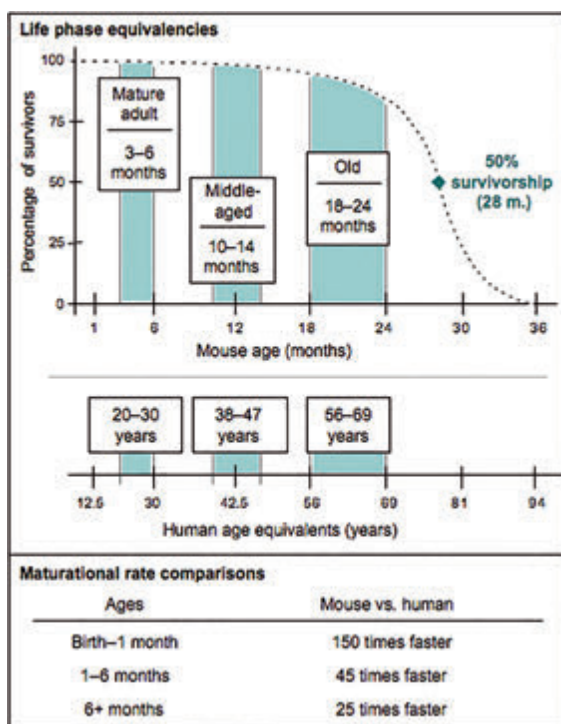


図1

C57BL/6J マウスの生涯の典型的な年齢段階：ヒトとの比較。（Flurkey, Curren, and Harrison, 2007. 「医学生物学研究におけるマウス」(James G. Fox 編；米国実験動物医学協会シリーズ、Elsevier, AP：アムステルダム；ボストン) 図 20-3 を改変。）

成熟マウス：3-6 か月齢

成熟個体群は、発達段階はすでに過ぎていているものの老化の影響をまだ受けていないため、加齢にともなう変化を調べる上での、年齢変化の参照群（対照群）として使用した。マウスは、およそ 35 日齢ころに性成熟に達するが、3 か月齢ころまでは、急速な成長がつづく。成熟マウス個体は、少なくとも 3 か月齢であると定義される。成熟個体の上限月齢は、およそ 6 か月齢である。マウスは、この月齢（6 か月齢）を過ぎると、加齢性変化を示すと考えられる。たとえば、一般的に、マウスは 6 か月齢から 8 か月齢ころに一腹の産子数が減少してくるので、繁殖コロニーから排除

される。より長期安定なバイオマーカー（生物指標化合物）を使用した場合には、6 か月齢以上のマウスを成熟個体群に含めることを正当化する可能性がある。バイオマーカーの生物学的変化やシステムなどを調べることによって、そのような選択をするための情報を提供することができる。

中間年齢マウス：10-14 か月齢

中間年齢個体群においては、全てではないが一部の加齢バイオマーカーにおいて老齢性変化がみられる。中間年齢個体群を使用することによって、加齢性の変化が進行性であるものなのか、あるいは加齢性の変化が老齢になって初めてみられるものなのかを決定することができる。マウスを中間年齢個体群に含めるためには、少なくとも 10 か月齢でなければならない。中間年齢個体群の上限月齢は、およそ 14-15 か月齢である。この月齢（14-15 か月齢）になると、大部分のバイオマーカーが変化している。

老齢マウス：18-24 か月齢（系統によってはそれ以上の月齢）

老齢個体群においては、すべての動物において、そしてほとんどすべてのバイオマーカーにおいて、老齢性変化が検出される。老齢個体群のマウスは、少なくとも 18 か月齢でなければならない。C57BL/6J マウスならびに他の多くの近交系マウスに関して、老齢個体群の上限は、およそ 24 か月齢である。しかし、この上限の月齢は、系統によっては、24 か月齢以上の場合もあり得る。24 か月齢以上のマウスを使用すると、老齢性変化が疾病によるものか、あるいは老化によるものかを区別するのが困難になることがある。なぜなら、疾病がバイオマーカーに影響をおよぼし、その結果、誤解を招くような実験結果を生み出すことがあるからだ。老化は、加齢にともなって、生物体内で自然におこる特徴的な変化をひき起こす。たとえば、成長因子の分泌増加や炎症性サイトカインの産生などである。老化は避けられないものであり、集団のすべての個体に起こる。しかし、病気は異常な障害とみなされ、集団の一部分にのみ影響を及ぼす。加齢によって影響を受ける多くのバイオマーカーは、病気によっても影響を受けることがある。C57BL/6J マウスでは、免疫応答を大幅に低下させる可能性のある転移性のリンパ系腫瘍が頻繁に発症する。しかし、健常な C57BL/6J マウスも、加齢とともにナイーブ T 細胞集団が減少し、免疫応答が低下することが知られている（Yuom *et al.*, 2016）。老齢個体群では、データを正確に解釈するためには、剖検や病理学的評価が必須になる。

加齢の研究においては、「十分に老いた」とされる特定の齢はない。研究に適した齢を決定するためには、調べようとしている特定のシステムが、老化による特徴的な変化をいつ示し始めるかを知ることが必要である（Flurkey *et al.*, 2007）。加齢のプロセスならびに生命の段階を理解する上で重要なのは、加齢のバイオマーカーを同定することである。本稿の範囲外であるが、生命の段階を調べるために、どのバイオマーカーを含めるかの考慮には注意を払わなければならない（Wagner *et al.*, 2016; Galkin *et al.*, 2020）。加齢性疾患の治療に関するバイオマーカーについて考慮する際には、バイオマーカーはヒトへの橋渡しが可能で、かつ臨床的に関連している必要がある。

加齢にともなう「正常な」表現型を理解し定義する

実験結果が異常であるか否かを判断するためには、加齢マウスにおいて何が正常であるかを知らなければならない。何が正常であるかを知るための最善の方法は、適切な人に尋ねること、適切な資料を利用すること、および / または当該実験に適切な対照群を含めることである。適切な対照群とは、研究に関連する変異をもたない、および / または未処置の、同時期に生まれた同腹子や同じ繁殖コロニーの対照動物である。系統、亜系統、および環境条件の変化が、観察される表現型の発症または重症度に影響を及ぼす可能性があることを念頭におくことが重要である。以下は、加齢マウスの表現型情報を得る上で役立つかもしれないいくつかの推奨リソースである。

Mouse Genome Informatics: MGI

Mouse Genome Informatics (MGI) リソース (www.informatics.jax.org) は、マウスの研究を促進するために、統合的な遺伝学的、ゲノム科学的、ならびに生物学的データを 25 年以上にわたって提供してきた (Eppig *et al.*, 2017)。MGI には、C57BL/6J 系統に固有な情報が集積されているのみならず、いくつかの系統特異性に影響を及ぼすことが知られているアレルに関する情報も記載されている。たとえば、C57BL/6J マウスは、Mx1 遺伝子のエクソン 9 から 11 に至る欠失をもち、その結果、ミクソウイルスへの感受性を示す近交系のひとつである。さらに MGI は、最新の遺伝子名ならびにマウスの公式命名法を整備した一元的なリファレンスである。最新の遺伝子名やマウス命名法は、きわめて重要である。なぜなら、「正式なマウス系統名を使用しないことによって、混乱や誤りがひき起こされることがあり、場合によっては、再現性のない科学の原因となりえる。」からである。データを共有し、実験結果のメタ解析をおこなうことが科学研究においてきわめて重要なアプローチになっている現代の科学においては、最新の遺伝子名やマウス公式命名法は、きわめて重要なのである (Sundberg and Schofield, 2010)。

The Mouse Phenome Database

Mouse Phenome Database (<http://phenome.jax.org/>) は、共同作業で作成されたものであり、さまざまなマウス系統に関して、標準的な測定データが集成されている (Maddatu *et al.*, 2012)。C57BL/6J マウスは、正常な病理に関する情報が最も多い系統である。ジャクソン研究所ネイサン・ショック (Nathan Shock) 加齢基礎生物学中核的研究拠点もまた、加齢に特徴的な表現型に関するいくつかのデータセットを Mouse Phenome Database に寄託している。その目的とするところは、加齢現象の遺伝学的解析を促進し、寿命を調節している遺伝子座を発見し、寿命と加齢性疾患感受性との重要な関係を解き明かし、そしてマウスとヒトのあいだにおいて、寿命と加齢に特徴的な表現型に影響を及ぼす共通の遺伝子座を同定することである (Bogue *et al.*, 2016)。このデータベースには、図 2 に C57BL/6J マウスの例が示されているように、さまざまな系統の寿命に関するデータセットが生存曲線とともに掲載されている (Yuan *et al.*, 2007; MPD データセット :Yuan2)。

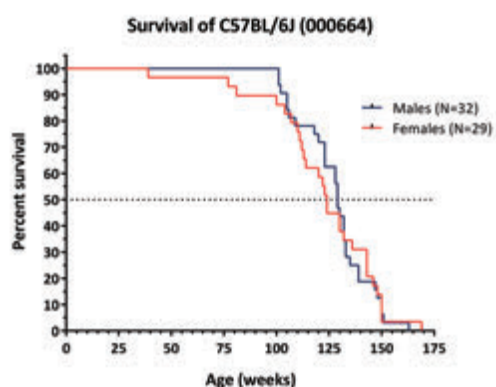


図 2
C57BL/6J マウスの生存曲線。データは、Mouse Phenome Database (Yuan *et al.*, 2007) にて閲覧することができる。ジャクソン研究所ネイサン・ショック (Nathan Shock) 加齢研究センターのデータによる。

症例報告、文献

「正常な」データは、珍しいまたは異常な臨床所見が記述されている症例報告や科学文献の調査データにおいてよくみられる。多くの場合、症例報告においては、対照データとして、正常な基準値の範囲が示されている。たとえば、「C57BL/6J マウスの一般的な加齢関連健康状態」において下記のように記述されている症例発表の対照データとして提示されている。そのような「正常な基準値の範囲」は、一般的な指標としてのみ利用すべきである。「正常」を決定するための理想的な対照動物は、同一の飼育室内において飼育されている同性かつ同週齢 / 同月齢の同腹子である。これにより研究者は、例えば、実験処置による効果と環境因子の影響によってひき起こされる障害とを区別することができるのである。

販売業者が提供する特性評価データ

ジャクソン研究所の C57BL/6J マウスの表現型データは、本稿だけでなく、ジャクソン研究所の「Aged B6」系統データシート (<https://www.jax.org/jax-mice-and-services/find-and-order-jax-mice/most-popular-jax-mice-strains/aged-b6>) にも掲載されている。

図 3 に、老齢マウスの外観がいかに若齢マウスの外観と異なるかを示す。被毛は、加齢にともなって、薄くなり、そして灰色や茶褐色になることがある。さらに、高齢の C57BL/6J マウスにおいては、脱毛が珍しくない。脱毛は、自身または同種他個体による過剰な毛づくろい（「バーバリング (barbering)」とよばれる）によるものであると考えられている。バーバリングは、マウスにおける正常な社会的行動のひとつであるものの、ときには、それがきわめて広範囲に及び、著しく目立つ外観を呈することがある。バーバリングによって、鼻口部の触毛（洞毛）が抜けることもある。

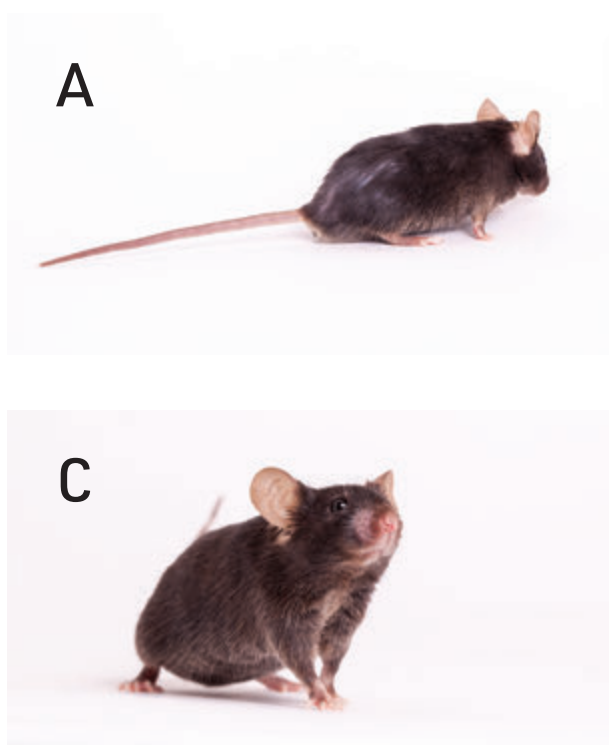


図 3

高齢 C57BL/6J マウスの正常な外観には、被毛や触毛の変化が含まれる。A. 背部・尾部の脱毛または薄毛ならびに灰色の被毛がみられる高齢 C57BL/6J マウス。B. 眼周囲の脱毛および同種他個体によるバーバリングの徴候がみられる高齢 C57BL/6J マウス。これは、同じケージ内の他個体が鼻口部の一部の被毛と触毛（洞毛）を抜いたことによる。C. 鼻口部をバーバリングされた痕跡を示す高齢 C57BL/6J マウス。

さらなるデータは、上述の「AgedB6」系統データシート「Phenotype Information」のセクションからダウンロードすることができる。たとえば、次のようなデータである。

臓器重量

血液学

骨ミネラル濃度：二重エネルギー X 線吸収測定法（DEXA または DXA）による

血清生化学プロファイル

フローサイトメトリー解析

病理組織学

あらゆる加齢研究において、必須かつ最善の実践指南は、資格と経験を有するスタッフが病理学的評価をおこなうことである。このことは、いくら強調しても強調しすぎることではない (Ward, 2002; Schofield *et al.*, 2009; Treuting *et al.*, 2016; Ladiges *et al.*, 2013)。高齢マウスを使用する実験を計画したり、実施したり、あるいは実験結果を評価したりする際に、病理学の専門家がいないと、誤った結論が導かれることになる。このことは、インパクトファクターの高い学術雑誌においてさえみられる誤りである (Ward, Schofield, and Sundberg, 2017)。加齢研究においては、適切な病理学専門家の支援を受けることによって、ヒトへの橋渡し効率、研究の正確性、ならびに研究の再現性を最大化させることができるのである (Brayton, Treuting, and Ward 2012; Bolon *et al.*, 2008; Bronson and Lipman 1993)。

3-4 か月齢の雌雄 C57BL/6J マウスは、文献「比較解剖学・比較組織学：マウスとヒトのアトラス」(Treuting, Dintzis, *et al.*, 2012) のなかで基準系統となっている。この文献には、すべての臓器系の正常な肉眼所見および組織学的所見、ならびに表現型解析や解剖図のような特別なトピックなども掲載されている。さらに、それぞれの章には、参考文献リストも掲載されている。マウス専門の獣医病理学者たちは、ときおり、総説や資料のリストを公表している (Sellers, 2017, 2012; Bolon *et al.*, 2012; Sundberg, Ward, and Schofield, 2009; Barthold, 2002; Sellers *et al.*, 2012; Sellers and Ward, 2012; Treuting, Clifford, *et al.*, 2012)。このような資料は、初めてマウスを使った研究をおこなう人々、あるいは経験はあるが復習を試みるマウス研究者たちにとってきわめて有用な資料となるであろう。

高齢 C57BL/6J マウスにおける正常なばらつき

近交系は、ゲノムのほぼすべての遺伝子座において同一であると考えられているものの、このことは、表現型が同一であることを意味するわけではない。バリア環境で飼育条件が安定している同腹子や同一コロニー内の、出生日が同じマウスであっても、C57BL/6J マウスは、集団内でさまざまな表現型を示すことがある。

高齢マウスでは、変動を示す目に見える表現型がたくさんある。これには、白髪と脱毛の程度 (図 3 参照)、エネルギーレベル、姿勢、および代謝パラメーターの違いなどが含まれる。たとえば、ジャクソン研究所においては、C57BL/6J マウスの高齢コロニーは体重のばらつきがきわめて大きく、さらに加齢が進むにつれてこの変動は拡大する (図 4)。体重の変動に加えて、体脂肪含有量、T 細胞の構成 (Youm *et al.*, 2016) など、他の表現型においても個体差がみられる。これらの表現型の違いは、高齢コホートにおいては正常なものであり、かつ予期されるものであることに注意することが肝要である。

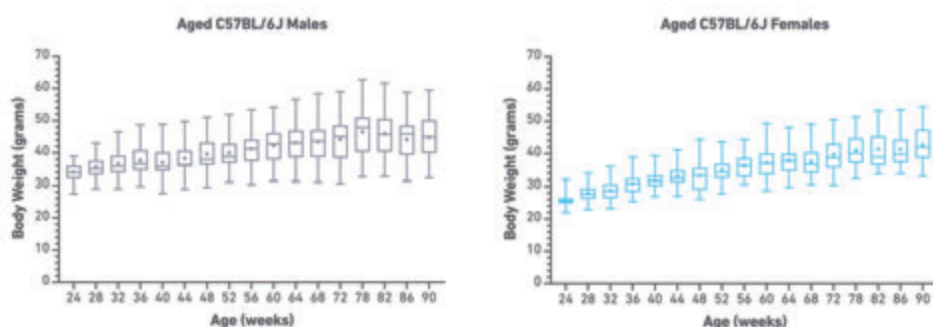


図 4

加齢にともなって体重と体重の変動が増加する。30 匹の雄と 30 匹の雌の C57BL/6J マウスのグループに自由に飼料を与え (LabDiet® 5K52 配合、6% 脂質)、体重を毎月 1 回測定した。□は 25-75 百分位数を示す。水平の線は中央値の体重を示し、+ は平均体重を示す。上下の縦線は、最大と最小の体重の範囲を示している。

性的二型

若齢マウスと同様に、高齢マウスにも性的二型の特徴がある。国際マウス表現型コンソーシアム（International Mouse Phenotyping Consortium: IMPC）のデータによると、2,000 以上のノックアウトマウス系統、14,000 以上の野生型マウス、ならびに 40,000 以上の変異（ミュータント）マウスにおいて、多くの表現型が性別による影響を受けることが示されている（Karp *et al.*, 2017; Kollmus *et al.*, 2020）。重要なことには、性的二型の特徴は複数のセンターにおいて再現性があり、性的二型の特徴のうち反対の効果を示すのが 10% 未満であることがわかった。たとえば、高齢の雄 C57BL/6J マウスは、高齢の雌 C57BL/6J マウスにくらべ、より顕著な進行性の耐糖能異常を示す（図 5）。性的二型が存在し、検討するマウスの表現型や齢によって性的二型が異なる可能性があることを理解することが肝要である。

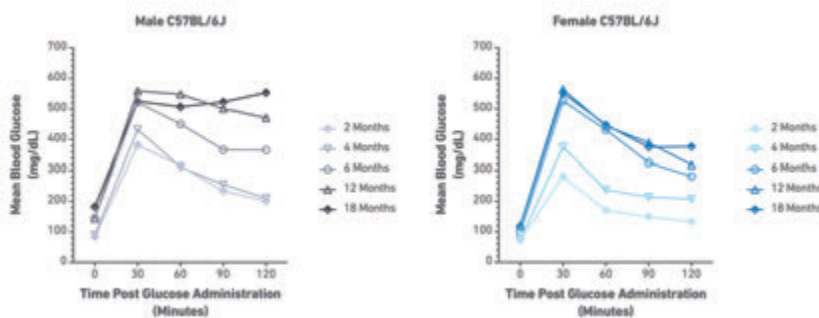


図 4

C57BL/6J マウスにおける耐糖能異常。C57BL/6J マウスは、6 か月という若齢において耐糖能異常を示し、加齢とともに悪化した。雄マウスは、雌マウスにくらべ、耐糖能障害の程度がより強かった。マウスを 16 時間絶食させた後、2g/kg のグルコースを腹腔内に投与した。1 群の匹数は、2 か月および 4 か月では各 10 匹、6 か月、12 か月、18 か月では各 20 匹である。

環境要因が表現型に及ぼす影響

環境要因は、正常なマウスにおける表現型の変動をひき起こす原因としてきわめて重要であるが、時には忘れられがちである。環境要因が表現型に及ぼす潜在的な影響は、動物がはるかに長い期間環境に曝されるため、非加齢関連の研究に比べ加齢関連の研究においてより顕著にみられる。

表 1 は、特定の環境条件が特定の表現型パラメーターにどのように影響を与えるのかについての総説をまとめたものである。それぞれの項目に関する参考文献については、原著を参照していただきたい（Brayton, Treuting, and Ward, 2012）。加齢およびその他の研究において、表現型の変動を導入する環境要因には、飼料、エンリッチメントの有無とエンリッチメントのタイプ、取り扱い、飼育ケージの種類と飼育密度、健康状態、ならびにその他の飼育方法などが含まれる（Treuting, Clifford, *et al.*, 2012; Sellers, 2012; Brayton, Treuting, and Ward, 2012）。

この総説において強調されている重要な要素は、飼料が表現型に及ぼす影響である。さらなる研究により、実験的に誘導したカロリー制限が、体重を減少させ生存率を高めることが示された（Turturro, *et al.*, 2002; Mitchell, *et al.*, 2023）。非実験的な給餌条件下においても、「通常」のげっ歯類用飼料は、カロリー密度、マクロ栄養素の比率、ビタミン、ミネラルの含有量が販売業者によって大きく異なる。通常、若齢動物を維持するために使用される飼料が（どの程度うまくいくかは不明ながらも）高齢の動物も維持すると考えられている（Lee *et al.*, 2023）。ジャクソン研究所においては、すべての C57BL/6J マウスならびに他のほとんどのマウスコロニーが、LabDiet® 5K52 配合のパレット型、オートクレーブ可能な 6% 脂質飼料を自由摂取している（www.labdiet.com）。飼料の影響は大きいので、加齢研究における再現性を確保するためには、飼料と給餌プロトコルの詳細な報告がきわめて重要である（Lee *et al.*, 2023）。

研究者が自身の施設において、さまざまな実験パラダイムがどのように機能するかを理解し、英国 3Rs 研究センター (NC3Rs) が作成した「ARRIVE ガイドライン」に従って結果を報告することが重要である。このガイドラインは、動物実験の結果を報告する際の完全性、正確性、透明性において、専門的な最善の実践として推奨されている (Baker *et al.*, 2014; Kilkenny *et al.*, 2010)。

EXPERIMENTAL CONDITION OR VARIABLE	AFFECTED PARAMETERS
Diet-Additives: Fendbendazole, vitamins	Tumors
Diet-Additives: Trimethoprim-sulfamethoxazole	Thyroid function
Diet-Fat/calories	Mammary tumors
Diet-Fat/calories	Atherosclerosis
Diet-Fat/calories	Leukemia
Diet-Fat/calories	Immune responses, bone loss
Diet-Fat + supplement	Alzheimer pathology
Diet restriction	Longevity, tumors, lesion burden
Diet type-Purified AIN-76A vs natural ingredient diet (NIH-07)	Tumors, body weight, etc
Diet type-NIH-07, NTP-2000	Tumors, body weight, survival
Diet type-Hardness, autoclaving	Tumors, body weight, survival
Enrichment	Body weights, organ weights, hematology
Enrichment	Amyloid
Housing-Cage type: suspended, shoebox	Survival
Housing-Bedding	Cancer, drug metabolism
Housing-Bedding or cage type	Urologic syndrome, survival
Housing-Density/grouping	Body composition
Housing-Density/grouping	Cancer and/or chemotherapy response
Housing-Density/grouping and pathogen status	Amyloidosis
Implant-Ear tag	Squamous cell carcinoma
Implant-Transponders	Tumors, proliferative lesions
Infectious agents	Longevity, phenotypes, pathology
Light cycle	Tumor growth
Temperature	Immune function, tumor growth, toxicity

表 1

長期実験において、表現型や実験結果に影響を及ぼした実験変数の例。それぞれの研究に関する参考文献については、原著を参照していただきたい (Brayton, Treuting, and Ward, 2012; PMID: 22215684)。

「正常」な表現型を評価する

「正常」な表現型に関する参照データが必要であることに加え、マウスの表現型を解析するために使われるさまざまなプロトコルや方法に関心が集まることがしばしばある。

ジャクソン研究所 (JAX®) のウェブサイトやその他のいくつかのオンラインデータベースには、プロトコルも掲載されている。たとえば、「Mouse Phenome Database」(<http://phenome.jax.org/>)、「国際マウス表現型解析法標準スクリーン (International Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screens: IMPReSS)」(<https://www.mousephenotype.org/impress>)、および「ジャクソン研究所ネイサン・ショックセンター (The JAX Nathan Shock Center)」(<https://www.agingmice.org/>) などがある。

米国国立老化研究所 (NIA) の資金によって支援されている「老年病理学研究ネットワーク (Geropathology Research Network: GRN)」は、高齢マウスおよび他の前臨床モデルに関する一貫した病理評価に寄与することを目的として2019年に設立された (Snyder *et al.*, 2019)。GRNには、高齢マウス組織の解析プロトコルおよび注釈付きスライド、ならびに加齢モデルにおける一般的な病理学に習熟していない研究者や獣医師向けの教育リソースも含まれている。

公表された文献には、加齢研究に特有の詳細 (Ackert-Bicknell *et al.*, 2015; Bellantuono *et al.*, 2020)、剖検および病理組織学 (Treuting and Snyder, 2015; Schofield, Gruenberger, and Sundberg, 2010; Schofield *et al.*, 2012; Bolon *et al.*, 2008)、または加齢と病理学 (Brayton, Treuting, and Ward, 2012; Snyder, Ward, and Treuting, 2016; Ward, Youssef, and Treuting, 2016) などマウスの表現型評価に関連する豊富な参考文献が含まれている。特定の研究に向けた系統的なアプローチに関する文献もときおり発表される。たとえば、皮膚 (Silva, Kennedy, and Sundberg, 2014)、または乳腺、前立腺、もしくは造血系器官の病理学に関する資料 (Cardiff *et al.*, 2000; Shappell *et al.*, 2004; O'Connell *et al.*, 2015) などである。行動解析のような特殊な研究に関する有用な総説 (たとえば, Sukoff Rizzo and Silverman, 2016) などすべての文献解題を示すことは、本稿の範囲をはるかに越えている。本稿の読者におかれては、計画している研究に関する文献検索を徹底的におこない、そして最善のアウトカムを確かなものにするために、当該研究に最も適した、資格のある専門家の助言を求めることを強く勧める。

C57BL/6J マウスにおける一般的な加齢関連の健康状態

高齢マウスを使う研究者ならびに研究者をサポートする獣医師 / 施設スタッフは、マウスが加齢にともなう通常の続発症として複数の病変を発症することを知っておくべきである。高齢マウスを使った研究に慣れていない獣医スタッフは、高齢マウスにおいてどのような異常がよくみられるのかということに関する、何らかのオリエンテーションを受けるとよいであろう。高齢マウスにおいて異常がみられた場合に、ときおり、それらのマウスが「病気である」と報告されることがあるからだ。しかし、すべての異常がかならずしも、重篤な苦痛をひき起こしたり、命を脅かしたりするわけではない。事前に、獣医スタッフと協働して、予測される健康問題をどのように管理するかについて計画を立てておくことが肝要である。Pettan-Brewer と Treuting は、加齢研究特有の福祉的課題を管理するためのアプローチについて、以下のように記載している。

「加齢研究プログラムを効果的に遂行するためには、研究者、飼育管理者、獣医スタッフ、ならびに動物実験委員会メンバーの協力および教育が必要である。高齢マウスを人道的に維持し、非致死疾患に対して過度の検閲を行うことを防ぐためには、このような共同努力が必要なのである。このような教育のなかには、臨床、剖検や病理組織学的検査において、高齢マウスがどのような状態を示すのかについてよく理解することなども含まれる。このような基礎知識は、人道的エンドポイントを定めたり、健康寿命を同定したり、あるいは死因や介入の効果などを解明したりする際にきわめて重要である。」 (Pettan-Brewer and Treuting, 2011)

ワシントン大学（UW）にて、高齢 C57BL/6J マウスを使用して、独立して実施された研究では、UW 動物実験施設で飼育されている高齢 C57BL/6J マウスコロニーでよくみられた臨床症状が示されている。この高齢マウスコロニーは、16-36 か月齢の雌雄 C57BL/6J マウスで構成されている。これらの高齢 C57BL/6J マウスにおいては、次の4つの臨床症状がよくみられた：1) 直腸脱、2) 脱毛および皮膚炎、3) 眼病変、および4) 触知腫瘍（Pettan-Brewer and Treuting, 2011）。よくみられる皮膚および眼の異常を図6に示す。腫瘍性疾患に関する剖検および病理所見の調査データを表2に示す（表に示すパーセントは、腫瘍性疾患をもつマウスのなかで占める割合である）。非腫瘍性疾患を表3に示す（とくにことわりのないかぎり、表に示すパーセントは、非腫瘍性疾患をもつマウスのなかで占める割合である）。

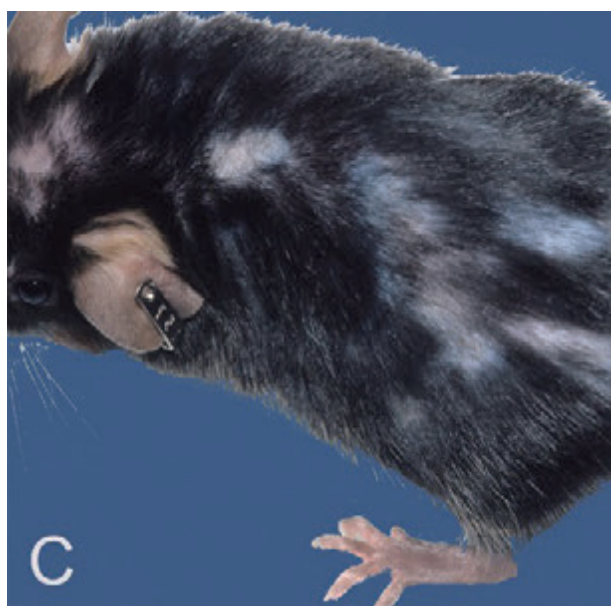
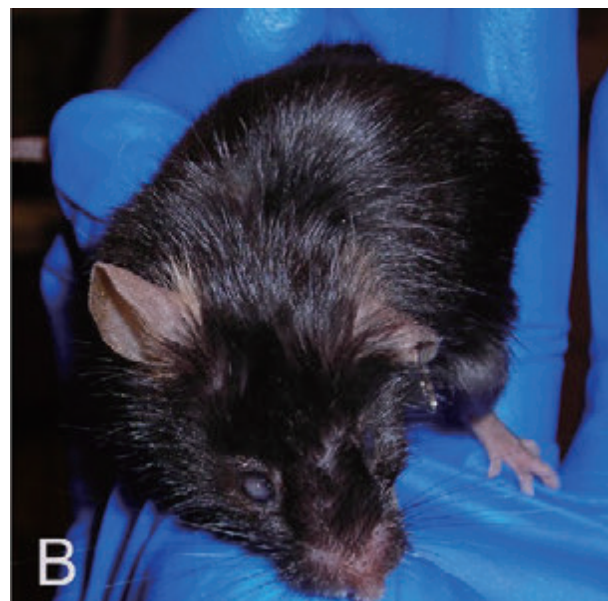
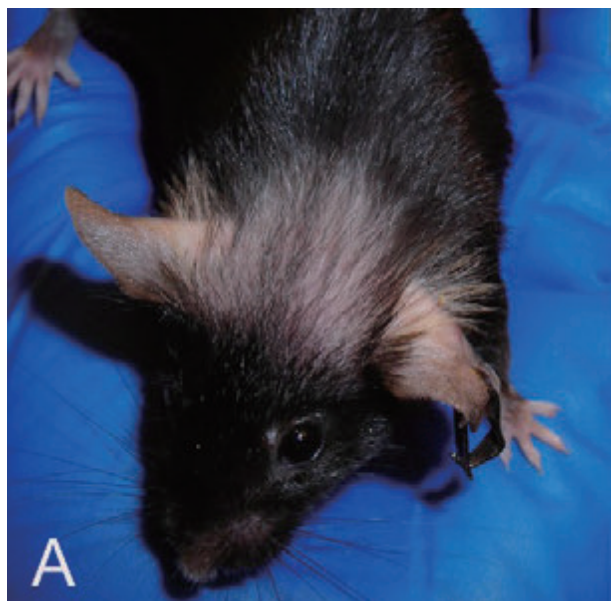


図6

高齢 C57BL/6J マウスにおいてよくみられる皮膚および眼の異常。A. 臨床的に正常な28か月齢の雌 C57BL/6J マウス。比較的健康であり、軽度の^{とくとう}禿頭がみられる。眼は正常であり、被毛はよく毛づくろいがなされている。B. 28 か月齢の雌 C57BL/6J マウス。毛づくろいが適切になされていない。背を丸めており、角膜は混濁している。鼻口部が伸びているようにみえることと写真Aのマウスにくらべて痩せていることに注意されたい。後に、このマウスは大きな下垂体腺がんをもっていると診断された。C. 中等度の斑状脱毛。齢不詳の C57BL/6J マウス。（Pettan-Brewer and Treuting, 2011 より許可を得て転載）

NEOPLASTIC DISEASES	LOCATION	% OF MICE WITH	NON-NEOPLASTIC DISEASES	LOCATION	% OF MICE WITH
Fibrosarcoma	Uterus, skin, perirenal, ear	4	Acidophilic macrophage pneumonia	Lungs	13
Hemangioma	Spleen	1	Amyloid, glomerular	Kidney	41
Hemangiosarcoma	Spleen, uterus, ovary, liver, skin	4	Amyloid, intestinal	Small intestine	14
Hematopoietic neoplasia (Malignant lymphoma or Histiocytic sarcoma)	Systemic	67	Biliary hyperplasia	Liver	3
Hepatic adenoma	Liver	1	Cataracts or cornea opacity	Eyes	30
Leiomyosarcoma	Seminal vesicle, colon	3	Chronic infarct	Kidney	4
Malignant Pheochromocytoma	Adrenal	1	Cystic endometrial hyperplasia	Uterus	14
Osteosarcoma	Vertebra	1	Heart lesions ^a	Heart	97
Ovarian granulosa cell tumor	Ovary	1	Hepatic cysts	Liver	3
Pituitary adenocarcinoma	Pituitary	1	Hydronephrosis ^b	Kidney	19
Pituitary adenoma	Pituitary	6	Nephropathy	Kidney	100
Pulmonary adenocarcinoma	Lung	3	Ovarian atrophy	Ovary	6
Pulmonary adenoma	Lung	1	Ovarian cysts	Ovary	3
Squamous cell carcinoma	Skin	1	Polyarteritis	Systemic arteries	10
Squamous papilloma	Stomach	3	Preputial cystic adenitis	Preputial glands	3
Testicular interstitial cell adenoma	Testicle	1	Rectal prolapse ^b	Rectum	19 ^c
			Seminal vesiculitis, cystic degeneration	Seminal vesicles	17
			Skin lesions ^b	Skin	17
			Systemic antigenic stimulation	Most major organs	60
			Testicular degeneration	Testes	19
			Ulcerative keratitis	Eyes	13

注：臨床データ、剖検、ならびに組織学的所見の遡及的検討結果を表にした。表に示すパーセントは、疾患をもつマウスのなかで占める割合である（n=72；雄=26、雌=46）。年齢の範囲は、16-36 か月齢である

表 2

ワシントン大学の高齢 C57BL/6J マウスでみられた腫瘍性疾患に関する調査データ（ジャクソン研究所のデータではない）。表に示すパーセントは、腫瘍性疾患をもつマウスのなかで占める割合であり、コロニー内のすべてのマウスのなかで占める割合ではない（Pettan-Brewer and Treuting 2011 より許可を得て転載）。

注：臨床データ、剖検所見、ならびに組織学的解析結果を遡及的にまとめて表にした。表に示すパーセントは、さまざまな重篤度（軽度～重度）の動物を含めた割合である（n=72；雄=26、雌=46）。検討に用いられたのは、16-36 か月齢のマウスである。

a 心肥大、心筋ミオパチー、動脈硬化症、弁膜症、ならびにアミロイドーシスを含む

b 飼養中もしくは剖検時における診断

c コロニー全体の動物のなかで占める割合、n=711

d 皮膚炎および脱毛症を含む

表 3

ワシントン大学の高齢 C57BL/6J マウスコロニーでみられた非腫瘍性疾患に関する調査データ（ジャクソン研究所で得られたデータではない）。表に示すパーセントは、とくにことわりのないかぎり、腫瘍性疾患を発生しなかったマウスのなかで占める割合である（Pettan-Brewer and Treuting 2011 より許可を得て転載）。

ワシントン大学により報告された、高齢の C57BL/6J マウスでみられる慢性炎症に関連した各臓器の組織像を図 7 に示す。包括的な組織学的解析をおこなうことによって、剖検時の肉眼所見から断定・推定されるより、多くの（ときには、はるかに多くの）無症候性疾患や肉眼所見では見つからない疾患がしばしば見つかる。本稿の読者におかれては、ワシントン大学の高齢 C57BL/6J マウスコロニーにおいて報告された、これら 4 つの臨床所見（訳注：「1）直腸脱、2）脱毛および皮膚炎、3）眼病変、4）触知腫瘤」を指している）の原因に関して、Pettan-Brewer & Treuting の原著論文を読んだ上で、さらに深く考察・議論していただきたい。

ジャクソン研究所の高齢マウスにおいて観察される病変は、かならずしもワシントン大学における高齢マウスにおいて観察された病変と同じではないことに注意されたい。その理由はおそらく、ジャクソン研究所で解析に用いられた高齢マウス群の平均年齢が、ワシントン大学のコホートにくらべて比較的若い動物が解析に用いられたこと、そして、それぞれの施設における動物の健康状態および飼養管理や飼育環境が、前述のとおり異なりうることによるのであろう。ジャクソン研究所の高齢マウスコロニーにおいては、潰瘍性皮膚炎および水腎症がときおりみられた。また頻度は低いものの、好酸性マクロファージ性肺炎（acidophilic macrophage pneumonia: AMP）、多発性動脈炎、そしてきわめて頻度は低いものの、リンパ腫もみられた。これらの相違は、異なる表現型や病理所見が、コホート内のマウスの年齢や性の偏り、異なる環境要因、あるいは実験既歴等に応じて引き起こされる可能性を強く示している。

C57BL/6 の系統マウス（かならずしも「J」亜系統にかぎらない）を長期間にわたって使用する研究においてよくみられる病理所見には、次のような所見が含まれる：腎症、糸球体腎炎、好酸性マクロファージ性肺炎（AMP）、膿瘍、潰瘍性皮膚炎、心筋症、脂肪肝、リンパ結節、精巣萎縮、卵巣萎縮、卵巣嚢胞、下垂体嚢胞、副腎色素沈着、下垂体腫瘍、あるいはリンパ腫のような造血系腫瘍などである（Brayton, Treuting, and Ward, 2012）。その他、高齢マウスにおいて、偶発的に観察される病理学的異常所見を表 4 に示す。ほかにも研究や診断病理学に役立つ資料は多数あるが、これらの資料には、C57BL/6 マウスならびにその他の系統の生涯にわたってよくみられる自然発生病変が記載されている（Barthold 2002; Sundberg *et al.*, 2016; Begley *et al.*, 2012; Brayton, 2007; Ward, Youssef, and Treuting, 2016; Ward, 2000; Barthold, Percy, and Griffey, 2016）。

高齢マウスおよびその健康状態に関する要点をまとめると、高齢マウスでは実験的な介入の有無にかかわらず、背景となる加齢性の病態が発生することが予測され、そして長い期間をとおして、これらの病変によって死亡する個体もあるということである。C57BL/6J マウスでの加齢による表現型の変化を包括的に理解することは、その先の研究の成功のためにも重要である。

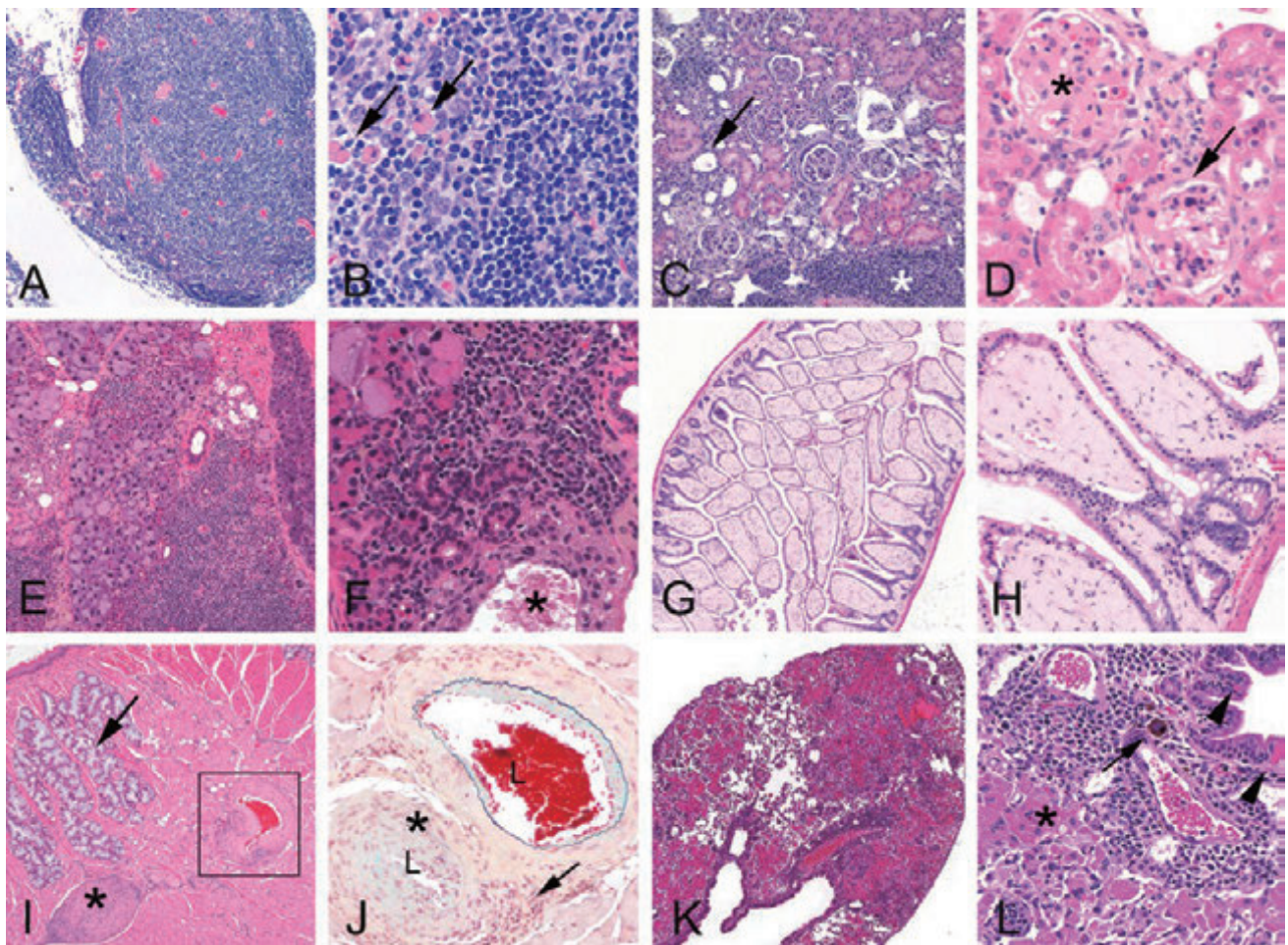


図7

ワシントン大学により報告された、16-36 か月齢の C57BL/6J マウスにおける無症候性の全身性慢性炎症に関連した障害の組織所見。A. 腸間膜の肥厚性乳斑 (milky spot)。B.A の高倍率写真。乳斑には、大型リンパ球、小型リンパ球、形質細胞、ならびに Mott 細胞 (矢印) が見られる。C. 慢性腎障害の低倍率像。間質でのリンパ球集簇 (*), 尿細管の拡張 (矢印)、尿細管の変性、再生像、壊死、ならびに膜性糸球体腎症がみられる。D. メサンギウム細胞でみられる細胞外基質の肥厚 (*) および糸球体周囲でみられる線維化 (矢印) は、膜性糸球体腎症の特徴である。また、糸球体アミロイドーシスもみられるようである。E. 眼窩外涙腺を含むさまざまな腺構造において慢性炎症がみられる。F.E の高倍率写真。リンパ形質細胞性炎症によって、腺構造が破綻している。腺管が拡張 (*) していることに注意。G. 小腸絨毛におけるアミロイド沈着。H.G の高倍率写真。粘膜固有層内の薄ピンク色の均質な細胞外物質 (アミロイド) によって絨毛が広がっている。I. 舌根部の横断面。多発性結節性動脈炎がみられる (四角内および *)。舌下小唾液腺を示す (矢印)。J. 写真 I の舌動脈のモバットペンタクローム (Movat's pentachrome) 染色像。障害を受けた部分 (*) では、弾性板 (細い黒線) を欠いており、平滑筋細胞によって中膜は肥厚している。血管周囲の軽度ないし中等度の慢性炎症像を示す細胞 (矢印) および管腔 (L) を示す。内耳または中耳付近における同様な増殖性壊死性動脈炎によって、神経症状が引き起こされることがある (詳細については、原著を参照されたい)。K. 好酸性マクロファージ性肺炎 (acidophilic macrophage pneumonia: AMP) によって重篤な症状を示している肺の低倍率組織像。L.AMP の高倍率像においては、組織球内結晶質 (*) ならびに血管周囲および細気管支周囲の密なリンパ形質細胞性炎症がみられる。リンパ形質細胞性炎症は、重篤な症例においてしばしば認められる。ヘモジゲリンを貪食したマクロファージ (矢印) および硝子化変性した気道上皮 (矢頭) を示す (Pettan-Brewer and Treuting 2011 より許可を得て転載)。

BODY SYSTEM	CONDITION
Ocular	Cataracts Corneal ulceration Chronic keratitis Harderian gland adenoma
Central nervous system	Cerebral mineralization, lipofuscin accumulation
Skin and subcutis	Alopecia Mild dermatitis
Reproductive	Seminal vesicle, coagulating gland, and preputial gland dilation Testicular degeneration/atrophy Cystic endometrial hyperplasia Uterine polyps Ovarian atrophy Ovarian cysts
Endocrine	Thyroid cysts Adrenal gland subcapsular spindle cell hyperplasia
Hepatic	Hepatocyte karyomegaly and cytomegaly Biliary hyperplasia Hepatic cysts Mild hyalinosis gall bladder epithelium
Cardiac	Endo-/myo-/epicardial mineralization
Respiratory	Mild hyalinosis respiratory epithelium Mild alveolar macrophage accumulation
Gastrointestinal	Mild hyalinosis gastrointestinal epithelium Mild rectal acute prolapse

表 4

高齢げっ歯類における良性の変性疾患および炎症性疾患の例。
表に含まれるデータは C57BL/6 マウス由来のものに限らない
(Snyder, Ward, and Treuting 2016)。

加齢研究においてさらに考慮すべき事項

加齢に伴う死亡率を考慮した上で 実験に用いるコホートサイズを決定する必要がある

動物を加齢させるプロセスにおいて、実験に使用できる動物数が減少することは、加齢研究においてまれな課題ではない。加齢のプロセスならびに実験の時間枠において動物の数が減少する要因としては、闘争、疾病、またはケージの水没のような悲劇的な事故などが挙げられる。研究のなかには、少数の動物が死亡することが知られている齢で実験を行う場合もあるので、コホート（実験群）サイズを計画する際には、動物数が減少することを予め考慮する必要がある。系統特有の特性によって、使用可能な動物数が減少しうることも考慮すべきである。たとえば、C57BL/6J 雌マウスの一部は加齢にともなって、前述のとおおり皮膚炎を呈するため、これらのマウスを研究から除外しなければならない可能性が高まる。研究を実施する際には、実験開始時に必要なマウスの匹数だけではなく、統計的に有意なデータを確保するために最終的に必要になるマウスの匹数も考慮すべきである。生存曲線をはじめとした寿命に関連したデータは、たとえば、「Mouse Phenome Database」（図 2）などのリソース・データベースを通じて見つけることができる。寿命の性差は図 2 で示した通りだが、他の研究ではこれに加えて、ケージ密度、繁殖歴（「実験用マウスの生物学」第 26 章）、給餌飼料（Lee *et al.*, 2023）、健康状態などを含む要因によって、寿命が変化することが示されている（Xie *et al.*, 2017）。これらの要因は、実験群間において、異なる程度で動物数の減少をひき起こす可能性がある。実験群および対照群の動物匹数は、ロバスト（頑強）であるべきで、たとえ、数匹のマウスが実験群や対照群から取り除かれたとしても、統計的有意性を許容するバッファ（緩衝帯）を有するものでなければならない。これはすなわち、実験モデルや環境によって、検出力分析（パワーアナリシス）にもとづいて得られた必要最小限の有意な匹数よりも 10-20% 多くの、もしくはそれ以上の匹数のマウスを含めることを考慮しなければならないことを意味する。実験開始時のマウスの年齢と実験毎に必要なとされる動物数・コホートサイズにもよるが、加齢による死亡動物数を補償するために、必要と予想される匹数以上のマウスを実験群として予め用意することが賢明であろう。

寿命の終点を定義する

加齢研究に関して事前に計画しておくべき重要な部分は、寿命の終点、ならびに人道的な実験の終点（人道的エンドポイント）を決定することである。理想的な人道的エンドポイントは、苦痛を軽減し、寿命データへの影響を最小限に抑え、適時に組織サンプルを採取することを可能にする（Brayton, Treuting, and Ward, 2012）。加齢研究においては特に、研究の科学的目標のみならず、動物福祉についても考慮することが不可欠である。動物の健康が危機的状況に陥る前に、動物実験委員会および獣医師と協働することは、人道的エンドポイントを遵守しつつ、研究への影響を最小限に抑えるための最善の方法である。

安楽死の基準には、次のような臨床的徴候が含まれるであろう。これらの徴候は、24 時間以内に動物が死亡する徴候とみなされている。

1) 触っても反応しない、2) 触ったときの体温が低い、3) 呼吸緩徐または呼吸困難、4) 丸まった姿勢で毛艶が悪い、および 5) ボディ・コンディション・スコアが低い（Brayton, Treuting, and Ward, 2012; Ullman-Cullere and Foltz, 1999; Ackert-Bicknell *et al.*, 2015）

人道的エンドポイントを決定することに加えて、実験用マウスの健康をモニタリングし評価する方法について検討することが重要である。フレイル（frailty）およびボディ・コンディション・スコアは、健康状態を評価する一般的な方法である。フレイルとは、「虚弱、緩徐行動、活動低下、および耐久力低下」と定義される（Toth, 2018）。フレイルを評価する方法は複数あるが、マウスで最も研究されているのは臨床フレイル指数（clinical frailty index: CFI; Toth, 2018; Bellantuono *et al.*, 2020）である。

再現性に影響を及ぼす可能性がある実験要因

実験の再現性は、きわめて重要な懸念事項になってきた。なぜなら、再現性のない実験は、科学に対する一般市民の信用を損なうものであり、また貴重な研究資源を無駄にし、さらにヒトの健康を増進するのに必要な知識の獲得を遅らせるからである (Freedman, Cockburn, and Simcoe, 2015; Baker, 2016; 'Reality check on reproducibility', *Nature*, 2016)。

現在の研究における「再現性の危機」は、動物実験の報告のための「ARRIVE ガイドライン」の必要性や価値をあらためて明確に示している (Kilkenny *et al.*, 2010)。科学界にとっては、体系的かつ標準化された正式な命名法を用いて系統名を記載すること、ならびに明確に定義されたプロトコルや評価システムを使用することに関して、合意に達することが最も重要である。このことは、大きな資源や労働力を要する、寿命や健康寿命の研究においては、とくに重要である (Treuting *et al.*, 2016; Brayton, Treuting, and Ward, 2012; Scudamore *et al.*, 2016)。本稿においてすでに述べたように、環境要因は、表現型を変化させる可能性のきわめて高い要因である。

どのような研究においても、いつ、どのようにしてデータを収集するかについて多くの決定をしなければならない。たとえば、いつ採血するか、実験に先立ち動物を絶食させるか、採血管の中にどのような抗凝固剤を入れるか、というような「些細な」決定が積み重なって、研究のあいだになんらかの変動をもたらすことがある (Treuting, Dintzis, *et al.*, 2012; Ackert-Bicknell *et al.*, 2015)。再現性を向上させるためには、表現型の変動に影響を及ぼす可能性のある実験方法（環境要因を含む）を徹底的に伝達することが肝要である。最も権威のある学術雑誌においてさえ、誤った、そして再現性のない結論を導く可能性のある、明らかに欠陥のある組織学的評価における実例が報告されている (Ward, Schofield, and Sundberg, 2017)。

「ARRIVE ガイドライン」には、動物実験に必要な群数などの基本情報、ならびに重要な飼育管理および飼養環境に関するパラメーターおよび住居パラメーターの概略が示されている。しかしながら、病理学的研究に関しては、研究者は、「ARRIVE ガイドライン」の重要な数値情報を参照する必要がある。すなわち、「実験病理学データの公表のための最小限の情報に関する推奨 (Recommendations for Minimum Information for Publications of Experimental Pathology Data: MINPEPA)」である。MINPEPA は、再現性のある病理学データセットを立案、報告するためのチェックリストを提供するガイドラインである。MINPEPA には、形態学的解析、免疫組織化学染色、ならびに *in situ* ハイブリダイゼーションを用いた研究などが含まれている (Scudamore *et al.*, 2016)。Schofield, Ward, and Sundberg は、次のことを強調している

「研究コミュニティ内でも、これらの要因の認知度を上げる必要性はあるが、それと同じくらい、これらのパラメーターを論文出版時に記述し、普及させることが重要である。「ARRIVE ガイドライン」は、ここで述べたすべてのパラメーターを詳細に網羅している。それにもかかわらず、論文投稿時に著者にこれらの情報を書くよう充分に啓蒙できていないし、また学術雑誌の投稿規程にも十分に反映されていない。しかし、肝心なことは、研究者、学術雑誌、ならびに研究費提供機関がデータの公開と共有に関して確固たる方針をもつことである。とくに、研究費提供機関は、再現性を確かなものにするためには、多くの場合、十分な研究費用が必要であることを認識しなければならない。これは研究費の効果的な利用を促し、効率的に投資することによって、生物モデル開発、研究費を効率よく利用することができ、その結果、ひいてはさらに頑強な橋渡し研究のパイプライン構築に繋がる (Schofield, Ward, and Sundberg 2016)。」

参考文献

- Ackert-Bicknell, C. L., L. C. Anderson, S. Sheehan, W. G. Hill, B. Chang, G. A. Churchill, E. J. Chesler, R. Korstanje, and L. L. Peters. 2015. 'Aging Research Using Mouse Models', *Curr Protoc Mouse Biol*, 5: 95-133. PMID: 26069080
- Baker, D., K. Lidster, A. Sottomayor, and S. Amor. 2014. 'Two years later: journals are not yet enforcing the ARRIVE guidelines on reporting standards for pre-clinical animal studies', *PLoS Biol*, 12: e1001756. PMID: 24409096
- Baker, M. 2016. '1,500 scientists lift the lid on reproducibility', *Nature*, 533: 452-4. PMID: 27225100
- Barthold, S. W. 2002. "'Muromics': genomics from the perspective of the laboratory mouse", *Comp Med*, 52: 206-23. PMID: 12102565
- Barthold, Stephen W., Dean H. Percy, and Stephen M. Griffey. 2016. *Pathology of laboratory rodents and rabbits* (John Wiley & Sons, Inc.: Ames, Iowa).
- Begley, D. A., D. M. Krupke, S. B. Neuhauser, J. E. Richardson, C. J. Bult, J. T. Eppig, and J. P. Sundberg. 2012. 'The Mouse Tumor Biology Database (MTB): a central electronic resource for locating and integrating mouse tumor pathology data', *Vet Pathol*, 49: 218-23. PMID: 21282667
- Bellantuono, I., de Cabo, R., Ehninger, D. et al. A toolbox for the longitudinal assessment of healthspan in aging mice. *Nat Protoc* 15, 540–574 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0256-1>
- Bogue, M. A., L. L. Peters, B. Paigen, R. Korstanje, R. Yuan, C. Ackert-Bicknell, S. C. Grubb, G. A. Churchill, and E. J. Chesler. 2016. 'Accessing Data Resources in the Mouse Phenome Database for Genetic Analysis of Murine Life Span and Health Span', *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 71: 170-7. PMID: 25533306
- Bolon, B., C. Brayton, G. H. Cantor, D. F. Kusewitt, J. K. Loy, E. A. Sartin, T. R. Schoeb, R. S. Sellers, J. C. Schuh, and J. M. Ward. 2008. 'Editorial: best pathology practices in research using genetically engineered mice', *Vet Pathol*, 45: 939-40. PMID: 18984800
- Bolon, B., S. Couto, L. Fiette, and K. L. Perle. 2012. 'Internet and print resources to facilitate pathology analysis when phenotyping genetically engineered rodents', *Vet Pathol*, 49: 224-35. PMID: 21825311
- Brayton, C. 2007. 'The mouse in biomedical research.' in James G. Fox (ed.), *American College of Laboratory Animal Medicine series* (Elsevier, AP: Amsterdam ; Boston).
- Brayton, C. F., P. M. Treuting, and J. M. Ward. 2012. 'Pathobiology of aging mice and GEM: background strains and experimental design', *Vet Pathol*, 49: 85-105. PMID: 22215684
- Bronson, R. T., and R. D. Lipman. 1993. 'FRAR course on laboratory approaches to aging. The role of pathology in rodent experimental gerontology', *Aging (Milano)*, 5: 253-7. PMID: 8297928
- Cardiff, R. D., M. R. Anver, B. A. Gusterson, L. Hennighausen, R. A. Jensen, M. J. Merino, S. Rehm, J. Russo, F. A. Tavassoli, L. M. Wakefield, J. M. Ward, and J. E. Green. 2000. 'The mammary pathology of genetically engineered mice: the consensus report and recommendations from the Annapolis meeting', *Oncogene*, 19: 968-88. PMID: 10713680

Eppig, J. T., C. L. Smith, J. A. Blake, M. Ringwald, J. A. Kadin, J. E. Richardson, and C. J. Bult. 2017. 'Mouse Genome Informatics (MGI): Resources for Mining Mouse Genetic, Genomic, and Biological Data in Support of Primary and Translational Research', *Methods Mol Biol*, 1488: 47-73. PMID: 27933520

Flurkey, K., J. M. Curren, and D. E. Harrison. 2007. 'The mouse in biomedical research.' in James G. Fox (ed.), *American College of Laboratory Animal Medicine series* (Elsevier, AP: Amsterdam ; Boston).

Freedman, L. P., I. M. Cockburn, and T. S. Simcoe. 2015. 'The Economics of Reproducibility in Preclinical Research', *PLoS Biol*, 13: e1002165. PMID: 26057340 Kilkenny, C., W. Browne, I. C. Cuthill, M. Emerson, D. G. Altman, and N. C3Rs Reporting Guidelines Working Group. 2010. 'Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines', *Br J Pharmacol*, 160: 1577-9. PMID: 20649561

Galkin F, Mamoshina P, Aliper A, de Magalhães JP, Gladyshev VN, Zhavoronkov A. 2020. 'Biohorology and biomarkers of aging: Current state-of-the-art, challenges and opportunities.' *Ageing Res Rev*. 60:101050. Epub 2020 Apr 6. PMID: 32272169.

Kollmus H, Fuchs H, Lengger C, Haselimashhadi H, Bogue MA, Östereich MA, Horsch M, Adler T, Aguilar-Pimentel JA, Amarie OV, Becker L, Beckers J, Calzada-Wack J, Garrett L, Hans W, Höltter SM, Klein-Rodewald T, Maier H, Mayer-Kuckuk P, Miller G, Moreth K, Neff F, Rathkolb B, Rácz I, Rozman J, Spielmann N, Treise I, Busch D, Graw J, Klopstock T, Wolf E, Wurst W, Yildirim AO, Mason J, Torres A; Mouse Phenome Database Team; Balling R, Mehaan T, Gailus-Durner V, Schughart K, Hrab de Angelis M. 2020. 'A comprehensive and comparative phenotypic analysis of the collaborative founder strains identifies new and known phenotypes.' *Mamm Genome*, 31:30-48. PMID: 32060626

Ladiges, W., Y. Ikeno, D. Liggitt, and P. M. Treuting. 2013. 'Pathology is a critical aspect of preclinical aging studies', *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 3. PMID: 23970952

Lee J, Purello C, Booth SL, Bennett B, Wiley CD, Korstanje R. 2023. 'Chow diet in mouse aging studies: nothing regular about it.' *Geroscience*, 45: 2079-2084. PMID: 37079216

Maddatu, T. P., S. C. Grubb, C. J. Bult, and M. A. Bogue. 2012. 'Mouse Phenome Database (MPD)', *Nucleic Acids Res*, 40: D887-94. PMID: 22102583

Mitchell SE, Togo J, Green CL, Derous D, Hambly C, Speakman JR. 'The effects of graded levels of calorie restriction: XX. impact of long term graded calorie restriction on survival and body mass dynamics in male C57BL/6J mice.' *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 24: 152. Epub ahead of print. PMID: 37354128.

O'Connell, K. E., A. M. Mikkola, A. M. Stepanek, A. Vernet, C. D. Hall, C. C. Sun, E. Yildirim, J. F. Staropoli, J. T. Lee, and D. E. Brown. 2015. 'Practical murine hematopathology: a comparative review and implications for research', *Comp Med*, 65: 96- 113. PMID: 25926395

Pettan-Brewer, C., and P. M. Treuting. 2011. 'Practical pathology of aging mice', *Pathobiol Aging Age Relat Dis*, 1. PMID: 22953032 'Reality check on reproducibility'. 2016. *Nature*, 533: 437. PMID: 27225078

Schofield, P. N., S. D. Brown, J. P. Sundberg, M. Arends, M. V. Warren, P. Dubus, M. Ellender, L. Fiette, B. Rozell, L. QuintanillaMartinez, M. Raspa, J. Y. Song, M. van der Valk, and C. McKerlie. 2009. 'PRIME importance of pathology expertise', *Nat Biotechnol*, 27: 24-5. PMID: 19131991

Schofield, P. N., M. Gruenberger, and J. P. Sundberg. 2010. 'Pathbase and the MPATH ontology. Community resources for mouse histopathology', *Vet Pathol*, 47: 1016-20. PMID: 20587689

Schofield, P. N., P. Vogel, G. V. Gkoutos, and J. P. Sundberg. 2012. 'Exploring the elephant: histopathology in high-throughput phenotyping of mutant mice', *Dis Model Mech*, 5: 19-25. PMID: 22028326

Schofield, P. N., J. M. Ward, and J. P. Sundberg. 2016. 'Show and tell: disclosure and data sharing in experimental pathology', *Dis Model Mech*, 9: 601-5. PMID: 27483498

Scudamore, C. L., E. J. Soilleux, N. A. Karp, K. Smith, R. Poulosom, C. S. Herrington, M. J. Day, C. F. Brayton, B. Bolon, B. Whitelaw, E. S. White, J. I. Everitt, and M. J. Arends. 2016. 'Recommendations for minimum information for publication of experimental pathology data: MINPEPA guidelines', *J Pathol*, 238: 359-67. PMID: 26387837

Sellers, R. S. 2012. 'The gene or not the gene--that is the question: understanding the genetically engineered mouse phenotype', *Vet Pathol*, 49: 5-15. PMID: 21971987

Sellers, R. S. 2017. 'Translating Mouse Models', *Toxicol Pathol*, 45: 134-45. PMID: 27815489
Sellers, R. S., C. B. Clifford, P. M. Treuting, and C. Brayton. 2012. 'Immunological variation between inbred laboratory mouse strains: points to consider in phenotyping genetically immunomodified mice', *Vet Pathol*, 49: 32-43. PMID: 22135019

Sellers, R. S., and J. M. Ward. 2012. 'Toward a better understanding of mouse models of disease', *Vet Pathol*, 49: 4. PMID: 22215683

Shappell, S. B., G. V. Thomas, R. L. Roberts, R. Herbert, M. M. Ittmann, M. A. Rubin, P. A. Humphrey, J. P. Sundberg, N. Rozengurt, R. Barrios, J. M. Ward, and R. D. Cardiff. 2004. 'Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee', *Cancer Res*, 64: 2270-305. PMID: 15026373

Silva, K. A., V. E. Kennedy, and J. P. Sundberg. 2014. 'Systematic evaluation of skin and adnexa in mutant laboratory mice', *Curr Protoc Mouse Biol*, 4: 105-19. PMID: 25554736

Snyder JM, Snider TA, Ciol MA, Wilkinson JE, Imai DM, Casey KM, et al. 2019. 'Validation of a geropathology grading system for aging mouse studies.' *Geroscience*. 41(4):455–65. PMID : 31468322

Snyder, J. M., J. M. Ward, and P. M. Treuting. 2016. 'Cause-of-Death Analysis in Rodent Aging Studies', *Vet Pathol*, 53: 233-43. PMID: 26508696

Sukoff Rizzo, S. J., and J. L. Silverman. 2016. 'Methodological Considerations for Optimizing and Validating Behavioral Assays', *Curr Protoc Mouse Biol*, 6: 364-79. PMID: 27906464

Sundberg, J. P., A. Berndt, B. A. Sundberg, K. A. Silva, V. Kennedy, R. S. Smith, T. K. Cooper, and P. N. Schofield. 2016. 'Approaches to Investigating Complex Genetic Traits in a Large-Scale Inbred Mouse Aging Study', *Vet Pathol*, 53: 456-67. PMID: 26936752

Sundberg, J. P., and P. N. Schofield. 2010. 'Commentary: mouse genetic nomenclature. Standardization of strain, gene, and protein symbols', *Vet Pathol*, 47: 1100-4. PMID: 20685919

Sundberg, J. P., J. M. Ward, and P. Schofield. 2009. 'Where's the mouse info?', *Vet Pathol*, 46: 1241-4. PMID: 19605899
Treuting, P. M., C. B. Clifford, R. S. Sellers, and C. F. Brayton. 2012. 'Of mice and microflora: considerations for genetically engineered mice', *Vet Pathol*, 49: 44-63. PMID: 22173977

Toth, L. 2018. 'Identifying and Implementing Endpoints for Geriatric Mice.' *Comparative Medicine Dec*; 68(6):439-451. PMID: 30486919

Treuting, P. M., and J. M. Snyder. 2015. 'Mouse Necropsy', *Curr Protoc Mouse Biol*, 5: 223-33. PMID: 26331757

Treuting, P. M., J. M. Snyder, Y. Ikeno, P. N. Schofield, J. M. Ward, and J. P. Sundberg. 2016. 'The Vital Role of Pathology in Improving Reproducibility and Translational Relevance of Aging Studies in Rodents', *Vet Pathol*, 53: 244-9. PMID: 26792843

Treuting, Piper M., Suzanne M. Dintzis, Charles W. Frevert, H. Denny Liggitt, and Kathleen S. Montine. 2012. *Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas* (Elsevier/Academic Press: Amsterdam ; Boston).

Turturro A, Duffy P, Hass B, Kodell R, Hart R. 2002. 'Survival characteristics and age-adjusted disease incidences in C57BL/6 mice fed a commonly used cereal-based diet modulated by dietary restriction.' *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 57: B379-89. PMID: 12403793

Ullman-Cullere, M. H., and C. J. Foltz. 1999. 'Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice', *Lab Anim Sci*, 49: 319-23. PMID: 10403450

Wagner KH, Cameron-Smith D, Wessner B, Franzke B. 2016 'Biomarkers of Aging: From Function to Molecular Biology.' *Nutrients*, 2;8(6):338. PMID: 27271660

Ward, J. M. 2002. 'Comment on the muromics "garden path"', *Comp Med*, 52: 302. PMID: 12211269

Ward, J. M., P. N. Schofield, and J. P. Sundberg. 2017. 'Reproducibility of histopathological findings in experimental pathology of the mouse: a sorry tail', *Lab Anim (NY)*, 46: 146-51. PMID: 28328876

Ward, J. M., S. A. Youssef, and P. M. Treuting. 2016. 'Why Animals Die: An Introduction to the Pathology of Aging', *Vet Pathol*, 53: 229-32. PMID: 26936750

Ward, Jerrold Michael. 2000. *Pathology of genetically engineered mice* (Iowa State University Press: Ames).

Yuan R, Ackert-Bicknell C, Paigen B, Peters LL. 2007. Aging study: Lifespan and survival curves for 31 inbred strains of mice. MPD: Yuan2. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. <http://phenome.jax.org> [Cited 03 May, 2017]

Youm YH, Horvath TL, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA, Dixit VD. 2016. 'Prolongevity hormone FGF21 protects against immune senescence by delaying age-related thymic involution.' *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113(4):1026-31. PMID: 26755598

JAX® Mice, Clinical & Research Services

The Jackson Laboratory

Maine | Connecticut | California | Japan | China

[jax.or.jp / aged-b6](http://jax.or.jp/aged-b6)

micetech@jax.or.jp

WPJ23-01A

