

学習・記憶における脳内一酸化窒素の役割： ラットの放射状迷路行動に及ぼす一酸化窒素 合成酵素阻害薬 L-NAME の効果

筑波大学大学院（博）心理学研究科 末永 叔子

筑波大学心理学系 一谷 幸男

The role of brain nitric oxide in learning and memory: effects of nitric oxide synthase inhibitor L-NAME on radial maze behavior in rats.

Toshiko Suenaga and Yukio Ichitani (*Institute of Psychology, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan*)

Nitric oxide (NO) has various physiological functions. In the brain, NO facilitates neurotransmission functioning as a synaptic retrograde neurotransmitter. The first part of this study reviews the behavioral effects of administering NO synthase (NOS) inhibitors and NO donors, particularly on learning and memory in animals. The changes in NOS activity accompanied by learning and memory are also reviewed. The second part of the study examines the effect of the NOS inhibitor N^G-nitro-L-arginine-methyl-ester (L-NAME) on radial arm maze (RAM) performance in rats. Rats were trained in the RAM task prior to a drug test. In the test trials, intraperitoneal injection of L-NAME 30 or 60 minutes before the test did not impair task performance (Exp. 1). In Exp. 2 and 3, the effects of L-NAME injection into the dorsal and ventral hippocampus, respectively, were investigated, although neither treatment produced significant deficits in performance. These results suggest that brain NO does not play an essential role in the working memory required for RAM performance in rats.

Key words: nitric oxide, learning and memory, radial maze, L-NAME, hippocampus, rats.

1. 一酸化窒素の生理作用

一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は低分子のガス状フリーラジカルの一種である。NO は不対電子を持つ構造であるため、化学的反応性が非常に高く、毒性も強い。近年、NO は生体内にも存在しており、多彩な生理的機能に役割を担っていることが明らかになった。生体内において NO は、神経型 NO 合成酵素 (neuronal NO synthase, nNOS)、血管内皮型 NO 合成酵素 (endothelial NOS, eNOS)、または誘導型 NO 合成酵素 (inducible NOS, iNOS) が活

性化されることによって作られる。nNOS および eNOS による NO 合成は Ca²⁺ に依存しており、iNOS による NO 合成は免疫系の情報伝達物質であるサイトカインによって調節されている。

1.1 血管系および免疫系における NO のはたらき

血管系において NO は、血圧調整の決定因子として働き、血管を弛緩させたり血小板の凝集を阻害する作用を持つ。心臓においては eNOS 由来 NO が心筋細胞の収縮制御に関与している。このように NO

は内皮由来血管弛緩因子 (endothelium derived relaxing factor) として生体にとって重要な働きをしている。

また免疫系において NO は、生体が細菌、ウイルス、真菌あるいは原虫などの微生物感染を受けた際に、マクロファージ内で産出されたり、微生物により刺激を受けた免疫細胞が放出するサイトカインによって誘導された肝クッパー細胞、腎メサンギウム細胞、軟骨細胞、血管平滑筋細胞、脳グリア細胞などのマクロファージ様細胞から放出されたりするが、それらは細菌や腫瘍細胞を殺し、生体をこれらの有害物質から防御している。

1.2 中枢神経系における NO のはたらき

脳内において NO は細胞外および細胞内情報伝達物質として機能している。シナプス前部から放出された興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸がシナプス後部の NMDA (*N*-methyl-D-aspartate) 受容体に結合し、細胞内に Ca^{2+} が流入する。NO は流入した Ca^{2+} が NOS を活性化することで生成される。NO はガス状であるので、生体内ですばやく拡散し、シナプス前部や周辺の神経細胞、およびグリア細胞に取り込まれる。シナプス前部に取り込まれた NO は cGMP (3'-5' cyclic guanosine monophosphate) 生成を上昇させ、グルタミン酸の放出を促す。以上の過程によって NO はシナプスにおける逆行性シグナルとして働き、神経情報伝達を促進しているのではないかと考えられている。

また、cGMP を介さない経路の存在も示唆されている (Prast & Philippu, 2001)。同経路を介し、NMDA 依存性の電流が減じ、細胞内カルシウム量が増加することが報告されている (Manzoni, Prezeau, Martin, Deshager, Bochaert & Fagni, 1992)。この作用により、NO は NMDA 受容体の過度の興奮を減衰させるフィードバック系としても働いている可能性が考えられる。

シナプス伝達の長期増強 (long-term potentiation, LTP) は、学習・記憶の神経基盤である可能性が高いとして盛んに研究されているシナプス可塑性の現象である。LTP には NO が関与しているという報告がある。海馬 LTP は NOS 阻害薬投与により消失したり (Böhme, Bon, Stutzmann, Doble & Blanchard, 1991; O'Dell, Hawkins, Kandel & Arancio, 1991; Schuman & Madison, 1991; Bon, Böhme, Doble, Stutzman & Blanchard, 1992; Doyle, Hölscher, Rowan & Anwyl, 1996)、部分的に抑制されたりする (Gribkoff & Lum-Ragan, 1992; Chetkovich, Klann & Sweatt, 1993; Haley,

Malen & Chapman, 1993; Iga, Yoshioka, Togashi & Saito, 1993)。また、nNOS, eNOS 両方の遺伝子を欠損したマウスでは LTP が阻害される (Son, Hawkins, Martin, Kiebler, Huang, Fishman & Kandel, 1996)。さらに、NO 供与体をシナプス前部に投与すると、LTP の促進が見られる (Arancio, Kandel & Hawkins, 1995; Arancio, Kiebler, Lee, Lev-Ram, Tsien, Kandel & Hawkins, 1996)。これらの報告から、NO は LTP に促進的に働いていると考えられる。

しかし一方で、海馬 LTP に NOS 阻害薬が影響を及ぼさないという報告もあり (Williams, Li, Nayak, Errington, Murphy & Bliss, 1993; Bannerman, Chapman, Kely, Butcher & Morris, 1994b; Boulton, Iring, Southam, Potier, Garthwaite & Collingridge, 1994; Cummings, Nicola & Malenka, 1994; Murphy, Williams, Bettache & Bliss, 1994)、これらは LTP に対する NO の関与を支持していない。このように、これまで報告されてきた結果に一貫性がみられない原因として、いくつかの可能性がある。まず、LTP を観察した部位の違いが考えられる。海馬 CA1 の放射状層 (stratum radiatum) の LTP は NO 非依存性であり、上昇層 (stratum oriens) のものは NO 依存性であるという可能性である。第2に、灌流液の温度や薬物投与のタイミングなどの実験環境の違いが、受容体の興奮性や反応性、LTP の必要条件の変化を生じさせている可能性も考えられる。また第3に、用いられた高頻度刺激の種類の違いが考えられる。vitro の実験条件で用いられる通常の高頻度刺激の手続きは、生理的状況下の神経活動とは全く異なり、そのため、NOS 非依存性の LTP を引き起こしている可能性がある。その証拠として、 θ リズム波で位相固定された刺激 (より生理的な刺激に近い) によって引き起こされる LTP は、NOS 阻害薬によって完全に抑制されたという報告がある (Hölscher, 1999)。以上のことから、NO が LTP に何らかの役割を担っている可能性は否定できないであろう。各種の学習課題を用いて、その遂行に及ぼす NOS 阻害薬や NO 供与体の効果を見た研究においても、学習における NO の関与が示唆されており (後述)、NO が LTP に影響することによって、学習・記憶過程に関与している可能性が考えられる。

2. 学習・記憶における NO のはたらき：行動学的研究

NO は逆行性の神経伝達物質としてシナプス終末部でのグルタミン酸の放出を促し、学習・記憶に関与すると考えられている。以下では様々な学習・記憶場面において、NO の合成過程に影響する薬物が課題遂行に及ぼす効果について、あるいは課題の学習によって生じる NOS や NO 由来物質の量的変化について検討した研究を概観する。

2.1 放射状迷路学習

放射状迷路課題は通常、高架式 8 方向放射状迷路を用いて訓練される。この装置は中央のプラットフォームと、そこから放射状に延びる 8 本のアームからなる。この課題でラットは、各々のアームの先端にある報酬すべてを取るまで自由に走行することができるが、その際、装置周辺の空間情報を利用しながら、試行内ですでに進入したアーム（あるいはまだ進入していないアーム）を記憶することが要求される。そのため、空間的作業記憶課題の 1 つであると考えられている。

NOS の非特異的阻害薬 N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) をこの課題の習得期間中に末梢投与すると、この課題の習得が阻害された。しかし、すでに習得した課題の保持については、L-NAME の阻害効果は見られなかった (Yamada, Noda, Nakayama, Komori, Sugihara, Hasegawa & Nabeshima, 1995; Noda, Yamada & Nabeshima, 1997)。これは NO が放射状迷路課題の習得に何らかの関与をすることを示唆している。また、この課題は 8 本のアームのうち、特定の 4 本にだけ報酬を置くことで、作業記憶と参照記憶を分離して測定することが出来る。この手続きを用い、L-NAME を習得期間中に末梢投与すると、参照記憶および作業記憶が阻害されたが、nNOS 特異的阻害薬 7-nitroindazole (7-NI) の投与によっては参照記憶のみが阻害された。また、NO の前駆体である L-Arginine (L-Arg) を腹腔内投与すると参照記憶エラーが減少した (Zou, Yamada, Tanaka, Kameyama & Nabeshima, 1998)。

非特異的阻害薬は血圧にも影響を及ぼし、脳の血流量の低下を招く (Bannerman et al., 1994b)。従って、末梢投与による非特異的 NOS 阻害薬の学習阻害効果は、nNOS 由来以外の NO に対する作用によるものかも知れない。nNOS 特異的阻害薬の末梢投与では参照記憶のみが阻害され、作業記憶は阻害されなかったことから (Zou et al., 1998)、非特

異的 NOS 阻害によって引き起こされる作業記憶の障害は、おそらく eNOS 阻害に基づく血管系の変化によるものであり、さらに nNOS 由来の NO は参照記憶に関与する可能性が考えられる。

2.2 モリス型水迷路学習

モリス型水迷路は、円形プールにミルクや絵の具などによって濁らせた水を張り、水面下の一定の位置に逃避用のプラットフォームを沈めた装置である。この課題では、ラットやマウスは水中にあるプラットフォームを見ることができないので、装置周辺の空間の手がかりをもとにプラットフォームの位置を学習することが要求される。

習得期間中に NOS の非特異的阻害薬 L-NAME あるいは nNOS 特異的阻害薬 7-NI を末梢投与すると、モリス型水迷路課題の習得が遅れる (Chapman, Atkins, Allen, Haley & Steinmetz, 1992; Bannerman, Chapman, Kelly, Batsher & Morris, 1994a; Hölscher, McGlinchey, Anwyl & Rowan, 1996; Prendergast, Buccafusco & Terry, 1997)。しかし、すでに習得した課題の遂行には末梢投与、海馬内投与とも影響を及ぼさなかった (Bannerman et al., 1994a; Blokland, de Vente, Prickaerts, Honing, Markenrink-van Ittersum & Steinbusch, 1999)。また、この課題を高齢ラットに訓練したところ、習得に障害を示した高齢ラットでは、課題習得に障害のなかった高齢ラットや若齢の成体ラットと比較して、海馬 nNOS 発現が少なく、iNOS 発現が多かったという報告がある (Law, O'Donnell, Gauthier & Quirion, 2002)。これらのことから、海馬 nNOS はこの課題の習得に促進的に働くと考えられるが、すでに学習した空間的位置の想起には NO は関与しないと考えられる。

2.3 3 パネルランウェイ課題

3 パネルランウェイ課題で用いられる装置は、出発箱と目標箱、およびそれを結ぶ通路からなり、4 つの選択点が設けられている。それぞれの選択点には 3 枚のパネルがついており、実験者はこのうち 1 枚のみ、ラットが押し開いて通過できるように設定する。ラットは出発箱に入れられた後、通過できるパネルを探し、報酬の置かれた目標箱にたどり着くことを要求される。1 セッションは 6 試行よりなり、1 日 1 セッション行なう。全てのセッションで正答パネルの位置 (左, 中, 右) が固定されている課題が参照記憶課題であり、セッションごとに正答パネルの位置が変化する課題が作業記憶課題である。作業記憶課題では、セッション毎に通過可能な

パネルが変わるので、セッション内の6試行のなかで、新しく定められた正答パネルの位置を記憶しなければならない。

習得後に非特異的 NOS 阻害薬 L-NAME を海馬内投与すると、作業記憶課題では成績の有意な低下が見られたが、参照記憶課題では成績は低下しなかった (Ohno, Yamamoto & Watanabe, 1993)。従って、セッション間に渡って有効な記憶、すなわち参照記憶に NO は関与していないが、セッション内でのみ有効な記憶、すなわち作業記憶の形成や保持には NO が関与していると考えられる。

この考え方は、NO が参照記憶に関与しているのではないかという放射状迷路課題での結論 (前述) と対照的である。その食い違いの原因は明らかでないが、Zou et al. (1998) は参照記憶形成に対する NOS 阻害薬の効果は、海馬以外の他の脳部位 (例えば大脳皮質) を含んでいるため、NOS 阻害薬の海馬内投与を行った Ohno et al. (1993) の研究では参照記憶障害が見られなかったのではないかと考えている。

2.4 受動的回避学習

ステップスルー式の受動的回避学習は、床や壁の素材、明るさなどによって識別可能な2つの区画からなる装置を用いて行う。頻繁に用いられる手続きとしては、ラットなどのげっ歯目が暗いところをより好むことを利用し、照明の点いた区画と暗い区画 (電撃箱) を用意する。明るい区画に被験体を入れると、やがて被験体は暗い方の電撃箱に入る。被験体が完全にこの箱に入った時点で、そこに閉じこめ、足への電撃を与える。この訓練を行った後に一定の時間をおき、再び被験体を装置に入れた際の、暗い区画に侵入するまでの潜時が記憶の指標として用いられる。また、ステップダウン式の受動的回避学習課題では、ステンレス製の格子の床に置かれたプラットフォームに被験体を置き、被験体が床に降りると電流を流す。この手続きでは、訓練後一定の時間を挟んで再び装置に被験体を投入した際の、被験体が床に降りるまでの潜時が記憶の指標として用いられる。

これらの課題を用いた研究において、NOS 阻害薬の N-nitroarginine (NO-Arg)、L-NAME、L-N^G-monomethylarginine (L-MeArg) を訓練前あるいは直後に末梢・海馬内投与すると、テスト時の反応潜時が減少した (Fin, da Cunha, Bromberg, Schmitz, Bianchin, Medina & Izquierdo, 1995; Huang & Lee, 1995; Reddy & Kulkarni, 1998)。一方、NO 供与体である sodium nitroprusside (SNP)、S-nitroso-

N-acetylpencillamine (SNAP)、L-Arg を訓練直後に末梢・脳室内・海馬内投与すると、いずれも潜時が増加した (Fin et al., 1995; Huang & Lee, 1995; Telegdy & Kokavszky, 1997)。従って、NO はこの課題の保持過程に促進的な役割を担っており、さらには記銘過程にも関与する可能性があると考えられる。

2.5 物体再認記憶

物体再認課題の一つとして、フィールド内に置かれた物体を自由に探索させる手続きがある。この手続きでは、第1試行でフィールド内に置かれた物体を探索させた後、一定の時間をおき、再びフィールドに被験体を入れる (第2試行)。第2試行では、フィールド内の物体は、最初の試行で提示した物体と同一のものと、新奇な物体の両方が提示されており、それぞれの物体を探索した時間が測定される。ラットは新奇な物体をより長く探索する傾向があることから、新奇な物体を探索した時間の長さが記憶の指標となる。

この課題を用いた研究では NOS 阻害薬 N^G-nitro-L-arginine (L-NA)、および nNOS 特異的阻害薬 7-NI を第1試行の直後に末梢・海馬内投与すると、第2試行で初めて提示された新奇な物体に対する探索時間が少なくなった (Prickaerts, Steinbusch, Smits & de Vente, 1997; Blokland, Prickaerts, Honig & de Vente, 1998)。しかし、第1試行の前に L-NA を海馬内投与すると、新奇な物体の探索時間は統制条件と差がなかった (Blokland et al., 1998)。従って、NOS 阻害はこの課題における情報の保持を阻害するが、記銘過程は阻害しない可能性が考えられる。

2.6 14ユニットT迷路学習

14ユニットT迷路は、ギロチンドアで仕切られた5つの区分からなり、合計14の選択地点が設けられている。被験体は出発箱に置かれ、制限時間内に正しい方向に進まないと足に電撃が与えられる。電撃は被験体が正しい方向に向かうまで与えられ、最終的に被験体は目標箱へたどり着く。走行時間と誤選択数 (正しい方向から逸脱した数) が測定される。

この課題を用いた研究において、習得期間中の NOS 阻害薬 N^G-nitro-L-arginine (N-Arg)、7-NI の末梢・脳室内投与は、用量依存的に課題習得を阻害した (Ingram, Spangler, Meyer & London, 1998; Ingram, Spangler, Kametani, Meyer & London, 1998; Meyer, Spangler, Patel, London & Ingram, 1998)。7-NI は eNOS 阻害によって生じる血圧の上

昇を引き起こさなかったことから、上記の学習阻害効果はnNOSを介したものであると考えられる(Meyer et al., 1998). 従って、nNOS阻害はこの課題の参照記憶形成を抑制したと考えられる。

2.7 遅延見本合わせ学習

Prendergast, Terry, Jackson & Buccafusco (1996) はサルが遅延見本合わせ学習に及ぼすNOS阻害薬の効果を検討した。この課題では、パネルに4色のディスクが配置されている。見本期では4つのうち1つのディスクが光り、被験体はそのディスクのキーを押すと消える。一定の遅延時間後に、見本期に提示したキーを別のもう1つのキーと同時に提示し、見本期に提示したキーをサルが選択すると報酬が与えられた。

この課題の習得の後、テスト前にNOS阻害薬L-NAMEを末梢投与すると、遅延なしの試行では薬物の効果は見られなかったが、60～120秒の遅延では正反応率の低下が見られた(Prendergast et al., 1996)。従って、この課題で要求される短期記憶に、NOが関与していることが示唆される。

2.8 弁別学習

Knepper & Kurylo (1998) はラットを用いて、ライトの点灯の有無の弁別(手がかり学習)と左右の弁別(空間学習)に及ぼすNOS阻害薬(L-NAME)末梢投与の効果調べた。いずれの課題の習得に対してもNOS阻害は影響を及ぼさなかったことから、NOSの阻害は単純な空間的または視覚的分析を含む課題の習得または保持には、何ら影響を及ぼさないと考えられる。

2.9 空間交替反応学習

Chen, Zhang, Zuo & Tang (1997), およびZhang, Chen & Wang (1998) は、Y迷路を用いた空間交替反応学習に伴う脳内NOの変化を検討した。被験体は見本期に一方のアームを提示され、報酬(水)を得た。遅延時間後に被験体にアームの選択を行わせ、見本期に提示したアームと反対のアームを被験体が選択した場合のみ、報酬を与えた。この訓練を一定期間行った後に、被験体の脳を取り出して調べると、NOS活性の上昇およびNOの酸化物質であるnitrite量の増加がみられ(Chen et al., 1997), またNO産生ニューロンの発現が上昇した(Zhang et al., 1998)。それらの現象は訓練の中期よりも後期の方がより明確に見られた。従って、この課題の訓練によって、NO産生が増加したと推測される。このように、学習の進行に伴ってNOS活性やNO由来

物質の量が変化したことから、NOは学習の習得過程に深く関与している可能性があると考えられる。

以上に述べたように、学習・記憶におけるNOのはたらきを検討した過去の知見をまとめると、NOは嫌悪性刺激によって動機づけられた学習課題の習得、および空間的学習課題の習得に関与することが示唆される。また、作業記憶へのNOの関与についてはこれまでの研究の結果は一致しておらず、さらなる検討が必要と思われる。

3. ラットの放射状迷路行動に及ぼすNOS阻害薬L-NAMEの効果

3.1 目的

前節で述べたように、脳内のNOは様々な学習・記憶に関与していると考えられる。このうち作業記憶についてみると、過去の研究では、放射状迷路課題をすでに習得したラットにNOS阻害薬L-NAMEを末梢投与しても、その成績が阻害されなかった(Yamada et al., 1995)。しかし、3パネルランウェイを用いた研究では、すでに課題を習得したラットの背側海馬にL-NAMEを投与すると、作業記憶課題でのみ成績の低下が報告された(Ohno et al., 1993)。従って、作業記憶には海馬のNO合成が必要である可能性があるが、薬物の末梢投与によって海馬のNO合成が十分に阻害されず、それゆえYamada et al. (1995)の実験では学習成績への影響が出現しなかったのかもしれない。そこで本実験では、あらかじめラットが学習した放射状迷路課題遂行に対する、非特異的NOS阻害薬L-NAMEの末梢および海馬内投与の効果を検討した。また、ラットの海馬におけるNOSの分布は、背側よりもむしろ腹側海馬において、より多く見られるので(Jinno & Kosaka, 2002)、本研究では背側のみでなく、腹側海馬への薬物局所投与の効果も検討した。

3.2 全般的な方法

被験体 8～16週齢のWistar-Imamichi系雄ラットを用いた。実験開始時の体重は平均310g(SD=55g)であった。実験期間中は食餌制限を行い、餌自由摂取時の80～90%の体重を維持した。水は自由摂取とした。12:12時間の明暗サイクル(明期:8時～20時)で飼育し、飼育室は24℃前後に維持されていた。

薬物 薬物は非特異的NOS阻害薬N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)を生理食塩水(SAL)に溶解したものを用いた。

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。迷路は床から50cmの高さの中央プラットフォーム（直径33.5cm）と、そこから放射状に出た8本のアーム（60cm×12cm）から構成されており、アームの先端には報酬の餌ペレットを置くための円形の穴（直径3cm、深さ1cm）が空けられていた。中央プラットフォームと各アームの間は、高さ20cmの透明アクリル板製のギロチンドアで仕切られており、実験者によって個別に開閉することが出来た。アームの側壁の高さは3.5cmで、ギロチンドアから12cmまでの部分のみ高さ11.5cmであった。実験室内にはドア、カーテン、机や色画用紙など、迷路外手がかりとなるような視覚刺激が配置され、これらは実験期間中を通して同じ位置に保たれた。

放射状迷路課題習得訓練 訓練に先立ち、食餌制限、ハンドリングと装置馴化を行った。ハンドリングは各被験体5分ずつで3日間行い、引き続き3日間の装置馴化を行った。全てのギロチンドアを上げた状態で、1日目と2日目は5匹の被験体を同時に装置内に投入し30分間放置し、3日目は各被験体ごとに15分間行った。それ以降の訓練で報酬として用いる餌ペレットを、1匹あたりおよそ20個、中央プラットフォームおよびアームの中央寄り部分に置き、自由に摂取させた。

習得訓練では、報酬として45mgの餌ペレットを8本のアームの報酬受け皿に1つずつ置いた。ラットを中央のプラットフォームに入れ、すべてのギロチンドア（以下ドア）を上げて試行を開始した。ラットの四肢が完全にいずれかのアームに入った時点で1選択と見なし、ドアを下ろした。その後、ラットが進入したアームのドアのみを上げ、ラットが中央プラットフォームに戻るとドアを下ろした。この状態で、5秒間中央プラットフォームに閉じこめた後、再びすべてのドアを上げ、次の選択を行わせた。ラットがその試行でまだ進入していないアームに入り報酬を取ることを正選択とし、それ以外を誤選択とした。1試行は8つのアームすべての報酬を取り終える、16選択を行う、10分が経過するのいずれかまでとし、1日1試行を行った。各試行の最初の8選択中、7以上が正選択である試行が5回連続することを、この課題の習得基準とした。

3.3 実験1：L-NAME 腹腔内投与の効果

あらかじめ放射状迷路課題を習得したラットにL-NAMEの腹腔内投与を行い、課題遂行に及ぼす効果を検討した。

3.3.1 手続き

放射状迷路課題の習得基準に達したラットから順

に、薬物テストを行った。各試行の30分あるいは60分前に薬物の腹腔内投与を行った。薬物条件は溶媒（SAL）およびL-NAME 5, 10, 30, 90mg/kgの5条件であった。被験体はすべての薬物条件と投与時間の組み合わせ、計10条件をランダムな順番で受けた。薬物テスト間には、薬物無投与下の試行を行い、最初の8選択中7以上が正選択である試行が2回連続することを、次の薬物投与を行う際の基準として設けた。

3.3.2 結果と考察

薬物テストでの最初の8選択中の正選択数をFig. 1Aに示す。いずれの薬物投与タイミング（30分または60分前）でも、溶媒投与とその他のL-NAME投与との間にほとんど差が見られなかった。2要因分散分析（ANOVA）の結果、投与タイミングおよび薬物条件の効果はいずれも有意でなかった。また、1試行あたりの誤選択数についてFig. 1Bに示す。溶媒60分前投与で誤選択数が増加していたが、2要因ANOVAの結果、投与タイミングおよび薬物条件の効果はいずれも有意でなかった。さらに、1選択あたりの所要時間（Fig. 1C）についても各条件での差はほとんど見られず、2要因ANOVAの結果、投与タイミングおよび薬物条件の効果はいずれも有意でなかった。

以上のように、NOS阻害薬の腹腔内投与は、あらかじめラットが習得した放射状迷路課題の遂行に対し、有意な影響を及ぼさなかった。薬物の投与タイミングについては2つの条件を設け、このうち60分前というのは、放射状迷路課題の習得を阻害したもの（Yamada et al., 1995; Zou et al., 1998）と同じ条件であったが、いずれの条件でも選択反応や走行時間に対する影響は認められなかった。この結果は、Yamada et al. (1995)の報告とも一致しており、すでに習得した放射状迷路課題の遂行には、NOは必ずしも重要な役割を果たしていないことが示唆される。しかし、腹腔内投与では、放射状迷路課題遂行に重要な役割を担っていると考えられる、海馬のNOSを十分に阻害しなかった可能性があるため、実験2および3では海馬内に薬物を局所投与し、その効果を検討した。

3.4 実験2：L-NAME 背側海馬内投与の効果

放射状迷路課題を習得したラットの背側海馬へL-NAMEを局所投与し、課題遂行に及ぼす効果を検討した。

3.4.1 手続き

放射状迷路課題の習得基準に達した被験体から順に、背側海馬へ局所投与用のガイドカニューレ埋め

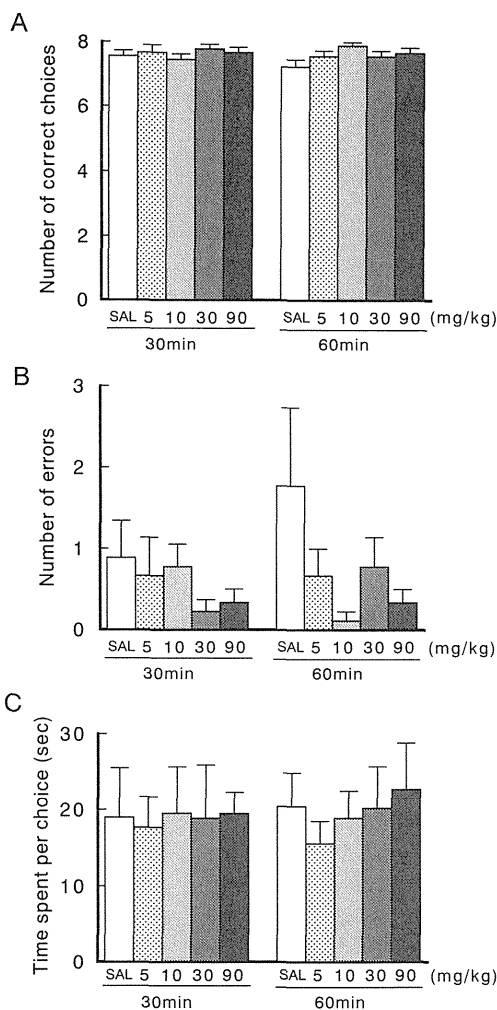


Fig. 1 Performance of radial maze task under i. p. treatment of L-NAME 30 or 60min before testing (Exp. 1). A: Mean number of correct choices (\pm S. E. M.) in the first 8 choices. B: Mean number of errors (\pm S. E. M.). C: Mean time spent per choice (\pm S. E. M.). SAL: saline.

込み手術を行った。被験体を硫酸アトロピン (0.05mg, i.p.) で前処置した後、ペントバルビタール (35mg/kg, i.p.) およびケタラル (10mg, i.m.) で麻酔し、脳定位固定装置に固定した。Paxinos & Watson (1998) の脳地図に従い、AP: -3.8 mm (プレグマより), ML: ± 2.7 mm, DV: -4.0 mm (骨表面より) にインジェクションカニューレの先端がくるようにガイドカニューレを刺入し、頭蓋に埋め込んだ補強用ネジとともに歯科用セメントで固

定した。

術後1週間の回復期間をおき、放射状迷路課題の再習得訓練を行った。習得基準に達したラットから順に、薬物テストを行った。薬物条件はSAL, L-NAME 20, 40, 80 μ g/side であり、被験体は全ての薬物条件をランダムな順で受けた。ガイドカニューレにインジェクションカニューレを通し、マイクロシリンジポンプ (エイコム, ESP-32) を使い、試行開始の10分前に流速0.5 μ l/min で1.0 μ l を両側海馬へ局所投与した。薬物の拡散を促すため、インジェクションカニューレを挿入したまま1分間放置し、抜き去った。薬物テストの次の日から薬物無投与下で試行を行い、最初の8選択中7以上が正選択である試行が2連続することを、次の薬物テストを行う際の基準とした。

行動実験終了後、被験体をペントバルビタール (45mg/kg, i.p.) で深麻酔し、0.9%塩化ナトリウム含有の0.02M リン酸緩衝液180ml で前灌流した後、10%フォルマリン300ml で灌流固定し、脳を取り出した。同固定液中でさらに数日間浸漬した後、20%シュクロース溶液に約24時間浸し、クリオスタットで40 μ m の前額断切片を作成した。クレシルバイオレットによるニッスル染色を行い、光学顕微鏡にてインジェクションカニューレの刺入部位を確認した。

3.4.2 結果と考察

組織学的検索の結果、インジェクションカニューレの刺入部位は Fig. 2A に示す通りであった。すべてのラットでその先端は背側海馬内に位置していることが確認された。

薬物テストでの最初の8選択中の正選択数を Fig. 3A に、また誤選択数を Fig. 3B に示す。L-NAME 20および40 μ g 投与で平均誤選択数の増加が見られた。しかし、1要因ANOVAを行ったところ、いずれの測度についても薬物用量による有意な差は認められなかった。さらに Fig. 3C には1選択あたりの走行時間を示すが、これについても薬物条件間での有意な差は認められなかった。

以上のように、いずれの測度についても L-NAME の背側海馬内投与は、放射状迷路課題遂行に影響を及ぼさなかった。今回の実験で用いた L-NAME の用量は、3パネルランウェイ課題 (Ohno et al., 1993) において遂行成績を低下させた海馬内投与の用量を上回っており、背側海馬における NOS 阻害の程度が不十分であったために、遂行成績が低下しなかったとは考えにくい。実験3では、NOS がより多く分布している腹側海馬に L-NAME を投与し、その効果を検討した。

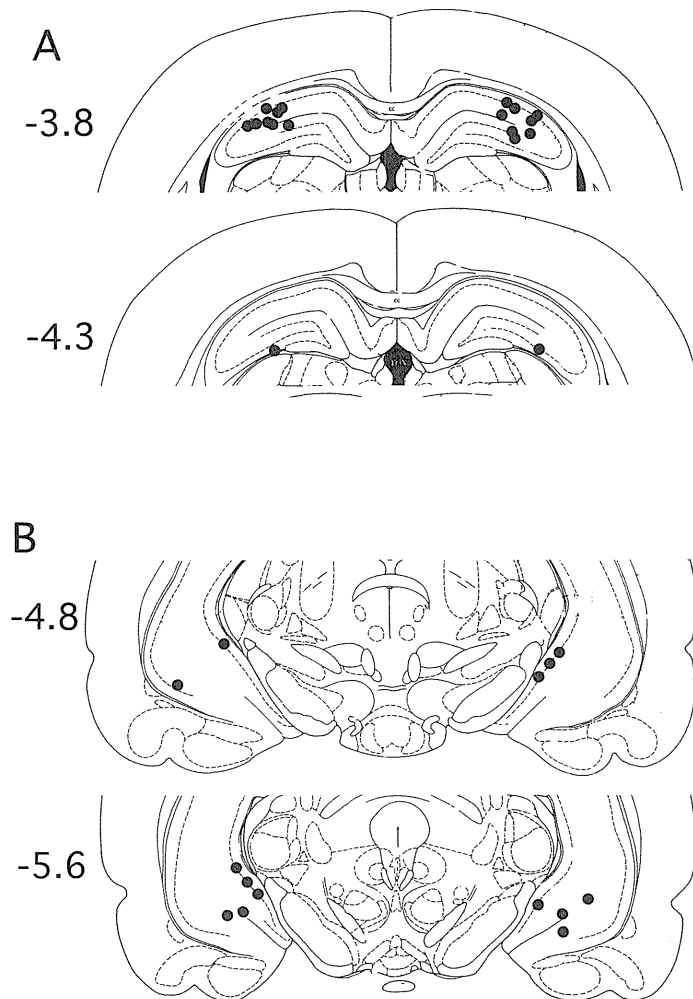


Fig. 2 Frontal sections showing the locations of tips of injection cannulae at the dorsal (A) and ventral hippocampus (B). The numbers beside each section show the anteroposterior distance (mm) from bregma.

3.5 実験3：L-NAME 腹側海馬内投与の効果

放射状迷路課題を習得したラットの腹側海馬へL-NAMEを局所投与し、課題遂行に及ぼす効果を検討した。

3.5.1 手続き

習得基準に達した被験体から順に、腹側海馬へ局所投与用のガイドカニューレ埋め込み手術を行った。実験2と同様の手続きで、Paxinos & Watson (1998)の脳地図に従い、AP: -5.5mm (ブレグマより), ML: $\pm 4.5\text{mm}$, DV: -8.4mm (骨表面より)にインジェクションカニューレの先端がくるよ

うにガイドカニューレを刺入し、固定した。

術後1週間の回復期間をおき、実験2と同様の手続きを用いて薬物テストと組織学的検索を行った。

3.5.2 結果と考察

組織学的検索の結果をFig. 2Bに示す。インジェクションカニューレの刺入部位は、すべてのラットで腹側海馬内に位置していた。

薬物テストでの最初の8選択中の正選択数をFig. 4Aに、誤選択数をFig. 4Bに示す。正選択数は各用量でほとんど変わらず、またL-NAME 20および $80\mu\text{g}$ 投与で誤選択数の増加が見られたが、薬物条件を要因とする1要因ANOVAの結果、いずれの測度でも有意な差は認められなかった。さらに、1

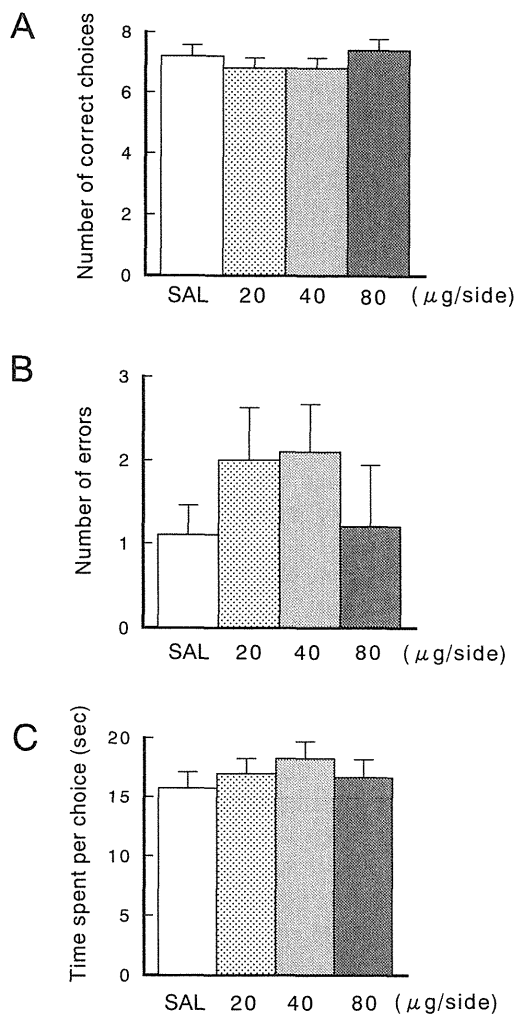


Fig. 3 Performance of radial maze test under microinjection of L-NAME into the dorsal hippocampus (Exp. 2). A: Mean number of correct choices (\pm S.E.M.) in the first 8 choices. B: Mean number of errors (\pm S.E.M.). C: Mean time spent per choice (\pm S.E.M.). SAL: saline.

選択あたりの走行時間 (Fig. 4C) については、L-NAME 投与条件で走行時間がやや増加したが、1 要因 ANOVA の結果、薬物条件間での有意な差は認められなかった。

L-NAME の腹側海馬内投与は、あらかじめラットが習得した放射状迷路課題遂行に有意な影響を及ぼさなかった。NOS は腹側海馬により多く分布していると報告されているが (Jinno & Kosaka, 2002), この部位の NOS を両側性に阻害しても、放

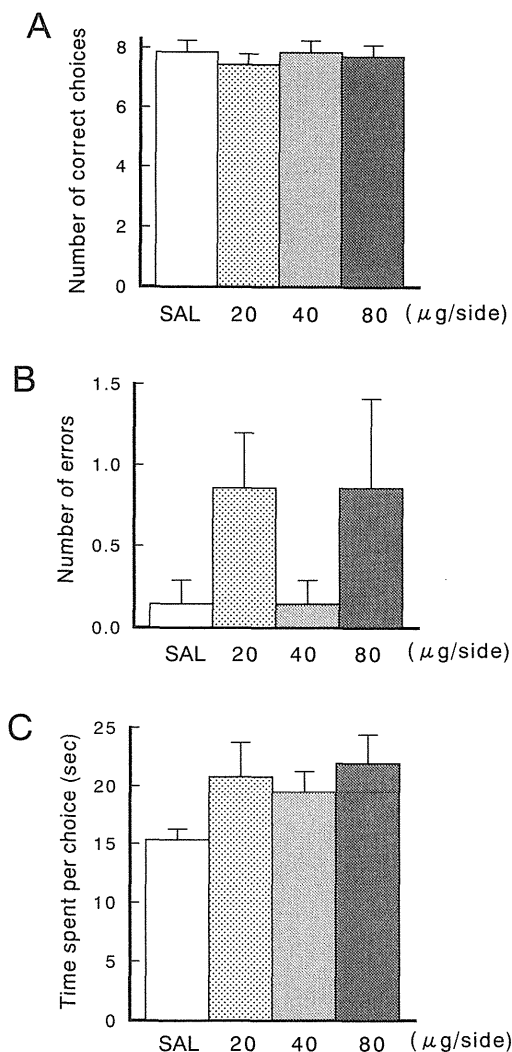


Fig. 4 Performance of radial maze task under microinjection of L-NAME into the ventral hippocampus (Exp. 3). A: Mean number of correct choices (\pm S.E.M.) in the first 8 choices. B: Mean number of errors (\pm S.E.M.). C: Mean time spent per choice (\pm S.E.M.). SAL: saline.

射状迷路課題遂行は阻害されなかった。従って、腹側海馬での NO は、すでに習得した放射状迷路課題の遂行には重要な役割を担っていないことが示唆された。T 迷路を用いた遅延交替反応学習は、ラットが直前の試行での自らの反応を一時的に記憶し、その情報を利用しなければならないので、作業記憶課題の一つといえるが、この課題の遂行に腹側海馬のイボテン酸損傷は効果がなかった (Hock &

Bunsey, 1998). 従って, 腹側海馬は作業記憶課題の遂行には関与していないことが考えられ, 実験3の結果は, 放射状迷路課題の作業記憶にも腹側海馬が関与しないことによるのかも知れない.

3.6 総合考察

実験1~3において, あらかじめラットが習得した放射状迷路課題の遂行に対する L-NAME の末梢および海馬内投与の効果を検討した. その結果, 末梢投与および背側・腹側海馬内投与のいずれも, この課題の遂行成績に有意な影響を与えなかった. 本研究では, 末梢投与, 海馬内局所投与とも, 他の研究において学習・記憶阻害効果が見られた L-NAME の用量と同じあるいはそれ以上の用量を用いており, NOS の阻害が不十分であったために, 遂行阻害効果が現れなかったとは考えにくい. また, 海馬内において NOS は背側部と比較して腹側部により多く分布しているが (Jinno & Kosaka, 2002), 腹側海馬への L-NAME 投与によっても, 放射状迷路課題の遂行が阻害されなかった. 従って本研究の結果から, すでに習得した放射状迷路課題の遂行に, 脳内 NO の合成が必ずしも必要ではないことが示唆された. 放射状迷路課題を用いて, NOS 阻害薬の効果をみたこれまでの研究ではすべて, 課題の習得に対して阻害効果が認められており (Yamada et al., 1995; Noda et al., 1997; Zou et al., 1998), 習得後の遂行に対しては有意な影響を示していないことは, この考え方と一致するものである.

作業記憶課題の一つと考えられる3パネルランウェイ課題の遂行に対して, L-NAME の背側海馬内投与は成績の低下をもたらした (Ohno et al., 1993). 一方, 本研究では放射状迷路課題の遂行に対して, L-NAME の末梢投与, 海馬内投与はいずれも遂行阻害効果を持たなかった. 本研究で用いた放射状迷路課題は, 習得に平均12.8試行を要したのに対し, 3パネルランウェイ課題では20-30セッション (120-180試行) を要している. この点で, 同じ作業記憶課題ではあっても, 放射状迷路課題は3パネルランウェイ課題より難度が低く, L-NAME の学習阻害効果を十分に検出することが出来なかった可能性も残される.

また, 3パネルランウェイ課題は廊下式の直線走路であり, ラットが遂行において空間的な情報にほとんど依存しないのに対し, 放射状迷路課題は装置周辺の空間的情報を用いて遂行される. 空間的情報の処理が要求される他の課題として, モリス水迷路課題があげられるが, この課題では, 習得期間中の

NOS 阻害薬投与は学習を遅らせるが, 習得後の投与は課題遂行に影響を及ぼさなかった (Chapman et al., 1992; Bannerman, et al., 1994a; Hölscher et al., 1995; Prendergast et al., 1997; Blokland et al., 1999). 従って, NO は空間情報に依存する課題の習得後の遂行では要求されないような, 何らかの要因に関与している可能性が考えられる. NO が学習・記憶のどのような側面に関与しているのかについて, 今後のさらなる検討が必要である.

引用文献

- Arancio, O., Kandel, E.R. & Hawkins, R.D. 1995 Activity-dependent long-term enhancement of transmitter release by presynaptic 3', 5'-cGMP in cultured hippocampal neurons. *Nature*, 376, 74-80.
- Arancio, O., Keibler, M., Lee, C.J., Lev-Ram, V., Tsien, R.Y., Kandel, E.R. & Hawkins, R.D. 1996 Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*, 87, 1025-1035.
- Bannerman, D.M., Chapman, P.F., Kelly, P.A.T., Butcher, S.P. & Morris R.G. 1994a Inhibition of nitric oxide synthase does not impair spatial learning. *Journal of Neuroscience*, 14, 7404-7414.
- Bannerman, D.M., Chapman, P.F., Kelly, P.A.T., Butcher, S.P. & Morris R.G. 1994b Inhibition of nitric oxide synthase does not prevent the induction of long-term potentiation in vivo. *Journal of Neuroscience*, 14, 7415-7425.
- Blokland, A., Prickaerts, J., Honig, W. & de Vente J. 1998 State-dependent impairment in object recognition after hippocampal NOS inhibition. *NeuroReport*, 9, 4205-4208.
- Blokland, A., de Vente, J., Prickaerts, J., Honig, W., Markenink-van Ittersum, M. & Steinbusch, H. 1999 Local inhibition of hippocampal nitric oxide synthase does not impair place learning in the Morris water escape task in rats. *European Journal of Neuroscience*, 11, 223-232.
- Bon, C., Böhme, G.A., Doble, A., Stutzman, J.M. & Blanchard, J.C. 1992 A role of nitric oxide in long-term potentiation. *European Journal of Neuroscience*, 4, 420-424.
- Boulton, C.L., Iring, A.J., Southam, E., Potier, B., Garthwaite, J. & Collingridge, G.L. 1994 The

- nitric oxide-cyclic GMP pathway and synaptic depression in rat hippocampal slices. *European Journal of Neuroscience*, 6, 1528-1535.
- Böhme, G.A., Bon, C., Stutzmann, J.M., Doble, A. & Blanchard, J.C. 1991 Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *European Journal of Pharmacology*, 199, 379-381.
- Chapman, P.F., Atkins, C.M., Allen, M.T., Haley, J.E. & Steinmetz, J.E. 1992 Inhibition of nitric oxide synthesis impairs two different forms of learning. *NeuroReport*, 3, 567-570.
- Chen, J., Zhang, S., Zuo, P. & Tang, L. 1997 Memory-related changes of nitric oxide synthase activity and nitrite level in rat brain. *NeuroReport*, 8, 1771-1774.
- Chetkovich, D.M., Klann, E. & Sweatt, J.D. 1993 Nitric oxide synthase-independent long-term potentiation in area CA1 of hippocampus. *NeuroReport*, 4, 919-922.
- Cummings, J.A., Nicola, S.M. & Malenka, R.C. 1994 Induction in the rat hippocampus of long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD) in the presence of a nitric oxide synthase inhibitor. *Neuroscience Letters*, 176, 110-114.
- Doyle, C., Hölscher, C., Rowan, M.J. & Anwyl, R. 1996 The selective neuronal NO synthase inhibitor 7-nitroindazole blocks both long-term potentiation and depotentiation of field EPSPs in rat hippocampal CA 1 in vivo. *Journal of Neuroscience*, 16, 418-424.
- Fin, C., da Cunha, C., Bromberg, E., Schmitz, P.K., Bianchin, M., Medina, J.H. & Izquierdo, I. 1995 Experiments suggesting a role of nitric oxide in the hippocampus in memory processes. *Neurobiology of Learning and Memory*, 63, 113-115.
- Gribkoff, V.K. & Lum-Ragan, J.T. 1992 Evidence for nitric oxide synthase inhibitor-sensitive and insensitive hippocampal synaptic potentiation. *Journal of Neurophysiology*, 68, 639-642.
- Haley, J.E., Malen, P.L. & Chapman, P.F. 1993 Nitric oxide synthase inhibitors block long-term potentiation induced by weak but not strong tetanic stimulation at physiological brain temperatures in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letters*, 160, 85-88.
- Hock, B.J. & Bunsey, M.D. 1998 Differential effects of dorsal and ventral hippocampal lesions. *Journal of Neuroscience*, 18, 7027-7032.
- Huang, A. & Lee, E.H.Y. 1995 Role of hippocampal nitric oxide in memory retention in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 50, 327-332.
- Hölscher, C. 1999 Nitric oxide is required for expression of LTP that is induced by stimulation phase-locked with theta rhythm. *European Journal of Neuroscience*, 11, 335-343.
- Hölscher, C., McGlinchey, L., Anwyl, R. & Rowan, M. 1996 7-Nitro indazole, a selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor in vivo, impairs spatial learning in the rat. *Learning and Memory*, 2, 267-278.
- Iga, Y., Yoshioka, M., Togashi, H. & Saito, H. 1993 Inhibitory action of N omega-nitro-L-arginine methyl ester on in vivo long-term potentiation in the rat dentate gyrus. *European Journal of Pharmacology*, 238, 395-398.
- Ingram, D.K., Spangler, E.L., Kametani, H., Meyer, R.C. & London, E.D. 1998 Intracerebroventricular injection of N^ω-nitro-L-arginine in rats impairs learning in a 14-unit T-maze. *European Journal of Pharmacology*, 341, 11-16.
- Ingram, D.K., Spangler, E.L., Meyer, R.C. & London, E.D. 1998 Learning in a 14-unit T-maze is impaired in rats following systemic treatment with N^ω-nitro-L-arginine. *European Journal of Pharmacology*, 341, 1-9.
- Jinno, S. & Kosaka, T. 2002 Patterns of expression of calcium binding proteins and neuronal nitric oxide synthase in different populations of hippocampal GABAergic neurons in mice. *Journal of Comparative Neurology*, 449, 1-25.
- Knepper, B.R. & Kurylo, D.D. 1998 Effects of nitric oxide synthase inhibitor N^ω-nitro-L-arginine methyl ester on spatial and cued learning. *Neuroscience*, 83, 837-841.
- Law, A., O'Donnell, J., Gauthier, S. & Quirion, R. 2002 Neuronal and inducible nitric oxide synthase expressions and activities in the hippocampi and cortices of young adult, aged cognitively unimpaired, and impaired Long-Evans rats. *Neuroscience*, 112, 267-275.
- Manzoni, O., Prezeau, L., Martin, P., Deshager, S., Bochaert, J. & Fagni, L. 1992 Nitric oxide-induced blockade of NMDA receptors. *Neuron*,

- 8, 653-662.
- Meyer, R.C., Spangler, E.L., Patel, N., London, E.D. & Ingram, D.K. 1998 Impaired learning in rats in a 14-unit T-maze by 7-nitroindazole, a neuronal nitric oxide synthase inhibitor, is attenuated by the nitric oxide donor, molsindomine. *European Journal of Pharmacology*, **341**, 17-22.
- Murphy, K.P., Williams, J.H., Bettache, N. & Bliss, T.V. 1994 Photolytic release of nitric oxide modulates NMDA receptor-mediated transmission but does not induce long-term potentiation at hippocampal synapses. *Neuropharmacology*, **33**, 1375-1385.
- Noda, Y., Yamada, K. & Nabeshima, T. 1997 Role of nitric oxide in the effect of aging on spatial memory in rats. *Behavioural Brain Research*, **83**, 153-158.
- Ohno, M., Yamamoto, T., Watanabe, S. 1993 Deficits in working memory following inhibition of hippocampal nitric oxide synthase in the rat. *Brain Research*, **632**, 36-40.
- O'Dell, T.J., Hawkins, R.D., Kandel, E.R. & Arancio, O. 1991 Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, **88**, 11285-11289.
- Paxinos, G. & Watson, C. 1998 *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edition. San Diego: Academic Press.
- Prast, H. & Philippu, A. 2001 Nitric oxide as modulator of neuronal function. *Progress in Neurobiology*, **64**, 51-68.
- Prendergast, M.A., Buccafusco, J.J. & Terry, A.V. 1997 Nitric oxide synthase inhibition impairs spatial navigation learning and induces conditioned taste aversion. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **57**, 347-352.
- Prendergast, M.A., Terry, A.V., Jackson, W.J. & Buccafusco, J.J. 1996 Nitric oxide synthase inhibition impairs delayed recall in mature monkeys. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, **56**, 81-87.
- Prickaerts, J., Steinbusch, H.W.M., Smits, J.F.M. & de Vente, J. 1997 Possible role of nitric oxide-cyclic GMP pathway in object recognition memory: Effects of 7-nitroindazole and zaprinast. *European Journal of Pharmacology*, **337**, 125-136.
- Reddy, D.S. & Kulkarni, S.K. 1998 Possible role of nitric oxide in the nootropic and anti-amnesic effects of neurosteroids on aging- and dizocilpine-induced learning impairment. *Brain Research*, **799**, 215-229.
- Schuman, E.M. & Madison, D.V. 1991 A requirement for the intracellular messenger nitric oxide in long-term potentiation. *Science*, **254**, 1503-1506.
- Son, H., Hawkins, R.D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P.L., Fishman, M.C. & Kandel, E.R. 1996 Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell*, **87**, 1015-1023.
- Telegdy, G. & Kokavszky, R. 1997 The role of nitric oxide in passive avoidance learning. *Neuropharmacology*, **36**, 1583-1587.
- Williams, J.H., Li, Y.G., Nayak, A., Errington, M.I., Murphy, K.P.S.J. & Bliss, T.V.P. 1993 The suppression of long-term potentiation in rat hippocampus is temperature and age dependent. *Neuron*, **11**, 877-884.
- Yamada, K., Noda, Y., Nakayama, S., Komori, Y., Sugihara, H., Hasegawa, T. & Nabeshima, T. 1995 Role of nitric oxide in learning and memory and in monoamine metabolism in the rat brain. *British Journal of Pharmacology*, **115**, 852-858.
- Zhang, S., Chen, J. & Wang, S. 1998 Spatial learning and memory induce up-regulation of nitric oxide-producing neurons in rat brain. *Brain Research*, **801**, 101-106.
- Zou, L.B., Yamada, K., Tanaka, T., Kameyama, T. & Nabeshima, T. 1998 Nitric oxide synthase inhibitors impair reference memory formation in a radial arm maze task in rats. *Neuropharmacology*, **37**, 323-330.

(受稿 9 月 30 日: 受理 11 月 13 日)