

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

2014年度 博士論文

チューイングは中脳中心灰白質におけるストレス誘発性
pERK 免疫陽性細胞数の増加を抑制する

Chewing suppresses the stress-induced increase in the number
of pERK-immunoreactive cells in the periaqueductal grey.

2015年3月6日

成松 侑梨

Yuri Narimatsu

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

歯科矯正学講座

河田俊嗣教授 指導

要約

我々は、中脳中心灰白質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、拘束ストレス下におけるチューイングの影響について検討した。

ラットに拘束ストレスを与えると、中脳中心灰白質において pERK 免疫陽性細胞の数が増加した。中脳中心灰白質の 4 つに細分化された領域の中では、中脳中心灰白質の背外側部と腹外側部において顕著に免疫陽性細胞の数が増加した。拘束ストレス条件下でのチューイングはこれら 2 つの領域におけるストレス誘発性 pERK 免疫陽性細胞数の増加を、有意差 ($p < 0.05$) をもって抑制した。我々はこれまで、視床下部などの脳領域でチューイングによるストレス抑制効果を明らかにしてきたが、今回の結果は、中脳中心灰白質（背外側部、腹外側部）においてもストレス応答を軽減させる可能性があることを示唆している。

緒言

ストレスはしばしば、不快感を伴い、神経伝達物質などの変化を引き起こす¹⁾。チューイングは脳のストレス応答を調節する自発的な行為であると考えられている²⁻⁵⁾。これまで脳の色々な部位で、チューイングがストレスによって起こる脳内変化を抑制することを示してきた。例えば、拘束ストレスは視床下部の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)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明らかになっている²⁾。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 (neuronal nitric oxide synthase; nNOS)の mRNA 発現を増加させるが、チューイングはこの増加を抑制する³⁾。拘束ストレス下におけるチューイングは、海馬の CA1 領域のミネラルコルチコイド受容体におけるストレス誘発性の増加を防ぐ⁵⁾。電気生理学的には、ストレスは海馬における長期増強(LTP)の減衰を促進するが、チューイングはこの減衰を抑制する⁶⁾。これらの結果は、チューイングが様々なストレスに応答する種々の脳領域に影響し、ストレスを軽減する可能性があることを示唆する。

中脳中心灰白質は中脳水道の周囲にあり、中脳水道を基準に背内側部、背外側部、外側部そして腹外側部の 4 領域に分けられる⁷⁾。中脳中心灰白質は不安や恐怖に対する防御反応⁸⁻¹⁰⁾と下行性の痛覚抑制性経路の形成に必須な領域であ

る^{11,12)}。ラットにおいて中脳中心灰白質はストレスや恐怖によって誘発される鎮痛の形成に重要な役割を果たしていることが報告されている¹³⁾。外側部と背外側部は不安や恐怖に対する攻撃的行動を起こし^{14,15)}、腹外側部の一部は回避的行動を起こす¹⁶⁻¹⁸⁾。中脳中心灰白質の背外側部は特に下行性の痛覚抑制に重要である。これらの事実は、中脳中心灰白質が様々なストレスに対する反応行動を引き起こす脳領域の一つであることを示唆する。

本研究では、MAP キナーゼ (Mitogen-activated Protein Kinase) の一つである ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) のリン酸化型 ERK (pERK) を応答性神経細胞の指標として^{19,20)}検出することにより、拘束ストレス下におけるチューイングの効果を検討した。

材料および方法

実験には 7 週齢の Sprague-Dawley 雄性ラットを用いた。室温 $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ に調整した部屋で 12 時間の明暗サイクルで飼育した。本実験は神奈川歯科大学動物倫理委員会の承認を受け、定める動物実験指針を遵守して行われた。

実験動物をコントロール群($n=7$)、拘束ストレスのみの拘束ストレス群($n=7$)、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($n=7$)に分けた。対照群ラットは拘束しなかった。ストレス群、ストレスチューイング群は定法に従って急性ストレスを負荷した。拘束ストレスは、木製のボード($18 \times 25\text{cm}$)にラットを仰臥位にし、四肢を固定することによって与えた。前肢は体の正中線に対して 45° になるように、後肢は正中線に対して 135° になるようにテープで固定した。拘束ストレスをかける時間は過去の論文を参考に 15 分とした。ストレス群はこの位置を 15 分間継続し、ストレスチューイング群は拘束ストレスを与えている間木製の棒を噛ませた。ストレス負荷終了後直ちにストレス群、ストレスチューイング群両群の灌流固定を行った。

免疫組織化学的検索は、我々の通法により行った²¹⁾。実験動物はペントバルビタールナトリウム(35 mg/kg i.p. , Wako Pure Chemical Industries Ltd., 大阪, 日本)で深く麻酔し、 $0.9\% \text{NaCl}$ で経心的に灌流、その後、 $4\% \text{パラホルムアルデヒド}$ 、 $0.2\% \text{ピクリン酸}$ を含む 0.1M 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、上丘の吻側 (G. Paxinos and C. Watson のラット脳アトラスにおけるブレグマおおよそ-5.3mm)、および下丘の尾側(ブレグマおおよそ-8.7mm)で横断し、3ブロックに分け、4°Cで1~2日間、同じ固定液で後固定を行った。PBで洗浄し、20%スクロース浸漬後、中央ブロック(中脳)を凍結マイクロトームを用い厚さ30 μ mのスライスを作成した。3枚に1枚の切片をすべて集め、フリーフローティング法を用いて免疫染色を行った。切片は0.9%NaClを含む0.1 M PB(pH7.4)で一晩洗浄し、1次抗体として rabbit polyclonal antibody against phospho-p44/42 MAP kinase (ERK 1/2, lot number #9101, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA)を使用した。この抗体はリン酸化した ERK1、ERK2 を検出するが、非リン酸化型は検出しない。抗体は希釈倍率 1:1,000 で 1% ウシアルブミン(BSA)と 0.3% Triton X-100 を含む PBS (PBS-BSAT)で希釈し、切片はこの溶液で 4°C、3日間反応させた。PBSにて洗浄後、2次抗体(biotinylated goat anti-rabbit IgG; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)にて希釈倍率 1:1,000 で PBS-BSATに希釈、室温で1時間反応させた。切片を再度 PBS で洗浄後、avidin-biotin-horseradish peroxidase complex (ABC; Vector Laboratories)を希釈倍率 1:200 で PBS-BSATに希釈、室温で30分反応させた。PBSで最終洗浄後、切片を 0.02% 3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)、0.005% hydrogen

peroxide を含む 0.05 M Tris-HCl バッファー(pH 7.4)で 5~10 分間反応させた。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。免疫陽性細胞の数はすべての染色した切片(約 30 枚)を使い、顕微鏡倍率 100 倍(接眼レンズ 10 倍×対物レンズ 10 倍)で観察しながらカウントした。中脳中心灰白質亜領域の境界線についてはラット脳アトラスを参照した²²⁾。

統計分析は SPSS(Version 13.0)を用いて行った。一元配置分散分析は Tukey's honest significant (HSD) test に従って行い、 $p < 0.05$ をもって免疫陽性細胞数の差を有意とみなした。

結果

コントロール群では、中脳中心灰白質の pERK 免疫陽性細胞は散在性であった。中脳中心灰白質の 4 区画の中で、背外側部と腹外側部の中脳中心灰白質に比較的多くの免疫陽性細胞が観察され (Fig. 1A, D)、外側部と背内側部には免疫陽性細胞はわずかであった (Fig. 1G, J)。腹外側部の免疫陽性細胞は多く観察されたにも関わらず、コントロール群の中脳中心灰白質の pERK 免疫陽性線維は他の 3 区画を含めわずかしか観察されなかった (Fig. 1A, G, J)。

ストレスのみの群では、コントロール群と比較して、特に背外側部、腹外側部の中脳中心灰白質でより多くの pERK 免疫陽性細胞がみられた (Fig. 1B, E)。コントロール群での免疫陽性胞体は紡錘形、ないしは三角形を呈していたが、ストレス群でみられる免疫陽性細胞体も、類似した形状を示した。背外側部、腹外側部では、pERK 免疫陽性線維もより多く観察され、より強く染色されていた (Fig. 1B, E)。これらの免疫陽性線維の形状は平滑を示すものが多かったが、これに加えて、細い念珠状の免疫陽性線維も観察された。コントロール群の中脳中心灰白質はこのような免疫陽性線維はごくわずかしかみられなかった。

ストレスチューニング群では、コントロール群と同様に pERK 免疫陽性細胞は背外側部、腹外側部でさえストレス単独群と比較すると少数しか観察されなかった。免疫陽性線維の特徴もコントロール群と同様であった。すなわち形状

が平滑を示す免疫陽性線維は少数観察されるにもかかわらず、念珠状の免疫陽性線維はほとんど観察されなかった(Fig. 1C, F)。このような差は、背外側部、腹外側部で著明であったが、外側部(Fig. 1G, H, I)、背内側部(Fig. 1J, K, L)では明らかではなかった。

中脳中心灰白質のそれぞれの区画の免疫陽性細胞の数の解析は顕微鏡観察によって得られた結果と一致した。チューイングは背外側部、腹外側部におけるストレスによる pERK 免疫陽性細胞数の増加を抑制した(Fig. 2)。背外側部では、拘束ストレスで免疫陽性神経の数が増加した (94 ± 9)。この増加はコントロール群と比較し 170%の増加率であった。そして、ストレス中のチューイングはその増加を抑制した (38 ± 6 $p < 0.01$)。この細胞数はコントロール群の背外側部における免疫陽性細胞数と類似していた(35 ± 10)。このチューイングによる抑制はストレス群と比較して 150%の減少率であった。また、拘束された動物の腹外側部では、免疫陽性細胞数は 189 ± 6 であり、この増加はコントロール群と比較して 130%の増加率であった。ストレス下でのチューイングは動物あたりの免疫陽性細胞数は 130 ± 12 と、コントロール群 (82 ± 32) と類似していた。このチューイングによる抑制はストレス群と比較して 45%の減少率であった。腹外側部におけるコントロール群と拘束ストレス群、拘束ストレス群とストレスチューイング群との差は $p < 0.05$ をもって統計学的な有意差があったが、コン

トロール群とストレスチューニング群との間では統計学的な有意差はなかった。

背外側部と腹外側部とは対照的に、ストレス下(Fig. 2)での外側部、背内側部の免疫陽性細胞の増加は統計学的に有意差はなかった。従って、ストレスチューニング群の免疫陽性細胞数の変動も統計学的に有意差がなかった。

考察

本研究で、ストレス下でのチューイングは背外側部、腹外側部中脳中心灰白質においてストレス誘発性の pERK 免疫陽性細胞の増加を抑制したが、この効果は外側部と背内側部では認められなかった。チューイングの抑制効果は特に背外側部(150%減少率)において著明であった。このことはチューイングの脳内に及ぼす影響は、中脳中心灰白質に限れば背外側部で特に大きいことを示唆する。中脳中心灰白質は扁桃や視床下部²³⁻²⁵⁾などの領域から投射を受け、同時に脳幹、例えば黒質や腹側被蓋野²⁶⁾などに投射している。中脳中心灰白質は発声、生殖行動、循環器系のコントロール、防御反応、そして侵害受容の感受性の調節などを含めた多くの生理機能と関係している。c-fos タンパク質を指標とすると、中脳中心灰白質の腹外側部は内臓由来の持続性疼痛に選択的に応答する²⁷⁾。この腹外側部の人工的刺激は活動停止、無動、活動低下のような消極的防御応答を誘導する^{14,28-29)}。さらに腹外側中脳中心灰白質に β -N-oxalyl-amino-L-alanine (AMPA グルタミン酸受容体作動薬) をマイクロインジェクションすると、72%のマウスに無動がみられた³⁰⁾。拘束ストレスは腹外側部の pERK 免疫陽性細胞の数を増加させることから、拘束ストレスは、おそらく持続性疼痛と同種のストレスであり、またそのようなストレスは中脳中心灰白質の腹外側部を通して他の神経細胞に投射し、応答行動に影響している可能性がある。一方、腹外側

部も若干含まれるが、背外側部は痛みの下行性抑制のコントロール^{16,17)}や、心理的ストレスや恐怖による鎮痛誘発のメカニズムに重要な部位である³¹⁾。また、捕食者との遭遇は著明に中脳中心灰白質の背外側部でc-fosタンパク質発現量を増加させる。ただし、この増加は背外側部に限局されたものではない³²⁾。背外側部と外側部の一部は積極的防御行動を起こし、腹外側部の一部は消極的防御行動を起こす¹³⁾。従って、背外側部と腹外側部は積極的または消極的防御応答の選択及び決定に関与していると示唆される。このように、背外側部、腹外側部でのpERK免疫陽性細胞の増加は積極的または消極的防御応答の選択のための神経回路に関与しているかもしれない。チューイングは拘束ストレスによるこの強制的選択及び決定をさせる圧力を軽減する可能性が考えられる。

夜間のチューイング、いわゆるブラキシズムは機能的な目的ではなく不随意性の歯ぎしりやグライディングと定義されている³³⁾。近年、ブラキシズムはストレス対処の生理機構であると示唆されている³⁴⁾。対照的にチューイングはブラキシズムと同様の行動であるが随意性である。近年の論文でチューイングはストレス応答を調節していると報告されている²⁻⁵⁾。ストレスは神経伝達物質、神経ペプチド、ホルモンの変動を引き起こす¹⁾。例えば、拘束ストレスは視床下部室傍核での副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）免疫陽性ニューロンの数を増加させ、そしてチューイングはその増加を抑制する²⁾。神経型一酸化窒

素合成酵素 (nNOS) の mRNA 発現は拘束により視床下部で増加するが、拘束中のチューイングはその増加を抑制する³⁾。同様に拘束ストレスは視床下部で c-fos や pERK 免疫陽性細胞を増加させ、チューイングの併用はこのストレス誘発性増加を抑制する⁴⁾。チューイングのこのような効果は脳だけでなく血漿でも認められる。急性拘束ストレスは副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)やコルチコステロンの血中濃度を増加させるが、チューイングはこのホルモンの増加を抑制することができる³⁵⁾。これらの事実は、チューイングは視床下部を通してだけでなく、中脳中心灰白質を通してストレスが原因で起こるの様々な変化を軽減させることができることを示唆している。

MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinases) の中でも、リン酸化した ERK (Extracellular Signal-regulated Kinase) (pERK) は、成長因子、ホルモン、神経伝達物質、そしてカルシウムイオン流入のような様々な細胞外シグナルに対する応答神経細胞の指標として使われている³⁶⁻⁴²⁾。ERK のリン酸化のメカニズムは多様であり³⁵⁻³⁷⁾、誘導因子によって異なる場合も考えられるが pERK はストレスに対する応答神経細胞のマーカーとしても利用されている⁴³⁻⁴⁶⁾。興味深いことに、脳内の反応領域はストレスの種類によって差異がみられる。例えば、強制水泳は前頭前野を含めた新皮質や線条体での pERK を増加させる⁴²⁾が、拘束ストレスは海馬、前頭前野、帯状回皮質で pERK レベルが増加

する⁴⁷⁾。このことは、pERK がマーカーとして利用される場合、ストレスの受容経路およびその応答経路によって反応する神経細胞および/またはストレス知覚に実質的な差異があるということが示唆される。ERK のリン酸化は、以前から反応性ニューロンの検出に使用されてきた c-fos のようなタンパク質合成と比べると非常に速やかに起こる化学反応である。実際に、ストレスのわずか 15 分間に大脳皮質と線条体で pERK レベルが増加することが明らかになっている⁴²⁾。拘束ストレスは視床下部室傍核で 15 分後のピークをもって pERK 免疫陽性細胞数を増加させる⁴⁾。本研究においても 15 分ですでに中脳中心灰白質の pERK 免疫陽性細胞の数が増加する。これら 2 つの脳領域は拘束ストレスに対して同時に応答していることが推察される。総合すると拘束ストレスは中脳中心灰白質、視床下部室傍核、そしておそらく他の脳領域においてストレス後速やかに pERK レベルを増加させる、そしてストレス中のチューイングの併用はこれらストレス誘導性の変化を抑制することを示唆している。従って、チューイングはストレス時の防御行動の一つである可能性が示唆される。

結論

本研究で我々は、拘束ストレスは中脳中心灰白質の背外側部、腹外側部において pERK 免疫陽性細胞を増加させることを明らかにした。拘束ストレス中のチューイングはストレス誘導性の免疫陽性細胞の増加を抑制した。中脳中心灰白質は不安や恐怖に対する痛覚の感受性を調節する主要な脳領域の一つである。従って、チューイングは中脳中心灰白質を通してストレス感受性を調節している可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜りました本学高次脳機能学講座 山本利春准教授，山田健太郎特別研究員，歯科矯正学講座 河田俊嗣教授，笹栗健一講師に深く感謝の意を表します。

文献

- 1) H. Anisman, Z. Merali, and S. Hayley, "Neurotransmitter, peptide, and cytokine processes in relation to depressive disorder: comorbidity between depression and neurodegenerative disorders", *Progress in Neurobiology*, vol. 85, no. 1, pp. 1-75, 2008.
- 2) N. Hori, N. Yuyama, K. Tamura, "Biting suppresses stress-induced expression of corticotrophin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus," *Journal of Dental Research*, vol. 83, no. 2, pp. 124-128, 2004.
- 3) N. Hori, M. C. Lee, K. Sasaguri, et al., "Suppression of stress-induced nNOS expression in the rat hypothalamus by biting," *Journal of Dental Research*, vol. 84, no. 7, pp. 624-628, 2005.
- 4) K. Sasaguri, M. Kikuchi, N. Hori, N. Yuyama, M. Onozuka, and S. Sato, "Suppression of stress immobilization-induced phosphorylation of ERK 1/2 by biting in the rat hypothalamic paraventricular nucleus," *Neuroscience Letters*, vol. 383, no. 1-2, pp. 160-164, 2005.
- 5) K. Sasaguri, G. Yoshikawa, K. Yamada, S. Miyake, K. Kubo, and T. Yamamoto, "Combination of chewing and stress up-regulates hippocampal glucocorticoid receptor in contrast to the increase of mineralocorticoid receptor under stress only," *Neuroscience Letters*, vol. 519, no. 1, pp. 20-25, 2012.
- 6) Y. Ono, T. Kataoka, S. Miyake, et al., "Chewing ameliorates stress-induced suppression of hippocampal long-term potentiation," *Neuroscience*, vol. 154, no. 4, pp. 1352-1359, 2008.
- 7) R. Bandler and K. Keay, "Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray and the integration of emotional expression," *Progress in Brain Research*, vol. 107, pp. 285-300, 1996.
- 8) R. Bandler, A. Depaulis, and M. Vergnes, "Identification of midbrain neurons mediating defensive behavior in the rat by microinjections of

- excitatory amino acids," *Behavioral Brain Research*, vol. 15, no. 2, pp. 107-119, 1985.
- 9) P. Carrive, J. Lee, and A. Su, "Lidocaine blockade of amygdala output in fear-conditioned rats reduces Fos expression in the ventrolateral periaqueductal gray," *Neuroscience*, vol. 95, no. 4, pp. 1071-1080, 2000.
- 10) J. LeDoux, "Fear and the brain: where we been, and where are we going?," *Biological Psychiatry*, vol. 44, no. 12, pp. 1229-1238, 1998.
- 11) M. A. Oliveira and W. A. Prado, "Role of PAG in the antinociception evoked from the medial or central amygdala in rats," *Brain Research Bulletin*, vol. 54, no. 1, pp. 55-63, 2001.
- 12) M. Millan, "Descending control of pain," *Progress in Neurobiology*, vol. 66, no. 6, pp. 355-474, 2002.
- 13) F. J. Helmstetter and J. Landeira-Fernandez, "Conditional hypoalgesia is attenuated by Naltrexone applied to the periaqueductal gray," *Brain Research*, vol. 537, no. 1-2, pp. 88-92, 1990.
- 14) R. Bandler, K. A. Keay, N. Floyd, and J. Price, "Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping," *Brain Research Bulletin*, vol. 53, no. 1, pp. 95-104, 2000.
- 15) A. Depaulis, K. A. Keay, and R. Bandler, "Quiescence and hyperactivity evoked by activation of cell bodies in the ventrolateral periaqueductal gray of the rat," *Experimental Brain Research*, vol. 99, no. 1, pp. 75-83, 1994.
- 16) S. McMullan and B. M. Lumb, "Midbrain control of spinal nociception discriminates between responses evoked by myelinated and unmyelinated heat nociceptors in the rat," *Pain*, vol. 124, no. 1-2, pp. 59-68, 2006.
- 17) A. J. Waters and B. M. Lumb, "Descending control of spinal nociception from the periaqueductal grey distinguishes between neurons with and without C-fibre inputs," *Pain*, vol. 134, no. 1-2, pp. 32-40, 2008.

- 18) A. Haghparast, L. Ahmad-Molaei, "Effects of electrolytic lesion of dorsolateral periaqueductal gray on analgesic response of morphine microinjected into the nucleus cuneiformis in rat," *Neuroscience Letters*, vol. 451, no. 2, pp. 165-169, 2009.
- 19) C. R. Houser, N. Zhang, Z. Peng, C. S. Huang, and Y. Cetina, "Neuroanatomical clues to altered neuronal activity in epilepsy: from ultrastructure to signaling pathways of dentate granule cells," *Epilepsia*, vol. 53, suppl. 1, pp. 67-77, 2012.
- 20) R.-R. Ji, R. W. Gereau IV, M. Malcangio, and G. R. Strichartz, "MAP kinase and pain," *Brain Research Reviews*, vol. 60, no. 1, pp. 135-148, 2009.
- 21) K. Yamada, H. Park, S. Sato, M. Onozuka, K. Kubo, T. Yamamoto, "Dynorphin-A immunoreactive terminals on the neuronal somata of rat mesencephalic trigeminal nucleus," *Neuroscience Letters*, vol. 438, no. 2, pp. 150-154, 2008.
- 22) G. Paxinos and C. Watson, "The rat brain in stereotaxic coordinates," Academic Press, New York, NY, 2007.
- 23) T. S. Gray, D. J. Magnuson, "Galanin-like immunoreactivity within amygdaloid and hypothalamic neurons that project to the midbrain central grey in rat", *Neuroscience Letters*, 83 no. 3, pp. 264-268, 1987
- 24) T. S. Gray, D. J. Magnuson, "Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat", *Peptides*, vol.13, no.3, pp. 451-560, 1992
- 25) A. J. Beitz, "The organization of afferent projections to the midbrain periaqueductal gray of the rat", *Neuroscience*, vol. 7, no.1, pp. 133-159, 1982
- 26) S. K. Suckow, E. L. Deichsel, S. L. Ingram, M. M. Morgan, S. A. Aicher, "Columnar distribution of catecholaminergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray and their relationship to efferent pathways", *Synapse*,

vol. 67, no.2, pp. 94-108, 2013

27) K. A. Keay and R. Bandler, "Distinct central representations of inescapable and escapable pain: observations and speculation," *Experimental Physiology*, vol. 87.2, no. 2, pp. 275-279, 2002.

28) A. Depaulis, K. A. Keay, and R. Bandler, "Longitudinal neuronal organization of defensive reactions in the midbrain periaqueductal gray region in the rat," *Experimental Brain Research*, vol. 90, no. 2, pp. 307-318, 1992.

29) T. A. Lovick, "The periaqueductal gray-rostral medulla connection in the defence reaction: efferent pathways and descending control mechanisms," *Behavioral Brain Research*, vol. 58, no. 1-2, pp. 19-25, 1993.

30) S. Maione, L. Berrino, J. Leyva, V. De Novellis, M. Pallotta, and F. Rossi, "Behavioural effects induced by microinjection of L-BOAA into the ventrolateral PAG matter of the mouse," *Pharmacological and Biochemical Behavior*, vol. 50, no. 3, pp. 453-455, 1995.

31) W. M. Olango, M. Roche, G. K. Ford, B. Harhen, and D. P. Finn, "The endocannabinoid system in the rat dorsolateral periaqueductal grey mediates fear-conditioned analgesia and controls fear expression in the presence of nociceptive tone," *British Journal of Pharmacology*, vol. 165, no. 8, pp. 2549-2560, 2012.

32) E. Comoli, E. R. Ribeiro-Barbosa, N. S. Canteras, "Predatory hunting and exposure to a live predator induce opposite patterns of Fos immunoreactivity in the PAG," *Behavioural Brain Research*, vol. 138, no. 1, pp. 17-28, 2003.

33) G. Bader and G. Lavigne, "Sleep bruxism: an overview of an oromandibular sleep movement disorder," *Sleep Medicine Reviews*, vol.4, no. 1, pp. 27-43, 2000.

34) R. Slavicek and S. Sato, "Bruxism-a function of the masticatory organ to cope with stress," *Wiener Medizinische Wochenschrift*, vol. 154, no. 23-24, pp.

584-589, 2004.

35) T. Lee, J. Saruta, K. Sasaguri, S. Sato, and K. Tsukinoki, "Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression," *Brain Research*, vol. 1195, pp. 43-49, 2008.

36) J. D. Graves and E. G. Krebs, "Protein phosphorylation and signal transduction," *Pharmacology and Therapeutics*, vol. 82, no. 2-3, pp. 111-121, 1999.

37) M. H. Cobb, "MAP kinase pathways," *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, vol. 71, no. 3-4, pp. 479-500, 1999.

38) J. S. Gutkind, "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 4 pp. 1839-1842, 1998.

39) K. Fukunaga and E. Miyamoto, "Role of MAP kinase in neurons," *Molecular Neurobiology*, vol. 16, no. 1, pp. 79-95, 1998.

40) J. Schlessinger, "Cell signaling by receptor tyrosine kinases," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 211-225, 2000.

41) J. Curtis, S. Finkbeiner, "Sending signals from the synapse to the nucleus: possible roles for CaMK, Ras/ERK, and SAPK pathways in the regulation of synaptic plasticity and neuronal growth," *Journal of Neuroscience Research*, vol. 58, no. 1, pp. 88-95, 1999.

42) Z. Xia, H. Dudek, C. K. Miranti, and M. E. Greenberg, "Calcium influx via the NMDA receptor induces immediate early gene transcription by a MAP kinase/ERK-dependent mechanism," *Journal of Neuroscience*, vol. 16, no. 17, pp. 5425-5436, 1996.

43) C. Shen, Y. Tsimberg, C. Salvatore, and E. Meller, "Activation of Erk and JNK MAPK pathways by acute swim stress in rat brain regions," *BioMed Central Neuroscience*, vol. 5, pp. 36, 2004.

- 44) M. -S. Kwon, Y. -J. Seo, E. -J. Shim, S. -S. Choi, J. -Y. Lee, and H. -W. Suh, "The effect of single or repeated restraint stress on several signal molecules in paraventricular nucleus, arcuate nucleus and locus coeruleus," *Neuroscience*, vol. 142, no. 4, pp. 1281-1292, 2006.
- 45) Y. Shimizu, S. Sugama, L. A. Degiorgio, B. P. Cho, and T. H. Joh, "Cell-type specific signal transduction and gene regulation via mitogen-activated protein kinase pathway in catecholaminergic neurons by restraint stress," *Neuroscience*, vol. 129, no. 3, pp. 831-839, 2004.
- 46) H. Imbe, S. Murakami, K. Okamoto, Y. Iwai-Liao, and E. Senba, "The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus," *Pain*, vol. 112, no. 3, pp. 361-371, 2004.
- 47) E. Meller, C. Shen, T. A. Nikolao, et al., "Region-specific effects of acute and repeated restraint stress on the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases," *Brain Research*, vol. 979, no. 1-2, pp. 57-64, 2003.

Figure 1.

中脳中心灰白質の背外側部(A, B, C)、腹外側部(D, E, F)、外側部(G,H,I)、背内側部(J,K,L)の pERK 免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A, D, G, J)、ストレスのみの群(B, E, H, K)、ストレスチューニング群(C, F, I, L)。ストレスチューニング(C, F)は背外側部、腹外側部の免疫陽性細胞のストレス誘導性増加(B, E)を抑制することに注目。チオニンで対照染色。矢印は免疫陽性細胞を示す。

略称

Aq: aqueduct, 中脳水道; dlPAG: dorsolateral PAG, 背外側中脳中心灰白質; dmPAG: dorsomedial PAG, 背内側中脳中心灰白質; lPAG: lateral PAG, 外側中脳中心灰白質; vlPAG: ventrolateral PAG, 腹外側中脳中心灰白質。

オリジナル倍率 100 倍; スケールバー=100 μ m.

Figure 2.

中脳中心灰白質のそれぞれの区画における pERK 免疫陽性細胞数。
白カラムはコントロール群、グレーカラムはストレスのみの群、黒カラムはストレスチューニング群を表す。
カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。

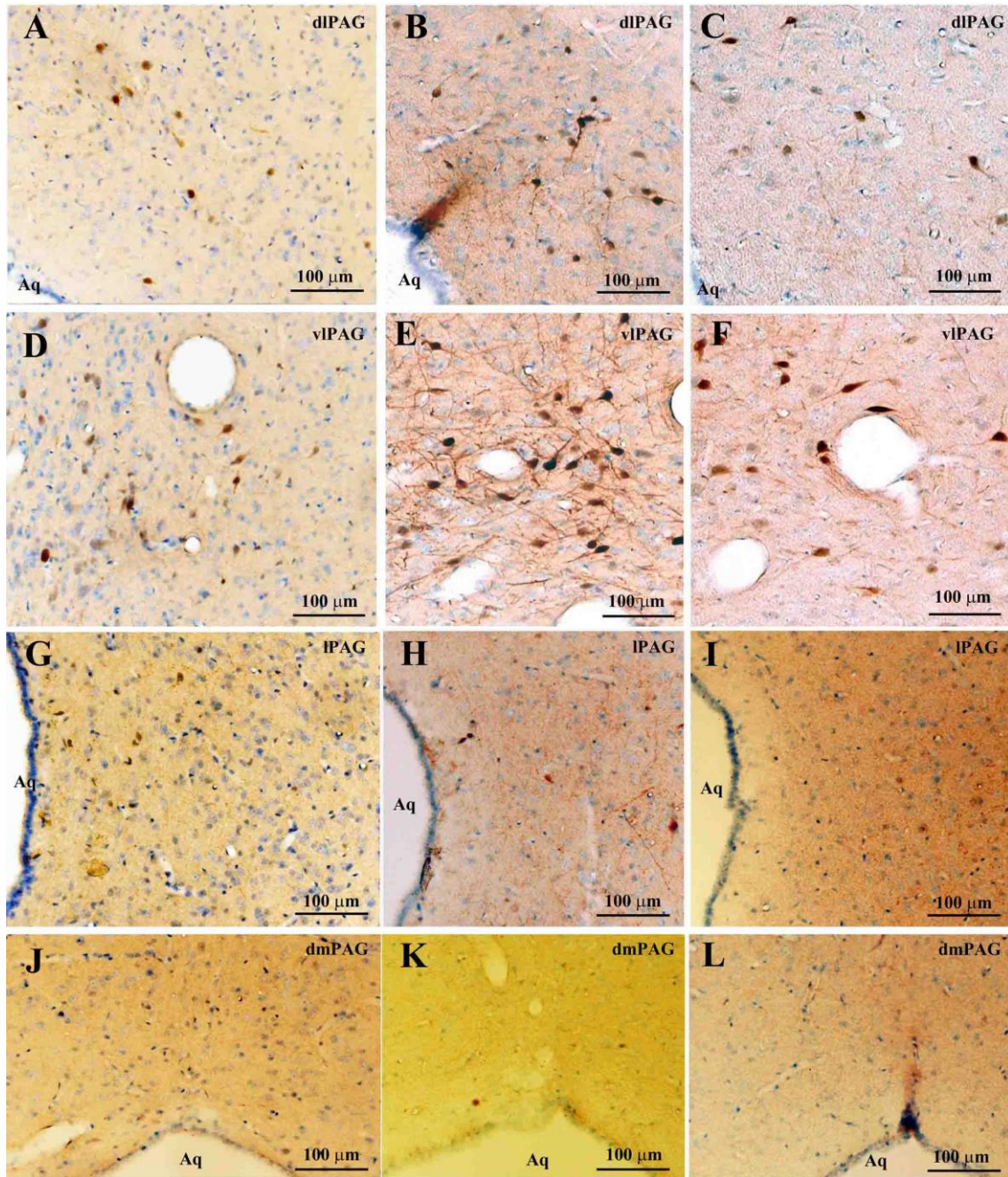


Figure 1.

中脳中心灰白質の背外側部(A, B, C)、腹外側部(D, E, F)、外側部(G,H,I)、背内側部(J,K,L)のpERK免疫陽性細胞を示す写真。コントロール群(A, D, G, J)、ストレスのみの群(B, E, H, K)、ストレスチューイング群(C, F, I, L)、ストレスチューイング群(C, F)は背外側部(B, C)、腹外側部(E, F)の免疫陽性細胞のストレス誘導性増加(B, E)を抑制することに注目

略語

Aq, aqueduct : 中脳水道、dlPAG, dorsolateral PAG : 背外側中脳中心灰白質、dmPAG, dorsomedial PAG : 背内側中脳中心灰白質、lPAG, lateral PAG : 外側中脳中心灰白質、vlPAG, ventrolateral PAG : 腹外側中脳中心灰白質

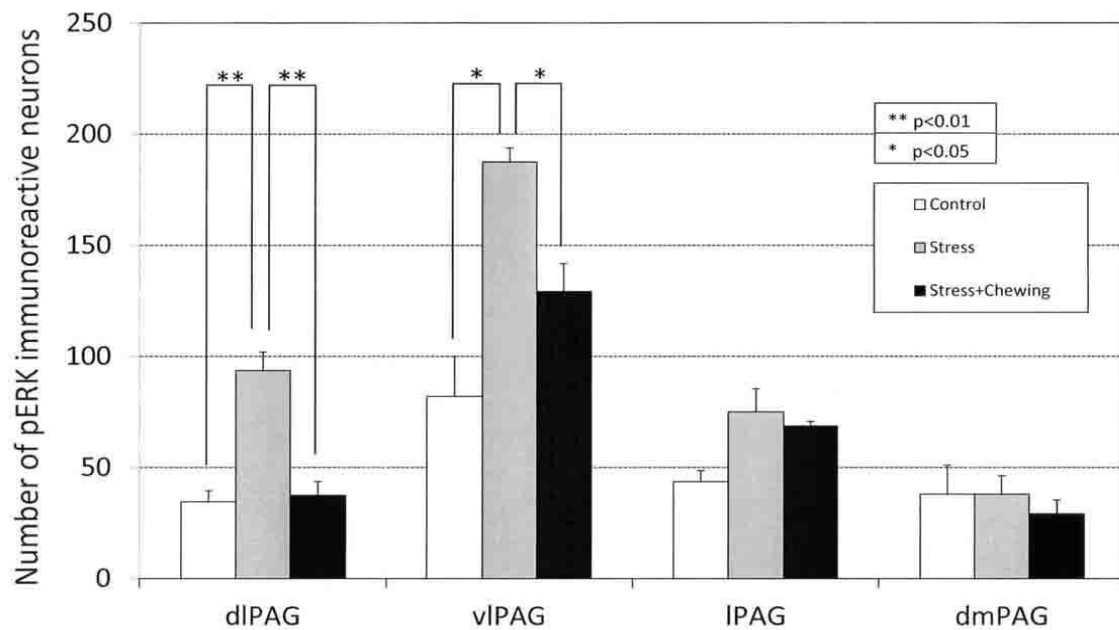


Figure. 2

中脳中心灰白質のそれぞれの区画における pERK 免疫陽性細胞数。

白カラムはコントロール群、グレーカラムはストレスのみの群、黒カラムはストレスチューイング群を表す。

カラム上の直線はそれぞれの標準偏差を示す。