実験技術

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

永井 拓^{1) 2)}, 田熊 一徹¹⁾, 亀井 浩行³⁾, 溝口 博之¹⁾, 鍋島 俊隆²⁾, 山田 清文¹⁾

要約：実験動物において、空間記憶の評価には放射状迷路試験が汎用されている。放射状迷路を用いた実験方法の中でも delayed spatial win-shift (SWSh) 課題は、遅延反応を使った行動課題の一種であり、遅延時間を挟んで訓練試行と保持試行より成る。動物は訓練試行で得た情報を遅延時間の間保持し、その記憶をもとに保持試行で効率よく報酬を獲得できる。訓練試行は、8本のアーム全てに餌を置き、毎回ランダムに4カ所のアームのギロチンドアを閉め、ラットが残り4カ所すべてのアームに進入して餌を食べるか、5分経過するまで行った。訓練試行後、ラットをホームケージに戻し、一定の遅延時間が経過した後、保持試行を行った。保持試行では全てのギロチンドアを開放し、訓練試行で餌を食べたアームに進入した回数を試行間エラー、保持試行で一度進入したアームに再び進入した回数を試行内エラーとした。訓練試行後、迷路のみを回転させ餌ペレットの空間的位置を変化させない場合にはエラー数は変化しなかったが、迷路と餌ペレットと一緒に回転させ餌ペレットの空間的位置を変化させた場合には試行間および試行内エラー数が顕著に増加した。また、遅延時間を5分から60分まで延長しても試行間エラー数は変化しなかったが、90分以上では有意に増加した。訓練試行に伴う海馬の機能変化を調べると、訓練試行から60分後まではリン酸化 extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) の増加が認められ、120分後にはコントロールレベルに回復した。MAPK キナーゼ阻害薬を海馬内に微量注入すると、試行間エラー数が有意に増加した。以上の結果から、delayed SWSh 課題は空間作業記憶を評価するのに有用であり、空間作業記憶には海馬における

ERK1/2 の活性化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

1. はじめに

記憶の過程は記銘 (encoding)、保持 (retention)、想起 (recall) からなり、どれか1つ欠けても記憶として成立しない。過去の出来事や経験の獲得から起こる行動の変容は学習として表れ、情報の保持と想起は記憶として評価される。記憶は保持時間の長さにより短期記憶と長期記憶に分類される。これまでの研究から記憶の形成に海馬が重要な役割を果たすことが明らかになっているが、特に事実に関する記憶である陳述記憶の形成に必須であることが知られている。ヒトにおいて両側の海馬を含む内側側頭葉を損傷すると過去の記憶は問題なく想起できるが、新たな記憶を形成できなくなり、さらに損傷前1~2年の記憶もなくなってしまう逆行性の健忘を示すことから、海馬は陳述記憶を一定期間保存しておき、それを分類して大脳皮質に送り込み長期記憶を形成するものと考えられている (1)。作業記憶 (working memory) は陳述記憶に含まれ、一時的な情報の認知と貯蔵を司り、同時にその情報処理を行い、次の行動を決定する役目を担っている。

実験動物において、空間記憶の評価には放射状迷路試験および Morris 水迷路試験が汎用されている (2)。放射状迷路試験は餌を用いた報酬性課題であり、Morris 水迷路試験よりもストレスが少なく空間記憶を試験できる方法である。また、放射状迷路課題の中でも、8本のアームの内ある特定の4本のアームの先端に報酬 (餌) をおいた学習課題 (報酬位置固定型課題: fixed-position reward task; FPR) は、「試行内に

キーワード: delayed spatial win-shift 課題, 放射状迷路, 行動, 空間作業記憶, ラット

¹⁾ 金沢大学 大学院自然科学研究科 薬物治療学 (〒920-1192 金沢市角間町)

²⁾ 名古屋大学 大学院医学系研究科 臨床薬物情報学講座医療薬学 (〒466-8560 名古屋市昭和区鶴舞町 65)

³⁾ 名城大学 薬学部 病院薬学 (〒468-8503 名古屋市天白区八事山 150)

e-mail: t-nagai@med.nagoya-u.ac.jp 原稿受領日: 2007年2月23日, 依頼原稿

Title: Behavioral analysis for spatial working memory in rats with a delayed spatial win-shift task in a radial arm maze.

Author: Taku Nagai, Kazuhiro Takuma, Hiroyuki Kamei, Hiroyuki Mizuguchi, Toshitaka Nabeshima, Kiyofumi Yamada

において有効な情報の記憶」である作業記憶と「試行間にわたって有効な情報の記憶」である参照記憶 (reference memory) を同時に独立して測定できる方法である。これまでに我々は、FPR 課題を用いた参照記憶および作業記憶の分子機序として, nitric oxide, brain-derived neurotrophic factor とその受容体 TrkB および phosphatidylinositol-kinase 3 の関与を明らかにしている (3-6)。また, 海馬 CA3 領域が FPR 課題の獲得において重要であることも明らかにした (7)。一方, 放射状迷路を用いた実験方法の中でも空間作業記憶に特化した方法として delayed spatial win-shift (SWSh) 課題がある (8,9)。SWSh 課題は, 遅延反応 (delayed-response) を使った行動課題の一種であり, 遅延時間を挟んで訓練試行と保持試行より成る。動物は訓練試行で得た情報を遅延時間の間保持し, その記憶をもとに保持試行で効率よく報酬を獲得できる。したがって, delayed SWSh 課題は作業記憶の評価に最も適した方法の 1 つである。本稿では, delayed SWSh 課題を用いたラットの空間作業記憶の評価方法について述べると共に, 本実験方法を用いて得られた我々の研究成果について紹介する。

2. 方法

1) 使用動物

実験には入荷時 7 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用した。動物はブラケットケージにて 1 ケージあたり 3 匹ずつ, 室温 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 湿度 $50 \pm 5\%$, 明期 8:45-20:45 の明暗サイクルにて飼育した。水は常に自由に摂取させ, 餌は実験開始 8 日前まで自由に摂取させた。実験を開始する 7 日前よりすべての動物に対して摂食制限を行い, 初期体重の約 80% まで減量させた。摂食制限は実験期間中も継続して行った。

2) 実験装置

実験には高架式 8 方向放射状迷路を使用した。装置は高さ 45 cm で, 中央のプラットフォーム (直径 32 cm) と中央部から放射状に張り出した 8 つのアーム (48×12 cm) からなり, 装置の周りにはラットが装置から落下するのを防ぐために高さ 5 cm の縁がついている (図 1A)。プラットフォームと各アームとの間には脱着可能なギロチンドア (30×11 cm) を装着できるようにした。装置の下には, 装置全体を回転させるための回転テーブル (直径 110 cm) が置いてある。

図 1 Delayed SWSh 課題の概略

A, 8 方向放射状迷路。B, 実験方法。C, 評価項目。訓練試行の前に 8 本のアーム全てに餌ペレットを 1 粒ずつ置き, ギロチンドアをランダムに選んだ 4 カ所のアーム (アーム番号 3, 4, 6, 8) に設置する。装置の中心にアクリル製の円柱を置き, その中にラットを入れて, 20 秒後に円柱を取り除き, 訓練試行を開始する。訓練試行はラットが 4 カ所全てのアームに入るか, 5 分経過するまで行う。訓練試行終了後, ラットを一旦ホームケージに戻し, 遅延時間が経過した後, ラットを迷路に戻して保持試行を行う。保持試行では, 4 カ所のギロチンドアを取り除き, ラットが残りの 4 カ所全てのアームに入るか, 5 分経過するまで行う。本課題において一度侵入したアームに再進入した回数をエラー (餌をとってしまっても既に餌のないアームへの進入) としてカウントし, 空間作業記憶の指標とする。1 つは, 試行内におけるアームへの再進入を意味する訓練試行エラー (図中では訓練試行時のアーム番号 1 への再進入) および試行内エラー (図中では保持試行時のアーム番号 3 への再進入)。もう 1 つは保持試行において訓練試行時に侵入したアームへの再進入を意味する試行間エラー (図中では保持試行時のアーム番号 5 への再進入) である。試行間および試行内エラーを合わせて保持試行エラーとする。試行では各試行の課題遂行に要した時間も計測し, 反応時間を算出する。

各アームの先端部にはプラスチック製のフードカップ（直径 3 cm, 深さ 1.5 cm）が設置されている。また、プラットフォームには、ラットがプラットフォームに置いた瞬間にアームに進入するのを防ぐためのアクリル製の無色透明な円柱（直径 28 cm, 高さ 40 cm）を設置した。実験期間中は装置の周りに実験台やポスター、ほうき、パソコン、カレンダー、時計、立て看板など視覚的な目印となりうるものを置き、これらの位置を一定にした。

3) 学習訓練

実験 1 日目はラットを迷路に慣らせるために、ギロチンドアを外した迷路全体に餌ペレットを撒き、ラットを 3 匹ずつ入れ、迷路全体を 10 分間探索させた。2 日目は同様の操作を 1 匹ずつで行った。3 日目には 8 本のアームの先端部に餌ペレットを撒き、迷路全体を 10 分間探索させた。4 日目は 8 個のフードカップ一杯に餌ペレットをいれ、迷路全体を 10 分間探索させた。5 日目は 8 個のフードカップに 10 粒ずつ餌ペレットをいれ、食べ切るまで迷路全体を探索させた。6 日目は 8 個のフードカップに 1 粒ずつ餌ペレットをいれ、食べ切るまで迷路全体を探索させた。7 日目からはギロチンドアを付け、delayed SWSH 課題の訓練を開始した。

4) Delayed SWSH 課題

訓練試行では、餌ペレットを 8 本のアームすべてに 1 粒ずつ置き、ランダムに選んだ 4 カ所にギロチンドアを設置した。ラットをプラットフォームに置いたアクリル製の円柱の中に入れ、20 秒後に円柱を取り除き、ラットが 4 カ所すべてのアームに進入するか、5 分経過するまで行なった。ラットを一旦ホームケージに戻し、5 分の遅延時間が経過した後、保持試行を行なった。保持試行では、4 カ所のギロチンドアを取り除き、ラットをプラットフォームに置いた円柱の中に入れ、20 秒経過したら円柱をはずした。ラットが訓練試行中ギロチンドアを設置してあった 4 カ所すべてのアームに入るか、5 分経過するまで行なった（図 1B）。このとき、訓練試行においてラットが 1 度進入したアームに再進入した回数を訓練試行エラー（training phase error）とした。また、保持試行においてラットが進入したアームのうち、訓練試行で餌ペレットを食べ終えたアームに進入した場合を試行間エラー（across phase error）、保持試行で一度進入したアームに再び進入した場合を試行内エラー（within phase error）とし、試行間エラーと試行内エラーの合計を保持試行エラー（test phase error）とした。運動機能の指標として、各試行の課題遂行に要した時間を各試行のアーム進入

回数で除したものを反応時間（response time）として記録した（図 1C）。Delayed SWSH 課題の保持試行エラー数が 5 日間連続で 1 回以下となったラットは、この課題を習得したと判定し、以下の実験に使用した。

5) 回転テスト-1

Delayed SWSH 課題を習得したラットをコントロール群と回転テスト-1 群に分けた。回転テスト-1 では、訓練試行におけるギロチンドアの位置を 1, 3, 4, 6 の 4 カ所に固定した。コントロール群は、訓練時と同様、5 分間の遅延時間の後、保持試行を行なった。回転テスト-1 群は、訓練試行終了後に迷路全体を 180 度回転させ、餌ペレットは本来あるべき空間位置のアームである 2', 5', 7', 8' に置いた。保持試行では、4 カ所のギロチンドアを取り除き、ラットをプラットフォームに置いた円柱の中に入れてから 10 秒経後に円柱を取り除き、ラットが餌ペレットのある 2', 5', 7', 8' の 4 カ所すべてのアームに入るか、5 分が経過するまで行なった。保持試行でラットが進入したアームのうち、訓練試行で入った空間位置のアーム、すなわち 1', 3', 4', 6' のアームに進入した場合を試行間エラー、保持試行で一度進入したアームに再び進入した場合を試行内エラーとし、この 2 つのエラーの合計を保持試行エラーとした（図 2A）。

6) 回転テスト-2

Delayed SWSH 課題を習得したラットをコントロール群と回転テスト-2 群に分けた。回転テスト-2 では、訓練試行におけるギロチンドアの位置を 1, 3, 4, 6 の 4 カ所に固定した。コントロール群は、訓練時と同様、5 分間の遅延時間の後、保持試行を行なった。回転テスト-2 群は、訓練試行終了後に餌ペレットも含めて迷路全体を 180 度回転させた。保持試行では 4 カ所のギロチンドアを取り除き、ラットをプラットフォームに置いた円柱の中に入れてから 10 秒後に円柱を取り除き、ラットが餌ペレットのある 1', 3', 4', 6' の 4 カ所すべてのアームに入るか、5 分が経過するまで行なった。保持試行でラットが進入したアームのうち、訓練試行で入った空間位置のアーム、すなわち 1', 3', 4', 6' のアームを進入した場合を試行間エラー、保持試行で一度進入したアームに再び進入した場合を試行内エラーとし、この 2 つのエラーの合計を保持試行エラーとした（図 2A）。

7) 神経化学の実験に用いるコントロール動物の作製

Delayed SWSH 課題におけるコントロール課題として次の課題を行なった。訓練試行では、delayed SWSH 課題と同様に、餌ペレットを 8 本のアームすべてに 1 粒ずつ置き、ランダムに選んだ 4 カ所にギロチンドア

図2 Delayed SWSH 課題の成績におよぼす空間情報の影響

A, 実験方法。数字はアーム番号を示す。B, エラー数。C, 反応時間。回転テスト-1では訓練試行後に迷路のみを180度回転させ、空間的な餌ペレットの位置を変化させなかった。回転テスト-2では訓練試行後に迷路と餌ペレットを一緒に180度回転させ、空間的な餌ペレットの位置を変化させた。*は訓練試行後に迷路を回転しなかった群と比較して危険率 $P < 0.05$ を示している。（文献9より許可を得て引用、一部改変）

を設置する。ラットをプラットフォームに置いたアクリル製の円柱の中に入れ、10秒経後に円柱を取り除き、ラットが4カ所すべてのアームに進入するか、5分が経過するまで行なった。訓練試行終了後、ラットをホームケージに戻し、遅延時間の後、保持試行を行なった。コントロール課題の保持試行においては、全てのアームからギロチンドアを取り除き、各アームに1粒ずつ餌ペレットを置いた（図2A）。ラットをプラットフォームに置いた円柱の中に入れ、10秒経過したら円柱をはずし、ラットがいずれか4カ所のアームに進入するか、5分が経過するまで行なった。このとき、保持試行で一度進出したアームに再び進出した回数を保持試行エラーとした。保持試行における全エラー数が5日間連続して1回以下のラットを神経化学実験のコントロール群とした。したがって、コントロール課題を習得したラットは、delayed SWSH 課題を習得したラットと同様のハンドリング操作を受け、同数の餌を食べ、迷路上で同じ行動を示し、試行内の情報は記憶するが、試行間にまたがる情報の記憶はできないと考えられる。

3. 結果

1) Delayed SWSH 課題における空間情報の影響

迷路のみを180度回転させ、空間的な餌ペレットの位置を変化させない回転テスト-1ではコントロール群と回転テスト-1群との間に、エラー数および反応時間のいずれにおいても有意な差は見られなかった（図2B, C）。一方、迷路と餌ペレットを一緒に180度回転させ、空間的な餌ペレットの位置を変化させた回転テスト-2では、保持試行における保持試行エラー、試行内エラー、試行間エラーおよび反応時間が回転テスト-2群で有意に増加した（図2B, C）。したがって、ラットは迷路内の傷や匂いなどではなく、実験室の空間的な配置関係を手がかりにして課題を遂行していることが示唆された。

2) 遅延時間テスト

遅延時間を変化させて保持試行を行なったところ、遅延時間が90分以上になると保持試行エラーおよび試行間エラーが有意に増加し、遅延時間120分では反応時間も延長した（図3）。しかし、試行内エラーには

図3 Delayed SWSH 課題の成績におよぼす遅延時間の影響

A, 訓練試行および保持試行エラー. B, 試行内および試行間エラー. C, 反応時間. 遅延時間 5 分の delayed SWSH 課題を習得したラットを用いて空間作業記憶の保持時間について検討した. 訓練試行終了後, ラットを一旦ホームケージに戻し, 5-120 分の遅延時間が経過した後, 保持試行を行った. *は遅延時間 5 分の群と比較して危険率 $P < 0.05$ を示している. (文献 9 より許可を得て引用, 一部改変)

遅延時間 120 分まで変化が認められなかった (図 3B). 以上のことから, 遅延時間の延長に伴い訓練試行で得た情報を忘れ, 試行間エラーが増加したと考えられる (9).

3) 空間作業記憶と extracellular signal-regulated kinase1/2

Extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) は mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系に分類され, 神経細胞をはじめ, 多くの細胞の転写過程を制御する役割を担っている (10). 神経細胞において, ERK1/2 は Ca^{2+} イオンの流入や神経成長因子などの神経活動や神経可塑性に関連する刺激で活性化される. ERK1/2 の活性化は学習や短期記憶ではなく長期記憶に必要であることが報告されているが (11-13), 短期および長期記憶の両方に関連しているとの報告もあり (14), 学習記憶における ERK1/2 の役割は未だ不明である. 特に, 作業記憶における ERK1/2 の役割はほとんど分かっていない. 我々は, 空間作業記憶に重要な海馬における ERK1/2 の役割について検討した.

訓練試行 5 分, 60 分後の海馬におけるリン酸化 ERK1/2 の発現量は, コントロール群と比較して有意に増加し, 120 分後ではコントロールレベルまで減少した (9). 一方, 前頭前皮質では, 遅延時間によるリン酸化 ERK の発現量の有意な変化は認められなかった (9). したがって, 海馬における ERK1/2 の活性化が delayed SWSH 課題の作業記憶の保持に関連していることが示唆された. そこで, ERK1/2 を活性化する MAPK kinase (MEK) の阻害薬である PD98059 を両側海馬 CA1 領域に微量注入し, 遅延時間 5 分の条件で delayed SWSH 課題を行った. PD98059 を投与した群では, 溶媒投与群に比べ保持試行エラー数および試行間エラー数が有意に増加した (図 4A). 一方, 訓練

図4 Delayed SWSH 課題の成績に対する PD98059 の効果

A, エラー数. B, 反応時間. PD98059 を両側海馬 CA1 領域に微量注入し, delayed SWSH 課題を行った. *は溶媒投与群と比較して危険率 $P < 0.05$ を示している. (文献 9 より許可を得て引用, 一部改変)

試行エラー数, 試行内エラー数および反応時間には有意な変化が認められなかった (図 4).

4. 考察

放射状迷路試験において, 迷路外の複数の視覚の手がかりを互いに入れ替えると正選択率が著しく低下すること, 嗅覚機能や聴覚機能を低下させても正選択率はあまり変化しないが, 眼球摘出によって視覚機能を奪うと著明に成績が悪化する (15-17). 本研究においても, 迷路のみを 180 度回転させ空間的な餌ペレットの位置を変化させない回転テスト -1 ではエラー数は変化せず, 迷路と餌ペレットを一緒に 180 度回転させ空間的な餌ペレットの位置を変化させた回転テスト -2 では, エラー数の著明な増加と反応時間の延長が見られた. したがって, ラットは放射状迷路周囲の情報を手がかりに delayed SWSH 課題を遂行していると考えられる. さらに, delayed SWSH 課題における訓練試行と保持試行の間の遅延時間の影響について検討した結果, 遅延時間が 90 分以上では, 試行間エラ

一数および保持試行エラー数の有意な上昇が認められた。したがって、本研究におけるラットの空間情報の保持能力は60分程度であり、その後次第に消去されることが示唆された。

ERK1/2は神経可塑性に関与し、学習記憶に重要であることが知られている(18)。Morris水迷路実験において、訓練後に背側海馬のERK1/2のリン酸化が増加すること、また、ERK1/2を阻害することにより空間記憶の長期保持が障害されることが報告されている(11)。本研究において、海馬におけるERK1/2のリン酸化が、訓練試行終了60分後まで有意に上昇することが認められた。これは、ラットの作業記憶が60分程度保持されるという行動実験の結果と一致する。さらに、MEK阻害薬であるPD98059を両側海馬のCA1領域に微量注入すると、試行内エラー数に影響することなく、試行間エラー数の有意な増加が認められた。したがって、delayed SWSH課題の空間作業記憶の保持に海馬のERK1/2の活性化が関与していることが示唆された。

5. おわりに

本稿では放射状迷路を用いたdelayed SWSH課題による空間作業記憶の評価方法について述べた。本実験条件下におけるラットの空間作業記憶の特徴は、以下のとおりである。1) Delayed SWSH課題においてラットは実験室の空間的な配置関係を手がかりにして課題を遂行している。2) ラットの空間作業記憶は60分間保持される。3) 空間作業記憶の保持に海馬におけるERK1/2の活性化が関連している。今後、本方法によって空間作業記憶のメカニズムが解明され、作業記

憶障害を示す疾患に対する治療薬が開発されることを期待する。

文 献

- 1) Scoville WB, et al. J Neurochem. 1957;20:11-21.
- 2) Morris R. J Neurosci Methods. 1984;11:47-60.
- 3) Yamada K, et al. Br J Pharmacol. 1995;115:852-858.
- 4) Mizuno M, et al. J Neurosci. 2000;20:7116-7121.
- 5) Mizuno M, et al. Learn Mem. 2003;10:108-115.
- 6) Mizuno M, et al. Mol Psychiatry. 2003;8:217-224.
- 7) He J, et al. Neuropsychopharmacology. 2002;26:259-268.
- 8) Seamans JK, et al. Behav Neurosci. 1994;108:456-468.
- 9) Nagai T, et al. Neuroreport. 2006;17:1453-1457.
- 10) Treisman R. Curr Opin Cell Biol. 1996;8:205-215.
- 11) Blum S, et al. J Neurosci. 1999;19:3535-3544.
- 12) Hebert AE, et al. Learn Mem. 2002;9:156-166.
- 13) Schafe GE, et al. J Neurosci. 2000;20:8177-8187.
- 14) Igaz LM, et al. Cell Mol Neurobiol. 2006;26:987-1000.
- 15) Suzuki S, et al. Learn Motiv. 1980;11:1-18.
- 16) Zoladek L, et al. Anim Learn Behav. 1978;6:77-81.
- 17) Olton DS, et al. J Exp Psychol Anim Behav Process. 1976;2:97-116.
- 18) Adam JP, et al. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2002;42:135-163.

著者プロフィール

永井 拓 (ながい たく)

名古屋大学 大学院医学系研究科 臨床薬物情報学講座医療薬学、講師、博士(医学)

◇1998年名城大学薬学部卒業、'00年名城大学大学院薬学研究科修士課程修了、

'03年名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了、同年4月名古屋大学医学部附属病院薬剤部、

'04年金沢大学大学院自然科学研究科助手、'06より現職。◇研究テーマ：依存性薬物による精神障害の発現機序の解明、記憶形成機序に関する研究。◇趣味：ドライブ。