

原著 急性および慢性痛発現時のストレスマーカーとしての 唾液クロモグラニンAの分泌動態

昭和大学医学部生理学講座（生体制御学部門）

米山 早苗 砂川 正隆 本田 豊
池本 英志 須賀 大樹 岩本 泰斗
石川慎太郎 中西 孝子 久光 正

昭和大学医学部麻酔科学講座

岡田まゆみ

要約：クロモグラニンA (CgA) は主に副腎髄質クロム親和性細胞，交感神経終末の分泌顆粒中に存在し，カテコールアミンの貯蔵や分泌に関与する糖タンパクであることから，視床下部-交感神経系の反応を反映すると考えられている。コルチゾールと比べると，精神的ストレスに対して鋭敏にかつ特異的に唾液中への分泌が高まることから，近年，唾液 CgA が精神的ストレスマーカーとして用いられている。しかし，どのようなストレス条件下で分泌が促進されるのかについては充分明らかにされていない。そこで本研究では，疼痛発現と CgA 分泌との関係について検討することを目的とした。急性炎症性疼痛モデルラットならび慢性炎症性疼痛モデルラットを作製し，疼痛ストレス下における唾液 CgA の分泌動態を調べた。急性実験では，ラットの右側後肢足底に4%ホルマリン溶液 50 μ l を皮下注射し，1時間後に唾液と血液を採取した。慢性実験では，同部位に Complete Freund's adjuvant 100 μ l を皮下注射し，1週間後に唾液と血液を採取した。その後，血漿コルチコステロンと唾液 CgA，唾液 α -アミラーゼの濃度を測定した。血漿コルチコステロンは急性痛・慢性痛ともに有意に増加した。唾液 α -アミラーゼは急性痛では有意に増加し，慢性痛でも増加傾向を示した。しかし，唾液 CgA は急性痛では変化せず，慢性痛では有意な増加がみられた。過去の報告では，CgA は精神的ストレスに特異的に反応し，身体的ストレスによる影響は受けにくいとされている。疼痛は身体的にも精神的にもストレスをもたらしうるが，慢性痛に比べ急性痛は危険信号としての意味合いが大きく，精神的ストレスよりも身体的ストレスの要素が大きいため，急性痛では唾液 CgA は増加しなかったと考えられる。近年，CgA が精神的ストレスマーカーとして応用されているが，正確に利用するためにも，様々なストレス条件下での分泌動態の検討が必要である。

キーワード：クロモグラニンA， α -アミラーゼ，コルチコステロン，ストレスマーカー，疼痛ストレス

内閣府の調査によると，ストレスの多い現代社会では，約6割の人が収入や仕事，人間関係においてストレスを感じ，年齢層別では40代の7割を最高に10代でも5割の人がストレスを感じているという¹⁾。一般にストレスというとネガティブな意味合いが高く，生体にとっては好ましくないものと考えられているが，実際には生体に有益な快ストレス (eustress) と不利益な不快ストレス (distress) とがあり²⁾，同じストレスでもその程度によって，また受け手

やその受け手の置かれている条件によって，快ストレスとなるか不快ストレスとなるかは異なってくる。

1936年 Selye³⁾によって，ストレスは「環境から加えられた刺激に適応しようとする身体の特異的な反応」と定義されたが，現在，広義では，ストレスラーやその状況までも含めてストレスと呼ばれている。ストレス（以後のストレスは不快ストレスを意味する）は，ストレスラーの種類によって，大きく身体的ストレス，精神的ストレスに分類される。

身体的ストレスの原因としては、過度の運動・喫煙・睡眠不足・寒暖などが、精神的ストレスの原因としては、人間関係・家計・死別・不安・怒りなどが挙げられ、病気や怪我・疲労など肉体的要因はいずれのストレスの原因にもなると考えられている。

ストレスは、精神疾患はもちろん、様々な疾患の誘発あるいは増悪因子であることはよく知られている。そこで、ストレスを客観的に評価することは重要であり、高感度かつ簡便な評価方法が求められている。ストレスの客観的評価のひとつとして生化学的ストレスマーカーがあり、血中のアドレナリンやノルアドレナリン、コルチゾールなどのストレスホルモンの測定が一般的に行われている⁴⁾。一方、血液と比べサンプル採取が非侵襲的であるという利点をもつ、唾液中のストレスホルモンや α -アミラーゼ^{4,5)}、IgA⁶⁾などの測定も行われている。

クロモグラニンA (CgA) は交感神経-副腎髄質系の反応を反映し、コルチゾールと比べても精神的ストレスに対して鋭敏にかつ特異的に分泌が高まることから^{7,8)}、近年、唾液CgAが精神的ストレスマーカーとしてしばしば用いられている。しかし、どのようなストレス条件下で分泌が促進されるのかについては充分検討されていない。そこで本研究では、疼痛発現とCgA分泌との関係について検討することを目的とした。急性疼痛モデルラットならび慢性疼痛モデルラットを作製し、疼痛ストレス下における唾液CgAの分泌動態を調べ、従来からストレスマーカーとして利用されている唾液 α -アミラーゼや血漿コルチコステロンと比較した。

研究方法

1. 実験動物

本実験では、6週齢(体重180~220g)の雄性Wistar系ラット((株)日本生物材料センターより購入)24匹を使用した。動物は温度 $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、室温 $55\pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクルでの条件で、水と飼料(日本クレア(株)CE-2)は自由摂取とした。なお、本実験は昭和大学動物実験倫理委員会の承認(認証番号00098)を受け、同大学動物実験実施指針を遵守して行った。

動物を無作為に6匹ずつ4群に分け、第1群は急性実験の対照群(AC群)、第2群は急性炎症性疼痛モデル群(AP群)、第3群は慢性実験の対照群

(CC群)、第4群は慢性炎症性疼痛モデル群(CP群)とした。

2. 急性炎症性疼痛(AP)モデルラットの作製

APモデルラットは、ジエチルエーテル(和光純薬工業(株))麻酔下に、4%ホルマリン溶液50 μl を右側後肢足底に皮下注射して作製した⁹⁾。AC群には、同部位に50 μl の生理食塩水を注射した。

3. 慢性炎症性疼痛(CP)モデルラットの作製

CPモデルラットはエーテル麻酔下に、完全フロイントアジュバント(Complete Freund's adjuvant (CFA): Sigma-Aldrich)100 μl を右側後肢足底に皮下注射して作製した¹⁰⁾。CC群には、同部位に100 μl の生理食塩水を注射した。

4. 疼痛発現の確認

急性実験では、疼痛発現により後肢を舐めたり(licking)、振り回したり(flinching)などの疼痛行動を示すようになる。ホルマリン注射後から検体採取までの間、疼痛行動の有無を確認した。

慢性実験では1週間後、熱刺激に対する疼痛閾値の測定をPlantar Test Analgesia Meter (UGO Basile, Italy)を用い、Hargreaves法¹¹⁾にて行った。左右の後肢の足底に熱刺激を与え、逃避行動を示すまでの時間を測定し閾値とした。

なお、AP群あるいはCP群で、疼痛発現が確認できない動物は測定から除外することとした。

5. 検体の採取

急性実験は疼痛誘発から1時間後に、慢性実験はCFA投与から1週間後に検体の採取を行った。

ペントバルビタールナトリウム(共立製薬(株)ソムノペンチル[®]50mg/kgを腹腔内投与)麻酔下に、唾液分泌誘発のためムスカリン受容体刺激薬であるピロカルピン(Sigma-Aldrich)を投与し(1mg/kgを腹腔内投与)、動物を仰臥位にして、唾液をマイクロピペットにて採取した。その後開腹し、腹部下大静脈より採血を行った。

検体はいずれも、採取後遠心分離し、唾液は上清を、血液は血漿を測定まで冷凍保存(-40°C)した。

6. CgA、 α -アミラーゼ、コルチコステロンの測定
唾液CgA濃度、唾液 α -アミラーゼ活性、血漿コルチコステロン濃度をそれぞれ専用のキット(YK070 Human Chromogranin A EIA kit: 矢内原研究所, SALIVARY α -AMYLASE ASSAY KIT: SALIMETRICS, Corticosterone ELISA KIT: Enzo Life

Sciences) を用いて測定した。なお唾液 CgA は、Bradford 法にて測定した蛋白量で補正した値 (pmol/mg protein) で示した¹²⁾。

7. 統計解析

実験結果は平均 ± 標準誤差で示し、統計学的推定 Student's t-test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

1. 疼痛発現の確認

急性実験で AP 群は、ホルマリン注射から検体採取までの間、全例で licking, flinching 行動を示した。

慢性実験で、健肢の逃避行動を示すまでの時間に対し患肢の時間は、CC 群の $100.33 \pm 2.58\%$ に対し、CP 群は $57.49 \pm 4.02\%$ と有意に ($p < 0.01$) に低下した。

2. 唾液 CgA 濃度

唾液 CgA は AC 群 (0.048 ± 0.009 pmol/mg protein) と AP 群 (0.047 ± 0.010 pmol/mg protein) の間で有意差はみられなかったが、CP 群 (0.113 ± 0.039 pmol/mg protein) は CC 群 (0.049 ± 0.005 pmol/mg protein) と比べ有意な増加がみられた ($P < 0.05$) (Fig. 1)。

3. 唾液 α -アミラーゼ活性

急性実験では、AC 群 (66.99 ± 7.69 U/ml) と比較し、AP 群 (90.84 ± 8.18 U/ml) では有意な上昇がみ

られた ($P < 0.05$)。慢性実験では、有意差はなかったが CC 群 (29.01 ± 2.84 U/ml) と比較し、CP 群 (44.36 ± 7.17 U/ml) では上昇傾向が認められた ($p = 0.07$) (Fig. 2)。

4. 血漿コルチコステロン濃度

急性実験では、AC 群 (159.66 ± 17.85 ng/ml) と比較し、AP 群 (226.24 ± 20.16 ng/ml) では有意な上昇がみられた ($P < 0.05$)。慢性実験でも、CC 群 (150.55 ± 28.74 ng/ml) と比較し、CP 群 (247.29 ± 9.91 ng/ml) では有意な上昇がみられた ($P < 0.01$) (Fig. 3)。

考 察

ストレスは、不安や緊張、怒りなどの不快な心理的变化をもたらすと同時に、身体的変化や行動変化をももたらす。うつ病や不安神経症、心身症などの神経精神疾患のほか、自律神経系や免疫系にも影響を与え、生活習慣病^{13,14)}をはじめ様々な疾患の発症や増悪に関与する。

また各種疾患に伴う疼痛もストレスとなり、身体に悪影響をもたらす。過去に我々は、急性¹⁵⁾ならび慢性炎症性疼痛モデル¹⁶⁾や慢性絞扼モデル動物¹⁷⁾を用い、全身の免疫能が低下することを報告しているが、疼痛ストレスは、疾患の治癒反応あるいは術後の予後 (感染、腫瘍の転移や再発等) にも影響を与えうる^{18,19)}。そのため、ストレス下にある

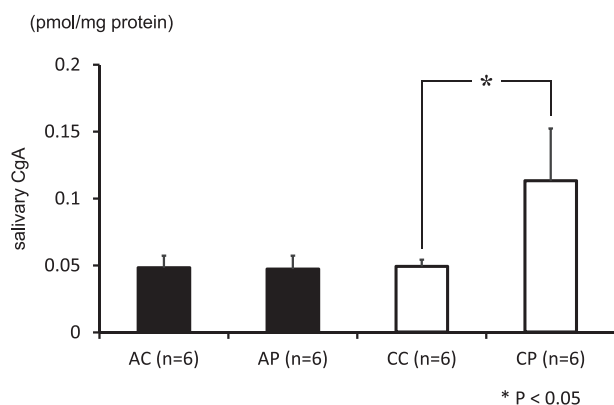


Fig. 1 The levels of salivary chromogranin A in rats subjected to pain stress

The level of salivary CgA was significantly increased by chronic pain, but did not change following acute pain. AC: acute control group, AP: acute pain group, CC: chronic control group, CP: chronic pain group. The data are expressed as the means ± SEM.

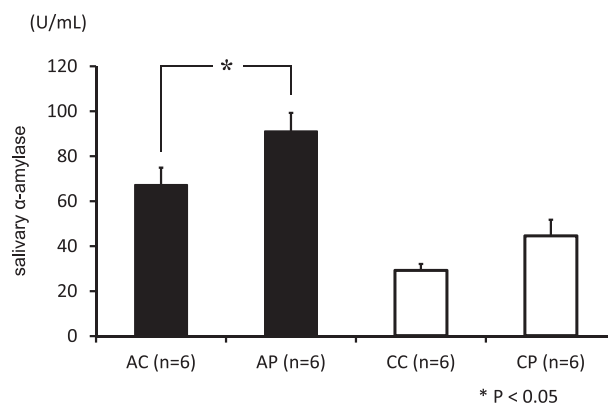


Fig. 2 The activity of salivary α -amylase in rats subjected to pain stress

The salivary α -amylase activity was significantly increased by acute pain, and also tended to be increased by chronic pain. AC: acute control group, AP: acute pain group, CC: chronic control group, CP: chronic pain group. The data are expressed as the means ± SEM.

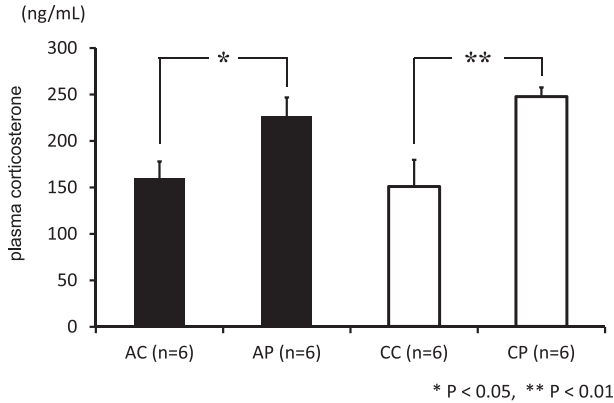


Fig. 3 The levels of plasma corticosterone in rats subjected to pain stress

The levels of plasma corticosterone were significantly increased by both acute and chronic pain. AC: acute control group, AP: acute pain group, CC: chronic control group, CP: chronic pain group. The data are expressed as the means \pm SEM.

のか否かを判断し、必要に応じて、ストレス軽減処置や治療を施さなければならない。しかし、ストレスの感受性には個人差があり、同程度の疾患や外傷であったとしても、人によって身体的反応は異なるため、個々のストレス度合いを客観的にまた正確に評価することが求められる。

今回我々が着目したCgAは、精神的ストレスマーカーとして用いられているが^{7,8)}、いかなる条件下で分泌が促進されるのかは結論に至っておらず、特に疼痛発現時の分泌動態についての報告はない。そこで本研究では、急性痛と慢性痛モデルラットを作製し、唾液CgAの分泌の変化を、従来からストレスマーカーとして利用されている唾液 α -アミラーゼや血漿コルチコステロンと比較検討した。その結果、唾液 α -アミラーゼ活性は急性痛で有意に上昇し (Fig. 2)、血漿コルチコステロン濃度は、急性痛でも慢性痛でも上昇したが (Fig. 3)、唾液CgA濃度は急性痛では変化せず、慢性痛で有意に上昇した (Fig. 1)。

コルチコステロンは、視床下部-下垂体-副腎皮質系の変化を反映するが、CgAは主に副腎髄質クロム親和性細胞、交感神経終末の分泌顆粒中に存在し、カテコールアミンの貯蔵や分泌に関与する糖タンパクであることから²⁰⁾、視床下部-交感神経-副腎髄質系の反応を反映すると考えられている。よって

コルチコステロンとは分泌の機序が異なり、急性痛発現時のCgAとコルチコステロンの分泌反応が異なると考えられる。しかし、ホルマリン注射により動物は患肢を激しく舐めたり、振り回したりなどの疼痛行動を示していることから、交感神経系の興奮状態にあると思われるが、唾液CgAの分泌が増加しなかったのは、血中と唾液中では分泌動態が異なる可能性がある。事実、現在進行中の我々の他の実験では、急性痛によって血漿CgAは有意に増加している (unpublished observation)。

唾液 α -アミラーゼとの比較では、小学生に歯科治療のタービン音を4分間聞かせた時、唾液CgA濃度は有意に増加したが、 α -アミラーゼ活性には変化はなかったこと²¹⁾、一方では、成人男女を20分間騒音曝露させた時は²²⁾、唾液CgA濃度は変化しなかったが、 α -アミラーゼ活性は有意に上昇したことなどが報告されている。唾液アミラーゼの主な分泌源は耳下腺であり、その分泌は交感神経支配であるが²³⁾、CgAは顎下腺導管部に存在し、交感神経のみならず副交感神経刺激によっても唾液中に放出されるとの報告もあり²⁴⁾、ストレス条件が異なると、各唾液腺に及ぼす影響も異なることが考えられる。

唾液CgAは、認知課題²⁵⁾やスピーチ⁸⁾などの精神的ストレス負荷で分泌は増加し、エルゴメーターなどの身体的ストレス負荷²⁶⁾では増加しないことから、精神的ストレスに特異的に反応し、身体的ストレスによる影響は受けにくいと考えられている。疼痛は身体的にも精神的にもストレスをもたらしうるが、慢性痛と比較すると急性痛は危険信号としての意味合いが大きく、精神的ストレスよりも身体的ストレスの要素が大きいため、急性痛では唾液CgAは増加しなかったとも考えられる。

近年、CgAが精神的ストレスマーカーとして応用されているが、正確に利用するためにも、今後も様々なストレス条件下での分泌動態の検討が必要である。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 内閣府編. 消費者市民社会への展望: ゆとりと成熟した社会構築に向けて. 東京: 内閣府;

2008. (国民生活白書, 平成 20 年版)
- 2) Selye H. Stress and distress. *Compr Ther.* 1975;1:9-13.
 - 3) Selye H. A Syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature.* 1936;138:32.
 - 4) Danhof-Pont MB, van Veen T, Zitman FG. Biomarkers in burnout: a systematic review. *J Psychosom Res.* 2011;70:505-524.
 - 5) Gordis EB, Granger DA, Susman EJ, *et al.* Salivary alpha amylase-cortisol asymmetry in maltreated youth. *Horm Behav.* 2008;53:96-103.
 - 6) Valdimarsdottir HB, Stone AA. Psychosocial factors and secretory immunoglobulin A. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1997;8:461-474.
 - 7) Nakane H, Asami O, Yamada Y, *et al.* Effect of negative air ions on computer operation, anxiety and salivary chromogranin A-like immunoreactivity. *Int J Psychophysiol.* 2002;46:85-89.
 - 8) Ugawa Y, Nishigawa G, Maruo Y, *et al.* Salivary stress biomarker levels during speech in patients with maxillectomy defect. *Head Neck.* 2011;33:620-626.
 - 9) Guo LH, Trautmann K, Schluesener HJ. Expression of P2X4 receptor by lesional activated microglia during formalin-induced inflammatory pain. *J Neuroimmunol.* 2005;163:120-127.
 - 10) Rasool M, Varalakshmi P. Protective effect of Withania somnifera root powder in relation to lipid peroxidation, antioxidant status, glycoproteins and bone collagen on adjuvant-induced arthritis in rats. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007;21:157-164.
 - 11) Hargreaves K, Dubner R, Brown F, *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain.* 1988;32:77-88.
 - 12) Fukui M, Hinode D, Yokoyama M, *et al.* Levels of salivary stress markers in patients with anxiety about halitosis. *Arch Oral Biol.* 2010;55:842-847.
 - 13) Tsurugano S, Nakao M, Takeuchi T, *et al.* Job stress strengthens the link between metabolic risk factors and renal dysfunction in adult men. *Tohoku J Exp Med.* 2012;226:101-108.
 - 14) von Kanel R. Psychosocial stress and cardiovascular risk: current opinion. *Swiss Med Wkly (Internet).* 2012;142:w13502. (accessed 2012 Sep 15) <http://www.smw.ch/content/smw-2012-13502/>
 - 15) 坂上聡志, 砂川正隆, 谷川博人, ほか. モルヒネ単回投与はラット急性炎症性疼痛による免疫能の低下を抑制する. *麻酔.* 2011;60:336-342.
 - 16) 大下優介, 蔭 星紅, 萩原久子, ほか. アジュバント関節炎ラットにおける脾臓ナチュラルキラー細胞活性の低下. *昭和医学会誌.* 2005;65:337-344.
 - 17) 砂川正隆, 岡田まゆみ, 郭 試瑜, ほか. 頤神経(三叉神経第3枝末梢枝)慢性絞扼によるラット脾臓NK細胞活性の低下. *麻酔.* 2000;49:250-254.
 - 18) Lennard TW, Shenton BK, Borzotta A, *et al.* The influence of surgical operations on components of the human immune system. *Br J Surg.* 1985;72:771-776.
 - 19) Yang Q, Goding SR, Hokland ME, *et al.* Antitumor activity of NK cells. *Immunol Res.* 2006;36:13-25.
 - 20) Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, *et al.* Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature.* 1967;215:58-59.
 - 21) Okano A, Miyamoto Y, Asari J, *et al.* Change in salivary levels of chromogranin A in children by hearing dental air turbine noise. *Pediatr Dent J.* 2009;19:220-227.
 - 22) Wagner J, Cik M, Marth E, *et al.* Feasibility of testing three salivary stress biomarkers in relation to naturalistic traffic noise exposure. *Int J Hyg Environ Health.* 2010;213:153-155.
 - 23) Speirs RL, Herring J, Cooper WD, *et al.* The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland. *Arch Oral Biol.* 1974;19:747-752.
 - 24) Kanno T, Asada N, Yanase H, *et al.* Autonomic control of submandibular chromogranin A secretion in the anaesthetized rat. *Biomed Res.* 1998;19:411-414.
 - 25) Kawada S, Fukusaki C, Ohtani M, *et al.* Effects of hyperoxic inhalation on psychological stress-induced salivary biomarkers. *Biomed Res.* 2009;30:245-249.
 - 26) 三木圭一. 唾液中クロモグラニンA 濃度の生体負担指標としての検証 長時間の被験者実験での応用. *労安全衛研.* 2008;1:59-62.

CHANGES IN THE STRESS MARKER, SALIVARY CHROMOGRANIN A,
ASSOCIATED WITH ACUTE AND CHRONIC PAIN

Sanae YONEYAMA, Masataka SUNAGAWA, Yutaka HONDA,
Hideshi IKEMOTO, Hiroki SUGA, Taito IWAMOTO,
Shintaro ISHIKAWA, Takako NAKANISHI and Tadashi HISAMITSU

Department of Physiology, Showa University School of Medicine

Mayumi OKADA

Department of Anesthesiology, Showa University School of Medicine

Abstract — Chromogranin A, CgA, is co-released with catecholamines by exocytosis from the adrenal medulla and sympathetic nerve endings. It has been reported that CgA reflects the sympathoadrenal medullary activity, and the secretion of CgA is specifically enhanced by psychological stress. Salivary CgA is used as a marker of psychological stress, because the secretion of CgA is higher than that of cortisol in the saliva, and saliva samples can be collected noninvasively. However, it is unclear what types of stress increase its secretion. In the present study, to clarify the relationship between the appearance of pain and the secretion of CgA, the changes in the secretion of salivary CgA under pain-related stress were investigated using both acute and chronic inflammatory pain model rats. In the acute pain study, rats were injected with 4% formaldehyde subcutaneously into the plantar region of the right foot. One hour later, saliva and blood samples were obtained. In the chronic pain study, rats were injected with complete Freund's adjuvant into the same site, and samples were obtained one week later. The levels of plasma corticosterone and salivary CgA, and the salivary α -amylase activity were also measured. The levels of corticosterone and α -amylase activity increased in both pain model rats. However, the salivary CgA level was significantly increased in the chronic inflammatory pain model rats, while it did not change in the acute pain model. The secretion of salivary CgA differed from that of other stress markers even under the same stress conditions. Although the salivary CgA level is used as a parameter of stress, it is necessary to investigate the differences in salivary CgA secretion under various stressful environments.

Key words: chromogranin A, α -amylase, corticosterone, stress marker, pain stress

[受付：1月21日，受理：1月29日，2013]