

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03936

研究課題名(和文) ツキノワグマにおける冬眠中の体温調節機構の解明 - ふるえ産熱か非ふるえ産熱か -

研究課題名(英文) Thermo-regulation of hibernation in Japanese black bears - shivering or non-shivering? -

研究代表者

坪田 敏男 (TSUBOTA, TOSHIO)

北海道大学・獣医学研究院・教授

研究者番号：10207441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：冬眠中のツキノワグマにおける体温調節機構を解明することを目指して、とくに体脂肪を使った非ふるえ産熱に着目して研究を行った。飼育下(北秋田市阿仁クマ牧場)のツキノワグマに体温および心拍数測定用データロガーを埋め込み、冬眠期とその前後の期間の体温および心拍数をモニタリングした。その結果、11月下旬にツキノワグマを個室に移動させ、給餌を停止した直後に体温および心拍数が低下し、冬眠に入ったと判断された。その後は、雄と雌とで体温および心拍数の変化に違いが認められ、冬眠時期(雌では繁殖プロセス)によって体温と心拍数の調節機序が異なることが示唆された。非ふるえ産熱に使われる褐色脂肪の存在は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、精巧な体温、心拍数および活動量測定用データロガーの開発に伴って、冬眠中のクマでの体温および心拍数のモニタリング研究が行われている。しかしながら、繁殖プロセスに伴う変化をモニタリングした研究はなく、本研究において初めて雌の繁殖プロセス、すなわち着床遅延期、胎子発育期(妊娠期)および泌乳/哺育期による体温・心拍数変化を捉えることができた点が学術的には大きな成果である。また、本研究成果が冬眠というユニークで特殊な生命現象の一端を明らかにしたことに加え、人の医療や動物医療、とくに低温治療や冷え症の治療、さらには不動化を伴う疾患(寝たきり高齢者)への応用という分野において社会的な意義も大きい。

研究成果の概要(英文)：Aiming to elucidate the thermoregulatory mechanism in the Japanese black bear during hibernation, we conducted a study focusing on the non-shivering thermogenesis using body fat. A data logger for measuring body temperature and heart rate was embedded in the breast area of black bears in captivity (Ani Bear Park, Kitaakita City), and the body temperature and heart rate before and during hibernation period were monitored. As a result, soon after the black bears were moved to individual rooms in late November, their body temperature and heart rate decreased immediately following feeding was stopped, resulting in hibernation. After that, changes in body temperature and heart rate were observed differently in males and females, suggesting that the regulation mechanisms of body temperature and heart rate differ depending on the hibernation phase and/or reproductive process, especially in female bears. The presence of brown fat, which is used for non-shivering thermogenesis, was not found.

研究分野：獣医学/野生動物医学

キーワード：クマ 冬眠 体温 心拍数 白色脂肪組織 産熱 非ふるえ産熱

1. 研究開始当初の背景

クマは、餌資源が極端に減少する冬期に冬眠をする(右図)。冬眠中は一切の摂食・飲水がない(絶食)ので、冬眠前に蓄積した体脂肪のみを使い生命を維持する。冬眠中には中途覚醒がなく、4~5 か月間、間断なく眠り続ける(Nelson et al. 1973)。妊娠メスは、冬眠半ばに出産するため、冬眠の前半期を妊娠(胎子発育)、後半期を哺育(新生子発育)に充てている。その背景には、初夏に交尾しても冬眠に入る時期(11月下旬頃)まで着床を遅らせること(着床遅延)がある(坪田 2016)。



クマの冬眠は、体温の降下度が小さいものの確実に代謝を下げる点で、他の冬眠性哺乳類の冬眠と何ら変わることはない。すなわち、いったん冬眠に入ると体温は30~35℃に、心拍数は8~10回に下がり、代謝全体として25~50%まで低下する(Tøien et al. 2011)。一般的に冬眠性哺乳類は、活動時の体温(クマでは37~38℃)を冬眠時の体温(クマでは30~35℃)に再設定する。冬眠時に再設定した閾温度(クマでは30~31℃)を下回ると生命に危険が及ぶので、産熱により体温を維持する。とくにクマの場合、冬眠中に妊娠(胎子発育)と哺育(新生子発育)を完遂しなければならないので、自らの生命に加え子の生命の危険をも免れなければならない。

以上のように、クマでは冬眠中に代謝を下げつつもある程度高い体温を維持する必要があり、そのための産熱機構が備わっていると考えられる。これまでに、数日~十数日間隔で皮下および深部体温上昇がみられ(Harlow et al. 2004; Tøien et al. 2015)、この上昇はふるえ産熱によるとされているが、非ふるえ産熱については調べられていない。一方、妊娠メスの体温保持という点では、胎子発育期間(黄体活性期間)にはプロゲステロン分泌によって37~38℃で維持されているが、出産後には通常の冬眠状態(体温30~33℃)にまで低下する(Shimozuru et al. 2013)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ツキノワグマにおける冬眠中の体温、心拍数および活動量を長期モニタリングし、心拍数増加と同調的に起こる不定期な体温上昇がふるえ産熱によるものか、非ふるえ産熱によるものか、さらに非ふるえ産熱であった場合、その分子メカニズムを解明することである。作業仮説としては、“ツキノワグマは冬眠中に体温を下降させるが、閾温度(30~31℃)を下回らないように交換神経系を介したふるえ産熱か非ふるえ産熱かによって体温を上昇させる”である。これまでに、クマで褐色脂肪細胞の存在を示唆する報告(Davis et al. 1990)と、否定的な報告がある(Jones et al. 1999)。近年新たな産熱細胞として発見されたベージュ細胞の報告はない。これまでに報告されていない新たなクマ類での産熱機構を明らかにすることが本研究の最重要課題である。本研究では、北秋田市阿仁クマ牧場で飼育されているツキノワグマを用いて、次の5つの事項を明らかにすることを目的とした。

- (1) 妊娠・偽妊娠メスおよびオスの体温・心拍数が数日~十数日間隔で同調的に増減するかを確認する。
- (2) 体温・心拍数(活動量は未知)の増加が産熱に伴う変化であるかを明らかにする。
- (3) 産熱は、ふるえ産熱によるものか、非ふるえ産熱によるものかを明らかにする。
- (4) 非ふるえ産熱の場合、褐色・ベージュ脂肪細胞での産熱機序を分子レベルで明らかにする。
- (5) 妊娠メスの出産後の体温調節が、非妊娠メスおよびオスのそれと異なるのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) オスおよび妊娠・偽妊娠メスをを用いた体温、心拍数および活動量測定（長期モニタリング）

オスは、冬眠に入るとすぐに体温を低下させるので、体温低下後の数日～十数日間隔の体温増減を調べるには好適な実験対象である。一方、妊娠・偽妊娠メスは、黄体から分泌されるプロゲステロンの作用により着床時期（11月下旬頃）以降に一旦体温が上昇し、出産時期（1月下旬頃）以降、通常の冬眠時の低体温になる。当飼育施設では、11月下旬～翌4月上旬の間ツキノワグマを冬眠させるので



（右図）冬眠前活動期の9月、冬眠中の1月ならびに冬眠後活動期の5月の3回にわたって麻酔を施し、以下のような実験を実施した。

9月に、オス9頭および妊娠・偽妊娠メス6頭に対して、麻酔下で外科手術により体温・心拍数・活動量測定用デバイス：DST centi-HRT ACT（Star-Oddi）を皮下に埋め込んだ。同時に、体重測定ならびに血液および脂肪組織（頸部、肩部および鼠径部の3カ所）の採取を行った。

11月下旬に、クマを舎内に収容し、餌を止めて冬眠状態にした。

1月中旬に、体重測定ならびに血液および脂肪組織（頸部、肩部および鼠蹊部の3カ所）の採取を行った。同時に、行動撮影用ビデオカメラを設置した。また随時、赤外線サーモグラフィで撮影をした。

1か月間撮影を続け、2月中旬にデータを回収した。

3月下旬に、冬眠から覚醒させ、通常の放牧飼育に戻した。

5月に、埋め込んだデバイスを取り出し、データを回収した。同時に、体重測定ならびに血液および脂肪組織（頸部、肩部および鼠蹊部の3カ所）の採取を行った。

(2) 冬眠中の妊娠・偽妊娠メスおよびオスでのふるえ産熱・非ふるえ産熱機序の解明

妊娠・偽妊娠メスおよびオスでの数日～十数日間隔で起こる不定期な体温上昇を引き起こす産熱機序の解明を試みた。産熱機序としては、ふるえ産熱か非ふるえ産熱かのいずれか（あるいはその両方）の可能性があったので、両面から実験を進めた。とくに非ふるえ産熱であった場合、熱産生機能を有する褐色脂肪細胞以外に、近年白色脂肪細胞から発生するベージュ脂肪細胞が発見され（Wu et al. 2012）、これら2種類の細胞に注目して、その存在および産熱のための分子機序を明らかにすることを目指した。

上記(1)で撮影した1か月分のビデオ映像を視聴し、ふるえ行動の有無を確認した。ふるえ行動が認められれば、その時間帯を記録し、冬眠中の頻度を解析することとした。

上記(1)で撮影した赤外線サーモグラフィ映像を分析した。とくに体温および心拍数が上昇した期間の放射体温の変化を捉え解析した。

褐色脂肪細胞およびベージュ脂肪細胞が存在するか否かを解剖・組織学的に調べた。その上で、褐色またはベージュ脂肪細胞内のUCP1発現量（mRNAおよび蛋白レベル）と活性を測定した。

4. 研究成果

(1) オスおよび妊娠・偽妊娠メスをを用いた体温、心拍数および活動量測定（長期モニタリング）

オス、妊娠・偽妊娠メスともに、冬眠前（11月下旬）に個室にクマを移動させ餌を止めると体温と心拍数は徐々に低下し、冬眠に入ったと判断された。その後、妊娠・偽妊娠メスではプロゲステロンの作用により約2ヶ月間高温（36-38℃）を維持し、妊娠個体の出産時期（1月下旬）を境にして31-35℃まで低下した。一方オスでは、プロゲステロンの影響がないので、11月下

旬になるとすぐに 31-36 に体温が下降し、冬眠に入った。心拍数は、雄雌共に 11 月下旬に冬眠に入ると 60-100 回 / 分から 20-60 回 / 分まで低下した。妊娠・偽妊娠メスでは、妊娠メスの出産時期を過ぎるとさらに低下した。個体毎にみると、冬眠前の活動期にはおよそ 24 時間周期で体温および心拍数が変動していたのが、冬眠に入ると 24 時間周期が消え、不規則に心拍数の増加がみられた。オスは冬眠導入直後から、妊娠・偽妊娠メスでは出産時期後から体温と心拍数に数日～十数日間隔で同調的に増減を繰り返す変化がみられた。これらの結果より、冬眠時期（メスでは繁殖プロセス）によって体温と心拍数の調節機序が異なることが示唆された。

(2) 冬眠中の妊娠・偽妊娠メスおよびオスでのふるえ産熱・非ふるえ産熱機序の解明

冬眠中にビデオ撮影されたツキノワグマの行動を観察したが、明確なふるえ行動は観察されなかった。次に冬眠中の非ふるえ産熱機構を探究するために、冬眠期および冬眠明け直後の当施設飼育グマおよび野生ヒグマから脂肪組織を採取して褐色脂肪組織の探索を行ったが、褐色を呈した脂肪組織は観察されず、さらに様々な部位から採取した白色脂肪組織での脱共役蛋白 (UCP1) の発現などは認められず、他の冬眠性哺乳類が中途覚醒時に用いる褐色脂肪組織は存在しないと考えられた。今後は白色脂肪組織を使った非ふるえ産熱の存在とその機構を明らかにする計画である。その他、冬眠中のクマの筋肉および骨機能の維持機構についても研究を進めた。

< 引用文献 >

- Nelson RA, Wahner HW, Jones JD, Ellefson RD, Zollman PE. Metabolism of bears before, during, and after winter sleep. *Am. J. Physiol.* 224: 491-496, 1973.
- 坪田敏男, クマの移動と冬眠. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズVI 回遊・渡り .裳華房, 2016.
- Tøien Ø, Blake J, Edger DM, Grahn DA, Heller HC, Barnes BM. Hibernation in black bears: independence of metabolic suppression from body temperature. *Science* 331: 906-909, 2011.
- Harlow HJ, Lohuis T, Anderson-Sprecher RC, Beck TDI. Body surface temperature of hibernating black bears may be related to periodic muscle activity. *J. Mammal.* 85: 414-419, 2004,
- Tøien Ø, Blake J, Barnes BM. Thermoregulation and energetics in hibernating black bears: metabolic rate and the mystery of multi-day body temperature cycles. *J. Comp. Physiol. B* 185: 447-461, 2015.
- Shimozuru M, Iibuchi R, Yoshimoto T, Nagashima A, Tanaka J, Tsubota T. Pregnancy during hibernation in Japanese black bears: effects on body temperature and blood biochemical profiles. *J. Mammal.* 94: 618-627, 2013.
- Davis WL, Goodman DBP, Crawford LA, Cooper OJ, Matthews JL. Hibernation activates glyoxylate cycle and gluconeogenesis in black bear brown adipose-tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1051: 276-278, 1990.
- Jones JD, Burnett P, Zollman P. The glyoxylate cycle: does it function in the dormant or active bear? *Comp. Biochem. Physiol.* 124: 177-179, 1999.
- Wu J, Cohen P, Spiegelman BM. Adaptive thermogenesis in adipocytes: Is beige the new brown? *Genes & Development* 27: 234-250, 2013.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyazaki, M., Shimozuru, M. & Tsubota, T.	4. 巻 14
2. 論文標題 Skeletal muscles of hibernating black bears show minimal atrophy and phenotype shifting despite prolonged physical inactivity and starvation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Moriwaki, J., Omori, R., Shimozuru, M., Tsuruga, H., Mano, T. & Tsubota, T.
2. 発表標題 Evaluation of body condition using body mass and chest girth in brown bears of Hokkaido, Japan (<i>Ursus arctos yesoensis</i>)
3. 学会等名 26th International Conference on Bear Research and Management (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubota, T., Yamazaki, K., Sashika, M., Moustafa, M. A. M., Shimozuru, M.
2. 発表標題 Changes in body temperature and heart rate during hibernation in captive male and female Japanese black bears (<i>Ursus thibetanus japonicus</i>)
3. 学会等名 25th International Conference of Bear Research and Management (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坪田敏男
2. 発表標題 冬眠中のクマにおけるエネルギー代謝および体温調節機構
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪田敏男
2. 発表標題 クマ類の冬眠と繁殖について
3. 学会等名 第3回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 Hibernating bear serum leads to increased protein content in human skeletal muscle cells
3. 学会等名 第7回骨格筋生物学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠中クマ血清によるヒト骨格筋培養細胞のタンパク質代謝制御の変化
3. 学会等名 第3回冬眠休眠研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮崎充功
2. 発表標題 冬眠中のツキノワグマはどのように骨格筋機能を維持しているのか？
3. 学会等名 第74回日本体力医学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 坪田敏男	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京大学出版会	5. 総ページ数 125
3. 書名 哺乳類の生物学 生理（新装版）	

1. 著者名 坪田敏男（協力）	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ニュートンプレス	5. 総ページ数 143
3. 書名 睡眠の教科書	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮崎 充功 (MIYAZAKI Mitsunori) (20632467)	北海道医療大学・リハビリテーション科学部・准教授 (30110)	
研究分担者	佐鹿 万里子 (SASHIKA Mariko) (30722954)	北海道大学・獣医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	下鶴 倫人 (SHIMOZURU Michito) (50507168)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	

6. 研究組織(つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	MOHAMED MOUSTAFA (MOUSTAFA Mohamed) (80794023)	北海道大学・獣医学研究院・学術研究員 (10101)	
研究 分 担 者	岡松 優子 (OKAMATSU Yuko) (90527178)	北海道大学・獣医学研究院・准教授 (10101)	