

マウスを用いた強制水泳による味覚嫌悪学習

梅本 嗟紀・永石 高敏

問題

空腹のイヌに餌を呈示すると、イヌは唾液を分泌する。これは唾液分泌と呼ばれる無条件反射である。具体的には、餌は無条件刺激 (Unconditioned stimulus, US) と呼ばれ、そのUSによって誘発された無条件反応 (Unconditioned response, UR) が唾液分泌である。仮に、この唾液分泌の無条件反射に対して、次のような処置をおこなってみる。空腹のイヌに餌 (US) を呈示する直前にベルの音を聞かせる処置を何度も繰り返す。その結果、おそらくイヌはベルの音を聞いただけで唾液を分泌するようになるだろう。この現象は、古典的条件づけと呼ばれている。この場合、ベルの音が条件刺激 (Conditioned stimulus, CS) となり、そのCSによって誘発された唾液分泌が条件反応 (Conditioned response, CR) となる。

我々の身近な古典的条件づけの一つに味覚嫌悪学習とよばれる現象がある。例えば、ある人が初めて牡蠣を食べた後に、食中毒などのネガティブな経験をすると、その人は以後牡蠣を嫌いになって、食べることができなくなるだろう。これを味覚嫌悪学習という。この味覚嫌悪学習は、Garcia, Kimeldorf & Koelling (1955) によって発見された。彼らは、ラットにCSとして味覚溶液 (サッカリン) を飲ませた後に、USである放射線を呈示すると、その味覚溶液の摂取量が減少することを報告した。また、呈示する放射線の強度が強くなるにつれ、その摂取量も大きく減少したことも報告した。それ以降、様々な被験体を対象に味覚嫌悪学習の研究が数多く行われた (レビューとして、Reilly & Schachtman, 2009)。使用されたUSも様々で、放射線の照射、塩化リチウムやアポモルヒネなどの薬物、高速回転などがある (データベースとして、Riley & Freeman, 2004)。その中でもユニークなものとして運動をUSとしたものがある。例えばLett & Grant (1996) は、ラットに対してある味覚溶液を摂取させた後、回転カゴを走行させる (運動によるUS) という処置を行い、別の味覚溶液に対しては回転カゴ走行をさせないという処置を行なった。その結果、回転カゴ走行と対呈示した味覚溶液の摂取量が減少したことを報告した。つまり、この結果は回転カゴ走行をUSとした味覚嫌悪学習が生じたことを示している (彼らは、回転カゴ走行が乗り物酔いのような不快感を誘発し、これが食欲不振 (味覚嫌悪) を引き起こすとしていた)。

それ以降、ラットを対象とした回転カゴ走行による味覚嫌悪学習の様々な研究が実施され (レビューとして、Boakes & Nakajima, 2009)、塩化リチウムなどによる味覚嫌悪学

習と同様に、様々な学習現象が確認されている (例えば、Heth & Pierce, 2007; Nagaishi & Nakajima, 2010)。また、マウスを対象とした回転カゴ走行による味覚嫌悪学習も確認され (例えば、Nakajima, 2019)、その頑健性が確かめられている。さらに、回転カゴ走行以外の運動として、強制水泳をUSとした味覚嫌悪学習も確認されている。例えば、Nakajima & Masaki (2004) は、ラットを対象とした強制水泳に関する実験を行なった。具体的には、ある味覚溶液は強制水泳と対呈示、別の味覚溶液は非対呈示という処置を行なった。その結果、強制水泳と対呈示された味覚溶液の摂取量が減少した。これは、強制水泳が味覚嫌悪を引き起こすUSとして機能することを示している。その後、この強制水泳による味覚嫌悪学習に関する研究が行われ (例えば、Masaki & Nakajima, 2004b; Masaki & Nakajima, 2004b)、その頑健性が確認されている。

しかし、管見の限りでは、現在のところ、マウスを対象とした強制水泳による味覚嫌悪学習は報告されていない。例えば、原 (2021) ではマウスを対象として強制水泳による味覚嫌悪学習の有無を検討した。具体的には、CSをチーズ、USを強制水泳として、条件づけ群のマウスはチーズと強制水泳の対呈示を行い、非条件づけ群のマウスはチーズと強制水泳の対呈示を行わなかった。その結果、条件づけ期間における2群間のチーズの摂取量に差が確認されず、味覚嫌悪が生じていないことが示唆された。その後、選択テストとして、2群のマウスに対してチーズと固形飼料の同時選択テストを実施した。その結果、非条件づけ群よりも条件づけ群の方がチーズに対する選好率が低かったが、統計的に有意な差は確認されなかった (有意傾向であった)。そこで、本研究ではマウスを対象として、CSをチーズ、USを強制水泳とした味覚嫌悪学習が確認されるか否かについて検討することとした。基本的な手続きについては、原 (2021) の手続きに準拠し、条件づけで使用するチーズ (CS) および選択テストで使用する比較刺激を変更した。原 (2021) によると、実験の問題点として、チーズへの新奇性恐怖を低減するための馴致期間が短かった点、選択テストで使用した比較刺激である固形飼料が適切ではなかった (あまり好まれない刺激であった) という点、そして強制水泳がUSとしての強度が弱かったのではという点を指摘している。それを踏まえて、本研究ではチーズに対する馴致期間を1日間ではなく2日間とした。また、使用するCSであるチーズを明治北海道十勝カマンベールチーズに変更した。中島・木原・金下 (2015) によると、ラットおよびマウスはチー

ズの中でカマンベールチーズを最も好むことが示唆されたため、摂取量を高い水準で維持するためにカマンベールチーズをCSとして採用することとした。さらに、選択テストにおける比較刺激を乃が美の食パンに変更した。永石・吉田(2021)によると、ラットは食パン中で高級食パンである乃が美の食パンを最も好むということが明らかになった。また、佐保・永石(2022)によると、高級食パンの中でも乃が美が比較的好まれることが示された。そのため、本研究では、乃が美の食パンを比較刺激として採用した。

なお、本研究の仮説として、仮に強制水泳による味覚嫌悪学習が生じた場合、条件づけ群のマウスのチーズの摂取量は非条件づけ群に比べて少なくなることが予測される。また、選択テスト期では、条件づけ群のマウスのチーズに対する選好率は非条件づけ群に比べて低くなることが予測される。

方法

被験体

日本SLC株式会社より購入した雄性的C57BLマウス8匹を被験体とした。実験開始時の週齢は16週齢であり、平均体重は31.6 g(範囲:28.4-33.3 g)であった。また、被験体は6週齢時にお茶の選好に関する実験に用いられた個体であった。餌には、オリエンタル酵母工業株式会社製の実験動物用固形飼料(MF-20)を与え、水は水道水を自由に摂取することができる状態であった。本研究は帝塚山大学動物実験委員会の承認を得て実施された(承認番号 2022-01)。

実験器具及び材料

被験体は実験期間中、室温23℃、湿度60%で12時間/12時間の明/暗周期(明期開始午前8時)の飼育室において日本クレア株式会社製の透明プラスチックケージ(縦22 cm × 横38 cm × 高さ16 cm)を金属板で4分割した状態で個別飼育した。天井には、網目状になっている金属製の蓋をした。蓋の網目に給水ノズルを差し込むことで、各個体が水道水を自由に摂取することが可能であった。プラスチックケージの底には木製チップを厚さ3 cm敷き詰め、1週間ごとに取り換えた。また、実験室ではサナダ精工株式会社製の透明プラスチック製タッパー(縦15 cm × 横11 cm × 高さ12 cm)を、馴致期・条件づけ期・テスト期にマウスにチーズや比較刺激を与える際のコンパートメントとして用いた。天井には空気孔の穴が3箇所あけられたプラスチック製の蓋がされていた。コンパートメントにおいて、マウスにチーズを呈示する際は、日本クレア株式会社製のガラス製の器(縦5 cm × 横5 cm × 高さ5 cm)に入れて呈示した。水泳用タッパーに岩崎工業株式会社製タッパー(縦20 cm × 横13.5 cm × 高さ18 cm)を用いた。実験期間中は、タッパーに水深11 cmになるまで水道水を入れた。水温は実験室内の室温と同じにするために、水は実験日の前日に事前にタッパーに

入れて置いておいた。実験終了後、タッパーの水は破棄した。また、実験期間中はマウスが他の個体の様子を見ることのできないように、タッパーには白色のビニールテープを全体に貼り付けた。

本研究で使用したCSは明治北海道十勝カマンベールチーズ(以下、チーズ)であり、1回に呈示した量は7.5 g(1個を2等分したもの)であった。選択テストで使用した比較刺激は、乃が美の「生」食パン(以下、食パン)であり、クラム(パンの中身)部分の7 gを呈示した。チーズは冷蔵庫で保存し、食パンは飼育室で常温保存した。マウスの体重および固形飼料を計測する際は、A&D株式会社製デジタルはかりHT-500(最小単位0.1 g)を用い、チーズおよび食パンの重さを測定する際は、A&D株式会社製デジタルはかりHT-300(最小単位0.1 g)を用いた。水温を計測する際は、Cangda Electronics製のデジタル温度計KT800を用いた。水温計測は、マウスに水泳をさせる直前に行なった。なお、チーズの呈示、強制水泳の時間を測定する際は、ストップウォッチ(SEIKO ALBA PICCO W071-4000)を使用した。

手続き

まず被験体8匹を体重をもとに4匹ずつ、2群に分けた。一方を条件づけ群、もう一方を非条件づけ群と命名した。すべての実験処置は、飼育室から被験体の入ったホームケージを実験室に移動して実施した。なお、実験器具の数の関係のため、2回に分けて実施した。1回目は、各群2匹ずつ合計4匹に対して実験処置を行い、2回目は各群の残り4匹に対して実験処置を行った。

体重統制

5月16日から5月24日までの9日間は、体重統制を行った。1日目に測定した各被験体の体重の85%を目標体重と定め、与える固形飼料を0.1 g単位で調整し、体重を統制した。

馴致

5月25日から5月26日までの2日間は馴致期間であった。チーズに対する新奇性恐怖を低減することを目的とし、コンパートメントの手前中央にガラスの器を置き、そこにチーズを入れて20分間呈示した。

条件づけ訓練

5月27日から6月7日までの12日間は、条件づけ訓練を行った。条件づけ群の半数は、第1日目にチーズを20分間呈示し、その後すぐに20分間の強制水泳をさせた。残りの半数は、40分間のホームケージ待機をさせた。第2日目は、その手順を入れ替えた。非条件づけ群の半数は、第1日目に20分間のチーズ呈示後、ホームケージへ戻し20分間待機させた。残りの半数は、20分間のホームケージ待機後に、20分間の強制水泳をさせた。第2日目は、その手順を入れ替えた。両群とも第1日目と第2日目の手続きを1セットとし、合計6セット行った(各被験体の実験処置について

は、Table 1を参照のこと)。

選択テスト

6月8日から6月9日の2日間は、選択テストの環境に慣れさせるための処置を行った。具体的には、コンパートメントの手前中央に、ガラスの器を2つ並べて置き、その両方に食パンを少量入れ、20分間呈示した。呈示する位置は、各群内でカウンターバランスを行なった。

6月10日から6月11日の2日間は、選択テストを行った。選択テストは、各群に対して、チーズと食パンを20分間同時に呈示した。呈示する位置は、各群内でカウンターバランスを行なった。

摂取量の測定

条件づけ訓練におけるチーズの摂取量は、チーズ呈示前のガラスの器を含めた重さからチーズ呈示後のガラスの器を含めた重さを差分することで求めた。また、選択テストにおけるチーズおよび食パンの摂取量の測定方法も、条件づけ訓練と同様であった。

結果

条件づけ訓練におけるチーズ摂取量

Figure 1は、条件づけ訓練における各群のチーズの平均摂取量を示している。縦軸は、チーズの平均摂取量、横軸は条件づけ試行を示している。条件づけ群のチーズ摂取量はほぼ横ばいになっているが、非条件づけ群のチーズ摂取量は徐々に増加していることがわかる。群(2) × 条件づけ試行(6)の2要因分散分析を行ったところ、交互作用のみ有意であり($F(5, 30) = 3.50, p < .05$)、群の主効果($F(1, 6) = 0.69, n.s.$)および条件づけ試行の主効果($F(5, 30) = 0.49, n.s.$)は有意ではなかった。交互作用が有意であったため単純主効果検定を行なったところ、群の要因では第6試行のみが有意傾向($F(1, 36) = 3.07, p < .10$)であり、条件づけ試行の要因は非条件づけ群のみが有意であった($F(5, 30) = 2.72, p < .05$)。このことから、非条件づけ群のチーズ摂取量は増加しているが、条件づけ群のチーズ摂取量は増加していないことがわかった。つまり、条件づけ群のマウスは、チーズに対して忌避傾向を示していることがわかった。

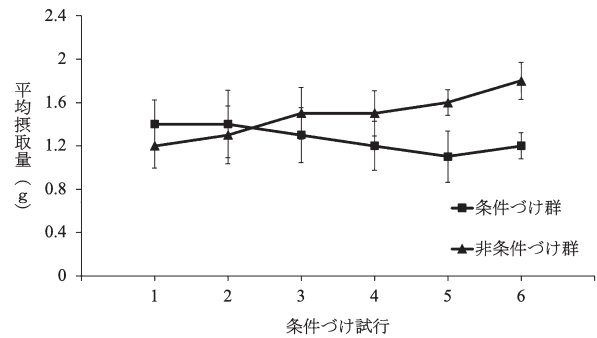


Figure 1 条件づけ訓練における各群のチーズの平均摂取量。エラーバーは標準誤差を示す。

選択テストにおけるチーズ選好率

選択テストにおけるチーズ摂取量と食パン摂取量をもとに、各被験体のチーズ選好率を算出し、分析した。チーズ選好率は、各被験体のチーズ摂取量 / (各被験体のチーズ摂取量 + パン摂取量) × 100で求めた。今回は、各被験体の選択テスト2日間を平均した選好率を分析対象とした。

Figure 2は、選択テストにおける各群のチーズ選好率を示している。縦軸はチーズの平均選好率、横軸は群を示している。条件づけ群のチーズ選好率は、非条件づけ群よりも低くなっていることがわかる。各群のチーズ選好率について、ウェルチの *t* 検定を行ったところ、有意差がみとめられた($t(3) = 4.10, p < .05$)。このことから、条件づけ群のマウスがチーズを忌避していることが示され、味覚嫌悪が生じたことが示唆される。

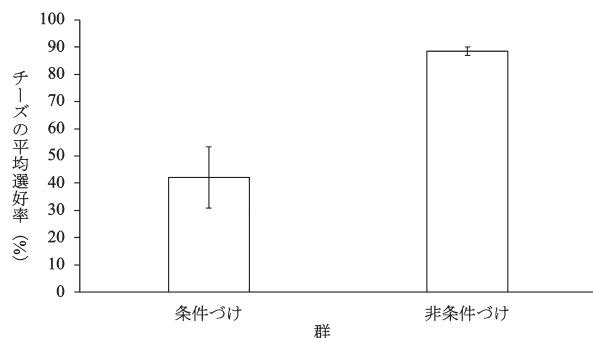


Figure 2 選択テストにおける各群のチーズに対する平均選好率。エラーバーは標準誤差を示す。

Table 1 本研究における各被験体に対する実験手続き

被験体	条件づけ試行 (1,3,5,7,9,11日目)	条件づけ試行 (2,4,6,8,10,12日目)
条件づけ群1,3	チーズ(20分)→水泳(20分)	ホームケージ待機 (40分)
条件づけ群2,4	ホームケージ待機 (40分)	チーズ (20分) →水泳 (20分)
非条件づけ群1,3	チーズ(20分)→ホームケージ待機(20分)	ホームケージ待機(20分)→水泳(20分)
非条件づけ群2,4	ホームケージ待機(20分)→水泳(20分)	チーズ(20分)→ホームケージ待機(20分)

考察

本研究は、マウスを対象に強制水泳をUSとした運動性の味覚嫌悪学習が生じるかどうかを確認する目的で実施した。その結果、条件づけ訓練では明確なチーズに対する味覚嫌悪を確認することができなかったが、選択テストのチーズに対する選好率では条件づけ処置を行なったマウスはチーズを忌避していることが示された。つまり、マウスを対象とした強制水泳による味覚嫌悪学習を確認することに成功し、本研究の仮説の一部が支持されたといえる。この結果は、ラットを対象とした強制水泳をUSとした運動性の味覚嫌悪学習の先行研究(例えば, Nakajima & Masaki, 2004a; Masaki & Nakajima, 2004b)の結果と一致する。

しかし、本研究にはいくつかの問題点が存在する。まず第1点は、条件づけ訓練において味覚嫌悪学習が明確に示されなかったことである。通常、味覚嫌悪学習が明確に生じれば、条件づけ訓練が進むにつれて、チーズ(CS)摂取量が減少することが考えられる。しかし、本研究では条件づけ群のチーズ摂取量は減少せず、横ばいで推移していた。つまり、本研究で用いた20分間の強制水泳のUS強度が弱く、そのため条件づけ訓練で明確な味覚嫌悪学習が確認されなかった可能性がある。Masaki & Nakajima (2006)では、USとして回転カゴ走行・強制水泳・塩化リチウムの3種類を用いたラットを対象とした味覚嫌悪学習の実験を行い、それぞれのUS強度について比較検討を行っている。その結果によると、強制水泳は比較的US力が弱く、泳がせる時間も30分以上が望ましいと述べている。彼らの結果に従うと、本研究で用いた20分間の強制水泳はUSとして不十分であり、条件づけ訓練において条件づけが適切にされていなかった可能性が示唆される。ただし、対象としている被験体の違いがあるため、その点は考慮する必要があるだろう。そのため、続く研究では、強制水泳の時間を20分から30分間などに変更して、US強度の検討をする必要がある。第2点は、本研究でCSとして用いたチーズに対する選好が非常に強すぎたため、条件づけ訓練において条件づけがうまく生じなかった可能性がある。本研究の選択テストの結果によると、非条件づけ群のチーズ選好率は約90%と非常に高い選好率を示している通り、マウスが食パンよりもチーズを非常に好むことを示している。そのため、選好の非常に強いチーズをCSとして嫌悪的なUSと対呈示すると、拮抗条件づけのような手続きとなってしまい、CSであるチーズに対する味覚嫌悪条件づけが生じにくくなってしまったことが考えられる。今後は、比較的選好の弱い食物をCSとして採用するなど、使用するCSを再度検討する必要があるだろう。最後に第3点は、今回用いたマウスには実験歴があったという点である。本研究で用いたマウスは、過去にお茶に対する選好実験の経験があり、ナイーヴな被験体ではなかった。現象の頑健性・信頼性などを考慮すると、今後はナイーヴなマウスを用いて追試をする必要がある

だろう。

本研究では、選択テストにおいて味覚嫌悪学習が確認されたものの、条件づけ期では確認されなかったため、明確に味覚嫌悪学習が生じたとはいえない。しかし、マウスを対象とした強制水泳による味覚嫌悪学習の部分的な確認は新しいものであり、今後の条件づけ研究に活かすことのできる価値のある報告といえるだろう。今後は、上記に挙げた問題点を改善し、マウスの強制水泳による味覚嫌悪学習の一般性・頑健性を確かめる必要があるだろう。さらに、強制水泳による味覚嫌悪事態をマウスの条件づけ研究のツールとして確立し、ラットやハトなどで発見されているような様々な学習現象をマウスでも再現することができれば、様々な学習現象の一般性を確かめることが期待できる。

引用文献

- Garcia, J., Kimeldorf, D. J., & Koelling, R. A. (1955). Conditioned aversion to saccharin resulting from exposure to gamma radiation. *Science*, *122*, 157–158.
- 原 将太 (2021). マウスにおける水泳性味覚嫌悪学習 帝塚山大学卒業論文(未公開)
- Heth, C. D., & Pierce, W. D. (2007). The role of pre-exposure to novel food tastes in activity-based conditioned taste avoidance. *Learning and Motivation*, *38*, 35–43.
- Lett, B.T., & Grant, V.L. (1996). Wheel running induces conditioned taste aversion in rats trained while hungry and thirsty. *Physiology & Behavior*, *59*, 699–702.
- Nakajima, S. (2019). Food avoidance learning based on voluntary wheel running in laboratory mice (*Mus musculus*). *Behavioural Processes*, *159*, 31–36.
- Nakajima, S., & Masaki, T. (2004). Taste aversion learning induced by forced swimming in rats. *Physiology & Behavior*, *80*, 623–628.
- 中島 定彦・木原 千彰・金下 真子 (2015). ラットおよびマウスにおけるチーズ選好 関西学院大学心理科学研究, *41*, 7–15.
- 永石 高敏・吉田 貴彦 (2021). ラットにおける食物選好—乃が美の食パンはネズミにも人気なのか?— 帝塚山大学心理科学論集, *4*, 53–57.
- Masaki, T., & Nakajima, S. (2004a). Swimming-induced taste aversion and its prevention by a prior history of swimming. *Learning and Motivation*, *35*, 406–418.
- Masaki, T., & Nakajima, S. (2004b). Taste aversion learning induced by delayed swimming activity. *Behavioural Processes*, *67*, 357–362.
- Masaki, T., & Nakajima, S. (2006). Taste aversion in rats induced by forced swimming, voluntary running, forced running, and lithium chloride injection treatments. *Physiology & Behavior*, *88*, 411–416.
- Nagaishi, T., & Nakajima, S. (2010). Overshadowing of running-based taste aversion learning by another taste cue. *Behavioural Processes*, *83*, 134–136.
- Riley, A. L., & Freeman, K. B. (2004). Conditioned taste aversion: A database. *Pharmacology, Biochemistry, and*

Behavior, 77, 655–656. Available from <http://www.ctalearning.com>.

佐保 優希音・永石 高敏(2022). 4種の高級食パンを用いたラットにおける食物選好 帝塚山大学心理科学論集, 5, 53-57.

Forced Swimming Induced Taste Aversion Learning With Mice

Saki UMEMOTO and Takatoshi NAGAISHI

Abstract

This study examined whether swimming-based conditioned taste aversion can be observed in mice. Specifically, the conditioning phase comprised six cycles, with one cycle every two days. On the first day of each cycle, mice in the paired group were given 20 minutes of access to cheese in the feeding cages, immediately followed by a 20-minute forced swim treatment. On the next day, the mice spent 40 minutes in their home cages at the experimental room. Mice in the unpaired group were given 20 minutes of access to cheese, followed by a 20-minute holding period in the home cages on the first day of each cycle. On the next day, the mice spent a 20-minute holding period in their home cages, immediately followed by a 20-minute forced swim treatment. Upon completion of the conditioning, both groups of mice were given a choice test for cheese (cheese vs. bread). During the conditioning phase, there was no difference in the amount of cheese consumed by the two groups of mice, and no conditioned taste aversion to cheese was observed. In the choice test, however, mice in the paired group showed a much lower preference for cheese than the unpaired group of mice. This suggests that swimming-based conditioned taste aversion to cheese occurs.

Keywords: taste aversion learning, forced swimming, mice