

ラットにおけるオペラント行動中の定位反応と海馬活動

野手美希子**・坂田省吾*・杉本助男*

*広島大学総合科学部人間行動研究講座 **広島大学工学部計数管理工学講座
(1988年10月31日受理)

Orienting response during operant behavior and hippocampal electrical activity in the rat.

Mikiko NOTE, Shogo SAKATA and Sukeo SUGIMOTO

Abstract

In the present study, electroencephalographic activity of the hippocampus was recorded from free moving rats during operant conditioning. Tone stimuli or photic stimuli were inserted into 20 lever-press responses. The orienting response to novel stimuli was observed 7 of 10 rats at the first test session. Hippocampal rhythmic slow activity (RSA) was presented under Fixed Ratio 20 (FR20) schedule with reinforcements of food pellets and also at the orienting response (OR). Both RSA frequency of FR and OR was about 8 Hz. We did not find the differences of RSA frequency between two situations. These results indicate that RSA of the hippocampus was associated with the orienting response and with approach behavior to positive reinforcement.

海馬から記録される電気的活動の特徴として高電位の律動的活動がある。海馬の解剖学的簡潔さと相まって、その広い部位から記録できる単純なサイン波様のこの律動的脳波は特に“海馬シータ”と呼ばれてきた。海馬から非常に規則的な脳波が記録されることを観察した初期の研究 (Green et al., 1954) では、その周波数は 4 Hz から 7 Hz であると報告されていた。しかし海馬の広い部位からかなり確実に律動的活動が記録されるにつれて、動物の行動や学習との関連において 8 Hz よりも高い周波数の律動的活動も報告されてきた。一般的に用語として使用されているシータ (θ) 波は 4 Hz ~ 7 Hz であり、8 Hz より高い周波数のものも含めて呼んでいる海馬シータは用語の混乱を引き起こしている。海馬シータと並んで用いられる用語として律動性活動あるいは律動性緩徐活動 (RSA : rhythmic slow activity) の用語が用いられており、それは海馬体の細胞から発せられる 3 Hz ~ 12 Hz の規則的に振動する脳波パターンであると定義されている (Buzsáki 1986)。Isaacson (1982) の言う“混乱を避けるために単に律動的活動か、できるだけ近似の優勢な周波数かで呼ぶべきである。”という意見に従い、本報告においても律動性緩徐活動 (以下 RSA) を用いることとする。

海馬の RSA の研究は、一般に RSA の活動と、運動、注意または定位、記憶情報処理、特定の筋群の活動との関連において行われてきた。ネコにおいて聴覚弁別学習を用いた Gras-

tyan ら (1959) は、学習中の RSA の出現は基本的な情動過程に関係している海馬が、単に定位反応を媒介していることを反映しているにすぎないと結論している。また同じくネコで視覚弁別学習を用いた Adey ら (1960) は、それに反対して RSA は学習や課題遂行中の記憶保持、意志決定および情報処理の海馬の役割を反映したものであろうと述べている。いずれにしてもこれらの研究者達は、RSA は意味のある環境刺激に近づくときに生起し、それから遠ざかる時には RSA が非同期化することを観察している。しかし、これらの観察もラットを用いた Routtenberg ら (1968) の研究では、嫌悪刺激呈示中に刺激から遠ざかるときに常に RSA が生じていることから、近づくとか遠ざかるだけが問題ではないと疑問が投げかけられている。Bennett ら (1970) は、DRL 強化スケジュールのように反応の抑制が要求される課題ではネコの海馬から記録される RSA は非同期化することを報告している。また、進行中の行動パターンを拘束すると、海馬の電気的活動は非同期となるが、行動の始動時には RSA が見られる事も報告している。

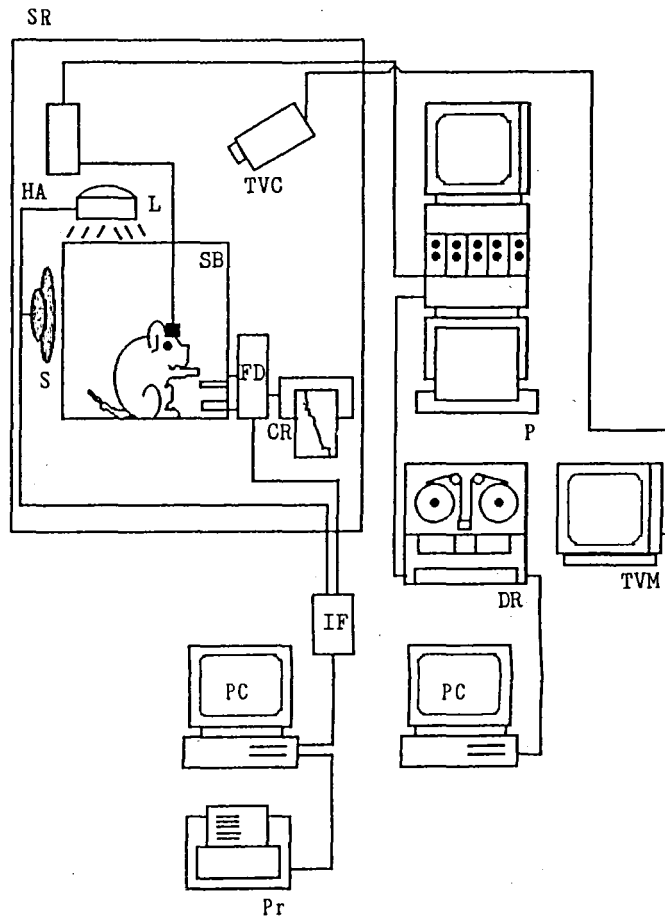


Fig.1. Diagram of the experimental apparatus.

- | | | |
|---------------------|---------------------|--------------------------|
| SR : Shield Room | S : Speaker | P : Polygraph |
| HA : Head Amplifier | L : Light | DR : Data Recorder |
| TVC : TV Camera | FD : Food Dispenser | PC : Personal Computer |
| IF : Interface | SB : Skinner Box | CR : Cumulative recorder |
| Pr : Printer | TVM : TV Monitor | |

そこで本研究ではラットを用いて餌を強化刺激とする FR 強化スケジュールにおいて、高率でレバー押し反応をしているときに新奇刺激を挿入し、進行中の行動途中で定位反応を起こさせたとき、進行中の行動が停止することで RSA が非同期化するのか、それとも定位反応成分の特有な RSA に周波数変化するか、RSA がどのように変化するかを観察することを目的とした。本実験における定位反応の定義は、続行中のオペラント行動が新奇刺激の呈示により一時的に途絶することとした。具体的には一定の率で反応しているレバー押し行動が外的に挿入された音あるいは光刺激により一時的に止まることを行動上の指標とした。

方 法

被験体：実験開始時、生後約 90 日の実験経験のない雄のウィスター系アルビノラット 10 匹を用いた。個別ケージで飼育し、3 日間の自由摂食時体重を計測した後、給餌制限を施して約 2 週間で 80 % 体重まで落とし、実験期間中は常に 80 % 体重を維持した。水はホームケージ内で自由摂取とした。

装置：透明アクリル板製の 1 レバースキナー箱（縦 27 × 横 35 × 高さ 42 cm）を用いた。後面パネルには音刺激呈示用のスピーカーを、天井には光刺激呈示用のクセノン管を設置した。音及び光の刺激呈示は光音刺激装置（三栄測器製 3G11）を用い、刺激を入れるタイミングはパーソナルコンピュータ（NEC 製 PC-9801F）で操作した。用いた刺激は約 0.1 秒間の 4000 Hz、約 95 dB の音刺激とクセノン管から発する 64 Hz の光刺激 0.5 秒であった。強化子は約 45 mg のペレット餌であり、強化スケジュールの統制とレバー押しの 1 msec. 単位の反応間隔測定はパーソナルコンピュータで行った。また、レバー押し反応を累積記録器に記録した。スキナー箱は 23℃ に維持された簡易防音シールド恒温槽（日本医科機器製 LH-IPC 型）内に置かれ、換気ファンによって約 60 dB のマスキングノイズが与えられていた。音刺激はマスキングノイズ以下でも十分に聞こえる大きさであった。ラットの行動はテレビカメラによりモニターした。Fig.1 に示すように脳波の導出はヘッドアンプを通してポリグラフ（日電三栄製 362 型）に接続して行い、チャート書きと同時にデータレコーダに記録した。また脳波の処理はパスカル言語で組んだプログラムを使い、AD コンバータを通してパーソナルコンピュータに取り込んでディスクに保存した後、FFT 処理と誘発電位の加算平均処理を行った。

手続き：1 日 20 分間スキナー箱に入れて実験箱への探索行動を観察した後、レバー押し反応の行動形成を行った。連続強化スケジュールを 1 日 100 強化、3 日間行った後、FR (Fixed Ratio: 定率) 強化スケジュールに移行した。FR 3, FR 5, FR 10 強化スケジュールを各スケジュール数日間、1 日 50 強化の訓練をした後、FR 20 強化スケジュールに移した。訓練日数は被験体により異なるが、FR 20 強化スケジュールで安定したレバー押し反応が得られるまで訓練した。学習進行の早い被験体で約 2 週間、遅い被験体では約 2 ヶ月を要した。その後、脳波導出用の電極埋め込み手術を行い、3 日間の回復期間を置いた。再び FR 20 強化スケジュールを行い、反応遂行の安定しているのを確認した後、音か光を呈示するテストセッションを行った。テストセッションでは FR 20 強化スケジュールは訓練セッションと同じであるが、50 試行のセッション中最初の 5 試行を除き、20 試行中に音か光が呈示される。この刺激呈示試行では強化を得るまでの 20 回のレバー押し反応中 10 回目から 12 回目のレバー押し反応直後に刺激が呈示された。その時ラットが振り向くか、レバー押し反応に一時停止がみとめられれば、定位反応が生じたと判定した。各被験体の実験手順を Fig.2 に示した。

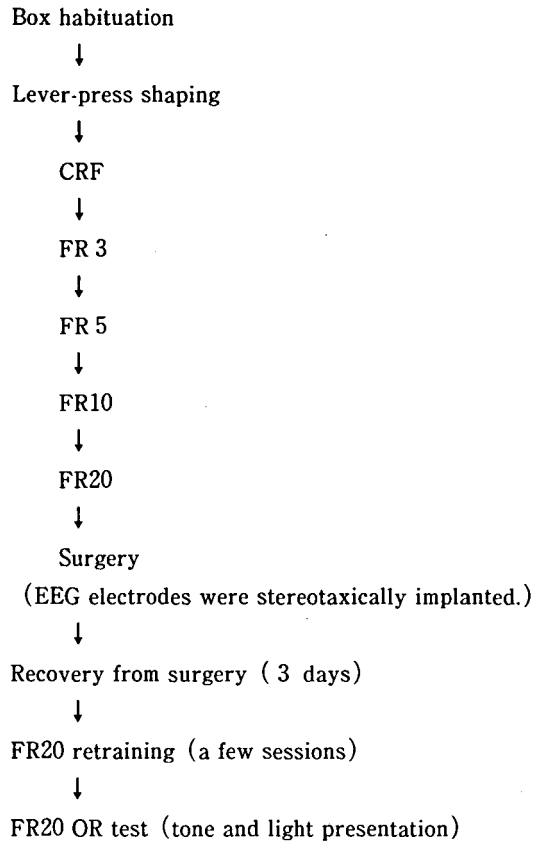


Fig.2. A flow chart of the experimental procedure.

手術：FR 20 強化スケジュールを十分に訓練した後，脳波導出用の電極埋め込み手術を行った。チアミラールナトリウム（イソゾール：吉富製薬）50 mg/kg を腹腔内投与して麻酔を施し，脳定位固定装置（成茂製）に頭蓋を固定し，直径0.2 mm のコーティングステンレス線を深部用電極として，またテフロン加工の銀ボール電極を皮質用の電極として埋め込んだ。部位は Paxinos & Watson (1982) の脳アトラスに従い，中隔（Bregma 0.5, Lateral 0.5, Ventral 5.0；以下同順），歯状回（-6.8, 4.0, 5.0），海馬 CA 1（-3.8, 1.5, 2.5），視床下部（-2.3, 0.5, 9.5），扁桃体（-3.8, 5.5, 7.5），および皮質の前頭葉（3.0, 1.9）と後頭葉（-7.0, 1.9）に電極を挿入した。電極をコネクター（AMPHENOL 223-1609）に接続し，頭蓋骨に固定したネジに歯科用セメントで固定した。手術後3日間の回復期間をおいた。

組織学的確認：実験終了後，深麻酔をして10%ホルマリン液で還流し，脳を取り出し，凍結ミクロトームで組織切片を作成し，電極挿入位置の組織学的確認を行った。結果の分析に使用した歯状回，海馬 CA 1 については，各10匹中4匹が挿入部位が外れていたり，ノイズの混入が多かったため結果の分析の対象から除外した。

結 果

行動観察：テレビモニターによる観察では、初めての光刺激に対しては「振り返り」、「上を見る」等の定位反応が観察されたが、数回で明らかな定位反応はみられなくなった。音刺激の場合には光刺激の時ほど明確な行動変化は現われなかった。行動観察による定位反応は個体差が大きく、10匹中3匹にはまったく観察されなかった。オペラント行動中の定位反応を見る目的に沿わない3匹は結果の分析から除外した。定位反応の観察された個体の典型的な行動は、刺激の呈示された方向を振り向くか、レバーに手をかけたまま寄り掛かるようにして動かない行動であった。しかしその行動も持続時間は短く、1秒以上続く定位反応はみられなかった。

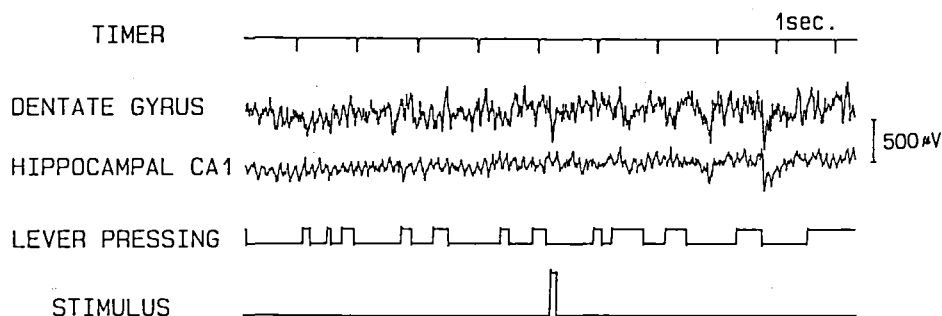


Fig.3. An example of the simultaneous record of EEG and lever-press responses of a rat
The bottom line indicates a tone presentation.

Fig.3にレバー押し反応と脳波の同時記録の例を示す。脳波の導出部位は歯状回と海馬CA1である。これは音刺激の呈示されたときの記録の一例であり、刺激呈示により幾分レバー押し反応が遅延しているように見えるが、統計的検定により有意差はなかった。

累積記録：累積記録器の反応曲線を見ると、テストセッションにおいて50試行中刺激呈示のあった20試行では、若干の反応遅延が観察されたに留まり、反応停止を示す明確な曲線パターンは出現しなかった。Fig.4に平均累積反応曲線を示す。Fig.4Aは電極埋め込み手術後の刺激を挿入していないベースラインセッションの、50強化の平均反応累積曲線である。図の曲線の基点は強化直後であり、ラットはレバーを20回押すことにより図の右上点で餌を得る。Fig.4Bは音刺激を呈示したときの20強化の平均累積曲線と同じセッション内の、刺激を呈示していない残りの30強化の平均累積曲線である。Fig.4Cは光刺激を呈示したときの同様の平均累積曲線である。音刺激と光刺激のモダリティによる違いを同一個体において検討してみると、Fig.4に示すように音刺激呈示時の平均累積曲線では刺激のあるときと無いときでは差はみられなかったが、光刺激呈示時では、反応の遅延が出現していた。この遅延は刺激呈示の無い強化試行の平均累積曲線ではみられなかった。モニターの行動観察から得られた結果と一致して光刺激において定位反応がみられたといえる。

海馬脳波：Fig.3に示したようにレバー押し反応中にかなり明確なRSAが海馬CA1部位の脳波で観察された。音あるいは光の刺激呈示によるRSAの非同期化は観察されなかった。刺激呈示前後の周波数変化を検討するために刺激呈示前後5秒間の脳波についてFFT処理を行い比較した。Fig.5に音と光刺激呈示前後の各々の海馬脳波の20回平均の周波数分布を示した。

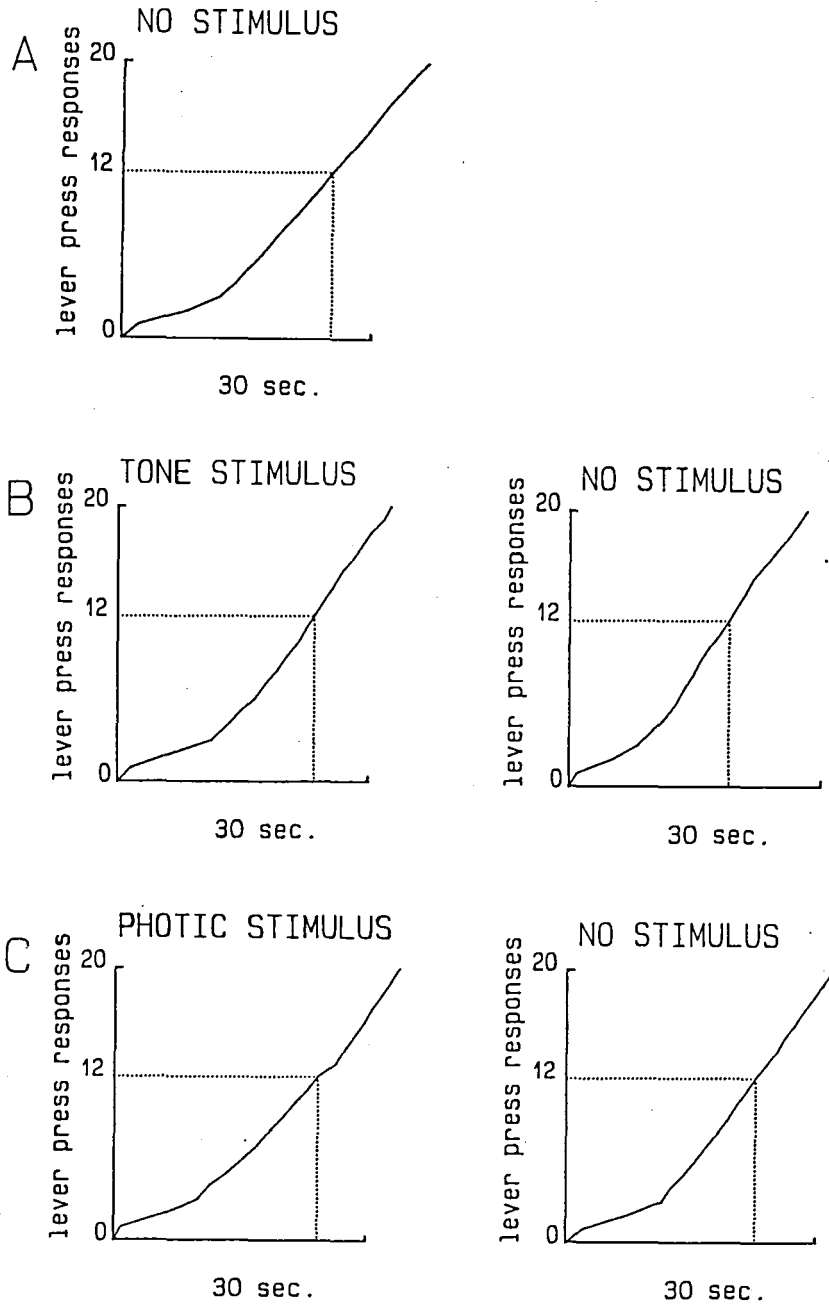


Fig.4. Mean cumulative records of lever pressing. The bottom point is the first response, and the upper point indicates 20 responses at where is presented a food pellet. A : Base line session with no presentation of stimulus. It was averaged by 50 trials. B : left figure was inserted tone stimulus at the 12th response, and right figure no tone stimulus within the same session. C : Left figure was inserted photic stimulus at the 12th response, and right figure no photic stimulus within the same session. Each left figure took on the average 20 trials and the right on 30 trials.

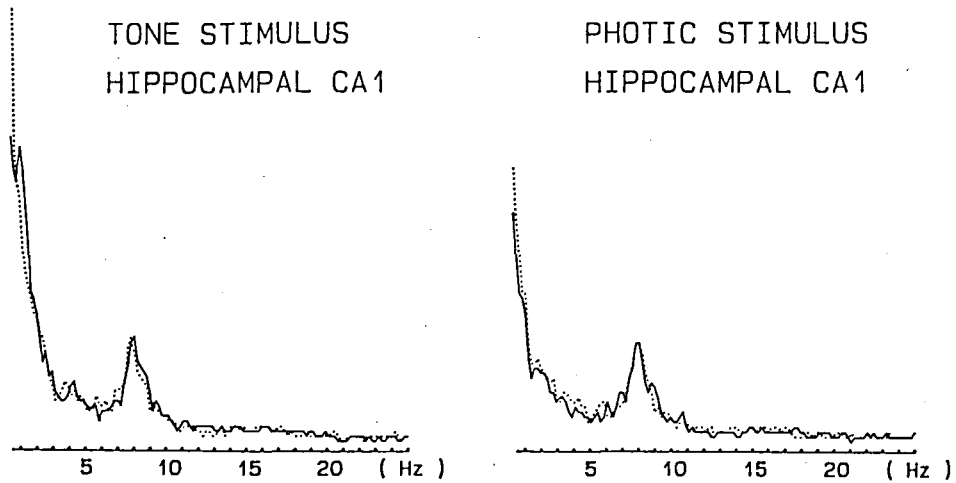


Fig.5. Fast Fourier Transform analysis of 5 second samples before and after tone (left) or photic (right) presentation. Dotted lines show the pre-stimulus data and solid lines post-stimulus.

点線で示したものが刺激呈示前5秒間の周波数分布であり、実線が刺激呈示後5秒間のものである。8 Hz 前後の周波数帯に大きなピークが出現している。これが RSA の周波数成分である。音と光の刺激呈示による RSA の周波数変化も、個体によっても、刺激呈示試行によってもばらつきがあり、一定の傾向は観察されず、むしろ RSA は安定して出現していた。刺激呈示による変化はないといえる結果であった。Fig.6 に音と光を呈示したときの20回加算平均の誘発電位の例を示す。音刺激の誘発電位は光刺激の誘発電位に比較して潜時が短く、また振幅は光刺激の方が大きい。

刺激の入力は各感覚受容器を通して嗅内皮質野から歯状回を経由して海馬に行くことが分か

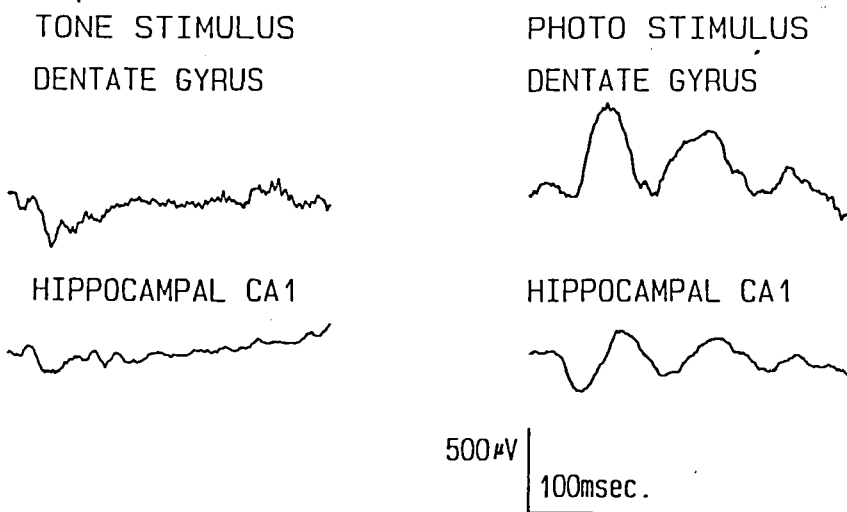


Fig.6. Average evoked potentials of tone stimulus or photic stimulus. Each data was averaged on 20 trials.

っている。モニターから観察した行動上では刺激呈示の最初の頃にはのみ定位反応がみられたが、音刺激も光刺激も誘発電位でみる限り、脳内に入力されていることが確認された。

考 察

本研究の目的である新奇刺激提示前後の海馬脳波において RSA の非同期化が見られるかどうかについては、Fig.5 に示したように非同期化はみられず、また RSA の周波数変化についても刺激呈示による一定の変化の傾向は観察されず、むしろ 8 Hz 辺りの同じ周波数で比較的安定した RSA が出現していた。これは行動上で 10 匹中 3 匹には定位反応が観察されず、定位反応の見られた個体においても、予想されたような顕著な定位反応が見られなかったことと関係しているかもしれない。明かな定位反応が観察されなかった原因として、用いた強化スケジュールが FR スケジュールであり、かなり高率にレバー押し反応がみられたこと、擬人的に表現すれば、わき目も振らずにレバー押し行動に熱中していたことに因るところが大きいと思われる。したがって、反応率に依存する FR スケジュールではなく、時間経過に依存する VI スケジュールを採用することにより、確実に顕著な定位反応が観察されるのではないかと考えられる。

脳波に関しては、RSA は FR スケジュール下でのレバー押し反応中、ほとんど常に出現していた。Bennett ら (1970) のネコを用いた報告では、DRL 20 秒スケジュール下では RSA は出現しておらず、途中で実験者が何かすることによってネコの定位反応を引き起こしたときだけ RSA が観察された。これは FR と DRL の強化スケジュールによる明らかな相違と思われる。つまり FR スケジュールのように、課題の遂行のためにひたすらレバー押し反応を要求するスケジュールでは RSA が常に安定して出現し、逆に DRL スケジュールのようにレバー押し反応の抑制を要求されるスケジュールでは、RSA の出現が抑えられると考えられる。彼らは RSA が DRL スケジュールの学習成績とは関係なく、定位反応の時のみ見られたことから、RSA は海馬の情報処理とか、記憶固定とかの役割を反映しているのではなく、単に定位反応を媒介している海馬の役割を反映して出現したのではないかと結論したが、DRL スケジュール中 RSA が出現しなかったのは、むしろ RSA の出現が抑制されたと考えた方が妥当であるように思われる。Buzsáki ら (1981) によると、ネコを用いた条件刺激による定位行動中には 5~6 Hz の RSA が生じたが、レバー押し行動時には非同期性活動が生じた。これは Bennett らの結果と一致している。このレバー押し行動は、一回レバーを押せば餌が与えられる CRF スケジュールであり、今回用いた FR スケジュールのような高率のレバー押し反応を要求するものではない。やはり被験体に要求するパフォーマンスの違いによると考えられる。

海馬からの RSA は、動物の運動のタイプを反映したものであるという見解と、学習に関する入力情報処理に関連したものであるという主張がある。前者の立場に立つ報告として、Whishaw ら (1973) によれば、ラットではジャンプのような決まったタイプの運動を始めるときに海馬の RSA の周波数が高い方へシフトする。たとえば、28 cm のジャンプをするときは RSA の周波数は 9~10 Hz であるが、56 cm のジャンプをするときにはそのピーク周波数は 11~12 Hz にまで高くなることを観察している。また Whishaw (1982) はウサギが姿勢を変えるときに RSA のピーク周波数が高くなることを観察し、この周波数変化は動きが生じる時のスピードと関連があると主張している。後者はウサギを用いた Adey ら (1960) やラットを用いた Routtenberg ら (1968) の研究であり、彼らの研究によれば、外的に呈示された刺激が報酬に関係したものであるか、嫌悪性を持ったものに関係したものであるかによって身体の

動きとは関係なく RSA が出現する。つまり、RSA の出現は強化子が正であるか負であるかの入力情報処理に関係しており、RSA の非同期化は海馬の出力情報処理に関係していると推論している。RSA は学習や課題遂行中の記憶保持、意志決定および情報処理の海馬の役割を反映したものであろうと述べている。

RSA は測定観察が比較的容易であり、RSA に関する研究も数多いが、研究者によりその解釈にはかなりの開きがある。ただ、RSA が運動の準備に伴って出現することと、定位反応のような注意に関連した事象に対して出現することは確かなようである。その点で今回報告した FR スケジュール下における定位反応の条件では、FR スケジュールにおいても、また定位反応の生起との関連においても RSA が出現することは従来の結果を支持したものであった。RSA を引き起こす原因が何かによって、その周波数成分に特異性がみられるのではないかと考えたが、有意差は見出せなかった。CRF スケジュールでは RSA が見られないという報告があるので、CRF から FR スケジュールに移行するどの時期に RSA が出現するのか、強化スケジュールと RSA との関連は興味ある課題であり、今後実験的に検討されるべきであろう。

引用文献

- Adey, W. R., Dunlop, C. W. and Hendrix, C. E. 1960 Hippocampal slow waves ; distribution and phase relationships in the course of approach learning. *Arch. neurol.* (Chic.) , 3 : 74-90.
- Bennett, T. L. 1970 Hippocampal theta activity and response inhibition. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 29 : 196-200.
- Buzsáki, G., Haubenreiser, J., Graystyan, E., Czopf, J., and Kellenyi, L. 1981 Hippocampal slow wave activity during appetitive and aversive conditioning in the cat. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 51 : 276-290.
- Buzsáki, G. 1986 Generation of hippocampal EEG patterns. In R. L. Isaacson and K. L. Pribram (Eds.) , *The hippocampus*, Vol. 3 Plenum Press, New York.
- Grastyan, E., Lissak, K., Madarasz, I. and Donhoffer, H. 1959 Hippocampal electrical activity during the development of conditioned reflexes. *Electroenceph. clin. Neurophysiol.*, 11 : 409-430.
- Gray, J. A. 1982 *The neuropsychology of anxiety : an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system*. Oxford University Press, New York.
- Green, J. D. and Arduini, A. A. 1954 Hippocampal electrical activity in arousal. *J. Neurophysiol.*, 17 : 533-557.
- Isaacson, R. L. 1982 *The limbic system*. Plenum Press, New York.
- Paxinos G. and Watson, C. 1982 *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic press Australia.
- Routtenberg, A. and Kramis, R. C. 1968 Hippocampal correlates of aversive midbrain stimulation. *Science*, 160 : 1363-1365.
- Whishaw, I. Q. and Vanderwolf, C. H. 1973 Hippocampal EEG and behavior : Changes in amplitude and frequency of RSA (theta rhythm) associated with spontaneous and learned movement patterns in rats and cats. *Behav. Biol.* 8 : 461-484.
- Whishaw, I. Q. 1982 A simple behavioral paradigm for the study of type 1 hippocampal rhythmic slow activity (RSA) frequency shift. *Physiology and Behavior*, 29 : 751-753.