

時間弁別課題遂行中のラットの血圧連続測定

坂田 省吾

広島大学総合科学部人間行動研究講座

Successive measurement of blood pressure during temporal discrimination task in rats.

Shogo SAKATA

*Department of Behavioral Sciences, Faculty of Integrated Arts and Sciences,
Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739, Japan*

Abstract : Rats were trained to discriminate 8 seconds duration under a differential reinforcement of long latencies (DRLL) schedule. Once the discrimination was learned, rats were implanted with an indwelling vascular catheter in femoral artery. A femoral arterial catheter (PE20 heat-fused to PE10) was inserted into a rat for measurement of blood pressure. The catheter was routed subcutaneously to exit at the back of the neck and connected to syringe with extension tubing (PE50 heat-fused to PE20). The vascular catheter was flushed with saline containing heparin, and the rats were placed in individual Plexiglas home cages. After recovery of surgery, blood pressure and response latencies were recorded on a DRLL8" schedule in an operant chamber. Arterial pressure was slightly changed with the time stages on a DRLL8" schedule. Arterial pressure was elevated for the end of a eight seconds trial. The results showed that temporal discrimination correlated with internal cardiovascular changes. The femoral artery catheterization procedure is preferable in terms of simultaneously recording of blood pressure and response latencies.

Key words : Temporal discrimination, differential reinforcement of long latencies (DRLL) schedule, arterial blood pressure, femoral artery, rats.

序 論

生理心理学の研究においては、一般に動物に弁別課題を行わせ、その課題遂行中の行動指標と生理指標を同時に計測して、生体内部で行われている情報処理過程を探ろうとする方法が用いられる。その多くは脳内情報処理過程との関連から、課題呈示時の脳波を記録し、加算平均処理による誘発電位や事象関連電位の分析、または周波数分析による脳内の優勢部位の推定などが行われる。また

同時に、動物が実験場面で示す情動性を測定するものとして、血圧や心拍数も重要な指標となる。血圧や心拍数は、生体の自律神経の活動を推定するものとして、直接神経活動を計測するよりも、はるかに簡便な方法で測定可能な指標である。

生理学や内科学の分野で、特に循環系の機構解明や高血圧の治療を目的とする研究では、以前はもっぱら麻酔下での測定データが中心であったが、今日では無麻酔下での血流量および血圧の連続測定が多く行われている。実際、麻酔されている状態と無麻酔下では、生体の循環動態はまったく異なると言っても過言ではない(Kawaue et al., 1984)。測定機器の進歩により、臨床場面やヒトを被験者とした実験等では、PETやMRI等を用いた非侵襲的方法での測定法が使用されるようになってきているが、あまりに装置が高価で大きすぎるため、動物実験ではなかなか使用できないのが実状である。動物における血流量の無麻酔下での連続測定には、高価な電磁流量計を用いて、電磁流量計プローブを埋め込む難度の高い手術が必要となる。それに比較して、心理学研究に用いられる指標としての血圧および心拍数の測定には、安価な装置と簡単な手術でこと足りる。

しかし現在、日本の心理学分野における動物の血圧測定の論文はほとんどない。この理由として、動物実験をする研究者数の減少もさることながら、課題作業中の循環動態を研究したくても、どのようにすればよいのか、その方法論を紹介する論文が見あたらないことも大きな障害となっている。そこで、本論文では、ラットの時間弁別課題中の血圧変動の測定を例として、その測定方法を詳細に紹介し、もっと多くの研究者に、生体の自律神経の指標としての血圧の重要性と、測定の容易さを知ってもらうことを目的とした。

例として挙げた時間弁別課題は、動物の時間弁別行動を研究する際に用いられる課題である。被験体は設定された時間が経過するのを待たなければ、報酬が与えられない。ゆるやかな自律神経系の反応変化を観察するのに適した課題でもある。

方 法

1. 被験体

生後約180日齢のウィスター系アルビノラット2匹を用いた。実験期間中は自由摂食時体重の85%を維持した。水はホームケージ内で自由摂取とした。

2. 装置

実験には防音シールド恒温槽内に設置されたスキナー箱(L350xW270xH420mm)を用いた。時間弁別課題には反応潜時分化強化(DRLL: differential reinforcement of long latencies)スケジュールを用い、パソコン(NEC製PC-9801F)により制御した(Fig. 1)。試行開始には光刺激装置(日電三栄3G11)から8Hzのフリッカー光を呈示した。強化子として45mgのペレット餌を用いた。血圧測定のためにストレインゲージ(日本光電DX-360)と歪圧力用アンプ(日電三栄6M57A)を用いた。血圧の波形はペンオシログラフに紙記録した。

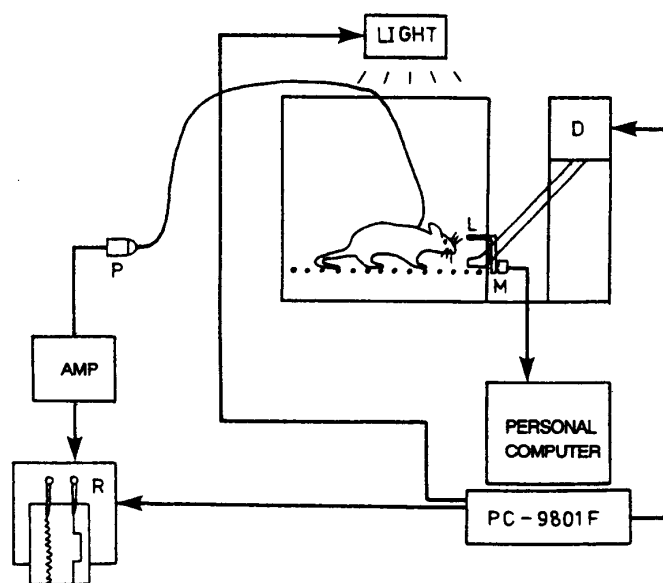


Fig. 1 A Schematic representation of the apparatus used in this experiment.
R: recorder L: lever M: microswitch D: dispenser

3. 手続き

スキナー箱のレバー押しの予備訓練を行った後、DRLL 8秒スケジュールに入れた。DRLL 8秒スケジュールは、光刺激の呈示が試行の開始となり、ラットのレバー押し反応で光刺激が消えて試行の終了となる。光刺激呈示からラットのレバー押し反応までの潜時が8秒以上のときは、強化子としてペレット餌が出た。反応がない場合は60秒経過時点で光刺激が消灯し、試行が終了した。試行間隔は10秒として、1日100試行を1セッションとした。訓練を20セッション行った後、血圧測定のためのカニューレ挿入手術を行った。手術後3日間の回復期間をおいた後、血圧同時記録のDRLL 8秒スケジュールを行った。

4. 手術

ラットに麻酔 (thiamylal sodium 50mg/kg腹腔内注射) した後、血圧測定用のカニューレを一側の大腿動脈から腹部大動脈末端まで挿入した (Fig. 2)。手術の詳細は、手術メモとして末尾に別記した。

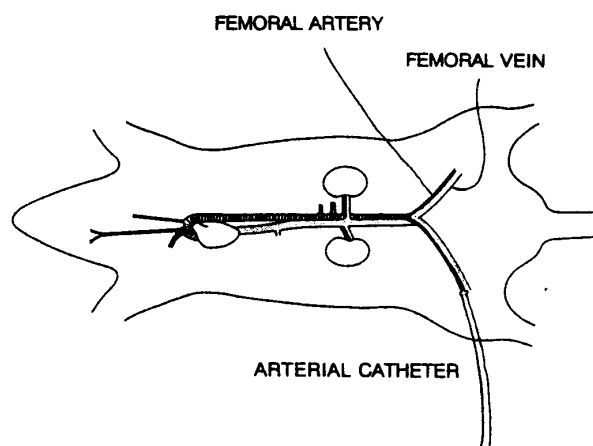


Fig. 2 A Schematic diagram of femoral artery catheterization.

5. 血圧記録

静水圧によるアーティファクト混入を避けるため、スキナー箱内のラットの心臓の高さと、圧トランスデューサーの高さを同じに設定し、スキナー箱の天井の穴からラットの背頸部のカニューレに接続した。校正圧は、実験者が水銀柱の目盛りを読みながら、50mmHg ごとに実際の圧を入力して行った。セッション中は連続して血圧記録を行った。

結 果

反応の時間分布

レバー押し反応潜時の分布は、5セッションまでの DRLL 訓練初期では2秒以下の短い潜時の反応が多く、10セッションまで訓練を行うと、4秒前に分布のピークが移動した。さらに学習が進むにしたがって、より長い潜時の反応が見られるようになり、20セッションでは6秒～10秒に反応が集中する分布になった(Fig. 3)。

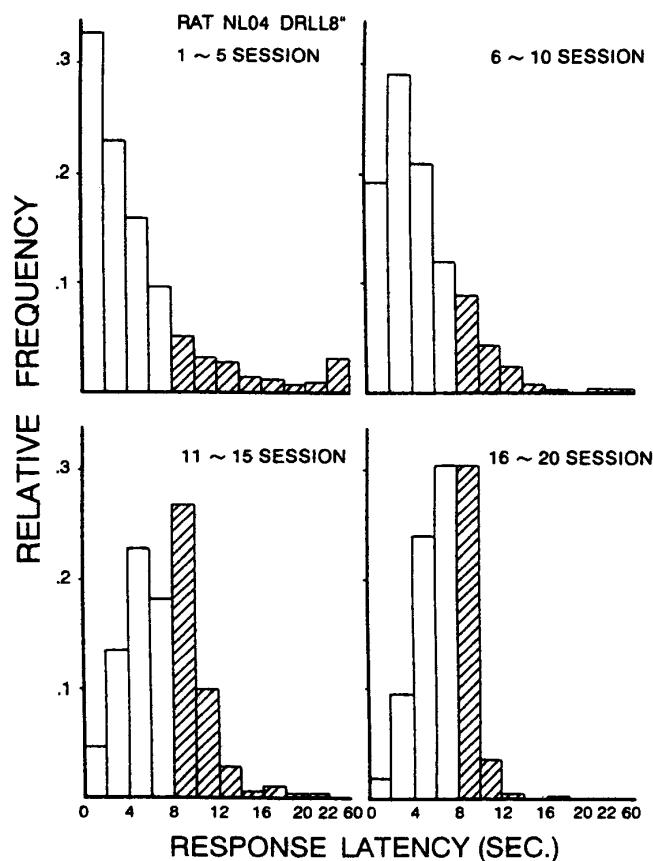


Fig. 3 Histograms of latency distributions during DRLL8" training for a rat. Latencies are tabulated in class intervals of two seconds. Shading area show reinforced responses (latencies longer than 8 seconds).

血圧の時間変動

カニューレ挿入手術の後、3日間の回復期間をにおいて、血圧を記録しながら DRLL 8秒スケジュールを行った(Fig.4)。ラット2匹の血圧はともに正常血圧の範囲にあったが、その平均血圧は102mmHgと116mmHgであり異なった。被験体数が少ないので、各被験体ごとに時間変動について分析した。血圧は DRLL 8秒スケジュールの試行が始まる前が一番低く(Fig. 5: dark L)、時間が経過するに

したがって、徐々に上昇する傾向が見られた。そしてレバー押し直後が最も血圧が高くなった (Fig 5 . dark F)。程度の差はあるがこの傾向は2匹で共通していた。

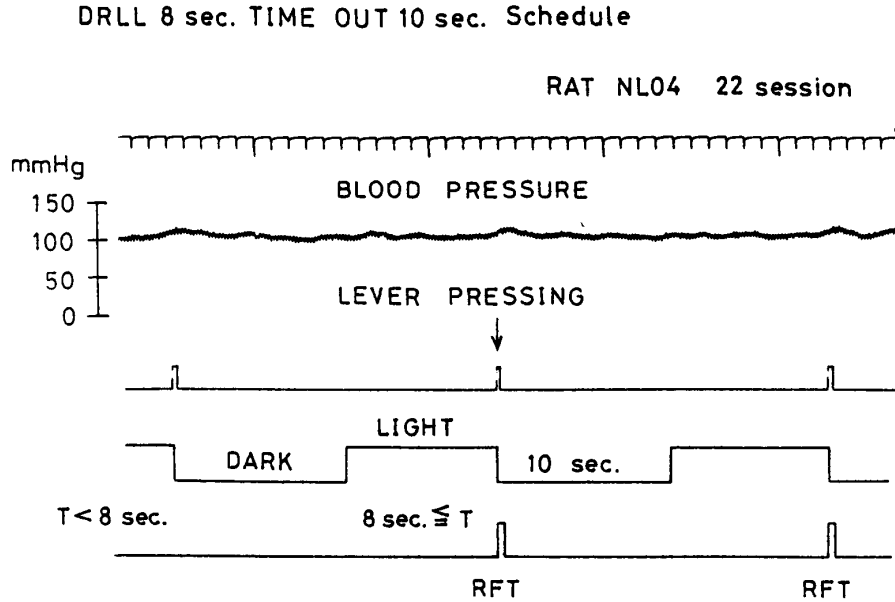


Fig. 4 A typical example of blood pressure recording during DRLL8" schedule. Immediately after a lever pressing, blood pressure value was higher than other time stages. This chart shows time scale, blood pressure, lever pressing response, flicker light presentation and reinforcement (from upper to bottom).

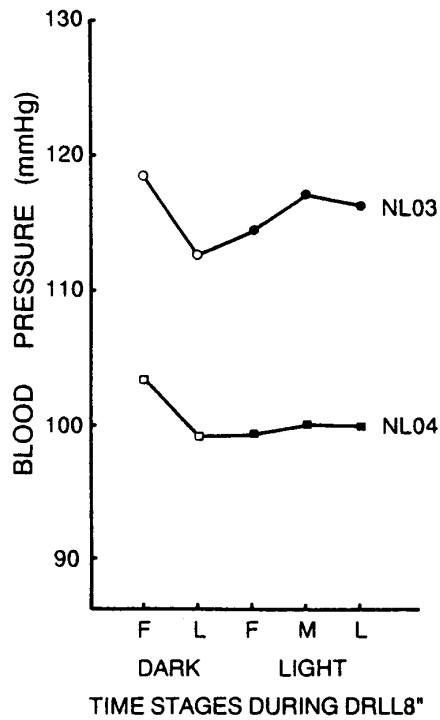


Fig. 5 Successive changes of mean arterial pressure during DRLL 8". Open marks are in the intertrial intervals. Filled marks are in the trails. Each time stage shows first (F), middle (M) and last (L).

考 察

DRLL 8秒スケジュールの訓練における反応潜時の分布の変化は、DRLL20秒およびDRLL 4秒の分布変化と相対的に同じであった。強化設定時間に反応潜時の分布のピークが、移動していくまでに要する期間は、設定時間が長くなればなるほど、訓練期間も長くなるが、時間弁別行動を示すようになる過程は、基本的に同じであろうと推測される。

DRLL 8秒スケジュール中の時間経過にともなう血圧の変化が観察された。血圧は試行開始前が最も低く、試行開始から課題設定時間である8秒に近づくにしたがって上昇する傾向が観察された。DRLL20秒スケジュール下での心拍数の時間変化を検討した研究においても、試行開始時点が一番低く、時間経過とともに心拍数が上昇する結果が得られている(坂田ら、1981)。血圧の変化も心拍数の変化と同様であった。

さらに、先行研究(坂田ら、1981)では、DRLLスケジュールから消去スケジュールに移行すると、この心拍数の変化が見られなくなったことから、まさに課題に依存した形で循環系の変化が引き起こされていたことが確認されている。今回の結果は、心拍数の変化のみならず、血圧についても時間弁別行動と関係していることがうかがえる。しかし、この結果が時間弁別行動を引き起こす基礎になっているのかどうかは、生理学的に血圧の変動をブロックする薬物投与を行った上で、反応潜時の分布に変化が見られるかどうかを検討する必要がある。

血圧維持の神経機構としては、自律神経系の直接関与と、交感神経の興奮による副腎髄質からのアドレナリン分泌の増加および脳下垂体からのバゾプレッシン分泌による機構が考えられている(Iriuchijima et al., 1985; 寺西ら、1995a, 1995c)。特にラットでは、アドレナリンによる血管拡張および心拍出量増加の寄与が大きく、ラットの循環系制御の主要部分は副腎髄質からのアドレナリンであるとの主張もある(Iriuchijima et al. 1985; Sakata et al., 1988)。また、個体によって血圧の変動に違いがみられるのは、血圧維持機構の各成分の寄与度の違いが反映されているとも考えられる。特に高血圧研究における境界領域高血圧ラットの研究は、正常な血圧維持機構の解明には重要である(寺西ら、1995b)。

最後に、この論文の目的とした、課題遂行中のラットの血圧連続測定について、その問題点とカニューレ挿入手術についてまとめる。

麻酔下での急性の血圧測定は、本論文に記したように非常に簡単である。歪み圧力計に接続したカニューレを、直接動脈内に挿入するだけで、確実に測定できる。しかし、これが慢性の測定となると少し工夫が必要である。カニューレを直接動脈内に挿入することは同じでも、3つの問題が生じる。第一は、血液が漏れ出さないこと。動脈につないだカニューレは、いわば血管と同じである。カニューレの接続部位または先端から漏れ出すと、これは血管が破れて出血することと同じことになる。動いても血液が漏れないようにするために、カニューレは大腿動脈から腹部大動脈末端まで、約35mm挿入する。第二の問題は、血栓 (clot) ができることを避けなければならない。血液が外気に触れると当然、血液凝固のカスケードが作動して出血する部位で血栓が形成される。これを避けるために、血液凝固阻止剤であるヘパリンを生理食塩水の中に混入しておく。また、血液が一カ所に滞留しないようにする工夫が必要である。第三の問題として、無麻酔下で測定をする際には、個体はいろいろと動いてその姿勢を変化させる。血管の中に挿入したカニューレの先端が血管壁に接してしまって塞がれてしまうと、もはや連続した血圧測定はできなくなる。解決策としては、カニューレを挿入するときに、その先端の切り口の向きに注意をすればよい。

血圧測定のために生体内に挿入するカニューレは、市販されている規格品のポリエチレン性カニ

ューレを用いた。血液凝固の起こりにくさや、生体への免疫反応性から考慮すればシリコン性を用いる方が安全かもしれない(Weeks, 1964)。しかし、確実な材料の入手と加工のしやすさを考慮すればポリエチレン管で十分使用可能であり、測定上特に問題は生じない。

血圧測定のためのカニューレの挿入部位は、原理的にはどこの動脈でもよい。しかし、生体にとって比較的侵襲の少ない部位で、しかも手術の容易な場所が最適であろう。Yoburn et al. (1984)は、薬物投与や採血のためのカニューレ挿入部位として、頸静脈、大腿動脈、頸動脈の3つで比較検討を行った。その結果、体重減少を侵襲の指標とした場合、頸静脈、大腿動脈、頸動脈の順で、侵襲が少ないが、利用できる期間ではその逆の順になった。結論として、実験上有用な部位で最も侵襲の少ない部位はラットにおいては大腿動脈であると述べている。

カニューレを慢性的に埋め込んで、ラットをホームケージ内において、行動観察をしながら、血圧を連続測定した実験がある(Mizuma et al. 1987)。それによれば、ラットがリラックスしたときに出現するグルーミング時に、血圧が少し上昇する結果が得られている。これは主に下肢血管領域に配分されていた血液が、頸動脈の方へ再配分された結果であると考察されている。また、ラットの睡眠中の血圧を記録した Junqueira et al. (1976)によれば、正常血圧ラットでもレム睡眠中に血圧の上昇が見られたと報告している。

以上、実験動物としてラットを使用して、慢性的に血圧データを収集するための方法とその例を述べた。末尾に記した手術メモは、はじめて手術を行おうとする研究者にもわかるように配慮して詳細に記述した。これを参考にして、血圧データを活用する生理心理学研究者が少しでも増えれば、この論文の意図したことが達成されることになる。

手術メモ

ラットの体内に挿入するカニューレは、長さ15cm内径0.35mm、外径1.05mmのポリエチレン管(PE20、Clay-Adams7405または夏目 SP19)と長さ8cm内径0.28mm、外径0.61mmのポリエチレン管(PE10、Clay-Adams7400または夏目 SP10)を中にステンレス線を通して接触させた後、熱風内で融合させて作成する。次にステンレス線を通したままで、細い方のポリエチレン管の先端から約4cmのところ、熱風をあてて瘤をつくる。この瘤は血管の切り口のふたの役目を果たす。太い方のポリエチレン管の先端から1.5cm、2.5cmと3.5cmのところ、瘤を作成する(Fig. 6)。この瘤は、後にラットの背頸部に糸で固定するときの滑り止めの役割を果たす。ラットにカニューレを挿入する直前までは、手術用に用意した逆性石鹼(塩化ベンザルコニウム液：大矢薬品工業)の中につけておく。

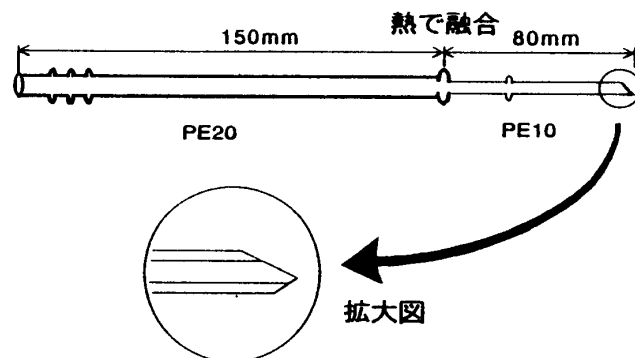


Fig. 6 Diagram of the cannula.

手術を開始する前に、血圧測定用のストレインゲージおよび注射用シリンジを、三方活栓を介してポリエチレン管と接続しておく。すべての管内に血液凝固阻止剤であるヘパリンを混入した生理食塩水(1:50の割合)を満たしておく。このポリエチレン管の先端にステンレス管を装着し、ラットの体内に埋め込むカニューレと接続する。血管内に挿入するカニューレの先端を斜めに切る。さらにその先端のとがった部分を少しだけ逆に切る(Fig. 6の拡大図)。

麻酔したラットの背頸部とカニューレを挿入する側の鼠蹊部の毛を剃る。2カ所を逆性石鹼で洗浄した後、まず背頸部を縦に約2cm切開する。次にラットを仰臥位に固定し、触診して大腿動脈の拍動を確認した後、鼠蹊部を縦に約2cm切開する。ピンセットで結合組織を分離して動脈を見えるようにする。この状態では、動脈と静脈と神経が一緒になって末梢へと走行しているのが見える。ピンセットを動脈の上当て、神経に触れないようにしながら、ピンセットを開くようにして動脈だけを分離する。剥離できたら糸を2本渡す。2本の糸を両方に開くようにして、できるだけ見やすくしておく。末梢側の糸を強く縛り、さらに末梢側に糸を引き鉗子で糸を留める。中心側を動脈クレンメで止血する。

動脈にカニューレを挿入するための切り込みを横に入れる。間違っても切断しないこと。動脈は非常に弾力的な平滑筋なので、眼科鉗で少し傷をつける程度で切り込みがつけられる。ピンセットでガイドしながら、用意したカニューレを切り込みから滑り込ませる。注意しながら、動脈クレンメをはずして、すばやくカニューレを押し込む。ここで失敗すると大出血になる。うまくいくと全く出血しない。この手術で唯一注意を要するところである。予め作っておいた瘤のところまで挿入する。これで動脈内には細いカニューレが約3.5cm挿入されたことになる。挿入時の注意としては、カニューレの先端の切り込みの向きが上に見える状態に入れること。こうするとラットが通常の姿勢に戻ったときも、確実に血圧測定ができる。もし、逆向きにカニューレが挿入されていると、先端部が血管壁に塞がれて血圧が測定されない場合がある。三方活栓を開いて、注射シリンジに接続すると、血液の逆流が見られる。動脈にうまくカニューレが挿入されていること確かな証拠である。中心側の動脈の上からカニューレを糸で縛る。逆流はするが出血はしない程度に縛る。注射シリンジを押して、カニューレの中が生理食塩水だけの状態にして、太いカニューレの瘤の上辺りで、先端をゴムで保護した鉗子を使って、止血する。外部カニューレを脱着して、ラット側のカニューレの他端にステンレス棒で栓をする。これでカニューレ挿入の手術は終わりである。

無麻酔下での血圧測定が簡単にできるように、皮下を通して鼠蹊部から背頸部へカニューレを出す。これは、長い鉗子を利用して、背頸部側から鼠蹊部側へカニューレを迎えに行くようにして通す。鼠蹊部の傷口を縫合する。縫合するときに針でカニューレを傷つけないこと。いまやカニューレは動脈と同じである。背頸部では、筋肉に緩く糸を通して結び、カニューレが外れないように固定する。カニューレの先端を出して、背頸部の傷口を縫合して、すべての手術が終了である。

空気が入らないように外部カニューレと接続して、三方活栓をストレインゲージ側に接続すると、ラットの血圧が測定できることを確認する。

謝 辞

本研究にあたり、無麻酔下での血圧測定および血流量測定に適切なお指導を頂いた広島大学名誉教授(現広島県立保健福祉短期大学教授)入内島十郎先生に深謝いたします。本研究は、文部省科学研究費補助金奨励研究A:課題番号58710071によって行われた。なお本研究の一部は、第44回日本動物心理学会で発表した。

文 献

- Iriuchijima, J. and Sakata, S. (1985) Regional difference in sympathetic vasoconstrictor tone in conscious rats. *Japanese Journal of Physiology*, **35**, 1051-1063.
- Junqueira, L. F. Jr and Krieger, E. M. (1976) Blood pressure and sleep in the rat in normotension and in neurogenic hypertension. *Journal of Physiology*, **259**, 725-735.
- Kawaue, Y. and Iriuchijima, J. (1984) Changes in cardiac output and peripheral flows on pentobarbital anesthesia in the rat. *Japanese Journal of Physiology*, **34**, 283-294.
- Mizuma, E., Takemoto, Y., Iriuchijima, J. (1987) Redistribution of cardiac output during grooming of the rat. *Japanese Journal of Physiology*, **37**, 49-57.
- 寺西泰弘、藤井孝司、水流弘通 (1995a) Wistar rat 系から分離されたラット株 (Hiroshima rat strain) の hindquarter 血管領域における交感神経系及びバゾプレッシン系の役割 自律神経、**32**、44-52.
- 寺西泰弘、水流弘通、坂田省吾、島本博幸 (1995b) 境界域高血圧ラット Hiroshima rat strain に対する食塩負荷の影響—神経節遮断後に発現する vasopressin 系による代償性血圧維持機能— 自律神経、**32**、53-63.
- 寺西泰弘、水流弘通 (1995c) 新しく開発されたラット系 (Hiroshima rat strain) の内蔵血管領域における交感神経系及びバゾプレッシン系の役割 自律神経、**32**、64-72.
- Sakata, S. and Iriuchijima, J. (1988) Adrenomedullary origin of the hindquarter vasodilation during the transposition response of the rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, **66**, 18-21.
- 坂田省吾、杉本助男 (1981) ラットの DRLL スケジュール下における心拍の変化 中国四国心理学会論文集、**14**、25.
- Weeks, J. R. and Davis, J. D. (1964) Chronic intravenous cannulas for rats. *Journal of Applied Physiology*, **19**, 540-541.
- Yoburn, B. C., Morales R. and Inturrisse, C. E. (1984) Chronic vascular catheterization in the rat: Comparison of three techniques. *Physiology & Behavior*, **33**, 89-94.