



唾液アミラーゼ活性を利用した 交感神経活動モニターの開発

Development of sympathetic nervous system activity monitor
using salivary amylase activity

東 朋幸 水野 康文 山口 昌樹

技術論文

Abstract

In order to understand human sensitivity and emotion, it is considered useful to evaluate the functions of the the autonomic nervous system (the sympathetic nervous system and parasympathetic nervous system). In addition, it is understood that the salivary amylase activity reflects the sympathetic nervous system activity based on the results of recent studies. In order to easily monitor the sympathetic nervous system activity in daily life, a dry chemistry type salivary amylase activity analyzer was then developed. By developing a method for quantitatively sampling a small amount ($\sim \mu\text{L}$) of saliva, the technology for measuring the salivary amylase activity using colorimetry has been established. Functions to eliminate the effects of the ambient temperature and the pH of the saliva on the measured value are included in this instrument. The measuring range is 10 - 140 kU/L, and the measuring accuracy of $R^2 = 0.99$, which exceeds the standard value of $R^2 = 0.95$ for the portable measuring instrument, have been achieved. This instrument can precisely analyze the salivary amylase activity in about one minute including the time for sampling the saliva.

要旨

ヒトの感性や情動を知るためには、自律神経系(交感神経系と副交感神経系)の機能を評価することが有用であると考えられている。その一方で、最近の研究結果から唾液アミラーゼ活性は交感神経活動を反映することが分かってきた。そこで、日常生活における交感神経活動を簡単にモニタリングするために、ドライケミストリー式の唾液アミラーゼ活性分析装置を開発した。 μL オーダーの微量唾液を定量採取する方法などを考案することによって、比色法による唾液アミラーゼの活性値を測定する技術が確立できた。本装置には、環境温度と唾液 pH の測定値への影響を除去する機能も搭載されている。測定レンジは10～140kU/Lで、その測定精度は携帯型簡易測定器の目安となる $R^2 = 0.95$ を上回る $R^2 = 0.99$ を実現した。本装置は、唾液採取までを含めておよそ1分程度で唾液アミラーゼ活性を高精度に分析できる。

1 はじめに

ヒトの情動や感性を客観的に評価できれば、より快適で違和感のない製品や、個人の能力や好み等に合せて仕様の変更が可能なパーソナルフィット

製品等、付加価値の高い商品開発が可能になる。ヒトの情動を計測、評価する技術としては、アンケートやインタビューを通して心理学的側面から評価する方法¹⁾や、自律神経系等の生理的反応から評価する方法²⁾が用いられている(表1)。

表1 各測定方法の特徴

	心理学的手法	生理学的手法
長所	- 測定自体が簡易である - 機械では測定できない感覚での評価が可能	- 客観的な評価が得られる - 実時間での反応を捉えることができる
短所	- 客観的評価が得にくい - 意識されない刺激の評価は不可能	- 測定が大掛かりとなる - 被検者の拘束が強い

一方、ヒトの唾液は、唾液腺と呼ばれる器官から口腔内に分泌され、その唾液腺の活動を支配しているのは、主に、交感神経であることが知られている。従って、唾液中に最も多く存在する酵素であるアミラーゼの分泌も、同様に交感神経系により支配されていると考えられる。このことから、唾液中のアミラーゼの働き度合いを示す唾液アミラーゼ活性は、交感神経 - 副腎髄質系 (SAM system: Sympathetic nervous-adrenomedullary system) の神経活動を評価するための指標になり得ると考えられている^{3,4)}。唾液は非侵襲で採取できること、さらに頻回計測が容易であることから、唾液を用いた交感神経活動の計測は、日常生活における実用レベルでの情動や感性の評価に極めて有効であると考えられる。

これまでに著者らは、唾液による交感神経活動の測定技術の確立を目的として、携帯型の唾液アミラーゼ活性分析装置の開発に取り組んできた⁵⁾。この装置には、ドライケミストリー方式による唾液アミラーゼ活性の分析技術が採用されており、従来用いられていた試薬と臨床自動分析装置を用いた液系の分析方法に比べて、小型化が実現されている。しかし、期待される随時性や即時性、簡便性といった長所を実用レベルで実現するためには、 μL オーダーの微量検体の定量採取や反応時間の制御といった機能を追加することが必要である。

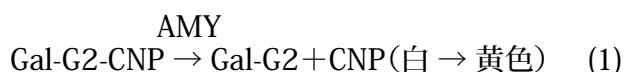
そこで本研究では、上記課題を解決するために、新たに唾液採取器具、定量転写機構を考案し、これらを搭載した携帯型唾液アミラーゼ活性分析装置を開発した。環境温度や唾液 pH による唾液アミラーゼ活性の測定値への影響を除去するために、温度依存性、pH 依存性を実験的に求め、それらの特性値に基づいて活性値を自動校正する機能を搭載した。また、測定装置のレンジ、精度を知るために検量線を作成し、交感神経活動モニターとしての有用性を検討した。

2 機材と方法

2.1 測定原理

アミラーゼはデンプンを麦芽糖に加水分解する酵素の総称であり、唾液中に最も多く含まれる酵素である。酵素を定量的に分析するには、その数(濃度)を測定する方法と、酵素の働き度合いを測定する方法の2種類がある。一般的には後者が用いられ、その働き度合いを酵素活性(Enzyme Activity)という。濃度と活性は異なる単位であるが、同一の条件下(温度、pH等)では比例関係にあり、いずれも酵素の働き度合いを示す単位として用いられることが多い。アミラーゼ活性は、 37°C において1分間に $1\ \mu\text{mol}$ のマルトースに相当する還元糖を生成する酵素量を1Unitとして示される⁷⁾。

試作した携帯型唾液アミラーゼ活性分析装置は、唾液 α -アミラーゼ(AMY)の基質であるGal-G2-CNP (2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside)を含浸した試験紙を用いたドライケミストリー式の測定システムである。Gal-G2-CNPとは、血液中のアミラーゼ活性を分析するための臨床用試薬である。Gal-G2-CNPにAMYが加えられると、AMYの加水分解作用により色原体であるCNPが遊離し、黄色に発色する(式(1))。



AMYの分解能力と遊離するCNPの数は比例関係にあるため、CNPによる発色濃度を光学的に測定することで、唾液アミラーゼ活性を知ることができる。

唾液中のアミラーゼは、血液中に比べて数100～1000倍の濃度があるため、血液用の試薬をそのまま用いることができない。従って唾液のアミラーゼ活性を分析するには、唾液検体を希釈する等の前処理が必要となる。本装置においては、日常生活における実用レベルでの測定を実現するために、試薬に競合剤を調合することで、希釈を必要としない反応系を開発した。すなわち、基質と同様の働きを持つオリゴ糖(マルトース1水和物、ペンタオース)を添加し、AMYとGal-G2-CNPとの反応をオリゴ糖で阻害させることによって、希釈と同様の効果を実現した。

本反応においては、AMYは酵素としての機能を失わないため、次々と新しい基質と反応を続けていく。そのため、AMYに対して測定時間内に反応が持続するのに十分な量のGal-G2-CNPを供給し、ある単位時間内のCNP生成量を測定することで、酵素活性を測定する。そのためには、反応時間と検体量の制御が必要となる。そこで、一定量の唾液を採取できる唾液採取機構、および簡易な操作で反応時間を制御できる唾液転写機構を考案し、比色法による唾液アミラーゼ活性の定量を実現した。



図1 測定器本体とテストストリップ

2.2 携帯型唾液アミラーゼ活性分析装置

測定系は、使い捨て式のテストストリップと測定器本体(110×100×40mm、350g)から構成される(図1)。テストストリップは唾液採取紙(10×10×0.23mm)が取り付けられた採取シート(120×10×0.25mm)と試験紙ホルダーから構成される(図2)。試験紙ホルダーの裏面には試験紙(4×4×0.25mm)が貼り付けられている。試験紙には、基質の他に、検体である唾液のpHの影響を受けにくくするためのpH緩衝剤を含浸させている。すなわち、MES(2-Morpholinoethanesulfonic acid, CAS No.4432-31-9)で緩衝能をpH6.5に調整したグッドバッファーに、基質であるGal-G2-CNPを溶解してから濾紙に含浸し、その後乾燥させている。測定器本体には、唾液転写機構と、試薬の発色濃度を測定する光学測定部が設けられている。

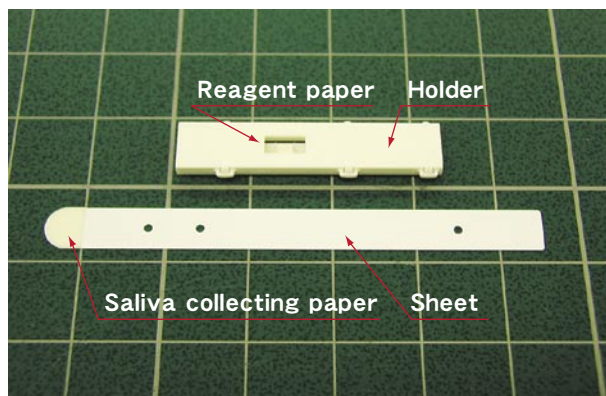


図2 テストストリップ

採取シートを口腔内に挿入し、舌下部から10～30sかけて直接全唾液を約20～30μL採取する(図3)。その後、テストストリップを測定器本体に取り付け、カバーを閉じる。転写レバーを操作すると、

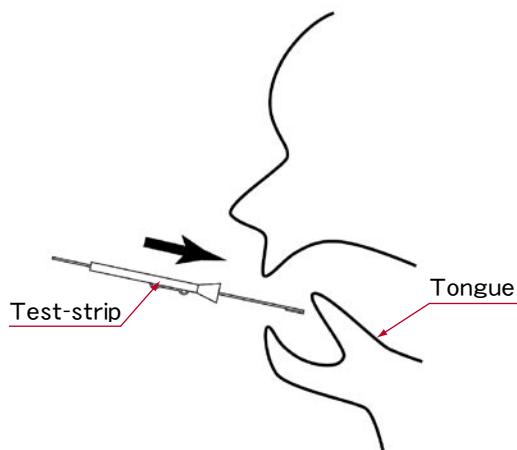


図3 唾液の採取

試験紙ホルダーの裏側に貼り付けられた試験紙が唾液採取紙に押し付けられ、唾液が転写される(図4a)。この時点を実験開始時間として検出し、予め設定しておいた転写時間が経過するとアラームが鳴る(図4b)。その後採取シートを引き出すと、酵素反応によって発色した試験紙の発色濃度が、光学測定部によって測定される(図4c)。反応開始から予め設定しておいた一定時間経過時の発色濃度を測定し、その測定値から換算されたアミラーゼ活性値がディスプレイに表示される。本分析装置は唾液採取が30s、転写が10s、反応時間が20sに設定されている。全て含めて約1分程度で唾液アミラーゼ活性を測定できる。

2.3 温度特性と pH 特性

唾液アミラーゼ活性の温度依存性を調べるために、温度特性を求めた。現在、ヒトアミラーゼ活性の国際的な標準測定法は規定されていない⁶⁾。一般的には、基質にデンプンを用いる方法や、共役酵素を用いる方法などがある。今回は、Gal-G2-CNP を基質とした酵素法試薬(Espa AMY liquid2, Nipro Co., Japan)と臨床自動分析装置(Miracle Ace 919, Nipro Co., Japan)を用いて唾液アミラーゼ活性を分析する方法を採用した。唾液検体としては、健康男性3名から採取した全唾液を用いた。まず37℃

の条件下での唾液アミラーゼ活性を測定し、次に、恒温セルホルダーを内蔵した分光光度計を用いて、温度を10、20、30℃に変化させて同一の唾液検体を測定した($n=60$)。ヒトの体温に近い37℃でのアミラーゼ活性を100%とし、他の温度における相対活性を計算して温度特性を求めた。

次に、唾液アミラーゼ活性のpH特性を求めた。唾液検体のpHを所望の値に調整するため、採取した検体に1% BSA(Bovine Serum Albumin,ウシ血清アルブミン: 酵素を安定化させる作用がある)溶液にて希釈したHClとNaOH溶液を加え、pHを4.4~9.1に調整した。BSAは、pH調整により唾液検体の総タンパク量が希釈されないように用いた。これらのpH調整した検体を試験紙(4×4×0.25mm)に4.5 μ L滴下し、滴下から30s後の唾液アミラーゼ活性を携帯型分析装置で測定した($n=35$)。同時に、試験紙のpHを、マイクロpH電極(9810BN, Orion Research Inc., MA, USA)を用いて測定した。このpH電極のpH感応部の直径は0.9mm、長さは1.1mmと微小なので、数 μ Lの検体のpHの測定が可能である。pH6.5におけるアミラーゼ活性を100%とし、他のpHにおける相対活性を計算してpH特性を求めた。

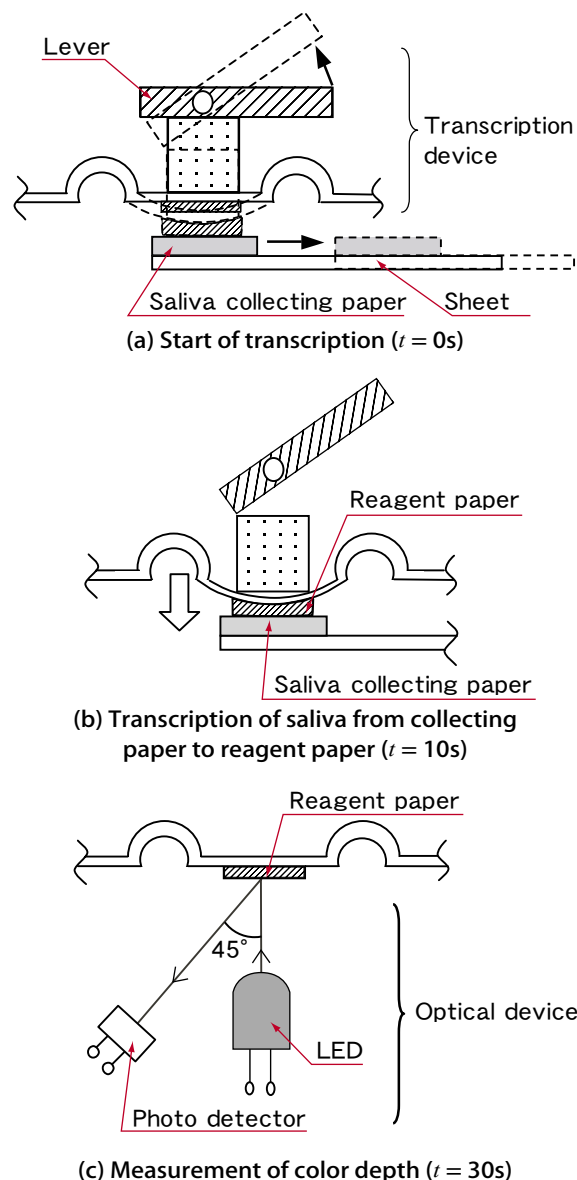


図4 唾液転写機構と測定プロトコル

2.4 検量線

本試作機では、酵素活性を直接測定しているのではなく、試薬の発色濃度を光学的に測定した結果を酵素活性に換算している。測定器の出力には明確な基準がないため、試作機の出力を校正して基準となる酵素活性との関連を知る必要がある。そこで、前記酵素法試薬と臨床自動分析装置を基準とした検量線を作成した。検体には、被検者7名(男性5名、女性2名)より採取した全唾液を用いた。この検体の37℃における唾液アミラーゼ活性を、酵素法試薬と臨床自動分析装置により測定した。同時に同じ検体を携帯型分析装置によって測定し、臨床自動分析装置を基準とした携帯型分析装置の検量線を作成した。唾液アミラーゼ活性の測定はそれぞれの唾液検体について7回繰り返して行い、最大値、最小値を除いた5件のデータを用いた。この検量線の結果より、携帯型分析装置の測定レンジと測定精度を評価した。

3 結果と考察

3.1 温度特性とpH特性

温度の低下に伴う唾液アミラーゼ活性の低下が観察され、温度に大きく依存していることが確認できた(図5)。アミラーゼ活性の標準測定温度条件⁶⁾に対する温度特性式として、次式が得られた($R^2=0.99$)。

$$\%AMY = 0.048T^2 + 0.59T + 12.1 \quad (2)$$

この温度依存性を補正するために、携帯型分析装置には温度補正機能を搭載してある。本体にはデジタル温度計(DS18S20, Maxim Integrated Products, Inc., CA, USA)が搭載されており、この温度計により検出された雰囲気温度と、式(2)より求めた温度補正式により、37℃における唾液アミラーゼ活性が算出される。

唾液pHの測定値への影響を除去するために、試験紙にはMESで緩衝能をpH6.5に調整した緩衝剤を含浸してある。測定の結果、pH特性において唾液アミラーゼ活性はpH6.5で最大値を取り、酸性またはアルカリ性に変化するにつれて低下することが分かった(図6)。pH特性式として、次式が得られた($R^2=0.96$)。

$$\%AMY = -0.075pH^2 + 0.99pH - 2.3 \quad (3)$$

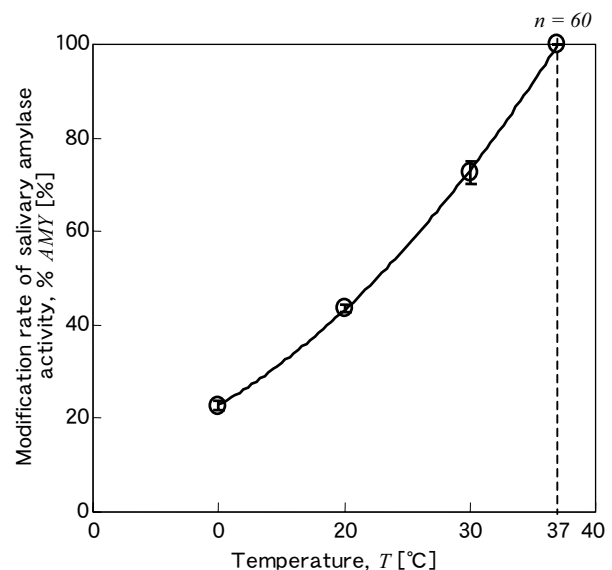


図5 唾液アミラーゼ活性の温度特性
($\%AMY = 0.048T^2 + 0.59T + 12.1$)

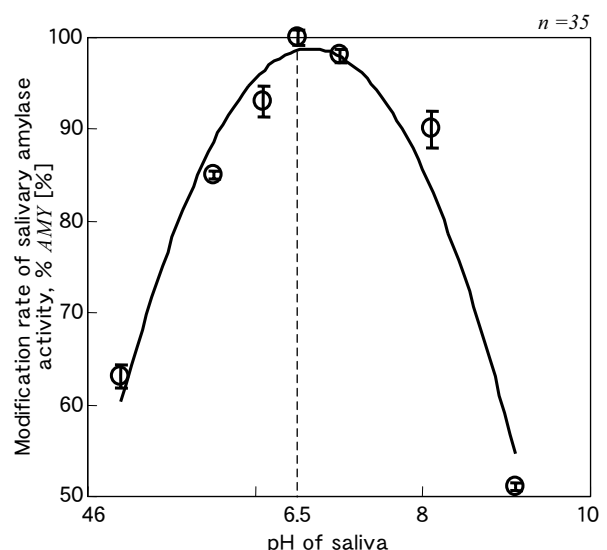


図6 唾液アミラーゼ活性のpH特性
($\%AMY = -0.075pH^2 + 0.99pH - 2.3$)

携帯型分析装置にはpH補正機能も搭載した。通常はpH6.5の値を表示するように設定されている。被検者の口腔内のpHが中性からの大きな差異が予想される場合には、市販のpH試験紙を用いて口腔内のpHを測定する。そのpH値を本体に入力することにより、式(3)から求めた補正式からpH6.5における唾液アミラーゼ活性が計算され、pHの影響を除去することができる。

3.2 検量線

臨床自動分析装置の分析結果を基準とした、携帯型分析装置の検量線を図7に示す。唾液アミラーゼ活性が10～140kU/Lの範囲で $R^2=0.99$ と良好な検量線が得られた。測定精度については、携帯型簡易測定器の目安となる $R^2=0.95$ を超える精度を有しており、十分な測定精度であることが確認された。測定レンジについては、想定される実用範囲には十分適用可能であるが、試薬や測定条件を調整することによって、測定レンジを変更することも可能である。

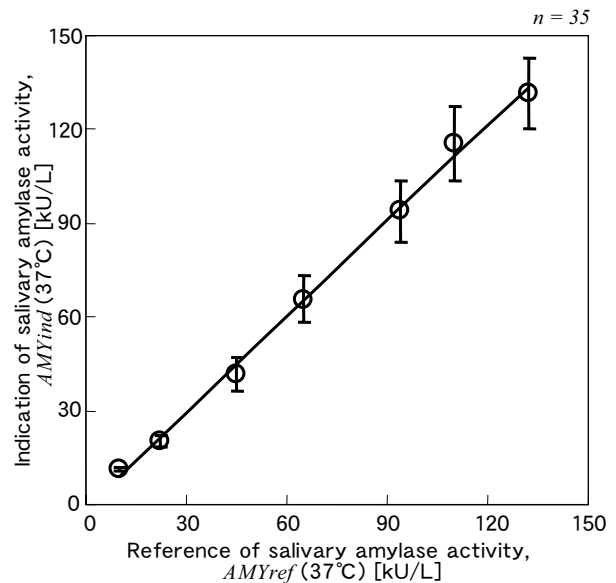


図7 携帯型唾液アミラーゼ活性分析装置の検量線
($y = 0.97x - 1.71$)

4

おわりに

日常生活における交感神経活動のモニタリングを実現するために、ドライケミストリー式の携帯型唾液アミラーゼ活性分析装置を試作した。比色法による唾液アミラーゼ活性値の測定技術を開発した。試作機には、活性値に影響を与える環境温度と唾液pHを補正する機能が搭載されている。携帯型分析装置の性能を示す検量線は、唾液アミラーゼ活性が10～140kU/Lの範囲で $R^2=0.99$ と良好な結果が得られた。想定される実用範囲に十分適用可能で、一般的な簡易測定器以上の精度が実現されている。唾液採取までを含めておよそ1分程度で唾液アミラーゼ活性を分析できる技術が確立された。

最後に、テストストリップの試作に協力されたニプロ株式会社総合研究所 吉田 博部長代理に謝意を表す。

■参考文献

- 1) 天坂格郎, 長沢伸也: 官能評価の基礎と応用, 日本規格協会 (2000)
- 2) 三宅晋司: 快適工学, 泉文堂 (1994)
- 3) Skosnik, D.P., Chatterton, T.R.Jr., Swisher, T., Park, S., 2000. Modulation of attentional inhibition by norepinephrine and cortisol after psychological stress. *Int. J. Psychophysiol.* 36, 59-68.
- 4) Chatterton, T.R., Vogelsong, M.K., Lu, Y., Ellman, B.A, Hudgens, A.G., 1996. Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clinical physiology.* 16, 433-448.
- 5) Yamaguchi, M., Kanemori, T., Kanemaru, Takai N., Mizuno, Y. Yoshida, H., 2004. Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosensors & Bioelectronics.* 20, 491-497.
- 6) Lorentz K., 1998. Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes part 9. IFCC method for α -amylase (1,4- α -D-Glucan 4-Glucanohydrolase, EC 3.2.1.1). *Clin. Chem. Lab. Med.* 36, 185-203.
- 7) NC-IUBMB, 1992. *Enzyme Nomenclature*. Academic Press Inc., San Diego.

■著者



東 朋幸

Tomoyuki Higashi

コーポレートR&D本部
システム技術研究チーム



水野 康文

Yasufumi Mizuno

コーポレートR&D本部
システム技術研究チーム



山口 昌樹

Masaki Yamaguchi

富山大学工学部