

[原著]

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

福永 貴之¹⁾²⁾ 行平 崇¹⁾³⁾ 小牧 龍二¹⁾⁴⁾
田中 哲子¹⁾ 上村 太亮¹⁾ 亀山 広喜⁵⁾
申 敏哲^{1)*}

Effect of touch/pressure and pain stimulus on the tongue in memory and learning ability of
valproic acid-induced developmental disorder model rats

Takayuki FUKUNAGA, Takashi YUKIHIRA, Ryuji KOMAKI, Tetsuko TANAKA,
Taisuke UEMURA, Hiroki KAMEYAMA, Min-Chul SHIN

要旨

近年，我々は舌への触・圧覚，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，記憶力の増強に影響を与えた可能性を報告した。しかし，舌への触・圧覚，痛覚のみの刺激が発達障害ラットの記憶力と学習能力に及ぼす影響については詳細な報告はなく，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 Valproic acid (VPA) 曝露発達障害モデルラットにおける記憶力と学習能力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，VPA 曝露発達障害ラット群に対し，VPA 曝露発達障害ラット群に舌触・圧覚舌刺激，痛覚舌刺激を行った群で，8方向放射状迷路試験での所要時間，WME，全選択数の有意な減少，Step-Down 試験では逃避時間の有意な増加が認められた。また，記憶力の中心部である海馬領域における細胞活性は細胞新生と成長因子の検討では，VPA 曝露発達障害ラット群に対し，VPA 曝露発達障害ラットに舌触・圧覚舌刺激，痛覚舌刺激を行った群で，c-Fos, BrdU 陽性細胞，BDNF タンパク質の有意な増加が認められた。これらの結果から，舌への触・圧覚，痛覚刺激は記憶力の中心部である海馬を活性化させ，成長因子の増加や細胞新生を促進させることで，VPA 曝露発達障害ラットの学習と記憶異常の改善に影響を与えた可能性が示唆された。

キーワード：舌刺激，痛覚，VPA 曝露発達障害ラット，触・圧覚，記憶力，ラット

I. はじめに

発達障害は，「自閉症，アスペルガー症候群その他の広汎性発達障害，学習障害，注意欠陥多動性障

害その他これに類する脳機能障害であってその症状が通常低年齢で発現するもの」と定義されている。文部科学省の統計では，教育上の配慮を要する児童・生徒は，通常教育を受けている児童・生徒の

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⁾ くまもと南部広域病院

³⁾ 帝京大学福岡医療技術学部 理学療法学科

⁴⁾ リハビリテーションセンター 熊本回生会病院

⁵⁾ 熊本保健科学大学 保健科学部 医学検査学科

責任著者：karusu94@kumamoto-hsu.ac.jp

6.5%とされているが、これ以外に、特別支援教育に在籍する発達障害の生徒と軽度の発達障害者を加えると約10%になると考えられている。発達障害は、外見では障害の有無に気づきにくい場合がある。特に軽度の障害の場合、本人や周囲からの発見が遅くなることがあると同時に、ストレスへの耐性が低く、就職後も社会適応が困難になることもあり、社会的な支援や工夫が必要になる¹⁾。発達障害の中でも、全般的な知的発達に遅れはないが、聞く・話す・読む・書く・計算するまたは推論する能力のうち特定のものの習得と使用が困難を示す様態を学習障害という。読む、書く、計算することそれぞれが心理学的にみて複雑な過程であり、まだ十分に解明されていない²⁾。

バルプロ酸 (Valproic acid, VPA) は、一般的に抗痙攣薬や鎮静薬として使用されているが、神経発達期に曝露されると生後の脳機能への影響が懸念されている有機化合物である。実際、母体に VPA を投与することで、発達障害でみられる成熟の遅延、体重の減少、運動発達の遅延、社会行動異常、学習障害、記憶障害等を示すモデル動物が得られることが確立されている³⁾。

近年、田中⁴⁾らは、成長期ラットの舌への体性感覚刺激が脳の活性化や記憶・認知能力の増強、発達の促進等に影響を与える可能性を報告している。舌は味覚と体性感覚の感覚情報を受容するとともに、咀嚼、嚥下、発語等舌下神経を介して複雑な運動を担当している。舌の研究に関しては味覚受容について多くの報告がなされているが、もう1つの重要な役割である体性感覚については少ないのが現状である。Utsugiら⁵⁾とTsutsumiら⁶⁾の報告によると、硬い餌を摂取させたラットに対する記憶力テストで、軟らかい餌を摂取させたラットより硬い餌を摂取させたラットで記憶力の有意な強化がみられ、長期間軟らかい餌を摂取させた場合は記憶力の低下や海馬の神経細胞新生が有意に減少することを報告している。これらの報告は、舌への体性感覚刺激が中枢神経に影響を与える可能性を示唆している。近年、我々はフィラメントとカプサイシンによる舌への触・圧覚、痛覚刺激が成長期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、学習能力の向上に影響を与える可能性を報告した⁷⁻⁹⁾。これらの結果は、舌への体性感覚刺激が発達障害等の症状改善に十分効果的である可能

性を示している。しかし、舌のみへの感覚刺激と発達障害の症状改善に関する報告は殆どなく、未だ解明されていない。よって本研究では、舌への体性感覚刺激が Valproic acid (VPA) 曝露発達障害ラット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を目的とした。

II. 対象および方法

1. 実験動物

Wistar 系雄性ラット 5 週齢 (体重約 110 ~ 130 g) を用いて正常群 (Nomal: 6 匹), VPA 曝露発達障害ラット群 (Developmental disorder, DD: 6 匹), バルプロ酸 (Valproic acid, VPA) 曝露発達障害ラット +0.73 N 舌触・圧覚刺激群 (DD+0.73N Von: 6 匹), VPA 曝露発達障害ラット +1600 ng/10 μ l カプサイシン痛覚刺激群 (DD+1600ng Cap: 6 匹) に分け、舌への体性感覚刺激が VPA 曝露発達障害モデルラットに及ぼす影響について検討した。正常ラットは妊娠 9 日目に生理食塩水を、VPA 曝露発達障害モデルラットは 600 mg/kg VPA を 1 ml ずつ投与し、得られた仔ラットを、それぞれ正常ラット、VPA 曝露発達障害ラットとして使用した。動物の飼育および実験は熊本保健科学大学実験規則を遵守した (動16-005, 動19-06)。

2. 舌刺激法

触・圧覚刺激群は、鼻鏡を用いて開口させ、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 0.73 N の SW 知覚テスターを用いて 1 ヶ月間持続的に刺激を行った。痛覚刺激群は 1600 ng/10 μ l 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に落として刺激を行った。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。

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 90 cm 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て実施した。水の設置は、8方向すべての先端に直径3 cm、深さ1 cmの白い蓋を設置し、8本のアームのうち4本のみ水に50 μ l 入れ、残りの4つの蓋には、水を入れずに開始した。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5分間とした。

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

試験

Step-Down 試験では50 cm \times 25 cm \times 30 cm の透明なアクリル製ボックスの右側に5 cm \times 12 cm \times 25 cm の長さのプラットフォームを備え、左側には2 mm 間隔の一連のステンレス鋼棒、直径2 mm が配置されている。実験開始から20秒間は待機時間として、ラットを5 cm の高さのプラットフォーム上に置く。Step-Down 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20 V 電気刺激を与えた。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を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。

5. 免疫組織化学的検査

8方向放射状試験の事前学習から1ヶ月経過した後、8方向放射状迷路試験とStep-Down 試験終了後、3種混合麻酔薬(0.5 ml/100 g, 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、8 μ m の厚さで薄切した海馬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, Abcam)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)を用いて陽性細胞の数を海馬組織標本の左右で計測した⁹⁾。

6. Western Blot 法

凍結したラットの脳は解凍後、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-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。

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. 舌刺激による体重の変化

図1はVPA曝露発達障害ラットに対する舌刺激前を0日目とした一週間ごとの体重の推移を示す。VPA曝露発達障害ラット群では正常ラット群に比べ、生後6週目で10 g程度軽い体重を示したが、最終測定時には、20 g程度まで有意な体重の減少がみられた。しかし、発達障害ラットに舌刺激を行ったラット群に関しては、VPA曝露発達障害ラット群に対し、体重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。

2. 8方向放射状迷路試験 (Radial arms maze test)

VPA曝露発達障害ラットの舌刺激が空間学習・作業記憶の変化に及ぼす影響を測定するために、8方向放射状迷路試験を行った。図2は、8方向放射状迷路試験の所要時間 (A)とWorking memory error (WME) (B)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正常群 (2.1 \pm 0.42)に対し、発達障害群 (4.66 \pm 0.52)で有意

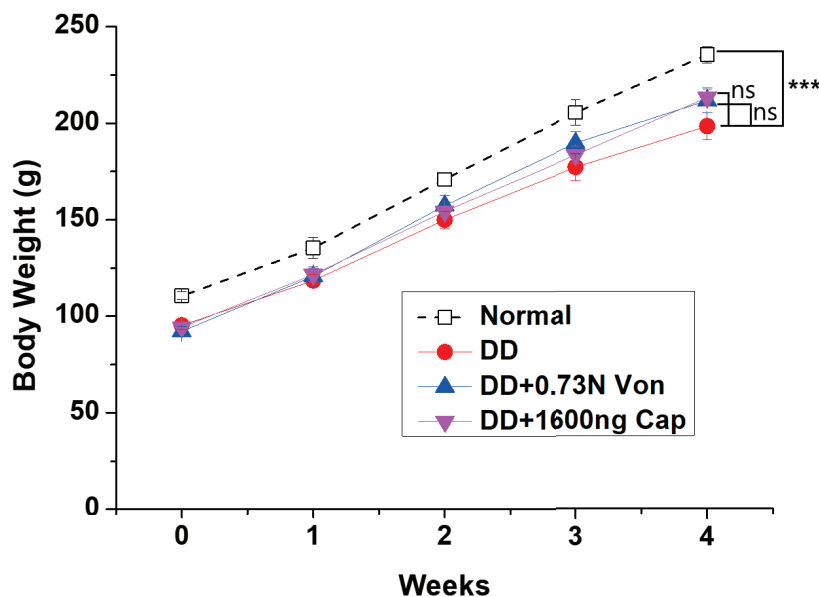


図 1. 舌刺激が発達障害ラットの体重変化に及ぼす影響

Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; ***, $P < 0.001$; ns, no significant; Mean \pm S.E.; $n = 6$

な時間の延長が認められた。しかし、発達障害群でみられた時間の延長は VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群 (3.15 ± 0.51) とカプサイシン痛覚舌刺激群 (3.4 ± 0.6) で有意な所要時間の短縮が認められた (図 2 A)。WME に関しても、正常群 (1.93 ± 0.23) に対し、VPA 曝露発達障害ラット群 (3.3 ± 0.28) で有意な増加が認められた。しかし、痛覚舌刺激群 (2.5 ± 0.33) では、VPA 曝露発達障害ラット群に対して有意な増加の抑制が認められた。カプサイシン痛覚刺激群 (2.7 ± 0.38) に対しては VPA 曝露発達障害ラット群に対し、WME 増加の抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった (図 2 B)。

図 3 は、全選択数と Reference memory error (RME) を示す。全選択数 (図 3 A) と Reference memory error (RME) (図 3 B) に関しては、正常群 (11.43 ± 1.25 , 3.26 ± 0.83) に対し、VPA 曝露発達障害ラット群で全選択数 (15.33 ± 1.33) と RME (5.59 ± 0.95) の有意な増加が認められたが、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群 (12.67 ± 1.28 , 4.33 ± 1.01) とカプサイシン痛覚舌刺激群 (13.09 ± 0.92 , 3.97 ± 0.83) ではその増

加の抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。

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 4 は、Step-down 試験の逃避時間を示す。正常群 (286.24 ± 13.56 sec.) に対し、VPA 曝露発達障害ラット群 (110.14 ± 23.56 sec.) で逃避時間の有意な短縮が認められた。しかし、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群 (190.95 ± 45.35 sec.) とカプサイシン痛覚舌刺激群 (175.33 ± 30.52 sec.) では、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、その増加の抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。

4. 免疫組織化学染色を用いた c-Fos 陽性細胞の数

記憶の中枢部である海馬で舌刺激による細胞の活性化を測定するため、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、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、c-Fos が発現後、様々なカスケード反応が続き、リ

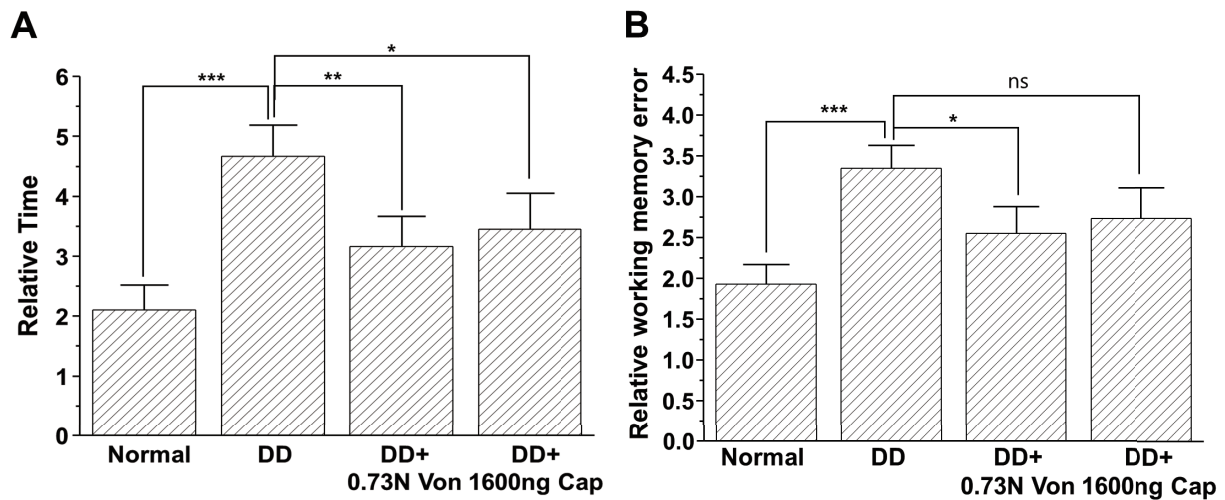


図2. 8方向放射状迷路試験の所要時間と Working memory error(WME)

Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 6

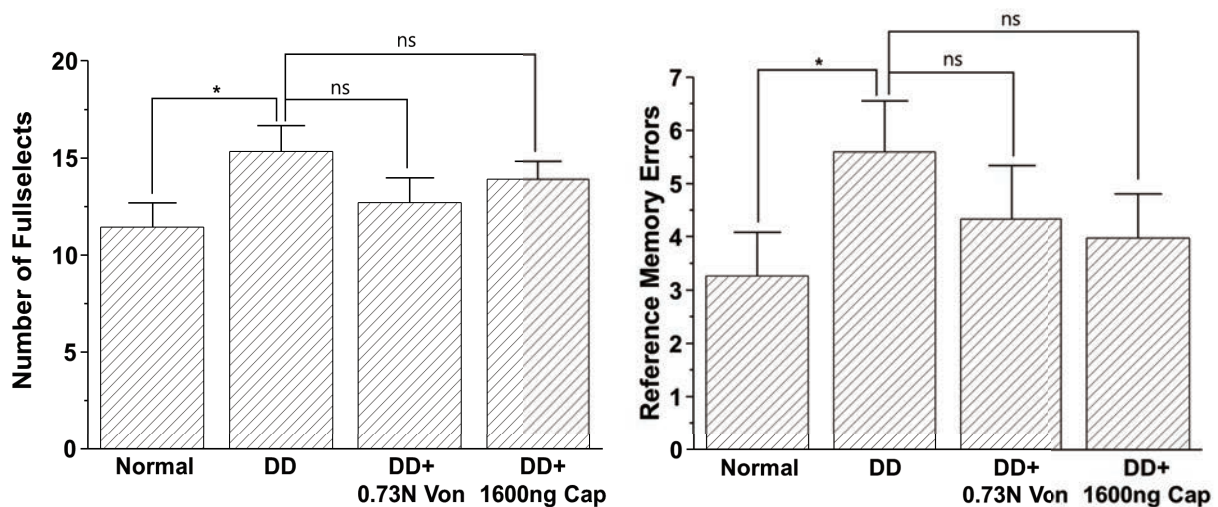


図3. 8方向放射状迷路試験の全選択数と Reference memory error(RME)

Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, P<0.05; **, P<0.01; ***, P<0.001; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 6

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。c-Fos に関しては、正常群 (24.54 \pm 5.65) に対し、VPA 曝露発達障害ラット群 (21.5 \pm 4.65) で若干の c-Fos 陽性細胞の抑制がみられたものの有意差は認められなかったが、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群

(31.34 \pm 3.66) に対しては、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、c-Fos 陽性細胞の有意な増加が認められた。カプサイシン痛覚舌刺激群 (28.5 \pm 4.66) については、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、c-Fos 陽性細胞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)。

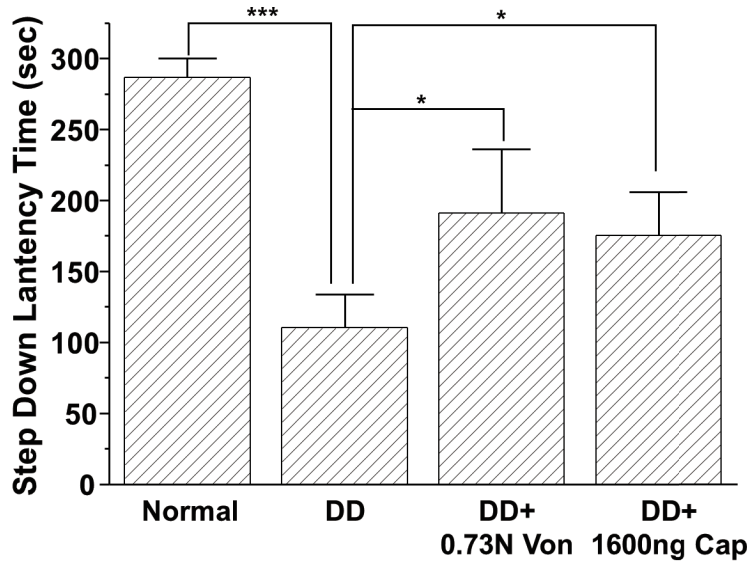


図4. Step-down 試験による短期記憶の評価

Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, P<0.05; ***, P<0.001; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 6

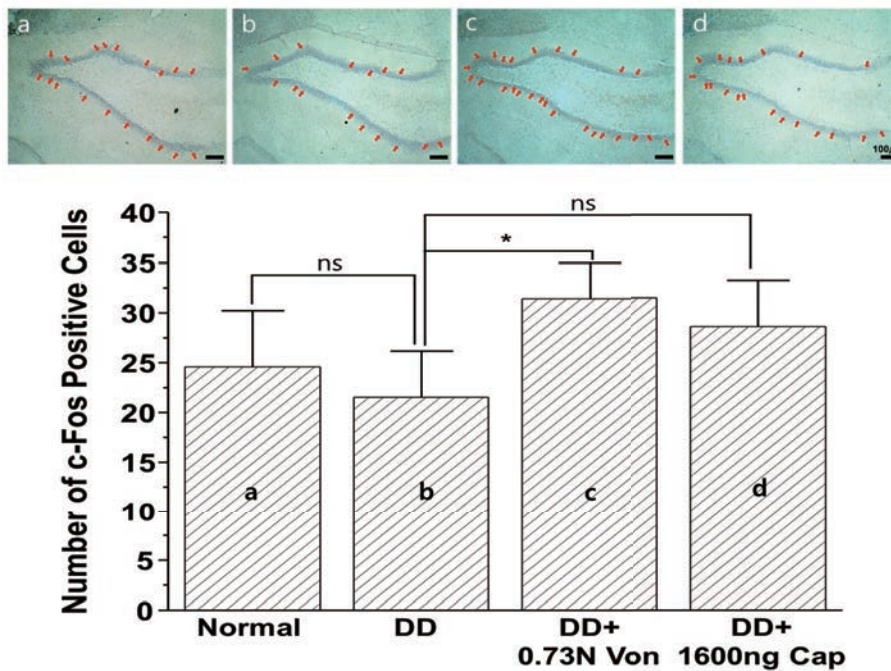


図5. 舌刺激による c-Fos 陽性細胞の発現変化

Red arrow indicates the c-Fos positive cells. Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, P<0.05; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 6

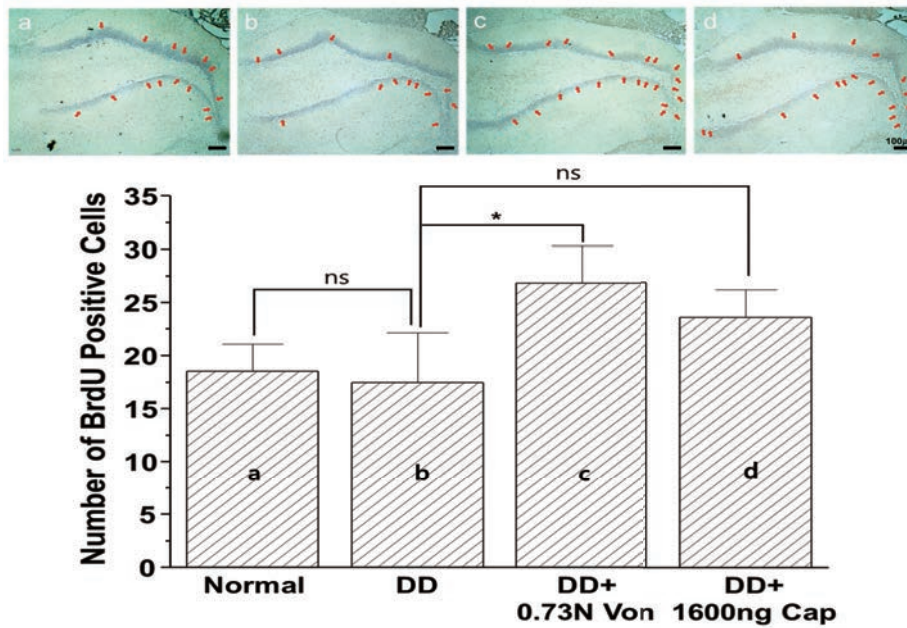


図6. 舌刺激による BrdU 陽性細胞の発現変化

Red arrow indicates the BrdU positive cells. Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 4

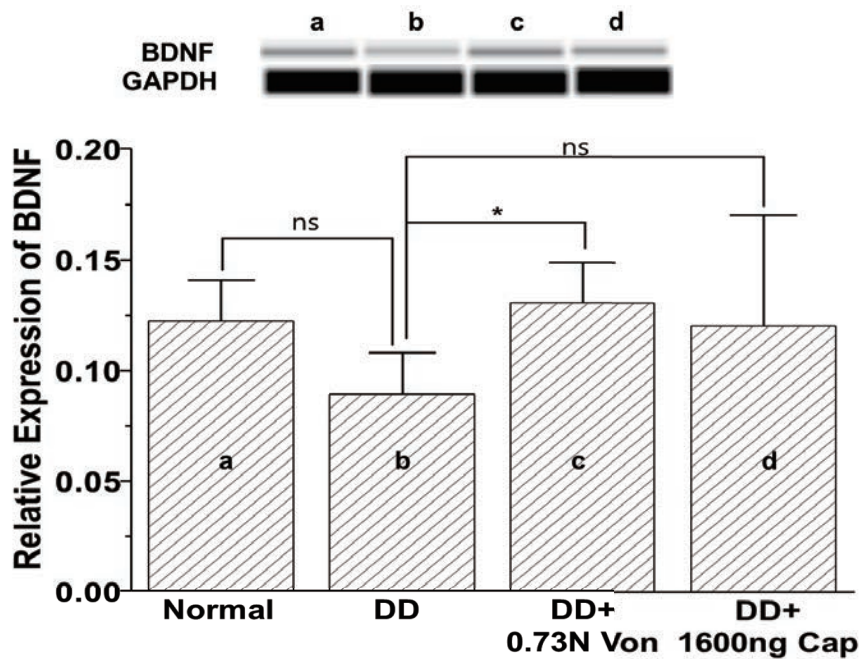


図7. 舌刺激による BDNF タンパク質の発現変化

BDNF, Brain-derived neurotrophic factor. GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Normal, 正常ラット; DD, 発達障害ラット; 0.73N Von, 0.73N SW 知覚テスター触・圧覚舌刺激; 1600ng Cap, 1600ng/10 μ l Capsaicin 痛覚舌刺激; *, $P < 0.05$; ns, no significant; Mean \pm S.E.; n = 4

5. 免疫組織化学染色を用いた BrdU 陽性細胞の数

本研究では、記憶の中樞である海馬での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。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。その結果、BrdU 陽性細胞に関しては、VPA 曝露発達障害ラット群 (17.45 ± 4.66) では正常群 (18.5 ± 2.61) に対し、有意な差は認められなかったが、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群 (26.8 ± 3.47) に対しては、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、BrdU 陽性細胞の有意な増加が認められた。カブサイシン痛覚舌刺激群 (23.5 ± 2.65) に対しては、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、BrdU 陽性細胞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6)。

6. BDNF タンパク質

成長因子である BDNF の変化を海馬で測定した。VPA 曝露発達障害ラット群 (0.09 ± 0.02) では、正常群 (0.12 ± 0.02) に対し、BDNF タンパク質の発現抑制傾向がみられたものの、有意差は認められなかった。VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った触・圧覚舌刺激群 (0.13 ± 0.02) に対しては、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、BDNF タンパク質の有意な発現増加が認められたが、カブサイシン痛覚舌刺激群 (0.12 ± 0.05) に対しては、VPA 曝露発達障害ラット群に比べ、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7)。

IV. 考察

本研究では、舌への触・圧覚、痛覚刺激が VPA 曝露発達障害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。その結果、VPA 曝露発達障害ラットについては、正常ラットに比べ、生後6週目では10 g 程度軽い体重を示し、最終測定時には、有意な体重の減少がみられた。しかし、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行ったラット群に関しては、有意差は認められなかったものの VPA 曝露発達障害ラットと比較して体重が増加傾向にあった。Schneider ら¹¹⁾ や Liu ら¹²⁾ は、ラット胎児を600

mg/kg バルプロ酸 (VPA) に曝露することによって作成された VPA モデルラットは、人間のデータと解剖学的、病理学的、病因的に非常に類似しており、成熟の遅延、体重の減少、運動発達の遅延等がみられたと報告している。しかし、体重に関する Favre ら¹³⁾ の報告では、500 mg/kg VPA に曝露させたラットに対しては曝露させていないコントロール群に比べ、雄ラットで若干体重の変化がみられたが、有意差は認められなかったと報告している。本実験の結果では600 mg/kg VPA に曝露させたラットで体重の減少がみられ、これらの報告と同様な結果が得られたことから体重の減少は VPA による影響である可能性が考えられる。

VPA 曝露発達障害ラットに対する舌刺激が空間学習・作業記憶に及ぼす影響を評価するために行った8方向放射状迷路試験では、正常ラット群と比べ、VPA 曝露発達障害ラット群では有意な所要時間の延長と WME, 全選択数, RME の増加が認められ、短期記憶の試験である Step-Down 試験では逃避時間の有意な減少が認められた。しかし、VPA 曝露発達障害ラットに舌刺激を行った群では、VPA 曝露発達障害ラット群に対し、8方向放射状迷路試験での有意な所要時間の短縮と WME, 全選択数, RME の増加傾向、Step-Down 試験での逃避時間の有意な延長が認められた。Morris water maze test を用いた Hou ら¹⁴⁾ の研究によると、胎児期の VPA 曝露は、海馬と前頭葉の GABAergic GAD67 発現を減少させ、神経ネットワークの形成を損傷させることで、空間の学習や保存に異常をきたした結果として、空間学習と記憶力を低下されたと報告している。また、VPA 曝露ラットでは記憶の獲得が遅延するだけでなく、記憶力の操作の急激な変化にも耐性があることを報告している。Liu ら¹²⁾ の報告でも、記憶力と学習能力テストとして行った Passive avoidance test と Morris water maze test で、コントロール群に対し VPA モデルラット群で記憶力と学習能力の低下がみられたと報告している。さらに、Umka ら¹⁵⁾ はラットの腹腔内に VPA を投与した結果、海馬に依存する空間記憶テストで重大な障害がみられたと報告している。これらの結果から本研究の VPA 曝露発達障害ラットにおける記憶力と学習能力の低下は、VPA 曝露によるものと考えられる、それらの低下が舌刺激により有意に改善されたことを示唆している。

近年、我々は舌への体性感覚刺激がラットの記憶力を増強させたことを報告している。田中ら⁴⁾は、舌への触・圧覚刺激により8方向放射状迷路試験での空間学習と記憶の増強、Step-Down試験での短期記憶が増強されたと報告している。また、行平ら¹⁶⁾はカプサイシンを用いた舌への痛覚刺激がラットの海馬を活性化させ、学習能力と記憶力を強化させたと報告している。さらにFukushimaら¹⁷⁾は成長期のラットに柔らかい餌を与え続けた群と固形の餌を与えた群で受動回避試験を行った結果、潜伏時間の有意な減少が見られたと報告している。これらの報告では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し、学習能力と記憶の増強に影響を与えた可能性を報告している。従って、本研究での舌刺激によるVPA曝露発達障害ラットの学習能力と記憶の改善は海馬領域における変化が関連している可能性が考えられるため、記憶力の中心部である海馬領域における細胞活性と細胞新生のマーカーであるc-FosとBrdU陽性細胞、成長因子であるBDNFタンパク質の変化を測定した。その結果、発達障害ラット群に対し、舌への触・圧覚、痛覚刺激群でc-FosとBrdU陽性細胞、BDNFタンパク質の有意な増加又は増加傾向が確認された。Huangら¹⁸⁾はカプサイシンのintra-cisternal (i.c.) 点滴注入によって誘発される片頭痛小児モデルラットの中樞神経でのc-Fos陽性細胞の増加がVPA投与により抑制されたと報告している。Dubielら¹⁹⁾は、VPAに曝露されたラットに4又は16kHzの音を聞かせた結果、VPAに曝露された動物の聴性脳幹でc-Fos陽性細胞が有意に増加したと報告している。また受精後5日のゼブラフィッシュ幼生を用いた実験では、発生中のVPA曝露がアポトーシスを誘発することなくBrdU陽性細胞を減少させたとLeeら²⁰⁾は報告している。Umkaら¹⁵⁾は腹腔内にVPAを投与したラットの空間記憶テストでの重大な障害は海馬歯状回顆粒下帯における細胞増殖の減少が原因であると報告しており、さらにVPA曝露は脳由来神経栄養因子(BDNF)の有意な減少も引き起こしたと報告している。舌刺激によるc-FosやBrdU、BDNFに関する報告では、舌への痛覚刺激が記憶力の中心部である海馬領域を活性化させ、海馬内のc-FosやBrdU陽性細胞を増加させたことが報告されており¹⁶⁾、Utsuguraら²¹⁾は柔らかい餌と硬い餌を与えたマウスの脳内の変化を比較した結果、硬い餌を

与えたマウスの脳室下帯で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、SW知覚テスターを用いた舌への触・圧覚刺激より海馬領域でのBDNF mRNAの発現増加傾向や細胞活性化、細胞新生の促進も確認されている⁴⁾。Kimら²²⁾の報告によるとラットに対して1日30分のトレッドミル運動を6週間実施した結果、トレッドミル運動群において記憶力の増強に加え、BDNFやBrdU陽性細胞が有意に増加したと報告している。これらの結果から本研究で確認された発達障害ラットへの舌刺激によるc-FosとBrdU陽性細胞、BDNFタンパク質の有意な増加は、胎児期のVPA曝露による海馬のGABAergic GAD67発現異常により発生した神経ネットワーク形成の損傷が舌への触・圧覚、痛覚刺激により海馬領域が活性化(c-Fos)され、成長因子(BDNF)の分泌促進や神経細胞の新生(BrdU)を促進することで神経ネットワーク損傷の改善に影響を与えた可能性が示唆された。

VPAは、一般的に抗痙攣薬や鎮静薬として用いられているが、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害するため、神経発達期に曝露されると生後の脳機能への影響が懸念されている有機化合物である。実際、母体にVPAを投与することで、成長後に社会行動異常を示すモデル動物が得られることが確立されている。本研究ではVPA曝露ラットの学習と記憶異常に着目し、舌への刺激がVPA曝露ラットの学習と記憶低下に改善効果があるかを検討したが、社会行動異常に関する部分については未検討である。本研究の結果をみると舌への刺激がVPA曝露ラットの社会行動異常にも十分影響を与え得る可能性が示唆されるため、今後社会行動異常に対する更なる検討も必要であると考えられる。

V. 結語

本研究の結果、舌への触・圧覚、痛覚刺激がVPA曝露発達障害ラットの海馬等の中樞神経系を活性化させ学習と記憶異常を改善させる可能性が示唆された。これらの結果から舌への刺激が記憶力と学習能力(集中力)などに障害がある子供の症状改善に寄与できる可能性があると考えられる。

謝 辞

本研究はJSPS 科研費 JP20K11274の助成と熊本保健科学大学学内研究費（2020-C-04）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) 梅永雄二：発達障害者の就労上の困難性と具体的対策—ASD者を中心に。特集 障害者雇用の変化と法政策・職場の課題, No.685 : 57-68, 2017.
- 2) 室橋春光：学習障害（LD）とは。大学の物理教育, 10 : 38-42, 2004.
- 3) 田熊一敏：バルプロ酸の体内曝露による発達障害モデルの作製と新規薬物療法の追求。子供のこころと脳の発達, Vol.12 26-33, 2021.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacol, 31 (12) : 1279-1285, 1992.
- 10) 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.
- 11) Schneider T, Przewłocki R: Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: animal model of autism. Neuropsychopharmacol, 30 (1) : 80-9, 2005.
- 12) Liu S, Jia F, Xia T, et al : Cognitive dysfunction and bumetanide treatment in a valproate-induced rat model of autism. Int J Clin Exp Med, 9 (12) : 23363-23374, 2016.
- 13) Mônica R Favre I, Tania R Barkat, Deborah Lamendola, Georges Khazen, Henry Markram, Kamila Markram. General developmental health in the VPA-rat model of autism. Front Behav Neurosci, 7 : 88. 2013.
- 14) Hou Q, Wang Y, Li Y, et al : A developmental study of abnormal behaviors and altered GABAergic signaling in the VPA-treated rat model of autism. Front Behav Neurosci, 12 : 182, 2018.
- 15) Umka J, Mustafa S, ElBeltagy M et al : Valproic acid reduces spatial working memory and cell proliferation in the hippocampus. Neuroscience, 166 (1) : 15-22, 2010.
- 16) 行平崇, 小牧龍二, 福永貴之, 田中哲子, 申敏哲。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。保健科学研究誌, 17 : 49-58, 2020.
- 17) Fukushima-Nakayama Y, Ono T, Hayashi M : Reduced Mastication Impairs Memory Function. J Dent Res, 96 (9) : 1058-1066, 2017.
- 18) Huang P, Kuo PH, Lee MT : Age-Dependent Anti-migraine Effects of Valproic Acid and Topiramate in Rats. Front Pharmacol, 9 : 1095, 2018.
- 19) Dubiel A, Kulesza RJ Jr: Prenatal valproic acid exposure disrupts tonotopic c-Fos expression in the rat brainstem. Neuroscience,

- 324 : 511-523, 2016.
- 20) Lee YK, KimYH, Yun JS et al : Valproic acid decreases the proliferation of telencephalic cells in zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol*, 39 : 91-99, 2013.
- 21) 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.
- 22) 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.

(令和3年11月23日受理)

Effect of touch/pressure and pain stimulus on the tongue in memory and learning ability of valproic acid-induced developmental disorder model rats

Takayuki FUKUNAGA, Takashi YUKIHIRA, Ryuji KOMAKI,
Tetsuko TANAKA, Taisuke UEMURA, Hiroki KAMEYAMA,
Min-Chul SHIN

In our previous paper, we reported activation of the hippocampus and increased neurogenesis, with the possibility of improvement of memory and learning in rats, on stimulating the rat's tongue using touch/pressure and pain. However, the effect of stimulating their tongue with touch/pressure and pain on their memory and learning ability in valproic acid (VPA) -induced developmental disorder model rats is not well-known. In the present study, we investigated the effects of touch/pressure and pain tongue stimuli on memory and learning ability in VPA exposure developmental disorder model rats using behavioral and molecular biological methods. We discovered that stimulating the tongue with touch/pressure and pain improved spatial memory and learning ability during the radial arms maze and step-down tests in VPA-induced developmental disorder model rats. In addition, c-Fos and BrdU positive cells, and BDNF proteins in the hippocampus, significantly increased in the tongue stimulation rat group compared to the VPA-induced developmental disorder model rats. 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 their memory and learning abilities in VPA-induced developmental disorder model rats.

Keywords: tongue stimulation, memory and learning, rat, valproic acid-induced developmental disorder model rat