

恒明条件下におけるラットの受動的 回避反応の日内変動¹⁾

筑波大学心理学系 山田一夫・岩崎庸男

Diurnal variation in passive avoidance response under constant light condition in rats

Kazuo Yamada and Tsuneo Iwasaki (*Institute of Psychology, University of Tsukuba, Tsukuba 305, Japan*)

Diurnal variation in performance of step-through passive avoidance response (PAR) of rats under constant light (LL) condition was investigated in order to examine the possible effects of introducing the rats from dark home cage into light experimental apparatus under LD condition. In Wistar-Imamichi strain rats, retention latency of PAR and serum corticosterone (CORT) level immediately after retention test were measured either at 14:00 or 2:00 under LL condition. The PAR latency was found to be longer at 14:00 than at 2:00, and CORT markedly increased from basal level only at 14:00. These results were almost identical to those under LD condition. In addition, diurnal variation in basal CORT level under LL condition was similar to that under LD condition in rats which were subjected only to measurement of basal CORT level. These results confirm that the difference of lighting condition between in home cage and in experimental apparatus does not influence PAR performance, and suggest that diurnal variation in PAR performance has a close relationship to that in emotional or stress response to aversive situation.

Key words: diurnal variation, passive avoidance response (PAR), corticosterone (CORT), constant light (LL) condition, rats.

我々人間は何か特別な事情でもない限り、朝起きて日中働き、夜は眠って休息する。これは24時間の周期をもった睡眠と覚醒のリズムが毎日繰り返されているということである。これは人工的な照明がまだ発達していなかった頃から現在まで基本的には変わっていない。確かに現代人は必ずしも太陽の光に正確に合わせた生活をしなくなったが、24時間おきに繰り返すリズムのある生活行動をしていることには変わりはないのである。

このようなリズム性は睡眠と覚醒だけでなく、他の行動的、生理的機能にもみられる。たとえば我々

の体温は、朝目覚める少し前から上昇し始め、午後にはピークに達する。そして夜になると徐々に下降し、明け方に最低になる。そのようなパターンはヒトが昼行性の動物であることに由来する。ラットのような夜行性の動物では、これとは反対に、夜間に高く昼間に低いという体温リズムがみられる。これらのリズムは、ラットを温度を一定に維持した恒暗あるいは恒明条件下においた場合も、ほぼ24時間周期でみられることから、体内時計によって作り出される内因性リズムであると考えられ、Halberg (1959)によってサーカディアンリズム(circadian rhythm)と名付けられた。現在では、ラットの視交叉上核を破壊すると副腎皮質ホルモン(Moore & Eichler, 1972)や睡眠-覚醒(Ibuka & Kawamura,

1)本研究は、平成7年度筑波大学学内プロジェクトの援助を受けた。

1975)のリズムが消失することから、視交叉上核がラットの体内時計として考えられている。

ところで生体には様々な生理的機能のリズムが存在するが、それらは相互に同調している。この同調が乱れると、我々ヒトの場合疲れを覚え、ひどい場合には健康を損なうこともある。その例として“時差ボケ”が挙げられ、この場合ジェット機での急速な環境変化に様々な生理的機能のリズムが適応できず、不眠や作業能率の低下、疲労感などの症状がみられる(佐々木, 1984)。

このように生理的機能のリズムは生体の行動と深く関係しているが、有害刺激に対する生理的反応にも日内変動がある。生体は常に様々な刺激に曝されており、それらの刺激に適宜反応することにより、生体機能の恒常性を維持している。

しかしながら、刺激の大きさが生体が反応できる範囲を超えると、恒常性が部分的に崩壊する。これがストレスと呼ばれる状態であり、この場合の有害刺激をストレスと呼ぶ。生体は様々なストレスに曝された場合に、ストレス反応といわれる視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応とそれに誘発される免疫系と消化器系の反応を示す。このことを最初に見いだしたのは Selye (1936)であり、彼は副腎の肥大、胸線の萎縮、胃潰瘍をストレス反応として挙げ、それらの症状はストレスの種類とは独立であるとしている。現在では、自律神経系、内分泌系、免疫系、運動系、高次の神経系のすべての反応にストレス反応がみられると考えられている。そして、そのようなストレス反応にも日内変動がみられるという知見が数多く報告されている(see review; 山田・岩崎, 1993)。

またその一方で、記憶研究によく用いられる回避学習課題の成績にも、日内変動があることが知られている(Childs & Redfern, 1981; Davies, Navaratnam, & Redfern, 1973, 1974; Gold & Van Buskirk, 1976; Sandman, Kastin, & Schally, 1971, 山田・岩崎, 1994)。回避学習場面では、無条件刺激として電撃が用いられるが、電撃は動物にとってストレスナーになりうる。ストレス反応に日内変動があるとする、回避学習のリズムにはストレス反応のリズムが関わっている可能性がある。さらに主要なストレス反応として、視床下部室旁核からの corticotropin-releasing hormone (CRH)放出、そしてそれにとともなう下垂体前葉からの adrenocorticotrophic hormone (ACTH)放出、さらにそれにとともなう副腎皮質からの corticosterone 放出という視床下部-下垂体-副腎皮質ストレス反応系があるが、これらストレス関連ホルモンは回避学習に影響を及ぼすことが知られ

ており(see review; 山田・岩崎, 1993)、ホルモンレベルでもストレス反応の日内変動が回避学習に影響している可能性も考えられる。

我々はこれまでの実験(山田・岩崎, 1994)により、ラットの受動的回避反応には明期に回避訓練と保持テストを行ったほうが、それらを暗期に行った場合よりも保持テストにおける回避潜時が長い、すなわち学習成績が良いことを実証した。さらに保持テスト直後に血中 corticosterone 定量のための採血を行ったところ、明期に回避訓練と保持テストを行ったほうが、ストレス反応としての血中 corticosterone のベースレベルからの増加量が多かった。そこで我々は、受動的回避反応の日内変動の背景には、血中 corticosterone 量の増加に代表される視床下部-下垂体-副腎皮質系のストレス反応の日内変動が深く関与していると示唆した。

しかしながら上述の実験において、いくつかの問題点が残った。そのひとつは、飼育環境と実験環境の照明条件が明期群と暗期群で異なっていたということである。我々が用いた step-through 型受動的回避装置の場合、その根底にあるのは電撃と光のコンフリクトである。ラットは明るい場所よりも暗い場所を好み、まだ電撃が与えられていない回避訓練時にはすばやく暗い電撃箱へ入る。暗期群は暗い飼育場所から、突然明るい実験装置に入れられることによって光に対する嫌悪性が強まり、より早く電撃箱に入る、その結果として回避成績が悪いという可能性が考えられる。

この問題点に関しては、受動的回避反応の日内変動を最初に報告した Davies ら(1973)も触れているが、彼らは回避訓練時のラットの行動に明暗差がみられなかったことから、照明の変化の要因は排除できると考えている。さらに彼らは別のラットを用い、明期の中間と暗期の中間の時刻でそれぞれ電撃を与えないということ以外は受動的回避学習課題の手続きと同じように実験を行い、訓練時にあたる試行と保持テストにあたる試行のどちらにおいても安全箱にいた時間に差がないことから同様の主張をしている。

しかしながらもうひとつの可能性として、そのような急激な環境の変化が記憶過程に影響を及ぼすということが考えられる。訓練後に強い電撃を与えるとその記憶成績が低下するということが知られている電気痙攣ショック(ECS)ほど強力なものでないと考えられるが、その影響は無視できない。

そこで本実験では、回避訓練から保持テスト終了まで照明を恒明条件にして、山田・岩崎(1994)の実験における明期群、暗期群のそれぞれに該当する14

: 00, 2 : 00での受動的回避反応と血中 corticosterone 量を比較, 検討した。

方法

被験体 Wistar-Imamichi系雄ラットを27匹用いた。実験開始時において被験体は, 約90日齢であった。12時間毎の明暗サイクル(明期が8 : 00~20 : 00)で飼育し, 実験期間中, 餌と水は自由に摂取させた。

装置 受動的回避装置は, 直径50cm, 高さ40cmの円形の部屋と, これに隣接する縦18cm, 横20cm, 高さ40cmの部屋からなり, それぞれの部屋はギロチンドアによって区切ることができた。円形の部屋(安全箱)の壁と床にはすべて白い塗装が施されていた。もう一方の部屋(電撃箱)の壁は灰色に塗装されており, また床は直径3mmのステンレス鋼が1.2cmの間隔でならんだグリッドになっており, ここを介してラットに電撃を与えることができた。照明は, 室内灯と安全箱の中央上, 高さ40cmのところの電球(20W)によった。安全箱中央の照度は200luxであった。

手続き 被験体を実験開始の2週間前から8 : 00~20 : 00までが明期の明暗条件下に置いた。まず実験開始3日前にすべての被験体について, 14 : 00と2 : 00に血中 corticosterone のベースレベルを測定するための採血を行った。ラットの尾の表面を剃刀で切開することにより, 尾静脈から出血させて約200mlの血液を得た。ただし採血の手続き自体が corticosterone レベルに影響を及ぼすのを少なくするために, 150秒以内に採血を終了した。なお暗期である2 : 00の採血は赤色照明下で行った。採血した血液は遠心分離器にかけ(5000rpm, 10分間), その血清を corticosterone 定量のための材料として-80℃で冷凍保存した。corticosterone 定量には radiostereoassay (Murphy, 1967)を改良した方法を用いた。

実験開始日から照明を恒明条件にした。被験体を14 : 00群(n=12)と2 : 00群(n=10)に振り分け, それぞれの時刻に受動的回避訓練を行った。回避訓練では, ギロチンドアを開けた状態で安全箱の中央に, 電撃箱に対して背を向けるようにして被験体を装置に入れた。そして, 被験体が電撃箱に入った直後にギロチンドアを閉め, 電撃(1.5mA)を3秒間与えた。電撃終了から10秒後に被験体を装置から取り出し, ホームケージに戻した。

回避訓練の24時間後に保持テストを行った。訓練

時と同様に被験体を装置に入れ, 電撃箱に入るまでの反応潜時をストップウォッチにより測定した。3分以内に電撃箱に入らなかった被験体の潜時は180秒として, 保持テストを終了した。保持テスト終了直後に, 血中 corticosterone 定量のための採血を行った。採血および corticosterone 定量は, ベースレベル測定時と同様の方法で行った。

また, 12時間周期(通常)の明暗(LD)条件から恒明(LL)条件への変化が血中 corticosterone のベースレベルに影響を及ぼすかどうかを検討するために, 14 : 00群と2 : 00群それぞれの回避訓練および保持テストと同時刻にホームケージから取り出し, 採血のみを行う群(n=5)を設定した。

結果

保持テスト時の各群の反応潜時を Fig. 1 に示した。14 : 00群の方が2 : 00群に比べて反応潜時が長く, すなわち回避成績が良かった。分散分析の結果, 2群間に有意差がみられた[F(1,21)=5.0, P<.05]。

またベースレベル測定日および保持テスト直後の各群の血中 corticosterone 量を Fig. 2 に示した。これを見ると, ベースレベル測定日には14 : 00群の方が2 : 00群よりも明らかに血中 corticosterone 量が多い。2要因の分散分析の結果, 実験時刻の主効果[F(1,20)=13.7, p<.05], 採血時期の主効果[F(1,20)=10.8, p<.05]および交互作用[F(1,20)=21.1, p<.05]のすべてが有意であった。そこで下位検定として単純主効果の検定を行ったところ, ベースレベル測定日において14 : 00群よりも2 : 00群のほうが血中 corticosterone 量が多かった[F(1,20)=34.7, p<.01]。一方, 保持テスト直後においては14 : 00群と2 : 00群の間に差はみられなかった。また, ベースレベル測定日と保持テスト直後の血中 corticosterone 量の変化を14 : 00群だけで見ると, ベースレベル測定日より保持テスト直後のほうが有意に多かった[F(1,20)=34.3, p<.01]。すなわち14 : 00群にのみ, 保持テスト直後の血中 corticosterone 量はベースレベルよりも有意に増加していた。

Fig. 3はベースレベル測定日, 受動的回避訓練日および保持テスト実行日でベースレベル測定のための採血のみ行った被験体(n=5)の血中 corticosterone 量を示している。これを見ると, 訓練日と保持テスト日のどちらにおいても, ベースレベル測定日とほぼ同様の血中 corticosterone の日内

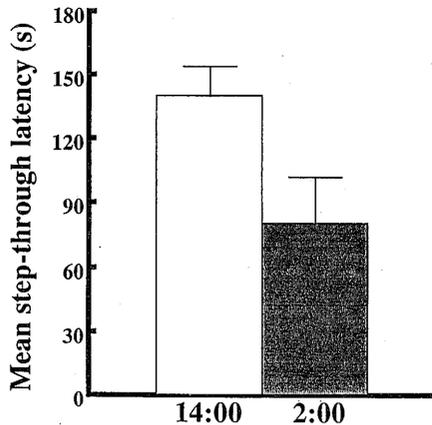


Fig. 1 Mean passive avoidance latency as a function of training/testing time. Vertical bars represent standard errors of mean.

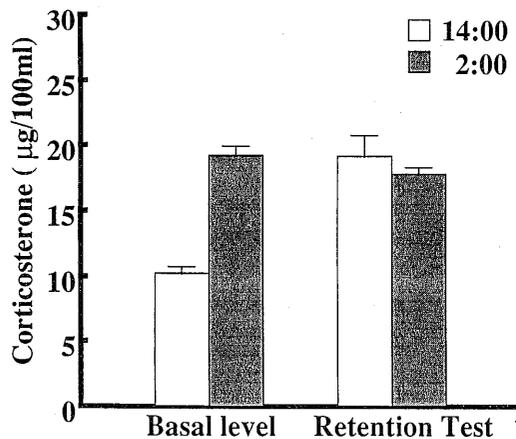


Fig. 2 Mean serum corticosterone level in home cage and immediately after retention test as a function of time of day. Vertical bars represent standard errors of mean.

変動が示されており、それぞれの日の血中 corticosterone 量は 14:00 よりも 2:00 のほうが明らかに多い。採血時刻を個体内要因とする 1 要因の分散分析の結果、採血時刻の効果が有意であった [$F(5,20)=13.5, p<.01$]。そこで多重比較を行ったところ、14:00 と 2:00 の血中 corticosterone 量はそれぞれの日において 2:00 のほうが有意に多かった [$p<.01$]。

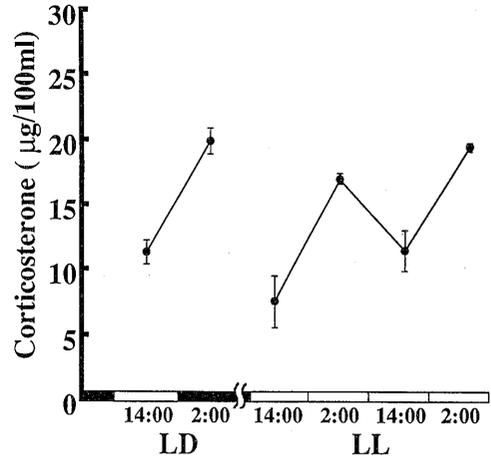


Fig. 3 Mean serum corticosterone level for control (untrained) rats as a function of blood sampling time. White and black bars in the abscissa represent light and dark periods, respectively. Vertical bars represent standard errors of mean.

考 察

これまでに受動的回避反応の日内変動を報告してきた先行研究では、実験時の明期群と暗期群の照明条件が異なっていた。すなわち、明期群は飼育場所と同じ明るい実験装置に入れられるのに対し、暗期群は暗い飼育場所から突然明るい実験装置に入れられる。したがって、これまでの実験で得られた受動的回避反応の日内変動は、この飼育環境と実験環境との照明条件の違いを反映している可能性があった。たとえば暗期群では、暗い飼育場所から急に明るい安全箱に入れられたがゆえに、明るい場所に対する嫌悪性が高まり、その結果としてより早く暗い電撃箱にほうへ移動しただけなのかもしれない。また、そのような急激な環境の変化が学習成績に影響したということも考えられる。しかしながら、Fig. 1 の結果から、恒明条件下でも先行研究に一致して、2:00 群(暗期群)よりも 14:00 群(明期群)のほうが受動的回避成績が良いことが明らかになった。

恒明条件や恒暗条件のような明暗周期をなくした条件下では、生体の様々な日内変動はそれぞれの個体の持つリズムの周期に従ってフリーランを示すことが知られている。またそのような場合、受動的回避学習では回避成績が低下することが報告されている (Tapp & Holloway, 1981)。

我々と同様に、Daviesら(1973)も飼育環境と実験環境の照明条件が異なるという問題を排除するために、恒明条件で実験を行うことを考えたが、彼らはこのフリーランというリズムの特性に悩まされた。彼らの実験では、恒明条件下において光以外の同調因子として音を用いて、フリーランを防ごうと試みられた。しかしながら、音はラットにとって同調因子となり得るものではなく、結局彼らは、回避訓練時の反応潜時、および回避訓練時に電撃を与えられなかったラットの保持テスト時の反応潜時に明暗差がみられなかったという結果によって、照明の変化の要因は排除できると説明するのに留まった。

しかしながら、照明を12:12時間の明暗(LD)条件から恒明(LL)条件に移行した場合、生体の様々な機能の日内変動がフリーランをするまでには2, 3日を要することが知られている(井深, 1990; 川村, 1989)。そこで本実験では、ラットのもつ日内変動がフリーランを示さない程度、すなわち実験開始前の12:12時間の明暗周期下で示されていた日内変動が保たれる程度の短期間で恒明条件下での実験を終了させた。それを証明しているのがFig. 3の結果である。恒明条件下での回避訓練と保持テスト日のそれぞれ14:00と2:00において、血中corticosteroneのベースレベル測定の際のみが行われたラットのcorticosterone量では、実験開始前の血中corticosteroneのベースレベルとほぼ同じような日内変動がみられた。したがって本実験の結果に関しては、恒明条件という要因の影響は排除できると考えられ、これまでの実験で問題となった飼育時と実験時の照明条件の違いという要因を純粋に検討できたといえよう。

以上のことから、本実験でもこれまでの実験と同様に、14:00群のほうが2:00群よりも回避反応潜時が長いという日内変動が得られたということは、暗い飼育場所から明るい実験装置に入れられるといった環境条件の急激な変化が、受動的回避反応に影響を及ぼしているという可能性を否定するものである。

また保持テスト直後の血中corticosterone量に関しても、我々の先行研究(山田・岩崎, 1994)と同様に、14:00群においてのみベースレベル測定時よりも保持テスト測定時の血中corticosterone量が有意に多かった。したがって、血中corticosteroneのベースレベルが低い14:00のみに保持テスト直後のストレス反応としてのcorticosteroneの増加がみられたと推定される。この結果は、受動的回避反応の日内変動には、ストレス反応の日内変動が深く関与しているという我々のこれまでの示唆を支持するもので

ある。

ラットの副腎皮質ホルモンであるcorticosteroneは、視床下部室旁核からのCRH放出、下垂体前葉からのACTH放出に伴って副腎皮質から血中に放出される。このcorticosterone放出が、ストレスに対する視床下部-下垂体-副腎皮質系の最終反応である。これまでに、de Wied(1964)をはじめ数多くの研究により、CRH、ACTHおよびcorticosteroneといった視床下部-下垂体-副腎皮質ストレス反応系のホルモンが受動的回避学習のような嫌悪性学習に影響を及ぼすことが報告されてきた。さらにcorticosteroneに関しては、ストレス誘発性のcorticosterone放出を抑制するcycloheximideを受動的回避訓練30分前に投与すると受動的回避学習が阻害され、このcycloheximideによる学習障害はcorticosteroneの皮下あるいは海馬内投与によって回復することが報告されている(Cottrell & Nakajima, 1977)。彼らは受動的回避訓練時に電撃により副腎皮質から放出されるcorticosteroneが海馬に作用し、これがその後の受動的回避反応を維持するように働くことを示唆している。Patacchioli, Casolini, Puglisi-Allegra, Sadile & Angelucci(1990)は³Hで標識したcorticosteroneを用いて、海馬のcorticosterone結合能力(glucocorticoid receptorの数)と能動的回避成績との正の相関を見いだしている。また彼らは、副腎除去されたラットの回避成績低下がcorticosterone投与によって回復されたことから、適応反応の調節に海馬のglucocorticoid receptorが関与していることを示唆している。

さらに近年になって、corticosteroneが脳内の様々な物質やレセプターに影響を及ぼすことが報告されてきた。たとえば、人工的なglucocorticoidsであるdexamethasoneは、ACTHと並んで記憶を増強する物質と考えられているvasopressinのレセプター数の増加というup-regulationを引き起こす(Colson, Ibarondo, Devilliers, Balestre, Duvold, & Guillon, 1992)。副腎除去によって、大脳皮質、小脳、視床および海馬における、³Hで標識したmuscimolのbindingが偽損傷ラットに比べて減少し、逆にcorticosteroneがこれらの脳部位でのmuscimolのbindingを増加させることから、corticosteroneはGABA_Aレセプターの親和性を調節する(Majewska, Bisslerbe, & Eskay, 1985)。

これらの知見から、視床下部-下垂体-副腎皮質ストレス反応系のみではなく、そのストレス系とそれ以外の神経伝達物質系やホルモン系との相互作用を探究していくことが、受動的回避反応の日内変動のメカニズムをより一層解明していくために必要で

あると考えられる。

要約

ラットの受動的回避反応の日内変動の研究における問題点として、暗期群は暗い飼育場所から明るい装置に入れられるので、照明の急激な変化が受動的回避反応に影響している可能性がある。そこで本実験では、恒明条件下での14:00群(n=12)と2:00群(n=10)の受動的回避反応および保持テスト後の血中corticosterone量を比較した。また明暗条件下から恒明条件への変化が血中corticosteroneのベースレベルに及ぼす影響を検討するために、14:00群と2:00群のそれぞれの訓練および保持テストと同時刻にホームケージから取り出し、採血のみを行う群(n=5)を設定した。その結果、恒明条件下での血中corticosteroneのベースレベルには、12時間周期の明暗条件下と同様に14:00に低く2:00に高いという日内変動がみられた。また受動的回避反応に関しては、14:00群のほうが2:00群よりも回避成績が良かった。さらに14:00群のみに保持テスト直後の血中corticosteroneのベースレベルからの増加がみられた。これらの結果は、飼育環境と実験環境の照明の違いが受動的回避反応に影響を及ぼしているという可能性を否定するものであり、受動的回避反応の日内変動の背景にはストレス反応の日内変動が関与しているというこれまでの示唆を支持する。

引用文献

- Childs, G., & Redfern, P. H. 1981 A circadian rhythm in passive avoidance behavior: The effect of phase shift and the benzodiazepines. *Neuropharmacology*, **20**, 1365-1336.
- Colson, P., Ibarondo, J., Devilliers, G., Balestre, M. N., Duvoid, A., & Guillon, G. 1992 Upregulation of V1a vasopressin receptors by glucocorticoids. *The American Physiological Society*, **26**, E1054-E1062.
- Cottrell, G. A., & Nakajima, S. 1977 Effect of corticosteroids in hippocampus on passive avoidance behavior in the rat. *Pharmacology, Biochemistry & Behavior*, **7**, 277-280.
- Davies, J. A., Navaratnam, V., & Redfern, P. H. 1973 A 24-hour rhythm in passive avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacologia*, **32**, 211-214.
- Davies, J. A., Navaratnam, V., & Redfern, P. H. 1974 The effect of phase-shift on the passive avoidance response in rats and the modifying action of chlordiazepoxide. *British Journal of Pharmacology*, **51**, 447-451.
- de Wied, D. 1964 Influence of anterior pituitary on avoidance learning and escape behavior. *American Journal of Physiology*, **207**, 255-259.
- Gold, P. E., & Van Buskirk, R. 1976a Effects of post-trial hormone injections on memory processes. *Hormones & Behavior*, **7**, 509-517.
- Halberg, F. 1959 Physiologic 24-hour periodicity: General and procedural considerations with reference to the adrenal cycle. *Vitamin, Hormone and Ferment Forschung*, **10**, 225-296.
- 井深信男 1990 行動の時間生物学 朝倉書店
- Ibuka, N., & Kawamura, H. 1975 Loss of circadian rhythm in sleep-wakefulness cycle in the rat by suprachiasmatic nucleus lesions. *Brain Research*, **96**, 76-81.
- 川村 浩 1989 脳とリズム 朝倉書店
- Majewska, M. D., Bisslerbe, J. C., & Eskay, R. L. 1985 Glucocorticoids are modulators of GABA_A receptors in brain. *Brain Research*, **339**, 178-182.
- Moore, R. Y., & Eichler, V. B. 1972 Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasmatic lesions in the rat. *Brain Research*, **42**, 201-206.
- Murphy, B. E. P. 1967 Some studies of protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicromerement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay. *Journal of Clinical Endocrinology*, **27**, 973-990.
- Patacchioli, F. R., Casolini, P., Puglisi-Allegra, S., Sadile, A. G., & Angelucci, L. 1990 Hippocampal glucocorticoid receptor and behavior: A correlative study in rats and mice. *Journal of steroid biochemistry molecular biology*, **37**, 405-409.
- 佐々木三男 1984 時差ボケ 鳥居鎮夫(編) 睡眠の科学 朝倉書店 Pp.149-183.
- Sandman, C. A., Kastin, A. J., & Schally, A. V. 1971 Behavioral inhibition as modified by melanocyte-stimulating hormone (MSH) and light-dark conditions. *Physiology & Behavior*, **6**, 45-48.
- Selye, H. 1936 A Syndrome produced by diverse noxious agents. *Nature*, **138**, 32.
- Tapp, W. N., & Holloway, F. A. 1981 Phase shifting circadian rhythms produces retrograde amnesia.

- Science*, **211**, 1056-1058.
- 山田一夫・岩崎庸男 1993 回避学習とストレス関連ホルモンの関係に対する時間生物学的アプローチ. 筑波大学心理学研究, **15**, 63-70.
- 山田一夫・岩崎庸男 1994 ラットの受動的回避反応の日内リズムと血中コルチコステロン. 心理学研究, **65**, 173-180.

—1995. 9 .30受稿—