

唾液バイオマーカーを用いた
嗅覚刺激の定量評価技術に関する研究

Research on Quantitative Measurement Techniques of Olfactory Response
Using Salivary Biomarkers

2013年9月

September, 2013

岩手大学 大学院工学研究科
機械・社会環境システム工学専攻

Graduate School of Engineering, Iwate University
Machine and Social Environment System Engineering Specialty

学績番号：25710005

中野 敦行

Atsunori Nakanao

指導教員： 山口 昌樹 教授

研究要旨

嗅覚刺激がヒトの生理的・心理的状态に影響を及ぼすことは、広く知られている。評価方法として、質問紙や物理計測の脳波、血圧、心拍数、呼吸数などがあるが、主として交感神経系の変化しか観察できない。そこで、非侵襲で拘束等の制限がなく、分析に必要な検体を数分でミリリットル単位の量を採取可能な唾液に着目した。しかも、唾液には、交感神経系のマーカーだけでなく、内分泌系や免疫系のマーカーも含まれるので、複数の系を同時に評価することができる。

これまで、唾液バイオマーカーを用いた嗅覚刺激の研究では、健常被検者における急性試験を中心に、一過性の合成香料の鎮静効果や香料の睡眠への影響等が研究されており、急性の交感神経活性の亢進や鎮静をもたらすことなどが明らかになっている。しかし、ヒトには国籍や生活習慣によって嗅覚刺激に対して感じ方に個性があり、好き・嫌いという嗜好性があるが、香りの嗜好性によって引き起こされる生理反応に関する検討や被検者の経験を考慮した検討は、十分に行われているとは言えない。

本研究では、嗅覚刺激がヒトの心身に与える生理反応を、香りの嗜好性と生理反応の関連性と被検者の経験を考慮しつつ主観評価と唾液バイオマーカーを用いて非侵襲・無拘束の条件下かつ唾液の同時解析して検証することで、嗅覚刺激に対する生理反応の定量評価技術を開発することを、目的としている。

本研究では、大別して2つのアプローチを試みた。1つ目には、精油の香りの嗜好性における生理反応の評価するため、日常的に使用されている精油を用いて、主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミラーゼ活性とコルチゾール濃度の変化を検証した。対象者を、日常的に精油を使用している被検者22名 (40.6 ± 8.4 歳, mean \pm SD) を用い、被検者に好まれるローズマリー、オレンジスイート、フランキンセンス、ラベンダー、ゼラニウムの5種類の精油を嗅覚刺激として、主観評価と急性反応と慢性反応を検証するため α -アミラーゼとコルチゾールの2種類の唾液バイオマーカーの同時解析を行った。その結果、0~10の範囲で主観評価を行ったところ、好みの

平均値が最低でも 6.8 以上の高値を示し，かつ嗅覚刺激の経験の有無が 8.6 - 9.6 の範囲，日常生活での使用の有無は，7.1 - 8.9 の範囲を示した。これは，用いた精油全て被検者に好まれ，かつ日常的に使用している被検者を選定できたと判断できた。唾液アミラーゼ活性は，精油の種類によって，オレンジスイートでは活性化，ラベンダーでは鎮静化，ローズマリーでは鎮静化と活性化といった 3 パターンを示した。コルチゾールでは，嗅覚刺激前後でラベンダーとローズマリーにおいて， $P < 0.05$ の有意差が確認された。これらより，唾液バイオマーカーを用いれば，精油の嗜好性によって引き起こされる複雑な生理反応を考察できる可能性が示唆された。

2 つ目として，香辛料における記憶と経験による生理反応の評価するため，日本人にとって馴染み深い香りであるカレー粉に使われている香辛料を用い，主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミラーゼ活性，オレキシン A， β -エンドルフィンの変化を検証した。対象者を 10 人の日本人成人男性（ 22.1 ± 1.1 歳，平均 \pm 標準偏差）として行った。コリアンダー，フェヌグリーク，クミンを同量で混合したものを香辛料標準見本とし，市販されているカレー粉を香辛料優良見本として嗅覚刺激を行った。主観評価と α -アミラーゼ，オレキシン， β -エンドルフィンの 3 種類の唾液バイオマーカーを安静時，嗅覚刺激時，後半安静時に測定し，分析をおこなった。その結果，主観評価では，2 種類の香辛料間で食欲増進について， $p < 0.1$ の統計的有意差が認められた。香辛料優良見本は，市販のカレー粉として誰もが 1 度は嗅いだ経験がある香りであることから，香辛料標準見本よりも食欲増進の評価が高かったと言える。 α -アミラーゼでは，嗅覚刺激後において，2 種類の香辛料間で $p < 0.1$ の統計的有意差が確認され，香辛料優良見本が高値を示した。これは，香辛料優良見本の方が有意な上昇が認められ，交感神経活性の活性化を示唆した。オレキシン A では，2 種類の香辛料間で統計的な有意差は認められなかったが，香辛料優良見本では，刺激前と刺激直後で $p < 0.1$ の統計的有意差が，刺激直後と刺激安静後で $p < 0.05$ の統計的有意差が認められ，嗅覚刺激による中枢神経系の変化が，唾液バイオマーカーに現れる可能性を示唆された。 β -エンドルフィンでは，2 種類の香辛料間，および経時変化の双方に関して，統計的な有意差は認

められなかった。以上により，主観評価と唾液バイオマーカーの双方で香りに対する経験の有無が生理反応の変化に反映されることが示唆された。本研究により，以下の事項が明らかとなった。

- 1) 唾液アミラーゼ活性を用いれば，主観評価だけでは判別が困難な覚醒効果，鎮静効果，鎮静とその後の高揚効果といったより複雑な精油の生理反応を観察できる可能性が示唆された。
- 2) 香りに対する経験の有無が，主観評価と唾液バイオマーカーの生理反応の両方に反映され，摂食促進物質などを唾液バイオマーカーとして用いることで，より詳細な生理反応を観察できる可能性が示唆された。

記号表

記号	名称	[単位]
mean	各変数の平均値	—————
n	データ数	—————
p	有意確率	—————
R^2	決定係数	—————
SD	標準偏差	—————
CV	変動係数	—————
df	自由度	—————
SAA	唾液アミラーゼ活性値	kU/l

目次

第1章 序論

1.1 嗅覚刺激おけるに生体反応	1
1.2 唾液バイオマーカーの定量化	3
1.2.1 α -アミラーゼ	3
1.2.2 コルチゾール	5
1.2.3 オレキシン A	5
1.2.4 β -エンドルフィン	6
1.3 本研究の目的	6

第2章 唾液バイオマーカーの定量分析

2.1 α -アミラーゼ	11
2.1.1 分析原理	11
2.1.2 分析精度	11
2.1.3 分析時間	12
2.1.4 分析方法	12
2.2 コルチゾール	12
2.2.1 分析原理	12
2.2.2 分析精度	13
2.2.3 分析時間	13
2.2.4 分析方法	13
2.3 オレキシン A	14
2.3.1 分析原理	14
2.3.2 分析精度	14
2.3.3 分析時間	14
2.3.4 分析方法	15
2.4 β -エンドルフィン	15
2.4.1 分析原理	15
2.4.2 分析精度	15

2.4.3	分析時間	16
2.4.4	分析方法	16

第3章 香りの嗜好性と生理反応の関連性

3.1	対象と方法	22
3.1.1	対象	22
3.1.2	嗅覚刺激	22
3.1.3	主観評価	23
3.1.4	唾液バイオマーカー	23
3.1.5	検査プロトコル	23
3.1.6	統計分析	24
3.2	分析結果	24
3.2.1	主観評価	24
3.2.2	唾液アミラーゼ活性	25
3.2.3	コルチゾール	26
3.3	考察	26
3.4	結論	28

第4章 香りの記憶・経験と生理反応の関連性

4.1	対象と方法	34
4.1.1	対象	34
4.1.2	嗅覚刺激	34
4.1.3	主観評価	34
4.1.4	唾液バイオマーカー	35
4.1.5	検査プロトコル	35
4.1.6	統計分析	36
4.2	分析結果	36
4.2.1	主観評価	36
4.2.2	α -アミラーゼ	36
4.2.3	オレキシジン A	37

4.2.4 β -エンドルフィン	37
4.3 考察	37
4.4 結論	38
第5章 結論	43
参考文献	45
業績	50
謝辞	51

第 1 章 序論

1.1 嗅覚刺激における生体反応

嗅覚刺激は日常生活で常に体験している外的要因刺激である。例えば、食事をするとき、日本の四季を感じる時、鼻で刺激を感じ、過去の記憶からどういった匂いなのか考える。嗅覚刺激がヒトの生理的・心理的状态に影響を及ぼす効果があることは、広く知られている。嗅覚刺激は古代から民間薬や医薬品としても利用されており、近代医学が発達する以前のヒトの健康管理を担ってきたといわれる。例えばインドでは糖尿病の伝統的な治療にアカシアの葉やアロエが利用されてきた⁽¹⁾。また、代替医療や予防医学的手法としてアロマセラピーを代表するように、植物由来の揮発成分の組み合わせを吸入することで、ヒトの気分を変えたり、ストレスを解消したりする効果があるとされており、広範囲な分野で活用されている⁽²⁾。

嗅覚刺激とは、香りを構成する匂い分子が、ヒトの鼻腔内に到達すると嗅細胞に作用することによりおこる。嗅細胞の嗅覚受容体に結合して匂いとして検出されると、匂い情報が脳の嗅球に伝わる。匂い情報は、嗅球からさらに高次の脳領域へと伝わるが、情報が脳皮質を経由してから大脳辺縁系に送られる視聴覚情報とは異なり、匂い情報は海馬などの大脳辺縁系に直接伝わって自律神経系、内分泌系の生体調節に作用する。そのため、解剖学的にも、嗅覚刺激は他の感覚よりも情動反応を誘引しやすい。また、大脳辺縁系に取り巻かれている脳幹は、恐怖、憎悪、怒り、幸福感といった情動を司る部分であり、心理的な影響も与える。このように、嗅覚と情動の関係は他の感覚系と比べて異なっており、非常に興味深い⁽³⁾。逆に表現すると、嗅覚刺激をうまく刺激すれば、ヒトの感情をコントロールすることが可能かもしれない。

香りについては近年、香りの化学組成の分析や香りの生理心理作用を科学的に解明しようとする試みが行われており、客観的な検証が行われつつある。これまで、ヒトの香りに対する嗜好性や香りの影響を検証する官能検査の方法としては、質問紙が主流であった⁽⁴⁾。しかし、この方法では、

同じ質問を繰り返すと、面倒さや慣れた同一者でも結果が異なったり、逆にほとんど変化しなくなるなど、定量性、再現性に問題があった。そこで、客観的、定量的な指標として、脳波 (Electroencephalogram: EEG)⁽⁵⁾などの脳機能、血圧⁽⁶⁾や心拍数⁽⁷⁾、心電図などの循環機能、呼吸数や呼吸量の呼吸機能や、発汗、体温、眼球運動などの物理計測が用いられてきた(表 1-1)。これらは、ヒトの交感神経系活性の変化からストレスを定量化しようというアプローチである。しかし、その多くは電極等を生体に装着する必要があるので、被検者の行動が拘束されるという制約など、さまざまな制限が生じており、随時性、即時性、簡便性に優れた指標がなかった。また、物理計測では、交感神経系のみでの単一な計測しかできない。

そこで、近年研究がさかんである唾液バイオマーカーに着目した。唾液バイオマーカーは、血液や尿と違い、採取場所はとらず、誰でも採取することができ、数分で ml 単位の採取が可能となっている。さらに、測定するバイオマーカーにより、同時に、交感神経系、内分泌系や免疫系の変化まで測定する事が最大のメリットである。

これまで、唾液から非侵襲に分析できるストレスマーカーを用いて、香りが心身に与える影響を、定量的に評価する研究が行われてきた。今までに、健常被検者を用いた急性試験を中心として、合成香料の鎮静効果⁽⁸⁾・⁽⁹⁾、精油の鎮静効果⁽¹⁰⁾、日本由来の香りを再現した合成香料の効果⁽¹¹⁾、室内悪臭の評価⁽¹²⁾、香料の睡眠への影響⁽¹³⁾や、精油の濃度の影響⁽¹⁴⁾に関する生体評価が行われている。これらを通して、ヒトに共通する性質として、i) 嗅覚刺激が急性の交感神経活性の亢進や鎮静をもたらすことや、ii) 濃度の濃い香りは不快に感じやすく、濃度が低ければ不快に感じにくいことなどを明らかになった。しかし、ヒトには国籍や生活習慣によって嗅覚刺激に対して感じ方に個性が生じる。つまり、好き・嫌いという嗜好性があるが、香りの嗜好性によって引き起こされる、交感神経系の変化、内分泌系の変化、免疫系の変化等の生理反応に関する検討や被検者の経験を考慮した検討は、十分とは言えない。

1.2 唾液バイオマーカーの定量化

人体に加えられた様々な刺激は，感覚器で検知され，末梢神経を介して脳内の中枢神経系に伝達される。脳では，それらの刺激が認知され統合される。刺激に対応するために脳から発せられた指令は，交感神経系や内分泌系を介して全身に伝達され，各器官の亢進または活性化や抑制または鎮静化などの生体反応として現れる。

バイオマーカーとは，このような人が発する生体情報を，血液，間質液，唾液，尿などの生体サンプルに含まれる化学物質の濃度から読み取り，数値化・定量化した指標を意味している。バイオマーカーは，特定の疾患や身体の状態に相関して量的に変化するため，その量を測定することで疾病の診断や効率的な治療法の確立などが可能になる。また，交換神経系や内分泌系に直接・間節的に関与するバイオマーカーは，ストレスの強度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呼ばれるものもある。こうした，外的要因刺激において変化するストレスマーカーは，血液に含まれているものが多く，その行為自体が刺激となり，刺激に対する純粋な定量化が難しい。しかし，その一部は唾液でも分析可能である。バイオマーカーを唾液で分析が可能であることは，身体に対するわずかな変化を数値として大きく捉えることができる。唾液アミラーゼ活性の変化は，小児でも 10KU/L から 300KU/L との報告がある⁽¹⁵⁾。唾液バイオマーカーは，非侵襲で拘束等の制限がなく，分析に必要な唾液検体は数分で mL 単位の採取が可能である。生物学的な尺度を数値でとらえることができ，生理変化を捉えやすく，交感神経系，内分泌系や免疫系といった複数の評価が同時に行う事ができる。また，非侵襲で，随時性，簡便性に優れ，誰でも定量化できるメリットもある。

本研究では，このストレスマーカーである唾液バイオマーカーに着目し，嗅覚刺激の定量評価技術に用いることとした。

1.2.1 α -アミラーゼ

数ある唾液中の生化学物質の中でも， α -アミラーゼは，炭水化物を加水分解する消化酵素で，デンプンなどの炭水化物に作用して，デキストリン

と麦芽糖とに分解する。

α -アミラーゼが唾液中に存在することは 19 世紀前半から知られており、この酵素は酵素学の基本となった。その活性は、数千から数十万 (U/l) と非常に高いという特徴がある⁽¹⁶⁾。測定方法は、尿中、血清中から測定する試薬に広く使われている、基質 Gal-G4-CNP (2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltetraoside)⁽¹⁷⁾ではなく、消化酵素である α -アミラーゼの基質 Gal-G2-CNP (2-chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside)⁽¹⁸⁾を用いて、 α -アミラーゼの加水分解で時間とともに黄色に発色することを利用した、比色法により簡便に定量を行った。

また、Gorza ら⁽¹⁹⁾や Speirs ら⁽²⁰⁾によって、交感神経系作用の結果として唾液に含まれるアミラーゼ活性や唾液流速の増大が報告されて以来、唾液アミラーゼ活性はストレス反応における血漿ノルエピネフリン濃度の有用な指標と考えられるようになった。この唾液アミラーゼ活性とストレスとの関係は、唾液アミラーゼ活性の定量に関する生理学的な検討⁽²¹⁾や、小腸における消化酵素分泌に関する検討⁽²²⁾から、徐々に明らかにされた。1980年代になると、交感神経作用との関連からその機序が検討された⁽²³⁾⁽²⁴⁾。唾液アミラーゼは、交感神経-副腎髄質系 (Sympathetic nervous-adrenal modularly system, SAM system)、制御の他に、直接神経作用による制御システムが存在する。この直接神経作用により唾液中の α -アミラーゼ分泌が亢進される場合には、応答時間が 1-数分と短く、ホルモン作用に比べて格段にレスポンスが速く、反応が一過性である。

図 1-1 に、ストレッサーに対する代表的な生体内反応を示す。最近ではエクササイズ⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾やスカイダイビング⁽²⁷⁾などの肉体的・精神的ストレスとの因果関係も考察されており、血液中のカテコールアミンとの相関が良好であるという報告もなされた⁽²⁸⁾。さらに、歯周病とのストレスの関連についても研究されている⁽²⁹⁾。

このような唾液アミラーゼ活性の特性を生かし、本研究では、嗅覚刺激によって引き起こされる交感神経活動の亢進 / 鎮静を測定するための指標として用いた。

1.2.2 コルチゾール

コルチゾールとは、副腎皮質から分泌されるホルモンで、糖質コルチコイドの一種である。糖代謝をはじめ、タンパク代謝、脂質代謝、電解質の代謝、骨代謝、さらに免疫機構にも関与しており、生命維持に不可欠なホルモンとされている。炎症を抑制する作用もある。また、ストレスに関与し、過度なストレスを受けると分泌量が増加しますが、その反応は反応性がよいことからストレスホルモンとも呼ばれている。慢性の指標として使用されている。

また、内分泌系の指標であるコルチゾールは、血液中の基準値が 10 - 15 $\mu\text{g}/\text{dl}$ と比較的高いので、免疫測定法 (ELISA) など高感度な分析法を用いれば唾液から分析できる⁽³⁰⁾、⁽³¹⁾。最近では、マイクロ電気泳動による分析時間の短縮化の検討も始まっている⁽³²⁾。コルチゾールは、安定性が高い物質であり、数日であれば冷蔵保存できる。

このような唾液コルチゾールの特性を生かし、本研究では、嗅覚刺激によって引き起こされる内分泌系の変化を測定するための指標として用いた。

1.2.3 オレキシン A

オレキシン A は、視床下部にある神経細胞のオレキシニューロンから産生され、1998 年に日本で発見された物質である。オレキシン A は摂食活動の促進、睡眠と覚醒のコントロール、交感神経の活動の促進を行う機能がある。これまでの研究で、ラットの脳室内に投与すると摂食量が増加することから、摂食調節因子であることがわかっている⁽³³⁾、⁽³⁴⁾。また、オレキシン A の働きで、筋肉での糖代謝が促進され、インスリン分泌に影響することなく血糖上場が抑えられ、嗅覚刺激において記憶と深く関与し、規則正しく食事をすることで摂食への期待感に関与することがわかっている⁽³⁵⁾。オレキシン A は、摂食の促進の指標だけでなく、経験、記憶との関連性も関与する。

このようなオレキシン A の特性を生かし、本研究では、嗅覚刺激によって引き起こされる経験記憶に関与する摂食中枢の摂食促進を測定するた

めの指標として用いた。

1.2.4 β -エンドルフィン

β -エンドルフィンとは、脳内ではたらく神経伝達物質であり、副腎皮質刺激ホルモンなどの同一の前駆体であるプロオピオメラノコルチンに由来する。中脳中心灰白質に投射する視床下部弓状核のニューロンから分泌される。 β -エンドルフィンは、内的・肉体的環境の変化により報酬・ストレスの双方に対して反応する特徴がある。これは、大脳辺縁系の情動反応で、報酬系は摂食・満腹感時に、ストレス反応は肉体的疲労時により分泌される。中脳腹側被蓋野の μ 受容体に作用し、モルヒネに似た作用を発揮するが、ストレスなどの外的刺激により生産されて鎮痛、鎮静にも働く機能がある。例えば、マラソンなどで苦しい状態が一定時間以上続くと、脳内でそのストレスを軽減するために β -エンドルフィンが分泌され、やがて快感や陶酔感を覚えるランナーズハイ現象がおきる。 β -エンドルフィンは、報酬系に多く分布しており、ラットが好む甘味を与えた時にその血中濃度が上昇することから、美味しさという情報との関連性があるとされている⁽³⁶⁾。⁽³⁷⁾。このような、身体的変化は、生得的な無条件反応としてあらわれ、本能行動の中枢で判定される。本指標を用いることにより、無意識的な生理反応をとらえられると考えられる。

このような β -エンドルフィン活性の特性を生かし、本研究では、嗅覚刺激によって引き起こされる脳内で起きる無意識的な摂食・満腹感を測定するための指標として用いた。

1.3 本研究の目的

本研究では、嗅覚刺激がヒトの心身に与える生理反応を、香りの嗜好性と被検者の経験を考慮しつつ、主観評価と唾液バイオマーカーを用いて非侵襲・無拘束の条件下で同時分析することで、嗅覚刺激に対する生理反応の定量評価技術の開発を目的としている。

1つ目には、精油の香りの嗜好性における生理反応の評価するため、日常的に使用されている精油を用いて、主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミ

ラーゼ活性とコルチゾールの変化を検証した。2つ目には、香辛料における記憶と経験による生理反応の評価するため、日本人にとって馴染み深い香りであるカレー粉に使われている香辛料を用い、主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミラーゼ活性、オレキシシン A、 β -エンドルフィンの変化を検証した。以下にそれぞれの検討項目を述べる。

精油の香りの嗜好性における生理反応の評価では、精油の香りの嗜好性と生理反応の関連性を考察するために、22名の被検者を対象として以下の項目を実施した。

- (1) 5種類の精油を用いて嗜好性及び濃度が、被検者の心身へ与える影響を定量評価するため、質問紙を考察して主観評価を行った。
- (2) 嗅覚刺激前、中、後において唾液アミラーゼ活性の経時変化を測定し、嗜好性や好みによって急性反応を示す交感神経活性に統計的な有意差が生じるか評価した。
- (3) 嗅覚刺激前後において、コルチゾール濃度の経時変化の比較を行うことで、慢性反応を示す内分泌系に変化を引き起こすか検証した。

次に、香辛料における記憶と経験による生理反応の評価では、嗅覚刺激に対する経験の有無が生理反応に反映されるか考察するために、主観評価と唾液バイオマーカーの双方を尺度に用いて、10名の被検者を対象として、以下の項目を検討した。

- (1) 経験の有無を発掘できるような質問紙を考察して主観評価を行い、使用した香辛料の濃度、使用量が妥当であるか評価した。
- (2) 嗅覚刺激前、中、後において、唾液アミラーゼ活性を測定することで、経験の有無により交感神経活動に統計的な有意差が生じるか評価した。
- (3) 摂食促進の指標としてオレキシシン Aを用い、嗅覚刺激前後とその後の安静において、経験の有無により統計的な有意差が生じるかを評価した。
- (4) 摂食・満腹感の指標として β -エンドルフィンを用い、嗅覚刺激前とその後の安静時において、経験の有無により統計的な有意差が生じるかを評価した。

本論文では、以下の事項について述べる。

第 2 章唾液バイオマーカーの定量分析では、生体の指標を用いた α -アミラーゼ、コルチゾール、オレキシン A、 β -エンドルフィンの分析方法についてまとめる。

第 3 章精香りの嗜好性と生理反応の関連性では、植物から抽出した精油を使用することで、香りの嗜好性と生理反応の関連性を、主観評価と唾液バイオマーカーを用いて評価についてまとめる。

第 4 章香りの記憶・経験と生理反応の関連性では、香辛料の香りがヒトの心身に与える生理反応を被検者の経験をファクターとして考慮しつつ、脳内のバイオマーカーの唾液中の濃度が、嗅覚刺激によって統計的に有意に変動するか否かを、主観評価と唾液バイオマーカーを用いて評価についてまとめる。

第 5 章結論では、本研究の成果をまとめる。

表 1-1 心理計測に用いられる物理計測と主観評価
 Table 1-1 The physical measurement and subjectivity evaluation that are used for psychological measurement.

測定法の分類	測定項目	原理
脳機能	脳血流量，脳波	光，電気
循環機能	血流量，血中酸素濃度，心電図，血圧，心拍数	電気，光，圧力
呼吸機能	呼吸数，呼吸量，呼吸率（速さ）	圧力，電気
その他の機能	発汗，体温・皮膚温，眼球運動（瞬目）	湿度，温度，光，電気
自覚的測定	主観評価，自覚症状数	アンケート
多覚的測定	表情，態度，動作所要時間，作業量	

山口昌樹:ヒューマンストレスバイオマーカー,ヒューマンサイエンス;2008, 19, 18-21より引用

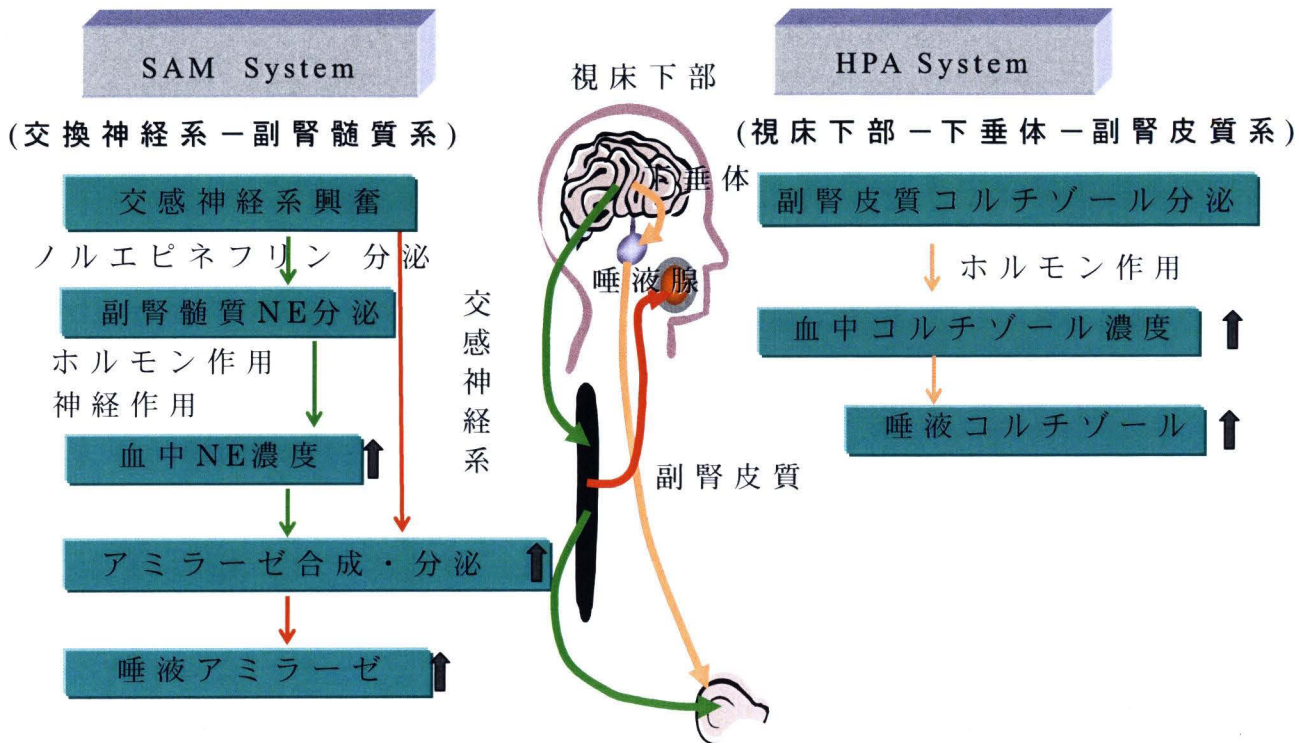


図 1-1 ストレッサーに対する代表的な生体内反応
 (NE: ノルエピネフリン)
 Fig.1-1 Representative vital reaction for the stressor.
 (NE: Norepinephrine)

金丸正史, 金森貴裕, 山口昌樹, 吉田博, 水野康文:唾液アミラーゼ活性によるジェットコースターの感性評価, 電子情報通信学会, 2003;24, 1-6 より引用

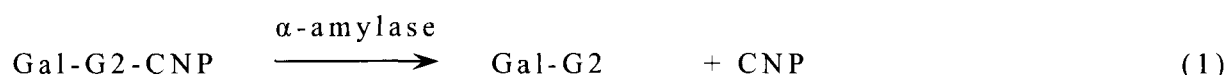
第 2 章 唾液バイオマーカーの定量分析

本研究では， α -アミラーゼ，コルチゾール，オレキシン A， β -エンドルフィンの定量分析をおこなった。全ての唾液バイオマーカーにおいて，唾液にて測定することが可能である。本章では，それらの分析方法について述べる。

2.1 α -アミラーゼ

2.1.1 分析原理

α -アミラーゼの分析には，携帯式の唾液アミラーゼモニタ (α -Amy, ヤマハ発動機株) を用いた (図 2-1)。この唾液アミラーゼモニタは，使い捨て式のテストストリップとモニタ ($126 \times 130 \times 48 \text{ mm}^3$; 350 g) で構成されている。モニタには，自動の唾液転写機構と光学測定器が設けてある。使い捨て式のテストストリップは，唾液採取紙とアミラーゼ試験紙で構成されている。試験紙には，唾液アミラーゼの基質となる Gal-G2-CNP をあらかじめ含浸されており，次の反応に基づき測定を行う⁽³⁸⁾。



遊離した CNP は黄色を呈し，反射型吸光光度法により測定する。

α -アミラーゼは，刺激からの応答時間が 1-数分と非常に短いため，本プロトコルでは，唾液採取紙で採取後，直ぐに唾液アミラーゼモニタにて測定を行った。

2.1.2 分析精度

唾液アミラーゼモニタの分析範囲は，10 ~ 200kU/l であり，広範囲で測定が可能である。分析精度は，臨床自動分析装置で測定する従来法と比べ，相関性 $R^2 > 0.95$ ， $CV = 10.2\%$ の分析精度がある⁽³⁹⁾。また，再現性は，30kU/l の低濃度，50kU/l の中濃度，100kU/l の高濃度，150kU/l の異常高濃度で CV の値がいずれも 10% 以下の性能を有している。

2.2.3 分析時間

唾液アミラーゼモニタの分析時間は、唾液採取後、機器にセットし約 35 秒で検査結果を表示させる。即時性及び簡便性がある分析装置を使用した。

2.1.4 分析方法

唾液採取紙を口腔に挿入し、10 - 30 秒かけて舌下部から舌下腺唾液から唾液を採取する (図 2-2 (a))。シートを引いて唾液採取紙をスリーブ内に入れた後、テストストリップを唾液転写機構にセットすると、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 (図 2-2 (b))。この時を反応開始時間 0 秒とし、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し、シートを引く。この後、アミラーゼ試験紙に含浸された Gal-G2-CNP が α -アミラーゼで加水分解され黄色に発色する。反応開始時間から 20 秒後の反射率が、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 (図 2-2 (c))。すなわち、本唾液アミラーゼモニタは、唾液採取に 30 秒、転写と測定に 35 秒が必要であり、計 1 分ほどで唾液アミラーゼ活性を分析できる。使用済みのテストストリップを抜き取ると、自動的に電源が切れる。

2.2 コルチゾール

2.2.1 分析原理

コルチゾールの分析には、コルチゾールに対する特異抗体を用いた免疫測定法 (immunoassay) が比較的頻繁に用いられており、従来法は放射性同位元素を標識物質とする放射性同位元素免疫測定法 (radioimmunoassay) やペルオキシダーゼなどの酵素を抗体に標識した酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay) がある。また、近年では、ランタニドなどの蛍光物質を標識とする蛍光免疫測定法 (Fluoroimmunoassay) やルミノールなどの科学発行物質を標的とする化学発行免疫測定法 (luminescence immu

noassay) が用いられるようになった (表 2-1)。

本分析には、酵素免疫測定法の ELISA キット (Cortisol, EIA Kit, Salimetrics LLC) とプレートリーダー (Wallac 1420ARVO MX/Light, PerkinElmer Japan Co., Ltd.) を用いた。コルチゾールの抗体抗原反応で固定化させた後、標識抗体を反応させることで発色が起こる。発色をプレートリーダーで行い、吸光度を測定した。また、同時に既知のコルチゾール濃度で測定を行っており、吸光度との検量線を作成する事で、測定した吸光度から濃度を算出した。

2.2.2 分析精度

本測定キットの測定範囲は、0 ~ 3 ng/ml で、最小検知度が 0.003 ng/ml 以下である非常に高感度なキットである。また、希釈直線性も期待値とのずれが $\pm 10\%$ 以内の分析が可能となっている。また、再現性は、0.097 ng/ml の低濃度、0.999 の高濃度にて、CV の値がいずれも 4% 以下の性能を発揮する。

2.2.3 分析時間

本測定キットの分析時間は、試薬調整も含め、約 120 分かかかる。高感度の分析を行う事ができるが、検体の調整や試薬の調整が必要であり時間がかかる。

2.2.4 分析方法

コルチゾールは、一般的に朝高く、夜低いというサーカディアンリズムがある。その為、分析には、唾液採取時間を全被験者で午後から行った。また、食事の 1 時間後、アルコール摂取後 12 時間経過していることに注意し、歯磨き及び口を水でゆすいでから 10 分経過してから唾液の採取を行った。唾液採取には、脱脂綿を舌下に 2 分間入れ、十分にしめったことを確認し、シリンジで絞り出した。嗅覚刺激による変動を考慮するため、必要唾液量を短時間で取る必要があり、嗅覚刺激直前と安静座位後に採取を行った。コルチゾールは、採取後安定性が高いため、冷蔵保存しプロト

コル終了後，分析を行った。採取した唾液を十分に室温に馴染ませた後，遠心分離器にて 3,000rpm で 15 分間遠心分離を行い，検体の調整を行った。プレートには，コルチゾールの抗体を固定化させ，そこに唾液を添加することにより抗原抗体反応させた。抗原抗体反応後，不要な唾液成分等の洗浄を行い，発色基質溶液添加する事により発色させ，プレートリーダーにより吸光度測定を行った。検量線より濃度の算出を行った。

2.3 オレキシン A

2.3.1 分析原理

オレキシン A は，ELISA 法で分析を行った。分析には，ELISA キット (Orexin A, EIA Kit, Fluorescent, Phoenix Pharmaceuticals, Inc.) とプレートリーダー (Wallac 1420ARVO MX/Light, PerkinElmer Japan Co., Ltd.) を用いた。図 2-3 には，オレキシン A の測定原理を示した。マイクロプレートにはオレキシン A の抗体を固相化し，採取した唾液を添加する事で，オレキシン A と抗原抗体反応が起こる。その後，オレキシン A に結合する酵素標識抗体を添加し，不必要な唾液成分等の洗浄を十分に行う。次に，酵素標識抗体の酵素により発色基質の発色反応が促進される。よって，反応生成物が呈色し，マイクロプレートリーダーで吸光度を測定し分析を行った。また，同時に既知のオレキシン A 濃度 6 段階で測定を行っており，吸光度との検量線を作成する事で，測定した吸光度から濃度を算出した。

2.3.2 分析精度

測定範囲は，0～10,000 pg/ml と広範囲であり，感度 42.5 pg/ml の非常に高感度でオレキシン A の濃度を算出できる。

2.3.3 分析時間

検体の前処理に約 24 時間，分析に 3 時間ほど必要である。これは，検体と試薬の調整及び反応に時間がかかるためである。

2.3.4 分析方法

今回唾液採取は、オレキシン A とセルロースの吸着の影響を回避するため、被検者よりサンプルチューブを使用することで直接採取紙、検体の調整を行った。ピペットマンでコルチゾール用抗体を免疫プレートに 25 μ l/well 加え、さらに検体とコントロールを 50 μ l/well 滴下した。4 $^{\circ}$ C のインキュベーターにて一晚培養を行った。一晚培養することで、マイクロプレートに固定化を行った。次に、標識抗体ゼオチン化ペプチドを 25 μ l/well 滴下を行い、20 \sim 23 $^{\circ}$ C で 1.5 時間培養を行った。その後、350 μ l/well の緩衝液で 4 分間、免疫プレートを洗浄し、調整した発色基質溶液を 100 μ l/well 加え、20 \sim 23 $^{\circ}$ C で 20 分間培養を行った。反応停止溶液を 100 μ l/well 加えて反応を止めた。325nm \sim 420nm のプレートリーダーにより蛍光発光を計測した。既知の濃度で算出した、検量線により濃度を計算した。

2.4 β -エンドルフィン

2.4.1 分析原理

唾液 β -エンドルフィンの分析には、ELISA 法による分析を行った。分析には、ELISA キット (β -endorphin, Enzyme Immunoassay Kit, Peninsula Laboratories Inc.) とプレートリーダー (Wallac 1420ARVO MX/Light, PerkinElmer Japan Co., Ltd.) を用いた。 β -エンドルフィンの測定原理を (図 2-4) に示す。マイクロプレートには β -エンドルフィンの抗体を固相化し、採取した唾液を添加する事で、 β -エンドルフィンと抗原抗体反応が起こり、マイクロプレートに固定化できる。その後、 β -エンドルフィンに結合する酵素標識抗体を添加し不必要な唾液成分等の洗浄を十分に行った。次に、酵素標識抗体の酵素により発色基質の発色反応が促進される。よって、反応生成物が呈色しマイクロプレートリーダーで吸光度を測定し分析を行った。また、同時に既知の β -エンドルフィン濃度 6 段階で測定を行っており、吸光度との検量線を作成する事で、測定した吸光度から濃度を算出した。

2.5.2 分析精度

測定範囲は、0.625 \sim 10,000 ng/ml と広範囲であり、感度 0.5ng/ml の非

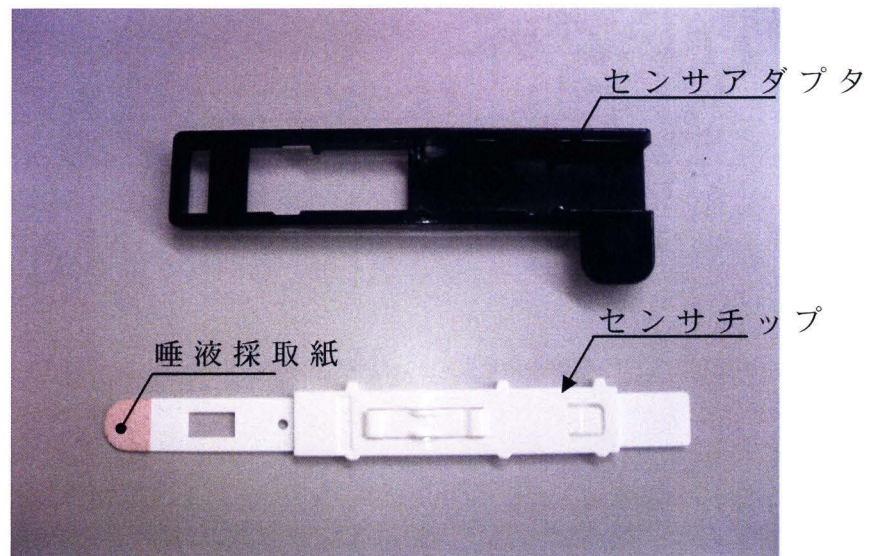
常に高感度で β -エンドルフィンの濃度を算出できる。

2.5.3 分析時間

検体の前処理に約 24 時間，分析に 3 時間ほど必要である。これは，検体と試薬の調整及び反応に時間がかかるためである。

2.5.4 分析方法

今回唾液採取は， β -エンドルフィンにセルロースの吸着の影響を回避するため，被検者よりサンプルチューブを使用することで直接採取紙，検体の調整を行った。ピペットマンで β -エンドルフィン用抗体を免疫プレートに 25 μ l/well 加え，さらに検体とコントロールを 50 μ l/well 滴下した。4℃のインキュベーターにて一晚培養を行った。次に，標識抗体のゼオチン化ペプチドを 25 μ l/well 滴下を行い，20～23℃で 1.5 時間培養を行った。その後，350 μ l/well の緩衝液で 4 分間，免疫プレートを洗浄し，調整した発色基質溶液を 100 μ l/well 加え，20～23℃で 20 分間培養を行った。反応停止溶液を 100 μ l/well 加えて反応を止めた。325nm～420nm のプレートリーダーにより蛍光発光を計測した。既知の濃度で算出した，検量線により濃度を計算した。



(a) テストストリップ



(b) 唾液アミラーゼモニタ本体
(140 × 130 × 80 mm³)

図 2-1 携帯式唾液アミラーゼモニタの外観
Fig.2-1 External view of the salivary amylase monitor
for commercial use.

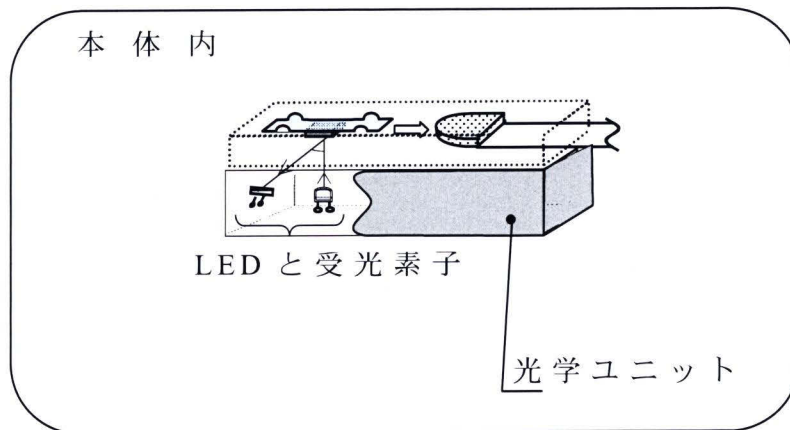
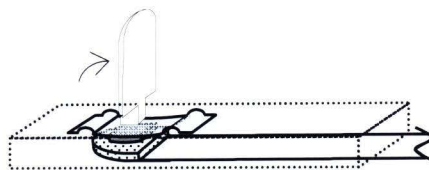
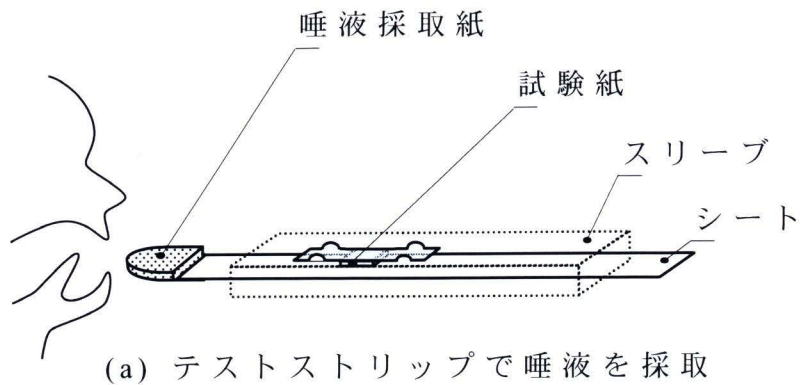


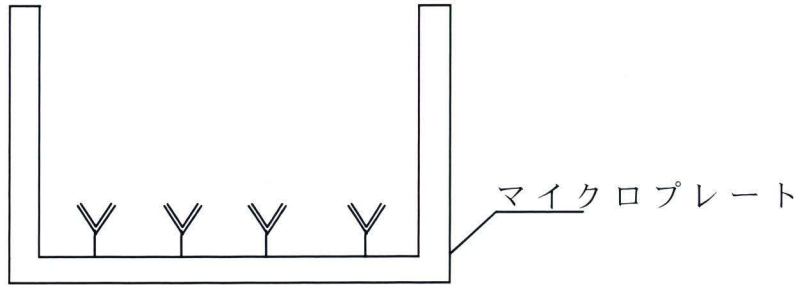
図 2-2 唾液アミラーゼモニターの操作方法

Fig.2-2 Operation method of the saliva amylase monitor.

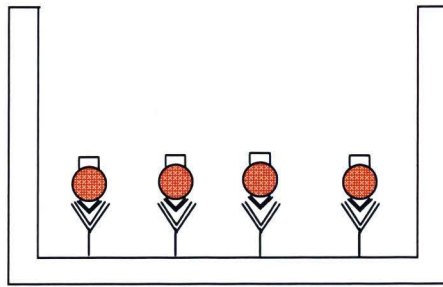
山口昌樹，花輪尚子，吉田博：唾液アミラーゼ式交感神経モニタの基礎的性能，生体医工学，2007，45(2)，161-168より引用

Y: 抗オレキシシン A 抗体 : オレキシシン A

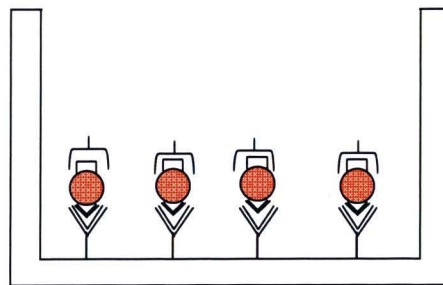
: 酵素標識抗体 : 発色基質



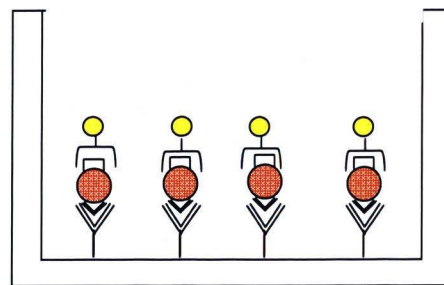
(a) 抗体の固定



(b) オレキシシン A (抗原) の添加




(c) 酵素標識抗体の添加

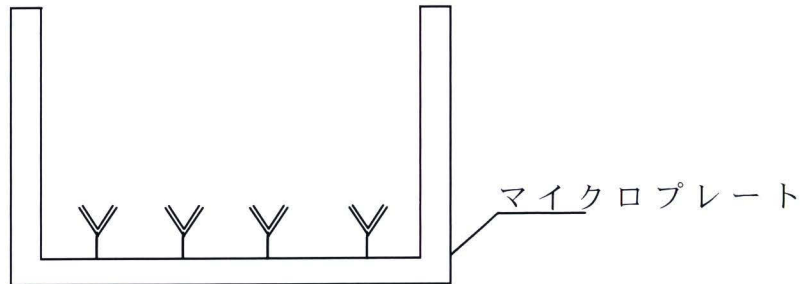


(d) 発色基質の添加

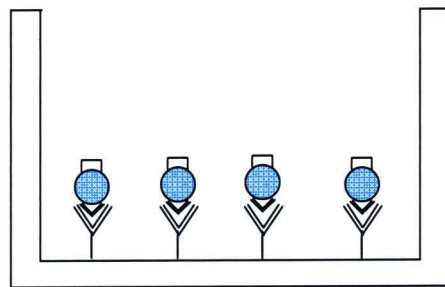
図 2-3 オレキシシン A の測定原理
Fig.2-3 Principle of measurement of OrexinA

Y: 抗β-エンドルフィン抗体 : β-エンドルフィン

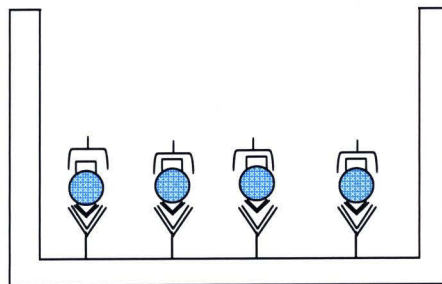
: 酵素標識抗体 : 発色基質



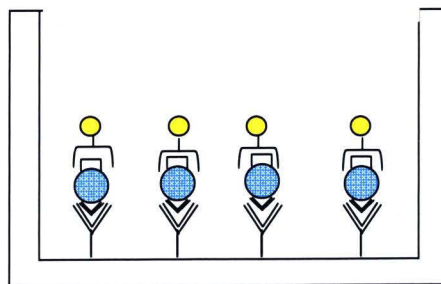
(a) 抗体の固定



(b) β-エンドルフィン（抗原）の添加



(c) 酵素標識抗体の添加



(d) 発色基質の添加

図 2-4 β-エンドルフィンの測定原理
Fig.2-4 Principle of measurement of β-endorphin.

表 2-1 免疫測定法の種類
 Table 2-1 Kind of the immunoassay method.

免疫測定法	標識
放射線同位元素免疫測定法 Radioimmunoassay	放射セイン同位元素
酵素免疫測定法 Enzyme-linked immunosorbentassay	ペルオキシダーゼなどの酵素
蛍光免疫測定法 Fuoroimmunoassay	ランタニドなどの蛍光物質
化学発光免疫測定法 luminescenceimmunoassay	ルミノールなどの化学発光物質

第 3 章 香りの嗜好性と生理反応の関連性

本章では，精油の嗜好性とその生理反応の相関性について述べる。精油を日常的に使用している健常成人女性を対象として，精油の利用実態に即した条件下で，かつ被検者が日常用いている言語表現によって，その嗜好性の個人差に関する実態調査を行った。生理反応の評価尺度には唾液バイオマーカーを，また，嗜好性の評価尺度には精油に対する質問紙を用いた。唾液バイオマーカーには，交感神経系の指標である α -アミラーゼと，内分泌系の指標であるコルチゾールの 2 種類を用いて検証を行った。この 2 種類の唾液バイオマーカーを用いたのは，急性と慢性の評価を行うこと，分析に必要な唾液量が多く，嗅覚刺激による変動に影響しないぎりぎりの採取時間で分析可能とするためである。

3.1 対象と方法

3.1.1 対象

対象は，精油を日常的に使用している健常成人女性 22 名 (40.6 ± 8.4 歳) である。特定の性周期の影響が結果に反映されないように，性周期が異なる被検者を任意に集めた。検査時に通院しておらず，口腔内疾患および嗅覚異常に関する申告がない被検者を用いた。

香りの検査に先立ち，検査のプロトコルは，岩手大学に設置された倫理委員会の承認を受けた (承認番号：201004)。被検者には，検査の趣旨を口頭と書面の双方で十分に説明し，書面で同意を得た。

3.1.2 嗅覚刺激

嗅覚刺激には，日本人女性が多く利用されていると考えられる精油としてフローラル系のゼラニウム，ラベンダー，カンキツ系のオレンジスイート，ハーブ系のローズマリー，樹脂系のフラキンセンスの 5 種を使用した (表 3-1)。精油はすべて 5 % 濃度となるように溶剤 (無水エタノール，和光純薬工業株) で希釈した。ネガティブコントロール条件として，溶剤のみの無臭の条件を用いた。

嗅覚刺激の提示には、ディフューザー（NE-U22, オムロン株）を使用し、ディフューザーは被検者の鼻の位置から高さ 15 cm, 距離 10 cm の位置に設置した。

3.1.3 主観評価

スケールが 0 から 10 の質問紙（Visual Analog Scale; VAS）で、香りの嗜好性と気分の変化を、それぞれ尋ねた。香りの嗜好性に関しては、「濃度の適切さ」、「好み」、「経験の有無」、「日常生活での使用の有無」の 4 項目からなる質問を用意し、検査後に精油ごとに 1 回実施した。気分に関しては、「快適さ」、「楽しさ」、「鎮静度」、「回復度」、「居心地」、「元気さ」の 6 項目からなる質問を用意し、低いを 0, 高いを 10 とし記入させる質問紙を、香りの検査の前後で実施した。

3.1.4 唾液バイオマーカー

唾液バイオマーカーには、交感神経系の指標である唾液アミラーゼ⁽⁴⁰⁾、⁽⁴¹⁾と、内分泌系の指標であるコルチゾールの 2 種類を用いた。唾液アミラーゼ活性の測定には、携帯式の唾液アミラーゼモニタ（ α AMY, ヤマハ発動機株, 測定範囲：0 - 150 kU/l）を使用し、即時分析を行った⁽⁴²⁾、⁽⁴³⁾。コルチゾール濃度の分析には、市販の Cortisol EIA Kit (1-3002, Salimetrics LLC, PA, USA) とプレートリーダー（波長 450 nm, ARVO MX, PerkinElmer Inc., MA, USA）を使用した。

3.1.5 検査プロトコル

図 3-1 には、香りの検査プロトコルを示した。唾液を検体として使用するため、被検者には検査の 1 時間前から水以外の飲食を禁止した。また、検査を始める 10 分前までに被検者に歯みがきとうがいをさせ、口腔内を清潔にさせた。

検査時間帯は、コルチゾールが朝高く、夜低いとサーカディアンリズムによる変動があるため、一番影響が受けにくい、午後 13 時から全被験者統一して行った。検査は、静寂な室内環境で行い、室温は 24 °C に設定

した。検査の間，被検者には安静座位を保たせ，読書や会話など交感神経活性に影響を与えるような作業は行わせなかった。

始めに，気分に関する主観評価の A_1 を行い，プリストレスを緩和するため，被検者に前半安静時として 15 分間安静座位をとらせた。嗅覚刺激として，ディフューザーを用いて植物精油を 2 分間嗅がせた。その後，後半安静時として，15 分間安静座位をとらせた。唾液アミラーゼ活性分析は，安静座位をとらせてから 10 分後の B_1 と 15 分後の B_2 ，嗅覚刺激終了直後の B_3 ，再び安静座位をとらせてから 5 分後の B_4 ，10 分後の B_5 ，15 分後の B_6 の計 6 回行った。コルチゾール濃度分析のための唾液採取は，嗅覚刺激前後の各 1 回，すなわち前半安静時の終盤 2 分間の C_1 と，後半安静時の終盤 2 分間の C_2 の計 2 回行った。コルチゾールの唾液採取のタイミングは，コルチゾールの応答時間である刺激後 15 分で行うことで，前後の変化を正確に捉える工夫を行った。また，安静座位終了後直ちに，気分と嗜好性の主観評価の A_2 を行って信頼性を高めた。

嗅覚刺激の先入観や提示順序の影響を排除するため，被検者には精油の名前を伏せ，かつ提示順序はランダムにして検査を行った。

3.1.6 統計分析

2 群間の比較には，Wilcoxon 検定を用いた。また，唾液アミラーゼ活性の経時変化に関して，測定時間を独立変数，従属変数を唾液アミラーゼ活性として二元配置分散分析を行った。これらの統計分析には，StatView (Ver. 5.0, SAS Institute Inc., NC, USA) を使用した。特に断りのない場合，データは $\text{mean} \pm \text{SD}$ (standard deviation) で示した。

3.2 分析結果

3.2.1 主観評価

嗜好性の主観評価において，「濃度の適切さ」はローズマリー 6.5 ± 2.1 ，オレンジスイート 5.8 ± 1.3 ，フランキンセンス 6.1 ± 1.8 ，ラベンダー 6.2 ± 1.9 ，ゼラニウム 7.1 ± 1.7 の値を示した (表 3-2)。何れもスコア 5 の中央値よりも大きかったものの，平均値は 5.8 - 7.1 の範囲にあり，精油間

で有意差は観察されなかった。好みの平均値は、5種の精油で6.8-9.6の範囲にあり、スコアの高値からオレンジスイート、ゼラニウム、ラベンダー、フランキンセンス、ローズマリーの順であった。経験の有無の平均値は、5種の精油で8.6-9.6の範囲にあったが、平均値の差は最大でも1.0であり、精油間で有意差は観察されなかった。日常生活での使用の有無の平均値は、5種の精油で7.1-8.9の範囲にあり、ゼラニウム、フランキンセンス、ローズマリーに対してオレンジスイートが $p < 0.05$ と有意に高値を示した。

気分の主観評価について、精油ごとにスコアの差分を求めた(図3-2)。コントロールの平均値は、6項目とも-0.3-0.3の範囲にあり、検査前後の差は認められなかった。オレンジスイートでは検査後に全てのスコアが上昇し、コントロールに対して「楽しさ」、「回復度」、「元気さ」の3項目で $p < 0.05$ と有意差が認められた。その他の精油では、ローズマリーの回復度のみで、コントロールに対して $p < 0.05$ と有意差が認められた。

3.2.2 唾液アミラーゼ活性

コントロールにおける嗅覚刺激前の安静時である B_1 と B_2 の唾液アミラーゼ活性が 41.1 ± 20.1 kU/lであったので、その3倍である120 kU/lを超えるデータを異常値として除外した。これは、唾液アミラーゼモニタの測定範囲を超えるデータを除外することと同じような意味があったと考えられる。その結果、3名の被検者のデータが全て除外され、唾液アミラーゼ活性の評価に関しては被検者数が19名(40.6 ± 8.9 歳)となった。

いずれの精油でも、唾液アミラーゼ活性 B_1 と B_2 の間には、統計的な有意差は確認されなかった。そこで、急性反応を示す唾液アミラーゼモニタでは、嗅覚刺激前を $(B_1 + B_2)/2$ 、嗅覚刺激中を B_3 、嗅覚刺激後を B_6 として、唾液アミラーゼ活性の経時変化を比較した(図3-3)。オレンジスイートでは、嗅覚刺激中に対して嗅覚刺激後で $p < 0.1$ と有意に上昇した。ラベンダーでは、嗅覚刺激前に対して嗅覚刺激後で $p < 0.1$ と有意に低下した。ローズマリーでは、嗅覚刺激前に対して嗅覚刺激中で有意に低下し、かつ嗅覚刺激中に対して嗅覚刺激後で $p < 0.05$ と有意に上昇した。

好みのスコアが7.5以上の高群とそれ未満の中群,低群の2群に分類し,2元配置分散分析を行った(図3-4)。好みの主観評価で最高得点であったオレンジスイートは,全被検者が高群に分類され,それ以外の精油では2群に別れた。何れの条件でも, $p < 0.05$ となる有意差は観察されなかったが,2位のゼラニウムのみで群間に $p < 0.1$ の有意差が観察された(図3-4(d))。

3.2.3 コルチゾール

全データにおいて,唾液コルチゾール濃度は 0.106 ± 0.063 ng/mlとばらつきが非常に大きかったので,3SD以上のデータを除外した。唾液コルチゾールの経時変化として,嗅覚刺激前の C_1 と嗅覚刺激後の C_2 を比較した。ラベンダーとローズマリーにおいて,嗅覚刺激前に対して嗅覚刺激後で $p < 0.05$ と有意に上昇した(図3-5)。

3.3 考察

嗜好性の主観評価において,表3-2に示すとおり,好みの平均値は最低でも6.8以上の高値を示し,かつ経験の有無が8.6 - 9.6の範囲,日常生活での使用の有無は7.1 - 8.9の範囲と何れも7以上の高得点を示したことから,用いた精油は全て被検者に好まれるものであり,本検査には精油の香り刺激を好み,かつ日常的に使用している者のみを被検者に選定できたと判断できた。これは,本研究の趣旨に合致していた。

濃度は何れも中央値(スコア5)よりも大きかったものの,平均値は5.8 - 7.1の範囲にあったことから,精油の濃度は被検者にとって不快ではなく,今回設定した濃度や使用量は妥当であり,精油間の生理反応の差異の原因とはならないと考えられた。

被検者の個人差を考慮せず,全被検者のデータを用いた嗜好性の主観評価では,高値からスコア順にオレンジスイート,ゼラニウム,ラベンダー,フランキンセンス,ローズマリーの順で並べられた。このオレンジスイートの評価が格段に高かったという傾向は,図3-2に示すとおり,気分の主観評価においてオレンジスイートのスコアのみがコントロールに対して

「楽しさ」、「回復度」、「元気さ」の3項目で有意に上昇したものと一致した。

唾液アミラーゼ活性は、交感神経活性と正の相関を持ち、上昇、下降を示す指標である。図3-3に示すとおり、 α -アミラーゼの経時変化は、精油の種類によってオレンジスイートは、交感神経活性の活性化、ラベンダーは、交感神経活性の鎮静化、ローズマリーは、交感神経活性の鎮静化と活性化の3つのパターンを示した。これは、オレンジスイートが示した、単なる覚醒効果やラベンダーが示した、鎮静効果だけでなく、ローズマリーが示した、鎮静とその後の高揚効果といった、精油によって引き起こされたより複雑な生理反応を現していると考えられた。このような特徴を、主観評価だけから観察することは困難であり、測定からわずか1分で結果が分かることに意義が強いと考える。

香りの嗜好性に関する個人差の影響を考察するために、被検者を好みのスコアで2群に分けて比較した。全被検者が高群に分類されたオレンジスイートは別として、嗜好性の主観評価で2位であったゼラニウムのみで2群に差がある傾向が観察された。ゼラニウムは、5種類の中では比較的好まれたといっても、そのスコアは7.6と他の精油との差異はそれほど大きくないので、好みの個人差が唾液アミラーゼ活性の経時変化に反映されたのではないかと考えられた。よって、被検者の数を多くするだけでは、嗜好性の個人差を詳しく検証することにならず、むしろ被検者の経験や好みといった背景を把握しつつ考察することに意義があると考えられた。

コルチゾールは、血液中と唾液中の濃度相関が高く⁽⁴⁴⁾、ストレスホルモンとして医学的エビデンスがあり、慢性ストレスの指標として有用であるという報告は多い⁽⁴⁵⁾。本評価においても、嗅覚刺激によって上昇するという急性反応が観察され、これらの既報と一致する傾向を示した。しかも、図3-5に示すとおり、統計的に有意差が観察された2つの精油は、唾液アミラーゼ活性で経時変化に有意差が観察された精油と一致していた。ただし、最も被検者に好まれたオレンジスイートには、統計的な有意差が観察されなかった。この理由としては、コルチゾールの変化量が小さいことが考えられ、急性でかつ嗅覚刺激のように比較的弱い刺激の評価に用いるに

は、限界があると考えられた。

3.4 結論

香りの嗜好性と生理反応の関連性を考察するために、日常的に精油を使用している被検者を用い、被検者に好まれる5種類の精油を嗅覚刺激として、主観評価と唾液バイオマーカーの同時分析を行った。主観評価だけでは単に香りの好き・嫌いでしか被検者を分類できないが、唾液アミラーゼ活性を用いれば、覚醒効果、鎮静効果、鎮静とその後の高揚効果といった、より複雑な精油の生理反応を測定からわずか約1分ほどで観察できる可能性が示唆された。また、精油を好む被検者の間にも、その程度には個人差があり、その違いを生理反応の経時変化から観察できる可能性も示唆された。

以上のように、主観評価と唾液バイオマーカーの比較検討を通して、香りに対する嗜好性の差異が、唾液バイオマーカーの生理反応の変化に反映されることが示された。非侵襲、簡便で即時分析可能な唾液アミラーゼ活性の経時変化を、精油の鎮静効果や覚醒効果の評価・分類に用いれば、ヒトの感性を引き出す機能性精油の設計開発にも有効ではないかと考えられる。

表 3-1 嗅覚刺激に用いた精油の成分

Table 3-1 Ingredient of essential oil used for olfactory response.

植物精油	成分名	含有 (%)
ローズマリー	1,8 - シネオール	48.63
	α - ピネン	12.36
	カンファー	10.38
	β - ピネン + ミルセン	7.14
オレンジスイート	リモネン	94.79
	ミルセン	1.87
フランキンセンス	α - ピネン	27.42
	α - ツヨネン	13.70
	リモネン	11.14
	ミルセン	5.40
	サビエル	5.35
ラベンダー	酢酸リナリル	39.00
	リナロール	30.30
ゼラニウム	シトロネロール	36.40
	蟻酸シトロネリル	9.89
	イソメントン	6.47
	6,9 - グアイアジエン	6.15

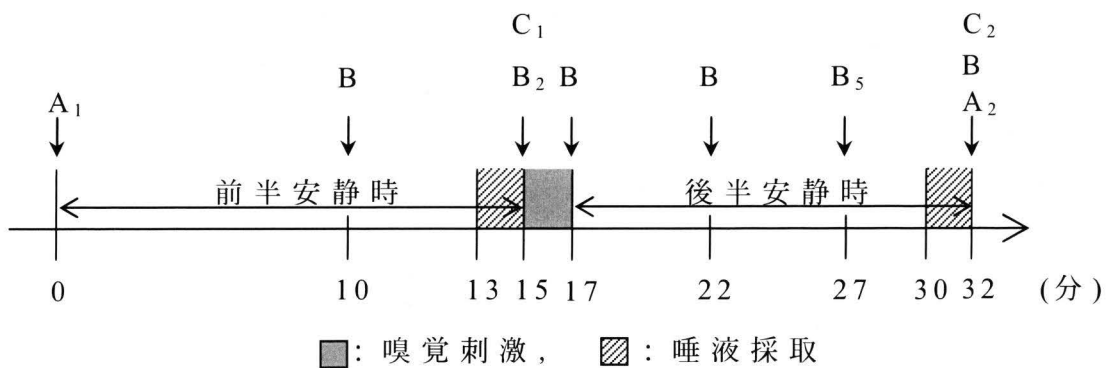


図 3.1 香りの検査プロトコル

(A: 質問紙記入, B: 唾液アミラーゼ分析, C: コルチゾール用唾液の採取)

Fig.3-1 Experimental protocol for the evaluation of the olfactory response (A: self - assessed questionnaire, B: analysis of salivary amylase activity, C: saliva collection).

表 3-2 嗜好性の主観評価結果 (mean ± SD)

Table 3-2 Subjectivity evaluation result of the palatableness.

項目	ローズマリー	オレンジスイート	フランキンセンス	ラベンダー	ゼラニウム
濃度の適切さ	6.5 ± 2.1	5.8 ± 1.3	6.1 ± 1.8	6.2 ± 1.9	7.1 ± 1.7
好み	6.8 ± 2.5	9.6 ± 0.7	7.0 ± 2.7	7.5 ± 1.6	7.6 ± 2.8
経験の有無	8.6 ± 1.6	9.6 ± 0.8	9.0 ± 1.5	9.0 ± 1.0	9.1 ± 1.3
日常生活での使用の有無	7.1 ± 2.8	8.9 ± 1.5	7.4 ± 2.6	8.1 ± 2.4	8.0 ± 2.3

●: コントロール △: ローズマリー □: オレンジスイート
 ◇: フランキンセンス ○: ラベンダー ⊠: ゼラニウム

(n = 22)

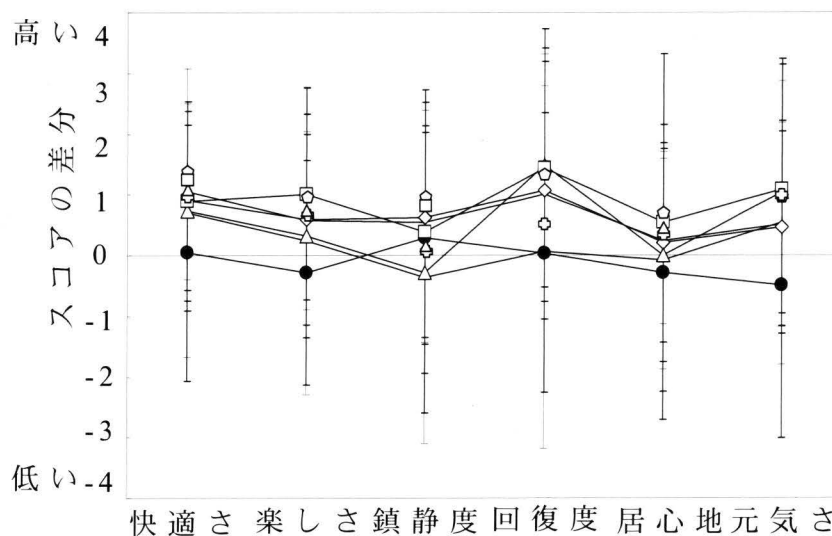


図 3-2 検査前後での被検者の主観的な気分の変化

Fig.3-2 Change of the subjective feeling of the subject in before and after inspection.

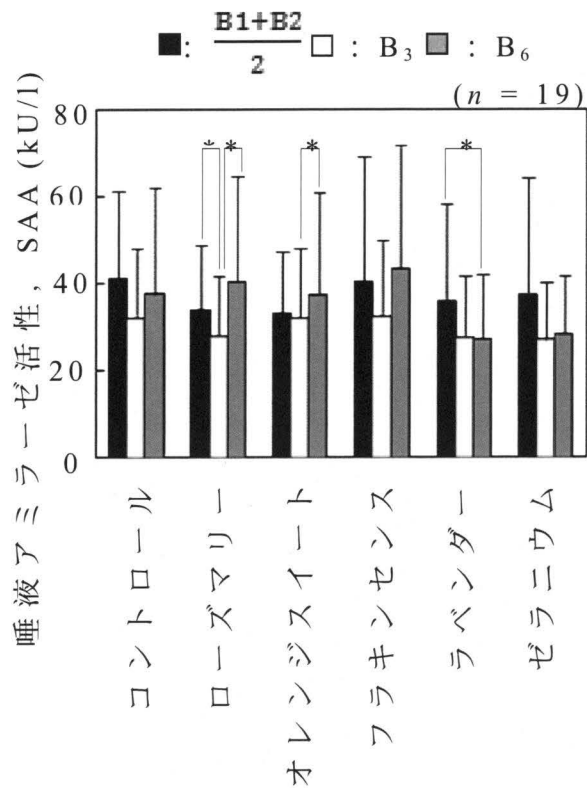


図 3-3 精油ごとの唾液アミラーゼ活性の経時変化

(** : $p < 0.05$, * : $p < 0.1$)

Fig.3-3 Time-course changes of salivary amylase activity between essential oil(** : $p < 0.05$, * : $p < 0.1$).

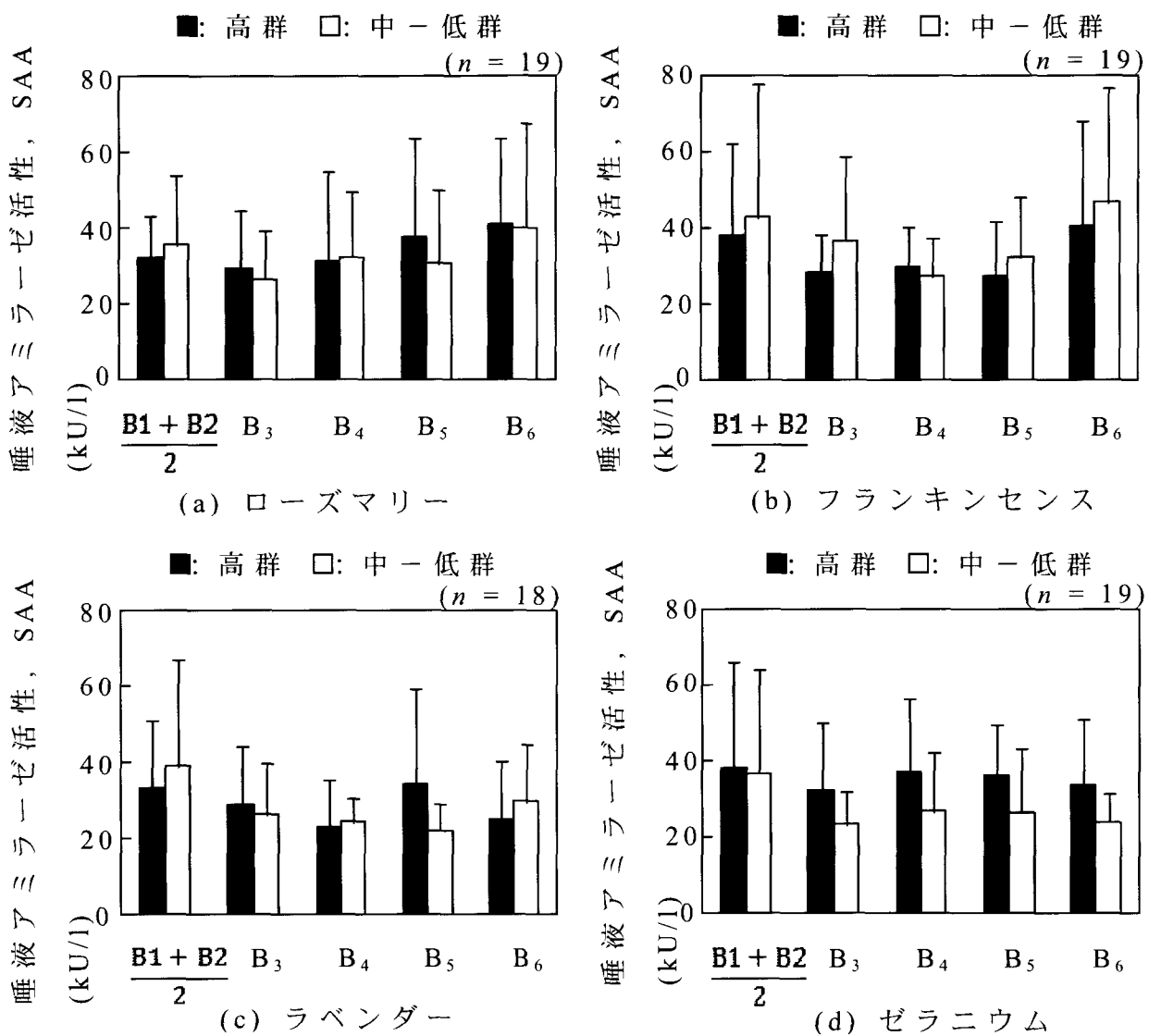


図 3-4 好みのスコア 7.5 で 2 群に分類した唾液アミラーゼ活性の比較
 Fig.3-4 Parallel of saliva amylase activity over favorite score 7.5.

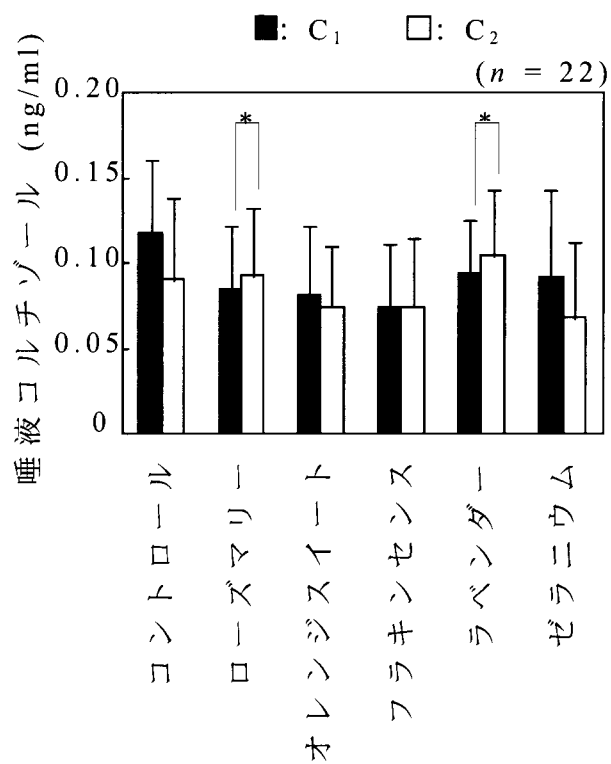


図 3-5 精油ごとの唾液コルチゾールの経時変化 (* : $p < 0.05$)
 Fig.3-5 Time-course changes of salivary cortisol between essential oil(* : $p < 0.05$).

第 4 章 香りの記憶・経験と生理反応の関連性

本章では，被検者の経験と香辛料の香りがヒトの心身に与える生理反応の変化について述べる。そこで，嗅覚刺激には，日本人にとって馴染み深い香りであるカレー粉に使われている香辛料を用い，日本人の成人を被検者とした。また，唾液バイオマーカーには，交感神経活性状態を反映する唾液アミラーゼ活性と，摂食促進物質のオレキシン，報酬系脳内麻薬の β -エンドルフィンを用いて検証を行った。この 3 種類の唾液バイオマーカーを用いたのは，急性の反応を観察するため選定を行った。

4.1 対象と方法

4.1.1 対象

対象は，健常な日本人成人男性 10 名 (22.1 ± 1.1 歳) である。検査時に通院しておらず，口腔内疾患および嗅覚異常に関する申告がない被検者を用いた。香辛料の検査に先立ち，本検査のプロトコルは，岩手大学倫理委員会の承認を受けた (承認番号：200910)。被検者には，検査の趣旨を口頭と書面の双方で十分に説明し，書面で同意を得た。

4.1.2 嗅覚刺激

嗅覚刺激には，カレー粉の香辛料の主成分であるコリアンダー，フェネグreek，クミンの 3 種を重量比 1:1:1 に混合した混合香辛料を「香辛料標準見本 (Standard sample)」として用いた。また，すでに多くの日本人が好むことが示されている市販のカレー粉 (エスビーカレー，原材料：ターメリック，コリアンダー，クミン，フェネグreek，こしょう，赤唐辛子，ちんぴ，その他香辛料，S&B 食品株) を「香辛料優良見本 (Excellent sample)」として用いた (表 4-1)。嗅覚刺激の先入観や提示順序の影響を排除するため，検査者・被検者ともにどちらの香辛料を用いているかを知らせず，かつ被検者を無作為に香辛料標準見本と香辛料優良見本に割り当てたる二重盲検試験を行った。

4.1.3 主観評価

スケールが 0 から 10 段階の質問紙 (Visual Analog Scale; VAS) で，香辛料の香りの強さ，好み，食欲増進，やみつき感の程度の 4 項目を，10 段階

で評価させた。香りが「強すぎる」、「好き」、「食欲を増す」、「もう一度嗅ぎたい」と感じた場合を 10、「弱すぎる」、「嫌い」、「食欲を減じる」、「二度と嗅ぎたくない」と感じた場合を 0 とした。

4.1.4 唾液バイオマーカー

バイオマーカーには、交感神経活性の指標として唾液アミラーゼ活性、摂食中枢の指標としてオレキシン A、報酬系の指標として β -エンドルフィンを選定し、全て唾液から分析した。唾液アミラーゼ活性は、携帯式の唾液アミラーゼモニタ (α -Amy, ヤマハ発動機株) を用いて即時分析を行った。オレキシン A の分析には、ELISA キット (測定範囲 0 - 10,000 pg/ml, 感度 42.5 pg/ml, Orexin A EIA Kit, Phoenix Pharmaceuticals, Inc., USA) とプレートリーダー (波長 450 nm, ARVO MX, PerkinElmer Inc., MA, USA) を用いた。 β -エンドルフィンの分析には、ELISA キット (測定範囲 0.625 - 10.0 ng/ml, 感度 0.5 ng/ml, β -endrophin Enzyme Immunoassay Kit, Peninsula Laboratories Inc., USA) とプレートリーダーを用いた。

4.1.5 検査プロトコル

図 4-1 には、本検査のプロトコルを示した。唾液を検体として使用するため、被検者には検査の 1 時間前から水以外の飲食を禁止した。また、検査を始める 10 分前までに被検者に歯みがきとうがいをさせ、口腔内を清潔にさせた。

検査時間帯は午前 10 - 12 時の間に統一し、室温は 25 °C に維持した。また、検査場所をパーティションで区切り、環境からの音・視覚刺激を遮断した室内環境下で検査を実施した。被検者は安静座位を保たせ、読書や会話など交感神経活動に影響を与える精神的作業は行わせなかった。

プリストレスを緩和するため、被検者に前半安静時として 12 分間安静をとらせた。次に、容量 5 ml の蓋付きサンプルカップに香辛料 300 mg を入れたものを、被検者自身が鼻から約 1 - 2 cm の距離に持っていき、蓋をあけて香辛料を 4 分間嗅いだ。その後、再び後半安静時として 14 分間安静をとらせた。この間、唾液アミラーゼ活性の即時分析を約 3 分間隔で 7 回の A₁ から A₇、唾液オレキシン A と唾液 β -エンドルフィン分析用の唾液採取を前半安静時の終盤 2 分間の B₁、嗅覚刺激時の終盤 2 分間の B₂ と、

後半安静時の終盤 2 分間の B₃ の 3 回 の約 300 μl の唾液採取を行った。唾液は、サンプルチューブに直接唾液を吐出させることで採取した。その後、30 分間、116.3 g、4 °C で遠心分離し、その上澄み約 200 μl を唾液検体に用いた。香辛料の検査後に、質問紙に回答させた。

4.1.6 統計分析

バイオマーカーは個人差が大きく、また他のストレッサーを反映して異常値を取ることがあるので、3SD を超えるデータは除外して示した。香辛料間、および同一のバイオマーカーのデータ間で Wilcoxon 検定を行った。また、バイオマーカーの経時変化に関しては、嗅覚刺激の前、中、後に関して一元配置分散分析を行った。さらに、香辛料を独立変数、唾液アミラーゼ活性を従属変数として二元配置分散分析を行った。唾液バイオマーカーの濃度は極微量で、測定系の感度限界に近いため、 $p < 0.1$ を有意差ありとした。これらの統計分析には、StatView (Ver. 5.0, SAS Institute Inc., NC, USA) を使用した。

4.2 分析結果

4.2.1 主観評価

嗅覚刺激の強さは、香辛料標準見本で 4.8 ± 1.5 、香辛料優良見本で 4.8 ± 1.6 と同等であり、今回設定した香辛料の濃度・使用量は妥当と考えられた。好みのスコアは香辛料標準見本 5.6 ± 1.0 、香辛料優良見本 6.1 ± 1.1 、食欲増進のスコアは、香辛料標準見本 5.1 ± 1.8 、香辛料優良見本 6.2 ± 1.2 となり、他の項目より高い値を示した (表 4-2)。

主観評価において、2 種類の香辛料間で統計的な有意差を検証したところ、好み $p = 0.161$ 、食欲増進 $p = 0.051$ 、やみつき $p = 0.345$ となり、食欲増進で $df = 9$ 、 $p < 0.1$ と有意差が認められた。

4.2.2 α-アミラーゼ

唾液アミラーゼ活性は、安静座位時の A₁、A₂、A₃ の平均が香辛料標準見本で 15.8 ± 5.4 kU/l、香辛料優良見本で 14.6 ± 3.9 kU/l、嗅覚刺激中の

A₄ が香辛料標準見本で 15.0 ± 5.4 kU/l, 香辛料優良見本で 14.6 ± 3.5 kU/l 嗅覚刺激直後の A₅ が香辛料標準見本で 15.4 ± 6.7 kU/l, 香辛料優良見本で 16.7 ± 7.2 kU/l, 嗅覚刺激後の安静時の A₆, A₇ の平均が香辛料標準見本で 13.9 ± 5.0 , 香辛料優良見本で 14.4 ± 5.2 kU/l であった。

唾液アミラーゼ活性において, 経時変化で統計的な有意差を検証したところ, 香辛料優良見本では嗅覚刺激後より変化が観察され, A₅ と A₇ の間に $df = 8, p < 0.05$ と統計的有意差が確認された。さらに, 2種類の香辛料間で統計的な有意差を検証したところ, A₆ において2種類の香辛料による $df = 8, p < 0.1$ と統計的有意差が確認され, 香辛料優良見本が有意に高値を示した (図 4-2)。

4.2.3 オレキシン A

オレキシン A は, 安静座位時の B₁ では香辛料標準見本で 121.3 ± 102.8 pg/ml, 香辛料優良見本で 78.3 ± 65.5 pg/ml, 嗅覚刺激直後の B₂ では香辛料標準見本で 64.8 ± 29.4 pg/ml, 香辛料優良見本で 42.0 ± 23.5 pg/ml, 嗅覚刺激後の安静時の B₃ では香辛料標準見本で 95.3 ± 93.6 pg/ml, 香辛料優良見本で 64.9 ± 103.1 pg/ml であった。

オレキシン A において, 経時変化で統計的な有意差を検証したところ, 香辛料優良見本では B₁ と B₃ の間で $df = 9, p < 0.1$, および B₂ と B₃ の間で $df = 9, p < 0.05$ の統計的有意差が確認できた。ただし, 2種類の香辛料間で統計的な有意差を検証したところ, 統計的な有意差は認められなかった (図 4-3)。

4.2.4 β-エンドルフィン

β-エンドルフィンの絶対値は, $0.32 - 9.88$ ng/ml の範囲にあった。β-エンドルフィンにおいては, 2種類の香辛料間, および経時変化の双方に関して, 統計的な有意差は認められなかった。(図 4-4)。

4.3 考察

主観評価において, 表 4-2 に示すとおり, 2種類の香辛料間で食欲増進

の項目に有意差が認められた。香辛料優良見本は，市販のカレー粉として誰もが1度は嗅いだ経験のある香りであることから，香辛料標準見本よりも食欲増進の評価が高かったと言える。

オレキシン A では，図 4-3 に示すとおり，食欲増進の評価が高かった香辛料優良見本では経時変化に関して有意な低下が認められた。この妥当性であるが，先行研究が少なく，胃バンディング手術を受けた患者の BMI と血漿オレキシン濃度が正の相関を示したという報告⁽⁴⁶⁾がある程度で断定は難しく，更なる検証が必要であると考えられる。急性のオレキシンの低下が食欲増進を示すのか，食欲低下を示すのかは明確となっていないが⁽⁴⁷⁾，嗅覚刺激による摂食中枢系の変化が，唾液バイオマーカーに現れる可能性があることが示唆された。

β -エンドルフィンでは，図 4-4 に示すとおり，香辛料の香りに対するやみつきの程度を反映すると期待したが，統計的に有意な変化は観察されなかった。

唾液アミラーゼ活性において，図 4-2 に示すとおり，香辛料標準見本では嗅覚刺激前後で有意差が観察されなかったのに対し，香辛料優良見本では嗅覚刺激後より有意な低下が確認され，交感神経活性の鎮静化を示唆した。さらに，嗅覚刺激直後において，香辛料優良見本の方が活性値の有意な上昇が認められ，交感神経活性の活性化を示唆した。これらより，香辛料優良見本の方が，香辛料標準見本よりも，生理反応が顕著であることが示された。

4.4 結論

被検者の経験をファクターとして考慮しつつ，香りがヒトの心身に与える生理反応を考察するために，日本人にとって馴染み深い香りであるカレー粉に使われている香辛料を嗅覚刺激として用い，日本人の成人を被検者とした。その結果，香りに対する経験の有無が，主観評価と唾液バイオマーカーの生理反応の両方に反映されることが示された。さらに，唾液から分析可能な摂食促進物質などをバイオマーカーとして用いることで，より詳細な生理反応を観察できる可能性が示唆された。

以上により，主観評価と唾液バイオマーカーの双方で，香りに対する経験の有無が生理反応の変化に反映されることが示された。

表 4-1 嗅覚刺激に用いた香辛料の成分

Table 4-1 Chemical ingredients of spices used for olfactory stimuli.

香辛料標準見本	構成比率 (%)	香辛料優良見本	構成比率 (%)
コリアンダー	33.3	コリアンダー	10
フェネグリーク	33.3	フェネグリーク	10
クミン	33.3	クミン	10
		ターメリック	20
		こしょう	5
		赤唐辛子	5
		ちんぴ	5
		その他香辛料	35

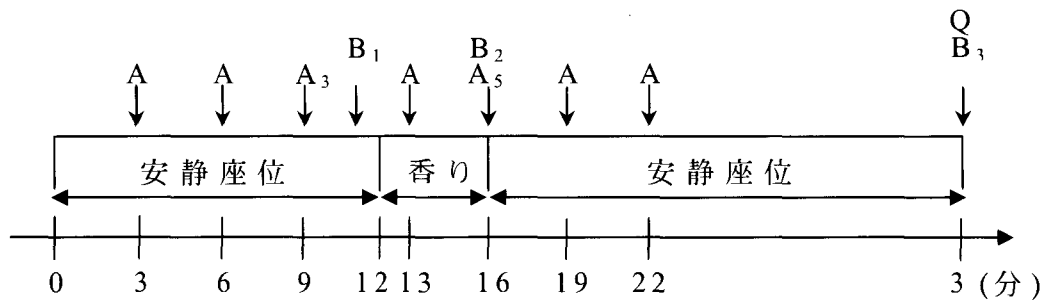


図4-1 香辛料の香りの評価プロトコル

(A₁₋₇ : 唾液アミラーゼ分析, B₁₋₃ : 唾液の採取, Q : 質問紙記入)

Fig.4-1 Experimental protocol for the evaluation of the acute effect of odor of spices (A₁₋₇ : analysis of salivary amylase activity, B₁₋₃ : saliva collection, Q : self - assessed questionnaire).

表 4-2 嗜好性の主観評価結果 (mean ± SD)

Table 4-2 Result of the self-assessed questionnaire on odor preference of spices (mean ± SD).

項目	香辛料標準見本	香辛料優良見本
濃度の適切さ	4.8 ± 1.5	4.8 ± 1.6
好み	5.6 ± 1.0	6.1 ± 1.1
食欲増進	5.1 ± 1.8	6.2 ± 1.4
やみつき	4.7 ± 0.7	5.0 ± 1.2

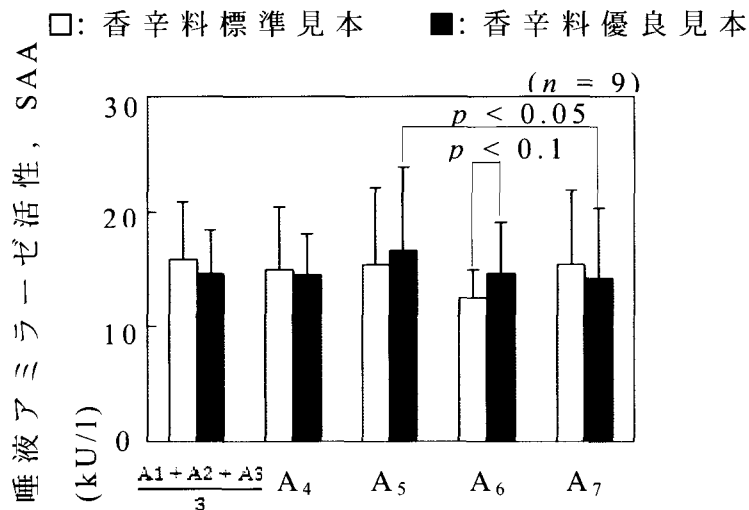


図 4-2 唾液アミラーゼ活性の香辛料提示前後での変化

Fig.4-2 Time-course changes of salivary amylase activity between baseline, inhalation, and resting periods. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.1$).

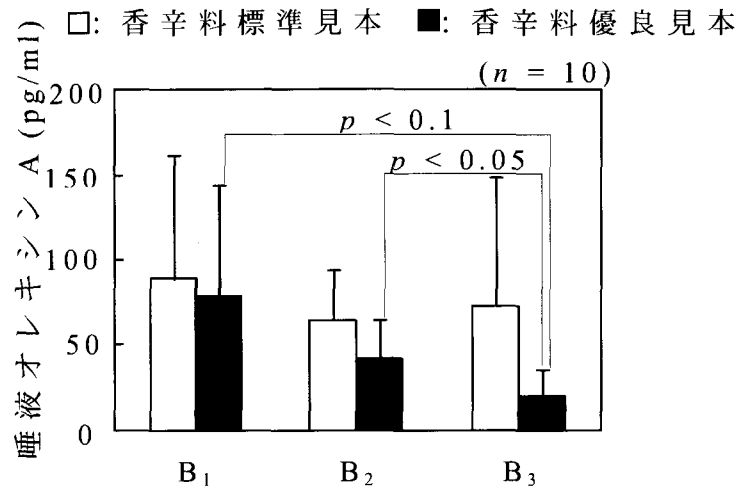


図 4-3 唾液オレキシン A の香辛料提示前後での変化
Fig.4-3 Time-course changes of salivary orexin A between baseline, inhalation, and resting periods (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.1$).

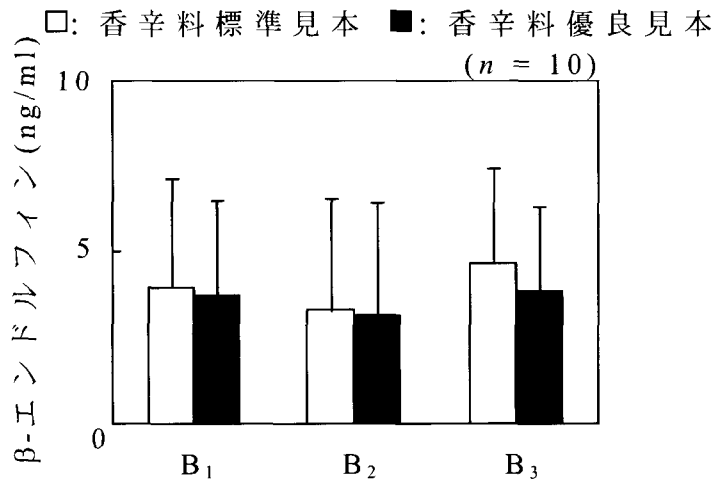


図 4-4 唾液β-エンドルフィンの香辛料提示前後での変化
Fig.4-4 Time-course changes of salivary β-endorphin between baseline, inhalation, and resting periods.

第 5 章 結論

香辛料の香りがヒトの心身に与える生理反応を、香りの嗜好性と生理反応の関連性と被検者の経験を考慮しつつ主観評価と唾液バイオマーカーを用いて非侵襲・無拘束の条件下で検証することで、嗅覚刺激に対する生理反応の定量評価技術の開発を目的としている。1 つ目には、精油の香りの嗜好性における生理反応の評価するため、日常的に使用されている精油を用いて、主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミラーゼ活性とコルチゾール濃度の変化を検証し、2 つ目として、香辛料における記憶と経験による生理反応の評価するため、日本人にとって馴染み深い香りであるカレー粉に使われている香辛料を用い、主観評価と嗅覚刺激前後の唾液アミラーゼ活性、オレキシン A、 β -エンドルフィンの変化を検証した結果、以下の項目が明らかとなった。

- (1) 5 種類の精油を用いて嗜好性及び濃度が、被検者の心身へ与える影響を定量評価するため、質問紙を考察して主観評価を行った結果、用いた精油全て被検者に好まれ、かつ日常的に使用している被検者を選定できたと判断できた。
- (2) 嗅覚刺激前、中、後において唾液アミラーゼ活性の経時変化を分析時間が約 1 分と短い時間で測定し、嗜好性や好みによって交感神経活性に統計的な有意差が生じるか評価した結果、有意差を生じ、精油により、鎮静化、活性化、沈静化と活性化の異なるパターンがあることが確認することができた。
- (3) 嗅覚刺激前後において、コルチゾール濃度の経時変化の比較を行うことで、内分泌系に変化を引き起こすか検証した結果、有意な差が確認できた。
- (4) 経験の有無を発掘できるような質問紙を考察して主観評価を行い、使用した香辛料の濃度、使用量が妥当であるか定量化した結果、2 種類の香料間で食欲増進について、有意差が認められ妥当であることが確認できた。
- (5) 嗅覚刺激前、中、後において、唾液アミラーゼ活性を測定することで、

経験の有無により交感神経活動に統計的な有意差が生じるか評価した結果、2種類の香辛料間で統計的な有意差が確認され、香辛料優良見本が高値を示すことが確認された。

(6) 摂食促進の指標としてオレキシン A を用い、嗅覚刺激前後とその後の安静において、経験の有無により統計的な有意差が生じるかを評価した結果、嗅覚刺激前後で統計的な有意差が確認された。

(7) 摂食・満腹感の指標として β -エンドルフィンを用い、嗅覚刺激前とその後の安静時において、経験の有無により統計的な有意差が生じるかを評価した結果、統計的な有意差が認められなかった。

以上のように、主観評価だけでは定量的な判別しかできないが、唾液アミラーゼ活性を用いれば、覚醒効果、鎮静効果、鎮静とその後の高揚効果といったより複雑な精油の生理反応を約1分の分析時間で観察できる可能性があり、香りに対する経験の有無が、主観評価と唾液バイオマーカーの生理反応の両方に反映され、摂食促進物質などを唾液バイオマーカーとして用いることで、より詳細な生理反応を観察できる可能性が示唆された。また、データを蓄積する事で、統計的に閾値を求めることも可能であることが主観評価と違い優れているところである。

本技術により機能性香料が作成できる。機能性香料で生体を制御することができ、治癒力、免疫力を向上させる香りで医療への応用や精神的落ち着きを促す香りでストレスの緩和、躁鬱病への治療、自殺者の低減、更に、犯罪の低下等社会的意義が強いと考える。

参考文献

- (1) Mukherjee PK, Aiti K, Ukhrjee K, Oughton PJ: Leads from Indian medicinal plants with hypoglycemic potentials, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006; 106(1), 1-28.
- (2) Graham PH, Cox, L, Graham J: Inhalation aromatherapy during radiotherapy: Results of a placebo-controlled double-blind randomized trial, *Journal of Clinical Oncology*, 2003; 21 (12), 2372-2376.
- (3) Rolls ET: The rules of formation of the olfactory representations found in the orbitofrontal cortex olfactory areas in primates, *Chem. Senses*, 2001; 26, 595-604.
- (4) Lundström JN, Gonçalves M, Esteves F, Olsson MJ: Psychological effects of subthreshold exposure to the putative human pheromone 4, 16-androstadien-3-one, *Horm. Behav.*, 2003; 44, 395-401.
- (5) Diego MA, Jones NA, Field T, Hernandez-Reif M, Schanberg S, Kuhn C, McAdam V, Galamaga R, Galamaga M: Aromatherapy positively affects mood, EEG patterns of alertness and math computations, *Int. J. Neurosci.*, 1998; 96, 217-224.
- (6) Haze S, Sakai K, Gozu Y: Effects of fragrance inhalation on sympathetic activity in normal adults, *Jpn. J. Pharmacol.*, 2002; 90, 247-253.
- (7) Romine IJ, Bush AM, Geist CR: Lavender aromatherapy in recovery from exercise, *Percept Motor Skill*, 1999; 88, 756-758.
- (8) Yamaguchi M, Sakakima J, Sato K, Nakano K: Evaluation of the Sedative Effect of Fragrance on Filipinas Using a Biochemical Marker, *J. Physiological Anthropology*, 2007; 26, 247-251.
- (9) Yamaguchi M, Hanawa N, Hamazaki K, Sato K, Nakano K: Evaluation of the acute sedative effect of fragrances based on a biochemical marker, *J. Essent. Oil Res.*, 2007; 19, 470-476.

- (10) 花輪 尚子, 才木 祐司, 山口 昌樹: 植物精油の吸入が唾液アミラーゼに与える影響, *AROMA RESEARCH*, 2007; 8, 66-72.
- (11) 花輪 尚子, 才木 祐司, 山口 昌樹: 日本由来の香りが日本人にもたらず交感神経活動の鎮静作用, *日本生理人類学会誌*, 2008; 13, 49-56.
- (12) Yamaguchi M, Sakakima J, Kosaka S, Nakabayashi M: A Method for Evaluating the Discomfort Induced by Odor Using a Biochemical Marker, *Sensors & Actuators B*, 2008; 131, 143-147.
- (13) Hanawa N, Hasegawa Y, Yamaguchi M: Physical Effects of Santalol Inhalation on Sleep, *Life Support*, 2008; 20, 158-163.
- (14) Yamaguchi M, Tahara Y, Kosaka S: Influence of concentration of fragrances on salivary α -amylase, *Int. J. Cosmet. Sci*, 2009; 31, 391-395.
- (15) 後藤 敦子, 藤枝 俊之, 檜本 秀美, 鈴木 里香, 木戸 循子, 田中 由里, 清水 章江: 子どものストレス判定の指標としての唾液アミラーゼ測定, *外来小児科*, 2008; Vol.11, No.2.
- (16) Tenovuo JO: Human Saliva, *Clinical Chemistry and Microbiology*, Volume I, II, CRC Press, Inc, 1989; 246-250.
- (17) Morishita Y, Iinuma Y, Nakashima N, Majima K, Mizuguchi K, Kawamura Y: Total and Pancreatic Amylase Measured with 2-Chloro-4-nitrophenyl-4-O- β -D-galactopyranosylmaltoside, *Clinical Chemistry*, 2000; vol. 46 No. 7 928-933.
- (18) Teshima S, Mitsuhida N, Ando M: Determination of alpha-amylase in biological fluids using a new substrate (beta-2-chloro-4-nitrophenyl -maltopentaoside)., *Clinica chimica acta*. 1985; 150(3), 165-174.
- (19) Groza P, Zamfir V, Lungu D: Postoperative salivary amylase changes in children., *Revue roumaine de physiologie*, 1971; 8(4), 307-312.

- (20) Speirs RL, Herring J, Cooper WD, Hardy CC, Hind CR: The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of amylase from the human parotid gland, *Archives of oral biology*, 1974; 19(9), 747 - 752.
- (21) Groza P, Zamfir V, Lungu D : Postoperative salivary amylase changes in children, *Rev Roum Physiol*, 1971; Vol.8, 307-312.
- (22) Ugolev AM, Laey PD, Iezuitova NN, Rakhimov KR, Timofeeva N M, Stepanova AT : Membrane digestion and nutrient assimilation in early development, *Ciba Found Symp*, 1979; Vol.16, 221-246.
- (23) Morse DR, Schacterle GR, Furst ML, Esposito JV, Zaydenburg M : Stress, relaxation and saliva, relationship to dental caries and its prevention, with a literature review, *Annals of Dentistry*, 1983; Vol.2, 47-54.
- (24) Morse DR, Schacterle GR, Esposito DJ, Chod SD, Furst ML, Di Ponziano J, Zaydenberg M : Stress, meditation and saliva: a study of separate salivary gland secretions in endodontic patients, *Journal of Oral Medicine*, 1983; Vol.38, 150-160.
- (25) Chicharro JL, Lucia A, Perez M, Vaquero AF, Urena R : Saliva composition and exercise, *Sports Med*, 1998; Vol.26, 17-27.
- (26) Walsh NP, Blannin AK, Clark AM, Cook L, Robson PJ, Gleeson M : The effects of high-intensity intermittent exercise on saliva IgA, total protein and α -amylase, *J of Sports Sciences*, 1999; Vol.17, 129-134.
- (27) Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu Y, Hudgens GA : Hormonal responses to psychological stress in men preparing for skydiving, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1997; Vol.82, 2503-2509 .
- (28) Chatterton RT, Vogelsong KM, Lu Y, Ellman AB, Hudgens GA : Salivary α -amylase as a measure of endogenous adrenergic activity, *Clinical Physiology*, 1996; Vol.16, 433-448.

- (29) Bosch JA, Brand HS, Ligtenberg TJM, Bermond B, Hoogstraten J, Amerongen AVN: Psychological stress as a determinant of protein levels and salivary-induced aggregation of *Streptococcus gordonii* in human whole saliva, *Psychosomatic Medicine*, 1996; Vol.58, 374-382.
- (30) Vining RF, Mcginley RA, Maksvytis JJ, Ho KY: Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol., *Annals of clinical biochemistry*, 1983; 20: 329-335.
- (31) Kirschbaum C, Hellhammer DH: Salivary cortisol in psychobiological research: an overview, *Neuropsychobiology*, 1989; 22(3), 150-169.
- (32) 田中 喜秀: 唾液で手軽に測れるストレス計測ツール, 産総研TODAY, 2006; 2006-04: 24-25.
- (33) Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki J, Chemelli RM, Tanaka H, et al.,Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*, 1998; 92:573-585.
- (34) Lecea L, Kilduff TS, Peyron C, Gao X-B, Foye PE, Danielson PE, et al., The hypocretins : Hypothalamus-specific peptides with neuroexcitatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95:322-327.
- (35) Shiuchi T, HaqueMS, Okamoto S, Inoue T, Kageyama H, Lee S, Toda C, Suzuki A, Bachman ES, Kim YB, Sakurai T, Yanagisawa M, Shioda S, Imoto K, Minokoshi Y: Hypothalamic Orexin Stimulates Feeding-Associated Glucose Utilization in Skeletal Muscle via Sympathetic Nervous System, *Cell Metabolism*, 2009; Vol. 10, Issue 6, 466-480.
- (36) Fukabori R, Yamamoto T: The effect of CRF antagonist on saccharin intake behavior, *日本味と匂学会誌* 2001; 8 (3): 511-514.
- (37) Fukabori R, Yamamoto T: POMC gene expression is induced in the hypothalamus by sweet taste stimulation, *日本味と匂学会誌* 2000; 7 (3): 581-584.

- (38) Sakai N: Effects of chemical senses on easing mental stress induced by solving puzzles, *感情心理学研究*, 2009; 17(2), 112-119.
- (39) 山口 昌樹, 花輪 尚子, 吉田 博: 唾液アミラーゼ式交感神経モニタの基礎的性能, *生体医工学*, 2007; Vol.45No.2.
- (40) Groza P, Zamfir V, Lungu D: Postoperative salivary amylase changes in children, *Rev Roum Physiol*, 1971; 8, 307-312.
- (41) Speirs RL, Herring J, Cooper WD, Hardy CC, Hind CR: The influence of sympathetic activity and isoprenaline on the secretion of a mylase from the human parotid gland, *Arch Oral Bio*, 1974; 19, 747-752.
- (42) Yamaguchi M, Kanemori T, Kanemaru M, Takai N, Mizuno Y, Yoshida H: Performance evaluation of salivary amylase activity monitor, *Biosens Bioelectron*, 2004; 20, 491-497.
- (43) Yamaguchi M, Deguchi M, Wakasugi J, Ono S, Takai N, Higashi T, Mizuno Y: Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment, *Biosens Bioelectron*, 2006; 21, 1007-1014.
- (44) Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY: Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol, *Ann. Clin Biochem*, 1983; 20, 329-335.
- (45) Yehuda R: Neuroendocrine aspects of PTSD, *Handb. Exp. Pharmacol*, 2005; 169, 371-403.
- (46) Heinonen MV, Purhonen AK, Miettinen P, Pääkkönen M, Pirinen E, Alhava E, Åkerman K, Herzig KH, Apelin: orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regulatory Peptides* 2005; 5 (130):7-13.
- (47) Hiroto Y, Toshikatsu O, Wataru M, Yoshifumi K, Yutaka K, Inhibition of Food Intake by Central Injection of Anti-orexin Antibody in Fasted Rats, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2000; 267: 527-531.

業績

原著論文

(1) 審査制度のある学術雑誌等に掲載のもの

- [1] 唾液バイオマーカーによる精油の嗜好と生理反応の関連性の検証，
中野 敦行，長山 優，佐々木 誠，山口 昌樹，アロマセラピー
学雑誌, Vol.12, No.1 (2012年3月) 34-40
- [2] 香辛料により引き起こされる生理反応の唾液バイオマーカーを用いた評価，
中野 敦行，長山 優，山口 昌樹，ライフサポート(2012年)in press

(2) 審査制度のない学術雑誌等に掲載のもの

なし

賞

生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2012

若手プレゼンテーション賞 受賞

テーマ：交感神経活性の尺度に用いる唾液アミラーゼモニタ

受賞日：2012年11月4日

謝 辞

本研究を遂行し，論文をまとめるにあたり，終始ご懇切なご指導とご鞭撻を賜りました山口 昌樹 教授に，心より敬意と感謝の意を申し上げます。会社の業務がある中，ここまでたどりつけたのも，先生の熱心かつ丁寧なご指導があってのことです。博士の学位に挑戦するという機会を与えてくださったことに感謝いたします。

副指導教員をお引き受けくださった水野 雅裕 教授，萩原 義裕 准教授に，心から御礼申し上げます。

佐々木 誠 助教には，実質的なご助言を多々いただきました。また，いろいろと抱え込んでしまう私を気にかけてくださったおかげで，この3年間を乗り越えることができたと思います。本当にありがとうございます。

ニプロ株式会社 岡部 則夫 部長には，通常勤務外の学業であることにご理解ご協力いただき，多数のご助言を頂き，心からお礼申し上げます。

山口研究室においては，本研究を遂行するにあたり多くのご助言を頂いた長山 優氏，中山 友紀氏，井岡 大輔氏，小林 亜紀江氏，中川 朝美氏，米倉 孝氏，また互いに切磋琢磨した荒川 峻之氏，伊藤 翔太氏，金子 康夫氏，佐々木 雄悟氏，松田 陽平氏，松田 敬子氏，長田 仁也氏，木村 勇太氏，佐々木 翔平氏，佐々木 優聡氏，千葉 祐樹氏，石澤 康次氏，大沢 金一郎氏，大西 康平氏，佐々木 慎也氏，手塚 勇希氏，山本 貴晶氏，および3年生の諸氏，さらに被検者としてご協力いただいた方々に厚くお礼を申し上げる次第である

最後に，私の身勝手な選択を受け容れ，あらゆる面で励まし支援してくれた家族に感謝いたします。