

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2019 年度 博士論文

チューイングはラットの帯状回において
ストレス誘動性 pERK 免疫陽性細胞を増加する

2020 年 2 月 28 日

畠中玲奈

Reina Hatanaka

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔機能修復学講座

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2019 年度 博士 論文

チューイングはラットの帯状回において
ストレス誘動性 pERK 免疫陽性細胞を増加する

2020 年 2 月 28 日

畠中玲奈

Reina Hatanaka

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔機能修復学講座

猿田樹理准教授 指導

論文内容要旨

帯状回は大脳辺縁系に属し、刺激に対する感情的な反応を調節し、ストレスへの反応に関与している。そのため、アルツハイマー病や抑うつ障害などの様々な神経疾患に関連している。帯状回は、前部、中部、および後部の3つの領域に分かれている。前帯状回は、痛覚情報の処理、自律神経系と内分泌機能の調節、悲観的情绪形成に関与すると言われている。中帯状回は、前帯状回、後帯状回を含む種々の大脳皮質領域からの情報を基に、運動前野に投射し、恐怖などの負の刺激に対する回避行動を担うとされている。後帯状回は、空間認知と記憶に関与することが知られている。我々は、ラットの帯状回においてストレス応答マーカーである Phosphorylated Extracellular Signal-regulated Kinase (pERK) を指標とし、拘束ストレス、および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。

コントロール群と比較した場合、ストレス群では、前帯状回、中帯状回および後帯状回の pERK 免疫陽性細胞数の有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。さらに、ストレスチューイング群の前帯状回および後帯状回における pERK 免疫陽性細胞数は、ストレス群よりも有意に増加した ($p < 0.01$)。中帯状回は、チューイングすることでストレスによって誘導される pERK 免疫陽性細胞数の増加を抑制させる傾向を示した。

先行研究では、前帯状回の活性化が中脳中心灰白質を経由して、脊髄神経の損傷に伴う痛覚の減弱に繋がるということが報告されている。また、背外側中脳中心灰白質は痛覚情報をコントロールする抑制性の下行性伝導路の要を担っている領域とされている。前帯状回を含む帯状回が、ストレス誘導性の血中コルチコステロン濃度上昇に対し、負のフィードバック機能を担っているという報告がされている。これらのことは、ストレス中のチューイングが、前帯状回の神経細胞をより活性化することを示唆し、チューイングによって増強された活性化神経細胞が、前帯状回の抑制性の投射経路を使って、島皮質、視床下部、海馬、中脳中心灰白質、血中コルチコステロン濃度などにみられるチューイングのストレス緩和作用を遂行していることが示唆される。

中帯状回におけるチューイングのストレス応答抑制効果は、島皮質や視床下部で見られる現象と類似し、前帯状回の抑制性の投射を受けることによって生じていることが示唆される。

後帯状回は、前視床核や海馬支脚をへて海馬から主要な投射を受けている。ストレス情報が前視床核を経て後帯状回に達し、pERK 免疫陽性細胞数を増加させることを示唆している。また、ストレス中のチューイング情報は、同様に前視床核を経て、pERK 免疫陽性細胞数の増加を増幅するに至ることを示唆している。

これらの結果より、帯状回が負のフィードバック効果に関与しており、チューイングのストレス緩和作用の高次中枢として重要な役割を果たしていることが示唆された。

論文審査要旨

ストレスは、様々な神経疾患の発症や重症化に関与しており、海馬では持続的な慢性ストレスが海馬の萎縮を引き起こすなど、脳神経に影響をおよぼす。一方、ストレス反応の緩和において咀嚼器官の役割についての研究から、チューイングが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数の抑制に関与することが示されるなど、これまでの申請者の研究グループが行ってきたチューイングの脳への影響を明らかにすることで、咀嚼器官の新たに意義の追及は極めて評価できる。とくに、ストレス反応に関与する帯状回に注目した研究はこれまでになく新規性の高い論文である。

用いた動物はラットであり、適切な安楽死の方法がとられ、実験動物倫理委員会の承認も受けていることを確認した。方法は、過去の文献に従い拘束ストレスを負荷し、チューイングは木製のスティック棒を咬ませておりストレス反応緩和のモデルとしている。また、帯状回を前・中・後に分けるために脳アトラスを用いて詳細に部位を特定している。免疫組織化学的方法は、いわゆるフリーフローティング法であり適切な選択がされている。ストレスマーカーとしては、神経細胞がストレスで応答することで生じるリン酸化型細胞外シグナル誘導性キナーゼ（以下 pERK）の検出を試みており、過去の文献から考慮して適切と判断できた。統計方法にも問題はなく、方法は適切に実施されていた。

コントロール群と比較してストレス群で、3 部位の帯状回で pERK 陽性細胞は有意に増加した。さらに、チューイング群では前帯状回と後帯状回において、ストレス群より pERK 陽性細胞は有意に増加した。中帯状回では、有意な差は無かった。以上の結果は明瞭に示されていた。

帯状回は、ストレス誘導性の血中コルチコステロン濃度の上昇に対して負のフィードバック機能を担っていると報告されている。申請者らは、過去に島皮質においてチューイングで pERK は減少すると報告してきたが、その理由として帯状回に認められる抑制性の投射経路により、ストレス抑制反応を誘導するという考察をしている。特に、帯状回のチューイング群で pERK は亢進しており、そのことが抑制性神経を活性化しているのは十分に考えられる。すなわち、帯状回がチューイングのストレス反応緩和作用の高次中枢である可能性を示唆しており、新たな知見として学術的な意義が認められる。

審査委員会は、申請者に内容の説明を求め質疑応答を行い、論文の背景、方法の適切性、結果の解釈と考察のプロセスなどの確認を行い、十分な説明を得た。

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。

2020 年 2 月 28 日

主査：槻木 恵一

副査：高橋 理

副査：高橋 聡子

目次

緒言	1
実験材料および方法	3
結果	6
考察	8
結論	11
謝辞	12
文献	13
図	
図 1	19
図 2	20
図 3	21
図 4	22
図 5	23
図 6	24

緒 言

多種多様なストレスに対する特定の生理学的および心理学的変化が起こることは以前から報告されている¹⁾。ストレスは、胃潰瘍、リンパ萎縮、副腎肥大など、様々な病気を引き起こすことが分かっている^{2,3)}。ストレス誘発性障害で見られる変化は、視床下部-下垂体-副腎系および/または交感神経系の活性化に起因している。帯状回は大脳辺縁系に属し、刺激に対する感情的な反応を調節し、ストレスへの反応に関与している。そのため、アルツハイマー病や抑うつ障害などの様々な神経疾患に関連している^{4,5)}。

帯状回は、前部、中部、および後部の 3 つの領域に分かれている。前帯状回 (anterior cingulate cortex; ACC) は、感情を伴う身体運動に関連すると考えられており、加えて、痛覚情報の処理に重要な役割を果たしている^{6,7)}。後帯状回 (posterior cingulate cortex; PCC) は、空間認知と記憶に関与することが知られている^{8,9)}。中帯状回 (mid-cingulate cortex; MCC) は、帯状運動野とも呼ばれ、運動前野への出力により、骨格運動の制御に関与するとして最近特定された領域である^{8,10)}。

ブラキシズムは、ヒトにおいて帯状回を含む脳の様々な領域を活性化している¹¹⁾。チューイングは、脳のストレス反応を調節する自発的な行動であると言われている¹²⁾。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¹³⁾。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制すると言われている¹⁴⁾。さらに、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も

阻止する¹⁵⁾。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 (long-term potentiation; LTP) の減弱を抑制する¹⁶⁾。これらの結果は、チューイングがストレスに応答するいくつかの脳領域において、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。

MAP キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase) はセリン/スレオニンキナーゼの一つであり、細胞にかかる様々なストレス応答としてこの経路が作動する。MAP キナーゼの一種である細胞外シグナル誘導性キナーゼ (Extracellular Signal-regulated Kinase; ERK) のリン酸化型 ERK (pERK) はこれまで多くの研究においてストレス応答細胞の検出に利用されてきた。本研究では、この検出系を用い、ラットの帯状回においてストレス、およびストレス下のチューイングの影響を調べた。

実験材料および方法

10 週齢の雄の Sprague-Dawley ラット（日本 SLC、静岡、日本）を $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ の温度で 12 時間明/ 12 時間暗サイクルで飼育した。本実験は、神奈川歯科大学動物実験倫理委員会の承認を受け（許可番号、18-023）、委員会が定めた動物実験指針に従って実施した。

ラットはコントロール群 ($n = 5$)、拘束ストレスのみのストレス群 ($n = 5$)、拘束ストレスをかけている間にチューイングをさせたストレスチューイング群 ($n = 5$) 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が、ストレス群およびストレスチューイング群のラットには確立されたプロトコルにより、急性ストレスの一つである拘束ストレスを与えた^{13-15, 17-19}。拘束ストレスは、各ラットを仰臥位にし、四肢をタコ糸により木製のボード (18 cm×25 cm) に固定することで与えた。前肢は体の正中線に対して 45° 、後肢は体の正中線に対して 135° になるように粘着テープを使用し固定した。拘束ストレスをかける時間は、これまでの大貫らの研究に準じ、30 分とした¹⁹。ストレス群のラットは 30 分間この位置に固定され、ストレスチューイング群は 30 分間の拘束ストレス中に木製のスティックを噛ませた。拘束ストレスの直後に、ストレス群、ストレスチューイング群のラットを麻酔後、灌流固定した。

麻酔は、ペントバルビタールナトリウム (35 mg / kg *ip*、和光純薬工業株式会社、大阪、日本) を使用し、ラットの足や尻尾を強く圧迫し、痛覚に対する反応がないことを確認し、0.9%NaCl で経心的に灌流した。その後、4%パラホルムアルデヒドと 0.2%ピクリン酸を含む、0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液 (PB; pH 6.9) で灌流固定を行った。速やかに脳を摘出し、帯状回を 3 つの部分に分けた。脳は、視交叉を基準に 6 mm 前方、3 mm 前方、4 mm 後方で横方向に切断し

た。最も前方の部分は ACC、中央の部分は MCC、最も後方の部分は PCC を含む領域とした。3 つのブロックは、前述と同じ固定液で 4°C、1 または 2 日間さらに浸漬し、後固定をした。

免疫組織化学的検索は 0.1 M PB (pH 7.4) で洗浄し、20%スクロースに浸漬後、凍結ステージを備えたスライド式マイクロトームを使用して、試料を厚さ 20 μ m の横断面に切断した。4 枚に 1 枚の切片を集めて、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 を含む 0.1 M PB (pH 7.4;PBS) で一晩洗浄し、一次抗体として 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 ERK を検出するが、非リン酸化型は検出しない。抗体は、1:750 の希釈で、1%ウシ血清アルブミン (BSA) と 0.3%Triton X-100 (PBS-BSAT) を含む PBS で希釈した。切片はこの溶液で 4°C、3 日間反応させた。PBS で洗浄した後、切片を PBS-BSAT で 1:100 に希釈した第 2 次抗体 (biotinylated goat anti-rabbit IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で室温 1 時間反応させた。次に、切片を再度 PBS で洗浄し、PBS-BSAT で 1:200 に希釈した avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC; Vector Laboratories) で室温 30 分間反応させた。PBS で最終洗浄した後、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。その後、切片はチオニンで対照染色し、アルコールで脱水、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。

帯状回は、ラット脳アトラスを参照し、前帯状回 (ブレグマ+3.00 mm から+1.20 mm の範囲)、中帯状回 (ブレグマ-0.12 mm から-1.92 mm の範囲)、後帯状回 (ブ

レグマ-3.00 mm から-4.92 mm の範囲) の 3 つの領域に分けた²⁰⁾。1 個体の帯状
回の各領域からの約 11 枚を使用して、免疫陽性細胞体の総数を数えた。光学顕
微鏡の倍率 100 倍 (対物レンズ 10 倍×接眼レンズ 10 倍) で観察しながら細胞
数をカウントした。統計分析は、Statcel 3 プログラム (OMS publishing Inc.、
Tokorozawa, Japan) を用いて行った。免疫陽性細胞数は、平均±標準偏差 (SD)
として示した。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

免疫陽性細胞体は紡錘形または楕円形であり(図 1I)、主に外顆粒層(第Ⅱ層)または外錐体層(第Ⅲ層; 図 1E)に散在していた。免疫陽性線維は、多くの場合、免疫陽性細胞体から伸びていた(図 1C)。免疫陽性線維が免疫陽性細胞体と連続して観察される場合、多くの pERK 免疫陽性線維は先端樹状突起であった。基底樹状突起が、ストレスチューニング群で見られることもあった(図 1I)。免疫陽性線維における免疫染色強度は、免疫陽性細胞体における免疫染色強度よりも弱かった(図 1I)。

ACC

ストレス群 (14.5 ± 10.0 ; 図 1D-F および図 2) の ACC における pERK 免疫陽性細胞の数は、コントロール群 (7.2 ± 9.3 ; 図 1A-C) と比較して有意に多かった ($p < 0.01$)。ストレスチューニング群では、pERK 免疫陽性細胞の数は 27.9 ± 15.3 個であり、コントロール群およびストレス群と比較して有意に多かった ($p < 0.01$; 図 1G-I および図 2)。

MCC

MCC において、コントロール群では pERK 免疫陽性細胞は観察されなかったが(図 3A-C)、ストレス群では 4.6 ± 6.8 個の細胞が観察され(図 3D-F)、2つの群の間で有意差 ($p < 0.01$) があった(図 4)。pERK 免疫陽性細胞の数は、ストレス群と比較して、ストレスチューニング群 (2.8 ± 3.0 ; 図 3G-I) で減少する傾向があったが、有意差はなかった(図 4)。しかし、コントロール群と比較した場合、ストレスチューニング群は pERK 免疫陽性細胞の数は有意に多かった(図

4)。

PCC

PCC では、コントロール群の pERK 免疫陽性細胞の数 (0.4 ± 1.1 ; 図 5A-C) は、ストレス群 (2.0 ± 3.6 ; 図 5D-F) と比較して有意に少なかった ($p < 0.01$; 図 6)。同様に、コントロール群の pERK 免疫陽性細胞の数はストレスチューニング群 (2.4 ± 2.3 ; 図 5G-I) と比較して有意に少なかった ($p < 0.01$; 図 6)。さらに、ストレスチューニング群の pERK 免疫陽性細胞の数は、ストレス群と比較し有意に多かった ($p < 0.05$; 図 6)。

考 察

ERK は、細胞分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼの一つである。ERK は種々の細胞外刺激、すなわちコンカナバリン A などの細胞分裂促進因子、成長因子、サイトカインによってリン酸化される²¹⁾。ERK のリン酸化は *c-fos* の転写を誘導する重要なファクターである²²⁾。*c-fos* 遺伝子の転写、翻訳タンパク質である Fos は種々の生理学的ストレス刺激に応答する神経細胞の指標として、広く使用されてきた²³⁾。加えて、中枢神経系では、ERK のリン酸化は海馬の誘発長期増強²⁴⁾ や薬物乱用²⁵⁾ に関与することが知られている。また、味覚刺激や逃避行動抑制が、島皮質のリン酸化 ERK (pERK) 免疫陽性細胞の増加を誘導することが知られている²⁶⁻²⁸⁾。これらの知見は、pERK 免疫活性の増強が神経細胞の活性化を反映していることを示唆する。本実験で使われた刺激の種類は、味覚刺激や逃避行動抑制とは異なるものであるが、我々の以前の研究は、拘束ストレスが、視床下部、島皮質、中脳中心灰白質などの、脳の種々の領域で pERK 免疫陽性細胞の数を増強させることを示している¹⁷⁻¹⁹⁾。このことは、これら脳領域の神経細胞が拘束ストレスによって活性化されることが示唆される。ストレス中のチューイングは、ストレス誘導性の pERK 免疫陽性細胞の増加を抑制する。この事実は、チューイングによって活性化する神経回路が、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示唆される。結果として、チューイングのストレス緩和作用を具現していると考えられる。

一般に帯状回は、前帯状回、中帯状回、後帯状回からなる⁸⁾。近年新規な亜領域に分ける意見も提唱されているが^{9, 10)}、本論文では、従来の齧歯類を実験動物として得られたデータと比較検討するため、この三領域に分ける一般的な分類に従った。

本研究では、ストレス中のチューイングが、前帯状回のストレス誘導性の pERK 免疫陽性細胞数の増加を増幅するという結果が得られた。前帯状回は、痛覚情報の処理、自律神経系と内分泌機能の調節、悲観的情緒形成に関与するとされている^{6, 7)}。興味深い点は、前帯状回の活性化が、中脳中心灰白質を經由して、脊髄神経の損傷に伴う痛覚の減弱に繋がるという報告が存在することである²⁹⁾。中脳中心灰白質に着目した我々の先行研究¹⁸⁾によれば、ストレス中にチューイングさせることにより、ストレス誘導性の pERK 免疫陽性細胞数の増加が抑制される。この現象は、中脳中心灰白質の一亜領域である背外側中脳中心灰白質で著明であった¹⁸⁾。この背外側中脳中心灰白質は痛覚情報をコントロールする抑制性の下行性伝導路の要を担っている領域とされている^{30, 31)}。これらのことは、ストレス中のチューイングが、前帯状回の神経細胞をより活性化することを示唆し、チューイングによって増強された活性化神経細胞が、前帯状回の抑制性の投射経路を使って、島皮質¹⁹⁾、視床下部¹⁷⁾、海馬¹⁶⁾、中脳中心灰白質¹⁸⁾、血中コルチコステロン濃度³²⁾などにみられるチューイングのストレス緩和作用を遂行していることが示唆される。この考えを支持する事実として、前帯状回を含む帯状回が、ストレス誘導性の血中コルチコステロン濃度上昇に対し、負のフィードバック機能を担っているという報告がある^{33, 34)}。

中帯状回は前帯状回、後帯状回を含む種々の大脳皮質領域からの情報を基に、運動前野に投射し、恐怖などの負の刺激に対する回避行動を担うとされている^{8, 10)}。この領域の pERK 免疫陽性細胞は、前帯状回や後帯状回と異なり、チューイングがストレス誘導性の免疫陽性細胞数の増加を抑制する傾向を示した。このチューイングのストレス応答抑制効果は、島皮質や視床下部で見られる現象と類似し、前帯状回の抑制性の投射を受けることによって生じていることが示唆される。実際に前帯状回から中帯状回への投射経路の存在が証明されている³⁵⁾。

36)。

後帯状回は、前視床核³⁷⁾や海馬支脚をへて海馬^{38, 39)}から主要な投射を受ける。この神経連絡を基に、後帯状回は、齧歯類では、空間認知や学習に関与するとされ⁴⁰⁻⁴⁵⁾、ヒトでは情緒にともなう行動に関与するとされている^{45, 46)}。興味深い点は、視床からの後帯状回への投射は、後帯状回の第 II 層と、第 IV 層に終末を形成することである³⁷⁾。本研究において、pERK 免疫陽性細胞が観察された主な領域も第 II 層であった。このことは、ストレス情報が前視床核を経て後帯状回に達し、pERK 免疫陽性細胞数を増加させるに至ることを示唆している。また、ストレス中のチューニング情報は、同様に前視床核を経て、pERK 免疫陽性細胞数の増加を増幅するに至ることを示唆している。

結 論

本研究は、拘束ストレスがラット帯状回における pERK 免疫陽性細胞数を増加させることを示したものである。また、前帯状回、後帯状回においては、ストレス中のチューイングがストレス誘導性の pERK 免疫陽性細胞数の増加を増幅することを示したものである。

これまでの研究で、視床下部、海馬、扁桃体、島皮質などでは拘束ストレスが pERK 免疫陽性細胞数を増加させ、チューイングが pERK 免疫陽性細胞数を減少させることが判明しており、チューイングがストレス軽減効果を持つことが分かっている¹⁴⁻¹⁹⁾。

この帯状回でのチューイングによる増幅現象が、おそらく、視床下部や海馬などの脳の諸領域で見られるチューイングのストレス緩和作用と関連があるものと考えられる。本研究は、チューイングのストレス緩和作用の高次中枢として、帯状回を候補として提示できたが、チューイングのストレス緩和作用を遂行している神経経路は、おそらく、より複雑なものと推定される。したがって、より詳細なこの神経経路の解明には、さらなる研究が必要と考えられる。

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、本学口腔科学講座 山本利春先生、猿田樹理先生、本学口腔統合医療学講座 大貫真美先生、自治医科大学歯科口腔外科学講座 笹栗健一先生、山田健太郎先生に心より深謝の意を表します。

文 献

- 1) Ventura J: Psychotic disorders. In Encyclopedia of Stress. Fink G, editor; Academic Press, New York, 308–316, 2007.
- 2) Murison R, Milde AM: Ulceration, gastric. In Encyclopedia of Stress. Fink G, editor; Academic Press, New York, 787–791, 2007.
- 3) Aarella VG, Mudenha ET, Okpe A, Fernando DJ, Acute transient stress induced adrenal hypertrophy and adrenal medullary hyperactivity, Eur. J. Case Rep. Intern. Med. 2 doi: 10.12890/2015 000257, 2015.
- 4) Leech R, Sharp DJ. The role of the posterior cingulate cortex in cognition and disease. Brain 137: 12–32, 2014.
- 5) Drevets WC, Savitz J, Trimble M. The subgenual anterior cingulate cortex in mood disorders. CAN Spectr. 13: 663–681, 2013.
- 6) Fuchs PN, Peng YB, Boyette–Davis JA, Uhelski ML. The anterior cingulate cortex and pain processing. Front. Integr. Neurosci. 8: 35: doi: 10.3389/fnint.2014.00035, 2014.
- 7) Alexander L, Clarke HF, Roberts AC. A focus on the functions of area 25. Brain Sci. 9 doi: 10.3390/brainsci9060129, 2019.
- 8) Rolls ET. The cingulate cortex and limbic systems for emotion, action, and memory. Brain Struct. Funct. doi: 10.1007/s00429-019-01945-2, 2019
- 9) Vogt BA, Paxinos G. Cytoarchitecture of mouse and rat cingulate cortex with human homologies. Brain Struct. Funct. 219: 185–192, 2014.
- 10) Vogt BA. Midcingulate cortex: Structure, connection, homologies, functions and diseases. J. Chem. Neuroanat. 74: 28–46, 2016.

- 11) Otsuka T, Watanabe K, Hirano Y, Kubo K, Miyake S, Sato S, Sasaguri K. Effects of Mandibular Deviation on Brain Activation During Clenching: An fMRI Preliminary Study. *CRANIO®*. 27: 88-93, 2009.
- 12) Sasaguri K, Yamada K, Yamamoto T. Uncovering the neural circuitry involved in the stress-attenuation effects of chewing. *J. Dent. Sci. Rev.* 54: 118-126, 2018.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) Yamada K, Narimatsu Y, Ono Y, Sasaguri K, Onozuka M, Kawata T,

Yamamoto T. Chewing suppresses the stress-induced increase in the number of pERK-immunoreactive cells in the periaqueductal grey. *Neurosci. Lett.* 599: 43-48, 2015.

19) Onuki M, Yamamoto T, Sasaguri K, Yamada K, Okada N, Kawata T. Chewing ameliorates the effects of restraint stress on pERK-immunoreactive neurons in the rat insular cortex. *Neurosci. Lett.* 674: 60-65, 2018.

20) Paxinos G, Watson C. *The rat brain stereotaxic coordinates.* Academic Press, New York, 2007.

21) Piali AT, Humphreys JM, Goldsmith EJ. MAP kinase modules: the excursion model and the steps that count. *Biophys. J.* 107: 2006-2015, 2014.

22) Cruz FC, Rubio FJ, Hope BT. Using c-fos to study neuronal ensembles in corticostriatal circuitry of addiction. *Brain Res.* 1628: 157-173, 2015.

23) Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog. Neurobiol.* 50: 83-107, 1996.

24) Sweatt JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. *J. Neurochem.* 76: 1-10, 2001.

25) Zamora-Martinez ER, Edwards S. Neuronal extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity as marker and mediator of alcohol and opioid dependence. *Front. Integr. Neurosci.* 8: 24, 2014.

26) Fornari RV, Wichmann R, Atucha E, Desprez T, Eggens-Meijer E, Roozendaal B. Involvement of the insular cortex in regulating

glucocorticoid effects on memory consolidation of inhibitory avoidance training. *Front. Behav. Neurosci.* 6: 10, 2012.

27) Kobayashi M, Fujita S, Takei H, Song L, Chen S, Suzuki I, Yoshida A, Iwata K, Koshikawa N. Functional mapping of gustatory neurons in the insular cortex revealed by pERK-immunohistochemistry and in vivo optical imaging, *Synapse* 64: 323-334, 2010.

28) Berman DE, Hazvi S, Neduva V, Dudai Y. The role of identified neurotransmitter systems in the response of insular cortex to unfamiliar taste: activation of ERK1-2 and formation of a memory trace. *J. Neurosci.* 20: 7017-7023, 2000.

29) LaBuda CJ, Fuchs PN. Attenuation of negative pain affect produced by unilateral spinal nerve injury in the rat following anterior cingulate cortex activation. *Neuroscience* 136: 311-322, 2005.

30) McMullan S, Lumb BM. Midbrain control of spinal nociception discriminates between responses evoked by myelinated and unmyelinated heat nociceptors in the rat. *Pain* 124: 59-68, 2006.

31) Waters AJ, Lumb BM. Descending control of spinal nociception from the periaqueductal gray distinguishes between neurons with and without C-fibre input. *Pain* 134: 32-40, 2008.

32) Lee T, Saruta J, Sasaguri K, Sato S, Tsukinoki K. Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. *Brain Res.* 1195: 43-49, 2008.

33) Diorio D, Viau V, Meaney MJ. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal

- responses to stress. *J. Neurosci.* 13: 3839–3847, 1993.
- 34) Veer IM, Oei NYL, Spinhoven P, van Buchem MA, Elzinga BM, Rombouts SARB. Endogenous cortisol is associated with functional connectivity between the amygdala and medial prefrontal cortex. *Psychoneuroendocrinology* 37: 1039–1047, 2012.
- 35) Jones BF, Groenewegen HJ, Witter MP. Intrinsic connections of the cingulate cortex in the rat suggest the existence of multiple functionally segregated networks. *Neuroscience* 133: 193–207, 2005.
- 36) van Groen T, Wyss JM. Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 463: 249–263, 2003.
- 37) van Groen T, Wyss JM. Projections from the anterodorsal and anteroventral nucleus of the thalamus to the limbic cortex in the rat. *J. Comp. Neurol.* 358: 584–604, 1995.
- 38) Wang J, Akaike T, Sokabe M. Spatiotemporal properties of neural activity propagation from the subicular complex to the posterior cingulate cortex in rat brain slices detected by the optical recording technique. *Jpn. J. Physiol.* 49: 445–455, 1995.
- 39) Hedberg TG, Sperber EF, Veliskova J, Hoshe SL. Laminar and temporal heterogeneity of NMDA/metabotropic glutamate receptor binding in posterior cingulate cortex. *J. Neurophysiol.* 84: 1881–1887, 2000.
- 40) Aggleton JP, O’ Mara SM, Vann SD, Wright NF, Tsanov M, Erichsen JT. Hippocampal–anterior thalamic pathways for memory: uncovering a network of direct and indirect actions. *Eur. J. Neurosci.* 83: 2292–2307, 2010.
- 41) Cooper BG, Mizumori SJ. Temporary inactivation of the retrosplenial

cortex causes a transient reorganization of spatial coding in the hippocampus. *J. Neurosci.* 21: 3986–4001, 2001.

42) Dumont JR, Petrides M, Sziklas V. Fornix and retrosplenial contribution to a hippocampo-thalamic circuit underlying conditional learning. *Behav, Brain Res.* 209: 13–20, 2010.

43) Garden DLF, Massey PV, Caruana DA, Johnson B, Warburton EC, Aggleton JP, Bashir ZI. Anterior thalamic lesions stop synaptic plasticity in retrosplenial cortex slices: expanding the pathology of diencephalic amnesia. *Brain*: 1847–1857, 2009.

44) Pothuizen HHJ, Aggleton JP, Vann SD. Do rats with retrosplenial cortex lesions lack direction? *Eur. J. Neurosci.* 28: 2486–2498, 2008.

45) Vann SD, Aggleton JP, Maguire EA. What does the retrosplenial cortex do? *Nat. Rev. Neurosci.* 10: 792–802, 2009.

46) Maddock RJ. The retrosplenial cortex and emotion: new insights from functional neuroimaging of the human brain. *Trends Neurosci.* 22: 310–316, 1999.

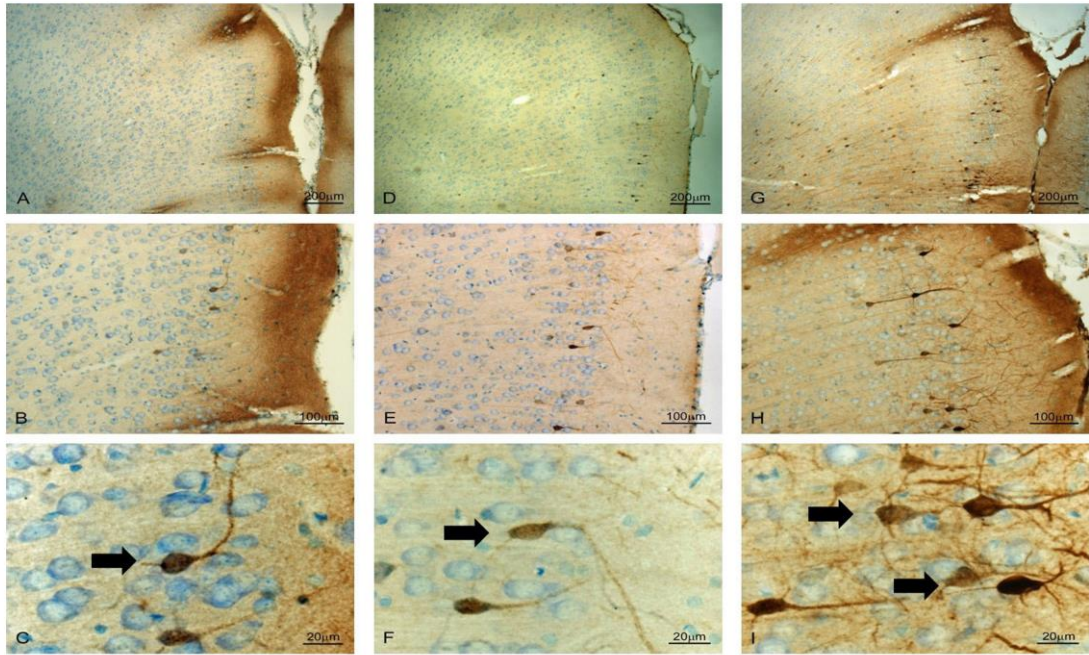


図1:前帯状回の低倍率(A,D,G)、中間倍率(B,E,H)、高倍率(C,F,I)におけるpERK免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A-C)、ストレス群(D-F)、ストレスチューイング群(G-I)。CとFとIにおける矢印はpERK免疫陽性細胞を示す。切片はチオニンによる対照染色を施したもの。
Scale bars in A, D and G = 200 μ m; B, E and H = 100 μ m; C, F and I = 20 μ m

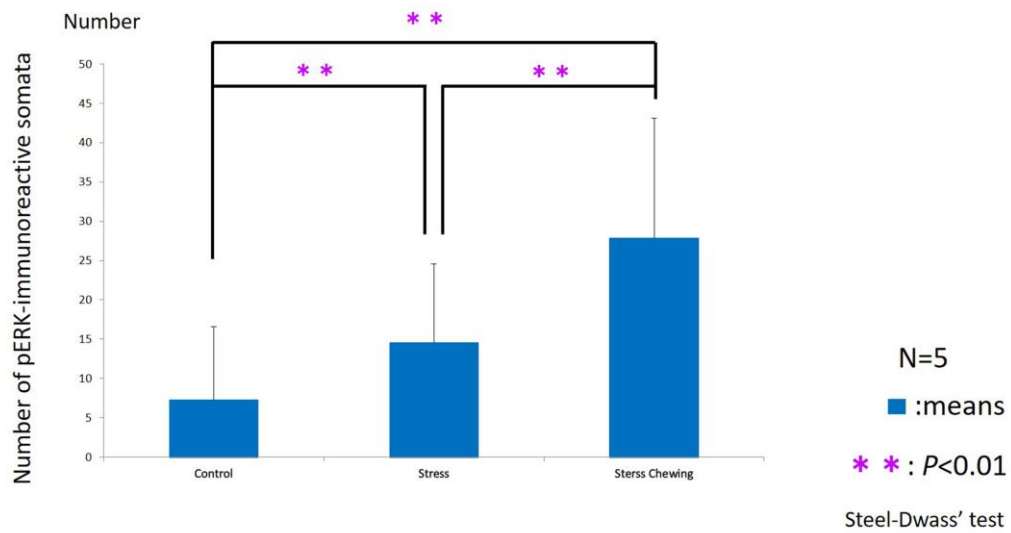


図2:前帯状回におけるpERK免疫陽性細胞体の数(平均±SD)。

左からコントロール群、ストレス群、ストレスチューイング群を示す。

カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。

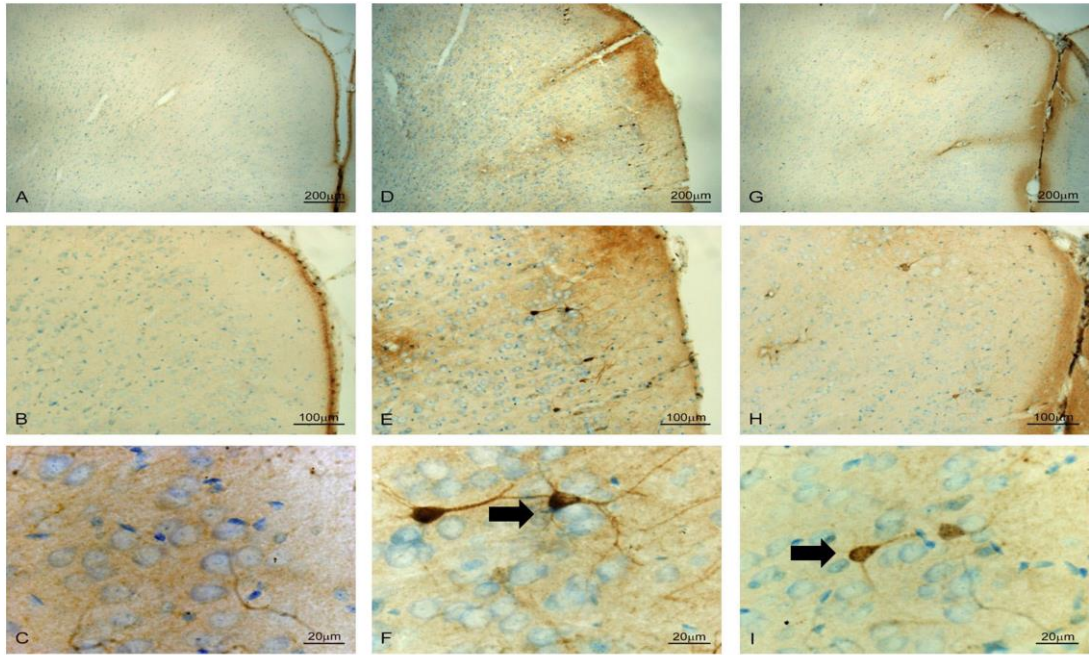


図3:中帯状回の低倍率(A,D,G)、中間倍率(B,E,H)、高倍率(C,F,I)におけるpERK免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A-C)、ストレス群(D-F)、ストレスチューイング群(G-I)。FとIにおける矢印はpERK免疫陽性細胞を示す。切片はチオニンによる対照染色を施したもの。
Scale bars in A, D and G = 200 μ m; B, E and H = 100 μ m; C, F and I = 20 μ m

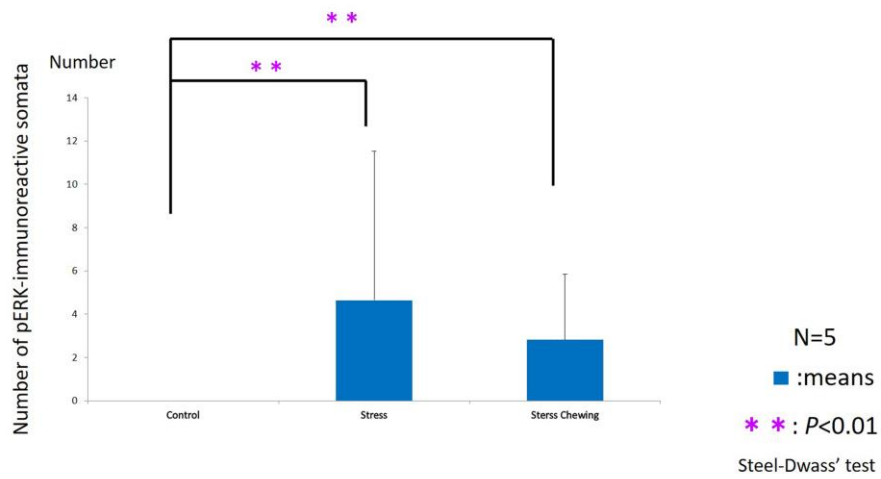


図4: 中帯状回におけるpERK免疫陽性細胞体の数(平均±SD)。
 左からコントロール群、ストレス群、ストレスチューイング群を示す。
 カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。

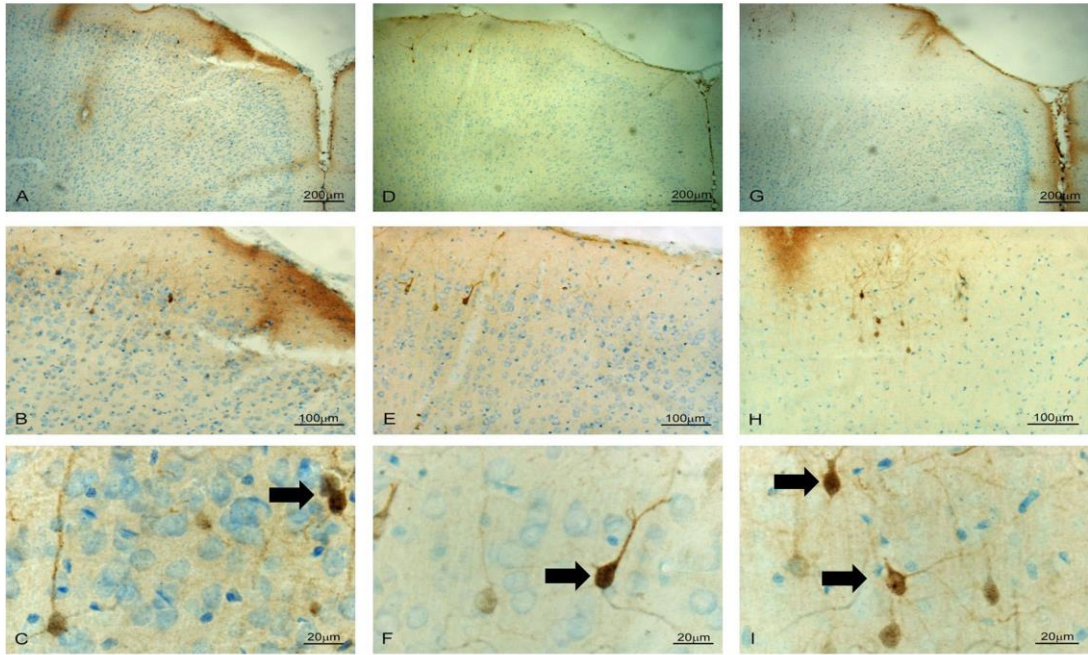


図5:後帯状回の低倍率(A,D,G)、中間倍率(B,E,H)、高倍率(C,F,I)におけるpERK免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A-C)、ストレス群(D-F)、ストレスチューイング群(G-I)。CとFとIにおける矢印はpERK免疫陽性細胞を示す。切片はチオニンによる対照染色を施したもの。

Scale bars in A, D and G = 200 μ m; B, E and H = 100 μ m; C, F and I = 20 μ m

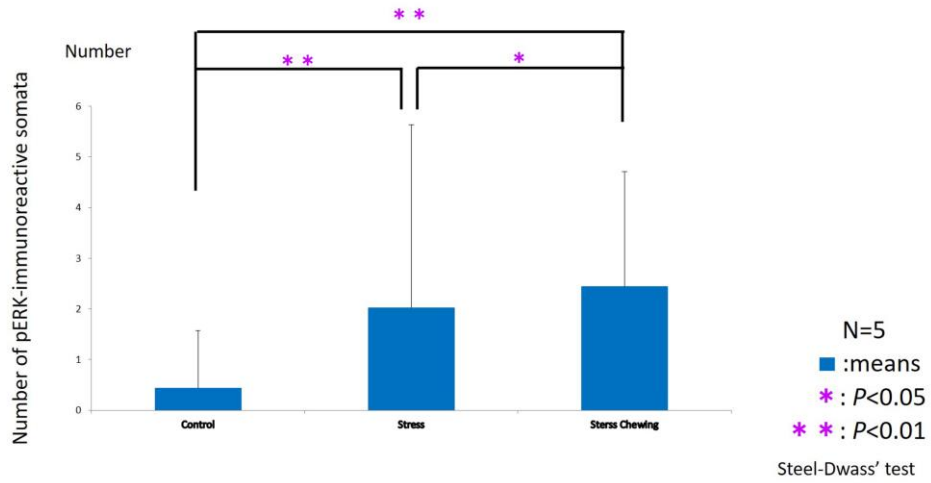


図6:後帯状回におけるpERK免疫陽性細胞体の数(平均±SD)。

左からコントロール群、ストレス群、ストレスチューイング群を示す。

カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。