

内分泌系の尺度に用いる唾液コルチゾール測定器の開発

Development of Salivary Cortisol Analysis System used for the Barometer of an Endocrine System

○ 丹羽 大介, 今井 義勝, 浜地 健次 (ローム㈱) 佐々木 誠, 山口 昌樹 (岩手大)

Daisuke NIWA, Yoshikatsu IMAI, Kenji HAMACHI, ROHM Co., Ltd.

Makoto SASAKI, Masaki YAMAGUCHI, Iwate University

Abstract: Cortisol is one of the endocrine hormone, and known as the stress maker. The determination of cortisol level is supposed to lead to mental health care at early stage. Now, we are developing a new type of immuno-sensing system based on microfluidic and photo-detection technology, applying to the non-invasive and quantitative analysis of salivary cortisol. The detected fluorescent signal resulting from a competitive reaction between the sample cortisol and an enzyme-labeled cortisol conjugate was indicated to be inversely related to the cortisol concentration in the sample solution. A calibration curve using the relative detected signal showed a $R^2=0.92$ for the range of standard cortisol solutions corresponding to that of native salivary cortisol (0.1–10 ng/ml). The measurement could be accomplished around 5 min. Our results are promising as the new cortisol immuno-sensing system for non-invasive, point of care measurement of human salivary cortisol levels.

Key Words: Salivary cortisol, Non-invasive, Stress, Immuno-sensing

1. はじめに

内分泌系ホルモンの一種であるコルチゾールは、代表的なストレス指標として知られている。最近ではストレスの可視化に関する、社会的要請も高まってきている。とくに、東日本大震災は、1900年以降に世界で発生した地震の中で4番目の規模であった¹⁾。震災後、心的外傷後ストレス障害(PTSD)やうつ病、アルコール依存症になるケースが増加しており、既に多くの方がこころの病が引き金となり亡くなっているとメディア媒体等で報道されている。厚生労働省も、メンタルヘルス対策の重要性を認識し、2011年にはがん、脳卒中、心臓病、糖尿病に精神疾患を加えて「5大疾病」とするなど、重点化している。

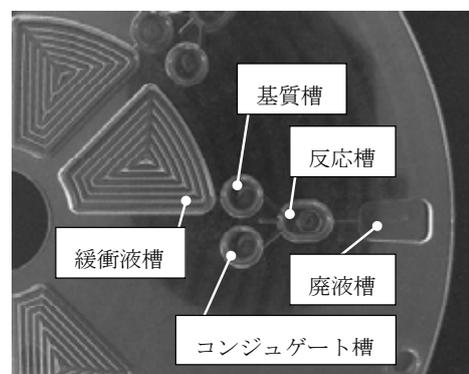
筆者らは、経済産業省経済産業局 震災復興技術イノベーション創出実証研究事業の「唾液バイオマーカーによるストレス関連疾患評価システムの開発」として、非侵襲唾液コルチゾール迅速測定器のプロトタイプを開発を行っている。これは、臨床現場で非侵襲的な即時診断に利用できるストレス関連疾患の評価システムを提供し、被災者のストレス関連疾患の発症を未然に防ぐことを目的としている。

コルチゾールは血液中の濃度が数 mg/mL と比較的高く、また脂溶性であることから唾液腺細胞を通過しやすいので、血液中と唾液中の濃度の相関も良好であることが知られている²⁾。唾液測定は血液測定と比較して、非侵襲検査手法であることから、安全性が高く大きなメリットとなるものと考えられる。2000年頃からバイオベンチャー企業サリメトリックス社が、唾液バイオマーカーを分析する酵素免疫測定法(ELISA)のキットを販売したこともあって、唾液を用いたストレス研究が盛んになっている。

本講演では、マイクロ流路と遠心力を用いてサンプルや試薬の送液を制御することが可能な分析チップ装置系と、分析チップ内でコルチゾールを短時間(5分程度)で定量測定可能な試薬系から構成される唾液コルチゾール測定器について報告する。

2. 唾液コルチゾール測定器

コルチゾールは、分子量が362.47しかないハプテンなので、酵素ラベリングキットを用いて酵素標識コルチゾール



(a) ディスポーザブル式分析用チップ



(b) 本体の外観

図1 非侵襲式の唾液コルチゾール測定器の開発に向けた試作品

抗体（以下、コンジュゲート）を独自に調整し、分子認識に競合法を採用した。図 1(a)には、分析チップの構造を示した。分析チップは、中央に固定穴が設けられたディスク形状を有しており、回転可能となっている。微細流路が、緩衝液槽、基質槽、コンジュゲート槽、反応槽、廃液相を繋いでいる。コンジュゲート槽は、サンプル滴下口を兼ねている。基質槽には基質が、コンジュゲート槽には酵素標識コルチゾール抗体が、それぞれ配置されている。反応槽には、コルチゾールをウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) で固相化したパッドが設置されている。図 1(b)には、遠心機能を備えた本体の外観 (装置系) を示した。

図 2 には、コルチゾールの分析原理 (試薬系) を示した。サンプル (唾液検体) をコンジュゲート槽に滴下すると、乾燥固定されていた酵素標識コルチゾールがそれに溶け込む。分析チップを回転させると、遠心力でサンプル溶液が反応槽に移され、競合反応が起こる。一定時間反応させた後に、分析チップを回転させると、余分な液体が廃液槽に除去される。その後、緩衝液槽から基質槽に緩衝液を流入させ、蛍光基質を溶け込ませる。分析チップを回転させると、反応槽のコンジュゲートと蛍光基質が反応し、コンジュゲート濃度に比例した蛍光強度が観察される。

図 3 には、標準コルチゾール溶液を用いた場合の唾液コルチゾール測定器の検量線を示した。蛍光測定装置のファイバー径をパラメータとし、 $\phi 400$ mm と $\phi 700$ mm の 2 種類を比較してある。競合法により、標準コルチゾール溶液濃度に反比例した蛍光強度が観察され、決定係数 $R^2 = 0.92$ までが得られている。

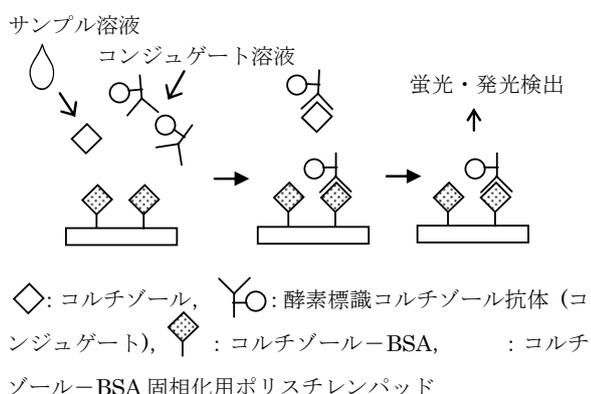


図 2 コルチゾールの分析原理

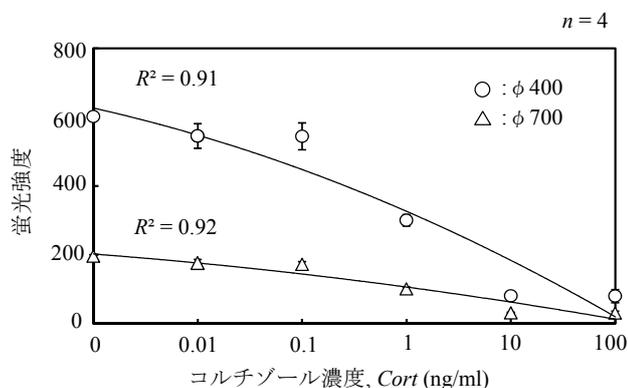


図 3 唾液コルチゾール測定器の検量線

3. 今後の展望

コルチゾールは、スウェーデンで 2 万人を対象として実施されたストレス関連疾患の臨床研究 (コホート研究) において³⁾、起床後 30 分の唾液コルチゾールで判定すれば、ストレス関連疾患への罹患の有無を診断できる可能性が高いという報告などがあり、医学的根拠 (エビデンス) の構築が進みつつある。唾液コルチゾールを用いた PTSD の判断閾値に関する臨床報告もある⁴⁾。

将来的には、PTSD のみならず、胃・十二指腸潰瘍、潰瘍性大腸炎、気管支喘息、うつ病、過敏性大腸炎、慢性疲労症候群、パニック障害、睡眠障害といったこころの状態と関連の深い疾患やストレス評価といった健康診断市場へと本システムを展開していきたい。

謝辞

本稿で紹介した研究の一部は、平成 23 年度経済産業省経済産業局 地域イノベーション協創プログラム補助金 震災復興技術イノベーション創出実証研究事業「唾液バイオマーカーによるストレス関連疾患評価システムの開発」によって行われた。

参考文献

- (1) 山口 昌樹, 中島 康, 中山 友紀, 災害ストレスの対処法, 講談社サイエンティフィク, pp. 11-24, 2011.
- (2) R.F. Vining, R.A. McGinley, J.J. Maksvytis, K.Y. Ho, *Ann. Clin. Biochem.*, **20**(Pt6), pp. 329-335, 1983.
- (3) M. Alderling, B. de la Torre, Y. Forsell, I. Lundberg, H.P. Sondergaard, T. Theorell, *Psychother. Psychosom.*, **77**(2), pp. 129-131, 2008.
- (4) P. Pervanidou, G. Kolaitis, S. Charitaki, C. Lazaropoulou, I. Papassotiriou, P. Hindmarsh, C. Bakoula, J. Tsiantis, G.P. Chrousos, *Biol. Psychiatry.*, **62**(10), pp. 1095-1102, 2007.