

1. はじめに

私は昨年、カフェインがマウスの運動性に与える影響について研究を行い、有意な結果を得ることができました。一方で、カフェインに記憶力向上の効果があるとする報告も存在します。そこで今度はカフェインがマウスの記憶に与える影響について調べるため、一般に記憶を評価する試験がどのように行われているかについて調査を行いました。

なお、種々の試験に汎用されるマウスやラットについては小動物と略記し、以下で「小動物」の名称を用いる際は、例外なく当該小動物を指すものとします。

2. 記憶についての概要

記憶には大きく「記銘(符号化)」「保持」「想起」の3つの過程が存在し、いずれか1つでも欠けると記憶として成立しないと考えられています。記銘は情報を取り込んで記憶情報として形成するまでの過程を、保持は情報を貯蔵する過程を、想起は情報を思い出す過程を指します。これに基づくと、例えば私達が「特定の物事を認識していながらも、その名前を思い出す事ができない」状態は、「記銘と保持はできているが想起ができていない」状態だと言い換えることができるのです。

また、記憶を保持できる長さに応じて「短期記憶」と「長期記憶」に分ける場合があります。初め、全ての記憶は短期記憶として記銘されますが、固定化という手順を踏んで長期記憶へと変化します。長期記憶には一度想起されると再び不安定な状態になるという特徴があるほか、短期記憶の容量には制限があるのに対して長期記憶の容量には制限がないという差異もあります。

更に、上に記した長期記憶を大きく「陳述記憶」「非陳述記憶」の2つに分ける場合もあります。陳述記憶は意識上で内容を言語化またはイメージ化できるものを指し、非陳述記憶はそれができないものを指します。例えば「今朝の朝食は何を、誰と食べたのか」や「『玉子焼き』という言葉が意味するもの」に関する記憶は陳述記憶に、「梅干しを見ると唾液が出てくる」ことや「ペットボトル飲料の飲み方」に関する記憶は非陳述記憶に該当します。

さて、記憶については以上のように概説することができますが、実際には記憶の分類や各過程の仕組みは極めて複雑で、未だに分かっていないことも少なくありません。以下に示すような試験は、新薬の開発のみ

ならず、記憶の仕組みを解明することにも一役買っているのです。

3. 各試験についての詳細

(1) Y-迷路試験（自発交替行動試験）

当該試験は小動物が新しい場所に置かれると探検する習性を示すことを利用したもので、小動物の空間作業記憶*1を評価します。なお、自発行動についても評価することができますが、ここでは割愛します。迷路が単純であるため、様々な試験に汎用されますが、ここでは自発交替行動試験について述べます。



手法としては

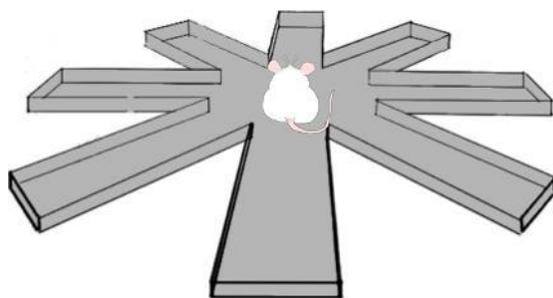
① 小動物を走路 A に置く

② 5～8分程度探索させ、進入した走路を順番に記録するという手順を踏むものが一般的です。

空間作業記憶の指標として「交替率 (%) = (3回連続で別の走路へ進入した回数) / (総進入回数 - 1) * 100」を算出し、交替率が高い程、空間作業記憶が優れていると判断します。

具体的には、例えば小動物の移動パターンが A (初期位置) - B - C - B - A - C - B - C であったとき、総進入回数は 7、交替率は $4 / (7 - 1) * 100 \approx 66.7$ (%) となります。

特に、正常な小動物にはまだ訪れていない走路を選択する傾向があるため、交替率は高い水準を示します。なお、覚醒剤や一部薬品の投与によってこの値は低下することが知られています。



*1)空間記憶とは、環境に対する主観的なイメージに関する記憶のこと。空間作業記憶は空間記憶の一種であり、特に一時的な情報貯蔵に関するものを指します。ただしここでいう空間作業記憶は、人間の作業記憶とは区別される必要があります。

ただしここでいう空間作業記憶は、人間の作業記憶とは区別される必要があります。

(2) 8方向放射状迷路試験

当該試験は餌ペレットを報酬として用いた報酬制課題の一つであり、小動物の空間作業記憶及び空間参照記憶*2について評価します。手法と

しては、試験に先立って

- ① 小動物に食餌制限を行い、体重を制限前の 85%に維持する
- ② 迷路周辺の定位置に視覚的な目印となりうるオブジェクトを配置する
- ③ 全走路の先端に報酬を置いた迷路内を小動物に探索させ、馴化させる

という手順を踏んだ後、学習試験として

- ④ 毎回同じ 4 つの走路の先端にのみ報酬を置く
- ⑤ 小動物を中央のプラットフォームに置く
- ⑥ 全ての報酬を採り終えるか 5 分経過するまで探索させる

という試行を数日間行うものが一般的です。

空間作業記憶の指標として(a)「作業記憶エラー数 = 一度進入した走路に再進入した回数」を、空間参照記憶の指標として(b)「参照記憶エラー数 = 報酬が置かれていない走路に進入した回数」を見るほか、(c)「正選択数 = 最初の 4 選択のうち報酬が置かれている走路に進入した回数」および(d)「全所要時間 = 全ての報酬を採り終えるまでに要した時間」を数え、(a)~(d)を空間認知機能の指標として用います。ただし、(d)を指標とする際は、試験に用いた小動物の運動性に差異がないことを事前に確認しておく必要があります。

*2)ここで、空間参照記憶は課題内の全ての試行において共通して有効な空間記憶を指します。より具体的に言うと、その試行内で既に進入した走路がどれであるかに関する記憶は空間作業記憶にあたり、報酬が置かれている、または置かれていない走路がどれであるかに関する記憶は空間参照記憶にあたります。

(3) 遅延空間 win-shift 課題

当該課題は(2)と同様に 8 方向放射状迷路を用いるものですが、(2)と比較してより短期的な空間参照記憶を評価することができます。

手法としては、(2)の①~③と同じ手順を踏んだ後、訓練試行として

- ④ 全走路の先端に報酬を置く
- ⑤ ギロチンドア等で任意の 4 走路への進入を制限する
- ⑥ 小動物を中央のプラットフォームに置く
- ⑦ 進入可能な 4 走路にある報酬を採り終えるか 5 分経過するまで探索させる

という手順を踏んだ後、小動物をケージに戻して 5 分間の遅延時間をおき、更に報酬の位置を動かさずに保持試行として

⑧ 全てのギロチンドアを開放する

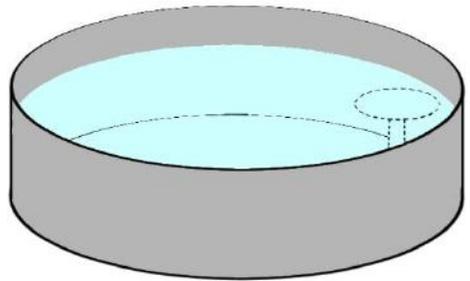
⑨ 残っている報酬を全て採り終えるか 5 分経過するまで探索させる

という試行を数日間行うものが一般的です。

(a)「訓練試行エラー数 = 訓練試行において一度進入した走路に再進入した回数」、(b)「試行間エラー数 = 保持試行において訓練試行で進入した走路に再進入した回数」、(c)「試行内エラー = 保持試行において一度進入した走路に再進入した回数」を短期空間記憶の指標として用います。

(4) モリス水迷路試験

当該試験は水を張った円形のプールを用いるもので、空間参照記憶を評価します。空間作業記憶の影響をほとんど考慮しなくてよいため、1日に複数回の試験を行うことができ、かつ学習の早さや成績の安定性が高いという長所があります。一方で、当該試験が元々ラットを対象として考案されたものであり、マウスでは遂行能力が大きく劣ること、また個体ごとの水泳能力や水に対する反応性が混交要因*3となり結果が大きく変わってしまうことが報告されており、注意が必要です。



手法としては

① プールにスキムミルク等で白濁させた 20℃以上の水を張る

② 迷路周辺の定位置に視覚的な目印となりうるオブジェクトを配置する

という手順を踏んだ後、訓練として

③ 試行間で空間的な位置が不変で、水面より僅かに低い逃避台を設置する

④ 逃避台を置いた場所を基準に 4 つの象限を考え、任意の象限に小動物を放つ

⑤ 小動物が 60 秒以内に逃避台に到達した場合、逃避台に 20 秒滞在させる

⑥ ⑤を達成できなかった場合、逃避台へ誘導して 20 秒滞在させる

⑦ その後小動物を掬い上げ、速やかに水分を拭き取り、体温維持に配慮する

という試行を繰り返すものが一般的です。

空間参照記憶の指標として遊泳時間を用い、学習について評価します。正常な小動物*4の場合、試行を繰り返すことで逃避台のある位置に関する空間参照記憶が形成され、最終的には逃避台のある方向へ直線的に向かうようになります。

また、学習の成立を確認するためにプローブテストを行う場合もあります。逃避台を撤去した迷路上に訓練後の小動物を放つと、小動物は訓練時に逃避台が設置されていた象限でより多く遊泳します。この遊泳時間を空間参照記憶の保持と想起の指標として評価します。

*3)混交要因とは、ある特定の行動を測定する際に、目的の行動と無関係でありながら測定結果に影響を及ぼす行動異常や外的要因のこと。混交要因の影響が大きく測定が困難だと判断された場合は、別の試験で代用する必要があります。

*4)実験を行う際は、身体の機能が正常に働く個体と、身体の損傷または遺伝子改変等を行った個体とで結果を比較するケースが多く見られます。ここでは前者に該当するものを「正常な小動物」としています。

(5) バーンズ迷路試験

当該試験は小動物が明るく開けた場所を嫌う性質を示すことを利用したもので、主に空間参照記憶を評価します。(4)との類似点が目立つものの、伴うストレスが比較的小さく汎用性が高い一方で、僅かながら空間作業記憶に依存するという問題点があります。

手法としては、試験に先立って

① 迷路の円盤部分を明るく照らされた状態にする

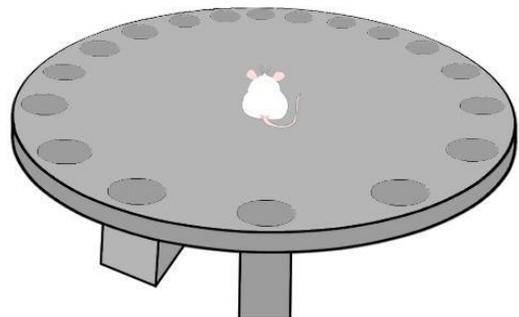
② 迷路周辺の定位置に視覚的な目印となりうるオブジェクトを配置する

という手順を踏んだ後、訓練として

③ 試行間で空間的な位置が不変な1つの穴の下に暗く狭い逃避箱を設置する

④ 小動物を円盤中央に置き、逃避箱に入るまで探索させる

という試行を繰り返すものが一般的です。ただし、円盤状の傷や匂いなどの刺激を記憶の手掛かりとさせないため、試行毎に円盤を回転させる必要があります。



空間参照記憶の指標として(a)「逃避潜時 = 逃避箱に入るまでの時間」および(b)「エラー数 = 逃避箱の無い穴を覗いた回数」を用い、学習について評価します。正常な小動物の場合、試行を繰り返すことで逃避箱のある穴の位置に関する空間参照記憶が形成され、最終的には逃避箱のある穴の方向へ直線的に向かうようになります。なお、(a)を指標とする際は、試験に用いた小動物の運動性に差異がないことを事前に確認しておく必要があります。

また、(4)と同様にプローブテストを行う場合もあります。逃避箱を撤去した迷路上に訓練後の小動物を置くと、小動物は訓練時に逃避箱が設置されていた穴の付近へ向かい、そこに留まろうとします。この滞在時間を空間参照記憶の保持と想起の指標として評価します。

4. 適切な試験の検討

前章に示したものを含め、小動物の記憶を評価する試験には様々な種類があり、それぞれ目的や状況に応じて使い分けが可能であることがわ

試験・課題	評価対象	長所	短所
(1)Y-迷路	空間作業記憶	簡便に行うことができる	機能障害について調べることはできない
(2)8方向放射状迷路	空間作業記憶 空間参照記憶	空間作業記憶・参照記憶を同時に評価できる	食餌制限に伴うストレスあり
(3)遅延空間win-shift	空間作業記憶 空間参照記憶	(2)に類似、より短期的な参照記憶を評価できる	食餌制限に伴うストレスあり
(4)モリス水迷路	空間参照記憶	短期間で結果が出る、作業記憶の影響ほぼなし	マウス利用困難、ストレス大、混交要因の影響大
(5)バーンズ迷路	空間参照記憶	伴うストレスが比較的小さい	僅かながら作業記憶の影響あり

かります。なお、前ページの表は(1)～(5)の特徴をまとめたものです。

さて、私はカフェインがマウスの記憶に与える影響について調べることが目的としており、かつ環境的な要因によりラットを飼育し代替とすることが困難であるため、試験として(4)を用いることは不適です。また、カフェインが記憶力の向上に貢献するという結果を期待している状況で、試験内で正常な小動物が元から高い記憶力の水準を見せる(1)についても利用しがたいと言えます。

一方、(2)、(3)、(5)についてはいずれを用いても研究は可能なのですが、空間作業記憶、参照記憶の双方への影響を調べられる(2)または(3)の利用が好ましいと考え、今回は(3)を研究に用いることとしました。研究から得られた結果は来年度の記事に掲載する予定です。

5. おわりに

私達がヒトの健康と福祉を追求し、医療として適用する上で、ヒト以外の動物を用いた実験は欠かせないものとなっています。もちろんヒトを用いた実験も数多行われていますが、実験の内容には厳しい制約が付きまといまます。

他方、マウスを始めとする種々の動物はヒトと生命原理を同じくしており、それらから得られた知見は、多少の差異こそあれ基本的に人間にも適用することが可能です。動物実験はこの事実に基づいて行われており、実際に並々ならぬ成果を上げています。現状、動物を実験に用いることは、ヒトが他の生物種を食物とすることと同じく、ヒトがよりよい生を享受する上で必要なことなのです。

しかし、だからといって実験動物を徒に虐げるような所業は、決して許されることではありません。動物を実験に用いる際は可能な限り人道的に扱うことが求められていますし、実際に人道的動物実験の3原則(3R)として知られる「Replacement(代替)」「Reduction(削減)」

「Refinement(実験精度向上)」、すなわち「可能な限り動物を使用しない実験に置き換える」「可能な限り実験に用いる動物の数を減らす」「可能な限り動物の負担を軽くし、かつ有効な情報をより多く得られるよう実験方法を改良する」ことは、動物実験における基本方針として世界的に受け入れられています。私自身もこの指針に則って以降の実験を行っていく所存であることをここに明記いたします。

最後になりましたが、拙文をここまで読んで下さった皆様に厚く御礼申し上げます。来年度の記事も読んで頂けますと幸いです。

6. 参考文献

- ・迷路 - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/25)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/迷路>
- ・Y-迷路試験 (最終閲覧日 2021/3/21)
https://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/biochem/labo/Y_meiji.pdf
- ・学習・記憶行動の評価法 (最終閲覧日 2021/3/24)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/130/2/130_2_112/_pdf
- ・行動テストバッテリー - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/25)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/行動テストバッテリー>
- ・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 (最終閲覧日 2021/3/23)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/129/6/129_6_457/_pdf
- ・IL1RAPL1 欠損マウスの表現型解析 (最終閲覧日 2021/3/25)
https://www.jstage.jst.go.jp/article/fpj/145/4/145_187/_pdf
- ・痛みと鎮痛の基礎知識 齧歯類を用いた学習・記憶行動解析 (最終閲覧日 2021/3/25)
<http://plaza.umin.ac.jp/~beehappy/analgesia/nr-mouse-behav.html>
- ・記憶の分類 - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/20)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/記憶の分類>
- ・記憶想起 - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/20)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/記憶想起>
- ・記憶固定化 - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/20)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/記憶固定化>
- ・符号化 - 脳科学辞典 (最終閲覧日 2021/3/20)
<https://bsd.neuroinf.jp/wiki/符号化>
- ・動物実験について 日本生理学会 (最終閲覧日 2021/3/26)
<http://physiology.jp/guidance/4804/>