

研究報告

新規精神的ストレス指標としての
唾液中クロモグラニンA

中根英雄

Salivary Chromogranin A as Index of Psychosomatic Stress Response

Hideo Nakane

要 旨

人間感覚の客観的な評価方法は、ストレス低減や快適性向上効果を持った商品や技術の開発に必要であり、微弱なストレスの評価が可能な高感度指標が求められている。交感神経系は、ストレスに対して鋭敏に反応する。そこで、交感神経活動と関連した唾液中の物質を探索した。クロモグラニンA (CgA) は、副腎髄質クロム親和性細胞や交感神経ニューロンから分泌される主要なタンパク質の一種である。CgAはカテコールアミンとともに細胞外へ共分泌されることが知られている。ストレス負荷に伴う唾液中および血中CgA、カテコールアミンおよびコルチゾール濃度の変化を男性

被験者を対象として調べた。その結果、精神的ストレス時（人前での口頭発表、自動車運転）に唾液中CgAは唾液中コルチゾールよりも早期に上昇することが判明した。一方、運動負荷時においては、血中カテコールアミン濃度が即座に上昇したのに対して、唾液中CgAは顕著な変化を示さなかった。これらの結果より、唾液中CgAは、高感度な精神的ストレス指標として有用であることが示唆された。唾液中CgAが新たな生化学指標として加わり、さまざまな状況下において、より正確な人間感覚評価が可能になると期待される。

Abstract

Objective measurement of human feelings is essential for the development of products and technologies to reduce stress. Therefore, sensitive indices of stress are sought to evaluate even weak stress. Since the sympathetic nervous system responds sensitively to stress, we searched for substances in saliva which are related to the activity of the nervous system. The resulting chromogranin A (CgA) is a major protein in adrenal chromaffin cells and adrenargic neurons. CgA and catecholamines are co-released into an extra-cellular environment. We measured changes in the concentrations of CgA, catecholamines and cortisol in saliva and plasma of

male volunteers with exposure to stress. We found a prompt elevation in salivary CgA level and a delayed increase in salivary cortisol level with psychosomatic stresses applied by oral presentation in front of audience and car driving. After exercise, however, the CgA level did not change though the plasma catecholamine level increased immediately. These results suggest that salivary CgA may be a sensitive and promising index for psychosomatic stress. Salivary CgA, a novel biochemical index of stress, is expected to allow more precise evaluation of human feelings in various situations.

キーワード

精神的ストレス, 唾液, クロモグラニンA, 生化学, 緊張, バイオテクノロジー

1. はじめに

近年、ストレス低減や快適性向上効果をねらった感性指向商品や技術に関心が寄せられている。しかし、実際に効果の有無を判断するためには、従来行われている被験者の主観に基づく心理評価に加えて、生理学的な裏付けのある測定方法を適用した客観的な評価が必要である。ストレスや快適性の客観的計測方法としては、脳波や心拍を測定する電気生理的方法や、ストレスホルモンのように人間感覚を反映して変化する生体内物質を測定する生化学的方法がある。バイオテクノロジーによる計測は、人間の体液のように多数の成分が含まれる検体でも複雑な分離操作を行うことなく、目的物質の高感度かつ高選択的な測定を可能とする。そこで、我々はこの技術の特長を生かし、生化学的方法による人間感覚計測技術を開発し、自動車、住宅分野における製品/技術の評価および感性工学的デザイン技術を目標として研究を実施している。

生体がストレスを受けると、交感神経 - 副腎髄質系と視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系という2つのストレス応答系の活動が高まり、ストレスホルモンとしてそれぞれカテコールアミンおよびコルチゾールが分泌され、心拍の亢進や血糖の上昇を促し、生体のストレス対処能力を高めるように作用する。従って、カテコールアミンやコルチゾールを指標とした生化学計測によるストレス評価が可能である。交感神経 - 副腎髄質系は視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系に先行して活性化されることから、カテコールアミンはコルチゾールよりもストレスに対する反応性が高く、微弱なストレスの早期検出に適していると期待される。カテコールアミンの測定は血液あるいは尿でルーチン化されている。しかし、尿はサンプリング頻度や場所が限定され、血液はサンプリング行為自体がストレスとなる懸念がある。これに対して唾液は、場所を選ばず頻繁なサンプリングが可能で、非侵襲性も高い。この理由から、ストレス応答性は劣るものの、唾液で測定可能なコルチゾールがフィールドにおけるストレス評価においてしばしば利用されている¹⁻³⁾。一方、カテコールアミンの他に

交感神経活動を反映して変化する物質の中には唾液を用いて測定が可能なものがあるかもしれない。そこで、カテコールアミンに代わって唾液で測定可能な新たな交感神経活動指標物質を探索した。

クロモグラニンA (CgA) は、当初、副腎髄質クロム親和性細胞において見いだされた可溶性タンパク質であるが⁴⁾、その後さまざまな内分泌器官や交感神経ニューロンに存在することが判明した⁵⁾。CgAは、カテコールアミンの貯蔵に関与しているといわれており、カテコールアミンとともに血中に共分泌されることが知られている。また、唾液中CgAの測定法が確立されたことから⁶⁾、交感神経活動を反映した唾液中ストレス指標となることが期待される。

そこで、種々のストレス環境を提示した際の唾液中CgA濃度の変動を調べ、コルチゾールやカテコールアミンの濃度変化と比較した結果、唾液中CgAが精神的ストレス指標として有用である可能性を見いだした。

2. 方法

全ての実験において、被験者に対しては、実験の目的および実施方法について口頭および書面にて説明した上で、実験へ参加することへの同意を得た。また、特に運動負荷実験においては、実験中に体調等に異常を感じたときには、被験者自らの判断で直ちに実験を中止するよう指示した。

2.1 研究発表

20歳～40歳代の男性研究者9名が、研究発表会において15分間の研究報告を行った。唾液はSalivette (Salstedt, ドイツ) を用いて、発表1時間前、発表直前、発表直後、終了1時間後、終了2時間後に約1mlを採取した。採取した唾液は直ちに氷冷し、実験終了後遠心して回収し、測定に供するまで-20°Cにて保存した。また、アンケートによる緊張感評価(-3: リラックス ~ +3: 緊張) を併せて行った。コントロールとして、通常勤務日の同一時間帯について唾液サンプリングおよびアンケート評価を行った。

2.2 自動車運転

被験者は、30歳代後半から40歳代前半、運転歴

10年以上で、プロドライバーでない男性3名を対象とした。高速道路を約50分間走行後、折り返し地点にて10分間休憩し、再び約50分間走行して帰着した。唾液のサンプリングは、走行開始直前、折り返し地点での休憩時、および走行終了直後に2.1と同様に行った。また、これに併せて緊張感(-3:リラックス~+3:緊張)および疲労感(-3:元気~+3:疲れた)に関するアンケート評価を行った。コントロールとして、通常勤務日の同一時間帯について唾液サンプリングおよびアンケート評価を行った。

2.3 運動負荷

被験者は22~24歳の体育学部大学院生4名で、エルゴメータによる運動を各被験者の最大酸素摂取量の95%強度にて継続可能な限り実施した。実験には医師の資格を持つ教官が立ち会い、採血を行うとともに被験者の万一の異常に備えた。血液は、左腕に留置針を挿入し、運動前、終了直後、3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 60分後に、EDTAとaprotininを含んだ氷冷チューブにサンプリングし、直ちに遠心して回収した血漿を-20°Cにて保存した。唾液は、運動前、終了直後、および3, 7, 10, 15, 20, 30, 60分後に2.1の実験と同様にサンプリングした。

2.4 唾液および血中濃度の測定

唾液中および血中CgAは、放射免疫測定法に基づくNishikawaらの方法⁶⁾を適用して測定した。唾液中CgA濃度は、総蛋白濃度(蛋白定量キット(BioRad, USA)を用いて測定)によって補正し、mg蛋白あたりのモル濃度で表示した。唾液中コルチゾールは、Hublらの方法⁷⁾に若干の修正を施して実施した。血中アドレナリンおよびノルアドレナリンは、HLC-725CAオートアナライザ(東ソー)を用いて測定した。

3. 結果

3.1 研究発表

Fig. 1に、9名の男性研究者が、研究発表会において15分間の発表を行った際の、唾液中CgA (Fig. 1A)、唾液中コルチゾール (Fig. 1B) および緊張感 (Fig. 1C) の変化(平均値±SEM)を示す。唾液中CgAは、発表直前に最高値を示し、終了直後

には低下しており、この変化は緊張感スコアとよく関連していた。一方、唾液中コルチゾールは、むしろ発表終了直後に最高値に達した。このように、緊張に伴う唾液中CgAの上昇は、コルチゾールよりも速やかに生じることが示された。

3.2 自動車運転

3名の男性被験者が高速道路を2時間運転した。実験期間中を通して、天候および道路事情には大きな違いはみられなかった。唾液中CgA、唾液中コルチゾール、および心理スコア(緊張感および疲労感)の変化をFig. 2に示す。唾液中CgAは、1時間運転後の中間点で高値を示し、運転終了時には低下していた (Fig. 2A)。一方、唾液中コルチゾールは、中間点ではほとんど変化がみられず、運転終了時点で上昇傾向がみられた (Fig. 2B)。心理スコアとの関連からみると、CgAは緊張感と、コ

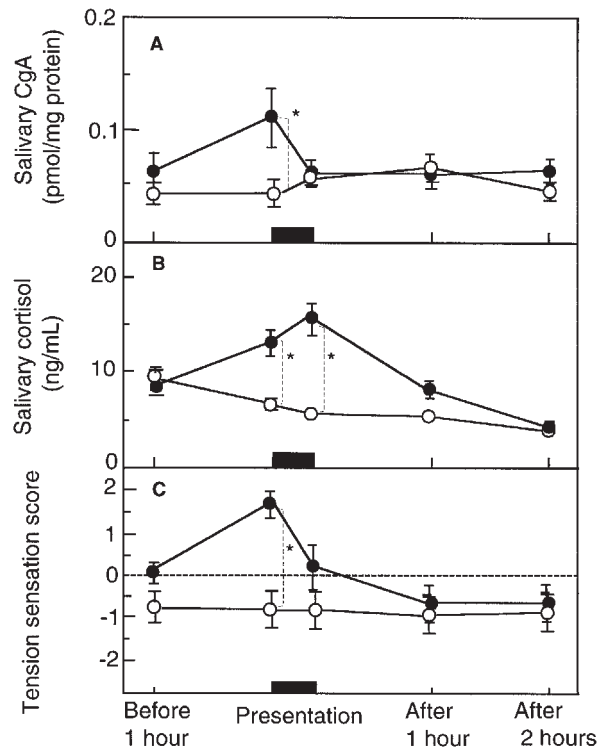


Fig. 1 Changes of mean values (with SEM) in salivary CgA (A), salivary cortisol (B) and tension sensation score (C) on the presentation day (●) and control day (○).
*p < 0.05 by paired *t*-test.

ルチゾールは疲労感と類似した変化パターンを示した (Fig. 2C)。自動車の運転は、体の動きとしては比較的小さいことから、精神的なストレスが主体であると考えられる。これらの被験者は、運転には熟練していることから、ストレスの強さは前述の人前での発表の場合に比較して弱いが、運転中は継続していると推定される。このようなストレス下でも唾液中CgAはコルチゾールに比べてより早期に上昇することが判明した。

3.3 肉体的ストレス負荷

短時間の非常に強い肉体的ストレス負荷として、95%最大酸素摂取量の強度でのエルゴメータによる運動を実施した。被験者は、体育学部大学院男子学生4名で、全員このような運動負荷と実験における採血の経験があり、実験に伴う緊張感や不安感の変化は認められなかった。また、運動

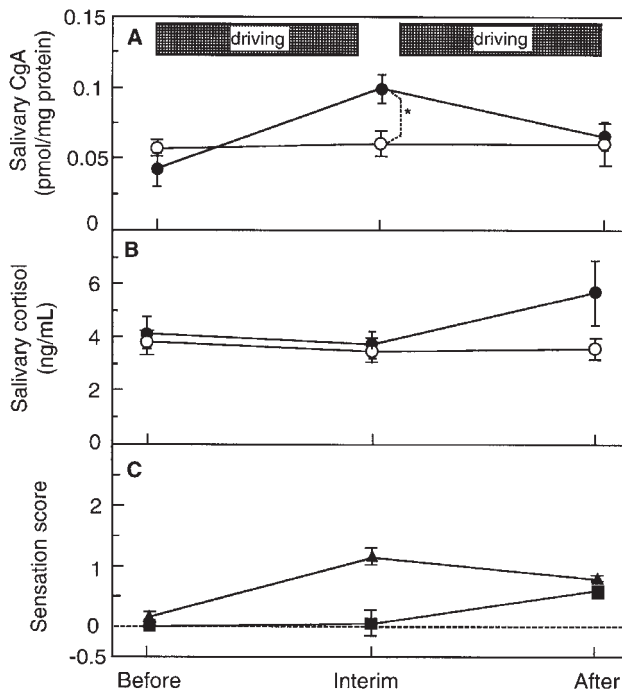


Fig. 2 Changes of mean values (with SEM) of salivary CgA (A), salivary cortisol (B) and sensation score (C) by the driving on highway. Symbols used in the figure were as follows: driving (○) and control day (□) in panel A and B, tension sensation score (●) and fatigue sensation score (■) in panel C (driving only). * $p < 0.05$ by paired t -test.

の継続時間は3~4分であった。運動前後の唾液中および血中濃度の測定結果をFig. 3に示す。血中カテコールアミンは、運動後急激に上昇した後、短時間のうちに低下し (Fig. 3CおよびD)、心拍数と類似した変化を示した (Fig. 3F)。一方、コルチゾールは、運動後15分経過した頃から緩やかに上昇した (Fig. 3E)。これに対して唾液中および血中CgA濃度は顕著な変化はみられなかった (Fig. 3AおよびB)。これらの結果より、唾液中および血中CgAは運動のような肉体的なストレス負荷に対する変化は乏しいことが判明した。

4. 考察

唾液中CgAが精神的ストレス指標として有用であることは、次の結果より支持される。

1. 唾液中CgAは、発表直前で緊張感とともにピークに達し、発表終了直後には低下した (Fig. 1)。
2. 自動車運転時において、中間点で高値を示し、運転終了時には低下しており、この変化は緊張感と関連していた (Fig. 2)。
3. これらのストレス下におけるCgA上昇は、常に唾液中コルチゾールに先行して認められた。
4. 唾液中CgAは、運動負荷時には明確な変化は示さなかった (Fig. 3)。

また、ストレスによる唾液中CgAの分泌は、コルチゾールよりも早期にみられたことより、CgAの分泌は自律神経を介するものであることが考えられる。一般に、ストレス状態では、生体の交感神経活動が活発になり、カテコールアミンの分泌が亢進している。しかし、運動負荷時において、唾液中CgAは血中カテコールアミン濃度変化と関連していなかったことから、唾液中CgAの分泌は単に交感神経のみに支配されているのではなく、副交感神経活動の影響も受けていることも予想される。唾液中CgAの由来および分泌メカニズムに関しては、実験動物やヒトの組織を用いた解剖学、生理学的研究が必要である。また、CgAタンパク質やmRNAの発現を分子生物学的に解析することも有用であろう。

一言でストレスといっても、例えば緊張、恐怖という精神的ストレス、筋肉疲労や温度変化のような肉体的なストレスなど、さまざまな要因があ

る上、同じ刺激であっても感じる程度には個人差がある。快適性に関しては、個人の嗜好の違いという要因が加わり、さらに複雑である。これまで、唾液中生化学指標として、ストレス評価にはコルチゾールを、快適性評価に免疫グロブリンA⁸⁾を利用してきたが、さまざまな状況下における人間感覚を計測するためには、これらの生化学指標とともに、電気生理指標、行動指標、および心理指標の中から、提示環境や評価する被験者の特性に応じて選択、組み合わせることが必要と考えられる。今回、唾液中CgAという精神的ストレスに対して特に反応性の高い指標が得られたことにより、評価に利用できるツールの選択肢が広がり、より正確な人間感覚評価が可能になると期待される。今後、このような指標を総合的に利用して、製品開発、評価を行っていきたいと考えている。

5. まとめ

唾液中クロモグラニンA (CgA)のストレス指標としての可能性を検証するため、種々のストレス下における唾液中CgAの変化を、既知のストレス指標物質であるコルチゾールやカテコールアミンと比較した。その結果、唾液中CgAは、精神的ストレス負荷時にはコルチゾールより先行して上昇し、負荷後は早期に減少すること、および肉体的ストレスに対しては反応性が乏しいことが判明した。これらの結果より、唾液中CgAは高感度な新規精神的ストレス指標として有用である可能性が示唆された。

謝辞

本研究を開始するにあたり貴重なご意見をいただきました(株)矢内原研究所矢内原昇所長、ならびに運動負荷実験の実施にあたりご指導、ご協力

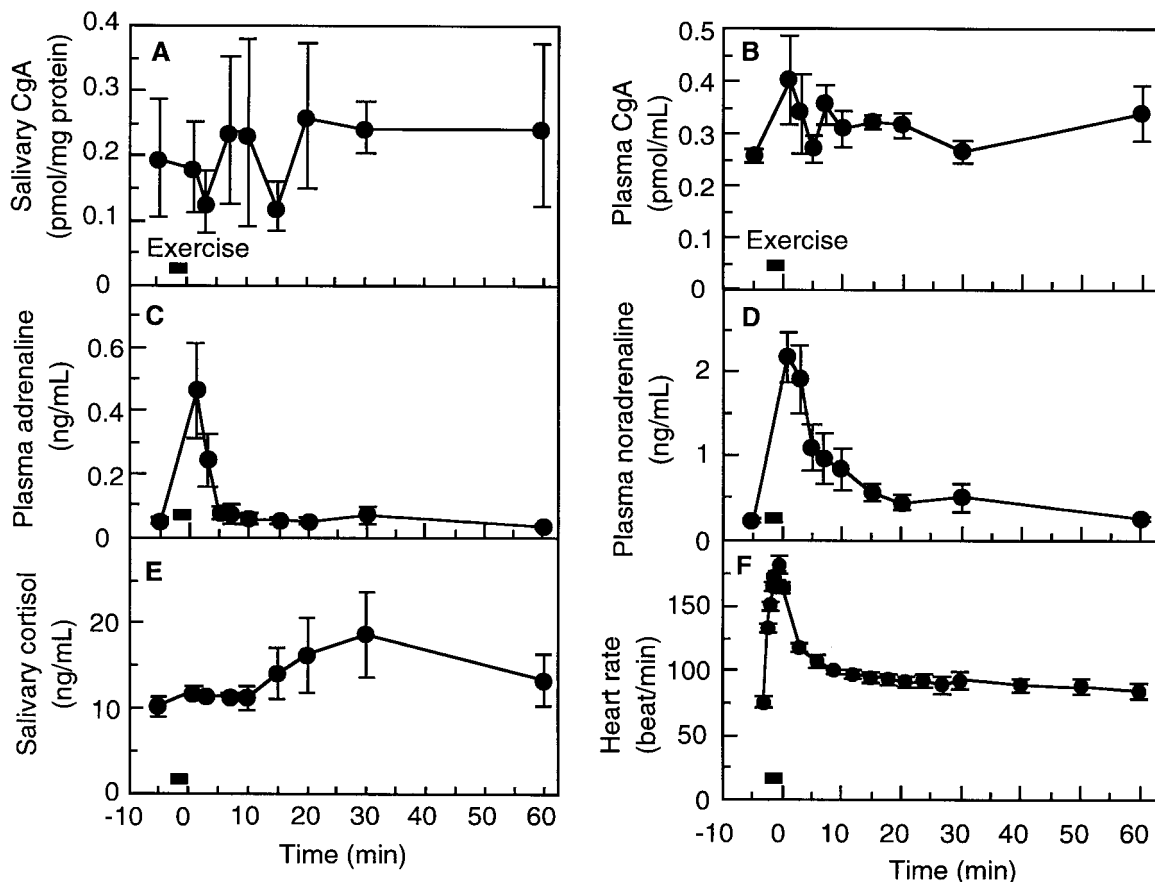


Fig. 3 Changes of various stress biomarkers by exercise (mean \pm SEM). A : salivary CgA, B : plasma CgA, C : plasma adrenaline, D : plasma noradrenaline, E : salivary cortisol, and F : heart rate.

をいただきました中京大学運動生理学教室松井信夫教授に感謝いたします。

参考文献

- 1) Kirschbaum, C. and Hellhammer, D. H. : "Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research : Recent developments and applications", *Psychoneuroendocrinol.*, 19(1994), 313
- 2) Tarui, H. and Nakamura, A. : "Hormonal responses of pilots flying high-performance aircraft during seven repetitive flight mission", *Aviat. Space Environ. Med.*, 62(1991), 1127
- 3) 垣本由紀子 : "ジェット輸送機による長時間飛行が搭乗員に及ぼす影響について", *医実報告*, 26(1985), 131
- 4) Helle, K. B. : "Some chemical and physical properties of the soluble protein fraction of bovine adrenal chromaffin granules", *Mol. Pharmacol.*, 2(1966), 298
- 5) Winkler, H. and Fischer-Colbrie, R. : "The chromogranins A and B : The first 25 years and future perspectives", *Neurosci.*, 49(1992), 497
- 6) Nishikawa, Y., et al. : "Region-specific radioimmunoassay for human chromogranin A", *Biomed. Res.*, 19(1998), 245
- 7) Hubl, W., et al. : "An improved solid-phase enzyme and luminescent immunoassay system for steroid hormones and digoxin", *Clin. Chem.*, 34(1988), 2521
- 8) 中根英雄, ほか : "感性の計測方法及び簡易感性計測キット", 特願平09-045212(1997)

著者紹介



中根英雄 Hideo Nakane

生年：1959年。

所属：生物分子応用研究室。

分野：生化学計測法を利用した人間感覚計測。

学会等：日本ストレス学会会員。日本薬学会会員。