

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
研究期間：2007～2008
課題番号：19890232
研究課題名（和文） 慢性疲労モデルにおける唾液疲労マーカーの探索と客観的疲労診断法の開発
研究課題名（英文） Basic studies about development of chronic fatigue syndrome diagnosis method using chronic fatigue saliva marker
研究代表者 猿田 樹理（SARUTA JURU） 神奈川歯科大学・歯学部・助教 研究者番号：30454151

研究成果の概要：ラットに慢性疲労を経時的に負荷し、唾液疲労マーカー探索のために唾液腺組織のプロテオソーム解析による慢性疲労特異的蛋白の同定を行った。慢性疲労の唾液腺組織内蛋白質のプロテオソーム解析の結果、発現に差異のあった蛋白質は、コントロール群のラットと慢性疲労負荷条件のラット群と比較して、両方で2倍以上発現に差異のあった蛋白質は28種類あり、新規の蛋白の発現が10種類あることが明らかになった。また、①慢性疲労症候群患者、②外科手術時の疲労患者、③運動疲労負荷、④本学附属病院矯正科外来患者のヒト唾液を採取し、唾液疲労マーカー探索のためにプロテオソーム解析による慢性疲労特異的蛋白の同定を行い、ヒト唾液由来慢性疲労症候群蛋白の簡易検出系のプレート開発を行っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,330,000	0	1,330,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,680,000	405,000	3,085,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：慢性疲労症候群、唾液疲労マーカー、プロテオソーム解析、疲労診断法

1. 研究開始当初の背景

近年、ストレスによって引き起こされる胃腸の潰瘍・高血圧・心筋梗塞・過敏性大腸・アトピー・慢性疲労症候群・外傷後ストレス障害・自律神経失調症・心気症などの様々な疾患が存在するが疲労はその下地になって

いる可能性があり、疲労を科学することは現代社会にとって極めて重要である。現在、慢性疲労患者は約21.6万人存在していると報告されている。特にこの中に歯科の問題をもつ患者がいる事が推測され、顎関節症や矯正治療前後における疲労の関与について明ら

かにするために本研究を行った。

2. 研究の目的

1) ラットに各種疲労(強制水泳疲労、運動疲労、絶食疲労)と各種疲労度(1日、7日連続、14日連続、21日連続、29日連続)の組み合わせによる唾液腺内に特異的に発現が増加する蛋白をプロテオソーム解析で同定する。

2) ヒト唾液を用いた慢性疲労測定に特異性の高い蛋白を同定する。

医療の現場ではもちろんのこと、どこでも簡便に測定可能な簡易キットを開発する。

3) 顎関節症患者や矯正治療前後で疲労物質がどのように変動するか明らかにする。それにより顎関節症の発症と病態進展に疲労の関与を明らかにし、疲労の緩和という観点からの治療を検討する。また、矯正治療前後で疲労が緩和されるのかどうか明らかにし、矯正治療の最終目標を単なる咬み合わせの治療から疲労緩和による全身の健康といコンセプトを検討する。

3. 研究の方法

(1) 慢性疲労負荷条件: 各種疲労種および各疲労負荷時間の組み合わせにより行う。

① 強制水泳疲労モデル

② 運動疲労モデル

③ 絶食疲労モデル

(2) 慢性疲労負荷時間

①強制水泳疲労モデル: 1週間連続。1日30分間を朝・昼・夕の3回、強制水泳させる。

②運動疲労モデル: 1日、7日連続。1日2時間運動をさせる。

③絶食疲労モデル: 1日、7日、14日、21日、29日間連続。

以上の慢性疲労負荷により、血液を用いた疲労測定を行い、疲労度をモニタリングする。

(3) 動物実験により得られた唾液・唾液腺組織のウェスタンブロッティングにより、発現蛋白質を確認

(4) ヒト唾液により得られた唾液・唾液腺組織のウェスタンブロッティングにより、発現蛋白質を確認

① 慢性疲労症候群患者: 本学附属横浜研修センター横浜クリニックにある頭痛外来に来院される患者の唾液。

② 外科手術時の疲労: 口腔外科において口腔扁平上皮癌の手術直前と後に唾液を採取し、手術時の疲労で得られた唾液。

③ 運動疲労: 本学学生のボランティアによる運動前後の唾液を採取し、運動疲労で得られた唾液。

④ 本学附属病院矯正科では、患者の症状としてCFSの症状と同様の疲労感・頭痛・顎関節痛・思考力・集中力低下の患者が多く来院しており歯列矯正前に、実際に患者の唾液を採取して得られた唾液。

①-④で得られた慢性疲労関連唾液蛋白のどれと関連があるか、あるいは無いかを検討し慢性疲労特異性をウエスタンブロットで検討する。

疲労種・蓄積度に特異性の高い蛋白を決定する。

(5) ヒト唾液腺由来慢性疲労蛋白の簡易検出系のプレート開発への着手

4. 研究成果

慢性疲労測定を行うために、血清コルチゾール、アセチルカルニチン、乳酸、ピルビン酸、サイトカイン、セロトニン、トリプトファンなどによる血液を用いた疲労測定を行い、疲労度をモニタリングした。

結果は強制水泳疲労モデルでは、血清コルチゾール、乳酸、ピルビン酸、トリプトファンなど日増しに増加傾向を示した。運動疲労モデルも同様に血清コルチゾール、乳酸、ピルビン酸、トリプトファンなど日増しに増加傾向を示した。絶食疲労モデルは反対に乳酸、ピルビン酸、トリプトファン、セロトニンなど減少傾向が認められた。その結果を踏まえて唾液腺組織内発現タンパク質の網羅的解析を行った。コントロール群のラットと慢性疲労負荷条件のラット群と比較して、両者で2倍以上発現に差異のあったたんぱく質は28種類あり、新規の蛋白の発現が10種類あることが明らかになった。動物実験で行った新規たんぱく質10種類は、本学内に設置され

ているモノクローナル抗体研究所において抗体の作成中である。また、2倍以上発現に差異のあったたんぱく質に関しても既知の蛋白に関しては抗体の動物種の検討や抗体価による検出感度を検討している。

現在、①慢性疲労症候群患者、②外科手術時の疲労患者、③運動疲労負荷、④本学附属病院矯正科外来患者のヒト唾液のサンプリング最中である。また、ヒト唾液由来慢性疲労症候群たんぱく質の簡易検出系のプレートの試作品を開発中である。

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 6 件)

①Chronic stress affects the expression of BDNF in rat submandibular glands Juri Saruta, Taeki Lee, Masayoshi Shirasu, Takeshi Takahashi, Chikatoshi Sato, Sadao Sato, Keiichi Tsukinoki Stress 2009 in press. 査読アリ。

② Human submandibular gland produces neuroendocrine granules Juri Saruta, Keiichi Tsukinoki, Naoto Shiiki, Yusuke Kondo, Sadao Sato The Bulletin of Kanagawa Dental College 37(1):31-33, 2009 査読アリ。

③Role of certain saliva proteins as a biomarker under conditions of stress Juri Saruta, Keiichi Tsukinoki, Sadao Sato The Bulletin of Kanagawa Dental College 37(1):65-68, 2009 査読アリ。

④Relationship between occlusal contact patterns and the prevalence of non-carious cervical lesions Toshimi Kawagoe, Juri Saruta, Shinjiro Miyake, Kenichi Sasaguri, Sadao Sato Journal of Dental health 58(5):542-547, 2008 査読アリ。

⑤ Effect of Bruxism-Like Activity on the Salivary Chromogranin A as a Stress Marker Mari Okamura, Ayaka Yoshida, Juri Saruta, Keiichi Tsukinoki, Kenichi Sasaguri, and Sadao Sato Stomatologie 105:33-39, 2008 査読アリ。

⑥Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression Taeki Lee, Juri Saruta, Kenichi Sasaguri, Sadao Sato, Keiichi Tsukinoki Brain Res 1195C:43-49, 2008 査読アリ。

[学会発表] (計 28 件)

① Yusuke Kondo, Juri Saruta, Keiichi

Tsukinoki: Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. The 11th Meeting of Hiroasaki International Forum of Medical Science Emerging Frontiers in Brain Research –Crossroads of metabolic regulation, stress response and disease- March 27-28, 2009 Hiroasaki, Japan.

②Saruta J., Sasaguri K, Tsukinoki K, Sato S: Allowing animals to bite reverses the effects of immobilization stress on hippocampal neurotrophin expression. Iaaid-Asia 2nd, 3.19-20, 2009. Tokyo, Japan.

③高原円, 諏訪幸子, 猿田樹理, 小野塚実, 佐藤貞雄: 子どもの睡眠時歯ぎしりとストレス緩和に関する研究 (2) 第 128 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2009. 1. 15.

④猿田樹理, 佐藤允俊, 笹栗健一, 佐藤貞雄, 椎木直人, 近藤裕介, 槻木恵一: 唾液を用いたメタボリックシンドローム診断法の開発についての基礎的研究 第 43 回神奈川歯科大学総会, 横須賀, 2008. 12. 06

⑤猿田樹理: 唾液によるストレス判定の試み: 咬合咀嚼器官と高次脳のクロストーク 一次世代の歯科医療の基盤創生— 神奈川歯科大学オープンリサーチセンター「高次脳・口腔科学研究センター」中間報告会, 神奈川歯科大学附属横浜研修センター 横浜クリニック, 2008. 11. 09

⑥近藤裕介, 椎木直人, 槻木恵一, 猿田樹理, 佐藤貞雄: 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究—第 6 報: ヒト唾液腺における BDNF 発現部位の発現と局在 第 127 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2008. 10. 9.

⑦椎木直人, 近藤裕介, 猿田樹理, 森裕介, 槻木恵一: クロモグラニンAの発現を伴う多形性腺腫の一例 第127回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2008. 10. 9.

⑧猿田樹理, 笹栗健一, 槻木恵一, 佐藤貞雄: 噛むことはラット唾液腺においてストレスで誘導された BDNF を増加させる 第 50 回日本歯科基礎医学会総会・学術大会, 東京, 2008. 9. 24-25

⑨槻木 恵一, 猿田樹理, 佐藤貞雄: 急性拘束ストレスモデルにおけるラット全身臓器の BDNF receptor, TrkB mRNA 発現について (第 3 報) 第 50 回日本歯科基礎医学会総会・学術大会, 東京, 2008. 9. 24-25

⑩猿田樹理, 李兄基, 笹栗健一, 槻木恵一, 佐藤貞雄: 噛むことはラット唾液腺においてストレスで誘導された BDNF を増加させる 第 67 回日本矯正歯科学会大会, 千葉, 2008. 9. 17-18.

⑪槻木恵一, 森裕介, 猿田樹理, 山崎等,

長村義之： クロモグラニン A の発現を伴う多形性腺腫 第 38 回 (社) 日本病理学会関東支部学術集会, 神奈川, 2008. 2. 23

⑫槻木恵一, **猿田樹理**, 椎木直人, 近藤裕介, 佐藤貞雄: 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究—第 5 報: 急性拘束ストレスモデルにおけるラット全身臓器の BDNF receptor; TrkB mRNA 発現の変動についての検討 第 126 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2008. 6. 12

⑬高原円, 諏訪幸子, **猿田樹理**, 小野塚実, 佐藤貞雄: 子どもの睡眠時歯ぎしりとストレス緩和に関する研究 第 125 回 神奈川歯科大学学会例会, 横須賀, 2008. 2. 14

⑭槻木恵一, 椎木直人, **猿田樹理**: 拘束ストレスはラット顎下腺において BDNF の mRNA とタンパクの産生を誘導する 第 62 回 日本口腔科学会学術集会, 福岡, 2008. 4. 17-18

⑮**猿田樹理**, 椎木直人, 佐藤貞雄, 槻木恵一: 慢性拘束ストレスモデルはラット唾液腺において神経栄養因子の発現に影響を与える 第 62 回 日本口腔科学会学術集会, 福岡, 2008. 4. 17-18

⑯槻木直人, **猿田樹理**, 槻木恵一: 急性拘束ストレスモデルにおけるラット顎下腺は BDNF 血漿レベルに影響を与える 第 62 回 日本口腔科学会学術集会, 福岡, 2008. 4. 17-18

⑰**Saruta J**, Sasaguri K, Tsukinoki K, Sato S: Chronic stress affects the expression of neurotrophins in the rat salivary glands. *Iaaid-Asia 1st*, 3.20-21, 2008. Tokyo, Japan.

⑱Taeki Lee, **Saruta J**, Sasaguri K, Tsukinoki K, Sato S: Increase of Stress-induced BDNF Expression in the Rat Salivary Gland by Biting. *Iaaid-Asia 1st*, 3.20-21, 2008. Tokyo, Japan.

⑲ **Juri Saruta**, Ko Nakajima, Lee Tae Ki, Masayoshi Shirasu, Takeshi Takahashi, Chikatoshi Sato, Keiichi Tsukinoki, Sadao Sato: Chronic stress affects the expression of neurotrophins in the rat salivary glands. 2nd World Conference of Stress, 8.23-26, 2007. Budapest, Hungary.

⑳Keiichi Tsukinoki, **Juri Saruta**, Lee Tae Ki, Sadao Sato: Acute immobilization stress affects the expression of BDNF in the rat salivary glands. 2nd World Conference of Stress, 8.23-26, 2007. Budapest, Hungary.

㉑槻木 恵一, **猿田樹理**, 佐藤貞雄: 急性拘束ストレスモデルにおけるラット顎下腺は BDNF 血漿レベルに影響を与える 第 49 回日本歯科基礎医学会総会・学術大会, 北海道, 2007. 8. 30-31

㉒**猿田樹理**, 佐藤貞雄, 槻木 恵一: 慢性拘束ストレスはラット唾液腺において神

経栄養因子の発現に影響を与える 第 49 回 日本歯科基礎医学会総会・学術大会, 北海道, 2007. 8. 30-31

㉓李兄基, **猿田樹理**, 佐藤貞雄, 槻木恵一: 噛むことは拘束ストレスによる海馬の BDNF 発現減少を抑制する 第 49 回日本歯科基礎医学会総会・学術大会, 北海道, 2007. 8. 30-31

㉔**猿田樹理**, 中嶋仰, 李兄基, 白数正義, 高橋豪, 佐藤允俊, 笹栗健一, 槻木恵一, 佐藤貞雄: 慢性拘束ストレスはラット唾液腺において神経栄養因子の発現に影響を与える 第 66 回日本矯正歯科学会大会, 大阪, 2007. 8. 20-21

㉕李兄基, **猿田樹理**, 笹栗健一, 佐藤貞雄, 槻木恵一: 噛むことは拘束ストレスによる海馬の BDNF 発現減少を抑制する 第 66 回日本矯正歯科学会大会, 大阪, 2007. 8. 20-21

㉖川越俊美, 小野寺寛司, 常磐修, 高階博文, 岡村麻里, 石井秀典, **猿田樹理**, 三宅真次郎, 中島仰, 岡田鈴人, 天沼崇, 大塚剛郎, 笹栗健一, 秋本進, 佐藤貞雄: 一般集団における不正咬合、顎関節疾患、ブラキシズムの発現に関する調査 第 66 回日本矯正歯科学会大会, 大阪, 2007. 8. 20-21

㉗川越俊美, 小野寺寛司, 高階博文, 常磐修, 岡村麻里, 石井秀典, **猿田樹理**, 三宅真次郎, 中島仰, 岡田鈴人, 天沼崇, 大塚剛郎, 笹栗健一, 秋本進, 佐藤貞雄: 一般集団における不正咬合、顎関節疾患、咬合様式調査報告 第 42 回神奈川歯科大学総会 2007. 12. 8

㉘**猿田樹理**, 李兄基, 笹栗健一, 槻木恵一, 佐藤貞雄: 唾液腺 BDNF の病態生理学的意義についての研究—第 4 報: 咀嚼器官の活性化は血漿 BDNF レベルの増加に貢献する 第 42 回神奈川歯科大学総会 2007. 12. 8

〔図書〕 (計 1 件)

①Novel Trends in Brain Science

Brain Imaging, Learning and Memory, Stress and Fear, and Pain

Springer 2008 P.183-200

Bruxism and Stress Relief

Sadao Sato, Kenichi Sasaguri, Takero Ootuka, **Juri Saruta**, Shinjiro Miyake, Mari Okamura, Chikatoshi Sato, Norio Hori, Katsuhiko Kimoto, Keiichi Tsukinoki, Kazuko Watanabe, and Minoru Onozuka

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猿田 樹理 (SARUTA JURU)

神奈川歯科大学・歯学部歯学科・助教

研究者番号: 30454151