

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：33938

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390395

研究課題名（和文）チューイングによる小児期の母胎ストレス性神経認知回路の賦活と再生

研究課題名（英文）Maternal chewing prevents stress-induced learning impairment in pups

研究代表者

久保 金弥（KUBO KIN-YA）

星城大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：00329492

研究成果の概要（和文）：妊娠母体がストレスに曝されると、その母親から生まれた子に神経発達障害や情動障害、認知障害が発症することがわかっている。ストレスを負荷した妊娠マウスにつまようじを噛ませると、母体のストレス物質の分泌が抑制され、新生仔の神経発達障害や情動障害、認知障害の発症が抑制されることが本研究によって明らかとなった。妊娠母体のチュウイングは母体のストレス緩和だけではなく、生まれてくる子の認知障害予防にも役立つ可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Maternal stress induces developmental brain impairment, emotional abnormalities, and learning deficits in pups. Maternal chewing prevents the stress-induced increase in plasma corticosterone levels in dams, as well as neurodevelopmental disorders, anxiety-like behavior, and learning deficits in the pups. Maternal chewing is an effective stress-coping method for the dams to prevent learning deficits in pups.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	9,000,000	2,700,000	11,700,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：小児歯科学

### 1. 研究開始当初の背景

社会構造の急激な変化に伴い人々は計り知れないストレス環境下にある。学童においてもご多分に漏れず、うつ病や自閉症などの精神的機能障害が急増し、深刻な社会問題となっている。近年、動物を用いた研究において、妊娠中に強いストレス或いは弱くても持続的にストレスを被った母親から生まれた子供は、脳の高次神経ネットワークの生後発

達が遅れ、神経認知機能の低下に繋がることがわかってきた。妊娠中の母体のストレス緩和対策は母体の健康維持に重要であるばかりではなく、生まれてくる子の精神認知機能障害を予防する上でも極めて重要な課題である。一方、我々はこれまでの研究において、拘束ストレスを負荷させたラットやマウスに木の棒を噛ませることにより、ストレス性に減衰した海馬の長期増強がよみがえるこ

とや海馬での細胞新生機構の抑制が緩和されることなどを明らかにしてきた。そこで、本研究課題ではストレス負荷中の妊娠マウスに木の棒を噛ませた場合の新生仔の神経発達に及ぼすチューイングの影響を明らかにする。

## 2. 研究の目的

妊娠中に被った母体のストレスと学童の神経認知機能障害との関係が強く指摘されている。一方、噛む動作（チューイング）にはストレス緩和作用があることがわかってきた。本研究ではストレス条件下でチューイングさせた妊娠マウスとチューイングさせなかった妊娠マウスから生まれた仔マウスにおいて、記憶、情動テスト、脳機能回路の生後成長発達の観察、及び関連神経伝達分子の定量分析を行い、チューイングによる小児期の母体ストレス性神経認知機能回路の再生機構を世界に先駆けて解明し、チューイングの神経科学的意義を社会にアピールすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

ストレス条件下でチューイングさせた妊娠マウスとチューイングさせなかった妊娠マウス、および両者から生まれた仔マウスを用いて以下の検索を行う。

(1) チューイングが母体のストレス反応に与える影響の抽出

妊娠母体のチューイングがストレスによって活性化される母体の視床下部-下垂体-副腎皮質系 (HPA axis) に及ぼす影響を検索する。

① 視床下部におけるバソプレッシン mRNA の発現量の測定 (in situ hybridization 法)

② 血中コルチコステロン濃度の測定

(2) ストレス負荷中の母体のチューイングが仔マウスの行動に及ぼす影響の抽出

妊娠母体のチューイングが仔マウスのストレス性認知機能障害や情動障害に及ぼす影響を検討する。

① 仔マウスの空間認知能の検索 (Morris water maze test)

② 情動行動の検索 (hole-board test)

(3) ストレス負荷中の母体のチューイングが仔マウスの脳の生後発達に及ぼす影響の抽出

妊娠母体のチューイングが仔マウスのストレス性の Neurogenesis の抑制、海馬神経細胞の発達障害、カテコールアミン系神経の発達障害に及ぼす影響を検討する。

① 海馬歯状回における Neurogenesis (cell generation, survival, differentiation) の解析

② 海馬 CA3 錐体細胞の樹状突起の発達状況の解析

③ 黒質、尾状核、青斑核、背側縫線核におけ

る HT、GCH および 5-HT ニューロンの免疫組織学的活性の解析

④ 海馬における脳由来神経成長因子 (BDNF) 発現量の解析

## 4. 研究成果

(1) 母体におけるバソプレッシン mRNA の発現量

ストレスを負荷された妊娠母体では視床下部室傍核 (PVN) におけるバソプレッシン mRNA の発現量が顕著に上昇したが、ストレス負荷中にチューイングさせた母体の視床下部 PVN ではバソプレッシン mRNA の発現量の上昇が認められなかった。

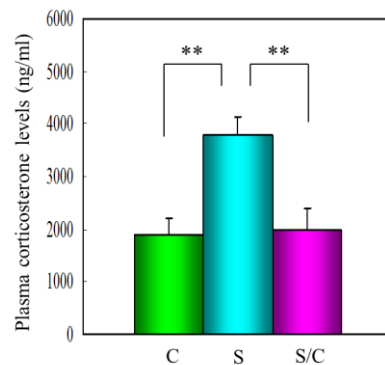


図 1 妊娠母体の血中コルチコステロン濃度  
C: コントロール, S: ストレス群, S/C: チューイング群

(2) 母体における血中コルチコステロン濃度

ストレスを負荷された妊娠母体では血中コルチコステロン濃度が顕著に上昇したが、チューイングさせた母体では血中コルチコステロン濃度の上昇がみられなかった (図 1)。

ストレス負荷中のチューイングは妊娠母体の視床下部でのバソプレッシンの分泌を抑制し、HPA axis の活性化を抑え、結果として母体の血中のコルチコステロン濃度の上昇を抑制しているものと考えられた。チューイングは母体の慢性ストレスを抑制していることが示唆された。

(3) 仔マウスの空間認知機能

ストレスを被った妊娠母体から生まれた仔マウスでは Morris 水迷路学習テストにおいて空間認知能が顕著に障害されたが、ストレス下でチューイングさせた母マウスから生まれた仔マウスでは、空間認知障害が認められなかった (図 2)。

妊娠ストレス負荷中の母体のチューイングはストレス性に惹起される仔マウスの空間認知障害を抑制することが示唆された。

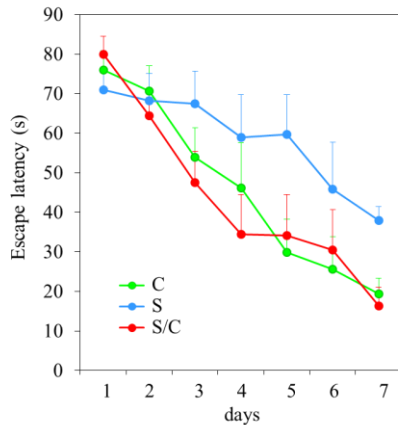


図2 Morris water maze testの結果  
C:コントロール, S:ストレス群, S/C:チューニング群

#### (4) 仔マウスの情動行動

ストレスを負荷した妊娠母体から生まれた仔マウスでは hole-board test において、一つ目の穴を覗くまでの時間が顕著に延長し、穴を覗く回数も著しく減少した (図3)。一方、ストレス下でチューニングさせた母マウスから生まれた仔マウスではこれらの障害が認められなかった。

妊娠母体のチューニングはストレス性に惹起される仔マウスの情動障害を抑制することが示唆された。

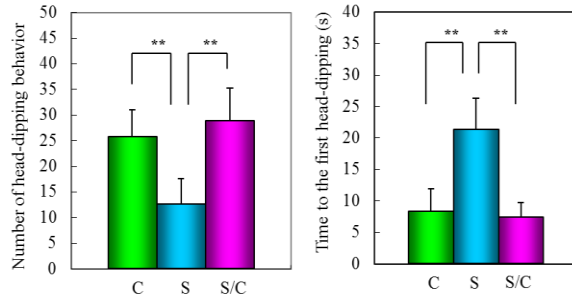


図3 Hole-board testの結果  
C:コントロール, S:ストレス群, S/C:チューニング群

#### (5) 仔マウスの海馬における Neurogenesis

ストレスを負荷された母マウスから生まれた仔マウスでは海馬歯状回における cell generation、survival および differentiation のすべてが障害された。一方、ストレス条件下でチューニングを行なった母マウスから生まれた仔マウスではこれらの障害が認められなかった (図4)。

海馬歯状回における Neurogenesis は空間認知機能に影響を及ぼすといわれていることから、チューニングによる Neurogenesis の正常化が空間認知能の改善に深く関与しているものと考えられた。

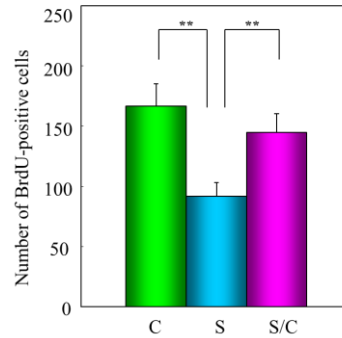


図4 海馬歯状回における BrdU 陽性細胞数  
C:コントロール, S:ストレス群, S/C:チューニング群

#### (6) 仔マウス海馬神経細胞の生後発達

ストレスを負荷された母マウスから生まれた仔マウスでは、海馬 CA3 錐体細胞の樹状突起の長さおよび分岐点数がともに著しく減少していた。一方、チューニングを行なった母から生まれた仔マウスでは海馬 CA3 錐体細胞の樹状突起がほぼ正常な成長像を示した (図5)。

海馬 CA3 領域の神経細胞の樹状突起の成長状況が空間認知能とリンクしているといわれていることから、チューニングによる神経細胞樹状突起の正常な生後発育が空間認知能の改善に繋がったものと考えられた。

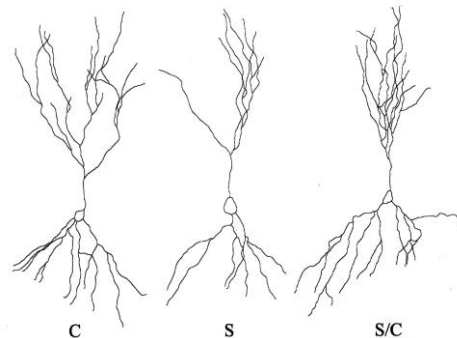


図5 海馬 CA3 錐体細胞の生後発達  
C:コントロール, S:ストレス群, S/C:チューニング群

#### (7) 仔マウスのカテコールアミン系ニューロン

ストレスを負荷された母マウスから誕生した仔マウスでは黒質、尾状核、青斑核、背側縫線核などでチロシンヒドロキシラーゼ (TH)、GTP シクロヒドロラーゼ (GCH) およびセロトニン (5-HT) の免疫活性が低下していた。これに対して、チューニングを行なった母から誕生した仔マウスではこれらの部位における TH、GCH および 5-HT の免疫活性の低下が認められなかった。

カテコールアミン系ニューロンは情動活

動に影響を及ぼすといわれていることから、チューイングによるカテコールアミン系ニューロンの免疫活性の改善と情動運動の正常化とが密接に関与しているものと考えられた。

#### (8) 脳由来神経成長因子 (BDNF) の発現量

ストレスを負荷された母体マウスから誕生した仔マウスの海馬では BDNF の発現量が顕著に低下していたが、チューイングを行わせた母体から誕生した仔マウスの海馬では BDNF の発現量の低下は認められなかった。

BDNF の発現量と Neurogenesis とは密接に関係しているといわれていることから、チューイングは妊娠ストレスによる BDNF 発現量の低下を抑制し、Neurogenesis を正常化しているものと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① K Kubo, Y Ichihashi, C Kurata, M Iinuma, D Mori, T Katayama, H Miyake, S Fujiwara, Y Tamura, Masticatory function and cognitive function, *Okajima Folia Anat Jpn*, 査読有, 87, 2010, 135-140

[学会発表] (計 7 件)

① 久保金弥、佐藤和彦、小萱康德、東華岳、チューイングによる母胎ストレス性の認知機能障害を抑制する、第 118 回日本解剖学会全国学術集会、2013 年 3 月 28 日～3 月 30 日、かがわ国際会議場

② M Onishi, M Kurahashi, H Kondo, C Kurata, M Iinuma, Y Tamura, D Mori, K Kubo, Maternal chewing prevents stress-induced anxiety-like behavior, *IADR*, 2013 年 3 月 20 日～23 日, アメリカ (シアトル)

③ K Kubo, M Onishi, D Mori, M Iinuma, Y Tamura, H Chen, N Karasawa, M Onozuka, Maternal chewing prevents stress-induced developmental impairment of catecholaminergic neurons, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18 日～21 日, 名古屋国際会議場

④ M Onishi, M Kurahashi, H Kondo, C Kurata, Y Ichihashi, M Iinuma, Y Tamura, D Mori, M Onozuka, K Kubo, Chewing during stress suppresses stress-induced activity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18 日～21 日, 名古屋国際会議場

⑤ 大西見佳、倉橋実里、近藤裕子、倉田知香、市橋幸子、飯沼光生、田村康夫、久保金弥、咀嚼運動が母胎ストレス性情動障害に及ぼ

す影響、小児歯科学会第 50 回記念大会、2012 年 5 月 12 日～13 日、東京フォーラム

⑥ M Onishi, C Kurata, Y Ichihashi, M Iinuma, Y Tamura, D Mori, N Karasawa, M Onozuka, K Kubo, Maternal chewing prevents stress-induced anxiety-like behavior and learning impairment, 第 34 回日本神経科学大会, 2011 年 9 月 14 日～17 日、パシフィコ横浜

⑦ K Kubo, N Karasawa, M Onozuka, Maternal chewing rescues stress-induced deterioration of learning-stimulated hippocampal neurogenesis in her baby, 第 33 回日本神経科学大会, 2010 年 9 月 2 日～4 日, 神戸コンベンションセンター

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 金弥 (KUBO KIN-YA)

星城大学・リハビリテーション学部・教授  
研究者番号: 00329492

##### (2) 研究分担者

飯沼 光生 (IINUMA MITSUO)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号: 70184364

東 華岳 (CHEN HUAYUE)

岐阜大学・医学研究科・講師

研究者番号: 20273146

小野塚 實 (ONOZUKA MINORU)

神奈川歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号: 90084780

市橋幸子 (ICHIHASHI YUKIKO)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号: 70515634

唐沢 延幸 (KARASAWA NOBUYUKI)

星城大学・リハビリテーション学部・名誉教授

