

マウスの回避学習と報酬学習に及ぼす vinblastine の腹腔内投与の影響

岡山大学医学部第一生理学教室

村上 哲英・岸田 昭・川上 雅之
山口 隆昌・片山 昭・土井 昭孚
西田 勇

(昭和54年5月7日受稿)

Key words: 回避学習, 報酬学習, vinblastine

はじめに

最近の電子顕微鏡による観察によると、神経細胞内には大別して三種の微細管構造が存在していると云われている：Petersら(1976)²⁸⁾、石川(1977)¹⁷⁾、酒井(1977)³⁰⁾。その一つは外径約24nm、厚さ約6nmの中空の管状構造で、微細管 microtubule と呼ばれている。又、外径10nm、厚さ3nm程度の neurofilament と呼ばれる管状構造と、更に、外径6~8nm程度の microfilament と呼ばれる繊維構造である。これらの微細管構造は神経細胞に限らず、広く真核細胞においても存在が認められている。そして、これら微細管構造物の生理学的機能としては、細胞分裂の際の分裂装置、繊毛運動や鞭毛運動の際の運動器官、細胞表層と核を連結する鎖、細胞骨格、分泌顆粒の輸送、更に神経細胞においては軸索流に関与していること等が考えられている：Schmitt (1974)³¹⁾、Roberts (1974)²⁸⁾、小宮、黒川 (1977)²¹⁾。

これらの微細管構造の内、微細管構造は細胞分裂阻害剤である colchicine や vinblastine (vinb. と略す) を作用させると崩壊し、細胞分裂は停止し、繊毛運動や鞭毛運動は阻害され、分泌顆粒の放出は停止し、更に、神経細胞の細胞体、樹状突起や軸索内の微細管構造は崩壊し、軸索流は停止する：Banksら (1971)²⁾、Fernandezら (1971)⁸⁾、Edström, Mattsson (1972)⁶⁾、Englandら (1973)⁷⁾、Bunt, Lund (1974)³⁾、Friede, Ho (1977)⁹⁾、Hammond (1977)¹¹⁾。しかし、活動電位の伝導や、終板電位の発生には変化を及ぼさない：Albuquerqueら(1972)¹⁾、Turkanis (1973)³³⁾、Pécot-Decharassine (1976)²⁷⁾ 等が最近明らかになりつつある。そして軸索流は、

mitochondria や伝達物質、或は伝達物質合成酵素の輸送に関与し、神経回路網の形成に深くかかわり合っているものと考えられる。この様な関係から、我々は colchicine や vinb. で微細管構造を破壊すれば、高次神経活動としての学習の成立や、記憶の保持が阻害されるのではないかと考え、マウスの前頭葉に vinb. を投与すると、回避学習が著しく阻害されることを見出した：村上(1975)²²⁾、Murakami (1978)²³⁾、1979)²⁴⁾。

この報告は、vinb. を腹腔内に注射し、回避学習及び報酬学習の成立及び保持に及ぼす影響を調べ、更に、³H-vinblastine を腹腔内に注射し、脳内へ取り込まれる部位を明らかにしたものである。

材料及び方法

ddN 系マウスを用い回避学習を行わせ、学習の成立し易い雌雄を選び、近交系の育成を続けている第10代~第12代 (ddN-F10~ddN-F12) を実験動物として使用した。生後6週間以上、体重20g以上の成熟マウスを用いた。回避学習の成立には ddN系マウスは雌雄間で差のないことから：原 (1977)¹²⁾、実験成績の統計は雌雄の区別なく行った。実験に際しては、雌雄は別々に一箱6匹づつの群として飼育し、飼料(オリエンタル酵母KK製, CMF)、及び水は自由に与えた。体重の測定は午前9:00~10:00の間に行い、実験開始一週間の間に、体重の測定、一日5分間の handling と、続いて、既報(原 1977¹²⁾、伊丹 1979¹⁸⁾、Murakami 1979²⁴⁾) の移動活性度測定装置を用いて、一日5分間の移動活性度 (open field activity) の測定を行った。回避学習は既報(村上 1975²²⁾、原 1977¹²⁾、Hayakawa 1977¹³⁾) の jump-box 型の装置を用いて

行った。報酬学習には ddN-F11~ddN-F12 の雄を使用し、装置としては、Tech Serv 社製の Skinner-box を用いた。マウスを一匹づつステンレス製の網ケージに隔離し、水のみは自由に与え、24時間絶食させると体重は $15.9 \pm 2.8\%$ ($N=270$) 減少する。この状態で報酬学習を開始した。報酬は、bar を押すと pellet (Biomedica 社製) が、1:1 に与えられる方式を用いた。報酬学習は一日30分間行い、30分の間に bar を押した回数で測定した。両学習共、12~24匹を一群とし、又、両学習共一週間間隔で実験を行った。

vinblastine sulfate (Lilly 社) は生理的食塩水溶液とし、 $50 \mu\text{g}/0.5\text{ml}$ の量を学習開始前、或は学習終了直後に腹腔内に注射した。 0.5ml の生理的食塩水のみを注射したマウスを対照として比較した。又、vinb. を腹腔内に投与した後、脳内へ取り込まれる部位を調べる目的で、($G\text{-}^3\text{H}$)-vinblastine sulfate, The Radiochemical Centre, England, specific activity 17.7 Ci/m M を用いて autoradiography により観察した。 ^3H -vinb. (methanol 溶液) は Millipore 社製の滅菌

済の孔径 $0.45 \mu\text{m}$ の Millex filter を通して窒素ガスを通風して乾燥の後、生理的食塩水溶液として用いた。 $40 \mu\text{Ci}/0.5\text{ml}$ の ^3H -vinb. を腹腔内に注射し、注射後1時間、24時間及び1週間の各時期に断頭後脳を摘出し、Carnoy 氏液 (acetic acid: ethanol, 1:3) 中で24時間固定した。この間3回固定液を交換した。その後、常法に従って paraffine に包埋し、 $8 \mu\text{m}$ の切片標本を作り、xylene により脱 paraffine の後、小西六社製の autoradiographic emulsion, NRM2 で dipping を行い、常法に従って、暗箱内で乾燥剤と共に 4°C で4週間露出を行った。Konidol X で現像の後、Toluidine blue で軽く染色して顕微鏡標本を作り検鏡した。マウスの脳の解剖図譜は Sidman ら (1971)³²⁾ を参照した。

結 果

24匹のマウスを一群として、 $50 \mu\text{g}$ の vinb. の生理的食塩水溶液を腹腔内に注射し、一週間の間隔で体重の変動と合せて移動活性度の変化を測定した結果を表1に示す。

BODY WEIGHT

	1	2	3	4	5	6
Saline	25.0 ± 2.8	24.9 ± 2.7	25.3 ± 2.8	25.3 ± 4.3	26.3 ± 2.5	26.7 ± 2.6
Vinblastine	24.7 ± 2.1	24.7 ± 2.4	23.8 ± 5.5	24.4 ± 2.7	22.9 ± 6.0	25.7 ± 2.4

OPEN FIELD ACTIVITY

	1	2	3	4	5	6
Saline	149 ± 34	140 ± 41	140 ± 42	132 ± 36	124 ± 37	110 ± 41
Vinblastine	148 ± 42	159 ± 48	145 ± 44	116 ± 44	103 ± 40	106 ± 36

Table 1. Changes in body weight and open field activity (5 min) of ddN-F10 mice after intraperitoneal injection of vinblastine $50 \mu\text{g}$ in 0.5 ml of saline. Vinblastine was injected after the first estimation. Measurements performed at one week intervals. There are no differences between saline and vinblastine injected mice. The data represent the mean \pm S.D. from the 24 mice.

対照として生理的食塩水のみを 0.5ml 腹腔に注射したマウスと比較してある。体重の変動においても、又、移動活性度の変化においても、両者の間に差のないことが判った。

回避学習の成立に及ぼす vinb. の影響を調べる目的で、ddN-F10 マウスを24匹を一群とし、jump-box を用いる回避学習開始一週間前に vinb. $50 \mu\text{g}$ を腹腔内に注射し、生理的食塩水のみを注射したマウスを対照として比較した。腹腔内注射1週間後に、第1回目の回避学習(第1学習と略)として30試行を

行い、続いて1週間間隔で第2回、第3回(夫々第2学習、第3学習と略)目の学習を行った結果を図1Aに示してある。vinb. を投与したマウスは学習の成立が抑制されており、且つ学習成績の標準偏差も大きい。

同じく、ddN-F10 マウスの24匹を一群として、第1学習終了直後に vinb. $50 \mu\text{g}$ を腹腔内に注射し、生理的食塩水のみを注射したマウス24匹を対照として、記憶の保持に及ぼす影響を調べた結果を図1Bに示した。図に示してある様に、vinb. 投与1週間後の成

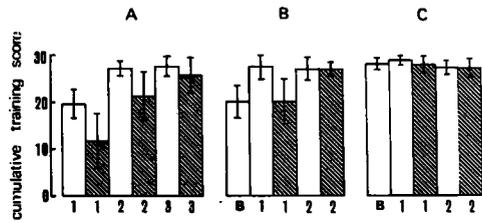


Fig. 1. Avoidance training curve in ddN-F10 mice injected intraperitoneally with saline and vinblastine at a dose of 50 μ g in 0.5 ml of saline. A: Injected one week before the first training session. B: Injected immediately after the first training session. C: Injected after consolidation. Training sessions performed at one week intervals. Ordinate shows cumulative training scores in thirty trials. White columns indicate saline injected mice and hatched columns indicate vinblastine injected mice. Bar indicates standard deviation (N=24). Abscissa shows training session. B: Training score one week before injection.

績では、記録の保持も抑制されており、且つ標準偏差も大きい。しかし、更に1週間後の第3学習においては、生理的食塩水を注射した対照群との差はなくなっている。

回避学習を1週間間隔で4回行うと、学習の成立しているマウス (consolidated mouse) を得ることができる。今、この学習の成立しているマウス48匹を2群に分け、一群には vinb. 50 μ g を、他の一群には生理的食塩水のみを夫々腹腔内に注射し、長期記憶に及ぼす影響を調べた結果を図1Cに示した。vinb. 注射の1週間後の最初の10試行において、標準偏差の大きい成績が得られたが、以後は対照と差がなく学習は成立している。

回避学習に使用する目的で遺伝学的な選択淘汰を続けている ddN-F11, ddN-F12 を用いて報酬学習を行って見た。図2A, B に示してあるように、1週間間隔で強化を行っていくと30分間は bar を押す回数は段階的に上昇し学習が成立していることを示している。学習開始の1週間前に vinb. を注射すると、対照のマウスに比べ、特に第2学習での成績の上昇が認められない。しかし、第3学習においては対照と差がなく学習成績は上昇している (図2B)。強化学習を5回行うと、図2Cに見られる様に30分間に bar を押す回数は著しく上昇している。この時期に vinb. を投与すると、図2Cに見られる様に、対照との差はなく vinb. の影響は認められない。

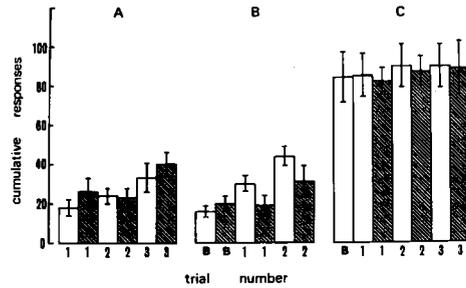
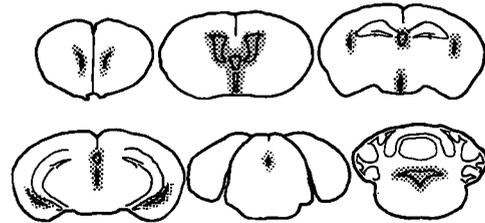


Fig. 2. Reward training curve in ddN-F11~F12 mice injected intraperitoneally with saline (white column) and vinblastine (hatched column) at a dose of 50 μ g in 0.5 ml saline. Training sessions performed at one week intervals. A: Injected one week before the first training session. B: Injected immediately after the first training session. C: Injected after consolidation. Ordinate shows cumulative responses during a thirty minute period. Bar indicates standard deviation (N=12). Abscissa shows training sessions. B: Training score one week before injection.

3 H-vinb. 40 μ Ci を腹腔内に注射し、autoradiogram を観察すると、投与1時間後の標本においては、側脳室、第3脳室、中脳水道及び第4脳室の上衣細胞層に grain が認められた。24時間後に、取り込まれている部位を図示すると図3の様になる。注射後1



I.P. 40 μ Ci. 3 H-Vinb. 24h.

Fig. 3. Schematic representation of mice brain showing areas where 3 H-vinblastine was incorporated. Silver grains in the cells are shown by dot. The brain specimen was fixed twenty-four hours after intraperitoneal administration of vinblastine (40 μ Ci in 0.5 ml).

時間の像を比べると、最初に脳室系の上衣細胞層に取り込まれていた grain 数がや、上昇し、続いて隣接する上衣組織層にもわずかに拡散している。投与1週間後の標本においても、脳室系の上衣細胞層には依然として grain が認められた。

考 察

たとえ純系動物を実験材料として、学習実験を行っても、学習成績の上に大きな誤差の見られることは、我々のしばしば経験するところである。それで同腹の仔を用いる方法等が用いられているが、実験例数を増すことが困難である。そこで、使用する動物の特性を調べて実験に供する方法：Glassman(1969)¹⁰、Oliverio(1974)²⁵、横尾(1976)²⁴、Jaffard(1977)¹⁹が用いられているが、我々は繁殖力の大きい ddN 系マウスを用いて、最初の60試行中20以上の正の成績を示した雌雄を交配し、以後3 pair からの rotation system を用いて、回避学習の成立し易い系統を作り出すべく、近交系の開発を続けてきた。第7代(ddN-F7)からは最初の30試行中15以上の正の成績を示した雌雄を交配し、更に ddN-F10 からは full sib mating 法を用い、最初の10試行中4以上の正の成績を示した兄妹交配を続け、現在 ddN-F15 を得ている。現在の F15 においては、初期の頃に使用したマウスに比べ、学習は著しく成立し易くなっており、且つ標準偏差も小さくなってきた：村上(1975)²²、Hayakawa(1977)¹³、原(1977)¹²、伊丹(1979)¹⁸、Murakami(1978)²³、1979)²⁴。今回の実験には F10~F12 を用いた。又、報酬学習には F11~F12 を用いたが、報酬学習の成立に関しては、他の系統マウスと比較して見たところ、C3H や Swiss の方が優れていた。又、比較に用いた何れの系統のマウスも実験成績の標準偏差が大きい。そこで我々は現在、回避学習にも報酬学習にも用いることのできる学習実験用のマウスを、ddN-F15 を親として近交系の育成を始めている：Doi, Murakami(未発表)⁵。報酬学習用の実験動物の開発に成功すれば、vinb. の影響等は更に詳細に分析できるものと期待される。

さて、ある種の薬品を作用させたり、外科的手術を行った後、学習実験を行う場合、実験動物の生理的状態が行動表現に大きな影響を与えるであろうことは想像に難くない。そこで学習実験開始1週間前から体重の測定と、移動活性度の測定を行った。移動活性度の測定はマウスが5分間に一定区画内を水平に移動し、所定の赤外線を横切る回数で測定されるものである。マウスを home cage から新しい環境に移すと、マウスは探索行動を行い、最初の2~3分間は盛んに運動を行うが、5分を過ぎる頃からは移動度は次第に減少していく。この性質を利用し

て、5分間の移動活性度を測定したものである。又、移動活性度の測定回数を重ねると、慣れのためか、移動活性度は次第に減少する傾向にあることは既に報告した：原(1977)¹²、Murakami(1979)²⁴、そして、移動活性度と回避学習の成立の間には何等の関係も見出せない：Hayakawa(1977)¹³。表1に示してある様に、vinb. の腹腔内投与は、体重の変化や移動活性度の変動に対し影響を与えていない。このことは、vinb. は行動表現そのものには何等の影響を与えないものと推察することができる。

vinb. をマウスの腹腔内に投与し、1週間後に第1回避学習を行うと、図1A、に示すように学習の成立が抑制されている。生理的食塩水のみを注射した対照群では、続いて1週間間隔で続行した第2、第3の強化学習で、既に学習は成立している(consolidated)のに対して、vinb. 投与群では学習の成立の抑制が見られる。これは第1の強化学習で充分学習が成立していないことが、第2、第3の学習に影響しているのではないかと考えられる。又、第3学習で最初の10試行中の成績で標準偏差が大きい。このことは、記憶の保持に阻害を受けたマウスの存在も考えられるが、第2学習で充分記憶が行なわれていなかったために生じた現象であると考えられる。

第1回避学習直後に vinb. を投与したマウスでは、図1B、に示す様に記憶の保持の抑制が認められる。そして、この抑制は投与2週間後の第2学習の成績においては認められなくなる。vinb. を投与して学習の成立の抑制や記憶の保持が抑制されても、以後強化学習を続けて行えば学習は成立し、強化の効果は認められることは、学習の成立や記憶の保持に関して、新たな神経回路網の形成や修飾が行なわれていることを物語っていると考えられる。

回避学習を1週間間隔で4回行うと学習の成立しているマウスを得ることができる。このマウスを4週間 home cage で飼育し、再学習を行って見ると、学習成績の低下は認められない。このことは、4回の強化学習によって長期記憶が成立していると考えられる。この様な長期記憶の成立しているマウスに vinb. を投与し、1週間間隔で再学習を行うと、図1C、に示してある様に vinb. による記憶の消失は認められない。

ddN-F11~F12 を用いた報酬学習の成立過程を見ると、強化の回数を増すに従い反応回数の増加が認められることから、強化の効果は現われている。し

かし、図 2 A, B の対照に見られる様に、学習の成立曲線は用いたマウスによって誤差が大きい。

報酬学習に及ぼす vinb. の影響は、学習開始 1 週間前に投与した場合、図 2 A の様に、vinb. 投与群の方が、第 1 学習において反応数が大であった。しかし、対照群では強化回数を増加するに従って反応数の増加が認められるのに対し、vinb. 投与群では第 2 回目の強化において反応数の増加が認められない。同様の結果が、第 1 学習直後に vinb. を投与したマウスにおいても認められる (図 2 B)。これらのことは vinb. は報酬学習の成立や記憶の保持に対しても抑制的に作用していると考えられる。報酬学習の強化を 5 回行ったマウスに投与した場合には図 2 C に見られる様に vinb. の影響は認められない。

^3H -vinb. を腹腔内に注射すると、1 部は既に報告した様に：Murakami (1979)²⁵⁾、1 時間以内に脳室系の周辺部の上衣細胞層に取り込まれ、更に 24 時間後の autoradiogram では、上衣細胞層に隣接する glia 細胞層へ拡散している。そして、上衣細胞層に取り込まれた grain は 1 週間後においても認められる。側脳室に隣接する海馬域は、学習実験を行うと、RNA や蛋白の合成が高まることから、記憶と関係の深い部位と考えられており：Jakoubek (1974)²⁰⁾、vinb. は脳室系の周辺部、又、これに隣接する部位に取り込まれ、或は脳室周辺部の機能に変化を与え、記憶に関する抑制作用を表わしているものと考えられる。

vinb. の神経細胞に対する作用機序としては：Banks (1971)²⁾、Fernandez ら (1971)⁸⁾、Edström, Mattsson (1972)⁶⁾、Bunt ら (1974)³⁾、Fried, Ho (1977)⁹⁾、Hammond, Smith (1977)¹¹⁾ 等の報告している軸索流を停止させることが先ず考えられる。そして、Hirano, Zimmerman (1970, 1971)^{14, 15)}、Hirano (1972)¹⁶⁾、Murakami (1979)²⁴⁾ 等によって報告されている様に、vinb. を作用させると、軸索内の微小管構造が崩壊し、続いて軸索内に paracrystal と呼ばれる巨大分子の蜂の巣状の構造が出現し、このことが軸索流を停止させる原因と考えられている。又、Albuquerque ら (1972)¹⁾、Turkanis (1973)³³⁾、Pécot-Dechavassine (1976)²⁷⁾ 等の報告している様に、vinb. を作用させて神経を刺激しても筋肉の収縮を阻害することはなく、従って興奮の伝導や伝達を阻害しない。しかし、微小終板電位の発生頻度を上昇させる。このことは、vinb. はシナプスの膜構造を変化させ、神経回路網に変化を起させ、或は新たな神経回路網の形成に影響を与える。そしてこのシナプスの可塑性に

変化を与えることが学習の成立や記憶の保持に重要な役割を果しているものと考えられる。

細胞分裂阻害剤の一種である colchicine も微小管構造を破壊し、軸索流を停止させる。この colchicine をキンギョの脳内に注射すると学習の成立が阻害される：Cronly-Dillon (1973)⁴⁾。又、伊丹 (1979)¹⁸⁾ によれば、微小管構造を一過的に破壊する colcemid や lidocaine をマウスの脳内に注射すると、学習の成立や保持が抑制されるが、この抑制の程度は colchicine や vinb. に比べ微弱であると云う。更に、Murakami (1978, 1979)^{23, 24)} が報告したように、マウスの前頭葉に vinb. を注射すると、学習の成立の著しい抑制と、記憶の保持の阻害、更には長期記憶に対しても影響を与えることなどと考え合わせ、神経細胞内微小管構造と記憶との間に深い相互関係のあることが伺える。

結 論

回避学習用の実験動物として遺伝学的な純化と開発を行いつつある ddN 系マウスの第 10 代～第 12 代 (ddN-F10～F12) を用いて、神経細胞内の微小管構造を破壊する vinb. 50 μg を腹腔内に注射し、回避学習及び報酬学習の成立と記憶の保持に及ぼす影響を調べた。又、 ^3H -vinb. をマウスの腹腔内に注射し、autoradiography により脳内へ取り込まれる部位を調べ、次の様な結果を得た。

1) 成熟マウスの腹腔内に vinb. を注射し、1 週間間隔で体重の変化と、移動活性度の変動を調べたところ対照として生理的食塩水を注射したマウスに差は認められなかった。

2) 回避学習開始 1 週間前に vinb. を投与すると、学習の成立が著しく抑制された。続いて 1 週間間隔で強化学習を続けると、学習は次第に成立してきた。

3) 第 1 学習の直後に vinb. を投与すると、1 週間後の再学習の成績は、対照に比べ低下していた。続いて強化学習を重ねていくと学習は次第に成立してきた。

4) 回避学習の成立しているマウスに、vinb. を投与すると、記憶の消失は認められない。

5) 報酬学習開始 1 週間前に vinb. を投与すると、対照のマウスは強化学習を重ねると段階的に学習成績が上昇するのにに対し、第 2 学習で返って成績の低下が見られた。

6) 第 1 回目の報酬学習直後に vinb. を投与すると、記憶の保持が抑制されていた。

7) 報酬学習の成立しているマウスに投与すると、

記憶の消失は認められない。

8) ddN 系マウスを用いて報酬学習を行うと、学習成績の標準偏差が大きい。従って回避学習用の実験動物を開発したと同様に、報酬学習用の実験動物として遺伝育種の純化と開発が望まれる。

9) ^3H -vinb. を腹腔内に投与すると、1時間以内に脳室周辺の上衣細胞層に取り込まれる。24時間後には更に隣接する周辺に拡散していた。1週間後においても、脳室周辺の上衣細胞層には依然として grain が認められた。

本研究を行うに当たり、昭和51年度文部省特定研究(1) マウスの遺伝育種の純化に関する研究、課題番号111, 504, 昭和52年度文部省特定研究(1) マウスの遺伝育種の純化に関する研究、課題番号210, 704, 文部省特定研究(1) 記憶と学習に関する中枢神経機構の研究、課題番号212, 103, 昭和53年度文部省特定研究(1) 記憶と学習に関する中枢神経機構の研究、課題番号311, 404, 文部省総合研究(A) 行動研究分野における実験動物の開発と利用、課題番号339, 026の援助を受けた。ここに記して感謝の意を表す。

文 献

1. Albuquerque, E.X., Warnick, J.E., Tasse, J.R. and Sansone, F.M.: Effect of vinblastine and colchicine on neural regulation of the fast and slow skeletal muscle of the rat. *Exp. Neurol.* **37**, 607—634, 1972.
2. Banks, P., Mayor, D., Mitchell, M. and Tomlinson, D.: Studies on the translocation of noradrenaline-containing vesicles in post-ganglionic sympathetic neurons *in vitro*. Inhibition of movement by colchicine and vinblastine and evidence for the involvement of axonal microtubules. *J. Physiol.* **216**, 625—639, 1971.
3. Bunt, A.H., and Lund, R.D.: Vinblastine-induced blockage of orthograde and retrograde axonal transport of protein in retinal ganglion cells. *Exp. Neurol.* **45**, 228—297, 1974.
4. Cronly-Dillon, J.: The effect of colchicine on memory. *J. Physiol.* **234**, 104P—105P, 1973.
5. Doi, A. and Murakami, T.H.: 未発表
6. Edström, A. and Mattsson, H.: Fast axonal transport *in vitro* in the sciatic system of the frog. *J. Neurochem.* **19**, 205—221, 1972.
7. England, J.M., Kadin, M.E. and Goldstein, M.N.: The effect of vincristine sulfate on the axoplasmic flow of proteins in cultured sympathetic neurons. *J. Cell Sci.* **12**, 549—565, 1973.
8. Fernandez, H.L., Burton, P.R. and Samson, F.E.: Axoplasmic transport in the crayfish nerve cord. The role of fibrillar constituents of neurons. *J. Cell Biol.* **51**, 176—192, 1971.
9. Friede, R.L. and Ho, K.-C.: The relation of axonal transport of mitochondria with microtubules and other axoplasmic organelles. *J. Physiol.* **265**, 507—519, 1977.
10. Glassman, E.: The biochemistry of learning: An evaluation of the role of RNA and protein. *Ann. Rev. Biochem.* **38**, 605—646, 1969.
11. Hammond, G.R. and Smith, R.S.: Inhibition of the rapid movement of optically detectable axonal particles by colchicine and vinblastine. *Brain Res.* **128**, 227—242, 1977.
12. 原 武仁: 回避学習に使用する純系マウスの開発. 岡山医誌, **89**, 1549—1560, 1977.
13. Hayakawa, M.: The effect of cycloheximide on learning. *Acta Med. Okayama* **31**, 161—175, 1977.
14. Hirano, A. and Zimmerman, H.M.: Some effects of vinblastine implantation in the cerebral white matter. *Lab. Invest.* **23**, 358—367, 1970.
15. Hirano, A. and Zimmerman, H.M.: Glial filaments in the myelinated sheath after vinblastine implantation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **30**, 63—67, 1971.
16. Hirano, A.: The pathology of the central myelinated axon. In *The Structure and Function of Nervous Tissue*, ed. G.H. Bourne, Vol. V, pp. 73—162, 1972.
17. 石川春律: ニューロンにおける微小管とニューロフィラメント. 蛋白質, 核酸, 酵素, **22**, 435—440, 1977.

18. 伊丹義明：マウスの回避学習に及ぼす colcemid 及び lidocaine の影響。岡山医誌, **91**, 101—113, 1979.
19. Jaffard, R., Ebel, A., Destrade, C., Durkin, T., Mandel, P. and Cardo, B.: Effects of hippocampal electrical stimulation on longterm memory and an cholinergic mechanisms in three inbred strain mice. *Brain Res.* **133**, 277—289, 1977.
20. Jakoubek, B.: *Brain Function and Macromolecular Synthesis*. Pion Limt., London, 1974.
21. 小宮義璋, 黒川正則：軸索内輸送。蛋白質, 核酸, 酵素, **22**, 545—553, 1977.
22. 村上哲英：神経微小管と記憶との関連。医学のあゆみ, **93**, 306—307, 1975.
23. Murakami, T.H.: Effect of destruction of microtubules upon the memory function of mice. In *Integrative Control Functions of the Brain*, ed. M. Ito, N. Tsukahara, K. Kubota, and K. Yagi, Kodansha, Tokyo/Elsevier, Amsterdam, Vol. 1, 428—430, 1978.
24. Murakami, T.H.: Microtubule and memory: Effect of vinblastine on avoidance training. In *Neurobiological Basis of Learning and Memory*. ed. Y. Tsukada, and B.W. Agranoff, Jhon Wiley & Sons Inc., New York, (in the press).
25. Murakami, T.H.: An autoradiographic analysis of ³H-vinblastine distribution in mouse brain after intraperitoneal and intracerebral injection. In *Integrative Control Functions of the Brain*, Vol. 2, (in the press).
26. Oliverio, A.: Genetic factors in the control of drug effects on the behaviour of mice. In *The Genetics of Behaviour*, ed. J.H.F. van Abeelen, North-Holland Pub. Co., Amsterdam, pp. 373—395, 1974.
27. Pécot-Dechavassine, M.: Action of vinblastine on the spontaneous release of acetylcholine at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol.* **261**, 31—48, 1976.
28. Peters, A., Palay, S. and Webster, H.deF.: *The Fine Structure of the Nervous System*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1976.
29. Roberts, K.: Cytoplasmic microtubules and their functions. In *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, ed. J.A.V. Butler, and D. Nobel, Pergamon Press, Oxford, Vol. 28, pp. 373—420, 1974.
30. 酒井彦一：脳の繊維系の蛋白。蛋白質, 核酸, 酵素, **22**, 647—660, 1977.
31. Schmitt, F.O.: Fibrous protein—Neuronal organelles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **60**, 1092—1101, 1974.
32. Sidman, R.L., Angevine, J.B.Jr. and Pierce, E.T.: *Atlas of the Mouse Brain and Spinal Cord*. Harvard Univ. Press, Massachusetts, 1971.
33. Turkanis, S.A.: Some effects of vinblastine and colchicine on neuromuscular transmission. *Brain Res.* **54**, 324—329, 1973.
34. 横尾能範：系統を異にするマウスの学習行動に対する状況変化の影響。日本生理誌, **38**, 287—297, 1976.

Effects of intraperitoneal administration of vinblastine on avoidance and reward training in mice

Tetuhide H. MURAKAMI, Akira KISHIDA, Masayuki KAWAKAMI,
Takamasa YAMAGUCHI, Sho KATAYAMA, Akitaka DOI, and Isamu NISIDA

Department of Physiology, Okayama University Medical School, Okayama, Japan

Destruction of microtubules by an antimetabolic drug, e.g. vinblastine, leads to inhibition of axonal transport. This process may be important in the maintenance of synaptic viability or in the mediation of local changes in membrane structure during the formation and modification of synapses. The authors wondered, therefore, whether disruption of microtubules with vinblastine could alter the acquisition and retention of learning behaviour.

The mice ddN-F10 ~ F12 strain animals of age between 6 to 10 weeks were used. They were handled and allowed open field activity beforehand to get them used to the conditions of the experiments.

The standard deviation in learning experiments based on avoidance training is large if inbred strains are used. Therefore, ddN strain mice, which have a large litter size and high training scores were selected for genetic improvement through avoidance training. The standard deviation of scores for the twelfth generation, that is ddN-F12, was significantly different from that of earlier generations. There were no remarkable differences between males and females.

The effects of intraperitoneal administration of vinblastine were tested as the changes of body weight and open field activity performed at one week intervals. There were no marked differences between saline and vinblastine injected mice.

Vinblastine studies were conducted by giving each animal an intraperitoneal dose of 50 μ g in 0.5 ml of saline. Controls were given the same volumes of saline only.

In mice given the injection one week before the first avoidance training session, learning ability in the first training session was much less than in the saline injected group. In the second and third training sessions, learning ability gradually increased to reach a normal rate. The mice injected immediately after the first avoidance training session showed a slight retardation of memory retention in the first training session after the injection, and no difference from saline injected animals in the second training session. The same results were obtained for the consolidated animals. Vinblastine did not cause any loss of memory in the first and second training sessions after the injection.

In mice given the injection one week before the first reward training session, learning ability in the first training session was slightly increased, but in the second reward training session, memory acquisition was slightly decreased. Similar results were obtained for mice injected immediately after the first reward training session. After consolidation of memory, vinblastine did not cause any loss of memory.

The mice were given a single intraperitoneal dose of ^3H -vinblastine (40 μ Ci in 0.5 ml of saline). Animals were killed one hour, one day, or one week after injection and the brains were fixed. Sections were prepared for autoradiographic analysis. One hour after injection, label was present in the ependymal layer of ventricles. Twenty-four hours after injection, the intensity of label had increased in the ependymal and adjacent regions of the ventricles. One week after injection, grains still remained in the vicinity of the ventricles.

The findings suggest that microtubules were deeply involved in memory formation and retention.