

Tsukuba 情動系ラットの概日リズムの特徴

— 輪回し行動による検討 —

吉 田 和 典

本実験は、Tsukuba 情動系ラットの中で、特に、Tsukuba 低情動系（L系）ラットの概日リズムの特徴を明らかにするために、12：12時間明暗条件下で1ヶ月間の自発的輪回し行動を2時間毎に連続で観察した。その結果、Tsukuba 高情動系（H系）ラットは、統制群である雑種の Wistar 系（W系）ラットの活動パターンとほぼ同様であったのに対して、L系ラットは、H系やW系ラットとは明らかに異なる活動パターンを示した。すなわち、L系ラットは実験開始から徐々に活動量が増加し、活動ピークに達するまでに期間が有意に延長し、最終的な総活動量はH系ラットより約4倍、W系ラットより約3倍に達していた。また、暗期での活動ピークが、W系やH系ラットでは、暗期の各時間帯に分布しているのに対して、L系ラットでは暗期直後の2時間（20時～22時）に活動ピークが集中する傾向が認められた。さらに、ほぼ毎日、暗期に移行する2時間前の明期（18時～20時）から活動が増加することがすべてのL系ラットで観察された。これらの結果から、L系ラットの多動性と同時に特異な概日リズムの証拠が得られた。今後は、これらのL系ラットの概日リズムの特異性を明らかにするために、脳内中枢と言われている視交叉上核の構造的変化と同時に、恒暗条件下での光刺激に対する概日リズムの位相反応などを検討する必要がある。

キーワード：Tsukuba 情動系ラット、多動性、明暗条件、概日リズム、輪回し行動

はじめに

これまで、Tsukuba 高情動系（H系）及び低情動系（L系）ラットの行動特性に関して数多くの研究がなされてきた（藤田ら，1980；Fujita, Annen & Kitaoka, 1994）。その中で、L系ラットの多動性による様々な学習行動障害が示唆された。すなわち、反応を抑制しなければならない GO/NO-GO 学習（岩崎・藤田，1979）や DRL 学習（木村・吉田，2007，木村・吉田，2009）において障害を呈することが報告されている。また、明暗弁別能力を必要とする学習に対しても成績が悪くなることが知られている（片山ら，1979；山口，2004）。さらに、作業記憶や参照記憶を要するより高次な空間認知能力に関しては、8方向放射状迷路課題を用いた実験結果から（吉田，2007）L系ラットは、学習成立までの試行数の増加や、アームの誤選択数や全選択数の増加などの多動的行動特性を

示し、明瞭な空間学習障害の証拠が得られている。一方、参照記憶のみを必要とする水迷路学習においては統制群と同じ成績であったことから、観察された空間学習障害は作業記憶障害であることが示唆されている（吉田，2008）。しかしながら、これまで得られたL系ラットの多動性による様々な行動障害はすべて明期での観察結果であり、本来、夜行性である Tsukuba 情動系ラットの暗期での行動様式に関しては未だ明らかとなっていない。

そこで、本実験では、まず、L系ラットの多動性について、暗期も含めた1日の自発的な輪回し行動から概日リズムを長期間（30日間）観察し、H系及び統制群である雑種の Wistar（W系）ラットと比較しながら、L系ラットの行動特性の全貌を明らかにすることを目的とした。

方 法

被験体は、12:12時間の明暗条件下(20時～8時までが暗期)で誕生から飼育され3ヶ月齢に達した実験群であるH系雄ラット5匹とL系雄ラット5匹を用いた。さらに、統制群として、実験開始の2週間前から12:12時間の明暗条件下で飼育し3ヶ月齢に達したW系雄ラット5匹を用いた。

装置は、ラット用回転式運動測定装置(夏目製作, NK-78)を5台同時に用いた。この装置は餌や水の摂取及び休息できる空間(縦12cm, 横32cm, 高さ12cm)と、輪回し行動ができる空間(直径30cm, 幅9.4cm, 1回転で94.2cm)からなり、それぞれの空間を自由に行き来できるようになっている。

実験は、飼育環境と同じ12:12時間の明暗条件下の飼育室に回転式運動測定装置を設置し、H系群、L系群、W系群の順に、それぞれ30日間行った。まず、輪回し行動空間への入口を閉じ、午後7時に、ラットを装置内の休息空間へ入れ、馴化を行った。暗期直後の午後8時に輪回し行動空間への入口を開け実験を開始した。その後、30日間、2時間毎に輪回しの回転数を連続で測定した。暗期での回転数測定の際には外部の光刺激が入らないように十分配慮しながら観察した。実験期間中、給餌や給水は2日毎に、また、脱糞や脱尿処理掃除を1週間毎に、明期の午前10時から12時の間に行った。

結 果

(1) 日間活動の特徴

図1～図3は、一日の明暗条件(光同調条件)下での活動リズム(概日リズム)を30日間観察した結果で、それぞれL系ラット(図1)、H系ラット(図2)、W系ラット(図3)の代表例を示した。これらのグラフは活動パターンを比較することが目的で、縦軸の回転数の最大値は、それぞれの系統の活動量に応じて異なっている。すなわち、L系ラット(図1)は4000回、H系ラット(図2)は700回、W系ラット(図3)は1000回となっている。これらによれば、L系ラットは装置に入れられて約1週間は活動量が少なく(但し、

H系ラットやW系ラットと同じかやや多い)、その後、約1週間徐々に活動量が増大し続け、活動ピーク(実験期間中の暗期での1日平均活動量に達した時点)に達していた。この例では13日目に活動ピークに達していた。また、暗期になった2時間ないし4時間以内に活動が集中しており、暗期終了の2時間(6時～8時)は極端に活動量が減少する傾向が期間中同様に観察された。さらに、18時から20時の間の明期において、ほぼ毎日活動量が増大する傾向が認められた。このような傾向は、H系ラット(図2)やW系ラット(図3)では全く観察されなかった。すなわち、H系ラットは実験開始後3日以内で活動ピークに達し、暗期での活動も期間を通して一定した時間帯に集中することなく各時間帯に分布していた。W系ラット(図3)においてもH系ラットとほぼ同様の結果が観察された。但し、活動ピークに達するまでの日数はH系よりやや長く、この例では9日目であった。群間全体で活動ピークに達するまでの平均日数を比較したところ(L系: 16 ± 2 日, H系: 6 ± 3 日, W系: 12 ± 3 日)、群間で有意差が認められ($F=17.2$, $df=2/12$, $p<.01$), L

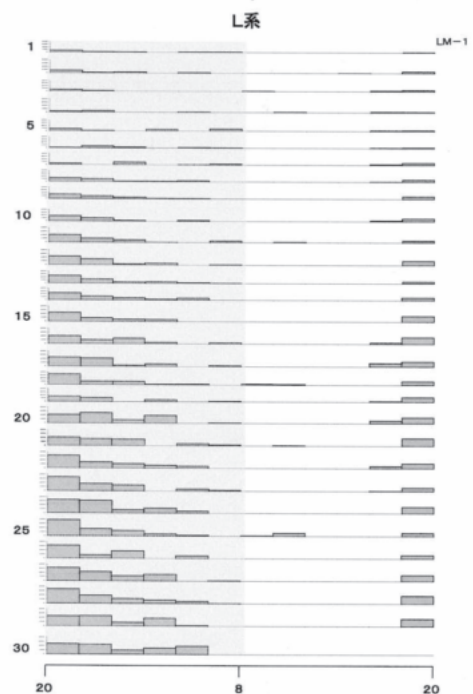


図1. L系ラットの日間概日リズム変動の代表例
横軸に1日の時間、縦軸に2時間毎の活動量(輪回し回転数)をグラフ化したものを連続30日間縦に重ね書きした。左側(網掛け部分)が暗期(20時～8時)で右側が明期(8時～20時)を示している。LM-1は被験体番号

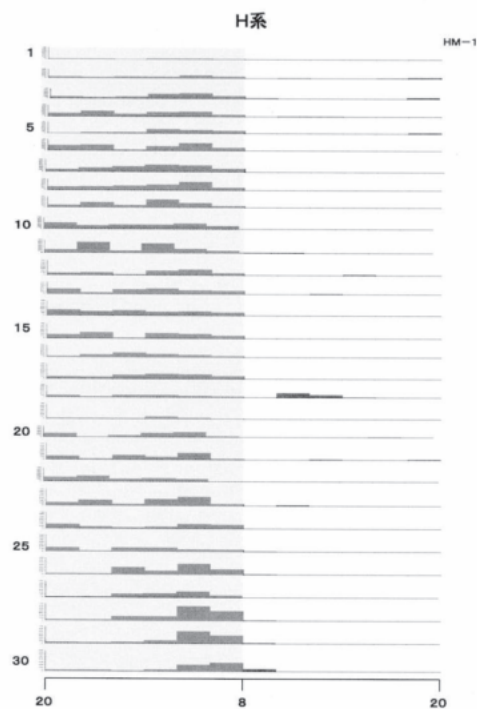


図2. H系ラットの日間概日リズム変動の代表例
詳細は図1を参照, HM-1は被験体番号

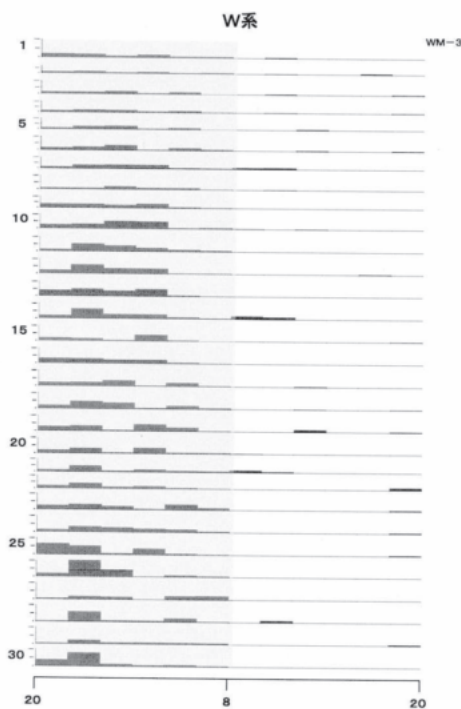


図3. W系ラットの日間概日リズム変動の代表例
詳細は図1を参照, WM-3は被験体番号

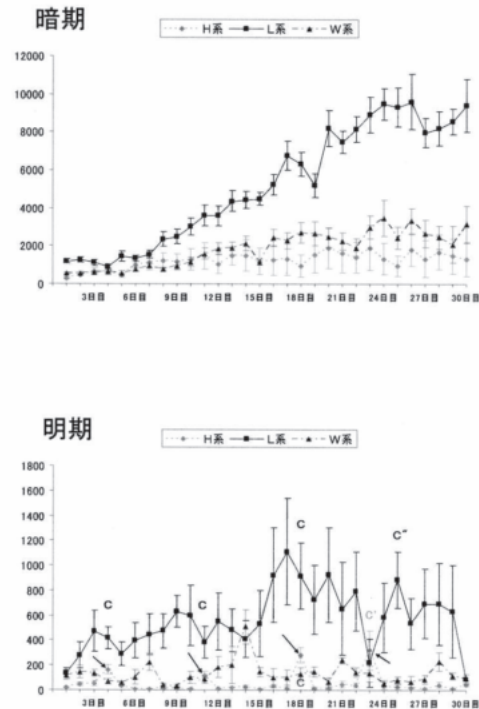


図4. 各群の平均活動量の日間変動 (\pm SE)

上段が暗期, 下段が明期の平均活動量 (回転数) を示している。下段のグラフ内のCは1週間毎の飼育室掃除日を示しており, C'はH系群のみで, C''はL系群とW系群の掃除日を示している。矢印は掃除日にH系群の活動増大傾向を示している。

系群は, H系群より有意に延長してした ($p < .01$)。また, W系群との差は有意ではないが, やはりL系群のほうが日数が長い傾向が認められた ($p < .11$)。

次に, 各群の30日間における平均活動量を調べたところ, 図4に示したとおり, 暗期において, L系群は8日目より徐々に活動量が増加しつづき, 17日目まで持続し, その後増減を繰り返す活動ピークに達していた。L系群の30日間の平均総活動量 (154617 ± 13167 回) はH系群の4.3倍 (36098 ± 18174 回), W系群の2.8倍 (54913 ± 9308 回) に達していた。分散分析の結果, 群間で有意差が認められ ($F=20.98, df=2/12, p < 0.01$), L系群はH系群及びW系群との間で有意な活動量の増加が認められた ($p < .01$)。しかしながら, H系群とW系群との間には有意差は認められなかった。Mann-Whitney Uテストを用いて各群間で日間毎に検定したところ, L系—W系群間では, 1日目, 2日目, 15日目~18日目, 20日目~30日目 ($p < .01$) 及び3日目, 5日目, 8日目~11日目, 13日目~14日目

($p < .05$) でL系群の活動量が有意に多かった。一方、H系とW系群間では、1日目 ($p < .05$) 以外すべての日において有意差は認められず、同様の活動パターンを示していた。

明期の活動量は (図4の下段)、暗期と比較してL系群は約1/9、H系群で約1/24、W系群で約1/14であった。明期においてもL系群は他の群と比べて活動量は有意に多く ($F=5.89$, $df=2/12$, $p < .05$)、また、日間で変動が大きく、分散も大きい傾向が認められた。しかし、明期においても、H系群とW系群間に有意差は認められなかった。さらに、H系群において、飼育室内の掃除日に限って活動量が増加する傾向が観察され (図4のC及びC'の矢印)、H系ラットの外的刺激に対する敏感性が確認された。L系群においても掃除日の時間帯に一部活動増加傾向が観察されたが (図4のC'), それ以外は一定の傾向は認められなかった (図4のC)。W系群においては上述の傾向は全く認められなかった。

図5は、暗期の時間帯毎の平均日間活動を各群で示したものである。この場合も、活動パターンのみを比較するために、グラフの縦軸最大値を各群で変更して表した。

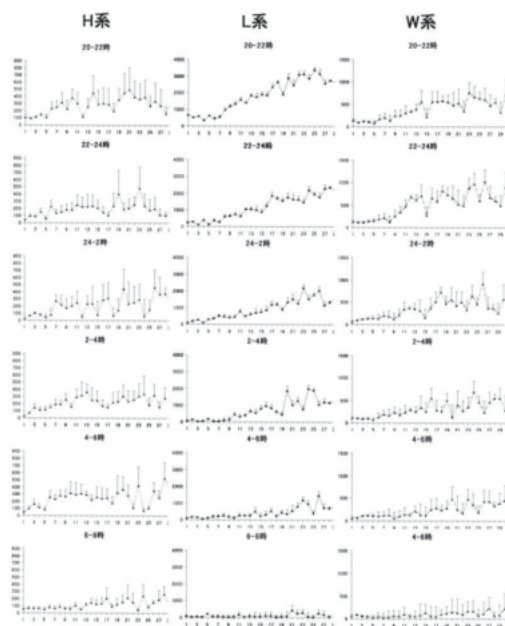


図5. 暗期での各時間帯毎の平均日間活動 (±SE)

グラフの縦軸の最大値 (回転数) は各群で異なっており、H系群900回、L系群4000回、W系群1500回となっている。

図1～図3でも述べたが、L系群の暗期の活動は20～22時及び22時～24時に集中しており、その他の時間帯は実験期間前半の活動が減少し、特に、6～8時の時間帯で極端に減少していることがわかる。それに対して、H系群は実験期間中、活動が各時間帯に分布しており、その中でも、22～24時と4～6時の2つの時間帯に活動量の増加が認められた。W系群は、L系群と類似した活動パターンを示しているが、L系群で見られた20～22時の活動ピークが22～24時に移行しており、その後の時間帯での相対的活動量もL系群に比べて多い傾向が観察された。

(2) 日内活動の特徴

30日間全体の1日での平均日内活動 (概日リズム) を調べたところ (図6)、これまで述べてきた通り、L系群は20時から22時に活動ピークがあり、その後の暗期の時間帯は減少し、明期最後の18時から20時に活動量が増加する独特の活動パターンが観察された。それに対して、H系群やW系群は暗期の各時間帯でほぼ同じ活動を示していた (但し、6～8時の活動はやや減少気味であった)。分散分析の結果、群間で明瞭な有意差が認められた ($F=23.74$, $df=2/12$, $p < .01$)。今回もH系群とW系群間には有意差は認められず、L系群がその他の群より有意に活動が増大していた ($p < .01$)。そこで、群間で時間帯毎に検定 (Mann-Whitney Uテスト) したところ、まず、L系群とW系群間においては、暗期の20～22時から2～4時 ($p < .01$) と明期の12～14時及び18～20時 ($p < .05$) の時間帯でL系群の活動が有意に多かった。次に、L系群とH系群間においては、暗期の20～22時から24～2時と明

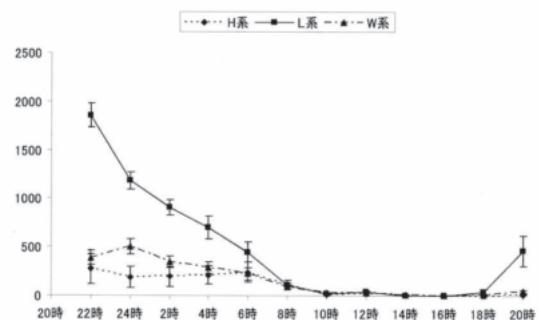


図6. 時間帯毎の平均日内活動 (±SE)

各時間帯での値は2時間の平均活動量 (回転数) を表している。例えば、22時は20時～22時までの平均活動量を示している。

期の18–20時の時間帯 ($p < .01$), さらに, 暗期の2–4時と明期の8–12時の4時間及び16–18時の時間帯 ($p < .05$) でL系群の活動が有意に増加していた。最後に, H系群とW系群との比較では, 明期の8–10時 ($p < .05$) と16–18時 ($p < .01$) の時間帯でW系群の活動が有意に多かったが, 暗期のすべての時間帯において有意差は全く認められなかった。

次に, 実験期間中 (30日間) の1日の中で最も活動量が多かった活動ピークの数回数を各時間帯で調べた結果 (図7), 暗期及び明期ともに, 群間で有意差は認められなかった。しかし, 群間と時間帯との交互作用に有意差が認められた (暗期: $F = 17.83$, $df = 10/60$, $p < .01$, 明期: $F = 24.77$, $df = 10/60$, $p < .01$)。そこで, 暗期及び明期それぞれの時間帯毎に各群間比較を行ったところ (Mann-Whitney U テスト), まず, 暗期において, L系群とW系群間では20–22時にL系群が有意に活動ピークが多く ($p < .01$), 22–24時, 24–2時及び4–6時の時間帯は逆にW系群が有意に多かった ($p < .01$)。

H系群との比較では, やはり, 20–22時にL系群が有意に活動ピークが多く ($p < .01$), 2–4時及び4–6時の時間帯は逆にH系群が有意に多い ($p < .01$)

結果が得られた。また, H系群とW系群とを比較したところ, 22–24時においてW系群が有意に多く ($p < .01$), 4–6時においてはH系群が有意に多い ($p < .05$) 結果が得られた。さらに, 明期での各群を比較した結果では, 明らかにL系群は他の2群に比べて18–20時の時間帯に活動ピークが集中しており, 有意に多い ($p < .01$) 結果となった。その他の時間帯はH系群がL系群より有意に多く ($p < .05$, 但し, 12–14時は $p < .01$), W系群とL系群との比較では8–10時 ($p < .05$) と14–18時 ($p < .01$) においてW系群が有意に多かった。

従って, L系群の活動ピークは, 暗期の20–22時と明期の18–20時のそれぞれ1箇所に集中しているのに対して, H系群やW系群は暗期及び明期の各時間帯に活動ピークがほぼ均等に分布していることが明らかとなった。

考 察

本実験は, Tsukuba 情動系ラット, 特に, L系ラットの行動特性を明らかにするために, 12時間毎の光同調条件下で輪回し行動による概日リズムを長期間観察した。その結果, 実験期間中, L系ラットは暗期に入る約2時間前から活動し始め, 暗期直後に活動が集中する傾向がすべての例で観察された。これらの傾向はH系ラットや統制群のW系ラットでは観察されなかった。

これまでに, げっ歯類 (マウス, ハムスター, ラットなど) を用いた概日リズムに関する数多くの研究がなされてきた (Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka, et al, 1977; 川村・川村, 1983; 井深, 1985; 本間, 1994; 鬼島, 2007; 川口ら, 2007; 村上, 2008)。これらの研究のほとんどは, 恒暗条件或いは恒明条件下 (フリーラン) の概日リズムを検討しているが, 本実験と同様の光同調条件下での報告もある (本間, 1994; 川口ら, 2007)。これらによれば, 夜行性動物の特徴を示し, 明期での活動はほとんどなく, 暗期での活動パターンは, 暗期の各時間帯に分布しており (川口ら, 2007), また, 暗期直後に活動が高まり, その後減少し, 再び, 暗期後半に増大する傾向が観察され

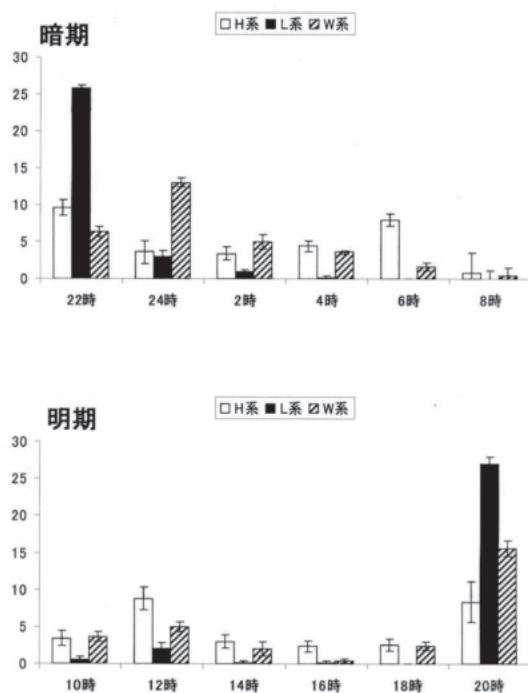


図7. 時間帯毎の活動ピークの平均回数 (±SE)

ている（本間，1994）。これらの傾向は，本実験で統制群として用いたW系ラットは同様に観察された（図3参照）が，H系ラットにおいても，その活動パターンがこれまでの研究結果と酷似しており（図2参照），H系ラットは正常な活動リズムを有していることが示された。しかし，L系ラットで見られた上述の活動パターンは今のところ全く報告されておらず，L系ラットの特異な概日リズムの存在が示唆された。

概日リズムをコントロールしている脳内中枢は視床下部視交叉上核（suprachiasmatic nucleus: SCN）であることは，これまでの数多くの研究からよく知られている（Stephan & Zucker, 1972; Moore & Lenn, 1972; Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka, et al, 1977; Inouye & Kawamura, 1979; 川村・川村, 1983; 井深, 1985; 川口ら, 2007; 重吉, 2008）。すなわち，ラットのSCNを破壊すると活動性や飲水行動などの概日リズムや睡眠覚醒リズムが完全に消失することが報告されている（Stephan & Zucker, 1972; Ibuka & Kawamura, 1975; Ibuka, et al, 1977）。また，SCNへの神経入出力について，Moore & Lenn (1972) が詳細な研究結果を報告している。すなわち，網膜の神経節細胞の軸索（視神経）は交叉後，反対側のSCN（光受容部）へ直接投射を送っており，また，SCNは外側膝状体や縫線核からも求心性入力を受けている。さらに，SCNは視床下部背内側核や室周核へ遠心性線維を送っていることが明らかとなっている。さらに，これらの神経ネットワークにはセロトニンやGABAなどの抑制性神経伝達物質の他に様々な神経ペプチドが関与しており，この神経制御機構が正常な概日リズムの保持に重要であると考えられている（川村・川村, 1983）。一方，光入力が無くても（例えば，眼球摘出や恒暗状態），ラットはヒトと同じ24時間よりやや長い概日リズムが保持されることもよく知られている。また，SCNへの入出力を切断（“島”状態）してもSCN内の神経活動に概日リズムが存続することも報告されている（Inouye & Kawamura, 1979）。従って，概日リズムの成立には光刺激やSCNへの神経入出力は必ずしも必要ではなく，SCNそれ自体が概日リズムのペースメーカー（生物時計）となっており，そこからの神経結合により正常な概日リズムが形成さ

れていると言われている（井深，1985）。

以上のことから，本実験で得られたL系ラットの特異な概日リズムの背景には，おそらく，長年にわたる選択交配の中で遺伝的にSCNの機能的及び神経構造的変異が生じていた可能性が考えられる。そこで今後は，L系ラットのSCNを含めた神経機構の詳細な形態学的検索と同時に，光同調条件だけでなく，恒暗条件での単発光刺激に対する概日リズムの位相反応や新規明暗時間への適応状態など（川口ら，2007），SCNの機能的側面を検討する必要がある。

本研究は，平成21年度科学研究費補助金基盤研究C（課題番号：20530670）の助成を受けた。なお，本実験は，仁愛大学心理学科4年の吉村奈美氏と澤崎加奈江氏のご協力の下で行われたもので，彼女らのご尽力に深く感謝いたします。

参考文献

- Fujita, O., Annen, Y. & Kitaoka, A. Tsukuba high- and low-emotional strain of rats (*rattus norvegicus*): an overview. *Behavior Genetics*, 24(4), 389-415, 1994
- 藤田統・中村則雄・宮本邦雄・片山尊文，鎌塚正雄・加藤宏 「選択交配により作られた高・低情動反応性系ラットの行動比較」『筑波大学心理学研究』2, 19-31, 1980
- 本間研一「健康指標としての生体リズム」『人間工学』30(5), 275-280, 1994
- 井深信男 「サーカディアン・システムの神経機構とその生理心理学」『心理学研究』56(5), 300-315, 1985
- Ibuka, N., Inouye, S. T. & Kawamura, H. Analysis of sleep-wakefulness rhythms in male rats after suprachiasmatic nucleus lesions and ocular enucleation. *Brain Research*, 122, 33-47, 1977
- Ibuka, N. & Kawamura, H. Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rats by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Research*, 96, 76-81, 1975
- Inouye, S. T. & Kawamura, H. Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic "island" containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 76, 5962-5966, 1979

- 岩崎庸男・藤田統 「高・低情動反応性系ラットの行動比較(16) GO/NO-GO 学習」 『日本動物心理学会第39回大会発表抄録集』 1979
- 片山尊文・岩崎庸男・藤田統・中村則雄・加藤宏 「高・低情動反応性系ラットの行動比較(17) 明暗弁別・逆転学習」 『日本動物心理学会第39回大会発表抄録集』 1979
- 川口ちひろ・磯島康史・馬場明道 「動物個体を用いた概日リズム解析法」 『日本薬理学雑誌』 130, 193-199, 2007
- 川村浩・川村恵子 「脳ペプチドと時間生理学」 『日本臨床』 41(5), 85-90, 1983
- 木村誠・吉田和典 「ADHD モデル構築の試み—TLE ラットを用いて—」 『日本動物心理学会第67回大会発表抄録集』 p60, 2007
- 木村誠・吉田和典 「Tsukuba 低情動系ラットにおける行動抑制の検討—DRL スケジュールを用いて—」 『日本動物心理学会第69回大会発表抄録集』 p56, 2009
- 鬼島宏 「1 日24時間を刻む時計遺伝子」 『病理と臨床』 25(8), 820-821, 2007
- Moore, R. Y. & Lenn, N. J. A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 146, 1-14, 1972
- 村上昇 「アショフの法則」 『時間生物学事典』 石田直理雄・本間研一編, 48-49, 2008
- 重吉康史 「視交叉上核」 『時間生物学事典』 石田直理雄・本間研一編, 144-147, 2008
- Stephan, F. K. & Zucker, I. Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions. *Proceeding of National Academy of Sciences*, 69, 1583-1586, 1972
- 山口真緒 「ラットの情動反応性の違いによる行動比較—Tsukuba 情動系ラットを用いた迷路学習と形態学的検索による検討—」 『2004年度仁愛大学心理学科卒業論文要旨集』 104, 2004
- 吉田和典 「Tsukuba 情動系ラットの学習行動の特徴—8 方向放射状迷路を用いた空間学習行動について」 『仁愛大学研究紀要』 6, 23-30, 2007
- 吉田和典 「Morris 型水迷路による Tsukuba 高・低情動系ラットの空間学習過程」 『人間学研究』 7, 87-94, 2008