資 料

海馬采一脳弓損傷ラットの報酬探索における各種環境手掛の効果

同志社大学 坂本敏郎・岡市広成

The Roles of Environmental Cues in Food-searching Behavior in Fimbria-fornix-lesioned Rats

TOSHIRO SAKAMOTO & HIROSHIGE OKAICHI
*Department of Psychology, Doshisha University,
Kamigyo-ku, Kyoto 602*

齧歯類の海馬の心理的な機能を検討するために、多くの研究が報告されている。これらの研究において、海馬損傷ラットは装置外刺激に依存する場所学習課題に障害を示すが、統制ラットは課題解決後に装置外刺激の一部を取り除いても遂行が可能であることが示されている (Morris, Hagan, & Rawlins, 1986; Pico, Gerbrandt, Pondel, & Ivy, 1985)。しかし、装置内刺激に基づく手掛学習課題では海馬損傷ラットも統制ラットと同様に課題を解決することができる (Jarrard, 1983; Morris, Garrud, Rawlins, & O'Keefe, 1982)。これらの結果は、海馬が装置外刺激の空間的な関係性を用いる場所課題の学習に重要な役割を果たしていることを示しており、海馬の認知地図仮説 (O'Keefe & Nadel, 1978) を支持すると考えられてきた。

しかし、これらの場所学習課題では、装置外の刺激との関係で課題解決を検討してきたために、海馬損傷ラットの遂行障害は単に遠隔刺激を利用できないためであり、空間関係の認知とは別問題ではないかという疑問が残る。Save, Poucet, Foreman, & Buhot (1992) は、円形のオープンフィールド内に色と形の異なる複数

の物体を置きラットに探索させた。ラットがその環境に慣れた後にその物体を移動させたり新しい物体と取り替えたりして、ラットの探索行動を観察した。その結果、統制群では新奇な物体だけでなく、熟知した物体の位置関係の変化に対しても探索行動が多くなった。しかし、海馬損傷群では、物体の位置関係の変化に対する探索行動の変化はみられず、新奇な物体にのみ探索行動が増加した。この結果は、海馬損傷動物が、装置内の近接刺激相互の空間的な関係性の認知にも、障害をもたらすことを示唆している。

ところで、上述の実験では装置外あるいは装置内刺激と課題解決の関係のみに注目したため、その他の刺激 (例えば装置の構造そのもの) が課題解決の手掛になることを避ける必要があった。そのため、Olton 型の放射状迷路や Morris 型の水迷路といった完全な対称性を持つ装置が使用されてきた。しかし、現実生活場面で動物がこのような完全な対称性を有する空間内で行動することは稀なことであり、むしろ行動空間の構造が行動を決定する手掛にもなりうると思われる。

Cheng (1986) は、装置内・外の刺激を使用できないように統制した環境に長方形の箱を置き、遅延見本合わせ法を用いた報酬探索課題をラットに行わせた。彼は、長方形の枠構造を地理情報、長方形箱の四隅に設置した視覚的・触覚的・嗅覚的に異なるパネルを非地理的な特徴情報と呼び、課題の遂行におけるこれらの情報の役割について検討した。その結果、ラットは地理情報を用いて報酬を探索し、特徴情報は付加的に利用するだけであることが明らかになった。また、Margules & Gallistel (1988) は、装置外刺激が利用可能な環境で、Cheng (1986) と同じパラダイムの実験を行なった。この場合ラットは、まず装置外刺激を利用して課題を解決するが、この刺激の利用が制限されると装置の構造（地理情報）を用いて解決するようになることを示した。

本実験では、Cheng (1986) や Margules & Gallistel (1988) の実験をもとに、遅延見本合わせ法を用いた報酬探索課題の解決に与える装置の枠構造、パネル、装置外刺激の効果とともに、課題の遂行に及ぼす海馬損傷の効果を明らかにすることを目的とした。本実験でラットが使用可能な刺激の組み合わせを Table 1 に示した。条件 A, B では、装置外刺激が利用可能な状況でパネル（特徴情報）が両群の遂行に与える効果を調べる。条件 C, D では、装置外刺激が利用できない状況でパネルが両群の遂行に与える効果を調べる。

Table 1 各条件における課題解決に使用可能な刺激の組み合わせ

	枠構造	パネル	装置外刺激
条件A	○	○	○
条件B	○	×	○
条件C	○	○	×
条件D	○	×	×

○：使用可， ×：使用不可を示す

方 法

被験体： Wistar 系 albino ラットの雄 14 匹を使用し、海馬采一脳弓損傷群（以下海馬群）7 匹、統制群 7 匹に配分した。海馬群、統制群のそれぞれ 2 匹は以前に円形フィールド実験の経験があったが、他の 10 匹は実験経験のないラットであった。各ラットは、生後約 140 日で、実験開始時の平均体重は 301 g であった。実験期間中、ラットの体重が自由摂食時の約 85% になるように餌の量を制限し、その体重を維持するのに必要な量の餌を毎日の実験終了 30 分後に与えた。但し、ラットの成長を考え、1 週間に体重が 5 g ずつ増えるように餌の量を調節した。実験期間中ラットは、7:00 A. M を基準に 12 時間サイクルで明期と暗期とが交替する飼育室で飼育された。実験は明期中に行われた。

手術及び組織学的方法： 海馬群 7 匹に、海馬と前脳下部との主要な連絡経路である海馬采一脳弓を熱破壊する手術を行った。被験体を sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔内注射により麻酔した後、atropine sulfate (0.1 cc) を腹腔内注射した。頭部を脳定位固定装置 (David Kopf 社製) に固定し、bregma (冠状及び矢状縫合の交差点) を基準に、AP = -2.1 mm, ML = ±1.2 mm と ±2.7 mm, 硬膜面から DV = -3.8 mm の 4 箇所 に電極を差し込み、脳損傷装置 (Radionics 社製 RFG-4) により 56°C で 60 秒間保ち、損傷した。

海馬群には、手術後 1 週間の回復期間後に、摂食制限、課題の訓練を開始した。全ての実験終了後、被験体を sodium pentobarbital による深麻酔下におき、10%ホルマリン液で灌流を行い、ついで脳を取り出した。その後ゼラチン処理を行い、脳を滑走式電気冷凍ミクロトームを用いて凍結切断し、40 μm の冠状切片を得た。その切片標本を Klüver & Barrera 法で染色し、光学顕微鏡下で損傷部位の検索を行った。

装置： 長方形のベニヤ板製の箱（縦 120 cm, 横 60 cm, 壁の高さ 35 cm）を用いた。箱

の底面には深さ 9 cm に木の削りくず(チップ)を敷き、箱の内壁には濃い茶色のニス塗装した。底面に縦横 9 本ずつ等間隔に平行線を引き、それぞれの線の 81 の交点を報酬の位置とした。報酬の提示には、ベニヤ板 (11×7 cm) の上に楕円形のアルミカップ (8×3 cm) を貼り付けた報酬カップを使用した。報酬には、飼育用の固形飼料 (オリエンタル酵母工業株式会社製) を 1 個約 300 mg に切ったものを使用した。

条件 A と条件 B では、装置は実験室 (3.5×4.0×2.5 m) の中央に置かれ、周囲には机、棚、ラットのケージ、ビデオモニター一式などが固定され、実験者も定位置にいた。装置は 2 m 上から 40 W 白色蛍光灯 4 本で照らされ、装置内のチップ面の照度は 380 lx であった。条件 B では条件 A から装置内の四隅にあるパネルを取りはずした。

条件 C と条件 D では、長方形の箱の対角線の交点を中心とする半径 1 m の円に沿って、天井から装置の下部まですっぽり覆う円筒状のカーテンを取り付けた。カーテンは光沢のないビニール製の黒布であった。装置内を照らすために、天井に 100 W の電球を 1 個取り付けた。装置内のチップ面の照度は 600 lx であった。なお、実験中室内灯は消され、実験者はラットを出し入れする時を除いて、カーテンの外側にいた。条件 D では条件 C から装置内のパネルを取りはずした。装置及び室内配置と遮蔽カーテンを Fig. 1 に示す。

条件 A と条件 C では、長方形の箱の四隅に幅 11 cm、高さ 33 cm の視覚的・触覚的に異なる 4 枚のパネルを、長辺に対し 60°、短辺に対し 30°で置いた。4 枚のパネルは、黒のプラスチック板、白布をベニヤ板に貼ったもの、白黒縦縞のプラスチック板、オレンジ色の絨毯を貼ったものであり、これらのパネルは 1 匹のラットにとっていつも同じ場所に置かれ、従って互いの地理的關係も一定に保たれた。ラットの行動は全て装置上のビデオカメラを通じて記録された。

Fig. 1 装置及び室内配置と遮蔽カーテン
(条件AとBではカーテンをはずす。)
(条件BとDではパネルをはずす。)

手続き： 1 日 5 分間のハンドリングと装置馴致を 5 日間行った。装置馴致は遮蔽カーテンを上げ、箱の四隅にパネルを設置せずに行った。その後、海馬群には手術を実施し、両群ともに予備訓練に続いて本訓練を行った。予備訓練、本訓練を通じて、1 試行は報酬提示期（以下提示期）と遅延期、そしてテスト期からなる。

提示期では、装置内のチップに報酬カップを 1 つ埋めた後、ラットを入れ、ラットがその報酬カップを探し出し、中に入っている 4 個の餌 (300 mg×4 個) のうち 2 個を食べると、ラットを取り出す。そしてラットを待機用ケージに入れ、75 秒間待機させる。この遅延期中に装置内のチップをかき混ぜて、提示期に生じたラットの臭いの軌跡や餌の臭いなどを拡散させ、再び表面を平らにする。

テスト期では、再び装置内にラットを入れ、提示期に報酬カップを置いた場所の真下に餌入りカップ (予備訓練の場合)、あるいは餌のないカップ (本訓練の場合) を埋め、それを探させる。ラットが、埋められた報酬カップ周辺の決められた範囲を掘るとその場所に残り 2 個の餌を与える。ラットが決められた範囲を掘らずに 150 秒経過すると、報酬カップが埋められているチップの表面に残り 2 個の餌を与える。ラットが餌を食べ終わると装置から取り出し、試行を終了する。

ラットを装置内に置く位置は、長方形の各辺の中心にあたる4箇所、置く方向は、壁向きと中央向きの2方向である。このため合計8通りの置き方があり、これを提示期とテスト期に偏りなく割り当てた。報酬を置く位置も試行ごとに異なり、地域的な偏りを避け、中央を除く80の交点に各ラットにランダムに割り当てた。

予備訓練は、報酬を掘り出す行動をラットに学習させるために4段階に分けて行った。予備訓練での各段階の装置及び環境条件は条件Aと同じであり、遮蔽カーテンを上げて箱の四隅にパネルを設置した状況で実施した。各段階ごとに提示期とテスト期での報酬カップの埋め方を、Fig. 2に示す。1日に1段階の訓練を3試行ずつ、4日間で合計12試行実施した。第1段階の提示期では、報酬カップをチップ表面に置く。テスト期では、報酬カップをチップの表面から4 cmの深さに埋める。第2段階の提示期では、チップの表面に窪みを付け、その下1~2 cmの所に報酬カップを埋める。テスト期では、報酬カップを表面から9 cmの深さに埋める。第3段階の提示期では、報酬カップをチップ表面下2~3 cmの所に埋め、チップの表面を平らにする。テスト期では、報酬カップをチップの表面から9 cmの深さに埋める。第4段階の提示期では、報酬カップをチップの表面下2~3 cmの所に埋め、チップの表面を平らにする。テスト期では、餌の臭い手掛を排除するために餌の入っていない空カップだけをチップ表面から9 cmの深さに埋める。テスト期でラットが空カップの位置を中心に半径15 cm以内を掘った時、残り2個の餌をカップに入れて与える。なおチップを掘るという行動は、体を止めて、前足と鼻との両方を使って3~4 cm掘ることと定義し、このうちのどれかが欠けてもチップ掘り行動とは見なさなかった。

本訓練の手続きは予備訓練の第4段階と同じであり、予備訓練終了の翌日から、本訓練である条件A, B, C, Dを順次行った。各被験体は各条件につき1日に3試行ずつ、12日間で合計

Fig. 2 予備訓練の各段階における提示期とテスト期の報酬カップの位置
(カップを含む装置の断面図：数字は報酬カップのチップ面からの深さを示す。)

36 試行の訓練を受けた。予備訓練、本訓練ともに試行間隔はおおよそ30分程度であった。条件Bと条件Cの間には1日の休止日をおいた。また、条件Dではカップ自体が嗅覚の手掛となっているかを調べるために、36試行中の後半18試行でのテスト期には、カップを埋めなかった。

結 果

組織学的結果： Fig. 3 は海馬采一脳弓の最大（灰色）と最小（黒色）の損傷例を König & Klippel (1967) の脳地図上に示したものである。全てのラットにおいて海馬采一脳弓が両側性に破壊されていた。加えて、損傷の最大のものは、吻側では外側中隔の一部から内側中隔に及び、尾側では腹側海馬にまで及んでいた。また、海馬系以外では、新皮質、脳梁交連、帯状回の一部や、視床背側部の諸核、髄条及び分界条の一

部にも損傷が及んでいた。損傷の最小のものは、吻側では、内・外側中隔から損傷が始まり、尾側では背側海馬の一部の損傷で終わっていた。なお、線条体の一部に損傷が認められたが、髄条及び分界条は無傷であった。

行動学的結果： 各試行のテスト期でラットが最初に掘った反応を、Cheng (1986) に従って次の4つに分けた。カップの中心の直上のチップ表面の点を中心に半径 15 cm 以内を掘った反応を正反応とする。これに対し、仮に装置を 180° 回転させた時に、カップ上の位置になる地

Fig. 3 海馬采一脳弓損傷群ラットの脳損傷部位
(灰色：最大損傷ラット，黒色：最小損傷ラット)

点を中心に半径 15 cm 以内を掘った反応を対角誤反応, その他の領域を掘ると単に誤反応とする。また, 150 秒間に 1 度も掘らなかった場合は無反応とする。

群ごとの全試行における 4 種類の反応の生起頻度の割合を Table 2 に示す。半径 15 cm の円の面積は箱の底面積のほぼ 10% を占める。このため正反応が偶然に生じる割合は理論上は 10% である。統制群の正反応の生起率 (以下, 正反応率) は, いずれの条件においても約 60% と, 偶然値をはるかに上回っていた。これに対して, 海馬群の正反応率も全条件で偶然値を上回ってはいるが, いずれの条件とも統制群より低く, また条件 A から条件 D と刺激利用が制限され, 訓練が進むに従って, その正反応率は低下した。対角誤反応の生起率は, 条件や群の違いに関わらず, 偶然値以下であった。また, 報酬の位置 (角寄り, 壁寄り, 中央) に関しての反応の違いは, 群や条件に関わらずみられなかった。

条件ごとに海馬群と統制群との間で 4 種類の反応の生起頻度に違いがあるか否かを χ^2 検定で分析した。条件 A では有意差は無かったが, 条件 B [$\chi^2(3, N=14)=21.4, p<.01$], 条件 C [$\chi^2(3, N=14)=29.8, p<.01$], 条件 D [$\chi^2(3, N=14)=54.6, p<.01$] では有意差がみられた。また, 条件 D で, カップを埋めた前半 18 試行とカップを埋めなかった後半 18 試行の正

反応数を群別に χ^2 検定したところ, 両群ともに有意差は無かった。このことは, 条件を通じてラットがカップの嗅覚的手掛を用いて課題を解決していなかったことを示している。

各条件を通じて両群ともに, 対角誤反応と無反応の生起は常に少なく, 正反応の増加 (減少) が誤反応の減少 (増加) と対応している。そのため, 以後は正反応について分析した。

正反応率に関して, 条件ごとに各群のラットを成績のよいものから順に並べたものを Fig. 4 に示す。成績順に並べた時, 条件 A では両群の相対する個体間での遂行の差は小さいが, 条件 B, C, D と進むに従い, その差は大きくなっている。また, 両群ともに各条件内での試行に伴う正反応率の変化はみられなかった。

正反応数について, 群 (海馬群と統制群) と条件 (条件 A, B, C, D) を主効果とする 2 要因の分散分析を行ったところ, 群の主効果のみ有意であり [$F(1, 12)=6.67, p<.05$], 条件の主効果, 交互作用は認められなかった。しかしながら, Fig. 4 で示すように海馬群の正反応率は, 統制群よりも特に条件 C, D で著しく低下する傾向が認められた。

両群での正反応の生起頻度の違いを検討するために, 条件ごとに群間の t 検定を行った。その結果, 条件 A では群差は無く, 条件 B [$t(12)=1.46, p<.10$] では有意な傾向が認められた。条件 C では, 両群の分散に有意差があっ

Table 2 4 条件における正反応, 対角誤反応, 誤反応及び, 無反応の平均生起率

条件	群	正反応	対角誤反応	誤反応	無反応
条件 A	海馬損傷群	50	7	33	10
	統制群	58	4	27	11
条件 B	海馬損傷群	44	6	44	6
	統制群	61	4	24	11
条件 C	海馬損傷群	39	6	43	12
	統制群	62	5	22	11
条件 D	海馬損傷群	31	4	52	13
	統制群	60	4	25	11

Fig. 4 4条件におけるラットの個別正反応率
(数字は統制群の個体番号, アルファベットは海馬群の個体番号を示す。)

た [$F(6, 6) = 7.75, p < .05$] ので, Welch の修正式で t 検定を行ったところ有意差が認められた [$t(14.08) = 1.98, p < .05$]。条件 D [$t(12) = 4.90, p < .01$] でも両群に有意差が認められた。

考 察

長方形の枠構造, パネル, 装置外刺激の利用の有無について群別に検討する。統制群では, 刺激条件の違い, つまりパネルの有無と装置外刺激の有無に関わらず正反応率は一定であった。このことから, ラットは実験者が与えたパネルや装置外刺激だけを手掛として課題を解決したとは考えられない。また, 4条件に共通する長方形の枠構造を手掛として課題を解決したのかというと, 枠構造だけを手掛として使用し

た場合にみられる対角誤反応がどの条件でもほとんどみられなかったことより, この可能性も考えにくい。それでは統制ラットは, 装置外刺激, パネル, 枠構造以外のどのような刺激を利用して, 高い正答率を得ていたのであろうか。

それについては, ラットが統制不十分な装置外刺激を利用した可能性が指摘されうる。もし装置外刺激の一部を使用できるならば, 統制ラットはその刺激を用いて課題を解決することができる (Pico et al., 1985; 岡市, 1991)。また, 装置外刺激を利用することができれば, たとえ他の種類の刺激を利用できたとしても, ラットはまず装置外刺激を利用する (Margules & Gallistel, 1988; Suzuki, Augerinos, & Black, 1980)。このような知見と合わせて, 本実験の刺激の統制手続きをみると, 次の2点で

装置外刺激利用の可能性が考えられる。1つは、ラットを装置に置く位置は常に変化させたが、その際、実験者が装置に接近し、ラットを置いてから離れる方向が一定になったことである。2つ目は、天井にある刺激は覆われずに残っていた点である。装置は円筒状の遮蔽カーテンによって囲われていたが、カーテン内の天井の中央には記録用のビデオカメラ1台と装置を照らす1個の電灯があり、さらに、消されているが室内照明用の蛍光灯が2本設置されていた。統制ラットは、条件CとDのような装置外刺激が少ない状況では、このような利用可能な装置外刺激を見つけて課題を解決したのかもしれない。つまり、装置外刺激が共通して存在した条件AとBでは、パネルの有無に関係なく、装置外刺激を課題解決に利用したと考えられ、この結果は、Margules & Gallistel (1988) と一致する。しかし、装置外刺激を統制した条件CとDでは、ラットは統制不十分な装置外刺激を課題解決に利用したため対角誤反応の出現もほとんど無かったと考えられ、この結果は、Cheng (1986) の結果とは一致しない。

海馬群では、条件Aから、B, C, Dと条件が変化するに従って、正反応率が低下する傾向がみられた。条件AとB, 条件CとDの各条件間でパネルの有無による正反応率を比較すると、パネルがある条件AとCの成績が良い。しかし条件AとC, 条件BとDの各条件間で装置外刺激の有無の効果を比べると、装置外刺激の利用可能な条件AとBの方が成績が良い。また、正反応率について統制群と比較した場合、条件Aでは差は無く、条件B, C, Dでは統制群の方が良かった。

これらの結果は、海馬群の課題解決が、ある特定の刺激情報に依存しているのではなく、利用できる刺激情報の数に依存していることを示している。条件Aでは、枠構造、パネル、装置外刺激の3種類の利用可能な刺激情報があったために、海馬群の成績は統制群に比べ差は無かった。条件BとCでは、利用可能な刺激が2

種類に制限され、また条件Dでは、刺激の利用が1種類に制限されたために、利用できる刺激数が多い条件に比べ成績は悪くなり、統制群と比較してもその差がみられたのであろう。これらのことは、海馬損傷ラットが、枠構造、パネル、装置外刺激の1つ1つの利用では統制群より劣るが、行動空間を規定する枠組の中に装置内・外の刺激情報を加え、利用できる刺激情報の数を多くすれば、各刺激は加算的に作用し、課題解決に有利な手掛を得ることができることを示唆している。

本実験での報酬探索課題は作業記憶を必要とする見本合わせ課題であり、Olton, Becker, & Handelsmann (1979) の作業記憶仮説からすると、利用できる刺激情報の如何に関わらず、海馬群にとっては本実験の課題の遂行は困難であると思われる。しかしながら、条件Aでは、海馬群と統制群との成績の差はみられず、海馬損傷の効果は、課題の4条件に通じて必要とされる作業記憶にではなく、この課題の各条件で利用できる刺激情報の数の違いにのみみられた。この結果はOltonの作業記憶仮説とは一致していない。そこで、今後も性質を異にする多様な刺激情報を組み合わせた場合の海馬損傷の効果を検討する必要があるであろう。それとともに、枠構造の刺激利用の有無について検討するために、正方形の装置を使用して刺激情報を統制することも試みるべきであると思われる。

REFERENCES

- Cheng, K. 1986 A purely geometric module in the rat's spatial representation. *Cognition*, **23**, 149-178.
- Jarrard, L. E. 1983 Selective hippocampal lesions and behavior: Effects of kainic acid lesions on performance of place and cue tasks. *Behavioral Neuroscience*, **97**, 873-889.
- König, J. F. R., & Klippel, R. A. 1967 *The Rat Brain*. New York: Robert, E. Krieger Publishing Co. Inc.

- Margules, J., & Gallistel, C. R. 1988 Heading in the rat: Determination by environmental shape. *Animal Learning & Behavior*, **16**, 404-410.
- 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.
- Morris, R. G. M., Hagan, J. J., & Rawlins, J. N. P. 1986 Allocentric spatial learning by hippocampectomized rats: A further test of the "spatial mapping" and "working memory" theory of hippocampal function. *Quarterly Journal of Psychology*, **38 B**, 365-395.
- 岡市広成 1991 格子状迷路における海馬損傷ラットの迷路外刺激利用障害 第15回大会 日本神経科学学会予稿集
- O'Keefe, J., & Nadel, L. 1978 *The hippocampus as a cognitive map*. Oxford: Clarendon Press.
- Olton, D. S., Becker, J. T., & Handelmann, G. E. 1979 Hippocampus, space, and memory. *Behavioral and Brain Sciences*, **2**, 313-365.
- Pico, R. M., Gerbrandt, L. K., Pondel, M., & Ivy, G. 1985 During stepwise cue deletion, rat place behaviors correlate with place unit responses. *Brain Research*, **330**, 369-372.
- Save, E., Poucet, B., Foreman, N., & Buhot, M. 1992 Object exploration and reactions to spatial and nonspatial changes in hooded rats following damage to parietal cortex or hippocampal formation. *Behavioral Neuroscience*, **106**, 447-456.
- Suzuki, S., Augerinos, G., & Black, A. H. 1980 Stimulus control of spatial behavior on the eight-arm maze in rats. *Learning & Motivation*, **11**, 1-18.