

ミツバチの条件づけ実験システム

池野 英利, 村岡 智之, 小永 兼, 南茂 良幸

集蜜効率を考慮した訪花やダンス言語による相互コミュニケーションに代表されるように、ミツバチは極めて高度な情報処理機構を数十万個の神経細胞によって実現していることが知られている (von Frish, 1963). その神経系メカニズムについては、生物における情報処理機構の解明という科学的興味に加えて、マイクロマシンなどに応用可能な機能的神経回路モデルを構築するという工学的視点からも大いに関心が持たれている。

ミツバチにおいては、触角に対する嗅覚刺激を条件刺激とし、前足基部や触角、口吻へのサッカロース溶液の接触を無条件刺激とする条件づけを行うことによって、条件刺激の提示のみで口吻伸展を生じるという条件反射の獲得が知られている (Bitterman et al., 1983). この条件反射については、最近では、関連する脳の部位が特定され、条件づけに伴って特性変化が生じる神経細胞応答の計測も行なわれてきている (Hammer, 1993; Hammer, 1997). さらに、このような実験的知見に基づき構成された、ニューラルネットモデルで、採餌行動を再現できることも示されており (Montague, 1995), 神経細胞から神経系、行動にいたる多くの実験データが統一的に説明付けられようとしている。

さて、このような生物を対象とした研究を進めていく場合に、動物の行動、あるいは、応答の正確な計測と定量化は極めて重要であるが、ミツバチの条件づけ実験に関しては、ほとんどの場合、口吻伸展が生じたかどうかを実験者が目視により観測するのみであった。口吻伸展反射を生じる筋肉について電位計測法が適用され

た例もあるが (Rehder, 1987), 生物の行動に影響を及ぼさない非接触の計測法は提案されていなかった。

本論文では、ミツバチの条件づけ実験のための刺激制御と口吻伸展反射のビデオ計測装置を開発した結果について報告する。この装置を行動実験に適用することによって、条件づけ獲得前後における口吻の伸展状態の変化が正確に抽出でき、神経細胞応答、筋電位などと対応づけた解析が可能となった。

ミツバチの条件づけと行動変化

ミツバチ条件づけの方法の一つとして、触角 (Antennae) に対する嗅覚刺激を条件刺激 (Conditioned Stimulus: CS), 触角、口吻 (Proboscis) へのサッカロース溶液の接触を無条件刺激 (Unconditioned Stimulus: US) とするプロトコルがよく知られている。すなわち、条件づけを行なうまでは US を与えることによって生じる無条件応答 (Unconditioned Response: UR, この場合は口吻の伸展) が、CS と US をペアで与える訓練を繰り返すと CS のみで口吻の伸展が生じるようになるというものである。この学習は、CS に引き続いて US が与えられるという二つの刺激の時間的関連を学習した結果によるものであり、生物における記憶の基本形態と考えられている。

この条件づけは、極めて少ない試行 (1~数回) で獲得され、かつ、動物を固定した状態で実験ができることから、行動の観測、神経応答計測などが行ないやすいという特徴があり、学習に伴う神経系の特性変化を研究する場合の標

準的な手法として用いられている。

実験システムの構成

神経系における特性変化を論じる上で重要な点は、最終的な出力ともいべき動物の行動、あるいは応答（条件づけ実験においては口吻伸展反射）を正確に計測し、常に行動と神経応答との関連を対照づけることである。しかしながら、これまでの行動計測は、単に伸展が生じたか否かが観測者によって判定されてきただけであり、その時間的な応答特性などについては全く議論されていなかった。

最近では、条件づけに関連する神経細胞応答や口吻の運動を生じる筋肉に関して筋電位の計測がなされ、条件づけ前後における特性変化が定量的に評価されるようになってきている。このことから、今後は行動に関してもこれらの実験データと対応づけられる計測データが不可欠となると考えられる。そこで、ビデオ画像のピクセル濃度変化から口吻伸展状態を非接触で計測する実験システムを構築した。

1. ビデオ計測システム

ビデオ計測システムは、実体顕微鏡（SMZ-2 T, ニコン）に設置された CCD カメラ（XC-57, ソニー）によって撮影したミツバチ頭部の映像を VTR に記録、この映像を画像入力ボード（FDM4-256, フォトロン）を介してパーソナルコンピュータ（PC-386LS, エプソン）に入力する構成である（図 1）。パーソナルコンピュータ（PC-386LS, エプソン）では、口吻を伸展する位置の画像ピク



図 1 実験システムの構成 (左) システムの外観, (右) システムブロック図

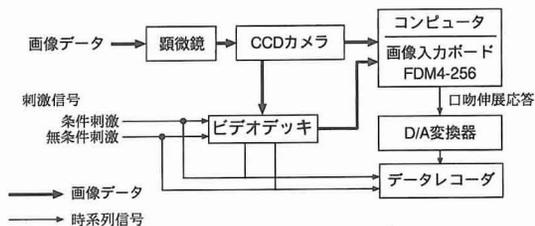
セルの濃度変化を計測する。なお、本システムでは、この計測データ（PER Data）を D/A 変換し、随時、プリンタポートからアナログデータとして出力することで、実験時にチャートレコーダなどによるリアルタイムモニタ、及び、刺激制御信号との同時記録を可能としている。

2. 条件づけのための刺激コントロール

条件づけを行なうには、最低でも 2 つの刺激を正確なタイミングで与える必要がある。条件刺激（ラベンダーなどの花の匂いを含む空気を頭部に与える）は、コンピュータによって制御されたエアープンプにより適切なタイミングで噴出できるようになっている（池野, 1991）。一方、無条件刺激（触角、口吻へのサッカロース溶液の接触）は機械的に制御することが困難なため、現在のところ実験者によって与える必要があるが、そのタイミングについてはコンピュータからのビーブ音で実験者に通知される。

実験方法

実験は、巣門で採取した働き蜂（セイヨウミツバチ, *Apis mellifera*）を用いて行なった。標本は、図 2 のようにアクリルパイプ内に頭部を出した状態で、首の付け根部分をアクリル板と粘着テープで止め、さらに頭部をミツロウによって固定したものをを用いた。この状態に慣れさせるため、標本は室温中に 3 時間以上放置した。さらに、実験には、触角及び口吻へのサッカロース溶液の接触に対して口吻の伸展を示した標本のみを使用した。



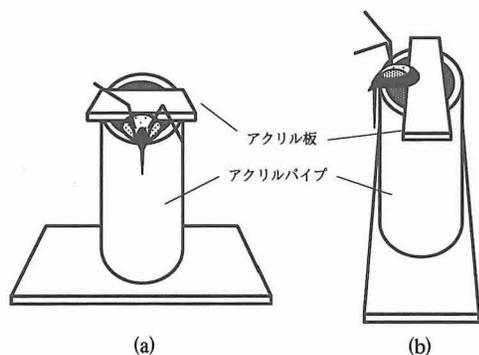


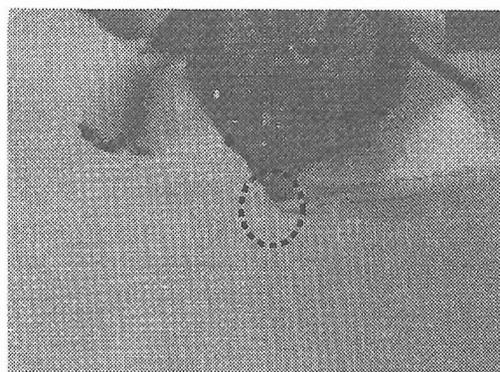
図2 実験標本 (a) 正面, (b) 側面

条件刺激として使用する嗅覚刺激は、エアポンプから噴出させた空気を、ラベンダー溶液を綿に染み込ませたカプセル内を通過させることによって生成した。なお、嗅覚刺激として与えた匂いを含む空気は、エアダクトによって直ちに部屋の外に排出した。一方、無条件刺激は、綿棒の先端に20%のサッカロース溶液を染み込ませておき、これを実験者が触角、口吻に接触させることによって与えた。

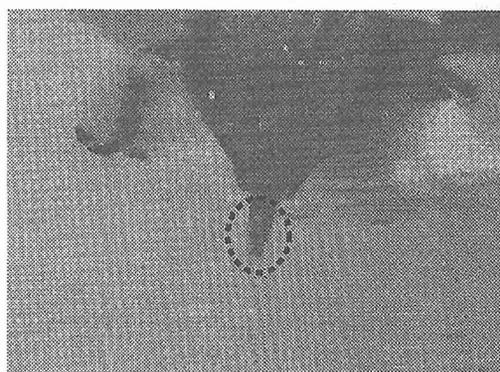
標本は実体顕微鏡下に設置し、口吻に焦点をあわせて白黒 CCD カメラにより撮影した。あらかじめ口吻伸展によって濃度変化を生じる画像ピクセルの位置を設定し、条件づけを実施、設定したピクセルにおける濃淡変化を計測、記録した。なお、画像データはビデオにも記録していることから、実験後に別の画像ピクセルについても濃淡変化を計測することができるため、実験中に厳密に位置決めをして計測する必要はなかった。

実験結果

CCD カメラ撮影した画像から、図3のように口吻の伸展が観測でき(図中、点線の円内に画像の変化が見られる)、口吻が伸びる位置における画像ピクセルの濃度を計測することにより、伸展反射の時間応答を求めることができた。図4は、その実験結果の一例である。この応答において、しきい値(破線)を越えた部分は、口吻の伸展により画像ピクセルが暗くなっ



(a)



(b)

図3 口吻伸展反射のビデオ観測画像

(口吻の伸展により円内の画像に変化が生じている)

(a) 口吻を縮めた状態, (b) 口吻を伸ばした状態

たことを示している。また、網かけ部分は、条件刺激のみが与えられている状態での応答を示している。

一連の応答において、条件づけを行なう前に条件刺激(CS: ラベンダーの匂いを5秒間与える)のみを与えた場合には、口吻の伸展は全く見られない(Pre-test)。

条件づけ試行では、CSを与えた2秒後に無条件刺激(US: 触角、口吻へのサッカロース溶液の接触を3秒間行なう)与えたが、試行1, 2(Tr #1, Tr #2)においては、いずれも、口吻の伸展はCSだけではほとんど見られず、USを与えることによってはじめて伸展を生じていることがわかる。

ところが、試行3, 4(Tr #3, Tr #4)では、

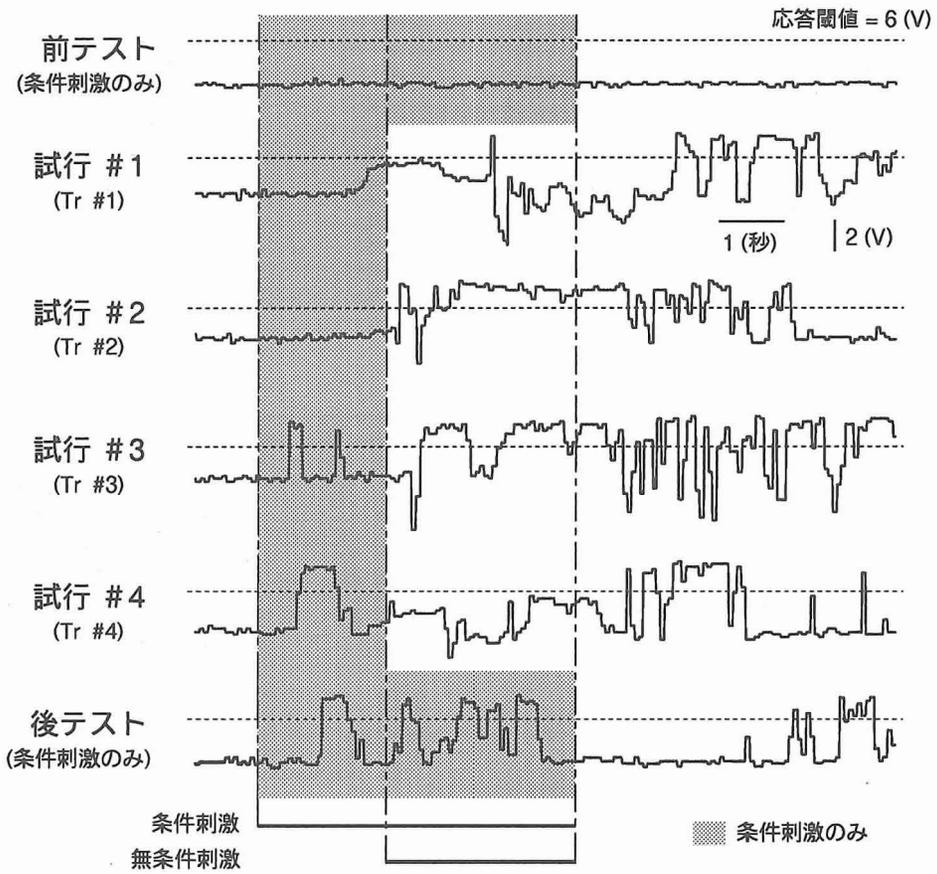


図4 条件づけによる口吻部分の画像ピクセル濃度値の変化

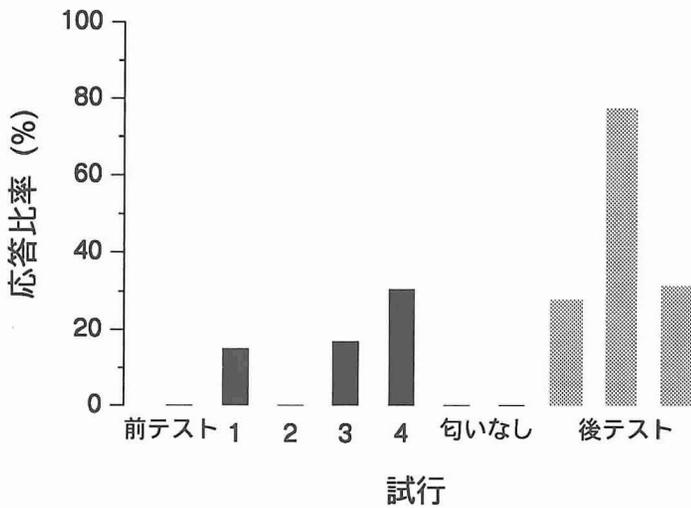


図5 条件づけ獲得に伴う口吻伸展応答率の変化

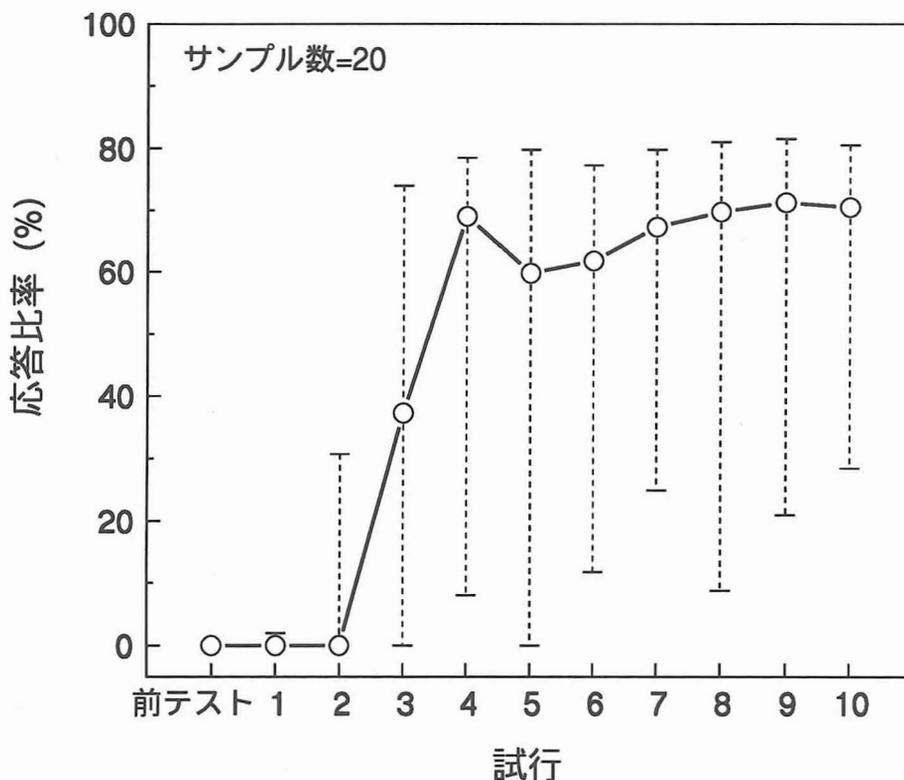


図6 条件づけ獲得による口吻伸展応答率中央値の変化 (20 サンプル)

点線は4分の1値の範囲を示す

CSしか与えられていない状態ですでに口吻の伸展が生じており、このことから、条件づけの試行によってUSの前兆信号としてCSを認識、記憶したことがわかる。最後にCSのみを(Post-test)。

5秒間与えたところ、激しい口吻の伸展が見られ、条件づけを獲得していることが確認できた条件づけ試行における口吻伸展の状態を画像によって計測し、次式のように口吻伸展を生じている時間(30msec毎にサンプリング)と条件刺激提示時間の比率(応答比率, response ratio)を求めたものが図5である。

$$\text{応答比率} = \frac{\text{口吻の伸展時間}}{\text{条件刺激提示時間}}$$

この結果より、Pre-test及びtrial 1, 2ではあまり口吻の伸展は生じていないが、trial 4ではかなり長時間にわたって伸展を生じている

ことがわかる。

さらに、ラベンダーの香りを加えず、ポンプから空気のみを送った場合(no odor)には、口吻の伸展は全く見られず、条件づけはラベンダーの匂いによって生じていることが確認された。Post-testでは、10分ごとに条件刺激のみを与えて口吻伸展を観測しているが、いずれの場合も顕著な伸展が生じていることがわかる。

次に、20サンプル(n=20)について10回の条件づけをおこない、試行回数に対する応答比率を求めた結果が図6である。この図において、実線で結んだ値は中央値、破線は四分の1値の範囲を表している。この特性からも、3回目の試行から学習の獲得の影響が行動として顕著に現れてくることが明らかになった。

むすび

本装置により、ミツバチの条件づけ獲得の過程、および、条件づけ後における口吻伸展反射の変化が非接触で計測できるようになった。この装置では口吻伸展反射の時間的な応答特性が得られることから、神経系における特性変化と対応づけが可能な行動指標として利用できるものとする。

また、本装置を用いて、予備的に、複数の条件刺激を用いた条件づけの実験を実施した。その結果、ラベンダーの匂い刺激を用いた条件づけでは、数回の試行で条件づけを獲得することが確認できた。さらに、ラベンダーによって条件づけを行なった後、異なる種類の刺激（クローブ油の匂い）により条件づけを行なうと、この場合も数回の試行で条件づけを獲得した。また、この時にも空気のみや、これらとは異なる匂い刺激に対しては口吻の伸展は見られなかった。

この一連の実験結果は、ミツバチが、複数の嗅覚刺激をそれぞれ異なるシグナルとして識別、記憶していることを示すものである。

現在、本システムを口吻伸展行動と神経細胞応答の同時計測が可能なシステムへと発展させており、この装置によって行動と神経活動との関連を実験的に調べていく予定である。また、この実験によって獲得された学習が、巣内外のミツバチの実行動に及ぼす影響を調べていくことも今後の課題である。

謝 辞

本研究の一部は、平成7、8年度 笹川科学研究助成のもとに実施されたものであり、関係各位に御礼申し上げます。

(〒625 舞鶴市宇白屋 234 舞鶴工業高等専門学校)

主な引用文献

Bitterman, M. E., et al. 1983. *J. Comp. Psychol.* 97 (2) : 107-119.

- Hammer, M. 1993. *Nature.* 366: 59-63.
 Hammer, M. 1997. *Trends in Neurosci.* 20 (6) : 245-252.
 池野英利, 榊原 学, 臼井支朗. 1991. *日本生理誌.* 53 (10) : 362-367.
 池野英利, 小永 兼, 南茂良幸. 1996. *信学技報.* MBE96-20 (5) : 135-139.
 池野英利, 村岡智之, 小永 兼, 南茂良幸. 1997. *舞鶴高専紀要.* 32: 38-42.
 Montague, P. R., et al. 1995. *Nature.* 377: 725-728.
 Rehder, V. 1987. *J. Insect. Physiol.* 33 (7) : 501-507.
 von Frisch, K. 1963. *The dance language and orientatio of bees.* Harvard Univ. Press.
 HIDETOSHI IKENO, TOMONORI MURAOKA, KEN KONAGA and YOSHIYUKI NANMO. Development of a system for conditioning of honeybee. *Honeybee Science* (1997) 18 (4) : 159-164.
 Maizuru National College of Technology. 234, Shiraya, Maizuru, Kyoto, 625, Japan.

Honeybee (*Apis mellifera*) is able to learn the association between odor (as the Conditioned Stimulus) and touching sucrose solution to the antennae and proboscis (as the Unconditioned Stimulus). This simple modification of behavior is considered to reflect the basic mechanisms of learning in the central nervous system. Recently, behavioral modification of honeybee can be described in the term of neural network, neuron and molecular, because it was found the neuron which caused changes of response by this appetitive conditioning. However, in these experiments and analysis, it is so important to measure the animal behavior precisely and quantitatively.

In this paper, it is described that a system has the functions to control the conditioning stimulus and measure the proboscis extension response (PER). PER is measured and recorded by personal computer from the image data of mouse part. As the result of reward conditioning experiments, it was shown that PER could be described as the time series signal. The system can be applied to the measurement and evaluation of PER in behavioral and physiological experiments.