

〔特別掲載〕

視覚弁別記憶学習と脳内物質の変動に
関する一考察

東京女子医科大学大学生化学教室 (主任: 松村義寛教授)

小 池 正 明
コ イケ マサ アキ

(受付 昭和54年10月20日)

**Memory by Visual Discrimination Learning and Changes of
Substances in Mouse Cerebrum****Masaaki KOIKE**

Department of Biochemistry (Director: Prof. Yoshihiro MATSUMURA)

Tokyo Women's Medical College

There are some studies, whether psychological visual discrimination memory could be acquired by C 57/6J mice or not. Two same devised Y-form discrimination learning apparatus which decide only visual discrimination were used for learning mice and controls. Remaining body odor of mice on the two run ways and walls from the choice point to the doors of two goal box was cleaned and destroyed with 95% ethanol to exclude instinctive behaviour of mouse by olfaction. Hitherto, this procedure was not interested.

Acquired, fixed memory of learned mice was investigated after about a month by memory retention test and mice almost remained memory for a month without reduction. Mice which remain some memory after time elapse were then sacrificed and change of some biochemical materials in brain was examined.

Although there was no remarkable difference between learned mice and controls, the author found unexpected fluorescent materials.

I. 緒 言

多くの動物は、感覚器官をとおして入ってくるさまざまな外部環境からの情報を適切に取捨選択して、よりよく環境に適応している。

特にその生体にとって、また種にとって無視できない生命維持のための新しい情報の連続は、能動的であれ、受動的であれ、新しい体験の蓄積、

すなわち記憶の固定となつて以後の適応行動に生かされる。

従来心理現象として理解されてきたこのような記憶機能は、近年生化学的に分子レベルで、脳内物質の変化や新生として考えられるようになってきた。

学習と脳内物質の変化、新生との関係を検討し

た研究には、古く Hydén らの報告がある。

Hydén らは、ラットに綱渡りを学習させて前庭神経核の神経細胞内のリボ核酸 (RNA) の塩基組成が変化すること、利き手転換学習によつて、大脳皮質感覚運動領神経細胞内の RNA 量の増大と塩基組成の変化があること、さらに海馬回錐体細胞内の S-100 タンパク量の増大や生合成の促進があることなどを報告した^{1)~4)}。

また Hydén らは、実験動物にアカゲザルを使つて、ウィスコンシン式一般検査装置を改良した視覚弁別テストや遅延交替テスト (Delayed alternation test) を行ない、学習に深い関係のある脳の3つの部位について分析した結果、海馬回神経細胞の RNA 塩基組成の存在比の変化が、学習の種類に係らず、同じようなパターンで生じることなどを発見した⁵⁾。

一方、記憶の固定が、こうした脳内物質の代謝変動に基礎をおくものならば、その変動を阻害することで、記憶の固定化も阻止されるであろうとの見地からの研究も多い。

この面からのアプローチによれば、代謝阻害剤を投与する時点を変えて、記憶固定の過程を経時的に知ることができる。

Agranoff らは、タンパク合成阻害剤であるピュロマイシン (puromycin) を通常の金魚 (*Carassius auratus*) に経時的に脳内注射して、シャトル箱型水槽を使つて電撃逃避学習をさせた。

対照無注射金魚群は、30日に及ぶ間隔をおいて、テストをしても記憶が保持され条件刺激である光に反応したが、学習終了直後や1時間未満のうちにピュロマイシン注射を受けた金魚は、記憶保持に障害を示したと言う⁶⁾。

記憶固定に関連のあるタンパクが、学習終了後1時間未満で合成されたことになる。

問題点が多いが、学習した動物から記憶と最も関係の深いと考えられる脳内物質を抽出し、これを未学習の同じ動物に注射、対照動物と比較すると学習成績が向上しているという研究もある⁷⁾。

いずれにしても多面的な研究成果から、記憶現象が脳内物質依存的であることが示されている。

記憶に対する物質的基礎が以上のように特異タンパクの新生などタンパクの代謝変動にあるならば、その素材となる前駆物質の脳内タンパクへのとりこみに対しても注目と検討が必要であろう。

Glassman らは、C57BL/6J 系マウスのオスを使つて、皮下に放射性標識アミノ酸を注射した後、スキナー箱でパー押し学習をさせて、脳タンパクへの放射能のとりこみを調べたところ、³H-リジンでは有意な増大が認められたが、³H-ロイシンでは異化反応が促進され、とりこみ増大はおこらず却つて低下した。

³H-メチオニンにおいては90%以上が ³H₂O 画分に認められた⁸⁾。

このことは同じ学習をしても、アミノ酸を異にすると脳タンパクへのとりこみパターンが変わることを意味する。

このアミノ酸とりこみ実験、さらに同じマウスでも系を異にすれば学習能力も異なるという事実⁹⁾、また同じ代謝阻害剤を使つても動物の種を異にすれば、副作用の発現をみたり、記憶障害の内容も異なるという報告¹⁰⁾などを例にして、以上述べてきた主な記憶研究の諸報告から考察されるように、学習と記憶固定の過程に伴つて生じる脳内物質の変動は非常に多面的である。

本研究では、以上のような記憶研究の特殊性を考慮し、まず研究に不可欠な学習について、従来用いられてきた方法を検討し、異常体位の転換修正、新しい運動の学習といった運動機能の記憶ではなく、判断という高次の脳機能を充分働かせねばならない弁別記憶が獲得固定されるような学習方法であるとともにあわせて飢餓状態を動因としたり、電撃を無条件刺激に用いることが、被験動物に生理的変化や心理的動揺を引き起こし、結果的に記憶の固定化やそれに関連する脳内代謝への影響を及ぼすことを考慮して、このような不要因子が極力除外し得るような学習方法を計画考案し、脳内物質の変化をとらえようと考えた。

ついで、この高次の弁別記憶が充分被験動物に獲得固定されるように、長期間にわたつて記憶学

習を行なった後、獲得固定されたこの記憶が長時間の休止期を設定しても消滅せず保持されているか否かを調べるとともに、その時点で脳内物質の変動が認められるかどうかを、脳機能に関連すると思われる脳内遊離アミノ酸の変動をとおして検討するのを目的とした。

II. 実験動物

C57BL/6J 系で8週齢のオスのマウスが本学動物管理室より導入され、実験動物として使われた。

学習訓練時以外は、各マウスは一個体ごとにケージに入れられ、動物管理室で飼育される。

III. 実験方法

(A) 記憶学習装置 (写真1)

弁別記憶学習装置は、厚さ約4mmの不透明黒色アクリル板を材料とし、3本の走路が互いに120°に開いたY型学習装置で、写真1に示すような構造になっている。

S 出発箱 学習を受けるマウス1個体が入られる。

G ゲート 上下動し、マウスを走路と隔離する。

A 走路 マウスが出発箱を出て目標箱に至るまでの道。

C 選択地点 マウスが正しい目標箱へ向かうか否かが決定される重要な地点である。

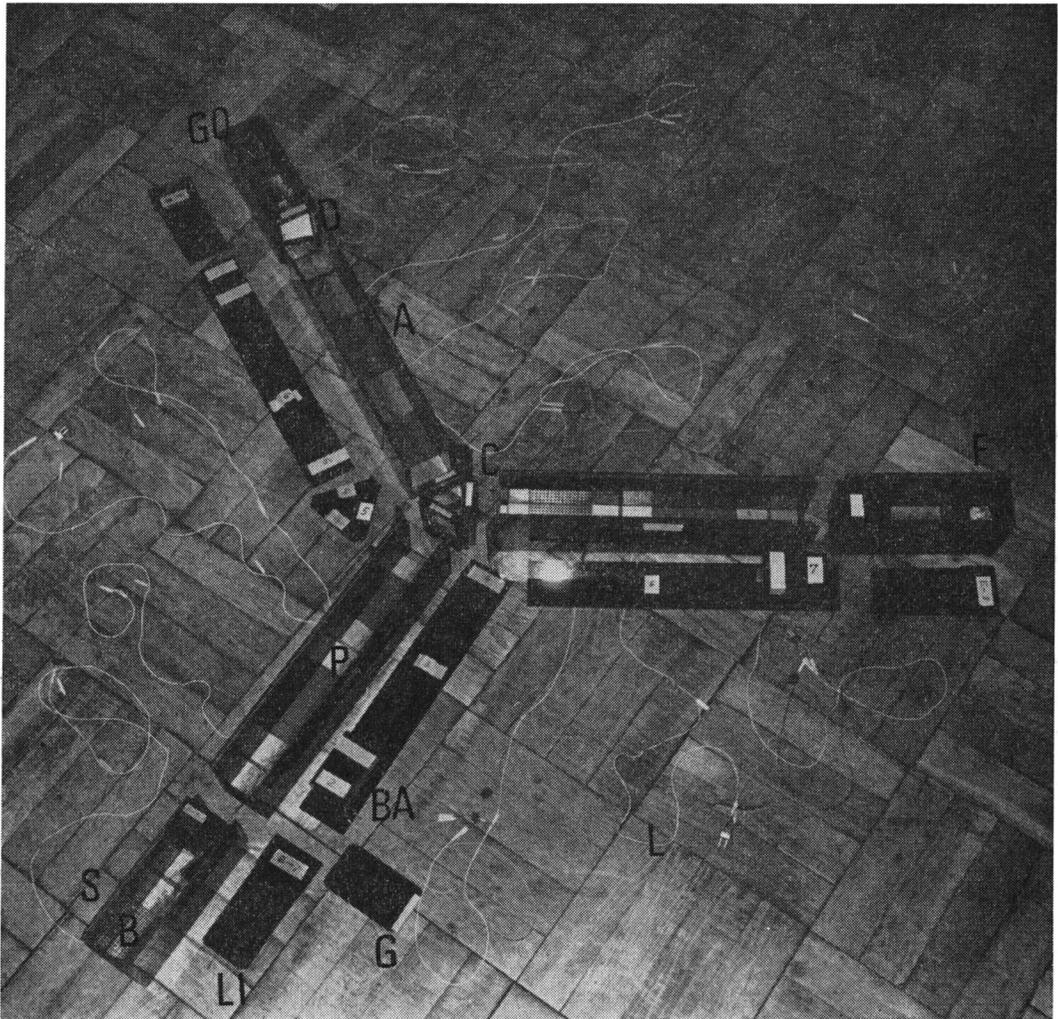


写真1 弁別記憶学習装置

D ドア 正反応または誤反応を示す視覚弁別カードが取付けられており、ストッパーによつて走路側には開かなくなる左右開きのドア。

GO 目標箱 マウスが完全に入った時、正誤が判定される場所。

F エサ箱 2つのエサ箱はともにピーナッツが5g入れられてあるが、誤反応側に入った時は、食べられないように穴のあいた蓋がされてある。

B 絶縁床板 穴のあいたベークライトの床板で電極銅板と絶縁される。

P 検知銅板 裏側はベークライト。向かいあつて1組となりマウスの四肢が同時に触れると導電し、位置表示ランプが点灯する。

トランジスターの高周波発振を利用しているのでマウスの体には何らの影響ももたらされない。

BA 電池室 電池室の直下には450mwの豆球が点灯する。

定電圧を期するため適時電池は新しくする。

L リード線 位置表示装置に連絡して回路をつくる。

LI 蓋 外界と視覚的に絶縁するため、すべての装置上へのせられる。

学習用と対照用の2つの装置が用意されたが、全く同じに作製されてある。

(B) 位置表示装置 (写真2)

学習装置に蓋がのせられるので、装置内のマウスの位置の経過を知る必要があるため特に設けた装置である。

トランジスターの高周波発振とサイリスタのランプ点灯制御とを組み合わせた回路で、学習装置の検知銅板と、それと絶縁して向かい合うアース銅板とにマウスがまたがり乗ると回路が閉じて、高周波発振が弱化したり、または停止したりする。

その結果、トランジスターの電流が増大してバリオームの電圧上昇をもたらし、サイリスタがトリガーされ、大きい電流が流れてリレーを作動させる。

リレーは乾電池(4.5V)と青緑色に点灯する発光ダイオード(対照マウス用装置では赤色に点灯する)とで回路を構成しているので、リレー作動とともにこの回路が閉じ、発光ダイオードが点灯する。

点灯回路も検知回路も消費電力は極めて少なくてす

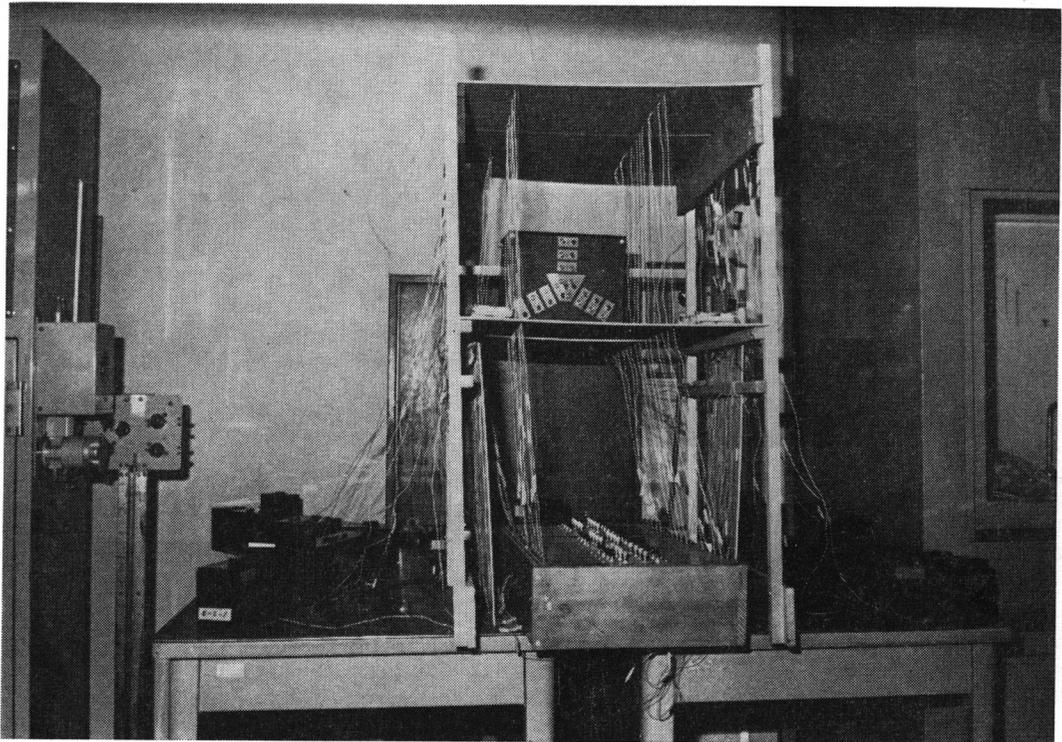


写真2 位置表示装置外観

む。

位置表示用発光ダイオードは学習用（青緑色に点灯）、対照用（赤色に点灯）とも1枚のペークライト盤上に配列され、一見して2匹のマウスの位置を知ることができる。

写真2は、表示装置の外観を示したものである。

（C）同時弁別学習訓練

無作為に選んだ2匹のマウスを1組とし、10組、20匹のマウス群をつくつて、各組の1匹を学習マウス、他の1匹を対照マウスとして扱う。

学習マウスは弁別学習を受けるが、対照マウスは弁別学習を受けない。

この相違を除いて、1組のマウスは常に同じ条件で飼育される。

1組ずつのそれぞれのマウスは、最初学習装置に対する順化訓練を受ける。

学習マウスは学習用、対照マウスはそれに隣接して置かれてある対照用装置が使われる。

それぞれの出発箱に各マウスを入れ、すべてのゲート

を除去、すべてのドアを開放してマウスに自由探索行動をとらせる。

装置のすべての蓋は除去してマウスの行動を観察する。

時にマウスは装置壁面に前肢をのせ外部の様子をうかがったりするが、その際は軽く制してマウスの飛び出しを防止する。

順化は観察によつて、探索行動や警戒的な行動が消えるまで続けるが、通常は30分ほどでよいことが予備実験からわかつた。

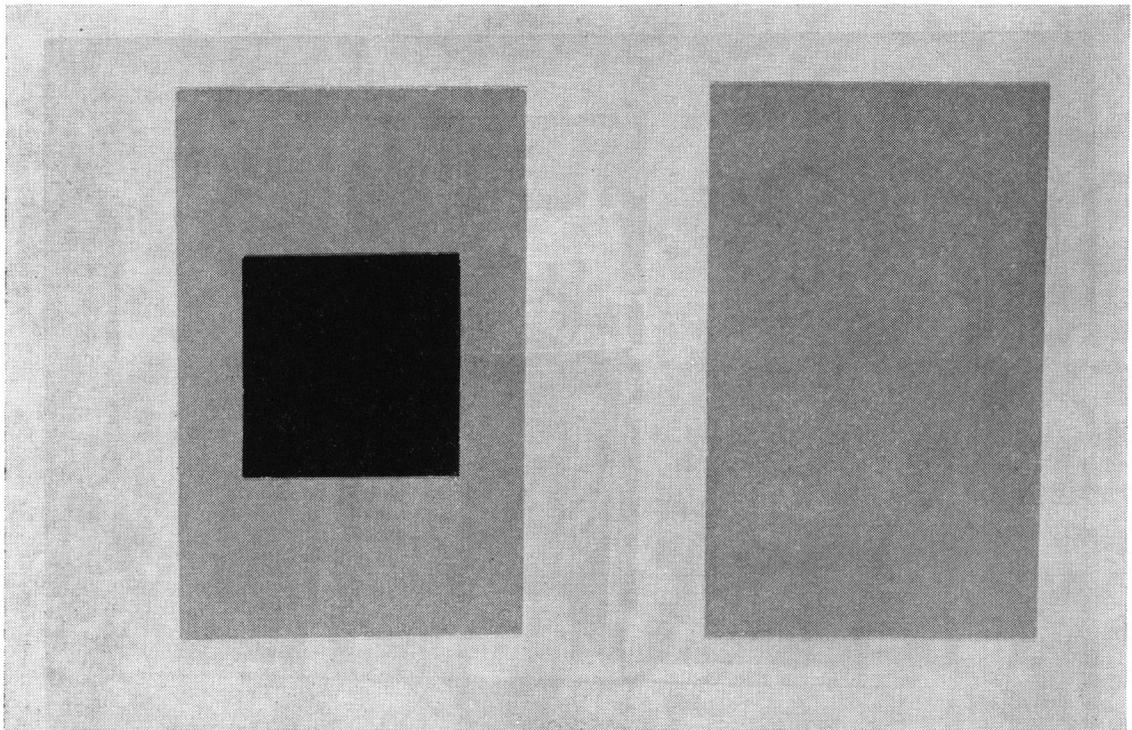
順化を終えたマウスは次にドア開き訓練を受ける。

2つの目標箱のドアを半開きにしておき、マウスをドア近くにおいて、軽く追いたてて目標箱の中へ追いこむ。

体の一部がドアに触れる程度の開きであればマウスは楽に目標箱に入っていく。

目標箱から走路へ出す場合も同じ要領で行なう。

訓練を反復し、少しずつドアを閉じていけば、マウスはやがて前肢などでドアを押しあけ前進するようにな



正反応カード

誤反応カード

写真3 弁別学習用刺激カード

る。

強い追い立ては、おびえて装置の外部へ飛び出すことを招くので注意が必要である。

この訓練は予想以上に短い時間で終了した。

訓練中、マウスは装置内床面に脱糞、排尿をすることがあるので、その際は糞はピンセットで除去、尿はティッシュペーパーなどで拭きとつたあと、95%エタノールをガーゼに含ませて床面を拭き清めておく。

学習、対照マウスとも1組ずつ装置への順化とドアあけ訓練が完了したあと、初めて学習実験を行なう。

まず2枚1組の刺激カードが2組用意された。

1枚のカードはライトグレイにぬられたもので残りの1枚はそのライトグレイの面の中心部に1辺が28mmの黒色正方形色紙を貼付したものである(写真-3)。

黒色正方形色紙貼付のカードを正反応、ライトグレイのカードを誤反応として条件づける。

2枚のカードは2つのドアに走路に面して装着され、450mwの豆球によつて照明されるが、照度の一定化を期するため乾電池を適時新しくして定電圧を維持する。

左右ドアへの正反応カードの装着は、マウスなどの行動特性、すなわち位置習性や交替反応を考慮して工夫された Gellermann の系列に従つた¹¹⁾(表-1)。

対照用マウスに対するカード2枚の装着も実験マウス

表1 Gellermann 系列(1933)

1	RRLLRRLRLL	23	LRRLRRLRLL
2	RRLLRRLRLL	24	LRRLRRLRLL
3	RRLRLRRLLL	25	LRRLRRLRLL
4	RRLRLRRLLL	26	LRRLRRLRLL
5	RRLRLLRRL	27	LRRLRRLRLL
6	RRLRRLRRL	28	LRRLRRLRLL
7	RRLRRLRRL	29	LRRLRRLRLL
8	RRLRRLRRL	30	LRLRRLRLL
9	RRLRRLRRL	31	LRLRRLRLL
10	RRLRRLRRL	32	LRLRRLRLL
11	RRLRRLRRL	33	LRLRRLRLL
12	RRLRRLRRL	34	LLRRLRLLR
13	RRLRRLRRL	35	LLRRLRLLR
14	RRLRRLRRL	36	LLRRLRLLR
15	RRLRRLRRL	37	LLRRLRLLR
16	RLLRRLRRL	38	LLRRLRLLR
17	RLLRRLRRL	39	LLRRLRLLR
18	RLLRRLRRL	40	LLRRLRLLR
19	RLLRRLRRL	41	LLRRLRLLR
20	RLLRRLRRL	42	LLRRLRLLR
21	RLLRRLRRL	43	LLLRLRLLR
22	RLLRRLRRL	44	LLLRLRLLR

講座心理学 Vol. 7 182ページより

用と同一にする。

学習は10試行を1セッション(session)とし、試行間隔は5分とした。

位置表示ランプ(発光ダイオード)のスイッチを入れ、目標箱のドアが走路側に開かないようストッパーをかけ、1組のマウスをそれぞれの出発箱内へ同時に入れる。

次いで出発箱のゲートを同時に引き抜き、直ちに2個のストップウォッチで計時、表示ランプでマウスの進みを視認、マウスが目標箱内に完全に入り、エサ箱に触れて最後の表示ランプが点灯した際、計時を終える。

正反応カード側目標箱に入つたマウスは、エサ箱内のピーナッツを摂食したりして、制限時間まで自由に行動できるが、誤反応カード側目標箱へ入つた場合は、直ちに罰を受け出発箱へ戻される。

罰は指でマウスの体をはじく程度のものとするが、必ずドアを走路側に開いておき、マウスが走路側へ即座に逃げられるようにしてやるとともに、正反応側目標箱に逃げこまないようにゲートを降ろしておく。

ドアを閉じた状態で罰を与えると、逃げ場を失つたマウスは、目標箱外へ飛び出してしまうので特に注意が必要である。

マウスが出発箱へ逃げ戻つたらゲートを降ろし、次の試行の準備をする。

対照マウスはどちらの目標箱へ入つても罰を受けず、ピーナッツの摂食も自由であるが、対になつている相手の学習マウスが誤反応して罰を受けた場合は、出発箱へ戻つた時点で体をはじき、対照としての条件を揃える。

1試行終了のたびに装置の蓋を除去し、装置内の清掃を行なう。

汚物の清掃後、マウスは嗅覚に頼つて自分の残した体臭が検出される方向を選ぶ習性があるので、既述したように95%エタノールを用いて床面、壁面をよく拭き清める。

もし選択点より分岐する2走路に自分の体臭が検出できれば、視覚弁別の判断なしに体臭依存的に走路を選んでしまうであろう。

この手がかりは完全に除去しなければならないので特に選択点と、その先の2走路は念入りに拭き清めて、排出汚物の臭気、体臭の消去の完全を期する。

エタノール残存のないことを確かめた後、正誤の刺激カードを左右交換させる場合は、目標箱ごと左右交換して次の試行を始める。

学習成績は、正反応には○、誤反応には×の印を記録しておき、1セッション10試行毎に正反応数の10試行に対する百分率で表わすことにした。

Gellermann 系列は既述したようにラットやマウスの左右選択の際の嗜好習性を考慮して工夫された系列であるので、条件つけない対照マウスが偶然の数値を越える成績をとることはない(表-1)。

したがって学習マウスが少なくとも80%以上になる学習正反応率を連続獲得する日が2日以上続くようになった状態で、弁別記憶が固定したと認め、その状態になる日まで学習開始時刻やセッション数にこだわらず学習を進めた。

(D) 記憶保持テスト

弁別判断という高次の脳機能を作用させて獲得固定された記憶が、長期にわたって保持されているかどうかを究めるため行なわれた。

記憶固定が充分認められた日から約30日間、各1組毎のマウスは飼育ケージに入れられたまま動物管理室で、通常の飼育を受ける。

期日に達したマウスは、前に学習を受けた所定の場所に選ばれて記憶保持テストを受けた。

テスト方法は学習訓練の場合と全く同じである。

テストは1セッションとし、正反応数の、試行総数(10試行)に対する百分率を求めて記憶保持程度の評価とした。

(E) 強化学習

脳の弁別判断機能が活発に作用している時点で脳内物質の変動、代謝も活性を高めていると考えられる。

そこで分析直前に活性を高めた状態にしておく目的で、記憶保持テストに引き続いて学習の強化をはかつた。

すなわち前回の学習訓練と全く同じ方法で学習を始めるが、今回は5セッションを1単位として学習訓練を、途中で中断することなく連続して実施する。

各セッション間の時間間隔も最大10分までに制限する。

1単位内で成績基準に達しない場合は、1時間の休息をマウスに与えた後、引き続いて次の1単位の連続学習を行なう。

しかし、基準達成に失敗してもマウスの疲労を考え1日あたり2単位を越える学習はせず、達成に失敗したマウスは飼育ケージに戻され翌日改めて学習の強化を受ける。

1単位内で正反応率80%以上を連続2回以上とり、さらに1単位内に過去の最高成績と同一の成績か、または過去にない最高成績を獲得したセッションが含まれた時点を以て弁別判断機能活発化の現れの基準とみなし、脳内物質の変動や代謝の活性が高められた状態に達している基準とみなした。

基準に達した学習マウスから順次に24時間以内に断頭された。

(F) 薄層クロマト分析

弁別記憶の充分な固定成立が脳内遊離アミノ酸に、いかに影響したかを薄層クロマトグラフで調べた。

分析方法は以下に示すとおりである。

各マウスは、ギロチン式の断頭機によつて室温下で、1組単位で断頭される。

氷冷したスライドガラス上で、眼科手術用の鉗と安全カミソリの替刃を用いて直ちに脳を取り出し、嗅脳、大脳両半球前2/3、後1/3の3つの部位に分ける(図-1)。

それぞれの脳組織は、氷冷された秤量ビンに収納され、速やかに直示天秤で湿重量が計量される。

その後、各組織は5.0ml テフロンホモジェナイザーに、20%スルフォサルチル酸2ml とともに入れられ、氷冷されながら2分間ホモジェナイズされる。

次いで高速冷却遠心分離機(久保田製作所製)を用い、4°Cに保ちながら毎分3,000回転で30分間遠心分離を行なつて除タンパクする。

除タンパク上清の約2μl をシリカゲル TLC に付着させたのち、n-プロパノールとIN 酢酸を3:1 v/v に混和した展開溶媒で、約60分かけて展開する。

0.5%ニンヒドリン-エタノール溶液9.8ml を酢酸0.2ml と混和した発色液をスプレーした後、風乾し、デシケーター中に入れて、一晚、暗所に放置した。

標準試薬は、スレオニン、タウリン、グルタミン酸、セリン、グリシン、グルタミン、アスパラギン酸の7種のアミノ酸、それぞれ0.2mg ずつを1ml 再留水に溶解した混合液とした。

展開時の気温、湿度、展開槽内の溶媒飽和の程度などR_fの再現性に影響を及ぼす要因に留意して、展開法も上昇法とした。

展開溶媒、展開槽も毎回新鮮なものとし、不純物の付着、混入を防止した。

その結果、同一展開槽内の薄層板(2枚)のR_fは再現性よく一致した。

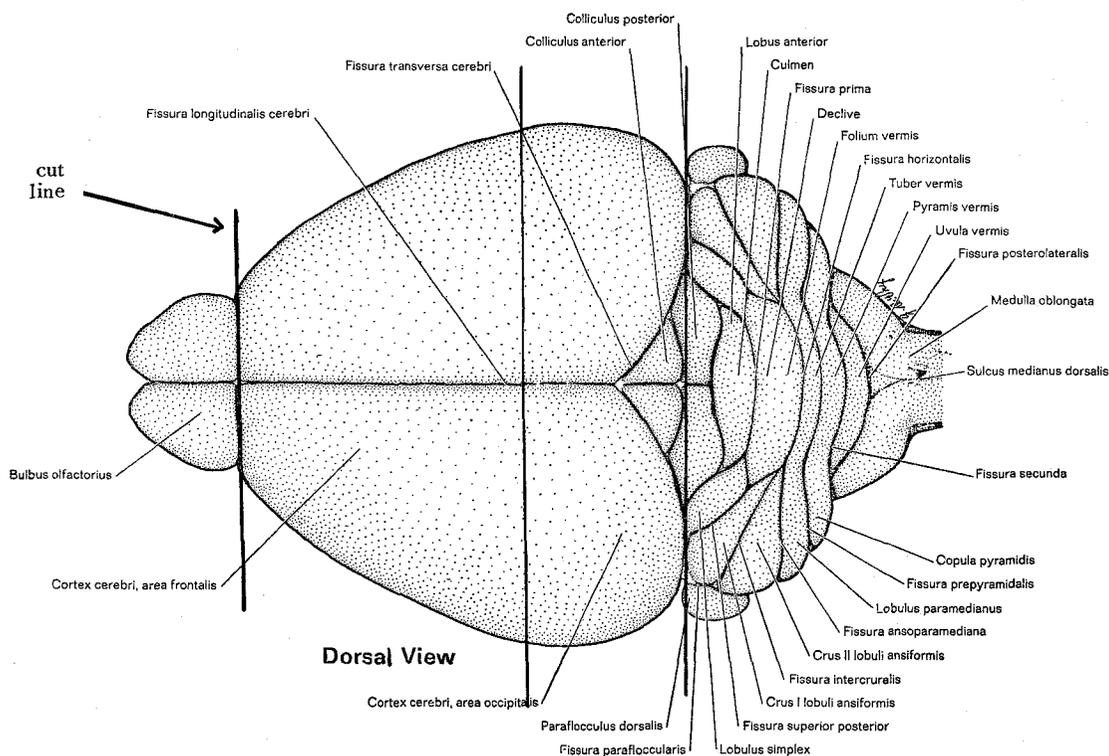


図 1

IV. 結 果

(A) 弁別学習

1979年(昭和54年)5月18日より1組ずつ順化(順致)に入り、ドア開け訓練も含めて最低1時間以上の十分な時間を与え順化を終了した。

次いで順化終了の組から学習を始め、記憶保持テスト開始予定日より約1カ月前ぐらいまでに、学習正反応率が80%以上で2セッション連続するまで各組順次学習を進めた。

その結果10組中8組の学習マウスが上記の条件を満たした。

正誤選択10試行中、8試行以上の正解が2回連続して生起する偶然率は、8試行正解2回連続の場合だけでも0.2%ぐらいなので、学習マウスの弁別成績は偶然によるものではないと考える。

図2は、記憶保持テスト前、最終3セッションの学習マウスの成績を対照マウスの成績とともに示してある。

学習マウスと対照マウスの平均成績をみると、学習マウスでは最低が73%正反応率、最高が83%正反応率であるのに対して、対照マウスでは、最低40%、最高57%で、すべて学習マウスが対照マウスに対して上位の成績を獲得した。

学習と対照の成績の差は、t-検定の結果 $p < 0.01$ で有意であった。

(B) 記憶保持テスト

図形の有無弁別という、マウスにとって高次の判断を要する記憶学習の結果、固定獲得されたと認められる弁別記憶が、1カ月程度(29日から42日)の長期の学習休止期を経過した後、消滅せずに保持されているか否かが調べられた。

記憶の消滅が生起したならば、休止後の最初のセッションの再生テストで、学習マウスの成績の低下をみるべきである。

結果が表-2に示される。

8組の学習マウスのうち、1組が極端な成績低

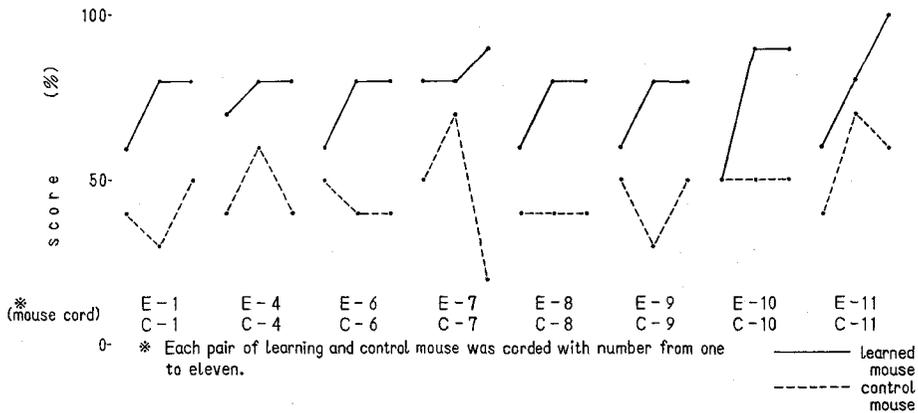


図2 The last three scores before retention test

表2 Result of retention test

Mouse cord	Last score before rest (%)	Rest time (days)	Retention test score (%)	Difference between last and retention (%)
E-1	80	29	100	+20
C-1	30		50	+20
E-9	80	34	80	0
C-9	50		40	-10
E-11	100	34	30	-70
C-11	60		60	0
E-10	90	35	90	0
C-10	50		70	+20
E-8	80	38	70	-10
C-8	40		40	0
E-6	80	41	70	-10
C-6	40		50	+10
E-7	80	42	90	+10
C-7	70		30	-40
E-5	60	48	90	+30
C-5	40		60	+20

下、2組が10%の低下を示したが、残る5組は、休止前最終テストの成績を保持したか逆に成績の向上が認められた。

極端な成績低下をみた1組を除外した残り7組の学習マウスの休止前、最終成績と休止後最初の記憶保持テストの成績の差は、t検定の結果、有意でなかつた。

すなわち弁別記憶という、マウスにとって高次

の脳機能が消滅・低下していなかつたことを示す。

(C) 学習の強化

罰を警戒しながら記憶に依存して活発に弁別学習を続けている学習マウスの行動状態では、この弁別記憶学習に関連した脳内物質の変動、代謝活性が認められる状態にあると思われる。

そこで、この状態での行動と脳内物質の変動の関係を調べるために、保持テストを終了した学習マウスから直ちに再学習に入った。

そして既述した基準に達した学習マウスから、できるだけ速やかに断頭がなされた。

一般に学習成績は大きく上下に変動しながらも向上して断頭前の最終成績に至つた。

図-3は、本実験に入つた最初の2セッションの成績と、断頭前最終の2セッションの成績とを、対照マウスの成績とともに示してある。

学習マウス10匹の最初の成績の平均正反応率は47%で、偶然に依る正反応率50%に近かつた。

しかし、最終成績では平均91%に達した。また10匹の最終2セッション、延べ20試行の平均正反応率は80%、最初の2セッション、延べ20試行の平均値は49.5%であつた。

平均の差のt検定は $p < 0.001$ となつて、弁別記憶学習の成績は有意に向上した。

一方、対照マウスは、最初のセッションの平均値も最終セッションの平均値も同じ45%と変わら

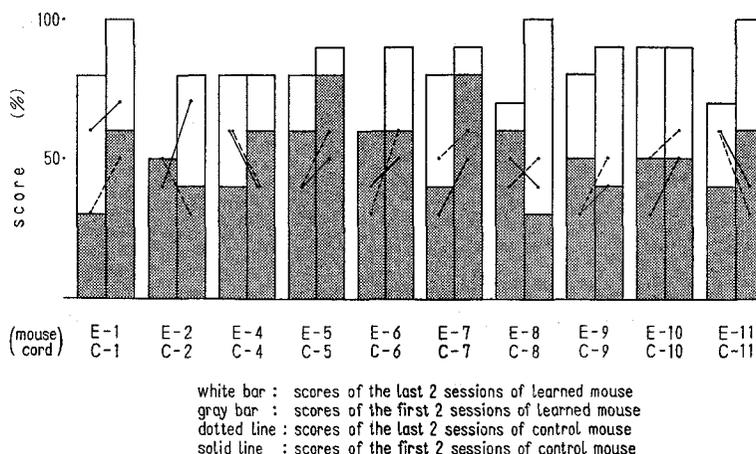


図3 Scores of the first 2 sessions and the last 2 sessions

ず、最初の延べ20試行、最後の延べ20試行の平均値も47.5%および45.5%で全く有意の差がなかった。

また最初のセッションで、学習マウスと対照マウスの平均成績の差は22%、最終セッションでは46%であった。

どちらにも有意の差があつたが、後者により大きい差があつた ($t=6.26$, $t=7.69$)。

(D) 弁別記憶再生に伴う判断所要時間と正反応数

本研究では、学習マウスは弁別記憶による判断というマウスにとっては高次の脳機能を働かせて

行動した。

弁別記憶固定化への進行過程は同時に記憶再生による判断の正確化、迅速化をもたらすものと考えられる。

弁別判断が特に必要になる場所は当然ながら選択地点および刺激カードが装着されているそれぞれのドアの直前で、学習の初期にあつてはこの3地点のいずれかで長く滞留して時間を消費し、その上誤反応してしまうことが多かつた。

とりわけ誤反応した試行の次の試行で刺激カードが交替される場合には、罰を受けた目標箱側に正反応カードが装着されるので、正確な記憶の再

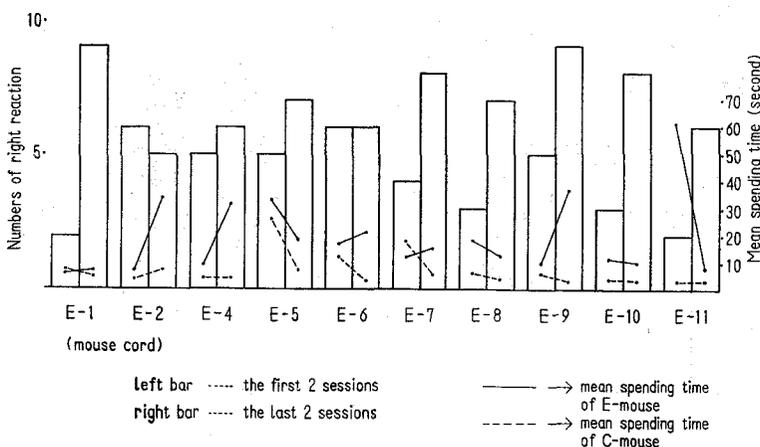


図4 The numbers of right reaction for ten stimulation card exchange trials both the first and the last 2 sessions

生がないと、この試行を成功することが困難であった。

それ故1セッション10試行中5回あるカード交換試行の時の成績が、所要時間の短縮とともに向上することは記憶固定を確認する一つの指標になると思われる。

そこで、学習最初2セッション計10試行と最終2セッション計10試行のカード交換試行の時の成績と1試行あたりの平均所要時間とを比較してみた。

図-4はその結果を示している。10匹の学習マウスのうち、E-2 マウスは初期に比べ成績が振わないが、残り9匹のうち8匹は初期よりすべて成績がよく記憶固定の確実さを思わせる。

所要時間については予期したように初期より大幅に短縮したマウスもいたが(E-11)、逆に増加したマウスもあつた(E-4, E-6, E-7, E-9)。

成績が向上したのに係らず所要時間が長くなったのは、判断に慎重になつたことのように考えられる。

対照マウスは、判断の場が与えられていないので、全セッションをとおして学習マウスに比べ殆

ど所要時間が少なく(最大平均26秒, 最少平均3秒)、初期と終期でも大部分に差がなかつた。

(E) 薄層クロマトグラフィによる分析

弁別学習成績の向上に伴い、幾つかの指標から記憶の固定が充分認められた時点で、脳内物質の変動の一端を脳内遊離アミノ酸をとおして調べようとした。

脳機能に関与する遊離アミノ酸は数多いが特に高濃度に存在するアミノ酸であるグルタミン酸、グルタミン、アスパラギン酸などについて注目した。

結果は写真, 4-A, 4-B に示される。大脳半球の前2/3の部位と海馬回を含む後1/3の部位について、目視的には、学習マウスと対照マウスとの間に差が認められなかつた。

グルタミン酸は脳の後1/3部位に、学習マウス、対照マウスとも、前2/3の部位に比べて濃いスポットとなつたが、学習マウスと対照マウスとの間には確然とした差がつかなかつた。

しかし多少対照の方に多い傾向があつた。

脳前2/3の部位に、矢張り学習、対照ともセリン、タウリンのスポットが強く検出された。

図五も同様な結果を得た。右の図は前記の図に比

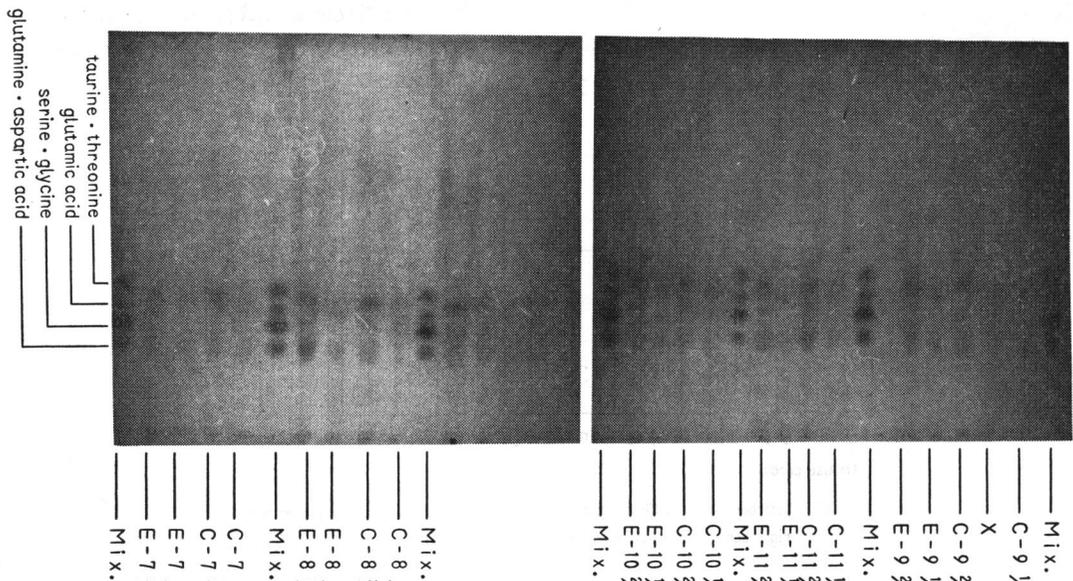
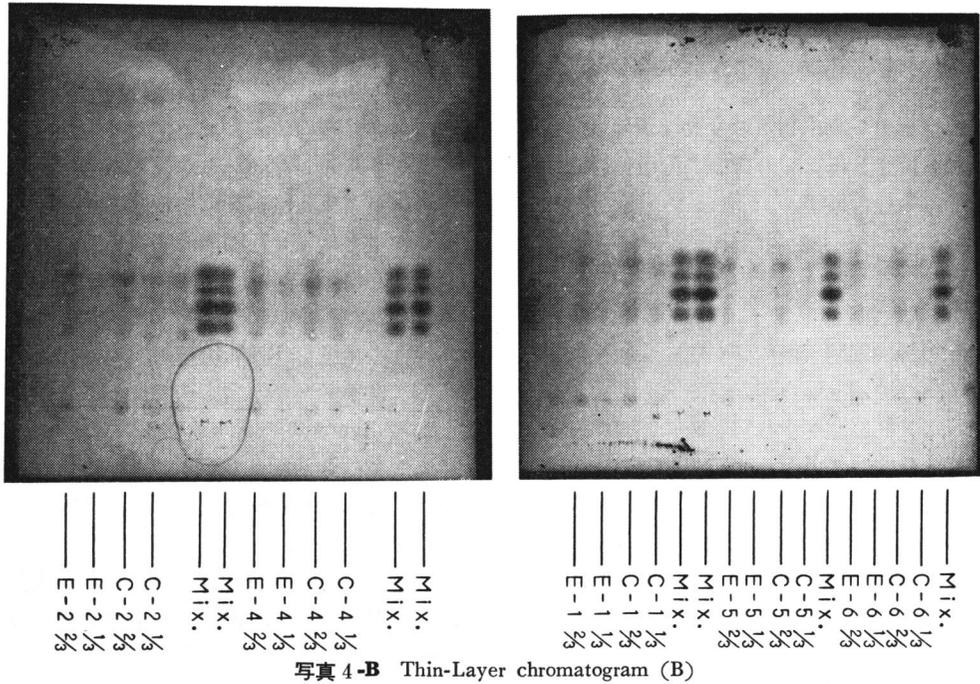


写真 4-A Thin-Layer chromatogram (A)



今回の展開で、すべての標品についてクロマトグラムの最上部分に蛍光物質が検出された。

これは除タンパク剤であるスルフォサルチル酸に由来するものではなかつた。

V. 考 察

記憶を脳内物質の変動や新生が担うものとして追求する研究は、従来から分子レベルで最近に至るまで多面的になされてきている^{12) 13) 21) 22)}。

心理的、非物質的に扱われてきた記憶現象を物質的現象として解明することは、その内容の複雑さから考えて容易なことではない。

とは言え、現実にはこの自然界には、心理現象として解明できない多くの動物の記憶による行動がある。

その 1 例を挙げればサケの母川回帰がある。サケはその稚魚期を過ごした河川を母川とし、数年後(約 4 年)にその母川に回帰する。ふ化した河川へ回帰しない事実は、成熟サケが育ちの川、すなわち母川を記憶しているからである。

大脳分化がそれほど著しくないサケが、母川を数年間にわたつて、心理的に記憶しているとは考

えられない。

サケにとつて河川回帰による産卵は遺伝機構によつて規定された本能行動と考えられている。

しかし、その機能に育ちの川へ回帰するという後天的な規定要素が関与しているのである。

サケの母川記憶の研究によれば、母川水に溶解している母川特異的な物質が、サケに記憶されており、脳内 RNA の変化が関与しているといふ^{14) 15)}。

また嗅覚中枢の誘起脳波による研究でも、母川水に特異的に反応するのをみている¹⁶⁾。

サケは母川水を記憶刺激として、数ヶ月の稚魚期をとおして、心理的なものと無関係に記憶を固定、保持して海洋へ下ると思われる。数年後、広大な海洋から母川河口まで回遊してきた成熟サケは、嗅覚器官から入ってくる様々の支流からの刺激インパルスの中から記憶した母川水のインパルスが伝達されると、保持されてきた記憶系が特異的に反応して母川の方角を認知し、その反応が続くように遡上行動をとつて最終母川に到達するのではないかと思われる。

記憶という心理現象は、サケの産卵行動の様式の中へは全く物質的な要素として参加しているのである。

この事実は記憶が脳内物質の変動、新生によって固定され保持されるという記憶の分子仮説を強力に支持するものである。

Hydén らは、ネズミに綱渡り学習や利き手転換学習を行なつて脳内 RNA の塩基組成の変化や RNA 量の増大を報告したが、彼らの実験分析が単一分離した神経細胞を使つているので結果に対する批判が出た¹⁷⁾。

分析された神経細胞が少ないために、真に神経インパルスを受容していたか否かの問題、興奮する神経細胞と抑制する神経細胞とは電気パルスによつてしか識別できないという問題、RNA 量も神経細胞の種類によつては増大するものとしなないものがあるという実験報告の問題などである。

しかしながらこのような細胞レベルにおける分析検討とともに、学習方法の適否についても検討がなされるべきであろう。

Hydén らの綱渡り学習や利き手転換学習は運動機能の学習であり、その結果としての核内 RNA 塩基組成の変化や RNA 量の増大は単に運動機能向上を、あるいは激しい全身運動によるストレスなどの心理的情動を加味したものを反映しているのかも知れない。

また前庭器官を刺激した対照群は、その前庭神経核細胞を学習群と同じように興奮させ同じインパルスを起こさせるので、RNA 塩基組成に変化がないのは疑問であるとされるが、変化のないのが事実とすれば、学習群との差は、能動か受動かという被験動物の行動への心構えの差を現わしているのかも知れない。

学習ネズミの新生 RNA は学習記憶の所産ではないと考えられよう。

Shashoua らは金魚にフロートを取付け異常体位をとらせたあと正常体位に戻らせる学習をした¹⁸⁾。

しかしこれも体位の正常転換という運動機能の学習で、綱渡りや利き手転換の場合と変わらな

い。

RNA の塩基組成のウラシル/シトシンは対照の約 2 倍に達し、塩基組成の変化をみたわけであるが、Hydén らの結果と一致するのも運動機能の上達という共通した面からの故と考えられる。

タンパク代謝阻害剤であるピュロマイシンによる学習阻害結果も運動機能障害やピュロマイシンの副次的作用によるものを示している恐れがある。

純粋に記憶を RNA 塩基組成の変化として確認するには不適当な学習方法であろう。

また Agranoff らも金魚を使いピュロマイシン、アセトキシシクロヘキシミドなどの代謝阻害剤を用いてタンパク合成を阻害し、記憶固定に及ぼす影響をみている。

しかし、学習方法は電撃を無条件刺激にした逃避学習であつて、電撃そのものが記憶の固定化に強く影響していることを否認ない。

電撃ショックが学習阻害をもたらす実験報告が多くある¹⁹⁾。

Hydén らはその後アカゲザル (*Rhesus monkey*) を用い、視覚弁別学習と遅延交替学習を行なつている²⁾。

両学習とも弁別判断という高次の脳機能を作動させる必要があり、学習の向上は弁別判断記憶の固定化を確信させるものである。

そして両学習に最も関係の深い 3 つの脳部位 (*inferior temporal gyrus, gyrus principalis, hippocampus*) からの神経細胞がとり出され RNA 量が求められた。

すると RNA の有意な増加が学習ザルの海馬回神経細胞にのみ、視覚弁別学習の結果生じ、学習ザルと学習対照ザルとの間では、*gyrus temporalis inferior* の神経細胞 RNA の塩基組成で、アデニンの増加とシトシンの減少という組成の変化が有意に弁別学習に認められたという。

遅延交替学習では 3 つの脳部位とも RNA 成分の有意な変化が初期にはあつたが、長期間学習を続けたサルにはそれがなかつたという。

また学習をとおしてアカゲザルを心理面からみ

た時、学習対照群となつたサルが、50%のほうびスケジュールのためにフラストレーションをおこしたかも知れないと述べている。学習対照の目的からしてほうびの50%スケジュールはやむを得ず、常にほうびをもらえないことに対する学習対照ザルのフラストレーション発生もまた当然であろう。

しかし高等動物のフラストレーションが記憶に影響を全く及ぼさないとは言えないだろう。

高等動物であるが故にこそこの事が言える。それにしても RNA の増大や塩基組成の変化は弁別記憶という高次の心理現象の物質的転換として大いに意義がある。

著者は、飢餓状態とか電撃とか明白に脳内物質に影響を及ぼし、ひいては記憶にまで影響を及ぼす方法をさげ、綱渡り、体位転換、利き手転換、といった運動機能が主になる記憶ではなく、弁別判断という高次の脳機能に依つて固定化された記憶が、マウスなどの場合にも矢張り脳内物質に変化をもたらすものかを調べた。

またこの弁別判断というマウスにとつて高次の脳機能によつて固定化された記憶が、電撃学習を受けた金魚やマウスのように長期間にわたつて保持されるものか否かを調べた。

マウスの能動的なしかし多分に心理的な学習からの記憶は、全身的な運動機能や苦痛などによつて得られた記憶よりも、その固定化に長時間を要し、しかもその保持は困難であろうと思われた。

しかし実際には、実験者がマウスに不馴れのため、固定化に長時間を要した1例を除き残りのマウスはすべて20セッション以内に固定化の基準に達し、その保持は平均して1カ月以上になることを確かめた。

電撃学習金魚の約1カ月、電撃学習マウスの約5週間と余り変わらなかつた。

しかしながらこのように長期にわたつて保持されている記憶が、脳内物質の変動として認められるか否かを脳内遊離アミノ酸をとおして確かめようとしたが、差を検出することができなかつた。

今回の結果から、弁別判断という心理的な記憶

を担う物質的変動は、目視的な相違として認められなかつたが、この事をもつて心理的記憶の固定は矢張り心理的であるとは言えないであろう。

これは先の Hydén によるアカゲザルの視覚弁別学習の結果からうかがい知れる。

今回の実験について検討すべき点を挙げてみれば以下のとおりであろう。

(A) 遊離アミノ酸の選択の問題

今回は、従来脳機能に関係ありと思われる幾千のアミノ酸を選んだに過ぎない。

そのいずれもが今回の記憶固定に対応して関与しなかつたのかも知れない。

この事は用いるアミノ酸の種類によつて、脳内タンパクへのとりこみパターンが違うということを示した Glassman の結果からも推察される⁹⁾²⁰⁾。

(B) 脳血液からのアミノ酸供給作用

特異タンパクの新生のために素材として組み込まれた遊離アミノ酸の不足分が、直ちに脳血液からの持続的供給作用によつて供給補充され、分析段階では量的変化とならないことも考えられる。

(C) 分析方法の問題

充分な記憶の固定化は薄層クロマトグラム上に、スポットの有無、目視的な濃淡差として観察できるであろうという前提条件の誤りが挙げられよう。

学習マウスの湿重量平均 14.7mg の嗅脳部分には、除タンパク濾液 2 μ l 中の量としては殆どスポットを目視できなかつた。

学習マウスの大脳両半球前2/3の部位と海馬回を含む後1/3の部位は平均湿重量 239.9mg および 94.6mg (表-3) で明瞭なスポットを得たが対照との間に目視的には差をみなかつた。

(D) 蛍光物質の検出

予想外のスポット、すなわち蛍光物質の検出をみた。

(E) 脳内物質変動の微少な産生

Hydén らの研究結果によれば、綱渡りなど激しい全身運動の結果として、前庭神経核の神経細胞内 RNA 量は学習ネズミが 751pg/cell, 受動的な前庭刺激ネズミが 722pg/cell であつた。

表3 Wet weight of three brain sections relating to learned and control mice

Mouse cord	Brain 2/3 section (mg)	Brain 1/3 section (mg)	Olfactory bulb (mg)
E-1	255	65	7
C-1	179	120	23
E-2	279	48	27
C-2	243	151	24
E-4	192	115	21
C-4	206	120	8
E-5	236	85	13
C-5	223	97	17
E-6	245	97	7
C-6	193	112	12
E-7	224	123	11
C-7	195	97	9
E-8	257	123	8
C-8	215	109	22
E-9	236	93	20
C-9	212	127	15
E-10	247	102	16
C-10	217	138	11
E-11	228	95	17
C-11	263	111	16
Mean			
E-Mice	239.9	94.6	14.7
C-Mice	214.6	118.2	15.7
Total	227.3	106.4	15.2

E-3, C-3 were excluded

一方、利き手転換では大脳皮質細胞について学習が 27 ± 2.5 pg/cell, 対照が 22 ± 2.3 pg/cell であった。

利き手転換学習は、綱渡り学習より激しい全身運動ではない。

Deiters 核神経細胞と大脳皮質神経細胞とでは大きさが違うが、それぞれ対照との差 68pg/cell および 5pg/cell の比較は、身体運動の激しさの差を思わせる。

今回の弁別記憶学習で、マウスは走路約 90cm を進んで目標箱へ入る。

歩行又は走行、楽に開くドアあけだけが運動機能であり、この機能がもたらすと思われる RNA 量は一段と少量なのではないかと思われ、これに上積みされる記憶固定化に伴う新生 RNA 量もさらに微量なのであろう。

pg の 1 桁量にも及ばないとしたら、実用的に検出能の高い薄層クロマトグラフィを以てしても、検出限界をはるかに越えた量として結果的に目視的な差にもならないのであろうと思われる。

記憶を担う分子の生化学的機構については現在のところ、脳内物質の変動、新生という段階で、記憶が直接保持貯蔵される高分子物質といったものの存在は認められていない。

VI. 結 語

多分に心理的である弁別判断に依る記憶が、マウス (C57/6J 系) にも固定されるか否かが調べられた。

視覚弁別だけが判断の手がかりになるように工夫された Y 型弁別学習装置が用いられ、従来特に注目されなかつた選択点から目標箱に至る走路上に残留するマウスの体臭などを清拭消去して、マウスが嗅覚依存的に機械的に行動するのを阻止した。

獲得、固定されたマウスの記憶が、長期間にわたって保持されるか否かが調べられ、約 1 カ月の休止期において記憶再生テストがなされた。

マウスの記憶は 1 カ月後にも保持され、記憶の低下は殆どなかつた。

記憶を保持したマウスが脳内物質変動を示したか否かが調べられた。

その結果、定性的に学習群と対照群との間には特に著しい相違がなかつた。

しかし、予想されない蛍光物質の検出をみた。

学習群と対照群とに相違がなかつた事に対する検討がなされた。

稿を終るにあたり、ご指導いただきました松村義寛教授に深く感謝申し上げます。

またいろいろ助言いただきました降矢奨助教授お

よび星合之代講師に深く感謝しますとともに、当生化学教室検査技師塚田美奈子氏および教室諸氏に心からの謝意を表します。

文 献

- 1) **Hydén, H.** and **E. Egyházi**: Nuclear RNA changes of nerve cell during a learning experiment in rats. *Proc Nat Acad Sci* **48** 1366~1375 (1962)
- 2) **Hydén, H.** and **E. Egyházi**: Glial RNA changes during a learning experiment in rats. *Proc Nat Acad Sci* **49** 618~624 (1963)
- 3) **Hydén, H.** and **E. Egyházi**: Change in RNA content and base composition in cortical neurons of rats in a learning experiment involving transfer of handedness. *Proc Nat Acad Sci* **52** 1030~1035 (1964)
- 4) **Hydén, H.**: Changes in brain protein during learning [in Ansell, G.B. and Bradley, P.G. (Editors):] *Macromolecules and behaviour*. Macmillan, London (1973) p. 3~26
- 5) **Hydén, H.** and **P.W. Lange**: Changes of RNA base composition in nerve cells of monkeys subjected to visual discrimination and delayed alternation and performance. *Brain Research* **65** 215~230 (1974)
- 6) **Agranoff, B.W., E.D. Roger** and **J.B. John**: Chemical studies on memory fixation in goldfish. *Brain Research* **1** 303~309 (1966)
- 7) **Unger, G., D.M. Desiderio** and **W. Parr**: Isolation, identification and synthesis of a specific behaviour inducing brain peptide. *Nature* **238** 198~202 (1972)
- 8) **Rees, H.D., L.L. Brogan, D.J. Entingh, A.J. Dunn, P.G. Shinkman, T. Damstra, J.E. Wilson** and **E. Glassman**: Effect of sensory stimulation on the uptake and incorporation of radioactive lysine into protein of mouse brain and liver. *Brain Research* **58** 143~156 (1974)
- 9) **関口茂久**: 近交系マウスの学習行動にみられる系統差. *遺伝* **30** 31~36 (1976)
- 10) **Gambetti, P., L. Hirt, A. Stieben** and **B. Shafer**: Distribution of puromycin peptides in mouse entorhinal cortex. *Exp Neurol* **34** 223~228 (1972)
- 11) **佐々木正伸**: 弁別行動. 八木 晃編. *心理学研究法*. 5巻 動物実験 1 東京大学出版会 東京 (1975) 173~218頁
- 12) **Shashoua, V.E.**: Brain metabolism and the acquisition of new behaviours. III. Evidence for secretion of two proteins into the brain extracellular fluid after training. *Brain Research* **166** 349~358 (1979)
- 13) **Kovács, G.L., B. Béla** and **D.H.G. Versteeg**: Facilitation of memory consolidation by vasopressin: Mediation by terminals of the dorsal noradrenergic bundle? *Brain Research* **172** 73~85 (1979)
- 14) **上田一夫**: サケの母川回帰のナゾ. *科学朝日* **38** 53~58 (1978)
- 15) **上田一夫**: 回遊と感覚. *科学* **39** 308~314 (1969)
- 16) **原 俊昭**: サケの homing と嗅覚. *生物科学* **19** 153~159 (1967)
- 17) **黒川正則**: 神経情報の化学的貯蔵. 黒川正則著. *脳の機能と物質*. 現代科学選書 岩波書店 東京 (1973) 123~129頁
- 18) **Shashoua, V.E.**: RNA changes in goldfish brain during learning. *Nature* **217** 238~240 (1968)
- 19) **Duncan, C.P.**: The retroactive effect of electroshock on learning. *J Comp Physiol Psychol* **42** 33~44 (1949)
- 20) **Hershkomitz, M., J.E. Wilson** and **E. Glassman**: The incorporation of radioactive amino acids into brain subcellular proteins during training. *J Neurochem* **25** 687~694 (1975)
- 21) **Ott, T.** und **H. Matthies**: Der Einfluss von Orotsäure und Pentetrazol auf die Akquisition und Extinktion am Modell der optischen Diskriminierung. *Acta Biol Med Germ* **26** 79~85 (1971)
- 22) **Matthies, H., C.H. Fähse** und **W. Lietz**: Die Wirkung von RNS-Präkursoren auf die Erhaltung des Langzeitgedächtnisses. *Psychopharmacologia* **20** 10~15 (1971)