

ストレス計測評価用バイオチップのプロトタイプ開発

Research and Development of Biochip System Towards Stress Monitoring

○脇田慎一, 田中喜秀, 永井秀典 (産総研, 健康工学)

Shin-ichi WAKIDA, Yoshihide TANAKA, Hidenori NAGAI,
Health Research Institute (HRI),
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

Key Words: Biomonitoring, Biosensors, Microfluidics, Prototype Instruments

1. はじめに

ストレスはうつの原因であることは良く知られ、うつ病などの心の病から自殺に至るケースが多いと考えられている。ここ10年余り、我が国の自殺者が3万人を越えている。かつて大きな社会問題であった交通事故による死者数は昨年4914人であり、こころの健康は大きな社会問題である。

健康工学研究部門では、こころとからだの健康維持管理を行うために、各種健康予防マーカーの探索及び計測デバイス技術の研究開発を組織的に進めている⁽¹⁾。

2. ストレス診断の現状と課題

例えば、軽いストレス心身症にかかったと認識して、心療内科の先生にアドバイスを求めて診察してもらうと、今時の多くの検査結果に基づく診断とは全く異なり、医師は問診で診断する。外部ストレス刺激の定量化を行うライフイベントや気分プロフィールなどの生体応答のチェックリストに相当する高度な問診技術が使われる。

抗うつ薬として知られるSSRIは、選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors) であり、セロトニンは脳内に存在する神経伝達物質であり、ストレスの緩和や癒し (いやし) 効果があるとされる。医師がセロトニンなどを計って診断に用いれば良いことになるが、脳内の生体試料の採取からして容易ではない。

生体のストレス応答を把握する計測・評価システムが普及していない原因は、まず、現場で使える測定機器が無いこと、ストレス応答には個体差が認められること、ストレス応答物質には朝と夕方とで量が異なる日内変動があること、周囲の生活環境によって鋭敏に影響を受けることなどが、ストレス計測評価を複雑化しているからである⁽²⁾。

3. ストレス応答⁽³⁾

3-1 ストレス学説

科学的な根拠のあるストレス指標 (ストレスマーカー) を測るためには、ストレスの科学的な学説を理解することが早道である。現在、学会などで認知されているのは、1936年にハンス・セリエがまとめたストレス学説である。彼は、ストレスとは、外界からのストレス刺激に対して、生体は適応するために、非特異的な生体防御反応 (ストレス応答) と定義した。

3-2 良いストレスと悪いストレス

疫学的な調査により、ストレス刺激は各種疾患の増悪因子とされているが、適度なストレス刺激は人を活性化させ、爽快感や達成感を産む良い側面も持つ。例えば、血圧が上がるジェットコースターに好んで乗って、スリルと爽快感を得るために、ストレス刺激を求める若者が多いのも事実である。これは適度な快ストレス刺激 (良いストレス:

eustress) と呼ばれる。逆に、ストレス刺激が重なり、過剰な生体防御が生体に変調 (いわゆるストレス心身症) をもたらす不快ストレス刺激 (悪いストレス: distress) がある。ストレス計測制御技術は、新しい健康総合産業の非常に大きな市場を形成する可能性を秘めている。

3-3 ストレス応答機序

生体のストレス応答の作用機序は、生体の持つ自律神経系、内分泌系、免疫系の3つの生体調節系が相互に作用しながら働くことが数多く報告され、最新の研究では、ストレス応答は非常に複雑な生体防御応答であることが明らかにされている。

3-4 自律神経系によるストレス応答

ストレス刺激に対して、生体は速やかにストレス応答し外部刺激に適応するホメオスタシス (homeostasis) 機構を持つ。しかしながら、ホメオスタシスによって補償できない強いストレス刺激の場合、交感神経系の活動が副交感神経系の活動に対して優位となる自律神経系のストレス応答が生じる。このストレス応答は、心拍の増加、筋肉の血管拡張や消化器の血管収縮など、ストレス刺激に対して比較的急性な生体防御応答を示す。

3-5 内分泌系によるストレス応答

ストレス刺激が継続すると、自律神経系の急性ストレス応答に続いて、生体は内分泌系の変動を伴う生体防御反応を行う。セリエは、内分泌系によるストレス応答を、全身適応症候群と定義した。この一過性でないストレス応答は、生体内部環境を変化させて新しい平衡状態を作る防御機構であることから、ホメオスタシスと対比して、ヘテロスタシス (heterostasis) と呼ばれる。このストレス応答は、ストレス刺激に対して、脳から副腎へのホルモンによるシグナル伝達により、副腎皮質からコルチゾールや副腎髄質からカテコールアミン類がストレスホルモンとして内分泌される。体温、血圧や血糖値が上昇し、交換神経系の活動が高まる。この時、コルチゾールなどの内分泌系ストレスホルモン濃度は、血液中では10倍以上に達することが認められている。脳や副腎から血液に放出される血中ストレスホルモンは、ストレス応答機序に直接関与することから、科学的に根拠のある典型的なストレスマーカーである。

3-6 免疫系によるストレス応答

ストレス学説では、全身適応症候群は身体の抵抗力を指標として用いられた。身体の抵抗力を示す免疫はストレス指標の一つと考えられ、特に、非特異的に初期の生体防御機能を担う免疫タンパクなどがストレスマーカー候補となる。その一つに、リンパ球の一種であるナチュラルキラー (NK; natural killer) 細胞の免疫活性が注目されている。しかし、放射性物質を用いた超高感度分析が必要であり、計測の簡便化は容易でない。

4. ストレス計測評価⁽²⁾

外部ストレス刺激の数値化では、①生活の出来事（ライフイベント；life events）を社会的再適応評価尺度に、②日常のいらだち事（daily hassles）を尺度化した提案がある。

おもなストレス応答評価法は、③問診や心理テストによる主観評価法（気分プロフィール検査、コーネルメディカルインデックスなど）、④血圧や心拍などの電気生理信号を統計的に解析する手法、⑤血液などの生体試料中のストレス関連物質を計測する生化学手法がある。現状のストレス評価の多くは、①や③を用いているが、主観的な要素が強く客観的な評価に課題がある。客観的な評価として、④の生理指標及び⑤の生化学指標を用いる手法の確立が求められている。

4-1 客観的なストレス計測評価

ストレス応答を制御している自律神経系や内分泌系応答は、それぞれ脳内の視床下部と下垂体に中枢がある。前者の自律神経系活動の計測には、おもに間接的な電気生理信号（心拍、血圧、皮膚コンダクタンスなど）の計測が利用され、後者の内分泌系活動の計測には血液中に含まれるストレスホルモン量の直接計測が利用されることになる。

4-2 ストレスマーカー

生体ストレス応答機序に基づいた生化学的なストレスマーカーには、脳組織中のシグナル伝達物質や脳の視床下部を介して血液へ放出される内分泌物質、すなわちストレスホルモンがある。脳組織中のストレス伝達物質の測定は極めて困難である。後者のストレスホルモンには、①自律神経系の応答では、大脳辺縁系－視床下部－自律神経系から血中にノルアドレナリンや副腎髄質からノルアドレナリンが放出される。②内分泌系の応答では、大脳辺縁系－視床下部－脳下垂体－内分泌系から血中にコルチゾールが放出される。例えば、ストレス学説の「抵抗期」では、コルチゾールやアドレナリンのホルモン濃度が健常時と比較して10倍以上に達することが認められている。

採血に不慣れた健常人の場合、採血ストレス刺激により血液中のストレスホルモン濃度が変化し、客観的なストレス評価が困難となる。

我々は、非侵襲的な採取が可能な唾液にも注目し、血液中のストレスマーカーのみならず、唾液中のストレス関連物質（マーカー候補物質）計測評価用バイオチップの研究開発を行っている。本法は、学術的な検証研究により確立する必要があるが、快適性や癒し効果の健常人による客観的な評価法を可能にする有力候補であると考えている。

5. バイオチップ⁽⁴⁾

近年、生体試料を計測するバイオチップの研究開発が活発に行われている。①ドライケミストリー（試験紙法）、②バイオセンサー、③イムノロマト、④DNA チップ、⑤Lab-on-a-Chip（以下、ラボチップ）である。

唾液アマラーゼ活性は自律神経活動と関連する報告もあることから、岩手大の山口らが研究開発を進めてきた唾液アマラーゼ活性を測定するドライケミストリー装置が簡便な唾液採取器具と合わせて実用化された。唾液アマラーゼ活性は血圧などの鋭敏な自律神経系ストレス応答（副交感神経系の亢進）を反映するとされ、生活環境が高度に制御された状態での被験者実験に有効である⁽⁵⁾。また、徳島大の六反らはストレス診断用 DNA チップを開発し⁽⁶⁾、元気チップの受託研究として事業化された。

我々の研究グループでは、ストレス計測評価を目的として、典型的な MEMS（Micro Electro Mechanical Systems）技

術を用いたバイオチップである、②バイオセンサーと⑤バイオチップの研究開発を行っている。企業との共同研究などにより作製し展示会に出品したプロトタイプ開発装置を Fig. 1 に示す。



Fig. 1 Biochip prototype for salivary stress marker

6. 唾液マーカー計測バイオチップ装置のプロト開発⁽⁴⁾

ここでは、Fig. 1 に示す 3 種類の唾液中のストレス関連物質（マーカー候補物質）計測評価用バイオチップの研究開発のねらいを紹介することにする。講演では時間の許す限り、具体的な研究成果を紹介する。

2 種類のラボチップシステムは、流体制御法が全く異なる電気浸透流による電気泳動型ラボチップ^(7,8)と遠心力によるラボ CD^(9,10)技術に基づく。数多くのラボチップの中で、この 2 種類のチップではバルブ機能がオンチップ可能であることから、非常に単純なチップ構造でかつ送液駆動部も小型である優れた特長がある。我々は、チップの表面物性を積極的に制御することにより、産業技術化を図ってきた。

6-1 電気泳動型ラボチップ

分泌型免疫グロブリン A（secretory immunoglobulin A；sIgA）を測定対象に選んだ。唾液中の sIgA 濃度はタンパク質濃度としては比較的高い 100～400 μg/mL である。抗原抗体反応複合体と未反応物を電気泳動分離するいわゆる均一系電気泳動免疫アッセイのオンチップ化を検討した。開発戦略としては、Fig. 2⁽¹¹⁾に示すように、高い選択性を持つ抗原抗体反応を微小な反応場で迅速化し、高精度電気泳動分離を行い、高感度レーザー励起蛍光法により検出することとした。具体的な成果は参考文献⁽¹²⁾を参照していただければ幸いである。

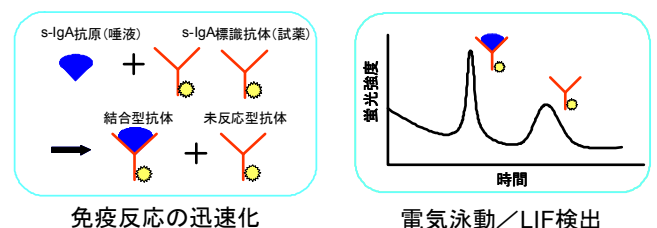


Fig. 2 R&D Strategy of electrophoretic Lab-on-a-Chip⁽¹¹⁾

6-2 遠心力型ラボ CD

ラボ CD は比較的容易にマルチチャンネル化が可能であり、回転数を制御するだけで、免疫アッセイプロトコルを自動化することが可能である。測定対象は 6-1 と同じ sIgA の例を紹介する。典型的な不均一免疫アッセイ法である ELISA 法のオンチップ化を検討した。開発戦略としては、Fig. 3⁽¹¹⁾に示すように、微小流路のチャンネル幅の大きさで変わる表面濡れ性と回転数で変わる遠心力とのバランスで開閉する

バルブを利用して、多段階の送液を回転数で制御し、抗原抗体反応を微小な反応場で迅速化させ、その反応を抗原固定化反応ビーズ数で制御し、ビーズ上の抗原との反応複合体と未反応物を遠心送液により分離し、固定化ビーズ上で酵素反応による発色反応を増幅制御させた。具体的な成果は参考文献^(10,13)を参照していただければ幸いです。

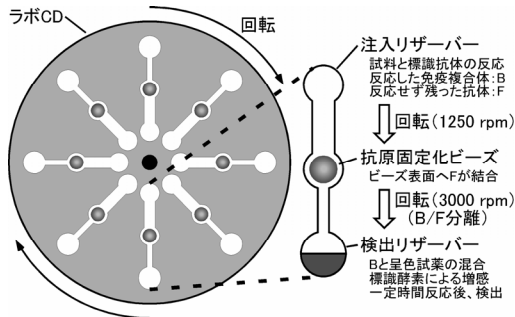


Fig. 3 R&D Strategy of electrophoretic Lab-on-a-CD⁽¹¹⁾

6-3 MEMS バイオセンサー

MEMS バイオセンサーは MEMS 微細加工技術により、pH ガラス電極と pH メーターの初段増幅トランジスターである電界効果トランジスター (Field-Effect Transistor ; FET) を集積化した微小バイオセンサーである。電界検知部であるゲート部に生体機能や生体機能を模倣した物質認識部を固定化することにより、非常に小さな電気化学式のバイオセンサーを構築することができる。

典型的な自律神経系応答により高くなる血圧と関連して血管内皮細胞から産生される NO が増加する報告がある。我々は、唾液中の NO 最終代謝産物である亜硝酸イオン濃度が比較的低いので、硝酸イオンで測定することとした。開発戦略として、物質認識部の人工イオンチャネルとなる硝酸イオン検知物質に高度に材料設計した硝酸イオン対化合物、高選択性と高信頼性が得られる高保留性の高誘電率液膜溶媒、生体適合性高分子材料を開発し、プラスチック膜化して FET ゲート部に固定化して作製した。

唾液中の塩化物イオン除去用のオフライン銀カラム処理した 2 倍希釈ヒト唾液試料を試作した FET 硝酸イオンチェッカとイオンクロマトグラフィーを用いて測定した結果を Fig. 4 に示す。具体的な成果は参考文献^(14,15)を参照していただければ幸いです。

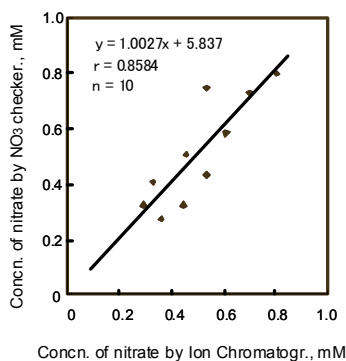


Fig. 4 Single drop salivary analysis of pre-treated human saliva⁽¹⁵⁾

最後に、本研究開発を行うにあたり、プロトタイプ装置開発にご協力いただいた企業各位、さらに、我々の研究グループの宮道隆特別研究員、吳曉玲博士、テクニカルスタッフの鳴石奈穂子さん、井口稚菜さん、植田真由美さん、中山雄介氏、松原正幸氏、吉川晴美さん、入江 隆氏に謝意を表します。さらに、研究連携を行ったヒューマンストレスシグナル研究センター、健康工学研究センター、健康工学研究部門スタッフ各位、招へい型客員研究員として研究連携を進めた大学関係者各位に厚く感謝します。

参考文献

- (1) 産業技術総合研究所, 健康工学研究部門ホームページ, <http://unit.aist.go.jp/hri/about/outline.html>
- (2) 脇田慎一, ストレス計測チップ, バイオチップ実用化ハンドブック (金子, 堀池監修) エヌ・ティー・エス, 東京, pp. 5501-5507, 2010.
- (3) 脇田慎一, 田中喜秀, 永井秀典, ストレスマーカーの迅速アッセイ, ぶんせき, vol. 2004, no.6, pp.309-316, 2004.
- (4) 脇田慎一, MEMS バイオチップを用いたストレス計測, バイオセンサーの先端科学技術と応用 (民谷編) シーエムシー出版, 東京, pp. 229-239, 2008.
- (5) K. Murai, S. Wakida, T. Miyado, K. Fukushi, Y. Hayashi, Basic Study of a Ship Navigator's Stress Using Salivary Amylase Activity, *IEEJ Trans. on Electrical, Electronics Eng.*, vol. 4, no. 5, pp. 680-682, 2009.
- (6) 脇田慎一, DNAチップを利用したストレス評価, ぶんせき, vol. 2008, no. 3, pp. 142-143, 2008.
- (7) S. Wakida, X. Wu, K. Akama, T. Motoshige, K. Yoshino, K. Matsuoka, E. Niki, High Throughput Stress Marker Assay using Polymer Microchip Electrophoresis with Laser induced fluorescence Detection, *Proc. of μTAS 2002 Conf.*, vol. 1, pp. 210-211, 2002.
- (8) Y. Tanaka, N. Naruishi, Y. Nakayama, T. Higashi, S. Wakida, Development of an analytical method using microchip capillary electrophoresis for the measurement of fluorescein-labeled salivary components in response to exercise stress, *J. Chromatogr. A*, vol. 1109, no. 2, pp. 174-178, 2006.
- (9) H. Nagai, Y. Narita, M. Matsubara, T. Irie, K. Saito, S. Wakida, Single Bead Analysis on Compact Disk Shaped Microfluidic Device, *Proc. of μTAS 2006 Conf.*, vol. 1, pp.852-854, 2006.
- (10) H. Nagai, Y. Narita, M. Ohtaki, K. Saito, S. Wakida, A Single-Bead Analysis on a Disk-shaped Microfluidic Device Using an Antigen-immobilized Bead, *Anal. Sic.*, vol. 23, no. 8, 975-979, 2007.
- (11) 脇田慎一, 田中喜秀, 永井秀典, 宮道隆, ストレス計測評価用マイクロ流体システムのプロトタイプ開発ーストレスや健康を手軽に計ることを目指してー, 化学センサ, vol. 24, no. 3, pp. 132-139, 2008.
- (12) 田中喜秀, ラボオンチップ技術を利用した唾液中ストレス関連物質のオンサイト計測システムの開発, ストレス科学, vol. 23, no. 3, pp. 212-219, 2008.
- (13) 永井秀典, ラボCD, ストレスの科学と健康 (二木編) 共立出版, 東京, pp. 277-281, 2008.
- (14) S. Wakida, K. Ohnishi, T. Kobayashi, Y. Shibutani, Development of a nitrate-selective field-effect transistor

for monitoring nitrates in real samples, *Technical Digests of 12th Int. Meeting on Chemical Sensors*, pp. 446-447, 2008.

- (15) 脇田慎一, 吉田尚弘, 小林智樹, 澁谷康彦, 生体成分計測用バイオFETの研究開発 (IV) FETチェッカのセンサ特性, *化学センサ*, vol. 25, no. Supplement B, pp. 73-75, 2009.