「人間感覚計測応用技術」特集

副腎皮質・髄質ホルモンを中心としたストレスの測定

中 村 実

1. はじめに

ストレス研究はホメオスタシスの概念を提唱した W. B. Cannon と 1936 年にストレス学説を提出した H. Selye の報告がその出発点となっている。Cannon の危急反応説によると危急の際に交感神経活動すなわちカテコールアミン（エピネフリン，ノルエピネフリン，ドーパミンの総称で以下 CA と略記する）分泌の亢進を特徴とする一連の反応が起こるといふ。また，Selye は刺激の種類によらず侵襲的な刺激一般によってコルチゾール（以下 CS と略記する）分泌に代表される汎適応症候群が発生すると述べている。

Selye はその後ストレスとは「誘因的作用因子に反応する生体内の状態を意味する」ものとし，誘因的作用因子をストレスと呼んだ（周知のように理工学分野では以前から Stress-Strain [応力-歪み] という言葉が用いられているが，これとはかなり異なった使い方である）。

本研究ではいくつかの事例をもとに視床下部-下垂体-副腎皮質系と交感神経-副腎髄質系の挙動（CS および CA）を調べることによって，Selye の定義を採用すれば，ストレスとそれに対応するストレスとの関係を，情動（特に不快，不安といった負の情動に着目）と CS，CA との関連において明らかにすることを試みている。

ストレスの生理指標として上記ホルモンを分析するためには，検体採取の行為自体がストレスにならないことが肝要である。従って，

- ①尿や唾液のような非侵襲的に採取可能な生体液中に存在する微量のホルモンが分析できる（計測技術の開発）

- ②比較的簡便に測定値を得ることができる（測定装置の開発）

- ④それらのホルモンとストレスと情動との関連性を見出す（ストレスの指標化）
ことを具体的な目的とした。

2. ストレス指標物質測定技術の開発

生体液を試料としてステロイド類を分析する研究は古くから行われているが，血液，尿，唾液などの多数の検体を取り扱う臨床検査センターなどでは放射性同位元素で標識した化合物を用いる免疫測定法（Radio-immunoassay, RIA 法）が多用されており，分析試薬のキットも市販されている。しかし，放射性物質を取り扱うために設備面や管理面の制限を受けるため，簡便な方法とは言いがたい。

また，汎用分析装置である HPLC 法を基本システムとして，高感度で選択的に目的物質を定量するために UV 検出法や誘導体化-蛍光検出法，質量分析法との組み合わせが種々検討されている。検出感度や選択性などの条件を含め，専用装置としての実用化・小型化を考えると HPLC 法は魅力ある方法と考えられた。

2.1 唾液中 CS の分析法

対象とする生体液としては被験者もしくは患者の心身の負担が少なく，採取行為自体ができるだけストレスとならないことを第一に考え，血中遊離 CS 濃度とも相関があると言われている唾液を選択した（装置の開発では臨床医学的にも重要な尿も対象にしている）。唾液中の CS 濃度は血中濃度に比べてかなり低く，0.1ppb (pmol/mol) のレベルのため高感度な検出法が必須になる。また，通常 HPLC 分析上妨害となる成分を除去し，目的物質の濃縮を図るため，採取試料を除蛋白した後ア

著者紹介 MINORU NAKAMURA
Shiseido Co., Ltd.

株式会社 資生堂ビューティーサイエンス研究所 参事

著者は分析化学を専門とされる。

本稿では，一般の実験室でも取扱える HPLC を用いた副腎ホルモンの高感度分析法と装置および日常生活での応用研究事例について解説いただいた。

図1. 唾液中CS測定用HPLCシステム

図2. 唾液中CA測定用HPLCシステム

ルミナカラム, ODS 固相抽出カラム, ジクロロメタンによる溶媒抽出等を行う必要がある。このような前処理操作は煩雑で、熟練した技術と時間を要するため誰もが一定の良好な回収率を得るのは難しい。そこで、この前処理部分に関して除蛋白や濃縮機能を持つカラムおよび高感度検出条件を組み合わせるカラムスイッチングHPLCによる自動化を検討した(図1, 2)。

唾液は唾液採取具 Salivette® (Sarstedt 社, Germany; 直径9mm, 長さ40mm 程の円柱状吸取体を口に含むことによって約2mlの全唾液が吸収される)を用いて採取した。HPLCに導入された試料はMFカラム(弊社製HPLC用カプセル型ミックスドファンクショナル充填カラム, 図1では除蛋白カラム)と呼ばれるカラムを通して, CS, CAに分離される。CS画分はカラムスイッチングによりCN(シアノプロピルカラム)の先端に濃縮され, グラジエント溶出法により分離される。分離後蛍光ラベル化剤として濃硫酸を用い, レーザー蛍光検出器(Ex.488nm, Em.537nm)により検出, 定量される。本法で要する時間は唾液採取に約2分, 遠心分離・希釈・ろ過に約5分, HPLC分析に約40分(CSのピークは保持時間約30分に認められる)である。

2.2 唾液中CAの分析法

唾液中CAの分析例は極めて少なく, その挙動を明らかにすることはストレス研究にとって有益と考えられる。方法的には先のCSの分析システムを踏襲できるが, いくつかの検討が必要となった。ひとつはCAの唾液中での安定性の問題である。初期の検討段階でCAの酸化が

主要因と考えられる比較的速やかな分解, 消失がみとめられた。その対策として効果があったのは唾液採取後直ちに酸化防止剤として還元型グルタチオンとEGTA(エチレンジアミン-N,N',N'-四酢酸)を添加することで, それにより冷凍保存で少なくとも約2.5か月は安定に存在することが分かった。もうひとつは検出感度の向上とそのためのCAの濃縮である。CAの場合は溶離分析を行う前に濃縮機能を持ったカラムに一旦濃縮する必要があるため, フェニルホウ酸カラム(図2では濃縮カラム)を組み込み, 選択的にCAを吸着させ, その後カチオン交換カラム(図2では分離カラム)で分離分析する。更に常法であるDPE(ジフェニルエチレンジアミン)付加による誘導体化の後, 高感度化のため一部改造したレーザー蛍光検出器(Ex.355nm, Em.470nm)を用いて定量した。その結果, 文献等で報告されている検出限界の約5倍の感度(5fmol)を得ることが出来た。現在確立した方法で基礎的なデータ蓄積を図っており, 一部はストレスホルモンの挙動の項で紹介する。

3. ストレス指標物質測定装置の開発

分析法の開発研究で用いた装置は約8m²のスペースを必要とするため, 実用装置としては小型化を第一の目標に開発を行った。装置としてはセミマイクロHPLC(弊社製: ナノスペース)を使用した。

セミマイクロHPLCの特長は分析法の開発研究で用いた装置の1/8~1/10の大きさであること, また移動相の線速度を汎用HPLCと同じ値に設定した場合, 相対的に10~20倍の感度の向上が図れることである。更に, 汎用HPLCではポンプの送液量は約1ml/minで使用されることが多く, 本法のようなカラムスイッチング, ポストカラムラベル化法の場合, 多数のポンプを使用するために一日の溶媒の使用量は相当なものになる。セミマイクロHPLCの場合, ポンプの送液量は約0.1ml/minと10分の1の量ですむため, 溶媒使用量の大幅な低減が可能で, 長期の連続自動運転にも適している。そこで, ナノスペースをベースにしてプロトタイプを組み立て, 実用機の検討を行った。

3.1 尿中CS, CAの分析

ストレス指標物質測定装置のプロトタイプの概略を図3に示す。基本的な考え方は分析技術の開発研究で得られた知見を応用しており, 前処理カラムとカラムスイッチングが基本になっている。小型化に際して配慮した点はポストカラム蛍光検出器の部分で, プロトタイプ(セミマイクロHPLC)の場合, 初期の検討ではCSはUV検出器のみで25pg, CAは電気化学検出器(ECD)

とが示唆された(図6)。

次に社内研究発表会(聴衆100名以上, 重役出席)の

図5. 唾液中CSの日間変動

図6. 徹夜時の唾液中CSの変動

発表者(女性, 30歳)とOHP操作者の唾液中CSと情動の変化を図7に示す。発表前後での唾液中CSの濃度はOHP操作者はほとんど変化していないが, 発表者は発表日の朝から上昇しており, 発表後は日常値(発表から8日後の同時刻)の約5倍の値を示している。一方, 情動質問紙による主観変化を見ると発表者の発表前のエネルギー覚醒+ (活力興奮; 機敏な, 活動的な, 気力に満ちた), 発表後のエネルギー覚醒- (脱力鎮静; 無気力な, 生気がない, 気分ののらない)の急上昇が特徴的である。

次に怒り, 嫌悪, 恐怖, 喜び, 悲しみの情動を喚起す

図8. ビデオ視聴による尿中CA, CSの変化

(Aは怒りビデオ群, Dは嫌悪ビデオ群, Fは恐怖ビデオ群, Hは喜びビデオ群, Sは悲しみビデオ群, 各カラム上の線分はSDを示す)

図7. 研究発表時の唾液中CSと情動の変化

るビデオ視聴時の尿中 CA の変化は、怒りと恐怖においてエピネフリンの増大、喜びと悲しみにおいてノルエピネフリンの減少が認められた (図 8)。CS はビデオ視聴による減少が認められたが、これは新奇場面による緊張の緩和を反映したものと解釈される。これは研究発表等の現実の場とは異なる実験室実験の難しさを示しており、実場面の多様な情動とホルモンの変化を地道に捉えていくことが大切である。

5. さいごに

唾液中 CS の分析法や尿中 CS、CA 測定装置の開発により、当面はストレスを検知する際の基礎となる標準値を設定することが必要となる。それと並行して情動と CS、CA の挙動についても、事例研究を通して一層明らかなものにしていきたい。

また、唾液中 CA の挙動については先行研究が乏しく、今後詳細な検討を行いたい。

本研究は通産省工業技術院の産業科学技術研究開発制度「人間感覚計測応用技術」の委託研究で、(株)資生堂安全性・分析センター、基盤技術研究所、ビューティーサイエンス研究所が担当している。

6. 参考文献

1. 坂内四郎著, 新バイオサイエンスシリーズ: ストレス探究—分子レベルでみると— (化学同人, 1994)
2. 高松翼, 唾液中のストレス指標物質の計測, 日本機械学会全国大会先端技術フォーラム (1994, 札幌)
3. 大津裕, セミマイクロラム高速液体クロマトグラフを用いた体液中のストレス指標物質の測定, ヘルシーライフ機器システム研究会 (1994, 大阪)
4. 阿部恒之ら, ビデオによる情動の変化, 日本心理学会第59回大会発表論文集, p.906 (1995, 沖縄)
(平成 8 年 6 月 21 日受理)

膜シンポジウム '96 “膜材と輸送現象”

(Membrane Materials and Transport Phenomena)

日 時: 12月5日(木), 6日(金)

会 場: 京都大学薬学部記念講堂

〒606-01 京都市左京区吉田下阿達町46-29

発表申込締切: 9月7日(土)必着

講演要旨原稿締切: 10月4日(金)必着

参加費: 主催・協賛学会員 6,000円 (当日 7,000円)

非会員 9,000円 (当日 10,000円),

学生 3,000円, 法人 (5名まで参加可)

25,000円

懇親会: 会費 5,000円 (当日 6,000円)

問い合わせ先: 〒560 大阪府豊中市待兼山町1-3

大阪大学基礎工学部化学工学科

東稔 節治

電話 06-850-6250

FAX 06-850-6254

液晶若手研究会第3回講演会 「2000年の液晶研究」

—21世紀へ挑戦する LCD 技術の最先端—

日 時: 10月4日(金) 9:00~20:00

会 場: 九州大学 工学部

申込締切: 定員300名になり次第締切

参加費: 事前申込 会社7,000円, 大学・官公庁5,000円

当日受付 会社8,000円, 大学・官公庁8,000円,

学生1,000円

問い合わせ先: 〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

九州大学工学部応用物質化学科

菊池裕嗣

電話 092-642-3560

FAX 092-615-5606

E-mail: hkikutcf@mbox.nc.kyushu-u.ac.jp