

# Tsukuba 情動系ラットの空間的作業記憶能力の検証

吉田 和典

仁愛大学人間学部

## Verification of Spatial Working Memory Ability in Tsukuba Emotional Strain Rats

Kazunori YOSHIDA

Faculty of Human Studies, Jin-ai University

So far, the spatial learning ability of Tsukuba emotional strain rat was examined using the water maze which needed only reference memory and eight-arm radial maze that needed both working memory and reference memory. As a result, the performances of Tsukuba low emotional strain (L) rat were worse than those of Tsukuba high emotional strain (H) rat only in eight-arm radial maze task, and then the working memory disturbance of the L rat was suggested. The present study inserted a delay problem by eight-arm radial maze learning process, in order to verify more strictly the working memory ability in both H and L rat. Obtained results summarized as follows; although the number of the trials until insertion of the delay problem in L rat were less than those in H rat, the false choice rate in the first choice after the five-minutes delay was higher, and the number of the trials until the learning criterion significantly increased in L rat, and then the working memory disturbance of the L rat became clearer. And it was thought that the cause of the spatial learning disturbance of L rat might be a deficit of the working memory capacity.

*Keywords; Tsukuba emotional strain rats, spatial working memory, delayed task*

### はじめに

Tsukuba 高情動系 (H系) ラットと Tsukuba 低情動系 (L系) ラットの空間学習行動について、これまでに 8 方向放射状迷路と Morris 型水迷路を用いて検討してきた (吉田, 2007, 2008)。その結果, 8 方向放射状迷路学習において, L 系ラットは H 系ラットに比べて, 誤反応数が多く, 学習基準に達するまでの試行数が有意に延長することが観察された。しかし, Morris 型水迷路学習においては, 雑種のアルビノラットと同等かそれ以上に成績が良く, 何ら障害を示さなかった。8 方向放射状迷路学習は, 選択したアームを一旦覚えておく作業記憶と, アーム先端に餌があることや迷路外の環境などを覚える参照記憶を必要とする課題である一方, Morris 型水迷路学習は逃避用プラッ

トホームの一定の場所を覚える参照記憶のみが必要な課題であると言われている (岩崎ら, 1981)。従って, L 系ラットで観察された 8 方向放射状迷路による空間学習障害は作業記憶の障害であることが示唆された (吉田, 2008)。通常, 作業記憶を正確に測定する方法として, 学習過程に遅延時間を挿入する遅延課題が多く用いられている (Olton, et al, 1977 : Maki et al, 1979 : Beatty & Shavalia, 1980 : 津田, 1984 : 津田, 1989 : 津田・今田, 1989 : 古川, 1990 : Sasaki & Iwasaki, 2003 : 永井ら, 2007)。そこで本実験においても, 8 方向放射状迷路学習過程に遅延時間を挿入することにより, 両系統の作業記憶能力をより厳密に比較検討し, L 系ラットの作業記憶障害の実態を明らかにすることを目的とした。

## 方 法

被験体は、仁愛大学動物飼育室内の12:12時間の明暗条件下（午前7時45分より午後7時45分までが明期）で飼育された3ヶ月齢のH系雄ラット6匹、L系雄ラット6匹を用いた。これらのラットは、82世代目の情動系ラットを筑波大学より譲り受けた後、仁愛大学で兄妹交配を継続し、108世代目になったものである。飼育室内の温度は $24^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は40～50%に保った。

今回用いた空間学習装置は、これまでの報告（吉田, 2007）と同じ装置を用いた。すなわち、高さ50cmの高架式8方向放射状迷路で、各アーム長は50cm、アーム幅は10cm、中央プラットホームの長さは30cmで、各アームへの入口にはキロチンドアが取り付けられている。装置の置かれた部屋の周囲には、視覚的手がかりとして机やダミー人形及びポスターや写真などを配置し、実験期間中それぞれの位置を一定に保った。

予備訓練として、1日5分間の装置への馴化とアーム先端でのペレット（一粒40mg）摂取訓練を1週間行った。同時に、ハンドリングと23時間の食餌制限を行った。1時間の食餌時間中に通常の固形飼料と一緒に報酬であるペレットも与えた。

本訓練は、まず、第1段階として、中央プラットホームにラットを置き、スタートと同時に全てのキロチンドアを開け、いずれかのアームを選択後、他のキロチンドアを閉め、ラットがプラットホームに戻った時点で一旦キロチンドアを閉めプラットホームに2秒間閉じ込めた。正選択は、報酬であるペレットのあるアームを選択しそのペレットを摂取することで、それ以外の行動はすべて誤選択とみなした。これらの手続きを繰り返し、最大10分間、或いは、8つのペレットのあるアームを選択するか16選択するまでを1日1セッション行った。第1段階での学習成立基準は、最初の4選択がすべて正選択である試行が3セッション（3日間）連続とした。第1段階が成立した翌日より、遅延時間挿入の第2段階の訓練を行った。これは、最初の4選択が正選択であった場合に、一旦ラットを装置からホームケージに5分間戻し、その後再び装置

でのアーム選択を行わせた。但し、最初の4選択で誤選択があった場合は、遅延時間を設けず、そのまま試行を継続し、このセッションは分析から除いた。第2段階での学習成立基準は、第8選択までに3選択が正選択で、最大10選択以内にすべてのアームを正選択するまでとし、これが3セッション（3日間）連続とした。但し、最大30セッションで実験を終了した。全てのラットの遅延前後の試行毎の選択したアーム番号、所要時間、正誤選択数、全選択数を記録すると同時に、デジタルビデオカメラを用いて、各試行での行動記録から走行速度や走行軌跡を解析した。

すべての実験終了後、使用したラットはエーテル深麻酔下で安楽死させ、専門業者に委託し火葬を行った。また、本実験は仁愛大学動物実験委員会の審査を受け承認を得て行われた。

## 結 果

### (1) 遅延時間挿入前の空間学習過程

本訓練の第一段階である遅延時間挿入前の空間学習過程を両系統で比較したところ、遅延時間挿入までのセッション数、つまり、最初の4選択が正選択で3日連続するまでのセッション数は、H系ラットが $12.3\pm 3.0$ で、L系ラットが $4.7\pm 1.5$ であった。統計的検定（t test）の結果、L系ラットのセッション数が有意に少ないことが明らかとなった（ $p<.01$ ）。また、各セッションでの平均選択数は、H系ラットが $7.6\pm 2.0$ 、L系ラットが $12.5\pm 1.2$ で、L系ラットの選択数が有意に多かった（ $p<.01$ ）。すなわち、学習初期段階において、H系ラットはプラットホームからアームへの進入が少なく、また、アームに入ってもペレットを食べずに途中で引き返すなどの誤選択が多く観察された。それに対して、L系ラットは最初から選択数が多く、そのうち最初の4選択が偶然正選択になっており、結果的にセッション数が少なかったと考えられる。また、全体の誤選択率は両系統で高く、有意差は認められず、この初期段階においては、学習行動というより、これまでに報告されている両系統の行動特性が顕著に表れていた（Fujita, et al, 1994）。

(2) 遅延時間挿入後の空間学習過程の特徴

・アームでの走行速度

各セッションでの所要時間からプラットホーム内での時間を差し引き、アーム1回選択を1mとして全体の走行距離を算出し、アームでの平均走行速度 (cm/sec) を求めた (図1). その結果、H系ラットは遅延課題挿入後も、学習初期には動きが鈍く周囲を探索しながらアーム先端に行くことが多かった. しかし、学習が進むにつれて徐々に速度が増し、スムーズにアームを選択していた. それに対して、L系ラットは最初から走行速度が速く、学習過程を通じてほとんど変化しなかった. そこで、学習基準3セッションの平均値 (学習後) とそれ以前の平均値 (学習前) を比較したところ (図2), H系ラットは学習後に有意に走行速度が速くなっており ( $p < .05$ ), この時点では、L系ラットと有意差は認められなかった. それに対して、L系

ラットは学習前後で有意差は認められず、走行速度と学習習得過程との対応関係は観察されなかった.

・アーム選択の正誤率

図3は両系統の遅延時間後の正選択率を示したものである. 図からも明らかなように、H系ラット ( $82.1 \pm 7.2\%$ ) はL系ラット ( $72.2 \pm 3.7\%$ ) に比べて、選択数は少ないが、有意に正選択を行っていた ( $p < .01$ ). それに対して、L系ラットは選択数が多く、正確性に欠ける選択行動をとっていた. そこで、遅延直後の第1選択 (第5選択目) の誤選択率を調べたところ (図4), 有意ではないが、L系ラット ( $36.8 \pm 12\%$ ) がH系ラット ( $24.2 \pm 20.2\%$ ) よりやや高い傾向が認められた ( $p < .11$ ). さらに、遅延後に誤ったアームが遅延前に選択したもの (試行間誤選択) か、遅延後に選択したものの (試行内誤選択) かで、それぞれの誤選択率を求め

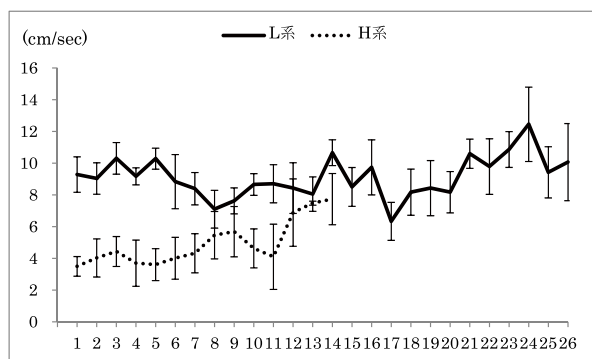


図1. 学習過程での平均走行速度の変化 (±SE)

縦軸はアームでの平均走行速度 (cm/sec), 横軸はセッション数 (日数) を表す.

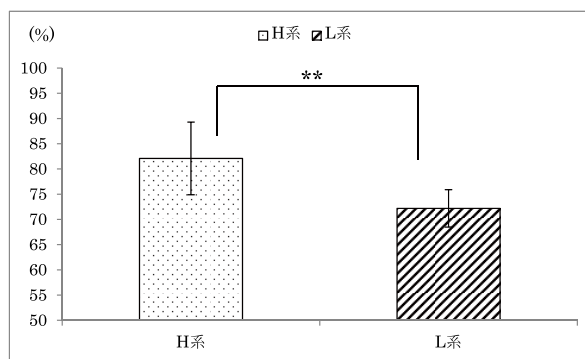


図3. 正選択率 (±SD)

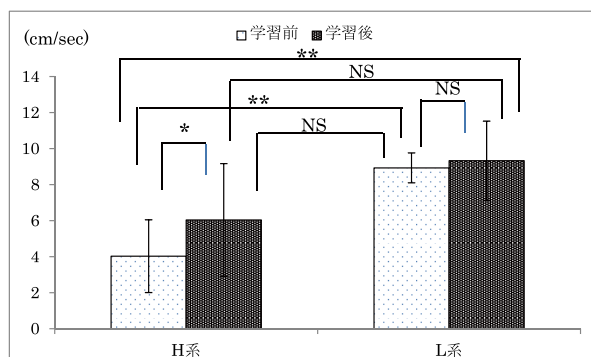


図2. 平均走行速度 (±SD)

学習前と学習後 (3試行の学習基準試行) の平均走行速度を表す. \* :  $p < .05$ , \*\* :  $p < .01$ , NS : Non-significant (t testによる検定, 以下の図も同様)

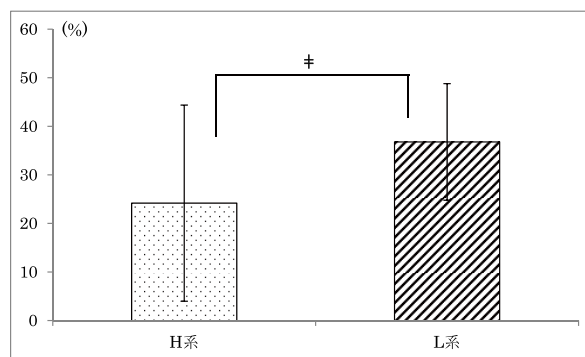


図4. 遅延後の第1選択の誤選択率 (±SD)

# :  $p < .11$

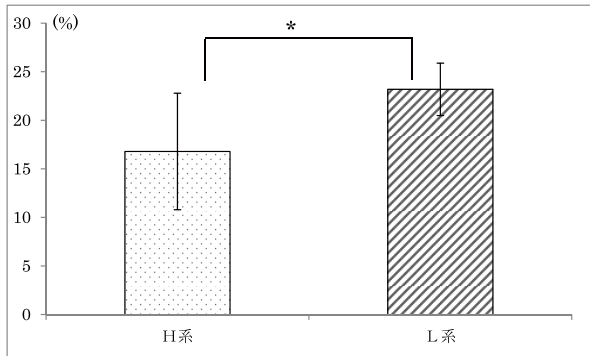


図5. 試行間誤選択率 (±SD)

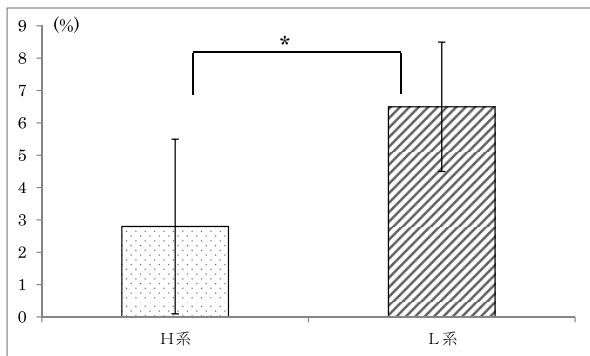


図6. 試行内誤選択率 (±SD)

たところ (図5, 図6), 試行間 (H系: 16.5±6.0%, L系: 23.2±2.7%), 試行内 (H系: 2.8±2.7%, L系: 6.5±2.1%) 共に誤選択率がL系ラットで有意に高かった ( $p < .05$ ).

・学習成立までのセッション数

遅延時間挿入課題での学習基準は, 方法でも述べたが, 第5選択から第8選択までに3選択が正選択で10選択までに残りのアームを正選択するのが3セッション連続とした. 今回は学習基準3セッションも含めて分析した. その結果, H系ラットは 10.2±4.1セ

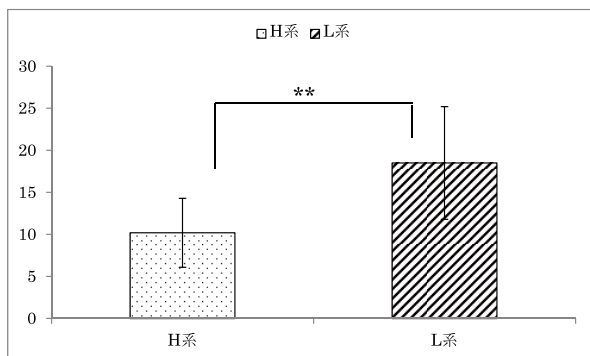


図7. 学習完成までの平均セッション数 (±SD)

ッション, L系ラットは 18.5±6.7セッションで, L系ラットの有意なセッション数の延長が観察された (図7,  $p < .01$ ). しかし, 本訓練の第1段階である遅延時間挿入前を含めた全セッション数は, 両系統で有意差は認められなかった (H系: 22.5±3.5, L系: 23.2±7.5).

・アーム選択ストラテジーの特徴

両系統のアームを選択する順番 (選択ストラテジー) をすべての試行で分析した. 選択ストラテジーは8つに分類した. すなわち, あるアームに対して180度移動したものを4, ±135度を±3, ±90度を±2, ±45度を±1, 0度 (同じアームに入ることを) を0とした. 例えば, あるセッションでの選択順番が3→4→8→5→(遅延)→1→6→2→7であった場合, 選択ストラテジーは1→4→-3→(遅延)→4→-3→4→-3となる. このようにすべての試行及び全セッションでの選択ストラテジー総数に対するそれぞれの割合を算出した. その結果, 図8に示したように, 統計的に有意差

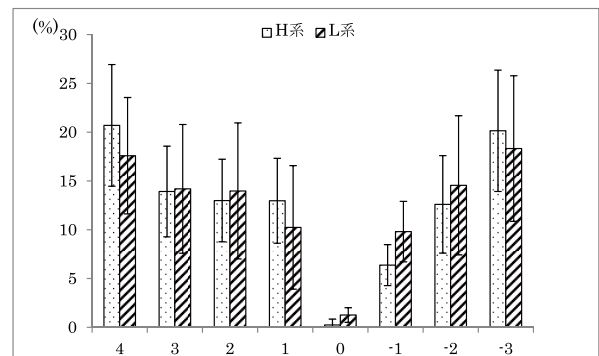


図8. アーム選択ストラテジー (±SD)

全セッションでの全選択数に対する各アームの選択率を表す. 4: 180度, ±3: ±135度, ±2: ±90度, ±1: ±45度, +: 時計回り, -: 反時計回り

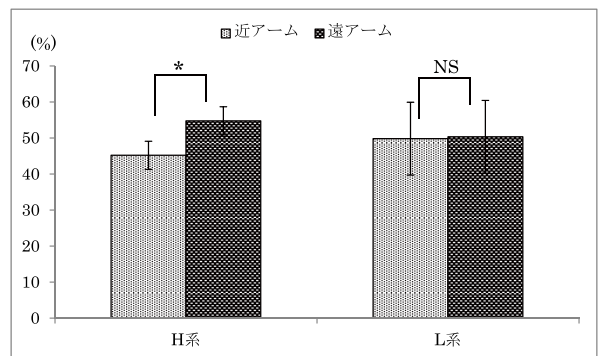


図9. 遅延試行でのアーム選択ストラテジー (±SD)

近アーム: 0, ±1, ±2, 遠アーム: ±3, 4

は認められなかったが、H系ラットはL系ラットに比べて4 (180度) や-3 (-135度) が多い傾向が見られた。また、明らかに誤選択である0度の回数がH系ラット6例中1例に2回あったのに対して、L系ラットは6例すべてに1~7回計16回観察された。

次に、H系ラットで4 (180度) や-3 (-135度) の選択戦略が多く見られたので、選択戦略を遠アーム (180度と±135度) と近アーム (±90度と±45度と0度) に分けて、同様にそれぞれの割合を求めた (図9)。その結果、H系ラットは有意に遠アームを選択していることが明らかとなった ( $p < .05$ )。それに対して、L系ラットは両アーム間で有意差は認められず、相対的にH系ラットに比べて近アームを多く選択していたと言える。また、図には示していないが、H系ラットは遅延前及び遅延後の試行においても同様に遠アームを有意に多く選択していた ( $p < .05$ )。さらにまた、本訓練の第一段階である非遅延課題においても同様に検討した結果、両系統とも有意差は認められなかったことから、H系ラットで見られた遠アーム選択戦略は遅延課題挿入時の独特の選択反応であることが判明した。

このようなアーム選択行動について、同じアーム

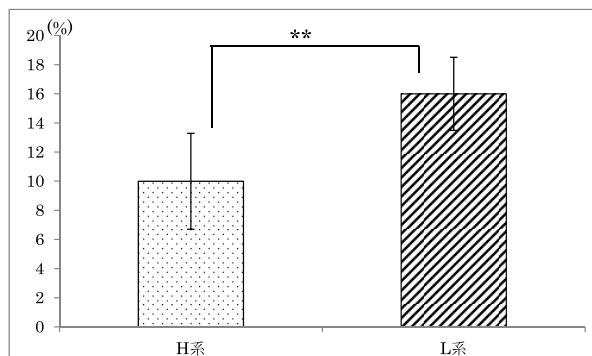


図10. 同じ選択戦略を使用する割合 (±SD)

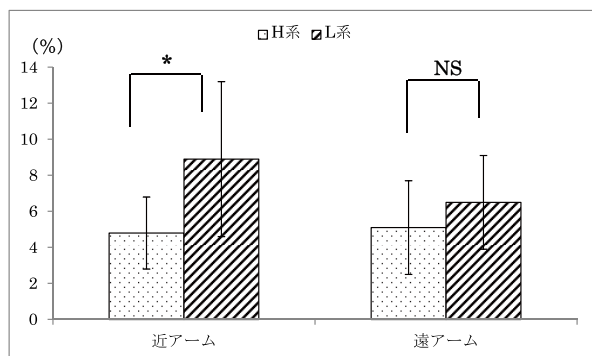


図11. アーム毎の同じ選択戦略を使用する割合 (±SD)

選択戦略を連続して使用する回数を求めた。例えば、あるセッションで、2 → 4 → 6 → 8 → (遅延) → 2 → 3 → 4 → 5 → 1 → 7、の選択行動であった場合、選択戦略は、2 → 2 → 2 → (遅延) → 2 → 1 → 1 → 1 → 4 となり、連続回数は「2」が2回、「1」が2回の計4回となる。ここで、遅延前後 (第4選択と第5選択) の連続回数は省いた。このようにして、すべてのセッションでの選択回数に対する連続回数の割合を算出したところ、図10に示したように、同じ戦略を連続して使用する割合がL系ラットで有意に高いことが明らかとなった ( $p < .01$ )。そこで、これらの連続して使用するアーム選択戦略が近アーム (±2, ±1) か遠アーム (4, ±3) であるかを調べたところ (図11)、遠アーム選択戦略の連続使用は、両系統で有意差は認められなかったが、近アームの連続選択戦略において、L系ラットが有意に多く使用していることが判明した ( $p < .05$ )。

## 考察

本実験で得られた結果をまとめると、遅延時間挿入前の訓練初期には Tsukuba 情動系ラットの一般的な情動特性が顕著に表れていた (Fujita, et al, 1994)。すなわち、H系ラットはプラットホームから出ないことが多く、時間内のアーム選択数も少ない傾向が見られ、出ても走行速度が遅く、アーム先端で餌を食べないという誤選択が多かった。それに対して、多動なL系ラットは最初から走行速度が速く選択数や誤選択も多い傾向が見られた。しかしながら、5分間の遅延時間挿入後 (最初の4選択が安定して正選択になった後) のセッションでは、H系ラットも徐々に走行速度が増し、正確にアーム選択を行うようになった。一方、L系ラットは相変わらず走行速度は速いが、誤選択率 (遅延前の試行間と遅延後の試行内誤選択率) が高く、H系ラットに比べて学習基準に達するまでのセッション数 (日数) が有意に延長した (H系ラット:  $10.2 \pm 4.1$  日, L系ラット:  $18.5 \pm 6.7$  日)。以前報告した遅延時間を挿入しない実験 (吉田, 2007) では、学習基準までの日数はH系ラットが  $17.8 \pm 2.4$ 、L系ラットが  $21.8 \pm 2.7$  であった。本実験は、選択行動が安定した後に

遅延時間を挿入したため、学習基準までの日数が両系統とも短くなっているが、両系統の学習基準までの日数差はさらに大きくなっていった（平均4日間の差が8日間以上の差に広がっていた）。

岩崎・平賀（1986）によれば、Tsukuba 情動系ラットの基礎集団である雑種のアルビノラットの8方向及び12方向放射状迷路学習を検討した結果、学習基準に達するまでの日数は、それぞれ $7.6 \pm 5.0$ 、 $13.7 \pm 7.2$ であった。従って、本実験でのH系ラットはほぼ正常な空間学習能力を持っていると考えられる。それに対して、L系ラットは空間学習能力、とりわけ空間的作業記憶能力に障害があり、それが遅延時間を挿入することによってより明瞭になったと言える。

遅延時間を系統的に検討した研究（Maki et al, 1979: Beatty & Shavalia, 1980: 永井ら, 2007）によれば、永井ら（2007）は、本実験と同じ放射状迷路を用いて最初の4選択を強制選択させた（本実験では自由選択させた）後、5分間、60分間、90分間、120分間ホームケージに戻し、その後の保持試行を検討した。その結果、5分間と60分間の遅延時間では誤選択数に差はなく、90分で誤選択が急激に増加することを示し、通常のラットの空間作業記憶は少なくとも60分間は保持されていることを報告している。さらに、60分間から4時間後までは完全に学習ができ、24時間後でも学習できるラットがいるという報告がある（Beatty & Shavalia, 1980）。また、このような放射状迷路で正確に記憶できる選択肢の数、すなわち、作業記憶の範囲は、ラットの場合、8～12個（岩崎ら, 1981: 岩崎・平賀, 1986）程度ではなく、17個以上あり、最大25～30個あると推定されている（Olton, et al, 1977）。従って、本実験の8個の選択肢による5分間の短い遅延時間においても、L系ラットで空間学習障害がみられたことから、L系ラットは作業記憶範囲が非常に狭い重篤な空間的作業記憶障害を持っていることが判明した。

一般的に、放射状迷路学習におけるアーム選択は、迷路内の臭いなどの手がかりではなく、迷路外の視覚的手がかりに基づき、ランダムで毎日異なるアームを選択すると言われている（Olton & Samuelson, 1976: 岩崎ら, 1981）。そこで、両系統ラットのアーム

選択戦略を詳細に分析したところ、両系統とも180度や135度の遠アームを多く選択する傾向が見られた（図8）。さらに、L系ラットは隣接するアームや2つ隣りのアーム（近アーム）を次々と連続して選択する単純な選択戦略が多く見られた（図11）。それに対して、H系ラットは遠アームをより多く選択する複雑なパターンを示した（図9）。岩崎・平賀（1986）やOlton, et al（1977）によれば、雑種のアルビノラットは近アームを高頻度（約80%）に選択し、選択距離が増すにしたがって選択頻度は減少すると、本実験とは異なる結果を報告している。このことは、H系ラットも含めてTsukuba 情動系ラットは遠アームを好むという独特の選択戦略を持っている可能性が考えられる。しかしながら、岩崎・平賀（1986）は、L系ラットのような近アームを次々と連続して選択する例はほとんど観察されなかったと報告しており、やはり、L系ラットは作業記憶範囲の狭さを補うために特異的で単純なアーム選択行動を行っていたことが考えられる。

これまでに、放射状迷路の空間学習成立には海馬を中心とした大脳辺縁系や大脳基底核（主に、尾状核）が重要な役割を果たしていることが、数多くの研究から指摘されている（益田・岩崎, 1979: 益田・岩崎, 1980: 岩崎ら, 1981: Seamans & Phillips, 1994: Kawabe et al, 1998: Kawabe et al, 1998: Sasaki & Iwasaki, 2003: Nagai et al, 2006: 永井ら, 2007）。一方で、L系ラットの海馬、特に背側海馬内歯状回の形態学的変容や線条体（尾状核）へ投射している黒質のドーパミンニューロンの減少傾向なども示唆されている（吉田, 2006: 吉田, 2010）。そこで今後は、上述のようなL系ラットの空間学習障害、特に、空間的作業記憶障害の背景となる脳内神経機構の全容を明らかにするために、海馬を中心とした大脳辺縁系や黒質-線条体の神経ネットワークを、H系ラットや雑種のアルビノラットと比較しながら詳細に検討する必要がある。

#### 謝辞

本実験は、心理学科4年大村恵子氏のご協力の下に行われたもので、ここに深く感謝いたします。

## 参考文献

- Beatty, W. W., & Shavalia, D. A., Spatial memory in rats: time course of working memory and effect of anesthetics. *Behavioral and Neural Biology*, 28, 454-462, 1980
- 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
- 古川聡, 作業記憶に関する生理心理学的研究, 筑波大学心理学研究科博士論文, 1990
- 岩崎庸男・平賀義裕, ラットにおける放射状迷路課題の習得過程と選択行動の特徴, 筑波大学心理学研究, 8, 29-34, 1986
- 岩崎庸男・益田良子・平賀義裕, 動物の空間記憶とその中枢メカニズム, 筑波大学心理学研究, 3, 79-86, 1981
- Kawabe, K., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. Effects of intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, 781, 300-306, 1998
- Kawabe, K., Yoshihara, T., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. Intrahippocampal D-cycloserine improves MK-801-induced memory deficits: radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, 814, 226-230, 1998
- Maki, W.S., Brokofsky, S., & Berg, B. Spatial memory in rats: resistance to retroactive interference. *Animal Learning and Behavior*, 7, 25-30, 1979
- 益田良子・岩崎庸男, ラットの空間記憶に及ぼす海馬および尾状核損傷の効果, 日本心理学会第43回大会発表論文集, 36, 1979
- 益田良子・岩崎庸男, ラットの空間記憶に及ぼす尾状核損傷の効果—尾状核内損傷部位による差異—, 日本心理学会第44回大会発表論文集, 54, 1980
- Nagai, T., Kamei, H., Dohniwa, M., Takayanagi, M., Suzuki, M., Mastuya, T., Nabeshima, T., Takuma, K., & Yamada, K. Involvement of hippocampal extra-cellular signal-regulated kinase 1/2 in spatial working memory in rats. *Learning and Memory*, 17 (13), 1453-1457, 2006
- 永井拓・田熊一敏・亀井浩行・溝口博之・鍋島俊隆・山田清文, 放射状迷路を用いたDelayed spatial win-shift課題による空間作業記憶の評価, 日薬理誌, 129, 457-462, 2007
- Olton, D. S., Collison, C., & Werz, M. A. Spatial memory and radial arm maze performance of the rat. *Learning and Motivation*, 8, 289-314, 1977
- Olton, D. S., & Samuelson, R. J., Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology*, 2(2), 97-116, 1976
- Sasaki, Y., & Iwasaki, T., Differential effects of entorhinal and hippocampal lesions on DNMT1 performance in rats. *Japanese Journal of Physiological Psychology and Psychophysiology*, 21(3), 231-238, 2003
- Seamans, J., & Phillips, A. G. Selective memory impairments produced by transient lidocaine-induced lesions of the nucleus accumbens in rats. *Behavioral Neuroscience*, 108 (3), 456-468, 1994
- 津田泰弘, 動物の記憶(行動的研究): 基礎編, 人文論究, 33 (4), 91-115, 1984
- 津田泰弘, ラットの指向性忘却—放射状迷路課題を用いて—, 心理学研究, 59 (6), 357-360, 1989
- 津田泰弘・今田寛, ラットの放射状迷路におけるwin-shift行動とwin-stay行動の比較, 心理学研究, 60 (2), 109-112, 1989
- 吉田和典, Tsukuba低情動系ラットの多動傾向と脳内の形態学的変容との関連について, 第24回日本生理心理学会大会予稿集, 34, 2006
- 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
- 吉田和典, Tsukuba情動系ラットの空間学習成績と海馬内の神経構造との関連—飼育環境条件による影響について—, 仁愛大学研究紀要 人間学部編, 9, 35-41, 2010