

老齢における脳の空間学習に関する研究

Age-related impairment of spatial learning in mice

プロジェクト代表者：町田 武生（大学院理工学研究科・教授）

Takeo Machida (Graduate School of Sci. & Eng., Professor)

高齢化社会を迎えた今日、「脳の老化」の本態を知り、それに適切に対処することが望まれる。脳の老化機構を解明することは、パーキンソン病やアルツハイマー症など神経変性疾患の治療の糸口ともなると考えられる。

空間記憶・学習の老化では、環境におけるランドマーク（目印）と自身との空間的な関係の想起に障害があることが知られている [1]。加えて、地図を用いた経路の学習において、老化にともない経路の最初の記憶化および記憶から経路のナビゲーションに障害が生じることも知られている [2]。

げっ歯類などの実験動物を用いた研究においても、老化にともない空間学習に障害が生じていることが知られている。モリスの水迷路課題において、老化ラットでは、不透明な水中の避難場所のプラットホームにたどり着く学習能力に障害が生じている [3]。老齢ラットでも、試行全ての成績が低下している訳ではなく、試行の30%で若齢ラットと変わらない成績を示していることから、加齢・老化に伴い空間マップの想起が安定しなくなることが老化に伴う空間学習の低下であると云える [4]。

空間情報が脳でどのように処理されているかを調べるために、大脳辺縁系海馬からの電気生理学的な記録が行われ、自由行動下の動物において環境中のある領域で特異的に活動が高くなる場所ニューロンの存在が知られた [5]。ところが、これらの研究は、専ら若齢動物を用いて行われ、齢の進んだ動物を用いた報告はほとんどない。本研究では、大局的な空間ランドマークのみを設置した新規のオープンフィールド課題を用いて、老齢マウスおよび若齢マウスの空間学習の能力の比較、それらの特徴の解析を行い、さらには、空間学習に深く関わる大脳辺縁系の海馬に慢性電極を置き、場所ニューロンの記録を行い、老齢マウスの空間表現の特徴を解析した。

材料および方法

動物

C57BL/6J 系マウスのオスの若齢 (2-7 ヶ月齢)および老齢個体(18-22 ヶ月齢)を用いた。実験を行なった期間は、食餌制限により体重を通常の 80%程度に維持した。

行動記録の方法

記録装置

内径 59cm、高さ 20cm の透明な円筒を平らな灰色のテーブルの上に置いたオープンフィールドを記録容器として記録室の中央に設置した。記録室の壁および天井は布で覆い、空間認識の手がかりとなるよういくつかの物体を取りつけた。記録室の隅に立てられた支柱からアームを伸ばし、マウスの場所をたどるための TV カメラ、遠隔操作により餌を落とす装置、そして電極とコンピュータを接続するためのコネクタをフィールドの真上に設置した。記録室の四隅からは間接照明を当て、記録容器の床の照度が 7.0 lx になるように調節した (図 1)。

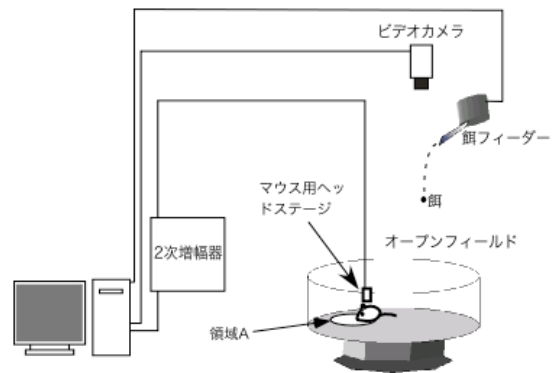


図 1 実験装置の模式図

行動の記録

記録を行なう前後はマウスの入ったケージを不透明な覆いで囲み、記録を始める際には記録容器のランダムな方角からマウスを入れた。

まず記録環境に慣れさせるための訓練を行なった。マウスの走行を促すため、固形餌料の小片を 1-3 分に 1 個の間隔で記録容器内のランダムな場所に落とした。記録は 1 日に 1 回、20 分間行なった。マウスが記録容器全体を訪れるようになると、訓練を次の段階へ移した。

次の段階ではマウスが記録容器内のある場所(直径約 6cm の円領域)を訪れたときのみ餌を落とした。過剰な餌の連続した摂取はマウスの行動に影響するため、1 回の記録は餌が 5 個落ちた時点で終了し、ケージに戻して 1 ないし 2 分おいた。記録は 1 日に 3 回行なった。

電気生理学的手法

電極の作成

電極はフォルムバールによって被覆されたニクロムワイヤ(直径 18 μ m; A-M systems, INC)を 4 本撚り合わせたテトロードを用いた。インピーダンスを下げるため、各ワイヤの先端には金メッキを施した。

手術方法

イソフルランにより麻酔したマウスを定位装置に固定して頭蓋骨を露出させ、ブレグマから後方 1.7mm、右側 1.7mm の位置に孔を開けて電極を挿入した。電極を増幅器に接続して電位を確認しながら、ワイヤの先端が CA1 錐体細胞層に達したと判断される深さで電極を固定した。この深さではリップルと呼ばれる早い電場電位の振動と、リップルと共役した神経細胞の発火が見られる。電極の実際の位置は実験後に組織学的に確認した。電極埋込後、5-7 日間の回復期間をおいてから記録を開始した。

電気生理学的活動の記録とクラスターの分離

電気生理学的活動の記録は行動実験で用いた記録装置を用いて行った。1 回 20 分の記録を 1 日に 2 回行い、1-3 分に 1 個の間隔で餌を記録容器内のランダムな場所に落とした。記録と記録の間は記録容器の壁を不透明な長方形に変え、餌を与えず 20 分間おいた。電極からの信号は増幅器によって増幅してからコンピュータに記録した。このときテトロードの 4 本のワイヤのうち、1 本を比較電極とした。

記録をコンピュータに蓄えた後、非接続の状態でクラスターの分離を行った。クラスターの分離は主に異なるワイヤ同士でのピークの大きさに基づいて計算した。

データ解析

行動データ

マウスの空間学習能力を評価するため、餌が 5 個落ちるまでの時間と経路の長さを求めた。いずれの値も小さいほど効率よく目的の場所に到達できたことを意味する。また、マウスの運動能力を評価するため、個体ごとの各記録における最高速度を求め、さらに実験期間を通じた最高速度を求めた。

電気生理学データ

フィールドを 2cm×2cm の格子に区切り、各ピクセルにおけるマウスの滞在時間、スパイク数を求めた。そして、それぞれにおけるスパイク数を滞在時間で割ることにより発火頻度を求めた。電気生理学的活動の場所特異性についてその再現性を評価するため、2 つの発火頻度地図における対応するピクセルに基づいて発火頻度の相関係数を求めた。そしてさらに相関に伴う天井効果を避け、正規分布を得るためにフィッシャーの Z 変換を行った(similarity score)。

また、一方で coherence を求めた。これはある発火頻度地図において、各ピクセルで隣接する周囲 8 つのピクセル全体での発火頻度を求めてリストにし、元の発火頻度地図と対応するピクセルに基づいて発火頻度の相関係数を求め、Z 変換した値である。coherence は周囲のピクセルの発火頻度が中央のピクセルの発火頻度を反映している度合いを示していることから、発火頻度の局所的な滑らかさが評価できると考えられる。今回の実験では発火頻度地図と coherence を参照し、coherence が 0.24 以上の細胞が場所細胞であるとの基準を設けた。

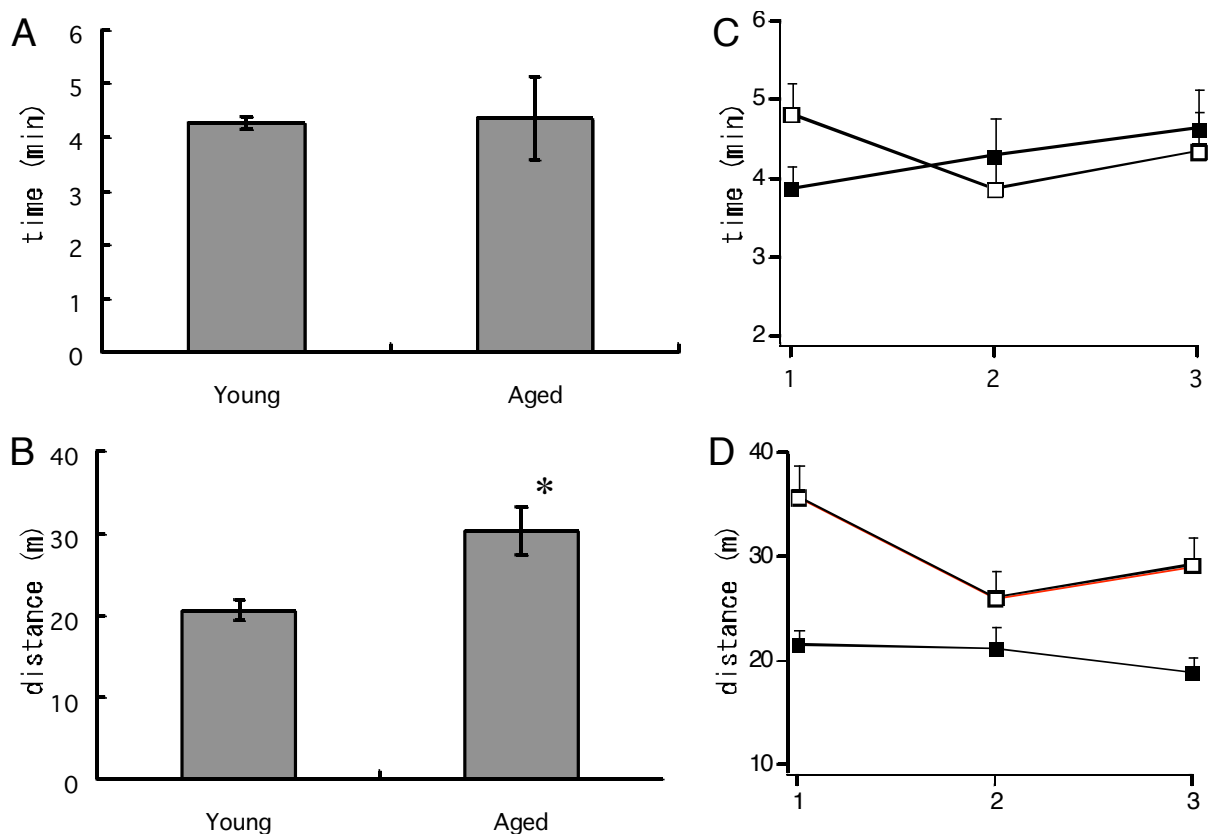


図2 場所課題の成績。A は、課題終了までに要した時間の平均で、Bは走行距離の平均を示す。C は、さらに1日3回の試行における課題終了までに要した時間の平均で D は走行距離の平均を示す。■は若齢マウスを、□は老齢マウスを示す。*はマンホイットニー検定で有意な差 ($P < 0.05$) があることを示す。エラーバーは、標準誤差。

結果

オープンフィールドテストにおける行動の比較

本研究で用いた課題では、オープンフィールド内の指定された領域にマウスが入ると、高い確立で装置の上部に設置してある餌フィーダーから餌が落下し、5個の餌を落下させると課題を終了した。従って、この課題はオープンフィールド内の餌を落下させる領域(場所)を学習させるものである。しかし、餌がどこに落下するかはランダムになるよう調節しているので、マウスは餌が落下するとそのつど餌を探索する必要がある。若齢マウスでは6日間のトレーニングの後に学習終了を確認したので、本研究では7日目以降のデータを用いた。本課題において、若齢マウスと老齢マウスで、課題終了までに要する時間と移動距離を比較した。課題終了までに要する時間は、若齢マウスも老齢マウスも有意な差は見られなかった(図2A, $P > 0.05$, マンホイットニーU検定)。また、若齢マウスと老齢マウスとで、1日3回の試行間で課題終了に要した時間を比較すると、若齢マウスでは3回の試行を通して有意な差がなく、老齢マウスでは、有意差は見られなかったが、1回目の試行が長い傾向があった(図2C, $P > 0.05$, フリッドマン検定)。一方、課題終了までに要する移動距離は、若齢マウスの方が有意に短いことが分った(図2B, $P < 0.05$, マンホイットニーU検定)。加えて、若齢マウスと老齢マウスで、1日3回の試行間での移動距離の比較を行うと、若齢マウスでは3回の試行を通して有意な差がないが、老齢マウスでは、1回目の試行で2回目と3回目よりも距離が長かった(図2D, $P < 0.05$, フリッドマン検定)。

老齢マウスにおける場所ニューロンの応答特性

行動実験で得られた老齢マウスの成績の特性が、場所ニューロンの特性と関連するかどうかを調べるために、上記の行動実験と同じオープンフィールドで、電気生理学的手法を用いて海馬ニューロンの活動記録を行った。課題は、行動実験の場合と異なり、餌の落ちる場所はランダムとした。その結果、老齢マウスにおいて3個の場所ニューロンを記録することができた(図3)。これらの場所ニューロンは、

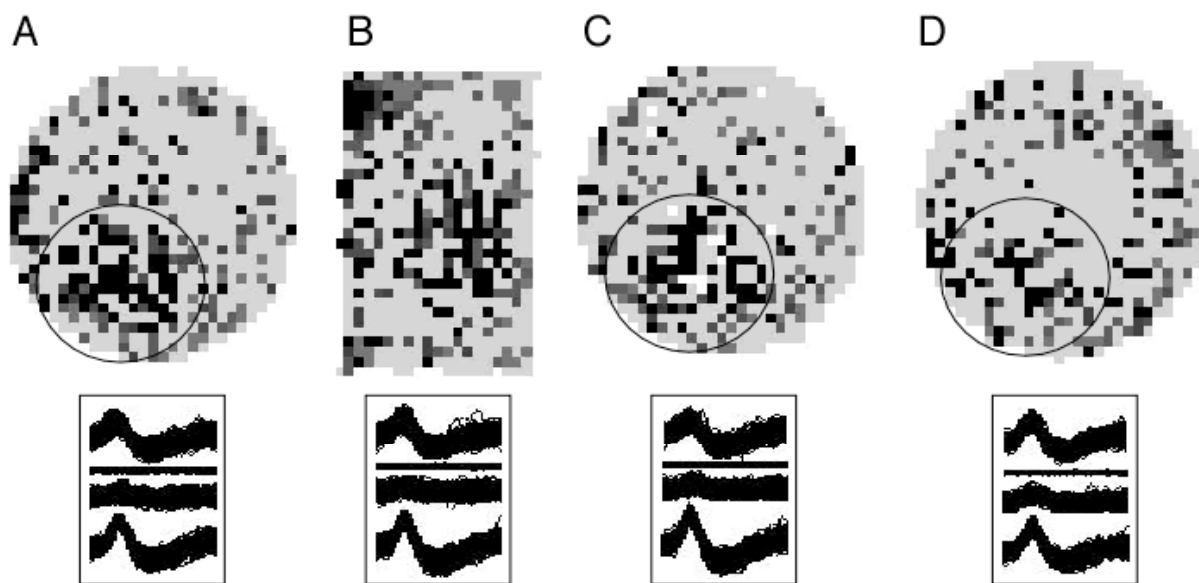


図 3 老齢マウスから記録された場所ニューロンの場所受容野。A–C は連続した環境変化に対する場所受容野を、D は、次の日に再記録を行った際の場所受容野を示す。それぞれの地図はニューロン発火頻度の分布を示し、最大発火頻度をもとに求めた相対値を示す。黒色の成分が高いことは発火頻度が高いことを示す。それぞれの地図の下部にはテトロード電極で記録されたニューロンの波形を示す。

短時間の間隔においては比較的に場所受容野の特性は安定であるが、次の日に再記録を行うと安定性が低下する傾向がある。図 3 の場所ニューロンの例では、場所受容野はオープンフィールドの左下側（円で示している）に存在するが、連続で円形から長方形のフィールドに変更し、その後円形のフィールドに戻すと、ほぼ同じ場所受容野 ($r=0.2238$) を示す。しかし、次の日に再記録を行うと、同一の場所受容野の成分 ($r=0.0266$) も残しているが、右側部分にも受容野が出現していた。他の 2 個のニューロン活動についても、同様な傾向を示していた。

結論

本研究から、老齢マウスでは若齢マウスに比べて運動量はむしろ高いが、場所の空間記憶の想起、もしくは学習が低下していると考えられる。1 日 3 回の試行間の走行距離の比較により、若齢マウスでは 3 回の試行を通してほぼ同じ距離であることから、空間の記憶およびその想起は安定していることが示されるが、老齢マウスでは、1 回目の走行距離が他の試行に比べて大きいことから、前日の記憶内容の呼び出しもしくは学習が障害を受けているが、3 回の試行を通して短期的な学習が行われていることを示唆している。老齢マウスの海馬から記録された場所ニューロンでは、短期的に場所受容野は保存されるが、長期の保存性は低い可能性がある。このことが行動実験で示された老化動物の成績低下の原因のひとつかもしれない。今後は、若齢マウスの海馬場所ニューロンからの記録を加え、さらに詳細な解析を行う必要がある。

参考文献

- [1] Weber, R., Brown, L., Weldon, J., (1978) Cognitive maps of environmental knowledge and preference in nursing home patients. *Exp. Aging Res.* 4, 157–174.
- [2] Wilkniss, S.M., Jones, M.G., Korol, D.L., Manning, C.A., (1997) Age-related differences in an ecologically-based study of route learning. *Psychol. Aging* 12, 372–375.
- [3] Gage, F.H., Björklund, A., Stenevi, U., Dunnett, S.B., Kelly, P.A.T., (1984) Intrahippocampal septal grafts ameliorate learning impairments in aged rats. *Science* 225, 533–536.
- [4] Barnes, C.A., Suster, M.S., Shen, J., McNaughton, B.L., (1997) Multistability of cognitive maps in the hippocampus of old rats. *Nature* 388, 272–275.
- [5] O'Keefe J., Dostrovsky J. (1971) The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. *Brain Res*; 34:171–5.