

# ラットの自発的物体再認記憶に及ぼす内側前頭前野損傷の効果<sup>1)</sup>

筑波大学人間系 梶田麻菜美・山田 一夫・一谷 幸男

Effects of medial prefrontal cortex lesions on spontaneous object recognition memory in rats

Manami Sugita, Kazuo Yamada and Yukio Ichtani (*Faculty of Human Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8577, Japan*)

The spontaneous object recognition test is a memory test that utilizes the innate tendency of rodents to explore novel stimuli longer than familiar ones. Within the "Different Objects Task (DOT)", which is a modified form of the spontaneous object recognition test, multiple different objects are presented during the sample phase, and after the delay period, one of the objects is replaced with a novel one during the test phase, and subjects' exploration behavior for each object is analyzed. A previous study reported that rats could not discriminate the novel object in the DOT under 24 h delay condition. In the present study, we investigated whether rats exhibited a preference to the novel object over the familiar ones in the DOT, where 3, 4, or 5 different objects were presented (3-, 4-, or 5-DOT) under a 24 h delay condition, when the sample phase was long (5 min×3 times) (Experiment 1). As a result, rats showed longer explorations for the novel object in all the DOTs under the 24 h delay condition. Next, the effects of medial prefrontal cortex (mPFC) lesions were examined on both a 5-DOT (high memory load condition) and a 2-DOT (low memory load condition) (Experiment 2). mPFC lesions did not affect DOT performance in either of the high and low memory load conditions. Thus, it is suggested that mPFC is not important for spontaneous object recognition memory regardless of the degree of memory load.

**Key words:** spontaneous object recognition memory, Different Objects Task, medial prefrontal cortex, rat

自発的物体再認テストとは、既知物体よりも新奇物体を多く探索するという、げっ歯類の生得的傾向を用いた記憶テストである。このテストは、食餌制限のような動機づけや、訓練を必要としないという特徴があり、げっ歯類の記憶研究において広く用いられている。標準的な自発的物体再認テストは、1回の見本期と1回のテスト期から構成されている。見本期では、2つの同一物体が置かれたアリーナ内を被験体に自由探索させる。その後のテスト期で、

見本期に提示されていた物体と同一の物体1つ（既知物体）と新奇物体1つが置かれたアリーナ内を被験体に自由探索させ、既知物体と新奇物体への探索時間を比較すると、ラットやマウスは既知物体よりも新奇物体を多く探索する。ラットを用いた研究では、多くの場合、見本期－テスト期間の遅延時間は数分から24時間程度に設定されている。

近年、Sannino et al. (2012) によって、より複雑な自発的物体再認テストである "Different Objects Task (DOT)" が開発された。DOTでは、見本期に複数の異なる物体が提示され、テスト期にそのうちの1つが新奇物体に置き換えられる。そのため、提示する物体数を増減させることで、記憶負荷の程度を操作することができる。Sugita, Yamada, Iguchi, &

1) 本研究の実施にあたり、実験データの収集と整理には筑波大学心理学類の栗岡誠氏の協力を得ました。お礼申し上げます。

連絡先：✉ m-sugita@kansei.tsukuba.ac.jp (梶田麻菜美)

Ichitani (2015) は、ラットを被験体として、見本期に3, 4, または5個の異なる物体が提示されるDOT (3-, 4-, または5-DOT) を、5分及び24時間の遅延条件で行った。その結果、5分遅延条件では、ラットは4個の物体まで記憶できたのに対し、24時間遅延条件では最も記憶負荷の低い3-DOTでも新奇物体への選好は示さなかった。一方、マウスは24時間遅延条件でも複数の物体の中から新奇物体を弁別できることが報告されている (Sannino et al., 2012)。これらの結果の違いは、ラットとマウスという動物種の違いだけではなく、見本期の設定方法の違いが原因である可能性がある。Sugita et al. (2015) では、ラットが見本期に物体探索に費やした時間の長短に関わらず、5分間の見本期を1回行っていた。しかし、Sannino et al. (2012) では、各物体を35秒探索すること (例えば、3-DOT では105秒の探索) を見本期での物体探索の基準としていた。標準的な自発的物体再認テストでは、見本期を複数回行うことで長期の記憶保持が可能であることが報告されている。Gaskin, Tremblay, & Mumby (2003) は、1日5分の見本期を5日間行い、3週間及び7週間後のテスト期でも、ラットは新奇物体への選好を示すことを報告した。同様に、Broadbent, Gaskin, Squire, & Clark (2010) も、1日5分間×3回の見本期を3日間行くと、10週間の遅延後でも、ラットはテスト期に新奇物体への選好を示すことを報告している。これらのことから、DOTにおいても見本期を複数回行い、見本物体への探索時間を十分に確保すれば、ラットも複数の物体の記憶を24時間保持できるかもしれない。

自発的物体再認記憶に関与する脳領域としては嗅周囲皮質が知られているが (Barker, Bird, Alexander, & Warburton, 2007; Hannesson, Howland, & Phillips, 2004; Winters, Forwood, Cowell, Saksida, & Bussey, 2004)、近年 DOT を用いた研究により、実験条件によっては海馬が自発的物体再認記憶において重要な役割を果たすことが報告されている。Sannino et al. (2012) の報告では、マウスは1分遅延条件において3-, 4-, 6-DOT を遂行することができるが、海馬損傷により記憶負荷の高い6-DOTにおいて新奇物体弁別が障害された。同様に、ラットでも海馬グルタミン酸 *N*-メチル-*D*-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体遮断により、記憶負荷の高い時のみ自発的物体再認記憶が障害されることが報告されている (Sugita et al., 2015)。DOT において、記憶負荷が高い時のみ海馬が重要となる理由として、recollection と呼ばれる記憶処理の関与が示唆されている (Sannino et al., 2012; Sugita et al., 2015)。記憶には familiarity

(知っているという感覚) と recollection (詳細な情報を思い出すこと) という2つの記憶処理過程が存在し、familiarity には嗅周囲皮質、recollection には海馬がそれぞれ関与すると考えられている (Eichenbaum, Yonelinas, & Ranganath, 2007; Yonelinas, 2002)。自発的物体再認テストにおいては familiarity が用いられるとされているが (Good, Barnes, Staal, McGregor, & Honey, 2007)、DOT で記憶すべき物体数が増加し、記憶負荷が高くなると、各物体の色や形、大きさ、配置といった詳細な情報を思い出すことが必要となり、familiarity よりむしろ recollection の処理を使用するために海馬が重要となる可能性が示唆されている (Sugita et al., 2015)。

内側前頭前野 (mPFC) は、海馬と同様、recollection に関与する (Farovik, Dupont, Arce, & Eichenbaum, 2008)。mPFC は海馬との間に直接的及び間接的な投射経路を持つ脳領域であり (Jay, Glowinski, & Thierry, 1989; Jin & Maren, 2015)、時間的順序などの記憶において、海馬と同様に重要な働きをすることが知られている (Chiba, Kesner, & Reynolds, 1994)。これまで、自発的物体再認記憶には mPFC は関与しないことが報告されてきた (Barker et al., 2007; Hannesson et al., 2004; Mitchell & Laiacina, 1998)。しかし、DOT を用いた記憶負荷の異なる条件での mPFC の役割はこれまで検討されておらず、recollection が必要となると考えられる記憶負荷の高い条件では、mPFC も海馬と同様、自発的物体再認記憶に関与するかもしれない。

以上のことから、本研究では DOT を用い、見本期を複数回行うことで24時間の遅延条件でもラットは新奇物体弁別ができるのか (実験1)、さらに、mPFC 損傷が記憶負荷の異なる物体再認記憶に及ぼす影響について検討した (実験2)。

## 実験 1

### 方法

**被験体** Long-Evans 系雄ラット ((一財) 動物繁殖研究所) 30匹を用いた。実験開始時に10週齢、体重は309-398gであった。実験期間を通して餌と水を自由摂取させた。被験体は12時間周期の明暗サイクル下で個別飼育され、全ての実験は明期 (8:00-20:00) に行なった。なお、本研究の全ての実験は筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

**装置** 直径79cm、高さ30cmのポリ塩化ビニール製の円形アリーナを使用した。床の色は灰色、壁の色は黒色であり、アリーナ中央の床面の照度は62 lx であった。

刺激物体として、ラットが初めて提示された際に同程度探索することが確認されている11種類の物体を用いた。これらには十分な重さがあり、ラットが動かすことはできなかった。使用した物体及びアリーナは1回の探索が終わるごとに消毒液を含む布で拭き、匂いが手掛かりとなることを防いだ。

**ハンドリング・装置馴化** ハンドリング及び装置馴化を1日1回3日間行った。ハンドリングは1匹につき5分間行った。装置馴化では、物体を何も置いていないアリーナ内を被験体に10分間自由探索させた。

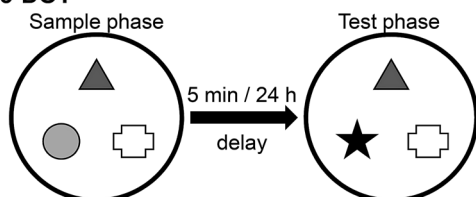
**自発的物体再認テスト (Figure 1A)** 見本期とテスト期から構成されており、見本期－テスト期間の遅延時間は5分または24時間であった。見本期では、アリーナ内に3、4、または5個 (3-, 4-, または 5-DOT) の異なる見本物体が置かれ、ラットはアリーナ内を5分間自由探索した。物体は、3個の場合は正三角形、4個の場合は正方形、5個の場合は正五

角形の頂点となる場所に、物体どうし及び物体と壁との距離が15cm以上離れるよう配置した。ラットの行動は、アリーナ上部に設置したビデオカメラで記録した。記録した映像を実験者が観察し、各物体の探索時間を計測した。物体に対する探索は、物体から約2cm以内で被験体の鼻が物体の方を向いていることと定義した。見本期は5分遅延条件では1回、24時間遅延条件では約10分の間隔で3回行った。ラットは見本期が終了するとホームケージに戻され、遅延時間中はホームケージ内で待機した。

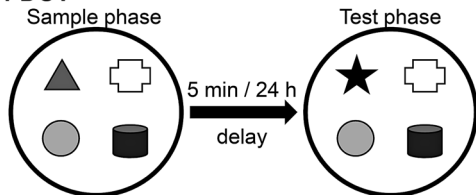
5分または24時間の遅延の後、テスト期が開始した。テスト期には、見本期に提示した物体のうち1つを新奇物体に置き換えたアリーナ内をラットに5分間自由探索させ、各物体への探索時間を測定した。新奇物体が配置される位置、提示物体の組み合わせはランダムであった。全ての被験体は5分遅延条件と24時間遅延条件で1回ずつ、計2回のテストを、異なる見本物体数で経験した。テスト間隔は24

## A. Experiment 1

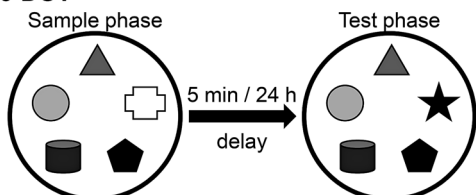
### 3-DOT



### 4-DOT

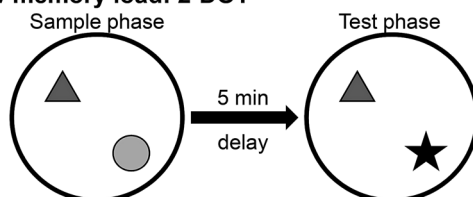


### 5-DOT



## B. Experiment 2

### low memory load: 2-DOT



### high memory load: 5-DOT

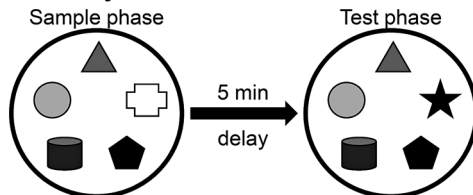


Figure 1. Schematic diagrams of the “Different Objects Task (DOT)”. The task consisted of a sample phase (5 min) and a test phase (5 min) with a delay period. (A) In experiment 1, the delay period was either 5 min or 24 h. In 5 min delay condition, one sample phase was conducted, while in 24 h delay condition, the sample phase was conducted three times. (B) In experiment 2, sham and mPFC lesion groups experienced DOTs both in low and high memory load conditions. Delay between the sample and test phases was 5 min.

時間であり、どちらの遅延条件、どの物体数のテストから始めるかはカウンターバランスを取った。

## 結果

動画データの破損等により計4匹の被験体を分析から除外した。

**見本期での物体探索時間** 5分遅延条件における見本期での各物体の探索時間 (Figure 2A-C) を比較するために、対応のある1要因分散分析を行った。その結果、いずれのDOTにおいても各物体の探索時間の間に有意差は見られなかった。また、1物体あたりの平均探索時間 (Figure 2D) を対応のない1要因分散分析によりDOT間で比較したところ、有意差がみられた ( $F(2, 23) = 3.42, p = .05$ )。TukeyのHSDによる多重比較の結果、4-DOTでの探索時間が5-DOTと比較して有意に長い傾向にあった ( $p < .10$ )。

次に、24時間遅延条件での各物体の探索時間

(Figure 3A-C) について、物体数×見本期の回数の2要因分散分析 (対応あり) を行った。その結果、3-DOTと5-DOTでは物体数及び見本期の回数の主効果、交互作用のいずれも有意でなかった。4-DOTでは見本期の回数の主効果のみ有意であった ( $F(2, 16) = 6.96, p < .01$ )。Bonferroniによる多重比較の結果、1回目の見本期での探索時間が3回目と比較して有意に長かった ( $p < .01$ )。見本期での1物体あたりの平均探索時間 (Figure 3D) について、物体数×見本期の回数の2要因混合分散分析を行った。その結果、見本期の回数の主効果が有意であった ( $F(2, 46) = 5.21, p < .01$ )。Bonferroniによる多重比較の結果、見本期1回目の平均探索時間が3回目と比較して有意に長く ( $p < .05$ )、さらに2回目と比較しても有意に長い傾向にあった ( $p < .10$ )。

**新奇物体弁別** 新奇物体弁別率 (discrimination ratio :  $DR = \text{新奇物体探索時間} / \text{総探索時間}$ ) を算出したのが Figure 4 である。1サンプルの  $t$  検定によ

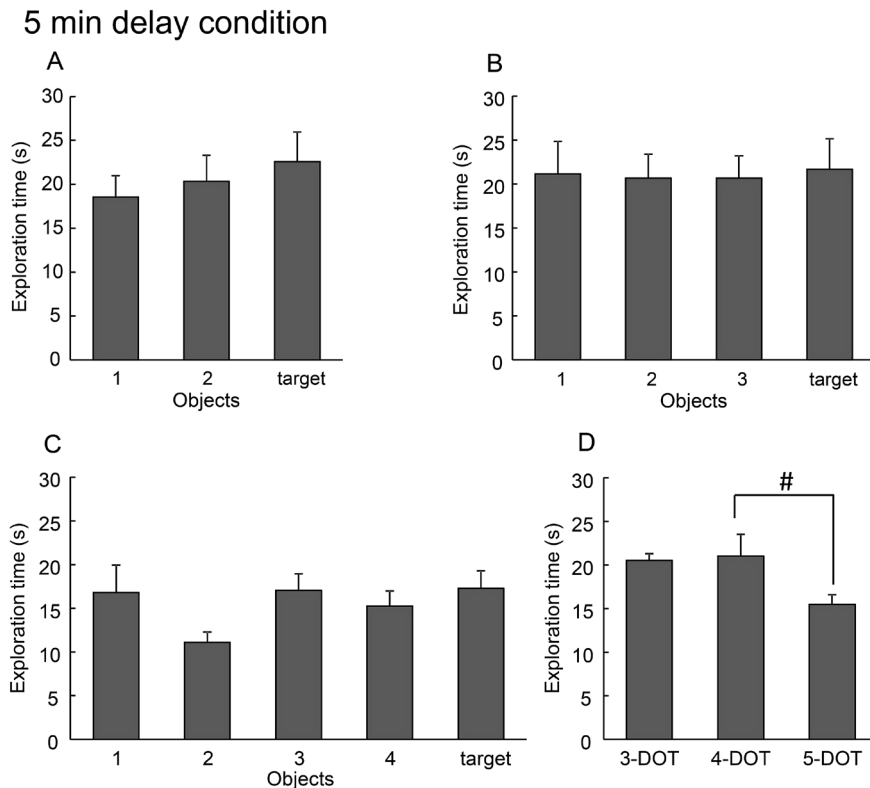


Figure 2. Time spent exploring each object in the sample phase under 5 min delay condition. Three, four and five different objects were placed in an arena in 3-DOT (A), 4-DOT (B) and 5-DOT (C), respectively. "Target" means the object that will be replaced with a novel object in the test phase. (D) Mean exploration time per object in the sample phase for DOT with 5 min delay period. #  $p < .10$ .

り、チャンスレベル (3-DOT: 33%, 4-DOT: 25%, 5-DOT: 20%) との比較を行った。その結果、5分遅延条件では5-DOTでDRはチャンスレベルよりも有意に高く ( $t(9)=2.42$ ,  $p<.05$ ), 3-DOTと4-DOTでも有意に高い傾向にあった (3-DOT:  $t(6)=2.28$ ,  $p<.10$ ; 4-DOT:  $t(8)=2.16$ ,  $p<.10$ )。24時間遅延条件では4-DOTと5-DOTでDRはチャンスレベルより有意に高く (4-DOT:  $t(8)=4.25$ ,  $p<.01$ ; 5-DOT:  $t(7)=3.46$ ,  $p<.05$ ), 3-DOTでもチャンスレベルより有意に高い傾向にあった ( $t(8)=2.05$ ,  $p<.10$ )。

## 考察

実験1では、DOTにおいて見本期を複数回行うことで、ラットが24時間遅延条件下でも複数の異なる物体を記憶できるのか検討した。その結果、5分間の見本期を3回行うと、ラットは5つの異なる物体の記憶を24時間保持することができた。

DOTを用いた先行研究において、ラットは複数の

異なる物体の記憶を24時間保持することはできないと報告されている (Sugita et al., 2015)。しかし本研究では、見本期の長さを先行研究よりも長く設定することで (5分間の見本期×3回)、24時間の遅延条件でも、ラットは5つの異なる物体を記憶することができた。Cohen & Stackman (2015) によると、標準的な自発的物体再認テストでは、多くの場合、見本期の探索時間が基準に達した時点で見本期を終了し、探索時間が基準に満たない被験体は分析から除外するという手続きが採用されており、ラットの場合は一般的に見本期での総探索時間が30秒に達することが基準とされている。このことから、ラットがテスト期で新奇物体への選好を示すためには、見本期において1物体当たり約15秒の探索時間が必要であると考えられる。しかし、Sugita et al. (2015) では、5分と24時間といういずれの遅延条件でも、5分間の見本期で1物体当たり15秒程度の探索時間は得られていたにも関わらず、ラットは24時間遅延条

## 24 h delay condition

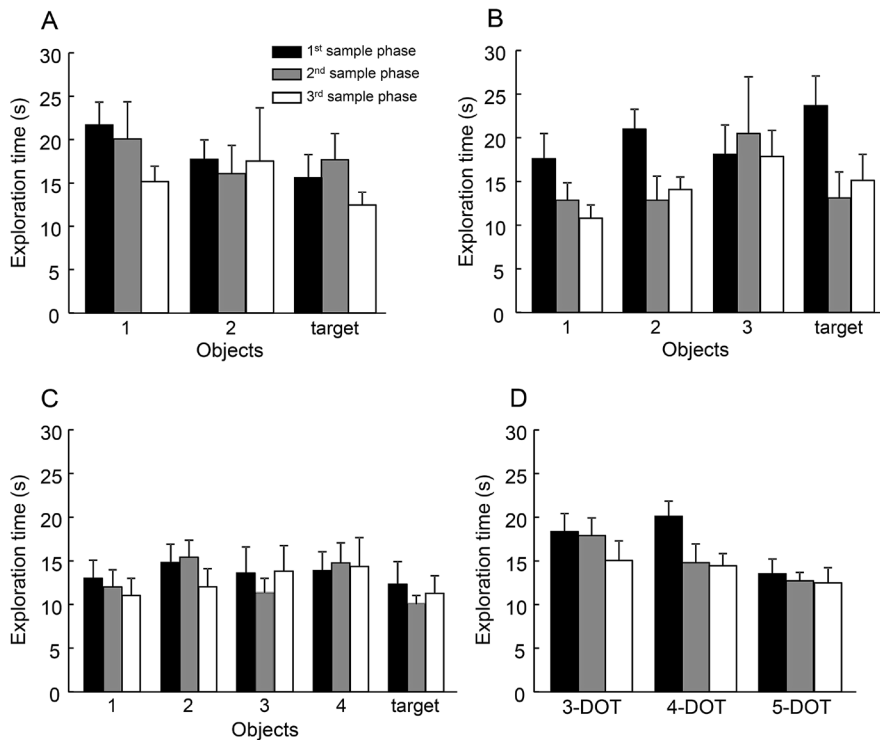


Figure 3. Time spent exploring each object in the sample phase under 24 h delay condition. Three, four and five different objects were placed in an arena in 3-DOT (A), 4-DOT (B) and 5-DOT (C), respectively. "Target" means the object that will be replaced with a novel object in the test phase. (D) Mean exploration time per object in the sample phase for DOT with 24 h delay period.

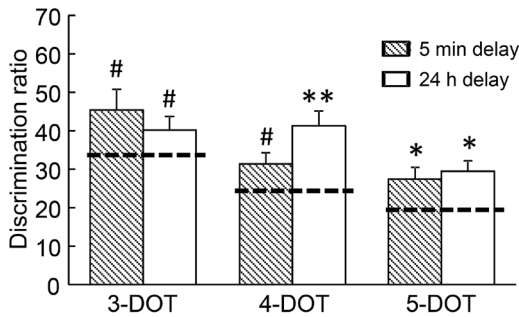


Figure 4. Discrimination ratios in the test phase for each DOT with 5 min and 24 h delay conditions. Dotted lines show chance level. Chance levels were 33%, 25%, and 20% in 3-DOT, 4-DOT, and 5-DOT, respectively. \*\* $p < .01$ , \* $p < .05$ , #  $p < .10$ .

件では最も記憶負荷の低い3-DOTでさえ、新奇物体への選好を示さなかった。5分間の見本期を3回行った本研究での見本期での1物体あたりの平均探索時間は、1回目よりも3回目で減少していたものの (Figure 3D), いずれのDOTでも3回の見本期で毎回10~20秒程度、つまり、3回の見本期の探索時間を合計すると約30秒以上は各物体を探索していた。これらのことから、以前出会った複数の異なる物体の記憶を24時間保持するためには、標準的な自発的物体再認テストで必要であるとされている時間よりもさらに長い見本物体への探索時間を確保することが必要であると示唆される。

5分遅延条件において、ラットは5つの異なる物体を記憶することができた。この結果は、DOTを用いてラットが5分遅延条件で5つの異なる物体を記憶できることを報告した Toyoshima, Yamada, Sugita, & Ichitani (2018) と一致するのに対し、ラットの物体記憶容量は4であることを報告した Sugita et al. (2015) とは異なるものである。研究間での結果のくい違いについて、Toyoshima et al. (2018) は、使用した被験体の系統差が原因である可能性を示唆している。しかし、Toyoshima et al. (2018) は本研究とは異なる Wistar-Imamichi 系雄ラットを使用したのに対し、Sugita et al. (2015) は、本研究と同じ Long-Evans 系雄ラットを使用していた。そのため、使用した系統の違いが、記憶できる物体数の差の原因ではないと考えられる。また、飼育条件についても、本研究は Sugita et al. (2015) と同じメッシュケージでの個別飼育であったのに対し、Toyoshima et al. (2018) では、社会的接触を妨げるために不透明な仕切りをケージの間に設置したプラスチックケージでの個別飼育、または10匹での集団飼育で

あった。さらに、見本期での各物体の探索時間はいずれの研究でも15~20秒程度であり、研究間で大きな違いはないように思われる。そのため、現時点では、なぜラットが記憶できる物体数が研究間で異なるのか明らかではない。ラットの物体記憶容量に影響を及ぼす要因についてさらに検討する必要がある。

## 実験 2

### 方法

**被験体** (一財) 動物繁殖研究所から購入した Long-Evans 系雄ラット20匹 (sham 群10匹, mPFC 損傷群10匹) を用いた。実験開始時の週齢は11-12週齢、体重は367-487gであった。飼育条件は実験1と同様であった。

**装置** 実験1と同じ円形アリーナ、刺激物体を用いた。

**ハンドリング** 1日1回3日間、1匹につき5分間のハンドリングを行った。

**脳損傷手術** 硫酸アトロピン (0.05 mg, i.p., 和光純薬工業株式会社) 投与後、ペントバルビタールナトリウム (40 mg/kg, i.p., ナカライテスク株式会社) およびケタラル (5 mg, i.m., 第一三共株式会社) 麻酔下で、ラットを脳定位固定装置に固定した。mPFC 損傷群では、*N*-methyl-*D*-aspartic acid (NMDA; Sigma, 米国) を10 mg/mlの濃度で0.9%塩化ナトリウム含有0.1 M リン酸緩衝液 (PB) (pH 7.4) に溶解し、ステンレスチューブを用いて4か所 (AP: +3.5 mm, ML:  $\pm 0.7$  mm from bregma, DV: -4.4 mm from skull; AP: +2.7 mm, ML:  $\pm 0.7$  mm from bregma, DV: -4.9 mm from skull) に、それぞれ0.3  $\mu$ l/minの速度で1分間ずつ投与した。投与後3分間は、薬物の拡散を促すためにステンレスチューブを脳内に留置した。一方、sham群では同量の溶媒をmPFCに投与することにより、疑似手術を行った。手術後1週間以上の回復期をおいた。

**装置馴化** 回復期の後、装置馴化を1日1回3日間行った。物体を何も置いていないアリーナ内を各被験体10分間自由探索させた。

**自発的物体再認テスト** (Figure 1B) 記憶負荷低条件として2-DOT、記憶負荷高条件として、実験1でラットは最大5つの物体を記憶できたため、5-DOTを用いた。見本期-テスト期間の遅延は、Sugita et al. (2015) が用いたのと同じ5分とした。DOTの手続きは実験1と同様であった。全ての被験体は5-DOTと2-DOTをそれぞれ1回ずつ経験した。テスト間隔は24時間であり、実施する順序はカウン

ターバランスを取った。

**組織学的検討** すべての実験終了後に、被験体をペントバルビタールナトリウム深麻酔下 (50 mg/kg, i.p.) で、0.9%塩化ナトリウム含有0.02 M PB, 続いて10%ホルマリン液で灌流固定し脳を取り出した。10%ホルマリン液で浸漬固定後、20%ショ糖含有の0.02 M PBに浸漬した。クリオスタット (CM3000: Leica, ドイツ) を用いて40  $\mu$ m厚の冠状切片を作成し、クレジルバイオレットによるニッスル染色を行い、損傷部位の確認を行った。

## 結果

**組織学的検討** Figure 5にmPFC損傷群の脳損傷範囲を示す。mPFC損傷群では、全ての被験体でmPFCの損傷が確認された。Sham群では、溶媒投与による脳損傷は見られなかった。

**見本期での物体探索時間** 見本期での総探索時間 (Figure 6A) について、物体数 $\times$ 群の2要因混合分散分析を行った。その結果、物体数の主効果が有意であった ( $F(1, 18)=61.09, p<.01$ )。

**新奇物体弁別** (Figure 6B) 実験1と同様に、DRを算出した。2-DOTについて、1サンプルの $t$ 検定を用いてDRをチャンスレベル (50%) と比較したところ、mPFC損傷群でのみチャンスレベルより有意に高い傾向が見られた ( $t(9)=1.94, p<.10$ )。また、対応のない $t$ 検定により sham群とmPFC損傷群のDRを比較したところ、有意差は見られなかった。次に、5-DOTについて1サンプルの $t$ 検定を用いてDRをチャンスレベル (20%) と比較したところ、両群ともにDRはチャンスレベルより有意に高かった (sham群:  $t(9)=4.23, p<.01$ ; mPFC損傷群:  $t(9)=3.60, p<.01$ )。また、対応のない $t$ 検定により sham群とmPFC損傷群のDRを比較したところ有意差は

見られなかった。

## 考察

実験2では、自発的物体再認記憶におけるmPFCの役割について記憶負荷の異なる条件下で検討した。その結果、記憶負荷の程度に関わらず、mPFC損傷は自発的物体再認記憶に影響しなかった。このことから、mPFCは海馬とは異なり、記憶負荷の程度に関わらず自発的物体再認記憶に関与しないことが示唆される。

Clark, Zola, & Squire (2000) は、海馬損傷ラットに短期 (10秒, 1分) または長期 (10分, 1時間,

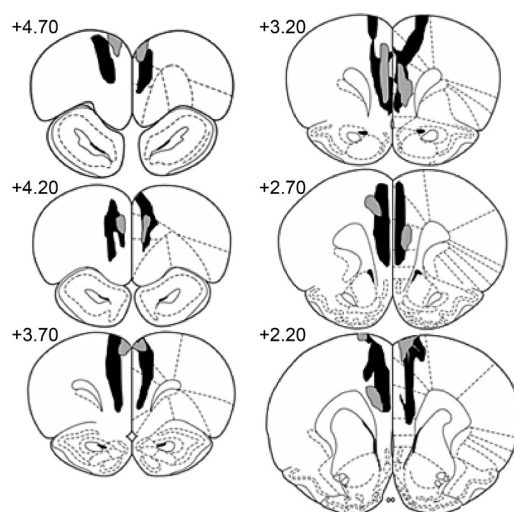


Figure 5. Coronal brain sections illustrating the extent of the largest (black) and smallest (gray) lesions of mPFC. Numbers represent the distance (mm) anterior to bregma (Paxinos & Watson, 1998).

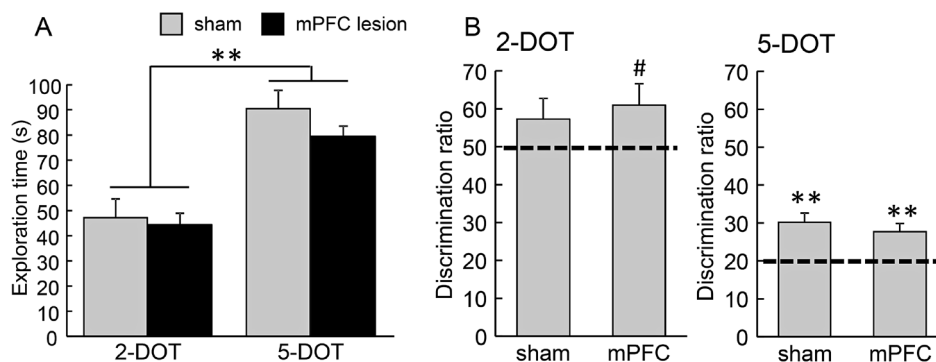


Figure 6. Effects of mPFC lesions on performance of DOT. (A) Total amount of object exploration during the sample phase. (B) Discrimination ratios in sham and mPFC lesion groups in the test phase for 2-DOT and 5-DOT. Dotted lines show chance levels (2-DOT: 50%, 5-DOT: 20%). \*\*  $p<.01$ , #  $p<.10$ .

24時間)の遅延条件で自発的物体再認テストを行い、長期遅延条件でのみ海馬損傷により記憶成績が低下することを報告した。遅延時間の増加は、記憶すべき項目数の増加と同様に記憶負荷の程度に影響すると考えられることから、この結果はDOTを用いた先行研究(Sannino et al., 2012; Sugita et al., 2015)の結果と同様、海馬が記憶負荷の高い条件でのみ自発的物体再認記憶に重要であることを示唆するものであると考えられる。一方、mPFC損傷は24時間遅延条件の自発的物体再認記憶(見本期に異なる2つの物体を提示する自発的物体再認テストで検討)に対して、影響を及ぼさないことが報告されている(Mitchell & Laiacina, 1998)。これらのことから、記憶すべき物体数の増加及び、遅延時間の増加という、記憶負荷の増大した条件では、自発的物体再認記憶の処理において海馬が重要な役割を果たすのに対し、mPFCは重要でないことが示唆される。しかし、本研究では6つ以上の物体をラットが記憶できるのかについては検討していない。そのため、記憶負荷高条件として用いた5-DOTは、ラットにとって十分に記憶負荷が高い条件ではなかった可能性も残される。今後、ラットが記憶できる最大の物体数を調べ、より記憶負荷を高くした条件でmPFC損傷の効果について再検討する必要がある。

### 総合的考察

本研究では、自発的物体再認における記憶負荷を操作するために、見本期に複数の異なる物体を提示するDOTを用いた。DOTでは、見本期により多くの異なる物体が提示されるほど記憶負荷が高くなると想定される。しかし、実験2のsham群は、記憶負荷高条件(5-DOT)において新奇物体への有意な選好を示したのに対し、記憶負荷低条件(2-DOT)では、新奇物体への選好を示さなかった(Figure 6B)。さらに、記憶すべき物体数の増加と同様に、見本期-テスト期間の遅延時間の延長も記憶負荷を高める要因であると想定されるが、実験1の4-DOTにおいて、ラットは24時間遅延条件では有意に新奇物体を選好していたのに対し、5分遅延条件での新奇物体選好は有意傾向にとどまった(Figure 4)。つまり、必ずしも記憶負荷の低い条件で、負荷の高い条件と比較して、新奇物体の弁別が容易であったわけではなかった。これは、見本期での物体探索時間が原因である可能性が考えられる。

実験1の24時間遅延条件では、見本期を5分遅延条件より長く設定したため、見本物体をより長時間探索することができた。そのため、ラットは24時間

遅延条件において新奇物体弁別をより容易に行えたのかもしれない。また、実験2のsham群では、見本期の総探索時間は、2-DOTで約47秒(1物体あたり約24秒)、5-DOTで約90秒(1物体あたり約18秒)であった。標準的な自発的物体再認テストでは、見本期の探索時間の基準として、見本物体への総探索時間がマウスでは約38秒、ラットでは約30秒であることが用いられている(Cohen & Stackman, 2015)。一方、マウスでDOTを行ったSannino et al. (2012)は、見本期に同一の物体が提示されるテストと比較して、DOTでは必要な情報量が増加することから各見本物体をより長く探索する必要があると考え、見本期で1物体あたり35秒の探索を基準とし、提示される物体数に応じて見本期の物体探索時間を設定していた。本研究での1物体あたり約24秒という2-DOTでの見本期の探索時間は、1物体あたりの探索時間が約18秒である5-DOTでは新奇物体への有意な選好が見られたものの、DOTでは十分でなかったのかもしれない。これらのことから、DOTにおいて安定した結果を得るためには、より長い時間の見本期を設定したり、見本期の探索時間の基準を設定することで、見本物体の探索時間を十分に確保することが重要であると考えられる。

本研究では、DOTにおいて見本期を複数回行うことで、24時間遅延条件でも以前出会った複数の異なる物体の記憶を保持できるかを検討し、その結果、ラットは24時間遅延条件でも5つの物体を記憶することができた(実験1)。このことから、見本期で物体を十分に探索させることが、自発的物体再認テストにおいて記憶を長期間保持するために重要であることが示唆された。さらに、mPFC損傷が記憶負荷の異なる条件で自発的物体再認記憶において果たす役割について検討した(実験2)。その結果、mPFCは記憶負荷の程度に関わらず、自発的物体再認記憶に関与しないことが示唆された。しかし、本研究で用いた記憶負荷高条件は、ラットにとって十分に記憶負荷が高い条件ではなかった可能性があるため、今後、見本物体数をより増やした条件で再検討することが必要である。

### 引用文献

- Barker, G., Bird, F., Alexander, V., & Warburton, E. (2007). Recognition memory for objects, place, and temporal order: A disconnection analysis of the role of the medial prefrontal cortex and perirhinal cortex. *The Journal of Neuroscience*, 27, 2948-2957.



- Broadbent, N. J., Gaskin, S., Squire, L. R., & Clark, R. E. (2010). Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, 17, 5-11.
- Chiba, A. A., Kesner, R. P., & Reynolds, A. M. (1994). Memory for spatial location as a function of temporal lag in rats: Role of hippocampus and medial prefrontal cortex. *Behavioral and Neural Biology*, 61, 123-131.
- Clark, R. E., Zola, S. M., & Squire, L. R. (2000). Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20, 8853-8860.
- Cohen, S., & Stackman Jr, R. W. (2015). Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, 285, 105-117.
- Eichenbaum, H., Yonelinas, A. R., & Ranganath, C. (2007). The medial temporal lobe and recognition memory. *Annual Review of Neuroscience*, 30, 123-152.
- Farovik, A., Dupont, L. M., Arce, M., & Eichenbaum, H. (2008). Medial prefrontal cortex supports recollection, but not familiarity, in the rat. *The Journal of Neuroscience*, 28, 13428-13434.
- Gaskin, S., Tremblay, A., & Mumby, D. G. (2003). Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus*, 13, 962-969.
- Good, M. A., Barnes, P., Staal, V., McGregor, A., & Honey, R. C. (2007). Context- but not familiarity-dependent forms of object recognition are impaired following excitotoxic hippocampal lesions in rats. *Behavioral Neuroscience*, 121, 218-223.
- Hannesson, D., Howland, J., & Phillips, A. (2004). Interaction between perirhinal and medial prefrontal cortex is required for temporal order but not recognition memory for objects in rats. *The Journal of Neuroscience*, 24, 4596-4604.
- Jay, T. M., Glowinski, J., & Thierry, A. M. (1989). Selectivity of the hippocampal projection to the prelimbic area of the prefrontal cortex in the rat. *Brain Research*, 505, 337-340.
- Jin, J., & Maren, S. (2015). Prefrontal-hippocampal interactions in memory and emotion. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 9, doi:10.3389/fnsys.2015.00170
- Mitchell, J. B., & Laiacona, J. (1998). The medial frontal cortex and temporal memory: Tests using spontaneous exploratory behaviour in the rat. *Behavioural Brain Research*, 97, 107-113.
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). San Diego: Academic Press.
- Sannino, S., Russo, F., Torromino, G., Pendolino, V., Calabresi, P., & De Leonibus, E. (2012). Role of the dorsal hippocampus in object memory load. *Learning & Memory*, 19, 211-218.
- Sugita, M., Yamada, K., Iguchi, N., & Ichitani, Y. (2015). Hippocampal NMDA receptors are involved in rats' spontaneous object recognition only under high memory load condition. *Brain Research*, 1624, 370-379.
- Toyoshima, M., Yamada, K., Sugita, M., & Ichitani, Y. (2018). Social enrichment improves social recognition memory in male rats. *Animal Cognition*, 21, 345-351.
- Winters, B. D., Forwood, S. E., Cowell, R. A., Saksida, L. M., & Bussey, T. J. (2004). Double dissociation between the effects of periposthinal cortex and hippocampal lesions on tests of object recognition and spatial memory: Heterogeneity of function within the temporal lobe. *The Journal of Neuroscience*, 24, 5901-5908.
- Yonelinas, A. P. (2002). The nature of recollection and familiarity: A review of 30 years of research. *Journal of Memory and Language*, 46, 441-517.

(受稿10月31日：受理11月26日)