

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82629

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13169

研究課題名(和文) 爪試料を利用した慢性的・蓄積的なコルチゾール分泌の評価法の確立

研究課題名(英文) Measurements of chronically accumulated cortisol by using fingernail samples

研究代表者

井澤 修平 (Izawa, Shuhei)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・産業ストレス研究グループ・上席研究員

研究者番号：00409757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性的な心理社会的ストレスはうつや心疾患を引き起こすことが知られている。本研究では慢性的な心理社会的ストレスの評価手法として、爪に含まれるコルチゾールに注目し、その定量方法について検討を行った。14名の学生から爪試料を収集し、爪試料の粉碎粒度や抽出時間を段階的に実験条件として設定し、コルチゾールの測定を行った。その結果、粉碎粒度が細かいほど、また抽出時間が長いほど、コルチゾールの抽出量が多いことが示された。爪試料からのコルチゾールの定量において粉碎粒度や抽出時間が重要な要因であることが示された。

研究成果の概要(英文)：It is well known that chronic psychosocial stress could cause depression and heart disease. Considering the assessment of chronic psychosocial stress, in this study, we focused cortisol contained in fingernail samples, and investigated the procedure for determining fingernail cortisol. Fourteen healthy males provided fingernail sample, and we measured cortisol levels in the fingernails, in which we investigated the effects of ground-fingernail grain size and cortisol extraction time. The results indicated that finer grading and longer extraction time was associated with higher cortisol levels. This study demonstrated that the grain-size of ground fingernails and extraction time could affect the amount of extracted cortisol obtained from fingernails and should therefore be considered during fingernail cortisol assay.

研究分野：生理心理学

キーワード：コルチゾール 爪 ストレス

1. 研究開始当初の背景

現代社会においてストレスは大きな問題となっており、ストレスを評価することは、これらのストレスに関連した問題を考える上で重要な課題である。このような中、最近では手の指の爪から測定できるストレスホルモン(コルチゾール)について研究が行われている。人の手の爪は形成される際に毛細血管からホルモンが拡散することがわかっており、一定期間(例えば、2週間)伸びた爪からはその期間の生体内で分泌されたホルモン量を評価できると言われている。短期的なストレスよりは長期的なストレスが健康を害することを考えると、このような長期的なコルチゾールの動態を把握できる特徴は非常に重要な点だといえる。しかしながら、この分野において爪試料を扱った研究は非常に少数であり、爪試料のコルチゾールの基礎的な特徴を検討し、評価法の確立を行っていく必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、爪に含まれるコルチゾールの定量方法について検討を行うことを目的とした。爪からコルチゾールを定量する際には、洗浄、粉碎、抽出、濃縮の処理を経た後に、酵素免疫学的測定によりコルチゾール濃度を測定する。本研究では特に粉碎方法(粉碎粒度)と抽出方法(抽出時間)に注目し、粉碎粒度と抽出時間を段階的に実験条件として設定し、粉碎粒度や抽出時間が爪検体から抽出されるコルチゾール量に与える影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 対象者ならびに爪試料の採取手続き

爪試料は、健康な男性の大学生・大学院生14名から収集した。収集に当たっては、10本の指から、4週間の間に伸びた爪をジップロックに回収するように指示した。

(2) 爪コルチゾールの測定手続きならびに条件の設定

爪のコルチゾールの測定は Izawa et al. (2015) や野村ら(2012)などの研究も参考にし、下記の工程によって実施した。粉碎と抽出の工程において実験条件を設定した。

洗浄 爪検体を2.0mlのマイクロチューブの中に入れ、1.0mlのメタノールを注ぎ、5秒間攪拌した。メタノールを排出した後、爪検体を24時間以上、自然乾燥させた。

粉碎 乾燥させた爪検体とメタルコーンをマイクロチューブの中に入れ、多検体細胞粉碎機(マルチピースショッカー®、安井器械株式会社、日本)によって、回転数を2,000rpmに設定して粉碎した。粉碎粒度を操作するために、粉碎時間を1分、4分、16分に設定した。利用した爪検体の量は一人当たり約135mgであり、これを3本のマイクロチューブに45mgずつ分けて、粉碎した。この手続きによって、一人の実験参加者の爪

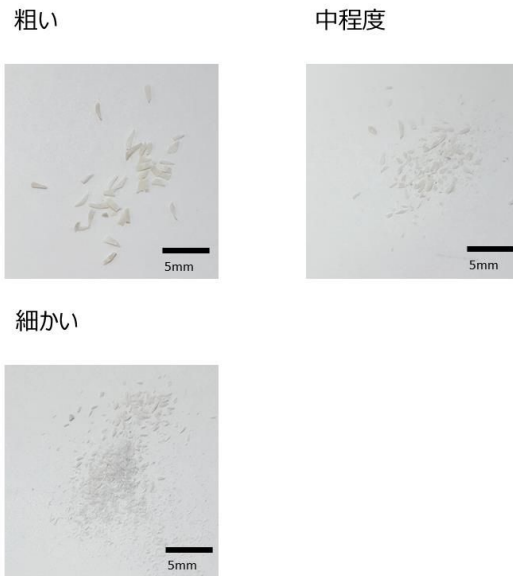


図1 粉碎された爪の例:粗い条件の粒度(爪片の長さの平均値±標準偏差)は 3.07 ± 0.76 mm、中程度の条件では 1.61 ± 0.78 mm、細かい条件では 0.05 ± 0.02 mmであった。粒度の測定にあたっては、顕微鏡で撮影したデジタル画像から粒径の最大値を1つずつ計測した。

検体について、粉碎粒度が粗い条件(1分)、中程度の条件(4分)、細かい条件(16分)を設定した(図1)。

抽出 マイクロチューブの中に約40mgの爪粉をいれ、そこに1.6mlのメタノールを加えて、コルチゾールの抽出を行った。抽出は室温下(18-25℃)で行い、抽出の間、マイクロチューブをローテーターの上で攪拌した。抽出時間の条件を1時間、6時間、24時間、48時間に設定した。該当するタイミングで270μlのメタノールの上澄みを、別の1.5mlのマイクロチューブに移した。なお、上澄みを移動させる前にマイクロチューブを6,000rpmで10分間遠心した。またシリッジとフィルターを利用して、上澄み液をさらに精製した。フィルターはポリフッ化ビニリデン製、孔径0.22μmのものであった。メタノールに爪粉が含まれた場合、爪粉が後述の酵素免疫測定に影響を及ぼす可能性が懸念されるが、本研究ではこの手続きにより、その可能性を排除した。

蒸発乾固・酵素免疫測定 得られた上澄みは室温下(18-25℃)で蒸発乾固した。コルチゾールの測定には酵素免疫学的測定法の原理に基づく分析キット(Cortisol EIA kit salivary, 1-3002, Salimetrics LLC, USA)を用いた。キットに付随している希釈液30μlを蒸発乾固したマイクロチューブに加えて、懸濁を行い、希釈液に含まれるコルチゾール量をキットの指定する手順によって測定した。キットの測定内変動係数は7%以下、測

定間変動係数は 11%以下であった。測定値は爪 1 グラム中に含まれるコルチゾール量で表した (pmol/g)。

(3) 統計

コルチゾール濃度を従属変数とし、粉碎粒度(粗い、中程度、細かい)、抽出時間(1時間、6時間、24時間、48時間)を被験者内要因とした 2 要因の分散分析を行った。球面性の仮定が支持されなかったため、Greenhouse-Geisser 法による自由度の補正を行った。多重比較では対応のある t 検定を行い、ボンフェローニ法による有意水準の補正を行った。

4. 研究成果

粉碎粒度と抽出時間を要因とした 2 要因分散分析を行った結果、粉碎粒度 ($F [1.1/14.9] = 31.6, p < .001, \eta^2 = .71$) と抽出時間 ($F [1.1/14.0] = 82.3, p < .001, \eta^2 = .86$) の主効果、ならびに粉碎粒度と抽出時間の交互作用 ($F [2.7/34.9] = 4.1, p < .05, \eta^2 = .24$) が有意であった。全般的に粉碎粒度が細かいほど、また抽出時間が長いほど、コルチゾールの測定値が高いことが示された。交互作用について単純主効果の検定を行った結果、48 時間の抽出の条件では、粒度が中程度の条件と細かい条件の間ではコルチゾールの測定値に有意な差が認められなかった。それ以外の間では有意差が認められた (図 2)。

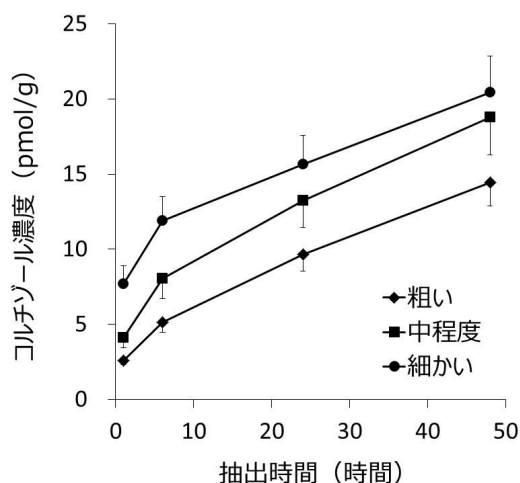


図 2 各粉碎粒度条件および抽出時間条件における爪コルチゾール濃度 (平均値と標準誤差)

本研究では、全体的に粉碎粒度が細かい程、また抽出時間が長い程、抽出されるコルチゾール量が多いことが示された。私たちの知る限り、爪のコルチゾールの測定において、粉碎粒度や抽出時間の影響を検討した研究は本報告がはじめてのものであり、定量方法に関する基礎的な情報を示したという点において本研究は意義があるものと考えられる。

また、本研究では、爪検体が中程度以上に粉碎されていて、かつ抽出時間が長い条件では、粉碎粒度の影響は比較的小さいことも示された。この結果は爪試料からコルチゾールを測定するような研究に対して方法論的な示唆を与える。基本的に人から得られる爪検体は個人差が大きい。例えば、爪の切り方はさまざまであり、得られる爪検体の細かさは個人によって異なり、これは粉碎粒度に影響を与える。本研究では中程度以上の細かさに粉碎し、かつ長い抽出時間の条件では、粉碎粒度の影響はみられなかった。したがって、一定以上の細かさに爪を粉碎して、抽出時間を長く設定することが爪検体の細かさの個人差の影響を少なくする一つの方法となる可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

井澤修平, 吉田怜南, 大平雅子, 山口歩, 野村収作 爪に含まれるコルチゾールの定量手法の検討—粉碎粒度と抽出時間の検討—. 生理心理学と精神生理学 (掲載決定) (査読有)

井澤修平, 三木圭一 毛髪・爪試料を利用した慢性的・蓄積的なストレスホルモン分泌の評価: 産業ストレス研究における展望. 産業ストレス研究, 24, 213-218, 2017. (査読有)

井澤修平 毛髪や爪の試料を利用したストレスホルモンの評価. 産業保健 21, 88, 26, 2017. (査読無)

〔学会発表〕(計 5 件)

吉田怜南, 山口歩, 大平雅子, 井澤修平, 野村収作 毛髪・爪に含まれるストレス・ホルモンの抽出手法の検証. 第 11 回日本感性工学春季大会, 2016 年 3 月 27 日, 神戸国際会議場 (神戸).

大平雅子, 吉田怜南, 山口歩, 井澤修平, 野村収作 爪に含まれるコルチゾールの定量分析条件の検討. 第 86 回日本衛生学会学術総会, 2016 年 5 月 13 日, 旭川市民文化会館, (旭川).

小川奈美子, 井澤修平 爪に含まれるコルチゾールの定量分析—抽出時間の検討—. 第 34 回日本生理心理学会, 2016 年 5 月 14 日, 名古屋大学 (名古屋).

大平雅子, 吉田怜南, 山口歩, 井澤修平, 野村収作 毛髪に含まれるコルチゾールの定量分析条件の検討. 日本生理人類学会第 73 回大会, 2016 年 6 月 4 日, 大阪市立大学 (大阪).

吉田怜南, 山口歩, 大平雅子, 井澤修平, 野村収作 毛髪・爪に含まれるストレス・ホルモンの定量手法の検討. 第 32 回日本ストレス学会学術総会, 2016 年 10 月 30 日, 杏林大学 (東京).

〔図書〕(計 2件)

井澤修平 生化学的指標(概論). 堀忠男, 尾崎久記 監修, 坂田省吾, 山田富美男 編集, 生理心理学と精神生理学 第 巻 基礎, 255-257, 北大路書房, 2017.

井澤修平 生化学的指標(各指標を利用する際の留意点). 堀忠男, 尾崎久記 監修, 坂田省吾, 山田富美男 編集, 生理心理学と精神生理学 第 巻 基礎, 269-272, 北大路書房, 2017.

6. 研究組織

(1)研究代表者

井澤 修平 (IZAWA SHUHEI)
独立行政法人労働者健康安全機構
労働安全衛生総合研究所
産業ストレス研究グループ・上席研究員
研究者番号: 00409757

(2)研究分担者

野村収作 (Nomura Shusaku)
長岡技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 80362911

三木圭一 (Miki Keiichi)
独立行政法人労働者健康安全機構
労働安全衛生総合研究所
研究推進国際センター・上席研究員
研究者番号: 90392894

(4)研究協力者

小川奈美子 (Ogawa Namiko)
文教大学生活科学研究所・客員研究員
研究者番号: 60795524