HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導 |
| Author(s) | 堀井, 有希; 椎名, 貴彦; 志水, 泰武 |
| Citation | 低温科学, 81, 131-139 |
| Issue Date | 2023-03-20 |
| DOI | 10.14943/lowtemsci.81.131 |
| Doc URL | http://hdl.handle.net/2115/89103 |
| Type | bulletin (article) |
| Note | 第二章：恒温動物（哺乳類） |
| File Information | 14_p131-139_LT81.pdf |

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 81 （2023） 131-139
doi: 10.14943/lowtemsci. 81. 131

# 実験室における哺乳動物の冬眠・休眠誘導

堀井　有希[1)]，椎名　貴彦[2)]，志水　泰武[2)]

2022 年 12 月 8 日受付，2023 年 1 月 23 日受理

一部の哺乳動物は，冬季に環境温度付近にまで体温を低下させる冬眠を行う．また，数時間の低体温を呈する日内休眠を行う動物種もある．冬眠や日内休眠のメカニズムを解明する手立てとして，実験室内でそれらを再現することは重要である．シリアンハムスターでは低温で暗期の長い環境において冬眠が誘発され，与える栄養素により冬眠誘発までの期間が変化する．また，マウスでは絶食，スンクスでは寒冷環境が日内休眠を誘発する引き金となる．さらに，冬眠しない哺乳動物であるラットは，薬理学的な方法によって冬眠様の低体温へ誘導することが可能である．本稿では，実験室における哺乳動物の冬眠・休眠の誘導についてまとめ，冬眠研究の展望を論じる．

## Induction of hibernation and daily torpor of mammals in the laboratory

Yuuki HORII[1], Takahiko SHIINA[2] and Yasutake SHIMIZU[2]

Some mammals enter hibernation in winter and lower their body temperature to near ambient temperature. Mice and house musk shrews undergo daily torpor, in which they remain hypothermic for several hours. It is important to reproduce hibernation and daily torpor in the laboratory for elucidating their mechanisms. In the Syrian hamster, hibernation is induced under the condition of low ambient temperatures and long dark periods, and the essential time for hibernation induction varies depending on nutrient intake. Fasting and cold environment trigger the induction of daily torpor in mice and in shrews, respectively. Furthermore, rats, which are non-hibernators, can be induced to hibernation-like hypothermia with pharmacological methods. This article summarizes the induction of hibernation and torpor in the laboratory and discusses the prospects for hibernation research.

キーワード：シリアンハムスター，スンクス（*Suncus murinus*），冬眠，日内休眠，人為的冬眠様低体温
Syrian hamster, house musk shrew (*Suncus murinus*), hibernation, daily torpor, artificial hibernation-like hypothermia

## 1．はじめに

ほとんどの哺乳動物は，恒温動物と呼ぶにふさわしく，外気温がどのように変化しようとも 37℃程度の体温を維持している．しかし，リスやハムスターなど一部の小型齧歯類をはじめ哺乳動物の一部は，気温低下や食糧不足など冬季の厳しい環境を耐えるために，体温を大幅に下げ冬眠する．マウスなどは，特定の条件下で数時間の単位で体温を低下させる日内休眠を行うが，哺乳動物の日内休眠は多くの点で冬眠と類似性の高い行動である．

連絡先
志水　泰武
岐阜大学　応用生物科学部　獣医生理学研究室
〒501-1193　岐阜県岐阜市柳戸 1-1
Tel. 058-293-2940
e-mail：shimizu.yasutake.b5@f.gifu-u.ac.jp
1）岐阜大学　糖鎖生命コア研究所　糖鎖分子科学研究センター　研究基盤部門
岐阜県岐阜市柳戸 1-1
Institute for Glyco-core Research (iGCORE), Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan
2）岐阜大学　応用生物科学部　獣医生理学研究室
岐阜県岐阜市柳戸 1-1
Laboratory of Veterinary Physiology, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu 501-1193, Japan

変温動物の両生類や爬虫類が外気温の低下に伴い低体温となることとは対照的に，哺乳動物の行う冬眠や休眠は制御された低体温である．例えば，冬眠中のハムスターは，環境温度が上昇せずとも一定期間の低体温から中途覚醒し摂食や飲水，排便や排尿を行う．このことからも，哺乳動物の冬眠が受動的な低体温でないことがわかる．

冬眠中の動物は，放射線照射や感染症に耐性があると言われている（Musacchia and Barr, 1968; Ghosh et al., 2017; Sharapov, 1984）．また，有害化学物質を投与しても組織傷害が起こらないこと，虚血再環流傷害が起こらないこと，さらには寿命が延長することや廃用性筋萎縮が起こらないこと（宮崎の稿参照），等々，医学領域で活用可能な多くの特徴が認められる（Kemper and Ruben, 1982; Kondo et al, 2006；川道ほか，2000）．このようなメリットをヒトや伴侶動物で再現できれば，さまざまな疾病に対して新しい視点の治療法を提供できる可能性がある．それゆえに，冬眠の機序を解明し，冬眠しない動物に人工冬眠を誘導するための研究は重要である（小野の稿参照）．このような研究を推進するためには，実験室内で冬眠や休眠を誘発する必要がある．

## 2．冬眠と休眠

### 2.1　自然界における冬眠と休眠の特徴

哺乳動物は，代謝を調節することで，環境温度が上がろうが下がろうが，深部体温をある一定の範囲内に収めるように制御している．恒温動物と呼ばれる所以である．ところが，哺乳動物の中には，代謝を低下させて体温を著しく低下させる動物種が存在する．このような低代謝，低体温に陥る現象を哺乳動物における「休眠（Torpor）」という．その中で，日周変動の一部として低体温となる現象を「日内休眠（Daily torpor）」と呼び，比較的長期間に渡って休眠状態を維持する現象を「冬眠（Hibernation）」と呼ぶ（Ruf and Geiser, 2015）．

「冬眠」は，冬季の厳しい生育環境を乗り切るための適応といえる．冬眠する哺乳動物は，リス，ヤマネ，ハムスター，クマ，コウモリ，キツネザルなど多岐にわたる（川道ほか, 2000）．有名なのは，リスやハムスターといった小型齧歯類とクマである．どちらの動物も冬眠する哺乳動物として一般的に理解されているが，その冬眠様式には異なる点がある．リスやハムスターといった小型齧歯類の冬眠は，冬眠期間中ずっと低体温状態にあるわけではない．数日間の低体温の状態（深冬眠，持続的冬眠，休眠バウトとも呼ぶ）と半日～1 日程度の平常体温の状態（中途覚醒）を交互に繰り返す．深冬眠の際の体温は10℃以下となり，環境温度によっては 0℃付近に達することがある（川道ほか，2000）．種によっては中途覚醒時に排泄や摂食を行う（Sonoyama et al., 2009）．

一方，クマ類の冬眠は小型齧歯類のものとは少し異なった様式を取る．クマ類の冬眠時の体温は 30℃以上であり，小型齧歯類の冬眠時と比較し，体温低下はわずかである．中途覚醒は行わず，冬眠期間中は低体温状態が数ヶ月間に渡って維持される．また，冬眠期間中，飲まず食わずで過ごすことも特徴である（川道ほか, 2000）．

「日内休眠」は，アカネズミやハツカネズミ（マウス）など特定の哺乳動物が，体温や代謝活動を低下させる現象である．休眠期間が 1 日のうち数時間であり，体温の低下も冬眠ほど顕著ではない．冬眠と同様に，低温環境や日照時間の短縮，食餌制限が日内休眠の引き金となる（川道ほか，2000）．

### 2.2　冬眠，睡眠，麻酔で共通する意識消失

休眠を含めた冬眠状態は，睡眠や麻酔と比較されることが多い．共通項は「意識の消失」である．意識というのは定義の難しい言葉であるが，“覚醒していて外界の情報が認知できる状態”と考えてみる．認知とは，外界の情報を受容し意味のあるものとして理解する過程で最も高度な営みであり，その前段階に感覚，知覚がある．ここで，冬眠と睡眠，麻酔の異同を論議する上で重要な，感覚，知覚，認知という言葉について整理しておく．私たちは通常の生活の中で，目から入った情報を画像として「見る」こと，耳から入った情報を音として「聞く」ことに違和感を感じることはないが，外界から与えられる刺激は光であれ音であれ，全て感覚神経のインパルスに変換されている．モールス信号のような入力であるにも関わらず，目から入った情報が画像として認識されるのは，目で光の情報をインパルスに変換し，その情報が視覚を処理する領域に送られ，画像として認識されているからである．このように外界の情報が受容され脳に送られることを「感覚」という．この感覚情報から，入力情報が何であるか認識することを「知覚」という．外界にある対象を知覚した後に，経験や知識，記憶などに基づいた思考，考察，推理によって，解釈する，知る，理解するにまで至ったことを「認知」と呼んでいる．例えば，食べ物を紹介するテレビを見ているとき，目から入った情報が画像になるのが「感覚」，その画像が食べ物とわかることが「知覚」，美味しそうだ，自分も食べたいと感じることが「認知」である．

冬眠，睡眠，麻酔は，意識の消失，つまり覚醒を保てない，認知ができないという点では同じであるが，感覚，

知覚の有無において明確な違いがある．麻酔は，外科手術ができるように無痛状態を確保しなければならないので，感覚や知覚が成立しないようにしておく必要がある．一方，睡眠時には少なくとも感覚は機能している．覚醒時よりも感度が低くなっているものの，ほとんどの感覚器から外界の情報が脳に入力され，それに基づく反応が起こっている．目覚まし時計の音，カーテンを開けられたときの光，皮膚の痒みや痛み，嫌なニオイ，等々，五感のどこからでも睡眠を中断させる刺激を入れることができる．麻酔による意識消失と睡眠時の意識消失の違いを端的にまとめるなら，感覚が成立するかしないかということになる．冬眠中の動物は，体を触ったり，外気温を上げたりすれば，たちまち体温を上昇させて覚醒してくる．そっと持ち上げる程度の刺激では覚醒することはないので，睡眠よりも感度は下がっていると思われるが，明らかに感覚は機能している．したがって，意識は消失しているが感覚は機能しているという点からは，冬眠は睡眠に近い状況にあると言える．冬眠中の動物は，触れても体温を感じることができず，呼吸を目視で確認することも困難であるため，感覚を成立させる程度に脳が活動しているとは思えない状態であるが，間違いなく機能している．

冬眠と睡眠には類似性は見出されるものの，睡眠の延長線上に冬眠があるか否かは不明である．冬眠中の動物から脳波を記録することができないために，比較検討することが困難であった．このことと関連して，興味深い論文が発表されている．ジリスは冬眠期間を通して低体温状態で過ごすのではなく，一定期間過ぎると中途覚醒を示す．この中途覚醒中には，徐波睡眠と同じような脳波像を示すという（Daan et al., 1991; Trachsel et al., 1991）．このことは，冬眠中は断眠状態にあり，体温を復帰させるという多大なコストをかけて中途覚醒するのは眠るためであるという解釈につながる．この解釈に従えば，冬眠と睡眠は全く異なる事象であるということになる．その後の検討で，中途覚醒中に発生する脳波像は，正常な睡眠とは異なるメカニズムであることも示唆されており（Larkin and Heller, 1999），結論を出すまでに更なる検討が必要であろう．

### 2.3　哺乳動物の冬眠と休眠のモデル動物

冬眠する哺乳動物として認知度が高いクマでは，冬眠中の体温低下はそれほど顕著ではなく，せいぜい30℃付近までの低下にとどまる．特徴的なのは，冬眠期間中にいっさい摂食や飲水をしないし，排便や排尿もしないということである．しかも雌のクマは冬眠中に出産し，子熊に授乳するという（川道ほか，2000；Shimozuru et al., 2013）．冬眠前に充分に脂肪を蓄えるので，これが冬眠中のエネルギー源になることは間違いないであろう．しかしながら，哺乳動物には脂肪酸をグルコースに変換する代謝経路が備わっていないことを考えると，子熊に与える糖質をどのように確保するのか等々，単純には説明できないことが多い．一般的な哺乳動物では，飢餓時の糖新生の基質は，骨格筋のアミノ酸が主体となるが，冬眠中にこの反応を多用すればアンモニアの処理が不可欠であり，排尿しないことと矛盾する．また，骨格筋をすり減らすことは，春先になって冬眠からさめた後には大きな支障を来すと予想される．実際に冬眠中のクマの血漿グルコースレベルは低下しておらず（Græsli et al., 2015），クマの冬眠時の筋肉のタンパク質減少量はわずかである（Lohuis et al., 2007; Tinker et al., 1998）．エネルギー維持のためにケトン体を活用することも予想できるが，呼吸数が激減している冬眠中にはケトン体によって酸性に傾いた血液に対して呼吸により補償をかけることが困難であり，酸塩基平衡の問題を抱えるであろう．また，一般的な哺乳動物におけるケトン体の最大消費器官である脳は活性が落ちている状態では，ケトン体の生成に大きな意義を求めるのが困難である．このように，クマは，エネルギーバランスの維持の仕組みや有害老廃物の生成と除去の仕組みを考えると非常に興味深い動物であるが，実験室レベルで扱える動物ではない．

それに対して，ハムスターなど小型齧歯類は，入手が容易で，ラットやマウス等と同じ実験室内での飼育が可能であるため，多くの研究室で使われている．リスは，冬眠に関する多くの重要な発見を導いてきた動物種であるが，入手，飼育の面で難のある動物である．日内休眠のモデルとしてはマウスがよく活用されている．最近，私たちは食虫目のスンクスが日内休眠を示す有用なモデル動物であることを見出し，注目している．

## 3．実験室内における冬眠・休眠誘導

### 3.1　ハムスターの冬眠

シリアンハムスター（ゴールデンハムスター）は，夏季でも環境を制御することにより実験室内で冬眠を誘発できることから，冬眠研究に使いやすい動物である．図1に，冬眠中のシリアンハムスターを示した．Curly shape と呼ばれる丸まった姿勢をとるのが特徴である．冬眠中のハムスターに触れたときには，体温を感じることができず死亡個体と区別できないことがしばしばあるが，足蹠部の皮膚にチアノーゼ様の色変がないことが生

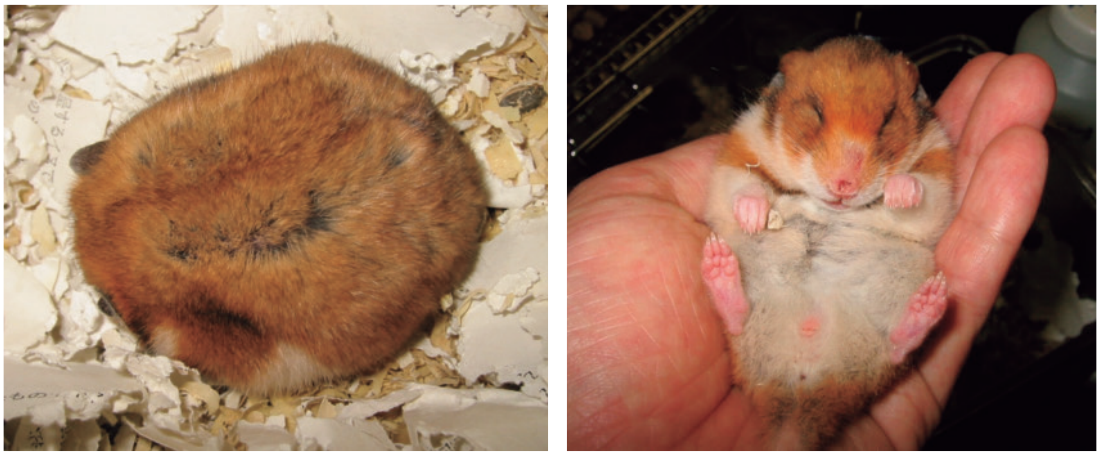

**図 1**：冬眠中に Curly shape を呈するシリアンハムスター

存していることの指標となる．

覚醒時のハムスターでは，心拍数が 350 回/分以上，呼吸数が 90 回/分程度であるのに対して，冬眠中には心拍数が 15 回/分，呼吸数が 2 回/分にまで低下する．このような極端な心拍数や呼吸数の低下は，低体温に起因する受動的な低下であるとともに，自律神経を介する調節性の低下という要素も含まれると考えられる．いずれにせよ，心臓循環器系と呼吸器系は，低体温下での組織の酸素要求を満たすべく確実に機能している．また，脳も機能しており，積極的に代謝活性や体温を調節していると考えられる．冬眠中のハムスターの体温は，外気温より数度高いレベルに維持されている．5℃の環境温度に設定し，実験室内で冬眠を誘発した場合，平均体温が 6℃程度となる．一般的に，哺乳動物は 20℃以下に体温が低下すると，心臓や神経系が機能しなくなり凍死する（Ivanov, 2000; Johansson et al., 1996）ことから，冬眠中のハムスターには極度の低体温下でも生存を可能にする仕組みがあると言える．私たちは，この低温耐性機構に寄与する可能性のある低温ショックタンパク質において，冬眠時に特徴的な選択的スプライシングの変化が起こることを明らかにした（Horii et al., 2019; Sano et al., 2015）．低温ショックタンパク質は心臓，脳，肝臓，腎臓という多くの臓器に発現しており，RNA 結合タンパク質として多くのタンパク質の転写後調節に関与している．冬眠時の特殊な制御機構によって，低温ショックタンパク質が全身の細胞内で発現を効率化し，細胞機能を調節することで冬眠する哺乳動物を生存へ導く可能性がある．

さて，当然のことながら，低体温に陥るということは同時に平常体温へと回復するフェーズが存在するということである．前述のように，ハムスターの冬眠というのは全期間を眠り続けるのではなく，持続的冬眠期（深冬眠）と中途覚醒期を冬眠期間中に何度も繰り返すことを特徴としている．深冬眠からの覚醒時の体温は，低下した状態から正常体温付近まで，30℃もの顕著な変化を起こす．また，心拍の回復にともない，全身の血流も著しく変化する．つまり，ハムスター等の冬眠の興味深い仕組みを整理すると，①代謝を著しく低下させて低体温のまま長期間にわたり生命を維持する仕組みに加えて，②低体温の急激な回復に耐えうる生命維持の仕組みがあると考えられる．このような冬眠時の低体温からの覚醒にともなう仕組みの解明は，虚血性疾患の再潅流障害などにアプローチするための重要な手掛かりになると考えられている．

シリアンハムスターの冬眠を実験室内で誘発するためには，秋から冬へ移行する時期の気温や日照時間を再現するように環境を制御する必要がある．通常，冬眠を誘発するまでに 2〜3ヶ月の期間を要することになるが，これは冬眠研究を遂行する上でひとつの障壁となっている．私たちは，冬眠誘発に対する気温や日照時間の影響に加えて，摂取する栄養素の重要性を考えて条件を検討した．ハムスターには，野生齧歯目が摂食すると考えられる「木の実」を模倣して，ヒマワリの種子を与えた．また，冬季の食物不足の状況を模して給餌の制限も行った．ヒマワリの種子を充分に与えたのち給餌を制限した個体は，自由に摂食をさせた場合と比較して短期間で冬眠状態に入った（椎名ほか，2007）．しかし，市販のハムスター用ペレットを与えたコントロール個体は，給餌を制限しても短期間では冬眠状態に入ることができなかった．また，ヒマワリの種子を給餌したハムスターでは，ペレットの場合より有意に高体重であった．これらの結果は，低温および短日環境に加えて，食物の量と組成，

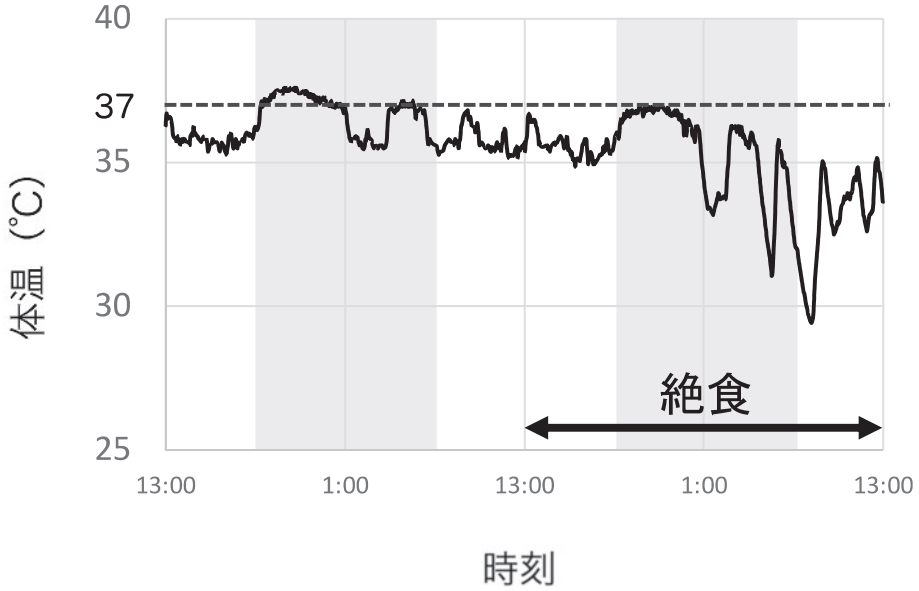


**図 2**：マウスにおける絶食誘導性日内休眠時の体温変化
マウスの皮下温度を経時的に測定した．グレーの背景は暗期，白の背景は明期を表す．

そして体重の増加が冬環境における冬眠行動の誘発に深く関連することを示唆するものである．ヒマワリの種子の重要性は，飼料にヒマワリ油を添加するとシマリスの深冬眠の持続時間が長くなったという報告からも支持される（Dark, 2005）．過去の報告で多価不飽和脂肪酸が豊富な食物油が哺乳動物の冬眠の持続時間と深さを増強するというものがある（Harlow and Frank, 2001）．また，冬眠する哺乳動物の肝臓では，ビタミンＥのアナログである $\alpha$-トコフェロールが保持されており，寒冷による細胞死を防いでいると報告されている（Anegawa et al., 2021）（曽根の稿参照）．このことも，トコフェロールを含有するひまわり種子が冬眠の誘発に重要な要素である可能性を支持している．

シリアンハムスターを用いた冬眠の誘発は，段階的な気温低下や日照時間の短縮を行うための特殊な飼育室を必要としない上に，比較的短期間で冬眠中の哺乳動物を得られるため，実験を遂行する上で有用であると考えられる．

### 3.2　マウスの休眠

マウスは実験動物として最も広く使用されている哺乳動物である．一般的な実験室の条件である 22±2℃，自由摂食の条件下では，哺乳動物の特徴である恒温性を保つ．また，寒冷環境下で飼育しても，30℃を下回るような体温低下はない．一方で，マウスを絶食させると，一時的に体温が 30℃を下回る日内休眠が誘発される（Webb et al., 1982）．図 2 に示すように，室温が 22℃の環境下であっても，体温が波打って低下する日内休眠を再現することができる．

また，絶食以外にも，恐怖に関連する 2-methyl-2-thiazoline（2MT）の香りによってマウスが低代謝を引き起こし，10℃以上の体温低下を引き起こすことが報告されている（Matsuo et al., 2021）．さらに，2MT の刺激による低体温状態は，冬眠する哺乳動物動物のように，低酸素や虚血再灌流障害からの保護作用を示した．これらの報告のように，一般的な哺乳動物として実験に使用されているマウスにおいても，絶食や恐怖の刺激によって日内休眠様の低体温を誘発できることが明らかとなり，様々な研究展開が考えられる．

日内休眠中のマウスは，冬眠する哺乳動物と類似し，休眠中には明らかに活動性が低下する．また，冬眠と同様，接触刺激等で容易に活動量を増加させ，体温を回復させる．日内休眠時の最低体温は冬眠時よりも高く，低体温の維持時間も冬眠と異なり数時間であることから，冬眠する哺乳動物とは異なるメカニズムの存在を考慮する必要がある一方で，マウスは比較的容易に遺伝子改変を行うことができ，詳細な解析が可能である優れた実験動物である．マウスの日内休眠を利用し，休眠のメカニズムのさらなる解明が行われることが期待される．

### 3.3　スンクスの休眠

スンクス（*Suncus murinus*）は，成熟体重が約 30～70 g の小型の実験動物で真無盲腸目（しんむもうちょうもく）トガリネズミ科ジネズミ亜科ジャコウネズミ属に属する，東南アジアを原産

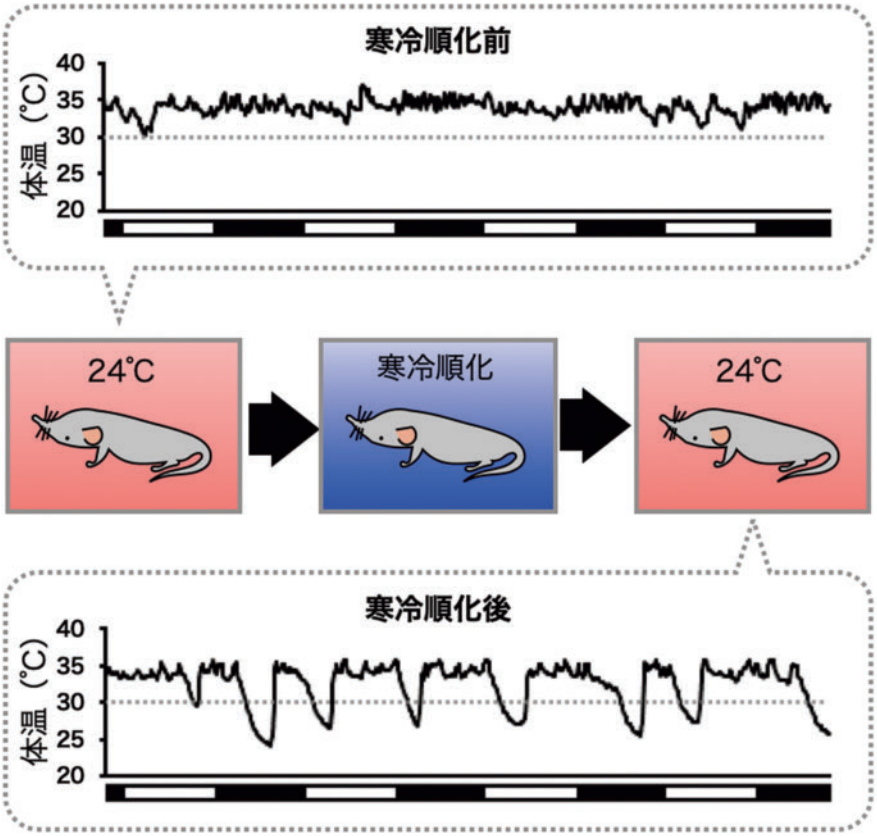


図 3：スンクス（*Suncus murinus*）における寒冷順化による日内休眠パターンの変化
スンクスの皮下温度を経時的に測定した．上段には寒冷順化前の体温，下段には寒冷順化後の体温を示した．横軸は時間を表しており，白抜きが明期，黒が暗期を示している．（Horii et al. (2022). Suncus murinus as a novel model animal that is suitable for elucidating the mechanism of daily torpor. *Biomed Res (Tokyo)*, **43**(2), 53–57.より改変）

とした夜行性の哺乳動物である（Kurachi et al., 2007）（大舘の稿参照）．スンクスは齧歯目であるマウスやラットが行わない，嘔吐をするなどの特徴から，消化管の研究等にも有用な動物である．スンクスは暖かい地方に生息し，低温環境下では不動化することから，低温に不耐性な動物であるとされてきた（織田ほか，2011）．一方で，前述のように，スンクスも休眠を行う動物である（Ishii et al., 2002）．我々の研究では，スンクスが環境温度によって日内休眠を調節する動物であることを見出してきた．24℃の部屋で飼育すると，わずかな日内変動はあるものの体温は著しく低下することはない．一方，室温を20℃に設定すると，スンクスの体温は平均約 3 回/4 日という頻度で 30℃以下の低体温を呈する．さらに室温を16℃，12℃，8℃と低下させると，室温の低下にともない，体温が 30℃以下の低体温の時間は延長し，スンクスは平均約 5 回/4 日という高頻度で日内休眠をおこなうようになる．このことから，スンクスは寒冷の環境刺激によって日内休眠を誘発することのできる実験動物であるといえる（Horii et al., 2022）．さらに，非常に興味深いことに，このように寒冷を経験したスンクスを，本来日内休眠をほとんど行わない 24℃の室温におくと，寒冷経験前と比較し頻繁に日内休眠を行うようになる（図 3）．このことは寒冷環境で休眠のためのプライミングが行われ，その後の 24℃環境においても日内休眠を引き起こしやすいような変化が誘導されることを示唆する．寒冷順化がスンクスにもたらす変化の実態等，今後解明すべき課題が多く残されている．

さて，スンクスにおける日内休眠は，制限給餌を行なわずに寒冷刺激により誘発することができるが，マウスは制限給餌なしでは寒冷による日内休眠は行わない．シベリアンハムスターを用いた研究では，絶食誘導性の日内休眠と寒冷に誘導される日内休眠は様相が異なることが報告されている（Diedrich et al., 2015）．マウスにおける絶食誘導性の日内休眠の研究に加え，スンクスの寒冷誘導性の日内休眠の研究という異なる手法の休眠誘導によって，哺乳動物の普遍的な休眠メカニズムの解明に寄与できると期待している．スンクスは遺伝子組換え等の技術が発展しておらずマウスと比較し未開拓な点の多い実験動物ではあるが，冬眠・休眠の機序を解明するためのモデルとして，興味深い実験動物であると言える．

## 4．冬眠しない哺乳動物における人為的冬眠様低体温誘導

冬眠する哺乳動物の特殊な性質を医療に活かす試みとして，これまで冬眠する哺乳動物を用いた研究を紹介してきた．ただその一方で，体温の低下は冬眠しない哺乳動物にとって一般に有害な事象である．例えば，ヒトでは体温が 20℃以下になると心室細動などの致死的な不整脈が生じるため（Ivanov, 2000; Johansson et al., 1996），極度の低体温状態に誘導することは容易ではない．冬眠の特質を医療に応用するためには，冬眠しない動物を障害なく低体温状態に誘導するとともに正常体温に復帰させる方法の確立が必須である．そこで，冬眠しない哺乳動物を冬眠様の極度の低体温状態に安全に誘導する方法の確立についての研究を紹介したい．

### 4.1　アデノシン A1 受容体シグナルを用いた低体温誘導

ハムスターにおいては，中枢のアデノシン A1 受容体を阻害することにより，冬眠導入期の体温低下がキャンセルされることが報告されている（Tamura et al., 2005）（渡邊の稿参照）．また，アデノシン A1 受容体アゴニストである N6-cyclohexyladenosine（CHA）をハムスターの側脳室内へ投与して低温環境に置くと，冬眠と同じような低体温に誘導することが可能である（Miyazawa et al., 2008）．これらの事実は，冬眠時の体温低下に中枢のアデノシン A1 受容体の活性化が重要であることを示すものである．興味深いことに，CHA の脳室内投与によって誘発される低体温は，冬眠しないラットにおいても再現できた（Shimaoka et al., 2018）．さらに，通常は致死的な 20℃以下の体温であっても本方法で低体温へ誘導したラットでは洞調律（心臓の規則正しいリズム）は維持されること，体温を回復させた後に臓器傷害を示す所見が認められないことも確認できた．これらの成果は，冬眠する哺乳動物が自発的に低体温となる仕組み，および低温による悪影響を回避する仕組みが，冬眠に固有の機序に依存するものではないことを示唆する点で極めて重要である．多くの哺乳動物に普遍的に備わっている仕組みを上手く使うことによって，特定の種の動物が冬眠を成立させているのであれば，人為的にその仕組みを活性化させれば人工冬眠を誘発できることになる．完全に冬眠と一致する低体温でなくとも，冬眠中の動物が示すメリットを引き出すための安全な低体温をヒトや伴侶動物で誘導できると期待される．

### 4.2　麻酔薬を用いた低体温誘導

低体温の医療応用を前提とした場合，脳室内投与は必ずしも適切な方法とは言い難い．このような課題に対応するために，私たちは麻酔により体温が低下すること（Shimizu and Saito, 1991）に着目して，安全な低体温誘導法の確立に着手した．ラットに麻酔を施し冷却すると，体温は顕著に低下するものの，25℃を下回ると正常な心拍動が維持されず，最終的には心停止してしまう（Shimaoka et al., 2021）．一方，冬眠する哺乳動物であるハムスターでは，麻酔下で強制的に 25℃以下の低体温へ誘導しても心停止に至ることはない（Miyazawa et al., 2008）．このような事実を素直に受け入れれば，生得的な低温耐性能があるから冬眠する哺乳動物は低体温下で生存できる，それゆえに低温耐性能のない動物に冬眠様の低体温を誘導することは不可能である，という結論に至るのが妥当であり，ラットを低体温に誘導するトライアルをこれ以上継続する理由は見あたらない．しかし，CHA の脳室内投与実験から，冬眠しない動物でも 20℃以下の低体温で臓器傷害を起こすことなく維持し，問題なく平常体温に復帰させられることが示されたので，条件検討を粘り強く繰り返すことができた．試行錯誤の結果，吸入麻酔薬を用いて，体温低下に伴い麻酔濃度を調節する方法を確立するに至った（Shimaoka et al., 2021）．体温がある時点に達した段階で麻酔量を徐々に落としていくと，最終的に 15℃の状態で 6 時間は生存できる．さらにここから体温の回復も可能である．また，AST（アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ），ALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ），LDH（乳酸脱水素酵素），BUN（尿素窒素）といった主要臓器の障害の指標となる血液生化学値の測定結果から，この方法で低体温状態をある程度の時間持続しても臓器機能に大きな影響を与えないと考えられた．現在，この方法で誘導した低体温に，冬眠する哺乳動物が示す医療応用可能な特性が発現しているかを検証しているところである．将来的には，極度の低体温域を活用した低体温療法，さらには夢の「人工冬眠」に応用できる可能性があると期待している．

麻酔による低体温は，麻酔薬が体温調節中枢を抑制することで誘導されるものと考えられる．実際，ラットの体温が 27.5℃で麻酔吸入を停止した場合には，体温調節中枢の機能が回復するためか，震えが誘発され体温が上昇する．興味深いことに，22.5℃の時点で麻酔を停止した場合は，吸入を停止したにも関わらず震えを起こすことなく体温は低下し続け，15℃の体温で少なくとも 6 時間の維持が可能であった（Shimaoka et al., 2021）．この

ことから，体温調節中枢は体温が低くなるにつれて強く活性化されるものの，ある温度を下回ると応答しなくなる性質を持っていると想定できる．熱産生の亢進反応と熱放散の抑制反応を活性化することのできる下限の温度が 27.5℃から 22.5℃の間にあり，それを下回ると冬眠様の低体温へ移行するという考え方である．麻酔による冬眠様低体温誘導では，この下限の温度を下回る体温に誘導するところまで麻酔を存在させることが重要であると予想される．同時に，この下限温度を下回る領域の体温では，麻酔のない状態，すなわち脳の一部は機能する状態であることが，生存に必要であることも特筆すべき点である．つまり，低体温下では，呼吸や心拍等の機能に関しては能動的な生理機能が維持される必要があると考えるのが妥当である．冬眠する動物と冬眠しない動物は，自らの制御でこのレンジに移行できる動物とそうでない動物という区分けが成立するかも知れない．もしこの想定が正しいのならば，体温調節中枢が機能する下限の温度を下回る温度域にまで体温を低下させる手法であれば，麻酔を使用する方法と同様に低体温誘導が可能であると考えられる．例えば，TRPV1 チャネルのアゴニストの全身性の投与は熱放散の促進と震えの抑制により体温を低下させる（Szolcsányi, 2015）ので，このような機序を応用することによっても冬眠様低体温誘導が可能であると期待される．

## 5．まとめ

哺乳動物の冬眠は，哺乳動物が獲得してきた恒常性を柔軟に変化させ，体内・体外環境の変化に対応するという興味深い生存戦略である．哺乳動物の常識を覆すような冬眠する哺乳動物の生理現象を明らかにし，メカニズムを人工的に再現することは，医療分野，ライフサイエンス研究分野等への多大なる貢献が期待される．

本稿では実験室内における冬眠･休眠の誘導法として，飼育環境等を整え，できる限り生理的な冬眠行動を再現する方法や，麻酔等の非生理的な方法で冬眠時の状態を再現する方法を紹介した．どのような方法を選択し実験を行なっていくかによって，様々なバリエーションの冬眠研究が発展する．国内外のさまざまな冬眠研究が相互作用し，冬眠や休眠に関わる研究成果が実社会へ貢献することを期待している．

## 参考文献

Anegawa, D., Sugiura, Y., Matsuoka, Y., Sone, M., Shichiri, M., Otsuka, R., Ishida, N., Yamada, K., Suematsu, M., Miura M., & Yamaguchi, Y. (2021). Hepatic resistance to cold ferroptosis in a mammalian hibernator Syrian hamster depends on effective storage of diet-derived α-tocopherol. *Commun Biology,* **4**(1), 796. doi: 10.1038/s42003-021-02297-6

Daan, S., Barnes, B. M., & Strijkstra, A. M. (1991). Warming up for sleep? Ground squirrels sleep during arousals from hibernation. *Neurosci Lett,* **128**(2), 265-268. doi: 10.1016/0304-3940(91)90276-y

Dark, J. (2005). Annual lipid cycles in hibernators: Integration of physiology and behavior. *Annu Rev Nutr,* **25**(1), 469-497. doi: 10.1146/annurev.nutr.25.050304.092514

Diedrich, V., Kumstel, S., & Steinlechner, S. (2015). Spontaneous daily torpor and fasting-induced torpor in Djungarian hamsters are characterized by distinct patterns of metabolic rate. *J Comp Physiol B*, **185**(3), 355-366. doi: 10.1007/s00360-014-0882-4

Ghosh, S., Indracanti, N., Joshi, J., Ray, J., & Indraganti, P. K. (2017). Pharmacologically induced reversible hypometabolic state mitigates radiation induced lethality in mice. *Sci Rep*, **7**(1), 14900. doi: 10.1038/s41598-017-15002-7

Græsli, A. R., Evans, A. L., Fahlman, Å., Bertelsen, M. F., Blanc, S., & Arnemo, J. M. (2015). Seasonal variation in haematological and biochemical variables in free-ranging subadult brown bears (Ursus arctos) in Sweden. *BMC Vet Res*, **11**(1), 301. doi: 10.1186/s12917-015-0615-2

Harlow, H. J., & Frank, C. L. (2001). The role of dietary fatty acids in the evolution of spontaneous and facultative hibernation patterns in prairie dogs. *J Comp Physiol B*, **171**(1), 77-84. doi: 10.1007/s003600000148.

Horii, Y., Shimaoka, H., Horii, K., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2019). Mild hypothermia causes a shift in the alternative splicing of cold-inducible RNA-binding protein transcripts in Syrian hamsters. *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology*, **317**(2), R240-R247. doi: 10.1152/ajpregu.00012.2019

Horii, Y., Okadera, K., Miyawaki, S., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2022). Suncus murinus as a novel model animal that is suitable for elucidating the mechanism of daily torpor. *Biomed Res (Tokyo)*, **43**(2), 53-57. doi: 10.2220/biomedres.43.53

Ishii, K., Uchino, M., Kuwahara, M., Tsubone, H., & Ebukuro, S. (2002). Diurnal fluctuations of heart rate, body temperature and locomotor activity in the house musk shrew (*suncus murinus*). *Exp Anim*, **51**(1), 57-62. doi: 10.1538/expanim.51.57

Ivanov, K. P. (2000). Physiological blocking of the mechanisms of cold death: theoretical and experimental considerations. *J Therm Biol*, **25**(6), 467-479. doi: 10.1016/s0306-4565(00)00012-7

Johansson, B. W. (1996). The hibernator heart--nature's model of resistance to ventricular fibrillation. *Cardiovasc Res*, **31**

(5), 826–832. doi: 10.1016/0008-6363(95)00192-1

川道武男，近藤宣昭，森田哲夫（2000）冬眠する哺乳類．東京大学出版会，東京．

Kondo, N., Sekijima, T., Kondo, J., Takamatsu, N., Tohya, K., & Ohtsu, T. (2006). Circannual control of hibernation by HP complex in the brain. *Cell*, **125**(1), 161–172. doi: 10.1016/j.cell.2006.03.017

Kemper, G. B., & Ruben, R. L. (1982). Effect of 7,12-dimethylbenz (a) anthracene on the integument of the hibernating and nonhibernating 13-lined ground squirrel. *Comp Biochem Physiol C Comp Pharmacol*, **73**(2), 445–450. doi: 10.1016/0306-4492(82)90151-4

Kurachi, M., Chau, B. L., Dang, V. B., Dorji, T., Yamamoto, Y., Nyunt, M. M., Maeda, Y., Chhum-Phith, L., Namikawa, T., & Yamagata, T. (2007). Population structure of wild musk shrews (*Suncus murinus*) in Asia based on mitochondrial DNA variation, with research in Cambodia and Bhutan. *Biochem Genet*, **45**(3–4), 165–183. doi: 10.1007/s10528-006-9051-0

Larkin, J. E., & Heller, H. C. (1999). Sleep after arousal from hibernation is not homeostatically regulated. *Am J Physiology*, **276**(2), R522-R529. doi: 10.1152/ajpregu.1999.276.2.r522

Lohuis, T. D., Harlow, H. J., & Beck, T. D. I. (2007). Hibernating black bears (Ursus americanus) experience skeletal muscle protein balance during winter anorexia. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, **147**(1), 20–28. doi: 10.1016/j.cbpb.2006.12.020

Matsuo, T., Isosaka, T., Tang, L., Soga, T., Kobayakawa, R., & Kobayakawa, K. (2021). Artificial hibernation/life-protective state induced by thiazoline-related innate fear odors. *Commun Biology*, **4**(1), 101. doi: 10.1038/s42003-020-01629-2

Miyazawa, S., Shimizu, Y., Shiina, T., Hirayama, H., Morita, H., & Takewaki, T. (2008). Central A1-receptor activation associated with onset of torpor protects the heart against low temperature in the Syrian hamster. *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology*, **295**(3), R991-R996. doi: 10.1152/ajpregu.00142.2008

Musacchia, X. J., & Barr, R. E. (1968). Survival of whole-body-irradiated hibernating and active ground squirrels; Citellus tridecemlineatus. *Radiat Res*, **33**(2), 348. doi: 10.2307/3572485

織田銑一.，東家一雄.，宮木孝昌.（2011）．スンクスの生物学（磯村源藏 監修）．学会出版センター，東京．

Ruf, T., & Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biol Rev*, **90**(3), 891–926. doi: 10.1111/brv.12137

Sano, Y., Shiina, T., Naitou, K., Nakamori, H., & Shimizu, Y. (2015). Hibernation-specific alternative splicing of the mRNA encoding cold-inducible RNA-binding protein in the hearts of hamsters. *Biochem Biophys Res Commun*, **462**(4), 322–325. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.135

Sharapov, V. M. (1984). Influence of animal hibernation on the development of mycoses. *Mycopathologia*, **84**(2–3), 77–80. doi: 10.1007/bf00436516

関島恒夫.（2002）．冬眠できない動物の体温低下現象．遺伝，**56**(1)，61–67.

椎名貴彦.，Marwan Draid.，志水泰武.，武脇　義.（2007）．哺乳動物の冬眠行動に影響する環境条件．日本野生動物医学会誌，**12**，35–39.

Shimaoka, H., Kawaguchi, T., Morikawa, K., Sano, Y., Naitou, K., Nakamori, H., Shiina, T., & Shimizu, Y. (2018). Induction of hibernation-like hypothermia by central activation of the A1 adenosine receptor in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci*, **68**(4), 425–430. doi: 10.1007/s12576-017-0543-y

Shimaoka, H., Shiina, T., Suzuki, H., Horii, Y., Horii, K., & Shimizu, Y. (2021). Successful induction of deep hypothermia by isoflurane anesthesia and cooling in a non-hibernator, the rat. *J Physiol Sci*, **71**(1), 10. doi: 10.1186/s12576-021-00794-1

Shimizu, Y., & Saito, M. (1991) Activation of brown adipose tissue thermogenesis in recovery from anesthetic hypothermia in rats. *Am J Physiol*, **261**, R301-R304. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261. 2.R301.

Shimozuru, M., Iibuchi, R., Yoshimoto, T., Nagashima, A., Tanaka, J., & Tsubota, T. (2013). Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. *J Mammal*, **94**(3), 618–627. doi: 10.1644/12-mamm-a-246.1

Sonoyama, K., Fujiwara, R., Takemura, N., Ogasawara, T., Watanabe, J., Ito, H., & Morita, T. (2009). Response of Gut Microbiota to Fasting and Hibernation in Syrian Hamsters. *Appl Environ Microbiol*, **75**(20), 6451–6456. doi: 10.1128/aem.00692-09

Szolcsányi, J. (2015). Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects. *Temperature*, **2**(2), 277–296. doi: 10.1080/23328940.2015.1048928

Tamura, Y., Shintani, M., Nakamura, A., Monden, M., & Shiomi, H. (2005). Phase-specific central regulatory systems of hibernation in Syrian hamsters. *Brain Res*, **1045**(1–2), 88–96. doi: 10.1016/j.brainres.2005.03.029

Tinker, D. B., Harlow, H. J., & Beck, T. D. (1998). Protein use and muscle-fiber changes in free-ranging, hibernating black bears. *Physiol Zool*, **71**(4), 414–424. doi: 10.1086/5154

Trachsel, L., Edgar, D. M., & Heller, H. C. (1991). Are ground squirrels sleep deprived during hibernation? *Am J Physiology-Regulatory Integr Comp Physiology*, **260** (6), R1123-R1129. doi: 10.1152/ajpregu.1991.260.6.r1123

Webb, G. P., Jagot, S. A., & Jakobson, M. E. (1982). Fasting-induced torpor in Mus musculus and its implications in the use of murine models for human obesity studies. *Comp Biochem Physiol Part A Mol Integr Physiol*, **72**(1), 211–219. doi: 10.1016/0300-9629(82)90035-4