

ラットの放射状迷路行動における作業記憶と 参照記憶に対する NMDA 受容体遮断薬 MK-801 の効果

筑波大学大学院人間総合科学研究科 高野 越史

筑波大学人間系 山田 一夫・一谷 幸男

Effects of NMDA receptor antagonist MK-801 on working and reference memory for radial maze behavior in rats

Etsushi Takano (*Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan*)

Kazuo Yamada, Yukio Ichitani (*Faculty of Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan*)

The role of glutamatergic N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in working and reference memory for radial maze behavior was investigated by administering the receptor antagonist. Rats were trained in a modified version of 8-arm radial maze task in which 4 arms were consistently baited and other 4 arms were not, so that working memory and reference memory errors could be measured separately. After reaching the task criterion, rats were systemically administered with either the NMDA receptor antagonist MK-801 or saline. MK-801 significantly increased the number of reference memory errors (entering into unbaited arms) but not working memory errors (repeatedly entering already visited arms in a trial). The results suggest that NMDA receptors play an important role in reference memory rather than in working memory for the radial maze behavior in rats.

Key words: NMDA receptor, MK-801, working memory, reference memory, radial maze behavior, rats

背景と目的

N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は脳内の主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体の一種である。NMDA 受容体は長期増強 (LTP) 現象に重要な役割を果たすことが知られている (Collingridge, Kehl & McLennan, 1983)。LTP は Bliss & Lømo (1973) がウサギの海馬から発見したもので、一過性の高頻度刺激によってシナプス間伝達効率の上昇が生じ、それが長期に渡って維持される現象である。これはシナプス伝達の可塑性を表す現象であるため、記憶の生理学的基盤として注目されてきた。したがって、記憶と NMDA 受容体の

関連が示唆されるが、脳内 NMDA 受容体の記憶への関与を実証する 1 つの方法として、様々な記憶・学習課題を動物に訓練し、その際に NMDA 受容体遮断薬を投与してその習得や遂行に及ぼす影響を調べる研究が行われている。

NMDA 受容体と学習・記憶の関係を行動学的に初めて明らかにしたのは、Morris, Anderson, Lynch & Baudry (1986) である。彼らは NMDA 受容体遮断薬である 2-5-aminophosphonopentanoic acid (AP5) を脳室内に慢性投与すると、空間記憶課題の一種であるモリス水迷路課題の習得が障害されることを示した。この研究で用いられた用量の AP5 は、海馬で起こる LTP の誘導を阻害したため、海馬 NMDA 受

容体遮断がLTPを阻害し、それによって記憶・学習に影響を及ぼす可能性を示唆した。さらにMorris, Halliwell & Browery (1989) はAP5を海馬内に局所投与し、脳室内投与と同様にモリス水迷路課題の習得を遅らせることを明らかにした。このことから、海馬NMDA受容体はモリス水迷路課題の習得に重要な役割を果たすことが示唆された。

モリス水迷路課題と同じく空間記憶課題の典型として放射状迷路課題がある。Olton & Samuelson (1976) は、中央プラットホームから放射状に広がる8本のアームを持った高架式迷路を考案した。この課題においてラットは各アームの先端に置かれた小さな報酬(餌ペレット)を効率よく獲得することが求められ、訓練を重ねることで、一度進入し報酬を得たアームに再進入することなく、全てのアームの報酬を速やかに得るようになる。ラットは迷路周囲の視覚手がかりに基づいてアームとその周囲の空間記憶を形成し、さらにはすでに進入したアームと未進入のアームを何らかの形で一時的に記憶していると考えられることから、この課題は空間的作業記憶の1つとされている。Ward, Mason & Abraham (1990) は、ラットに放射状迷路課題を訓練した後、NMDA受容体の競合的遮断薬である3-(2-Carboxypiperazine-4-yl) propyl-1-phosphonic acid (CPP)、または非競合的遮断薬である(+)-5-methyl-10, 11-5H-dibenzo [a, d] cyclohepten-5, 10-imine maleate (MK-801)を腹腔内投与して遂行への影響を検討した。その結果、CPP (10, 30 mg/kg)、MK-801 (0.5 mg/kg)ともに誤選択数を増加させた。このことから放射状迷路課題の遂行にNMDA受容体が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

彼らは同じ論文(Ward et al., 1990)の中で、8本のアームのうち常に同じ4本にのみ報酬を置き、残りの4本には報酬を置かないという手続きの放射状迷路課題(以下4/8放射状迷路課題)を用いてさらに実験を行った。すなわちこの課題では、各ラットにとって報酬のあるアームは8本のうち一定の4本のみであり、これはどの試行でも一貫していた。したがって、報酬の置かれた4本のアームにそれぞれ一回ずつ進入してペレットを得ることが効率的であり、被験体が1試行内でどこに進入したか、またはどこに未進入であるかという「作業記憶」の他に、8本のうちどのアームに報酬が置かれているか、または置かれていないかという「参照記憶」を必要とする。つまり作業記憶は1試行内でのみ有効な記憶であり、参照記憶は課題遂行時にその試行のみならず全試行にわたって有効な記憶である(Honig, 1978)。Ward et al. (1990)はこの課題の遂行にお

いて、CPP、MK-801がどちらの種類の記憶に対してより強く影響を及ぼすかを検討した。その結果、CPP (10 mg/kg)は作業記憶エラー、参照記憶エラーの両方を増加させ、中でも作業記憶エラーの方をより多く増加させたのに対し、MK-801 (0.1, 0.33 mg/kg)はどちらのエラー数にも影響を及ぼさなかった。

さらにShapiro & O'Connor (1992)は4/8課題の毎訓練試行前にMK-801 (0.0625 mg/kg)を腹腔内投与したところ、作業記憶と参照記憶の両方の習得が有意に阻害された。しかし課題習得後、テスト試行直前に同量のMK-801を投与しても、作業記憶、参照記憶どちらにも影響を及ぼさなかった。

4/8放射状迷路課題は空間記憶を作業記憶と参照記憶を分類して薬物や損傷の効果を検討できるという点で長所を有する課題である。しかしながら、前述のように課題習得後のNMDA受容体遮断薬の効果については、一貫した結果が得られていない。本研究では4/8課題習得後、テスト試行直前のMK-801投与が課題遂行に及ぼす効果を検討した。

方 法

被験体

実験開始時において7週齢のWistar-Imamichi系雄ラット6匹を用いた。12/12時間の明暗周期条件下(明期:8:00~20:00)で飼育した。食餌制限を行い、実験期間中の体重は自由摂取時の約80%に維持した。水は実験期間を通して自由に摂取させた。なお本研究は、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

装置

灰色塩化ビニール製の高架式8方向放射状迷路を用いた。中央プラットホーム(直径34 cm)からアーム(長さ各60 cm, 幅12 cm)が放射状に8本突き出ており、各アームの先端には報酬の餌ペレット(45 mg, Bio-Serv Inc., NJ)を置くための円形の溝(直径3 cm, 深さ1 cm)が空けられていた。中央プラットホームと各アームとの間は透明アクリル板のギロチンドアで隔たれていた。迷路は実験室床面より高さ70 cmに位置し、迷路周辺には机、待機ケージ、壁掛け時計、スチールラック、カーテンなどの迷路外手がかりになり得る様々な刺激が置かれていた。

薬物

非競合的NMDA受容体拮抗薬MK-801を生理食

塩水 (SAL) に溶解したものをを用いた。0.15および、0.3 mg/ml 溶液を作成し、被験体の体重100 g 当たり0.1 ml を腹腔内投与した。統制条件として同量のSALを投与した。

手続き

(1) ハンドリング・装置馴化 食餌制限開始1週間後より、ハンドリングおよび装置馴化を3日間行った。ハンドリングは1匹あたり1日5分間行い、続いて被験体を装置に入れて10分間の装置馴化を行った。なお、馴化の際には、装置内には後の訓練で用いる餌ペレットを散在させて、自由に摂取できるようにした。

(2) 4/8課題の習得訓練 各被験体は8本のアームのうちランダムに4本を報酬アームとして設定され、どの試行でも一貫してそれら4本のアームの先端に置かれた餌ペレットを全て取り終えるまで装置内を自由に走行できた。残る4本のアームは常に無報酬であった。訓練では被験体は、常に報酬のないアームには進入せず、かつその試行内ですでに進入して報酬を得たアームに繰り返し進入することなくアームを効率良く選択することが要求された。正選択は報酬が置かれている4つのアームのうち、その試行で未だ進入していないアームを選択すること、誤選択は常に報酬の置かれていないアームに進入すること (参照記憶エラー、最大値は4)、および試行内ですでに進入したアームに再び進入すること (作業記憶エラー) とした。

被験体を中央プラットフォームに置き、5秒後に全てのギロチンドアを一斉に開いて試行を開始した。被験体の尾部を除く体幹部が完全に1つのアームに入った時点で選択とみなし、ギロチンドアを閉めた。被験体がアームの先端に行き、餌ペレットを食べたことを確認したのち、アームのギロチンドアを開け、中央プラットフォームに戻った時点でギロチンドアを閉じた。その状態で中央プラットフォームに被験体を5秒間閉じ込めたのち、再び8つすべてのギロチンドアを開き次の選択を行わせた。1試行は、4つの報酬を全て取り終える、16選択行、試行開始から5分間経過する、のいずれかを満たした時点で終了とした。1試行が終了するごとにアームおよび中央プラットフォームを、消毒液を含む布で水拭きした。訓練は1日4試行とし、試行間間隔は20-60分であった。

習得基準は、1日4試行での誤選択数の合計が1以下である日が2日間連続することとした。この基準を一旦満たした後に薬物テストを開始したが、統制条件であるSAL投与下でも成績が低下する傾向

が見られたために、さらに訓練を追加した。再び前述の習得基準を満たした後に、第2回目の薬物テストを行った。本研究ではこの第2回目の薬物テストの成績を分析した。

(3) 薬物テスト 4/8課題の習得基準を満たした被験体から順に薬物テストを行った。テストの30分前にSAL、MK-801 0.15 mg/kg、または0.3 mg/kgの3条件のうちのいずれかを腹腔内投与した。投与順序はランダムとし、被験体間でカウンターバランスをとった。試行は習得訓練と同じ手続きで行い、ラットの選択反応と走行時間を記録した。ただし薬物テストにおいては、1日1試行のみ行った。次の薬物条件によるテストに移る前に、薬物無投与と試行を最低2日間計8試行行い、習得基準を満たすかどうか確認した。3つの薬物条件すべてのテストが終了するまで行った。

結果

薬物テストにおける各薬物条件での作業記憶エラー数、参照記憶エラー数、総誤選択数をFig. 1に示す。作業記憶エラー (Fig. 1A) は、SALおよびMK-801 0.15 mg/kg条件において0であったのに対し、MK-801 0.3 mg/kg条件においては出現した。しかし、フリードマン検定を行ったところ、薬物条件間における有意差は認められなかった。したがって、MK-801末梢投与は作業記憶エラー数を有意に増加させるには至らなかった。

参照記憶エラー (Fig. 1B) はSAL条件では0であったが、MK-801投与によって出現し、用量依存的に増大した。フリードマン検定を行ったところ、3条件間に有意差が認められ ($\chi^2=6.71$, $df=2$, $p<.05$)、ウィルコクソンの符号付き順位和検定を行ったところ、SALとMK-801 0.3 mg/kgの条件間に有意差が認められた ($Z=2.04$, $p<.05$)。したがって、MK-801 (0.3 mg/kg) が参照記憶エラー数を増加させたといえる。

作業記憶エラー数と参照記憶エラー数を合わせた総誤選択数 (Fig. 1C) については、MK-801 0.3 mg/kg条件下のエラー数が高条件と比較して顕著に多かった。薬物投与の3条件でフリードマン検定を行ったところ、3条件間に有意差が認められ ($\chi^2=6.71$, $df=2$, $p<.05$)、ウィルコクソンの符号付き順位和検定を行ったところ、SALとMK-801 0.3 mg/kgの条件間に有意差が認められた ($Z=2.06$, $p<.05$)。したがって総誤選択数についても、MK-801による増大が認められた。

1選択あたりの走行時間をFig. 1Dに示す。この

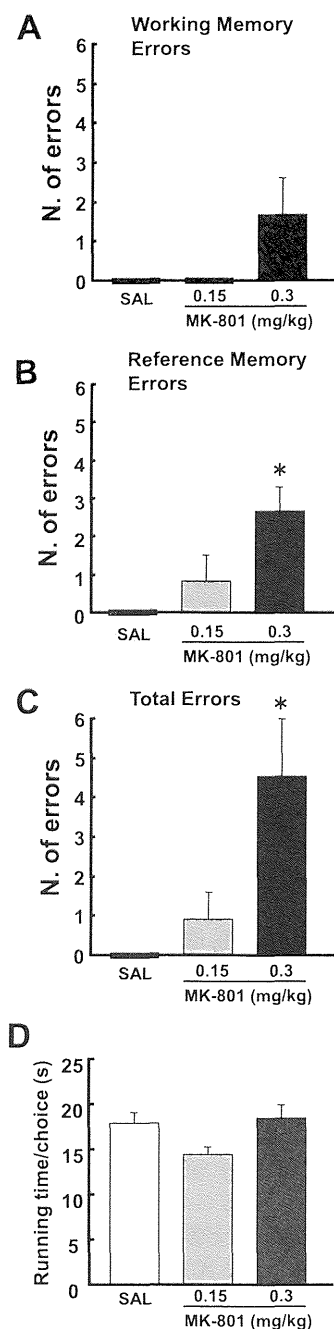


Fig. 1 Effects of MK-801 on working and reference memory errors and running speed in radial maze behavior. Mean number of working memory errors (A), reference memory errors (B), total errors (C), and mean running time per choice (D) under each drug treatment are shown. Vertical bars in each column indicate SEM. * $p < 0.05$ compared with SAL condition.

値は、試行終了までにかかった時間をその試行における総選択数で割ることによって求めた。分散分析を行ったところ、主効果が有意であった [$F(2, 10) = 6.50, p < 0.05$]。ボンフェローニ法による多重比較を行ったところ、MK-801 0.3 mg/kg 条件が0.15 mg/kg 条件より有意に長かった ($p < 0.05$)。しかし、どちらの条件も SAL 条件との有意な差は認められなかった。

考 察

本研究では、放射状迷路の8本のアームのうち特定の4本のアームのみに常に報酬を置くという課題(4/8放射状迷路課題)をラットに訓練し、その後薬物テストとして試行直前にMK-801を末梢投与し、一時的なNMDA受容体遮断による課題遂行への影響を検討した。その結果、テスト試行30分前のMK-801(0.3 mg/kg)投与によって、総誤選択数がSAL投与条件より有意に増加した。誤選択を作業記憶エラーと参照記憶エラーに分類して分析したところ、MK-801投与により有意に増加したのは参照記憶エラーであり、これは用量依存的な傾向であった。一方、作業記憶エラーは0.3 mg/kg投与によって出現したが、有意な増加ではなかった。これらの成績低下を引き起こした用量のMK-801によって、1選択あたりの走行時間はほとんど変化しなかったことから、参照記憶エラーの増大は放射状迷路行動における運動障害や動機づけの低下によって生じたとは考えられない。したがって、いったん習得された後の放射状迷路行動の遂行のためにNMDA受容体が重要な役割を果たし、特に参照記憶にとって重要であることが示唆された。

先行研究において、本研究と同様に4/8放射状迷路課題を行ったWard et al. (1990)の研究では、MK-801末梢投与(0.1, 0.33 mg/kg)は作業記憶エラーと参照記憶エラーのいずれをも増加させなかった。本研究とほぼ同用量のMK-801(0.33 mg/kg)が誤選択数を増加させなかった点で結果が異なっている。薬物投与のタイミングを比較すると、本研究ではテスト試行の30分前に投与したのに対し、Wardらはテスト試行の2時間前に投与しており、このことでMK-801の効果が減弱し、成績の低下を十分にもたらさなかった可能性が考えられる。一方で、Shapiro & O'Connor (1992)はテスト試行直前のMK-801投与が誤選択数を増加させないという結果を示したが、用量が0.0625 mg/kgであり、本研究の用量と比べるとかなり低用量であったといえる。以上のことから、MK-801末梢投与はその用量と投

与タイミングを適切に行うと、放射状迷路行動における走行運動や動機づけにほとんど影響することなく、記憶成績を低下させるものと推測できる。本研究では参照記憶エラーのみが MK-801 によって有意に増大したが、作業記憶についても 0.3 mg/kg 投与によって出現したため作業記憶にも影響する可能性は否定しきれず、今後さらなる検討が必要である。

一方で、この課題の習得そのものへの MK-801 末梢投与の影響について、Shapiro & O'Connor (1992) は非常に低い用量 (0.0625 mg/kg) を訓練時に投与することで、作業記憶と参照記憶の両者の習得が阻害されることを報告した。この用量は、いったん課題を習得した後の遂行直前の投与では影響を及ぼさなかったことから、NMDA 受容体は 4/8 課題の習得により強く関与している可能性が考えられる。同様に課題習得における NMDA 受容体の役割はモリス水迷路課題でも指摘されている。Heale & Harley (1990) は、AP5 脳室内投与および MK-801 腹腔内投与は、モリス水迷路課題の習得を阻害するが、習得後の遂行には影響しないことを示し、NMDA 受容体はモリス水迷路課題の習得に重要であるが、遂行には重要でないことを示唆した。しかし先述のように、NMDA 受容体遮断薬の効果が用量や投与タイミングによって影響を受けることから、モリス水迷路課題の遂行においても NMDA 受容体が関与している可能性がないとは言い切れない。

MK-801 や CPP の末梢投与の効果を検討したこれらの研究では、脳内のどの部位の NMDA 受容体を遮断することによって行動的效果が発現しているのかを特定することはできない。従来から空間記憶には海馬が重要であると考えられており (Jarrard, 1993)、また海馬には NMDA 受容体が密に分布していることが知られている (Monaghan & Cotman, 1985)。Morris et al. (1989) は海馬に AP5 を局所投与し、モリス水迷路課題の習得が阻害されることを示した。また放射状迷路課題について、Kawabe, Ichitani & Iwasaki (1998) が課題習得後、薬物テストで試行直前に AP5 を海馬局所投与すると、成績が著しく低下することから、海馬 NMDA 受容体は放射状迷路課題の遂行に重要な役割を果たすことを示唆した。したがって、本研究や Ward et al. (1990) の研究で認められた MK-801 や CPP の末梢投与による放射状迷路行動の成績低下には、海馬の NMDA 受容体が関与している可能性が高いと考えられる。しかし、作業記憶と参照記憶への影響を別々に評価できる 4/8 放射状迷路課題を用いて、海馬 NMDA 受容体遮断の効果を検討した研究はいまだ見られず、今後はそのような研究が期待される。

引用文献

- Bliss, T.V., & Lømo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, **232**, 331-356.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., & McLennan, H. (1983). The antagonism of amino acid-induced excitations of rat hippocampal CA1 neurons in vitro. *Journal of Physiology*, **334**, 19-31.
- Honig, W.K. (1978). Studies of working memory in the pigeon. In S.H. Hulse, H. Fowler, & W.K. Honig (Eds.), *Cognitive processes in animal behavior*. Hillsdale, NJ: Lawrence Erlbaum Associates. pp.211-248.
- Jarrard, L.E. (1993). On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. *Behavioral and Neural Biology*, **60**, 9-26.
- Kawabe, K., Ichitani, Y., & Iwasaki, T. (1998). Effects of intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, **781**, 300-306.
- Heale, V., & Harley, C. (1990). MK-801 and AP5 impair acquisition, but not retention, of the morris milk maze. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **36**, 145-149.
- Monaghan, D.T., & Cotman, C.W. (1985). Distribution of N-methyl-D-aspartate-sensitive L-[3H] glutamate-binding sites in rat brain. *Journal of Neuroscience*, **5**, 2909-2919.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S., & Baudry, M. (1986). Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, **319**, 774-776.
- Morris, R.G.M., Halliwell, R.F., & Browery, N. (1989). Synaptic plasticity and learning II: do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia*, **27**, 41-59.
- Olton, D.S., & Papas, B.C. (1979). Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, **17**, 669-682.
- Olton, D.S., & Samuelson, R.J. (1976). Remembrance of places passed: spatial memory in rats. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, **2**, 97-116.
- Shapiro, M.L., & O'Connor, C. (1992). N-methyl-D-

aspartate receptor antagonist MK-801 and spatial memory representation: working memory is impaired in an unfamiliar environment but not in a familiar environment. *Behavioral Neuroscience*, **106**, 604-612.

Ward, L., Mason, S.E., & Abraham, W.C. (1990).

Effects of the NMDA antagonists CPP and MK-801 on radial maze performance in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **35**, 785-790.

(受稿3月30日：受理5月7日)