

동물의 기억 검사

한정수

인제대학교 뇌과학기술연구소
뇌과학협동과정프로그램

Address for correspondence

Jung-Soo Han, Ph.D.
Institute for Brain Science & Technology & Brain
Science Program, Graduate School Inje University,
607 Obang-dong, Gimhae 621-749, Korea
Tel: +82-42-865-6638
Fax: +82-42-865-6690
E-mail: jshan@inje.ac.kr

Memory Tests in Animals

Jung-Soo Han, Ph.D

Institute for Brain Science & Technology & Brain Science Program, Graduate School Inje University,
Gimhae, Korea

Good animal models for memory impairments by aging or the diseases are necessary for the understanding of the fundamental cognitive mechanisms, and studying the causes of neurological diseases related memory disorders and the development of new drugs. It is widely accepted that the hippocampus and the related brain areas mediate declarative memory in humans. The rats with hippocampal damages fail to learn so called 'the hippocampal-dependant task', such as water maze task, radial arm maze and context fear conditioning. It was also pointed out that animal's strains and characteristics of memory task should be considered before the start of experiments for accessing memory nature or effects of a drug on the memory with rats or mice.

Key Words: Memory, Hippocampus, Animal, Water maze

서 론

과학과 의학의 발전은 현대 사회를 고령화 사회로 만들었다. 노화에 따른 여러 질환 중에 중추신경계와 관련된 질환은 현대 과학과 의학이 풀어야 할 마지막 과제일 것이다. 하지만 뇌의 획득의 어려움과 정확한 동물 모델의 부재는 뇌 질환의 정확한 과학적 규명과 신약 개발에 장애이다. 하지만, 최근 들어 transgenic mice와 known-out mice는 이 분야의 연구를 일보 진전하게 만들었다[8-10]. 그러나 생산된 동물 행동의 정확한 규명과 분석은 아직도 풀어야 할 숙제이다. 본 논문에서는 동물을 사용하여 기억 능력을 측정하는 방법과 해석하는 방법을 소개하고자 한다. 또한 현재 연구자들이 기억의 해마 역할을 연구하기 위하여 사용하는 동물 기억 검사의 타당성과 신뢰성을 소개하고자 한다.

동물의 기억 검사의 타당성

내측 측두엽(medial temporal lobe)의 손상을 입은 H.M. 환자가 기억 장애를 보이듯이[28], 쥐나 생쥐의 해마(Hippocampus)를 손상한다면 기억 장애를 보일까? 답은 예이다[23]. 즉, 해마를 손상 받은 동물은 공간기억(spatial memory)을 측정하는 수중미로(water maze) 과제를 습득하지 못한다[23]. 그리고 인간의 경우, 노화에 의해 기억 장애를 보이는데, 노화된 쥐

나 노화된 생쥐도 기억 장애를 보일까? 또한 이도 예이다[14, 16, 17]. 구체적으로 설명하면, 노인을 피험자로 한 경우, Delayed Recall 검사는 쉽게 측정할 수 있다. 일부 노인들은 젊은 피험자 같은 정도의 기억 능력을 보유하고 있지만, 일부 노인은 기억 장애를 보인다[15]. Rapp과 Amaral[25]이 노화된 원숭이를 실험 동물로 하여 Delayed Recall를 측정한 결과, 일부 노화된 원숭이가 기억 장애를 보였고 일부는 온전한 기억능력을 보전하고 있었다. Dunnett 등[11]은 노화된 쥐를 사용하여 Delayed Recall를 측정하였고 노화된 쥐는 6개월 된 쥐와 비교해서 기억력 장애를 보였다. 그렇지만, 쥐의 재인 기억(recognition memory)를 측정하는 연구는 연구간에 차이도 있고 절차상에 연구자들 사이에 이견이 많다. 하지만 종합해 보면, 노화된 쥐도 노인이나 노화된 원숭이와 같이 기억 장애를 보인다. 연구비, 설비, 시간과 같은 연구 실행의 현실적인 문제를 고려한다면, 원숭이를 사용하여 기억 연구를 진행하기란 상당한 어렵다. 이에 반하여 쥐나 생쥐는 사육, 연구비, 기억 능력 등을 고려한다면 이상적인 실험 동물이다. 그렇지만, 쥐를 사용하여 인간에게 쉽게 측정할 수 있는 Delayed Recall를 측정하기란 쉽지 않다. 이 기억 검사는 연구간에 차이가 있고 이 검사의 신뢰도는 상당히 낮다. 그러나 쥐의 공간기억 능력은 상당히 뛰어나다. 해마를 손상 받은 쥐는 쥐의 공간기억 능력을 측정하는 수중미로 기억 과제를 습득하지 못한다[23]. 그렇다면, 내측 측두엽의 손상이 있는 인간도 공간기억의 장애를 보일까? 직접적인 대답을 주는 연구는 없다. 단

지 간접적인 증거로 답은 “예”이다. 한 연구는 복잡한 도로로 유명한 런던에 택시기사의 내측 측두엽의 활성 정도를 측정하였다. 일반인에 비해 런던 택시기사의 내측 측두엽이 발달되어 있었다[21]. 또한 다른 연구는 노화 원숭이의 공간기억 능력이 현저하게 저하되어 있음을 보고하였고[26], 박물관을 이용하여 노인의 공간 기억 능력을 측정한 연구는 노인의 공간기억 능력이 젊은 피험자에 비해 현저하게 저하됨을 보고하였다[31]. 종합해보면, 수중 미로를 사용한 쥐의 연구를 인간 기억 연구에게 일반화할 수 있고 수중 미로를 사용한 쥐의 연구 모델이 기억 연구를 위한 좋은 표본(preparation)이라고 결론을 내릴 수 있다.

기억에 있어 해마의 역할

H.M. 환자와 기억 상실을 보이는 환자는 심각한 기억장애를 보이지만, 선택적 기억장애를 보인다[4]. 즉, 생활하면서 필요한 사실을 회상하지 못하고 처한 상황을 해결하기 위한 필요한 기억을 사용하지 못한다. 이런 기억을 declarative memory 또는 explicit memory라 한다. 이와는 반대로, 운동 기술(motor skills), 습관(habit) 등의 습득 기능은 어떤 장애도 보이지 않는다. 이런 종류의 기억의 습득은 내측 측두엽이 아닌 다른 뇌 구조(소뇌, 선조체)를 사용하고 무의식적으로 일어난다. 이런 기억을 non-declarative memory 또는 implicit memory라 한다[4, 7, 27]. 결론적으로 declarative memory를 매개하기 위하여, 해마를 포함한 신경 연결 망(network)을 사용한다고 할 수 있다. 물론 기억 상실증 환자(amnesia)에 있어서 온전한 기억과 손상된 기억을 구별하는 용어(terminology)는 연구자간에 차이는 있다. 하지만, ‘기억 상실증 환자를 대상으로 기억에 대해 발견한 사실이 기억의 일반적 현상이다’ 임에는 전체적 합의는 이루어졌다. 또한 이 같은 사실은 동물 연구를 통해서도 입증되었다[13].

Declarative Memory를 Episodic Memory와 Semantic Memory로 구분할 수 있다[12]. Episodic Memory는 구체적인 개인의 경험을 기억하는 것이다. 이 기억은 경험 자체와 경험이 있었던 공간적 그리고 시간적 배경을 포함한다. Semantic Memory는 세상 지식(언어의 의미, 사회적 구조, 지질학 등)과 습득을 말한다. Episodic Memory를 유지하고 회상하는 능력은 인간에 있어 해마에 매우 의존적이다[29, 32]. 그렇지만, 해마는 또한 Semantic Memory에도 관여한다. 기억 상실증 환자는 새로운 단어의 의미를 습득하지 못하고 자유롭게 표현하지 못한다.

그리고 세포적/분자적 수준에서 기억을 연구하는 많은 신경 과학자들은 기억을 단기기억/장기기억으로 구분하기도 한다[1]. 단기기억은 신경적 활동이고, 장기기억은 시냅스 변화나 세포내의 변화이다[1]. 단기기억은 응고화(consolidation)에 의해서 장기기억으로 전환한다. 해마가 응고화 과정을 담당한다고 한다. 또한 Olton은 방사성 미로 실험 연구를 기초로 하여 기억을 Reference Memory/Working Memory으로 구분하였다[20]. Work-

ing Memory는 우리가 전화를 걸 때, 전화번호를 기억하기 위하여 반복적으로 외우는 것을 의미한다. 해마는 Working Memory를 담당한다. 이와 같이 해마가 어떤 기억을 담당하는가, 그리고 그 기억의 본질은 무엇인가에 대해서는 연구자간에 상당한 이견이 있다. 그래서 최근에는 해마와 관련이 있는 기억과제나 기억을 해마 의존적 과제 또는 기억(Hippocampus Dependant Task or Memory)으로 표현하기도 한다.

동물의 기억 검사 종류

본 본문에서는 Declarative/Explicit Memory를 측정하는 과제만을 아래에 자세히 기술하고자 한다. Non-declarative memory/Implicit Memory를 측정하는 동물모델은 Eyeblick 고전적 조건화[30], Motorod's motor skill 등은 있고 이들의 신경실체는 소뇌 및 선조체 등이다. 이외에도 Passive Avoidance 과제와 Shuttle Box를 사용하는 Active Avoidance 과제 등이 있으나, 특정 신경실체에 의존하지 않으며, 최근에는 거의 사용을 하지 않는다.

1. 미로(maze) 기억 검사

1) 수중 미로(water maze)

쥐의 해마는 다른 동물과 비교해 보면 상대적으로 크다. 그리고 천부적으로 공간 기억 능력이 상당히 뛰어 나고 수영을 아주 잘한다. 이런 점을 고안하여 Richard Morris[22]는 수중 미로를 고안하였다. 상세하게 설명하면, 쥐는 1.5에서 2 m 크기의 원형 수영장을, 생쥐는 1.2에서 1.6 m 크기의 수영장을 사용한다. 크기는 실험자의 여건에 따라 달리 사용할 수 있다. 이 수영장을 균등하게 4등분하고 한 구역 중간에 10 cm 정도 물 수면 아래에 원형 플랫폼(12 cm 정도)을 위치하게 한다. 물에 물감을 타서 플랫폼을 보이지 않게(invisible) 한다. 쥐가 수영장 주위에 있는 공간 단서(인위적으로 배열하거나 책상, 탁자 등 자연적 단서를 이용하기도 함)를 사용하여만 이 플랫폼을 찾아 갈수 있도록 훈련시킨다[22]. 앞에서 언급하였듯이, 해마를 손상 받은 쥐는 훈련을 받아도 이 플랫폼을 찾아 가지 못한다[23]. 보통 정상 쥐는 10회 시행 내에 플랫폼을 찾아간다. 이 기억 검사는 연구간에 높은 신뢰도를 보인다. 그러나, 플랫폼을 수면위로 올려서 쥐가 수영하면서 볼 수 있게 해주면, 해마를 손상 받은 쥐는 플랫폼(visible platform)을 찾아 가는 데, 정상 쥐와 차이를 보이지 않는다. 보이는 플랫폼을 찾아 가는 학습은 해마와 관련 없는 과제(hippocampal independent task)이다.

2) 방사선 미로(radial arm maze)

전형적인 8-arm 방사성 미로를 Fig. 1에 제시하였다. 방사성 미로는 바닥으로부터 1 m 정도 위로 위치하게 하여 쥐가 방사

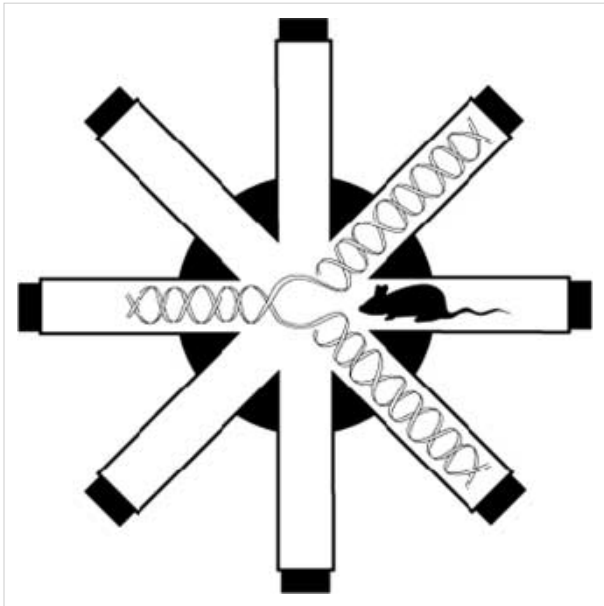


Fig. 1. 대표적인 8-arm 방사성 미로.

성 미로에서 바닥으로 내려오지 않게 한다. 미로의 벽은 투명한 재질로 하여 주위에 있는 실험실 책상, 벽 모서리, 벽에 걸려 있는 그림 등의 단서를 쥐가 볼 수 있게 한다. 조명은 약간 어둡게 하여 방사성 미로에 있는 쥐가 불안하지 않게 한다. 각각 방사성 미로 끝에는 먹이(단맛이 있는 먹이)를 둔다. 쥐는 8개의 arm에 방문하여 먹이를 얻을 수 있다. 16번 arm을 방문하거나 15분 이상 경과하면 시행을 종결한다. 보통 하루에 한번 시행을 한다. 방문한 arm을 다시 방문하면 error로 한다. 이 error는 시행을 거듭할수록 감소한다. 해마를 손상 받은 쥐는 방사성 미로 주위에 있는 공간 단서를 기억할 수 없음으로 시행을 계속하여도 방문한 arm과 방문하지 않은 arm을 구별할 수 없다[20]. 이는 수중 미로와 같이 공간 기억을 측정하지만, 공간기억 단서를 학습하는 것 이외에 방문한 arm과 방문하지 않은 arm을 기억해야 한다. 이 기억 검사는 수중 미로보다 쥐에게 더 많은 기억 부담(load)을 요한다. 이 과제의 특징은 인간 기억 검사에서 가장 많은 쓰이는 Delayed Recall을 할 수 있다는 점이다. 8개의 arm 중에 4개를 막아서 나머지 4개 arm을 방문하게 한다. 그리고 나서 일정시간 후에(5분에서 24시간) 4개 arm을 막았던 차단 막을 제거한 후, 모든 arm을 방문할 수 있게 한다. 지연 전에 먹이를 먹었던 arm을 다시 방문하면 이를 retroactive error이고 지연 전에 차단한 arm을 1번 이상 방문하면 이를 proactive error이다[5].

3) Barnes Maze 또는 T/Y Maze

Barnes[2]는 쥐가 밝은 것을 싫어하는 특징을 고안하여 만들었다. 수중 미로 정도의 크기에 백색의 원형 판이 있고 원형 가장자리를 따라 구멍들이 있다. 이중에 한 구멍으로 백색의 판을 도피할 수 있다. 주위에 공간 단서로 이 구멍을 찾아야 한다. 해

마 손상은 이 과제를 습득하지 못하게 한다. 이 과제의 문제점은 쥐가 밝은 조명에 쉽게 순응하여, 구멍을 찾는 동기가 쉽게 사라진다는 것이다. T/Y maze도 수중미로나 방사성미로와 같은 논리로 사용하고 생쥐에게 적절한 기억 과제이다. 생쥐는 8-arm maze를 습득할 수 없다.

2. 공포조건화

혐오적(aversive) 고전적 조건화를 쥐에게 시킨다. 쥐에게 빛이나 소리를 전기쇼크와 함께 제시한다. 그러면 전기쇼크에만 보이던 행동반응, 즉 동결 반응(freezing)이 소리나 빛에도 보인다. 이를 정서 조건화 또는 공포 조건화라고 하고 신경실체는 편도체이다(amygdala). 또한 배경자극(context: 훈련 박스)에 조건화시키기 위해, 뚜렷한 소리나 빛없이 전기쇼크만 제시한다. 후에 전기쇼크를 받았던 훈련 박스(context)에 다시 쥐를 두면 동결반응을 보인다. 이를 Context fear conditioning이라 한다[18]. 해마의 손상은 이 context fear conditioning 습득을 못하게 한다[19].

3. 재인 검사

쥐는 새로운 물체(novelty)를 탐색하기를 좋아한다. 사전에 접촉하여 익숙한 물체와 새로운 물체가 있으면 새로운 물체를 더 탐색한다. 즉 정상 쥐는 한 물체를 제시한 후 일정 시간(delayed interval) 뒤에 익숙한 물체와 새로운 물체를 제시하면 새로운 물체를 더 탐색하지만, 해마를 손상 받은 쥐는 과거의 물체를 기억하지 못함으로 두 물체를 탐색하는 시간은 거의 같다[6].

논 의

해마의 기억 기능을 밝히기 위해, 기억의 본질을 연구하기 위한 다양한 동물기억 검사가 개발되어 왔고 개발되고 있다. 또는 위에서 열거한 기억과제들을 변형하여 기억과 기억질환을 연구하고 있다[3]. 또한 이들 과제를 사용하여 기억 질환을 치료하는 약의 효능을 측정한다. 그리고 연구자들은 동물을 훈련시키고 검사하는 protocol을 연구와 연구환경에 변경하여 사용한다. 몇 가지 동물 기억 검사 실행에 고려해야 할 점을 논한다. 먼저 고려해야 할 점은 동물의 strain이다. Sprague-Dawley 쥐는 가장 많이 쓰이는 동물이다. 이 종의 특징은 영리하지만 질병에 약하고 노화하면서 백내장과 눈꺼풀의 문제로 시각의 장애를 보인다. 대부분의 기억 검사가 시각을 요하므로 이 점을 고려해야 한다. 국내에서 이 종의 큰 문제점은 동물간에 많은 차이를 보인다는 것이다. Long-Evans 쥐나 Wistar 쥐는 국내에서 구하기 어렵고 비싸다. 두 종 다 영리하여 기억 검사를 잘 수행한다. 단지 Long-Evans는 사나워, 오랜 기간의 handling이 필요하다. 다음은 사

육시설이다. Specific pathogen free (SPF)이면 좋다. 국내에 많은 기관이 이 시설을 가지고 있다. 쥐는 건강하고 질병에 강하므로 SPF 시설 없이도 실험을 진행할 수 있지만, 가능한 빨리 실험을 종결해야 한다. 장기적 처치나 동물모델 개발을 원하는 연구자에게 SPF를 추천하고 싶다. 그렇지만 생쥐는 종마다 기억 능력에 있어 엄청난 차이를 보이고 생쥐는 질병에도 약하다. 거의 모든 종의 Inbred는 기억과제를 습득하지 못하다. 단지 몇 개 종이 일부 기억과제를 수행할 수 있다. 반면에 F1 hybrid는 좋은 기억 능력을 보유하고 있다[24]. 그리고 생쥐와 쥐를 같이 사육하는 경우, 언제나 생쥐가 감염의 주범이므로 언제나 조심해야 한다.

신경과학 연구는 엄청난 속도로 발전하고 있다. 신경질환과 정신질환 연구를 위한 동물 모델들이 많은 문헌에 보고 되고 있다. 그렇지만 실제로 실험실에서 문헌대로 이 모델을 개발하고 실험을 할 때, 문헌에서 보이는 결과를 내기란 쉽지 않다. 실험 전과 후에 실험 결과와 실험 절차를 가지고 동물 실험 전문가의 도움을 받기를 추천한다. 특히, 생쥐를 사용하여 기억을 연구하고자 하는 연구자는 생쥐의 기억 능력을 행동적으로 연구한 연구자의 도움을 요청해야 한다.

참고문헌

1. Bailey CH, Giustetto M, Huang YY, Hawkins RD, Kandel ER. Is heterosynaptic modulation essential for stabilizing Hebbian plasticity and memory? *Nat Rev Neurosci* 2000; 1: 11-20.
2. Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat. *J Comp Physiol Psychol* 1979; 93: 74-104.
3. Baxter MG, Gallagher M. Intact spatial learning in both young and aged rats following selective removal of hippocampal cholinergic input. *Behav Neurosci* 1996; 110: 460-7.
4. Benzing WC, Squire LR. Preserved learning and memory in amnesia: intact adaptation-level effects and learning of stereoscopic depth. *Behav Neurosci* 1989; 103: 538-47.
5. Chappell J, McMahan R, Chiba A, Gallagher M. A re-examination of the role of basal forebrain cholinergic neurons in spatial working memory. *Neuropharmacology* 1998; 37: 481-7.
6. Clark RE, Zola SM, Squire LR. Impaired recognition memory in rats after damage to the hippocampus. *J Neurosci* 2000; 20: 8853-60.
7. Cohen NJ, Squire LR. Preserved learning and retention of pattern-analyzing skill in amnesia: dissociation of knowing how and knowing that. *Science* 1980; 210: 207-10.
8. Crawley JN. Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests. *Brain Res* 1999; 835: 18-26.
9. Crawley JN, Belknap JK, Collins A, Crabbe JC, Frankel W, Henderson N, et al. Behavioral phenotypes of inbred mouse strains: implications and recommendations for molecular studies. *Psychopharmacology (Berl)* 1997; 132: 107-24.
10. Crawley JN, Paylor R. A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice. *Horm Behav* 1997; 31: 197-211.
11. Dunnett SB, Evenden JL, Iversen SD. Delay-dependent short-term memory deficits in aged rats. *Psychopharmacology (Berl)* 1988; 96: 174-80.
12. Tulving E. Episodic and semantic memory. In: Tulving E DW, ed. *Organization of Memory*. New York: Academic Press, 1972.
13. Eichenbaum H. The hippocampus and declarative memory: cognitive mechanisms and neural codes. *Behav Brain Res* 2001; 127: 199-207.
14. Erickson CA, Barnes CA. The neurobiology of memory changes in normal aging. *Exp Gerontol* 2003; 38: 61-9.
15. Flicker C, Bartus RT, Crook TH, Ferris SH. Effects of aging and dementia upon recent visuospatial memory. *Neurobiol Aging* 1984; 5: 275-83.
16. Gallagher M, Bizon JL, Hoyt EC, Helm KA, Lund PK. Effects of aging on the hippocampal formation in a naturally occurring animal model of mild cognitive impairment. *Exp Gerontol* 2003; 38: 71-7.
17. Gallagher M, Burwell R, Burchinal M. Severity of spatial learning impairment in aging: development of a learning index for performance in the Morris water maze. *Behav Neurosci* 1993; 107: 618-26.
18. Holland PC, Bouton ME. Hippocampus and context in classical conditioning. *Curr Opin Neurobiol* 1999; 9: 195-202.
19. Kim JJ, Fanselow MS. Modality-specific retrograde amnesia of fear. *Science* 1992; 256: 675-7.
20. Knowlton BJ, Shapiro ML, Olton DS. Hippocampal seizures disrupt working memory performance but not reference memory acquisition. *Behav Neurosci* 1989; 103: 1144-7.
21. Maguire EA, Gadian DG, Johnsrude IS, Good CD, Ashburner J, Frackowiak RS, et al. Navigation-related structural change in the hippocampi of taxi drivers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 4398-403.
22. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60.
23. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681-3.
24. Owen EH, Logue SF, Rasmussen DL, Wehner JM. Assessment of learning by the Morris water task and fear conditioning in inbred mouse strains and F1 hybrids: implications of genetic background for single gene mutations and quantitative trait loci analyses. *Neuroscience* 1997; 80: 1087-99.
25. Rapp PR, Amaral DG. Recognition memory deficits in a subpopulation of aged monkeys resemble the effects of medial temporal lobe damage. *Neurobiol Aging* 1991; 12: 481-6.
26. Rapp PR, Kansky MT, Roberts JA. Impaired spatial information processing in aged monkeys with preserved recognition memory. *Neuroreport* 1997;

- 8: 1923-8.
27. Schacter DL, Tulving E. *What are the memory systems of 1994?* In: Schacter DL TE, ed. *Memory Systems*. Cambridge, MA: MIT Press, 1994: 1-38.
28. Scoville WB, Milner B. *Loss of recent memory after bilateral hippocamal lesions*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1957; 20: 11-2.
29. Squire LR, Zola SM. *Episodic memory, semantic memory, and amnesia*. *Hippocampus* 1998; 8: 205-11.
30. Thompson RF, Kim JJ. *Memory systems in the brain and localization of a memory*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 13438-44.
31. Uttl B, Graf P. *Episodic spatial memory in adulthood*. *Psychol Aging* 1993; 8: 257-73.
32. Vargha-Khadem F, Gadian DG, Watkins KE, Connelly A, Van Paesschen W, Mishkin M. *Differential effects of early hippocampal pathology on episodic and semantic memory*. *Science* 1997; 277: 376-80.