
原著論文

タッチスクリーンを用いた新たなマウス意思決定課題の作出

Creating a new decision-making task for mice using touchscreen

鈴木 健 (早稲田大学人間科学研究科)¹, 城宝 大輔 (早稲田大学人間科学研究科)
牧野 友祐 (早稲田大学人間科学研究科), 京相 和貴 (早稲田大学人間科学研究科)
掛山 正心 (早稲田大学人間科学学術院)

Takeru Suzuki (Graduate School of Human Sciences, Waseda University)¹,
Daisuke Joho (Graduate School of Human Sciences, Waseda University),
Yusuke Makino (Graduate School of Human Sciences, Waseda University),
Kazuki Kyoso (Graduate School of Human Sciences, Waseda University),
Masaki Takeyama (Faculty of Human Sciences, Waseda University)

(Received : February 27, 2023 ; Accepted : August 2, 2023)

Abstract

Decision-making is the cognitive function of selecting an action from a set of options based on experience, memory and current sensory information. The neural mechanisms of decision-making are one of the 'black boxes' involved in dementia and depression, and the mechanisms are still unknown. Several studies have been conducted in mice to elucidate the neural basis of cognitive functions, but no behavioral task has been able to accurately capture the moment of decision. In this study, we developed a novel behavioral task in which mice choose an action based on visual information using a touch-screen operant behavior apparatus. Based on a series of experiments conducted during the development process, the experimental protocol was modified and revalidated. As the decision task developed in this study can capture the moment of decision, it is expected that in the future it can be combined with neural activity analysis to elucidate the neural mechanisms of decision-making.

Key Words : Decision-making, Mouse, Touchscreen, Behavior, Neuroscience

1. はじめに

意思決定は外部環境の知覚が駆動するボトムアップ情報処理と、脳内の経験・知識が駆動するトップダウン情報処理によってなされると考えられている^(1, 2)。

意思決定は認知症⁽³⁾やうつ病⁽⁴⁾に関与するが、その神経機構は未だ解明されていない。霊長類において、意思決定はわずか0.5秒程度で行われることが明らかとなっている⁽⁵⁾。このタイムスパ

¹ Takeru Suzuki (Graduate School of Human Sciences, Waseda University) : tptq7117@akane.waseda.jp

ンの中でボトムアップ、トップダウンの神経情報処理を検出するためには、遺伝子操作による特異的神経回路の可視化と神経活動計測^(6, 7)、その特異的神経活動制御^(8, 9)が可能なマウス実験を行うことが望ましい。しかしながら、経験を利用し、悩み、意識的に判断を下すような高度な意思決定プロセスを反映するマウス行動課題は少ない。

そこで本研究は、マウスに視覚情報と過去の経験・記憶をもとに行動を選択させる、意思決定行動課題を作出する目的で行った。行動課題には、我々が開発したマウス・タッチスクリーンオペラント実験装置を用いた。実験1では課題作成のため、探索的に様々な条件を検討した。実験2では実験1で得られた知見をもとに、別の動物で要因を絞りより詳しく検討し、訓練プロセスの短縮に成功した。さらに、今後意思決定の神経機構を調べることに適した、意思決定の瞬間を捉えることが可能な行動課題へと改良した。

2. 方法 (実験1と実験2共通)

2.1. 実験場所と動物

全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のもと、早稲田大学の各種規則に則り行った。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 (P2A) で行った (室温 22 ± 3 °C、湿度40 ~ 70%、明暗周期12時間 (明期 8 : 00 ~ 20 : 00))。ジャクソン・ラボラトリー・ジャパンから購入した10週齢の野生型雄C57BL/6Nマウスを10匹使用した。実験1では7匹、実験2では3匹使用

した。課題では餌を報酬として用いたため、試験期間中、実験開始前体重の80%以上を維持するよう制限給餌を行った。試験期間中、飲水は自由とした。マウスは1匹ずつ個別飼育した。

2.2. タッチスクリーンオペラント実験装置

実験チャンバーの一面に有機ELディスプレイとタッチ検出ユニットから構成される15インチのタッチスクリーンが置かれ、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行動試験装置を用いた (小原医科産業、東京; Fig. 1)。実験チャンバーはタッチスクリーンモニター側 (240mm) から報酬ディスペンサー側 (55mm) に向けて狭まっている台形状の高さ200mmの不透明アクリル製である。タッチスクリーンの前面には、中央に1辺57mmの正方形の穴、実験1では左右には直径57mmの正円の穴が、実験2では左右に1辺57mmの正方形の穴が水平に8mmの間隔で3つ開けられた黒色のプラスチック板を設置した (以後、3つの穴を左から左窓、中央窓、右窓とする。後述する一部の実験では取り外した)。チャンバー内のマウスはこの穴からスクリーンを見てNose Pokingにより回答する (Fig. 1B)。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観察した。報酬として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から与えた。チャンバー内の床から45cm上方にハウスランプを設置した。

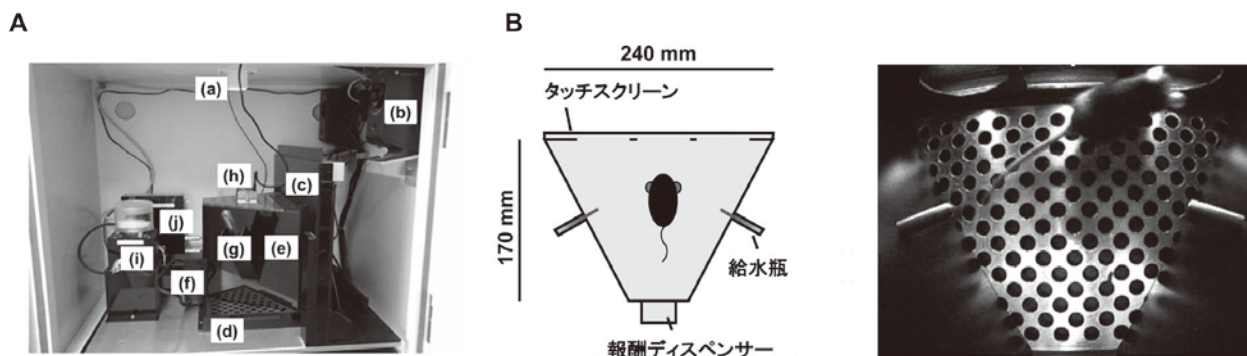


Figure 1. タッチスクリーンオペラント実験装置

(A) 装置の外観 (a) ハウスランプ (b) スピーカー (c) タッチスクリーン (d) ステージ (e) 装置の壁面 (f) 給餌口 (g) 給水瓶 (h) CCDカメラ (i) 報酬ディスペンサー (j) 制御装置
(B) 実験装置内を上から見た模式図 (左) と画像 (右)。

3. 方法 (実験1)

以下のすべての実験において、1日1セッション行った。各Taskの目的と直前のTaskからの変更点はTable 1にまとめた。

3.1. 馴化 (Habituation)

30分を1セッションとし、全てのマウスが1セッション行った。課題開始前に10粒の報酬ペレツ

ト (10mg) を報酬ディスペンサーに置いた状態で開始した (Fig. 1)。チャンバーにマウスを投入し、前半の15分間はチャンバー内を自由に探索させた。後半の15分間は、30秒毎に1秒間の高いピーブ音 (正解音) が鳴り、それとともに報酬ペレット1粒を報酬ディスペンサーから放出した。課題終了後、マウスをホームケージに戻し、報酬ディスペンサーに残ったペレットの数を計測した。

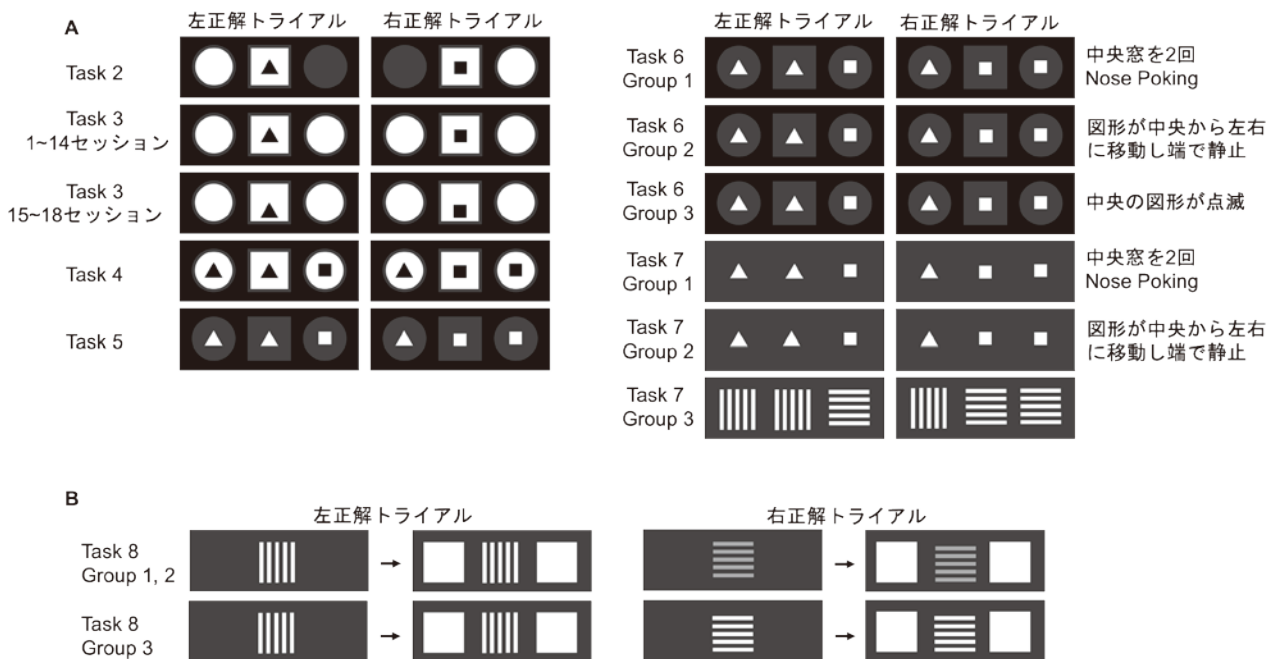


Figure 2. 実験1 マウスから見たスクリーンの模式図 (A) Task 2 ~ Task 7 (B) Task 8

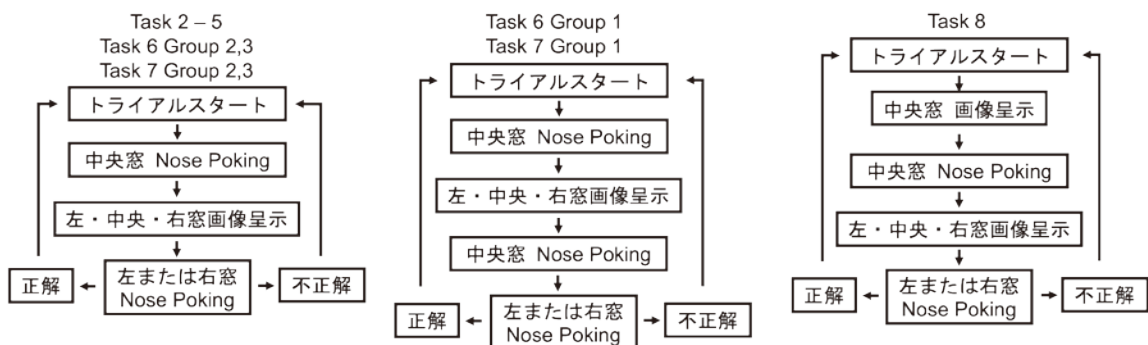


Figure 3. 実験1 トライアル手順 (Task 2 ~ Task 8)

Table 1. 各Taskの目的、直前Taskからの変更点 (実験1)

| Task | 直前 Task からの主な変更点 | 目的 |
|--|---|--|
| Task 1(行動形成課題) | マウスが中央窓を Nose Poking すると報酬を与えた | 行動形成(中央窓への Nose Poking)を行う |
| Task 2(明るさ手がかり課題) | 中央窓 Nose Poking 後、中央に図形を呈示し左右の正解の方のみ点灯させ、マウスが正答すると報酬を与えた | 各図形の正解方向を学習させる |
| Task 3(意思決定課題、図形) 1-14 セッション | 「左右の正解の方のみ点灯」から「左右両方点灯」に変更した | 図形と対応する正解方向を学習したかを検証する |
| Task 3(意思決定課題、図形) 15-18 セッション | 中央に呈示する図形的位置を下げた | 図形的位置が学習に与える影響を検証する |
| Task 4(見本合わせ課題、黒図形) | 左右にも図形を呈示した | 図形と対応する正解方向の窓にも図形を呈示し、マウスが左右のうち中央と同図形が呈示されている方を選択することで、各図形の正解方向を学習させる |
| Task 5(見本合わせ課題、白図形) | 呈示する図形の色を白背景・黒図形から黒背景・白図形に変更した | 画像全体の明度が学習に与える影響を検証する |
| Task 6 Group 1(見本合わせ課題、図形 Nose Poking) | 図形呈示後も中央窓を再度 Nose Poking させた | マウスに図形呈示後 Nose Poking させ、図形を認識させる |
| Task 6 Group 2(図形移動課題) | 中央の図形を正解方向に移動させた | 図形を正解方向に移動させ、マウスを誘導することで、図形に対応した正解方向を学習させる |
| Task 6 Group 3(図形点滅課題) | 中央の図形を点滅させた | 図形を点滅させ、マウスの注意を引き、図形を認識させる |
| Task 7 Group 1(見本合わせ課題、図形 Nose Poking) | プラスチック板を外した | プラスチック板除去の学習への影響を検証する |
| Task 7 Group 2(図形移動課題) | プラスチック板を外した | プラスチック板除去の学習への影響を検証する |
| Task 7 Group 3(見本合わせ課題、縞画像) | <ul style="list-style-type: none"> プラスチック板を外した 画像を図形から縦縞・横縞に変更した | プラスチック板除去と画像の変更による学習への影響を検証する |
| Task 8 Group 1, 2(意思決定課題、縦縞・横縞) | <ul style="list-style-type: none"> トライアル開始時から視覚刺激を中央に呈示した 視覚刺激には縦縞と横縞を用いた 縦縞は黒と白色線、横縞は黒と灰色線を用いた 左右には白色画像を呈示した コレクショントライアルを導入した | (1)トライアル開始時に視覚刺激を呈示、(2)刺激画像を全体の明るさが異なる縦縞と横縞に変更、(3)コレクショントライアルの導入による学習への影響を検証する |
| Task 8 Group 3(意思決定課題、縦縞・横縞) | <ul style="list-style-type: none"> トライアル開始時から視覚刺激を中央に呈示した 視覚刺激には縦縞と横縞を用いた 縦縞および横縞で黒と白色線を用いた 左右には白色画像を呈示した コレクショントライアルを導入した | (1)トライアル開始時に視覚刺激を呈示、(2)コレクショントライアルの導入による学習への影響を検証する |

3.2. Task 1 (行動形成課題)

全てのマウスにおいて8セッション行った。マウスがモニターの中央窓をNose Pokingした場合、正解音とともに報酬ディスペンサーより報酬ペレットを一粒放出した。中央窓へのNose Pokingから

報酬ディスペンサーへのNose Pokingまでを1トライアルとした。セッション中はトライアルを繰り返し、50トライアルに到達またはセッション開始から30分経過で1セッション終了とした。

3.3. Task 2 (明るさ手がかり課題)

全てのマウスにおいて15セッション行った。

まず、マウスが中央窓をNose Pokingした場合、中央窓には1つの視覚刺激画像を呈示した (Fig. 2A, Fig. 3)。視覚刺激画像は正三角形または正方形 (白色背景・黒色図形) のうちどちらか一方を呈示し、正三角形を呈示したトライアルでは、同時に左窓に白色正円画像を呈示した。正方形を呈示したトライアルでは、同時に右窓に白色正円画像を呈示した。マウスが左右の穴のどちらかをNose Pokingし、正解または不正解を判定した。中央窓に正三角形を呈示した場合、左窓をNose Pokingすると正解、右窓をNose Pokingすると不正解とし、中央窓に正方形が呈示された場合、右窓をNose Pokingすると正解、左窓をNose Pokingすると不正解とした。正解した場合、1秒間の高い正解音とともに報酬ディスペンサーに報酬ペレットを1粒放出し、不正解の場合、10秒間のInter Trial Interval (ITI) に入った。ITIでは、1秒間の低いビーブ音 (不正解音) が鳴り、ビーブ音の開始と同時にチャンバー上部のハウスランプを10秒間消灯した。正解トライアルでは中央窓への画像呈示から報酬ペレットが放出されるまでを1トライアルとした。不正解トライアルでは中央窓への画像呈示から10秒間のハウスランプ消灯が終了するまでを1トライアルとした。正三角形のトライアルと正方形のトライアルの順番は擬似ランダムで決定した。総トライアル数が50に到達するか、セッション開始から30分経過で1セッション終了とした。

3.4. Task 3 (意思決定課題、図形)

全てのマウスにおいて18セッション行った。Task 2からの変更点として、中央窓への視覚刺激画像呈示と同時に、左右の窓両方に白色の正円画像を呈示した (Fig. 2A, Fig. 3)。また、15セッション以降は、視覚刺激画像の正三角形と正方形の位置を12.5mm下 (床から図形の底辺まで27.5mm) に変更した画像を用いた。14セッションまでは総トライアル数が50に到達するか、セッション開始から30分経過で1セッション終了とした。15セッション以降は総トライアル数が100に到達するか、セッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

3.5. Task 4 (見本合わせ課題、黒図形)

全てのマウスにおいて6セッション行った。中央窓に呈示する視覚刺激画像は、Task 2及びTask 3の1から14セッションまでに用いた、中央に正三角形または正方形図形が配置された画像を用いた。Task 3からの変更点として、左右の窓に呈示する白色正円画像を変更した (Fig. 2A, Fig. 3)。左窓に呈示する画像には、視覚刺激画像に用いたものと同サイズの正三角形を正円の中央に配置した画像を用いた。右窓に呈示する画像には、視覚刺激画像に用いたものと同サイズの正方形を正円の中央に配置した画像を用いた。総トライアル数が100に到達するか、セッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

3.6. Task 5 (見本合わせ課題、白図形)

全てのマウスにおいて7セッション行った。Task 4からの変更点として、3つの窓全てにおいて、呈示する図形画像を白色背景・黒色図形画像から黒色背景・白色図形画像に変更した (Fig. 2A, Fig. 3)。

3.7. Task 6 (見本合わせ課題・図形移動課題・図形点滅課題)

7匹のマウスを3グループに分け (Group 1, 2, 3の順に $n=2, 2, 3$)、異なる課題を行った (Fig. 2A, Fig. 3)。Group 1, 3は8セッション、Group 2は4セッション行った。

Group 1では中央窓へのNose Pokingにより3つ全ての窓に画像を呈示し、再度マウスが中央窓をNose Pokingした場合、その後の左右の窓へのNose Pokingで正解または不正解を判定した。つまり、Task 5からの変更点としては、中央窓へのNose Pokingと左右の窓へのNose Pokingの間に、視覚刺激画像が呈示された状態でもう一度中央窓をNose Pokingをすることをマウスに課した。

Group 2では、Task 5からの変更点として、中央窓に呈示する刺激画像をGIF形式の画像に変更した。刺激画像の図形にはTask 5と同サイズ・色の正三角形、正方形図形を用い、正三角形の場合、水平左方向に一定の速度で一度だけ移動するGIF画像を用いた (移動時間1000 msec)。正方形の場合、水平右方向に一定の速度で一度だけ移動するGIF画

像を用いた（移動時間800 msec）。各図形の移動は、刺激呈示と同時に開始し、窓の中央から左または右の端まで移動させ、移動後は窓の端で停止させた。

Group 3では、Task 5からの変更点として、中央窓に呈示する刺激画像の図形を点滅させたGIF形式画像を用いた。刺激画像の図形にはTask 5と同サイズ・色の正三角形、正方形図形を用いた。黒色の背景と、白色図形画像を100 msecごとに交互に呈示することで図形が点滅するGIF形式画像を作成した。

3.8. Task 7（見本合わせ課題・図形移動課題）

全てのマウスにおいて15セッション行った。Task 6からの変更点として、タッチスクリーンの前面に配置した穴の空いたプラスチック板を外した状態で課題を行った（Fig. 2A, Fig. 3）。Group 1ではTask 6と同様の課題をプラスチック板なしで行った。Group 2はTask 6と同様に図形を移動させ、その移動速度を上げた（移動時間は正三角形500 msec、正方形600 msec）。Group 3は、Task 6の正三角形の図形を縦縞図形、正方形の図形を横縞図形に変更した。

3.9. Task 8（意思決定課題、縦縞・横縞）

全てのマウスにおいて33セッション行った。Task 7に引き続き、プラスチック板を外した状態で課題を行った。Task 7からの変更点として、視覚刺激画像（縦縞または横縞画像）を中央に呈示した状態でトライアルを開始し、マウスが中央の画像をNose Pokingした後、中央の視覚刺激画像は呈示し続け、左右には白色正方形画像を呈示した（Fig. 2B, Fig. 3）。マウスの左または右窓へのNose Pokingによって、正解・不正解を判定した。中央に呈示した視覚刺激画像は、縦縞及び横縞画像を用いた。Group 1及びGroup 2では、縦縞画像の縞模様には黒・白色線を、横縞画像の縞模様には、黒・灰色線を用いた。Group 3の縦縞・横縞画像の縞模様には、どちらも黒・白色線を用いた。Group 1では、Task 7までと同様、不正解後にのみITIを10秒設けたが、Group 2, 3では、正解後・不正解後共にITIを20秒に変更した。全てのマウスにおいて、不正解トライアルの後に正解するまで不正解トライアルと同内容のトライアルを繰り返し行った。その

繰り返し行ったトライアルをコレクショントライアルとした。セッション中はトライアルを繰り返し、コレクショントライアルの正解も含めた総正解トライアル数と経過時間をセッション終了条件とした。Group 1では、総正解トライアル数が50に到達するか、セッション開始から60分経過で1セッション終了とした。Group 2, 3では、総正解トライアル数が30に到達するか、セッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

3.10. 統計解析（実験1）

統計解析にはGraphPad PRISM 7（GraphPad Software）を用いた。正解トライアル数を総トライアル数で割り、正答率とした（%表記を用いた）。Task 8の正答率には、コレクショントライアルを除いたトライアルにおける正答率を用いた。Task 2の第1セッションと他のセッションの正答率の比較（Fig. 4A）では、repeated measure one-way ANOVAとDunnettの多重比較検定を用いた。Task 3からTask 7の第1セッションと最終セッションの正答率の比較（Fig. 4B）には、対応のあるt検定を用いた。正答率のチャンスレベル（50%）との比較では、1標本t検定を用い、Task 2からTask 5では全7匹の正答率、Task 6からTask 8ではGroupごとに正答率を比較した。いずれも $p < 0.05$ を有意水準とした。ns：統計的有意差なし。統計データは特に記載のない限り平均値±標準誤差で表示し、nは動物数を示す。

4. 結果（実験1）

各Taskの結果はTable 2にまとめた。

4.1. Task 1（行動形成課題）

実験1では、7匹のマウスで馴化を行った後、Task 1を行った。Task 1は、モニター中央窓へのNose Pokingにより報酬を獲得する課題により、マウスは中央窓へのNose Pokingと、正解音を経験した。第1セッションでは全マウスのトライアル数は 14 ± 3.9 （平均±標準誤差）であった。最終第8セッションでは全マウスで上限50トライアルに達した。

Table 2. 各Taskの結果 (実験1)

| Task | 結果の概要 |
|--|--|
| Task 1(行動形成課題) | 全マウスで上限トライアル数を達成した |
| Task 2(明るさ手がかり課題) | 正答率は徐々に増加した(1 st = 51.6 ± 3.3 %, 15 th = 88.9 ± 2.9 %, Fig. 4A) |
| Task 3(意思決定課題、図形)1-14 セッション | 正答率は、Task 3からTask 7において、第1セッションと最終セッションで有意差は見られなかった(Fig. 4B) |
| Task 3(意思決定課題、図形)15-18 セッション | |
| Task 4(見本合わせ課題、黒図形) | |
| Task 5(見本合わせ課題、白図形) | |
| Task 6 Group 1(見本合わせ課題、図形 Nose Poking) | |
| Task 6 Group 2(図形移動課題) | |
| Task 6 Group 3(図形点滅課題) | |
| Task 7 Group 1(見本合わせ課題、図形 Nose Poking) | |
| Task 7 Group 2(図形移動課題) | |
| Task 7 Group 3(見本合わせ課題、縞画像) | |
| Task 8 Group 1, 2, 3(意思決定課題、縦縞・横縞) | <ul style="list-style-type: none"> • 正答率は徐々に上昇した(Fig. 4C) • Group 1, 2, 3 で正答率がチャンスレベルより有意に高いセッションはそれぞれ 7, 2, 16 セッションであった |

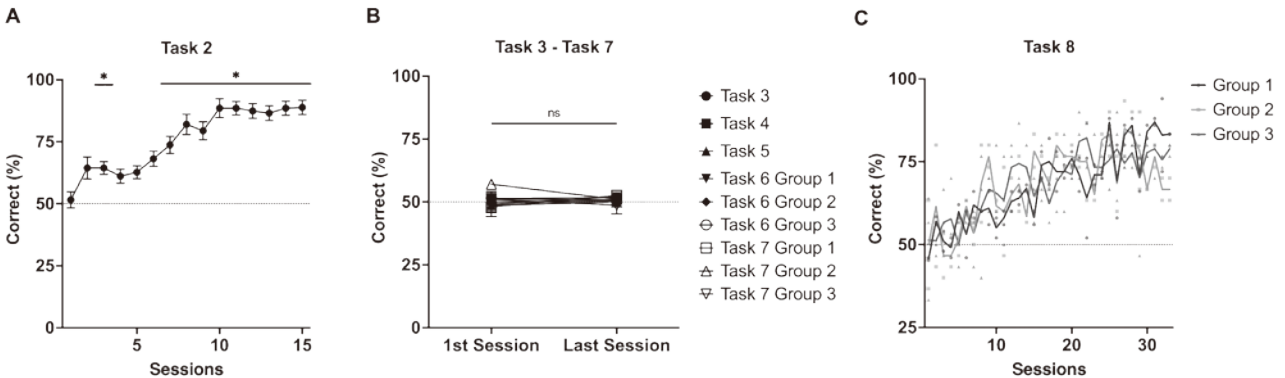


Figure 4. 実験1
 (A) Task 2正答率の推移 (n=7, 平均±標準誤差)。* $p < 0.05$ vs 1stセッション
 (B) Task 3からTask 7の1stセッションと最終セッションの正答率の比較 (Task 3, 4, 5 : n=7, Task 6, 7 Group 1, 2 : n=2, Task 6, 7 Group 3 : n=3, 平均±標準誤差)
 (C) Task 8正答率の推移 (線: Group内平均値, 点: 各個体の値)

4.2. Task 2 (明るさ手がかり課題)

Task 1では全個体上限トライアル数に達したため、Task 2に移行した。Task 2では中央窓に正三角形または正方形の視覚刺激を呈示し、左右のうちその刺激と対応した正解の一方のみ白色正円画像を呈示した。トライアル数は第1セッションでは48.7 ± 1、第4セッション以降は全マウスで上限50トライアルに達した。正答率は徐々に増加した (1st = 51.6 ± 3.3%, 15th = 88.9 ± 2.9%, Fig. 4A)。セッション1と比較した正答率の比較では、セッション3及びセッション7以降において有意に高かった ($p < 0.05$)。また、チャンスレベルとの比較では、セッション2以降で有意に高かった ($p < 0.05$)。

4.3. Task 3 (意思決定課題、図形) — Task 7 (見本合わせ課題・図形移動課題)

Task 2で正答率の上昇が確認できたため、Task 3に移行した。Task 3では、中央の視覚刺激呈示と同時に左右窓両方に白色正円画像を呈示した。Task 3の14セッションまでに正答率の上昇は見られず、視覚刺激図形の位置を下に移動させた15セッション以降においても正答率の上昇は見られなかった。Task 3を18セッション行った後、Task 4に移行した。Task 4では中央窓に視覚刺激を呈示し、視覚刺激と対応した左右の窓それぞれに対応した視覚刺激を呈示した (左窓には正三角形、右窓に

は正方形)。Task 4は6セッション行い、正答率の上昇は見られなかった。Task 5ではTask 4で用いた白色背景・黒色図形画像を、黒色背景・白色図形画像に変更して同様の課題を行った。Task 5は7セッション行ったが、正答率の上昇は見られなかった。Task 6では7匹のマウスを3つのGroupに分けた。Group 1では、中央窓へのNose Pokingにより視覚刺激が呈示され、再度中央窓をNose Pokingした後、左右の窓をNose Pokingさせる課題、Group 2では中央の図形を正解方向に移動させる画像に変更した課題、Group 3では視覚刺激図形が点滅する画像に変更した課題を行ったが、いずれも正答率の上昇は見られなかった。Task 7では、モニターの前に配置した黒色プラスチック板を取り外し、Task 6と同様の課題を行った。Group 3では、視覚刺激図形を正三角形・正方形から縦縞・横縞画像に変更したが、全Groupにおいて正答率の上昇は見られなかった。

トライアル数は、全マウスにおいて、3セッション (Group 3の1個体のTask 5セッション4:90トライアル、Group 1の1個体のTask 6セッション1:77トライアル、Task 6セッション5:98トライアル)を除いて全てのセッションで上限に達した。正答率は、Task 3からTask 7において、第1セッションと最終セッションで有意差は見られなかった (Fig. 4B)。また、各セッションの正答率のチャンスレベルとの比較では、3セッション (Task 3の第16セッション:52.9±1.1、Task 4の第1セッション:55±1、Group 3のTask 7の第5セッション:51.7±0.3)を除いた全てのセッションで有意差は見られなかった。

4.4. Task 8 (意思決定課題、縦縞・横縞)

Task 8では、視覚刺激画像をトライアルスタート時から中央窓に呈示する課題を行った。コレクショントライアルを含めた総正解トライアル数は、セッション1では、Group 1で46±4、Group 2で30±0、Group 3で28.3±1.7であったが、セッション3以降は全てのマウスで上限に達した。正答率は徐々に上昇した (Fig. 4C)。Group 1, 2, 3で正答率がチャンスレベルより有意に高いセッションはそれぞれ7, 2, 16セッションであった。

5. 考察 (実験1)

実験1では様々な刺激画像や手順を試した結果、最終的に視覚刺激をもとにマウスが正解を選択できることが示唆された。Task 2は、中央窓への視覚刺激呈示と同時に、正解の窓に白色正円画像を呈示する課題である一方、Task 3は正解・不正解窓ともに白色正円画像を呈示した。Task 2で正答率がチャンスレベルから上昇した一方、Task 3では正答率の上昇は見られなかったため、マウスはTask 2において、(1) 正解を選択し報酬を獲得することを学習し、(2) 左右窓の明るさを手がかりに正解を選択し、(3) Task 3で、視覚刺激を手がかりに左右を選択することを学習出来なかったと言える。Task 4からTask 7では、2種類の視覚刺激と同じ図形を、視覚刺激と対応する左右の窓にそれぞれ呈示したが、正答率の上昇は見られなかった。その理由として、中央窓をNose Pokingし、視覚刺激が呈示されたときにマウスはスクリーン付近にいるため、スクリーン全体を俯瞰して見るのが難しく、左右の窓から中央窓と同じ図形が呈示されている一方を選択することが難しいことが考えられる。Task 8では、Group 1, 2において、異なる明度の縦縞・横縞画像を用い、Group 2では同明度の縦縞・横縞画像を用いた。全てのGroupで正答率の上昇が見られたため、マウスは2つの視覚刺激の明度差の有無に関わらず、視覚刺激と左右の関係を学習し、正解を選択することができたと言える。

6. 方法 (実験2)

以下のすべての実験において、1日1セッション行った。各Taskの目的と直前のTaskからの変更点はTable 3にまとめた。

6.1. 馴化 (Habituation)

実験1と同内容の馴化を1セッション行った。

6.2. Task 1 (行動形成課題)

全マウスが15セッション行った。マウスが報酬ディスペンサーへNose Poking (タッチ検出ユニットにおいて検出) することで開始し、モニターの中央窓にクロスポイント画像が呈示される。クロスポイント画像にマウスがNose Pokingすると、正解音とともに報酬ディスペンサーより報酬ペレット

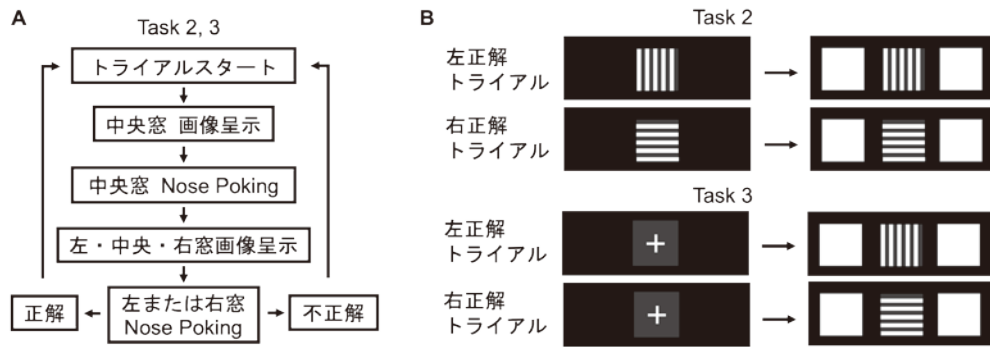


Figure 5. 実験2 Task3, 4 (A) トライアル手順 (B) マウスから見たスクリーンの模式図

Table 3. 各Taskの目的、直前Taskからの変更点 (実験2)

| Task | 直前 Task からの主な変更点 | 目的 |
|------------------------------|--|--|
| Task 1(行動形成課題) | マウスが中央窓を Nose Poking すると報酬を与えた | 行動形成(中央窓への Nose Poking)を行う |
| Task 2(意思決定課題、縦縞・横縞) | <ul style="list-style-type: none"> • トライアル開始時から視覚刺激を中央に呈示した • マウスが中央窓 Nose Poking 後、中央には視覚刺激を呈示し続け、左右両方白色画像を呈示し、マウスが正答すると報酬を与えた • 視覚刺激には縦縞と横縞を用いた | 実験1の Task 8 からコレクショントライアルを除き、正答率が上昇するかを検証する |
| Task 3(意思決定課題、縦縞・横縞、開始キューあり) | トライアル開始時に中央に呈示する画像を視覚刺激画像からクロスポイント画像に変更した | マウスが中央を Nose Poking してから視覚刺激を呈示しても高い正答率を示すかを検証する |

トを一粒放出した。最初の報酬ディスペンサーへの Nose Pokingから報酬ペレット放出までを1トライアルとした。セッション中はトライアルを繰り返す、100トライアルに到達するかセッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

6.3. Task 2 (意思決定課題、縦縞・横縞)

全マウスが24セッション行った。

まず、中央窓に2種類の視覚刺激画像(縦縞、横縞)のうちどちらか一方を呈示した(Fig. 5A, B)。マウスが中央窓をNose Pokingした場合、中央窓には同じ視覚刺激画像を呈示し続け、左右に白い正方形画像を呈示した。両群とも、マウスが左右の穴のどちらかをNose Pokingし、正解または不正解を判定した。中央窓に縦縞が呈示された場合、左を選択すると正解、右を選択すると不正解とし、中央窓に横縞が呈示された場合、右を選択すると正解、左を選択すると不正解とした。正解した場合、1秒間の高い正解音とともに報酬ディスペンサーに報酬ペレットを一粒放出し、不正解の場合は1秒間の低いピープ音(不正解音)が鳴り、ピープ音の開始と

同時にチャンバー上部のハウスランプを10秒間消灯した。正解トライアルでは中央窓への画像呈示から報酬ペレットが放出されるまでを1トライアルとした。不正解トライアルでは中央窓への画像呈示から10秒間のハウスランプ消灯が終了するまでを1トライアルとした。縦縞のトライアルと横縞のトライアルの順番は疑似ランダムで決定した。総トライアル数が100に到達するか、セッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

6.4. Task 3 (意思決定課題、縦縞・横縞、開始キューあり)

全てのマウスで25セッション行った。Task 3からの変更点として、トライアル開始時に中央窓に呈示する画像を、視覚刺激画像からクロスポイント画像に変更した(Fig. 5A, B)。マウスが中央に呈示されたクロスポイント画像をNose Pokingした場合、中央窓には2種類の視覚刺激(縦縞、横縞)のうちどちらか一方を呈示し、左右に白い正方形画像を呈示した。その後、マウスが左右のどちらかを選択し、正解または不正解を判定した。セッション中

はトライアルを繰り返し、100トライアルに到達するかセッション開始から60分経過で1セッション終了とした。

6.5. 統計解析 (実験2)

統計解析にはGraphPad PRISM 7 (GraphPad Software) を用いた。正解トライアル数を総トライアル数で割り、正答率とした (%表記を用いた)。正答率のチャンスレベル (50%) との比較では、1標本t検定を用いた。いずれも $p < 0.05$ を有意水準とした。ns: 統計的有意差なし。統計データは特に記載のない限り平均値±標準誤差で表示し、nは動物数を示す。

7. 結果 (実験2)

各Taskの結果はTable 4にまとめた。

7.1. Task 1 (行動形成課題)

実験2では、実験1とは異なる3匹のマウスを用いて、課題を行った。Task 1では、中央窓にクロスポイント画像を呈示し、マウスが中央窓をNose

Pokingした場合、報酬を与える課題を行った。第1セッションでは全マウスのトライアル数は 49.2 ± 3.3 であった。第4セッション以降では全マウスで上限100トライアルを達成した。

7.2. Task 2 (意思決定課題、縦縞・横縞)

Task 1で全マウスのトライアル数が上限に達したため、Task 2に移行した。Task 2は、実験1のTask 8を参考にした。トライアルスタートと同時に縦縞または横縞画像を中央窓に呈示し、マウスが中央窓をNose Pokingした場合、中央窓には視覚刺激画像を呈示し続け、左右には白色正方形画像を呈示した。トライアル数は第2セッションの1個体を除いて (トライアル数93)、全てのセッションで全個体100 トライアルに到達した。正答率は徐々に増加した ($1^{st} = 51 \pm 0\%$, $24^{th} = 89.7 \pm 4.98\%$, Fig. 6)。各セッションの正答率をチャンスレベルと比較した検定では、第10セッション以降で正答率が有意に高かった。

Table 4. 各Taskの結果 (実験2)

| Task | 結果の概要 |
|------------------------------|--|
| Task 1(行動形成課題) | 全マウスで上限トライアル数を達成した |
| Task 2(意思決定課題、縦縞・横縞) | 正答率は徐々に増加した ($1^{st} = 51 \pm 0\%$, $24^{th} = 89.7 \pm 4.98\%$, Fig. 6) |
| Task 3(意思決定課題、縦縞・横縞、開始キューあり) | 正答率はTask 3の初期においてTask 2から減少したが、セッションを経るごとに徐々に上昇した ($1^{st} = 61.3 \pm 5.7\%$, $25^{th} = 79 \pm 4\%$, Fig. 6) |

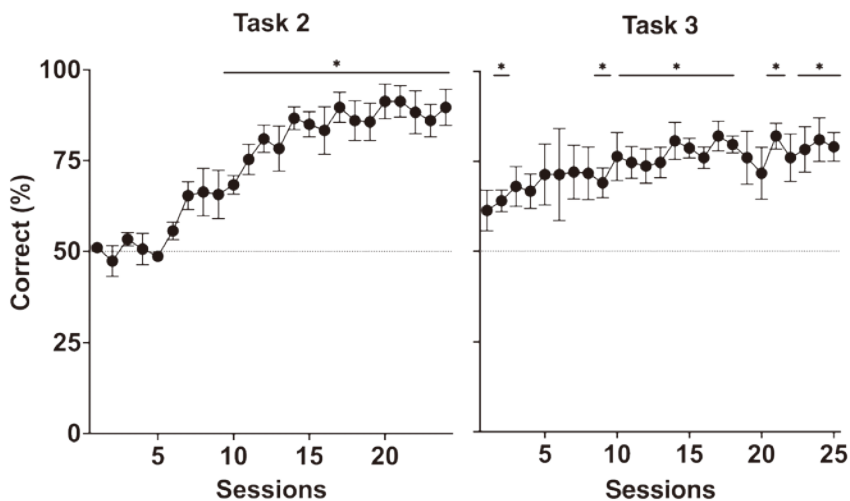


Figure 6. 実験2 Task 2, 3正答率の推移 (n=3, 平均±標準誤差)。* $p < 0.05$ (vs chance)

7.3. Task 3 (意思決定課題、縦縞・横縞、開始キューあり)

Task 2で正答率の上昇が見られたため、Task 3に移行した。Task 3では、トライアルスタート時に中央窓に呈示する画像を視覚刺激画像からクロスポイント画像に変更した。マウスが中央窓に呈示されたクロスポイント画像をNose Pokingすると、視覚刺激画像が呈示され、その後左右を選択する課題を行った。全マウスが全セッションで100トライアルを達成した。正答率はTask 3の初期においてTask 2から減少したが、セッションを経るごとに徐々に上昇した ($1^{\text{st}}=61.3\pm 5.7\%$, $25^{\text{th}}=79\pm 4\%$, Fig. 6)。各セッションの正答率をチャンスレベルと比較した検定では、14セッションで正答率が有意に高かった。

8. 考察 (実験2)

実験2では、実験1で得られた結果を受けて、実験1で正答率が上昇したTask 8と同様の課題で再度検証し、視覚刺激を手がかりに正解を選択する行動が実験1と比較し短い手順で再現された。さらに開始キュー(クロスポイント)をNose Pokingした後に視覚刺激を呈示した課題でも、視覚刺激をもとに正解を選択することを学習したことが示された。

実験2のTask 2では、中央窓の視覚刺激をトライアルスタート時から呈示した課題を行った。その後のTask 3では、トライアル開始時から視覚刺激を呈示するのではなく、マウスが一度クロスポイントをNose Pokingした後、視覚刺激を呈示した。Task 2とTask 3ともに最終的に正答率は上昇したが、Task 3の初期にはTask 2の終盤より正答率が減少した。このことから、Task 2では主に、中央窓に呈示された視覚刺激へのNose Pokingまでに、マウスが視覚刺激を認識し、その視覚情報が正解選択にとって重要であったと言える。一方で、Task 3では中央窓へのNose Pokingにより視覚刺激が呈示された後、視覚刺激を認識し、正解選択が行われた。Task 2, 3で、視覚刺激と左右の関係は一貫していたが、Task 3ではマウスが視覚刺激を認識するタイミングがより限定された。その上で、マウスは経験を重ねるにつれてその変化に対応したことが示された。

9. 総括

本研究では、タッチスクリーン装置を用いて、視覚情報を手がかりにマウスが刺激と対応した選択を行う意思決定が可能であることが示された。実験1のTask 8ではコレクショントライアルを導入し、不正解後に正解するまで不正解トライアルを繰り返したことが正答率の上昇に寄与した可能性がある一方で、実験2のTask 2, 3では、コレクショントライアルを用いない場合でも正答率が上昇することが確認された。また、実験1のTask 8で正答率が上昇した理由として、トライアルスタート時から視覚刺激を中央窓に呈示したことが挙げられる。なお、実験2のTask 2でもトライアルスタート時から視覚刺激を中央窓に呈示する課題を行っており、正答率の上昇を確認した。さらに、正答率の上昇が見られた実験1のTask 8や実験2の特徴として、視覚刺激として縦縞・横縞画像を用いた課題であった。以上から、現時点では正答率上昇の十分条件として、(1) トライアルスタート時から視覚刺激を中央窓に呈示したこと、(2) 縦縞・横縞画像を用いたこと、(3) コレクショントライアルを導入したことが挙げられる。そして、実験2のTask 3で示されたように、正答率が上昇したマウスにおいて、トライアルスタート時から中央窓に呈示する画像を視覚刺激画像から開始キューに変更した場合でも、正答率は徐々に高い値に到達することが明らかとなった。

タッチスクリーン装置を用いた齧歯類における類似課題では、図形や照明の位置やON/OFFを刺激として用いるものはあるが⁽¹⁰⁾、明るさや位置の弁別は一次視覚野を除去した動物でも可能である^(11,12)。一方、本研究では同じ明るさの視覚刺激を用いており、新皮質の視覚情報処理ボトムアップ経路を経た2つの図形の弁別が必要である⁽¹³⁾。そしてマウスが日常的に目にするものがない新規の光刺激を用いているので、課題学習時に形成された記憶のトップダウン情報処理が意思決定に必要である。タッチスクリーン装置では自由行動下のマウスで行動課題を行うため、比較的ストレスが少なく学習ができる。また、実験2のTask 3の課題では開始キューを設けることで、開始キューから視覚刺激画像に呈示画像が移る際、マウスはスクリーンを固視し続ける。そのため、視覚刺激を見始めたタイムポイントが明確に得られる。本研究の行動課題と、近

年開発されたMicroendoscope⁽¹⁴⁾を用いた細胞レベルの神経活動解析や、光照射により神経活動を制御できるオプトジェネティクス⁽¹⁵⁾を組み合わせ、視覚のボトムアップ情報処理や、記憶のトップダウン情報処理による意思決定の神経機構を解明することが可能となるだろう。本研究では、最終的に開始キューを設けた課題においても正答率を上昇させることに成功し、神経活動解析や制御への応用が期待される一方、より短いトレーニング期間での実現可能性も考慮して、プロトコルの更なる改訂も重要であると考えられる。

10. 研究倫理的な配慮

本研究に関わる実験計画書は早稲田大学動物実験倫理委員会の承認済であった。用いた動物の数は必要最小限になるように努め、不必要な苦痛やストレスを与えないよう注意を払いながら実験を行った。本研究に携わるもの全員が、文部科学省並びに早稲田大学の定める研究倫理講習を受講済みであった。

11. 利益相反

利益相反の有無：無

謝辞

本研究の遂行にあたり、早稲田大学大学院人間科学研究科環境脳科学研究室の皆様には終始ご指導、ご協力を賜りました。心よりの感謝を申し上げます。

引用文献

- Miller EK, Cohen JD. An integrative theory of prefrontal cortex function. *Annu Rev Neurosci.* 2001; 24: 167-202.
- Euston DR, Gruber AJ, McNaughton BL. The role of medial prefrontal cortex in memory and decision making. *Neuron.* 2012; 76(6): 1057-70.
- Manes F, Torralva T, Ibáñez A, Roca M, Bekinschtein T, Gleichgerricht E. Decision-making in frontotemporal dementia: clinical, theoretical and legal implications. *Dement Geriatr Cogn Disord.* 2011; 32(1): 11-7.
- Lawlor VM, Webb CA, Wiecki TV, Frank MJ, Trivedi M, Pizzagalli DA, et al. Dissecting the impact of depression on decision-making. *Psychol Med.* 2020; 50(10): 1613-22.
- Tomita H, Ohbayashi M, Nakahara K, Hasegawa I, Miyashita Y. Top-down signal from prefrontal cortex in executive control of memory retrieval. *Nature.* 1999; 401(6754): 699-703.
- Harvey CD, Coen P, Tank DW. Choice-specific sequences in parietal cortex during a virtual-navigation decision task. *Nature.* 2012; 484(7392): 62-8.
- Okuyama T, Kitamura T, Roy DS, Itoharu S, Tonegawa S. Ventral CA1 neurons store social memory. *Science.* 2016; 353(6307): 1536-41.
- Liu X, Ramirez S, Pang PT, Puryear CB, Govindarajan A, Deisseroth K, et al. Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature.* 2012; 484(7394): 381-5.
- Hyun JH, Nagahama K, Namkung H, Mignocchi N, Roh SE, Hannan P, et al. Tagging active neurons by soma-targeted Cal-Light. *Nat Commun.* 2022; 13(1): 7692.
- Turner KM, Simpson CG, Burne THJ. Touchscreen-based Visual Discrimination and Reversal Tasks for Mice to Test Cognitive Flexibility. *Bio Protoc.* 2017; 7(20): e2583.
- CRAFT LH, BUTTER CM. EFFECT OF STRIATE CORTEX REMOVAL ON WAVELENGTH DISCRIMINATION IN RATS. *The Psychological Record.* 1968; 18: 311-6.
- Humphrey NK, Weiskrantz L. Vision in monkeys after removal of the striate cortex. *Nature.* 1967; 215(5101): 595-7.
- Marshall JH, Kim YS, Machado TA, Quirin S, Benson B, Kadmon J, et al. Cortical layer-specific critical dynamics triggering perception. *Science.* 2019; 365(6453).
- Ghosh KK, Burns LD, Cocker ED,

- Nimmerjahn A, Ziv Y, Gamal AE, et al. Miniaturized integration of a fluorescence microscope. *Nat Methods*. 2011; 8(10): 871-8.
15. Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, Nagel G, Deisseroth K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat Neurosci*. 2005; 8(9): 1263-8.