

## マイクロチップ電気泳動技術を用いたオンサイト唾液ストレス計測システムの開発

田中喜秀\*, 鳴石奈穂子

**Development of an On-site Measurement System for Salivary Stress-related Substances Based on Microchip Capillary Electrophoresis Technology**

Yoshihide TANAKA\* and Nahoko NARUISHI

*Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 1-8-31 Midorigaoka, Ikeda City 563-8577, Japan*

(Received July 29, 2008)

Psychological stress is of major importance to all age groups in recent years, and may lead to mental disorder and various diseases. An objective and quantitative method for measuring salivary stress-related substances is highly desired because saliva collection is easy, stress free and noninvasive. We have developed a rapid and easy-to-use analytical tool for the measurement of cortisol and secretory immunoglobulin A (sIgA) based on microchip technology, immunoselectivity and electrophoretic separation technique. Performing immunoreaction and capillary electrophoresis (CE) separation on microchips is a promising technique for on-site determination of biogenic substances, and has a few advantages over conventional immunoassay methods: reduced sample size, shortening analysis times, high separation efficiency, reduced cost, and downsizing of analytical system. At this stage of our research, some preliminary prototypes of a high-sensitive microchip CE instrument were constructed to determine the stress-related substances in real saliva samples. However, there is not enough detection sensitivity for cortisol analysis. On the other hand, sIgA was successfully analyzed using a laboratory-built microchip CE system and optimal analytical conditions. The sIgA determination is rapid compared with a conventional immunoassay method, and provides an acceptable degree of repeatability and recovery. In the future, microchip technologies will enable total automation and integration of sample preparation. This research has widespread future potential for monitoring multiple stress-related markers within minutes from a trace of saliva, and can contribute to disease prevention and overall good health.

**Key words**—microfluidic analytical system; stress measurement; saliva; cortisol; secretory immunoglobulin A; immunocapillary electrophoresis

**1. はじめに**

現代社会では、仕事や勉強、職場・学校・近隣での人間関係、個人や家庭の諸問題等々、様々なストレス要因（ストレッサー）が蔓延しており、多くの人が精神的ストレスを抱えていると思われる。過度なストレスにさらされて心身症、神経症、うつ病などに罹り、残念ながら自殺という最悪のケースに至る方も少なくない。また、精神障害による疾病休業の推定逸失利益（賃金ベース）は国内で約1兆円にのぼり、医療費、周囲のケアに伴う労務費、軽症の精神障害の存在などを考えると国や企業の損失は

さらに膨らむと言われている。急速に少子高齢化社会を迎え、介護ストレスなども社会問題化しつつあり、あらゆる世代でのメンタルヘルス対策が急務である。

ストレス評価では、問診や質問紙法による心理的評価法が一般的な方法である。しかしながら、客観的な方法による精神的ストレスの定量化・指標化は社会ニーズとして高く、心拍変動や脳波などの生体信号変化を捉える生理学的評価法や、血液・尿・唾液中の生理活性物質を測定する生化学的評価法などの研究開発が進められている。その中で、血液の生化学的検査は、病気の診断、治療、早期発見や予防にいまや不可欠な存在ではあるが、穿針採血そのものがストレス負荷となり、ストレス診断に限れば、正しく評価できないことが危惧される。また、ストレス評価は病気の診断・検査のように必ずしも病院

舩産業技術総合研究所健康工学研究センター（〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31）

\*e-mail: yoshihide-tanaka@aist.go.jp

本総説は、日本薬学会第128年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

で行うものではなく、日常生活の場（オンサイト）で簡便・迅速・非侵襲的に測れることも重要な要素であり、生化学的評価法ではストレスフリーで簡単に採取できる唾液への注目度が特に高い。

昨今のマイクロ・ナノテクノロジーの進展に伴い、分析化学分野でも迅速化・高精度化、システムの小型化などで急速な技術革新が進みつつある。半導体微細加工技術を利用したマイクロチップ（マイクロ流体チップ、マイクロ化学チップ、ラボチップ（Lab-on-a-chip）、Micro Total Analysis Systems ( $\mu$ TAS) とも呼ばれているが、ここでは「マイクロチップ」と称することにする）がその1であり、最先端の研究から多くの基盤・要素技術が蓄積され、バイオ・医療・健康・環境・食品など様々な分野への応用展開が図られている。マイクロチップとは、Fig. 1のようにガラスやプラスチックの基板の上に $\mu$ mオーダーの溶液が流れる微小流路を形成したもので、このマイクロ空間内を利用して、溶液の混合、反応、精製、分離、検出などの様々なプロセスを効率的かつ自動的に実行する。省サンプルで迅速分析が可能となり、特にオンサイト臨床診断やバイオ計測分野で「次世代の分析ツール」として期待が大きい。われわれは、唾液中のストレス指標物質であるコルチゾールと分泌型イムノグロブリンA (sIgA) を対象に、このマイクロチップ技術を利用したオンサイト計測システムの開発に取り組み、チップデザイン設計に加え、免疫測定法と電気泳動分離原理を組み合わせた分析メソッドを構築し、実唾

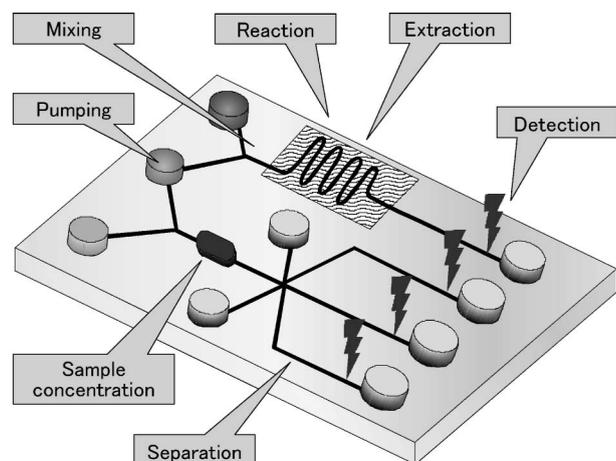


Fig. 1. Schematic Illustration of a Concept of Integrated Microchip

液での測定を可能とした。<sup>1,2)</sup> sIgA 分析を中心に、実用化・製品化を目指して積極的に進めており、現在の開発状況を含めて紹介する。

## 2. ストレスの生理的メカニズム

ストレス応答とは、外界からの刺激（ストレッサー）によって生体の諸バランスが崩れた際に、これを回復させる生体の諸反応である。様々なストレス応答の基盤になるのは、自律神経系である「視床下部-交感神経-副腎髄質系（SAM系）」、内分泌系である「視床下部-下垂体前葉-副腎皮質系（HPA系）」、並びに生体機能調節系である「免疫系」の変化と考えられている。SAM系が活性化されると血液中にカテコールアミンが放出され、血圧上昇、発汗、血糖上昇、覚醒、戦闘態度などの基礎反応が導かれ、ストレスに対抗する。一方、HPA系が活性化されると血液中に糖質コルチコイドが放出され、血圧上昇、血糖上昇（糖新生の増加）、心収縮力の上昇、心拍出量の上昇を導くとともに、カテコールアミンの作用に対しても補助的な役割を示す。糖質コルチコイドの1つであるコルチゾールは、ストレスに敏感に反応して分泌量が増加する生体防御ホルモンであり、ストレスホルモンとも言われている。もう1つの免疫系では、生体の情報伝達制御機構である自律神経系と内分泌系の影響を強く受け、慢性ストレスによって感染抵抗性が低下したり、リンパ球の反応性やナチュラルキラー細胞の活性が低下するというストレスに対する免疫機能への影響が報告されている。<sup>3)</sup> このように、ストレスにより物質濃度や活性が変動すると思われる成分を、ストレス指標物質とすることにする。

## 3. 唾液の分泌と神経支配

唾液は、主に耳下腺、顎下腺、舌下腺の3大唾液腺から分泌され、これに多数の小唾液腺からの分泌物などが加わり、口腔内で混合されて全唾液となる。唾液腺では体液をもとに分泌液（原唾液）が生成され、血液中の電解質に加え、例えばストレス指標物質であるコルチゾールも能動輸送により移行する。<sup>3)</sup> 血液の中ではコルチゾールの大部分はタンパク質に結合して存在するが、唾液中のコルチゾールはほとんどが遊離型であり、その濃度は血液中の遊離型コルチゾール濃度との相関関係が認められている。<sup>4,5)</sup> 一方で、アミラーゼやムチンなどのタンパク質は唾液腺にある腺房細胞の分泌顆粒に含まれ、開

口分泌によって腺腔内に放出されると言われている。唾液腺の種類によって腺房細胞に含まれるタンパク質が異なり、例えば耳下腺はアミラーゼを多く含んだ粘性の低い唾液を分泌するのに対し、顎下腺や舌下腺はムチンを含んだ粘性の高い唾液を分泌する。sIgA や成長因子などは、唾液の輸送路を形成する導管細胞から分泌される。<sup>6)</sup>

唾液腺は自律神経によって二重支配を受けており、ストレス応答により唾液の分泌量や構成成分などが影響する。他の臓器と異なり、唾液腺は交感神経系及び副交感神経系のいずれの活動亢進でも分泌機能が促進され、交感神経系ではアミラーゼやムチンなどを主成分とする粘性の高い唾液が分泌され、副交感神経系では主として水や電解質からなる粘性の低い唾液が大量に分泌される。

#### 4. 唾液中のストレス指標物質

**4-1. 自律神経系** カテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン）は交感神経系の直接的な指標であり、ストレス評価では古典的に用いられてきた。ストレス応答により血液中にカテコールアミンが放出されると、唾液中にも能動輸送されると考えられる。しかしながら、唾液中のカテコールアミン濃度は極めて低いため（数十～数百 pM 以下）、検出するには超高感度な測定法が必要となる。<sup>7)</sup> また、仮に全唾液からカテコールアミンが検出できたとしても、歯周病等による血液混入による血液由来のカテコールアミンの可能性は否定できず、加えてカテコールアミンは唾液中ですぐに分解が始まることもあり、全唾液では正確に定量できないことが予想される。そこで、カテコールアミンに代わるストレス指標物質の探索が進められ、クロモグラニン A が抽出された。<sup>8)</sup> 血液中へカテコールアミンと共に放出されると言われており、SAM系の活動を示す指標とすることができる。ただし、この系は運動負荷時にも活性化されるため、血液中のクロモグラニン A 濃度では運動負荷の影響を考慮する必要がある。一方、唾液中のクロモグラニン A は運動負荷のみで明確な変化を示さず、精神的ストレスにのみに反応すると言われている。このことから、唾液中のクロモグラニン A は血液中から移行したものでなく、顎下腺導管部に存在するクロモグラニン A が、自律神経刺激により唾液中に放出されていると考えられている。<sup>9)</sup>

自律神経系が関与しているもう1つのストレス指標物質として、唾液アミラーゼ ( $\alpha$ -アミラーゼ) が挙げられる。唾液アミラーゼは、交感神経系の直接神経作用などにより分泌され、ストレスにより濃度が増加すると考えられている。<sup>10)</sup> 唾液中に最も多く含まれる酵素で、分析し易いこともあり、SAM系の神経活動を簡易にリアルタイムに評価する新しい指標として期待されている。

**4-2. 内分泌系** HPA系の活動亢進の指標としては、コルチゾールが有名であり、カテコールアミンとともに古典的なストレス指標として広く用いられてきた。コルチゾールは副腎皮質束状層から分泌される糖質コルチコイドの1つで、血液中の遊離型コルチゾールは濃度相関的に唾液中へ移行し、特に精神的・身体的な急性ストレスに対して濃度が数倍にも上昇する。唾液中のコルチゾールに対する免疫測定キットも市販されており、コルチゾールを指標としたストレス研究の報告は非常に多い。<sup>5,11)</sup> なお、分泌は副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) によりコントロールされているため、早朝に高く午後から低いという日内リズムをもつ。本研究を進めるにあたって、われわれも唾液中コルチゾールの日内変動や学生の卒業論文・修士論文発表会時の精神的ストレス (プレゼンテーションストレス) に対する影響について検証した。本被験者実験は、(独)産業技術総合研究所倫理委員会の承認を得て、日内変動実験は研究所内の職員4名、プレゼンテーションストレス実験は8名の学生に対して実施した。採取した唾液は、Salimetrics社製のコルチゾール測定用免疫測定キット (Expanded Range High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, Cat. No. SAL1-3012) で測定した。Fig. 2にはコルチゾールの日内変動結果を、Fig. 3にはプレゼンテーションストレスによるコルチゾール濃度の上昇例を示す。コントロール実験として、8名の学生が普段の学生生活を送った日 (発表会当日から36-56日前並びに6-18日後) に唾液を測定したが、発表会と同時刻でのコルチゾールの上昇は認められず、プレゼンテーションの緊張によりコルチゾール濃度が上昇することは明白であった。

**4-3. 免疫系** 口腔は外界からの異物に対して最前線にあり、粘膜免疫機構のはじまりの場である。唾液はその中心的な役割を担っており、sIgA

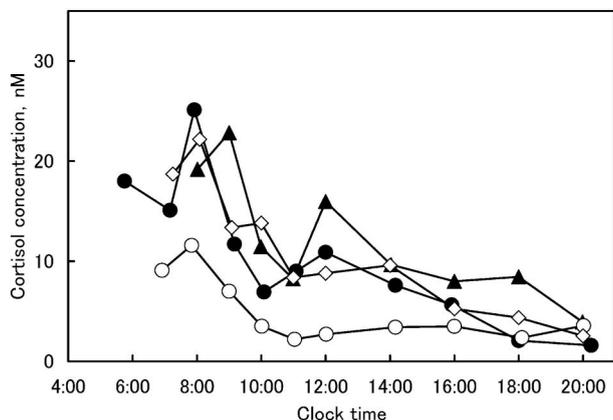


Fig. 2. Circadian Rhythm of Salivary Cortisol in Healthy Four Volunteers

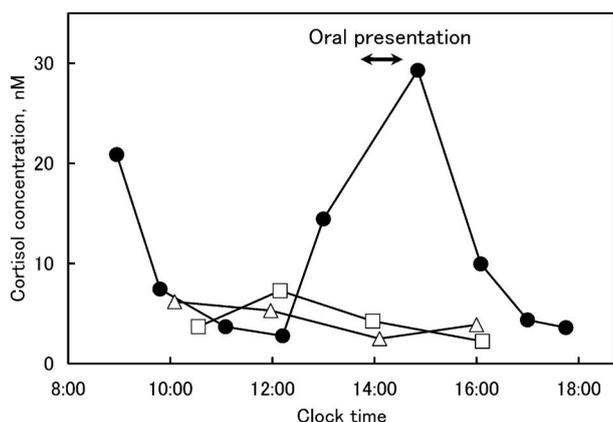


Fig. 3. Effects of Acute Psychological Stress on Salivary Cortisol Levels

Closed circles indicate the data on the academic oral presentation day. Open squares indicate 56 days before the presentation and open triangles 6 days after the presentation.

をはじめ、リゾチーム、ラクトフェリン、ヒスタチンなどの免疫、殺菌・抗菌成分が多数含まれている。<sup>6,12)</sup>その中で、われわれは sIgA に着目した。

sIgA は、口腔、鼻腔、消化管などの粘膜上の粘液中に存在し、粘膜局所の免疫機構において主たる役割を担っているタンパク質である。また、初乳中にも高濃度の sIgA が含まれ、新生児の感染症防御に重要な役割を果たしていると言われている。唾液中には 50–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  程度の濃度で存在し、血液中に存在する IgA とは形態が異なるため、抗原抗体反応を利用すると唾液中の sIgA を特異的に検出することが可能である。

慢性的なストレスにさらされると、免疫力が低下して感染症に罹り易くなるというのは多くの人々が

経験していると思われる。しかしながら、sIgA のような唾液中の免疫系指標物質と精神的ストレスとの関係を報告した研究は非常にわずかである。<sup>13)</sup> ストレス研究の大半が急性ストレスに対するもので、カテコールアミンやコルチゾールがストレス指標として使われている。慢性ストレスに対するストレス指標の探索は、これからの重要な研究テーマの 1 つであり、sIgA は慢性ストレスの指標として期待している。そこで、オンサイトで簡単かつ迅速に測れるツールを提供できれば、それを多くの方に利用していただき、慢性ストレス指標物質としての実証研究が進むことを期待している。

**4-4. ストレス指標物質の分析方法** 今回提示した唾液中のストレス指標物質は、微量で存在することが多い。そのため、分析コストを度外視して高感度分析装置を利用するか、もしくは特異的かつ高感度な免疫測定法を利用せざるを得ない。唾液アミラーゼに限れば、発色基質を用いた酵素法による測定キットなどが市販されており、約 1 時間で多検体分析が可能である。また、ドライケミストリー方式を採用して約 1 分で測定できる携帯式の分析装置が開発され、<sup>14)</sup> ニプロ(株)から「唾液アミラーゼモニター」という製品名で販売されている。コルチゾール、クロモグラニン A、sIgA などの測定は、特異的抗体を利用した免疫測定キットが市販され、マイクロプレートリーダーやピペッターなどの基本的な装置・設備があれば、実験室レベルで分析可能である。しかしながら、この方法では抗原抗体反応の平衡化に長時間を要することから、総分析時間として数時間以上を、クロモグラニン A に至っては 24 時間以上を必要とする。また、免疫測定キットは多検体同時測定 (30~40 検体) には適しているが、日常生活の場においてストレス評価を目的に、個人に対応させたリアルタイム計測には不向きである。ストレス評価では、唾液アミラーゼモニターのようなオンサイト迅速計測のニーズは高いが、免疫測定法では、操作の簡略化や自動化、精度の向上、免疫反応時間 (分析時間) の短縮化などに限界がある。そこで、今回紹介するマイクロチップ技術が活かされることになる。チップ上に形成された微小の反応場 (微小流路等) を利用することで、サイズの微小化の 2 乗に比例して拡散時間が短くなることから、免疫反応などの反応効率が飛躍的に増大し、分析時

間の大幅な短縮化が期待できる。その上、試料や抗体などの使用量は削減でき、分析コストの低価格化も実現できる。さらに、小さなチップ上に試料前処理、成分濃縮、分離・検出などのプロセスを集積化し、分析の自動化も達成可能となる。われわれは、マイクロチップ上で短時間に抗原抗体反応の平衡化を達成させ、さらに電気泳動原理により高性能な B/F 分離（結合型と遊離型の分離）を行うマイクロチップ電気泳動技術を利用し、sIgA やコルチゾールのオンサイト迅速計測を目標に研究開発を進めた。

### 5. マイクロチップ電気泳動とは

生体成分や薬物代謝物の分離分析手法として、一般的には GC, HPLC などが広く普及しているが、キャピラリー電気泳動 (CE) は特にイオン性成分に対して、GC や HPLC よりも高性能な分離手法として利用されている。CE は、内径 25-100  $\mu\text{m}$  の溶融石英毛细管 (キャピラリー) に電解質溶液 (泳

動溶液) を満たして分離の場とし、キャピラリーの両端に高電圧を印加したときに、溶液中でイオン化している物質がキャピラリー内を異なる速度で移動することで分離を達成する。マイクロチップ電気泳動 (マイクロチップ CE) とは、このキャピラリーに代わって、マイクロチップに形成された微小流路内 (例えば幅 100  $\mu\text{m}$   $\times$  深さ 30  $\mu\text{m}$ ) で同様の電気泳動分離を行う手法で、従来の CE 法の有する特徴 (超微量分析・高分離能) に加え、マイクロ化、高速分析という利点を兼ね備えており、DNA, RNA, タンパク質などの分析を中心に、最近非常に注目を集めている分析技術である。Fig. 4 は、マイクロチップ電気泳動で試料を分析する際の過程を簡単に図式化したものである。

### 6. 唾液ストレス計測システムの開発

6-1. 唾液採取法の検討 唾液の採取用具として、いくつかの製品が既に市販されているが、Sar-

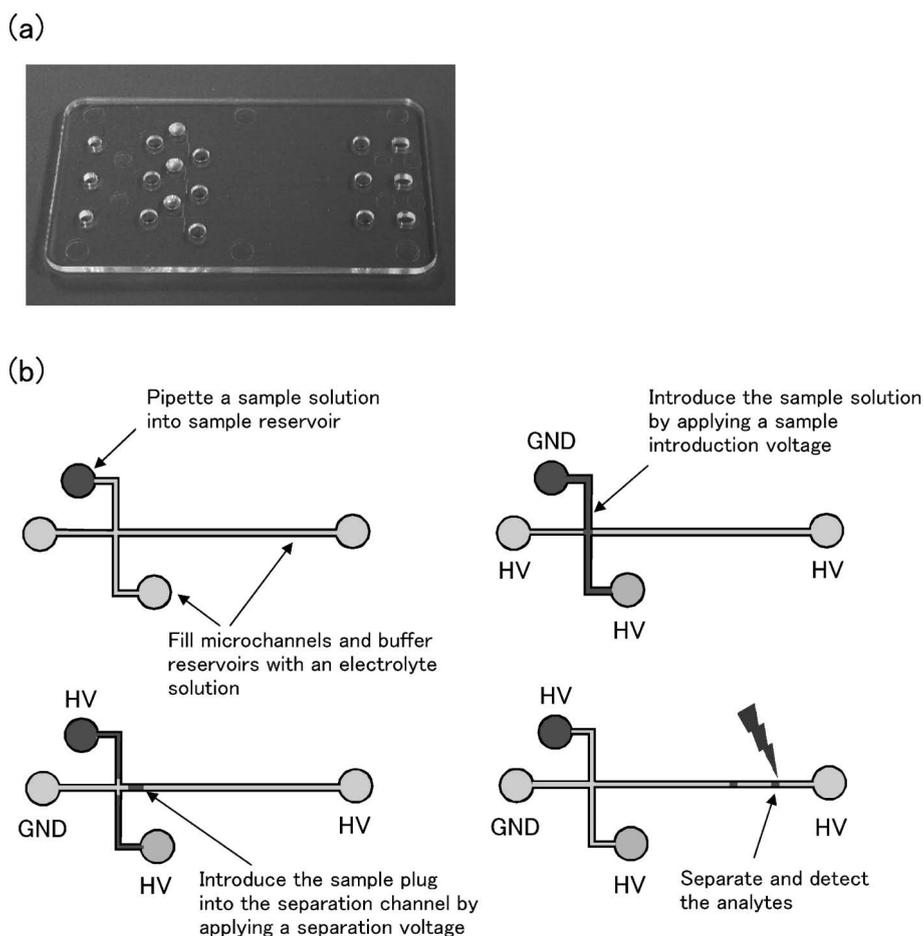


Fig. 4. (a) Photograph of a Developed Microchip for Electrophoretic Separation, and (b) Schematic Illustrations of Experimental Setup, Sample Introduction, Separation and Detection in Microchip CE Analysis

HV: applied high voltage, GND: electrical ground.

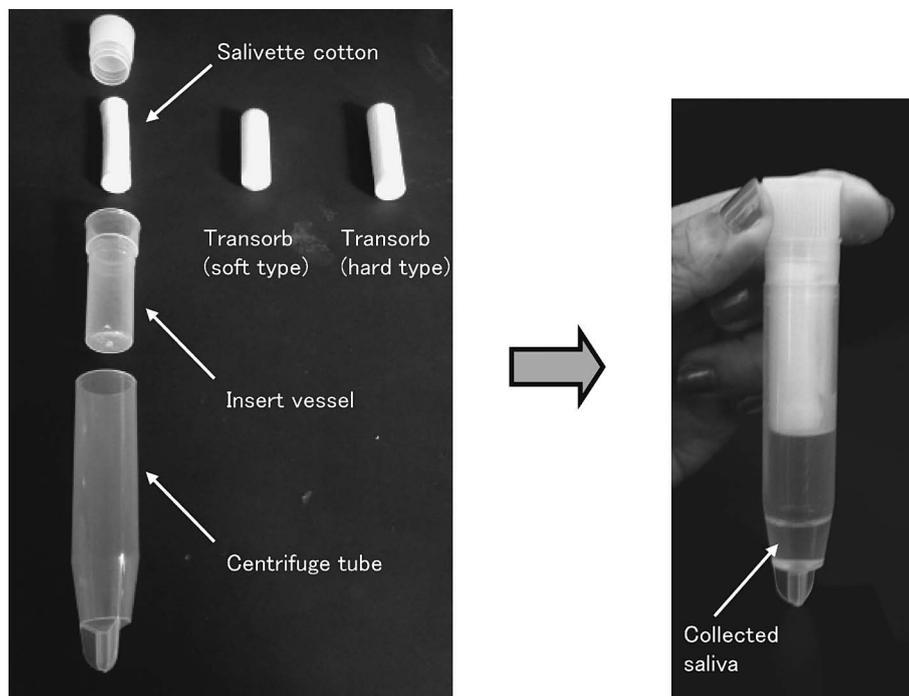


Fig. 5. Photographs of Saliva Sampling Device, Cotton Swabs, and Collected Saliva after Centrifugation

stedt 社のサリベット (Salivette) を利用した研究例が非常に多い。Fig. 5 に示したコットンを舌下に約 1 分間含み、そのコットンを容器に戻した後に遠心分離をすることで、唾液を簡単に回収できる。サリベットは唾液中のコルチゾール測定には適しているが、他のステロイド類では回収率が低下するという報告がある。<sup>15)</sup> また、唾液中のペプチドやタンパク質の測定を目的とした場合、唾液回収用のコットンに吸着して、回収率が低下する可能性も否定できない。そこで、sIgA 分析に適した唾液採取用具を選定するために、疎水性成分やタンパク質の吸着が少ない素材として開発された Filtrona Fibertec 社の Transorb を用いて、sIgA の添加回収実験を行った。唾液を容器に直接吐き出してプールし、これに一定量の sIgA を添加して調製し、コットンを入れた唾液採取容器の上から唾液 1 ml を滴下し、遠心分離後の唾液に対して Salimetrics 社製の sIgA 測定用免疫測定キット (Salivary Secretory IgA Indirect Enzyme Immunoassay Kit, Cat. No. SAL 1-1602) と Pierce 社製のタンパク量測定キット (BCA Protein Assay Reagent Kit, Cat. No. 23227) を用いて、sIgA 濃度と総タンパク量をそれぞれ測定した。その結果、Table 1 のようにサリベットでは sIgA の回収率が低下し、コットンに吸着していることが判

Table 1. Recovery of sIgA Obtained by Direct Collection and by the Use of Different Cotton Swabs

Saliva sampling	Sample <sup>1)</sup>	Recovery <sup>2)</sup> , %	
		sIgA	Total protein
Direct collection	A	115.9	102.3
	B	92.0	98.8
Cotton swab			
Salivette	A	71.0	172.9
	B	72.2	119.1
Transorb soft type	A	102.3	97.3
	B	96.3	93.2
Transorb hard type	A	109.7	99.2
	B	97.9	93.6

1) Pooled saliva spiked with sIgA at different concentrations (A: 186.7  $\mu\text{g/ml}$ , B: 933.3  $\mu\text{g/ml}$ ). Endogenous concentrations of sIgA and total proteins were determined in the pooled saliva (153.66  $\mu\text{g/ml}$  for sIgA and 479.45  $\mu\text{g/ml}$  for total proteins). 2) The percent recovery is calculated by dividing the measured concentration by the expected concentration.

明した。また、総タンパク量の測定では正の誤差を与える妨害物質の溶出が示唆された。一方、Transorb では概ね 100% の回収率が得られ、唾液中の sIgA などを定量するには、このような素材のコットンを選択すべきことが判明した。

**6-2. 分析装置の開発** マイクロチップ電気泳動は、微小空間で分離・検出を達成するために、注入可能試料量も制限され、濃度感度は低いという弱

点がある。また、唾液中のストレス関連物質には微量にしか存在しないものも多く、DNA・RNA分析用に開発された市販のマイクロチップ電気泳動装置では、検出感度が不足していた。そこで、市販のマイクロチップ電気泳動装置であるコスモアイSV1100（日立ハイテクノロジーズ社製）の光源を青色発光ダイオードから青色固体レーザーに変更し、かつ蛍光標識化物質として選定したフルオレセインの蛍光特性に適した光学フィルターに交換することで、フルオレセインとして98倍の高感度化を達成した。これにより、固相抽出カートリッジ（OASIS HLB, Waters社製）を用いて唾液成分を100倍に濃縮すれば、Fig. 6のように実唾液のコルチゾールをかるうじて検出できた。しかしながら、この装置はレーザー光源がむき出しであり、Fig. 6のフェログラムからも励起光の漏洩が認められ、安全性、耐衝撃性などの観点から実用化には程遠いものであった。そこで、これらの問題点を改良し、同等の検出感度でベースラインの安定性も確保したプロトタイプ装置を試作した。

**6-3. マイクロチップ開発と抗原抗体反応の迅速化** マイクロチップの大きな利点は、前述したように免疫反応などの反応効率が飛躍的に増大し、分析時間の大幅な短縮化が期待できることである。われわれは、今回クロス型チップの試料リザーバー内に免疫反応の迅速化機構を組み込んだチップを設計・開発した。まずは対照実験として、通常の免疫測定キットで用いられている液量で反応平衡化時間を確認した。マイクロチューブ内でsIgA抗体溶液20 $\mu$ l、内標を含むsIgA溶液40 $\mu$ l及び人工唾液40 $\mu$ l混合し、反応溶液を一定時間毎に採取して、sIgAと複合体を形成した抗体（免疫複合体）をマイクロチップ電気泳動で分離・測定し、内部標準ピークに対するピーク面積比を求めた。その結果、Fig. 7(a)のように反応の平衡化には少なくとも60分を要することが判明した。市販の免疫測定キットでは反応平衡化時間を90分間に設定しており、今回の結果は妥当と考えた。なお、Fig. 7は対照実験の60–120分におけるピーク面積比の平均値を算出して100%の基準値とし、縦軸には反応率に換算した値をプロットした。次に、開発したチップの試料リザーバーを利用して、免疫反応の迅速化を実証した。4 $\mu$ lの液量で抗原抗体反応を行ったところ、

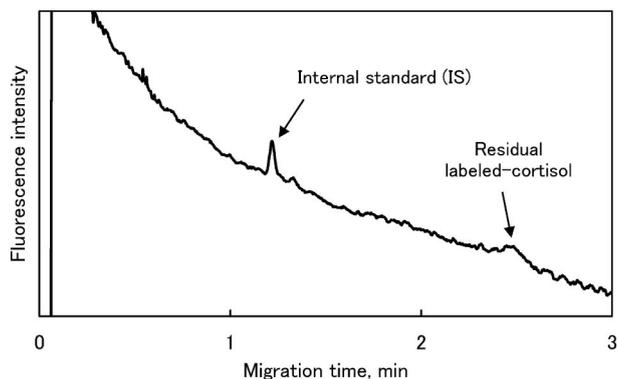


Fig. 6. Analysis of Cortisol in Human Saliva Collected from a Volunteer Using a Microchip-based Immunocapillary Electrophoresis

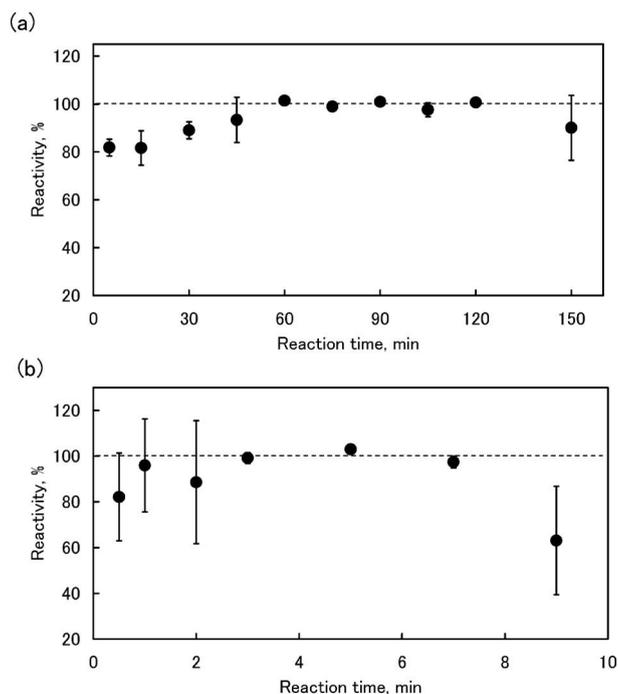


Fig. 7. Equilibrium Curves for the Immunoreaction of SIgA and Antibody (a) Immunoreaction in a 0.6 ml Microcentrifuge Tube, and (b) in a Sample Reservoir of our Developed Microchip

Fig. 7(b)のように約3分で平衡に達し、大幅な迅速化を達成できた。

**6-4. 分析メソッドの開発** 免疫測定法では、免疫複合体と未反応の抗体（もしくは未反応の抗原）を反応容器から分離除去（B/F分離）することが必要である。本法では、試料リザーバー内で反応させた溶液の一部を分離チャンネルに導入し、そこで高精度な電気泳動分離技術を利用して、高いB/F分

離効率を獲得できる。免疫反応として競合法と非競合法とを選択できるが、一般に低分子化合物が結合した抗体と未反応の抗体とでは電気泳動移動度の差がほとんどなく、電気泳動による B/F 分離が難しいことから、コルチゾール分析では一定量の抗体に対して標識抗原と非標識抗原とを競合的に反応させる競合法を採用した。具体的には、Fig. 8(a) のように唾液試料と一定量の蛍光標識化したコルチゾール（標識化コルチゾール）を混合して抗体と反応させ、未反応の標識化コルチゾールを分離・定量することで唾液中のコルチゾール濃度を算出した。唾液中のコルチゾール濃度は 1–50 nM 程度であり、装置での高感度化を図るとともに、分析メソッド開発でも抗体量や競合抗原量を調節して感度向上に取り組んだ。その結果、(Fig. 9) のように 1–10  $\mu\text{M}$  (100 倍濃縮前の唾液として 10–100 nM) で検量線が得られ、Fig. 6 の結果に至った。しかしながら、現状でも検出感度は不十分であり、実用化には更なる高感度化や試料濃縮機構のオンチップ化による濃縮倍率の向上など、いくつかの課題が残されている。

一方、sIgA 分析では非競合法を採用して分析メソッドを開発した。二次抗体を用いるサンドイッチ法ではなく、Fig. 8(b) のように一次抗体として蛍光標識化した抗体（標識化抗体）を用い、sIgA と

の免疫複合体と未反応の抗体とを電気泳動で B/F 分離し、sIgA 濃度を求めた。唾液中の sIgA 濃度は 50–200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  と高く、濃縮等の前処理操作も特に不要で、現在のプロトタイプ装置を用いて Fig. 10 のように測定可能であった。なお、実唾液試料を用いて分析バリデーションを実施したところ、Table 2 のように市販の免疫測定キットと比較しても遜色ない結果が得られた。

**6-6. 免疫測定法との関連** 前述した日内変動実験で採取した 16 検体（被験者 3 名）の実唾液に対して、マイクロチップ電気泳動法と市販の免疫測

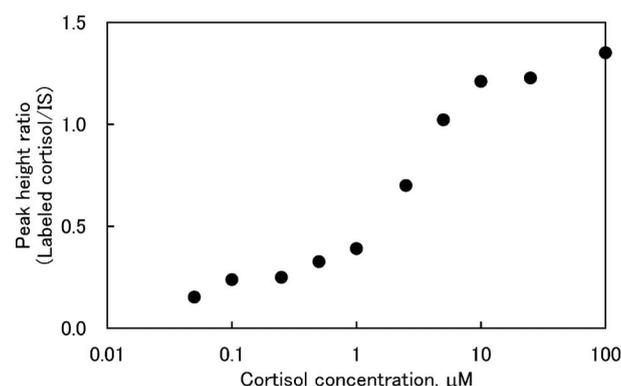


Fig. 9. Calibration Curve Obtained with Different Amounts of Standard (unlabelled) Cortisol  
IS: internal standard.

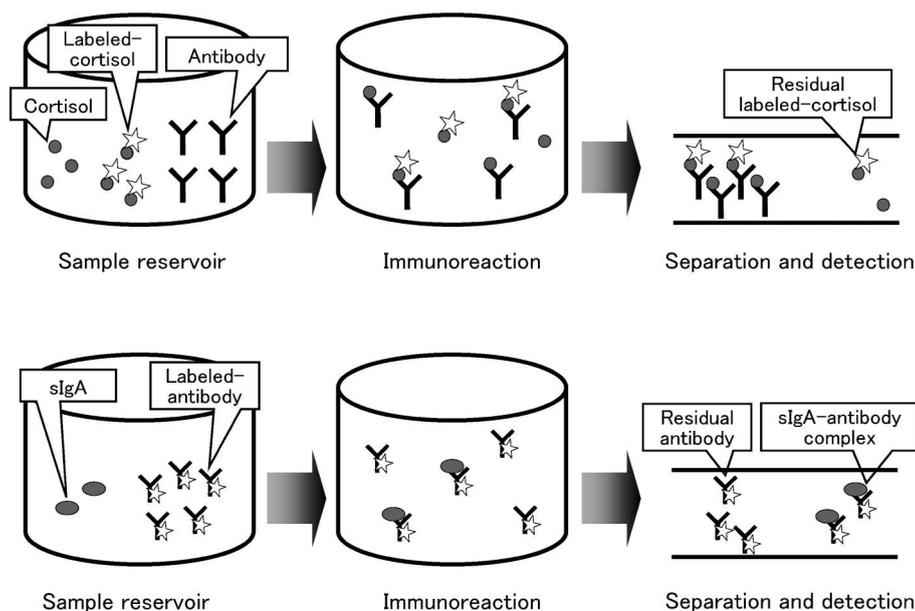


Fig. 8. Schematic Illustrations showing two kinds of Separation Principle for the Analysis of Salivary Stress-related Compounds using a Microchip-based Immunocapillary Electrophoresis

(a) A competition immunoassay for cortisol analysis and (b) non-competition immunoassay for sIgA analysis.

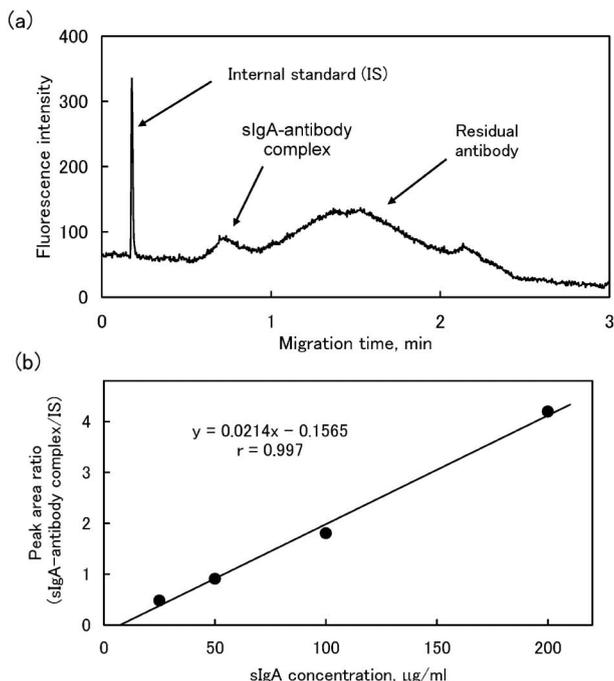


Fig. 10. Analysis of Salivary sIgA using a Microchip-based Immunocapillary Electrophoresis. (a) Representative electropherogram of a saliva sample collected from a volunteer and (b) a linear calibration curve using a commercial sIgA

Table 2. Comparison of Repeatability and Recovery for sIgA Determinations

Analytical method	Repeatability, %	Recovery, %
Microchip CE	5.7-7.1 <sup>a)</sup>	92.2-107.7 <sup>d)</sup>
Immunoassay kit (Product A)	4.5-7.0 <sup>b)</sup>	100.7-115.9 <sup>e)</sup>
Immunoassay kit (Product B)	5.0-9.0 <sup>c)</sup>	101.0-121.4 <sup>f)</sup>

Numbers of samples (N) and analytical replicates per sample (n): a) N=3, n=4. b) N=3, n=10. c) N=2, n=20. d) N=6, n=1. e) N=6, n=2. f) N=8, n=2. Supplier data from catalog is displayed for immunoassay kits.

定キット (Salivary Secretory IgA Indirect Enzyme Immunoassay Kit, Salimetrics 社製) とで測定を行い、分析相関性を検証した。その結果、Fig. 11 のように良好な直線相関は得られたが、両分析法で測定値は乖離していた。それぞれの分析法で使用した抗体が異なるために、唾液中の sIgA に対する親和性や交差反応性の違いが影響したものと考えている。また、チップ法では蛍光標識抗体に結合した唾液中 sIgA を直接測定しているのに対し、キット法では余剰の標識抗体を測定するインダイレクト法を用いており、測定原理が異なることも要因の可能性

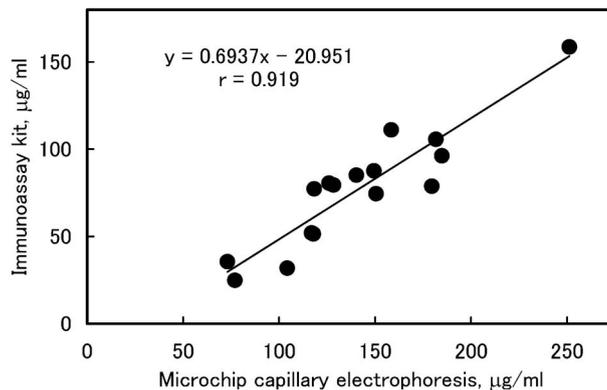


Fig. 11. Comparison between Determinations of sIgA in Human Saliva Obtained by our Developed Microchip CE Method and by a Conventional Immunoassay Method

として考えている。例えば、複数メーカーの市販 sIgA 試薬を用いて、同じ濃度に調製した試料をキット法で同時測定したときに、測定値が合わないという結果をわれわれは獲得している。タンパク質のような高分子では、単一構造の標準物質を利用することができず、sIgA 濃度の真値から測定値を検証することが非常に困難である。今後は、同一の抗体を使用してマイクロチップ電気泳動法と従来の免疫測定キット法との分析相関性を検証し、マイクロチップ電気泳動法の信頼性を高める必要があると考えている。

### 8. おわりに

現代社会ではストレスがもたらす諸問題は深刻であり、非侵襲で採取できる唾液を用いてストレス評価が可能になれば、予防医学や健康産業分野へ大きな貢献ができるものと考えている。急速に少子高齢化が進む中で、医療費削減に加えて、労働生産性を上げることも必然的に求められるようになり、ストレス管理は今後さらに重要性が増すであろう。あらゆる世代の人々が、ストレスに対抗して心の健康を保ち質の高い生活が維持できるように、世の中の仕組みを築き上げていく必要があると思われる。そのなかで、われわれの研究成果が少しでもお役に立てればと願っている。しかしながら、唾液成分によるストレス評価は現時点で確立されたものではなく、いまだ研究段階にあると考えていただきたい。また、ひとつのストレス指標物質で評価するのではなく、複数の指標物質を組み合わせる必要があるかもしれない。多種類の指標物質の同時計測に

際して、「マイクロチップ」という先端技術は大きな可能性を秘めている。進歩を続けるマイクロ・ナノテクノロジーを駆使することによって、小さなチップ上にたくさんの機能を組み込むことが可能となり、唾液1滴から短時間での多項目同時計測を目指したい。

**謝辞** 本研究テーマは、SCIVAX 株式会社及びフジプレアム株式会社との共同研究として実施したものであり、深謝いたします。また、研究遂行にあたり、脇田慎一チーム長、永井秀典研究員をはじめストレス計測評価研究チームのスタッフ諸氏、Filtrona Fibertec 在日事務所の袴田秀雄氏、日本精工株式会社池田憲文氏、日本板硝子株式会社福澤隆氏、古河電気工業株式会社加藤智也氏など、多くの方にお世話になりました。この場を借りて感謝いたします。

#### REFERENCES

- 1) Tanaka Y., *AIST Today*, **6**, 24–25 (2006).
- 2) Tanaka Y., *Rinsho Kensa*, **52**, 441–449 (2008).
- 3) Irwin M. R., *Brain Behav. Immun.*, **22**, 129–139 (2008).
- 4) Lac G., *Pathol. Biol.*, **49**, 660–667 (2001).
- 5) Kirschbaum C., Hellhammer D. H., *Psychoneuroendocrinology*, **19**, 313–333 (1994).
- 6) Teeuw W., Bosch J. A., Veerman E. C. I., Nieuw Amerongen A. V., *Biol. Chem.*, **385**, 1137–1146 (2004).
- 7) Okumura T., Nakajima Y., Matsuoka M., Takamatsu T., *J. Chromatogr. B*, **694**, 305–316 (1997).
- 8) Nakane H., Asami O., Yamada Y., Harada T., Matsui N., Kanno T., Yanaihara N., *Biomed. Res.*, **19**, 401–406 (1998).
- 9) Kanno T., Asada N., Yanase H., Iwanaga T., Ozaki T., Nishikawa Y., Iguchi K., Mochizuki T., Hoshino M., Yanaihara N., *Exp. Physiol.*, **84**, 1073–1083 (1999).
- 10) Van Stegeren A., Rohleder N., Everaerd W., Wolf O. T., *Psychoneuroendocrinology*, **31**, 137–141 (2006).
- 11) Fukuda S., Morimoto K., *Environ. Health Prev. Med.*, **6**, 9–14 (2001).
- 12) Nieuw Amerongen A. V., Bolscher J. G. M., Veerman E. C. I., *Caries Res.*, **38**, 247–253 (2004).
- 13) Cohen S., Miller G. E., Rabin B. S., *Psychosom. Med.*, **63**, 7–18 (2001).
- 14) Yamaguchi M., Deguchi M., Wakasugi J., Ono S., Takai N., Higashi, T., Mizuno Y., *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1007–1014 (2006).
- 15) Gröschl M., Rauh M., *Steroids*, **71**, 1097–1100 (2006).