

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650417

研究課題名（和文） 次世代情報技術を用いた慢性疾患患者のストレス軽減システムの構築

研究課題名（英文） Studies on the scale for stress induced emotional changes

研究代表者

齋藤邦明 (SAITO KUNIAKI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80262765

研究成果の概要（和文）：

ストレスは精神神経疾患や生活習慣病など様々な疾患の引き金の一つとして考えられているが、ストレスによる疾患発症の詳細なメカニズムは未だ解明されない部分が多く残されている。本研究では個々のストレス状況を把握し、負荷が少ない IT 技術を用いた利便性の高い設問形式を用いて、ストレス評価法の構築と新規ストレスバイオマーカー検索の可能性について検討した。設問集を用いたストレス解析については、CES-D、GST28などをベースとして、データを IT 技術による算出する方法を確立し、同時に種々の臨床データと経時的に血清等のバイオリソースを高品質で保管管理できるシステムが構築された。本システムが構築された事により、健常人および慢性疾患患者の個人レベルでの追跡が可能となり、データ解析の際に臨床で問題となるノイズの軽減が可能となった。さらに、高ストレス群と低ストレス群でのプロテオーム解析の結果より、両群間で差のあるいくつかのタンパクが認められた。すなわち、高ストレス群と低ストレス群共に例数を重ねてターゲットタンパクを絞り込み、特異性のあるタンパクを詳細に解析して複数のターゲットタンパクを組み合わせることでストレス度を判定できる新しいバイオマーカーを確立できる可能性の充分ある事が判明した。設問紙を利用することにより、ストレスの総合的解析が可能となり、ストレス軽減方法の開発に寄与できるものと考えている。すなわち、客観的側面からの分析（類似回答パターンの有効性の検討）として、回答から類似の回答パターン（数種類）に分類し、ストレス度が高いパターン、ストレス度が低いパターンを構築したシステムから抽出し、クラスタ分析など統計的解析と血液等のストレスバイオマーカーを加える事による精度の高いシステム構築が可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The scale for stress induced emotional changes were developed using based on the patient-reported assessments included General Health Questionnaire (GHQ-28), Center for Epidemiological Studies Depression Scale (CES-D). Furthermore, the stress-related serum protein profiles were analyzed by using developed fully online-automated highly sensitive multi-dimensional LC/MS/MS systems in persons who report high or low levels of stress. Although the established system is reliable and valid to measure the stressors, use of reproducible and highly accurate automated-stress-analytical system and further unique technologies are still needed for the development of stress-analysis system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3000000	900000	3900000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：ストレス バイオマーカー 健康科学 インターネット

1. 研究開始当初の背景

肉体的・精神的なストレスから、いわゆるバーンアウト（燃え尽き）の状態に陥るケースが報告されている。慢性疾患患者や人間ドック受診者に対して定期的にカウンセリングを受けさせるなどの対策をとっているところもあるが、IT技術を利用したストレス度により数値化することで管理するシステムは発展途上にある。ストレス度を簡単な設問への回答という行為を通して客観的に判定するネットワークシステムが構築できれば、個々人のストレス度を日々把握することが容易になり、ストレス度に応じてより適切なタイミングでのケアを行うことが可能となる。申請者は、今までに Web ベースのストレス分析システムの構築、がんや慢性疾患患者のための色彩映像によるストレス緩和媒体によるストレスの軽減法に関する研究を行ってきた。今回はこれらの研究の延長線上に位置し、IT技術を有効に利用し、科学的エビデンスをベースとしたストレス軽減を目指しており、完成した場合の学術的評価に加え、社会的貢献度も高いと考えられる。インターネット技術を用いたリアルタイム次世代ストレス分析システムの構築を目指しており、システムが構築されれば、ストレスが客観的に判断でき、個別のケアを行う事で、患者のストレス軽減につながる。また、電子的に得られる設問に対する回答から明らかな高ストレス群と低ストレス群の絶対数を確保し、被験者の生体サンプルについて、ストレス関連マーカー候補が抽出できる。

2. 研究の目的

現代の社会問題となっているストレスは様々な方法によりその軽減が求められている。しかし精神的ストレスを反映し、被検者の負荷が少なく利便性の高い検査方法は少ないのが現状である。また、ストレスは精神神経疾患や生活習慣病など様々な疾患の引き金の一つとして考えられているが、ストレスによる疾患発症の詳細なメカニズムは未だ解明されない部分が多く残されている。本研究では人間ドック受診者あるいは慢性疾患で治療している患者のストレス状況を把握し、負荷が少ない IT 技術を用いた利便性の高い設問形式を用いて、ストレス軽減法を提案するために、主観的（自己申告）・客観的（科学的）、両面からストレス度を診断するシステムを開発することを目指している。

3. 研究の方法

次世代型ストレス解析システムの基礎的検討

個々人のストレス調査

申請者らが過去に報告した設問表、抑うつ度自己評価尺度（CES-D）、さらに身体的症状因子、不安・不眠因子、社会的活動障害因子、うつ傾向因子という 4 因子構造からなる General Health Questionnaire (GHQ-28) を使用した。問診は受診時に実施し、主観的側面からの分析（自己申告の有効性の検討）として、自己申告において恒常的にストレスを感じている人、ストレスを感じていない人を抽出する。さらにその中で、プロフィール、回答パターンなどストレス度を判別する有効な解析方法の検討を行った。客観的側面からの分析（類似回答パターンの有効性の検討）として、回答から類似の回答パターン（数種類）に分類し、ストレス度が高いパターン、ストレス度が低いパターンをクラスタ分析により抽出した。

客観的側面からの分析（類似回答パターンの有効性の検討）

回答から類似の回答パターン（数種類）に分類し、ストレス度が高いパターン、ストレス度が低いパターンを抽出し、その群におけるストレス度を判別する有効な指標の検討を行った。今回の分析にはクラスタ分析の 1 つであるデンドログラムを用いた。デンドログラムとは縦軸に距離をとり、横軸に対象を等間隔に並べ、統合された対象またはクラスタを統合時の距離の高さで結んだものである。階層的クラスタリングの凝集型

各終端ノードが各対象を表し、併合されてきたクラスタを非終端ノードで表した二分木で、非終端ノードの横軸は、併合されたときのクラスタ間の距離を表す手法である。最短距離法と再長距離法とがあり、最短距離法は空間濃縮という性質のため、極めて外乱に弱く実データではあまり良い結果は得られない。空間濃縮とは併合されてきた新しいクラスタは以後の併合の対象として選ばれる可能性が加速度的に増加する現象で、視覚的なまとまりで囲んだ部分に二つのクラスタ見なせる部分が存在している。このデータに最短距離法を適用すると、デンドログラムが得られる。最長距離法には、併合されてきたクラスタは、以後、併合されにくくなる空間拡散という性質があり、本来のクラスタから偶然離れた対象があると過剰に分割される傾向がある。群平均法は空間濃縮や拡散は生じないがクラスタを併合してもクラス

タ間の距離が単調に減少しないデンドログラムの反転現象があり、階層構造が必要な場合には適さないことが知られており、実際の分析では、最長距離法にて回答パターンについて解析した。

・高感度ナノ LC / MS / MS システムを用いたヒト血清プロテオーム解析によるストレスタンパクの検索

本研究の目的の1つである、ストレス関連マーカーをヒト血清中タンパクの発掘について、LC/MS/MS システムを用いて解析することを試みた。サンプルは、問診、設問の回答パターン、自己申告の結果等から種々の条件を満たした高ストレス群と低ストレス群をサンプルとして基礎的検討を行った。

検体前処理方法はヒト血清中に高濃度で存在する6種類のタンパクを抗体結合カラムで除去した後、トリプシンで消化したペプチドを二次元ナノ自動分析システムと質量分析器を組み合わせた Liquid chromatography-tandem

Mass Spectrometric (LC-MS/MS) 解析には Capillary LC System (Shimadzu, Kyoto, Japan)を使用した。LC-MS/MS のデータは Mascot (Matrix Science, Boston, MA)を用いて解析した。

すなわち、Web 経由でストレス度などの解析を行った結果から、ストレス度を判定、さらにストレス関連タンパク質のうち有用な因子のプロファイリングを行う事とした。実施した測定内容

(設問集の回答、血液採取、問診、CES-D, GHQ-28 など)

主観的側面からの分析… (自己申告の有効性の検討)

恒常的にストレスを感じている人、ストレスを感じていない人を抽出する。プロフィール、回答パターンなどストレス度を判別する有効な指標の検討を行った。

客観的側面からの分析… (類似回答パターンの有効性の検討)

設問表回答から類似の回答パターン (数種類) に分類し、ストレス度が高いパターン、ストレス度が低いパターンを抽出した。その群におけるストレス度を判別する有効な指標の検討を行った。

血液サンプルの系統的保存

採血後、室温にて10分放置後血清を遠心分離し、2次元バーコード付きチューブに1本あたり200マイクロリットル分注し、検体登録システムで匿名化して登録後、マイナス80℃でストレス関連物質測定まで系統的に保存した。

4. 研究成果

・高感度ナノ LC / MS / MS システムを用いたヒト血清プロテオーム解析によるストレスタンパクの検索

本研究の目的の1つである、ヒト血清中ストレス関連マーカーについて、LC/MS/MS システムを用いて解析することを試みた。検体前処理方法はヒト血清中に高濃度で存在する6種類のタンパクを抗体結合カラムで除去した後、トリプシンで消化したペプチドを二次元ナノ自動分析システムと質量分析器を組み合わせた LC/MS/MS システムによって分析した。サンプルは、医師の問診、設問の回答パターン、自己申告の結果等から種々の条件を満たした高ストレス群と低ストレス群のサンプルを対象とした。

血清プロテオーム解析の基礎検討の結果、血清分離後4℃で保存した場合の同定タンパク数はサンプル採取後6時間まで安定していた。高ストレス群と低ストレス群でのプロテオーム解析の結果より、両群間で差のあるいくつかのタンパクが認められた。すなわち、高ストレス群と低ストレス群共に例数を重ねてターゲットタンパクを絞り込み、特異性のあるタンパクを詳細に解析して複数のターゲットタンパクをプロファイルすることで可能性の充分ある事が判明した。

設問集を用いたストレス解析については、CES-D、GST28などをベースとして、データをIT技術による算出する方法を確立し、同時に種々の臨床データと経時的に血清等のバイオリソースを高品質で保管管理できるシステムが構築された。本システムの構築により、健常人あるいは慢性疾患患者の個人レベルでの経時的追跡が可能となり、データ解析の際に臨床で問題となるノイズの軽減が可能となった。今回の研究で基礎検討した複数のストレス関連物質を解析する事で、新しいストレス軽減方法の開発に寄与できるものと考えている。すなわち、客観的側面からの分析 (類似回答パターンの有効性の検討) として、回答から類似の回答パターン (数種類) に分類し、ストレス度が高いパターン、ストレス度が低いパターンを構築したシステムから抽出し、クラスタ分析など統計的解析と血液等の新たなストレスバイオマーカーを加える事による精度の高いシステムを構築する事が可能であると考えられた。

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2件)

健康管理におけるオミックス解析の意義
村上由希、松尾雄志、齋藤邦明 医療と検査
機器試薬 35, 331-334 2012-

遺伝子検査に有用なインターネット活用
齋藤邦明 Medical Technology 40, 1580-
2012-

〔学会発表〕(計1件)

Saito, K

Recent advances of biomarker discovery
in biological fluids by using Mass Spec
trometry

8th International Conference of Clinica
l Laboratory Automation (招待講演)
4/11-12, 2013 Seoul, Korea

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.saito-lab-kyotouniv.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤邦明 (SAITO KUNIAKI)

京都大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号：80262765

(2) 研究分担者

山本康子 (YAMAMOTO YASUKO)

京都大学大学院・医学研究科・助教

研究者番号：00331869

村上由希 (MURAKAMI YUKI)

京都大学大学院・医学研究科・研究員

研究者番号：50580106

齋藤ゆみ (MURAKAMI YUKI)

京都大学大学院・医学研究科・その他

研究者番号：40196019