

タッチモニタを用いたマウスにおける視覚弁別の訓練手続き

後藤和宏¹⁾・幡地祐哉¹⁾

Training protocol for touchscreen-based visual discrimination in mice

KAZUHIRO GOTO¹⁾ and YUYA HATAJI¹⁾

Abstract Automated touchscreen-based tasks are increasingly being used to explore a broad range of issues in learning and behavior in mice. Researchers usually report how they train mice before acquiring a target task concisely, and shaping protocols at this stage are typically flexible. In this report, we described a training protocol, developed in our laboratory, for mice acquiring a simultaneous discrimination performance using visual stimuli. C57BL/6N mice were first given magazine training. Nosepoke responses were then autoshaped and maintained on a continuous reinforcement schedule. Self-start response was then introduced in order to measure response time to complete each trial. The stimulus position was also varied across trials. We finally examined the contrast discrimination performance. Mice were tested with four different contrast ratios. Target stimuli were white and black targets and the brightness of distractors had values between targets and background. All mice successfully went through all training stages, confirming that this training protocol is promising for shaping appropriate discriminative behaviors in mice.

Key words : Mice, Touchscreen, Visual perception, Discrimination

1. 導入

オペラント箱を用いる実験では、実験者が動物に触れることなく、試行ごとに強化子を反復提示できるため、比較的長期間にわたり、条件統制された環境下で動物の行動を解析できる。タッチモニタを取り付けることで、試行ごとに異なる視覚刺激を提示できるため、霊長類や鳥類などの視覚を主な感覚モダリティとする動物種では、タッチモニタを取り付けたオペラント箱が様々な研究で用いられてきた。タッチモニタを動物実験に利用する試みは古くからあり、1970年代には、すでにハトの視覚探索課題の実験に使用されており (Blough, 1977)、タッチモニタが普及した1990年代にはヒトと動物との比較研究にも利用されるようになっていた (Robbins et

al., 1994)。

げっ歯類においても鳥類や霊長類と同様、タッチモニタを取り付けたオペラント箱や訓練プロトコルの開発などがされている (Sahgal & Steckler, 1994)。たとえば、タッチモニタを用いた装置には、動物が視覚刺激を弁別するとき、弁別刺激とレバーなどの反応デバイスとの対応関係を学習する条件性弁別よりも、モニタ上に提示される刺激に対して直接反応するほうが、弁別が速やかに学習されるという利点もある (Cook et al., 2004)。また、タッチモニタの普及に伴い、様々な装置開発がされる中で、既製品として購入すると高額になりがちなオペラント箱を安価に作製した装置を用いて、様々な視覚刺激の弁別が可能であることが報告されている (Brooks

1) 相模女子大学

〒252-0383 神奈川県相模原市南区文京2-1-1

連絡先：後藤和宏

E-mail: kazuhiro.goto@gmail.com

1) Sagami Women's University

Corresponding author: KAZUHIRO GOTO

J-STAGE Advance Published Date: June 23, 2020.

doi: 10.2502/janip.70.1.2

et al., 2013; Leising et al., 2013; O'Leary et al., 2018; Piantadosi et al., 2019; Wolf et al., 2014)。Bussey と Saksida らは、ラットとマウスの両方の動物種において、霊長類における Robbins らの開発した CANTAB のように標準化されたバッテリーテストを開発してきた (Bussey et al., 2001; Horner et al., 2013; Maret al., 2013)。彼らの研究成果をもとに、Bussey-Saksida Touchscreen Systems (Lafayette Instrument Company) や Touch panel operant test (小原医科産業株式会社) などの製品が開発され、現在では、ラットだけでなくマウスでもタッチモニタを取り付けたオペラント箱が普及している。

げっ歯類用のタッチモニタを取り付けたオペラント箱が普及する一方、その装置を用いて、実験者が関心を持つ実験課題を実施するための反応形成の方法は実験者によってまちまちである。実験者は実験ごとに、反応形成について試行錯誤し、徐々により効率の良い訓練方法を確立していくことが多いが、通常、実験の結果を報告する論文では、どのように反応形成したかは簡素な記述にとどまり、それについて具体的な記載がされることはほとんどない。また、実験者が動物の反応形成をおこなうときには、動物の行動を観察しながら、逐次接近法によって手動で行うことも多いため、パラメータを最適化した訓練プロトコルについて論文で言及されていることは少ない。また、手動での反応形成は、実験者の技能次第で、反応形成がうまくいく場合もあれば、そうでない場合も出てきてしまう。

Bussey および Saksida らは、タッチモニタを取り付けたオペラント箱で対連合学習、連続逆転学習、遅延見本合わせなどの課題を実施するために、ラットやマウスの反応形成をする際の方法や注意点についてまとめている (Horner et al., 2013)。しかし、これはラットのプロトコルが中心であり、マウスについては、ラット同様に見える箇所が多い。ラットにおいては、その後も訓練成功率を上げるためのパラメータの最適化が行われ、反応形成の更なる効率化が進んでいる。たとえば、視覚刺激を左右に配置した2肢弁別課題において、試行開始のためのスタート反応が導入され、刺激サイズが大きく、1セッションあたりの試行数が多く、試行間隔が長いことが弁別学習を速めることが示されている (Bussey et al., 2008)。また、液体報酬では、グルコースとサッカリンの混合液よりもストロベリーミルクシェイクを用いるほうが誤答数を減少させ、弁別学習を速められる (Phillips et al., 2017)。

本研究では、訓練のためのパラメータについて具

体的な記述がされていないマウスにおいて、視覚刺激を用いた2肢選択の同時弁別のための反応形成プロトコルについて示す。マウスでもタッチモニタ上に提示した視覚刺激を弁別するための訓練手続きや弁別可能な視覚刺激について報告したものはあるが (Bussey et al., 2001)、視覚刺激の弁別以前の訓練段階のプロトコルについては詳細な記述がない。また、訓練の進行が個体ごとに異なるため、個々の訓練段階に要する日数を個体ごとに変えている。これに対して、本研究は、視覚弁別前の訓練段階のプロトコルを詳述することを心がけた。また、各訓練段階に要する訓練日数を経験的に導き、すべての個体を同じ訓練日数で訓練できるような標準的なプロトコルを作成した。本研究では、さらに、反応形成完了後に、視覚弁別課題の一例として、明暗コントラスト弁別課題を実施し、コントラスト比を体系的に操作することで、実験者が想定した刺激次元による刺激性制御が生じることを確かめた。

反応形成は、以下に示す順序で段階的に進めた。マガジントレーニングでは、マウスが餌箱から餌を回収し、消費することを訓練することを目標とした。我々のプロトコルでは、マガジントレーニングは、装置への馴致も兼ねている。これは、マウスが新奇環境を探索する動物であり、装置内の探索行動が活発な状態では、反応形成が進められないからである。自動反応形成では、モニタ上に提示される刺激に対する接近行動を形成することを目標とした。連続強化訓練 (Continuous reinforcement: CRF) 第1段階では、モニタの左半分には提示される白円に対するノーズポークを定着させることを目標とした。CRF 第2段階では、刺激の提示位置を左右ランダムにし、提示位置にかかわらず刺激に対する反応を形成するのに加え、スタート刺激を導入し、スタート反応を形成することが目的である。CRF2 より肝心なのは、スタート反応の形成である。スタート反応の導入により、ラットでは、弁別学習が促進されることが示されている (Bussey et al., 2008)。CRF3 および CRF4 では、その後の明暗コントラストでの背景色および標的刺激を用いた訓練を行った。明暗コントラスト弁別では、実験者の意図した刺激次元にもとづく刺激性制御が生じるか確認した。

2. 方法

2.1 被験体

C57BL/6N 雄性マウス 6 個体 (日本 SLC) を用いた。マウスは 8 週齢で購入し、6 個体を 1 ケージ (182×260×128mm) で集団飼育した。飼育室に 2 週間馴致した後、実験を開始した。実験開始後、摂食は自由のまま、摂食を制限した。摂食制限前の平

均体重は24.2g（範囲：23.0–25.4）であり，摂食制限後の体重は21.2g（範囲：19.8–21.8）であった。実験は1個体ずつ実施し，6個体すべての実験終了後，集団ケージに10g程度，げっ歯類用の固形飼料（CE-2，日本クレア）を付加給餌することで体重を維持した。実験を実施しない日は15g程度の付加給餌をおこなった。飼育室内は，室温23℃に維持し，12：12時間の明暗周期（6：00–18：00が明期）であった。本研究計画は，相模女子大学の動物実験委員会によって承認された（承認番号2018-06）。

2.2 装置

1台のオペラント箱(ENV-307W, Med Associates, Georgia, VT)を用いた (Figure 1a)。オペラント箱は動物飼育室内のポリ塩化ビニル製の防音箱 (ENV-022V) の中に設置された。箱の内径は21.6(L)×18(W)×17.8(H)cmであった。オペラント箱の前面には10.4インチの赤外線入力方式のタッチモニタ (K-limbic systems, Sawbridgeworth, UK) が組み込まれていた。タッチモニタは窓枠の間に配置されている光学センサが，その上を通過する身体部位の水平，垂直座標を検出したが，この入力を反応と定義した。私たちの観察では，マウスは

鼻先あるいは臀部をモニタに近づけることが多いが，視覚刺激を観察させるために，モニタ上に提示される刺激に対して鼻先を近づけ，光学センサを遮るノーズボーク反応の形成を試みた。モニタの画面解像度は1,024×768pixelsに設定した。Figure 1bに前面パネルと背面パネルの配置図を示す。モニタ上には，金属製の窓枠が設置され，左右2つの窓枠（7.5×7.5cm）は1.0cm離れていた。窓枠内のモニタへのノーズボークは，タッチモニタにより検出できた。背面パネルの中央には，グリッド床から9.5cm上の高さにはハウスライトが，0.5cm上に餌箱（2.8×2cm）が取り付けられていた。また，餌箱内にはLEDとマウスの頭部挿入を検出するための光学センサが取り付けられていた。餌箱には給餌器（ENV-203-20）から20mgのペレット（Bioserve, F0071-J50）が提示できた。ペレットの組成は，タンパク質18.5%，脂肪4.9%，繊維4.5%，灰分6.5%，水分10%以下，炭水化物59.1%であった。また，背面パネル左上部にスピーカーが取り付けられており，音刺激が提示できた。実験制御および反応の記録には，防音箱の外側に設置されたPC (Lenovo, ThinkPad T440p) によって Visual Basic 6を用いて作成したプログラムを用いた。

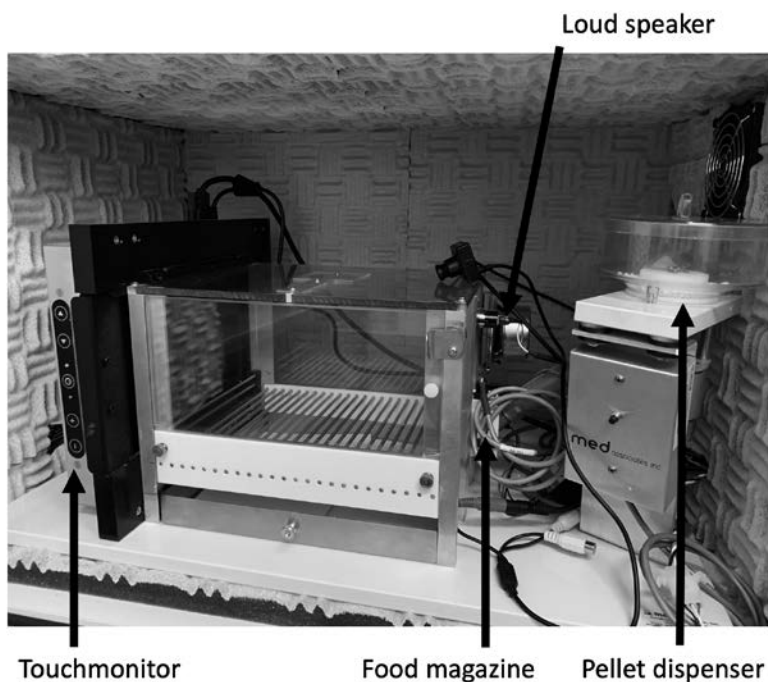


Figure 1a. Touchscreen chamber. Touchscreen was mounted on the front panel. A metal frame was placed in front of the monitor. The frame has two windows in which stimuli were presented. A loud speaker mounted on the rear panel provided feedback sound for correct responses. Pellet dispenser delivered a 20-mg pellet into a food magazine.

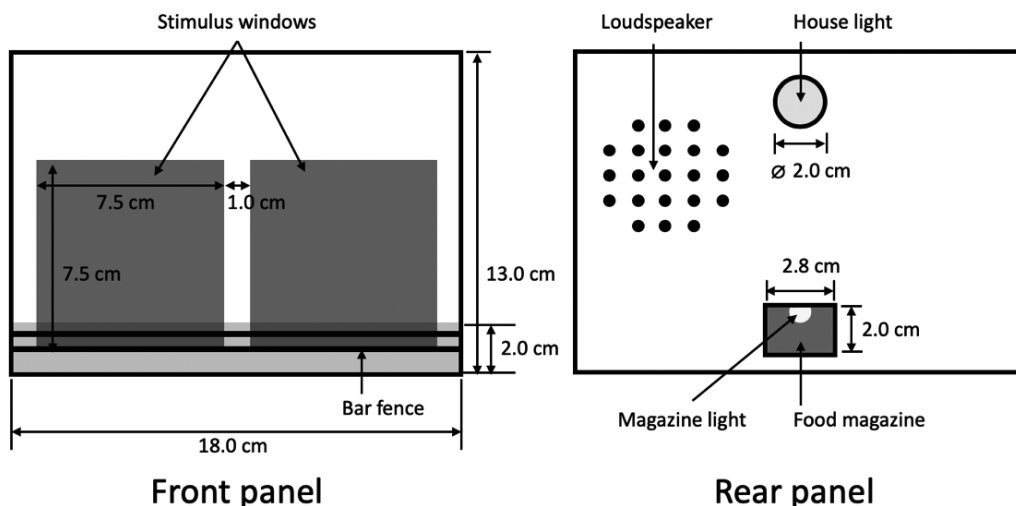


Figure 1b. An illustration of front and rear panels of the operant conditioning chamber.

2.3 手続き

2.3.1 マガジントレーニング

セッション開始後、ハウスライトを点灯させた。変動時間 (Variable time : VT) 250 s のスケジュールで、マガジンライトを 5 s 間点灯させ、マガジンライトの点灯開始と同時に強化子としてペレット 1 粒を呈示した。各セッションは 10 試行からなり、10 試行目が終了してから 15 分後にマウスを実験箱から取り出した。マガジントレーニングは 1 日 1 セッション、3 日間実施した。

2.3.2 自動反応形成

左側の窓枠内中央内の黒背景上に白い円 (直径 2.7 cm) を 10 秒間提示し、刺激に対する反応の有無に関わらず、円が消失すると同時に、スピーカーから 1 秒のホロホロ音を提示し、餌箱内を LED で 5 s 間点灯させ、給餌器から餌箱内にペレットを 1 つ提示した。試行間隔は VT 250 s だった。各セッションは 10 試行からなり、1 セッションのみ実施した。

2.3.3 連続強化訓練第 1 段階 (CRF1)

自動反応形成で用いた白円を左側の窓枠内中央のモニタ上に提示した。白円は反応が生起するまで提示されたままであり、白円が提示された窓枠内のモニタへのノーズポークと同時に刺激が消失し、ノーズポークは餌箱内の LED の点灯 5 s 間およびペレット 1 粒により強化された。試行間隔は 20 s であった。各セッションは、30 試行完了あるいは 60 分経過後のどちらかで終了した。この訓練を 2 セッション実施した。

2.3.4 連続強化訓練第 2 段階 (CRF2)

刺激は CRF1 で用いたものを使用したが、試行ごとにランダムに左右どちらかの窓枠内中央に提示した。それ以外の手続きは CRF1 のまま、3 セッション実施した。CRF2 開始後、4 セッション目から CRF1 では用いなかったスタート刺激を導入した。Figure 2 にスタート刺激導入後の手続きを示す。スタート刺激は餌箱内の LED の 250ms 間隔での点滅であり、LED 点滅中に餌箱への頭部の挿入により、LED の点滅が終了し、前面パネルのモニタに刺激を提示した。刺激が提示された側の窓枠内のモニタ領域へのノーズポークを餌箱内の LED 点灯 5 s 間およびペレット 1 粒で強化し、刺激が提示されなかった側の窓枠内のモニタ領域へのノーズポークをハウスライトの消灯 5 s で弱化した。試行間隔は 20 s とした。これは、モニタへの反応後、強化子であるペレット 1 粒を回収し食べるのに 5 s 程度かかるため、ペレット回収とスタート反応が混線しないために十分な間隔をとったからであった。各セッションは 30 試行完了、あるいは 60 分経過のどちらかで終了した。スタート刺激導入後、7 セッション実施した。

2.3.5 連続強化第 3 段階 (CRF3) および第 4 段階 (CRF4)

CRF3 は、背景を黒色から灰色に変更したが (Figure 3, Positive S+), それ以外は CRF2 の手続きのままであった。CRF4 は、背景を灰色のまま、白円を黒円に変更した (Figure 3, Negative S+). それ以外は CRF3 の手続きのままであった。

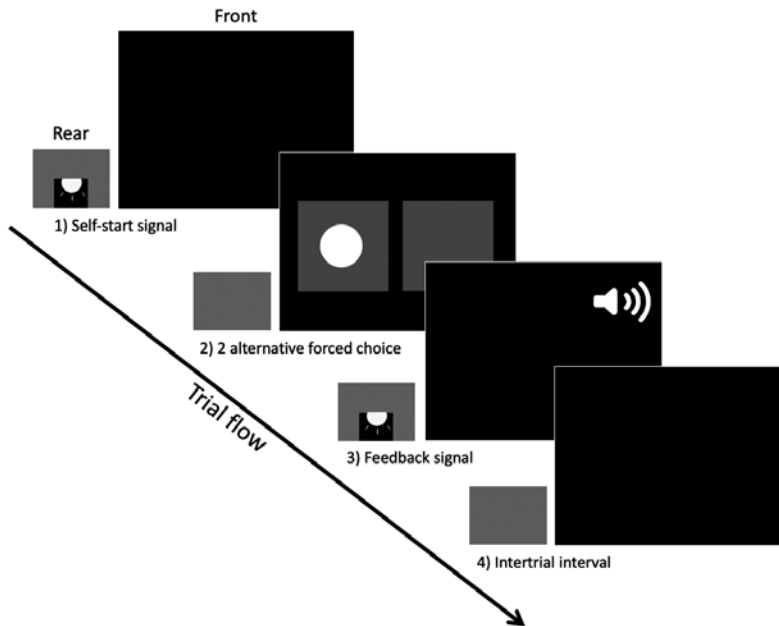


Figure 2. Schematic drawing of the trial sequence for a 2 alternative forced choice task. 1) Each trial started with a head entry to the food magazine following a presentation of a self-start signal (magazine light blinks at 250 ms). 2) Two images were horizontally aligned on the monitor immediately after the self-start response. 3) When mice made correct responses, they were reinforced by a 20-mg pellet as well as a feedback sound signal. The availability of a pellet was also signaled by a 5-s magazine light. Incorrect response was punished by a 5-s blackout. 4) Trials were separated by a 20-s intertrial interval.

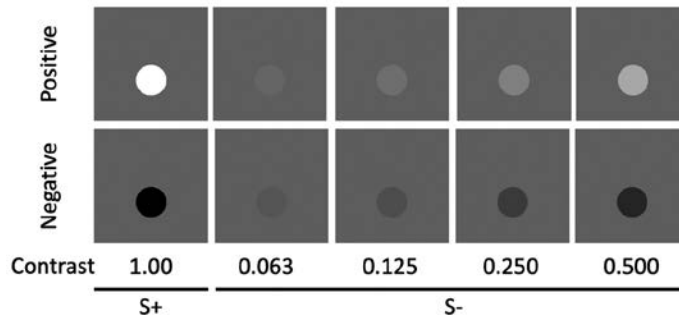


Figure 3. Stimuli used in contrast discrimination. The maximum brightness values from background was set to 1.0. The brighter stimuli compared to background had positive valence and the darker ones had negative one.

2.3.6 明暗コントラスト弁別

背景に対してコントラストが異なる2つの円を刺激対として用いたコントラスト弁別を行った。灰色背景 (80.1cd/m²) に対して、明るいものを正のコントラスト、暗いものを負のコントラストとし、モニタ上で提示できる最大輝度 (201.0cd/m²)、最小輝度 (0.4cd/m²) の刺激を正刺激 (S+) として用い、それらをコントラスト比1と定義した。正刺激と同

じ極性を持つ負刺激 (S-) を用い、背景に対するコントラスト比を0.063, 0.125, 0.250, 0.500の4条件で操作した (Figure 3)。基本的な試行の流れはCRF3およびCRF4同様であったが、マウスが左右どちらかの刺激のみを選択し続けてしまう位置偏好が発達するのを阻止するために、マウスがS-を選択してしまった場合は、試行終了後、S+を選択するまで同じ試行を繰り返し提示する矯正試行手

続きを用いた。これらの矯正試行は、分析の対象からは除外した。各セッションは、正負のコントラストそれぞれが4刺激対ずつあり、S+を各刺激対につき左右の窓枠内にそれぞれ2回ずつ提示したため、計32試行とした。各セッションは32試行完了、あるいは60分経過のどちらかで終了した。

2.4 分析

分析にはR (ver.4.0.0) (R Core Team, 2020)を用いた。データの整形と可視化にtidyverseパッケージ (Wickham et al., 2019) を、一般化線形混合モデル(GLMM)を用いた解析にlme4パッケージ (Bates et al., 2015) を用いた。

3. 結果

3.1 マガジントレーニング

初日は、ペレットを残したり、グリッド床の下に食べこぼしがあったりしたが、3日目には6個体すべてのマウスが10粒すべてのペレットを消費するようになったことを目視で確認した。

3.2 自動反応形成

Table 1に10試行中1回でも反応が生じた試行数を示す。6個体すべてで少なくとも1試行はモニタ上の白円に対する接触反応が生じた。ビデオカメラを通じてマウスの行動を観察していたところ、すべてのマウスがモニタの刺激に接近する様子を見せ

Table 1. Number of trials mice responded to target in an autoshaping session

Subject	Responses
L01	2
L02	1
L03	2
L04	4
L05	3
L06	5

ていたため、自動反応形成は1セッションのみを実施してCRF1に移行した。

3.3 CRF1以降の正答率

Figure 4にCRF1以降の各セッションの正答率を示す。CRF1では、正刺激しか提示していなかったため、正答率は1であった。CRF2では、最初のセッションから正答率が0.7を超え、CRF1からの般化が見られた。セッションが進むにつれて正答率は上昇し、12セッション目にはすべての個体の正答率が0.9を超えた。CRF3では、背景色を黒色から灰色に変更したために、最初のセッションでは正答率が低下したが、次のセッションで平均正答率が0.9を超えた。さらにCRF4で標的を白色から黒色に変更したときには正答率の低下は生じなかった。コントラスト弁別では、最初のセッションから平均正

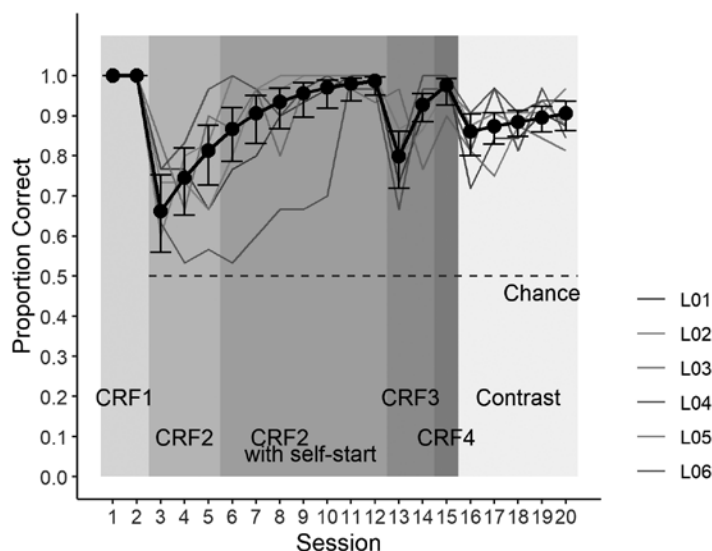


Figure 4. Proportion correct over training stages. L01 to L06 indicate subject ID. A thick black line represents predicted values with 95% confidence intervals by fitting GLMMs for CRF2, CRF3-4 and Contrast phases, separately. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

答率が0.8を超え、5セッションの間、維持された。

3.4 CRF1以降の反応時間

Figure 5 に CRF1 以降の各セッションの反応時間について、個体ごとの中央値の平均の推移を示す。CRF1 の1セッション目から2セッション目にかけて、反応時間は大幅に減少した。CRF2 でもセッションが進むにつれて反応時間はさらに減少した。CRF2 開始後4セッション目からスタート刺激を導入したが、反応時間はすぐには減少せず、数セッション後から訓練が進むにつれて反応時間が減少していった。

Figure 6 にスタート刺激導入後、反応時間が安定した段階である CRF3 および CRF4 の反応時間を個体ごとに示す。反応時間の最頻値はどの個体でも2500ミリ秒付近であった。L04やL05のように反応時間が比較的安定してばらつきが小さい個体がいる一方、L01やL02のように反応時間が広い範囲にばらついてしまう個体もいた。この原因やそれに対する対処法は後述する。

3.5 明暗コントラスト弁別

Figure 7 に刺激対の明暗、および各刺激対の S+ と S- の背景に対するコントラスト比の弁別に関する正答率を示す。刺激対の明るさに関しては正のコントラストより負のコントラストの場合に正答率が高く、S+ と S- の背景に対するコントラスト比の差が小さくなるほど正答率は低下した。しかし、実験

で用いた刺激対のうち、S+ と S- の間のコントラスト比の差が最も小さい刺激対でも、正答率は偶然確率よりも高かった。刺激対の明るさおよびコントラスト比の主効果、個体名をランダム効果とした二項分布を仮定した GLMM を行ったところ、コントラスト比の主効果 ($X_2(1)=52.413, p<.001, \beta_{std}=-1.791$)、標的刺激の明るさの主効果 ($X_2(1)=8.582, p=.003, \beta_{std}=2.526$) およびそれらの交互作用が有意であった ($X_2(1)=4.934, p=.026, \beta_{std}=-1.478$)。

Figure 8 に刺激対の明暗、および S+ と S- の背景に対するコントラスト比の弁別に関する個体ごとの反応時間の中央値の平均を示す。正のコントラストより負のコントラストの刺激に対して反応時間が短かったが、コントラスト比の差の大きさによる違いはほとんど見られなかった。刺激対の明るさおよびコントラスト比の主効果、個体名をランダム効果とした逆ガウス分布を仮定した GLMM を行ったところ、刺激対の明るさの主効果は有意だった ($X_2(1)=164.305, p<.001, \beta_{std}=0.097$)。コントラスト比の主効果 ($X_2(1)=0.257, p=.613, \beta_{std}=-0.001$)、交互作用は有意ではなかった ($X_2(1)=0.048, p=.827, \beta_{std}=0.000$)。コントラスト弁別の個体ごとの反応時間を刺激対の明暗別に見ると、正のコントラストより負のコントラストの場合に分散が小さく、より急尖的な分布をしていた (Figure 9)。

Figure 10 に明暗コントラスト弁別課題中の個体ごとの総矯正試行数を示す。ほとんどの個体は、誤

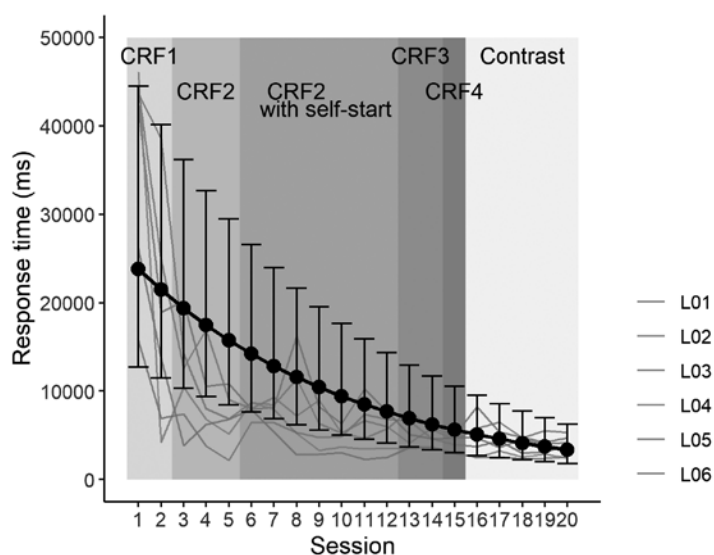


Figure 5. Median response time by individuals over training stages. L01 to L06 indicate subject ID. A Thick black line represents predicted values with 95% confidence intervals by fitting GLMMs (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

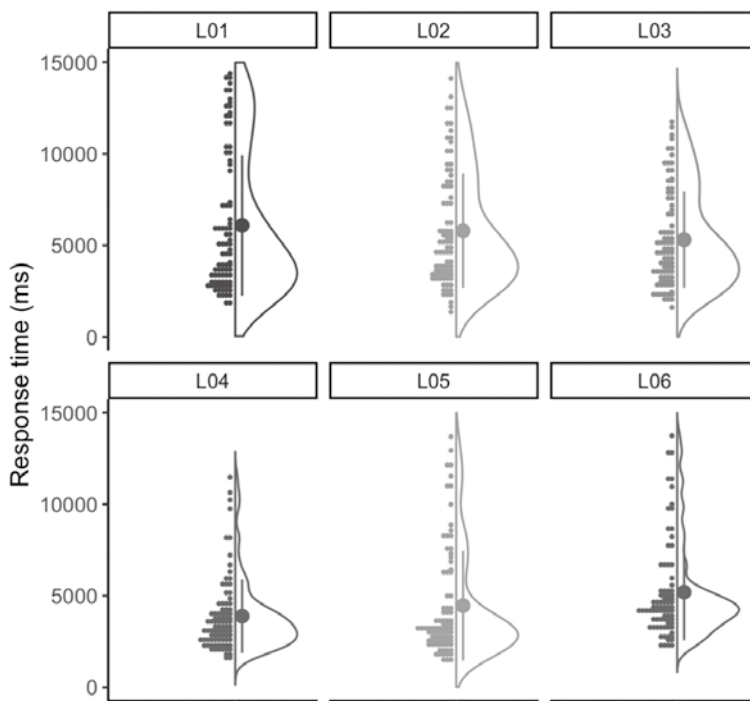


Figure 6. Response time for each trial by each subject during CRF3 and CRF4 stages. A right-half violin plot shows variations in response time across trials with mean and \pm standard deviation. Data from each response time are shown in left-half dot plot.

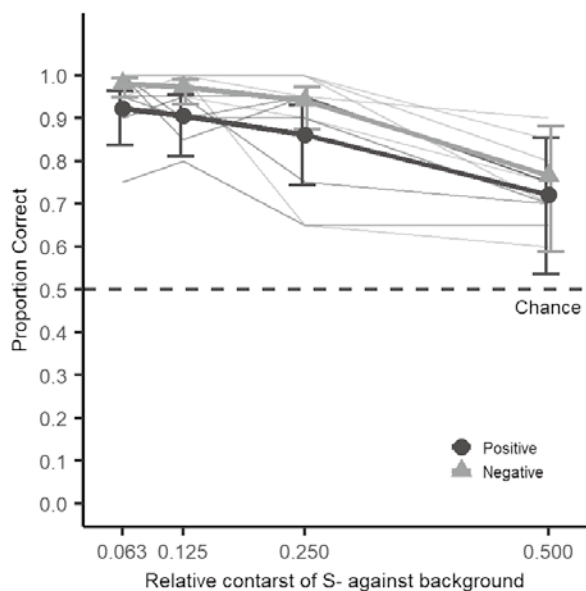


Figure 7. Mean proportion correct in contrast discrimination. Relative contrast of S- of 0.063, 0.125, 0.250, and 0.500 were randomly intermixed without replacement on a trial-by-trial basis. Circle and triangle symbols indicate predicted values and 95% confidence intervals of GLMM fitting for positive and negative contrast valence, respectively. Thinner lines indicate individual data. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

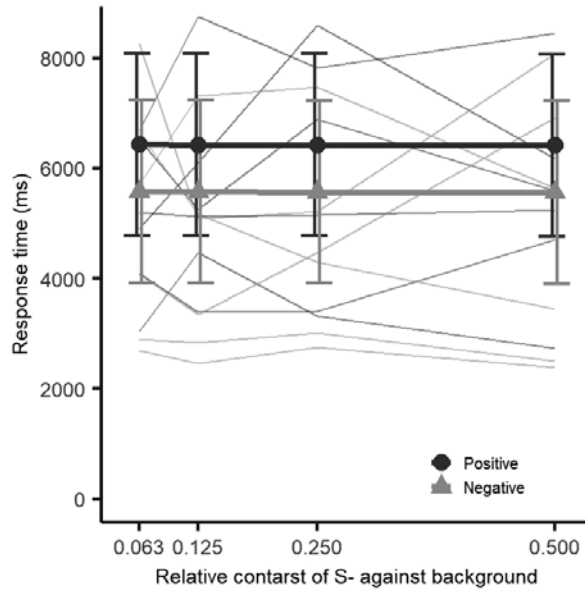


Figure 8. Response time in contrast discrimination. Relative contrast of S-of 0.063, 0.125, 0.250, and 0.500 were randomly intermixed without replacement on a trial-by-trial basis. Circle and triangle symbols indicate predicted values and 95% confidence intervals of GLMM fitting for positive and negative contrast valence, respectively. Thinner lines indicate individual data. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

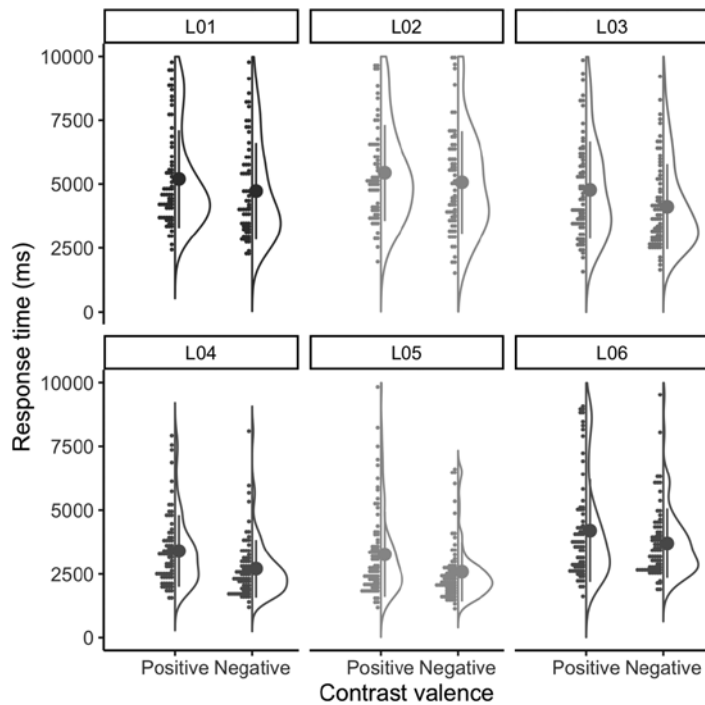


Figure 9. Response time for each trial by contrast valence and by each subject in the contrast discrimination. A right-half violin plot shows variations in response time across trials with mean and \pm standard deviation. Data from each response time are shown in left- half dot plot.

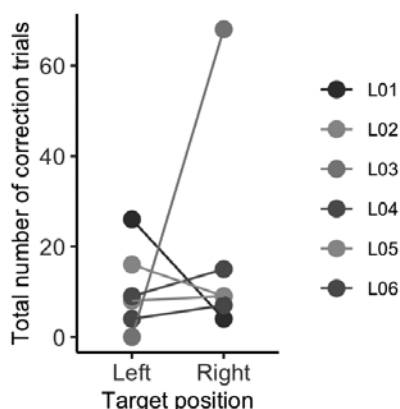


Figure 10. The number of correction trials received during contrast discrimination. The number of correction trials are shown separately for both left and right target positions. L01 to L06 indicate subject ID. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

反応のち、数試行でS+へ切り替えることができていたが、L03は左側の選択肢への位置偏好が強く、誤反応の後、矯正試行を繰り返す回数が多かった。

4. 考察

本研究は、視覚刺激を用いた同時弁別課題を始めるまでの予備訓練についての標準的な手続きについて報告するとともに、明暗コントラスト弁別によって、実験者が想定した刺激次元に対して刺激性制御が生じていることを確認した。本研究で用いたマウス6個体すべてで反応形成できているが、著者らは、本研究で報告したプロトコルとほぼ同じものを用いて、これまでに4回（各回6個体ずつ）のマウスの反応形成を行ってきた。これらすべての個体でマガジントレーニング、自動反応形成、CRF1については本実験で用いたものと同じセッション数で反応形成ができている。CRF2のスタート刺激の導入は20セッション以内に完了しており、2選択同時弁別課題の訓練プロトコルとしては確立できたものと考えている。以下では、訓練の各段階について考察していきたい。

マガジントレーニングでは、マガジントレーニング初日は、ペレットが餌皿に落ちてから回収するまでに長い時間がかかる個体が多く、ほとんどペレットを回収しない個体もいた。また、ペレットを餌皿から回収するときにグリッド床下に落としてしまう個体が多かった。しかし、マガジントレーニング3日目になると、どの個体もペレットが餌皿に落ちるとすぐに回収するようになり、ペレットを床下に落

としてしまうことはほとんどなくなった。

マガジントレーニングでは、ペレットが無条件刺激、給餌器の駆動音ならびに餌箱内のLEDの点灯がペレットに時空間的に近接した条件刺激となる条件づけが成立したと考えられる。自動反応形成では、さらにモニタ上に提示される白円とホロホロ音を条件刺激とする高次条件づけが成立することで白円への接近行動が生じたと考えられる。自動反応形成は、1セッションしか実施しなかったが、ほとんどの個体において白円への接近行動が成立しており、今回、行動形成を行った6個体すべてにおいて少なくとも1回以上のノーズボークが生じた。

CRF1では、すべてのマウスが刺激に対してノーズボークを行うことが確認できた。本研究では、2セッション実施しているが、これはノーズボークが安定して生じるまで訓練する必要がある一方、過剰訓練してしまうと、新奇な行動を訓練しにくくなるためである。Figure 5の反応時間に見られるように、CRF1初日は刺激が提示されてからノーズボークが生じるまでの時間が長い、2日目には、半分程度の時間に短縮された。

CRF2では、CRF1の履歴のため、最初のセッションでは、左側の窓枠への反応が見られたが、訓練が進むにつれて、刺激が提示された窓枠内へのノーズボークが増加していった。CRF2で重要なのは、スタート反応の形成である。ラットでは、スタート反応の導入が弁別学習を促進させることが示されている (Bussey et al., 2008)。本研究では、スタート刺激として、餌箱内のLED点滅を用いたが、背面パネルの餌箱の前の床面に設置されたパネルを踏むことをスタート反応としたラットの弁別学習もある (Bussey et al., 1997)。スタート反応の役割の1つは、左右の刺激からおおよそ等距離の位置に動物を移動させることで、選択反応に関する位置偏好を弱めることである。我々の装置を作成するときに、背面にレバーを設置し、レバー押しをスタート反応とすることも考えたが、その場合、レバー押しの反応形成をしなければならず、訓練にさらに時間を要するため、レバーの設置をしなかった。これに対して、餌箱への頭部挿入はすでに行動レパートリーとして存在しているため、新たに行動形成する手間を省くことができる。ただし、試行開始の頭部挿入と、餌の回収行動を機能的に分化させるために、試行間隔を広めにとる必要があった。

スタート反応の導入については、もう2つ注意点がある。第1の問題は、スタート刺激の導入時期である。モニタ上の刺激へのノーズボークが安定してから導入しないと、ノーズボークに代わり、モニタ前で回転して、臀部や尾部が接触するという行動が

モニタ上への刺激に対する反応として固定化してしまうことがある。スタート反応の役割の1つが刺激提示開始からの反応時間を計測するためのものであるため、反応トポグラフィが個体ごと、あるいは試行ごとに異なってしまうと、試行ごとの反応時間のばらつきが大きくなってしまう。第2の問題は、直前の試行終了後に提示されたペレットを回収後、餌箱内に頭部挿入を保持する反応を形成してしまうことである。本研究では、明暗コントラスト弁別を開始したときに、餌箱内のペレットを回収後、餌箱内に頭部を挿入し試行開始を待つ様子がしばしば見受けられた。これでは、被験体はLEDの点滅なしに試行が開始してしまうため、モニタ上に刺激が提示されてから反応までの反応時間が増大してしまう。この問題を避けるため、現在では、試行間隔20秒経過後、餌箱内への頭部挿入を検出するセンサに対して入力信号がある場合には、センサの入力信号がなくなるのを待ち、LEDの点滅を開始するよう対処した。その結果、餌箱内への頭部挿入保持は消去できている。

CRF3およびCRF4では、その後の明暗コントラスト弁別の背景色に変更した。訓練初期には、刺激の顕著性を高めるために、黒背景に白円を提示していた。CRF3およびCRF4では、その後のコントラスト弁別実験のために、背景と刺激との輝度差を小さくしたことで、一時的に正答率が低下した。他の実験につなげる場合も同様だが、実際に実験で使用する刺激のみを提示して、まずはその刺激の有無が検出できることを確認しておくほうがよいだろう。

明暗コントラスト弁別では、刺激対のうち、S+を固定し、S-を変化させることで、弁別難易度を操作し、マウスが刺激間の相対的な明暗の差異にもとづく弁別をしていることを示した。この結果は、すでに報告されているマウスの明暗弁別とおおよそ一致している (Swan et al., 2014)。本研究ではS+を固定していたため、刺激対の背景に対するコントラスト比の差異にもとづくものであると断定するためには、本来、新奇な標的刺激を用いた刺激対でのテストを行うことが望ましい。しかし、本研究とは逆に、S-を固定し、S+を変化させる場合でも同様、刺激量の相対的な差異にもとづき正答率が変化することから、特定のS+への反応のために、見かけ上、刺激量の相対的な差異に基づく正答率の変化が生じているというのは考えにくい。

明暗コントラスト弁別では、正のコントラストより負のコントラストの場合に正答率が高く、また反応時間が短かった。マウスの上丘や一次視覚野の神経細胞は、白よりも黒に対して強い応答を示すことが知られている (Franceschi & Solomon, 2018 ;

Jimenez, Tring, Trachtenberg, & Ringach, 2018)。さらに、興味深いことに、系統発生的な類縁性が低いニトリでも中脳の視蓋と同様に白より黒ターゲットに強く応答がみられる (Verhaal, & Luksch, 2013)。このような明暗刺激に対する神経応答の差異が、明暗コントラスト弁別における差異を生じさせたと考えられる。ただし、上記の先行研究や本研究における刺激輝度の操作はヒトの比視感度特性に基づいたものであり、マウスや他の動物にとって灰色背景に対する白刺激と黒刺激の知覚感度が等しいとは限らない。今回の結果が刺激量の差ではなく正負のコントラストに対する非対称的な処理であることを示すためには、マウスの知覚特性を加味した刺激でテストすることや、モニタ全体の輝度を調整しても反応の非対称性が維持されるか調べる必要がある。

明暗コントラスト弁別のような2肢弁別課題では、動物が特定の刺激や刺激提示位置に偏好を示すことがしばしば問題となる。本研究では、S-を選択した場合、誤答を知らせる条件刺激を提示したうえで、S+を選択するまで同じ試行を繰り返し提示するという方法を使った。他の方法として、S-を選択した場合、その刺激を除去し、S+のみを提示する矯正試行も考えられたが、この方法では位置偏好を除去することは難しかった。また、それらの折衷案として、矯正試行の回数に上限を設けるといっても考えられたが、位置偏好が十分に除去できない個体もあり、すべての個体で画一的に適用できるプロトコルとはなり得なかった。さらに、誤反応にたいしてタイムアウトによる弱化を随伴させるという方法で誤反応を減少させるということも考えられたが、それも位置偏好を弱めるには効果的ではなく、タイムアウトによりセッション時間が増大するというデメリットが大きかった。

本研究では、タッチモニタを取り付けたオペラント箱を用いた視覚弁別実験のための訓練手続きについて詳述した。マウスは、ラットに比べ、体サイズが小さいため、強化子として用いる餌報酬や液体報酬に対する飽和化が生じやすく、1セッション中の強化数がより厳しく制限されるために、ラットよりも反応形成は困難で時間を要する。しかしながら、近年、マウスでも主観的輪郭の知覚 (Okuyama-Uchimura & Komai, 2016)、運動知覚 (Stirman et al., 2016)、写真弁別 (Yu et al., 2018) などの研究が行われるようになってきている。本研究で報告したように、標準化された訓練方法を確立しておくことで、正答率や反応時間について複数の課題について測定したデータを比較することも可能である。今後、げっ歯類と他の動物種との比較研究において、

タッチモニタを用いた視覚弁別は有用な研究手法の一つとなるだろう。

謝辞

本研究はJSPS 科研費 (17K04507, 20K03485, 20H0517) の助成を受けた。動物の管理および実験の実施にあたりお世話になった宇山香さん, 本研究に関わってくれた木村みくさん, 石川愛未さんに感謝する。本研究は, 動物心理学会 (専修大学) の自由集会「動物行動実験・解析手法の展開」における発表「タッチモニタを用いたげっ歯類の学習実験の実際」をもとにしたものである。データおよび解析スクリプト, 実験刺激等は, Open Science Framework で公開している。https://osf.io/8wf94/

引用文献

- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using **lme4**. *Journal of Statistical Software*, 67(1).
https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01
- Blough, D. S. (1977). Photoelectric recording of pigeon-peck responses to computer-driven visual displays. *Behavior Research Methods & Instrumentation*, 9(3), 259-262.
https://doi.org/10.3758/BF03202228
- Brooks, D. I., Ng, K. H., Buss, E. W., Marshall, A. T., Freeman, J. H., & Wasserman, E. A. (2013). Categorization of photographic images by rats using shape-based image dimensions. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 39(1), 85-92.
https://doi.org/10.1037/a0030404
- Bussey, T. J., Muir, J. L., Everitt, B. J., & Robbins, T. W. (1997). Triple dissociation of anterior cingulate, posterior cingulate, and medial frontal cortices on visual discrimination tasks using a touchscreen testing procedure for the rat. *Behavioral Neuroscience*, 111(5), 920-936.
https://doi.org/10.1037//0735-7044.111.5.920
- Bussey, T. J., Padain, T. L., Skillings, E. A., Winters, B. D., Morton, A. J., & Saksida, L. M. (2008). The touchscreen cognitive testing method for rodents: How to get the best out of your rat. *Learning & Memory*, 15(7), 516-523.
https://doi.org/10.1101/lm.987808
- Bussey, Timothy J., Saksida, L. M., & Rothblat, L. A. (2001). Discrimination of computer-graphic stimuli by mice: A method for the behavioral characterization of transgenic and gene-knockout models. *Behavioral Neuroscience*, 115(4), 957-960.
https://doi.org/10.1037/0735-7044.115.4.957
- Cook, R. G., Geller, A. I., Zhang, G.-R., & Gowda, R. (2004). Touchscreen-enhanced visual learning in rats. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, 36(1), 101-106. https://doi.org/10.3758/BF03195555
- Franceschi, G., & Solomon, S. G. (2018). Visual response properties of neurons in the superficial layers of the superior colliculus of awake mouse. *The Journal of Physiology*, 596(24), 6307-6332.
https://doi.org/10.1113/JP276964
- Horner, A. E., Heath, C. J., Hvoslef-Eide, M., Kent, B. A., Kim, C. H., Nilsson, S. R. O., ... Bussey, T. J. (2013). The touchscreen operant platform for testing learning and memory in rats and mice. *Nature Protocols*, 8(10), 1961-1984.
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.122
- Jimenez, L. O., Tring, E., Trachtenberg, J. T., & Ringach, D. L. (2018). Local tuning biases in mouse primary visual cortex. *Journal of Neurophysiology*, 120(1), 274-280.
https://doi.org/10.1152/jn.00150.2018
- Leising, K. J., Wolf, J. E., & Ruprecht, C. M. (2013). Visual discrimination learning with an iPad-equipped apparatus. *Behavioural Processes*, 93, 140-147.
https://doi.org/10.1016/j.beproc.2012.11.013
- Mar, A. C., Horner, A. E., Nilsson, S. R. O., Alsjö, J., Kent, B. A., Kim, C. H., ... Bussey, T. J. (2013). The touchscreen operant platform for assessing executive function in rats and mice. *Nature Protocols*, 8(10), 1985-2005.
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.123
- Okuyama-Uchimura, F., & Komai, S. (2016). Mouse Ability to Perceive Subjective Contours. *Perception*, 45(3), 315-327.
https://doi.org/10.1177/0301006615614440
- O'Leary, J. D., O'Leary, O. F., Cryan, J. F., & Nolan, Y. M. (2018). A low-cost

- touchscreen operant chamber using a Raspberry PiTM. *Behavior Research Methods*, 50(6), 2523-2530.
<https://doi.org/10.3758/s13428-018-1030-y>
- Phillips, B. U., Heath, C. J., Ossowska, Z., Bussey, T. J., & Saksida, L. M. (2017). Optimisation of cognitive performance in rodent operant (touchscreen) testing: Evaluation and effects of reinforcer strength. *Learning & Behavior*, 45(3), 252-262.
<https://doi.org/10.3758/s13420-017-0260-7>
- Piantadosi, P. T., Lieberman, A. G., Pickens, C. L., Bergstrom, H. C., & Holmes, A. (2019). A novel multichoice touchscreen paradigm for assessing cognitive flexibility in mice. *Learning & Memory*, 26(1), 24-30.
<https://doi.org/10.1101/lm.048264.118>
- Robbins, T. W., James, M., Owen, A. M., Sahakian, B. J., McInnes, L., & Rabbitt, P. (1994). Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB): A factor analytic study of a large sample of normal elderly volunteers. *Dementia (Basel, Switzerland)*, 5(5), 266-281.
<https://doi.org/10.1159/000106735>
- Sahgal, A., & Steckler, T. (1994). Touchwindows and operant behaviour in rats. *Journal of Neuroscience Methods*, 55(1), 59-64.
[https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90041-8](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90041-8)
- Stirman, J. N., Townsend, L. B., & Smith, S. L. (2016). A touchscreen based global motion perception task for mice. *Vision Research*, 127, 74-83.
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2016.07.006>
- Swan, A. A., Clutton, J. E., Chary, P. K., Cook, S. G., Liu, G. G., & Drew, M. R. (2014). Characterization of the role of adult neurogenesis in touch-screen discrimination learning: Neurogenesis and Discrimination Learning. *Hippocampus*, 24(12), 1581-1591.
<https://doi.org/10.1002/hipo.22337>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., ... Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wolf, J. E., Urbano, C. M., Ruprecht, C. M., & Leising, K. J. (2014). Need to train your rat? There is an App for that: A touchscreen behavioral evaluation system. *Behavior Research Methods*, 46(1), 206-214.
<https://doi.org/10.3758/s13428-013-0366-6>
- Yu, Y., Hira, R., Stirman, J. N., Yu, W., Smith, I. T., & Smith, S. L. (2018). Mice use robust and common strategies to discriminate natural scenes. *Scientific Reports*, 8(1), 1379.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-19108-w>
(2020. 3. 30 受稿, 2020. 5. 24 受理)