

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2023-30558
(P2023-30558A)

(43)公開日 令和5年3月8日(2023.3.8)

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	G 2 G 0 4 5
C 1 2 Q	1/68 (2018.01)	G 0 1 N	33/50	Z 4 B 0 6 3
C 1 2 Q	1/6876(2018.01)	G 0 1 N	33/50	P
		C 1 2 Q	1/68	
		C 1 2 Q	1/6876	
		審査請求	未請求	請求項の数 11 O L (全60頁)
(21)出願番号	特願2021-135757(P2021-135757)	(71)出願人	301021533	
(22)出願日	令和3年8月23日(2021.8.23)		国立研究開発法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関 1 - 3 - 1	
		(71)出願人	504203572	
			国立大学法人茨城大学 茨城県水戸市文京二丁目 1 番 1 号	
		(74)代理人	110002860	
			弁理士法人秀和特許事務所	
		(72)発明者	大石 勝隆	
			茨城県つくば市梅園 1 - 1 - 1 中央第 1 国立研究開発法人産業技術総合研究所内	
		(72)発明者	豊田 淳	
			茨城県稲敷郡阿見町中央三丁目 2 1 番 1 号 国立大学法人茨城大学 農学部内	
		(72)発明者	吉田 悠太	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 唾液中の睡眠障害バイオマーカー

(57)【要約】

【課題】

本発明は唾液中の睡眠障害のバイオマーカーを提供することを課題とする。

【解決手段】

唾液中の代謝産物やマイクロRNAが睡眠障害のバイオマーカーとして使用できることを見出し、さらにこのバイオマーカーを用いた睡眠障害の病状や重症度を判定・評価するための方法、睡眠障害を判定するためのプログラム、睡眠障害を判定するための検査キット、並びに睡眠障害の治療薬のスクリーニング及び評価方法に応用できることを見出し、本発明に到達した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被検対象から採取された唾液試料中における、表 1 及び表 2 に記載される代謝産物からなる群から選択される 1 つ以上の代謝産物、及び / 又は表 3 ~ 表 6 に記載されるマイクロ RNA からなる群から選択される 1 つ以上のマイクロ RNA 若しくはそれらのマイクロ RNA に相当するヒトでのマイクロ RNA の、睡眠障害の診断のためのバイオマーカーとしての使用。

【表 1 - 1】

表 1

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
11-Aminoundecanoic acid	17083	
Lactic acid	612	HMDB0000190, HMDB0001311
Urea	1176	HMDB0000294
3-Indoxylsulfuric acid	10258	HMDB0000682
S-Adenosylmethionine	34755	HMDB0001185
"Homovanillic acid 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid Hydroxyphenyllactic acid"	"1738 348154 9378"	"HMDB0000118 HMDB0000423 HMDB0000755"
3-Hydroxybutyric acid	441	HMDB0000011, HMDB0000357, HMDB0000442
4-Aminohippuric acid	2148	HMDB0001867
N-Formylmethionine	439750	HMDB0001015
N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	440810	HMDB0004194
2-Hydroxybutyric acid	440864	HMDB0000008
Succinic acid	1110	HMDB0000254
Malic acid	525	HMDB0000156, HMDB0000744
"Phenaceturic acid N-(o-Toluoyle)glycine"	"68144 91637"	"HMDB0000821 HMDB0011723"
Allantoin	204	HMDB0000462
N-Acetylhistidine	75619	
7-Methylguanine	11361	HMDB0000897
N1-Methylguanosine	96373	HMDB0001563
Gluconic acid	10690	HMDB0000625
Creatinine	588	HMDB0000562
5-Hydroxypentanoic acid	25945	HMDB0061927
Uridine	6029	HMDB0000296
Guanidoacetic acid	763	HMDB0000128
Imidazole-4-acetic acid	96215	HMDB0002024
Putrescine	1045	HMDB0001414
Thr	6288	HMDB0000167
1-Methyl-4-imidazoleacetic acid	75810	HMDB0002820
6-Aminohexanoic acid	564	HMDB0001901
Gly-Asp	97363	
Isethionic acid	7866	HMDB0003903

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
Methionine sulfoxide	158980	HMDB0002005
N-Acetyl glycine	10972	HMDB0000532
"N-Acetyl leucine-1 Isovaleryl alanine-1"	"70912 129285"	"HMDB0011756 HMDB0000747"
Ser-Glu		
1-Methyladenosine	27476	HMDB0003331
"1-Methylhydantoin Glycine anhydride"	"69217 7817"	"HMDB0003646 "
4-(β - Acetylaminoethyl)imidazole	69602	
Choline	305	HMDB0000097
Histamine	774	HMDB0000870
Hydroxyproline	5810	HMDB0000725
Ala	602	HMDB0000161, HMDB0001310
Mucic acid	3037582	HMDB0000639
N-Acetylputrescine	122356	HMDB0002064
Pipecolic acid	439227	HMDB0000070, HMDB0000716, HMDB0005960
Gluconolactone	7027	HMDB0000150
"Glutaric acid Methylsuccinic acid"	"743 6950476 "	"HMDB0000661 HMDB0001844"
Cysteic acid	72886	HMDB0002757
Muscimol	4266	
Pro	614	HMDB0000162, HMDB0003411
SDMA	169148	HMDB0003334
Nicotinamide riboside	439924	HMDB0000855
Cadaverine	273	HMDB0002322
N8-Acetylspermidine	123689	HMDB0002189
Cysteinesulfinic acid	1549098	HMDB0000996
"2-Hydroxyoctanoic acid 8-Hydroxyoctanoic acid"	"94180 69820"	"HMDB0000711 "
Ascorbic acid	54670067	HMDB0000044
"Glucuronic acid-1 Galacturonic acid-1"	"94715 439215"	"HMDB0000127 HMDB0002545"
Thymine	1135	HMDB0000262
4-Guanidinobutyric acid	500	HMDB0003464
γ -Glu-Lys_divalent	65254	

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
1-Methylnicotinamide	457	HMDB0000699
1H-Imidazole-4-propionic acid	10105257	
ADMA	123831	HMDB0001539
Imidazolelactic acid	793	
Pyruvic acid	1060	HMDB0000243
Decarboxylated S-Adenosylmethionine	439415	HMDB0000988
Met	876	HMDB0000696
Gly	750	HMDB0000123
1-Methylhistamine	3614	HMDB0000898
Carboxymethyllysine	123800	
Glycerophosphocholine	439285	HMDB0000086
Carnitine	85	HMDB0000062
Nω-Methylarginine	132862	
Trimethylamine N-oxide	1145	HMDB0000925
Uracil	1174	HMDB0000300
γ-Butyrobetaine	134	HMDB0001161
"N-Acetylglucosamine N-Acetylmannosamine N-Acetylgalactosamine"	"439174 439281 35717"	"HMDB0000215 HMDB0001129 HMDB0000853"
Tartaric acid	444305	HMDB0000956
Threonic acid	5460407	HMDB0000943
5-Hydroxylysine	3032849	HMDB0000450
3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone	8369	HMDB0030776
γ-Glu-Gly	165527	HMDB0011667
"2-Amino adipic acid O-Acetylhomoserine"	"92136 439389"	"HMDB0000510 "
Dyphylline	3182	
His-Glu	7010583	
β-Hydroxyisovaleric acid	69362	HMDB0000754
"3-(2-Hydroxyphenyl)propionic acid 3-Phenyllactic acid Atrolactic acid p-Methoxyphenylacetic acid m-Ethoxybenzoic acid Tropic acid"	"873 643327 1303 7690 12126 10726"	"HMDB0000748, HMDB0000779 HMDB0002072"
"4-Methyl-2-oxovaleric	"70 47	"HMDB0000695 HMDB0000491

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid 2-Oxohexanoic acid"	159664"	HMDB0001864"
Asn	236	HMDB0000168, HMDB0033780
2-Oxoglutaric acid	51	HMDB0000208
Spermidine	1102	HMDB0001257
N-Methylputrescine	439791	HMDB0003661
Cystine	595	HMDB0000192
Glycerol 3-phosphate	439162	HMDB0000126
Homoarginine	9085	HMDB0000670
Nicotinic acid	938	HMDB0001488
Gly-Gly	11163	HMDB0011733
2-Hydroxyisobutyric acid	11671	HMDB0000729
Cytosine	597	HMDB0000630
Pilocarpine	5910	HMDB0015217
Citrulline	9750	HMDB0000904

10

20

【表 2】

表 2

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
Kynurenic acid	3845	HMDB0000715
Riboflavin	493570	HMDB0000244
AC(10:0)	10245190	HMDB0000651
"Cortexolone Corticosterone 21-Deoxycortisol"	"440707 5753 92827"	"HMDB0000015 HMDB0001547 HMDB0004030"
1-Oleoyl-glycero-3-phosphocholine-2		
Cholesterol sulfate	65076	HMDB0000653
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	445580	HMDB0002183
1-Palmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine	9547069	HMDB0011503

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3

パイオメーカー名	Accession ID
mmu-let-7e-3p	MIMAT0017016
mmu-let-7j	MIMAT0025123
mmu-miR-103-1-5p	MIMAT0017024
mmu-miR-103-3p	MIMAT0000546
mmu-miR-106b-3p	MIMAT0004582
mmu-miR-10a-5p	MIMAT0000648
mmu-miR-1188-5p	MIMAT0005843
mmu-miR-1224-5p	MIMAT0005460
mmu-miR-1249-5p	MIMAT0014804
mmu-miR-1258-5p	MIMAT0029904
mmu-miR-129b-5p	MIMAT0029862
mmu-miR-130c	MIMAT0025132
mmu-miR-133b-5p	MIMAT0017083
mmu-miR-133c	MIMAT0025078
mmu-miR-139-5p	MIMAT0000656
mmu-miR-140-3p	MIMAT0000152
mmu-miR-142a-3p	MIMAT0000155
mmu-miR-142b	MIMAT0031402
mmu-miR-146a-5p	MIMAT0000158
mmu-miR-146b-5p	MIMAT0003475
mmu-miR-147-3p	MIMAT0004857
mmu-miR-150-3p	MIMAT0004535
mmu-miR-150-5p	MIMAT0000160
mmu-miR-154-3p	MIMAT0004537
mmu-miR-15b-5p	MIMAT0000124
mmu-miR-16-5p	MIMAT0000527
mmu-miR-1668	MIMAT0031414
mmu-miR-185-5p	MIMAT0000214
mmu-miR-187-5p	MIMAT0016997
mmu-miR-1894-5p	MIMAT0007877
mmu-miR-1903	MIMAT0007868
mmu-miR-191-5p	MIMAT0000221
mmu-miR-194-2-3p	MIMAT0017073
mmu-miR-1943-3p	MIMAT0017342
mmu-miR-1955-5p	MIMAT0009426
mmu-miR-1969	MIMAT0009442
mmu-miR-1982-5p	MIMAT0009459
mmu-miR-200a-3p	MIMAT0000519
mmu-miR-216b-3p	MIMAT0017233
mmu-miR-216c-3p	MIMAT0029889
mmu-miR-21a-5p	MIMAT0000530
mmu-miR-22-3p	MIMAT0000531
mmu-miR-221-3p	MIMAT0000669
mmu-miR-223-3p	MIMAT0000665
mmu-miR-223-5p	MIMAT0017056
mmu-miR-23a-3p	MIMAT0000532
mmu-miR-24-3p	MIMAT0000219
mmu-miR-25-3p	MIMAT0000652
mmu-miR-26a-5p	MIMAT0000533
mmu-miR-26b-5p	MIMAT0000534

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-27a-3p	MIMAT0000537
mmu-miR-292a-3p	MIMAT0000370
mmu-miR-294-5p	MIMAT0004574
mmu-miR-295-3p	MIMAT0000373
mmu-miR-299b-3p	MIMAT0022837
mmu-miR-29a-3p	MIMAT0000535
mmu-miR-29c-3p	MIMAT0000536
mmu-miR-3058-3p	MIMAT0014814
mmu-miR-3059-3p	MIMAT0014812
mmu-miR-3076-3p	MIMAT0014861
mmu-miR-3077-5p	MIMAT0014862
mmu-miR-3079-5p	MIMAT0014866
mmu-miR-3086-3p	MIMAT0014881
mmu-miR-3086-5p	MIMAT0014880
mmu-miR-3092-3p	MIMAT0014906
mmu-miR-3092-5p	MIMAT0014905
mmu-miR-30a-5p	MIMAT0000128
mmu-miR-30c-5p	MIMAT0000514
mmu-miR-30e-5p	MIMAT0000248
mmu-miR-30f	MIMAT0025179
mmu-miR-3101-3p	MIMAT0014922
mmu-miR-3102-5p	MIMAT0014933
mmu-miR-3110-5p	MIMAT0014951
mmu-miR-322-5p	MIMAT0000548
mmu-miR-326-3p	MIMAT0000559
mmu-miR-338-3p	MIMAT0000582
mmu-miR-339-5p	MIMAT0000584
mmu-miR-344g-3p	MIMAT0014930
mmu-miR-344g-5p	MIMAT0014929
mmu-miR-345-5p	MIMAT0000595
mmu-miR-3473c	MIMAT0020614
mmu-miR-3569-3p	MIMAT0029855
mmu-miR-365-2-5p	MIMAT0017179
mmu-miR-374b-5p	MIMAT0003727
mmu-miR-378b	MIMAT0019348
mmu-miR-380-5p	MIMAT0000744
mmu-miR-412-3p	MIMAT0001094
mmu-miR-425-5p	MIMAT0004750
mmu-miR-466d-3p	MIMAT0004931
mmu-miR-466i-3p	MIMAT0005834
mmu-miR-466n-3p	MIMAT0014894
mmu-miR-466q	MIMAT0020631
mmu-miR-467d-3p	MIMAT0004887
mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206
mmu-miR-487b-5p	MIMAT0017216
mmu-miR-5106	MIMAT0020613
mmu-miR-5110	MIMAT0020618
mmu-miR-5128	MIMAT0020639
mmu-miR-582-3p	MIMAT0005292
mmu-miR-615-3p	MIMAT0003783
mmu-miR-615-5p	MIMAT0004837

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-6335	MIMAT0025077
mmu-miR-6339	MIMAT0025082
mmu-miR-6345	MIMAT0025088
mmu-miR-6348	MIMAT0025091
mmu-miR-6351	MIMAT0025094
mmu-miR-6352	MIMAT0025095
mmu-miR-6354	MIMAT0025097
mmu-miR-6356	MIMAT0025099
mmu-miR-6376	MIMAT0025120
mmu-miR-6415	MIMAT0025169
mmu-miR-6418-3p	MIMAT0025174
mmu-miR-652-3p	MIMAT0003711
mmu-miR-653-5p	MIMAT0004943
mmu-miR-6538	MIMAT0025583
mmu-miR-664-3p	MIMAT0012774
mmu-miR-669b-5p	MIMAT0003476
mmu-miR-669d-2-3p	MIMAT0014884
mmu-miR-670-5p	MIMAT0003736
mmu-miR-672-3p	MIMAT0017241
mmu-miR-673-5p	MIMAT0003739
mmu-miR-676-3p	MIMAT0003782
mmu-miR-678	MIMAT0003452
mmu-miR-684	MIMAT0003462
mmu-miR-6898-5p	MIMAT0027696
mmu-miR-6906-3p	MIMAT0027713
mmu-miR-6910-3p	MIMAT0027721
mmu-miR-6918-5p	MIMAT0027736
mmu-miR-6919-5p	MIMAT0027738
mmu-miR-6921-5p	MIMAT0027742
mmu-miR-6922-3p	MIMAT0027745
mmu-miR-6924-3p	MIMAT0027749
mmu-miR-6927-5p	MIMAT0027754
mmu-miR-6928-3p	MIMAT0027757
mmu-miR-6933-5p	MIMAT0027766
mmu-miR-6934-5p	MIMAT0027768
mmu-miR-6943-5p	MIMAT0027786
mmu-miR-6946-5p	MIMAT0027792
mmu-miR-6948-3p	MIMAT0027797
mmu-miR-6953-5p	MIMAT0027806
mmu-miR-6958-3p	MIMAT0027817
mmu-miR-6969-3p	MIMAT0027841
mmu-miR-697	MIMAT0003487
mmu-miR-6976-3p	MIMAT0027855
mmu-miR-6983-5p	MIMAT0027868
mmu-miR-6985-3p	MIMAT0027873
mmu-miR-6990-3p	MIMAT0027883
mmu-miR-6995-3p	MIMAT0027893
mmu-miR-6998-5p	MIMAT0027898
mmu-miR-7002-5p	MIMAT0027906
mmu-miR-7005-5p	MIMAT0027914
mmu-miR-7007-5p	MIMAT0027918

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-7008-3p	MIMAT0027921
mmu-miR-7009-3p	MIMAT0027923
mmu-miR-701-3p	MIMAT0017257
mmu-miR-7014-5p	MIMAT0027932
mmu-miR-7015-5p	MIMAT0027934
mmu-miR-7016-5p	MIMAT0027936
mmu-miR-7017-3p	MIMAT0027939
mmu-miR-7020-5p	MIMAT0027944
mmu-miR-7022-3p	MIMAT0027949
mmu-miR-7027-3p	MIMAT0027959
mmu-miR-7030-3p	MIMAT0027965
mmu-miR-7032-5p	MIMAT0027968
mmu-miR-7035-3p	MIMAT0027975
mmu-miR-7035-5p	MIMAT0027974
mmu-miR-7046-5p	MIMAT0027996
mmu-miR-7047-3p	MIMAT0027999
mmu-miR-7049-5p	MIMAT0028002
mmu-miR-7052-5p	MIMAT0028008
mmu-miR-7060-3p	MIMAT0028025
mmu-miR-7066-3p	MIMAT0028037
mmu-miR-7068-3p	MIMAT0028043
mmu-miR-7069-5p	MIMAT0028044
mmu-miR-7070-5p	MIMAT0028046
mmu-miR-7071-3p	MIMAT0028049
mmu-miR-7082-3p	MIMAT0028071
mmu-miR-7089-5p	MIMAT0028084
mmu-miR-7117-3p	MIMAT0028132
mmu-miR-712-3p	MIMAT0003743
mmu-miR-712-5p	MIMAT0003502
mmu-miR-714	MIMAT0003505
mmu-miR-7210-5p	MIMAT0028388
mmu-miR-7225-3p	MIMAT0028419
mmu-miR-7226-3p	MIMAT0028421
mmu-miR-7237-3p	MIMAT0028443
mmu-miR-7238-3p	MIMAT0028445
mmu-miR-7240-3p	MIMAT0028449
mmu-miR-7240-5p	MIMAT0028448
mmu-miR-760-3p	MIMAT0003898
mmu-miR-762	MIMAT0003892
mmu-miR-7647-5p	MIMAT0029796
mmu-miR-7648-5p	MIMAT0029798
mmu-miR-7653-3p	MIMAT0029813
mmu-miR-7658-3p	MIMAT0029823
mmu-miR-7659-5p	MIMAT0029824
mmu-miR-7664-3p	MIMAT0029835
mmu-miR-7668-3p	MIMAT0029843
mmu-miR-7669-5p	MIMAT0029844
mmu-miR-7677-3p	MIMAT0029869
mmu-miR-7684-3p	MIMAT0029891
mmu-miR-7685-3p	MIMAT0029897
mmu-miR-7689-3p	MIMAT0029909

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-8112	MIMAT0031418
mmu-miR-877-3p	MIMAT0004862
mmu-miR-879-3p	MIMAT0004843
mmu-miR-93-5p	MIMAT0000540
mmu_piR_000159/gb/DQ539904/ Mus_musculus:2:73668844:73668871:Plus	GenBank:DQ539904
mmu_piR_000580/gb/DQ540862/ Mus_musculus:11:106317126:106317155:Plus	GenBank:DQ540862
mmu_piR_000935/gb/DQ541777/ Mus_musculus:6:47717737:47717766:Minus	GenBank:DQ541777
mmu_piR_001071/gb/DQ542279/ Mus_musculus:5:115384197:115384225:Minus	GenBank:DQ542279
mmu_piR_001662/gb/DQ544105/ Mus_musculus:2:151104333:151104361:Minus	GenBank:DQ544105
mmu_piR_003770/gb/DQ550765/ Mus_musculus:15:82977530:82977560:Plus	GenBank:DQ550765
mmu_piR_004265/gb/DQ552333/ Mus_musculus:11:103253603:103253633:Plus	GenBank:DQ552333
mmu_piR_004919/gb/DQ554400/ Mus_musculus:8:95081734:95081762:Plus	GenBank:DQ554400
mmu_piR_005046/gb/DQ554933/ Mus_musculus:15:78492641:78492670:Minus	GenBank:DQ554933
mmu_piR_008899/gb/DQ568790/ Mus_musculus:9:67535016:67535044:Plus	GenBank:DQ568790
mmu_piR_013680/gb/DQ691499/ Mus_musculus:14:22937260:22937289:Plus	GenBank:DQ691499
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	GenBank:DQ694298
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	GenBank:DQ694629
mmu_piR_022202/gb/DQ704066/ Mus_musculus:2:151097288:151097315:Minus	GenBank:DQ704066
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:150950762:150950792:Minus	GenBank:DQ706399
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	GenBank:DQ706399
mmu_piR_027673/gb/DQ711996/ Mus_musculus:11:106317081:106317102:Plus	GenBank:DQ711996
mmu_piR_035343/gb/DQ723106/ Mus_musculus:18:67167171:67167200:Minus	GenBank:DQ723106
mmu_piR_035358/gb/DQ723132/ Mus_musculus:6:127759806:127759831:Minus	GenBank:DQ723132
mmu_piR_036137/gb/DQ724278/ Mus_musculus:13:50672062:50672091:Minus	GenBank:DQ724278
mmu_piR_036363/gb/DQ724592/ Mus_musculus:4:42628661:42628691:Minus	GenBank:DQ724592

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-7043-3p	MIMAT0027991
mmu-miR-6350	MIMAT0025093
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	GenBank:DQ707536
mmu_piR_019674/gb/DQ700348/ Mus_musculus:17:66125541:66125571:Plus	GenBank:DQ700348
mmu-miR-466c-5p	MIMAT0004877
mmu-miR-5618-3p	MIMAT0022364
mmu-miR-6972-3p	MIMAT0027847
mmu-miR-1a-2-5p	MIMAT0017047
mmu-miR-3077-3p	MIMAT0014863
mmu-miR-7116-5p	MIMAT0028129
mmu-miR-6937-5p	MIMAT0027774
mmu-miR-195b	MIMAT0025076
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	GenBank:DQ700914
mmu-miR-7090-5p	MIMAT0028086
mmu-miR-6355	MIMAT0025098
mmu-miR-705	MIMAT0003495
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:16:57312815:57312840:Minus	GenBank:DQ698371
mmu-miR-6925-3p	MIMAT0027751
mmu-miR-669o-5p	MIMAT0009421
mmu-miR-410-3p	MIMAT0001091
mmu-miR-1952	MIMAT0009423
mmu-miR-1941-5p	MIMAT0009405
mmu-miR-741-3p	MIMAT0004236
mmu-miR-1b-3p	MIMAT0017326
mmu_piR_000578/gb/DQ540853/ Mus_musculus:17:39456112:39456137:Plus	GenBank:DQ540853
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:14:49387992:49388017:Plus	GenBank:DQ698371
mmu-miR-6238	MIMAT0024859
mmu_piR_024652/gb/DQ707642/ Mus_musculus:12:98810616:98810645:Minus	GenBank:DQ707642
mmu-miR-881-3p	MIMAT0004846
mmu-miR-669j	MIMAT0005838
mmu-miR-3070-5p	MIMAT0014846
mmu_piR_002643/gb/DQ547181/ Mus_musculus:3:5843705:5843732:Plus	GenBank:DQ547181
mmu-miR-6336	MIMAT0025079
mmu-miR-206-5p	MIMAT0017004
mmu-miR-8120	MIMAT0031426
mmu-miR-3618-3p	MIMAT0035717
mmu-miR-1264-5p	MIMAT0014802
mmu-miR-384-5p	MIMAT0004745
mmu-miR-3962	MIMAT0019340
mmu-miR-3963	MIMAT0019341
mmu-miR-5709-5p	MIMAT0022504
mmu-miR-3069-5p	MIMAT0014844

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-7034-5p	MIMAT0027972
mmu_piR_004374/gb/DQ552696/ Mus_musculus:18:85832427:85832456:Minus	GenBank:DQ552696
mmu-miR-181b-1-3p	MIMAT0017067
mmu-miR-105	MIMAT0004856
mmu-miR-3082-3p	MIMAT0014873
mmu-miR-195a-5p	MIMAT0000225
mmu-miR-7241-3p	MIMAT0028451
mmu-miR-153-3p	MIMAT0000163
mmu-miR-20a-3p	MIMAT0004627
mmu-miR-290a-5p	MIMAT0000366
mmu-miR-551b-5p	MIMAT0017236

10

【表 5】

表 5

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-1224-3p	MIMAT0017231
mmu-miR-449c-5p	MIMAT0003460
mmu-miR-450a-1-3p	MIMAT0017182
mmu-miR-465a-5p	MIMAT0002106
mmu-miR-467e-3p	MIMAT0005294
mmu-miR-6972-3p	MIMAT0027847
mmu-miR-7064-3p	MIMAT0028033
mmu_piR_004956/gb/DQ554593/ Mus_musculus:3:122811404:122811432:Minus	GenBank:DQ554593

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-let-7f-1-3p	MIMAT0004623
mmu-miR-100-3p	MIMAT0017051
mmu-miR-143-3p	MIMAT0000247
mmu-miR-154-3p	MIMAT0004537
mmu-miR-15a-3p	MIMAT0004624
mmu-miR-187-5p	MIMAT0016997
mmu-miR-299a-3p	MIMAT0004577
mmu-miR-3074-2-3p	MIMAT0014946
mmu-miR-3086-5p	MIMAT0014880
mmu-miR-3094-3p	MIMAT0014910
mmu-miR-344e-5p/mmu-miR-344h-5p	MIMAT0014923 MIMAT0022383
mmu-miR-344i	MIMAT0022503
mmu-miR-345-5p	MIMAT0000595
mmu-miR-347l	MIMAT0015642
mmu-miR-374b-5p	MIMAT0003727
mmu-miR-380-5p	MIMAT0000744
mmu-miR-450b-3p	MIMAT0003512
mmu-miR-466b-3p/mmu-miR-466c-3p/ mmu-miR-466p-3p	MIMAT0004876 MIMAT0004878 MIMAT0014892
mmu-miR-466d-5p	MIMAT0004930
mmu-miR-466g	MIMAT0004883
mmu-miR-466q	MIMAT0020631
mmu-miR-467d-5p	MIMAT0004886
mmu-miR-467h	MIMAT0005855
mmu-miR-5618-3p	MIMAT0022364
mmu-miR-6348	MIMAT0025091
mmu-miR-6411	MIMAT0025164
mmu-miR-652-3p	MIMAT0003711
mmu-miR-669a-3p/mmu-miR-669o-3p	MIMAT0017243 MIMAT0017347
mmu-miR-669b-5p	MIMAT0003476
mmu-miR-669k-3p	MIMAT0005831
mmu-miR-669k-5p	MIMAT0017323
mmu-miR-6910-3p	MIMAT0027721
mmu-miR-6958-3p	MIMAT0027817
mmu-miR-6995-3p	MIMAT0027893
mmu-miR-7007-3p	MIMAT0027919
mmu-miR-701-3p	MIMAT0017257
mmu-miR-7021-3p	MIMAT0027947
mmu-miR-7033-3p	MIMAT0027971
mmu-miR-7037-3p	MIMAT0027979
mmu-miR-7043-3p	MIMAT0027991
mmu-miR-7043-5p	MIMAT0027990
mmu-miR-7046-5p	MIMAT0027996
mmu-miR-7061-3p	MIMAT0028027
mmu-miR-7066-3p	MIMAT0028037
mmu-miR-7066-5p	MIMAT0028036
mmu-miR-7075-3p	MIMAT0028057
mmu-miR-7083-3p	MIMAT0028073
mmu-miR-7089-3p	MIMAT0028085
mmu-miR-7115-3p	MIMAT0028128

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-7222-3p	MIMAT0028413
mmu-miR-7225-3p	MIMAT0028419
mmu-miR-7666-3p	MIMAT0029839
mmu-miR-7678-3p	MIMAT0029871
mmu-miR-7685-3p	MIMAT0029897
mmu_piR_000219/gb/DQ540058/ Mus_musculus:17:39455665:39455691:Plus	GenBank:DQ540058
mmu_piR_000619/gb/DQ540976/ Mus_musculus:17:39454691:39454717:Plus	GenBank:DQ540976
mmu_piR_000639/gb/DQ541113/ Mus_musculus:17:39455268:39455298:Plus	GenBank:DQ541113
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:11:74136081:74136106:Plus	GenBank:DQ541218
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:8:126472331:126472356:Minus	GenBank:DQ541218
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:2:5296574:5296603:Minus	GenBank:DQ543701
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:3:5843412:5843441:Plus	GenBank:DQ543701
mmu_piR_008386/gb/DQ567246/ Mus_musculus:11:105872236:105872266:Plus	GenBank:DQ567246
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	GenBank:DQ694298
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	GenBank:DQ694629
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	GenBank:DQ700914
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	GenBank:DQ706399
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	GenBank:DQ707536

10

20

30

【請求項 2】

前記バイオマーカーが、被検対象の入眠時刻において採取された唾液試料中のものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 3】

前記バイオマーカーが、表 3 及び表 4 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものである、請求項 2 に記載の使用。

【請求項 4】

前記バイオマーカーが、被検対象の起床時刻において採取された唾液試料中のものである、請求項 1 に記載の使用。

40

【請求項 5】

前記バイオマーカーが、表 5 及び表 6 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものであり、請求項 4 に記載の使用。

【請求項 6】

前記睡眠障害が、概日リズム睡眠障害又はストレス性睡眠障害である、請求項 1 ～ 5 の何れか一項に記載の使用。

【請求項 7】

被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するための方法であって、

前記被検対象から採取された唾液試料における、請求項 1 ～ 6 の何れか一項において定

50

義されるバイオマーカーの量を測定する工程、

前記被検対象由来のバイオマーカーの量を、コントロール対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量と比較する工程、及び

前記被検対象由来のバイオマーカーの量が、前記コントロール対象由来のバイオマーカーの量よりと比較して有意差がある場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び／又は重症であると判定及び／又は評価される工程

を含む、方法。

【請求項 8】

前記バイオマーカーが、表 1 に記載されるものであるとき、CE-FTMS 解析によって測定されるものであり、表 2 に記載されるものであるとき、LC-TOFMS 解析によって測定されるものであり、及び／又は表 3 ～ 表 6 に記載されるものであるとき、次世代シーケンス解析によって測定されるものである、請求項 7 に記載の方法。

10

【請求項 9】

被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するためのプログラムであって、

以下の手順 (1) 及び (2) をコンピュータに実行させるためのプログラム：

(1) 前記被検対象から採取された唾液試料における請求項 1 ～ 6 の何れか一項において定義されるバイオマーカーの量の入力された測定データ、及びコントロール対象から採取された唾液試料におけるバイオマーカーの量の入力された測定データに基づき、被検対象由来の測定データとコントロール対象由来の測定データとの間で有意差があるかどうかを算出する手順、

20

(2) 前記算出した結果、両者の測定データの間で有意差があった場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び／又は重症であるとの判定及び／又は評価を表示する手順。

【請求項 10】

被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するためのキットであって、前記被検対象から採取された唾液試料における請求項 1 ～ 6 の何れか一項において定義されるバイオマーカーの量を測定するための試薬を含み、

前記試薬が、表 3 ～ 6 に記載される少なくとも 1 つのマイクロRNA 若しくはそれらのマイクロRNA に相当するヒトでのマイクロRNA を特異的に検出する核酸プローブ及び／又は核酸プライマー

30

を含む、キット。

【請求項 11】

睡眠障害の治療薬をスクリーニングする方法及び／又は評価方法であって、

治療薬の候補物質を投与された睡眠障害を有する対象から採取された唾液試料における請求項 1 ～ 6 の何れか一項において定義されるバイオマーカーの量を測定する工程、

睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較する、又は睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較する工程、及び

40

睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合又は睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合、前記候補物質が睡眠障害の治療薬として有効であると評価される工程

を含む、スクリーニングする方法及び／又は評価方法。

【発明の詳細な説明】

50

【技術分野】

【0001】

本発明は、唾液中の睡眠障害バイオマーカーや、このバイオマーカーを用いた睡眠障害の病状や重症度を判定・評価するための方法、睡眠障害を判定するためのプログラム、睡眠障害を判定するための検査キット、並びに睡眠障害の治療薬のスクリーニング及び評価方法に関する。

【背景技術】

【0002】

睡眠障害は、精神疾患や代謝性疾患の重要なリスクファクターとして認識されており、世界的な社会問題となっている。

10

【0003】

血中や糞便中における睡眠障害のバイオマーカー候補分子に関しては既にいくつか報告がある。例えば、マウスにおける糞便中の菌叢と徐波睡眠との関連や（非特許文献1）、ラット及びヒトにおける血中の断眠のバイオマーカー候補分子（非特許文献2）、睡眠とサーカディアンリズムに関するバイオマーカー（非特許文献3）、不眠症患者におけるMRSによる脳内代謝物への影響（非特許文献4）、血液、糞便、尿における睡眠・不眠症のメタボロミクス解析（非特許文献5、6）、ヒトにおける断眠、血漿メタボローム解析（非特許文献7）、家族性の糖尿病素因を有するヒトにおける睡眠制限、血漿メタボローム解析（非特許文献8）に関しての報告が行われている。しかしながら、これらはいずれも血中や糞便中のバイオマーカーに関する報告であり、これまでのところ唾液を用いた慢性的な睡眠障害のバイオマーカーに関する報告はほとんど無かった。

20

【0004】

本発明者らは、これまでに睡眠障害モデルマウスを開発し、この睡眠障害モデルマウスを用いた睡眠障害の解析を進めている（非特許文献9～13）。この睡眠障害モデルマウスは、長期間にわたって睡眠障害が継続されるヒトの慢性的な不眠症モデルであり、本発明者らはこれまでに、この睡眠障害モデルマウスには、過食や糖代謝異常、認知機能の低下、不安情動の亢進などが認められることを報告している。

そして、本発明者らは、この睡眠障害モデルマウスを用いて、これまでに血中や尿中の塩、アミノ酸、脂質、糖質、アミン、アミド、ペプチン、カルボニル化合物、ヒドロキシカルボニル化合物、グリセロール、クレアチン、ならびに、タンパク質および核酸およびそれらの分解物を睡眠障害マーカーとして用いることができることや（特許文献1）、血中や臓器中のHSPA1a又はその遺伝子を睡眠障害マーカーとして用いることができることをこれまでに開示している（特許文献2）。

30

【0005】

唾液試料を用いたメタボローム解析やmiRNAseq(マイクロRNAシーケンス解析)、フローラ解析などによるバイオマーカーの探索は、これまでに口腔内疾患や各種の癌、アルツハイマー病や生活習慣病などの診断につながる可能性が報告されている。

睡眠促進作用をもつ松果体ホルモンであるメラトニンは、唾液中でも検出できるが、メラトニン自体が慢性的な睡眠障害のバイオマーカーとなるものとは考えられていない。また、睡眠評価用マーカーとして、尿中や唾液中のN-アセチルヒスタミン、アラントイン酸、テアニン、アンセリン、タウリン及びヒポタウリンを用いることについて開示されているのみであった（特許文献3）。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】特開2014-085214号公報

【特許文献2】特開2013-255481号公報

【特許文献3】特開2018-009986号公報

【特許文献4】特開2013-181005号公報

【非特許文献】

50

【 0 0 0 7 】

【非特許文献 1】Sci. Rep., 2020;10(1):19554

【非特許文献 2】Proc Natl Acad Sci U S A., 2015;112(8):2569-74

【非特許文献 3】Current Sleep Medicine Reports, 2015;1:38-46

【非特許文献 4】PLoS One., 2016;11(6):e0156771

【非特許文献 5】Int J Mol Sci., 2020;21(19):7244

【非特許文献 6】Curr Neurol Neurosci Rep., 2017;17(11):89

【非特許文献 7】Proc Natl Acad Sci U S A., 2014;111(29):10761-6

【非特許文献 8】Physiol Behav., 2013;122:25-31

【非特許文献 9】Biochem Biophys Res Commun., 2014;450(1):880-4

10

【非特許文献 10】Biochem Biophys Res Commun., 2018;495(4):2616-2621

【非特許文献 11】J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)., 2019;65(2):164-170

【非特許文献 12】Nutrition., Jul-Aug 2020;75-76:110751

【非特許文献 13】Biochem Biophys Res Commun., 2020;529(2):175-179

【非特許文献 14】Proc Natl Acad Sci U S A., 2009;106:9890-5

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明は、唾液中の睡眠障害のバイオマーカーを提供すること、このバイオマーカーを用いた睡眠障害の病状や重症度を判定・評価するための方法、睡眠障害を判定するためのプログラム、睡眠障害を判定するための検査キット、並びに睡眠障害の治療薬のスクリーニング及び評価方法を提供することを目的とするものである。

20

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 9 】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討した結果、睡眠障害を有する対象の唾液試料において、特定の代謝産物や特定のマイクロRNAがコントロール対象の唾液試料と比較して増加又は減少していることを見出し、本発明に想到した。

【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 被検対象から採取された唾液試料中における、表 1 及び表 2 に記載される代謝産物からなる群から選択される 1 つ以上の代謝産物、及び / 又は表 3 ~ 表 6 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択される 1 つ以上のマイクロRNA若しくはそれらのマイクロRNAに相当するヒトでのマイクロRNAの、睡眠障害の診断のためのバイオマーカーとしての使用。

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
11-Aminoundecanoic acid	17083	
Lactic acid	612	HMDB0000190, HMDB0001311
Urea	1176	HMDB0000294
3-Indoxylsulfuric acid	10258	HMDB0000682
S-Adenosylmethionine	34755	HMDB0001185
"Homovanillic acid 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid Hydroxyphenyllactic acid"	"1738 348154 9378"	"HMDB0000118 HMDB0000423 HMDB0000755"
3-Hydroxybutyric acid	441	HMDB0000011, HMDB0000357, HMDB0000442
4-Aminohippuric acid	2148	HMDB0001867
N-Formylmethionine	439750	HMDB0001015
N1-Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	440810	HMDB0004194
2-Hydroxybutyric acid	440864	HMDB0000008
Succinic acid	1110	HMDB0000254
Malic acid	525	HMDB0000156, HMDB0000744
"Phenaceturic acid N-(o-Toluoyl)glycine"	"68144 91637"	"HMDB0000821 HMDB0011723"
Allantoin	204	HMDB0000462
N-Acetylhistidine	75619	
7-Methylguanine	11361	HMDB0000897
N1-Methylguanosine	96373	HMDB0001563
Gluconic acid	10690	HMDB0000625
Creatinine	588	HMDB0000562
5-Hydroxypentanoic acid	25945	HMDB0061927
Uridine	6029	HMDB0000296
Guanidoacetic acid	763	HMDB0000128
Imidazole-4-acetic acid	96215	HMDB0002024
Putrescine	1045	HMDB0001414
Thr	6288	HMDB0000167
1-Methyl-4-imidazoleacetic acid	75810	HMDB0002820
6-Aminohexanoic acid	564	HMDB0001901
Gly-Asp	97363	
Isethionic acid	7866	HMDB0003903

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
Methionine sulfoxide	158980	HMDB0002005
N-Acetyl glycine	10972	HMDB0000532
"N-Acetyl leucine-1 Isovaleryl alanine-1"	"70912 129285"	"HMDB0011756 HMDB0000747"
Ser-Glu		
1-Methyladenosine	27476	HMDB0003331
"1-Methylhydantoin Glycine anhydride"	"69217 7817"	"HMDB0003646 "
4-(β-Acetylaminoethyl)imidazole	69602	
Choline	305	HMDB0000097
Histamine	774	HMDB0000870
Hydroxyproline	5810	HMDB0000725
Ala	602	HMDB0000161, HMDB0001310
Mucic acid	3037582	HMDB0000639
N-Acetylputrescine	122356	HMDB0002064
Pipecolic acid	439227	HMDB0000070, HMDB0000716, HMDB0005960
Gluconolactone	7027	HMDB0000150
"Glutaric acid Methylsuccinic acid"	"743 6950476 "	"HMDB0000661 HMDB0001844"
Cysteic acid	72886	HMDB0002757
Muscimol	4266	
Pro	614	HMDB0000162, HMDB0003411
SDMA	169148	HMDB0003334
Nicotinamide riboside	439924	HMDB0000855
Cadaverine	273	HMDB0002322
N8-Acetylspermidine	123689	HMDB0002189
Cysteinesulfinic acid	1549098	HMDB0000996
"2-Hydroxyoctanoic acid 8-Hydroxyoctanoic acid"	"94180 69820"	"HMDB0000711 "
Ascorbic acid	54670067	HMDB0000044
"Glucuronic acid-1 Galacturonic acid-1"	"94715 439215"	"HMDB0000127 HMDB0002545"
Thymine	1135	HMDB0000262
4-Guanidinobutyric acid	500	HMDB0003464
γ-Glu-Lys_divalent	65254	

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
1-Methylnicotinamide	457	HMDB0000699
1H-Imidazole-4-propionic acid	10105257	
ADMA	123831	HMDB0001539
Imidazolelactic acid	793	
Pyruvic acid	1060	HMDB0000243
Decarboxylated S-Adenosylmethionine	439415	HMDB0000988
Met	876	HMDB0000696
Gly	750	HMDB0000123
1-Methylhistamine	3614	HMDB0000898
Carboxymethyllysine	123800	
Glycerophosphocholine	439285	HMDB0000086
Carnitine	85	HMDB0000062
Nω-Methylarginine	132862	
Trimethylamine N-oxide	1145	HMDB0000925
Uracil	1174	HMDB0000300
γ-Butyrobetaine	134	HMDB0001161
"N-Acetylglucosamine N-Acetylmannosamine N-Acetylgalactosamine"	"439174 439281 35717"	"HMDB0000215 HMDB0001129 HMDB0000853"
Tartaric acid	444305	HMDB0000956
Threonic acid	5460407	HMDB0000943
5-Hydroxylysine	3032849	HMDB0000450
3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone	8369	HMDB0030776
γ-Glu-Gly	165527	HMDB0011667
"2-Amino adipic acid O-Acetylhomoserine"	"92136 439389"	"HMDB0000510 "
Dyphylline	3182	
His-Glu	7010583	
β-Hydroxyisovaleric acid	69362	HMDB0000754
"3-(2-Hydroxyphenyl)propionic acid 3-Phenyllactic acid Atrolactic acid p-Methoxyphenylacetic acid m-Ethoxybenzoic acid Tropic acid"	"873 643327 1303 7690 12126 10726"	"HMDB0000748, HMDB0000779 HMDB0002072 "
"4-Methyl-2-oxovaleric	"70 47	"HMDB0000695 HMDB0000491

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid 2-Oxohexanoic acid"	159664"	HMDB0001864"
Asn	236	HMDB0000168, HMDB0033780
2-Oxoglutaric acid	51	HMDB0000208
Spermidine	1102	HMDB0001257
N-Methylputrescine	439791	HMDB0003661
Cystine	595	HMDB0000192
Glycerol 3-phosphate	439162	HMDB0000126
Homoarginine	9085	HMDB0000670
Nicotinic acid	938	HMDB0001488
Gly-Gly	11163	HMDB0011733
2-Hydroxyisobutyric acid	11671	HMDB0000729
Cytosine	597	HMDB0000630
Pilocarpine	5910	HMDB0015217
Citrulline	9750	HMDB0000904

10

20

【表 2】

表 2

バイオマーカー名	PubChem CID	HMDB ID
Kynurenic acid	3845	HMDB0000715
Riboflavin	493570	HMDB0000244
AC(10:0)	10245190	HMDB0000651
"Cortexolone Corticosterone 21-Deoxycortisol"	"440707 5753 92827"	"HMDB0000015 HMDB0001547 HMDB0004030"
1-Oleoyl-glycero-3-phosphocholine-2		
Cholesterol sulfate	65076	HMDB0000653
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	445580	HMDB0002183
1-Palmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine	9547069	HMDB0011503

30

40

50

【表 3 - 1】

表 3

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-let-7e-3p	MIMAT0017016
mmu-let-7j	MIMAT0025123
mmu-miR-103-1-5p	MIMAT0017024
mmu-miR-103-3p	MIMAT0000546
mmu-miR-106b-3p	MIMAT0004582
mmu-miR-10a-5p	MIMAT0000648
mmu-miR-1188-5p	MIMAT0005843
mmu-miR-1224-5p	MIMAT0005460
mmu-miR-1249-5p	MIMAT0014804
mmu-miR-1258-5p	MIMAT0029904
mmu-miR-129b-5p	MIMAT0029862
mmu-miR-130c	MIMAT0025132
mmu-miR-133b-5p	MIMAT0017083
mmu-miR-133c	MIMAT0025078
mmu-miR-139-5p	MIMAT0000656
mmu-miR-140-3p	MIMAT0000152
mmu-miR-142a-3p	MIMAT0000155
mmu-miR-142b	MIMAT0031402
mmu-miR-146a-5p	MIMAT0000158
mmu-miR-146b-5p	MIMAT0003475
mmu-miR-147-3p	MIMAT0004857
mmu-miR-150-3p	MIMAT0004535
mmu-miR-150-5p	MIMAT0000160
mmu-miR-154-3p	MIMAT0004537
mmu-miR-15b-5p	MIMAT0000124
mmu-miR-16-5p	MIMAT0000527
mmu-miR-1668	MIMAT0031414
mmu-miR-185-5p	MIMAT0000214
mmu-miR-187-5p	MIMAT0016997
mmu-miR-1894-5p	MIMAT0007877
mmu-miR-1903	MIMAT0007868
mmu-miR-191-5p	MIMAT0000221
mmu-miR-194-2-3p	MIMAT0017073
mmu-miR-1943-3p	MIMAT0017342
mmu-miR-1955-5p	MIMAT0009426
mmu-miR-1969	MIMAT0009442
mmu-miR-1982-5p	MIMAT0009459
mmu-miR-200a-3p	MIMAT0000519
mmu-miR-216b-3p	MIMAT0017233
mmu-miR-216c-3p	MIMAT0029889
mmu-miR-21a-5p	MIMAT0000530
mmu-miR-22-3p	MIMAT0000531
mmu-miR-221-3p	MIMAT0000669
mmu-miR-223-3p	MIMAT0000665
mmu-miR-223-5p	MIMAT0017056
mmu-miR-23a-3p	MIMAT0000532
mmu-miR-24-3p	MIMAT0000219
mmu-miR-25-3p	MIMAT0000652
mmu-miR-26a-5p	MIMAT0000533
mmu-miR-26b-5p	MIMAT0000534

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-27a-3p	MIMAT0000537
mmu-miR-292a-3p	MIMAT0000370
mmu-miR-294-5p	MIMAT0004574
mmu-miR-295-3p	MIMAT0000373
mmu-miR-299b-3p	MIMAT0022837
mmu-miR-29a-3p	MIMAT0000535
mmu-miR-29c-3p	MIMAT0000536
mmu-miR-3058-3p	MIMAT0014814
mmu-miR-3059-3p	MIMAT0014812
mmu-miR-3076-3p	MIMAT0014861
mmu-miR-3077-5p	MIMAT0014862
mmu-miR-3079-5p	MIMAT0014866
mmu-miR-3086-3p	MIMAT0014881
mmu-miR-3086-5p	MIMAT0014880
mmu-miR-3092-3p	MIMAT0014906
mmu-miR-3092-5p	MIMAT0014905
mmu-miR-30a-5p	MIMAT0000128
mmu-miR-30c-5p	MIMAT0000514
mmu-miR-30e-5p	MIMAT0000248
mmu-miR-30f	MIMAT0025179
mmu-miR-3101-3p	MIMAT0014922
mmu-miR-3102-5p	MIMAT0014933
mmu-miR-3110-5p	MIMAT0014951
mmu-miR-322-5p	MIMAT0000548
mmu-miR-326-3p	MIMAT0000559
mmu-miR-338-3p	MIMAT0000582
mmu-miR-339-5p	MIMAT0000584
mmu-miR-344g-3p	MIMAT0014930
mmu-miR-344g-5p	MIMAT0014929
mmu-miR-345-5p	MIMAT0000595
mmu-miR-3473c	MIMAT0020614
mmu-miR-3569-3p	MIMAT0029855
mmu-miR-365-2-5p	MIMAT0017179
mmu-miR-374b-5p	MIMAT0003727
mmu-miR-378b	MIMAT0019348
mmu-miR-380-5p	MIMAT0000744
mmu-miR-412-3p	MIMAT0001094
mmu-miR-425-5p	MIMAT0004750
mmu-miR-466d-3p	MIMAT0004931
mmu-miR-466i-3p	MIMAT0005834
mmu-miR-466n-3p	MIMAT0014894
mmu-miR-466q	MIMAT0020631
mmu-miR-467d-3p	MIMAT0004887
mmu-miR-486a-3p	MIMAT0017206
mmu-miR-487b-5p	MIMAT0017216
mmu-miR-5106	MIMAT0020613
mmu-miR-5110	MIMAT0020618
mmu-miR-5128	MIMAT0020639
mmu-miR-582-3p	MIMAT0005292
mmu-miR-615-3p	MIMAT0003783
mmu-miR-615-5p	MIMAT0004837

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-6335	MIMAT0025077
mmu-miR-6339	MIMAT0025082
mmu-miR-6345	MIMAT0025088
mmu-miR-6348	MIMAT0025091
mmu-miR-6351	MIMAT0025094
mmu-miR-6352	MIMAT0025095
mmu-miR-6354	MIMAT0025097
mmu-miR-6356	MIMAT0025099
mmu-miR-6376	MIMAT0025120
mmu-miR-6415	MIMAT0025169
mmu-miR-6418-3p	MIMAT0025174
mmu-miR-652-3p	MIMAT0003711
mmu-miR-653-5p	MIMAT0004943
mmu-miR-6538	MIMAT0025583
mmu-miR-664-3p	MIMAT0012774
mmu-miR-669b-5p	MIMAT0003476
mmu-miR-669d-2-3p	MIMAT0014884
mmu-miR-670-5p	MIMAT0003736
mmu-miR-672-3p	MIMAT0017241
mmu-miR-673-5p	MIMAT0003739
mmu-miR-676-3p	MIMAT0003782
mmu-miR-678	MIMAT0003452
mmu-miR-684	MIMAT0003462
mmu-miR-6898-5p	MIMAT0027696
mmu-miR-6906-3p	MIMAT0027713
mmu-miR-6910-3p	MIMAT0027721
mmu-miR-6918-5p	MIMAT0027736
mmu-miR-6919-5p	MIMAT0027738
mmu-miR-6921-5p	MIMAT0027742
mmu-miR-6922-3p	MIMAT0027745
mmu-miR-6924-3p	MIMAT0027749
mmu-miR-6927-5p	MIMAT0027754
mmu-miR-6928-3p	MIMAT0027757
mmu-miR-6933-5p	MIMAT0027766
mmu-miR-6934-5p	MIMAT0027768
mmu-miR-6943-5p	MIMAT0027786
mmu-miR-6946-5p	MIMAT0027792
mmu-miR-6948-3p	MIMAT0027797
mmu-miR-6953-5p	MIMAT0027806
mmu-miR-6958-3p	MIMAT0027817
mmu-miR-6969-3p	MIMAT0027841
mmu-miR-697	MIMAT0003487
mmu-miR-6976-3p	MIMAT0027855
mmu-miR-6983-5p	MIMAT0027868
mmu-miR-6985-3p	MIMAT0027873
mmu-miR-6990-3p	MIMAT0027883
mmu-miR-6995-3p	MIMAT0027893
mmu-miR-6998-5p	MIMAT0027898
mmu-miR-7002-5p	MIMAT0027906
mmu-miR-7005-5p	MIMAT0027914
mmu-miR-7007-5p	MIMAT0027918

10

20

30

40

50

【表 3 - 4】

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-7008-3p	MIMAT0027921
mmu-miR-7009-3p	MIMAT0027923
mmu-miR-701-3p	MIMAT0017257
mmu-miR-7014-5p	MIMAT0027932
mmu-miR-7015-5p	MIMAT0027934
mmu-miR-7016-5p	MIMAT0027936
mmu-miR-7017-3p	MIMAT0027939
mmu-miR-7020-5p	MIMAT0027944
mmu-miR-7022-3p	MIMAT0027949
mmu-miR-7027-3p	MIMAT0027959
mmu-miR-7030-3p	MIMAT0027965
mmu-miR-7032-5p	MIMAT0027968
mmu-miR-7035-3p	MIMAT0027975
mmu-miR-7035-5p	MIMAT0027974
mmu-miR-7046-5p	MIMAT0027996
mmu-miR-7047-3p	MIMAT0027999
mmu-miR-7049-5p	MIMAT0028002
mmu-miR-7052-5p	MIMAT0028008
mmu-miR-7060-3p	MIMAT0028025
mmu-miR-7066-3p	MIMAT0028037
mmu-miR-7068-3p	MIMAT0028043
mmu-miR-7069-5p	MIMAT0028044
mmu-miR-7070-5p	MIMAT0028046
mmu-miR-7071-3p	MIMAT0028049
mmu-miR-7082-3p	MIMAT0028071
mmu-miR-7089-5p	MIMAT0028084
mmu-miR-7117-3p	MIMAT0028132
mmu-miR-712-3p	MIMAT0003743
mmu-miR-712-5p	MIMAT0003502
mmu-miR-714	MIMAT0003505
mmu-miR-7210-5p	MIMAT0028388
mmu-miR-7225-3p	MIMAT0028419
mmu-miR-7226-3p	MIMAT0028421
mmu-miR-7237-3p	MIMAT0028443
mmu-miR-7238-3p	MIMAT0028445
mmu-miR-7240-3p	MIMAT0028449
mmu-miR-7240-5p	MIMAT0028448
mmu-miR-760-3p	MIMAT0003898
mmu-miR-762	MIMAT0003892
mmu-miR-7647-5p	MIMAT0029796
mmu-miR-7648-5p	MIMAT0029798
mmu-miR-7653-3p	MIMAT0029813
mmu-miR-7658-3p	MIMAT0029823
mmu-miR-7659-5p	MIMAT0029824
mmu-miR-7664-3p	MIMAT0029835
mmu-miR-7668-3p	MIMAT0029843
mmu-miR-7669-5p	MIMAT0029844
mmu-miR-7677-3p	MIMAT0029869
mmu-miR-7684-3p	MIMAT0029891
mmu-miR-7685-3p	MIMAT0029897
mmu-miR-7689-3p	MIMAT0029909

10

20

30

40

50

【表 3 - 5】

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-8112	MIMAT0031418
mmu-miR-877-3p	MIMAT0004862
mmu-miR-879-3p	MIMAT0004843
mmu-miR-93-5p	MIMAT0000540
mmu_piR_000159/gb/DQ539904/ Mus_musculus:2:73668844:73668871:Plus	GenBank:DQ539904
mmu_piR_000580/gb/DQ540862/ Mus_musculus:11:106317126:106317155:Plus	GenBank:DQ540862
mmu_piR_000935/gb/DQ541777/ Mus_musculus:6:47717737:47717766:Minus	GenBank:DQ541777
mmu_piR_001071/gb/DQ542279/ Mus_musculus:5:115384197:115384225:Minus	GenBank:DQ542279
mmu_piR_001662/gb/DQ544105/ Mus_musculus:2:151104333:151104361:Minus	GenBank:DQ544105
mmu_piR_003770/gb/DQ550765/ Mus_musculus:15:82977530:82977560:Plus	GenBank:DQ550765
mmu_piR_004265/gb/DQ552333/ Mus_musculus:11:103253603:103253633:Plus	GenBank:DQ552333
mmu_piR_004919/gb/DQ554400/ Mus_musculus:8:95081734:95081762:Plus	GenBank:DQ554400
mmu_piR_005046/gb/DQ554933/ Mus_musculus:15:78492641:78492670:Minus	GenBank:DQ554933
mmu_piR_008899/gb/DQ568790/ Mus_musculus:9:67535016:67535044:Plus	GenBank:DQ568790
mmu_piR_013680/gb/DQ691499/ Mus_musculus:14:22937260:22937289:Plus	GenBank:DQ691499
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	GenBank:DQ694298
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	GenBank:DQ694629
mmu_piR_022202/gb/DQ704066/ Mus_musculus:2:151097288:151097315:Minus	GenBank:DQ704066
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:150950762:150950792:Minus	GenBank:DQ706399
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	GenBank:DQ706399
mmu_piR_027673/gb/DQ711996/ Mus_musculus:11:106317081:106317102:Plus	GenBank:DQ711996
mmu_piR_035343/gb/DQ723106/ Mus_musculus:18:67167171:67167200:Minus	GenBank:DQ723106
mmu_piR_035358/gb/DQ723132/ Mus_musculus:6:127759806:127759831:Minus	GenBank:DQ723132
mmu_piR_036137/gb/DQ724278/ Mus_musculus:13:50672062:50672091:Minus	GenBank:DQ724278
mmu_piR_036363/gb/DQ724592/ Mus_musculus:4:42628661:42628691:Minus	GenBank:DQ724592

10

20

30

40

50

【表 4 - 1】

表 4

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-miR-7043-3p	MIMAT0027991
mmu-miR-6350	MIMAT0025093
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	GenBank:DQ707536
mmu_piR_019674/gb/DQ700348/ Mus_musculus:17:66125541:66125571:Plus	GenBank:DQ700348
mmu-miR-466c-5p	MIMAT0004877
mmu-miR-5618-3p	MIMAT0022364
mmu-miR-6972-3p	MIMAT0027847
mmu-miR-1a-2-5p	MIMAT0017047
mmu-miR-3077-3p	MIMAT0014863
mmu-miR-7116-5p	MIMAT0028129
mmu-miR-6937-5p	MIMAT0027774
mmu-miR-195b	MIMAT0025076
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	GenBank:DQ700914
mmu-miR-7090-5p	MIMAT0028086
mmu-miR-6355	MIMAT0025098
mmu-miR-705	MIMAT0003495
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:16:57312815:57312840:Minus	GenBank:DQ698371
mmu-miR-6925-3p	MIMAT0027751
mmu-miR-669o-5p	MIMAT0009421
mmu-miR-410-3p	MIMAT0001091
mmu-miR-1952	MIMAT0009423
mmu-miR-1941-5p	MIMAT0009405
mmu-miR-741-3p	MIMAT0004236
mmu-miR-1b-3p	MIMAT0017326
mmu_piR_000578/gb/DQ540853/ Mus_musculus:17:39456112:39456137:Plus	GenBank:DQ540853
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:14:49387992:49388017:Plus	GenBank:DQ698371
mmu-miR-6238	MIMAT0024859
mmu_piR_024652/gb/DQ707642/ Mus_musculus:12:98810616:98810645:Minus	GenBank:DQ707642
mmu-miR-881-3p	MIMAT0004846
mmu-miR-669j	MIMAT0005838
mmu-miR-3070-5p	MIMAT0014846
mmu_piR_002643/gb/DQ547181/ Mus_musculus:3:5843705:5843732:Plus	GenBank:DQ547181
mmu-miR-6336	MIMAT0025079
mmu-miR-206-5p	MIMAT0017004
mmu-miR-8120	MIMAT0031426
mmu-miR-3618-3p	MIMAT0035717
mmu-miR-1264-5p	MIMAT0014802
mmu-miR-384-5p	MIMAT0004745
mmu-miR-3962	MIMAT0019340
mmu-miR-3963	MIMAT0019341
mmu-miR-5709-5p	MIMAT0022504
mmu-miR-3069-5p	MIMAT0014844

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-7034-5p	MIMAT0027972
mmu_piR_004374/gb/DQ552696/ Mus_musculus:18:85832427:85832456:Minus	GenBank:DQ552696
mmu-miR-181b-1-3p	MIMAT0017067
mmu-miR-105	MIMAT0004856
mmu-miR-3082-3p	MIMAT0014873
mmu-miR-195a-5p	MIMAT0000225
mmu-miR-7241-3p	MIMAT0028451
mmu-miR-153-3p	MIMAT0000163
mmu-miR-20a-3p	MIMAT0004627
mmu-miR-290a-5p	MIMAT0000366
mmu-miR-551b-5p	MIMAT0017236

10

【表 5】

表 5

20

バイオマーカー名	Accession_ID
mmu-miR-1224-3p	MIMAT0017231
mmu-miR-449c-5p	MIMAT0003460
mmu-miR-450a-1-3p	MIMAT0017182
mmu-miR-465a-5p	MIMAT0002106
mmu-miR-467e-3p	MIMAT0005294
mmu-miR-6972-3p	MIMAT0027847
mmu-miR-7064-3p	MIMAT0028033
mmu_piR_004956/gb/DQ554593/ Mus_musculus:3:122811404:122811432:Minus	GenBank:DQ554593

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6

バイオマーカー名	Accession ID
mmu-let-7f-1-3p	MIMAT0004623
mmu-miR-100-3p	MIMAT0017051
mmu-miR-143-3p	MIMAT0000247
mmu-miR-154-3p	MIMAT0004537
mmu-miR-15a-3p	MIMAT0004624
mmu-miR-187-5p	MIMAT0016997
mmu-miR-299a-3p	MIMAT0004577
mmu-miR-3074-2-3p	MIMAT0014946
mmu-miR-3086-5p	MIMAT0014880
mmu-miR-3094-3p	MIMAT0014910
mmu-miR-344e-5p/mmu-miR-344h-5p	MIMAT0014923 MIMAT0022383
mmu-miR-344i	MIMAT0022503
mmu-miR-345-5p	MIMAT0000595
mmu-miR-347l	MIMAT0015642
mmu-miR-374b-5p	MIMAT0003727
mmu-miR-380-5p	MIMAT0000744
mmu-miR-450b-3p	MIMAT0003512
mmu-miR-466b-3p/mmu-miR-466c-3p/ mmu-miR-466p-3p	MIMAT0004876 MIMAT0004878 MIMAT0014892
mmu-miR-466d-5p	MIMAT0004930
mmu-miR-466g	MIMAT0004883
mmu-miR-466q	MIMAT0020631
mmu-miR-467d-5p	MIMAT0004886
mmu-miR-467h	MIMAT0005855
mmu-miR-5618-3p	MIMAT0022364
mmu-miR-6348	MIMAT0025091
mmu-miR-6411	MIMAT0025164
mmu-miR-652-3p	MIMAT0003711
mmu-miR-669a-3p/mmu-miR-669o-3p	MIMAT0017243 MIMAT0017347
mmu-miR-669b-5p	MIMAT0003476
mmu-miR-669k-3p	MIMAT0005831
mmu-miR-669k-5p	MIMAT0017323
mmu-miR-6910-3p	MIMAT0027721
mmu-miR-6958-3p	MIMAT0027817
mmu-miR-6995-3p	MIMAT0027893
mmu-miR-7007-3p	MIMAT0027919
mmu-miR-701-3p	MIMAT0017257
mmu-miR-7021-3p	MIMAT0027947
mmu-miR-7033-3p	MIMAT0027971
mmu-miR-7037-3p	MIMAT0027979
mmu-miR-7043-3p	MIMAT0027991
mmu-miR-7043-5p	MIMAT0027990
mmu-miR-7046-5p	MIMAT0027996
mmu-miR-7061-3p	MIMAT0028027
mmu-miR-7066-3p	MIMAT0028037
mmu-miR-7066-5p	MIMAT0028036
mmu-miR-7075-3p	MIMAT0028057
mmu-miR-7083-3p	MIMAT0028073
mmu-miR-7089-3p	MIMAT0028085
mmu-miR-7115-3p	MIMAT0028128

10

20

30

40

50

【表 6 - 2】

バイオマーカー名	Accession_ID	
mmu-miR-7222-3p	MIMAT0028413	
mmu-miR-7225-3p	MIMAT0028419	
mmu-miR-7666-3p	MIMAT0029839	
mmu-miR-7678-3p	MIMAT0029871	
mmu-miR-7685-3p	MIMAT0029897	
mmu_piR_000219/gb/DQ540058/ Mus_musculus:17:39455665:39455691:Plus	GenBank:DQ540058	10
mmu_piR_000619/gb/DQ540976/ Mus_musculus:17:39454691:39454717:Plus	GenBank:DQ540976	
mmu_piR_000639/gb/DQ541113/ Mus_musculus:17:39455268:39455298:Plus	GenBank:DQ541113	
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:11:74136081:74136106:Plus	GenBank:DQ541218	
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:8:126472331:126472356:Minus	GenBank:DQ541218	
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:2:5296574:5296603:Minus	GenBank:DQ543701	
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:3:5843412:5843441:Plus	GenBank:DQ543701	20
mmu_piR_008386/gb/DQ567246/ Mus_musculus:11:105872236:105872266:Plus	GenBank:DQ567246	
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	GenBank:DQ694298	
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	GenBank:DQ694629	
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	GenBank:DQ700914	
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	GenBank:DQ706399	30
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	GenBank:DQ707536	

〔 2 〕 前記バイオマーカーが、被検対象の入眠時刻において採取された唾液試料中のものである、〔 1 〕に記載の使用。

〔 3 〕 前記バイオマーカーが、表 3 及び表 4 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものである、〔 2 〕に記載の使用。

〔 4 〕 前記バイオマーカーが、被検対象の起床時刻において採取された唾液試料中のものである、〔 1 〕に記載の使用。

〔 5 〕 前記バイオマーカーが、表 5 及び表 6 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものであり、〔 4 〕に記載の使用。

〔 6 〕 前記睡眠障害が、概日リズム睡眠障害又はストレス性睡眠障害である、〔 1 〕～〔 5 〕の何れかに記載の使用。

〔 7 〕 被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するための方法であって、

前記被検対象から採取された唾液試料における、〔 1 〕～〔 6 〕の何れかにおいて定義されるバイオマーカーの量を測定する工程、

前記被検対象由来のバイオマーカーの量を、コントロール対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量と比較する工程、及び

前記被検対象由来のバイオマーカーの量が、前記コントロール対象由来のバイオマーカー

10

20

30

40

50

ーの量よりと比較して有意差がある場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び／又は重症であると判定及び／又は評価される工程を含む、方法。

[8] 前記バイオマーカーが、表 1 に記載されるものであるとき、CE-FTMS解析によって測定されるものであり、表 2 に記載されるものであるとき、LC-TOFMS解析によって測定されるものであり、及び／又は表 3 ～表 6 に記載されるものであるとき、次世代シーケンス解析によって測定されるものである、[7] に記載の方法。

[9] 被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するためのプログラムであって、

以下の手順 (1) 及び (2) をコンピュータに実行させるためのプログラム：

(1) 前記被検対象から採取された唾液試料における [1] ～ [6] の何れかにおいて定義されるバイオマーカーの量の入力された測定データ、及びコントロール対象から採取された唾液試料におけるバイオマーカーの量の入力された測定データに基づき、被検対象由来の測定データとコントロール対象由来の測定データとの間で有意差があるかどうかを算出する手順、

(2) 前記算出した結果、両者の測定データの間で有意差があった場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び／又は重症であるとの判定及び／又は評価を表示する手順。

[10] 被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するためのキットであって、前記被検対象から採取された唾液試料における [1] ～ [6] の何れかにおいて定義されるバイオマーカーの量を測定するための試薬を含み、

前記試薬が、表 3 ～ 6 に記載される少なくとも 1 つのマイクロRNA若しくはそれらのマイクロRNAに相当するヒトでのマイクロRNAを特異的に検出する核酸プローブ及び／又は核酸プライマーを含む、キット。

[11] 睡眠障害の治療薬をスクリーニングする方法及び／又は評価方法であって、

治療薬の候補物質を投与された睡眠障害を有する対象から採取された唾液試料における [1] ～ [6] の何れかにおいて定義されるバイオマーカーの量を測定する工程、

睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較する、又は睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較する工程、及び

睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合又は睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合、前記候補物質が睡眠障害の治療薬として有効であると評価される工程

を含む、スクリーニングする方法及び／又は評価方法。

【発明の効果】

【 0011 】

本発明により、唾液中の代謝産物やマイクロRNAが睡眠障害のバイオマーカーとして使用できることを見出し、さらにこのバイオマーカーを用いた睡眠障害の病状や重症度を判定・評価するための方法、睡眠障害を判定するためのプログラム、睡眠障害を判定するための検査キット、並びに睡眠障害の治療薬のスクリーニング及び評価方法を提供することを可能とした。

【発明を実施するための形態】

【 0012 】

10

20

30

40

50

< 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー >

本発明の一実施態様は、被検対象から採取された唾液試料中における、表 1 及び表 2 に記載される代謝産物からなる群から選択される 1 つ以上の代謝産物、及び / 又は表 3 ~ 表 6 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択される 1 つ以上のマイクロRNA若しくはそれらのマイクロRNAに相当するヒトでのマイクロRNAの、睡眠障害の診断のためのバイオマーカーとしての使用である。

【 0 0 1 3 】

本発明のバイオマーカーは唾液試料中に含まれるものである。唾液試料は被検対象から非侵襲的に採取できるため、被検対象の身体的及び / 又は精神的負担を低減させることができる点が優れている。唾液試料は、1 日のうちのどの時間帯において採取されたものであってもよく、例えば、被検対象の入眠時刻又は起床時刻において採取された唾液試料であってよい。入眠時刻及び起床時刻は被検対象の動物の種類や生活環境、実験環境により異なるが、例えば、マウスであれば 8 : 00 が入眠時刻、20 : 00 が起床時刻としてもよい。

10

唾液の採取方法は特に限定されず、当業者に既知の方法により行うことができる。バイオマーカーが、1 日の間で変動するものである場合は、唾液試料を特定の時間帯に採取することによって、より正確な診断を行うことができる。

【 0 0 1 4 】

唾液試料が、被検対象の入眠時刻において採取されたものであるとき、特に限定されないが、バイオマーカーは、表 3 及び表 4 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものであってもよい。

20

【 0 0 1 5 】

唾液試料が、被検対象の起床時刻において採取されたものであるとき、特に限定されないが、バイオマーカーは、表 5 及び表 6 に記載されるマイクロRNAからなる群から選択されるものであってもよい。

【 0 0 1 6 】

唾液試料は、被検対象から回収された後、任意で前処理を行ってもよく、凍結保存されたものでよく、随時調製されたものでよい。前処理としては、例えば、唾液試料中の任意の内部標準物質の濃度が各試料間で一定になるように調製することであってよく、限外ろ過処理などを行ってもよい。

30

またバイオマーカーがマイクロRNAであるとき、マイクロRNAは当業者に既知の方法により試料から単離することができる。例えば、市販の試薬やキット（例えば、miRNeasy Serum/Plasma Kit（キアゲン））をキットに添付されているプロトコルに従って行うことができる。

【 0 0 1 7 】

各バイオマーカーの測定方法は、そのバイオマーカーを測定できる限り特に限定されないが、バイオマーカーが代謝産物であるとき、例えば、メタボローム解析によって行うことができる。バイオマーカーが、表 1 に記載される代謝産物であるとき、CE-FTMS（キャピラリー電気泳動 - フーリエ変換型質量分析計）解析によって測定することができ、表 2 に記載される代謝産物であるとき、LC-TOFMS（液体クロマトグラフィ - 飛行時間型質量分析計）解析によって測定することができる。

40

また、バイオマーカーがマイクロRNAであるとき、例えば、次世代シーケンス解析により行ってもよく、マイクロアレイ法により行ってもよく、定量PCR法により行ってもよい。いずれの測定方法も当業者に既知の方法により行うことができる。例えば、表 3 ~ 表 6 に記載されるマイクロRNAであるとき、次世代シーケンス解析によって測定することができる。

【 0 0 1 8 】

被検対象は、睡眠障害を発症し得る対象であり、本発明のバイオマーカーを睡眠障害の診断に使用できる限り特に限定されず、典型的にはヒトであるが、イヌやネコなどの愛玩動物、ウシ、ウマ、ブタなどの家畜動物、マウス、ラットなどの実験動物など、どのよう

50

な哺乳動物であってもよい。バイオマーカーがマイクロRNAである場合、表3～6に記載されるマイクロRNAに相当する各哺乳動物でのマイクロRNAを用いることができる。

【0019】

本発明におけるいずれの代謝産物もPubChemやHMDB (The Human Metabolome Database) 等のデータベースに開示されており、またいずれのマイクロRNAもmiRBaseやGenBank等のデータベースに開示されている。

【0020】

本発明において、「睡眠障害」は、米国睡眠障害連合会 (American Sleep Disorders Association) により出版された睡眠障害国際分類：診断および法則マニュアル (International Classification of Sleep Disorders: Diagnostic and Coding and Psychiatric Association) により出版された精神障害分類・診断基準第4版 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders) (1994年) の記述に従って定義できる。

本発明において睡眠障害は、例えば、概日リズム睡眠障害又はストレス性睡眠障害が挙げられる。「ストレス性睡眠障害」は脳へのストレスに起因する睡眠障害であり、「概日リズム睡眠障害」または「サーカディアンリズム睡眠障害」とは、体内時計がその発症にかかわるとされる睡眠障害であり、時差ぼけ、不規則な食生活、精神的ストレスなどの生活習慣が原因となりうると考えられている。「概日リズム睡眠障害」としては、例えば、時差帯域変化 (ジェット時差) 症候群、交代勤務睡眠障害、不規則型睡眠・覚醒パターン、睡眠相後退症候群、睡眠相前進症候群、非24時間型睡眠・覚醒障害、特定不能の概日リズム睡眠障害が挙げられる。

【0021】

睡眠障害の診断は、被検対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量と、コントロール対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量とを比較し、被検対象由来のバイオマーカーの量が、前記コントロール対象由来のバイオマーカーの量と比較して有意差がある場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び/又は重症であると判定及び/又は評価することができるものであってもよい。被検対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量が有意に増加するか、それとも有意に減少するかは、測定するバイオマーカーに依存する。

コントロール対象とは、睡眠障害を有しない対象のことである。

有意差検定は、当業者に既知の検定を使用することができ、例えば、Welchのt検定やStudentのt検定によって行うことができる。有意差があるとは、特に限定されないが、例えば、p値が0.05未満としてもよく、p値が0.01未満としてもよく、p値が0.001未満としてもよい。

睡眠障害の診断は、バイオマーカー1種の測定結果のみに基づくものであっても睡眠障害を有すると判断することができるが、複数のバイオマーカーの測定結果を組み合わせることによって、睡眠障害のより正確な診断及び/又は評価を行うことができる。複数のバイオマーカーとは、例えば、2種以上、3種以上、4種以上、5種以上、6種以上、7種以上、8種以上、9種以上、10種以上、15種以上、20種以上、25種以上、30種以上、35種以上、40種以上であってもよく、また、例えば、50種以下、40種以下、30種以下、20種以下であってもよい。複数のバイオマーカーを用いるときは、複数のバイオマーカーの測定結果に基づきリスクスコアを算出して、そのリスクスコアによって診断を行ってもよい。

【0022】

また、睡眠障害の診断は、予め被検対象と同じ種である健常な哺乳動物 (例えば健常人) の唾液試料中のこれらのバイオマーカーの値を基準値として設定しておけば、被検対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量がその基準値を超えた又は下回った場合に、睡眠障害であると診断することもできる。

【0023】

10

20

30

40

50

< 睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するための方法 >

本発明の他の実施態様は、被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するための方法であって、

前記被検対象から採取された唾液試料における、上述の < 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー > の項に記載する何れか 1 つ以上のバイオマーカーの量を測定する工程、

前記被検対象由来のバイオマーカーの量を、コントロール対象から採取された唾液試料中におけるバイオマーカーの量と比較する工程、及び

前記被検対象由来のバイオマーカーの量が、前記コントロール対象由来のバイオマーカーの量よりと比較して有意差がある場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び / 又は重症であると判定及び / 又は評価される工程

を含む、方法である。

【 0 0 2 4 】

睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するための方法における各記載は、上述の < 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー > の項の記載を援用することができる。

【 0 0 2 5 】

< 睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するためのプログラム >

本発明の他の実施態様は、被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するためのプログラムであって、

以下の手順 (1) 及び (2) をコンピュータに実行させるためのプログラム :

(1) 前記被検対象から採取された唾液試料における上述の < 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー > の項に記載する何れか 1 つ以上のバイオマーカーの量の入力された測定データ、及びコントロール対象から採取された唾液試料におけるバイオマーカーの量の入力された測定データに基づき、被検対象由来の測定データとコントロール対象由来の測定データとの間で有意差があるかどうかを算出する手順、

(2) 前記算出した結果、両者の測定データの間で有意差があった場合に、被検対象が睡眠障害を有する及び / 又は重症であるとの判定及び / 又は評価を表示する手順。

【 0 0 2 6 】

このプログラムは、さらに、測定データを入力する手順を含んでもよい。

【 0 0 2 7 】

このプログラムのコンピュータへの実装方法は、当業者に既知の方法により行うことができる。例えば、上述のプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を介して、コンピュータに実装することができる。

【 0 0 2 8 】

睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するためのプログラムにおける各記載は、上述の < 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー > の項の記載を援用することができる。

【 0 0 2 9 】

< 睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するためのキット >

本発明の他の実施態様は、被検対象における睡眠障害の病状又は重症度を判定及び / 又は評価するためのキットであって、前記被検対象から採取された唾液試料における上述の < 睡眠障害の診断のためのバイオマーカー > の項に記載する何れか 1 つ以上のバイオマーカーの量を測定するための試薬を含み、

前記試薬が、表 3 ~ 6 に記載される少なくとも 1 つのマイクロRNA若しくはそれらのマイクロRNAに相当するヒトでのマイクロRNAを特異的に検出する核酸プローブ及び / 又は核酸プライマー

を含む、キットである。

【 0 0 3 0 】

マイクロRNA又はその相補的核酸を特異的に検出し得る核酸プローブとしては、例えば、当該マイクロRNAのヌクレオチド配列の一部又は全部に相補的な 10 塩基以上 (例えば、10 ~ 24 塩基、好ましくは 15 ~ 24 塩基) の連続したヌクレオチド配列又はその相補

10

20

30

40

50

配列を含

み、当該マイクロRNA又はその相補的核酸にハイブリダイズすることが可能なポリヌクレオチドを挙げることができる。そのような核酸プローブは、本明細書に記載されたマイクロRNAの情報等に基づいて、既知の方法により適宜設計することができ、または市販の核酸プローブを用いることもできる。

マイクロRNAを特異的に検出する核酸プライマーは、マイクロRNA又はその相補的核酸のヌクレオチド配列の一部又は全部の領域を特異的に増幅し得るように設計されたものである限り、いかなる配列を有するものであってもよい。

【0031】

核酸プローブ及び／又は核酸プライマーは、任意の標識剤、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質、ビオチン等で標識されていてもよい。

【0032】

本実施形態のキットは、さらに、マイクロRNAの測定法に依存して、RNAを抽出する試薬、内部標準試薬、定量PCR用試薬、マイクロアレイ用メンブレンなどを適宜含むものであってもよい。

【0033】

睡眠障害の病状又は重症度を判定及び／又は評価するためのキットにおける各記載は、上述の＜睡眠障害の診断のためのバイオマーカー＞の項の記載を援用することができる。

【0034】

＜睡眠障害の治療薬をスクリーニングする方法及び／又は評価方法＞

本発明の他の実施態様は、睡眠障害の治療薬をスクリーニングする方法及び／又は評価方法であって、

治療薬の候補物質を投与された睡眠障害を有する対象から採取された唾液試料における上述の＜睡眠障害の診断のためのバイオマーカー＞の項に記載する何れか1つ以上のバイオマーカーの量を測定する工程、

睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較する、又は睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量を、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較する工程、及び

睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、前記治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合、又は睡眠障害を有する対象における前記候補物質を投与された後における前記バイオマーカーの量が、この睡眠障害を有する対象における前記治療薬の候補物質を投与される前における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があった場合、前記候補物質が睡眠障害の治療薬として有効であると評価される工程

を含む、スクリーニングする方法及び／又は評価方法である。

【0035】

具体的な手順は、例えば、以下に記載する通りである。

睡眠障害を有する対象を2群に分け、1つの群は治療薬の候補物質を投与する群とし、他方の群は治療薬の候補物質を投与しない群とする。治療薬の候補物質を投与した群の対象由来の唾液試料と治療薬の候補物質を投与しない群由来の唾液試料を採取し、それぞれの群間において上述の睡眠障害に関するバイオマーカーの量を比較する。比較した結果、治療薬の候補物質を投与した群の測定値が、治療薬の候補物質を投与されていない睡眠障害を有する対象における前記バイオマーカーの量と比較して有意差があり、また睡眠障害を有さない健常群の測定値と比較して有意差が無い場合、用いた治療薬の候補物質を、睡眠障害の治療薬の候補として選択することができる。

また、睡眠障害を有する対象において、治療薬の候補物質を投与した前と後のそれぞれ

10

20

30

40

50

において唾液試料を採取し、治療薬の候補物質を投与した後の唾液試料における上述の睡眠障害に関するバイオマーカーの量が、治療薬の候補物質を投与する前の唾液試料における当該バイオマーカーの量と比較する。比較した結果、治療薬の候補物質を投与した後の唾液試料中の当該バイオマーカーの量が、治療薬の候補物質を投与する前の唾液試料中の当該バイオマーカーの量と比較して有意差があり、また睡眠障害を有さない健常群の測定値と比較して有意差が無い場合、用いた治療薬の候補物質を、睡眠障害の治療薬の候補として選択することができる。

対象への投与は、経口、静注、塗布などの投与形態を用いることができるが、飼料中又は、給水中に被検物質を添加しておくことが好ましい。

【0036】

睡眠障害の治療薬をスクリーニングする方法及び／又は評価方法における各記載は、上述の＜睡眠障害の診断のためのバイオマーカー＞の項の記載を援用することができる。

【実施例】

【0037】

以下に実施例を用いて本発明を説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0038】

＜睡眠障害モデルマウスの作製＞

C3H/HeN系統のマウス（5週齢、雄性、日本エスエルシー株式会社）を明期12時間、暗期12時間の明暗サイクル下（8：00点灯、20：00消灯）で4週間飼育した（馴化飼育）。実験の全期間を通して、マウスは回転かごケージ（SW-15S、有限会社メルクエスト）内で飼育し、活動量をクロノバイオロジーキット（Stanford Software Systems、CA）を用いて測定した。飼料は、AIN-93G（オリエンタル酵母工業）を用い、実験の全期間を通して自由摂餌とした。馴化飼育の終了後、既報（特許文献2、4、非特許文献9～13）に従い、ケージの底面に水を満たしマウスが回転輪から降りられないように制限することにより、1週間のストレス性睡眠障害を負荷した睡眠障害モデルマウスを得た。

既報（特許文献1）の通り、このストレス性睡眠障害モデルマウスは、一般的なヒトの睡眠障害に外挿できるリズム障害を示す。例えば、夜行性であるマウスの本来の非活動期である昼間（明期）の活動量が増加するとともに、活動期である夜（暗期）の活動量の減少が認められる。特に、明期前半の過活動が特徴である。またこれに連動するように、明期前半の睡眠量低下、活動期（暗期）における睡眠量の増加が認められる点も特徴的である（非特許文献14）。

【0039】

＜睡眠障害モデルマウスを用いた唾液のメタボローム解析＞

上記方法により作製した睡眠障害モデルマウスと（6匹）を用いて唾液のメタボローム解析を行った。

活動期の初期（22：00）に、睡眠障害を負荷していないマウス（対照群、6匹）と睡眠障害を負荷したマウス（6匹）にそれぞれピロカルピン塩酸塩（15 mg/kg、富士フィルム和光純薬株式会社）を腹腔内投与し、口腔内にあふれ出てくる唾液を回収した。この回収した唾液試料は、メタボローム解析までマイナス80℃にて凍結保存した。

メタボローム解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社（HMT）にて、CE-FTMS（キャピラリー電気泳動・フーリエ変換型質量分析計）解析とLC-TOFMS（液体クロマトグラフィ・飛行時間型質量分析計）解析にて行った。

【0040】

[CE-FTMS解析]

＜測定＞

睡眠障害モデルマウス6匹と対照マウス6匹に由来する唾液試料のそれぞれにおいて、当業者に既知の方法であるCE-FTMSのカチオンモード、アニオンモードによる測定を実施した。

10

20

30

40

50

唾液試料の前処置として、40 μL の唾液試料に対し、内部標準物質の濃度が100 μM となるように調製した10 μL の水溶液を加えて攪拌し、限外ろ過チューブ（ウルトラフ

リー MC PLHCC, HMT, 遠心式フィルターユニット 5 kDa）に移し取った。これを遠心（9,100 $\times g$, 4 , 60分）し、限外ろ過処理を行い、測定に供した。

カチオンモードによる測定では唾液試料を2倍希釈したものを用い、アニオンモードによる測定では唾液試料を5倍希釈したものを用いた。

各マウス由来の唾液試料において、カチオンモード、アニオンモードの測定をそれぞれ以下に示す条件で行い、得られた各データを統合した。その結果、合計で288（カチオン188、アニオン100）のピークが検出された。

10

・陽イオン性代謝物質（カチオンモード）

装置

CE: Agilent CE system

MS: Q Exactive Plus 2 号機

Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer: Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Rinse buffer: Cation Buffer Solution (p/n : H3301-1001)

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 10 sec

CE voltage: Positive, 30 kV

MS ionization: ESI Positive

MS capillary voltage: 4,000 V

MS scan range: m/z 60-900

Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n : I3301-1040)

20

・陰イオン性代謝物質（アニオンモード）

装置

CE: Agilent CE system

MS: Q Exactive Plus 2 号機

Capillary: Fused silica capillary i.d. 50 μm \times 80 cm

測定条件

Run buffer: Anion Buffer Solution (p/n : H3302-1023)

Rinse buffer: Anion Buffer Solution (p/n : H3302-1023)

Sample injection: Pressure injection 50 mbar, 22 sec

CE voltage: Positive, 30 kV

MS ionization: ESI Negative

MS capillary voltage: 3,500 V

MS scan range: m/z 70-1,050

Sheath liquid: HMT Sheath Liquid (p/n : I3301-1040)

30

【0041】

<データ処理>

40

CE-FTMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.2.18.0.1（慶應義塾大学開発）を用いて、シグナル/ノイズ（S/N）比が3以上のピークを自動抽出し、質量電荷比（m/z）、ピーク面積値、泳動時間（Migration time: MT）を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相対面積値に変換した。

【数1】

$$\text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピークの面積値}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{試料量}}$$

また、これらのデータには Na^+ や K^+ などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウ

50

ムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。精査したピークについて、 m/z とMTの値をもとに、各試料間のピークの照

合・整列化を行った。

【 0 0 4 2 】

< 候補代謝物質の検索 >

検出されたピークに対して m/z とMTの値をもとにHMTが有する代謝物質のライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差はMTで $\pm 0.5 \text{ min}$ 、 m/z では $\pm 5 \text{ ppm}$ とした。ライブラリに登録された物質の m/z 及びMTの値から288 (カチオン188、アニオン100) ピークに候補化合物が付与された。

10

【数 2】

$$\text{質量誤差 (ppm)} = \frac{\text{実測値} - \text{理論値}}{\text{実測値}} \times 10^6$$

【 0 0 4 3 】

< 対象代謝化合物の定量 >

対象代謝化合物の一部について解析を行った。検量線は内部標準物質により補正したピーク面積を用い、各物質について $10 \text{ } \mu\text{M}$ の一点検量 (内部標準物質 $20 \text{ } \mu\text{M}$) として濃度を算出した。定量結果を表 7 に示す。

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 7

バイオマーカー名					Comparative Analysis		
	対照マウス		睡眠障害モデルマウス		睡眠障害モデルマウス vs 対照マウス		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio †	p-value ‡	
2-Hydroxybutyric acid	1.6	0.3	4.4	0.9	2.8	1.9E-04	***
2-Oxoglutaric acid	8.8	1.8	6.5	0.9	0.7	0.026	*
2-Oxoisovaleric acid	2.6	0.5	2.7	0.4	1.0	0.769	
2-Phosphoglyceric acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
3-Hydroxybutyric acid	32	19	128	29	4.1	1.0E-04	***
3-Phosphoglyceric acid	0.2	N.A.	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
6-Phosphogluconic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Acetyl CoA_divalent	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Adenine	0.03	0.02	0.011	0.006	0.4	0.057	
Adenosine	0.004	3.5E-04	0.008	0.006	2.0	0.369	
ADP	0.015	N.A.	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
Ala	34	7.5	20	4.3	0.6	0.004	**
AMP	0.02	N.A.	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
Anthranilic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Arg	5.9	2.2	4.3	0.9	0.7	0.146	
Asn	2.8	0.8	1.8	0.5	0.6	0.024	*
Asp	13	1.8	12	2.3	0.9	0.315	
ATP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Betaine	4.5	0.9	3.7	0.7	0.8	0.129	
Betaine aldehyde_+H2O	0.02	0.015	0.014	0.006	0.6	0.274	
cAMP	0.04	0.007	0.03	N.A.	0.6	N.A.	
Carnosine	0.11	0.02	0.10	0.014	0.9	0.345	
CDP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
cGMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Choline	15	3.6	7.4	1.1	0.5	0.003	**
cis-Aconitic acid	0.2	0.004	0.3	0.10	1.2	0.507	
Citric acid	11	3.8	8.0	1.3	0.7	0.125	
Citrulline	2.0	0.6	1.4	0.3	0.7	0.047	*
CMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
CoA_divalent	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

10

20

30

40

50

【表 7 - 2】

バイオマーカー名					Comparative Analysis		
	対照マウス		睡眠障害モデルマウス		睡眠障害モデルマウス vs 対照マウス		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio †	p-value ‡	
Creatine	12	1.7	11	2.2	1.0	0.623	
Creatinine	1.0	0.4	2.8	0.7	2.7	6.2E-04	***
CTP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Cys	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Cytidine	0.10	0.02	0.2	0.08	1.7	0.104	
Cytosine	0.009	0.004	0.02	0.009	2.1	0.043	*
dATP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
dCTP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Dihydroxyacetone phosphate	0.3	0.08	0.2	0.02	0.8	0.352	
dTDP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
dTMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
dTTP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Erythrose 4-phosphate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Fructose 1,6-diphosphate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Fructose 6-phosphate	0.04	0.012	0.03	0.008	0.9	0.817	
Fumaric acid	12	1.4	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
GABA	0.2	N.A.	0.2	0.02	1.0	N.A.	
GDP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Gln	17	4.8	12	4.6	0.7	0.110	
Glu	19	3.0	16	1.6	0.8	0.057	
Gluconic acid	0.7	0.3	1.8	0.4	2.5	5.6E-04	***
Glucose 1-phosphate	0.04	0.02	0.03	0.02	0.7	0.429	
Glucose 6-phosphate	0.05	0.03	0.04	2.4E-04	0.7	0.413	
Glutathione (GSH)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Glutathione (GSSG)_divalent	0.15	0.14	0.06	0.02	0.4	0.206	
Gly	58	11	41	7.8	0.7	0.015	*
Glyceraldehyde 3-phosphate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Glycerol 3-phosphate	1.5	0.14	2.0	0.4	1.3	0.031	*
Glycolic acid	17	4.3	14	0.5	0.9	0.323	
Glyoxylic acid	20	1.1	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
GMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

10

20

30

40

50

【表 7 - 3】

バイオマーカー名					Comparative Analysis		
	対照マウス		睡眠障害モデルマウス		睡眠障害モデルマウス vs 対照マウス		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio †	p-value ‡	
GTP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Guanine	0.007	0.004	0.008	0.002	1.2	0.516	
Guanosine	0.02	0.010	0.02	0.014	1.1	0.821	
His	3.5	1.0	2.6	0.7	0.7	0.104	
Homoserine	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Hydroxyproline	1.3	0.3	0.6	0.09	0.4	0.003	**
Hypoxanthine	0.2	0.06	0.2	0.2	1.1	0.786	
Ile	3.1	0.8	2.8	1.2	0.9	0.534	
IMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Inosine	0.13	0.08	0.12	0.06	0.9	0.847	
Isocitric acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Lactic acid	1,655	121	915	111	0.6	6.9E-07	***
Leu	5.5	1.2	5.8	2.0	1.1	0.772	
Lys	11	2.7	7.3	2.3	0.7	0.051	
Malic acid	22	2.3	15	1.3	0.7	2.8E-04	***
Malonyl CoA_divalent	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Mct	2.2	0.7	1.0	0.5	0.5	0.012	*
N,N- Dimethylglycine	0.2	0.05	0.4	0.13	1.5	0.086	
NAD+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
NADP+	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Ornithine	3.3	0.8	3.0	0.6	0.9	0.459	
Phe	2.9	0.7	2.2	0.7	0.8	0.161	
Phosphoenolpyruvic acid	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Pro	8.4	2.2	4.4	0.7	0.5	0.006	**
PRPP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Putrescine	0.9	0.4	1.8	0.3	2.0	0.001	**
Pyruvic acid	155	26	114	4.4	0.7	0.011	*
Ribose 5-phosphate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Ribulose 5- phosphate	0.03	N.A.	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
S- Adenosylmethionine	0.02	0.006	0.04	0.004	2.3	1.8E-05	***
Sarcosine	1.2	0.2	N.A.	N.A.	<1	N.A.	
Sedoheptulose 7- phosphate	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

10

20

30

40

50

【表 7 - 4】

バイオマーカー名					Comparative Analysis		
	対照マウス		睡眠障害モデルマウス		睡眠障害モデルマウス vs 対照マウス		
	Mean	S.D.	Mean	S.D.	Ratio ¶	p-value	
Ser	16	5.4	11	2.1	0.7	0.054	
Spermidine	6.4	0.9	4.8	1.2	0.7	0.027	*
Spermine	1.5	0.4	1.3	0.3	0.9	0.347	
Succinic acid	15	2.3	6.9	0.7	0.5	2.2E-04	***
Thr	8.0	1.7	4.1	1.2	0.5	0.001	**
Thymidine	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Thymine	0.008	0.002	0.02	0.004	2.1	0.009	**
Trp	0.6	0.10	0.5	0.2	0.9	0.426	
Tyr	2.5	0.6	1.8	0.9	0.7	0.119	
Tyramine	0.05	0.003	0.06	0.09	1.1	0.900	
UDP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
UMP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Uracil	0.2	0.09	0.5	0.2	2.0	0.019	*
Uridine	0.3	0.08	0.7	0.2	2.6	8.7E-04	***
UTP	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	
Val	9.4	1.8	7.8	3.4	0.8	0.340	
β-Ala	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	

N.A.: Not Available. 計算対象であるが、データ不足のため計算不可であった。

¶ 2群間の検出平均値の比は、後者を分母として算出している。

|| Welchのt-検定のp-valueとその範囲を示す。(* 0.05, ** 0.01, *** 0.001)

【0044】

< 群間比較 >

候補化合物が絞り込まれた288ピークについて、各群の相対面積値比の算出及びWelchのt-検定を実施した。その結果、106種類(CE-FTMS)の代謝物の濃度が睡眠障害によって有意に変化することが示された。それらの代謝物のうち、化合物が特定できたものを表8に示した。Welchのt-検定のp-valueを示す。(* 0.05, ** 0.01, *** 0.001)。

10

20

30

40

50

【表 8 - 1】

表 8

CE-FTMS 解析				
バイオマーカー名	Fold change	p value		q value
11-Aminoundecanoic acid	10	1.4E-07	***	0.000
Lactic acid	0.6	6.9E-07	***	0.000
Urea	1.6	6.4E-06	***	0.000
3-Indoxylsulfuric acid	9.0	1.8E-05	***	0.001
S-Adenosylmethionine	2.3	1.8E-05	***	0.001
Homovanillic acid 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid Hydroxyphenyllactic acid	4.3	4.3E-05	***	0.001
3-Hydroxybutyric acid	4.1	1.0E-04	***	0.003
N-Formylmethionine	3.9	1.5E-04	***	0.003
4-Aminohippuric acid	7.6	1.5E-04	***	0.003
N ¹ -Methyl-4-pyridone-5-carboxamide	2.3	1.7E-04	***	0.004
2-Hydroxybutyric acid	2.8	1.9E-04	***	0.004
Succinic acid	0.5	2.2E-04	***	0.004
Malic acid	0.7	2.8E-04	***	0.004
Phenaceturic acid N-(o-Toluoyl)glycine	6.8	3.5E-04	***	0.005
Allantoin	2.7	3.8E-04	***	0.005
N-Acetylhistidine	4.0	4.1E-04	***	0.005
7-Methylguanine	3.3	4.8E-04	***	0.006
N ¹ -Methylguanosine	3.0	5.4E-04	***	0.006
Gluconic acid	2.5	5.6E-04	***	0.006
Creatinine	2.7	6.2E-04	***	0.006
5-Hydroxypentanoic acid	2.0	7.6E-04	***	0.008
Uridine	2.6	8.7E-04	***	0.008
Guanidoacetic acid	3.1	0.001	**	0.010
Putrescine	2.0	0.001	**	0.010
Thr	0.5	0.001	**	0.010
Imidazole-4-acetic acid	3.3	0.001	**	0.011
N-Acetylleucine-1 Isovalerylalanine-1	5.0	0.002	**	0.012
Methionine sulfoxide	0.6	0.002	**	0.013
1-Methyl-4-imidazoleacetic acid	8.7	0.002	**	0.013
6-Aminohexanoic acid	1.7	0.002	**	0.013
Isethionic acid	2.4	0.002	**	0.014
N-Acetylglycine	2.1	0.002	**	0.014
Gly-Asp	1.5	0.002	**	0.014
Ser-Glu	2.1	0.002	**	0.014
Choline	0.5	0.003	**	0.014

10

20

30

40

50

【表 8 - 2】

CE-FTMS 解析				
バイオマーカー名	Fold change	p value		q value
1-Methylhydantoin Glycine anhydride	2.3	0.003	**	0.014
Histamine	3.0	0.003	**	0.014
Hydroxyproline	0.4	0.003	**	0.015
1-Methyladenosine	2.2	0.003	**	0.015
4-(β-Acetylaminoethyl)imidazole	9.8	0.003	**	0.017
Ala	0.6	0.004	**	0.018
Pipecolic acid	1.9	0.004	**	0.018
Mucic acid	0.3	0.004	**	0.019
N-Acetylputrescine	2.4	0.004	**	0.019
Gluconolactone	2.3	0.005	**	0.021
Glutaric acid Methylsuccinic acid	0.6	0.005	**	0.022
SDMA	2.0	0.006	**	0.023
Nicotinamide riboside	1.4	0.006	**	0.023
Muscimol	1.9	0.006	**	0.023
Pro	0.5	0.006	**	0.024
Cysteic acid	0.5	0.006	**	0.025
Cadaverine	5.6	0.007	**	0.026
N ⁸ -Acetylspermidine	1.8	0.007	**	0.026
Cysteinesulfinic acid	0.6	0.008	**	0.030
Thymine	2.1	0.009	**	0.031
Ascorbic acid	9.1	0.009	**	0.031
Glucuronic acid-1 Galacturonic acid-1	3.2	0.009	**	0.032
2-Hydroxyoctanoic acid 8-Hydroxyoctanoic acid	2.2	0.009	**	0.032
γ-Glu-Lys_divalent	0.5	0.010	**	0.032
4-Guanidinobutyric acid	2.7	0.010	**	0.032
Imidazololactic acid	1.7	0.011	*	0.034
1 <i>H</i> -Imidazole-4-propionic acid	2.4	0.011	*	0.034
1-Methylnicotinamide	2.1	0.011	*	0.034
Pyruvic acid	0.7	0.011	*	0.034
ADMA	1.6	0.011	*	0.034
Met	0.5	0.012	*	0.036
Decarboxylated S- Adenosylmethionine	2.3	0.012	*	0.037
Gly	0.7	0.015	*	0.043
1-Methylhistamine	1.9	0.017	*	0.049
Glycerophosphocholine	0.5	0.017	*	0.049
Carboxymethyllysine	1.8	0.017	*	0.049

10

20

30

40

50

【表 8 - 3】

CE-FTMS 解析				
バイオマーカー名	Fold change	p value		q value
γ -Butyrobetaine	0.8	0.019	*	0.051
<i>N</i> -Methylarginine	0.6	0.019	*	0.051
Trimethylamine <i>N</i> -oxide	1.7	0.019	*	0.051
Carnitine	0.8	0.019	*	0.051
Uracil	2.0	0.019	*	0.051
Threonic acid	0.6	0.020	*	0.051
Tartaric acid	2.2	0.020	*	0.051
<i>N</i> -Acetylglucosamine <i>N</i> -Acetylmannosamine <i>N</i> -Acetylgalactosamine	1.1	0.020	*	0.052
5-Hydroxylysine	0.6	0.021	*	0.053
3-Hydroxy-2-methyl-4-pyrone	0.2	0.022	*	0.053
γ -Glu-Gly	0.5	0.022	*	0.054
β -Hydroxyisovaleric acid	1.6	0.023	*	0.054
His-Glu	1.3	0.023	*	0.054
2-Aminoadipic acid <i>O</i> -Acetylhomoserine	0.7	0.023	*	0.054
Dyphylline	0.4	0.023	*	0.054
3-(2-Hydroxyphenyl)propionic acid 3-Phenyllactic acid Atrolactic acid <i>p</i> -Methoxyphenylacetic acid <i>m</i> -Ethoxybenzoic acid Tropic acid	1.5	0.024	*	0.055
Asn	0.6	0.024	*	0.055
4-Methyl-2-oxovaleric acid 3-Methyl-2-oxovaleric acid 2-Oxohexanoic acid	1.6	0.024	*	0.055
2-Oxoglutaric acid	0.7	0.026	*	0.058
Spermidine	0.7	0.027	*	0.059
<i>N</i> -Methylputrescine	1.7	0.028	*	0.062
Glycerol 3-phosphate	1.3	0.031	*	0.066
Cystine	0.3	0.031	*	0.066
Homoarginine	0.7	0.031	*	0.066
Nicotinic acid	0.5	0.033	*	0.069
Gly-Gly	1.1	0.034	*	0.070
2-Hydroxyisobutyric acid	1.1	0.042	*	0.086
Cytosine	2.1	0.043	*	0.088
Pilocarpine	0.6	0.046	*	0.091
Citrulline	0.7	0.047	*	0.092

10

20

30

40

【 0 0 4 5 】

[LC-TOFMS解析]

< 測定 >

睡眠障害モデルマウス6匹と対照マウス6匹に由来する唾液試料のそれぞれにおいて、当業者に既知の方法であるLC-TOFMSのポジティブモード及びネガティブモードによる測定を実施した。

唾液試料の前処置として、80 μ Lの試料に対し、内部標準物質の濃度が4 μ Mとなるように調製した240 μ Lのメタノール溶液を加えて攪拌し、遠心分離（2,300 \times g, 4分）を行い、上清を回収した。これを乾固させ、再び160 μ Lの50%イソプロパノール

50

ル水溶液(v/v)に溶解して測定に供した。

各マウス由来の唾液試料において、ポジティブモード、ネガティブモードの測定をそれぞれ以下に示す条件で行い、得られた各データを統合した。その結果、合計55(ポジティブ35, ネガティブ20)のピークが検出された。

・陽イオン性代謝物質(ポジティブモード)

装置

LC system: Agilent 1200 series RR LC system SL (Agilent Technologies 社)

Column: ODS column, 2×50 mm, 2 μm

MS system: Agilent LC/MSD TOF (Agilent Technologies 社) 10 号機

10

測定条件

Column temp.: 40

Mobile phase A: H₂O / 0.1% HCOOH

Mobile phase B: Isopropanol: Acetonitrile: H₂O (65:30:5) / 0.1% HCOOH, 2 mM HCOONH₄

Flow rate: 0.3 mL / min

Run time: 20 min

Post time: 7.5 min

Gradient condition: 0-0.5 min: B 1%, 0.5-13.5 min: B 1-100%, 13.5-20 min: B 100%

20

MS ionization mode: ESI Positive

MS Nebulizer pressure: 40 psi

MS dry gas flow: 10 L / min

MS dry gas temp: 350

MS capillary voltage: 4,000 V

MS scan range: m/z 100-1,700

Sample injection: 1 μL

・陰イオン性代謝物質(ネガティブモード)

装置

LC system: Agilent 1200 series RR LC system SL (Agilent Technologies 社)

30

Column: ODS column, 2×50 mm, 2 μm

MS system: Agilent LC/MSD TOF (Agilent Technologies 社) 10 号機

測定条件

Column temp.: 40

Mobile phase A: H₂O / 0.1% HCOOH

Mobile phase B: Isopropanol: Acetonitrile: H₂O (65:30:5) / 0.1% HCOOH, 2 mM HCOONH₄

Flow rate: 0.3 mL / min

Run time: 20 min

Post time: 7.5 min

Gradient condition: 0-0.5 min: B 1%, 0.5-13.5 min: B 1-100%, 13.5-20 min: B 100%

40

MS ionization mode: ESI Negative

MS Nebulizer pressure: 40 psi

MS dry gas flow: 10 L / min

MS dry gas temp: 350

MS capillary voltage: 3,500 V

MS scan range: m/z 100-1,700

Sample injection: 1 μL

50

【 0 0 4 6 】

< データ処理 >

LC-TOFMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアの MasterHands ver.2.18.0.1 (慶應義塾大学開発) を用いて、シグナル/ノイズ (S/N) 比が3以上のピークを自動抽出し、質量電荷比 (m/z)、ピーク面積値および保持時間 (Retention time: RT) を得た。得られたピーク面積値は下記の式を用いて相対面積値に変換した。さらに、この相対面積値を用いて、各物質についての濃度を算出できる。

【 数 3 】

$$\text{相対面積値} = \frac{\text{目的ピーク的面積値}}{\text{内部標準物質の面積値} \times \text{試料量}}$$

10

また、これらのデータにはNa⁺やK⁺などのアダクトイオン及び、脱水、脱アンモニウムなどのフラグメントイオンが含まれているので、これらの分子量関連イオンを削除した。しかし、物質特異的なアダクトやフラグメントも存在するため、すべてを精査することはできなかった。精査したピークについて、m/zとRTの値をもとに、各試料間のピークの照合・整列化を行った。

【 0 0 4 7 】

< 候補代謝物質の検索 >

検出されたピークに対してm/zとRTの値をもとにHMTが有する代謝物質のライブラリに登録された全物質との照合、検索を行った。検索のための許容誤差はRTで±0.3min、m/zで±25ppmとした。ライブラリに登録された物質のm/z及びRTの値から55 (ポジティブ35、ネガティブ20) ピークに候補化合物が付与された。

20

【 数 4 】

$$\text{質量誤差 (ppm)} = \frac{\text{実測値} - \text{理論値}}{\text{実測値}} \times 10^6$$

【 0 0 4 8 】

< 群間比較 >

候補化合物が絞り込まれた55ピークについて、各群の相対面積値比の算出及びWelchのt-検定を実施した。その結果、11種類 (LC-TOFMS) の代謝物の濃度が睡眠障害によって有意に変化することが示された。それらの代謝物のうち、化合物が特定できたものを表9に示した。Welchのt-検定のp-valueを示す。(* 0.05, ** 0.01, *** 0.001)。

30

40

50

【表 9】

表 9

LC-TOFMS 解析				
バイオマーカー名	Fold change	p value		q value
Kynurenic acid	2.9	1.3E-04	***	0.005
Riboflavin	0.7	0.002	**	0.031
AC(10:0)	1.7	0.010	**	0.072
Cortexolone Corticosterone 21-Deoxycortisol	2.6	0.011	*	0.072
1-Oleoyl-glycero-3-phosphocholine-2	0.7	0.021	*	0.109
Cholesterol sulfate	1.5	0.021	*	0.109
cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	1.8	0.026	*	0.117
1-Palmitoyl-glycero-3-phosphoethanolamine	0.6	0.031	*	0.118

10

20

【 0 0 4 9 】

睡眠障害モデルマウスでは、Pyruvic acid、Lactic acid、Malic acid、Succinic acidやAla、Gly、Met、Pro、Thrなどの血糖値関連アミノ酸が有意に減少しており、その一方で3-Hydroxybutyric acid、2-Hydroxybutyric acid、4-Methyl-2-oxovaleric acid、3-Methyl-2-oxovaleric acidなどのケトース関連分子が有意に増加しており、糖代謝異常を有することが示唆された。

S-Adenosylmethionine (SAM)及びその脱炭酸 (dc) SAM (Decarboxylated S-Adenosylmethionine) 濃度は睡眠障害モデルマウスでは2.3倍に増加しており、このことは、1-Methyl-4-imidazoleacetic acid、1-Methyladenosine、1-Methylhydantoin、7-Methylguanine、ADMA及びSDMAなどのメチル化代謝物や、Putrescine、N-Acetylputrescine、Cadaverine、N-Methylputrescine及びN⁸-Acetylspermidineなどのポリアミンの増加を説明するものである。

30

さらに、睡眠障害モデルマウスでは、これらのポリアミンに加えて、Histamine、Homovanillic acid及びKynurenic acidなど、睡眠障害や認知機能障害に関連する中枢神経系関連の代謝物も増加していた。

NMDARの補酵素であるSarcosineは、対照マウスでは1.2 μMの濃度であったが、睡眠障害モデルマウスでは検出できないレベルまで減少した。また、実験動物に発作や痙攣を誘発するGuanidoacetic acidや4-Guanidinobutyric acidなどのグアニジノ化合物は、睡眠障害モデルマウスにおいてそれぞれ対照マウスの3.1倍、2.7倍に増加した。

40

【 0 0 5 0 】

<睡眠障害モデルマウスを用いた唾液のマイクロRNA解析>

上記方法により作製した睡眠障害モデルマウス（6匹）のそれぞれにおいて唾液のマイクロRNA解析を行った。

起床時刻（20:00）と入眠時刻（8:00）に、睡眠障害を負荷していないマウス（対照群、6匹）と睡眠障害を負荷したマウス（6匹）にそれぞれピロカルピン塩酸塩（15 mg/kg、富士フィルム和光純薬株式会社）を腹腔内投与し、口腔内にあふれ出てくる唾液を回収した。この回収した唾液試料は、マイクロRNA解析までマイナス80℃にて凍結保存した。

50

RNAの抽出は、miRNeasy Serum/Plasma Kit (キアゲン) を用いて、キットに添付されているプロトコル通り行った。マイクロRNAのシーケンス解析は、株式会社DNAチップ研究所

にて当業者に既知の方法により実施した。

各マウス由来の唾液試料をそれぞれ分析し、得られた各データを統合した。

【 0 0 5 1 】

マイクロRNA解析の結果、睡眠障害によって、起床時刻に唾液中に増加するマイクロRNA、入眠時刻に唾液中に増加するマイクロRNA、起床時刻と入眠時刻の両時刻に唾液中で減少するマイクロRNA、起床時刻に唾液中で減少するマイクロRNA、入眠時刻に唾液中で減少するマイクロRNAがあることが示された。それぞれを以下の表 1 0 ~ 1 4 に示す。

10

【 0 0 5 2 】

起床時刻に唾液中に増加するマイクロRNAを表 1 0 に示す。

【 表 1 0 】

表 1 0

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-1224-3p	1.1E-04	8.4E-07	7.5	7.5	2.9
mmu-miR-449c-5p	8.9E-06	3.9E-08	7.0	7.0	2.8
mmu-miR-450a-1-3p	3.1E-02	1.1E-03	2.4	2.4	1.3
mmu-miR-465a-5p	3.2E-06	7.7E-09	7.7	7.7	3.0
mmu-miR-467c-3p	2.2E-02	7.3E-04	7.5	7.5	2.9
mmu-miR-6972-3p	9.3E-03	2.4E-04	5.4	5.4	2.4
mmu-miR-7064-3p	4.6E-04	6.2E-06	6.3	6.3	2.6
mmu_piR_004956/gb/DQ554593/ Mus_musculus:3:122811404:122811432:Minus	1.3E-03	2.1E-05	21.0	21.0	4.4

20

【 0 0 5 3 】

入眠時刻に唾液中に増加するマイクロRNAを表 1 1 に示す。

30

40

50

【表 1 1 - 1】

表 1 1

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-let-7e-3p	2.0E-02	2.1E-03	4.2	4.2	2.1
mmu-let-7j	1.9E-03	5.5E-05	21.2	21.2	4.4
mmu-miR-103-1-5p	6.8E-05	4.3E-07	5.2	5.2	2.4
mmu-miR-103-3p	3.4E-03	1.3E-04	4.6	4.6	2.2
mmu-miR-106b-3p	4.5E-04	5.6E-06	2.5	2.5	1.3
mmu-miR-10a-5p	4.4E-03	2.0E-04	6.6	6.6	2.7
mmu-miR-1188-5p	4.4E-02	6.4E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-1224-5p	5.9E-03	3.4E-04	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-1249-5p	2.7E-02	3.2E-03	5.1	5.1	2.3
mmu-miR-1258-5p	2.9E-03	1.0E-04	7.7	7.7	2.9
mmu-miR-129b-5p	3.9E-02	5.4E-03	2.7	2.7	1.4
mmu-miR-130c	2.4E-02	2.7E-03	2.6	2.6	1.4
mmu-miR-133b-5p	2.4E-02	2.6E-03	5.7	5.7	2.5
mmu-miR-133c	4.9E-04	7.0E-06	6.7	6.7	2.7
mmu-miR-139-5p	2.8E-02	3.3E-03	2.5	2.5	1.3
mmu-miR-140-3p	5.4E-03	2.8E-04	3.8	3.8	1.9
mmu-miR-142a-3p	3.9E-03	1.6E-04	10.9	10.9	3.4
mmu-miR-142b	1.7E-02	1.6E-03	2.1	2.1	1.1
mmu-miR-146a-5p	1.3E-02	1.1E-03	3.4	3.4	1.8
mmu-miR-146b-5p	6.1E-03	3.6E-04	5.8	5.8	2.5
mmu-miR-147-3p	5.8E-03	3.0E-04	2.1	2.1	1.1
mmu-miR-150-3p	1.6E-02	1.4E-03	2.2	2.2	1.1
mmu-miR-150-5p	1.3E-02	1.1E-03	3.1	3.1	1.6
mmu-miR-154-3p	3.4E-05	1.6E-07	120.8	120.8	6.9
mmu-miR-15b-5p	6.7E-03	4.3E-04	5.0	5.0	2.3
mmu-miR-16-5p	4.1E-03	1.8E-04	6.2	6.2	2.6
mmu-miR-1668	1.7E-02	1.7E-03	6.5	6.5	2.7
mmu-miR-185-5p	3.6E-03	1.5E-04	3.0	3.0	1.6
mmu-miR-187-5p	5.2E-05	3.0E-07	146.8	146.8	7.2
mmu-miR-1894-5p	3.7E-02	5.0E-03	4.5	4.5	2.2
mmu-miR-1903	2.5E-02	2.8E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-191-5p	8.3E-03	5.7E-04	3.6	3.6	1.8
mmu-miR-194-2-3p	2.2E-03	6.8E-05	5.3	5.3	2.4
mmu-miR-1943-3p	4.4E-02	6.3E-03	2.1	2.1	1.1
mmu-miR-1955-5p	1.2E-02	9.6E-04	2.5	2.5	1.3
mmu-miR-1969	1.1E-03	2.7E-05	7.4	7.4	2.9
mmu-miR-1982-5p	1.0E-04	8.0E-07	11.0	11.0	3.5
mmu-miR-200a-3p	8.3E-03	5.8E-04	2.6	2.6	1.4
mmu-miR-216b-3p	2.1E-05	6.6E-08	8.5	8.5	3.1
mmu-miR-216c-3p	9.9E-04	2.1E-05	13.0	13.0	3.7
mmu-miR-21a-5p	1.6E-02	1.5E-03	3.5	3.5	1.8
mmu-miR-22-3p	3.1E-02	4.0E-03	3.3	3.3	1.7
mmu-miR-221-3p	6.0E-04	1.1E-05	4.5	4.5	2.2
mmu-miR-223-3p	2.9E-03	9.6E-05	11.2	11.2	3.5
mmu-miR-223-5p	1.2E-02	9.4E-04	3.0	3.0	1.6
mmu-miR-23a-3p	2.0E-02	2.0E-03	3.9	3.9	2.0
mmu-miR-24-3p	4.3E-02	6.2E-03	2.2	2.2	1.2

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 2】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-25-3p	1.1E-03	2.5E-05	5.4	5.4	2.4
mmu-miR-26a-5p	7.6E-04	1.5E-05	6.9	6.9	2.8
mmu-miR-26b-5p	8.3E-03	5.8E-04	4.3	4.3	2.1
mmu-miR-27a-3p	2.4E-04	2.6E-06	8.9	8.9	3.2
mmu-miR-292a-3p	2.9E-03	9.9E-05	7.9	7.9	3.0
mmu-miR-294-5p	1.5E-02	1.4E-03	3.8	3.8	1.9
mmu-miR-295-3p	3.5E-02	4.6E-03	2.9	2.9	1.5
mmu-miR-299b-3p	3.6E-03	1.4E-04	4.1	4.1	2.0
mmu-miR-29a-3p	5.9E-03	3.5E-04	4.7	4.7	2.2
mmu-miR-29c-3p	2.0E-02	2.1E-03	2.4	2.4	1.3
mmu-miR-3058-3p	2.5E-02	2.8E-03	6.5	6.5	2.7
mmu-miR-3059-3p	1.6E-02	1.4E-03	4.3	4.3	2.1
mmu-miR-3076-3p	8.1E-03	5.4E-04	7.0	7.0	2.8
mmu-miR-3077-5p	9.0E-03	6.5E-04	3.8	3.8	1.9
mmu-miR-3079-5p	1.7E-02	1.6E-03	8.4	8.4	3.1
mmu-miR-3086-3p	2.4E-02	2.6E-03	3.4	3.4	1.8
mmu-miR-3086-5p	2.6E-02	2.9E-03	3.6	3.6	1.8
mmu-miR-3092-3p	3.2E-02	4.1E-03	4.4	4.4	2.1
mmu-miR-3092-5p	6.4E-03	3.9E-04	4.6	4.6	2.2
mmu-miR-30a-5p	1.7E-02	1.7E-03	4.2	4.2	2.1
mmu-miR-30c-5p	1.8E-02	1.7E-03	5.6	5.6	2.5
mmu-miR-30e-5p	4.1E-03	1.8E-04	3.3	3.3	1.7
mmu-miR-30f	6.1E-03	3.7E-04	3.0	3.0	1.6
mmu-miR-3101-3p	9.7E-03	7.3E-04	2.2	2.2	1.1
mmu-miR-3102-5p	4.7E-02	6.9E-03	3.1	3.1	1.7
mmu-miR-3110-5p	1.2E-03	3.0E-05	3.6	3.6	1.8
mmu-miR-322-5p	1.1E-02	8.4E-04	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-326-3p	3.4E-03	1.3E-04	4.4	4.4	2.1
mmu-miR-338-3p	8.8E-03	6.3E-04	3.1	3.1	1.6
mmu-miR-339-5p	6.3E-06	9.1E-09	6.2	6.2	2.6
mmu-miR-344g-3p	2.4E-02	2.7E-03	4.9	4.9	2.3
mmu-miR-344g-5p	3.7E-03	1.5E-04	10.2	10.2	3.4
mmu-miR-345-5p	3.6E-03	1.5E-04	3.7	3.7	1.9
mmu-miR-3473c	7.6E-03	5.0E-04	8.5	8.5	3.1
mmu-miR-3569-3p	8.1E-03	5.3E-04	4.8	4.8	2.3
mmu-miR-365-2-5p	4.9E-03	2.4E-04	2.6	2.6	1.4
mmu-miR-374b-5p	3.8E-02	5.1E-03	2.3	2.3	1.2
mmu-miR-378b	3.2E-02	4.0E-03	3.8	3.8	1.9
mmu-miR-380-5p	6.3E-06	9.2E-09	94.8	94.8	6.6
mmu-miR-412-3p	4.0E-04	4.8E-06	20.7	20.7	4.4
mmu-miR-425-5p	2.4E-03	7.4E-05	5.9	5.9	2.6
mmu-miR-466d-3p	3.4E-03	1.3E-04	4.2	4.2	2.1
mmu-miR-466i-3p	4.4E-02	6.3E-03	2.0	2.0	1.0
mmu-miR-466n-3p	6.5E-03	4.1E-04	7.4	7.4	2.9
mmu-miR-466q	5.1E-04	8.0E-06	4.3	4.3	2.1
mmu-miR-467d-3p	1.1E-03	2.4E-05	3.4	3.4	1.8
mmu-miR-486a-3p	1.1E-03	2.7E-05	41.4	41.4	5.4
mmu-miR-487b-5p	1.6E-03	4.3E-05	17.6	17.6	4.1

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 3】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-5106	3.1E-02	4.0E-03	2.1	2.1	1.0
mmu-miR-5110	2.0E-03	5.7E-05	3.5	3.5	1.8
mmu-miR-5128	2.1E-02	2.2E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-582-3p	4.0E-02	5.6E-03	3.3	3.3	1.7
mmu-miR-615-3p	1.7E-02	1.6E-03	3.4	3.4	1.8
mmu-miR-615-5p	5.6E-03	2.9E-04	8.8	8.8	3.1
mmu-miR-6335	3.8E-02	5.1E-03	4.9	4.9	2.3
mmu-miR-6339	5.0E-03	2.5E-04	5.1	5.1	2.3
mmu-miR-6345	1.6E-02	1.6E-03	5.7	5.7	2.5
mmu-miR-6348	1.2E-03	3.0E-05	21.6	21.6	4.4
mmu-miR-6351	1.1E-02	9.0E-04	5.5	5.5	2.5
mmu-miR-6352	1.8E-02	1.8E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-6354	1.0E-03	2.3E-05	9.6	9.6	3.3
mmu-miR-6356	3.1E-02	3.8E-03	2.6	2.6	1.4
mmu-miR-6376	3.1E-02	3.8E-03	3.7	3.7	1.9
mmu-miR-6415	4.2E-03	1.9E-04	6.0	6.0	2.6
mmu-miR-6418-3p	1.4E-02	1.2E-03	5.5	5.5	2.5
mmu-miR-652-3p	2.9E-03	9.6E-05	9.5	9.5	3.3
mmu-miR-653-5p	1.7E-02	1.7E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-6538	5.9E-03	3.2E-04	10.0	10.0	3.3
mmu-miR-664-3p	4.9E-03	2.3E-04	3.1	3.1	1.6
mmu-miR-669b-5p	4.5E-03	2.1E-04	3.1	3.1	1.6
mmu-miR-669d-2-3p	5.9E-03	3.3E-04	3.3	3.3	1.7
mmu-miR-670-5p	9.1E-03	6.7E-04	5.1	5.1	2.3
mmu-miR-672-3p	1.4E-02	1.2E-03	2.2	2.2	1.2
mmu-miR-673-5p	8.4E-03	6.0E-04	6.4	6.4	2.7
mmu-miR-676-3p	1.8E-02	1.8E-03	3.3	3.3	1.7
mmu-miR-678	1.2E-03	3.0E-05	13.8	13.8	3.8
mmu-miR-684	1.8E-02	1.9E-03	3.2	3.2	1.7
mmu-miR-6898-5p	6.5E-03	4.1E-04	5.2	5.2	2.4
mmu-miR-6906-3p	5.9E-03	3.3E-04	2.5	2.5	1.3
mmu-miR-6910-3p	4.9E-04	6.9E-06	14.5	14.5	3.9
mmu-miR-6918-5p	3.6E-03	1.5E-04	6.8	6.8	2.8
mmu-miR-6919-5p	4.4E-03	2.1E-04	4.4	4.4	2.1
mmu-miR-6921-5p	9.2E-03	6.8E-04	5.6	5.6	2.5
mmu-miR-6922-3p	8.3E-03	5.6E-04	14.7	14.7	3.9
mmu-miR-6924-3p	4.4E-03	2.0E-04	5.4	5.4	2.4
mmu-miR-6927-5p	3.6E-03	1.4E-04	16.4	16.4	4.0
mmu-miR-6928-3p	5.2E-04	8.5E-06	26.3	26.3	4.7
mmu-miR-6933-5p	2.4E-03	7.6E-05	18.1	18.1	4.2
mmu-miR-6934-5p	9.0E-03	6.5E-04	6.2	6.2	2.6
mmu-miR-6943-5p	1.1E-02	8.3E-04	6.6	6.6	2.7
mmu-miR-6946-5p	2.4E-03	7.6E-05	8.5	8.5	3.1
mmu-miR-6948-3p	1.2E-02	9.6E-04	5.0	5.0	2.3
mmu-miR-6953-5p	3.4E-02	4.5E-03	3.5	3.5	1.8
mmu-miR-6958-3p	3.4E-03	1.2E-04	24.5	24.5	4.6
mmu-miR-6969-3p	3.8E-02	5.2E-03	4.9	4.9	2.3
mmu-miR-697	6.1E-03	3.7E-04	6.6	6.6	2.7

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 4】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-6976-3p	4.9E-03	2.4E-04	7.3	7.3	2.9
mmu-miR-6983-5p	1.3E-03	3.5E-05	6.6	6.6	2.7
mmu-miR-6985-3p	4.1E-03	1.8E-04	4.2	4.2	2.1
mmu-miR-6990-3p	7.4E-05	5.0E-07	8.5	8.5	3.1
mmu-miR-6995-3p	2.4E-05	1.0E-07	36.7	36.7	5.2
mmu-miR-6998-5p	5.9E-03	3.4E-04	4.0	4.0	2.0
mmu-miR-7002-5p	8.3E-03	5.7E-04	2.6	2.6	1.4
mmu-miR-7005-5p	3.9E-03	1.6E-04	3.0	3.0	1.6
mmu-miR-7007-5p	5.1E-04	8.1E-06	7.1	7.1	2.8
mmu-miR-7008-3p	1.2E-02	9.5E-04	7.9	7.9	3.0
mmu-miR-7009-3p	5.9E-03	3.1E-04	9.1	9.1	3.2
mmu-miR-701-3p	1.2E-03	3.1E-05	23.7	23.7	4.6
mmu-miR-7014-5p	5.7E-03	3.0E-04	5.0	5.0	2.3
mmu-miR-7015-5p	8.1E-03	5.4E-04	6.8	6.8	2.8
mmu-miR-7016-5p	1.6E-02	1.6E-03	3.6	3.6	1.8
mmu-miR-7017-3p	1.1E-02	8.3E-04	4.4	4.4	2.1
mmu-miR-7020-5p	2.9E-02	3.5E-03	5.2	5.2	2.4
mmu-miR-7022-3p	1.8E-04	1.7E-06	20.9	20.9	4.4
mmu-miR-7027-3p	1.0E-03	2.3E-05	10.0	10.0	3.3
mmu-miR-7030-3p	2.2E-04	2.2E-06	5.2	5.2	2.4
mmu-miR-7032-5p	4.9E-03	2.3E-04	6.0	6.0	2.6
mmu-miR-7035-3p	7.1E-04	1.3E-05	15.1	15.1	3.9
mmu-miR-7035-5p	5.8E-03	3.1E-04	6.3	6.3	2.7
mmu-miR-7046-5p	1.3E-03	3.4E-05	11.7	11.7	3.6
mmu-miR-7047-3p	9.0E-03	6.6E-04	4.6	4.6	2.2
mmu-miR-7049-5p	1.7E-02	1.7E-03	2.8	2.8	1.5
mmu-miR-7052-5p	2.0E-02	2.1E-03	2.5	2.5	1.3
mmu-miR-7060-3p	3.1E-02	3.8E-03	5.5	5.5	2.5
mmu-miR-7066-3p	3.0E-03	1.0E-04	8.2	8.2	3.0
mmu-miR-7068-3p	2.7E-02	3.2E-03	3.1	3.1	1.7
mmu-miR-7069-5p	5.9E-03	3.3E-04	3.5	3.5	1.8
mmu-miR-7070-5p	4.4E-03	2.1E-04	22.3	22.3	4.5
mmu-miR-7071-3p	1.6E-02	1.5E-03	3.9	3.9	1.9
mmu-miR-7082-3p	2.1E-02	2.2E-03	7.9	7.9	3.0
mmu-miR-7089-5p	1.5E-04	1.3E-06	42.8	42.8	5.4
mmu-miR-7117-3p	6.7E-03	4.3E-04	5.4	5.4	2.4
mmu-miR-712-3p	6.1E-03	3.7E-04	6.4	6.4	2.7
mmu-miR-712-5p	5.9E-03	3.5E-04	6.4	6.4	2.7
mmu-miR-714	2.5E-02	2.8E-03	5.7	5.7	2.5
mmu-miR-7210-5p	3.4E-03	1.3E-04	7.3	7.3	2.9
mmu-miR-7225-3p	2.1E-05	6.6E-08	8.4	8.4	3.1
mmu-miR-7226-3p	1.0E-02	7.6E-04	3.5	3.5	1.8
mmu-miR-7237-3p	2.8E-02	3.4E-03	8.9	8.9	3.2
mmu-miR-7238-3p	6.7E-03	4.3E-04	6.4	6.4	2.7
mmu-miR-7240-3p	1.0E-02	8.0E-04	3.8	3.8	1.9
mmu-miR-7240-5p	2.4E-03	7.6E-05	5.0	5.0	2.3
mmu-miR-760-3p	2.0E-03	5.7E-05	14.4	14.4	3.9
mmu-miR-762	2.0E-03	6.0E-05	19.8	19.8	4.3

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 5】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-7647-5p	3.0E-03	1.1E-04	4.8	4.8	2.3
mmu-miR-7648-5p	1.1E-02	8.8E-04	6.7	6.7	2.7
mmu-miR-7653-3p	5.8E-04	9.8E-06	11.3	11.3	3.5
mmu-miR-7658-3p	3.0E-02	3.6E-03	5.9	5.9	2.6
mmu-miR-7659-5p	5.4E-03	2.7E-04	10.6	10.6	3.4
mmu-miR-7664-3p	2.6E-02	2.9E-03	2.3	2.3	1.2
mmu-miR-7668-3p	1.4E-02	1.2E-03	4.3	4.3	2.1
mmu-miR-7669-5p	3.1E-02	4.0E-03	3.2	3.2	1.7
mmu-miR-7677-3p	4.3E-02	6.0E-03	2.3	2.3	1.2
mmu-miR-7684-3p	5.9E-03	3.3E-04	5.2	5.2	2.4
mmu-miR-7685-3p	1.6E-03	4.5E-05	22.8	22.8	4.5
mmu-miR-7689-3p	1.8E-02	1.8E-03	2.4	2.4	1.3
mmu-miR-8112	9.7E-03	7.3E-04	9.3	9.3	3.2
mmu-miR-877-3p	1.2E-02	1.0E-03	4.3	4.3	2.1
mmu-miR-879-3p	4.1E-02	5.8E-03	3.7	3.7	1.9
mmu-miR-93-5p	8.3E-03	5.8E-04	3.1	3.1	1.6
mmu_piR_000159/gb/DQ539904/ Mus_musculus:2:73668844:73668871:Plus	1.2E-02	9.8E-04	3.8	3.8	1.9
mmu_piR_000580/gb/DQ540862/ Mus_musculus:11:106317126:106317155:Plus	6.3E-06	4.4E-09	9.3	9.3	3.2
mmu_piR_000935/gb/DQ541777/ Mus_musculus:6:47717737:47717766:Minus	2.8E-02	3.3E-03	3.2	3.2	1.7
mmu_piR_001071/gb/DQ542279/ Mus_musculus:5:115384197:115384225:Minus	5.0E-03	2.5E-04	12.8	12.8	3.7
mmu_piR_001662/gb/DQ544105/ Mus_musculus:2:151104333:151104361:Minus	1.7E-05	3.3E-08	24.6	24.6	4.6
mmu_piR_003770/gb/DQ550765/ Mus_musculus:15:82977530:82977560:Plus	9.7E-04	2.0E-05	4.5	4.5	2.2
mmu_piR_004265/gb/DQ552333/ Mus_musculus:11:103253603:103253633:Plus	2.5E-02	2.9E-03	3.9	3.9	2.0
mmu_piR_004919/gb/DQ554400/ Mus_musculus:8:95081734:95081762:Plus	2.1E-05	7.2E-08	62.3	62.3	6.0
mmu_piR_005046/gb/DQ554933/ Mus_musculus:15:78492641:78492670:Minus	8.4E-03	5.9E-04	6.3	6.3	2.7
mmu_piR_008899/gb/DQ568790/ Mus_musculus:9:67535016:67535044:Plus	4.1E-05	2.2E-07	4.9	4.9	2.3
mmu_piR_013680/gb/DQ691499/ Mus_musculus:14:22937260:22937289:Plus	2.6E-02	3.0E-03	8.1	8.1	3.0
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	2.4E-05	1.1E-07	48.5	48.5	5.6
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	7.1E-04	1.3E-05	4.4	4.4	2.1

10

20

30

40

50

【表 1 1 - 6】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu_piR_022202/gb/DQ704066/ Mus_musculus:2:151097288:151097315:Minus	3.8E-02	5.2E-03	7.3	7.3	2.9
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:150950762:150950792:Minus	5.9E-03	3.4E-04	5.9	5.9	2.6
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	4.9E-04	7.1E-06	5.0	5.0	2.3
mmu_piR_027673/gb/DQ711996/ Mus_musculus:11:106317081:106317102:Plus	2.6E-04	2.8E-06	5.3	5.3	2.4
mmu_piR_035343/gb/DQ723106/ Mus_musculus:18:67167171:67167200:Minus	1.4E-02	1.2E-03	4.6	4.6	2.2
mmu_piR_035358/gb/DQ723132/ Mus_musculus:6:127759806:127759831:Minus	2.0E-02	2.1E-03	5.0	5.0	2.3
mmu_piR_036137/gb/DQ724278/ Mus_musculus:13:50672062:50672091:Minus	2.4E-02	2.6E-03	11.3	11.3	3.5
mmu_piR_036363/gb/DQ724592/ Mus_musculus:4:42628661:42628691:Minus	9.5E-04	1.9E-05	5.4	5.4	2.4

10

20

【0054】

起床時刻と入眠時刻の両時刻に唾液中で減少するマイクロRNAを表 1 2 に示す。

【表 1 2】

表 1 2

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-5618-3p	2.2E-02	7.3E-04	6.5	-6.5	-2.7
mmu-miR-7043-3p	1.9E-02	5.9E-04	4.7	-4.7	-2.2

30

【0055】

起床時刻に唾液中で減少するマイクロRNAを表 1 3 に示す。

40

50

【表 1 3 - 1】

表 1 3

パイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-let-7f-1-3p	3.7E-04	4.1E-06	8.0	-8.0	-3.0
mmu-miR-100-3p	2.2E-02	7.4E-04	6.4	-6.4	-2.7
mmu-miR-143-3p	3.2E-02	1.1E-03	6.7	-6.7	-2.7
mmu-miR-154-3p	4.6E-04	6.1E-06	19.5	-19.5	-4.3
mmu-miR-15a-3p	5.6E-06	2.1E-08	6.8	-6.8	-2.8
mmu-miR-187-5p	6.3E-03	1.6E-04	15.1	-15.1	-3.9
mmu-miR-299a-3p	2.6E-03	4.7E-05	5.5	-5.5	-2.5
mmu-miR-3074-2-3p	4.5E-03	1.0E-04	9.1	-9.1	-3.2
mmu-miR-3086-5p	2.4E-02	8.1E-04	2.4	-2.4	-1.3
mmu-miR-3094-3p	7.5E-05	5.1E-07	7.2	-7.2	-2.9
mmu-miR-344c-5p/mmu-miR-344h-5p	1.9E-04	1.9E-06	7.1	-7.1	-2.8
mmu-miR-344i	3.7E-03	7.4E-05	5.9	-5.9	-2.6
mmu-miR-345-5p	1.9E-02	5.6E-04	2.7	-2.7	-1.4
mmu-miR-347l	5.1E-04	7.7E-06	5.4	-5.4	-2.4
mmu-miR-374b-5p	1.2E-04	9.6E-07	10.9	-10.9	-3.4
mmu-miR-380-5p	4.8E-02	1.8E-03	8.5	-8.5	-3.1
mmu-miR-450b-3p	2.6E-02	9.0E-04	5.0	-5.0	-2.3
mmu-miR-466b-3p/mmu-miR-466c-3p/mmu-miR-466p-3p	3.6E-06	1.0E-08	6.2	-6.2	-2.6
mmu-miR-466d-5p	2.2E-02	7.4E-04	5.2	-5.2	-2.4
mmu-miR-466g	4.3E-06	1.5E-08	7.4	-7.4	-2.9
mmu-miR-466q	7.5E-05	5.4E-07	9.9	-9.9	-3.3
mmu-miR-467d-5p	3.9E-05	2.3E-07	12.3	-12.3	-3.6
mmu-miR-467h	1.2E-02	3.3E-04	5.9	-5.9	-2.6
mmu-miR-5618-3p	2.2E-02	7.3E-04	6.5	-6.5	-2.7
mmu-miR-6348	1.0E-03	1.6E-05	69.4	-69.4	-6.1
mmu-miR-641l	2.0E-03	3.3E-05	5.4	-5.4	-2.4
mmu-miR-652-3p	1.5E-02	4.2E-04	2.9	-2.9	-1.5
mmu-miR-669a-3p/mmu-miR-669o-3p	6.7E-05	4.2E-07	5.2	-5.2	-2.4
mmu-miR-669b-5p	1.9E-04	1.8E-06	7.6	-7.6	-2.9
mmu-miR-669k-3p	1.9E-06	1.8E-09	8.2	-8.2	-3.0
mmu-miR-669k-5p	4.0E-03	8.5E-05	4.2	-4.2	-2.1
mmu-miR-6910-3p	3.6E-03	7.1E-05	11.5	-11.5	-3.5
mmu-miR-6958-3p	3.2E-06	7.4E-09	109.3	-109.3	-6.8
mmu-miR-6995-3p	1.5E-02	4.1E-04	4.2	-4.2	-2.1
mmu-miR-7007-3p	3.5E-04	3.7E-06	11.8	-11.8	-3.6
mmu-miR-701-3p	3.2E-06	5.0E-09	13.7	-13.7	-3.8
mmu-miR-7021-3p	1.4E-03	2.3E-05	8.1	-8.1	-3.0
mmu-miR-7033-3p	5.1E-04	7.5E-06	5.5	-5.5	-2.5
mmu-miR-7037-3p	1.1E-05	5.2E-08	7.6	-7.6	-2.9
mmu-miR-7043-3p	1.9E-02	5.9E-04	4.7	-4.7	-2.2
mmu-miR-7043-5p	4.4E-04	5.3E-06	8.9	-8.9	-3.2
mmu-miR-7046-5p	4.5E-03	1.0E-04	5.7	-5.7	-2.5
mmu-miR-7061-3p	4.3E-03	9.3E-05	11.5	-11.5	-3.5
mmu-miR-7066-3p	7.6E-03	1.9E-04	23.1	-23.1	-4.5
mmu-miR-7066-5p	3.5E-02	1.3E-03	2.4	-2.4	-1.2
mmu-miR-7075-3p	1.4E-04	1.2E-06	9.2	-9.2	-3.2

10

20

30

40

50

【表 1 3 - 2】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-7083-3p	3.1E-04	3.1E-06	5.0	-5.0	-2.3
mmu-miR-7089-3p	1.7E-02	4.8E-04	4.5	-4.5	-2.2
mmu-miR-7115-3p	3.1E-05	1.6E-07	7.5	-7.5	-2.9
mmu-miR-7222-3p	4.0E-07	1.9E-10	9.7	-9.7	-3.3
mmu-miR-7225-3p	4.5E-04	5.7E-06	5.6	-5.6	-2.5
mmu-miR-7666-3p	3.5E-02	1.3E-03	2.4	-2.4	-1.3
mmu-miR-7678-3p	5.1E-04	7.5E-06	11.9	-11.9	-3.6
mmu-miR-7685-3p	3.1E-03	5.8E-05	25.3	-25.3	-4.7
mmu_piR_000219/gb/DQ540058/ Mus_musculus:17:39455665:39455691:Plus	4.9E-03	1.1E-04	6.9	-6.9	-2.8
mmu_piR_000619/gb/DQ540976/ Mus_musculus:17:39454691:39454717:Plus	1.7E-02	5.0E-04	4.1	-4.1	-2.0
mmu_piR_000639/gb/DQ541113/ Mus_musculus:17:39455268:39455298:Plus	3.1E-03	6.0E-05	5.6	-5.6	-2.5
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:11:74136081:74136106:Plus	5.2E-03	1.2E-04	4.5	-4.5	-2.2
mmu_piR_000691/gb/DQ541218/ Mus_musculus:8:126472331:126472356:Minus	4.8E-03	1.1E-04	11.9	-11.9	-3.6
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:2:5296574:5296603:Minus	2.5E-02	8.6E-04	6.5	-6.5	-2.7
mmu_piR_001570/gb/DQ543701/ Mus_musculus:3:5843412:5843441:Plus	2.0E-03	3.6E-05	6.8	-6.8	-2.8
mmu_piR_008386/gb/DQ567246/ Mus_musculus:11:105872236:105872266:Plus	3.1E-03	6.0E-05	4.8	-4.8	-2.3
mmu_piR_015572/gb/DQ694298/ Mus_musculus:2:92386337:92386364:Plus	1.0E-02	2.7E-04	10.5	-10.5	-3.4
mmu_piR_015802/gb/DQ694629/ Mus_musculus:9:54013125:54013153:Minus	2.1E-02	6.3E-04	4.1	-4.1	-2.0
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	4.4E-04	5.1E-06	7.3	-7.3	-2.9
mmu_piR_023799/gb/DQ706399/ Mus_musculus:2:151104329:151104359:Minus	4.0E-03	8.3E-05	5.6	-5.6	-2.5
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	6.4E-03	1.6E-04	4.7	-4.7	-2.2

10

20

30

【 0 0 5 6 】

入眠時刻に唾液中で減少するマイクロRNAを表 1 4 に示す。

40

50

【表 1 4 - 1】

表 1 4

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-7043-3p	9.3E-05	6.7E-07	6.7	-6.7	-2.7
mmu-miR-6350	1.3E-04	1.0E-06	9.0	-9.0	-3.2
mmu_piR_024586/gb/DQ707536/ Mus_musculus:14:43858859:43858886:Plus	1.9E-04	1.8E-06	5.6	-5.6	-2.5
mmu_piR_019674/gb/DQ700348/ Mus_musculus:17:66125541:66125571:Plus	3.9E-04	4.5E-06	8.7	-8.7	-3.1
mmu-miR-466c-5p	4.9E-04	7.2E-06	6.0	-6.0	-2.6
mmu-miR-5618-3p	4.9E-04	6.8E-06	7.6	-7.6	-2.9
mmu-miR-6972-3p	6.0E-04	1.1E-05	5.6	-5.6	-2.5
mmu-miR-1a-2-5p	7.4E-04	1.4E-05	5.5	-5.5	-2.5
mmu-miR-3077-3p	2.4E-03	7.7E-05	2.6	-2.6	-1.4
mmu-miR-7116-5p	3.4E-03	1.2E-04	2.6	-2.6	-1.4
mmu-miR-6937-5p	4.1E-03	1.8E-04	3.9	-3.9	-2.0
mmu-miR-195b	5.9E-03	3.4E-04	4.5	-4.5	-2.2
mmu_piR_020045/gb/DQ700914/ Mus_musculus:6:119180400:119180427:Plus	6.7E-03	4.2E-04	4.5	-4.5	-2.2
mmu-miR-7090-5p	9.4E-03	7.0E-04	2.1	-2.1	-1.1
mmu-miR-6355	1.1E-02	8.3E-04	3.5	-3.5	-1.8
mmu-miR-705	1.1E-02	8.5E-04	4.1	-4.1	-2.0
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:16:57312815:57312840:Minus	1.1E-02	9.1E-04	7.8	-7.8	-3.0
mmu-miR-6925-3p	1.2E-02	9.4E-04	4.2	-4.2	-2.1
mmu-miR-6690-5p	1.2E-02	1.0E-03	4.1	-4.1	-2.0
mmu-miR-410-3p	1.4E-02	1.2E-03	2.2	-2.2	-1.1
mmu-miR-1952	1.5E-02	1.3E-03	2.5	-2.5	-1.3
mmu-miR-1941-5p	1.6E-02	1.4E-03	2.3	-2.3	-1.2
mmu-miR-741-3p	1.6E-02	1.4E-03	2.6	-2.6	-1.4
mmu-miR-1b-3p	1.6E-02	1.5E-03	3.0	-3.0	-1.6
mmu_piR_000578/gb/DQ540853/ Mus_musculus:17:39456112:39456137:Plus	1.6E-02	1.5E-03	5.8	-5.8	-2.5
mmu_piR_018323/gb/DQ698371/ Mus_musculus:14:49387992:49388017:Plus	1.6E-02	1.5E-03	9.5	-9.5	-3.2
mmu-miR-6238	1.7E-02	1.6E-03	3.3	-3.3	-1.7
mmu_piR_024652/gb/DQ707642/ Mus_musculus:12:98810616:98810645:Minus	1.7E-02	1.6E-03	15.8	-15.8	-4.0
mmu-miR-881-3p	1.8E-02	1.8E-03	2.8	-2.8	-1.5
mmu-miR-669j	1.8E-02	1.9E-03	3.3	-3.3	-1.7
mmu-miR-3070-5p	2.1E-02	2.3E-03	2.7	-2.7	-1.5
mmu_piR_002643/gb/DQ547181/ Mus_musculus:3:5843705:5843732:Plus	2.2E-02	2.4E-03	3.7	-3.7	-1.9
mmu-miR-6336	2.3E-02	2.5E-03	3.3	-3.3	-1.7
mmu-miR-206-5p	2.3E-02	2.5E-03	2.4	-2.4	-1.2
mmu-miR-8120	2.6E-02	3.0E-03	2.3	-2.3	-1.2
mmu-miR-3618-3p	2.9E-02	3.5E-03	2.2	-2.2	-1.1
mmu-miR-1264-5p	3.0E-02	3.6E-03	2.2	-2.2	-1.1
mmu-miR-384-5p	3.1E-02	3.7E-03	4.4	-4.4	-2.1
mmu-miR-3962	3.1E-02	3.8E-03	3.9	-3.9	-1.9

10

20

30

40

50

【表 1 4 - 2】

バイオマーカー名	p (Corr)	p	FC (abs)	FC	Log FC
mmu-miR-3963	3.1E-02	4.0E-03	3.3	-3.3	-1.7
mmu-miR-5709-5p	3.1E-02	4.0E-03	2.6	-2.6	-1.4
mmu-miR-3069-5p	3.2E-02	4.1E-03	2.6	-2.6	-1.4
mmu-miR-7034-5p	3.2E-02	4.2E-03	4.3	-4.3	-2.1
mmu_piR_004374/gb/DQ552696/ Mus_musculus:18:85832427:85832456:Minus	3.6E-02	4.8E-03	4.6	-4.6	-2.2
mmu-miR-181b-1-3p	3.7E-02	4.9E-03	2.2	-2.2	-1.1
mmu-miR-105	3.8E-02	5.1E-03	3.0	-3.0	-1.6
mmu-miR-3082-3p	3.8E-02	5.1E-03	2.2	-2.2	-1.1
mmu-miR-195a-5p	4.1E-02	5.7E-03	3.5	-3.5	-1.8
mmu-miR-7241-3p	4.4E-02	6.3E-03	8.8	-8.8	-3.1
mmu-miR-153-3p	4.5E-02	6.5E-03	4.3	-4.3	-2.1
mmu-miR-20a-3p	4.6E-02	6.8E-03	3.3	-3.3	-1.7
mmu-miR-290a-5p	4.6E-02	6.8E-03	3.1	-3.1	-1.6
mmu-miR-551b-5p	4.8E-02	7.1E-03	2.1	-2.1	-1.1

10

20

30

40

50

フロントページの続き

茨城県稲敷郡阿見町中央三丁目 2 1 番 1 号 国立大学法人茨城大学 農学部内

F ターム (参考) 2G045 AA25 CB07 DA02 DA04 DA14 DA16 DA35

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ52 QR32 QR55 QR62 QS25 QS34 QS36