

1. はじめに

私はカフェインがマウスの短期空間記憶に与える影響について研究を行っています。特に昨年は諸般の記憶評価法についてその仔細をまとめ、比較の上遅延空間 win-shift 課題で以て評価を行うことを決めました。その後研究を進め、成果を得ることができたため本稿にて報告します。

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、これらのいずれか 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る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、記憶は保持できる期間に応じて「短期記憶」と「長期記憶」に分類される場合があります。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認められています。

一方で、環境に対する主観的なイメージに関する記憶は空間記憶と呼ばれ、これは短期記憶、長期記憶のいずれであるかに依りません。更に、空間記憶の評価法として主に用いられる 8 方向放射状迷路課題(Olton & Samuelson (1976)による)を遂行する上で用いられる記憶行動として、空間記憶は空間作業記憶と空間参照記憶に分けられる場合があります。8 方向放射状迷路課題では例えば、試行間で共通の複数走路の先端に報酬となる餌ペレットを配置し、これらを選択させる手法がとられますが、この場合動物が効率よく課題を解決するには、自身が既にその試行で進入した走路はどれであるか、或いはどの走路に報酬が配置され、どの走路に報酬が配置されないかという 2 つの事項を記憶する必要があります。以下では前者に関する記憶を空間作業記憶、後者に関する記憶を空間参照記憶とし、また以下でこれらの用語が使用された場合は例外なくこの定義に従うものとします。

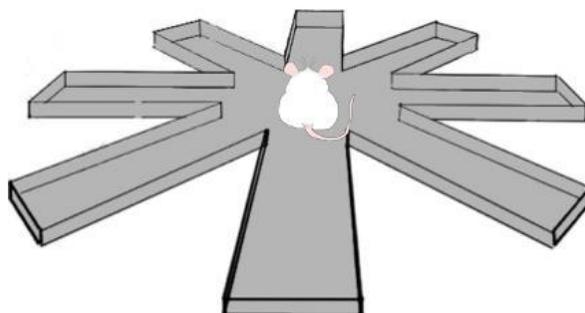
3. 実験内容

(1) 実験に用いたもの

実験を行うにあたって使用したものは以下の通りです。

- ・ 8 方向放射状迷路
- ・ カフェイン水和物粉末
- ・ マウス用給水器
- ・ 餌ペレット

なお、8 方向放射状迷路には各走路への進入口にギロチンドアを、各走路の先端に餌ペレット用のカップを備え付け、中央のホーム区画からはカップの内部の餌ペレットの有無を確認できないようにしました。大きさについての詳細は以下の通りです。



走路長さ	300 mm
走路幅	80 mm
走路ガード高さ	20 mm
ホーム区画大きさ	200 mm * 200 mm
土台高さ	400 mm

(2) 使用動物

実験は4月齢のマウス *Mus musculus* (いずれも JF1 系統と考えられるが、近交系であるかどうかは不明) をコントロール群とカフェイン摂取群に分けて行いました。両群は共に同じ温度、湿度並びに昼夜サイクルの下で飼育し、実験開始7日前まで水並びに餌を自由に摂取させ、以降は給餌量を制限し体重を制限前の85%に保ちました。また、カフェイン摂取群では実験開始3日前に給水器内の水を濃度0.8 mmol/L のカフェイン水溶液に交換し、カフェインを継続的に経口摂取させました。なお、カフェイン摂取群において、この変更以前と以後では給水器からの摂取量に変化は見られませんでした。

(3) 実験手順

今回、空間作業記憶ならびに空間参照記憶を評価するにあたってマウスに課した課題は遅延空間 win-shift 課題と呼ばれるもので、特に第 2 章にて言及した 8 方向放射状迷路課題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るとされています。具体的な手順は以下の通りです。

① 学習訓練

遅延空間 win-shift 課題は空腹状態の動物による餌の探索行動を利用したものであるため、当該課題にあたらせたマウスには事前に食餌制限を課し、実験が終了するまで体重を平常時の 85% 程度に保ちました。また、学習訓練として全ての走路の先に餌ペレットを置き、ギロチンドアを全て解放した状態の 8 方向放射状迷路をマウスに探索させる試行を 1 個体あたり 1 日 1 回、計 10 日間繰り返し、迷路への馴化を図りました。この間、迷路の周囲には目印となる物体を多数配置し、実験が終了するまでこれらは動かしませんでした。

② 訓練試行・保持試行

学習訓練を行ったマウスには 1 個体あたり 1 日 1 回、遅延空間 win-shift 課題を課しました。当該課題では訓練試行を行った後マウスをケージに戻し、5 分経過したのち保持試行を行います。訓練試行の具体的な手順は以下の通りです。

- (a) 全走路の先端に報酬として餌ペレットを配置する
- (b) ギロチンドアで任意の 4 走路への進入を制限する
- (c) マウスを中央のプラットフォームに置く
- (d) 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

保持試行の具体的な手順は以下の通りです。ただし報酬の位置は動かさないものとします。

- (e) 全てのギロチンドアを開放する
- (f) 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

ここで、訓練試行エラー数、試行間エラー数、試行内エラー数の 3 数値を計測し、訓練試行エラー数及び試行内エラー数を短期空間作業記憶の指標として、試行間エラー数を短期空間参照記憶の指標として用います。なお、この 3 数値の定義は以下に従うものとします。

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

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

試行内エラー数 = 保持試行において一度進入した走路に再進入した回数

(4) 統計の手法

両群の各エラー数は全て正規分布に従うと仮定し、この下で各エラー数についてウェルチの t 検定を用いて比較します。

ウェルチの t 検定では、まず比較する両群 X_1, \dots, X_m および Y_1, \dots, Y_n (それぞれサンプルサイズは m, n) について標本平均 \bar{X} および \bar{Y} 、ならびに不偏分散 U_X および U_Y を求め、検定統計量 t_0 を $t_0 =$

$$\frac{|\bar{X} - \bar{Y}|}{\sqrt{\frac{U_X + U_Y}{m + n}}}$$

$$\frac{\left(\frac{U_X + U_Y}{m + n}\right)^2}{\frac{U_X^2}{m^2(m-1)} + \frac{U_Y^2}{n^2(n-1)}}$$

出されますが、これは小数値を取りえるので、 ν が 10 以上の場合は小数部を切り捨て整数部のみを使用し、10 未満であれば少数自由度の t 分布表を利用します。

以上の計算から得られた自由度 ν 及び事前に定めた有意水準 α を t 分布表に照らし合わせて t 値の臨界値を導き、これと t_0 を比較することで以て、2 群間で得られた差異が有意であるか否かを判断します。なお、以下では $\alpha = 0.05$ として結果を算出しています。

4. 実験結果

(1) 訓練試行エラー数、
試行間エラー数、試行内エラー数

自由度 ν \ α	0.1	0.05	0.025	0.01
1	3.078	6.314	12.706	31.821
2	1.886	2.920	4.303	6.965
3	1.638	2.353	3.182	4.541
4	1.533	2.132	2.776	3.747
5	1.476	2.015	2.571	3.365
6	1.440	1.943	2.447	3.143
7	1.415	1.895	2.365	2.998
8	1.397	1.860	2.306	2.896
9	1.383	1.833	2.262	2.821
10	1.372	1.812	2.228	2.764
11	1.363	1.796	2.201	2.718
12	1.356	1.782	2.179	2.681
13	1.350	1.771	2.160	2.650
14	1.345	1.761	2.145	2.624
15	1.341	1.753	2.131	2.602
16	1.337	1.746	2.120	2.583
17	1.333	1.740	2.110	2.567
18	1.330	1.734	2.101	2.552
19	1.328	1.729	2.093	2.539
20	1.325	1.725	2.086	2.528
21	1.323	1.721	2.080	2.518
22	1.321	1.717	2.074	2.508
23	1.319	1.714	2.069	2.500
24	1.318	1.711	2.064	2.492
25	1.316	1.708	2.060	2.485
26	1.315	1.706	2.056	2.479
27	1.314	1.703	2.052	2.473
28	1.313	1.701	2.048	2.467
29	1.311	1.699	2.045	2.462
30	1.310	1.697	2.042	2.457
31	1.309	1.696	2.040	2.453
32	1.309	1.694	2.037	2.449
33	1.308	1.692	2.035	2.445
34	1.307	1.691	2.032	2.441
35	1.306	1.690	2.030	2.438

t 分布表：株式会社サイエンス社

公開 PDF(本稿末尾に記載)より一部抜粋

計測された両群の訓練試行エラー数、試行間エラー数、試行内エラー数は以下の通りです。

コントロール群				カフェイン摂取群			
ID	訓練試行er	試行間er	試行内er	ID	訓練試行er	試行間er	試行内er
1	1	3	0	1	0	1	1
2	0	2	0	2	0	1	0
3	1	0	0	3	0	1	1
4	1	2	0	4	1	2	0
5	0	2	0	5	1	0	0
6	0	2	0	6	0	1	2
7	4	3	3	7	0	1	1
8	2	1	5	8	0	1	1
9	1	2	3	9	0	3	0
10	0	2	0	10	1	0	0
11	0	2	1	11	0	2	0
12	1	1	0	12	0	3	1
13	1	3	0	13	0	0	0
14	0	2 *		14	1	0	0
				15	0	1	0
				16	0	1	1
				17	2	3	0
				18	1	0	0
				19	0	1	1
				20	2	1	2
				21	0	1	0
				22	0	0	0
				23	0	0	0
				24	0	1	0
				25	1	2	1
				26	0	3	1
				27	1	3	1
				28	0	1	0

ここで、*をつけたサンプルはコントロール群における試行内エラー

数の UCL(上方管理限界)である 6.5 を上回るため、外れ値として除外して計算します。

① 訓練試行エラー数

コントロール群における訓練試行エラー数の標本平均は 0.857143、不偏分散は 1.208791、またカフェイン摂取群における訓練試行エラー数の標本平均は 0.392857、不偏分散は 0.395503 ですから、検定統計量 $t_0 \approx 1.465$ 、自由度 $\nu \approx 17$ が得られます。このとき t_0 は $\nu = 17$ 、 $\alpha = 0.05$ のときの t の臨界値 1.740 を下回るので、両群の訓練試行エラー数の差異は有意とは言えません。

② 試行間エラー数

コントロール群における試行間エラー数の標本平均は 1.928571、不偏分散は 0.686813、またカフェイン摂取群における試行間エラー数の標本平均は 1.214286、不偏分散は 1.063492 ですから、検定統計量 $t_0 \approx 2.421$ 、自由度 $\nu \approx 32$ が得られます。このとき t_0 は $\nu = 32$ 、 $\alpha = 0.05$ のときの t の臨界値 1.694 を上回るので、両群の試行間エラー数の差異は有意と言えます。

③ 試行内エラー数

コントロール群における試行内エラー数の標本平均は 0.923077、不偏分散は 2.74359、またカフェイン摂取群における試行内エラー数の標本平均は 0.50、不偏分散は 0.407407 ですから、検定統計量 $t_0 \approx 0.891$ 、自由度 $\nu \approx 14$ が得られます。このとき t_0 は $\nu = 14$ 、 $\alpha = 0.05$ のときの t の臨界値 1.761 を下回るので、両群の試行内エラー数の差異は有意とは言えません。

5. 考察

(1) 実験結果から示唆されること

第 4 章にて示されたように、本実験では、カフェイン摂取群における試行間エラー数はコントロール群における試行間エラー数と比較して有意に小さな値をとったものの、訓練試行エラー数ならびに試行内エラー数については有意な差は見られませんでした。第 3 章の②を踏まえると、以上の結果はカフェインの継続的な経口摂取が短期空間参照記憶を優位に働かせる一方、短期空間作業記憶には大きく影響しないことを示唆していると言えます。

(2) 遅延空間 win-shift 課題の問題点

マウスが遅延空間 win-shift 課題にあたる際、時計回り、ないし反時計回りの向きに隣り合う走路のみを順に選択しているような行動が確

認められました。このような行動をとっている時、マウスは自身の空間記憶に基づかずに走路選択を行っている場合があります。本実験においてこのような行動は稀でしたが、頻度によっては実験結果に大きな影響を及ぼす場合も考えられるため、サンプルの精査が必要だと考えられます。

6. おわりに

本稿ではカフェインがマウスの短期空間記憶に与える影響について、その研究成果を述べました。しかし、動物実験が「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ある」という事実に基づいて行われていることを鑑みれば、今回の実験を通して得られた知見もまた人間に応用できると考えられます。

他方、認知症の進行緩和や治療法に注目が集まっている現在、記憶分野の研究もまた盛んにおこなわれています。近い将来、記憶分野の研究が進み、様々な成果が挙げられることを期待します。

7. 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>

・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

・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

・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>

・Welch の t 検定 | 統計学の時間 | 統計WEB (最終閲覧日 2022/3/28)

<https://bellcurve.jp/statistics/course/9936.html>

・t 分布表 : -株式会社サイエンス社 (最終閲覧日 2022/3/28)

[t_distribution.pdf\(saiensu.co.jp\)](http://t_distribution.pdf(saiensu.co.jp))

・マウス画像データベース (最終閲覧日 2022/3/30)

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/AnimalCenter/mouseDB/index2.html>