



Title	唾液中ストレスマーカ－の動態分析
Author(s)	児玉, 高有; Kodama, Takaari; 阿部, 貴恵 他
Citation	北海道歯学雑誌, 31(2), 52-61
Issue Date	2010-12-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/45799
Type	journal article
File Information	03_kodama.pdf



原 著

唾液中ストレスマーカの動態分析

児玉 高有^{1,5)} 阿部 貴恵²⁾ 兼平 孝³⁾ 森田 学⁴⁾ 船橋 誠⁵⁾

抄 録：近年，唾液中のアミラーゼ，コルチゾール，クロモグラニンAをストレスマーカとして用いることが注目されている。しかし，これらの物質の経時的動態変化については不明な点が多い。そこで生体への刺激に対する唾液中のストレスマーカの変動を定量し，その動態について調べた。さらに，これを歯科治療の術中や予後の評価に応用出来るかどうかについて検討を行った。

外科的，内科的疾患のない成人男性61名から任意の時期に唾液採取管を用いて唾液を採取した。これらの被験者は，1)前腕肘部の静脈から真空採血管と注射針を用いて採血を行った者(30名)，2)抜歯を施術した者(5名)，3)抜歯を伴わない一般的な歯科治療のみを施術した者(26名)がいた。各被験者群において，採血前後および施術前後の唾液中のアミラーゼ，コルチゾール，クロモグラニンAの変動比の経時変化を分析した。

アミラーゼとクロモグラニンAは採血前の時点においてすでに有意な増加を示し，心理的ストレスに対して反応することが示唆された。被験者は採血前の基準日におけるストレスマーカ量について高濃度群と低濃度群に大別された。このうち高濃度群は低濃度群と比べて，すべての上記ストレスマーカの変動が少なく，ストレス応答系の活動が高まりにくい可能性が示唆された。

歯科治療を行った場合，アミラーゼとコルチゾール濃度は初診時に比べ再診時には有意な低下を認め，また抜歯による有意な増加が観察された。これらの結果は，初診時の不安や恐怖が再診時には緩和されることによりストレスが減少したことを示し，一方，抜歯は強いストレスとして作用したことを示していると考えられた。

本研究により唾液中のアミラーゼ，コルチゾール，クロモグラニンAは採血によるストレスに対してそれぞれ反応速度が異なり，さらにその変化率はもともとの唾液中ストレスマーカ量が多いか少ないかによって異なることが明らかとなった。また，これらのストレスマーカは歯科治療の内容や受診回数によって動態が変化し，歯科治療の術中や予後の評価に応用出来ることが示された。

キーワード：ストレス，唾液，アミラーゼ，コルチゾール，クロモグラニンA

緒 言

ストレスという概念は，本来物理工学のものである。Stressは「応力」と訳され，物体に外力が作用したときに，その外力に応じて物体内部に生ずる単位面積あたりの力のことである。物体に外から力を作用させると応力が生じ，Strain(歪み)が出来る。このような現象は生体においてもよく当てはまり，Walter B Cannonは20世紀初頭に現在のストレスとほぼ同じ概念を医学的に用いて，ストレスが

生体の恒常性を乱しStrain(歪み)を生じることを報告した¹⁾。Cannonはこの反応に交感神経-副腎髄質系が深く関与していることに注目している。

一方，最初にストレス学説を唱えたHans Selyeは種々の侵害刺激に対して非特異的に全身に起こる反応があり，生体は新しい環境に適応するために総合的努力を示すとして，これを汎適応症候群と名付けた²⁾。Selyeはこの反応の中心が視床下部-下垂体-副腎皮質系にあることを示し，刺激が加わったときに生体が示す反応を「ストレス」。

〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究科

¹⁾口腔健康科学講座予防歯科学教室(主任:本多丘人 准教授)

²⁾口腔健康科学講座高齢者歯科学教室(主任:井上農夫男 教授)

⁵⁾口腔機能学講座口腔生理学教室(主任:船橋 誠 教授)

〒060-8648 札幌市北区北14条西5丁目

³⁾北海道大学病院歯科診療センター保存系歯科(科長:大畑 昇 教授)

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2丁目

⁴⁾岡山大学大学院医歯薬学総合研究科予防歯科学分野(主任:森田 学 教授)

そしてこの反応を引き起こす刺激を「ストレッサー」と定義した。さらにストレッサーとして生理的（肉体的）なものや心理的なものを挙げている。

近年ではストレスとストレッサーは同義語として用いられており、ストレスは生理的（肉体的）ストレスと心理的（精神的）ストレスに分類されるだけでなく、単一刺激による一時的なストレスは急性ストレス、長期間持続する刺激によるストレスは慢性ストレスと分類されることもある³⁾。また、活性酸素が生体に与える刺激はとくに酸化ストレスと呼ばれている⁴⁾。

一言にストレスと言っても、多様なものがあり、ストレスに対する反応やストレス耐性を計測するのは容易ではないが、現在、アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA等をストレス指標として計測することが利用され始めている。

アミラーゼは消化酵素であり、唾液腺では交感神経、副交感神経どちらの興奮でも分泌が亢進される。コルチゾールは副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドであり、副腎皮質刺激ホルモンにより血中への分泌がコントロールされ、血中から唾液中へ直接移行することが知られている。クロモグラニンAは副腎髄質から分泌される糖タンパク質であり、顎下腺導管部にも存在し、交感神経の活動を反映すると考えられている⁵⁻⁶⁾。

これらの唾液中物質の上昇は次の2つの応答系によることが知られている。1) 交感神経-副腎髄質系であり、この応答によりアミラーゼ、クロモグラニンA濃度の上昇が起こる^{7,8)}。2) 視床下部-下垂体-副腎皮質系であり、この応答によりコルチゾール濃度の上昇が起こる^{9,10)}。これら2つの応答系は生体にストレスが加わったときに活性化され、その際に放出される生化学物質（バイオマーカー）は、血圧や心拍数、血糖値を上昇させる等、生体がストレスに対処出来るよう作用する。人間の精神状態を反映するバイオマーカーは10種類以上報告されており、長期・短期的なストレス事態に対して、概して増加することからストレスマーカーとも呼ばれている¹¹⁾。

検査試料として利用可能と考えられるのは血液^{12,13)}、尿¹⁴⁾、唾液^{7,15-19)}であるが、本研究では非侵襲的に採取出来るという利点から唾液を用い、ストレスに対する唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAの変動について実験をおこなった。

ストレスの研究分野では検査試料として血液を用いてカテコールアミンやコルチゾールを定量したストレス評価も行われているが、採血にともなう疼痛がストレスマーカーに影響を与える可能性がある。また、唾液中ストレスマーカーはストレス負荷後30分程の時間内で大きく変動し、各ストレスマーカーは異なる反応速度を示すとの報告^{17,20,21)}や、ストレスに対する個人ごとの感受性や、唾液中コルチゾール濃度の変化には個人差があることが報告

されている²²⁾。さらに、歯科治療によりストレスマーカーに変動が見られたとの報告²³⁻²⁵⁾もあるが、その変動の詳細については不明な点も多い。したがって、ストレスマーカーを用いたストレス評価は臨床的に確立されたものではなく、まだ研究途上の段階にあると著者らは考えている。

本研究では、採血時の唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAの動態を明らかにするとともに、歯科治療時のこれらのストレスマーカーの変動を治療内容や受診回数といった条件で比較分析し、歯科治療の術中や予後の評価法として用いることが出来るかどうかについて検討することを目的とした。

材料と方法

本研究は北海道大学歯学研究科倫理委員会の承認を得て実施した。また疫学研究に関する倫理指針（平成14年6月17日文科科学省・厚生労働省告示第2号）および疫学研究に関する倫理指針の施行等について（平成14年6月17日文科科学省研究振興局長・厚生労働省大臣官房厚生科学課長連盟通知）に基づいて研究を行った。なお、被験者の人権擁護上の配慮、研究遂行による不利益、インフォームド・コンセント等についてはヘルシンキ宣言を遵守した。

1) 採血をストレッサーとする実験

被験者は外科的、内科的疾患を有しない健康な成人男性で、定期健康診断時に採血を予定する者（30名、年齢は24歳から43歳、平均年齢34.2歳）とした。被験者には実験開始日以前の任意の日の実験の説明を行い全員から同意を得た。採血は座位にて肘正中静脈あるいは橈側静脈から行われた。採血前後における唾液採取の時期について図1に示す。採血日以前の唾液として健康診断の1-3日前に採取し、以後、採血直前、採血5分後、10分後、15分後に連続的に唾液を採取した。唾液採取は被験者を座位にて安静を保ち、4分50秒間口腔内に唾液を貯留させたのち、10秒かけて採取管に吐き出させる方法で行った。ホルモンの分泌にはサーカディアンリズムが見られるため^{26,27)}、実験は午前9時から午前11時半までの時間帯に行い、被験者に実験開始1時間以内に飲食および口腔清掃を行わないよう指示した。採取した唾液は直ちに-30℃にて凍結し、測定時まで保存した。

アミラーゼ活性値は Phadebas Amylase Test (Magle Life Sciences, Sweden) を使用¹⁵⁾して Blue-Starch 法により測定した。コルチゾールは Salivary Cortisol EIA Kit (Salimetrics Inc, USA) を使用²⁸⁾して定量を行った。クロモグラニンAはクロモグラニンA測定 EIA キット (矢内原研究所, 日本) を使用²⁹⁾して定量を行った。

データ解析

唾液中のアミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度には個人差があるため、採血日以前に採取した唾液中

の各ストレスマーカー濃度ならびに歯科初診日診療前の各マーカー濃度を1として正規化し、変動比を算出した。

得られたデータは統計解析ソフト SPSS for WINDOWS を用いて paired t-test をおこない、有意水準 5%未満を統計学的有意差があると判定とした。各値は平均値±標準誤差で示した。

2) 歯科診療をストレスラーとする実験

被験者は歯科受診希望者で外科的、内科的疾患を有しない健康な成人男性 (31名, 年齢は20歳から48歳, 平均年齢36.8歳) とし、初診の受付時に説明を行い、全員から同意を得て実験を行った。歯科治療を受けることをストレスラーとし、治療内容は抜歯5名, Teeth Blushing Instruction (以下 TBI) および Professional Mechanical Tooth Cleaning (以下 PMTC) 7名, その他の処置19名であった。図2に示すように、初診日, 再診1日目, 再診2日目に、診療の直前および直後に唾液を採取した。唾液採取はサリベット® (Salivette, Starstedt社, Germany) を使用^{19,30,31)}して行い、被験者は付属のロール綿を2分間口腔内に保持し、その間分泌された唾液をロール綿に吸収させた。実験は午前9時から午前11時半までの時間帯に行い、被験者に実験開始1時間以内に飲食および口腔清掃を行わないよう指示した。採取した唾液は直ちに-30℃にて凍結し、測定時まで保存した。唾液中ストレスマーカーの測定およびデータ解析については前述の実験と同じ方法で行った。

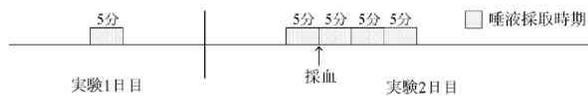


図1 採血前後における唾液採取時期

実験1日目: 採血日の1-3日前であり、5分間に分泌された全唾液を採取。実験2日目: 採血5分前, 採血5, 10, 15分後に分泌された全唾液を採取。実験は午前9時から午前11時半までの時間帯に行い、被験者に実験開始1時間以内に飲食および口腔清掃を行わないよう指示した。

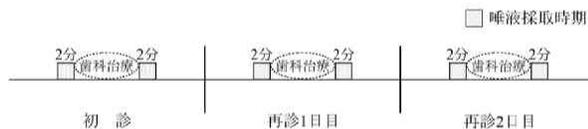


図2 歯科治療前後における唾液採取時期

初診日を実験開始日として再診1-2日目までの唾液を採取。診療の直前および直後の2分間に分泌された全唾液を採取した。

結 果

1) 採血前後の唾液中アミラーゼ, コルチゾール, クロモグラニンA濃度の変化

アミラーゼ濃度の変動比は採血直前には 1.22 ± 0.10 であり、非採血日と比較してすでに有意な上昇を示した ($p <$

0.05). さらに採血後においても、採血5分後は 1.28 ± 0.10 , 10分後は 1.25 ± 0.11 , 15分後は 1.24 ± 0.12 であり、非採血日と比較して有意な上昇が認められた ($p < 0.05$, 図3).

コルチゾール濃度の変動比は採血直前, 採血5分後には非採血日と比較して有意な変動を示さず、採血10分後は 2.14 ± 0.25 , 15分後は 1.88 ± 0.22 とそれぞれ非採血日と比較して有意な上昇を示した ($p < 0.05$, 図4).

クロモグラニンA濃度の変動比は採血直前には 2.07 ± 0.42 であり、非採血日と比較してすでに有意な上昇を示した ($p < 0.05$). さらに採血後においても、採血5分後は 2.54 ± 0.31 , 10分後は 2.39 ± 0.60 , 15分後は 1.52 ± 0.21 であり、非採血日と比較して有意な上昇が認められた ($p < 0.05$, 図5).

各ストレスマーカーの採血前後における変動は上述のようであったが、基準となる非採血日においてすでに個人差が大きいことが判明した。そこで、非採血日の時点での各ストレスマーカーの濃度が測定平均値より高い被験者を高濃度群, 低い被験者を低濃度群と分類した。つまり高濃度

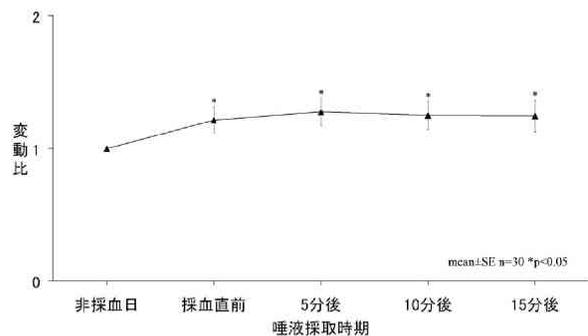


図3 採血前後における唾液中アミラーゼ濃度の変動比

非採血日のアミラーゼ濃度を1として正規化し変動比を算出し、それぞれの変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。paired t-testを行い、有意水準5%未満を統計学的有意差ありとした。これらは以下の図においても同様とする。アミラーゼ濃度の変動比は採血直前, 採血5, 10, 15分後において非採血日と比較して有意な上昇を示した。

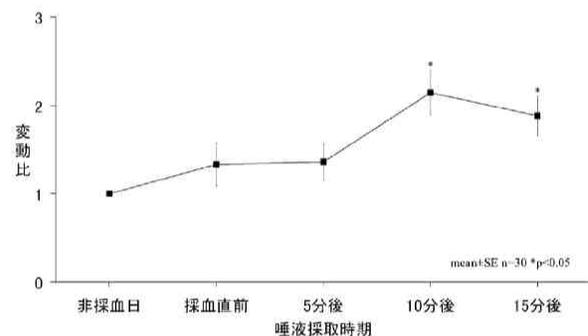


図4 採血前後における唾液中コルチゾール濃度の変動比

コルチゾール濃度の変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。コルチゾール濃度の変動比は採血10, 15分後において非採血日と比較して有意な上昇を示した。

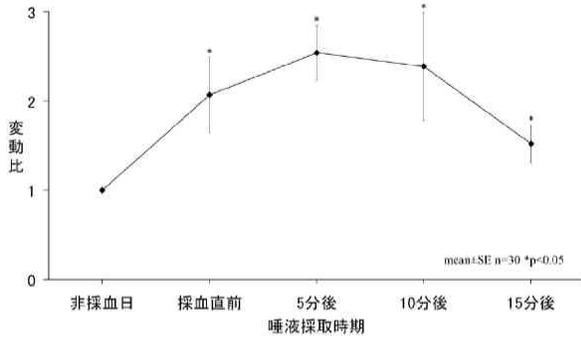


図5 採血前後における唾液中クロモグラニンA濃度の変動比
クロモグラニンA濃度の変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。クロモグラニンA濃度の変動比は採血直前、採血5、10、15分後において非採血日と比較して有意な上昇を示した。

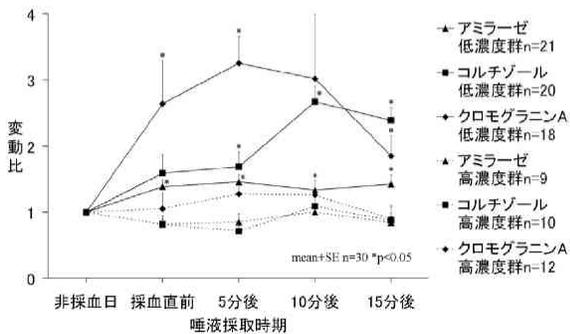


図6 採血前後における高濃度群、低濃度群の各ストレスマーカー濃度の変動比

非採血日の時点でのアミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度が測定平均値より高い被験者を高濃度群、低い被験者を低濃度群と分類し、それぞれの変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。低濃度群では各ストレスマーカー濃度の変動比は採血直前から採血15分後にかけて非採血日と比較して有意な上昇を示したが、高濃度群では有意な上昇を示さなかった。

群は実験的ストレス負荷がない状態でもストレスマーカー濃度が相対的に高値を示す群であり、低濃度群はその逆と考えられた。この分類により被験者はアミラーゼ高濃度群9名、低濃度群21名に、コルチゾール高濃度群10名、低濃度群20名に、クロモグラニンA高濃度群12名、低濃度群18名にそれぞれ大別された。両群を比較したところ、図6に示すように、低濃度群のアミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動比は採血の前後において、採血10分後のクロモグラニンAを除き、非採血日と比較して有意な上昇を示した ($p<0.05$) のに対し、高濃度群は有意な上昇を示さなかった。

2) 歯科診療初診日から再診2日目までの唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変化

歯科治療を受けたすべての被験者(31名)の唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変化を図7に示す。アミラーゼ濃度の変動比は再診2日目の診療前は 0.85 ± 0.05 、同日診療後は 0.82 ± 0.04 であり、初診日診

療前と比較して有意な低下を示した ($p<0.05$)。コルチゾールについては初診日診療後において 0.91 ± 0.03 、再診2日目の診療前は 0.80 ± 0.05 、同日診療後は 0.81 ± 0.05 であり、初診日診療前と比較して有意な低下を示した ($p<0.05$)。クロモグラニンAについては初診日診療後において 1.55 ± 0.19 であり、初診日診療前と比較して有意な上昇を示した ($p<0.05$) が、再診1日目から2日目にかけては有意な差を示さなかった。

抜歯前後の唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変化を図8に示す。抜歯を施行した5名の被験者において、抜歯直前のコルチゾール濃度の変動比は 1.22 ± 0.08 であり、初診日診療前と比較して有意な上昇を認めた ($p<0.05$)。抜歯直後のコルチゾール濃度の変動比は 1.38 ± 0.17 、アミラーゼ濃度の変動比は 1.21 ± 0.07 であり、初診日診療前と比較して有意な上昇を認めた ($p<0.05$)。抜歯の前後ともにクロモグラニンAは高値であったが、個人間の測定値のばらつきが大きく有意な上昇は認めなかった。また抜歯翌日にはクロモグラニンA濃度の変動比は 0.76 ± 0.10 、コルチゾール濃度の変動比は 0.80 ± 0.08 であり、初診日診療前と比較して有意な低下を認めた ($p<0.05$)。

TBI, PMTC 前後の唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変化を図9に示す。TBI, PMTCを初診日から3回にわたり受けた7名の被験者において、アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動比は1回目の治療後から3回目の治療後にかけて、1回目の治療前(初診日診療前)と比較して有意な上昇は認められず、有意な低下 ($p<0.05$) が散見され、アミラーゼとコルチゾール濃度の変動比は初診日診療後においてすでに有意な低下を示し、クロモグラニンA濃度の変動比については2回目の治療後から有意な低下を示した。

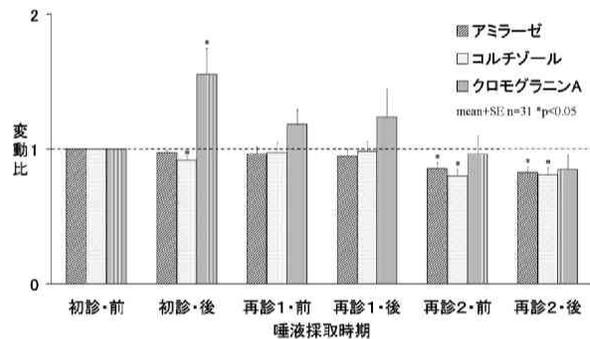


図7 初診日から再診2日目までの各ストレスマーカー濃度の変動比

歯科治療を受けた被験者から採取した唾液のアミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度について、それぞれの変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。再診2日目の診療前後においてアミラーゼおよびコルチゾール濃度の変動比は初診日診療前と比較して有意な低下を示した。

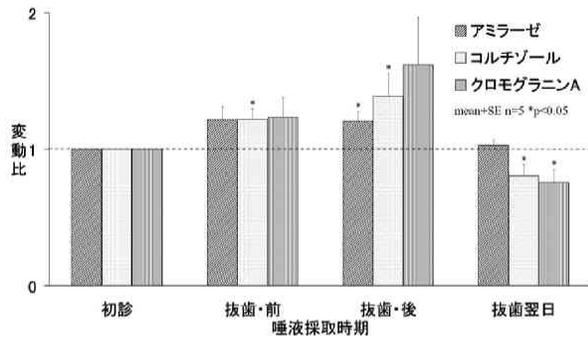


図8 抜歯前後における各ストレスマーカー濃度の変動比
抜歯を受けた被験者における唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。抜歯直前にはコルチゾール濃度が、抜歯直後にはアミラーゼおよびコルチゾール濃度が初診日診療前と比較して変動比の有意な上昇を示した。一方、抜歯翌日にはコルチゾールおよびクロモグラニンA濃度が初診日診療前と比較して変動比の有意な低下を示した。

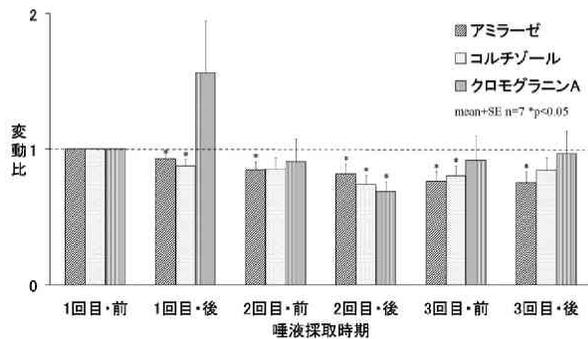


図9 TBI, PMTCT 前後における各ストレスマーカー濃度の変動比

TBI, PMTCT を初診日から3回にわたり受けた被験者における唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動比の平均値と標準誤差をグラフに示す。1回目治療前(初診日診療前)と比較して、1回目治療後から3回目治療後にかけて各ストレスマーカー濃度の変動比の有意な低下が散見された。

考 察

1. ストレスマーカー測定の意味

ストレス学説を唱えたSelyeによれば、生体のストレス反応には3段階の時期(警告反応期-抵抗期-疲憊期)があり、当初はストレスに適応するよう反応するが、強いストレスが持続するとストレス耐性が衰えていき、生体機能の低下を引き起こすとされる。またホメオスタシスの概念を確立したCannonが言うように、ストレスが加わると生体に歪みを生じ、ストレス刺激が長期化したり、その量が大きすぎると生体はホメオスタシスを維持出来なくなり、生体の機能に種々の弊害を引き起こす。近年では、ストレスと免疫抑制の関連が指摘されている³²⁻³⁶⁾。ストレスがある人は歯周病に罹患しやすく、歯周治療によって治療してもメンテナンス中に再発しやすいとの報告³⁷⁾がある。

また、*in vitro*の実験により、生体のストレス条件下と同濃度のコルチゾールがTリンパ球のテロメア短縮に関与することが示されている³⁸⁾。

ストレス過多が生体へ及ぼす悪影響を回避するためには、正確なストレス評価を行うことが必要であると考えられる。これまで多く用いられてきた質問表によるストレス評価は主観的要素の影響を受けやすく、より客観的な評価を行うことが望まれる。今回の研究において測定した生体の内因性物質をストレスマーカーとして測定することが確立出来れば、より客観的なストレス評価方法として期待されるところである。

2. 検査試料としての唾液の有用性について

ストレスの研究分野では検査試料として血液を用いて血中のカテコールアミンやコルチゾール濃度を測定する手法でのストレス評価が数多く行われている。これまで採血行為が生体にストレスを与える危険性が指摘されているにもかかわらず、採血行為によるストレスマーカーの変動は十分に検討されてこなかった。過去の研究のなかには採血を受ける子どもに対する親の支援が子どもの唾液アミラーゼの上昇を抑えるという報告³⁹⁾もあるが、採血行為がアミラーゼをはじめ唾液中ストレスマーカーにどのような変動をもたらすかについて、詳細は明らかとなっていない。本研究において採血による唾液中アミラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAの経時的動態変化の詳細が示され、採血行為そのものが生体に明らかなストレス反応を引き起こすことがわかった。このことから、ストレス評価を行う場合に採血のように疼痛や恐怖を伴う採取方法を用いると、ストレスを過大に評価してしまう危険性があると考えられる。

一方で唾液は採取時にストレスを与えにくいという利点⁴⁰⁾があるが、味覚刺激や口腔内の機械的刺激によって流量が増加することがわかっており、一般的に流量の変化は唾液中アミラーゼ濃度の変動を引き起こす。また耳下腺、顎下腺、舌下腺といった唾液腺の種類によって唾液成分が異なるうえ、刺激の有無によって全唾液に占める各唾液腺から分泌される唾液の割合は異なるため、採取した全唾液のストレスマーカー測定値はばらつきが出やすいと考えられる。このような測定値のばらつきを減少させるためには、異なる被験者間の測定値を比較する場合はもちろん、同一被験者における測定値の時系列的変化を比較する場合であっても採取条件の統一が不可欠である。つまり、1日の中でどの時間帯に採取するか、飲食からの経過時間、ブラッシングや喫煙といった口腔内刺激による影響や運動による影響等を考慮する必要がある。採取条件の統一は対象が実験における被験者であれば比較的容易であるが、臨床現場ではやや困難であると考えられるため、ストレス評価の検査試料として唾液を用いるには、患者に対して事前に説明

を行う等、採取条件の統一に注意を払う必要があると考えられる。以上の点に注意することで、より正確な唾液を用いたストレス評価法が確立出来ると考えられた。

3. 唾液中アマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAの反応速度について

今回測定した唾液中アマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAには採血によるストレスに対して固有の反応速度があることが明らかとなり、ストレス負荷前から負荷後15分の時間内でも各マーカー濃度の変動の様相に大きな違いが認められた。このことから、ストレス負荷からの経過時間のわずかな差がストレス評価結果を大きく左右する可能性があると考えられ、正確なストレス評価を実現するためには、断面的ではなく連続的な採取を行うことが望ましいと考えられる。

採血前からすでに上昇していたアマラーゼおよびクロモグラニンAは心理的ストレスのみでも反応するストレスマーカーであることが示唆され、これは中根ら⁴¹⁾、荒垣ら²⁰⁾の報告を裏付けるものである。このことから、例えば採血のような急性ストレス負荷の直前、直後の2回のみアマラーゼ、クロモグラニンA濃度を測定しても、被験者があらかじめ急性ストレスを受けることを認識していれば、それが心理的ストレスとなり、急性ストレス負荷の直前にはすでに平常時に比べて濃度が上昇していることが予想される。この場合、ストレスのない平常時の濃度が不明であるため、正確なストレス評価は不可能であると考えられる。また急性ストレス負荷後数分以内にコルチゾール濃度を測定しても濃度の上昇がまだ起こっていないことが予想されるし、急性ストレス負荷から20分から30分以上経過後にクロモグラニンA濃度を測定してもすでに平常時に近い水準まで濃度が低下している可能性がある。そのため、測定するストレスマーカーの種類によって適切な唾液採取時期は異なると考えられ、採取時期を十分に考慮しない方法での正確なストレス評価を困難なものにしているものと思われる。

4. ストレスマーカー基準値の個人差について

個人ごとにストレスに対する反応は異なると言われており²²⁾、ストレスマーカー濃度の変動についても、個人差が生じる要因は明らかにされていない。本研究では、ストレス負荷前におけるアマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度が高値を示す被験者は、これら全てのストレスマーカー濃度の変化が少ないことが明らかとなった。つまり個人間のストレスの大きさをストレスマーカー濃度の高低によって単純に比較することは困難と考えられる。ストレスマーカーの基準値が高値の被験者はすでに他の慢性的なストレスの影響を受けていて、ストレス応答系がすでに活性化されているため、それ以上の濃度上昇が起こりに

くい可能性がある。あるいは、両群において、抱えている慢性ストレスの大きさに相違がないと仮定する場合でも、個人毎のストレスに対する感受性の違いも考慮する必要がある。本研究により、少なくとも慢性ストレスあるいは恒常的なストレスマーカー濃度の違いそのものが生体の急性ストレスに対するアマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動に、個人差を生じる要因の一つであることが示唆された。

また、歯科治療前後のクロモグラニンAはアマラーゼ、コルチゾールに比べて個人ごとの濃度のばらつきが特に大きいことがわかった。この原因として、クロモグラニンAは唾液含有量がpmol/ml単位の微量物質であり他の唾液中ストレスマーカーに比べると採取、測定に熟練を要するばかりでなく、ストレスに対する反応の鋭敏さ⁴²⁾ゆえにストレス負荷からの経過時間の影響を強く受けた可能性がある。歯科治療は治療部位や治療内容、歯科疾患の重篤度によりチェアタイムの長さが異なり、またチェアタイムのうちどの時間帯に強いストレスを伴う処置を行うかも様々である。しかし、治療中に連続的に唾液を採取することは容易ではなく、唾液クロモグラニンAを歯科治療におけるストレス指標として用いるには困難が伴うと考えられた。

5. 歯科治療はストレスになるか

歯科治療前後の唾液アマラーゼおよびコルチゾール濃度は再診2日目の診療前後において、初診日診療前と比較して有意に低下 ($p < 0.05$) していることがわかった。上り口らの報告²⁴⁾にあるように、初診時は歯科治療への不安や恐怖、歯科疾患をもつ悩みが強いストレスであり、受診を重ねるごとにそれらのストレスが緩和していく可能性があると考えられる。

拔牙を受けた患者の唾液中アマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の変動から、拔牙が生体にストレスとして作用したことが示唆された。拔牙時には歯肉浸潤麻酔の影響を考慮する必要があるが、歯肉浸潤麻酔による疼痛刺激は、唾液中ストレスホルモン濃度を上昇させるほど大きなストレスではないとされている^{23, 29, 43)}。本研究においても拔牙以外の症例において歯肉浸潤麻酔を行った処置が12例(10名)あり、アマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンAはこれらの処置前後において、初診日診療前と比較して有意差を認めなかったことから、これらの濃度上昇は拔牙によるところが大きく、拔牙はそれだけで強いストレスとなりうると考えられる。

TBI, PMTCによるアマラーゼ、コルチゾール、クロモグラニンA濃度の有意な低下は治療自体のストレス軽減効果と受診回数を重ねたことによる影響の両方が考えられる。過去の研究では、森林浴^{44, 45)}や温泉への入浴⁴⁶⁾、ヒーリングミュージック¹³⁾、リラクゼーション効果を期待出来る映像^{20, 21)}によるストレス軽減効果が報告されている。歯科

治療においても疼痛や恐怖を伴わず、患者に対し快適さを与える口腔清掃等の処置は、それ自体にストレス軽減効果があることが示唆された。

6. 唾液中ストレスマーカーによるストレス評価の臨床応用の可能性

TBI, PMTC など口腔衛生の分野で快適さを与えると考えられる治療においては治療自体にストレス軽減効果があると考えられる。特に寝たきり高齢者や重度の障がい者等、自身による口腔清掃が困難な者はその効果が高いことが予想される。ストレスマーカー濃度測定によりストレス軽減効果を数値化することが可能であると考えられ、近年重要視されつつあるメンタルヘルスの観点からも歯科医療の新しい役割が生まれる可能性がある。

様々な歯科処置に対して、歯科医師の想像するストレスと患者が感じるストレスは異なる⁴⁷⁾。さらに、患者が感じるストレスを術者が認識出来ないまま治療を続けると、心因性ショック等の異常な状態が招来される場合もある^{9,23)}。抜歯など侵襲が高くストレス負荷のある治療においては、ストレスマーカー濃度測定により治療前から治療後にかけて、どの程度のストレスを患者に与えたかを評価可能であると考えられる。従来から行われている血圧や心拍数といった循環モニタリング装置を用いた手法との併用により、より正確なストレス評価が可能となり、インフォームド・コンセントの質やストレスを与えにくい治療環境の追求が可能になると考えられる。

舌痛症、口腔乾燥症、顎関節症などはストレス関連疾患とされ、ストレスの軽減により軽快する可能性も高いが、その診断は今のところ問診によるしかない⁴⁸⁾。逆に、これらの疾患がストレスであり、患者にとって肉体的にだけでなく精神的にも大きな負担であると考えられる。唾液中ストレスマーカー測定によりストレス由来のものかどうかを診断可能となったり、患者本人が感じる疾患の重篤度や症状の改善度合いを評価することが出来れば、治療方針を決定する上での客観的指標となり、治療効果の確認にも応用可能であり、その臨床的意義はきわめて大きい。この場合、慢性ストレスの評価を行うことが重要である。本研究における高濃度群の被験者が慢性ストレスにさらされている可能性はあるものの、マーカー濃度の変動が乏しいという結果を得たのみであり、今後、慢性ストレスを自覚している者や、一般に強いストレスを受けるとされる失業や離婚、配偶者の死等のライフイベントを経験した者のみを対象に実験をおこない、ストレスマーカー濃度の特性を分析する必要がある。本研究でストレスマーカーとして対象としたものの他に、唾液中の sIgA⁴⁹⁾ やヘルペスウイルス量⁵⁰⁾ をストレスマーカーとして用いた報告があり、これらの免疫系の抑制を唾液を用いて測定する手法は慢性ストレスの評価に役立つものと考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に御協力、御援助を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔生理学教室、ならびに口腔健康科学講座高齢者歯科学教室および予防歯科学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行う機会を与えて頂き御指導頂いた、現岡山大学大学院医歯薬学総合研究科予防歯科学分野の森田学教授に心より感謝致します。

文 献

- 1) Cannon WB: The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. *Am J Physiol* 33 : 356-372, 1914.
- 2) Selye H: A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138 : 32, 1936.
- 3) 川村則行, 宮崎隆穂, 酒見正太郎, 中田光紀: 精神と免疫, *Brain Medical*, 15 : 367-372, 2003.
- 4) 片山善章: 酸化ストレス, *生体試料分析*, 32 : 245-246, 2009.
- 5) Winkler H, Fischer-Colbrrie R: The chromogranins A and B: the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience* 49 : 497-528, 1992.
- 6) Kanno T, Asada N, Yanase H, Iwanaga T, Yanaihara N: Salivary secretion of chromogranin A. Control by autonomic nervous system. *Adv exp med biol* 482 : 143-151, 2000.
- 7) Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, Ellman AB, Hudgens GA: Salivary alpha-amylase as a measure of endogenous adrenergic activity. *Clin Physiol* 16 : 433-448, 1996.
- 8) Helle KB, Aunis D, Dominique A: A Physiological role for the granins as prohormones for homeostatically important regulatory peptides? A working hypothesis for future research. *Adv exp med biol* 482 : 389-397, 2000.
- 9) 国分正廣, 久保田康耶: 歯科治療時のストレスと内分泌, *歯科ジャーナル*, 8 : 609-615, 1978.
- 10) 前多敬一郎: 日本比較内分泌学会編, ストレスとホルモン. 初版. 東京. 学会出版センター, 1-5, 1997.
- 11) 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*, 36 : 23-32, 2009.
- 12) Davis J, Morrill R, Fawcett J, Upton V, Bondy PK, Spiro HM: Apprehension and elevated serum cortisol levels. *J Psychosom Res* 6 : 83-86, 1962.
- 13) 貫 行子, 吉内一浩, 野村 忍: ヒーリング・ミュージックのストレスホルモンへの効果—心理学的調査と

- 内分泌学的実験を通して, 日本音楽療法学会誌, 3 : 64-70, 2003.
- 14) Sakuma N, Nagasaka N: Changes in urinary excretion of catecholamines and their metabolites in pediatric dental patients. *J Dent child*. 63 : 118-122, 1996.
- 15) Morse DR, Schacterle GR, Furst ML, Esposito JV, Mark Zaydenburg: Stress, relaxation and saliva: relationship to dental caries and its prevention, with a literature review. *Ann Dent* 42 : 47-54, 1983.
- 16) Chatterton RT Jr, Vogelsong KM, Lu YC, Hudgens GA: Hormonal Responses to Psychological Stress in Men Preparing for Skydiving. *J Clin Endocrinol Metab* 82 : 2503-9, 1997.
- 17) Nater UM, La Marca R, Florin L, Moses A, Langhans W, Koller MM, Ehlert U: Stress-induced changes in human salivary alpha-amylase activity--associations with adrenergic activity. *J psyneuen* 31 : 49-58, 2006.
- 18) 山口昌樹: 唾液マーカーでストレスを測る, 日本薬理誌, 129 : 80-84, 2007.
- 19) 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, 日本補完代替医療会誌, 4 : 91-101, 2007.
- 20) 荒垣聡亮: 唾液中アマラーゼとコルチゾルによる心理ストレスの評価, *Jpn J Oral Diag. Oral Med* 16 : 362-370, 2003.
- 21) Takai N, Yamaguchi M, Aragaki T, Eto K, Uchihashi K, Nishikawa Y: Effect of psychological stress on the salivary cortisol and amylase levels in healthy young adults. *Arch oral biol* 49 : 963-968, 2004.
- 22) Roy MP, Kirschbaum C, Steptoe A: Psychological, cardiovascular, and metabolic correlates of individual differences in cortisol stress recovery in young man. *Psychoneuroendocrinology* 26 : 375-391, 2001.
- 23) 大村満晴, 假谷直之, 西村美智子, 小田和子, 前田有実, 岡崎好秀, 嶋本達家, 松村誠士, Peter K. Domoto, 下野 勉: 歯科恐怖に関する研究, 岡山歯学会雑誌, 6 : 71-75, 1987.
- 24) 上り口晃成, 井上 宏, 森本兼曩: 唾液コルチゾール濃度分析を用いた歯科処置時のストレス評価, 歯科医学, 66 : 48-54, 2003.
- 25) 平尾彰規, 野崎中成, 大東道治: 唾液 α -アマラーゼの定量による小児患者の歯科治療におけるストレスの評価, 小児歯科学雑誌, 44 : 573-580, 2006.
- 26) Richard FW, Riad-Fahmy D, Read GF: Adrenal Status Assessed by Direct Radioimmunoassay of Cortisol in Whole Saliva or Parotid Saliva. *Clin Chem* 24 : 1460-1463, 1978.
- 27) Hucklebridge F, Clow A, Evans P: The relationship between salivary secretory immunoglobulin A and cortisol: neuroendocrine response to awakening and the diurnal cycle. *Int J Psychophysiol* 31 : 69-76, 1998.
- 28) 井澤修平, 鈴木克彦: 唾液中コルチゾールの測定キットの比較, 日本補完代替医療会誌, 4 : 113-118, 2007.
- 29) 上り口晃成, 青木誠喜, 森田真功: 歯肉浸潤麻酔が唾液中のコルチゾールおよびクロモグラニンAの濃度に及ぼす影響, 歯科医学, 65 : 248-254, 2002.
- 30) 秋本崇之, 香田泰子, 赤間高雄, 柳川真美, 龍野美恵子, 杉浦弘一, 柿山哲治, 前田清司, 河野一郎, 松田光生: 一過性運動負荷による唾液中分泌型IgAの変動, 体力科学, 46 : 523-528, 1997.
- 31) Shirtcliff EA, Granger DA, Schwartz E, Curran MJ: Use of salivary biomarkers in biobehavioral research: cotton-based sample collection methods can interfere with salivary immunoassay results. *Psychoneuroendocrinology* 26 : 165-173, 2001.
- 32) Bartrop RW, Luckhurst E, Lazarus L, Kiloh LG, Penny R: Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet* 1 : 834-836, 1977.
- 33) Schleifer SJ, Keller SE, Camerino M, Thornton JC, Stein M: Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *Jama* 250 : 374-377, 1983.
- 34) 平野鉄雄, 新島 旭: ストレス概論, 脳とストレス—ストレスにたちむかう脳, 2-43, 共立出版, 東京, 1995.
- 35) 山岡昌之: ストレスと心身症. 臨床病理, 45 : 27-31, 1997.
- 36) 深田順一: ストレスとからだ—細胞からヒトへ. 前多敬一郎, 森裕司, 東村博子責任編集, からだの中からストレスをみる, 18-37, 学会出版センター, 東京, 2000.
- 37) 下田平貴子, 瀬戸口尚志, 町頭三保, 和泉雄一: 精神的ストレスおよび自己効力感が歯周病の進行・再発に与える影響に関する臨床評価, 日歯周誌, 48 : 174-181, 2006.
- 38) Choi J, Fauce SR, Effros RB: Reduced telomerase activity in human T lymphocytes exposed to cortisol. *Brain Behav Immun* 22 : 600-605, 2008.
- 39) Ryugo C, Hohashi N: Effect of Nursing Interventions on Parents of Children Who Had Blood Drawn: Enhancing Parents' Sense of Efficacy of Support and Reducing Stress in Parents and Children. *J Jpn Soc Nurs Health Care* 10 : 8-19, 2008.
- 40) Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY: Salivary cortisol: a better measure of adrenal cortical function than serum cortisol. *Ann Clin Biochem* 20 : 329-335, 1983.
- 41) 中根英雄: 新規精神的ストレス指標としての唾液中クロモグラニンA, 豊田中央研究所R&Dレビュー, 34

- : 17-22, 1999.
- 42) 長澤晋吾：新しいストレス検査，日本未病システム学会雑誌，9：137-139，2003.
- 43) Craig SM, Jeffrey BD, Donald AF, Alan LK, Lexington KY: Salivary cortisol response to dental treatment of varying stress. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79 : 436-441, 1995.
- 44) 小崎智照，石橋圭太，堀之内和彦，野口朱里，橋富加奈，安河内朗：森林浴が生理反応へ与える影響，日本生気象学会雑誌，44：105-110，2008.
- 45) 小山泰弘，高山範理，朴範鏡，香川隆英，宮崎良文：森林浴における唾液中コルチゾール濃度と主観評価の関係，日本生理人類学会誌，14：21-24，2009.
- 46) Toda M, Morimoto K, Nagasawa S, Kitamura K: Change in salivary physiological stress markers by spa bathing. *Biomed Res* 27 : 11-14, 2006.
- 47) 間宮秀樹，一戸達也，金子 譲：歯科治療のストレス評価 患者はどの治療がいちばん怖いのか，日本歯科麻酔学会雑誌，24：248-254，1996.
- 48) 永田頌史：ストレス関連疾患の発症・経過に影響する心理社会的ストレス，治療，91：11-15，2009.
- 49) Ng V, Koh D, Mok BY, Chia SE, Lim LP: Salivary Biomarkers Associated with Academic Assessment Stress among Dental Undergraduates. *J Dent Educ* 67 : 1091-1094, 2003.
- 50) 近藤一博：唾液中のウイルス測定による疲労評価法，日本未病システム学会雑誌，12：19-21，2006.

ORIGINAL

Analysis of fluctuations of stress markers in saliva

Takaari Kodama^{1,5)}, Takae Abe²⁾, Takashi Kanehira³⁾, Manabu Morita⁴⁾ and Makoto Funahashi⁵⁾

ABSTRACT : Recently, there has been reports of using salivary amylase, cortisol, and chromogranin A as stress markers. However, the relationship between stress and these biomarkers in saliva is not fully understood. The present study attempted to clarify the fluctuations in these markers caused by blood drawing and dental treatments. Saliva samples were collected from a total of 61 healthy males, using an intra-individual repeated measures design. The blood drawing was made from the cubital vein (n=30), tooth extraction (n=5), or dental treatments other than tooth extraction (n=26). The change ratios of salivary amylase, cortisol, and chromogranin A was analyzed before and after each stimulation. Amylase and chromogranin A have shown significant increases before drawing blood, suggesting that these ratios react to psychological stress. Subjects were divided into two groups according to the differences in the control levels of each stress marker at the first day of collecting saliva with no drawing of blood. The group displaying higher concentrations of stress markers showed no significant changes in the concentration of the markers, while the group displaying lower concentrations of stress markers showed significant changes in the concentration of the markers. This suggests that the stress markers may be saturated in saliva. Dental treatment caused significant decreases in the concentration of amylase and cortisol at the time of re-visits, when compared with that at the initial visit, although tooth extraction caused significant increases in the concentration of amylase and cortisol. These results suggest that anxiety and fear at the first examination had been reduced at the following visits, and tooth extraction was considered to act as a powerful stressor. Based on these results, the usefulness of salivary stress markers as an objective index of psychological stress is discussed.

Key Words : stress, saliva, amylase, cortisol, chromogranin A

¹⁾ Department of Preventive Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine. (Chief: Associate Prof. Okahito Honda) N13W7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾ Department of Geriatric Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine. (Chief: Prof. Nobuo Inoue)

³⁾ Comprehensive conservation Dentistry, Dental Clinical Division of Hokkaido University Hospital. (Chief: Department Director. Noboru Ohata) N14W5, Kita-ku, Sapporo, 060-8648, Japan

⁴⁾ Department of Oral Health, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences. (Chief: Prof. Manabu Morita) 2-5-1, Sikata-cho, Kita-ku, Okayama, 700-0914, Japan

⁵⁾ Department of Oral Physiology, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine. (Chief: Prof. Makoto Funahashi)