

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19530646

研究課題名（和文） 脳内ドパミン作動性神経系によるオペラント行動の制御機序の解析

研究課題名（英文） Dopaminergic mechanisms and operant behavior in rats

研究代表者

筒井 雄二 (TSUTSUI YUJI)

福島大学・共生システム理工学類・准教授

研究者番号：70286243

研究成果の概要（和文）：本研究では動物が自ら進んで遂行する行動（オペラント行動）と脳内のドパミン(DA)神経との関係を調べた。側坐核という部位で DA 神経を阻害すると、動物は自ら進んで行動するタイミングが若干遅れるようになり、また、新たに何かを学習することが難しくなった。一方、線条体という部位で DA 神経を阻害した場合、D1 とよばれる受容体を介した伝達の阻害では、反応のスピードが低下、D2 とよばれる受容体を介した伝達の阻害では、反応の正確さが低下することがわかった。以上より、側坐核や線条体の DA 神経系が、オペラント行動の発現とコントロールに重要な役割を果たしていることがわかった。

研究成果の概要（英文）： In this research, we investigated the relationship between operant behavior in animals and the dopaminergic (DA) neurotransmission in the central nervous system. Inhibition of the DA transmission at the nucleus accumbens delayed the response initiation and made it difficult to acquire new learning tasks. On the other hand, impairment of the DA transmission in the striatum decreased the response speed when the impairment was provided to the D1 receptors, and decreased the accuracy of responses when the impairment was provided to the D2 receptors. These results suggested that the DA system in the nucleus accumbens and the striatum have an important role for the initiation and the control for operant behavior in animals.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
20 年度	800,000	240,000	1,040,000
21 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：社会科学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：

オペラント行動，ドパミン作動性神経，側坐核，線条体，レバー押し，ラット，マウス

1. 研究開始当初の背景

ドパミン作動性神経は主として2つの大きな経路によって構成される。一つは、中脳の黒質緻密部から線条体に投射する経路で、黒質-線条体ドパミン(DA)系と呼ばれる。もう一つは、腹側被蓋野から側坐核、嗅結節、扁桃体に投射する経路で、中脳辺縁ドパミン(DA)系と呼ばれる。これらの2つのドパミン系は、それぞれ線条体および側坐核において、ドパミンを神経伝達物質とする神経伝達を行っているが、線条体や側坐核といった部位の違い、あるいはドパミンD1受容体を介するかドパミンD2受容体を介するかといった、受容体タイプの違いなどによって、それぞれの機能が異なっていることがこれまでの研究によって明らかにされてきた。

ところで、動物(ヒトを含む)が運動を発現し、その運動を調節する過程において中枢神経系が重要な役割を果たしている。例えば、大脳皮質の運動野から内包や脳幹と呼ばれる部位を経由する下降性の神経連絡は、運動の発現を制御する上でもっとも重要な働きをしていると言われている。この経路は錐体路と呼ばれて、脊髄を介して筋組織に投射する。

錐体路を中心とする運動駆動システムを、その他の多くの神経回路が補助的に修飾することで、微妙で細やかな運動の遂行が可能となるのである。脳内のドパミン作動性神経系は、このような動物の運動調節において重要な働きを担っていると考えられる。特に黒質-線条体ドパミン系の働きが、このような運動調節に密接に関わると考えられてきた。

また、脳内ドパミン神経は情動や報酬とも密接に関わっていると考えられている。例えばエサや水などの自然強化子、あるいは覚せい剤や麻薬などの薬物による強化効果の発現は、ドパミン作動性神経系の機能に依存する。このような情動や報酬に関わる機能は、中脳辺縁ドパミン系と特に関係が深いと考えられてきた。

ところで、レバー押し行動のようなオペラント行動は、エサや水など(あるいは薬物が使われる場合もある)の報酬によって維持される自発反応である。従って、中脳辺縁ドパミン系が強く関わる行動であると考えられる。しかし、それと同時にレバーを押すという行動は、一定程度の負荷のかかる運動でもある。従って、黒質-線条体系も同時に関与する行動であると考えられる。本研究における大きな目的は、ここまで述べてきたような脳内ドパミン作動性神経系が、動物のオペラント行動の神経制御においてどのような働きを担っ

ているのかを明らかにすることにある。

2. 研究の目的

我々の研究の大きな特徴の一つは、オペラント行動を、運動機能を測定する指標の一つとして使用することである。本来、レバー押し行動のようなオペラント行動は、オペラント行動と報酬との関係を個体が理解し、学習するプロセスを分析するための課題として利用されるのが一般的であるが、本研究のように運動機能の評価法として用いられることは、これまでほとんどなかった。オペラント行動を運動機能の指標とする最大のメリットは、動物が積極的に運動課題に取り組む場面で運動機能を評価できること、そして、運動負荷の大きさを実験者が決定できることである(具体的には固定比率スケジュールの値を変化させることで負荷の大きさを決定する)。従来から用いられているロコモーションなどの運動評価法は、「動くかどうかは、動物まかせ」であり、動物の自発性にまかせた課題と言えるだろう。それに対してオペラント行動を指標とした場合、むしろ運動の能動的な側面を評価することになるが、ヒトの日常行動の多くはそのようなオペラント行動の特徴を有すると考えられ、従って、オペラント行動を指標に運動機能の研究を行うことは、ヒトの運動機能を理解する上で、より妥当性の高い動物モデルといえることができるであろう。

本研究ではまず、中脳辺縁ドパミン系の投射部位である側坐核に焦点をあてる。側坐核におけるドパミンによる神経伝達の機能とオペラント行動との関係を明らかにするために、側坐核に投射するドパミンニューロンを6-hydroxydopamineにより破壊し、破壊による影響をレバー押し反応課題の遂行結果から分析する。

また、レバー押し行動以外のオペラント行動の遂行と側坐核との関係についても調べるため、側坐核のドパミン伝達を阻害した動物の、条件性場所選好課題(conditioned place preference: CPP)の獲得についても分析を行うこととした。

さらに、黒質から線条体に投射するドパミンニューロンについてもオペラント行動との関係を明らかにするため、線条体でのドパミンを介した神経伝達を阻害し、レバー押しを指標とした課題の遂行について調べた。特に線条体については、ドパミン D1 受容体を介した神経伝達と、ドパミン D2 受容体を介し

た神経伝達の機能の違いを明らかにするために、それぞれ実験を行うこととした。

これらの実験を通して、本研究では脳内の主要なドーパミンシステムが動物のオペラント行動をどのように制御しているのかを明らかにすることを研究の目的として位置づけた。

3. 研究の方法

実験1【6-hydroxydopamineの側坐核投与がFR強化スケジュール下でのマウスのレバー押し反応に及ぼす影響】

被験体：C57BL/6J雄マウス，15匹。

装置：マウス用オペラントチャンバ，2台。フロントパネルにはリトラクタブルレバー1機，エサ皿（フードディスペンサに接続），2.9KHzの音刺激提示用ソナラートが配置された（Fig.1）。



Fig.1 実験装置

行動実験：レバー押し反応の形成後，FR5強化スケジュールでの訓練を実施。その後，FR強化スケジュールの値を順次，10，20，40，60，80，100，120へと増加させた。マウスがFR120でのレバー押し反応を遂行したならば，側坐核に6-hydroxydopamine(6-OHDA)を投与する外科的処置を行った。外科的処置から回復後，再びマウスにはFR5，10，20，40，60，80，100，120の訓練を行い，外科的処置後のレバー押し反応の観察を行った。FR120でのレバー押し実験の終了後，摂食行動や活動量についてもテストを行い，最後に組織学的検証を行った。

外科的処置：8匹のマウスを6-OHDA投与群，残りの7匹をコントロールとしてvehicle投与群とした。ペントバルビタール麻酔下でマウスを脳定位固定装置に固定し，ガラスキャピラリーを介して6-OHDA群には6-OHDAを，vehicle群には0.9%生理食塩水を投与した。6-OHDAは0.4μl(2.5μg/μl，アスコルビン酸0.01%を含む0.9%生理食塩水に溶解させた)を片側2箇所，両側性に投与した。

組織学的検証：被験体の脳を凍結させ，側坐核に含有するドーパミン量をHPLCにより測定することで，6-OHDAによるドーパミン神経への影響を定量した。

実験2【条件性場所学習の獲得に及ぼす側坐核ドーパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

被験体：ドーパミンD2R遺伝子にヒトIL-2Rサブユニットを発現する遺伝子改変マウスを用いた。

装置：明暗箱(KN-80 CPP装置：夏目製作所)を用いた。

行動実験：プレテストとして，1日15分間マウスを装置内に放し，明箱と暗箱でのマウスの滞在時間を測定した。条件づけでは，メタンフェタミン(meth, 2.0mg/kg)を皮下投与し，直後に，プレテストにおいて滞在時間の短かった箱にマウスを1時間放置した。この手続きを6日間，続けた。最後に，再びマウスに明暗箱を自由に往復させ，15分での滞在時間を各箱について測定した。

外科的処置：ペントバルビタール麻酔下でマウスの側坐核に両側性にイムノトキシン(IT)またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を注入した。ITは，ヒトIL-2Rと選択的に結合し，そこで神経毒性を発揮する。従って，ITを側坐核に投与することにより，側坐核に所在するヒトIR-2Rを含有する神経細胞を選択的に破壊することが可能になるわけだ。今回の実験では，それがドーパミンD2R受容体である。

組織学的検証：頸椎脱臼後，脳を凍結保存し，in situ hybridizationにより染色し，細胞数をカウントした。

実験3【リアクションタイム課題の遂行に及ぼす線条体D1ドーパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

被験体：ドーパミンD1受容体上にヒトIL-2Rサブユニットを発現する遺伝子改変マウス，15匹を使用した。

装置：マウス用オペラントチャンバ，4台を使用した。フロントパネルにはリトラクタブルレバー2機，各レバーの上部にそれぞれキューライト，フードディスペンサに接続したエサ皿を配置した。

行動実験：レバー押し反応の形成後，リアクションタイム課題の形成に移行した。同課題は，左右のレバーの上に配置したキューライトのうち，どちらか一方を点灯させ，キューライトを点灯させた側のレバーを押した場合に正反応として報酬を提示した。マウスがリアクションタイム課題を習得した後，外科的処置を施し，手術から回復後，再びリアクションタイム課題の遂行を観察し，線条体のDA伝達の阻害が同課題の遂行に及ぼす効果を調べた。

外科的処置：ペントバルビタール麻酔下でマウスの線条体に両側性にITまたはPBSを注入した。

実験 4【リアクションタイム課題の遂行に及ぼす線条体 D2 ドパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

被験体：ドパミン D2 受容体上にヒト IR-2R サブユニットを発現する遺伝子改変ラット，22 匹を使用した。

装置：ラット用オペラントチャンバ，5 台を使用した。フロントパネルにはリトラクタブルレバー 2 機，フードディスペンサに接続したエサ皿を配置，また 2KHz と 8KHz の電子音を提示するためのトーンジェネレータに接続したスピーカをバックパネル中央に配置した。

行動実験：周波数の異なる 2 種類の聴覚刺激(2KHz と 8KHz)のいずれか一方を提示した直後に，左右のレバーを同時に提示した。このとき，ラットは音の高さに応じて左右のレバーを押し分けなければならなかった。すなわち，2KHz の音刺激の場合には左レバーを，8KHz の音刺激の場合には右レバーを押しした場合に，正反応として報酬を与えた。ラットがリアクションタイム課題を獲得したのち，外科的処置を行い，回復後に 15 セッションのテストを行った。

外科的処置：ペントバルビタール麻酔下で，ラットの線条体に両側性に IT または pbs を投与した。

4 . 研究成果

実験 1【6-hydroxydopamine の側坐核投与が FR 強化スケジュール下でのマウスのレバー押し反応に及ぼす影響】

実験 1 で明らかになったことは主として 3 つある。第一に，Fig.2 にも示したように，側坐核における DA による神経伝達を阻害したことで，レバー押しに取り掛かるまでの反応潜時が有意に長くなった。第二に，レバー押し反応とレバー押し反応との間隔時間は逆に側坐核の DA 低下により短縮した (Fig.3)。第三に，側坐核 DA 低下ラットのレバー押し回数は有意に減少した (Fig.4)。以

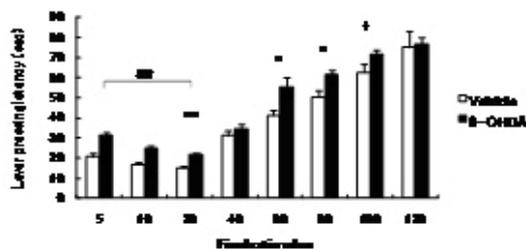


Fig. 2

上のことから，側坐核における DA を介した

神経伝達は，エサを報酬とするオペラント行動を抑制することが示唆された。

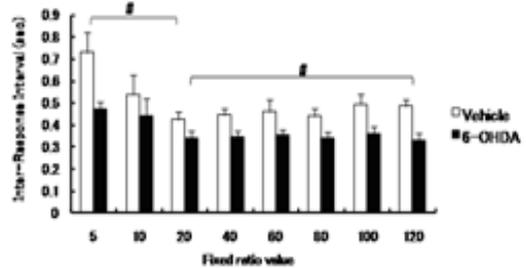


Fig. 3

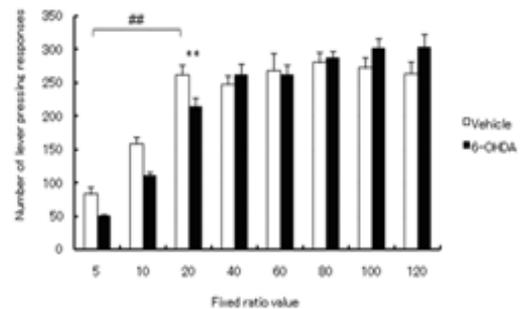


Fig. 4

実験 2【条件性場所学習の獲得に及ぼす側坐核ドパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

Fig.5 に示したように，IT 投与時に Mutant 群では Wild-type 群に比べて有意に CPP スコアが低下した。このことは側坐核に注入した IT により側坐核内 DA 受容体が減少し，そのために Meth と場所との連合学習が困難になることを示している。すなわち，側坐核に所在する DA 受容体は条件性場所学習の形成に重要な役割を果たしており，中脳辺縁 DA 系は薬物を報酬とするオペラント行動に関与していることを示唆している。ただし，放射状迷路を使った空間課題の遂行にはそのような効果がみられなかった。

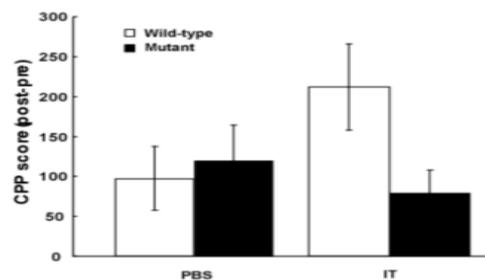


Fig. 5

実験3【リアクションタイム課題の遂行に及ぼす線条体 D1 ドパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

実験3では IT を線条体に注入することで、主として黒質-線条体 DA 系の D1 受容体を介した神経伝達に障害を与え、オペラント行動の遂行に及ぼす影響を調べた。マウスにおけるリアクションタイム課題の遂行を調べたところ、線条体の D1 受容体を介した伝達は正しい反応の遂行には何ら影響を与えないことがわかった(Fig. 6)。しかし、同破壊は反応速度を低下させることが示された(Fig. 7)。これらの結果から、線条体における D1 受容体を介した神経伝達は、学習機能というよりは、オペラント行動の発現調節に關与している可能性が考えられた。

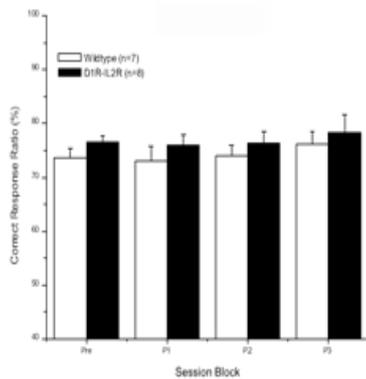


Fig. 6

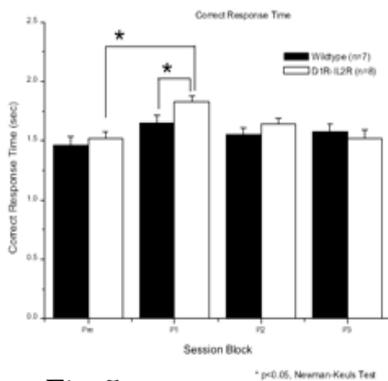


Fig. 7

実験4【リアクションタイム課題の遂行に及ぼす線条体 D2 ドパミン受容体を介した神経伝達の遮断の効果】

実験4では線条体における D2 受容体を介した神経伝達がオペラント行動の遂行に及ぼす影響を調べた。実験の結果、IT により線条体の D2 受容体に障害を与えた場合、正反応率が有意に減少したが(Fig. 8)、反応時間には影響が現れないことがわかった(Fig.9)。

この結果は線条体における D1 受容体を回押した神経伝達に障害を与えた実験3の結果とは一致せず、線条体における D1 受容体を介した神経伝達と、D2 受容体を介した神経伝達とが、オペラント行動の遂行において異なる役割を演じている可能性が強く示唆された。

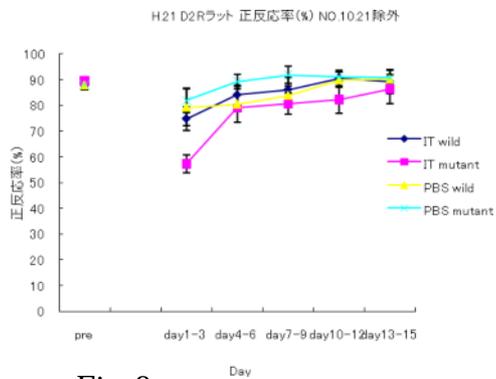


Fig. 8

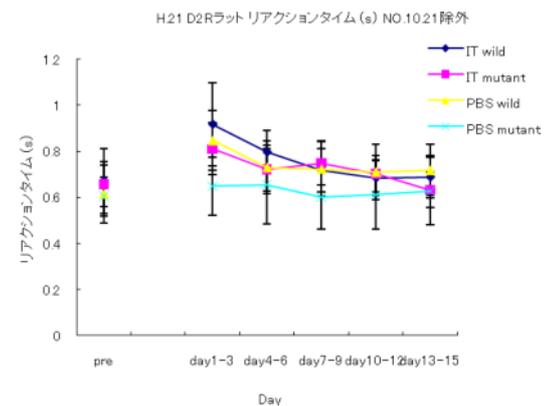


Fig. 9

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計 11 件)

Ryoji Fukabori, Nobuyuki Kai, Kenta Kobayashi, Kana Okada, Yasunobu Yasoshima, Yuji Tsutsui, & Kazuto Kobayashi, Behavioral roles of the striatonigral neural pathway in reinforcement learning., 2009年9月17日, 名古屋.

Yuji Tsutsui, Effects of 6-hydroxydopamine injections into the nucleus accumbens on lever-pressing behavior under the fixed ratio schedule in mice., 14th Biennial Scientific meeting of the International Society for Comparative Psychology, 2008年10月10日, プエノスアイレス, アルゼンチン

Yuji Tsutsui, Kayo Nishizawa, Nobuyuki

Kai, & Kazuto Kobayashi, A lesion of the nucleus accumbens dopamine system shortens the lever-pressing inter-response time and delays response initiation in mice. NEUROSCIENCE 2007, 2007年11月7日, サンディエゴ, アメリカ合衆国

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 雄二 (TSUTSUI YUJI)
福島大学・共生システム理工学類・准教授
研究者番号：70286243

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：