馴化－脱馴化法を用いたメスラットによるオスの性的匂い弁別

金沢大学 近藤佐和・谷内 通

日本医科大学 近藤保彦

Olfactory discrimination of male sexual odor in female rats using habituation-dishabituation paradigm

SAWA KONDO and TOHRU TANIUCHI

Kanazawa University

YASUHIKO KONDO

Nippon Medical School

Abstract The present study examined whether a new habituation-dishabituation paradigm using multiple habituation-donors can detect the ability to discriminate sexual activeness of males by female rats. All females were ovariectomized and chronically treated with estradiol benzoate. During the habituation trials, half of the females were exposed to a urine odor obtained from a single castrated male (the single donor group), and the other half were exposed to 4 different urine odors collected from 4 different castrated males (the multiple donor group). After the habituation trials, half of each group was tested with a urine odor of a novel intact male, and the other half with that of a novel castrated male. Females exposed to odor of single males showed a significant increase in investigation time to the test-donor odor, irrespective of donors' sexual activeness. In contrast, females habituated to odors of multiple males showed dishabituation specific to odor of intact test males. These results suggest that the habituation-dishabituation paradigm with multiple donors should be useful for evaluating the discrimination ability of sexual odors by rats.

Key words : habituation-dishabituation, odor discrimination, sexual activeness, rats

多くの哺乳類と同様、げっ歯類の社会行動も嗅覚に大きく依存しており、彼らは他個体の発する固有の匂いによって個体識別を行っている(Carr, Krames & Costanzo, 1970; Johnston & Peng, 2000; Petrulis & Johnston, 1999; Tang-Martinez, Mueller & Taylor, 1993)。このような個体識別能力を研究する方法としては、従来、2 個体の匂いを用いた馴化－脱馴化法が用いられてきた。この手続きでは、被験体に対してある単一の他個体の匂いを反復提示し、馴化によって探索時間が低下した後に、新奇個体の匂いの提示によって脱馴化（探索反応の増加）が起こることで嗅覚弁別が示される。しかし、この手法では特定の2 個体間での匂い弁別を行わせるため、単なる個体差以上の情報についての弁別能力を測ることはできない。つまり、個体臭には性別

や年齢などの様々な要素が含まれているが、そのいずれもが弁別刺激となりうる。そのため、単一個体への馴化後の他個体への脱馴化では、脱馴化の原因となった嗅覚手がかりを特定できないという短所がある。

複合的な特徴を持つ刺激における特定の要素に対する弁別能力を吟味するために、複数の刺激に馴化させるという手法がある。例えば、ヒト乳児における名詞・動詞などの語彙語と冠詞・前置詞などの文法語の弁別能力について、複数の文法語への馴化後に新奇な語彙語を提示すると脱馴化が生じるが、新奇な文法語には脱馴化が生じないことを示した研究がある (Shi & Werker, 2001)。馴化段階において複数の文法語の提示を受けることで、文法語という標的となる共通要素以外に、種々の音素や音節数な

どの標的以外の要素にも馴化することになる。そのため、テスト段階において、テスト刺激にも含まれるこれらの標的以外の要素に対しては脱馴化が生じないが、馴化刺激と異なる標的要素を持つ語彙に対して脱馴化が生じたと考えられる。これは、馴化－脱馴化法において、標的となる要素を共有する複数の刺激に馴化させることで、個別の刺激が持つ様々な要素の中から標的となる要素に特定の脱馴化を生じさせうる可能性を示すものである。

この種の手法をげっ歯類の嗅覚弁別に適用し、嗅覚刺激となる馴化ドナーを複数にすれば、個体の匂いに含まれる特定の要素が弁別手がかりになることを馴化－脱馴化法で示せると考えられる。例えば、性行動研究で取り上げられることの多い性的匂い (Edwards & Pfeifle, 1983; Romero, Beltramino & Carrer, 1990; Xiao, Kondo & Sakuma, 2004) の嗅覚弁別能力を測りたい場合、複数の去勢オスドナーに対する馴化後にそれとは性的レベルの異なる正常なテストドナーに対する脱馴化を吟味することにより、性的匂いの弁別能力について特定の測定が可能になるだろう。本研究では、複数ドナーによる馴化という技法を用いて、メスラットがオスの性的レベル（去勢対正常）を弁別する能力を特定の測定できるかについて検討した。馴化ドナーとテストドナーが同一の性的レベルである場合、馴化ドナーが複数である条件では単数である条件よりも脱馴化が抑制されることが予想される。また、馴化ドナーとテストドナーの間の性的活性度が異なるならば、複数の馴化ドナーを用いても脱馴化が生じると予測される。

実験 1

性的レベルの等しい複数ドナーで馴化を行うと、性的レベル以外にも馴化ドナー間に存在する様々な要素に馴化するため、同じ性的レベルのテストドナーに対する脱馴化は弱まると予想される。実験1では、複数ドナーで馴化を行う条件において、馴化ドナー群と同じ性的レベルのテストドナーに対する脱馴化が小さくなることを確認することを目的とした。

方法

被験体 実験開始時に約60日齢の Wistar 系アルビノラットのメスを16匹用いた。ラットは12時間ごとの明暗周期（午前9時から明）の下、個別ケージで飼育された。餌・水の摂取は自由とした。性周期の統制のため、エーテル麻酔下で卵巣を摘除し、エストラジオールベンゾエート (Sigma chemical 社製 β -Estradiol 3-benzoate) を含むサイラスティッ

クカプセル（内径×直径1.6×3.2mm、長さ10mm）の皮下投与によってホルモンを慢性的に投与した。

嗅覚刺激 実験開始時約80日齢の Wistar 系アルビノラットのオス5匹を嗅覚刺激のドナーとして用いた。尿採取ケージにおいて尿を採取し、冷凍保存した後、使用の直前に解凍して用いた。直径14mmの綿球に約1mlの尿を染み込ませ、刺激として装置内に置いた。

装置 T迷路を使用した。迷路の寸法は内径で、高さ150mm、幅120mm、ステムの長さ500mm、出発箱の長さ200mm、通気部の長さ100mm、アーム全体の長さ1260mm、目標箱の長さ400mmだった。また、刺激箱は一辺100mmの立方体だった。刺激箱はアームの末端、目標箱の奥に取り付けた。目標箱の奥から100mmの位置に黒色の直線を引き、探索反応生起の基準とした。通気用に刺激箱と目標箱の間の壁には直径10mmの穴を4つ開け、また、刺激箱の壁のうち目標箱の対面に位置する場所には吸気穴を開けた。床、壁は灰色の塩化ビニル板からなり、天井は透明の亚克力板を用いた。通気部は穴を開けた灰色塩化ビニル板によって出発箱から遮られていた。さらに、通気部の外壁には直径25mmの穴を開け、そこから電動ファンにつながる排気用パイプを通じて屋外へ排気した。

手続き エストロゲンの投与開始から21日目より予備訓練を3日間行った。予備訓練では、1日につき10分間装置内を自由に探索させた。予備訓練に引き続き、本実験を4日間行った。1－3日目は、1日につき4試行の馴化段階を行った。左右の刺激箱の一方に嗅覚刺激を置き、1試行につき5分間装置内を個別に自由探索させた。左右の目標箱への嗅覚刺激の割付は、試行ごとに無作為に決定した。ラットの鼻が目標箱の奥から100mmの位置に引かれた基準線を越えた時間を各刺激への探索時間として左右別に計測した。試行間間隔は約1時間とした。4日目にはテストを行い、4回の馴化試行の後にテスト試行を1回行った。

単一の個体で馴化する単数群 ($n=8$) と、複数ドナーで馴化する複数群 ($n=8$) を設定し、被験体を無作為に振り分けた。実験1において刺激として使用するオスは全て正常個体とした。複数群における馴化ドナー数は4匹で、これらを1日の試行内で1回ずつ無作為な順序で提示した。単数群では、馴化試行において全て同一のドナーを用いた。テストドナーは、馴化試行で提示されたことのない個体を用いた。馴化ドナーおよびテストドナーは被験体ごとに相殺した。

結果と考察

刺激の探索時間を群ごとに平均したものを Figure 1

Figure 1. Mean investigation time to each odor donor in Experiment 1.

に示した。両群ともに馴化第1試行では長時間の探索を行ったが、試行を重ねるにつれて探索時間は減少し、馴化が認められた。テスト試行では単数群において脱馴化が生じ、探索時間が大きく増加した。複数群では探索時間にほとんど変化は無く、脱馴化は認められなかった。4日目の最終馴化試行とテスト試行の2試行について、試行を被験体内要因とする混合計画で、試行(2)×群(2)の2要因分散分析を行った。その結果、試行の主効果 ($F(1, 14) = 11.07$, $p < .01$) と試行×群の交互作用 ($F(1, 14) = 4.65$, $p < .05$) が有意となった。試行×群の交互作用について単純主効果を検定したところ、馴化最終試行では群の主効果は認められなかったが ($F(1, 28) < 1$, $n.s.$)、テスト試行に有意差があった ($F(1, 28) = 4.24$, $p < .05$)。また、単数群では試行の主効果が有意となり脱馴化が認められたが ($F(1, 14) = 15.03$, $p < .01$)、複数群では有意でなく脱馴化は認められなかった ($F(1, 14) < 1$, $n.s.$)。

単数・複数両群で同様に、1日目における日内の短期的馴化、および2日目以降への日間の長期的馴化が生じたことが示された。また、テストドナーは馴化ドナーと性的レベルが異ならないにもかかわらず、単数群で明らかな脱馴化が認められた。従って、単数群では性的レベル以外の個体差によって脱馴化したと考えられる。しかし、複数群では有意な脱馴

化は認められず、複数ドナーで馴化を行った場合には個体差から生じる脱馴化が抑制されることが示唆された。

実験 2

実験1によって、馴化ドナーが4個体の複数になると、性的レベルの等しい新奇なテストドナーに対する脱馴化は減少し、ほぼ消失することが示された。そこで、馴化ドナーが複数の条件下でも、馴化ドナーとテストドナーの間に性的レベルの違いが存在するとき、その差に対する脱馴化が生じる可能性を検討した。例えば、馴化ドナーが去勢オス、テストドナーが正常オスである場合、性的レベルの高低が非共通要素として存在する。一方、馴化ドナーもテストドナーも去勢オスであれば性的レベルの非共通要素は存在しない。複数の個体での馴化後、馴化ドナーとテストドナーの性的レベルが等しいときには実験1と同様に脱馴化が生じないが、テストドナーの性的レベルが異なるときは脱馴化が生じると予測される。また、馴化ドナーが単数の場合には、馴化ドナーとテストドナーで性的レベルが同じでも、性的レベル以外の個体差によって脱馴化が生じると考えられる。

Figure 2. Mean investigation time to each odor donor in Experiment 2. Cast: castrated male urine odor, Intact: intact male urine odor.

方法

被験体 実験開始時に約60日齢の Wistar 系アルビノラットのメス32匹を用いた。卵巣摘除とホルモン投与の処置および飼育に関しては実験1と同様であった。

嗅覚刺激 実験開始時に約60日齢の Wistar 系アルビノラットのオス10匹を嗅覚刺激のドナーとして用いた。半数のドナーはエーテル麻酔下で精巣を摘除した。去勢オスに関しては、処置から21日以上経過後に尿を採取した。その他の手続きは実験1と同様だった。

手続き 使用する装置および予備訓練の手続きは実験1と同様だった。馴化に用いる刺激は全て去勢オスドナーの尿臭とした。被験体は、馴化ドナーが単数である条件と複数である条件の2つに分けた。さらにテストドナーが馴化ドナーと同じ去勢オスであるか(共通)、正常オスであるか(非共通)で2つの条件を設けた。従って、単数-共通、単数-非共通、複数-共通、複数-非共通の4群に被験体を無作為に振り分けた(各 $n = 8$)。他の手続きは実験1と同様だった。

結果と考察

群ごとの各試行の平均探索時間を Figure 2 に示し

た。全ての群において第1試行以降、探索時間が漸減し、馴化が認められた。単数条件では、馴化ドナーとテストドナーで性的レベルが共通しているか否かにかかわらず、テスト時に探索時間が増大し、脱馴化が認められた。また、複数-非共通群では脱馴化が見られたが、複数-共通群では探索時間は変化せず、脱馴化は認められなかった。馴化最終試行とテスト試行の探索時間について、試行を被験体内要因とする混合計画で、馴化ドナー数(2)×テストドナーの性的レベル(2)×試行(2)の3要因分散分析を行ったところ、試行の主効果が有意となった($F(1, 28) = 33.27, p < .01$)。また、馴化ドナー数×試行の交互作用($F(1, 28) = 9.35, p < .01$)、性的レベル×試行の交互作用($F(1, 28) = 7.17, p < .05$)が有意となった。馴化ドナー数×試行の交互作用における単純主効果を検定すると、馴化最終試行では馴化ドナー数による有意差は無く($F(1, 56) < 1, n.s.$)、テスト試行における馴化ドナー数が有意だった($F(1, 5) = 10.30, p < .01$)。また、性的レベル×試行の交互作用については、馴化最終試行における性的レベルでの有意差は見られず($F(1, 56) < 1, n.s.$)、テスト試行における性的レベルの効果が有意となった($F(1, 56) = 10.66, p < .01$)。従って、馴化ドナーが複数になることで脱馴化が抑制さ

れるという実験1の結果が再現され、さらに複数馴化条件でも性的レベルの異なる個体を提示すると脱馴化が生じることが確認された。また、複数－非共通群についてテスト試行の探索時間から馴化最終試行の探索時間を引いて脱馴化量を求め、この母平均の95%信頼区間を算出したところ、上限が8.25、下限が-9.71と0付近を中心とした狭い範囲が得られた。従って、4個体程度の複数ドナーによる馴化後に性的レベルの同じ個体を提示してテストした場合には、脱馴化はほとんど生じないことが期待される。従って、今回のように複数ドナーでの馴化後に性的レベルの異なる個体を提示して脱馴化が生じた場合は、性的レベルの差異に基づくものと考えられるだろう。

全体的考察

本研究では、複数ドナーの匂いを刺激として馴化させたところ、馴化ドナー集団と新奇なテストドナーの間に性的レベルの差が無い場合には脱馴化が生じなかった。一方で、馴化ドナー集団とテストドナーの間に性的レベルの違いがある場合には脱馴化が認められた。これらの結果から、性的レベル以外の個体差については、馴化ドナーを複数にすることによって脱馴化が抑えられるが、ドナーの性的レベルが異なると、それが非共通要素として働き脱馴化が生じることが示唆された。従って、本研究で用いた複数の馴化ドナーによる馴化－脱馴化法は、ラットの性的レベルの嗅覚弁別能力を検討するのに有効であると考えられる。さらに、今回の実験のように、馴化ドナーを複数にして特定の弁別手がかりのみを馴化ドナー・テストドナー間の非共通要素として設定すると、馴化－脱馴化法は、性的レベルだけでなく様々な嗅覚的特徴の弁別能力を評価するために有効な手段となりうる可能性が示唆される。

一方、今回の実験では、単数ドナーを刺激として馴化し、性的レベルが同じテストドナーでテストした場合、すなわち非共通要素が無い条件でも脱馴化が観察された。従って、単一の刺激への馴化を行う馴化－脱馴化法では、たとえ性的レベルの異なる個体間で脱馴化が観察されたとしても、必ずしも性的匂いの弁別能力の証拠とはならないと言えよう。

また、今回の実験2の単数－非共通群では、馴化1日目の第1試行よりもテスト試行での探索時間が長く示された。従来、卵巣摘除後に性ホルモンを投与されたメスラットは、去勢オスと正常オスの匂いの同時探索課題において、正常オスへの探索が長くなることが知られている(Edwards & Pfeifle, 1983; Romero, Beltramino & Carrer, 1990; Xiao,

Kondo & Sakuma, 2004)。非共通条件では馴化ドナーが去勢オス、テストドナーは正常オスであったため、性的レベルの弁別による脱馴化に加えて、この現象が反映された可能性が考えられる。

性的レベルの嗅覚弁別能力の評価は、水報酬によるT迷路の弁別学習を用いた手法によっても試みられている(Kondo, Taniuchi, & Kondo, 2004)。この弁別学習では、各々複数の正常オスと去勢オスを嗅覚刺激のドナーとし、性的レベル以外の個体差が弁別手がかりとならない条件を設定することによって、メスラットは性的レベルに基づく匂いの弁別が可能であることが示された。しかし、この手法には、比較的長期にわたる訓練が必要である、水報酬のための摂水制限を要する、という短所がある。これに対し、今回の馴化－脱馴化法は極めて短い期間で検討が可能であり、食餌・摂水制限といった操作を必要としない。このように、複数個体への馴化を行うという点で改良された馴化－脱馴化法によって、弁別学習よりも簡便に嗅覚能力を吟味することが可能となる。このように、複数刺激への馴化を用いた馴化－脱馴化法は、弁別能力を簡易に検討する方法として、動物の嗅覚の問題にも適用可能であると考えられる。

引用文献

- Carr, W. J., Krames, L. & Costanzo, D. J. 1970 Previous sexual experience and olfactory preference for novel versus original sex partners in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 71, 216-222.
- Edwards, D. A. & Pfeifle, J. K. 1983 Hormonal control of receptivity, proceptivity and sexual motivation. *Physiology & Behavior*, 30, 437-443.
- Johnston, R. E. & Peng, M. 2000 The vomeronasal organ is involved in discrimination of individual odors by males but not by females in golden hamsters. *Physiology & Behavior*, 70, 537-549.
- Kondo, S., Taniuchi, T. & Kondo, Y. 2004 Effect of estrogen on discrimination learning of male sexual odors in female rats. *Hormones and Behavior* (SBN 2004 Annual Meeting Issue), 46, 93-94.
- Petrulis, A. & Johnston, R. E. 1999 Lesions centered on the medial amygdala impair scent-marking and sex-odor recognition but spare discrimination of individual odors in

- female golden hamsters. *Behavioral Neuroscience*, **113**, 345-357.
- Romero, P. R., Beltramino, C. A. & Carrer, H. F. 1990 Participation of the olfactory system in the control of approach behavior of the female rat to the male. *Physiology & Behavior*, **47**, 685-690.
- Shi, R. & Werker, J. F. 2001 Six-month-old infants' preference for lexical words. *Psychological Science*, **12**, 70-75.
- Tang-Martinez, Z., Mueller, L. L. & Taylor, G. T. 1993 Individual odours and mating success in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. *Animal Behaviour*, **45**, 1141-1151.
- Xiao, K., Kondo, Y. & Sakuma, Y. 2004 Sex-specific effects of gonadal steroids on conspecific odor preference in the rat. *Hormones and Behavior*, **46**, 356-361.
(2004.12.25 受稿, 2005.4.28 受理)