

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：12102
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21530759
研究課題名（和文） 空間的作業記憶における海馬-前頭前野系の役割に関する生理心理学的研究
研究課題名（英文） Biopsychological study on the role of hippocampal-prefrontal system in spatial working memory
研究代表者 一谷 幸男（ICHTANI YUKIO） 筑波大学・人間系・教授 研究者番号：80176289

## 研究成果の概要（和文）：

ラットの空間的作業記憶における海馬および前頭前野の役割について調べるため、主としてグルタミン酸 NMDA 受容体の役割に注目し、行動薬理学的方法を用いて受容体拮抗薬脳内投与の効果を検討した。背側海馬への NMDA 受容体拮抗薬投与はラットの放射状迷路行動や遅延挿入放射状迷路行動を顕著に阻害することがすでに知られてきたが、腹側海馬への投与、内側前頭前野への投与が、これらの学習行動の遂行を阻害することが明らかとなった。また同受容体の部分作用薬末梢投与は、自発的物体位置再認テストでの遂行に対して促進的な効果を及ぼすことが明らかとなった。空間的作業記憶において、海馬-前頭前野系の NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。

## 研究成果の概要（英文）：

The role of hippocampal-prefrontal system, especially its glutamatergic NMDA receptors, in spatial working memory was investigated by behavioral pharmacological techniques using intracerebral administration of a NMDA receptor antagonist. It has been known from previous studies that the antagonist treated into the dorsal hippocampus causes marked deficits in radial maze behavior in rats. The present study revealed that the antagonist treated into the ventral hippocampus and the medial prefrontal cortex also caused deficits of these learned behaviors. Additionally, systemic administration of a partial agonist of the receptor exerted facilitative effect on spontaneous object place recognition performance. The results suggest that NMDA receptors in the hippocampal-prefrontal system play an important role in spatial working memory.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：実験心理学

科研費の分科・細目：心理学・実験心理学

キーワード：空間記憶，作業記憶，海馬，前頭前野，グルタミン酸受容体，ラット

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 作業記憶 (working memory) は、ある当面の課題を適切に解決・遂行するために一時的に活用される能動的な記憶であり、ヒトでは大脳皮質連合野の中でも最も高次の機能に係わるとされる前頭前野がその中枢であると考えられている。作業記憶の脳内メカニズムを解明することは現在の心理学、脳科学にとって大きな課題であり、近年の脳機能イメージングの進歩により、ヒトの作業記憶課題遂行中の脳画像記録から、どのような種類の記憶に脳のどの部位が関わっているかを示すデータが蓄積されてきた。しかし、このような非侵襲的研究方法から得られる情報は作業記憶を必要とする課題で脳のどの部位が盛んに活動したかを知ることにとどまり、脳内の神経伝達物質・神経調節物質やそれらの受容体がどのようにして作業記憶を司っているかを解明するには、侵襲的方法を用いた動物実験に頼らざるをえない。サルでは各種の課題を遂行中の単一ニューロン活動の記録から、前頭前野背外側部が作業記憶の中枢であると考えられているが、ラットではサルの前頭前野背外側部に相当する領域は、前頭葉の前方内側部に位置する内側前頭前野 (medial prefrontal cortex) であると考えられている。

(2) ラットの作業記憶の脳内機構については、従来から大脳辺縁系の一領域である海馬 (hippocampus) の関与が示唆されてきた (Olton & Papas, 1979)。作業記憶課題の中で最もよく用いられるものの1つが放射状迷路学習課題である。この課題は作業記憶課題であると同時に空間的情報の記憶を必要とするのが特徴であるが、その習得や遂行にはグルタミン酸受容体の一種である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体が関わること (Lyford & Jarrard, 1991 など)、遂行に海馬の NMDA 受容体が関わること (Kawabe et al., 1998) が知られている。また、同課題の途中で遅延を挿入した課題では、海馬の NMDA 受容体が作業記憶の記銘と検索過程に重要であり、もう1つの別のグルタミン酸受容体である AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate) 受容体は、これらのみならず記憶の固定・保持過程にも関わることを我々の先行研究は示唆した (Yoshihara & Ichitani, 2004)。一方、Steele & Morris (1999) はモリス水迷路を用いて日ごとに逃避可能なプラットホームの位置が変化する課題 (遅延場所見本合わせ学習) を考案し、作業記憶過程における海馬 NMDA 受容体の関与を調べたが、記憶の固定の過程に重要であるという結論に至った。このように海馬の NMDA 受容体だけをみても研究者の見

解は一致しておらず、作業記憶に係わる脳内伝達物質系、さらには作業記憶におけるラット前頭前野の役割については未解明の部分が多い。

## 2. 研究の目的

本研究は、空間的作業記憶における海馬-前頭前野系の役割を解明すること、とくに空間的作業記憶課題遂行の各過程に係わる脳内神経伝達物質-受容体を明らかにすることを目的とした。

具体的には、空間的な作業記憶における海馬と前頭前野の役割について検討した。その際、課題の手続きを工夫することにより、作業記憶の各過程 (記銘, 固定・保持, 検索) における関与をできる限り分離して調べた。空間的作業記憶課題としては、主に放射状迷路課題を用いた。モリス水迷路を用いた作業記憶課題 (Steele & Morris, 1999) についても一部検討したが、動物の安定した遂行成績が認められず、この課題については途中で検討を中断した。また、自発的な物体位置再認が空間記憶テストとして有効であるため、このテストを用いた検討を一部追加した。

神経伝達物質およびその受容体としては、海馬および前頭前野におけるそれらの分布に関する過去の報告にもとづき、グルタミン酸作動性神経系、ドーパミン作動性神経系に焦点を当て、これらの神経伝達を一時的に遮断する薬物 (拮抗薬) または促進する薬物 (作用薬) を用いてその影響を検討した。海馬では長期増強 (LTP) 現象が記憶の神経学的基盤として注目されているが、この現象には脳内グルタミン酸受容体、とくに NMDA 受容体の存在が不可欠であることが知られているからである。

## 3. 研究の方法

Wistar-Imamichi 系の成体ラットを用いて、筑波大学実験動物委員会の承認を得て実験を行った。放射状迷路学習実験では、食餌制限による動機づけを行った。水は自由に摂取させた。モリス水迷路学習実験、自発的物体位置再認テストでは、食餌制限も摂水制限も課さなかった。

装置として、灰色塩化ビニル製の高架式 8 方向放射状迷路 (中央プラットホームの直径が 35cm、各アームが 60cm で幅が 12cm) を床から 50 (または 70) cm の高さに設置して用いた。モリス水迷路は直径が 150cm、水面下プラットホームは直径 10cm であり、プールの水は白濁させた。いずれの装置も実験期間を通して実験室内の一定の位置に置き、迷路周辺の刺激配置は変化させないこととした。また、自発的物体位置再認テストでは、塩化ビニル製オープンフィールド (90x90x45 cm)

をアリーナとして用いた。予備訓練として、放射状迷路実験と自発的物体位置再認実験では装置（放射状迷路、アリーナ）への馴化をあらかじめ施した。

薬物は、グルタミン酸 NMDA 受容体拮抗薬である AP5、ドーパミン D1 受容体拮抗薬である SCH23390 を用いた。薬物の脳内投与は、あらかじめペントバルビタール麻酔下の脳定位固定手術でラット両側の背側海馬、腹側海馬、あるいは内側前頭前野に埋め込んだステンレス製のガイドカニューレを介して、課題やテスト遂行の直前に、あるいは遂行中の特定のタイミングで、インジェクションカニューレを挿入してポンプで微量投与した（1  $\mu$ l）。また一部の実験では、NMDA 受容体の部分作用薬である D-cycloserine (DCS) の末梢投与を行った。

行動実験終了後に、ペントバルビタール深麻酔下で脳の灌流固定を行い、脳を取り出して凍結切片を作成し、ニッスル染色を行ってガイドカニューレ刺入部位を確認した。

以上のような一般的方法を用い、以下のよう項目について検討した。

#### (1) 腹側海馬グルタミン酸受容体遮断による放射状迷路行動への効果の検討

あらかじめ放射状迷路課題を十分に訓練したラットを用いて、その日の試行の直前に NMDA 受容体拮抗薬 AP5 または溶媒を両側の腹側海馬に投与し、遂行成績への効果を調べた。

#### (2) 内側前頭前野グルタミン酸受容体遮断およびドーパミン D1 受容体遮断による放射状迷路行動への効果の検討

あらかじめ放射状迷路課題を十分に訓練したラットを用いて、その日の試行の直前に NMDA 受容体拮抗薬 AP5、D1 受容体拮抗薬 SCH23390、あるいはそれらの溶媒を両側の内側前頭前野に投与し、遂行成績への効果を調べた。

#### (3) 内側前頭前野グルタミン酸受容体遮断およびドーパミン D1 受容体遮断による遅延挿入放射状迷路行動への効果の検討

あらかじめ放射状迷路課題の訓練に続いて、第 4 正選択と第 5 選択の間に 2 時間の遅延を挿入した課題（遅延挿入課題）を十分に訓練したラットを用いた。薬物テストでは、試行前半の直前（タイミング I）、試行前半の直後（タイミング II）、または試行後半の直前（タイミング III）に NMDA 受容体拮抗薬 AP5、D1 受容体拮抗薬 SCH23390、あるいはそれらの溶媒を両側の内側前頭前野に投与し、遂行成績への効果を調べた。

#### (4) モリス水迷路における遅延場所見本合わせ課題を用いた空間的作業記憶テストの基

#### 礎的検討

Steele & Morris (1999) の手続きに準拠し、モリス水迷路における遅延場所見本合わせ学習課題をラットに訓練した。この課題では通常モリス水迷路課題とは異なり、水面下に隠されたプラットホームの位置は、毎日変化するが、1 日の中では一定であった。したがってラットは、毎日の第 1 試行ではプールの中のどこに逃避可能な場所があるかを日毎に新たに習得し、第 2 試行以降ではその記憶をもとに節約的に泳ぐことが要求された。

#### (5) 自発的物体位置再認テストの基礎的検討

自発的物体再認テストの改変である自発的「物体位置」再認テストは、2 つの同じ物体が置かれたアリーナにラットを一定時間暴露して（見本期）、しばらくの遅延時間の後、同じアリーナに戻した際に片方の物体の位置を変化させると（テスト期）、その物体により多く探索を示す傾向を利用した空間記憶テストである。

従来は比較的短期の保持時間（遅延）条件を用いた検討がなされてきたので、これをさらに長時間（数時間～24 時間に及ぶ期間）の後でも記憶の保持がテストできるよう、記憶テストとしての実施手続きを確立するための実験を行った。具体的には、本研究において空間記憶テストとして適用する際の基礎データを得るため、刺激物体の選択、見本時間の設定、遅延時間の設定を検討し、さらにテスト期にはどの時間帯の行動に注目すればいいのかを分析した。

#### (6) 自発的物体位置再認に及ぼす NMDA 受容体の部分作用薬 DCS の効果の検討

自発的物体位置再認テストで測定される記憶におけるグルタミン酸受容体の役割を調べるため、NMDA 受容体の部分アゴニストである DCS の末梢投与の効果を検討した。見本期は 5 分、遅延時間は 24 時間であった。ラットを 3 群に分けてテストを行い（見本期 30 分前投与群、見本期直後投与群、テスト期 30 分前投与群）、DCS 7.5～30mg/kg または溶媒を腹腔内投与した。

テスト期における 2 つの物体（見慣れた位置の物体と新奇な位置の物体）に対するラットの探索時間の比を、弁別率として評価した。

#### 4. 研究成果

#### (1) 腹側海馬グルタミン酸受容体遮断による放射状迷路行動への効果の検討

あらかじめ課題を習得したラットの試行直前の腹側海馬への AP5 投与は、放射状迷路課題における最初の 8 選択中の正選択数を有意に低下させ、また 8 つすべてのアームの報酬を取り終えるまでの誤選択数を有意に増

大させた。従って、背側海馬と同様に、腹側海馬の NMDA 受容体もまた、ラットの空間的作業記憶にとって不可欠の役割を果たしていることが示唆された。

(2) 内側前頭前野グルタミン酸受容体遮断およびドーパミン D1 受容体遮断による放射状迷路行動への効果の検討

あらかじめ課題を習得したラットの試行直前の内側前頭前野への AP5 投与および SCH23390 投与は、いずれもラットの放射状迷路行動にほとんど影響を及ぼさなかった。この結果は、海馬に AP5 を投与した場合の影響とは対照的である。したがって、この実験からは、標準的な放射状迷路課題の遂行における内側前頭前野 NMDA 受容体およびドーパミン D1 受容体の関与の可能性は、いずれも明らかにはならなかった。

(3) 内側前頭前野グルタミン酸受容体遮断およびドーパミン D1 受容体遮断による遅延挿入放射状迷路行動への効果の検討

上記(2)の結果を受けて、第4正選択と第5選択の間に2時間の遅延を挿入した課題(遅延挿入課題)をラットに遂行させ、いろいろなタイミングで AP5、SCH23390 を投与して、試行後半の遂行成績への影響を調べた。その結果、タイミング III (試行後半の直前)の AP5 投与によって、後半の誤選択数が有意に増大した。したがって内側前頭前野 NMDA 受容体は、遅延挿入課題の遂行にとって必要な空間情報の記録や保持には関わらないものの、それを検索・再生する過程には何らかの役割を果たすことが示唆された。一方、SCH23390 投与は、いずれのタイミングで行っても遂行に有意な影響を及ぼさず、ドーパミン D1 受容体の遅延挿入放射状迷路行動への関与は示唆されなかった。

(4) モリス水迷路における遅延場所見本合わせ課題を用いた空間的作業記憶テストの基礎的検討

Steele & Morris (1999) の手続きに準拠し、上述のようにモリス水迷路における遅延場所見本合わせ課題をラットに訓練した。しかし、先行研究で報告されたような安定した泳ぎの成績のパターン、すなわち各日の第1試行の逃避潜時に対する、第2試行以降の明らかな潜時の短縮は見られず、モリス水迷路を用いての空間的作業記憶の測定、さらには NMDA 受容体や D1 受容体拮抗薬の効果検討のための行動薬理学実験は、実施しなかった。この課題を動物に訓練する際の実験手続きの確立のため、さらに検討すべき事項が残された。

(5) 自発的物体位置再認テストの基礎的検討

空間記憶テストとして適用する際の基礎データを得るため、見本時間の設定(5分-20分)、遅延時間の設定(6-24時間)を検討し、さらにテスト期には1分ごとの弁別指数(新奇な位置の物体への探索時間と見慣れた位置の物体への探索時間の差をもとに算出)の変化を分析した。

その結果、見本期における物体への暴露が計20分に及ぶような十分に長い時間を設定すれば、24時間という長い遅延時間の後でも、ラットは新しい位置の物体をより多く探索し、記憶保持の証拠を示すことがわかった。またテスト期の物体探索行動については、最初の1-2分の分析が適切であることが明らかとなった。

(6) 自発的物体位置再認に及ぼす NMDA 受容体の部分作用薬 DCS の効果の検討

見本期前、見本期直後、さらにテスト期前の DCS 投与はいずれもテスト期の成績(2つのうちの新奇な位置の物体に対する探索の率で評価)の上昇をもたらし、自発的物体位置再認記憶における複数の様々な過程に NMDA 受容体が関わることを示唆された。同時に DCS が記憶改善薬として有効である可能性が示された。

以上のことから、空間的作業記憶において、海馬一前頭前野系のグルタミン酸 NMDA 受容体が重要な役割を果たしていることが示唆される。一方で、海馬と内側前頭前野では、その果たす役割や重要となる過程(タイミング)が異なることが示唆される。

## 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)

[雑誌論文] (計 5 件)

1) Ozawa, T., Kumeji, M., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2012) D-Cycloserine enhances spatial memory in spontaneous place recognition in rats. *Neuroscience Letters*, 509: 13-16. (査読有)

2) Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2011) Long-term object location memory in rats: effects of sample phase and delay length in spontaneous place recognition test. *Neuroscience Letters*, 497: 37-41. (査読有)

3) Yamada, K., Furukawa, S., Iwasaki, T. & Ichitani, Y. (2010) Nicotine improves AF64A-induced spatial memory deficits in Morris water maze in rats. *Neuroscience Letters*, 469: 88-92. (査読有)

4) 領家梨恵・山田一夫・一谷幸男 (2009) 齧歯類を用いた心的外傷後ストレス障害 (PTSD) 動物モデルに関する研究の概観 筑波大学心理学研究 38:11-19. (査読無)

5) 清水 誠・山田一夫・一谷幸男 (2009) ラットの空間記憶の再固定過程に関する研究の概観 筑波大学心理学研究 37: 1-8. (査読無)

[学会発表] (計 16 件)

1) Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2011) Increase of brain-derived neurotrophic factor in the hippocampus plays a key role in consolidation of spatial memory in spontaneous place recognition test in rats. 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Washington, DC, USA.

2) 小沢貴明・山田一夫・一谷幸男 : ラットの自発的位置再認テストにおける空間記憶の固定には海馬内 BDNF の増加が必要である 第 34 回日本神経科学大会 パシフィコ横浜 (神奈川県) 2011. 9 月

3) 林 和子・一谷幸男 : 空間的作業記憶のモニタリングにおけるラット前頭前野NMDA受容体の役割 日本動物心理学会第71回大会慶応大学 (東京都) 2011. 9 月

4) Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2010) Effects of intra-hippocampal administration of mRNA and protein synthesis inhibitors on the performance in long-term spatial memory tasks in rats. 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. San Diego, California, USA.

5) 小沢貴明・山田一夫・一谷幸男 : ラットの長期空間的作業記憶における海馬内新規 mRNA および蛋白質合成の役割 第33回日本神経科学大会 神戸コンベンションセンター (兵庫県) 2010 . 9 月

6) 高野越史・山田一夫・一谷幸男 : ラットにおける匂い刺激を用いた再認記憶の測定 日本動物心理学会第70回大会 帝京大学 (東京都) 2010. 8 月

7) 荒井美咲・山田一夫・一谷幸男 : ラットの自発的位置再認に及ぼす AP5 海馬投与の効果 : 見本期投与とテスト期投与の比較 日本動物心理学会第 70 回大会 帝京大学 (東京都) 2010. 8 月

8) 古家宏樹・山田一夫・一谷幸男 : 新生仔期 MK-801 慢性投与ラットのモリス水迷路学習 第 28 回日本生理心理学会大会 茨城大学 (茨城県) 2010. 5 月

9) Ichitani, Y., Kudo, A., Niikura, R., Kawabe, K. & Yamada, K. (2009) Effects of

quetiapine on radial maze learning deficits in rats neonatally treated with MK-801. 第 39 回日本神経精神薬理学会年会, 第 1 回アジア神経精神薬理学会 京都.

10) Hayashi, K. & Ichitani, Y. (2009) Effects of NMDA and AMPA receptor blockade in the ventral hippocampus on spatial working memory in rats. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago, Illinois, USA.

11) Ozawa, T., Yamada, K. & Ichitani, Y. (2009) Role of intrahippocampal de novo protein synthesis in the processes of long-term spatial memory in rats. 39th Annual Meeting of the Society for Neuroscience. Chicago, Illinois, USA.

12) 林 和子・一谷幸男 : ラットの放射状迷路課題習得に及ぼす内側前頭前野 D1 受容体遮断の効果 日本動物心理学会第 69 回大会 岐阜大学 (岐阜県) 2009. 9 月

13) 小沢貴明・山田一夫・一谷幸男 : ラットの遅延挿入放射状迷路および自発的位置再認課題の遂行に及ぼす蛋白質合成阻害薬海馬投与の効果 日本動物心理学会第 69 回大会 岐阜大学 (岐阜県) 2009. 9 月

14) 林 和子・一谷幸男 : ラットの空間的作業記憶における腹側海馬NMDAおよびAMPAレセプターの役割 第32回日本神経科学大会名古屋国際会議場 (愛知県) 2009. 9 月

15) 小沢貴明・山田一夫・一谷幸男 : ラットの長期空間的作業記憶の処理過程における海馬内新規蛋白質合成の役割 第 32 回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 (愛知県) 2009. 9 月

16) Hayashi, K., Yoshihara, T. & Ichitani, Y. (2009) Differential effects of NMDA receptor blockade in the prefrontal cortex and hippocampus on spatial working memory in rats. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS 2009). Kyoto.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

一谷 幸男 (ICHTANI YUKIO)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号 : 80176289

