

毛髪・爪からのコルチゾールの定量手法の検討

A study on the determination of cortisol in human hair and nail

○ 野村収作(長岡技術科学大学) 山口 歩(長岡技術科学大学) 大平雅子(滋賀大学)

Shusaku NOMURA, Nagaoka University of Technology
Ayumi YAMAGUCHI, Nagaoka University of Technology
Masako OHIRA, Shiga University

Abstract: Cortisol, a glucocorticoid, is known to be a leading candidate as the physiological measure of humane mental stress state. In this report, the technical variability and limitation of the extraction of cortisol which is included in human hair and nail were studied. Especially the influence of physical damage of the sample on the cortisol extraction was focused. As for a result, the extracted cortisol from artificially dyed hair was significantly less comparing with that from undyed hair ($p<0.01$). Moreover cortisol in hair was significantly less when the hair sample were not sufficiently grinded to powder in the pretreatment process ($p<0.001$). On the other hand, to be processed by our protocol, cortisol in hair and nail was enough to be determined by a dozen of hair shaft and a small piece of nail (less than 5mg for both).

Key Words: stress, cortisol, hair, nail

1. 序論

本稿では、人間のストレスに関連して分泌されるホルモンとして広く知られているコルチゾールを対象とし、人間の毛髪・爪由来のコルチゾールの定量方法とその課題について述べる。

1-1 “ストレスホルモン”としてのコルチゾール

「病は気から」と言うように、人間の心と体の状態は密接に関連している。近年、そうした心身の相関は精神神経内分泌学 (Psychoneuroendocrinology) や精神神経免疫学 (Psychoneuroimmunology) などの研究領域において、ホルモンの過剰分泌や免疫細胞の不活性化など、生体内で引き起こされる生化学物質のダイナミクスとして理解されるようになってきた。

本稿で扱うコルチゾールはこうした生化学物質による心身相関研究の代表的な物質であり、精神的なストレスに関連して変動すること⁽¹⁻³⁾ことから、しばしば“ストレスホルモン”と呼ばれている。

コルチゾールは、生理学的には人間の代表的なストレス反応経路である視床下部-下垂体-副腎皮質系 (Hypothalamus-Pituitary-Adrenal system: HPA系) を反映するホルモンであり、とりわけ社会的評価 (文脈) を伴うような高次かつ強烈なストレスに対して分泌が促進されることが知られている⁽³⁾。また長期にわたる慢性的・日常的なストレス状態に対しても分泌が促進される⁽⁴⁾。したがって、複雑な人間社会におけるストレスに対しても良い評価指標となることが期待されている。

しかしながら、現在までに数百件以上報告されているコルチゾールによるストレス評価研究は、そのほぼ全てが検体として唾液中のコルチゾールを扱ったものである。唾液中コルチゾールは血中コルチゾールと高い相関をもち⁽³⁾、検体の採取も容易であることから血液検体に比べてメリットは大きい。しかしながらその反面、唾液流量の影響や飲食制限、急性ストレスの影響の排除 (イニシャライズ)、また日中の大きな概日変化に対するサンプリングのタイミングなど方法論的な制約も少なくない。これに対し、最近、毛髪や爪由来のコルチゾールを抽出し、ストレス評価研究に導入しようとする研究が進められている。

1-2 毛髪・爪由来のコルチゾール研究

ごく最近になって、唾液コルチゾールに代わる検体とし

て毛髪や爪由来のコルチゾールを対象とした研究がおこなわれている⁽⁵⁻⁹⁾。例えば Dettenborn ら (2010) の研究では、就労者に比べ非就労者の毛髪中に含まれるコルチゾールが多いことを報告している⁽⁸⁾。しかしながら、同研究は始まったばかりであり、毛髪検体の前処理、毛髪の状態、染髪の影響、栄養状態、また洗髪頻度、整髪料・洗剤、薬剤の影響など技術的には未だ十分に検証されていない⁽⁷⁾。

これに対し本稿では、毛髪・爪に含まれるコルチゾールを対象に、毛髪検体の粉碎状態および染髪の影響について、また毛髪部位 (毛根からの距離) に対するコルチゾール量の変化について検証結果を報告する。

2. 方法

3-1 検体の採取

健康な成人男性 21 名 (21~38 歳) に対し、毛根から 2cm 毎、3 セグメント (それぞれ毛根から R:0-2cm, M:2-4cm, T:4-6cm) 分の毛髪を採取した (図 1)。採取量は R, M, T の各セグメントにつきそれぞれ約 50mg とした。爪については両手の爪を 2mm 程採取し、そのうち 30mg を定量分析に用いた。尚、被験者は全て日本人であり生来黒髪を有しているが、このうち 5 名は染髪を行っており毛髪検体も茶色~黄色を呈していた。

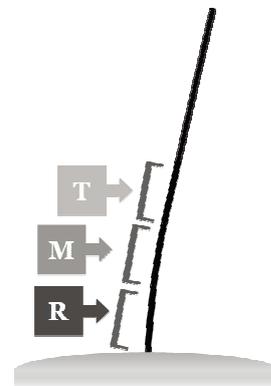


Fig. 1 Schematic image of hair segmentation. They are segmented by the length from the root: R (0-2cm), M (2-4cm), and T (4-6cm).

3-2 検体の前処理

毛髪・爪各検体の洗浄はメタノールにより行った。次に、精密粉砕機によりパウダー状になるまで粉砕を行った。その後、抽出溶媒（メタノール）を加え室温で24時間かけて抽出を行った。抽出後、抽出溶媒を遠心濃縮機により乾燥させ、後のコルチゾールの生化学定量分析のための緩衝液によりけん濁を行った。生化学定量分析は酵素結合免疫測定（ELISA）により行った。

上記プロトコルは過去の一連の研究⁽⁵⁻⁹⁾と大きく変わらないものの、洗浄・抽出手法、また定量分析手法（HPLCなど）において相違がある。しかしながら、これらの相違による影響を全て検証することは実験計画が複雑になりすぎるため、本研究ではコルチゾールの抽出量にとりわけ大きく影響すると想定される粉砕状態について検討した。具体的には、粉砕状態について（1）パウダー状に粉砕されたもの、および（2）粉砕が不十分なものを用意して最終的なコルチゾール量を比較した。図2にそれぞれ粉砕状態の良し悪しにおける毛髪検体の状態を例示している。

3. 結果

3-1 染髪による影響

図3に染髪を施していた5名の被験者、および染髪を施していない11名の毛髪から抽出したコルチゾール量（毛髪1mgあたりの抽出量）の平均値（エラーバーは標準偏差）を示す。尚、染髪を行っている者においても毛根に近い部分（例えばRのサンプル）については新しい毛髪の成長により洗髪の影響を受けていない為、洗髪者・非洗髪者双方ともT（毛根より4-6cm）のサンプルにより比較している。

同図に示されるように、染髪を施した者はコルチゾール量が有意に低かった（ $p < 0.01$, t 検定）。

3-2 粉砕による影響

図4に毛髪検体の前処理の一つである粉砕状態に対するコルチゾール量の平均値（標準偏差）を示す。同図において「粉砕（良）」とは毛髪がパウダー状になるまで粉砕を行った検体を示し（検体数56個）、「粉砕（不良）」とは粉砕機の粉砕パラメータを変更し毛髪が数mm程の長さに裁断された状態を示す（検体数13個）。

同図に示されるように、粉砕が十分でない検体においてコルチゾール量が有意に低かった（ $p < 0.001$, t 検定）。



粉砕（不良） 粉砕（良）

Fig. 2 An example of insufficiently grinded sample (left) and well grinded sample (right). Well grinding makes hair shaft into powdery substance.

3-3 毛根の部位とコルチゾール量の関係

図5に毛髪の各部位におけるコルチゾール量の平均値（標準偏差）を示す。既に述べたように各毛髪検体は毛根からの距離に応じてそれぞれ R (0-2cm), M (2-4cm), T (4-6cm) と分類され、それぞれ定量分析を行った。尚、前述した染髪者の検体および粉砕が不十分な検体については除外している。

同図に示されるように、コルチゾール量は毛根からの距離が離れる程、したがって、毛髪の生成から時間が経過した部位ほど有意に低下した（ $p < 0.05$: R vs T, R vs M, $p < 0.01$: M vs T, それぞれ Bonferroni 補正による t 検定に基づく）。

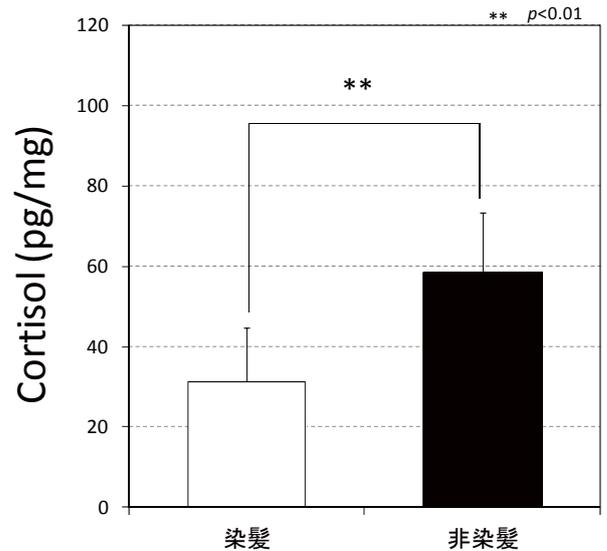


Fig. 3 Cortisol concentration extracted from dyed and undyed hair sample.

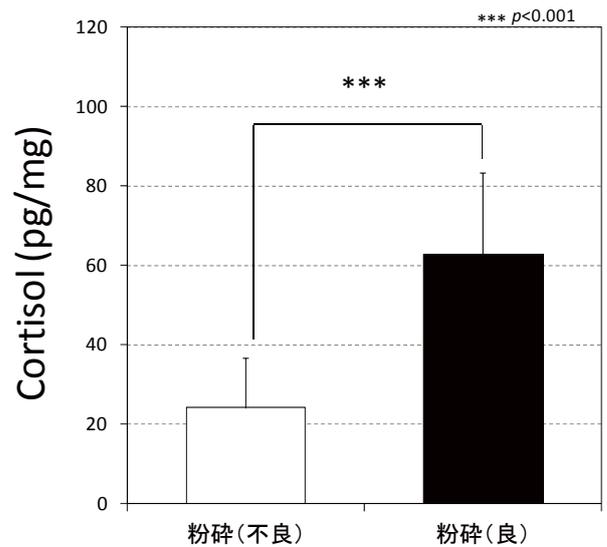


Fig. 4 Difference in the cortisol concentration in the powdered hair sample (right) and roughly grinded hair sample (left).

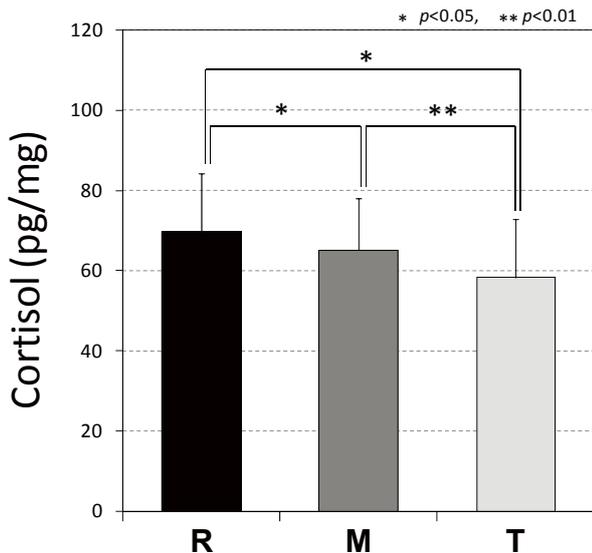


Fig. 5 Cortisol concentration of the hair sample which is segmented by the length from its root: R (0-2cm), M (2-4cm), and T (4-6cm).

3-4 爪検体におけるコルチゾール量

毛髪抽出と同様のプロトコルにより粉碎した爪検体よりコルチゾールを定量した結果(検体数 17 個), 12~59 pg/mg (平均 35.4 pg/mg) となった。毛髪検体との有意な相関関係は認められなかった。

4. 考察・結語

第一に, 本研究で定量された毛髪中のコルチゾール量(39~110 pg/mg) は過去の研究で示された値(例えば 5 to 91 pg/mg⁽⁵⁾) と概ね同様のレンジを示している。さらに, 図 3 において認められたように, 毛髪はその生成から時間が経過するほどにコルチゾール量が減少しているが, この事も過去の一連の研究成果⁽⁵⁻⁸⁾を再現している。

毛髪は 1 ヶ月に約 1cm 伸びることが知られているが, コルチゾールにより数カ月以上にわたる長期的なストレス評価を行いたい場合, このコルチゾールの経時的減少は考慮する必要がある。

一方, 本研究で示されるように, 染髪を施した者は平均的なコルチゾール量が約 3 分の 1 にまで低下しており, (実験デザインの制約から個人差である可能性も捨てきれないもの) 染髪による影響が示唆された。

毛髪は, 毛小皮(あるいはキューティクル)という硬質のケラチン蛋白質により内部構造(毛皮質・毛髄質)が保護されている。しかしながら, 染髪による物理的なダメージが付加されることにより, 内部に含有されていたコルチゾール(およびその他, 細胞間質に含まれる生化学物質)が流出し, 結果的に本研究結果のように染髪者においてコルチゾール量が低下したと考えられる。

さらに, これとは逆のことが毛髪の粉碎状態の差異におけるコルチゾール量の相違についても説明できる。つまり, 粉碎が不十分な検体においては 24 時間の抽出時間を経てもなお, 毛小皮による保護機能によりコルチゾールの抽出量が少なくなったと推察できる。

先に, 本研究で定量した毛髪中のコルチゾール量について概ね過去の研究のレンジと一致していると述べたが, コルチゾールの平均値(R で 69.9 pg/mg) については過去の

研究の 2~4 倍の値を示している。この事は, 人種や生来の髪質による差異も当然影響すると思われるが, 他の先行研究ではボールミルによる粉碎を行っていることも影響している可能性がある。つまり, ボールミルによる粉碎により, 結果的に粉碎後の検体が粗い場合, それだけ最終的な収量が落ちる可能性がある。しかしながら先行研究の粉碎後のサンプルの状態は明示されていないため, この点は追って検証する必要があると思われる。

本研究では毛髪中のコルチゾールを対象に, その抽出の技術的な課題について, 特に(1) 染髪による影響, および(2) 前処理における粉碎状態の影響, を検証した。その結果, 双方共にコルチゾールの収量を低下させる要因となり得ることが示唆された。

その一方, 本研究のプロトコルにより抽出されたコルチゾールの平均値は他の研究と比較して高かった。これは, わずか十数本の毛髪でコルチゾールの定量が十分可能であることを意味している(従前の研究では数百本のサンプリングを行っている)。さらに爪検体においても, 片手の指一本分, 厚さ 1mm 程度の量(ともに 5mg 以下)で十分なコルチゾールを定量できることが示された。これらの結果は, 毛髪・爪のコルチゾールによるストレス評価研究において実質的なメリットを示していると考えられる。

本研究において技術的に解決すべき点は山積しているものの, 毛髪や爪は数カ月におよぶ“ストレスの履歴”を評価できる可能性があり, 唾液や血液に替わるストレス評価の方法論として有望であると思われる。

謝辞

本研究は, 科学研究費補助金(若手研究(A), 課題番号: 23680023)により実施された。

参考文献

- (1) Kirschbaum, C. & Hellhammer, D.H., Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. *Psychoneuroendocrinology*, **9**(1), pp.313-333, 1994.
- (2) Dickerson, S.S. & Kemeny, M.E., Acute stressors and cortisol responses: A theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychological Bulletin*, **30**(3), pp.335-391, 2004.
- (3) Hellhammer, D.H., Wüst, S., and Kudielka, B.M., Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, **34**(2), pp.163-171, 2009.
- (4) Steptoe, A. & Wardle, J., Positive affect and biological function in everyday life. *Neurobiology of Aging*, **26**(1), pp.108-112, 2005.
- (5) Raul, J.S., Cirimele, V., Ludes, B., and Kintz, P., Detection of physiological concentrations of cortisol and cortisone in human hair. *Clinical Biochemistry*, **37**(12), pp.1105-1111, 2004.
- (6) Kirschbaum, C., Tietze, A., Skoluda, N., and Dettenborn, L., Hair as a retrospective calendar of cortisol production-Increased cortisol incorporation into hair in the third trimester of pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*, **34**(1), pp.32-37, 2009.
- (7) Gao, W., Xie, Q., Jin, J., Qiao, T., Wang, H., Chen, L., Deng, H., and Lu, Z., HPLC-FLU detection of cortisol

distribution in human hair. *Clinical Biochemistry*, **43**(7-8), pp.677-682, 2010.

- (8) Dettenborn, L., Tietze, A., Bruckner, F., and Kirschbaum, C., Higher cortisol content in hair among long-term unemployed individuals compared to controls. *Psychoneuroendocrinology*, **35**(9), pp.1404-1409, 2010.
- (9) Warnock, F., McElwee, K., Seo, R.J., McIsaac, S., Seim, D., Ramirez-Aponte, T., Macritchie, K.A., and Young, A.H., Measuring cortisol and DHEA in fingernails: a pilot study. *Neuropsychiatric Disease Treatment*, **3**(6), pp.1-7, 2010.