

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2017年度 博士論文

チューイングはラット島皮質において拘束ストレスにより  
発現する pERK 免疫陽性細胞ニューロンを抑制する

2017年8月24日

大貫 真美

Masami Onuki

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2017年度 博士論文

チューイングはラット島皮質において拘束ストレスにより  
発現する pERK 免疫陽性細胞ニューロンを抑制する

2017年8月24日

大貫 真美

Masami Onuki

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔科学講座

河田俊嗣教授 指導

## 論文内容要旨

ストレス応答とは、環境の変化や生体に与えられる有害な刺激に反応して起こる身体的および心理的な変化の集合である。ストレスを制御することは現代社会において大きな問題の一つである。チューイングは脳におけるストレス反応を調整する自発的行動である。

拘束ストレスは、視床下部における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン免疫陽性細胞の数を増加させるが、チューイングはこの増加を抑制することが示されている。また、拘束ストレスは、視床下部における神経型一酸化窒素合成酵素の mRNA 発現を増強させるが、チューイングはこの増強を抑えることが報告されている。また、拘束ストレス下でのチューイングは海馬 CA1 領域におけるミネラルコルチコイド受容体のストレス誘導性の増加をも阻止する。さらに、拘束ストレス下でのチューイングは中脳中心灰白質(背外側部、腹外側部)のストレス応答性神経細胞数の増加を抑制する。生理学的には、チューイングは海馬のストレスによる誘発長期増強の減弱を抑制する。これらの結果は、チューイングがいくつかのストレス応答性脳領域において様々なストレス関連分子に影響を及ぼすことを示唆している。

海馬、扁桃体、前頭前野はストレス応答機構を構成する脳領域であり、行動および生理学的反応を変化させる。島皮質は、前帯状回や種々の連合野に加え扁桃体や前頭前野と相互的な神経連絡を有する極めて重要な脳領域の一つである。本論文では、前部島皮質および後部島皮質において MAP カイネース (Mitogen-activated Protein Kinase) の一種 ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) を用い、そのリン酸化型 ERK (pERK) をストレス応答マーカーとして拘束ストレス下におけるチューイングの影響について検討した。

ラットに拘束ストレスを与えると、前部島皮質および後部島皮質において pERK 免疫陽性細胞の数が増加した。拘束ストレス条件下でのチューイングは前部島皮質および後部島皮質におけるストレス誘発性 pERK 免疫細胞数の増加を、有意差 ( $p < 0.01$ ) をもって抑制した。特に前部島皮質での抑制が強かった。

これまでの研究では、視床下部、中脳中心灰白質(背外側部、腹外側部)などの脳領域でチューイングによるストレス抑制効果を明らかにしてきたが、今回の結果は、島皮質においてもチューイングがストレス応答を軽減させる可能性があることを新たに提示した。一般に前部島皮質は情動関連野と考えられ、後部島皮質は感覚運動関連野と考えられている。チューイングによる拘束ストレス誘導性 pERK 免疫陽性細胞増加の抑制は前部島皮質でより著明であった。このことは、チューイングのストレス抑制効果は前部島皮質の機能、すなわち情動形成過程に関連した神経回路の方に強く作用する可能性が示唆された。

## 論文審査要旨

学位申請論文である「チューイングはラット島皮質において拘束ストレスにより発現する pERK 免疫陽性細胞ニューロンを抑制する」は、MAP カイネース (Mitogen-activated Protein Kinase) の一種 ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) のリン酸化型 ERK (pERK) をストレス応答マーカーとして拘束ストレス下におけるチューイングの影響について島皮質をターゲットに検討した論文である。

申請者らのグループは、海馬、扁桃体、前頭前野さらには視床下部、中脳中心灰白質(背外側部、腹外側部)などの脳領域でチューイングによるストレス抑制効果を明らかにしてきた。今回対象とした島皮質は、前帯状回や種々の連合野に加え扁桃体や前頭前野と相互的な神経連絡を有する極めて重要な脳領域の一つである。本研究は、“チューイングとストレスとの関わり”を解明する研究プロジェクトの一つとして位置付けられ、研究目的の設定には十分な整合性が認められる。

研究方法は、10 週齢の雄ラットを用いてコントロール群・拘束ストレス群・拘束ストレス+チューイング群の 3 群 (n=21) に分類し、各群の前部島皮質と後部島皮質における pERK 免疫陽性細胞数を計測し比較検討しており (一元配置分散分析とその後の多重比較)、研究目的に対する研究デザインは論理的であり、適切な解析手法を用いて研究が行われている。本実験によりラットに拘束ストレスを与えると、前部島皮質および後部島皮質の pERK 免疫陽性細胞数は増加し、拘束ストレス条件下でのチューイングは前部島皮質および後部島皮質におけるストレス誘発性 pERK 免疫細胞数を有意に抑制した。また、前部島皮質は後部島皮質よりもその抑制が強いことも明らかにしている。

本論文は、適切な方法により導き出された明快な所見であり、チューイングがストレス応答を軽減させるメカニズムに島皮質の関与を示唆したことは新規性が高く、今後のストレス研究の展開が期待される内容である。

以上により、本審査委員会は申請者が博士(歯学)の学位に十分値するものと認めた。

2017 年 8 月 24 日

主査：木本 克彦

副査：槻木 恵一

副査：保田 将史

2017年度 博士論文

チューイングはラット島皮質において拘束ストレスにより発現するPERK免疫陽性細胞ニューロンを抑制する

口腔科学講座 大貫真美

## 目次

緒言	1
実験材料（対象）および方法	3
結果	6
考察	8
結論	11
謝辞	12
文献	13
図	
図 1	20
図 2	22
図 3	23

## 緒言

ストレス応答とは、環境の変化や生体に与えられる有害な刺激に反応して起こる身体的および心理的な変化の集合である<sup>1)</sup>。脳は何が脅威であるかを判断する器官であるが故、ストレスに対するメカニズムの調節の要を担う器官である。この結果として脳は生理学的応答もしくは行動学的応答を引き起こし、結果として適応ないしは生理学的不調を招く<sup>2)</sup>。ストレスを制御することは、現代社会において大きな問題の一つである。海馬、扁桃体、前頭前野はストレス応答機構を構成する脳領域であり、行動および生理学的反応を変化させる。ヒトの島皮質は大腦半球に覆われ、前帯状回や種々の連合野に加え扁桃体や前頭前野と相互的な神経連絡を有する。これまでの研究から、島皮質の前部は内省、ネガティブな感情、体性知覚に伴う感情、悲しい出来事の想起、会話の開始、痛みに伴う感情、痛みの予測に関連し、島皮質の後部は体性知覚、会話時の聴覚系の情報処理に関連することが示唆されている<sup>3)</sup>。チューイングは脳におけるストレス反応を調整する自発的行動である<sup>4,7)</sup>。例えば、拘束ストレスは、視床下部における副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン免疫陽性細胞の数を増加させるが、チューイングはこの増加を抑制することが示されている<sup>6)</sup>。また、拘束ストレスは、視床下部における神経型一酸化窒素合成酵素の mRNA 発現を増強させるが、チューイングはこの増強を抑えると言われている<sup>5)</sup>。また、拘束ストレス下でのチュー

イングは海馬 CA1 領域におけるミネラルコルチコイド受容体のストレス誘導性の増加をも阻止する<sup>7)</sup>。生理学的には、チューイングは海馬のストレスによる誘発長期増強の減弱を抑制する<sup>8)</sup>。これらの結果は、チューイングがいくつかのストレス応答性脳領域において様々なストレス関連分子に影響を及ぼすことを示唆している<sup>9-11)</sup>。このように先行研究では、視床下部、海馬、扁桃体において、チューイングがストレス軽減効果を持つことが明らかとなった。今回はこれらの脳領域の上位中枢と考えられる島皮質において、拘束ストレス下でのチューイングのストレス抑制メカニズムを知るべく本研究を開始した。

本研究では、MAP カイネース(Mitogen-activated Protein Kinase)の一種 ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)を用い、そのリン酸化型 ERK (pERK)をストレス応答マーカーとした<sup>9-11)</sup>。応答のマーカーとしてこの検出系を用い、拘束ストレス下でのチューイングが前部および後部島皮質に及ぼす影響を調べた。



## 実験材料および方法

### 1) 実験動物

実験には体重 367~390g の雄 Sprague-Dawley ラット(10 週齢)21 匹(日本 SLC、静岡、日本)を使用した。ラットは  $22\pm 3^{\circ}\text{C}$  の温度下で、12 時間ごとの明暗サイクル下にて管理された。本実験は神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認番号 15-046 番を得て、定める動物実験指針を遵守して行った。

ラットをコントロール群(コントロール群 ;  $n = 7$ )、拘束ストレスのみの群(ストレス群 ;  $n = 7$ )、拘束ストレス中にチューイングをさせた群(チューイング群 ;  $n = 7$ )の 3 群に分けた。コントロール群には拘束ストレスを与えなかった。ストレス群とチューイング群は、確立されたプロトコールに従って急性ストレスの一つである拘束ストレスを負荷した<sup>4,5)</sup>。拘束ストレスは、各ラットを仰臥位に置き、革ベルトを用いて木製ボード(18cm×25cm)に四肢を固定することによって与えられた。前肢は革ベルトで体の正中線に対して  $45^{\circ}$  の角度で、後肢は正中線に対して  $135^{\circ}$  の角度で固定した。拘束ストレスをかける時間は過去の論文を参考にして 30 分間とした<sup>12,13)</sup>。ストレス群のラットは 30 分間この位置に維持されたが、チューイング群のラットは 30 分間の拘束ストレス中に木製の棒を噛ませた。ストレス群とチューイング群は、拘束ストレスの直後に灌流固定した。

### 2) 免疫組織化学

免疫組織化学は我々の通法通り<sup>14)</sup>、ペントバルビタールナトリウム(35mg/kg 腹腔内投与、和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を用いてラットを深く麻酔し、0.9%NaClにて経心的に灌流した。次いで4%パラホルムアルデヒドと0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(PB、pH6.9)中に0.2%ピクリン酸を溶かしたもので灌流固定した。剖出により脳を迅速に摘出し、同じ固定液中に4℃で1日間さらに浸漬し、後固定をした。PBで洗浄し、20%スクロースに浸漬した後、試料を凍結ステージを備えたスライド式マイクロトームを用いて厚さ20 $\mu$ mの横断切片を作成し3枚に1枚の切片をすべて集め、フリーフローティング法により免疫染色した。切片を0.9%NaClを含有する0.1M PB (pH7.4; PBS)中で一晩洗浄した。

1次抗体として rabbit polyclonal antibody against phosphor-p44/42 MAP kinase (ERK 1/2, lot number #9101, Cell Signaling Technology Inc., Denbers, MA,USA)を使用した。この抗体は、リン酸化した ERK1、ERK2 を検出する。抗体は希釈倍率 1:1,000 で 1%ウシ血清アルブミン(BSA)と 0.3%Triton X-100 を含む PBS (PBS-BSAT)で希釈し、切片はこの溶液で4℃、3日間反応させた。

PBS で洗浄した後、2次抗体(biotinylated goat anti-rabbit IgG; Vector Laboratories,Burlingame, CA,USA)を希釈倍率 1 : 100 で PBS-BSAT に希釈、室温で1時間反応させた。切片を再び PBS で洗浄後、avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC; Vector Laboratories)を希釈倍率 1: 100 で PBS-

BSAT に希釈、室温にて 30 分反応させた。PBS で最終洗浄後、切片を 0.02% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)、0.005% hydrogen peroxide を含む 0.05M Tris-HCl バッファー(pH 7.4)で 5~10 分間反応させた。切片は、一般的な組織学および脳領域の同定のために、チオニンでわずかに対比染色した。次いで、切片をアルコールで脱水し、キシロールで透徹しマリノール(Muto Pure Chemicals、東京、日本)で封入した。

### 3) pERK 免疫陽性細胞数

G. Paxinos and C. Watson のラット脳アトラスを参照し、島皮質の同定はブレグマ-3mm より吻側で腹外側の脳皮質のうち、背外側に隣接する第一次体性感覚野にみられる 6 層構造の層が減少する領域と定めた(Fig. 1)<sup>15)</sup>。前部島皮質としてはブレグマよりおおよそ+ 2.52mm~+ 2.12mm の領域から、後部島皮質としては-0.12mm~-0.48mm の領域から、1 個体につきそれぞれ 6 枚の切片を用いて免疫陽性細胞をカウントした。顕微鏡倍率 100 倍(接眼レンズ 10 倍×対物レンズ 10 倍)で観察しながら細胞数をカウントした。島皮質領域細胞数の全ての値は平均値±SD である。Kruskal-Wallis 検定を実施し、Steel-Dwass 法に従い、 $p < 0.05$  をもって免疫陽性細胞数の差を有意とみなした。

## 結果

前部島皮質では、pERK 免疫陽性細胞、 $14 \pm 9$  個がコントロール群で観察された(Fig. 1A)。ここでの免疫陽性細胞体は主に円形から紡錘形を呈していた。免疫陽性線維は免疫陽性細胞体から伸び出ているものが主であった。免疫陽性線維の染色性は細胞体と比較し乏しかった。細胞体は密集する傾向にあった。ストレス群では、コントロール群と比較して、より多数の pERK 免疫陽性細胞、 $32 \pm 13$  個が観察された(Fig. 1B)。コントロール群と比較して有意に多数であった( $p < 0.01$ ) (Fig. 2)。ストレス群の免疫陽性細胞体は紡錘形から多角形を呈していた。免疫陽性線維は免疫陽性細胞体からコントロール群のように伸び出るものもあれば、免疫陽性線維単独で存在するものも認められた。ストレス群の免疫陽性細胞の染色性はコントロールと比較し、濃染していた。

ストレス群の細胞体は密集性がコントロール群よりも強かった。チューイング群では、pERK 免疫陽性細胞、 $7 \pm 6$  個が観察された(Fig. 1C)。これはコントロール群およびストレス群の pERK 免疫陽性細胞数と比較すると、統計学的な有意差を持って少なかった(Fig. 2)。チューイング群の免疫陽性細胞体は三角形から紡錘形を呈していた。免疫陽性線維は細胞体から伸び出るものはあまり確認されず、確認できるものの長さは短かった。多くの免疫陽性線維が単独で存在していた。免疫陽性細胞体の染色性と対比し、免疫陽性線維の染色性の方が強く観

られた。チューイング群の免疫陽性細胞体の分布は散在性であった。

後部島皮質では、pERK 免疫陽性細胞、 $16\pm 11$  個がコントロール群で観察された(Fig. 1D)。ここでの細胞体は主に紡錘形を呈していた。免疫陽性線維はごくわずかであった。免疫陽性細胞体の分布は散在している傾向にあった。ストレス群では、コントロール群と比較して、より豊富な pERK 免疫陽性細胞、 $35\pm 19$  個が後部島皮質で観られた(Fig. 1E)。この細胞数はコントロール群と比較し有意に多数であった( $p < 0.01$ )。免疫陽性細胞体は紡錘形から多角形を呈していた。免疫陽性線維は細胞体から伸びるものはほとんど確認できず、細胞体単独で存在する傾向にあった。免疫陽性線維の染色性はやや乏しかった。チューイング群では、pERK 免疫陽性細胞、 $11\pm 7$  個であった(Fig. 1F)。チューイング群の pERK 免疫陽性細胞数は、ストレス群と統計学的な有意差を持って少なかった(Fig. 3)。チューイング群の免疫陽性線維はコントロール群と類似していた。免疫陽性細胞体の分布は散在し、染色性は弱い傾向にあった。

## 考察

1809年に Reil の研究によって学術的に取り上げられた insula は今日でもその名を使用されている<sup>16-18)</sup>。島皮質は前頭弁蓋部とともに第一次味覚野として機能するが<sup>19)</sup>それだけにとどまらず、今日その複雑な機能が明らかにされている。島皮質は前頭葉、側頭葉、頭頂葉と双方向性の神経線維連絡をもち、大脳辺縁系に属す扁桃体、海馬、帯状回とも神経線維連絡をもつ<sup>20)</sup>。また、島皮質内での神経線維連絡も多くみられる<sup>20)</sup>。このような神経回路網の存在を基に、島皮質は感覚の統合領域、すなわち多重知覚収束の場と考えられている<sup>21)</sup>。このことは味覚、嗅覚、視覚、聴覚、触覚、痛覚などの諸感覚の統合、または融合を担う脳部位であることを示唆する。また、島皮質の刺激により自律神経系の変動が誘発されることから、島皮質が自律神経系の制御を担う脳部位とも考えられている<sup>22)</sup>。

我々はこれまで、視床下部、海馬、扁桃体において、チューイングがストレス軽減効果を持つことを明らかにしてきた<sup>4,8,23)</sup>。本研究により、これら視床下部、海馬、扁桃体の上位中枢と考えられる島皮質においても、拘束ストレス下でのチューイングはストレス誘導性の pERK 免疫陽性細胞の増加を抑制することが明らかになった。このことはチューイングのストレス軽減効果は大脳辺縁系を構成する脳領域のみならず、それらの上位中枢に位置する脳部位においても効果

を示していることを示唆する。

島皮質は島中心溝により前部と後部に分けられ、胎生期における島皮質の溝の形成は、右島皮質が左島皮質に先行する<sup>24, 25)</sup>。今日、前部島皮質と後部島皮質の機能分化が知られている。一般に前部島皮質は情動関連野と考えられ、後部島皮質は感覚運動関連野と考えられている<sup>26-28)</sup>。また、前部島皮質はパニック発作を示す患者で活動増強を示し<sup>29)</sup>、後部島皮質は心血管系の制御に関与することが示唆されている<sup>30)</sup>。本研究ではチューイングによる拘束ストレス誘導性 pERK 免疫陽性細胞増加の抑制は前部島皮質でより著明であった。このことはチューイングのストレス抑制効果は前部島皮質の機能、すなわち情動形成過程に関連した神経回路の方に強く作用することを示唆する。

夜間行われるチューイング、つまりブラキシズムは機能的な目的ではなく不随意性の歯ぎしりやグラインディングとの定義がある<sup>31)</sup>。近年、不随意性のチューイングはストレス対応の生理機構であると示唆されている<sup>32)</sup>。対照的に随意性のチューイングはストレス応答を調節しているという報告がある<sup>4-7)</sup>。ストレスは神経伝達物質、神経ペプチド、ホルモンの変動を引き起こす<sup>33)</sup>。拘束ストレス下におけるチューイングが血中ストレスホルモンであるコルチコステロンや副腎皮質刺激ホルモンのストレス誘導性増加を抑制する<sup>34)</sup>。先に述べたように、島皮質は自律神経系の制御に関わる領域であり、これら末梢器官領域での

チューイングによるストレス軽減効果は島皮質、並びに島皮質と神経線維連絡を持つ扁桃体や視床下部における軽減効果の総和として表出している可能性が示唆される。また、島皮質は心臓制御を含めた内臓運動、内臓知覚に関与している<sup>35)</sup>。このことはチューイングが島皮質を経て内臓運動や内臓知覚に影響を与える可能性が示唆される。



## 結論

本研究で我々は、拘束ストレスは前部島皮質、後部島皮質において pERK 免疫陽性細胞を増加させること明らかにした。さらに、拘束ストレス中のチューイングはストレス誘導性免疫陽性細胞の増加を抑制した。特に前部島皮質での抑制が顕著であった。島皮質は、扁桃体や前帯状回、海馬などと神経連絡をもち多重知覚収束の場として示唆される一方で、心臓制御を含めた内臓運動、内臓知覚に関与する極めて重要な脳領域の一つである。従って、チューイングは島皮質を通してストレス感受性を調節している可能性が示唆された。

## 謝辞

本論文を作成するにあたり、終始御懇篤なる御指導および御高閲を承りました本学口腔機能修復学講座 河田俊嗣教授、本学口腔科学講座 山本利春先生、山田健太郎先生、自治医科大学歯科口腔外科学講座 笹栗健一先生に心より深謝の意を表します。

## 文献

- 1) Selye H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 38: 32, 1936.
- 2) McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev* 87: 873-904, 2007.
- 3) Nagai M, Kishi K, Kato S. Insular cortex and neuropsychiatric disorders: a review of recent literature. *Eur Psychiatry* 22: 387-394, 2007.
- 4) Hori N, Yuyama N, Tamura K. Biting suppresses stress-induced expression of corticotrophin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. *J Dent Res* 83: 124-128, 2004.
- 5) Hori N, Lee MC, Sasaguri K, Ishii H, Kimoto M, Toyoda M, Sato S. Suppression of stress-induced nNOS expression in the rat hypothalamus by biting. *J Dent Res* 84: 624-628, 2005.
- 6) Sasaguri K, Kikuchi M, N Hori, N Yuyama, M Onozuka, S Sato. Suppression of stress immobilization-induced phosphorylation of ERK 1/2 by biting in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Neurosci. Lett* 383: 160-164, 2005.
- 7) Sasaguri K, Yoshikawa G, Yamada K, Miyake S, Kubo K, Yamamoto T. Combination of chewing and stress up-regulates hippocampal glucocorticoid receptor in contrast to the increase of mineralocorticoid

- receptor under stress only. *Neurosci. Lett* 519: 20-25, 2012.
- 8) Ono Y, Kataoka T, Miyake S, Cheng SJ, Tachibana A, Sasaguri K, Onozuka M. Chewing ameliorates stress-induced suppression of hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience* 154: 1352-1359, 2008.
  - 9) Houser CR, Zhang N, Peng Z, Huang CS, Cetina Y. Neuroanatomical clues to altered neuronal activity in epilepsy: from ultrastructure to signaling pathways of dentate granule cells. *Epilepsia* 53: 67-77, 2012.
  - 10) Ji R-R, Gereau RW, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res. Rev* 60: 135-148, 2009.
  - 11) Mathiasen ML, Hansen L, Witter MP. Insular projections to the parahippocampal region in the rat. *J Comp Neurol* 523: 1379-1398, 2015.
  - 12) Yokoyama C, Sasaki K. Regional expressions of Fos-like immunoreactivity in rat cerebral cortex after stress; restraint and intraperitoneal lipopolysaccharide. *Brain Res* 816: 267-275, 1999.
  - 13) Kwon MS, Seo YJ, Shim EJ, Choi SS, Lee JY, Suh HW. The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus. *Neuroscience* 142: 1281-92, 2006.
  - 14) Yamada K, Park H, Sato S, Onozuka M, Kubo K, Yamamoto T. Dynorphin-A immunoreactive terminals on the neuronal somata of rat mesencephalic trigeminal nucleus. *Neurosci Lett* 438: 150-154, 2008.
  - 15) Paxinos G, Watson C. The rat brain stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, 1986.

- 16) Mesulam MM, Mufson EJ. The insula of Reil in man and monkey: architectonics, connectivity, and function. In *Cerebral cortex*, 4, eds by Peters A, Jones EG, Plenum Press, New York, 179-226, 1985.
- 17) Augustine JR. The insular lobe in primates including humans. *Neurol Res* 7: 2-10, 1985.
- 18) Reil JC. Die sylvische Grube. *Arch Physiol (Halle)* 9: 195-208, 1809.
- 19) Rolls ET. Brain mechanisms underlying flavor and appetite. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361: 1123-1136, 2006.
- 20) Nagai M, Kishi K, Kato H. Structure and functions of the insular cortex –A review of the recent researches– (in Japanese). *Shinkeishinpo* 46: 157-173, 2002.
- 21) Mesulam MM, Mufson EJ. The insula of Reil in man and monkey: architectonics, connectivity, and function. In *Cerebral Cortex*, 4, eds by Peters A, Jones EG, Plenum Press, New York, 179-226, 1985.
- 22) Showers MJC, Lauer EW. Somatovisceral motor patterns in the insula. *J Comp Neurol* 117: 107-116, 1961.
- 23) Narimatus Y, Yamada K, Sasaguri K, Yamamoto T, Kawata T. Chewing alleviates immobilization stress through amygdaloid GABAergic neurons. 93<sup>rd</sup> General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston, USA, 2015
- 24) Guldberg GA. Zur morphologie der insula Reilii. *Anat Anz* 2: 659-665, 1887.
- 25) Cunningham DJ. The development of the gyri and sulci on the surface of the island of Reil of the human brain. *J Anat Physiol* 25: 338-348,

1891.

- 26) Droutman V, Bechara A, Read SJ. Roles of the different sub-regions of the insular cortex in various phases of the decision-making process. *Front Behav Neurosci* 9: Article 309, 2015.
- 27) Gu X, Hof PR, Friston KJ, Fan J. Anterior insular cortex and emotional awareness. *J Comp Neurol* 521: 3371-3388, 2013.
- 28) Wattendorf E, Westermann B, Lotze M, Fieder K, Celio MR. Insular cortex activity and the evocation of laughter. *J Comp Neurol* 524: 1608-1615.
- 29) Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, Price JL, Hackman KA. Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Arch Gen Psychiatry* 46: 493-500, 1989.
- 30) Zhang ZH, Dougherty PM, Oppenheimer SM. Characterization of baroreceptor-related neurons in the monkey insular cortex. *Brain Res* 796: 303-306, 1998.
- 31) Bader G, Lavigne G. Sleep bruxism: an overview of an oromandibular sleep movement disorder. *Sleep Med Rev* 4: 27-43, 2000.
- 32) Slavicek R, Sato S. Bruxism-a function of the masticatory organ to cope with stress. *Wiener Medizinische Wochenschrift* 154: 584-589, 2004.
- 33) Anisman H, Merali Z, Hayley S. Neurotransmitter, peptide, and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders. *Prog Neurobiol* 85: 1-75, 2008.
- 34) Ono Y, Lin HC, Tzen KY, Chen HH, Yang PF, Lai WS, Chen JH, Onozuka M, Yen CT. Active coping with stress suppresses glucose

metabolism in the rat hypothalamus. *Stress* 15: 207-217, 2012.

35) Ostrowsky K, Isnard J, Ryvlin P, Guenot M, Fischer C, Mauguiere F.

Functional mapping of the insular cortex: clinical implication in temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 41: 681-686, 2000.

図

Figure 1.

前部島皮質(A,B,C)、後部島皮質(D,E,F)の pERK 免疫陽性細胞を示す写真。

コントロール群(A,D)、ストレスのみの群(B,E)、ストレスチューニング群(C,F)。

ストレスチューニング群(C,F)では免疫陽性細胞のストレス誘導性増加(B,E)を

抑制することに注目。チオニンで対比染色。矢頭は免疫陽性細胞を示す。

オリジナル倍率 100 倍; スケールバー=100 $\mu$ m

前部島皮質(AIC; G)および後部島皮質(PIC; H)の脳部位を示す模式図。

ac: anterior commissure; Acb: accumbens nucleus; AIC: anterior insular cortex; CPu: caudate putamen; Hy: hypothalamus; PIC: posterior insular cortex; S: septum; S1J: primary somatosensory cortex, jaw region; S2: secondary somatosensory cortex

Figure 2.

前部島皮質における pERK 免疫陽性細胞数。

左から順にコントロール群、ストレスのみの群、ストレスチューニング群を表す。

カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。



**Figure 3.**

後部島皮質における pERK 免疫陽性細胞数。

左から順にコントロール群、ストレスのみの群、ストレスチューニング群を表す。

カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。

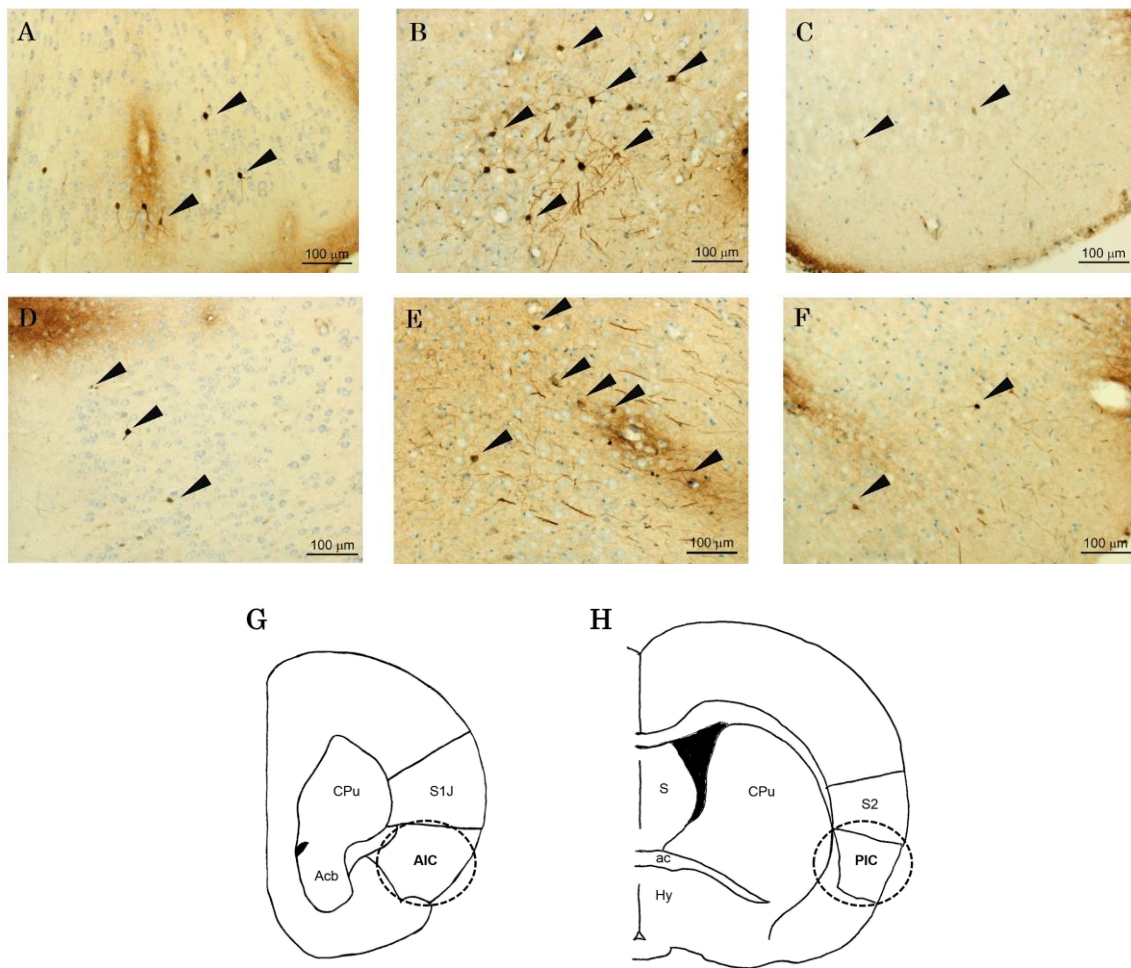


Figure 1.

前部島皮質(A,B,C)、後部島皮質(D,E,F)の pERK 免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A,D)、ストレスのみの群(B,E)、ストレスチューニング群(C,F)。ストレスチューニング群(C,F)では免疫陽性細胞のストレス誘導性増加(B,E)が抑制されていることに注目。チオニンで対比染色。矢頭は免疫陽性細胞を示す。オリジナル倍率 100 倍; スケールバー=100μm

前部島皮質(AIC; G)および後部島皮質(PIC; H)の脳部位を示す模式図。

ac: anterior commissure; Acb: accumbens nucleus; AIC: anterior insular

cortex; CPu: caudate putamen; Hy: hypothalamus; PIC: posterior insular  
cortex; S: septum; S1J: primary somatosensory cortex, jaw region; S2:  
secondary somatosensory cortex

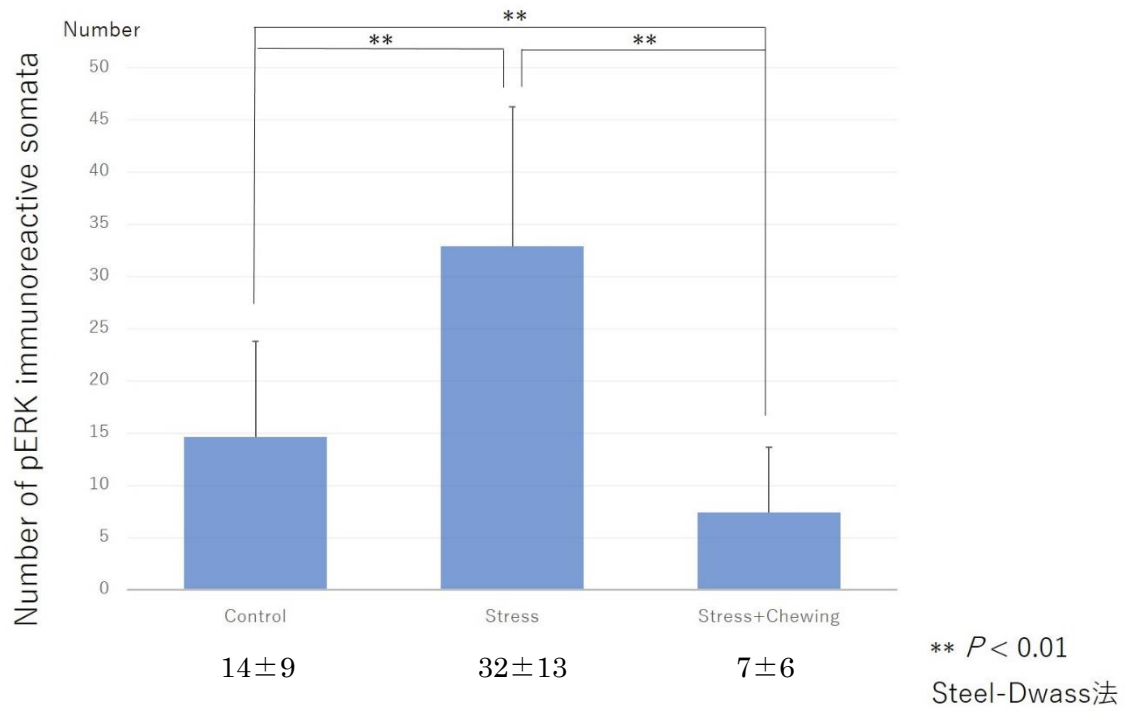


Figure 2.

前部島皮質における pERK 免疫陽性細胞数。

左から順にコントロール群、ストレスのみの群、ストレスチューイング群を表

す。カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。

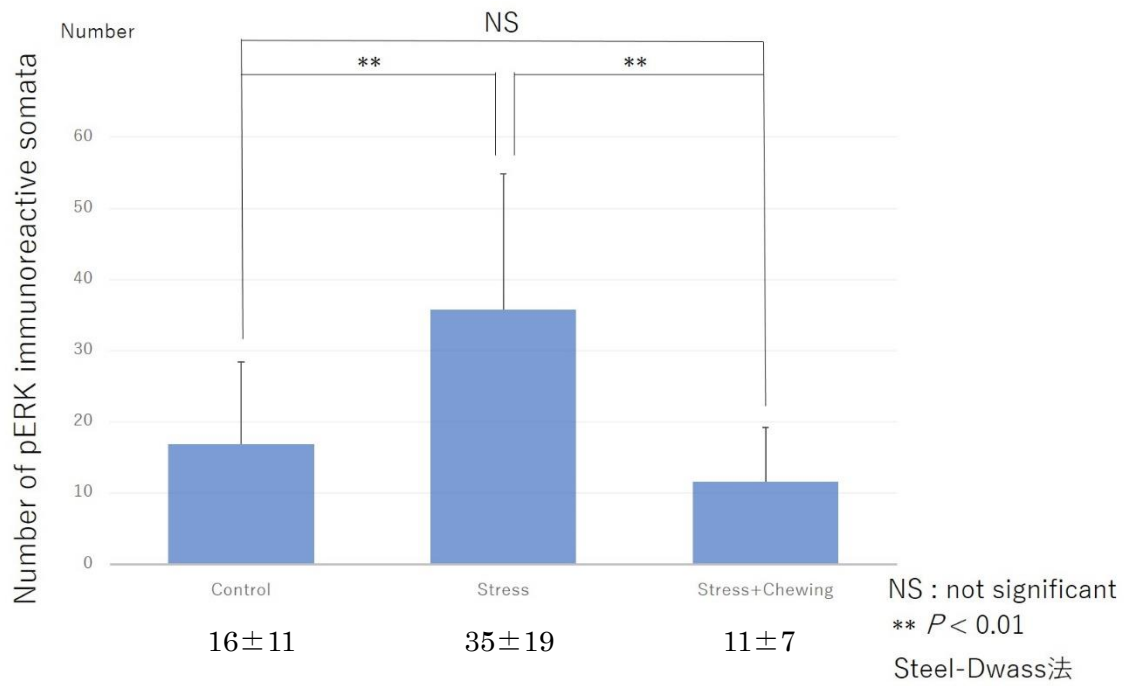


Figure 3.

後部島皮質における pERK 免疫陽性細胞数。

左から順にコントロール群、ストレスのみの群、ストレスチューイング群を表

す。カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。