

〈原著〉

教育現場でのストレスマーカーとしての唾液アミラーゼと 唾液コルチゾール測定の有用性について

下村 弘治¹⁾、金森きよ子¹⁾、西牧 淳一²⁾、芝 紀代子¹⁾

Usefulness of salivary amylase and cortisol measurement as stress markers at educational sites

Hiroji Shimomura¹⁾, Kiyoko Kanamori¹⁾, Junichi Nishimaki²⁾ and Kiyoko Shiba¹⁾

Summary To evaluate stress in student life, we measured salivary amylase, cortisol, and antioxidative activity in students of the Department of Clinical Laboratory Medicine, expecting that periodic examination increases the salivary amylase and cortisol levels.

Regarding the circadian rhythm, the salivary amylase level was high in the daytime and low early in the morning and at night. The salivary cortisol level was high early in the morning and low in the daytime and at night. The antioxidative activity level was high in the daytime, particularly at 3:00 p.m., and low at night.

The salivary amylase activity level increased with the course of periodic examination more markedly in male than female students. The salivary cortisol level did not vary during the periodic examination period in either male or female students, but the mean was higher in males than in females.

Based on these findings, periodic examination increased stress, and the stress continued even after the examination.

Since the variation patterns of the salivary amylase and cortisol levels were characteristic of individual students, measurement of these may be useful for individual instruction.

Key words: Salivary amylase monitor, Salivary cortisol, Stress, Antioxidant activity

I. 緒言

平成18年4月より本文京学院大学に保健医療技術学部臨床検査学科が開設された。新設学科

ゆえに講義及び実習内容や将来の進路、教員の性格など、種々の学生生活に関する先輩からの情報のない新入学生にとって不安が多いと考えられる。今回、我々はこのような教育環境の

¹⁾文京学院大学 保健医療技術学部 臨床検査学科
〒113-0023 東京都文京区向丘2-4-1

²⁾株式会社アドバンス 先端科学研究所
〒103-8354 東京都中央区日本橋小舟町5-7

¹⁾Faculty of Health Science Technology, Department of
Clinical Laboratory Medicine, Bunkyo Gakuin
University,
2-4-1 Mukougaoka, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0023, Japan

²⁾Fronter Science Laboratory, ADVANCE Co., Ltd,
5-7 Nihonbashi-Kobunacho, Chuo-Ku, Tokyo 103-8354,
Japan

受領日 平成22年3月1日
受理日 平成22年3月10日

中で、学生たちが日々の試験や日常生活においてどのようなストレスを受けているかを検討することにした。

試験の実施は不安、緊張、興奮という精神的なストレスと共に、生理学的にもNK細胞の活性低下やEBウイルス抗体価の上昇を示したりすることが報告されている¹⁾。このようなストレスの測定手法として本研究では唾液アミラーゼと唾液コルチゾールを測定し、ストレスを評価した。唾液アミラーゼはストレスを受けることによる交感神経系の直接的な作用の一つとして分泌すると考えられている²⁾。また、唾液コルチゾールの測定は、これまでに代表的なストレスマーカーとしての多くの報告がなされてきている^{3),4),5)}。さらに、ストレスによる抗酸化能の変動についても日常生活で得られる唾液を用いて検討を行った。

Ⅱ. 方法と材料

1. 対象

本学臨床検査学科学生を対象として、定期試験を前に今回の研究内容を説明し承諾書の協力の得られた新年度第1年次学生81名(18-19才80名、24歳1名：女性67名、男性14名)を被検者とした。また、日常生活での日内ストレスのパターン検査には事前に学生に測定意義を説明し承諾書の得られた学生(19才女性、5名)を被検者とした。

2. 実験手順

実験は、まず始めに定期試験の前後におけるストレス測定を試みた。ストレスチェックの測定手段として、試験前後について唾液を採取しアミラーゼの簡易測定とコルチゾールの測定を実施した。また日常生活での日内ストレスの変動と抗酸化能との関係を合わせて調べた。

3. ストレスの測定法

1) 唾液の採取と保存

唾液の採取方法は無刺激で分泌される全唾液をスポイトで約1ml採取しサンプルチューブに回収した後、測定まで -20°C にて保存した。採取時期は定期試験の1週間前、試験前日、試験終了直後の3回とした。唾液アミラーゼ測定に

際しては、測定機器の操作法に従い、専用チップに唾液を浸み込ませてそのまま機器に装着した。また、日内および日間の唾液アミラーゼ測定値の変動はその都度専用チップにて採取した。

2) 唾液アミラーゼの測定

唾液アミラーゼによるストレスの判定には、アミラーゼ簡易測定を原理としてニプロ株式会社より発売された酵素分析装置『唾液アミラーゼモニター』により測定した⁶⁾。本機器は特定保守管理医療機器として承認されている。測定法の操作は機器の使用説明書に従った⁶⁾。測定は始めに専用チップを舌下に挿入し唾液を浸み込ませる。唾液を採取したチップをすみやかに本体に挿入すると操作が開始され、約60秒後には唾液中のアミラーゼ活性がKU/lの単位で表示されると共に判定結果が得られる。測定結果の評価は、0-30 KU/lがストレスなし、31-45 KU/lはストレスややあり、46-60 KU/lはストレスあり、61 KU/l以上はストレスがかなりある、が結果の目安である。200 KU/lの上限まで測定できる。

3) 唾液中コルチゾールの測定

採取した唾液は凍結保存し、測定時に唾液を室温に戻し解凍し、2,000g 5分間遠心後の上清よりサンプリングをした。唾液コルチゾールの測定は競合酵素免疫学的測定法を原理とする高感度唾液コルチゾールEIA測定キット、EXPANDED RANGE High sensitivity SALIVARY CORTISOL ENZYME IMMUNOASSAY KIT (SALIMETRICS社、USA)を用い、ARVO MX/Light 1420 Multilabel/Luminescence Counter (Perkin Elmer社、USA)により波長450 nmで吸光度を測定し定量した。

4) 抗酸化能の測定

唾液中の抗酸化能の測定には抗酸化能測定キット、ラジカルキャッチ(アロカ株式会社)を用いた。本法は化学発光法を利用した高感度な測定法で、フェントン反応で発生した活性酸素をルミノール発光として生物・化学発光測定装置 AccuFLEX Lumi 400(アロカ株式会社)により測定した。抗酸化能の測定は、活性酸素OHラジカルがルミノールを発光する原理に基づいて、唾液によりこのラジカルが消去する度合い

を測定した。発光量は反応後、80~120秒間の積分値を測定し活性酸素の消去率(%)で表示した。なお、コントロールには精製水を用いた。その他の測定法の詳細な操作法は機器の使用説明書に従った。

Ⅲ. 結果

1. 唾液アミラーゼ測定の再現性

はじめに唾液アミラーゼ測定の同時再現性について調べた。男女2名のデータ(n=5)より求めると、平均値=12.0 KU/l、CV=5.9%であっ

た(データ非表示)。

そこで本測定法により男女2名について、起床時から翌朝まで8ポイントの日内変動について測定した結果、平均値はそれぞれ22.6と41.6 KU/l、標準偏差8.90、4.60 KU/lであった(Fig. 1a)。

また、日差再現性についても起床時を男女2名の学生について5日間にわたり調べた結果、個人内では比較の変動が少ない事がわかった(Fig. 1b)。

2. 唾液アミラーゼ、唾液コルチゾール、抗酸化

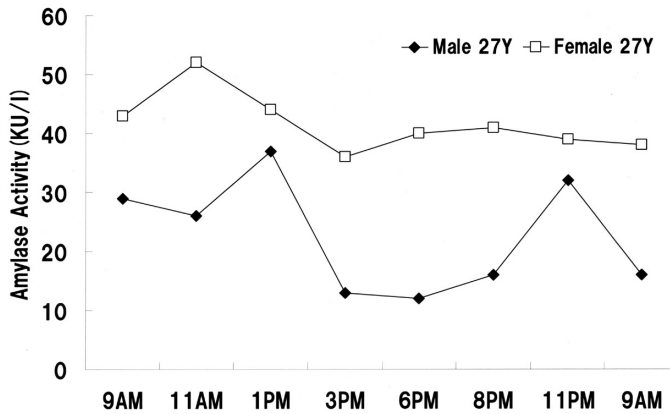


Fig. 1a Circadian change in the activity of salivary amylase.
Student A (Male 27 Y), Average 22.68 (KU/l), SD 8.9, CV 39.5(%)
Student B (Female 24 Y), Average 41.6 (KU/l), SD 4.6, CV11.1(%)

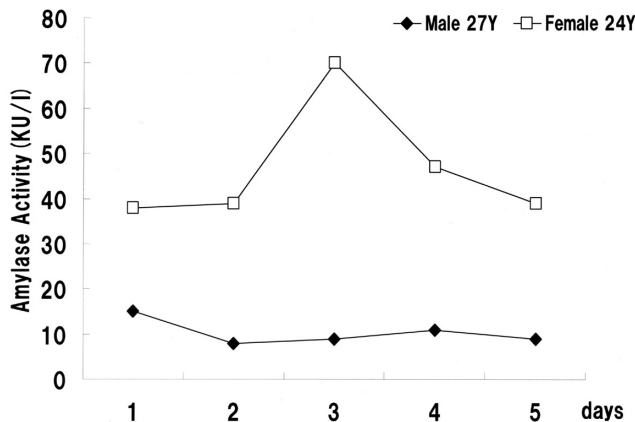


Fig. 1b Dairy variance in the activity of salivary amylase [during 5 days awakening].
Student A (Male 27 Y), Average 10.4 (KU/l), SD 2.5, CV 24.0 (%)
Student B (Female 24 Y), Average 46.6 (KU/l), SD 12.1, CV 26.1 (%)

能測定の日内変動

さらに、5名について個人の唾液アミラーゼの日内変動は平均値18.0~66.5 KU/l、標準偏差4.65~44.6 KU/lであった。明らかな傾向はないものの、昼間高く夜間と早朝には低い傾向が見られた。

唾液コルチゾールの日内変動に関して、早朝は高値に測定され、昼間から夜間は低くなった(データ非表示)。

5名の被検者について抗酸化能の日内変動を見てみると早朝から夕方(の昼間)には高く、特に午後3時付近では最も高くなり、逆に夜間は低くなる傾向がみられた。個人の抗酸化能の日内変動は、平均値75.6~83.1%、標準偏差9.2~22.4%であった。

3. 定期試験前後の唾液アミラーゼ測定によるストレス測定

定期試験前後のストレスを唾液アミラーゼの測定値により男女それぞれについて評価した。『唾液アミラーゼモニター』により測定された唾液アミラーゼ活性を試験の経過で見ると、男子では試験の1週間前 30.8 ± 22.3 KU/l、試験前日 43.9 ± 33.0 KU/l、試験終了直後 45.7 ± 31.2 KU/lとなり、試験1週間前、前日、終了直後と平均値の上昇する傾向が見られた (Fig. 2a左図)。図中高値を示した2名はいずれも化学の試験成績が80点以上であり、50 KU/l付近の3名は60点以上が2名、59点以下が2名であった。

また、女子では、試験の1週間前 23.6 ± 15.0 KU/l、試験前日 25.1 ± 18.6 KU/l、試験終了直後 25.6 ± 21.2 KU/lとなり、平均値はほとんど変化

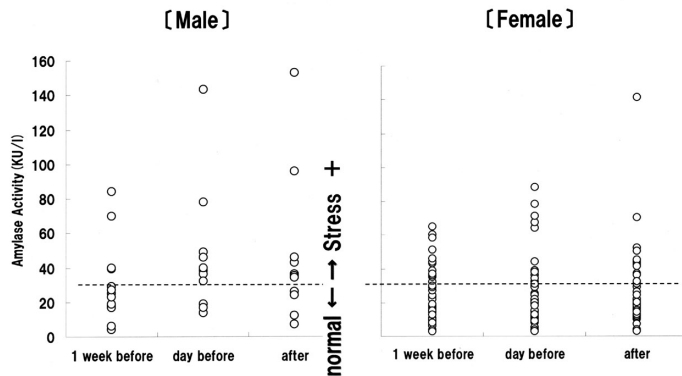


Fig. 2a Variation in the activity of salivary amylase at 1 week before, the day before and after the examination.

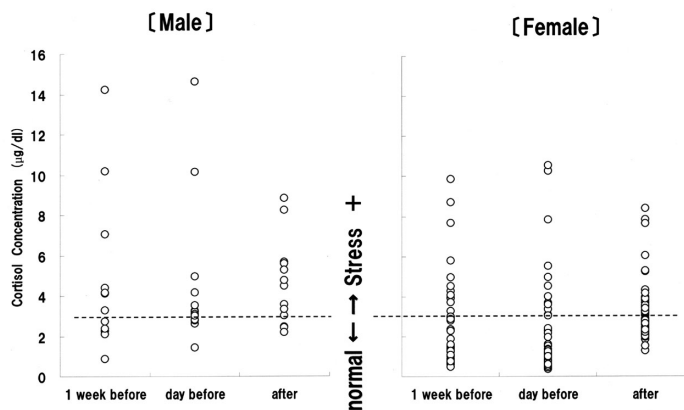


Fig. 2b Variation in the activity of salivary cortisol at 1 week before, the day before and after the examination

は見られなかった (Fig. 2a右図)。図中高値を示した1名は80点以上の得点を取り、いずれかのポイントで46 KU/l以上を示したもので化学の得点が60-80点の生徒が8名、59点以下の生徒は2名であった。

以上のように男子の方が女子よりも高値の傾向を示していたが、有意差はなかった。

個々の学生の挙動としてはストレスあり (46 KU/l以上) と認められた学生 (16例) のピーク値が1週間前であったもの7例、試験前日のもの4例、試験終了直後のもの5例であった。

4. 定期試験前後の唾液コルチゾール測定によるストレス測定

定期試験前後のストレスを唾液コルチゾールの測定値により、男女それぞれについて評価した。唾液コルチゾール測定値を試験の経過で見ると、男子では試験1週間前、前日、終了直後それぞれ $4.6 \pm 3.6 \mu\text{g/dl}$ 、 $4.6 \pm 3.5 \mu\text{g/dl}$ 、 $4.6 \pm 2.0 \mu\text{g/dl}$ となり (Fig. 2b左図)、また、女子では試験1週間前、前日、終了直後それぞれ $2.3 \pm 2.1 \mu\text{g/dl}$ 、 $2.2 \pm 2.2 \mu\text{g/dl}$ 、 $3.3 \pm 1.5 \mu\text{g/dl}$ となり

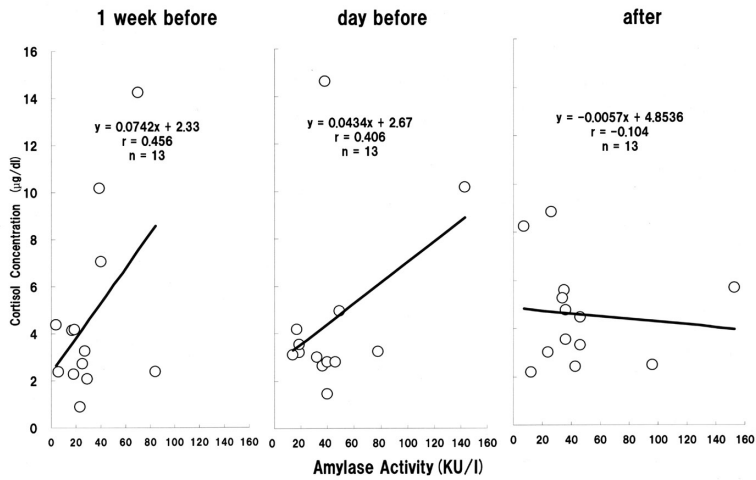


Fig. 3a Correlation between the activity of salivary amylase and concentration of salivary cortisol. (Male); Change at 1 week before, the day before and after the examination.

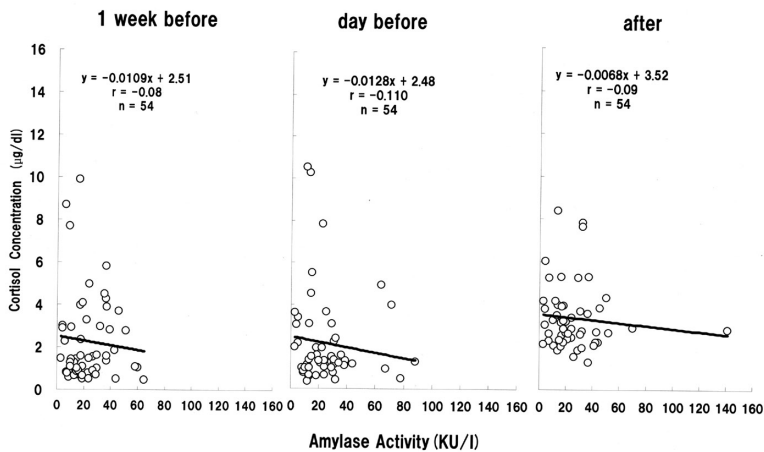


Fig. 3b Correlation between the activity of salivary amylase and concentration of salivary cortisol. (Female); Change at 1 week before, the day before and after the examination.

(Fig. 2b右図)、男女共に試験経過に伴う平均値の変化は見られず有意な経日変化は見られなかった。しかしながらわずかながらではあるが上昇傾向を示していることが分かった。

男子で高値を示した3名はいずれも高得点者であり、女子でいずれかのポイントが7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ を示した生徒5名について、化学得点は合格ラインの生徒は4名、59点以下の生徒が1名であった。唾液アミラーゼの場合と同様に唾液コルチゾールにおいても男子の方が平均値は高い傾向は見られたが有意差は認められなかった。

5. 唾液コルチゾールと唾液アミラーゼとの相関

唾液コルチゾールと唾液アミラーゼ測定値との相関を試験経過に従い試験1週間前、前日、終了直後で解析した。男子では試験1週間前

では相関する傾向は見られるが有意ではなかった (Fig. 3a)。一方、女子においては男子よりも検体数は多いにもかかわらずまったく相関は見られなかった (Fig. 3b)

6. 化学試験点数分布と唾液コルチゾールおよび唾液アミラーゼとの関係

化学の得点を点数分布に従い3群に分類し、唾液アミラーゼによるストレス判定のを検討した。59点以下の群では平均値の変化は見られないが、60点以上、80点以上の群においては試験の前日及び直後の平均値が高くなった (Fig. 4a)。

同様の解析をコルチゾールについても行ったがコルチゾールの平均値は、試験直後が最も高いもののアミラーゼのような傾向は見られな

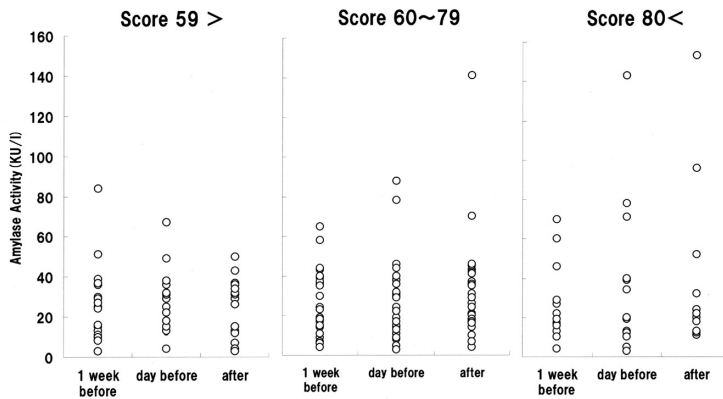


Fig. 4a Relationship between score distribution in the examination of chemistry and activity of salivary amylase.

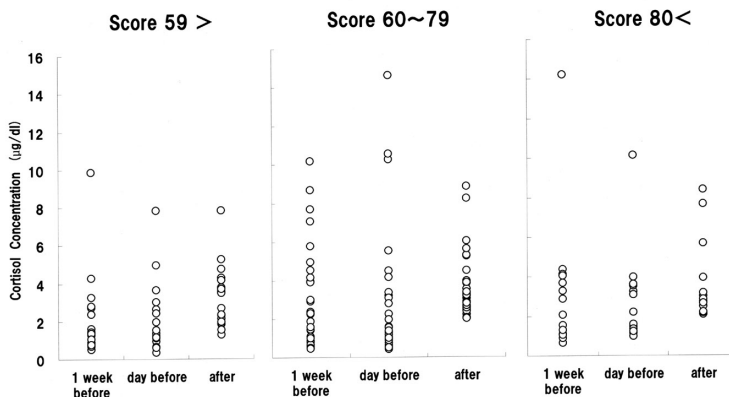


Fig. 4b Relationship between score distribution in the examination of chemistry and concentration of salivary cortisol.

った (Fig. 4b)。

7. 唾液アミラーゼ、コルチゾール、抗酸化能の相関

唾液中の抗酸化能と唾液コルチゾール測定値と唾液アミラーゼ測定によるストレス判定値との相関を検討したがいずれとも有意となる相関は見られなかった。

IV. 考察

伊藤ら⁷⁾は臨床検査技師国家試験がその受験学生に対してどれほどの精神的負荷を与えているかについて検討し、唾液コルチゾール、クロモグラニンAなどの測定から心因性のストレスの増大を示している。また加藤ら⁸⁾は唾液中MHPG濃度やHVA濃度の測定から大学生の長期に渡る試験に対するストレスを反映することを報告している。

今回の我々の研究結果から本学の新設学科での定期試験によりストレスの増大傾向が示唆され、定期試験とストレス評価の有用性が示唆された。

『唾液アミラーゼモニター』を用いたストレス評価について日内、日差のデータより、個人差はあるものの個人では比較的変動が少ない事が分かり、ストレスは個人差が大きいことが判明した。ストレスは個人差が大きい、試験によりストレスがかかると思われた。

定期試験が学生にストレスを与えるかどうかについても調べた結果、試験1週間前、試験前日、試験終了直後の唾液アミラーゼの値はやや上昇していく傾向のあることがわかったが、コルチゾール測定値とは有意な関連は認められなかった。これはコルチゾールよりアミラーゼのほうが刺激から分泌までの時間が短いためであろうと推測される。特に、アミラーゼは交感神経系の興奮を受けて副腎髄質ノルエピネフリンの分泌を通して唾液腺での酵素分泌のほかに交感神経系からの直接制御もされていることから、コルチゾールよりも早く反応していると思われた。

また、全体として評価すると、試験が近づくと高値傾向となりストレス増加が示唆され、試験終了直後でも測定値は高値を示し、試験によ

るストレスは試験終了時でもかかると思われた。今回は試験終了後数日後の測定を行っていないが、この試験によるストレスの高値がいつ頃まで継続するかについて今後検討を加えたい。

一方、試験点数との関係において今回は化学の点数と相関を調べた。明らかな傾向ではないが、試験の点数の良い群において前日及び直後でアミラーゼの平均値が高く、ストレスが示唆された。

個々の学生についてみると、特徴的な変動を示す学生も見られた事から、ストレス増加のデータは個人別指導にも有用性があるのではないかと思われる。以上のようにさまざまな角度から、定期試験とストレス評価の有用性が示唆された。

日内変動を見ると抗酸化能は、早朝と午後3時に高い傾向を示した。アミラーゼは昼間高く、早朝と夜間が低く、コルチゾールは早朝高く、昼間や夜間は低くなりそれぞれ動態が異なった。また、抗酸化能とコルチゾール及びアミラーゼとの相関は明らかでなかった。抗酸化能の日内変動はアミラーゼに類似していることが示唆された。

新設学科での学生は定期試験に対する対策や対応についての情報が全くないという不安も多い。今回、被検者となった学生たちが4年次となり、初めての国家試験受験を経験する第一期生卒業生としての立場に臨む時期に、再度これらの手法によるストレス測定を試みることにより、個人間差を越えた学科としての教育指導の有用性を検討したい。また、ストレスパターンをグループ化することにより、個人別指導においても有効に本データを活用し、本学臨床検査学科としての教育指導をさらに充実させてゆきたい。

V. 結語

本学新設臨床検査学科の学生を対象に定期試験の前後でのストレスの有無を唾液アミラーゼ、唾液コルチゾールおよび唾液中の抗酸化能を測定することにより検討した。唾液アミラーゼモニターでは男子では試験経過に伴いストレスの増加傾向を示したが女子ではその傾向は見られなかった。唾液コルチゾールでの測定では男女共に試験によるストレスに変化は見られず、唾液

アミラーゼによるストレス判定との相関も無かった。化学試験点数分布で唾液アミラーゼによるストレスをみると、男女とも高得点群で試験前日及び直後が高い傾向を示した。唾液検体を用いて日内変動を見ると、アミラーゼは昼間高く、早朝と夜間が低く、コルチゾールは早朝高く、昼間や夜間は低くなりそれぞれ動態が異なった。抗酸化能は早朝から夕方昼間には高く、特に午後3時付近では最も高いなり逆に夜間は低くなる傾向があった。しかし、抗酸化能と唾液コルチゾール測定値、抗酸化能と唾液アミラーゼ測定によるストレス判定値との相関は無かった。

全体として評価すると、試験が近づくともストレスが増加し、試験終了直後でも高値を示し、定期試験とストレス評価の有用性が示唆された。また、特徴的な動態を示す学生も見られ、個別指導に用いる可能性があった。

文 献

- 1) Glaser R, Kiecolt-Glaser J, Stout JC, Tarr KL, Speicher CE, and Hpliday JE: Stress-related impairments in Cellular immunity. *Psychiatry Res*, 16: 223-239, 1985.
- 2) Yamaguchi M, Deguchi M, Wakasugi J, Ono S, Takai N, Hihashi T, Mizuno Y: Hand-held monitor of sympathetic nervous system using salivary amylase activity and its validation by driver fatigue assessment. *Biosens Bioelectron*, 21: 1007-1014, 2006.
- 3) Kirschbaum C, Hellhammer DH: Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology*, 22: 150-169, 1989.
- 4) Kirschbaum C, Hellhammer DH: Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research. recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, 19: 313-333, 1994.
- 5) Weibel L: Methodological guidelines for the use of salivary cortisol as biological marker of stress. *Presse Med*, 32: 845-851, 2003.
- 6) 山口昌樹: 唾液マーカーでストレスを測る. *日薬理誌 (Folia Pharmacol Jpn.)*, 129: 80-84, 2007.
- 7) 伊藤康宏, 伊藤 彩, 寺平良治, 川本保子: 臨床検査技師国家試験が受験学生に及ぼすストレスの影響. *生物試料分析*, 29: 375-378, 2006.
- 8) 加藤みわ子, 伊藤康宏, 永 忍夫, 清水 遵: 大学生の長期に渡る試験ストレスが唾液中MHPG濃度, HVA濃度に及ぼす影響. *生物試料分析*, 30: 409-414, 2000.