

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658092

研究課題名（和文）非冬眠動物であるラットにおける冬眠の誘発と虚血性疾患の治療に対する応用

研究課題名（英文）Induction of hibernation in the rat, a non-hibernator, and its application to therapy for ischemic injury.

研究代表者

志水 泰武（SHIMIZU YASUTAKE）

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：40243802

研究成果の概要（和文）：体温を極端に下げることによって、ガンの進行を抑えたり、脳や心臓の障害を軽くしたりできるはずである。本研究では、冬眠動物が10℃以下の体温で生存できることをヒントにして、冬眠することのない動物において冬眠と同等の低体温を誘発することにチャレンジした。非冬眠動物であるラットに麻酔をかけた状態で冷却すると、体温が低下した。このまま放置すると、25℃付近で心臓が停止するが、途中で麻酔を解除すると極度の低体温に誘導でき、元の体温に戻すこともできた。

研究成果の概要（英文）：An extreme hypothermic condition would be beneficial for developing new therapies, especially for cancers or reperfusion injury in ischemic diseases. The present study was designed to develop a method for inducing hypothermia, which is equivalent to hibernating animals, in non-hibernators. In rats (non-hibernator), hypothermia forcibly induced by inhalation anesthesia combined with cooling of the animals resulted in cardiac arrest when their body temperatures were dropped around 25°C. In contrast, body temperature of rats can be reduced less than 10°C when inhalation of the anesthesia was stopped during the cooling process.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|------|-----------|---------|-----------|
| 22年度 | 1,800,000 | 0 | 1,800,000 |
| 23年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 390,000 | 3,490,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：冬眠、低体温、心臓、虚血性心疾患、アデノシン、心電図、睡眠、アデノシン A1 受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 冬眠動物が極度の低体温下で生命を維持するためには、冬眠前に短日・寒冷環境へ馴化する過程が必須であると考えられていて、冬眠研究のほとんどが馴化過程で獲得される適応性変化を捉えるために、冬眠時と非冬眠時（活動時）の比較するものであった。

(2) 研究代表者らの先行研究において、ハムスターを冬眠状態にするために、冬眠前の短日・寒冷環境への適応は必須ではなく、脳内のアデノシン系の活性化が重要であることが明らかとなっていた。

2. 研究の目的

(1) 冬眠しない動物であるラットを「低体温・冬眠状態」に誘導する手法を確立する。

(2) 冬眠状態のラットを用いて、虚血性障害（特に血流依存臓器である心臓と脳に注目）が回避できるか、できるのであればどのようなメカニズムが関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者らは、これまでに実験室内でシリアンハムスターを効率よく冬眠させる方法を確立しているため、この条件をラットに与え、冬眠するかどうかを確かめる。

(2) 麻酔下のラットを低温環境（4℃）に置いて、強制的に低体温を誘導し、心停止するまでの時間、血圧や心電図、呼吸数、体温をモニターし、低体温がラットに与える影響を明らかにする。特に、心電図上に現れるJ波（低温障害により発生する異常波形）に注目し、この異常波形の出現と体温低下の関係を調べる。

(3) ラット脳室内へアデノシン受容体アゴニストである N6-cyclohexyladenosine (CHA) を投与して、低温環境下に置き、シリアンハムスターの冬眠と同等の低体温状態（体温 10℃以下を目安とする）に誘導できるか否か検証する。

(4) CHA を脳室内投与した後に冷却を施したラットについても、血圧や心電図、呼吸数、体温をモニターして、体温の変動の時間経過、心電図の変化（心室細動の発現、J波の出現など）、体温と心電図の関係、死

亡率を調べる。

(5) CHA を投与して低体温状態にした後、加温して正常体温への回復を試みる。

(6) 脳内アデノシン系は低体温を誘発する要因に過ぎないのか、低体温を維持する作用もあるのかを明らかにするために、脳内アデノシン系の活性化のみで、数日間に及ぶ低体温状態を維持し、健全な状態で覚醒に導けるのか、あるいは他の要素の関与が必要なのか、実験的に確かめる。

(7) 麻酔の影響を除去することが容易な吸入麻酔を用いて、体温調節中枢を抑制する時間を体温が低下する初期段階に限定し、中枢が抑制されていない状態で低体温にすることを試みる。

(8) 上記の方法で冬眠動物と同等の低体温に誘導したラットを正常体温へ回復させた後、傷害が起こっていないか、血液、尿のサンプルを用いた網羅的な診断を行う。

(9) 体温を復帰させるための自律的な機序として、褐色脂肪組織の機能亢進が起こるかどうか検証する。また低体温下で臓器が活動しているか調べるために、内在的な神経を保有する消化管の運動を調べる。

4. 研究成果

(1) ハムスターを実験室内で冬眠に導く条件（段階的な短日・低温環境への移行、高脂肪食の過剰給餌とそれに続く給餌制限）をラットに適用したが、冬眠状態に入る個体は認められなかった。このことからラットは条件を整えるだけでは、自ら体温を下げて冬眠状態に移行できない種であることが確かめられた。

(2) ペントバルビタールにより麻酔を施したラットを 4℃の低温室で冷却し、強制的な低体温の誘発を試みた。時間経過に伴い直腸温度が低下した。冷却開始初期には、心拍数の緩やかな減少が観察されたが、ある程度の時間が経過すると心拍数は急激に減少し、心拍動を維持することが困難な状態になった。体温低下初期には、心臓は規則正しく拍動し、心電図において異常な波形も認められなかったが、直腸温度が 20℃に近づくと、心房細動、心室細動および完全房室ブロックが出現した。直腸温度が 22.5℃まで低下した段階では、すべての個体において健全な心拍動が維持され、生存率は 100%であったが、直腸温度が 20℃に

低下すると生存率は 33.3%に低下し、17.5°Cではすべての個体が死亡した。

(3) アデノシン A1 受容体アゴニストである CHA をラットの側脳室内に投与し、4°Cの低温室で冷却したところ、時間経過に伴い直腸温度が低下した。ペントバルビタールで麻酔を施したラットを冷却することによって強制的に低体温に誘導した場合は、直腸温度が 17.5°Cに低下するとすべての個体が死亡したが、CHA の投与により体温を低下させた場合には、直腸温度が 15°Cまで低下しても生存率は 100%であった。10°Cを下回る個体も認められ、これまで非冬眠動物は生存できないとされてきた体温にまで低下させることに初めて成功した。

(4) CHA の側脳室内投与により体温を低下させた場合には、心房細動、心室細動あるいは房室ブロックなどの心臓の異常は出現しなかった。心拍数は大幅に小さくなったが、正常な洞律動が維持されていた。

(5) 褐色脂肪組織を支配する交感神経の活動を記録する方法を導入したが、低体温下にある動物で記録するにいたらなかったため、自律的に体温を復帰するメカニズムが機能するかどうかは判断できなかった。In vivo で消化管運動を調べる実験を行ったところ、25°C付近の低温下では運動が減弱していることがわかった。

(6) CHA を側脳室内に投与後冷却し、直腸温度を 15°Cまで低下させたラットについて、室温に戻し加温して、体温を回復させた。回復率は約 50%であった。体温を回復させることができた個体においても、自発行動は消失しており、24 時間以上生存した例はわずかであった。このことから、CHA を脳室内投与することによって、冬眠と同等の低体温に誘導することはできるものの、致死的な傷害を受けることが明らかとなった。

(7) CHA を側脳室内に投与後冷却する方法の代替として、麻酔によって体温調節中枢を抑制する時間を体温が低下する初期段階に限定し、中枢が抑制されていない状態で低体温にすることを試みた。冬眠動物であるハムスターに影響を除去することが容易な吸入麻酔を施して冷却し、直腸温度が 20°Cに低下したところで、イソフルランの吸入を停止する実験を行った。吸入停止後、麻酔の効果が無いにもかかわらず、体温が 10°C付近まで低下した。直腸温度が 10°C以下の状態が 3 時間~1 日続いた後、4°Cの寒冷環境下にいながら、自発的に体温が回

復することが確認された。人工的に誘導した低体温から、正常な冬眠と同じように自律的に覚醒したことは、人工冬眠の可能性を肯定する事象であると言える。

(8) 自発的に覚醒したハムスターは、活発な行動を示し、血液検査、尿検査で異常は認められなかった。

(9) ハムスターで成功した吸入麻酔を活用した低体温誘導法を、ラットに適用した。ラットにおいてもイソフルランで低体温に誘導したところ体温を 10°C付近まで低下させることができた。直腸温度が低下する間、心拍数は 400 回/分から 45~60 回/分へと緩やかに減少した。心電図には異常が認められなかった。

(10) 吸入麻酔を体温低下の途中で止める方法で、低体温に誘導したラットを室温環境下に戻したところ、直腸温度が 20~25°Cまで上昇した。また、直腸温度の上昇に伴う心拍数の増加が観察された。体温を回復させたラットは全て飲水および摂食行動を示した。血液検査、尿検査で異常は認められなかったことから、大きな傷害を被ることなく低体温から回復したことが示された。このことは、非冬眠動物においても冬眠動物と同等の低体温に導入し、健全な状態で復帰させるという人工冬眠へのトライアルが成功したことを意味する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Iwami M., Mahmoud F.A., Shiina T., Hirayama H., Shima T., Sugita J., Shimizu Y. Extract of grains of paradise and its active principle 6-paradol trigger thermogenesis of brown adipose tissue in rats. Auton. Neurosci. Vol.161, pp.63-67, 2011, 査読有
- ② Iwami M., Shiina T., Hirayama H., Shimizu Y. Intraluminal administration of zingerol, a non-pungent analogue of zingerone, inhibits colonic motility in rats. Biomed. Res. Vol.32, pp.181-185, 2011, 査読有

- ③ Hirayama H., Shiina T., Shima T., Kuramoto H., Takewaki T., Furness J.B., Shimizu Y. Contrasting effects of ghrelin and des-acyl ghrelin on the lumbo-sacral defecation center and regulation of colorectal motility in rats. *Neurogastroenterol. Motil.* Vol.22, pp.1124-1131, 2010, 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① 志水泰武、冬眠動物の特性と医療への応用、岐阜健康長寿・創薬推進機構 第3回異分野交流研究会 (岐阜) 2011年9月30日
- ② 川口敬之、笹木かほり、宮澤誠司、椎名貴彦、志水泰武、非冬眠動物であるラットにおける冬眠様低体温の誘導、第152回日本獣医学会学術集会 (大阪) 2011年9月20日
- ③ 川口敬之、椎名貴彦、志水泰武、低体温モデルラットの作成、病態生理学会サテライトセミナー (神戸) 2011年1月22日
- ④ 笹木かほり、平山晴子、椎名貴彦、志水泰武、脳内アデノシン系の賦活化はラットに低体温を誘発し健常な心拍動を維持させる、第150回日本獣医学会学術集会 (帯広) 2010年9月17日
- ⑤ 志水泰武、宮澤誠司、椎名貴彦、Central adenosine A1-receptor activation protects the heart against low temperature in hibernating hamster (Symposium "Energy-saving thermoregulation") 中枢におけるA1 アデノシン受容体の活性化は、冬眠ハムスターの心臓を低温による障害から保護する (シンポジウム「省エネ型体温調節」演題)、第87回日本生理学会大会 (盛岡) 2010年5月19日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志水 泰武 (SHIMIZU YASUTAKE)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：40243802

(2) 研究分担者

椎名 貴彦 (TAKAHIKO SHIINA)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号：90362178