

博士論文

ラットの自発的物体再認記憶の検索における
海馬グルタミン酸受容体の役割に関する研究

平成 28 年度

筑波大学大学院人間総合科学研究科

感性認知脳科学専攻

岩村越史

筑波大学

目次

第1章 序論	1
第1節 海馬と記憶研究	1
1. 記憶の二重貯蔵モデル	
2. 海馬と記憶	
3. 記憶の検索における海馬の役割	
第2節 グルタミン酸受容体と記憶	6
1. 長期増強とグルタミン酸受容体	
2. NMDA 受容体と記憶	
第3節 自発的物体再認記憶	8
1. 自発的物体再認テスト	
2. 自発的物体再認テストの一般的方法	
3. 自発的物体再認記憶における海馬損傷の影響	
4. 自発的物体再認記憶における海馬一時的不活性化の影響	
5. 自発的物体再認記憶における NMDA 受容体の役割	
第2章 本研究の目的と一般的方法	18
第1節 本研究の目的	18
第2節 本研究における一般的方法	19
1. 被験体	
2. 装置	
3. 薬物投与	
4. ガイドカニューレ埋込手術	
5. 行動学的手続き	

- 6. 統計的分析
- 7. 組織学的検索

第3章	自発的物体再認記憶の検索における NMDA 受容体の役割	27
第1節	自発的物体再認に及ぼす長期遅延の効果【実験1】	27
第2節	自発的物体再認に及ぼす見本物体提示回数の効果【実験2】	38
.....		
第4章	自発的物体再認記憶の検索における AMPA 受容体の役割	46
第1節	自発的物体再認に及ぼす長期遅延（24時間～3週間）の効果【実験3】	46
第2節	自発的物体再認に及ぼす短期遅延（30分および6時間）の効果【実験4】	54
.....		
第5章	見本期物体提示回数と記憶保持期間の関連【実験5】	62
.....		
第6章	総合的考察	68
.....		
引用文献		77
.....		
謝辞		85

第1章 序論

第1節 海馬と記憶研究

1. 記憶の二重貯蔵モデル

記憶研究において、処理過程を説明するいくつかの理論が提唱されている。認知心理学的研究による知見から、その中でも有力な理論の一つが、「記憶の二重貯蔵モデル」である (Atkinson & Shiffrin, 1965, 1968)。このモデルでは、記憶を保持期間の長さによって短期記憶 (short-term memory; STM) と長期記憶 (long-term memory; LTM) に分類し、それぞれを別の記憶貯蔵庫とみなした。また、記憶には複数の処理過程 (記銘, 固定, 保持, 検索) が必要であることが示されている。

記憶の二重貯蔵モデルにおいて、まず、外部環境からの情報は、感覚器を介して感覚情報に置き換えられる。その後、感覚情報は「記銘過程」を経て意味的な要素へ移行されることにより、「短期記憶」として維持される。しかし、この短期記憶は数秒から数時間しか持続せず、他の情報入力によって容易に維持が妨害されてしまう不安定な状態である。獲得された記憶がより永続的・安定的になるためには、「長期記憶」として保持される必要がある。短期記憶表象の強度が十分であった場合、短期記憶は「固定過程」を経て、長期記憶へ転送される。短期記憶の強度は、外部環境からの刺激の強度それ自体に加えて、リハーサル (短期記憶内の情報を意図的または無意図的に何度も反復して想起すること) や、体制化 (関連する情報をまとめ、整理すること) などの認知的修飾の影響を受けると考えられている。このように固定され、長期記憶として保持されている (保持過程) 記憶は、必要に応じて想起される。この過程を「検索過程」という。

以上のような心理学的な記憶の二重貯蔵モデルとは別に、Hebb (1949)は心理学、神経科学双方の知見を踏まえた考察から、記憶を支える神経のモデルを提唱した。Hebb はシナプスの伝達効率の永続的変化のパターンが記憶のエングラム（痕跡）を構成すると考えた。長期記憶を支える神経基盤として、シナプスの構造的変化を想定し、シナプス前細胞が繰り返し発火することによりシナプス後細胞が興奮することで、そのシナプスの伝達効率が持続的に増加すると考えた。「ヘブ則」と呼ばれるこの仮説はのちに、実際の生理学的現象としてウサギの海馬で長期増強（long-term potentiation : LTP）が確認されたことから、今日においても学習・記憶研究の基礎的な仮説として多大な影響を及ぼしている。

Hebb は、記憶は強いシナプス結合で結ばれた特定の神経細胞の集団として符号化されて保持されると考えた。これが物理的な記憶痕跡と想定される。ある刺激をきっかけに強く結合した神経細胞群（記憶痕跡）が活性化することで記憶が想起されるのである。この仮説を支持する証拠として、記憶獲得時に神経細胞群が記憶痕跡として保持され、検索時にそのニューロン集団が再発火するという現象を、Liu et al. (2012)が光遺伝学的手法と遺伝子改変マウスを用いて示した。Liu らは光遺伝学的手法を用いて、恐怖条件づけを行った際に海馬の特定の神経細胞をタグ付けし、その神経細胞を刺激することで恐怖反応を引き起こせることを示した。このように近年では、光遺伝学的手法を用いることで、脳内に存在するとされる記憶痕跡を物理的に検討することが可能である。したがって、記憶痕跡が保持されている脳部位や、記憶痕跡の時間経過による変化が明らかにされることが今後期待される。

2. 海馬と記憶

記憶が脳内のどこにどういった形で貯蔵されているかという疑問は古くか

ら存在しており，現在でも重要な研究課題である．記憶に海馬が重要な役割を果たすという知見をもたらしたのは，一件の臨床例であった．1957年，**Scoville & Milner** はてんかんの治療として海馬を含む内側側頭葉を摘除した患者 **H.M.** が，特異的な記憶障害を示すことを報告した．**H.M.**は手術以後の記憶を保持できず（順向性健忘），手術以前の記憶も部分的に阻害されていた（逆向性健忘）．この報告により，記憶の主要部位として海馬が注目されるようになった．

海馬は，ラットでは大脳皮質と視床の間に位置する部位で，大脳辺縁系の一部である．海馬は大きく分けて，**CA1・CA3** からなるアンモン角，歯状回，海馬支脚の三領域からなり，その解剖学的形態は特徴的かつ非常に整った層構造を成している．

H.M.の研究により海馬と記憶の関係が注目され，動物を用いた行動実験でも記憶における海馬の役割が研究された．**Morris et al. (1982)** は，海馬を損傷したラットのモリス水迷路課題の成績が低下することを示し，海馬が水迷路の記憶に重要であることを示した．モリス水迷路課題とは，円形のプールを用いた記憶課題である．プールの特定の場所に被験体のラットやマウスが逃避できるプラットホームを設置する．このプラットホームは透明の亚克力などで作られており，染料などでにごらせたプールの水面の **1 cm** 下にあるため，被験体であるラットやマウスが視覚的に見つけることはできない．しかし，複数回プールで泳がせると，被験体はプールの周囲の空間情報からプラットホームの位置を学習し，素早くプラットホームにたどりつけるようになる．また，**Olton & Papas (1979)** は，放射状迷路課題習得後に海馬を損傷したラットの課題遂行におけるエラー数の増加を報告した．放射状迷路課題とは，中央のプラットホームから放射状に伸びたアームの先端にあるエサ（報酬）を効率的に獲得する方法をラットやマウスに学習させる課題である．訓練を繰り返すと，被験体は一度進入したアームに再度進入することなく，効率的に全てのアーム

の報酬を獲得できるようになる。放射状迷路課題において被験体は、実験装置の周囲の空間情報からアームや報酬の位置関係を記憶していると考えられている。モリス水迷路課題や放射状迷路課題はともに空間的な情報に関する記憶を測定するものであり、海馬損傷によりこれらの課題の成績が低下することから、海馬は特に空間記憶に重要であると考えられている。

空間記憶を含まない課題についても海馬の重要性は示されているが、空間記憶ほど海馬に強く依存しているものではないと考えられる。例えば、文脈恐怖条件づけにおけるラットの海馬損傷実験で、海馬機能が文脈と恐怖刺激の連合学習に重要であるが、海馬損傷によっても記憶が障害されない補償作用が存在することが示唆されている (Wiltgen et al., 2006)。また、恐怖条件づけは情動記憶としての側面が強いため、情動性の記憶ではない非空間記憶課題として、遅延非見本合わせやそれを改良した自発的物体再認テスト (Ennaceur & Delacour, 1988) が考案された。物体の記憶を測定するとされる遅延非見本合わせでは、空間記憶課題と対照的に海馬損傷の影響がなく (Aggleton et al., 1986)、自発的物体再認テストでも海馬の関与を否定する結果が報告された。しかし、自発的物体再認記憶については、近年海馬の関与を示唆する研究が報告されており、空間記憶に比べると非空間記憶における海馬の役割は未だ明らかでないことが多い。したがって、自発的物体再認テストと海馬の関連については第3節にて概説する。

3. 記憶の検索における海馬の役割

課題の習得前に損傷を行う手法では、海馬が恒久的に失われてしまうため、記憶の検索における海馬の役割に言及することが不可能であった。課題を習得し、テストを行うまでの間に損傷を行う事後損傷型の研究ではその点を克服できる。しかしながら、事後損傷実験は被験体の1週間程度の回復期間が必要で

あるため、訓練とテストまでの期間が長期に及んでしまうことが欠点として挙げられる。後述する自発的物体再認テストで損傷実験を行った Mumby et al. (2005)は、海馬があらかじめ損傷されていることにより、海馬周囲の構造が海馬の代わりとして補償的に働く可能性を示唆した。これらの損傷による解釈の複雑化をさけるために、後述するように受容体の遮断薬などを用いた一時的で可逆的な脳部位の不活性化の手法が用いられる。また、被験体に記憶の検索を行わせたのちに、最初期遺伝子や mRNA、タンパク質の発現を神経活動のマーカースとして測定する方法も広く用いられる。Wartman et al. (2014)はモリス水迷路の訓練を行ったのちに、放射状迷路課題の訓練を行い、再度水迷路のプローブテストを行った際のラットの c-Fos 標識を比較することで、近時記憶よりも遠隔記憶を検索する際に海馬が活性化することを示した。また近年では、光遺伝学的手法を用いてごく限られた時間のみ、特定の脳部位の活性を抑えることが可能となっている。さらにその手法を応用し、活性化した神経細胞をタグづけし、のちにそれらの細胞を任意のタイミングで活性化、あるいは抑制する手法が考案されている。Tanaka et al. (2014)は、*fos-tTA* mice を用いて、恐怖条件づけの際に CA1 の活性化した神経細胞を同定、タグづけし、テスト時にそれらの細胞をレーザーによって抑制することを可能にした。タグづけした CA1 の細胞を抑制すると、マウスの恐怖反応が抑制され、周囲の皮質と扁桃体の再活性も抑えることを示し、検索時に海馬が特定の記憶表象を活性化する可能性を示唆した。これらの研究から、記憶の検索には海馬が重要な役割を果たしていると考えられる。光遺伝学の研究が示すように、記憶痕跡が神経細胞の回路に実際に存在していること、さらに海馬がその検索に関わっていることは近年明らかにされ、今後研究が進むことが予想される分野であり、記憶検索における海馬の役割は今後も注目されると思われる。

第2節 グルタミン酸受容体と記憶

1. 長期増強とグルタミン酸受容体

H.M.の記憶障害の報告などから、海馬は記憶に重要な役割を果たす脳部位であると考えられるが、それでは記憶とは脳内でどのような変化が起こる現象なのだろうか。Bliss & Lomo (1973) はウサギの海馬から長期増強 (long-term potentiation : LTP) という現象を発見した。LTP とは、シナプス前部の興奮性入力線維に高頻度刺激 (テタヌス刺激) を与えると、シナプス前部の刺激で誘発される興奮性シナプス後電位 (excitatory post-synaptic potential; EPSP) の振幅が増大し、この効果が数時間から数週間という長期にわたって維持される現象である。つまり、一過性の刺激により長期にわたる情報伝達の効率の上昇が起こる。この LTP ではヘブ則で述べられた入力特異性、協同性、連合性が確認された。これによりシナプス可塑性が理論的にも、また実際の現象としても学習・記憶の生理学的基盤の有力な候補とされている。したがって、前述の海馬における行動学的記憶研究と合わせて、海馬内 LTP が記憶に重要な役割を果たすものと考えられる。

LTP の発生機序には、イオンチャネル型グルタミン酸受容体の一種である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体と α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA) 受容体が重要であるとされている。興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、神経細胞の興奮によってシナプス前膜から放出され、シナプス後膜に存在する AMPA 受容体に結合する。グルタミン酸が結合することで AMPA 受容体のイオンチャネルが開放し、 Na^+ を流入させて後シナプス細胞に EPSP を生じさせる。この時、NMDA 受容体は Mg^{2+} によりイオンチャネルが閉塞されているため、イオンの流入は起こら

ない。しかし高頻度の電気刺激（テタヌス刺激）が与えられると，多量のグルタミン酸により多くの AMPA 受容体が反応してシナプス後膜が強く脱分極する。すると，膜電位の変化により NMDA 受容体チャンネルに結合していた Mg^{2+} が遊離する。その結果，NMDA 受容体を通して細胞外から Na^{+} および Ca^{2+} が流入する。 Ca^{2+} の流入は結果的に，シナプス後膜における AMPA 受容体の増加と機能向上を引き起こす。この変化はテタヌス刺激による脱分極が終了した後も持続し，したがって弱い刺激に対しても強い EPSP が引き起こされる現象（LTP）が持続する。

2. NMDA 受容体と記憶

Morris et al. (1986) は，競合的 NMDA 受容体遮断薬の 2-amino-5-phosphonopentanoic acid (AP5) の脳室内慢性投与が，モリス水迷路の課題習得やプローブテストの成績を低下させることを示した。さらに彼らは AP5 投与が *in vivo* で LTP を阻害することを確認した。この研究は，脳内グルタミン酸 NMDA 受容体によって引き起こされる LTP が記憶において重要な役割を果たしていることを示唆しているが，その際に特に重要となる脳部位を局限できていない。NMDA 受容体感受性の 3H -グルタミン酸結合部位は脳内に広く分布しているが，特に海馬 CA1 領域に豊富にみられる (Monaghan & Cotman, 1985)。したがって，NMDA 受容体遮断薬を海馬に局所投与することで，海馬 NMDA 受容体の記憶への関与を検討できる。Morris et al. (1989) は AP5 を海馬内に微量投与した後にモリス水迷路の訓練を行ったところ，脳室内投与と同様に，課題の習得が遅れることを報告した。したがって，海馬 NMDA 受容体の正常な働きがモリス水迷路の課題習得に必要であることが示された。また，放射状迷路課題では，Kawabe et al. (1998) が被験体に課題を習得させたのち，テストの 20 分前に AP5 を海馬内投与すると，用量依存的に

成績が低下することを示した。また、高野ら(2012)は放射状迷路の 8 本のアームのうち 4 本に報酬を置き、その場所を学習させる課題を行った。被験体が習得基準を満たしたのち、テストの前に非競合的 NMDA 受容体遮断薬 (5S,10R)-(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d]cyclohepten-5,10-imine (MK-801)を投与すると、報酬が置かれていないアームに進入する参照記憶エラー数は増加するが、一度進入し報酬を獲得したアームに再度進入する作業記憶エラー数は増加しないことを報告した。さらに Yamada et al. (2015) は、同様の課題を用いて、海馬内 AP5 投与が参照記憶、作業記憶を共に障害することを示した。これらの結果は、海馬 NMDA 受容体が放射状迷路課題の遂行に重要であることを示唆する。

第 3 節 自発的物体再認記憶

1. 自発的物体再認テスト

ラットを用いて記憶研究を行う際、よく用いられる手法としてモリス水迷路課題や放射状迷路課題、その他古典的条件づけの手法などが挙げられる。古典的条件づけを除くと、海馬に関する研究では空間記憶課題を用いたものが多い。これは O'Keefe & Dostrovsky (1971)が電気生理学的手法を用いて、海馬内で場所細胞を発見し報告したことにより、海馬が特に空間情報の処理に重要であるという生理学的な証拠が認められたことによる。Morris 水迷路や放射状迷路を用いた研究では、場所細胞の存在が示唆する通り、海馬が空間記憶に重要であることが確認されたが、一方で非空間記憶には重要でないという研究が報告された。遅延非見本合わせ課題は、以前見たものと異なるものを選べば報酬が得られるというシンプルな非空間記憶課題の代表的なものであるが、アカゲザルを用いた実験では海馬損傷の影響がないことが示された (Delacour,

1977). Aggleton は 1986 年, ラットにおいても海馬損傷が遅延非見本合わせ課題に影響を及ぼさないことを示した. このことから空間記憶課題に対して, 非空間記憶課題において海馬は重要ではないという解釈がなされた. しかしながら, この遅延非見本合わせ課題や水迷路, 放射状迷路課題, あるいは古典的条件づけは摂食制限後の餌報酬や電撃などの嫌悪刺激が強化子として用いられ, ルール学習のために長期の訓練が必要になる場合もある. したがって, 海馬損傷による行動の変容が記憶への作用によるものなのか解釈が困難になる場合がある. そこでより単純に非空間記憶を測定する手法が考案された. 本研究で用いる自発的物体再認テスト (以下物体再認テスト) は, **Ennaceur & Delacour (1988)** が提唱した手法で, 既に探索した経験のある物体よりも初めて探索する (新奇な) 物体の方をより長く探索するという, ラットやマウスの生得的行動を利用した記憶テストである. 遅延非見本合わせ課題を参考に開発され, 強化子を用いず, 特別な訓練が必要ないという利点をもつ. 特に手法がシンプルであることから幅広い応用が考えられ, 同時に提示する物体数の数を増加させることで「記憶負荷」の検討を行った研究 (**Sannino et al., 2012; Sugita et al., 2015**) や, 見本期とテスト期の中に再度, 見本物体に出会わせることで「検索誘導性忘却」という記憶の現象がラットで観測できるかを検討した研究 (**Yamada et al., 2014**) などが行われている.

2. 自発的物体再認テストの一般的方法

自発的物体再認テストの一般的な手続きを以下に記述する. このテストは見本期とテスト期, そしてその間に設けられる遅延期から構成される. 見本期では 2 つの同一な物体をアリーナに設置し, 被験体のラットやマウスに自由探索させる. 遅延期の後に行われるテスト期では 2 つの物体のうち一方を見本期とは異なる, 新奇な物体と入れ替えて提示する. ラットやマウスは新奇な刺激を

より長く探索する生得的傾向がある。したがって、テスト期におけるそれぞれの物体の探索時間を計測することで、見本期に提示された物体の記憶を評価することが可能であるとされる。これは被験体がテスト期に遭遇した物体の情報と、見本期に探索した物体の情報に関する記憶を照らし合わせた結果の行動であると推測される。したがって、評価される記憶は物体自体の情報に関するものであると考えられるため、このテストは物体再認テストと呼ばれる。

また、この再認テストにはいくつかのバリエーションが存在する。テスト期に新奇な物体を提示するのではなく、物体の配置を変えるものは自発的場所再認テストと呼ばれている。見本期で2つの同一な物体を提示し、テスト期に一方の物体を見本期とは別の場所に配置するのだが、この場合ラットは場所が変わった物体をより長く探索する行動傾向を示す。さらに異なる4つの物体を用い、テスト期ではそのうち2つの位置を入れ替えそれらを新奇刺激とすることで、物体自体とその位置関係の総合的な記憶を評価する物体場所課題というものも用いられている (Dix & Aggleton, 1999)。Dix & Aggleton (1999)はさらにテスト期のはじめの1-2分で、ラットがよく新奇性選好を示すことを報告した。Besheer & Bevins (2000)は物体再認テストを行うには事前の装置馴化が重要であることを示した。あらかじめ物体を提示するフィールドにラットを馴化させた場合、見本期に2分間の物体提示を行うことで、80分後のテスト期に新奇物体弁別が示された。なお標準的には、ラットは5分以内の見本期を行うことで24時間後のテスト期で新奇物体弁別が行えるものと想定され、先行研究の遅延期間も24時間以内に設定されたものがほとんどである。Gaskin et al.(2010)は見本期で提示した物体をラットが実際に探索した累積時間によって、24時間後の再認テストの成績が変化するかを検討した。その結果、テスト期で新奇物体弁別を行うには、最低90秒の累積物体探索時間が必要であるが、それ以上延長しても成績が向上するものではないことを示した。また、

120 秒を超えるとラットの物体への興味が減少してしまうことから、より長期の物体探索を設定すること自体が実際的でないだろうと述べている。

3. 自発的物体再認記憶における海馬損傷の影響

モリス水迷路課題や放射状迷路課題については、海馬に関する研究が多く存在するが、それは海馬が記憶の中でも特に空間記憶に重要な役割を果たしていると考えられているからである。自発的場所再認テストは、場所が変化した物体を弁別するテストであるため、海馬の働きが重要であると考えられている。Mumby et al. (2002) は、NMDA 投与による海馬損傷を受けたラットは、遅延 5 分の場所再認テストの成績が低下した一方で、物体再認テストの成績は低下しないことを示した。これにより場所再認テストに比べ、物体再認テストには海馬は重要ではないと考えられた。

遅延非見本合わせ課題の研究では海馬の重要性を示す結果が得られなかったため、物体再認テストにおいても海馬は重要ではないと想定された。物体再認記憶に重要である部位は嗅周囲皮質およびその周囲であると考えられている。嗅周囲皮質は視覚をはじめとする様々な感覚を結びつけ、物体情報を処理する際に重要な役割を果たしていると考えられ、その機能は哺乳類で共通していると考えられている (Murray & Richmond, 2001)。Winters et al. (2004) は嗅周囲・嗅後部皮質 (PPRh) 損傷あるいは海馬損傷を施したラットを用いて、物体再認テストと放射状迷路課題を行った。その結果、PPRh を損傷したラットは、物体再認テストの成績が統制群、海馬損傷群と比較して低下したのに対し、放射状迷路課題の成績は統制群と変わらなかった。一方、海馬を損傷したラットは放射状迷路課題の成績が統制群、PPRh 損傷群と比較して低下したが、物体再認テストの成績は正常であった。この結果は、海馬が空間記憶の処理に重要であることを確認し、一方物体再認記憶には海馬ではなく PPRh が重要で

あることを示唆した。

一方で物体再認に海馬が重要な役割を担うとする主張も存在する。Clark et al. (2000) は、熱損傷や神経毒損傷によって海馬損傷されたラットが、10秒や1分等の短い遅延では成績の低下を示さないが、遅延が1時間や24時間になると成績低下を示すことを報告した。また、海馬損傷が物体再認を阻害する条件として、損傷の程度も指摘されている。Broadbent et al. (2004) は、海馬の損傷が背側から腹側にまでおよび、損傷が海馬全体の75-100%に達すると物体再認記憶が阻害されるが、背側海馬のみの50-70%の損傷では阻害されないとした。

また、物体再認テストに海馬が関与するのは、実験装置の空間手がかりや文脈手がかりが明白であるときのみではないかということが提起されており、前述のWinters et al. (2004) の研究では自発的物体再認テストの装置として、空間手がかりが制限された周囲の見えないY字迷路を用いた場合、海馬損傷による影響はみられないことを示した。同様の装置を用いたForwood et al. (2005) は、イボテン酸による海馬損傷を行ったラットは、遅延が48時間でも物体再認記憶が阻害されないことを示した。これは上述の24時間の遅延で課題遂行が障害されるとするClark et al. (2000) の結果と一致していない。

海馬損傷のタイミングによって、自発的物体再認テストへの影響が異なるという報告もある。Gaskin et al. (2003) は、見本期からテスト期までの遅延期間を3週間および7週間に設定し、テスト期2週間前に行った海馬損傷の影響を検討した。その結果、海馬損傷群が統制群に比べ物体再認の成績低下を示し、物体再認記憶における海馬の関与を示す結果となった。続けて彼らは、見本期前に海馬損傷したラットに遅延期間が比較的短い物体再認テストを行った。その結果、15分、24時間の遅延では海馬損傷による影響は見られなかった。さらに、見本期前に海馬を損傷した場合、遅延期間が長期の場合でも海馬損傷の

影響がないという結果が示された。さらに、Mumby et al. (2005) は見本期前に海馬損傷を行い、24 時間、1 週間、3 週間の遅延期間の後に物体再認テストを行った。その結果、どの遅延期間においても損傷群は統制群と同様の物体弁別率を示し、海馬損傷の効果はみられなかった。Haijima & Ichitani (2012) もまた、見本期後の海馬損傷が物体弁別率を低下させる一方、見本期前に海馬を損傷した場合は、新奇物体選好性を示すことを示した。また、Broadbent et al. (2010) は、見本期の 1 日後に海馬損傷を行った場合でも、2 週間後、4 週間後のテスト期の新奇物体弁別率がチャンスレベル (50% : 新奇物体と見本物体を同時間探索したことを示す) まで低下することを示した。これらの研究から、自発的物体再認における海馬の重要性は、損傷するタイミングによることが示唆された。すなわち、見本期以前に海馬が損傷されていた場合、自発的物体再認に海馬は関与しないが、見本期後に海馬が損傷された場合には自発的物体再認に海馬が必要となる。しかしながら、見本期後に損傷を行う手続きでは、損傷後に被験体の回復期間を必要とするため、15 分や 24 時間などの比較的短期的な遅延後のテストを行うことができず、この点で見本期前損傷との比較が行えなかった。

4. 自発的物体再認記憶における海馬一時的不活性化の影響

損傷実験による研究は、損傷後に数日～2 週間程度の回復期間を設ける必要があり、損傷部位の機能が恒久的に失われてしまう。また、Mumby et al. (2005) は、事前に海馬が損傷されていることにより、海馬周囲の構造が補償的な働きを行う可能性を指摘している。したがって、損傷研究は記憶過程 (記録, 固定, 保持, 検索) の各時点における脳部位の役割を検討するには適していない。ナトリウムイオンチャンネルを阻害するリドカインや γ -アミノ酪酸 (GABA) アゴニストであるムシモール, グルタミン酸受容体遮断薬を脳内に投与するこ

とで、脳部位の働きを一時的に阻害することができる。これらの薬物を記銘直前や直後、あるいは検索直前に投与することによって、各記憶過程に局限した脳部位の役割の検討が可能であるため、自発的物体再認テストにおいても薬物投与による一時的な不活性化を用いた実験の割合が増加している (Fig. 1; Cohen et al., 2014).

Hammond et al. (2004) はマウスの背側海馬 CA1 領域にリドカインを投与することで海馬の一時的な不活性化を行い、自発的物体再認テストへの効果を検討した。見本期直前にリドカインを投与したところ、見本期の行動は変化しないが、24 時間後のテストの成績が溶媒群より低下することを示した。また、5 分後のテストには影響しないことを報告したが、これは遅延がごく短い場合に、自発的物体再認における海馬の関与を否定した Clark et al. (2000) の結果と一致する。de Lima et al. (2006) は、見本期直後、3 時間後、および 6 時間後に背側海馬にムシモールを投与し、24 時間後のテスト期の成績を比較した。その結果、見本期直後と 3 時間後に薬物を投与した場合に再認記憶が阻害されたが、見本期の 6 時間後に投与した場合は統制群と同様の物体弁別を示した。このことから彼らは、見本期後の 3 時間までの固定過程に海馬が重要な役割を果たすと述べている。一方で Oliveria et al. (2010) は見本期直後にムシモールを投与しても、24 時間遅延後の物体再認記憶が阻害されないとし、テストの文脈によっては海馬不活性化がむしろ物体再認記憶の成績を向上させると主張した。Cohen et al. (2013) はリドカインをマウスの背側海馬に投与するタイミングを様々に設定し、物体再認記憶の各段階（記銘、固定、検索）のすべてに海馬が関わることを示した。これらの海馬を一時的に不活性化する手法を用いた研究から、海馬も自発的物体再認記憶の処理に関わっていると考えられる。

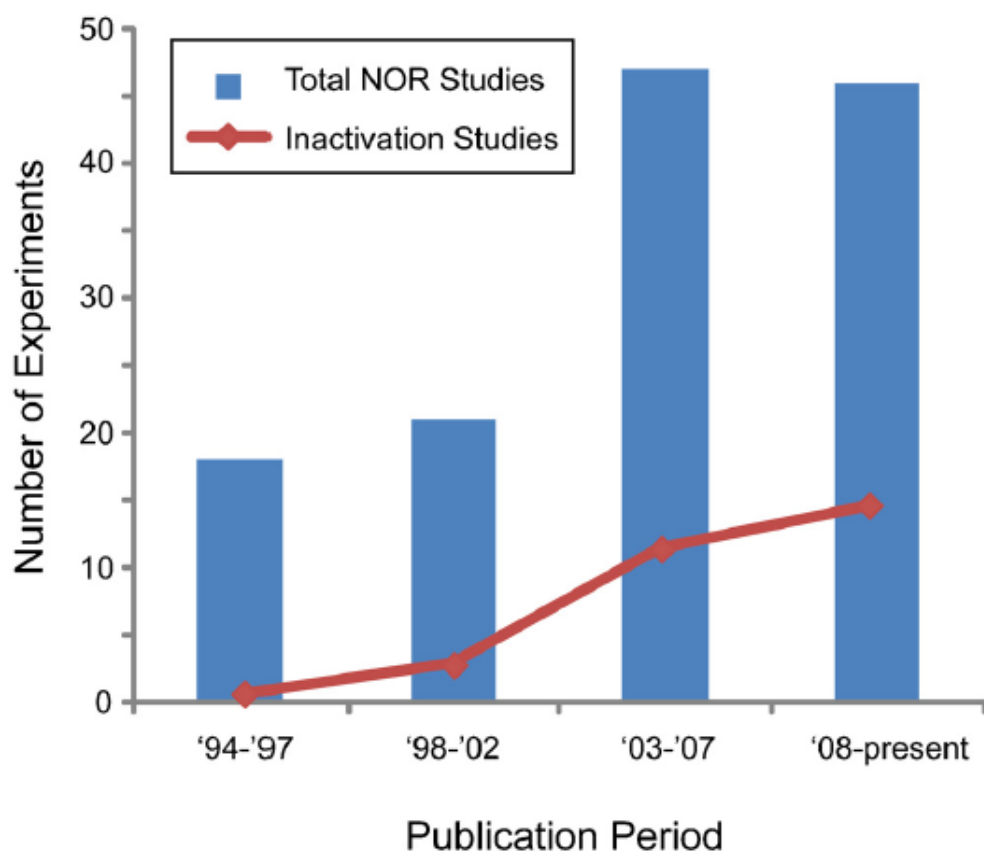


Fig. 1 自発的物体再認テストにおける一時的不活性化研究の割合 (Cohen et al., 2014).

5. 自発的物体再認記憶における NMDA 受容体の役割

損傷実験あるいは一時的な不活性化を行う研究から、自発的物体再認と海馬の関係を概観してきたが、モリス水迷路や放射状迷路を用いた研究で示されてきたように、NMDA 受容体は自発的物体再認記憶に重要な役割を果たしているのだろうか。

NMDA 受容体に着目した研究では、de Lima et al. (2005)が NMDA 受容体阻害薬の MK-801 を見本期前、あるいは見本期後に投与することで、ラットの物体再認が障害されることを示した。Nilsson et al. (2007)は MK-801 をマウスに投与して自発的物体再認テストを行った。MK-801 は見本期の 30 分前、見本期直後、テスト期 30 分前に投与され、見本期とテスト期の間の遅延期間は 1.5 時間または 26 時間と設定された。実験の結果、見本期前投与のみが成績を低下させ、見本期直後とテスト期前の投与では新奇物体選好性を高めた。この結果は、NMDA 受容体の活性化は記憶の獲得には必要だが、固定と検索には必要でないという可能性を示す。しかしながら、MK-801 の投与は、新奇物体の顕著性を高めたり、新しいものに近寄りやすい行動を引き出したりしたのかもしれないと解釈することもできる。MK-801 は NMDA 受容体の非競合的遮断薬として広く用いられるが、腹腔投与により全身への作用が懸念され、活動性を顕著に高める作用もあるため、自発的物体再認テストにおける効果の解釈には注意が必要である。

自発的物体再認記憶に重要な脳部位であるとされる嗅周囲皮質について、Winters & Bussey (2005b)は、NMDA 受容体の遮断薬である AP5、AMPA 受容体の遮断薬である 6-cyano-7-nitroquinoxaline (CNQX)を嗅周囲皮質に投与し、自発的物体再認テストを行った。その結果、CNQX は見本期前、見本期直後、テスト期前投与によって弁別率の低下を引き起こし、AP5 は特に見本期直後の投与によって弁別率の低下を引き起こすことを明らかにした。AP5 の見本

期前投与は遅延が 5 分という短期間ならば影響しないが、3 時間に及ぶと障害効果を引き起こし、また、テスト期前投与は障害を及ぼさないことが示された。この結果は、嗅周囲皮質の AMPA 受容体が物体再認テスト遂行において重要な役割を果たすが、NMDA 受容体は 3 時間以上の記憶の記録、固定のみに関与することを示唆する。

海馬の NMDA 受容体に着目して、物体再認記憶テストを行った研究は少ない。Baker & Kim (2002) は、見本試行の約 3 分前に AP5 をラットの海馬に投与し、物体再認テストにおいて遅延が 3 時間ならば阻害されるが、遅延が 5 分だと阻害されないことを示した。これは 10 秒や 1 分の短い遅延ならば海馬損傷の影響がなく、遅延が 10 分より長くなれば海馬損傷による成績低下が生じることを示した Clark et al. (2000) の結果を支持し、リドカインによる背側海馬の一時的不活性化を行った Hammond et al. (2004) の結果と一致する。このように、AP5 を用いて海馬の NMDA 受容体が物体再認記憶に関与する証拠が示されているが、リドカインを用いて記憶の各段階への効果を検討した Cohen et al. (2013) とは異なり、記憶の記録、あるいは記録・固定過程にのみに限局した結果である。また、Gaskin et al. (2003) や Mumby et al. (2005) などの研究から、見本期に複数回物体を提示することで長期遅延後の自発的物体再認記憶を検討することが可能であることが示されたが、一時的な不活性化を用いた実験では行われていない。

第 2 章 本研究の目的と一般的方法

第 1 節 本研究の目的

自発的物体再認記憶については、嗅周囲皮質が重要な役割を果たしているという説が一般的である (Winters et al., 2004 ; Winters & Bussey, 2005a, 2005b). 海馬が自発的物体再認記憶に重要な役割を果たしているか否かは未だ結論が出ていないとされるが、近年、条件によっては海馬が自発的物体再認記憶に関与するという証拠が示されている. 先行研究によると、自発的物体再認記憶テストの見本期とテスト期の間の遅延期間が比較的短い場合には、見本期前の海馬損傷や、海馬 NMDA 受容体の一時的な遮断は物体再認記憶を阻害しない (Clark et al., 2000; Baker & Kim, 2002; Winters et al., 2004; Oliveria et al., 2010). 一方、遅延期を比較的長期に設定した場合、見本期後の海馬損傷が物体再認記憶を阻害するという結果が報告されている (Gaskin et al., 2003 ; Broadbent et al., 2010). また、Cohen et al. (2013)は、海馬内リドカイン投与は、物体再認テストのどの段階でも障害を引き起こすことを示し、海馬が物体再認記憶に重要な脳部位であると主張している. しかしながら、記憶の生理学的基盤であるとされる LTP に関与するグルタミン酸 NMDA 受容体の重要性に関しては、自発的物体再認テストでの役割がほとんど検証されていない. Baker & Kim (2002)は、自発的物体再認記憶の記銘に海馬 NMDA 受容体に関与する可能性を報告したのみで、検索過程への影響は検討していない.

そこで本研究では、脳内の主要な神経伝達物質であるグルタミン酸の受容体の一種であり、記憶の生理学的基盤であるとされる LTP と密接な関係のある NMDA 受容体と AMPA 受容体に着目する. 薬物を用いて背側海馬内の NMDA 受容体あるいは AMPA 受容体を一時的に遮断することで、自発的物体再認記

憶に海馬 NMDA 受容体あるいは AMPA 受容体が関与しているかどうかを検討する。この際、テスト期の直前に薬物を投与することで、記憶の検索過程における各受容体の役割を検討する。また、Gaskin et al. (2003)や Mumby et al. (2005)が行った長期記憶の検討ができるよう、遅延期間を 30 分の短期から 6 週間の長期に設定し、記憶の保持期間の長さによってグルタミン酸受容体遮断の効果が変化するかを検討する。

第 2 節 本研究における一般的方法

1. 被験体

8~9 週齢の Wistar-Imamichi 系雄ラット 123 匹を用いた。実験期間中、被験体は、12 : 12 時間の明暗スケジュール（明期は 8 : 00~20 : 00）下で、個別ケージにて飼育し、飼育室は室温が $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ になるように保たれた。食餌、水の制限は行わなかった。なお、本研究のすべての動物実験は、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

2. 装置

黒色塩化ビニール製のオープンフィールドを実験時のアリーナとして用いた (Fig. 2)。アリーナは一辺 90 cm の正方形であり、壁の高さは 45 cm であった。床は灰色であった。アリーナ中央の照度は 70 lx であった。

物体は鋳物の三角柱や円柱、ジュースの缶、瓶など様々な素材でできた物体 10 種類（高さ : 7~15 cm）を用いた (Fig. 3)。これらはラットが接触することで転倒、移動することがないように十分な重さを有するものを選び、軽いものは鉄製のおもりに接着した。なお、用いた物体は先行研究により、ラットにとって選好に著しい差がないことを確認したものとした。



Fig. 2 本研究の自発的物体再認テストのためのアリーナとして用いたオープンフィールド。見本期における2つの物体の配置の1例を示している。



Fig. 3 本研究の自発的物体再認テストにおいて用いた物体。

ビデオカメラをアリーナ上部の天井に取り付け、アリーナ上の物体の位置とラットの動きの映像をモニターに映し出した。また、アリーナが設置された部屋の物品等の配置は実験期間中大きな変化がないようにした。

3. 薬物投与

グルタミン酸 NMDA 受容体の遮断薬として、AP5 (Sigma) を 20 mM の濃度で 0.02 M リン酸緩衝溶液 (PB) に溶かしたものをを用いた。また、グルタミン酸 AMPA 受容体の遮断薬として、2, 3 - dioxo - 6 - nitro - 1, 2, 3, 4 - tetrahydrobenzo [f] quinoxaline - 7 - sulfonamide (NBQX; Sigma) を 5.0 mM の濃度で PB に溶かしたものをを用いた。各実験では溶媒条件として、0.02 M PB をを用いた。

薬物投与のタイミングは、すべて自発的物体再認テストのテスト期の 15 分前とした。ガイドカニューレ内にインジェクションカニューレを刺入、インジェクションポンプ (ESP-32: エイコム, 京都) を用いて、両側海馬に 0.5 μ l /分で 2 分間、計 1 μ l ずつ投与した。拡散を促すため、投与後 1 分間インジェクションカニューレを刺入したままにし、その後抜き去った。薬物および溶媒は、日を変えてすべての被験体に投与した。投与順は各遅延群内でカウンターバランスをとった。Steele & Morris (1999) が本研究と同量の [³H] D-AP5 を投与し、放射線写真法を用いることで、投与 30 分後にも薬物が広く背側海馬に広がっていることを示しており、本研究の手順はこれに基づく。また、AP5 と NBQX の濃度は Yoshihara & Ichitani (2004) を参考にした。

4. ガイドカニューレ埋込み手術

遅延 3 週間群、6 週間群のラットはテスト期の約 1 週間前に、遅延が 1 週間より短い群のラットは見本期の 1 週間前にガイドカニューレ埋込み手術を行

った．あらかじめ硫酸アトロピン (0.05 mg/kg, i.p.) を注射した後，ペントバルビタール・ナトリウム (40 mg/kg, i.p.)，動物用ケタラール (5 mg/kg, i.m.) 麻酔下で被験体を脳定位固定装置に固定し，薬物のマイクロインジェクションを行うためのガイドカニューレを背側海馬に埋め込んだ．頭蓋が水平になるようにし，インジェクションカニューレの先端が，ブレグマを基準として AP : -3.8 mm, ML : ±2.7 mm, DV : -3.2 mm (頭蓋表面より) の位置になるようにガイドカニューレを刺入し，補強用のネジを頭蓋表面に取り付けた後，全体にデンタルセメントで固定した．薬物投与時のインジェクションカニューレは，ガイドカニューレよりさらに下方へ 1.0 mm 突き出すようにした．

5. 行動学的手続き

5-1 : ハンドリングと装置馴化

予備訓練として，最初の 3 日間，被験体にハンドリングと装置への馴化を行った．それぞれの日に個別にハンドリングを 5 分間行い，その後続いて，何も物体を置かないアリーナに入れ 10 分間自由に探索させた．

5-2 : 長期遅延 (1~6 週間) を伴う自発的物体再認テスト (Fig. 4A)

5-2-1 : 見本期

装置馴化が終了した翌日以降に見本期 1 を行った．見本期では 2 つの同一の物体 (見本物体) をアリーナに置き，被験体に自由に探索させた．2 つの物体は常に対角線上にあるようにし，いずれも 2 つの隣り合う壁から 22.5 cm の位置にその中心があるように設置した (Fig.1 参照)．被験体の物体に対する探索行動は，物体から約 2 cm 以内に接近し，被験体の鼻が物体に向いている，あるいは触れている状態と定義した．探索時間は 5 分間とし，探索時間が終了したらケージに戻し，待機させた．30 分~40 分のインターバルをはさんだの

ちに、同じ手続きで再び物体探索を行わせた。以上を繰り返し、5分間の見本期を複数回行って見本期を終了した。一回の探索が終わるごとにアリーナを、消毒液を浸した布でよくふき、匂い刺激が手がかりになることを防いだ。

翌日に同様の手続きで、異なる物体を用いた見本期 2 を行った。したがって全個体に対し、異なる物体で見本期 1 と見本期 2 を実施した。

5-2-2：遅延期

見本期からテスト期までの期間を遅延期とした。遅延期には被験体を通常通り飼育ケージで飼育し、アリーナに入れたり、物体刺激と出会わせたりすることは全くなかった。

3つの遅延期間のうち、遅延3週間群および遅延6週間群では、テスト期に入る1週間前にガイドカニューレ埋込手術を行った。遅延が1週間より短い群のラットは、見本期よりもさらに前にあらかじめ手術を行ったので、遅延期には行わず、通常通りに飼育した。

5-2-3：テスト期

テスト期では、見本期に示した2つの物体のうち、一方はそのままとし、一方を新奇な物体と取り換えてアリーナに設置し、被験体をアリーナに入れてから自由に探索させた。探索時間は5分間であった。ただし、すべてのテスト期において探索行動の分析は最初の2分間についてのみ行った。物体への探索行動の定義は見本期と同じであった。探索時間をもとにして弁別率[{新奇物体への探索時間(秒) / 両物体への探索時間の合計(秒)} × 100] (%) を算出した。

テスト期は見本期の2種類の物体に対応して2日間行い、いずれの日もテスト期の開始15分前に薬物 (AP5 / NBQX) または PB を両側海馬に投与した。

投与する順序はランダムとし、カウンターバランスをとった。

5-3：短期遅延（30分~24時間）を伴う自発的物体再認テスト（Fig. 4B）

長期自発的物体再認テストを経験したラット、あるいはナイーブなラットを使用した。ナイーブなラットを使用する際は、予備訓練として装置馴化を行った。物体を置かない状態のアリーナに放置する馴化手続きを1日10分間、3日間繰り返した。その翌日、見本期1を行った。被験体がまだ一度も経験していない（長期遅延実験では用いていない）物体を用いて、5分間の見本期を複数回（1~5回）繰り返した。設定した遅延期間後にテスト期1を行った。テスト期は長期遅延実験と同様の手続きで行った。その後3~4日の間隔を置き、見本期2を行い、さらにその翌日にテスト期2を行った。これらにおいては、テスト期1までに使用したことのない新しい物体を用いた。テスト期1およびテスト期2の開始15分前に、薬物（AP5/NBQX）またはPBを両側海馬に投与した。投与する順序はランダムとした。

6. 統計的分析

テスト期の物体探索時間を、薬物（Drug or PB）と物体（Novel or Familiar）を被験体内要因として、2要因分散分析を行った。分散分析で有意な交互作用が認められた場合、単純主効果の検定を行った。

弁別率については、遅延期間の長さを被験体間要因、薬物を被験体内要因として2要因分散分析を行った。有意差が認められた場合、Bonferroniの方法を用いて多重比較を行った。また、それぞれの弁別率について t 検定を用いてチャンスレベル（50%）との比較を行った。

7. 組織学的検索

行動実験終了後、被験体をペントバルビタール・ナトリウムで深麻酔し (50 mg/kg, i.p.), 0.9%塩化ナトリウム含有 0.02 M PB, 続いて 10%ホルマリン液で脳を灌流固定し取り出した. 取り出した脳は 10%ホルマリン液で一晩浸漬固定し, 続いて 20%ショ糖含有の 0.02 M PB に浸漬した. 数日後, クリオスタット (CM3000 : Leica, Wetzlar) で厚さ 40 μ m 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, その後インジェクションカニューレの刺入部位を確認した. インジェクションカニューレの先端が海馬に刺入していない個体, および行動実験の途中でカニューレの破損がみられた個体は結果から除外した.

第 3 章

自発的物体再認記憶の検索における NMDA 受容体の役割

第 1 節 自発的物体再認に及ぼす長期遅延の効果【実験 1】

目的

自発的物体再認記憶に海馬が重要であることが先行研究で示されてきた。リドカインの背側海馬投与により、自発的物体再認テストのどのタイミングにも海馬が重要であるという研究報告がなされ (Cohen et al., 2013), 記銘の段階において海馬 NMDA 受容体が重要であることが示された (Baker & Kim, 2002). しかしながら、自発的物体再認記憶の検索過程における海馬 NMDA 受容体の役割を検討した研究は前例がない。また、長期遅延を伴う自発的物体再認テストにおいては、Gaskin et al. (2003)や Mumby et al. (2005)および Broadbent et al. (2010)の損傷実験が報告されているのみであり、特定の記憶過程に着目して検討した研究はいまだない。

本実験では、長期遅延を伴う自発的物体再認記憶の検索における背側海馬 NMDA 受容体の役割を明らかにするため、1 週間から 6 週間の長期遅延を設定した自発的物体再認テストのテスト期直前に NMDA 受容体遮断薬である AP5 を海馬内投与し、その効果を検討した。また比較的短期の遅延を伴う再認テストにおける海馬 NMDA 受容体遮断の効果を検討するため、24 時間遅延のテストを続けて行った。

方法

Wistar-Imamichi 系の雄ラット 39 匹を用いた。被験体は 1 週間群 ($n = 15$), 3 週間群 ($n = 13$), 6 週間群 ($n = 11$) の 3 群にわけた。Fig. 5A に示した長期遅

延を伴う自発的再認テストのスケジュールを設定した。見本期の物体提示回数は5回とし、各試行間の間隔は30~40分とした。薬物はNMDA受容体遮断薬のAP5を用い、テスト期の15分前に背側海馬内微量投与した。

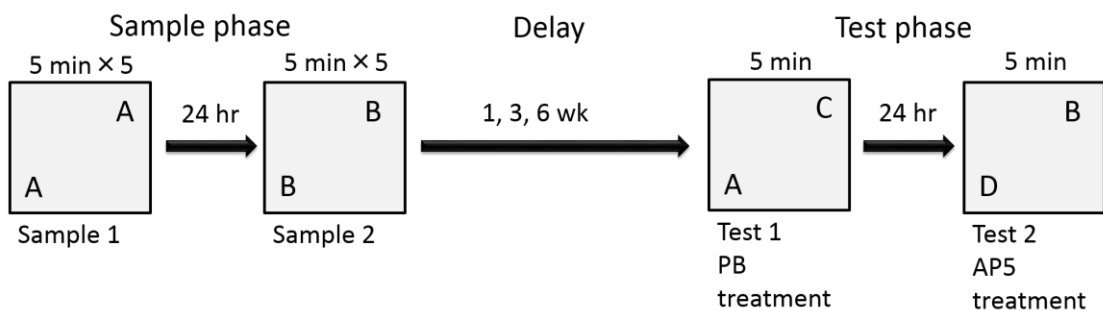
長期遅延を伴う自発的物体再認テストのテスト期を2回行ったのち、一部の被験体を用いて ($n = 15$)、24時間遅延を伴う自発的物体再認テストを行った (Fig. 5B)。テストに使用する物体はすべて長期遅延のテストとは異なるものとした。すべての行動実験を終えたのち、インジェクションカニューレの刺入部位を確認した。

結果

背側海馬への刺入が確認されたインジェクションカニューレの先端位置を Fig. 6 に示す。また、カニューレが背側海馬に刺入されていたことを示す典型的な Nissl 染色切片の写真を Fig. 7 に示す。

テスト期におけるラットの見本物体と新奇物体に対する探索時間を Fig. 8 に示す。遅延1週間群では、ラットは新奇物体への選好を示した。2要因の分散分析の結果、物体の主効果が有意であった [$F(1, 14) = 25.93, p < .01$]。薬物の主効果と交互作用は有意ではなかった。遅延3週間群では、PB投与条件下でラットが新奇物体への選好性を示したが、AP5を投与した条件では見本物体と新奇物体を同程度探索した。2要因の分散分析の結果、薬物の主効果 [$F(1, 12) = 9.05, p < .05$]、物体の主効果 [$F(1, 12) = 15.76, p < .01$]、および交互作用が有意であった [$F(1, 12) = 12.05, p < .01$]。単純主効果の検定を行ったところ、PB投与条件下における新奇物体の探索時間が見本物体の探索時間より有意に長く ($p < .01$)、また AP5投与条件下の新奇物体の探索時間より長かった ($p < .01$)。遅延6週間群では、どちらの条件下でも新奇物体を長く探索する行動は認められなかった。分散分析の結果、薬物、物体の主効果、および交互作用は有意で

(A) SOR with 1, 3, or 6 wk-delay interval



(B) SOR with 24 hr-delay interval

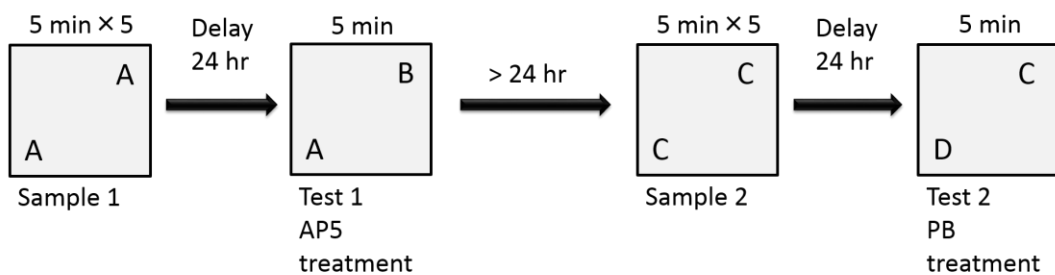


Fig. 5 (A): 実験 1 における長期遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. 1 週間群は見本期の 1 週間前, 3, 6 週間群はテスト期の 1 週間前にカニューレ埋め込み手術を行った. テスト期における A, B の順はランダムとし, さらに AP5, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした. (B): 実験 2 における 24 時間遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. AP5, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした.

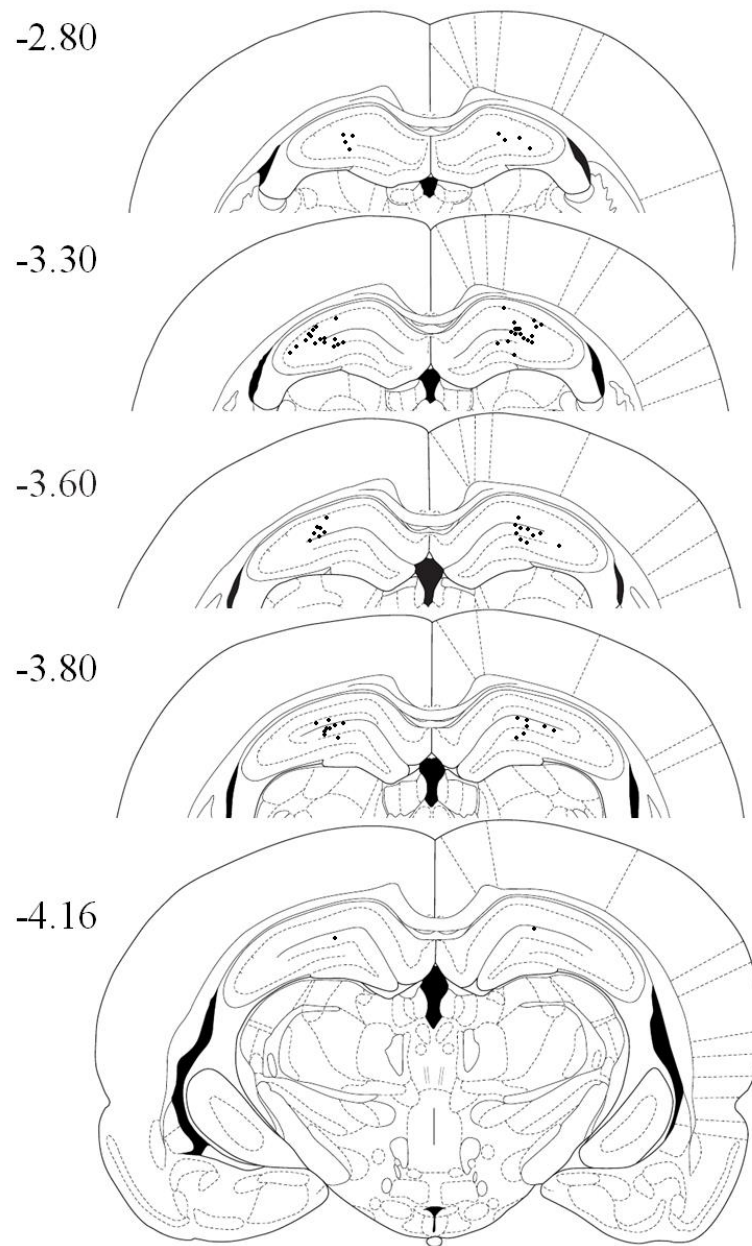


Fig. 6 実験 1 における各被験体のインジェクションカニューレの刺入位置.
 図中の●はインジェクションカニューレの先端の位置を, 各切片の左の数字は
 ブレグマからの距離 (mm) を示す. 脳図譜は Paxinos & Watson (1998) より引用.

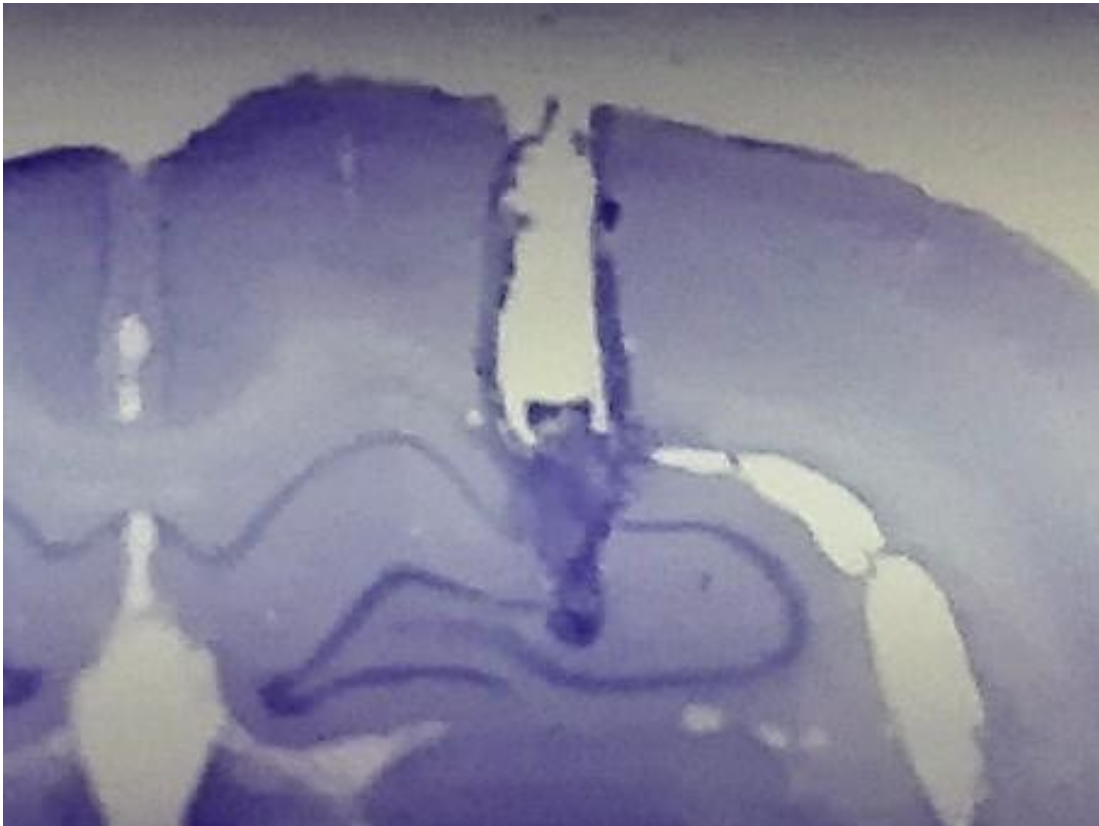


Fig. 7 背側海馬に刺入されたガイドカニューレの位置を示す典型的なニッスル染色切片の写真.

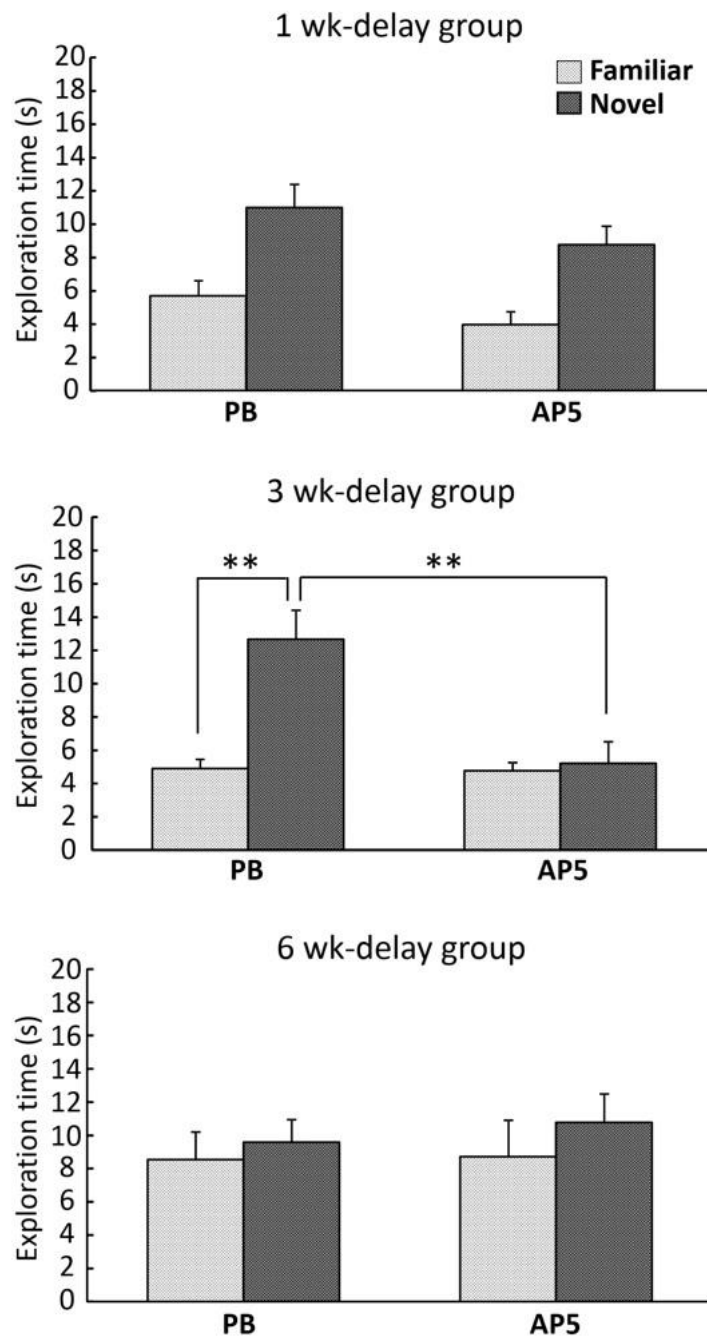


Fig. 8 遅延1週間群, 3週間群, 6週間群における見本物体および新奇物体に対する探索時間 (平均±SEM) 【実験1】. **: $p < .01$.

はなかった。

テスト期の各物体への探索時間から算出した弁別率を Fig. 9 に示す。2 要因の分散分析の結果、遅延期間の主効果が有意であり [$F(2, 36) = 4.53, p < .05$], 遅延期間と薬物の交互作用も有意であった [$F(2, 36) = 7.08, p < .01$]。単純主効果の検定を行ったところ、遅延 3 週間群において AP5 投与条件下の弁別率が PB 投与条件下の弁別率より有意に低かった ($p < .01$)。さらにチャンスレベルである 50% と比較したところ、遅延 1 週間群の PB, AP5 投与条件、および遅延 3 週間群の PB 投与条件下で有意にチャンスレベルより高かった (t -test, $p < .01$)。その他の投与条件での弁別率はチャンスレベルとの差が認められなかった。

長期遅延テストを経験したラットの一部を用いて行った 24 時間遅延の自発的物体再認テストにおける物体探索時間、新奇物体弁別率を Fig. 10 に示す。物体探索時間について 2 要因分散分析を行った結果、物体の主効果のみが有意であった [$F(1, 14) = 30.02, p < .01$]。AP5 および PB 投与条件下の弁別率をチャンスレベルと比較したところ、両条件ともに有意にチャンスレベルより高かった ($p < .01$)。

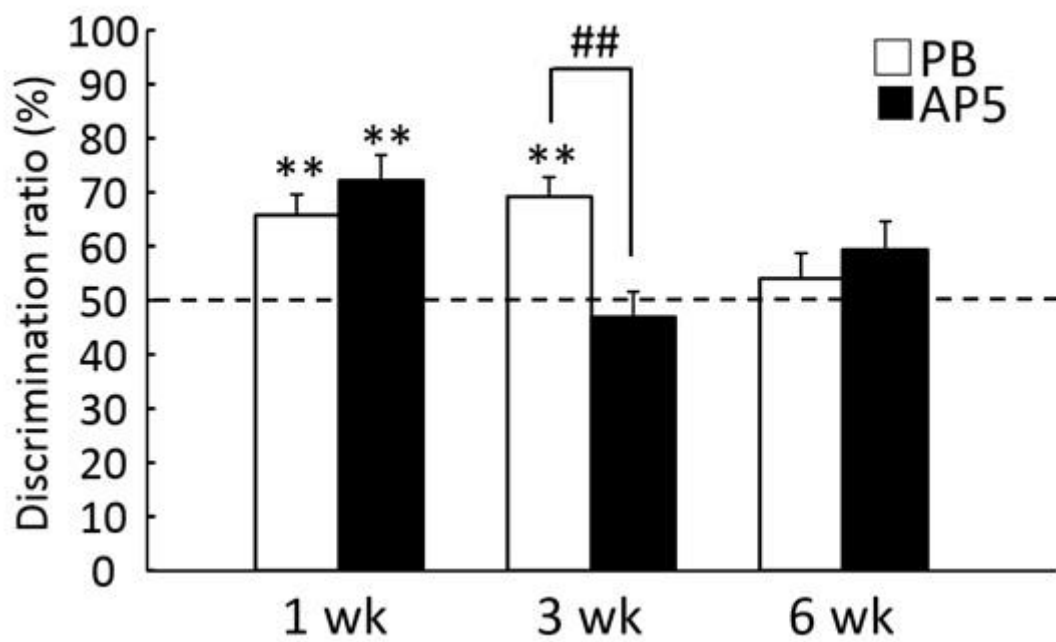


Fig. 9 遅延1週間群, 3週間群, 6週間群における薬物投与条件別の弁別率(平均±SEM)【実験1】. **: $p < .01$ vs. chance (50%). #: $p < .01$.

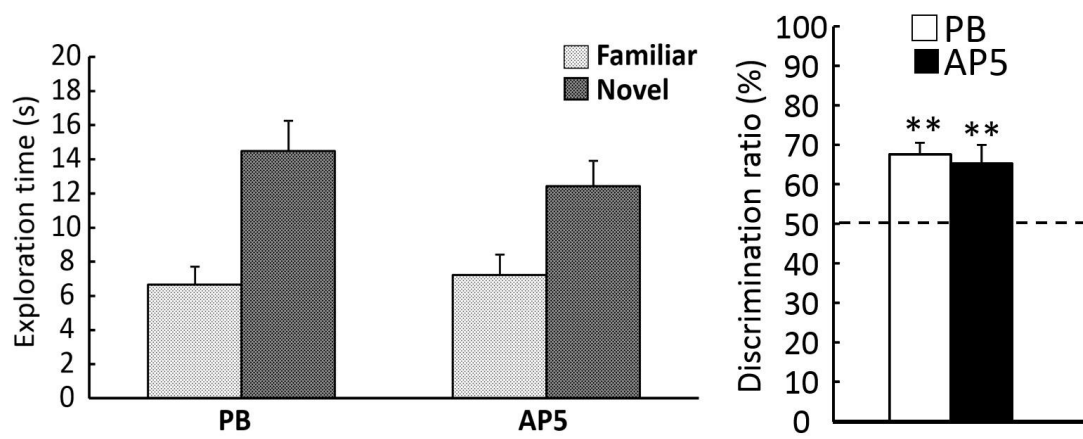


Fig. 10 24時間遅延テストにおける探索時間と弁別率(平均±SEM)【実験1】.

** : $p < .01$ vs. chance (50%).

考察

本実験では自発的物体再認記憶の検索における海馬 NMDA 受容体の役割を検討するため、NMDA 受容体遮断薬である AP5 を自発的物体再認テストのテスト期直前に背側海馬に投与し、その効果を調べた。見本期に物体を 5 回繰り返し提示することにより、3 週間後のテスト期においてもラットが物体記憶を保持していることが、PB 投与条件の新奇物体弁別率から示された。しかし、遅延 6 週間群の物体弁別率がチャンスレベルと同程度まで低下したことから、本実験の手続きでは 3 週間から 6 週間の間に、新奇物体選好性を示さない程度まで自発的物体再認記憶が減弱する可能性が示唆された。

PB 条件下でラットが新奇物体選好性を示した遅延 1 週間群、3 週間群および 24 時間遅延テストにおいて、海馬 AP5 投与は異なる影響を及ぼした。24 時間遅延テスト、遅延 1 週間群では AP5 投与は物体弁別率を下げることなく、ラットは PB 投与条件と同様に新奇物体選好性を示した。これは、自発的物体再認テストの遂行に AP5 は影響を与えず、海馬 NMDA 受容体が自発的物体再認記憶の検索に重要ではないことを示唆する。しかしながら、遅延 3 週間群では AP5 投与により物体弁別率が低下した。遅延 1 週間群の結果から AP5 の背側海馬投与が自発的物体再認テストの遂行それ自体に影響を与えないことが示されているため、遅延 3 週間群の結果は、自発的物体再認記憶の検索に海馬 NMDA 受容体が重要な役割を果たす可能性を示す。Cohen et al. (2013) は 24 時間の遅延を設定した自発的物体再認記憶の検索に海馬が重要であることを、リドカインをテスト期前に海馬内投与することで示した。この結果と本研究の結果を比較すると、海馬全体の働きが重要であっても海馬 NMDA 受容体の働きは重要ではないというタイミングが存在する可能性が考えられる。そして、海馬 NMDA 受容体は自発的物体再認記憶の検索において、遅延期間が長期に及んだ場合に重要な役割を果たすようになる、という可能性が示された。

見本期からテスト期までの遅延の長さが、海馬 NMDA 受容体と自発的物体再認記憶の関連にどのような影響を及ぼすと考えられるだろうか。ひとつの可能性として、3 週間という時間経過の中で、海馬が記憶検索に重要な役割を果たすような構造の変化が起こっているという仮説が考えられる。そう仮定するならば、6 週間以上長い遅延後でも PB 条件が正常な新奇物体選好性を示すような実験を行った場合でも、3 週間の時点から海馬 NMDA 遮断による障害の効果を示すような結果が得られるだろう。別の可能性として、見本期からの時間経過によって記憶痕跡が減弱していき、記憶痕跡が強い条件下では海馬 NMDA 受容体は記憶検索に重要ではなく、記憶痕跡が減弱した条件下でのみ海馬 NMDA 受容体が記憶検索に重要な役割を果たすという仮説が考えられる。この仮説によれば、6 週間以上記憶が保持される実験を行った場合、記憶痕跡の強度は本実験より高くなっていると想定され、AP5 投与による障害効果は 3 週間より後に現れるだろう。あるいは反対に、3 週間より早く自発的物体再認記憶が減弱するような状況では、AP5 投与はより早いタイミングで障害を引き起こすと考えられる。

第2節 自発的物体再認に及ぼす見本物体提示回数の効果【実験2】

目的

実験1より海馬 NMDA 受容体は、遅延期間が3週間より長くなった場合に、自発的物体再認記憶の検索に重要な役割を果たすことが示された。この結果から、3週間の時間をかけて、記憶に関わる回路に海馬 NMDA 受容体が強く関与するような構造の変化が起こる可能性と、3週間の時間経過により、減弱した記憶痕跡を検索する際に海馬 NMDA 受容体の働きが重要となる可能性の2つの仮説を提示した。見本期の物体を5回繰り返し提示することで、3週間まで記憶が保持されているが、6週間の時点では保持されていない可能性が、実験1で示唆された。自発的物体再認記憶が保持されている期間は、見本期における物体提示回数の影響を受けると想定される。Gaskin et al. (2003)は1日1回の物体提示を5日間繰り返すことで、見本期から7週間後のテスト期でも新奇物体選好性が認められることを示した。Mumby et al. (2005)や Broadbent et al. (2010)も、同様の手続きで数週間の長期自発的物体再認記憶を検討している。これらの先行研究では、海馬を見本期の前に損傷すると、数週間後のテスト期においても障害が認められないが、見本期の後に損傷すると、2~7週間後の物体再認が障害されることを示した。しかしながら、物体の提示回数と自発的物体再認記憶の保持期間の関連について検討した研究はない。

また、実験1の結果から、時間経過により記憶痕跡が減弱することで、検索に海馬 NMDA 受容体が重要となるという仮説を提示した。この仮説によると、3週間より早い段階で自発的物体再認記憶が観察されなくなる条件下では、海馬 NMDA 受容体遮断の効果は実験1よりも早いタイミングで現れると想定される。本実験では、見本物体の提示回数を減らすことで、3週間より短い時点で自発的物体再認記憶が観察できなくなる状況を設定し、テスト期における海

馬 NMDA 受容体遮断の効果を検討した.

方法

Wistar-Imamichi 系雄ラット 14 匹を用いた. 実験 1 で見本物体を 5 回提示する本研究の手法では, ラットは 6 週間の遅延後のテスト期では新奇物体選好性を示さないことが明らかとなったため, 本実験では被験体を遅延 1 週間群 ($n = 6$), 遅延 3 週間群 ($n = 8$) にわけた. 実験 1 と同様に, Fig. 11A に示した長期遅延を伴う自発的再認テストのスケジュールを設定した. 見本期の物体提示回数は 2 回とした. 薬物は NMDA 受容体遮断薬の AP5 を用い, テスト期の 15 分前に背側海馬内微量注入した.

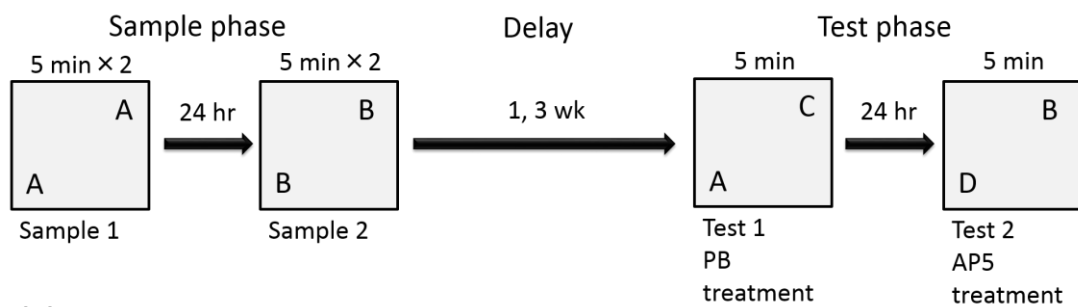
長期遅延を伴う自発的物体再認テストのテスト期を 2 回行ったのち, 遅延 3 週間群の被験体を用いて, 24 時間遅延を伴う自発的物体再認テストを行った (Fig. 11B). テストに使用する物体はすべて長期遅延のテストとは異なるものとし, 物体の提示回数は 2 回とした. すべての行動実験を終えたのち, インジェクションカニューレの刺入部位を確認した.

結果

背側海馬への刺入が確認されたインジェクションカニューレの先端位置を Fig. 12 に示す.

テスト期におけるラットの見本物体と新奇物体に対する探索時間を Fig. 13 に示す. 遅延 1 週間群では, ラットは PB 投与条件下で新奇物体選好性を示したが, AP5 投与下では示さなかった. 2 要因の分散分析の結果, 物体の主効果 [$F(1, 5) = 14.81, p < .05$] と, 薬物と物体の主効果の交互作用が有意であった [$F(1, 5) = 20.39, p < .01$]. 単純主効果の検定を行った結果, PB 投与条件下で見本物体への探索時間が新奇物体への探索時間より有意に長く ($p < .01$), AP5 投

(A) SOR with 1 or 3 wk-delay interval



(B) SOR with 24 hr-delay interval

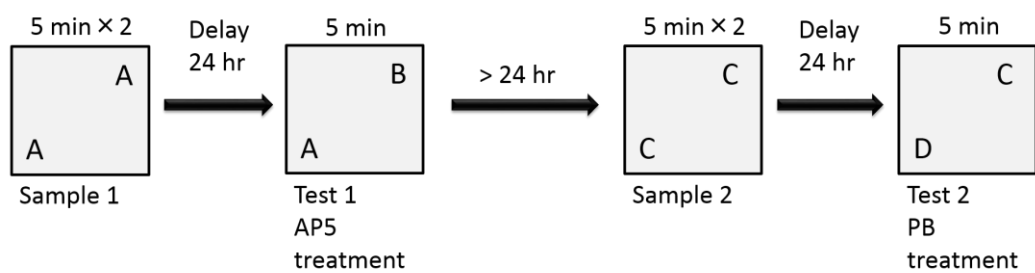


Fig. 11 (A): 実験 2 における長期遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. 1 週間群は見本期の 1 週間前, 3 週間群はテスト期の 1 週間前にカニューレ埋め込み手術を行った. テスト期における A, B の順はランダムとし, さらに AP5, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした. (B): 実験 2 における 24 時間遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. AP5, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした.

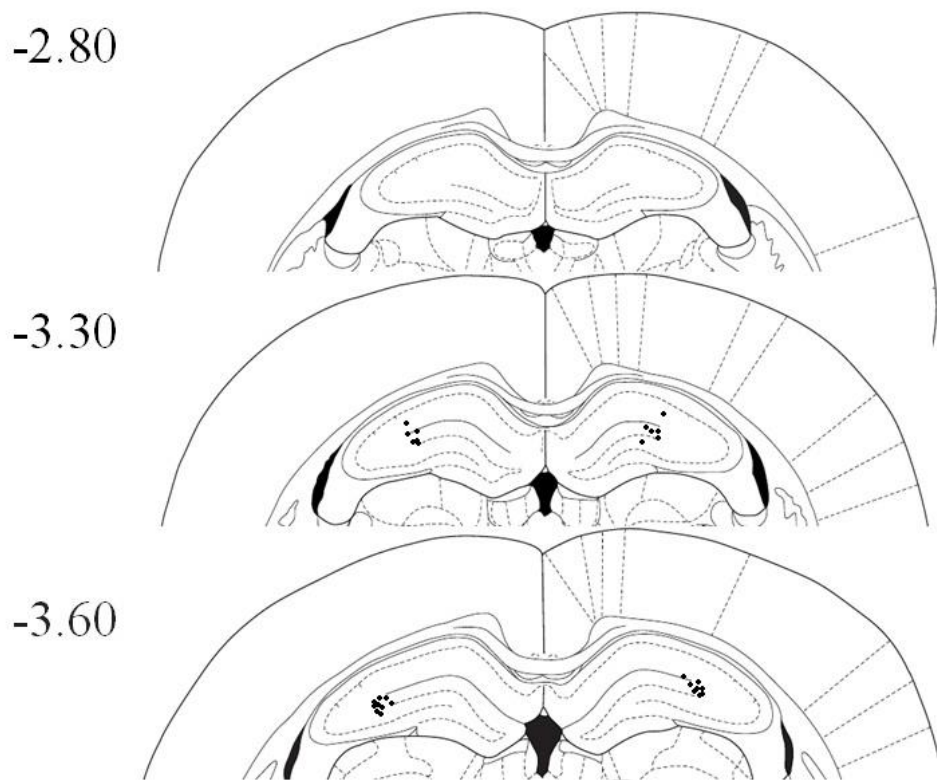


Fig. 12 実験 2 における各被験体のインジェクションカニューレの刺入位置.
 図中の●はインジェクションカニューレの先端の位置を, 各切片の左の数字は
 ブレグマからの距離 (mm) を示す. 脳図譜は Paxinos & Watson (1998) より引用.

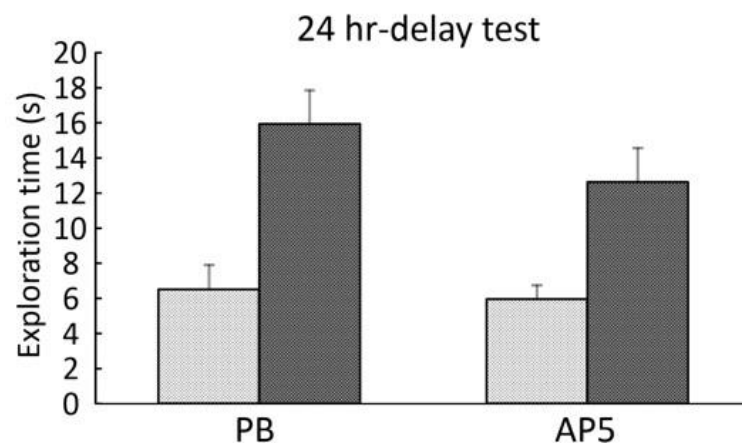
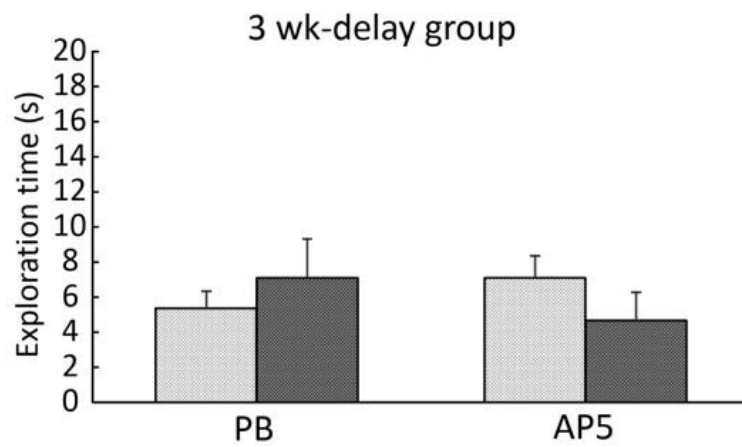
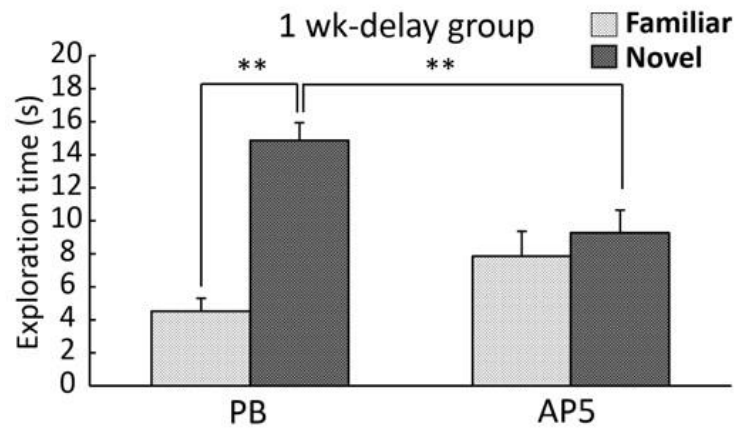


Fig. 13 テスト期における見本物体および新奇物体に対する探索時間（平均±SEM）【実験 2】. **: $p < .01$.

与条件下の新奇物体への探索時間よりも有意に長かった($p < .01$). 遅延 3 週間群では, 2 要因の分散分析の結果, 有意な主効果, 交互作用は認められなかった. 同被験体を用いて行った 24 時間遅延テストでは, 2 要因の分散分析の結果, 物体の主効果が有意であったが[$F(1, 7) = 16.10, p < .01$], 薬物の主効果および 2 要因の交互作用は有意ではなかった.

テスト期の各物体への探索時間から算出した弁別率を Fig. 14 に示す. 遅延 1 週間群と遅延 3 週間群のデータでの 2 要因の分散分析の結果, 薬物の主効果のみが有意であった[$F(1, 12) = 10.48, p < .01$]. また, 弁別率をチャンスレベルと比較したところ, 24 時間遅延テストの PB 条件 ($p < .01$), AP5 条件 ($p < .05$) がともにチャンスレベルより有意に高く, 遅延 1 週間群の PB 条件もまたチャンスレベルより有意に高かった ($p < .05$).

考察

実験 2 の結果, 見本期における物体提示回数を 5 回から 2 回に減らすことで, 自発的物体再認記憶が観察されなくなるタイミングが早まることが示された. 実験 1 では遅延 3 週間群の PB 条件が正常な物体弁別を示したのに対し, 本実験における遅延 3 週間群は PB 条件においても新奇物体選好性を示さなかった. しかし, 同被験体を用いた 24 時間遅延テストや, 遅延 1 週間群の PB 条件は新奇物体を弁別することができたことから, 物体を 2 回繰り返し提示することによって最低 1 週間は自発的物体再認記憶が保持されていることが示唆された. 24 時間遅延テストにおける AP5 投与の結果, ラットは PB 条件と同様に新奇物体選好性を示した. これは 24 時間前の物体記憶の検索には海馬 NMDA 受容体の活性化が不可欠ではないことを示唆し, 実験 1 の結果を支持する. しかしながら, 遅延 1 週間群の AP5 投与条件では弁別率がチャンスレベルと同程度まで低下し, 自発的物体再認記憶の検索に海馬 NMDA 受容体が関与する

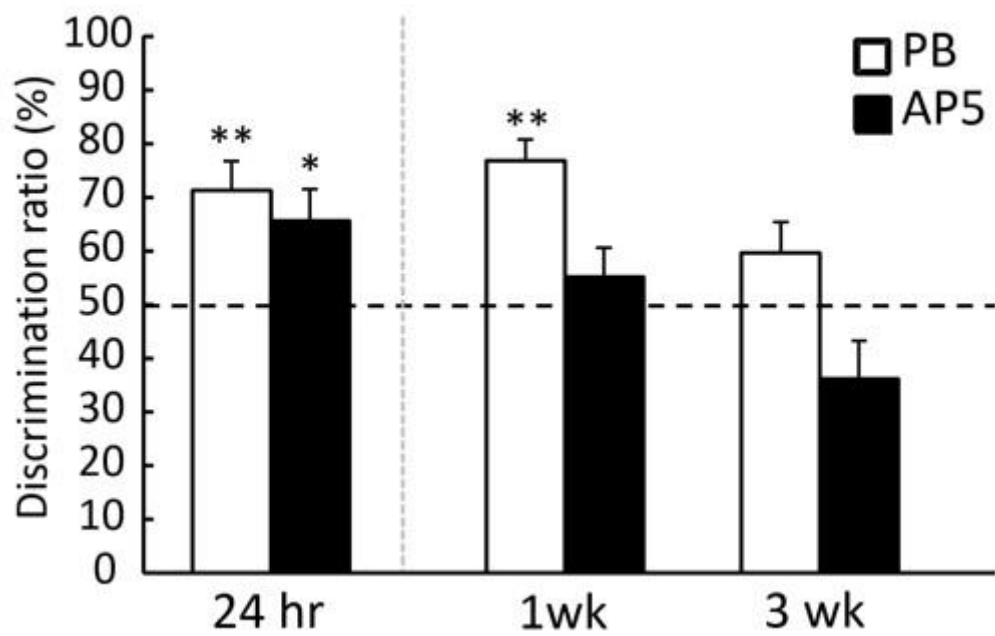


Fig. 14 テスト期における薬物投与条件別の弁別率（平均±SEM）【実験2】.

*: $p < .05$. **: $p < .01$ vs. chance (50%).

可能性が示された。実験 1 の遅延 1 週間群，3 週間群，6 週間群の結果と，本実験の 24 時間遅延テスト，遅延 1 週間群，3 週間群の結果を照らし合わせると，遅延期間が長くなることによる弁別率の低下，AP5 による弁別率の低下の現れ方に類似がみられる。実験 2 において，時間経過や薬物投与による弁別率の低下がより早い時期に観察されたのは，見本期の物体提示回数が 5 回から 2 回に減少した影響であると考えられる。より早く減弱する記憶の検索には，より早いタイミングで海馬 NMDA 受容体が関与する可能性が示唆された。これは実験 1 で提示した，記憶検索における海馬 NMDA 受容体の役割は記憶痕跡の強度によって変化する，という仮説を支持するものであると考えられる。また，他の可能性として提示した 3 週間という特定の時間の長さが重要であるという仮説は否定された。しかしながら，海馬が記憶の検索に重要な役割を果たすような構造の変化が起こっている可能性を否定するものではないだろう。

自発的物体再認記憶の検索における海馬 NMDA 受容体の重要性が，時間経過によって減弱する記憶痕跡によるものであるとすると，他の要因によって記憶痕跡が減弱した場合でも海馬 NMDA 受容体の関与が示唆される結果が得られると考えられる。例えば，見本物体の提示後に，複数の異なる刺激を続けて提示することで，情報の干渉を引き起こし，見本物体の痕跡が減弱すると想定される。自発的物体再認テストにおいて，見本期の一時間後に一度干渉刺激を提示しただけでは，さらにその 1 時間後のテスト期での弁別率に影響を及ぼさないことが示されている (Yamada et al., 2014)。しかし，Sannino et al. (2012) や Sugita et al. (2015) は見本期に同時に提示する物体数を増加させると，テスト期の弁別率が低下することを示している。これらのことから，見本期後に複数回干渉刺激を提示することで，テスト期の弁別率に影響を及ぼす実験を行うことができるだろう。

第4章

自発的物体再認記憶の検索における AMPA 受容体の役割

第1節 自発的物体再認に及ぼす長期遅延（24時間～3週間）の効果

【実験3】

目的

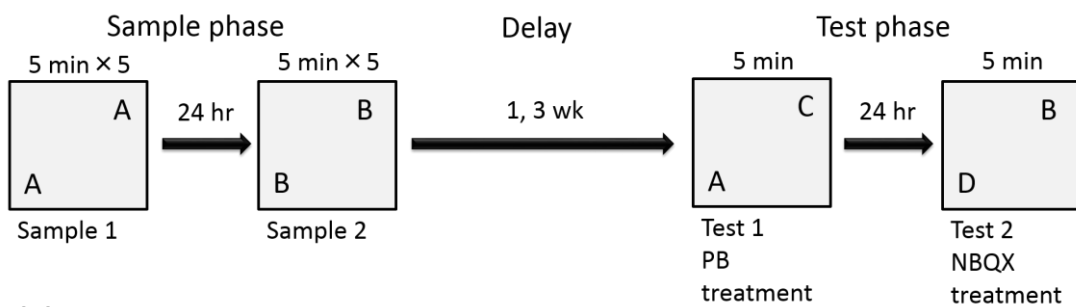
実験1および実験2より海馬 NMDA 受容体は自発的物体再認記憶の検索に重要な役割を果たすが、見本期の物体提示回数と遅延期間の長さの相互作用の影響を受けることが示された。それでは NMDA 受容体とともに働くことで記憶を支えるとされるグルタミン酸 AMPA 受容体は、長期遅延を伴う自発的物体再認記憶の検索にどのように関与しているのだろうか。AMPA 受容体はグルタミン酸の主要な受容体であると考えられ、AMPA 受容体を遮断することはその部位の神経興奮の大部分を抑制するものと想定される。Cohen et al. (2013)はリドカインを用いて、自発的物体再認記憶の検索に海馬が重要であることを示したが、長期遅延後の自発的物体再認記憶については検討していない。

本実験では、長期遅延を伴う自発的物体再認テストのテスト期直前に AMPA 受容体遮断薬である NBQX を背側海馬に投与することで、自発的物体再認記憶の検索に海馬 AMPA 受容体が重要な役割を果たすか、また、NMDA 受容体のように遅延期間の長さの影響を受けるかを検討した。

方法

Wistar-Imamichi 系の雄ラット 29 匹を用いた。被験体は遅延期間の長さによって 24 時間群 ($n = 10$)、1 週間群 ($n = 10$)、3 週間群 ($n = 9$) にランダムに分けた。遅延 1 週間群、遅延 3 週間群には、Fig. 15A に示した長期遅延を伴う自発的再認テストのスケジュールを設定した。見本期の物体提示回数は 5 回と

(A) SOR with 1 or 3 wk-delay interval



(B) SOR with 24 hr-delay interval

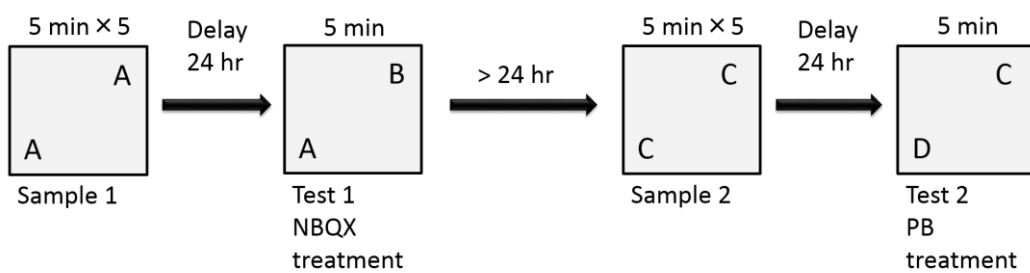


Fig. 15 (A): 実験 3 における長期遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. 1 週間群は見本期の 1 週間前, 3 週間群はテスト期の 1 週間前にカニューレ埋め込み手術を行った. テスト期における A, B の順はランダムとし, さらに NBQX, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした. (B): 本研究における 24 時間遅延を伴う物体再認テストのタイムスケジュールの例. NBQX, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした.

し、各試行間の間隔は 30~40 分とした。遅延 24 時間群は Fig. 15B の手続きにしたがった。薬物は AMPA 受容体遮断薬の NBQX を用い、テスト期の 15 分前に背側海馬内微量注入した。

結果

背側海馬への刺入が確認されたインジェクションカニューレの先端位置を Fig. 16 に示す。

遅延 24 時間、1 週間群、3 週間群の、テスト期におけるラットの見本物体と新奇物体の探索時間を Fig. 17 に示す。遅延 24 時間群では、ラットは PB 投与条件下で新奇物体を見本物体より長く探索したが、NBQX 投与条件下ではその傾向が認められなかった。2 要因の分散分析の結果、薬物の主効果 [$F(1, 9) = 9.86, p < .05$]、と物体の主効果 [$F(1, 9) = 46.19, p < .01$] が有意であった。また、両者の有意な交互作用が認められた [$F(1, 9) = 5.57, p < .05$]。単純主効果の検定を行ったところ、PB 投与条件下での新奇物体への探索時間は見本物体への探索時間より有意に長く ($p < .01$)、また NBQX 投与条件下での新奇物体探索時間よりも有意に長かった ($p < .05$)。遅延 1 週間群の物体探索時間を 2 要因の分散分析にかけたところ、物体の要因にのみ有意な主効果がみられた [$F(1, 9) = 11.15, p < .01$]。遅延 3 週間群では、PB 投与条件下ではラットは新奇物体を長く探索する傾向を示したが、NBQX 投与条件下では示さなかった。2 要因の分散分析の結果、物体の主効果 [$F(1, 8) = 19.17, p < .01$] と、交互作用 [$F(1, 8) = 5.96, p < .05$] が有意であった。単純主効果の検定を行ったところ、PB 投与条件下で、新奇物体への探索時間が見本物体への探索時間より有意に長かった ($p < .01$)。また、NBQX 投与条件下の見本物体への探索時間も、PB 投与条件下の見本物体への探索時間より有意に長かった ($p < .05$)。

探索時間から算出した弁別率を Fig. 18 に示す。2 要因の分散分析の結果、

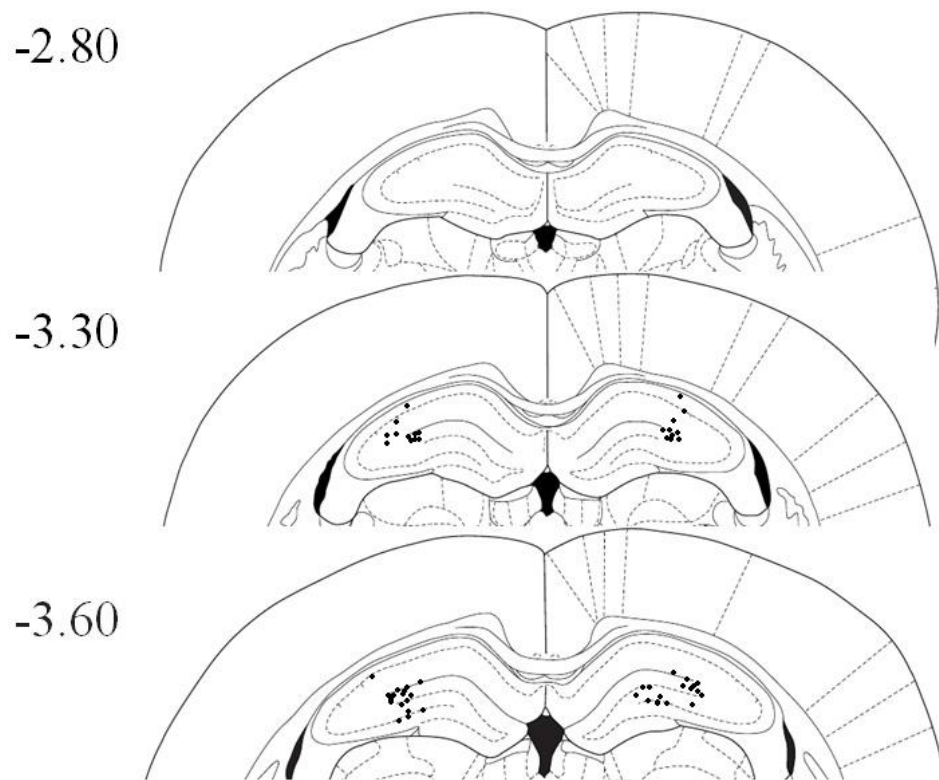


Fig. 16 実験3における各被験体のインジェクションカニューレの刺入位置. 図中の●はインジェクションカニューレの先端の位置を, 各切片の左の数字はブレグマからの距離(mm)を示す. 脳図譜は Paxinos & Watson (1998)より引用.

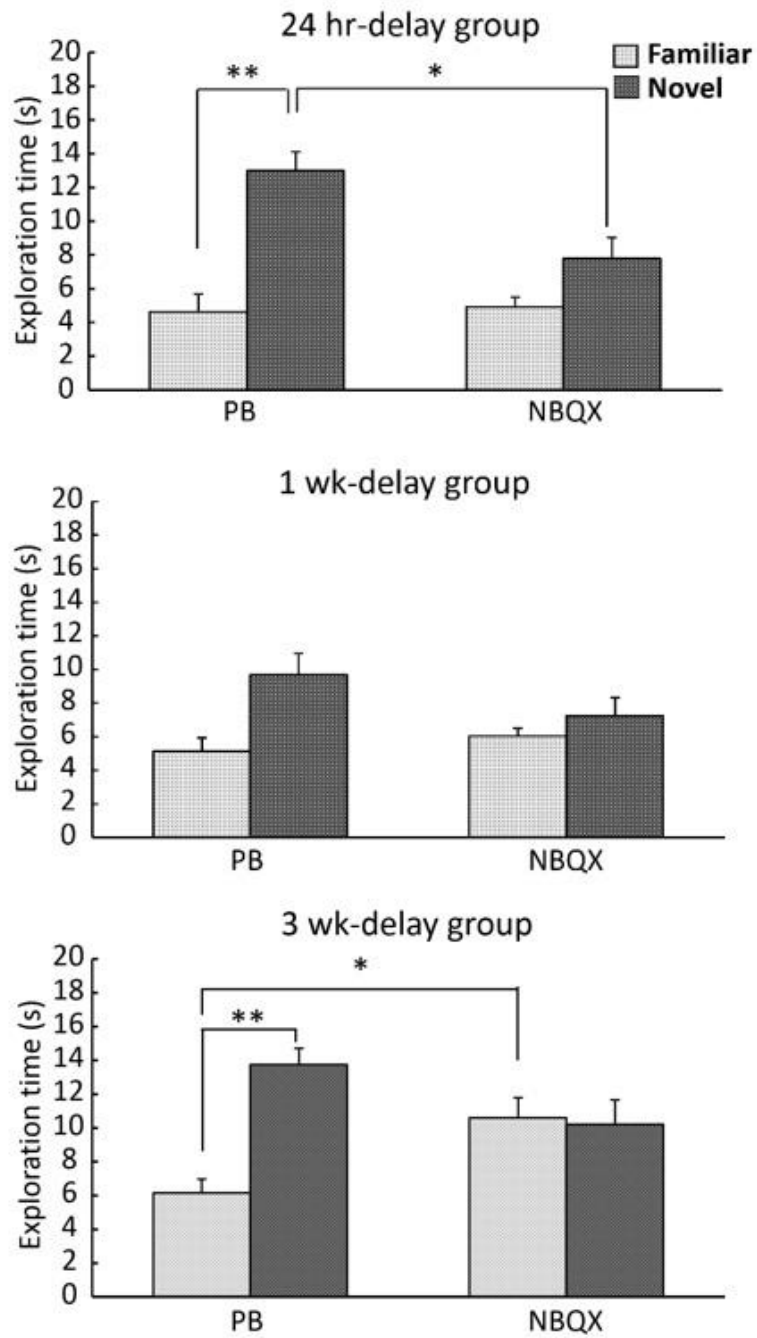


Fig. 17 遅延 24 時間，1 週間，3 週間群のテスト期における見本物体および新奇物体に対する探索時間（平均±SEM）【実験 3】. *: < .05. **: $p < .01$.

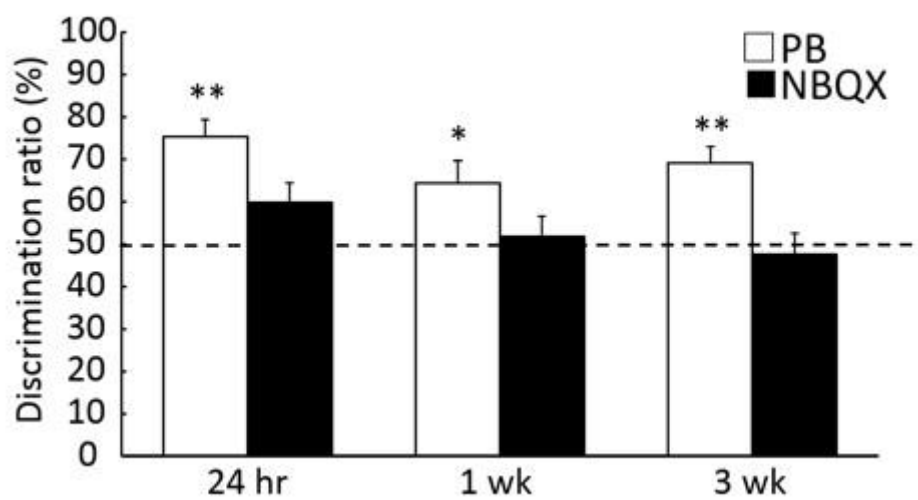


Fig. 18 遅延 24 時間群, 1 週間群, 3 週間群における薬物投与条件別の弁別率 (平均±SEM) 【実験 3】. *: $p < .05$. **: $p < .01$ vs. chance (50%).

薬物 [$F(1, 26) = 15.08, p < .01$] と遅延期間 [$F(2, 26) = 3.59, p < .05$] の主効果が有意であったが、交互作用は有意でなかった。弁別率をチャンスレベルと比較したところ、PB 投与条件下ですべての群がチャンスレベルより有意に高かったのに対し(遅延 24 時間群: $p < .01$, 遅延 1 週間群: $p < .05$, 遅延 3 週間群: $p < .01$), NBQX 投与条件下ではすべての群においてチャンスレベルとの有意差が認められなかった。

考察

本実験の結果、海馬 AMPA 受容体は自発的物体再認記憶の検索に重要であることが示された。実験 1 の NMDA 受容体遮断の効果とは異なり、遅延期間の長さによる効果の違いは認められなかった。AMPA 受容体はグルタミン酸による興奮性神経伝達において主要な役割を果たすことから、海馬は自発的物体再認記憶の検索に重要であると考えられる。これは Cohen et al. (2013) のテスト前海馬内リドカイン投与により、自発的物体再認が阻害されるという結果を支持する。この結果は 24 時間の遅延後のテストに限られた結果であったが、本実験ではさらに長期 (24 時間~3 週間) にわたっても海馬の重要性が維持されることを示したはじめての結果である。

実験 1, 2 で示された AP5 投与の結果は、24 時間遅延後のテストにおいて海馬内の NMDA 受容体が自発的物体再認記憶の検索に重要でないことを示すものであるが、AMPA 受容体は活動していたと考えられるため、海馬そのものの関与の重要性を否定するものではない。NMDA 受容体は AMPA 受容体の働きでシナプス後膜が強く脱分極することにより、チャンネルに結合していた Mg^{2+} が遊離することで、 Ca^{2+} 流入を引き起こす。したがって、AMPA 受容体を遮断することで NMDA 受容体の働きも合わせて抑えられるが、NMDA 受容体が遮断されても AMPA 受容体は通常のグルタミン酸伝達を行えると考えられる。

このことから、NMDA 受容体遮断が実験 1,2 で部分的な障害効果を示し、本実験で AMPA 受容体遮断がより広範囲にわたる障害効果を示したのは驚くべき結果ではないだろう。これまでの結果をまとめると、海馬は自発的物体再認記憶の検索に常に重要な役割を果たし、特に遅延が長期に及んだ場合には NMDA 受容体の活動を必要とする可能性が示された。

第2節 自発的物体再認に及ぼす短期遅延（30分および6時間）の効果

【実験4】

目的

本研究における NMDA 受容体遮断の効果とは異なり，AMPA 受容体遮断薬 NBQX 投与は 24 時間から 3 週間の遅延後のテスト期において，すべて障害効果を示した．AMPA 受容体の働きにより NMDA 受容体の活動が引き起こされるという前提を考えると，AMPA 受容体遮断が NMDA 受容体遮断より幅広いタイミングで障害を引き起こすことは不思議ではない．しかし，NMDA 受容体遮断が，1 週間や 3 週間後のテスト期で障害を引き起こしたのに対し，24 時間後のテスト期では影響を及ぼさなかったことから，AMPA 受容体遮断も 24 時間より短い遅延の条件下では影響を及ぼさないタイミングが存在するのかもしれない．Cohen et al. (2013)は，テスト期前にリドカインを背側海馬に投与することで成績が低下することを示し，自発的物体再認記憶の検索に海馬が重要であると提唱したが，24 時間より短い遅延条件では検討していない．これまでの損傷実験による先行研究では，10 分より長い遅延では障害効果が認められたが，10 秒や 1 分など短い遅延では影響がないという報告がある (Clark et al., 2000)．自発的物体再認記憶の検索には，海馬の活動が必要ない段階，海馬の活動が必要となる段階，海馬 NMDA 受容体の活動が必要となる段階という，時間経過による変化が起こっている可能性が考えられる．

本実験では実験 3 より短い遅延期間を設定した自発的物体再認テストを行い，テスト期における海馬内 NBQX 投与の効果を検討した．

方法

Wistar-Imamichi 系雄ラット 15 匹を用いた．遅延期の長さによって，30 分群 (n = 7)，6 時間群 (n = 8) に分けた．実験の手続きは，見本期とテスト期の

セットを薬物条件と溶媒条件で2セット行った。ただし、遅延期が短いため、見本期とテスト期は同一の日の中で行い、次のセットまでは1日以上の間隔をあけた。また、見本期の物体提示回数は1回とした (Fig. 19)。

結果

背側海馬への刺入が確認されたインジェクションカニューレの先端位置を Fig. 20 に示す。

遅延30分群および遅延6時間群のテスト期における物体への探索時間を Fig. 21 に示す。遅延30分群において、2要因の分散分析を行った結果、物体の主効果のみが有意であった [$F(1,6) = 11.45, p < .05$]。遅延6時間群では、2要因の分散分析の結果、薬物、物体の要因の主効果は有意ではなかったが、交互作用が有意であった [$F(1,7) = 9.17, p < .05$]。単純主効果の検定を行ったところ、PB投与条件下で、新奇物体への探索時間が見本物体への探索時間よりも有意に長く ($p < .01$)、NBQX投与条件下の新奇物体への探索時間よりも有意に長かった ($p < .05$)。また、NBQX投与条件下の見本物体への探索時間は、PB投与条件下の見本物体への探索時間よりも有意に長かった ($p < .05$)。

Fig. 22 は両遅延群の弁別率を表している。2要因の分散分析を行った結果、薬物の主効果のみが有意であった ($p < .05$)。チャンスレベルとの比較を行ったところ、遅延30分群、6時間群両方において、PB投与条件下の弁別率がチャンスレベルより有意に高かった (遅延30分群: $p < .05$, 遅延6時間群: $p < .01$)。しかしながら、両群のNBQX投与条件においてはチャンスレベルとの有意差が認められなかった。

考察

本実験では、30分または6時間という短期間の遅延を伴う自発的物体再認

SOR with 30 min or 6 hr-delay interval

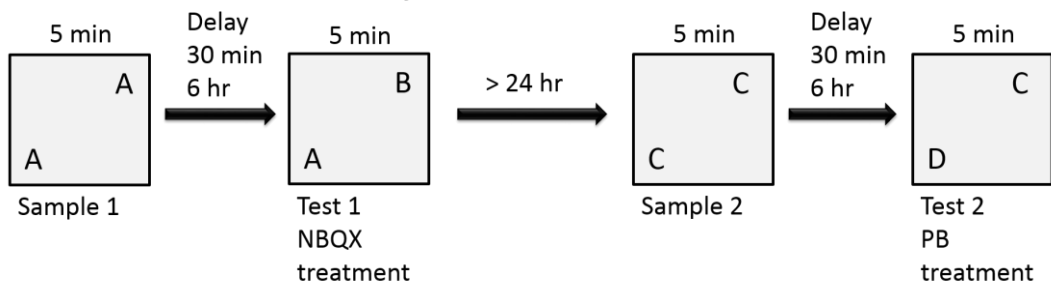


Fig. 19 実験 4 における物体再認テストのタイムスケジュールの例。被験体に対して行動実験の前にカニューレ埋め込み手術を行った。NBQX, PB のどちらを先に投与するかはランダムとした。

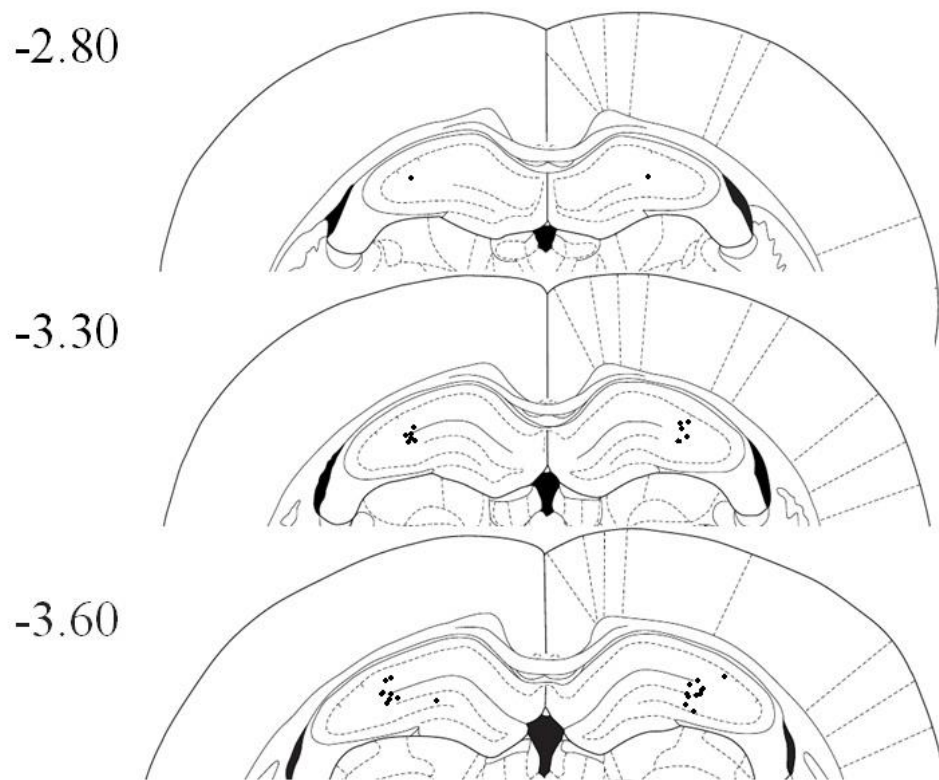


Fig. 20 実験 4 における各被験体のインジェクションカニューレの刺入位置. 図中の●はインジェクションカニューレの先端の位置を, 各切片の左の数字はブレグマからの距離 (mm) を示す. 脳図譜は Paxinos & Watson (1998) より引用.

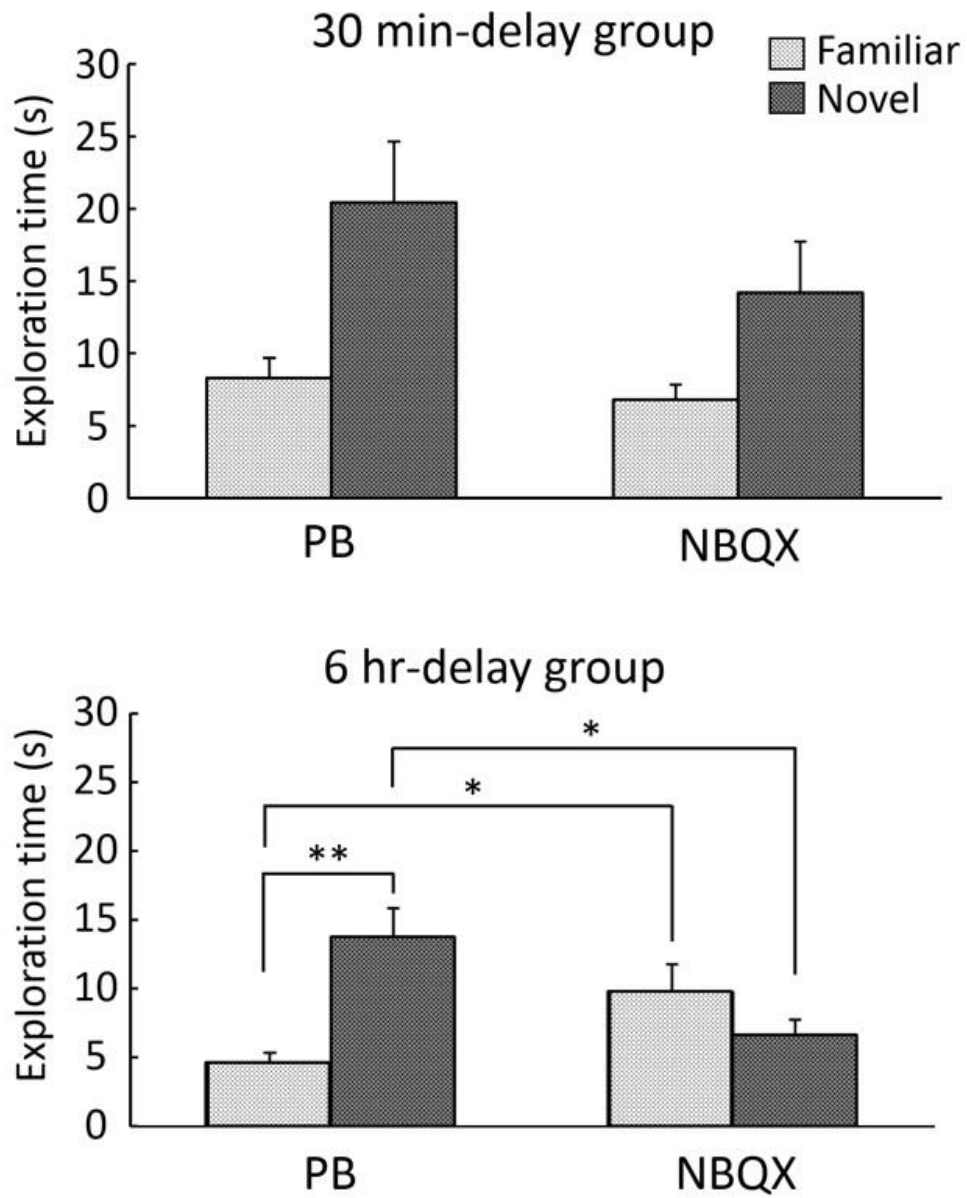


Fig. 21 遅延 30 分, 6 時間群のテスト期における見本物体および新奇物体に対する探索時間 (平均±SEM) 【実験 4】. *: < .05. **: $p < .01$.

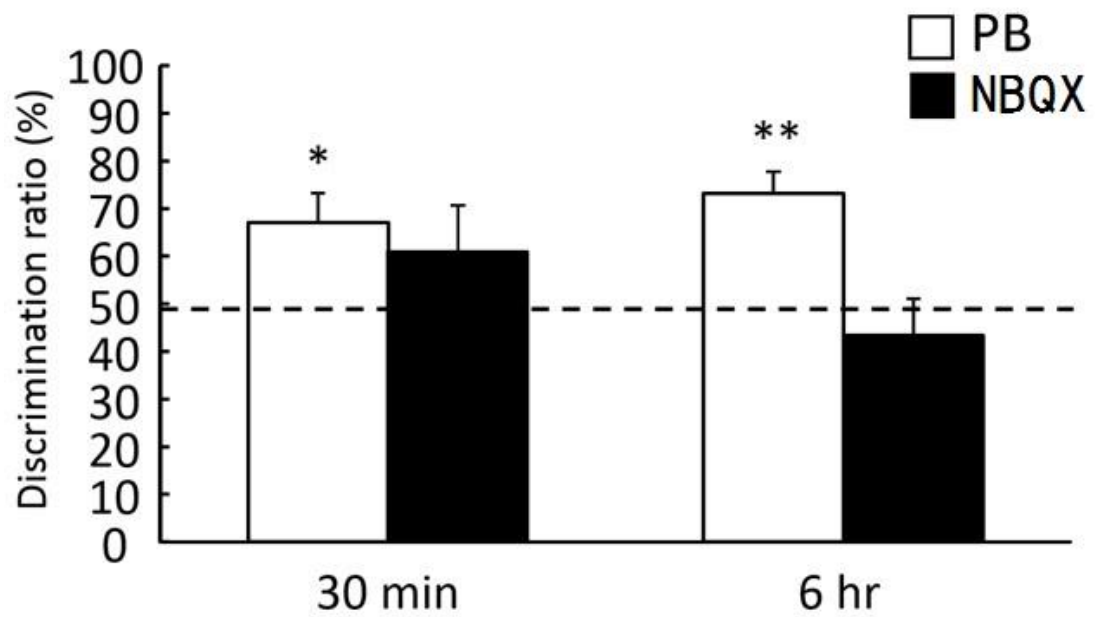


Fig. 22 遅延 30 分群, 6 時間群における薬物投与条件別の弁別率 (平均±SEM)

【実験 4】. *: $p < .05$. **: $p < .01$ vs. chance (50%).

テストの検索過程に、海馬 AMPA 受容体が関与するかを検討した。テスト期前に背側海馬に NBQX を投与した結果、30 分群、6 時間群ともに弁別率の低下を示した。これはたとえ遅延が短期であっても、自発的物体再認記憶の検索に海馬グルタミン酸受容体が重要な役割を果たすことを示唆している。薬物投与はテスト期の 15 分前に行う必要があるため、本実験よりさらに短い遅延期を設定して実験を行うことは困難である。したがって、Clark et al. (2000) が示した、10 秒や 1 分という遅延後では AMPA 受容体が関与しない可能性が考えられるが、本実験の手法では検討できない。見本期前に薬物を投与する手法では、Baker & Kim (2002) がすでに AP5 を背側海馬に投与して障害効果を認めたが、薬物の作用が記銘、固定、検索のすべての段階に影響している可能性が考えられる。より限局したタイミングでの海馬の関与を検討するには、光遺伝学的手法を用いてテスト期のみで海馬の活性をおさえる手続きを行う必要があるだろう。しかしながら、本実験の結果は、自発的物体再認記憶の検索に海馬が重要であることを確認し、遅延が 30 分から 3 週間に及ぶまで幅広い期間関わっていることを示唆するものである。

実験 3、実験 4 の結果は損傷実験で提示された仮説を検証するものである。Mumby et al. (2005) は見本期前の損傷が、24 時間、1 週間、3 週間遅延後のテスト期の弁別率を低下させない現象について、見本期後に損傷を行った Gaskin et al. (2003) の結果と比較し、海馬を損傷するタイミングこそが重要であると考察した。すなわち、見本期の時点ですでに海馬が損傷されていた場合、海馬周囲の構造が補償的に働くことで、海馬の機能が失われた状態でも正常な自発的物体再認記憶を示すことができるが、見本期後に海馬を損傷した場合、海馬が記銘の段階で自発的物体再認記憶に関与しているため、海馬損傷による障害が起きる、という仮説をたてた。本実験の結果は、見本期に正常に記銘が行われた状態で、テスト期で海馬の活動を阻害すると自発的物体再認記憶の検索が障害

されることを確認し，Mumby et al. (2005)の仮説を支持する．見本期に海馬を一時的に不活性化する手法はすでに，Cohen et al. (2013)や Baker & Kim (2002)で示されているように，自発的物体再認記憶の記銘を阻害してしまう．このことから，海馬損傷によって海馬周囲の構造の補償作用が働くとしても，損傷から1, 2週間の時間が必要と考えられる．

第 5 章 見本期物体提示回数と記憶保持期間の関連【実験 5】

目的

実験 1, 実験 2 では見本物体提示回数を増減させることによって, ラットの自発的物体再認記憶が保持できる遅延期間の長さを調整できることが明らかとなった. すなわち, 見本期での物体提示回数を増やせば, より長期遅延後に自発的物体再認記憶を観測することができる. 物体提示回数を増やすことでより強固な記憶を形成できることは感覚的には推測しうることであり, また先行研究(Gaskin et al., 2003; Mumby et al., 2005; Broadbent et al., 2010)でも物体を複数回提示することで長期記憶の検討を行った. しかしながら, 提示回数と記憶の強度の関連について言及している研究はいまだない. 本章では, 実験 1, 実験 2 の結果を踏まえながら, 物体提示の回数を変化させることで, 記憶の保持期間がどのように影響を受けるかを検討する.

方法

9 週齢の Wistar-Imamichi 系雄ラット 26 匹を用いた. 手術, 薬物投与は行わなかった. 被験体は遅延 24 時間群($n = 16$)と遅延 1 週間群($n = 10$)に分けられた. また, 見本期における物体提示は 1 回のみとした (Fig. 23).

結果と考察

テスト期における物体探索時間と弁別率を Fig. 24 に示す. 物体探索時間について, 2 要因分散分析を行ったところ, 物体の主効果が有意であった [$F(1, 24) = 10.54, p < .01$]. 遅延の主効果, および 2 要因の交互作用は有意でなかった. 物体弁別率を対応のない t 検定で比較したところ, 遅延の長さによる有意な差は認められなかった. チャンスレベルとの比較を行ったところ, 遅延 24 時間

SOR with 24 hr or 1 wk-delay interval

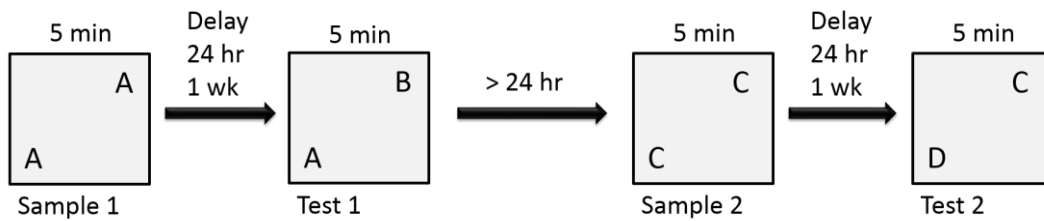


Fig. 23 実験 5 における物体再認テストのタイムスケジュールの例。被験体に対して行動実験の前にカニューレ埋め込み手術を行った。事前のカニューレ埋め込み手術およびテスト期における薬物投与は行わなかった。

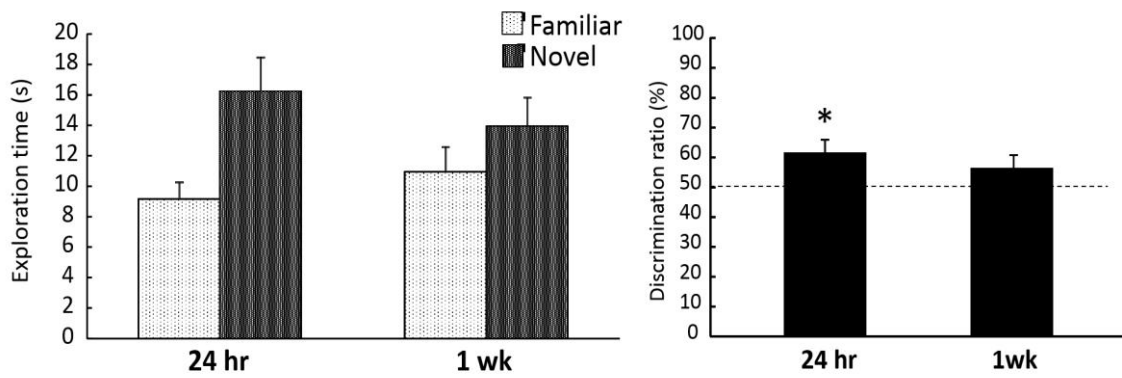


Fig. 24 見本物体を1回提示した際の各テスト期における物体探索時間と物体弁別率（平均±SEM）【実験5】. *: $p < .05$ vs. chance (50%).

群のみが有意に高かった ($p < .05$)。このことから、見本期に 1 回物体を提示した場合、ラットは 24 時間の遅延後のテスト期で新奇物体弁別が行えるが、1 週間後には行えなくなることが示された。

本実験の結果と、実験 1、実験 2 の PB 条件の物体弁別率を比較したグラフを Fig. 25 に示す。縦軸は物体弁別率を表し、横軸は遅延期の長さを表す。各折れ線は、実験 1 の PB 条件から見本物体 5 回提示条件、実験 2 の PB 条件から見本物体 2 回提示条件、そして実験 4 の見本物体 1 回提示条件を表す。見本期における物体提示の回数の増加は、新奇物体弁別率がチャンスレベルまで低下するまでの期間を延長することから、見本期に繰り返し物体を探索することでラットの自発的物体再認記憶が強固に保持されることが示唆された。一方で、繰り返し提示することで、弁別率が通常より高まり、100%にさらに近づくことはない。Gaskin et al. (2010)も同様に、ラットがテスト期で新奇物体選好を示すには最低限の物体探索時間が必要であるが、それ以上探索時間を伸ばすことで弁別率の上昇が起こるものではないことを示し、弁別率の高さが見本物体の記憶の強さを反映するものではないと指摘している。これらを踏まえると、自発的物体再認テストにおいて、ある特定の時点での弁別率の高さを指標とするのではなく、新奇物体選好性が維持される期間の長さを指標とすることで、記憶痕跡の強度を検討できる可能性を本研究は提示する。

見本物体の提示回数と弁別率の関係を表した Fig. 25 のグラフと、実験 1、実験 2 で示された AP5 背側海馬内投与の結果から、NMDA 受容体遮断は記憶が形成されてからしばらくの間は障害を引き起こさず、あるタイミング以降から阻害効果を及ぼすことがわかる。NMDA 受容体遮断が自発的物体再認記憶の検索を阻害するタイミングは、見本期における物体提示回数を増やすことで遅くなり、それは自発的物体再認記憶の保持期間の延長と平行しているように思われる。このことから、海馬 NMDA 受容体遮断は、時間経過により減弱した

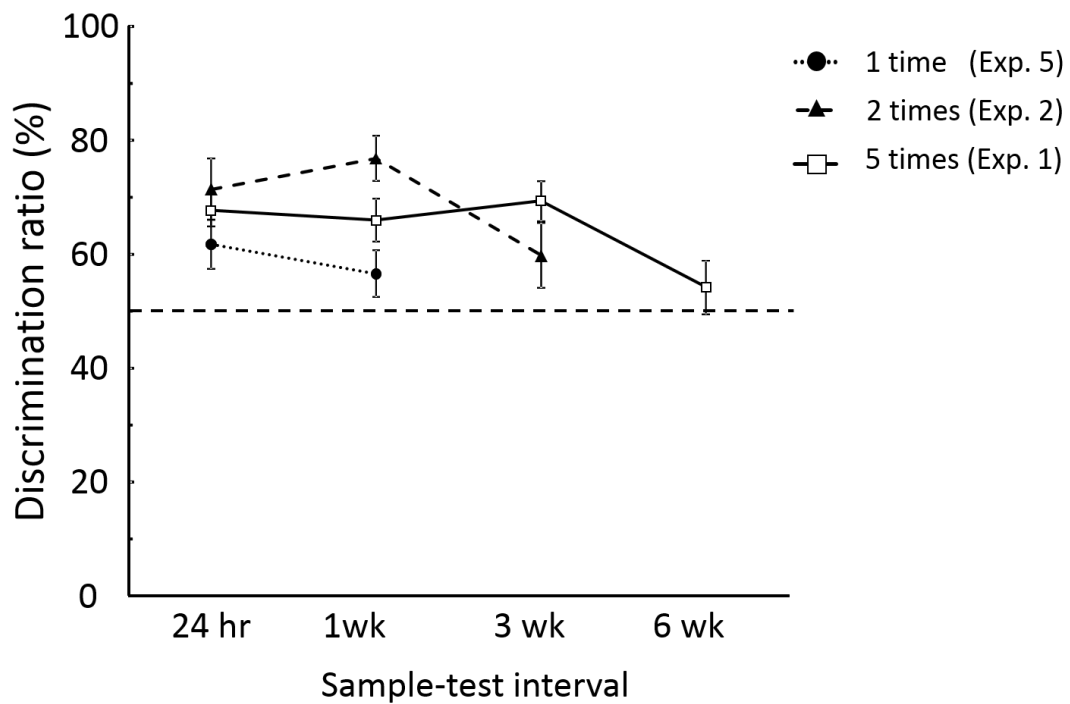


Fig. 25 見本物体の提示回数と遅延期間の長さの関係. 縦軸は弁別率 (平均±SEM), 横軸は遅延期間の長さを表す.

自発的物体再認記憶の記憶痕跡を検索する際に重要な役割を果たすと考えられるだろう。

第 6 章

総合的考察

本研究では、自発的物体再認記憶の検索過程における海馬グルタミン酸受容体の役割を、テスト期直前に NMDA 受容体遮断薬 AP5、AMPA 受容体遮断薬 NBQX を投与することで検討した。長期記憶における効果を検討するため、被験体には見本物体を 5 回繰り返し提示した。実験の結果、NBQX はすべての遅延群（24 時間～3 週間）で弁別率を低下させた。また、見本期に物体を 1 回のみ提示し、30 分、6 時間後に行ったテスト期においても NBQX は障害効果を示した。一方、AP5 は遅延 1 週間群では影響がなく、遅延 3 週間群において弁別率の低下を引き起こした。また、見本期の提示回数を 2 回にして行ったテストでは、遅延 1 週間群で AP5 の障害効果が現れたが 24 時間遅延テストにおいては影響が認められなかった。これらの結果から、物体再認記憶の検索に海馬が重要であり、特に海馬 NMDA 受容体が関与する特定の条件が存在することが示唆された。

実験 3, 4 において、NBQX 投与の結果、遅延期間の長さに関わらず（30 分～3 週間）、すべての群が新奇物体選好性を示さなかった。これは、海馬が自発的物体再認記憶に重要な役割を果たすとする Cohen et al. (2013) を支持し、さらに 3 週間前に提示された物体の記憶の検索にも海馬が重要であることを示唆する。自発的物体再認テストのテスト期における海馬内のグルタミン酸の細胞外濃度をマイクロダイアリシス法で測定した Stanley et al. (2012) は、新奇物体が存在している条件下でグルタミン酸の細胞外濃度が増加することを示した。この結果もまた、自発的物体再認記憶の検索過程に海馬グルタミン酸受容体が重要な役割を果たすことを示唆する。海馬が記憶の検索過程に関わることは、Tanaka et al. (2014) がマウスの恐怖条件づけでも示している。彼らは、光遺

伝学的手法を用いて条件づけ時に活性化した海馬内の細胞をタグ付けし、テスト時に不活性化することで、恐怖反応が抑制されることを明らかにし、記憶検索時に海馬が扁桃体や嗅周囲皮質などに存在する特定の記憶表象を活性化する役割を果たす可能性を示唆している。海馬が検索のタイミングのみで重要となるのか、それとも自発的物体再認記憶が保持される脳部位として機能しているのかは、本研究では検討できなかった。しかし、他の先行研究により、物体再認記憶に嗅周囲皮質が重要であることが示されていることから (Winters et al., 2004, Winters et al., 2005a, Winters et al., 2005b, Forwood et al., 2005), 物体再認記憶は嗅周囲皮質と海馬、あるいは嗅周囲皮質に保持されており、検索時に海馬により記憶表象が活性化される可能性が考えられる。

NMDA 受容体遮断は、遅延期間の長さにより異なる結果を示した(実験 1)。見本物体を 5 回繰り返して提示した場合、遅延 1 週間群では AP5 投与条件は PB 投与条件と差がなく、新奇物体選好性を示した。しかし、遅延 3 週間群では、AP5 投与により新奇物体弁別を示さなくなった。この結果は、海馬 NMDA 受容体は遅延期間依存的に自発的物体再認記憶の検索に関わることを示唆する。遅延期間が長い場合の記憶検索において海馬 NMDA 受容体が重要となる理由として、記憶痕跡の強度を仮定した。すなわち、遅延期間が延びるほど物体記憶の痕跡が減弱するが、海馬 NMDA 受容体が活性化することで検索が可能となると考えた。この仮説にもとづき、実験 2 では、物体の提示回数を 5 回から 2 回に減らし、記憶痕跡の減弱が早く起こる条件下での NMDA 受容体遮断の効果を検討した。見本期の物体提示回数を 5 回から 2 回に減らすことで、5 回提示時では示された 3 週間群の新奇物体選好性が見られなくなった。また、遅延 1 週間群では PB 投与条件が新奇物体選好性を示したのに対し、AP5 投与条件は示さなかった。さらに、遅延 24 時間のテストを行ったところ、AP5 投与は PB 投与と同程度の新奇物体弁別率を示した。これらの結果から、見本期

の物体提示回数の減少により，物体記憶を保持できる期間が短縮し，海馬 NMDA 受容体が重要となるタイミングがより早くなったことが示唆された。

これら AP5 投与実験の結果より，物体再認記憶の検索には海馬 NMDA 受容体が関与するが，見本期の回数と遅延期間の長さの相互作用による，記憶痕跡の強度を反映している可能性がある。

近接記憶より遠隔記憶の検索に，より強く海馬の活性化が必要とされることを示した先行研究がある。Schlesiger et al. (2013)は放射状迷路を用いた記憶課題を用い，訓練期間とテストの間隔を1日と6週間とに分けることで，近接記憶と遠隔記憶それぞれにおける海馬の働きを検討した。CA1, CA3, 歯状回の c-Fos の発現を比較したところ，近接記憶より遠隔記憶のテストを行った際に強い発現が認められた。Wartman et al. (2014)はモリス水迷路の訓練の後に放射状迷路課題を行い，その後のモリス水迷路のプローブテストを行うタイミングを操作した。その後，c-Fos 発現を測定し，近接記憶より遠隔記憶で海馬 CA1 の活性が高まっていることを示した。これらの研究は直接的に NMDA 受容体の関与を示唆するものではないが，遠隔記憶検索時に必要とされる海馬の活性化を，NMDA 受容体が担っている可能性が考えられる。

本研究のように記憶の検索に海馬 NMDA 受容体が関わるという結論は，他の研究パラダイムで示されている。Nakazawa et al. (2002)は海馬 CA3 錐体細胞特異的に NMDA 受容体の発現を抑えた変異マウスを用いて，モリス水迷路課題を行った。プローブテスト時，変異マウスは迷路外刺激が減少した条件下で，CA1 の発火が減少し成績の低下を示した。これは空間記憶の検索に，海馬 CA3 領域の NMDA 受容体が関与し，さらに情報が少ない条件下で海馬の活性化が重要となることを示唆する。モリス水迷路では空間情報が少ない条件下で，自発的物体再認テストでは遅延期間が長期に及んだ条件で海馬 NMDA 受容体の関与が示唆されたことから，「記憶の思い出しやすさ」が検索と海馬 NMDA 受

容体の関わりに重要な要素なのかもしれない。また、Jo & Choi (2014)は内側前頭前皮質の NMDA 受容体に着目し、モリス水迷路の検索過程に対する AP5 の効果を検討した。その結果、訓練時に空間刺激がある状態では NMDA 受容体遮断の効果が認められなかったが、空間刺激の数が減少した条件下で成績の低下が認められた。このことから海馬に関わらず NMDA 受容体は「記憶の思い出しやすさ」と重要な関わりをもち、検索しにくい条件下で活性化を必要とされるのかもしれない。

記銘してから検索までの間隔、あるいは検索時における手がかり刺激の数が、記憶検索における海馬 NMDA 受容体の役割に関連するという報告を示したが、その他の可能性として「記憶負荷」に着目した研究がある。Sannino et al. (2012)はマウスの自発的物体再認テストにおいて、複数の異なる物体を同時に提示することで、一度にいくつの物体が覚えられるかを検討した。24 時間の遅延後のテストでは、マウスは 3~6 つの条件では新奇物体弁別を行えたが、9 つまで増やすと新奇物体選好性がみられなくなった。さらに海馬損傷は 6 つの物体提示条件では障害を引き起こしたが、3 つの物体提示条件では影響がなかった。このことから、同時に提示された物体の数が記憶負荷を高め、記憶負荷が高いときに海馬が自発的物体再認記憶に関与すると示唆した。また、Sugita et al. (2015)は Sannino et al. (2012)と同様の手続きをラットに用いて、見本期前の海馬内 AP5 投与の効果を検討した。その結果、2 つの物体を用いたテストでは AP5 の影響がみられないが、物体を 4 つに増やしたテストでは AP5 投与による弁別率の低下がみとめられた。この結果は、Sannino et al. (2012)の結果を支持するものであり、さらに記憶負荷が高まるような条件下で海馬 NMDA 受容体が自発的物体再認記憶に関与する可能性を示すものであるが、記銘、固定、保持、検索のどの段階に重要であるかの検討はいまだ行われていない。時間経過、検索時の手がかりの少なさ、あるいは記憶情報の過多、これらはともに「記

憶の思い出しやすさ」に影響するものであると考えられる。これらの要素によって、思い出しにくくなった記憶を検索するために海馬 NMDA 受容体の働きが重要であると考えられる。

記憶痕跡という概念は Hebb が提唱した、シナプス伝達効率の変化した神経細胞群の存在を想定している。ある神経細胞群のシナプス伝達効率が高まっている場合を、強く記憶痕跡が残っている状態として考え、時間経過などによるシナプスの伝達効率の低下が記憶痕跡の減弱を引き起こすものと筆者は仮定している。シナプス伝達の効率を大きく左右するものとして、AMPA 受容体と NMDA 受容体の相互作用が考えられる。AMPA 受容体と NMDA 受容体はどのように記憶の検索に関与しているのだろうか。Lopez et al. (2015)は、AMPA, NMDA 受容体が記憶の検索に関わる、シナプス内のメカニズムを提唱している (Fig. 26)。彼らによると、記憶検索時に、カルシウム透過性の GluA1 を含む AMPA 受容体がシナプス後膜上に輸送される必要がある。その輸送は NMDA 受容体の活性化による細胞内へのカルシウム流入によって、数秒で引き起こされる。彼らの研究は、そのシナプス輸送のメカニズムに関与すると考えられるタンパク質が、細胞内で合成されている必要があることを示唆したものであり、NMDA 受容体の必要性を直接的に示したものではない。彼らの研究の結果では、NMDA 受容体の阻害は、24 時間前の恐怖記憶の検索を阻害しなかった。しかしそれは、AMPA 受容体輸送に関わるタンパク質がまだまだ多く細胞内に存在しているためと考えられ、NMDA 受容体の活性化が必要ない状態であったためと解釈される (Fig. 26C)。さらに長い時間経過によりどのような変化が起こるのか、今後の研究が待たれるが、記憶検索を行うにはシナプス上に一定の AMPA 受容体が発現している必要があり、それを支えるメカニズムに NMDA 受容体関わっていることは、本研究の結果を一部支持するものである。NMDA 受容体の働きによって、シナプス上に多くの AMPA 受容体が発現、よ

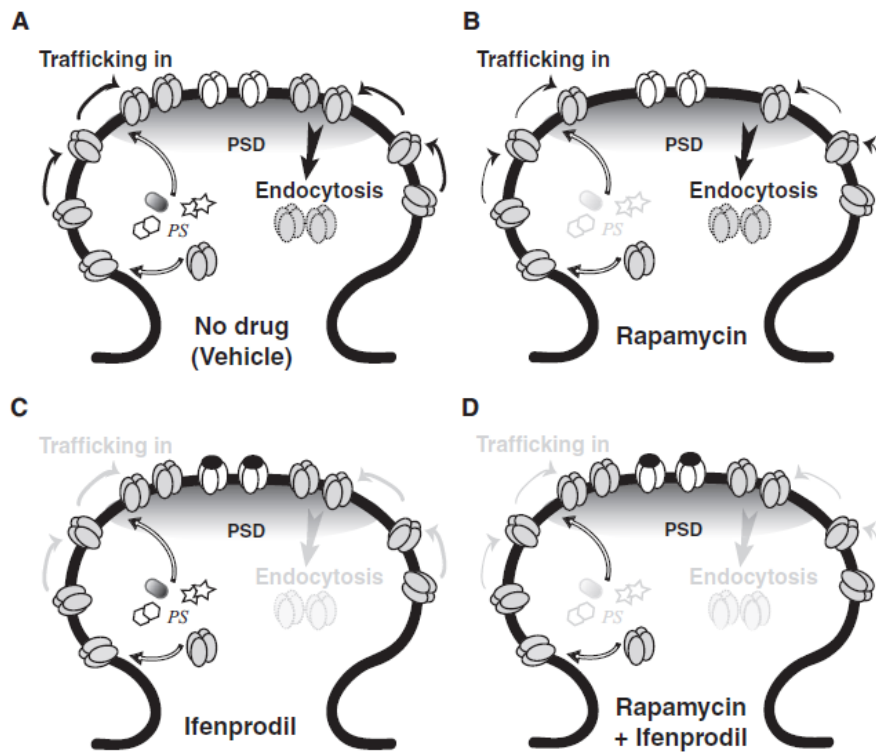


Fig. 26 記憶検索における GluA1 を含む AMPA 受容体位の輸送メカニズムのモデル. (A) NMDA 受容体は GluA1-AMPA 受容体をシナプス上に輸送させる働きを持つ. またタンパク質合成は, シナプス内に AMPA 受容体の発現を行うタンパク質を貯蔵することで, 記憶検索を支える. (B) タンパク質合成阻害薬 rapamycin 投与は, AMPA 受容体の発現を止めるが, NMDA 受容体の働きにより輸送は続き, エンドサイトーシスが起るため, 結果としてシナプス上の AMPA 受容体の密度が下がり, 検索障害が起る. (C) NMDA 受容体遮断薬 ifenprodil は AMPA 受容体のシナプス輸送を阻害することで, AMPA 受容体の密度を保つため, 障害を引き起こさない. (D) Rapamycin と ifenprodil を合わせて投与すると, タンパク質合成阻害により AMPA 受容体の発現が止まるが, NMDA 受容体遮断により, エンドサイトーシスを含めた AMPA 受容体輸送が止まるため, 結果として検索の障害は起らない. Lopez et al. (2015)の図より抜粋.

り強い海馬の活性化を引き起こすことで、記憶の検索を支えているのかもしれない。このメカニズムは、遠隔記憶や、情報過多な記憶を正確に検索するため、あるいは手掛かりが少ない条件下でも検索するために重要となるメカニズムなのではないだろうか。

本研究は背側海馬に着目しており、腹側海馬への薬物投与は行っていない。自発的物体再認テストと海馬の関連について、特に薬物投与を用いた一時的な不活性化の手法を用いた研究は、背側海馬に着目したもののみで、腹側海馬の関与まで検討したものがない。しかしながら損傷実験では、海馬損傷が大きく腹側まで及ぶことで自発的物体再認記憶の障害が認められると報告されており

(Broadbent et al., 2004)、腹側海馬の関与が示唆されている。背側海馬と腹側海馬は、それぞれ空間記憶と情動記憶に強く関わりと考えられているが、他の脳部位からこれらの海馬の各領域に入力する神経回路は独立性が高く、並列していることが明らかとなっている (Ohara et al., 2013)。彼らの研究では、物体再認記憶に重要とされる嗅周囲皮質から海馬へとつながる経路である嗅内皮質からも、海馬の背側、腹側へそれぞれ入力があることが示されており、腹側海馬も物体再認記憶に関わる情報を処理していると考えられる。本研究において、海馬 NMDA 受容体遮断が記憶障害を引き起こさなかった理由として、正常に機能していた腹側海馬の補償的作用の可能性が考えられる。自発的物体再認記憶と海馬の関連性が徐々に明らかとなってきているが、今後は腹側海馬の関与も含めて検討する必要があるだろう。

また、海馬は CA1, CA3, DG の下位領域にわけて考えることができる。

Nakazawa et al. (2002)はモリス水迷路課題を用いた研究で、記憶の検索に CA3 の NMDA 受容体が重要であることを示した。本研究は、非空間記憶テストであるが検索過程における NMDA 受容体の関与を検討したものであり、CA3 の NMDA 受容体が遮断されたことより自発的物体再認記憶の検索が障害された

可能性が考えられる。しかしながら、CA1のNMDA受容体に着目した研究では、CA1特異的にNMDA受容体のサブユニットであるNR1をノックアウトしたマウスが、自発的物体再認の障害を示すことが報告された (Rampon et al., 2000)。この結果から、CA1のNMDA受容体が自発的物体再認記憶に重要であることが示唆される。これらの先行研究をふまえると、本研究におけるNMDA受容体遮断による記憶検索の障害は、CA1、CA3それぞれの領域が関与している可能性が考えられる。また、皮質から海馬内への連絡は基本的にはDGを介するため、DGの受容体を遮断することによっても、障害が引き起こされる可能性がある。本研究におけるインジェクションカニューレの刺入位置を確かめると、特定の領域に限られて刺入されているものではなく、先行研究 (Steele & Morris, 1999) による海馬内での薬物の広がり を考慮すると、下位領域に限定した詳細な分析は困難である。今後、下位領域に限定した検討を行う際には、CA1やCA3限定的にNMDA受容体の発現を抑えた遺伝子改変動物で行う必要があるだろう。

本研究により、物体再認記憶の検索に海馬が関わるということが明らかとなった。その関与は30分前から3週間前の記憶までおよび、記銘、固定に重要とされる海馬が検索においても長期に関わることを示された。本結果は、記憶において海馬は空間だけではなく非空間記憶、そして記銘、固定だけではなく検索にまで、幅広く関与する可能性を提示するものである。また、自発的物体再認記憶の検索過程における海馬NMDA受容体の働きをはじめて明らかにした。海馬NMDA受容体は、記銘からの時間経過により重要性が上昇し、遠隔記憶の検索により密接に関与すると考えられる。遠隔記憶で海馬がより強く活性化される、あるいは情報が少ない場合にNMDA受容体の働きが重要となるという先行研究が空間記憶では報告されていたが、本研究は非空間記憶において海馬NMDA受容体でそのような現象が起こることを明らかにした。本研究で示さ

れた結果から、海馬 NMDA 受容体は、時間経過や提示される刺激の減少などによって記憶痕跡が減弱し、検索が困難となった際に、記憶検索を支えている可能性を提示する。しかしながら、時間経過などで記憶痕跡が減弱する、いわゆる忘却の脳内メカニズムはいまだ明らかとなっていない。近年、記憶痕跡を神経細胞の活動として観測できる光遺伝学の手法が発達してきたことにより、時間経過による脳内の変化を検討することができるようになるだろう。そして、記憶痕跡の減弱のメカニズムが明らかになることにより、本研究で提唱した仮説を将来的に検証することができるだろう。

引用文献

- Aggleton, J.P., Hunt, P.R. & Rawlins, J.N.P. (1986) The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial test of working memory. *Behavioural Brain Research*, **19**, 133-146.
- Atkinson, R.C. & Shiffrin, R.M. (1965) Mathematical models for memory and learning. Technical Report No.79, Psychology Series, Institute for Mathematical Studies in the Social Science. Stanford: Stanford University Press.
- Atkinson, R.C. & Shiffrin, R.M. (1968) Human memory: a proposed system and its control processes. In K.W. Spence & J.T. Spence, eds., *The Psychology of Learning and Motivation*, Vol. 2. New York: Academic Press.
- Baker, K.B. & Kim, J.J. (2002) Effects of stress and hippocampal NMDA receptor antagonism on recognition memory in rats. *Learning & Memory*, **9**, 58-65.
- Besheer, J. & Bevins, R.A. (2000) The role of environmental familiarization in novel-object preference. *Behavioral Processes*, **50**, 19-29.
- Bliss, T.V. & Lømo, T. (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*, **232**, 331-356.
- Broadbent, N.J., Gaskin, S., Squire, L.R. & Clark, R.E. (2010) Object recognition memory and the rodent hippocampus. *Learning & Memory*, **17**, 5-11.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R. & Clark, R.E. (2004) Spatial memory,

- recognition memory, and the hippocampus. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, **101**, 14515-14520.
- Clark, R.E., Zola, S.M. & Squire, L.R. (2000) Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *Journal of Neuroscience*, **20**, 8853-8860.
- Cohen, S.J., Munchow, A.H., Rios, L.M., Zhang, G., Asgeirsdóttir, H.N. & Stackman, R.W.Jr. (2013) The rodent hippocampus is essential for nonspatial object memory. *Current Biology*, **17**, 1685-1690.
- Cohen, S.J. & Stackman R.W. Jr. (2015) Assessing rodent hippocampal involvement in the novel object recognition task. A review. *Behavioural Brain Research*, **285**, 105-117.
- Delacour, J. (1977) Role of temporal lobe structures in visual short-term memory, using a new test. *Neuropsychologia*, **15**, 681-684.
- Dix, S.L. & Aggleton, J.P. (1999) Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. *Behavioural Brain Research*, **99**, 191-200.
- Ennaceur, A. & Delacour, J. (1988) A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behavioural Brain Research*, **31**, 47-59.
- Forwood, S.E., Winters, B.D. & Bussey, T.J. (2005) Hippocampal lesions that abolish spatial maze performance spare object recognition memory at delays of up to 48 hours. *Hippocampus*, **15**, 347-355.
- Gaskin, S., Tradif, M., Cole, E., Piterkin, P., Kayello, L. & Mumby, D.G. (2010) Object familiarization and novel-object preference in rats. *Behavioural Processes*, **83**, 61-71.

- Gaskin, S., Tremblay, A. & Mumby, D.G. (2003) Retrograde and anterograde object recognition in rats with hippocampal lesions. *Hippocampus*, **13**, 962-969.
- Haijima, A. & Ichitani, Y. (2012) Dissociable anterograde amnesic effects of retrosplenial cortex and hippocampal lesions on spontaneous object recognition memory in rats. *Hippocampus*, **22**, 1868-1875.
- Hammond, R.S., Tull, L.E. & Stackman, R.W. (2004) On the delay-dependent involvement of the hippocampus in object recognition memory. *Neurobiology of Learning and Memory*, **82**, 26-34.
- Jo, Y.S. & Choi, J.S. (2014) Memory retrieval in response to partial cues requires NMDA receptor-dependent neurotransmission in the medial prefrontal cortex. *Neurobiology of Learning and Memory*, **109**, 20-26.
- Kawabe, K., Ichitani, Y. & Iwasaki, T. (1998) Effects of intrahippocampal AP5 treatment on radial-arm maze performance in rats. *Brain Research*, **781**, 300-306.
- Liu, X., Ramirez, S., Pang, R.T., Puryear, C.B., Govindarajan, A., Deisseroth, K. & Tonegawa, S. (2012) Optogenetic stimulation of a hippocampal engram activates fear memory recall. *Nature*, **484**, 381-385.
- Lopez, J., Gamache, K., Schneider, R. & Nader, K. (2015) Memory retrieval requires ongoing protein synthesis and NMDA receptor activity-mediated AMPA receptor trafficking. *The journal of Neuroscience*, **35**, 2465-2475.
- Monaghan, D.T. & Cotman, C.W. (1985) Distribution of N-Methyl-D-aspartate-sensitive L-[³H]Glutamate-binding sites in rat

- brain. *Journal of Neuroscience*, **5**, 2909-2919.
- Monyer, H., Sprengel, R., Schoepfer, R., Herb, A., Higuchi, M., Lomeli, H., Burnashev, L., Sakmann, B. & Seeburg, P.H. (1992) Heteromeric NMDA receptors: Molecular and function of subtypes. *Science*, **256**, 1217-1221.
- Morris, R.G.M., Anderson, E., Lynch, G.S. & Baudry, M. (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature*, **319**, 774-776.
- Morris, R.G.M., Garrud, P., Ascher, J.N.P. & O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, **297**, 681-683.
- Morris, R.G.M., Halliwell, R.F. & Browery, N. (1989) Synaptic plasticity and learning II: do different kinds of plasticity underlie different kinds of learning? *Neuropsychologia*, **27**, 41-59.
- Mumby, D.G., Tremblay, A., Lecluse, V. & Lehmann, H. (2005) Hippocampal damage and anterograde object-recognition in rats after long retention intervals. *Hippocampus*, **15**, 1050-1056.
- Mumby, D.G., Gaskin, S., Glenn, M.J., Schramak, T.E. & Lehman, H. (2002) Hippocampal damage and exploratory preferences in rats: memory for objects, place, and contexts. *Learning & Memory*, **9**, 49-57.
- Murray, E.A. & Richmond, B.J. (2001) Role of perirhinal cortex in object perception, memory, and associations. *Current Opinion in Neurobiology*, **11**, 188-193.
- Nakazawa, K., Quirk, M.C., Chitwood, R.A., Watanane, M., Yeckel, M.F., Sun, L.D., Kato, A., Carr, C.A., Johnston, D., Wilson, M.A. & Tonegawa, S. (2002) Requirement for hippocampal CA3 NMDA receptors in

- associative memory recall. *Science*, **297**, 211-218.
- Nilsson, M., Hansson, S., Carlsson, A. & Carlsson, M.L. (2007) Differential effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 on different stages of object recognition memory in mice. *Neuroscience*, **149**, 123-30.
- Ohara, S., Sato, S., Tsutsui, K., Witter, M.P. & Iijima, T. (2013) Organization of multisynaptic inputs to the dorsal and ventral dentate gyrus: retrograde trans-synaptic tracing with rabies virus vector in the rat. *PLOS ONE*, **8**, e78928.
- Oliveria, A.M., Hawk, J.D., Abel, T. & Haveles, R. (2010) Post-training reversible inactivation of the hippocampus enhances novel object recognition memory. *Learning & Memory*, **17**, 155-160.
- Olton, D.S. & Papas, B.C. (1979) Spatial memory and hippocampal function. *Neuropsychologia*, **17**, 669-682.
- Paxinos, G. & Watson, C. (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 4th ed. San Diego: Academic Press.
- Rampon, C., Tang, Y.P., Goodhouse, J., Shimizu, E. & Kiyin, M. Tsien Jr. (2000) Enrichment induces structural changes and recovery from nonspatial memory deficits in CA1 NMDAR1-knockout mice. *Nature Neuroscience*, **3**, 238-244.
- Sannino, S., Russo, F., Torromino, G., Pendolino, V., Calabresi, P. & Leonibus, E.D. (2012) Role of the dorsal hippocampus in object memory load. *Learning and Memory*, **19**, 211-218.
- Schlesiger, M.I., Cressey, J.C., Bublil, B., Koenig, J., Melvin, N.R., Leutgeb, J.K. & Leutgeb, S. (2013) Hippocampal activation during the

- recall of remote memories in radial maze tasks. *Neurobiology of Learning and Memory*, **106**, 324-333.
- Scoville, W.B. & Milner, B. (1957) Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *Neurosurgery & Psychiatry*. **20**, 11-21.
- Stanley, E.M., Wilson, M.A. & Fadel, J.R. (2012) Hippocampal neurotransmitter efflux during one-trial novel object recognition in rats. *Neuroscience Letters*, **511**, 38-42.
- Steele, R.J. & Morris, R.G.M. (1999) Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. *Hippocampus*, **9**, 118-36.
- 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.
- Tanaka, K.Z., Pevzner, A., Hamidi, A.B., Nakazawa, Y., Graham, J. & Wiltgen, B.J. (2014) Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval. *Neuron*, **84**, 347-354.
- Wartman, B.C., Gabel, J. & Holahan, M.R. (2014) Inactivation of the anterior cingulate reveals enhanced reliance on cortical networks for remote spatial memory retrieval after sequential memory processing. *PLoS One*, **9**, e108711.
- Winters, B.D. & Bussey, T.J. (2005a) Transient inactivation of perirhinal cortex disrupts encoding, retrieval, and consolidation of object recognition memory. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 52-61.
- Winters, B.D. & Bussey, T.J. (2005b) Glutamate receptors in perirhinal cortex mediate encoding, retrieval, and consolidation of object

- recognition memory. *The Journal of Neuroscience*, **25**, 4243-4251.
- Winters, B.D., Forwood, S.E., Cowell, R.A., Saksida, L.M. & Bussey, T.J. (2004) Double dissociation between the effects of peri-postrhinal 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.
- Yamada, K., Ueno, M., Takano, E. & Ichitani, Y. (2014) Retrieval-induced forgetting in rats. *Animal Cognition*, **17**, 1407-1411.
- Yamada, K., Shimizu, M., Kawabe, K. & Ichitani, Y. (2015) Hippocampal AP5 treatment impairs both spatial working and reference memory in radial maze performance in rats. *European Journal of Pharmacology*, **758**, 137-141.
- Yoshihara, T. & Ichitani, Y. (2004) Hippocampal *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated encoding and retrieval process in spatial working memory: Delay-interposed radial maze performance in rats. *Neuroscience*, **129**, 1-10.
- de Lima, M.N.M., Laranja, D.C., Bromberg, E., Roesler, R. & Schröder, N. (2005) Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behavioural Brain Research*, **156**, 139-143.
- de Lima, M.N.M., Luft, T., Roesler, R. & Schröder, N. (2006) Temporary inactivation reveals an essential role of the dorsal hippocampus in consolidation of object recognition memory. *Neuroscience Letters*, **405**, 142-146.
- 高野越史, 山田一夫, 一谷幸男 (2012) ラットの放射状迷路行動における作業

記憶と参照記憶に対する NMDA 受容体遮断薬 MK-801 の効果. Tsukuba
Psychological Research, **44**, 17-22.

謝辞

本博士論文を書き上げるまでに、非常に多くの方々のお世話になりました。この場を借りて深く感謝申し上げます。一谷幸男先生には、実験の計画から手続き、論文の作成に至るまで、事細かくご指導いただきました。特に投稿論文の作成には、ご多忙の中多くの時間をいただきました。明確な文章で、信頼のおける論文を書き上げる大切さ、そして難しさを学ぶことができました。誠にありがとうございました。山田一夫先生には、大学入学から卒業論文指導を経て、この博士論文を仕上げるまで非常に長い間お世話になりました。また、山田先生には研究生活の中で幅広くお付き合い頂けました。ほとんど毎年同行させて頂いたアメリカの神経科学会は毎回非常に刺激的で、研究にとどまらない様々な経験をすることができました。非常に感謝しております。お二人の先生方に気にかけて頂き、非常に恵まれた環境で研究を行うことができたと実感しております。古家さん、新倉さん、梶田さん、角さん、小澤さん、領家さんの先輩方には常に温かく見守って頂きました。研究の進み具合を気にかけて頂き、共にお酒を飲み、長い時間を共に過ごしてきました。それらすべてがとても大切な経験であったと思います。また、現在の一谷研の後輩である畠山君、上野君、藤井さん、杉浦さん、その他研究室で共に過ごした皆様との時間が、今日の自分を支えているものと今あらためて感じます。私は、この博士論文を仕上げた時点で一度研究の世界を離れ、一般の企業で働く道を選びました。しかし、学術系展示会の運営を行う仕事であるため、これまでお世話になった皆様とまたどこかで共に仕事をするところがあるかもしれません。学会の場でお会いするようなことがありましたら、その際はなにとぞよろしくお願ひいたします。