

機関番号：33938

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390493

研究課題名（和文）チューイングによるストレス性記憶障害修復回路の賦活化

研究課題名（英文）Protective effect on stress-related memory deficits by chewing

研究代表者

渡邊 和子（WATANABE KAZUKO）

星城大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：50140413

研究成果の概要（和文）：

最初にマウスを用いてストレス指標を微量血液で経時的測定する手法の開発を試みた。拘束ストレス負荷では白血球数減少、フィブリン凝固時間の短縮が認められたが、固体間のばらつきが顕著であった。いずれのストレス指標の測定でも全血を必要とし、1 固体で経時的なストレス応答確認と行動科学的解析の実施は不可能であった。軽度拘束ストレスでは自発性チューイング行動を誘発し、学習効果の向上が認められた。

研究成果の概要（英文）：

A new method for measuring method of stress indicator, which is measurable in a slight amount of blood and short time, had been developed at the beginning. Mild restrain stress induced a slight decrease of leucocyte number and shortening fibrin clotting time, but variability was quite-variable and whole volume of blood was necessary in mice, which is suitable for behavioral analysis. Spontaneous chewing behavior was induced during mild restrain stress and enhanced learning effect in the morris water maze test.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：チューイング・ストレス・記憶障害・マウス

## 1. 研究開始当初の背景

科学技術の進歩は日常生活に様々な社会的・精神的ストレスを急増させ、過剰なストレスが、心身に疲労をもたらし、子供から大人まで多くがストレス性疾患に悩まされ、深刻な社会問題となっている。簡便なストレス緩和対策法の開発が急務である。

近年、ガムチューイングが特に脳の健康に重要な役割を担っていることが明らかになりつつあり、ガムチューイングによる前頭葉

側頭葉および視床の脳血流量増加（Momose et al., 1997, Sesay M et al., 2000）、健全なボランティアにおけるエピソード記憶、ワーキングメモリの増強（Wilkinson らは2002年にAppetite, 38:235-236）などの報告がある。

申請者らは健康成人を対象にガムベースチューイングのfMRI解析により、様々な脳部位、皮質感覚運動野、島、弁蓋、視床に賦活化が認められ、特に高齢者では皮質連合野

領域、特に右前頭前野に高い活性が出現すること、記憶課題提示前の適度のチューイング負荷により記憶力の向上および海馬の神経活動の上昇を報告し、国内外から高い評価を得ている (Onozuka M et al., JDR, 2002; 2003)。

最近、米国学生の試験前やスポーツ選手の緊張感ストレス緩和にガムチューイングが有効であるという報告があるが、いずれも“事象”であって、科学的根拠がない。誰でもどこでも実施できるガムチューイングがストレス緩和に有効であるならば、その効果を脳科学的に解明することは極めて重要である。

申請者らは、拘束ストレス状況下のラット顔面に木製棒を近づけるとこれを噛み続ける (チューイング) ことから、拘束ストレス時のチューイング効果を調べ、①視床下部室傍核 (PVN)、青斑核 (LC)、扁桃体の内側核 (MeA)、皮質運動野および感覚野の Fos タンパク発現量はストレスにより顕著に増加するが、チューイング併用で有意に低下する (Kaneko M et al., Stomatologie, 2004)、②ストレス負荷で活性化される PVN の ERK1/2 リン酸化が抑制される (Sasaguri K et al., Neurosci Lett, 2005) ③ストレスが誘発する PVN の nNOS および corticotropin releasing factor (CRF) の発現量増加が有意に抑制される (Hori N et al., JDR, 2005) ことを明らかにしている。このことから、拘束ストレス下では扁桃体への過度な刺激入力に他の脳部位への刺激入力を異常に増強させるが、チューイングはストレス曝露時の扁桃体への過剰刺激入力を調節する回路 (修復回路) を活性化する効果があると仮説した。

## 2. 研究の目的

本研究では、①ストレス曝露による固体のストレス応答レベルを明らかにするためのストレス指標の抽出および②仮説の実証を目的としている。

ヒトおよび動物の研究において、ストレス曝露による固体の応答レベルに差違があり、ストレス効果の判定時、ストレス曝露効果が不十分であるのか、ストレス曝露に対する抵抗性が高い固体であるのかが不明瞭であるケースが多く、ストレス効果確認には血中ストレスホルモン量等の測定が必要となり、ストレス実験の困難さの要因となっている。マウスは行動科学的解析の研究に適しているが、ストレスレベル確認の血中ホルモン測定には採血に全血容量を必要とし、するは不可能であるため、より簡便でストレスレスな手法によるストレス応答指標の抽出は、特に行動科学研究に適した小動物であるマウスの実験には、ストレス曝露程度および、正確なストレス応答をより効率よく把握するのに必須である。本研究ではまず、拘束ストレ

ス条件下におけるストレス応答指標の抽出を目的とし、研究に着手した。

## 3. 研究の方法

ストレス応答指標の抽出：ストレス負荷は若齢 [2. 5-3 ヶ月齢] マウスを用い、頭部は木片棒 (つまようじ) が噛めるフリーな状態として頭部以下をマウス固定用ポリチューブ内に仰臥位または垂直位で拘束固定した。拘束時間はこれまでの行動解析実験の条件である 30 分 (軽度ストレス) に加え、1 時間から 3 時間 (中度～高度ストレス) とした。拘束後深麻酔下で腋窩静脈から採血し、遠心分離後血清を採取した。凝固因子の分析には COAG2V (和光純薬) を用いた。血球動態変化 ((顆粒球数、リンパ球数) には血液量を考慮し塗抹標本を用いた。行動解析にはモリス水迷路学習を実施し、脳活性部位同定には c-fos 抗体による免疫組織化学解析を行った。

## 4. 研究成果

①モリス水迷路学習で学習抑制効果が認められた軽度ストレス条件下では、ストレス直後における血球動態変化および血液凝固因子の凝固時間は、固体によるばらつきが顕著で、一定の結果は得られなかった。ストレス 30 分後、1 時間後、3 時間後においても、同様の結果であった。

②中～高度ストレス条件下では、ストレス直後に顆粒球の増加、白血球の減少が認められた。血液凝固因子ではフィブリン凝固時間に短縮傾向が認められた。しかし、固体間のばらつきが大きく、また、固体によっては、白血球が増加するものも認められた。

③中度から高度拘束では拘束時間が 30 分を越えるころからストレス適応行動様のマウスの無動化が出現することから、30 分経過以降、定期的な触刺激を追加することで無動化防止を実施し、血球動態変化および凝固因子変化を調べたが、軽度ストレス負荷と同様、個体間のばらつきが大きく、変動が認められるフィブリン凝固時間は、短縮されるものと、逆に増加されるものが認められ、変化は一定ではなかった。

④マウスストレス負荷字のストレス因子抽出には、マウスのほぼ全血を必要とする解析法しか見いだせず、経時的で微量血液量で実施できるストレス因子抽出法は見いだせなかった。

⑤これまでの行動科学解析で学習効果抑制が認められた軽度ストレス負荷を実施し、チューイングによるストレス予防効果を検討したが、ストレス負荷により、学習効果が抑制される個体と、逆に学習効果が増強される個体が認められ、この固体では自発的なチューイング行動が顕著であった。

⑥行動科学解析で学習効果抑制効果が顕著な個体では、扁桃体の fos 陽性細胞の密度は明らかに上昇していたが、学習効果がストレ

スにより増強された個体（自発的チューイング動作有り）では扁桃体の fos 陽性細胞密度に変化は認められなかった。

⑦以上の結果から、ストレス負荷実験における個体のストレス応答を確認するための微量血軽量で実施できるストレスレスな血中ストレス因子測定法の検討を試みたが、行動解析実験に最適であるマウスでは、研究室で簡便・短時間に測定できる血球動態、血液凝固因子であっても微量血液量による測定は不可能であった。

⑧行動科学的解析から、チューイングによるストレス減弱効果は、ストレス強度が強すぎる場合、ストレス適応反応が生じ、その効果はマスクされる可能性が示唆された。

⑨軽度ストレス負荷時に自発的チューイング行動を伴う個体が、学習増強効果を示す結果から、チューイングは、海馬-扁桃体-連合皮質回路における刺激情報量調整において何らかの形でスイッチ的な役割を果たしていることを推測させた。

#### 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 8 件）

1. Bruxism affects stress responses in stressed rats., Sato C, Sato S, Takashina H, Ishii H, Onozuka M, Sasaguri K, 査読有, Clin Oral Investig, 14:153-160, 2010.
2. Chewing under restraint stress inhibits the stress-induced suppression of cell birth in the dentate gyrus of aged SAMP8 mice., Kubo KY, Sasaguri K, Ono Y, Yamamoto T, Takahashi T, Watanabe K, Karasawa N, Onozuka M, 査読有 Neurosci Lett, 463:109-113, 2009
3. Effects of chewing in working memory processing, Hirano Y, Obata T, Kashikura K, Nonaka H, Tachibana A, Ikehira H, Onozuka M, 査読有, Neurosci Lett 436: 189-92, 2008
4. Changes in GFAP-immunoreactive astrocytes-induced by the bite-raised condition in aged SAMP8 mice., Ichihashi Y, Arakawa Y, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K, Iwaku F, Takahashi T, Karasawa N, Nagatsu I, Onozuka M, 査読有, Biogenic Amines 22: 39-48, 2008
5. The bite-raised condition in aged SAMP8 mice induces dendritic spine changes in the hippocampal region, Kubo K, Kojo A, Yamamoto T, Onozuka M, 査読有, Neurosci Lett 441: 141-4, 2008

6. Chewing ameliorates stress-induced suppression of hippocampal long-term potentiation, Ono Y, Kataoka T, Miyake S, Cheng SJ, Tachibana A, Sasaguri KI, Onozuka M, 査読有, Neuroscience 154: 1352-9, 2008
7. Occlusal disharmony attenuates glucocortical negative feedback in aged SAMP8 mice, Ichihashi Y, Arakawa Y, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K, Iwaku F, Sato Y, Onozuka M, 査読有, Neurosci Lett 427: 71-76, 2007
8. Occlusal disharmony induces spatial memory impairment and hippocampal neuron degeneration via stress in SAMP8 mice., Kubo KY, Yamada Y, Iinuma M, Iwaku F, Tamura Y, Watanabe K, Nakamura H, Onozuka M., Neurosci Lett. ;414: 188-191. 2007

〔学会発表〕（計 8 件）

1. Chewing suppresses stress-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in the periaqueductal gray, Yamada K, Ono Y, Yamamoto T, Onozuka M, 第 32 回神経科学会, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)
2. Chewing is involved in cell generation in the aged hippocampus dentate gyrus, Kubo K, Sasaguri, KI, Kimura K, Watanabe K, Onozuka M, 第 32 回神経科学会, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)
3. Chewing ameliorates stress-suppressed hippocampal CA1-LTP via activation of histamine H1 receptor, Ono Y, Kataoka T, Miyake S, Sasaguri KI, Sato S, Onozuka M, 第 32 回神経科学会, 2009 年 9 月 17 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)
4. Chewing and amygdaloid response to stress, Niwa M, Hirano Y, Otsuka T, Watanabe K, Onozuka M, 第 31 回神経科学会, 2008 年 7 月 9 日, 東京国際フォーラム (東京)
5. Amelioration of stress-reduced CaMKII-dependent hippocampal protein phosphorylation by chewing, Iwamoto M, Kato K, Sasaguri TI, Watanabe K, Sato S, Onozuka M, 2008 年 7 月 11 日, 東京国際フォーラム (東京)
6. Chewing-related neuronal mechanism under stress condition, Kim W, Tachibana A, Otsuka T, Hirano Y, Kubo KY, Ono Y, Nakamura H, Karasawa N,

Onozuka M, Watanabe K, 2007年9月11日, 30回日本神経科学大会, パシフィコ横浜(横浜)

7. Ameliorative effect of biting on the stress-attenuated hippocampal memory process: a Morris water Maze study, Miyake S, Ono Y, Kataoka T, Kim W, Sasaguri KI, Watanabe K, Sato S, Onozuka M, 第30回日本神経科学大会、2007年9月11日, パシフィコ横浜(横浜)
8. Ameliorative effect of biting on the stress-attenuated hippocampal memory process: a CA1-LTP study, Ono Y, Miyake S, Kataoka T, Sasaguri K, Sato S, Watanabe K, Onozuka M, 第30回日本神経科学大会、2007年9月11日, パシフィコ横浜(横浜)

[図書] (計2件)

1. Watanabe K et al., Involvement of dysfunctional mastication in cognitive system deficits in the mouse, *In Nover Trends in Brain Science*, pp115-180, 2008, Springer, Tokyo
2. Onozuka M, Hirano Y, Tachibana A, Kim W, Ono Y, Sasaguri K, Kubo K, Niwa M, Kanematsu K, Watanabe K, Interactions between chewing and brain activity in humans, *In Nover Trends in Brain science*, pp99-114, 2008, Springer, Tokyo

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 和子 (WATANABE KAZUKO)  
星城大学・リハビリテーション学部・教授  
研究者番号: 40158621

(2) 研究分担者

唐沢 延幸 (KARASAWA NOBUYUKI)  
星城大学・リハビリテーション学部・教授  
研究者番号: 70148287

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

(H21→H21)  
小野塚 実 (ONOZUKA MINORU)

神奈川歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号: 90084780

笹栗 健一 (SASAGURI KEN-ICHI)  
神奈川歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号: 140235286

金 完哉 (KIMU WANZE)  
神奈川歯科大学・歯学部・特別研究員  
研究者番号: 3270360225

(H19→H19)

(3) 連携研究者  
該当無し ( )

研究者番号:

