

妊娠期ストレス中の咀嚼運動が仔マウス
の脳のストレス脆弱性に及ぼす影響

すずきあゆみ

鈴木あゆみ

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(2016年10月20日，岐阜)において発表した．本論文の一部は，第38回日本神経科学大会(2015年7月30日，兵庫)，10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia(2016年5月27日，東京)，第39回日本神経科学大会(2016年7月20日，神奈川)において発表した．また，本論文の一部は以下の論文に掲載した．

Suzuki A, Iinuma M, Hayashi S, Sato Y, Azuma K and Kubo K. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced hypomyelination, synaptic alterations, and learning impairment in mouse offspring. *Brain res.* 2016;1654:36-43.

緒 言

出産前の母体の環境が子の情動障害，学習障害およびストレス関連障害の形成に関与しているという研究結果¹⁻⁷⁾が多数発表されたため，子の健康や成長発育の観点から妊娠期の母体に注目が集まっている．ヒトにおいて，妊娠期に深刻なストレスを経験した母親から生まれた子では，不安障害，うつ状態，注意障害，多動性障害，言語習得遅延などの神経発達障害や精神疾患を生じるリスクが高まる¹⁾．ラットやマウスを用いた実験において，妊娠後期に拘束ストレスを負荷された母親から生まれた仔では，学習障害，情動障害が引き起こされるだけではなく，ストレスに対して過敏反応を示すストレス脆弱脳が形成されることが示されており，妊娠期ストレスと出生後の仔の脳機能障害との関連が動物では証明されている²⁻⁷⁾．これらの仔の障害では，ストレスを被った母体から胎盤を通じて胎仔に移行したグルココルチコイド(GC)が原因であるというグルココルチコイドプログラミング説が有力である^{8,9)}．母体から胎仔に移行したGCが胎仔の視床下部-下垂体-副腎皮質系(HPA axis)を攪乱し，様々な障害が惹起される^{10,11)}．

中枢神経系ではオリゴデンドロサイトの突起が

神経細胞の軸索の周囲を覆い、ミエリン鞘を形成している。ミエリン鞘は神経伝導、特に情報の伝導速度に影響を及ぼし¹²⁾、哺乳類の成長過程や成熟脳で軸索の安定化に関与している¹³⁾。Xuら¹⁴⁾は、妊娠中の母体のストレスがストレスの期間と時間に依存して、仔マウスの海馬CA1領域のミエリン鞘の低形成を引き起こすことを報告している。シナプスはニューロン間のコミュニケーションに関与し、シナプスの大きさの変化が様々な神経成長障害とリンクしている^{15,16)}。シナプスにおいて、シナプス後肥厚部の長さ(Postsynaptic Density: PSD length)はシナプス効力、シナプスの可塑性の変化、神経伝達速度に影響を与える¹⁷⁻¹⁹⁾。PSD lengthは高齢マウスや記憶障害を呈するラットなどで顕著に減少することが確認されている²⁰⁻²²⁾。また、妊娠期ストレスは、神経の成長過程において、シナプス前器官のマーカであるシナプトフィジンの発現を低下させたり、PSD lengthを減少させることが示されている^{21,23,24)}。

海馬は脳のなかでもGCに敏感で、ストレスに弱いといわれている²⁵⁾。妊娠期ストレスによって仔に移行した過剰なGCは、海馬のGCレセプター(GR)のダウンレギュレーションを引き起こし、海馬から視床下部へのネガティブフィードバック機構を障害して、仔のHPA axisを攪乱する。この結

果，妊娠期ストレス中の母体から生まれた仔では海馬歯状回での細胞新生が障害され，空間認知能が障害される²⁶⁾．さらに，仔のHPA axisが障害されると，仔の脳は新たなストレスに対し視床下部室傍核(Paraventricular Nucleus: PVN)で過剰な副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(Corticotropin-Releasing Hormone: CRH)を分泌するようになり，軽度なストレスに対しても過敏な反応を呈するストレス脆弱脳が形成される^{2, 27, 28)}．

最近，積極的な咀嚼運動がストレス反応を抑制するというデータが多数報告されるようになり，咀嚼運動がストレス対処法として注目されている²⁹⁻³²⁾．拘束ストレスを負荷したラットやマウスに木の棒を噛ませると，血中GC濃度の上昇が抑制され，ストレス性の学習障害が改善される．また，同様な実験系において，ラットやマウスの積極的な咀嚼運動は，PVNにおけるCRHの分泌を抑制することやストレスによって引き起こされる海馬歯状回の細胞新生障害や骨量減少を抑制するデータも示されている²⁹⁻³²⁾．さらに，母体の妊娠期ストレス中の咀嚼運動は，ストレス負荷によって増加する血中GC濃度を抑制し，仔の海馬歯状回における細胞新生障害が抑制され，Morris水迷路学習テストにおける空間認知能が改善すると報告さ

れている²⁶⁾。

そこで本研究では，妊娠期ストレス中に咀嚼運動を行わせた母マウスと咀嚼運動を行わせなかった母マウスから生まれた仔マウスにおける海馬の変化に着目し，空間認知能，海馬 CA1 領域のミエリン鞘やシナプスの超微細構造および海馬 GR の発現状況を解析し，母体の咀嚼運動が仔の妊娠ストレス性の脳障害を抑制するかどうかを検討した。さらに，母体の咀嚼運動が仔の脳のストレス脆弱脳形成に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

実験には 12 週齢の雌雄 (雌 24 匹, 雄 12 匹) の DDY マウス (中部科学資材, 名古屋) を用いた³³⁾. これまでに妊娠した経験のない雌 2 匹と雄 1 匹をケージに入れ交配させた. 交配翌日膈のプラグを確認し, プラグの認められたマウスを妊娠 0 日として個別のケージで飼育を行った.

実験に用いた DDY マウスは朝日大学歯学部実験動物飼育施設において飼育した. マウスは固形飼料 (日本クレア社, CE-2, 東京) と水を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専門委員会の承認 (16-018) を得ている.

1 妊娠期のストレス

Lemaire ら^{4,34)}の方法にしたがって, 妊娠マウスに拘束ストレスを負荷した. 妊娠 12 日目から出産までの 1 週間, 1 日 3 回 (10 時, 14 時, 18 時), 1 回 45 分間, 長さ 10.3 cm, 内径 4.5 cm のプラスチック製のチューブに妊娠マウスを閉じ込め, 拘束ストレスとした.

2 咀嚼運動

拘束ストレスを負荷するプラスチックチューブ

の片側(頭側)に2か所直径約2mmの穴をあけ直径約2mmの爪楊枝を挿入し、マウスの鼻先に位置するように爪楊枝を固定し、マウスに爪楊枝を噛ませた。マウスが爪楊枝を噛みきった場合は、古い爪楊枝を除去し、新たな爪楊枝をチューブの穴に挿入し、引き続き爪楊枝を噛ませた。この操作をストレス負荷中繰り返した。

3 仔マウスの分類

拘束ストレスのみを負荷した母マウスから出生した仔マウスを「ストレス群(S)」, 拘束ストレス負荷中に爪楊枝を噛ませた母体から出生した仔マウスを「ストレス/咀嚼群(S/C)」, ストレスを負荷せず通常之母体から出生した仔マウスを「コントロール群(C)」とした。出生した仔マウスを母マウスとともに通常飼育し、生後21日目に離乳させた。離乳後、雌雄別に同腹ごとに同一ケージで飼育した。本実験では4週齢の雄の仔マウスを各群43匹ずつ使用した。

4 妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が仔の海馬に及ぼす影響の検討

(1) 海馬におけるオリゴデンドロサイトの解析

妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が、生まれ

た仔の海馬でのオリゴデンドロサイトに及ぼす影響を調べた。海馬 CA1 領域でオリゴデンドロサイトのマーカーであるミエリン塩基性タンパク質 (MBP) と 2,3-サイクリックヌクレオチド 3 ホスホジエステラーゼ (CNPase) に対する特異抗体を用いて免疫染色し、画像解析を行った。

MBP はミエリン総蛋白質の 30% を占める蛋白質でミエリン及びオリゴデンドロサイトの細胞体の中に局在しており、CNPase はミエリン蛋白質全体の約 4% の酵素蛋白質で細胞体に局在している³⁵⁾。

(1)-1) 動物の固定と標本作製

仔マウス (各群 n=6) を 3 種混合麻酔 (0.01 ml /g) し、4℃ の 4% パラホルムアルデヒド (PFA) / 0.1 M リン酸緩衝液 (PB) 固定液を灌流させ固定を行った。その後、パラフィン包埋し、包埋された脳を、前頭断で厚さ 5 μm の海馬の連続切片を作製した。

(1)-2) 免疫組織染色

MBP および CNPase の各抗体による染色時に、ネガティブコントロールとして一次抗体を抜いて、他の手技は同様に行い、これらの抗体陽性像がみられないことを確認した。

(1)-2)- i) MBP 免疫組織染色

薄切した切片を脱パラフィンし，0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) により洗浄した後，一次抗体の抗 MBP ラットモノクロナル抗体 (#MAB386, Millipore, CA, USA) を，4℃ にて一晩反応させた．その後 PBS で切片を洗浄した後，二次抗体はビオチン化抗ラット抗体 (Dako, CA, USA) で反応させた．その後 PBS で切片を洗浄した後，ABC standard Kit (PK-4000, フナコシ, 東京) にて反応させた．発色は DAB Liquid System (Dako, CA, USA) を用いて反応させた．

(1)-2)- ii) CNPase 免疫組織染色

薄切した切片を脱パラフィンし，PBS により洗浄した後，10mM クエン酸緩衝液と 0.05% Tween20 (pH6.0) によって，121℃ 20 分オートクレーブにて抗原賦活化を行った．次いで Protein Block Serum Free Ready to Use (Dako, CA, USA) を滴下し反応させた．一次抗体は，抗 CNPase マウスモノクロナル抗体 (#MAB326, Millipore, CA, USA) を 100 μ l 用いて 4℃ にて一晩反応させた．二次抗体は，Envision+System-HRP labeled Polymer Anti-mouse K4000 (Dako, CA, USA) で反応させた．発色は DAB Liquid System (Dako, CA, USA) を用いて反応させた．

(1)-2)-iii) 陽性細胞数の解析方法

海馬 CA1 領域を顕微鏡下で撮影し, Tanaka ら³⁵⁾の方法にしたがって, NIH 画像ソフトウェア 1.61 版を使用して, MBP と CNPase 陽性細胞の占める面積を算出した.

(2) 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) による海馬神経細胞やミエリン鞘の厚みとシナプスの超微細構造の検索

(2)-1) 動物の固定と標本作製

仔マウス (各群 n=5) に 3 種混合麻酔 (0.01 ml/g) を行い, 続いて 4°C の 4% PFA/0.1M PBS と 1% グルタルアルデヒドの混合固定液を灌流させ固定を行った. 次いで, 海馬を取り出し, 同混合固定液 (4°C) で一晩固定を行った.

組織は PB で洗浄後, 1% 四酸化オスミウムにて 1 時間後固定し, アセトンで脱水した後, エポキシ樹脂包埋した. ブロックのトリミング後, Porter-Blum MT-1 Ultramicrotome (Dupont-Sorvall, Wilmington DE, USA) で厚さ 100 nm の超薄切切片の作製を行った. その後, 酢酸ウラニルと鉛塩類にて電子染色を施し, JEOL1010 透過電子顕微鏡 (JEOL, 東京) にて海馬 CA1 領域の微細構造, ミエリン鞘および PSD length を観察した.

(2)-2) 海馬 CA1 領域の神経細胞の超微細構造およびミエリン鞘，シナプスの形態変化

海馬 CA1 領域の神経細胞，ミエリン鞘およびシナプスの超微細構造を観察した．ミエリン鞘は少なくともマウス 1 匹当たり 20 の画像に基づいて分析を行い，200 以上の軸索を検討した．シナプスは，シナプス小胞の存在によってシナプス前終末とシナプス後肥厚 (PSD) を特定し，PSD length の測定を行った．PSD length の測定は，Hara ら³⁶⁾の方法にしたがって．動物当たり約 50 のシナプスを計測した．

(2)-3) G-ratio

今回，Chomiak ら³⁷⁾の方法に従って各群の海馬 CA1 領域のミエリン鞘の G-ratio (内径 / 外径 = G-ratio) を求めた．G-ratio は透過型電子顕微鏡の形態変化を観察したミエリン鞘で計測を行った．G-ratio の値が高値を示すとミエリン鞘が薄く，神経伝導の速度が遅くなると報告されている³⁷⁾．

(3) 仔マウスの海馬における GR 発現量の検索

GR は GC の受容体で，海馬に豊富に存在し，海馬から HPA axis へフィードバック機能を行っている⁷⁾ことから，妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が生まれた仔の海馬での GR 発現量に及ぼす影

響を解析した。

(3)-1) 動物の固定と標本作製

仔マウス(各群 n=6)に 3 種混合麻酔(0.01 ml/g)を行い, 続いて 4℃ の 4% PFA/0.1M PB 固定液を灌流させ固定を行った。次いで, パラフィン包埋し, 包埋された脳を, 前頭断で厚さ 5 μm の海馬の連続切片を作製した。

(3)-2) *in situ* hybridization 法による GRmRNA の検出

GRmRNA の検索には *in situ* hybridization 法を用いた。

最初に, 切片を脱パラフィン後, 10 μg/ml Proteinase K(Roche Diagnostcs, 東京)(0.067M リン酸緩衝液)を用いて, 蛋白分解酵素処理を行った。その後, 3% H₂O₂ 処理を行った。ハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン(DIG)標識 cRNA プローブ(NM_008173)を用いた。ハイブリダイゼーション終了後, 切片を 55℃ の 5×Standard saline citrate(SSC)(1×SSC:0.15M, NaCl;0.015 M, sodium citrate)に浸漬した後, 50%ホルムアミド / 2 ×SSC で洗浄した。次いで, 37℃ の TNE(1M Tris-HCl, pH7.5;0.5M EDTA; 5M NaCl/1L DW)で洗浄後, 切片を 10 μg/ml RNase A(Roche diagnostics, 東

京)/TNEにより37℃で処理した。その後、37℃でTNEにより洗浄後、2×SSC、0.2×SSC、0.2×SSCを用いて、それぞれ55℃で洗浄を行った。NaClとTween20を最終濃度がそれぞれ300mM、0.1%になるように添加したTBS(TBS-2T)で洗浄を3回を行い、AvidinおよびBiotinブロッキングを行い、再びTBS-2Tで洗浄を3回行った。さらに、0.5%カゼイン添加TBS反応後、Anti-Digoxigenin-POD, fab fragments horseradish peroxidase(HRP)標識DIG抗体(Dako, CA, USA)を滴下し、反応させた。その後TBS-2Tで洗浄を3回を行い、0.07μM biotinylated tyramide solutionを切片に滴下し、反応させた。その後再びTBS-2Tで洗浄を3回行った後、0.5%カゼイン添加TBSを用いてStreptavidin/HRP(Dako, CA, USA)を希釈し、切片にのせ反応させた後、TBS-2Tで洗浄を3回、TBSで洗浄を行った。発色はDAB Liquid System(Dako, CA, USA)を用いて反応させた。

(3)-3) リアルタイムPCRによるGR(Nr3c1)の定量解析

仔マウス(各群 n=6)の海馬を切り出し、トライゾール溶液中に採取し、ホモジナイズして-80℃で凍結保存した。

太田らの方法³⁸⁾に従い、凍結組織をDirectzol™

RNA MiniPrep(フナコシ, 東京)を用いて total RNA を抽出した. PrimeScriptTM RT reagent Kit(Takara, 大津)を用いて, cDNA を生成した. GR(Nr3c1)プライマー(Forward: AAGCAGGGACGACAATTCCAG, Reverse: CTAAAGCTCCCGAAGGCTACCA, PCR product: 149bp)および SYBR[®] Premix Ex TaqTM II (Takara, 大津)を加え, 7500Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA)を用いた. 解析は, $\Delta\Delta C_t$ 法³⁹⁾にて GR(Nr3c1)の遺伝子発現量を測定した. なお, 内部標準遺伝子として, グリセルアルデヒド 3リン酸脱水素酵素 (Gapdh) (Forward: TGTTCTACCCCAATGTGT, Reverse: GGTCCTCAGTG TAGCCCAAG, PCR product: 137bp)を用いた

5 Morris 水迷路学習テスト

Morris 水迷路学習テストは, 齧歯類の海馬機能を反映した空間認知機能の測定に広く利用されている⁴⁰⁻⁴²⁾. 各群の仔マウスに 1日に 4回ずつ 7日間連続して Morris 水迷路学習テストを実施し, ストレス負荷中の妊娠母体の咀嚼運動が生まれた仔マウスの空間認知機能に及ぼす影響を検討した(各群 n=8). 水迷路には直径 90cm, 深さ 30cm のステンレス製のプール(内壁面は青く塗られている)を用いて, 深さ 22cm まで水(水温 28℃)を入れ,

直径 12cm の台 (プラットフォーム) をプールの中央近くの水面下 1cm の深さの位置に設置した。また、水中のプラットフォームが見えないようにするため水面を直径 1-2mm の灰色のスチレンビーズで覆った。本実験では 4箇所 のスタート地点を設け、マウスをプール内壁面に向けながら静かに水中に入れた。投入場所の順序は乱数表により毎日変化させた。始めのうちマウスはプラットフォームの存在を知らず泳ぎ回り、偶然にプラットフォームにたどり着く。テストの回数を重ねるにつれ、プラットフォームの位置をプール周囲の目標物との位置関係で記憶するようになり、プラットフォームへの到達時間が次第に短くなる。各群の仔マウスをこのプールで泳がせ、コンピュータシステム (Move-tr/2D[®], Library, 東京) に連結した CCD カメラ (Exwane, SONY, 東京) により遊泳中の動きを記録し、プラットフォームへの到達時間を計測した。さらに、視力や遊泳能力による影響を調べるため、6日目の水迷路テスト終了後プラットフォームを水面上に約 1cm 露出させ、Visible Probe Test²⁶⁾を行った。

6 妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が仔マウスのストレス脆弱脳に与える影響の検討

妊娠母体のストレス曝露は、生まれた仔の脳を

ストレスに過敏に反応するストレス脆弱脳を作り出すといわれている²⁾。そこで本研究では妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が仔のストレス脆弱脳に及ぼす影響を検討した。

(1) 新規ストレス

仔マウスに60分間の拘束ストレスを用いて新規急性ストレスを負荷した。マウスを長さ8cm、内径3.5cmのプラスチック製のチューブに60分間入れ、拘束処置とした。拘束ストレス負荷前(各群n=6)および拘束ストレス負荷が終了して60分後(各群n=6)に固定を行った。

(1)-1) 動物の固定と標本作製

仔マウスに3種混合麻酔(0.01ml/g)を行い、続いて4℃の4%PFA/0.1MPB固定液を灌流させて固定を行った。次いで、パラフィン包埋し、包埋された脳を、前頭断で厚さ5μmのPVNの連続切片を作製した。

(1)-2) *in situ* hybridization 法による CRHmRNA の検出

CRHmRNA の検索には *in situ* hybridization 法を用いた。

最初に、薄切した切片を脱パラフィン後、

10 µg/ml Proteinase K (Roche Diagnostics, 東京)(0.067M リン酸緩衝液)を用いて, 蛋白分解酵素処理を行った. その後 3% H₂O₂ 処理を行った. ハイブリダイゼーションはジゴキシゲニン (DIG) 標識 cRNA プローブ (NC_000069)を用いた. ハイブリダイゼーション終了後, 切片を 55℃ の 5×SSC に浸漬した後, 50%ホルムアミド/2×SSC で洗浄した. 次いで, 37℃ の TNE で洗浄後, 切片を 10 µg/ml RNase A (Roche diagnostics, 東京)(TNE)により 37℃ で処理した. その後, 37℃ で TNE により洗浄後, 2×SSC, 0.2×SSC, 0.1×SSC を用いて, それぞれ 55℃ で洗浄を行った. その後 TBS-2T で洗浄を 3 回行い, Avidin および Biotin ブロッキングを行い, 再び TBS-2T で洗浄を 3 回行った. さらに, 0.5% カゼイン添加 TBS 反応後, Anti-Digoxigenin-POD, fab fragments horseradish peroxidase (HRP) 標識 DIG 抗体 (Dako, CA, USA) を滴下し, 反応させた. 次いで TBS-2T での洗浄を 3 回行い, 0.07 µM biotinylated tyramide solution を切片に滴下し, 反応させた. その後再び TBS-2T で洗浄を 3 回行った. その後, 0.5% カゼイン添加 TBS を用いて希釈した Streptavidin/HRP (Dako, CA, USA) を切片に滴下し, 反応させた後, TBS-2T で洗浄を 3 回, TBS で洗浄を行った. 発色は DAB Liquid System (Dako,

CA, USA)を用いて反応させた。

(1)-3) CRHmRNA の定量解析の方法

3群の仔マウスのPVNにおけるCRHmRNA陽性部分の面積をNIH画像ソフトウェア1.61版を用いて、Hsuらの方法⁴³⁾に従って解析した。計測部位は、Swason Brain Maps⁴⁴⁾を用いて、Bregma-1.80mmから-1.88mmの部位を計測範囲とし、両側のPVN領域内におけるCRHmRNAシグナルの発現数を解析した。

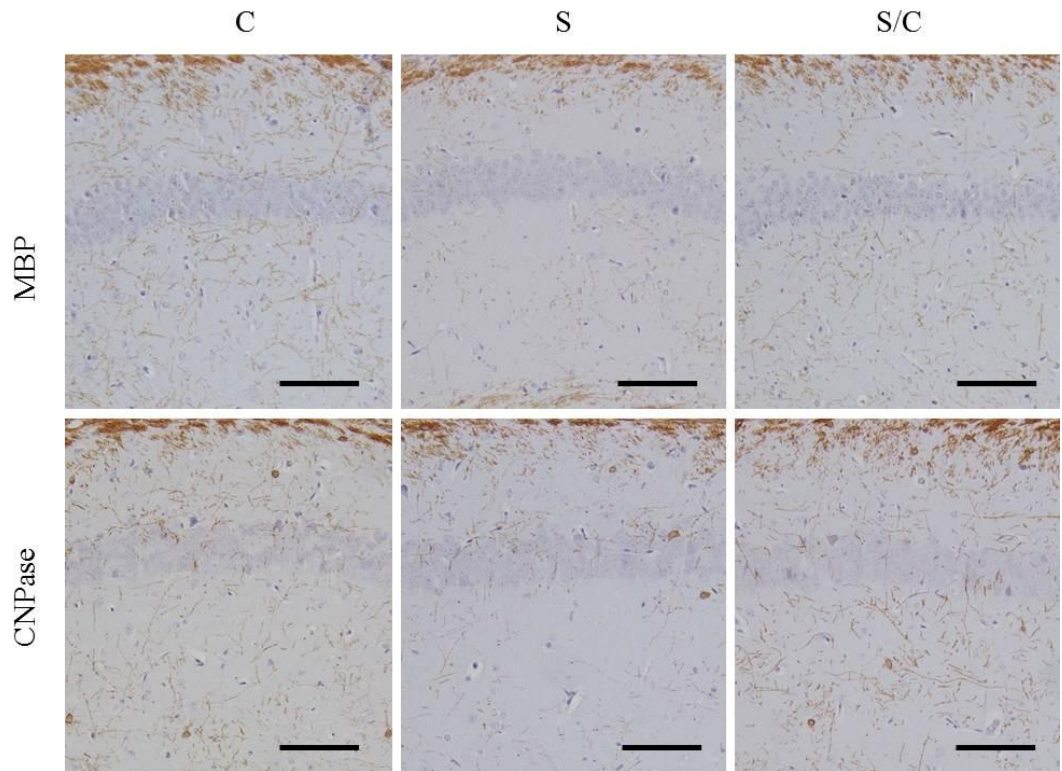
7 統計学的処理

各計測結果は分散分析または反復測定分散分析後、有意差のあるものは、Tukeyによる多重比較検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差があるものと判定した。

結 果

1 妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が仔のオリゴデンドロサイトに及ぼす影響

各群の海馬 CA1 における MBP と CNPase 陽性細胞の免疫組織染色像の典型例を図 1 に示す。C および S/C の MBP 陽性細胞は S の MBP 陽性細胞より豊富に認められた。また、CNPase 陽性細胞においても同様な傾向が認められた。MBP および CNPase 陽性細胞の面積を測定し分析した結果を図 2 に示す。各群の MBP および CNPase 陽性細胞の面積をグラフに示す。C ($p < 0.01$) と S/C ($p < 0.01$) の CNPase 陽性細胞の面積は S より高値を示し有意差を認めた。



Bars : 100 μ m

図 1 各群の海馬 CA1 領域における MBP および CNPase 陽性細胞の免疫染色像

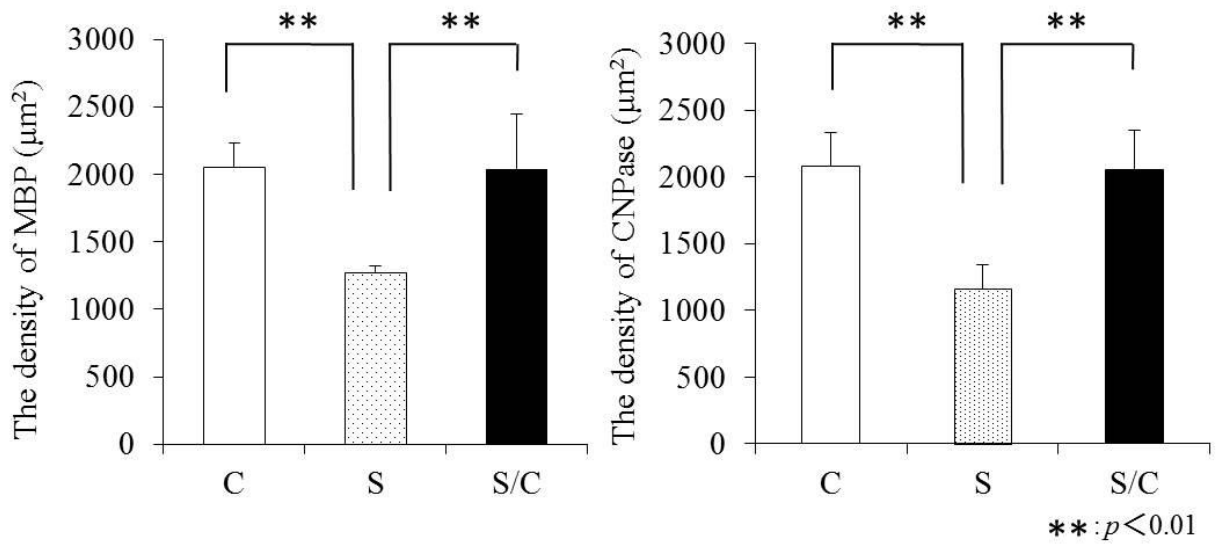
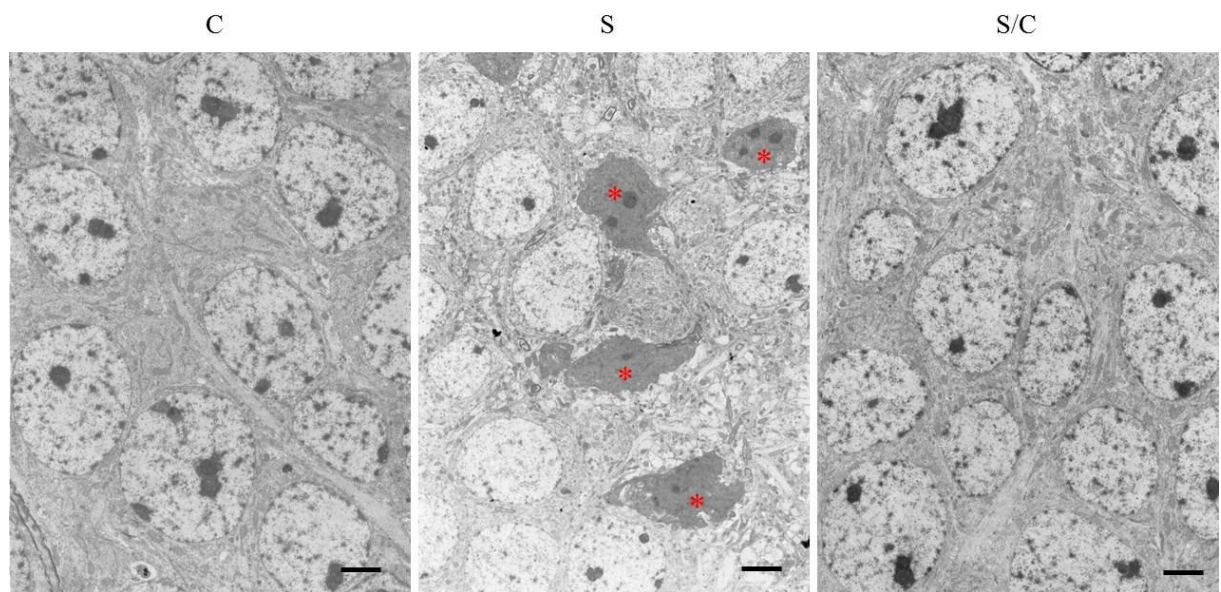


図 2 海馬 CA1 領域における MBP および CNPase 陽性細胞面積 (mean ± SE, 各群 n = 6) .

2 海馬神経細胞の超微細構造

海馬 CA1 領域の神経細胞の超微細構造の一例を図 3 に示す。S では、核を含む圧縮された細胞などの変性が多く認められた。C および S/C では、ほとんど変性細胞は観察できなかった。

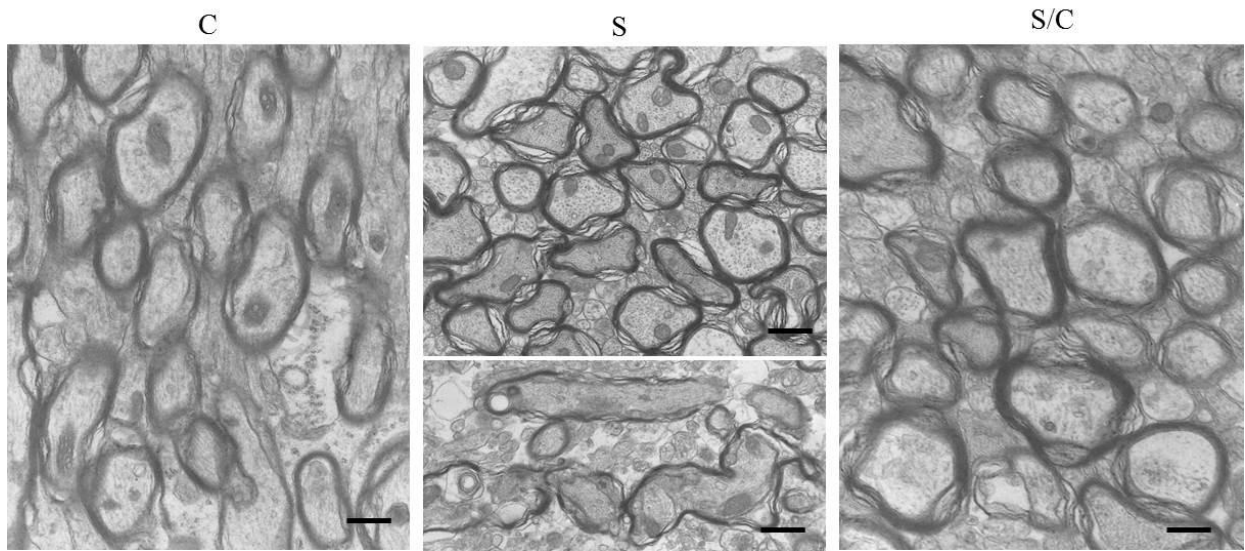


*: 変性神経細胞, Bars: 3 μ m

図 3 海馬 CA1 領域の神経細胞の超微細構造

3 海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造とミエリン鞘の厚みの解析

海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造の典型例と G-ratio を図 4 に示す。ミエリン鞘の断面は C および S/C で円形または楕円形に観察されたのに対し，S では変性や萎縮が認められた。G-ratio はミエリン鞘の内径/外径で計算され，値が大きいほどミエリン鞘が薄いことを示している。C ($p < 0.01$) と S/C ($p < 0.01$) の G-ratio は S より小さい値を示し，両者間で差は認めなかった。つまり，S のミエリン鞘が C や S/C に比べて薄いことが示された。



Bars: 1 μm

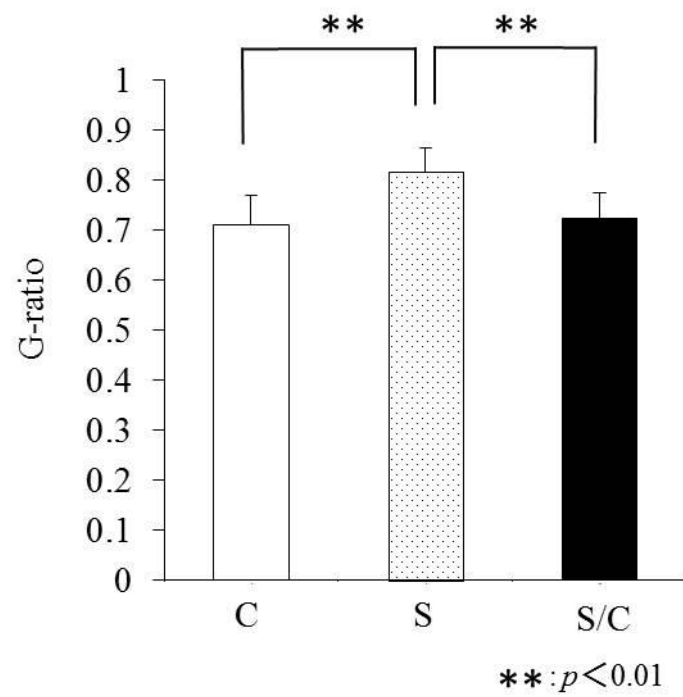
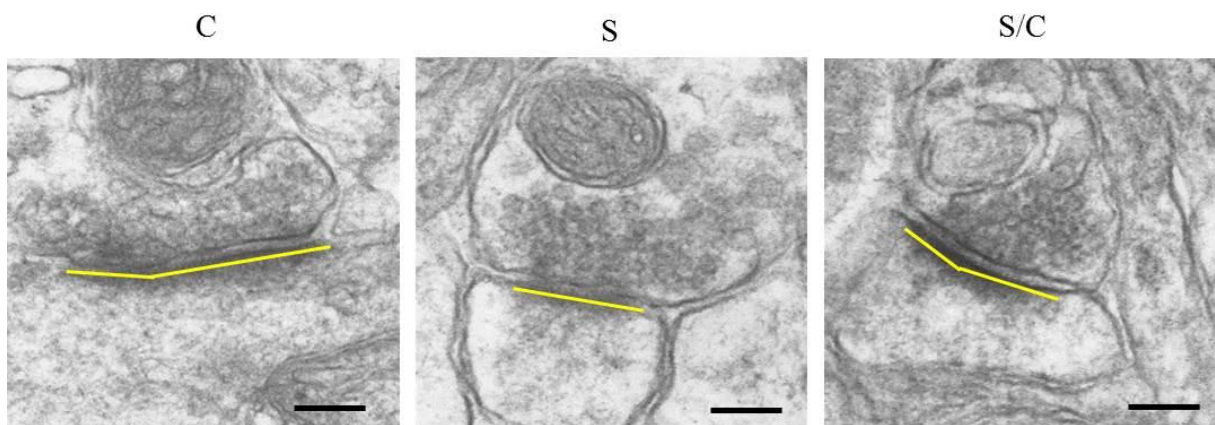


図 4 海馬 CA1 領域のミエリン鞘の超微細構造と G-ratio (mean ± SE, 各群 n = 8)

4 シナプスの超微細構造と PSD length

海馬 CA1 領域のシナプスの超微細構造と PSD length の分析結果を図 5 に示す。PSD length は、S で有意に低値 ($p < 0.01$) を示したが、S/C と C との間では有意な差は認められなかった。



Yellow line: PSD length, Bars: 100 nm

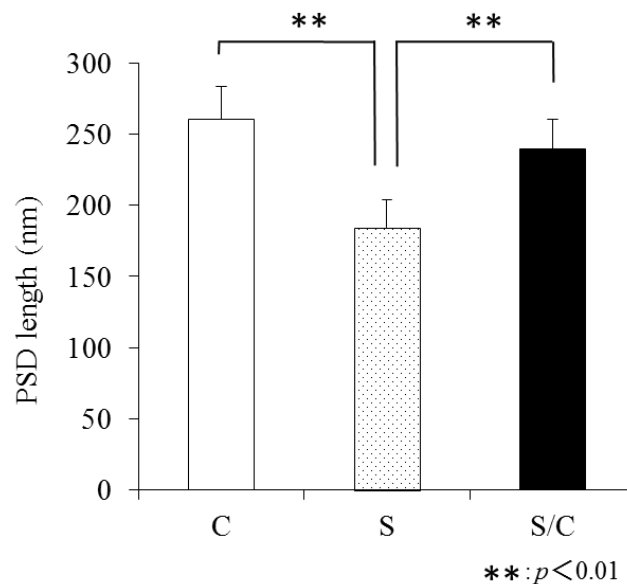
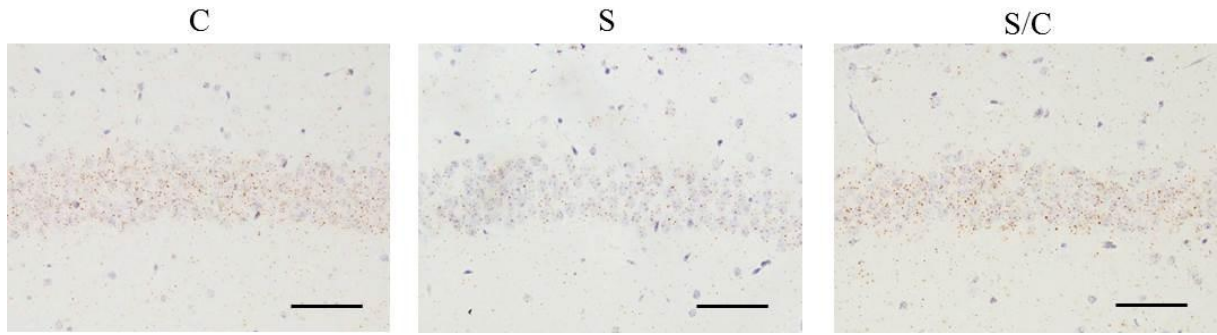


図 5 海馬 CA1 領域のシナプスの超微細構造と PSD length (mean \pm SE, 各群 n = 6)

5 海馬における GRmRNA の発現量

in situ hybridization 法による GRmRNA の発現像 (図 6) とリアルタイム PCR による GRmRNA 定量解析の結果 (図 7) を示す.

in situ hybridization 法による組織像において, S では GRmRNA の発現量が他の 2 群に比較して少ないように観察される. リアルタイム PCR を用いた GRmRNA の発現量は, C および S/C に比較して, S で有意に低い値を示した ($p < 0.01$). 一方, C と S/C との間に有意な差は認められなかった.



Bars: 100 μ m

図 6 GR mRNA の発現量 (in situ hybridization 法による染色像) (各群 n = 6)

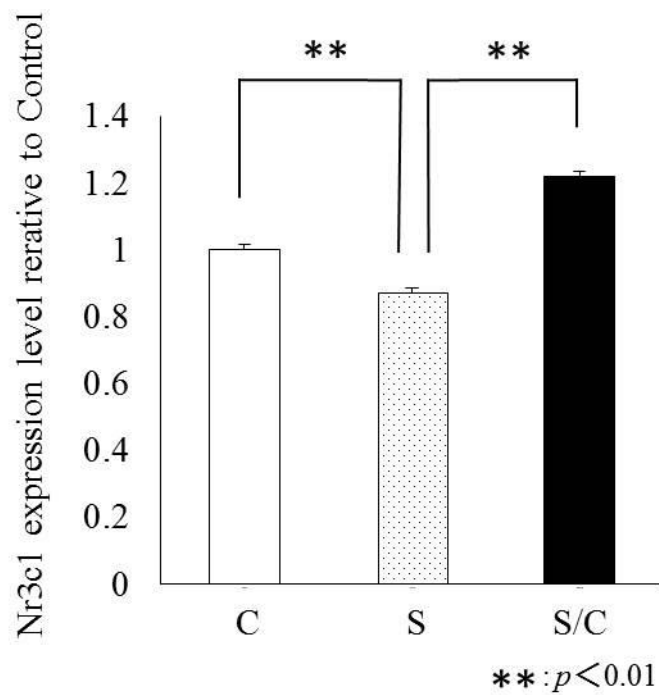


図 7 Nr3c1 (GR) の mRNA の発現量 (mean \pm SE, 各群 n = 6, qPCR Nr3c1 (GR) n = 4, qPCR mGapdh n = 4)

6 Morris 水迷路学習テストの結果

Morris 水迷路学習テストの結果および Visible Probe Test の結果を図 8 に示す。

S のプラットフォームへの到達時間は C および S/C に比較して有意に延長した ($p < 0.01$). C と S/C との間でプラットフォームへの到達時間に有意な差は認められなかった。

Visible Probe Test において 3 群の間で有意な差は認められなかった。

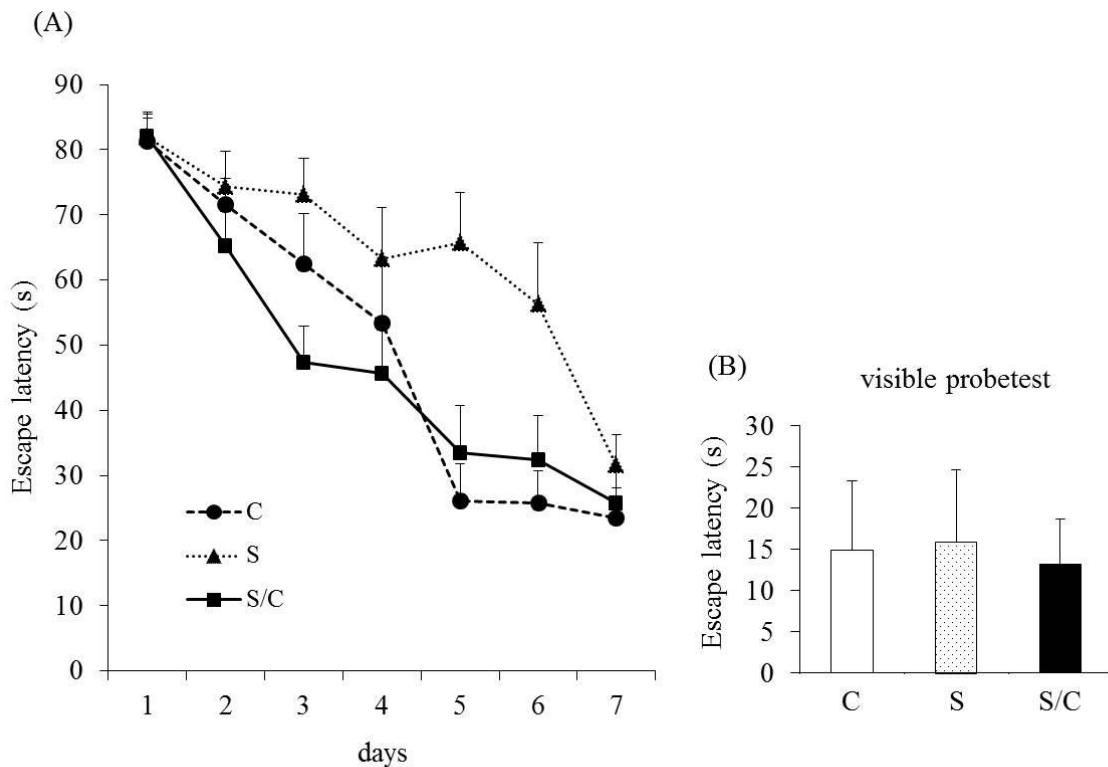


図 8 Morris 水迷路テストの結果

(A) 1 日 4 回の平均到達時間 (mean \pm SE, 各群 n = 8).

(B) Visible Probe Test の結果 (mean \pm SE, 各群 n = 8).

7 仔マウスの PVN における CRH mRNA の発現量

新規拘束ストレス前後の PVN における CRH mRNA の染色像を図 9 に示す。新規拘束ストレス後に各群で CRH mRNA が多く発現した。特に S では、より強く発現していた。S/C における CRH mRNA 発現細胞は S と比較してやや少ないような所見が得られた。

定量解析した結果、新規拘束ストレス負荷前の 3 群に差は認められなかった。しかし、新規拘束ストレス負荷後の S/C における CRH mRNA 発現は、S と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。C と S/C に差は認められなかった (図 10)。

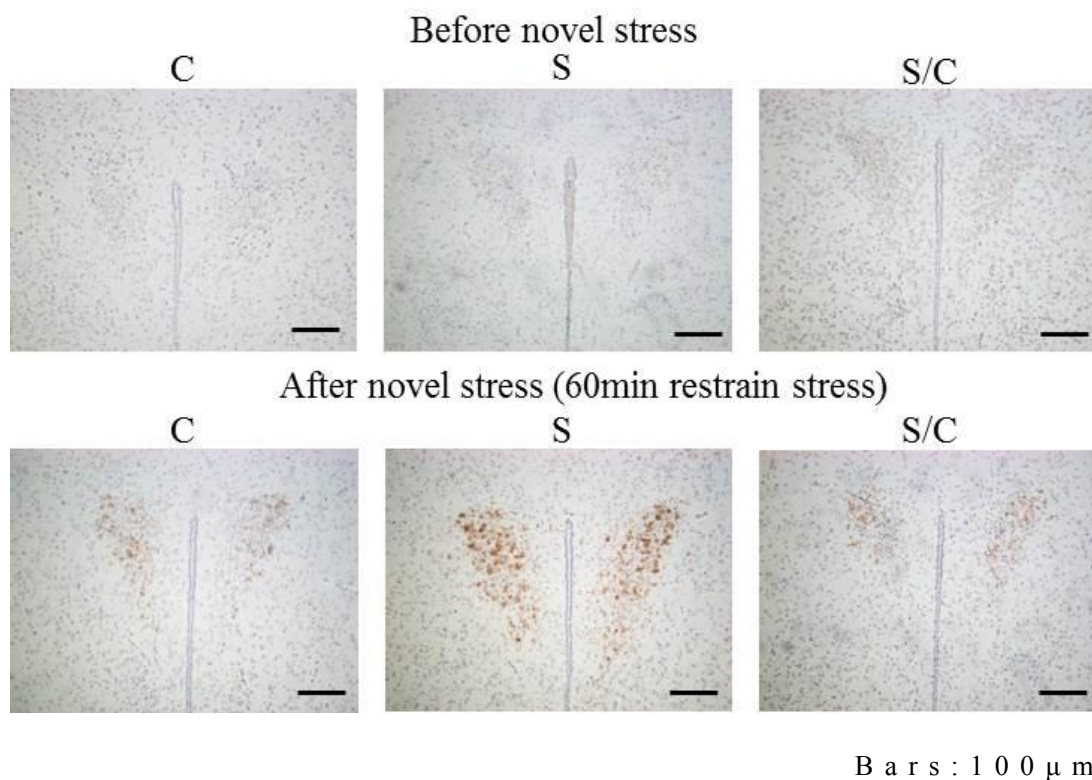


図 9 各群の仔マウスのPVNにおけるCRHmRNAの発現像

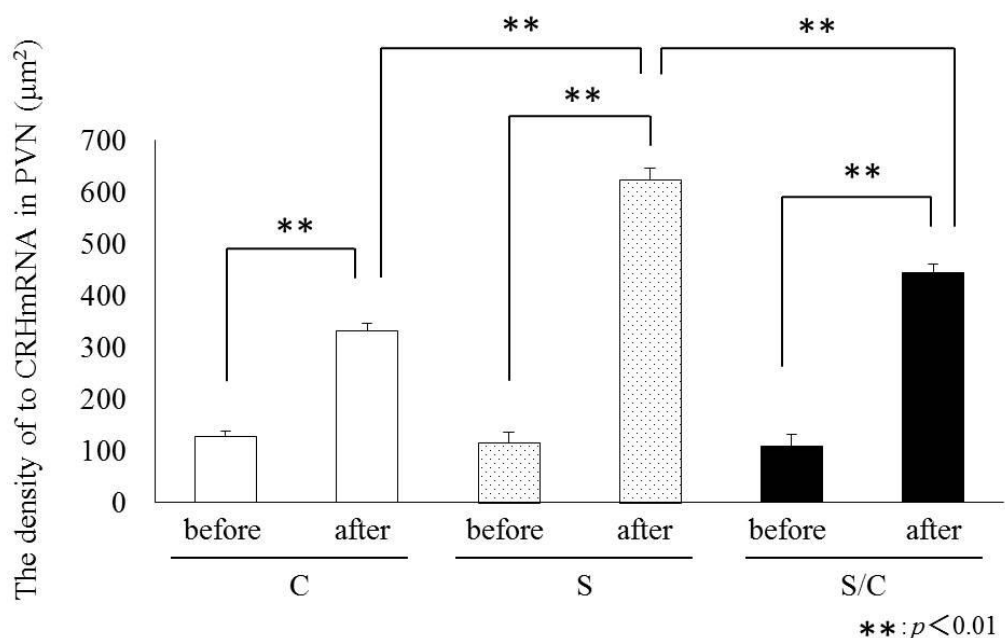


図 10 各群の仔マウスのPVNにおけるCRHmRNAの発現量の定量解析結果 (mean ± SE, 各群 n = 6)

考 察

母体の妊娠期ストレスは、子の脳の発育に非常に大きな影響を及ぼすとされている⁴⁵⁾。特に海馬は妊娠期後半から出生後も形成され続ける組織であり、子の空間認知能および記憶において重要な役割を行っている⁴⁵⁾。

本研究において、妊娠期ストレス中に咀嚼運動を行った母体から生まれた仔を分析することで、仔の脳の妊娠期ストレス誘発性の形態学的および機能学的変化を調べ、妊娠期ストレス中の咀嚼運動の作用に注目した。

本研究では過去の報告と一致して、妊娠期ストレスは仔マウスの海馬 CA1 領域では MBP と CNPase の免疫染色性の低下、ミエリン鞘の菲薄化、PSD length の短縮および空間認知障害が認められた。また、これらの仔では海馬における GR の発現が減少し、新規ストレスに対して PVN で過敏な CRH の分泌が確認された^{14, 46-49)}。一方、妊娠期ストレス中に咀嚼運動をさせると、仔の海馬 CA1 領域の MBP および CNPase の免疫染色性が向上し、ミエリン鞘の委縮が抑制された。また G-ratio の高値化、PSD length の短縮化などが改善され、空間認知障害の予防効果が認められた。これらの仔では海馬における GR のダウンレギュレーション

が抑えられ，新規ストレスに対する過敏反応が抑制された．

妊娠期ストレスは母体の血中 GC 濃度を増加させ，これが胎盤を通じて胎児に移行することによって，胎児の発育や組織成熟の抑制に繋がるといわれている^{10,11)}．こうして子供たちは，新たなストレスに対して過敏反応を起こし，ストレス脆弱脳を形成すると考えられている⁵⁰⁾．移行した GC は仔の海馬で GR のダウンレギュレーションを引き起こし，海馬から視床下部へのネガティブフィードバック機構をブロックし，HPA axis を攪乱されて生涯を通じて様々な神経学的および行動学的な障害を持続的に発現させる^{10,11)}．このように妊娠ストレスによる様々な障害は GC が鍵となっていることから，GC による一連の障害形成過程がグルココルチコイドプログラミング説と呼ばれている^{8,9)}．齧歯動物に加わるストレスの大きさを調べるために血中 GC レベルの測定を行った先行実験では，咀嚼運動させた母体の血中 GC 濃度は減少することが報告されている²⁶⁾．また，3週間の拘束ストレス負荷中に木の爪楊枝を咬ませたマウスでは，ストレス性に引き起こされる血中 GC 濃度の上昇が抑制されることが示されている⁵¹⁾．

多くの研究で，ストレス負荷中に咀嚼運動させることは，有効なストレス対処法であることが証

明されている (26, 29, 30, 52-54)。

今回の研究において, GR の変化を調べると妊娠期ストレスを受けた仔で GR 発現量は減少していることがわかった。GR は脳全体に分布し, 特に海馬の GR 密度は高く (55), 海馬の GR が GC と結合すると, HPA 系の視床下部に対してネガティブフィードバックが働く。海馬は GC レベルの上昇に敏感である (56)。一方, GC 移行が遷延すると, 海馬 GR と GR mRNA のダウンレギュレーションがおこり (57, 58), 生まれた仔の HPA 系の負のフィードバック機構が障害される (59)。この結果, 血中 GC 濃度の上昇が持続し, GC による神経毒性による海馬の神経細胞死が惹起され (58), 海馬機能が低下し, さらに HPA 系の制御が難しくなるという悪循環を引き起こす (59)。しかし, 咀嚼運動によって, 拘束ストレスに刺激され低下するはずの海馬 GR が, 高値を示すと報告されている (30)。本実験で, 妊娠期ストレス中に咀嚼運動をさせた母体から生まれた仔では海馬における GR mRNA の発現量が減少せず, GR のダウンレギュレーションが認められなかった。これらの所見から, 妊娠期ストレス中に咀嚼運動を行うことで母体の HPA 系の活性が低下し GC の分泌が抑えられ, その結果, 仔が高濃度の GC に曝されることなく海馬機能が保たれると考えられる。つまり, 仔への GC によるプログ

ラミングを防いでいることが示唆された。

オリゴデンドロサイト (MBP および CNPase) は、ミエリン鞘を形成していることが知られている⁴⁶⁾。過去の報告と一致して^{14,46-49)}、妊娠期ストレスによって仔の海馬 CA1 領域の MBP と CNPase 陽性細胞が減少し、海馬ミエリン鞘およびシナプスの変性を確認した。これは母体のストレスによる GC 暴露によって海馬神経細胞死や神経ネットワークの障害が生じていることを示している。咀嚼運動が行われた場合では、これら神経細胞の減少や神経ネットワークの変性が抑制されていたことを受け、やはり咀嚼運動によって母体のストレス緩和作用が生じた結果と考えられる。ミエリン鞘およびシナプスは神経伝達に重要な役割を果たしているため、妊娠期ストレス中の咀嚼運動が、オリゴデンドロサイトの成長やミエリン鞘の形成が正常化したことで空間認知能の改善につながったものと考えられる。また妊娠期ストレス中の咀嚼運動は、PSD length の短縮を抑制し仔マウスの神経伝達効率が低下しないことを示し、空間認知能の結果とよく一致している。以上の結果から妊娠期ストレス中の咀嚼運動による空間認知能の改善には、母体の咀嚼運動による仔の PSD length の改善も関与していることが示唆された。

さらに Morris 水迷路学習テストの結果からも、

妊娠期ストレスによって、海馬の記憶機能に影響が出ていることが明らかであり、咀嚼運動によってストレス刺激による記憶力の低下を防げることが示された。

PVNはHPA系の制御核であり、PVNの小細胞群がCRHとバゾプレッシン(Arginine Vasopressin: AVP)という2種類のホルモンを分泌している²⁷⁾。生体に急性ストレスが負荷されると、小細胞群からCRHが分泌される。CRHは下垂体前葉のCRH受容体に結合して、下垂体から副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)の分泌が促される²⁷⁾。下垂体から分泌されたACTHは副腎皮質の細胞を刺激し、GCの放出を促進させ、ストレスに対応する²⁷⁾。しかし、ストレスが長期間持続するような慢性ストレスの場合には、小細胞群から主にAVPが分泌され、ストレス反応が行われる²⁷⁾。つまり、CRHは急性ストレス時に、AVPは慢性ストレス下でHPA系の活性化に関与していることになる。本実験で新規ストレスとして使用した拘束ストレスは急性ストレスに分類される。新規拘束ストレスによってSの仔マウスのPVNでCRH mRNAの発現量が他の2群のマウスに比較して顕著に増加していたことから、ストレスに過敏に反応していることが示唆された。これに対して、S/CのPVNでは新規拘束ストレス後のPVNでのCRH mRNAの発現量がCとほぼ

同じ程度にまで抑えられていたことから，妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動は仔のストレスへの過敏反応を抑制し，ストレス脆弱脳の形成を防いでいることが示唆された．

妊娠期ストレス中の母体の咀嚼運動が仔の海馬のオリゴデンドログリアの成長障害，ミエリン鞘低形成やシナプス形成障害などの変化だけではなく，空間認知能の低下を抑制し，ストレス脆弱脳の形成を防いだ．これまでに，ストレス中の咀嚼運動がストレス抑制効果を示す多くの報告がみられる．例えば，ストレス中の咀嚼運動はストレス性に上昇する前頭前野や扁桃体の活性を抑制し，また咀嚼運動によって視床下部，扁桃体，大脳皮質などの脳部位におけるノルアドレナリンの代謝や血中GC濃度の上昇を抑制していることが確認されている^{60,61)}．Kanekoら⁶⁰⁾およびHoriら⁶¹⁾は，45分間の拘束ストレス条件下でラットに木製の棒を噛ませると，ストレスによってPVNで増加するFos発現の増強とCRH陽性細胞数の増加が抑制されることを報告している．これ以外にもTail-pinchストレスやcold-restraint中の積極的な咀嚼運動は線条体のドーパミンの代謝を高め^{62,63)}，視床下部や辺縁系におけるノルアドレナリンの代謝を上昇させるとともにストレス性の胃潰瘍の発生を抑制する⁶⁴⁾．Onishiら²⁶⁾は妊娠期ス

ストレス中の咀嚼運動によって母体の血中 GC 濃度の上昇が抑制されることによって、仔の学習障害が改善するというデータを示している。これらの報告から、咀嚼運動のストレス抑制効果には、青斑核を中心としたノルアドレナリン神経系が関与している可能性が考えられる。今後の課題は、妊娠ストレス中の咀嚼運動が脳辺縁系およびカテコールアミン系ニューロンに与える影響を詳細に調べる必要がある。

ストレスや栄養不良、感染などの妊娠期の環境変化は子の精神疾患や学習機能障害のリスクを高めるといわれている^{10,11,65,66}。ヒトの多くはストレス回避や集中力を高めるためにチューイングガムを噛む。咀嚼運動がストレスに及ぼす様々な影響が報告されている³¹が、研究デザインの難しさから、妊娠期の出来事、歯の数、咀嚼習慣などの要因と子の精神障害や学習障害発症との関係に関するコホート調査はほとんど行われていない。今後、これらの関係を明らかにするためのコホート調査の実施が望まれる。

結 論

DDY マウスを用いて，妊娠期ストレス中の咀嚼運動が新生仔(4週齢)の母体ストレス性脳機能障害に及ぼす影響について検討した結果，以下の結論を得た．

- 1) CNPase 陽性細胞および MBP 陽性細胞は，S は有意に減少したが，S/C と C との間で差はなかった．
- 2) 海馬神経細胞における超微細構造では S で多くの変性が認められたが，C および S/C では S に比較して少なかった．
- 3) 海馬ミエリン鞘では C に比べ S で萎縮および G-ratio の上昇がみられ，ミエリン鞘が薄いことが示された．C と S/C では差が認められなかった．
- 4) PSD length では S で長さの短縮が確認された．
- 5) GRmRNA 発現量は，S/C と C に比較して，S で有意に減少した．
- 6) Morris 水迷路学習テストを行い，新生仔の空間認知能に与える影響を検討した結果，プラットフォームへの到達時間は，S では有意に延長したが，S/C と C との間で差はなかった．

7) PVN における CRH mRNA 発現量は新規拘束ストレス前では 3 群間に差は認められなかったが、新規拘束ストレス後では、S で有意に増加したが、S/C と C との間で差はなかった。

以上の結果から、妊娠期ストレス中の母体の積極的な咀嚼運動が、出生後の仔マウスの脳の発達やストレス脆弱性の対処法として有用であることが示唆された。

引用文献

- 1) Talge NM, Neal C and Glover V. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry*. 2007;48:245-61.
- 2) Abe H, Hidaka N, Kawagoe C, Odagiri K, Watanabe Y, Ikeda T, Ishizuka Y, Hashiguchi H, Takeda R, Nishimori T and Ishida Y. Prenatal psychological stress causes higher emotionality, depression-like behavior, and elevated activity in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Neurosci Res*. 2007;59:145-151.
- 3) Gilbert ME, Kelly ME, Sam TE and Goodman JH. Chronic developmental lead exposure reduces neurogenesis in adult rat hippocampus but does not impair spatial learning. *Toxicol Sci*. 2005;86:365-374.
- 4) Lemaire V, Koehl M, LeMoal M and Abrous DN. Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. *PNAS*. 2000;97:11032-11037.
- 5) Wadhwa PD, Sandma CA and Garite TJ. The neurobiology of stress in human pregnancy: implication for prematurity and development of

- the fetal central nervous system. *Prog Brain Res.* 2001;133:131-142.
- 6) Meek LR, Burda KM and Paster E. Effects of prenatal stress on development in mice: maturation and learning. *Physiol Behav.* 2000;71:543-549.
- 7) Maccari S, Darnauder M, Morely-Fletcher S, Zuena AR, Cinque C and Van-Reeth O. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosci Biobehav Rev.* 2003;27:119-127.
- 8) Seckl JR and Meaney MJ. Glucocorticoid “programming” and PTSD risk. *Ann NY Acad Sci.* 2006;1071:351-378.
- 9) Kapoor A, Petropoulos S and Matthew SG. Fetal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal(HPA) axis function and behavior by synthetic glucocorticoids. *Brain Res Rev.* 2008;57:586-595.
- 10) Cottrell EC and Seckl JR. Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease. *Front Behav Neurosci.* 2009.
<http://dx.doi.org/10.3389/neuro.08.019.2009>.
- 11) Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol.*

2004;151:49-62.

- 12) Ye Y, Xiong J, Hu J, Kong M, Cheng L, Chen H, Li T and Jiang L. Altered hippocampal myelinated fiber integrity in a lithium-pilocarpine model of temporal lobe epilepsy: A histopathological and stereological investigation. *Brain Res.* 2013; 1522:76-87.
- 13) Meier S, Bräuer AU, Heimrich B, Nitsch R and Savaskan NE. Myelination in the hippocampus during development and following lesion. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:1082-1094.
- 14) Xu J, Yang B, Yan C, Hu H, Cai S, Liu J, Wu M, Ouyang F and Shen X. Effects of duration and timing of prenatal stress on hippocampal myelination and synaptophysin expression. *Brain Res.* 2013;1527:57-66.
- 15) Margeta MA and Shen K. Molecular mechanisms of synaptic specificity. *Mol Cell Neurosci.* 2010;43:261-267.
- 16) Fiala JC, Spacek J and Harris KM. Dendritic spine pathology: cause or consequence of neurological disorders? *Brain Res Rev.* 2002; 39:29-54.
- 17) Desmond NL and Levy WB. Changes in the

postsynaptic density with long-term potentiation in the dentate gyrus. *J Comp Neurol.* 1986;253:476-482.

- 18) Moretti P, Jonathan ML, Fortunato B, Richard A, Ryan T, Barbara A, Dawna A, Ottavio A, David S and Huda YZ. Learning and memory and synaptic plasticity are impaired in a mouse model of Rett syndrome. *J Neurosci.* 2006;26:319-327.
- 19) Toni N, Buchs PA, Nikonenko I, Povilaitite P, Parisi L and Muller D. Remodeling of synaptic membranes after induction of long-term potentiation. *J Neurosci.* 2001;21:6245-6251.
- 20) Muller D, Nikonenko I, Jourdain P and Alberi S. LTP, memory and structural plasticity. *Curr Mol Med.* 2002;2:605-611.
- 21) Weeks A, Ivanco TL, Leboutillier JC, Racine RJ and Petit TL. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: III. Long-term maintenance phase. *Synapse.* 2001;40:74-84.
- 22) Nicholson DA, Yoshida R, Berry R, Gallagher M and Geinisman Y. Reduction in size of perforated postsynaptic densities in

hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. *J Neurosci*. 2004;24:7648-7653.

- 23) Amaral DG and Witter MP. Hippocampal formation (Paxinos G, The rat nervous system). *Academic Press*. 1995;5:443-492.
- 24) Weeks A, Ivanco TL, Leboutillier JC, Racine RJ and Petit TL. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus. II. Induction/early maintenance phase. *Synapse*. 2000;36:286-296.
- 25) Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P and Morris R. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. *PNAS*. 1995;92:9697-9701.
- 26) Onishi M, Iinuma M, Tamura Y and Kubo K. Learning deficits and suppression of the cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of offspring are attenuated by maternal chewing during prenatal stress. *Neurosci Lett*. 2014;560:77-80.
- 27) Itoi K, Jiang YQ, Iwasaki Y and Watson SJ. Regulatory mechanism of corticotrophin-releasing hormone and vasopressin gene

expression in the hypothalamus. *J Neuroendocrinol.* 2004;16:348-355.

- 28) Miyake H, Mori D, Katayama T, Fujiwara S, Sato Y, Azuma K and Kubo K. Novel stress increases hypothalamic-pituitary-adrenal activity in mice with a raised bite. *Arch Oral Biol.* 2016;68:55-60.
- 29) Furuzawa M, Chen H, Fujiwara S, Yamada K and Kubo K. Chewing ameliorates chronic mild stress-induced bone loss in senescence-accelerated mouse(SAMP8), a murine model of senile osteoporosis. *Exp Gerontol.* 2014;55:12-18.
- 30) Kubo K, 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.
- 31) Kubo K, Iinuma M and Chen H. Mastication as a stress-coping behavior. *BioMed Res Int.* 2015. <http://dx.doi.org/10,1155/2015/876409>.
- 32) Miyake S, Yoshikawa G, Yamada K, Sasaguri K, Yamamoto T, Onozuka M and Sato S. Chewing ameliorates stress-induced suppression of

- spatial memory by increasing glucocorticoid receptor expression in the hippocampus. *Brain Res.* 2012;1446:34-39.
- 33) Yamazaki T, Kishimoto K and Ezaki O. The ddy mouse: a model postprandial hypertriglyceridemia in response to dietary fat. *J Lipid Res.* 2012;53:2024-2037.
- 34) Lemaire V, Lamarque S, Le Moal M, Piazza PV and Abrous DN. Postnatal stimulation of the pups counteracts prenatal stress-induced deficits in hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry.* 2006;59:786-792.
- 35) Tanaka J, Okuma Y, Tomobe K and Nomura Y. The age-related degeneration of oligodendrocytes in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse(SAM)P8: A quantitative immunohistochemistry study. *Biol Pharm Bull.* 2005;28:615-618.
- 36) Hara Y, Rapp PR and Morrison JH. Neuronal and morphological bases of cognitive decline in aged rhesus monkeys. *Age.* 2012;34:1051-1073.
- 37) Chomiak T and Hu B. What is the optimal value of the g-ratio for myelinated fibers in the rat CNS? A theoretical approach. *PLoS One.* 2009;

4:e7754.

- 38) Ohta E, Nihira T, Uchino A, Imaizumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Takahashi K, Hayakawa H, Nagai M, Ohyama M, Ryo M, Oginno M, Murayama S, Takashima A, Nishiyama K, Mizuno Y, Mochizuki H, Obata F and Okano H. I2020T mutant LRRK2 iPSC-derived neurons in the Sagami-hara family exhibit increased Tau phosphorylation through the AKT/GSK-3 β signaling pathway. *Hum Mol Genet.* 2015;24:4879-4900.
- 39) Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods.* 2001;25:402-408.
- 40) Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984;11:47-60.
- 41) Bromley-Brits K, Deng Y and Song W. Morris water maze test for learning and memory deficits in Alzheimer's disease model mice. *J Vis Exp.* 2011;53:e2920.
- 42) Kubo K, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Fujita M and Onozuka M. Molarless-induced changes of spines in hippocampal region of SAMP8 mice. *Brain Res.*

2005;1057:191-195.

- 43) Hsu DT, Chen FL, Takahashi LK and Kalin NH. Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: An in situ hybridization analysis. *Brain Res.* 1998;788:305-310.
- 44) Swanson LW. Brain maps: Structure of the Rat Brain, 2nd ed. Amsterdam: Elsevier Science Publishers BV; 1998.
- 45) Seress L, Abraham H, Tornoczky T and Kosztolanyi GY. Cell formation in the human hippocampal formation from mid-gestation to the late postnatal period. *Neuroscience.* 2001;105:831-843
- 46) Bennett GA, Palliser HK, Shaw JC, Walker D and Hirst JJ. Prenatal stress alters hippocampal neuroglia and increases anxiety in childhood. *Dev Neurosci.* 2015;37:533-545.
- 47) Hayashi A, Nagaoka M, Yamada K, Ichitani Y, Miake Y and Okada N. Maternal stress induces synaptic loss and developmental disabilities of offspring. *Int J Dev Neurosci.* 1998;16:209-216.

- 48) Hosseini-Sharifabad M and Hadinedoushan H. Prenatal stress induces learning deficits and is associated with a decrease in granules and CA3 cell dendritic tree size in rat hippocampus. *Anat Sci Int.* 2007;82:211-217.
- 49) Wu J, Song T, Li Y, He K, Ge L and Wang L. Prenatal restraint stress impairs learning and memory and hippocampal PKC β 1 expression and translocation in offspring rats. *Brain Res.* 2007;1141:205-213.
- 50) O'Donnell K, O'Connor TG and Glover V. Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. *Dev Neurosci.* 2009;31:285-292.
- 51) 高階博文, 伊藤由美, 岩宮万里子, 笹栗健一, 佐藤貞雄. 拘束ストレスの全身への影響と歯ぎしり様運動の効果. 神奈川歯学. 2005;40:1-11.
- 52) Hori N, Lee MC, Sasaguri K, Ishii H, Kamei M, Kimoto K, Toyoda M and Sato S. Suppression of stress-induced nNOS expression in the rat hypothalamus by biting. *J Dent Res.* 2005;84:624-628.
- 53) Miyake S, Takahashi S, Yoshino F, Todoki K, Sasaguri K, Sato S and Lee MC. Nitric oxide

levels in rat hypothalamus are increased by restraint stress and decreased by biting.

Redox Rep. 2008;13:31-39.

- 54) Yamada K, Narimatsu Y, Ono Y, Sasaguri K, Onozuka M, Kawata T and Yamamoto T. Chewing suppresses the stress-induced increase in the number of pERK-immunoreactive cells in the periaqueductal gray. *Neurosci Lett.* 2015;599:43-48.
- 55) Morimoto M, Morita N, Ozawa H, Yokohama K and Kawata M. Distribution of glucocorticoid receptor immunoreactivity and mRNA in the rat brain: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Neurosci Res.* 1996;26:235-269.
- 56) Reul JM and de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology.* 1985;117:2505-2511.
- 57) Freeman AI, Munn HL, Lyons V, Dammermann A, Seckl JR and Chapman KE. Glucocorticoid down-regulation of rat glucocorticoid receptor does not involve differential promoter regulation. *J Endocrinol.* 2004;183:365-374.

- 58) Herman JP, Adams D and Prewitt C. Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*. 1995;61:180-190.
- 59) 伊東宏晃. 妊娠中のストレスと児への影響. 周産期医学. 2012;42:845-848.
- 60) Kaneko M, Hori N, Yuyama N, Sasaguri K, Slavicek R and Sato S. Biting suppresses Fos expression in various regions of the rat brain-further evidence that the masticatory organ functions to manage stress. *Stomatologie*. 2004;101:151-156.
- 61) Hori N, Yuyama N and Tamura K. Biting suppresses stress-induced expression of corticotrophin-releasing factor(CRF) in the rat hypothalamus. *J Den Res*. 2004;83:124-128.
- 62) Gomez FM, Ortega JE, Horrillo I and Meana JJ. Relationship between non-functional masticatory activity and central dopamine in stressed rats. *J Oral Rehabil*. 2010;37:827-833.
- 63) 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.

- 64) Vincent GP, Pare WP, Prenatt JE and Glavin GB. Aggression, body temperature, and stress ulcer. *Physiol Behav.* 1984;32:265-268.
- 65) Bale TL, Baram TZ, Brown AS, Goldstein JM, Insel TR, McCarthy MM, Nemeroff CB, Reyes TM, Simerly RB, Susser ES and Nestler EJ. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry.* 2010;68:314-319.
- 66) Nolvi S, Karlsson L, Bridgett DJ, Korja R, Huizink AC, Kataja EL and Karlsson H. Maternal prenatal stress and infant emotional reactivity six months postpartum. *J Affect Disord.* 2016;199:163-170.