

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20500592

研究課題名（和文）CD4陽性T細胞分画によるストレス判定法の開発

研究課題名（英文）Assessment of psychological stress by analyzing CD4 positive T cell subsets

研究代表者

小河原 はつ江 (OGAWARA HATSUE)

群馬大学・医学部・教授

研究者番号：60134293

研究成果の概要（和文）：国家試験受験前の学生を対象として精神的ストレスによるCD4陽性T細胞分画の変動をPOMS心理テストや唾液中アミラーゼ活性、クロモグラニンA（sCgA）濃度と共に比較検討した。その結果、POMSの「T-A」（緊張・不安）尺度とsCgA濃度が有意に相関すること、sCgA高値の場合、CD4+CD25+T細胞比率およびTh1/Th2比が増加することを認めた。ストレスの存在が獲得免疫系の細胞にも影響することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：To assess the psychological stress of students before taking a national-license examination, we investigated the changes of CD4-positive T-cell subsets in peripheral blood, salivary amylase activity and salivary chromogranin A (sCgA) concentration in addition to conducting Profile of Mood States (POMS) psychological tests. sCgA concentration was significantly correlated with the POMS T-A scale, and higher percentages of CD4+CD25+ T cells and greater Th1/Th2 ratios were observed with increasing sCgA concentrations. These results suggest that psychological stress affects the T-cell subsets related to acquired immunity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：血液検査学・免疫血液学・病態検査学

科研費の分科・細目：健康・スポーツ科学・応用健康科学

キーワード：ストレス・POMS心理テスト・唾液中アミラーゼ活性・唾液中クロモグラニンA・

CD4陽性T細胞・CD4/CD8比・Th1/Th2比・制御性T細胞

1. 研究開始当初の背景

現代はストレス社会と云われている。外界からの過剰なストレス（ストレッサー）によりホメオスタシスシステムが大きく影響を受け、システムを構成する免疫機構にもその影響がおよび、とくに免疫を担当するリンパ球が強く影響を受けることがわかっている。

リンパ球にはT細胞、B細胞、NK細胞などに分類され、さらにT細胞にはCD4陽性細胞、CD8陽性細胞が存在する。そのうち、CD4陽性T細胞には細胞性免疫をつかさどるTh1細胞と、液性免疫を活性化するTh2細胞がある。我々は、インターフェロン- γ （IFN- γ ）を産生するTh1細胞とインターロイキン-4

(IL-4) を産生する Th2 細胞のバランスを精神的ストレス負荷前後で測定し、POMS テスト（心理テスト）の F 値（精神的ストレス強度）が高い群と低い群で比較したところ、F 値の高い群で Th1/Th2 比が高値を示す傾向がみられた。

近年、フローサイトメトリーの進歩により、リンパ球をより詳細に解析することができるようになったことから、精神的ストレスの免疫制御機構への影響をより詳しく解析し、精神的ストレスを鋭敏に、かつ簡便に検出可能な免疫パラメータを見出し、リラクゼーション等のストレスマネジメントの効果判定に用い、人々の健康管理に貢献できるようにしたいと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

- ①保健学科および医学科学生の 2 年生と国家試験受験直前の 4 年生または 6 年生に POMS 心理テスト、唾液中クロモグラニン A 濃度、血球計算、リンパ球サブセット検査および CD4+T 細胞サブセット検査（Th1/Th2 比、制御性 T 細胞）を行い、ストレス度と免疫能の変化を検討する。
- ② ①で協力していただいた学生の卒業後 1 年経過した後に同様な検査を行い、それぞれの専門職別にストレス度や免疫能の変化を比較検討する。具体的には、医師、看護師、臨床検査技師、理学療法士、作業療法士に従事して 1 年目の人を対象に検討する。
- ③ CD4+T 細胞サブセット検査（Th1/Th2 比、制御性 T 細胞）がストレスの評価に役立つことを確認した後、リラクゼーション外来の受診者を対象にストレスマネジメントの効果判定にこれらの免疫検査が役立つことを確認する。

3. 研究の方法

- (1) 研究体制は、小河原はつ江を研究代表者とし、村上博和、半田寛の 2 名を研究分担者とした。小河原は研究計画の作成および研究の遂行状況の確認、採取された試料の管理、研究成果の発表を行った。村上は対象者の医学的評価を、半田はサンプル採取、リンパ球培養、分子生物学的評価の指導を行った。研究協力者として大学院医学系研究科保健学専攻博士前期課程牛木和美他 6 名の協力、および群馬大学医学部附属病院検査部（村上正巳部長）からはリンパ球サブセット（CD4/CD8 比等）測定の協力を得た。
- (2) 2008 年 5 月本研究について群馬大学医学部倫理審査委員会の審査を受け、8 月に承認を得た。はじめに、国家試験受験前の学生から短期間に検体を採取するため、培養や染色に時間のかかる Th1/Th2 比では検体処理に問題があると考え、Th1/Th2 比を T リンパ球の表面抗原であるケモカインリセプターで判定

する方法について基礎的検討を行った。

- (3) 国家試験受験直前の学生を対象とした研究： 研究計画に従い、2009 年 1 月末から保健学科 4 年生および医学科 6 年生計 51 名、2010 年には 19 名の協力を得て、国家試験受験直前に血液と唾液を採取し、自動血液分析装置による血球計算、白血球分類測定および T 細胞比率、B 細胞比率、NK 細胞比率、CD4/CD8 比、Th1/Th2 比測定および制御性 T 細胞比率の測定を行った。ストレスの心理的評価には POMS 短縮版を用いた。その他のストレス評価として、最近普及してきたドライケミストリーの一つである唾液アミラーゼ簡易検査法も実施した。また、2009 年 5 月下旬から 7 月下旬にかけて医学部 2 年生 36 名の協力も得て、同様の検討を行い、対照群として比較検討した。

- (4) 卒業 1 年後の変化に関する研究

2010 年 4 月下旬から 5 月下旬にかけて 2009 年 1 月下旬から 2 月下旬に協力してくれた学生の卒業 1 年後の変化を上記と同様の項目で検討し、卒業前（国家試験受験前）の値と比較した。

- (5) 統計解析

統計解析には IBM 社の SPSS Statistics 17.0 (SPSS Japan Inc) を用い、ノンパラメトリック解析、対応するサンプルの t-検定で解析した。

4. 研究成果

- (1) Th1/Th2 比測定のための基礎的検討

T 細胞を PMA と ionomycin で活性化し、7%炭酸ガス培養器で 4 時間培養後、細胞内サイトカイン染色して求める方法が一般的であるが、この方法では時間が掛かり、より多くの検体を測定するには難点があった。そこで、細胞表面分子の変化から Th1 細胞、Th2 細胞を測定する方法を検討していたところ、Th1 細胞には CCR5 が、Th2 細胞には CCR7 が特異的に発現しているとの文献を見つけ、検討したところ、従来の細胞内サイトカイン（IFN- γ と IL-4）染色法で求めた Th1 細胞比率、Th2 細胞比率との相関関係を認めたため、本研究ではケモカインリセプター染色法で検討することとした。この成果は第 12 回日本検査血液学会学術集会（2011. 7. 17-18、倉敷市）で発表する予定である。

- (2) 唾液分泌物によるストレス評価について

国家試験受験という比較的長期間の精神的ストレスに対する唾液アミラーゼ（sAMY）活性および唾液クロモグラニン

A (sCgA) 濃度の変動を検討し、POMS 心理テストとの比較を行った。POMS テストにおける「T-A」「D」「A-H」の3つの尺度とTMD得点は、国家試験の精神的負担が大きくなるに従い増加した(図1)。そこで、sAMY 活性、sCgA 濃度および「T-A」との関係 Spearman の順位相関係数で比較したところ、sCgA 濃度と「T-A」尺度の相関係数が、有意に高値を示すことがわかった(図2)。

51名の学生を対象に行ったデータを取りまとめて、日本臨床検査医学会発行の雑誌「臨床病理」に投稿したところ、受理され、2011年2月に原著論文として掲載された。

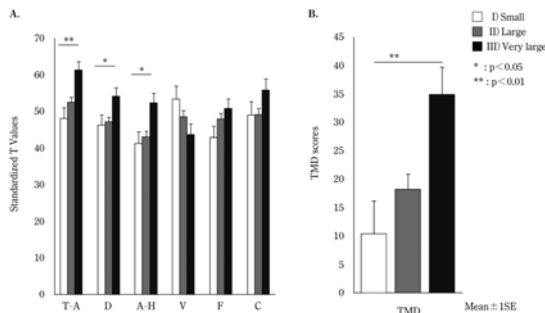


図1. POMS 心理テストと精神的負担

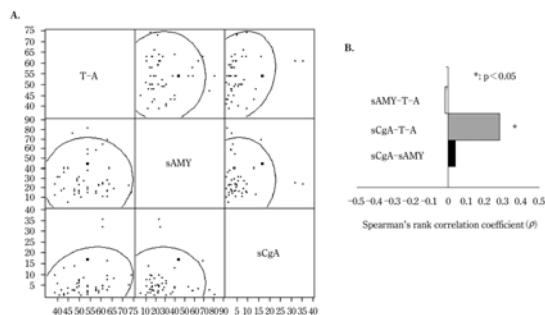


図2. POMS「T-A」尺度と唾液 AMY 活性および唾液 CgA の順位相関

(3) リンパ球サブセット測定によるストレス評価

生体にストレスが加わり、視床下部-下垂体-副腎軸 (HPA) 系、自律神経系が活性化されると、両者の影響を強く受けている免疫系にも変化をもたらす。ストレスが急性に加わると末梢 NK 細胞活性の亢進、CD8 細胞数の上昇による CD4/CD8 比の低下、唾液中 IgA の増加が確認されている。また慢性的にストレスが加わると、NK 細胞活性及び細胞数の低下、ConA や PHA などのマイトジェンによる T 細胞増殖能の低下、唾液 IgA の減少などが確認されている。よって、急性ストレスでは交感神経系が優位に働き、一部の免疫機能が一過性に賦活化されるのに対し、慢性的ストレスでは HPA 系が優位となり、細胞性免疫及び液性免疫を抑制すると考えられてい

る。免疫細胞の中心的役割を担うヘルパー T 細胞は、産生するサイトカインの違いにより Th1 細胞、Th2 細胞に分類される。Th1 細胞は主に IFN- γ を産生し、マクロファージの活性化、キラー T 細胞の分化を誘導する(細胞性免疫)。Th2 細胞は IL-4、IL-5、IL-6 を産生し、B 細胞を抗体産生細胞(形質細胞)へと分化させる(液性免疫)。最近では、精神的ストレスが加わることにより、Th1 細胞が抑制され Th2 細胞にシフトされるなど、免疫細胞にも影響を及ぼしているという研究報告がある。しかし、現時点での機序は十分に解明されていない。

一方、免疫系には制御性 T 細胞

(regulatory T cell; Treg) と呼ばれる T 細胞サブセットがある。Treg は他の T 細胞を含め細胞増殖に抑制的に働き、免疫系のホメオスタシスの確立や維持に必須の機能を担ってきていることがわかってきた。

Treg の表現型としての特徴は、CD4+CD25+ T 細胞である。これらの表現型はメモリー T 細胞、活性化 T 細胞と似ており、表現型だけではこれらの T 細胞群と区別するのは困難であった。最近 Treg は転写因子 Foxp3 を特異的に発現することが明らかになった。

CD25 (IL-2 receptor- α) は活性化するとすべての T 細胞で発現するが、Foxp3 は CD4+CD25- 細胞では発現をせず、Treg に極めて特異的な分子マーカーとされている。

今後の人生を大きく左右するであろう国家試験受験が医療専門職を目指す学生にとってストレスになると考え、ストレスが免疫系細胞に及ぼす影響について 2009 年と 2010 年の 1 月中旬~2 月下旬に掛けて研究を行った。

① POMS「T-A」尺度とリンパ球サブセットの関係

T-A 尺度が国家試験受験の精神的負担をよく反映していたことから、T-A 尺度の T 得点の 95% 信頼区間の上限である 55 点を境に T-A の T 得点が 55 点以上を T-A 高値群、55 点未満を T-A 低値群として 2 群に分け、比較した。

その結果、CD3+、CD4+、CD8+ 及び B 細胞比率には T-A 高値群と T-A 低値群の間に有意な差を認めなかったが、NK 細胞比率においてのみ有意な差を認めた ($p < 0.05$)。即ち、T-A 高値群における NK 細胞比率は T-A 低値群に比べ有意に高値を示した(図3)。一方、CD4 陽性 T 細胞サブセットである Th1、Th2 細胞、CD4+CD25+ 細胞および Treg 細胞では有意な差を認めなかった。

T-A 高値群では T-A 低値群に比べて急性的

にストレスが加わった状態のように NK 細胞比率が上昇したが、CD8 細胞数の上昇や CD4 陽性 T 細胞サブセットに変化を認めなかった。

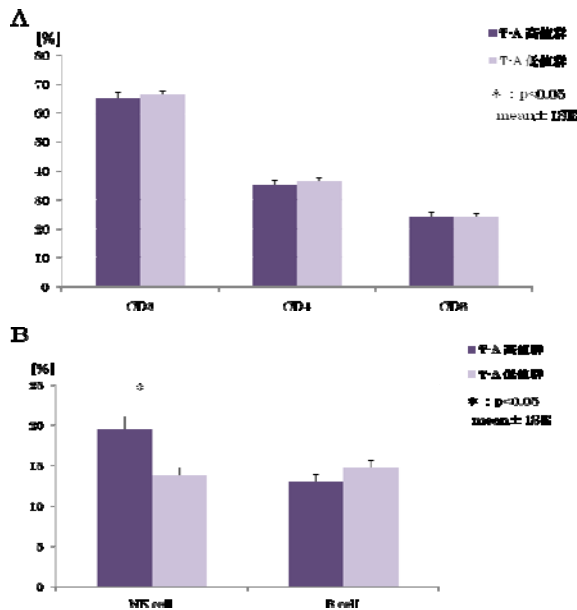


図 3. 「T-A」尺度とリンパ球サブセットの関係

②国家試験受験群と医学部 2 年生（対照群）との比較

国家試験受験直前の保健学科 4 年生と医学科 6 年生で、同意を得られた学生 67 名を A 群とし、2009 年 5 月下旬～7 月下旬にかけて、医学部 2 年生で同意を得られた学生 36 名を B 群として POMS 心理テスト、リンパ球サブセットおよび CD4 陽性 T 細胞サブセットを検討した。その結果、POMS テストではここでも「T-A」尺度において A 群の方が B 群に比べ高値を示し、かつ CD8 + 細胞比率において A 群の方が B 群に比べ有意に高値を示した。しかし、その他の NK 細胞、CD4+ 細胞、B 細胞、Th1, Th2 細胞、CD4+CD25+T 細胞、Treg 細胞には有意の差を認めなかった。また、血球計算項目やストレスマーカーである sCgA 濃度においても有意な変化は確認されなかった。医学部 2 年生の検体採取時期を 1 月中旬から 2 月下旬に実施できなかったことが影響している可能性も考えられるが、A 群と B 群に明かな違いを認めることはできなかった。ストレス社会と言われてる現在、対照群として選んだ学生も何らかのストレスを抱えている可能性もあり、対照群を選ぶ基準を今後検討していく必要があると思われる。

③卒業 1 年後のストレスとリンパ球サブセットの変化に関する検討

2009 年に協力してくれた学生で、卒業 1 年後に協力してくれた対象者 14 名対象にストレスとリンパ球サブセットの変化を検討した。国家

試験受験前を A' 群とし、卒業 1 年後を C 群とした。なお、A' 群と C 群は同一者である。

POMS 心理テストでは 6 項目いずれの尺度においても有意の差を認めなかったが、唾液クロモグラニン A (sCgA) 濃度は A' 群に比べ、C 群が有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図 4)。

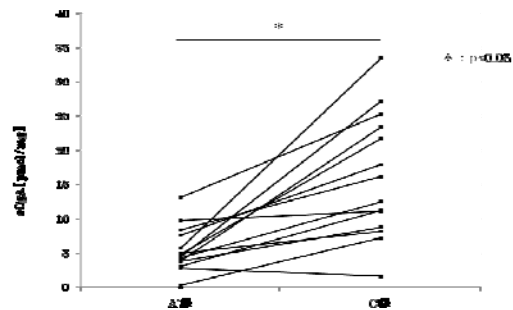
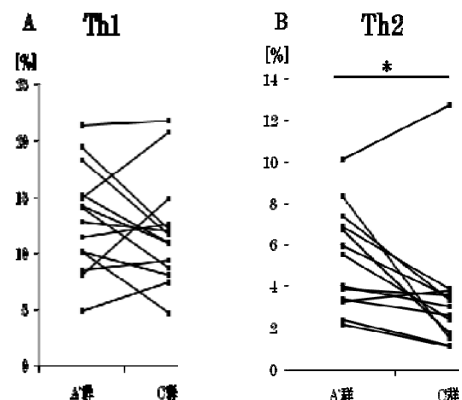


図 4. A' 群と C 群における sCgA 濃度の変化

次にリンパ球サブセットの変化を検討したところ、CD3%の平均値(95%CI)はそれぞれ A' 群: 64.1 (60.1~68.1)%, C 群: 64.4 (59.8~69.1)%であった。CD4%のそれは A' 群: 37.2 (33.4~41.0)%, C 群: 37.9 (33.0~42.7)%, CD8%では A' 群: 23.2 (20.1~25.8)%, C 群: 22.2 (18.9~25.4)%であり、CD4/CD8 比は A' 群: 1.7 (1.4~1.9), C 群: 1.8 (1.4~2.3)となった。NK%のそれは A' 群: 16.4 (12.0~20.8)%, C 群: 16.4 (12.2~20.5)%, B%では A' 群: 13.8 (11.1~16.6)%, C 群: 14.2 (12.0~16.4)%であり、どの項目においても有意な変化はみられなかった。

一方、Th1%の平均値(95%CI)は A' 群: 13.1 (10.4~15.8)%, C 群: 11.8 (14.8~20.9)%となった。Th2%のそれは A' 群: 5.5 (4.1~6.8)%, C 群: 3.3 (1.6~4.9)%であり、Th1/Th2 比では A' 群: 3.0 (1.9~4.1), C 群: 5.7 (2.9~5.8)であった。Th2 細胞比率は C 群の方が A' 群に比べ有意に低値を示し、それにより Th1/Th2 比では C 群が A' 群に比べ有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図 5)。



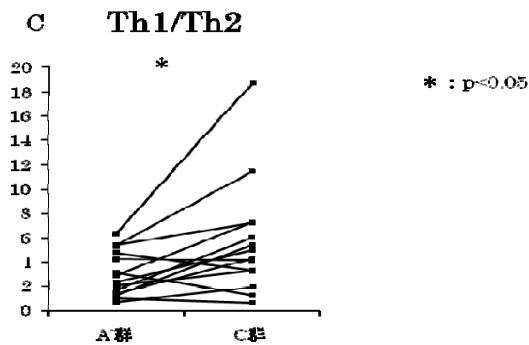


図5. A'群とC群におけるTh細胞の変化
 A. Th1細胞比率の変化
 B. Th2細胞比率の変化
 C. Th1/Th2比の変化

また、CD4⁺CD25⁺T細胞比率の平均値(95%CI)はそれぞれA'群:12.6(10.3~15.0)%, C群:17.9(14.8~20.9)%, Treg細胞比率のそれはA'群:5.4(3.9~6.8)%, C群:7.0(5.6~8.3)%であった。CD4⁺CD25⁺T細胞比率はC群の方がA'群に比べ有意に高値を示した(p<0.05)。またTreg細胞比率においても同様な傾向がみられた(p=0.092)(図6)。

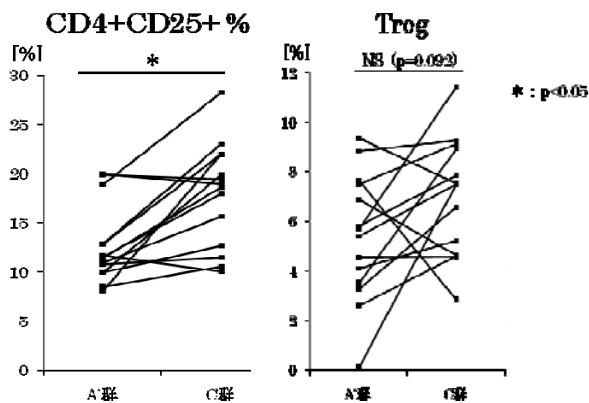


図6. A'群とC群における制御性T細胞の変化

POMSの6つの気分尺度においてA'群、C群間に有意の差を認めなかったものの、活力を表わすV尺度においてC群がA'群に比べ低値傾向を示した(p=0.120)こと、また、図4の如くsCgA濃度においてA'群よりもC群が有意に高値を示したことから、学生生活の中で抱えている精神的ストレスよりも社会における医療専門職としての責任などからくる精神的ストレスの方がより強いストレスである可能性が考えられた。ストレスの評価にあたっては対象者に合った心理テストの選択も重要であると考えられた。

さらに、リンパ球サブセットによる比較では、CD4⁺CD25⁺T細胞やTh2細胞において有意な変

化を確認した。糖質コルチコイドやカテコールアミンが増加するとIL-10などのサイトカインが産生され、それにより制御性T細胞(Treg)が増加すると報告がある(Elenkov IJ, et al, 1996)。また、Tregが増加することにより、Th1, Th2, CD8, NK, B細胞等の免疫細胞が抑制されるとの報告がある

(Ralainirina N, et al, 2007, De Gucht V, et al, 1999)。今回、Treg細胞ではC群がA'群に比べ増加傾向があり、またTregを含めたCD4⁺CD25⁺T細胞ではC群がA'群に比べ有意に高値を示した。これによりTh2細胞は抑制され、その他Th1細胞でも同様にC群がA'群に比べ減少傾向を示したと考えられた。

今回の結果から、精神的ストレスにより自然免疫であるNK細胞だけでなく、Th1, Th2細胞、Treg細胞などの獲得免疫系にも影響を及ぼすことが示唆された。今後、ストレスサワーの種類やストレスを受ける期間などを変えて検討していきたいと考えている。

(4) ストレスマネジメントの効果判定への応用

研究計画ではCD4⁺T細胞サブセット検査(Th1/Th2比、制御性T細胞)がストレスの評価に役立つことを確認した後、リラクゼーション外来の受診者を対象にストレスマネジメントの効果判定にこれらの免疫検査が役立つことを確認することをあげたが、研究期間内に実施することはできなかった。

国家試験受験前と卒業1年後の比較にみられるようにC群は生活環境の変化や社会に出たことによる仕事などに対する責任など、新たなストレスに暴露されている可能性も示唆され、またPOMS心理テストでは評価しづらい精神的ストレスによる身体への影響をsCgAやCD4⁺T細胞サブセットの測定により評価できる可能性が示唆された。本研究期間内にその応用まで検討することはできなかったことから、医療専門職の宿直勤務が免疫系の細胞に与える影響と、ストレスを緩和する介入方法の効果を判定する研究を計画し、平成23年度の民間研究助成金制度に応募したが、採択されなかった(平成23年5月11日確認)。引き続き、その応用に向けて努力したいと考えている。

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1件)

- ① 牛木和美、佐藤友香、新井勝哉、井出規文、松井直紀、半田寛、村上博和、小河原

はつ江, 唾液分泌物によるストレス評価の検証. -国家試験直前の学生を対象として-, 臨床病理, 査読有, 59 巻 2 号, 2010, 138-143.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 牛木和美, 新井勝哉, 井出規文, 松井直紀, 井上まどか, 神山知沙子, 静怜子, 早川昌基, 小林良乃, 天谷初夫, 半田寛, 小河原はつ江, 村上正巳, 村上博和, 国家試験による精神的負担と POMS 心理テスト・唾液クロモグラニン A との関係, 第 17 回日本未病システム学会学術総会, 2010. 11. 14, 沖縄県男女共同参画センター「ていりる」(沖縄県)
- ② 牛木和美, 新井勝哉, 井出規文, 松井直紀, 佐藤友香, 井上まどか, 神山知沙子, 静怜子, 早川昌基, 小林良乃, 天谷初夫, 半田寛, 小河原はつ江, 村上正巳, 村上博和, リンパ球サブセットによるストレス評価-国家試験受験前の学生を対象として-, 第 57 回日本臨床検査医学会学術集会, 2010. 9. 10, 京王プラザホテル (東京都)
- ③ 牛木和美, 佐藤友香, 小栗章裕, 松井直紀, 長久保由貴, 静怜子, 早川昌基, 小林良乃, 天谷初夫, 半田寛, 小河原はつ江, 村上正巳, 村上博和, 精神的ストレス評価における唾液中アミラーゼ活性とクロモグラニン A 測定の意義, 第 17 回日本健康体力栄養学会大会, 2010. 3. 6, 千葉科学大学マリーナキャンパス (千葉県)
- ④ 牛木和美, 佐藤友香, 小栗章裕, 松井直紀, 長久保由貴, 静怜子, 早川昌基, 小林良乃, 天谷初夫, 半田寛, 小河原はつ江, 村上正巳, 村上博和, 医学部学生を対象とした国家試験直前のストレスと血球成分の変化について, 第 16 回日本未病システム学会学術総会, 2009. 11. 1, 千里ライフサイエンスセンター (大阪府)

- ⑤ 牛木和美, 佐藤友香, 小栗章裕, 松井直紀, 長久保由貴, 静怜子, 早川昌基, 小林良乃, 天谷初夫, 半田寛, 小河原はつ江, 村上正巳, 村上博和, 唾液アミラーゼ測定によるストレス評価の検証-国家試験受験前の学生を対象として-, 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会, 2009. 8. 28, 札幌コンベンションセンター (北海道)

[その他]

- ① 牛木和美 平成 22 年度修士 (保健学) 学位論文 (指導教員 小河原はつ江). リンパ球サブセットによるストレス評価-国家試験受験前の学生を対象として- 2010, pp1-38

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小河原 はつ江 (OGAWARA HATSUE)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号: 6 0 1 3 4 2 9 3

(2) 研究分担者

村上 博和 (MURAKAMI HIROKAZU)
群馬大学・医学部・教授
研究者番号: 4 0 1 6 6 2 6 0

半田 寛 (HANDA HIROSHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号: 9 0 2 8 2 4 0 9