

ラットの味覚嫌悪学習の日内変動¹⁾

筑波大学心理学系 山田 一夫

Diurnal variation in taste aversion learning in rats

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

Diurnal variation in passive avoidance response in rats has a close relationship to diurnal variation in emotional or stress response to an aversive situation. In this study, the diurnal variations in saccharose preference and LiCl-induced conditioned taste aversion were investigated. In Wistar-Imamichi strain rats, the subjects were divided into 4 groups (Light-Light: LL, Light-Dark: LD, DD, DL) as a function of time of day when the conditioning and the extinction test were conducted. The preference to 10% saccharose solution before and after 0.15M LiCl-induced taste aversion conditioning were measured either in Light (14:00) or Dark (2:00) phase of the illumination cycle. The saccharose preference before the conditioning was significantly higher in Light phase than Dark phase, and the strength of the LiCl-induced taste aversion for LL group was greater than other groups. These results are identical to that obtained in passive avoidance response, and suggest that the underlying mechanisms of diurnal variation in taste aversion learning is the same as that underlying diurnal variation in passive avoidance response.

Key words : diurnal variation, taste aversion learning, saccharose preference, rats.

ヒトを含め、動物の行動は1日の時刻を関数として一定ではない。たとえば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。これは動物でも同様で、夜行性のラットだと、昼行性である我々人間が起きている昼間に眠り、逆に夜になると活動を始める。

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、さらにそれに伴って、薬物の効果や有害刺激に対する生理的反応も日内で変動する。体温や血中ホルモンレベル、神経伝達物質の脳内レベルは1日の時刻を関数に変動し、それに伴いそれらの機能を変化させる目的で用いられる薬物の効果も変動することが知られ、それは時

間薬理学という分野で精力的に研究されている。また、薬物と同様に、ストレス者となりうるような有害刺激に対する生理的反応(ストレス反応)もまた、時刻によって、言い換えればストレス者が与えられた時の生理的状态に伴って変動する。たとえば、血中ホルモンのベースレベルが低い時刻にストレス者に曝されたときのほうが、ホルモンレベルの高い時刻に曝された場合よりも、ストレス反応としての血中ホルモンの分泌反応は大きい (see review; 山田・岩崎1993a)。

これまでに我々は、ストレス者に対するホルモン分泌反応に日内変動が存在すること、さらにこれらストレス関連ホルモンがラットの学習・記憶課題の成績に影響を及ぼすという数多くの証拠に注目し、ラットの学習・記憶(受動的回避反応)の日内変動とストレス関連ホルモンの日内変動との関係を詳細に検討してきた。たとえば、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

1) 本研究の一部は、新エネルギー産業技術総合開発機構による提案公募型・最先端分野研究開発事業(F-0038, 代表岩崎庸男)の援助を受けた。

における回避潜時が長いという日内変動がみられる(山田・岩崎, 1994a)。さらに回避訓練と保持テスト直後に, 代表的なストレス関連ホルモンである血中コルチコステロン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コルチコステロンのベースレベルからの増加量が多い(山田・岩崎, 1992; 1994)。この受動的回避反応の日内変動と血中コルチコステロン放出反応の日内変動との関係は, 恒明条件下においても認められ(山田・岩崎, 1996), さらに血中コルチコステロン分泌反応の起始核である視床下部室旁核を破壊することにより血中コルチコステロン分泌反応を抑制すると, 受動的回避反応の日内変動は消失する(Yamada & Iwasaki, 1996)。そこで我々は, 受動的回避反応の日内変動の背景には, 血中コルチコステロン量の増加に代表される視床下部一下垂体-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ことを示唆した。

これまでの研究で用いられてきた受動的回避学習課題は, ラットの学習・記憶の研究, とりわけ学習・記憶に対するなんらかの薬物の効果を検討する際によく用いられる課題であり, 条件刺激として動物にとってストレスナーになりうる電撃が用いられる嫌悪性学習である。1回の回避訓練で学習が成立することから, 学習・記憶のリズムの研究にも適しており(Davies, Navaratnam & Redfern, 1993), 学習・記憶の日内変動とストレス反応の日内変動との関係を検討するのに有用な課題である。

さて, これらの条件を満たす別の学習課題として, 味覚嫌悪学習が考えられる。味覚嫌悪学習の一般的な手続きでは, ある特定の味覚の溶液を動物に提示し, その直後に塩化リチウムを単回投与することでその味覚に対して嫌悪性が条件づけられる。塩化リチウムは動物にとってストレスナーになりうるものであり, 塩化リチウムの投与によりラットの視床下部一下垂体-副腎皮質ストレス反応系が数時間賦活されることが知られている。

この味覚嫌悪学習における日内変動の研究も受動的回避反応と同様にいくつか報告されている。たとえば Infurna, Steinert, Freda & Spear (1979) は, 明期(14:00)に味覚嫌悪条件づけと消去テストを行ったほうが, 暗期(2:00)にそれらの手続きを行った場合よりも消去抵抗が大きい, すなわち学習成績が良いということを報告している。また同様の結果を Caza, Steinert & Spear (1980) も報告している。

さらにストレス関連ホルモンが受動的回避学習と同様に, 味覚嫌悪学習にも影響を及ぼすことが知られている。たとえば Rigter & Popping (1976) は, 視

床下部一下垂体-副腎皮質ストレス反応系のうちの下垂体から放出されるストレス関連ホルモンである副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone; ACTH)のアナログであるACTH₄₋₁₀を消去テストの1時間前に投与することで, グルコース溶液に対する味覚嫌悪の消去を遅らせることを報告している。また Hennessy, Smotherman & Levine (1976, 1980) は条件づけ時に人工的な glucocorticoid である dexamethasone を投与することによって味覚嫌悪の程度が弱まり, また ACTH を消去テスト前に投与することで味覚嫌悪の消去が遅れることを報告している。

これらのことから, 味覚嫌悪学習の日内変動もまた受動的回避学習と同様に, その背景にはストレス反応の日内変動が関与していると考えられる。しかしながら上述したような味覚嫌悪学習の日内変動の研究では, 味覚刺激(たとえばサッカロース溶液やグルコース溶液)に対する動物の選好性のベースレベルが時刻によって変動するのかがどうか検討されていない。消去テストでの明期と暗期の味覚刺激に対する選好性の違いは, 単に動物が生得的にもつ選好性の日内変動を反映しているのにすぎないのかもしれない。また嫌悪条件づけと消去テストは, 明期あるいは暗期のどちらか一方だけで行われており, 味覚嫌悪学習の日内変動の根底に関わっているのは, 嫌悪条件づけを行う時刻なのか, あるいは消去テストを行う時刻なのか特定されていない。受動的回避反応に関しては, 回避訓練と保持テストのそれぞれの時刻を変えた場合, 回避訓練と保持テストの両方を明期に行った群は, それら両方を暗期に行った群やそれぞれを行う時刻を変えた群(たとえば回避訓練を明期に, 保持テストを暗期に行う)に比べ, 最も成績が良いことが明らかになっている(山田・岩崎, 1993b)。味覚嫌悪学習に関しても, 嫌悪条件づけと消去テストのそれぞれを行う時刻を変えることで, 日内変動の背景にある要因のより詳細な検討ができると考えられる。

そこで本研究では, (1) サッカロースに対するラットの選好性のベースレベルに日内変動がみられるのか, (2) サッカロースに対する味覚嫌悪条件づけを行う時刻と消去テストを行う時刻のそれぞれを変えた場合, その学習成績はどのように影響されるのかを検討した。

方法

被験体 Wistar-Imamichi 系雄ラットを40匹用いた。実験開始時において被験体は, 約90日齢であつ

た。実験を通して、被験体は12時間毎の明暗サイクル(明期が8:00~20:00)下で飼育された。被験体を、味覚嫌悪条件づけを行う時刻(明期L: 14:00・暗期D: 2:00)とその消去テストを行う時刻(明期L・暗期D)を組み合わせさせた計4群(LL群, LD群, DL群, DD群)に振り分けた。被験体数は各群10匹であった。

手続き: 本実験は54日間かけて行われた。以下、実験開始日をDay 1として詳細な手続きを述べる。

【Day 0】まずすべての被験体は、実験開始の24時間前から摂水制限された。なおここでは餌は自由に摂取することができた。

【Day 1~Day 4】1日10分間の水飲み訓練を4日間連続で行った。水飲み訓練では、水道水の入った水瓶が飼育ケージ上部中央の位置に提示され、10分間自由に摂水することができた。なお水飲み訓練は、明期に味覚嫌悪条件づけが行われる群(LL群, LD群)は明期(14:00)に、暗期に嫌悪条件づけが行われる群(DD群, DL群)は暗期(2:00)に行った。また被験体は、水飲み訓練の10分間餌は摂取できなかった。水飲み訓練の前後において、水瓶の重量を測定し、各被験体の摂取量を測定した。水飲み訓練の終了後、被験体は次の水飲み訓練までの24時間摂水制限された。

【Day 5~Day 8】1日10分間のサッカロース溶液に対する選好テストを4日間連続で行った。4日間のうち、すべての被験体に対して、明期と暗期のそれぞれの時刻に2日間ずつ行い、実験時刻の順序は被験体によって変えられた。すなわち、1日目と3日目の選好テストが明期に行われ、2日目と4日目のテストは暗期に行われる被験体と、逆に1日目と3日目の選好テストが暗期に行われ、2日目と4日目のテストは明期に行われる被験体に振り分けた。選好テストは、前日からの24時間の摂水制限の後、10%のサッカロース溶液の入った水瓶と水道水の入った水瓶を10分間飼育ケージの上部に提示する2瓶法で行った。瓶の提示位置は左右ランダムに変化させ、それぞれの摂取量を測定した。

【Day 9~Day 12】4日間の選好テスト終了の翌日から、再び4日間の水飲み訓練を行った。手続きは上述の水飲み訓練時と同様であった。

【Day 13】明期あるいは暗期のどちらかの時刻に塩化リチウムによる味覚嫌悪条件づけを行った。前日からの24時間の摂水制限の後、まず10%のサッカロース溶液の入った水瓶を飼育ケージ上部中央に提示し、サッカロース溶液のみを10分間自由に摂取させた。その直後、0.15Mの塩化リチウム(20mg/kg, i.p.)を投与した。また各被験体のサッカロース溶

液の摂取量を測定した。

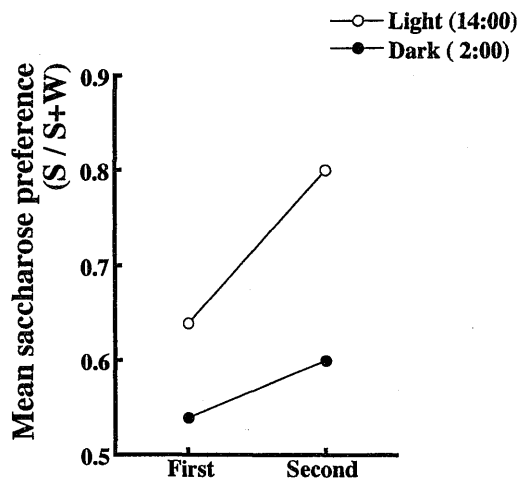
【Day 14~Day 18】嫌悪条件づけ手続きの後、5日間の回復期間をおいた。この間餌水は自由に摂取できた。

【Day 19~Day 24, Day 34, Day 44, Day 54】嫌悪条件づけの6日後から、明期あるいは暗期のどちらか一方の時刻に1日10分間の消去テストを行った。消去テストは前述した選好テストと同様の2瓶法で行った。

結果

味覚嫌悪条件づけ時のサッカロース溶液の摂取量は群間に差がなかった(LL群: 15.3g, LD群: 17.1g, DD群: 16.0g, DL群17.6g:)。

Fig. 1は、味覚嫌悪条件づけを行う前の明期、暗期それぞれの時刻におけるサッカロースに対する選好性を示している。1回目、2回目のどちらの選好テストにおいても、明期のほうが暗期よりもサッカロースに対する選好は大きかった。また明期、暗期ともに、1回目に比べて2回目のほうがサッカロースに対する選好は大きくなった。特に暗期の1回目の選好テストでの値はほぼ0.5に近いものであり、したがってサッカロースに対する選好がほとんどみられていない。選好テストを行った時刻(明期・暗期)と選好テストの経験(1回目・2回目)の2要因



Experience in preference test

Fig. 1. Mean saccharose preference rate on two-bottle preference test before aversive conditioning as a function of testing time and experience in preference test. (S: saccharose, W: water)

の分散分析の結果、時刻の主効果 ($F(1,39) = 15.5$, $p < .01$) と経験の主効果 ($F(1,39) = 10.9$, $p < .01$) が有意であり、交互作用はみられなかった。

Fig. 2は、それぞれの消去テストにおける各群のサッカロースに対する選好性を示している。各群のサッカロースに対する選好性のベースレベルの違いを考え合わせると、明期に消去テストを行った場合にサッカロースに対する選好性のより強い抑制がみられた。実験時刻の条件(LL, LD, DD, DL)とテスト日の2要因の分散分析の結果、実験時刻の主効果 ($F(3,36) = 2.7$, $p < .05$)、テスト日 ($F(9,324) = 144.4$, $p < .01$) および交互作用 ($F(27,324) = 5.7$, $p < .01$) 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、嫌悪条件づけ前(テスト日0)と21日目以降のすべての消去テストにおいて実験時刻の効果が有意であった (Day 0: $F(3,360) = 9.3$, $p < .01$; Day 21: $F(3,360) = 11.58$, $p < .01$; Day 31: $F(3,360) = 7.4$, $p < .01$; Day 41: $F(3,360) = 5.0$, $p < .01$)。したがって、嫌悪条件づけが行われてからの保持期間が短い間は、各群ともサッカロースに対する選好性は同程度であった。しかしながら、その後保持期間が長くなると、嫌悪条件づけと消去テストの両方を明期に行った群(LL群)の消去抵抗が最も大きく、嫌悪条件づけを明期に行い消去テストを暗期に行った群(LD群)では、嫌悪条件づけから21日目の消去テストでサッカロースに対する選好性はほとんどベースレベルまで回復した。

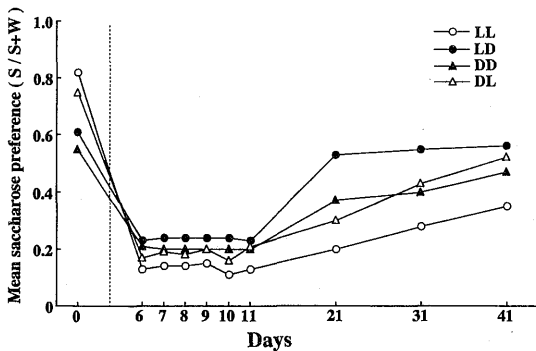


Fig. 2. Mean saccharose preference rate on each two-bottle extinction test as a function of conditioning/ testing time (L: 14:00, D: 2:00) and day after aversive conditioning. (S: saccharose, W: water)

考察

サッカロースに対する味覚嫌悪学習の日内変動を検討する際に、被験体の生得的に持つサッカロースに対する選好性の日内変動をあらかじめ測定しておくことは重要である。様々な行動的・生理的機能に日内変動がみられることから、サッカロースに対する選好性にも日内変動が存在することは十分に考えられることであり、このベースレベルの違いを考慮しておかないと、味覚嫌悪学習の日内変動の解釈を誤る危険性がある。たとえば、いくつかの先行研究 (Infurna, et al., 1979; Caza, et al., 1980) で報告された味覚嫌悪学習の日内変動は、単にサッカロースに対する選好性の違いを反映しているだけなのかもしれない。

本研究の結果から、ラットは明期のほうが暗期よりもサッカロースに対する選好性が強いということが明らかになった。なぜこのような現象がみられるのかは明らかではないが、ひとつの可能性として、サッカロースの吸収能力が時刻によって異なるということが考えられる。サッカロースに対する選好性や糖分の消費量は、糖分の吸収能力の限界と高い相関があることが知られている (Infurna, et al., 1979)。しかしながら夜行性であるラットの場合、代謝系の活動やカロリー消費量は暗期のほうが明期の2倍程度であることが知られており、本研究の結果と矛盾する。本研究と手続きは異なっているが、Rusak & Zucker (1974) は1瓶法により明期と暗期のどちらか一方でサッカリンをラットに提示した場合、暗期の消費量が明期よりも多いことを報告している。本来なら暗期により多くの水分を補給するラットの場合、暗期では明期よりもより水分に対する欲求が高まり、本研究で用いた2瓶法でのサッカロースに対する選好性が低下したのかもしれない。

しかしながら、条件づけ前のサッカロースに対する選好性がより高い明期に条件づけと消去テストを行った場合(LL群)に、その選好性が最も抑制されたという結果は注目し得るものである。嫌悪条件づけから41日目のテストにおいても、サッカロースに対する選好性はかなり強く抑制されたままであった。この結果は、味覚嫌悪学習の日内変動を報告した先行研究 (Infurna, et al., 1979; Caza, et al., 1980) や受動的回避反応の日内変動 (山田・岩崎, 1994) と一致するものである。受動的回避反応と同様に、味覚嫌悪学習においても、明期に条件づけと消去テストを両方を行った場合に最も学習成績が良いといえる。

さて本研究では、嫌悪条件づけを行う時刻と消去

テストを行う時刻のそれぞれを変えて、味覚嫌悪学習の日内変動にはどちらの手続きを行う時期が関与しているのかを検討した。その結果、上述したように最も学習成績の良かったのはどちらの手続きも明期に行った群(LL群)であったが、逆に最も早くサッカロースに対する嫌悪性が消去されたのは、嫌悪条件づけを明期に行い消去テストを暗期に行った群(LD群)であった。味覚嫌悪学習はラットにとってかなり容易な学習課題であり、その学習効果は強固なものであることが知られている(Garcia, Hankins & Rusiniak, 1974)。また嫌悪条件づけに用いられる塩化リチウムの濃度が大きいほど、その条件づけの程度は強力になり、嫌悪条件づけ時の塩化リチウムに対する感受性の違いが、嫌悪条件づけの程度に影響を及ぼし、その結果として学習成績が日内で変動するという可能性も考えられる。すなわち明期のほうが暗期よりも塩化リチウムに対する嫌悪性が強いということが、味覚嫌悪学習の日内変動に関与しているということである。しかしながら、明期に条件づけを行ったとしても、消去テストを暗期に行った群(LD群)が最も学習成績が悪かったという結果は、塩化リチウムの感受性の違いの関与を否定するものである。

嫌悪条件づけと消去テストのそれぞれを行う時刻を変えた場合、問題となるのは、条件づけ時とテスト時の生体内の生理的機能の状態が異なるという点である。ある生理的状态下で学習された事象は、それとは異なる生理的状态下では成績が低下し、再び元の生理的状态下に戻すと学習成績が回復するという状態依存学習(Overton, 1964)はよく知られた現象である。これらのことから、学習実験を行う場合には、訓練(条件づけ)とテストは一日のうちの同じ時期で行われるのが一般的である。したがって、嫌悪条件づけと消去テストの時期が異なる2群(LD群、DL群)はこの状態依存学習という観点から、その成績を評価する必要がある。しかしながら、嫌悪条件づけと消去テストの両方を暗期に行った群(DD群)は、生理的状态が一致していると考えられ、この場合にそれらの両方を明期に行った群(LL群)に比べ、サッカロースに対する嫌悪性の消去が早かった、すなわち学習成績が悪かったことは、味覚嫌悪条件づけにとって、その条件づけと消去テストを明期に行うことの重要性を示しているといえる。

これまでの受動的回避反応の日内変動の研究では、その背景にあるストレス反応の日内変動の関与を検討してきた。本研究で用いた味覚嫌悪学習も、受動的回避反応と同様の嫌悪性の学習課題であり、動物にとってはストレスサーとして働くと考えられ

る。したがって味覚嫌悪学習の日内変動と受動的回避反応の日内変動が一致したということから、味覚嫌悪学習の日内変動の背景にあるメカニズムとして、ストレス反応の日内変動が関与している可能性は大きい。しかし実験の手続きの問題として、味覚嫌悪学習では実験の24時間前から摂水制限をする必要がある。この摂水制限は動物にとってストレスサーとなりうるものであり、血中コルチコステロンレベルでみれば、摂水制限中は血中レベルが上昇していると考えられ、嫌悪条件づけ時および消去テスト時のストレス反応の大きさを純粋に評価することが困難である。しかしながら、視床下部-下垂体-副腎皮質ストレス反応系の起始核である視床下部室旁核損傷、下垂体や副腎皮質の除去、corticotropin-releasing hormone (CRH) レセプターのアンタゴニスト投与等のストレス反応系を変化させるような手続きを用いて、味覚嫌悪学習の日内変動とそのストレス反応系との関連性を検討することは可能であり、今後の課題である。

要約

これまでに、ラットの受動的回避学習において明期のほうが暗期よりも回避成績が良いという日内変動がみられることが報告されている。本研究では同じ嫌悪性の学習課題である味覚嫌悪学習に、受動的回避学習と同様の日内変動がみられるのかどうかを、サッカロースに対する嫌悪条件づけと消去テストのそれぞれを行う時刻を変えて検討した。被験体を条件づけの時刻(明期:14:00・暗期:2:00)×消去テストの時刻(明期・暗期)の計4群(LL群、LD群、DL群、DD群)に振り分け、10%のサッカロース溶液に対する10分間の選好テストを4日間行った後、0.15Mの塩化リチウム(20mg/kg, i.p.)を投与して条件づけを行った。5日間の回復期間の後、選好テストと同様の手続きで消去テストを9日間行った。その結果、条件づけ前の選好テストにおいて、明期のほうが暗期よりもサッカロース溶液に対する選好が大きかった。また消去テストにおいては、条件づけと消去テストの両方を明期に行ったLL群が最も消去抵抗が大きく、味覚嫌悪学習においても受動的回避学習と同様の日内変動がみられることが明らかとなり、それらの背景には同一のメカニズムが関与している可能性が示唆された。

引用文献

- Caza, P., Steinert, P. A. & Spear, N. E. 1980 Comparison of circadian susceptibility to LiCl-induced taste aversion learning between preweanling and adult rats. *Physiology & Behavior*, **25**, 389-396.
- Davies, J. A., Navaratnam, V., & Redfern, P. H. 1973 A 24-hour rhythm in passive avoidance behaviour in rats. *Psychopharmacologia*, **32**, 211-214.
- Garcia, J., Hankins, W. G. & Rusiniak, K. W. 1974 Behavioral regulation of milieu interne in man and rat. *Science*, **185**, 824-831.
- Hennessy, J. W., Smotherman, W. P. & Levine, S. 1976 Conditioned taste aversion and the pituitary-adrenal system. *Behavioral Biology*, **16**, 413-424.
- Hennessy, J. W., Smotherman, W. P. & Levine, S. 1980 Investigations into the nature of the dexamethasone and ACTH effects upon learned taste aversion. *Physiology & Behavior*, **24**, 645-649.
- Infurna, R. N., Steinert, P. A., Freda, J. S. & Spear, N. E. 1979 Sucrose preference and LiCl illness-induced aversion as a function of drug dose and phase of the illumination cycle. *Physiology & Behavior*, **22**, 955-961.
- Overton, D. A. 1964 State-dependent or "dissociated" learning produced with pentobarbital. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, **57**, 3-12.
- Rigter, H. & Popping A. 1976 Hormonal influences on extinction of conditioned taste aversion. *Psychopharmacologia*, **46**, 255-261.
- Rusak, B. & Zucker, I. 1974 Fluid intake of rats in constant light and during feeding restricted to the light or dark portion of the illumination cycle. *Physiology & Behavior*, **13**, 91-100.
- 山田一夫・岩崎庸男 1992 ラットの受動的回避反応のサーカディアンリズムと血漿コルチコステロン. *薬物・精神・行動*, **12**, 404.
- 山田一夫・岩崎庸男 1993a 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 1993b 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—訓練と保持テストの時刻を変数として—. *薬物・精神・行動*, **12**, 404.
- 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.
- 山田一夫・岩崎庸男 1996 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. *筑波大学心理学研究*, **18**, 45-51.
- Yamada, K. & Iwasaki, T. 1996 Effects of hypothalamic paraventricular nucleus lesion on passive avoidance response in rats. *International Journal of Psychology*, **31**, 308.