

[原著]

舌への刺激がラットの記憶力に及ぼす影響

田中哲子¹ 行平 崇² 西 健太郎³
久保高明³ 申 敏哲^{3,*}

Influences of tongue stimulation upon spatial memory/learning ability in rat

Tetsuko TANAKA, Takashi YUKIHIRA, Kentarou NISHI, Takaaki KUBO, Min-Chul SHIN*

要旨

舌には味覚だけではなく体性感覚を伝える感覚神経が、密に分布している。これまでの先行研究において、舌の味覚受容については多くの研究がなされているが、舌のもう一つの重要な役割である体性感覚についての研究は少ない。特に舌への触・圧覚刺激のみの刺激と脳の記憶力に関する詳細な報告は少なく、今日に至っても明らかではない。そこで、本研究では舌への触・圧覚刺激が、脳の発達と記憶力・学習能力に及ぼす影響を行動学的手法、免疫学的手法を用いて検討をした。その結果、学習・記憶機能評価である8方向放射状迷路試験と Step-down 試験では、刺激強度0.73 newton (N) 群では、コントロール群に対し記憶力の増強が認められた。さらに、舌への触・圧覚刺激は、ラット海馬における c-Fos 陽性細胞増加させた。しかし、BrdU 陽性細胞や BDNF mRNA の若干の増加は認めしたが、有意差を認めるには至らなかった。BrdU 陽性細胞や BDNF mRNA のを増加させた。これらの結果から、舌への触・圧覚刺激は、ラットの海馬を活性化させ、成長因子の増加や細胞新生を促進させることで、記憶力の増強に影響した可能性が示唆された。

キーワード：舌刺激，記憶力，ラット

I. はじめに

神経新生 (Neurogenesis) は、細胞増殖、生存、遊走、分化から成り立っている。成長するにつれて神経新生量は減少していくと考えられていたが、海馬や脳室下帯では実際には大人になってからも脳内で新たな神経細胞が生まれる「神経新生」という現象が続くことが確認されている¹⁻³⁾。神経新生の明確な役割は解明されていないが、海馬 (hippocampus) での神経新生は、学習や記憶に重要な役割を果たし

ていることが示唆されている⁴⁾。これらの先行研究においては、神経発生が増加することが確認されている。また海馬や記憶に関する研究では、クラシック音楽やノイズによる聴覚刺激が、ラットの海馬神経細胞の新生に影響を与えることも示唆されている⁵⁾。さらにラットの前足底の感覚脱失により学習及び記憶の発達が損なわれることも示唆されている⁶⁾。また軟らかい餌を摂取したラットに比べ、硬い餌を摂取したラットのほうが、記憶力 (回避) テストに有意な差がみられた⁷⁾。軟らかい餌を長期間摂取する

所属

¹熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

²帝京大学 福岡医療技術学部 理学療法学科

³熊本保健科学大学 保健科学部 リハビリテーション学科 理学療法専攻 (兼) 大学院 保健科学研究科

*責任著者：karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

ことで、記憶力テストの成績低下や海馬神経細胞新生が有意に減少するという報告⁸⁻¹⁰⁾など、多岐にわたっている。また、海馬での神経新生の制御因子に対して、豊富な環境下での飼育や運動が有効であることも報告¹¹⁻¹³⁾されている。つまり、神経細胞の新生は、神経系の活動の程度に依存して増えたり減ったりする。一方、舌には感覚情報の中枢への投射が多く存在するとされているが、舌刺激（感覚刺激）と中枢神経系、特に海馬との関連性に関する報告は無く、まだ解明されていない。

よって本研究では、ラットの舌への刺激が記憶力に及ぼす影響を行動学的手法及び分子生物学的手法を用いて解明することで、舌から脳に伝えられる体性情報の意義を明確にし臨床応用への生理学的基盤を構築することを目的とした。

II. 対象および方法

1. 実験動物

実験動物には、ホルモンの影響を排除するため、Wistar系雄性ラット（体重約220~250g）33匹を用いて①コントロール群（n=10）、②0.28 newton（N）舌刺激群（n=12）、③0.73 N舌刺激群（n=11）の3群に分け、舌への刺激が中枢神経に及ぼす影響を調べた。ラットは市販の飼料（CE-2、日本クレア）および水を自由に摂取させ、動物舎の照明は12時間ごとに明暗のコントロールをし、室温25.0℃、湿度55±5%の条件下で飼育した。動物の飼育および実験に関しては熊本保健科学大学実験規則を遵守した（動16-005）。

2. 舌刺激法

ラットの舌への触・圧覚刺激に関しては、鼻鏡を用いて開口させ、受容野は舌尖部及び舌縁部を選択し1日1回、1回あたり9回の頻度で1ヶ月間持続的に刺激した。各強度は、SW知覚テスター（von Frey装置を改良した製品 Semmes-Weinstein monofilament tester, Smith & Nephew社製）を用いた。先行研究¹⁴⁾を参考にして、刺激群では0.28Nと0.73 Nの強度を選択して実施した。コントロール群では、鼻鏡による開口のみを行った。また、細胞の増殖を確認するために、舌を刺激する1時間前に腹腔（I.P. Injection）に毎日1回100 mg/kgのBrdUを投与した。

3. 8方向放射状迷路試験（Eight-Arm Radial Maze Test）

実験にあたり、ラットの学習と記憶を評価するために床上60cmの位置に八角形の中央プラットフォームは、直径28cm、側壁高18cmと8本のアームは、長さ43cm×幅11cmとなるアクリル製高架式方向迷路を作製し、試験を実施した（図1）。また外部の景色による影響を一定にするため、床から90cmの高さまで灰色のプラスチック板で四方を囲み、各面にはラットから見えるように四角、丸、星、三角の模様をそれぞれ描いた。さらに中央プラットフォーム直上で床上190cmの位置に定点カメラを設置して観察を行った。装置順化のため1週間の適応期間の後、刺激開始3日前より水探索学習に関する事前学習を行った。3日目に事前学習終了後、8方向放射状迷路試験を行った。その後舌刺激を1ヶ月間継続した。1ヶ月間の舌刺激後、8方向放射状迷路試験を行った。先行研究では先端部分に餌を設置していたが、本研究では、嗅覚による影響を排除するため水を用いて実施した。水の設置は、8方向すべての先端に直径3cm、深さ1cmの白い蓋を設置し、8本のアームのうち4本のみに水を50 μ l入れ、残りの4つの蓋には、水を入れないで開始した。実験に際しては、開始24時間前より水分制限を実施した後に、水を探索する行動を観察・分析し、所要時間、Working memory error（WME）、全選択数、Reference memory error（RME）を計測し空間認知機能の指標とした。なお、所要時間に関しては最大で8分間とした。



図1. 8方向放射状迷路

4. Step-down inhibitory avoidance (step-down) 試験

1ヶ月間の舌刺激後、8方向放射状迷路試験を行った後、短期記憶の評価のためにstep-down試験を実施した。Step-down試験では、50cm×25cm×30cmの透明なアクリル製ボックスを用いた。このボックスの右側に5×12×25cmの長さのプラットフォームを備え、左側には2mm間隔の一連のステンレス鋼棒（直径2mm）が配置されている。学習習得では、ラットを5cmの高さのプラットホーム上に置く。ステップダウン待ち時間20秒後、ラットがプラットホーム上から下段のステンレス鋼棒へ降りて約5秒経過した時に、30Vの電気刺激を与え、これを受けたラットがプラットホーム上へ逃避した時点で、ボックスから引き引き抜く。試験では、24時間後、ラットを再びプラットホーム上に置き、プラットホーム上から下段のステンレス鋼棒へ完全に降りきるまでの時間をlatency timeとして計測した。この場合にはラットが下段のステンレス鋼棒に降りてもステンレス鋼棒には電気刺激を与えない¹⁵⁾。

5. 免疫組織化学的検査

1ヶ月後の8方向放射状迷路試験とStep-Down試験終了後、ペントバルビタール（10mg/kg, i.p.）にて麻酔後、腹部を切開した。Phosphate Buffered Saline (PBS) を全身血と交換した後、脳標本作製した。ラットより得られた脳組織を4% Paraformaldehyd (PFA) に浸漬し組織固定後、パラフィン包埋し、ミクロトームを用い、6μmの厚さで薄切した海馬組織標本作成した。これら薄切標本にc-Fos (Anti c-Fos, サンタクルズ) とBrdU (Anti-BrdU, アブカム) の免疫染色を行った。その後、顕微鏡用デジタルカメラ (BX51, OLYMPUS) により20倍の写真を撮影し、Cell Sens Dimension (Ver1.7, OLYMPUS) を用いて200μm×200μm内にある陽性細胞の数を計測した¹⁶⁾。

6. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 法

RT-PCR法では、ラットより摘出した海馬部を用いた。また脳細胞の増加には不可欠な神経系の液性タンパク質であり、神経細胞の生存・成長・シナプスの機能亢進などの神経細胞の成長を調整するとされる脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived

neurotrophic factor) の mRNA 発現を、RT-PCR法 (reverse transcription-PCR) を用いて測定した。ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて、海馬からの mRNA 抽出を行った。精製した mRNA は、Bio Photometer plus (eppendorf) により濃度を測定、全ての検体を1000ng/μmに調整した。Prime Script™ RT-PCR Kit (Takara Bio) 及び Thermal Cycler Gene Atlas (Astec) を使用し、Template RNA 1000ng/μLを用いて、変性・アニーリング (65℃ 5 min)、逆転写反応 (42℃ 20 min, 95℃ 5 min) により合成された cDNA 1 μLを鋳型として primer 20 μM, TaKaRa EX Taq HS を用い RT-PCR法を行った。条件を (94℃ 3 min), (94℃ 30 sec, 58℃ 30 sec, 72℃ 30 sec) 40cycles, (72℃ 10min) とした。使用したプライマー配列を以下に示す。

BDNF (増幅サイズ169 bp)

F-primer 5'- CAAAAGGCCAACTGAAGC -3',

R-primer 5'- CGCCAGCCAATTCTCTTT - 3'

GAPDH (増幅サイズ306bp)

F-primer 5'- CCTTCATTGACCTCAACTAC -3',

R-primer 5'- TTCACACCCATCACAAAC - 3'

BDNF mRNA 発現量は、2% アガロースを用いて100V 40 minの条件で、アガロース電気泳動を行い、その後、エチジウム・ブロマイド溶液で染色し、増幅したDNAのバンドを写真撮影し、photoshop (ver. 7.0, adobe Systems Software Ireland Ltd) を用いてバンドのdensityを測定し、BDNFとGAPDHの割合で増減を比較検討した。

7. 統計処理

データは、平均±標準誤差 (S.E.) をそれぞれ算出した。群間差は、一元配置分散分析をし、事後検定としてScheffe検定を用いた多重比較を行った。なお有意水準は5% (p<0.05) とした。

Ⅲ. 結果

1. 8方向放射状迷路試験 (Radial arms maze test)

舌刺激による空間学習・作業記憶の変化を測定するために、8方向放射状迷路試験を行った。図2Aは、8方向放射状迷路試験の所要時間とWorking memory error (WME) を示す。所要時間に関しては、コントロール群で75.6±8.1秒、0.73N群では

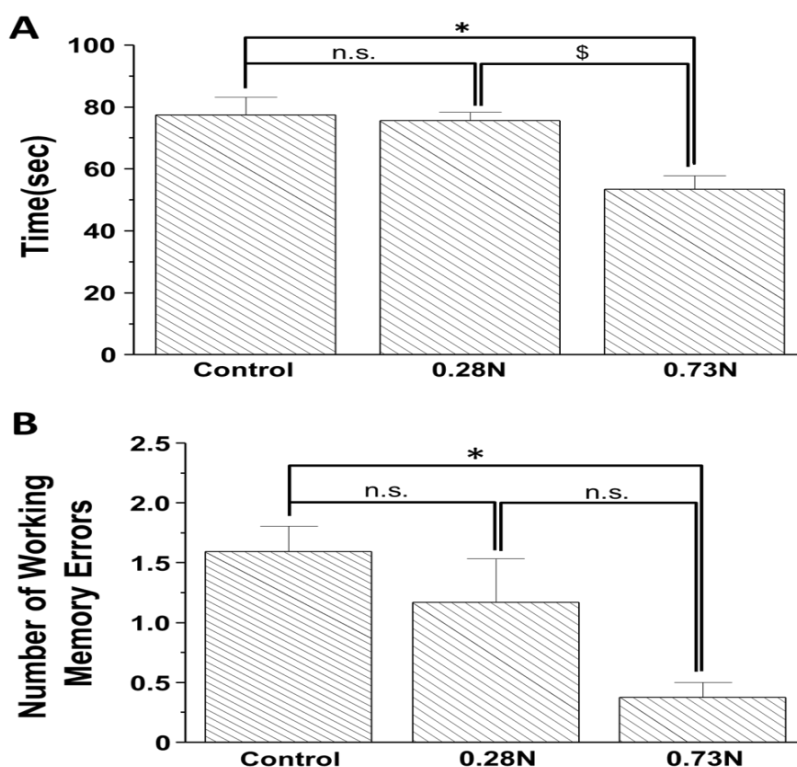


図2. 8方向放射状迷路試験の所要時間と WME

Control vs. 0.73N, * : $P < 0.05$; 0.28N vs. 0.73N, \$: $P < 0.05$; ns: no significant ; $n = 7 \sim 8$; Mean \pm S.E.

54 \pm 3.9秒と有意な減少が認められた ($P < 0.05$)。また、0.28Nの舌刺激群より0.73N群で有意な減少が認められた。WMEに関して、コントロール群では1.6 \pm 0.3回、0.28N群では1.2 \pm 0.4回、0.73N群では0.4 \pm 0.1回と、コントロール群と比較して0.73N群では有意な減少が認められた ($P < 0.05$) (図2B)。しかし、0.28N群と0.73N群の間では有意差は認められなかった。

図3は、全選択数と Reference memory error (RME)を示す。全選択数(図3A)、RME(図3B)ともに、各群間で有意差は認められなかった。

2. Step-down inhibitory avoidance (step-down) 試験

短期記憶に対する影響を検討するために Step-down 試験を行った。コントロール群は58.0 \pm 16.8、0.28N群では221.5 \pm 84.3、0.73N群では460.1 \pm 72.4と、コントロール群に対し、0.73N群で逃避時間の有意な増加が認められた(図4) ($P < 0.05$)。しかし、

0.28N群と0.73N群の間では有意差は認められなかった。

3. 免疫組織化学染色を用いた c-Fos 陽性細胞の数

本研究では、細胞活性のマーカーとして c-Fos を用いた。c-Fos は、c-Fos mRNA がコードするタンパクであり、他の遺伝子を活性化させる転写因子として働くと考えられている。c-Fos が発現した後に、様々なカスケード反応が続き、リン酸化が起こったり、細胞の反応が変化していると考えられている。図5は c-Fos 陽性細胞の数を示す。c-Fos 陽性細胞の数について、コントロール群では16.1 \pm 2.5 (Aa)であったのに対し、0.28N群38.6 \pm 4.9 (Ab)、0.73N群33.8 \pm 4.4 (Ac)と、両群ともにコントロール群と比較して有意な増加が認められた (B) ($P < 0.05$)。しかし、0.28N群と0.73N群の間では有意な差は認められなかった。

4. 免疫組織化学染色を用いた BrdU 陽性細胞の数

抗 BrdU 抗体によるラベルされた BrdU の検出

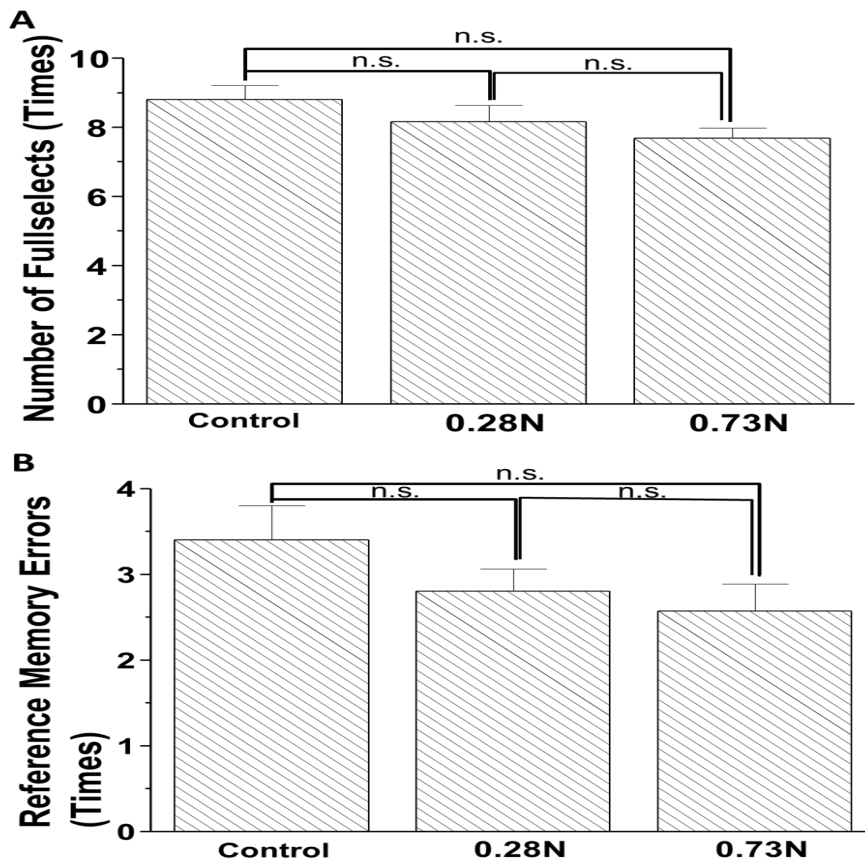


図3. 8方向放射状迷路試験の全選択数と Reference memory errors (RME)
n=7~8; Mean ± S.E.

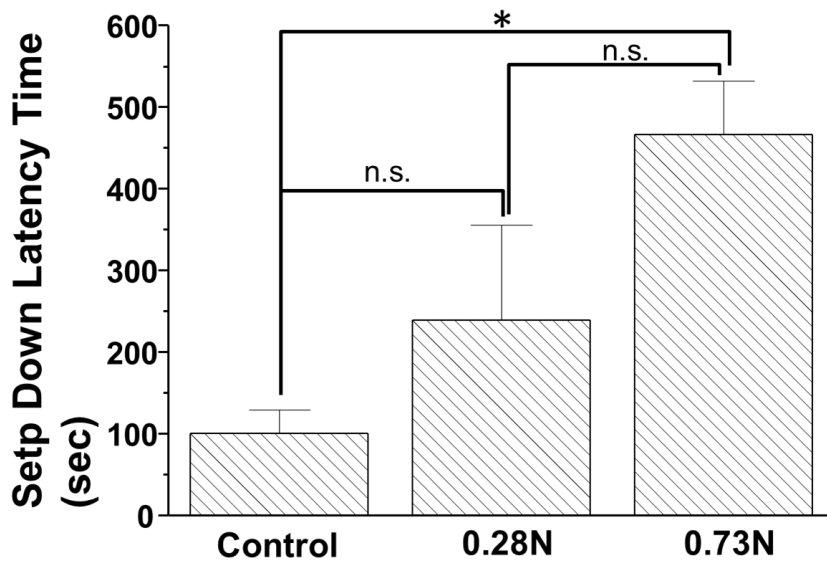


図4. Step-down 試験

Control vs. 0.73N, * : P<0.05 ; ns : no significant ; n=7~8 ; Mean ± S.E.

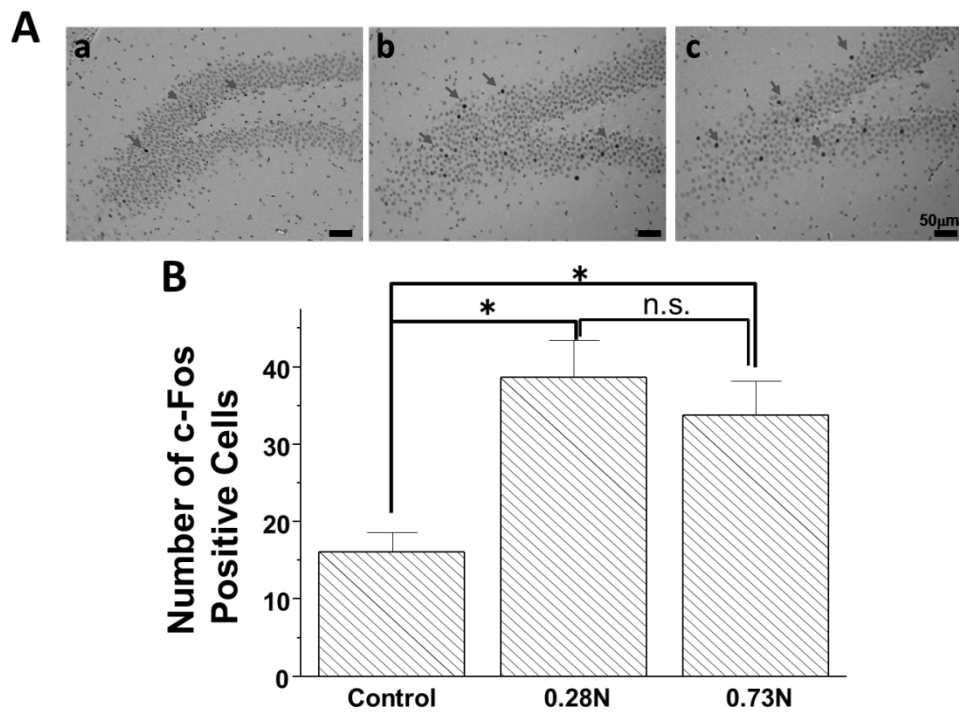


図5. c-Fos 陽性細胞

赤い矢印は c-Fos 陽性細胞を示す。 Aa : Control ; Ab : 0.28N ; Ac : 0.73N ; Control vs. 0.73N, * : $P < 0.05$; $n = 5$; Mean \pm S.E.

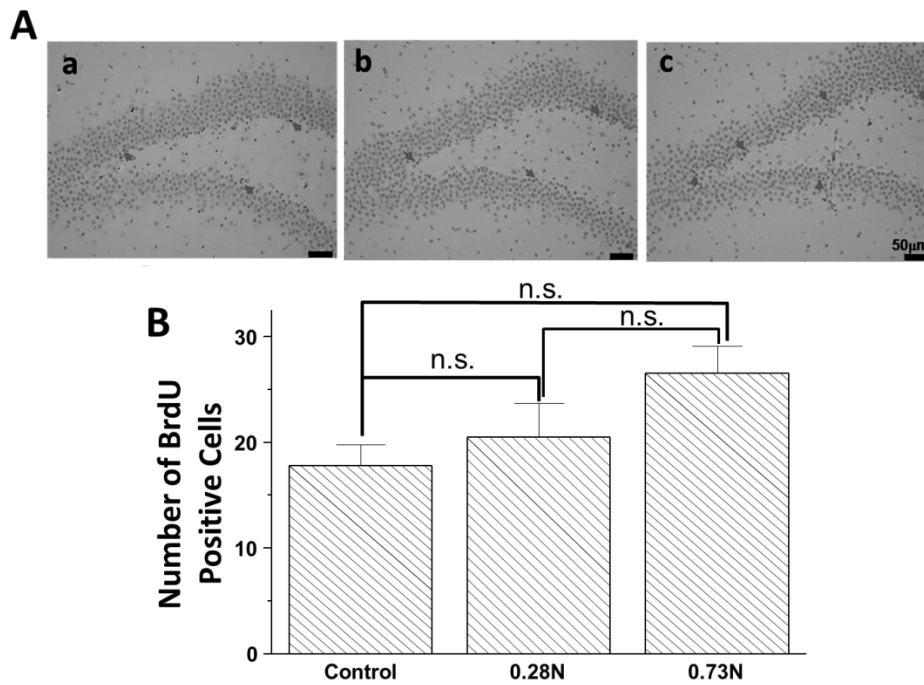


図6. BrdU 陽性細胞

赤い矢印は BrdU 陽性細胞を示す。 Aa : Control ; Ab : 0.28N ; Ac : 0.73N ; $n = 5$; Mean \pm S.E.

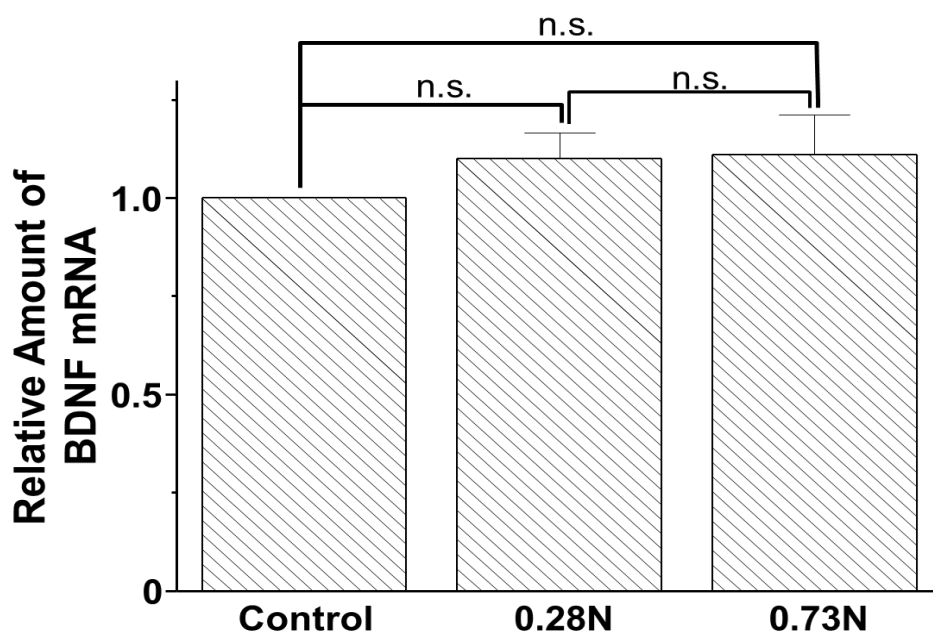


図7. BDNF mRNA

n=4; Mean \pm S.E.

は、増殖細胞の検出や DNA 合成の程度を知る上で有用であるため (Bromodeoxyuridine) BrdU を用いて実験した。本研究では、細胞の増殖を確認するために、舌を刺激する 1 時間前に、BrdU 100 mg/kg を毎日 1 回ラットの腹腔 (I.P. Injection) に投与した。BrdU 陽性細胞の数について、コントロール群では 17.8 ± 2.0 (Aa), 0.28N 群では 18.5 ± 2.9 (Ab), 0.73N 群では 26.5 ± 2.6 (Ac) と、コントロール群と比較して 0.28N 群・0.73N 群共に BrdU 陽性細胞の若干の増加を示したが、有意差は認められなかった (B) (図 6)。

5. BDNF mRNA

成長因子である BDNF mRNA の変化を検討した。コントロール群に対し、0.28N 群、0.73N 群共に若干の発現増加を示したが、有意差を検出するには至らなかった (図 7)。

VI. 考察

本研究では、舌への触・圧覚刺激が脳の発達と記憶力に及ぼす影響を行動学的手法、免疫学的手法を用いて検討をした。

8 方向放射状迷路試験において、コントロール群に対して 0.28N 舌刺激群では所要時間、WME、全

選択数に有意な差が見られなかったが、0.73N 舌刺激群では有意な減少が認められた。Kim ら⁵⁾ は、クラシック音楽とノイズでの刺激でノイズを聞かせたラットが、8 方向放射状迷路試験のエラー数が増加したと報告している。Yamamoto ら³⁾ は硬さの違う餌をマウスに摂取させ、硬い餌を摂取したマウスでは、軟い餌を摂取したマウスと比較して空間学習能力が向上していたこと、また口腔の刺激や聴覚刺激などの末梢刺激がラットの記憶に影響を及ぼすことが報告されており、本研究でもそれを支持する結果が得られた。Step-down 試験において、コントロール群に対し、0.28N 舌刺激群では潜伏期の有意な差は見られなかったが、0.73N 舌刺激群において有意な潜伏期の増加が見られた。Utugi⁷⁾ らは固い餌を摂取することでの回避テストに有意な差が見られたと報告している。また Yamamoto ら⁸⁾、Aoki ら¹⁰⁾ の報告では、軟らかい餌を摂取することによってラットの記憶力の低下が見られたとされており、口腔への刺激が、ラットの記憶力に影響を与えたという点で類似した結果が得られた。

舌への刺激がラットの海馬の活性化、細胞新生や成長因子の変化に及ぼす影響を検討した結果、コントロール群に対して、舌刺激群で c-Fos の有意な増加を示唆した。しかし、BrdU 陽性細胞や BDNF mRNA の発現量では舌刺激の強度による増加が見

られたが、有意差はなかった。Utsugiら⁷⁾は硬い餌を与えたマウスと軟らかい餌を与えたマウスを比較し、硬い餌を与えたマウスに脳室下帯での c-Fos 陽性細胞、BrdU 陽性細胞が有意に増加したと報告している。また、Kimら⁵⁾はラットに対してクラシック音楽、ノイズでの刺激を行い、ノイズを聞かせたラットの海馬歯状回で BrdU 陽性細胞が有意に減少し、クラシック音楽を聞かせたラットは CA1, CA3にて BrdU 陽性細胞が、有意に増加したと報告している。小松ら¹⁴⁾は、ラットの三叉神経節における舌機械受容ニューロンの反応特性を検討し、刺激強度の増加と共にスパイク頻度が増加したと報告している。今回の結果では、有意差は見られなかったが、舌刺激の強度で BrdU 陽性細胞の増加に違いが見られ、舌刺激の強度によって細胞増殖の程度が、変わる可能性が示唆された。これは、海馬での細胞増殖が起こることによって記憶力の増強が起こり、その結果0.73N 群では8方向放射状迷路試験や step-down 行動試験に有意差が見られた可能性が示唆される。細胞増殖が少なかった0.28N 群では記憶力のわずかな増強が起き、8方向放射状迷路試験や Step-Down 試験に有意な差を認めるまでには、至らなかったものの、WME や Step-Down 試験に変化が見られているのではないかと考えられる。また、BDNF mRNA は各群において有意な変化を認めなかったが、Kimら¹⁵⁾はラットに対して1日30分のトレッドミル運動を6週間実施し、トレッドミル運動群において記憶力の増強に加え、BDNF が有意に増加し、BrdU 陽性細胞が有意に増加したと報告している。今回の舌刺激による結果では、BrdU 陽性細胞や BDNF mRNA の若干の増加は認めしたが、有意差を認めるには至らなかった。これに関しては、標本にばらつきが見られたため、標本数を増やして検討する必要や定量的 PCR の検討も必要があると思われる。

舌を刺激することで、その刺激は三叉神経主知覚枝、視床後内側腹側核、体性感覚野という流れで伝達されるが、今後はこれらの過程ごとでの検証が必要となる。また、舌刺激期間の検討、伝道路別の検討、参照記憶への影響の検討、そしてインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factors : IGF) をはじめとした他の成長因子での検討も必要と考えられる。

V. 結語

本研究の結果は、歯磨き等の舌への触・圧覚刺激が、子供の脳の発達と記憶力、集中力などに影響を与える可能性と、高齢者には脳の活性化を誘導することで記憶力低下予防、脳虚血と認知症などの脳疾患の予防と治療などに寄与できると考えられる。

謝辞

本研究は、熊本保健科学大学学内研究費 (2016-C-12, 2017-C-03) の助成を受け実施した。

利益相反

本研究における利益相反は存在しない。

VI. 引用文献

- 1) Biliss TVP, Collingridge GL: A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*, 361 : 31-39, 1993.
- 2) Gould E, Tanapat P, Hastings NB, et al : Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci*, 3 (5) : 186-92, 1999.
- 3) Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature*, 386 (6624) : 493-5, 1997.
- 4) Neves G, Cooke SE, Bliss TV: Synaptic plasticity, memory and the hippocampus: a neural network approach to causality. *Nat Rev Neurosci*, 9 (1) : 65-75, 2008.
- 5) Kim H, Lee MH, Chang HK, et al: Influence of prenatal noise and music on the spatial memory and neurogenesis in the hippocampus of developing rats. *Brain Dev*, 25 (2) : 109-114, 2006.
- 6) Li F, Zhang YY, Jing XM, et al: The influence of forepaw palmar sensorimotor deprivation on learning and memory in young rats. *Neurosci Res*, 63 (1) : 17-23, 2009.
- 7) Utsugi C, Miyazono S, Osada K, et al: Hard-

- Diet Feeding Recovers Neurogenesis in the Subventricular Zone and Olfactory Functions of Mice Impaired by Soft-Diet Feeding. *PLoS One*, 9 (5) : e97309, 2014.
- 8) Yamamoto T, Hirayama A: Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-accelerated mice. *Brain Res*, 902 (2) : 255-63, 2001.
 - 9) Tsutsumi K, Kaku M, Motokawa M, et al: Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. *Biomedical Research*, 28 (1) : 1-7, 2007.
 - 10) Aoki H, Kimoto K, Hori N, et al: Cell proliferation in the dentate gyrus of rat hippocampus is inhibited by soft diet feeding. *Gerontology*, 51 (6) : 369-374, 2005.
 - 11) Shors TJ : Acute stress rapidly and persistently enhances memory formation in the male rat. *Neurobiol Learn Mem*, 75 (1) : 10-29, 2001.
 - 12) Snyder JS, Hong NS, McDonald RJ, et al : A role for adult neurogenesis in spatial long-term memory. *Neuroscience*, 130 (4) : 843-852, 2005.
 - 13) Anderson BJ, Rapp DN, Baek DH, et al: Exercise influences spatial learning in the radial arm maze. *Physiol Behav*, 70 (5) : 425-429, 2000.
 - 14) 小松偉二, 田端孝義, 林治秀, 真柳秀昭: ラット三叉神経節における舌機械受容ニューロンの反応特性, *Jpn J Oral Biol*, 40: 179-186, 1998.
 - 15) Kim SE, Ko IG, Kim BK, et al : Treadmill exercise prevents aging-induced failure of memory through an increase in neurogenesis and suppression of apoptosis in rat hippocampus. *Exp Gerontol*, 45 (5) : 357-65, 2010.
 - 16) Fukamachi S, Yukihiro T, Kameyama H: Effect of electrical peripheral nerve stimulation on intrastriatal hemorrhage-induced apoptotic neuronal cell death in the rat. *Japanese journal of electrophysiological agents*. 22 : 1-9, 2015.

(平成29年12月4日受理)

Influences of tongue stimulation upon spatial memory/ learning ability in rat

Tetsuko TANAKA, Takashi YUKIHIRA, Kentarou NISHI,
Takaaki KUBO, Min-Chul SHIN

Abstract

The tongue plays an important role in the functions of taste, mastication, swallowing, and speech. These functions are due to the tongue's sensory functions, e.g., taste and somatosensory functions, and motor functions. There are many studies on the relationship between the tongue and taste, but not well known about another important role of somatosensory of the tongue in rat. In the present study, we investigated the effects of tongue stimulation upon spatial memory/learning ability in rat by using behavioral testing and immunostaining. 0.73 newton (N) tongue stimulation decreased the frequencies of both times and working memory errors in a radial arms maze test and increased latency time in a step down test. In addition, 0.73N tongue stimulation increased the number of c-Fos positive cells in rat hippocampus. Tongue stimulation also slightly increased the number of BrdU-positive cells and BDNF mRNA but there was no significant. Based on the results, it can be suggest that net increases in hippocampal neurogenesis from sustained tongue stimulation are likely a result of hippocampal activation and neuronal differentiation, and it could ameliorate the ability of memory/learning in rats.

Keywords : tongue stimulation, memory/learning ability, rat