

【論文】

## 微細針穿孔法による起床時コルチゾール反応の経皮的な評価

### Transdermal Assessment of Cortisol Awakening Response by Microneedle Perforation Technique

野村収作(正会員), 大平雅子(非会員)\*, 鈴木健太(非会員), 野崎綾子(非会員),

吉川泰生(非会員)\*\*, 佐藤利幸(非会員)\*\*

Shusaku Nomura, Masako-Hasegawa Ohira\*, Kenta Suzuki, Ayako Nozaki,  
Yasuo Kikkawa\*\*, and Toshiyuki Sato\*\*

#### Abstract

Transdermal assessment of cortisol awakening response (CAR) by microneedle perforation technique was regarded. CAR is a prominent cortisol variation after awakening. Since it has been reported to associate with chronic or daily stress, CAR is assumed as a possible stress indication. However CAR determination by saliva has methodological disadvantages such as lower compliance of multiple specimen collection, bold estimation of total cortisol by discrete sampling time points, etc. We then introduced our developed transdermal interstitial fluid extraction technique, which was implemented by microneedle perforation technique, and investigated the validity of CAR determined by extracted interstitial fluid. Subjects, 10 healthy male, were instructed to collect their saliva at four time points after awakening at 6:00-7:00 and in the afternoon at 14:30-15:30. Besides, their interstitial fluid was collected by microneedle perforation technique on the same schedule. There found a significant positive correlation ( $r = 0.80, p < .01$ ) between salivary CAR and that of interstitial fluid when it was adjusted by sodium ion concentration which was assumed as a calibrator of the extracted interstitial fluid. The proposed transdermal assessment of interstitial cortisol can be a useful methodology for CAR determination as the minimally invasive manner without any physical pain or bleeding.

#### Key Words

Stress, Cortisol, Microneedle, Interstitial fluid, Saliva

---

2011年12月26日受理

2012年6月17日最終原稿受理

長岡技術科学大学, 新潟県長岡市上富岡町 1603-1

\* 滋賀大学, 滋賀県大津市平津 2-5-1

\*\* シスメックス株式会社, 神戸市西区高塚台 4-4-4

Nagaoka University of Technology, 1603-1

Kamitomioka, Nagaoka 940-2188, Japan

\* Shiga University, 2-5-1 Hiratsu, Otsu 520-0862,  
Japan

\*\* Sysmex Corporation, 4-4-4 Takatsukadai,  
Nishi-ku, Kobe 651-2271, Japan

#### 1. はじめに

##### 1.1 ストレス・バイオマーカー研究

近年の分子分析技術の発展を背景に, 人間の心理的なストレスを生体内に分泌されるホルモンなどの変動により客観的(物質的)に評価しようとする試みが進められている. 例えば, Steptoeら(2005)は日常生活において幸福感が少ない者は幸福感が高い者に比べて, 副腎皮質ホルモンであるコルチゾールの分泌が多いことを報告している<sup>1)</sup>. こうしたホルモンや免疫の分泌過多は長期的には心臓血管系やその他の慢性疾患との関連が指摘されており, したがって, これはいわば“病は気から”を科学的に研究する学問領域といえる.

現在、ストレスと関連して変動するとされる生化学物質は 10 種類以上知られている<sup>2)</sup>。こうした物質はストレス・バイオマーカーと呼ばれ、ストレスに対する客観的な評価指標として期待されている。中でも、本研究で対象とするコルチゾールは別名ストレス・ホルモンとも呼ばれ、短期(急性)あるいは長期(慢性)のストレス指標として有望である<sup>3-5)</sup>。

### 1.2 ストレス・バイオマーカーとしてのコルチゾールと起床時コルチゾール反応(CAR)

副腎皮質ホルモン的一种であるコルチゾールは免疫・炎症・血糖値・各種の代謝の制御を担う、生体にとって非常に重要なホルモンである。それと同時に、コルチゾールは人間がストレスを受けた時に引き起こされる生理反応経路の一つである“視床下部-下垂体-副腎系(hypothalamus-pituitary-adrenal system: HPA system)”の賦活を間接的に反映する指標として注目されている<sup>5)</sup>。実際に、唾液中のコルチゾールは面接試験・認知課題・暗算課題などの短期(急性)のストレスにより一過性の上昇を示す<sup>4,6)</sup>。また、前述した幸福感の例の他にも、仕事・失業・離婚などによる長期(慢性)のストレスに対しても増加することが報告されている<sup>5)</sup>。

特に近年は、起床時のコルチゾール分泌が日常的なストレスの良い指標として注目を集めている<sup>7)</sup>。コルチゾールには朝から夜にかけて単調に減少する日内変動があるが、それとは別に、起床後1時間以内に一日のピークに達するような朝の大きな分泌が知られている。この特徴的な分泌は、“起床時コルチゾール反応(cortisol awakening response: CAR)”と呼ばれ、起床後30~45分後に一日のピーク(起床時に対して50~160%増加)に達するような大きな変動である<sup>5,8)</sup>。CARは日常的なストレス状態に応じて反応性が強くなる(分泌量が多くなる)ことが知られているが<sup>7-9)</sup>、その一方で、疲労感の高い者や、心的外傷後ストレス障害(post-traumatic stress disorder: PTSD)をもつ者では反応性が弱くなることも報告されている<sup>7)</sup>。したがって、CARは日常的なストレスから精神疾患に及ぶ広い研究領域において、ストレスの客観的指標として有望視されている。

しかしながら通常、CARは起床後1時間の唾液中コルチゾールの分泌総量(時間に対する積分値)により評価されるため、常に方法論的な問題が指摘されている<sup>7-10)</sup>。CARを評価しようとする場合、起床直後から1時間程度にわたり数回唾液を採取し、それら各時点におけるコルチゾール濃度の変化の積分値(area under the curve: AUC)を求める必要がある。しかしながら、CAR研究の多くは、被験者自身に自宅で起床時の唾液を採取させるために、起床時刻や“起床直後”という唾液検体の採取時間が正確に統制されているとは言い難く、結果的に起床時のCARが観察されない場合も散見される。実際、Michaudら(2006)のCAR研究では、やはり自宅で行ったセッションにおいて起床時刻が統制できなかったことが報告されており、実験統制上の課題として挙げられている<sup>10)</sup>。

以上をまとめると、コルチゾールはストレスの生化学物質指標(ストレス・バイオマーカー)として有用であり、とりわけ、起床時のコルチゾール分泌であるCARは日常的・慢性的なストレスの評

価指標として有望視されている。しかしながら、CARの評価は手続きが煩雑であり方法論的な問題が常に議論されている。

これに対し、本研究では次に述べる微細針を用いた組織液の抽出技術による経皮的なCARの評価について検討した。

### 1.3 微細針による組織液中コルチゾールの定量

本研究では微細針(Microneedle)を用いて皮膚に $\mu\text{m}$ オーダーの微細孔を形成し、組織液を採取する手法を検討した。もともと同技術は経皮的な投薬技術の一つとして研究開発されてきたものであるが、一方で、組織液の採取においても微細針を適当な形状に設計すれば神経や血管を傷つけることなく、したがって痛みや出血を伴わずに実行することができる。さらに、同技術のメリットは後述するように一回の定量で組織液中のコルチゾール変化の積分値(AUC)を推定できる点にある。

既に我々は同技術を用いた新しい血糖値の簡易計測系を開発しており、グルコース(AUC)の定量の有効性について報告している<sup>11-13)</sup>。また、同様に本研究で対象とするコルチゾールについても同手法により経皮的に抽出できることを確認し、研究速報として報告している<sup>14)</sup>。

これに対し、本研究ではこの微細針技術によりCARの経皮的な評価の可能性について検討した。具体的には、同手法により求めたCARと唾液中コルチゾールより求めたCARについて相関を分析・評価し、微細針技術によるCAR評価の有効性について検証した。

## 2. 方法

Fig.1に本研究の実験概要を示す。本研究では、既に述べたように起床後に分泌されるコルチゾールを組織液検体および唾液検体より定量し、これらの相関を分析することで微細針技術によるCAR評価の有効性を検証した。また、同様に同日午後のコルチゾール分泌を評価することで、日内変動に対する組織液検体の有効性も評価した。

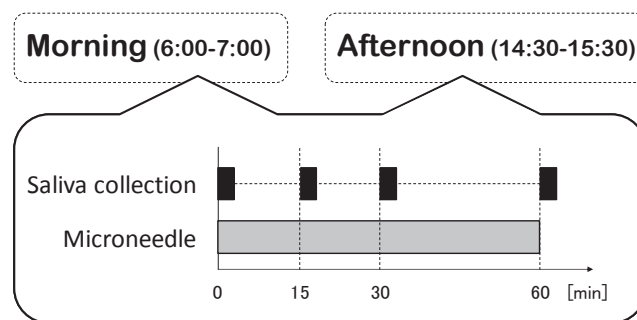


Fig.1 Schema of the experiment. Saliva samples were collected at four time points, in the morning at 6:00-7:00 and in the afternoon at 14:30-15:30, respectively. The interstitial samples were also collected by microneedle technique on the same schedule.

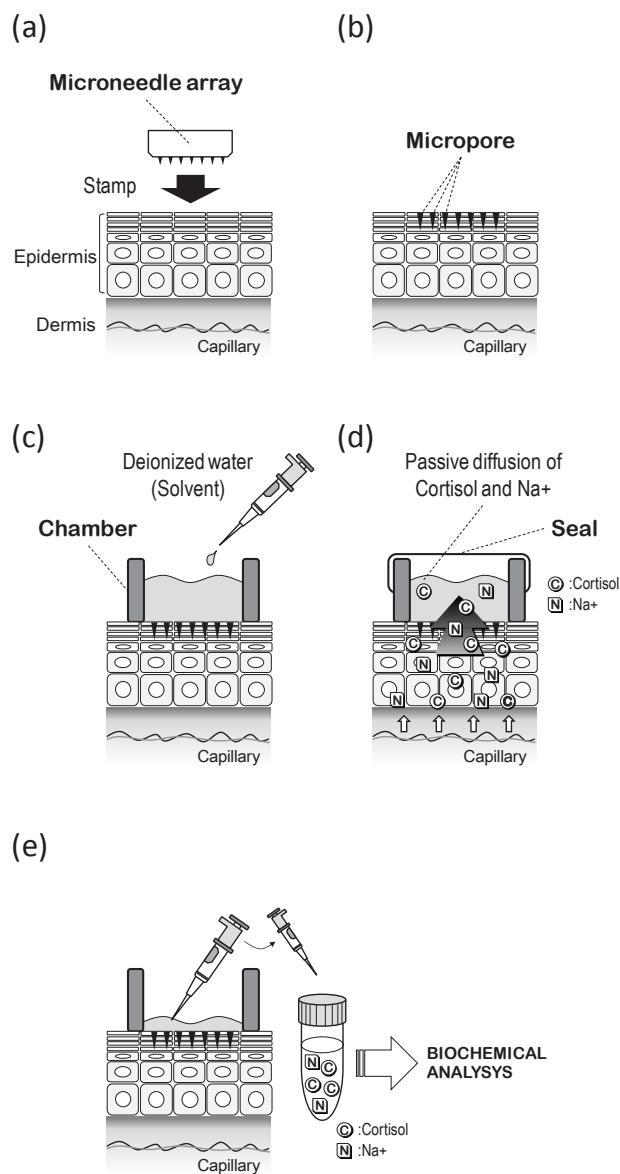


Fig.2 Procedure of the cortisol collection by microneedle perforation technique: (a) the microneedle array unit is stamped onto the skin surface, (b) as a result micropores are formed on the surface, (c) adhering a resin chamber and filling it up with deionized water (solvent), (d) passive diffusion of the targets (cortisol and Na<sup>+</sup> ion) into the solvent, and (e) collection of solvent for further biochemical analysis.

### 2.1 被験者

被験者は健康な成人男性 10 名 (21-36 歳) である。被験者には禁則事項として実験実施日の前日よりアルコールを摂取しない、また実験前 1 時間は飲食・激しい運動・喫煙・入浴をしないことを指示した。さらに、CAR の開始時刻を統制する目的により、被験

者には実験当日の深夜 0 時まで就寝し、午前 6 時に起床するよう指示した。尚、睡眠時間が 6 時間と短めに設定してあるのは中途覚醒による影響を避けるためである。

### 2.2 実験概要

本研究では 6:00 に起床した後、1 時間にわたって唾液および組織液の採取を行い (各採取方法については後述)、それぞれの検体より CAR を定量評価する。また、同日 (又はその前日) の 14:30 より同様に 1 時間にわたり各検体の採取を行い、日内変動によるコルチゾールの濃度変化を評価する。実験時間が 1 時間にわたるため、被験者は起床時・午後ともに実験の間は安静にしていれば雑誌やテレビなどを見ても良いこととした。実験は被験者各自の家で実施し、各検体の採取も各自で実施させた。

### 2.3 組織液の採取 (回収) 方法

生体内の組織液“そのもの”を直接採取することは微細針技術に限らず困難であり、況してコルチゾールの定量分析に必要な収量 (25 $\mu$ L) を得ることは現実的ではない。そこで我々は、以下 (1)~(3) の手順により組織液中のコルチゾールを抽出溶媒に受動拡散させて回収し、回収した抽出溶媒中のコルチゾール濃度を定量する方法を採用した (Fig.2(a)-(e))。

- (1) 皮膚表面をアルコールで清拭した後、微細針アレイを押し当てて微細孔 (Micropore) を形成する (Fig.2(a), (b))。微細針アレイは樹脂製で縦 5 mm  $\times$  横 10 mm の表面に高さ 300  $\mu$ m、底面直径 160  $\mu$ m の円錐状の微細針を 305 本アレイ状に成型したものである (Fig.3(a))。微細針アレイは専用の穿刺具 (Fig.3(c)) により、皮膚に対して一定の速度 (約 6 m/s) で押し当てられる。尚、これら微細針アレイや穿刺具の仕様は、毛細血管を損傷しないよう設計されている (11-13)。
- (2) 続いて微細孔を形成した部位を囲むように樹脂製のチャンバー (内測: 縦 5 mm  $\times$  横 10 mm  $\times$  高さ 8 mm, Fig.3(b)) を接着し、その中に抽出溶媒として 100 $\mu$ L の脱イオン水で満たす (Fig.2(c))。また抽出溶媒が自然に蒸発するのを防ぐため、上部をシールで覆う。
- (3) 微細孔からの受動拡散により組織液中のコルチゾールが抽出溶媒へ浸出する。一定の時間 (本研究では 1 時間) が経過した後抽出溶媒を回収する (Fig.2(d), (e))。

Fig.1 に示す通り、各被験者は起床直後 (6:00) および午後 (14:30) に前腕腹側の体毛が無い部分に上記 (1)~(3) の手順に従って微細針による穿刺を行い、1 時間後に抽出溶媒の回収を行った。さらに、バックグラウンドの評価のため、各被験者について同時刻に微細針による穿刺を行わないで前腕腹側にチャンバーを設置し、1 時間後に抽出溶媒の回収を行った (つまり、アルコールで清拭した後、上記 (2), (3) の手順のみを実施した)。

回収した抽出溶媒はポリプロピレン製の容器に移されコルチゾールとナトリウムイオン (後述) の定量分析を行う日まで -25 $^{\circ}$ C の冷凍庫に保管した。

### 2.4 組織液中のコルチゾール濃度 (AUC) の推定手法

前述の (1)~(3) の手順により回収した抽出溶媒 (以下、「回収溶液」とする) に含まれるコルチゾールは、微細孔より回収溶液中

に受動拡散したものであるから、その濃度は組織液中のコルチゾール濃度とは異なる(実際にはかなり小さい<sup>14)</sup>。さらにまた、組織液の浸出量は抽出時間のみに依存する訳ではなく、微細孔の形成状態にも大きく依存する。したがって本研究では、我々の過去の研究<sup>11-14)</sup>と同様に、体内ではほぼ一定に保たれているナトリウムイオン(以下、「Na<sup>+</sup>」とする)を浸出量の参照値として利用した。つまり、回収液中のコルチゾール濃度を Na<sup>+</sup>量で規格化することにより相対的に 1 時間の間に浸出した組織液中のコルチゾール濃度の積分値(AUC)を推定した。

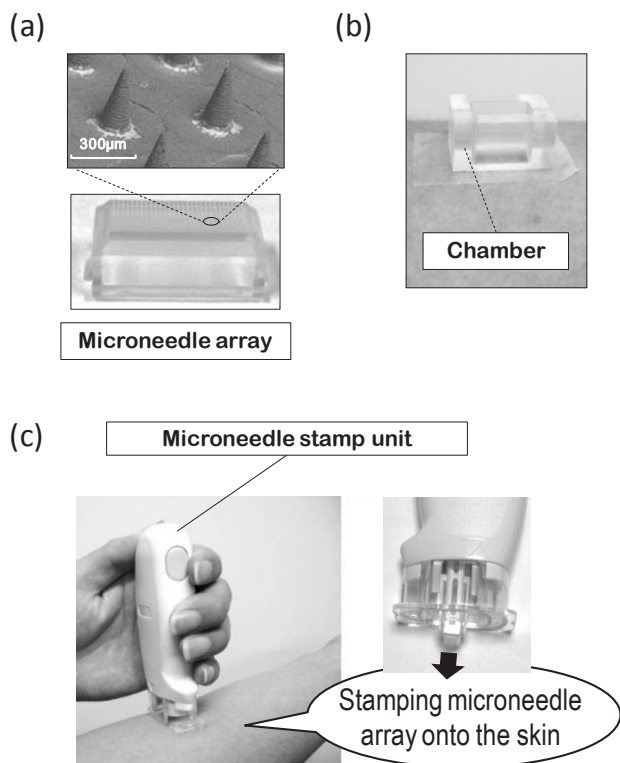


Fig.3 (a) microneedle array unit (lower) and its electron micrograph (upper), (b) resin chamber, and (c) microneedle stamp unit.

### 2.5 唾液の採取方法

唾液検体は Fig.1 に示すように、起床後(あるいは午後の実験開始時刻から)0分、15分、30分、60分の各時点よりそれぞれ5分間自然に分泌されたものを回収した。採取にあたり各被験者は5分間口を閉じて安静を保ち、5分後に口内に溜まった唾液をストローによりポリプロピレン製の容器に移した(Passive drool法)。回収した唾液はコルチゾールの定量分析を行う日まで-25°Cの冷凍庫に保管した。

### 2.6 コルチゾールと Na<sup>+</sup>の定量分析, および AUC の算出法

唾液および回収液中のコルチゾールは酵素免疫測定法(Cortisol EIA Kit, Salimetrics, LLC, USA)により定量した。回収液中の Na<sup>+</sup>濃度は Na<sup>+</sup>電極(カーディ専用 Na<sup>+</sup>電極 0221, 堀場製作所)を用いて定量した。

唾液中コルチゾールの総分泌量(前述の AUC)は 4 回の定量

時点(0分、15分、30分、60分)を結ぶ直線と時間軸とで囲まれる面積により求めた。したがって、それぞれの時点でのコルチゾール濃度を C<sub>0</sub>, C<sub>15</sub>, C<sub>30</sub>, C<sub>60</sub>([nM])とすると次の式、

$$AUC [nM \cdot h] = (C_0 + 2C_{15} + 3C_{30} + 2C_{60})/8$$

により求められる。

### 2.7 統計学処理

統計学的検定において、被験者内での差異を検討する場合は全て対応のある t 検定を実施し、相関分析においては無相関の検定を実施した。また全ての被験者について検体やコルチゾール・Na<sup>+</sup>の定量データにおける欠損値は無かった。全ての検定において有意水準は 5%とした。

### 2.8 倫理的配慮

本研究計画は長岡技術科学大学倫理委員会の承認を得た。また、被験者には事前に口頭、書面にて実験内容を説明し、書面による同意を得た。

## 3. 結果

### 3.1 唾液中コルチゾール濃度

Fig.4(a)に唾液検体より定量した起床後および午後の各時点におけるコルチゾール濃度(平均値±標準誤差)の時間変化を示す。有意差は認められないものの起床後 1 時間以内にピークをもつ上昇が認められる。また Fig.4(b)は起床直後および午後の 1 時間における AUC 値(平均値±標準偏差)である。同図が示すように、起床直後 1 時間は午後の時間帯に比べて有意にコルチゾール分泌が多かった(起床時:8.37±5.27 [nM·h], 午後:2.77±2.07 [nM·h], p<.01)。これらの図が示す起床時のコルチゾールの大きな分泌が、本研究で対象としている CAR(起床時コルチゾール反応)である。

### 3.2 微細針による穿刺の有無の影響(バックグラウンド)

微細針により穿刺を行った場合・行わなかった場合(バックグラウンド)における回収液中の Na<sup>+</sup>濃度(平均値±標準偏差)については、Fig.5 に示すように 50 倍近い差異が認められた(穿刺有:5.10±2.58 [mM], 穿刺無:0.10±0.03 [mM], p<.001)。

### 3.3 組織液中(回収液中)の Na<sup>+</sup>およびコルチゾール濃度

Fig.6(a)および 6(b)に起床時・午後における回収液中の Na<sup>+</sup>濃度およびコルチゾール濃度を示す。Fig.6(a)に示すように Na<sup>+</sup>濃度(平均値±標準偏差)は起床時と午後間に有意な差異は認められなかった(起床時:4.93±2.87 [mM], 午後:5.28±2.39 [mM], p>.1)。これに対し、Fig.6(b)に示すように回収液中のコルチゾール濃度(平均値±標準偏差)は起床時が午後に比べて有意に高かった(起床時:0.92±0.51 [nM], 午後:0.55±0.29 [nM], p<.05)。

一方、Fig.7 に回収液中の Na<sup>+</sup>濃度を用いて規格化した(今の場合単純にコルチゾールと Na<sup>+</sup>の濃度比を求めた)場合の同コルチゾール濃度を示す。同図に認められるようにコルチゾール/Na<sup>+</sup>濃度(平均値±標準偏差)は起床時が午後に比べて有意に高かった(起床時:(2.22±0.92)\*10<sup>-6</sup>, 午後:(1.20±0.69)\*10<sup>-6</sup>, p<.001)。

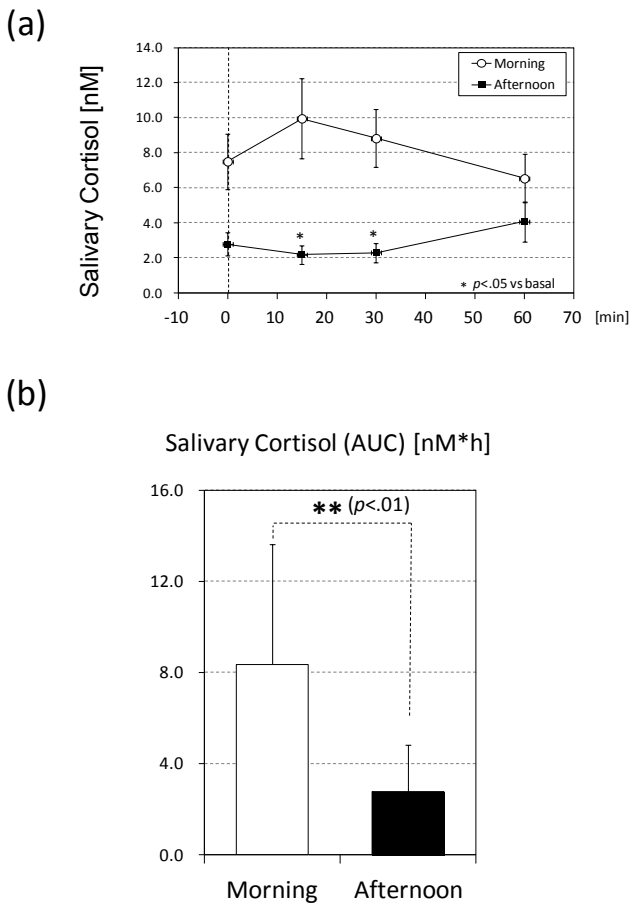


Fig.4 (a) Change in the salivary cortisol concentration (AV±S.E.M) in the morning and in the afternoon. (b) Area under the curve (AUC) of salivary cortisol (AV±SD). Note that AUC in the morning is so-called cortisol awakening response (CAR).

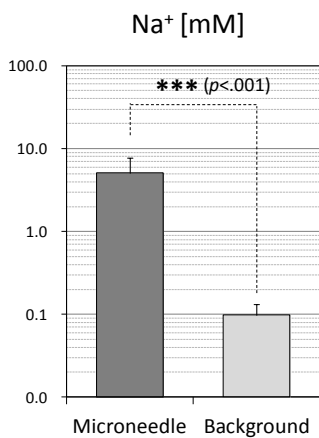


Fig.5 Difference in Na<sup>+</sup> concentration (AV±SD) between the solvent collected by microneedle procedure and that of the background in which micropores were not formed.

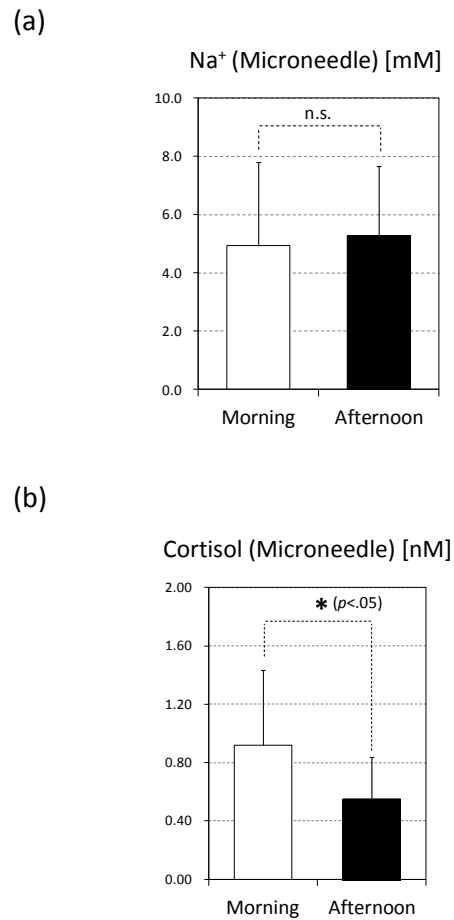


Fig.6 (a) Na<sup>+</sup> concentration (AV±SD) and (b) cortisol concentration (AV±SD) of the solvent collected by the microneedle procedure, in the morning and in the afternoon, respectively.

### 3.4 唾液および組織液中(回収液中)のコルチゾール濃度の被験者内相関

唾液中コルチゾール濃度(AUC)について各被験者において起床時および夕方方の値の間で相関分析を行ったところ、正の相関( $r = 0.71, p < .05$ )が認められた。同様に、回収液中のコルチゾール/Na<sup>+</sup>濃度においても正の相関( $r = 0.83, p < .01$ )が認められた。被験者内におけるこうした日内変動の個人特性(相対的に朝高い者は夕も高く、その逆も然り)は過去の一連のコルチゾール研究において報告されている<sup>1)</sup>。

尚、回収液中のコルチゾールを Na<sup>+</sup>濃度で規格化しない場合においては有意な相関は認められなかった( $r = 0.48, p > .1$ )。

### 3.5 組織液中(回収液中)のコルチゾール濃度と唾液中のコルチゾール濃度(ACU)との相関

Fig.8 に唾液中コルチゾール濃度(AUC)に対する回収液中のコルチゾール/Na<sup>+</sup>濃度の散布図を示す。同図中、白抜き凡例は起床時のデータ、黒塗りの凡例は午後を示す。同図に示すように、唾液中コルチゾール濃度(AUC)と回収液中

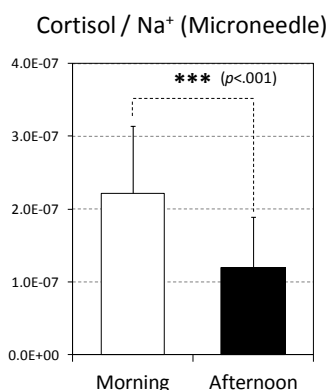


Fig.7 Cortisol / Na<sup>+</sup> ratio (AV±SD) of the solvent collected by the microneedle procedure in the morning and in the afternoon. It can be compared with that of salivary cortisol (AUC) presented in Fig.4(b).

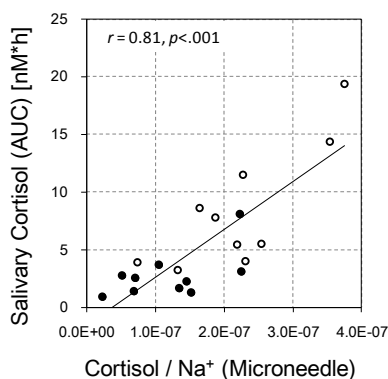


Fig.8 Scatter diagram of salivary cortisol (AUC) and cortisol / Na<sup>+</sup> ratio (Microneedle). The legend with white and black circle represents values in the morning and in the afternoon, respectively. There is a significant positive correlation as denoted in the figure.

コルチゾール濃度 (Na<sup>+</sup>規格化) との間に強い正の相関が認められた ( $r = 0.81, p < .001$ ). これは、起床時の唾液中コルチゾール濃度 (AUC), つまり唾液 CAR と起床時の回収液中コルチゾール (Na<sup>+</sup>規格化) に注目した場合でも同様であり、両者に強い正の相関が認められた ( $r = 0.80, p < .01$ ).

尚、回収液中のコルチゾールを Na<sup>+</sup>濃度で規格化しない場合、唾液中コルチゾール (AUC) との間に有意な相関は認められなかった ( $r = 0.28, p > .1$ ).

#### 4. 考察

##### 4.1 微細針による CAR 評価の有効性

Fig.8 に示したように、本研究の結果、唾液中のコルチゾール濃度と組織液中 (回収液中) のコルチゾール濃度との間に強い正

の相関が認められた。よって第一義的には、我々が開発した微細針技術による CAR 評価の有効性が示唆されており、これは本研究により得られた新規の知見である。以下、この点について詳しく考察する。

まず、微細針による穿刺の有・無によりバックグラウンドの影響を検討した結果において、Fig.5 に示すように非穿刺条件 (バックグラウンド) においても Na<sup>+</sup>が僅かに検出された。これは主には汗腺からの分泌によるものと推察される。しかしながら、非穿刺条件で検出された Na<sup>+</sup>の量は穿刺条件に比べて平均値ベースで 2.0%程である。したがって、本研究の方法論におけるバックグラウンドの影響は十分に小さいと考えられる。

一方、我々は回収液中の Na<sup>+</sup>濃度を組織液の浸出量の参照値として用い、回収液中のコルチゾール濃度を Na<sup>+</sup>量で規格化することにより、相対的に起床時・午後の組織液中のコルチゾール濃度の変動を評価した。同手法は我々の過去のグルコースを用いた研究<sup>13)</sup>ではその有効性が示されているものの、コルチゾールについても応用可能か否かは不明である。この点、本来は血漿および回収液中のコルチゾール濃度を直接比較・検証することが望ましい。しかしながら、「1. はじめに」で述べたようにコルチゾールは急性 (短期) のストレス・バイオマーカーでもあるから、血液採取に係る心理的なストレスによる一過性の変動が無視できず (いわゆる“観測問題”がある)、血漿中コルチゾール濃度と直接比較することは困難である。ただし、本研究の結果を眺める限り、コルチゾール濃度を Na<sup>+</sup>濃度で規格化した場合 (1) 起床時・午後の濃度差がより明確になり (有意差が顕著になった) (Fig.7), また (2) 被験者内で起床時・午後のコルチゾール濃度に正の相関が認められた ( $r = 0.83, p < .01$ ), 反対に (3) Na<sup>+</sup>濃度で規格化しない場合では、被験者内の起床時・午後の相関 ( $r = 0.48, p > .1$ ) や回収液 - 唾液間の相関 ( $r = 0.28, p > .1$ ) が認められない、ことなどにより Na<sup>+</sup>濃度を体内の組織液の浸出量の参照値として用いることは妥当であると解釈できる。

以上により、微細針を用い組織液中のコルチゾール濃度を相対的に推定する本研究手法は、新しい CAR 評価 (あるいはより一般に、日中の分泌量の評価) の方法論として有効であると考えられる。

##### 4.2 微細針によるコルチゾール評価手法のメリット

本研究で導入した微細針技術によるコルチゾールの評価方法は、ストレス評価の場面において実際的なメリットは大きい。

第一に、本研究で示されたように唾液中コルチゾールとの相関が認められれば、これまでに蓄積されてきた“唾液”によるストレス評価研究のパラダイムをそのまま継承出来る。具体的には、本研究で対象とした CAR や日中の総分泌量、あるいは急性 (短期) ストレス反応などにおいてコルチゾールは慢性 (長期) および急性 (短期) ストレスの良い指標であるとされているが<sup>1-9)</sup>、これらは殆ど全てが唾液検体により得られた知見である。したがって、本研究で導入した微細針技術は CAR のみならず他のストレス評価のパラダイムにおいても応用することができると考えられる。

第二に、より実際的なメリットとして我々の手法はコルチゾールの総分泌量 (AUC 値) を直接観察できるという点が挙げられる。

例えば唾液により CAR の評価を行う場合、通常は本研究の様に 4~5 時点にわたって唾液を採取し、その時間積分値 (AUC) を求める必要があるが、そうして離散的な時点により求められた AUC は、当然連続的な時間変化に基づく AUC とは異なる。さらに、既に述べたように起床時における唾液採取の確実な実施の問題は常に議論されている。またなにより、各被験者は起床直後から 1 時間にわたって安静にしつつ定期的に唾液を採取しなければならず、実質的にはその間、何もすることができない。

これに対し、微細針を用いる我々の方法では起床直後に 1 回のみ穿刺で 1 時間の AUC を見積もることができ、さらにチャンバーを液漏れ防止シールで覆えば自由に行動することもできる。

以上のように、微細針によるコルチゾール評価手法は技術的また研究の応用面において十分なメリットがあると思われる。

### 4.3 微細針による CAR 評価の課題および制約

本研究手法の制約として、なによりも組織液中のコルチゾール濃度の絶対値が求められない、と言う点が挙げられる。これは既に述べたとおり、組織液を“直接”採取することが技術的に困難であり、抽出溶媒に受動拡散したコルチゾールを測定していることに帰結される。しかしながら、コルチゾールはもともと個人差が大きいため、唾液によるストレス評価のパラダイムにおいても相対値や変化量が評価されることが多く、唾液との相関が認められれば血中や組織液中の絶対濃度を求める必要性は少ない。

一方、本研究で未解決の課題として微細孔からの Na<sup>+</sup>の浸出量に対するコルチゾールの浸出量の比率の問題が挙げられる。皮膚に形成された微細孔は、皮膚の持つ自然の防御作用により時間とともに収縮する。その結果、組織液中の Na<sup>+</sup>や他の物質の浸出量も時間とともに低下する。この時、Na<sup>+</sup>とコルチゾールの低下量比が時間に対して同じ(あるいは変化しても無視できる範囲)であれば本研究の様に Na<sup>+</sup>濃度で規格化することは合理的である。この点、グルコースを評価した過去の研究においては有効性が示されているものの<sup>13)</sup>、コルチゾールにおいては未検討である。現状では測定系の検出限界の問題よりコルチゾールの時間変化を詳細に追うことは難しいが、この Na<sup>+</sup>とコルチゾールの浸出量比の問題は今後の課題である。反対に、仮により長時間にわたる微細孔の状態と Na<sup>+</sup>や他の物質の浸出量の詳細が明らかになれば、それだけ長時間わたる AUC の評価が可能であり、これはコルチゾールの日内変動によるストレス評価においても大変有用である。

その他、本研究における制約条件として、被験者が少数であり (10 名)、また全て男性であることによるサンプリングバイアスは本研究を解釈する上で留意する必要がある。

## 5. 結論

本研究の目的は、起床後に分泌されるコルチゾールを唾液および組織液(回収液)より定量し、これらの相関を分析することで微細針技術による CAR 評価の有効性を検証するものであった。その結果、起床時の唾液中コルチゾール濃度 (AUC) と組織液中 (回収液中) のコルチゾール濃度 (Na<sup>+</sup>規格化) との間に強い正の相関が認められた ( $r = 0.80, p < .01$ )。また、午後の時間帯を

含めても同様に唾液コルチゾール濃度 (AUC) との間に強い正の相関が認められた ( $r = 0.81, p < .001$ )。よって、本研究で導入した微細針技術による微侵襲的なコルチゾールの定量手法は、慢性ストレス評価の良い指標である CAR や日内変動の新たな方法論として有効であると考えられる。

唾液によるストレス・バイオマーカーの研究は過去の実験的研究において既に一定の成果を得ており、現在は、主にコルチゾールを中心としてより大規模な疫学研究の段階に移行しつつある<sup>15)</sup>。またコルチゾールの定量手法も免疫センサを用いた手法など日々進歩している<sup>16,17)</sup>。これに対し、本研究で提案した手法は、前述したようにとりわけ AUC の評価において実際的なメリットがあり、これは疫学研究のようなフィールド調査においては殊更有用である。本研究手法は新しい試みであり、未だ解決すべき課題は山積しているものの、将来におけるストレス評価の一方法論として有用であると思われる。

## 謝辞

本研究は、文部科学省の「テニユアトラック普及・定着事業」および科研費 MEXT/JSPS 若手研究(A)(23680023)により支援を受けて実施された。

## 参考文献

- 1) Steptoe, A. & Wardle, J., Positive affect and biological function in everyday life. *Neurobiology of Aging*. 2005; **26**(1): 108-112.
- 2) 井澤修平, 城月健太郎, 菅谷渚, 小川奈美子, 鈴木克彦, 野村忍, 唾液を用いたストレス評価. *日本補完代替医療学会誌*. 2007; **4**(3): 91-101.
- 3) Kirschbaum, C. & Hellhammer, D.H., Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*. 1994; **9**(1):313-333.
- 4) Dickerson, S.S. & Kemeny, M.E., Acute stressors and cortisol responses: A theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological Bulletin*. 2004; **30**(3): 335-391.
- 5) Hellhammer, D.H., Wüst, S., and Kudielka, B.M., Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 2009; **34**(2): 163-171.
- 6) 野村収作, 水野統太, 野澤昭雄, 浅野裕俊, 井出英人, 唾液中のコルチゾールによる軽度な精神作業負荷の生理評価. *バイオフィードバック研究*. 2009; **36**(1): 23-32.
- 7) Chiba, Y. & Steptoe, A., Cortisol awakening response and psychosocial factors: A systematic review and meta-analysis. *Biological Psychology*. 2009; **80**(3): 265-278.
- 8) Clow, A., Thorn, L., Evans, P., and Hucklebridge, F., The awakening cortisol response: methodological issues and significance. *Stress*. 2004; **7**(1): 29-37.

- 9) Schulz, P., Kirschbaum, C., Prüßner, J., Hellhammer, D., Increased free cortisol secretion after awakening in chronically stressed individuals due to work overload. *Stress Med.* 1998; **14**(2): 91–97.
- 10) Michaud, D.S., Miller, S.M., Ferrarotto, C., Konkle, A.T., Keith, S.E., Campbell, K.B., Waking levels of salivary biomarkers are altered following sleep in a lab with no further increase associated with simulated night-time noise exposure. *Noise Health.* 2006; **8**(30): 30-39.
- 11) Sato, T., et al., Measurement of glucose area under the curve using minimally invasive interstitial fluid extraction technology: Evaluation of glucose monitoring concepts without blood sampling. *Diabetes Technology & Therapeutics.* 2011; **13**(12): 1194-1200.
- 12) 吉川 泰生 他 , Development of efficient skin-pretreatment technique for minimally invasive interstitial fluid extraction. 第 48 回日本生体医工学会抄録. 2010; PS2-4-3:250.
- 13) 吉川泰生他, 微侵襲組織液抽出技術を用いた食後血糖モニタリング技術の開発. 生体医工学シンポジウム 2009 抄録, 2009; 4-1-08:436-438.
- 14) 鈴木健太, 大平雅子, 野崎綾子, 内山尚志, 吉川泰生, 佐藤利幸, 野村収作, 生体液中コルチゾールの経皮的な定量の試み. 電子情報通信学会和文誌 D. 2012; **J-95D**(1):162-165.
- 15) Kumari, M., Shipley, M., Stafford, M., and Kivimaki, M.J., Association of diurnal patterns in salivary cortisol with all-cause and cardiovascular mortality: findings from the Whitehall II study. *Clin Endocrinol Metab.* 2011;**96**(5):1478-85.
- 16) Arya, S.K., Chornokur, G., Venugopal, M., and Bhansali, S., Dithiobis (succinimidyl propionate) modified gold microarray electrode based electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of cortisol. *Biosensors and Bioelectronics.* 2010; **25**(10):2296-2301.
- 17) Venugopal, M., Arya, S.K., Chornokur, G., and Bhansali, S., A realtime and cortisol in ISF using electrochemical impedance spectroscopy. *Sensors and Actuators A: Physical.* 2011; **172**(1):154-160.