

# 唾液中Cortisol及びMelatoninのELISA法による測定と サーカディアンリズムの評定 —朝の疲労感がなく、生き生きと活動する青少年の育成をめざして—

長根光男<sup>1)</sup> 野村正彦<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>千葉大学・教育学部 <sup>2)</sup>埼玉医科大学・医学部

Determination of salivary cortisol and melatonin by ELISA and  
its application to the assessment of the circadian rhythm in Japanese student

NAGANE Mitsuo<sup>1)</sup> NOMURA Masahiko<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Faculty of Education, Chiba University, Japan <sup>2)</sup>Department of Physiology, Saitama Medical School, Japan

現代社会で青少年の置かれた状況は、物質的に豊かになった反面、ストレスと戦いながら生きていくことが求められる。また一方では、夜型社会の到来で生活が不規則になりがちである。本研究において、大学生を被験者として睡眠と疲労感に関する実態調査を行なったところ、朝の疲労感や意欲のなさを訴える姿が浮かび上がってきた。

筆者らはこの実態をふまえ、内分泌ホルモンである唾液中コルチゾール、メラトニンの生理的指標からELISA法でサーカディアンリズム障害の分析方法の確立をめざした。サンプル数は少なかったが、本研究で開発したプロトコルで十分分析できることが確認された。さらに生理的指標のみならず心理的指標との組み合わせでリズム障害を判別する方法を提起した。いずれにしても身体のリズム性に留意し、朝の疲労感のない生活がストレスへの対処上も重要であると思われる。

キーワード：慢性疲労感 (chronic fatigue) サーカディアンリズム (circadian rhythm)  
唾液中コルチゾール (salivary cortisol) 唾液中メラトニン (salivary melatonin)  
酵素免疫測定法 (ELISA)

## はじめに

現代日本青少年の慢性的疲労感、学習意欲の喪失、不登校やひきこもり、体力低下、ストレスに対する耐性の低下等の実態が現代日本社会の様相を反映していると思われる (Okamoto et al., 2000; Tanaka et al., 2000)。筆者らはそのひとつの要因は生活の夜型化による生体リズムの変調、すなわち「体内時計 (Honma et al., 1998)」が刻む体内調節機構の変調に起因すると考えている。

ところで体内時計の指標のひとつである副腎皮質ホルモンのCortisolや松果体から分泌されるMelatoninは、1日を周期とするサーカディアン(概日)リズムを有することが知られている (Shimada et al., 1995; Ardura et al., 2003)。唾液中のMelatoninを指標としたサーカディアンリズムの研究は、わが国においても近年意欲的に研究されるようになってきている (Harada, 2004)。特に学校教育に焦点を当てると、サーカディアンリズム障害は不登校の一因であるとも考えられている (Miike et al. 2004; Tomoda et al., 1994)。

近年は非観血的に唾液中のホルモンの酵素免疫測定法 (ELISA; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) によるサーカディアンリズムの分析が可能になっている。しかし市販のELISAキットは極めて高価であり、また

研究者が関心のある複数のホルモンを1プレートで同時に測定するなど応用的活用は不可能である。そこで、1) キットに拠らないCortisolやMelatoninの、より高感度で低コストの分析プロトコルを確立すること、2) 分泌リズムからサーカディアンリズム変調の指標を見出すこと、3) 質問紙法による疲労感の自己評定結果とのデータの対応を検討することを本研究の目的とする。

以上の一連の研究により、1) リズム障害の研究手法の確立と基礎的なデータの検討を行ない、生活リズムの変調が心身にさまざまな影響を及ぼすことを分析する方法を検討すること。2) 更に、朝の疲労感がなく、ストレスに前向きに対処 (coping) しようとする青少年を育成するためのサーカディアンリズム安定・不安定タイプ判別指標を提起し実用化することを研究目的とする。

## I. 睡眠と疲労感に関する基礎的調査

### 1. 調査対象

研究の手始めとして、千葉大生を対象にして以下の要領で基礎的実態調査を行なった。

- ・千葉大学学部生 男子56, 女子53 計109名
- ・調査日時 平成16年11月
- ・調査内容 睡眠と疲労感に関する心理的・身体的内容
- ・調査方法 質問紙法 (質問項目はTable 1参照)

連絡先著者：

**Table 1 睡眠と疲労に関する実態調査項目**  
 千葉大生 **睡眠と疲労感に関する実態調査**

( 男 、 女 )      年 齢      歳      NO.

I 身体状況編

当てはまる1ヶ所に○をつけて下さい

	はい	どちらかといえば はい	どちらかといえば いいえ	いいえ
1 夜 よく眠れないことが多い				
2 夜 寝相が悪い				
3 悪夢を良く見る				
4 朝 とても眠いことが多い				
5 朝 いつも食欲がない				
6 朝 頭痛を感じるが多い				
7 朝 たちくらみやめまいがある				
8 朝 眼の疲れを感じるが多い				
9 眼が覚めた時、口の中が乾いている				
10 自分は顔色が青白いと思う				

II 心理状態編

	はい	どちらかといえば はい	どちらかといえば いいえ	いいえ
1 朝 いちばん気分が良い				
2 朝 いつも生き生きとしている				
3 朝 今日どんな1日になるか楽しみだ				
4 朝 幸せな気分である				
5 朝 すぐ物事を決めることができる				
6 朝 何事にもあまりやる気がしない				
7 朝 いらいらすることが多い				
8 朝 憂うつな気持ちだ				
9 朝 休みたい気持ちになることが多い				
10 朝 心配ことが多い				

**2. 調査項目**

心理的側面10項目 (例)

- ・朝 休みたい気持ちになることが多い
- ・朝 いらいらすることが多い
- ・朝 憂うつな気持ちだ

身体的側面10項目 (例)

- ・朝 いつも食欲がない
- ・朝 頭痛を感じるが多い
- ・朝 よく眠れないことが多い

調査項目は現代日本の青少年を念頭におき、睡眠と疲労感に関する日常的な心理的・身体的項目とした。本研究室ゼミ生や筆者らの授業受講生に予備調査として参加してもらい、原質問項目に修正を加えながら作成した。質問項目はHarter (1981)と同様に、被調査者がチェックしやすいように、相互に対照をなす対項目を提示する形式の4段階の質問項目とした。なお現時点で信頼性・妥当性については検討していない。

**3. 結果と考察**

**① 全体的考察**

Fig. 1に示したように、「朝 とても眠いことが多い」

という訴えが「はい」「どちらかといえば はい」を合わせて76%と極めて多い。そのほか「朝 休みたい気持ちになることが多い」という回答も合計70%と目立つ。更に「朝 何事にもあまりやる気がしない」も58%と多い。

**② 因子分析結果**

心理的側面と身体的側面各10項目についてSPSS統計ソフト11.5 J (SPSS Japan社製)を用いて、因子分析(主因子法・バリマックス回転)を行った。その結果、心理的側面・身体的側面とも2因子が抽出された。それぞれの因子は、[朝の気分]、[朝の抑うつ感]及び[朝の体調]、[睡眠の質]と命名した。なお要因間の連関などの詳細は現在分析中である。

**II. 唾液中ホルモンによる分析方法の開発**

**1. なぜ唾液アッセイを行なうか**

唾液アッセイは非侵襲的で、いつでもどこでも特別な器具を使用せず、短時間でサンプルを得ることができる。従って血液などとは異なり、被験者に負担がかからず、生理的指標のサンプル等を収集するのに最適である。近年、分析機器の性能向上が著しく、血液に代替するもの

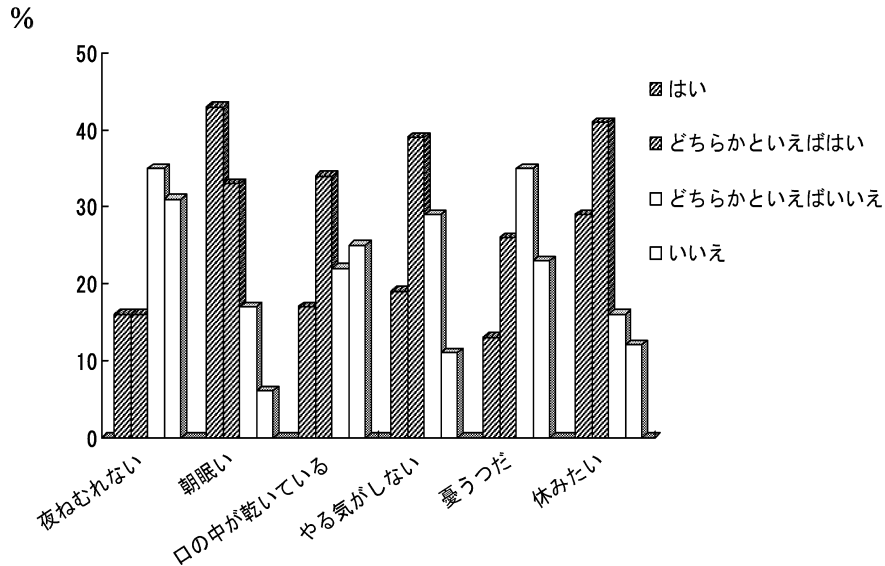


Fig. 1 睡眠と疲労感に関する実態調査結果 (一部)

Table 2 Cortisol分析ELISA法プロトコール

唾液の採取

1. 唾液採取専用容器 (Sarstedt社サリベット) で約1.5ml採取
2. 冷凍庫で凍結保存

測定

1. 唾液サンプル解凍, 遠心3,000回転10分
2. ELISAプレート (Costar9018) にサンプルとスタンダードをcoating  
4℃でover night incubation
3. 洗浄後 3%bovine serum albuminでblocking 1時間
4. 洗浄後 1次抗体添加 2時間incubation  
Anti-Cortisol developed in Rabbit (SigmaC8409)
5. 洗浄後 2次抗体添加 1時間incubation  
Goat Anti-Horseradish Peroxidase (Pierce31460)
6. 洗浄後TMB substrate kit (Pierce34021) で発色  
反応停止液 (2 M硫酸) 添加
7. ELISA plate reader (Bio-Rad Benchmark) で450nmの吸光度と濃度を測定

計算

1. 資料の吸光度 (OD) を計算
2. 各資料の吸光度からブランクの (OD) を引く
3. 結合率 = StandardのOD/negative controlのODを計算
4. EXCEL上に縦軸に結合率, 横軸に標準資料の濃度の片対数をプロットし,  
各点を通る検量線を引く。その標準曲線より検体の濃度を決定する。

試薬等

- ・ Coating Buffer 0.1M Carbonate Buffer, pH9.5
- ・ ELISA Assay Diluent Buffer : PBST
- ・ ELISA Wash Buffer
- ・ ELISA Stop Solution

として研究者の関心を集めている。

本研究で用いた唾液の収集方法は, Sarstedt社の専用容器サリベットを使用し, 約1分間口の中に滅菌済の円筒スポンジを入れ, 0.5~1.5mlの唾液を吸い込ませる方法である。手で直接唾液に触れることなく, 容器に収集することができる利点がある。

2. ELISA法による分析方法の開発

前述したように, 本研究では, 市販キットに依らない研究ベースを確立するため, Cortisol (MW 362.47) お

よびMelatonin (MW 232.28) のプロトコールの開発に関わった (Table 2参照, Melatoninプロトコール省略)。

ELISA法は酵素反応と免疫反応の両者を利用し, 対象物質の濃度を測定する方法である。一般にはELISAプレートと呼ばれる96個の穴の開いたプラスチック板の底に, 測定対象物 (抗原) を固定し, 次に1次抗体を, 更には酵素標識した2次抗体を加え, その後酵素に対する基質を添加して発色させ, 吸光度により比色定量する方法である (Table 2参照)。本プロトコールでは, 非競

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Std Cortisol		Std Melatonin		Sample Cortisol			Sample Melatonin				
B	10 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$		10 $\text{pg}/\text{d}\ell$		Sample 1		Sample 3		Sample 1		Sample 3	
C	1 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$		1 $\text{pg}/\text{d}\ell$									
D	0.1 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$		0.1 $\text{pg}/\text{d}\ell$									
E	0 $\mu\text{g}/\text{d}\ell$		0 $\text{pg}/\text{d}\ell$		Sample 2		Sample 4		Sample 2		Sample 4	
F	Nsb	Nsb	Nsb	Nsb								
G												
H												

Nsb; do not contain anti-cortisol or melatonin antibody

Fig. 2 ELISAプレートレイアウト

合的測定法 (non-competitive assay) を用いた。96 well プレートのスタンダードとサンプルのレイアウトは、Fig. 2に示した割り当てを標準とし、データのバラツキを最小限にするため、被験者1人あたり複数wellのデータを取り、最大値・最小値を除き、残りの吸光度の平均値を求めた。なおCortisolに関しては市販のELISAキット (Salimetrics社, High Sensitivity Salivary Cortisol Enzyme Immunoassay Kit) をデータ分析の比較対照のコントロールとして用いた。遠心分離機、プレートリーダー (Bio-Rad Benchmark) 等は、埼玉医科大学生理学教室および中央研究施設機能部門の分析機器を使用した。

指標作成において唾液の採取を承諾した研究協力者、千葉大学教育学部生10名 (男2, 女8) を被験者とした。そのうち、筆者らの試行錯誤的なプロトコル作成過程において5人分使用したので、残り5人 (女) のサンプルを本研究データとして示した。なお唾液中のCortisolは、凍結保存していても濃度は安定していることが報告されている (Clements & Parker, 1998) が、被実験者には採集後すぐ提出するよう依頼した。唾液の採取に関しては、千葉大学教育学部生命倫理委員会に諮り承認を得た。

### 3. ELISA法による結果と考察

Cortisolは視床下部・下垂体・副腎 (HPA) 系を通して分泌され、ストレス防御機構としての副腎皮質ホルモンである。このホルモンはサーカディアンリズムが認められ、通常朝の分泌量が高いことが知られている。

一方、松果腺から分泌されるMelatoninは、特にnon-REM睡眠と深い関わりがあり、合成と分泌は夜間に高く昼間に低いことが知られている。これらの知見をもとに、わが国においても基礎的な研究が盛んに行なわれており (Higuchi et al., 2005), 成果は教育臨床的に反映されている。

さてTable 2に示したような本プロトコル (Melatoninプロトコルは省略) に従った実験において、Cortisol及びMelatoninの定量的測定が可能であることが確認された。Fig. 3やFig. 4で示したように個人差は認められたが、Cortisolは夜間よりも朝、またMelatoninは逆

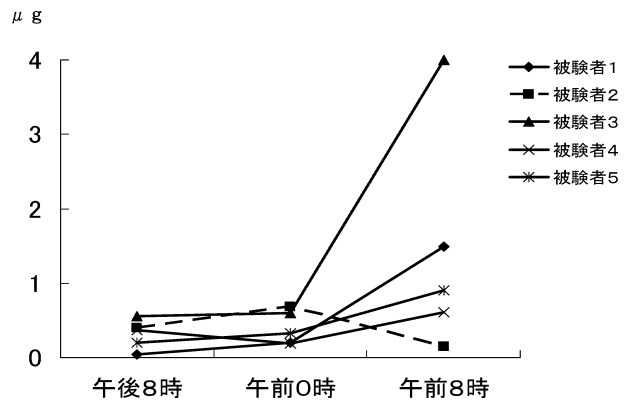


Fig. 3 Cortisolのサーカディアンリズム

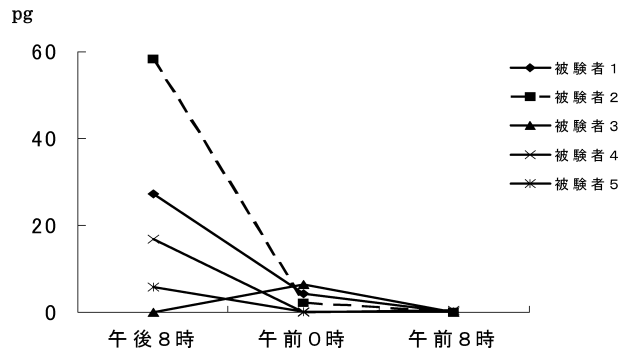


Fig. 4 Melatoninのサーカディアンリズム

に夜間の方が朝より分泌量が多かった。本研究の多くの被験者のように、夜Melatoninの分泌量が多く、それにより良質の睡眠をとり、更に朝Cortisolの分泌量が高いことは、これから始まる一日に対する心と体の準備状態ができていていることを示していると考えられる。

### Ⅲ. 心理的・生理的統合リズム障害指標の作成

#### 1. リズム障害指標のめざすもの

わが国の社会全体はますます24時間型に移行しつつある。一方で、現代社会の生活スタイルや生活リズムに心身が不調和を示し、種々の問題が指摘されるようになってきている。

学校場面においてもサーカディアンリズム障害の症状



## 2. 「生きる力」は生活リズムに定着しているか

わが国の公教育において、平成8年中央教育審議会第一次答申において、これからの学校教育において「生きる力」の育成を基本とすることが示された。すなわち自分で課題を見つけ、自ら学び、自ら考え、主体的に判断し、行動し、よりよく問題を解決する資質や能力の育成こそ新しい時代の教育の在り方であるとして答申された。平成10年には学校教育法施行規則が改正され、すべての教育活動はこの「生きる力」のコンセプトのもと行われるようになった。健康教育的側面では、よりよい生活習慣、自己抑制力の育成こそ大切であると考えられる。しかしながら、多くの報告や本実態調査で明らかになった青少年の状況は、この「生きる力」が未だ十分に実生活に定着していない現状を示していると思われる。

## 3. 学校・地域・家庭の役割の再認識

学校・地域および家庭において、今後さらに適正なサーカディアンリズムを意識した青少年の生活スタイルや生活リズムを求めていかなければならないと思われる。重要なことは、最も基本的なことであるが、いかに青少年に望ましい生活リズムを身につけさせるか意識の向上を図ること、すなわち本当の意味での「生きる力」を定着させることであると思われる。

以上のことから、青少年の健全な精神的・身体的発育のためには、体内時計に合った健全なサーカディアンリズムが求められよう。従って、学校・地域・家庭の果たす役割を、もう一度サーカディアンリズムの視点から再認識する必要があると思われる。これは教育生理学、健康心理学的立場からみても大きな研究課題であることを肝に銘じてこの論を閉じたい。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、分析機器の使用で適切な助言で支援して下さった埼玉医科大学中央研究施設・機能部門坂本安先生に深く感謝申し上げます。

## 引用文献

- Ardura, J., Gutierrez, R., Andres, J. & Agapito, T. Emergence and evolution of the circadian rhythm of melatonin in children. *Hormone Research*, 2003, Vol. 59, 66-72.
- Clements, A.D. & Parker, C.R. The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples. *Psychoneuroendocrinology*, 1998, Vol. 23, No. 6, 613-616.
- Harada, T. Effects of evening light conditions on salivary melatonin of Japanese junior high school students. *J of Circadian Rhythms*, 2004, Vol. 11, No. 2.
- Harter, S. A new self-report scale of intrinsic versus extrinsic orientation in the classroom: Motivational and informational components. *Developmental Psychology*, 1981, Vol. 17, 300-312.
- Higuchi, S., Motohashi, Y., Maeda, T. & Ishibashi, K. Relationship between individual difference in melatonin suppression by light and habitual bedtime. *J of Physiological Anthropology and Applied Human Science*, 2005, Vol. 24, No. 4, 419-423.
- Honma, S., Ikeda, M., Abe H., Tanahashi, Y., Namihira M., Honma, K. & Nomura, M. Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, Vol. 250, 83-87.
- Miike, T., Tomoda, A., Jhodoi, T., Iwatani, N. & Mabe, H. Learning and memorization impairment in childhood chronic fatigue syndrome manifesting as school phobia in Japan. *Brain and Development*, 2004, Vol. 26, No. 7, 442-447.
- Murata, M. Secular trends in growth and changes in eating patterns of Japanese children. *American J of Clinical Nutrition*, 2000, Vol. 72, No. 5, 1379-1383.
- 灘本智憲, 藤澤史子, 伊藤洋右, 池内隆造 朝食の欠食はヒト唾液糖質コルチコイドの概日リズムを変える日本栄養・食糧学会誌 2003, Vol. 56, No. 2, 103-107
- Nagane, M. Relationship of subjective chronic fatigue to academic performance. *Psychological Reports*, 2004, Vol. 95, 48-52.
- Okamoto, M., Tan, F., Suyama, A., Okada, H., Miyamoto, T. & Kishimoto, T. The characteristics of fatigue symptoms and their association with the life style and the health status in school children. *J of Epidemiology*, 2000, Vol. 10, 241-248.
- Shimada, M., Takahashi, K., Ohkawa, T., Segawa, M. & Higurashi, M. Determination of salivary cortisol by ELISA and its application to the assessment of the circadian rhythm in children. *Hormone Research*, 1995, Vol. 44, 213-217.
- Tanaka, H., Tamai, H., Terashima, S., Takenaka, Y. & Tanaka, T. Psychosocial factors affecting psychosomatic symptoms in Japanese schoolchildren. *Pediatrics International*, 2000, Vol. 42, 354-358.
- Tomoda, A., Miike, T., Uezono, K., & Kawasaki, T. A school refusal case with biological rhythm disturbance and melatonin therapy. *Brain and Development*, 1994, Vol. 16, 71-76.