

はしがき

本報告書は、平成 20・21・22 年度に「動物モデルによる多動・学習障害のメカニズムを探る生理心理学的研究」という課題で、日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究 C，課題番号 20530670）の助成を得て実施された研究の成果をまとめたものである。

研究組織： 研究代表者 吉田 和典（仁愛大学・人間学部・心理学科 教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：円）

年度	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
平成 21 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 22 年度	400,000	120,000	520,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

直接経費の使用内訳

（金額単位：円）

年度	物品・消耗品費	旅費	謝金等	その他	総計
平成 20 年度	2,409,750	90,250	0	0	2,500,000
平成 21 年度	750,740	44,260	0	5,000	800,000
平成 22 年度	298,175	58,040	0	43,785	400,000
総計	3,458,665	192,550	0	48,785	3,700,000

研究発表

(1) 学会誌等

- ・ 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, p87-94, 2008
- ・ 吉田和典, 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—, 仁愛大学研究紀要, 8, p53-59, 2009

- 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, 9, p 35-41, 2010

(2) 口頭発表

- 吉田和典, Tsukuba 情動系ラットの海馬機能について, 第26回日本生理心理学会大会, 2008
- 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—, 第69回日本動物心理学会大会, 2009
- 吉田和典, モーリス水迷路を用いた Tsukuba 情動系ラットの空間学習過程, 第27回日本生理心理学会大会, 2009
- 吉田和典, Tsukuba 情動系ラットの輪回し行動によるサーカディアンリズムの特徴, 第28回日本生理心理学会大会, 2010

本研究の目的と各年度の研究計画

研究目的

最近、多動障害や学習障害を主症状とする軽度発達障害が教育現場で大きな問題となっており、これらの障害発生メカニズムを探る基礎的研究が様々な動物モデルを用いて盛んに行われてきた。しかしこれらの動物モデルはほとんどが薬物や遺伝子改変など人為的モデルで自然発症的疾患モデルとしては程遠いものであった。そこで本研究では、数十年にわたり選択交配され自然発症的に作製された Tsukuba 情動系ラットの中で特に低情動系ラットの多動性に注目し、これらのラットの一般活動性や様々な学習習得過程を詳細に観察することにより、Tsukuba 低情動系ラットの多動・学習障害動物モデルとしての妥当性と検討すると同時に、これらの障害発生メカニズムを明らかにすることを目的とした。

研究計画

(平成20年度)

本年度は、Tsukuba低情動系ラットの種々の学習行動を、Tsukuba高情動系ラットや雑種のWistar系ラットの成績と比較検討し、学習障害の動態を明らかにする計画である。まず、現有する8方向放射状迷路と、今年度設備として計上したモーリス水迷路を用いて、空間認知能力を調べる。8方向放射状迷路学習は、作動記憶と参照記憶を要する空間学習である。手続きは、最大10分間ないしは8つの餌のあるアームを選択するか、16選択するまでを1日1試行行う。学習基準は、餌のあるアームへ8連続正選択するか12選択以内で7連続正選択が3試行(3日間)連続とし、最大30試行(30日間)とした。また、モーリス水迷路学習は主に参照記憶を必要とする空間学習である。手続きは、1試行90秒間、直径150cmの円形プール内を泳がせ、水面下のプラットホームまでの逃避訓練(場所学習訓練)を1日4試行で4日間行う。5日目に逃避用プラットホームを取り除くプローベテストを1試行60秒間行う。これらの一連の行動を自動的に解析し、各試行毎のゴール(プラットホーム)までの泳いだ軌跡や逃避潜時及びプローベテスト時の本来あったゴール付近の通過数や滞留時間を求める。これらの装置を用いることによって、Tsukuba低情動系ラットの弁別能力や作動記憶及び参照記憶を要する空間認知能力を詳細に検討することを計画している。

(平成21年度)

本年度は、Tsukuba低情動系ラットの一般活動性を詳細に観察し、Tsukuba高情動系ラット及び雑種のWistar系ラットの行動量と比較検討することによって、多動性障害の動態を明らかにする。まず、一般活動性を測定するために、80×

80cmの正方形で高さ30cmの自製オープンフィールド装置を用いる。オープンフィールドの中央にラットを置き、5分間の通過区画数(Ambulation)、立ち上がり行動(Rearing)、洗顔行動(Face Washing)、毛づくろい行動(Grooming)、におい嗅ぎ行動(Sniffing)、脱糞(Defecation)、脱尿(Urination)の回数を記録するとともに、ビデオ録画する。これらの記録から走行軌跡を描き、走行距離や平均走行速度を求める。さらに、今年度購入する回転式運動量測定装置(KN-78)を用いて、1日の総行動量を測定する。この装置は、ラットが自由に回転籠を回すことによってカウンター方式で行動量が測定できるものである。夜行性のラットの場合、暗期に行動量が多いこと予測され、また、雌ラットの場合は性周期(4~5日周期)と行動量との関連が示唆されているため、複数台の運動量測定装置を同時に用いてラットの明期(午前8時~午後8時)と暗期(午後8時~午前8時)の行動量を30日間連続測定し、雌雄のTsukuba両情動系ラット及び雌雄の雑種Wistar系ラットの行動リズムを比較解析する。

(平成22年度)

本年度は、20年度及び21年度に実施した学習実験や行動実験結果から、多動・学習障害を呈したラットの脳内メカニズムを明らかにするために、用いたすべてのラットの脳内の形態学的検索を行う。前々年度の学習実験及び前年度の行動実験終了後、ネンブタール深麻酔下で、0.1%硫化ナトリウム溶液とホルマリン溶液で脳を灌流定し、20%シュクロース溶液に浸し、冷蔵保存しておいた脳組織を用いる。クリオスタットを用いて、50 μ mの連続凍結薄切片を作製し、ニッスル染色とビオチン化デキストランアミン(BDA)免疫染色を別々に行なう。ニッスル染色はNeutral Redを用い、染色された脳内ニューロンの形状やニューロン数などから、脳内の神経核組織の形態を明らかにするためである。また、BDA免疫染色法は、脳内にBDAを注入し、順行性に標識された神経終末や逆行性に標識されたニューロン分布を調べ、Tsukuba情動系ラットの脳内の神経ネットワークの全貌を明らかにする。

《平成 20 年度研究成果（その 1）》

8 方向放射状迷路を用いた Tsukuba 情動系ラットの空間学習過程

はじめに

Tsukuba 情動系ラットとは、1972 年より、当時の東京教育大学（現筑波大学）心理学教室内で、雑種の Wistar 系雌雄ラットを用いて直線走路での区画通過数により選択交配が行われ、明所での動きの少ない高情動系（H 系）ラットと明所でも多動な低情動系（L 系）ラットに分離され、現在、情動反応性に関して遺伝的に近交系ラットとして認められている系統である。これらのラットの種々の情動事態における行動特性に関しては、H 系ラットは、能動的な反応を抑制し、閉鎖的或いは受動的に環境に対処する、いわゆる内向的行動様式をとるのに対して、L 系ラットは情動事態でも活発に反応し、環境に対して積極的ないしは外向的に対処する傾向が強いことが報告されている（藤田ら、1980 ; Fujita et al, 1994）。これらのラットの学習行動に関して、ステップ・ダウン型受動的回避学習において、H 系ラットは台に降りるまでの潜時が常に長く、すくみ反応が多いけれども、電撃付加により両系統とも潜時が増大したことから、受動的回避学習成立に本質的な差がないことが報告されている（宮本&藤田、1977）。また、シャトル箱による能動的回避学習事態では、L 系ラットが H 系ラットより正反応率が統計的に高い結果が得られているが、毎日の試行後半の成績を比較したところ、両系統間に有意な差が無いことが指摘されている（片山ら、1978）。従って、電撃などの強い情動刺激を伴う回避学習習得には両系統に本質的な差がないことが明らかとなっている。一方、反応を抑制しなければならない GO/NO-GO 学習（岩崎&藤田、1979）や非強化と結びついた刺激を避けなければならない明暗弁別学習（片山ら、1979 ; 山口、2004）においては、L 系ラットは H 系ラットに比べて成績が悪いことが報告されている。以上のように、L 系ラットは反応抑制や弁別能力を必要とする学習に対しては明瞭な障害を呈することが観察されており、L 系ラットの注意集中を要する学習の障害モデルとしての可能性が示唆されている。しかしながら、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今のところ明らかとなっていないのが現状である。

そこで、本研究では、作業記憶や参照記憶を必要とする 8 方向放射状迷路による空間学習（岩崎ら、1981）について、Tsukuba 情動系ラット、特に、L 系ラットの学習習得過程を詳細に観察し、空間学習障害の有無を H 系ラットと比較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 ヶ月齢の Tsukuba 高情動系（H 系：雄 4 匹，雌 5 匹）及び低情動系（L 系：雄 5 匹，雌 5 匹）ラットを用いた。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、仁愛大学で兄妹交配し 84 世代目になったものである。

今回用いた空間学習装置は、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ギ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（図 1）。

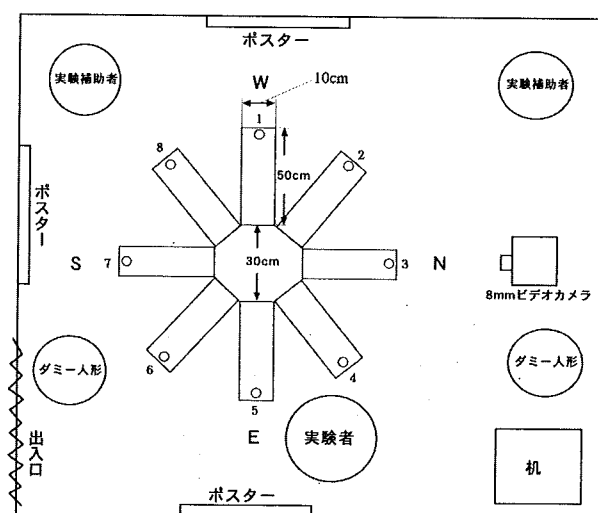


図 1 実験配置図

実験室上部からの配置図で、実験期間中、これらの装置等の配置は一定に保った。E, W, S, N は東西南北の方向を示している。

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、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ギロチンドアを開け、いずれかのアームを選択後、他のギロチンドアを閉め、ラットがプラットホームに戻った時点で一旦ギロチンドアを閉めプラットホームに 5 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試行行った。学習成立基準は、8連続正選択ないしは12選択以内で7連続正選択が3試行(3日間)連続とした。但し、最大30試行で実験を終了した。全てのラットの各試行毎の所要時間、誤選択数、全選択数を測定すると同時に、8mm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。

実験終了後、ネンブタール深麻酔下で脳を灌流固定後、脳を摘出し脳重を測定した。さらに、クリオスタットを用いて、50 μ mの連続凍結脳薄切片標本を作製し、ニッスル染色像から脳内の形態学的検索を行った。但し、今回は、空間学習行動を中心に結果をまとめた。

結果

8方向放射状迷路の各試行での最大10分間ないしは16選択するまでの所要時間を両系統間で比較したところ(図2)、学習初期(特に、第1試行と第2試行目)には、H系群はプラットホームからほとんど出ず、H系ラット特有の受動的および内向的行動パターンを示した。しかし、その後、第5試行目まで急速に所要時間が減少し、それ以降は、所要時間の漸減傾向が見られ、最終的には約1分前後の所要時間で試行が終了するようになった。それに対して、L系群の学習初期には、H系群と比較して、有意に所要時間が短く、非学習性の活発な動きが観察された。しかし、第4試行目からは、所要時間が長くなり、その後も所要時間は短くなるけれども、H系群と比べてほとんどの試行で有意に時間の延長が

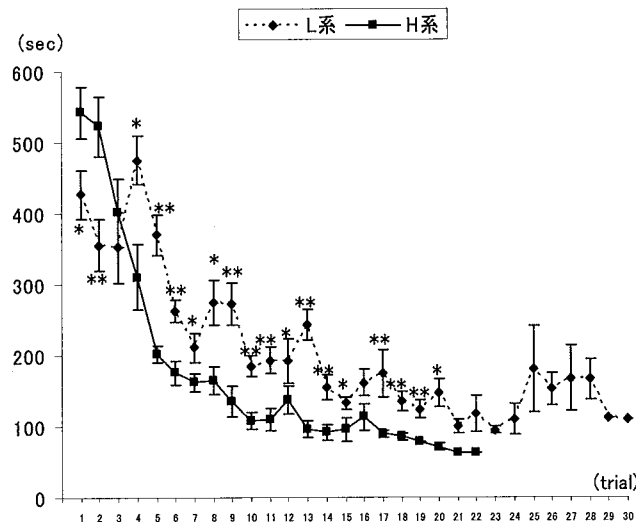


図2 各試行での平均所要時間(±SE)

縦軸に平均所要時間と標準誤差(SE)、横軸に試行数(trial)を示している。*、**は各試行毎に両群間でMann-Whitney Uテストを行った結果で、それぞれ $p < .05$ 、 $p < .01$ を示している。

以下の図の表示に関しても同様の検定を行った。

認められた。

そこで、各試行での所要時間からプラットホーム内での時間を差し引いたアームでの平均走行速度 (cm/sec) を求めたところ (図 3), 所要時間の結果と逆で, H 系群は第 1 試行と第 2 試行では有意に遅いが, 第 4 試行目に逆転し, 第 10 試行目まで急速に速度が増し, その後の平均値 (\pm SD) は 18.8 ± 3.3 cm/sec でほぼ安定していた。それに対して, L 系群は学習初期には有意に速いものの, その後の急速な速度上昇は見られず, 第 10 試行目以降の平均速度 (\pm SD) は 10.2 ± 2.5 cm/sec であり, 明らかに H 系群と比べて走行速度が遅くなっていることが判明した。これは, L 系群が各アームへ素早く入るものの, ある程度試行が進んだ段階でも, アームの先端で周囲を探索したり, 選択アームの途中で立ち止まり再びアーム先端へ戻るなどの行動が多く観察された。これらの学習過程によって無駄な行動が, L 系群の各試行での所要時間の延長とアームでの平均走行速度の遅延に結びついたものと考えられる。

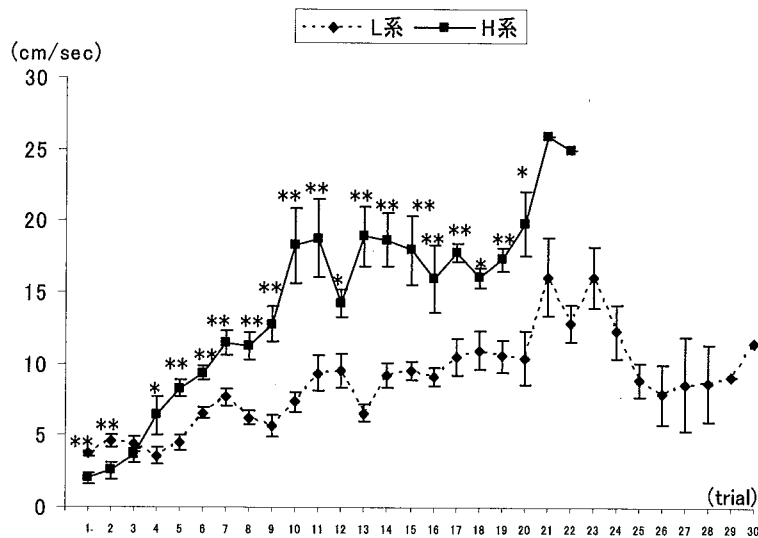


図 3 各試行での平均走行速度 (\pm SE)

次に、各試行での誤選択数 (図 4) と全選択数 (図 5) を調べたところ, L 系群は H 系群と比べて, 全試行においてアームの誤選択数および全選択数が多い傾向が認められた。特に, 誤選択数では, 第 1, 第 6, 第 18 試行目 ($p < .05$) と第 13 試行目 ($p < .01$) で有意差が認められた。また, 全選択数では, 第 1, 第 2, 第 13, 第 18 試行目で有意に多くなっていた ($p < .05$)。ここで, 第 1 試行目や第 2 試行目での誤選択数と全選択数が L 系群で多くなっているのは, 本来 L 系群が持っている多動性の遺伝的素質の表れであると思われる。しかし, その後の誤選択数や全選択数の増加は, 学習性の障害の表れと考えられる。

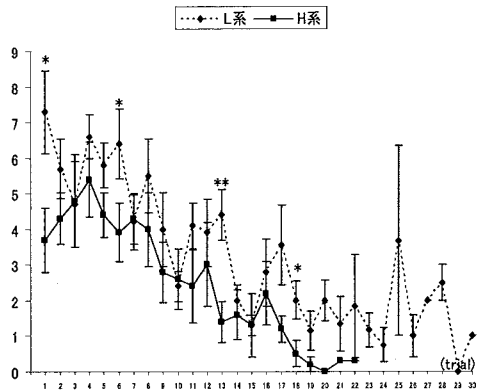


図4 平均誤選択数(±SE)

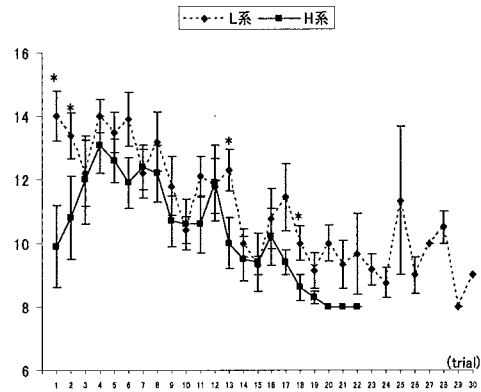


図5 平均全選択数(±SE)

さらに、両群の各試行での平均正選択率について調べたところ(図6)、H系群は、第一試行目から約70%の正選択率で、その後徐々に上昇し20試行目以降の平均正選択率は全て100%となっていた。それに対して、L系群の第一試行目の正選択率は約50%で、その後も僅かに良くなるものの、20試行目以降の平均正選択率は約85%前後にとどまっていた。また、第6試行目と第13試行目及び第18試行目の正選択率がL系群で有意に低く($p < .05$)、その他の試行でも全般的に正選択率の低い傾向が認められた。

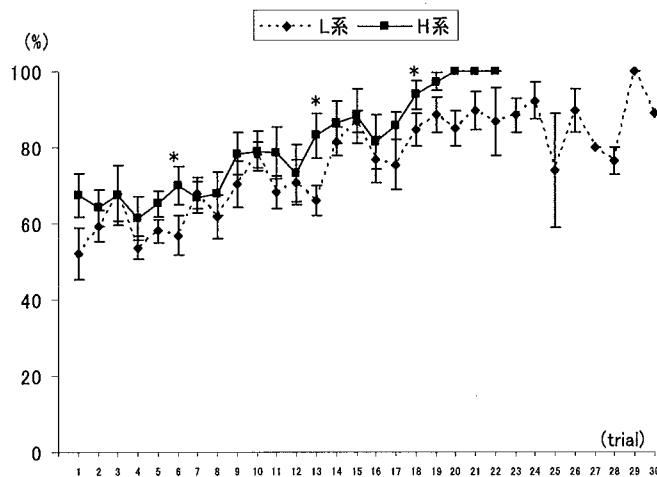


図6 平均正選択率(±SE)

最後に、空間学習成立と見なす学習基準(8連続正選択、或いは、7連続正選択で全選択が12選択以内の試行が3試行連続した場合)に達するまでの平均試行数(±SE)を調べたところ(図7)、H系雄(H系♂)群は 17.0 ± 3.0 試行で、H系雌(H系♀)群は 13.0 ± 2.0 試行であった。

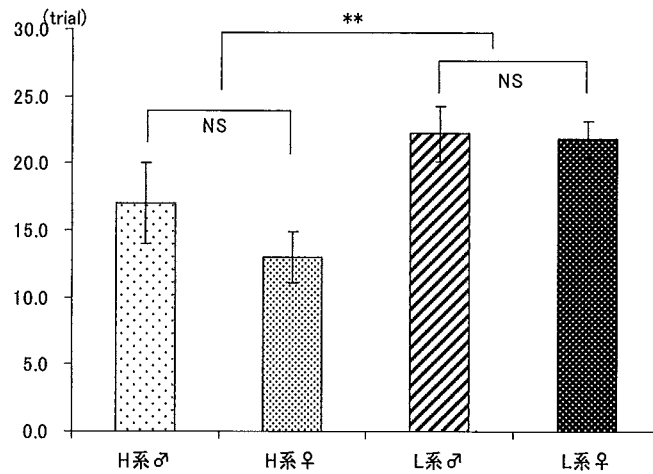


図7 学習成立までの平均試行数(±SE)

縦軸は学習基準試行(3試行)を除いた平均試行数を示している。♂、♀はそれぞれ雄ラット、雌ラットのデータである。NS: Non-significant, **: $p < 0.01$

Mann-Whitney の U テストの結果、有意な雌雄差は認められなかった (NS)。一方、L 系群は雄 (L 系♂) 群及び雌 (L 系♀) 群それぞれ、 22.2 ± 2.0 試行と 21.8 ± 1.4 試行であった。同様に統計的検定の結果、L 系群においても有意な雌雄差は認められなかった (NS)。そこで、雌雄のデータをまとめた全体の平均試行数 (±SE) を求めたところ、H 系群及び L 系群で、それぞれ、 14.8 ± 1.8 試行と 22.0 ± 1.2 試行であった。統計的検定の結果、両群間で有意差が認められ ($p < 0.01$)、L 系群は学習成立までにより多くの試行数を要することが明らかとなった。

考 察

本実験は、Tsukuba 情動系ラットの 8 方向放射状迷路による空間学習習得過程を詳細に検討した。その結果、Tsukuba 低情動系 (L 系) ラットの明瞭な空間学習障害の証拠が得られた。すなわち、L 系ラットは、高情動系 (H 系) ラットに比べて、学習成立までの試行数が有意に延長し、また、各試行での 8 選択ないしは最大 16 選択するまでの所要時間が、第 1 試行と第 2 試行を除いた他の試行で常に長く、全選択数や誤選択数も多い傾向が認められた。

岩崎&平賀 (1986) によれば、雑種の Wistar-Imamichi 系ラットの 8 方向放射状迷路学習習得過程を調べた結果、学習基準に達するまでの試行数は平均 7.6 試行であった。また、さらに難易度の高い 12 方向放射状迷路においても学習基準に達するまでに試行数は平均 13.7 試行であったことが報告されている。従って、本実験での H 系ラットにおいても多少の学習障害の可能性が考えられる。しかし、H 系ラットの最初の数試行は出発点であるプラットホームから出ること

が少なく、出てもアーム先端まで行くことが無く餌も食べない、という H 系ラット独特の情動反応性が高い行動特性が学習基準達成までの試行数の延長に結びついたもので、本質的な学習障害とは異なるものと考えられる。なぜなら、H 系群の中で約半数は 7～12 試行以内で、最大でも 22 試行以内で全てのラットが学習基準に達していた。それに対して、L 系群では最も成績の良かったラットでも学習基準達成までに 15 試行以上要しており、30 試行で学習が成立しなかったラットも観察された。これらのことから、L 系群の空間学習障害の程度が重篤であることは明らかである。

また、岩崎ら (1981) によれば、放射状迷路による学習方略は、win-stay 方略ではなく win-shift 方略であると言われている。すなわち、餌のあった場所にいつまでも固執する (win-stay) のではなく、次々と別の場所を探す (win-shift) 方略である。人がもしこのような放射状迷路でうまく選択するように要求されたら、おそらく隣のアームを順番に選ぶ方略をとるであろう。しかしラットの場合は、アームを選択する順番は試行毎に異なり、ランダムとも思えるような行動パターンが試行を重ねるに従って徐々にその正確さを増してくる。さらにまた、この種の迷路における空間記憶には、迷路の置かれている周囲の環境の認知地図及びアーム先端には餌があるという記憶 (参照記憶) と試行内で選択したアームの記憶 (作業記憶) の 2 種類があると言われており、このような空間記憶成立は、迷路内の様々な手がかり (例えば、選択肢の色や臭いなど) によるものではなく、迷路外の複数の視覚的手がかりの空間的配置が重要であることが報告されている。

そこで、L 系群の学習過程を詳細に分析したところ、ほとんどの L 系ラットは最初の 4 から 5 選択目までは win-shift 方略で正反応しているが、それ以降の選択で以前訪れたアームを誤選択するケースが多く、このような試行がその後も継続する傾向があった。また、試行がある程度進んだ段階でも、餌のあるアームを選択しているにもかかわらず餌を食べずアームを往復する、という誤選択も多く観察され、結果的に学習成立までの試行数が増えたことになっていた。このような行動パターンは H 系群においてはほとんど観察されなかった。従って、L 系群においてもこの種の迷路学習は win-shift 方略で行っているが、L 系ラットで見られた空間学習障害は、作業記憶範囲 (選択アームの数) の障害と周囲環境の視覚的手がかりの空間認知能力或いはアーム先端には餌があるという記憶 (参照記憶) 障害の両方が生じていることが考えられる。しかし、今回の実験ではどちらの記憶障害が主たる原因であるかに関しては明らかとなっていない。

従って、今後は、参照記憶のみを必要とすると言われている水迷路 (Morris, et al, 1982 ; Okaichi & Okaichi, 2000; 吉田, 2002; 吉田, 2003) を用いた L

系ラットの空間学習過程を調べる必要がある。さらに、脳の損傷研究から、放射状迷路における空間学習を司る部位は海馬を中心とした大脳辺縁系であることが示唆されている（岩崎ら, 1981; Kawabe, et al, 1998; Kawabe, et al, 1998; Nonaka, et al, 1998）ことから、L系ラットの海馬内に何らかの障害が生じていることが予測される。従って、L系ラットの海馬を含めた大脳辺縁系の形態学的及び機能的変容過程を今後より詳細に検討する必要がある。

《平成 20 年度研究成果（その 2）》

モーリス水迷路を用いた Tsukuba 情動系ラットの空間学習過程

はじめに

Tsukuba 情動系ラットの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上述の実験結果から、L系ラットは、学習成立までの試行数が H系ラットより有意に多くなり、アームの誤選択数や全選択数も学習が進むにつれて増加するという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。従って、L系ラットは注意集中を要する学習や空間認知能力を必要とする学習の障害モデルになる可能性が示唆されている。しかしながら、L系ラットで見られたこれらの空間記憶障害が、作業記憶か参照記憶のどちらの記憶障害が主たる原因であるかについては今のところ明らかとなっていない。

そこで、本研究では、主に参照記憶を必要とすると言われているモーリス水迷路課題（Morris, et al, 1982; Okaichi & Okaichi, 2000; 吉田, 2002; 吉田, 2003）を用いた空間学習の習得過程を詳細に比較検討することを目的とした。

方 法

被験体は、2004 年 3 月に筑波大学より 82 世代目を譲り受け、仁愛大学で選択交配された第 96 世代と第 97 世代になる Tsukuba 高情動系ラット（H系：♂5 匹，♀5 匹），及び第 95 世代になる Tsukuba 低情動系ラット（L系：♂6 匹，♀6 匹）を用いた。また、統制群として雑種の Wistar 系ラット（W系：♂6 匹，♀5 匹）を用いた。すべての被験体は、実験開始時に月齢 3 ヶ月になったものを用いた。被験体は、室温約 24°C（±2°C），湿度約 60%（±10%）の下で飼育され、飼育室の明暗サイクルは午前 8 時より午後 8 時までが明期、その後の 12 時間が暗期の 12 時間交替であり、餌と水は自由摂取であった。

実験場所は仁愛大学 B 館 3 階の動物基礎実験室（B303）で、各被験体で 6 日間

行った。また、時間帯は9時から14時迄であった。実験中の室内の温度は24℃(±2℃)、湿度は平均56%(±10%)に保った。騒音の大きさは、平均53db(49db～59db)であった。実験場所の明るさは、平均30Lx(25Lx～39Lx)であった。

本実験で使用した水迷路はバイオリサーチ社製のモーリス型水迷路で、内径150cm、壁の高さ45.5cmの水槽全体が灰色に塗られている円形プールを用いた。プールの中央から40cm、周囲から23cmのところの直径12cm、高さが30cmの透明プラスチック製の逃避用のプラットホームを1箇所セットした。実験時の水迷路の水温は23℃(±1.5℃)とした。実験開始1日目から4日目の場所学習ではプラットホームから1cmの高さ(水深31cm)まで水を溜め、5日目のプローベテストでは、プラットホームを取り除き、水深31cmの高さまで水を溜めた。6日目の手がかり学習では、プラットホームから1cm低い高さ(水深29cm)まで水を溜めた。また、ラットが周囲の様々な空間的配置を記憶できるように、壁にポスターや写真などの手がかりになるものを配置し、これらの手がかりの場所は実験中、常に一定とした(図8)。

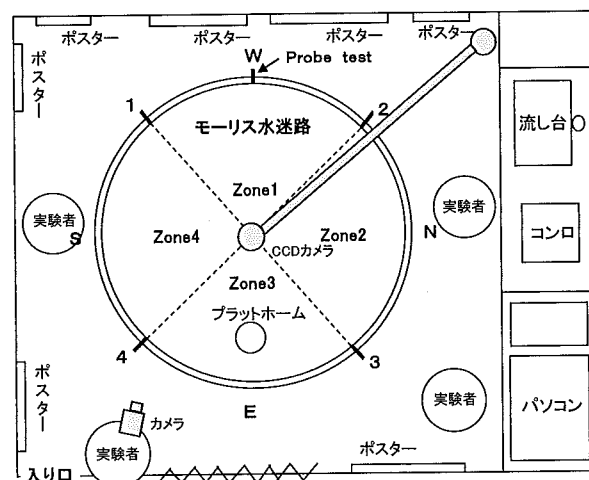


図8 モーリス型水迷路の平面図と実験室の配置

モーリス型水迷路の数字(1～4)は、1日の各試行での出発点を示し、Zone1～Zone4は円形プールの4分割領域を示している。また、E、W、S、Nは東西南北の方向を示す。実験者4人中3人は実験補助者で、水迷路上中央のCCDカメラとパソコンでラットの白色を自動的に感知し泳いだ軌跡を解析する。

実験手続きは、まず予備訓練として、実験開始前の4日間、毎日5分間ハンドリングを行った。

本訓練は、1日4試行の場所学習課題訓練を4日間行った。被験体は、4カ所(図8の1, 2, 3, 4に相当する)の出発点からランダムな順序で、水迷路の外側に頭を向けて水迷路内に投入された。プラットホームの位置は、4日間水迷路内

の東側(図8のEに相当する)の位置(図8のZone3に相当する)に固定された。1試行は最大90秒とし、90秒以内にプラットホームに辿り着いた場合は15秒間そのまま放置し、90秒経過しても辿り着かなかった場合は実験者が手でプラットホームまで誘導し、そこで15秒間放置した。従って、ラットは90秒間の場所学習と15秒間のプラットホームの放置の間に周囲の様々な空間的配置を手がかりにプラットホームの場所を学習することになる。

5日目に、4日間の場所学習を習得したかどうかを確認するために、プローベテストを行った。これは、場所学習訓練時にゴールであったプラットホームを取り除いた状態で自由に泳がせ、本来プラットホームがあった領域(図8のZone3に相当する)を泳いでいた時間を調べるテストであった。被験体ごとに1試行のみ行い、時間は60秒とし、出発点はプラットホームの対面(図8参照)とした。

6日目にラットの運動能力や視覚能力を確認するために、手がかり学習を行った。ゴールであるプラットホームの位置を場所学習時の対面(図8のZone1に相当する)とし、水面から1cm見えるように設置した。出発点は場所学習時と同様の4カ所(図8の1, 2, 3, 4に相当する)で4試行行い、1試行の時間も最大90秒で、その後、15秒間プラットホームに放置した。

各試行時のラットの行動は、バイオリサーチ社製のCCDカメラと行動解析プログラムSMARTを用い、ラットの白色と周囲の黒灰色の二値化により自動的に解析し、試行毎のゴールまで泳いだ軌跡、水泳距離、水泳逃避潜時、平均水泳速度、及びプローベテスト試行時の各Zone滞留時間を求めた。また、試行毎に脱糞数を測定した。

結 果

(1) 場所及び手がかり学習訓練時の逃避潜時の比較

1日4試行4日間で計16試行の場所学習課題において、プラットホームへの逃避潜時を各群で調べたところ(図9)、H系群の平均水泳潜時は試行を重ねる毎に短くなる傾向が認められたが(1日目から4日目の4試行平均潜時はそれぞれ60.7sec, 44.3sec, 32.5sec, 29.2sec)、統制群であるW系群に比べて訓練初期から潜時が長くなっており、訓練後半においてもほとんどの試行で有意な潜時の延長が認められた(図9A)。それに対して、L系群は訓練初期(2試行目と3試行目)には潜時が有意に延長していたが、1日目の1試行から4試行にかけての平均水泳潜時は急速に短くなり(1試行目78sec, 4試行目30sec)、訓練が進むにつれて(2日目から4日目の4試行平均潜時はL系群でそれぞれ31.5sec, 18.5sec, 14.6sec, W系群は22.1sec, 13.1sec, 7.8sec)W系群との間で有意差は認められず、潜時の短縮が観察されプラットホームにほぼ直線的にゴールしていた(図9B)。H系群とL系群との比較では(図9C)、H系群

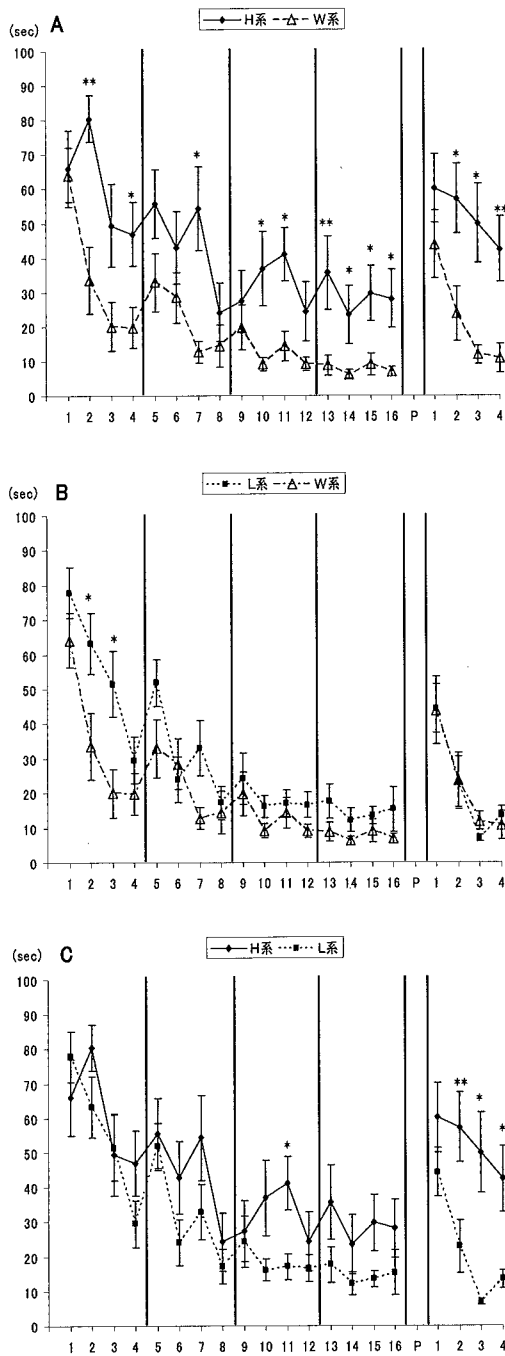


図 9 各群の平均逃避潜時の変化

A, B, CはそれぞれH系群とW系(統制群), L系群とW系群, H系群とL系群を比較した試行毎の平均逃避潜時(±SE)を示す。横軸の数字(1~16)は毎日4試行で4日間の場所学習で,縦棒が日間を示す。Pは5日目のプローベテストで,最後の4試行は6日目の手がかり学習を示す。*, **は各試行毎に両群間でMann-Whitney Uテストを行った結果で,それぞれ $p < .05$, $p < .01$ を示している。以下の図の表示も同様である。

がほぼ全ての試行で潜時の増大傾向を示していたが, 11試行目(3日目の3試行目, $p < .05$) 以外は分散が大きく有意差は認められなかった。

また全ての系統群において, 5, 9, 13試行目の平均水泳潜時は, 場所学習2~4日目それぞれの最初の試行であるため, 前日最後の試行よりも潜時が長くなる傾向が認められた。しかし, 訓練後半にかけては(図9Bの13試行目), L系群とW系群のこの日間変動幅は小さくなっていた。

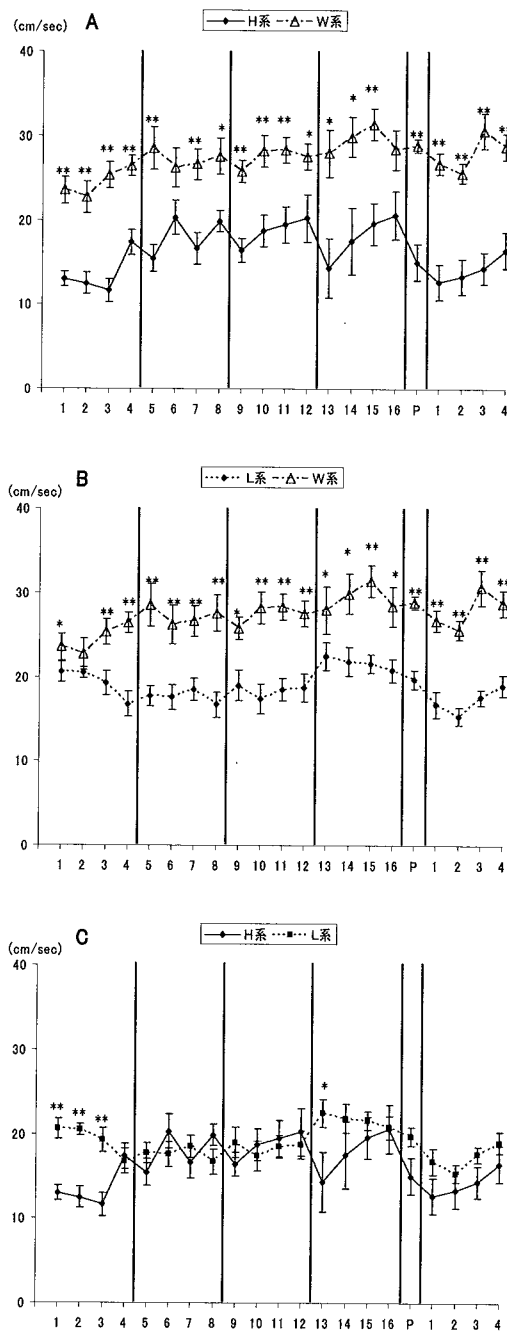


図 10 各群の平均水泳速度の変化

A, B, CはそれぞれH系群とW系群, L系群とW系群, H系群とL系群を比較した各試行毎の平均水泳速度 (cm/sec) (±SE) を示す. 他は図9を参照.

一方, 手がかり学習訓練においては, H系群はL系及びW系群に比べて, 1試行目以外, 有意に逃避潜時が長くなっており (図9A, 9C), しかも, 場所学習終了時よりもさらに潜時が延長していることが判明した. 一方, L系群はW系群と比べて全ての試行間で有意差は認められず, W系群と同様に試行とともに潜時の短縮が観察された (図9B).

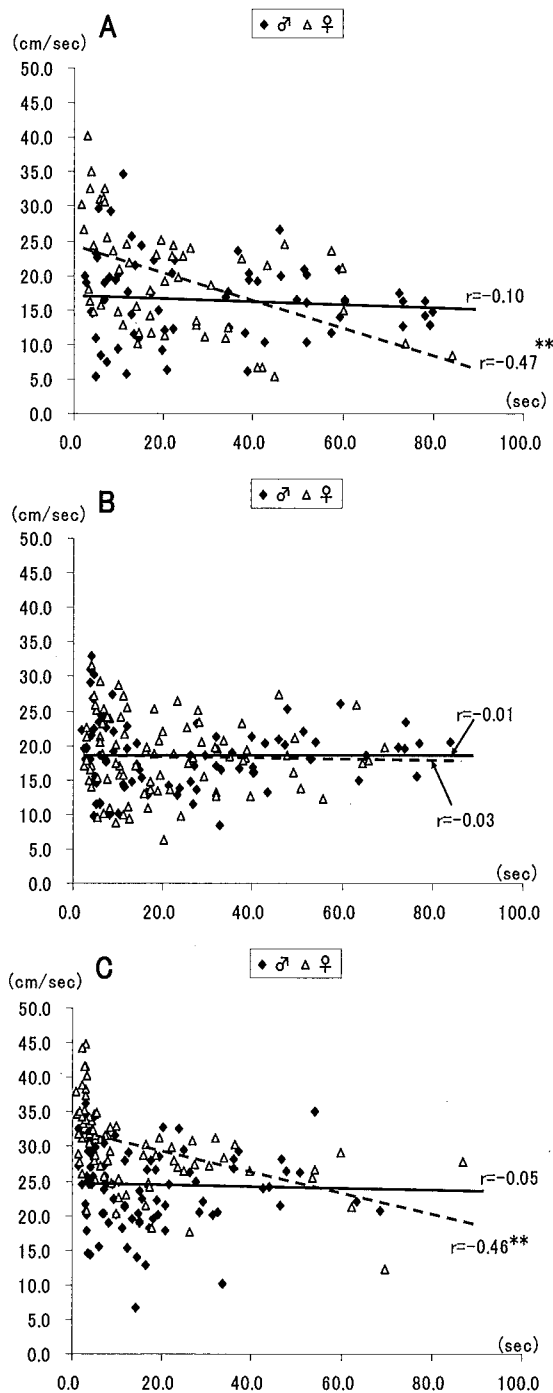


図 11 各群の逃避潜時と水泳速度との相関

A, B, C はそれぞれ H 系群, L 系群, W 系群の♂♀各個体の逃避潜時(横軸)と水泳速度(縦軸)の関係を示す。実線と点線はそれぞれ♂と♀の回帰直線を示す。r はそれぞれの相関係数で、** は t 検定による $p < .01$ を示す。

(2) 各群の水泳速度の特徴

各試行での水泳距離を水泳時間(90sec 或いはプラットホームまでの逃避潜時)で割った平均水泳速度(cm/sec)を求めたところ、場所学習時、プローベテスト時及び手がかり学習時のすべての課題において、ほとんどの試行で H 系群及び L 系群の水泳速度は W 系群に比べて有意に遅い結果となった(図 10A, 10B)。

統制群としての W 系ラットは訓練が進むにつれて漸増的速度変化を示していた(1日目から4日目の平均水泳速度はそれぞれ 24.5, 27.2, 27.5, 29.4cm/sec)が, H系群は1日目の平均水泳距離が最も短く(1271.5 cm), しかもH系群の訓練1日目の水泳速度は最も遅かった(13.6cm/sec, 図10A, 10C). その後, 速度が増しほぼ一定を保つ傾向が見られた(2日目から4日目の平均速度はそれぞれ 18.1, 18.7, 18.0cm/sec, 図10A). それに対して, L系群の1日目の平均水泳距離は最も長く(1830.9cm), 水泳速度はW系群より遅いものの場所学習課題を通じてほぼ一定を保っていた(1日目から4日目の平均速度はそれぞれ 19.3, 17.6, 18.4, 21.7cm/sec, 図10B).

手がかり学習課題遂行時においても, 同様のパターンを示し, H系群とL系群との間には有意差は認められず(それぞれ 14.2, 17.2cm/sec), 両系統群ともW系群(27.9cm/sec)と比べて有意に速度が遅かった($p < .01$).

次に, 場所学習時の水泳行動の詳細な特徴を明らかにするために, プラットホームへ逃避が成功した試行での逃避潜時とそのときの水泳速度との相関関係を調べた結果(図11), H系群はW系群と類似した水泳パターンを示していた(図11A, 11C). すなわち, 逃避潜時が短くなると水泳速度が増すという負の相関関係が得られ, 特に, 両系統群の雌ラットで有意な負の相関が認められた(H系雌群 $r = -0.47$, W系雌群 $r = -0.46$, ともに $p < .01$). 但し, 雄ラットは両系統群ともに有意な相関関係は認められなかった(H系雄群 $r = -0.10$, W系雄群 $r = -0.05$). しかしながら, L系群は雌雄とも有意な相関は認められなかった(L系雄群 $r = -0.01$, L系雌群 $r = -0.03$, 図4B). 従って, 図10のH系群とW系群で見られた, 場所学習訓練の進行に伴う水泳速度の増加傾向は主に雌ラットの行動特徴を表していたことが判明した.

(3) プローベテスト時の比較

4日間の場所学習終了後, 5日目に場所学習習得の正確性を確認するためにプラットホームを取り除くプローベテストを行い, 本来プラットホームがあったZone(今回はZone 3)での滞留時間割合(%)を各群で比較した(図12).

その結果, H系群はW系群と比べて有意差は認められなかったが, Zone 3の滞留時間割合が少なく(28.1%), Zone 1(29.1%)とZone 4(26.3%)で多い傾向が見られた(図12A). それに対して, L系群はW系群と同等あるいはそれ以上にZone 3の割合が多く(L系群 42.8%, W系群 34.6%, 図12B), H系群と比較すると有意に($p < .05$) Zone 3の滞留時間割合が多く, Zone 4(12.6%)で少ない結果となった(図12C).

さらに, プローベテスト60秒間で移動した総水泳距離を求めたところ(図13), H系群が最も短く, L系群との間には有意差は認められなかったが, W系群と比

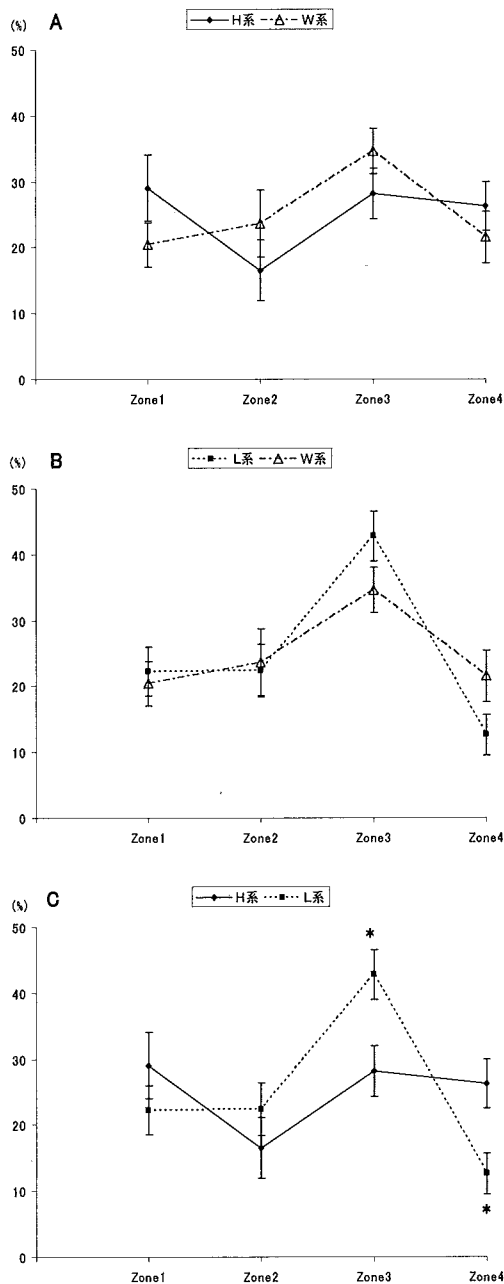


図 12 各群のプロベテスト時の各 Zone 滞留時間の割合

A, B, C はそれぞれ H 系群と W 系群, L 系群と W 系群, H 系群と L 系群を比較したプロベテスト時の平均滞留時間割合 (%) (±SE) を示す. Zone3 が場所学習時に逃避用プラットフォームがあった位置である.

べて L 系群とともに有意に水泳距離が短かった ($p < .01$).

これらの結果をまとめると, H 系群はプロベテスト時の出発点である Zone 1 周辺に留まっておりほとんど移動していないラットが多かったことを示していた. それに対して, L 系群は W 系群より水泳速度が遅かったために水泳距離は短くなったが, Zone 3 での滞留時間の割合が W 系群より多かったことから, プラットホームの場所をより正確に習得していることが考えられた.

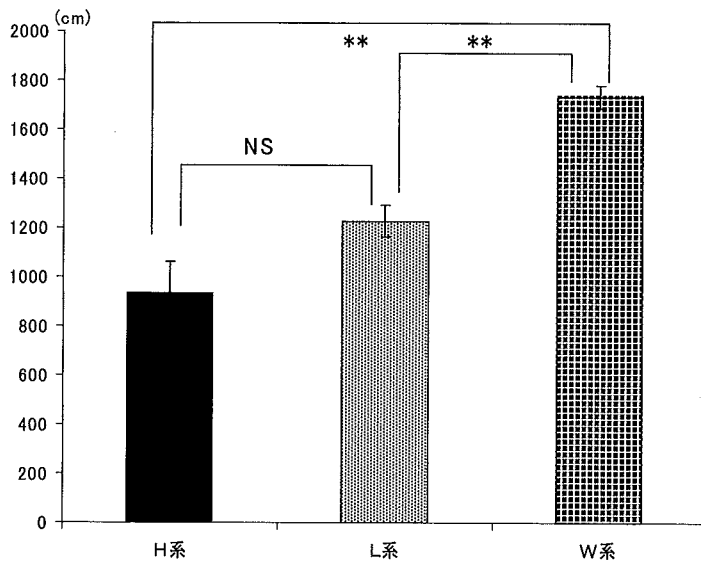


図 13 プローベテスト時の総水泳距離

プローベテスト時 60 秒間の総水泳距離 (cm) (±SE) を示す. **, NS は各群間で Mann-Whitney U テストを行った結果で, それぞれ $p < .01$, non-significant を示している.

考 察

本実験は, Tsukuba 低情動系 (L 系) ラットで観察された空間学習障害の実態を明らかにするために, Tsukuba 高情動系 (H 系) ラット及び統制群としての雑種 Wistar 系 (W 系) ラットを比較対照としながら, モーリス水迷路課題による空間学習過程の詳細を観察した. その結果, 場所学習時に訓練が進むにつれてプラットホームまでの逃避潜時が L 系ラットは W 系ラットと同様の経過をたどり有意差は認められなかった (但し, 訓練初期においては L 系ラットの潜時の延長が認められた). また, プローベテスト時の本来プラットホームのあった Zone での滞留時間においても有意差は認められず, むしろ W 系ラットより滞留時間が長い傾向が認められ, L 系ラットのほうがプラットホームの場所をより正確に学習していた可能性が考えられた.

水迷路課題は迷路外のような視覚的刺激など周囲の環境 (例えば, 実験者やポスターなど) を手がかりにプール内の 1 箇所を設置した不可視状態のプラットホームを見つけ出す空間認知能力を測定するもので, 参照記憶を必要とする課題と言われている. 一方, 放射状迷路課題は, 周囲の視覚的刺激が同様に手がかりとなるが, 選択したアームを一旦覚えておく作業記憶と装置が置かれた全体の環境やアーム先端に報酬である餌があるという参照記憶が必要となるものである (岩崎ら, 1981; 岩崎&平賀, 1986). 上述したように, L 系ラットは 8 方向放射状迷路による空間学習において顕著な学習障害を示すことは明らか

となっている。従って、本実験での水迷路課題による結果から、L系ラットの空間学習障害は主に作業記憶の障害がその背景にあることが示唆された。

一方、本実験においてH系ラットの参照記憶障害を思わせる結果が観察された。すなわち、場所学習訓練を重ねてもプラットホームまでの逃避潜時が有意に延長し続け、プローベテスト時においても滞留時間が有意に短い結果が得られた。しかしながら、H系ラットのストレス耐性の脆弱性が最近示唆されており（野村，2008，；山下，2008），水などの嫌悪刺激がH系ラットにとってストレスサーとなり，そのことが水迷路学習の習得を阻害したと考えられる。さらに，プラットホーム可視条件での手がかり学習においても逃避潜時の有意な延長が認められたことから，H系ラットで見られた学習障害は明らかに冷水のストレスによる二次的影響であったと考えられた。水迷路課題はもともと水の嫌悪刺激から逃れることを学習するものであるから，今後は，H系ラットの参照記憶能力を正確に測定するためには水迷路以外の装置（例えば，8方向放射状迷路）を用いた実験手続の工夫が必要であると考えられる。

平成20年度 要 約

本年度は，Tsukuba 情動系ラットの中で，特に，Tsukuba 低情動系（L系）ラットの空間認知能力を検討する目的で，2種類の空間学習課題を実施した。まず，作業記憶と参照記憶を必要とする8方向放射状迷路を用いた課題において，L系ラットの明瞭な空間学習障害の証拠が得られた。すなわち，L系ラットは，Tsukuba 高情動系（H系）ラットに比べて，学習成立までの試行数が有意に延長し，また，各試行での8選択ないしは最大16選択するまでの所要時間が，第1試行と第2試行を除いた他の試行で常に長く，全選択数や誤選択数も多い傾向が認められた。この段階では，L系ラットの空間学習障害は作業記憶と参照記憶のどちらの障害であるかに関しては不明であった。そこで，次に，参照記憶のみを必要とするモーリス水迷路による課題を行った。その結果，場所学習訓練時，L系ラットのプラットホームまでの逃避潜時は，統制群として用いた雑種のWistar系（W系）ラットと同様の経過をたどり，両群間で有意差は認められなかった。また，プローベテスト時においては，本来プラットホームのあったZoneでの滞留時間がW系ラットより長い傾向が認められ，L系ラットのほうがプラットホームの場所をより正確に学習している可能性が考えられた。以上のことから，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，主に，作業記憶の障害であることが明らかとなった。

《平成 21 年度研究成果》

Tsukuba 低情動系ラットの多動性に注目した行動解析

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, et al, 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の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, 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学習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, オープンフィールド内での一般活動性を解析し, L 系ラットの多動性について再確認すると同時に, 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

まず, オープンフィールド内での一般活動性の解析には, 30 日齢・60 日齢・90 日齢の H 系ラットと L 系ラットの雄雌それぞれ 6 匹ずつ, 合計 72 匹を用いた.

装置は, ラワン材を用いた自製のオープンフィールド (内径 80cm×80cm の正方形で, 高さは 30cm) を用いた. また, 内・外側ともにグレーのペイントで塗装されており, 内側は 20cm×20cm の正方形 16 区画に黒のペイントで区切られ, 区画の中央には白色のシールに黒文字で区画番号が貼ってあった. この区画の中心をスタート地点とした.

手続きは, オープンフィールドの中央にラットを置き, 5 分間の通過区画数 (Ambulation), 立ち上がり行動 (Rearing), 洗顔行動 (Face Washing), 毛づく

ろい行動(Grooming), におい嗅ぎ行動(Sniffing), 脱糞(Defecation), 脱尿(Urination)の回数を記録すると同時にビデオ録画し, 走行軌跡を描き走行距離を測定した. なお, 通過区画数については, 尻尾の付け根部分を基準とし, 通過した区画数をカウントした. Rearing については, 壁に前足をかけ立ち上がっている状態のものも含めた. Sniffing においては, 完全に止まった状態での回数を記録した. この手続きを各日齢の翌日から3日間行った.

次に, 輪回し行動の概日リズム観察実験には, 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(夏目製作所, 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) オープンフィールド内での行動解析

図1は, 実験時に記録された90日齢の走行軌跡の一例である. L系ラットの

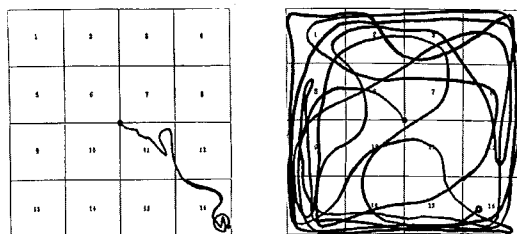


図1. 90日齢の走行軌跡の一例

左がH系ラット、右がL系ラットの例を示している

特徴は、オープンフィールドの中央から素早く走り出し、隅に留まることなく、オープンフィールド内全体を動きまわる傾向が見られた。それに対して、H系ラットは中央からあまり動かず、動いてもオープンフィールドの隅の方へゆっくりと動き、ほとんどフィールド中央に戻ることはなかった。

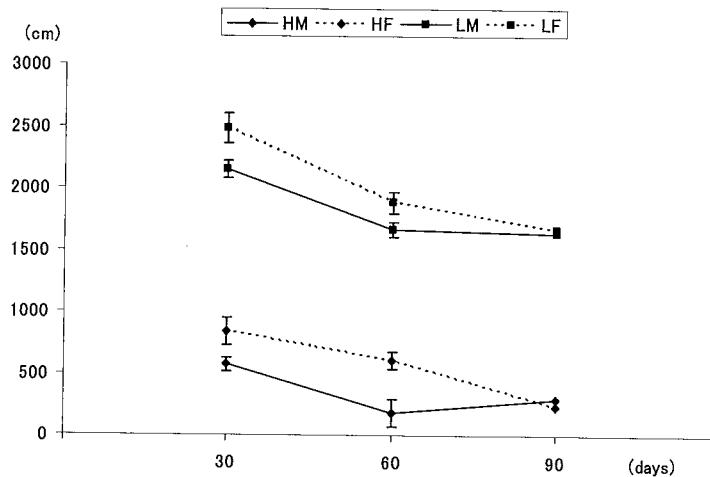


図2. 各群の日齢毎の平均走行距離 (±SE)

HM, HFはそれぞれH系雄, 雌ラット, LM, LFはそれぞれL系雄, 雌ラットを示している

図2は、図1で示した走行軌跡から走行距離を測定し、3日間それぞれ5分間の平均値を示したものである。3要因分散分析を行った結果、L系ラットの走行距離が有意に長く ($F=541.57$, $df=1/60$, $p<.01$), 日齢間においても、幼若期 (30日齢) で有意に長く、その後の発達に伴い減少していた ($F=28.70$, $df=2/60$, $p<.01$)。また、雌が雄より有意に走行距離が長かった ($F=9.63$, $df=1/60$, $p<.01$) が、90日齢ではその差は認められなくなった。

その他の行動について、まず、L系ラットは、Rearing ($F=224.3$, $df=1/60$, $p<.01$) と Face Washing ($F=4.88$, $df=1/60$, $p<.05$) の回数が有意に多かった。その中で、雌ラットの Rearing 回数が有意に多く ($F=8.49$, $df=1/60$, $p<.01$), また、90日齢での Face Washing 回数が有意に多かった ($F=11.54$, $df=2/60$, $p<.01$)。一方、Grooming 回数はH系ラットに比べて有意に少なく ($F=6.73$, $df=1/60$, $p<.05$), 特に、L系雄ラットで顕著であった ($F=8.79$, $df=1/60$, $p<.01$)。また、Sniffing 回数もL系ラットは有意に少なく ($F=340.52$, $df=1/60$, $p<.01$), 発達に伴いさらにその回数が有意に減少していた ($F=235.88$, $df=2/60$, $p<.01$)。但し、この場合の Sniffing 回数は、Rearing 中のものを除いた回数である。

従って、オープンフィールド内でのL系ラットは、中央から素早く走り出し、Rearing を繰り返しながら動き続けており、この傾向は、幼若期 (30日齢) の

雌ラットで顕著であった。また、一時的に止まっても Face Washing を行うのみで、Grooming や止まった状態での Sniffing はほとんど行っていないことが明らかとなった。それに対して、H系ラットはフィールド中央に留まっているか、動いても隅にゆっくり移動し、そこで Grooming や止まった状態での Sniffing を繰り返し、そこからほとんど移動しなくて Defecation も多いことが判明した。

(2) 輪回し行動による概日リズム

① 日間活動の特徴

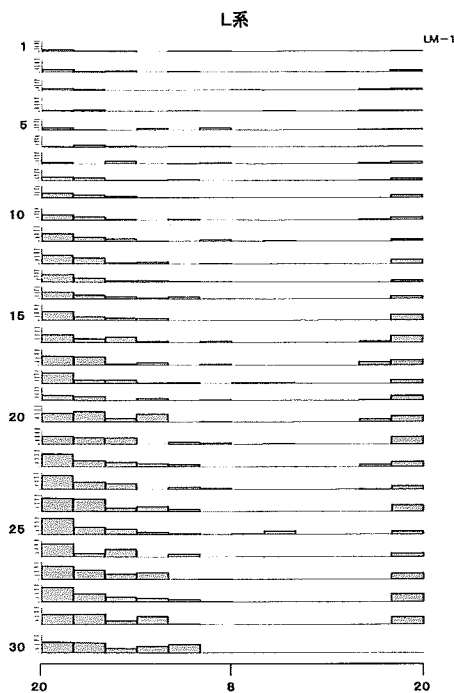


図3. L系ラットの日間概日リズム変動の代表例
 横軸に1日の時間、縦軸に2時間毎の活動量（輪回し回転数）をグラフ化したものを連続30日間縦に重ね書きした。左側（網掛け部分）が暗期（20時～8時）で右側が明期（8時～20時）を示している。LM-1は被験体番号

図3～図5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3）、H系ラット（図4）、W系ラット（図5）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3）は4000回、H系ラット（図4）は700回、W系ラット（図5）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

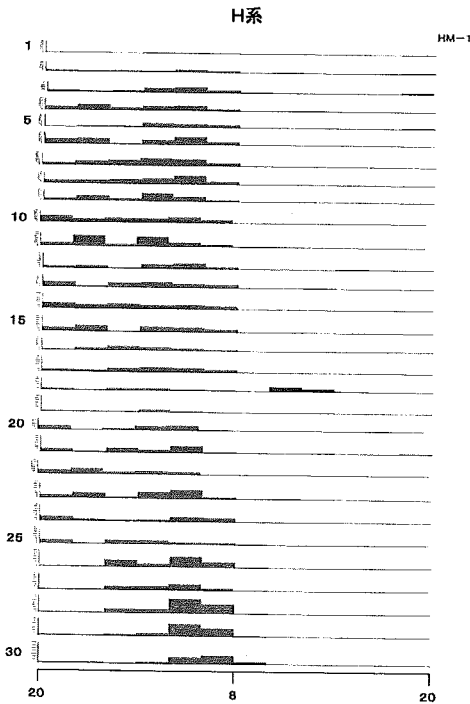


図 4. H系ラットの日間概日リズム変動の代表例

詳細は図 3 を参照, HM-1 は被験体番号

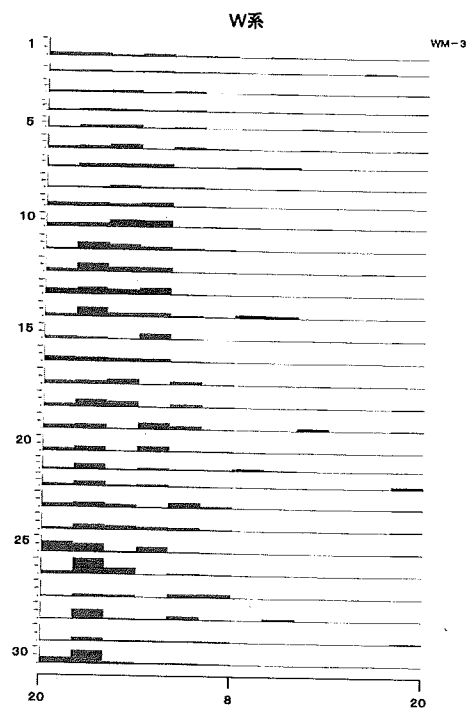


図 5. W系ラットの日間概日リズム変動の代表例

詳細は図 3 を参照, WM-3 は被験体番号

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4)やW系ラット(図5)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5)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($F=17.2$, $df=2/12$, $p<0.01$), L系群は、H系群より有意に延長してした($p<0.01$)。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($p<0.11$)。

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6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

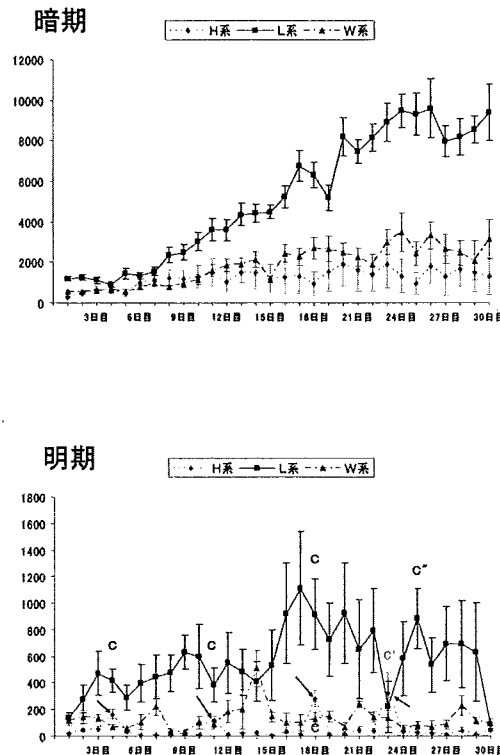


図 6. 各群の平均活動量の日間変動(±SE)

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 ($p<0.01$). しかしながら, H 系群と W 系群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 ($p<0.01$) 及び 3 日目, 5 日目, 8 日目~11 日目, 13 日目~14 日目 ($p<0.05$) 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 ($p<0.05$) 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 6 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 ($F=5.89$, $df=2/12$, $p<0.05$), 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

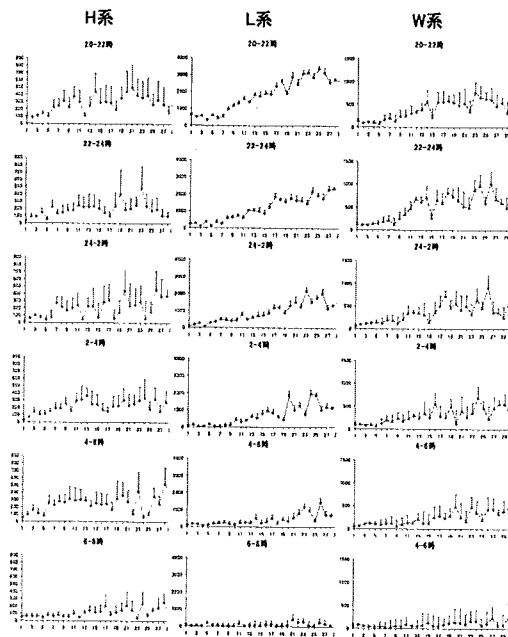


図 7. 暗期での各時間帯毎の平均日間活動 (±SE)

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。

活動量が増加する傾向が観察され (図 6 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 6 の C''), それ以外は一定の傾向は認められなかった (図 6 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 7 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 3～図 5 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 8), 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

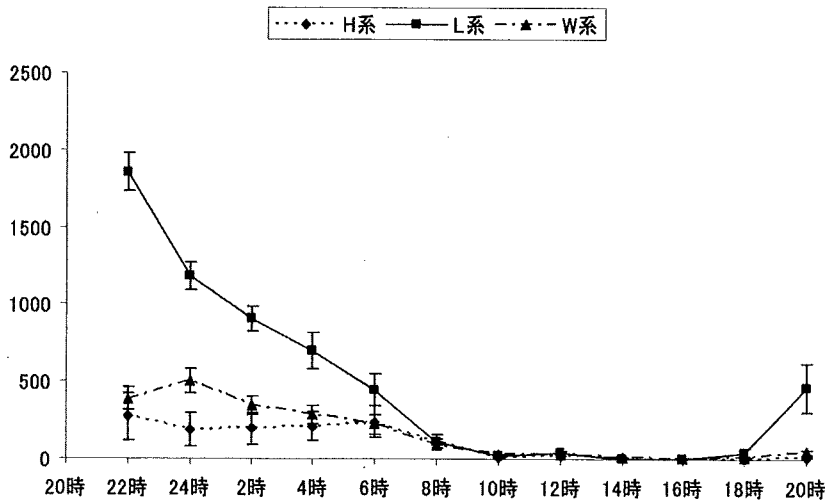


図 8. 時間帯毎の平均日内活動(±SE)

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。

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 ($F=23.74$, $df=2/12$, $p<0.01$)。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 ($p<0.01$)。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 ($p<0.01$) と明期の 12-14 時及び 18-20 時 ($p<0.05$) 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 時と明期の 18-20 時の時間帯 ($p<0.01$)、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 ($p<0.05$) 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 ($p<0.05$) と 16-18 時 ($p<0.01$) 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回数を各時間帯で調べた結果 (図 9)、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: $F=17.83$, $df=10/60$, $p<0.01$, 明期: $F=24.77$, $df=10/60$, $p<0.01$)。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

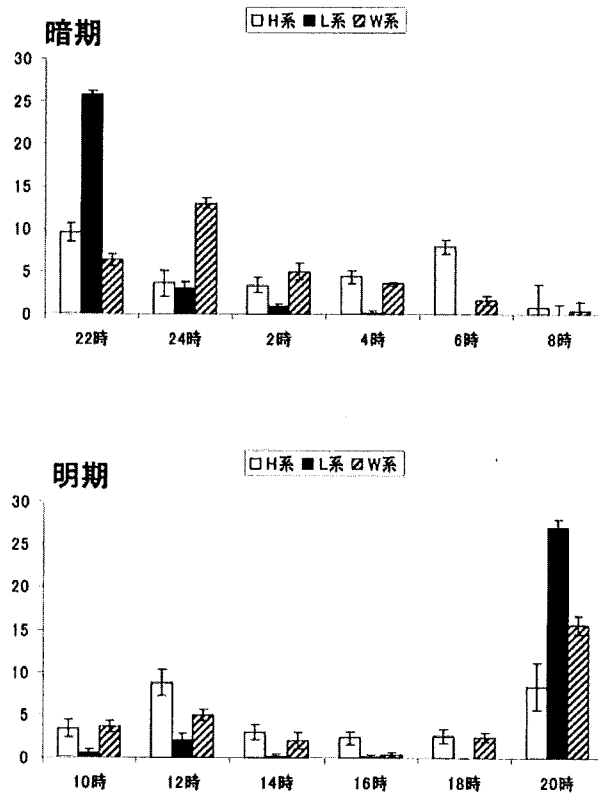


図9. 時間帯毎の活動ピークの平均回数 (±SE)

(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 ($p < 0.01$), 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 ($p < 0.01$).

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 ($p < 0.01$), 2-4時及び4-6時の時間帯は逆にH系群が有意に多い ($p < 0.01$) 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 ($p < 0.01$), 4-6時においてはH系群が有意に多い ($p < 0.05$) 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 ($p < 0.01$) 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 ($p < 0.05$, 但し, 12-14時は $p < 0.01$), W系群とL系群との比較では8-10時 ($p < 0.05$) と14-18時 ($p < 0.01$) 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、低情動系 (L系) ラットの行動特性を明らかにするために、まず、オープンフィールド行動を発達の観点から測定し、さらに、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、L系ラットの多動性が再確認されたが、多動のピークが幼若期 (30 日齢) 頃にあり、その後減少することが明らかとなった。また、概日リズムの実験期間中、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, 本実験で得られた多動な 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.

平成 21 年度 要 約

本年度は, L 系ラットの多動性について再確認するために, オープンフィールド内での一般活動性を解析すると同時に, 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. まず, オープンフィールド内での一般活動性の解析結果から, L 系ラットの多動性が再確認された. しかし, その多動性のピークは幼若期 (30 日齢) 頃にあり, その後減少することが明らかとなった. また, 輪回し行動による長期にわたる概日リズムの観察結果から, 明期においても, H 系ラットや統制群の W 系ラットと比べて明らかに活動量が多く, さらに, 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特異な概日リズムが観察された. 以上のことから, L 系ラットの多動性と特異な概日リズムの背景に, 概日リズムを統制する視交叉上核 (SCN) の機能的及び形態学的変容の可能性が考えられた.

《平成 22 年度研究成果》

Tsukuba 情動系ラットの海馬の形態学的特徴について

はじめに

これまでの研究結果を要約すると、Tsukuba 情動系ラットの特に低情動系 (L 系) ラットで観察された空間学習障害は作業記憶の障害であることが明らかとなった。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)。

そこで、本年度は、平成 20 年度に行った 8 方向放射状迷路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も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 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。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、平成 20 年度の研究報告で述べた同様の手続きで行った。実験終了後、ネンブタール深麻酔下で脳を灌流固定後、50 μ m 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。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 μ m 毎) にデジタルプラン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 μ m と仮定し、吻側極から尾側極ま

での海馬の総面積×200 μm として推定した)を求めた。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。

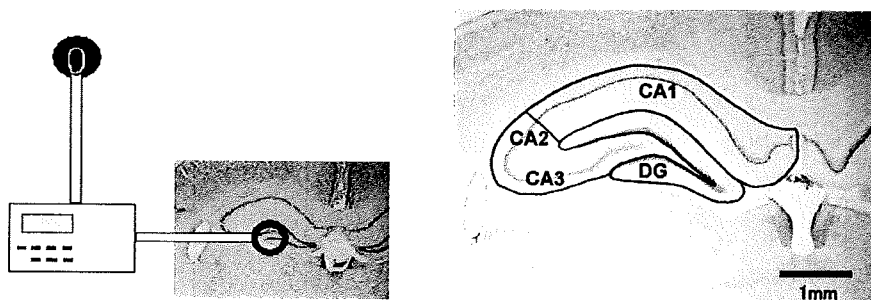


図1. 海馬面積測定方法と測定部位

50 μm のニッスル染色切片を4枚毎に撮影し、デジタルプランメーター(左)で海馬吻側部から尾側部の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、容積を推定した。

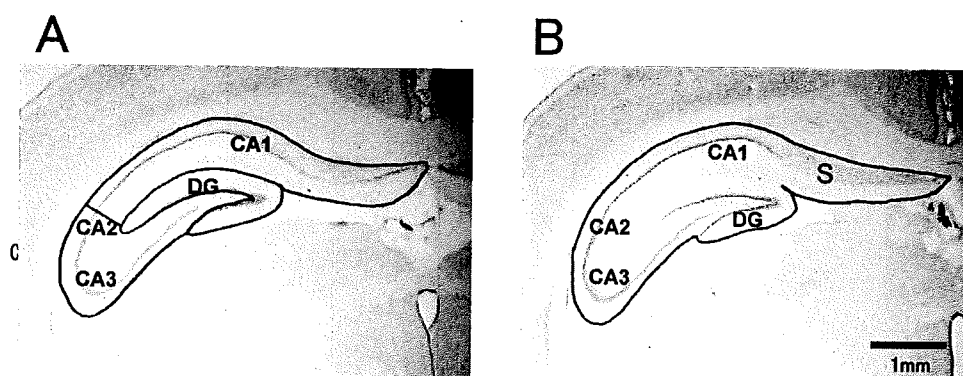


図2. 背側海馬領域設定基準

吻側部の背側海馬は、内側部に海馬支脚(Subiculum:S)が出現(B)するまでとし、そこまでの海馬(A)各領域(CA1, CA2-CA3, DG)の面積を測定した。

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 ± 1.1 試行で、SH群(14.8 ± 1.8 試行)に比べて有意(Mann-WhitneyのUテスト, $p < .05$)。

01) に試行数の増加が認められた (これは平成 20 年度に行ったデータである)。それに対して、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 (±SE) は 16.2 ± 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 ± 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。

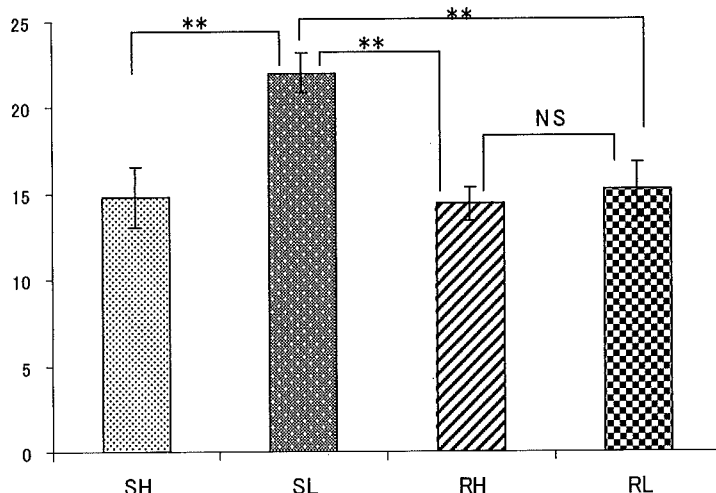


図 3. 各群の空間学習完成までの試行数 (±SE)

縦軸は学習基準に達するまでの平均試行数を示している。SH, SL: それぞれ標準環境飼育H系ラット群, L系ラット群, RH, RL: それぞれ豊環境飼育H系ラット群, L系ラット群のデータである。NS: Non-significant, **: $p < .01$ (Mann-Whitney のUテストによる)

(2) 海馬を中心とした形態学的検索

上記のすべてのラットの摘出された脳について、 $50 \mu\text{m}$ 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 ($0 \mu\text{m}$) から尾側方向約 $2400 \sim 2600 \mu\text{m}$ 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 $2400 \sim 2600 \mu\text{m}$ までということであった。それに対して、SL 群の平均的な背側海馬の範囲は約 $2200 \mu\text{m}$ 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 H 系群に比べて有意に大きかった ($p < .01$)。しかし、これは L 系群の脳自体が大きい (脳重は H 系群に比べて約 $0.1 \sim 0.2\text{g}$ 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大きく、SL群との間に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

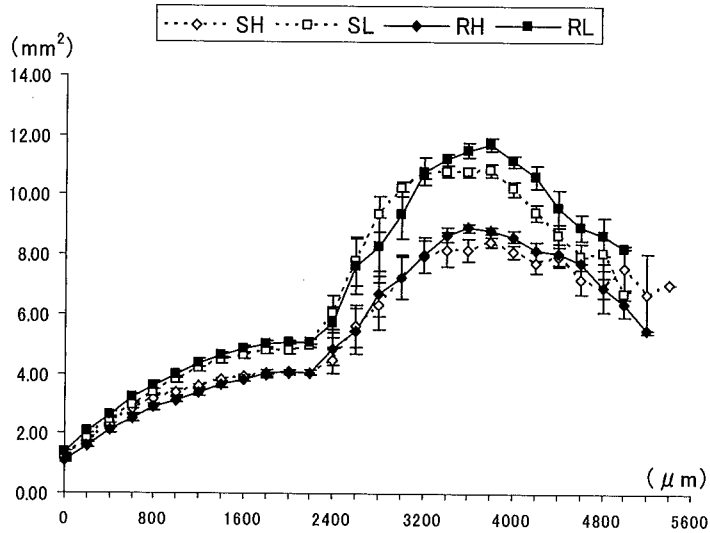


図4. 各群の海馬面積の推移 (±SE)

縦軸は各切片の海馬面積 (mm²) 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。

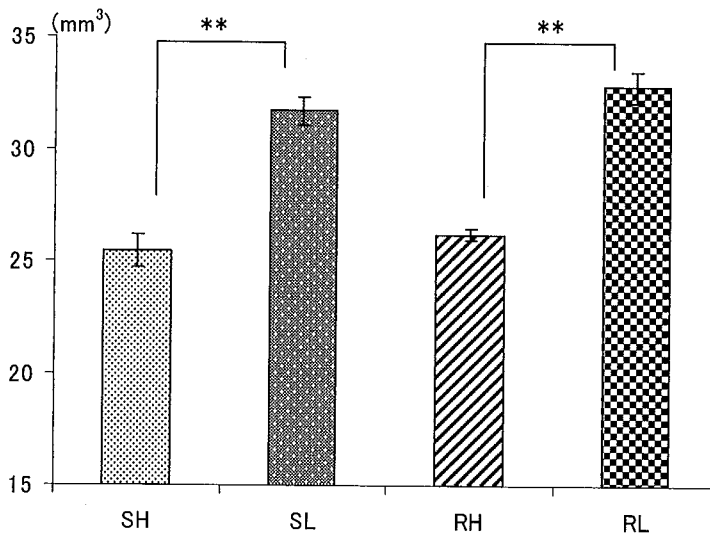


図5. 各群の海馬容積 (±SE)

** : $p < .01$ (Mann-Whitney の U テストによる)

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予測された。

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、図7に示したように、CA1領域の容積比はSL群が最も大きく、SH群に比べて有意に増大していた($p < .05$)。また、図には表示していないが、RH群との差はさらに大きくなっていた($p < .01$)。しかし、

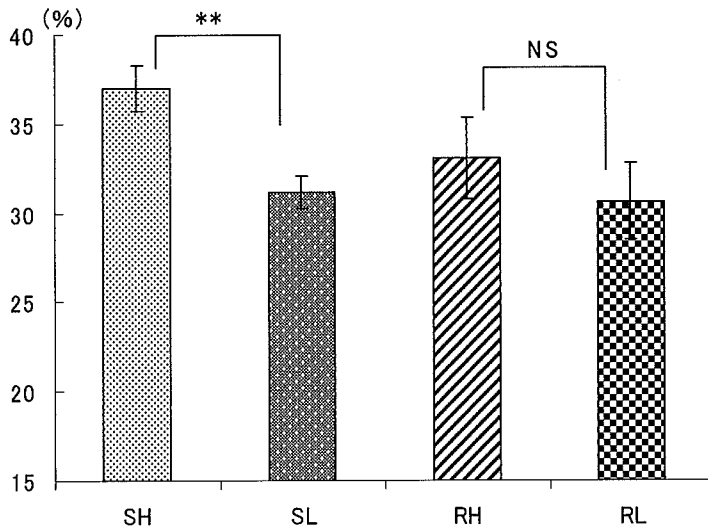


図6. 各群の海馬全容積に対する背側海馬容積の割合(±SE)

NS: Non-significant, **: $p < .01$ (Mann-WhitneyのUテストによる)

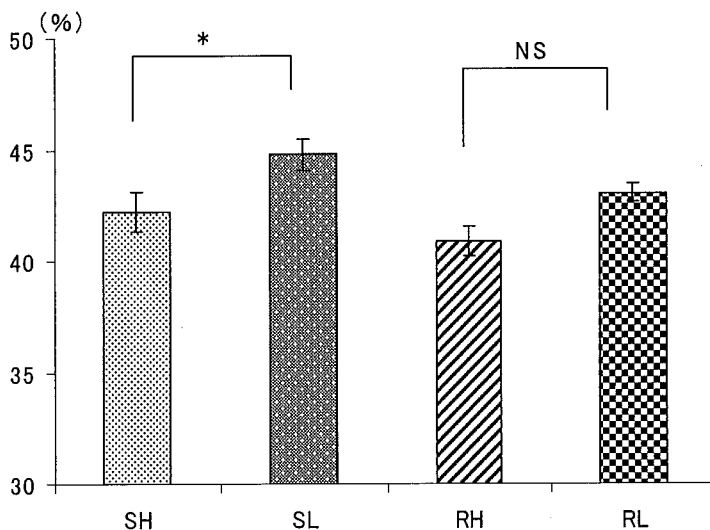


図7. 各群の背側海馬容積に対するCA1容積の割合(±SE)

*: $p < .05$ (Mann-WhitneyのUテストによる)

この場合も飼育環境により有意差は認められなくなった(RH群とRL群の比較)。

それに対して、背側海馬容積に対する歯状回容積比は(図8)、まず、SL群がSH群に比べて有意に減少していた($p < .05$)。飼育環境によりRH群とRL群との差はさらに大きくなっていった($p < .01$)が、SL群とRL群の間にも有意差が認められ($p < .05$)、豊環境によりL系群の歯状回容積が増大していたことが明らかになった。

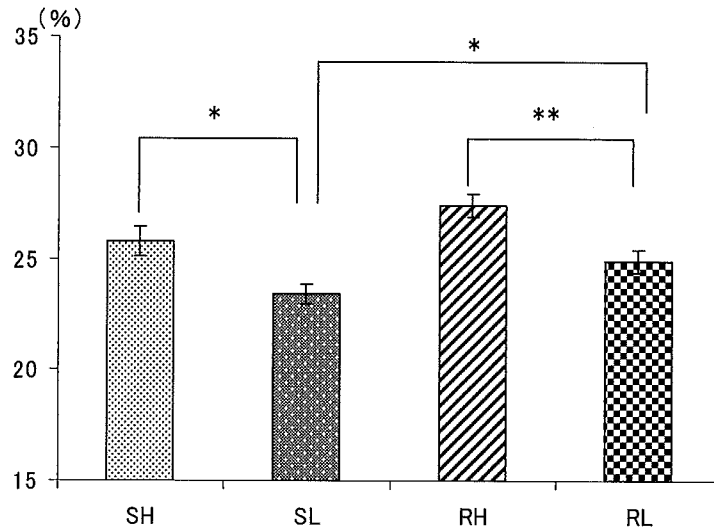


図8. 各群の背側海馬容積に対する歯状回容積の割合(±SE)

** : $p < .01$, * : $p < .05$ (Mann-WhitneyのUテストによる)

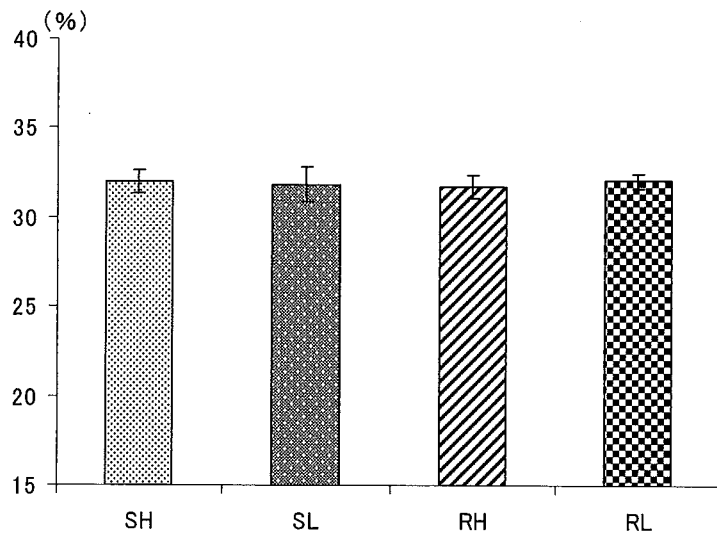


図9. 各群の背側海馬容積に対するCA2-CA3容積の割合(±SE)

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。

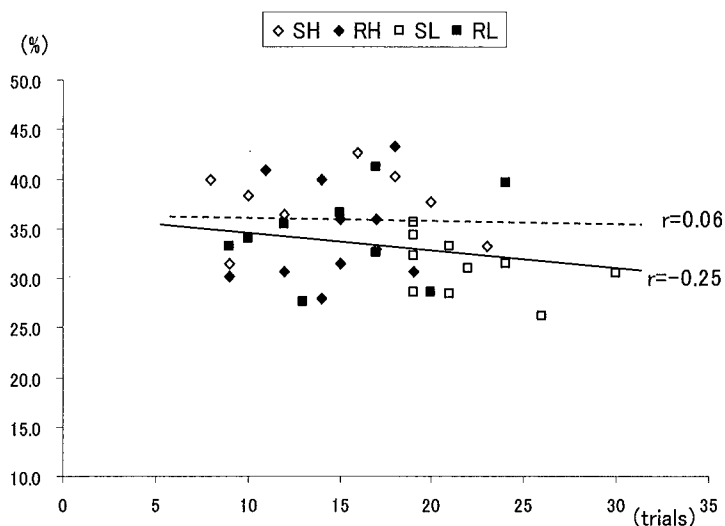


図10. 空間学習成績と背側海馬容積比との相関

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系とL系ラット群の回帰直線と相関係数を示している。

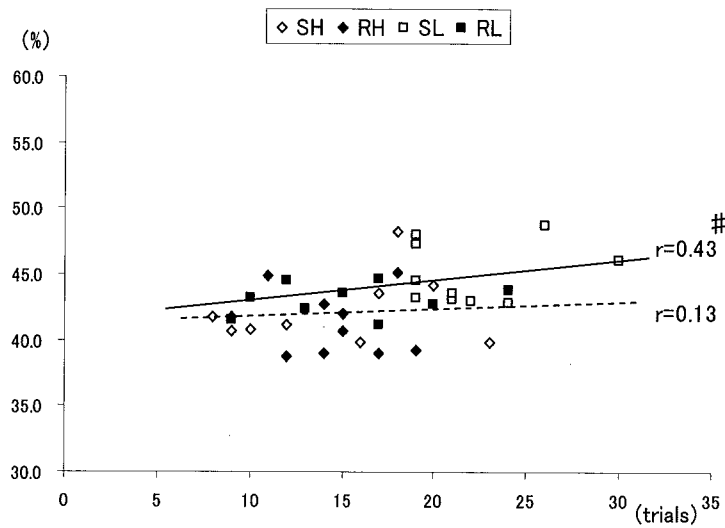


図 11. 空間学習成績と背側海馬 CA1 容積比との相関

: $p < .10$, その他は図 10 を参照.

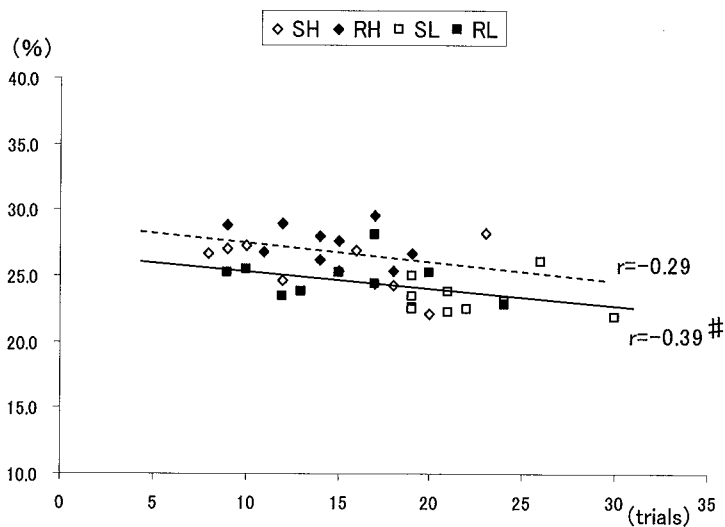


図 12. 空間学習成績と背側海馬歯状回容積比との相関

: $p < .10$, その他は図 10 を参照

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

本年度の結果をまとめると、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、脳に可塑的変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変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.

平成 22 年度 要 約

本年度は, Tsukuba 情動系ラットの中で, 特に, Tsukuba 低情動系 (L系) ラットの空間学習障害と脳内, 特に海馬内の形態学的変容過程との関連を調べ, さらに, 飼育環境条件により, 空間学習や海馬の神経構造にどのような影響が見られるかを検討した. その結果, まず, 豊環境飼育条件での Tsukuba 低情動系ラット (RL 群) の空間学習成立までの試行数が, 標準環境で飼育された Tsukuba 低情動系ラット (SL 群) と比較して有意に減少し, 飼育環境条件により明瞭な学習改善効果が認められた. そこで, これらのラットの海馬の形態学的検索を行った結果, 海馬全体に対する吻側部背側海馬の容積比が SL 群で有意に減少していることが認められ, 特に, SL 群の歯状回容積比が他の群と比べて有意に減少していることが明らかとなった. さらに, L系群 (RL 群と SL 群) の空間学習基準達成までの試行数と歯状回容積比との間に負の相関傾向が認められた. 以上のことから, SL 群で見られた空間学習障害や RL 群での学習改善効果の背景には海馬歯状回を中心とした神経ネットワークが重要な役割を果たしていることが示唆された.

《研究の総括》

本研究は、数十年にわたり選択交配され自然発症的に作製された Tsukuba 情動系ラットの中で特に低情動系（L系）ラットの多動性に注目し、これらのラットの一般活動性や様々な学習習得過程を詳細に観察することにより、L系ラットの多動・学習障害動物モデルとしての妥当性と検討すると同時に、これらの障害発生メカニズムを明らかにすることを目的として、3年間の計画を立てた。

得られた結果をまとめると、L系ラットは作業記憶を必要とする8方向放射状迷路を用いた空間学習課題において明瞭な空間学習障害を示すことが明らかとなった。また、L系ラットの多動性に伴い特異な概日リズムが観察され、L系ラットの多動・学習障害モデルの妥当性が確認された。そこで、空間記憶にとって重要な海馬を中心とした形態学的検索を行った結果、海馬全体に対する吻側部背側海馬の容積比がL系ラットで有意に減少しており、特に、歯状回容積比が他のラットと比べて有意に減少していることが判明した。さらに、L系ラットの空間学習成績と歯状回容積比との間に負の相関傾向が認められた。従って、空間学習障害の背景に、背側海馬歯状回の形態学的変容が示唆された。

そこで今後は、L系ラットの海馬を中心とした大脳皮質や脳幹部位との神経ネットワークを詳細に調べる必要がある。また、概日リズムを統制する視交叉上核や運動制御に関連する黒質などもL系ラットで縮小傾向が認められており、これらの部位も含めて、L系ラットの多動・学習障害の背景となる脳内神経ネットワークを広範囲に検討することが必要であると考えられる。

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: interconnectivity 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
- 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
- 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

- 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
- 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
- 片山尊文・藤田統・原正隆・宮本邦雄・, 鎌塚正雄, 高・低情動反応性系ラットの行動比較(14) 能動的回避学習, 日本心理学会第 42 回大会発表論文集, 400-401, 1978
- 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
- 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
- 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
- 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, p 56, 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
- 宮本邦雄・藤田統, 高・低情動反応性系ラットの行動比較(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
- Morris, R. G. M., Garrud, P., Rawlins, J. N. P. & O'Keefe, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683, 1982
- 村上昇, アシヨフの法則, 時間生物学事典, 石田直理雄・本間研一編, 48-49, 2008
- 野村将太, Tsukuba 情動系ラットにおける妊娠期ストレスが子ラットの空間学習に及ぼす影響-8 方向放射状迷路を用いた検討-, 2008 年度仁愛大学心理学科卒業論文要旨集, 122, 2008
- 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
- Okaichi, Y. & Okaichi, H. Effects of glucose on scopolamine-induced learning deficits in rats performing the Morris water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 74, 65-79, 2000
- 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
- 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
- Toradotter, 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
- 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
- 山下大輔, Tsukuba 情動系ラットにおける妊娠期ストレスが子ラットの学習行動に及ぼす影響-T 迷路明暗弁別課題による検討-, 2008 年度仁愛大学心理学科卒業論文要旨集, 123, 2008
- 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, 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
- 吉田和典, 梅田亜沙子, 梶本尚江, Tsukuba 低情動系ラットの空間学習障害と海馬内の形態学的変容との関連, 生理心理学と精神生理学, 25(2), 206, 2007