

咀嚼運動がストレス性骨粗鬆症発症
に及ぼす影響

ふるざわ まなぶ
古澤 学

本論文の要旨は，第146回朝日大学大学院歯学研究科発表会（平成25年9月24日，岐阜）において発表した．また本論文の一部は，日本補綴歯科学会東海支部学術大会（平成24年12月15，16日，愛知），91th International Association for Dental Research（平成25年3月20～23日，シアトル），第122回日本補綴歯科学会（平成25年5月18，19日，福岡），において発表した．

緒 言

近代化社会における急激な社会構造の変化に伴い、ストレスに関連した疾患が急増し深刻な社会問題となっている^{1, 2)}。ストレスが生体に負荷されると視床下部—下垂体—副腎系（HPA系）と交感神経系が活性化され副腎皮質からはグルココルチコイドが、交感神経末端や副腎髄質からはノルアドレナリンやアドレナリンが分泌され、ストレス反応が開始される³⁾。グルココルチコイドやノルアドレナリンなどは生体の恒常性維持に不可欠であるが、戦争などの非常に強い衝撃や弱くても持続的なストレスに長期間暴露されると、これらのストレス関連物質が過剰かつ持続的に分泌され、神経系、内分泌系、免疫系などの生体機能のバランスが崩され、癌^{4, 5)}、循環器疾患⁶⁻⁸⁾、消化器疾患^{9, 10)}、うつ病やPTSDなどの精神疾患¹¹⁻¹³⁾が誘発されるといわれている。

最近、慢性ストレスが骨量を減少させ骨粗鬆症のリスクファクターになるという研究成果が発表された¹⁴⁻¹⁸⁾。例えば、マウスを用いた実験で、慢性ストレスにより交感神経系の活動が高まり、骨局所でのノルアドレナリン濃度が上昇することにより骨芽細胞数が減少し、骨構造が悪化すること¹⁶⁾が報告された。また、慢性ストレスによりコルチコステロンが過剰分泌されると骨芽細胞の増殖や分化が抑えられ骨形成が抑制さ

れることや，破骨細胞のアポトーシスが抑えられ破骨細胞の寿命が延長し，結果として骨量が減少すること^{17, 18)}などがわかってきた．これらの結果は慢性ストレスがHPA系および交感神経系の活性化を引き起こし，分泌されたノルアドレナリンやグルココルチコイドが骨形成と骨吸収過程のバランスを崩して骨粗鬆症を発症することを示している．

一方，噛む動作がストレスを緩和させるという実験データが発表され，ヒトや動物を対象にした数多くの研究が行われ咀嚼刺激によるストレス緩和機構の一部が解き明かされつつある．これまでに，拘束ストレス下のラットに木の棒を噛ませると，ストレス性に惹起される視床下部室傍核(PVN)での副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)の分泌量¹⁹⁾，血中ACTH濃度^{20, 21)}，血中グルココルチコイド濃度^{20, 22-24)}および血中カテコールアミン量などの上昇が抑制されること^{24, 25)}などがわかってきた．また，磁気共鳴機能画像法(fMRI)を用いたヒトを対象とした実験において，ストレス条件下でガムの咀嚼を行わせるとストレス反応性に上昇する血中カテコールアミン量や血中ACTH濃度が低下することや，脳の扁桃体や前頭前野の賦活化が抑制されること²⁶⁾なども明らかとなってきた．これらの結果は，咀嚼刺激がストレス反応をコントロールしている大脳辺縁系，特に扁桃体の活動を抑えて，HPA系や交感神経系のストレス反応を緩和していることを示唆するもの

である．

本研究では，老化促進モデルマウス（SAMP8）を用いて慢性ストレス条件下で咀嚼様刺激を加えたマウスと咀嚼様刺激を加えなかったマウスにおいて骨量と骨質を3次元画像解析し，ストレス関連物質と骨代謝マーカーの測定を行い，咀嚼様刺激によるストレス性骨粗鬆症の改善効果を検討した．

材料及び方法

実験には5カ月齢の雄の老化促進モデルマウス(SAMP8)、30匹を使用した。SAMマウスは老化傾向を示すSAMP系統と、正常老化を示すSAMR系統に分けられ、老化関連の研究に広く用いられている²⁷⁻³⁰⁾。SAMP系統は、SAMR系統と比較して活動性の低下や体毛、視力の衰えなどの老化兆候が早期に起こる³¹⁾。また、寿命は約12カ月で、他のマウス(約24~36か月)の約半分である^{30, 31)}。SAMP8の骨量は、生後6ヶ月齢頃までに骨の成長がピークを迎え、その後SAMR系統と比較して早期に減少する³²⁾。

本実験では、朝日大学歯学部実験動物飼育施設において兄妹交配により繁殖させたSAMP8を使用した。室温 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 2\%$ 、6時より18時まで点灯、18時より6時まで消灯の明暗周期の条件下でマウスを飼育し、固形飼料(日本クレア社、CE-2、東京)と水は自由に摂取できる状態とした。

なお、この実験は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承諾を得ている(朝日大学動物倫理委員会許可番号10-021)。

1. 慢性変動ストレスの負荷

ストレスに対する順応^{33, 34)}を避けるため、長さ 8 cm、内径 3.5 cm のプラスチック製のチューブでの拘束処置 (図 1 A) に加え、振とう・水浸・光刺激のいずれかのストレスを組み合わせた慢性変動ストレスを負荷した (図 1 D)。慢性変動ストレスの負荷は乱数表によって作成されたストレスプロトコールに従い実施した (図 1 D)。慢性変動ストレスの負荷は 1 日に 2 回、朝 (9:00) と夕方 (16:00) に 1 時間ずつ実施し、これを 4 週間継続させた。振とうストレスはマウスを拘束したチューブを振とう台に固定し、速度 50 rpm、振り幅 20 mm で 1 時間揺らすことにより実施した (図 2 A)。水浸ストレスでは縦 20 cm、横 35 cm、高さ 15 cm のプラスチック容器に水温 26°C の水を深さ 3 cm まで入れ、マウスを拘束したチューブを浸漬した (図 2 B)。光刺激では明るさ 60 W、810 ルーメンの光源下にマウスを拘束したチューブを曝すことにより行った (図 2 C)。

2. つまようじによる咀嚼様刺激

ストレス/咀嚼群のマウスには上記の慢性変動ストレス負荷中に継続して直径約 2 mm の木製のつまようじを噛ませた (図 1 B, C)。拘束用チューブの片側端に直径約 2 mm の穴を 2 か所設け、木製のつまようじをその穴に通して固定することによりマウスにつまようじを噛ませた。マウスがつまようじを噛みきったら直ぐ

に新たなつまようじを穴に差し込み引き続きマウスにつまようじを嚙ませた。

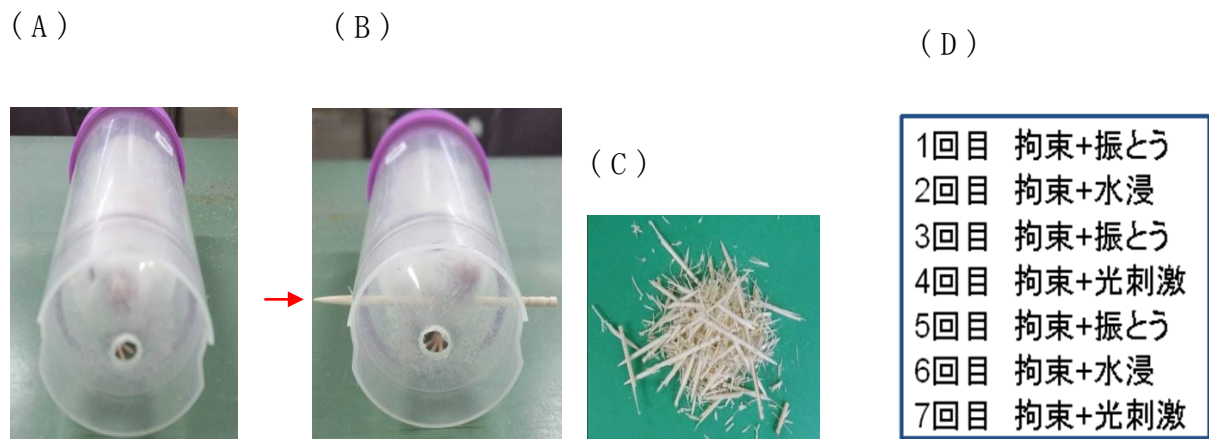


図 1 ストレスプロトコールおよび拘束処置

(A) ストレス群

プラスチックチューブによる拘束処置を示す。

(B) ストレス/咀嚼群

赤い矢印はマウスに嚙ませているつまようじを示す。

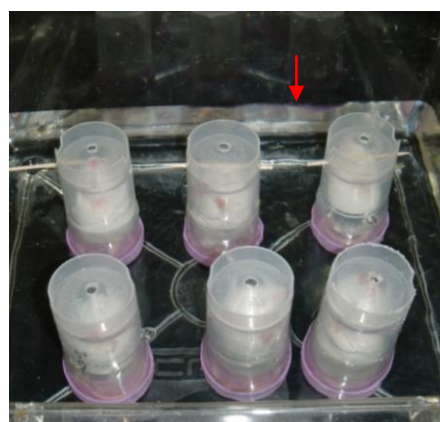
(C) 咀嚼後のつまようじ

(D) ストレスプロトコール

(A)



(B)



(C)



図 2 慢性変動ストレス処置

(A) 拘束 + 振とうストレス

振とう台，速度 50rpm，振り幅 20mm

(B) 拘束 + 水浸ストレス

赤い矢印は水の入っているラインを示す。

深さ 3cm，水温 26℃

(C) 拘束 + 光刺激ストレス

明るさ 60W，810ルーメン

2. 血液生化学検査

1) ストレス関連指標の測定

生体にストレスが加わると HPA 系及び交感神経系が活性化され，副腎皮質よりグルココルチコイドが，副腎髄質よりノルアドレナリンが分泌されストレス応答が開始される³⁾．グルココルチコイドには種差があることが知られており，ヒトやサルなどの霊長類，ウシ・ネコなどではコルチゾールが，ラットやマウスなどのげっ歯類ではコルチコステロンが最も強い生理作用を示す³⁵⁾．このため，本実験ではストレスマーカーとして，コルチコステロン濃度およびノルアドレナリン濃度の測定を行った．さらに，慢性ストレスにより副腎の重量が重くなる^{36, 37)}という報告がみられることから，採血終了後に副腎を摘出し，電子天秤（ME204, Mettler Toledo, Greifensee, CH）にて副腎の重量を測定した．

各群のマウスをペントバルビタール（35.0 mg/kg, Somnopentyl®, 共立製薬，東京）を腹腔内麻酔し，腋窩動脈を切開し全血を採取した（各群，n=10）．血中のコルチコステロン濃度は 20 時に最も高いといわれている³⁸⁾ため，20 時に採血を行った．血液は 2.0 ml のマイクロ遠心管に採取し，4℃で 10 分間，3,500×g で遠心分離した後，血清のみを採取して，分析するまでの期間 -80℃の冷凍庫で保存した．血中ノルアドレナリン濃度はフィルジェン受託解析センター（愛知）に

て Noradrenaline ELISA Kit (IBL International GmbH, HAM, DE) を用いて測定した。血中コルチコステロン濃度は SRL Biochemistry Laboratory (東京) にて AssayMax Corticosterone ELISA Kit (AssayPro, MO, USA) を用いて測定した。

2) 骨代謝関連指標の計測

骨は破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成をくり返し、骨強度と恒常性を維持している³⁹⁾。骨形成マーカーには、骨由来のアルカリホスファターゼ (BAP) 活性、オステオカルシン、1型コラーゲンN端やC端プロペチドなどがあり、それぞれ血中濃度で評価される⁴⁰⁾。一方、骨吸収マーカーには、骨吸収時に破骨細胞が分泌する酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP)、1型コラーゲンの分解産物であるピリジノリンやデオキシピリノジン、1型コラーゲン α 鎖のN端 (NTx) や α 1鎖のC端テロペプチド部分 (CTx) などがあり、血中や尿中の濃度で評価される⁴⁰⁾。本実験では、成熟骨芽細胞が産生・分泌するオステオカルシンを骨形成マーカーとし、骨吸収により生じる1型コラーゲン架橋N-テロペプチド (Ntx) を骨吸収マーカーとして測定した⁴¹⁾。

前述と同様の方法で、腋下動脈から全血を採取し、分析するまでの間 -80°C の冷凍庫で保存した (各群, $n = 10$)。血中オステオカルシン濃度はフィルジェン受託解析センター (愛知) にて Mouse Osteocalcin EIA

Kit (Biomedical Technologies Inc, MA, USA) を用いて測定した。血中 Ntx 濃度は SRL Biochemistry Lab (東京) にて, ELISA NTx Osteomark® (Alere Medical Co., Ltd., 東京) を用いて測定した。

3. マイクロ CT による骨の観察

1) 骨標本の作製

採血終了後, 各群 10 匹のマウスの大腿骨及び第 4 腰椎を摘出した。骨標本は付着した軟組織を除去後 10% フォルマリンで一晩, 4℃で固定を行った。固定後は 70% エタノールで保存した。

2) マイクロ CT 撮影

コーンビーム X 線マイクロ CT システム (MCT - CB100MF, Hitachi Medical Corporation, 東京) を用いて大腿骨及び第 4 腰椎の撮影を行った。撮影条件は管電圧 50kV, 管電流 100mA でスライス間隔 15 μ m, 撮影枚数は 512 スライスとした。

3) 3次元骨形態計測

3D 骨梁構造計測ソフトウェア (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング株式会社, 東京) を用いて大腿骨及び第 4 腰椎の 3次元骨形態計測を行なった。Chen らの方法⁴²⁾に従って, 成長板より 1.0-2.5mm の範囲 100 スライスを計測エリアとし, 2値化し MASK 処理を行い, 海綿骨を抽出した。海綿骨を抽出後に, 骨量 (BV/TV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁数 (Tb.N), 骨梁間

隙 (Tb. Sp) の 4 項目を解析した。

4. 骨形成速度の定量解析

慢性変動ストレス下の咀嚼様運動による骨形成への影響を調べるためにカルセイン(ナカライテスク, 京都)二重標識法⁴³⁾を用いて検索した。カルセインは骨標識剤でカルシウムとキレート結合し, 励起光をあてると蛍光を発する化学物質である⁴³⁾。

1) カルセイン投与

Bajayoらの用いた方法^{43, 44)}と同様に, 各群5匹のマウスに, 2%炭酸水素ナトリウムに溶かしたカルセイン溶液(30mg/ml)を15mg/kgの容量で屠殺8日前と2日前に腹腔内投与した。

2) 非脱灰骨標本の作製

マイクロCT撮影後の腰椎標本(各群5匹)を, アルコールとアセトンで脱水・脱脂を行い, Methyl methacrylate(MMA)樹脂を用いて包埋した。包埋後, 精密低速切断機(Isomet, Buehler, IL, USA)を用いて厚さ200 μ mの切片を切り出し, ガラス板上に切片をのせカーボランダムを散布しながら研磨し, 20 μ mの非脱灰研磨標本作製した後, 封入剤(マウントクイック®, 大道産業, 埼玉)を用いて封入した。

3) 非脱灰骨標本の観察および計測

蛍光顕微鏡(HSオールインワン蛍光顕微鏡, BZ-9000, 株式会社キーエンス, 大阪)を用いて組織画像の撮影

を行い，1個体あたり2枚の切片を用いて骨形成速度を計測した．計測方法は Bajayo らの方法^{43, 44)} に準じて， BFR/BS (骨形成速度/骨面) = $(sLS/2 + dLS) \times MAR/BS$ とした． sLS は1重標識面で， dLS は2重標識面で， MAR は2重標識幅を間隔(日数)で割算した石灰化速度で， BS は骨面長とした⁴⁵⁾．

5. 破骨細胞の定量解析

1) 脱灰標本の作製および TRAP 染色

マイクロCT撮影後の腰椎標本(各群5匹)を，10% EDTAにて2週間脱灰を行った．その後，アルコール上昇系列により脱水を行い，パラフィン包埋した．包埋後，スライディングマイクロトーム(リトラトーム，大和光機興業工業，埼玉)を用いて，厚さ $5\mu m$ の連続切片を作成し，脱パラフィン後，Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色キット(和光純薬工業，大阪)を用いて酒石酸溶液，酸性ホスファターゼ基質液A,Bを含む染色液を室温で30分間反応させた．TRAP染色を施した後水洗し，対比染色として Mayer's Hematoxylin Solution(和光純薬工業，大阪)を用いてヘマトキシリン染色を行った．次いで，通法にしたがってエタノールの上昇系列にて脱水し，キシレンで透徹後，封入剤(マウントクイック®，大道産業，埼玉)を用いて封入した．

2) 脱灰標本の観察及び計測

破骨細胞の大きさがおよそ $100\ \mu\text{m}$ といわれていることから⁴⁶⁾, 1個体あたり $100\ \mu\text{m}$ 間隔で3枚の切片を作成した. Moriらの方法⁴⁷⁾に従い皮質骨及び骨端線より 0.5mm の距離をとり, 約 $1.3 \times 2.2\text{mm}$ のエリアで計測を行った. 破骨細胞活性を解析するために, 破骨細胞によって覆われている骨梁面の長さ(OC.S)を, 骨面(BS)で除して $\text{OC.S}/\text{BS}$ を求め, 骨面(BS)における破骨細胞数(N.Oc)を計測し $\text{N.Oc}/\text{BS}$ を求めた⁴⁵⁾.

6. 統計学的処理

血液生化学検査および副腎重さ, マイクロCTによる骨の解析結果, 骨形成速度の定量および破骨細胞の定量の計測結果は, それぞれ One-way factorial ANOVA を用いて分散分析を行った後, Turkey-Kramer 法による多重比較検定を行った. なお, $p < 0.05$ を有意差があるものと判定した.

結 果

1. 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激がストレス関連指標に及ぼす影響

慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が血中コルチコステロン濃度，血中ノルアドレナリン濃度，副腎重量に及ぼす影響を解析した（図3）。

ストレス/咀嚼群の血中コルチコステロン濃度はストレス群の約59%まで有意に（ $p < 0.05$ ）低値を示したが，コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また，ストレス群の血中コルチコステロン濃度は，コントロール群の約156%で，有意に高値を示した（ $p < 0.05$ ，図3A）。

ストレス/咀嚼群の血中ノルアドレナリン濃度はストレス群の約38%まで有意に低値を示し（ $p < 0.01$ ），コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また，ストレス群の血中ノルアドレナリン濃度は，コントロールの約241%で，有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ，図3B）。

ストレス/咀嚼群の副腎重量/体重はストレス群と比較して有意に低値を示し（ $p < 0.05$ ），コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また，ストレス群の副腎重量/体重は，コントロール群と比較して有意に高値を示した（ $p < 0.01$ ，図3C）。

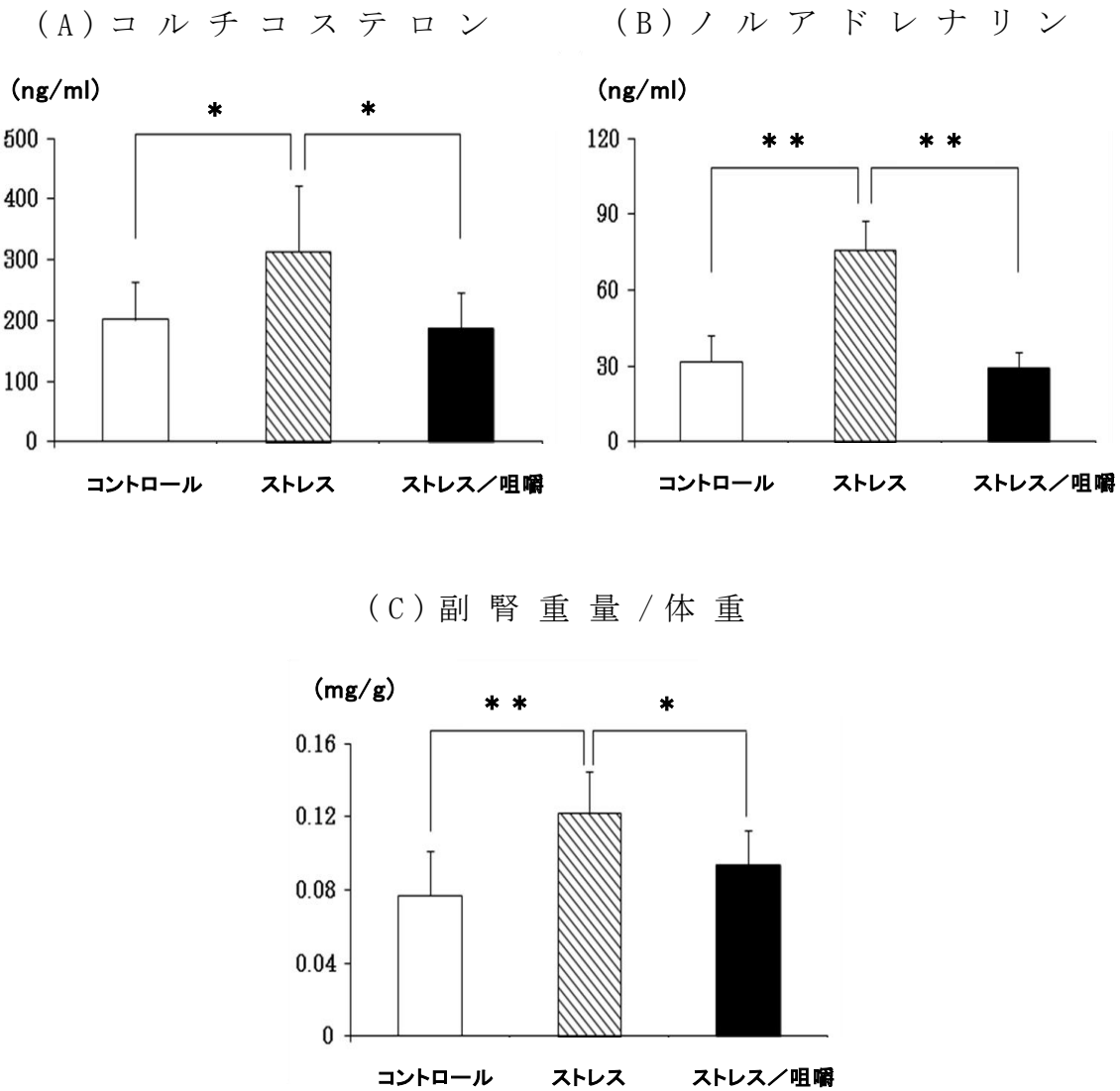


図 3 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激がストレス関連指標に及ぼす影響。

(A) 血中コルチコステロン濃度 (平均値 ± 標準誤差, n=5)。* : $p < 0.05$ 。

(B) 血中ノルアドレナリン濃度 (平均値 ± 標準誤差, n=6)。** : $p < 0.01$ 。

(C) 副腎重量 / 体重 (平均値 ± 標準誤差, n=9)。

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ 。

2. 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が骨構造に及ぼす影響

1) 第4腰椎に及ぼす影響

慢性変動ストレス下で咀嚼様刺激を加えたマウスの第4腰椎のマイクロCT画像を図4に示す。

ストレス/咀嚼群の海綿骨骨量はストレス群と比べて減少し、コントロール群と比べてほぼ変化がなかった。また、ストレス群の海綿骨骨量はコントロール群と比較して減少していた。

第4腰椎の椎体における骨形態計測の結果を図5に示す。

ストレス/咀嚼群の骨量はストレス群の約176%で両群間に有意差がみられたが($p < 0.01$),コントロール群との間では有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨量はコントロール群の約48%で、有意に低値を示した($p < 0.01$, 図5A)。

ストレス/咀嚼群の骨梁数はストレス群と比較して有意に高値を示し($p < 0.05$),コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨梁数は、コントロール群と比較して有意に低値を示した($p < 0.01$, 図5B)。

ストレス/咀嚼群の骨梁幅はストレス群と比較して有意に高値を示し($p < 0.01$),コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨梁幅は、コントロール群と比較して有意に低値を

示した ($p < 0.01$, 図 5 C).

ストレス/咀嚼群の骨梁間隙はストレス群と比較して有意に狭くなり ($p < 0.01$), コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった. また, ストレス群の骨梁間隙は, コントロール群と比較して広くなった ($p < 0.01$, 図 5 D).

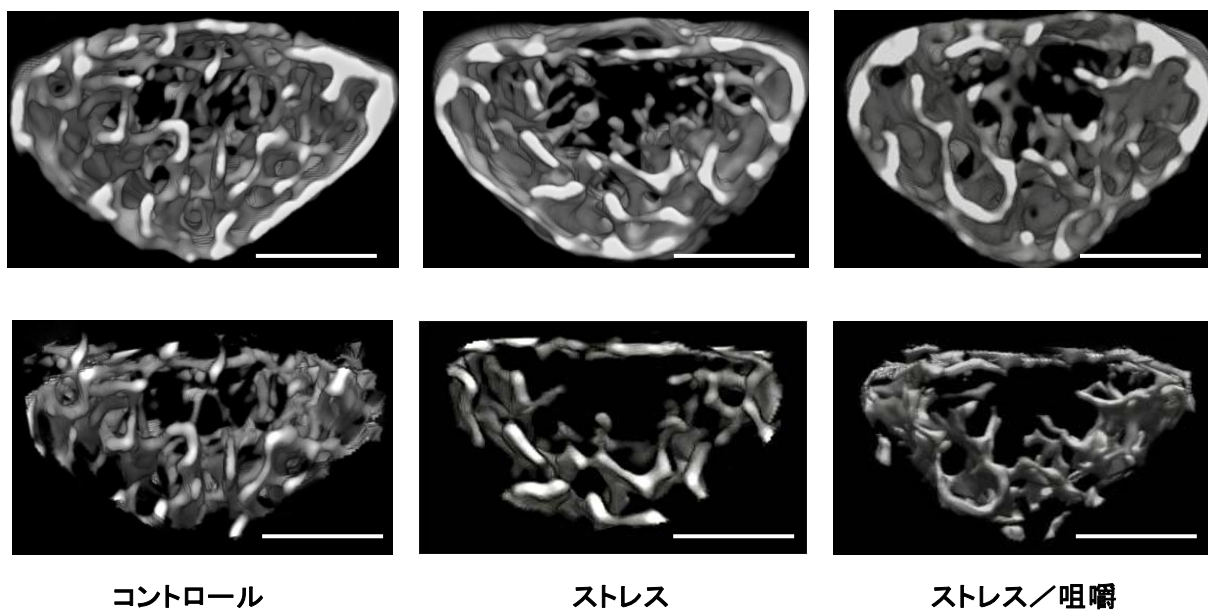


図 4 慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が第 4 腰椎の椎体構造に及ぼす影響。

Bars: 500 μ m.

上段は皮質骨を含めた第 4 腰椎におけるマイクロ CT 横断面を示し, 下段は海綿骨を抽出したマイクロ CT の再構築画像を示す。

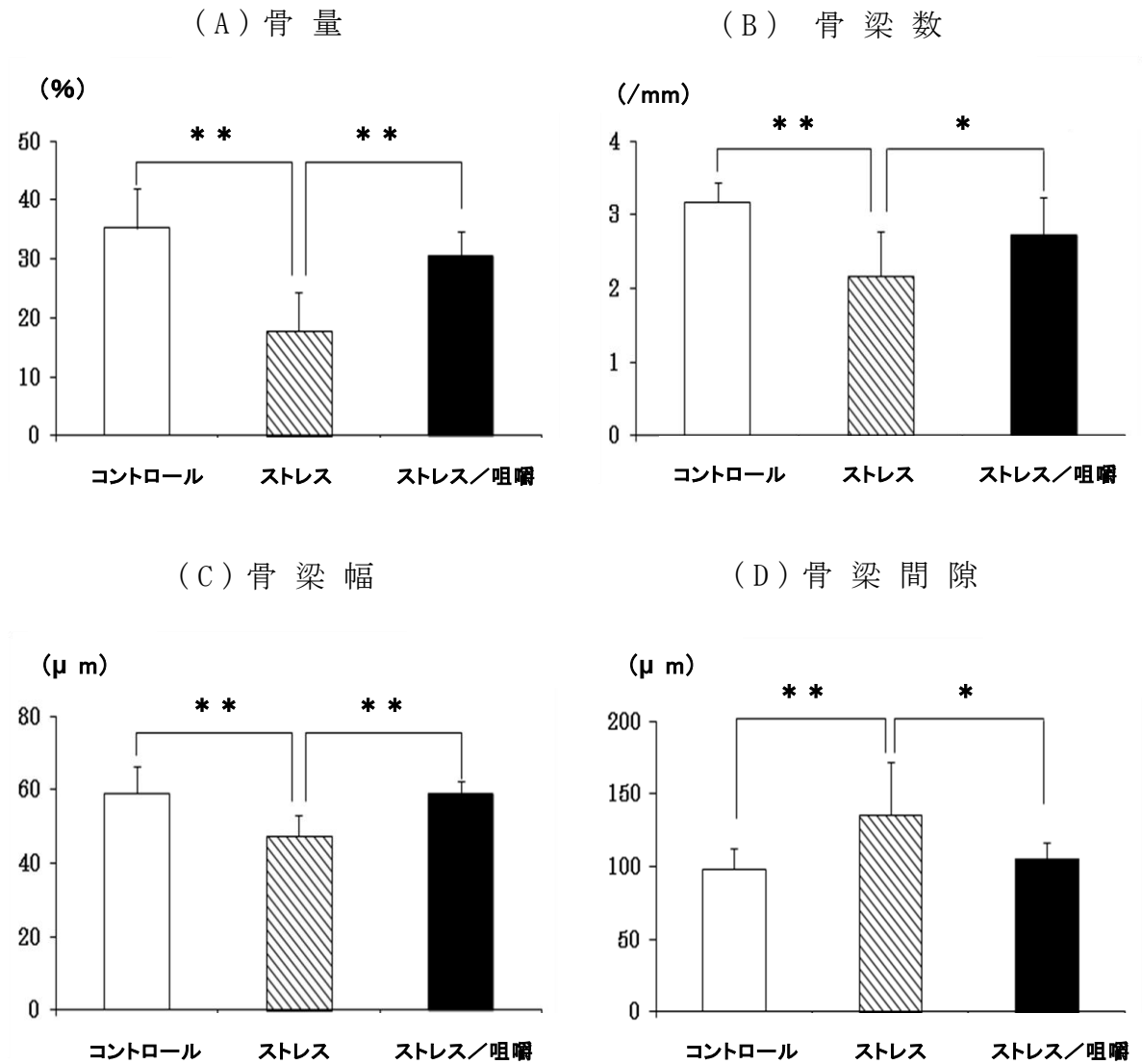


図 5 慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が第 4 腰椎骨構造に及ぼす影響。

(A) 海綿骨の骨量 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。

** : $p < 0.01$ 。

(B) 骨梁数 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。* : $p < 0.05$,

** : $p < 0.01$ 。

(C) 骨梁幅 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。** : $p < 0.01$ 。

(D) 骨梁間隙 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。* : $p < 0.05$,

** : $p < 0.01$ 。

2) 大腿骨に及ぼす影響

慢性変動ストレス下で咀嚼様刺激を加えたマウスの大腿骨遠位端のマイクロCT画像を図6に示す。

ストレス/咀嚼群の海綿骨骨量はストレス群と比べ減少が少なく、コントロール群と比べてほぼ変化がなかった。また、ストレス群の海綿骨骨量は、コントロール群と比較して減少していた。

大腿骨遠位端における骨形態計測の結果を図7に示す。

ストレス/咀嚼群の骨量はストレス群の約150%で有意に高値を示したが($p < 0.05$),コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨量は、コントロール群の約46%で、有意に低値を示した($p < 0.01$, 図7A)。

ストレス/咀嚼群の骨梁数はコントロール群およびストレス群と比較して有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨梁数は、コントロール群と比較して有意に低値を示した($p < 0.01$, 図7B)。

ストレス/咀嚼群の骨梁幅はコントロール群およびストレス群と比較して有意な差は認められなかった。また、ストレス群の骨梁幅は、コントロール群と比較して有意差が見られなかった(図7C)。

ストレス/咀嚼群の骨梁間隙はコントロール群およびストレス群と比較して有意な差はみられなかった。また、ストレス群の骨梁間隙は、コントロール群と比

較して有意差がみられなかった(図 7 D).

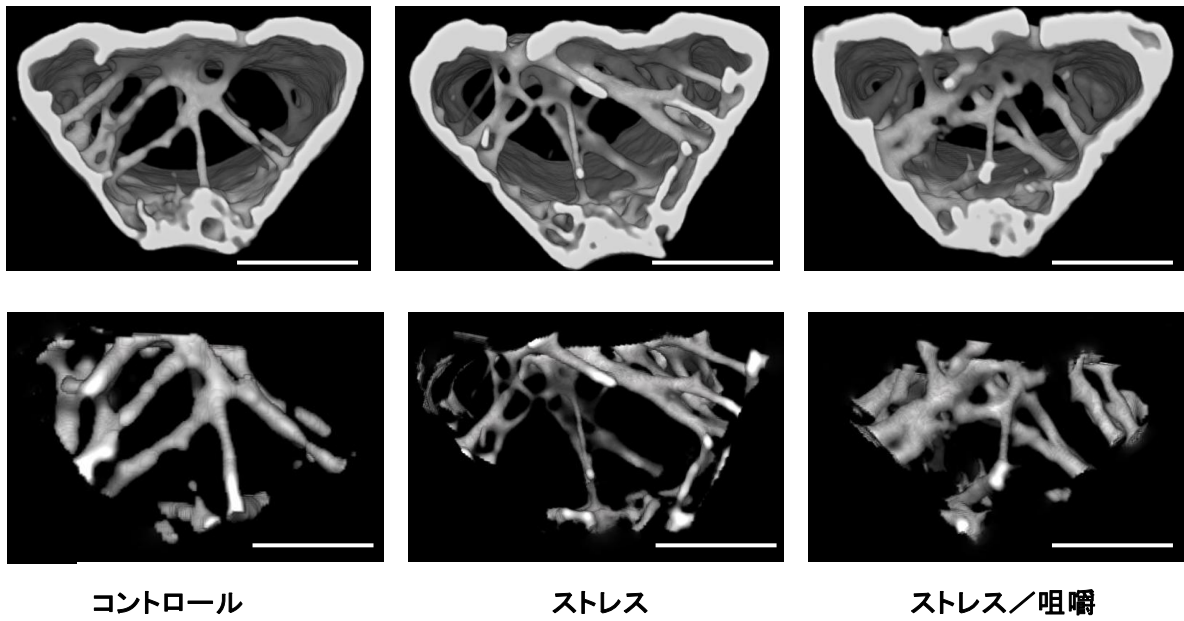


図 6 慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が大腿骨遠位端の構造に及ぼす影響。

Bars: 500 μ m.

上段に皮質骨を含めた大腿骨遠位端におけるマイクロCT横断面を示し,下段に海綿骨を抽出したマイクロCTの再構築画像を示す。

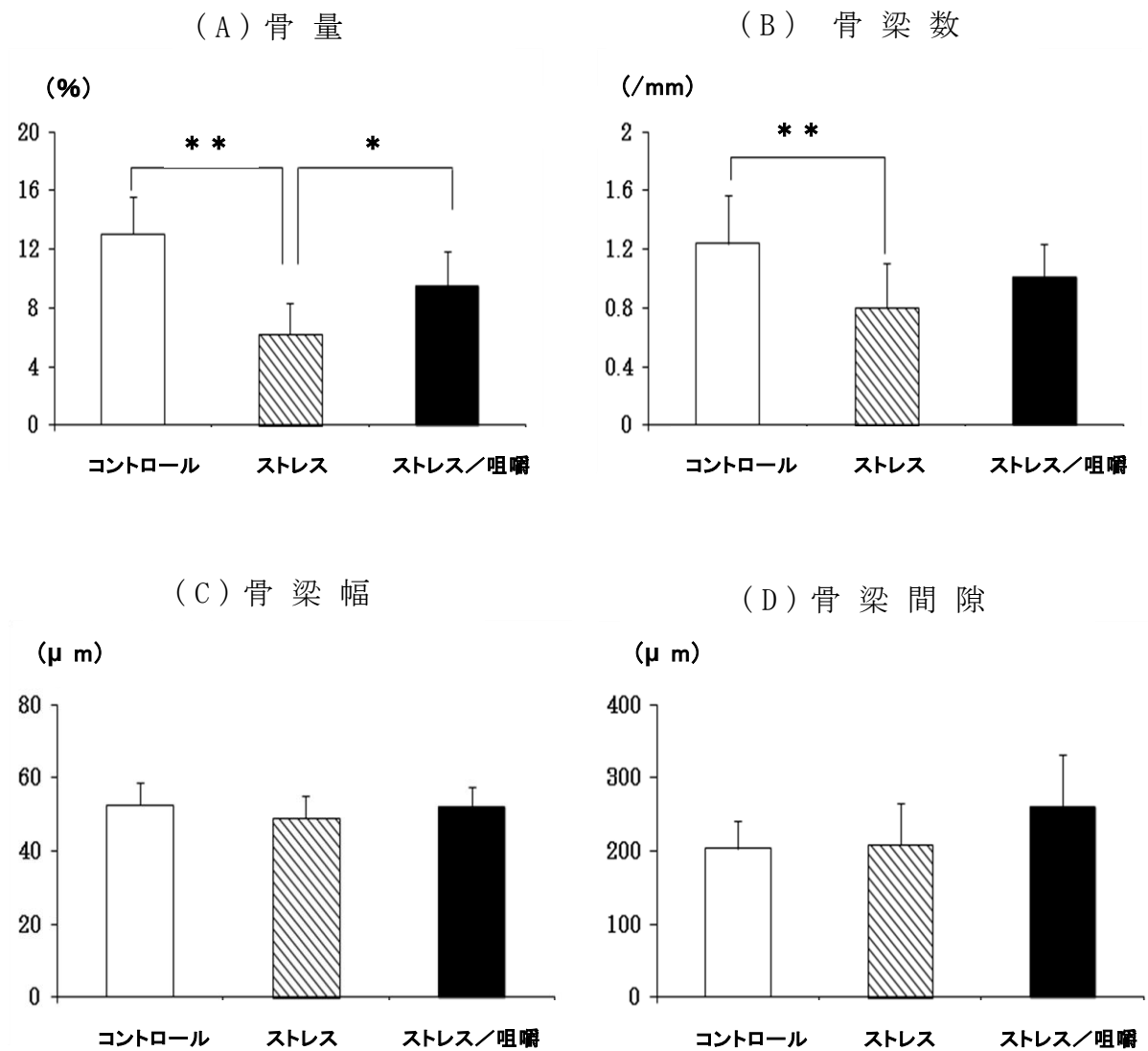


図 7 慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が大腿骨遠位端の構造に及ぼす変化。

(A) 海綿骨の骨量 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

(B) 骨梁数 (平均値 ± 標準誤差, n=5)。 **: $p < 0.01$ 。

(C) 骨梁幅 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。

(D) 骨梁間隙 (平均値 ± 標準誤差, n=8)。

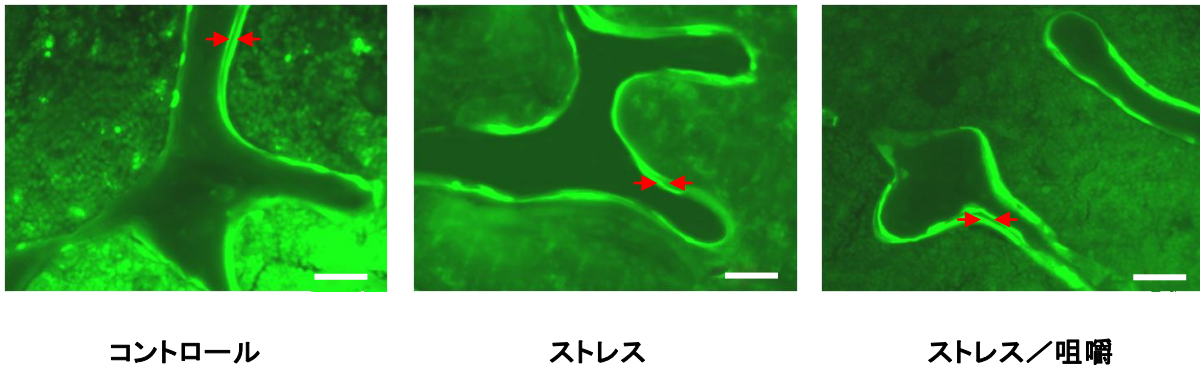
3. 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が骨芽細胞活性に及ぼす影響

慢性変動ストレス下で咀嚼様刺激を加えたマウスのカルセインにより標識された第4腰椎骨梁の組織画像を図8Aに示す。さらに、組織画像より算出したBFRの結果を図8Bに示す。

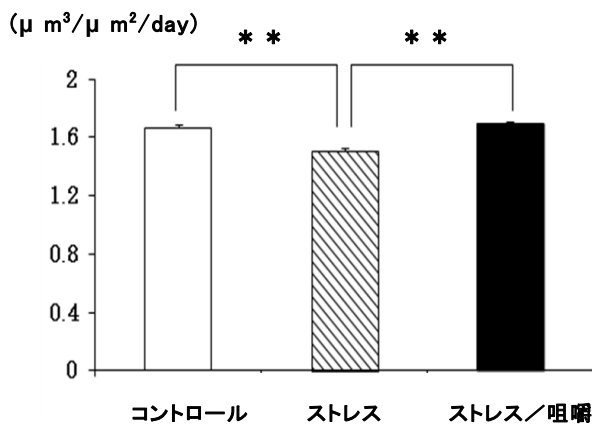
ストレス/咀嚼群のBFRはストレス群と比較して有意に高値を示し($p < 0.01$)、コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群のBFRは、コントロール群と比較して有意に低値を示した($p < 0.01$, 図8B)。

ストレス/咀嚼群の血中オステオカルシン濃度はストレス群の約214%で有意に高値を示し($p < 0.01$)、コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群の血中オステオカルシン濃度は、コントロール群の約52%で、有意に低値を示した($p < 0.05$, 図8C)。

(A)カルセインによる二重標識像



(B) B F R



(C) オステオカルシン

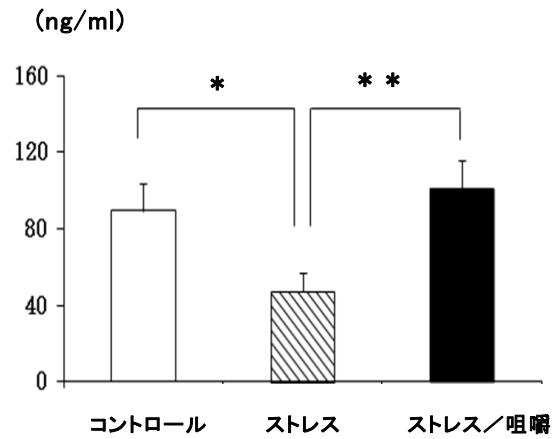


図 8 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が骨芽細胞活性に及ぼす影響。

(A) Bars: 50 μm.

赤い矢印により示した部位はカルセインにより二重標識された部位を示す。

(B) 骨形成速度/骨面 (平均値 ± 標準誤差, n=5).

** : $p < 0.01$.

(C) 血中オステオカルシン濃度 (平均値 ± 標準誤差, n=6). * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$.

4. 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が破骨細胞活性に及ぼす影響

慢性変動ストレス下で咀嚼様刺激を加えたマウスの第4腰椎のTRAP染色像を図9に示す。

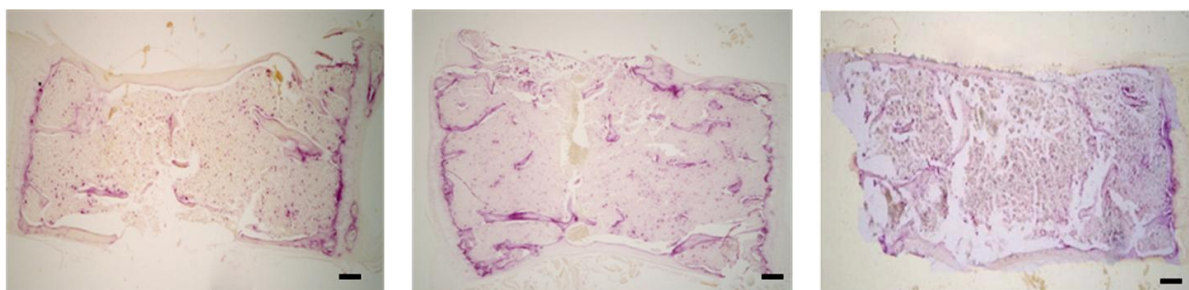
ストレス/咀嚼群の赤色で濃染しているTRAP陽性破骨細胞はストレス群と比べ少なく、コントロール群と比べてほぼ変化がなかった。また、ストレス群のTRAP陽性破骨細胞は、コントロール群と比較して多かった。

TRAP陽性破骨細胞の定量解析結果を図10A, Bに示す。

ストレス/咀嚼群のOc.S/BSはストレス群と比較して有意に低値を示し($p < 0.01$), コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群のOc.S/BSは、コントロール群と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$, 図10A)。

ストレス/咀嚼群のN.Oc/BSはストレス群と比較して有意に低値を示し($p < 0.01$), コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群のN.Oc/BSは、コントロール群と比較して有意に高値を示した($p < 0.01$, 図10B)。

ストレス/咀嚼群の血中Ntx濃度はストレス群の約82%で有意に低値を示し($p < 0.01$), コントロール群と比較すると有意な差は認められなかった。また、ストレス群の血中Ntx濃度は、コントロール群と比較して約138%で、有意に高値を示した($p < 0.01$, 図10C)。



コントロール

ストレス

ストレス/咀嚼

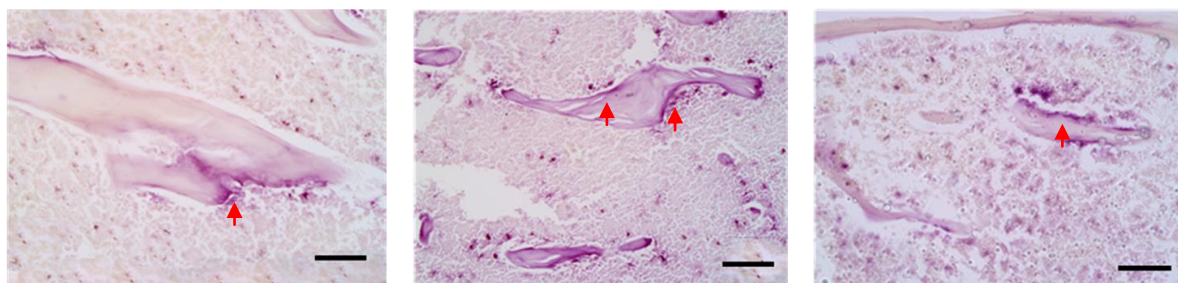


図 9 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が破骨細胞活性に及ぼす影響。

上段 Bars: $200 \mu\text{m}$, 下段 Bars: $50 \mu\text{m}$.

上段は弱拡大像で下段は強拡大像を示す。赤い矢印で示した部位は TRAP 陽性破骨細胞を示す。

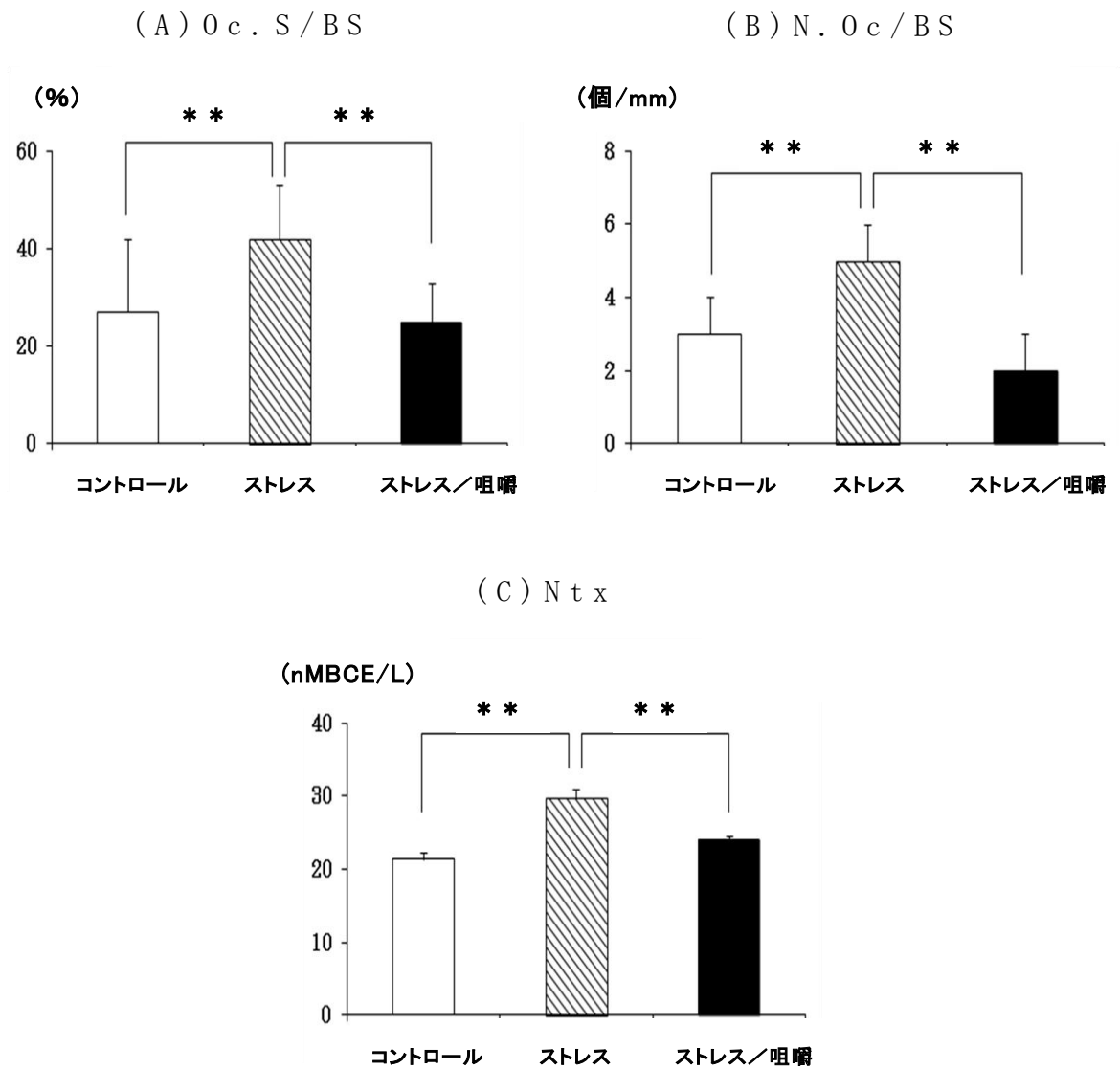


図 1 0 慢性変動ストレス下での咀嚼様刺激が破骨細胞活性に及ぼす影響。

(A) 破骨細胞面/骨面 $\times 100$ (平均値 \pm 標準誤差, $n=5$).

** : $p < 0.01$.

(B) 破骨細胞数/骨面 (平均値 \pm 標準誤差, $n=5$).

** : $p < 0.01$.

(C) 血中 Ntx 濃度 (平均値 \pm 標準誤差, $n=5$).

** : $p < 0.01$.

考 察

本研究において，形態学および生化学的検索結果から，慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激が血中ノルアドレナリンおよびコルチコステロン濃度の上昇を抑え，骨芽細胞と破骨細胞の活性を正常化し，ストレスによる骨量減少を抑制することを示唆した．

慢性ストレス実験においては，同一種類のストレスを実験動物に反復して負荷すると，適応や慣れを起こすことがある^{33, 34)}．このようなストレスへの慣れは，Selyeのいう適応期が長期継続したものの⁴⁸⁾といわれている．適応を避けるためにRothとKath⁴⁹⁾が提唱した慢性変動ストレス(Chronic variable stress: CVS)は，予測不能で回避不能なストレスを反復処置するもので慢性ストレス負荷の実験系に広く用いられている^{50, 51)}．慢性変動ストレスを負荷すると血中のストレスマーカーであるノルアドレナリンとコルチコステロン濃度^{51, 52)}および副腎重量^{36, 37)}が増加するといわれている．本研究で使用した慢性変動ストレスを4週間負荷したマウスでは，血中ノルアドレナリンとコルチコステロン濃度および副腎重量が有意に増加していたことから，行った慢性変動ストレスは適応が起こらなかったことを示唆し，適切なストレスモデルであると考えられる．

本研究において，慢性変動ストレスを負荷したマウ

ス群では，血中のノルアドレナリンおよびコルチコステロン濃度が上昇し，副腎重量が増加した．骨形成マーカーである血中オステオカルシン濃度が減少し，骨形成速度が低下した．また，骨吸収マーカーである血中 Nt x 濃度が上昇し，破骨細胞数が増加した．その結果，腰椎と大腿骨における海綿骨の量が減少し，骨梁幅と骨梁数が低下し，骨梁間隙が増大した．これらの所見はこれまでの慢性変動ストレス下の研究報告の結果と一致している^{16, 53)}．骨形態や骨量は骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞のダイナミックなバランスによって維持されている．このバランスの破綻で骨量が減少し骨粗鬆症が発症する^{16, 39, 54)}．骨芽細胞と破骨細胞のバランス調節にはホルモンやサイトカインの関与に加え，交感神経系の関わりを示唆する知見が得られている³⁹⁾．骨芽細胞には交感神経 β 受容体が強く発現し，骨芽細胞の一部には交感神経系の神経終末と接着するものも存在する⁵⁵⁾．また，カテコールアミン合成に必須であるドーパミン β 水酸化酵素ノックアウトマウスや β 2受容体ノックアウトマウスでは，交感神経系の作用が障害され骨形成や骨量が増加する．さらに， β 刺激薬のイソプロテレノールをマウスに投与すると骨形成や骨量が低下し，反対に β 遮断薬のプロプラノロールを投与すると骨形成や骨量が増加する．このように，交感神経系の活性が低下すると骨形成や骨量が増加する⁵⁵⁾．

これに加えて，交感神経の活動と骨吸収との関係を示す研究も数多く報告されている^{14, 56, 57)}．Cherruauら⁵⁶⁾は，交感神経を特異的に破壊するグアネチジンを投与した成熟ラットにおいて，下顎骨の破骨細胞数の減少とともに明らかな吸収面の減少を報告している．この結果は，交感神経の活動除去によりノルアドレナリンの枯渇が破骨細胞の前駆細胞から成熟破骨細胞への分化を抑制し，破骨細胞の活動を低下させている可能性を示している．また，マウスにおいてレプチンの脳室内投与が交感神経を介し骨芽細胞による骨形成を抑制し，骨量を減少させることも示されている． $\beta 2$ 受容体欠損マウスを用いた実験から，レプチンの脳室内投与によって認められる骨量減少に，骨芽細胞における $\beta 2$ 受容体刺激による破骨細胞分化因子（Receptor Activator of NF- κ B ligand・RANKL）産生を介した破骨細胞形成の促進による可能性も報告され⁵⁷⁾， $\beta 2$ 受容体刺激による骨吸収の促進を認めている．これらの実験結果から，交感神経系の活動亢進が β 受容体を介して骨芽細胞による骨形成が抑制され，破骨細胞による骨吸収が促進させるため，骨量が低下すると考えられている．

一方，副腎皮質ホルモンも骨代謝に影響を及ぼす．副腎皮質ステロイド薬は，近代医学において最も貢献した代表薬物の1つであるが，この薬物には顕著な有効性ととともに重篤な副作用があり⁵⁸⁾，なかでも副腎皮

質ステロイド誘発性骨粗鬆症は医薬品によっておこる骨粗鬆症の原因として最も頻度が高く，それに続発する骨折は，QOL (Quality Of Life) を著しく障害する危険性が高い極めて重症な副腎皮質ステロイド薬の合併症である⁵⁸⁾．副腎皮質ホルモンの一種であるコルチコステロンは骨髄の未分化間葉系幹細胞から骨芽細胞への分化に重要な転写因子 Runx2/Cbfa1 を抑制することにより，骨芽細胞への分化・増殖機能を抑制し⁵⁹⁾，骨芽細胞のアポトーシスを誘導する⁶⁰⁾．その結果，骨芽細胞数と活性の低下が起こり骨形成の低下を引き起こす⁶¹⁾．骨芽細胞が発現する RANKL は，破骨細胞の前駆細胞表面に発現される受容体 RANK と結合することにより成熟破骨細胞となり骨吸収が活発となる⁶²⁾．また，骨芽細胞が発現する Osteoprogenin (OPG) は，RANK より高い親和性で RANKL に結合し破骨細胞の活性化を抑制するデコイ受容体である．コルチコステロンは，この破骨細胞分化因子である RANKL の発現を増強するとともに，OPG の産生を抑制し破骨細胞形成を促進する⁶³⁾．さらに，コルチコステロンは破骨細胞のアポトーシスを抑制すること⁶⁴⁾が知られている．コルチコステロンにより破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が促進され，また破骨細胞の寿命が延長し，骨吸収が亢進すると考えられている．

ストレス負荷中の咀嚼様刺激は，ストレスで低下した骨形成速度とオステオカルシン濃度をある程度回復

させ、血中 Ntx 濃度の上昇と破骨細胞数の増加が抑制され、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のアンバランスが改善された。その結果、ストレスで低下した海綿骨の量、骨梁幅と骨梁数、および増大した骨梁間隙が維持されていた。ストレス下の咀嚼様刺激はストレスで活性化した HPA 系および交感神経系を抑制することによりストレス反応を緩和し、コルチコステロンとノルアドレナリンの過剰分泌が抑えられ骨代謝への悪影響が軽減していることを示唆した。この所見はストレス負荷下の咀嚼様刺激がストレスで上昇した血中コルチコステロン濃度^{20, 22-24)}を下げることやアドレナリンの血中濃度^{24, 25)}を抑制することでストレスにより誘発された胃潰瘍の形成が抑制されたという報告⁶⁵⁾と一致している。視床下部室傍核の CRF 分泌細胞は HPA 系を制御するだけではなく、大脳辺縁系とも相互方向性の線維連絡⁶⁶⁾を持っている。脳におけるノルアドレナリン分泌細胞は脳幹に存在し、延髄の A1 と A2 に存在するノルアドレナリン分泌細胞からは視床下部の PVN⁶⁷⁾と、橋の青斑核に存在するノルアドレナリン分泌細胞からは大脳皮質や大脳辺縁系に線維連絡されていること⁶⁶⁾が分かっている。ストレスが負荷されると A1 に存在するノルアドレナリン分泌細胞が活性化されコルチコステロンの分泌を促すこと⁶⁸⁾や、青斑核からのノルアドレナリンを増加させること⁶⁹⁾が分かっている。

fMRI を用いたヒトの研究でストレス負荷中にガム咀嚼させると，大脳辺縁系の扁桃体（海馬の隣に位置しストレス情動発動のトリガー部位）の神経活動が正常化され，ストレス反応を抑制することが示されている²⁶⁾．さらに動物実験において，拘束ストレス下の咀嚼様刺激が視床下部 PVN における CRF 陽性細胞数や fos 陽性細胞数の発現を抑制する¹⁹⁾とともに，海馬におけるグルココルチコイドレセプターの発現量を増加させること⁷⁰⁾が確認されている．Ono ら⁷¹⁾は，ストレス負荷中の咀嚼様刺激が視床下部でのグルコースの取り込みを抑制することにより，ストレスの主要な反応経路である HPA 系の活性化を抑えることを報告している．Hori ら¹⁹⁾は，ストレス下の咀嚼様刺激により視床下部に投射された青斑核ノルアドレナリン神経系からの求心性入力情報が減少することで視床下部室傍核における CRF の発現量が減少し，HPA 系が抑制されると報告している．本研究において慢性変動ストレス下で咀嚼様刺激を行わせることにより，ストレスで増加した血中ノルアドレナリンとコルチコステロン濃度および副腎重量が有意に低下した．これらの結果から，ストレス下の咀嚼様刺激は脳幹に存在するノルアドレナリン神経系を抑制することによってストレス反応を緩和している可能性がある．咀嚼様刺激によるストレス緩和機構の解明のためにさらなる研究が必要と思われる．

結 論

老化促進モデルマウス SAMP8 を用いて，慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激がストレス性骨粗鬆症の発症に及ぼす影響を検討し，以下の結論を得た．

- 1) ストレス/咀嚼群の血中ノルアドレナリン濃度，血中コルチコステロン濃度，副腎重量はストレス群と比較して有意に低値を示したが，コントロール群と比較すると有意差は認められなかった．
- 2) ストレス/咀嚼群の第4腰椎における海綿骨構造はストレス群と比較して骨量，骨梁数，骨梁幅が有意に高値を示し，骨梁間隙が有意に狭くなったが，コントロール群と比較すると有意差はなかった．
- 3) ストレス/咀嚼群の大腿骨遠位端における海綿骨構造は骨量がストレス群と比較して有意に高値を示したが，コントロール群と比較すると有意差はなかった．
- 4) ストレス/咀嚼群の血中オステオカルシン濃度および骨形成速度は，ストレス群と比較して有意に高値を示したが，コントロール群と比較すると有意差はなかった．
- 5) ストレス/咀嚼群の血中 NTx 濃度，破骨細胞数，破骨細胞面長は，ストレス群と比較して有意に低値を示したが，コントロール群と比較すると有意

差はなかった。

以上の結果から、慢性変動ストレス下の咀嚼様刺激はストレスによる交感神経系及びHPA系の活性を抑え、血中コルチコステロンおよびノルアドレナリン濃度の上昇を抑制し、コルチコステロンやノルアドレナリンが骨芽細胞や破骨細胞に与える影響を緩和することでストレスによる骨粗鬆症の発症を抑制していることが示唆された。

引用文献

- 1) 田中正敏. 多様化するストレス疾患. 臨床と研究. 2006;83:315-319.
- 2) 山田高裕, 庄司容子, 石川俊男. ストレスと健康. 臨床栄養. 2005;107:702-706.
- 3) Maier SF and Watkins LR. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev.* 1998;105:83-107.
- 4) Lillberg K, Verkasalo PK, Kapriol J, Teppo L, Helenius H and Koskenvuo M. Stressful life events and risk of breast cancer in 10,808 Women: A Cohort Study. *Am J Epidemiol.* 2003;157:415-423.
- 5) Fajdic J, Gotovac N, Horgovic Z and Fassebender WJ. Influence of stress related to war on biological and morphological characteristic of breast cancer in a defined population. *Adv Med Sci.* 2009;54:283-288.
- 6) Tofler GH, Stone PH, Maclure M, Edelman E, Davis VG, Robertoson T, Antman EM and Muller JE. Analysis of possible triggers of acute myocardial infection. *Am J Cardiol.*

- 1990;66:22-27.
- 7) Myers A and Dewar HA. Circumstances attending 100 sudden deaths from coronary artery disease with coroner's necropsies. *Br Heart J*. 1975;37:1133-1143.
- 8) Jiang W, Babyak M, Krantz DS, Waugh RA, Coleman RE, Hanson MM, Frid DJ, McNulty S, Morris JJ, O'Connor CM and Blumenthal JA. Mental stress-induced myocardial ischemia and cardiac events. *JAMA*. 1996;275:1651-1657.
- 9) Yamamoto N, Sakagami T, Fukuda Y, Koizuka H, Hori K, Sawada Y, Hikasa Y, Tanida N and Shimoyama T. Influence of *Helicobacter pylori* infection on development of stress-induced gastric mucosal injury. *J Gastroenterol*. 2000;35:332-340.
- 10) Levenstein S. The very model of a modern etiology: a biopsychosocial view of peptic ulcer. *Psychosom Med*. 2000;62:176-185.
- 11) 飛鳥井望. 外傷後ストレス障害 (PTSD). 分子精神医学. 2006;6:62-64.
- 12) 笠井清登, 山末英典. PTSDの脳内メカニズム. 脳 21. 2006;9:37-41.
- 13) 飯高哲也. うつ病とストレス脆弱性の脳画像・遺伝的多型に関する研究. 分子精神医学.

2007;7:20-26.

- 14) Cizza G, Primma S and Csako G. Depression as a risk factor for osteoporosis. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:367-373.
- 15) Bab IA and Yirmiya R. Depression and bone mass. *Ann N Y Acad Sci.* 2010;1192:170-175.
- 16) Yirmiya R, Goshen I, Bajayo A, Kreisel T, Feldman S, Tam J, Trembovler V, Csernus V, Shohami E and Ban I. Depression induces bone loss through stimulation of the sympathetic nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:16876-16881.
- 17) Mazziotti G, Angeli A, Bilezikian JP, Canalis E and Giustina A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. *Trends Endocrinol Metab.* 2006;17:144-149.
- 18) 高柳涼一, 大中佳三. グルココルチコイドの骨代謝作用機序. 骨粗鬆症治療. 2006;5:10-15.
- 19) Hori N, Yuyama N and Tamura K. Biting suppresses stress-induced expression of corticotrophin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. *J Dent Res.* 2004;83:124-128.
- 20) Lee T, Saruta J, Sasaguri K, Sato S and Tsukinoki K. Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on

- hippocampal neurotrophin expression. *Brain Res.* 2008;1195:43-49.
- 21) Ono Y, Kataoka T, Miyake S, Cheng SJ, Tachibana A, Sasaguri KI and Onozuka M. Chewing ameliorates stress-induced suppression of hippocampal long-term potentiation. *Neuroscience.* 2008;154:1352-1359.
- 22) Hennessy MB and Foy T. Nonedible material elicits chewing and reduces the plasma corticosterone response during novelty exposure in mice. *Behav Neurosci.* 1987;101:237-245.
- 23) Kubo KY, Sasaguri K, Ono Y, Yamamoto T, Takahashi T, Watanabe K, Karasawa N and Onozuka M. Chewing under restraint stress inhibits the stress-induced suppression of cell birth in the dentate gyrus of aged SAMP8 mice. *Neurosci Lett.* 2009;466:109-113.
- 24) Sato C, Sato S, Takashina H, Ishii H, Onozuka M and Sasaguri K. Bruxism affects stress responses in stressed rats. *Clin Oral Investig.* 2009;14:153-160.
- 25) 堀 紀雄, 湯山徳行, 金子正明, 笹栗健一, 李昌一, 豊田 實, 佐藤貞雄. ストレスの脳内機構と咬合の関係 (内分泌系). 神奈川歯学.

2004;39:166-170.

- 26) 丹羽 政美, 榎田 雄, 久岡清子, 水野潤造, 小野弓絵, 大塚剛朗, 久保金弥. チューイングによるストレス緩和の脳内機構: fMRIによる研究. 神奈川歯学. 2011;46:7-17.
- 27) 竹田俊男. 老化促進モデルマウス(SAM)の開発. 日病会誌. 1990;79:39-48.
- 28) 竹田俊男. 老化モデル動物(2)マウス(SAM). 臨床科学. 1994;23:345-352.
- 29) Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I and Katoh H. A novel murine model of ageing, senescence-accelerated mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr*. 1994;19:185-192.
- 30) Takeda T, Hosokawa M, Takeshita S, Irino M, Higuchi K, Matsushita T, Tomita Y, Yasuhira K, Hamamoto H, Shimizu K, Ishii M and Yamamuro T. A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev*. 1981;17:183-194.
- 31) Hosokawa M, Kasai R, Higuchi K, Takeshita S, Shimizu K, Hamamoto H, Honma A, Irino M, Toda K, Matsumura A, Matsushita M and Takeda T. Grading score system: a method for evaluation of the degree of senescence in senescence accelerated mouse (SAM). *Mech Ageing Dev*. 1984;26:91-102.

- 32) Chen CC, Wang MF, Liu MH and Yang SK. Effects of age on plasma levels of calcium-regulating hormones and bone status in male SAMP8 mice. *Chin J Physiol.* 2004;47:7-14.
- 33) Kvetnansky R, Palkovits M, Mitro A, Torda T and Mikulaj L. Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology.* 1997;23:257-267.
- 34) 野村 総一郎, 渡辺 雅幸, 澤 温, 金城 正建, 請井 伸行, 中澤 恒幸, 清水 遵, 亀谷 秀樹. ストレスに対する慣れの精神生物学的研究. 薬物・精神・行動. 1982;2:1-11.
- 35) 遠藤 豊. ストレスとグルココルチコイド. *Clin Neurosci.* 2003;21:1022-1024.
- 36) Tuli JS, Smith JA and Morton DB. Effects of acute and chronic restraint on the adrenal gland weight and serum corticosterone concentration of mice and their faecal output of oocysts after infection with *eimeria apionodes*. *Res Vet Sci.* 1995;59:82-86.
- 37) Magarinos AM and McEwen BS. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience.* 1995;69:83-88.

- 38) Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tonosaki K and Saito S. Evidence for involvement of glucocorticoid response in the hippocampal changes in aged molarless SAMP8 mice. *Behav Brain Res.* 2002;131:125-129.
- 39) 柏 真紀, 竹田 秀. 神経と骨代謝. *The Bone.* 2012;26:173-176.
- 40) Delmas PD, Eastell R, Garnero P, Seibel MJ and Stepan J. The use of Biochemical markers of bone turnover in osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2000;6:2-17.
- 41) Christopoulou GE, Stavropoulou A, Anastassopoulos G, Panteliou SD, Papadaki E, Karamanos NK and Panagiotopoulos E. Evaluation of modal damping factor as a diagnostic tool for osteoporosis and its relation with serum osteocalcin and collagen I N-telopeptide for monitoring the efficacy of alendronate in ovariectomized rats. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41:891-897.
- 42) Chen H, Zhou X, Washimi Y and Shoumura S. Three-dimensional microstructure of the bone in a hamster model of senile osteoporosis. *Bone.* 2008;43:494-500.
- 43) Bajayo A, Goshen I, Feldman S, Csernus V,

- Iverfeldt K, Shohami E, Yirmiya R and Bab I. Central IL-1 receptor signaling regulates bone growth and mass. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:12956-12961.
- 44) Tam J, Trembovler V, Marzo VD, Petrosino S, Leo G, Alexandrovich A, Regev E, Casap N, Shteyer A, Ledent C, Karsak M, Zimmer A, Mechoulam R, Yirmiya R, Shohami E and Bab I. The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J*. 2008;22:285-294.
- 45) Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Mlluche H, Meunier PJ, Ott SM and Recker RR. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. *J Bone Miner Res*. 1987;2:595-610.
- 46) 新井嘉則. 硬組織研究ハンドブック. 3版. 長野: 松本歯科大学出版会;2008:38-39.
- 47) 高橋英明. 骨形態計測ハンドブック. 2版. 新潟: 西村書店;1997:10-113.
- 48) Selye H. The stress of life. *Ind Med Surg*. 1964;33:621-625.
- 49) Roth KA and Katz RJ. Further studies on a novel animal model of depression: therapeutic effects of a tricyclic antidepressant.

Neurosci Biobehav Rev. 1981;5:253-258.

- 50) 藤原圭亮, 朝倉幹雄, 柳田拓洋, 中野三穂, 金井重人, 田中大輔, 貴家康男, 長田賢一. 慢性ストレス後に生じるNE-CRHシステムの遅延的感受性亢進. 日神精薬理誌. 2011;31:17-22.
- 51) Cotella EM, Lascano IM, Levin GM and Suarez MM. Amitriptyline treatment under chronic stress conditions: effect on circulating catecholamines and anxiety in early maternally separated rats. *Int J Neurosci.* 2009;119:664-680.
- 52) Uresin Y, Erbas B, Ozek M and Gurol AO. Losartan may prevent the elevation of plasma glucose, corticosterone and catecholamine levels induced by chronic stress. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2004;5:93-96.
- 53) Patterson-Buckendahl PP, Rusnak M, Fukuhara K and Kvetnansky R. Repeated immobilization stress reduces rat vertebral bone growth and osteocalcin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001;280:R79-86.
- 54) 竹田 秀. 神経と骨関連による骨代謝制御の解析. 上原記念生命科学財団研究報告書. 2009;23:1-4.
- 55) Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zahor L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P and Karsenty

- G. Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*. 2002;111:305-317.
- 56) Cherruau M, Facchinetti P, Baroukh B and Saffar JL. Chemical sympathectomy impairs bone resorption in rats: a role for the sympathetic system on bone metabolism. *Bone*. 1999;25:541-551.
- 57) Eleftheriou F, Ahn JD, Takeda S, Starbuck M, Yang X, Liu X, Kondo H, Richards WG, Bannon TW, Noda M, Clement K, Vaisse C and Karsenty G. Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*. 2005;434:514-520.
- 58) 大中桂三, 高柳涼一. ステロイド性骨粗鬆症の病態と発生機序. 痛みと臨床. 2006;6:146-152.
- 59) Chang DJ, Ji C, Kim KK, Casinghino S, McCarthy TL and Centrella M. Reduction in transforming growth factor beta receptor 1 expression and transcription factor CBFa1 on bone cells by glucocorticoid. *J Biol Chem*. 1998;273:4892-4896.
- 60) Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM and Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis

- of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J Clin Invest*. 1998;102:274-282.
- 61) Delany AM, Durant D and Canalis E. Glucocorticoid suppression of IGF I transcription in osteoblasts. *Mol Endocrinol*. 2001;15:1781-1789.
- 62) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*. 1999;20:345-357.
- 63) Hofbauer LC. Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol*. 1999;141:195-210.
- 64) Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM and Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest*. 2002;109:1041-1048.
- 65) Tanaka T, Yoshida M, Yokoo H, Tomita M and

- Tanaka M. Expression of aggression attenuates both stress-induced gastric ulcer formation and increases in noradrenaline release in the rat amygdala assessed by intracerebral microdialysis. *Pharmacol Biochem Behav.* 1998;59:27-31.
- 66) Herman JP and Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 1997;20:78-84.
- 67) Cunningham ET Jr and Sawchenko PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1988;274:60-76.
- 68) Gartside SE, Suaud-Chagny MF and Tappaz M. Evidence that activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by electrical stimulation of the noradrenergic A1 group is not mediated by noradrenaline. *Neuroendocrinology.* 1995;62:2-12.
- 69) Abercrombie ED and Jacobs BL. Single-unit response of noradrenergic neurons in the locus coeruleus of freely moving cats. I. Acutely presented stressful and nonstressful stimuli.

J Neurosci. 1987;7:2837-2843.

- 70) Sasaguri K, Yoshikawa G, Yamada K, Miyake S, Kubo KY and Yamamoto T. Combination of chewing and stress up-regulates hippocampal glucocorticoid receptor in contrast to the increase of mineralcorticoid receptor under stress only. *Neurosci Lett.* 2012;519:20-25.
- 71) Ono Y, Lin HC, Tzen KY, Chen HH, Yang PF, Lai WS, Chen JH, Onozuka M and Yen CT. Active coping with stress suppresses glucose metabolism in the rat hypothalamus. *Stress.* 2012;15:207-217.

