

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—

吉 田 和 典

仁愛大学人間学部

The Relationship between the Performances of the Spatial Learning and the Hippocampal Morphology in Tsukuba Emotional Strain Rats: With Special Reference to the Effects of the Bleeding Environment Condition

Kazunori YOSHIDA

Faculty of Human Studies, Jin-ai University

The present study had a twofold purpose, to examine the relationship between the performance of the spatial learning and the morphological change of the hippocampus of Tsukuba emotional strain rats, and to ascertain how breeding environment condition would affect this relationship. The results of the experiments showed that the number of trials achieved during spatial learning of Tsukuba low emotional strain rats housed under enriched breeding conditions (the RL group) significantly decreased in comparison with that of Tsukuba low emotional strain rats under a standard breeding conditions (the SL group), demonstrating a clear effect of improvement on the spatial learning performance in terms of environmental enrichment. Further, the morphological studies of the hippocampus in the rats were conducted, with the outcome in which the volume ratio of the dorsal hippocampus for the whole hippocampus notably declined in the SL group. It was also revealed that the volume ratio of the dentate gyrus for the dorsal hippocampus in the SL group quite lowered comparing with that in the other group. Moreover, the findings displayed a negative correlation between the number of trials achieved in spatial learning and the volume ratio of the dentate gyrus in the L groups (both the SL and RL groups). Therefore, the neural network including the neurogenesis of the granule cell in the dentate gyrus was considered as one of the factors with reference to the disabilities of spatial learning seen in the SL group as well as the causes of the increase in the volume ratio in the dentate gyrus observed in the RL group.

Keywords : Tsukuba emotional strain rats, spatial learning, hippocampal morphology, breeding environment

はじめに

Tsukuba 高情動系 (H系) 及び低情動系 (L系) ラットの様々な学習行動についてこれまで数多くの報告がなされてきた (宮本・藤田, 1977; 岩崎・藤田,

1979; 片山ら, 1979; Fujita, et al, 1994; 山口, 2004; 木村・吉田, 2007; 吉田, 2007; 吉田, 2008; 木村・吉田, 2009). その結果, L系ラットは弁別能力や行動抑制及び空間認知能力に障害を持っていることが示唆されてきた. 特に, 空間認知能力に関して, 作業記

憶や参照記憶を必要とする8方向放射状迷路を用いた空間学習課題においてL系ラットはH系ラットに比べて訓練を重ねてもアームの誤選択や全選択数が多く、また、学習基準達成までの試行数が有意に増加し、L系ラットの明瞭な空間学習障害が示された(吉田, 2007)。しかし、参照記憶のみを要する水迷路を用いた空間学習課題においては、プラットホームへの逃避潜時やプローベテスト時の滞留時間を調べた結果、H系ラットや統制群として用いた雑種のWistar系ラットと比べてもむしろ成績が良く、この空間学習課題に関しては、L系ラットがより正確に学習していることが判明した。従って、L系ラットで観察された空間学習障害は主に作業記憶の障害であることが明らかとなった(吉田, 2008)。

一般的に、作業記憶ないしは短期記憶から長期記憶への移行に重要な脳部位として海馬が注目されている(Corkin, et al, 1997; Beatty, 2001; 吉田ら, 2005)。また、作業記憶を要する空間学習にとっても海馬が重要な働きを持っていることを示唆する数多くの研究がある(Olton, et al, 1978; 岩崎ら, 1981; Kawabe, et al, 1998; Kawabe, et al, 1998; Nonaka, et al, 1998)。一方、飼育環境を豊環境にすることにより、これらの空間学習や記憶課題が改善すると同時に、脳内、特に海馬内に神経化学的変化をもたらすことも示唆されている(Rosenzweig & Bennett, 1996; Kempermann, et al, 1997; Torasdotter, et al, 1998; Ickes, B. R. et al, 2000)。

以上のことから、L系ラットで観察された空間学習障害は、海馬内での機能的及び形態学的変容と何らかの関連がある可能性が考えられた。そこで、本実験では、これまで8方向放射状迷路による空間学習実験で用いたすべてのラットの海馬内の形態学的検索を行うと同時に、飼育環境の違いが空間学習成績や海馬内の形態学的変容に及ぼす効果について検討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(午前8時より午後8時までが明期)で飼育された3~4ヶ月齢の

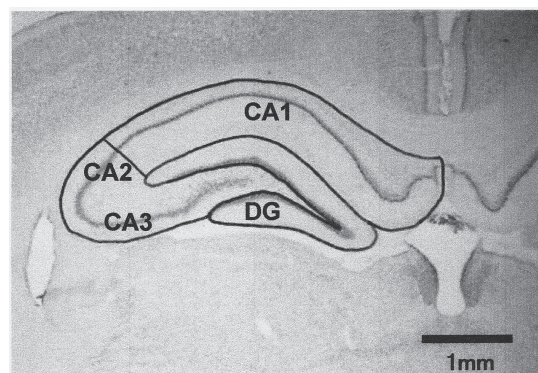


図1. 海馬の面積測定部位

ニッスル染色像から線で囲んだ海馬全体及び背側海馬内CA1, CA2-CA3, DG(歯状回)領域の面積を測定した。

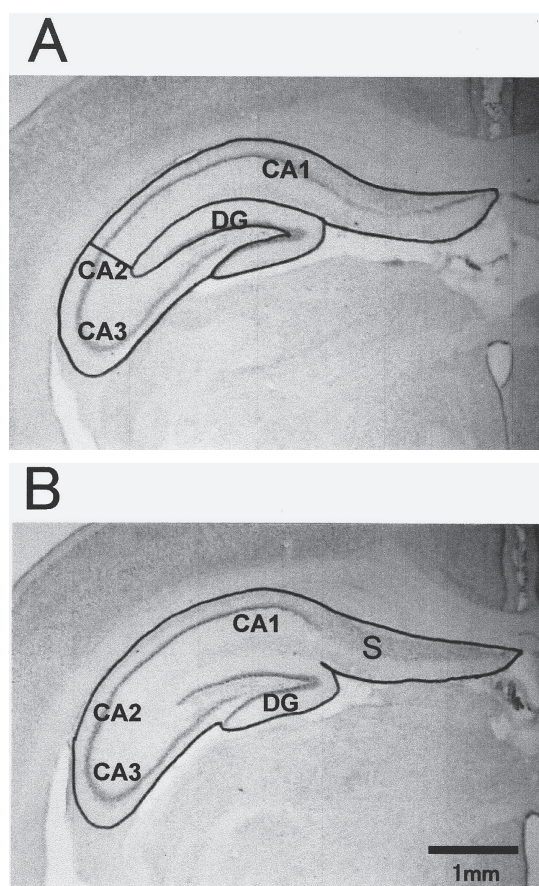


図2. 背側海馬領域設定基準

海馬内側部の海馬支脚(Subiculum: S)が出現(B)するまでを吻側部の背側海馬(A)領域とした。

Tsukuba 情動系ラットを用いた。プラスチックケージの標準環境(Standard Condition: S)で飼育されたTsukuba 高情動系ラット(SH群: 雄4匹, 雌5匹), 及び低情動系ラット(SL群: 雄5匹, 雌5匹)の空間学習についてはこれまでに報告したデータである(吉田, 2007)。今回、豊環境条件(Rich Condition: R)群として新たにTsukuba 高情動系ラット(RH

群：雄5匹、雌5匹）及び低情動系ラット（RL群：雄5匹、雌4匹）を用いた。これらのラットは、生後21日齢で離乳後、回転かごや巣箱やボールなどが置いてあるケージ（57×42×30cm）内で3ヶ月齢に達するまで飼育された。高架式8方向放射状迷路を用いた空間学習訓練は、これまでの研究報告（吉田，2007）で述べた同様の手続きで行った。実験終了後、ネンプター深麻酔下で脳を灌流固定後、50 μm の連続凍結薄切片を作製し Neutral Red によりニッスル染色を行った。Paxinos & Watson (1986) の脳地図に従い、顕微鏡写真撮影された切片標本について、吻側極から尾側極までの海馬の面積を4枚毎（200 μm 毎）にデジタルプランニメーターにより測定し（図1）、それらの測定値から海馬全体の容積（1枚の切片厚みを200 μm と仮定し、吻側極から尾側極までの海馬の総面積×200 μm とした）を推定した。さらに、海馬全体の容積に対する背側海馬（ここでは内側部に海馬支脚（Subiculum）が出現するまでを背側海馬領域とした、図2）の容積比や背側海馬容積に対するCA1、CA2-CA3、歯状回（DG）の各領域の容積比を求め、これらの測定値と空間学習成績（学習基準に達するまでの試行数）との相関係数を算出し各群間で比較検討した。

結果

（1）空間学習習得に及ぼす飼育環境条件の効果

図3に示したように、通常のプラスチック標準ケージで飼育された Tsukuba 低情動系ラット（SL群）の空間学習成立までの平均試行数（ $\pm\text{SE}$ ）は22.0 \pm 1.1試行で、かごや巣箱やボールなどが置いてある豊環境で飼育された Tsukuba 低情動系ラット（RL群）の学習基準に達するまでの試行数（ $\pm\text{SE}$ ）は16.2 \pm 1.6試行で、SL群と比較して有意に試行数の減少が認められた（ $p < .01$ ）。また、同じ豊環境で飼育された Tsukuba 高情動系ラット（RH群）（13.8 \pm 0.8試行）と比較して有意差が認められなくなり、飼育環境を豊条件にすることにより明瞭な学習改善効果が認められた。

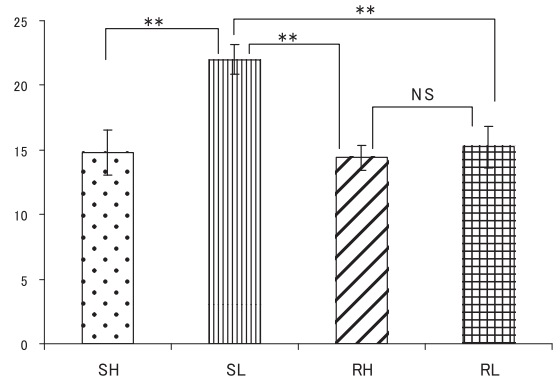


図3. 各群の空間学習完成までの試行数（ $\pm\text{SE}$ ）
縦軸は学習基準に達するまでの平均試行数、SH、SLはそれぞれ標準環境飼育H系ラット群とL系ラット群、RH、RLはそれぞれ豊環境飼育H系ラット群とL系ラット群を示している。NS：Non-significant, **： $p < .01$ (Mann-Whitney のUテスト、以下の表示も同様)

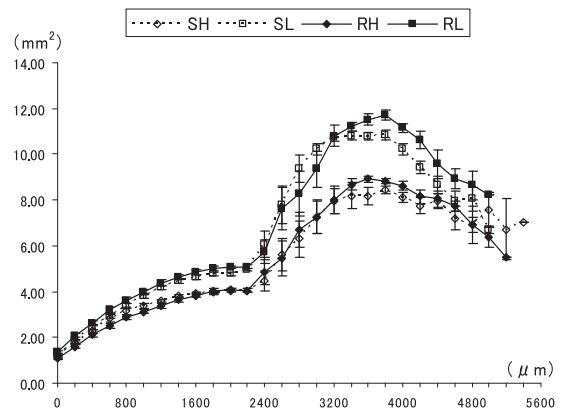


図4. 各群の海馬面積の推移（ $\pm\text{SE}$ ）
縦軸は各切片の海馬面積（ mm^2 ）を示している。横軸は海馬の吻側極（0 μm ）から尾側極（5600 μm ）を示している。

（2）海馬内の形態学的検索

上記のすべてのラットの摘出された脳について、50 μm の連続脳切片4枚毎に海馬の面積を吻側極から尾側極まで測定したところ（図4）、H系群（SH群及びRH群）とRL群は吻側極（0 μm ）から尾側方向約2400～2600 μm まで海馬面積が漸増し、その後急激に面積増大が見られた。これは腹側海馬の出現を意味しており、SH群とRH群及びRL群の平均的な背側海馬の範囲は約2400～2600 μm までであった。それに対して、SL群の平均的な背側海馬の範囲は約2200 μm で、SL群の背側海馬が特異的に縮小していることが考えられた。また、これらの海馬面積測定値から海馬全体の容積（図5）を求めたところ、L系群の容積が両H系群に比べて有意に大きかった（ $p < .01$ ）。しかし、これはL系

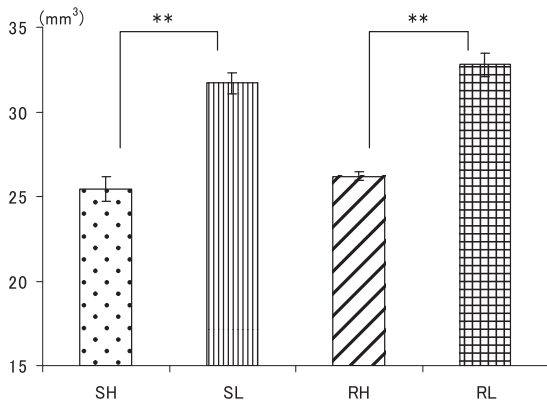


図5. 各群の海馬容積 (±SE)
** : p < .01

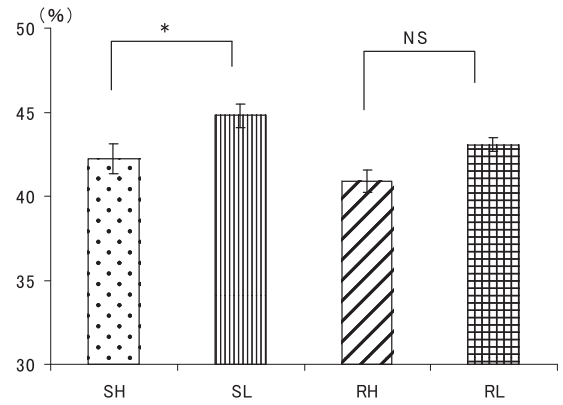


図7. 背側海馬容積に対するCA1容積の割合 (±SE)
NS : Non-significant, * : p < .05

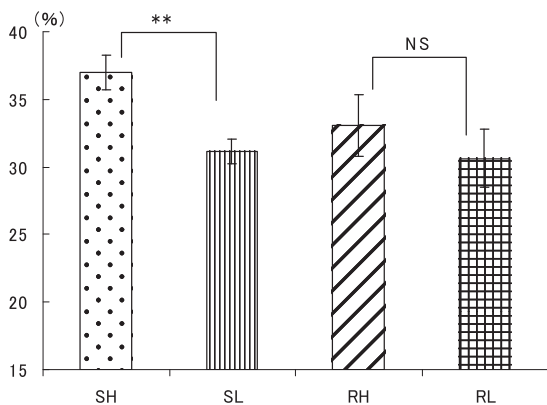


図6. 海馬全容積に対する背側海馬容積の割合 (±SE)
NS : Non-significant, ** : p < .01

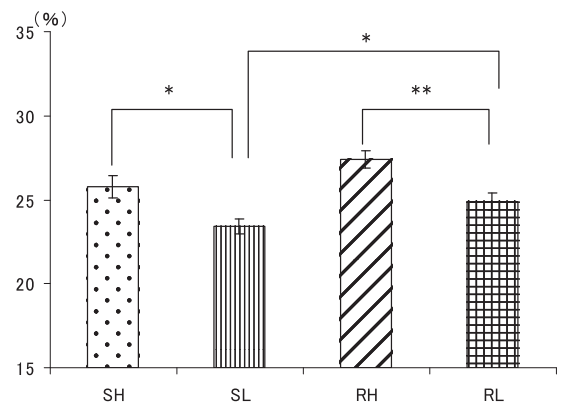


図8. 背側海馬容積に対する歯状回容積の割合 (±SE)
** : p < .01, * : p < .05

群の脳自体が大きい (脳重はH系群に比べて約0.1~0.2g重い) ことに比例していた. 海馬全体の容積については飼育環境の影響は認められなかった. そこで, 全海馬容積に対する背側海馬容積の割合 (容積比%) を算出したところ (図6), SH群の背側海馬容積比が最も多く, SL群とのみ有意差が認められた (p < .01). しかし, 飼育環境を豊環境にすることにより, 両群間 (RH群とRL群) の有意差は認められなくなり, 豊環境により背側海馬の容積がある程度改善してくることが推測された.

次に, 背側海馬容積に対する背側海馬内の各領域 (CA1, 歯状回, CA2-CA3) の容積の割合を各群で比較したところ, まず, CA1領域の容積比 (図7) はSL群が最も多く, SH群に比べて有意に増大していた (p < .05). しかし, 豊環境によりこの差は認められなくなった. それに対して, 背側海馬容積に対する歯状回の容積比 (図8) は, SL群がSH群より有意に少なく (p < .05), 豊環境によりその差 (RH群

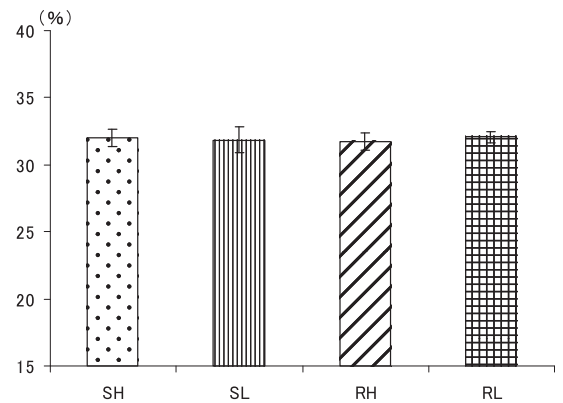


図9. 背側海馬容積に対するCA2-CA3容積の割合 (±SE)

とRL群) は一層大きくなった (p < .01). さらに, RL群の歯状回容積比はSL群より多くなり (p < .05), 豊環境により明らかに歯状回容積比が増大する結果となった. 一方, CA2-CA3の容積比 (図9) に関しては, 群間及び飼育条件間において有意差は全く認められなかった. 従って, 飼育環境条件の影響は海馬歯状回に特異的に現れていたことが明らかとなった.

(3) 空間学習成績と海馬容積比との関係

8方向放射状迷路による空間学習で用いた全てのラットの学習基準に達するまでの試行数と海馬の容積比との関係を個々に調べた結果、まず、全海馬容積に対する背側海馬の容積比との相関係数について(図10)、H系群(SH群とRH群)は $r=0.06$ で、ほとんど相関は認められなかったが、L系群(SL群とRL群)は $r=-0.25$ で、有意ではないが弱い負の相関が認められた。すなわち、空間学習成績が悪いL系ラットほど背側海馬容積比が少ない傾向であった。

そこで、背側海馬内の各領域について、背側海馬容積に対するCA1, CA2-CA3及び歯状回の容積比と空間学習成績との関係を検討した結果、図11に示したように、CA1領域においてH系群の相関は認められなかった($r=0.13$)が、L系群においては逆に正の相

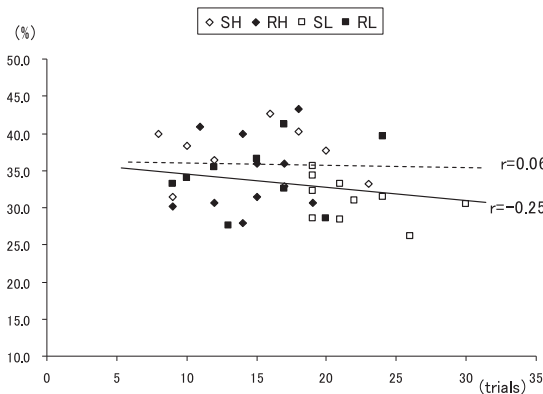


図10. 空間学習成績と背側海馬容積比との相関

横軸は学習基準に達するまでの試行数(trials)、縦軸は海馬全容積に対する背側海馬容積の割合(%)を示している。点線と実線はそれぞれH系群とL系群の回帰直線と相関係数(r)を示している。

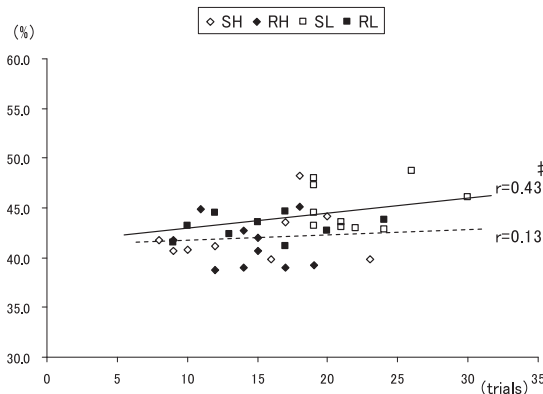


図11. 空間学習成績と背側海馬CA1容積比との相関
#: $p < .10$ (t test), その他は図10を参照。

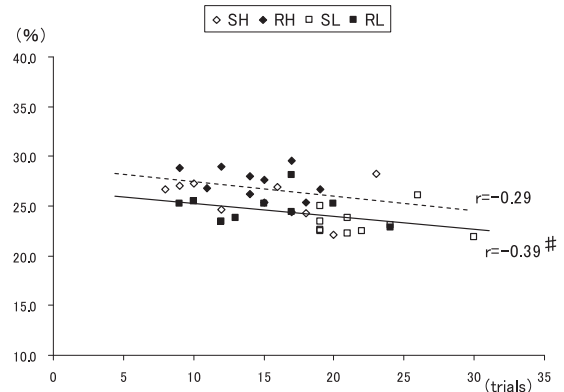


図12. 空間学習成績と背側海馬歯状回容積比との相関
#: $p < .10$ (t test), その他は図10を参照。

関傾向が認められた($r=0.43$, t testにより $p < .10$). それに対して、歯状回領域(図12)では、H系群でも弱い負の相関傾向が見られ($r=-0.29$), L系群ではさらに強い負の相関傾向が認められた($r=-0.39$, t testにより $p < .10$). CA2-CA3領域に関しては、図には表していないが、H系群は $r=0.11$, L系群が $r=-0.12$ で、両群とも相関は認められなかった。従って、L系群の空間学習成績が特に悪いラットほど歯状回の容積比が減少し、その分CA1領域の容積比が増大し、そのほとんどが標準環境で飼育されたラットであった。しかし、飼育環境を豊環境にすることにより空間学習成績が良くなり、それと同時に海馬歯状回の容積比が増大し神経構造が変化していたことが予測された。

考 察

本実験結果をまとめると、L系ラットの海馬全体の容積に対する背側海馬の容積の割合がH系ラットに比べて有意に少なくなっており、その中で特に、背側海馬領域の歯状回の容積の割合が少なくなっていることが明らかとなった。また、歯状回の容積比が少ないほど空間学習障害の程度(学習基準に達するまでの試行数)が大きくなる傾向が認められた。さらに、飼育条件を豊環境にすることによってL系ラットの空間学習が改善され、それと同時に海馬歯状回の容積も増大することが明らかとなった。

一般的に、環境を豊かにし多くの経験や訓練をすることにより、脳の発達や行動により良い影響があることはよく知られている。特に、発達初期の豊環境はそ

の後の記憶・学習行動が改善し、脳に可塑的变化をもたらすことが言われている (Rosenzweig & Bennett, 1996). また、豊環境により可塑的变化をもたらす脳部位として、コリン作動性ニューロンの投射部位である大脳皮質や海馬があげられており、空間学習や記憶課題など認知機能に重要な神経成長因子がこれらの脳部位で特に増えていることも報告されている (Torasdotter, et al, 1998 ; Ickes, et al, 2000). 一方、海馬歯状回の顆粒細胞は、誕生後の様々な環境刺激や経験により細胞新生 (neurogenesis) の生じることがよく知られている (Kempermann, et al, 1997 ; Praag, et al, 2002 ; Yanai et al, 2008). Kempermannら (1997) は、本実験と類似した研究結果を報告している。すなわち、豊環境で育てたマウスは標準ケージで育てたマウスに比べて、水迷路課題の空間学習において水泳距離が有意に短くなり、明らかに空間学習改善効果が観察されたと同時に、海馬歯状回の顆粒細胞数が約15%増大 (細胞新生) していたことを明らかにした。しかし本実験でのL系ラットは、主として作業記憶を必要とする放射状迷路課題にのみ学習障害を示し、参照記憶を要する水迷路課題にはなんら障害を示さなかった (吉田, 2008)。本実験では、水迷路課題に対する飼育環境の影響を確認していないが、少なくともL系ラットの海馬歯状回顆粒細胞は豊環境刺激状況において、作業記憶を要する課題に対してより敏感に反応しその結果として、歯状回容積比が増大したのではないかと考えられる。従って、L系ラットの背側海馬内の歯状回顆粒細胞への入力系に何らかの神経構造的変化が生じており、標準環境下では細胞新生が抑制されていたのではないかと推察された。

海馬歯状回への入力系に関しては、尾側部ないしは腹側海馬歯状回は主に、嗅覚系や扁桃核からの入力を受けているのに対して、吻側部ないしは背側海馬歯状回は、学習・記憶など認知機能にとって重要な大脳皮質から専ら入力を受けていることが明らかとなっている (Burwell & Amaral, 1998a, 1998b ; Dolorfo & Amaral, 1998)。また、背側海馬への入力は内側中隔核吻側部及び対角帯核中央部と嗅内野の外側部であることも判明している (Yoshida & Oka, 1990 ; Yoshida & Oka, 1995 ; 吉田, 2000)。

以上のことから、L系ラットの作業記憶を要する空間学習障害の背景となる脳内メカニズムに関しては、内側中隔—対角帯核からのコリン作動性入力と大脳皮質から嗅内野の外側部を経た背側海馬歯状回への入力系が関連しており、それらの神経系の何らかの変容が歯状回顆粒細胞の細胞新生を大きく左右していたのではないかと考えられる。そこで今後は、これまで報告された研究方法 (Kempermann, et al, 1997 ; Praag, et al, 2002 ; Yanai et al, 2008) と同様に、L系ラットの海馬歯状回顆粒細胞数の違いをH系ラットや雑種のWistar系ラットと比較確認すると共に、順行性及び逆行性標識物質や蛍光色素などを用いて海馬歯状回を中心とした海馬入出力系全体の形態学的検索をより詳細に行うことが必要である。

本研究は、平成20・21・22年度科学研究費補助金(基盤研究C, 課題番号:20530670)の助成を受けて行ったものである。

参考文献

- Beatty, J., The human brain; essentials of behavioral neuroscience, Cap.12, Learning, memory and brain plasticity, 403-435, 2001
- Burwell, R. D. & Amaral, D. G., The perirhinal and postrhinal cortices of the rat : inter-connectivity and connections with entorhinal cortex. *Journal of Comparative Neurology*, 391, 293-321, 1998a
- Burwell, R. D. & Amaral, D. G., Cortical afferents of the perirhinal, postrhinal, and entorhinal cortices of the rat. *Journal of Comparative Neurology*, 398, 179-205, 1998b
- Corkin, S., Amaral, D. G., Gonzalez, R. G., Johnson, K. A., & Hyman, B. T., H. M's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3964-3979, 1997
- Dolorfo, C. L. & Amaral, D. G., Entorhinal cortex of the rat: topographic organization of the cells of origin of the perforant path projection to the dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 398, 25-48, 1998
- 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
- Ickes, B. R., Pham, T. M., Sanders, L. A., Albeck, D. S.,

- Mohammed, A. H. & Granholm, A-C., Long-term environmental enrichment leads to regional increases in neurotrophin levels in rat brain. *Experimental Neurology*, 164, 45-52, 2000
- 岩崎庸男・藤田統, 高・低情動反応性ラットの行動比較 (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
- 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
- Kempermann, G., Kuhn, H. G. & Gage, F. H., More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386, 493-495, 1997
- 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
- 宮本邦雄・藤田統, 高・低情動反応性ラットの行動比較 (6) 受動的回避学習, 日本動物心理学会第37回大会発表抄録集, 1977
- Nonaka, H., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. Effects of early postnatal AF64A treatment on passive avoidance response and radial maze learning in rats. *Japanese Journal of Psychopharmacology*, 18, 39-44, 1998
- Olton, D. S., Walker, J. A., & Gage, F. H., Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research*, 139, 295-308, 1978
- Paxinos, G. & Watson, C. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 2nd ed, Academic Press, New York, 1986
- Praag, v. H., Schinder, A. F., Christie, B. R., Toni, N., Palmer, T. D. & Gage, F. H., Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-1034, 2002
- Rosenzweig, M. R. & Bennett, E. L., Psychobiology of plasticity: effects of training and experience on brain and behavior. *Behavioral Brain Research*, 78(1), 57-65, 1996
- Torasdotter, M., Metsis, M., Henriksson, B. G., Winblad, B. & Mohammed, A. H., Environmental enrichment results in higher levels of nerve growth factor mRNA in the rat visual cortex and hippocampus. *Behavioral Brain Research*, 93(1/2), 83-90, 1998
- 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
- Yanai, S., Okaichi, H. & Sugioka, K., Dietary restriction inhibits spatial learning ability and hippocampal cell proliferation in rats. *Japanese Psychological Research*, 50(1), 36-48, 2008
- Yoshida, K. & Oka, H., Topographical distribution of septohippocampal projections demonstrated by the PHA-L immunohistochemical method in rats. *Neuroscience Letters*, 113, 247-252, 1990
- Yoshida, K. & Oka, H., Topographical projections from the medial septum-diagonal band complex to the hippocampus: a retrograde tracing study with multiple fluorescent dyes in rats. *Neuroscience Research*, 21, 199-209, 1995
- 吉田和典, 大脳辺縁系間の神経結合に関する形態学的検討 —特に, 海馬—扁桃核間の神経結合について, 福井医科大学研究雑誌, 1 (3), 569-581, 2000
- 吉田和典, 抗コリン作動薬長期投与後のラット空間学習の成立過程と海馬内の形態学的変容との関連, 福井医科大学研究雑誌, 3 (1/2), 7-16, 2002
- 吉田和典, ラットの水迷路による空間学習過程と年齢との関連, 福井医科大学研究雑誌, 4 (1/2), 61-71, 2003
- 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, 明石秀美, 岩壁亮子, 鈴木香織, 立平起子, 林優子, 宮越通安, 学習及び記憶に関連する脳のメカニズムについての最近の展望, 人間学研究, 4, 51-60, 2005