ラットのレバー押しによるシドマン 回避行動におよぼす鉛の影響

Effects of Lead on Sidman Avoidance Behavior by Lever Pressing in Rats

東海大学医学部衛生学教室

重 田 定 義・三 澤 哲 夫・相 川 浩 幸

東海大学医学部法医学教室

平 瀬 文 子・永 田 正 博

Sadayoshi Shigeta, Tetsuo Misawa and Hiroyuki Aikawa

*Department of Environmental Medicine and Occupational Health,
School of Medicine, Tokai University, Isehara*

Fumiko Hirase and Masahiro Nagata

Department of Legal Medicine, School of Medicine, Tokai University, Isehara

Effects of asymptomatic lead exposure on Sidman avoidance behavior in rats were studied. The animals were administered asymptomatic doses of lead acetate until 60 days of age through maternal milk while suckling and drinking water after weaning. From 61 days of age, learning patterns for lever pressing and shock avoidance of animals were investigated for one hour every other day for a total of 10 sessions.

1) The mean concentration of lead in rats administered 2 mg/ml lead was 34.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the blood, and 99.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the brain at 60 days of age, and no significant differences were seen in shock avoidance learning when compared with the control group.

2) The mean lead level of lead in rats administered 5 mg/ml lead was 73.2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the blood, 222.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in the brain at 60 days of age, and the acquisition of shock avoidance patterns was significantly delayed in the first five sessions of the learning period when compared with the control group.

3) The acquisition of shock avoidance patters in the 5 mg/ml lead group was similar to that of the control group in the second half of the training sessions. These results indicated that reinforcement stimulus by electric shock used on a Sidman avoidance schedule was a very strong reinforcement stimulus of those used in the operant behavior experiments.

緒 言

明らかな臨床症状を呈しない程度の、少量の鉛曝露による小児の鉛中毒として、諸外国では知能障害や行動異常の有無が問題とされている¹⁻⁴⁾。一方、この問題について動物のモデルを用い、動物の学習行動から究明しようとする研究がおこり、すでにいくつかの業績が発表されている⁵⁻¹⁴⁾。

しかし、これらの報告をみると、毒性評価の指標に用

いられる学習方法や、鉛の投与方法、投与時期、投与量などがそれぞれ異なり、その結果鉛の学習行動におよぼす影響は必ずしも一定していない。

著者らは、レバーを押すごとにペレットの報酬が与えられるといういわゆる正の強化スケジュールで訓練すると、哺乳期に母乳を介して少量の鉛を投与したラットでは学習の遅延が認められるが、離乳後から鉛を投与したラットにはかかる結果は得られないことをすでに明らかにした¹⁵⁾。

今回は、レバーを押すことによって電撃ショックを回避するという、前回とは逆の負の強化スケジュールを用い、学習過程におけるラットのショック回避習得の遅延の有無によって、中枢神経に対する鉛の毒性評価をおこない、あわせて学習スケジュールが学習行動パターンにおよぼす影響について検討した。

実験材料および実験方法

実験動物：個体差ならびに母親の哺育差を極力少なくする目的で、ウィスター系の10週齢の雌ラットと15週齢の雄ラットを当教室で交配し、妊娠したラット9匹から生まれた仔数を整理して1腹当たり9匹とし、出生後2日目から交叉哺育をおこなった。学習訓練には雄を使用するが、雄仔は合計33匹であったので、交叉哺育により自腹の雄仔数は1腹当たり1～2匹となった。

鉛投与および飼育条件：交叉哺育開始と同時に母ラットは無作為に3匹ずつ3群にわけられ、それぞれ2mg/ml, 5mg/mlの酢酸鉛水溶液および対照として5mg/mlの酢酸ソーダ水溶液を飲水として自由に摂取せしめた。哺乳期間中は、仔はその母親とともに同一ケージ内で飼育した。離乳後、すなわち21日齢以降は、雄仔は1匹ずつ個別のケージで飼育し、哺乳時に引き続き母親に与えたと同濃度の酢酸鉛水溶液、または酢酸ソーダ水溶液を60日齢まで自由に摂取せしめた。なお、飼育は年間を通じて室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、気湿 $55 \pm 10\%$ の飼育室でおこない、実験期間の間は学習訓練の時間を除いて餌 (CE-2, 日本クレア) は自由に与えた。

学習の方法と手順：学習訓練には、制御部、記録部ならびにスキナー箱からなる条件回避反応測定装置 (群大式)、およびBRS/LVE社製のコンピュータ制御による制御・記録部ならびにスキナー箱からなるオペラント行動測定装置を用いた。なお、予備実験において、二つの測定装置の間における学習行動量に差がないことを確認した。学習スケジュールには、もっとも基本的な条件回避スケジュールの1つであるシドマン回避スケジュールを採用し、刺激-刺激間隔は5秒、反応-刺激間隔は30秒に設定した。このスケジュールでは、ラットはスキナー箱内でレバーを押さなければ5秒ごとに床のグリッドから瞬間的に電撃をうけ、レバーを押せば次の電撃まで30秒間はショックを回避できる。学習訓練は61日齢から開始し、各ラットとも1日1時間ずつ隔日10回実施した。学習行動の指標には、反応数すなわちレバー押し回数ならびに被ショック数を用い、60分間のオペラント学習訓練のなかでレバー押しの安定する後半30分間の値を

とり、10分当たりの反応数あるいは被ショック数としてあらわした。なお、訓練は飼育室と同じ温熱環境下において、午前9時から午後2時の間におこない、各群ともに同一ラットが同一時間帯に訓練をうけるよう配慮した。

血中ならびに脳中鉛量の分析：哺乳および飲水によって体内に摂取された鉛のうち、血中および脳中に移行した鉛量と学習行動との関係を知る目的で、学習訓練に使用する雄仔と同一の母ラットによって哺育され、その後は飲水によって鉛を摂取した同腹の雌仔を、30日齢と60日齢に達した時点において各群5匹ずつ放血屠殺し、血液および脳を湿式灰化ののちDDTC-MIBKによって抽出し、原子吸光法 (日立原子吸光光度計170-50) によって分析定量した。

発育状態：体重増加、開眼、発毛、歩行開始などの発育成長に関する指標について、交叉哺育直後から学習訓練開始まで、継続して観察記録した。

結 果

開眼、発毛および歩行開始の時期は、鉛投与群と対照群との間に差はみられなかったが、体重はFig. 1の如くに5mg/ml鉛投与群においてその増加が対照群よりも有意に少ない。しかし、2mg/ml鉛投与群と対照群との

Fig. 1 Body weight increases in 2mg/ml Pb group, 5mg/ml Pb group and control group

Table 1 Lead concentrations in the blood and in the brain of rats at age of 30 and 60 days (mean±S.D.)

	Age	Administration conditions (mg/ml)		
		Lead acetate		Sodium acetate
		2.0	5.0	5.0
Lead concentration in the blood (μg/100 g)	30 days	114.6±12.6	307.6±34.4	<4
	60 days	34.8±11.3	73.2±26.5	<4
Lead concentration in the brain (μg/100 g)	30 days	84.4±15.8	99.3±10.7	<4
	60 days	171.8±7.9	222.4±80.9	<4
Number of rats	30 days	5	5	5
	60 days	5	5	5

間における体重増加には有意差はみられなかった。

血中鉛量および脳中鉛量は Table 1 の通りである。血中鉛量は、30日齢と60日齢とともに投与濃度に比例した鉛量の増加がみられた。しかし、60日齢における鉛量は2 mg/ml 鉛投与群では平均 34.8 μg/100 g、5 mg/ml 鉛投与群では平均 73.2 μg/100 g といずれも30日齢の血中濃度と比較して約4に減少している。一方、脳中鉛量においても、30日齢と60日齢の双方に投与濃度に比例した鉛量の増加がみられたが、血中鉛量とは異なり、60日齢における脳中鉛量は2 mg/ml 鉛投与群では、平均 99.3 μg/100 g、5 mg/ml 鉛投与群では平均 222.4 μg/100 g と、むしろ30日齢の鉛量よりやや多い傾向がみられた。

学習訓練の結果は、Table 2、3 および Fig. 2、3 に

示す。レバー押しによる反応数は、Table 2 をみる限りにおいては対照群も両鉛投与群も学習訓練初日がもっとも少ないという以外には特に一定の傾向はみられ難い。しかし、各群について各訓練日の反応数を、訓練初日の反応数を基準にした反応増加率であらわすと、Fig. 2 のように対照群ならびに2 mg/ml 鉛投与群は訓練の2回目に急激に20%も反応が増加し、その後はこの20%増加ライン前後で推移するが、一方、5 mg/ml 鉛投与群では最初の3回は反応数が増加せず、その後徐々に増加して、訓練の6回目によりやく20%増加ラインに到達することが示された。

被ショック数は、Table 3 の如く学習訓練初日では対照群、2、5 mg/ml 鉛投与群ともにほぼ同じであるが、その後の推移は各群によって異なっている。すなわち、各群について各訓練日の被ショック数を、訓練初日の被ショック数を基準にした被ショック減少率であらわすと、

Table 2 Response counts per 10 min in 2, 5 mg/ml Pb groups and control group during 10 sessions by a Sidman avoidance test (mean±SE)

Sessions	Administration conditions (mg/ml)		
	Lead acetate		Sodium acetate
	2.0	5.0	5.0
1	38.5±4.6	34.1±4.1	32.4±4.1
2	47.1±5.7	35.1±4.0	39.3±3.1
3	44.1±4.4	34.5±3.8	36.9±2.0
4	43.2±4.2	36.8±3.5	39.4±2.5
5	46.3±2.9	38.8±2.5	38.2±2.3
6	45.9±3.3	40.3±2.3	34.7±2.5
7	43.6±2.5	41.4±2.0	40.5±1.9
8	46.5±2.7	42.7±2.2	35.4±2.0
9	45.6±2.3	40.5±2.4	43.5±2.5
10	46.5±2.1	41.6±2.4	44.2±2.4

Fig. 2 Rate of increase for responses in 2, 5 mg/ml Pb groups and control group during 10 sessions by a Sidman avoidance test

Table 3 Shock counts per 10 min in 2, 5 mg/ml Pb groups and control group during 10 sessions by a Sidman avoidance test
(mean $\pm$ SE)

Sessions	Administration conditions (mg/ml)		
	Lead acetate		Sodium acetate
	2.0	5.0	5.0
1	39.0 $\pm$ 6.3	37.2 $\pm$ 5.6	36.7 $\pm$ 5.7
2	29.8 $\pm$ 6.0	32.4 $\pm$ 5.4 ¹⁾	17.9 $\pm$ 2.0
3	25.5 $\pm$ 5.7	30.3 $\pm$ 5.5 ²⁾	14.7 $\pm$ 1.5
4	22.5 $\pm$ 4.8	25.0 $\pm$ 4.4 ¹⁾	15.3 $\pm$ 2.0
5	10.8 $\pm$ 1.2	16.1 $\pm$ 2.6	13.6 $\pm$ 2.1
6	11.8 $\pm$ 1.2	12.7 $\pm$ 1.5	17.4 $\pm$ 2.2
7	10.4 $\pm$ 1.0	12.8 $\pm$ 1.4	10.3 $\pm$ 1.2
8	10.0 $\pm$ 1.0	11.9 $\pm$ 1.3	13.6 $\pm$ 1.3
9	8.8 $\pm$ 1.3	9.6 $\pm$ 1.4	10.2 $\pm$ 1.1
10	8.1 $\pm$ 0.9	10.0 $\pm$ 1.6	10.2 $\pm$ 1.7

1): Significant at 5% level, relative to control, in Student's t-test

2): Significant at 1% level, relative to control, in Student's t-test

Fig. 3 Rate of decrease for shocks in 2, 5 mg/ml Pb groups and control group during 10 sessions by a Sidman avoidance test

Fig. 3 のように対照群は訓練の 2 回目にはやくも 50% 減少ラインに達し、その後は減少がゆるやかとなって 7 回目からは 70% 減少ライン前後で推移するが、5 mg/ml 鉛投与群は被ショック減少率がきわめてゆるやかで、5 回目においてようやく 50% 減少ラインを下廻り、8 回目で 70% 減少ライン近くに達する。また、2 mg/ml 鉛投与群は対照群と 5 mg/ml 鉛投与群の中間に位置し、訓練 4

回目で 50% 減少ライン近くに達し、5 回目からは 70% 減少ライン前後で推移する。

平均被ショック数について、それぞれの群の間における有意性の検定を訓練日ごとにおこなうと、Table 3 の如く対照群と 5 mg/ml 鉛投与群の間において訓練の 2, 3, 4 回の各回に有意差が認められたが、対照群と 2 mg/ml 鉛投与群との間、ならびに 2 つの鉛投与群の間には有意差を認めなかった。

以上の 2 つのオペラント行動の指標を用いて分析した結果をまとめると、シドマン回避スケジュールを用いた学習訓練によって、対照ラットと比べて鉛投与ラットには学習過程の前半の段階においてショック回避学習の習得が遅延することが明らかになった。

考 察

鉛とラットの学習行動との関係を究明する目的でこれまでの研究に用いられた学習実験法は、大別して迷路法、逃・回避箱法およびレバー押し法にわけられ、研究者によっては各種の弁別反応をこれと組み合わせて用いている。すなわち、Snowdon⁷⁾はHebb-Williams迷路テストによって、Brady ら⁹⁾は黒白弁別迷路テストで鉛投与群に対照群よりエラーが多いとし、Driscoll ら¹⁰⁾は明暗弁別迷路テストにおいて、Overmann¹³⁾はシャトル箱における電撃回避テストで、またWinneke ら¹²⁾はLashley型跳躍台における円の大小弁別学習にて、いずれも鉛投与群に学習の習得遅延が認められたと報告している。

レバー押しによるオペラント行動は、逃・回避箱や走路、迷路による実験の如くに、行動を大きく左右する運動機能に影響されないという長所がある。この方法を用いた実験では、Padich ら¹⁴⁾は 20 回レバーを押すごとに報酬が与えられる Fixed Ratio (FR)-20 の学習スケジュール、Shigeta ら¹⁵⁾は FR-10 の学習スケジュールで鉛投与群に学習の習得遅延が認められたことを報告している。しかし、一方にはHastings ら¹¹⁾のレバー押しによる光弁別テストにおいて、また、Brown ら⁵⁾の T 迷路ならびにシャトル箱による弁別回避テストにおいて、鉛による学習への影響はみられないとする報告もある。

著者らが今回の実験で用いたレバー押しによるシドマン回避スケジュールは、基本的な負のオペラント学習スケジュールの 1 つであり、もっとも学習が容易であるとされている¹⁶⁾。この学習スケジュールによる訓練において、学習過程の前半において反応数増加ならびに被ショック数減少の速度が対照群より遅く、鉛によってショック回避の習得に遅延が生じたことが示された。さらに、

学習訓練が進むにしたがい、鉛投与群も対照群と同様のショック回避を示すようになるが、これは、電撃という罰を強化刺激として用いる学習によるショック回避習得は遅延こそすれ、鉛の投与によっても対照群と同レベルまで達成されうることを示すものである。

すでに著者らはトルエン曝露のラットの中樞神経におよぼす影響について、シドマン回避スケジュールを用いて成熟ラットに学習訓練をおこない、確立したレバー押し行動基線がトルエン曝露で乱されることから、トルエンの毒性を評価しうることを明らかにした¹⁸⁾が、今回、学習過程におけるショック回避習得が鉛によって遅延することが明らかになったことによって、行動基線の乱れによる評価以外に、学習過程における学習遅延の度合いによる評価も有用であることが示された。

また、Shigeta ら¹⁵⁾や Padich ら¹⁴⁾の報告では、正の強化刺激による学習の容易なスケジュールである FR スケジュールによる学習訓練で、学習過程が進むにつれて鉛投与ラットに学習が遅延することを認めたが、このように、報酬を強化刺激としても罰を強化刺激としても、鉛による影響が学習行動にあらわれたが、レバー押し行動のパターンや、学習過程における学習遅延のパターンは、正と負の強化刺激によって異なることも明らかにあった。

Pentschew ら¹⁷⁾は、哺乳期に母乳を介して鉛を移行させることによって、始めてラットに鉛による脳症を発生せしめることに成功したが、Snowdon⁷⁾および Shigeta ら¹⁵⁾は、鉛投与を哺乳中からおこなった場合と離乳以降からおこなった場合とについて比較検討し哺乳期のうちに無症状量の鉛を投与したラットに学習の遅延あるいはエラーの多いことを確かめている。しかしながら、今回の著者らの実験においても、Snowdon⁷⁾や Shigeta ら¹⁵⁾の報告にみられる如く、哺乳期における鉛の投与は、外見上何等の異常行動もみられず、また発育成長の指標のなかの開眼、発毛、歩行開始については対照群と差がみられない程度のいわゆる無症状量であっても、体重増加には影響を与えることが示された。

学習の成績を投与鉛濃度からだけではなく、体内鉛量との関連において検討した報告は少なく、脳鉛量ならびに血中鉛の分析は、著者らのほかには Hastings ら¹¹⁾のみであり、血中鉛量の記載もわずかに Winneke ら¹²⁾および Overmann¹³⁾のみである。Hastings ら¹¹⁾は0.1%の酢酸鉛を母乳を介して投与し、離乳後40日目の60日齢における脳鉛は14 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、血中鉛は9 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、Winneke ら¹²⁾は哺乳中は母親に、離乳後は直接745 mg/kg

の酢酸鉛を投与し、190日齢で血中鉛量が28.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、Overmann¹³⁾は哺乳期のみ90 mg/kg の酢酸鉛を投与し、35日齢において血中鉛量が56 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ であったとしている。著者らは前回の実験においては哺乳期にのみ母乳を介して鉛を投与し、5 mg/ml 鉛投与群では60日齢で脳鉛量は22 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ であったが、今回の実験では離乳後も引き続き鉛を投与した結果、60日齢には5 mg/ml 鉛投与群で血中鉛量は73 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ であったが、脳鉛量は222 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ に達した。Hastings ら¹¹⁾ならびに Brown ら⁵⁾は、ラットの学習に対する鉛の影響は認められなかったとしているが、この理由は、Hastings らの研究においては脳内の鉛量が極めて微量であったためであり、また Brown らの研究においては、鉛の投与が学習実験の直前のわずか3ないし4回のみであったためと考えられる。

結 論

哺乳期には母乳を介して、その後60日齢まで飲水として鉛を投与したウイスター系ラットの中樞神経系におよぼす鉛の影響を、レバー押しによるシドマン回避行動によって分析し、次の如き結果を得た。

1. 2 mg/ml 酢酸鉛投与群は、60日齢で血中鉛量は平均34.8 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、脳鉛量は平均99.3 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ を示し、学習成績はショック回避の習得がやや対照群に比し遅延する傾向はうかがわれるが有意差は認められなかった。

2. 5 mg/ml 酢酸鉛投与群は、60日齢で血中鉛量は平均73.2 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 、脳鉛量は平均222.4 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ を示し、学習成績ではショック回避習得の遅延が対照群に比し学習訓練の初回から5回までは有意に認められた。

3. 5 mg/ml 酢酸鉛投与群においても学習訓練の5回目以降は対照群と同程度にショック回避が習得できたことは、オペラント学習行動実験に用いられる強化刺激のなかで、電撃による強化刺激が極めて強烈であることを示す。

文 献

- 1) Byers, R. K. and Lord, E. E.: Late effects of lead poisoning on mental development, *Amer. J. Dis. Child.*, **66**, 471-494 (1943).
- 2) Perlstein, M. A. and Attala, R.: Neurologic sequelae of plumbism in children, *Clin. Pediat.*, **5**, 292-298 (1966).
- 3) Baloh, R., Sturm, R., Green, B. and Gleser, G.: Neuropsychological effects of chronic asymptomatic

- matic increased lead absorption, *Arch. Neurol.*, **32**, 326-330 (1975).
- 4) Hebel, J. R., Kinch, D. and Armstrong, E.: Mental capacity of children exposed to lead pollution, *Brit. J. Prev. Soc. Med.*, **30**, 170-174 (1976).
 - 5) Brown, S., Dragann, N. and Vogel, W. H.: Effects of lead acetate on learning and memory in rats, *Arch. Environ. Health*, **22**, 370-372 (1971).
 - 6) Shapiro, M. M., Tritchler, J. M. and Ulm, R. A.: Lead contamination: Chronic and acute behavioral effects in the albino rat, *Bull. Psychol. Soc.*, **2**, 94-96 (1973).
 - 7) Snowden, C. T.: Learning deficits in lead-injected rats, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **1**, 599-603 (1973).
 - 8) Carson, T. L., Van Gelder, G. A., Karas, G. C. and Buck, W. B.: Slowed learning in lambs prenatally exposed to lead, *Arch. Environ. Health*, **29**, 154-156 (1974).
 - 9) Brady, K., Herrera, Y. and Zenick, H.: Influence of parental lead exposure on subsequent learning ability of offspring, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **3**, 561-565 (1975).
 - 10) Driscoll, J. M. and Stegner, S. E.: Behavioral effects of chronic lead ingestion on laboratory rats, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **4**, 411-417 (1976).
 - 11) Hastings, L., Cooper, G. P., Bornschein, L. and Michaelson, I. A.: Behavioral effects of low level neonatal lead exposure, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **7**, 37-42 (1977).
 - 12) Winneke, G., Brockhaus, A. and Baltissen, R.: Neurobehavioral and systemic effects of longterm blood lead elevation in rats, 1. Discrimination learning and open field behavior, *Arch. Toxicol.*, **37**, 247-263 (1977).
 - 13) Overmann, S. R.: Behavioral effects of asymptomatic lead exposure during neonatal development in rats, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **41**, 459-471 (1977).
 - 14) Padich, R. and Zenick, H.: The effects of developmental and/or direct lead exposure on FR behavior in the rat, *Pharmac. Biochem. Behav.*, **6**, 371-375 (1977).
 - 15) Shigeta, S., Misawa, T. and Aikawa, H.: Effect of lead on operant behaviour in rats, *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, **2**, 153-161 (1977).
 - 16) Kuribara, H., Okuizumi, K. and Tadokoro, S.: Analytical study of acquisition on free-operant avoidance response for evaluation of psychotropic drugs in rats, *Jap. J. Pharmacol.*, **25**, 541-548 (1975).
 - 17) Pentschew, A. and Garro, F.: Lead encephalomyelopathy of the suckling rat and its implications on the porphyrinopathic nervous diseases, *Acta Neuropath.*, **6**, 266-278 (1966).
 - 18) 重田定義, 三澤哲夫, 相川浩幸, 近藤敦子: ラットのレバー押しによる Sidman 型回避行動を指標としたトルエンの毒性評価, *産業医学*, **21**, 68-73(1979).
(受付 1979年3月13日)