

[原著]

舌への触・圧，痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットの 記憶力と細胞死に及ぼす影響

福永 貴之¹⁾²⁾ 小牧 龍二¹⁾³⁾ 申 敏哲^{1)*}

Effect of touch/pressure and pain stimulus on the tongue in memory
and cell death of cerebrovascular dementia model rats

Takayuki FUKUNAGA, Ryuji KOMAKI, Min-Chul SHIN

和文抄録

我々は舌への体性感覚刺激が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を与える可能性を報告した。しかし、舌への体性感覚刺激は認知症の中でも、脳血管性認知症モデルラットを使用した記憶力と細胞死に及ぼす影響については報告が少なく未だ明らかではない。本研究では舌への触・圧覚、痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットに及ぼす影響を行動学的手法、分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、総頸動脈結紮後開口のみを行った脳血管性認知症モデルラット (permanent 2-vessel occlusion ; P2VO) 群に対し、両側総頸動脈結紮後、触・圧覚刺激を行った (P2VO+TS) 群で、Water Maze 試験での島到達時間短縮、Step Down テストでの逃避時間延長、BrdU、c-Fos 陽性細胞、BDNF の有意な増加又は増加傾向を認めた。しかし、痛覚刺激を行った (P2VO+PS) 群は、Water Maze 試験では島到達時間の有意な短縮はみられたが、その他の有意差は認められなかった。また、Western blot 法を用いた神経細胞死の検討では、P2VO 群で有意な Caspase-3タンパク質の増加がみられたが、舌刺激群では若干の発現抑制がみられたものの、有意差は認められなかった。これらの結果から舌への触・圧覚、痛覚刺激は脳血管性認知症モデルラットの海馬を活性化させ細胞新生まで影響を与えた可能性が考えられる。その結果、脳血管性認知症での記憶力低下を改善させた可能性が示唆された。しかし、舌への刺激は細胞死からの神経保護作用による記憶力の低下改善効果は低い可能性が示唆された。今後、触・圧覚刺激と痛覚刺激の疾患モデルでの刺激強度の更なる検討が必要である。

キーワード：脳血管性認知症，神経細胞死，舌刺激，ラット

I 緒言

高齢化が進む現代社会で認知症患者は増加の一途を辿り、日本のみならず世界的な問題となっている。世界の認知症患者数は約5500万人と推定され、毎年1000万人近くが新たに発症している¹⁾。厚生労働省の報告では、日本における65歳以上の認知症患者は

約600万人 (2020年現在) と推計され、2025年には約700万人 (高齢者の約5人に1人) が認知症になると推定されている²⁾。現在、認知症は世界的に高齢者の障害とそれによる介護依存度を高める主要原因の1つであり、そのため認知症予防という観点が目ざされている¹⁾。全認知症の中でも6割以上を示すのが、アルツハイマー型認知症 (Alzheimer-

所属

¹⁾ 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

²⁾ くまもと南部広域病院

³⁾ リハビリテーションセンター 熊本回生会病院

責任著者：申 敏哲 karosu94@kumamoto-hsu.ac.jp

type dementia : AD) であり, 次ぐ 2 番目の原因疾患であるのが血管性認知症 (vascular dementia : VaD) である。特に近年の報告では, 65歳未満の若年性認知症の中で血管性認知症の割合が 4 割と筆頭疾患であることが報告されている³⁾。これらの疾患に対する治療方法の 1 つとして, 脳を刺激することで感覚統合中枢に働きかけるリハビリプログラムの効果が良く知られている。そこで, 日常生活で取り入れることのできるリハビリプログラムを構築し, 実践することが予防や治療のために重要であると考え, 食事やトイレ及び入浴等の日常生活動作そのものをリハビリとする「生活リハビリ」の概念が生まれた。軽度認知障害に対し, 運動療法は認知機能向上や認知症発症予防に有効であるとの報告もある⁴⁾。さらに, 認知症患者において, 運動習慣は認知症症状を軽減することが報告されており, 運動は新血管系を介するメカニズムと脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) などにより直接的に神経可塑性を促進するメカニズムの両者が関与して神経保護的に作用すると考えられている⁵⁾。

近年, 外傷性脳損傷や多発性硬化症等に対して舌に分布する体性感覚を電気刺激するリハビリプログラムによって, 神経障害が改善されたことが報告され, 舌刺激が病気や外傷による慢性的な神経症状を持つ人を助ける革新的方法になる可能性が報告された^{6,7)}。この研究結果は舌への電気刺激が脳機能を活性化させることや, その他の脳疾患にも応用可能な事を示唆している。さらに, 田中ら⁸⁾ 行平ら⁹⁾ は, 舌への触・圧覚また痛覚刺激が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を増強させる可能性を報告している。これらの報告は, 舌刺激がアルツハイマーや血管性認知症にも十分影響を与える可能性を示しているが, 報告の内容は正常ラットでの効果である。また, 認知症の中でも多くの研究がアルツハイマー型認知症に対する研究であり, 脳血管性認知症については未だ明らかでないことが現状である。従って, 本研究では正常ラットに効果的であった舌への触・圧覚, 痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットに及ぼす影響を行動学的手法, 分子生物学的手法を用いて解明することを目的とした。

II 方法

1. 実験動物

実験動物には, Wistar 系雄性ラット (体重約 200g) 20匹を用いて①総頸動脈非結紮群 + 開口のみ群 (Sham Control, n=5), ②両側総頸動脈結紮群 (Permanent 2-vessel occlusion : P2VO) + 開口のみ群 (P2VO, n=5), ③両側総頸動脈結紮群 + 0.73 newton (N) 触・圧覚舌刺激群 (P2VO+TS, n=5) ④両側総頸動脈結紮群 + 1600ng/10 μ l カプサイシン痛覚舌刺激群 (P2VO+PS, n=5) の 4 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°C, 湿度 55 \pm 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 20-03)。

2. 脳血管性認知症病態動物モデルの作成と体重測定

3 種混合麻酔薬 (0.5ml/100g.i.p.) を用いて全身麻酔下で右側の総頸動脈を 5-0 絹糸で結紮し, その 1 週間後, 右側同様に左側の総頸動脈を結紮することにより, 慢性低灌流による脳血管性認知症病態動物モデルラット (P2VO) を作成した¹⁰⁾。P2VO の作成と舌刺激が生体に及ぼす影響を確認するために P2VO の作成前を 0 日とした 1 週間ごとの体重の変化を測定した。

3. 舌刺激法

脳血管性認知症病態動物モデルの作成 1 週間後から舌刺激を行った。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。強度については, SW 知覚テスター (von Frey 装置を改良した製品 Semmes-Weinstein ofilament tester, Smith & Nephew 社製) を用い, 田中ら⁸⁾ の研究を参考にし, 舌刺激群では 0.73 N の強度を選択して実施した。痛覚舌刺激群に対しては, 行平ら⁹⁾ の研究を参考にし, ピペットを用いて, 1 回 / 1 日, 1600 ng/10 μ l のカプサイシンを直接舌に 1 ヶ月間投与した。コントロール群に対しては, 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。

4. Water Maze 試験

Water Maze 試験では、直径145cm、高さ60cmの円形プールを用いて行った。水温を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ とし、水深は20cmとした。水面と同様の高さの島を設置し、そこへ到達するまでの時間を記録した。事前学習期間を3日間設け、その際ラットにプール内で10cm × 10cm の透明の島を探索させ、島を見つけた後、30秒島上に待機させる手順を二回繰り返した。事前学習終了後、モデルを作成し、翌日から舌刺激を1ヶ月間実施後、再び島までの到達時間を計測した。

5. Step down inhibitory avoidance (step down) 試験

短期記憶のテストの為に Step Down 試験を行った。Step Down 試験では、50cm × 25cm × 30cm の透明なアクリル製ボックスの右側に5cm × 12cm × 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 を配置した。田中らの先行研究を応用し⁸⁾、実験開始から20秒間は待機時間として、ラットを5cm の高さのプラットフォーム上に置く。待機時間30秒後、ラットがプラットフォーム上から下段のステンレス鋼棒へ降り、約5秒経過した時に電気刺激 (1 Hz, 1s, 20V) を与える。これを受けたラットがプラットフォーム上に移動し、プラットフォームから下段のステンレス鋼棒に完全に降りきるまでの時間を計測した。なお、電気刺激後はラットが下段のステンレス鋼棒に降りても電気刺激は与えない。

6. 免疫組織化学的検査と Western Blot 法

1ヶ月後の Water Maze 試験と Step Down 試験終了後、3種混合麻酔薬 (0.5ml/100g, i.p.) にて麻酔後、腹部を切開した。心臓から Phosphate Buffered Saline (PBS) を全身血と交換した後、脳標本を作製した。ラットより得られた3匹の脳組織は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6 μm の厚さで薄切した海馬組織標本を作成した。これらの薄切標本に c-Fos (Anti c-Fos, サンタクルズ)、

BrdU (Anti-BrdU, アブカム) の免疫染色を行った後、顕微鏡用デジタルカメラ (BX51, OLYMPUS) により20倍の写真を海馬の左右から撮影し (n=6)、Cell Sens Dimension (Ver1.7, OLYMPUS) を用いて陽性細胞の数を海馬の歯状回にて計測した。また、Western Blot 法によってタンパク質の変化を分析した。凍結した2匹のラットの脳組織は解凍後、左右の海馬 (n =4) だけを取り出し、T-PER Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質を抽出した。得られたタンパク質抽出液は Anti-brain-derived neurotrophic factor (BDNF, Cosmo Bio), Anti-caspase-3 (caspase-3, フナコシ), Anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Abcam) の抗体を用いてタンパク質自動分析装置、WES (Protein simple) により分離し分析を実施した¹¹⁾。

7. 統計処理

体重、Water Maze 試験、Step Down 試験の結果は、平均 ± 標準偏差 (S.D.), c-Fos と BrdU 陽性細胞、BDNF と Caspase-3 タンパク質発現については、平均 ± 標準誤差 (S.E.) でそれぞれ算出した。群間差は、一元配置分散分析を行い、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. 体重の変化

脳血管性認知症病態動物モデル (P2VO) の作成と舌刺激が生体に及ぼす影響を確認するために体重の変化を検討した。図1はP2VOの作成前を0日とした1週間ごとの体重の推移を示す。術後各群若干の体重変化を示したが、各群共に最終測定時には100g程度の体重増加を示し、有意な体重の変化はみられなかった (図1)。

2. Water Maze 試験

長期記憶に対する影響を検討するために、Water Maze 試験を行った。図2は Water Maze 試験の島到達時間を示す。総頸動脈非結紮群 + 開口のみ群 (Sham Control 群, 25.5 ± 10.2) に対し両側総頸動脈結紮群 + 開口のみ群 (P2VO 群, 50.5 ± 5.4) で到

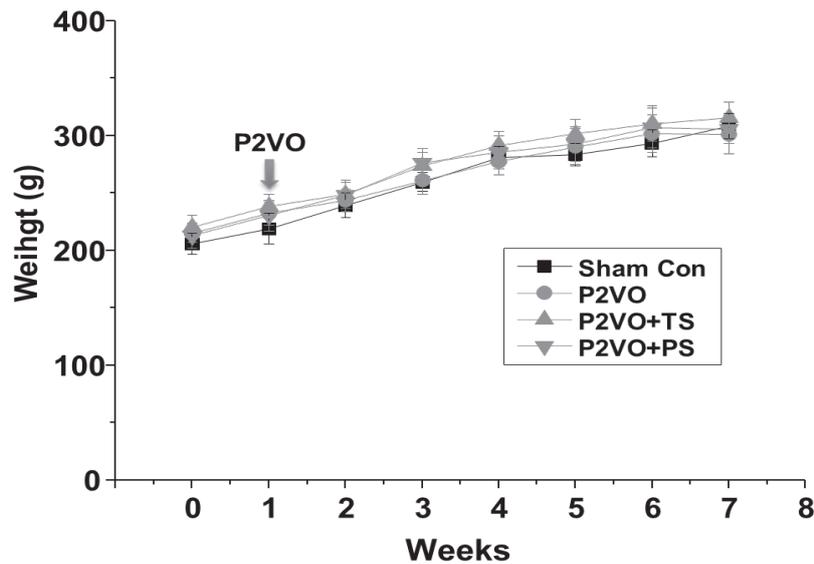


図1. 体重の変化

Sham Con, Sham Control; P2VO, 脳血管性認知症ラット; TS, 0.73N SW 知覚テスト
 ター触・圧覚舌刺激; PS, 1600ng/10 μ l カプサイシン舌刺激; Mean \pm S.D.; n = 5

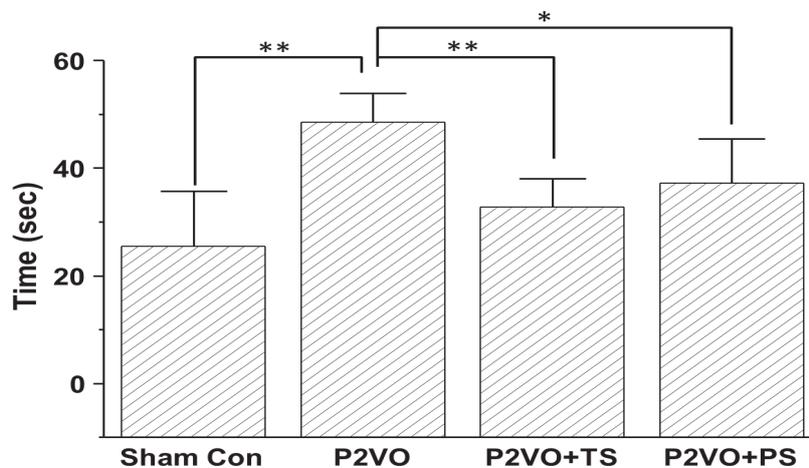


図2. Water Maze 試験による長期記憶の評価

Sham Con, Sham Control; P2VO, 脳血管性認知症ラット; TS, 0.73N SW 知覚テスト
 ター触・圧覚舌刺激; PS, 1600ng/10 μ l カプサイシン舌刺激; *, P<0.05; **, P<0.01;
 Mean \pm S.D.; n = 5

達時間の有意な遅延がみられた。しかし、P2VO 群での到達時間遅延は、両側総頸動脈結紮群 +0.73 newton (N) 触・圧覚舌刺激群 (P2VO+TS 群, 33.8 \pm 6.3) と両側総頸動脈結紮群 +1600ng/10 μ l カプサイシン痛覚舌刺激群 (P2VO+PS 群, 36.3 \pm 8.1) で有意な時間短縮を示した。

3. 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。図3は、Step Down 試験の逃避時間を示す。Sham Control 群 (531.4 \pm 93.9) に対し、P2VO 群 (257.8 \pm 114.2) で逃避時間の短縮が認められた。しかし、P2VO+TS 群 (468 \pm 128.1) では有意な逃避時間延長、P2VO+PS 群

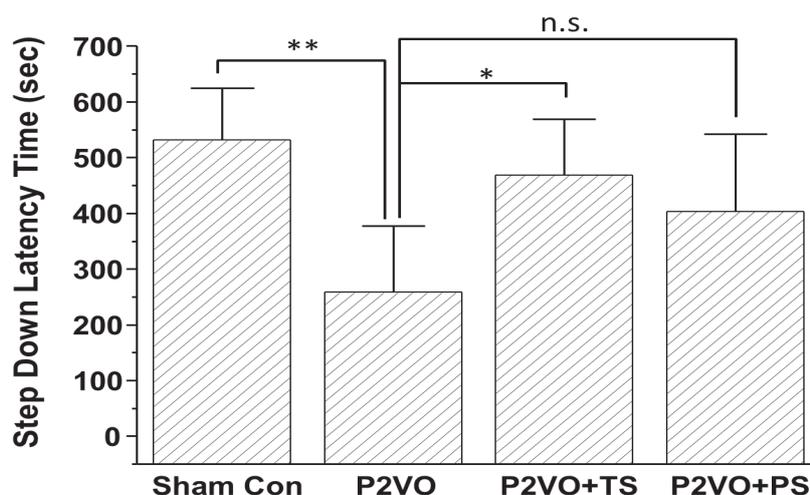


図3. Step Down 試験による短期記憶の評価

Sham Con, Sham Control; P2VO, 脳血管性認知症ラット; TS, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; PS, 1600ng/10 μ l カプサイシン舌刺激; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; n.s., no significant; Mean \pm S.D.; $n = 5$

(403.0 ± 149.1) では逃避時間の延長傾向がみられたものの有意差は認められなかった。

4. c-Fos と BrdU 陽性細胞発現に対する舌刺激の影響

血管性認知症モデルラットへの舌刺激による海馬での細胞活性化と細胞増殖に及ぼす影響を確認するために細胞活性化マーカーである c-Fos と細胞増殖マーカーである BrdU 陽性細胞を免疫染色法で測定した。c-Fos に関しては, Sham Control 群 (35.8 ± 4.8) に対し, P2VO 群 (16.9 ± 5.1) で有意な c-Fos 陽性細胞の減少がみられたが, P2VO+TS 群 (26.2 ± 4.9) では有意な c-Fos 陽性細胞の増加, P2VO+PS 群 (21.2 ± 3.4) では増加傾向がみられたものの有意差は認められなかった (図 4 A, B)。BrdU 陽性細胞に関しては, Sham Control 群 (25.9 ± 1.2) に対し, P2VO 群 (15.8 ± 2.8) で有意な BrdU 陽性細胞の発現減少が認められた。しかし, P2VO+TS 群 (21.5 ± 1.7) と P2VO+PS 群 (18.2 ± 2.1) に対しては, P2VO 群に比べ, BrdU 陽性細胞の有意な増加, 又は増加傾向がみられた (図 4 C, D)。

5. BDNF と Caspase-3 タンパク質発現に対する舌刺激の影響

本研究では, 舌刺激が海馬の成長因子の変化と細胞死に及ぼす影響を検討するために, 成長因子である BDNF と細胞死のマーカーである Caspase-3 タンパク質の発現を Western Blot 法で測定した。BDNF タンパク質に関しては, Sham Control 群 (0.81 ± 0.06) に対し, P2VO 群 (0.59 ± 0.07) で有意な BDNF タンパク質の発現減少が認められた。しかし, P2VO+TS 群 (0.7 ± 0.04) と P2VO+PS 群 (0.65 ± 0.04) に対しては, P2VO 群に比べ BDNF タンパク質の増加傾向がみられたものの, 有意差は認められなかった (図 5 A)。Caspase-3 タンパク質に関しては, Sham Control 群 (0.7 ± 0.1) に対し, P2VO 群 (2.1 ± 0.3) で有意な細胞死の増加が認められた。しかし, P2VO+TS 群 (1.6 ± 0.4) と P2VO+PS 群 (1.8 ± 0.4) に対しては, P2VO 群に比べ Caspase-3 タンパク質の減少傾向がみられたものの, 有意差は認められなかった (図 5 B)。

IV 考察

本研究では, 舌への触・圧, 痛覚刺激が脳血管性認知症モデルラットに及ぼす影響について行動学的手法, 分子生物学的手法を用いて検討した。その結果, 両総頸動脈結紮手術や舌刺激の影響による健康状態の変化を把握するために行った体重の測定では,

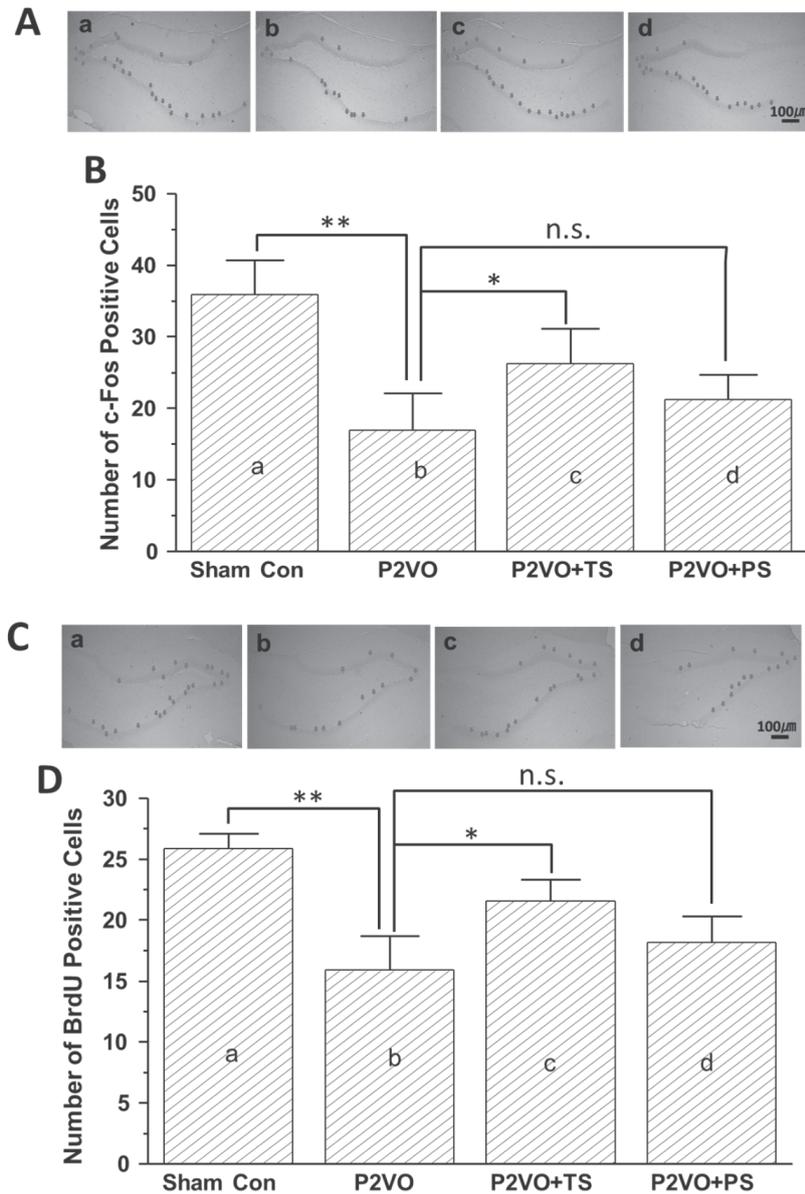


図4. 舌刺激による c-Fos, BrdU 陽性細胞の発現変化

A, B, c-Fos 陽性細胞の変化; C, D, BrdU 陽性細胞の変化; BrdU, Bromodeoxyuridine; Sham Con, Sham Control; P2VO, 脳血管性認知症ラット; TS, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; PS, 1600ng/10 μ l カプサイシン舌刺激; *, P<0.05; **, P<0.01; n.s., no significant; Mean \pm S.E.; n = 6

術後や舌刺激による各群若干の体重変化を示したものの、有意差はみられなかった。動物実験の場合、手術や薬物等が体重の変化に影響を与えることが多くある。本研究でも手術や舌刺激による影響を予測したが、各群若干の体重変化がみられたものの、有意差がなかったことから手術や舌刺激がラットの体調に大きく影響を与えなかったことが確認できた。また、本研究では脳血管性認知症モデルラットに対

する舌刺激が空間学習や作業記憶及び短期記憶に及ぼす影響を評価するため行った試験では、両総頸動脈結紮を行った P2VO 群に対し、両総頸動脈結紮後舌刺激を行った舌刺激群で有意な記憶の改善や向上が認められた。南里ら¹⁰⁾の研究では、両総頸動脈永久結紮ラットを用いて学習能力と行動変化について検討している。その研究では、放射状迷路、水迷路による空間学習課題で試験を試行した結果、非脳

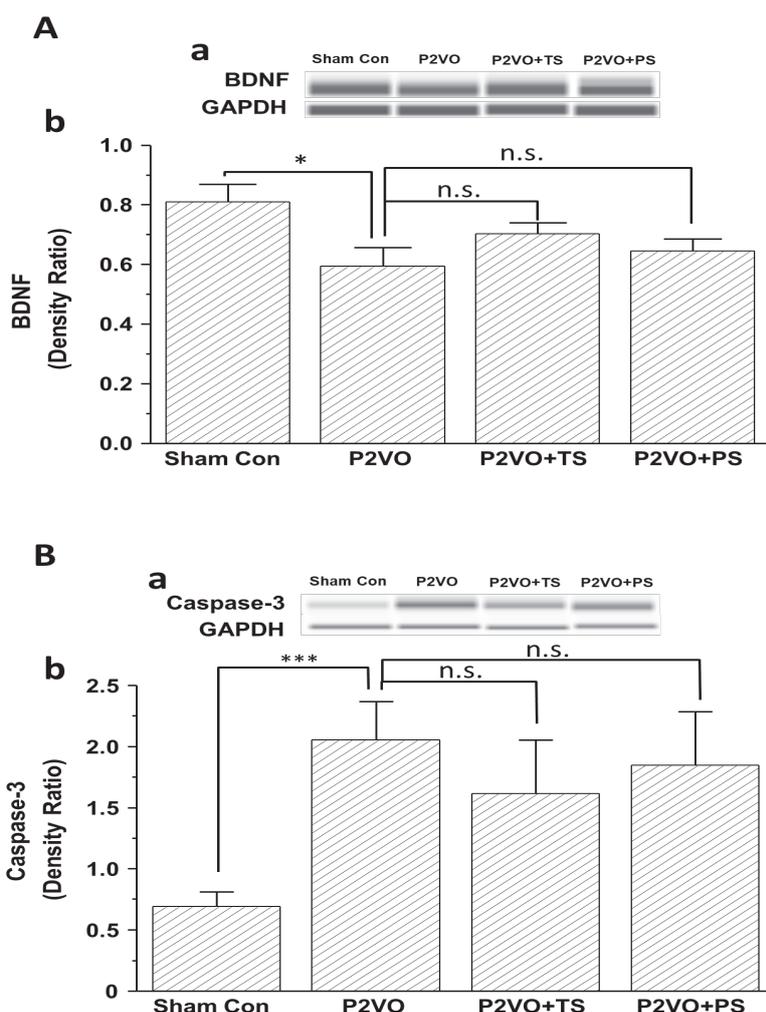


図5. 舌刺激によるBDNF, Caspase-3タンパク質の発現変化

A, BDNFタンパク質の発現量; B, Caspase-3タンパク質の発現量; BDNF, Brain-derived neurotrophic factor. GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Sham Con, Sham Control; P2VO, 脳血管性認知症ラット; TS, 0.73N SW 知覚テスト・触・圧覚舌刺激; PS, 1600ng/10 μ l カプサイシン舌刺激; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$; Mean \pm S.E.; $n = 4$

血管認知症ラットと比較し放射状迷路課題では課題習得にあきらかな遅延が認められている。また、放射状迷路課題を完全に習得させたラットに両総頸動脈永久結紮の処置を行うと、術後1か月であればワーキングメモリーは維持されるが、術後4か月ではあきらかな障害がみられたと報告している。水迷路試験では、非脳血管認知症ラット群と比較しプラットフォーム到達時間の有意な延長、術後3か月後のラットでは、課題達成困難であったことも報告されている。これらの報告は、脳血管障害が行動学習および記憶の障害を引き起こし、日数が経過すると更に行動学習及び記憶の障害は進行するという事

を示唆している。本研究でも Water Maze 試験では、Sham Con 群に対し、P2VO 群では有意に時間の延長がみられたが、P2VO+TS 群および P2VO+PS 群では、時間の有意な短縮がみられた。また、Step Down 試験においても、Sham Con 群に対し P2VO は有意に逃避時間の短縮がみられたが、P2VO+TS 群では有意な逃避時間の延長、P2VO+PS 群では延長傾向がみられたことから、南里ら¹⁰⁾の報告と同様、両総頸動脈結紮により学習や記憶能力に障害が発生した可能性が考えられる。学習や記憶能力障害の一つの原因として、場所細胞は海馬に依存する空間記憶や学習に深く関与すると言われている為^{10, 12)}、「場

所」に働く場所細胞の機能が低下することで空間記憶が障害された可能性が考えられる。

本研究では脳血管障害を起こしたラットに舌への触・圧、痛覚刺激を行った結果、P2VO群でみられた記憶・学習能力低下の改善または改善傾向がみられた。田中ら⁸⁾、行平ら⁹⁾は非脳血管性認知症モデルラットの舌への触・圧覚、痛覚刺激が8方向放射迷路試験、Step Down試験で空間学習・作業記憶、短期記憶低下の改善を報告している。田中ら⁸⁾はSW知覚テストを用いた舌刺激の研究で0.73Nの強度が脳神経の活性化を引き起こし、ラットの記憶・学習能力の向上に寄与したと報告している。行平ら⁹⁾は1600ng/10 μ lカプサイシンの濃度設定が咀嚼行為、舌への刺激等の口腔内刺激と同様にラットの記憶に関連する中枢神経の部分を活性化させ、記憶力の増強に影響を与えることで記憶・学習能力の向上に有意に働いている可能性があるとの報告がある。その伝導路としては舌刺激から三叉神経主知覚枝、視床後内側腹側核、体性感覚野を通り海馬に伝達される可能性を田中ら⁸⁾は報告している。また、末梢刺激が海馬の活性化、成長因子の分泌と細胞新生の変化を起こし、学習能力と記憶の増強に影響を与えた可能性を示している^{13, 18)}。土屋ら¹⁴⁾は咀嚼形態によって海馬の錐体細胞に影響を及ぼすことやYamamotoら¹⁵⁾は、軟らかい餌を与えたラット群より硬い餌を与えたラットの学習能力が向上したと報告している。これらの報告から本研究でのP2VOラットの記憶・学習能力低下は舌への触・圧覚刺激による末梢刺激が体性感覚野に伝わり、海馬の神経細胞の活性化を起こすことによって改善された可能性が示唆される。

しかし、行平ら⁹⁾の報告では、ラットの舌への痛覚刺激が記憶・学習能力の向上に寄与したと報告されているが、本研究の脳血管性認知症モデルラットでは十分な改善効果はみられなかった。これらの結果から、脳血管性認知症等の疾患がある場合、より強い舌への感覚刺激が効果的である可能性が示唆される。従って、今後同様なモデルラットを利用し、より強い刺激での効果検討が必要であると考えられる。

脳神経の活性化については、田中ら⁸⁾行平ら⁹⁾が舌への触・圧覚、痛覚刺激がラットの海馬領域における神経細胞の活性化や細胞新生を促進させたとの報告している。従って、本研究での舌刺激がP2VO

ラットの記憶・学習能力低下改善のメカニズムを明らかにするために細胞活性マーカーであるc-Fosと細胞増殖マーカーであるBrdU、成長因子であるBDNF、細胞死のマーカーであるCaspase-3タンパク質を用いて検討した。その結果、舌刺激を行ったP2VO+TS群、P2VO+PS群でP2VO群に比べ、c-FosとBrdU陽性細胞、BDNFの有意な増加、又は増加傾向、Caspase-3タンパク質の減少傾向が認められた。田中ら⁸⁾行平ら⁹⁾はSW知覚テストを用いた舌への触・圧覚刺激、カプサイシンを用いた舌への痛覚刺激は、ラット海馬におけるc-Fos陽性細胞とBrdU陽性細胞を増加させたと報告している。また、竹本ら¹⁶⁾はインターフェロン誘発性抑うつモデルラットにおいてBrdU陽性細胞数に変化がみられたことを示し、BrdU陽性細胞数の変化は神経細胞新生の変化と相関があり、記憶力改善が起きていることを報告している。金留ら¹⁷⁾は認知機能改善効果が確認された β ラクトリンを用いて海馬内の神経細胞の新生へ及ぼす影響を評価し、海馬歯状回でBrdU陽性細胞数が増加していることを示している。Kimら¹⁸⁾の報告でもラットに対して1日30分のトレッドミル運動を行った結果、ラットの記憶力増強に加え、BrdU陽性細胞やBDNFが有意に増加したと報告している。Zhangら¹⁹⁾は血管性認知症ラットの空間記憶に重大な障害があると報告しており、さらに血管性認知症はBDNFの有意な減少も引き起こしたと報告している。また、反復経頭蓋磁気刺激で海馬を活性化させることで血管性認知症ラットでのBDNF発現増加と認知機能の改善が出来たと報告している。本研究においてもこれらの報告と同様、舌刺激群でc-FosとBrdU陽性細胞の増加、BDNFの増加傾向がみられたことから舌刺激が海馬領域の細胞の活性化、細胞新生、成長因子の発現に影響を与えた可能性が考えられる。

Jun Chenら²⁰⁾は、Caspase-3阻害剤を用いた研究で海馬でのCaspase-3活性低下は神経細胞死とDNA断片化を大幅に減少させることを報告している。これらの報告は、Caspase-3活性が虚血後の神経細胞死と相関しており、脳損傷によるCaspase-3の活性化を低下させることで細胞死の増加を抑制させることができることを示唆している。Zeynab Pirmoradiら²¹⁾は、海馬のCA1領域において、慢性脳虚血モデルではCaspase-3の有意な増加を示し、酸化ストレスがアポトーシスを引き起こすと報告し

ている。本研究でも、Sham Con 群に対し、P2VO 群で有意な Caspase-3 タンパク質の増加が認められ、両総頸動脈の結紮が記憶の中心部である海馬の神経細胞死を促進した可能性、その結果記憶力の低下が P2VO 群でみられた可能性が考えられる。また、P2VO 群でみられた Caspase-3 タンパク質の増加は P2VO+TS 群と P2VO+PS 群で減少傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。脳虚血状態は低酸素ストレス、低グルコースストレスなどによる影響があり²²⁾、BDNF が減少した状態のラットでは、神経保護作用が十分に作用せず Caspase-3 の変化が見られなかった可能性がある。これらの結果から、舌への刺激は細胞死からの神経保護作用より神経損傷後の神経経路活性化に影響を与えることで細胞新生を促進し、その結果記憶力の低下改善効果を示した可能性が示唆される。

今回の研究では、脳血管障害による記憶・学習能力の低下に着目し研究を行ったため、海馬にターゲットを絞った検討のみを行った。従って、今後触・圧覚刺激の伝導路と痛覚刺激の伝導路の違いと舌刺激による脳の細胞活性化部位に関係する検討が必要であると考えられる。また、近年我々が行った非疾患モデルラットを用いた触・圧覚や痛覚刺激では、刺激により海馬内での c-Fos と BrdU 陽性細胞、BDNF 発現の有意な増加やラットの記憶力の有意な増強がみられた⁸⁾が、本実験での脳血管性認知症モデルでは有意な効果がみられなかったことから、より強度が高い刺激での効果検討が必要と考えられる。

V 結語

本研究の結果、舌への触・圧覚、痛覚刺激は脳血管性認知症ラットの海馬を活性化させ細胞新生を促進することで脳血管性認知症による記憶力低下改善に影響を与えた可能性が示唆された。しかし、脳血管障害での細胞死に関しては、神経細胞死の抑制作用による神経保護作用は少ない可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 JP20K11274 と JP23K10420、厚生労働行政推進調査事業費補助金 (21KA2003) 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。

文 献

- 1) 公益社団法人 日本 WHO 協会. 認知症. 2023, https://japan-who.or.jp/factsheets/factsheets_type/dementia/ [2023.08.22. 検索]
- 2) 厚生労働省. 知ることから始めよう みんなのメンタルヘルス総合サイト. 2011, https://www.mhlw.go.jp/mobile/m/kokoro/index_xhtml [2023.08.22. 検索]
- 3) 猪原匡史. 血管性認知症. 日本内科学会雑誌, 109 (8) : 1519-1525, 2020.
- 4) 田中尚文. 認知症リハビリテーションの現状とエビデンス. Jpn J Rehabil Med, 55: 653-657, 2018.
- 5) Nelson L, Tabet N. Slowing the progression of Alzheimer's disease. Neuroviol Aging, 23: 193-209, 2015.
- 6) Kaczmarek KA. The Portable Neuromodulation Stimulator (PoNS) for neurorehabilitation. Scientia Iranica D, 24 (6) : 3171-3180, 2017.
- 7) Chisholm AE, Malik RN, Blouin JS, et al. Feasibility of sensory tongue stimulation combined with task-specific therapy in people with spinal cord injury: a case study. J Neuroeng Rehabil, 11: 96, 2014.
- 8) 田中哲子, 行平崇, 西健太郎, 他. 舌への刺激がラットの記憶力に及ぼす影響. 保健科学研究誌, 15 : 73-82, 2018.
- 9) 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 他. 舌への痛覚, 温・冷覚刺激がラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響. 熊本保健科学大学研究誌, No.17 : 49-58, 2019.
- 10) 南里真人, 渡辺裕司. 慢性脳循環障害モデルとしての両側総頸動脈永久結紮ラットの有用性. 日本薬理学雑誌, 113 (2) : 85-95, 1999.
- 11) Takasaki K, Uchida K, Fujikawa R, et al. Neuroprotective effects of citidine-5 diphosphocholine on impaired spatial memory in a rat model of cerebrovascular dementia.

- Journal of pharmacological sciences, 116 (2) : 232-237, 2011.
- 12) 堀井新. 加齢による感覚器・運動器障害と認知症: 前庭系の関与. 日耳鼻, 125 : 960-965, 2022.
 - 13) 福永貴之, 行平崇, 小牧龍二, 他. 舌への触・圧覚, 痛覚刺激が Valproic acid 曝露発達障害モデルラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響. 保健科学研究誌, (19) : 51-62, 2022.
 - 14) 土屋享弘, 横山隆, 尾関創, 他. 咀嚼刺激の回復が老化促進モデルマウス P 8 における海馬に及ぼす影響. 老年歯学, 30 (2) : 80-90, 2015.
 - 15) 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.
 - 16) 竹本恵子, 大山建司, 工藤耕太郎, 他. インターフェロン誘発性抑うつモデルラットにおける海馬神経細胞新生に対するミルナシプランの効果. 脳と精神の医学, 20 (4) : 355-362, 2009.
 - 17) 金留理奈, 阿野泰久. β ラクトリン高含有ホエイペプチドによる海馬での神経新生への効果. ミルクサイエンス, 68 (3) : 159-166, 2019.
 - 18) 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 rat. Brain Dev, 25 (2) : 109-114, 2006.
 - 19) Zhang XQ, Li L, Huo JT, et al. Effects of repetitive transcranial magnetic stimulation on cognitive function and cholinergic activity in the rat hippocampus after vascular dementia. Neural Regen Res, 13 (8) : 1384-1389, 2018.
 - 20) Chen J, Nagayama T, Jin K, et al. Induction of Caspase-3-Like Protease May Mediate Delayed Neuronal Death in the Hippocampus after Transient Cerebral Ischemia. J Neurosci, 1-17, 1998.
 - 21) Pirmoradi Z, Yadegari M, Moradi A, et al. Effect of berberine chloride on caspase-3 dependent apoptosis and antioxidant capacity in the hippocampus of the chronic cerebral hypoperfusion rat model. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, 22 (2) : 154-159, 2019.
 - 22) 松本昌泰. 脳虚血・再灌流と脳細胞応答. 日薬理誌, 111 : 3-12, 1998.

(令和5年12月21日受理)

Effect of touch/pressure and pain stimulus on the tongue in memory and cell death of cerebrovascular dementia model rats

Takayuki FUKUNAGA, Ryuji KOMAKI, Min-Chul SHIN

Abstract

We reported the activation of the hippocampus and increased neurogenesis in rats through somatosensory tongue stimulation, which may enhance memory and learning. However, the impact of somatosensory tongue stimulation on memory and apoptotic cell death in the cerebrovascular dementia rat model remains unclear. Presently, we investigated the effects of touch/pressure and pain stimuli on memory and apoptotic cell death in the cerebrovascular dementia model rat using behavioral and molecular biological methods. Consequently, compared to the cerebrovascular dementia model rat (permanent 2-vessel occlusion ;P2VO) group, those subjected to tactile and pressure stimulation of the tongue (P2VO+TS group) exhibited improved memory, and there was a significant increase or tendency to increase in BrdU and c-Fos-positive cells and BDNF. However, the cerebrovascular dementia model rats subjected to nociceptive stimulation of the tongue (P2VO+PS group) exhibited significantly improved memory during the water maze test, while no significant differences were observed in other factors. In the study of neuronal cell death, a significant increase in Caspase-3 protein was found in the P2VO group; however, a slight inhibition of expression was observed in the tongue stimulation group and no significant difference was observed. Based on these results, we suggest that tongue stimulation with touch/pressure and pain activates the rat's hippocampus, neuronal differentiation, and growth factor; thereby, improving memory and learning abilities in cerebrovascular dementia model rats. However, it was suggested that the tongue stimulation may have a small effect on improving memory decline because of the neuroprotective action from cell death in cerebrovascular dementia. Eventually, it is necessary to further examine the different intensities of pain stimuli in disease models.

Keywords: cerebrovascular dementia, apoptotic cell death, tongue stimulation, rat