

研究課題名

発生-発達期における低用量の化学物質暴露による成熟後の神経行動毒性の誘発メカニズム解明と、その毒性学的評価系構築に資する研究（H27-化学一般-007）班会議資料/年次報告書

分担研究課題名

「行動柔軟性/抑制課題試験の開発と毒性評価への応用」

研究分担者

掛山 正心（早稲田大学人間科学学術院・行動神経科学研究室・教授）

【研究要旨】

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている。本研究グループでは昨年度までに、タッチスクリーンを用いることで、ヒトで行われている認知機能試験法（Go/NoGo課題）を、マウスにおいて行うことに成功した。今年度は試験法を最適化して高い再現性を担保することを目指し、行動課題スケジュールの検討を行った。マウスを3群に分け、Go/NoGo課題前にそれぞれ異なる事前課題（Pre-training）を経験させた。結果、Go/NoGo課題のGo正答率が高かったのは、Pre-trainingにおいてGoトライアルのみのセッションを経験した群であった。Goトライアルのみのセッションを経験した群は2群あり、試験期間が短い群はPre-trainingが8日間であったが、2群とも同程度のGo正答率を示した。NoGo正答率は、Pre-trainingにおいてNoGoトライアルを経験する回数が多いほど上昇した。またGo/NoGo課題においても、試行を重ねるに連れ、NoGo正答率は上昇する傾向が見られた。以上より、既存のプロトコルに比べ、Pre-trainingを短縮した上で、Go正答率、NoGo正答率とも上昇させることに寄与する知見を得ることに成功した。

Go/NoGo 課題とは、ヒトにおいて認知機能を評価する課題として、例えば、認知症の程度や有無の検査などに使用されている（Cummings, 2011）。Go/NoGo 課題では、Go Cue、NoGo Cue と呼ばれる2種類の視覚刺激を使用する。視覚刺激としては、色や文字、図形が使用される。Go/NoGo 課題では、Go Cue が提示された際には行動すること（例えば、“ボタンを押す” など）、NoGo Cue が提示された際には行動しないこと（行動抑制；セルフコントロール）が要求される。ヒトにおける Go/NoGo 課題では、特に注意欠如・多動症や認知症を持つ人の成績不良（健常者に比べ、“Go Cue” の際の反応時間が長くなる）や課題遂行時の脳活動異常が報告されている。これは、認知機能低下による状況判断速度の低下や行動抑制機能の問題によるものと考えられている。Go/NoGo 課題臨床検査や疫学調査でも多く用いられている。これまでのげっ歯類における Go/NoGo 課題ではラ

ットにおいては報告があるものの、マウスにおける成功例は極めて少ない。またラットにおいても、成績指標は Go/NoGo 課題の正答率が用いられており、ヒトにおける Go/NoGo 課題の成績指標とは必ずしも一致していない（後述）。

そこで本研究では、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の確立に取り組んだ。

## B. 研究方法

### (1) 実験動物

本研究は早稲田大学所沢キャンパスにて行った。動物飼育・実験は温度管理された動物飼育・実験室(P1A)で行った（室温 22±3℃、湿度 40～70%、明暗周期 12 時間（明期 8:00～20:00））。すべての動物実験は早稲田大学動物実験審査委員会の指導

と機関長の承認（総長：鎌田薫）のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。研究室で繁殖維持していた21~26週齢の12匹の雄C57BL/6マウスに加えて、日本クレア（東京）より購入した10週齢の雄C57BL/6マウスを8匹使用した。21~26週齢の12匹のマウスは6匹ずつ2群（実験群1-1, 1-2）に分け、10週齢の8匹のマウスは実験群2とした。課題では餌を報酬として用いたため、試験期間中、日本クレアが公開しているC57BL/6マウスの体重曲線を参考に、平均体重の80%以上を維持しながら制限給餌を行った。試験期間中、飲水は自由とした。

## (2) タッチスクリーンオペラント実験装置

15インチのタッチスクリーン、スピーカーと報酬ディスペンサーを備えたタッチスクリーンオペラント実験装置を作製した（図1）。タッチスクリーンモニターは、15インチの有機ELディスプレイとタッチ検出ユニットから構成される。実験チャンバーはタッチパネルモニター側（240 mm）から報酬ディスペンサー側（55 mm）に向けて狭まっている台形状の高さ200 mmの不透明アクリル製である。チャンバーとタッチスクリーンの間には、直径35 mmの穴が開けられた黒色のプラスチック板が設置されており、チャンバー内のマウスはこの穴よりスクリーンを見てnose pokingにより回答する。また、チャンバーの両側には給水瓶が設置され、試験中、マウスは自由に飲水できるようになっている。チャンバーの上部にはカメラが設置され、課題中のマウスの行動をリアルタイムでモニタリングした。報酬としては1粒10mgのペレットを使用し、課題時、自動的に報酬ディスペンサーより与えた。

### (3) 行動課題の手順

以下のすべての段階において、1日1セッション行った。

#### 慣化 (Habituation)

慣化は30分を1セッションとした。初めの15分は、前もって報酬ディスペンサーに15粒の報酬ペレットが置かれており、投入されたマウスはチャンバー内を自由に探索できる。次の15分間は、30秒毎に高いビーブ音 (Correct Sound) とともに1粒の報酬ペレットが報酬ディスペンサーから獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、報酬ディスペンサーに残ったペレットの数を計測した。全ての実験群に行い、次の段階（行動形成）に進むまでに、少なくとも1セッションを行った。

#### 行動形成 (Shaping)

行動形成は全ての実験群で5セッション行った。

全てのセッションは15分間に設定した。各画像が提示されてから、nose poking するまでには制限時間は設定しなかった。初めの2セッションでは、マウスが報酬ディスペンサーへnose poking することで開始し、モニター上に刺激画像が提示される。モニター上の刺激画像にマウスがnose poking する（タッチ検出ユニットにおいて検出する）と、報酬ディスペンサーよりCorrect Soundとともに3つのペレットが獲得できる。マウスをホームケージに戻した後、マウスが食べたペレット数を記録した。次の2セッションでは、報酬として獲得できるペレットが3つから1つに減少する以外は、前の2セッションと同一である。最後のセッションでは、nose poking することで報酬が獲得できる刺激画像よりも先に、十字型の固定点画像 (Fig. 3B) が提示される。固定点画像にnose poking しなければ、刺激画像は提示されない。固定点画像にnose poking した後の手順は、前の2セッションと同一である。

#### Pre-training 1 (Go/NoGo 課題)

Pre-training 1 (Go/NoGo 課題) では、Go Cue と NoGo Cue の2種類の視覚刺激 (Fig. 4A) が使用される。Go Cue は60%、NoGo Cue は40%の割合で擬似ランダム提示された。マウスが固定点画像にnose poking した直後に、Go Cue もしくはNoGo Cue が1.2秒間提示される。提示された画像が、Go Cue の場合 (Go トライアル) はモニターへnose poking すれば、NoGo Cue の場合 (NoGo トライアル) はnose poking をしなければ、Correct Sound とともに報酬を獲得することが出来る。Go Cue において、1.2秒以内にnose poking しなかった場合、NoGo Cue においてnose poking した場合はエラーとされ、報酬は得られない。固定点画像提示から報酬獲得もしくはエラーまでを1トライアルとし、100 トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから45分経過した時点で終了とした。報酬獲得後2秒で次のトライアルが自動的に開始される。エラーの場合は低いビーブ音 (Error Sound) とともに、実験装置内のランプが消灯された。消灯は20秒間に設定し、20秒経過後は再びランプが点灯し、自動的に次のトライアルに移行する。

なお、マウスはGo Cue, NoGo Cue を逆にした2群に分け、カウンターバランスをとった。Pre-training 1 は実験群1-1 のみに25セッション行った。

#### Pre-training 2 (Alternative task)

Pre-training 2 (Alternative task) では、1トライアルの手順、及び総トライアル数、制限時間

はPre-training 1と同一であるが、1セッション(100 トライアル)が全てGo トライアルもしくはNoGo トライアルである。Go トライアルのみのセッション、NoGo トライアルのみのセッションは1日毎に交互に行った。なお、マウスはGo Cue, NoGo Cueを逆にした2群に分け、カウンターバランスをとった。Pre-training 2は、実験群1-2のみに25セッション行った。

#### Reversal task

Reversal taskは、実験群1-1, 1-2それぞれでPre-training 1, 2の後、1セッション行った。

Pre-training 1, 2のセッション手順自体は変更せず、割り当てたGo CueとNoGo Cueを入れ替えて行った。

#### Pre-training 3 (Visual discrimination task)

Pre-training 3 (Visual discrimination task)では、モニターとチャンバーの間に設置されたプラスチック板の穴が2つに増える。チャンバー内のマウスには、左右の穴から独立した2つの視覚刺激(Correct Cue, Error Cue)が提示される。視覚刺激は、Go/NoGo Cueを使用し、それぞれのマウスに割り当てられたGo CueをCorrect Cueに、NoGo CueをError Cueとした。Correct Cueにnose pokingすれば、報酬が獲得でき、報酬獲得後2秒で次のトライアルが自動的に開始される。マウスがError Cueにnose pokingした場合はエラーとし、Error Soundとともに実験装置内のランプが消灯される。消灯は20秒間に設定し、20秒経過後は再びランプが点灯し、自動的に次のトライアルに移行する。視覚刺激提示からnose pokingするまでに時間制限はない。Correct Cue、Error Cueの左右配置は擬似ランダムとした。Correct CueとError Cueが提示されてから、報酬獲得もしくはエラーまでを1トライアルとし、100トライアル終了もしくはマウスがチャンバーに投入されてから45分経過した時点で終了とした。

#### Pre-training 4 (Go-only task)

Pre-training 4 (Go-only task)の手順、及び総トライアル数、制限時間は、Pre-training 2のGo トライアルのみのセッションと同一である。Pre-training 4では、全てGo トライアルのみのセッションを行った。実験群2においてのみ、8セッション行った。

#### Go/NoGo 課題

Go/NoGo 課題は、Pre-training 1と同一である。

Pre-training 3もしくは4の後、全ての実験群に対し、18セッション行った。最後の3セッションでは、Go /NoGo Cueの提示時間を1.2秒から2.0秒にした。

#### 記録項目

行動形成では、セッション毎に報酬としてディスプレイより与えられた餌の数を記録した。

Pre-training 1、Pre-training 2、Go/NoGo 課題では、セッション毎に全Go トライアルにおける正答数(報酬獲得数)と全NoGo トライアルにおける正答数(報酬獲得数)を記録し、3セッション毎に合計した(3 Session-Blocks)。Go/NoGo トライアルそれぞれで、合計正答数を総トライアル数で割り、Go/NoGo 正答率とした。

Pre-training 3では、セッション毎に正答数(Correct Cueにnose pokingした数; 報酬獲得数)を記録し、3セッション毎に合計した。合計した正答数を、総トライアル数(300 トライアル)で割り、Pre-training 3における正答率とした。

Pre-training 4では、セッション毎にGo トライアルにおける正答数(報酬獲得数)を記録した。セッション毎にGo トライアル正答数を総トライアル数(100 トライアル)で割り、Go 正答率とした。

#### 統計解析

統計解析にはGraphPad PRISM 7 (GraphPad Software)を用いた。

各課題における正答率の推移にはrepeated measure 2-way ANOVAとrepeated measure 1-way ANOVAを用いた。同一課題での最初のセッションと最後のセッションの試行数もしくは正答率の比較には1-way ANOVAと対応のあるt検定を用いた。多重比較は、Tukey検定を用いて行った。P値0.5以下を統計的有意とみなした。

## C. 研究結果

Go/NoGo Cueの提示時間が1.2秒であった第1から第5セッションブロックでは、Go/NoGo 正答率とも大きな変化はなく、どのセッションブロックでも、全ての実験群の正答率の順位は変化しなかった。Go 正答率では、実験群1-2と実験群2が約75%を維持したが、実験群1-1では約50%であった。NoGo 正答率では、実験群1-1が約65%、実験群1-2が約40%、実験群2が約30%であった(図5)。

Go/NoGo Cueの提示時間を1.2秒から2秒にして課題を行ったところ、全ての実験群でGo 正答率

は上昇、NoGo 正答率は低下する傾向が見られた。第15セッションと第18セッションを比較すると、Go 正答率は全ての実験群において、10~15%程度上昇した。実験群1-2では、第18セッションのGo 正答率が90%を超えた。第18セッションのNoGo 正答率は、第15セッションに比べ、実験群1-2で約2分の1、実験群2で約3分の1に低下した。一方で、実験群1-1においては、NoGo 正答率の低下は約3%に留まった(図6)。

#### D. 考察

今回の実験では、我々の研究グループが先行研究において検討したGo/NoGo課題のプロトコル最適化を主眼に、3つの実験群に異なるPre-trainingを実施し、Go/NoGo課題の成績を測定した。

結果、Go 正答率が高い傾向にあるのは、Pre-trainingにおいて、Go トライアルのみのセッションとNoGo トライアルのみのセッションを1日毎に繰り返した群(実験群1-2)とGo トライアルのみのセッションに限って行った群(実験群2)であった。このことより、Go トライアルで報酬を得るための手順をマウスに理解させるためには、始めからGo トライアルとNoGo トライアルが混在する課題ではなく、Go トライアルを繰り返すことが重要と思われる。

一方、対照的にNoGo 正答率が高い傾向にあったのは、始めからGo/NoGo課題を行った実験群1-2であった。これは、NoGo トライアルを適切に学習しているとも考えられるが、NoGo トライアルの性質上、マウスがNoGo Cue提示の際、スクリーンに注目していないにもかかわらず、制限時間をすぎれば報酬が得られてしまうため、学習を放棄、もしくは“何もしないこと”を習得してしまった可能性も多分にある。NoGo トライアルにおける、指標の鋭敏化は今後の課題である。今回の実験では、実験期間の短縮を目的とした。行動形成は、先行研究において9セッションかけていたが、5セッションに短縮することが出来た。一方、Go/NoGo課題では、正答率改善のため、プロトコルの修正していく必要があると考えられる。以下、個々の実験群について考察する。

##### (1) 実験群1-1

実験群1-1では、Pre-training 1すなわち、行動形成後に直ちにGo/NoGo課題を24セッション(8セッションブロック)行った。第8セッションブロックでは、Go 正答率は51.3%、NoGo 正答率は61.9%であった。Pre-training 1の後には、Pre-

training 3 (Visual discrimination task)を行っている。Pre-training 3を経験しながらも、次のGo/NoGo課題において、実験群1-1は、Go 正答率約50%、NoGo 正答率約65%で、Pre-training 1と同程度であった。更に、Go/NoGo課題の最後の3セッションでGo/NoGo Cueの提示時間が変更されても、NoGo 正答率の低下は3.3%に留まっており、他の実験群と比しても、有意にNoGo 正答率が高かった。

以上より、Go/NoGo課題を長期間行うことでNoGo行動が影響を受けにくくなると考えられる。

##### (2) 実験群1-2

実験群1-2の最終セッションブロック(Go/NoGoそれぞれの第4セッションブロック)における、Go 正答率は61%、NoGo 正答率は60.4%であった。Pre-training 3を行った後のGo/NoGo課題では、Go 正答率が約75%、NoGo 正答率が約40%で推移した。また、Go/NoGo Cueの提示時間の変更後、Go 正答率は73%から90%に上昇した一方で、NoGo 正答率は47.9%から25.8%に低下しており、Go トライアルのみで構成されるセッションとNoGo トライアルのみで構成されるセッションを1日毎に交互に行った場合、同じ試行数のGo/NoGo課題を行った場合に比べ、Go行動が優位になりやすいことが示唆される。

##### (3) 実験群2

実験群2はGo/NoGo課題の前に、Go トライアルのセッションだけを行い、NoGo トライアルは経験していない。Go トライアルのみのセッションでは、正答率は76.3%に達しており、その後のGo/NoGo課題でも、Go 正答率は約75%で推移している。一方で、NoGo 正答率は、どのセッションブロックでも、全ての実験群中で最低であった。これは、Go/NoGo課題までにNoGo トライアルを経験していないことが大きいと考えられる。

しかしながら、Go/NoGo課題でのNoGo 正答率において、第1セッションブロックでは24.5%、第5セッションブロックでは34.4%で、他の実験群に比して上昇幅も大きい傾向にある。試行を続けた場合、更に上昇していくことも考えられる。

また、Go 正答率において、実験群2はPre-training 4が8セッションのみにも関わらず、Pre-training 2でGo トライアルのみを12セッション行った実験群1-2と同程度のGo 正答率であり、Go 正答率を上昇させるには、8セッションで十分であると考えられる。

## E. 結論

本研究では、昨年度までに開発した、ヒトにおける認知・情動行動課題と同様の成績指標を用いたマウス Go/NoGo 課題の短縮化について検討した。実験群 2 が Pre-training を 8 日 (8 セッション) のみで、実験群 1-2 と同程度の Go 正答率を記録し、更に NoGo 正答率も上昇する傾向が見られている。今後は Pre-training としては Alternative task を採用し、Alternative task の期間を短縮・改良していくことが最善と思われる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

#### 1) 書籍

なし

#### 2) 雑誌

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Ling W, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Impaired dendritic growth and positioning of cortical pyramidal neurons by activation of aryl hydrocarbon receptor signaling in the developing mouse. *PLoS One*. 2017 Aug 18;12(8):e0183497. doi: 10.1371/journal.pone.0183497. eCollection 2017.

Kubo KI, Deguchi K, Nagai T, Ito Y, Yoshida K, Endo T, Benner S, Shan W, Kitazawa A, Aramaki M, Ishii K, Shin M, Matsunaga Y, Hayashi K, Kakeyama M, Tohyama C, Tanaka KF, Tanaka K, Takashima S, Nakayama M, Itoh M, Hirata Y, Antalffy B, Armstrong DD, Yamada K, Inoue K, Nakajima K. Association of impaired neuronal migration with cognitive deficits in extremely preterm infants. *JCI Insight*. 2017 May 18;2(10). pii: 88609. doi: 10.1172/jci.insight.88609.

Kimura E, Kubo KI, Endo T, Nakajima K, Kakeyama M, Tohyama C. Excessive activation of AhR signaling disrupts neuronal migration in the hippocampal CA1 region in the developing mouse. *J Toxicol Sci*. 2017;42(1):25-30. doi: 10.2131/jts.42.25.

### 2. 学会発表

掛山正心. 子どもへの低用量化学物質ばく露評価のための新たなマウス情動認知行動毒性試験装置の開発. 第 44 回日本毒性学会学術年会 (シンポジウム子ども期への低用量化学物質ばく露が誘発する情動認知行動影響の定量的解析法の開発状況と評価法確立への未来)、2017 年 7 月、横浜.

掛山正心、マウスにおける早期環境要因操作による自閉スペクトラム表現型発現の検討. 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会合同年会シンポジウム 2017/09、札幌.

掛山正心、集団生活下のマウス個体識別と行動計測. 日本動物行動関連学会 2017 (Koudou2017) (5 学会・研究会合同シンポジウム) 2017/09、東京.

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

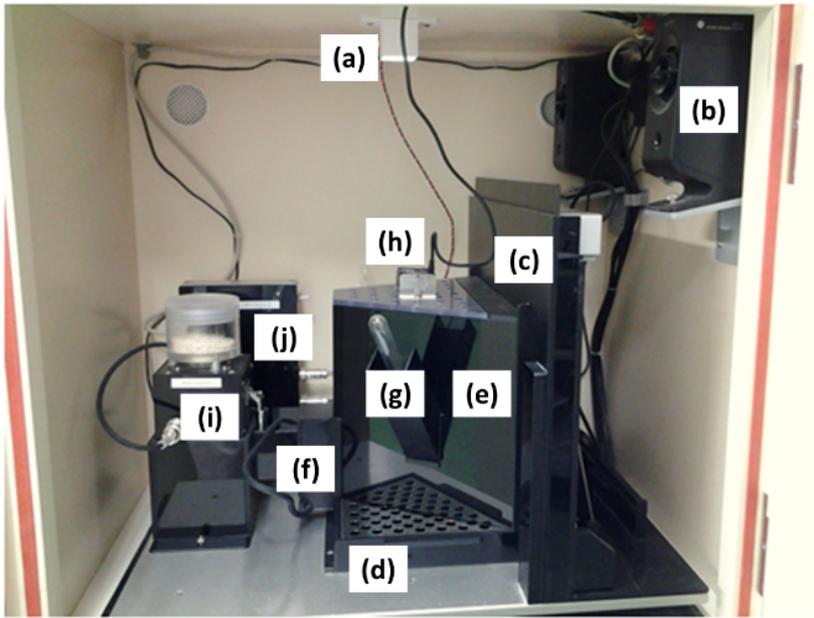


図1. タッチスクリーンオペラント実験装置. (a) house lamp (b) speaker (c) OLED monitor (d) stage (e) wall of testing arena (f) pellet dispensing area (g) water dispenser (h) LCD camera (i) reward dispenser (j) control panel

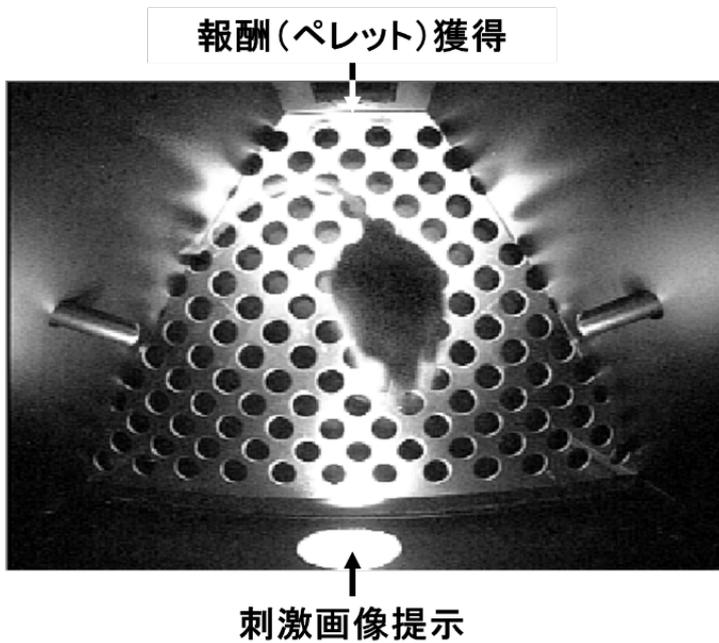


図2. チャンバー内観。刺激画像に対し、適切な行動をすれば、報酬を獲得できる。左右には給水瓶が設置され、課題中、飲水は自由である。

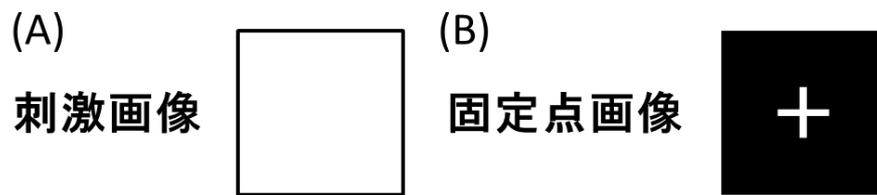


図 3. (A) 刺激画像 (B) 固定点画像

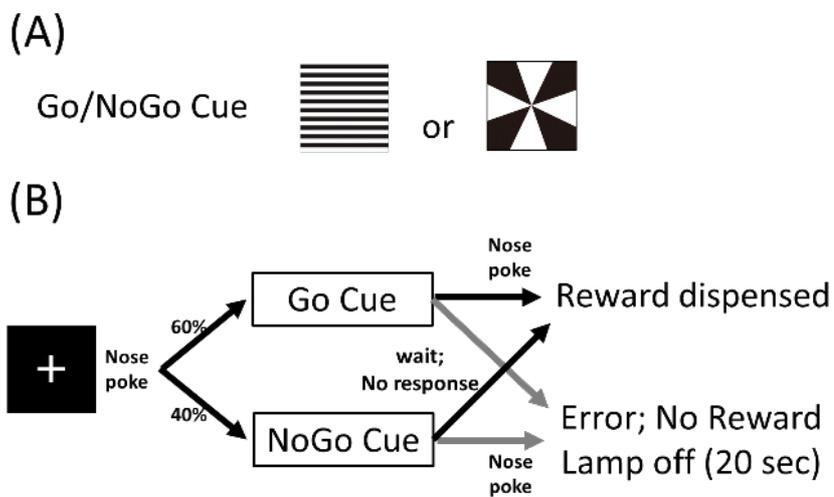


図 4. (A) Go/NoGo 課題スケジュールの模式図。

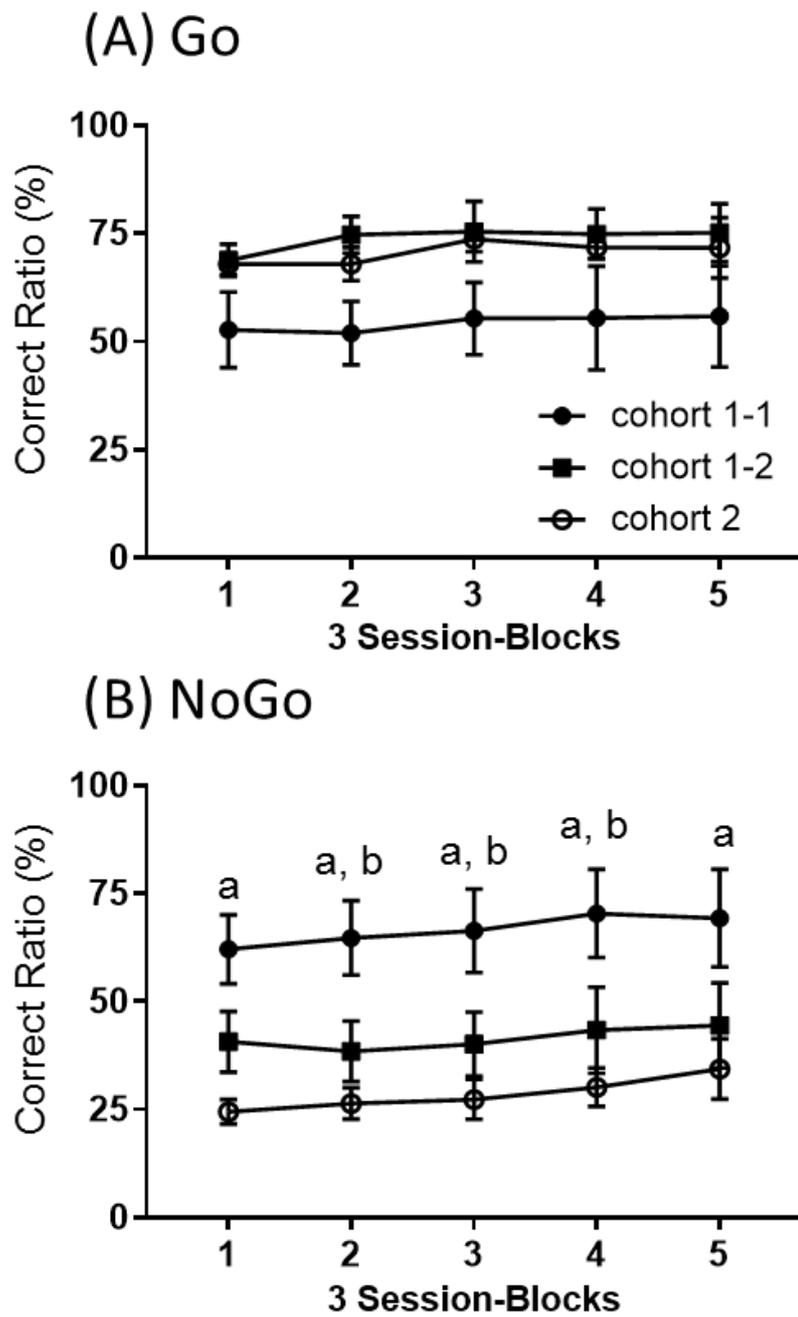


図5. Go/NoGo 課題における(A)Go 正答率と(B)NoGo 正答率. a:  $p < 0.05$ , vs cohort 2, b:  $p < 0.05$ , vs cohort 1-2.

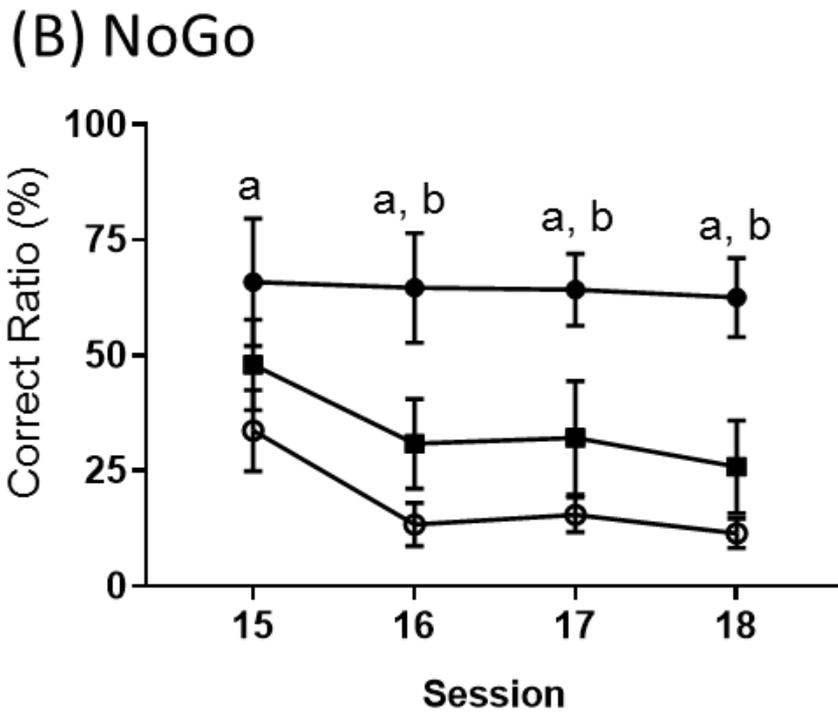
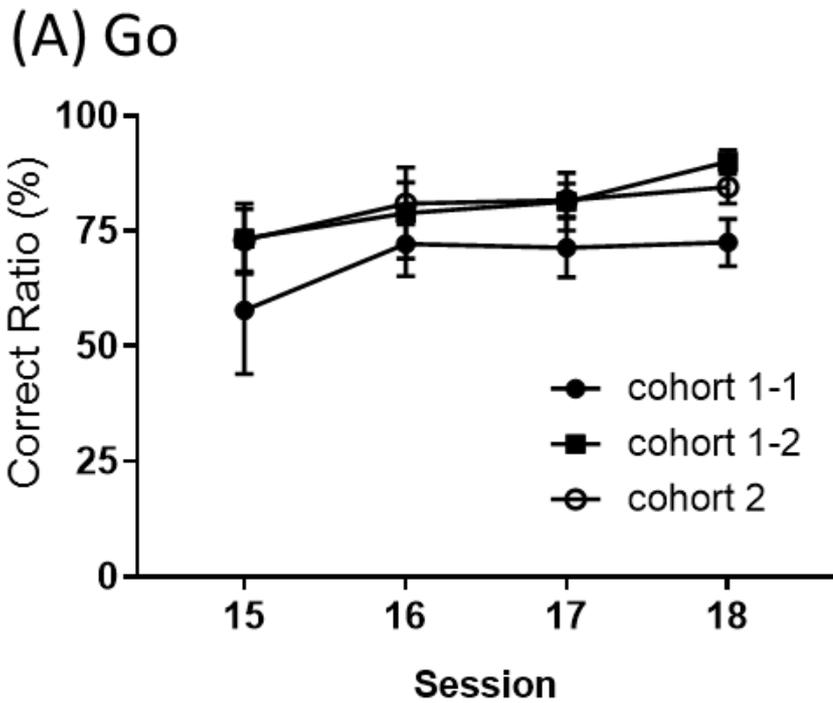
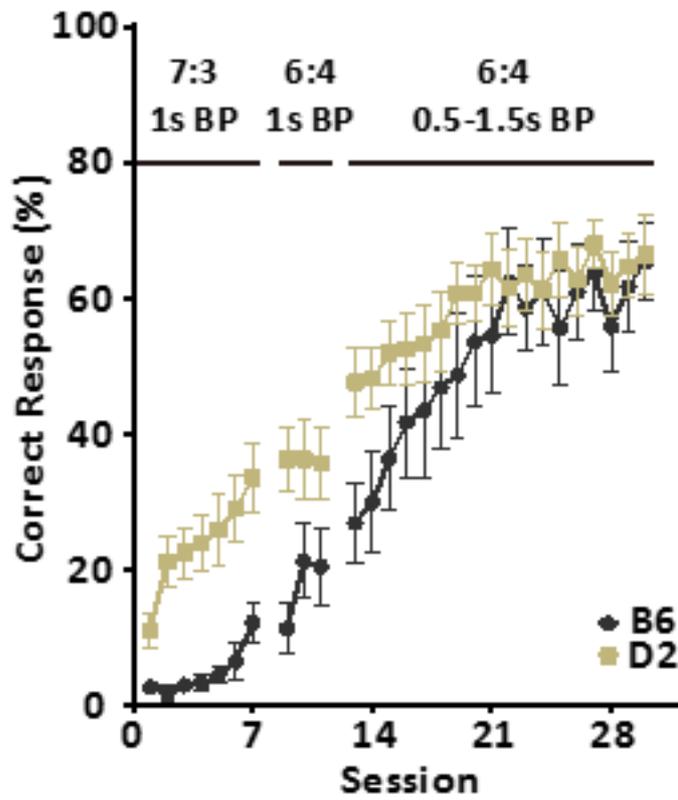


図 6. Go/NoGo 課題の最後の 4 セッションにおける (A)Go 正答率と (B)NoGo 正答率. a:  $p < 0.05$ , vs cohort 2, b:  $p < 0.05$ , vs cohort 1-2; 第 15 セッションは第 5 セッションブロックの最終日のデータ.



参照図 1. 昨年度報告した長期間訓練による Go/NoGo 課題の NoGo Cue 提示時の正答率 (nose poke (誤反応) をせずに報酬を受け取りに行くという正反応を示した割合)。