

マイクロダイヤリシス法で獲えた弁別学習課題により起きる神経伝達物質の変化

野村 正彦

(埼玉医科大学第一生理学)

I. はじめに

分子モニタリングを論じるときに、文字通り分子レベルの物質変化を時間の経過とともに追求して行って、生体に何が、どのように変化し、その結果何が分かったかを知ることが可能であれば、こんな理想的な実験方法は他にないと考えられる。例えば、動物が一步前に進もうとした、これは脳内で GO の命令が発せられたために、身体の中で“足を前に出せ”と言う命令が、大脳から足へ向けて送られるのである。しかし、足だけでなく、足を前に出すと、反対に腕は足の前に出たと同じだけバランスを取るために、後ろに向かって交互運動が起きなければ、一步前へ進めないし、またバランスを崩して転びかねない。しかし、分子レベルと言っても、原子・分子・細胞と言った、各々の言葉の意味に対応するレベルでモニタリングが出来ているのであろうか疑問である。事実、compute tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), positron emission tomography (PET) 等で、臓器内の真の分子運動変化を、正確に捉えている物もある。しかし、現実にはそこまで到達できていないのが事実である。

ここで述べる“学習・記憶の分子モニタリング”は以上の見解からすると多少かけ離れていることを断っておかねばならない。新しい一つの実事なり物事の名称なりを、学習したばかりの時点をも、仮に設定してみよう。インプットしたばかりのこの“事実”は、個体の脳内に初めて入力された物なら、確かにこれは覚えておかなければならないとの判断の上、短期記憶の事象として記憶するよう働くはずである。この時点の、各々の脳部位での、学習過程と記憶過程

が随時、分子レベルの変化として捉える事が可能であれば申し分ない。しかし、いくら発達した function MRI (fMRI) だとしても、これが海馬の CA1 領域のどの細胞の、更にどの分子内での変化であると言う事までは、残念ながらモニタリングはできない。

そこで、脳を対照として、また学習・記憶に関与する変化を分子レベルでモニタリングするには、以下に述べる神経活性物質その物を測定する事によって、何がどのように変化したのか測定できる唯一の方法であると考えられる学習・記憶の分子モニタリングを紹介する。それは、まさしく microdialysis と言う、透析膜を装着したプローベを使い、目的の脳内部に挿入をして、それに接している数百数千かあるいは数万の細胞から遊離された神経活性物質を灌流した後、回収をして集めた試料を分析して、定量する方法である。

II. 概要

MICRODIALYSIS 透析膜

A. 活性物質を生体から直接測定する

目的とする部位が、“脳”であればその組織全てを取り出し、分析・定量する方法がある。しかし、これでは in vivo の状態でしかも経時的に測定することは不可能である。生きていてこそ可能性が生じる。そこで、灌流を利用する方法が考え出された。

1. 灌流するために、生理食塩水、リンゲル液あるいは人工脳脊髄液を生体中に流し込み (push), その部位から導出してきた灌流液を採取する (pull) 方法が始まりである [1]. この push-pull を組み合わせることにより、採取したい目的の部位から目的とする試料を採取する

方法が Ungerstedt & Pycock [2] により開発されて in vivo dialysis 法がはじまった。

2. 分析能力と検出感度の精巧さが high performance liquid chromatography (HPLC) の急速な発展と工夫によって、微小部位の微量試料からでも充分分析と定量が可能になり、これを MICRODIALYSIS 法と呼ばれるようになった。これは、in vivo の条件下で、しかも free moving を維持しながら試料を採取できる利点が十分に生かされ広く使われるようになった。

B. 透析膜の種類

強力な分析の精度と微量中の試料でも定量が可能になり、透析膜にも種々の工夫が試みられて、急速の進歩を遂げた。Microdialysis のプローブは多種類のものが工夫されている。その装置は大きく分けて 5 種類の型があり、目的に応じてそれぞれの型が使われている [3]。

1. TRANSVERSE 型：この型は最も基本的なもので、脳を含むある一つの臓器を貫通させて灌流液を採取するものである。脳では左右を貫通させ流入側と貫通した流出側にいたる、全ての貫通経路中に透析膜を装着して灌流液をできるだけ多く採取する事が可能であり、大量の灌流を行える利点がある。

開発された当初は、透析膜部分から灌流して得られた試料は出来るだけ多めに越したことはない。その為に、回収して集めた量をできるだけ多く得るために、使用された。その後、脳の目的的部位を選んだ方法が求められた。

2. U字型：流入側と流出側を並列させて灌流する。その先端部位のU字をした部分に透析膜を装着して灌流液を採取する。

3. I字型：I字型をした内外2重の管チューブの先端の一部が透析膜を装着したものである。灌流を行う部位と量が著明に制限されるが、限られた局所を的確に決めて、定位置での採取が可能であるため測定部位の精密度が非常に優れている。

4. REMOVABLE 型：ガイド型で固定をしておき、測定時のみ透析膜のプローブと置き換え

る型である。手術によりプローブを植え込んだ時点と、実際に灌流をして測定を行う時点とを、自由に操作できる利点が大きく、最も広く利用されている型である。

5. プローブ本体に側枝の管が別に付けた型：この側枝の管が重要であり、灌流操作中に側枝から、薬物や活性物質等種々の作用する物質を注入することにより、反応作用系を直接調べる事が可能な型。

以上回収した試料の分析と定量するための機器の感度が改良を加えられ、特に発展した。そして、ごく限られた小部位から少量の試料でも分析と定量が可能になった。

C. 実際の使用例

1. 対照となる動物の種類

使用されている報告例の多いのはラットであり、盛んにラットを使つての研究が行われて来たことが分かる。

a. ヒト：Human はスウェーデン等で、伝統的に脳疾患の焦点を追跡した治療を目的に、人への応用も積極的に行われている。それはアルツハイマー病、癲癇やパーキンソン病患者の脳に直接 microdialysis を試行した報告がある [4,5]。例えば、パーキンソン病患者の脳内でドーパミン量の過不足の測定をモニタリングを行いながら、治療として使用するドーパミン量を定める等の適切なる治療に直結させる利用が行われている [6]。

b. サル：高次の脳機能を詳細に調べるのに不可欠の動物であり、多くの論文がある [7,8]。特に、両手を自由に操作でき、知能が高く課題が豊富に選べるのが最大の長所であり、種々の成果が期待される。

c. ウサギ [9,10] とネコ [11,12]：動物がある程度大きく、脳の局在部位と神経経路網関係を追求することが可能であるために、初期には良く使用された。瞬目反射等を条件反射として記録が比較的簡単に行えるために、実験例の報告が多い。

d. イヌ [13]、ヒツジ [14]、ブタ [15]：更に

大型の動物であるため、人の臓器移植等を念頭に置いた実験が考えられて来た。例えば、ヒツジに人工心臓を移植して、何日間生存したか、またその間の各臓器がどのように適応して行ったか等はモニター法を導入することで、全身の臓器の経過を観察できるだけでなく、応用範囲とその意義が数量化でき、豊富な資料のもとで評価できる意義深い実験系である。

e. 以上の他には哺乳動物に限らず、ヤツメウナギ[16]や鳥類の報告もある。例えば、孵化後、最初に眼に入力した映像を、追跡する習性を利用した“インプリンティング”をモニターした報告がある[17]。

f. マウス：また最近、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスが、分子生物学の急速な進歩と発展のため、各研究室レベルで盛んに作成できるようになった。そして、その“機能は”と言うと分子レベルでの物質や酵素や活性物質を変化させ、それによって生じた機能変化を知る必要性が大きくなってきた。これらを全てモニタリングを行い、その一端である脳の機能はと言えば、学習と記憶の実験系に持つていければ願ってもないところである。その為、当研究室で新たに高次の学習系を評価するマウスの実験系を確立した[18]。今後の多方面への応用が実現できるのを期待している。

2. 臓器の種類

対照となる臓器や組織は全てのあらゆるものに適応する可能性があると考えられる。脂肪組織[19]、心筋、[20,21]、副腎[22]、胃や腸管[23,24]、眼[25]、脊髄[16,26]や脳脊髄液[13]から、血液[13,19]からも測定が可能である。従って、臓器単位のみならず、移植を目的にした移植組織[27,28]が、移植後経過を含めて、極微小の組織からでも、その機能を維持していれば簡単にその動態を追跡することが可能である。

動物の組織に限らず、植物への測定応用例として、リングから分析した報告がある[29]。

III. 実験方法

学習実験および学習遂行時の神経伝達物質測定方法の実際例を示す。測定する物質は、早くから脳の機能を反映する意味から注目されてきたアセチルコリンの報告が非常に多く認められる[30,31]。また、測定の容易さからアミン類に関する報告も多い[32,33]。更に、アミノ酸、ペプチド、またオピオイドにおよぶ神経伝達物質と考えられている種々の測定可能な物質[11,26,34-38]は次々と工夫がなされ、測定が可能になってきた。また、アミノ酸代謝に関与するグルタミン酸受容体(NMDA)が酸化窒素(NO)と関与することが、学習・記憶の発現系で報告がされはじめ関心を集めている[39,40]。

今回は実際に手がけてきたアセチルコリンとモノアミンに限って述べる事にした。

A. 学習実験：

実験には無処置のままの実験動物を検体として、透析膜グローブを直接生体内に挿入する系と、既に学習課題や自己刺激条件を習得させた等の特定の処置を施した実験動物を検体として使用する系とがある。

ここでは、後者である学習課題を修得させた学習完成後のラットを使った症例を紹介する。

1. Mult 学習課題

1) 実験には12週齢の Fischer 344 ラットを使って、ラット用スキナー箱に設置してあるレバーを押せば、その報酬として餌ペレットが呈示される正の強化課題下で行った[41]。ラットが学習をする手がかりには、スキナー箱内に設置してあるルームランプの ON 及び OFF を対応させ、ON 時のレバー押し反応には餌強化を、OFF 時のレバー押し反応には餌強化をしないという課題とした。当研究室で行っている課題は多元変時強化学習課題(Multiple Variable Interval 15 seconds Extinction Discrimination Schedule)で、これを Mult 学習課題群と呼ぶ[42]。そして、スキナー箱のランプが ON 時に、レバーを押せば平均15秒に1度の餌強化が呈示

される時間の因子があり、OFF 時には餌強化が行われない課題である。

2) 一つの応用例として加齢によりこの学習課題の成績がどのように変化するかを24月齢のFischer 344 ラットを使って調べた。

2. Mix 学習課題：

もう一つの課題はランプはONのまま、餌強化はMult 学習課題群と同様に従来の課題通り行う、混合変時強化学習課題(Mixed Variable Interval 15 seconds Extinction Discrimination Schedule)である。これを Mix 学習課題群と呼ぶ[43]。この課題は、ラットはいつ餌が強化されるか否かは認識していない、学習課題の存在しない課題である。以上の二つの課題をそれぞれ2群に分けたラットに試行して、30日間連日連続して行った。以上の2種類の学習課題の概略を図-1に示した。

B. マイクロダイヤリシス法：

1. 透析膜プローブ装置

学習課題終了後のラットを麻醉下に、透析膜プローブを挿入する為に脳内に特定した部位を

設定し、脳地図は Paxinos & Watson [44] によった。定位脳固定装置のもとにステレオタキシックにガイドカニューレを装着する。そしてラットを両側の耳固定バーで固定し、内耳の固定により基線が決定すれば、これを基準位置 Bregma と決める。この位置からの上下前後左右の距離によって、それぞれ目的の部位を決め、定位脳固定装置のもとに3次元に場所が決定できる。そして、目的点にガイドカニューレの先端を進める。先端の確定が行えると、定法に従って歯科セメントで外管を含み固定する。

通常よく使用されている、ラット脳内灌流による試料採取と試料分析を、当教室で実際行っている学習課題遂行中の実験系の概略図を図-2に示した。また、ラット海馬から灌流実験を行っている Microdialysis 装置図を図-3に示した。

2. 学習課題遂行時の脳内神経伝達物質の同時測定

学習課題遂行時の脳内神経伝達物質の測定までの時間経過を明確にするために、その手順を図-4に示した。

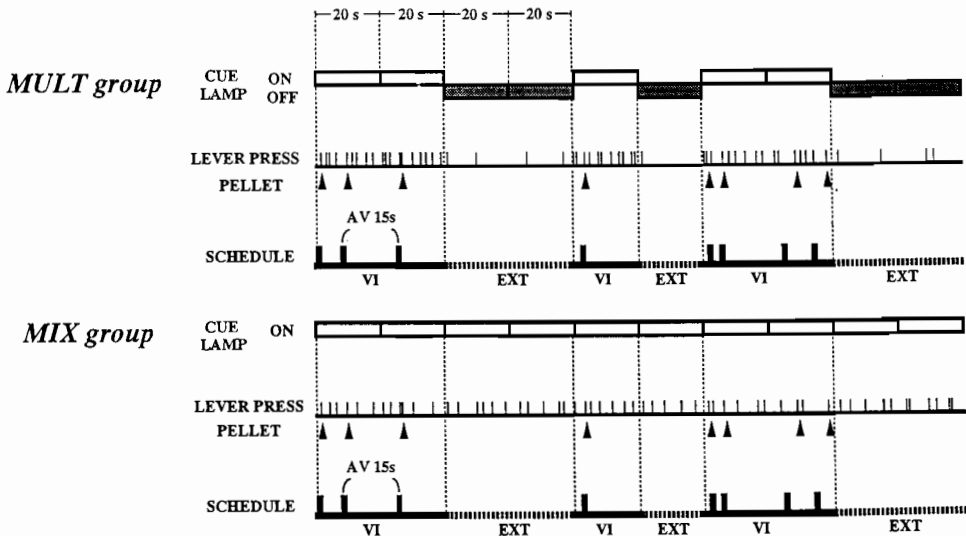


図-1. オペラント型弁別学習課題。

オペラント型弁別学習課題はスキナー箱内にあるキューランプのON (S+)時に餌を呈示して強化(R+)、およびOFF (S-)時に餌を呈示しない(R-)条件下で行い、これをMULT 課題とした。MIX 課題はランプがON のみの条件下で、MULT 課題と同様に(R+)と(R-)を呈示して、弁別学習課題のみが存在しない。

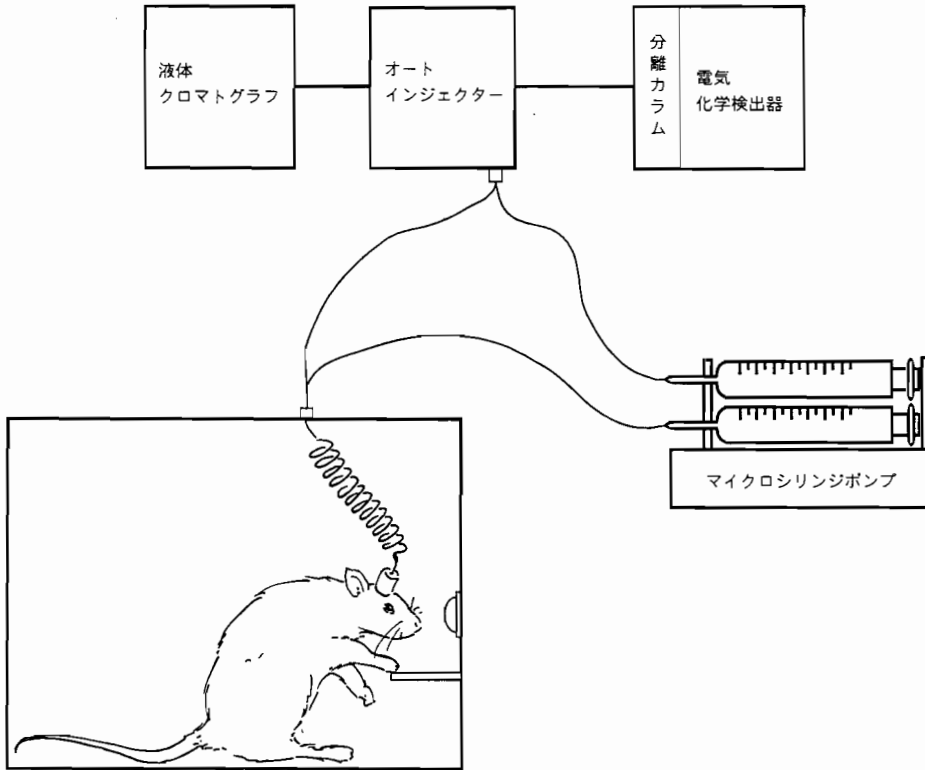


図-2. オペラント型スキナー箱と脳内に装着したマイクロダイヤリシス法から採取した灌流液を試料として、液体クロマトで分離分析定量する概略図。

オペラント型弁別学習課題はスキナー箱前面にあるキューランプのON (S+)時およびOFF (S-)時に対応して、レバー押し反応を餌で強化(R+)および強化しない(R-)課題で学習を行った。脳内に装着したマイクロダイヤリシス法により採取した灌流液を連続的に、学習前・学習中・学習後の各条件下で採取して、各々の神経伝達物質を分離分析定量した。

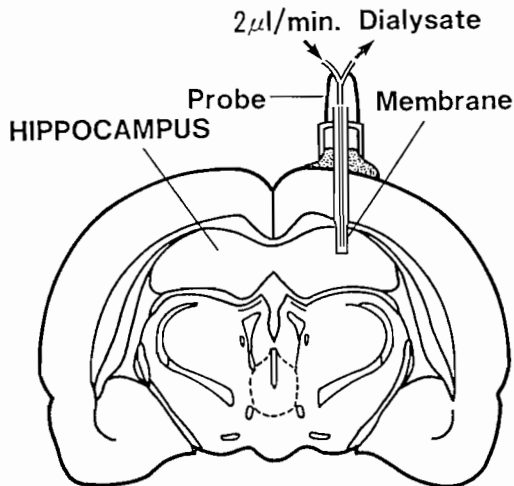


図-3. ラット海馬に固定したマイクロダイヤリシス法により灌流して試料を採取する概略図。

脳地図に従って、特定した部位にマイクロダイヤリシスを挿入し、装着した膜部分から灌流した灌流液を採取し、この中の含まれる神経伝達物質を分離分析定量した。

方法

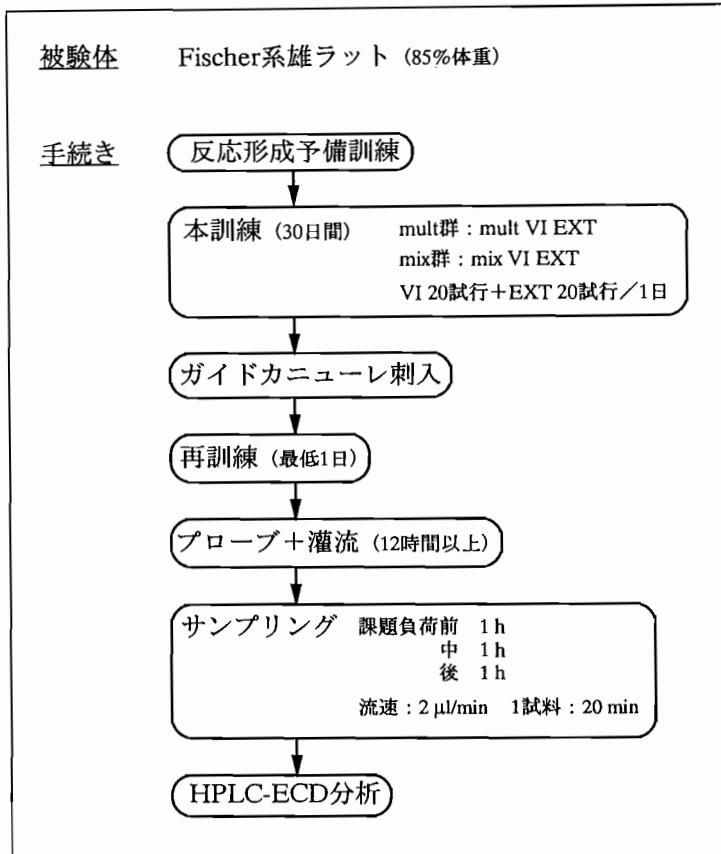


図-4. 学習完成後のラットにマイクロダイヤリシス法を行う装着と灌流による試料を採取する過程。

それぞれの学習課題獲得後のラットに、マイクロダイヤリシス法による透析を行うためのガイドカニューレの装着を行い、学習行動に影響の有無を確認する確認学習実験を行った後、脳内灌流を開始して学習遂行時の試料採取と定量に至る手順。

1) 手術によりガイドカニューレを装着する手術の当日は、学習実験を終了直後に行う。

2) 翌日の手術後24時間経過した第1日目は、通常どおり学習実験を行う。そして、手術による影響の有無を確認するために、手術以前の学習成績と比較検討する。

3) 手術後第2日目は、通常とおり学習実験を行った後、ダミーカニューレを透析膜プローブに交換する。脳内を流速(1 μ l/min.)のリンゲル液で灌流を開始しこれを12時間行う。

4) 手術後第3日目は、脳内灌流の流速(2 μ l/min.)を変えるとともに、学習を行うスキナー

箱にラットを移動する。

灌流12時間後に、学習実験遂行時の脳内神経伝達物質の測定を行うため、

a) 1時間前から、各20分づつの試料をそれぞれ採取を開始する。これを、学習課題負荷遂行前の試料とする。

b) 続いてスキナー箱にレバーを自動的に出して、ルームランプのON及びOFFが呈示される課題を遂行する。課題の負荷時間は1時間行い、学習開始前と同様各20分づつの試料を採取する。これを、学習課題負荷遂行時の試料とする。

c) 1時間の学習課題終了後、自動的にレバーがスキナー箱外に引っ込めて、更に1時間各20分ずつの試料を採取する。これを、学習課題負荷遂行後の試料とする。

以上の3条件下の3試料ずつ、即ち9試料を定法に従って、各種神経活性物質を分離・分析および定量する。定量にはHPLC(高速クロマトグラフ)を使って、目的に適った物質を測定する。

IV. 学習と脳内神経伝達物質の変化

1. 学習課題遂行時の脳内神経伝達物質の変化の評価

各々20分間ずつ採取した試料は、灌流速度が(2 μ l/min.)であるために、40 μ lの容量として最終的に集める。これを試料として、現在行われている分析能力精度から見ると、充分の試料の分量とその中に含まれている神経活性物質量が集められており、これらを正確に分析および定量する事が可能である。しかし、一匹の個体から、学習前値が3、学習中値が3、学習後値が3試料ずつしか得られないために、それぞれの3条件下の3試料を平均化して比較する方法が一般的に行われている。即ち、学習前値を100とした場合、学習中値がどれだけ変化し、また学習後値がどのようになるかを比較するのである。此の表現方法で、実測値の変化と、学習課題負荷による時間経過の両方を同時に知ることが可能になる。

2. 脳内灌流液中に採取された試料が本当の学習課題負荷による変化を捉えているか。

此の課題は非常に重要である。即ち、学習行動を起こした為に生じた種々の脳内変化を、正確に捉えていなければならないが、はたしてそれができているだろうか。例えば、報酬である“餌ペレット”を獲得する為の動きを伴う運動、レバー押しや餌そのものを食べる動作からの変化を、神経活性物質変化として拾っていないだろうかと言うことである。これははっきりと確認しなければならない。

ここで是非引用しなければならない Hernan-

dez & Hoebel[45]の論文がある。学習実験中の脳内モノアミン量変化を microdialysis で見事駆使して捉えた報告である。スキナー箱内にランプを ON して、レバー押しに対して餌を与える課題である。その実験結果はレバー押しで脳内側座核にモノアミンが有意に増加を示し、ラットが明らかに餌の獲得できる条件を学習した為の変化のように見えた。しかし、同一条件下でレバー押しまで行わせたが、餌の呈示のみをしなかった時、モノアミンの増加は見られなかった。ここで起きた違いは何か、モノアミンの増加は餌を食べたか否かの違いで起きた可能性は否定できない事が分かった。この問題は非常に重要である。即ち、単にスキナー箱のレバー押しに対して餌を食べた為に起きた現象を、捉えただけであって、学習をした為に起きた変化を捉えたのではなかったのである。従って、この時までには多くの論文報告があったにもかかわらず、以後この学習・報酬系で起きた脳内神経活性物質変化を追求した論文が見られなくなった。この方法では、本来の学習による脳内変化を捉えられない事が分かった。餌を摂食した因子を捨てるのではなく、真の学習による変化を捉えなければならないとの考えで、次の実験課題を考え出した。即ち、当研究室で行ってきた学習実験系である Mult 学習課題に対して、もう一つの課題はランプは ON のままで、餌強化は Mult 学習課題群と同様に従来の課題通り行う、混合変時強化学習課題(Mix 学習課題群)である[43]。この課題は、ラットにはいつ餌が強化されるか否かは認識することができない学習課題の存在しない課題である。以上の二つの課題をそれぞれ、2群に分けたラットに試行して、30日間連日連続して行った。これらの2群の結果を以下に示す。

V. 結果

A. 学習成績

1. Mult 学習課題：

全ての学習実験は飽食条件下の体重が85%になるまで1週間餌を制限した後、開始した。

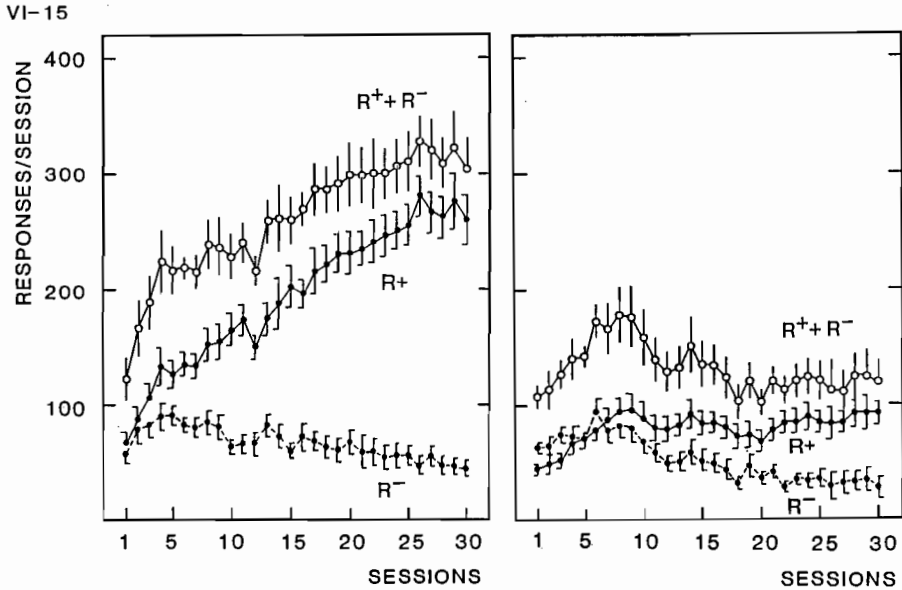


図-5. オペラント型弁別学習課題成績の加齢変化 1.

若齢ラットは3月齢、老齢ラットは24月齢のオペラント型弁別学習課題を、30日間連続して行った。その間の成績を、正の反応数(R+)と負の反応数(R-)は黒丸で示し、総反応数は白丸で示した。

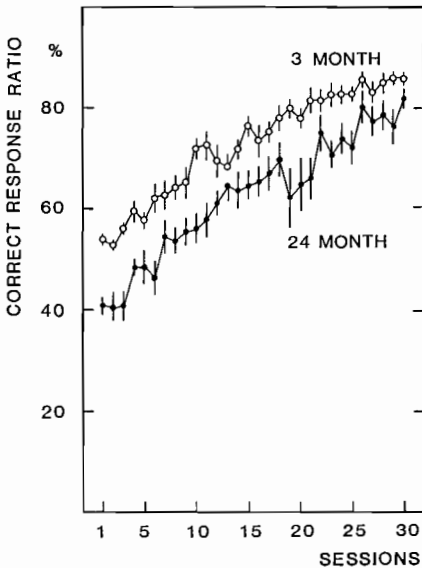


図-6. オペラント型弁別学習課題成績の加齢変化 2.

若齢ラットおよび老齢ラットのオペラント型弁別学習課題を、30日間連続して行った。成績は、正の反応数を負の反応数で除する正反応率 $\{(R+) / (R+) + (R-)\} \times 100$ で表現し、学習能力の指標とした。

1) 生後12週齢時に学習が開始できるようにした Fischer 344 ラットを10匹若齢群として用いた。

学習成績は図-5左に示した。図中にある黒丸を実線で結んだのは正の反応数であり、レバー押し反応に対して餌強化がされる。一方、黒丸を点線で結んだのは負の反応数であり、レバー押しに対して餌強化されない。白丸は総反応数であり、正と負両者の和である。学習成績の指標となる正反応率は正の反応数を総反応数で除した値である。これを、生後24月齢時との両齢群で比較して、図-6に示した。

2) 24月齢 Fischer 344 ラットを10匹老齢群として用い、加齢による変化を比較し図-5右に示した。反応数はいずれも、老齢群では著明に低下を示し、特に正の反応数が10日目以降から増加を示さなかった。従って、正反応率は低いまま推移した。

2. Mix 学習課題：

生後12週齢 Fischer 344 ラットを2群10匹、同一条件下で、Mult 学習課題群と比較し図-

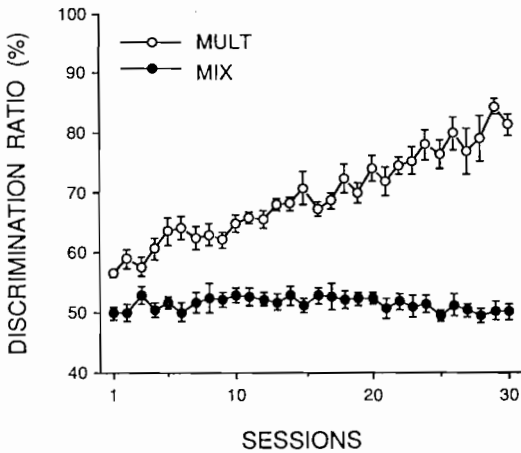


図-7. オペラント型弁別学習課題である多元変時強化学習課題 (MULT 課題) と混合変時強化学習課題 (MIX 課題) の学習成績。

3月齢ラットを2群に分けて、1群はMULT課題、他群はMIX課題をそれぞれ30日間行い、2群の学習成績を正反応率で比較した。

7に示した。

B. 脳内神経伝達物質の変化

1. 脳内モノアミン量の変化

ラットが30日間学習実験を行った後、microdialysis法で脳内モノアミン量を測定した。

1) 脳内部位差による脳内モノアミン量の変化

脳内の学習に関与していると考えられる海馬、扁桃体および視床前核各部位から採取した試料を、学習前値および学習中の含有量の変化を測定をした。学習前値を白のカラムで、学習中の値を斜線カラムで図-8に示した。量的な数値の大小に差があったが、学習制御に関与していると考えられる各部位で、dihydroxy phenylacetic acid (DOPAC), homouanillic acid (HVA), 5 hydroxy indole acetic acid (5 HIAA) 量はいずれも学習前値に比べ、学習中の値は著明に増加を示した。

2) Mult および Mix 学習課題遂行時の時間の経過とともに変化する経緯を詳細に見るために、扁桃体 DOPAC 量を経時的に図-9に示した。Mult 学習課題では学習前を100として、学習開始と併に300から800へと著明に増加した。

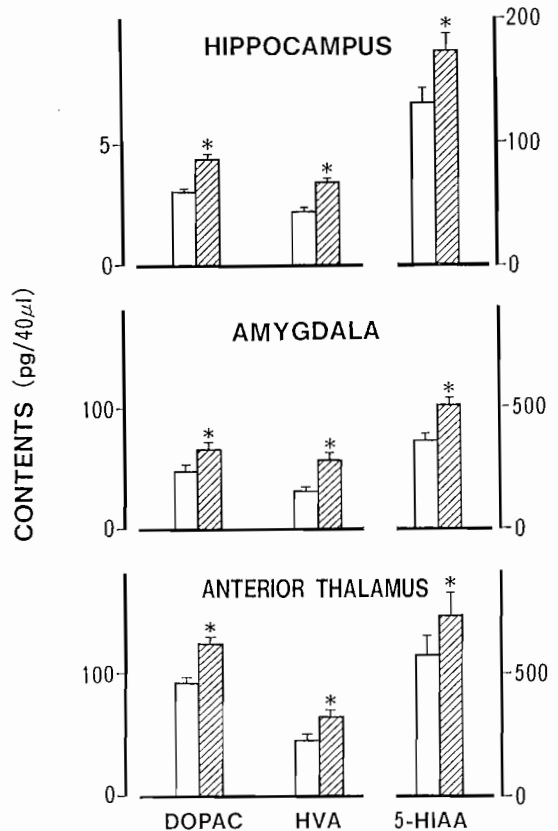


図-8. オペラント型弁別学習課題遂行時の脳各部位での神経伝達物質の変動。

学習前および学習課題遂行中の脳各部位での神経伝達物質の変動を、学習機能に関与すると考えられる、海馬・扁桃体・前視床核でマイクロダイヤリシス法による透析法で測定した。各試料は灌流して採取した20分間の試料中に含まれる量を示した。

そして、学習終了とともに急激に減少した。一方、Mix 学習課題では学習中および学習終了後も変化が全く見られなかった。更に、症例数を増やして、dopamine (DA), DOPAC および HVA 量を測定した。前2者の学習中の著明な増加と HVA 量の増加を認めた。一方、Mix 学習課題では変化がなく、これらを図-10に示した。

2. Mult および Mix 学習課題の違いにより何が分かったか

学習制御に関与していると考えられる海馬部位で、明らかに学習課題のある Mult 学習課題でのみモノアミンの変化があり、課題の存在し

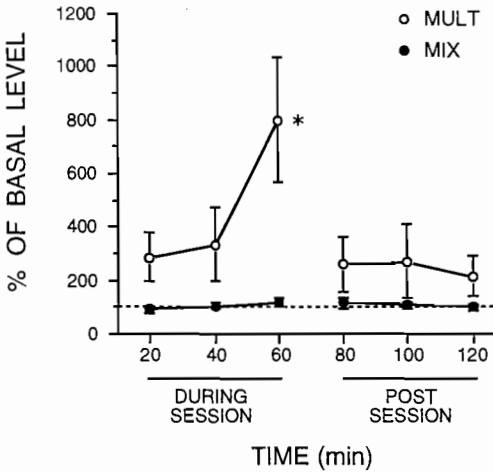


図-9. オペラント型弁別学習課題遂行時の海馬での DOPAC 含有量の経時の変化。
 学習前値を100として、学習課題遂行中の60分(20分づつ3試料)に続き、課題終了後60分の経過中、それぞれの時間での DOPAC 含有量の経時の変化を、MULT 課題群と MIX 課題群で比較した。

ない Mix 学習課題では認めなかった。はたして、両者から得た結果は本当だろうか。学習中に行った、レバー押し運動や餌を食べた等の他の因子が、強く影響を及ぼしていないのか疑問が残る。そこで、学習課題を行った、前・中・後すべての間に2群課題間にラットが示した全ての動きを比較した。即ち、レバー押し総数とその間食べた総餌の数を学習成績である正反応率と共に図-11に示した。正反応率以外は、有意差検定では差を示さなかった。このことは、学習課題の存在の有り無しにより、起きた変化であって、レバー押し回数の変化や獲得した餌の数の違いではなく、所定部位でのモノアミンの変化が起きたことが分かった。

3. 脳内アセチルコリンの変化

学習中の中隔-海馬領域のアセチルコリンの変化を測定した[46]。

脳内アセチルコリンはモノアミンと異なり、種々運動系の変化を敏感に捉えているかも知れない。これを確認するために、Mult 学習課題と Mix 学習課題とを平行させて行い、脳内アセチルコリン量の変化を測定した。

その結果は、モノアミンと同様に学習課題遂行時に明らかな増加を示し、神経伝達物質として DA と共に関与していることが考えられた。そして、学習課題遂行前に比較して Mult 学習課題中に高い値を示し、Mix 学習課題との有意差を示したことは意義深い。これを図-12に示した。

更に、学習形成時期に起きる脳内変化を中心に調べる目的で、連続強化学習 (CRF: continuous reinforcement) 時の前頭前野部位での脳内アセチルコリンの変化を図-13に示した[47]。即ち、レバー押しの獲得において、これを制御していると考えられる前頭前野部位で、

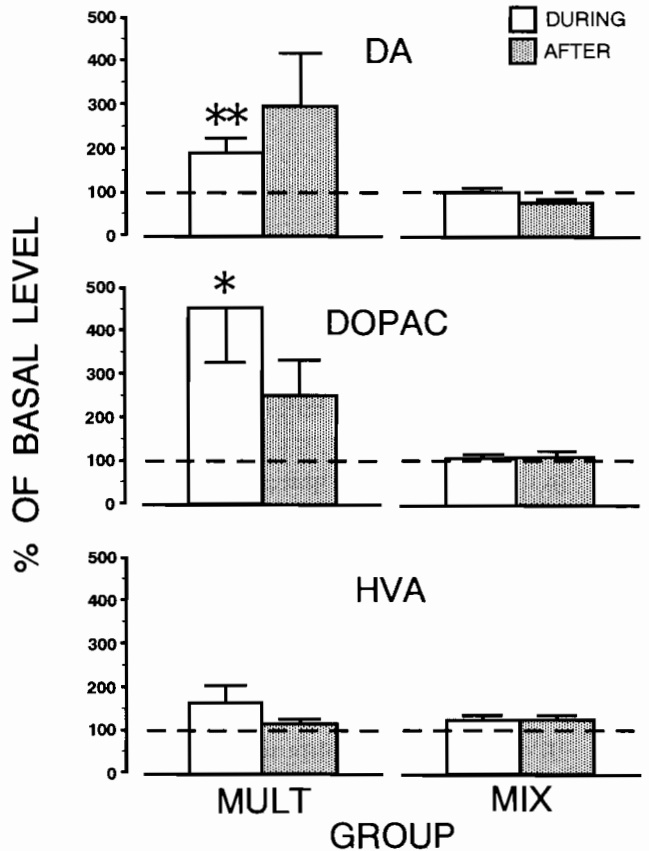


図-10. MULT 課題群と MIX 課題群間で学習前・中・後の時期の扁桃体での DA・DOPAC・HVA 量を比較した。
 学習前値を100として、学習課題遂行中の60分(20分づつ3試料)を一つの値に表現し、課題終了後60分の値を学習後値として、それぞれの物質の変化を、MULT 課題群と MIX 課題群で比較した。

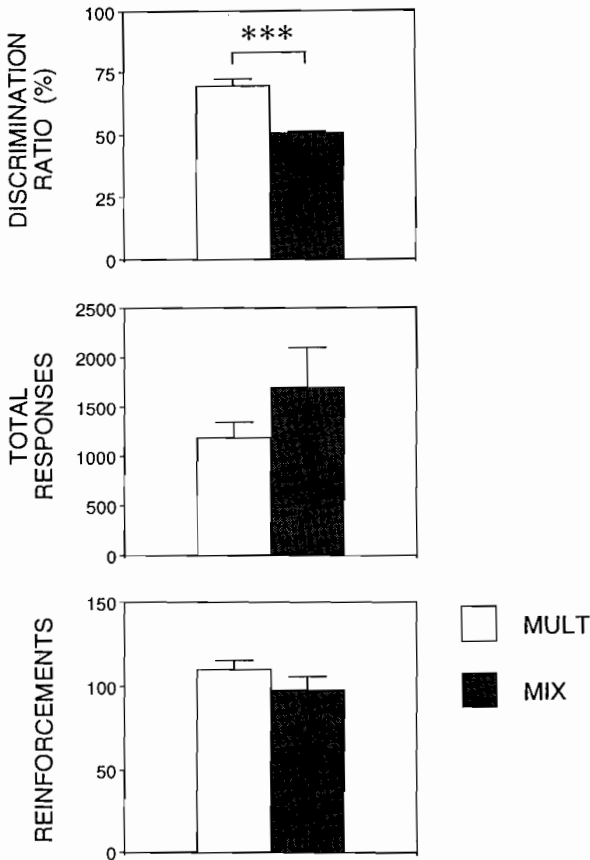


図-11. MULT 課題群と MIX 課題群間で、学習課題遂行中に示した正反応率、総反応数および獲得した餌の数を比較した。

MULT 課題群において、学習を獲得したことを示す正反応率にのみ有意差を示し、レバー押し回数および餌を食べた数には有意差を認めなかった。

著明なアセチルコリン量の増加を認めた。また、図-14に示したドーパミン量の変化は同様に、レバー押し学習課題を行っている際に於いてのみ、学習前・後時よりも有意に増加を示した。これらの結果は学習形成時期に於いても変化を捉えたのみならず、長期に及び形成された学習・記憶過程へと繋がる連続学習完成時期にも、同様の変化が起きていることは重要である。

VI. 種々の応用例

モニタリングを最大限に利用して、脳内の学習・記憶のありさまを直接みえる“モノ”とし

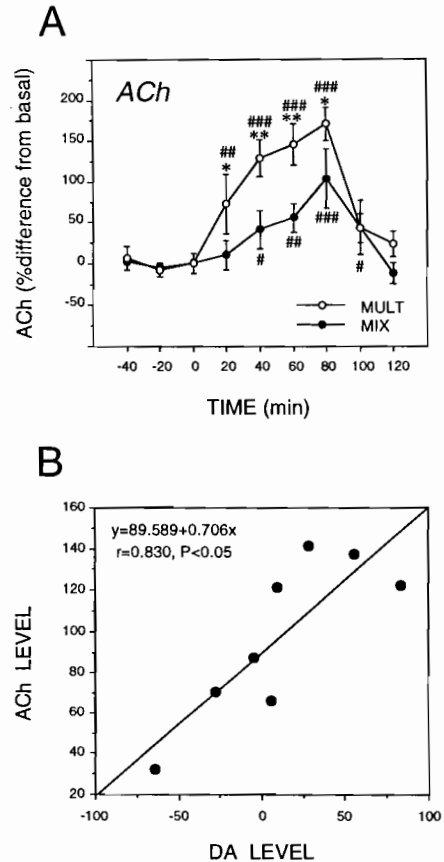


図-12. MULT 課題群と MIX 課題群間で、学習課題遂行時に示した海馬の ACh 量および DA 量の変化。

学習課題遂行時には、著明な ACh 量の増加と、これに続く DA 量の変化を認めた。そして、この ACh 量の増加は DA 量の変化と相関性があった。

てその実体を捉えたい。それには、今後どう言った課題や試みの可能性が存在するかを考えなければならない。

A. 疾患モデル動物

1. 加齢変化：Fischer 344 は加齢変化を見るときに非常に重要である [48, 49]。12や24月齢と言う年齢まで飼育すると、他の Wistar ラット等は体重700も800グラムにもなる。すると、学習箱内に身動きも自由にできず真の行動変化を調べるには、あまりにも不自然すぎる。しかし、空間認知能力が極端に低下していることを

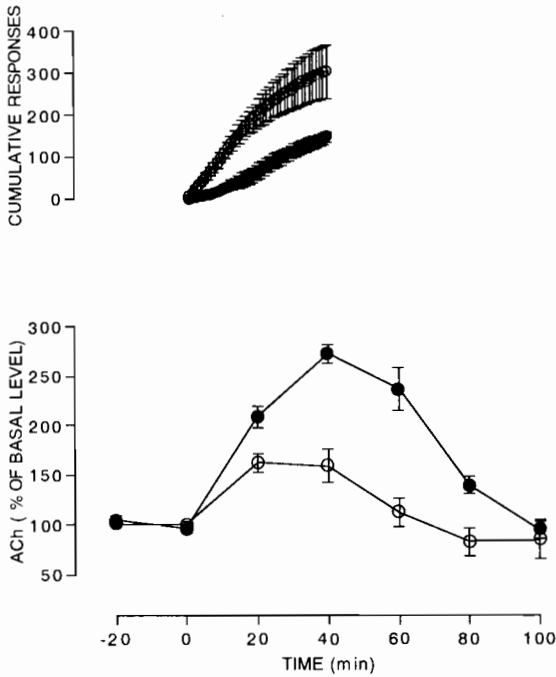


図-13. 初回の連続強化レバー押し獲得課題遂行中(これを獲得課題と呼ぶ), および数回目の課題遂行中(保持課題)の前頭前野皮質での Ach 量の変化.

40分のレバー押しに対して, 前頭前野皮質領域から採取した Ach 量の変化を示した. 初回の連続強化レバー押し獲得課題群は反応数は低いにもかかわらず, Ach 量の変化は急激な増加を示した(黒丸). 数回目の保持課題群は反応数は高いにもかかわらず, Ach 量の変化は50%増加を示した(白丸).

強調して調べた報告が多かったが, 更に多方面からの検討がなされ始めた[48-51]. 学習成績を支える脳内モノアミン変化をモニターリング測定をすることで, この加齢変化を検討した. 図-6で示した学習変化のあった老齢ラットとの比較で, 図-15は海馬内モノアミン量の変化である. 即ち, DA・DOPAC・HVA・5HIAA量の学習遂行時の変化は, 3月齢が24月齢に比較していずれも著明に増加を示した. この時の, 学習成績を正反応率で示すと, 加齢によるモノアミン量の変化の減少と, 学習成績の低下とを認め, これは意義深いことである.

更に, 図-15では, 若齢ラットが示した脳内モノアミン量変化が, 老齢では全く認めなかつ

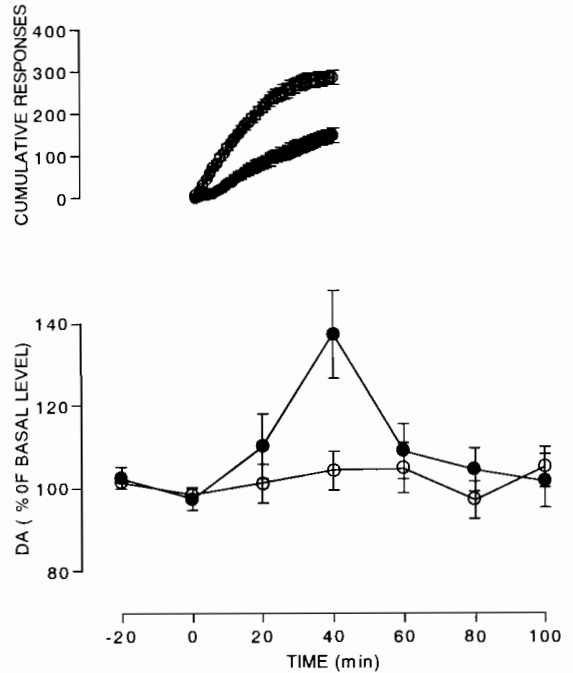


図-14. 初回の連続強化レバー押し獲得課題遂行中(これを獲得課題と呼ぶ), および数回目の課題遂行中(保持課題)の前頭前野皮質での DA 量の変化.

40分のレバー押しに対して, 前頭前野皮質領域から採取した DA 量の変化を示した. 初回の連続強化レバー押し獲得課題群は反応数は低いにもかかわらず, DA 量の変化は急激な増加を示した(黒丸). 数回目の保持課題群は反応数は高いにもかかわらず, DA 量の変化は全く示しなかった(白丸).

た. これは, 図右下に示した, 学習成績が低かったために, 充分量のモノアミン量変化が起こらなかったと考えられ, 非常に貴重な結果である.

2. 高血圧症: Wistar Kyoto (WKY)系から見いだされた高血圧を発症する高血圧自然発症ラット Spontaneously hypertensive rat (SHR)がある. 行動面では多動を特徴としており, 種々のモノアミン系の異常も報告されている[52]. また, その活動性の高さを見るために, 種々の時間や反応頻度の因子を導入して評価する方法がある. そのひとつに定率学習課題 Fixed Ratio (FR)がある. 即ち, FR 50 は第50回目のレバー押しをして, 初めて1個の餌ペレットが報酬として得られる学習課題である. SHRの

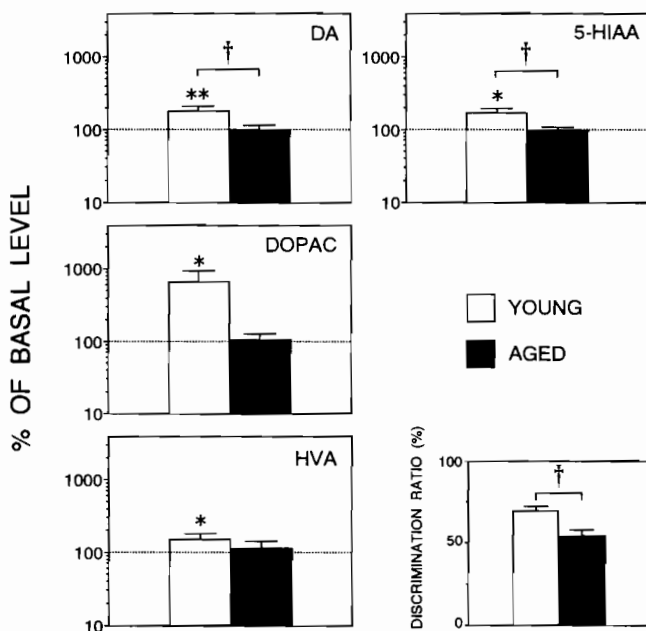


図-15. 加齢変化が海馬での神経伝達物質にどう変化するか。

若齢ラットおよび老齢ラットのオペラント型弁別学習課題を、30日間連続して行った。その間の正反応率は若齢ラット群72%であり、老齢ラット群51%であった。そして、この学習成績を反映して、海馬内 DA・DOPAC・HVA・5-HIAA 量を測定した。若齢ラット群はいづれも、学習成績と平行して著明な増加を示し、老齢ラット群は変化がなかった。

ように活動性が高いラットは絶え間なくレバー押しを続けて、対照のWKYの数倍の反応数を示す[53-56]。

また、定時学習課題(Fixed Interval:FI)と定率学習課題(Fixed Ratio:FR)および定率定時学習課題(FRFI)を組み合わせた課題等がある。例えば、FR30 FI60 はスキナー箱内の左のランプがONの時に30回レバーを押して餌が得られ、右のランプONの時に60秒間経過後の最初のレバー押しに対して餌が得られる課題である。FRは如何に速くレバーを押すか、FIは如何に一定の時間待っているかを評価する複雑な課題である。そして、それぞれの数字はそれぞれの目的にあった課題に対応して選ぶ事ができる[55-57]。高血圧症の病態との変化を調べる事にはじまり、血圧動態を司る自律神経系の変化や、これに作用する薬効効果を用いると、際限なく知りたいこと調べたい事が湧き出てくる[57,58]。

3. 脳虚血：ラットの総頸動脈を結紮することにより、脳内循環血液流量を制限し、脳虚血条件を作成して脳梗塞および脳出血の疾患モデルとする[59-61]。最近、虚血持続時間を変動させた実験系、および虚血処置後の経過時間、即ち数日から数週間の間を変動させる実験系を中心にして、急性および慢性症状を考えに入れた種々の実験系が考えられ大きな評価を受けている[62-64]。

4. 脳部位の神経薬物処置による損傷実験：カイニン酸およびイボテン酸等による、神経毒作用を利用して、神経細胞を局所的に破壊する方法がある[57,65,66]。これは、ごく限られた小さな部位を選定して破壊することができて、好んで使用される実験方法である。

5. 外科手術および電気焼却による損傷実験：神経薬物処置に比較して、脳実質組織・細胞の破壊が広い範囲に及び障害が著明であるので、あまり使用されなくなった。特に、電気焼却で

は神経細胞以外に神経線維やシナプス伝導系の障害が広く著明に起きると考えられている [67].

B. ラットからマウスへの応用

マウスは種々のトランスジェニックやノックアウトマウスが、多く作成されて研究が加速度的に行われている [68,69]. ノックアウトマウスに関しては、その行動解析の標的として処置された“モノ”が出現していないだけでなく、“臓器”や“部位”に至るあらゆる面を選択して、実験者が狙ったものを作り出せる。従って、狙ったものが何の役目を行っているのかと言う“機能”を少しでも早く、かつ確実に調べなければならない。学習と記憶に実験に限ってもこの分野の研究は急速に進んでいる [70-72]. そして、機能面ではマウス水迷路を好んで使用されて来た [69,73]. しかし、運動系に障害があると、いくら目的のゴールが頭で分かっている、身体が動かさずそこまでどり着けない [74-76]. その前に、泳げなければ水中に沈んでしまい、学習の評価どころではない結果を生じてしまう [69,74].

また、学習系には、反応に対して報酬を与える“正の学習系”だけでなく、電気ショック等の罰を負荷して逃避学習や回避学習と言う、それから如何に上手に逃げるか、避けるかを評価する“負の学習系”がある。これらは、予備訓練を含む前処置が単純であるため、好んで使用されてきた [75-77]. しかし、実験動物が学習課題を理解していたとしても、種々刺激—電気ショックや水中に入れる—に対して恐怖を示し、フリージングという立ちすくみ等の種々の行動を起こす動物がいる。これでは、刺激に鈍く、かつ強い動物を学習課題に良く対応した成績の良い動物という結果と評価をしてしまう危険性がある [77]. また逆に、これらの刺激によって、更に攻撃的になってしまうものもある [78].

更に、同じ学習行動を評価するにも、ラットとマウスでは、その表現系が全く、異なっていると言われている [79,80]. その報告によると、

上に述べた、迷路でも、水迷路と水のない迷路で、全く反応が異なる [81]. 従って、電気ショックを与えて、その後の反応を見る等と言った、ストレス下の条件を因子として加えると、両動物間で全く異なった、刺激・反応系を見ていることになる [82,83,84].

C. 今後の展望

以上の方法が今後どのように発展をし、応用が可能であるかが重要である。

1. ラットからマウスへの応用を積極的に進める。

両動物間で、その違いをはっきりさせて、どの学習課題が、どちらの種により適しているか見極めなければならない [85-87].

2. 種々疾患モデル動物を組み入れて、学習を制御している脳部位とそれに関与する活性物質の同定を進めたい [84-88].

3. 学習によって獲得した記憶が、分子レベルであれ、蛋白レベルであれ、また細胞レベルであっても、必ずや“モノ”として同定することが可能であると信じている。従って、学習獲得をした動物は、記憶物質も十分に脳内に発現しているはずである [86,88,89].

Ⅶ. おわりに

学習実験を開始するには、まず摂食と体重制限を行い、レバー押しを自由に行い、実験動物が自分で餌を獲得することを学習させる。これらの前処置とも言う段階を経た後、本実験に入る時間と労力を必要とするオペラント学習である。しかし、好きでもない電気ショックを与えられたり、突然水中へ放り込まれたり、さまざま強要されたのでは、動物もたまったものではない。そこで、実験動物を強制も強要もしないで、また条件刺激も餌を報酬として与えるために、嫌悪なものでないから強制反応ではなく、動物個体の意志で全てが行えるのが著者等が行ってきた学習方法である。このような最良の学習評価の系であれば、多少時間がかかっても、じっくりと時間をかけて、動物の本来の正確な

学習成績の評価と形成された記憶の質的、また量的な変化を正確に確認でき、かつ評価ができれば望むところではないか。

文 献

1. Gaddum JJ: Push-pull cannulae. *J Physiol* **155**: 1-2, 1961
2. Ungerstedt U & Pycock C: Functional correlates of dopamine neurotransmission. *Bull der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften* **30**: 44-55, 1974
3. Benveniste H: Brain microdialysis. *J Neurochem* **52**: 1667-1679, 1989
4. Denman RB, Rosenzwaig R & Miller DL: A system for studying the effect of familial alzheimer disease mutations on the processing of the β -amyloid peptide precursor. *Biochem Biophys Res Comm* **192**: 96-103, 1993
5. During MJ: In vivo neurochemistry of the conscious human brain: intrahippocampal microdialysis in epilepsy. In: *Microdialysis in the neurosciences*, Ed. Robinson TE & Justice JB, Jr, Elsevier Publ Co, Amsterdam, pp 452-442, 1991
6. Meyerson BA, Linderoth B, Karlsson H & Ungerstedt U: Microdialysis in the human brain; extracellular measurements in the thalamus of parkinsonian patients. *Life Sci* **46**: 301-308, 1990
7. Delgado JM, DeFundis FV, Roth RH, Ryugo DK & Mitruka BM: Dialytrode for long term intracerebral perfusion in awake monkeys. *Arch Int Pharmacodyn* **198**: 9-21, 1972
8. Skirboll S, Wang J, Mefford I, Hsiao J & Bankiewicz KS: In vivo changes of catecholamines in hemiparkinsonian monkeys measured by microdialysis. *Exp Neurol* **110**: 187-193, 1990
9. Bradbury MWB, Cserr HF & Westrop RJ: Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. *Am J Physiol* **240**: F 329-F 336, 1981
10. Jacobson I & Hamberger A: Veratoridine-induced release in vivo and in vitro of amino acids in the rabbit olfactory bulb. *Brain Res* **299**: 103-112, 1984
11. Brodin E, Linderoth B, Gazelius B & Ungerstedt U: In vivo release of substance P in cat dorsal horn studied with microdialysis. *Neurosci Lett* **76**: 357-362, 1987
12. Sandberg M & Lindstrom S: Amino acids in the dorsal lateral geniculate nucleus of the cat-collection in vivo. *J Neurosci Meth* **9**: 65-74, 1983
13. Bito L, Davson H, Levin EM, Murry M & Snider N: The concentration on of free amino acids and other electrolytes in cerebrospinal fluid, in vivo dialysis of brain, and blood plasma of the dog. *J Neurochem* **13**: 1057-1067, 1966
14. Kendrick KM, Baldwin BA, Cooper TR & Sherman DF: Uric acid is released in the zona incerta of the subthalamic region of the sheep during rumination and in response to feeding and drinking stimuli. *Neurosci Lett* **70**: 272-277, 1986
15. Jarry H, Einsparrier A, Kannpiesser L, Dietrich M, Pitzel L, Holtz W & Wuttke W: Release and effects of oxytocin on estradiol and progesterone secretion in porcine corpora lutea as measured by an in vivo microdialysis system. *Endocrini* **126**: 2350-2358, 1990
16. Brodin E, Tossman U, Ohta Y, Ungerstedt U & Grillner S: The effect of an uptake inhibitor (dihydrokainate) on endogenous excitatory amino acids in the lamprey spinal cord as revealed by microdialysis. *Brain Res* **458**: 166-169, 1988
17. Tsukada Y, Kanamatsu T & Takahara H: Neurotransmitter release from the medial hyperstriatum ventrale of the chick forebrain accompanying filial imprinting behavior, measured by in vivo microdialysis. *Neurochem Res* **24**: 315-320, 1999
18. Nomura M & Hori K: Operant learning tasks for mice: a controlling system and some data. *Abst Inter Congr Physiol Sci PO 91.9*, 1997
19. Arner P, Bolinder J, Eliasson A, Lundin A & Ungerstedt U: Microdialysis of adipose tissue and blood for in vivo lipolysis studies. *Am J Physiol* **255**: E 737-E 742, 1988
20. Hamberger A: Microdialysis in clinical diagnosis: amino acid patterns in the temporal cortex and the myocardium. *Current Separations* **9**: 119, 1989
21. Akiyama T, Yamazaki T & Ninomiya I: In vivo monitoring of myocardial interstitial norepinephrine by dialysis technique. *Am J Physiol* **261**: H 1643-H 1647, 1991
22. Medvedev OS, Kuzmin AI, Selivanov VN, & Sysoev AB: Pharmacological and physiological analysis of catecholamine secretion by the adrenal gland using in vivo microdialysis in the awake rat. *Current Separat* **9**: 89, 1989
23. Bunnett NW, Mogard M, Orloff M, Corbet HJ, Reeve JR & Walsh JR: Catabolism of neurotensin in interstitial fluid of rat stomach. *Am J Physiol* **246**: G 675-G 682, 1984
24. Meirieu O, Pariret M, Sutra JF & Ruckerbusch M: Local release of monoamines in the gastrointestinal tract: an in vivo study in rabbits. *Life Sci* **38**: 827-834, 1986
25. Ben-Nun J, Cooper RJ, Cringle SJ & Constable IJ: A new technique for in vivo intraocular pharmacokinetic measurements. *Archs Ophthal N Y* **106**: 254-259, 1988
26. Khan IM, Marsala M, Printz MP, Taylor P &

- Yaksh TL: Intrathecal nicotinic agonist-elicited release of excitatory amino acids as measured by in vivo spinal microdialysis in rats. *J Pharmacol Exper Therap* **278**: 97-106, 1996
27. Kalen P, Cenci MA, Daszuta A, Lindvall O & Bjorklund A: In vivo microdialysis: a new approach for the study of functional activity of grafted monoaminergic neurons and their interaction with the host brain. *Prog Brain Res* **82**: 329-338, 1990
 28. Sinden JD, Rashid-Doubell F, Kershaw TR, Nelson A, Chadwick A, Jat PS, Noble MD, Hodges H & Gray JA: Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immobilized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience* **81**: 599-608, 1997
 29. Ekulund L & Collin AK: Microdialysis, a new tool for sampling and manipulating internal ethylene concentration in apples. *J Plant Physiol* **137**: 375-377, 1991
 30. Ajima A & Kato T: Brain dialysis: detection of acetylcholine in the striatum of unrestrained and unanesthetized rats. *Neurosci Lett* **81**: 129-132, 1987
 31. Damsma G & Westerink BHC: A microdialysis and automated on-line analysis approach to study central cholinergic transmission in vivo. In: *Microdialysis in the neurosciences*, Ed. Robinson TE & Justice JB. Jr, Elsevier Publ Co, Amsterdam, pp 237-252, 1991
 32. Impero A & Di Chiara G: Transstriatal dialysis coupled to reverse phase high performance liquid chromatography with electrochemical detection: a new method for the study of the in vivo release of endogenous dopamine and metabolites. *J Neurosci* **4**: 966-977, 1984
 33. Di Chiara G: Brain dialysis of monoamines. In: *Microdialysis in the neurosciences*, Ed. Robinson TE & Justice JB. Jr, Elsevier Publ Co, Amsterdam, pp 175-187, 1991
 34. Hamberger A, Berthold CH, Karlson B, Lehmann A & Nystrom B: Extracellular GABA, glutamate and glutamine in vivo perfusion dialysis of the rabbit hippocampus. In: *Glutamine, glutamate and GABA in the central nervous system*, Ed. Herz L, Kvamme E, McGeer EG & Schousboe AF, Alan R Liss, NY, pp 473-492, 1983
 35. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A & Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* **43**: 1369-1374, 1984
 36. Mogensen J, Wortwein G, Hasman A, Nielsen P & Wang Q: Functional and neurochemical profile of place learning after l-nitro-arginine in the rat. *Neurobiol Lear Mem* **63**: 54-65, 1995
 37. Dourmap N, Michael-Titus A & Costentin J: Differential effect of interstitial kainic acid on the modulation of dopamine release by μ - and δ -opioid peptides: a microdialysis study. *J Neurochem* **58**: 709-713, 1992
 38. Vezzani A, Ruiz R, Monno A, Rizzi M, Lindfors N, Samanin R & Brodin E: Extracellular somatostatin measured by microdialysis in the hippocampus of freely moving rats: evidence for neuronal release. *J Neurochem* **60**: 671-677, 1993
 39. Ingram DK, Shimada A, Spangler EL, Ikari H, Hengemihle J, Kuo H & Greig N: Cognitive enhancement: New strategies for stimulating cholinergic, glutamatergic, and nitric oxide systems. *Ann N Y Acad Sci* **786**: 348-361, 1996
 40. Meyer RC, Spangler EL, Kametani H, Ingram DK: Age-associated memory impairment assessing the role of nitric oxide. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 307-317, 1998
 41. Tsukada Y, Nomura M, Nagai K, Kohsaka S, Kawahata H, Ito M & Matsutani T: Neurochemical correlates of learning ability. In: *Behavioral neurochemistry*. Eds. Delgado JMR & DeFeudis FV, Spectrum Pub, N Y, pp. 63-84, 1977
 42. Nomura M: Effects of aspartame on schedule controlled behavior in rats. *Res Comm Psychol Psychiat Behav* **9**: 373-384, 1984
 43. Hori K, Tanaka J & Nomura M: Effects of discrimination learning on the rat amygdala dopamine release: a microdialysis study. *Brain Res* **621**: 296-300, 1993
 44. Paxinos G & Watson C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic press, Sydney, 1986.
 45. Hernandez L & Hoebel BG: Feeding and hypothalamic stimulation increase dopamine turnover in the accumbens. *Physiol Behav* **44**: 599-606, 1988
 46. Yamamuro Y, Hori K, Iwano H, Nomura M: Septo-hippocampal cholinergic system under the discrimination learning task in the rat: a microdialysis study with the dual-probe approach. *Brain Res*. **684**: 1-7, 1995
 47. Izaki Y, Hori K, Nomura M: Dopamine and acetylcholine elevation on lever-press acquisition in rat prefrontal cortex. *Neurosci Lett*. **258**, 33-36, 1998
 48. Ogawa N, Nomura M, Haba K, Asanama M, Tanaka K, Hori K & Mori A: Effects of dihydroergotoxine on central cholinergic neuronal systems and discrimination learning test in aged rats. *Brain Res* **586**: 229-234, 1992
 49. Kametani H, Iijima S, Spangler EL, Ingram DK & Joseph JA: In vivo assessment of striatal dopamine release in the aged male Fischer 344 rat.

- Neurobiol Aging **16**: 639-646, 1995
50. 野村正彦, 加齢と学習・記憶: 神経精神薬理 **18**: 269-275, 1996
 51. Yurek DM, Hipkens SB, Hebert MA, Gash DM & Gehardt GA: Age-related decline in striatal dopamine release and monoric function in Brown Norway/ Fischer 344 hybrid rats. Brain Res **791**: 246-256, 1998
 52. McCarty R & Kopin IJ: Alterations in plasma catecholamines and behavior during acute stress in spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto normotensive rats. Life Sci **22**: 997-1005, 1978
 53. Nomura M & Ohtsuji M: Changes of learning performance in rats with spontaneous hypertension, Hypertensive Mechanisms. In: Eds, Rasher W, Clough D & Ganten D, FK Schattauer Verlag, Stuttgart, 658-661, 1982
 54. 野村正彦, 岡村邦博: 高血圧自然発症及び脳卒中易発症ラットの catechol アミンと学習行動変化, 神経化学 **23**: 147-149, 1984
 55. Nomura M: Effect of nimodipine on brightness discrimination learning test in wistar kyoto and spontaneously hypertensive rats. Arzneim-Forsch Drug Res **38**: 1282-1286, 1988
 56. 野村正彦, 本態性高血圧のモデルとしての高血圧自然発症ラットの, 情動・行動・学習面からの SHR, 医学のあゆみ **189**: 171-175, 1999
 57. 堀 耕治, 田中健一, 和田尚子, 野村正彦, 側座核ドーパミンニューロン破壊はモチベーションを低下させるか? I. 累積比率スケジュールによる検討. 神経化学, **35**: 236-237, 1996
 58. 野村正彦・堀 耕治, 記憶と学習, 生体の科学 **48**: 20-24, 1997
 59. Fisher M: Occlusion of the carotid arteries. Arch Neurol Psychiat. **72**: 187-204, 1954
 60. Volpe BT, Pulsinelli WA, Tribuna J & Davis HP: Behavioral performance of rats following transient forebrain ischemia. Stroke **15**: 558-562, 1984
 61. Hillered L, Persson I, Ponten U & Ungerstedt U: Neurometabolic monitoring of the ischemic human brain using microdialysis. Acta Neurochir **102**: 91-97, 1990
 62. Yamamuro Y, Iwano H, Sensui H, Hori K & Nomura M. Acetylcholine in the hippocampus during the discrimination learning performance in a rat model of chronic cerebral ischemia. Neuroreport **7**: 1837-1840, 1996
 63. Tanaka K, Ogawa N, Asanama M, Kondo Y & Nomura M: Relationship between cholinergic dysfunction and discrimination learning disabilities in Wistar rats following chronic cerebral hypoperfusion. Brain Res **729**: 55-65, 1996
 64. Tanaka K, Wada N, Hori K, Asanama M, Nomura M & Ogawa N: Chronic cerebral hypoperfusion disrupts discriminative behavior in acquired-learning rats. J. Neurosci.Meth **84**: 63-68, 1998
 65. Aggleton JP & Passingham RE: An assessment of the reinforcing properties of foods after amygdaloid lesions in rhesus monkeys. J Comp Physiol Psychol **96**: 71-77, 1982
 66. Nomura M: Schedule controlled learning ability on left-right discrimination in rats after lesion of the nucleus basalis magnocellularis by ibotenic acid. Neurosciences **15**: 160-162, 1989
 67. Joel D, Tarrasch R, Feldon J & Weiner I: Effects of electrolytic lesions of the medial prefrontal cortex or its subfields on 4-arm baited, 8-arm radial maze, two-way active avoidance and conditioned fear tasks in the rat. Brain Res **765**: 37-50, 1997
 68. Hanahan D: Transgenic mice as probes into complex systems. Science **246**: 1265-1274, 1989
 69. Silva AJ, Paylor R, Wehner JM & Tonegawa S: Impaired spatial learning in a (alpha)-calcium-calmodulin kinase II mutant mice. Science **257**: 206-211, 1992
 70. Abeliovich A, Paylor R, Chen A, Kim JJ, Wehner JM & Tonegawa S: PKCg mutant mice exhibit mild deficits in spatial and contextual learning. Cell **75**: 1263-1271, 1993
 71. Tonegawa S: Gene targeting: a new approach for the analysis of mammalian memory and learning. Prog Clin Biol Res **390**: 5-18, 1994
 72. Sakimura K, Kutsuwada T, Ito I, Manabe T, Takayama C, Kushiya E, Yagi T, Aizawa S, Inoue Y, Sugiyama H & Mishina M: Reduced hippocampal LTP and spacial learning in mice lacking NMDA receptor (epsilon) 1 subunit. Nature **373**: 151-155, 1995
 73. Morris RGM: Developments of a water-maze procedure for studying spacial learning in the rat. J Neurosci Meth **11**: 47-60, 1984
 74. McHugh TJ, Blum KI, Tsien JZ, Tonegawa S, & Wilson MA: Impaired hippocampal representation of space in CA1-specific NMDAR1 knockout mice. Cell **87**: 1339-1349, 1996
 75. Anisman H & Wahlsten D: Responses initiation and directionality as factors influencing avoidance performance. J Comp Physiol Psychol **87**: 1119-1128, 1974
 76. Heyser CJ, MacDonald JS, Polis IY & Gold LH: Strain distribution of mice in discrimination Y-maze avoidance learning: genetic and procedural differences. Behav Neurosci **113**: 91-102, 1999
 77. Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL & Wehner JM: Assessment of learning by the morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. Neurosci **80**:

- 1087-1099, 1997
78. Saudou F, Amara DA, Dierich A, LeMeur M, Ramboz S, Segu L, Buhot MC & Hen R: Enhanced aggressive behavior in mice lacking 5-HT 1b receptor. *Science* **265**: 1875-1878, 1994
 79. Whishaw IQ: A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task: some surprising differences. *Physiol Behav* **58**: 687-693, 1995
 80. Bovet D, Bovet-Nitti F & Oliverio A: Genetic aspects of learning and memory in mice. *Science* **163**: 139-149, 1969
 81. Whishaw IQ & Tomie J: Of mice and mazes: similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav* **60**: 1191-1197, 1996
 82. Takahashi JS, Pinto LH & Vitaterna MH: Forward and reverse genetic approaches to behavior in the mouse. *Science* **264**: 1724-1733, 1994
 83. Gerlai R: Gene-targeting studies of mammalian behavior: is it the mutation or the background genotype? *Trends Neurosci* **19**: 177-181, 1996
 84. Roush W: New knockout mice point to molecular basis of memory. *Science* **275**: 32-33, 1997
 85. 野村正彦・堀 耕治・田中淳一, IN VIVO MIC-RODIALYSIS 法による学習行動時の脳内神経伝達物質の定量化, *日本生理学会雑誌* **58**: 281-292, 1993
 86. 野村正彦, 学習と行動, 脳と神経: 分子神経生物学入門. 共立出版(金子・川村・植村編)pp. 72-82, 1999
 87. MacDonald RJ & White NM: Parallel information processing in the water maze: evidence for independent memory systems involving dorsal striatum and hippocampus. *Behav Neural Biol* **61**: 260-270, 1994
 88. Balk JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, LeMeur M & Borrelli E: Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* **377**: 424-428, 1995
 89. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G, Momoli F, Welner SA, Massicotte G, Julien JP & Shapiro ML: Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* **387**: 500-505, 1997