

〈原著〉

ストレス負荷による唾液中タンパク成分の変動

清水 美沙¹⁾、樋口 達也²⁾、川上 保子³⁾、下村 弘治⁴⁾、芝 紀代子⁵⁾

Changes in salivary protein levels depending on the stress load

Misa Shimizu¹⁾, Tatuya Higuchi²⁾, Yasuko Kawakami³⁾,
Hiroji Shimomura⁴⁾ and Kiyoko Shiba⁵⁾

Summary The saliva contains blood-borne proteins and is thought to be a clinically important specimen. Since the saliva can be obtained non-invasively, we aimed to determine if salivary proteins can be used as a novel stress marker. We focused on stress in educational settings (classroom learning) and used the Uchida-Kraepelin and Synthetic Personality Inventory (SPI) tests as stressors. Saliva was collected at different sampling points during these tests. We analyzed whether changes in salivary amylase activity, level of cortisol, which is a stress indicator, and protein composition were associated with the stress load. The results for the Kraepelin test were as follows. For load (1), amylase activity was increased in samples from three of seven subjects (43%), and for load (2), the cortisol level was increased in samples from four of seven subjects (57%). Furthermore, analysis of SDS-PAGE data showed changes in 19 protein bands over the course of the test, which indicated that protein bands in the saliva changed with stress. Thus, these results suggest the presence of novel proteins in the saliva during stress.

Key words: Uchida-Kraepelin test, Stress marker, Saliva

I. 緒言

唾液は、唾液腺から口腔内に分泌される分泌液であり、正常では1日に1~1.5 L程度（安静時唾液で700~800 mL程度）分泌され、成分の99.5%が水分であり、無機質と有機質が残りの約半分ずつを占める¹⁾。また、唾液は唾液腺から

分泌されており、唾液腺には3つの大唾液腺（耳下腺・顎下腺・舌下腺）と多数の小唾液腺がある。1日に分泌される唾液の約90%は大唾液腺から分泌され、そのうち、耳下腺からは25%、顎下腺から60%、舌下腺からは7~8%分泌される。唾液はその性質から大きく分けて、比較的粘度が低い漿液性唾液と粘性のある粘液

^{1), 2), 4)}文京学院大学大学院 保健医療科学研究科 保健医療科学専攻

〒113-0023 東京都文京区向丘1-19-1

^{3), 5)}文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科

〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

受領日 平成26年10月23日

受理日 平成27年3月7日

^{1), 2), 4)}Graduate school of Health Care Science, Bunkyo Gakuin University, 1-19-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

^{3), 5)}Faculty of Health Science Technology, Bunkyo Gakuin University, 2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

性唾液に分けられ、また、唾液の成分は、交感神経、副交感神経により複雑に支配されている。漿液性唾液は主に副交感神経の刺激によって分泌され、その主成分は水やタンパク質であり主に耳下腺から分泌される。また粘液性唾液は、交感神経系が働くことで分泌され、主成分は水と糖タンパク質であり舌下腺や小唾液腺から分泌される。近年、唾液は、非侵襲的に採取できる検体として、口腔特有の疾患診断²⁾だけでなく、全身疾患診断の検体として注目されてきており³⁾、富田らは唾液検査でがんを発見する新技術を開発した⁴⁾。

現代社会には様々なストレスが存在し、ストレス関連疾患が多くあるが、ストレスを客観的に知るストレスマーカーとして唾液中の cortisol 濃度やアミラーゼ活性が知られている。唾液中のほとんどの有機化合物は、唾液腺で局所的に産生されるが、いくつかの生体成分は血液から唾液へ拡散、能動輸送、限外濾過の手段で移行される。そのため、唾液成分は血液由来のタンパク質を含み、臨床的意義を持ち得る試料として期待される。

我々は、非侵襲的に採取できる唾液に注目し、これまでに学生の定期試験などのストレス負荷によって唾液中アミラーゼ活性および、cortisol 濃度が上昇することを見出した⁵⁾。また、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法により唾液中のタンパク質を分離解析し、ストレスにより変動する唾液中タンパク質についても研究を続けている⁶⁾。

本研究では、教育の場 (座学) におけるストレスに着目し、新しいストレスマーカーとなりうるタンパク質を検索することを目的とした。

ストレッサーとして内田クレペリン精神試験と SPI 試験を実施し、安静時・ストレス負荷中・ストレス負荷後の唾液を経時的に採取し、唾液中のアミラーゼ活性および cortisol 濃度の変化と、ストレス負荷によって生じる唾液中タンパク質成分の変動との関係について解析を試みた。

II. 方法と材料

[1] 方法

1. ストレス負荷法

内田クレペリン精神検査⁷⁾および SPI 試験⁸⁾をそれぞれは10分間、2回実施した。

2. 負荷前後の唾液採取条件

午後2時に負荷前 (安静時) の唾液を採取後、午後2~4時の間で⁹⁾あらかじめ設定した各採取ポイントに従い採取した (Fig. 1)。検査前1時間は飲食・喫煙を禁止した。唾液の採取方法は5分間かけて口腔内にため、全唾液をスポイトで吸い上げ1.5 mL チューブ (WATSON (株), Kobe, Japan) に採取した。採取した唾液にはプロテアーゼ阻害剤 (Protease Inhibitor Cocktail Tablets; Roche Applied Science, Basel, Schweiz) を添加した。即ち、1錠を1.5 mL の100 mM リン酸緩衝液 (pH7.0) で溶解し、7倍濃度のストック溶液を作成し、唾液600 μ L に対してストック溶液を100 μ L 添加し、よく混和後測定まで -80°C に保存した。

3. 唾液中成分の測定法

1) アミラーゼ活性

アミラーゼ活性測定専用機器アミラーゼモニ

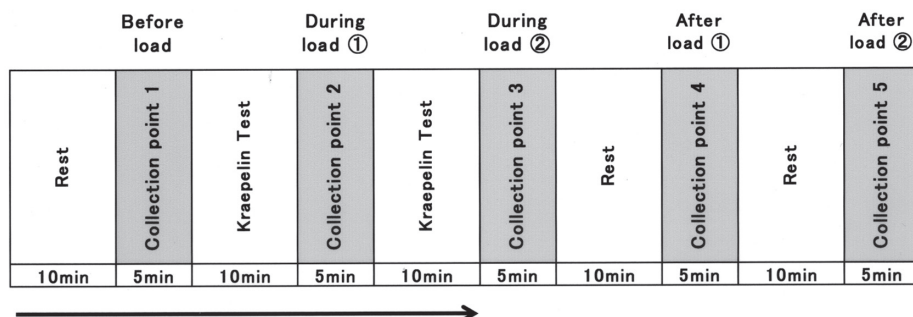


Fig. 1 Flow chart of the sampling method.

ター (ニプロ (株), 大坂, 日本) 付属のアミラーゼ測定専用チップに唾液試料50 μ Lを点着し、1分間反応させて測定した。アミラーゼ活性はKU/Lで表示した。

2) コルチゾール濃度

Salivary Cortisol Enzymeimmunoassey Kit (SALIMETRICS, Inc., Pennsylvania, USA) を用

いて測定した。コルチゾール濃度は μ g/dLで表示した。

3) 総タンパク質濃度

ピロガロールレッド法 (マイクロTPテストワコー 和光純薬工業(株), 大坂, 日本) を用いて生化学自動分析装置 (Accute TBA-40FR; TOSHIBA メディカルシステムズ(株), 栃木, 日本) により

Fig. 2-1

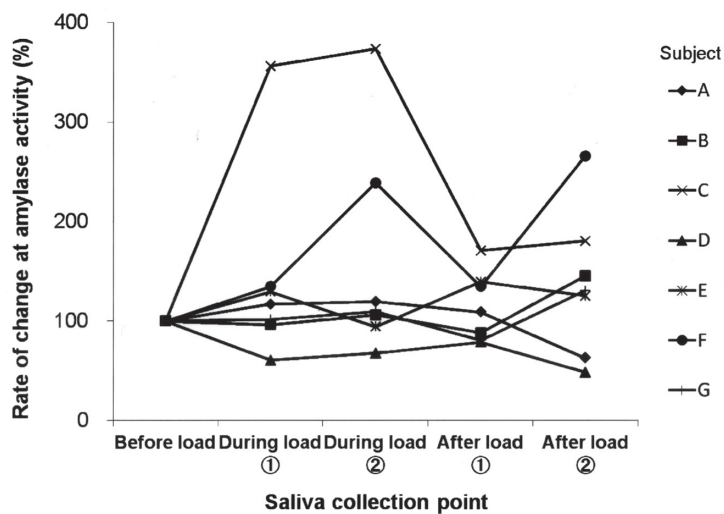


Fig. 2-2

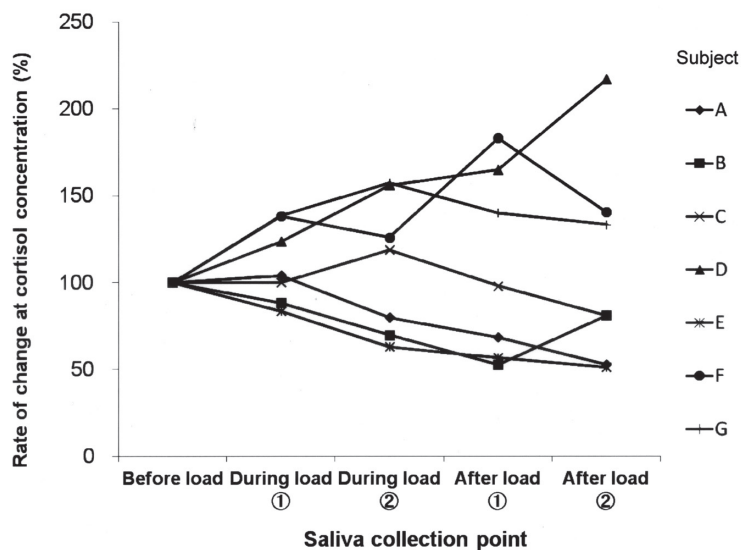


Fig. 2 Changes in salivary amylase activity and cortisol levels during the Kraepelin test.

2-1 Amylase activity

2-2 Cortisol levels

The rate of change at each sampling point is calculated by defining the value before the stress as 100%.

測定した。

4) タンパク質分離法

唾液中の総タンパク質濃度を約200 mg/Lに揃え、戸田ら¹⁰⁾の方法に従い非還元SDS-PAGE法により分離した。すなわち、10%自製ポリアクリルアミドゲルを使用し、電気泳動用緩衝液には、陰極側には0.1% SDS・100 mM Tris・100 mM Tricine緩衝液 (pH8.3)、陽極側には、0.1% SDS・25 mM Tris・0.19 M Glycine緩衝液 (pH8.6) を用い20 mA/ゲルの条件で90分間泳動を行った。電気泳動後のゲルは、銀染色キット (銀染色IIキットワコー; 和光純薬工業(株)) を使用しタンパク質染色を行った。また、主要なタンパク質の分子量推定には分子量マーカー (Low Molecular Weight Calibration Kid for Electrophoresis; GEヘルステアジャパン(株), 東京, 日本) を用いた。

5) 画像解析法

染色後の泳動ゲルはImage J (Wayne Rasband (NIH), USA) を用いて画像解析を行い、デンストメトリー像を得た。

[2] 材料

本研究に当たり文書で同意を得た本学学生7名 (男性3名、女性4名、年齢22~24歳) から採取した唾液を用いた。また、本研究は文京学院大学大学院の倫理審査委員会において承認を得ており (承認番号: 2013-MSJ02)、唾液採取においては予め承諾書を作成の上インフォームドコンセントを得た。

Ⅲ. 結果

[1] 内田クレペリン検査負荷によるストレスマーカー値の変動

クレペリン検査を実施した際のストレスマーカー値 (アミラーゼ活性およびコルチゾール濃度) の変動について、負荷前を100%として各採取ポイントの変化率をみた。被験者7例についてストレスマーカー値の平均値以上を変化ありとみなした。アミラーゼ活性においては採取ポイント負荷中①で7例中3例 (43%) に増加が見られた (Fig. 2-1)。コルチゾール濃度については採取ポイント負荷中②において7例中4例 (57%)、負荷後①で7例中3例 (43%) の

増加が見られ、負荷後②では3例 (43%) に増加が見られた (Fig. 2-2)。

[2] SPI試験負荷によるストレスマーカー値の変動

クレペリン検査の実施によりストレスマーカー値に大きな変化があった被験者Cと、変化があまり見られなかった被験者AについてSPI試験を実施し、ストレスマーカー値の変動をみた。図には示していないが、いずれの被験者においても、各採取ポイントの変化率を比較すると、ストレスマーカー値の変化においてクレペリン検査を実施した際の様な大きな変動は見られなかった。これらの結果より、クレペリン検査をストレス負荷法として採用することにした。

[3] ストレス負荷による唾液中タンパク質バンドの変化

クレペリン検査の実施によりストレスマーカー値に変化が見られた群と変化が見られなかった群の2群に分けたところ、変化が見られた群は4例、変化が見られなかった群は3例であった。SDS-PAGE法を実施し、クレペリン検査負荷によるタンパク質バンドの変動をみたところ19本のタンパク質バンドに変化が見られたので共通の番号を付し、分子量を推定したところ、バンド①は113 kDa、バンド②は105 kDa、バンド③は82 kDa、バンド④は68 kDa、バンド⑤は60 kDa、バンド⑥は50 kDa、バンド⑦は47 kDa、バンド⑧は41 kDa、バンド⑨は39 kDa、バンド⑩は35 kDa、バンド⑪は33 kDa、バンド⑫は26 kDa、バンド⑬は22 kDa、バンド⑭は19 kDa、バンド⑮は17 kDa、バンド⑯は15 kDa、バンド⑰は14 kDa、バンド⑱は12 kDa、バンド⑲は11 kDaであった。

ストレスマーカー値に変化が見られた群 (Fig. 3-1) では、負荷前と比較し19本のバンドに経時的な変化が見られた。そのうち採取ポイント負荷中①と負荷中②でバンドの幅が太く変化したものは、19本中7本 (37%)、すなわち、バンド⑦ (47 kDa)、バンド⑨ (39 kDa)、バンド⑪ (33 kDa)、バンド⑮ (17 kDa)、バンド⑯ (15 kDa)、バンド⑱ (12 kDa)、バンド⑲ (11 kDa) であり、採取ポイント負荷後①と負荷後②では8本 (42%)、すなわち、バンド① (113 kDa)、バンド② (105 kDa)、バンド③ (82 kDa)、

バンド④ (68 kDa)、バンド⑧ (41 kDa)、バンド⑩ (35 kDa)、バンド⑫ (26 kDa)、バンド⑰ (14 kDa) であった。ストレスマーカー数値に変化が見られなかった群 (Fig. 3-2) では、負荷前と比較し12本のタンパク質バンドに経時的な変化が見られ、そのうち負荷中①と負荷中②にバンドの幅が太く変化したものは、12本中3本

(25%)、すなわち、バンド⑧ (41 kDa)、バンド⑭ (19 kDa)、バンド⑰ (11 kDa) であり、負荷後①と負荷後②では2本 (16%)、すなわち、バンド④ (68 kDa)、バンド⑱ (12 kDa) であった。しかし、ストレスマーカー値に変化が見られた群ほどの大きな変化はみられなかった。

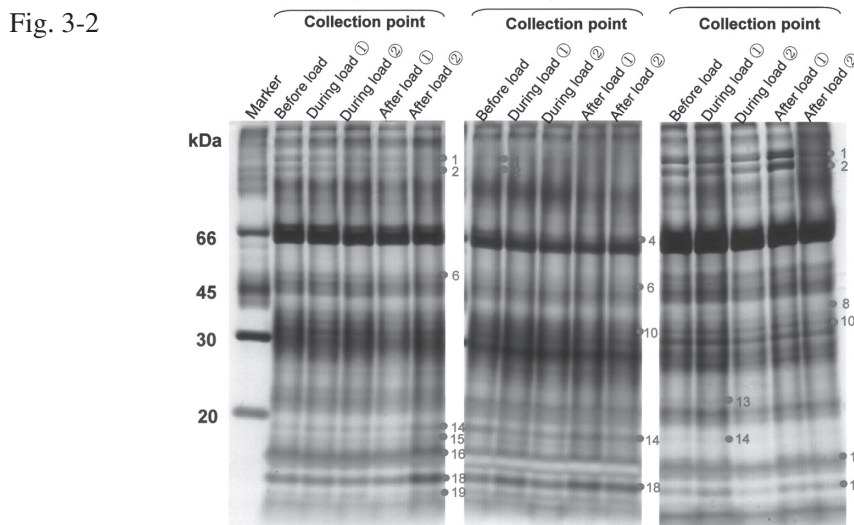
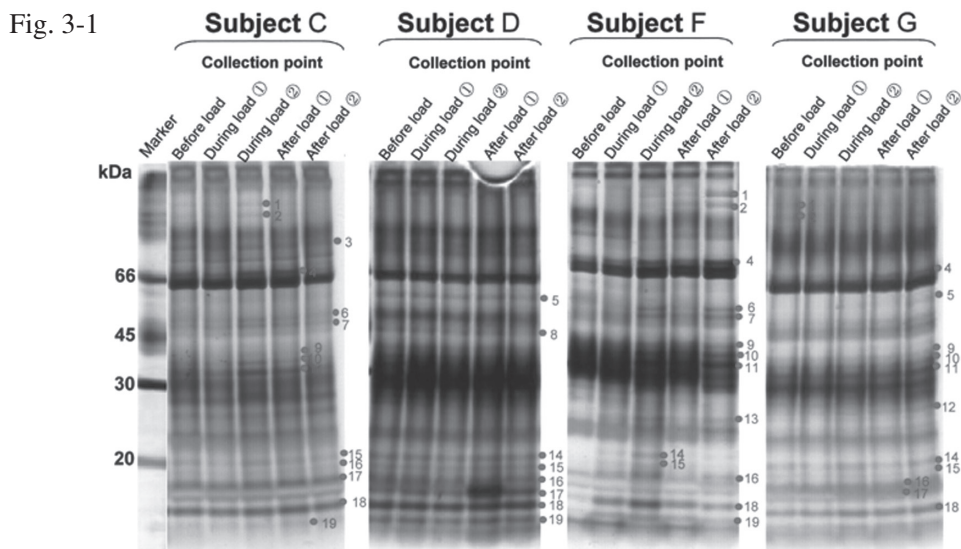


Fig. 3 Changes in the SDS-PAGE pattern for salivary proteins during the Kraepelin test .
 3-1 Group with changes in stress markers.
 3-2 Group without changes in stress markers.

[4] デンシトメトリーによって得られた各タンパク質バンドの平均変化率

ストレスマーカー値に変化が見られた群4例の共通の番号を付したタンパク質バンドについて、デンシトメトリーにより相対割合を求めた。負荷前の相対割合を100%とし、平均変化率を求

めてグラフ化したものをFig. 4に示した。合計19本のタンパク質バンドに変動が見られたが、そのうち、変化率が2倍に増加したタンパク質バンドはバンド① (113 kDa)、バンド② (105 kDa)、バンド⑩ (35 kDa)、バンド⑰ (14 kDa)、バンド⑱ (12 kDa)、⑲ バンド (11 kDa) の6本で

Fig. 4-1

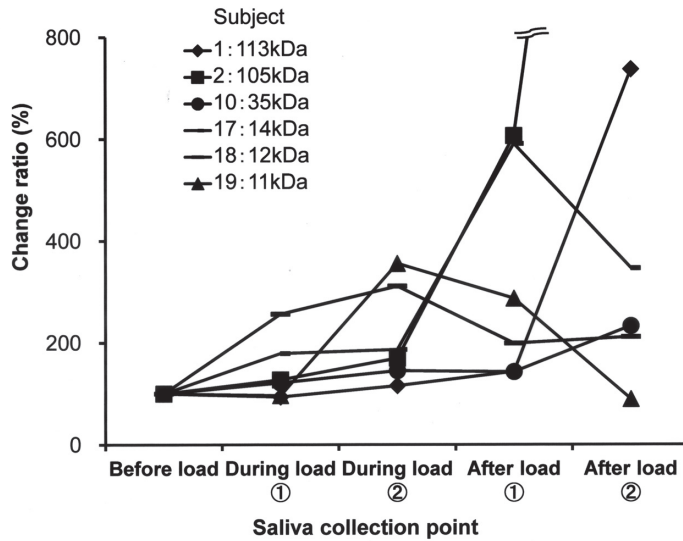


Fig. 4-2

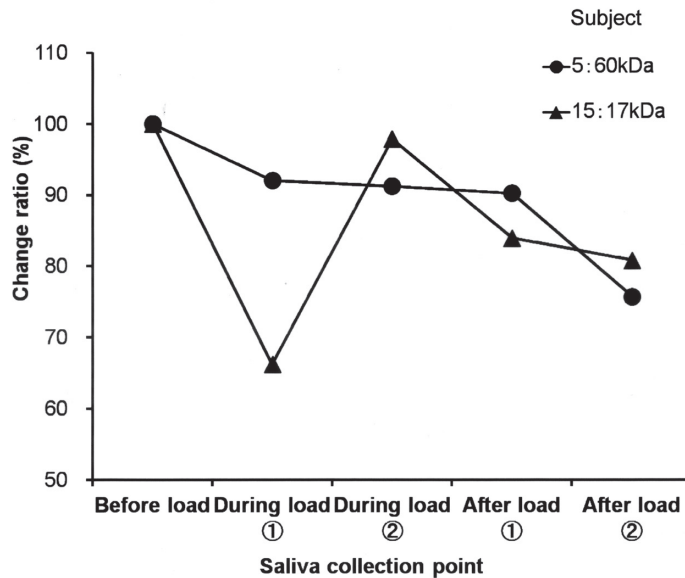


Fig. 4 Rate of changes in protein bands for the group showing changes in stress markers.
 4-1 Group with more protein bands.
 4-2 Group with lesser protein bands.

あり、バンド①、②、⑩、⑰、⑲は4例中3例(75%)に、バンド⑱は4例すべて(100%)で増加がみられた。また、バンド⑤(60 kDa)、バンド⑮(17 kDa)の2本は減少が見られ、4例中3例(75%)で確認した。

IV. 考察

クレペリン検査によるストレス負荷は、SPI試験に比べてストレスマーカー値を大きく変動させた。アミラーゼ活性は負荷開始後約15分の負荷中①から、コルチゾール濃度は負荷開始後約30分の負荷中②から増加が見られ、両者にはタイムラグが生じた。アミラーゼ活性は交感神経の作用により分泌が促されるため応答性が速いと考えられる。一方、コルチゾールは、下垂体からのACTHの分泌が副腎皮質に作用し、血中に分泌が促されるステロイドホルモンである。ステロイドホルモンのような脂肪親和性の強い分子成分の血中から唾液への拡散は、受動拡散、あるいはタンパクのリガントの受容体接着の能動輸送といった機序といわれている¹¹⁾。そのため、コルチゾールは比較的分子量が小さく、容易に血液から唾液に拡散できる¹²⁾と推測されるが、血液を経由して唾液中に移行するのでアミラーゼ活性と比べると応答性が遅いと考えられる。下村らは、定期試験前後でのストレスの有無を唾液アミラーゼ、唾液コルチゾールを測定したところ、試験が近づくともストレスが増大し、試験終了直後でも高値を示したと報告している³⁾。本研究結果から、クレペリン検査の実施によりストレスマーカーの明らかな変動がみられたことは、ストレスの存在の指標になると考えられた。今日までの研究において実験的に強いストレスを与える手法の研究はある。例えばMariaらはエルゴメーターにより45分間の負荷を与えた後、血中コルチゾール濃度の測定をおこなった¹³⁾。しかしながら、日常生活で遭遇する様な負荷によるストレスの研究は多くない。今回SPI試験やクレペリン検査など、集中して行わなければならない学習に対しても、ストレスマーカー値が変化したことは大きな成果であると考えている。この指標をもとに我々はSDS-PAGE法を行った結果、19本のタンパク質バンドに経時的な変化を見出した。このことからス

トレスにより唾液中タンパク質バンドに変動が見られることが明らかとなり、今後、これらのタンパク質バンドがどのようなタンパク質によるものかを調べることは、ストレスで変化する新規の唾液中タンパク質の解明を示唆するものである。

V. 結語

本研究では教育の場(座学)におけるストレスに着目し、ストレス負荷法としてクレペリン検査を実施した。すでにストレスマーカーとされている唾液中アミラーゼ活性値およびコルチゾール濃度を指標とし、新しいストレスマーカーとなりうる唾液中タンパク質をSDS-PAGE法を駆使して検索した結果、ストレスマーカー値とともに変動するいくつかのタンパク質バンドを確認した。特に、バンド①(113 kDa)、バンド②(105 kDa)、バンド⑩(35 kDa)、バンド⑰(14 kDa)、バンド⑱(12 kDa)、バンド⑲(11 kDa)の6本は、負荷後に変化率が2倍に増加し、バンド①、②、⑩、⑰、⑲は4例中3例(75%)に、バンド⑱は4例すべてにおいて確認した。また、バンド⑤(60 kDa)、バンド⑮(17 kDa)の2本は4例中3例(75%)で減少が見られたことは有益な知見であった。

参考文献

- 1) 安孫子 宜光 他編: スタンダード生化学・口腔生化学, 204-6, 学建書院, 東京, (2003)
- 2) Taba Jr, Kinney J, Kim S, Giannobile V: Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dent Clin North Am*, 49: 551-571, 2005.
- 3) Malamud D: Salivary diagnostics: the future is now. *J Am Dent Assoc*, 137: 284-286, 2009.
- 4) Sugimoto M, Wong T, Hirayama A, Soga T, Tomita M: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics*, 6: 78-95, 2010.
- 5) 下村弘治, 金森きよ子, 西牧淳一, 芝紀代子: 教育現場でのストレスマーカーとしての唾液アミラーゼと唾液コルチゾール測定の有効性. *生物試料分析*, 33: 247-254, 2010.
- 6) 樋口達也: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いた唾液タンパク質分析の基礎的検討とストレス負荷による唾液タンパク質バンドの変動.

- 文京学院大学大学院保健医療科学研究科修士論文
集, 2, 2013.
- 7) クレベリン検査; 日本・精神技術研究所 (株), 東京.
 - 8) SPI試験 (総合適性検査); 高橋書院, 東京.
 - 9) Dickmeis T: Glucocorticoids and the circadian clock. *J Endocrinol*, 200: 3-22, 2009.
 - 10) 戸田年総, 平野 久, 中村和行編: タンパク質研究なるほどQ&A. 羊土社, 東京 (2005).
 - 11) Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C: Diagnostic Potential of Saliva: current state and future applications. *Clin Chem*, 57: 675-687, 2011.
 - 12) Vining F, McGinley A, Symons G: Hormones in saliva: mode of entry and consequent implication for clinical interpretation. *Clin Chem*, 29: 1752-1756, 1983.
 - 13) Maria B, Juan G, Maria H, Eduardo F: Anti-Inflammatory and Stress Responses after Acute Moderate Exercise. *PLoS One*, 8: e74524, 2013.