

資料

ボイス刺激を用いたマーモセットの 認知機能を検討するシステムの開発

彦坂和雄^{*1} 難波文恵^{*2}

要 約

コモンマーモセット (*C. jacchus*) におけるボイスコミュニケーションの重要性を検討するため、我々はマーモセットのボイス刺激 (phee call, chatter call, squeal call, tsik call, and twitter call)、非マーモセットのボイス刺激 (犬とニホンザルのボイス)、反応ボタン、干し芋を用いて、Go/Nogo 課題ができるシステムを開発した。マーモセットのボイスを Go 試行として提示し、非マーモセットのボイスを Nogo 試行として提示した。Go 試行では、マーモセットはマーモセットのボイスが提示されるとすばやくボタンを押せば報酬として干し芋を与えた。Nogo 試行では、マーモセットは非マーモセットのボイスが提示されるとボタン押しをせずに、その後に提示されるマーモセットのボイス提示時すばやくボタン押しをすれば報酬として干し芋を与えた。我々は1頭のマーモセットに Go 試行 60%, Nogo 試行 40% 割合の課題を訓練した。49日目にマーモセットは学習でき、5日連続で80% 以上の正答率を示した。このシステムはマーモセットのボイスコミュニケーションに関する認知機能を研究する有用なシステムになるであろう。

1. はじめに

ヒトの脳機能を調べる研究では、さまざまな感覚の中で視覚が一番重要であると考えられ、また脳には多くの視覚関連領域があること¹⁾から、視覚機能(特に知覚機能と認知機能)について多くの研究が行われてきた。そして視覚機能の神経基盤を理解するために、動物を用いて特定部位の脳神経細胞の活動と行動を関連付けて研究が行われてきた。動物を用いて特定部位の脳神経細胞の活動を研究する際、次の点が重要である。動物の脳マップができていること、そして脳の摘除効果を調べる神経心理学的実験や神経細胞活動を調べる神経生理学的実験が広く研究されていることである。また、動物を用いて行動を研究する際、動物が行動の基盤にある学習ルールを理解でき²⁾、記憶^{3,4)}、報酬の予測^{5,6)}といった内的側面を表象できる知能を持つことである。これらの関連付けを研究する霊長類動物モデルとして最も用いられているのはマカクザルである。しかし、マカクザルがヒトの霊長類動物モデルにはならない点もある。ヒトでは視覚機能以外に言語によるコミュニ

ケーションが発達しているが、マカクザルは個体間のコミュニケーションを取る際には、単独の視覚情報あるいは聴覚情報でなく、異種感覚(視覚と聴覚)情報が使用されていると考えられ、この点について研究が行われている⁷⁾。

一方、コモンマーモセット (*C. jacchus*) は体重が400g程度、体長が40cmの小型の霊長類であり神経科学の分野で魅力的な動物である。最近の神経科学研究分野では、ヒトの病気、感染症、再生医療、加齢の霊長類動物モデルとしてマーモセットが使用されている⁸⁻¹¹⁾。また、マーモセットでも脳マップが作成されており、脳の摘除効果を調べる神経心理学的研究も広く研究されている¹²⁾。最大の特徴は、野生のマーモセットは豊富なボイスを持つ^{13,14)} ことであり、マーモセットはヒトの聴覚やボイスを用いたコミュニケーションを研究するための重要な動物モデルである^{15,16)}。聴覚に関して麻酔下あるいは無麻酔下の条件で、ボイスや他の聴覚刺激を用いて大脳皮質聴覚野における単一神経細胞活動が調べられている^{17,18)}。しかし、無麻酔科下でボイス刺激を用

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 感覚矯正学科

*2 川崎医療福祉大学大学院 感覚矯正学専攻

(連絡先) 彦坂和雄 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

E-mail : hikosaka@mw.kawasaki-m.ac.jp

いてマーモセットの認知機能に関連した神経細胞活動を調べた研究論文はほとんどない。また、マカザルの認知機能に関与する神経基盤を検討する研究では、弁別学習課題、遅延見本合わせ課題あるいはGo/Nogo 課題などが用いられている²⁾。この課題のなかで、Go/Nogo 課題は行動の抑制を検討できる代表的な課題であり、この課題の遂行には前頭前皮質の重要性が指摘され、背外側前頭前皮質を切除したサルにGo/Nogo 課題を行わせると、Nogo 試行におけるエラーが増えることが知られている¹⁹⁾。

本研究はマーモセットの認知機能に関する神経基盤を研究する目的で、ボイス刺激を用いたGo/Nogo 課題をマーモセットに行わせるためのシステム開発を検討した。

2. 方法

用いた動物はマーモセット1頭（雄、体重350g、3才齢）である。7種のボイス刺激を用いた。内訳は、マーモセットの5種類のボイス（Voice 1<Phee call>：遠くにいる仲間への合図、Voice 2<Twitter call>：近くにいる仲間への合図、Voice 3<Squeal

call>：子供の甘えた声、Voice 4<Tsik call>：警戒する合図、Voice 5<Chatter call>：キャッキャッ鳴く）、と日本ザルと犬のボイスである。それぞれのボイスは実験室内でICレコーダーを用いて録音し、ソフト（Audition 3, Adobe）で編集し、最大音圧を同じレベルに編集した。それぞれの音声のサウンドスペクトログラムを図1に示している。

反応ボタンとシャッターを備え付けたモンキージェア（1-CMP：小原医科産業）にマーモセットを座らせ、60cm眼前に12インチのディスプレイと2台のスピーカーを置いた。

予備訓練として、チェアに座らせることから始め、次にボタン押しをすればシャッターが下り、干し芋を手でつまみ、食べることを十分に学習させた後、Go/Nogo 課題を導入した（図2）。ディスプレイ上にスタート合図（Cue）として赤い点を1秒間提示した。Go 試行では、スタート合図終了1秒後にGo 刺激（マーモセットの5種類のボイスの内1種類のボイス）を提示し、動物が3秒以内にボタンを押せばシャッターが下がり報酬として干し芋を与えた。Nogo 試行では、スタート合図終了1秒後にNogo 刺

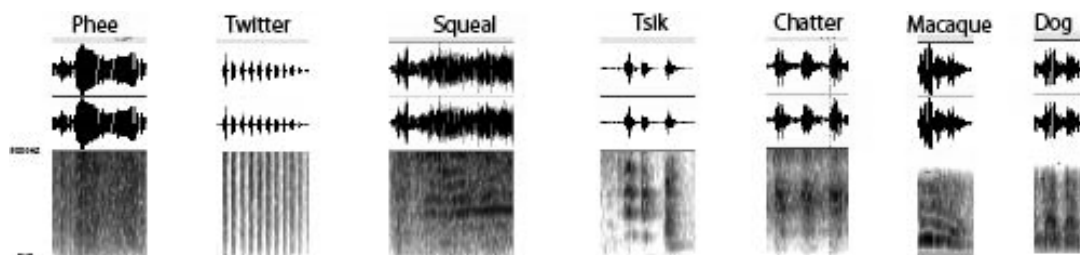


図1 用いた7種類の音声のサウンドスペクトログラム

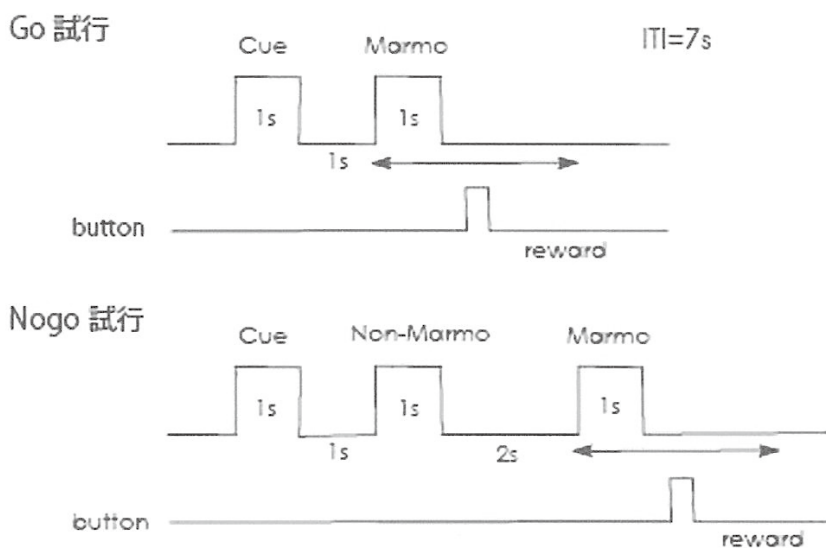


図2 Go/Nogo課題のパラダイム

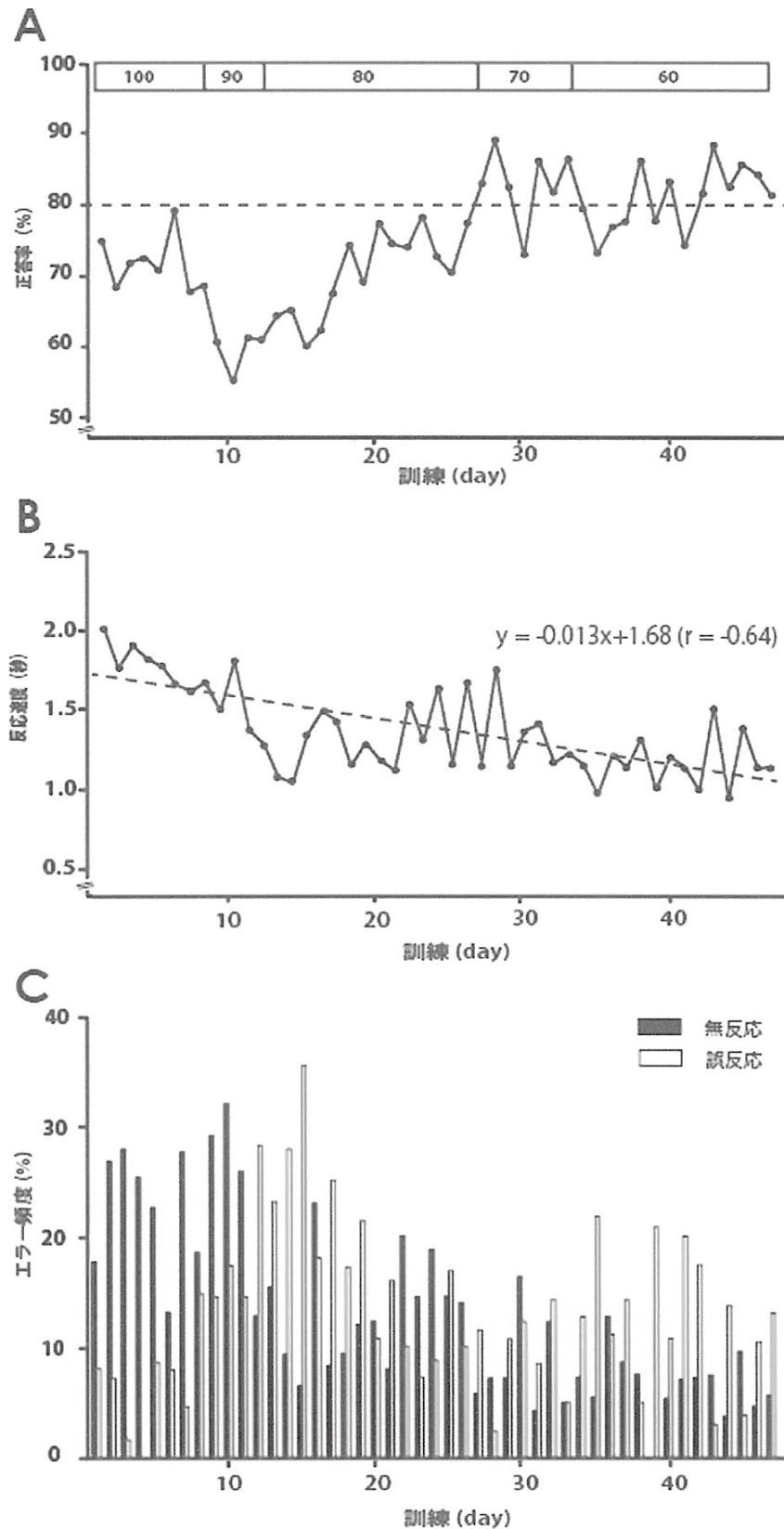


図3 訓練中のデータ

A: 正答率. Go/Nogo課題におけるGo試行の割合を上方の四角で囲んだ数字で表している. 点線は正答率80%の値を示している.

B: 反応速度. 点線は回帰直線を示している.

C: 2種類のエラー (無反応と誤反応) の生起率

激（ニホンザルか犬のボイス）を1秒間提示し、動物が3秒間ボタン押しをしなければGo刺激が1秒間提示され、3秒以内にボタン押しをすればシャッターが下り、干し芋を与えた。Go試行とNogo試行はランダムに提示し、試行間隔（ITI）は7秒である。

Go/Nogo課題の訓練では、はじめに（100% Go刺激）を行い、学習が進むにつれてNogo刺激の割合を10%、20%、30%、40%と割合を増加させた。Nogo試行の割合を40%に増加させ、そして訓練5日連続80%の正答率を超えるまで訓練した。学習が成立までの期間中の正答率、エラー分析、反応速度を検討した。また、提示されたマーモセットの音声間で反応速度に差があるのかを検討した。Nogo試行でのマーモセットの音声に対する反応には音声の弁別以外にも非マーモセットの音声の次にはマーモセットの音声が必要提示されるので（図1）、反射の要因も含まれる可能性がある。そのため、Go試行でのマーモセットの音声に対する反応速度だけを検討した。データの有意差検定にはt検定を用いた。この研究は川崎医科大学・動物実験委員会の承認（07-087）を受けている。

3. 結果

100%Go試行から始め、Nogo試行の割合を増加させ、60% Go - 40% Nogo試行まで行った。8日間の（100% Go試行）では、正答率65.5-78.9%、5日間の（90% Go - 10% Nogo試行）では50.7-58.1%、14日間の（80% Go - 20% Nogo試行）では56.5-82.7%、6日間の（70% Go - 30% Nogo試行）71.4-90.5%、14日間の（60% Go - 40% Nogo試行）では71.7-89.6%であり、訓練を初めてから47日目（60% Go - 40% Nogo試行）を行わせて、正答率80%を連続5日超えた（図3-A）。

反応速度はそれぞれの訓練日の平均の反応時間を示している。訓練1日目では2.016秒であったが、訓練47日目では1.141秒であり、訓練期間中に反応

速度は徐々に減少した。回帰直線と相関係数を求めると、 $y = -0.13x + 1.68$ ($r = -0.64$) であった（図3-B）。

音声間で反応速度に差があるのかを検討した（表1）ところ、Voice 2とVoice 4は他の音声に比べ有意に反応速度は速かった（ $p < 0.01$ ）。

不正解試行には、反応ボタンを押して不正解になった場合（誤反応）と制限時間内にボタンを押さずに不正解になった場合（無反応）の2つのパターンを含む。誤反応と無反応の頻度を比較するために、両者の生起率を比較した（図3-C）。無反応は学習初期（1-12日）には多く見られ、学習が進むにつれて頻度が少なくなっている。一方、誤反応は学習初期（1-7日）では頻度は少なく、いったん増加したのち（10-17日）、学習が進むにつれて頻度は少なくなる傾向がある。2種類の頻度の差を比べてみると学習期間中全体における両者の頻度は差がなかった（ $p > 0.05$ ）。一方、学習期間を前期（1-16日）、中期（17-32日）、後期（33-47日）に分けると、前期と中期では両者の頻度の差はなかった（ $p > 0.05$ ）が、後期では誤反応の割合が有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

4. 考察

4.1 マーモセットの認知機能はボイス刺激を用いた課題で調べることができる

今回の研究では動物をチェアに座らせ、ボタン押し反応と固形報酬を用いて、ボイス刺激を用いた認知課題を学習させることができた。本研究では、使用したマーモセットは1頭であるが、予備訓練として4頭中3頭のマーモセットをチェアに座らせ、ボタン押し行動まで行わせている。マーモセットを椅子に座らせ、ボタン押し行動、そして報酬として干し芋を使う本システムは、マーモセットの学習行動（認知機能や知覚機能）を調べる良いシステムに成り得ると考えられる。

Go試行におけるマーモセットの音声間で反応速

表1 マーモセットの5種の音声刺激に対する反応速度と有意差

	Voice 1	Voice 2	Voice 3	Voice 4	Voice 5
平均(秒) ± SE	1.585 ± 0.036	1.330 ± 0.045	1.586 ± 0.041	1.377 ± 0.043	1.467 ± 0.035
	Voice 1	Voice 2	Voice 3	Voice 4	Voice 5
Voice 1		***		***	*
Voice 2			***		*
Voice 3				***	*
Voice 4					
Voice 5					

平均±標準誤差(秒)。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

度に差が観察された（表1）。5種類の音声の中で、＜Voice 1 (Phee call)＞と＜Voice 2 (Twitter call)＞に着目した。いずれも仲間への合図であるが、近くにいる仲間への合図＜Voice 2＞への反応速度が遠くにいる仲間への合図＜Voice 1＞への反応速度よりも速くなっている。しかも警戒する合図＜Voice 4 (Tsik call)＞に対する反応速度も有意に速かった。危険が迫っている時に近くの仲間合図を送ることがマーモセットの社会的行動に重要であり、これらの音声は情動反応を促す刺激になっているのであろう。短時間に応答する情動反応は、動物の生存する確率を増大させ、天敵から身を隠すのに都合が良いと考えられている²⁰⁾。

サルを用いた認知機能の神経基盤を調べる研究では、動物に課題を行なわせる際、動物にどのような反応を要求し、正解の場合どのような報酬を与えるかを検討する必要がある。マカクザルやマーモセットでは、反応としてボタン押し、レバー運動、眼球運動、リッキング、パネルタッチなどが用いられており、報酬として、液体報酬や個体報酬が用いられている^{2,12)}。われわれはまず初めに液体報酬とレバー反応を検討した。液体報酬を用いるのは1試行あたりの水分量や1日の水分摂取量を調整・管理することができるのでマカクザルを用いた多くの研究で使用されている。マカクザルでは1日300cc程度の水分を摂取するのに対して、マーモセットでは、個体によって飲水量が異なるが、10-30ccである。そのため、1日の飲水量の管理が難しく、摂取量を制限するとすぐに動物は脱水症をおこしてしまった。そのため、報酬は液体報酬を止めて固形報酬とした。固形報酬を用いると、動物が手を伸ばして報酬をつまみ、報酬を口に入れる。動物の体の前方部には広く開ける必要があるため、レバー装置をやめて、ボタン押し反応とした。眼球運動、リッキング、パネルタッチなどの反応は、今回の実験では検討しなかった。

本研究で構築したシステムは、将来的にマーモセットの頭を固定し、単一の神経細胞活動を調べる研究に応用でき、マーモセットに関する新しい研究分野を進める可能性を示した研究である。

4.2 マーモセットを用いた研究の優れた点と問題点

マーモセットの自然界の中で観察される特定の行動が、ヒトでも同様に観察される場合、マーモセッ

トがヒトのその行動の霊長類モデルになる可能性がある。現在、次のマーモセットの2種類の行動がヒトの行動と同様であることが報告されている。第一に特定の興味のある目標物（特に動物の顔）の観察と眼球運動の関連性で、マーモセットは多くのサッケードを利用して特定の興味のある目標物を観察していることが報告された²¹⁾。この機能は能動的視覚機能（Active vision）と呼ばれ、視覚を歩行などの行動を制御するために使われることを意味する。そしてこの機能はヒトでも観察されている²²⁾。

第二の特徴は、野生の動物では夫婦とその子供による家族単位の行動が多く観察され、通常父親が子守を担当する²³⁾。この社会的行動はヒトで観察されているが、マカクザルでは観察されない。マーモセットがこれらの社会的行動に関する神経基盤や神経ネットワークを調べる霊長類モデルになる可能性がある。

一方、マーモセットを用いた研究に問題点も存在した。第一にマーモセットの指の構造である。マーモセットの手はかぎ爪が主体であり、第一指だけが平爪である。かぎ爪の指を使い、物をつかむのが不器用である。今回の研究では大きなボタン（直径20mm）を使用し、手全体でボタンを押せるよう工夫をしている。また、報酬として干し芋を用いたが、指を用いてつまむためにはある程度の大きさ（直径5mm程度）が必要であり、100試行程度で満腹になり1日の試行数が限られてしまった。

第二にマーモセットは神経質な動物であり、飼育していた5頭の内1頭は個別のケージに慣れてくれなかった。他の4頭中1頭はチェアに座ることに慣れず、予備訓練ができなかった。

第三に頭のサイズが小さい（おおよそ前後5cm、左右3cm程度）ことである。神経細胞活動を記録するためにはマカクザルでは頭を固定する部品や電極を駆動させるための部品を頭蓋骨に取り付ける。マーモセットでは頭のサイズが小さいため、これらの部品を取り付けるためには工夫が必要になる。

マーモセットを用いた神経科学的研究は始まったばかりである。マーモセットの行動にはどのような特徴があり、マーモセットがどのような研究分野で霊長類モデルとして用いることができるのかなどこれからの研究の課題である。

謝 辞

この研究を進めるにあたり、理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・生体機能評価研究チーム・尾上浩隆先生と理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・機能構築イメージングチーム横山ちひろ先生に

感謝いたします。

本研究は平成25年度川崎医療福祉研究費の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) Felleman DJ and Van Essen DC : Distributed hierarchical processing in the primate cerebral cortex. *Cerebral Cortex*, 1(1), 1-47, 1991.
- 2) Fuster JM : *The prefrontal cortex*. 5th ed, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 2015.
- 3) Fuster JM and Alexander GE : Neuron activity related to short-term memory. *Science*, 173(3997), 652-654, 1971.
- 4) Funahashi S, Bruce CJ and Goldman-Rakic PS : Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 61(2), 331-349, 1989.
- 5) Watanabe M : Reward expectancy in primate prefrontal neurons. *Nature*, 382(6592), 629-632, 1996.
- 6) Hikosaka K and Watanabe M : Delay activity of orbital and lateral prefrontal neurons of the monkey varying with different rewards. *Cerebral Cortex*, 10(3), 263-271, 2000.
- 7) Perrodin C, Kayser C, Logothetis NK and Petkov C : Auditory and visual modulation of temporal lobe neurons in voice-sensitive and association cortices. *Journal of Neuroscience*, 34(7), 2524-2537, 2014.
- 8) Mansfield K : Marmoset models commonly used in biomedical research. *Comparative Medicine*, 53(4), 383-392, 2003.
- 9) Tardif SD, Mansfield KG, Ratnam R, Ross CN and Ziegler TE : The marmoset as a model of aging and age-related diseases. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 52(3), 386-392, 2011.
- 10) Carrion R Jr and Patterson JL : An animal model that reflects human disease: The common marmoset (*Callithrix jacchus*). *Current Opinion in Virology*, 2(3), 357-362, 2012.
- 11) 't Hart BA, Abbott DH, Nakamura K and Fuchs E : The marmoset monkey: A multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease. *Drug Discovery Today*, 17(21-22), 1160-1165, 2012.
- 12) Mitchell JF and Leopold DA : The marmoset monkey as a model for visual neuroscience. *Neuroscience Research*, 93, 20-46, 2015.
- 13) Wang X : On cortical coding of vocal communication sounds in primates. *Proceeding of the National Academy of Science*, 97(22), 11843-11849, 2000.
- 14) Pistorio AL, Vintch B and Wang X : Acoustic analysis of vocal development in a New World primate, the common marmoset (*Callithrix jacchus*). *The Journal of the Acoustical Society of America*, 120(3), 1655-1670, 2006.
- 15) Miller CT, Mandel K and Wang X : The communicative content of the common marmoset phoe call during antiphonal calling. *American Journal Primatology*, 72(11), 974-980, 2010.
- 16) Wang X : The harmonic organization of auditory cortex. *Frontiers in Systems Neuroscience*, 7, 14, 2013.
<https://doi.org/10.3389/fnsys.2013.00114> (2018.6.28)
- 17) Bendor D and Wang X : The neuronal representation of pitch in primate auditory cortex. *Nature*, 436(7054), 1161-1165, 2005.
- 18) Eliades SJ and Wang X : Chronic multi-electrode neural recording in free-roaming monkeys. *Journal of Neuroscience Methods*, 172(2), 201-214, 2008.
- 19) Iversen SD and Mishkin M : Perseverative interference in monkeys following selective lesions of the inferior prefrontal convexity. *Experimental Brain Research*, 11(4), 376-386, 1970.
- 20) LeDoux JE : Brain mechanisms of emotion and emotional learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 2(2), 191-197, 1992.
- 21) Mitchell JF, Reynolds JH and Miller CT : Active vision in marmosets: A model system for visual neuroscience. *Journal of Neuroscience*, 34(4), 1183-1194, 2014.
- 22) Hayhoe M and Ballard D : Eye movements in natural behavior. *Trends in Cognitive Sciences*, 9(4), 188-194, 2005.
- 23) 谷岡功邦編著, 谷口和之, 藤野健分担執筆 : マーモセットの飼育繁殖・実験手技・解剖組織. アドスリー, 東京, 1996.

(平成30年6月28日受理)

Development of a System for Studying Cognitive Function of the Marmoset Using Voice Stimuli

Kazuo HIKOSAKA and Fumie NANBA

(Accepted Jun. 28, 2018)

Key words : marmoset, cognitive function, voice, system

Abstract

In order to explore the importance of vocal communication system in the common marmoset (*C. jacchus*), we developed a system in which a marmoset performed the Go/Nogo task (cognitive function), using voice stimuli of marmoset (phee call, chatter call, squeal call, tsik call, and twitter call) and those of non-marmoset (dog and Japanese monkey), button, and sweet potato reward. A marmoset call for a Go signal, and a non-marmoset call for a Nogo signal was presented. In go trials, if the marmoset pressed the button after the presentation of marmoset voice, the marmoset could obtain a piece of sweet potato. In Nogo trials, the marmoset should restrain to press the button after the presentation of non-marmoset call. Then, the marmoset pressed button after the presentation of marmoset voice and obtained a reward. We trained a marmoset on the Go/Nogo task with which the ratio of Go and No-go trials were 60:40. At the 49th day, the marmoset could learn the task over the level of 80% correct performance for five days successively. This system may be useful for studying the cognitive function regarding vocal communication.

Correspondence to : Kazuo HIKOSAKA

Department of Sensory Science and Technology

Faculty of Health Science and Technology

Kawasaki University of Medical Welfare

Kurashiki, 701-0193, Japan

E-mail : hikosaka@mw.kawasaki-m.ac.jp

(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.28, No.1, 2018 261 – 267)

