

# Tsukuba 情動系ラットの作業記憶能力について

## —物体認知課題による検討—

吉田 和典  
仁愛大学人間学部

### A Study of the Pure Working Memory Ability of Tsukuba Emotional Strain Rats using an Object Recognition Task

Kazunori YOSHIDA  
Faculty of Human Studies, Jin-ai University

The author conducted a study to examine the “pure” working memory ability of Tsukuba High (H) and Low (L) emotional strain rats using an object recognition task in comparison of that of Wistar (W) strain rats similarly examined as a control. The study consisted of two sessions. In the first session, the rats were each subjected to a first trial for exposure to two identical objects (samples) for two minutes, followed (with a delayed time of five minutes) by a second trial in which they were each exposed to two different objects; one the same object as used in the first trial (familiar as the sample) and the other a novel object, for two minutes, to measure the time spent by each rat for spontaneous exploration of both objects in each of the first and second trials. 48 hours after the end of the first session, the second session was performed on the rats in the same manner as in the first session, except using different objects from those used in the first session. The results of the study can be summarized as follows: the H and W rats spent significantly longer time for exploration of the novel objects than the familiar objects, while the L rats showed no such tendency; and the habituation components (h1, h2) and mnemonic components (d2, d3) of the L rats were significantly lower than those of the H and W rats. From the above, it was concluded that the L rats were inferior to the H and W rats, not only in their spatial working memory ability, but also in their non-spatial visual working memory ability.

*Keywords; Tsukuba emotional strain rat, working memory, spontaneous behavior, object recognition task*

#### はじめに

これまで、Tsukuba 情動系ラットの空間的作業記憶能力について8方向放射状迷路課題を用いて検討してきた(吉田, 2007, 2012)。その結果, Tsukuba 低情動系(L系)ラットはTsukuba 高情動系(H系)ラットに比べて, 学習基準に達するまでの試行数が有意に延長することが観察され, L系ラットの空間的作業記憶の障害の実態が明らかとなった。しかしながら, これ

らの空間的作業記憶はラットなどのげっ歯類に特異的な能力で, 人や霊長類などの作業記憶を測定する場合は, 非空間的な視覚的課題が多く用いられている(Bachevalier, Nemanic, & Alvarado, 2002)。

これまでも, ラットにおける非空間的記憶課題を用いた比較研究が行われてきた(Aggleton, 1985; Rothblat & Hayes, 1987; Ennaceur & Delacour, 1988; Winters, Forwood, Cowell, Saksida & Bussey, 2004)。例えば, Y迷路(Aggleton, 1985)や直線走

路 (Rothblat & Hayes, 1987) を用いて、まず、見本を選ばせ、遅延時間後に見本とは別の物を選択させる非見本合わせ課題であった。一方、Ennaceur & Delacour (1988) や Winters et al. (2004) は、新奇物体に対する自発的探索を利用した弁別行動を指標とした物体認知課題を考案し、ラットの非学習性 (餌などの強化子を伴わない) の純粋な作業記憶能力が測定できることを明らかにした。

そこで、本実験では、Ennaceur & Delacour (1988) の方法に従い、Tsukuba 情動系ラットの非空間的及び非学習性の作業記憶能力を明らかにすることを目的とした。

## 方 法

被験体は、仁愛大学動物飼育室内の12:12時間の明暗条件下 (午前7時45分より午後7時45分までが明期) で飼育された3.5ヶ月齢のH系雄ラット5匹、L系雄ラット5匹を用いた。これらのラットは、82世代目の情動系ラットを筑波大学より譲り受けた後、仁愛大学で兄妹交配を継続し、110世代目になったものである。また、統制群として3ヶ月齢のWistar系 (W系) 雄ラット5匹を用いた。飼育室内の温度は $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度は40~50%に保った。

物体認知課題の装置は、内側を灰色に塗った、 $50 \times 40 \times 30\text{cm}$ のオープンボックスを用いた。さらに、ラットの行動軌跡を詳細に観察するために、底面に $10 \times 10\text{cm}$ の区画線を描いた。この装置を各ラット用に5台用意し、実験期間中同じ装置を使用した。これは、装置内の形状や匂いなどのすべての手がかりに完全に慣れさせるためであった。実験はL系群、W系群、H系群の順に行い、各群の実験終了後、装置を洗浄し、匂いや汚れなどの影響を取り除いた。

実験手続きは、第1セッションとして、まず、装置内に物体を置かないで10分間の自由探索を行わせた。その後、一旦ラットをホームケージに戻し、その間に装置の対面両端に同じ物体 (A1とA2) をセットし、再びラットを物体が見えないように前面中央に置き、2分間の物体認知行動を観察した (第1試行)。5分間の遅延時間の後、第2試行として、第1試行で用

いた同じ形状の物体 (A3) と新奇な物体 (B) をセットし、同様に2分間の物体認知行動を観察した。2日後、同じ手続きで第2セッションを行った。但し、10分間の自由探索は行わず、第1セッションとは別の同じ物体 (C1,C2,C3) と新奇な物体 (D) を用いた。さらに、新奇な物体の位置を第1セッションとは逆にした。また、ラット毎に新奇物体の左右の位置を各セッションでランダムとした。実験に用いた物体は、7~8cm以内のガラス製及び陶器製のコーヒーカップや調味料ビンなど20種類であった。物体認知行動は、ラットの鼻先が物体の方向に向き接近して探索している状態とした。これらの行動はすべてデジタルビデオカメラに記録し、第1試行での同じ2つの物体 (A1とA2, C1とC2) を探索している合計時間 (a) 及び、第2試行での同じ物体 (A3, C3) を探索している時間 (a') と新奇物体 (B,D) の探索時間 (b) を測定した。但し、H系ラットは、第2試行で5匹中4匹のラットが、頭部は物体の方向に向きを変えるが、その場所から物体に接近することなく全く動かないという、H系ラット特有の行動パターンが見られた。そのために、H系ラットの物体認知行動は、物体の方向に鼻先だけに向けた状態を探索行動とし、その時間を測定した。これらの測定値を基に、まず、慣れの成分として、第1試行と第2試行の探索時間の差 ( $h1 = a - (a' + b)$ ) と第1試行の平均探索時間と第2試行での同じ物体への探索時間との差 ( $h2 = a/2 - a'$ ) を求めた。次に、記憶成分として、第2試行での新奇物体に対する探索時間と見慣れた物体との差 ( $d1 = b - a'$ ) と第2試行の探索時間に対するこの値 (d1) の比 ( $d2 = d1 / (a' + b)$ ) 及びh2とd1の和 ( $d3 = h2 + d1$ ) を求めた。これらはすべて第1セッションと第2セッションの平均値を求め、t検定による群間の有意差検定を行った。

すべての実験終了後、使用したラットはエーテル深麻酔下で安楽死させ、専門業者に委託し火葬を行った。また、本実験は仁愛大学動物実験委員会の審査を受け承認を得て行われた。

結果

図1は、第1試行での同一物体に対するそれぞれの探索時間を示したものである。A1とA2は第1セッションで、C1とC2は第2セッションで用いた物体に対する探索時間である。H系ラットが左右の位置でやや差が認められたが、各群内で対応のあるt検定を行った結果、すべての群で有意差は認められなかった。また、左右位置の嗜好性も認められなかった。従って、第1試行においては、すべてのラットは2つの同一物体をほぼ均等に探索していたことが明らかとなった。

一方、第2試行での慣れた物体(A3とC3)と新奇物体(BとD)のそれぞれの探索時間(a'とb)を調べたところ(図2)、両探索時間共に、H系ラットはL系ラットやW系ラットに比べて有意に短かった( $p < .05$ )。しかし、第1試行での2個の同一物体の1個当たりの探索時間(a/2)に関しては群間に有意差は認められなかった。つまり、H系ラットの多くは、第1

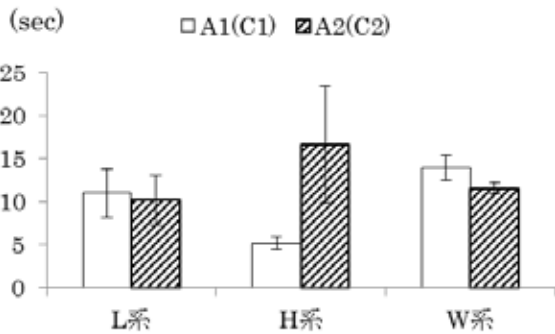


図1 第1試行での同一物体の平均探索時間(±SE) 第1セッション(A1, A2)と第2セッション(C1, C2)の同一物体への探索時間の平均値を示している。

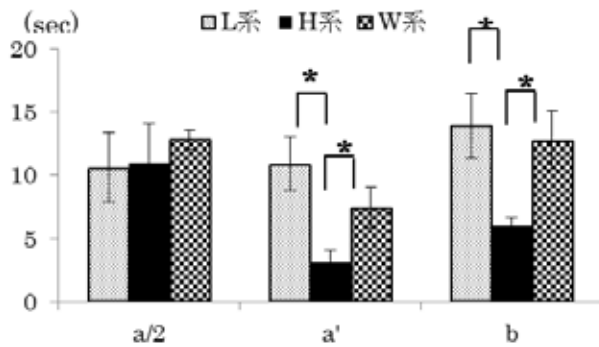


図2 第2試行での平均物体探索時間(±SE) a/2: 第1試行の1個当たりの探索時間, a': 第2試行の慣れた物体探索時間, b: 第2試行の新奇物体探索時間, \*:  $p < .05$

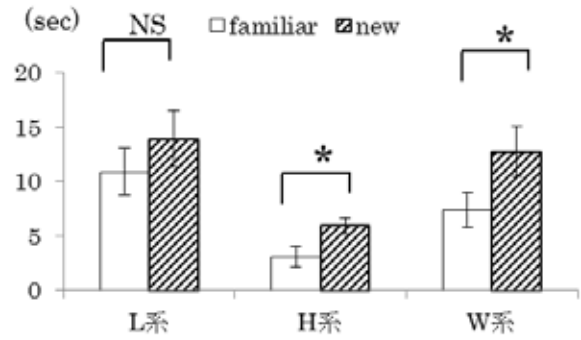


図3 見慣れた物体と新奇物体の平均探索時間(±SE) familiar: 見慣れた物体, new: 新奇物体, \*:  $p < .05$  NS: non-significant

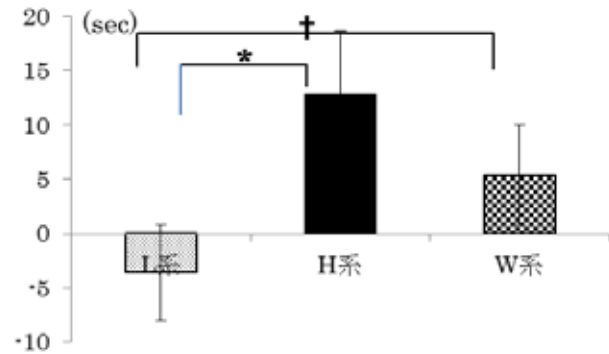


図4 各群の慣れの成分(h1) h1: 第1試行と第2試行の探索時間の差の平均(±SE) †:  $p < .10$ , \*:  $p < .05$

試行では他の群と同様に探索しているが、第2試行において、装置の反対側に向いたまま物体を見ることも少なくほとんど動かない行動パターンを示していた結果と考えられた。

そこで、図2に示した見慣れた物体(familiar)と新奇物体(new)の探索時間(a'とb)の差を各群で比較したところ(図3)、H系(3.1±0.9secと6.0±0.7sec)及びW系ラット(7.4±1.6secと12.8±2.3sec)は新奇物体に対する探索時間が有意に長かった( $p < .05$ )のに対して、L系ラット(10.9±2.2secと13.9±2.5sec)においては有意差は認められなかった。

通常、第2試行での探索時間は第1試行に比べて減少する慣れの現象が生じるのが一般的である。そこで、本実験においては2つの慣れの成分(h1とh2)を分析した。まず、第1試行の全体の探索時間から第2試行の全探索時間を引いた値(h1)を求めたところ(図4)、L系ラットはH系ラットと比べてその差は

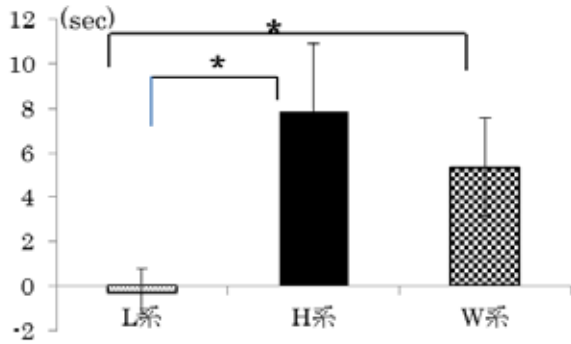


図5 各群の慣れの成分 (h2)

h2: 第1試行の半分の探索時間と第2試行の同一物体探索時間の差の平均 (±SE), \* :  $p < .05$

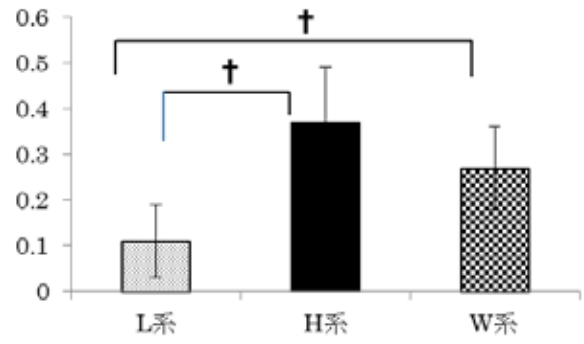


図7 各群の記憶成分 (d2)

d2: 第2試行での探索時間に対するd1の比の平均 (±SE), † :  $p < .10$

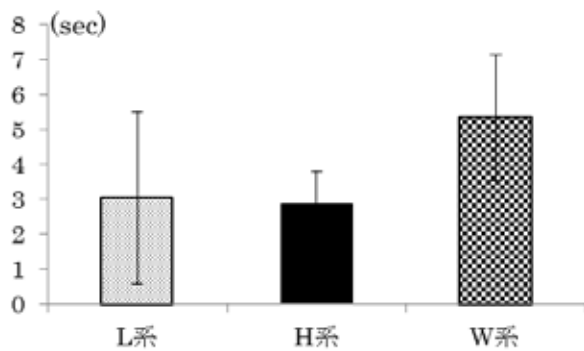


図6 各群の記憶成分 (d1)

d1: 第2試行での新奇物体と同一物体の探索時間の差の平均 (±SE)

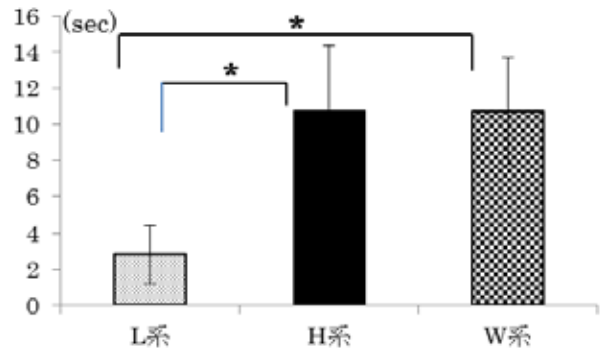


図8 各群の記憶成分 (d3)

d3: h2とd1の和の平均 (±SE), \* :  $p < .05$

有意に小さく ( $p < .05$ ), W系ラットとの比較でも有意傾向が認められた ( $p < .10$ ). また, 第1試行での1個当たりの探索時間 ( $a/2$ ) と第2試行での同一物体の探索時間 ( $a'$ ) との差 (h2) を求めたところ (図5), L系ラットは他の群と比べて有意に小さくなっていった ( $p < .05$ ). すなわち, L系ラットはマイナスの値を示す例が多く, 慣れの現象がほとんど生じていなかったことが明らかとなった.

次に, 記憶成分として, 第2試行での新奇物体の探索時間と見慣れた物体探索時間の差 (d1) を求めたところ (図6), L系ラットが最も小さく, 5例中2例でマイナスの値を示していたが, 個体差が大きく群間に有意差は認められなかった. しかし, 図3に示したように, 群内での比較ではH系ラットとW系ラットは有意に新奇物体を長く探索していたことが明らかとなっている. すなわち, 新奇物体と見慣れた物体との差の絶対値には群間で差がないと言えた. そこで, 第2試行全体の探索時間に対するd1の相対値 ( $d2 : d1 /$

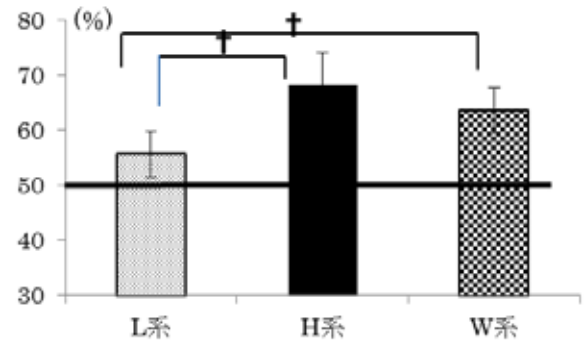


図9 新奇物体に対する平均選択率 (±SE)

† :  $p < .10$ , 横棒は chance level

( $a'+b$ ) を求めたところ (図7), L系ラットは他の2群 (H系とW系ラット) と比べて有意に低い傾向が認められた ( $p < .10$ ). さらに, 図5で示した慣れの成分 (h2) と図6に示した記憶成分 (d1) の和 (d3) を求め, 各群で比較したところ (図8), L系ラットはH系やW系ラットと比べて有意に値が低く ( $p < .05$ ), L系ラットは見慣れた物体と新奇物体との弁別が適切に行われていないことが考えられた.

最後に、第2試行での全探索時間に対する新奇物体への探索時間の割合（選択率）を調べたところ（図9）、L系ラット（ $55.7 \pm 4.1\%$ ）は、チャンスレベル（図の横棒）に近く、H系ラット（ $68.3 \pm 6.0\%$ ）やW系ラット（ $63.3 \pm 4.3\%$ ）に比べて低い傾向が認められた（ $p < .10$ ）。

## 考 察

本実験は、視覚的物体認知課題を用いて、Tsukuba 情動系ラットの非空間的及び非学習性の作業記憶を検討した。その結果、Tsukuba 低情動系（L系）ラットはTsukuba 高情動系（H系）ラット及び統制群のWistar系（W系）ラットと比べて、ある物体に十分に慣れさせた後5分間の遅延時間を置くと、見慣れた物体に対する慣れの現象が見られず、新奇物体を探索する時間との間に有意差がなくなり、見慣れた物体と新奇物体との弁別が適切に行われていないことが明らかとなった。すなわち、L系ラットは見慣れた物体の記憶（作業記憶）ができていなかったことが考えられた。

一般的に、ラットなどのげっ歯類は霊長類と同様に新奇なものを好む性質のあることが数多く報告されている（Mislin & Ropartz, 1981；Joubert & Vauclair, 1986；Renner, 1986；Ennaceur & Delacour, 1988；Renner & Rosenzweig, 1986；Winters, Forwood, Cowell, Saksida & Bussey, 2004）。その中で特に、Ennaceur & Delacour (1988) や Winters et al (2004) は、ラットが本来持っている自発的探索行動を利用した視覚的物体認知課題を考案し、ラットの純粋な（非学習性及び非空間的）作業記憶を測定した。すなわち、見本である物体を十分に探索した後、1分間、15分間、4時間、24時間と遅延時間を置いても、ほぼ一定に、新奇な物体を見慣れた物体と弁別し、より多くの時間探索することが明らかとなっている。従って、本実験で用いた5分間の遅延時間においても、L系ラットは見慣れた物体と新奇物体との弁別が困難であったことから、これまで述べてきた重篤な空間的作業記憶障害（吉田, 2007, 2012）に加えて、L系ラットは非空間的・非学習性の純粋な作業記憶障害をも持

ち合わせていることが明らかとなった。

これらの障害の脳内メカニズムについて、少なくとも空間的作業記憶障害の背景には海馬歯状回の顆粒細胞や海馬内神経ネットワークの変容が示唆されている（吉田, 2010）。また、Sasaki & Iwasaki (2003) によれば、海馬は全般的な空間的作業記憶に関連しているのに対して、遅延時間に依存した障害には嗅内野が重要であることを指摘している。一方、Winters et al (2004) によって興味深い結果が報告されている。すなわち、彼らは、本実験と同様の物体認知課題と8方向放射状迷路を用いた空間認知課題を、海馬破壊群と嗅皮質周辺野（peri-postrhinal cortex）破壊群にそれぞれ施行したところ、海馬破壊群は空間認知課題にのみ障害を示し、物体認知課題にはほとんど影響が無かったのに対して、嗅皮質周辺野破壊群は逆に、物体認知課題にのみ影響が見られることを報告した。

従って、本実験でのL系ラットの作業記憶障害の背景には、海馬や嗅内野に加えて、嗅皮質周辺野も構造的及び機能的に変容している可能性が示唆された。そこで今後は、作業記憶障害の脳内メカニズムを明らかにするために、これらの脳部位も含めた全般的な神経ネットワークの詳細な解析が必要となるであろう。また、本実験の物体認知課題に対するH系ラットの物体探索行動は、H系ラットの本来持っている動きの少ない行動特性（Fujita et al, 1994）により、他のラットとは異なる基準（鼻先だけを物体方向に向けた状態）で物体探索行動を解析した。従って、厳密な意味で他のラットと直接比較することはできないので、今後、H系ラットの行動特性に合った物体認知課題装置や方法などを改善し比較検討することも必要であろう。

## 謝 辞

本実験は、心理学科4年齊藤友哉氏のご協力の下に行われたもので、ここに深く感謝いたします。

## 参考文献

- Aggleton, J. P. One-trial object recognition by rats. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 37B, 279-294, 1985
- Bachevalier, J., Nemanic, S. & Alvarado, M. C. The medial temporal lobe structures and object

- recognition memory in nonhuman primates. In Squire, L. A. & Schacter, D. L. (Eds), *Neuropsychology of Memory*, Guilford, New York, 326-338, 2002
- Ennaceur, A. & Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioral Brain Research*, 31, 47-59, 1988
- Fujita, O., Annen, Y. & Kitaoka, A. Tsukuba high- and low-emotional strain of rats (*Rattus norvegicus*): an overview. *Behavior Genetics*, 24(4), 389-415, 1994
- Joubert, A. & Vauclair, J. Reaction to novel objects in a troop of guinea baboons: approach and manipulations. *Behaviour*, 96, 92-104, 1986
- Mislin, R. & Ropartz, R. Response in mice to a novel object. *Behaviour*, 78, 169-177, 1981
- Renner, M.J. Experience-dependent changes in exploratory behavior in the adult rat (*Rattus Norvegicus*): overall activity level and interactions with objects. *Journal of Comparative Psychology*, 101, 94-100, 1986
- Renner, M.J. & Rosenzweig, M.R. Object interactions in juvenile rats (*Rattus Norvegicus*): effects of different experiential histories. *Journal of Comparative Psychology*, 100, 229-236, 1986
- Rothblat, L. A. & Hayes, L. L. Short-term object recognition memory in the rat: nonmatching with trail-unique junk stimuli. *Behavioral Neuroscience*, 101(4), 587-590, 1987
- Sasaki, Y., & Iwasaki, T., Differential effects of entorhinal and hippocampal lesions on DNMT1 performance in rats. *Japanese Journal of Physiological Psychology and Psychophysiology*, 21 (3), 231-238, 2003
- Winters, B.D., Forwood S. E., Cowell, R. A. Saksida, L.M. & Bussey, T.J. Double dissociation between the effects of peri-posterior cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience*, 24(26), 5901-5908, 2004
- 吉田和典, Tsukuba情動系ラットの学習行動の特徴—8方向放射状迷路を用いた空間学習行動について—, 仁愛大学研究紀要, 6, 23-30, 2007
- 吉田和典, Tsukuba情動系ラットの空間学習成績と海馬内の神経構造との関連—飼育環境条件による影響について—, 仁愛大学研究紀要 人間学部編, 9, 35-41, 2010
- 吉田和典, Tsukuba情動系ラットの空間的作業記憶能力の検証, 仁愛大学研究紀要 人間学部編, 11, 11-17, 2012