

Morris 型水迷路による Tsukuba 高・低情動系ラットの空間学習過程

吉田 和典*

はじめに

Tsukuba 情動系ラットとは、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(High-emotional strain; H系)ラットと明所でも多動な低情動系(Low-emotional strain; L系)ラットに分離され、情動反応性に関して遺伝的に近交系ラットとして確立している系統である。これらのラットの行動特性として、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、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報告されている(岩崎 & 藤田, 1979; 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

1. 被験体

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ヵ月になったものを用いた。被験体は、室温約24℃(±2℃)、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。

2. 実験日時・場所および状況

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。

本研究は、平成20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年の小林茜氏、伊部香里氏、佐々木智佳氏、河辺美奈子氏ら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。

* 仁愛大学人間学部心理学科

3. 実験装置および実験配置

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 のところに直径 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 1)。

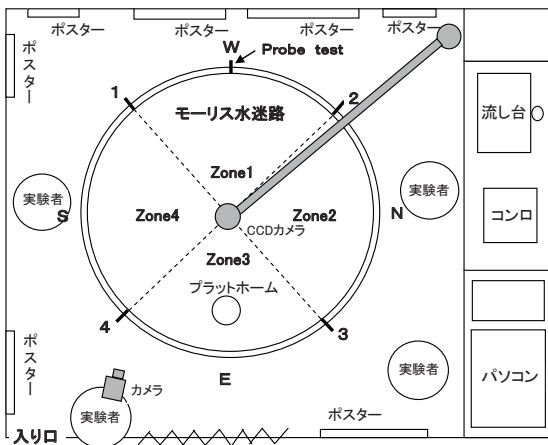


図 1 モーリス型水迷路の平面図と実験室の配置

モーリス型水迷路上の数字 (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。

4. 実験手続き

① 予備訓練

実験開始前の 4 日間、慣れさせるためにハンドリ

ングを行った。毎日のハンドリングの時間はそれぞれ 5 分間とした。

② 場所学習課題

1 日 4 試行の訓練を 4 日間行った。被験体は、4 カ所 (図 1 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 1 の E に相当する) の位置 (図 1 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。

③ プローベテスト

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、5 日目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 1 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 1 参照) とした。

④ 手がかり学習課題

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 1 の Zone 1 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 1 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。

5. 測定指標

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 2), 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 2A)。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はほぼ直線的にゴールしていた (図 2B)。H 系群と L 系群との比較では (図 2C), H 系群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 2B 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った。

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 2A, 2C), しかも, 場所

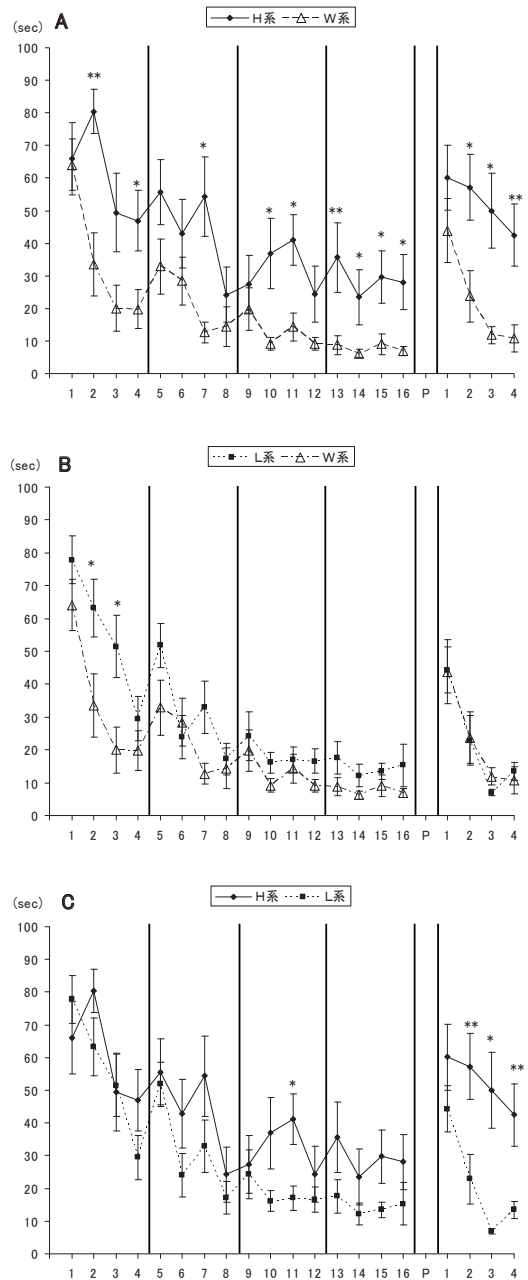


図 2 各群の平均逃避潜時の変化

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 (\pm 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。

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2B)。

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3A, 3B)。

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(1271.5cm)、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3A, 3C)。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3A)。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3B)。

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4)、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4A, 4C)。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

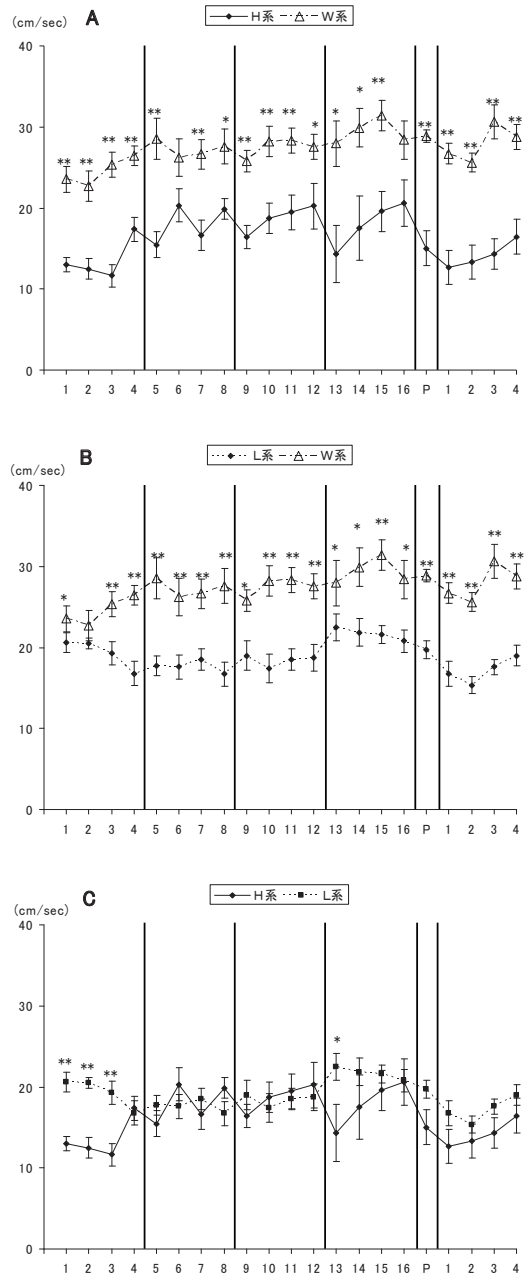


図3 各群の平均水泳速度の変化

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) (\pm SE)を示す。他は図2を参照。

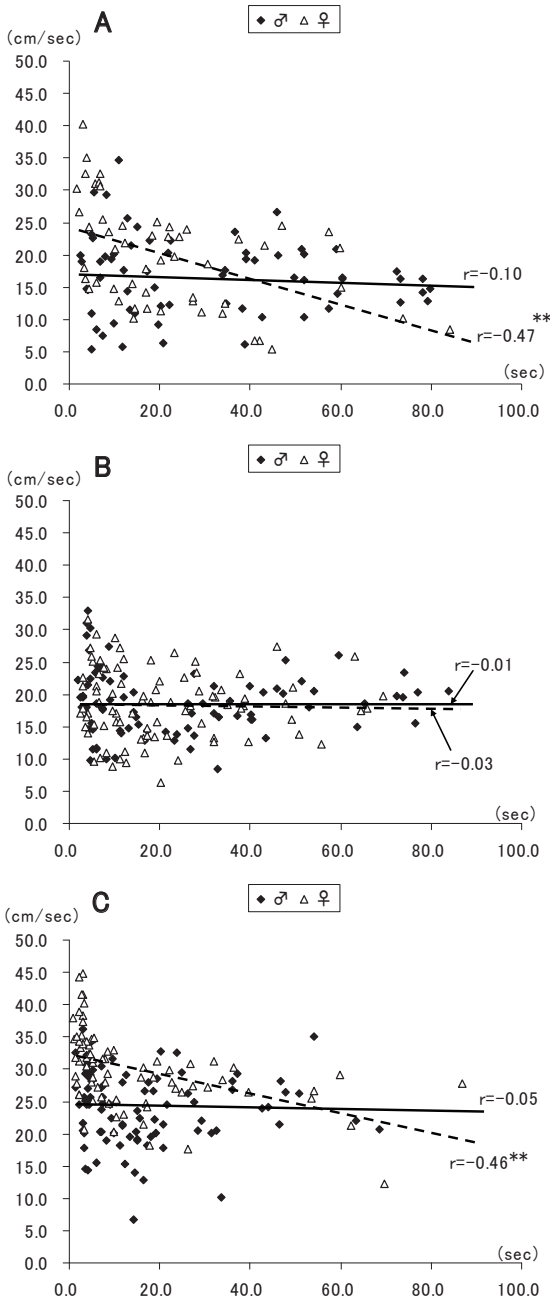


図4 各群の逃避潜時と水泳速度との相関

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 $p < 0.01$ を示す。

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3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5)。

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5A)。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5B), H系群と比較すると有意に($p < 0.05$)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5C)。

さらに, プロベテスト60秒間で移動した総水泳距離を求めたところ(図6), 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系群と比べてL系群とともに有意に水泳距離が短かった($p < 0.01$)。

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。

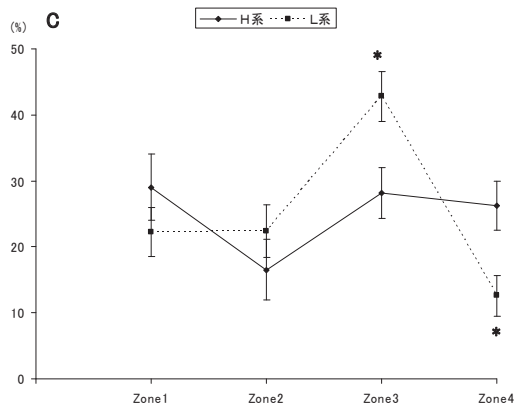
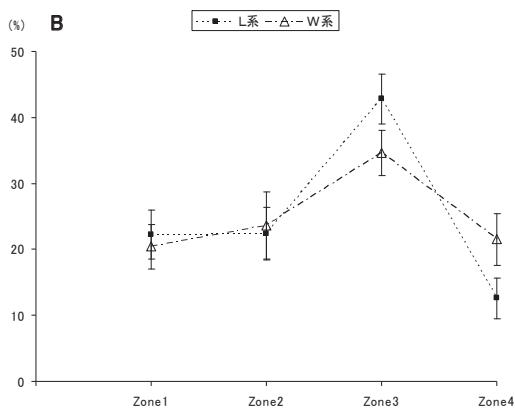
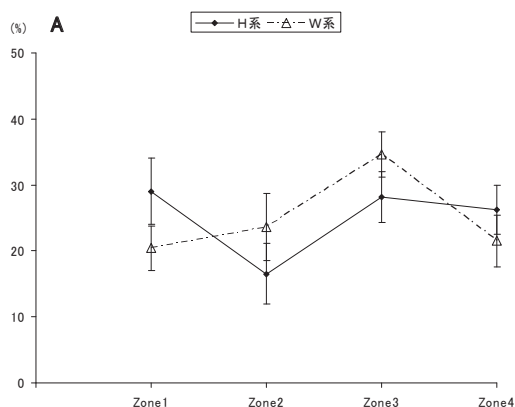


図5 各群のプローベテスト時の各Zone 滞留時間の割合

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ー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ホームがあった位置である。

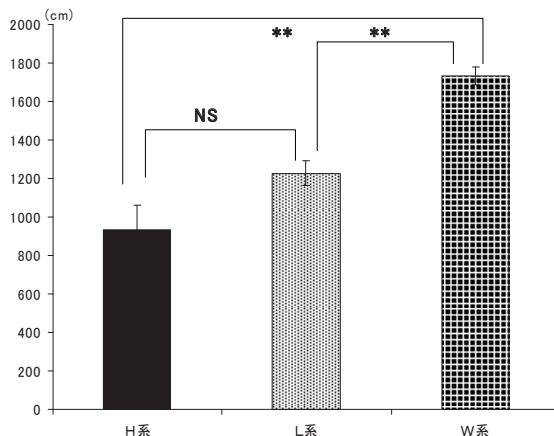


図6 プローベテスト時の総水泳距離

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 $p < 0.01$, 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(吉田, 2007)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様々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箇所に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(吉田, 2007). 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.

一般的に, 記憶を担っている脳部位は海馬であることはよく知られている(Corkin, et al, 1997; Beatty, 2001; 吉田ら, 2005). また, 作業記憶や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報告がある(Olton, et al, 1978; 岩崎ら, 1981; Kawabe, et al, 1998; Kawabe, et al, 1998; Nonaka, et al, 1998; 吉田ら, 2007). これらのことから, L系ラットの海馬においても何らかの機能的及び形態学的変容が生じていることが考えられる. 海馬内の形態学的変容に関しては, L系ラットの海馬歯状回の容積がH系ラットに比べて有意に小さくなっており, 歯状回の容積と空間学習障害の程度(この場合は, 学習基準に達するまでの試行数)との間に負の相関関係があることが認められている. 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示唆されている(川越, 2006; 吉田ら, 2007). 海馬歯状回の顆粒細胞は生後も細胞新生(neurogenesis)が見られ, 様々な環境刺激によりさらに増え続けることがよく知られている(Praag, et al, 2002; Yanai et al, 2008). 従って, 海馬歯状回の顆粒細胞が作業記憶にとって重要な働きを持っており, L系ラットの歯状回顆粒細胞は何らかの原因で細胞新生が抑制されていたことが推察された.

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.

以上, 本実験結果を要約すると, L系ラットの空間学習障害は作業記憶の障害であり, その背景となる脳内メカニズムに海馬歯状回顆粒細胞の細胞新生の動態が大きく関与していることが示唆された. そこで今後は, 新生した細胞を特異的に染色できるブロムデキシウリジン(BrdU)などを用いて(Praag, et al, 2002; Yanai et al, 2008) L系ラットの脳内の詳細な形態学的検索を行う必要がある.

REFERENCES

- Beatty, J. (2001) The human brain; essentials of behavioral neuroscience, Cap. 12, Learning, memory and brain plasticity, 403-435
- Corkin, S., Amaral, D.G., Gonzalez, R.G., Johnson, K. A., & Hyman, B.T. (1997) H. M's medial temporal lobe lesion: findings from magnetic resonance imaging. *The Journal of Neuroscience*, 17(10), 3964-3979
- Fujita, O., Annen, Y. & Kitaoka, A. (1994) Tsukuba high- and low-emotional strain of rats (*rattus norvegicus*): an overview. *Behavior Genetics*, 24(4), 389-415
- 藤田統, 中村則雄, 宮本邦雄, 片山尊文, 鎌塚正雄, 加藤宏(1980) 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
- 岩崎庸男, 藤田統(1979) 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
- 岩崎庸男, 平賀義裕 (1986) 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
- 岩崎庸男, 益田良子, 平賀義裕 (1981) 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
- 片山尊文, 岩崎庸男, 藤田統, 中村則雄, 加藤宏 (1979) 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
- Kawabe, K., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. (1998) Effects of intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, 781, 300-306
- Kawabe, K., Yoshihara, T., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. (1998) Intrahippocampal D-cycloserine improves MK-801- induced memory deficits: radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, 814, 226-230
- 川越未奈子 (2006) Tsukuba 情動系ラットの空間学習成績と脳内の形態学的変容との関連, 2006 年度仁愛大学心理学科卒業論文要旨集, 107
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Rawlins, J.N.P. & O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, 297, 681-683
- 野村将太 (2008) 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
- Nonaka, H., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. (1998) Effects of early postnatal AF64A treatment on passive avoidance response and radial maze learning in rats. *Japanese Journal of Psychopharmacology*, 18, 39-44
- Okaichi, Y. & Okaichi, H. (2000) Effects of glucose on scopolamine-induced learning deficits in rats performing the Morris water maze task. *Neurobiology of Learning and Memory*, 74, 65-79
- Olton, D.S., Walker, J.A., & Gage, F.H. (1978) Hippocampal connections and spatial discrimination. *Brain Research*, 139, 295-308
- Praag, v.H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D. & Gage, F.H. (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature*, 415, 1030-1034
- Yanai, S., Okaichi, H. & Sugioka, K. (2008) Dietary restriction inhibits spatial learning ability and hippocampal cell proliferation in rats. *Japanese Psychological Research*, 50(1), 36-48
- 山口真緒 (2004) 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
- 山下大輔 (2008) 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
- 吉田和典 (2002) 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
- 吉田和典 (2003) 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
- 吉田和典 (2007) 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
- 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 (2005) 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
- 吉田和典, 梅田亜沙子, 梶本尚江 (2007) 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