



Title	爬虫類における睡眠恒常性と皮質が持つ役割の解明
Author(s)	羽鳥, 聖七
Description	配架番号 : 2969
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16694号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16694
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98668
Type	doctoral thesis
File Information	HATORI_Sena.pdf, 全文



学位論文

爬虫類における睡眠恒常性と
皮質が持つ役割の解明

(Sleep Homeostasis in Lizards and
the Role of the Cortex)

2025 年 12 月

北 海 道 大 学

羽 鳥 聖 七

Sena Hatori

学位論文

爬虫類における睡眠恒常性と
皮質が持つ役割の解明

(Sleep Homeostasis in Lizards and
the Role of the Cortex)

2025 年 12 月

北 海 道 大 学

羽 鳥 聖 七

Sena Hatori

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	6 頁
方法	13 頁
結果	22 頁
考察	40 頁
結論	46 頁
謝辞	48 頁
利益相反	50 頁
引用文献	51 頁

発表文献目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. **Sena Hatori***, Sho T. Yamaguchi*, Riho Kobayashi, Kazuki Okamoto, Zhiwen Zhou, Koki T. Kotake, Futaba Matsui, Hiroyuki Hioki, Hiroaki Norimoto. Sleep homeostasis in lizards and the role of the cortex. Proc Natl Acad Sci USA. 2025; 122 (16) e2415929122

本研究の一部は以下の学会にて発表を行った。

1. **羽鳥聖七**, 山口翔, 松井双葉, 周至文, 乗本裕明, 睡眠研究への爬虫類導入の試み, 第 73 回日本薬理学会北部会, 札幌, 2022
2. **羽鳥聖七**, 山口翔, 松井双葉, 周至文, 乗本裕明, Sleep homeostasis of a monophasic sleep in reptiles, 第 96 回日本薬理学会年会, 横浜, 2022
3. **羽鳥聖七**, 山口翔, 松井双葉, 周至文, 乗本裕明, Sleep homeostasis in lizards, 第 46 回日本神経科学大会, 仙台, 2023
4. **羽鳥聖七**, 山口翔, 松井双葉, 周至文, 乗本裕明, Sleep homeostasis in lizards and the role of cortex, 第 101 回日本生理学会大会, 小倉, 2024
5. **羽鳥聖七**, 山口翔, 松井双葉, 周至文, 乗本裕明, Sleep homeostasis in lizards and the role of cortex, 第 47 回日本神経科学大会, 福岡, 2024

要旨

【背景と目的】

睡眠は幅広い生物種で保存されており、その必要量は種ごと、さらには個体ごとに定められている。必要睡眠量に対し、不足した睡眠を補う性質は睡眠恒常性と呼ばれ、例えば、覚醒時間延長に伴う眠気の蓄積や長く深い睡眠に伴う眠気の消失は、睡眠恒常性によるものである。これまで哺乳類と鳥類において睡眠恒常性の存在が確認されており、これらの動物において、眠気や睡眠の深さは、皮質の神経活動を記録した脳波を元に議論される。複数の先行研究では、その皮質自体が睡眠恒常性制御に関わる脳領域であることが示唆され、哺乳類では睡眠恒常性を議論する元となる脳波の測定領域と睡眠恒常性を制御する脳領域が同一である可能性が浮上した。そのため、皮質の活動操作によって睡眠恒常性の变化を調べる実験を行う場合、皮質の活動操作が睡眠恒常性に影響を与え脳波に変化が起きたのか、ベースの神経活動や脳波の出力そのものに影響を与えてしまったのか、区別できないという問題があり、睡眠恒常性を制御する脳領域の理解は曖昧なままであった。

本問題に対し、皮質以外の脳領域から脳波を取得する動物を用いることが解決策になると考え、本研究では皮質下領域から記録した神経活動を元に睡眠が定義されるフトアゴヒゲトカゲ (*Pogona vitticeps*、以下トカゲ) を用いた。トカゲは脳領域の多くが哺乳類と遺伝学的に高い相同性を示し、マウスやラットと同様に薬理実験や電気生理学実験を行うことができる。また、睡眠の観点からも、トカゲは哺乳類や鳥類と同様に徐波睡眠とレム睡眠を繰り返すことが知られている。そのため、トカゲに睡眠恒常性が存在するのであれば、皮質が睡眠恒常性に与える影響を調べるために適したモデル動物であると考えた。

そこで、まずトカゲにおける睡眠恒常性の存在を確かめ、その後睡眠恒常性における皮質の役割を明らかにすることを目的として実験を行った。

【対象と方法】

本研究ではトカゲをモデル動物とした。まず、成体トカゲの背側脳室隆起 (dorsal ventricular ridge, DVR) と呼ばれる皮質下領域に、脳波を取得するための電極を留置する手術を行った。電極の留置部位は、一連の実験後にトカゲを灌流固定し、脳切片を作製することによって確認した。手術後十分な回復期間を待ち、最初に通常睡眠時の脳波を記録した。その翌日、眠る兆候を示したトカゲを筆で触り強制的に起こし続ける断眠と呼ばれる手法を 7 時

間継続して行い、トカゲを睡眠不足にさせ、その直後の回復睡眠中における脳波を計測した。睡眠恒常性の指標として、徐波睡眠中における脳波の低周波成分（デルタ波）の強さであるデルタパワーが頻用され、デルタパワーは眠気が強く睡眠が深いほど高い値を示すことが知られている。このため、通常徐波睡眠時と回復睡眠中における徐波睡眠時のデルタパワーを比較し、トカゲにおいても睡眠恒常性の指標とした。

また、断眠によるシナプスの伝達効率の変化を調べるため、断眠後に急性脳切片を作製し、DVRの神経細胞にパッチクランプ法を適用した。

続いて、皮質が睡眠恒常性に関与する脳領域であるかを明らかにするために、両側皮質を外科的に切除し、露出したDVRに脳波電極を留置した。その後、同様に断眠実験を行い、得られた脳波を通常個体と比較した。また、皮質切除個体におけるDVRの神経細胞や、皮質の神経細胞からパッチクランプ記録を行うことで、皮質の神経細胞が断眠後の睡眠時脳波に与える影響を解析した。

【結果と考察】

最初に、通常睡眠時と回復睡眠時のデルタパワーを比較した。回復睡眠においてデルタパワーが有意に強まっており、増強されたデルタパワーは睡眠時間の経過による寝不足の解消とともに弱まった。脳波を詳細に解析すると、断眠後のデルタパワー増大は、トカゲの徐波睡眠に特徴的な脳波であるsharp wave (ShW) と呼ばれる 1Hz ほどの波の振幅増大に起因することが明らかとなった。ShWの振幅増大は神経活動の同期性の増大だと考えられるため、パッチクランプ法によって断眠後のシナプス強度の変化を検討したところ、確かにDVRのシナプスの伝達効率は断眠後に増強していた。この結果から、覚醒中の様々な入力によりシナプスの伝達効率が高まり神経の同期性が増大した結果、その後の睡眠中にShWの振幅が増大しデルタパワーが増強するという機構が想定され、哺乳類を用いた先行研究と矛盾しない結果が得られた。

続いて、睡眠全体の長さや睡眠中の睡眠ステージ構成に代表される睡眠構築が、断眠によってどのように変化するかを解析した。その結果、徐波睡眠やレム睡眠の切り替え周期、徐波睡眠やレム睡眠の1回あたりの長さなどいずれの指標においても有意な差は見られなかった。以上から、トカゲは睡眠を長くするのではなく、深くすることによって寝不足を代償する機構を有していると考えられ、睡眠恒常性は爬虫類であるトカゲにも保存された性質であることが明らかとなった。

次に、皮質が睡眠恒常性に与える影響を調べるため、トカゲの皮質を外科的に切除した。記録後に作製した脳切片から、本実験で切除した領域は主に哺乳類の新皮質と遺伝学的な相同性が高い領域であった。まず、皮質切除が通常の睡眠に与える影響を調べたところ、睡眠構築や睡眠中脳波のいずれにおいても変化はなく、皮質は通常の睡眠には寄与しないことが確認された。そこで、皮質切除個体を断眠し、回復睡眠中のデルタパワーの変化を通常個体と比較した。その結果、皮質切除群では回復睡眠中に見られたデルタパワーの増大が減弱した。さらに皮質切除群では、断眠後に見られた ShW の振幅増大や DVR におけるシナプス強度の増大も観察されなかった。最後に、皮質におけるシナプスの伝達効率をパッチクランプ法によって検討したところ、断眠後に皮質においてもその伝達効率が高まることが明らかとなった。以上の結果から、覚醒中の皮質における神経の興奮性増大が DVR の神経活動の同期性を生み出す駆動力となり、長期覚醒後に睡眠が深くなるという機構が想定される。また本研究から、皮質は睡眠量そのものを制御するのではなく、睡眠恒常性に働きかけることで、不足した睡眠量を補う役割を持つ脳領域であることが示された。

【結論】

本研究では、睡眠恒常性が爬虫類にも存在することを示し、哺乳類と鳥類を含めた有羊膜類間で保存された性質であることを明らかにした。さらに睡眠恒常性によって睡眠が深くなる機構が、シナプスレベルで哺乳類と類似することを示し、睡眠恒常性はその性質だけでなく背景のメカニズムまで有羊膜類間で共通する可能性がある、という知見を加えた。今後両生類や魚類、無脊椎動物を用いた研究によって、睡眠恒常性の進化学的な意義やルーツに迫ることが期待される。

また、これまで理解が曖昧であった睡眠恒常性に関わる脳領域について、皮質以外の脳領域から脳波を取得するというトカゲの利点を活かすことで、皮質が睡眠恒常性に寄与することを明示した。本研究を端緒とし、皮質に標的を絞り、睡眠恒常性の分子機構を解明する研究が加速するだろう。分子機構が同定されることで、寝不足やそれに伴うパフォーマンス低下にアプローチする創薬が可能になると考えられる。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

A	anterior, 前
ANOVA	analysis of variance, 分散分析
CLA	claustrum, 前障
D	dorsal, 背側
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DiI	1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate
DVR	dorsal ventricular ridge, 背側脳室隆起
L	lateral, 外側
LTD	long-term depression, 長期抑圧
M	medial, 内側
mEPSC	miniature excitatory postsynaptic currents, 微小興奮性シナプス後電流
NSD	non-sleep deprivation, 非断眠
n.s.	not significant, 有意ではない
P	posterior, 後
PBS	phosphate-buffered saline, リン酸緩衝生理食塩水
PFA	paraformaldehyde, パラホルムアルデヒド
P2V	peak to valley
RMS	root mean square, 二乗平均平方根
RNA	ribonucleic acid, リボ核酸
RS	recovery sleep, 回復睡眠
SD	sleep deprivation, 断眠
SEM	standard error of the mean, 標準誤差
ShW	sharp wave
V	ventral, 腹側
ZT	zeitgeber time

緒言

睡眠研究の社会的意義

睡眠は心身の健康に必要不可欠である。睡眠不足は身体機能や認知機能を低下させ、低下した機能は睡眠をとることによって回復する。1960年代に行われた実験では、11日間睡眠を剥奪すると幻覚や記憶障害が生じたものの、14時間の睡眠によって機能が完全に回復したとされており、寝不足が心身にきたす悪影響と睡眠が持つ回復機能は疑いようのないものである。こうした知見が知られているにもかかわらず、現代社会は慢性的な睡眠不足状態にあり、睡眠不足による経済損失は日本とアメリカだけでも年間5500億ドルに及ぶと算出されている (Hafner *et al.*, 2016)。寝不足や、それに伴う機能低下を回復させる睡眠の神経基盤を解明し、寝不足を標的とした治療や創薬に繋げる研究は、大きな社会的意義を持つと考える。

睡眠の定義

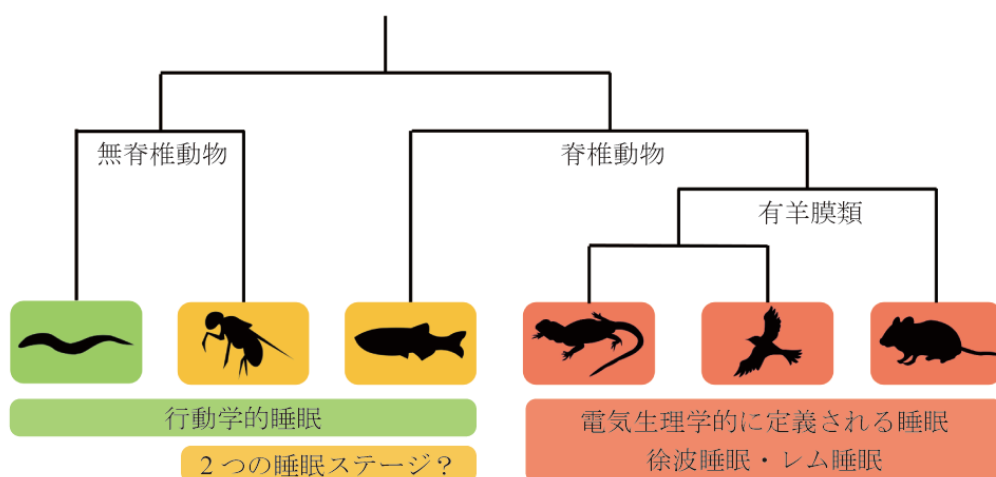
睡眠とは、行動学的特徴や脳波によって定義される生理状態である。行動学的な睡眠は、以下の4つによって定義される (Campbell and Tobler, 1984; Hendricks *et al.*, 2000a)。

- (1) 睡眠中は種ごとに特徴的な姿勢を保つ。
- (2) 睡眠中は外部刺激に対する反応性が低下し、覚醒閾値が増大する。
- (3) 睡眠は概日リズムの制御を受け、一日の中で特定の時間に多い(概日性)。
- (4) 睡眠量は個体ごとに決まっている (恒常性)。

これらによって、睡眠は単なる休息や麻酔状態、冬眠状態と明確に区別される。この定義に基づく行動学的な睡眠は、ショウジョウバエや線虫のみならず、中枢神経系を持たないクラゲやヒドラにも観察され、動物種間を超えて広く保存されている (図1、Hendricks *et al.*, 2000b; Shaw *et al.*, 2000; Raizen *et al.*, 2008; Nath *et al.*, 2017; Kanaya *et al.*, 2020)。

その一方、脳波によって定義される睡眠は、脳波を取得するための測定環境や技術的な制約のため、現状では哺乳類と鳥類、爬虫類からなる有羊膜類においてのみ報告されている (図1、Blumberg *et al.*, 2020)。脳波は電極周辺の神経活動の総和を反映するため、脳波の時系列データを通じて神経活動の推移を概観できる。神経活動は睡眠ステージによって異なるため、脳波から睡眠ステージを判別でき、睡眠ステージは主に徐波睡眠とレム睡眠の二つに大別される。徐波睡眠はノンレム睡眠とも呼ばれ、脳波におけるデルタ波と呼ばれる低周波成分 (0.5-4 Hz) によって特徴づけられる。ヒトではノンレ

ム睡眠の中でさらにステージ分けがなされ、その中でも深い睡眠を徐波睡眠と呼ぶが、モデル動物においては一括りに徐波睡眠とするのが一般的であるため、本論文においても以後徐波睡眠として統一する。一方レム睡眠は、覚醒時に似た比較的高い周波数帯成分が優位となる脳波によって判別され、脳波以外にもレム（REM）という名の元でもある急速眼球運動（Rapid-eye-movement）や、アトニアと呼ばれる筋緊張の抑制など、特徴的な現象が見られる睡眠ステージである。多くの動物において、徐波睡眠とレム睡眠は一定の割合を保ちながら睡眠中に切り替えられ、その比率は動物種によって異なる（Capellini *et al.*, 2008; Greening and McBride, 2022; Shein-Idelson *et al.*, 2016; Albeck *et al.*, 2022）。



（羽鳥・乗本、2022、一部改変）

図 1 睡眠の種間保存性

羽鳥・乗本, 2022 を一部改変した。睡眠は幅広い動物種に保存された生理状態である。哺乳類、鳥類、爬虫類を含む有羊膜類では脳波に基づいて睡眠が定義され、徐波睡眠とレム睡眠が存在する。無脊椎動物を含めそれ以外の動物種では、行動学的な指標から睡眠が定義される。

睡眠恒常性

睡眠恒常性は、覚醒時間が延長すると不足した睡眠を補うよう働きかけ、個体の睡眠量を調節する性質である。睡眠恒常性は前述のように睡眠を定義づける要素の一つであり、睡眠がこの恒常性と概日性によって制御されるという二過程モデル（Two process model）は、睡眠覚醒リズムを表現するフレームワークとして広く受け入れられている（Borbély *et al.*, 1982; Daan *et al.*, 1984）。こうした背景から、睡眠恒常性が個体の睡眠を司る基盤となることは明白である。

睡眠恒常性は不足した睡眠を補う性質であるため、その検証には個体を強制的に覚醒させ続ける断眠実験が用いられる。行動学的に睡眠が定義される動物における睡眠恒常性は、断眠後の睡眠時間の延長と、外部刺激に対する反応性の低下（すなわち覚醒閾値の増大）によって確認される（Shaw *et al.*, 2000; Raizen *et al.*, 2008）。

一方、脳波によって睡眠が定義される哺乳類や鳥類では、睡眠恒常性は特に徐波睡眠の恒常性を指すことが一般的であり、徐波睡眠中に優位となる脳波の低周波成分（デルタパワー）によって議論される。デルタパワーは覚醒時間に伴って強まり、睡眠時間の経過とともに弱まる（図 2、Franken *et al.*, 1991; Rattenborg *et al.*, 2009; Dijk, 2009）。そのため、デルタパワーは睡眠恒常性を反映した眠気の指標として頻用され、特に徐波睡眠中のデルタパワーは睡眠の深さを反映すると位置付けられている。すなわち、哺乳類や鳥類においては、覚醒時間が長引くと、睡眠恒常性によってその後の睡眠はより深くなり、それによって強い眠気が解消されるという機構が想定される。しかし、哺乳類と鳥類以外の動物で電気生理学的に睡眠が定義される爬虫類において、正確な脳波測定に基づいて睡眠恒常性を検討した報告は未だ存在しない。そのため、睡眠恒常性は進化的に保存された性質であるか、それとも収斂進化によって哺乳類と鳥類が進化の過程で独自に獲得した機構であるかは明らかになっていない。

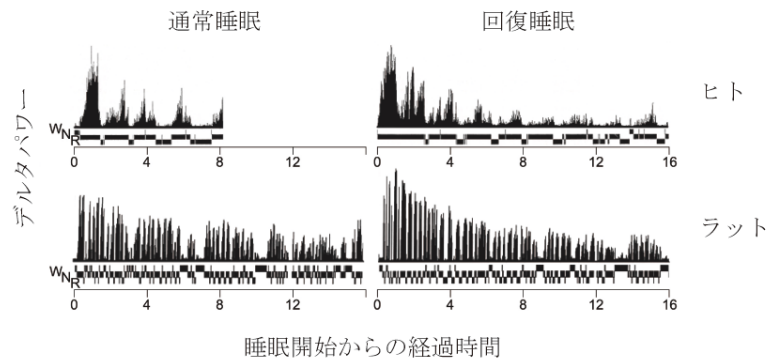


図 2 睡眠恒常性の指標としてのデルタパワー

Dijk, 2009 の図を一部改変した。いずれの図も縦軸はデルタパワーの強さ、横軸は睡眠開始からの経過時間を示す。上がヒト、下がラットの結果である。通常睡眠（左）と比較して長期覚醒後の回復睡眠（右）では、デルタパワーが強まる性質があり、長期覚醒後に強まるデルタパワーはリバウンドと呼ばれる。睡眠時間の経過とともにデルタパワーが弱まる性質と、長期覚醒後のリバウンドを合わせ、デルタパワーは睡眠恒常性を反映した眠気の指標として頻用されている。

睡眠恒常性を制御する脳領域

睡眠恒常性に関わる脳領域は長らく不明であったが、近年いくつかの脳領域と睡眠恒常性の関係が示された。例えば、視床中心核の神経細胞を光遺伝学によって刺激することで断眠後の回復が早まり、縫線核のセロトニン作動性神経をジフテリア毒素によって除去することで断眠後に本来観察される深い睡眠が見られなくなることが報告されている (Gent *et al.*, 2018; Oikonomou *et al.*, 2019)。

なかでも、皮質は睡眠恒常性を制御する脳領域の候補として注目を集めており、近年その可能性を示唆する研究結果がいくつか発表されている (Krone *et al.*, 2021; Kon *et al.*, 2024; Sawada *et al.*, 2024)。これらの研究では、皮質の錐体細胞や抑制性神経細胞、皮質内のシナプス強度のそれぞれが睡眠恒常性制御に重要であると結論づけている。また、睡眠恒常性の指標であるデルタパワーは睡眠中の皮質全体で画一ではなく、過去の覚醒中の使用歴に基づき脳領域ごとに異なることを示した研究も、皮質が睡眠恒常性に関与する領域である可能性を示していると言える (Huber *et al.*, 2004; Huber *et al.*, 2006)。しかし、ここで問題となるのは、これらの研究はいずれも哺乳類を対象とした研究であり、哺乳類において睡眠や睡眠恒常性を定義づける脳波は皮質から取得する、という点である。すなわち、皮質から脳波を計測する哺乳類では、皮質の操作が睡眠恒常性に影響を与えたために脳波が変化したのか、皮質の操作が神経活動そのものに影響を与えてしまったために脳波の出力が変化したただけなのか、区別ができない。皮質以外の脳領域においては、海馬や嗅球などの領域が睡眠ステージごとに異なる神経活動を示すと知られているものの、記録難易度の高さや判定精度の限界から、一般化された睡眠ステージの判定方法は存在しない (Durán *et al.*, 2018; Bagur *et al.*, 2018)。そのため、哺乳類をモデル動物として睡眠恒常性に寄与する脳領域を明示することは困難であった。

そこで私は、皮質以外の脳領域から脳波を取得するモデル動物を用いて研究を行うことで、本課題を解決できると考え、本研究を着想した。

フトアゴヒゲトカゲ (*Pogona vitticeps*)

本研究では、爬虫類であるフトアゴヒゲトカゲ (図 3、*Pogona vitticeps*、以下トカゲ) を用いた。トカゲは近年、哺乳類や鳥類と同様に徐波睡眠とレム睡眠の存在が明らかとなった動物であり、夜にまとまった睡眠をとる単相性睡眠を特徴とし、睡眠中は脳波の活動を元に睡眠ステージを分類することができる (Shein-Idelson *et al.*, 2016)。その際、皮質ではなく皮質下にある背側

脳室隆起（dorsal ventricular ridge, DVR）と呼ばれる広範な脳領域から脳波を測定するため、トカゲは先に述べた哺乳類の弱みを克服した睡眠研究が可能である。

また、これまでの研究によって、トカゲは電気生理学実験や薬理学実験をマウスと同様に行うことができると示された（Shein-Idelson *et al.*, 2016; Norimoto *et al.*, 2020）。さらにシングルセル RNA シークエンス解析によると、爬虫類の脳領域は哺乳類のそれと高い遺伝学的な相同性を示すことが分かっており、特に本論文で研究対象とする皮質は、哺乳類でも見られるように、多様な神経種によって構成され、はっきりとした層構造を持つという特徴を有する（Tosches *et al.*, 2018; Hain *et al.*, 2022; Naumann *et al.*, 2015）。そのため、トカゲの脳は遺伝学的にも形態学的にも哺乳類のそれと比較できる可能性が高い。さらに、トカゲの脳は低酸素状態に強いため、神経の投射関係が維持された摘出全脳標本を数日間に渡って記録できるという特長を持つ。このように、爬虫類は哺乳類とある程度の近縁さを持ち、類似の実験手法を適応できつつ、その一方で独自の特長を有しているため、従来の研究手法では見えてこなかった知見を創出できる潜在性を持つ。



図 3 フトアゴヒゲトカゲ (*Pogona vitticeps*)

本研究では、爬虫類であるトカゲをモデル動物として用いた。

トカゲの睡眠

トカゲはヒトと同様に、昼行性で夜にまとまった睡眠をとる単相性睡眠を特徴とし、実験室環境下では夜間 12 時間ほど睡眠をとる（補足図 1、Shein-Idelson *et al.*, 2016）。睡眠中は徐波睡眠とレム睡眠をおよそ 1:1 の割合で繰り返し、その切り替え周期は外気温に依存し、室温下において 80 秒ほどである。徐波睡眠中は、哺乳類と同様にデルタ波優位の脳波が出現し、特に sharp wave (ShW) と呼ばれるトカゲ特有の波形を特徴とする。レム睡眠中は、哺乳類よりも高周波成分であるベータ波（10-30 Hz）優位の脳波が見られ、急速眼球運動を認める。こうした哺乳類と類似した特徴から、トカゲは睡眠研究を行うモデル動物として有用であると考えている。実際、睡眠中における脳領域間の活動相関の解明や、睡眠ステージの切り替えを担う中枢パターン生成器の存在の提唱など、トカゲに特有の脳構造や神経活動パターンを活かした独自の研究が進められている（Fenk *et al.*, 2023; Fenk *et al.*, 2024）。しかし、睡眠恒常性という基本的な性質の存在は未だ検証されていない。

本論文の目的

本研究の目的は、大きく分けて二つに大別される。

まず、爬虫類であるトカゲにも睡眠恒常性が存在するか検討することを目的として実験を行った。睡眠恒常性を確かめるため、脳波電極を留置したトカゲに断眠実験を行い、寝不足時の睡眠中脳波を解析した。さらに、睡眠恒常性の基盤となる機構を詳細に探るため、断眠後に脳切片を作製してパッチクランプ記録を行い、断眠によるシナプスの伝達効率の変化を評価した。

また、前述したように、哺乳類では皮質が睡眠恒常性に関わる脳領域であると示唆されているものの、皮質は脳波を測定する領域でもあるため、皮質が睡眠恒常性に寄与することを直接的に明示することは困難であった。そこで、皮質下領域 DVR から脳波を取得するというトカゲの特長を活かし、睡眠恒常性における皮質の役割を解明することを二つ目の目的とした。皮質の役割を検討するために、皮質を外科的に切除した個体を用いて断眠実験を行い、寝不足時の睡眠中脳波を解析した。

方法

実験動物・飼育環境

本研究における全ての実験は、私が博士課程在学中に研究を行った北海道大学と名古屋大学にて、それぞれ「北海道大学動物実験に関する規程」、「名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程」に則り、承認を得て行われた。承認番号は北海道大学 21-0092、名古屋大学 S240020-009 である。

実験には、雌雄を問わず 150-300 g のフトアゴヒゲトカゲ (*Pogona vitticeps*、図 3) を用いた。これらは全てブリーダーから購入した個体であり、北海道では Lab K、名古屋では KEY というブリーダーからそれぞれ購入した。飼育環境は午前 8 時から午後 8 時までを明期 (ZT 0-12)、午後 8 時から午前 8 時までを暗期に設定し (ZT 12-24)、午前 11 時から午後 5 時まではトカゲの体温を高める目的でバスキングライトを照射した (ZT 3-9)。トカゲは 45 × 45 × 30 cm のケージにて自由給水下で単独飼育を行い、一日に一度バスキングライトの照射時間帯に餌を与えた。餌はコオロギと野菜(青梗菜、レタス、ニンジン)のいずれかを一日おきに交互に与え、野菜にはカルシウムとビタミン D3 を補給するサプリメント (GEX 社) を添加した。

In vivo 脳波電極留置手術

手術前日の夕方、消炎鎮痛剤であるメロキシカム (0.2 mg/kg、Boehringer Ingelheim Animal Health Japan 社) を皮下投与した。その後、個体を記録環境に慣れさせるため、記録インキュベーター内のアクリルケージ (30 × 30 × 30 cm) に移し、記録環境で一晩睡眠させた。

手術当日、まず麻酔をかけるためにイソフルラン (Mylan 社) が充満した箱にトカゲを入れた。十分に麻酔が効いていることを確認した後、気管周囲にキシロカインスプレー (Sandoz Pharma 社) を噴射して局所麻酔を行い、気管カニューレを挿管した。トカゲを脳定位固定装置に固定後は、常に人工呼吸下で麻酔濃度を管理し、手術終了まで 0.5-3 % の濃度を維持した。また、手術終了までトカゲの下にヒートパッド (バイオリサーチセンター) を敷き、体温を 32℃ 付近に保つとともに、超音波血流計 (Hadeco 社) を用いて適宜心拍を確認した。

最初に、頭蓋骨を覆っている皮膚を 7.5 % ポビドンヨードスクラブ液 (明治) で消毒し、その後メスを用いて頭蓋骨上にある皮膚を切除した。頭蓋骨を露出させた後、頭蓋骨をドリル (アルゴファイルジャパン) で削り、頭頂眼周囲におよそ 8 × 5 mm の穴 (craniotomy) を開けた。露出した頭頂眼をア

ロンアルファ（第一三共）によって **craniotomy** 後部の頭蓋骨と固定し、その後マイクロシザーズやピンセットを用いて硬膜、くも膜、軟膜を順に取り除いた。硬膜とくも膜は術野を確保するためにできる限り取り除いた。その一方、トカゲの軟膜は脳に張り付く形で存在しており、除去する際に出血や脳を傷つける可能性があるため、電極を留置する部位のみ取り除いた。出血した場合は血を生理食塩水で洗い流し、出血が激しい場合にはアドレナリン液ボスミン外用液（第一三共）に浸した綿棒を出血箇所当てて止血した。**craniotomy** 周囲の頭蓋骨や皮膚は紫外線硬化型接着剤（3M 社）によって覆った（*）。

脳波を記録するための電極を留置する前に、2 本のステンレスワイヤー（0.005 inch、A-M SYSTEMS）を脳脊髄液に浸るように固定し、記録時の ground および reference 電極とした。脳波電極は同様のステンレスワイヤーを用い、3D プリンタで自作したマイクロドライブに取り付けた。また、断眠実験終了後に脳切片を作製して電極留置位置を同定するため、脳への挿入直前に、電極の先端に赤色蛍光色素である DiI（和光）を塗布した。電極は脳定位固定装置のアームに固定し、CLA/DVR に電極が到達するよう前脳領域に脳表から 1-1.5 mm ほどゆっくり挿入し、脳表の乾燥を防ぐために脳表を duragel（Neurotech 社）で覆った。その後、紫外線硬化型接着剤や歯科用セメント（サンメディカル）を用いて頭蓋骨とマイクロドライブを固定した。最後に、筋電図を測定するため、脳波電極に用いたものと同様のステンレスワイヤーを首付近の筋肉に刺入し、手術を終了した。

手術終了後、トカゲを脳定位固定装置から外し、メロキシカム（0.2 mg/kg）を皮下投与した。その後ヒートパッド上でトカゲが麻酔から覚めるのを待ち、呼吸や動作から麻酔が覚めたことを確認した後、ホームケージに戻した。また、手術の翌日にもメロキシカム（0.2 mg/kg）を皮下投与した。

皮質切除

トカゲの皮質はシート状の構造をしており、皮質下領域との間に隙間が存在する。そのため、皮質下領域を傷つけずに皮質だけを簡易に切除することが可能である。また、哺乳類における脳の外科的な切除で懸念されるような手術時の致死的な出血や術後の行動障害は見られない。

上述の手術と同様の過程を*まで行った後、**craniotomy** 内の見えている皮質をピンセットとマイクロシザーズによって切除した（図 4）。皮質切除後、電極が通常個体と同じ位置に到達するよう、皮質下領域に 0.5-1 mm ほど刺入した。以降の操作は上述の手術における電極留置後と全く同様に行った。

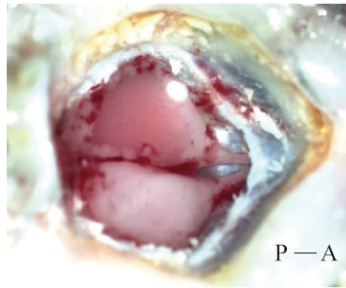


図 4 皮質切除

頭蓋骨を削り、開けた穴から見える皮質を外科的に切除した。写真右が anterior 側 (A)、左が posterior 側 (P) である。写真上の左半球はすでに皮質が切除され赤みがかった DVR が露出しており、写真下の右半球は切除されていない皮質が残っている。実際の手術では両側の皮質を切除し、露出した DVR に脳波電極を留置した。切除された脳領域は図 18 を参照。

睡眠記録

十分な回復期間後、手術前日に慣らした記録インキュベーター内のアクリルケージ (30 × 30 × 30 cm) にトカゲを移し、記録を行った。ケージ内は自由給水が可能であるが餌はなく、温度や光条件はホームケージと同様に管理した。記録は 32 Ch のヘッドステージ (Intan Technology 社) と Open Ephys 社の記録システムを用いて行い、データは 1000 Hz のサンプリングレートにて取得し、0.1-100 Hz のバンドパスフィルターをかけたものが記録された。通常睡眠を測定する際、記録は ZT 11 (19 時) から ZT 1 (翌朝 9 時) の間継続して行い、記録後はホームケージに戻した。断眠後の回復睡眠を記録する際は、断眠直後 ZT 18 (26 時) から ZT 1 (翌朝 9 時) まで記録した (図 5)。

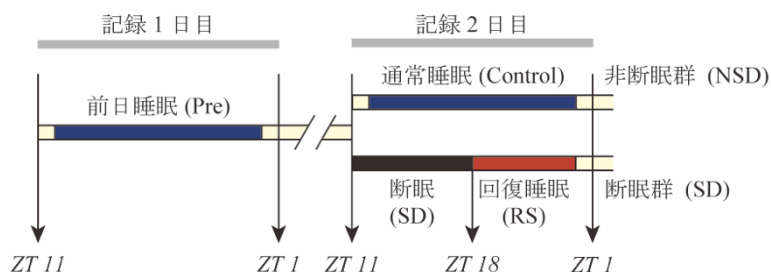


図 5 断眠実験の記録スケジュール

個体内コントロールと個体間コントロールを設けるため、非断眠群と断眠群を設け、実験は二日間にかけて行った。

断眠

まず断眠前日に通常時の睡眠（Pre sleep）を記録した。その翌日、ZT 11（19時）から ZT 18（26時）まで、断眠を行った。断眠はしばしば個体へのストレスの影響が懸念される方法であり、断眠後はストレスホルモンとして知られるコルチコステロンの血中濃度が増加し、その後の睡眠中におけるストレス応答遺伝子の発現上昇が知られている（Onaolapo *et al.*, 2016; Fukuoka *et al.*, 2022）。このような背景から、ストレスを極力小さくして断眠を行うため、哺乳類で頻用されるジェントルハンドリング法に加え、トカゲの好物であるコオロギを提示する餌提示法を考案し、この二つの手法を併用して断眠を行った（図 6）。基本的に個体が眠る兆候を示した時に筆でつつくジェントルハンドリング法を中心に行ったが、時間経過とともに目を瞑る回数が増加した場合は、ビーカー内に入れたコオロギを見せる餌提示法を併用した。断眠終了後は速やかに睡眠記録を開始し、回復睡眠（Recovery sleep, RS）を記録した。この一連の実験を行った群を断眠（Sleep deprivation, SD）群とした。その一方、断眠をせず二日連続で通常睡眠を記録した群を非断眠（Non-sleep deprivation, NSD）群として設け、断眠群と個体間比較を行った（図 5）。

また、日中の断眠実験（ZT 5-12、図 13 を参照）では、通常の生活環境と条件を揃えるため、ZT5 から ZT 9 まではバスキングライトの照射下で断眠を行った。

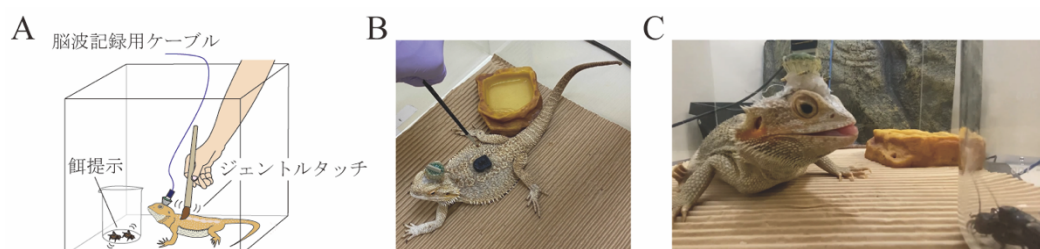


図 6 断眠方法

(A) 断眠の模式図。断眠は睡眠を記録するアクリルケージ内で行い、筆でつつくジェントルハンドリングと、トカゲの好物であるコオロギの提示を組み合わせて行った。

(B) ジェントルハンドリングによる断眠。

(C) コオロギの提示による断眠。

覚醒閾値の計測

コントロール群、断眠群いずれの群においても、USB カメラ（ELP 社）でビデオを記録しながら、ZT 21（午前 5 時）に 150 lux の光を照射した。光照射後から少なくとも片側の目を開けるまでの時間を測定し、かかった時間を外部刺激に対する反応性の指標とした。

電極留置部位の確認

イソフルラン吸入とケタミン（60 mg/kg）の筋肉内注射により十分な麻酔をかけ、角膜反射の消失を確認した。その後、十分に冷やしたリン酸緩衝生理食塩水（PBS）150 ml とそれに続く 4 %パラホルムアルデヒド（PFA）固定液 150 ml の経心灌流によって、脱血と組織の固定を行った。断頭後、脳を傷つけないよう慎重に取り出し、脳表に付着しているくも膜をピンセットで取り除いた。摘出した脳は 4 °C の冷蔵庫内で 4 %PFA に浸して一晩の後固定がなされ、翌日 30 %スクロース/PBS 溶液に移し替えスクロース置換が行われた。十分なスクロース置換が行われた後、スライディングミクロトーム（Eppredia 社）を用い、-21 °C 下で厚さ 100 μ m の冠状切片を作製した。作製した切片は、核を染める青色蛍光色素 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 入りの封入剤（H1500、Vector Laboratories）を用いて封入し、蛍光顕微鏡（Keyence 社）で DAPI と DiI のシグナルを撮像した。撮像した画像は、蛍光顕微鏡付属の解析アプリケーション（BZ-II）と ImageJ（NIH）を用いて解析した（図 7）。

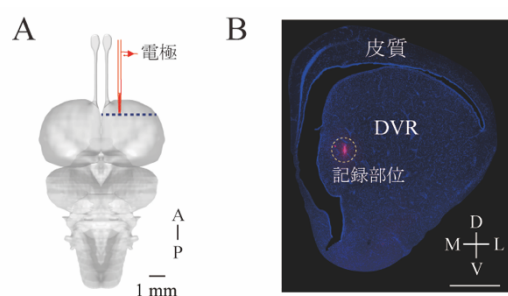


図 7 電極留置位置とその確認

(A) トカゲの脳全体を示す模式図。赤色は留置した電極を示し、青色で示した点線は切片 (B) を作製する際の冠状切断面を示す。

(B) 図 A 中の青色部分を切断し、作製した冠状切片。赤色蛍光色素は電極に塗布した DiI であり、記録が DVR から行われたことを示している。青色蛍光色素は核を染色する DAPI。

睡眠ステージ判定

トカゲは夜間にまとまった睡眠をとる単相性睡眠を特徴とするため（補足図 1、Shein-Idelson *et al.*, 2016）、夜の消灯時間全体を睡眠時間とし、その中で徐波睡眠とレム睡眠を判定する手法を用いた。

まず、得られた脳波データに対し、時間窓長を 10 秒として 1 秒ずつずらした高速フーリエ変換を行い、各時間におけるパワースペクトラムを算出した。睡眠ステージの判定にあたり、トカゲの睡眠において徐波睡眠中はデルタパワーと呼ばれる 0.1-3 Hz の周波数帯成分、レム睡眠中はベータパワーと呼ばれる 10-30 Hz の周波数帯成分がそれぞれ高くなることを利用した（Shein-Idelson *et al.*, 2016）。すなわち、この二つのパワーの比である δ/β 値を算出すると、徐波睡眠中は δ/β 値が高くなり、レム睡眠中は δ/β 値が低くなるため、コントラスト良く睡眠ステージを判定することができる。算出した δ/β 値に対し、20 秒の時間窓でメディアンフィルタをかけ（1）、この値にさらに 601 秒の時間窓で移動平均をかけた（2）。各時間において（1）と（2）の値を比較し、（1）が（2）よりも高値である時間を徐波睡眠、それ以外の時間をレム睡眠とした。本判定方法を用いることによって、 δ/β 値の概算値が夜の中で時間帯ごとに異なっているにもかかわらず、局所時間ごとに睡眠ステージ判定の閾値を設けることができるため、全解析時間において自動で睡眠ステージを判別することが可能である（図 8）。

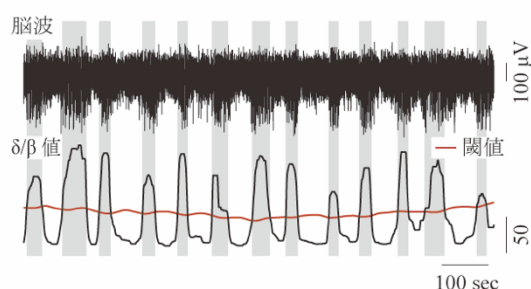


図 8 睡眠ステージの判定方法

脳波データを元に、徐波睡眠中に優位となるデルタパワーとレム睡眠中に優位となるベータパワーの比である δ/β 値を算出し、睡眠ステージを徐波睡眠とレム睡眠に分類した。脳波の振幅が大きい時間（徐波睡眠、灰色）とそうでない時間（レム睡眠、白色）を分類できていることが分かる。

ShW 検出

徐波睡眠と判定された時間の脳波データを抽出し、ShW を構成する周波数帯成分である 0.5-4 Hz のバンドパスフィルターをかけた。このデータの標準偏差を計算し、-2SD を閾値としてそれを下回るものを ShW として検出した。ShW の振幅は ShW の最下点の絶対値と定義した。ShW の発生頻度は、徐波睡眠 1 秒あたりの ShW 数として計算した。ShW の幅は、ShW の半値幅を求めることで算出した。

自己相関

徐波睡眠とレム睡眠の切り替え周期長を算出するために、 δ/β 値の自己相関関数を用い、30 分ごとに δ/β 値の自己相関を計算した。自己相関をプロットし、最初に正のピークが見られた時間（位相 2π ）を徐波睡眠とレム睡眠の切り替え周期長とした。また、最初の正のピーク（時間位相 2π ）と最初の負のピーク（時間位相 π ）における自己相関関数値の差分を Peak-to-valley (P2V) 値として定義し、徐波睡眠とレム睡眠の切り替えの頑健性の指標とした（図 9、Shein-Idelson *et al.*, 2016; Albeck *et al.*, 2022）。P2V が最も高い時間、すなわち徐波睡眠とレム睡眠の切り替えが最も安定して発生した時間帯における周期長を、その日の睡眠における徐波睡眠とレム睡眠の切り替え周期長と定義した。

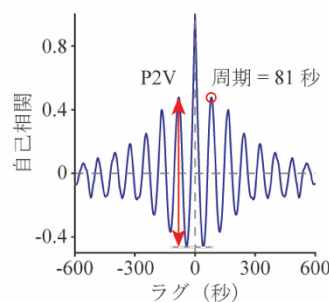


図 9 自己相関関数による徐波睡眠とレム睡眠の切り替え周期長の算出

δ/β 値の自己相関関数から、徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期長や、その頑健性の指標である Peak-to-valley (P2V) 値を算出した。最初に正のピークが見られた時間（位相 2π ）を徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期長とし、最初の正のピーク（時間位相 2π ）と最初の負のピーク（時間位相 π ）における自己相関関数値の差分を P2V 値として定義した。

パッチクランプ記録

断眠群では ZT 11 から ZT 18 まで上述の方法で断眠を行い、コントロール群では ZT 18 まで通常環境下で睡眠をとらせた。ZT 18 にイソフルラン吸入と注射麻酔により十分な麻酔をかけた。注射麻酔について、DVR を記録した個体（図 17）ではケタミン（60 mg/kg）の筋肉内注射によって行い、皮質切除時の DVR（図 21）や皮質（図 22）を記録した個体ではウレタン（2.5 g/kg）の腹腔内投与とそれに続くキシラジン（20 mg/kg）の筋肉内注射により行った。角膜反射の消失を確認した後、ZT 18.5 に個体を断頭し、冷却した人工脳脊髄液内（組成：27 mM NaCl、26 mM NaHCO₃、1.6 mM KCl、1.24 mM KH₂PO₄、1.3 mM MgSO₄、2.4 mM CaCl₂、10 mM D-glucose）において、95 %酸素/5 %二酸化炭素から成る混合ガスのバブリング下で十分な酸素濃度を維持しながら脳を取り出した。その後、同様の冷却人工脳脊髄液内で、ビブラトーム（ライカバイオシステムズ）を用いて 500-600 μ m の冠状切片を作製した。記録はいずれも切片作製から 30 分以上の回復期間を待って行った。

記録にはガラス電極を用い、プラー（Sutter 社）により抵抗を 4-6 M Ω とした。このガラスピペットの内液の組成は、DVR 記録時には 127 mM CsMeSO₄、8 mM CsCl、10 mM HEPES、1 mM MgCl₂、10 mM phosphocreatine-Na₂、4 mM MgATP、0.3 mM NaGTP、0.2 mM EGTA (pH 7.2-7.3、280-295 mOsm) とし、皮質記録時には 120 mM potassium gluconate、10 mM KCl、10 mM HEPES、10 mM creatine phosphate、4 mM Mg-ATP、0.3 mM Na₂-GTP、0.2 mM EGTA とした。一連の記録は 10 倍および 40 倍の水浸対物レンズを備えた顕微鏡（Olympus 社）を用い、目視で細胞や電極の位置を確認しながら行った。微小興奮性シナプス後電流（mEPSC）を測定するため、テトロドトキシン（1 μ M、Alomone Labs 社）の存在下で、電位を -70 mV に固定した状態で記録した。データは 20 kHz のサンプリングレートで取得し、アンプ（Sutter 社）によって 2 kHz でフィルタリングを行った。実験中、アクセス抵抗値を常にモニターし、30 M Ω を超えたデータは解析から除外した。

統計解析

全ての実験結果は、MATLAB R2022a バージョン（MathWorks 社）と R 4.4.2 バージョンを用いて解析した。二群間の時系列比較には二元配置分散分析（Two-way ANOVA）を用いた。二群間の平均値比較には Bootstrap test を用い、この検定においてリサンプリングはデータの重複を許して 10,000,000 回行った。時間変化における単調性の検定には Page's trend test

を用いた。データの分布比較には Kolmogorov–Smirnov test を用いて検定を行った。全ての統計検定に対し、有意水準 α は 0.05 とし、P 値 < 0.05 を統計学的に有意とした。

結果

行動学的な睡眠恒常性の確認

電気生理学的な睡眠恒常性を解析する前に、本実験の断眠操作がトカゲの睡眠に与えた影響を確認するため、まず行動学的な指標から断眠後の睡眠を評価した。行動学的に観察できる睡眠恒常性の特性のうち、覚醒閾値の増大に着目し、断眠後の回復睡眠における外部刺激に対する反応性を検討した。ZT 21 に 150 lux の光を当て、開眼までにかかる時間を評価したところ、断眠群では目を開けるまでにかかる時間が有意に長くなり、外部刺激に対する反応性が低下した（図 10）。本結果から、本研究で行った断眠操作はトカゲの睡眠に作用するということが確認された。

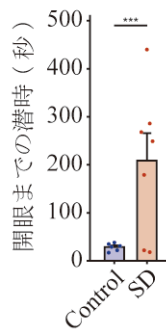


図 10 断眠による覚醒閾値の変化

ZT 21 に外部刺激として光を当て、目を開けるまでの時間を測定した。棒グラフは平均値、エラーバーは標準誤差を表す。N = 6 animals in Control and 7 animals in SD, *** $P = 3.1 \times 10^{-4}$, bootstrap test for means.

トカゲにおける電気生理学的な睡眠恒常性

哺乳類において徐波睡眠中のデルタパワーは、(1) 覚醒時間に伴って増強し、(2) 睡眠時間の経過とともに減弱することから、睡眠恒常性を反映した眠気の指標として頻用される。私は、デルタパワーを用いて爬虫類における睡眠恒常性の存在を明示するためには、爬虫類におけるデルタパワーも最低限この(1)(2)両方を満たす必要があると考えた。まず(1)を確かめるため、断眠前日の睡眠と断眠後の回復睡眠におけるデルタパワーを比較したところ、回復睡眠において徐波睡眠中のデルタパワーが有意に強まり、デルタパワーのリバウンドが確認された(図 11 B)。一日目と二日目のデルタパワーの比を計算することで断眠群と非断眠群の個体間比較も行ったところ、断眠群では有意に高いデルタパワー比が得られ、覚醒時間の延長がデルタパワーを増強させることが示された(図 11 C)。また、通常睡眠と回復睡眠のいずれにおいても、徐波睡眠中のデルタパワーは睡眠時間の経過に伴って単調に減少した(図 11 B)。これらの結果から、哺乳類で見られるデルタパワーの推移(1)(2)は、爬虫類であるトカゲにも保存されていることが明らかとなった。デルタパワーは爬虫類においても、睡眠恒常性を反映した眠気の指標になりうると示唆される。

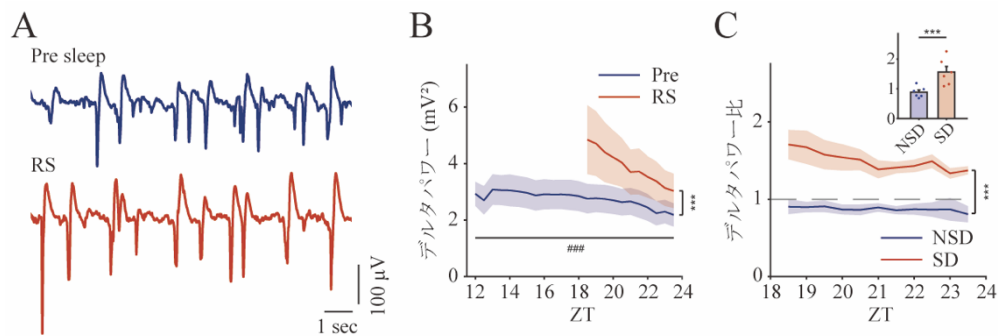


図 11 断眠後の徐波睡眠におけるデルタパワーの変化

(A) 徐波睡眠中に見られる脳波の代表例。

(B) 徐波睡眠中におけるデルタパワーの強さ。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 recordings each from 6 animals, $***P = 1.0 \times 10^{-4}$, two-way ANOVA; $###P < 1.0 \times 10^{-7}$, Page's trend test.

(C) デルタパワー比。デルタパワー比は、断眠後の回復睡眠中のデルタパワーを、前日の同じ時間のデルタパワーで割ることによって算出した。グラフは平均±標準誤差として表した。右上は ZT 18.5-21.5 の 3 時間におけるデルタパワー比を定量し、平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 sessions from 4 animals in NSD and from 6 animals in SD, $***P < 1.0 \times 10^{-7}$, two-way ANOVA; $***P = 2.4 \times 10^{-6}$, bootstrap test for means.

続いて、断眠後の睡眠時間の延長を検討するため、回復睡眠からの覚醒時間に着目した。トカゲは光によって強力に覚醒が誘導される動物であるため、ZT 0 に光が点灯すると断眠の有無を問わずいずれの個体も目を覚ました。すなわち、多くの哺乳類とは異なり、断眠後の睡眠時間の増加は観察されなかった。次に、睡眠恒常性は寝不足時に覚醒中のデルタパワーをも増大させることが知られているため、トカゲが目を覚ましていても寝不足を解消しきれていない可能性を考え、断眠後の翌朝のデルタパワーを検討した (Cajochen *et al.*, 2001; Huber *et al.*, 2000)。その結果、ZT 0-1 において、断眠群は非断眠群と比較して有意に高いデルタパワー比を示した (図 12)。このことから、トカゲは光によって覚醒するものの、その眠気は解消しきっていないと推測される。覚醒直後に低い覚醒レベル続く現象は睡眠慣性と呼ばれ、哺乳類では寝不足後に睡眠慣性がより強く働くことが知られている (Vallat *et al.*, 2019)。本結果は、睡眠慣性が爬虫類にも見られることを示唆する結果である。

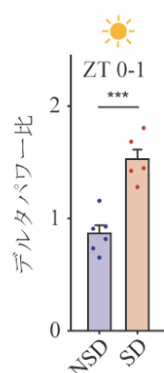


図 12 断眠後翌朝のデルタパワーの変化

ZT 0-1 におけるデルタパワー比。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 sessions from 4 animals in NSD and 5 sessions from 5 animals in SD, *** $P < 1.0 \times 10^{-7}$, bootstrap test for means.

また、これまで得られた結果が、断眠によって睡眠量が減少したことに起因する結果であり、断眠刺激によるストレスが原因ではないことを示すために、トカゲが基本的に覚醒している日中（ZT 5-12）に、同様の断眠実験を行った（図 13 A）。日中の断眠では、その後の睡眠においてデルタパワーの増大が見られなかったことから、断眠後に見られる徐波睡眠中のデルタパワーの増大は睡眠量減少に起因することが確認された（図 13 B）。

以上から、電気生理学的に定義される睡眠恒常性は、爬虫類であるトカゲにも存在することが明らかとなった。本結果から、睡眠恒常性は 3 億 2 千万年前に有羊膜類が共通祖先から分岐した時点で、すでに獲得されていた性質であると考えられる。

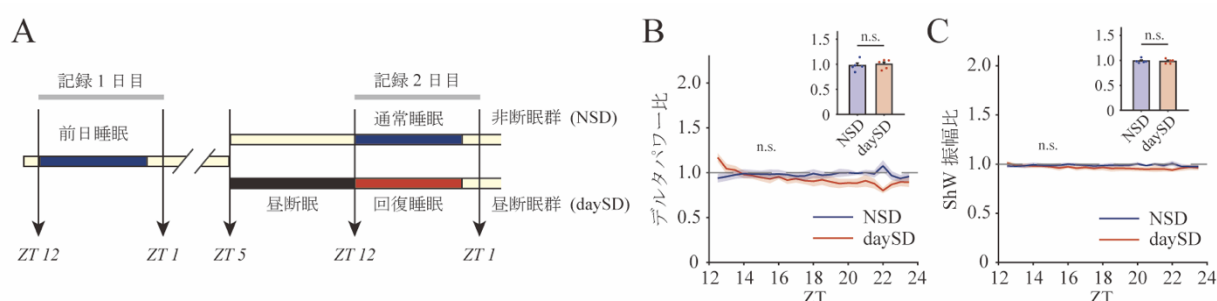


図 13 昼に断眠を行った後のデルタパワーの変化

(A) 昼断眠実験の記録スケジュール。基本的に通常の断眠と同じ記録スケジュールで行い、断眠時間を昼の ZT 5-12 とした。

(B) デルタパワー比。グラフは平均±標準誤差として表した。右上は ZT 18.5-21.5 の 3 時間におけるデルタパワー比を定量し、平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 5 sessions each from 3 animals, $P = 0.62$, two-way ANOVA; $P = 0.62$, bootstrap test for means.

(C) ShW の振幅比。グラフは平均±標準誤差として表した。右上は ZT 18.5-21.5 の 3 時間におけるデルタパワー比を定量し、平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 5 sessions each from 3 animals, $P = 0.083$, two-way ANOVA; $P = 0.068$, bootstrap test for means.

レム睡眠における恒常性

ここまで徐波睡眠中のデルタパワーを解析し、睡眠恒常性として検討してきたが、哺乳類ではレム睡眠にも恒常性の存在が知られている。哺乳類におけるレム睡眠の恒常性は、レム睡眠量やレム睡眠中の脳波で優位となるシータ波の強さ（シータパワー）を元に議論されることが多いが、種ごとさらには方法ごとに異なる結果が報告されており、未だ統一した見解は得られていない（Borbély *et al.*, 1984; Tobler *et al.*, 1990; Beersma *et al.*, 1990; Lancel, 1993; Suchecki *et al.*, 2012; Lyamin *et al.*, 2018; Arthaud *et al.*, 2020）。本研究では、トカゲのレム睡眠中に優位となるベータ波の強さ（ベータパワー）を用いて解析を行った。その結果、レム睡眠中のベータパワーは断眠によって高まることが明らかとなり、トカゲにおいてもレム睡眠は恒常性による制御を受ける可能性が高い（図 14 B）。翌朝覚醒後のベータパワーは断眠によって変化しなかったが、これはベータパワーがデルタパワーとは異なり眠気とは関連せず、睡眠慣性の影響を受けないためだと考えられる（図 14 C）。

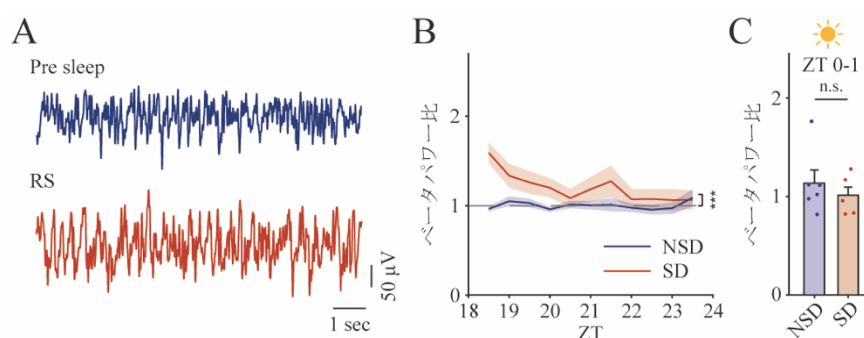


図 14 断眠後のレム睡眠におけるベータパワーの変化

(A) レム睡眠中に見られる脳波の代表例。

(B) ベータパワー比。グラフは平均±標準誤差として表した。ベータパワー比は、デルタパワー比と同様に、断眠後の回復睡眠中のベータパワーを、前日の同じ時間のベータパワーで割ることによって算出した。N = 6 sessions from 4 animals in NSD and from 6 animals in SD, *** $P = 2.1 \times 10^{-5}$, two-way ANOVA.

(C) 翌朝 ZT 0-1 におけるベータパワー比。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 sessions from 4 animals in NSD and 5 sessions from 5 animals in SD, $P = 0.75$, bootstrap test for means.

断眠による睡眠構築の変化

前述のように、トカゲは光によって強く覚醒が誘導されるため、眠気が強まっても睡眠量自体に変化は見られなかった。しかし、トカゲは単相性睡眠であり、睡眠中に徐波睡眠/レム睡眠の切り替えが起こる。そのため、徐波睡眠やレム睡眠の 1 回あたりの長さ、徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期などの睡眠構築に変化が起きる可能性があると考え、この可能性を検討した。

徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期を算出するため、睡眠判定に用いた δ/β 値の自己相関を 30 分ごとに算出し、徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期と、その頑健性の指標として P2V 値を計算した（方法：自己相関を参照）。30 分ごとの P2V をプロットすると図 15 A のようになり、断眠によって、P2V がピークを示す時間帯やその維持時間がシフトした。これは、P2V の推移が睡眠恒常性と概日性の両方の影響を受けた結果であると考えられる。その一方、P2V の最大値は断眠によって変化しなかった（図 15 B）。続いて、P2V が最大値を示した時間帯の自己相関から、その個体の徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期を算出したところ、通常睡眠と断眠後の回復睡眠においてその周期長に有意な差は見られなかった（図 15 C）。さらに、この P2V が最大値を示した時間帯における徐波睡眠、レム睡眠の 1 回あたりの長さをそれぞれ定量したが、いずれにおいても断眠による変化は見られなかった（図 15 D, E）。これらの結果を踏まえ、トカゲでは睡眠恒常性による睡眠構築の変化は見られないと結論づけた。

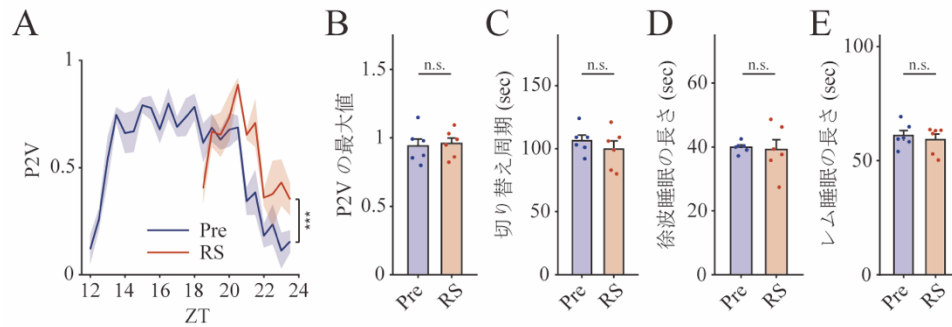


図 15 断眠後の睡眠構築の変化

(A) P2V 値の推移。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 recordings each from 6 animals, $***P = 4.8 \times 10^{-4}$, two-way ANOVA.

(B) 一晩における P2V の最大値。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.77$, bootstrap test for means.

(C) 徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.35$, bootstrap test for means.

(D) 徐波睡眠一回あたりの長さ。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.82$, bootstrap test for means.

(E) レム睡眠一回あたりの長さ。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.57$, bootstrap test for means.

断眠後にデルタパワーが増大する機構

ここまで、断眠によってトカゲの睡眠がどのような影響を受けるかを解析し、トカゲにおける睡眠恒常性の存在を明示した。ここからは、睡眠恒常性の基盤となる神経機構に迫るため、断眠後にデルタパワーが増大する機構について、詳細な検討を行った。

まず、トカゲの徐波睡眠における主要な脳波であり、デルタパワーへの寄与が大きいと考えられる ShW に着目した (図 16 A)。ShW がデルタパワー増大に寄与する可能性として、振幅増大と発生頻度上昇の二つが考えられるため、それらをそれぞれ定量した。断眠によって ShW の振幅が増大した一方、ShW の発生頻度には変化が見られなかったことから、ShW の振幅増大がデルタパワーの増大に重要であると言える (図 16 B, C)。

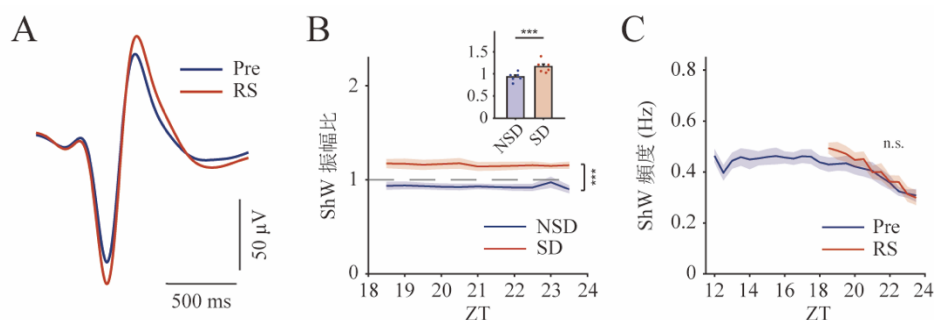


図 16 断眠後の徐波睡眠における ShW の変化

(A) ZT 18.5-21.5 に発生した ShW の平均波形。一個体の代表例を示した。N = 2290 in Pre and 1984 in SD respectively.

(B) ShW の振幅比。グラフは平均±標準誤差として表した。右上は ZT 18.5-21.5 の 3 時間におけるデルタパワー比を定量し、平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 sessions from 4 animals in NSD and from 6 animals in SD, *** $P < 1.0 \times 10^{-7}$, two-way ANOVA; *** $P = 6.6 \times 10^{-6}$, bootstrap test for means.

(C) ShW の頻度。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.071$, two-way ANOVA.

ShW 発生時は DVR において多くの神経細胞が同期して発火するため、ShW のような大きな電位変化が見られる。そのため、ShW の振幅増大は、ShW 時に同期して発火する神経細胞数の増大に起因するのではないかと考えた。そこで私は、覚醒時間の延長によって DVR における神経同士の結合性が増大した結果、神経活動の同期性が上昇し ShW の振幅が増大したという仮説を立てた。この仮説を検証するため、断眠後に急性脳切片を作製して DVR からパッチクランプ記録を行い、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を計測することで、興奮性シナプスの伝達効率の変化を調べた (図 17 A、方法: パッチクランプ記録を参照)。断眠群はコントロール群と比較して、mEPSC の頻度と振幅が有意に増大しており、覚醒時間の延長によって DVR におけるシナプスの伝達効率が増強したことが明らかとなった (図 17 B, C)。mEPSC の頻度は前シナプス側、mEPSC の振幅は後シナプス側の可塑性をそれぞれ反映するため、長期の覚醒によって DVR のシナプス全体が調節を受けた結果、シナプスの伝達効率が上昇したと考えられる。本結果は、哺乳類の皮質において断眠後に mEPSC の頻度や振幅が増大したという先行研究の結果とも矛盾しない (Liu *et al.*, 2010)。睡眠恒常性はその性質だけでなく、背景にあるメカニズムまで有羊膜類間で保存されている可能性がある。

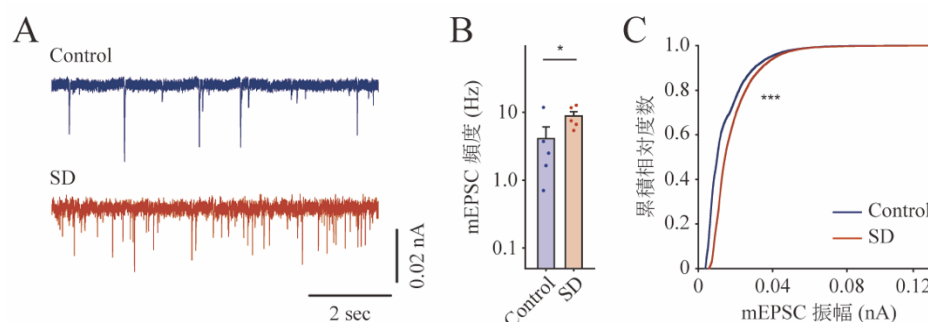


図 17 DVR における断眠後のシナプスの伝達効率の変化

(A) DVR から記録した mEPSC の代表例。

(B) mEPSC の発生頻度。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 5 slices from 3 animals in Control and from 2 animals in SD, $*P = 0.044$, bootstrap test for means.

(C) mEPSC の振幅。累積相対度数をグラフ化した。N = 9113 in Control and 13120 in SD respectively, $***P < 1.0 \times 10^{-7}$, Kolmogorov–Smirnov test.

皮質の外科的切除が通常の睡眠に与える影響

皮質下領域から脳波を測定するトカゲの利点を活かし、睡眠恒常性における皮質の役割を直接的に明示するため、手術の過程で皮質を外科的に切除したトカゲを用いて断眠実験を行った（方法：皮質切除を参照）。一連の実験後にトカゲを灌流固定し、作製した脳切片を元に切除された脳領域について確かめたところ、その領域は図 18A における緑色の領域に相当した。脳波を取得する脳領域であり切除した皮質の下（腹側）に位置する DVR は完全な状態を保っていた（図 18 A, B）。トカゲの脳に対しシングルセル RNA シークエンス解析を行った先行研究と照らし合わせると、切除した脳領域は哺乳類における大脳新皮質や海馬の一部と遺伝学的な相同性が高いことが明らかとなった（Tosches *et al.*, 2018）。

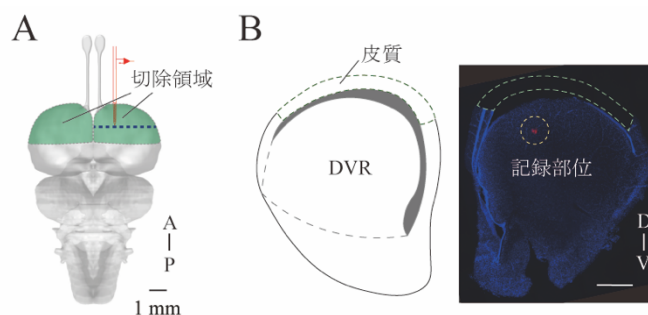


図 18 切除された皮質領域の確認

(A) トカゲの脳全体を示す模式図。切除した領域（前脳の皮質部分）を緑色で塗布し、留置した電極を赤で示した。青色で示した点線は、切片（B）を作製する際の冠状切断面を示す。

(B) 図 A 中の青色部分を切断し、作製した冠状切片。赤色蛍光色素は電極に塗布した DiI、青色蛍光色素は核を染色する DAPI による蛍光を示す。皮質が切除されていながら、記録は DVR から行われたことが分かる。

睡眠恒常性は通常時の睡眠量を制御する神経基盤の上に存在する性質である。したがって、睡眠恒常性における皮質の役割を評価するためには、まず通常時の睡眠が皮質の切除によってどのように変化するかを検討する必要がある。最初に、皮質切除群 (Cortex lesion) と通常個体群 (Intact brain) における脳波の変化を観察したところ、明瞭な差異は観察されなかった (図 19 A)。定量的な解析を行うため、トカゲの脳波の代表的な波形である ShW を解析対象とし、その振幅と幅の比を算出して波形を比較したところ、皮質切除の有無による有意な差は認められなかった (図 19 B)。また、ShW の発生頻度にも変化はなかった (図 19 C)。これらの結果から、皮質の切除は通常睡眠時における DVR の脳波出力には影響を与えなかったと判断した。続いて、睡眠構築に着目した。皮質切除群では通常個体群と比較して P2V の最大値が有意に増大していたものの、徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期、徐波睡眠の長さ、レム睡眠の長さいずれの指標においても、有意な差は見られなかった (図 19 D-H)。この結果から、皮質の切除は通常時の睡眠を制御する神経基盤には影響を与えないことが示された。

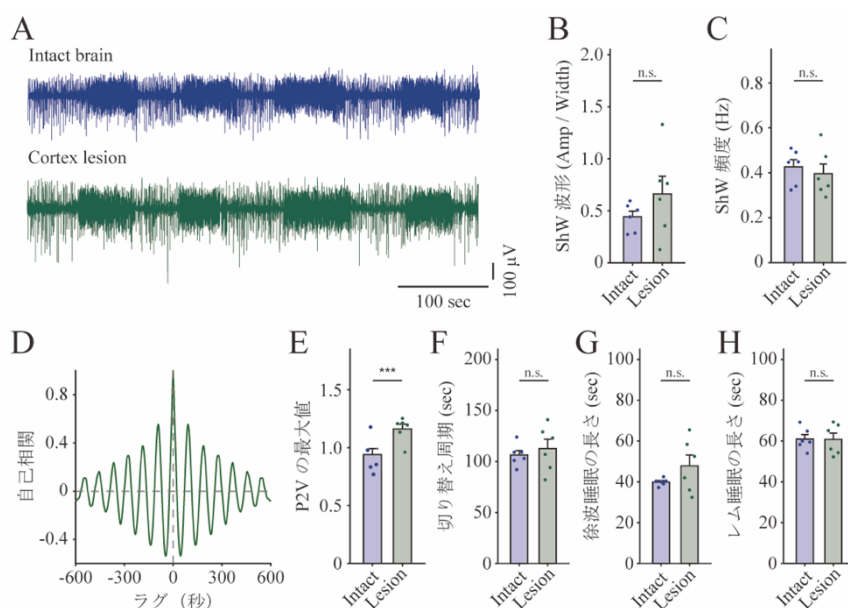


図 19 皮質切除による通常睡眠への影響の検討

(A) 通常個体 (Intact brain、上) と皮質切除個体 (Cortex lesion、下) における睡眠中脳波の代表例。

(B) ShW 波形。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.17$, bootstrap test for means.

(C) ShW 頻度。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.52$, bootstrap test for means.

(D) 皮質切除個体における δ/β 値の自己相関関数の代表例。

(E) P2V の最大値。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, *** $P = 9.6 \times 10^{-4}$, bootstrap test for means.

(F) 徐波睡眠/レム睡眠の切り替え周期。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.49$, bootstrap test for means.

(G) 徐波睡眠一回あたりの長さ。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.11$, bootstrap test for means.

(H) レム睡眠一回あたりの長さ。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 6 recordings each from 6 animals, $P = 0.97$, bootstrap test for means.

皮質による睡眠恒常性の制御

皮質切除個体を断眠させ、回復睡眠中の脳波を解析し、皮質が睡眠恒常性に与える影響を調べた。睡眠恒常性の指標である徐波睡眠中のデルタパワーは、通常個体群と比較して皮質切除群で有意に減弱した（図 20 A）。断眠後のデルタパワーのリバウンドは ShW の振幅増大に起因していたため（図 16 B）、デルタパワーと同様に断眠後の ShW の振幅変化を解析したところ、確かに皮質の切除によって断眠後に見られた ShW の振幅増大も減弱していた（図 20 B）。その一方、断眠後の ShW の発生頻度は皮質切除によって変化しなかった（図 20 C）。この結果は、通常個体における ShW の発生頻度が断眠前後で変化しなかったことと矛盾しない（図 16 C）。また、通常個体では回復睡眠中のみならず、回復睡眠後翌朝のデルタパワーも増大していた（図 12）。これが皮質における睡眠恒常性に起因するのであれば、皮質の切除によって翌朝のデルタパワーも睡眠中のデルタパワーと同様に減弱すると考えられる。解析を行ったところ、皮質切除によって翌朝のデルタパワーの増大も減弱していた（図 20 D）。以上の結果から、皮質は睡眠恒常性やデルタパワーのリバウンドに寄与する脳領域であることが示された。

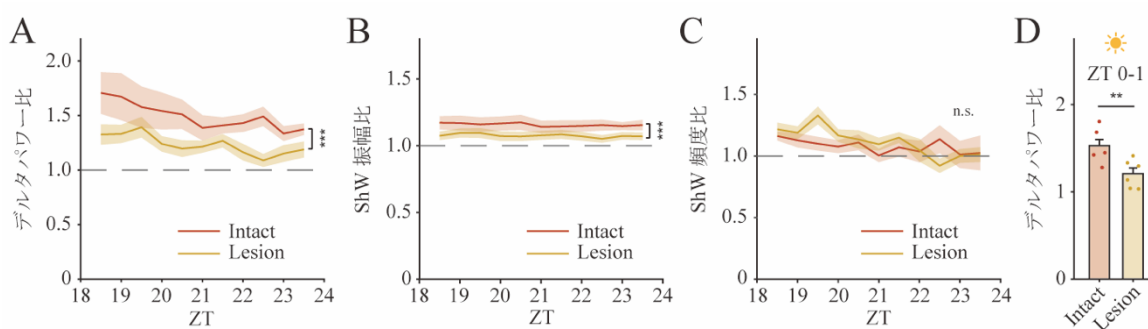


図 20 皮質切除による回復睡眠への影響の検討

(A) デルタパワー比。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 sessions each from 6 animals, $***P = 1.6 \times 10^{-6}$, two-way ANOVA.

(B) ShW の振幅比。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 sessions each from 6 animals, $***P = 3.3 \times 10^{-5}$, two-way ANOVA.

(C) ShW の頻度比。グラフは平均±標準誤差として表した。N = 6 sessions each from 6 animals, $P = 0.28$, two-way ANOVA.

(D) 断眠翌朝 ZT 0-1 におけるデルタパワー比。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 5 sessions from 5 animals in Intact and 6 sessions from 6 animals in Lesion, $**P = 0.0025$, bootstrap test for means.

これまで得られた結果から、(1) 長時間の覚醒によって DVR におけるシナプスの伝達効率が増強し、神経の同期性が高まった結果、(2) 断眠後の回復睡眠中に ShW の振幅増大やデルタパワーのリバウンドが起こる、という機構が想定される。(2) には皮質が寄与することを示したが、(1) も同様に皮質が関与するだろうか。この疑問を明らかにするため、皮質切除個体を断眠し、DVR からパッチクランプ記録を行うことで、シナプスの伝達効率を調べた (図 21 A)。通常個体では断眠後に mEPSC の頻度や振幅は増大していたが、皮質切除によってそれらの増大が見られなくなった (図 21 B-D)。このことから、覚醒中の皮質から DVR への入力が増加することで DVR のシナプス強度を強め、これが断眠後に深い睡眠を引き起こす要因となる可能性が考えられる。皮質から DVR に神経投射があることは、先行研究によって確認されている (Norimoto *et al.*, 2020)。

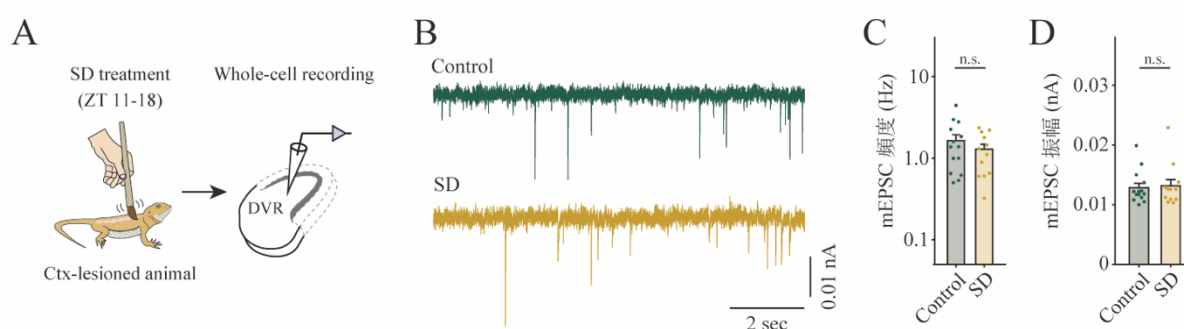


図 21 皮質切除個体の DVR における断眠後のシナプス強度の変化

(A) 実験手順を示した模式図。予め皮質を切除した個体を断眠し、その後切片を作製してパッチクランプ記録を行った。

(B) mEPSC の代表例。

(C) mEPSC の発生頻度。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 14 cells in Control and 12 cells in SD from 2 animals each, $P = 0.31$, bootstrap test for means.

(D) mEPSC の振幅。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 14 cells in Control and 12 cells in SD from 2 animals each, $P = 0.82$, bootstrap test for means.

この結果を踏まえ、覚醒中の皮質から DVR への入力が DVR のシナプス強度を強めるのであれば、断眠による覚醒時間の増大により、皮質自体の興奮性も上昇するのではないかと仮説立てた。爬虫類と同じく層構造を有する哺乳類の皮質においても、断眠後に神経細胞の興奮性は増大することが知られている (Liu *et al.*, 2010)。この仮説を検証するため、断眠後の皮質にパッチクランプ記録を適用し、断眠による神経細胞の興奮性変化を調べた。mEPSC を測定したところ、断眠によって mEPSC の振幅は増大し、その頻度は上昇した (図 22 A-C)。すなわち、爬虫類においても、長期間の覚醒によって皮質の神経細胞の興奮性は高まることが明らかとなった。

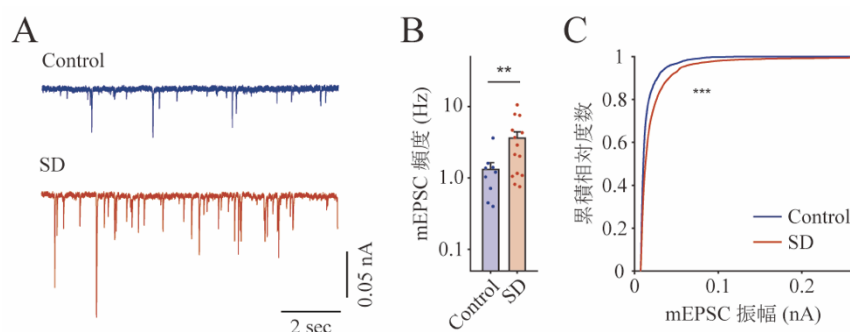
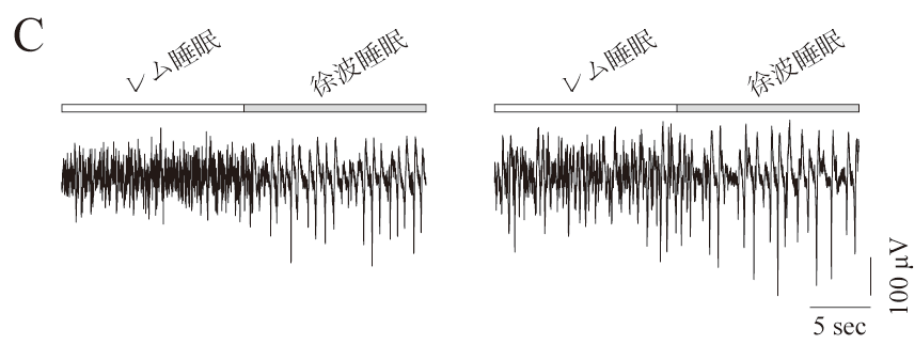
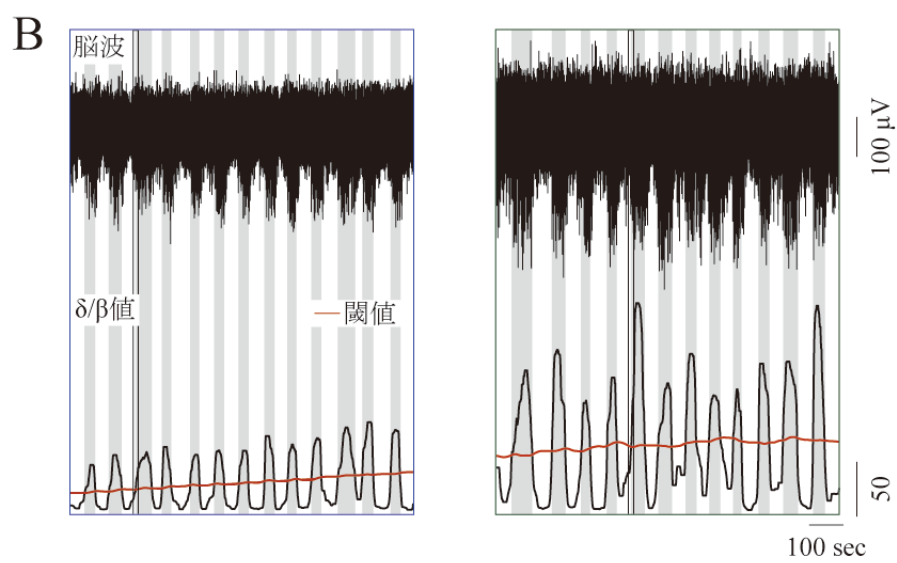
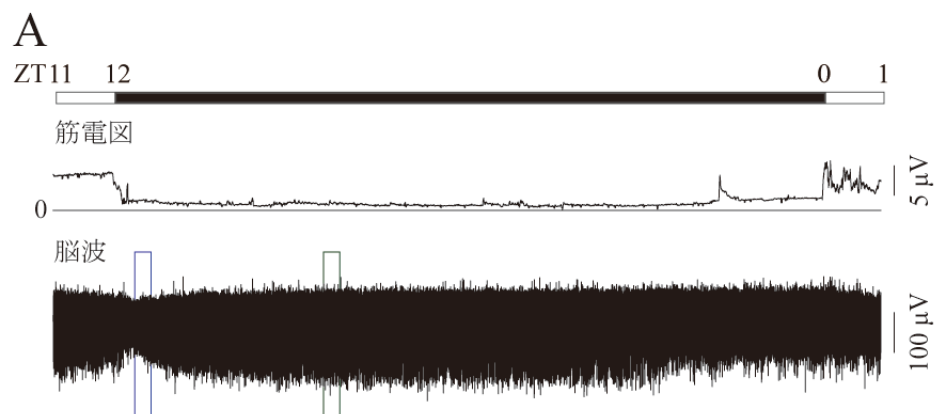


図 22 皮質における断眠後のシナプスの伝達効率の変化

(A) mEPSC の代表例。

(B) mEPSC の発生頻度。平均値を棒グラフ、標準誤差をエラーバーとしてプロットした。N = 9 cells in Control and 14 cells in SD from 2 animals each, $**P = 0.0026$, bootstrap test for means.

(C) mEPSC の振幅。累積相対度数をグラフ化した。N = 3774 in Control and 15591 in SD respectively, $***P < 1.0 \times 10^{-7}$, Kolmogorov–Smirnov test.



補足図 1 トカゲの睡眠

(A) 一晩における筋電図と脳波の代表例。筋電図は判読性を考慮し、時間窓長 60 秒の二乗平均平方根 (RMS) を算出し、その値をプロットした。この値は消灯中に低下していることから、消灯中はトカゲが寝ていたことが分かる。脳波における青枠、緑枠部分はそれぞれ B に拡大図を示す。

(B) A の枠内部分における脳波の拡大図と、対応する時間の δ/β 値の推移。 δ/β 値中の赤線は睡眠ステージを決定する閾値を示す（方法：睡眠ステージ判定を参照）。 δ/β 値が閾値よりも高い時間を徐波睡眠（灰色）、低い時間をレム睡眠（白色）として判定した。黒枠部分はそれぞれ C に拡大図を示す。

(C) B の枠内部分における脳波の拡大図。睡眠ステージの切り替え部分においても、脳波の変化に対応した睡眠ステージ判定ができていることが分かる。

考察

本研究では、爬虫類であるフトアゴヒゲトカゲを用い、睡眠不足にしたトカゲの脳波を解析することによって、爬虫類においても電気生理学的に定義される睡眠恒常性が存在することを明らかにした。デルタパワーは、爬虫類においても哺乳類や鳥類と同様に、睡眠恒常性を反映する眠気の指標として有用である。また、脳波成分の詳細な解析やパッチクランプ記録によって、睡眠恒常性は性質のみならず、制御機構も有羊膜類間で類似する可能性を示す結果を得た。

また、これまで理解が曖昧であった睡眠恒常性を制御する脳領域について、皮質下領域から脳波を取得するというトカゲ独自の特徴を活かし、皮質が睡眠恒常性に関与する脳領域であることを直接的に示した。本研究は、睡眠恒常性制御の理解に貢献するだけでなく、睡眠研究において非モデル動物が持つ高い潜在性を示した点においても、重要な意味を持つと考えられる。

回復睡眠における睡眠時間の変化

トカゲでは、断眠後の回復睡眠において睡眠時間の延長は見られず、睡眠の深さにのみ変化が見られた。本結果から、トカゲにおける睡眠恒常性は睡眠の深さを変化させることによって寝不足を補う特性を持つと考えられる。哺乳類と異なり睡眠量に変化が見られなかった理由として、二つの可能性が考えられる。一つは、トカゲは光によって強力に覚醒が誘導される動物であるため、光による覚醒作用が寝不足による睡眠欲求を上回り、ZT 0 の光点灯によって覚醒が誘導された可能性である。回復睡眠では P2V の推移がシフトし、光点灯の直前も比較的高い P2V が見られたこと（図 15 A）や、翌朝のデルタパワー増大（図 12）も、この可能性と矛盾しない結果である。本研究では行うことができなかったが、断眠後の翌朝も光が点灯しない条件下であれば、断眠群が通常群よりも長い睡眠をとることは十分に考えられる。もう一つは、寝不足を補う戦略が動物種間で異なる可能性である。鳥類は爬虫類と同じ竜弓類に属し、進化的に哺乳類よりも爬虫類に近いと考えられるが、鳥類であるカワラバトやミヤマシトドを用いた先行研究では、本研究と同程度の時間の断眠を行っても、その後の睡眠時間の延長は見られなかったと報告されている (Martinez-Gonzalez *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2008)。ただし、断眠時間が 24 時間を超えるとこの限りではなく、カワラバトや爬虫類であるグリーンイグアナにおいても、断眠後の睡眠量増加が報告されている (Tobler and Borbély, 1988; Ayala-Guerrero and Mexicano, 2008)。これらの結

果を踏まえると、哺乳類は睡眠の深さと長さの両方から睡眠不足を代償する戦略を取る一方、竜弓類では寝不足の程度が大きくないうちは睡眠を深くすることで睡眠不足を代償するよう試み、深さで補えないほどの寝不足になると、睡眠の長さを変化させる機構が働くのではないかと考えられる。

回復睡眠におけるデルタパワーの増強

トカゲでは断眠後の徐波睡眠において、ShW の振幅が増大し、それに伴うデルタパワーの増強が観察された (図 11 B, C、図 16 B)。一方、アルゼンチンテグー (*Salvator merianae*) を用いた先行研究では、断眠後に ShW の頻度が増大すると報告されており、これは本研究と一部異なる結果である (Libourel *et al.*, 2018)。この差異の原因は定かではないものの、本研究で見られた ShW の振幅の増大と先行研究における ShW の頻度の増大は、デルタパワーの増大に寄与するという点では矛盾しない。眠気の蓄積が脳波の低周波成分を生み出す神経活動を促進させるという機構は、爬虫類間でも保存されているようである。

長期間の覚醒による徐波睡眠中のデルタパワーの増強 (図 11 B, C) に加え、睡眠初期に高く睡眠経過とともに減弱するデルタパワーの推移 (図 11 B) も、哺乳類や鳥類と同様の結果であった。さらに、断眠によって DVR におけるシナプスの伝達効率が増強したことは、哺乳類の皮質において断眠後にシナプスの伝達効率が増強したという先行研究とも矛盾しない (Liu *et al.*, 2010)。哺乳類では、覚醒時の経験依存的にシナプス強度が高まり、高まったシナプス強度は睡眠中にダウンスケーリングされるところ、シナプス恒常性仮説が広く受け入れられている (Tononi and Cirelli, 2003; Tononi and Cirelli, 2014)。シナプスの伝達効率強化は神経の同期性を高め、高まった同期性は脳波上の徐波やデルタパワーに反映されることを踏まえると、本研究で得られた断眠後のデルタパワーの増強は、その背景にあるメカニズムまで哺乳類と保存されており、シナプス恒常性仮説は爬虫類にも適応できる可能性が高い。

また、脳波を取得する脳領域が哺乳類と爬虫類で異なるにもかかわらず、睡眠覚醒に伴うデルタパワーの推移は動物種間で共通していたことから、デルタパワーは単に眠気の出出として睡眠恒常性の指標となるのみならず、何らかの機能的役割を担う可能性も、考慮すべき点である。例えば、睡眠の機能の一つとして、脳に蓄積した老廃物の排泄を行うグリンファティックシステムが知られているが、このグリンファティックシステムによる老廃物の排泄は、デルタパワーを駆動力とした脳脊髄液の流れによって促進されること

が示唆されている (Xie *et al.*, 2013; Fultz *et al.*, 2019)。また、睡眠中に光遺伝学的に徐波様状態を生み出すことによって、脳卒中モデルマウスの運動機能の回復が促進されたことが報告され、行動レベルの機能回復における徐波の重要性も明らかとなりつつある (Facchin *et al.*, 2020)。さらに、先述したシナプス恒常性仮説において、デルタパワーはシナプスのダウンスケーリングを担う神経基盤であるとされている。シナプスのダウンスケーリングには長期抑圧 (LTD) と呼ばれる現象がその中核を担い、哺乳類において睡眠中や麻酔中の大脳皮質では徐波依存的に自発的な LTD が発生する (Vyazovskiy *et al.*, 2008; González-Rueda *et al.*, 2018)。トカゲの ShW が哺乳類の徐波と類似の周波数帯を持つことは、トカゲの徐波睡眠中における ShW を介したシナプスのダウンスケーリングを示唆しており、今後トカゲの ShW とシナプスのダウンスケーリングの関係が解明できれば、比較生理学的なアプローチから徐波やデルタパワーの機能的な意義に近づくことができるだろう。

睡眠恒常性の進化的な保存性

本研究によって、爬虫類においても電気生理学的な睡眠恒常性の存在が確認された。このことから、睡眠恒常性は哺乳類や鳥類が収斂進化によって独自に獲得したのではなく、有羊膜類に分化する以前にすでに獲得されていた性質であることが示唆される。さらに、睡眠恒常性によって睡眠が深くなる機構はシナプスレベルで哺乳類と類似することを示し、睡眠恒常性はその性質だけでなく背景のメカニズムまで有羊膜類間で共通する可能性を提示した。睡眠恒常性はこうした神経による制御に加え、遺伝子による制御も報告されており、睡眠恒常性に関与するとされる塩基配列が動物種間で高い保存性を示す遺伝子も報告されている (Funato *et al.*, 2016)。今後遺伝学的な観点から爬虫類における睡眠恒常性を解き明かす研究が進むことで、睡眠恒常性の進化的な保存性をより多角的に証明することができるだろう。

また、変温動物である爬虫類においても電気生理学的な睡眠恒常性の存在が確認されたため、両生類や魚類における電気生理学的な睡眠恒常性を調べる研究が進むだろう。しかし、これらの動物では未だ徐波睡眠とレム睡眠という二つの睡眠ステージの存在すら確認されていないため、まずはその睡眠様態について詳細に調べる必要がある。

皮質と睡眠恒常性

本研究の後半では、皮質を切除したトカゲにおいて、断眠後に見られる DVR のシナプス強度の増大が部分的に消失し、回復睡眠中のデルタパワー

のリバウンドが減弱することを示し、睡眠恒常性は皮質による影響を受けることを明らかにした（図 20、図 21）。本結果は、皮質の錐体細胞や抑制性神経細胞、皮質内のシナプス強度が睡眠恒常性を制御することを示したマウスの研究結果と矛盾しない（Krone *et al.*, 2021; Kon *et al.*, 2024; Sawada *et al.*, 2024）。DVR から脳波を取得するトカゲにおいても、哺乳類と類似の結果が得られたことは、皮質から脳波を取得する哺乳類において、皮質が真に睡眠恒常性を制御する脳領域であることをより確かなものにしたと言える。

さらに、覚醒時間の延長により皮質のシナプスの伝達効率が増強することを示し、皮質の神経活動が睡眠恒常性に寄与することを示唆する結果を得た（図 22）。トカゲの皮質と DVR は、逆行性トレーサーを用いた実験によって相互に神経投射があることが確認されている（Norimoto *et al.*, 2020）。これらの結果から、覚醒中の皮質における神経の興奮性増大が、DVR の神経活動の同期性を生み出す駆動力となり、長期覚醒後に睡眠が深くなるという仮説が想定される。この仮説を直接検証するためには、断眠中や回復睡眠中に生体内皮質から神経活動を記録することが必要不可欠だと考える。しかし、トカゲの皮質が薄い、細胞密度が低い領域が存在する、DVR の電気シグナルが皮質にまで漏れ出してしまうなどの特徴から、皮質の *in vivo* 記録は困難であり、本研究で実現させることはできなかった。ただし、1970 年代に行われた先行研究では、断眠によって爬虫類の皮質における ShW 様の神経活動が増大しており、記録や解析に改善の余地はあるものの、本仮説と矛盾しない結果が報告されている（Flanigan, 1973a; Flanigan *et al.*, 1973b; Flanigan, 1974a; Flanigan *et al.*, 1974b）。

また、皮質を切除すると断眠後の睡眠に変化が見られた一方、通常の睡眠に変化は見られなかった（図 19）。このことから、皮質から DVR への入力には睡眠不足によって皮質の興奮性が高まった時に限定して起こり、通常条件下での睡眠量制御系とは独立して存在すると考えられる。哺乳類において、睡眠量を制御する実行系は視床下部や脳幹であることが知られている。哺乳類と爬虫類の脳における遺伝学的な相同性の高さを鑑みると、爬虫類においても通常の睡眠が視床下部や脳幹によって制御されていることは十分に考えられる（Tosches *et al.*, 2018; Hain *et al.*, 2022）。

外科的に皮質を切除しても、断眠後のデルタパワー増強は完全には消失しなかった（図 20 A）。その理由として以下の二つが挙げられる。まず一つ目は、皮質の一部を切除しきれておらず、切除できなかった皮質が睡眠恒常性に寄与したためである。今回用いた外科的な切除では全ての皮質を切除することは困難であったが、今後遺伝学的な手法など別方法の検討によって皮質

全体の機能を欠損させる実験を行うことができれば、この可能性を検証することができるだろう。二つ目は、皮質以外にも睡眠恒常性を制御する脳領域が存在するためである。これまでに、皮質の他にも視床中心核や縫線核が睡眠恒常性に関与すると報告されている (Gent *et al.*, 2018; Oikonomou *et al.*, 2019)。皮質がこれらの脳領域と並列して睡眠恒常性を制御している場合、皮質切除個体に見られた断眠後の部分的なデルタパワー増大は、これらの脳領域による睡眠恒常性制御の結果であると考えられる。

睡眠研究における非モデル動物の重要性

本研究では、モデル動物として一般的ではないトカゲの特長を活かすことによって、哺乳類では困難であった課題を解決し、皮質における睡眠恒常性の役割を明示した。このことから、本研究は単に睡眠恒常性の理解に貢献するだけでなく、睡眠研究における非モデル動物の重要性を示した点においても、大きな意義があると考えられる。デンマークの生物学者である August Krogh は、Krogh's principle として "for such a large number of problems there will be some animal of choice, or a few such animals, on which it can be most conveniently studied." という言葉を遺しており、本研究はその一例である。睡眠は多くの生命現象と異なり、幅広い生物種で保存されているという特徴があるため、解くべき課題に対して必ずや最適なモデル動物が存在するだろう。一般的なモデル動物に囚われない研究戦略を推し進めることで、睡眠の普遍原理の解明に近づくことが期待される。

臨床応用を見据える上での本研究の限界と意義

最後に、本研究を臨床応用することを見据え、その限界と意義について述べる。本研究をヒトへ応用する上で重要な問題は、トカゲとヒトの進化的な距離の大きさにある。哺乳類における精緻な神経回路やそれに伴う高次な認知機能は、3 億 2 千年前に有羊膜類が分化したのちに独自に獲得したものが多くと考えられ、爬虫類にはない多様性がある。また、変温動物である爬虫類は、哺乳類とは異なる環境応答を示し、睡眠においても温度依存的に徐波睡眠やレム睡眠の割合が変化することが知られている (Albeck *et al.*, 2022)。こうした背景を踏まえると、本研究で得られた結果をそのまま哺乳類に適用できるかは未知数であり、齧歯類や鳥類を用いた先行研究と合わせて慎重に検討する必要がある。

その一方、近年の研究によって、トカゲの脳領域は哺乳類のそれと遺伝学的に高い相同性を示し、基本的な神経回路は多くの共通項を持つことが明ら

かとなっており、トカゲは哺乳類とある程度の近縁さを持つ単純な系として、有用なモデル動物となりうることも確かである（Tosches *et al.*, 2018; Hain *et al.*, 2022）。トカゲを用いて睡眠恒常性における皮質の役割を明示し、よりヒトに近い齧歯類の先行研究の結果をより確かなものとしたことは、将来の基礎研究の方針を定め、基礎研究をいち早く臨床に橋渡しする上で、一定の意味を持つと考えられる。具体的には、今後皮質に標的を絞り睡眠恒常性の分子機構を明らかにする研究が加速するだろう。分子機構の解明においては、遺伝学ツールが豊富な哺乳類に一日の長があり、哺乳類を中心に基礎研究が展開されると予想される。分子機構を同定することで、寝不足やそれに伴うパフォーマンス低下にアプローチする創薬が可能になると考えられる。さらに、皮質は脳の最外側に位置し、非侵襲的手法による介入が比較的容易な脳領域であるため、創薬に頼らない寝不足治療の可能性が高まったことも、臨床医学的な観点から大きな意義があると言えるだろう。現在、皮質への光や磁気刺激による非侵襲的な治療は注目を集めており、マウスだけでなく不眠症の小児においても、光刺激によって通常時の睡眠量が増加したとする論文が存在する（Zhou *et al.*, 2024）。しかし、本手法が寝不足時にも同じように睡眠量を増やし、寝不足によって低下した機能の回復まで認めるかは全く未知数であるため、今後の研究が待たれる。

結論

1. 本研究全体から得られた新知見

本研究による新知見は、主に以下の三点である。

- ・脳波によって定義される電気生理学的な睡眠恒常性は、哺乳類や鳥類だけでなく、爬虫類においても保存された性質である。
- ・睡眠恒常性は性質のみならず、制御メカニズムも哺乳類と爬虫類の間で保存されている可能性がある。
- ・皮質はデルタパワーのリバウンドに必要であり、不足した睡眠を代償する役割を担う。

2. 新知見の意義

まず、電気生理学的な睡眠恒常性が変温動物である爬虫類においても見られたという知見は、睡眠恒常性は恒温動物である哺乳類と鳥類が収斂進化によって独自に獲得した性質であるという従来の考え方を改め、有羊膜類に分化する以前にすでに獲得されていた可能性を示しており、比較生理学的な観点から大きな意義があると言える。

また、脳波を取得する領域が皮質（哺乳類、鳥類）であれ DVR（爬虫類）であれ、デルタパワーが寝不足によって増強され睡眠によって減弱することが示された。この知見は、デルタパワーは動物種間、さらには脳領域間を超えて重要な役割を持つ可能性を示しており、先行研究の結果と合わせ、脳機能の回復におけるデルタパワーの重要性を再認識させるものである。

さらに、これまで理解が曖昧であった睡眠恒常性を制御する脳領域について、皮質以外の脳領域から脳波を取得するというトカゲの利点を活かすことで、皮質が真に睡眠恒常性に関与する脳領域であることを明示した。非モデル動物であるトカゲの特長を活かすことによって、哺乳類では困難であった課題を解決したことは、睡眠研究における非モデル動物の重要性を示した点で、大きな意義があると考ええる。

3. 本研究で得られた新知見から今後どのような研究が展開されうるか。

変温動物である爬虫類においても電気生理学的な睡眠恒常性の存在が確認されたため、今後両生類や魚類における電気生理学的な睡眠恒常性を調べる研究が進むだろう。しかし、これらの動物では未だ徐波睡眠とレム睡眠という二つの睡眠ステージの存在すら明確に確認されていない

ため、まずはその睡眠様態について詳細に調べる必要がある。

また、皮質が睡眠恒常性に寄与する脳領域であることを明示したことで、皮質に標的を絞り、睡眠恒常性の分子機構を明らかにする研究が加速するだろう。分子機構の解明においては、遺伝学ツールが豊富な哺乳類に一日の長があり、哺乳類を中心に研究が展開されることが予想される。分子機構が同定されることで、寝不足やそれに伴うパフォーマンス低下にアプローチする創薬が可能になると考えられる。さらに、皮質は脳の最外側に位置し、非侵襲的手法による介入が比較的容易な脳領域であるため、創薬に頼らない寝不足治療の可能性が高まったことも、臨床医学的な観点から大きな意義があると考えられる。

4. 今後の課題

本研究では主に徐波睡眠の恒常性について研究を進めたが、その一方でレム睡眠の恒常性については、その存在を言及するに留まった。その理由として、レム睡眠の恒常性は哺乳類においてでさえ、統一した見解が得られていないことが挙げられる。そのため、哺乳類におけるレム睡眠の理解が進んだ後に、トカゲにおけるレム睡眠やその恒常性について再考する必要がある。

また、本研究では皮質の切除を外科的な手法によって行ったため、一部切除できていない皮質領域が存在する、切除領域が完全に同一ではない、という問題がある。今後、薬理学的・遺伝学的方法によって、本研究との再現性を確かめるべきだろう。

加えて、本研究では爬虫類における睡眠恒常性の有無を明らかにした一方、回復睡眠が持つ機能について解析することはできなかった。例えば、寝不足の記憶への影響や、その際の皮質の関与など、現象だけでなく機能にまで踏み込むことができれば、より興味深い研究を展開できると考えられる。

最後に、トカゲとヒトの進化的な距離の大きさは、本研究をヒトへ応用する上で考慮すべき重要な課題である。哺乳類における精緻な神経回路やそれに伴う高次な認知機能は独自に獲得したものが多いと考えられ、爬虫類にはない多様性がある。また、変温動物である爬虫類は、哺乳類とは異なる環境応答を示し、睡眠においても温度依存的に徐波睡眠やレム睡眠の割合が変化する。こうした背景を踏まえると、本研究で得られた結果をそのまま哺乳類に適応できるかは未知数であり、齧歯類や鳥類を用いた先行研究と合わせて慎重に検討する必要がある。

謝辞

本研究遂行にあたり、多くの方々にご協力いただきました。

博士課程を通じてご指導いただいた現・名古屋大学 理学研究科 神経行動学グループ（元・北海道大学 医学院 細胞薬理学教室）乗本 裕明 教授に深く感謝申し上げます。乗本先生には、博士課程進学にあたり悩んでいた段階から相談に乗っていただき、そのおかげで乗本研究室に参画でき、今の私があります。入学後は実験手技を教えていただいたのみならず、先生の研究への向き合い方やサイエンスに対する熱い情熱を間近で感じることができ、最先端を走る研究者の姿勢を学ばせていただきました。私は今後研究の土俵が変わりますが、それでも必ず活かすことができる経験を積むことができました。

私が北海道大学所属のまま研究拠点を名古屋大学に移すこととなり、乗本教授に代わって指導教員を引き受けてくださった北海道大学 医学院 組織細胞学教室 藤山 文乃 教授に、心から感謝申し上げます。藤山先生が快く引き受けてくださり、支えてくださったおかげで、名古屋でも安心して研究することができました。出張等でお会いした際は、お忙しい中にもかかわらず時間を作ってお話ししてくださり、いつも私を気にかけてくださいました。本当にありがとうございました。

本研究を進めるにあたり、パッチクランプ法を用いた実験につきましては、現・名古屋大学 理学研究科 神経行動学グループ（元・北海道大学 医学院 細胞薬理学教室）小林 里帆 博士研究員、周 至文 助教、順天堂大学 医学研究科 脳回路形態学教室 岡本 和樹 博士研究員の三名に行っていただきました。皆様の高度な実験手技があったからこそ、本研究をより深くまで掘り下げることができました。心より感謝申し上げます。

研究生活を共にし、研究室内のミーティングや日々の議論において、終始有益かつ適切な御助言をいただき、毎日の研究室生活において多大な御協力をいただいた現・名古屋大学 理学研究科 神経行動学グループ（元・北海道大学 医学院 細胞薬理学教室）向井 康敬 助教をはじめとする研究室メンバーの皆様に、深く感謝申し上げます。特に、山口 翔 博士研究員、小竹 皓貴 氏、松井 双葉 氏は、爬虫類グループとして日々動物の管理や世話を共

同で行っていただきました。皆様の御協力なくして本研究はありません。心より感謝申し上げます。

本研究の一部は、JSPS 特別研究員奨励費 JP23KJ0055 の助成を受けて行いました。日本学術振興会に感謝申し上げます。

また、この場をお借りして、本研究に使用した全ての実験動物に謹んで感謝の意を表すとともに、謹んでご冥福をお祈り申し上げます。

最後になりますが、終始私を見守り続け何一つ不自由なく学生生活・研究生生活を送らせてくださった家族、私の相談を聞き心の支えとなってくださった友人に心から感謝の意を表し、本博士論文の結びとさせていただきます。

利益相反

開示すべき利益相反関係はない。

引用文献

- Albeck, N., Udi, D.I., Eyal, R., Shvartsman, A. and Shein-Idelson, M., 2022. Temperature-robust rapid eye movement and slow wave sleep in the lizard *Laudakia vulgaris*. *Commun. Biol.* 5, 1310.
- Arthaud, S., Libourel, P.A., Luppi, P.H. and Peyron, C., 2020. Insights into paradoxical (REM) sleep homeostatic regulation in mice using an innovative automated sleep deprivation method. *Sleep* 43, zsaa003.
- Ayala-Guerrero, F. and Mexicano, G., 2008. Sleep and wakefulness in the green iguanid lizard (*Iguana iguana*). *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 151, 305–312.
- Bagur, S., Lacroix, M.M., De Lavilléon, G., Lefort, J.M., Geoffroy, H. and Benchenane, K., 2018. Harnessing olfactory bulb oscillations to perform fully brain-based sleep-scoring and real-time monitoring of anaesthesia depth. *PLOS Biol.* 16, e2005458.
- Beersma, D.G.M., Dijk, D.J., Blok, C.G.H. and Everhardus, I., 1990. REM sleep deprivation during 5 hours leads to an immediate REM sleep rebound and to suppression of non-REM sleep intensity. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 76, 114–122.
- Blumberg, M.S., Lesku, J.A., Libourel, P.A., Schmidt, M.H. and Rattenborg, N.C., 2020. What Is REM Sleep? *Curr. Biol.* 30, R38–R49.
- Borbély, A.A., 1982. A two process model of sleep regulation. *Hum. Neurobiol.*, 1(3), 195–204.
- Borbély, A.A., Tobler, I. and Hanagasioglu, M., 1984. Effect of sleep deprivation on sleep and EEG power spectra in the rat. *Behav. Brain Res.* 14, 171–182.
- Cajochen, C., Knoblauch, V., Kräuchi, K., Renz, C. and Wirz-Justice, A., 2001. Dynamics of frontal EEG activity, sleepiness and body temperature under high and low sleep pressure. *Neuroreport* 12, 2277–2281.
- Campbell, S.S. and Tobler, I., 1984. Animal sleep: A review of sleep duration across phylogeny. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8, 269–300.

- Capellini, I., Nunn, C.L., McNamara, P., Preston, B.T. and Barton, R.A., 2008. Energetic constraints, not predation, influence the evolution of sleep patterning in mammals. *Funct. Ecol.* 22, 847–853.
- Daan, S., Beersma, D.G. and Borbely, A.A., 1984. Timing of human sleep: recovery process gated by a circadian pacemaker. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 246, R161–R183.
- Dijk, D.J., 2009. Regulation and Functional Correlates of Slow Wave Sleep. *J. Clin. Sleep Med.* 5.
- Durán, E., Oyanedel, C.N., Niethard, N., Inostroza and M., Born, J., 2018. Sleep stage dynamics in neocortex and hippocampus. *Sleep* 41.
- Facchin, L., Schöne, C., Mensen, A., Bandarabadi, M., Pilotto, F., Saxena, S., Libourel, P.A., Bassetti, C.L.A. and Adamantidis, A.R., 2020. Slow Waves Promote Sleep-Dependent Plasticity and Functional Recovery after Stroke. *J. Neurosci.* 40, 8637–8651.
- Fenk, L.A., Riquelme, J.L. and Laurent, G., 2023. Interhemispheric competition during sleep. *Nature* 616, 312–318.
- Fenk, L.A., Riquelme, J.L. and Laurent, G., 2024. Central pattern generator control of a vertebrate ultradian sleep rhythm. *Nature* 636, 681–689.
- Flanigan, W.F., 1973a. Sleep and wakefulness in iguanid lizards, *Ctenosaura pectinata* and *Iguana iguana*. *Brain Behav. Evol.* 8, 417–436.
- Flanigan, W.F., Wilcox, R.H. and Rechtschaffen, A., 1973b. The EEG and behavioral continuum of the crocodilian, *Caiman sclerops*. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 34, 521–538.
- Flanigan, W.F., 1974a. Sleep and wakefulness in chelonian reptiles. II. The red-footed tortoise, *Geochelone carbonaria*. *Arch. Ital. Biol.* 112, 253–277.
- Flanigan, W.F., Knight, C.P., Hartse, K.M. and Rechtschaffen, A., 1974b. Sleep and wakefulness in chelonian reptiles. I. The box turtle, *Terrapene carolina*. *Arch. Ital. Biol.* 112, 227–252.
- Franken, P., Tobler, I. and Borbély, A.A., 1991. Sleep homeostasis in the rat:

Simulation of the time course of EEG slow-wave activity. *Neurosci. Lett.* 130, 141–144.

Fukuoka, K., Murata, Y., Otomaru, T., Mori, M., Ohe, K., Mine, K. and Enjoji, M., 2022. Recovery Sleep Immediately after Prolonged Sleep Deprivation Stimulates the Transcription of Integrated Stress Response-Related Genes in the Liver of Male Rats. *Clocks Sleep* 4, 623–632.

Fultz, N.E., Bonmassar, G., Setsompop, K., Stickgold, R.A., Rosen, B.R., Polimeni, J.R. and Lewis, L.D., 2019. Coupled electrophysiological, hemodynamic, and cerebrospinal fluid oscillations in human sleep. *Science* 366, 628–631.

Funato, H., Miyoshi, C., Fujiyama, T., Kanda, T., Sato, M., Wang, Z., Ma, J., Nakane, S., Tomita, J., Ikkyu, A., *et al*, 2016. Forward-genetics analysis of sleep in randomly mutagenized mice. *Nature* 539, 378–383.

Gent, T.C., Bandarabadi, M., Herrera, C.G. and Adamantidis, A.R., 2018. Thalamic dual control of sleep and wakefulness. *Nat. Neurosci.* 21, 974–984.

González-Rueda, A., Pedrosa, V., Feord, R.C., Clopath, C. and Paulsen, O., 2018. Activity-Dependent Downscaling of Subthreshold Synaptic Inputs during Slow-Wave-Sleep-like Activity *In Vivo*. *Neuron* 97, 1244-1252.e5.

Greening, L. and McBride, S., 2022. A Review of Equine Sleep: Implications for Equine Welfare. *Front. Vet. Sci.* 9.

Hafner, M., Stepanek, M., Taylor, J., Troxel, W. and Stolk, C., 2016. Why sleep matters -- the economic costs of insufficient sleep: A cross-country comparative analysis. RAND Corporation.

Hain, D., Gallego-Flores, T., Klinkmann, M., Macias, A., Ciirdaeva, E., Arends, A., Thum, C., Tushev, G., Kretschmer, F., Tosches, M.A., *et al*, 2022. Molecular diversity and evolution of neuron types in the amniote brain. *Science* 377, eabp8202.

Hendricks, J.C., Sehgal, A. and Pack, A.I., 2000a. The need for a simple animal model to understand sleep. *Prog. Neurobiol.* 61, 339–351.

Hendricks, J.C., Finn, S.M., Panckeri, K.A., Chavkin, J., Williams, J.A., Sehgal, A. and Pack, A.I., 2000b. Rest in *Drosophila* Is a Sleep-like State. *Neuron* 25, 129–138.

- Huber, R., Deboer, T. and Tobler, I., 2000. Effects of sleep deprivation on sleep and sleep EEG in three mouse strains: empirical data and simulations. *Brain Res.* 857, 8–19.
- Huber, R., Felice Ghilardi, M., Massimini, M. and Tononi, G., 2004. Local sleep and learning. *Nature* 430, 78–81.
- Huber, R., Ghilardi, M.F., Massimini, M., Ferrarelli, F., Riedner, B.A., Peterson, M.J. and Tononi, G., 2006. Arm immobilization causes cortical plastic changes and locally decreases sleep slow wave activity. *Nat. Neurosci.* 9, 1169–1176.
- Jones, S.G., Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Tononi, G. and Benca, R.M., 2008. Homeostatic regulation of sleep in the white-crowned sparrow (*Zonotrichia leucophrys gambelii*). *BMC Neurosci.* 9, 47.
- Kanaya, H.J., Park, S., Kim, J., Kusumi, J., Krenenou, S., Sawatari, E., Sato, A., Lee, J., Bang, H., Kobayakawa, Y *et al*, 2020. A sleep-like state in *Hydra* unravels conserved sleep mechanisms during the evolutionary development of the central nervous system. *Sci. Adv.* 6, eabb9415.
- Kon, K., Ode, K.L., Mano, T., Fujishima, H., Takahashi, R.R., Tone, D., Shimizu, C., Shiono, S., Yada, S., Matsuzawa, K., *et al*, 2024. Cortical parvalbumin neurons are responsible for homeostatic sleep rebound through CaMKII activation. *Nat. Commun.* 15, 6054.
- Krone, L.B., Yamagata, T., Blanco-Duque, C., Guillaumin, M.C.C., Kahn, M.C., van der Vinne, V., McKillop, L.E., Tam, S.K.E., Peirson, S.N., Akerman, C.J., *et al*, 2021. A role for the cortex in sleep–wake regulation. *Nat. Neurosci.* 24, 1210–1215.
- Lancel, M., 1993. Cortical and Subcortical EEG in Relation to Sleep-Wake Behavior in Mammalian Species. *Neuropsychobiology* 28, 154–159.
- Libourel, P.A., Barrillot, B., Arthaud, S., Massot, B., Morel, A.L., Beuf, O., Herrel, A. and Luppi, P.H., 2018. Partial homologies between sleep states in lizards, mammals, and birds suggest a complex evolution of sleep states in amniotes. *PLOS Biol.* 16, e2005982.
- Liu, Z.W., Faraguna, U., Cirelli, C., Tononi, G. and Gao, X.B., 2010. Direct

Evidence for Wake-Related Increases and Sleep-Related Decreases in Synaptic Strength in Rodent Cortex. *J. Neurosci.* 30, 8671–8675.

Lyamin, O.I., Kosenko, P.O., Korneva, S.M., Vyssotski, A.L., Mukhametov, L.M. and Siegel, J.M., 2018. Fur Seals Suppress REM Sleep for Very Long Periods without Subsequent Rebound. *Curr. Biol.* 28, 2000-2005.e2.

Martinez-Gonzalez, D., Lesku, J.A. and Rattenborg, N.C., 2008. Increased EEG spectral power density during sleep following short-term sleep deprivation in pigeons (*Columba livia*): evidence for avian sleep homeostasis. *J. Sleep Res.* 17, 140–153.

Nath, R.D., Bedbrook, C.N., Abrams, M.J., Basinger, T., Bois, J.S., Prober, D.A., Sternberg, P.W., Gradinaru, V. and Goentoro, L., 2017. The Jellyfish *Cassiopea* Exhibits a Sleep-like State. *Curr. Biol.* 27, 2984-2990.e3.

Naumann, R.K., Ondracek, J.M., Reiter, S., Shein-Idelson, M., Tosches, M.A., Yamawaki, T.M. and Laurent, G., 2015. The reptilian brain. *Curr. Biol.* 25, R317–R321.

Norimoto, H., Fenk, L.A., Li, H.H., Tosches, M.A., Gallego-Flores, T., Hain, D., Reiter, S., Kobayashi, R., Macias, A., Arends, A., *et al*, 2020. A claustrum in reptiles and its role in slow-wave sleep. *Nature* 578, 413–418.

Oikonomou, G., Altermatt, M., Zhang, R., Coughlin, G.M., Montz, C., Gradinaru, V. and Prober, D.A., 2019. The Serotonergic Raphe Promote Sleep in Zebrafish and Mice. *Neuron* 103, 686-701.e8.

Onaolapo, J.O., Onaolapo, Y.A., Akanmu, A.M. and Olayiwola, G., 2016. Caffeine and sleep-deprivation mediated changes in open-field behaviours, stress response and antioxidant status in mice. *Sleep Sci.* 9, 236–243.

Raizen, D.M., Zimmerman, J.E., Maycock, M.H., Ta, U.D., You, Y., Sundaram, M.V. and Pack, A.I., 2008. Lethargus is a *Caenorhabditis elegans* sleep-like state. *Nature* 451, 569–572.

Rattenborg, N.C., Martinez-Gonzalez, D. and Lesku, J.A., 2009. Avian sleep homeostasis: Convergent evolution of complex brains, cognition and sleep functions in mammals and birds. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 33, 253–270.

- Sawada, T., Iino, Y., Yoshida, K., Okazaki, H., Nomura, S., Shimizu, C., Arima, T., Juichi, M., Zhou, S., Kurabayashi, N., *et al*, 2024. Prefrontal synaptic regulation of homeostatic sleep pressure revealed through synaptic chemogenetics. *Science* 385, 1459–1465.
- Shaw, P.J., Cirelli, C., Greenspan, R.J. and Tononi, G., 2000. Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 1834–1837.
- Shein-Idelson, M., Ondracek, J.M., Liaw, H.P., Reiter, S. and Laurent, G., 2016. Slow waves, sharp waves, ripples, and REM in sleeping dragons. *Science* 352, 590–595.
- Suchecki, D., Tiba, P.A. and Machado, R.B., 2012. REM Sleep Rebound as an Adaptive Response to Stressful Situations. *Front. Neurol.* 3.
- Tobler, I. and Borbély, A.A., 1988. Sleep and EEG spectra in the pigeon (*Columba livia*) under baseline conditions and after sleep deprivation. *J. Comp. Physiol. A*, 163(5), 729–738.
- Tobler, I., Franken, P. and Scherschlicht, R., 1990. Sleep and EEG spectra in the rabbit under baseline conditions and following sleep deprivation. *Physiol. Behav.* 48, 121–129.
- Tononi, G. and Cirelli, C., 2003. Sleep and synaptic homeostasis: a hypothesis. *Brain Res. Bull.* 62, 143–150.
- Tononi, G. and Cirelli, C., 2014. Sleep and the Price of Plasticity: From Synaptic and Cellular Homeostasis to Memory Consolidation and Integration. *Neuron* 81, 12–34.
- Tosches, M.A., Yamawaki, T.M., Naumann, R.K., Jacobi, A.A., Tushev, G. and Laurent, G., 2018. Evolution of pallium, hippocampus, and cortical cell types revealed by single-cell transcriptomics in reptiles. *Science* 360, 881–888.
- Vallat, R., Meunier, D., Nicolas, A. and Ruby, P., 2019. Hard to wake up? The cerebral correlates of sleep inertia assessed using combined behavioral, EEG and fMRI measures. *NeuroImage* 184, 266–278.
- Vyazovskiy, V.V., Cirelli, C., Pfister-Genskow, M., Faraguna, U. and Tononi, G., 2008. Molecular and electrophysiological evidence for net synaptic potentiation in

wake and depression in sleep. *Nat. Neurosci.* 11, 200–208.

Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Chen, M.J., Liao, Y., Thiyagarajan, M., O'Donnell, J., Christensen, D.J., Nicholson, C., Iliff, J.J., *et al*, 2013. Sleep Drives Metabolite Clearance from the Adult Brain. *Science* 342, 373–377.

Zhou, X., He, Y., Xu, T., Wu, Z., Guo, W., Xu, X., Liu, Y., Zhang, Y., Shang, H., Huang, L., *et al*, 2024. 40 Hz light flickering promotes sleep through cortical adenosine signaling. *Cell Res.* 34, 214–231.

羽鳥聖七, 乗本裕明, 2022. 睡眠の進化史上における爬虫類の位置付け, 実験医学, Vol. 40 No. 11, 1719–1723.