

博士論文

ラットの情動コミュニケーション音声を対象にした

カテゴリー的知覚とそのメカニズムの検討

(Categorical perception and processing of emotional calls:

The study of rat ultrasonic vocalizations)

東京大学総合文化研究科 広域科学専攻生命環境科学系

齋藤優実

目次

要旨.....	2
対訳・略語表.....	6
第一章 序論	
1.1 研究の背景	8
1.1.1 音声によるコミュニケーションと情動の伝達.....	8
1.1.2 ラットの超音波発声	9
1.2 研究の目的	10
1.3 倫理規定	11
第二章 実験準備：USV の録音・解析と刺激の作成	
2.1 目的	13
2.2 方法	13
2.2.1 実験動物.....	13
2.2.2 USV の録音.....	13
2.2.3 音声の解析.....	14
2.2.4 USV 刺激の作成	15
2.2.5 プローブ刺激の作成	15
第三章 研究 1：USV に対する汎化と弁別.....	20
3.1 背景	20
3.2 方法	20
3.2.1 実験動物.....	20
3.2.2 条件づけ.....	21
3.2.3 プローブテスト.....	22
3.2.4 データ解析.....	22
3.3 結果	23
3.4 考察	24
3.4.1 快・不快 USV の汎化と弁別	24
3.4.2 音声弁別に対する各音響特徴の寄与.....	25
第四章 研究 2：USV に対する情動反応の測定	30
4.1 背景	30
4.1.1 情動の定義.....	30
4.1.2 USV 聴取による行動の変容	30
4.1.3 研究の目的.....	31
4.1.4 自律神経系指標としての心拍.....	32
4.1.5 仮説.....	33

4.2	心拍測定実験：方法.....	34
4.2.1	実験動物.....	34
4.2.2	ECG 記録.....	34
4.2.3	心拍計測セッション.....	35
4.2.4	データ解析.....	35
4.3	心拍測定実験：結果.....	37
4.4	音源接近実験：方法.....	39
4.4.1	実験動物.....	39
4.4.2	音源接近実験.....	39
4.4.3	データ解析.....	40
4.5	音源接近実験：結果.....	40
4.6	考察.....	41
4.6.1	心拍測定実験.....	41
4.6.2	音源接近実験.....	41
第五章	研究 3：USV 知覚における神経活動.....	52
5.1	背景.....	52
5.1.1	USV 発声と知覚に関わる脳領域.....	52
5.1.2	情動およびコミュニケーションに関与する脳領域.....	53
5.2	c-Fos 免疫染色実験：方法.....	54
5.2.1	実験動物.....	54
5.2.2	脳サンプリングと免疫組織化学染色.....	54
5.2.3	撮像.....	55
5.2.4	データ解析.....	56
5.3	c-Fos 免疫染色実験：結果.....	57
5.4	単一ニューロン記録実験：方法.....	57
5.4.1	実験動物.....	57
5.4.2	電極作成と埋め込み手術.....	58
5.4.3	神経活動記録.....	59
5.4.4	データ解析.....	60
5.5	単一ニューロン記録実験：結果.....	61
5.6	考察.....	63
5.6.1	USV 知覚処理に関連する領域.....	63
5.6.2	単一ニューロンレベルでの情報処理.....	64
第六章	総合考察.....	77
6.1	USV のカテゴリ的知覚.....	77
6.2	音響特徴による知覚への影響.....	78

6.3 音声カテゴリー的知覚の至近および究極要因的説明	79
引用文献	82
謝辞.....	94

要旨

ラットの超音波発声 (Ultrasonic vocalization: USV) には、発声者が快情動下で発声する USV (快 USV) と、不快情動下で発声する USV (不快 USV) の二種類が存在する。これらの音声は、1 コールのもつ平均周波数 (MF)、コールの持続時間 (D)、周波数変調パターンから算出した 1 コールの変動値 (FMI) の三つの音響特徴によって区別される。

本研究においては、第一の目的として、快 USV と不快 USV が聴取者にカテゴリ的に知覚されるかを検討した。カテゴリ的知覚であるかとは、音声の個々のコールやバウト (連続するコール) としての知覚ではなく、その音声をある一つの枠組み (カテゴリ) として捉えているかということの意味する。

これを実証するためにまず快 USV と不快 USV を汎化・弁別させた。汎化はオペラント条件づけにおいて同じ反応を学習すること (例: レバー押し)、弁別は異なった反応を学習することとして定義した。ラットは快 USV と不快 USV を汎化・弁別し、刺激に応じて学習した適切な反応を示すことがわかった。

次いで快 USV と不快 USV をプレイバックした際の情動反応を測定し、それが対照的なものであるか調べた。USV の快・不快は発声者の情動状態により定義されるが、これを知覚する聴取者もまた共感的に快-不快状態になっていることが複数の過去の研究により示されている。これに加えて、自律神経系の興奮-鎮静の次元においても USV カテゴリ間で異なった反応がみられるかを心拍により測定した。結果、快 USV では興奮の傾向が、不快 USV では鎮静が誘起された。このことから USV はカテゴリ的である、特に対照的な情動カテゴリに属する (快・興奮-不快・鎮静) ことが明らかになった。

最後に快・不快 USV に対する神経活動を測定した。興奮性神経活動時に迅速かつ一過性に転写を行う最初期遺伝子を神経マーカーとし、USV に対して賦活化する脳領域を調べた。扁桃体や島皮質などの情動関連領域が USV 呈示によって活動していたことがわかったが、快・不快 USV プレイバック間では空間的な差異はみられなかった。また、扁桃体および島皮質から単一ニューロン記録を行ったところ、自由行動下では扁桃体において両 USV に対し異なった反応を示すニューロンが発見された。一方麻酔下では USV に広く応答するニューロンのみ発見され、カテゴリ選択的ニューロンはみつからなかった。そのため覚醒度などの内的状態が USV のカテゴリ的知覚、特に情動的知覚に影響しうると考えられた。

本研究の第二の目的は、MF・D・FMI が USV のカテゴリ的知覚に及ぼす影響を検討することである。情動反応 (快-不快および興奮-鎮静) と扁桃体のニューロン活動は MF と D にのみ影響を受けており、この二パラメータが情動的知覚の手がかりとなっていると推察した。汎化・弁別においてはすべての音響特徴が知覚手がかりとなり、特に MF の影響が強く認められた。そのため、MF と D は知覚の手がかり、特に情動の手がかりとなっている一方、FMI は情動手がかりではないが、音声構造を知覚する上で重要な要因となっていると結論づけた。

対訳・略語表

ラット音声関連

D: Duration 音声の 1 コールの持続時間

FMI: Frequency modulation index 音声の 1 コール内の変動を表した周波数変調指標

MF: Mean frequency 音声の 1 コールの平均周波数

USV: Ultrasonic vocalizations 超音波発声

神経科学関連

ACC : Anterior cingulate cortex 前部帯状皮質

-Cg1 背側

-Cg2 腹側

Amygdaloid: 扁桃核

- BLA: Basolateral amygdala 扁桃核外側基底核

-CeA: Central amygdala 扁桃核中心核

- LaA Lateral amygdala 扁桃核外側核

FrA: Frontal cortex area 前頭皮質領域

Insula: 島皮質

-AI: Agranular insula 無顆粒島

-DI: Dysgranular insula 亜顆粒島

-GI: Granular insula 顆粒島

M1: Primary motor cortex 第一次運動皮質

MGB: Medial geniculate body 内側膝状体

PAG: Periaqueductal gray 中脳水道周囲灰白質

-dlPAG dorsal lateral 背外側

-dmPAG dorsal medial 背内側

-lPAG lateral 外側

PRh: Perirhinal cortex 嗅周皮質

統計・データ解析関連

ANOVA: Analysis of variance 分散分析

FFT: Fast Fourier Translation 高速フーリエ変換

GLM: Generalized linear model 一般化線形モデル

GLMM: Generalized linear mixed model 一般化線形混合モデル

HRV: Heart rate variability 心拍変動

-rMSSD: the square root of the mean squared differences of successive R-R intervals 連続

して隣接する RR 間隔の差の二乗平均平方根

-RRI: R-to R intervals RR 間隔

-SDNN: Standard deviation of N-N RR 間隔標準偏差

Information criteria: 情報量規準

-AIC: Akaike Information Criteria 赤池情報量規準

-BIC: Bayesian Information Criteria ベイズ情報量規準

-WAIC: Widely applicable information criterion もしくは Watanabe-Akaike information criteria 特異的統計モデルに一般化された AIC

PCA: Principle component analysis: 主成分分析

その他

ECG: Electrocardiogram 心電図

IEG: Immediate early genes 最初期遺伝子

ISI: Inter-stimulus interval 刺激間隔

PBS: Phosphorus buffered saline リン酸緩衝生理食塩水

PFA: Paraformaldehyd パラホルムアルデヒド

PSTH: Peristimulus time histogram 刺激前後時間ヒストグラム

第一章 序論

1.1 研究の背景

1.1.1 音声によるコミュニケーションと情動の伝達

発声はあらゆる脊椎動物において見られ、その能力は長い年月をかけて進化してきた (Bass, Gilland, & Baker, 2008)。音は空気中・水中の離れた距離を進むことから光のない環境においても有用であり、またにおいなどの化学的物質と異なり指向性を持たせられる上に高い時間解像度で変調させることができるため、様々な動物種が多様な目的で音声を獲得・使用している。特に同種他個体との社会的な相互作用に音声を用いる種は多く、個々の種がその音声の使用に特殊化した複雑な知覚処理・発声制御系を備えている。そのため、音声コミュニケーションの機能や進化、発達プロセス、そしてそのメカニズムに関する包括的理解は、多様な動物種の音声研究なくしては実現しえない。

音声のうち、あるきまった情動状態が反映される音声を情動音声 (emotional vocalizations) と呼ぶ。ヒトにおいては笑い声や泣き声、怒声、痛みやストレスによる呻きや叫びなどが挙げられる他、言語情報に感情を乗せる韻律 (prosody) などにも相当する (Morris, Scott & Dolan, 1999)。この情動音声の知覚は言語内容の知覚と全く独立であり (eg. Sander & Scheich, 2001)、また、特に哺乳類において、種を超えて共通してみられる音声である (eg. Belin et al., 2007) ため、情動音声の発声や知覚は進化的に古い音声機能であると考えられる。

さらに情動音声は社会的な文脈で利用される、すなわち社会的機能をもつ (情動コミュニケーション音声) 場合がある。低体温や飢餓状態になるなどして、親などの世話を必要とした場合に仔の発声が見られる (eg. 齧歯類の pup call: Noirot, 1972)。これに類似し、成体であってもなにか要求やストレスがある場合にその状態を反映した発声が見られる (eg. 家畜動物や伴侶動物: Manteuffel, Puppe & Schön, 2004)。笑いなどの快情動を伴う音声仲間との遊び文脈で発声される場合には、個体間での親近的な関係が保たれる (Smith, 1982)。情動音声によって発声者と聴取者が同様の情動状態になる現象である、音声による情動伝染 (emotional contagion: Hatfield, Rapson, & Le, 2011) は、集団内で快・不快対象が存在するという情報を共有することができるため (eg. Dezechache, Mercier, & Scott-Phillips, 2013)、包括的適応度を上昇させる機能があるかもしれない。

私は音声研究の対象として、ラット (*Rattus Norvegicus*) の超音波発声 (ultrasonic vocalizations :USV) に着目した。齧歯類は音声コミュニケーションに我々の可聴域を超えた超音波を用いるが、これは種によって異なった文脈・機能をもっている。たとえばマウス (*Mus musculus*) の USV は主に雄から雌への求愛の文脈で発声される。一方、成体ラットの USV は快・不快情動下で発声され、かつ社会的機能をもつ (Portfors, 2007) 「情動コ

コミュニケーション音声」であると考えられる。

1.1.2 ラットの超音波発声

ラットの USV には計三種類の音声が知られており、ひとつは他の齧歯類にも普遍的にみられる、母親から養育行動を引き出すための幼獣の pup call である (Portfors, 2007)。残り二種類は性成熟と社会的成熟の発達期にもっとも頻繁にみられ、成体になっても発声が持続する情動音声である。本研究が対象とする音声は后者であり、以下にその特徴について記載する。

一方の音声は 22 kHz USV と呼ばれ、不快情動下で発声される。音響特徴としては 18 から 32 kHz の周波数帯域に位置し (Sales & Pye, 1974)、1 コールの長さが 300 から 3400 ms と長く (Sales, 1972)、その構造は平坦であり、1 から 5 kHz 程度の周波数変調しかしない (Sales & Pye, 1974)。図 1a に 22 kHz USV のソナグラムを示す。ソナグラム (声紋) とは、縦軸を周波数、横軸を時間として音声を表したものである。表された音声の濃さは音の強度 (音圧) を反映している。

22 kHz USV 発声は捕食リスクが存在するとき (Blanchard et al., 1991) や、電気ショック (De Vry et al., 1993) などの嫌悪的刺激、大きな音 (Kaltwasser, 1990) や空気の噴射 (Knapp & Pohorecky, 1995)、十分に人馴れしていない状況でのハンドリング (Brudzynski & Ociepa, 1992) などのストレスや驚愕反応をもたらす刺激によって誘起される。性行動中の雄が射精後に発声する他 (Burgdorf et al., 2008)、個体序列を決定する雄間闘争に敗北した個体からの防御姿勢やすくみ (freezing) を伴う発声もみられる (Takahashi, Thomas & Barfield, 1983)。この際劣位雄の発声によって優位雄からの攻撃が減少することが報告されている (Sales, 1972)。

また動物には、報酬および罰の両方が与えられうるような状況において、快情動下においては罰よりも報酬を予測し (楽観的認知バイアス)、不快情動下では報酬よりも罰を予測する傾向がみられる (悲観的認知バイアス: Mendl et al., 2009)。このような状況をつくりだした際、敗北した劣位雄は不快情動指標である罰予測行動を増加させる (Papciak et al., 2013)。これらの知見により、22 kHz USV は不快な情動下で発声される、「不快 USV」であると結論づけられている。

超音波のなかでも特に高い周波数を持ち、短い連続したコールはその周波数帯域から 50 kHz USV と呼ばれる。音響特徴としては主に 35 から 70 kHz の周波数に位置し (Wintink & Brudzynski, 2001)、1 コールの長さが 3 から 65 ms と非常に短く (Sales, 1972)、さらにその 1 コールが多くの変異性を持ち、3 から 30 kHz 近くに及ぶ周波数変調を示す (Wright et al., 2010)。図 1b に 50 kHz USV のソナグラムを示す。また、図 1c, d, e は 1 コールを拡大した図である。

この音声は主に快情動文脈において発声されることから、快音声あるいは「原始的な笑

い声」であると考えられている (Blanchard et al., 1993; Brudzynski & Pniak, 2002; Panksepp & Burgdorf, 2003)。たとえば 50 kHz USV は他個体への接近やあるいはとっくみあい遊び (rough-and-tumble play) において発声される。実験者が手を用いてこの遊びの形態を模し、ラットを「くすぐった」際にも全く同様の発声が見られる (Panksepp & Burgdorf, 2003)。この発声を誘起するくすぐりは社会的報酬として機能し、ラットはくすぐりをねだるようになる (Burgdorf & Panksepp, 2001)。脳内の報酬系を電気刺激、あるいは薬理操作を用いて人為的に賦活化させ、強制的に快状態を誘起した際にもこれらの発声が見られる (Burgdorf et al., 2007)。

上述した認知バイアス的狀況においては、くすぐりによって 50 kHz USV を発声したラットが快情動の指標である報酬予測行動を増加させることが知られる (Rygula, Pluta & Popik, 2012)。これらの証左から、50 kHz USV は発声者の快情動を反映する「快 USV」であると結論づけられている。

1.2 研究の目的

上述したような知見が多数蓄積されているように、成体ラットの USV 研究は古くから非常に盛んに行われ、研究者の興味を引いてきた。これは二種類の USV が情動音声であり、他の動物にもこれらと共通点を持つような音声が普遍的に見られると考えられること、快・不快という対照的なカテゴリで分けられていること、実験室環境で頑健に観測される音声であり再現性が高いことなどに起因すると考えられる。

しかしながら、情動音声研究のモデルとして有用であるにも関わらず、USV の知覚に関する研究は発声研究と比較して非常に少なく、内容が限られている。これは、必ずしも社会的文脈や他個体の存在がなくても発声が行われるために、近年までそのコミュニケーション機能が明らかになっていなかったためであると考えられる。

とりわけ問題なのは、聴取側が USV を異なった二種類の音声のカテゴリと知覚しているかが実証されていない点である。刺激をカテゴリカルに知覚する (カテゴリ的知覚) とは以下のような現象を指す。生体が弁別可能な二種類の同モダリティ刺激 A、B が存在するとき (eg. 音声、色、表情)、この二者間で刺激物理量を連続的に変化させていくと、知覚は連続的に変化するのではなく、ある点において急に A が B に切り替わったように感じる (Harnad, 1987)。すなわち、ある程度の範囲では物理量のばらつきに寄らず、その刺激はいつも同カテゴリのものとして知覚され、同様の内的状態を誘起していると定義づけられる。

二種類の USV プレイバックによって異なった反応がみられたという報告は複数存在するものの (詳細は 4.1.2 および 5.1 に記載)、この音声の知覚がカテゴリ的かという知見は未だ不十分である。特に USV を情動コミュニケーション音声として扱う場合、聴取側への機能や知覚メカニズムを検討してはじめてコミュニケーション音声研究たりえるのだから、発声に対する研究と同様に知覚にも重点を置く必要がある。

以上を踏まえ、本研究ではまず快・不快 USV が聴取側にカテゴリ的に知覚されているかどうかを検討する（目的 A）。その方法として、プレイバックした際、

研究 1: 同カテゴリ内での汎化と異カテゴリ間での弁別が可能かどうか

研究 2: 対照的な情動状態を誘起するか

研究 3: 異なった神経処理を経ているか

を個々の研究で測定する。

USV の知覚研究例では人為的な音声刺激を使用する場合がある。これは主に 50 kHz (22 kHz) の純音が用いられる (eg. Ouda, Jilek & Syka, 2016; Parsana & Brown, 2012)。これらの例では USV と比較して純音に対する反応が低下する傾向があり、自然な USV のもつなんらかの音響特徴が知覚に不可欠であると結論づけられる。しかしながら、複数ある音響特徴がどのように影響を及ぼすのかは現状まったく不明である。1.1.2 節で述べたように、快 USV と不快 USV は音響学的には、中心的な周波数帯域、コールの長さ、そして周波数変調パターン（周波数変調の多寡）の三種類のパラメータによって区別される。そこで本研究ではさらに、これらの音響特徴を操作した人為的な音声をプローブ刺激として作成し、これをプレイバックした際の汎化と弁別反応（研究 1）、情動反応（研究 2）、神経系の反応（研究 3）が自然な USV と比較してどのように変化するかをテストした。これにより、USV 知覚に音響特徴が与える影響を検討することを第二の目的とした（目的 B）。この際、各音響特徴パラメータは互いの値に影響を及ぼさない独立の値として算出していること（2.2.3 を参照）、そして最も単純なモデルを仮定するべきだと考えたことから、これらの主効果ないし相互作用の足し合わせである線形モデルの推定を各実験の解析に採用している。

1.3 倫理規定

本研究を構成する全ての実験は、動物実験講習を受講した実験者が、東京大学動物実験専門委員会およびバイオサイエンス委員会の許諾を得た上（許諾番号：27-8）、東京大学動物実験実施規則を遵守して実施した。

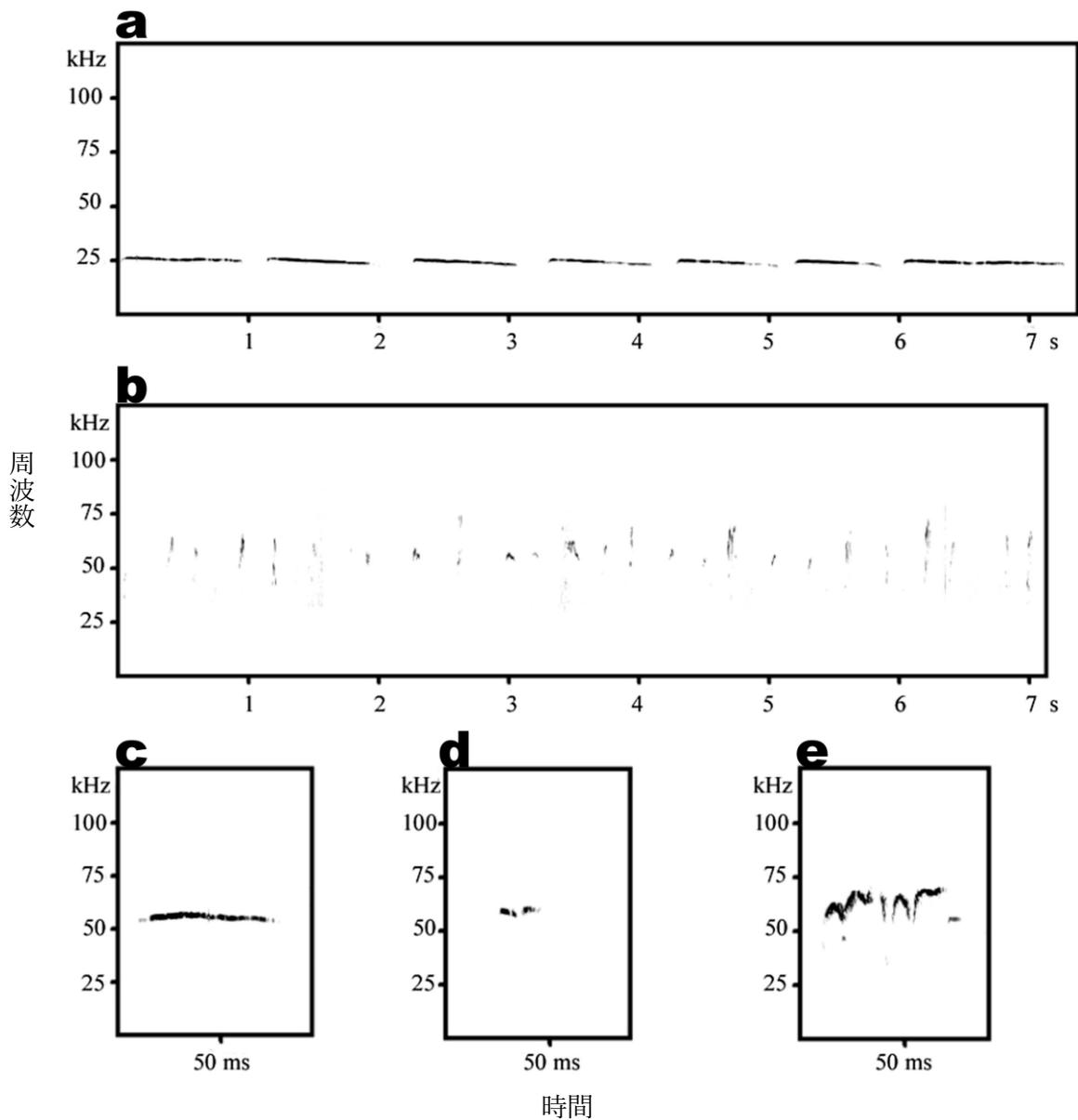


図1 ラットの超音波発声 (USV)

(a) 不快 USV のソナグラム。周波数帯域は 22 kHz 付近に位置し、1 コールが長く、比較的平坦な構造をもつ。

(b) 快 USV のソナグラム。周波数帯域は 50 kHz 付近に位置し、1 コールは短く、バリエーションのある周波数変調を示す。

(c)(d)(e) 快 USV のコールの一例。

第二章 実験準備：音声の録音・解析と刺激の作成

2.1 目的

第一章で述べたように、本研究は USV がカテゴリ的知覚されることの実証を目的として実施するため（目的 A）、これを裏付けるものとして「汎化と弁別」「情動」そして「神経活動」を測定する。そのため、本研究を構成する 3 つの下位研究では一貫して USV を音声刺激として使用する。また、USV の音響特徴がどのようにカテゴリ的知覚に影響を及ぼすかを検討するため（目的 B）、USV を基にした人為的な刺激も利用しなければならない。第二章ではラットの音声の録音と解析、そしてそのデータを基にした刺激の作成法について記述する。

2.2 方法

2.2.1 実験動物

6 匹の雄の Sprague-Dawley (SD) ラット (JapanSLC, *Shizuoka, Japan*) を使用した。ラットは購入時に個別のケージに入れられ、一週間の馴化期間に単独飼育された。飼育室は温度 20 から 22 度、湿度は 30% 以上に保たれ、12 時間ずつの明暗サイクル（点灯時間 8 時、消灯時間 20 時）で統制された。給餌および給水はすべて統制せず、ラットは自由に摂食・摂水が可能であった。餌は高蛋白質含有の齧歯類用ペレット (Lab Diet, PMI Nutrition International, *Missouri, the USA*) を与えた。

馴化期間のち、6 匹をそれぞれ任意の 3 ペアに分け、社会的コミュニケーション場面における発声を録音した。録音時、ラットは 10 から 12 週齢であり、体重は 302.5 ± 10.2 g であった。USV、特に快 USV の発声量はこの程度の成体ラットがピークである (Willey et al., 2009) ため、これは発声を録音するのに妥当な週齢であった。

2.2.2 USV の録音

3 ペアのラットをそれぞれ発声記録用のケージに入れ、録音を開始した (図 2a)。ケージ (内径 55 cm (L) × 30 cm (W) × 35 cm (H)) は防音箱に収納され、ラットの頭上に超音波用マイク (Ultrasoundgate 116Hb, Avisoft, *Glienicke, Germany*) を取り付けられた。音声は超音波マイクと互換性のある録音用ソフトウェア (Recorder-USGH, Avisoft) によって、サンプリング周波数 250 kHz、解像度 16 bit でデジタル化された。また、音声はこのソフトウェアによって実時間でソナグラムとして可視化され、実験者が確認できるようになっていた。録音時のラットの行動は広角 Web カメラ (BSW200M, Buffalo, Inc., *Aichi, Japan*) によってモニタリングされた。3 ペアすべてにおいて、録音は 30 分以内に終了した。

図 2a に快 USV と不快 USV 録音時のラットの行動を示している。使用した 3 ペアのすべてがケージ投入後ただちに快 USV の発声を開始した。この際、ラット間での探索行動およびとつきみあい遊び (rough-and-tumble play) がみられた。これらの社会的コミュニケーション行動における快 USV の発声は過去の知見と一致する (Burgdorf et al., 2008)。さらに 3 ペア中 2 ペアがとつきみあいから攻撃ディスプレイへ移行した。繁殖期を迎えた雄は雌が存在しない場面においてもしばしばこのような攻撃ディスプレイを行い、個体内の社会的序列を決定する (Blanchard & Blanchard, 1977)。この際、相手に敗北し劣位となった個体はフリージングとともに不快 USV を発声した。これは敗北時に不快音声を発することで、優位個体からの過剰な攻撃を抑制するためだと考えられている (Sales, 1972)。

2.2.3 音声の解析

録音した音声ファイル中の、発声が集中している箇所を 10 秒から 30 秒程度に切り分けた。そして個々のデータを USV シラブル検出・分割用ソフトウェア USVSEG を使用し、個々のシラブルに自動分割した (Tachibana et al., 2019)。ソフトウェアは、岡ノ谷一夫研究室所属研究員の橋亮輔氏が MATLAB(MathWorks, *Massachusetts, the USA*)を用いて独自に作成・開発したものである。

USVSEG によって分割された各シラブルのうち、不快 USV および快 USV それぞれの平均周波数(mean frequency: MF)、持続時間(duration: D)、そして周波数変調指標 (frequency-modulation index: FMI) を解析した。得られたシラブルは、大きなノイズを含むものを除外し、快 USV が 1441、不快 USV が 465 個であった。

まず MF の算出方法について述べる。検出したシラブルの開始から終了までを 0.5 ms ごとに区切り、これを時間窓として高速フーリエ変換 (Fast Fourier Translation: FFT) した。FFT は 512 ポイントで行った。音声のサンプリング周波数が 250 kHz であるため、周波数分解能はおおよそ 488 Hz となる。1 シラブルにつき、FFT によって周波数のピークが 0.5 ms ごとに得られ、このシラブル内の平均値を平均周波数 MF とした (図 2b)。窓関数には Hanning 窓を用いた。快 USV の MF の平均および標準偏差は 53.9 ± 7.4 kHz、不快 USV は 21.0 ± 0.9 kHz であった。図 2d は MF の分布を示し、これは過去の研究で報告された USV 周波数帯域の範囲に収まっていた (Wintink & Brudzynski, 2001; Sales & Pye, 1974)。そのため、発声は典型的な快 USV および不快 USV であったと考えられる。

D の算出は、USVSEG によって検出されたシラブルのオンセットとオフセットの差分とした (図 2b)。快 USV の D の平均および標準偏差は 33.4 ± 19.6 ms、不快 USV は 703.4 ± 236.7 ms であった。また、図 2e は D の分布を表す。数値の範囲は過去の研究で報告された USV のパラメータと一致しており (Sales, 1972)、これも発声が典型的な快・不快 USV であったことを示している。

FMI は、ひとつのシラブルが持つ周波数のゆらぎの強度をスカラー値として表すために、以下の方法により算出した。まず周波数帯域および持続時間をシラブル間で標準化し、これらのパラメータに寄らない周波数変調パターンを得た。音声の高さ、すなわち周波数の知覚は対数的に変化することから (Helmholtz, 2013)、周波数は対数スケール (常用対数) へ変換した。また、持続時間はオンセットを 0%、オフセットを 100% とした。このようにして得られた周波数パターンの変動係数を FMI と定義した (図 2c)。これは恣意的な数値であるため単位がなく、絶対的な意味をもたないが、標準化されたシラブルで周波数変調が大きい構造のパターンは FMI も相対的に大きく、変調が小さく平坦な構造のパターンは FMI も小さくなる。快 USV の FMI の平均および標準偏差は $25.61 \pm 25.78 \times 10^{-3}$ 、不快 USV は $8.73 \pm 6.04 \times 10^{-3}$ となった。また、図 2f は FMI の分布を表す。Wilcoxon 順位相関検定を用いたところ、快 USV と不快 USV の FMI には有意な差が認められた ($p < 0.001$)。これは快 USV の大きな周波数変調および不快 USV の平坦なパターンの差異を反映しており、適切な指標として機能している証左といえる。

2.2.4 USV 刺激の作成

本研究で用いたすべての USV 刺激は以下の方法により作成、呈示された。まず録音した USV の背景ノイズレベルを、音声編集ソフトウェア (SASLAB pro, Avisoft) を用いて減衰させ、S/N 比を上昇させた。ノイズ除去の後、シラブルの一連続 (バウト: bout) が 7 秒以上続く箇所を抜粋し、これをひとつの WAV ファイル (サンプリング周波数 250 kHz、解像度 16 bit) として保存した。快 USV、不快 USV それぞれにつき合計 30 ファイルを作成した。快 USV のシラブルは 1 ファイルにつき 27.70 ± 2.05 コール含まれ、ファイルの長さは 7.14 ± 0.24 s であった。また、不快 USV のシラブルは 1 ファイルにつき 7.37 ± 1.18 コール含まれ、ファイルの長さは 7.09 ± 0.26 s であった。図 3c は作成した USV 刺激のうち 1 ファイルのソナグラムである。

USV 刺激は超音波周波数帯域まで再生可能なオーディオ・アンプ (Integrated-amplifier A-10, Pioneer, *Kawasaki, Japan*; Ultrasoundgate Player 116, Avisoft) および超音波スピーカ (PT-R4, Pioneer; Ultrasoundgate Player 116, Avisoft) によってプレイバックされた。呈示時の刺激音圧は 55 から 75 dB(SPL) にランダム化した。なお録音時、不快 USV は快 USV よりも高い音圧レベルを有していたが、発声者と聴取者間の距離は不快 USV の方が快 USV よりも離れる傾向にあり、また発声距離は状況・ペアに応じて様々であった。これらの理由により実際の知覚強度レベルの評定が困難であったため、快・不快 USV の音圧が同程度の平均とばらつきになるように調節し、呈示を行っている。

2.2.5 プローブ刺激の作成

プローブ刺激は以下に述べる方法により作成された。なお呈示装置・方法は USV 刺激と

全く同様であるため省略する。

録音後、音声編集ソフトウェア (SASLAB pro, Avisoft) によって背景ノイズレベルを下げ、USVSEG によって分割された快 USV あるいは不快 USV シラブルの、MF か D、あるいはその両者を操作した音声を合成した。MF を操作する場合は一方の USV 的な周波数からもう一方の USV 的な周波数へとピッチ・シフトした。また、D を操作する場合は一方の USV 的な長さからもう一方の USV 的な長さへ伸張もしくは収縮した (図 3a, b)。以下に記載している MF および D の変化量は、各パラメータの代表値 (平均値) を基に算出した。

プローブ刺激は 6 カテゴリから成り、各カテゴリについて A から F までのアルファベットによるラベル付けを任意に行った。以下に各プローブ刺激の特徴について記載する。

プローブ A: 不快 USV の MF を 2.57 倍、D を 0.05 倍したシラブルから作成された。MF は 53.9 ± 4.0 kHz、D は 36.6 ± 16.2 ms、FMI は $7.22 \pm 5.98 \times 10^{-3}$ であった。

プローブ B: 快 USV の MF を 1.00 倍、D を 21.00 倍したシラブルから作成された。MF は 56.2 ± 8.1 kHz、D は 622.7 ± 287.1 ms、FMI は $22.55 \pm 20.95 \times 10^{-3}$ であった。

プローブ C: 不快 USV の MF を 2.57 倍、D を 1.00 倍したシラブルから作成された。MF は 54.5 ± 6.2 kHz、D は 683.0 ± 194.7 ms、FMI は $12.34 \pm 4.69 \times 10^{-3}$ であった。

プローブ D: 快 USV の MF を 0.39 倍、D を 1.00 倍したシラブルから作成された。MF は 19.2 ± 2.8 kHz、D は 41.7 ± 22.1 ms、FMI は $24.20 \pm 24.45 \times 10^{-3}$ であった。

プローブ E: 不快 USV の MF を 1.00 倍、D を 0.05 倍したシラブルから作成された。MF は 20.3 ± 0.2 kHz、D は 35.9 ± 19.2 ms、FMI は $11.07 \pm 6.89 \times 10^{-3}$ であった。

プローブ F: 快 USV の MF を 0.39 倍、D を 21.00 倍したシラブルから作成された。MF は 21.5 ± 2.2 kHz、D は 771.5 ± 309.0 ms、FMI は $26.85 \pm 22.25 \times 10^{-3}$ であった。

表 1 に上述した USV 刺激およびプローブ刺激の MF、D、FMI の平均と標準偏差を示し、それが快 USV と不快 USV どちらのパラメータに類似しているかを明示している。また、図 3 は各プローブ刺激の作成方法と特徴 (図 3a, b)、および刺激のソナグラム例 (図 3d) を表す。ここでは快 USV 的な数値をオレンジ、不快 USV 的な数値を青色の色符号により概略している。たとえばプローブ A は MF がオレンジ=不快 USV、D がオレンジ=不快 USV、FMI が青=快 USV 的な数値をもつ刺激となっている。なお、本研究で用いた全ての実験パラダイムにおいて刺激呈示回数が限られているため、各パラメータは連続的操作ではなく、快 USV あるいは不快 USV 的特徴を持つよう二値的操作を行い、刺激数を限定した。

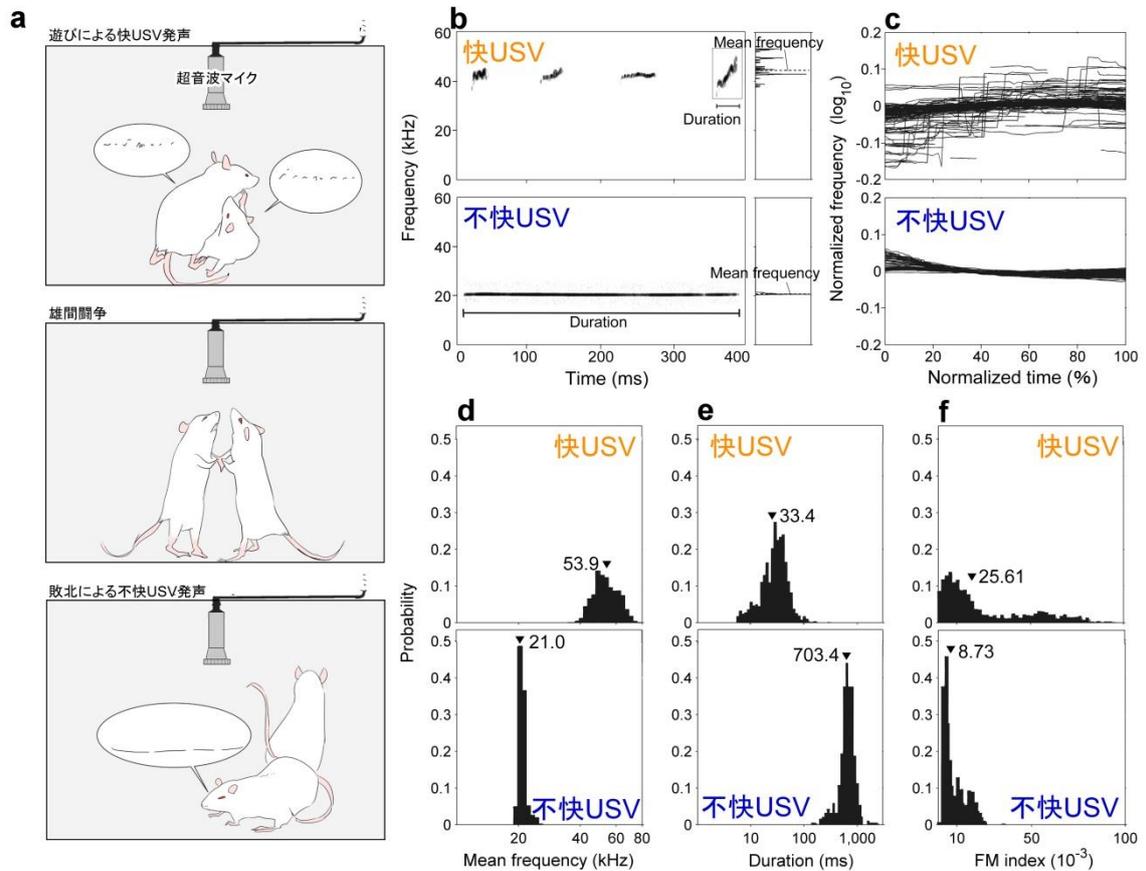


図2 USVの録音と解析方法

(a) ラットの快USV、不快USVの発声と録音方法。超音波マイクを備え付けたケージに雄ラットのペアを入れると遊びによる快音声が発声された。雄間闘争へ移行したペアのうち、敗北し劣位となった雄が不快USVを発声した。

(b) 快USV、不快USVの平均周波数 (Mean frequency: MF) と持続時間 (Duration: D) の算出方法。

(c) 快USV、不快USVの周波数変調指標 (Frequency modulation index: FMI) の算出方法。周波数と持続時間を標準化 (周波数は常用対数軸) した1コールのもつ変動係数として定義した。

(d) (e) (f) 快USV、不快USVのMF、D、FMIの分布と代表値 (平均)。

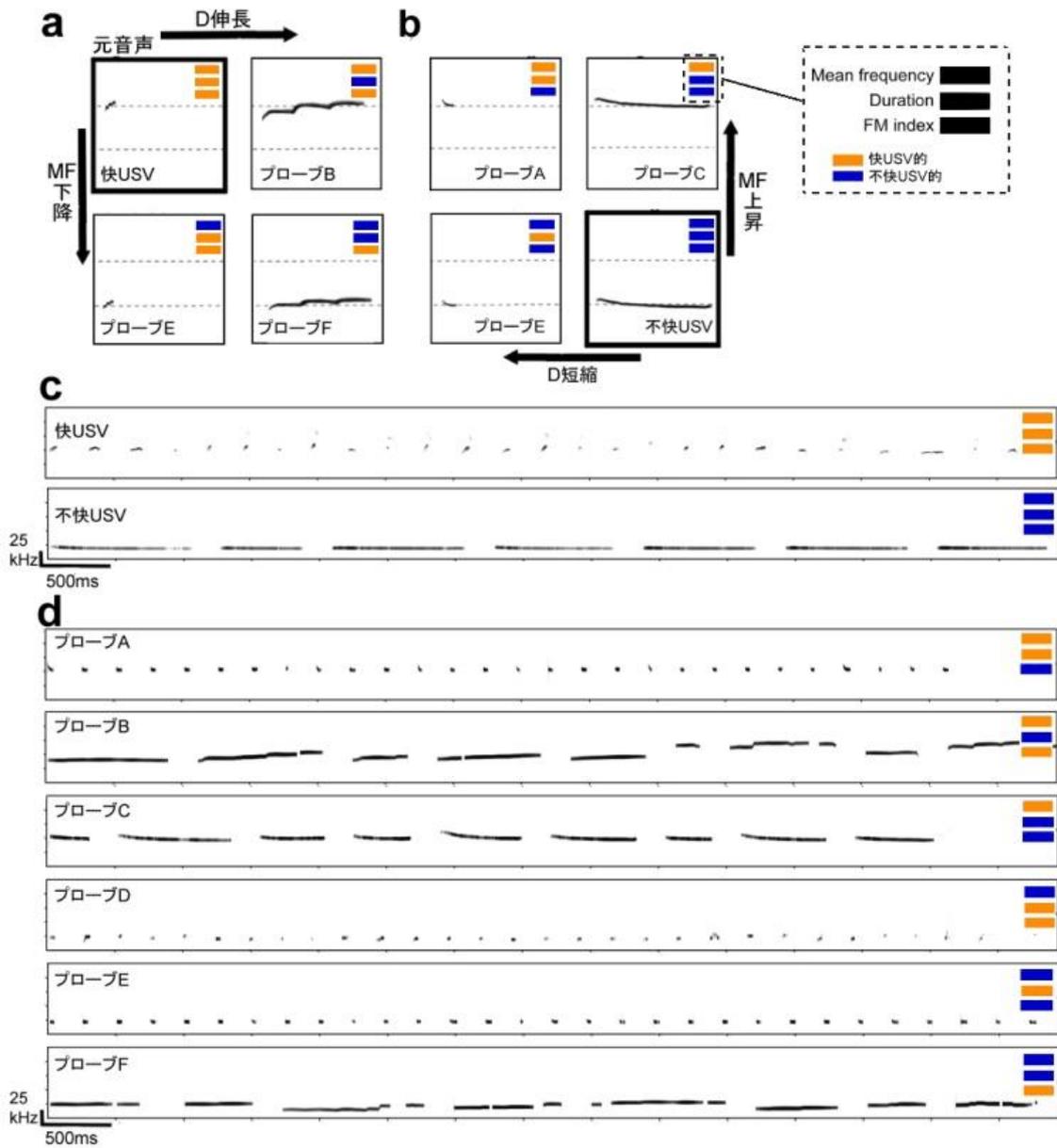


図3 音声刺激の作成方法

(a) 元音声の快 USV の持続時間 (Duration: D) を伸張しプローブ B を、平均周波数 (Mean frequency: MF) を下降させプローブ E を、その両者を行いプローブ F を作成した。

(b) 元音声の不快 USV の D を短縮しプローブ E を、MF を上昇させプローブ C を、その両者を行いプローブ A を作成した。

(c) 音声刺激が 7 秒程度になるように複数のコールを持つ wav ファイルを作成した。快 USV と不快 USV の音声刺激のソナグラムの一例を示す。

(d) 同様に 7 秒程度になるよう調整した各プローブの音声刺激のソナグラムの一例。

	Mean frequency		Duration		FM index	
	特徴	M ± SD (kHz)	特徴	M ± SD (ms)	特徴	M ± SD (10 ⁻³)
快 USV	—	53.9 ± 7.4	—	33.4 ± 19.6	—	25.61 ± 25.78
不快 USV	—	21.0 ± 0.9	—	703.4 ± 236.7	—	8.73 ± 6.04
プローブ A	快 USV	53.9 ± 4.0	快 USV	36.6 ± 16.2	不快 USV	7.22 ± 5.98
プローブ B	快 USV	56.2 ± 8.1	不快 USV	622.7 ± 287.1	快 USV	22.55 ± 20.95
プローブ C	快 USV	54.5 ± 6.2	不快 USV	683.0 ± 194.7	不快 USV	12.34 ± 4.69
プローブ D	不快 USV	19.2 ± 2.8	快 USV	41.7 ± 22.1	快 USV	24.20 ± 24.45
プローブ E	不快 USV	20.3 ± 0.2	快 USV	35.9 ± 19.2	不快 USV	11.07 ± 6.89
プローブ F	不快 USV	21.5 ± 2.2	不快 USV	771.5 ± 309.0	快 USV	26.85 ± 22.25

表1 プローブ刺激の音響特徴

第三章 研究 1：USV に対する汎化と弁別

3.1 背景

物理量が異なる刺激に対し、物理量が比較的近い刺激に対するものと同じ反応を示すことを汎化 (generalization)、物理量が遠いものに対しては異なる反応を示すことを弁別 (discrimination) という (Hanson, 1959)。この反応は主にオペラント条件づけによって形成される。刺激 A と B に異なった反応を示すよう行動を強化したあと、A と類似する別刺激 A'、B と類似する別刺激 B' を呈示する。A と同様の反応を A' に、B と同様の反応を B' に示せば AA' (BB') は汎化されているといえる。同時に、AA' と BB' 間は弁別されているといえる。

刺激そのものが新奇であるにも関わらず、刺激カテゴリに応じて割り当てられた反応がみられた場合、その動物の中に汎化と弁別された複数の刺激カテゴリが存在する証左となることが、複数の動物知覚の研究例により示唆されている。たとえばマカクザルの shrill bark という音声、さらに彼らの中で 2 カテゴリに分類されることが条件づけにより示されている (Fischer, 1998)。すなわち、条件づけを用いて汎化と弁別が形成されるかを測定することで、動物が音声カテゴリを所持しているか (あるいは形成できるか) が調べられる。

USV がカテゴリ的に知覚されるかどうかは不明瞭な点が多く、研究 1 においてはこれを実証する (目的 A) ために快・不快 USV を先行刺激とした条件づけを行う。快 USV と不快 USV を用いて作成した音声ファイルそれぞれに対して異なった反応 (実験中では左右のレバー押し) を形成したあと、新たな音声ファイルを呈示し、カテゴリに応じた汎化と弁別が可能かどうかを調べる。

また、USV をカテゴリ的に知覚していた場合、どのような音響特徴に基づく汎化と弁別であるのかを、プローブ刺激を呈示することで検討する (目的 B)。第二章で述べたとおり、プローブ刺激は MF、D、FMI が快 USV と不快 USV 間で部分的に入れ替えられた音声であり、カテゴリ的な曖昧性をもつ。このような音声に対しラットの条件づけ反応を測定することで、各音響特徴による知覚への影響を検討することができる。

3.2 方法

3.2.1 実験動物

12 匹の雄の SD ラット (JapanSLC) を使用した。ラットは購入時に個別のケージに入れられ、単独飼育された。なお、研究 2 および研究 3 では個体間の社会的相互作用を維持するためにペア飼育を実施しているが、この研究 1 においては個体の給餌制限による体重統制を徹底するため、単独飼育を行っている。

飼育室は温度 20 から 22 度、湿度は 30%以上に保たれ、12 時間ずつの明暗サイクル（点灯時間 8 時、消灯時間 20 時）で統制された。一週間の馴化期間中に自由給餌を行い、一週間後に測定した体重（312 g から 423 g）を基に、標準的な成長曲線（Japan SLC）に合わせた基準体重を個体および週齢ごとに定めた。

条件づけ開始時、ラットは 9 から 12 週齢であった。条件づけのために基準体重の 85 ± 2.5 %の範囲から逸脱しないよう体重統制を行い、1 日につきペレット (Lab Diet, PMI Nutrition International) 14 から 22 g を与え、給餌制限を行った。一方、給水には特に制限は設けなかった。

3.2.2 条件づけ

快 USV と不快 USV への弁別条件づけは全て同一のオペラント装置（内径 29.53 cm (L) × 23.50 cm (W) × 27.31 cm (H), ENV-007-CT, Med Associates, *Vermont, the USA*) 内で行った。装置は防音箱に入れられ、ライト、白色雑音スピーカ、二つの格納可能レバーと、その間に報酬用の液体定量吐出装置 (liquid dispenser) が備え付けられていた。床は格子式になっており、下の排泄物用トレイに、条件づけごとに新しい木屑製の床敷を入れた。超音波用スピーカがオペラント装置の上方に固定され、音声を呈示した。図 4 は装置内の概略図である。

条件づけ開始前にラットを 30 分間、2 から 3 回に渡ってオペラント装置に入れ、馴化させた。馴化中、ラットが左右のレバーを押した際には液体定量吐出装置から 20%スクロース溶液を報酬として与え、レバー押しを学習させた。

弁別条件づけは 3 段階から成る。全ての条件づけ段階において、快 USV が呈示された際は片側のレバーを、不快 USV が呈示された際はもう一方のレバーを押すようラットを訓練した。USV 刺激はオペラント装置制御システム (DIG-700F, DIG-716, DIG-726TTL-G, Med Associates; Power 1401, CED, *Cambridge, the UK*) によって制御され、アンプおよびスピーカを介して再生された。1 回の試行では、まずいずれかの USV 刺激が再生されてから 1 秒以内に両レバーが同時呈示され、ラットはどちらかのレバーを押すよう求められた。実験者が決めた音声-レバー間の組み合わせ（快 USV/不快 USV-左レバー/右レバー、組み合わせはカウンターバランスを設けた）に応じ、ラットの反応後に報酬または罰が与えられた。正しい反応を示した際には 20%スクロース溶液が 2 秒間報酬として与えられた。一方、誤った反応を示した際には 90 dB SPL の白色雑音が 30 秒間呈示された。このような非常に大きい音圧の白色雑音はラットにとって嫌悪的であり、罰として機能する (Bolles & Seelbach, 1964)。また、誤った反応を矯正するために同様の試行が繰り返され、正しい反応を示すまでは次の試行に進めないようになっていた。

条件づけ 1 段階目では快 USV、不快 USV 刺激がそれぞれ 10 ファイルずつ用いられた。USV 刺激の概要については 2.2.4 に記載している。1 日 1 セッション、60 分以内に計 120

試行の訓練が行われ、各試行間間隔 (inter-trial interval: ITI) は 10 秒間であった。条件づけ初期には、ほとんどのラットが 60 分以内に全 120 試行を終えられず、時間切れで訓練を打ち切った。しかし一か月以内には(16.5 ± 3.9 日)、全てのラットがカテゴリの異なる USV に対応したレバー押しを学習し、正しい反応を示すようになった。正反応率が 85%以上の基準を二日連続で達成した個体は条件づけ 2 段階目へ移行した。

条件づけ二段階目では快 USV、不快 USV が 20 ファイルずつ用いられた。この際、1 段階目で使用された 10 ファイルに新たに別の 10 ファイルが加えられた。1 日 1 セッション、120 分以内に計 240 試行の訓練が行われ、正反応率 85%以上を二日連続で達成した個体は条件づけ三段階目へ移行した。全てのラットが 4 日以内にこの基準を達成した。

条件づけ三段階目では快 USV、不快 USV が 30 ファイルずつ用いられた。二段階目までで用いられた 20 ファイルに、新たに別の 10 ファイルずつが追加された。1 日 1 セッション、120 分以内に計 240 試行の訓練が行われた。この試行のうち 10%、すなわち 24 試行がラットの反応に関わらず報酬も罰も与えられない無成果試行であった。これは続くプローブテストにおいて、試行の 10%が報酬・罰の無いプローブ刺激の呈示を予定しており、これに備えるための措置である。また、新たに加えられた USV 刺激 10 ファイルずつに対し、ラットは 85%基準を満たす高い正反応率を示した。このため、ラットは個々のファイルに対応したレバー押しではなく、USV のカテゴリに対する汎化・弁別レバー押し反応を学習していたと考えられる。全てのラットが条件づけ 3 段階目開始から正反応率 85%以上を二日連続で達成し、プローブテストへ移行した。

3.2.3 プローブテスト

弁別に対する音響特徴の寄与率を測定するため、プローブテストを実施した。テストは 1 日 1 セッション、120 分以内に 240 試行から成り、快 USV および不快 USV 刺激の 30 ファイルすべてと任意のファイル数のプローブ刺激が用いられた。試行のうち 10% (24 試行、プローブ刺激 6 カテゴリ×1 カテゴリにつき 4 試行ずつ) は USV 刺激の代わりにプローブ刺激が再生され、条件づけ時と同じようにいずれかのレバー押しが求められた。ただし、これはラットがどのような反応を示しても報酬・罰の呈示されない無成果試行であった。プローブ刺激への馴化を避けるため、ラットはテスト実施一回につき条件づけ三段階目に戻され、一週間同様の訓練を行った後に次のテストが実施された。テストは 1 個体につき合計 4 セッション実施され、テスト時の反応内容および反応時間はオペラント装置制御システム(DIG-700F, DIG-716, DIG-726TTL-G, Med Associates)によって記録された。

3.2.4 データ解析

すべての行動データを統計ソフトウェア R version 3.5.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria)によって解析した。また、追加パッケージ lme4 (Bates et al.,

2007) および multcomp (Hothorn, 2009) を用いた。

プローブテスト時の弁別反応データは、一般化線形混合モデル (generalized linear mixed model: GLMM) を用いて解析した。応答変数である弁別反応は、あるプローブ刺激が再生された際に快 USV と連合されたレバーを押す、すなわち快 USV にカテゴリ化するか、不快 USV と連合されたレバーを押す、すなわち不快 USV にカテゴリ化するかの二値である。そのため、解析はロジスティック回帰を用い、link 関数を logit とした。モデルのうち音響パラメータ平均周波数 (MF)、持続時間 (D)、周波数変調指標 (FMI) の特性を固定効果、ラットの個体差をランダム効果として、交互作用を考慮したものを含む複数のモデルで最尤推定を行った。固定効果の係数はラプラス推定により算出された (Bates et al., 2007)。また、これらのモデルに対し、赤池情報量規準 (Akaike information criteria: AIC) およびベイズ情報量規準 (Bayesian information criteria: BIC) を算出してモデル比較を行い、情報量規準が最小のモデルを、最もあてはまりのよいものとして選択した。

加えてプローブ刺激に対する、レバー押しまでの反応時間の統計解析も実施した。快 USV への連合レバーを押した際と不快 USV への連合レバーを押した際に分け、それぞれの USV 刺激に対する反応時間と各プローブ刺激に対する反応時間を、Dunnett の多重比較検定 (有意水準: $p < 0.05$) によって比較した。

3.3 結果

プローブ刺激に対する弁別反応は、それぞれの音響特徴に応じて体系的に変化した。ラットが快 USV への連合レバーを押す、すなわち快 USV としてカテゴリ化した割合はそれぞれプローブ A から F まで 82.8%, 90.6%, 72.4%, 42.2%, 19.8%, 33.3% であった (図 5a)。プローブ刺激に対しラットはいずれかのレバー押し選択を強制されているため、不快 USV への連合レバーを押す、すなわち不快 USV としてカテゴリ化した割合は、100% とこれらの割合との差分となっている。この結果は必ずしもプローブ刺激が USV そのものとして知覚されていることを意味しないが、少なくとも全てのプローブ刺激に対して、快・不快 USV に連合されたレバーを押す行動が見られたことが明らかになった。

GLMM で最尤推定された各項目の係数および AIC, BIC の情報量規準を表 2 に示す。最小の情報量規準を示したのもっともあてはまりのよいモデルとして選択した結果、モデルは

$$y_i \sim \text{Binomial}(n, p)$$

$$\log\left(\frac{p_i}{1-p_i}\right) = \beta_0 + \beta_{MF}x_{MF_i} + \beta_Dx_{D_i} + \beta_{FMI}x_{FMI_i} + r_i$$

となった。応答変数 y は任意のプローブ刺激に対する弁別反応であるため、快レバー押しか不快レバー押しかである。説明変数 x は固定効果であり、任意のプローブ刺激の MF、D、FMI の音響特徴が快 USV 的であるか不快 USV 的であるかである。快 USV 的な場合はダミー変数として 1 を、不快 USV 的な場合は 0 を挿入する。プローブ刺激の音響特徴の対応は

2.2.5 節および図 3、表 1 に記載している。 β は切片および MF、D、FMI の係数であり、係数の相対的な大きさが弁別知覚への寄与率となる。すなわち係数の大きい要因ほど弁別に及ぼす影響が大きいということを表す。また、 r は個体差をランダム効果の切片としてモデリングしたものである。

選択されたモデルは交互作用項をもたず、MF、D、FMI 全ての音響特徴を単純効果として表したモデルであった。また、各係数は、MF が $\beta_{MF} \pm SE = 3.00 \pm 0.20$ ($z = 15.38, p < 0.001$)、D が $\beta_D \pm SE = 0.49 \pm 0.16$ ($z = 3.0, p = 0.003$)、FMI が $\beta_{FMI} \pm SE = 1.19 \pm 0.18$, ($z = 6.51, p < 0.001$) となった (図 5c)。まず係数の大小関係から、最も強く弁別に寄与した音響特徴は快 USV 的 / 不快 USV 的な 50 kHz / 22 kHz 付近の平均周波数 MF であった。次いで FMI の係数が大きく、快 USV 的 / 不快 USV 的な周波数変調の大きい / 平坦なパターンも弁別への手がかりとなると示唆された。係数が相対的に最も小さかった持続時間 D に関しても係数は有意であり、快 USV 的 / 不快 USV 的な短い / 長い時間長が弁別に影響を及ぼしていることがわかった。

USV 刺激とプローブ刺激への平均レバー押し反応時間を図 5b に示す。快 USV に対する正しい反応時のレバー押し時間は 0.71 ± 0.35 秒であった。また、不快 USV に対する正しい反応時のレバー押し時間は 0.81 ± 0.39 秒であった。これらの反応時間と、プローブ刺激に対する反応時間を Dunnett 法により比較したところ、プローブ F が快 USV へカテゴリ化された際の反応時間にのみ有意差が認められた (2.20 ± 2.90 秒; $p = 0.025$) が、このケースを除いた全ての場合において反応時間の有意差は認められなかった。この結果から、プローブ F のみ快 USV カテゴリ化への曖昧性が高く、それ以外の全ての刺激は迅速にカテゴリ化が行われたと考えられる。

3.4 考察

3.4.1 快・不快 USV の汎化と弁別

実験に用いたすべてのラットが快 USV、不快 USV の 2 カテゴリの音声に対する汎化・弁別反応を学習することに成功した。条件づけは 3 段階から成り、そのうち 3 段階目で新たに導入した音声刺激ファイルに対しては、ラットは汎化および弁別 (Hanson, 1959) を示した。汎化および弁別とは、新しい快 (不快) USV ファイル再生時に、それまでに条件づけされた同様のレバー押し反応を示したことを意味する。すなわちラットは個々のファイルに対する個別のレバー押しを学習したのではなく、快 USV と不快 USV というカテゴリとして音声を知覚し、それに応じたレバー押しをしていたと考えられる。

本実験では USV とレバー押し行動に連合させるのに一貫して報酬を用いていることに留意する。本来、不快 USV は恐怖条件づけの先行刺激として迅速に学習される。すなわちこの音声には恐怖・嫌悪的イベントと連合しやすい学習準備性が存在し (Endres, Widmann &

Fendt, 2007; Bang et al., 2008)、本実験のような報酬連合は生得的には不自然である。しかしながら、全てのラットが条件づけ正答率 85% 基準を達成し、条件づけ成立後には迅速なレバー押し反応を示した（快 USV: 0.71 ± 0.35 秒; 不快 USV: 0.81 ± 0.39 秒）ことから、本実験においてこの学習準備性は USV のカテゴリー的知覚に影響を及ぼしていなかったと考えられる。なお、不快 USV によって齎される恐怖・嫌悪の情動的影響に関しては研究 2 で別個検討している。

3.4.2 音声弁別に対する各音響特徴の寄与

本実験では USV の 2 カテゴリーの音響的差異である 3 パラメータ：平均周波数 MF、持続時間 D、周波数変調指標 FMI が、弁別知覚にどの程度影響を及ぼすか調べることを第二の目的とした。そのため、これらパラメータを入れ替えたプローブ刺激を呈示し、そのカテゴリー的知覚が快 USV と不快 USV どちらに寄っているのかをテストした。本実験は心理物理学の恒常法 (Thurstone, 1927) を踏襲しており、このような手法を USV 研究に適用したのは初めての試みとなる。

プローブテストによって得られたデータの解析の結果、MF つまり音声の持つ周波数の平均が、最も支配的にカテゴリー的知覚に影響を及ぼすことがわかった。快 USV に近い周波数をもつ音声は快 USV 的に、不快 USV に近い周波数をもつ音声は不快 USV 的に知覚される。なお、この文脈における知覚とはレバー押しという弁別行動の偏りという客観的な観測値を指しており、必ずしも USV とプローブ刺激間の主観的知覚が同一であることを意味しない。弁別行動が同一であっても主観的知覚が異なっている可能性は高く、これは神経活動など内的処理過程の差異などで検討する必要がある (第五章：研究 3 を参照)。

MF よりも効果は小さいが、FMI および D もまたカテゴリー的知覚へ影響を及ぼしていた。FMI は音声内の周波数のばらつきのパターンを表す数値であり、D は音声のオンセットからオフセットまでの持続時間である。得られたデータからはこれら 3 要因間の交互作用は認められず、MF、D、FMI は独立に弁別に寄与していたことが示唆された。

音声のもつ平均周波数が弁別に対して最も支配的であった理由としては、まず動物の特定周波数に対する聴覚的感受性の高さが考えられる。齧歯類のような小動物は中耳および内耳のサイズが小さく、これらへの共鳴周波数が高周波になる傾向がある。すなわち、体サイズが大きい動物には高周波の音は聞こえづらく、小さい動物には高周波の音が聞こえやすくなる。そのため、齧歯類の超音波発声は体サイズが大きい捕食者からの検出を避けることが可能と考えられるのである (Kolacz et al., 2018)。実際にラットの聴覚曲線は 20 kHz 付近と 35 kHz 以上に二つのピークを持ち、USV 帯域とオーバーラップするこれらの帯域への聴覚感受性が高くなっていることがわかる (Gourevitch & Hack, 1966)。

また、音声の含む周波数成分が音源定位に関与することも、音声の弁別が周波数依存になっている理由のひとつとして考えられる。音源の推定には主に両耳に届く音声の時間差

(両耳間時間差- Interaural time differences: ITD) や音声レベルの差 (両耳間レベル差- Interaural level differences: ILD) が利用できるが、これらに加え、周波数が手がかりとなることも知られている (Wenzel et al., 1993)。なぜならば頭部や耳介といった複雑な身体形状は各周波数に対して異なった反射や回折を生じさせ、音源の方向に依存して周波数特性が変化するためである (Shaw & Teranishi, 1968)。すなわち周波数情報は知覚される音高の高さを決定づけるだけでなく、音源の場所情報としても利用できるために、生体はその情報を優先的に利用しうよう進化した可能性が考えられるのである。なお、低周波数に関してはそもそも ITD 手がかりが異なり、こちらも音源定位に関与する (Wightman & Kistler, 1992) が、本実験における音声は快・不快 USV とともに高周波の超音波帯域であるため、齧歯類音声においてはこのような計算は行われていないと推測される (Heffner, Koay & Heffner, 2001)。

音声の周波数変調パターンと持続時間も有意な効果がみられた。この理由のひとつとして、周波数変調 (周波数のゆらぎ) とその発声の長さの差異が、呼吸系や咽頭、声道の運動による副産物であるためと考えられる。異なった周波数を発声する際、発声系の運動パターンには差異が生じている (Riede, 2011)。さらに快 USV と不快 USV が発声される行動文脈は異なっており、たとえば遊び時の快 USV ならばゆらぎが大きく、断続的に発声されて短くなる。一方、恐怖を感じた際の不快 USV ならば、動きを止めた状態で発声されるために、平坦な音声を長く発声することができる。このような発声時の動きの違いによって生まれた音響的差異が、弁別の手がかりのひとつとされている可能性は高い。

また他の理由として、特に周波数変調の有無により音声への馴化を防ぎ、持続した検出が出来るようになるといったことも挙げられる。純音を持続して再生すると聴覚系の馴化が起こり、主観的知覚が弱まってしまうため、音声のもつ周波数パターンがそれを防いでいるという可能性が考えられるのである。実際に USV の平均周波数のみを模した純音 (50 kHz や 20 kHz の純音) を用いた際は、自然な USV と比較して神経活動が弱まるといった知見がある (Ouda, Jílek & Syka, 2016; 第五章を参照)。



図4 オペラント装置の概要図

研究1で用いたオペラント装置。音声刺激を呈示する超音波スピーカ、罰である白色雑音を呈示するスピーカ、報酬であるスクロース溶液を給与する液体定量吐出装置（liquid dispenser）、および2つのレバーが備え付けられた。

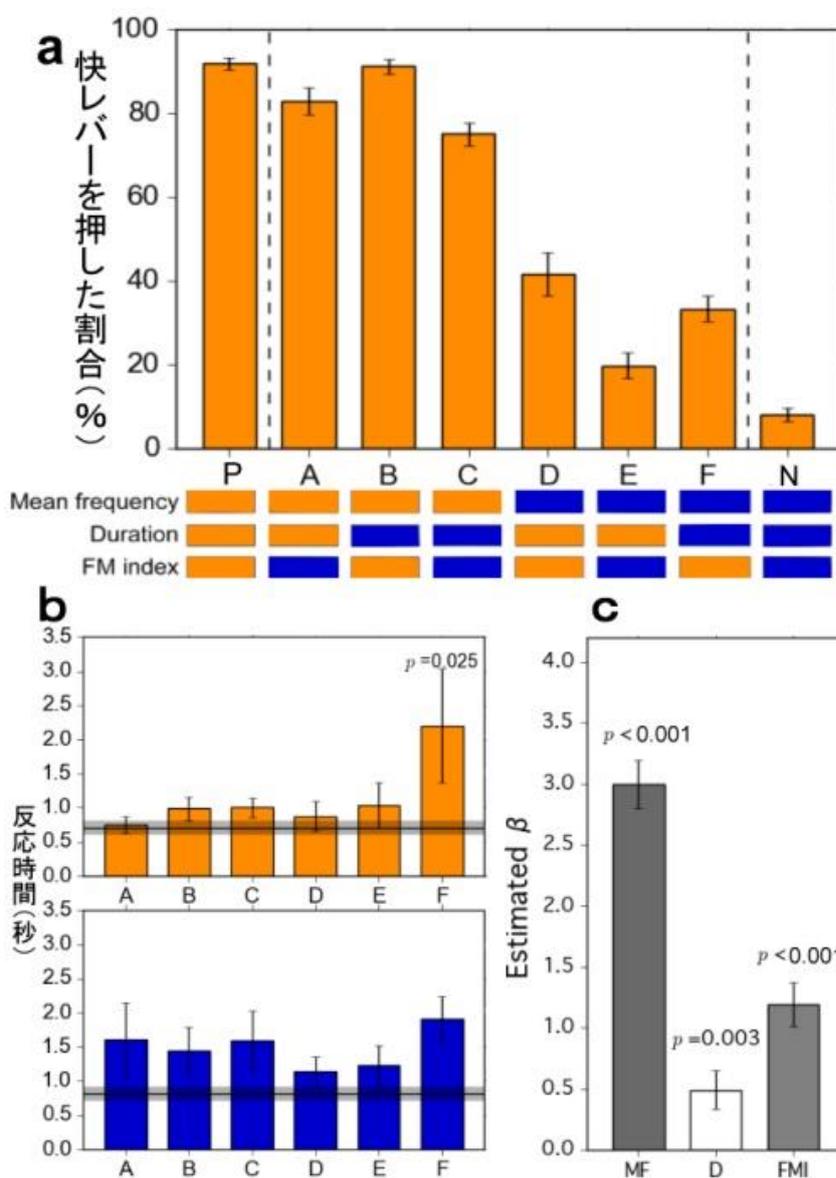
図5 汎化・弁別実験の結果
すべてのエラーバーは標準誤差を表す。

(a)各音声刺激に対し快レバーを押した割合。100%との差分が不快レバーを押した割合となる。P と N はそれぞれ快 USV (positive USV)、不快 USV (negative USV) のデータを示す。快 USV における快レバー押し (不快 USV における不快レバー押し) は基準の 85% 正答率を達成していたが 100% ではない。プローブ A から F における弁別の割合は図のようになった。

(b) 上: 各プローブに対し快レバーを押した際の反応時間。グラフ上の線分および陰影は快 USV への反応時間の平均と標準誤差を示す。プローブ F のみ快 USV と差があり、それ以外のプローブは変わらない反応速度でレバーが押された (プローブ F: $p=0.025$; Dunnett の多重比較)。

下: 不快レバーを押した際の反応時間。グラフ上の線分および陰影は不快 USV への反応時間の平均と標準誤差を示す。すべてのプローブ刺激において、不快 USV と変わらない反応速度でレバーが押された。

(c) ロジスティック回帰による GLMM による推定係数。MF は平均周波数、D は持続時間、FMI は周波数変調指標を示す。音響特徴のすべての項目が有意な係数を有していた (MF: $p < 0.001$; D: $p = 0.003$; FMI: $p < 0.001$)。最も弁別に影響していたのは MF であり、次いで FMI と D であった。



	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	AIC	BIC
1	-1.95 ($p<0.001$)	3.00 ($p<0.001$)	0.49 ($p=0.003$)	1.19 ($p<0.001$)	—	—	—	1221.8	1247.0
2	-2.04 ($p<0.001$)	3.03 ($p<0.001$)	0.61 ($p=0.009$)	1.33 ($p<0.001$)	—	—	-0.23 ($p=0.44$)	1223.2	1253.5
3	-1.90 ($p<0.001$)	2.93 ($p<0.001$)	0.42 ($p=0.041$)	1.19 ($p<0.001$)	0.16 ($p=0.61$)	—	—	1223.5	1253.8
4	-1.91 ($p<0.001$)	3.00 ($p<0.001$)	0.48 ($p=0.003$)	1.15 ($p<0.001$)	—	0.11 ($p=0.75$)	—	1223.7	1254.0
5	-2.04 ($p<0.001$)	3.03 ($p<0.001$)	0.62 ($p=0.014$)	1.34 ($p<0.001$)	—	-0.02 ($p=0.48$)	-0.23 ($p=0.44$)	1225.2	1260.5

表2 弁別反応の線形モデル比較

	快 USV レバー押し		不快 USV レバー押し	
	割合 (%)	反応時間 (s)	割合 (%)	反応時間 (s)
快 USV	91.8	0.71 ± 0.35	8.2	1.65 ± 1.01
不快 USV	8.0	1.18 ± 0.56	92.0	0.81 ± 0.39
プローブ A	82.8	0.75 ± 0.42	17.2	1.61 ± 1.72
プローブ B	90.6	0.99 ± 0.62	9.4	1.45 ± 1.14
プローブ C	72.4	1.00 ± 0.50	27.6	1.60 ± 1.49
プローブ D	42.2	0.88 ± 0.75	57.8	1.14 ± 0.77
プローブ E	19.8	1.04 ± 1.16	80.2	1.24 ± 0.98
プローブ F	33.3	2.20 ± 2.90	66.7	1.91 ± 1.13

表3 弁別反応の各レバー押し割合と反応時間

第四章 研究2：USV に対する情動反応の測定

4.1 背景

4.1.1 情動の定義

心理学および神経科学領野において、情動 (emotion) とは、「外的な刺激や内的動機などの要因によって急速に引き起こされる、生理反応や身体的表出を伴う一過性の変化」として定義される。そして感情 (feeling) は、このような自身の反応を認知した際に生じる主観的意識であると考えられている (Damasio, 1999)。生理反応や身体的表出とは、具体的には①自律神経系の活性や、②対象に対しどのような行動を示すかである。

①の自律神経系は交感神経系と副交感神経系から構成されており、交感神経系が優位となるとアドレナリンやノルアドレナリンなどの神経伝達物質が分泌され、血圧と心拍数の上昇、発汗、瞳孔の散大などの「興奮」反応が起こり、身体の活動性が増す。対照的に、副交感神経系優位となるとアセチルコリンが分泌され、血圧と心拍数の減少、瞳孔の収縮、消化系の蠕動運動の活発化と各消化酵素の分泌などの「鎮静」反応が引き起こされる。

また、②は以下のような行動を指す。対象が自身にとって有益なものである場合、接触・接近を試み親近的アプローチをとるなど「快」的行動を示す。一方、自身に有害なものに対しては攻撃や逃走、あるいは天敵などの警戒対象からの検出を逃れる際に動きをとめるといった、闘争 (fight) / 逃走 (flight) / 動きをとめる・すくみ (freezing) の 3F と呼称される「不快」的行動を示す。

すなわち、情動は「興奮 (自律神経系のうち交感神経系優位) — 鎮静 (自律神経系のうち副交感神経系優位)」と「快 (対象が好的であり、親近的反応を促しうる内的状態か) — 不快 (対象が嫌悪的であり、回避的反応を促しうる内的状態か)」の軸として表すことが可能である。実際に Russell は様々な種類の感情を興奮—鎮静と快—不快の二次元情動軸に分け、平面上の円環として表す「感情の円環モデル」を提唱している (Russell, 1980)。

4.1.2 USV 聴取による行動の変容

ラット USV はその発声文脈から、発声者が快・不快状態である際の音声であるとされている一方、聴取者側の反応を調べた研究は限定されている。USV という情動音声の知覚研究においては言うまでもなく、この聴取者への影響を測定することが不可欠である。

数少ない研究例としては、第一に聴取者の社会的行動 (ここでは他者間との相互作用を意味するので、雌雄間の性行動を含む) の変化を観察したものが挙げられる。性行動において快 USV を再生したのち、それを聴取した発情雌ラットを雄ラットと引き合わせると、雌の交尾受け入れ行動の頻度が上昇する (Geyer & Barfield, 1978; McIntosh, Barfield & Geyer, 1978; White & Barfield, 1990)。また、快 USV の再生に対し、雌からの鳴き交わり

がみられる (White, Gonzales & Barfield, 1993) ほか、発声器官を除去した雄の交尾成功率は減少し、快 USV を再生することでこれを回復させることができる (White & Barfield, 1978)。性行動以外の社会的行動にも、快 USV の再生は影響を及ぼす。快 USV を多く発声した個体に対する接近時間は発声の少ない個体に対してよりも上昇し、快 USV のコンタクト・コールとしての機能が指摘されている (Panksepp, Gordon & Burgdorf, 2002)。一方、不快 USV が雄間闘争における劣位雄から発せられると、それを聴取した優位雄は攻撃的な行動を減少させる (Thomas, Takahashi & Barfield, 1983)。

次いで快・不快 USV 聴取により引き起こされる、直接的な社会的行動ではない「快・不快情動に関連する行動」についても記載する。スピーカを備えた放射状アーム迷路を用いた際、ラットは快 USV の音源には接近を示す一方、不快 USV の音源には近寄らない (Wöhr & Schwarting, 2007)。また、不快 USV の再生により、不快情動を表す 3F 行動が引き起こされる (Brudzynski & Chiu, 1995; Burman et al., 2007; Commissaris et al., 2000; Neophytou et al., 2000)。さらに私はこれまでに、報酬合図となる先行刺激と罰合図となる先行刺激を弁別させるオペラント行動実験下において、快 USV の聴取は報酬予測を増加させ、不快 USV の聴取は罰予測を増加させることを明らかにしている (Saito et al., 2016)。動物は快情動下においては報酬予測が増加し (楽観的バイアス)、不快情動下では罰予測が増加する (悲観的バイアス: Mendl et al., 2009)。そのため、快・不快 USV による報酬・罰予測の増加は、USV が聴取個体にも同様の情動状態をもたらした証左であると解釈している。

4.1.3 研究の目的

以上の知見を踏まえ、研究 2 は以下に述べる二つの実験を実施した。それぞれが研究テーマである二つの目的に沿うものとなっている (目的 A: USV の知覚はカテゴリー的か検討する、目的 B: 音響特徴はカテゴリー的知覚にどのような影響を及ぼすか検討する)。

まず、ラットの USV が聴取個体にどのような自律神経系反応を引き起こすか (目的 A)、そして USV のどの音響特徴が自律神経系反応に影響するか調べる (目的 B)。4.1.1 で述べたとおり、情動は「快—不快」と「興奮—鎮静」の二軸で論じることができる。USV の聴取による情動的影響を検討するためには、「快—不快」を示すような行動指標だけでなく、「興奮—鎮静」を示す自律神経系応答の測定が必要であると考え、USV プレイバック時の心拍測定を実施した。現在までに心拍などの自律神経系応答が USV プレイバックにより引き起こされたという知見は存在せず、これは新奇な研究内容となる。また、USV によって自律神経系に変化がみられた場合、それがどのような音響特徴によるものかを調べるため、プローブ刺激を再生した際の心拍も同時に測定した (心拍測定実験)。心拍の測定に関するより詳細な知見は続く 4.1.4 に述べる。

また、USV のどのような音響特徴が快・不快情動反応を引き起こすのか検討する (目的

B)。4.1.2 で述べたように、快 USV の聴取は快情動的行動を、不快 USV の聴取は不快 USV の行動を誘発する。このような行動が USV のどの音響特徴によって引き起こされるものなのか検討するために、Wöhr らの放射状アーム迷路実験を踏襲した音源への接近実験を実施した (Wöhr & Schwarting, 2007)。音源からは快 USV、不快 USV のほかにプローブ刺激が再生され、音源への接近をどの程度示すか、研究 1 と同様に音響特徴の影響を解析した (音源接近実験)。

4.1.4 自律神経系指標としての心拍

異なった情動状態は異なった自律神経系反応を誘起すると考えられる (Ekman, Levenson & Friesen, 1983)。この自律神経系反応は主に心拍、皮膚電気抵抗、体表温度、瞳孔の大きさなどが挙げられるが、このうち心拍 (heart rate) は情動状態に高い時間解像度で影響を受ける (Sztajzel, 2004)。そのため、個体の情動状態がある事象を受けてどのように変化するかを調べる際には、その事象に対する心拍の変化や、心拍自体のゆらぎ (心拍変動- heart rate variability: HRV) を測定することが有用である。

心拍は主に拍動の筋電を心電図 (ECG) として記録することで数値化できるが、ECG においては急速な筋収縮と弛緩が、複数の陰性ないし陽性のピークから成るパルスとして現れる (図 6a)。このピークは出現する順にそれぞれ P 波、Q 波、R 波、S 波、T 波と呼称される。このうち、最も急峻な陽性のピークを R 波と呼び、隣り合う R 波の間隔 (RR 間隔) と、それを元に算出した複数の HRV 指標を心拍解析に用いるのが主流である (Niskanen et al., 2004)。

ヒトの情動指標として広く用いられている RR 間隔および HRV 指標である (Sztajzel, 2004) が、その計測手法が簡易かつ非侵襲的であるために、近年ヒト以外の哺乳動物においてもこれらを用いた情動評価が行われている。ラット・マウスにおいては環境や外的刺激、毒物などの侵害刺激によるストレスの評定 (Park et al., 2017; Burwell & Baldwin, 2006; Rowan et al., 2007) など多くの研究例が既に存在する。

実験動物である齧歯類以外には家畜動物や伴侶動物が対象とされている。ウマでは運動時のストレス (Rietman et al., 2004)、ウシでは搾乳 (Hagen et al., 2004) や飼育環境 (Mohr, Langbein & Numberg, 2002) のストレスが HRV と相関することが知られている。ヒツジでは群れからの分離ストレス (Reefmann, Wechsler, & Gygax, 2009) やグルーミングストレス (Coulon et al., 2015) の他、給餌内容の情動価 (おいしい餌かそうでないか) と HRV の関連について調べられている (Reefmann et al., 2009)。イヌでは社会的報酬・社会的ストレスの快・不快刺激を呈示した際に異なった心拍の変化がみられる (Katayama et al., 2016)。

以上の背景、すなわち心拍間隔および HRV を自律神経系応答の指標とするのに有用であること、そしてこれらの手法はヒト以外の動物にも適用可能であることにより、私は USV による自律神経系応答の計測に心拍の解析を採用した。

4.1.5 仮説

心拍測定実験では快・不快 USV とプローブ刺激を再生し、自律神経系応答として心拍間隔と HRV 指標：SDNN および rMSSD (4.2.4 節参照) を解析する。二種類の USV のうち、快 USV は興奮、すなわち交感神経系優位を促すと予測した。これは快 USV が接近という実際の運動を伴った行動をもたらす音声であり、かつ同種間との探索・遊び文脈でよく発声される音声であることを根拠としている。対照的に不快 USV は鎮静、すなわち副交感神経系優位を促すと予測した。不快 USV は天敵の存在を他者に知らせる警戒声としての機能が知られ、聴取個体にはしばしばすくみがみられる (Brudzynski & Chiu, 1995)。また古典的恐怖条件づけにおいて刺激に対するイヌの心拍を調べた研究では、罰である電気ショックに対しては心拍数が上昇した一方、その先行刺激である純音呈示では心拍数が減少した (Church et al., 1966)。先行刺激に対するイヌの心拍反応のように、ラットにおいても不快事象の予測的刺激に対しては心拍数が減少すると予測される。そしてラットにとって不快 USV は警戒声、すなわち不快事象の合図となる音声であり、その聴取時には脅威対象からの検出を逃れるために生理反応や行動が抑えられると考えられたため、自律神経系応答が鎮静であると予想した。

音響特徴による影響に関しては研究全体の仮説および研究 1 の結果から、平均周波数(MF) が最も強い効果をもたらすと考えた。また、不快 USV の長く平坦な構造の音声は動きを伴わない、すなわち鎮静時に、快 USV の短く変調の大きい音声は動きを伴う、すなわち興奮時に発声されていると考えられるため、持続時間 (D) および周波数変調指標 (FMI) による効果もみられると予測した。

音源接近実験では音源への接近を快情動の指標、非接近を不快情動の指標とし、USV およびプローブ刺激を聴取した際の快—不快の情動価について測定・比較を行う。これにより、音響特徴が情動価に寄与する影響を考察する。

USV 自体の情動価については、快 USV が接近を、不快 USV が非接近をもたらすことが既に知られている (Wöhr & Schwarting, 2007) ため、これは過去の研究の追試となっている。

また、音響特徴の影響に関しては、以下の理由から心拍測定実験の結果と同様であると考えた。情動系の中心である扁桃体などの神経基盤は、刺激の感覚入力を皮質領野から受け取り、刺激に対する興奮—鎮静応答と刺激への快—不快の意味づけの両者を行っている (Smith & DeVito, 1984; Murray, 2007)。扁桃体からの出力は視床下部を通じて自律神経系を調節するか、あるいは前頭領野において刺激に対する情動的価値判断を促し行動選択を調節するかといった違いがみられるが、その音声刺激の入力は共通であると考えられ、影響を及ぼす音響特徴も同様であると推測される。

4.2 心拍測定実験：方法

4.2.1 実験動物

5 週齢から 12 週齢の SD ラット計 30 匹（雄 24 匹、雌 6 匹; 258 ± 54 g）を用いた。ラットは購入後、同性のペアになるよう実験者に任意に分けられ、一つのケージ内でペア飼育された。これは音声に対する感受性を維持するよう、同種個体との社会的相互作用を継続させたためである。飼育室は温度 20 から 22 度、湿度は 30% 以上に保たれ、12 時間ずつの明暗サイクル（点灯時間 8 時、消灯時間 20 時）で統制された。給餌・給水はすべて統制せず、ラットは自由に摂食・摂水が可能であった。餌は高蛋白質含有の齧歯類用ペレット (Lab Diet, PMI Nutrition International) が与えられた。

購入から、三日から一週間の期間を設けたのち実験が開始された。USV に対する反応性は成体 (adult: 12 週齢以降)・発達期 (juvenile: 3 から 10 週齢) ともに見られるが、発達期の方がより高いという知見が存在するため (Wöhr & Schwarting, 2007)、12 週齢以前での心拍計測を行った。

4.2.2 ECG 記録

ラットにまずイソフルラン吸入器 (MK-A120eco, MUROMACHI, Inc., *Kyoto, Japan*) を用いて 2% の麻酔をかけ、心拍計測用電極と電極固定用のジャケットを取り付けた。電極はヒト用の貼り付け ECG 電極 (VitrodeV, NIHON KOHDEN, *Tokyo, Japan*) を $1.5 \text{ cm} \times 2 \text{ cm}$ 程度のサイズにカットし、導通用ジェル (SignaGel, Parker Laboratories, Inc., *New Jersey, the USA*) を用いて毛を掻き分けながら、ラットの胸部の二点および腹部の一点に貼り付けた (図 6b)。心臓を挟んだ胸部の位置に信号用電極を、そこから二等辺三角形を描くように腹部に基準電極を置くことで ECG が取得できる (Dupre et al., 2005)。この電極全体を覆うため、胸部から腹部にかけて絶縁ジャケットを装着した。ジャケットはラットの胴体を多少締め付けていたが、首および四肢は自由に動かさ、高所へのジャンプなどの垂直運動以外は支障なく行える状態であった。

電極から得られた ECG のアナログ信号を生体信号用アンプ (DAM50, World Precision Instruments, *Florida, the USA*) で 1000 倍に増幅し、1 Hz から 1000 Hz のバンドパス・フィルタをかけ、トレンドノイズを除去した。そしてマルチチャンネル生体信号記録装置 (Power 1401, CED) を用いてアナログ-デジタル信号変換を行い、サンプリング周波数 5000 Hz で記録した。また、装置には超音波スピーカ制御アンプ (Ultrasoundgate Player 116, Avisoft) から音声信号を入力し、音声の再生タイミングと ECG が同時に記録できるようになっていた。

4.2.3 心拍計測セッション

セッション前の数日間に渡りラットは 2 から 3 回、心拍計を取り付けられない状態で計測用ケージに入れられ、環境への馴化を行った。ケージは内径 55 cm (L) × 30 cm (W) × 35 cm (H) からなるアクリル・ケージであり、防音箱に入れられていた。また、ケージ上部には超音波スピーカ (Ultrasoundgate Player 116, Avisoft)、Web カメラ (NSW200M, Buffalo, Inc.)、および超音波モニタリング用の検出器 (USD6-6A-7, YS Design Studio, Tokyo, Japan) が取り付けられていた (図 6c)。超音波検出器のオーディオジャックを介し、ヒト可聴域まで音高が下げられた超音波音声刺激がモニタリング用動画ソフトウェア (Debut, NCH software, Canberra, Australia) に入力され、Web カメラからの映像と同時に記録された。

ECG 記録ではラット一匹につき 1 回の心拍計馴化セッション、1 回の USV 刺激再生セッション、3 回のプローブ刺激再生セッション、計 5 回の計測が実施された。1 日につき 1 セッションがこの順序で実施され、全てのセッションは 30 分間のタイムスケジュールから成っていた。また、セッション間は 1 日以上間隔が設けられた。

心拍計馴化セッションは字義通り心拍計への馴化を行う目的で実施した。電極とジャケットを装着したラットを麻酔器から取り外し、計測用ケージに入れた。全てのラットが数分以内に目を覚まし、数分から十数分間ケージ内を動き回ったが、特に探索可能なエリアが存在しないため、セッション終了の 30 分後までには行動量が低下していた。セッション中電極およびジャケットは剥脱することなく、安定して ECG 記録が行えていた。

USV 刺激再生セッションではラットをケージに入れ、15 分間の自由行動および馴化時間を設けた。そしておよそ 7 秒から成る USV 刺激音声ファイル (2.2.4 節参照) が、快 USV と不快 USV につき 9 ファイルずつ、計 18 ファイル再生された。刺激間隔 (Inter-stimulus interval: ISI) は 43 秒程度であり、1 ファイルの再生 1 ブロックにつき計 50 秒間となるよう調節された (図 6d)。快 USV と不快 USV はランダムに呈示されたが、同カテゴリの USV が連続して 4 回以上続かないようスケジュールが組まれた。

続く 3 回のプローブ刺激再生セッションでは、同様に 15 分間の自由行動および馴化時間を設けた。そして 1 回のセッションにつき 2 カテゴリのプローブ刺激を呈示した。プローブ刺激はおよそ 7 秒からなる音声ファイル (2.2.5 節参照) を、プローブ 1 カテゴリにつき 9 ファイルずつ、計 18 ファイル再生した。ISI は 43 秒程度、音声ファイル再生 1 ブロックにつき計 50 秒になるよう調節され、同カテゴリの刺激が 4 回以上続かないようランダム呈示された (図 6d)。このセッションは、ラット一匹につきプローブ刺激の 6 カテゴリ全ての呈示を経験するよう、合計 3 回実施された。

4.2.4 データ解析

MATLAB Version 2014a(MathWorks)を用いてプログラムを作成し、音声呈示開始タイミングを基点 0 秒としてそれより 7 秒前から 14 秒後の ECG を切り出した。音声呈示-7

秒から 0 秒をベースライン、0 秒から 7 秒をテスト、7 秒から 14 秒をポストと定義した。そして局所的最大値を検出する findpeaks 関数によって R 波の頂点ポイントを検出し、RRI を算出して時系列順にグラフ化した (図 7)。この際目視により、局所的最大値が検出されていないポイントをノイズとして、各ブロックに対する RRI 閾値を設定し除外した。算出した RRI から、各ブロックのベースラインおよびテストにおける RRI の平均(mean RRI) を心拍間隔として、RRI の標準偏差(SDNN)、隣接する RRI の差の二乗平均平方根(rMSSD) を HRV 指標としてそれぞれ算出した。mean RRI はブロック間で RRI の大きさを比較することができるので、心拍数の増減を表す。RRI の延長は心拍数の下降、すなわち副交感神経の活性を示し、RRI の短縮は心拍数の上昇、すなわち交感神経の活性を示す (Jose, 1966)。また SDNN は自律神経系全体の活性、rMSSD は副交感神経の活性の指標となる (Radespiel-Tröger et al., 2003)。これらの指標について、ブロック内におけるテストからベースラインの数値を差し引きした。

本実験では 1 カテゴリにつき 9 ファイルの呈示を行った。このうち、快 USV、不快 USV における mean RRI の推移を図 8 に示す。ベースラインの数値との差分を算出しているため、0 はベースラインを示す。後述のとおり快 USV では、HRV 指標の変化はベースラインと比較してみられなかった。一方不快 USV では音声呈示による顕著な RRI 変化がみられたが、これは刺激の繰り返し呈示によって徐々に下がっていくことがわかった。すなわち、音声に対する馴化により、繰り返し呈示により情動反応が減少することが示唆された。このため、解析には各音声カテゴリにつき、1 回目の呈示時の HRV 指標のみを用いた。

データ点は各音声カテゴリにつき 1 点、音声は 8 カテゴリ (快 USV、不快 USV、プローブ刺激 6 カテゴリ) なので 30 個体から計 240 点のデータを対象とした。そのうち 2 点 (1 個体からのプローブ B および C に対する応答データ) が欠損したため、解析に使用したデータ点は計 238 点となった。これらの mean RRI、SDNN、rMSSD の分布を図 9a に示す。分布は裾が重く、大きく外れた値が散見された。この外れ値は音声プレイバックに対するひと際大きい情動反応が観測された際に得られたため、データの生成構造は mean RRI、SDNN、rMSSD ともに Cauchy 分布に従うと見做した。

R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing)を用いてそれぞれの値に対し解析を実施した。USV の呈示によってベースラインから各指標が変化したかを調べるため、1 標本 Wilcoxon 符号順位検定による中央値の検定を行ったところ、快 USV の mean RRI に有意傾向が、不快 USV の mean RRI および SDNN に有意差が認められた。このため、mean RRI、SDNN において、プローブ刺激呈示時の mean RRI ないし SDNN が MF、D、FMI のどの音響特徴に影響されるか検討するために、一般化線形モデル (Generalized Linear Model: GLM) による解析を行った。誤差は Cauchy 分布であると仮定しているため、最尤推定ではなくベイズ推定によるパラメータ推定を行った。この際 RStan version 2.17.3 (Stan Development Team, 2018)を使用し、マルコフ連鎖モンテカルロ法 (Markov chain Monte Carlo methods, MCMC) により、パラメータの事後分布を求めた。パラメータの事前分布

は特に情報を与えていないため、すべて一様分布として設定された。

GLM モデルは MF、D、FMI の単体の項目とその交互作用項目をもつ複数を比較し、もっともあてはまりのよいモデルを採用した。モデル選択のために追加パッケージ loo (Vehtari, Gelman & Gabry, 2016) を使用し、情報量規準として WAIC (Widely applicable information criterion) を算出した。

4.3 心拍測定実験：結果

RRI が音声呈示によって上昇および下降した一例を図 7bc に示す。ベースラインと比較し、テスト（陰影部分）の RRI が変化するが、ポストで再びベースラインに戻るといった反応がみられた。これらは別個体から得られたデータである。図 7b のベースラインは 128 から 146 ms 程度の範囲であるが、図 7c のベースラインは 143 から 149 ms 程度の範囲に位置していることがわかる。このように RRI は個体間の差、あるいは個体内での日内変動と日間変動が大きいいため、テストとベースラインの差をとることで補正を行っている。

快 USV 一回目呈示時の、ベースラインからの変化量の中央値は mean RRI = -1.14 ms、SDNN = 0.04、rMSSD = -0.04 となった。不快 USV 一回目呈示時の、ベースラインからの変化量の中央値は mean RRI = 4.82 ms、SDNN = 0.78、rMSSD = 0.27 となった。図 9b にこれらの箱ひげ図を表す。図中のゼロはベースラインを表し、各中央値がベースラインから変化したかを 1 標本 Wilcoxon 符号順位検定により調べた。結果、不快 USV の再生時に mean RRI および SDNN は有意に上昇した (mean RRI: $p < 0.001$; SDNN: $p = 0.016$) 一方、rMSSD に有意差はみられなかった ($p = 0.30$)。また、快 USV の再生時には mean RRI の上昇が有意傾向であり (mean RRI: $p = 0.096$)、他 2 指標における有意な変化は確認されなかった (SDNN: $p = 0.84$; rMSSD: $p = 0.12$)。

プローブ刺激再生時の mean RRI、SDNN、rMSSD の、ベースラインからの変化量の中央値は以下のようになった。プローブ A: mean RRI = -0.91 ms、SDNN = 0.18、rMSSD = 0.09; プローブ B: mean RRI = 0.21 ms、SDNN = 0.12、rMSSD = 0.06; プローブ C: mean RRI = 1.73 ms、SDNN = 0.25、rMSSD = 0.02; プローブ D: mean RRI = 2.13 ms、SDNN = 0.29、rMSSD = 0.02; プローブ E: mean RRI = 2.35 ms、SDNN = 0.17、rMSSD = 0.25; プローブ F: mean RRI = 3.87 ms、SDNN = 0.27、rMSSD = 0.29。これらの箱ひげ図を図 10a に示している。比較のため、各図には快 USV、不快 USV のデータも併せて記載している。

不快 USV の再生により mean RRI と SDNN が上昇することがわかったので、プローブ刺激再生時を併せたデータを用い、mean RRI と SDNN の上昇が MF、D、FMI のどの音響特徴量によってもたらされるのかを GLM による項目評価で検討した。誤差は Cauchy 分布に従うとし、線形モデルのパラメータの確率分布を、MCMC を用いたベイズ推定で求めた。

推定したモデルの収束判定指標 Rhat は全てのパラメータで 1.05 を切っていた。これはサンプリングした値が定常分布へ収束していることを意味している (Carpenter et al., 2017)。

また、ベイズ統計の区間推定において、母集団の真のパラメータがその区間内に存在する確率を示す確信区間(credible interval)は、信頼区間 (confidence interval) のように 95%基準を採用すると安定性を欠く場合がある (Kruschke, 2014)。そのため、区間推定には 90% 確信区間を採用した。

mean RRI の線形回帰において、最もあてはまりのよい WAIC 最小モデルは

$$y_i \sim \text{Cauchy}(\mu_i, \gamma)$$

$$\mu_i = \beta_0 + \beta_{MF}x_{MF_i} + \beta_Dx_{D_i}$$

となり、MF と D が独立に mean RRI の変化を説明していた。なお応答変数 y は mean RRI、説明変数 x は任意のプロープ刺激の MF、D、FMI の音響特徴が快 USV 的であるか不快 USV 的であるかである。快 USV 的な場合はダミー変数として 1 を、不快 USV 的な場合は 0 を挿入する。また、 γ は正の値をとる Cauchy 分布の尺度母数 (scale) であり、ベイズ推定によって同時に推定される。 β は切片および MF、D の係数であり、推定された各係数の事後分布は図 10b のようになった。

事後分布によって算出される各係数の平均 (EAP 推定量) および SE は、切片が $\beta_0 \pm \text{SE} = 3.27 \pm 0.57$ (確信区間 5%: 2.35; 95%: 4.28)、MF が $\beta_{MF} \pm \text{SE} = -2.56 \pm 0.61$ (確信区間 5%: -3.59; 95%: -1.58)、D が $\beta_D \pm \text{SE} = -1.70 \pm 0.54$ (確信区間 5%: -2.61; 95%: -0.83) となり、係数は 90%以上の確率でゼロではないことがわかった (図 10b)。

すなわち MF が不快 USV 的な 22 kHz 付近の値になった際は、mean RRI はおよそ 2.56 ms 上昇し、D が不快 USV 的な長い値になった際はおよそ 1.70 ms 上昇することが予測され、MF の効果が D よりも大きいことがわかった。これは MF が不快 USV 的な 22 kHz 周辺であるとき、mean RRI が増大し心拍数が減少することを示している。また、MF ほどの影響はないが、D が不快 USV 的な長い音声であるときも、mean RRI が増大し心拍数は減少していた。

SDNN の線形回帰において、最もあてはまりのよい WAIC 最小モデルは変化を表す最優の線形モデルは、

$$y_i \sim \text{Cauchy}(\mu_i, \gamma)$$

$$\mu_i = \beta_0$$

となり、音響特徴では SDNN は説明されないことがわかった。推定された係数の事後分布の平均と SE は、 $\beta_0 \pm \text{SE} = 0.13 \pm 0.05$ (確信区間 5%: 0.04; 95%: 0.22) となった (図 10c)。図 10a の各群における SDNN データにおいても、不快 USV 呈示以外の音声刺激に対する応答は横並びであり、音響特徴による影響はないとする線形回帰の結果を支持している。

なおモデル選択の結果として、係数を算出したモデルのうち 3 つを、WAIC の小さい順にそれぞれ表 4、5 に記載している。

4.4 音源接近実験：方法

4.4.1 実験動物

6週齢から12週齢の雄SDラット14匹(232 ± 38 g)を用いた。心拍測定実験と音源接近実験には全て別個体のラットを用いており、両実験を経験した個体は存在しない。ラットは購入後、同性のペアになるよう実験者に任意に分けられ、一つのケージ内でペア飼育された。飼育室は温度20から22度、湿度は30%以上に保たれ、12時間ずつの明暗サイクル(点灯時間8時、消灯時間20時)で統制された。給餌・給水はすべて統制せず、ラットは自由に摂食・摂水が可能であった。餌は高蛋白質含有の齧歯類用ペレット(Lab Diet, PMI Nutrition International)が与えられた。

4.4.2 音源接近実験

8方向放射状アーム迷路(BS-RM8R, BrainScience Idea, *Osaka, Japan*)を用いた。迷路本体の外寸は直径130 cm × 50 cm(H)、アーム走路は50 cm(L) × 45 cm(H) × 10 cm、中央部分は28 cm(L)であった。迷路上方にWebカメラ(HD WebCam C270n, *Logicool, Tokyo, Japan*)を取り付け、モニタリング用動画ソフトウェア(Debut, NCH software)によって実験中の様子を録画した。また、8方向アームのうち一つをランダムに選び、走路の端に超音波スピーカ(Ultrasoundgate Player 116, Avisoft)を設置した(図11a)。実験開始前に超音波検出器(USD6-6A-7, YS Design Studio)を用いて再生を確認した。アーム走路へ続く扉は実験中すべて開け放たれ、ラットは中央部を介して自由にアームを行き来することができるようになっていた。

実験デザインは以下のようにした。快USV、不快USV、プローブ6カテゴリの計8カテゴリの音声刺激をランダムな順序に並べ、そのうち4カテゴリが呈示された。なお、カウンターバランスが設けられ、全データにおいて全ての音声刺激は同回呈示かつ呈示順序が分散するよう調整された。使用された個体数は14であるため、1カテゴリ音声から7点のデータが得られた。

実験開始時にラットを中央部に置き、10分間の馴化時間を設けた。その後、1分間音声刺激の呈示を行った。音声刺激ファイルは7秒程度であるため、8から9ファイルの音声1カテゴリが連続して再生された。音声刺激呈示一回につき5分間のISIを置き、次のカテゴリの音声を再生した(図11c)。行動データは記録した動画を用い、音声ファイル再生中の1分間におけるスピーカ設置アームへの滞在時間を、音声への接近の指標として評定した。滞在時間は音源有りアームに尾を除く全長が入った瞬間を時間のカウント開始、音源有りアームから尾を除く全長が出た瞬間をカウント終了とした(図11b)。1分間の音声呈示中にラットが何度もアーム内を出入りした場合はその合計時間を滞在時間として、またアームへ入らなかった場合は滞在時間0秒として扱った。

4.4.3 データ解析

R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing)、および追加パッケージ exactRankTests(Hothorn & Hornik, 2006)、VGAM(Yee, 2010)を用いて各データを解析した。

まず快 USV と不快 USV の音声呈示における音源有りアームへの滞在時間を、Wilcoxon 順位和検定を用いて比較した。

1 分間の音声プレイバック中における音源有りアーム滞在時間は 0 から 60 秒の値しか取りえない。特に非接近による滞在時間 0 秒が頻繁に観測されたため、Tobit モデルによる補正を加えた打ち切り (censored) 線形回帰を行った (Blundell & Meghir, 1987)。誤差は正規分布に従うと仮定し、最尤推定による線形モデルのパラメータ推定を行った。音響特徴による滞在時間への影響を検討するため、MF、D、FMI の単体項目および交互作用項目を持つ複数のモデルを比較し、AIC 最小モデルを最もあてはまりのよいものとして選んだ。

4.5 音源接近実験：結果

音声のプレイバックが開始されてただちに、首や体を回して音源定位を行う素振りをみせるなど、ラットはなんらかの反応を示した。その後、音源へ接近するかもしくは他のアーム走路へ走る、ないしすくみといった行動が観測された。

快 USV が再生された際の音源有りアーム滞在時間の平均値は 39.4 秒、中央値は 46.8 秒となり、不快 USV の平均値 13.6 秒、中央値 14.0 秒と比較して有意に上昇した (Wilcoxon 順位和検定、 $p = 0.01$ 、図 12a)。接近時の滞在時間が不快 USV の再生で短くなる傾向がみられた。加えてデータ 7 点のうち、不快 USV の再生でアームへ非接近した (滞在時間 0 秒) のが 3 個体だったのに対し、快 USV では非接近は一度もみられず、すべてのラットが音源へ接近した。

USV およびプローブ刺激をプレイバックした際の音源有りアーム滞在時間は図 12b のようになった。USV のデータは図 12a と同様であるが、比較のために併せて記載している。各滞在時間の平均値および中央値は以下ようになった。プローブ A : 34.2, 35.2; B: 20.7, 23.4; C: 22.2, 20.6; D: 14.0, 7.2; E: 9.8, 12.5; F: 3.5, 0 (秒)。非接近を示したのはプローブ A で 1 個体、プローブ C と E で 2 個体、プローブ D で 3 個体、プローブ F は 5 個体であった。このため、特にプローブ F では不快 USV よりも滞在時間が短く、非接近を示す傾向となったといえる。

Tobit モデルによる線形回帰を行い、AIC 最小モデルを選択した結果、

$$y_i = \begin{cases} y_i^* & y_i > 0 \\ 0 & y_i \leq 0 \end{cases}$$
$$y_i^* \sim N(\mu_i, \sigma^2)$$
$$\mu_i^* = \beta_0 + \beta_{MF} x_{MF_i} + \beta_D x_{D_i}$$

となった。滞在時間である応答変数 y_i に潜在変数 y_i^* を導入し、 y_i がゼロの場合は正規分布に従ったゼロより小さい値を連続的にとると仮定している。最尤推定における尤度関数は y_i ($y_i > 0$) の密度と、 $y_i = 0$ となる確率の積となっている。 x_i は MF もしくは D が快 USV 的な場合はダミー変数として 1 を、不快 USV 的な場合は 0 を挿入する。 β は切片および MF、D の係数である。モデル選択時に比較した他のモデルについては、AIC の小さい順に 3 つを表 6 に記載している。

結果、滞在時間は MF および D の独立した主効果によって説明された。推定された各係数は、MF が $\beta_{MF} \pm SE = 24.65 \pm 5.39$ ($z = 4.57, p < 0.001$)、D が $\beta_D \pm SE = 12.18 \pm 5.30$ ($z = 2.30, p = 0.022$) となった。すなわち、MF が快 USV 的な 50 kHz 付近のときは滞在時間がおおよそ 24.65 秒増加し、さらに D が快 USV 的な短い音声の場合におおよそ 12.18 秒増加する。これにより、心拍変動のうち mean RRI と同様に、音源への接近に関しても MF と D の効果が有意であり、かつ MF が D よりも大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。

4.6 考察

4.6.1 心拍測定実験

心拍測定実験では快 USV に対しては興奮、不快 USV には鎮静の自律神経系反応が見られるという仮説を立てた。快 USV に関しては、mean RRI が減少し心拍数が増加する興奮性の反応が見られたものの、統計的有意傾向に留まった。快 USV の効果が弱かった理由として、第一にラットが防音箱内のケージに隔離されていたことが挙げられる。快 USV は他者との社会的接触や遊びの発声という側面が強いので、情動反応を引き起こすには他個体の手がかりや、あるいはそれを探索できるようなオープンフィールド、迷路などの場所文脈が必要かもしれない。第二に、電極の取り付けおよび絶縁ジャケットの装着がストレスとなり、興奮性応答を抑制した可能性も考えられる。心拍計測以前にこれらの装置に対する馴化を行い、また装置取り付け後もある程度自由に動き回れるようにはなっていたが、それを加味しても身体を覆う装置が生態的に不自然であることは変わらない。

一方の不快 USV に対しては、SDNN が増加し強い変動がみられた。また、mean RRI が増加し心拍数が減少する鎮静応答が見られ、仮説を支持する結果となった。不快 USV はすくみを誘発するので、これは生態的観点からしても適応機能があるといえる。すなわち、不快なイベントに遭遇した際は運動性を低下させることで、ストレスを低減させる、あるいは危機を回避することができる。ただし、本研究で用いた SD ラットなどのアルビノラットでは不快 USV のプレイバックが運動性を低下させる一方、Lister hooded ラットでは走行や跳躍などの逃避行動がみられ、運動性はむしろ増加したとの報告もある (Beckett et al., 1996)。そのため、同種においても系統によって音声に対する自律神経系反応が異なる可能

性が考えられる。系統間での行動・心拍の変化と遺伝型・表現系を比較することで、たとえば不安や緊張性の個体差が生まれるメカニズムが明らかになるかもしれない。

さらに不快 USV の鎮静応答は MF および D によって引き起こされ、MF が D より強く影響することがわかった。つまり、22 kHz 付近の周波数と長いコールが副交感神経系を活性化させていた。MF は研究 1 で最も汎化と弁別に影響のあった音響特徴であったため、この結果から汎化・弁別知覚と情動知覚両者に共通した音声処理によるものだということが示唆された。

また、D による効果であるが、この理由として、長いコールが鎮静の指標となりうることが挙げられる。不快 USV を長時間持続して発声するには快 USV を短く連発するよりも呼吸系を安定させる必要があり、発声制御を行うために運動性を低下させる必要があると考えられる。そのため、長いコールの発声は発声者の鎮静を伴うものであり、聴取側にもまた同様の情動を誘起する可能性がある。

ただし、この仮説では FMI にも同様のことがいえる。すなわち平坦な周波数パターンもまた、運動性を低下させ安定した発声制御が必要であると考えられる。仮説ではこれらの理由により D と FMI の両効果を予測していたため、D の効果がみられる一方で FMI が影響を及ぼさなかった点に関しては更なる検討が必要である。

4.6.2 音源接近実験

音源接近実験では過去の知見 (Wöhr & Schwarting, 2007) と同様、快 USV のプレイバックで音源に対する接近を、不快 USV で非接近を誘発した。さらに、プローブ刺激による音響特徴の効果を検討した結果、MF と D がそれぞれ独立に接近に影響を及ぼしていた。快 USV 的な 50 kHz 帯域の音声は接近を促進し、不快 USV 的な 22 kHz 帯域の音声は接近を抑制していた。快 USV 的な短い音声もまた接近を引き起こし、不快 USV 的な長い音声はそれを減少させていた。

MF と D が効果をもつという結果は心拍測定実験と同様である。そのため、音声知覚から興奮—鎮静が制御されるまでと、快—不快に基づいた行動選択を行うまでは共通した聴覚処理を経ることが示唆された。これにより、「扁桃体などの情動系への音声刺激の入力は共通であるため、影響を及ぼす音響特徴も同様である」という仮説が支持された。

また、不快 USV よりもプローブ E やプローブ F において非接近 (滞在時間ゼロ秒) が頻繁に観測される一方、不快 USV に対しては比較的接近もみられたほか、長期滞在する個体も存在した (図 12b)。これはプローブ E, F が不快 USV より強度の高い不快情動価を備えているためではなく、不快 USV が生態学的音声であることに由来するためであると考察している。すなわち、不快 USV 自体は聴取者にとって不快=非接近的な音声である一方で、不快 USV の呈示によりラットが他個体の存在を予測し、社会的相互作用を試みるために近づくケースがあった可能性が考えられるのである。

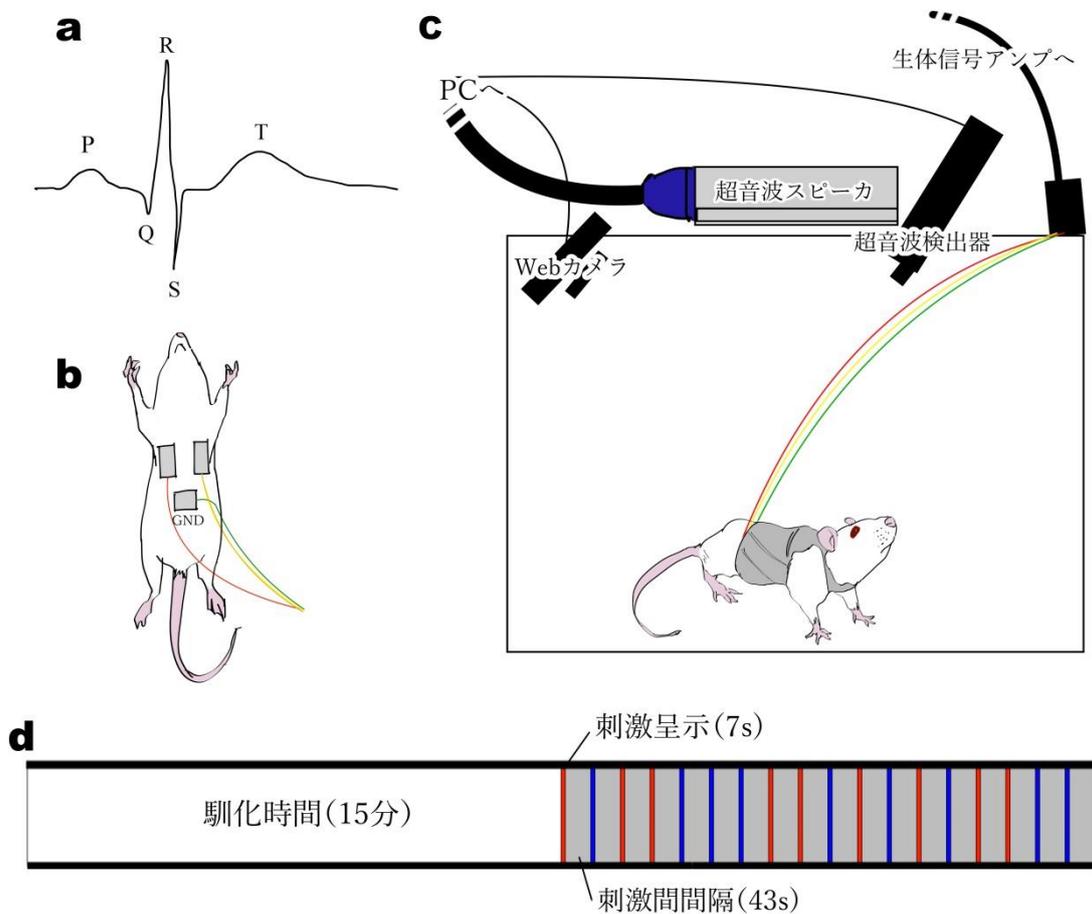


図6 心拍測定実験の概略図

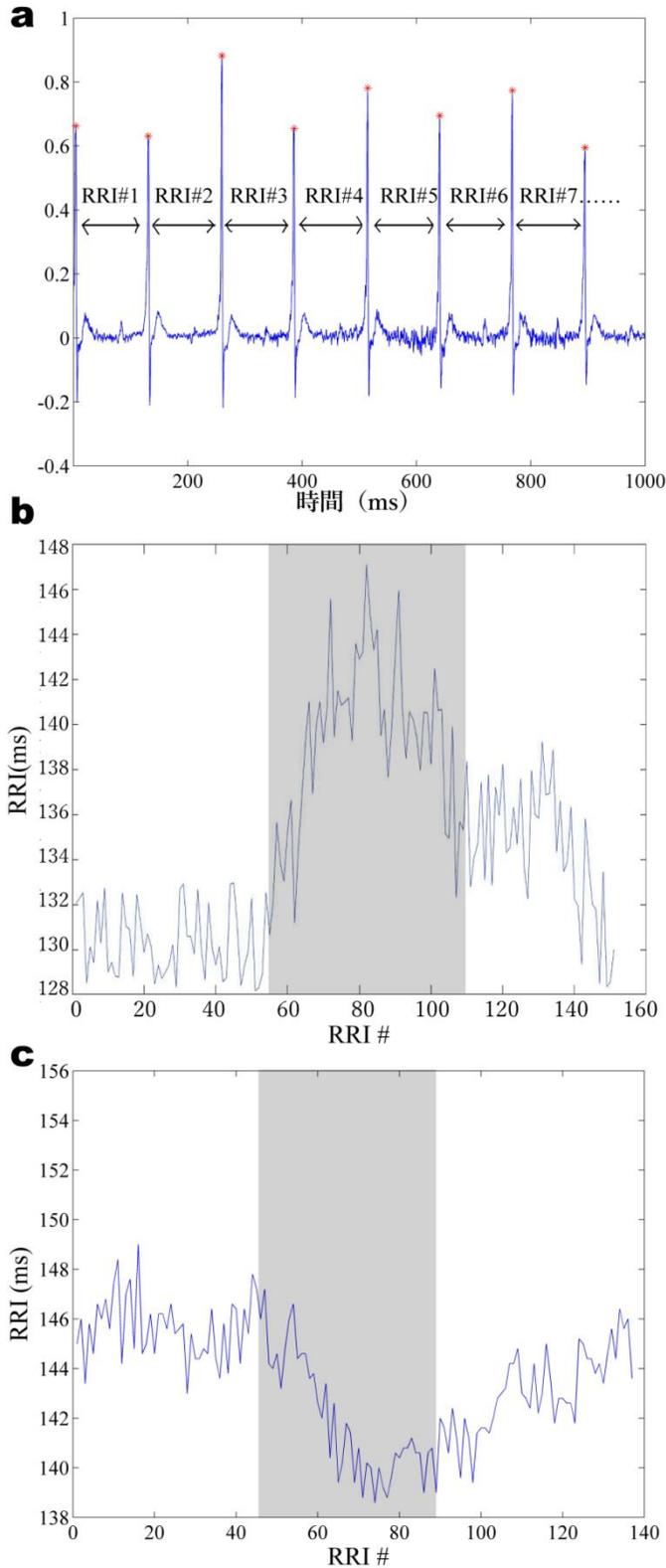
(a) ECGによって得られる心拍の波。局所的ピーク成分を出現順にP波、Q波、R波、S波、T波と呼称する。隣接するR波同士の間隔（RR間隔）を解析する。

(b) ECG電極を仰向けにしたラットに貼り付ける。心臓を挟んで左右に信号電極を置き、腹部にGND電極を置く。

(c) 心拍測定用ケージと装置。ケージ頭上に動画・音声モニタリング用のWebカメラと超音波検出器、音声再生用のスピーカ、生体信号アンプへの入力ボックスが取り付けられている。ラットは電極を覆う絶縁ジャケットを装着し、ケージ内を自由に動き回れる。

(d) 実験デザイン。1セッションは15分の馴化時間と15分のテスト時間からなる。テスト時間では2カテゴリーの音声刺激が9ファイルずつ、刺激間隔43秒でランダム順に呈示される。ただし1カテゴリーが4回以上連続して呈示されないよう調整されている。図は刺激呈示順の一例であり、赤と青がそれぞれ異なった刺激のカテゴリーを表している。

図 7 RRI の解析



(a) R 波と R 波の間隔 (RR interval: RRI) の算出方法。得られた ECG から局所的ピークである R 波を検出し (赤点で表示)、これらの間隔 (ms) を測定する。

(b) 音声呈示により RRI が上昇した一例。(a) のように出現した時系列で RRI をプロットしている。音声刺激呈示が灰色の陰影で表されている。プレイバック時間は音声ファイルの 7 秒間であり、呈示 7 秒前から呈示 7 秒後の RRI の推移を示している。呈示 7 秒前から呈示までをベースラインとした。音声呈示により上昇した RRI は呈示後には速やかにベースラインと同程度に下がっていた。

(c) 音声呈示により RRI が下降した一例。グラフは (b) と同様の内容を示す。音声呈示により減少した RRI は呈示後に速やかにベースラインと同程度に戻っていた。

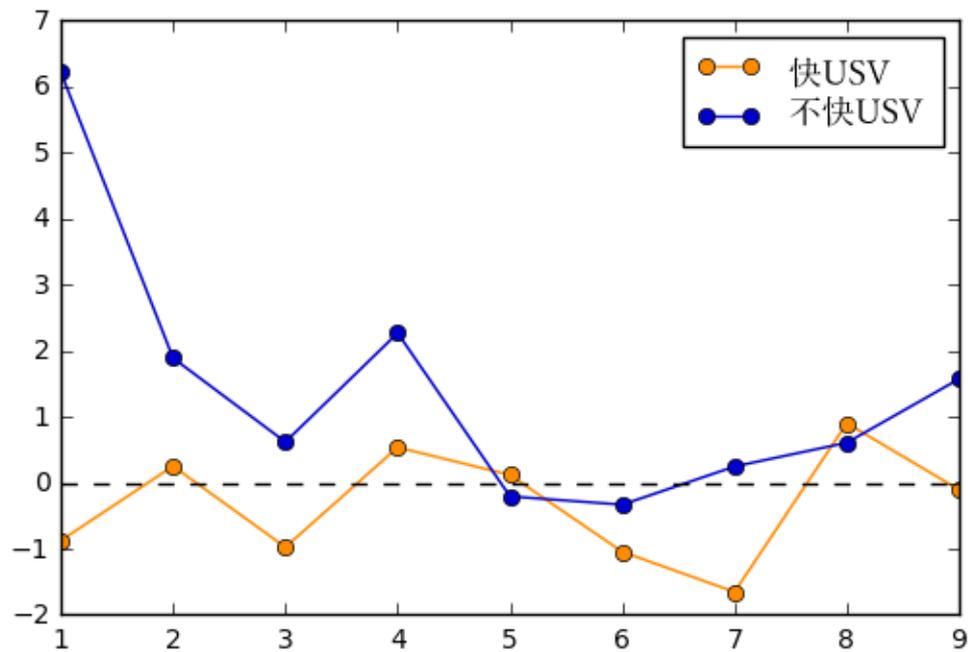


図8 繰り返し呈示による情動反応の低下

繰り返し呈示による快 USV、不快 USV の RRI 平均：mean RRI の変化量の個体間平均推移を表す（単位：ミリ秒）。ゼロはベースラインを示している。同カテゴリの音声は9回呈示を行った。最も大きな情動反応がみられたのは不快 USV プレイバック時であったが、繰り返し呈示するごとに情動反応の低下が見られたため、解析には呈示一回目のデータのみを用いた。

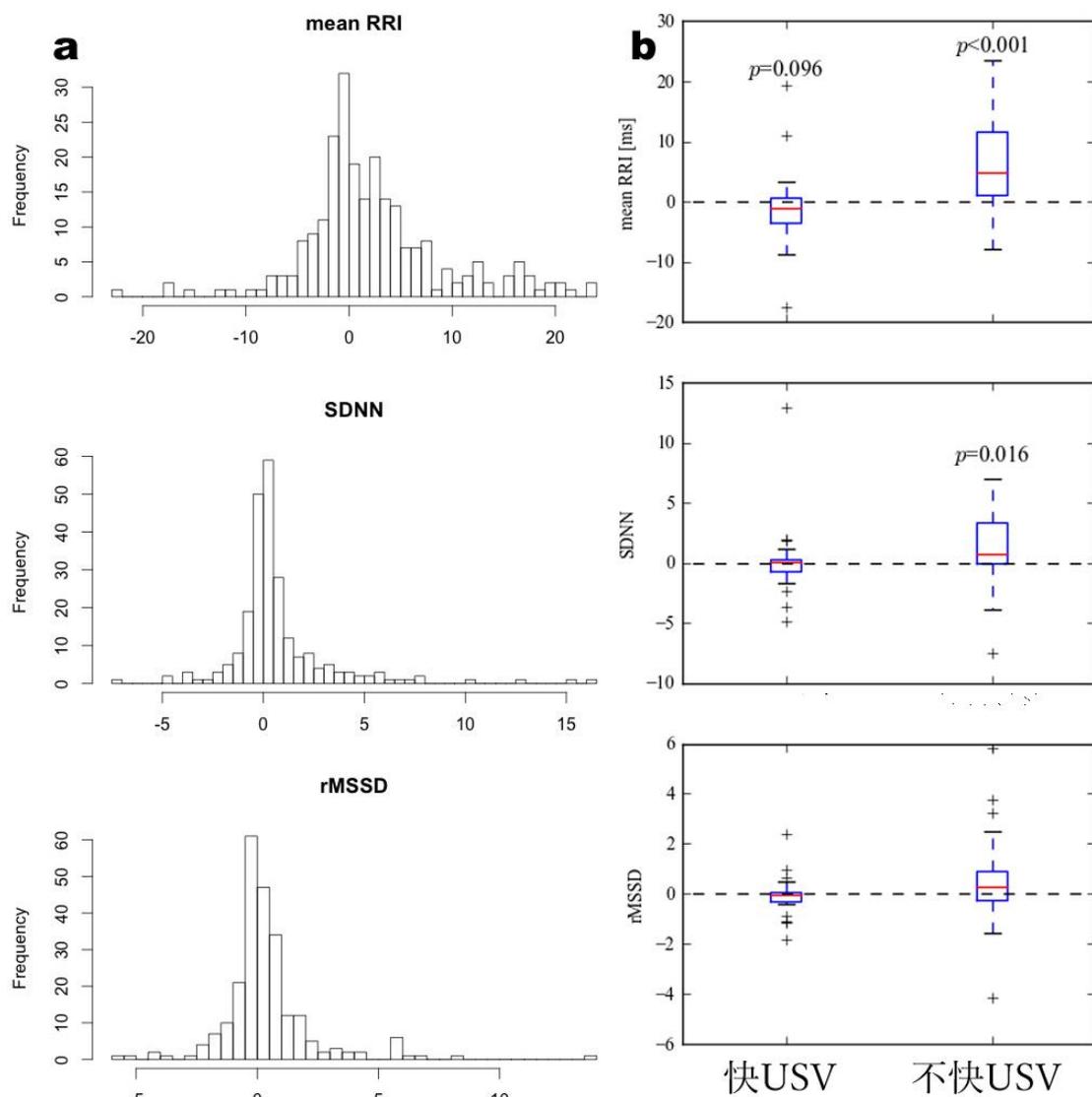


図9 心拍変動の3指標のデータ分布とUSV呈示時の反応

(a) 短時間の心拍の変化を表す指標としてRRI平均：mean RRI、RRの標準偏差：SDNN、隣接するRRIの差の二乗平均平方根：rMSSDを用いた。データの分布はそれぞれ図のようになった。

(b) 快USV (左) と不快USV (右) 呈示時のmean RRI、SDNN、rMSSDの箱ひげ図。呈示中7秒間と呈示前7秒間(ベースライン)との差分を算出しているため、ゼロはベースラインを表す。ベースラインからの変化量を検定したところ、快USV呈示時に有意傾向でmean RRIが減少した($p = 0.096$)。また不快USV呈示時に有意にmean RRIとSDNNが上昇した(mean RRI: $p < 0.001$; SDNN: $p = 0.016$; 1標本Wilcoxon符号順位検定)。

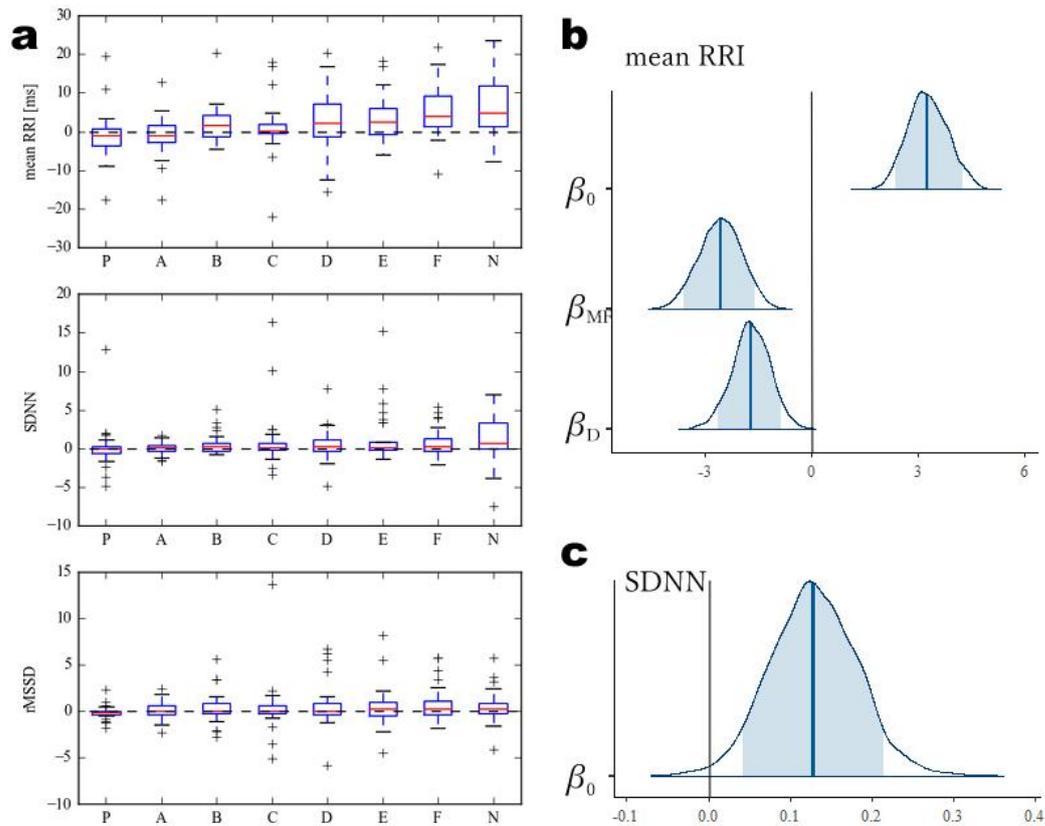


図 10 プローブ刺激に対する心拍変動と線形回帰の結果

(a)各音声刺激に対する mean RRI、SDNN、rMSSD の箱ひげ図。P は快 USV (positive USV)、N は不快 USV (negative USV) を、A から F は各プローブのラベルを表す。

(b)mean RRI を音響特徴で説明する線形モデルの、各係数の事後分布。 β_0 : 切片、 β_{MF} : MF の係数、 β_D : D の係数の事後分布。水色の陰影は 90% 確信区間の範囲を、分布内の青線は係数の平均 (EAP 推定量) を表す。MF および D が mean RRI の変化を説明していた。

(c)SDNN の線形モデルの、切片 β_0 の事後分布。SDNN は音響特徴によって説明されなかった。

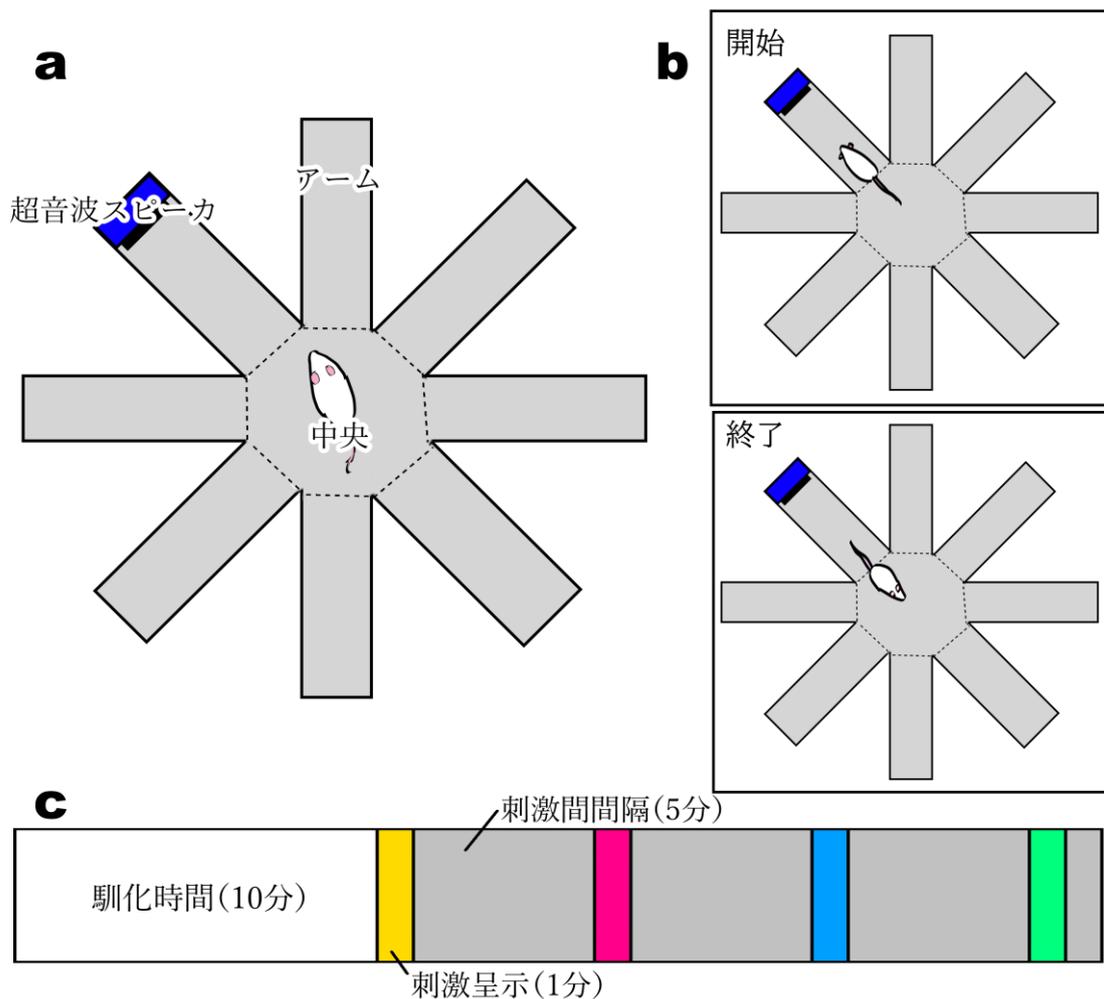


図 11 音源接近実験の概要図

(a) 放射状アーム迷路の概要図。8本あるアーム走路端の1つに超音波スピーカが備え付けられ、音声刺激が呈示された。アームの扉は実験中すべて開いており、ラットは走路と中央ケージを自由に行き来できた。

(b) 音源接近の指標は以下のように算出した。スピーカのあるアームに、尾を除いた全身が入ったタイミング（上パネル）を滞在開始、尾を除いた全身が出たタイミング（下パネル）を滞在終了とした。そして刺激呈示中の1分間以内で、どれだけ音源有りアームに滞在したかの時間を測定した。なお、刺激呈示中に何度もアームに出入りした場合は、滞在時間の合計を算出している。

(c) 実験デザインの概要を示す。ラットはまず中央部に置かれ、馴化時間が10分間設けられた。その後、異なる4カテゴリの音声刺激（快USV、不快USV、6カテゴリのプロープ刺激の計8カテゴリのうちランダムに半分）が呈示された。呈示時間は各カテゴリにつき1分間であり、刺激間隔は5分であった。実験時間は合計30分間であった。

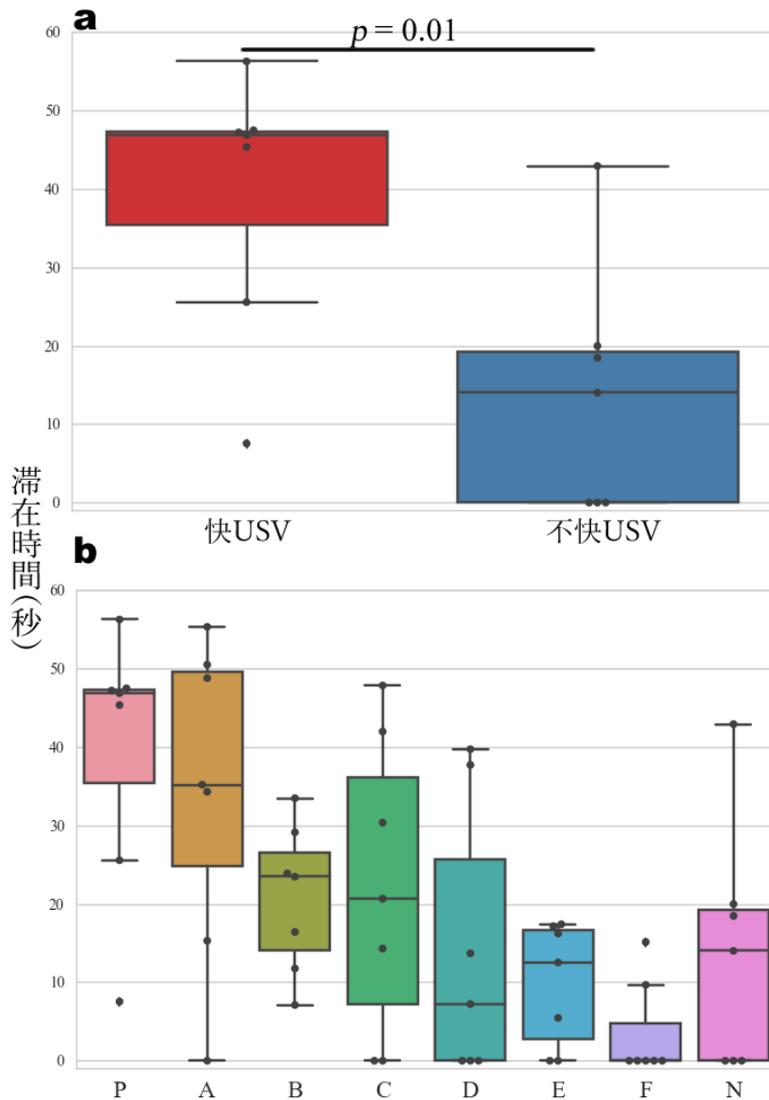


図 12 音源有りアームへの滞在時間

(a) 快 USV、不快 USV を呈示した際の滞在時間の箱ひげ図。7 個体ずつのデータ点を併せて記載している。快 USV の滞在時間は不快 USV と比較して有意に上昇した (Wilcoxon 順位和検定、 $p = 0.01$)。また、不快 USV の再生でアームへ非接近した (滞在時間 0 秒) のが 3 個体だったのに対し、快 USV では非接近は一度もみられず、すべてのラットが音源へ接近した。

(b) 各 USV とプローブ刺激の再生時の滞在時間の箱ひげ図。P は快 USV (positive) を、N は不快 (negative) を、A から F はプローブのラベルを示す。

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	γ (scale)	WAIC
1	3.27 ± 0.57*	-2.56 ± 0.61*	-1.70 ± 0.54*	—	—	—	—	2.79 ± 0.25	1563.2 ± 34.4
2	3.63 ± 0.65*	-2.51 ± 0.59*	-1.77 ± 0.56*	-0.58 ± 0.54	—	—	—	2.78 ± 0.24	1564.4 ± 34.4
3	3.53 ± 0.71*	-2.92 ± 0.84*	-2.19 ± 1.00	—	0.68 ± 1.19	—	—	2.79 ± 0.26	1565.9 ± 34.3

表 4 mean RRI の線形モデル比較

* : 90%確信区間の区間推定において各係数がゼロではないことを示す。

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	γ (scale)	WAIC
1	0.13 ± 0.05*	—	—	—	—	—	—	0.60 ± 0.06	926.9 ± 46.6
2	0.21 ± 0.08*	-0.14 ± 0.11	—	—	—	—	—	0.60 ± 0.06	927.5 ± 46.1
3	0.18 ± 0.09*	—	-0.08 ± 0.11	—	—	—	—	0.60 ± 0.06	927.8 ± 46.3

表 5 SDNN の線形モデル比較

* : 90%確信区間の区間推定において各係数がゼロではないことを示す。

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	WAIC
1	2.93 ± 0.12 ($p < 0.001$)	24.65 ± 5.39 ($p < 0.001$)	12.18 ± 5.30 ($p = 0.022$)	—	—	—	—	382.67
	2.92 ± 0.12 ($p < 0.001$)	19.93 ± 7.49 ($p = 0.008$)	7.35 ± 7.56 ($p = 0.33$)	—	8.87 ± 10.36 ($p = 0.39$)	—	—	
3	2.93 ± 0.12 ($p < 0.001$)	24.68 ± 5.39 ($p < 0.001$)	12.18 ± 5.29 ($p = 0.021$)	-1.26 ± 5.25 ($p = 0.81$)	—	—	—	384.61

表 6 滞在時間の線形モデル比較

第五章 研究3：USV 知覚における神経活動

5.1 背景

5.1.1 USV 発声と知覚に関わる脳領域

発声を制御する神経処理系は快 USV と不快 USV のそれで大きく異なり、それぞれ快情動系と不快情動系が深く関与する。薬理操作によって得られた知見において発声を誘起する系は、快 USV では腹側被蓋野から側坐核を介し、前頭前野に投射する中脳ドーパミン経路、いわゆる報酬系である。不快 USV の発声には背外側被蓋核から視床下部視索前野を介して中隔へ投射する中脳コリン経路が関与しており、覚醒状態を制御し、特定の行動を引き起こす (Brudzynski, 2013)。また、発声制御系は、中脳水道灰白質 (PAG) が発声器官を調節しているが、哺乳類においてこの系は多分に情動的影響を受けており、情動行動を表出させる役割をもつ (Davis et al., 1996)。

一方、USV 知覚に関与する神経処理系は、「聴覚系」そして「情動系」であるという括りは証明されているが、詳細なメカニズムに関しては知見が乏しい。以下代表的な研究例を述べる。

快 USV をプレイバックすると前頭皮質領域や視床室傍核が興奮性活動するという報告が存在する。不快 USV では扁桃体外基底外側核、外側核、中脳水道周囲灰白質の一部などが興奮性の活動を示し、20 kHz 程度の純音のプレイバックではこの反応は減少する (Sadananda, Wöhr & Schwarting, 2008; Ouda, Jilek & Syka, 2016)。

なお、これらの知見は最初期遺伝子 *c-fos* の標識化によるものである。最初期遺伝子 (immediately early genes: IEG) とは、外的刺激もしくは内的処理に応じたシグナルが神経細胞に伝達された際、比較的迅速且つ一過的に転写が引き起こされる遺伝子群の総称である。IEG はシナプス電位や活動電位に伴うイオンの流入等によって発現が誘導される (Okuno, 2011) ため、このような遺伝子の mRNA や蛋白質産物は神経活動マーカーとして用いられる (Morgan et al., 1987; Guzowski et al., 1999)。特に、IEG は特定の刺激に対して応答する脳部位の探索を細胞レベルで実施するのに有用であり、この転写産物を可視化することで局所的な神経活動をマッピングすることが可能となる。IEG の一種である *c-fos* 遺伝子は様々な刺激により神経細胞核内で発現する、転写制御因子をコードする遺伝子であり (Sheng & Greenberg, 1990)、過去の USV プレイバックにおいて *c-fos* 標識化が用いられていたため、本研究でも *c-fos* 遺伝子の蛋白質産物 (c-Fos 蛋白質) に対する免疫染色を行う。

また、IEG 標識以外には、USV に対する単一ニューロン活動電位や集合電位などの電気的活動も調べられている。不快 USV に反応するニューロンが嗅周皮質に (Allen, Furtak & Brown, 2007)、快 USV と不快 USV に反応するニューロンが扁桃体外側核および基底外側

核に存在する。扁桃体ニューロンは様々な発火パターンを快 USV、不快 USV、そして 50 kHz（快 USV の帯域）と 22 kHz（不快 USV の帯域）の純音に示したが、多くは快 USV に対する抑制性、不快 USV に対する興奮性の応答であった（Parsana & Brown, 2012）。

また、私はラット大脳皮質の前頭部から集合電位を記録し、USV と同帯域の純音が異なった処理を受けていると明らかにした（Saito & Okanoya, 2017）。ただしこれは集合電位であるため、音声に対する聴覚的処理か、あるいは音声によって引き起こされる、情動を含む知覚的な処理に関連するものかは分離できない。

5.1.2 情動およびコミュニケーションに關与する脳領域

前部帯状皮質（Anterior cingulate cortex: ACC）は情動的認知に關与する（Bush, Loo & Posner, 2000）。社会的な動物には、他者の痛み表出を観測すると自身の苦痛やストレスが上昇するという共感的知覚（情動伝染）がみられるが、その際にこの領域が活動することがヒトイメージング研究などから明らかになっている。

近年、マウスやラットなどの齧歯類がヒトと同様に他個体の痛みに共感することが多数の研究により支持されており（eg. Langford et al., 2006; Bartal, Decety & Mason, 2011）、細胞レベルでの研究が盛んにおこなわれるようになってきている。このような状況で現在明らかになっているのは、ラット ACC では他者の恐怖条件づけで IEG の発現量が増加すること（Sakaguchi et al., 2018）、自身が電気ショックを受けたときと他者が電気ショックを受けた際の両者に活動を示すニューロン（情動のミラー・ニューロン）が存在すること、そして ACC を抑制すると自身の恐怖条件づけにおけるすくみは減少しないが、他者の恐怖条件づけを観測した際の「共感的すくみ」のみが抑制されるということであった（Calliro et al., 2019）。ラットが恐怖条件づけを受ける他者を観測する際は視覚情報や嗅覚情報も得ており、ACC による痛み共感マルチモーダルな神経処理であると考えられる一方で、共感的すくみが生起されるのは恐怖条件づけの条件刺激（fear tone）の呈示時であった。USV のうち不快 USV は fear tone のように恐怖イベントの予期に用いられる可能性があるため、不快 USV が ACC 内で細胞レベルの処理を受けていると仮説を着想した。

島皮質（insula）もまた、感覚知覚から情動を生起することに密接に関わっている。加えて島皮質の場合、痛みといった「不快」に限定されず、快情動の体験にも關与する。たとえばマカクザルの島皮質のうち、特定の領域を電気刺激すると、不快行動（他者への威嚇・攻撃など）および快の行動（他者からの威嚇に対して仲直りのディスプレイを示す親近的な行動など）が誘発される（Caruana et al., 2011）。ラットは USV を介し、類似した個体間の社会行動を行うため、島皮質が USV 知覚に關与する可能性が高いと考えた。

また、ヒトや霊長類においては、島皮質は他者の情動表出を受け、共感的な情動体験を生み出すことに寄与している（Stein et al., 2007; Singer, Critchley & Preuschoff, 2009）。たとえばヒト島皮質は他者の情動的表情を観測し、それを模倣すると活動する（Carr et al.,

2003)。つまり島皮質もまた ACC と同様に「情動のミラー・システム」に関与すると示唆されている。私は快・不快 USV は共感的応答（快 USV が快情動、不快 USV が不快情動を誘起する）をもたらすことを、過去の研究（Saito et al., 2016）および本研究 2 の音源接近実験で明らかにしているため、情動的共感を担う ACC および島皮質は USV の知覚処理にも関連すると仮説を立てた。

研究 3 ではこれらの知見を踏まえた上で、より詳細な神経メカニズムを検討するために、USV 知覚に関与する前頭皮質領域、中脳水道周囲灰白質、扁桃核などの領域に加え、島皮質、ACC に対する神経活動を測定する。これは目的 A：USV に対するカテゴリー的知覚の検討のため、快・不快 USV に対して異なった脳部位の関与や神経活動が見られるか調べるためである。さらにプローブ刺激を呈示し、各音響特徴の影響も同時に検討する（目的 B）。

また、研究 3 では神経活動に関して、以下の二つの側面からの実験を行う。まず USV 知覚にどの脳領域が関与しているかということ調べるため、*c-fos* を神経マーカーとし、プレイバック時の興奮性神経活動部位をその蛋白質産物の発現によって可視化する。加えて音声に対する単一ニューロンの活動を電気生理学的手法によって記録する。これにより、音声に対して活動するニューロンが、刺激呈示のどのタイミングで興奮性ないし抑制性の反応を示すのか探り、音響特徴に対する処理過程がどのようなものであるかを検討する。

5.2 c-Fos 免疫染色実験：方法

5.2.1 実験動物

8 週齢から 12 週齢の SD ラット雄 21 匹（ 220 ± 58 g）を用いた。これらのラットは、研究 2 で心拍測定実験もしくは音源接近実験を経験した個体である。ラットは一つのケージ内でペア飼育された。飼育室は温度 20 から 22 度、湿度は 30% 以上に保たれ、12 時間ずつの明暗サイクル（点灯時間 8 時、消灯時間 20 時）で統制された。給餌・給水はすべて統制せず、ラットは自由に摂食・摂水が可能であった。餌は高蛋白質含有の齧歯類用ペレット（Lab Diet, PMI Nutrition International）が与えられた。

5.2.2 脳サンプリングと免疫組織化学染色

ECG 記録に用いた行動ケージ（内径 55 cm (L) × 30 cm (W) × 35 cm (H)、アクリル・ケージ）の上方に Web カメラ（BSW200M, Buffalo, Inc.）、超音波スピーカ（Ultrasoundgate Player 116, Avisoft）、および超音波検出器（USD6-6A-7, YS Design Studio）を取り付けた。ケージは防音箱に入れられていた。ラットをケージに入れただちにモニタリングを開始した。モニタリング用録画ソフトウェア（Debut, NCH software）にカメラからの映像と、超音波検出器のオーディオジャックを介しヒト可聴域に下げられた超音波音声と同時に記録された。また、超音波スピーカは互換性のある専用ソフトウェア

(Recorder-USGH, Avisoft) により制御され、音声刺激が再生された。

まず 60 分間の隔離時間が設けられた。これは、それまでに飼育環境等でラットが受けた、外的刺激に対する神経活動による c-Fos 蛋白質発現の影響を除外するためである。隔離後、プレイバック条件では 30 分間音声刺激のプレイバックが行われた（統制条件では音声呈示はされなかった）。2 カテゴリーの USV 刺激ないし 6 カテゴリーのプローブ刺激のうちいずれか 1 カテゴリーの刺激が 30 ファイル、ISI7 秒間でランダム順に連続再生された。その後、25 分間に渡って核外への蛋白質発現を待ち、ラットをケージから回収した。超音波検出器からはプレイバックした音声刺激以外の USV は録音されておらず、実験動物からの発声は確認されなかった。従って発声による c-Fos 蛋白質が発現することはなく、USV 知覚による影響のみが見られたと考えられる。

イソフルラン吸入により麻酔導入を行い、体重の $0.85 \times 10^{-6} \text{g}$ のベントバルビツール麻酔 (Somnopentyl, KYORITSU SEIYAKU, *Tokyo, Japan*) を腹腔に注射してラットを安楽殺した。呼吸が止まったことを確認してから開胸を行い、心臓左心室から 40 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (phosphorus buffered saline: PBS) を血管走行に注入した。次いで、4% のパラホルムアルデヒド溶液 (paraformaldehyd: PFA) を 40 ml 血管走行に注入し、組織灌流固定を行った。なお、麻酔導入から組織灌流固定開始までが 10 分程度で行われるよう作業時間を統制した。その後断頭を行い、後頭延髄部付近から頭蓋を破碎して全脳サンプルを摘出した。サンプルは小脳と嗅球を切除し、4% PFA に浸沈させて 4 度で後固定を行った。

17 時間の後固定の後、20% スクロース溶液置換を 4 度で 24 時間行った。その後、凍結スライサ (Electro Freeze MCR802A, KELK, *Kanagawa, Japan*) を用いて冠状断方向に 35 μm 厚の連続切片を作成した。

得られた連続切片を PBS で洗浄し、室温で 30 分間ブロッキングを行った。この際、0.3% Triton X-100 (Polyoxyethylene(10) octylphenyl ether, Wako, *Tokyo, Japan*) および 1% ブロッキング試薬 (Roche Diagnostics K.K., *Tokyo, Japan*) を含むブロッキング溶液 (inPBS) を用いた。そしてブロッキング溶液で 1:1000 に希釈した c-Fos 蛋白質一次抗体 (c-fos E-8 mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, *Texas, the USA*) で 4 日間、4 度でインキュベートした。

一次抗体でのインキュベート終了後、切片をブロッキング溶液で 1:1000 に希釈した二次抗体 (anti-mouse IgG Alexa Fluor 488 conjugate, Life technologies, *Massachusetts, the USA*) を用いて 40 分間室温でインキュベートし、PBS で洗浄した。切片は蛍光核染色封入剤 DAPI (VECTASHIELD Mounting Medium, Vector Laboratories, Inc., *California, the USA*) によって封入された。

5.2.3 撮像

蛍光顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE, *Osaka, Japan*) を用い、40 倍対物レンズ (PlanApo40

×, KEYENCE)で Bregma +4.7、+1.0、-2.8、-6.3 mm のスライスを撮像した (図 13)。撮像は目視で DAPI による細胞核の存在を確認しながら z 方向に 1.2 μ m ごと、21.6 μ m (18 枚) から 27.6 μ m (23 枚) に渡って行った。それぞれ Bregma +4.7 mm から前頭皮質領域 (Frontal cortex area: FrA)、Bregma +1.0 mm から島皮質の顆粒島 (Granular insula: GI)、亜顆粒島 (Dysgranular insula: DI)、無顆粒島 (Agranular insula: AI)、前部帯状皮質 (Anterior cingulate cortex) 背側部 (Cg1)、腹側部 (Cg2)、第一次運動皮質 (Primary motor cortex: M1)、Bregma -2.8 mm から扁桃体核 (Amygdaloid) 基底外側核 (Basolateral amygdala: BLA)、中心核 (Central amygdala: CeA)、外側核 (Lateral amygdala: LaA)、嗅周皮質 (Perirhinal cortex: PRh)、Bregma -6.3 mm から中脳水道周囲灰白質 (Periaqueductal gray: PAG) 背内側 (dorsal medial PAG: dmPAG)、背外側 (dorsal lateral PAG: dlPAG)、外側 (lateral PAG: lPAG)、内側膝状体 (medial geniculate body: MGB) の画像 (0.36 mm \times 0.27 mm) を得た。この際、c-Fos 蛋白質抗体の局在を緑色蛍光画像 (GFP フィルタ、励起波長 470 \pm 20 nm、吸収波長 525 \pm 25 nm)、および細胞核の局在を青色蛍光画像 (DAPI フィルタ、励起波長 360 \pm 20 nm、吸収波長 460 \pm 25 nm) を用いて可視化した。

MGB は聴覚反応を調べるために、M1 はプレイバックに対する運動性の影響を調べるために対象とした。その他の領域は情動処理との関連性が指摘され、相互に連絡をもつ領域であったために対象とした。特に FrA、BLA、CeA、LaA、PRh、dmPAG は USV プレイバックによる c-Fos 蛋白質発現がみられたとの知見が存在する (Sadananda, Wöhr & Schwarting, 2008)。これらの領域はラット脳地図 (Paxinos & Watson, 2006) を参照して特定された (図 13、14)。

5.2.4 データ解析

得られた画像データを解析用ソフトウェア (BZ-X Analyzer, KEYENCE) によって解析した。c-Fos の緑色画像はヘイズ・リダクション機能 (パラメータ設定: ボケ 12.0、明るさ 5.0、除去率 1.10、輝度閾値 40) によって蛍光ボケノイズを除去した上で解析された。各スライスの画像を z 軸方向にフル・フォーカスし、DAPI の青色光と c-Fos 蛋白質の緑色光が共発現している細胞を c-Fos 陽性としてカウントした。図 15 にそれぞれ DAPI の発現、c-Fos 蛋白質の発現、共発現画像とその自動抽出の様子を示す。音声呈示のない統制条件に 3 個体、快 USV プレイバックに 3 個体、不快 USV プレイバックに 3 個体、各プローブ刺激プレイバックに 2 個体ずつが用いられた。

1 画像 (0.36 mm \times 0.27 mm) から得られた c-Fos 陽性細胞数を単位面積 (mm^2) あたりの個数に換算した。快 USV、不快 USV、そしてプレイバックのない統制条件の三群間を、脳領域ごとに分散分析 (Analysis of variance: ANOVA) によって比較した。統計解析には R version 3.6.1 (R Foundation for Statistical Computing) が用いられた。

また、定点カメラによって録画した動画を用い、音声プレイバック中のラットの運動量

を以下の方法により求めた。動物個体トラッキングソフトウェア UMA Tracker (Yamanaka & Takeuchi, 2018) を用い、10 fps (frame per second) のレートでラットの位置座標を算出した。そして音声呈示中の 30 分間に及ぶ位置座標の変化量を、連続するフレーム間の座標のユークリッド距離をすべて加算することで算出し、運動量として定義した。なお、動画内の座標を実距離に置き換えていないので、この運動量は単位をもたない相対的な値となっている。さらに各脳領域の活動量と運動量の相関を調べるため、c-Fos 陽性細胞数とこの値の Pearson 相関係数をそれぞれ算出した。

5.3 c-Fos 免疫染色実験：結果

運動量と c-Fos 発現に相関がみられた領域は、M1($p = 0.002, r = 0.64$)、Fr($p = 0.009, r = 0.56$)、GI($p = 0.018, r = 0.51$)、dlPAG($p = 0.01, r = 0.55$)であった (図 16、表 7)。M1 は運動野であるため、運動量と発現量が相関したのは妥当な結果である。また、この結果により、本研究に用いたプロトコルによって興奮性神経活動を c-Fos 標識化できていたといえる。

ANOVA においてプレイバックのない統制条件、快 USV、不快 USV のプレイバックの三群間に有意差が認められたのは、MGB($F = 22.95, p = 0.002$)、BLA($F = 12.14, r = 0.008$)、LaA($F = 11.32, p = 0.009$)、PRh($F = 5.61, p = 0.042$)、AI($F = 6.61, p = 0.031$)、DI($F = 16.32, p = 0.004$)であった。また、GI と Fr で有意傾向がみられた (GI: $F = 4.61, p = 0.061$; Fr: $F = 4.59, p = 0.062$)。運動量に関しては快 USV で増加傾向がみられたものの、個体ごとのばらつきが大きく、有意差はみられなかった ($F = 2.41, p = 0.17$)。

これらの領域に Holm の調整法による多重比較 t 検定を実施したところ、統制条件といずれかの USV プレイバック間に差がみられた一方、快 USV と不快 USV 間に差がみられた領域はなかった。なお、多重比較の結果は、MGB が統制—不快 USV: $t = 0.002$ 、統制—快 USV: $t = 0.005$ 、BLA が統制—不快 USV: $t = 0.015$ 、統制—快 USV: $t = 0.015$ 、LaA が統制—不快 USV: $t = 0.011$ 、統制—快 USV: $t = 0.030$ 、PRh が統制—不快 USV: $t = 0.047$ 、統制—快 USV に差はなし、AI が統制—不快 USV: $t = 0.056$ で有意傾向、統制—快 USV: $t = 0.046$ 、DI が統制—不快 USV: $t = 0.005$ 、統制—快 USV: $t = 0.010$ であった (図 17、表 7)。快 USV と不快 USV プレイバック条件間に c-Fos 蛋白質発現領域の空間的差異がみられず、また各プローブに対する発現量もこれらと類似した結果になり、刺激特性に応じた際立った変化はみられなかった。そのため、蛋白質発現への音響特徴による影響は検討しなかった。

5.4 単一ニューロン記録実験：方法

5.4.1 実験動物

9 週齢から 12 週齢の SD ラット雄 10 匹 (276 ± 45 g) を用いた。これらのラットには、研究 2 で心拍測定実験もしくは音源接近実験を経験した個体を含む。ラットは一つのケージ内でペア飼育され、電極埋め込み前日に隔離された。飼育室は温度 20 から 22 度、湿度は 30% 以上に保たれ、12 時間ずつの明暗サイクル (点灯時間 8 時、消灯時間 20 時) で統制された。給餌・給水はすべて統制せず、ラットは自由に摂食・摂水が可能であった。餌は高蛋白質含有の齧歯類用ペレット (Lab Diet, PMI Nutrition International) が与えられた。

5.4.2 電極作成と埋め込み手術

直径 12.5 μm の被覆付ニクロム線 (SANDVIK, *Stockholm, Sweden*) を、電極スピナー (Tetrode Spinner, Neuralynx, *Montana, the USA*) を用いて撚り合わせ、テトロードを作成した。この際、複数のテトロードをポリイミド・チューブ (A-M Systems, *Wahington, the USA*) に通し、電極同士がばらけないように固定した。もしくは微小タングステン電極 (MicroProbes for Life Science, *Maryland, the USA*) を用いた。

微小タングステン電極はインピーダンスが 0.9 から 1.1 $\text{M}\Omega$ となるよう検査されたものである。テトロードは各チャンネルにばらつきがあるので、埋め込み直前に電極テスター (Electrode impedance tester, Bak electronics, inc., *Florida, the USA*) でインピーダンスを測定した。チャンネル間でショートがないかを確認し、急性記録の場合は各チャンネルのインピーダンスが 5 $\text{M}\Omega$ 以下であることを確認した。慢性記録の場合はさらにテトロード電極先端に金メッキ処理を施し、インピーダンスを 300-400 $\text{m}\Omega$ 程度にまで下げた。これはテトロード埋め込みから日数経過でインピーダンスが上昇するためである。慢性記録ではテトロードの場合 4 本 (16 チャンネル)、微小タングステン電極の場合は 4 本 (4 チャンネル) とした。また、急性の場合はテトロードが 1 本 (4 チャンネル)、微小タングステン電極が 1 本 (1 チャンネル) とした。

慢性記録では、これらの電極を 2 mm まで伸展可能なマイクロ・マニピュレータにとりつけ、マルチチャンネルコネクタ用インターフェース・ボード (EIB-36, Neuralynx) へ導通させた。これらの部品は 3D プリンタで作成したパーツに、エポキシ樹脂接着剤により固定された。またリファレンス電極として、ステンレス製微小ネジ (Matsumoto Industry Co., Ltd., *Chiba, Japan*) を被覆付き銀線 (A-M Systems) に繋ぎ、用いた (図 18a)。

動物を電極埋め込み手術前日に同飼育室内の別ケージに隔離し、餌を制限した。このケージは通常飼育時に用いているものよりも高さがあり、頭上においた電極パーツが天井にぶつからないようになっていた。

以下に手術の手法について記述する。まずイソフルラン吸入器 (MK-A120eco, MUROMACHI, Inc.) で 2.5% から 3% 濃度 (in room air) での麻酔導入を行った。頭皮の毛を剃り、定位脳手術装置 (SR-6N, Narishige, *Tokyo, Japan*) のイヤークリップに固定した。呼吸が落ち着くのを待って施術部をヨード殺菌し、リドカイン塩酸塩 (Xylocaine jelly 2%,

Aspen Japan, Tokyo, Japan) を塗布した上で頭皮を切開した。頭蓋膜を除去し、出血部分に吸水スポンジを押しあてるか、半田ごてにより血管を焼きつぶして止血した。

イソフルラン麻酔を 1.5 から 2% に緩め、定位を開始した。刺入先は USV 選択性ニューロンが存在すると仮定した (5.1.2 参照) 領域のうち、実際に c-Fos 発現量が変化していた扁桃核 LaA と BLA、島皮質 AI と DI を対象とした。扁桃核 LaA および BLA は、Bregma から 3.0 mm 後方、正中線から 5.0 mm 外側 (左右いずれか) に歯科用ドリルで頭蓋に直径 1mm 程度の電極穴を開け、脳表から深さ 8.0 mm まで垂直に刺入した。島皮質 AI および DI は Bregma から 1.0 mm 前方、正中線から 5.0 mm 外側 (左右いずれか) に電極穴を開け、脳表から深さ 5.0 mm まで刺入した。また、リファレンス電極用の穴を Ramda より後方の小脳に開けた。アンカー用のボルトネジを前頭部に二か所、電極穴の対側に二か所埋めた (図 18b)。この際、電極穴から微小ピンセットを用いて硬膜を除去し、各電極を刺入している。リファレンス電極ネジは穴に入れて脳表に食い込ませ、接着剤で固定した。

慢性記録の場合はマイクロ・マニピュレータ、3D プリンタパーツおよびコネクタごとエポキシ樹脂接着剤およびデンタルセメント (GC dental products, Aichi, Japan) で固定し、さらに塩化ビニル・チューブで電極パーツ回りを覆った。これはラットが毛づくろい等で電極に触れるのを防ぐためである。術後一週間の回復期間を設け、この間一日につき鎮痛剤としてカルプロフェンを 5 mg/kg (Rimadyl Injectable, Zoetis Japan, Tokyo, Japan) と、感染症予防にペニシリン系抗生物質を 50 mg/kg (Ampicillin, Zenoaq, Fukushima, Japan) 投与しつづけた。

急性記録の場合は電極の固定は行わず、定位脳装置の油圧ポンプ式マニピュレータ (SY-256, Narishige) で操作した。

5.4.3 神経活動記録

急性記録では定位脳手術装置に固定したままファラデー・ケージで手術環境を覆い電磁ノイズを除去した。ケージ内部上方に超音波スピーカ (Ultrasoundgate Player 116, Avisoft) を設置し、音声刺激の呈示を適宜行いながらマニピュレータを初期状態 (扁桃核: 深さ 8.0 mm、島皮質: 深さ 5.0 mm) から深部 (扁桃核: 9.0 mm まで、島皮質: 7.0 mm まで) へと動かして音声を選択的反応を示すニューロンを探索した。神経活動はアンプ (Microelectrode AC Amplifier Model 1800, A-M Systems, ×1000) を介してバンドパス・フィルタ (200 から 6000 Hz, NF Corporation, Kanagawa, Japan) をかけ、マルチチャンネル生体信号記録装置 (Power 1401, CED) によるアナログ-デジタル信号変換を行った。神経データは各チャンネルにつきサンプリング周波数 31250 Hz で記録した (図 18c)。

慢性記録では心拍測定、c-Fos 実験でも用いた防音箱内の行動ケージ (内径 55 cm (L) × 30 cm (W) × 35 cm (H)、アクリル・ケージ) にラットを入れ、コネクタにワイヤレス・ヘッドステージシステム (Triangle Biomedical Sciences, inc., North Carolina, the USA)

の送信機を取り付けた。防音箱は電磁的にシールドされていた。上方に受信機、超音波スピーカ (Ultrasoundgate Player 116, Avisoft)、および超音波検出器 (USD6-6A-7, YS Design Studio) を設置した。音声を適宜呈示しながら神経活動をモニタリングし、ラットを取り出してマイクロ・マニピュレータを深部へと動かし、音声選択性ニューロンを探索した。

送信機からの信号は受信機によって増幅された ($\times 800$ 、サンプリングレート 50 kHz)。その後バンドパス・フィルタ (200 から 6000 Hz, NF Corporation) をかけ、マルチチャンネル生体信号記録装置 (Power 1401, CED) によるアナログ-デジタル信号変換を行った。神経データは各チャンネルにつきサンプリング周波数 31250 Hz で記録した (図 18d)。

音声は 1 ファイルの開始コールの立ち上がりから終了コールの立ち下がりまでが厳密に 7.00 秒になるようにコール間隔を微調整した。快 USV、不快 USV、プローブ刺激 6 カテゴリーの計 8 カテゴリーの音声を、1 カテゴリーにつき 10 ファイルずつランダム順で呈示した。ISI は 10 秒間であった。

急性・慢性記録後、イソフルラン麻酔下で電極に 20 秒間 $10 \mu\text{A}$ (Stimulus Isolater DLS100, World Precision Instruments) の直流電流を流し、電極の最終的な位置を損傷した。その後、体重の $0.85 \times 10^{-6} \text{g}$ のベントバルビツール麻酔 (Somnopentyl, KYORITSU SEIYAKU) を腹腔に注射してラットを安楽殺し、開胸のち心臓左心室から 40 ml の PBS を血管走行に注入した。次いで、4%PFA を 40 ml 血管走行に注入し、組織灌流固定を行った。その後断頭を行い、後頭延髄部付近から頭蓋を破碎して全脳を摘出した。全脳は 4%PFA に浸沈させて 4 度で後固定を行い、標本とした。

標本をビブラトーム・スライサ (Dosaka EM, Kyoto, Japan) を用いて $50 \mu\text{m}$ の厚さにスライスし、クレシル・ヴァイオレットによって Nissl 染色した。封入したスライス標本を顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) により観察・撮像し、電極位置を確認した。

5.4.4 データ解析

波形データを MATLAB Version 2019a(MathWorks)により処理した。元波形データからスパイク (活動電位) が記録された部分を切り出し、300 Hz から 3000 Hz の Butterworth フィルタ (Selesnick & Burrus, 1998) をかけた。その後、関数 findpeaks で陰性のピークを検出した。バックグラウンド・ノイズの絶対値の平均振幅を基に 10 倍以上の S/N 比をもつよう信号の閾値を設定し、この値以上のピークを持つスパイクを、ピーク前 2 ms からピーク後 2 ms の 4 ms 間 (データ 125 点) に渡って抽出した。このうち、明らかにスパイクではないと考えられる波形 (他スパイクと比較し、飛びぬけて大きな振幅をもつ場合など) を目視により除去した。

1 チャンネル (テトロードの場合は 4 チャンネル) から抽出された各スパイクを個別に主成分分析 (principle component analysis: PCA) した。時系列データ 125 点を係数として算出さ

れた第一主成分から第三主成分と、ピーク振幅 (peak amplitude) の 4 次元情報 (テトロードの場合は×4 チャンネル=16 次元) を k-means クラスタリングした。これにより、同一のニューロンから得られたと評価できるスパイクをひとつのクラスターとして分離した。

音声刺激呈示タイミングは超音波スピーカ・アンプ (Ultrasoundgate Player 116, Avisoft) を介し、マルチチャンネル記録装置 (Power 1401, CED) に神経活動と同サンプリングレートで同時に入力されていた。音声呈示 5 秒前、音声呈示 7 秒間、音声呈示後 5 秒間の計 17 秒間に対する単一ユニットからの反応を、ラスタプロットおよび刺激前後時間ヒストグラム (peristimulus time histogram: PSTH) として解析し、スパイク密度推定を行った。PSTH の時間幅は 200 ms とした。

音声選択的と思われる反応を示したニューロンが扁桃核から少数見つかると、音声呈示中の発火頻度が上昇ないし下降した。そのため、音声呈示 5 秒前をベースライン、音声呈示中 7 秒間をテストとして Wilcoxon 符号順位検定を行い、ベースラインとテストの発火頻度に差がみられるか確認した。有意差が認められたニューロンに対してはさらに、個別に音響特徴による発火頻度への影響を検討した。各刺激カテゴリに対し発火頻度が連続的に変化しているようにみられたことから、各ニューロンの発火頻度は刺激の音響特徴 MF、D、FMI とその交互作用の線形和で決定されると想定し、線形モデルによる推定を実施した。ニューロンの発火の有無はポアソン過程によってよくモデリングされるため (Heeger, 2000)、応答変数 (テスト中の発火数) はポアソン分布に従うとし、GLM を用いて各音響特徴の項目の係数を推定した。link 関数は対数とした。

5.5 単一ニューロン記録実験：結果

電極刺入位置は図 19 のようになり、目的部位への定位が正しく行われていたことが確認された。

島皮質より記録を行ったラット 4 匹 (急性記録：2 匹、慢性記録：2 匹) からは 24 ユニットの活動が記録されたが、USV に選択的な反応を示すニューロンは観測されなかった (図 20a)。

扁桃核より記録を行ったラット 6 匹 (急性記録：4 匹、慢性記録：2 匹) からは 40 ユニットの活動が記録された (急性記録：25 ユニット、慢性記録：15 ユニット)。うち急性記録で 1 ユニットのニューロン、慢性記録で 3 ユニットのニューロンが USV 選択的応答を示した。図 20b に選択性のないニューロン反応を、図 20c から f に USV 選択性ニューロンの個別の活動のラスタプロットおよび PSTH を表す。

記録されたニューロン数が少なく、かつひとつを除くユニットが音声カテゴリごとに異なった発火頻度を示した (図 21) ため、個々のニューロンに対し個別に解析を行った。以下、急性記録で観測されたものをニューロン 1、慢性記録のものをニューロン 2、3、4 と呼称する。

急性記録により麻酔下のラット扁桃核で観測されたニューロン 1 の発火頻度を解析し

た。ベースライン（刺激呈示前 5 秒間）とテスト（刺激呈示中 7 秒間）を比較して、快 USV 呈示の場合はベースライン： 0.82 ± 0.44 Hz、テスト： 1.47 ± 0.61 Hz となった。なお、発火頻度は一定時間あたりのスパイク数を時間で割ったものである。Wilcoxon 符号順位検定の結果、快 USV の呈示によりニューロン 1 の発火頻度は有意に上昇したことがわかった ($p = 0.014$)。不快 USV の場合はベースライン： 1.04 ± 0.42 Hz、テスト： 1.90 ± 0.51 Hz となり、こちらも音声呈示によって有意に発火頻度が上昇した ($p = 0.004$)。

また、ニューロン 1 はプローブ刺激呈示間での発火頻度変化がみられず、音声刺激に対しては常に興奮性の応答を示していた (図 21)。そのため、音響特徴によるニューロン活動への影響はないとし、GLM による係数の推定は実施していない。

ニューロン 2, 3, 4 は慢性記録により、自由行動下の覚醒ラット扁桃体核から観測された。ニューロン 2 は不快 USV 呈示でベースライン： 0.44 ± 0.28 Hz、テスト： 1.20 ± 0.47 Hz となり、音声呈示によって有意に発火頻度が上昇した ($p = 0.002$)。一方快 USV 呈示ではベースライン： 0.40 ± 0.21 Hz、テスト： 0.36 ± 0.22 Hz となり、発火頻度の変化はみられなかった ($p = 0.83$)。

ニューロン 3 は不快 USV 呈示でベースライン： 0.50 ± 0.24 Hz、テスト： 1.59 ± 0.65 Hz となり、音声呈示によって有意に発火頻度が上昇した ($p = 0.002$)。一方快 USV 呈示ではベースライン： 0.44 ± 0.26 Hz、テスト： 0.40 ± 0.19 Hz となり、発火頻度の変化はみられなかった ($p = 0.92$)。すなわち、ニューロン 3 はニューロン 2 と同様、不快 USV にのみ興奮性の応答を示していたため、これらのニューロンは同じ性質を有していたと示唆された。

ニューロン 4 は快 USV 呈示でベースライン： 1.02 ± 0.47 Hz、テスト： 0.43 ± 0.21 Hz となり、音声呈示によって有意に発火頻度が減少した ($p = 0.006$)。一方不快 USV 呈示ではベースライン： 1.26 ± 0.48 Hz、テスト： 0.94 ± 0.37 Hz となり、有意な変化はみられなかった ($p = 0.06$)。このため、ニューロン 4 は快 USV に対し抑制性の応答を示すニューロンであると示唆された。

ニューロン 2、3、4 のプローブ刺激に対する発火頻度は図 21 のようになった。個別に GLM を実施し、音響特徴項目がニューロン発火に与える影響を検討した。これらのニューロンにおいて、もっとも当てはまりのよいモデルは、

$$y_i \sim Po(\lambda_i)$$

$$\log \lambda_i = \beta_0 + \beta_{MF} x_{MF_i} + \beta_D x_{D_i}$$

となった。応答変数 y はテストにおける発火数（発火頻度はこれを呈示時間の 7 秒で割ることで求められる）とし、これらはポアソン分布に従うとした。 x_i は音響特徴が快 USV 的な場合はダミー変数として 1 を、不快 USV 的な場合は 0 を挿入する。 β は切片および各項目の係数である。

モデル選択には AIC と BIC を併用した。ニューロン 2 およびニューロン 4 では AIC と BIC の最小モデルは一致し、かつそのモデルの係数はすべて有意であったためこれを選択

した (表 8, 10)。一方ニューロン 3 の AIC 最小モデルと BIC 最小モデルは異なり、AIC 最小のモデルには有意でない係数を含んでいた (表 9)。そのため、ニューロン 3 に関しては BIC 最小モデルをもっとも当てはまりのよいものとして選んだ。結果、すべてのニューロンの音声刺激に対する発火数は、MF および D の独立した主効果によって説明されることが分かった。

推定された各係数は、ニューロン 2 の MF は $\beta_{MF} \pm SE = -0.24 \pm 0.07$ ($z = -3.44, p < 0.001$)、D は $\beta_D \pm SE = -0.22 \pm 0.07$ ($z = -3.24, p = 0.001$) となった。ニューロン 3 の MF は $\beta_{MF} \pm SE = -0.85 \pm 0.10$ ($z = -8.92, p < 0.001$)、D は $\beta_D \pm SE = -0.47 \pm 0.09$ ($z = -5.21, p < 0.001$) となった。また、ニューロン 4 の MF は $\beta_{MF} \pm SE = -0.44 \pm 0.12$ ($z = -3.79, p < 0.001$)、D は $\beta_D \pm SE = -0.35 \pm 0.12$ ($z = -3.24, p = 0.003$) となった。すなわち、これらのニューロンでは快 USV 的な 50 kHz 付近の MF と短い D がそれぞれ発火頻度の低下をもたらしていることが明らかになった。ただしニューロン 4 はニューロン 2, 3 と比較してベースラインの発火頻度が高く、自発発火が多く見られるニューロンであり、快 USV に抑制性応答を示すという点でニューロン 2, 3 とは性質が異なっていた。

5.6 考察

5.6.1 USV 知覚処理に関連する領域

運動量と M1, Fr, GI, dlPAG の c-Fos 蛋白質発現量との間に有意な相関がみられた。M1 は運動野なので、これらで興奮性の応答が増強するのは自然な結果であり、間接的に実験プロトコルが機能していたことを証明した。

他の領域に関しては、まず GI は体性感覚野や運動皮質に連絡があるため (Bagaev & Aleksandrov, 2006)、運動に応じた興奮性活動があったのではないかと考えられる。また、dlPAG は外的刺激に応じ、攻撃や防御などの情動的行動を表出させる (Keay & Bandler, 2001)。本実験においてはこのような行動はみられず、単純にケージ内の移動が増加したのみであったが、内的には類似した反応が誘起されていたと推測される。

Fr は解剖学的に第二次運動皮質 (M2) に続いている (Paxinos & Brown, 2006)。本実験では嗅球を除く脳の先端部からスライスを作成し、Bregma +4.7 mm に相当するスライスを選んだが、これが Fr ではなく M2 を含んでいたために運動量と発現量に相関が見られた可能性が考えられる。

c-Fos 蛋白質の発現に関して、プレイバックのない統制条件、快 USV、不快 USV のプレイバックの三群間に有意差が認められたのは、まず低次聴覚経路である MGB、扁桃核のうち BLA、LaA、海馬と扁桃核の連絡路である PRh、島皮質のうち AI、DI であった。また、GI と Fr では有意傾向がみられた。これらは快 USV と不快 USV 間には有意差がなく、

USV 呈示と統制条件間でのみ差が認められた。

MGB で発現量が増加したのは聴反応によるものと考えるので、こちらも間接的に実験プロトコルが機能していたことを証明している。

また、MGB 以外の領域は全て情動関与かつ感覚連合を行う領域であるので、これらの発現は USV に対する興奮性応答を示した結果だと考えられる。ただし、過去の知見において快と不快 USV 間で発現量が見られるとされる領域でも、この二者間の差はみられなかった。特に BLA、LaA、PRh は不快 USV でのみ発現がみられ、Fr は快 USV でのみ発現がみられるという報告が存在する (Sadananda, Wöhr & Schwarting, 2008)。本実験の結果はこのような知見と一部矛盾する結果となった。これに関しては、テスト時の環境の違いが原因として考えられる。Sadananda らの研究では、プレイバック前の 60 分間の隔離時間は、テストケージとは別の環境で設けられ、ラットは隔離時間を経たのち、テストケージに移され音声呈示されている (Sadananda, Wöhr & Schwarting, 2008)。一方、本実験は隔離とプレイバックを同じケージで実施しており、長時間にわたる隔離によってラットは十分に環境に馴化してしまっていた。音声呈示によって運動量の増加を示さない個体の中には音声を無視し、睡眠しているように見える個体も少なからず存在した。USV による場所特異的な神経応答は、テスト環境への馴化を行わず、ラットにとって新奇な環境で行う必要があるかもしれない。これにより、たとえば他個体との社会的相互作用への予期や意欲を維持することができるかと推測される。

5.6.2 単一ニューロンレベルでの情報処理

本研究の仮説(5.1.2 参照)および c-Fos 発現実験の結果を受けて、単一ニューロンからの電気活動記録を行う部位は島皮質 (AI および DI) と扁桃核 (LaA と BLA) とした。一方の ACC は音声プレイバックによる c-Fos 発現が見られなかったため対象外とした。同座標から電極を刺入し、深さ方向に移動させていくことで、それぞれの領域から記録を行った。

島皮質から記録されたニューロンは計 24 ユニットであったが、音声反応を示すニューロンは発見されなかった。ある応答特性のニューロンが発見されないことを以て、そのようなニューロンが存在しないと言い切ることはできない。ただしこの結果から、島皮質は音声そのものを符号化しているのではなく、音声に関する情動的知覚を担っている可能性が高いと考えられた。これを検証するためには、島皮質のニューロン活動をより長期の時間スパンで追う必要がある。

扁桃核では、麻酔下のラット (急性記録) からは 25 ユニットが記録され、そのうち音声反応を示したものは 1 ユニットのみであった (ニューロン 1)。自由行動下の覚醒ラット (慢性記録) からは 15 ユニットが記録され、音声反応を示したものは 3 ユニットであった (ニューロン 2、3、4)。

自由行動下で記録されたニューロン 2、3 は不快 USV にのみ興奮性の応答を持続的に示した。一方ニューロン 4 は快 USV のみに抑制性の応答を持続的に示した。Parsana らは LaA および BLA から 100 ユニット以上の USV 応答ニューロンを記録しており、それらの応答特性を以下のように分類している。音声呈示中に持続的に興奮性応答を示す (tonic+) / 抑制性応答を示す (tonic-)。音声のオンセットにのみ興奮性応答を示す (phasic onset+) / 抑制性応答を示す (phasic onset-)。音声のオフセットにのみ興奮性応答を示す (phasic offset+) / 抑制性応答を示す (phasic offset-)。USV 選択性ニューロンはこれらのうちいずれか、もしくはその複合的な応答特性を持ち、全体の割合としては不快 USV には tonic+、快 USV には tonic-を示すニューロンが多く見られたと報告されている (Parsana & Brown, 2012)。さらにこれらの応答特性の違いは、ニューロンが USV の情動価、すなわち快か不快のいずれかを表象しているためであると考察されている。

本実験で記録されたニューロン 2,3 はこの不快 USV 選択性 tonic+ニューロンであり、ニューロン 4 は快 USV 選択性 tonic-ニューロンであったと考えられる。これらのニューロンの発火頻度は、音声刺激のもつ各音響特徴の線形和の影響を受けると仮定し、線形モデルによる検討を個別に実施したところ、すべてのニューロンの発火頻度変化は MF と D により説明された。ニューロンの表象が音声そのものではなく音声の情動価であるとするならば、音声のもつ MF と D が快・不快を定義付けていると考えられる。つまり 50 kHz 付近あるいは短い音声はラットにとって快であり、22 kHz 付近あるいは長い音声はラットにとって不快である。この知見は研究 2 の結果とも一致する (4.6 節の考察も参照)。

ただし、刺激の物理特性とその刺激を符号化していると考えられる単一ニューロンとの間に線形関係を想定できるかは、さらなる検討が必要である。感覚皮質ではこのような線形関係は一般的にみられ (eg. ラット聴覚皮質における自然音に対する応答、Machens, Wehr & Zador, 2004)、より高次の領域でも刺激の複数パラメータの線形和で発火頻度を予測できる (eg. 小脳プルキンエ細胞における眼球運動の逆推定、Shidara et al., 1993)。一方、刺激に対し非線形的な応答を示すニューロンも数多く報告されており、たとえば単一ニューロンではなくあるニューロン集団全体の活動による符号化を行っている場合など、線形モデルによる近似が不可能なケースも考えうる (Pouget, Dayan & Zemel, 2000)。

麻酔下で記録されたニューロン 1 は、快 USV および不快 USV 呈示中に興奮性応答を持続させ (tonic+)、またプローブ刺激の音響特徴に寄らず興奮性応答を示していた。USV カテゴリに選択的でない USV 応答ニューロンは Parsana らの報告 (Parsana & Brown, 2012) にも存在せず、麻酔による内的状態の変化がニューロンの音声選択性に影響を及ぼした可能性が示唆される。

このことにより、たとえば、「扁桃体の音声刺激に広く応答するニューロンが、覚醒状態や行動文脈に応じて神経内分泌系による神経修飾を受け、特定の音声 (特にコミュニケーション音声や情動音声などの生態学的音声) に対する選択性応答を形成している」といった仮説が提示できる。この神経内分泌系としては、覚醒状態や感覚刺激に対する注意を、

ノルアドレナリンを各部位に分泌することでトップダウン的に調整する青斑核 (Aston-Jones, Rajkowski & Cohen, 1999) などが候補として考えられる。仮説を検証するためには、同一のニューロンを *in vivo* イメージングなどの手技によってトレースし、麻酔時と覚醒時の活動の変化を比較する必要がある。あるいは光遺伝学的手技を用いてノルアドレナリン経路を人為的に賦活/抑制することで、音声選択性や音声への情動反応がどのように変化するか検討するのも有用である。これらに関して、今後の研究のさらなる発展性が期待できる。

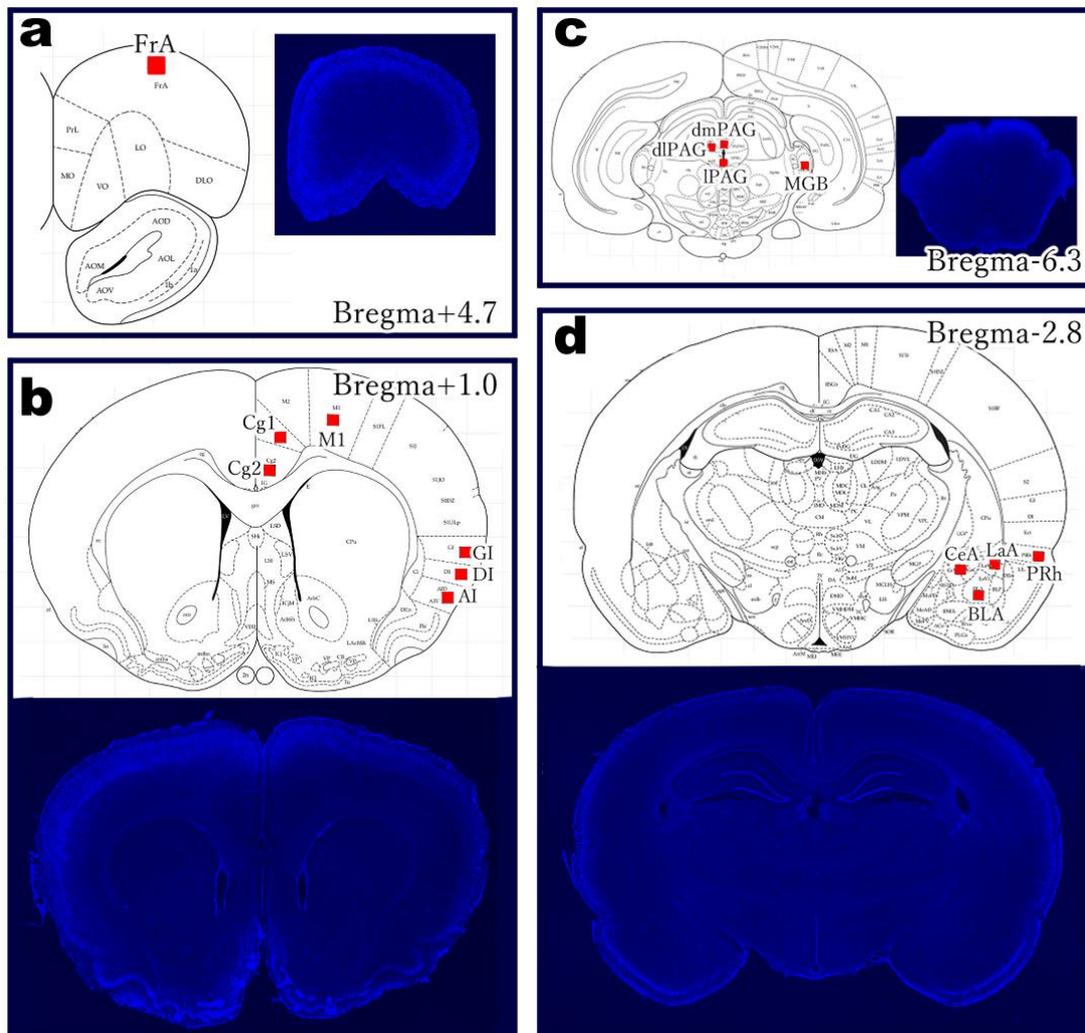


図 13 c-Fos 発現実験のサンプリング領域

サンプリング対象としたラット脳冠状断脳地図 (Paxinos & Watson, 2006) および実際に得られた脳スライスの一部 (青色蛍光画像)。また、脳地図上の赤色部分は画像解析に用いた。

FrA: 前頭皮質領域、Cg1: 前部帯状皮質背側、Cg2: 前部帯状皮質腹側、M1: 第一次運動皮質、AI: 無顆粒島、DI: 亜顆粒島、GI: 顆粒島、dmPAG: 中脳水道周囲灰白質背内側、dIPAG: 中脳水道周囲灰白質背外側、IPAG: 中脳水道灰白質外側 MGB: 内側膝状体、BLA: 扁桃体基底外側核、CeA: 扁桃体中心核、LaA: 扁桃体外側核、PRh: 嗅周皮質。

(a)Bregma +4.7 mm、(b)Bregma +1.0 mm、(c)Bregma -6.3 mm、(d)Bregma -2.8 mm。

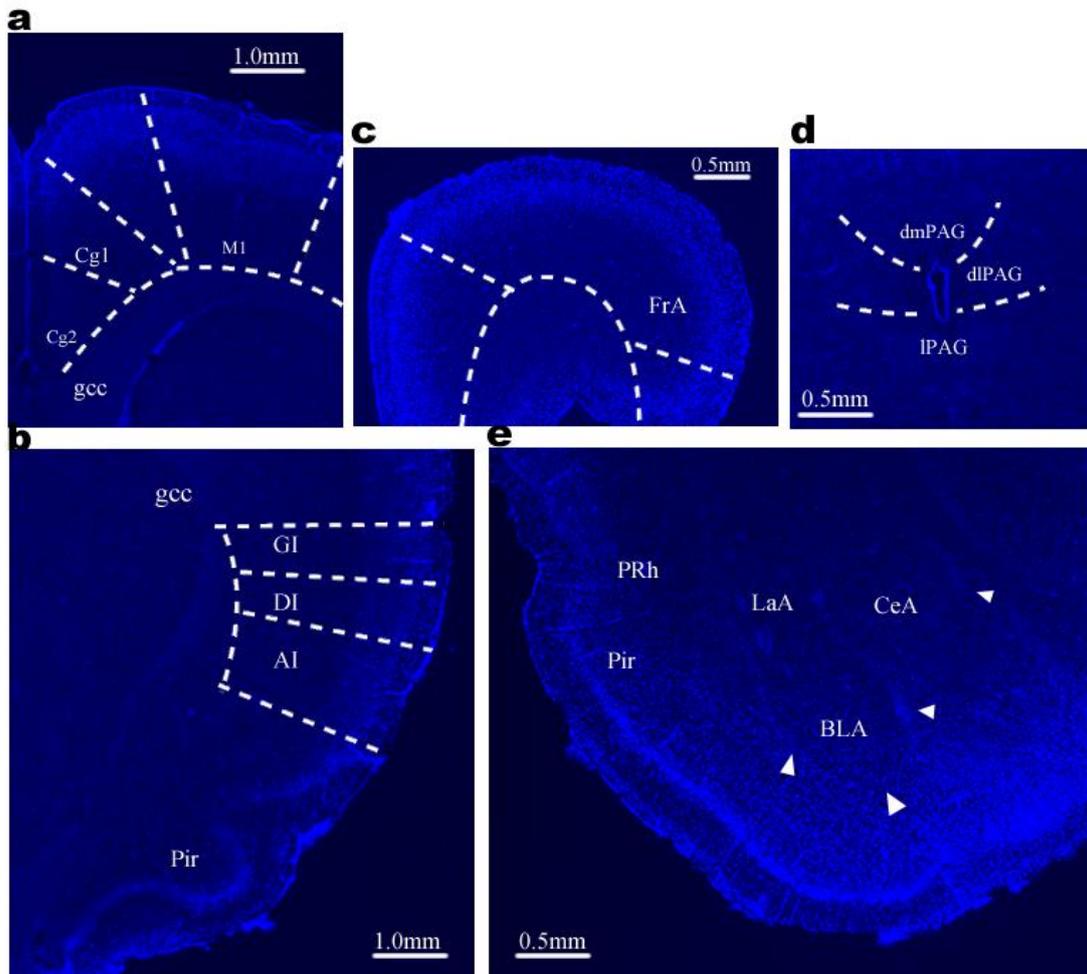


図 14 c-Fos 発現実験の脳領域の同定

(a) Bregma +1.0 mm スライスの前部帯状皮質周辺。脳梁 (gcc: genu of corpus callosum) を目安にして各部の同定を行った。

(b) Bregma +1.0 mm のスライスの上皮質周辺。脳梁および梨状皮質 (Pir: piriform cortex) を目安にして各部の同定を行った。

(c) Bregma +4.7 mm のスライス。FrA を同定した。皮質領域は 1, 2/3 層を避け、4, 5 層付近から撮像を行っている。

(d) Bregma -6.3 mm のスライス PAG 周辺。中心の水道 (Aqueduct) を目安にして各部の同定を行った。

(e) Bregma -2.8 mm のスライス扁桃体周辺。各扁桃体核 BLA、LaA、CeA は目視により構造物が同定できる。PRh は梨状皮質と溝を目安に同定した。

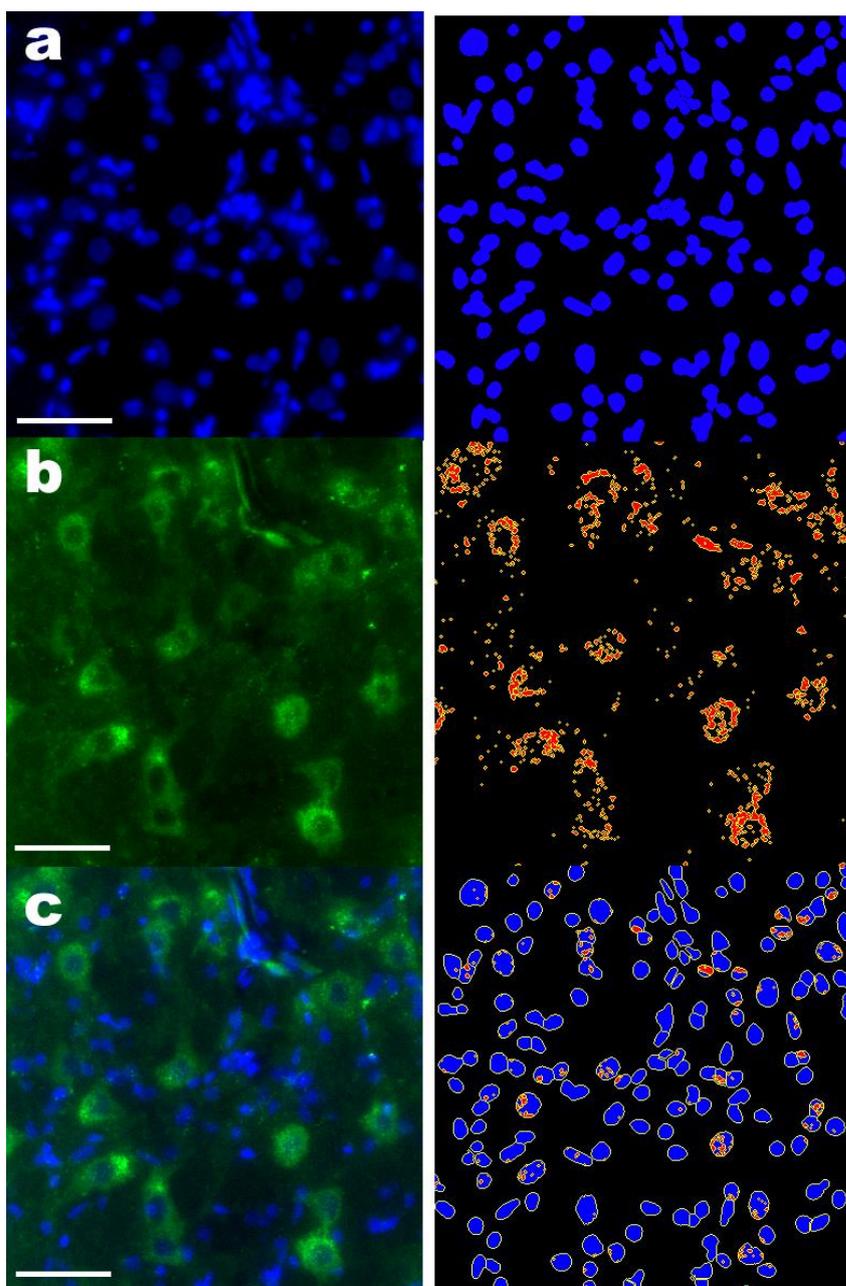


図 15 c-Fos 陽性細胞の解析

左は元の蛍光画像であり、右はシグナルを自動抽出した画像の一例を表している。スケールバーは $50\mu\text{m}$ を示す。

(a)DAPI により染色された細胞核。

(b)GFP により染色された c-Fos 蛋白質。

(c)上二画像をオーバーレイした画像。自動抽出にはまず細胞核の局在をマスクし（図中青色部分）、マスク内に c-Fos 蛋白質が発現している（図中の赤色部分）細胞の個数をカウントした。

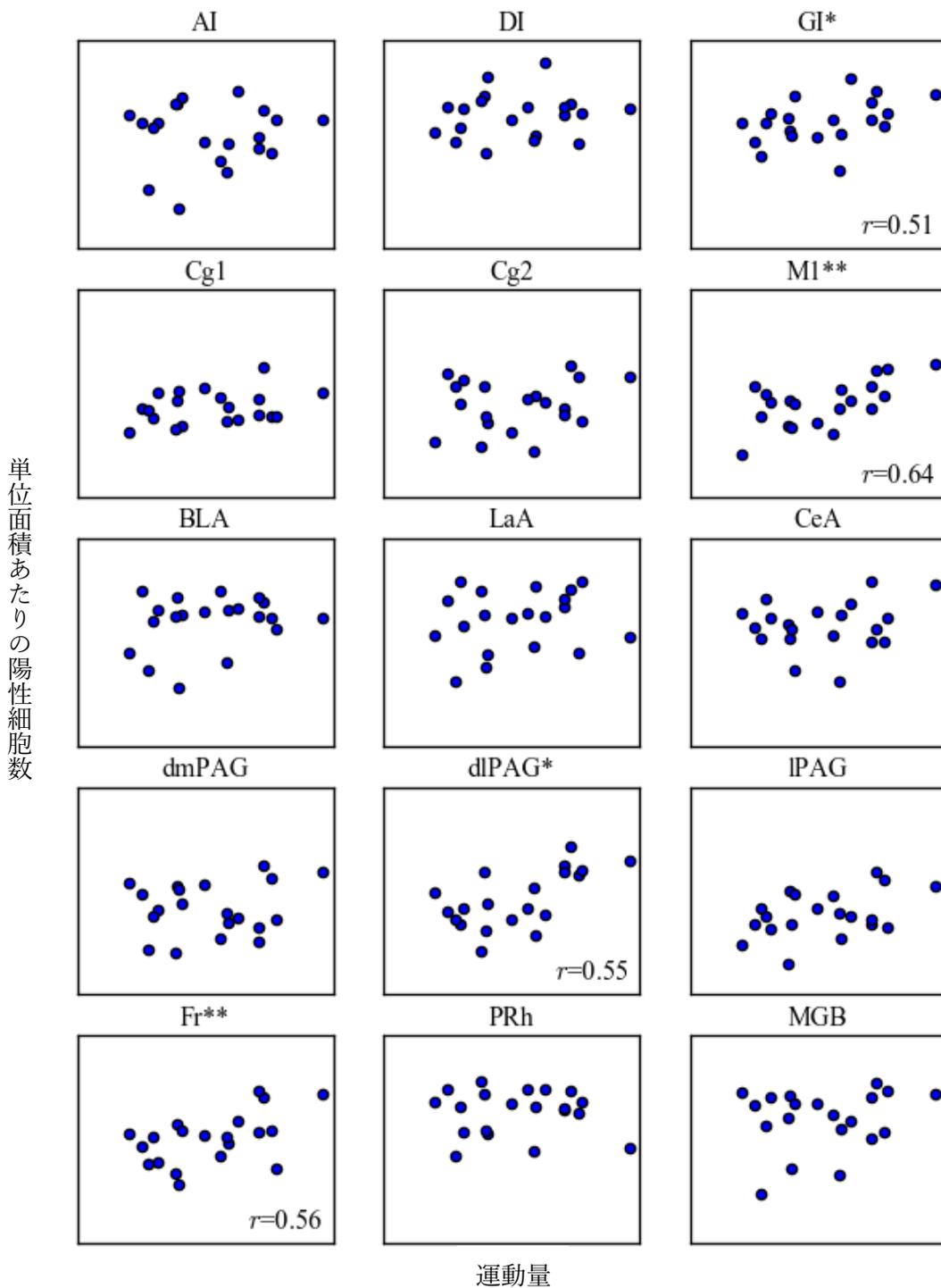


図 16 運動量と c-Fos 発現の相関

横軸は座標移動量によって算出された運動量、縦軸は単位面積 (mm^2) の c-Fos 陽性細胞数であり、数値は相対的なものであるため省略する。運動量と相関がみられたのは M1 ($p = 0.002$, $r = 0.64$)、Fr ($p = 0.009$, $r = 0.56$)、GI ($p = 0.018$, $r = 0.51$)、dlPAG ($p = 0.01$, $r = 0.55$)であった (Pearson の相関係数)。

運動量

単位面積あたりの陽性細胞数

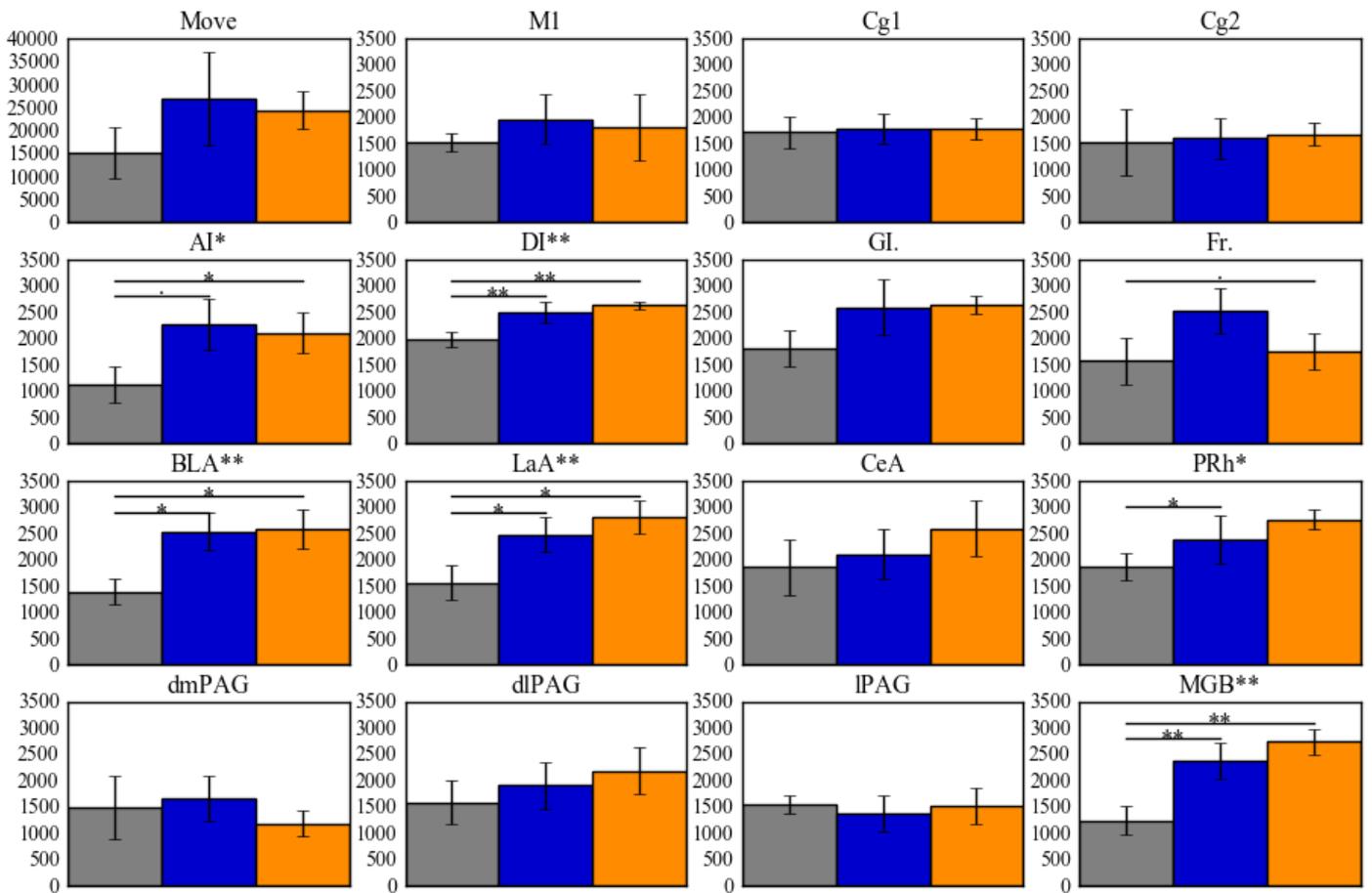


図 17 USV プレイバックによる c-Fos 発現

** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; . $p < 0.1$ を表す (ANOVA および Holm 法による多重比較)。また、エラーバーは標準誤差を示す。

棒グラフのうち、Move は運動量を、それ以外は c-Fos 発現量 (細胞数/ mm^2) を示している。オレンジは快 USV プレイバック、青は不快 USV プレイバック、灰色は統制条件を表す。

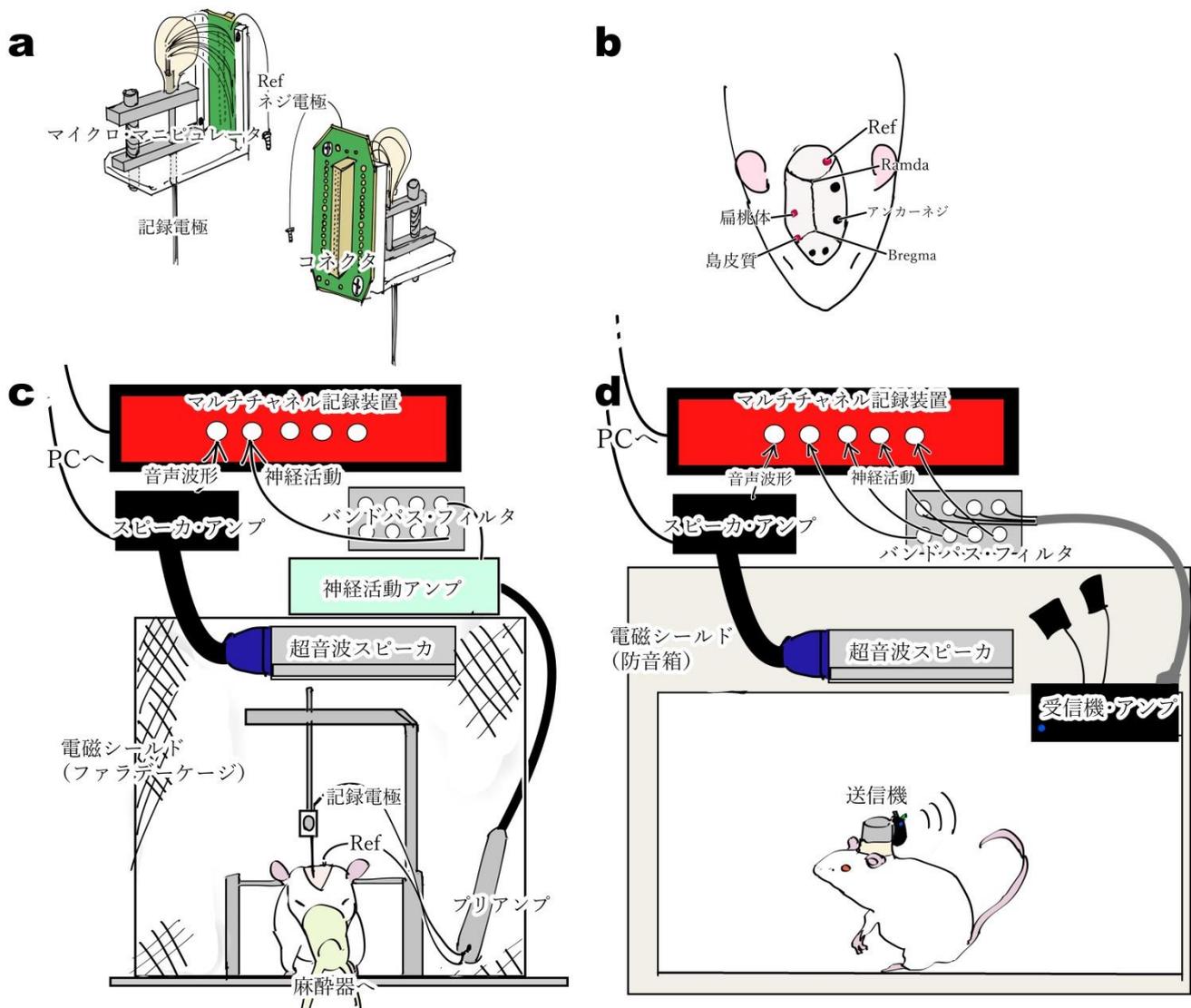


図 18 電気生理実験の概要図

- (a) 慢性記録用埋め込み電極装置。ワイヤレス・ヘッドステージシステムの送信機につなぐコネクタに記録電極 4~16 チャンネルと Ref (リファレンス) ネジ電極をピンで導通させている。記録電極先端はマイクロ・マニピュレータに固定され、このマニピュレータのネジを回し位置調整する。これらは 3D プリントで作成された樹脂パーツに固定されている。
- (b) 島皮質、扁桃体、Ref の電極穴の位置を示す。島か扁桃体いずれかの部位から神経活動を記録し、前頭の二か所と対側の二か所にアンカーネジ (黒色) を設置した。
- (c) 急性記録時の実験環境概略図。1~4 チャンネルで記録した。
- (d) 慢性記録時の実験環境概略図。4~16 チャンネルで記録した。

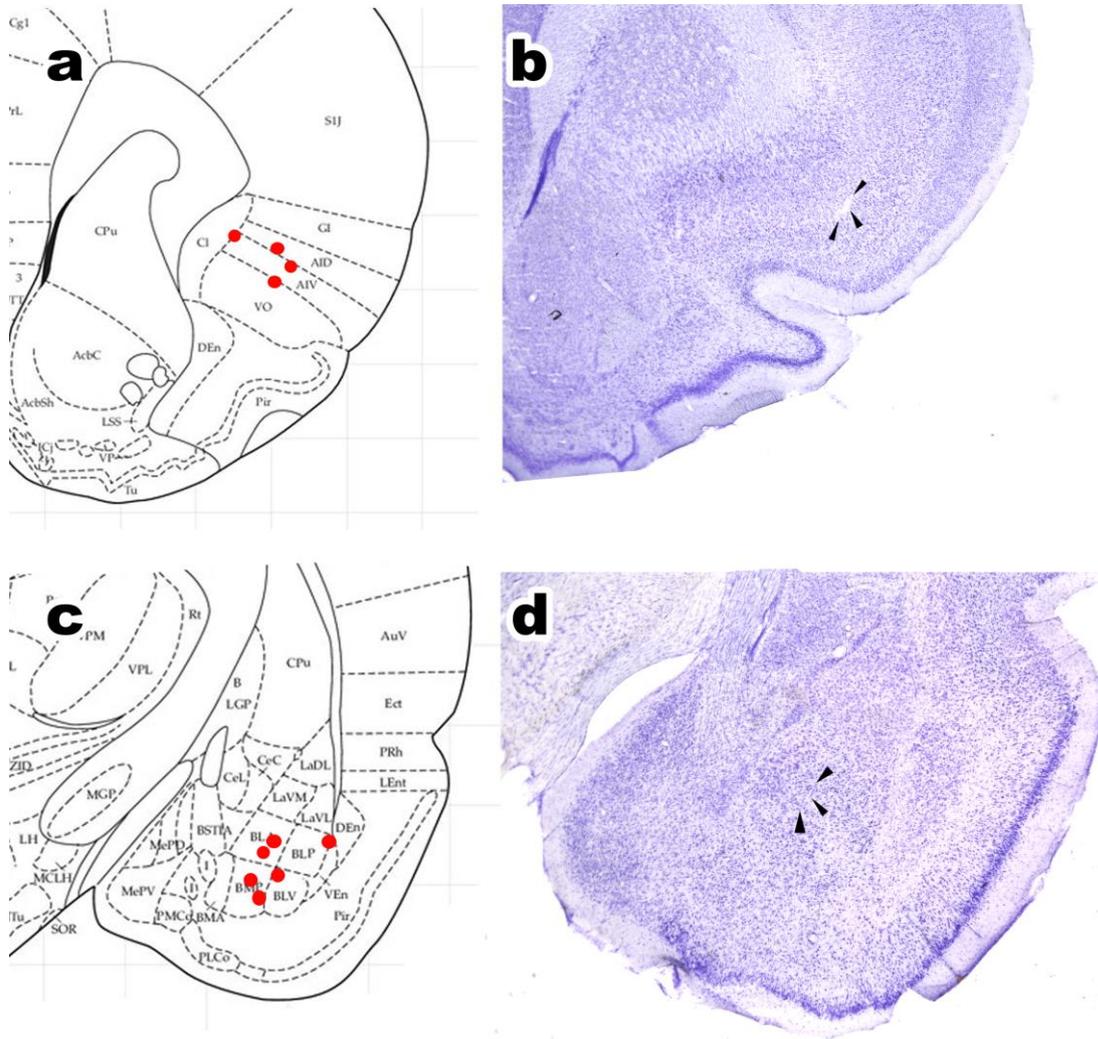


図 19 電極刺入位置

- (a) 島皮質から記録した 4 匹のラットの最終電極刺入位置。
- (b) (a) の一例。電極跡を示す。
- (c) 扁桃核から記録した 6 匹のラットの最終電極刺入位置。
- (d) (c) の一例。電極跡を示す。

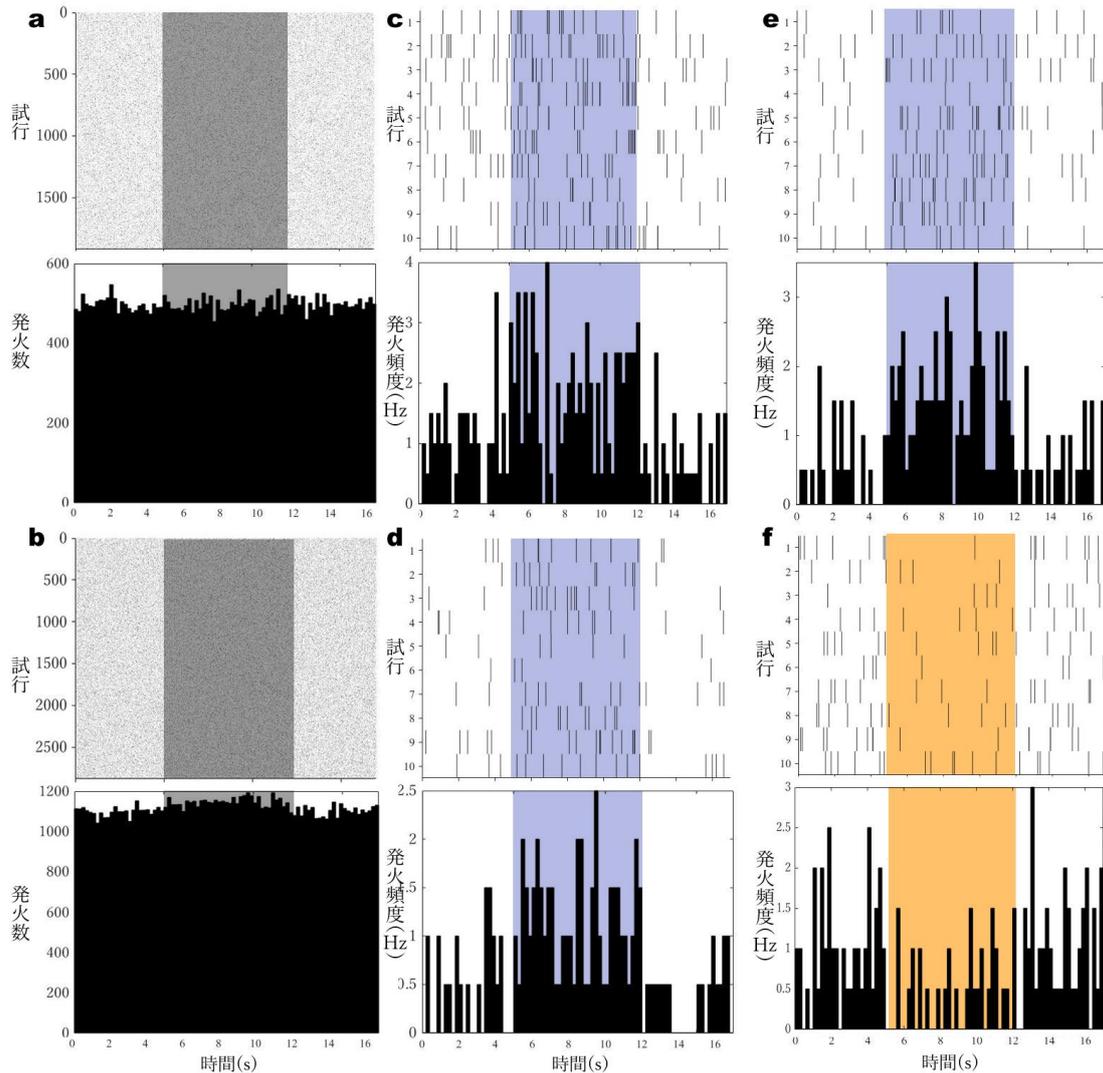


図 20 ニューロンのラスタプロットおよび PSTH

島皮質から 24 ユニット、扁桃体から 40 ユニットのニューロンを記録した。そのうち、USV 選択性ニューロンは扁桃体から 4 ユニット記録された。ニューロン反応のラスタプロットと PSTH を示す。灰色部分はすべての音声刺激プレイバックを示す。また青部分は不快 USV、オレンジ部分は快 USV プレイバックを表す。

- (a) 島皮質から記録された 24 ユニットのニューロン反応。音声選択性はみられなかった。
- (b) 扁桃体から記録された 40 ユニットのうち、USV 選択性をもつニューロンを除いた 36 ユニットのニューロン反応。
- (c) 麻酔下で記録された快・不快 USV 興奮性ニューロン。図は不快 USV プレイバック時。
- (d)(e) 自由行動下で記録された不快 USV 興奮性ニューロン。
- (f) 自由行動下で記録された快 USV 抑制性ニューロン。

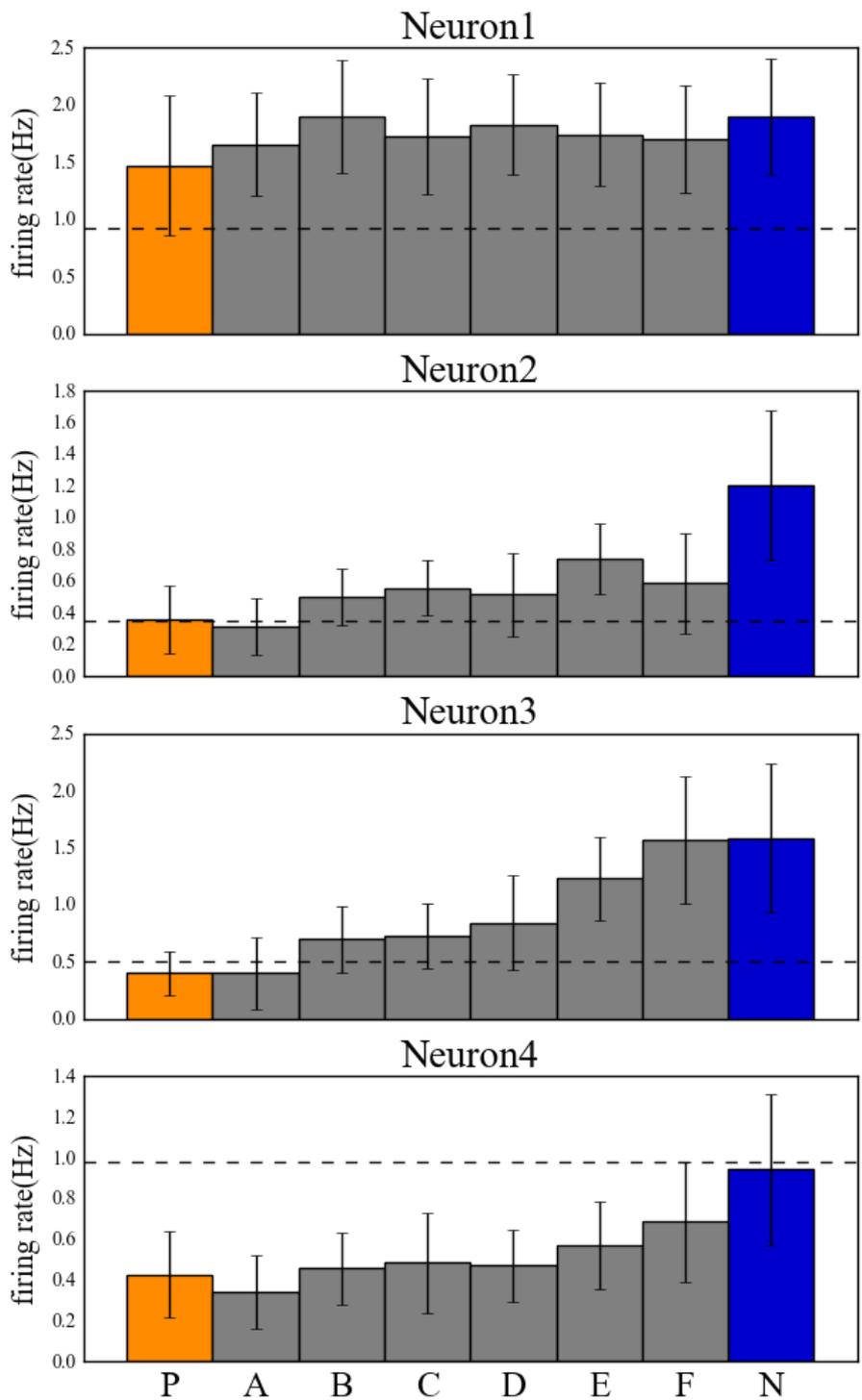


図 21 プローブ刺激に対する各ニューロンの発火頻度変化
 各ニューロンにおける発火頻度(firng rate)。エラーバーは標準誤差を表す。点線はすべての試行におけるベースラインの平均を表す。また、P は快 USV(positive)を、N は不快(negative)を、A から F はプローブのラベルを示す。

	ANOVA		Pearson の相関係数	
	F	<i>p</i> 値	<i>r</i>	<i>p</i> 値
運動量	2.41	0.17	—	—
M1	0.66	0.55	0.64	0.002
Cg1	0.05	0.95	0.22	0.34
Cg2	0.09	0.91	0.22	0.34
AI	6.61	0.031	0.15	0.51
DI	16.32	0.004	0.04	0.87
GI	4.61	0.061	0.51	0.018
Fr	4.59	0.062	0.56	0.009
BLA	12.14	0.008	0.15	0.52
LaA	11.32	0.009	0.10	0.68
CeA	1.60	0.28	0.008	0.97
PRh	5.61	0.042	-0.20	0.39
dmPAG	0.88	0.46	0.11	0.63
dIPAG	1.43	0.31	0.55	0.010
IPAG	0.27	0.78	0.23	0.32
MGB	22.95	0.002	0.17	0.46

表 7 c-Fos 発現実験の統計結果

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	AIC	BIC
1	2.57 ± 0.06 (<i>p</i> <0.001)	-0.24 ± 0.07 (<i>p</i> <0.001)	-0.22 ± 0.07 (<i>p</i> =0.001)	—	—	—	—	397.18	404.33
	2	2.57 ± 0.06 (<i>p</i> <0.001)	-0.24 ± 0.07 (<i>p</i> <0.001)	-0.27 ± 0.09 (<i>p</i> =0.002)	—	—	0.09 ± 0.10 (<i>p</i> =0.38)		
3	2.57 ± 0.07 (<i>p</i> <0.001)	-0.24 ± 0.07 (<i>p</i> <0.001)	-0.22 ± 0.07 (<i>p</i> =0.001)	-0.01 ± 0.07 (<i>p</i> =0.89)	—	—	—	399.17	408.69

表 8 ニューロン 2 の線形モデル比較

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	AIC	BIC
1	2.42 ± 0.06 (<i>p</i> <0.001)	-0.85 ± 0.10 (<i>p</i> <0.001)	-0.47 ± 0.09 (<i>p</i> <0.001)	—	—	—	—	380.09	387.24
	2.42 ± 0.06 (<i>p</i> <0.001)	-0.85 ± 0.10 (<i>p</i> <0.001)	-0.34 ± 0.11 (<i>p</i> =0.002)	—	—	—	-0.27 ± 0.14 (<i>p</i> =0.06)		
3	2.48 ± 0.08 (<i>p</i> <0.001)	-0.85 ± 0.10 (<i>p</i> <0.001)	-0.47 ± 0.09 (<i>p</i> <0.001)	-0.12 ± 0.09 (<i>p</i> =0.19)	—	—	—	380.37	389.90

表9 ニューロン3の線形モデル比較

	(切片)	MF	D	FMI	MF × D	MF × FMI	D × FMI	AIC	BIC
1	1.70 ± 0.09 (<i>p</i> <0.001)	-0.44 ± 0.12 (<i>p</i> <0.001)	-0.35 ± 0.12 (<i>p</i> =0.003)	—	—	—	—	315.53	322.67
	1.77 ± 0.10 (<i>p</i> <0.001)	-0.44 ± 0.12 (<i>p</i> <0.001)	-0.35 ± 0.12 (<i>p</i> =0.003)	-0.14 ± 0.11 (<i>p</i> =0.23)	—	—	—		
3	1.74 ± 0.09 (<i>p</i> <0.001)	-0.55 ± 0.15 (<i>p</i> <0.001)	-0.45 ± 0.15 (<i>p</i> =0.003)	—	0.25 ± 0.24 (<i>p</i> =0.30)	—	—	316.46	325.99

表10 ニューロン4の線形モデル比較

第六章 総合考察

6.1 USV のカテゴリ的知覚

本研究ではまず USV がカテゴリ的知覚かを検討することを目的とした。私は、音声が多数の枠組み（カテゴリ）を持ち、カテゴリ内での汎化とカテゴリ間での弁別が可能かつ、音声に応じて特定の情動状態と神経活動が生じることでこれを実証できると考えた。そのため本研究では、汎化と弁別、情動反応、神経活動の異なった側面から快 USV・不快 USV に対する応答を比較した。

汎化と弁別を測定する研究 1 では、オペラント条件づけを基本とした学習プロトコルを使用した。快・不快 USV の 2 カテゴリのうち、同カテゴリの USV には同じレバー（汎化）を、異なるカテゴリの USV には異なるレバー（弁別）を押すようラットに学習させることが可能であると示した。

情動反応を測定する研究 2 では、情動を自律神経系の興奮—鎮静と、刺激への情動価の快—不快の二軸にわけて検討した。興奮—鎮静は心拍数の増加（心拍のパルス間隔の短縮）と心拍数の減少（心拍のパルス間隔の延長）によって測定された。快 USV は有意傾向に心拍数を増加させ、不快 USV は有意に心拍数を低下させた。これにより、快 USV の知覚は興奮、不快 USV の知覚は鎮静であることが示された。ただし快 USV に対する興奮反応は弱く、自律神経系応答はテスト環境や装置に依拠すると示唆された。

快—不快情動軸は、USV をプレイバックする音源への接近と非接近で定義された。過去の研究で既に快 USV には接近を、不快 USV には非接近を示すことが明らかにされており、本実験ではこの知見と一致した結果を得た。一方で不快 USV に接近する個体も少数ながら存在していた。これは他個体の存在を予測したことで、社会的相互作用を期待して接近したためと推測される。あるいはラットは危機に陥っている他者を救助する向社会行動を示すので、不快 USV が援助を求める他個体の手がかりとして機能していた可能性も考えられる。

研究 3 では USV に対する神経活動を測定するため、最初期遺伝子 *c-fos* 転写産物の蛋白質 cFos を免疫染色し、USV 選択的応答を示す領域を特定した。過去の報告 (Sadananda, Wöhr & Schwarting, 2008) にある扁桃体核と前頭皮質領域に加え、新たに情動知覚や共感の形成に関与するとされる島皮質が興奮性の活動をしていることがわかった。ただしこれらの領域は USV カテゴリ選択的ではなく、音声呈示がない条件と比較して快・不快 USV に関わらず c-Fos 発現量が上昇しており、過去の知見と矛盾していた。この原因として、テスト環境に対する過度の馴化が考えられた。USV に対する異なった脳領域の活動、すなわち異なった情動価を知覚するためには、新奇的な環境における探索の動機の維持や警戒などの内的状態（特に覚醒度）が重要な要因となっているかもしれない。また、*c-fos* は興奮性の神経活動マーカーであるため、神経細胞のサブタイプの同定はできない。代わりに GABA 作動性の抑制性神経細胞やグルタミン酸作動性の興奮性神経細胞といった細胞タイ

プを適切な遺伝子マーカーなどで共に染めることで、快・不快 USV を符号化する神経細胞タイプを同定することができる可能性もあり、今後の研究ではこのような操作が必要であると考えられる。

c-Fos 発現がみられた扁桃体 LaA と BLA、島皮質 AI と DI に電極を刺入し、麻酔下での急性記録と自由行動下での慢性記録を実施した。島皮質からは USV 選択的ニューロンは発見されず、この領域は音声そのものではなく、音声に関する情動的知覚を表象しているのではないかと考察した。一方の扁桃体には、自由行動下で快 USV に抑制性の応答を示すニューロンと不快 USV に興奮性の応答を示すニューロンが発見され、これは過去の知見と一致していた (Parsana & Brown, 2012)。また、麻酔下では過去の報告には存在しない、快・不快 USV どちらにも興奮性応答を示すニューロンが発見された。このため、前述の c-Fos 実験と併せて、覚醒度などの内的状態が USV のカテゴリ選択性を調整する可能性が示唆された。

以上のことから、①快 USV (不快 USV) 内で汎化可能かつ快・不快 USV 間で弁別可能であること、②快 USV は聴取者の興奮と快を、不快 USV は聴取者の鎮静と不快という対照的な情動反応をもたらすこと、③単一ニューロンにおける神経表象が異なっていることにより、二種類の USV はカテゴリ的に知覚されていると結論づけられた。さらに USV の、特に情動価の知覚は、ラットの行動文脈や内的状態に影響を受けることが示唆された。

6.2 音響特徴による知覚への影響

二種類の USV はコールのもつ平均周波数 (MF)、コールの持続時間 (D)、そして MF と D に寄らない周波数変調パターンから算出した 1 コールの変動値 (FMI) の三つの音響特徴によって区別される。USV はカテゴリ的に知覚されることが明らかにされたが、これらの音響特徴がどのように知覚に影響を及ぼすか検討した。

汎化・弁別では全ての音響特徴が十分な手がかりとなっていた。特に MF が他の二つと比較し、最も支配的にラットの弁別レバー押しを決定していた。情動反応は自律神経系反応 (興奮-鎮静軸)、音源接近反応 (快-不快軸) とともに MF と D による影響がみられた。また扁桃体核の神経活動においても、快 USV 抑制性ニューロンおよび不快 USV 興奮性ニューロンの発火頻度は、音響特徴を操作したプローブ刺激間で段階的に変化しており、MF および D がこの変化を説明した。扁桃体核の、USV カテゴリによって異なった応答を示す USV 選択性ニューロンは音声の情動価を符号化しているという説がある (Parsana & Brown, 2012)。この仮説が正しいとすれば、MF と D による発火頻度への影響は、情動反応変化をもたらしたものと同一であると考えられる。

MF は弁別に対する感覚手がかりとして最も重要であり、情動反応にも一貫して関与していた。MF、すなわち音声が多く含む周波数成分は音声知覚において重要な情報となりうる。3.4.2 節で詳しく述べたように、動物は体サイズに応じて特定周波数に対する聴覚的感受性が高くなる。特に齧歯類のような小動物は聴覚器官の構造から高周波数が検知しやすく、

一方の天敵といった体サイズが大きい動物にはこの音は聞こえづらい。そのため、このような情報をコミュニケーションに用いることで捕食者からの検出を避けることができる。さらに周波数情報は音源の場所情報としても利用できるために、生体はその情報を優先的に処理しているとも考えられる。

また、MFほど強固ではないものの、MFと同様に、Dが感覚手がかりかつ情動の手がかりとなっていた。短いDは断続的な呼吸を必要とすることから、遊びやくすぐり、あるいは報酬系の賦活などによって身体状態が活性化し、多動的である場合の発声である。一方、一コールを長時間持続して発声するには呼吸を安定させる必要があり、発声制御を行うために運動性を低下させると考えられる。すなわち、発声側の快・興奮と不快・鎮静が発声ダイナミクスを通じてDに表れており、聴取側がこれらのUSVを知覚する際に共感的な情動反応が引き起こされると考えられる。

FMIは情動反応の誘発には関与しない一方、汎化・弁別には関与していたため、音声構造を感覚知覚の上では重要であると考えられる。FMIは発声時の運動に由来する発声系のゆらぎノイズであり、その情報は情動を伝達しない。しかしながら周波数変調パターンが聴覚系の馴化を防ぎ、音声への検出力をあげているので、感覚の手がかりとして利用されているという仮説を提唱する。

なお、本研究では音声の呈示回数が限られる実験デザインが多く、用いたプローブ刺激は六種類であり、MF・D・FMIは快USV的か不快USV的かの二値であった。今後、これらを連続的に変化させた刺激を導入することで、情動コミュニケーション音声がどのような情報処理を経ているかより詳細に検討することが可能であると考えられる。また、ラットに限らず、類似したパラダイムを多様な動物種の音声へ用いることで、情動コミュニケーション音声の知覚に一般的なメカニズムや神経基盤が解明できるものと思われる。

6.3 音声カテゴリー的知覚の至近および究極要因的説明

USVのような情動コミュニケーション音声をカテゴリー的に知覚することに対する、至近要因(proximate cause)および究極要因(ultimate function)について考察する。至近要因とは、生体を持つ身体機能や認知機能などの対象がどのように実現されるかのメカニズム、そして個体内で発達していく過程に対する説明である。究極要因とはある対象がどのような適応的意義を持ち、どのような進化を経てきたかに対する説明である。

まず至近要因について述べる。刺激に対する知覚が連続的でなくカテゴリー的なのは、そもそも神経系による情報処理の基本的なしくみが、連続的な外界を離散的(eg. ニューロンが発火するか、しないか)に計算していることに起因すると考えられる(Harnad, 1987)。ある物理刺激を神経系で表象して知覚を行う場合、有限の情報処理素子を用いて刺激を近似表現しなければならないのだから、遍く感覚知覚はその解像度に限界を持ち、複数の刺激を同一のものとして扱うカテゴリー的なものとならざるを得ない。

このような中で、さらに特定の刺激同士がひとつの枠組みをもち、その枠組み内に位置

する刺激には同一かつ特殊化した情報処理がなされており、これがいわゆる「カテゴリー的知覚」を生じさせる原因と推測する。これは感覚受容器が、ある範囲の物理量に同じ符号化をすることで実現されうる。たとえば快 USV の周波数帯域は 35 kHz から 70 kHz 程度とされているが、ラットの可聴域のうち 35 kHz 程度以上の周波数が蝸牛基底膜や聴覚皮質等の同じ場所で符号化されているなら、音声内でばらつきがあっても同一の音高として知覚されるであろう (eg. ラット聴覚皮質の周波数地図、Noda & Takahashi, 2015)。つまり、刺激入力からボトムアップ的に同一の神経処理を経ることでカテゴリー的知覚は実現される。

感覚処理が異なり、感覚知覚において弁別がなされていても、トップダウン的に刺激が同カテゴリに入れ込まれる可能性も考えられる。たとえば本実験で観測された扁桃体ニューロンは、不快 USV (あるいは快 USV) に対して興奮性応答 (抑制性応答) を示していた。この際に使用した刺激は 10 種類の異なった音声ファイルであり、コールの物理量が毎回異なっていたにも関わらず、応答特性は常に類似していた (図 20、試行間でのばらつきは音声ファイルの差異によるものではなく、そもそも神経発火がもつゆらぎによる)。つまり、音声に対する感覚処理と同時か、あるいはそれに遅延してなんらかの情報処理が加えられ、異なった音声のひとつのカテゴリとして知覚できると考えられる。このトップダウン的情報処理はおそらく動物種や刺激対象に固有であるので、汎用的なメカニズムを一概に論じることはできないだろう。ただし、USV をはじめとする情動音声に関しては、情動すなわち一過性の主観的体験がこれらをカテゴリ化させていると考えられる。USV の感覚入力が中枢へ送られた際、腹側被蓋野によるドーパミン分泌、青斑核によるノルアドレナリン分泌、縫線核によるセロトニン分泌、あるいは視床下部室傍核および視索上核によるオキシトシン分泌など、神経内分泌系による修飾を受けることで、特定の情動体験が USV カテゴリに応じて生み出される可能性がある (eg. Lövheim, 2012; Lischke et al., 2012)。扁桃体ニューロンのカテゴリ選択性が麻酔下ではみられなかったことから、この仮説は支持される。

カテゴリ獲得には生得的な要因が働きかけている (Beale & Keil, 1995; Locke & Kellar, 1973)。不快 USV が恐怖イベントと連合しやすいことから (Endres, Widmann & Fendt, 2007; Bang et al., 2008)、刺激のもつ生得的情動カテゴリの存在を裏づけている。しかしながら、USV 情動カテゴリは後天的な学習により獲得される可能性もまた生得説と同様に考えられる。生得的な快 USV と不快 USV の発声は、発声者がそのような情動文脈に置かれた際にみられるので、知覚する聴取側 (あるいはみずからの感覚フィードバックをうけた発声者自身) が情動文脈と各発声の連合を学習し、情動カテゴリが形成されるのかもしれない。知覚的影響ではないものの、現に USV 発声は社会的隔離により減少する (Rosa et al., 2005) といった知見が存在し、これらは社会的な環境要因を受ける音声であることが示唆されている。そのため USV カテゴリの獲得を論じる場合は、生得性に加え後天的学習性も加味する必要がある。

次に USV カテゴリ的知覚の究極要因について考察する。先述したように連続的知覚を有限の神経細胞で賄うのは不可能であるので、言い換えれば刺激のカテゴリ化は認知資源を節約し、効率的に情報処理を行う上で重要であるかもしれない。また、物理的に類似した刺激 (eg. 天敵の発声) は生起環境も同様のものであると考えられるので (eg. 天敵が近くに存在する)、これらを個別に処理するのではなく同様のものとして知覚し、常に同じ反応や行動を示すことで環境に適応することができる (eg. 逃げる)。

さらに USV は情動コミュニケーション音声であり、このような音声をカテゴリ的に知覚することは、包括的適応度の観点から意義があると考えられる。血縁度の高い集団においては、天敵の存在を集団内の他個体に知らせる警戒声 (alarm call) がみられる場合がある (Dunford, 1977)。警戒声の発声者は天敵から定位される確率が上がる。そのため個体の適応度のみを考えるとこれは自身の生存率を下げるので、一見「進化的に安定しない」音声である。しかし、情報を共有する相手と血縁関係にある場合、この音声は血縁個体の生存率を大幅に高めるので、結果的に遺伝子複製率を考慮した包括適応度は上がっている。このように血縁集団内で外界のもつ情動価を共有することで、適応度を上昇させることができる。実際、不快 USV も警戒声としての機能をもちうると指摘されている (Blanchard et al., 1991)。加えて、ラットは狭いケージに閉じ込められる・おぼれるなどストレスに晒された場合に不快 USV を発声するが、このような場面では他個体が援助的な向社会行動を示すと知られている (Bartal, Decety & Mason, 2011)。不快 USV は警戒声としての機能だけでなく、相手からの援助を引き出すといった機能も持っているかもしれない。

警戒声は害のある対象の情報を共有する不快音声であるが、快音声に対しても同様のことが考えられる。同性間であっても社会的集団を形成し、生育環境に資源が豊富にあり集団内で資源の奪い合いが発生しづらい環境では、食物のありかなどの快情報を共有することで、やはり包括的適応度が上昇すると推測される。そして、ラットの社会はこのような状況を満たすことが多い (Meaney & Stewart, 1979)。また、快 USV の発声により社会的関係が維持されるが、これは他者と友好的な関係を維持するモチベーションを快 USV によって伝達している所以かもしれない。

このような理由から、発声者の快・不快が聴取者に共有され、集団内で広まることには適応的意義がある。そのため、発声者と聴取者が USV の快情動カテゴリと不快情動カテゴリを共有するようになったと考えられるのである。

引用文献

- Allen, T. A., Furtak, S. C., & Brown, T. H. (2007). Single-unit responses to 22 kHz ultrasonic vocalizations in rat perirhinal cortex. *Behavioural brain research, 182*(2), 327-336.
- Aston-Jones, G., Rajkowski, J., & Cohen, J. (1999). Role of locus coeruleus in attention and behavioral flexibility. *Biological psychiatry, 46*(9), 1309-1320.
- Bagaev, V., & Aleksandrov, V. (2006). Visceral-related area in the rat insular cortex. *Autonomic Neuroscience, 125*(1-2), 16-21.
- Bang, S. J., Allen, T. A., Jones, L. K., Boguszewski, P., & Brown, T. H. (2008). Asymmetrical stimulus generalization following differential fear conditioning. *Neurobiology of learning and memory, 90*(1), 200-216.
- Bartal, I. B. A., Decety, J., & Mason, P. (2011). Empathy and pro-social behavior in rats. *Science, 334*(6061), 1427-1430.
- Bass, A. H., Gilland, E. H., & Baker, R. (2008). Evolutionary origins for social vocalization in a vertebrate hindbrain–spinal compartment. *Science, 321*(5887), 417-421.
- Bates, D., Sarkar, D., Bates, M. D., & Matrix, L. (2007). The lme4 package. *R package version, 2*(1), 74.
- Beale, J. M., & Keil, F. C. (1995). Categorical effects in the perception of faces. *Cognition, 57*(3), 217-239.
- Beckett, S. R. G., Aspley, S., Graham, M., & Marsden, C. A. (1996). Pharmacological manipulation of ultrasound induced defence behaviour in the rat. *Psychopharmacology, 127*(4), 384-390.
- Belin, P., Fecteau, S., Charest, I., Nicastro, N., Hauser, M. D., & Armony, J. L. (2007). Human cerebral response to animal affective vocalizations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 275*(1634), 473-481.
- Blanchard, R. J., & Blanchard, D. C. (1977). Aggressive behavior in the rat. *Behavioral biology, 21*(2), 197-224.

- Blanchard, R. J., Blanchard, D. C., Agullana, R., & Weiss, S. M. (1991). Twenty-two kHz alarm cries to presentation of a predator, by laboratory rats living in visible burrow systems. *Physiology & behavior*, *50*(5), 967-972.
- Blanchard, R. J., Yudko, E. B., Blanchard, D. C., & Taukulis, H. K. (1993). High-frequency (35–70 kHz) ultrasonic vocalizations in rats confronted with anesthetized conspecifics: effects of gepirone, ethanol, and diazepam. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *44*(2), 313-319.
- Blundell, R., & Meghir, C. (1987). Bivariate alternatives to the Tobit model. *Journal of Econometrics*, *34*(1-2), 179-200.
- Bolles, R. C., & Seelbach, S. E. (1964). Punishing and reinforcing effects of noise onset and termination for different responses. *Journal of comparative and physiological psychology*, *58*(1), 127.
- Brudzynski, S. M. (2013). Ethotransmission: communication of emotional states through ultrasonic vocalization in rats. *Current opinion in neurobiology*, *23*(3), 310-317.
- Brudzynski, S. M., & Chiu, E. M. (1995). Behavioural responses of laboratory rats to playback of 22 kHz ultrasonic calls. *Physiology & behavior*, *57*(6), 1039-1044.
- Brudzynski, S. M., & Ociepa, D. (1992). Ultrasonic vocalization of laboratory rats in response to handling and touch. *Physiology & behavior*, *52*(4), 655-660.
- Brudzynski, S. M., & Pniak, A. (2002). Social contacts and production of 50-kHz short ultrasonic calls in adult rats. *Journal of Comparative Psychology*, *116*(1), 73.
- Burgdorf, J., Kroes, R. A., Moskal, J. R., Pfau, J. G., Brudzynski, S. M., & Panksepp, J. (2008). Ultrasonic vocalizations of rats (*Rattus norvegicus*) during mating, play, and aggression: Behavioral concomitants, relationship to reward, and self-administration of playback. *Journal of comparative psychology*, *122*(4), 357.
- Burgdorf, J., & Panksepp, J. (2001). Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiology & behavior*, *72*(1-2), 167-173.

- Burgdorf, J., Wood, P. L., Kroes, R. A., Moskal, J. R., & Panksepp, J. (2007). Neurobiology of 50-kHz ultrasonic vocalizations in rats: electrode mapping, lesion, and pharmacology studies. *Behavioural brain research*, *182*(2), 274-283.
- Burman, O. H., Ilyat, A., Jones, G., & Mendl, M. (2007). Ultrasonic vocalizations as indicators of welfare for laboratory rats (*Rattus norvegicus*). *Applied Animal Behaviour Science*, *104*(1-2), 116-129.
- Burwell, A. K., & Baldwin, A. L. (2006). Do audible and ultrasonic sounds of intensities common in animal facilities affect the autonomic nervous system of rodents?. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, *9*(3), 179-200.
- Bush, G., Luu, P., & Posner, M. I. (2000). Cognitive and emotional influences in anterior cingulate cortex. *Trends in cognitive sciences*, *4*(6), 215-222.
- Carr, L., Iacoboni, M., Dubeau, M. C., Mazziotta, J. C., & Lenzi, G. L. (2003). Neural mechanisms of empathy in humans: a relay from neural systems for imitation to limbic areas. *Proceedings of the national Academy of Sciences*, *100*(9), 5497-5502.
- Carrillo, M., Han, Y., Migliorati, F., Liu, M., Gazzola, V., & Keysers, C. (2019). Emotional mirror neurons in the rat's anterior cingulate cortex. *Current Biology*, *29*(8), 1301-1312.
- Carpenter, B., Gelman, A., Hoffman, M. D., Lee, D., Goodrich, B., Betancourt, M., ... & Riddell, A. (2017). Stan: A probabilistic programming language. *Journal of statistical software*, *76*(1).
- Caruana, F., Jezzini, A., Sbriscia-Fioretti, B., Rizzolatti, G., & Gallese, V. (2011). Emotional and social behaviors elicited by electrical stimulation of the insula in the macaque monkey. *Current Biology*, *21*(3), 195-199.
- Church, R. M., LoLordo, V., Overmier, J. B., Solomon, R. L., & Turner, L. H. (1966). Cardiac responses to shock in curarized dogs: Effects of shock intensity and duration, warning signal, and prior experience with shock. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *62*(1), 1.
- Commissaris, R. L., Palmer, A., Neophytou, S., Graham, M., Beckett, S., & Marsden, C. A. (2000). Acoustically elicited behaviours in Lister hooded and Wistar rats. *Physiology & behavior*, *68*(4), 521-531.

- Coulon, M., Nowak, R., Peyrat, J., Chandèze, H., Boissy, A., & Boivin, X. (2015). Do lambs perceive regular human stroking as pleasant? Behavior and heart rate variability analyses. *PLoS One*, *10*(2), e0118617.
- Damasio, A. R. (1999). *The feeling of what happens: Body and emotion in the making of consciousness*. Houghton Mifflin Harcourt.
- Davis, P. J., Zhang, S. P., Winkworth, A., & Bandler, R. (1996). Neural control of vocalization: Respiratory and emotional influences. *Journal of Voice*, *10*(1), 23-38.
- De Vry, J., Benz, U., Schreiber, R., & Traber, J. (1993). Shock-induced ultrasonic vocalization in young adult rats: a model for testing putative anti-anxiety drugs. *European journal of pharmacology*, *249*(3), 331-339.
- Dezecache, G., Mercier, H., & Scott-Phillips, T. C. (2013). An evolutionary approach to emotional communication. *Journal of Pragmatics*, *59*, 221-233.
- Dunford, C. (1977). Kin selection for ground squirrel alarm calls. *The American Naturalist*, *111*(980), 782-785.
- Dupre, A., Vincent, S., & Iaizzo, P. A. (2005). Basic ECG theory, recordings, and interpretation. In *Handbook of cardiac anatomy, physiology, and devices* (pp. 191-201). Humana Press.
- Ekman, P., Levenson, R. W., & Friesen, W. V. (1983). Autonomic nervous system activity distinguishes among emotions. *Science*, *221*(4616), 1208-1210.
- Endres, T., Widmann, K., & Fendt, M. (2007). Are rats predisposed to learn 22 kHz calls as danger-predicting signals?. *Behavioural brain research*, *185*(2), 69-75.
- Fischer, J. (1998). Barbary macaques categorize shrill barks into two call types. *Animal Behaviour*, *55*(4), 799-807.
- Geyer, L. A., & Barfield, R. J. (1978). Influence of gonadal hormones and sexual behavior on ultrasonic vocalization in rats: I. Treatment of females. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *92*(3), 438.

Gourevitch, G., & Hack, M. H. (1966). Audibility in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 62(2), 289.

Guzowski, J.F., McNaughton, B.L., Barnes, C.A., & Worley, P.F. (1999). Environment-specific expression of the immediate-early gene Arc in hippocampal neuronal ensembles. *Nature neuroscience*, 2(12), 1120-4.

Hagen, K., Langbein, J., Schmied, C., Lexer, D., & Waiblinger, S. (2005). Heart rate variability in dairy cows—influences of breed and milking system. *Physiology & behavior*, 85(2), 195-204.

Hanson, H. M. (1959). Effects of discrimination training on stimulus generalization. *Journal of experimental psychology*, 58(5), 321.

Harnad, S. (1987). Psychophysical and cognitive aspects of categorical perception: A critical overview. In *Categorical perception: The groundwork of cognition* (pp. 1-52). Cambridge University Press.

Hatfield, E., Rapson, R. L., & Le, Y. C. L. (2011). Emotional contagion and empathy. *The social neuroscience of empathy*, 19.

Heeger, D. (2000). Poisson model of spike generation. *Handout, University of Stanford*, 5, 1-13.

Heffner, R. S., Koay, G., & Heffner, H. E. (2001). Audiograms of five species of rodents: implications for the evolution of hearing and the perception of pitch. *Hearing research*, 157(1-2), 138-152.

Helmholtz, H. (2013). On the sensations of tone. Courier Corporation.

Hothorn, T., Bretz, F., & Hothorn, M. T. (2009). The multcomp package. *The R Project for Statistical Computing*.

Hothorn, T., & Hornik, K. (2006). exactRankTests: exact distributions for rank and permutation tests.

Jose, A. D. (1966). Effect of combined sympathetic and parasympathetic blockade on heart rate and

cardiac function in man. *American journal of Cardiology*, 18(3), 476-478.

Kaltwasser, M. T. (1990). Startle-inducing acoustic stimuli evoke ultrasonic vocalization in the rat. *Physiology & behavior*, 48(1), 13-17.

Katayama, M., Kubo, T., Mogi, K., Ikeda, K., Nagasawa, M., & Kikusui, T. (2016). Heart rate variability predicts the emotional state in dogs. *Behavioural processes*, 128, 108-112.

Keay, K. A., & Bandler, R. (2001). Parallel circuits mediating distinct emotional coping reactions to different types of stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 25(7-8), 669-678.

Knapp, D. J., & Pohorecky, L. A. (1995). An air-puff stimulus method for elicitation of ultrasonic vocalizations in rats. *Journal of neuroscience methods*, 62(1-2), 1-5.

Kolacz, J., Lewis, G. F., & Porges, S. W. (2018). The integration of vocal communication and biobehavioral state regulation in mammals: A polyvagal hypothesis. In *Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 25, pp. 23-34). Elsevier.

Kruschke, J. (2014). *Doing Bayesian data analysis: A tutorial with R, JAGS, and Stan*. Academic Press.

Langford, D. J., Crager, S. E., Shehzad, Z., Smith, S. B., Sotocinal, S. G., Levenstadt, J. S., ... & Mogil, J. S. (2006). Social modulation of pain as evidence for empathy in mice. *Science*, 312(5782), 1967-1970.

Lischke, A., Berger, C., Prehn, K., Heinrichs, M., Herpertz, S. C., & Domes, G. (2012). Intranasal oxytocin enhances emotion recognition from dynamic facial expressions and leaves eye-gaze unaffected. *Psychoneuroendocrinology*, 37(4), 475-481.

Locke, S., & Kellar, L. (1973). Categorical perception in a non-linguistic mode. *Cortex*, 9(4), 355-369.

Lövheim, H. (2012). A new three-dimensional model for emotions and monoamine neurotransmitters. *Medical hypotheses*, 78(2), 341-348.

Machens, C. K., Wehr, M. S., & Zador, A. M. (2004). Linearity of cortical receptive fields measured

with natural sounds. *Journal of Neuroscience*, 24(5), 1089-1100.

Manteuffel, G., Puppe, B., & Schön, P. C. (2004). Vocalization of farm animals as a measure of welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 88(1-2), 163-182.

McIntosh, T. K., Barfield, R. J., & Geyer, L. A. (1978). Ultrasonic vocalisations facilitate sexual behaviour of female rats. *Nature*, 272(5649), 163-164.

Meaney, M. J., & Stewart, J. (1979). Environmental factors influencing the affiliative behavior of male and female rats (*Rattus norvegicus*). *Animal Learning & Behavior*, 7(3), 397-405.

Mendl, M., Burman, O. H., Parker, R. M., & Paul, E. S. (2009). Cognitive bias as an indicator of animal emotion and welfare: Emerging evidence and underlying mechanisms. *Applied Animal Behaviour Science*, 118(3-4), 161-181.

Mohr, E., Langbein, J., & Nürnberg, G. (2002). Heart rate variability: a noninvasive approach to measure stress in calves and cows. *Physiology & Behavior*, 75(1-2), 251-259.

Morgan, J.I., Cohen, D.R., Hempstead, J.L., & Curran, T. (1987). Mapping patterns of c-fos expression in the central nervous system after seizure. *Science (New York, N.Y.)*, 237(4811), 192-7.

Morris, J. S., Scott, S. K., & Dolan, R. J. (1999). Saying it with feeling: neural responses to emotional vocalizations. *Neuropsychologia*, 37(10), 1155-1163.

Murray, E. A. (2007). The amygdala, reward and emotion. *Trends in cognitive sciences*, 11(11), 489-497.

Neophytou, S. I., Graham, M., Williams, J., Aspley, S., Marsden, C. A., & Beckett, S. R. G. (2000). Strain differences to the effects of aversive frequency ultrasound on behaviour and brain topography of c-fos expression in the rat. *Brain research*, 854(1-2), 158-164.

Niskanen, J. P., Tarvainen, M. P., Ranta-Aho, P. O., & Karjalainen, P. A. (2004). Software for advanced HRV analysis. *Computer methods and programs in biomedicine*, 76(1), 73-81.

Noda, T., & Takahashi, H. (2015). Anesthetic effects of isoflurane on the tonotopic map and neuronal population activity in the rat auditory cortex. *European Journal of Neuroscience*, 42(6), 2298-2311.

- Noirot, E. (1972). Ultrasounds and maternal behavior in small rodents. *Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology*, 5(4), 371-387.
- Okuno, H. (2011). Regulation and function of immediate-early genes in the brain: beyond neuronal activity markers. *Neuroscience research*, 69(3), 175-86.
- Ouda, L., Jílek, M., & Syka, J. (2016). Expression of c-Fos in rat auditory and limbic systems following 22-kHz calls. *Behavioural brain research*, 308, 196-204.
- Panksepp, J., & Burgdorf, J. (2003). “Laughing” rats and the evolutionary antecedents of human joy?. *Physiology & behavior*, 79(3), 533-547.
- Panksepp, J., Gordon, N., & Burgdorf, J. (2002). Empathy and the action-perception resonances of basic socio-emotional systems of the brain. *Behavioral and Brain Sciences*, 25(1), 43-44.
- Papciak, J., Popik, P., Fuchs, E., & Rygula, R. (2013). Chronic psychosocial stress makes rats more ‘pessimistic’ in the ambiguous-cue interpretation paradigm. *Behavioural brain research*, 256, 305-310.
- Park, S. E., Park, D., Song, K. I., Seong, J. K., Chung, S., & Youn, I. (2017). Differential heart rate variability and physiological responses associated with accumulated short-and long-term stress in rodents. *Physiology & behavior*, 171, 21-31.
- Parsana, A. J., Li, N., & Brown, T. H. (2012). Positive and negative ultrasonic social signals elicit opposing firing patterns in rat amygdala. *Behavioural brain research*, 226(1), 77-86.
- Paxinos, G., & Watson, C. (2006). *The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition*. Elsevier.
- Portfors, C. V. (2007). Types and functions of ultrasonic vocalizations in laboratory rats and mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(1), 28-34.
- Pouget, A., Dayan, P., & Zemel, R. (2000). Information processing with population codes. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(2), 125.

- Radespiel-Tröger, M., Rauh, R., Mahlke, C., Gottschalk, T., & Mück-Weymann, M. (2003). Agreement of two different methods for measurement of heart rate variability. *Clinical Autonomic Research*, *13*(2), 99-102.
- Reefmann, N., Bütikofer, F. K., Wechsler, B., & Gygax, L. (2009). Physiological expression of emotional reactions in sheep. *Physiology & behavior*, *98*(1-2), 235-241.
- Reefmann, N., Wechsler, B., & Gygax, L. (2009). Behavioural and physiological assessment of positive and negative emotion in sheep. *Animal Behaviour*, *78*(3), 651-659.
- Riede, T. (2011). Subglottal pressure, tracheal airflow, and intrinsic laryngeal muscle activity during rat ultrasound vocalization. *Journal of neurophysiology*, *106*(5), 2580-2592.
- Rietmann, T. R., Stuart, A. E. A., Bernasconi, P., Stauffacher, M., Auer, J. A., & Weishaupt, M. A. (2004). Assessment of mental stress in warmblood horses: heart rate variability in comparison to heart rate and selected behavioural parameters. *Applied Animal Behaviour Science*, *88*(1-2), 121-136.
- Rosa, M. L. N. M., Nobre, M. J., Oliveira, A. R., & Brandão, M. L. (2005). Isolation-induced changes in ultrasonic vocalization, fear-potentiated startle and prepulse inhibition in rats. *Neuropsychobiology*, *51*(4), 248.
- Rowan, W. H., Campen, M. J., Wichers, L. B., & Watkinson, W. P. (2007). Heart rate variability in rodents: uses and caveats in toxicological studies. *Cardiovascular toxicology*, *7*(1), 28-51.
- Russell, J. A. (1980). A circumplex model of affect. *Journal of personality and social psychology*, *39*(6), 1161.
- Rygula, R., Pluta, H., & Popik, P. (2012). Laughing rats are optimistic. *PLoS One*, *7*(12), e51959.
- Sadananda, M., Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2008). Playback of 22-kHz and 50-kHz ultrasonic vocalizations induces differential c-fos expression in rat brain. *Neuroscience letters*, *435*(1), 17-23.
- Saito, Y., & Okanoya, K. (2017). Response characteristics of the rat anterior cingulate cortex to ultrasonic communicative vocalizations. *NeuroReport*, *28*(9), 479-484.

- Saito, Y., Yuki, S., Seki, Y., Kagawa, H., & Okanoya, K. (2016). Cognitive bias in rats evoked by ultrasonic vocalizations suggests emotional contagion. *Behavioural processes*, *132*, 5-11.
- Sakaguchi, T., Iwasaki, S., Okada, M., Okamoto, K., & Ikegaya, Y. (2018). Ethanol facilitates socially evoked memory recall in mice by recruiting pain-sensitive anterior cingulate cortical neurons. *Nature communications*, *9*(1), 3526.
- Sales, G. D. (1972). Ultrasound and aggressive behaviour in rats and other small mammals. *Animal behaviour*, *20*(1), 88-100.
- Sales, G., & Pye, D. (1974). Ultrasound in rodents. Ultrasonic communication by animals. *G. Sales and D. Pye, Chapman and Hall, London*.
- Sander, K., & Scheich, H. (2001). Auditory perception of laughing and crying activates human amygdala regardless of attentional state. *Cognitive Brain Research*, *12*(2), 181-198.
- Selesnick, I. W., & Burrus, C. S. (1998). Generalized digital Butterworth filter design. *IEEE Transactions on signal processing*, *46*(6), 1688-1694.
- Shaw, E. A., & Teranishi, R. (1968). Sound pressure generated in an external-ear replica and real human ears by a nearby point source. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *44*(1), 240-249.
- Sheng, M., & Greenberg, M.E. (1990). The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, *4*(4), 477-85.
- Shidara, M., Kawano, K., Gomi, H., & Kawato, M. (1993). Inverse-dynamics model eye movement control by Purkinje cells in the cerebellum. *Nature*, *365*(6441), 50.
- Singer, T., Critchley, H. D., & Preuschoff, K. (2009). A common role of insula in feelings, empathy and uncertainty. *Trends in cognitive sciences*, *13*(8), 334-340.
- Smith, P. K. (1982). Does play matter? Functional and evolutionary aspects of animal and human play. *Behavioral and brain sciences*, *5*(1), 139-155.

Smith, O. A., & DeVito, J. L. (1984). Central neural integration for the control of autonomic responses associated with emotion. *Annual review of neuroscience*, 7(1), 43-65.

Stan Development Team. (2018). RStan: the R Interface to Stan. R package version 2.17. 3.

Stein, M. B., Simmons, A. N., Feinstein, J. S., & Paulus, M. P. (2007). Increased amygdala and insula activation during emotion processing in anxiety-prone subjects. *American Journal of Psychiatry*, 164(2), 318-327.

Sztajzel, J. (2004). Heart rate variability: a noninvasive electrocardiographic method to measure the autonomic nervous system. *Swiss medical weekly*, 134(35-36), 514-522.

Tachibana, R. O., Kanno, K., Okabe, S., Kobayasi, K. I., & Okanoya, K. (2019). USVSEG: A robust segmentation of rodents' ultrasonic vocalization. *BioRxiv*, 572743.

Takahashi, L. K., Thomas, D. A., & Barfield, R. J. (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by residents during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, 97(3), 207.

Thomas, D. A., Howard, S. B., & Barfield, R. J. (1982). Male-produced ultrasonic vocalizations and mating patterns in female rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 96(5), 807.

Thomas, D. A., Takahashi, L. K., & Barfield, R. J. (1983). Analysis of ultrasonic vocalizations emitted by intruders during aggressive encounters among rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of comparative psychology*, 97(3), 201.

Thurstone, L. L. (1927). Psychophysical analysis. *The American journal of psychology*, 38(3), 368-389.

Vehtari, A., Gelman, A., & Gabry, J. (2016). loo: Efficient leave-one-out cross-validation and WAIC for Bayesian models. *R package version*, 1(0).

Wenzel, E. M., Arruda, M., Kistler, D. J., & Wightman, F. L. (1993). Localization using nonindividualized head-related transfer functions. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 94(1), 111-123.

- White, N. R., & Barfield, R. J. (1990). Effects of male pre-ejaculatory vocalizations on female receptive behavior in the rat (*Rattus norvegicus*). *Journal of Comparative Psychology*, *104*(2), 140.
- Wightman, F. L., & Kistler, D. J. (1992). The dominant role of low-frequency interaural time differences in sound localization. *The Journal of the Acoustical Society of America*, *91*(3), 1648-1661.
- Willey, A. R., Varlinskaya, E. I., & Spear, L. P. (2009). Social interactions and 50 kHz ultrasonic vocalizations in adolescent and adult rats. *Behavioural brain research*, *202*(1), 122-129.
- Wintink, A. J., & Brudzynski, S. M. (2001). The related roles of dopamine and glutamate in the initiation of 50-kHz ultrasonic calls in adult rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *70*(2-3), 317-323. 3.
- Wöhr, M., & Schwarting, R. K. (2007). Ultrasonic communication in rats: can playback of 50-kHz calls induce approach behavior?. *PloS one*, *2*(12), e1365.
- Wright, J. M., Gourdon, J. C., & Clarke, P. B. (2010). Identification of multiple call categories within the rich repertoire of adult rat 50-kHz ultrasonic vocalizations: effects of amphetamine and social context. *Psychopharmacology*, *211*(1), 1-13.
- Yamanaka, O., & Takeuchi, R. (2018). UMATracker: an intuitive image-based tracking platform. *Journal of Experimental Biology*, *221*(16), jeb182469.
- Yee, T. W. (2010). The VGAM package for categorical data analysis. *Journal of Statistical Software*, *32*(10), 1-34.

謝辞

本研究は 文部科学省／日本学術振興会による科研費助成（新学術領域「共創言語進化」、JP17H06380）および特別研究員フェローシップ（DC2、JP18J13784）の助成を受けて実施されました。

長年に渡る研究生生活、および本博士論文研究の実施・執筆において総合的にご指導いただいた東京大学 岡ノ谷一夫先生に、心よりお礼申し上げます。大変お世話になりました。

また、音響学的手法でご助力いただきました岡ノ谷研究室の橘亮輔氏、分子生物学的手法をご教授いただきました森千紘氏、電気生理実験でご助力いただきました柳原真氏、そのほか活発な議論をいただきました岡ノ谷研究室メンバーの皆様方、

本研究遂行に際し研究室見学に快く応じていただいた同志社大学 櫻井芳雄先生、ならびに研究員の結城笙子氏、

本論文執筆にあたり助言をいただきました東京大学 本吉勇先生、柳原大先生、四本裕子先生、理化学研究所 風間北斗先生に心より感謝いたします。誠にありがとうございました。