

[原著]

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

行 平 崇¹⁾²⁾ 小 牧 龍 二¹⁾³⁾ 福 永 貴 之¹⁾⁴⁾
田 中 哲 子¹⁾ 申 敏 哲^{1)*}

Effects of pain, warmth, and cold on rat's memory and learning ability via tongue stimulation

Takashi YUKIHIRA, Ryuji KOMAKI, Takayuki FUKUNAGA,
Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN

要旨

舌の味覚受容については多くの研究がされているが、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。近年、我々は舌への触・圧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した可能性を報告した。しかし、舌への痛覚, 温・冷覚のみの刺激と記憶力と学習能力に関する詳細な報告は少なく、未だ明らかではない。そこで、本研究では舌への痛覚, 温・冷覚刺激がラットの記憶と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、痛覚刺激群でコントロール群に対し記憶力の増強が認められたが、温・冷覚刺激群では記憶力の若干の増減がみられたものの有意差は認められなかった。海馬でのc-Fos, BrdU陽性細胞の検討でも、痛覚刺激群でコントロール群に対し、有意な増加が認められたが、温・冷覚刺激群では若干の増加がみられたものの有意差はなかった。これらの結果から、舌への痛覚刺激は、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。しかし、温・冷覚刺激に関して、今回の研究では有意差は見られず、今後刺激の強度について検証していく必要があると考えられる。

キーワード：舌刺激, 痛覚, 温・冷覚, 記憶力, ラット

I. はじめに

発達障害は何らかの要因によって中枢神経系の発達の遅延や障害を起し、生まれつきの認知やコミュニケーション, 社会性, 学習, 注意力等の能力に偏りや問題を生じることである。現代社会においては、発達障害が教育や社会生活上の大きな問題となっており、早期発見と治療が重要視されている。これらの治療方法としては、薬物治療や、感覚統合

(sensory integration) を助け、脳を刺激する感覚統合療法の効果が良く知られている¹⁻³⁾。Kimら⁴⁾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と発達に影響を与えることを報告しており、視聴覚等を介した末梢刺激が脳の活性化に効果があることを示唆している。近年、我々はフィラメントによる舌への触・圧覚刺激が海馬領域の細胞増殖を引き起こし、記憶, 学習能力の向上に影響を与える可能性を報告した⁵⁾。舌は体性

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 ²⁾ 帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

³⁾ リハビリテーションセンター 熊本回生会病院 ⁴⁾ くまもと南部広域病院

*責任著者：karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

感覚と味覚の2種類の感覚情報を受容するとともに、舌下神経を介し精巧かつ複雑な運動を行い、咀嚼、嚥下、発語等の重要な役割を担っている。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1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。美甘⁶⁾はラットの舌に機械的刺激、NaCl、冷水刺激を行ったところ三叉神経の第三枝である舌神経に機械的刺激、冷水刺激に神経応答が見られたことを報告している。これらの報告では、様々な舌への刺激による影響を検討しているが、痛覚・温冷覚のみの刺激が中枢神経系の発達や記憶力に及ぼす影響については殆ど報告が無く、未だ解明されていない。そこで、本研究では、舌への痛覚、温・冷覚刺激がラットの記憶・学習能力に及ぼす影響を明らかにすることで、舌から脳に伝えられる体性情報の意義と臨床応用への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100~150g：5週齢）を用いて痛覚刺激群では①コントロール群（Con, n=6）、②1ng/10 μ l カプサイシン痛覚刺激群（1ng CAP, n=6）、③100ng/10 μ l カプサイシン痛覚刺激群（100ng CAP, n=6）、④1600ng/10 μ l カプサイシン痛覚刺激群（1600ng CAP, n=6）に分け、温・冷覚刺激群では⑤コントロール群（25~26 $^{\circ}$ C）（Con, n=6）、⑥温覚刺激群（40~43 $^{\circ}$ C）（43 $^{\circ}$ C Warm, n=6）、⑦冷覚刺激群（10~11 $^{\circ}$ C）（11 $^{\circ}$ C Cold, n=6）に分け、舌への刺激が中枢神経に及ぼす影響を調べた。カプサイシン濃度の設定に関してはSakuradaら⁷⁾の報告を参考に予備実験を実施して設定した。ラットは市販の飼料（CE-2, 日本クレーア）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 $^{\circ}$ 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16-005, 動18-04）。

2. 舌刺激法

カプサイシンによる舌の痛覚刺激には鼻鏡を用いて開口させ、1日に1回、1ヶ月間連続で行った。

痛覚刺激群ではそれぞれの濃度のカプサイシン水溶液を10 μ lずつ、ピペットを用いて舌尖部及び舌中心部に落として刺激を行った。痛覚刺激のコントロール群では、鼻鏡で開口し10 μ lの蒸留水を投与した。温覚刺激群には鼻鏡を用いて開口させ、41~43 $^{\circ}$ Cに加温した特殊ガラス棒で舌を直接刺激した。冷覚刺激群では鼻鏡で開口させ、10~11 $^{\circ}$ Cに加温したガラス棒を用いて舌の刺激を行った。温・冷覚刺激のコントロール群に対しては室温に近い25~26 $^{\circ}$ Cに加温したガラス棒を用いて舌の刺激を行った。舌刺激に関してはいずれの実験においても10秒 \times 3回実施した。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（Radial arms maze）

ラットの空間記憶と作業記憶の変化を評価するために8方向放射状迷路試験を実施した。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。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。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の白い蓋を設置して実験を行い、8本のアームのうち4本のみ水を入れた蓋を、残りの4本には水を入れない蓋を設置した。また実験に際しては、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5分間とした。

4. Step-Down 試験

舌刺激による学習能力、記憶力に対する影響を検討するため、アクリル箱（長さ38cm、高さ21cm、奥行き23cm）を用い、底面には25Vの電流が流れている鉄棒を設置した。箱内に高さ5cmの木製の避難場所を設置し、避難している時間（最大10分）で学習能力・記憶力を評価した⁸⁾。

5. 免疫組織化学的検査

1ヶ月後の行動実験終了後、3種混合麻酔薬(0.5ml/100g)にて麻酔後に腹部を切開した。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脳組織を4%Paraformaldehyd (PFA)に浸漬し組織を固定後、パラフィン包埋し、マイクロトームを用い、6 μm の厚さで薄切した組織標本を作成した。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)の免疫染色を行い、顕微鏡用デジタルカメラ (OLYMPUS: BX51)によりパソコンに取り込み(100倍の写真を撮影)、cell Sens Dimension (Ver 1.7, OLYMPUS)を用いて陽性細胞の数を計測した。

6. 酸化ストレス・抗酸化力測定

最終日の行動実験実施後、採血を行った。血液試料は遠心分離し、取り出した血清を用いて、採血後72時間以内に酸化ストレスと抗酸化力の測定を行った。測定機器はフリーラジカル解析装置FREE CARRIO DUO (WISMERLL 社)を用いた。測定キットは、酸化ストレスの測定にd-ROMsテスト(正常範囲:200から300 U.CARR) (Diacron 社製)、抗酸化力の測定にBAPテスト(最適値:2200 $\mu\text{M/L}$ 以上) (Diacron 社製)を使用した。d-ROMsテストでは、pH4.8の酢酸緩衝液キュベットを37 $^{\circ}\text{C}$ まで加温し、保温したキュベットに血清20 μl を入れた後、呈色液クロモゲン(N,Nジエチルパラフェニレンジアミン)を20 μl 入れ混合し、光度計に入れて活性酸素・フリーラジカルによる代謝物であるヒドロペルオキシドの量を測定した。単位はU.CARRが用いられ、1 U.CARR = 0.08 mg/100 mlH₂O₂になる。BAPテストは、チオシアン酸塩誘導体を含む試薬入りのキュベットを37 $^{\circ}\text{C}$ まで加温する。次に三価鉄塩を含む試薬を50 μl 滴下、混合し赤く呈色させる。その後光度計で三価鉄イオン濃度を測定後、三価鉄イオンが呈色している試薬に血清を10 μl 入れて混合すると血清中の抗酸化物質の作用で二価鉄イオンに還元され、脱色される。その色の变化を光度計で計測し、血清の還元力を評価した。

7. 統計処理

データは、平均 \pm 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1は、8方向放射状迷路試験の所要時間とWorking memory error (WME)を示す。事前学習時の所要時間と比べ1か月後の相対的な所要時間では痛覚刺激群のCon群(3.28 \pm 0.28)に対し、1ng CAP群(3.48 \pm 0.44)、100ng CAP群(2.88 \pm 0.42)では有意差はみられなかったが、1600ng CAP群では1.86 \pm 0.28と有意な時間の短縮が認められた(図1 Aa, $P < 0.05$)。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con群(25 $^{\circ}\text{C}$)(2.45 \pm 0.34)に対し、43 $^{\circ}\text{C}$ Warm群(2.77 \pm 1.35)、11 $^{\circ}\text{C}$ Cold群(3.6 \pm 0.82)共に有意差はみられなかった(図1 Ab)。WMEに関して、痛覚刺激群のCon群(3.00 \pm 0.73)に対し、1ng CAP群(2.17 \pm 0.82)、100ng CAP群(2.16 \pm 0.82)では有意差は認められなかったが、1600ng CAP群では0.33 \pm 0.82 ($P < 0.05$)と有意なWEMの減少が認められた(図1 Ba)。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con群(25 $^{\circ}\text{C}$)(1.35 \pm 0.53)に対し、43 $^{\circ}\text{C}$ Warm群(0.94 \pm 0.38)、11 $^{\circ}\text{C}$ Cold群(0.83 \pm 0.20)共に有意差はみられなかった(図1 Bb)。

図2は、全選択数とReference memory error (RME)を示す。全選択数では痛覚刺激群のCon群(13.17 \pm 1.67)に対し、1ng CAP群(12.33 \pm 1.92)、100ng CAP群(11.83 \pm 1.37)では有意差はみられなかったが、1600ng CAP群では9.66 \pm 0.91と有意な全選択数の減少が見られた(図2 Aa) ($P < 0.05$)。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con群(25 $^{\circ}\text{C}$)(12.98 \pm 1.34)に対し、43 $^{\circ}\text{C}$ Warm群(14.11 \pm 1.1)、11 $^{\circ}\text{C}$ Cold群(13.21 \pm 0.98)共に有意差はみられなかった(図2 Ab)。RMEについては、各群間で有意差は認められなかった(図2 B)。

2. Step-Down 試験

Step-down試験を用いて短期記憶に対する影響を検討した。痛覚刺激群のCon群(120 \pm 9.59)と比

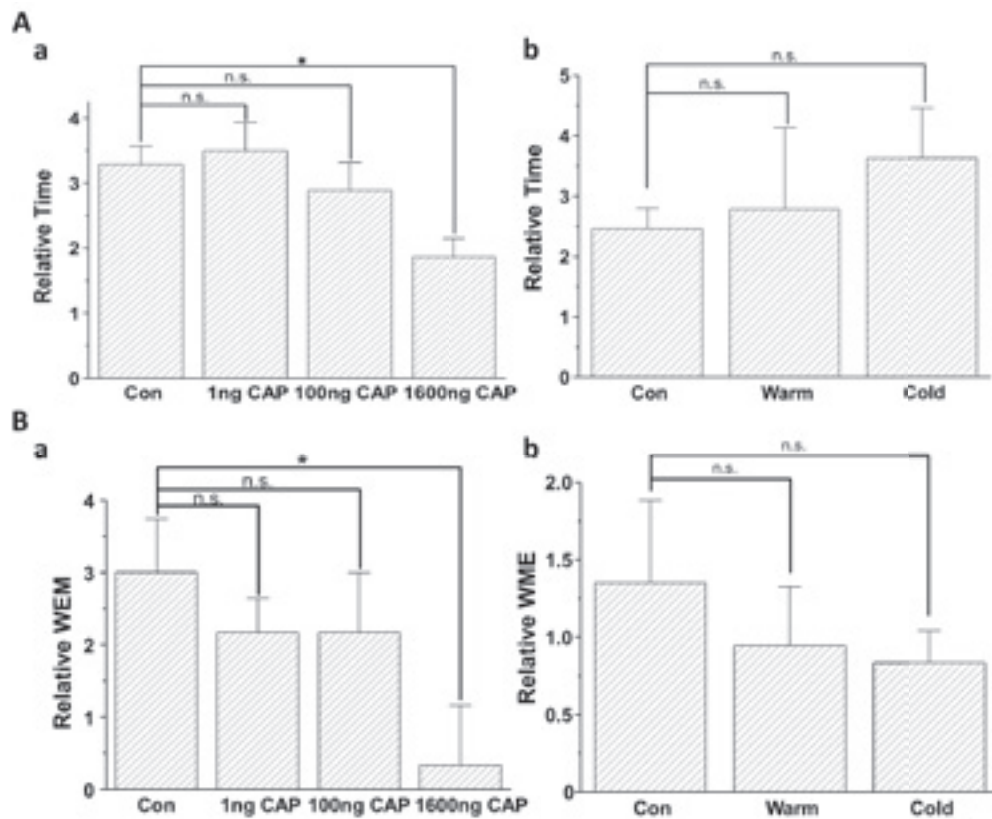


図1. 8方向放射状迷路試験の所要時間と Working memory error (WEM)

Con, control; CAP, Capsaicin; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.E.

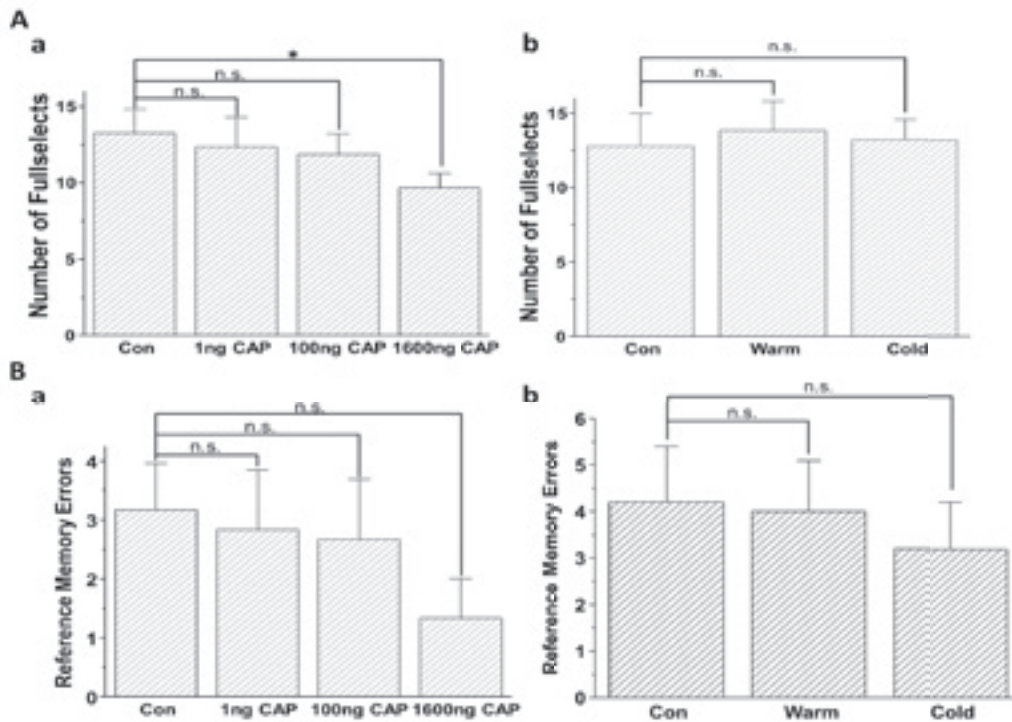


図2. 8方向放射状迷路試験の全選択数と Reference memory error (RME)

Con, control; CAP, Capsaicin; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.E.

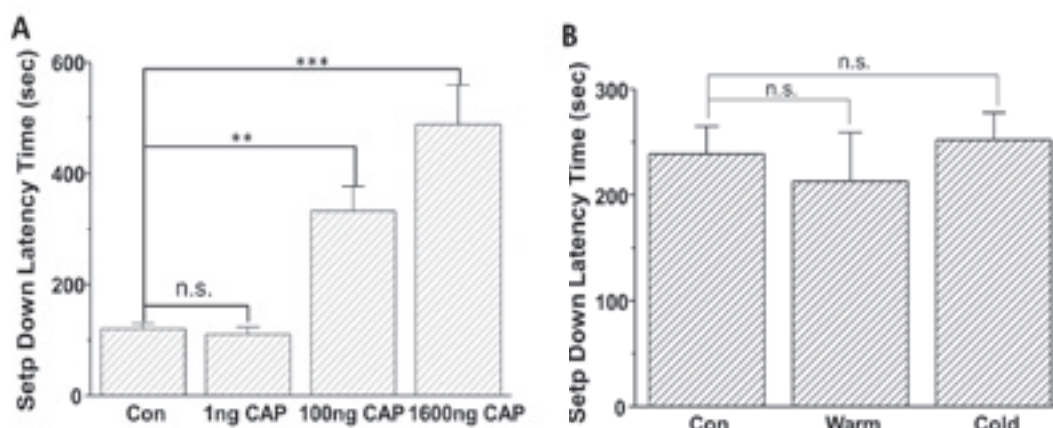


図3. Step-down 試験による短期記憶の評価

Con, control; CAP, Capsaicin; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ns, no significant; Mean \pm S.E.

較して1ng CAP 群 (110.67 ± 12.13) では有意差は認められなかったものの、100ng CAP 群 (331.67 ± 44.98 ; $P < 0.01$), 1600ng CAP 群 (487.67 ± 71.52 ; $P < 0.001$) においてそれぞれ逃避時間の有意な増加が認められた (図3A)。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con 群 (25°C) (238.75 ± 26.12) に対し、43 °C Warm 群 (213 ± 45.70), 11 °C Cold 群 (252 ± 25.74) 共に有意差はみられなかった (図3 B)。

3. 免疫組織化学染色を用いた c-Fos 陽性細胞の数

舌刺激による細胞の活性化を測定するため、記憶の中枢である海馬で細胞活性化マーカーである c-Fos 陽性細胞を計測した。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、リン酸化等が起こることで細胞の反応が変化すると考えられている。痛覚刺激群の Con 群 (14.63 ± 2.64) と比較して1ng CAP 群 (18.61 ± 3.14) では有意差は認められなかったものの、100ng CAP 群 (28.6 ± 2.16 ; $P < 0.05$), 1600ng CAP 群 (40.43 ± 6.34 ; $P < 0.01$) においてそれぞれ c-Fos 陽性細胞の有意な増加が認められた。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con 群 (25°C) (15.35 ± 3.25) に対し、43°C Warm 群 (19.4 ± 3.15), 11°C Cold 群 (20.5 ± 3.52) 共に増加傾向にあったものの有意差はみられなかった。

4. 免疫組織化学染色を用いた BrdU 陽性細胞の数

Bromodeoxyuridine (BrdU) 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。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。その結果、痛覚刺激群の Con 群 (16.5 ± 2.65) と比較して1ng CAP 群 (14.53 ± 4.87), 100ng CAP 群では有意差は認められなかったものの、1600ng CAP 群 (30.54 ± 7.65) において BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた ($P < 0.05$)。しかし、温・冷覚刺激群に関しては、Con 群 (25°C) (16.51 ± 3.25) に対し、43°C Warm 群 (21.5 ± 5.47), 11°C Cold 群 (19.6 ± 4.84) 共に増加傾向にあったものの有意差はみられなかった。

5. 酸化ストレス・抗酸化力測定

酸化ストレスや抗酸化酵素は細胞の増殖に影響を与えることが報告されている⁹⁾。従って、舌刺激による海馬の神経細胞増殖と酸化ストレス、抗酸化力の関連性を検討するため、血清を用いて d-ROMs テスト、BAP テストを行った。酸化ストレスと抗酸化力に関しては、痛覚刺激群、温・冷覚刺激群共に有意差はみられなかった。

IV. 考察

本研究では、舌への痛覚、温・冷覚刺激がラットにおける記憶力と学習能力に及ぼす影響について、行動学的手法、免疫学的手法を用いて検討した。そ

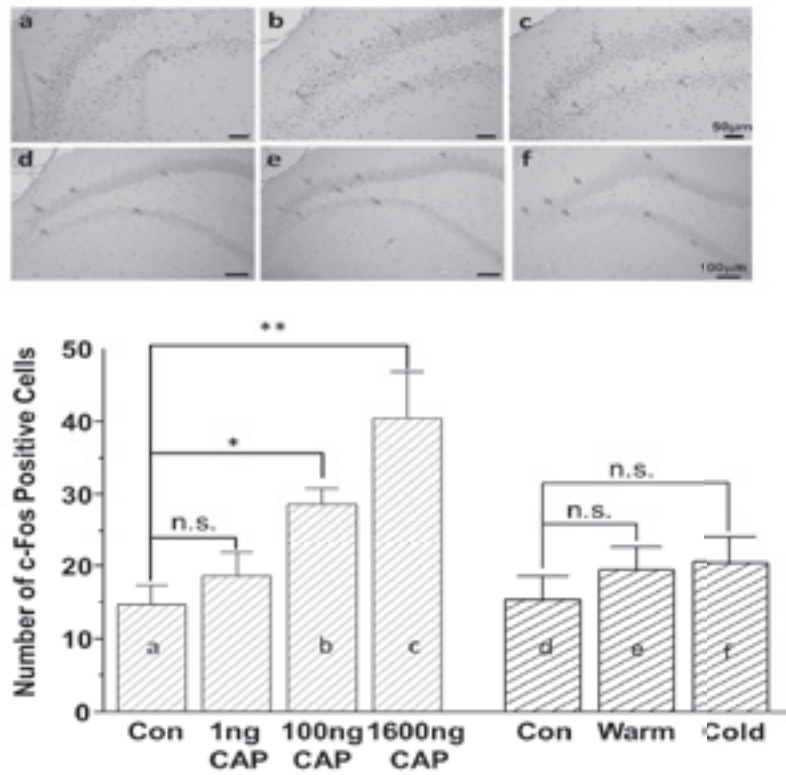


図4. 舌刺激による c-Fos 陽性細胞の発現変化

Red arrow indicates the c-Fos positive cells. Con, control; CAP, Capsaicin; *, P<0.05; **, P<0.01; ns, no significant; Mean ± S.E.

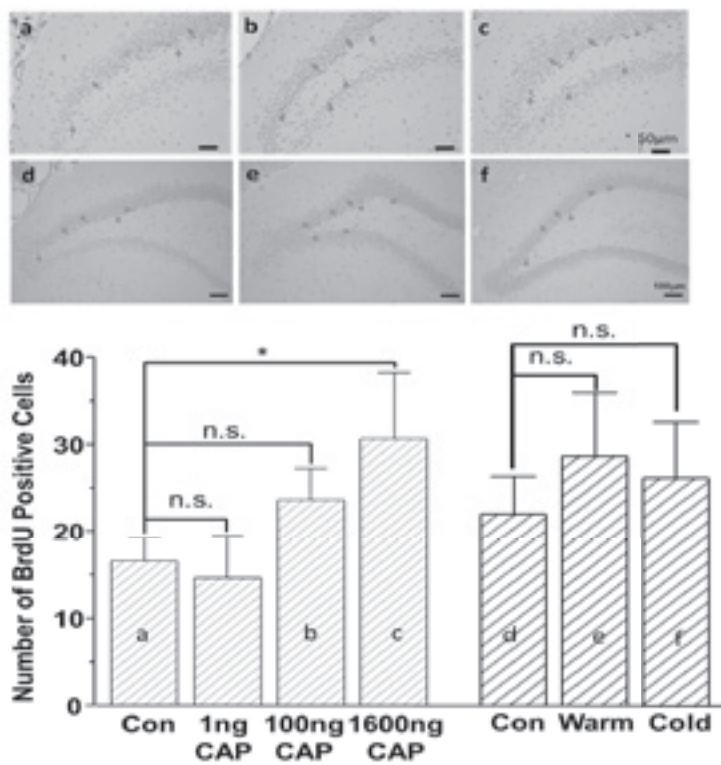


図5. 舌刺激による BrdU 陽性細胞の発現変化

Red arrow indicates the BrdU positive cells Con, control; CAP, Capsaicin; *, P<0.05; ns, no significant; Mean ± S.E.

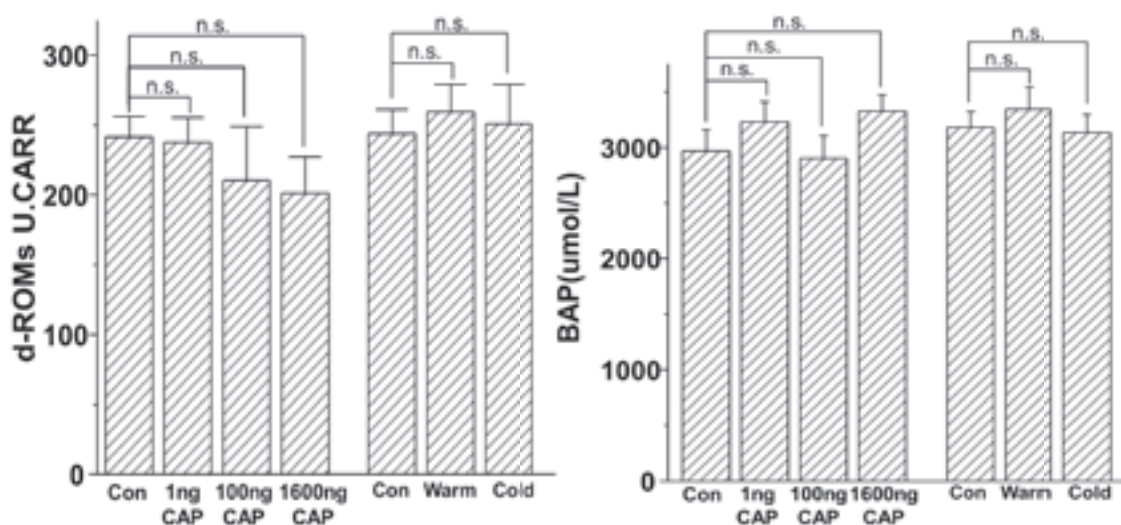


図6. 舌刺激による酸化ストレスと抗酸化力の変化

Con, control; CAP, Capsaicin; ns, no significant; Mean ± S.E.

の結果, 8方向放射状迷路試験においては, 蒸留水舌刺激群と比較し, 1ng, 10ng CAP 刺激群では所要時間と WME での有意差はみられなかったが, 1600ng CAP 刺激群では所要時間の有意な短縮と WME の有意な減少が認められた。しかし, 温・冷覚刺激に関しては若干の増減がみられたものの有意差はなかった。Yamamoto ら¹⁰⁾ 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おり, 田中ら⁵⁾ は舌への機械的刺激が8方向放射状迷路試験でラットの記憶力を増強させたと報告している。また, Step-Down 試験を用いた短期記憶に及ぼす影響の検討に関して, 温・冷覚刺激群では有意差が認められなかったものの, 100ng, 1600ng CAP 刺激群で逃避時間の有意な増加が認められた。Fukushima ら¹¹⁾ は成長期のラットに粉末の餌を与え続けた群と, 固形の餌を与えた群とを暗室と明室を用いた受動回避試験によって比較検討した結果, 潜伏時間の有意な減少が見られたと報告しており, 田中ら⁵⁾ は, 舌への触・圧覚刺激により Step-Down 試験での逃避時間の延長を報告している。Umeda¹²⁾ は, 成熟ラットの片側臼歯を抜歯した臼歯喪失モデル群は健常ラット群よりも8方向放射状迷路試験の学習成績が低下したと報告している。これらの結果から, 本実験でのカプサイシンの効果は咀嚼行為, 舌への刺激等の口腔内刺激のように, 舌への痛覚刺激が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た可能性も考えられる。しかし, 舌への温・冷覚

刺激で記憶力の増強が有意にみられなかったことは温・冷覚刺激が記憶に関連する脳神経の活性化を引き起こすまでの刺激には至らなかった可能性が考えられる。加えて, 温・冷覚刺激群で一部記憶力や学習能力の若干の増強がみられたのは田中ら⁵⁾ の報告のように, ガラス棒の刺激自体が舌への触・圧覚刺激となった可能性が考えられる。

舌への痛覚, 温・冷覚刺激がラットの海馬領域における神経活性化や細胞新生に及ぼす影響を, 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 を用いて検討した。その結果, c-Fos 陽性細胞数の変化に関して, 1ng CAP 群, 温・冷覚刺激群ではそれぞれの Con 群と比較して有意な増加は見られなかったが, 100ng CAP 群, 1600ng CAP 群では有意な増加を示した。また BrdU 陽性細胞においては1ng CAP 群, 100ng CAP 群で若干の増加がみられたものの有意差はみられず, 温・冷覚刺激群においても同様に有意差は認められなかった。しかし, 1600ng CAP 群では有意な増加がみられた。Zhang ら¹³⁾ は脊椎骨折モデルラットにおいて痛みは海馬における c-Fos 陽性細胞を減少させると報告している。また, Funahashi¹⁴⁾ らは強い歯髄の痛み刺激が海馬の c-Fos 陽性細胞の発現を有意に減少させたと報告している。しかし, カプサイシンを用いた今回の舌への痛覚刺激は海馬領域の c-Fos 陽性細胞を有意に増加させるという結果を得たことから, Zhang ら¹³⁾ や Funahashi ら¹⁴⁾ の報告にある c-Fos 陽性細胞の発現抑制は, 我慢出来ない末梢の強い有

害な痛み刺激が、海馬形成領域の阻害回路を活性化させることによって引き起こされた可能性が考えられる。硬い餌による口腔内のマイルドな刺激の場合、脳室下帯での c-Fos 陽性細胞, BrdU 陽性細胞を増加させたとの報告¹⁵⁾があり、同様に田中ら⁵⁾も SW 知覚テストを用いた舌への触・圧覚刺激は、ラット海馬における c-Fos 陽性細胞を増加させたと報告している。これらの結果は、末梢神経に対する痛覚刺激の強度が中枢神経系の活性化または抑制を引き起こす可能性を示唆している。今回の温・冷覚の刺激にあたっては温覚では41~43度、冷覚では10~11度に加温したガラス棒にて舌に対する直接刺激を行った。c-Fos 陽性細胞, BrdU 陽性細胞ともに優位な増加は見られなかったものの、若干の増加傾向を示しており、これはガラス棒による触・圧覚刺激が舌に加わったための変化である可能性も考えられる。熱刺激に関して西上ら¹⁶⁾は、43度以上の熱刺激が加わった際には侵害受容線維であるポリモーダル受容器が反応すると報告している。また、小松ら⁸⁾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。これらの報告から、今回、コントロール群と比較して有意差が得られなかった要因として刺激強度の不足も考えられる。本実験で使用した温度刺激は痛覚刺激にならない範囲の温度を使用している。Yamada ら¹⁷⁾は口蓋粘膜での感覚点の密度は皮膚と同様に痛覚が最も高く、以下触覚、冷覚、温覚の順であったと報告している。また、裕¹⁸⁾によると、体表皮膚の温点は1 cm²あたり1~4個も存在しているが、口腔粘膜になると1個見つけるのがやっとであり、口腔内は温熱刺激に対して体表よりも極めて鈍感であると報告している。今回用いた温・冷覚刺激では有意差は認められなかったため、温・冷覚刺激は体性感覚の中でも弱い刺激であり、感覚受容器が少ないことから、舌への温・冷覚刺激は脳への影響が小さい可能性も考えられる。従って、今後はこの侵害受容線維を活性化させる程度の温・冷覚刺激の刺激強度についても検証していく必要があると考えられる。

酸化ストレス、抗酸化力に関して、いずれの群間においても有意差を認めるには至らなかった。酸化ストレスは脳の老化と海馬における炎症と関連しており、海馬における慢性炎症はテロメアの短縮など神経新生に影響を及ぼすとされ、抗酸化酵素の活性

を高めることで、抗酸化効果を発揮するとされている⁷⁾。今回の刺激方法、刺激強度において、有意な抗酸化力の増強は認められなかったが、舌の感覚は体性感覚野でも多くの範囲を占めており、今後、更に様々な濃度や刺激強度を検討することによって異なる結果を得られる可能性も考えられる。

舌への温・痛覚刺激は三叉神経の感覚枝から視床後内腹側核を通り、体性感覚野に伝えられるが、今回は記憶・学習能力に着目して研究を行ったため、海馬にターゲットを絞った検討のみを行った。今後、細胞新生の増加量やシナプスの発火等について領域、伝導路別の検討も必要となると考えられる。また、細胞の分裂や成長に関与する脳由来神経栄養因子 (BDNF: Brain-derived neurotrophic factor) やインスリン様成長因子 (Insulin-like growth factors: IGF) などの成長因子における検討も必要と考えられる。今回の研究では、カプサイシンによる舌への痛覚刺激が、記憶と学習能力を増強させる positive な刺激となり得る可能性を示唆する結果を得た。しかし、強度の異なる痛覚刺激によって海馬の細胞新生を阻害した negative な痛覚刺激の報告も多く存在している^{11, 12)}。本研究では、舌への41℃~43℃の温覚刺激と10~11℃の冷覚刺激を行ったが、先行研究での触・圧覚、痛覚刺激に比べて優位な結果は得られなかった。温覚刺激を45℃以上、冷覚刺激を10℃以下の侵害性熱刺激を舌に与えた場合、本研究より優位な結果が得られると考えられるため、今後、更に様々な濃度や刺激強度を検討することによって positive な効果と negative な効果とが転換する境界を調べることも、また、より positive な効果が得られるカプサイシン濃度の検討や痛覚刺激に温・冷覚刺激を組み合わせた侵害性熱刺激をラットの舌に与えた場合の記憶に及ぼす影響の検討も必要である。これらを解明することができれば、発達障害や認知症などによる脳の発達、学習・記憶能力の障害発生子防と改善に繋がる、侵襲が少なくかつ簡便なアプローチの一つとして応用できる可能性を秘めていると考えられる。

V. 結語

本研究では、舌への刺激が海馬等の中枢神経系を活性化させ得る可能性を示唆する結果を得た。これにより、舌への刺激が子供の記憶力と学習能力 (集

中力)などに影響を与える可能性,また高齢者には脳の活性化を誘導することで記憶力の低下予防や認知症等の脳疾患の予防又は治療に寄与できる可能性があると考えられる。

謝辞

本研究は,熊本保健科学大学学内研究費(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) Kendall T, Megnin-Viggars O, Gould N, et al : Management of autism in children and young people,summary of NICE and Scie guidance. BMJ, 347 : f4965, 2013.
- 2) Myers SM, Johnson CP: Managemnt of children with autismspectrum disorders. Pediatrics, 120 : 1162-1182, 2007.
- 3) 岩永 竜一郎: 感覚統合アプローチを生かした支援. 小児科診療, 80 (7) : 833-836, 2017.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 美甘 真: 渋味溶液の舌刺激によるラット舌神経と鼓索神経の応答. 岡山歯学会雑誌, 34 (1) : 1-9, 2015.
- 7) Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The Capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology. 1992 Dec ; 31 (12) : 1279-85.
- 8) 小松偉二, 田端孝義, 林治秀, 他: 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.
- 9) Zhu J, Mu X, Zeng J, et al : Ginsenoside Rg1 prevents cognitive impairment and hippocampus senescence in a rat model of D-galactose-induced aging. PLoS One, 9 (6) : e101291, 2014.
- 10) Yamamoto T, Hirayama A: Effects of soft-diet feeding on synaptic density in the hippocampus and parietal cortex of senescence-acclerated mice. Brain Res, 902 (2) : 255-63, 2001.
- 11) Fukushima-Nakayama Y, Ono T, Hayashi M: Reduced Mastication Impairs Memory Function. J Dent Res, 96 (9) : 1058-1066, 2017.
- 12) Umeda K: Effects of Teeth Loss on Learning and Memory Ability in Adult Rats Part 1 : Influences of Molar - Teeth Lossin Maze Task - Jpn Stomatol Soc, 40 (2) :377-383, 1991.
- 13) Zhang MD, Barde S, Yang T, et al : Orthopedic surgery modulates neuropeptides and BDNF expression at the spinal and hippocampal levels. Proc Natl Acad Sci USA, 113 (43) : E6686-E6695, 2016.
- 14) Funahashi M, He YF, Sugimoto T, et al: Noxious tooth pulp stimulation suppresses c-fos expression in the rat hippocampal formation. Brain Res, 827 (1-2) : 215-220, 1999.
- 15) 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.
- 16) 西上智彦, 柴田政彦: 疼痛および鎮痛の神経メカニズム. Jpn J Rehabil Med 2016 ; 53 : 591-595
- 17) Yamada M, Maruhashi J, Miyake N: The Distribution of sensory spots on the oral mucous membrane. Jpn J Physiol 12 : 328-332, 1952.
- 18) 裕 哲崇: 口腔内の体性感覚の生理学的基盤と科学感覚. Japan Association on Odor Environment Vol. 37, No. 6, 2006.

(令和元年12月18日受理)

Effects of pain, warmth, and cold on rat's memory and learning ability via tongue stimulation

Takashi YUKIHIRA, Ryuji KOMAKI, Takayuki FUKUNAGA,
Tetsuko TANAKA, Min-Chul SHIN

Many studies focus on the relationship between tongue and taste, but not much is known about the tongue's other important somatosensory roles. In our previous paper, we reported that stimulating the rat's tongue with touch and pressure activated the hippocampus and increased neurogenesis, with the possibility of improving memory and learning in rats. However, it is not well known how stimulating their tongue with pain, warmth, and cold could affect their memory and learning ability. In the present study, we investigated the consequences of these stimuli by using behavioral testing and immunostaining. We discovered that stimulating the tongue with Capsaicin (pain) improved spatial memory and learning ability during the radial arms maze and step-down tests. However, stimulating the tongue with warmth and cold showed a non-significant improvement. In addition, c-Fos and BrdU positive cells in the hippocampus increased significantly in the pain tongue stimulation group (compared to the control group) but not in the warmth and cold stimulation group. Based on these results, we suggest that pain activates the rat's hippocampus and neuronal differentiation, and could improve their memory and learning abilities. However, the current study showed no significant difference with temperature stimuli, making it necessary to examine its intensity in the future.

Keywords: tongue stimulation, memory and learning, rat