



唾液アミラーゼ活性は ストレス推定の指標になり得るか

Is Saliva an Index for Stress Level?

水野 康文 Yasufumi Mizuno 山口 昌樹 Masaki Yamaguchi[※] 吉田 博 Hiroshi Yoshida^{※※}
●研究開発 C. コア技術研究室ダイナミクス G, [※] 富山大学 工学部 物質生命システム工学科,
^{※※} ニプロ (株) 総合研究所

Abstract

More than half a century has passed since Hans Selye defined “stress” as the body’s response when a human being is subjected to an outside stimulus. However, no one has yet proposed an index for making quantitative evaluations of stress. The authors of this report focused on the changes in activation of α -amylase in the saliva and attempted to detect psychological stress in tests with six normal subjects. As the psychological stressor, the Kraepelin Test was used. These tests resulted in the observation of relatively rapid response in the activation values when the subjects were subjected to a stress load. Also, when graphed, the slope of the line of the activation values against time is consistent with the eustress and distress response. What’s more, when the overall protein content of the saliva was measured simultaneously to study the effect of the saliva secretion flow, we were able to verify that changes did occur in the level of activation of α -amylase as a result of stress. This shows that α -amylase in the saliva is indeed a viable marker substance for making quantitative evaluations of stress.

要旨

ハンス・セリエが「ヒトが外界から刺激を加えられたときに生体に生じる反応」をストレスと呼んでから既に半世紀以上が経過した。しかし、ストレスを定量的に評価できる指標は今だ考案されていない。筆者らは、唾液中の α -アミラーゼ（唾液アミラーゼ）の活性変化に着目し、健常被検者 6 名を対象とした実験により精神的ストレスの判別を試みた。精神的なストレスラーとしてはクレペリンテストを用いた。その結果、ストレス負荷に対して活性値の比較的速い応答が観察された。また、快適、不快のストレス反応に対応して活性値の時間勾配の符号が正負に反転した。さらに、活性値と唾液総タンパク量を同時測定することによって唾液分泌流量の影響を検討したところ、ストレスに起因した唾液アミラーゼ活性の変化が確認できた。これらより、唾液アミラーゼはストレスを定量的に評価するための有効なマーカー物質であることが示された。

1 はじめに

1935 年、ハンス・セリエが「生体が外界から刺激を加えられたときに生体に生じる反応」をストレスと呼んでから既に半世紀以上が経過した^{1,2)}。しかし、ストレスの定量的評価を可能とする指標は今だ考案されていない。これは、ストレスが非常に複雑なメカニズムに起因して現れるものであり、ヒトによって刺激に対する感じ方が異なるだけでなく、同じヒトでも快適なストレス (eustress)・不快なストレス (distress) や、精神的ストレス・肉体的ストレス等多様な反応があることにも起因している。

生理学的には、脳がストレスを認知することによって、①交感神経の緊張による副腎髄質からのカテ

コルチゾールの放出と、②視床下部—脳下垂体—副腎皮質系の活動の亢進によるコルチゾールの分泌亢進という2つの応答が生ずることが知られている³⁾。カテコルチンとコルチゾールは「ストレスホルモン」と呼ばれ、血液中に放出される。これらストレスホルモンが心拍や血糖の上昇を促進することによって、生体のストレス対応能力を高める。したがって、血液中のストレスホルモン濃度を測定すればストレスをある程度定量的に捉えことができるとされている^{4,5)}が、その一方で、採血や「採血される」という予期や不安自体がストレスになることも指摘されていることから、血液以外の唾液や尿を用いた評価方法が検討されている^{6,7)}。その中で、唾液は、①被検者に心理的、肉体的苦痛を与えることなく随時に採取でき、②量的にも充分得られ、③特別な前処理を必要としないなど、血液や尿に比べて多くの長所がある。しかし、唾液中のホルモン濃度は nM (nmol/L) オーダーと非常に低いので定量計測自体が困難であることから、汎用性のある技術として実用化されていないのが現状である。

筆者らは、簡便な装置で場所や状況に左右されず、ストレスに対する生体反応(以下、ストレス反応)を定量的に評価する技術を確立するためのマーカー物質として、消化酵素のひとつである唾液中の α -アミラーゼ(以下、唾液アミラーゼと略す)の活性変化に着目している。唾液アミラーゼは、通常唾液中に40mg/dlという高濃度で存在するため、実用的なストレス評価のためのマーカー物質としてだけでなく、酵素電極法を利用して携帯可能なセンサを開発することによって、ストレス反応の連続計測の実現も期待できる。唾液アミラーゼとストレスホルモンとの関係については、アドレナリン等に関する報告が散見される⁸⁾。また、交感神経の緊張によるカテコルチンの放出は、コルチゾールよりもストレスに対する反応性が高いため、微弱なストレスの早期検出に適していることが知られている。したがって、唾液アミラーゼによって交感神経の緊張によるストレス反応を捉えることができれば、反応性の高い実用的なストレス評価技術の確立が期待できる。そこで、本論文では、最初に、精神的ストレスの評価物質として唾液アミラーゼを用いることの妥当性を知るために、ストレス反応と唾液アミラーゼ活性との相関を実験的に検証した結果について述べる(Study 1)。次に、唾液分泌流量がストレス負荷時の唾液アミラーゼ活性の変動に与える影響を知るために、唾液アミラーゼ活性と唾液中の総タンパク量(以下、唾液総タンパクと略す)を同時測定した結果を報告する(Study 2)。

2 対象及び方法

2.1 Study 1 (精神的ストレス)

ヒトは、日常生活においても常に様々なストレスを感じているため、ストレス反応の評価においてはこの被検者毎に異なるプリストレスの取り扱いがしばしば問題となる。そこで、日常のストレスを取り除いて、プリストレスの状態を作り出すために、精神的ストレスを負荷する前に、ストレス緩和を目的としたマッサージを行った。

図1に実験プロトコルを示す。被検者は、全身疾患がなく薬物の投与を受けていない健常者6名(男性3名、女性3名、年齢 22.2 ± 0.9 歳、mean \pm S.D.)である。被検者には、実験の趣旨を十分に説明し理解させて同意を得た。電動式の指圧子が

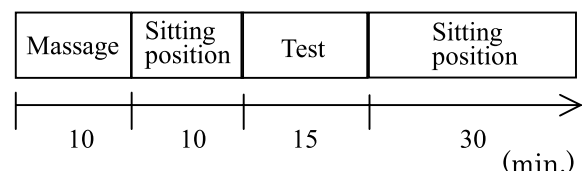


図1 精神的ストレス評価に用いた実験プロトコル
Test:クレペリンテスト

内蔵された長椅子 (EP1800、松下電工(株)) を使用し、被検者に 10 分座位をとらせて腰と背にマッサージを施した。この間、被検者にマッサージが快適か否かを問診した。その後、少し落ち着かせるために軽快な音楽環境下 (Mariah Carey, 1994, SONY MUSIC ENTERTAINMENT INC.) で 10 分安静座位をとらせた。次に、クレペリンテスト (Kraepelin Psychodiagnostic Test) を 15 分行わせた後、座位を 30 分取らせた。クレペリンテストは、簡単な一桁の足し算を数十分間行う心理検査のひとつであり、通常は性格などの検査に用いられる。本研究では、精神的なストレスとして用いた。実験の間、毛細管現象を利用して唾液を能動的に吸引することを目的に試作した使い捨て式の唾液採取器具⁹⁾ を用い、味覚刺激などを与えないで口腔内に自然に貯留した非刺激唾液を 5 分間隔で毎回 1 ~ 2 分かけて 1 μ L を経時的に採取した。この実験は、朝食の後十分な時間をおき、午前 10 時から 12 時の間に実施した。

アミラーゼの活性値の測定は、血液を検体として試薬を用いた方法でルーチン化されている。しかし、唾液アミラーゼ活性は血中アミラーゼ活性に比べて非常に高い。そのため、市販の血液用測定試薬の測定範囲を越えているために、そのまま用いることはできない。そこで、まず採取した唾液を生理食塩水で 100 倍に希釈した。次に、検体と共役酵素法試薬 (ESPA AMY-FS、ニプロ(株)) の計量と混合を行い、37 $^{\circ}$ C で加温し、その後に波長 405nm での吸光度を計測することによって活性値を測定した。アミラーゼ活性は、1 分間に 1 μ mol のマルトースに相当する還元糖を生成する酵素量を 1 単位 (U) として示した。以下、測定結果は mean \pm S.D. で示す。

2.2 Study 2 (流量との関係)

唾液中に含まれる化学物質濃度は唾液分泌流量の影響を受けることが多く、唾液アミラーゼでも唾液分泌流量に比例してその活性が増加することが知られている。これは、耳下腺由来の唾液アミラーゼ活性が顎下腺由来のものに比べて 4 倍も高く、かつ強い分泌刺激では全唾液量に対して耳下腺唾液の割合が大きくなるためと説明されている¹⁰⁾。また、唾液分泌は交感および副交感の自律神経の調節を受けているが、唾液アミラーゼの主な供給源は耳下腺であり、その分泌は交感神経支配である¹¹⁾。

すなわち、唾液アミラーゼ活性変化の主要因としては、**図 2** に示すように①ストレスに起因し、交感神経を介する耳下腺唾液アミラーゼ産生・分泌の増減 (細胞膜の一部がシャボン玉のようにふくれ、ちぎれる現象で“エキソサイトーシス (開口分泌)”という)、②耳下腺唾液の全唾液量に対する割合の変化に起因した唾液分泌流量の変化による見かけ上の増減、の 2 つが考えられる。したがって、「唾液腺の腺房細胞におけるアミラーゼ産生とその分泌がストレスによっても影響を受け、その結果唾液アミラーゼの活性が変化する」という仮説を検証するた

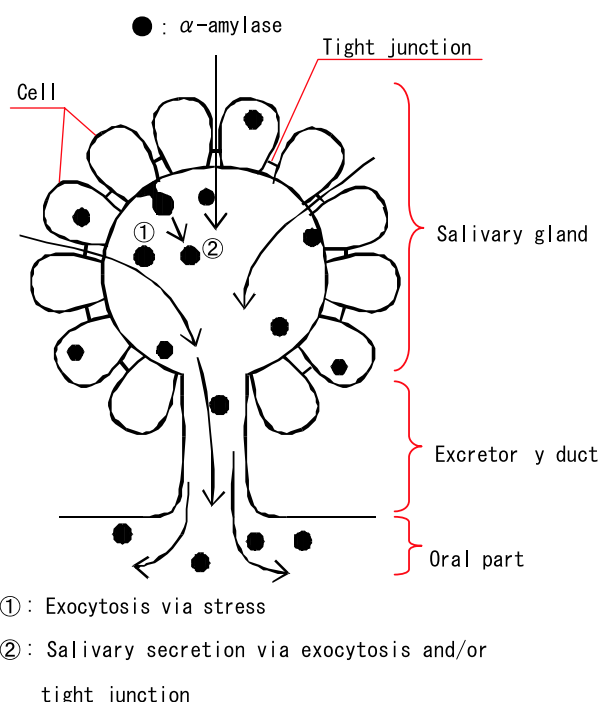


図 2 耳下腺における唾液アミラーゼの分泌メカニズム

めには、唾液分泌流量の影響をできるだけ受けない条件下でその作用を確認する必要がある。

ヒトに余分なストレスを与えることなく唾液分泌流量を測定する事は非常に困難であるが、口腔生理学において唾液中に含まれる総タンパク量(唾液総タンパク)は唾液分泌流量と良好な相関を示すことが知られている¹²⁾。そこで、咀嚼や味覚刺激を与えない条件下で、かつ唾液分泌流量があまり変化しない程度の弱い精神的ストレスを負荷することによって唾液分泌流量の影響をできるだけ小さくしておき、採取した唾液から唾液アミラーゼ活性(AMYa)と唾液総タンパク(TP)を同時に測定し、これらのストレス負荷に対する変化を測定した。

被検者は、Study 1 と同一の健常者 6 名である。図 3 に、唾液アミラーゼ活性と唾液総タンパクの同時測定プロトコルを示す。各被検者に対し、マッサージによるリラクゼーション(ストレス緩和)直後の唾液と、クレペリンテストによるストレス負荷直後の唾液を各々 3 回採取し、唾液アミラーゼ活性と唾液総タンパクを測定した。唾液総タンパクを測定には、ピロガロールレッド(PR) モリブデン(MO) 錯体発色法¹³⁾に基づく発色試薬(マイクロ TP-AR、和光純薬工業(株))を用いた。

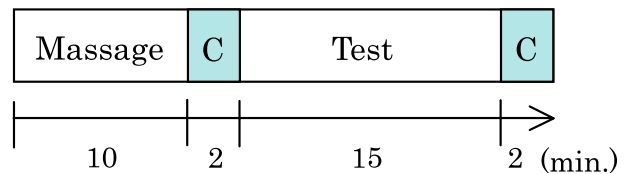


図 3 ストレスと唾液アミラーゼ活性、唾液総タンパク各々の関連性評価のための実験プロトコル

3 結果

3.1 Study 1 (精神的ストレス)

図 4 には、健常被検者における唾液アミラーゼ活性の経時変化の 2 例(A, C)を示す。マッサージを快適と回答した被検者では、マッサージにより唾液アミラーゼ活性が徐々に下降した。一方、不快と回答した被検者では、マッサージによって唾液アミラーゼ活性が上昇、下降を繰り返し安定しなかった。マッサージ後の座位(安静時に相当)における唾液アミラーゼ活性は、 $AMYa = 120.2 \pm 79.9$ kU/L の範囲にあるものの、被検者による差が比較的大きかった。

次に、個人のAMYaの変化のパターンの着目するために、唾液アミラーゼ活性の時間勾配AMYgを定義した。AMYgはクレペリンテストによって全ての被検者で上昇し、一方テスト後に座位をとらせることによって0 U/(L・min.)に収束した。

また、ストレスを加え始めてから唾液アミラーゼ活性が最大値を示すまでの時間は 8.5 ± 3.7 分であった。その後、唾液アミラーゼ活性が最大値を示してから初期値に復帰するのに要する時間は 21.8 ± 6.4 分であった。

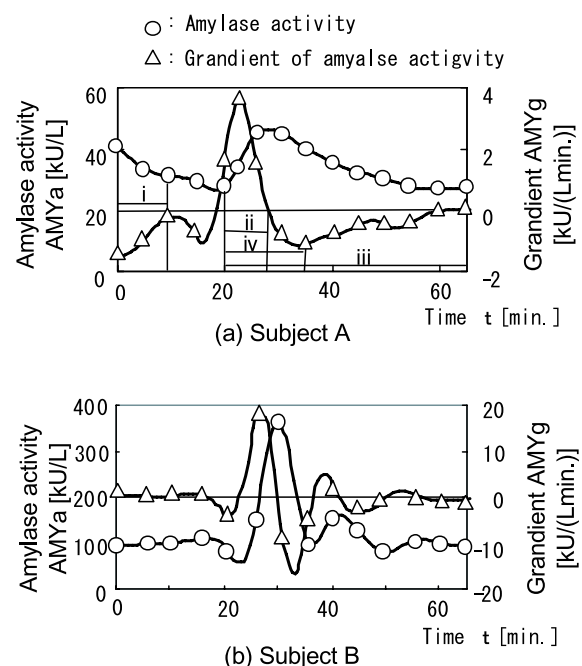


図 4 唾液アミラーゼ活性とその時間勾配の経時変化例(被検者 A、C) i~iv の定義は、表 1 で後述

3.2 Study 2 (流量との関係)

唾液アミラーゼ活性 (AMYa)、唾液総タンパク (TP) 各々について、リラクゼーション時とストレス負荷時の 2 群間の差異を Mann-Whitney 検定を用いて評価した。Mann-Whitney 検定は、母集団の分布が未知の場合において、独立 2 群の平均値を検定するためのノンパラメトリック検定法のひとつである。その結果、AMYa には 2 群間の差異が認められたが ($p = 0.04$)、TP には差異は認められなかった ($p = 0.55$)。

4 考察

表 1 には、提案したストレスの定量評価指標を、表 2 にはこの定義から求めた被検者 6 名のストレス値を示す。絶対値による評価では、快適、不快の差が明確でなく、その判別が容易ではない。それに対して、時間勾配を用いると快適、不快のストレス反応に対応して符号が逆転する。この結果は、ストレス評価指標としては、唾液アミラーゼ活性の絶対値よりもその時間勾配のように、個人の変化パターンに着目した評価法が適することを示す。また、ストレスを加え始めてから唾液アミラーゼ活性が最大値を示すまでの時間は 10 分以内、復帰するのに要する時間は 20 分程度であり、ストレス負荷に対して比較的速い応答が観察された。

唾液アミラーゼ活性と流量との関係においては、リラクゼーション時とストレス負荷時の 2 群間で唾液アミラーゼ活性には有意差が認められ、唾液総タンパク、すなわち流量では有意差が認められなかった。これにより、唾液分泌流量が変化しない条件下においてもストレスに起因するエキソサイトーシスによって唾液アミラーゼ活性が変化することが確認された。

マッサージを快適と回答した被検者では、唾液アミラーゼ活性が徐々に下降したことからストレス緩和の効果が認められたが、マッサージを不快と回答する被検者も存在することから、被検者毎にプリストレス状態を作り出すための適切なストレス緩和方法を選定する必要があると考えられる。これは今後の課題のひとつである。

表 1 定量評価に用いたストレス指標

Absolute value	Eustress: Mean value of the massage period, i
	Distress: Mean value of the mental stress period, ii
Gradient	Eustress: Maximum negative gradient after the mental stress period, iii
	Distress: Maximum positive gradient during the mental stress period, iv

表 2 被検者 6 名の唾液アミラーゼ活性側的結果

Subject	Absolute value[kU/L]		Gradient [kU/(L · min.)]		Inquiry *
	Eustress	Distress	Eustress	Distress	
A	34.8	39.1	-1.15	3.56	C
B	42.2	51.7	-2.43	1.17	C
C	95.2	254.7	-64.88	70.94	UC
D	223.6	296.0	-44.00	27.04	UC
E	205.4	217.9	-16.29	15.42	C
F	10.6	15.3	-0.66	1.71	C
Mean	120.2	171.8	-25.8	23.6	
± S.D.	± 79.9	± 106.2	± 24.9	± 25.4	

*C:comfortable, UC:uncomfortable

5 おわりに

健常者を対象として、唾液アミラーゼ活性と精神的ストレスの相関を実験により検証した。その結果、唾液アミラーゼがストレス評価のための有効なマーカー物質であることが確認された。唾液アミラーゼには、ストレス負荷に対して比較的速い応答が観察された。また、快適、不快のストレス反応に対応して唾液アミラーゼ活性の時間勾配が正負に反転する現象が観察されたことから、個人の変化パターンに着目した評価法が有効であることが示された。さらに、唾液アミラーゼ活性と唾液総タンパクを同時測定することによって唾液分泌流量の影響を検討したところ、ストレスに起因するエキソサイトーシスによって唾液アミラーゼ活性が変化することが確認された。

医学分野の専門家として、特に生理学的観点から多くの貴重な助言を賜ったヤマハ健康管理センター所長の倉田千弘博士に謝意を表する。

■参考文献

- 1) H. Selye, T. McKeown: Studies on the physiology of the maternal placenta in the rat, Proc. Roy. Soc., Lond., CXIX-B, 1/31 (1935)
- 2) ハンス・セリエ著, 細谷 東一郎訳: 生命とストレス, 工作舎, 東京 (1997)
- 3) 日本比較内分泌学会編: ストレスとホルモン, 学会出版センター, 東京 (1997)
- 4) 伊藤 眞次, 熊谷 朗, 出村 博: 情動とホルモン, 中山書店, 東京 (1997)
- 5) 日本比較内分泌学会編: からだの中からストレスをみる, 学会出版センター, 東京 (2000)
- 6) R. F. Vining, R. A. McGinley, J. J. Maksvytis, and K. Y. Ho: Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol, Ann. Clin. Biochem., 20, 329/335 (1983)
- 7) 織田 弥生, 中村 実, 龍田 周, 小泉 祐貴子, 阿部 恒之: 就労者の唾液中・尿中コルチゾール標準値作成の試みとその有用性の検討, 人間工学, 36, 287/297 (2000)
- 8) R. T. Chatterton Jr., K. M. Vogelsong, Yu-cai Lu, A. B. Ellman, G. A. Hudgens: Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity, Clinical Physiology, 16, 433/448 (1996)
- 9) 山口 昌樹, 佐藤 太亮, 畠山 豊正, 大久保 雅通: 唾液式非侵襲血糖測定器の携帯化と評価, 医用電子と生体工学, 38, 127/133 (2000)
- 10) N. Jenkins: The Physiology and Biochemistry of the Mouth (4th ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 284/359 (1978)
- 11) R. L. Speirs, J. Herring, W. D. Cooper, C. C. Hardy, C. R. K. Hind: The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from human parotid gland, Arch. Oral Biol. 19, 747/751 (1974)
- 12) J. O. Tenovuo 著, 石川 達也, 高江州 義矩 監訳: 唾液の科学, 一世出版, 東京, 1/20 (1998)
- 13) 吉崎 英清, 大澤 進: 金属キレート化合物を用いた新しい尿中たん白測定法の検討, 衛生検査, 35, 1171/1176 (1986)