

## げっ歯類を用いた物体認識試験及び位置認識試験の行動学的・薬理学的特徴

奥田尚紀、村井建之、太田尚

### 緒言

認知機能障害の治療薬を開発する上で、最も難しい課題の1つは実験動物の結果からどのようにヒトでの作用を予測するかということである。実験動物（げっ歯類）を用いて学習・記憶機能に対する薬物や遺伝子操作の影響を評価する系として、数多くの試験系がこれまで構築されているが、その多くは、報酬（餌）や罰（嫌悪刺激）といった要素を学習の強化因子として用いている。それゆえ、これらの試験系においては、記憶に影響を与える要因として強化因子に関連したストレスを無視することが出来ない。すなわち少なくとも形成される学習行動、記憶の一部には情動変化に伴う記憶が反映していると考えられる。しかしながら、動物には過度の情動・ストレスを伴わずに獲得する記憶も存在する。さらに、臨床試験において、ヒトの認知機能を測定する際に、強化因子を必要とする認知試験は通常用いられない。これらの事から、医薬品開発において望まれる動物認知試験系とは、1) 低い情動レベルの条件下で記憶が形成されること（強化因子を用いない）、2) 認知機能変化に対し、高い反応性を示すこと、3) シンプルかつ簡便な方法であること、といった条件を満たすものであると我々は考えている。本稿では、我々が実際に用いている物体認識試験、位置認識試験という二種の認知機能試験を紹介し、その行動薬理学的特徴について概説したい。

### 物体認識試験及び位置認識試験とは

物体認識試験（object recognition test, ORT）及び位置認識試験（object location test, OLT）は新奇性を好むというげっ歯類の特性を利用した試験系（1, 2）で、馴化、獲得、テストの三試行から成る（図1）。

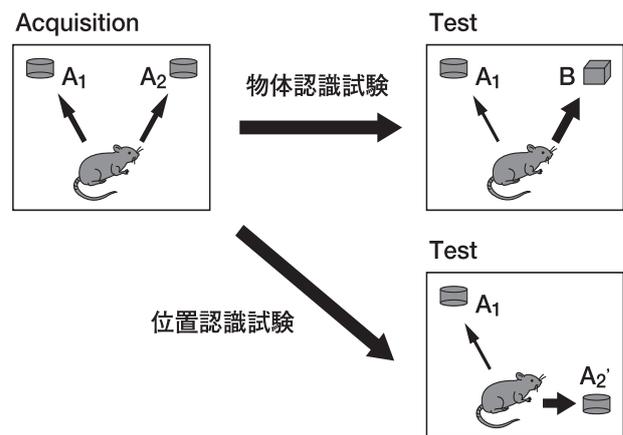


図1

予め観察箱に馴化させておいた動物を、その翌日同一の観察箱に入れ、2個の同一物体を自由に探索させる（獲得試行）。一定時間経過後、ORTの場合は片方の物体を新規の物体に、OLTの場合は片方の物体の位置を新規の位置に変え、再度動物を観察箱に入れ、物体の探索時間を測定する（テスト試行）。動物は、獲得試行とテスト試行の間隔が短いとき、新奇性のある物体（新奇の形状、あるいは新奇の位置）により長い時間探索行動を示し、その嗜好性は間隔を広げていくことで消失していく。このことから、この新奇性に対する行動変化は「獲得試行時の物体の形状または位置の記憶」を反映していると考えられる。本試験系では、獲得試行において報酬や罰といった強化因子を用いないことから、情動レベルの低い条件下で形成される記憶を検出できると考えられる。基礎検討の結果及びこれまでの報告から C57BL, Swiss, ddY, Lister, Wistar など、種々のマウス、ラット種を用いての検討が可能であるが、我々は、主として ICR 雄性マウス及び Sprague-Dawley 雄性ラットを用いて検討を行っている（3-7）。

キーワード：非空間記憶、空間記憶、ストレス、コルチコステロン  
 万有製薬株式会社つくば研究所 薬理研究部（〒300-2611 茨城県つくば市大久保3）  
 e-mail: shoki\_okuda@merck.com

Title: Behavioral and pharmacological characterization of object recognition and location tests in rodents.

Author: Shoki Okuda, Takeshi Murai, Hisashi Ohta

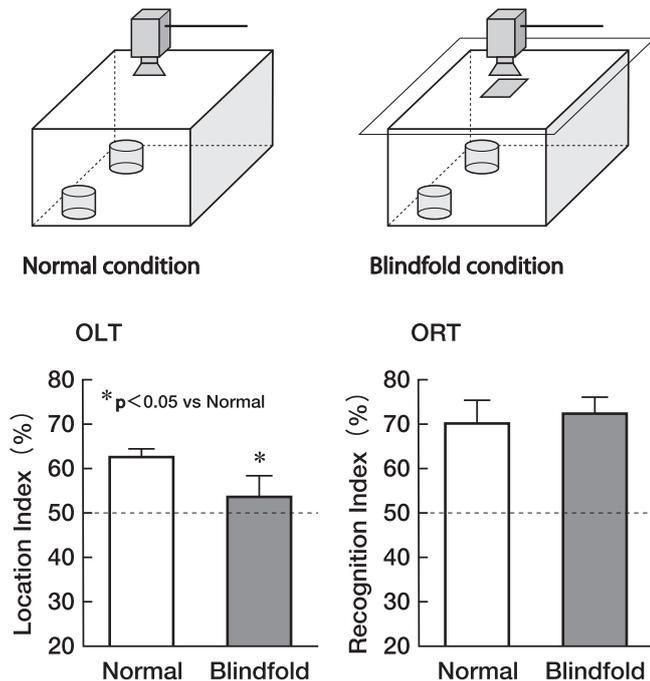


図2

### 物体認識試験及び位置認識試験の行動学的特徴

ORT および OLT は、その試験方法の性質上、それぞれ非空間記憶および空間記憶を評価する試験系と考えられている。さらにラットを用いた破壊実験の結果から ORT では鼻周囲皮質 (perirhinal cortex) が、OLT では海馬がそれぞれ重要な役割を果たしていると考えられており、この結果も上記の仮説を支持している。我々は、マウスを用い両実験系の特性を行動学的に解析した (3, 4)。まず、ORT において、マウスが物体の特徴として何を認識するのかを調べるため、呈示する物体を色、形状ともに異なるペアから、形状のみ異なるペア、あるいは色のみ異なるペアに変えて検討を行った。その結果、マウスはどの物体のペアであっても新奇物体を認識できることが明らかとなった。さらに、観察箱外部の空間情報から断絶された条件下においても、この記憶は保持されていた (図2)。これらの結果から、マウスは物体固有の非空間情報 (形状及び色・コントラスト) を利用して物体を認識していると考えられた。一方、OLT において、マウスの記憶は物体の配置やマウスのエントリー位置の変化によって影響を受けないのに対し、観察箱外部の遮断によって有意に障害された (図2)。すなわち、OLT において、マウスは外部空間情報を利用して物体の相対的位置関係を把握し、物体の新奇の位置を認識していると考えられた。これらの結果は、ORT, OLT が類

似した試験方法でありながら、それぞれ非空間、空間認知機能という異なる記憶を評価する試験系であることを強く示唆するものである。

### 物体認識試験及び位置認識試験の薬理学的特徴

次に、ORT および OLT 両試験において、薬理的解析を試みた。我々のマウス試験系では、各試行の時間を5分に設定した結果、獲得試行とテスト試行の間隔が短い場合 (1~2時間) ではマウスは強い記憶を保持しており、その後試行間隔依存的に忘却していくことが認められている。それゆえ、試行間隔を変化させることで対照群の記憶保持状態を調節することにより、薬物誘発の記憶障害作用及び記憶亢進作用の両側面を捕らえることが可能である。臨床的に健忘作用を有する抗コリン薬であるスコポラミンあるいはベンゾジアゼピン系抗不安薬であるジアゼパムは学習記憶障害作用を示した。興味深いことに、本試験系ではジアゼパムと異なる機構を持つ抗不安物質 8-OH-DPAT は学習障害を誘発しない。一方、アルツハイマー治療薬として臨床適用されているコリンエステラーゼ阻害薬ドネペジルは学習記憶亢進作用を示した。また老齢マウスは若齢マウスに比べ記憶能力が低下している事も明らかとなった。これらの結果から、ORT および OLT は薬物および加齢変化による学習・記憶機能変化に対して感受性の高い試験系である事が明らかとなった (3, 4)。

### 物体認識試験とストレス

情動 (喜怒哀楽) を伴う記憶が形成される場合、重要な役割を果たすが、副腎から放出されるストレスホルモン (グルココルチコイド及びアドレナリン) 及び扁桃体の活性化である。また、近年の臨床試験報告から、ストレスホルモンの記憶調節作用は情動記憶のみに選択的であることが示唆されている。げっ歯類を用いた研究において、ストレスホルモンは情動記憶に影響を与えることが明らかとなっている (5) が、情動レベルの低い認知試験と考えられる ORT において、ストレスホルモンはどのように作用するのであろうか? 我々はマウス、ラットの ORT を用い、検討を試みた (4, 6, 7)。我々のマウス試験系においては、コルチコステロン (獲得試行直後に投与) は、24 時間後のマウスの記憶保持能力にまったく影響を与えなかった。さらに、より詳細な検討を加えるため、観察箱に十分に馴化されたラット (通常条件) と馴化されていないラット (新奇ストレスが高い条件) の二種のストレスレベルが異なるグループを用いてコルチコステロンの作用

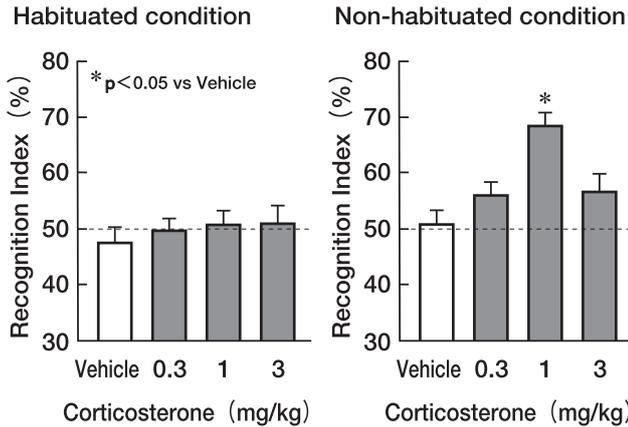


図 3

を検討した。その結果、コルチコステロンは非馴化ラットの記憶を亢進したのに対し、馴化ラットの記憶を変化させなかった(図3)。また、非馴化条件におけるこの記憶亢進作用は扁桃体外側基底核に局所投与されたプロプラノロールによって完全に抑制された。これらの結果は、ストレスホルモンが情動を伴う記憶を選択的に調節しているという臨床結果と一致するものであり、ORTが情動レベルの低い状態で形成された記憶を評価する試験系として有効であることを示している。しかしながら、我々のこの結果は、本試験系を用いてストレスレベルを変動させる被験薬物やターゲット遺伝子変化を評価する場合、試験方法によって結果が相違する可能性を示唆しており、試験条件の設定には注意が必要である。

## 総括

我々の研究結果は、ORTおよびOLTが情動レベルの低い条件下での薬剤や遺伝子変化による認知機能

## 著者プロフィール

### 奥田 尚紀 (おくだ しょうき)

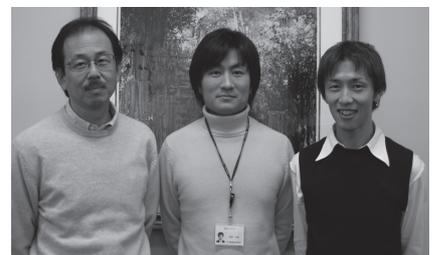
万有製薬株式会社つくば研究所 薬理研究部, 薬学博士  
 ◇ 1997年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了, 同年万有製薬入社. 1998-1999年名古屋大学大学院医学系研究科医療薬学分野(鍋島俊隆教授)派遣研究員, 2003-2004年米国カリフォルニア大学アーバイン校学習記憶神経生物学センター(McGaugh教授)博士研究員.  
 ◇専門分野: 神経薬理学, 行動薬理学 ◇趣味: 読書, 映画鑑賞

### 村井 建之 (むらい たけし)

万有製薬株式会社つくば研究所 薬理研究部  
 ◇ 1999年名古屋市立大学大学院薬学系研究科修士課程修了, 同年万有製薬入社. ◇専門分野: 電気生理学, 行動薬理学  
 ◇趣味: テニス, 料理

### 太田 尚 (おおた ひさし)

万有製薬株式会社つくば研究所 薬理研究部長, 薬学博士  
 ◇ 1984年九州大学大学院薬学研究科博士課程修了, 同年, 長崎大学医学部薬理学II講座助手, 1986-1989年, 米国アイオワ大学医学部薬理学講座(Brody教授)博士研究員, 1989-1995年, 同神経内科学講座(Talman教授)アソシエートリサーチサイエンティスト, 1995年, 万有製薬入社. ◇専門分野: 神経薬理学, 行動薬理学 ◇趣味: 木工



左より, 太田, 奥田, 村井.

変化を捉える事が出来る簡便な試験系であり, 医薬品開発における新規薬物や遺伝子改変動物の評価系として有用であることを示している. ORTは近年, 遺伝子改変マウスの認知試験として汎用されるようになってきたが, OLTの認知度はまだまだ低いのが現状である. ORT, OLTは同一獲得プロセスを用いるという特徴を持つことから, 両試験系を組み合わせることで, 同一環境における空間・非空間記憶に対する薬物の作用を比較することを可能にするという利点が生まれる. また, ストレス研究の分野においても, ORTは情動記憶, 非情動記憶のメカニズムを研究するツールとして非常に魅力的な評価法であると思われる. 最近では, これまで人に頼らざるを得なかったげっ歯類の探索行動の解析を自動的に行えるソフトウェアも開発されてきており, 今後ますます本試験系の発展が期待される.

謝辞: 本研究の遂行にご協力いただきました薬理研究部 古閑一実、田中岳、網のぞみ研究員に感謝いたします。また、本研究の一部は海外出向として派遣されたアメリカ留学で得た知見の成果です。懇切丁寧なご指導・ご助言をいただきましたカリフォルニア大学アーバイン校・学習記憶神経生物学センター、James L. McGaugh教授、Benno Roozendaal博士に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Ennaceur A, et al. Behav Brain Res 1998;31:47-59.
- 2) Dodart JC, et al. Neuroreport 1997;8:1173-1178.
- 3) Murai T, et al. Physiol Behav 2007;90:116-124.
- 4) Okuda S, et al. in preparation
- 5) McGaugh JL, et al. In PTSD Brain mechanisms and clinical implications. (Kato N, Kawata M, Pitman RK, ed) pp88-103, Springer (2006).
- 6) Okuda S, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004;101:853-858.
- 7) Roozendaal B, et al. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:6741-6746.