

教育講演

唾液アミラーゼによるストレスの評価

中野敦行・山口昌樹

岩手大学 大学院 工学研究科

抄 録

唾液アミラーゼ活性 (SAA) は、血漿ノルエピネフリン濃度と相関が高いことが良く知られており、ストレス評価における交感神経の指標として利用されている。ストレス研究への利用を目的として、本研究者らは携帯型の唾液アミラーゼモニターを実用化した。このバイオセンサは、使い捨て式のテストストリップと、唾液転写機構を備えた本体 (130 × 87 × 40 mm³; 190 g) で構成されている。分析時間は1分ほどで、迅速なSAAの分析が可能である。本論文は、ストレスと唾液アミラーゼの変化量の関連性を定量的に示すことで、エビデンスの構築に資することを目的としている。今まで報告されてきた事例研究のデータを用い、ストレスを精神的なストレス、精神的・肉体的双方のストレス (心身ストレス)、肉体的なストレスに分類した。ストレスに起因する唾液アミラーゼ活性の変化量を算出し、ストレスの種類で比較した。唾液アミラーゼは、その感度が鋭敏なことから、快・不快の判別が可能であることが示された。特に、急性のストレス評価に有効であると考えられた。このバイオセンサは、測定自体がストレスとなることなく、非侵襲、即時、随時、簡便なストレス計測手法として有効である。

キーワード：唾液, アミラーゼ, ストレス, 交感神経, バイオマーカー

連絡先：〒020-8551 盛岡市上田4-3-5
岩手大学 大学院 工学研究科 バイオ・ロボティクス部門
TEL：019-621-6349
E-mail：masakiy@iwate-u.ac.jp
受 理：2011年2月23日

1. はじめに

神経系と内分泌系から構成されるヒトのストレスシステムに関わる主要な生理活性物質としては、グルココルチコイドとカテコールアミンが挙げられる。コルチゾールやコルチゾンなどのグルココルチコイドは副腎皮質から、アドレナリン（エピネフリン）やノルアドレナリン（ノルエピネフリン）などのカテコールアミンは副腎髄質から分泌される。これら交感神経系や内分泌系に直接・間接的に関与するバイオマーカーでは、コルチゾールのようにストレスの度合いに応じて濃度が顕著に変化するものがあり、ストレスマーカーとも呼ばれる。

ストレスマーカーは、血液サンプルから分析されるものだけでなく、その一部は唾液サンプルでも分析可能である。唾液は、非侵襲的に採取できる検体として、口腔特有の疾患診断だけでなく [1]、全身疾患診断の検体として注目されてきた [2-4]。米国のサリメトリックス社 (salimetrics, <http://www.salimetrics.com/>) が、唾液検体専用の酵素標識免疫測定 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) キットをシリーズとして販売したところから [5]、唾液バイオマーカーを用いた研究が盛んになった。唾液分析できるストレスマーカーは、非侵襲で、随時性、簡便性に優れ、血液のようにサンプル採取がストレスにならないというメリットがある。

筆者らは、不快な刺激では唾液アミラーゼ活性が上昇し、快適な刺激では逆に低下することを見出し、唾液アミラーゼによって快適と不快を判別できる可能性があることを示してきた [6-7]。そして、使用環境に左右されず、迅速に交感神経活動の増加（亢進）／減少（沈静）を計測するために、ドライケミストリーシステムを用いた唾液アミラーゼ活性の迅速分析方法を考案し [8-9]、2005年末にはCOCORO METER©（ニプロ株）という商標名で製品化した [10]。2007年10月には、厚生労働省の医療認可を取得し（医療機器届出番号：27B1X00045000073）、「唾液アミラーゼモニター©」という名称で医療機器として販売を開始した。これら両機器には本質的な違いはないが、医療認可を取得する上で、量産性の改善を図り、性能保障を可能とした。

医学的診断においてはエビデンス (Evidence-Based Medicine; EBM) が重要であるが、それには「科学的根拠：ある生体現象が、特定の病気や症状に関連性があることを示す証拠がある」と言う意味と、「アルゴリズム：生体現象をもとに、特定の病気や症状をどう診断するかという判断基準（技術）が確立されている」という2つの意味がある。前者は医学者が見出し、後者の確立には工学者が寄与することが多い。

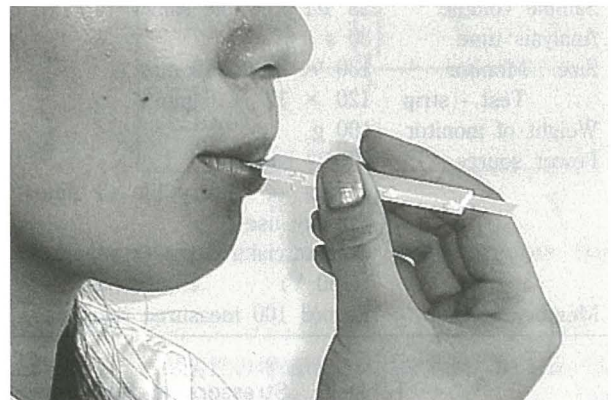
唾液アミラーゼとストレスに関する英文論文は既に100編を超え、その科学的根拠はかなり蓄積されてきた。

しかし、どの程度のストレスレベルで、唾液アミラーゼがどのくらい変化するかという判断基準を与えるアルゴリズムが確立されたとは言えない。

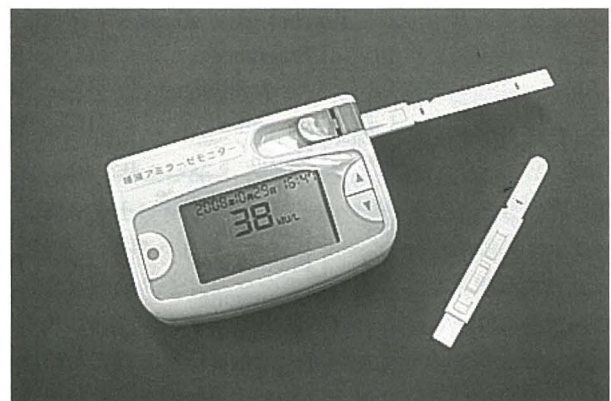
本論文では、筆者らが報告してきた事例研究を中心に、ストレス（刺激）の種類や与え方と、唾液アミラーゼの変化量の関連性を定量的に示すことで、エビデンスの構築に資することを目的としている。そこで、ストレスを、その与え方から、精神的なストレスが加わった場合、精神的・肉体的双方のストレス（心身ストレス）が加わった場合、肉体的なストレスが加わった場合に分類し、ストレスに起因する唾液アミラーゼ活性の変化量と比較する。また、快適なストレスと不快なストレスにも分類し、その判別の可否についても論じる。

2. 唾液アミラーゼモニター

唾液アミラーゼモニターは、使い捨て式のテストストリップ (Fig.1 (a), 商品名：チップ) と本体 (Fig.1 (b), 130 × 87 × 40 mm³, 190 g, 商品名：メータ) で構成されている (Table 1)。テストストリップは、スリー



(a) Saliva collection using a test-strip



(b) Measured result displayed in a monitor

Fig.1 External view of the salivary amylase monitor for commercial use.

ブ、シート、唾液採取紙（不織布、 $11 \times 9 \times 0.3 \text{ mm}^3$ 、半円状、採取紙体積 $28 \mu\text{l}$ ）とアミラーゼ試験紙（ $4 \times 4 \times 0.25 \text{ mm}^3$ 、試験紙体積 $4 \mu\text{l}$ ）で構成した。本体には、唾液転写機構と光学ユニット（波長 470 nm の light-emitting diode (LED) と受光素子）を設けた。

唾液採取紙を口腔に挿入し、30秒ほどかけて舌下部から直接全唾液を採取する。テストストリップを本体にセットすると、自動的に本体の電源が入る。ディスプレイの指示に従いレバーを操作すると、スリーブのバネの裏側に貼り付けられているアミラーゼ試験紙が唾液採取紙へ押し付けられ、唾液が転写される。転写時間は10秒に設定されており、終了を示すディスプレイの指示に従いレバーを元に戻す。この直後、アミラーゼ試験紙に含浸された基質（Gal-G2-CNP）が α -アミラーゼで加水分解され黄色に発色する。その反射率が、光学ユニットで自動的に測定され、酵素活性（Unit/l）に換算されてディスプレイに表示される。本唾液アミラーゼモニターは、

Table 1. Specification of a salivary amylase monitor.

Item	Function
Range	5 - 150 kU/l
Sample volume	28 μl of whole saliva
Analysis time	30 s
Size Monitor	$130 \times 87 \times 40 \text{ mm}^3$
Test - strip	$120 \times 13 \times 6 \text{ mm}^3$
Weight of monitor	190 g
Power source	CR-P2 battery \times 1 1 year of battery life (3 times per day use) Commercial AC power supply (100 V)
Memory of data	Record 100 measured results

唾液採取、転写と測定の計1分ほどで唾液アミラーゼ活性 (salivary amylase activity; SAA) を分析できる。

3. ストレス評価事例

3.1 ストレッサーの分類

唾液アミラーゼ活性は、交感神経系活性を反映するので、通常は精神的ストレス・肉体的ストレスの双方を反映する。よって、そのどちらかの影響のみを考察したい場合には、できるだけ評価したいストレッサーのみが加わるように実験プロトコルを工夫する必要がある。このような目的で、今までに様々な事例研究がなされ、唾液アミラーゼ活性とストレス（ストレッサー）の関係が報告されてきた。

Table 2 には、ストレッサーの種類に対する唾液アミラーゼ活性の変化量を比較するために取り上げた事例研究で用いられたストレッサーの種類を示した [8, 11-22]。被検者数が10名未満の事例は、選定しなかった (Table 3)。唾液アミラーゼ活性の絶対値から、その変化率 (Score of SAA; ΔSAA) を次式により求めた。

$$\Delta\text{SAA} = \frac{\text{SAA} - \text{SAA}_0}{\text{SAA}_0} \times 100 (\%) \quad (1)$$

ここに、 SAA_0 : ストレッサーを加える前の唾液アミラーゼ活性 (ベースライン, kU/l),

SAA : ストレッサーを加えた後の唾液アミラーゼ活性 (kU/l),

文献に示されたストレッサーの加え方から、下記の5条件に分類して比較することにした。

条件 I : 主として精神的なストレッサーが与えられ、かつ快適なストレス状態 (eustress) と考え

Table 2. Stressors in the previously reported case studies used for this evaluation.

I. Psychological stressor (-)*			III. Psychosomatic stressor		
I-i	Fragrance	[11]	III-i	Driving simulator	[16]
I-ii	Air conditioner	[12]	III-ii	Walking	[17]
I-iii	Lavender	[13]	III-iii	Sitting	
I-iv	Neroli		IV. Psychological stressor (+)		
II. Fragrance			IV-i	Kraepelin test	[8]
II-i	Ammonia	[14]	IV-ii	Video watching	[18]
II-ii	Phytoncide	[15]	IV-iii	Hand-eye coordination test	[19]
II-iii	Chamomile		IV-iv	Cold pressor test	[11]
II-iv	Jasmine		V. Physical stressor		
II-v	Grapefruit		V-i	Ergometer	[20]
II-vi	Mint oil		V-ii	Exercise	[21]
II-vii	Rosemary		V-iii	Skydiving	[22]

*-: eustress +: distress

Table 3. Conditions of the case studies used for this evaluation.

No.	Subject			Period (min)	No.	Subject			Period (min)
	Number		Age			Number		Age	
	M	F				M	F		
I-i	0	20	36.3	15	III-i	0	20	20.3	20
I-ii	0	14	23.6	10	III-ii	10	0	23.2	20
I-iii	0	15	21.4	10	III-iii	10	0	23.2	20
I-iv	0	15	21.4	10	IV-i	7	4	21.9	10
II-i	12	0	22.3	9	IV-ii	53	30	23.6	15
II-ii	0	18	21.4	30	IV-iii	0	17	22.5	5
II-iii	0	18	21.4	30	IV-iv	0	20	36.3	2.5
II-iv	0	18	21.4	30	V-i	9	6	21.3	15
II-v	0	18	21.4	30	V-ii	11	0	24.0	—
II-vi	0	18	21.4	30	V-iii	—	—	26.4	—
II-vii	0	18	21.4	30					

*M: male, F: female

- られる場合
- 条件II : 香りのみがストレッサーとして与えられ、かつ覚醒作用が認められたと考えられる場合
- 条件III : 主として心身ストレッサーが与えられ、かつ不快なストレス状態 (distress) と考えられる場合
- 条件IV : 主として精神的なストレッサーが与えられ、かつ不快なストレス状態 (distress) と考えられる場合
- 条件V : 主として肉体的なストレッサーが与えられた場合

3. 2 統計解析

統計処理には、SPSS 14.0J (SPSS Japan Inc., Japan) を用いた。特に断りの無い場合、データは mean ± SD で示した。唾液アミラーゼ活性が、唾液アミラーゼモニターで保証している測定範囲150kU/lを超えるデータは、異常値とみなし除外した。

唾液アミラーゼ活性の比較には Wilcoxon の符号付順位検定を用いた。

4. 結果と考察

今回採用したストレス評価事例では、ストレッサーの印加時間は、2.5-20分の範囲にあったことから (Table 3)、すべて急性 (一過性) のストレス評価であると考えられた。

交感神経活性が鎮静化する快適なストレス状態 (I) の唾液アミラーゼ活性の変化率は、 $\Delta SAA = -27.7 - -9.0\%$ の範囲にあった。交感神経活性が亢進する状態 (II-V) の唾液アミラーゼ活性の変化率は、 $\Delta SAA = -7.3 - 111.2\%$ の範囲にあった。ストレッサー前後の

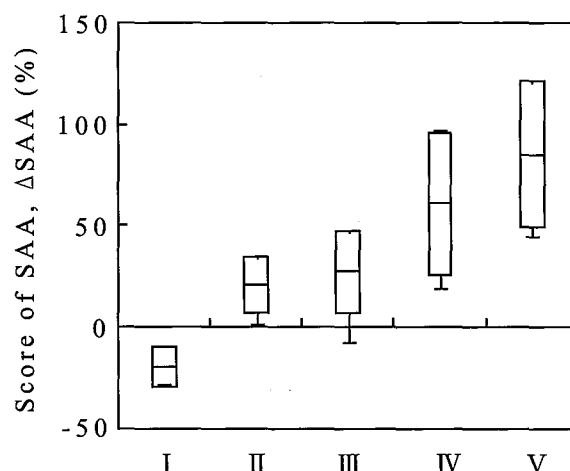


Fig.2 Comparison of score of SAA between five conditions.

唾液アミラーゼ活性の増減は、交感神経活動の亢進/沈静に良く一致していると考えられた。このことは、2時点以上の唾液アミラーゼ活を分析すれば、快適なストレス状態と不快なストレス状態を区別できることを示している。

条件IからVの唾液アミラーゼ活性の変化率は、それぞれ -19.3 ± 9.6 , 20.6 ± 13.6 , 27.2 ± 20.0 , 61.0 ± 34.9 , および $85.3 \pm 35.7\%$ を示した (mean ± SD)。今回取り上げた事例研究では、唾液アミラーゼ活性の絶対値は、香り<心身ストレッサー<精神的なストレッサー<肉体的なストレッサーの順に大きくなった。ただし、これは唾液アミラーゼ活性が精神的なストレッサーよりも肉体的なストレッサーを良く反映すると結論付けるものではなく、肉体的なストレッサーの方が強度の強い刺激を与えやすいことを示していると考えられる。

唾液アミラーゼ活性をストレスの指標として活用する

には、その機序も理解しておく必要がある。唾液アミラーゼ活性の生理的特徴として、既に以下のようなことが報告されてきた。唾液アミラーゼ活性の測定値の幅は、5 [9] - 1,140 [23] kU/lにあり、交感神経作用によって分泌されるのでストレスに対して数分で鋭敏に反応する。よって、その生物リズムを正確に把握するのは困難であるが、朝低くて午後上昇し [24]、就寝中は再び低値を取る [25] という日内変動を示す。唾液腺の機能も加齢と共に低下し、唾液流量などは加齢により低下するが、唾液アミラーゼについては、乳幼児を除けば加齢の影響は小さく、加齢と共に僅かながら増加すると報告されている [26]。Salvoliniらによる10-80歳を対象とした横断研究でも [27]、唾液アミラーゼは加齢により僅かながら増加するものの統計的な有意差は認められず、唾液総タンパクも同じ傾向を示す。

5. おわりに

ストレス研究への利用を目的として、本研究者らは携帯型の唾液アミラーゼモニターを実用化した。唾液アミラーゼは、他のバイオマーカーと同様に日内変動を有するものの、その感度が鋭敏なことから、快・不快の判別が可能であることが特長である。特に、急性のストレス評価に有効で、様々な臨床評価に応用されつつある。

今後は、慢性のストレス指標として有用なコルチゾール等のストレスホルモンと併用することによって、うつ病に代表されるストレス関連疾患の診断技術としての応用が期待される。

謝 辞

本研究の一部は、2010~2012年度文部科学省科学研究費補助金基盤研究(C) (課題番号: 22500400) によって行われた。データ整理に協力した本学大学院高橋 貴之君、工学部 小川 和宏君に謝意を表す。

参考文献

- [1] Taba, M. Jr, Kinney, J., Kim, A.S., Giannobile, W.V. (2005) Diagnostic biomarkers for oral and periodontal diseases. *Dental Clinics of North America*, 49, 551-571.
- [2] Malamud, D. (2006) Salivary diagnostics: the future is now. *The Journal of the American Dental Association*, 137, 284, 286.
- [3] Tabak, L.A. (2007) Point-of-care diagnostics enter the mouth. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1098, 7-14.
- [4] Segal, A. and Wong, D.T. (2008) Salivary diagnostics: enhancing disease detection and making medicine better. *European Journal of Dental Education*, 12, 22-29.
- [5] Granger, D.A., Kivlighan, K.T., Fortunato, C., Harmon, A.G., Hibel, L.C., Schwartz, E.B., et al. (2007) Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: problems and solutions for collecting specimens. *Physiology & Behavior*, 92, 583-590.
- [6] 山口昌樹, 金森貴裕, 金丸正史, 水野康文, 吉田博 (2001) 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, *医用電子と生体工学*, 39, 234-239.
- [7] Takai, N., Yamaguchi, M., Aragaki, T., Eto, K., Uchihashi, K., Nishikawa, Y. (2004) Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Archives of Oral Biology*, 49, 963-968.
- [8] Yamaguchi, M., Kanemori, T., Kanemaru, M., Takai, N., Mizuno, Y., Yoshida, H. (2004) Performance evaluation of salivary amylase activity monitor. *Biosensors & Bioelectronics*, 20, 491-497.
- [9] Yamaguchi, M., Deguchi, M., Wakasugi, J., Takai, N., Higashi, T., Mizuno, Y. (2005) Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment. *Biosensors & Bioelectronics*, 21, 1007-1014.
- [10] 山口昌樹, 花輪尚子, 吉田 博 (2007) 唾液アミラーゼ式交感神経モニターの基礎的性能, *生体医学*, 45, 161-168.
- [11] Yamaguchi, M., Hanawa, N., Hamazaki, K., Sato, K., Nakano, K. (2007) Evaluation of the Acute Sedative Effect of Fragrances Based on a Biochemical Marker. *The Journal of Essential Oil Research*, 19, 470-476.
- [12] Tahara, Y., Morito, N., Nishimiya, H., Yamagishi, H., Yamaguchi, M. (2009) Evaluation of environmental and physiological factors of a whole ceiling-type air conditioner using a salivary biomarker. *Building & Environment*, 44, 1156-1161.
- [13] Yamaguchi, M., Tahara, Y., Kosaka, S. (2009) Influence of concentration of fragrances on salivary α -amylase. *International Journal of Cosmetic Science*, 31, 391-395.

- [14] Yamaguchi, M., Sakakima, J., Kosaka, S., Nakabayashi, M. (2008) A method for evaluating the discomfort induced by odor using a biochemical marker. *Sensors and Actuators B*, *131*, 143-147.
- [15] 花輪尚子, 才木祐司, 山口昌樹 (2007) 植物精油の吸入が唾液アミラーゼに与える影響, *Aroma Research*, *8*, 66-72.
- [16] Yamaguchi, M., Sakakima, J. (2007) Evaluation of Driver Stress in a Motor-vehicle Driving Simulator Using a Biochemical Marker, *The Journal of International Medical Research*, *35*, 91-100.
- [17] Yamaguchi, M., Deguchi, M., Miyazaki, Y. (2006) The Effects of Exercise in Forest and Urban Environments on Sympathetic Nervous Activity of Normal Young Adults. *The Journal of International Medical Research*, *34*, 152-159.
- [18] Yamaguchi, M., Kanemori, T., Kanemaru, M., Takai, N., Mizuno, Y., Yoshida, H. (2003) Test-Strip-Type Salivary Amylase Activity Monitor and Its Evaluation. *Sensors & Materials*, *15*, 283-294.
- [19] 花輪尚子, 才木祐司, 山口昌樹 (2008) 日本由来の香りが日本人にもたらす交感神経活動の鎮静作用, *日本生理人類学会誌*, *13*, 49-56.
- [20] Yamaguchi, M., Kanemori, T., Kanemaru, M., Takai, N., Mizuno, Y., Takai, N (2003) The Influence of Physical Stress on Amylase Activity in Human Saliva. *Life Support*, *15*, 120-127.
- [21] Chicharro, J.L., Pérez, M., Carvajal, A., Bandrés, F., Lucía, A. (1999) The salivary amylase, lactate and electromyographic response to exercise. *Japanese Journal of Physiology*, *49*, 551-554.
- [22] Chatterton, R.T. Jr, Vogelsong, K.M., Lu, Y.C., Hudgens, G.A. (1997) Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *82*, 2503-2509.
- [23] Tenovuo, J.O. (1989) Human Saliva: Clinical Chemistry and Microbiology, Volume II (pp.93-119). Boca Raton: CRC Press Inc.
- [24] Jenzano, J.W., Brown, C.K., Mauriello, S.M. (1987) Temporal variations of glandular kallikrein, protein and amylase in mixed human saliva. *Archives of Oral Biology*, *32*, 757-759.
- [25] Parkkila, S., Parkkila, A.K., Rajaniemi, H. (1995) Circadian periodicity in salivary carbonic anhydrase VI concentration. *Acta Physiologica Scandinavica*, *154*, 205-211.
- [26] Wang, C.H. and Woolfolk, C.A. (1990) Salivary amylase activity of the aged. *Gerontology*, *36*, 193-198.
- [27] Salvolini, E., Mazzanti, L., Martarelli, D., Giorgio, R.D., Fratto, G., Curatola, G. (1999) Changes in the composition of human unstimulated whole saliva with age. *Aging*, *11*, 119-122.