

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26590180

研究課題名(和文)統合失調症モデルラットにおける虚連合記憶 動物の「妄想」研究の基礎として

研究課題名(英文)False associative memory in a rat model of schizophrenia: as an initial study in 'delusion' in animals

研究代表者

川辺 光一 (Kawabe, Kouichi)

大阪市立大学・大学院文学研究科・准教授

研究者番号：30336797

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、統合失調症に認められる妄想の認知的基盤に誤った連合記憶(虚連合記憶)があるという仮定に基づき、統合失調症モデル動物(NMDA受容体拮抗薬投与ラット)に虚連合記憶が生じるかどうかを調べた。虚連合記憶テストに用いる嗅覚刺激を選別するための行動テストを行ったのち、NMDA受容体拮抗薬のMK-801によって虚連合記憶が生じるかどうかを調べた。虚連合記憶テストでは、自発的物体再認テストの手法を嗅覚刺激と物体刺激からなる複合刺激に適用した。以前に経験していない複合刺激の探索が少なくなる傾向を虚再認記憶に相当する現象と仮定したが、MK-801投与はこのような現象を引き起こさなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, based on the hypothesis that false associative memory (FAM) is a cognitive basis of delusion in schizophrenia, it was examined whether rats treated with an NMDA receptor antagonist, an animal model of schizophrenia, had such a kind of memory. To begin with, behavioral tests to select the odor stimuli used in the following FAM test were conducted. Following this, it was examined whether an NMDA receptor antagonist MK-801 produced FAM. In the FAM test, the procedure of the spontaneous object recognition test was applied for the compound stimuli consisted of the odor and the object stimuli. Although it was assumed that FAM was less exploration of the compound stimulus that was unfamiliar for rats, MK-801 treatment did not produce such a phenomenon.

研究分野：生理心理学

キーワード：虚連合記憶 妄想 統合失調症 動物モデル ラット

1. 研究開始当初の背景

統合失調症は幻覚・妄想などの異常体験を主症状とする精神疾患である。その症状は、幻覚、妄想、滅裂思考、興奮、緊張症状などの陽性症状と、社会性の低下、自閉、感情・発話の貧困化などの陰性症状に分類されることがある。また、統合失調症の発症メカニズムの解明、抗精神病薬のスクリーニングなどを目的として数々の統合失調症動物モデルが開発されている。同時に、これらの動物モデルに対しその表面的妥当性を評価するために数々の行動テストが実施されている。妄想や幻覚は統合失調症における陽性症状の代表的な症状であり、かつこの疾患において最も特徴的な症状である。しかしこれらの症状は主に言語を介して判定されるため、動物がこれらの症状を有するかを判定することは極めて難しい。したがって、統合失調症の動物モデルにおいては陽性症状の指標として一般活動性の増加や常同行動などの興奮性、緊張性の症状が妄想や幻覚に代わるものとして調べられることが多い。このように動物実験においてはほとんど無視されてきたといってもいい妄想・幻覚という症状のうち、本研究では動物の「妄想」に着目した。妄想が発達していく段階で周囲の全く無関係な出来事を自らの妄想の中に組み込んでいくという過程が見られる。言いかえると、本来無関係なエピソードが妄想の中のエピソードと誤った連合を形成するのだと考えることができる。また、妄想を有する統合失調症患者がこれを有しない患者や健常者に比べ、本来経験していない事象についての記憶（虚記憶）が顕著に認められるとする研究が近年いくつか報告されている(e.g., Bhatt et al., 2010)。

2. 研究の目的

上記の知見をふまえ、本研究では妄想の認知的過程の一つとして誤った連合記憶（虚連合記憶）を仮定した。フェンサイクリジンやケタミンのような NMDA (*N*-methyl-D-aspartate)型グルタミン酸受容体拮抗薬はヒトにおいて幻覚や妄想のような統合失調症の陽性症状と類似した症状を引き起こすことが知られている。そこで、本研究では NMDA 受容体拮抗薬の一種である MK-801 を投薬した動物において虚連合記憶が生じるかどうかを検証することを目的とした。

同時に、統合失調症動物モデルとしての可能性が示唆される新生仔期 NMDA 受容体拮抗薬(MK-801)反復投与ラットの行動特性についても調べた。これらのラットが統合失調症モデルとして妥当であるということが確認できれば、上述のような虚連合記憶テストへの研究対象として応用することも期待できる。

3. 研究の方法

(1) 虚連合記憶テストにおいて用いる嗅覚刺激の選別

虚連合記憶テストにおいて用いる嗅覚刺激を選択するために、多くの行動テストを実施したが、ここでは最終的に採用された嗅覚刺激に関わる実験結果について述べる。

嗅覚刺激の弁別テスト：恐怖条件づけの手続きを用いて

恐怖条件づけの手続きを用いた虚連合記憶テストの予備実験として、無条件刺激(US: 電撃)と対提示した嗅覚刺激(CS+)に対する恐怖反応と、US との対提示を行わず単独で提示された嗅覚刺激(CS-)に対する恐怖反応の間に差が認められるかどうかを調べた。CS-提示時よりもCS+提示時の方が恐怖反応が大きかった場合はCS+とCS-を弁別できたということを示し、この恐怖条件づけにおいて嗅覚刺激を弁別刺激として用いることが可能であるということを示唆する。

嗅覚刺激にはベンズアルデヒドとサリチル酸メチルを用いた。嗅覚刺激はこれらのいずれかを染み込ませた紙タオルを装置内に置くことにより、試行中に常時提示されていた。CS+条件ではラットを装置内に入れた後、148秒後にUSを2秒間与えた。CS-条件ではこのUSは与えられなかった。CS+条件とCS-条件を1日に1回ずつ、3日間行った。各条件ともに、2、3日目の試行開始から148秒後までの装置内でのすみ反応（恐怖反応）を示した時間を測定し、それを条件づけの指標とした。

自発的物体再認テストの手続きを応用した虚連合記憶テストの開発を目指して

-1 嗅覚刺激の選好性テスト

虚連合記憶テストで用いる候補として嗅覚刺激のペア（ヘキサノール、酢酸イソペンチル、ベンズアルデヒド-シナムアルデヒド、シネオール-サリチル酸メチルの6種類、3ペア）について、選好性の差が生じない組み合わせを選定するための選好性テストを行った。同一の4物体のうち2つに嗅覚刺激ペアのうち一方を塗布し、残る2つにもう一方の嗅覚刺激を塗布した。これらの物体をオープンフィールド内に置き、ラットにこれらの物体を5分間自由に探索させた。この試行を3回繰り返した。これらの試行における各物体への探索時間を測定した。

-2 嗅覚刺激の弁別テスト

自発的物体再認テストはラットやマウスの頭在記憶能力を調べるのに使われる行動テストである(e.g., Ennaceur et al., 1997)。このテストは、ラットやマウスが既知の物体よりも未知の新奇物体を探索する傾向があることを利用した課題であり、既知物体への探索

時間に比し新奇物体への探索時間が長い場合が既知物体をよく記憶しているということになる。本実験では、虚連合記憶テストの予備実験としてラットの嗅覚刺激に対する弁別能力を調べるために、この手続きを嗅覚刺激に対する再認テストに応用した。すなわち、既知の嗅覚刺激よりも新奇な嗅覚刺激に対する探索時間が長いということを実験した。

-1 で選好性の差が認められなかったヘキサノール-酢酸イソペンチル、ベンズアルデヒド-シナムアルデヒドの嗅覚刺激ペアのそれぞれについて、後の虚連合記憶テストと同様の自発的物体再認テストに準じた手続きによって、ラットの嗅覚刺激の弁別能力を検出することができるかどうかを調べた。

このテストは見本期とテスト期からなっていた。見本期では、嗅覚刺激のペアのうち一方の刺激を塗布した4つの同一物体をオープンフィールド上に置き、ラットにこれらを5分間自由探索させた。この試行は3回繰り返された。その24時間後に行われたテスト期では、見本期と同じ4つの物体のうち2つに見本期と同じ嗅覚刺激 (= 既知刺激) を、残りの2つに刺激ペアのもう一方の刺激 (= 新奇刺激) を塗布した。これらの物体を見本期同様に5分間自由探索させ、各物体への探索時間を測定した。

(2) MK-801 投与ラットにおける虚連合記憶：自発的物体再認テストの手続きを応用して

ここでは(1) -2 で用いた手続きを物体刺激と嗅覚刺激からなる複合刺激に適用し、MK-801 を投与した場合においてこの2種類の刺激の間に虚連合記憶が生じるかどうかを調べた。

ここでのテストは見本期、干渉刺激提示期、テスト期の3つのフェーズからなっていた。見本期では、オープンフィールド内で嗅覚刺激 X を塗布した4つの物体 A を5分間提示した。この試行は3回行われた。その30分後に行われた干渉刺激提示期ではケージ内で嗅覚刺激 y を2分間提示した。24時間後に生理食塩水(SAL)、もしくは MK-801 (0.1, 0.2 mg/kg)を腹腔内投与し、その15分後にテスト期の試行を開始した。テスト期では、見本期で提示した既知物体 A と新たな物体 b の2種類を2つずつ用意し、それぞれに嗅覚刺激 X もしくは嗅覚刺激 y のいずれかを塗布した複合刺激を用いた。この4種類の複合刺激 (AX、Ay、bX、by) をオープンフィールド内で同時に5分間提示した。この4種類の刺激のうちラットが見本期においてオープンフィールド内で経験したのは物体 A と嗅覚刺激 X の組み合わせであるため、通常はこの複合刺激 AX を既知の刺激とみなしこれに対する探索時間が他に比べ低下するものと思われる。一方、虚連合記憶が生じた

場合は、見本期で提示した刺激 A と干渉刺激提示期で提示した嗅覚刺激 y の間にも連合を作り、Ay という未経験の組み合わせの刺激に対しても探索時間が低下することが考えられる。複合刺激 bX、by に対しては物体刺激 b が全くの新奇刺激であるため、これに対する虚連合は生じにくいと考えた。嗅覚刺激には、(1) -2 においてラットが弁別可能であるということが示唆されたヘキサノールメチルと酢酸イソペンチルのペアを用いた。

(3) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの行動特性

MK-801 14日間投与の効果

新生仔期 MK-801 投与ラットについて、プレパルス抑制 (prepulse inhibition; PPI)、自発的交替テスト、オープンフィールドテスト、強制水泳テストによってその行動特性を調べた。SAL、もしくは MK-801 (0.2, 0.4 mg/kg) を7~20日齢時に1日2回皮下投与した。上記の行動テストは10~12週齢時より行われた。

PPI テストは感覚運動ゲーティング機能を測定するために行われた。パルス試行ではパルス刺激 (105 dB) のみを与えた。プレパルス試行では、パルス刺激の40 ms 前にプレパルス刺激 (80, 85, 90, 95 dB のいずれか) を与えた。パルス試行、プレパルス試行ともに20試行ずつ行い、いずれの試行においてもパルス刺激終了直後より100 ms にわたり驚愕反応を測定した。70 dB のバックグラウンドノイズがセッションを通じて提示されていた。感覚運動ゲーティング能力の指標として PPI 値を以下の式によって算出した。

$$PPI = 1 - \frac{\text{プレパルス試行の驚愕反応の平均値}}{\text{パルス刺激の驚愕反応の平均値}}$$

自発的交替テストは作業記憶能力を測定するために行われた。3方向迷路の直線走路部と目標箱のうちの2つを選択肢とし、ラットを迷路中央に置きこの3つの選択肢を10分間にわたり連続的に自由に選択させた。直前2回の選択の両方と異なる選択肢を選択した場合を自発的交替とみなし、作業記憶能力の指標とされる自発的交替率を以下の式により算出した。

$$\text{自発的交替率} = \frac{\text{自発的交替数}}{(\text{総選択数} - 2)}$$

オープンフィールドテストは一般活動性を調べるために行われた。5分間にわたり移動活動量、立ち上がり反応数を計測した。

強制水泳テストでは水を張った強制水泳プール内にラットを投入し、15分間にわたり遊泳させた。ストレス対処能力の指標として無動時間を測定した。

MK-801 5日間投与の効果

薬物投与期間を7~21日齢時に設定し、この間にSAL、もしくはMK-801(0.2 mg/kg)を1日2回皮下投与した。前期群は7~11日齢時、中期群は12~16日齢時、後期群は17~21日齢時にMK-801を投与した。これらの群についてはMK-801投与期間以外の薬物投与期間はSALを投与した。別途、薬物期間中のすべての日にSALを投与したSAL群を設けた。それ以外の手続きはと同様であった。

強制水泳ストレス慢性負荷の効果

統合失調症のtwo-hit仮説は、遺伝的もしくは発達初期の有害な要因(first hit)に基づいた脳の脆弱性が統合失調症発症の前提にあり、このような脆弱性がその後の青年期や成体期における後天的な有害因子(second hit)に対する脆弱性を招くと考えている。この仮説に基づくと、first hitの影響を受けた個体は、second hit曝露が引き金となり統合失調症を発症すると考えられる。このようなsecond hit因子の一つとしてストレスが考えられる。ここでは、新生仔期MK-801反復投与ラットがtwo-hit仮説で仮定されるようなストレスに対する脆弱性を有するかどうかを検討した。

SAL、もしくはMK-801(0.2 mg/kg)を7~20日齢時に1日2回皮下投与したラットについて、強制水泳ストレスを56日齢時より20日間(週5日×4週間)負荷した。ストレス負荷を終了した翌日より、と同様の行動テストを行った。

幼若期における行動特性

統合失調症は青年期に発症することが多いため、動物モデルにおいても行動障害の発生時期が問題とされることがある。そこで、で障害が認められたPPIおよび強制水泳テストについて、幼若期においても異常が認められるかどうかを調べた。

SALもしくはMK-801(0.2 mg/kg)を7~20日齢時に1日2回皮下投与したラットに、21日齢時からPPIおよび強制水泳テストを実施した。PPIのプレパルス刺激は85、90 dBのみを用いた。他の手続きはに準じた。

4. 研究成果

(1) 虚連合記憶テストにおいて用いる嗅覚刺激の選別

嗅覚刺激の弁別テスト：恐怖条件づけの手続きを用いて

ベンズアルデヒドとサリチル酸メチルのいずれをCS+にした場合においても、CS+、CS-のいずれにおいても強い恐怖反応を示した。これは今回用いた手続きでは、嗅覚刺激の弁別能力を調べることは困難であることを示唆するものであった。このため、恐怖条件づけの手続きを利用したテストについては中断し、以降は自発的物体再認テストの手

続きを応用したテストを中心に実験を行った。

自発的物体再認テストの手続きを応用した虚連合記憶テストの開発を目指して

-1 嗅覚刺激の選好性テスト

ヘキサン酸メチル-酢酸イソペンチル、ベンズアルデヒド-シナムアルデヒドのペアについては嗅覚刺激の違いによる有意な探索時間の差が認められなかったのに対し、シネオール-サリチル酸メチルのペアについてはサリチル酸メチルを塗布した物体に対する探索時間が有意に長かった。したがって、このペアについてはサリチル酸メチルに対してより選好性が強いということが示唆された。

選好性の違いが認められたシネオール-サリチル酸メチルのペアについては、選好性の違いが成績に影響を及ぼす可能性があるため、以下の実験では用いなかった。

-2 嗅覚刺激の弁別テスト

テスト期における探索率(=新奇刺激に対する探索時間/すべての物体に対する探索時間)を算出したところ、ヘキサン酸メチル-酢酸イソペンチルのペアにおいてはテスト開始から2分時まで、および3分までにおける探索時間がランダムレベル(=50%)より有意に長かった。ベンズアルデヒド-シナムアルデヒドのペアについてはどの時間帯の探索率においてもランダムレベルとの有意な差は認められなかった。これらの結果は、ヘキサン酸メチル-酢酸イソペンチルの2種類の刺激をラットが弁別でき、この弁別能力を今回の実験手続きで検出可能であるということを示唆している。一方、ベンズアルデヒド-シナムアルデヒドのペアについては、今回の手続きでは弁別能力を検出できない、あるいはラットがこの2つの刺激を弁別するのが困難であるということを示唆する。このため、次の実験(2)では嗅覚刺激としてヘキサン酸メチル-酢酸イソペンチルのペアを用いた。

(2) MK-801投与ラットにおける虚連合記憶：自発的物体再認テストの手続きを応用して

テスト期における探索率(=各複合刺激に対する探索時間/すべての物体に対する探索時間)を算出したところ、4つの複合刺激に対する探索率において、薬物条件による違いは認められなかった。したがって、MK-801投与によって虚連合記憶に相当する現象は引き起こせなかった。また、複合刺激の違いによる探索率の差も認められなかったため、今回行った行動テストの手続き自体が虚連合記憶を調べるのに適していなかった可能性がある。

しかしながら、1分ごとにそれまでの探索

時間の累積値をもとにして探索率の分析を行ったところ、MK-801 0.2 mg/kg 群において、複合刺激 Ay (既知物体刺激-干渉嗅覚刺激の組み合わせ) の探索率がランダムレベル (= 25 %) より有意に低い時間帯が存在した。これは MK-801 が虚連合記憶を引き起こすという仮説に一致する変化である。

(3) 新生仔期 MK-801 反復投与ラットの行動特性

MK-801 14 日間投与の効果

MK-801 0.2, 0.4 mg/kg 投与群は SAL 群に比べ有意に PPI 値が低かった ($p < .01$)。また、MK-801 0.2, 0.4 mg/kg 投与群は SAL 群に比べ強制水泳テストにおける無動時間が有意に短かった ($p < .01$)。自発的交替テスト、オープンフィールドテストにおける指標については有意な差は認められなかった。

これらの結果は新生仔期 MK-801 投与ラットが成体期に及ぶまでの長期にわたり、感覚運動ゲーティング機能やストレス対処方略に異常を持つことを示唆する。

また、自発的交替率において、SAL 群のみがランダムレベル (= 50 %) より有意に高い値を示した。これは、MK-801 を投与した 2 群の作業記憶能力が SAL 群よりも低いということを示唆する。

MK-801 5 日間投与の効果

いずれの指標においても、薬物条件による有意な差は認められなかった。この結果は、新生仔期 MK-801 投与による行動障害は、薬物投与をある程度長期にわたって行った場合にのみ生じるということを示唆している。

しかしながら自発的反応率について、後期群のみランダムレベル (= 50 %) より有意に高い傾向が認められた一方で ($p < .05$)、他の 3 群についてはこのような傾向は認められなかった。この結果は、後期群が他の群より作業記憶能力において優れていることを示唆するものである。この結果については予想していなかったものであり、その原因は明らかではないが、MK-801 投与によって NMDA 受容体が適度に up-regulation したことによる可能性がある。

強制水泳ストレス慢性負荷の効果

強制水泳ストレスを負荷したラットは、強制水泳テストにおいて無動時間が延長する傾向にあったが、MK-801 を投与したラットはこの傾向が有意に抑制された ($p < .01$)。これは、MK-801 投与ラットがストレス刺激に対して敏感であることを示唆している。したがって、これらのラットは two-hit 仮説で仮定される second hit に対する脆弱性を有している可能性が示唆された (Kawabe, in press)。

幼若期における行動特性

MK-801 群は SAL 群よりも強制水泳テスト

における無動時間が有意に短かった ($p < .01$)。一方、PPI については群間に有意な差は認められなかった。したがって、ストレス対処能力については幼若期から異常が生じているのに対し、感覚運動ゲーティングは幼若期では障害が認められないということが示唆される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Kawabe, K. (in press) Effects of chronic forced-swim stress on behavioral properties in rats with neonatal repeated MK-801 treatment. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

Kawabe, K. Effects of chronic forced-swim stress on behavioral properties in rats with neonatal repeated MK-801 treatment. 日本動物心理学会第 75 回大会、2014 年 7 月 20 日、犬山国際観光センター フロイデ (愛知県犬山市)

Kawabe, K. Effects of repeated corticosterone administration on behavioral properties in rats with neonatal repeated MK-801 treatment. 日本動物心理学会第 75 回大会、2015 年 9 月 11 日、日本女子大学目白キャンパス (東京都文京区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川辺 光一 (KAWABE, Kouichi)

大阪市立大学・大学院文学研究科・准教授
研究者番号: 30336797