

平成6年度
人間感覚計測応用技術の研究開発
委託研究成果報告書

第Ⅱ編
本 論 編
(第1分冊)

生理的影響計測技術の研究開発

平成7年3月

NEDO 図書・資料室



010018103-1

社団法人 人間生活工学研究センター

目 次

(第1分冊) 生理的影響計測技術の研究開発

第1章 概 要	7
第2章 ストレス測定のための生理機能複合計測技術の研究開発	11
第3章 非接触皮膚温計測技術の研究開発	63
第4章 ストレス指標物質計測技術の研究開発	111

(第2分冊) 生理的影響計測技術の研究開発

第5章 簡易装着型・高感度脳波計測装置の研究開発	207
第6章 生体活性度及び生体リズムの計測技術の研究開発	253
第7章 無拘束加速度心拍計の研究開発	305

(第3分冊) 模擬環境提示技術の研究開発

第8章 複合音環境提示・評価・改善手法の研究開発	365
第9章 職場環境の向上に資する輻射モデルの研究開発	419
第10章 高精度な実感覚視覚認識の研究開発	473

(第4分冊) 相関・評価技術の研究開発

第11章 人体熱モデルによる作業者の 生活シーン別温熱快適性評価手法の研究開発	529
第12章 皮膚温による感覚量推定手法の研究開発	597
第13章 ストレスの計測技術及び香りによるストレス緩和技術の研究開発	657

(第5分冊) 相関・評価技術の研究開発

第14章 原子力発電所における人間感覚と親和性のある作業環境の研究開発	723
第15章 温熱環境を主とした複合環境における快適性相関技術の研究開発	775
第16章 人間感覚に適応する空間型ヒューマンインターフェースの研究開発	853
第17章 ヒューマンコンフォートメータの研究開発	919

(第6分冊) 模擬環境提示技術調査研究

第18章 模擬環境提示装置の概念設計	971
--------------------------	-----

第Ⅱ編 本論編（第1分冊）

生理的影響計測技術の研究開発

目 次

第1章 概 要	3
1. 1 まえがき	7
1. 2 研究開発の基本計画	7
第2章 ストレス測定のための生理機能複合計測技術の研究開発	11
1 無拘束皮膚インピーダンス計測装置の開発	11
1. 1 システム概要	11
1. 2 計測ソフトウェア	11
1. 3 性能評価	16
2 無拘束瞬目計測装置の開発	18
2. 1 システム概要	18
2. 2 計測ソフトウェア	20
2. 3 性能評価	21
3 連続血圧計測装置の開発	22
3. 1 システム概要	22
3. 2 計測制御ソフトウェア	24
3. 3 性能評価	28
4 精神作業負荷実験	30
4. 1 実験システム概要	30
4. 2 実験プロトコル・計測条件	32
4. 3 作業負荷課題	32
4. 4 作業成績	33
4. 5 NASA-TLX	36
4. 6 生理計測結果	36
5 生理情報データベースシステムの開発	48
5. 1 システム概要	48
5. 2 各サブシステムの概要	49

5. 3 生理情報データベースシステムの運用	58
6 あとがき	59
6. 1 第Ⅰ期成果について	59
6. 2 成果応用の展望	59
6. 3 第Ⅱ期研究への展開	59
6. 4 参考文献	60
6. 5 研究発表	60
第3章 非接触皮膚温計測技術の研究開発	63
1 非接触皮膚温計測装着の開発	63
1. 1 計測システムの概念	63
1. 2 システムの構成	63
1. 3 画像入力部	66
1. 4 画像処理装置	69
1. 5 テンプレートマッチング装置	73
1. 6 データ表示感覚量推定装置	78
1. 7 感覚量推定プログラム	83
2 人物抽出技術	85
2. 1 概 要	85
2. 2 人物抽出アルゴリズム	85
2. 3 人物抽出処理の高速化	88
3 人体部位認識・姿勢決定技術	90
3. 1 概 要	90
3. 2 特徴部位の認識	90
3. 3 特徴部位の追跡	98
3. 4 頭部姿勢の決定と温度計測点の計測	104
4 あとがき	107
4. 1 成果応用の展望	107
4. 2 第2期研究への展開	108
第4章 ストレス指標物質計測技術の研究開発	111
1 ストレス指標物質計測技術開発	111
1. 1 唾液中カテコールアミンの自動分析法の構築	111

1. 2	唾液中C Aの安定化と試験法の確立	126
1. 3	唾液中C A、C S同時分析用連続非一体型汎用H P L C装置の構築	131
1. 4	唾液中C Sのバックグラウンド及び標準化の検討	135
1. 5	唾液中C Aのバックグラウンド	155
1. 6	唾液中C A、C Sによるストレス検知予備実験	159
1. 7	唾液中C A測定用H P L Cシステムの 更なる高感度化と安定化についての予備検討	169
1. 8	予備実験に対する文献などからの総括的考察と今後の課題	174
2	ストレス指標物質測定装置開発	177
2. 1	はじめに	177
2. 2	ストレス指標物質測定装置プロトタイプA の改良及びその最適化の検討	178
2. 3	ストレス指標物質測定装置プロトタイプBの開発	193
2. 4	まとめ	197
3	あとがき	199
3. 1	第1期のまとめ	199
3. 2	成果応用の展望	200
3. 3	第2期研究への展開	201
3. 4	文 献	201
3. 5	研究担当者	202

第1章 概 要

第1章 概 要

1. 1 まえがき

本報告書は、通商産業省工業技術院の産業科学技術研究開発制度によって実施されている「人間感覚計測応用技術の研究開発」プロジェクトにおいて、(社)人間生活工学研究センターが工業技術院の委託を受けて実施した平成6年度における研究開発の成果内容を詳細に記述した第Ⅱ篇本論篇である。

本研究開発は、平成3年度から当時の大型プロジェクト制度によって開始され、平成5年度には制度変革に伴い、現在の産業科学技術研究開発の人間・生活・社会分野の研究開発として位置づけられた。

本研究費は、政府予算の特別会計電源開発費から支出されている。実質的な研究開発は、(社)人間生活工学研究センターが同センターと協力関係にある13企業の各研究室とともに実施したものである。

1. 2 研究開発の基本計画

「人間感覚計測応用技術」の研究開発基本計画によれば、9年間に総額約200億円の研究開発費が予定され、研究開発の目標は以下のように設定されている。

人間の感覚を反映した快適な衣服等の製品、ストレス等の少ない居住・職場環境の設計・製作を行なうため、人間の諸感覚を簡易かつ定量的に測定・評価できる人間感覚計測技術及び人間の諸感覚を製品の設計・製作に反映する人間感覚応用技術を確立することを最終目標とする。開発される技術は、人間及び社会に与える影響を十分考慮したものとする。

研究開発期間は平成2年度(脚注)から平成6年度までの5年間の第1期と、平成7年度から平成10年度までの4年間の第2期とに分けられている。このうち第2期については、計画概要が示されているにとどまり、第1期末に行なわれる中間評価の結果をまって、第2期の基本計画が策定される。

このうち第1期計画の目標は、生理的影響量から感覚量を推定するに際して必要な外的刺激環境・生理的影響・感覚量データを作成するための技術を確立することであり、基本計画にそって研究開発が行なわれた。

- ①熱、光等の外的刺激環境が人間の生理に及ぼす影響を計測する技術の研究開発
- ②外的刺激環境を模擬し、被験者に効果的に提示できる技術の研究開発
- ③外的刺激環境、生理的影響及び感覚量の相関調査方法の研究開発

それぞれの項目における研究開発の目標は次頁の表1-2.1のとおりである。

注：「人間感覚計測応用技術の研究開発」プロジェクトは、本成果報告書に記述されたものとは別途に一般会計予算においても実施されていて、両者が一体となって本事業の全体を構成する。ただし平成2年度においては、研究開発の手順等の基礎調査が一般会計予算のみで実施された。

表1-2.1 第1期研究開発目標

研究開発項目	第1期研究開発目標
生理的影響計測技術	外的刺激に起因した脳波、瞳孔反応、及び誘発電位等の人間生理変化を簡易に計測できる技術を確立する。計測技術の開発に当たっては、非接触、非侵襲を目標とする。
模擬環境提示技術	熱、音、振動、光、香り、景観、構成材等の人間の感覚に影響を及ぼす外的刺激環境を総合的に発生制御できる装置及びシステムを構築する。
外的刺激環境・生理的影響・感覚量の相関調査技術	統計的に有意な外的刺激環境、生理的影響及び感覚量の相関データを効率的に取得するための試験技術を確立する。
評価シミュレータの開発 (第2期計画の前倒し)	発汗マネキン等、人間による試験を代替でき、又は小人数の試験で人間の感覚を推定できる感覚評価シミュレータ及び人間の感覚を製品の設計に反映できる設計支援システム等の技術を開発する。

本報告書は平成6年度の各研究室の研究開発成果の内容を詳述したものである。

第2章 ストレス測定のための生理機能 複合計測技術の研究開発

第2章 ストレス測定のための生理機能複合計測技術の研究開発

(京都研究室)

1. 無拘束皮膚インピーダンス計測装置の開発

平成5年度までに開発した小型装置を実際の作業現場においても簡便に使用できる実用的な装置に再構築するのが本年度の目標である。そのため回路設計の改良などにより省電力化や小型化を進めるとともに、計測アルゴリズムをインテリジェント化し安定した計測を実現した。

1.1 システム概要

本年度は電源回路を見直すことで電源効率を向上し省電力化を実現した。その結果、これまで単4電池2本で動作していたシステムが単5電池2本で動作し、連続計測時間も25%程度向上し約8時間まで可能になった。さらに回路変更の結果、総容積・総重量ともに従来装置の約二分の一に小型化した。平成5年度に構築した計測装置との大きさの違いを表2-1.1に示す。

装置の外観と装着状態とを図2-1.1に示す。本体部および電池ボックスはプローブベルトに一体化し、これを手首に巻くだけで簡単に装着できる。手首用ベルトには球面形状に加工したステンレス電極を取り付け皮膚との接触を改善した。また指用電極も同様に改良しており、このようなセンサ構造の見直しにより計測安定性が向上したものと考えられる。

皮膚インピーダンス計測装置のブロック図を図2-1.2に、計測のフローチャートを図2-1.3に示す。ハードウェア構成や計測アルゴリズムの基本部分はこれまでに開発したものから大幅な変更はないが、本年度は計測信頼性を向上するため通電電流の直流成分を動的に除去するアルゴリズムを検討した。また個人差や状態差に応じて通電電流を制御するオートゲインアルゴリズムの機能を充実し安定した計測を目指した。

表2-1.1 皮膚インピーダンス計測装置小型化の概要

	外形寸法（縦×横×厚さ，単位 mm）	総容積（cm ³ ）	総重量（g）
平成5年度開発機	本体部：43×33×11 電源部：55×38×28	74.13	101
平成6年度開発機	本体部：45×38×14 電池ボックス：30×38×15	41.04	58

1.2 計測ソフトウェア

(1) 通電電流の直流成分除去アルゴリズム

通電電流を生成する過程でD/Aコンバータにより生成される通電波形から基準電圧との差を取りオフセットを除去しているが、この基準電圧は長時間計測による電池電圧の降下や電池電圧のばらつきなどの影響により変動する。このため通電電流に直流成分が重畳し、正確に計測できないという問題があった。この影響を除去するために基準電圧をA/D変換してCPUが電圧レベルを監視し、基準値からの変位分をD/Aコンバータへの出力値に反映させることで直流成分

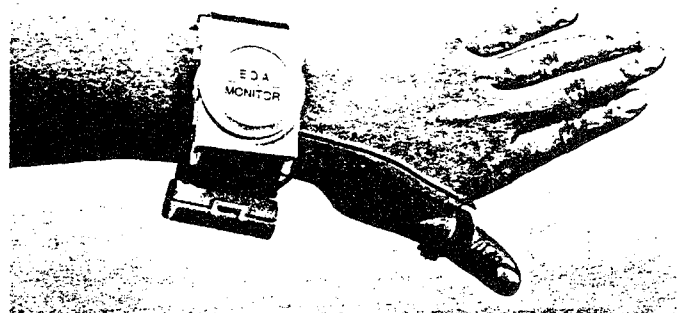
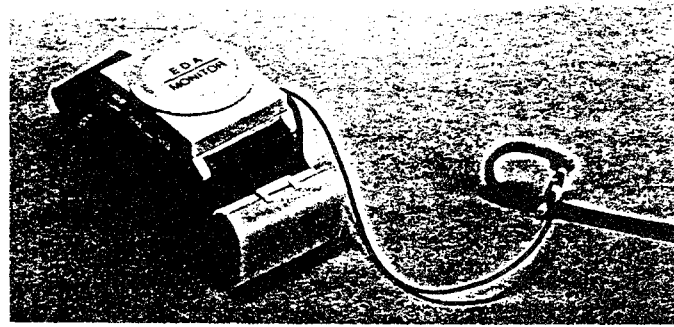


図2-1.1 皮膚インピーダンス計測装置の外観と装着状態

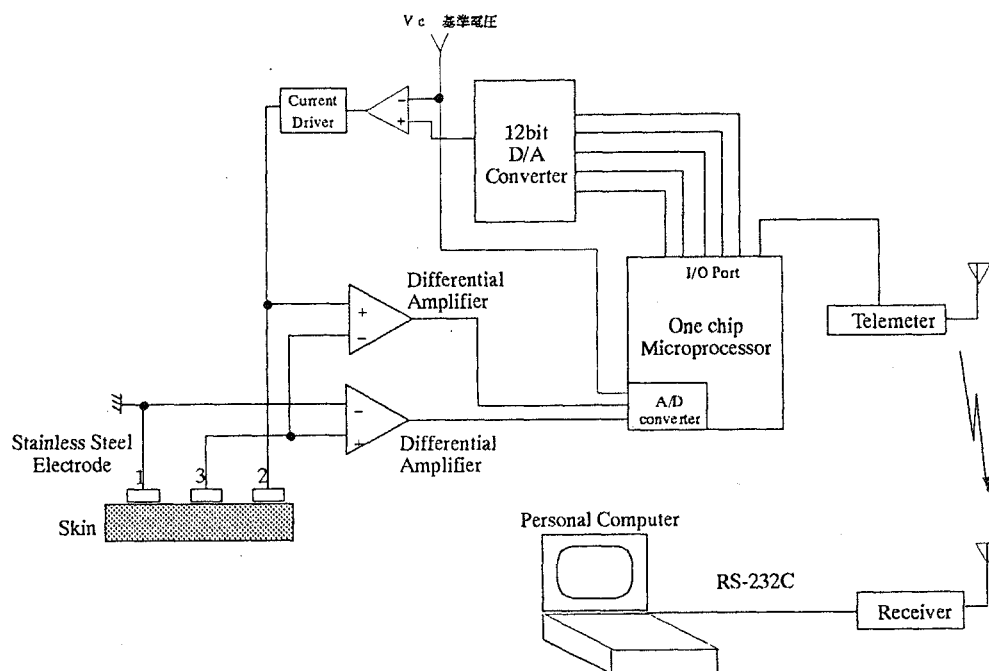


図2-1.2 皮膚インピーダンス計測装置の概要

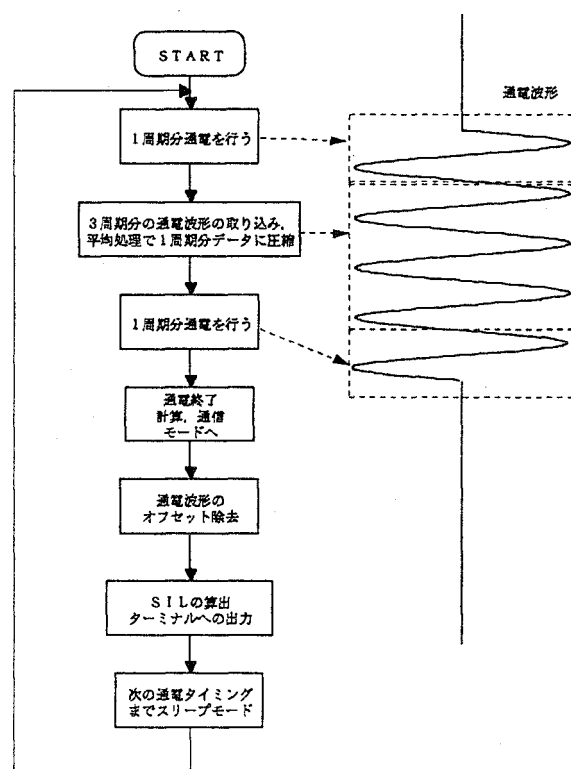


図2-1.3 皮膚インピーダンス計測アルゴリズム

が発生しないようにするアルゴリズムを検討した。

本装置駆動の時間経過にともなう電池電圧降下例を図2-1.4に示す。駆動時点では3 Vの電圧を示しているが、2時間後には2.7 Vまで下がり、その後5時間ほどは安定している。さらに1時間経過するとCPUが動作不能な状態に至った。このうち電圧が急激に低下する電源投入後2時間までを考えると、平均して約 $42 \mu\text{V}/\text{sec}$ で電圧が低下していることになる。CPU内蔵のA/Dコンバータの分解能は約 $4.9 \text{ mV}/\text{bit}$ であるため、電圧校正に最低必要なサンプリング周期は $4.9 (\text{mV}) / 42 (\mu\text{V}/\text{sec}) = 116.7 (\text{sec})$ となり、約2分に一度校正をかければよいことになる。電池のばらつきなどの影響も考慮し、20秒毎に校正をすれば充分であると考えアルゴリズムを構築した。フローチャートを図2-1.5に示す。皮膚インピーダンス計測と同時に基準電圧のサンプリングを行い、20秒毎に加算平均する。次にこの値が基準値よりも小さい場合にD/Aコンバータに出力する値のオフセットを調整して直流成分を除去する。この結果、従来までは最大0.1 V程度残存していた直流成分をほぼ0 Vに抑えることができた。

(2) オートゲインアルゴリズム

皮膚インピーダンスをS/N良く計測するためには通電電流がより多く流れるように設定することが望ましい。しかし、皮膚インピーダンス値の高い被験者では通電電流を大きくした場合にアンプの出力が飽和する可能性がある。また逆に、皮膚インピーダンス値の低い被験者で通電電流が小さい場合にはS/Nが悪くなるばかりでなく、CPUにデータを取り込む際のA/D変換

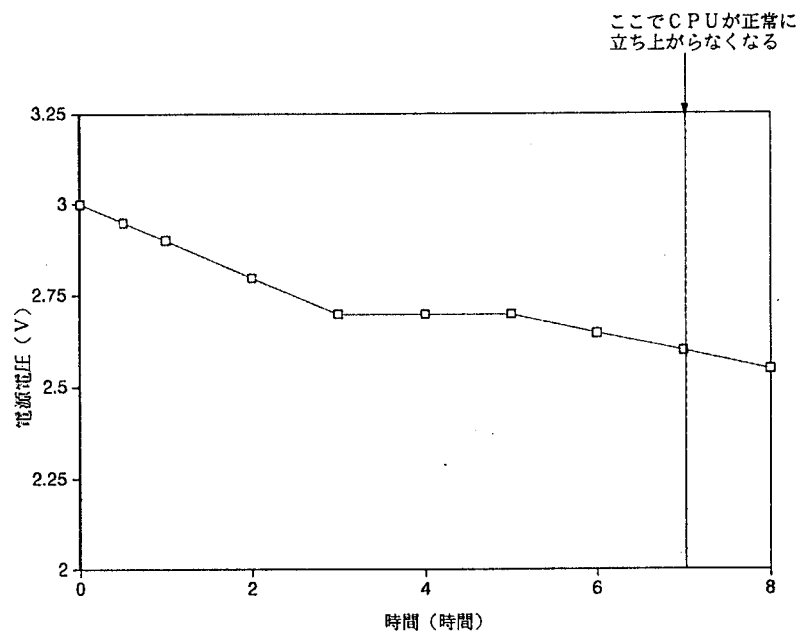


図2-1.4 皮膚インピーダンス計測装置の電池電圧降下例

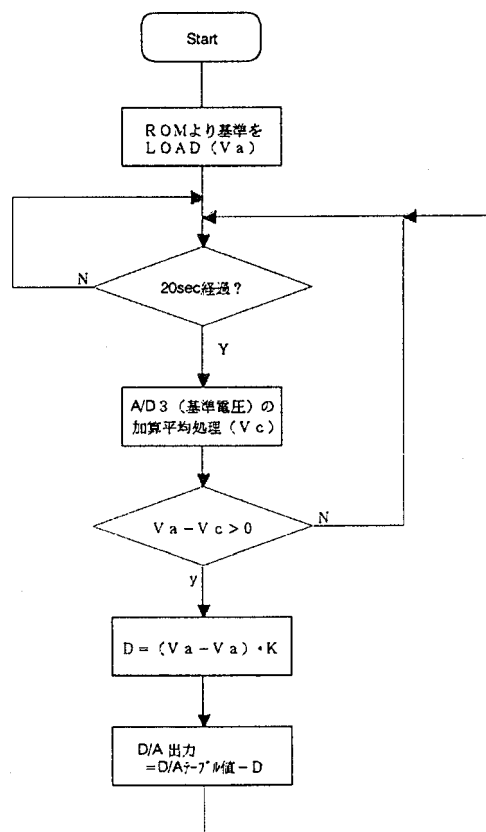


図2-1.5 直流成分除去アルゴリズム

での量子化誤差の中に皮膚インピーダンスの交流成分（Skin Impedance Response; S I R）の変動が埋もれてしまう可能性がある。これらの問題を解決するため被験者の皮膚インピーダンス値の高低に応じて最適な通電電流を加えるように制御するオートゲインアルゴリズムを検討した。オートゲインアルゴリズムのフローチャートを図2-1.6に示す。基本的には手掌部の皮膚インピーダンス変化を捉えて通電電流を制御するもので、手掌部の皮膚インピーダンス変動を反映するA/D値の振幅を求めておき、閾値よりも大きい場合にはゲインを下げ、閾値よりも小さい場合にはゲインを上げるように制御する。閾値はテーブル化してROM上に置くことで、皮膚インピーダンスの範囲により計測に適したゲインが設定されるので計測の信頼性が向上する。

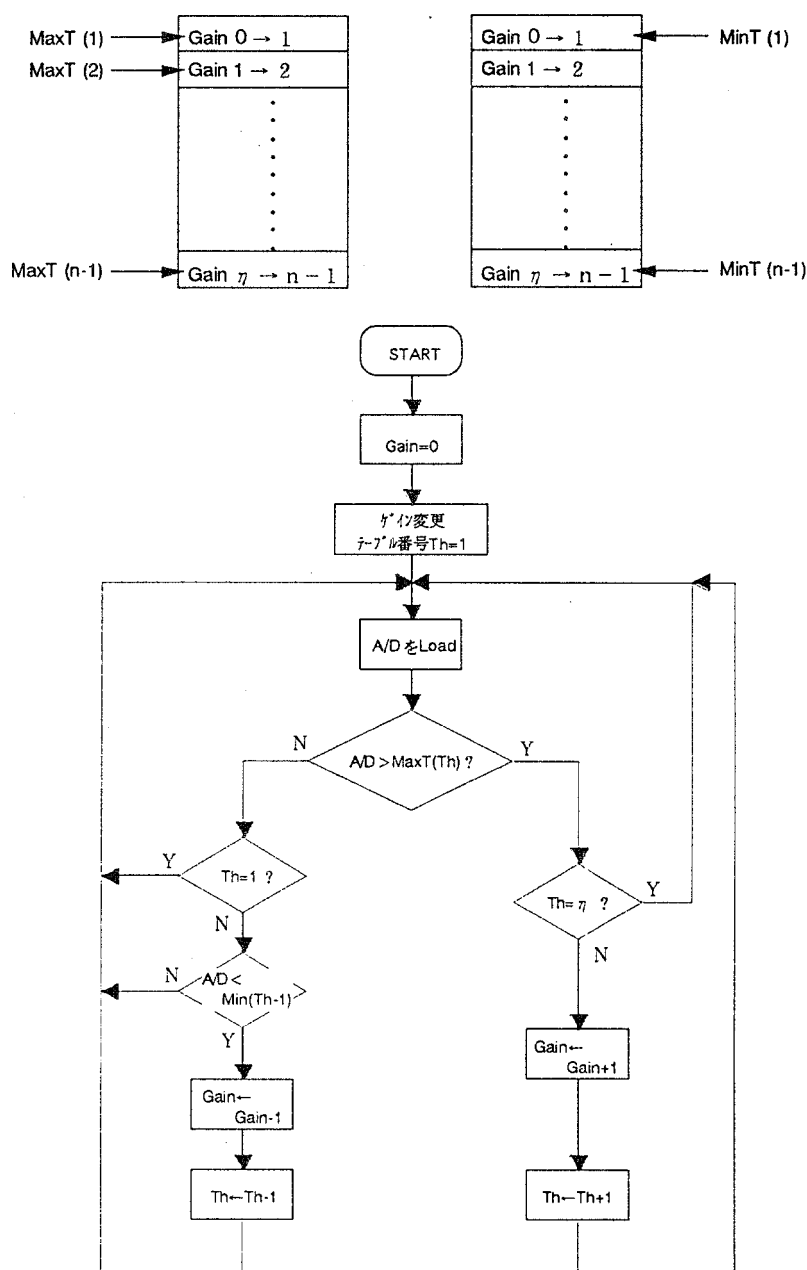


図2-1.6 オートゲインアルゴリズム

1.3 性能評価

(1) 計測直線性

本装置の計測直線性を評価するため標準抵抗を図2-1.2の電極1-3と2-3間に接続しCPUの出力値を計測した結果を図2-1.7に示す。電極1-3間、2-3間ともに500キロオームまでの抵抗値と出力値が線形になっており ($r=0.99$) 良好な計測直線性が得られている。現システムで実際に被験者を置いて計測した場合、通常皮膚インピーダンス値は200キロオーム以下であり計測性能としては充分である。また、前述したゲインコントロール機能が働いても各ゲインに対する計測直線性は確認されている。

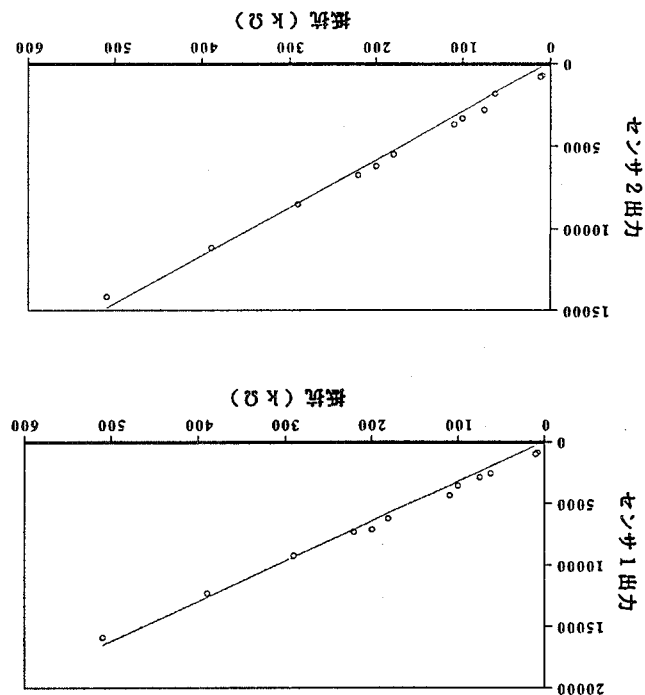


図2-1.7 計測直線性の評価

(2) 精神作業中の計測性能

本装置により従来通り精神作業中の皮膚インピーダンス変化が計測できるかどうかを確認するためVDT作業負荷実験を行った。計測結果を図2-1.8に示す。手では安静時にインピーダンスレベルが上昇し、作業時はレベル低下とSILの特徴的な変動が現れており、精神作業中も良好な計測性能が得られた。なお、本計測は室温で行ったため温熱性発汗部位である前腕の皮膚インピーダンス変化は生じていない。これまでの数十例の検討で精神作業中に手掌での皮膚インピーダンス変化が現れない被験者は皆無であり、このことが評価指標としての実用性を示している点は重要である。

(3) 実作業での計測例

一般的なオフィス作業での計測例として、ドキュメント編集作業中に計測した結果を図2-1.10に示す。5分間の休憩の後に作業を開始しているが当初はあまり作業に集中していなかったため

に皮膚インピーダンスレベルの低下はあまり大きくないが、実験開始後12分以降は作業に集中し始め、これにともない皮膚インピーダンスレベルが顕著に低下している。このように本装置はドキュメント編集作業のようなオフィス作業においても計測できることを確認した。

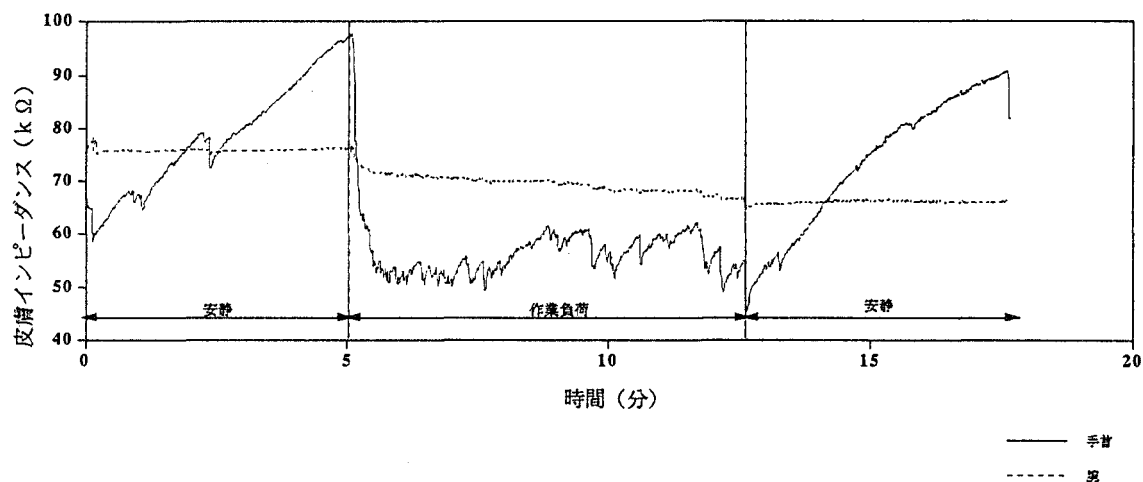


図2-1.8 生体での計測性能評価結果

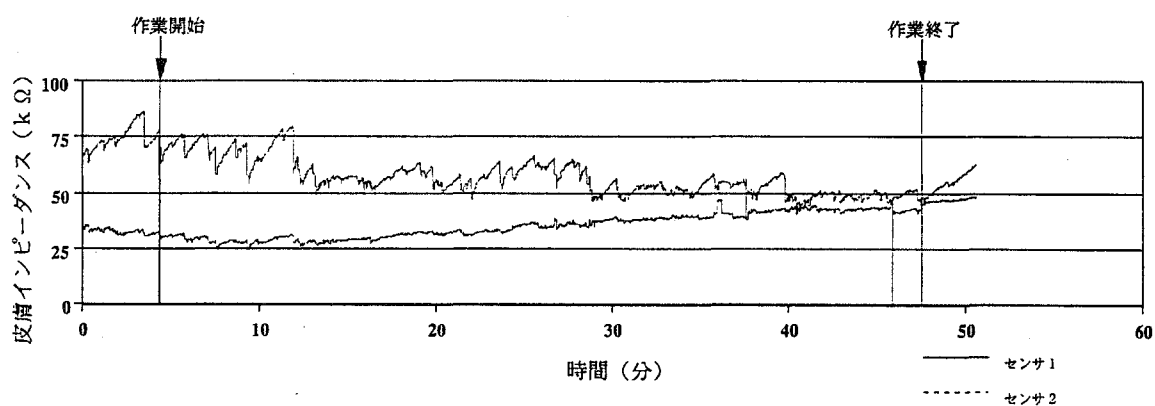


図2-1.9 ドキュメント編集作業時の計測例

2無拘束瞬目計測装置の開発

平成5年度に構築した計測装置は体動の影響を強く受けたので、ノイズ除去フィルタを改良するとともに、ゲインコントロール機能や基線変動除去回路を新たに搭載し計測安定性を向上した。また電源回路を含めた回路設計を見直し、実作業現場でも拘束感なく計測できるまで小型化した装置を開発した。

2.1 システム概要

システムの概要を図2-2.1に示す。瞬目にともなう前額部の電位変化を差動アンプで検出し、Dカットフィルタにより基線変動成分を除去する。アンプにより増幅した後さらにバンドパスフィルタ(0.07Hz~0.14Hz)により瞬目の成分だけを抽出しCPU内蔵のA/D変換器によりデータを取り込む。Dカットフィルタは体動などにより基線が大きく変動したときに用いる時定数の小さいもの(0.08Hz)と、通常の計測時に使うもの(0.05Hz)とをCPUからの信号により切り替えられるようになっている。また、CPUからの制御信号によりゲインを自動的に切り替える機能がある。以上のようなシステム構成にすることにより計測安定性を向上した。計測データはテレメータによりパーソナルコンピュータに転送される。瞬目計測装置の外観と装着状態を図2-2.2に示す。電源回路および計測回路を変更し小型化した結果、従来装置よりも総容積で約二分の一、重量で約四分の三にまで小型化した。平成5年度開発機との大きさの違いを表2-2.1に示す。

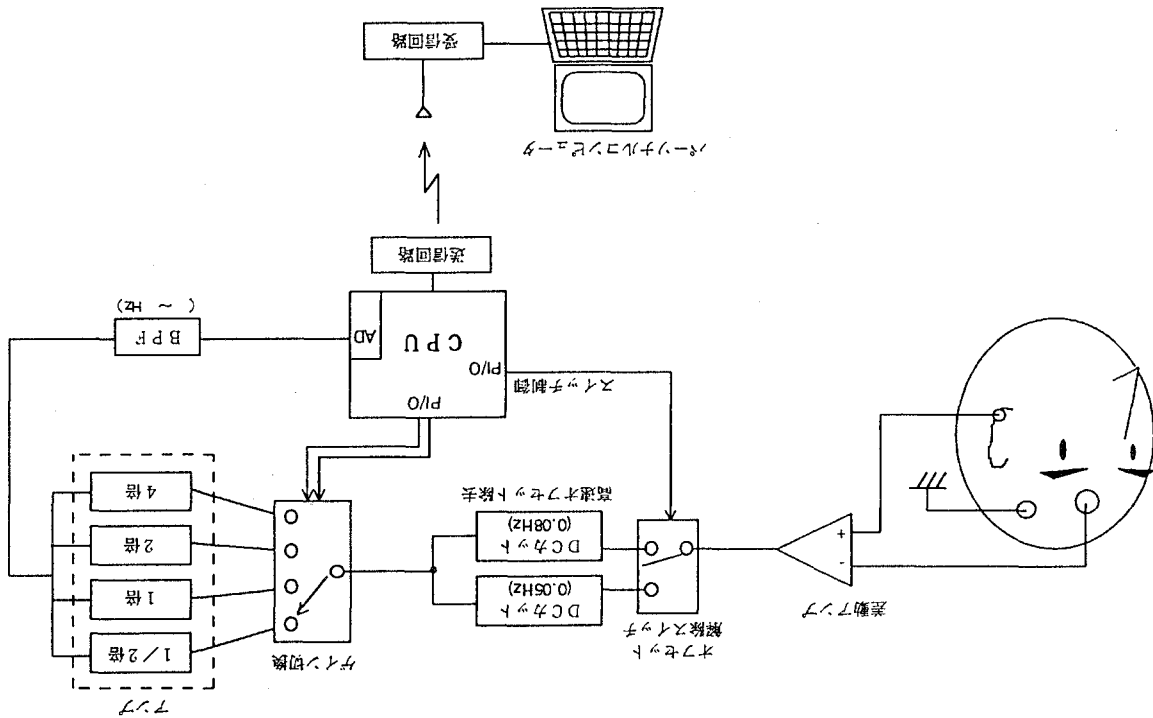


図2-2.1 瞬目計測装置の概要



図2-2.2 瞬目計測装置の外観と装着状態

表2-2.1 瞬目計測装置小型化の概要

	外形寸法（縦×横×厚さ，単位 mm）	総容積（ cm^3 ）	総重量（g）
平成5年度開発機	本体部：43×33×11 電源部：55×38×28	74.13	103
平成6年度開発機	本体部：45×38×14 電池ボックス：30×38×15	41.04	74

2.2 計測ソフトウェア

計測アルゴリズムのフローチャートを図2-2.3に示す。電源投入後約5秒間は増幅用アンプの出力が飽和し消費電流が一時的に増加するため、CPUの立ち上がりが不安定になる。これを避けるために電源投入後1秒間はDCカットフィルタの時定数0.68Hzを選択し出力が飽和しないようにする。その後1msec毎にデータをサンプリングし、10msec毎に加算平均した値をデータとして送出する。またA/D変換器への入力電圧が飽和している場合にゲインを小さくし、逆に入力電圧が極端に低い場合にゲインを大きくするというオートゲインアルゴリズムを搭載しており、適正なゲイン設定の調整を実現している。

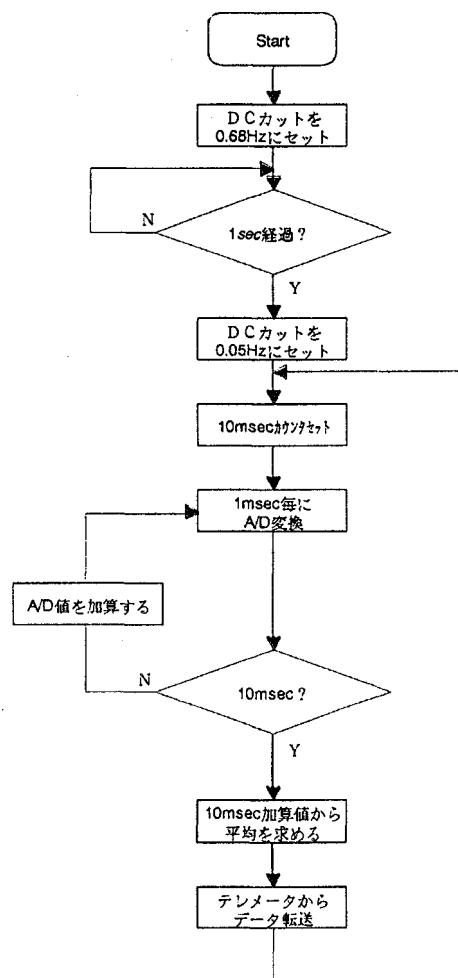
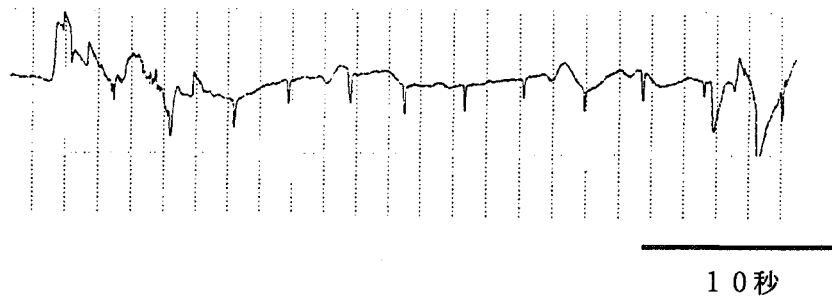


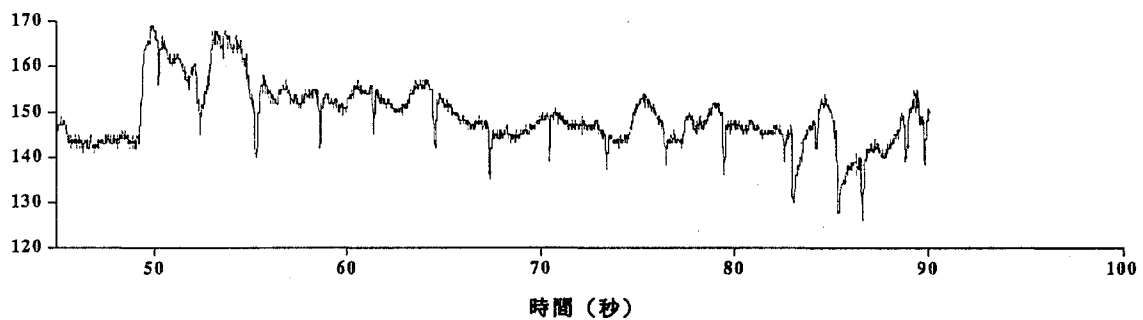
図2-2.3 瞬目計測アルゴリズム

2.3 性能評価

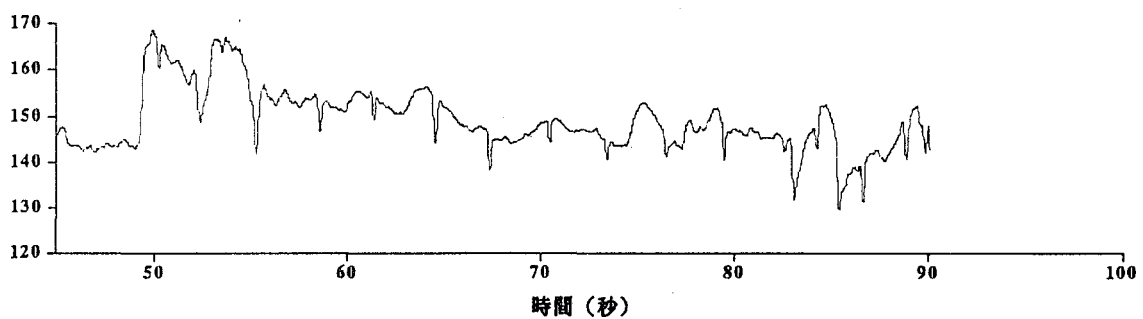
本装置の計測性能を評価するため、汎用生体アンプと本装置とにより安静時の瞬目を同時計測し出力を比較した。汎用生体アンプ（Bio-Top）での計測は小型生体電極を用いて、垂直EOG法で行った。汎用アンプのフィルタはハイカットフィルタ30Hz、ローカットフィルタ0.5Hzに設定した。汎用生体アンプの出力、本装置の出力、および本装置の出力の移動平均結果を図2-2.5のa、b、cにそれぞれ示す。本装置の出力は汎用アンプに比べ多少ノイズレベルが大きい、15点の移動平均処理によりノイズを除去でき、汎用アンプとほぼ同等の出力が得られることを確認した。



(a) 汎用アンプ出力



(b) 瞬目計測装置出力



(c) 瞬目計測装置の出力の移動平均結果

図2-2.4 汎用生体アンプとの出力比較

3.連続血圧計測装置の開発

平成5年度に構築した計測装置を改良し、被験者が携帯して使用できる装置を開発した。そのため電源回路の設計や計測プロトコルの一部変更により電池駆動ができるようにした。また計測制御性能の向上のためハードウェア構成を一部変更した。

3.1 システム概要

本装置のブロック図を図2-3.1に示す。カフは平成5年度に製作したものより空気系の容量を小さくし制御応答特性を向上した。また光電脈波検出部周辺のシリコンゴムを厚くすることで光電脈波の検出性能を向上させた。シリコンゴムの形状を図2-3.2に示す。カフ圧制御のフィードバック信号として用いるカフ圧センサからの信号にはノイズが重畳しやすいため、カフ圧を検出する圧力センサと電圧信号に変換する圧力アンプをカフとともにベルトに装着するようにし、出力インピーダンスを下げることによりノイズの低減をはかった。カフ圧制御の制御対象である電磁弁には小型のものを使用し、カフ内に流れる空気の流量を厳密に制御できるようにしたうえ、さらにカフとともにベルトに装着し制御の遅延ができる限り生じないようにした。

本体部は計測回路、制御回路、CPU、ポンプ、通信回路からなる。計測用回路として光電脈波検出回路と圧脈波検出回路とがあり、これらの信号はCPU内蔵の10bitのA/D変換器により取り込まれる。制御用回路としては光電脈波検出用LEDドライブ回路、ポンプ制御回路、電磁弁制御用のPWM（Pulse Wave Modulation）電流制御回路があり、それぞれCPUのPIO（Programmable Input/Output）ポートから制御される。通信回路はCPUのシリアル出力ポートからの信号をRS232Cレベルに変換してパーソナルコンピュータに出力するとともに、パソコン側からの制御信号をレベル変換してCPUに入力する構成にしている。本装置の外観とカフの装着状態とを図2-3.3に示す。

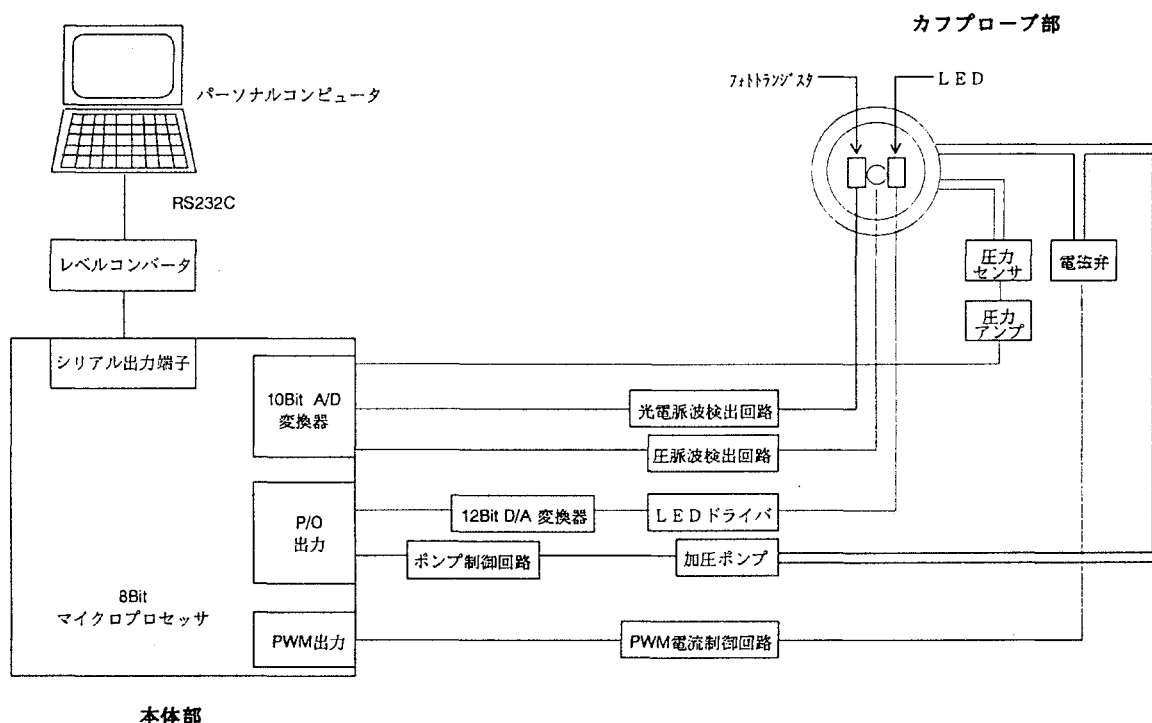


図2-3.1 連続血圧計測装置の概要

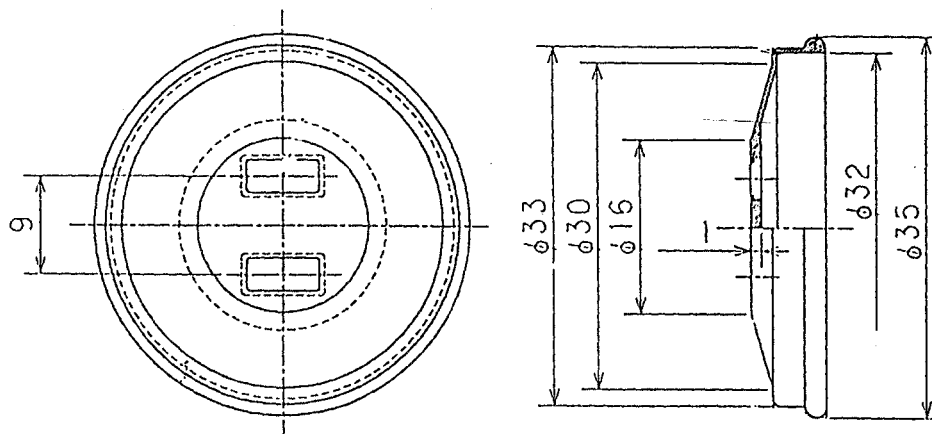


図2-3.2 カフプローブのシリコンゴムの構造

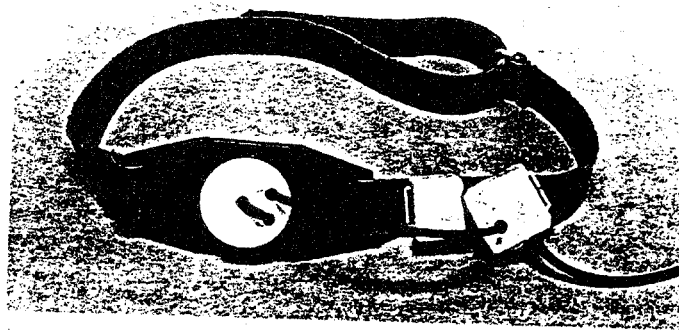


図2-3.3 連続血圧計測装置の外観と装着状態

3.2 計測制御ソフトウェア

平成5年度に検討したカフ圧制御法はP制御（Proportional control）とデジタルフィルタの組み合わせを用いてきたが圧制御が不安定になる場合があり、制御方式としてPD制御（Proportional and Differencial control）とデジタルフィルタの組み合わせによる方式を採用した。また省電力化のため、これまでポンプを常時駆動させたまま圧力を制御していたが、必要なときだけポンプを駆動するようにCPU制御するように改善した。

(1) 容積振動法

計測フローチャートを図2-3.4に示す。カフ圧制御用の電磁弁を全閉し、ポンプを駆動させて加圧を開始し、目標加圧値に圧が達した時点でポンプを止めて加圧を終了する。次に減圧速度を設定してカフ圧制御プログラムを作動させ、一定の減圧速度でカフ内を減圧する。基本的にはカフ圧から減圧速度を算出し、目標減圧速度よりも現在の減圧速度が大きければ電磁弁を閉め、逆に目標減圧速度よりも現在の減圧速度が小さければ電磁弁を開けて制御する。圧力値が20mmHg以下になった時点で計測を終了し、得られた光電脈波振幅とカフ圧の情報から最高血圧、最低血圧を算出する。

カフ圧制御の概要を図2-3.5に示す。圧力のA/D変換値の微分から求めた減圧速度とあらかじめ設定した減圧速度目標値との差をPD制御へ入力し、さらにこの出力をデジタルローパスフィルタ（Cut Off:0.2Hz）へ入力して制御値をスムージングする。この制御値と前回の電磁弁制御値を加え合わせて電磁弁制御用のPWM信号に変換し、電磁弁を制御する。この結果として現れるカフ内の圧力変化をフィードバックし、これら一連の処理を続ける。

(2) 連続計測

計測フローチャートを図2-3.6に示す。はじめに容積振動法により較正するまでの時間（ t_c ）をセットする。次に容積振動法により計測し、この時の光電脈波振幅とカフ圧の情報から連続計測時の押し圧目標値を決定する。次にポンプを駆動して押し圧制御目標値まで圧力を上昇させた後にポンプを止め、現在の圧が目標値よりも高い場合には電磁弁を開け、逆に低い場合には電磁弁を閉じて制御する。押し圧値が目標値よりも著しく小さい（目標値の75%以下）場合、ポンプを駆動させて目標値まで圧を上げた後にポンプを止めるようにしている。連続血圧計測時間が t_c を超えた時点で再び容積振動法による押し圧決定を行い連続計測を続行する。

容積振動法から得られた結果をもとにした連続計測時の加圧目標値決定法の概要を図2-3.7に示す。容積振動法により得られた脈波振幅の最大値を求めこの時のカフ圧値を求める。次にこの最大値の α 倍（ $0 < \alpha \leq 1$ ）の時点のカフ圧の低い方向から検索していき、その前後の値の2点での線形補間により時刻を求め、この時刻におけるカフ圧を前後の点での線形補間により求めて押し圧目標値とした。

カフ圧制御プログラムの概要を図2-3.8に示す。圧力と押し圧目標値との差を取りPD制御へ入力し、さらにこの出力をデジタルローパスフィルタ（Cut Off:0.2Hz）へ入力して制御値のスムージングを行う。この制御値と前回の電磁弁制御値を加え合わせて電磁弁制御用のPWM信号に変換し、電磁弁を制御する。この結果として現れるカフ内の圧力変化をフィードバックしこれら一連の処理を続ける。

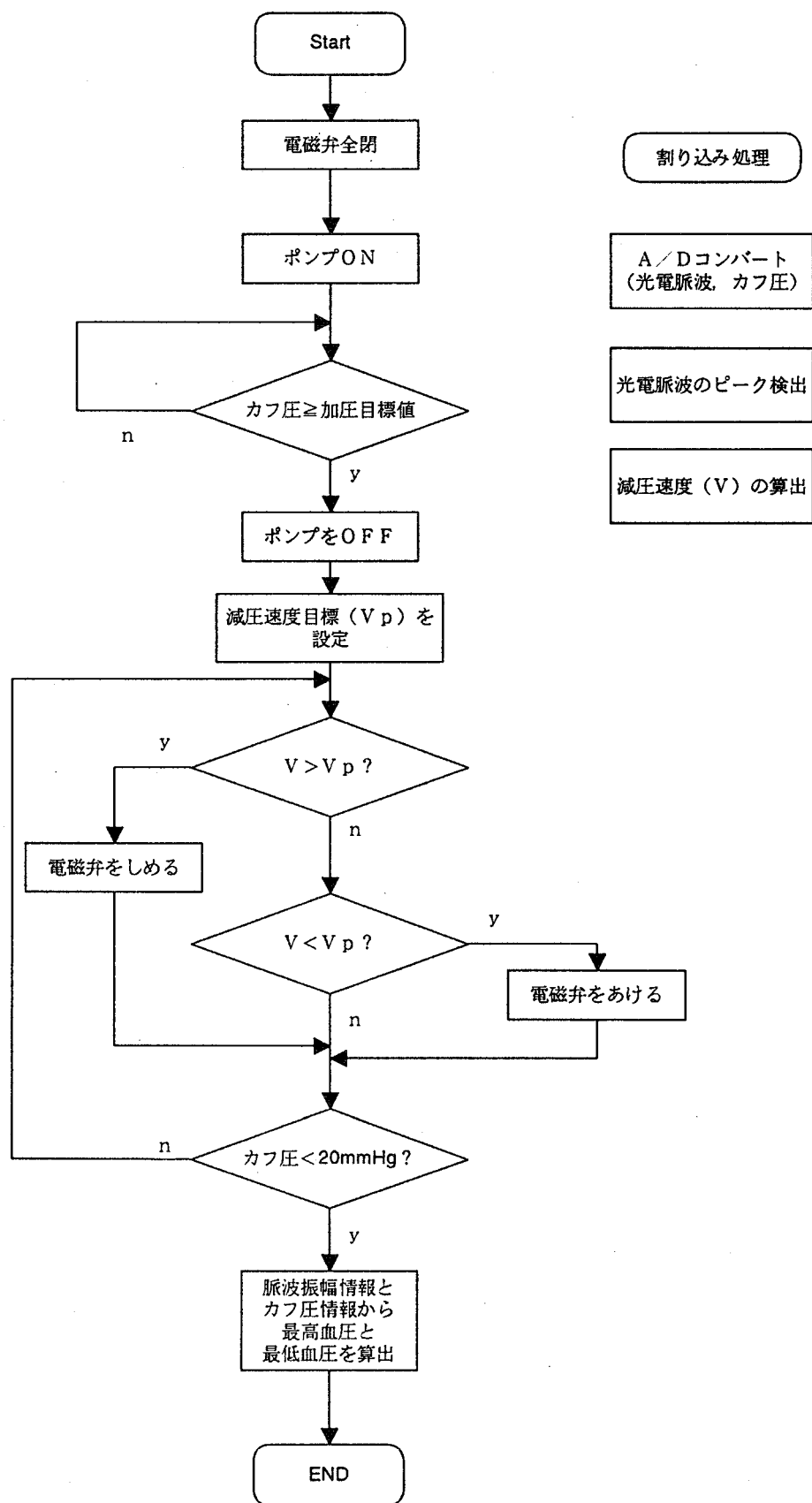


図2-3.4 容積振動法計測フローチャート

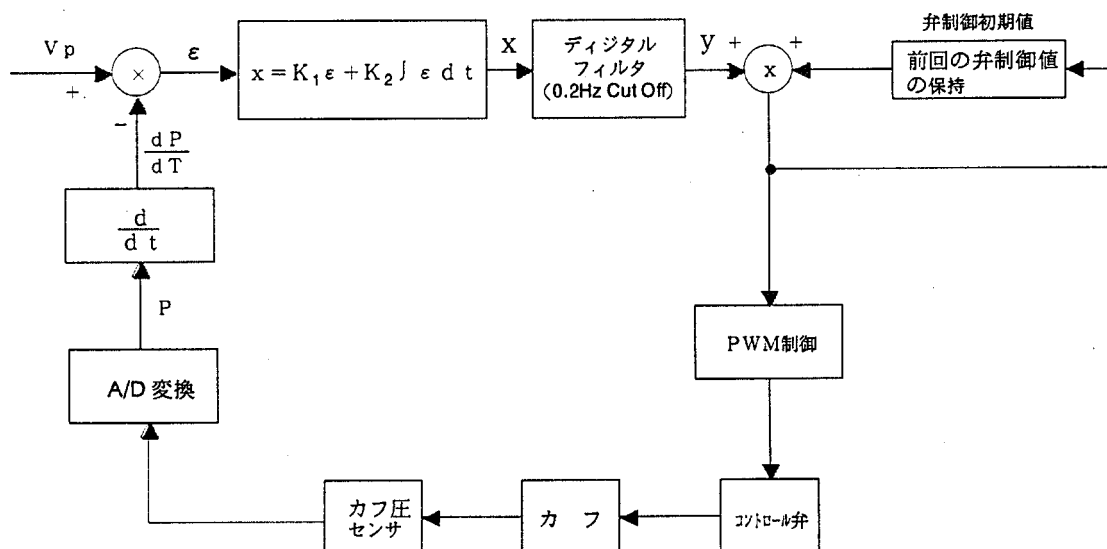


図2-3.5 容積振動法カフ圧制御方式

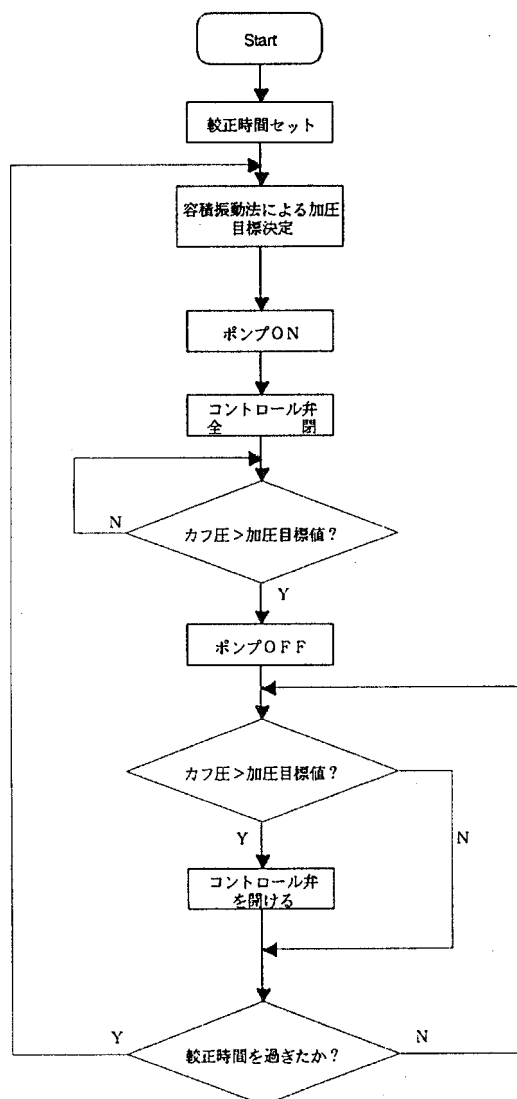


図2-3.6 連続計測プロトコル

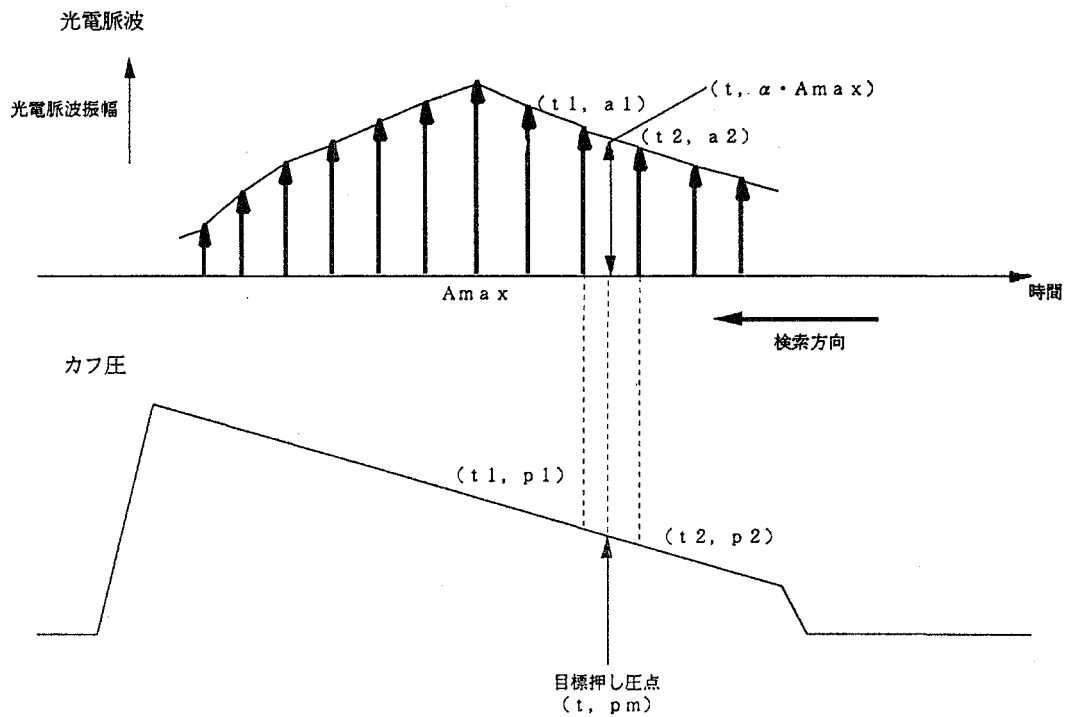


図2-3.7 加圧圧力値決定法

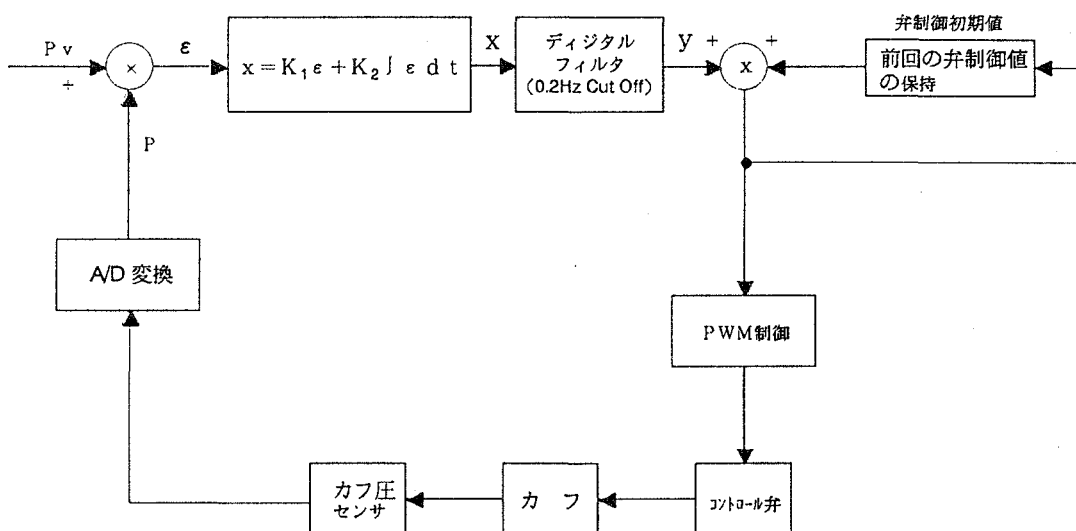


図2-3.8 連続計測カフ圧制御方式

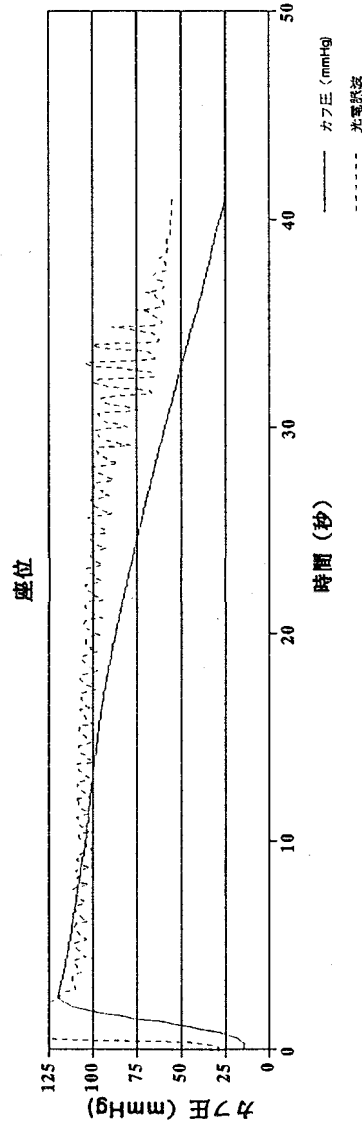
3.3 性能評価

(1) 容積振動法による血圧計測テスト

容積振動法により血圧を測定し、血圧計測性能を評価した。計測結果を図2-3.9に示す。座位にくらべ、頭を下げた状態では脈波が明確に現れるパターンがカフ圧値の高い方向にシフトしている。これは血圧計測部位と心臓との位置関係による変動を反映したものであり、本装置が血圧の変動を捉えていることを示している。

(2) 連続計測

次に連続血圧計測のテストを行った。3分毎に較正を行うモードでの計測例を図2-3.10に示す。これより3分毎に容積振動法により押し圧が決定され、その後約40mmHgの圧でほぼ一定に押されていることがわかる。この一定圧で押している時の計測波形例を図2-3.11に示す。これより光電脈波の振幅がほぼ一定になっており、血圧の連続的な変動を計測していることが確認できた。



頭を下げた状態

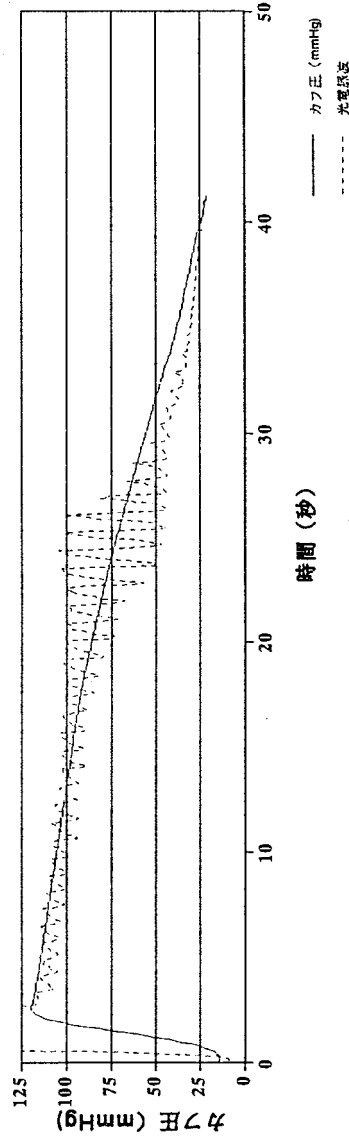


図2-3.9 容積振動法計測例

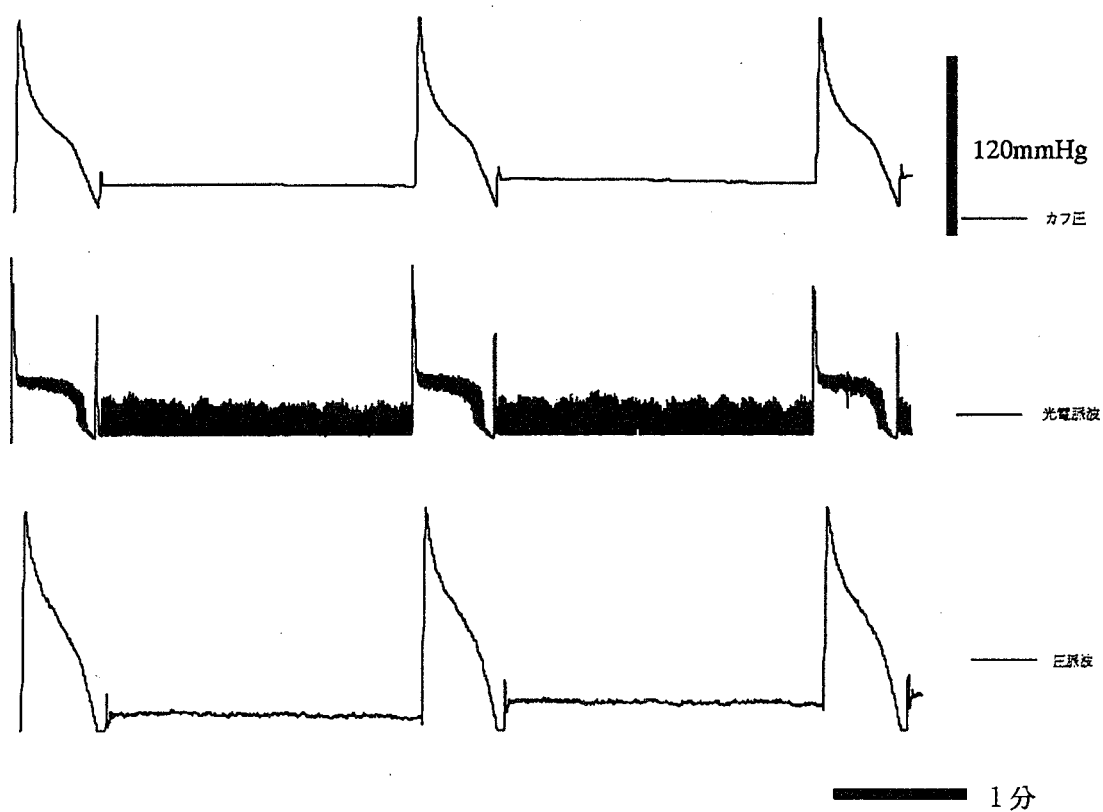


図2-3.10 連続計測例

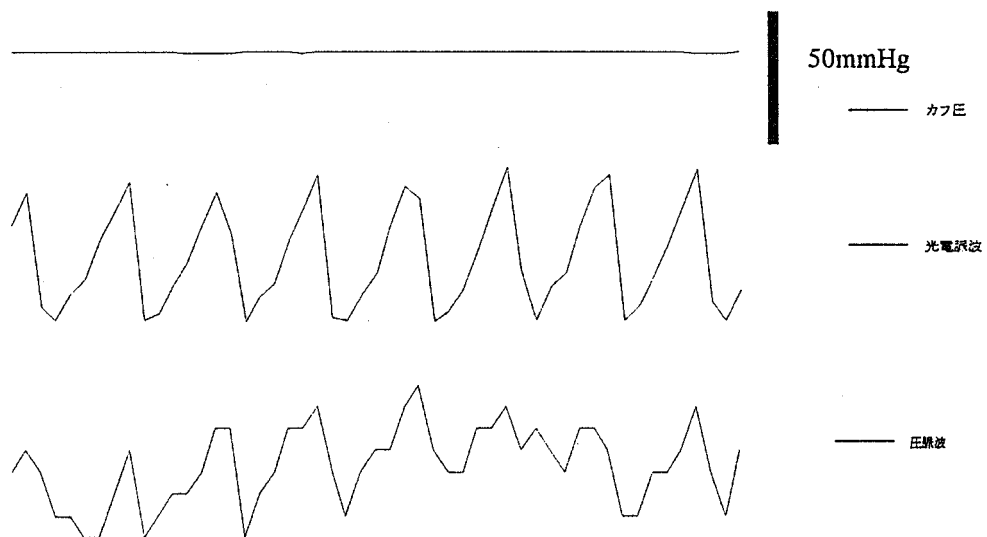


図2-3.11 連続血圧計測波形

4.精神作業負荷実験

本年度はストレス指標化研究に向けた基礎的検討を進めるため、精神作業負荷（メンタルワークロード）評価実験を本格的に実施した。そのため実験環境を整備する目的で作業負荷室を拡張するとともに、被験者の表情・体動や作業画面などと生体信号とを同時にビデオ記録する生体パフォーマンス観測システムを構築した。これにより監視作業を想定した大型スクリーンを用いた負荷実験ができるほか、生体信号とアーチファクトとの識別が容易になった。また、被験者の行動指標や第三者による主観評価と生理指標とを総合的に評価するにも有効な実験システムとした。

4.1 実験システム概要

(1)計測システム

計測システムの概要を図2-4.1に示す。作業負荷室は室内温度および照明環境をコントロールできる半防音のシールドルームで外寸4.2m、3.6m、高さ2.3mである。本年度の精神作業負荷実験での計測項目は生理指標として皮膚インピーダンス・瞬目・心電図・呼吸波形・連続血圧波形を選定した。皮膚インピーダンスは平成5年度に開発した皮膚インピーダンス計で計測し、データはテレメータによりパーソナルコンピュータ（PC-9801ES; NEC）に転送・ファイルされる。瞬目は小型生体電極を用いた垂直EOG法により記録し、生体用汎用アンプ（Bio Top; 日本電気三栄）で増幅した。なお、瞬目と眼球運動との識別の参考データとする目的で水平EOGも同時に記録した。垂直EOGと水平EOGはHiCut 30Hz、LoCut 0.05Hzにフィルタを調整した。心電図は胸部誘導で、呼吸波形は鼻腔に装着したサーミスタにより検出し、増幅後テレメータで受信機にデータを転送した（マルチテレメータシステム; 日本光電）。心電図はHiCut 30Hz、時定数0.1秒で、呼吸波形はHiCut 5 Hz、時定数5.2秒で計測した。連続血圧波形は左手の中指にカフを装着し連続血圧計（Finapres; Ohmeda）で計測した。瞬目、心電図、呼吸波形、連続血圧波形はシグナルプロセッサ（DP1100; 日本電気三栄）により波形がモニタされるとともにDATデータレコーダ（RD-200T; TEAC）に記録される。被験者の表情・体動や作業遂行状況は四画面合成装置を介し8ミリビデオテープに記録される。合成画面例を図2-4.1に示す。ビデオ画像は被験者の動作（第1画面）、表情（第2画面）、作業画面（第3画面）、生体信号（第4画面）を一括して記録するので生体時系列信号中のアーチファクトの識別が確実に把握でき有効である。体動は身体活動度計測装置（アクチグラム; 米国AMI）を作業に用いる側の手首に装着し作業にともなう動きを検出することで評価した。体動データは実験終了後にパーソナルコンピュータ（Compaq Elite; Compaq）にダウンロードされファイルに格納される。主観指標は今回参考データとして三宅らが提案しているNASA-TLXの簡便法^{24,1)}を試用した。適切な使用法かどうかという問題は措くが、5種類の精神作業負荷課題の作業分析に有効か否かを検討するため、各作業課題の実験が終了するごとに最も難しく感じた条件について評価させるようにした。試用したNASA-TLXの質問紙を図2-4.2に示す。

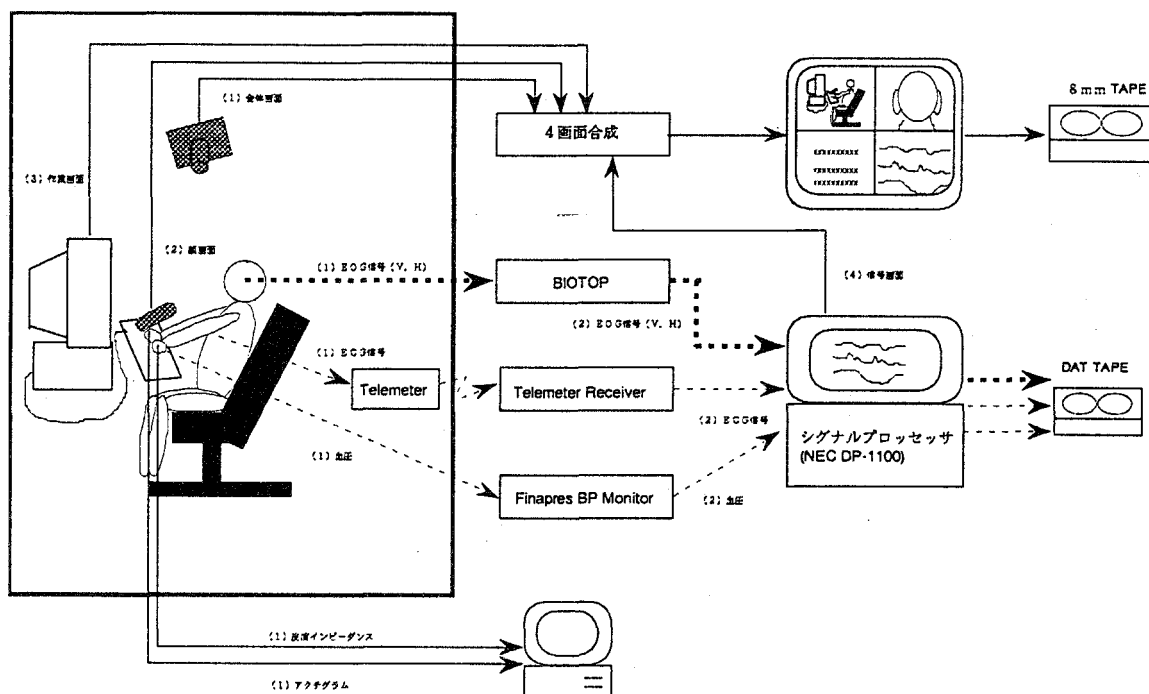


図2-4.1 実験システム概要

NASA-TLX

精神的要求	低い		高い
身体的要求	低い		高い
時間的圧迫感	低い		高い
作業達成度	良い		悪い
努力	低い		高い
不満	低い		高い

図2-4.2 NASA-TLX 質問紙

(2) データ解析システム

解析システムの概要を図2-4.3に示す。DATデータレコーダに記録された生理データはシグナルプロセッサ内蔵の12bit A/D変換器により5msecでサンプリングされ光ディスクに格納される。この生理データおよび皮膚インピーダンスデータと体動データはパーソナルコンピュータからイーサネットを介してEWS（HP9000モデル735crx; YHP）に転送され、EWS上に構築したデータベースシステムに登録される。その後このデータベースシステム上にある解析システムにより生理データは様々な指標に加工され、その結果はEWS画面上に表示される。さらにパーソナルコンピュータからもアクセスできるようになっている。

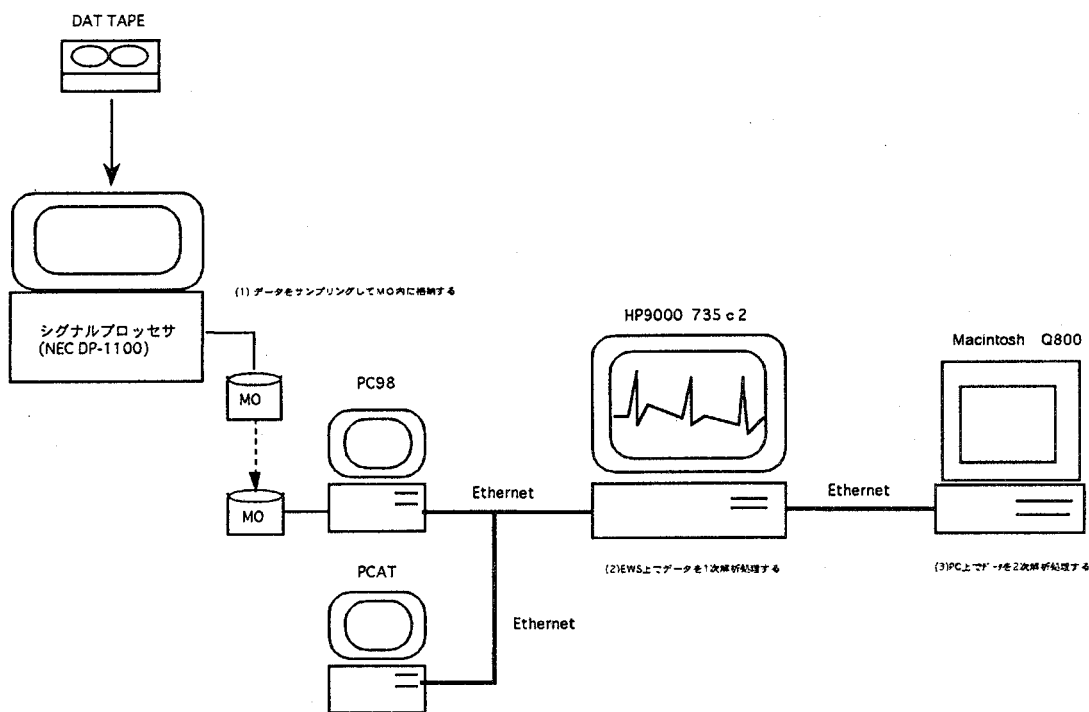


図2-4.3 解析システム概要

4.2 実験プロトコル・計測条件

実験プロトコルを図2-4.4に示す。実験開始前に被験者は閉眼で十分に安静状態を保った後、開眼安静5分間、作業15分間、開眼安静5分間のプロトコルで一実験を終了する。5種類の作業課題についてこれを繰り返し実施した。各課題の15分間の作業は作業難易度や作業パターンを3段階に操作・設定した条件でそれぞれ5分間ずつ連続して作業させた。難易度やパターンの提示順序はランダムとし、被験者にはどの課題においても正確かつ迅速に作業するように指示した。実験間の間隔は十分に時間を空け、被験者は休息を取るようにした。計測は室温21～25℃で実施した。照度は約800Lux、ビジランス作業は約100Luxであった。

被験者は男子大学生20名（平均年齢21.4±1.23才）で、このうち眼鏡もしくはコンタクトレンズを使用しているものは14名であった。

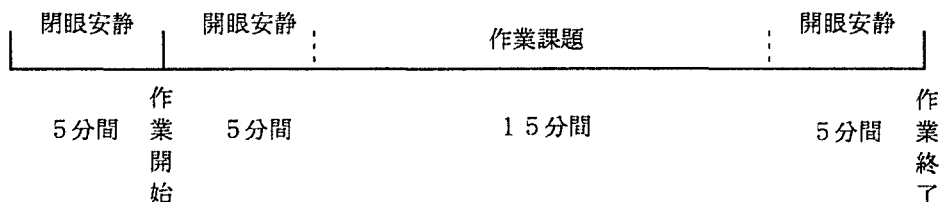


図2-4.4 実験プロトコル

4.3 作業負荷課題

作業負荷としてこれまでに独自に開発した2桁数字検索・1桁数字加算・四則演算・図形トレース・ビジランス作業の5課題を用いた。各作業の作業時間や難易度の条件設定などはすべてパソコンで制御されている。ビジランス作業以外は13インチカラーCRTで提示され、ビジランス作業はコンピュータプロジェクションパネルにより75インチ大型スクリーンに投射したものを

提示した。各課題の設定条件を以下に記載する。

(1) 2桁数字検索課題

画面上にランダムに呈示される00から99までの264個（縦11×横24）の2桁数字の中から標的となる数字を検索し消去する作業で一画面あたりの制限時間は2分30秒とした。難易度は標的数字の種類を3種、5種、7種と設定し操作した。標的となる数字は各画面の開始5秒間だけ呈示され被験者にはできる限り記憶して検索するよう指示した。ただし標的数字の再呈示方法も教示しておいた。

(2) 1桁数字加算課題

画面上に呈示されるランダムな一桁数字列の隣り合った数を加算し、合計数の下一桁をテンキーにより入力する作業である。作業パターンをセルフペース作業とコンベア作業とにし、コンベア作業ではさらに一問あたりの回答入力速度を3秒以内と2秒以内との2条件に設定した。

(3) 四則演算課題

画面上に呈示される80題の計算問題の答えをテンキーにより入力する作業である。加減算のみ、四則演算、乗除算のみの3条件を設定した。

(4) 図形トレース作業課題

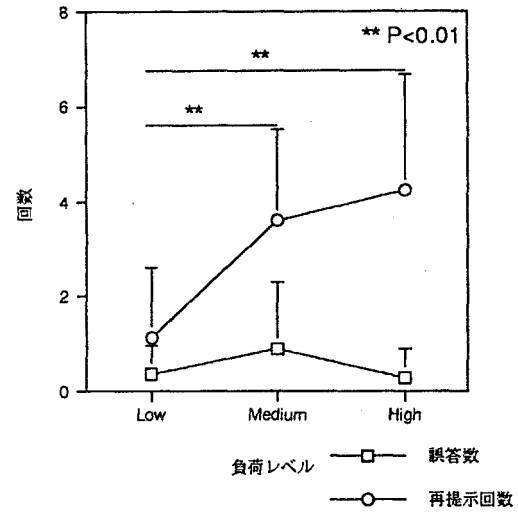
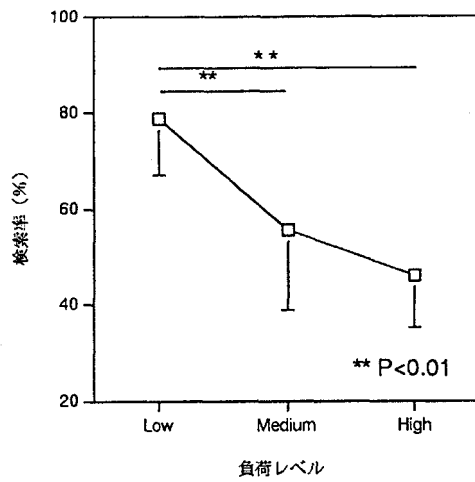
画面上に呈示される図形をマウスでトレースする作業である。難易度はマウスの制御方向に対するポイントの動き方を正常、上下左右逆、左右または上下逆の3条件に設定した。図形パターンは星形、ジグザグラインとした。

(5) ビジランス作業課題

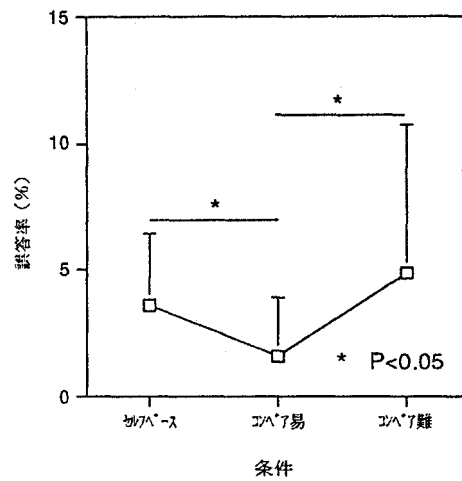
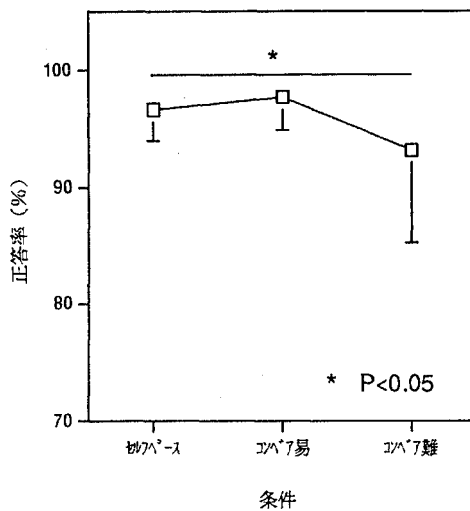
大型スクリーン上に写し出される30個の「角をもつ路」を3つのターゲットがランダムに動き、ターゲットの色変化に応じて10秒以内に対応した角の番号のボタンを押すという作業である。作業難易度はターゲットの移動スピードと色変化の種類の数や発生頻度により操作した。

4.4 作業成績

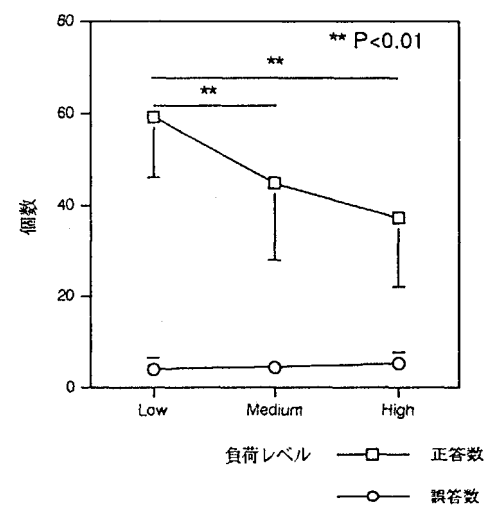
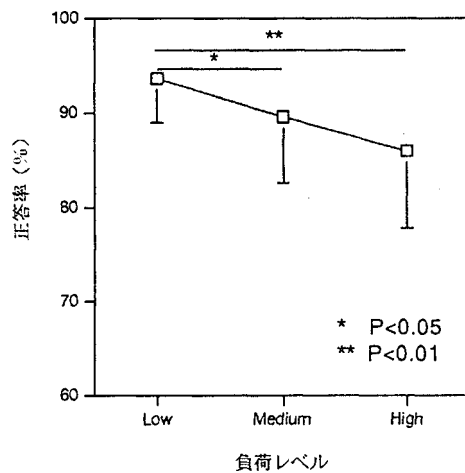
各作業課題の作業成績を図2-4.5に示す。結果は条件毎にt検定を行った。検索作業では低負荷に対し中レベル・高レベルで検索率が有意に低下し、全体としても作業が難しくなるにつれ低下傾向にあった。再呈示回数も同様で作業が難しくなると増加したが、誤答回数には差がなかった。加算作業ではコンベア作業の低負荷条件が他の条件と誤答率で有意な差があった。セルフペース作業ではできるだけ迅速に作業するように指示した結果、一問当たりの入力時間の平均と標準偏差は 1.35 ± 0.31 秒でコンベア作業の高負荷条件（2秒毎に入力）よりも早く、5分間で234 $\pm$ 55問もの回答があった。この2条件で誤答率に有意差はなかったが、充分に対応可能なスピードであっても一定ペースで作業するという条件の方が心的負担が大きいのではないかと考えられる。演算作業は検索作業同様の傾向で負荷レベルの上昇に応じて、回答数・正答率が減少した。トレース作業は図形と軌跡との差は作業成績の対象にしていなが、できる限り忠実にトレースするよう指示した結果、作業時間は負荷レベルが高くなるにつれ延長する傾向にあった。ビジランス作業は正答率自体に差はないが、誤答数は高負荷レベルで他条件よりも有意に増加した。反応時間に関しては高負荷レベルで他条件に比べて有意に延長した。作業成績から判断して概ね負荷条件は適正に設定されていると考えられる。



(a) 2桁検索作業

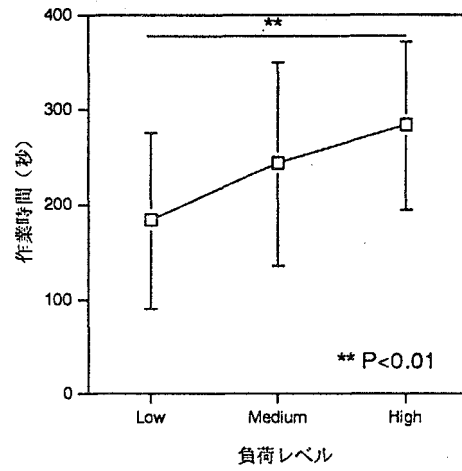


(b) 1桁加算作業

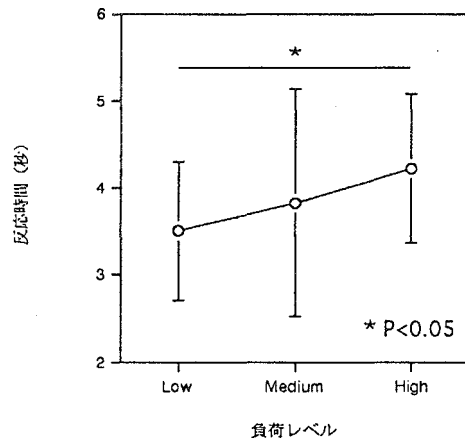
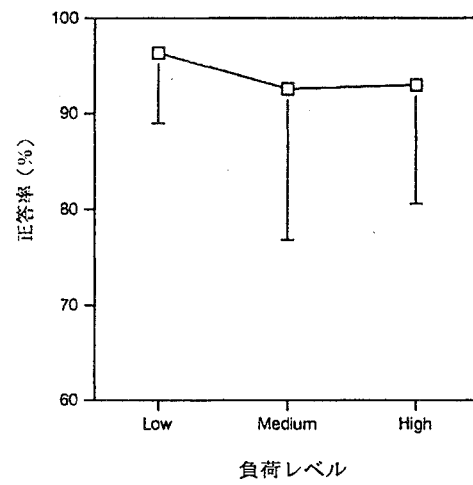
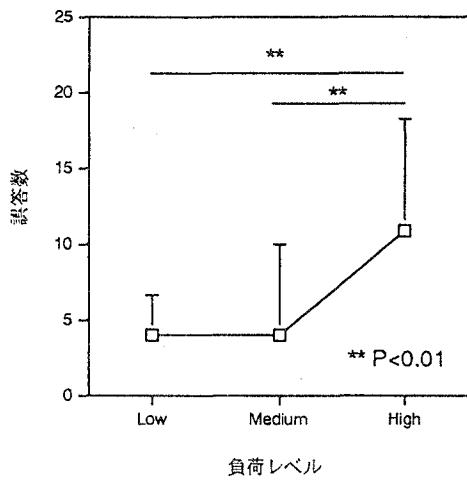


(c) 四則演算作業

図2-4.5 作業成績結果 (1)



(d) トレース作業



(e) ビジランス作業

図2-4.5 作業成績結果 (2)

4.5 NASA-TLX

NASA-TLXの結果を図2-4.6に示す。横軸に作業項目を、縦軸にNASA-TLXスコアをとり、全被験者の平均値と標準偏差を示した。作業課題で最もスコアが高かったのは四則演算で、以下2桁検索、トレース、1桁加算、ビジュアンスの順であった。各作業課題とも高負荷レベル条件（1桁加算作業はコンベア作業の高負荷条件）に対してスコアを記入したので各課題での負荷レベルの違いは評価できないが、尺度項目から各課題の特徴は反映されていた。今後、作業分析や作業条件の設定を検討するのにも有効と思われる。

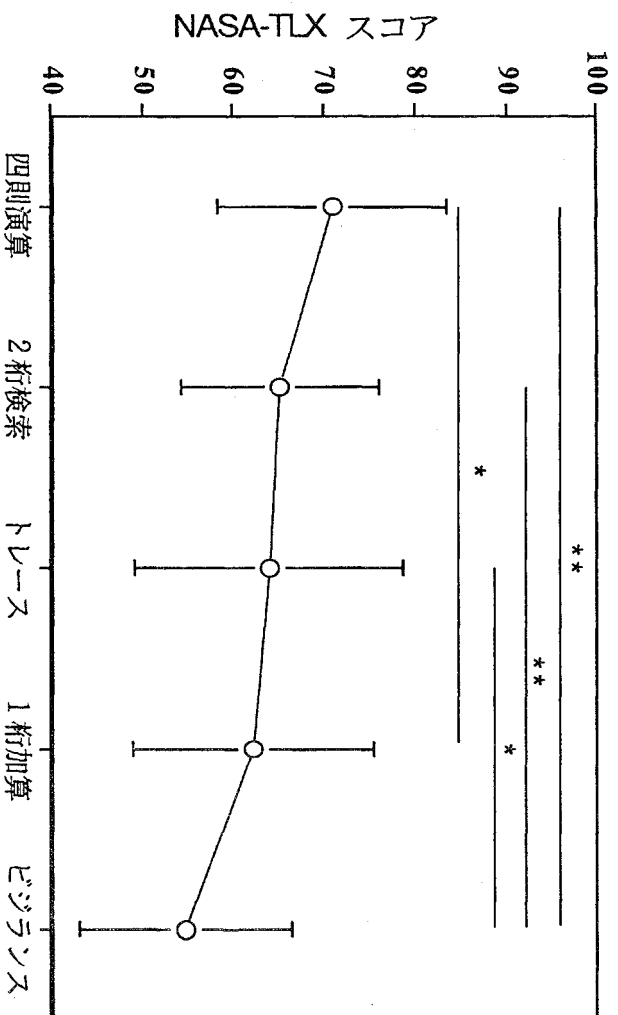


図2-4.6 NASA-TLX 解析結果

4.6 生理計測結果

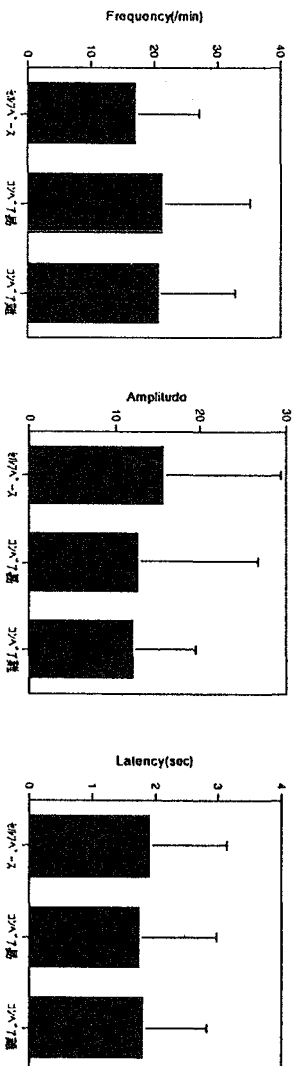
以下に生理計測結果の一例とそれに対する見解を示す。総合的な結果の解釈は今後詳細に検討する。

(1) 皮膚インピーダンス解析結果

2桁検索作業の場合を図2-4.7に示す。図で(a)はS I R頻度、(b)はS I R振幅、(c)はS I Rピーク潜時を示している。中負荷レベルでは低負荷レベルより頻度と振幅の増加およびピーク潜時の短縮がみられ、以前得られた知見と同様の傾向を示した。しかし、高負荷レベルでさらにこの傾向が進むということではなくむしろ低負荷レベルとほとんど差が認められなかった。7種類の標的数字が呈示される高負荷レベルにおいては一度に記憶できる標的数字の数が多く、作業に対する動機付けが低くなる可能性もあるため上述したような結果になったことも考えられる。

1桁加算作業の場合を図2-4.8に示す。コンベア作業条件の方がセルフペース作業条件よりも頻度が増加し、ピーク潜時が若干短縮していた。セルフペースではできるだけ迅速に作業するように指示した結果、コンベア作業で回答されるより多数の回答が得られたが、従来からの知見を考

慮するとコンベア作業の方が心的負担が大きかったものと考えられる。なお、コンベア作業の負荷レベル間の違いは認められなかったが、いずれの条件においても充分対応可能な設定条件であったと思われる。

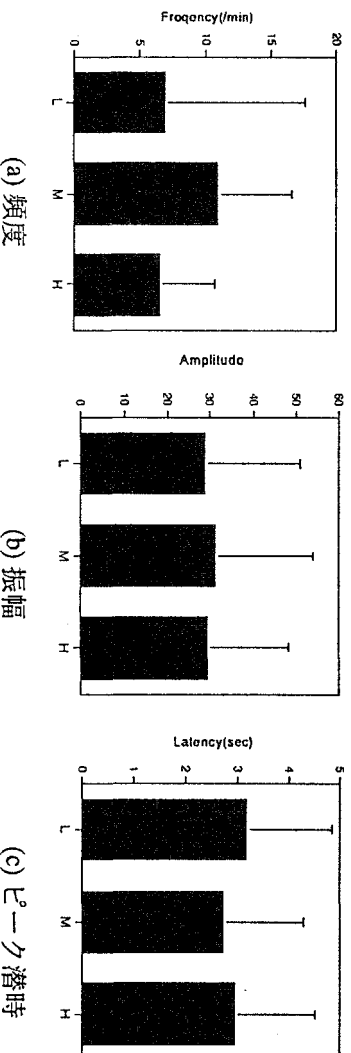


(a) 頻度

(b) 振幅

(c) ピーク潜時

図2-4.7 2桁検索作業時の皮膚インピーダンス解析結果



(a) 頻度

(b) 振幅

(c) ピーク潜時

図2-4.8 1桁加算作業時の皮膚インピーダンス解析結果

四則演算作業の場合を図2-4.9に示す。加減乗除全てが含まれる条件で頻度と振幅の増加が認められた。この被験者の作業成績は加減算のみの場合比較的多くの回答がなされ、加減乗除および乗除算の場合はほぼ同等の結果であった。乗除算のみの方が高負荷かと思われたが、作業者が現役大学生でありいずれの条件に対しても心的負荷は変わらず、むしろ演算の種類の数の方により注意を払ったのではないかと考えられる。

トレーサ作業の場合を図2-4.10に示す。作業成績から中負荷レベルと考えられる条件で頻度と振幅が他の条件に比べて増加していた。

ビジランス作業の場合を図2-4.11に示す。高負荷レベルで従来からの知見である頻度の増加と潜時の短縮がみられた。今回の負荷設定は作業者にとってはいずれも極端な違いがなかったとも考えられるが、全体的にみてS I Rの出現頻度の増減が最もよく負荷レベルを反映すると思われる。

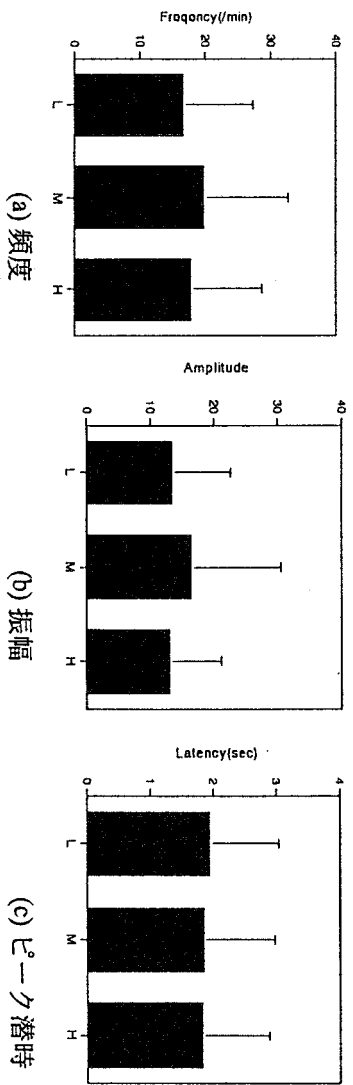


図2-4.9 四則演算作業時の皮膚インピーダンス解析結果

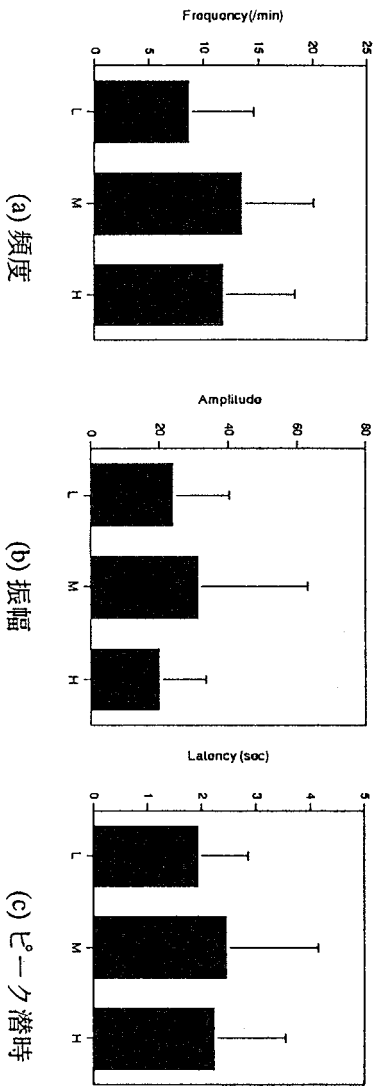


図2-4.10 トレース作業時の皮膚インピーダンス解析結果

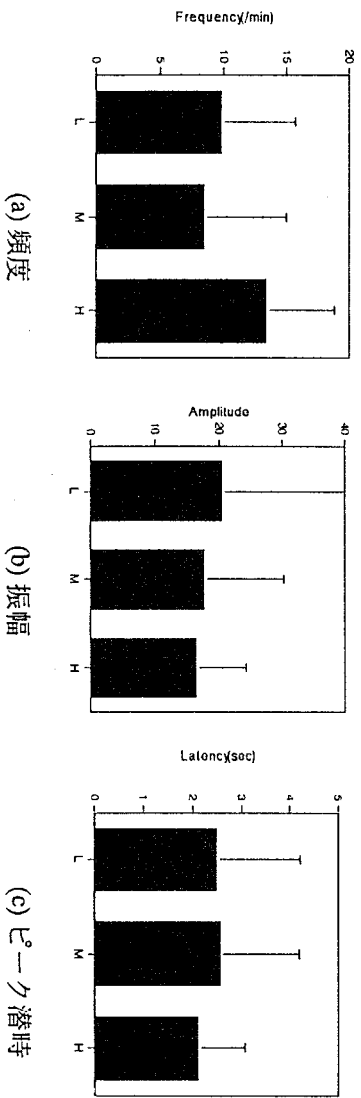


図2-4.11 ビジネス作業時の皮膚インピーダンス解析結果

(2) 瞬目解析結果

2 桁検査作業の場合を図2.4.12に示す。図で(a)は各条件での瞬目率、(b)は瞬目間隔対数値の度数分布の時間的変化を示したものである。瞬目率は作業前の安静時には緊張のためか非常に高い。作業中は大幅に抑制されたが、負荷レベルによる違いは認められなかった。瞬目間隔から発生パターンを見ると作業中は瞬目の発生間隔が長いことがわかるが、作業の後半には群発性瞬目が生じており、目の疲れを反映しているものと考えられる。

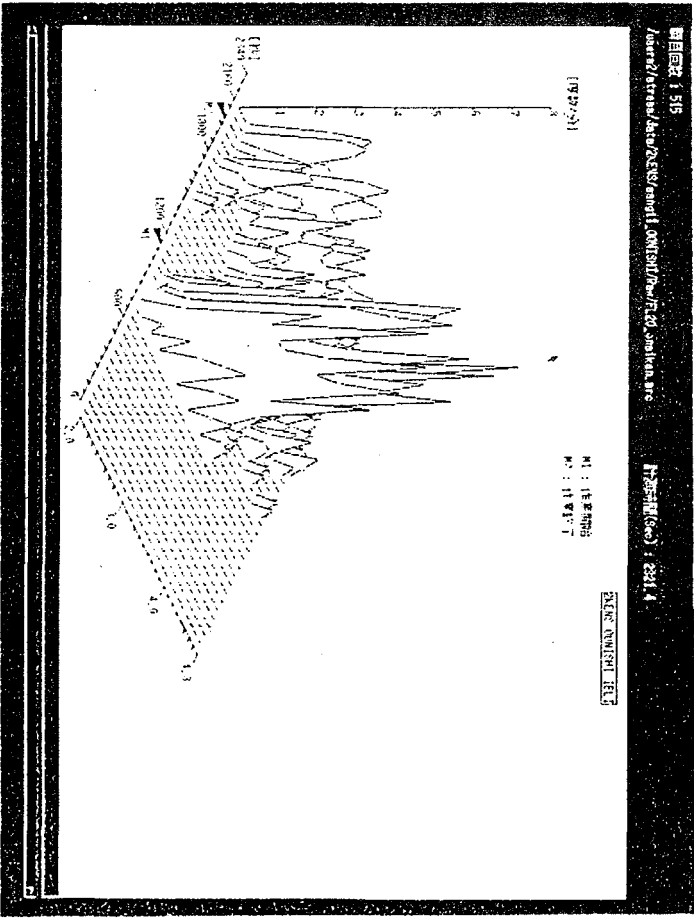
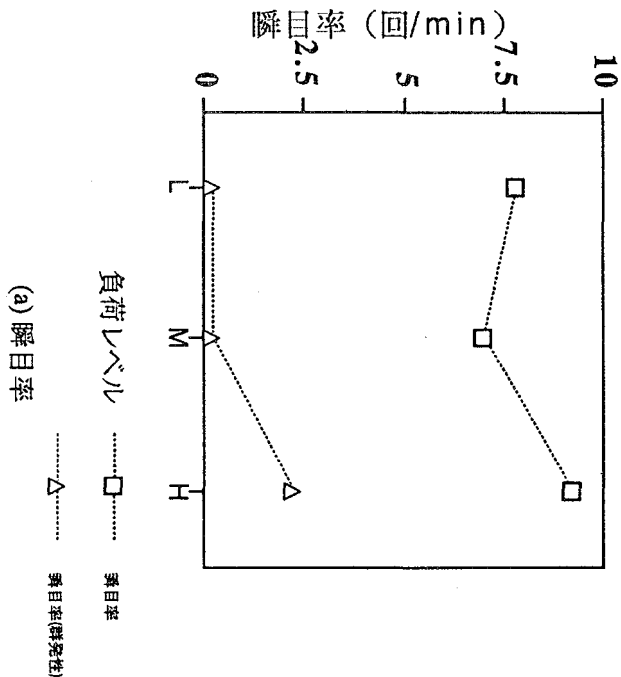
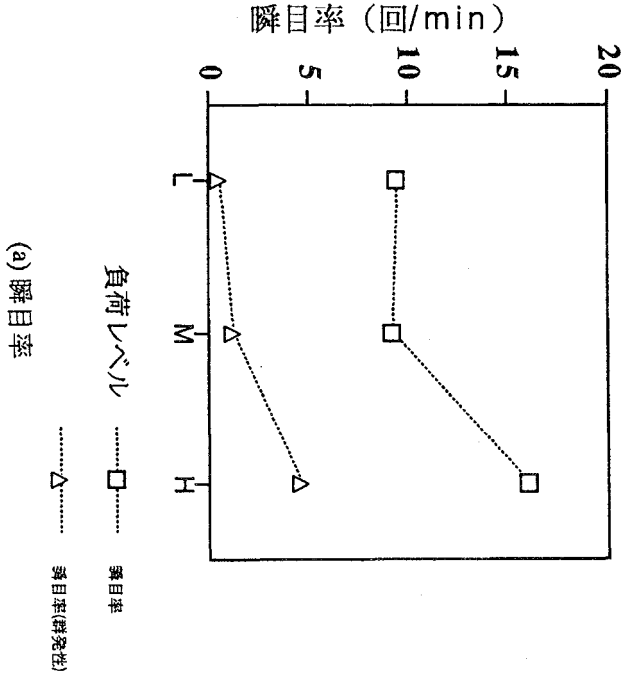
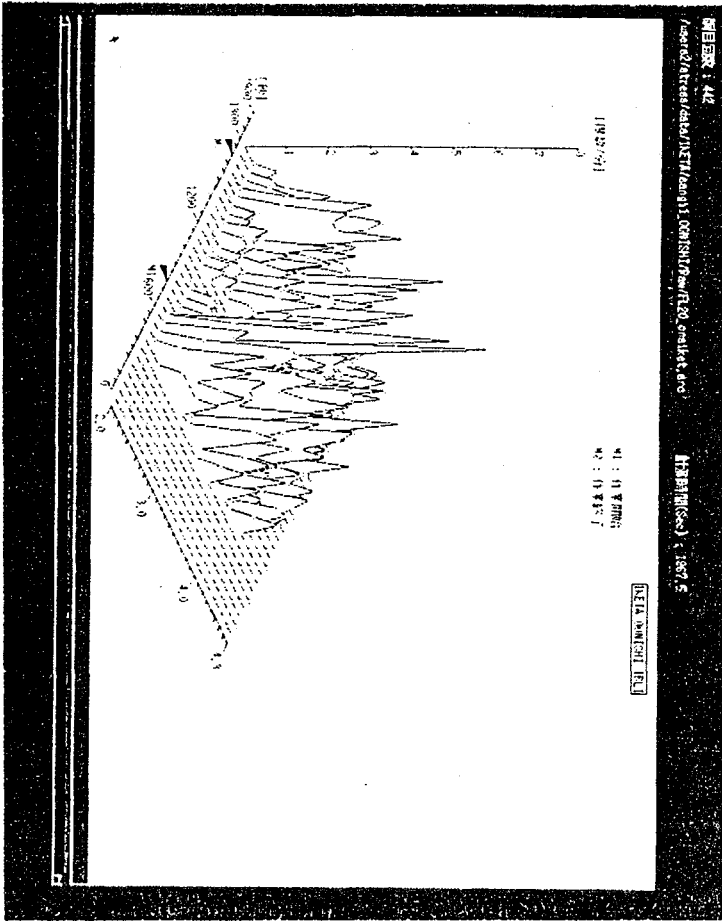


図2.4.12 2 桁検査作業時の瞬目解析結果

1 桁加算作業の場合を図2-4.13に示す。瞬目率はコンベア作業の高負荷条件でその他の場合よりも著しく高くなった。この被験者の場合、セルフペースにおいても一問当たりには要する入力時間が平均2秒であり、2秒毎に入力が必要な条件で心的負荷が高くなったためと考えられる。瞬目間隔の結果は2桁検査作業の場合と同様、作業の後半で群発性瞬目が多数生じているが、これは目の疲れに加えて心的負荷が高くなったことの影響も含まれると思われる。



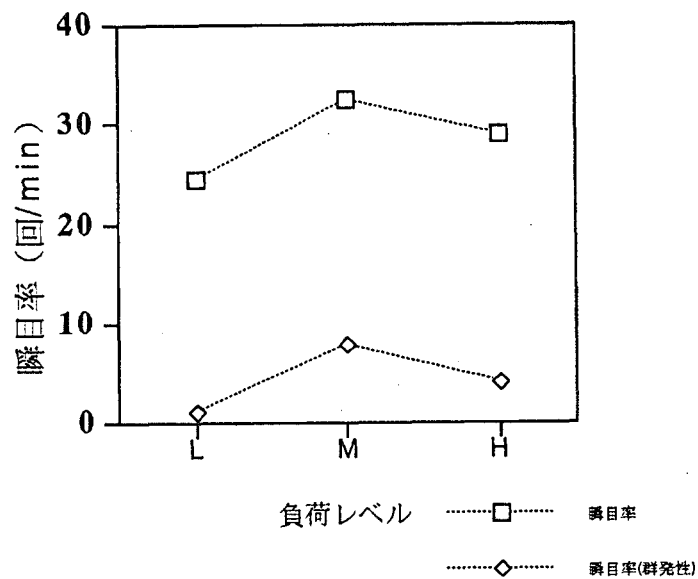
(a) 瞬目率



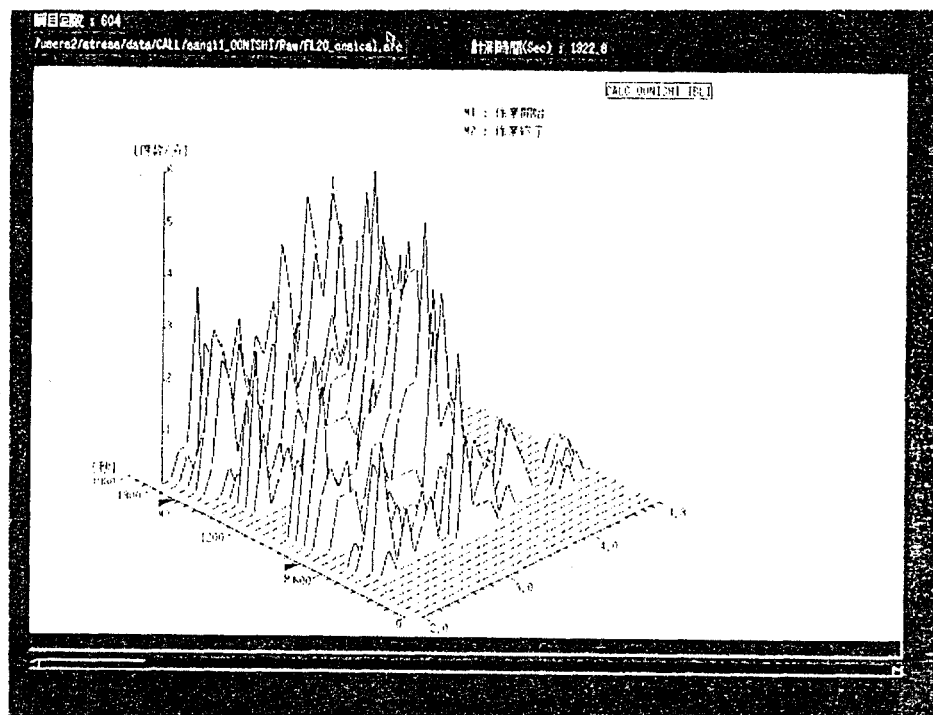
(b) 瞬目間隔

図2-4.13 1 桁加算作業時の瞬目解析結果

四則演算作業の場合を図2-4.14に示す。加減算のみの条件に比較して他の条件で瞬目率や群発性瞬目率が高く、乗除算が心的負荷を大きくしたものと考えられる。作業中の瞬目は2桁検索や1桁加算作業の場合と比較してそれほど抑制されなかったが、これは四則演算作業がそれほど画面を注視する必要がないためであると考えられる。



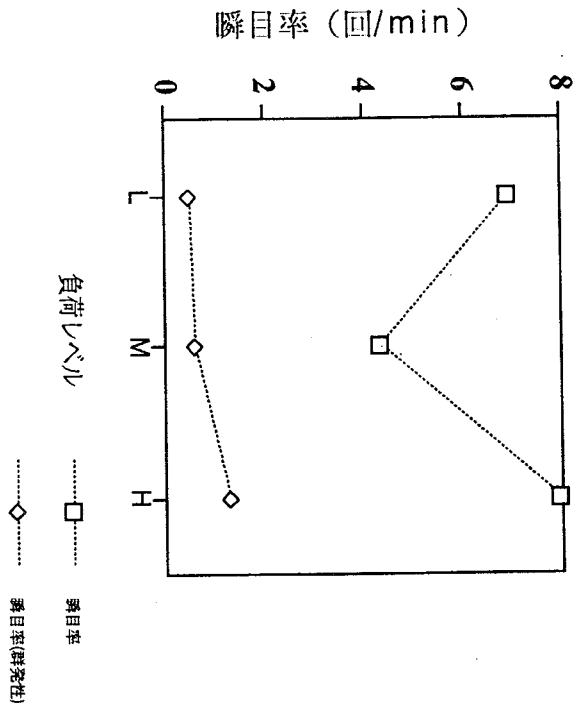
(a) 瞬目率



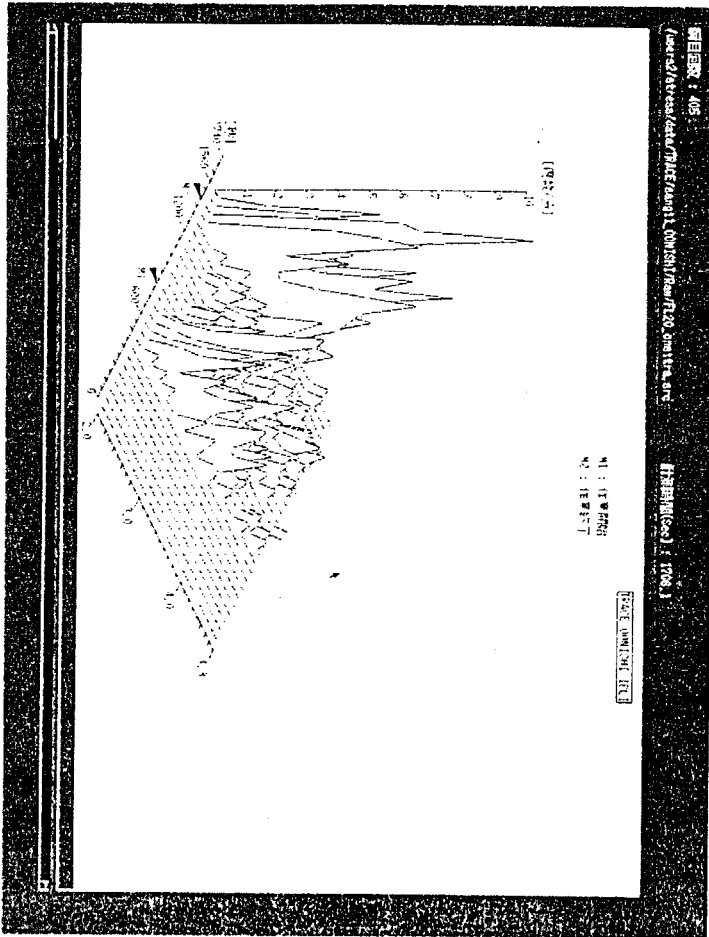
(b) 瞬目間隔

図2-4.14 四則演算作業時の瞬目解析結果

トレース作業の場合を図2-4.15に示す。作業中の瞬目は著しく抑制されるが、負荷レベルの違いによる差はなかった。群発性瞬目率については高負荷レベルでやや増加傾向にあり、心的負担を反映している可能性はある。瞬目間隔は視覚情報処理時の一般的な安静と作業の特徴的な発生パターンが明確であった。



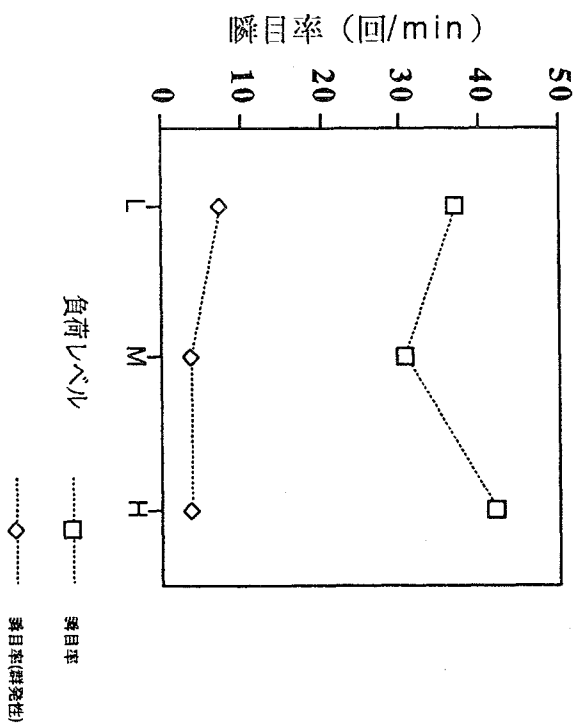
(a) 瞬目率



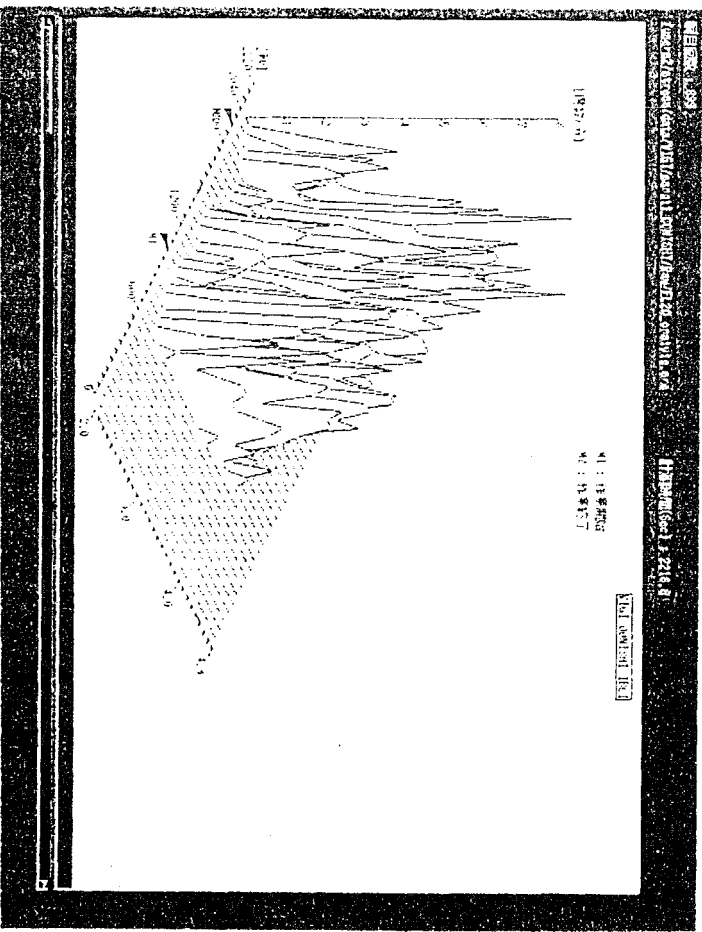
(b) 瞬目間隔

図2-4.15 トレース作業時の瞬目解析結果

ビジランス作業の場合を図2.4.16に示す。中負荷レベルよりも他の条件で瞬目率が高くなっているが、低負荷レベルではターゲットの動きが遅く作業による瞬目の抑制効果が小さいため、高負荷レベルでは心的負荷が大きいためであると考えられる。瞬目間隔では分布パターン自体に大きな変化は認められなかった。



(a) 瞬目率



(b) 瞬目間隔

図2.4.16 ビジランス作業時の瞬目解析結果

(3) 連続血圧解析結果

2 桁検索作業の場合を図2-4.17に示す。図で(a)は血圧スペクトル中の0.07Hzから0.14Hzまでのパワー積分値とこの帯域における最大ピークの周波数のプロットを、(b)は脈波間隔スペクトル中のL F (0.01Hz から0.07Hz)、MF (0.07Hzから0.14Hz) H F (0.14Hz から0.5Hz) のパワー積分値を、(c)は各帯域での最大ピーク周波数のプロットを、(d)は圧受容体反射感度の結果である。血圧スペクトルでは作業開始と終了の時点で0.01Hz付近のパワーに変化が見られたが、他の区間では顕著な変化は認められなかった。そのため血圧スペクトルのMFパワー積分値やピーク周波数にも顕著な差は認められなかった。脈波間隔スペクトルでは作業を開始すると0.3Hz付近の呼吸性変動成分 (Respiratory Sinus Arrhythmia ; R S A) のピークの高さが著しく減少し、作業終了後もその効果が継続していた。圧受容体反射は作業に入ると反射の頻度が減少

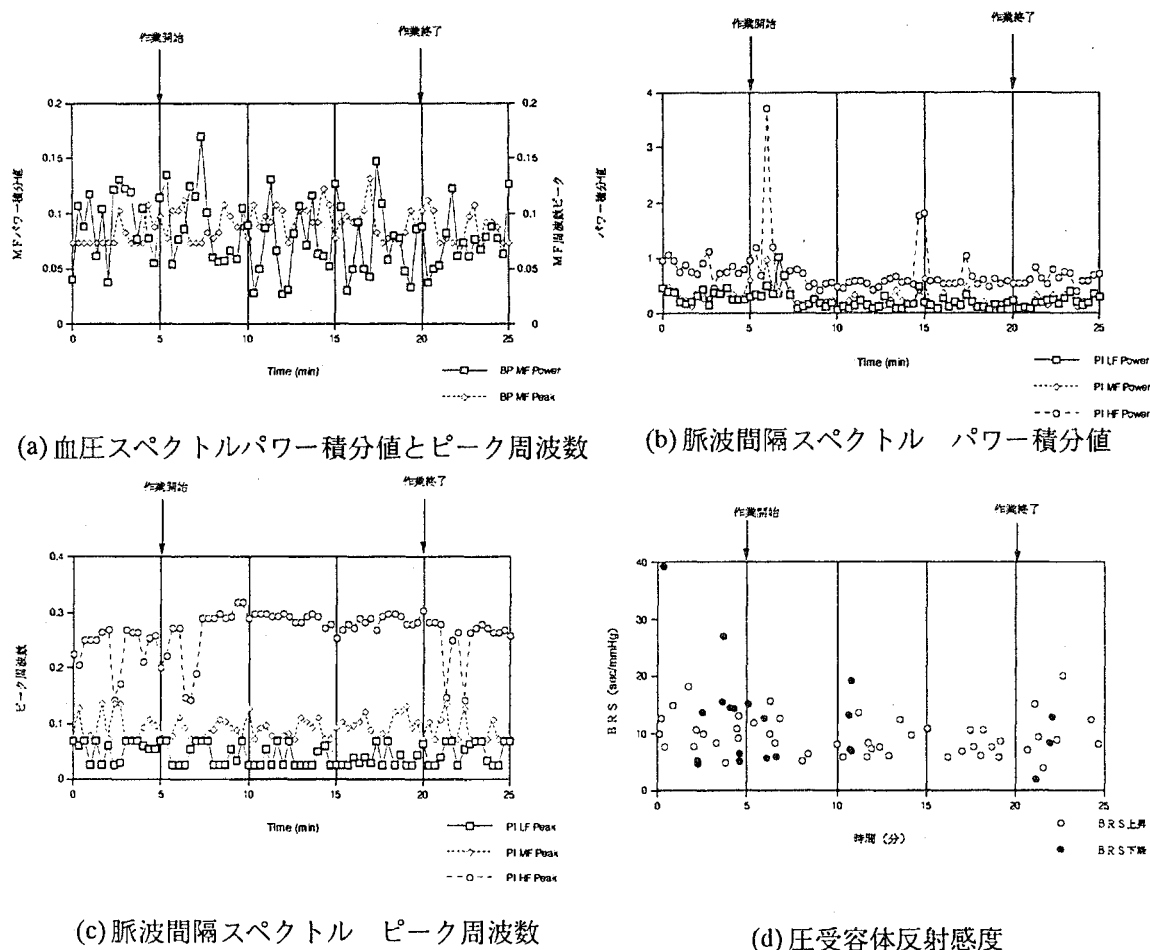
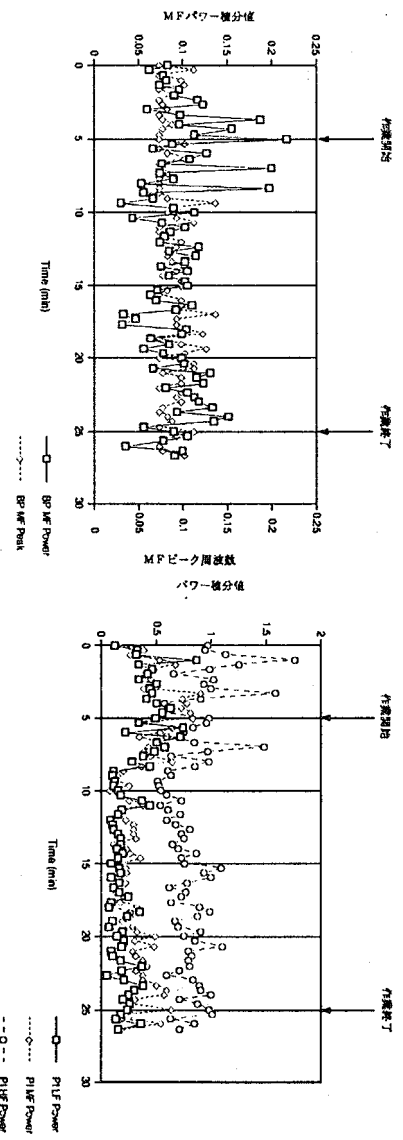


図2-4.17 2 桁検索作業時の連続血圧解析結果

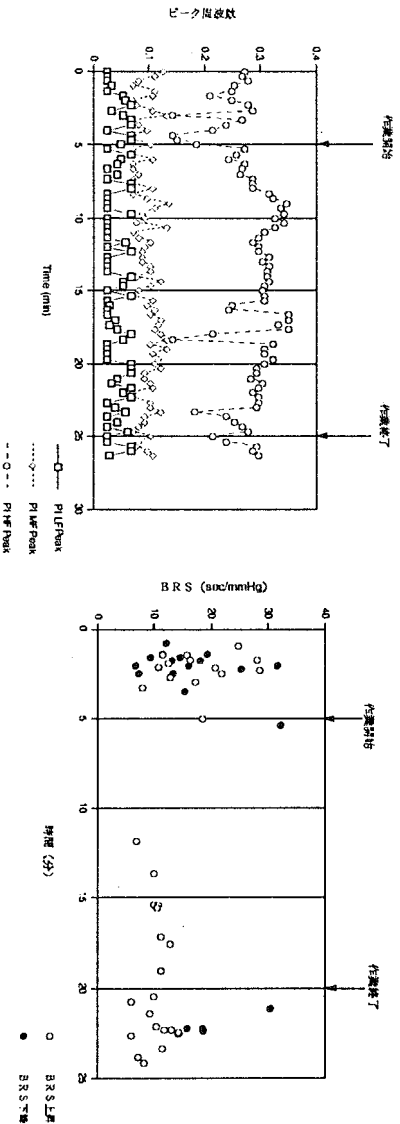
し、その後作業前の安静レベルまでは回復しなかった。

1 桁加算作業の場合を図2-4.18に示す。血圧スペクトルでは作業開始と終了の部分で0.01Hz付近のパワーに変化が見られ、また血圧スペクトルのMFパワー積分値は作業開始後5分間（コンベア作業の高負荷レベル）で変動が大きい、その後ほぼ一定レベルに落ちついた。脈波間隔

スベクトルは作業を始めるとRSAピークの高さが減少し、その後徐々に安静レベルにまで回復した。各帯域のパワー積分値ではLF、MF、HFとも作業開始後からゆるやかに減少し、その後徐々に安静レベルまで回復する傾向があった。ピーク周波数はLF、MFでは顕著な変化はないが、HFでは作業開始後にやや高くなった。安静時に見られた圧受容体反射は作業開始直後から約3分間抑制されその後少し生じ、作業終了後にはかなり回復した。作業開始直後の抑制は心



(a) 血圧スペクトルのパワー積分値とピーク周波数 (b) 脈波間隔スペクトル パワー積分値



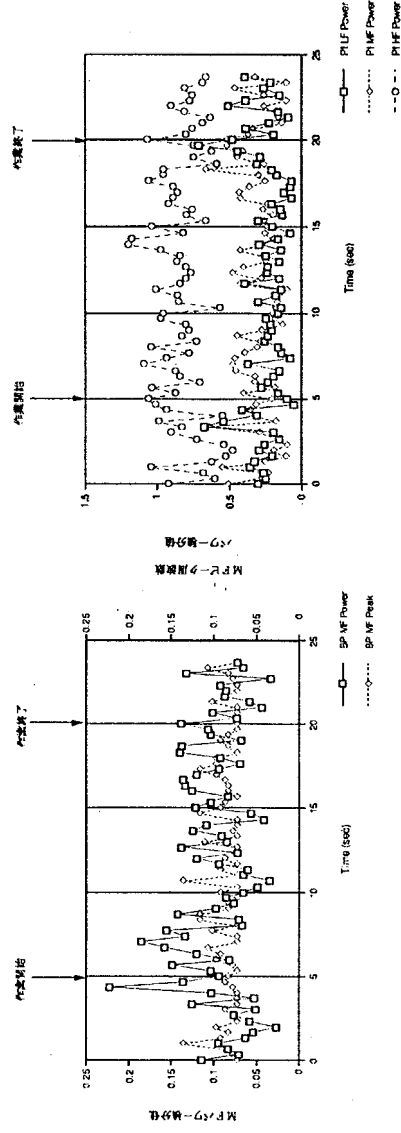
(c) 脈波間隔スペクトル ピーク周波数 (d) 圧受容体反射感度

図2-4.18 1桁加算作業時の連続血圧解析結果

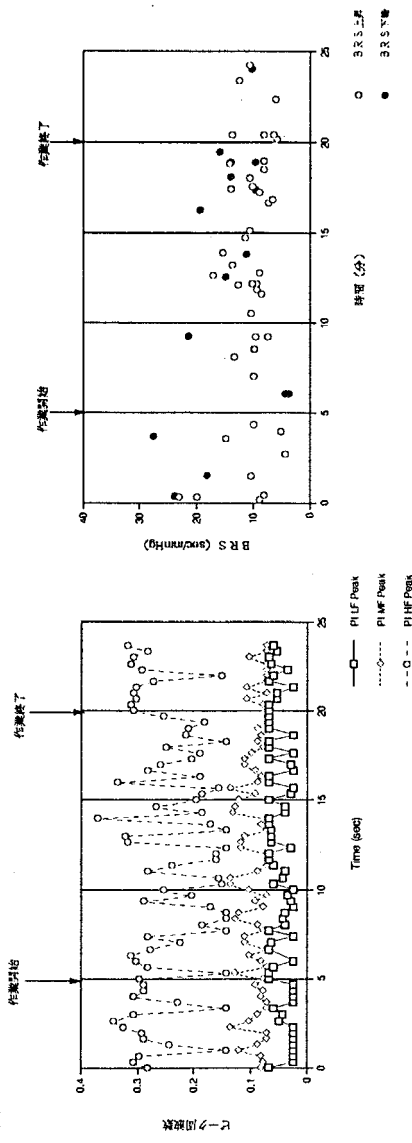
的負担が大きいためと思われるがこれは作業条件の設定と合致していた。

四則演算作業の場合を図2-4.19に示す。血圧スペクトルでは作業開始と終了の部分で0.01Hz付近のパワーに変化が見られた。また血圧スペクトルのMFパワー積分値で作業開始後5分間で変動が大きく、その後比較的変動が少なかった。脈波間隔スペクトルは、パターンに顕著な差はなく、スベクトルから得られるパワー積分値やピーク周波数値にも変化は認められなかった。圧受容体反射は作業開始直後から約1分間は抑制されたが、その後安静レベルと同程度生じた。

トレース作業の場合を図2-4.20に示す。血圧スペクトルでは顕著な差はなく、パワー積分値およびピーク周波数にも変動は認められない。脈波間隔スペクトルではスベクトルパターンからは安静時と作業時との差異は認められず、各周波数成分におけるピーク周波数にも差はなかった。しかし、各成分パワー積分値では変化が現れ、LFとMFは作業開始にともない減少し、作業終了後増加した。逆にHFは安静から作業に入った5分間は増加する傾向にあった。圧受容体

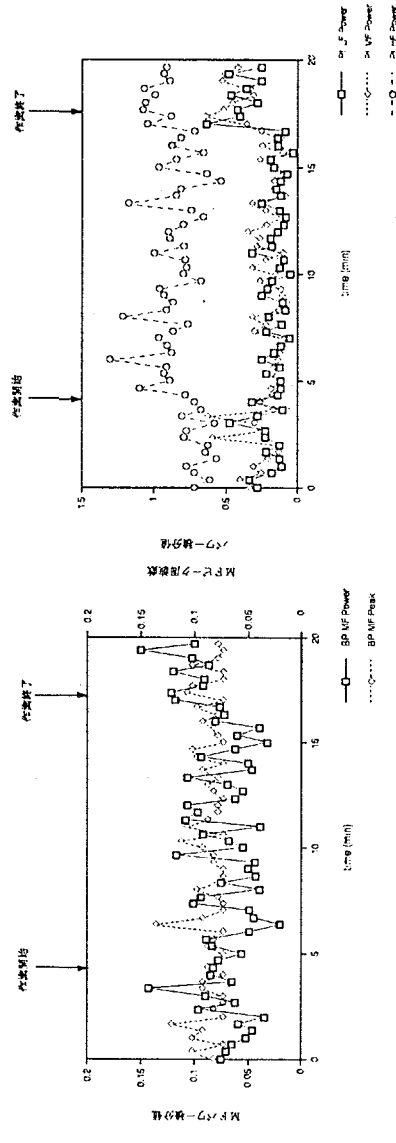


(a) 血圧スペクトルのパワー積分値とピーク周波数 (b) 脈波間隔スペクトル パワー積分値

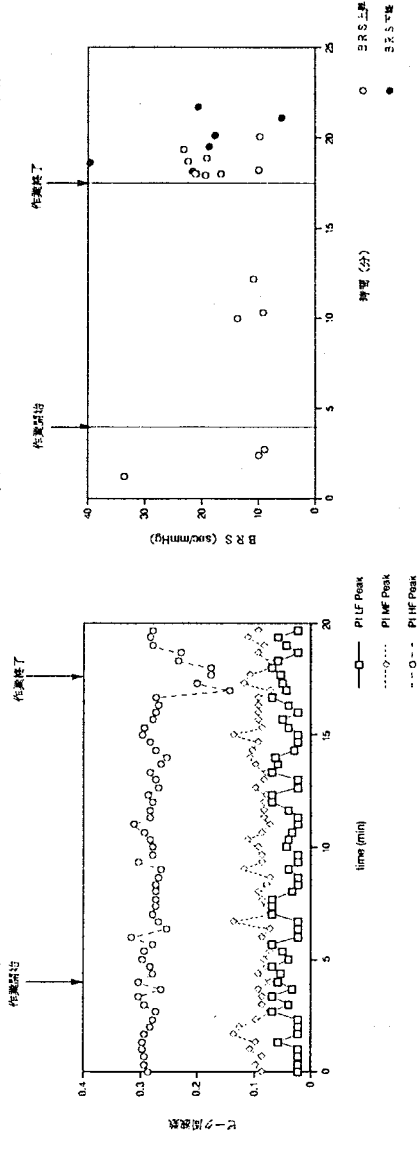


(c) 脈波間隔スペクトル ピーク周波数 (d) 圧受容体反射感度

図2-4.19 四則演算作業時の連続血圧解析結果



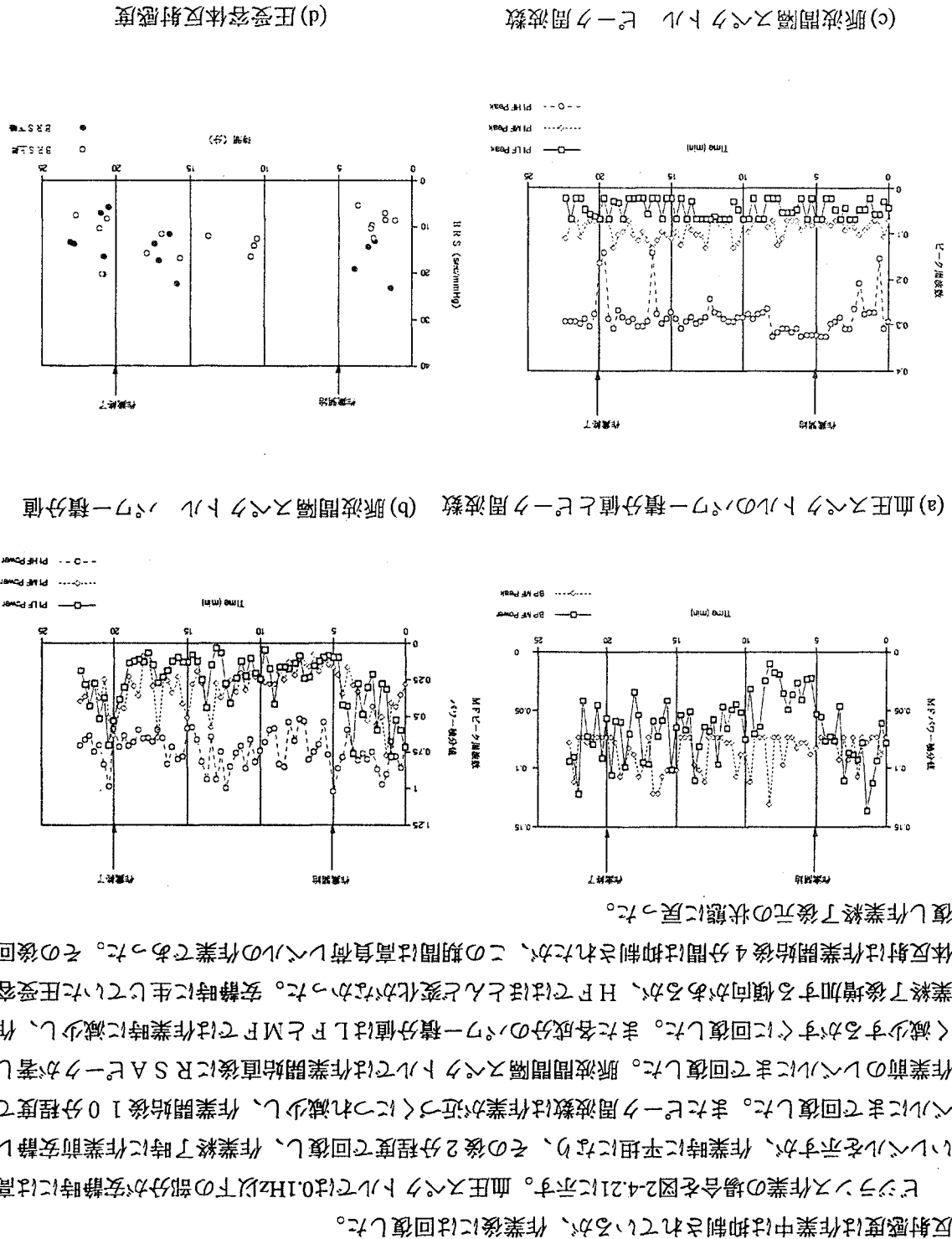
(a) 血圧スペクトルのパワー積分値とピーク周波数 (b) 脈波間隔スペクトル パワー積分値



(c) 脈波間隔スペクトル ピーク周波数 (d) 圧受容体反射感度

図2-4.20 トレース作業時の連続血圧解析結果

図2-4.21 ビジネス作業時の連続血圧解析結果



5. 生理情報データベースシステムの開発

被験者実験により得られる膨大な量の時系列生理データからストレス評価に有効な情報を効率的に抽出するためには、データの管理機能や必要な情報の抽出機能など、生理情報をデータベース化することが重要である。そこで本年度はデータの登録管理機能と皮膚インピーダンス・瞬目・連続血圧などの生理データ自動解析システムを統合化した生理情報データベースシステムを開発した。

5.1 システム概要

生理情報データベースシステムの概要を図2-5.1に示す。本システムは、計測データ登録システムと解析処理システム、および解析データ登録システムの3つのサブシステムから構成されており、基本的なデータ処理は以下の通りである。

- ①計測データ登録システムにより計測結果をデータベース内に登録する。
- ②解析処理システムにより計測波形をモニタしながらピーク抽出などの処理を行い、評価用指標に加工する。
- ③解析データ登録システムにより解析結果をデータベース内に登録する。

処理手続きはグラフィックユーザーインターフェース（GUI）を採用しているため、ほとんどの操作はマウスとテンキーだけで簡単に行える。システムは大容量ハードディスクを搭載し高速演算処理が可能なEWS（HP9000 hp735crx; YHP）上に構築されているため、長時間におよぶ計測データも迅速に処理できる。計測データをシステム上に保管しピーク抽出などの前処理を行うため、ピークの誤検出などの前処理でのエラーを未然に防ぐことができる。さらにシステムには皮膚インピーダンス・瞬目・連続血圧など生理データの解析アルゴリズムが搭載されているため、データを入力するだけでストレス評価に有効な指標にまで自動的に加工される。

開発環境はOSがHP-UX 9.05、開発言語がC言語（ANSI準拠）である。X-Windows上での描画のためMotif ver.1.2 とX-lib Rev.5 の関数呼び出し^{2-5.1),2-5.2)}を利用した。

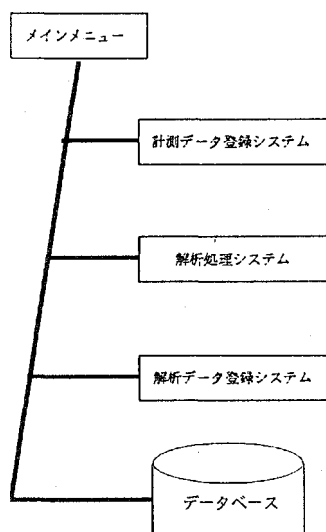


図2-5.1 生理情報データベースのシステム概要図

5.2 各サブシステムの概要

(1) 計測データ登録システム

計測データ登録システムの概要を図2-5.2に示す。計測データ登録システムの機能には①安静と作業などの実験条件区間の認識処理機能、②計測データファイルのデータベース内への登録機能、③被験者属性や実験条件などの登録／更新機能がある。①は計測中に記録するイベントマークによりデータ計測時の条件の違いなどを認識し区間として区分するものである。②は①の処理で得たデータをデータベースに登録するものである。③は実験条件や被験者状態のメモ、年齢・性別などの被験者属性をデータベース内に登録する機能である。これらの処理により、時系列計測データから実験条件の違うデータを自動的に区別できる。また解析の途中で対象となる被験者の抽出なども容易にできる。

システムの動作手順は以下の通りである。

- ①計測データファイルを選択し、解析対象区間を認識させる。
- ②計測データをデータベースに登録する。
- ③実験条件や被験者属性などを入力し登録する。

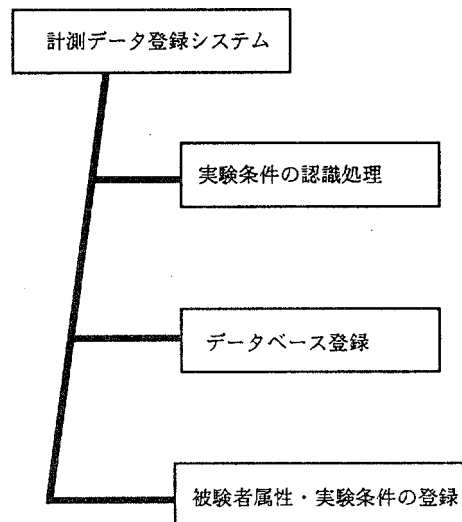


図2-5.2 計測データ登録システムの機能の概要図

(2) 解析処理システム

解析処理システムの概要を図2-5.3に示す。解析処理システムは登録データからストレス評価に有効と考えられる指標に加工し、その解析結果を様々なタイプの図表で表示する。このシステムでは解析処理のパラメータ設定を任意に行えるので計測した信号に応じたピークなどが正確に抽出でき解析精度を向上することができる。

システムの動作手順は以下の通りである。

- ①計測項目と解析方法を選択する。
- ②処理に必要なパラメータを設定する。

次に各計測項目について解析手順とグラフの表示形式を述べる。

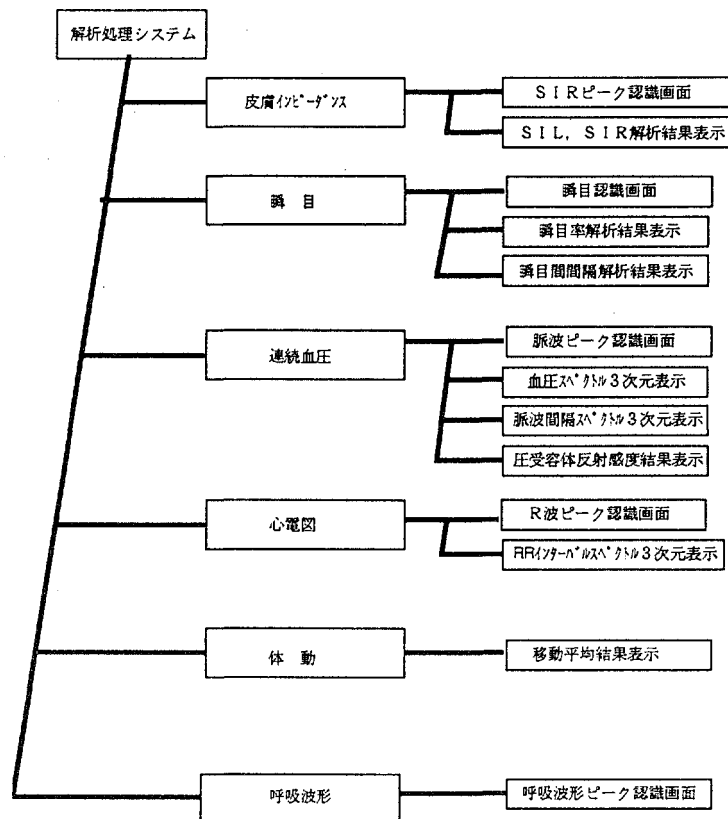


図2-5.3 解析処理システムの機能の概要図

a. 皮膚インピーダンス

装置から得られる0.5秒間隔の皮膚インピーダンスの直流成分（Skin Impedance Level；SIL）のデータから皮膚インピーダンスの交流成分（Skin Impedance Response；SIR）を求め、このSIR波形のピークを認識して出現回数・振幅・ピーク潜時を得る。以下に処理手順を示す。

- ①SILの移動平均処理によりSIL直流変動成分を算出する。
- ② $SIR = SIL - SIL$ 直流変動成分としてSIRを得る。
- ③SIRを微分し、微分値の平均値(mean)と標準偏差(SD)を求める。
- ④正負のスライスレベルを以下の式から算出する。

$$\text{正のスライスレベル} = \text{mean} + \alpha \text{SD}$$

$$\text{負のスライスレベル} = \text{mean} - \beta \text{SD}$$

（ α ：プラススライスレベル係数パラメータ、
 β ：マイナススライスレベル係数パラメータ）

振幅閾値を以下の式から算出する。

$$\text{振幅閾値} = \text{平均値} + \text{振幅レベル係数} \times \text{SD}$$

- ⑤SIRの微分波形が正から負のスライスレベルを越える区間で最大の位置を検出する。
- ⑥⑤の箇所がスライスレベルと交点の間隔がピークの判定時間以下の場合、その箇所を仮ピークとする。
- ⑦仮ピークの振幅値が振幅しきい値以下の場合の仮ピークをSIRのピークとする。

- ⑧ ピーク直前のピーク立ち上がり判定時間内での最小値をS I Rの立ち上がり位置とする。
- ⑨ S I Lレベルの任意時間の平均値をS I L平均値とする。
- ⑩ ピーク立ち上がり位置からピークまでの時間をS I Rピーク潜時、レベルの差をS I R振幅とする。
- ⑪ 1分間あたりのピークの出現回数をS I R頻度とする。

S I R波形のピーク抽出パラメータは、パラメータ変更メニューを選びウィンドウ内の数値変更で設定できる。パラメータ変更を反映したピーク認識結果は画面上の波形により確認できる。ピーク自動抽出画面例を図2-5.4に示す。

グラフ表示は、実験条件などの区間別の表示、任意の時間毎の平均値の経時変化の表示などの型で各パラメータ毎に表示できる。解析結果の表示例を図2-5.5に示す。

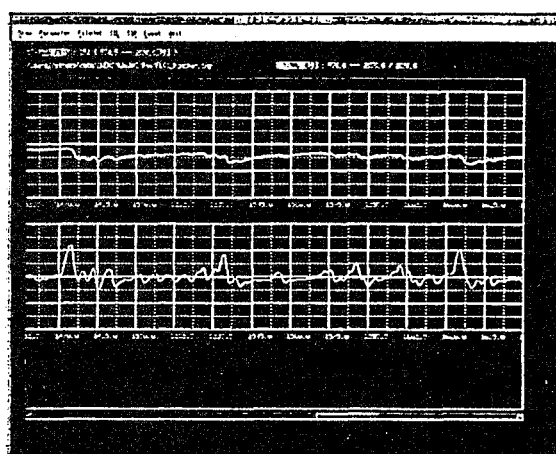
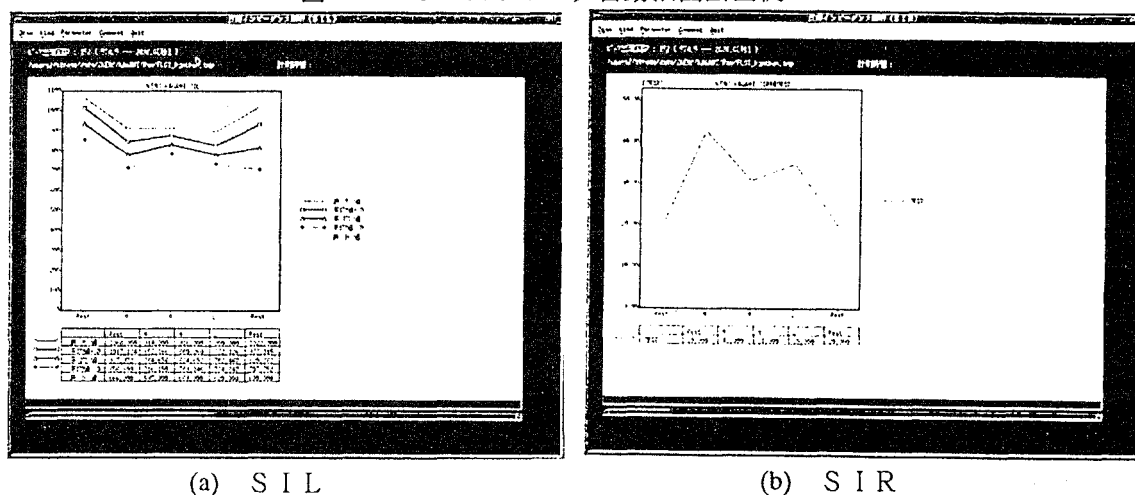


図2-5.4 S I Rのピーク自動抽出画面例



(a) S I L

(b) S I R

図2-5.5 皮膚インピーダンス解析結果の表示例

b. 瞬目

5msec間隔でサンプリングした垂直E O G波形を移動平均処理によりノイズを除去し、この波形から瞬目にともなう変化のみを検出し、瞬目率（1分あたりの瞬目数）・瞬目間間隔（瞬目が発生する時間間隔 Interblink Interval; IBLI）・群発性瞬目（瞬目間間隔が0.5秒以下の場合に後で

生じる瞬目)を求める。以下に処理手順を示す。

- ① 垂直 E O G 波形を M 個の移動平均処理をして移動平均波形を算出する。
- ② 移動平均波形を微分し、微分波形の平均値(mean)と標準偏差(SD)を求める。
- ③ 正負のスライスレベルを以下の式から算出する。
正のスライスレベル = $\text{mean} + \alpha \text{SD}$
負のスライスレベル = $\text{mean} - \beta \text{SD}$
(α : プラススライスレベル係数パラメータ、 β : マイナススライスレベル係数パラメータ)
- ④ 移動平均値が、仮ピークとなる位置(微分値が負から正のスライスレベルを切るまでで移動平均値が最小となる箇所)を決定する。
- ⑤ ④の負から正のスライスレベルを切るまでの時間が10msec以下の場合、その箇所を仮ピークとする。
- ⑥ 仮ピークのピーク立ち下がり開始位置とピーク立ち上がり終了位置を決定する。
- ⑦ 両位置の移動平均値の差が眼球運動閾値内の場合、仮ピークを瞬目のピークとする。
- ⑧ 1 分間あたりの瞬目の数を瞬目率とし、ピーク間隔を瞬目間隔とする。瞬目間隔が 0.5sec 以内のものに関しては後者の瞬目を群発性瞬目として区別する。

瞬目波形の自動認識のためのパラメータは、パラメータ変更メニューを選びウィンドウ内の数値変更で設定できる。パラメータ変更を反映したピーク認識結果は画面上の波形により確認できる。瞬目自動抽出画面例を図2-5.6に示す。

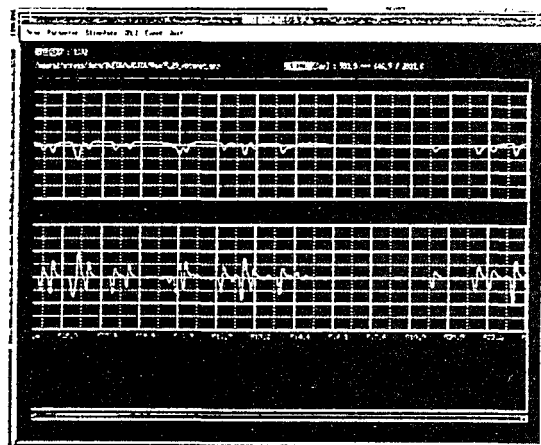
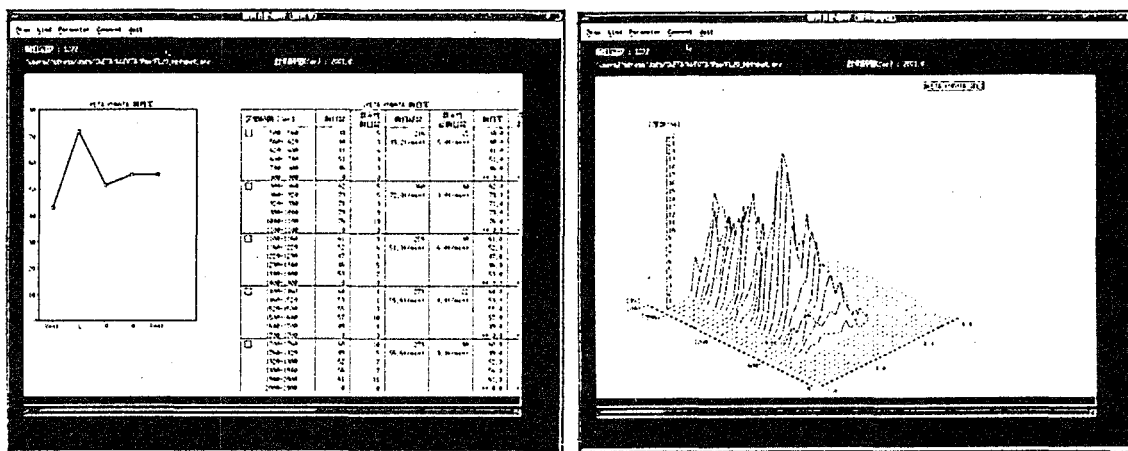


図2-5.6 瞬目の自動抽出画面例

グラフ表示は、瞬目率、瞬目間隔について安静や作業などの区間別平均値表示、時間経過にともなう変化の表示などの型で表示できる。また瞬目間隔の結果はその対数値の度数分布の区間別の表示、および度数分布の経時変化の三次元表示ができる。瞬目解析結果の表示例を図2-5.7に示す。

c. 心拍

5msec間隔でサンプリングした心電図波形を移動平均処理によりノイズを除去し、この波形からR波を検出し、心拍数(1分あたりのR波の数)、RRインターバルスペクトル時系列変化、



(a) 瞬目率

(b) IBLI

図2-5.7 瞬目の解析結果の表示例

RRインターバルスペクトルの低周波数変動成分（Low Frequency Component；L F）の積分値、血圧性周波数変動成分（Middle Frequency Component；M F）の積分値、呼吸性周波数変動成分（High Frequency Component；H F）の積分値を求めた。処理手順は以下の通りである。

- ① 心電図波形をM個の移動平均処理を行い移動平均波形を求める。
- ② 移動平均波形を微分し、微分波形の平均値(mean)と標準偏差(SD)を求める。
- ③ スライスレベルを以下の式から算出する。

$$\text{スライスレベル} = \text{mean} + \alpha \text{SD} \quad (\alpha : \text{心拍境界値レベル係数パラメータ})$$
- ④ 微分値がスライスレベルを越えて負値になる時点から移動平均個数分までの間の最大点をR波のピークとし、R波のピークの時間間隔をRRインターバル時間とし、1分あたりのR波の数を心拍数とする。
- ⑤ 4点のラグランジェ補間によりRRインターバル時間をリサンプリングし、0.1秒間隔の等間隔時系列データに変換する。
- ⑥ データのはじめから一定時間（5～20秒）ずつシフトさせながら1～2分間分のデータを切り出し、0点付加によるスペクトル平滑化処理とハニング窓による窓関数処理を行い、FFTによりパワースペクトルを算出し、RRインターバルスペクトル時系列変化を得る。
- ⑦ RRインターバルスペクトルにおいて0.02～0.06Hzまでの積分値をL F積分値、0.07～0.14Hzまでの積分値をM F積分値、0.15～0.5Hzまでの積分値をH F積分値とし、各スペクトルについて求める。

R波の自動認識のパラメータは、パラメータ変更メニューを選びウィンドウ内の数値変更で設定できる。パラメータ変更を反映したピーク認識結果は画面上の波形により確認できる。R波自動抽出画面例を図2-5.8に示す。

スペクトル解析の設定パラメータとしてデータ区間、シフト時間がありこれらもパラメータ変更メニュー内の数値を変更することで簡単に設定できる。

このほか本システムではRRスペクトル時系列変化が三次元的に表示できる。心拍解析結果の表示例を図2-5.9に示す。

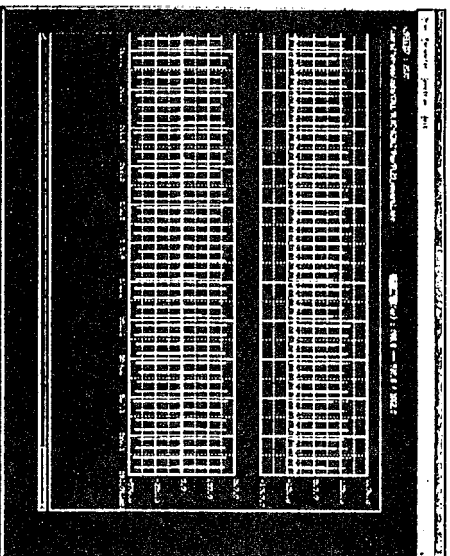


図2-5-8 R波の自動抽出画面例

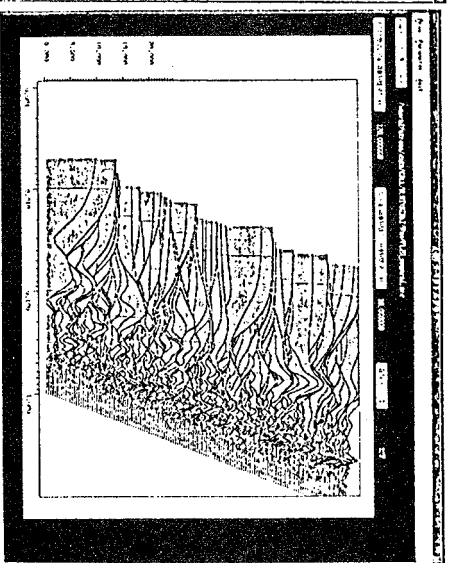


図2-5-9 心拍の解析結果の表示例

d. 連続血圧

5msec間隔でサンプリングした連続血圧波形から最高血圧時のピークを検出し、脈拍数（1分あたりのピーク数）・血圧スベクトル・脈波間隔スベクトル・圧受容体反射感度を求める。とくに血圧スベクトル・脈波間隔スベクトルについてはLF、MF、HF帯域でのスベクトルの積分値も求める。連続血圧波形から脈波ピークを求める処理手順を以下に示す。

- ① 連続血圧波形を微分し、微分波形の平均値(mean)と標準偏差(SD)を求める
- ② スライスレベルを以下の式から算出する。
スライスレベル = $\text{mean} + \alpha \text{SD}$ (α : 血圧波形境界値レベル係数/パラメータ)
- ③ 微分値がスライスレベルを越えて負値になる時点から移動平均個数分までの間の最大点を脈波ピークとし、脈波ピークの時間間隔を脈波間隔時間とし、1分あたりの脈波の数を脈拍数とする。

脈波の自動認識のパラメータは、パラメータ変更メニューを選びウインドウ内の数値変更で設定できる。パラメータ変更を反映したピーク認識結果は画面上の波形により確認できる。脈波自動抽出画面例を図2-5.10に示す。

血圧波形スベクトルは以下の手順で算出する。

- ① 連続血圧波形をデータ圧縮処理し、0.1秒間隔の時系列データに変換する。
 - ② データのはじめからP2秒ずつシフトさせながらP1秒分のデータを切り出し、0点付加によるスベクトル平滑化処理とハニシグ窓による窓関数処理を行い、FFTによりパワースペクトルを算出し、血圧スベクトル時系列変化を得る。
 - ③ 血圧スベクトルにおいて0.02～0.06Hzまでの積分値をLF積分値、0.07～0.14Hzまでの積分値をMF積分値、0.15～0.5Hzの積分値をHF積分値とし、各スベクトルについて求める。
- 脈波間隔スベクトルはRインターバルスベクトルの⑤～⑦の手順により脈波間隔スベクトル時系列変化、LF積分値、MF積分値、HF積分値を算出する。
- 次に圧受容体反射感度は以下の処理により求める。
- ① 脈波ピークの血圧値を求めて収縮期血圧値とし、脈波間隔時間とセットにしたデータを作成する。

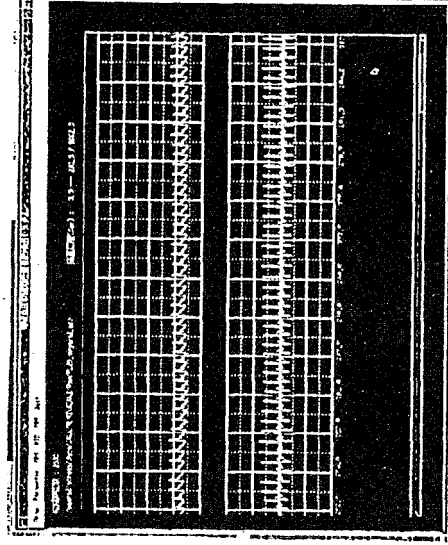
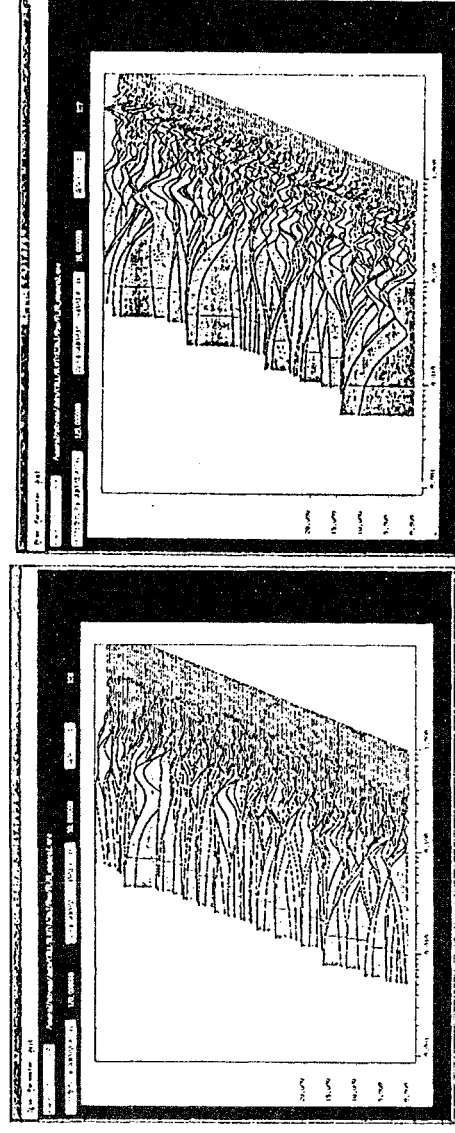


図2-5.10 脈波ピークの自動抽出画面例

②時系列的に隣り合ったデータの組を n 組取り出し、収縮期血圧と脈波間隔から相関係数および回帰直線を求める。相関係数が0.85以上の場合、圧受容体反射が生じているとし、この時の回帰直線の傾きを圧受容体反射感度として算出する。

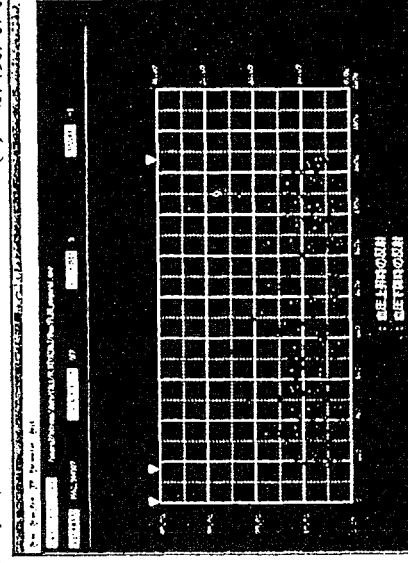
③②の処理をデータのはじめから1点ずつシフトさせて実行する。

この計算結果で得られた各スペクトル時系列変化は三次元的表示され、また圧受容体反射感度もグラフ表示される。連続血圧波形解析結果の表示例を図2-5.11に示す。



(a) 血圧スペクトル

(b) 脈波間隔スペクトル



(c) 圧受容体反射

図2-5.11 連続血圧の解析結果の表示例

e. 呼吸

5msec 間隔でサンプリングしたデータを圧縮処理し、0.5秒間隔のデータに変換した後にSIR波形のピーク認識処理と同様にして呼吸波形のピークを検出し呼吸周期を求めめる。ピーク抽出処理が適正であるかどうかは画面上に表示される波形パターンからチェックできる。呼吸波形ピーク認識結果の表示例を図2-5.12に示す。

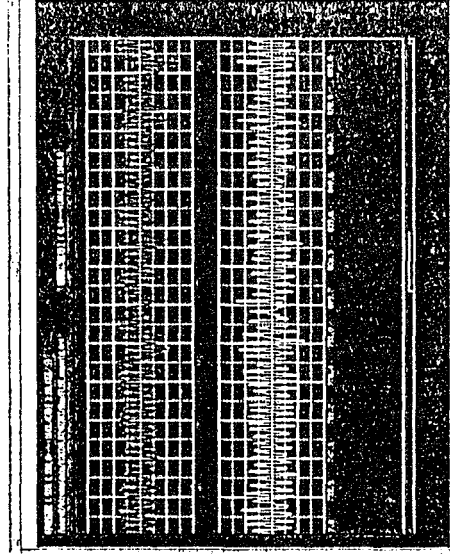


図2-5.12 呼吸波形のピーク認識解析結果の表示例

f. 体動

身体活動度計測装置から得られる10秒間隔のデータに移動平均処理を施した結果を描画できる。解析結果の表示例を図2-5.13に示す。

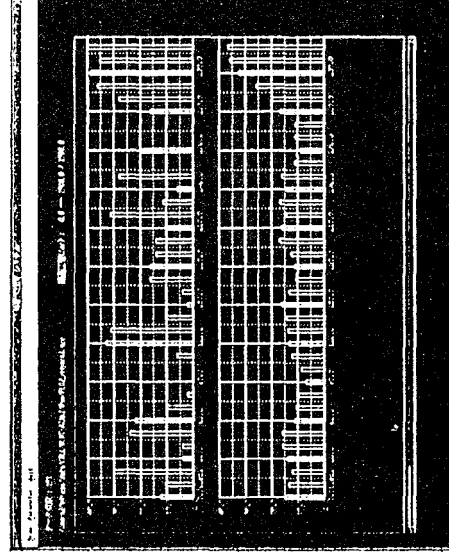


図2-5.13 体動の解析結果の表示例

g. ビジランス作業の応答時間

ビジランス作業で記録されるボタン押し動作の反応時間情報のパターンから正答・無答・誤答を自動的に認識し、ターゲットの色変化に対する応答時間と正誤答率が算出される。反応時間情報のパターン認識方法を以下に示す。

- ①反応時間波形の電圧レベルがしきい値以上の時をHigh (H)、しきい値以下の場合をLow (L) とする。

- ② HからLになった時点を応答要求状態とする。
- ③ 応答要求状態に移行してから10秒以内にLからHに変化し一定時間以上Hレベルを保つ場合は正答とし、応答要求状態に変化してから正答が認識されるまでの時間を反応時間とする。
- ④ 応答要求状態に移行してから10秒以内にLからHに変化するが、一定時間内に再びLレベルに戻った場合は誤答とする。
- ⑤ 応答要求状態に移行してから10秒以上経過してLからHに変化した場合は無答とする。

パターンの認識結果は画面に表示される波形により確認できる。解析結果の表示例を図2-5.14に示す。

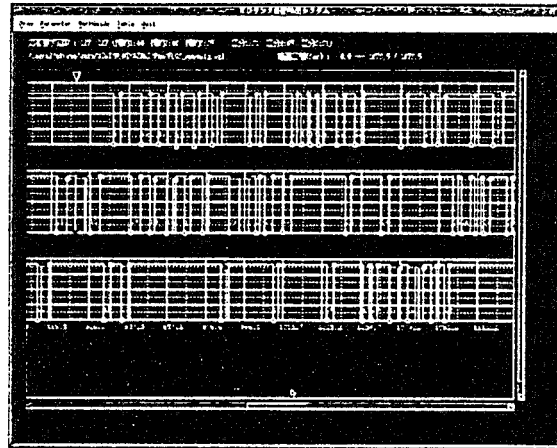


図2-5.14 ビジランスの作業結果の表示例

(3) 解析データ登録システム

解析データ登録システムの概要を図2-5.15に示す。解析データ登録システムでは、①解析データファイルの登録、②解析データに対するコメント（メモ）の登録／更新を行う。①では解析処理システムで計算した結果をデータベースシステム上に登録する。この解析データファイルに登録することでイーサネットを介して複数のユーザからのアクセスが可能になる。②では解析データから読みとれる被験者の情報が入力でき、解析結果を詳細に比較検討する際に有用である。

システムを動作させる手順は以下の通りである。

- ① 計測項目と解析方法を選択する。
- ② 前処理に必要なパラメータを確認しデータベースに登録する。
- ③ 解析データに対するコメントを入力する。

(4) 生理情報データベースシステムのデータ構造

計測データファイルと解析パラメータファイルとは図2-5.16に示す階層ディレクトリ構造へ格納される。計測データファイルと解析パラメータファイルのそれぞれに付随するメモは、管理テーブルファイルにより管理され保存される。

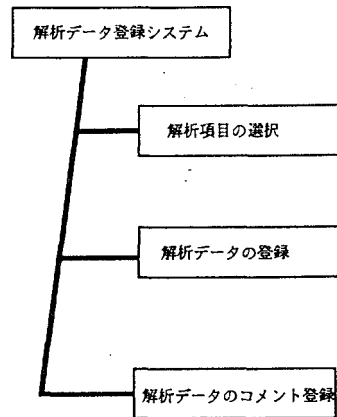


図2-5.15 解析データ登録システムの機能の概要図

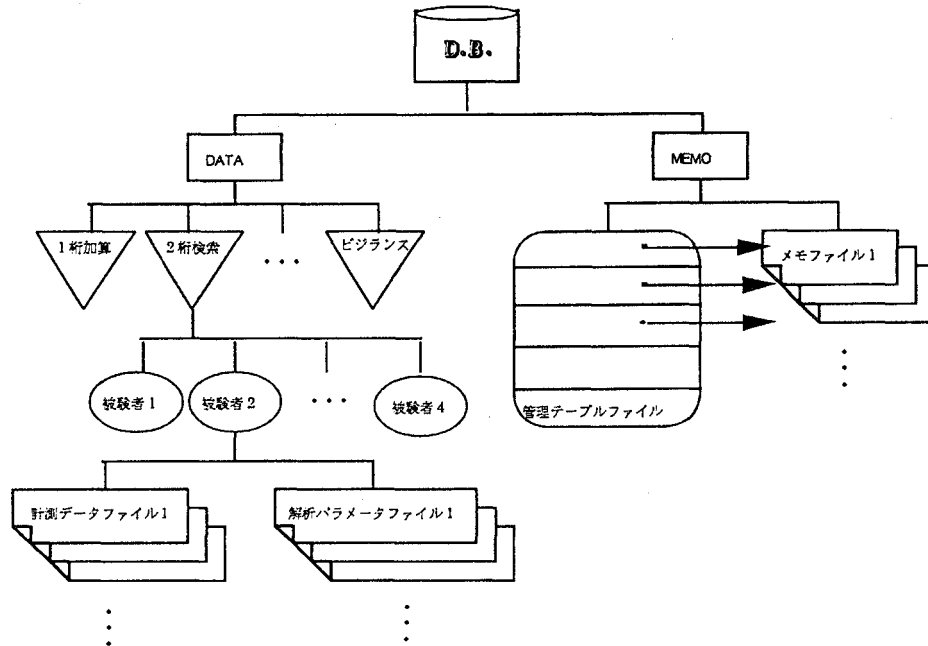


図2-5.16 生理情報データベースシステムのデータ構造図

5.3 生理情報データベースシステムの運用

男子大学生20名を被験者とした精神作業負荷実験結果を本システムに登録し運用を開始した。5種類の作業課題項目それぞれについて9種類の解析項目を解析しデータベースに登録した。解析処理に関しては自動解析システムを個別に作動させていたときよりも処理時間は大幅に短縮した。また対象とするデータを迅速に取り出せるので、解析データを容易に比較検討できる。

今後は項目の検索などのデータベースとしての機能を充実し、ノイズや個人差に対応した解析システムに改良する予定である。このシステムは指標化技術の研究開発にも充分役立つツールであると考えられる。

6. あとがき

6.1 第Ⅰ期成果について

第Ⅰ期はストレス計測に有効な無拘束生理計測技術の開発を目標に、3種類の計測装置の開発を進めた。このうち皮膚インピーダンス計と瞬目計は計測装置としての開発を完了した。いずれもテレメータ内蔵の小型装置で、皮膚インピーダンス計は腕時計型、瞬目計はヘアバンド型なので日常生活や作業を拘束することなく使用できる。センサ部も従来のように導電性ゲルなどを使用しないので取り扱いも簡便である。また、装置内蔵のCPUには計測性能を向上するための計測アルゴリズムを搭載しており、個人差や体動に対応できるインテリジェントな装置となっている。今後は実使用上生じる問題点は改良する。作業拘束性を考慮し、こめかみで計測する血圧計も携帯できる大きさにまとめ、一分間隔で血圧の絶対値とその間の圧脈波の変動を記録できるシステムとした。当研究室ではストレス評価には血圧の絶対値よりもその変動が重要であるという、一般的にも広く受け入れられている知見を実験により得ている。しかしながら、血圧の絶対値を連続的に計測することこそが有効であるという見解も一部にはあり、第Ⅱ期では新規方式の血圧計の開発に着手する。

また第Ⅰ期は計測技術の開発と同時に、第Ⅱ期の指標化研究のための生理指標解析評価技術の開発も並行して進めてきた。まず、生理計測データから客観的な指標を抽出する解析ソフトを開発し、多項目にわたる大量データを高速に処理できる解析システムをEWS上に構築した。さらにこの解析システム含む生理情報データベースシステムに発展させた。このシステムは生理計測実験で得られる生理指標を個人ごとや実験条件ごとにフェイリングするもので、必要な情報の検索・抽出機能により効率的に解析できるため、今後のストレス指標化研究で重要なツールになると考えている。今後、実際の運用にあたって生じる問題点に対しては改良し高機能システムにする予定である。当研究室は精神作業によるストレス評価を対象に考え、方法論として独自に開発した作業パターンの異なる6種類のVDT作業課題を用いた実験室内での被験者実験も実施した。これまで生理計測技術に重点を置いていたが、行動観測システムの導入により作業成績以外の行動指標や第三者による主観指標なども解析の対象にできる総合的な評価が可能な計測システムに改善した。

6.2 成果応用の展望

人間感覚により変化する生理量を無拘束に計測する装置および技術を確立し、これを用いて実験室やフィールドでデータ収集を実施する。得られた大量のデータをデータベース化することで精神作業によるストレス反応やストレスレベルを指標化する評価技術を確立する。具体的な成果物は、皮膚インピーダンス計・瞬目計・連続血圧計の3種類の無拘束生理計測装置、生理データ解析システムを含む生理情報データベースシステム、およびストレス評価指標を考えている。これらの成果は、単調・緊張作業のストレス反応をベースに監視作業や一般オフィス作業によるストレス反応評価や、蓄積した慢性ストレスレベル評価に役立ち、ヒューマンエラーなどの防止を通じて人々の安全や健康に貢献するものとなる。

6.3 第Ⅱ期研究への展開

第Ⅰ期で開発した技術を踏まえて第Ⅱ期では以下の3項目について研究を展開していく。第一

にストレス指標化のための精神作業負荷（メンタルワークロード）評価の研究で、生理情報データベースシステムを拡充し生理指標を詳細に解析するとともに、行動指標や主観指標評価技術を取り入れた総合的評価によりストレス指標化の基盤研究とする。第二に無拘束生理計測技術の高度化の研究で、新規方式の血圧計の開発と生理量解析アルゴリズム改良による評価技術の高精度化に取り組む。第三に慢性ストレスの指標化研究で、これまで対象にしてきた一過性ストレスに加えて、人間の健康や安全に役立てる指標として慢性ストレスを他研究室との共同研究により実施する。

6.4 参考文献

- 2-4.1) 三宅・神代：メンタルワークロードの主観的評価法，人間工学会誌 1993 Dec. vol.29 No. 6, 399 - 408
- 2-5.1) Heller, D. 著 吉田 監訳：Motif プログラミングマニュアル ソフトバンク株式会社出版部
- 2-5.2) Nye, A. 著 坂下 監訳：Xlib リファレンス・マニュアル ソフトバンク株式会社出版部

6.5 研究発表

- ・第 1 2 回日本生理心理学会大会（1994.5 大阪）
「小型瞬目計測装置の開発と応用」
- ・第 3 2 回日本ME学会大会（1994.5 高松）
「携帯型皮膚インピーダンスモニターの開発とその応用」
- ・第 3 5 回日本人間工学会大会（1994.6 東京）
「小型皮膚インピーダンス計の開発と精神作業評価への応用」
「精神作業時の連続血圧変動特性の評価」
- ・第 1 2 回国際人間工学会（1994.8 トロント）
「Development of Portable Skin Impedance Measurement System and its Application」
「Basic Study of Mental Workload by Physiological Measurement under VDT Work」
- ・第 2 4 回日本人間工学会関東支部会シンポジウム（1994.12 つくば）
「ストレス計測のための無拘束生理計測装置の開発」

研究担当者氏名

谷村 保明	（京都研究室）
斎藤 誠	（京都研究室）
三木 利章	（京都研究室）
西尾 恭幸	（京都研究室）
志賀 利一	（京都研究室）
鈴木 正幸	（京都研究室）
中西 みなと	（京都研究室）
迫田 勇策	（京都研究室）

第3章 非接触皮膚温度計測技術 の研究開発

第3章 非接触皮膚温計測技術の研究開発

(枚方研究室)

1. 非接触皮膚温計測装置の開発

1.1 計測システムの概念

移動する人体の特定部位を、赤外画像と可視画像のセンサフュージョンによる画像認識を用いて追尾し、人体に接触することなく、マーカレスで赤外画像から特定部位の皮膚温を連続計測する非接触皮膚温計測装置の開発を行った。

前年度までに構築した非接触皮膚温計測装置において、本年度は図3-1.1に示すように赤外・可視画像入力部、画像処理部、データ表示・感覚量推定部の改良を行った。

1.2 システムの構成

われわれの開発している非接触皮膚温計測装置は、図3-1.1に示すように赤外・可視画像入力部、画像処理部、データ表示・感覚量推定部の3つのパートから成り立っている。

画像入力部は、赤外・可視のカメラを用いて同一画角・同タイミングで画像の取得を行っている。同一画角で画像を取り込むために、両カメラの前に赤外・可視分離ミラーを設置している。取得した画像は、NTSCビデオ信号で画像処理部に送られる。装置外観を図3-1.2に示す。

画像処理部は、画像入力部で取得した画像データをもとに画像処理装置で人物領域の抽出および特徴部位の認識を行い、テンプレートマッチング装置で認識した特徴部位の追跡を行う。得られた特徴量はEthernetでデータ表示・感覚量推定部に送られる。

また、画像データは、NTSCビデオ信号に変換し、データ表示・感覚量推定部に送る。

本システムの画像処理装置は、入力・表示・メモリおよび画像処理に必要なハードウエ

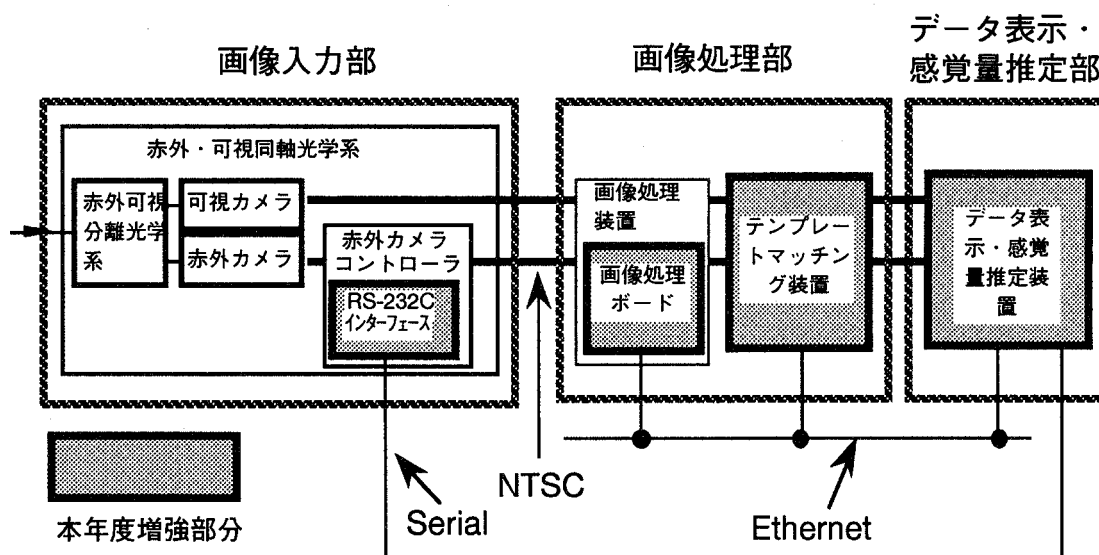


図3-1.1 非接触皮膚温計測システム構成

アをワンボード上に集約した動画像処理VMEボードを四枚組み合わせた装置である。装置外観を図3-1.3に示す。

テンプレートマッチング装置は、多値（濃淡）画像で正規化相関によりパターンマッチングを高速に行う装置である。装置外観を図3-1.4に示す。

データ表示・感覚量推定部は、画像処理部で得られた特徴量から温度計測と感覚量の推

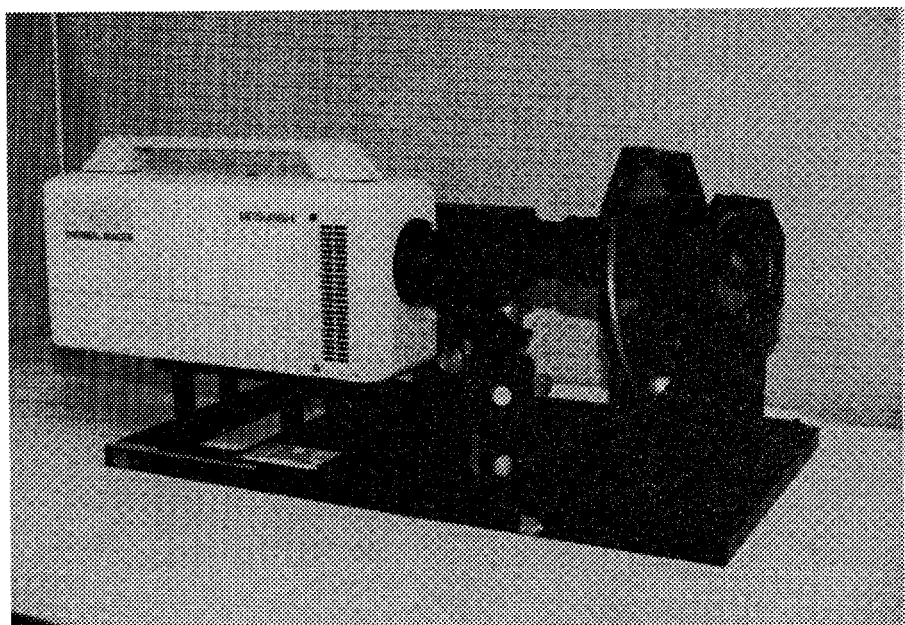


図3-1.2 画像入力部外観

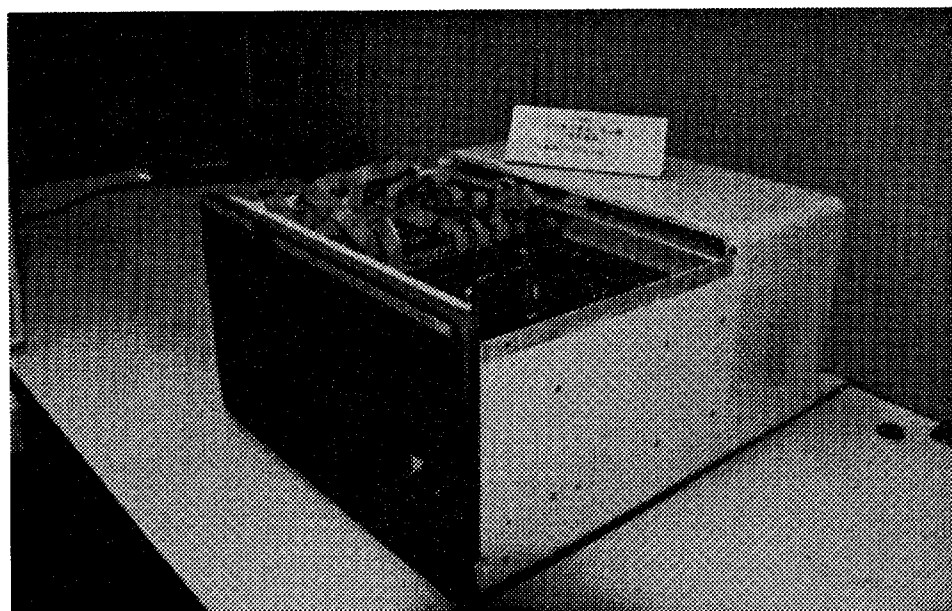


図3-1.3 画像処理装置

定計算を行い、同時に送られてくる画像データと共に表示を行う。装置外観を図3-1.5に示す。

データ表示・感覚量推定部から画像処理部へのコマンド送信、および画像処理部からデータ表示・感覚量推定部への特徴量データの送信は、Ethernetを用いている。またデータ表示・感覚量推定部から画像入力部へのコマンド送信は、RS-232Cを用いて行っている（図3-1.1参照）。

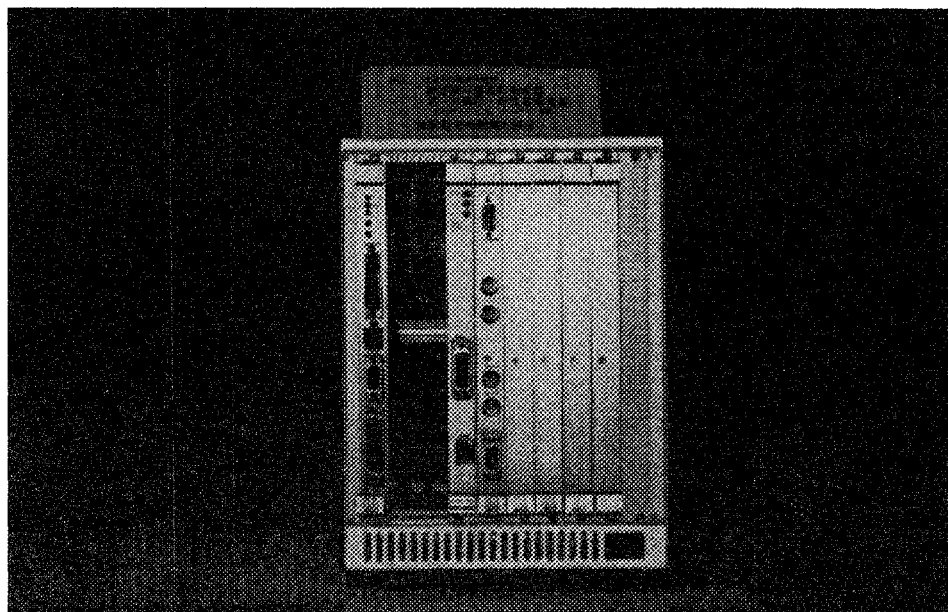


図3-1.4 テンプレートマッチング装置

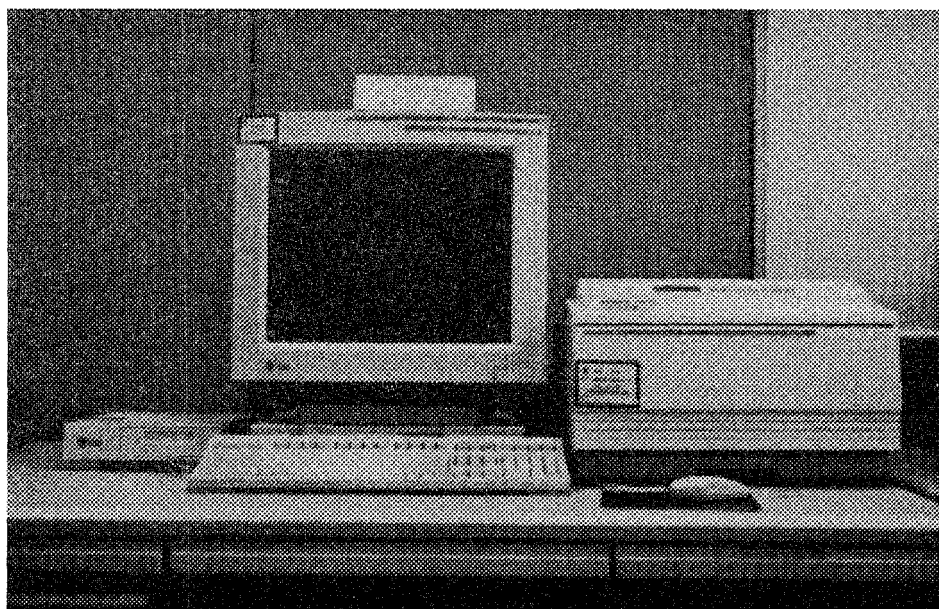


図3-1.5 データ表示・感覚量推定装置

1.3 画像入力部

1.3.1 装置構成

画像入力部では、図3-1.6に示すように赤外カメラと可視カメラの光軸を全く同じにするために、赤外カメラの前面に赤外光は透過させ可視光は反射させる、赤外光透過／可視光反射ミラーを設置した。赤外光透過／可視光反射ミラーを通った光を赤外カメラと、カラーCCDカメラで両カメラの入力同期を合わせて取得し、次の画像処理部へ送る。本システムで用いている赤外カメラは、 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ の短波長帯の赤外線に対応し、 256×256 の二次元シリコンショットキーバリア固体撮像素子を検出器として用い、電子走査方式によりフィールドタイム $1/60$ 秒で画像取得可能である。

1.3.2 赤外画像の擾乱となる表示部分の除去

赤外カメラコントローラは、あらかじめ操作者が設定した温度範囲内で、赤外カメラから得られた温度情報を輝度値に変換して画像（赤外画像）表示する。

非接触皮膚温計測装置は、この赤外画像を画像処理装置に入力し、逆に輝度値から温度に変換して温度情報を得ている。

しかし、赤外カメラコントローラの赤外画像には、被写体の映像以外に赤外カメラコントローラがユーザーインターフェースとして表示している温度データやメッセージあるいは設定用のパラメータなども同時に表示されていたために、人物抽出等の画像処理を行う際に擾乱となっていた。

そこで、赤外カメラコントローラのプログラムを変更し、ユーザーインターフェースとして表示していた温度データやメッセージあるいは設定用のパラメータなどを取り除いた。

改良前の赤外画像と改良後の赤外画像を図3-1.7に示す。

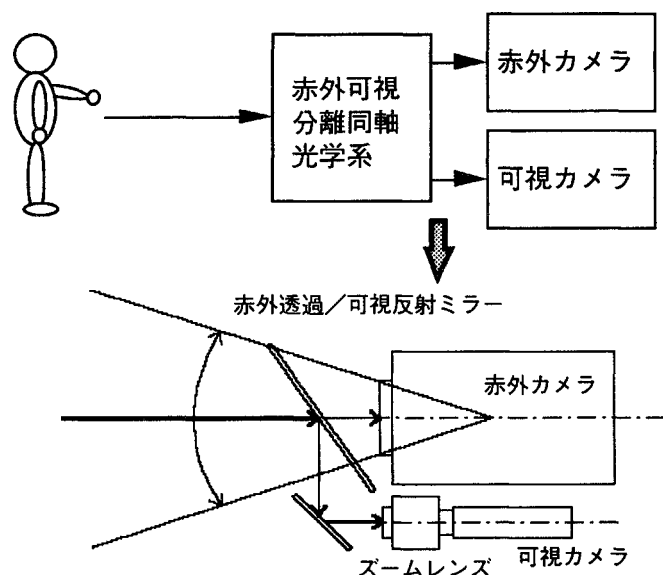


図3-1.6 画像入力部



(a) 赤外画像表示部の改良前



(b) 赤外画像表示部の改良後

図3-1.7 赤外画像表示部の改良前と改良後

1.3.3 RS-232c インターフェース

画像処理装置は赤外カメラコントローラからの赤外画像の輝度値を温度に変換するが、その際、輝度値と温度との対照表は、赤外カメラコントローラから得られる画像の輝度値の上限値および下限値と、赤外カメラに設定した測定温度範囲の上限値および下限値に対応させて作成する。

しかし、画像処理装置と赤外カメラコントローラの間で通信ができないため、操作者が直接赤外カメラコントローラに測定温度範囲を設定すると同時に、画像処理装置にも赤外カメラコントローラに設定した測定温度の上限値と下限値を入力する必要がある。

赤外カメラコントローラにRS232-Cインターフェースを追加し（図3-1.8）、データ表示・感覚量推定装置および画像処理装置から赤外カメラコントローラのコマンドを制御できるようにし、画像処理装置で測定温度の上限と下限を測定することによって、赤外カメラコントローラにもそれらの値が設定されるようにした。

(1) インターフェース伝送仕様

- | | |
|-----------|---------------------|
| ・同期方式 | 調歩同期式 |
| ・データ長 | 8ビット固定 |
| ・データ形式 | 全てASCIIで表現 |
| ・パリティ | 奇数／偶数を選択可 |
| ・ストップビット長 | 1ビット・2ビットを選択可 |
| ・伝送速度 | 2400bps・9600bpsを選択可 |

(2) 各コマンドの説明

- ・温度範囲の上限値および下限値
測定温度範囲の最高温度値と最低温度値の設定を行う。
- ・画面全体放射率補正
画面全体の放射率の設定を行う。
- ・画質改善
差分積分方式または加算平均方式の積分方式で画質を改善する。

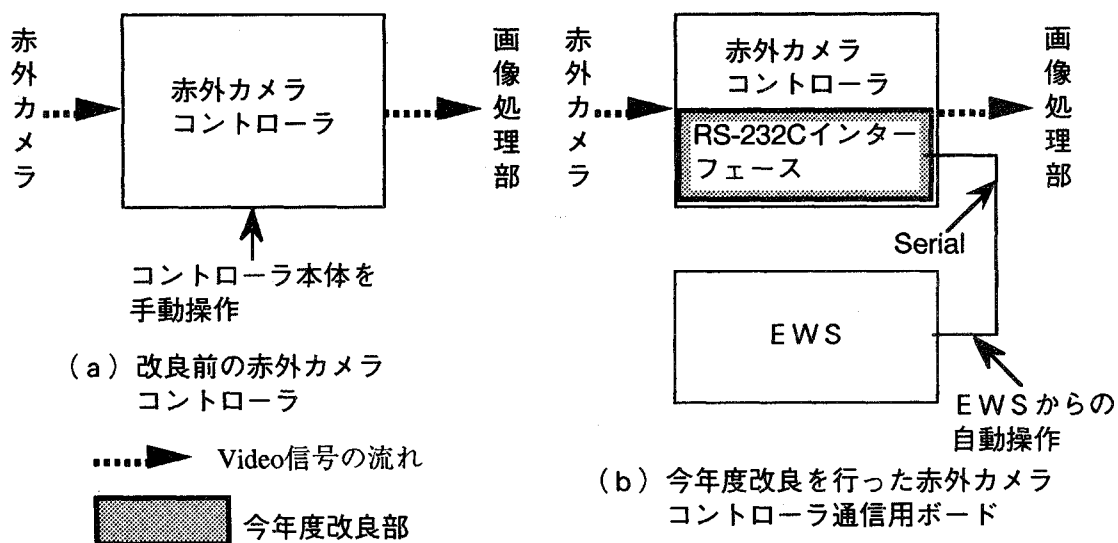


図3-1.8 赤外カメラコントローラの改良

1.4 画像処理装置

1.4.1 画像処理装置概要

画像処理装置の主な機能は、画像入力部により入力された人体の赤外画像および可視画像を同時にフレームメモリに記録し、人物抽出・人体部位認識アルゴリズムに従って濃度ヒストグラム、領域分割、輪郭抽出、フィルタリング、画像間演算などの処理により特定部位認識を行い、特徴量をデータ表示・感覚量推定部に送ることである。

動きを伴う人物の顔面皮膚温を計測するには、画像処理精度および速度の向上が必要であった。そのために本年度は、画像処理装置への画像処理ボードの追加（詳細は図3-1.9）を行った。

1.4.2 画像処理装置の増強

昨年度までは、顔面特徴部位の追跡には、顔の温度情報をもとに抽出した顔領域のモノクロ画像に対して、輝度値の低い部分（目や眉は皮膚に比べて黒く、モニター上の画素の輝度は低い）を抽出し、ラベリング（画素の集合体を、面積を持つ一つの領域として扱うための処理）を行い、最後に位置関係の情報から目と眉を決定し、その位置情報を得るという操作によって顔面特徴部位の追跡を行っていた。

しかし、目と眉の位置情報だけでは顔の姿勢（向き）の算出精度が低く、正確に計測点を追跡することが困難であった。そこで、もう1点の特徴部位を唇にし、唇を認識するために可視画像としてモノクロ画像ではなくカラー画像を用い、色情報を用いた唇（唇は一般的に赤色である）の認識を行うことで認識可能な特徴部位の数を増加して姿勢の推定精度を向上した。

カラー画像処理は、現状のモノクロ処理に比べ概ね3倍のプロセスが必要になるので（H，S，Vに分解して処理する）、処理時間が長くなるという新たな問題が発生する。カラー画像処理と赤外画像の処理の並列性を保つことによって、処理速度の低下を防ぐこ

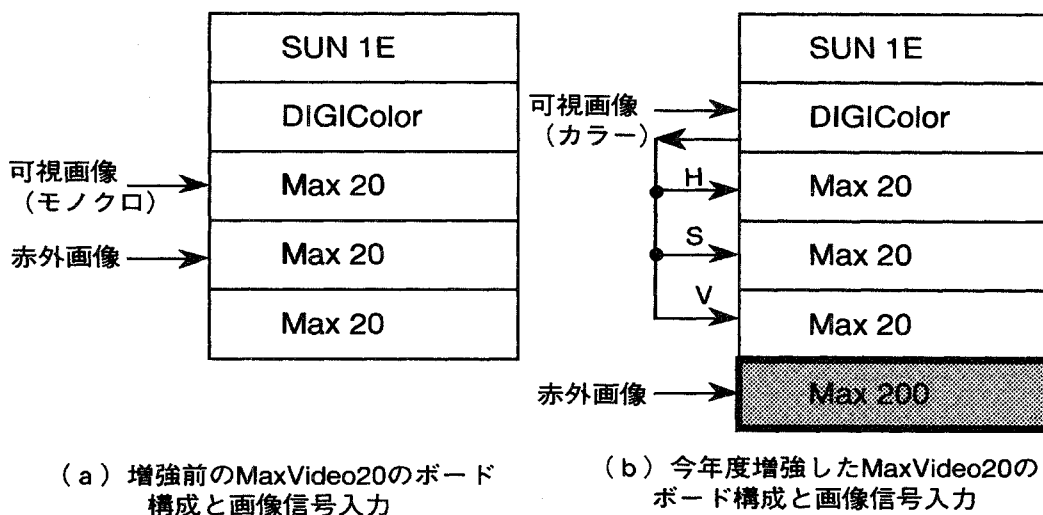


図3-1.9 画像処理装置の改良

とを目的に、画像処理装置MaxVideo20へ画像処理ボードMaxVideo200を追加し赤外画像の処理を行わせ、昨年度までに使っていた3枚のMaxVideo20ボードでカラー画像処理を行わせるよう改良を行った。

1.4.3 装置の説明

画像処理装置MaxVideo20は、VMEバスをもとにした画像処理装置であるため、ハードウェアの構成変更や機能拡張が容易である。本年度はさらに、MaxVideo200を追加した。

(1) MaxVideo200の主な性能

- ・ 種々の画像処理（ヒストグラム作成等の統計処理やアフィン変換など）をバイナリ処理により高速に実行できる（7000MIPS相当）。
- ・ 希望とするバイナリ処理はソフトウェアで自由に構成できる。
- ・ 画像メモリにおける処理に関しては内部クロック40MHzで動作するため、処理速度の向上が図れる。

MaxVideo200は以下のa～fの主要な構成要素（デバイス）から成り立っている。各々のデバイスは、画像処理に必要な機能を分担し実行する。ハード構成概要を図3-1.10に示す。

(2) 主要構成要素の機能

a. アーキテクチャアダプタ（A/B）

VMEバスによるホストとの通信およびあらゆるアプリケーションに対応するために、処理ルートがプログラミングにより変更可能な構造となっている。

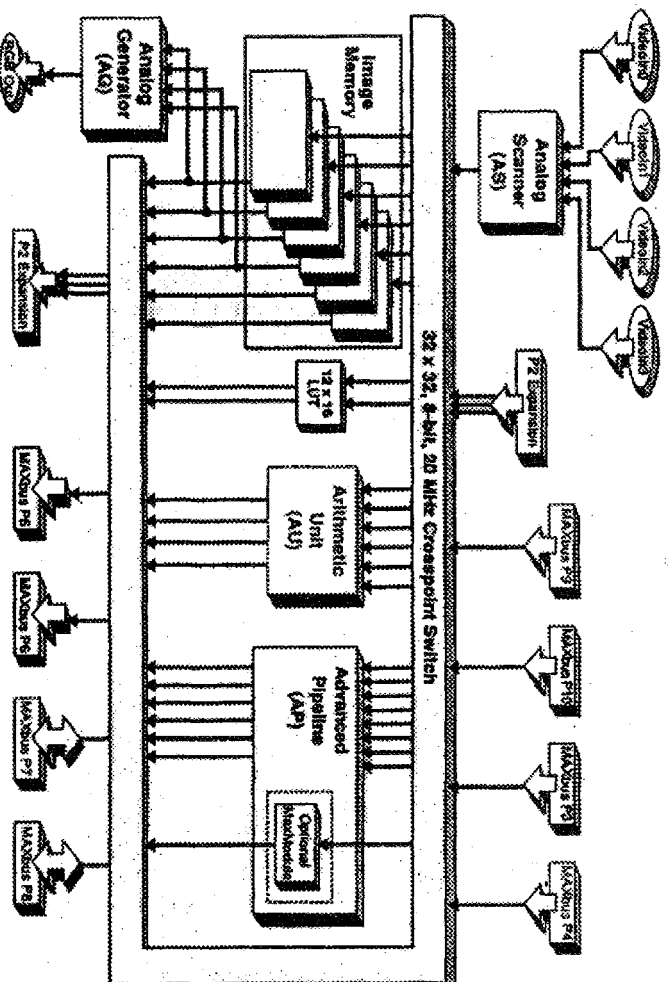


図3-1.10 画像処理部構成概要

Max Video200 (MV200) の構成要素AU、AS、AG、APおよび高性能画像メモリ (VSIM) は全て、アーキテクチャアダプタ (AB) デバイスに接続され、VMEバスへの接続はこのABボードを介して行っている。ABデバイスは、VMEホストインタフェース、内部データ線路スイッチ切り替え機能、Maxバスポート、P2拡張バス、ルックアップテーブルおよびその他これに接続するMV200構成要素5個の物理的接続ポイントとしての機能を有している。そして画像処理資源であるレジスタ、画像メモリ、ルックアップテーブルなどは、全てVMEスペースに完全にマップされている。

高速のクロスポイントスイッチを有し、MV200の内部処理アーキテクチャーの再配置をソフトウェアの制御下で変更することが可能である。32個に分かれた8ビットデータ経路の行く先は、データ転送速度に (フィールド、フレームまたは解像度がプログラマブルなデータの転送が終わる度に) ダイナミックに配列を変更できる。

b. 演算ユニット (AU)

演算ユニットは、複雑な線形、非線形および統計処理演算を行う50,000ゲートのVLSIビデオ処理チップである。入力に8ビットが6個、出力に8ビットが4個あり、ABおよびその他のMV200構成要素と200MB/secの通信が可能のようにチップ上に20MHzのポートが設けられている。AUは8ビットまたは16ビットの処理装置として使用でき、11ビット乗算器4個、10ビットALU7個、統計処理器2個、ランレングス処理器2個および行列アドレス発生器などの20MHzで動作するハード資源を有している。

c. アナログ発生器 (AG)

アナログ発生器は、画像情報の表示と他のCPUにより発生させたグラフィックスを重ね描きすることが可能である。ディスプレイの疑似カラー、真カラーおよびグレイスケールカラーの各モード (4ビットのグラフィック重ね書き有無) をサポートしている。他にRS-170/CCIR、正方形画素および120Hzのステレオ様式などの多様なディスプレイのビデオ情報を出力することが可能である。

d. 多重アナログ入力器 (AS)

多重アナログ入力器は、アナログの映像入力信号を最適化した後、デジタル信号に変換する8ビットデジタルデバイスで、リニアまたはマトリックスアナログカメラおよびセンサなどとインタフェースできるように設計され、赤外カメラの映像と可視カメラRGBの映像の計4chの映像を入力する。デジタル化速度DCから26MHz迄サポートでき、プログラマブルなゲイン、オフセット、フィルター選択並びに同期処理操作を含む特定アナログソース信号前処理を行う機能を持っている。ASタイミングセクションは完全にプログラマブルで、水平同期、垂直同期、コンポジット同期および画素クロック信号を生成またはスレイブすることが可能である。

e. パイプライン処理器 (AP)

パイプライン処理器は、コンボリューション、統計解析、LUT処理および2値モホロ

ジーなどの人物抽出や部位認識などで必要な画像処理特有な処理を20MHzの速度で行う。コンボルバは、64ポイントの8ビットFIRフィルタで、3種類の2次元モード（8×8カーネル、8×4カーネル、3×3SOBELエッジ抽出）や、1次元（64×1）フィルタ動作をすることが可能である。コンボリューションは、正規化することによって24ビットまでの結果を生成できる。統計処理は、ヒストグラム処理、特徴抽出処理、HOUGH変換の3種類のモード選択ができる。ルックアップテーブル（LUT）は8ビット×8ビット出力4バンクLUTと16ビット×16ビット4バンクLUTを有している。

f. 高性能画像メモリ（VSIM）

仮想サーフェスメモリ（VSIM）はMV200用の高性能イメージメモリで、VSIM8ビット40MHzの仮想メモリである。1台のMV200には6枚のVSIMを搭載することができ1枚のVSIMは40/20MHzで動作する4Mバイトまたは16Mバイトのものとして提供される。

(3) 装置仕様

a. 処理能力

- ・ラベリング処理 2/30sec以内 (512×512×8bit)
- ・膨張・収縮処理 1/30sec以内 (512×512×8bit)
- ・ヒストグラム演算 1/30sec以内 (512×512×8bit)
- ・画像間演算 1/30sec以内 (512×512×8bit)

b. 装置外観

図3-1.11に示す。

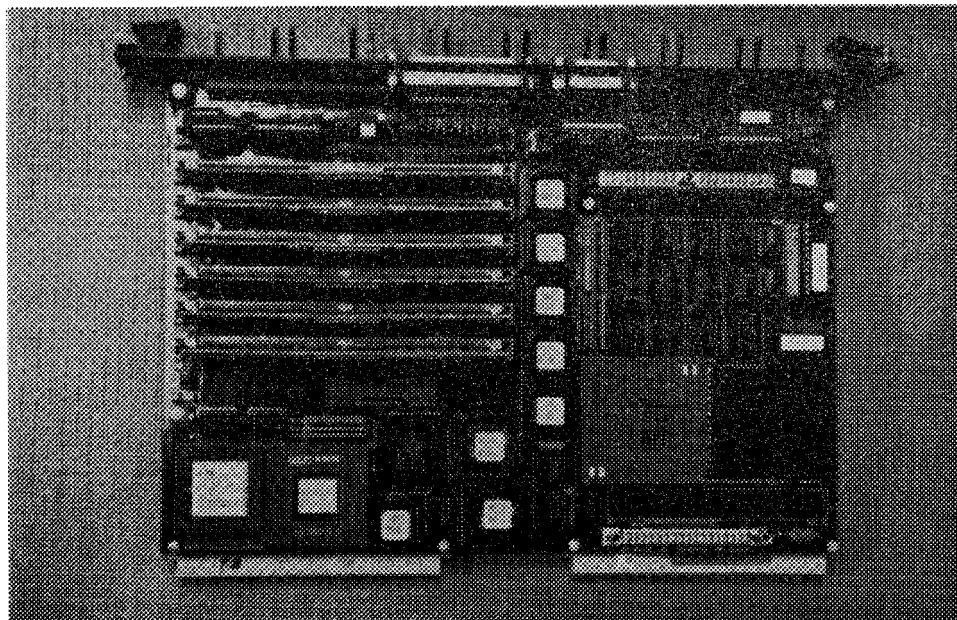


図3-1.11 画像処理ボード外観

1.5 テンプレートマッチング装置

1.5.1 開発目的

昨年度までは、目・眉などの特徴部位の認識は、

1. 顔の温度情報をもとに顔領域を抽出。
2. 抽出した顔領域に対して、輝度値の低い部分を抽出
(目や眉は皮膚に比べて黒く、モニター上の画素の輝度は低い)。
3. ラベリング処理を行ない、各領域の重心座標を求める。
4. 重心座標の位置関係の情報から目と眉を決定。

という手順で行い、1～4の操作を順次繰り返すことで、顔面特徴部位の追跡を行っていた。

しかし、この方法では、画像取り込みから目と眉の位置情報の取得まで約1秒の処理時間を必要とし、被験者が速い動作を行った場合、連続温度計測が困難であるという問題があった。これを解決するために、画像処理装置により得られた顔抽出画像から顔面内の特定部位の認識・追跡を高精度かつ高速に行うテンプレートマッチング装置の開発を行った。

1.5.2 テンプレートマッチング装置

本装置を導入することによって、特徴部位の追跡において、1.5.1節で示した1～4の操作を毎回繰り返す必要は無くなった。すなわち、1～4の操作を1度だけ実行し、認識された部位をテンプレート登録する事によって、以降は約0.3秒の時間で追跡し、それらの座標値を求めることが可能となった。このようにして求められた特徴部位の座標値は、計測結果表示装置に送られる。

(1) 装置構成

ハードウェア構成は以下の図3-1.12に示す通りである。

今回開発したテンプレートマッチング装置は、3枚のパターンマッチング処理ボードを持ち、3箇所のパターンマッチング処理を並列に実行することが可能である。

したがって、顔面上の3部位を並行して、追跡が可能である。

(2) 装置仕様

- ・測定手法 正規相関によるグレースケールパターンマッチング
- ・測定精度 繰り返し精度として1/3画素
- ・測定時間 190画素×160画素のサーチエリア内で60画素×60画素のテンプレートを検索した時・・・250msec
 - *測定条件 カメラ視野・・・360mm×300mm
 - 素子分解能・・・0.72mm×0.63mm
- ・測定仕様 本装置はパターンマッチングボードを3枚使用し、それぞれに1パターンずつを検出させる。

パターンマッチングの手法はグレイ画像に対する正規化相関で、NEV2500が高速に演

算 (80 nsec/ピクセル) し、一致度を算出する。

(3) 各ボードの仕様

a. 画像入力ボード (NEV2110)

本ボードはVMEbusREV C.1にコンパチブルな画像処理入力ボードである。本ボードはVME標準サイズ (ダブル・ハイトボード) で、画像入力は2チャンネルあり同時取り込み、または単独・連続取り込みが可能である。各チャンネルに対応したADCおよびLUTが2ch分あり、同時取り込みを可能にしている。

出力選択はVIDEOセレクトビットによりソフト的に行う。表3-1.1に基本仕様を記す。

b. CPUボード (NEV2300)

本ボードはモトローラ製32bitマイクロプロセッサMC68020RPを搭載したVMEbusボードである。本ボードは、SRAMが512KB、ROM256KBを備える。また、インターフェースには画像処理用キーボード、マウス、絶縁タイプI/O、RS-232C等を内蔵している。また、オンボードでメモリやI/Oを増設するために拡張バスコネクタも実装している。割り込みは7レベル使える。VMEbusに対してはDTBマスタとしての機能とリクエストの機能も備えている表3-1.2に基本仕様を記す。

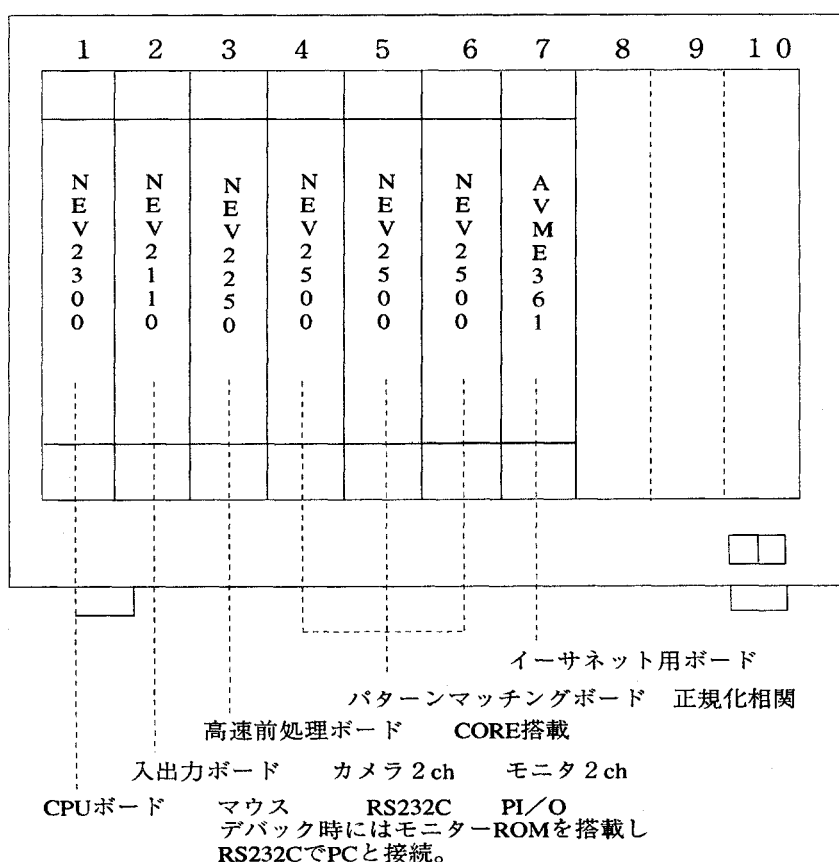


図3-1.12 テンプレートマッチング装置機器構成

c. 画像処理ボード (NEV2250)

本ボードはVMEbus機能を持ったCORE搭載画像処理ボードである。本ボードはフレームメモリ6面、データ取り出し、データ取り出し収納X、Yカウンタ、8面の変形ウインドメモリーを採用し、多機能かつ高速性を重視したボードある。画像処理アルゴリズムとして各種フィルタ、各種微分、コンボリューション演算などライブラリーが多数あるため、画像計測、認識等の処理を高速に行うことが可能である。表3-1.3に基本仕様を記す。

表3-1.1 画像入力ボードの基本仕様

項目		仕様
接続バス		VME bus REV C. 1
レジスタ		4WORD 出力 3WORD (SYNC. FRZ. VIDEO CONT) 入力 1WORD (Status)
メモリ		VRAM 512KB (256KB×2) : W IMPRAM 256KB (256K/4B) : B LUTRAM 2KB (256×2×4) : B
割り込み		1レベル 3要素 (VSYNC. フォトカプラ)
入出力	画像特性	走査線数 : 525本 (有効数480本) 垂直走査周波数 : 60Hz 垂直捜査期間 : 16.67ms 水平走査周波数 : 15.734Hz 水平捜査期間 : 63.5μs
	画像出力	モニター出力 (NTSC) : 1Vpp 75Ω 垂直同期信号 (VD) : TTLレベル 水平同期信号 (HD) : TTLレベル
	DIO (ストロボIF)	2cHフォトカプラ入力 +12V 2cHフォトカプラ出力 オープンコネクタ
入出力コネクタ		カメラ入力 : BNC又はD-SUB 9PIN TYPE 同期出力 : D-SUB 9PIN TYPE モニター出力 : BNC ストロボIF : D-SUB 9PIN TYPE
電源		+5V±5% A以下 +12V±5% A以下 -12V±5% A以下
環境		動作温度 0～40℃ 動作湿度 10～90% 結露無し 保存温度 -10～60℃ 保存湿度 5～95% 結露無し
外形寸法		233.4 (W) × 162.54 (D) mm
パネル幅		20mm

d. パターンマッチングボード (NEV2500)

本ボードはVMEbus機能を持った正規化相関によるグレースケールパターンマッチング処理ボードである。本ボードは多値（濃淡）によるパターンマッチングを高速（80nsec/画素）処理でき、画像取り込み中にリアルタイムに圧縮ができ圧縮データにより高速粗サーチが可能である。画像メモリは二画面あり、交互に使えるためリアルタイム処理ができる。また入力画像を回転、拡大、縮小、移動ができパターンサーチエリアも自由にスキップしながら移動できるため、高速のパターンマッチングが可能である。

表3-1.2 CPUボードの基本仕様

項 目	仕 様
M P U	MC68020RC25 25MHZ PGA
E P C P	MC68882RC25 25MHZ PGA (OPTION)
R A M	SRAM 512KB (128K×8 4個) 使用チップ HM628128LP (日立) 相当品 バス幅 32ビット ウェイト数 1 WAIT (85nsの場合)
B B R A M	SRAM 128KB (128K×8 1個) 使用チップ HM628128LP (日立) 相当品 バッテリー バックアップ機能付 ER3N 850mAh (MAXELL) 保持時間 850/0.02 = 42500 (h) バス幅 8ビット ウェイト数 3 WAIT (MAX)
R O M	EPROM 256KB (64K×1.6 2個) 又はIMB (256K×1.6 2個) 使用チップ HN27C1024H (日立) 又はHN27C4096H (日立) 相当品 バス幅 32ビット ウェイト数 2 WAIT (100nsの場合)
S I O	使用チップ MC68681P CH A, B 転送方式 調歩同期方式 電氣的仕様 RS-232-C ドライバ、レシーバ MAX233 入力信号 RxD CTS 出力信号 TxD RTS ボーレート 19, 2K BAUD (MAX) コネクタ D-SUB 25PIN (CHB) 10PIN (CHA)
K B I F	使用チップ MC68681P CHA 転送方式 調歩同期方式 電氣的仕様 TTL 入力信号 RxD 出力信号 RDY・RTY・RST ボーレート コネクタ TCS7580-01-201
M O U S E I F	入力信号 XA相 XB相 YA相 YB相 LEFT SW RIGHT SW 電氣的仕様 TTL シュミットトリガ コネクタ D-SUB 9PIN
P I O	使用チップ MC68230 出力信号 PORT A 8本 (又はフォト 4本) コントロール 2本 入出力信号 PORT B 8本 (又はフォト 4本) PCOにて方向制御 コントロール 2本 入力信号 電氣的仕様 TTL コネクタ D-SUB 25PIN

表3-1.3 画像処理ボードの基本仕様

名 称	仕 様
前処理 CPU	HRU-TAICHI-CORE 40NSEC / 1 画素
フレームメモリ	DRAM : MSM442256AL-10 : 6 面
ウィンドウメモリ	DRAM : MSM442256AL-10 : 1 面
インターラプト	P1 / T68230 H1 H2 H3 3 ベクタ割込み
	IRQ : IRQ 1 ~ 7 ジャンパー選択
画像入力	2 画面 フレームメモリ 1. 2 に取り込む
コア処理 clk	40nsec
CPU アクセスウェイト	コア, P1 / T : CLKsys, F / F, DRAM : Delay IC
システムバス	VME 8 / 16BIT
動作環境	温度 : 0 ~ 40℃, ~ % (結露しないこと)
基板寸法	233.35 (W) 320 (D) mm
パネル寸法	20m / m

1.6 データ表示感覚量推定装置

1.6.1 概要

データ表示感覚量推定装置は、以下の一連の動作を連続的行なう。

- ・ テンプレートマッチング装置で求められた特徴部位の重心座標値から、赤外画像上の温度計測点の座標値をもとめる。
- ・ 温度計測点における赤外画像の輝度値をもとめる。
- ・ 輝度値を温度に変換する。
- ・ 求められた温度を用いて、温冷感推定式やストレス推定式を解く。

データ表示感覚量推定装置は、このようにして求めた、特徴部位の座標値・皮膚温・ストレス推定値・温冷感推定値をモニターの画面上に表示する。また、これらの値をタイムスタンプとともにディスクに記憶することも可能である。

1.6.2 ハードウェア

本装置は、EWS本体(SPARCstation 20)・モニター(20inch color)・ハードコピー装置(QMS860)・磁気テープ装置(4mm DAT)から構成されている。また、EWS本体のS-BUSスロットには、赤外・可視の2枚の画像を同時に取得できるフレームグラバー(DataCell S2200)を挿入してある。

フレームグラバーで取得された赤外・可視画像は、顔面特徴部位の追跡状態をモニターするため、それぞれ画面上の独立したウインドウに表示される。また、赤外画像から、皮膚温度計測点の輝度値をサンプルし、温度が計算される。

フレームグラバーは、可視画像フレームメモリと赤外画像フレームメモリをそれぞれ2

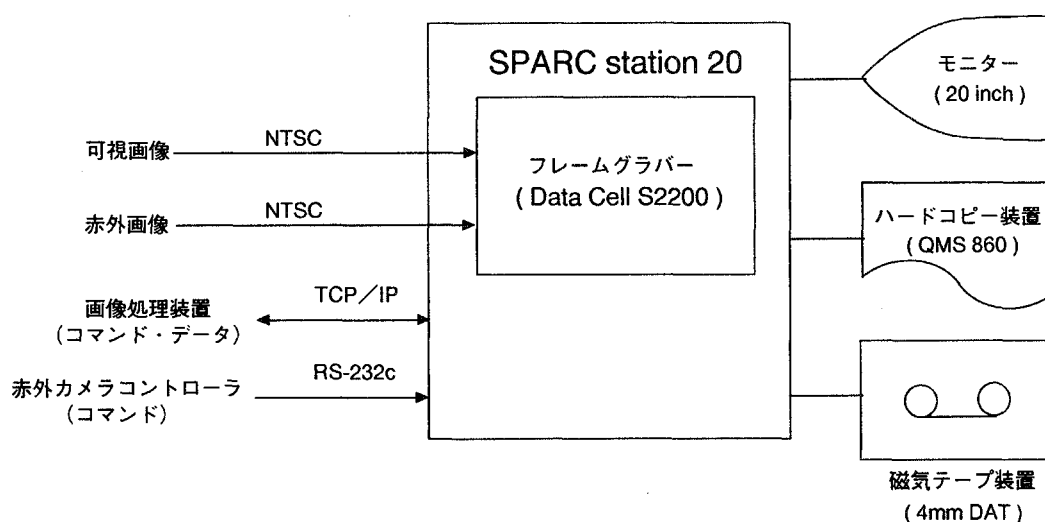


図3-1.13 データ表示感覚量推定装置システム構成

枚づつ持っており、画像取得中でも安定に輝度値をサンプリングしたり、画像を表示することが可能である。

可視・赤外画像は、NTSCでテンプレートマッチング装置から転送され、画像以外のデータやコマンドは、Ethernet(TCP/IP)で転送される。

また、RS-232cによって、赤外カメラの計測温度レンジなどをコントロールすることができる。

さらに、計測結果を磁気テープに保存したり、印刷することも可能である。

図3-1.13 にハードウェアのブロック図をしめす。

1.6.3 温度計測・結果表示プログラムの機能

温度計測・結果表示プログラムは、初期設定、皮膚温計測、計測結果の表示、計測結果の記録を行う。

本プログラムは、モニター上に表示される各種ウインドウを介して入出力を行う。入力にはキーボードおよびマウスを用いる。ユーザインタフェースの操作性(Look & Feel)は、Motif に準拠している。

本プログラムにおいて、用意されているウインドウは、次のとおりである。

1. メインウインドウ (図3-1.14)

装置全体のコントロールや計測結果の温度表示を行う。

2. 可視画像ウインドウ (図3-1.15)

可視カメラで撮影された顔画像（顔領域のみを抽出した画像）を表示する。特徴部位の追尾状態や温度計測点をクロスカーソルで顔画像上に表示する。また、初期設定時に、システムに温度計測点を指示する場合にも使用する。

3. 赤外画像ウインドウ (図3-1.16)

赤外カメラで撮影された温度画像を表示する。

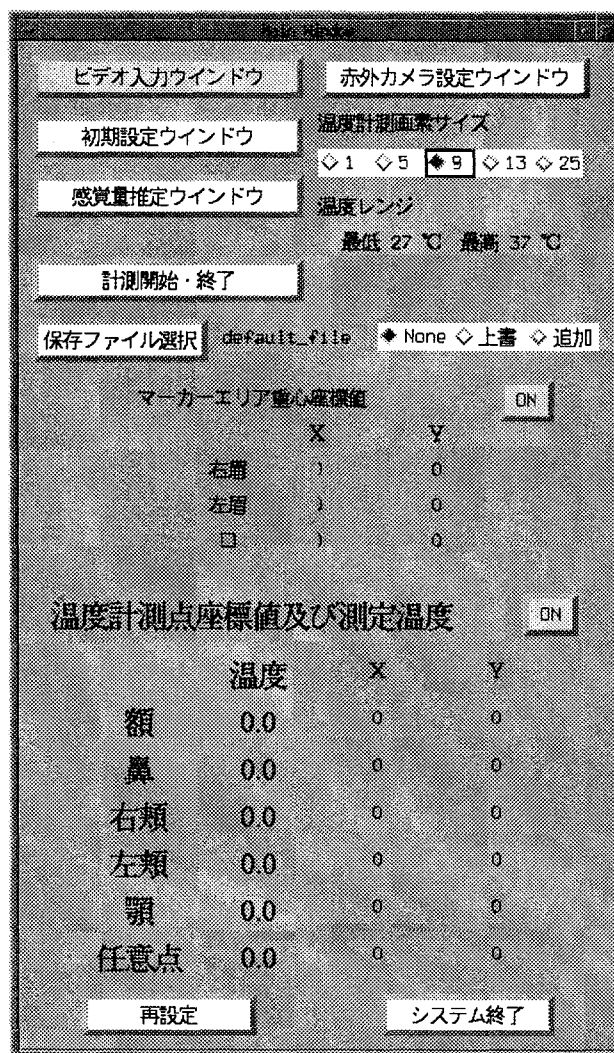


図3-1.14 メインウインドウ

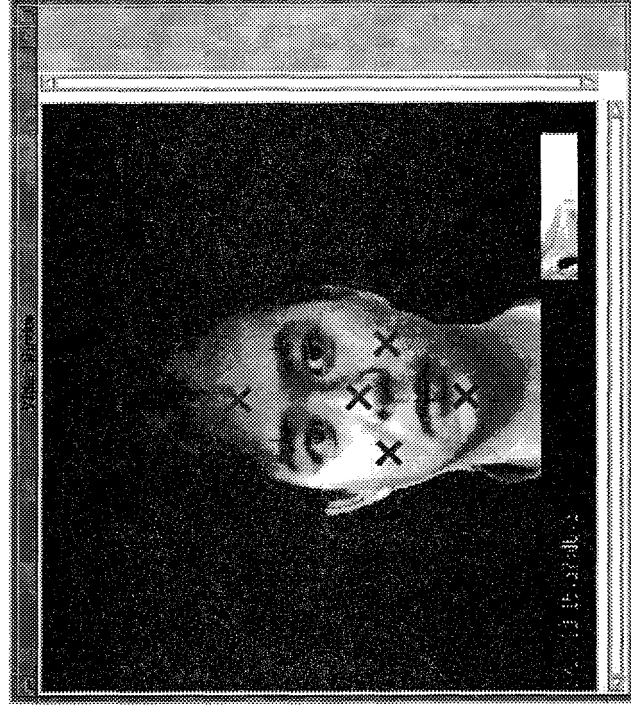


図3-1.15 可視画像ウインドウ



図3.1.16
赤外画像ウインドウ

4. 初期設定ウインドウ (図3-1.17)

初期設定時に、温度計測点や特徴部位入力に使用する。

5. 赤外カメラ設定ウインドウ(図3-1.18)

赤外カメラの制御を行う。

6. ファイル選択ウインドウ (図3-1.20)

計測結果を記録するためのファイルの選択を行う。

6. 感覚量推定ウインドウ

感覚量の推定結果を表示する。詳細は、1.7節参照。

以下、本プログラムの動作を説明する。

(1) 初期設定

a. 初期画像取得

”メインウインドウ”の”初期設定ウインドウ”ボタンをクリックすると、”初期設定ウインドウ”がオープンする。さらに初期設定ウインドウの”初期可視画像入力”ボタンをクリックすると、初期画像取得コマンドが画像処理装置に送信され、赤外と可視の初期画像が画像処

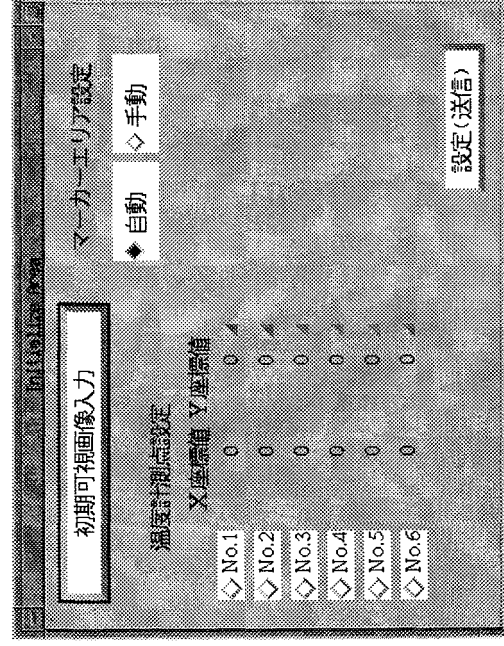


図3-1.17 初期設定ウインドウ

理装置に取り込まれる。画像処理装置が取得した初期画像はフレームグラバのフレームメモリーに取り込まれ、それぞれ赤外画像ウインドウと可視画像ウインドウに表示される。

b. テンプレートの設定

” マーカーエリア設定 ” が ” 自動 ” の場合には、画像処理装置が特徴部位（左右の眉と口）を自動認識し（3.2節参照）、皮膚温計測時にはこれらの部位を自動追跡する。追跡のための特徴部位をマニュアルで登録する場合には” マーカーエリア設定 ” を ” 手動 ” にきりかえ、a.で取得した初期画像（可視画像）上でマウスを用いて右目、左目、口のエリア（長方形）の対角頂点（計6点）をピックしテンプレート画像を定義する座標値を入力する。初期設定ウインドウの ” 設定（送信） ” ボタンをクリックするとテンプレート画像の座標値が画像処理装置に転送され、画像処理装置にテンプレートが登録される。皮膚温計測時にはテンプレートにマッチする部位を自動追跡する（3.3節参照）。

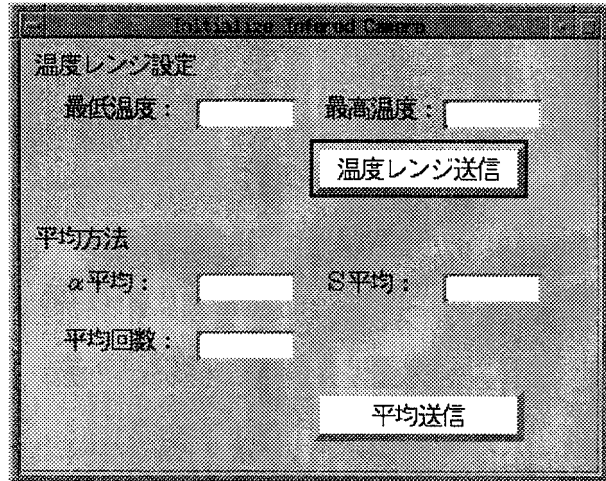


図3-1.18 赤外カメラ設定ウインドウ

c. 温度測定点の入力

a.で取得した初期画像（可視画像）上でマウスを用いて温度測定点をピックする。温度計測点は最大6点まで設定することができる。温度測定点を、それぞれ (m1, m2,, m6) とする。

d. 赤外カメラの設定

” メインウインドウ ” の ” 赤外カメラ設定ウインドウ ” をボタンクリックすると、赤外カメラ設定を制御するウインドウがオープンする。このウインドウでは、赤外カメラの計測温度レンジ（温度計測範囲の下限值 Tl と上限値 Th）と赤外画像のノイズキャンセルのための、画像積分法を設定する。積分の方法として、差分積分法と時間積分を選択することができる。

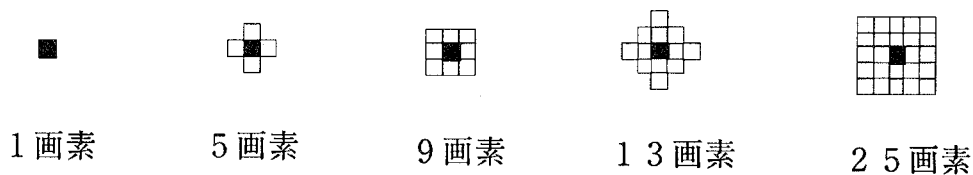


図3-1.19 温度計測画素の取り方

e. 温度計測画素サイズの設定

”メインウインドウ”の”温度計測画素サイズ”ボタンによって、温度計測点のサイズ（画素数）を1画素～25画素まで変更する事ができる。計測される温度は、指定した画素が示す温度の相加平均になる。画素の取り方を図3-1.19に示す。

f. 記録ファイルの設定

”メインウインドウ”の”保存ファイル選択”をボタンクリックすると、計測結果を記録するためのファイルを指定するウインドウ（ファイル選択ウインドウ）がオープンする。

計測結果は、タイムスタンプ（年月日時分秒）とともに、ASCIIコードで指定したファイルに記録される。

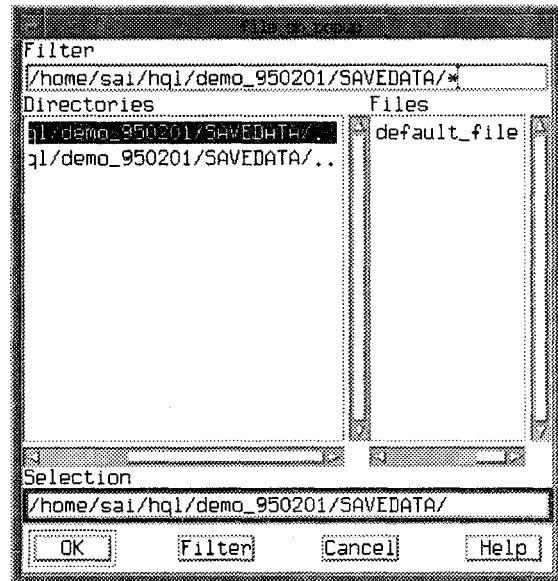


図3-1.20 ファイル選択ウインドウ

(2) 計測

a. 計測の開始

”メインメニュー”の”計測開始”ボタンをクリックすると、計測開始コマンドが画像処理装置に送られる。画像処理装置は、特徴部位である左右の眉と口を追跡し、これら3部位の重心座標値を連続的にデータ表示感覚量推定装置に送り返す。

データ表示感覚量推定装置側は、画像処理装置から特徴部位の重心座標値が送られてくる度に、以下の b.～e.の手順を繰り返し、温度計測を行う。

b. 赤外画像及び可視画像の取り込み

画像処理装置から特徴部位の重心座標値が送られてくると、画像処理装置が保持している赤外画像と可視画像をフレームグラバのフレームメモリに取り込む。

c. 温度測定点の計算

初期画像における特徴部位の重心座標値と画像処理装置から送られてきた特徴部位の重心座標値を用い、初期画像で設定した温度計測点の座標値 ($m_1, m_2, \dots, m_6$) をアフィン変換によって写像し、b.で取り込んだ赤外画像上での温度計測点の座標値($m_1', \dots, m_6'$)を求める。（詳細なアルゴリズムは、3.4 頭部姿勢の決定と温度計測点の計算の節を参照）

d. 赤外画像と可視画像の表示と測定点のマーク

b.で取り込んだ赤外画像と可視画像をそれぞれ赤外画像ウインドウと可視画像ウインドウに表示する。さらに、表示した可視画像上に c.で求めた温度測定点($m_1', \dots, m_6'$)を表示する。

e. 温度の計算

初期設定時に指定した温度計測画素サイズを考慮して、温度測定点(m1',.....,m6')近傍における赤外画像輝度値の平均値を求める。赤外カメラから出力される赤外画像は温度と輝度が線形な関係になるように補正されている。また、フレームグラバーの分解能は8 bitであるので、式 3-1.1 によって、輝度値から温度を求めることができる。

$$T = S \times \frac{T_h - T_l}{255} + T_l \quad (\text{式3-1.1})$$

ここで、 T_l 、 T_h はそれぞれ、初期設定時に指定した温度計測範囲の下限值と上限値である。

f. 温度計算結果の表示と記録

指定された6点の温度計測結果を”メインメニュー”の計測値表示部に表示する。さらに、計測結果を初期設定時に指定したファイルに、下記のようなフォーマットで書き込みを行う。

TIME	M1	M2	M3	M4	M5	M6
951225162000	34.2	32.0	34.0	34.2	32.6	25.0
951225162001	34.4	32.2	34.2	34.4	32.4	25.0
951225162002	34.6	32.6	34.2	34.2	32.4	25.0
951225162003	34.6	32.4	34.2	34.2	32.6	25.0
	.					
	.					
	.					

g. 計測終了

”メインメニュー”の”計測終了”ボタンをクリックすると、終了コマンドが画像処理装置に送信され、特徴部位のトラッキングが終了する。また、計測結果を書き込んだファイルがクローズされ、一連の温度計測が終了する。

1.7 感覚量推定プログラム

1.7.1 感覚量推定式

枚方研究室で並行して実施している”皮膚温による感覚量推定手法の研究開発”の研究成果である温冷感の推定式とストレスの推定式を、温度計測・結果表示プログラムに組み込んだ。(第13章 1.3節参照)

使用した温冷感の推定式は、

$$y = -711.41 - 2.39 \text{鼻温} + 15.33 \text{頬温} + 8.12 \text{顎温} \quad (\text{式3-1.2})$$

ただし、 $-100 < y < 100$

ストレスの推定式は、

$$S = 33.59 (\text{額部皮膚温} - \text{鼻部皮膚温}) \quad (\text{式3-1.3})$$

ただし、 $0 < S < 100$ かつ $34^\circ\text{C} < \text{額部皮膚温} < 36^\circ\text{C}$

1.7.2 感覚量推定プログラム

データ表示感覚量推定装置で、感覚を推定するためには、あらかじめ初期設定ウインドウで温度計測点を設定する際に、正しく皮膚温の計測点を指示しておく必要がある。

温度計測点と計測部位の関係は、

計測点 No.1	額
計測点 No.2	鼻
計測点 No.3	右頬
計測点 No.4	左頬
計測点 No.5	顎

である。

温度計測・結果表示プログラムのメインウインドウの"感覚量推定ウインドウ"ボタンをクリックすることで、図3-1.21 に示すウインドウがオープンし、温冷感の推定結果とストレスの推定結果が表示される。推定式の計算は、温度が計測されるたびに実行され、表示もその都度更新される。

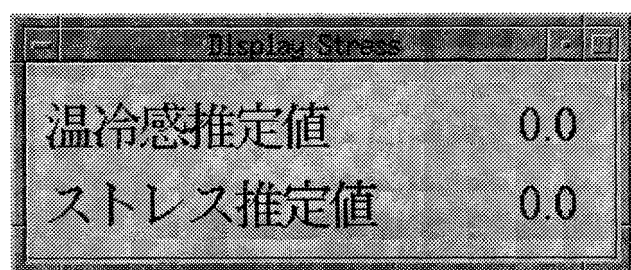


図3-1.21 感覚量推定ウインドウ

2. 人物抽出技術

2.1 概要

人物抽出技術とは、画像の中から画像処理により人物の領域と背景の領域とを区別し、人物領域のみを抽出する技術である。人体の皮膚の温度を測定したり、動作の解析を行うためには、人物領域の抽出が不可欠となる。

可視画像のみを用いた画像処理による人物抽出に関するわれわれの調査では、「動画像による手法」、「ステレオ画像による手法」、「差分画像による手法」、「テンプレートマッチング手法」等の研究例を見ることができた。しかし、これらの例は、背景が複雑であったり、明るさ等が変化する場合や抽出精度を上げようとする、装置やアルゴリズムが複雑になる。実際のオフィスや作業環境などを対象とした人物抽出では、複雑な背景から作業している人物を抽出しなければならない。

昨年度までの研究で、第1節で説明した赤外カメラと可視カメラを用い、赤外カメラからの温度情報をもとに人物と背景との温度差を利用して人物領域を抽出する、いわゆるセンサフュージョンを用いた人物抽出技術を開発した。この過程で、人物抽出アルゴリズムの設計、および人物抽出実験を行い、(2.2人物抽出アルゴリズムにおいて詳述する)オフィスでのさまざまな背景や照明条件の下で、上半身の画像を撮影し人物抽出を行ったところ、処理時間1秒程度で認識率80%以上の結果を得た。しかし、処理速度や精度の点でまだまだ改良の余地を残した。

本年度は、人物抽出技術の高精度化、高速化に重点をおいて研究を進めた。

処理速度の高速化という点では、アルゴリズムの処理ステップ数の減少、そして画像処理演算ハードウェアでの処理をパイプライン化及び並列化することにより、高速化(1秒以下での人物抽出)が達成できた。(2.3人物抽出処理の高速化において詳述する。)

2.2 人物抽出アルゴリズム

赤外カメラと可視カメラを用いたセンサフュージョンによる人物抽出技術のアルゴリズムの流れは、図3-2.2を用いて、具体的に順を追って説明する。

(1) 人物領域候補と皮膚領域候補の抽出

1. 非接触皮膚温計測装置の開発で説明した赤外カメラと可視カメラを使用し、同一時刻の赤外画像(a)と可視画像(b)を個々に撮影する。この操作によって得られた人物を含む赤外画像中の温度ヒストグラムを図3-2.1に示す。温度分布を見ると、環境温度に近い23℃にピークを持ち20～25℃に分布している領域は背景領域とみなすことができ、27～34℃に広がる領域は衣服の領域、36℃にピークを持ち33～38℃に分布する領域は皮膚の領域とみなすことができる。この赤外画像を25℃付近をしきい値として2値化処理すると、背景領域から衣服と皮膚を含む人物領域候補を抽出することができる(d)。その後、2値化処理した各点を領域としてコンピュータに認識させるラベリングを行うことによって人物領域候補として抽出する(f)。しかし、この人物領域候補はあくまで候補である。すなわち、オフィスなどの通常的环境下では、OA機器や暖房機のように衣服や皮膚と同じ温度になるものが存在する場合もあるので、人物領域候補は人物以外の物を含んでい

る可能性が高い。

(2) 皮膚領域の抽出

次に、上記(1)と同様に赤外画像(b)を用い、30℃付近をしきい値として2値化処理し、皮膚温度(約30℃～38℃)に相当する顔や手などの皮膚領域候補を求める(c)。しかし、この操作においても、上記(1)とまったく同様に、必要とする顔や手だけではなく皮膚温度と同じ温度を持つOA機器や暖房機等の部分も同時に抽出する可能性は高い。

そこで、日本人の皮膚の色は一般的に肌色であるという事実に着目し、可視画像(a)に含まれる肌色情報を使用して、皮膚領域候補の中から真の皮膚領域とOA機器や暖房機等の部分とを区別し、皮膚領域を決定する(e)。肌色領域は、可視カメラから得られている色情報を、RGB系からHSV系(H:色相, S:彩度, V:明度)へ変換し、色相, 彩度, 明度の各値を用いて決定する。

(3) 人物領域の抽出

最後に、上記(1)で求めた人物領域候補の中で、上記(2)で求めた皮膚領域を含んでいる領域を、人物領域として決定する(g)。この操作によって、上記(1)で述べた衣服や皮膚と同じ温度の人物以外の領域を除外する。

以上の手順によって得られた人物領域をマスクとして可視画像から人物を抽出する(h)。

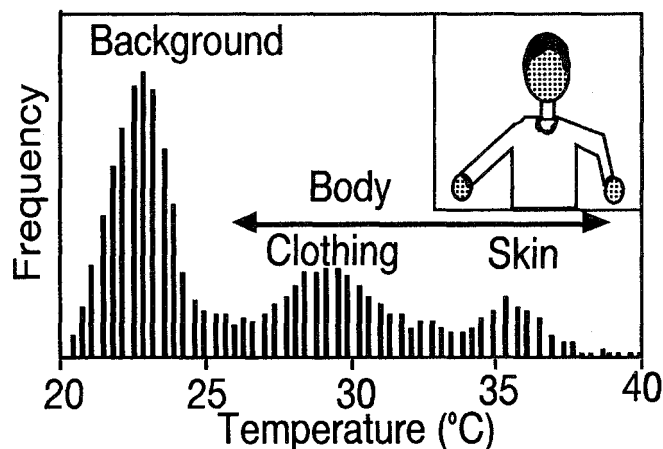


図3-2.1 人物を含む赤外画像中の温度ヒストグラム

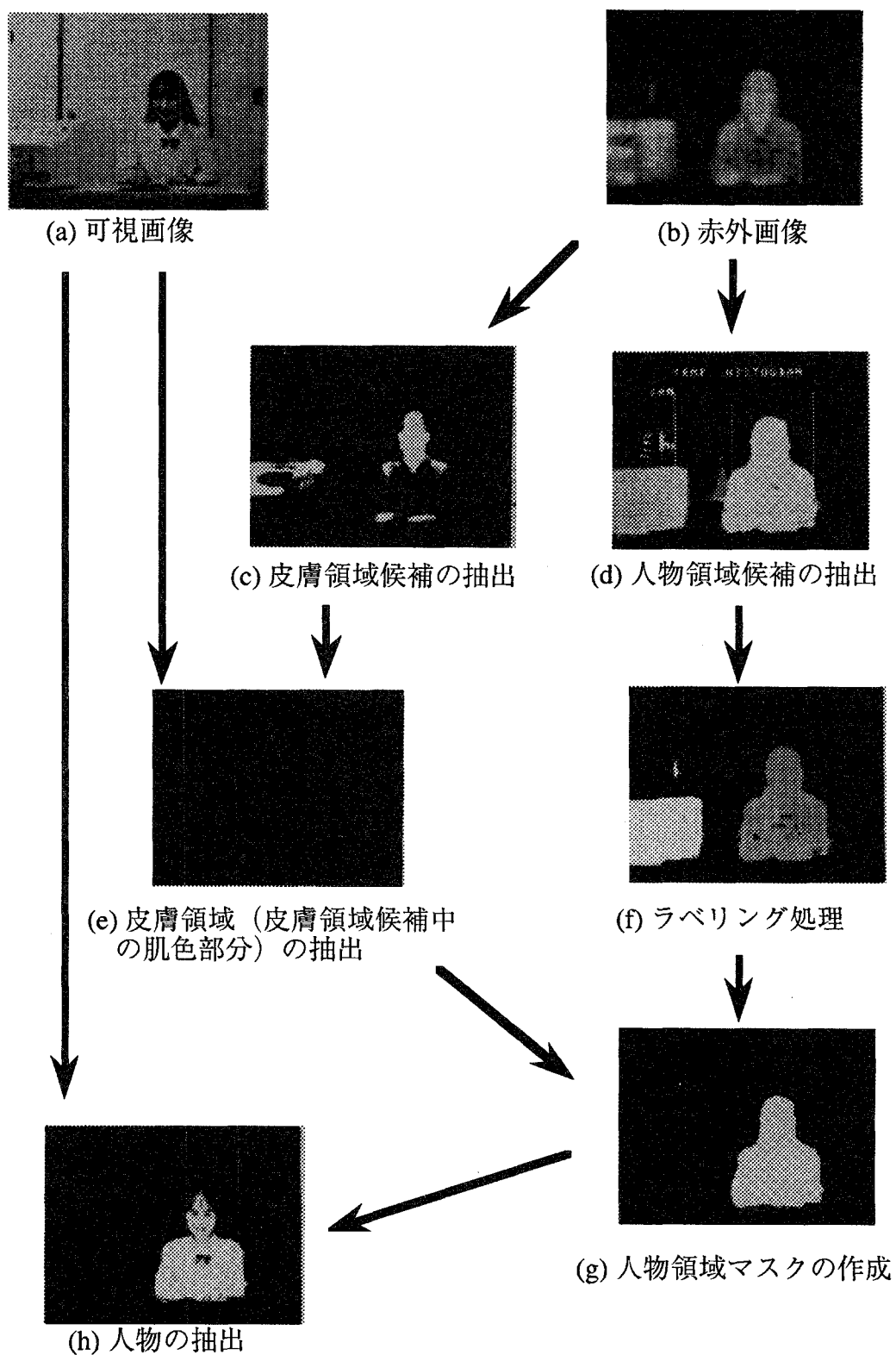


図3-2.2 人物抽出アルゴリズム

2.3 人物抽出処理の高速化

2.3.1 開発目的

人物抽出技術は、非接触皮膚温計測装置を開発するに当たって重要な技術である。しかも人物抽出技術は、人物の動作への対応という点から、できるだけリアルタイム処理に近づける必要がある。

本年度は、人物抽出処理の高速化のために、パイプライン化・並列化処理を導入することにより、処理ステップを削減し高速化を図った。

2.3.2 高速化アルゴリズム

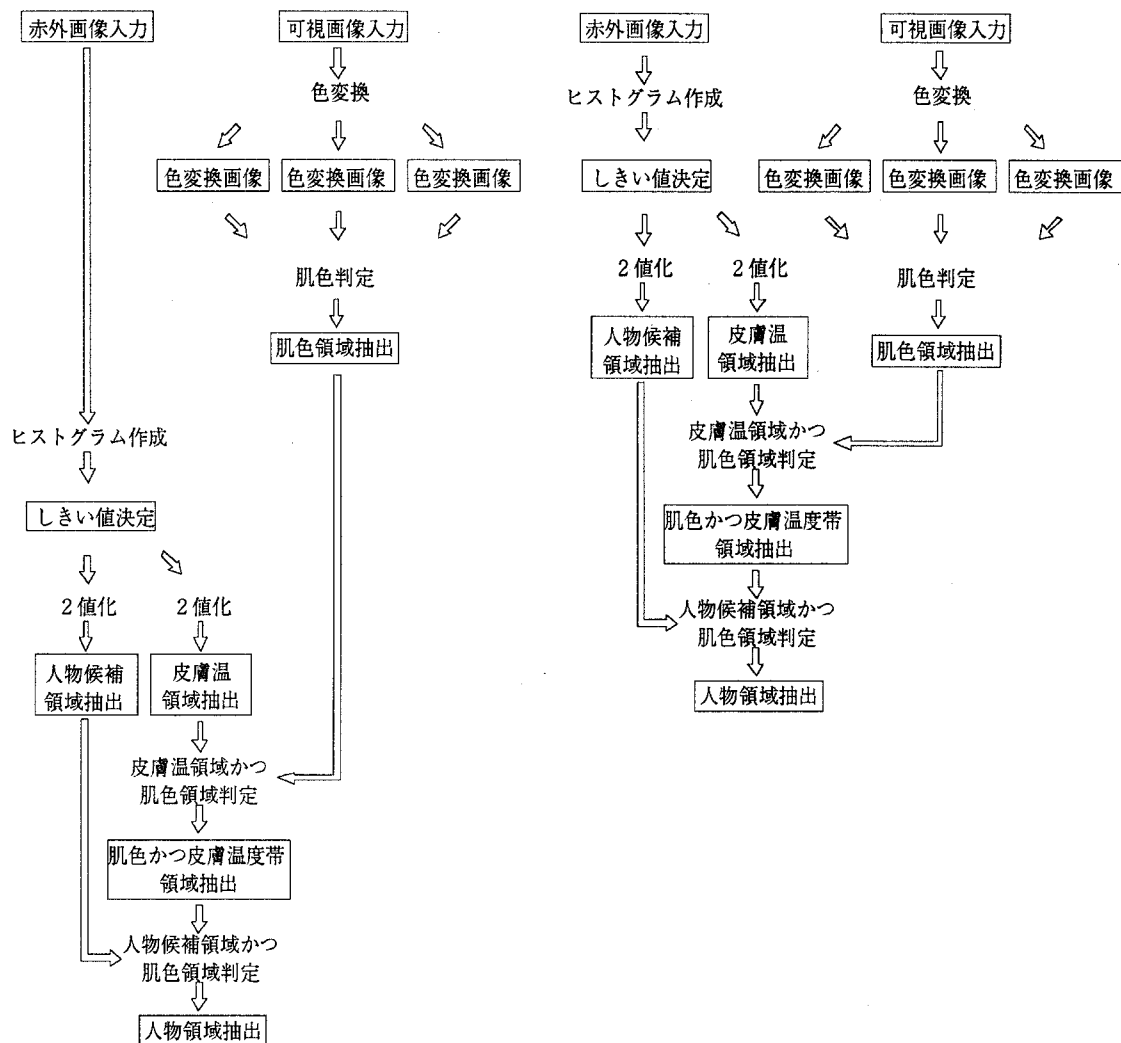
(1) 並列化

昨年度までは、画像処理ボードを3枚用い処理を行っていたために、可視画像としてカラー画像を入力すると、赤外および可視画像のRGB3系統の合計4系統の内、どれか1つの画像が、必ず待ちの状態になってしまっていた。このように入力される画像がすべて同時に処理されない状況下では、他の処理をいかに効率的に行ったとしても、どうしても処理時間が長くなってしまう(図3-2.3(a))。そこで、さらにもう1枚の画像処理ボードを導入し、4枚の画像処理ボードを用いることにより、赤外・可視(HSV)の合計4系統の画像を並列的に処理し、高速化を図った(図3-2.3(b))。

(2) パイプライン化

昨年度開発したアルゴリズムはパイプライン処理であったが、(1)で述べたように1系統だけが遅れるために、逐次処理的な部分が多く残り、パイプライン処理の効果があまり活かされなかった。しかし、今年度導入した画像処理ボードにより赤外・可視(HSV)の4系統のパイプライン処理化が可能になった。

さらに、各ステップのチューニングにより、一連の人物抽出が1秒以下で処理が可能になった。



(a) 従来の人物抽出アルゴリズム

(b) 高速化人物抽出アルゴリズム

図3-2.3 人物抽出アルゴリズムの高速化

3. 人体部位認識・姿勢決定技術

3.1 概要

人体部位認識・姿勢決定技術は、2節で説明した赤外画像および可視画像を用いて抽出した人物の領域から、頭部の特徴的な部位である目・眉および唇を認識する技術である。さらに、これらの特徴部位の位置をもとに、頭部の姿勢や皮膚温計測点をもとめる。

一連の処理は、以下のようにして実行される。

抽出された顔領域から輝度情報を用いて目・眉を抽出し、色情報を用いて唇の領域を抽出することで、特徴部位候補領域を決定する。各部位の幾何情報と位置関係の情報を用いて、特徴部位候補領域の中から左右の目・眉と唇の認識を行う。

このようにして認識された特徴部位の中から、部位のパターンをテンプレートとして記憶する。画面内の人物が移動すると、記憶した左右の眉・唇のパターンとマッチするエリアを、画面内の人物領域から検索し追尾することによって、頭部の動きや姿勢を計測する。

さらに、顔面上3カ所の特徴部位の初期座標値と、追尾によって求められた移動後の特徴部位初期座標値を用い、温度計測点の初期座標をアフィン変換する事で、移動後の温度計測点を求めることができる。

3.2 特徴部位の認識

3.2.1 開発目的

われわれが開発している非接触皮膚温計測技術において、皮膚温計測の対象は顔面である。顔面内の特定部位を安定的に認識することは極めて重要であり、これらの特定部位を認識するアルゴリズムの開発を行った。

顔の部位を認識するためにはまず、人物の顔領域をシーンの中から抽出する必要がある。そのために、昨年度までに、赤外・可視のセンサフュージョンを用いて人物の顔領域の抽出を行ってきた。

今年度は、抽出された顔領域から色情報と、輝度情報を用いて顔面内特徴部位候補領域を抽出し、さらに、面積、顔面内における位置関係から顔面内特徴部位を認識するアルゴリズムの開発を行った。

3.2.2 顔面内特徴部位認識アルゴリズム

(1) 赤外・可視画像からの顔領域の抽出および目・眉候補領域の抽出

本アルゴリズムにおける入力画像からの顔領域の抽出および目・眉候補領域の抽出には、昨年度までに開発した顔面内特定部

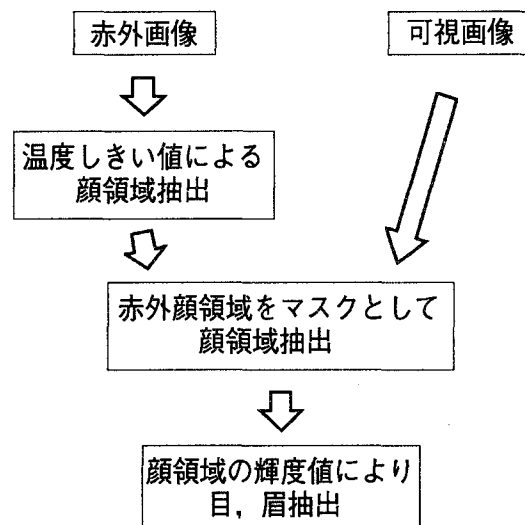


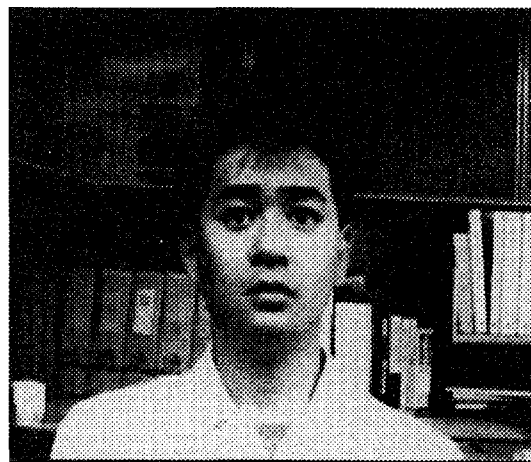
図3-3.1 部位抽出アルゴリズム

位抽出技術（図3-3.1）と同様の技術を用いた。

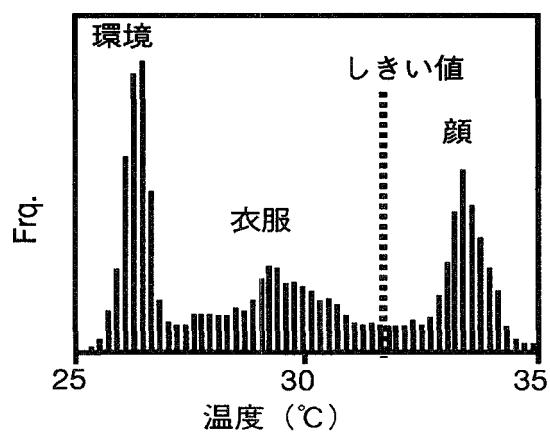
人物の存在する赤外画像（図3-3.2(a)）における温度分布のヒストグラムは、図3-3.2(c)のようになる。温度ヒストグラムは大きく分けて3つのピークがあることがわかる。3つ



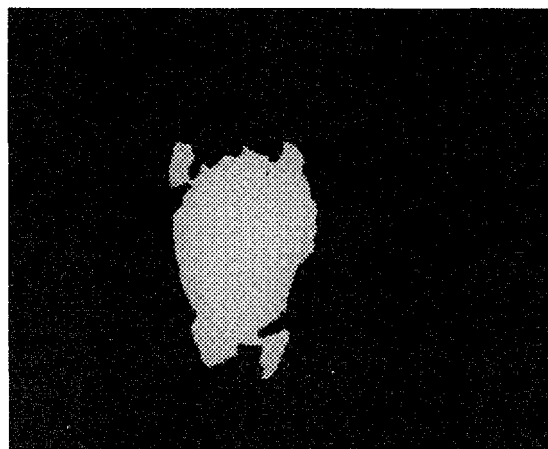
(a) 赤外原画像



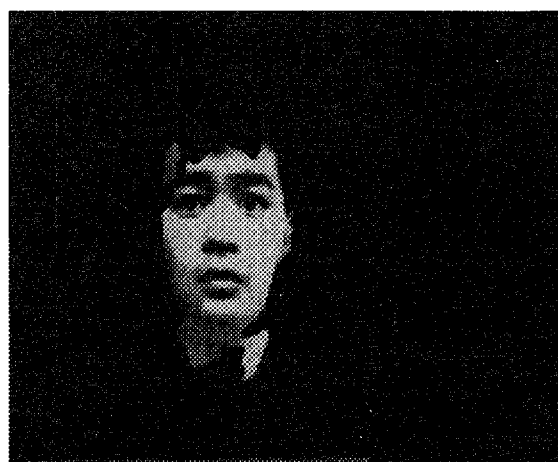
(b) 可視原画像



(c) 温度ヒストグラム



(d) 赤外顔領域抽出マスク



(e) 可視顔領域抽出画像

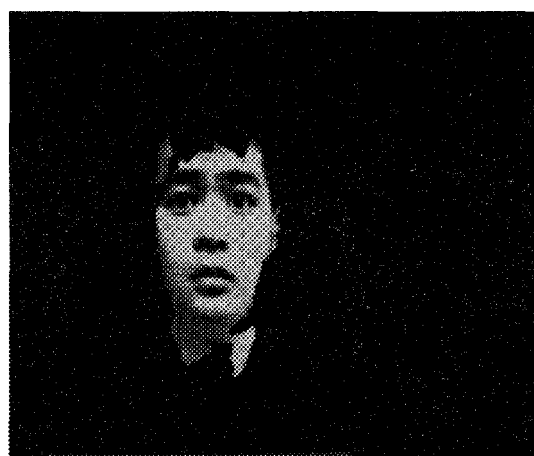
図3-3.2 赤外・可視画像による顔領域の抽出

のピークのうち最も低い温度でピークが表われているのが環境温度である。2番目のピークが衣服領域の温度帯である。そして最も高い温度のピークの周辺温度域に存在するのが顔領域に相当する。そこで、この最も温度の高いピークと、2番目のピークとの間にしきい値を設け抽出処理を行うことにより、赤外画像から顔領域の抽出を行うことができる。

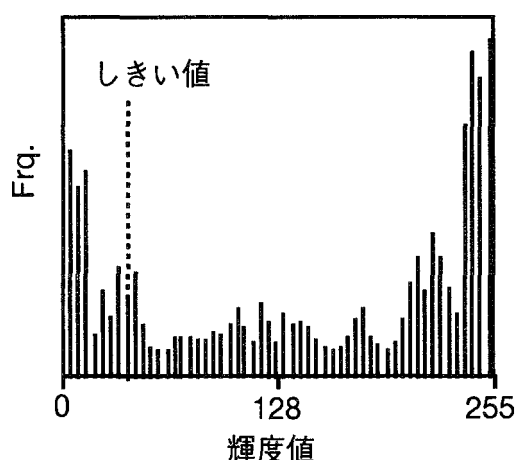
(図3-3.2(d)) しきい値の求め方に関しては種々の方法があるが、今回のしきい値決定法は、2番目のピークである被服領域の温度帯のピークに一定の温度を加えた温度をしきい値とするようにした。

次に、可視画像に対して、先程赤外画像から求めた顔領域をマスクとしてマスク処理を行うことにより、可視画像の顔領域抽出画像が得られる。図3-3.2に、赤外・可視画像からの顔領域の抽出の処理過程を示す。

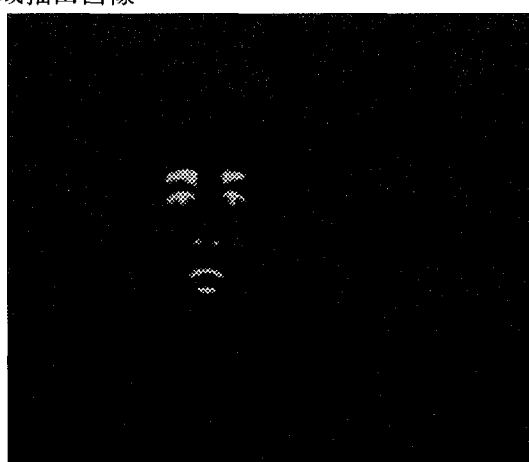
続いて、目および眉領域の抽出を行う。通常、目および眉領域は黒く、可視画像中における輝度値は低い値を示すと考えられる。そこでまず、この画像の顔領域の輝度値のヒストグラム(図3-3.3(b))をとる。このヒストグラムから、輝度値の低い一定面積を抽出するp-タイル法により、しきい値を設定し、2値化することにより目および眉の領域候補の抽出(図3-3.3(c))を行うことができる。



(a) 可視顔領域抽出画像



(b) 顔領域輝度ヒストグラム



(c) 目および眉領域抽出画像

図3-3.3 輝度値による目および眉領域の抽出

(2) 目および眉の認識

(1)で抽出された目および眉候補領域には、目、眉以外の領域も抽出されている。そこでこれらの目、眉以外の領域を除去し、目および眉を認識する。

目および眉の認識には、各候補領域の面積および目、眉の顔面内における相対的な位置関係を用いた。

まず、各候補領域の面積、重心の座標を求めるために目、眉候補領域抽出画像に対してラベリング処理を行う。ラベリング処理により求められた領域から面積を求め、この面積がある一定値以下の面積しか持たない領域を、ノイズ領域として除去する。

次に、この面積によるノイズ除去処理に残った領域に対して、顔面内の目、眉の相対的な位置関係により認識を行う。

右眉、左眉、右目、左目、の各重心座標を $G_0 (x_0, y_0)$, $G_1 (x_1, y_1)$, $G_2 (x_2, y_2)$, $G_3 (x_3, y_3)$ とする (図3-3.4)。この4点の正面を向いている状態での位置関係は、 G_0 , G_1 , G_2 , G_3 がそれぞれ、おおむね長方形の頂点に位置するので、

$$y_0 - \alpha < y_1 < y_0 + \alpha \quad (\text{式3-3.1})$$

$$x_0 - \beta < x_2 < x_0 + \beta \quad (\text{式3-3.2})$$

$$y_2 - \alpha < y_3 < y_2 + \alpha \quad (\text{式3-3.3})$$

$$x_1 - \beta < x_3 < x_1 + \beta \quad (\text{式3-3.4})$$

の4つの不等式で表される。

ここで各不等式は、

- a. 右眉の重心 $G_0 (x_0, y_0)$ のY座標 y_0 に対し、
左眉の重心 $G_1 (x_1, y_1)$ のY座標 y_1 はほぼ同じ位置にある (式3-3.1)
- b. 右眉の重心 $G_0 (x_0, y_0)$ のX座標 x_0 に対し、
右目の重心 $G_2 (x_2, y_2)$ のX座標 x_2 はほぼ同じ位置にある (式3-3.2)
- c. 右目の重心 $G_2 (x_2, y_2)$ のY座標 y_2 に対し、
左目の重心 $G_3 (x_3, y_3)$ のY座標 y_3 はほぼ同じ位置にある (式3-3.3)
- d. 左眉の重心 $G_1 (x_1, y_1)$ のX座標 x_1 に対し、
左目の重心 $G_3 (x_3, y_3)$ のX座標 x_3 はほぼ同じ位置にある (式3-3.4)

を示している。

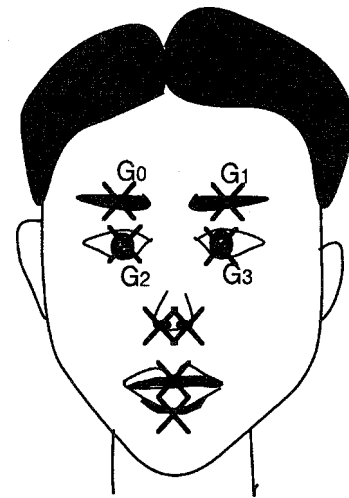


図3-3.4 目および眉候補領域重心

そこで、各候補点の重心の座標を $G_i(x_i, y_i)$ とし、この4つの不等式が成立するような4点を求め、目、眉領域の認識を行う。図3-3.6に候補領域を、図3-3.7に両目、両眉認識結果を示す。

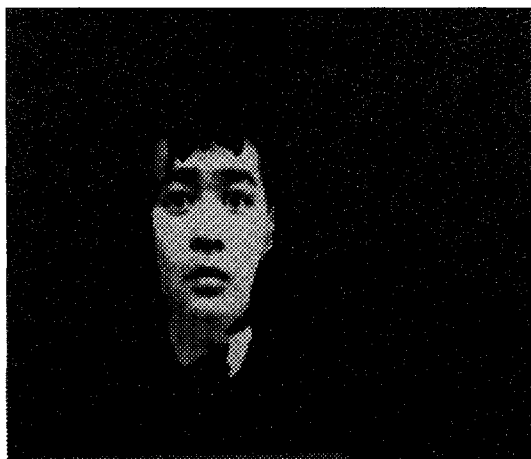


図3-3.5 可視顔抽出画像

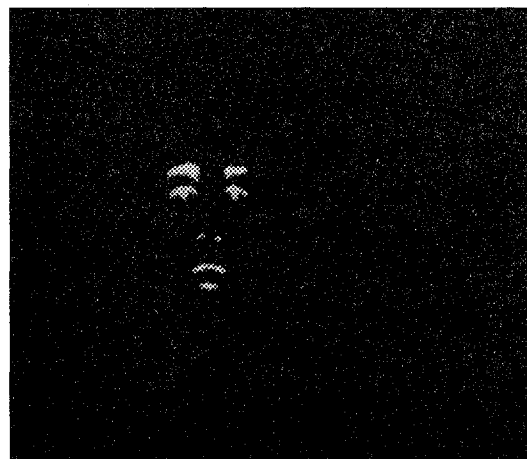


図3-3.6 目，眉候補領域抽出画像



図3-3.7 目，眉領域認識画像

(3) 唇の認識

唇の認識は、(1)で求められている顔抽出画像（図3-3.8）に対して、唇領域の色情報を用い、色彩判定処理により行っている。

色彩判定処理では、まず画素のRGB値をマンセルの表色系等の顕色系で使われるHSV系の均等知覚色空間への変換を行う。RGB値からHSV系への変換は式3-3.5～7を用いて変換を行う。式中のH、S、VはそれぞれHが色相(hue)を、Sが彩度(saturation)を、Vが明度(value)を指す。

$$H = \cos^{-1} \frac{(R - G) + (R - B)}{(R - G)^2 + (R - B) \cdot (G - B)} \quad (式3-3.5)$$

$$S = \frac{\max(R, G, B) - \min(R, G, B)}{V} \quad (式3-3.6)$$

$$V = \max(R, G, B) \quad (式3-3.7)$$

変換された3刺激値のうち、彩度、色相の各パラメータの範囲を限定し唇を認識する（図3-3.9）。パラメータの範囲を設定する際、明度の許容範囲を広く設定することによって照明条件にロバストな判定が可能となる。



図3-3.8 可視顔領域抽出画像

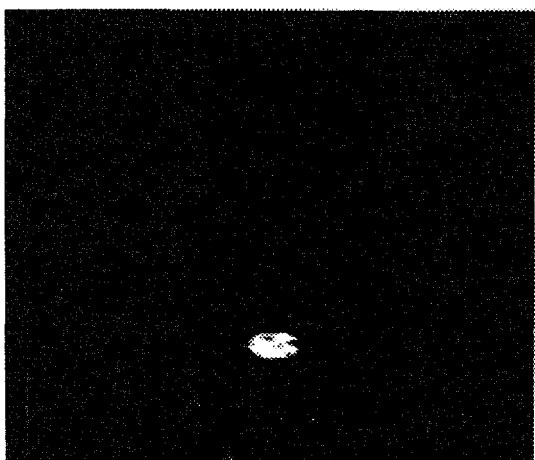


図3-3.9 唇領域認識画像

3.2.3 検証実験

本アルゴリズムを検証するために簡単な検証実験を行った。

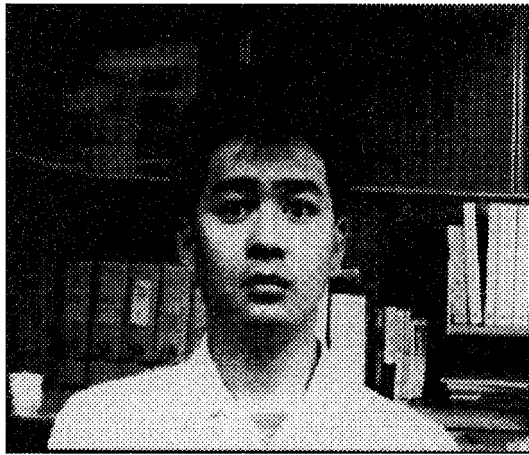
(1) 実験方法

通常のオフィス環境において、正面を向いた人物の上半身の赤外・可視画像を連続的に取得し、その画像から任意に画像を選び、まず目、眉認識の検証を行い、続いて唇認識の検証を行った。

(2) 実験結果

両目、両眉の認識実験結果を図3-3.10に示す。唇の認識実験結果を図3-3.11に示す。この図から分かるように本アルゴリズムにより両目、両眉および口領域の認識が可能となった。

また、不特定の人物に対しても、各個人毎に若干のしきい値を設定し直す必要はあるが、対応可能であることが確認できた。



(a) 可視原画像

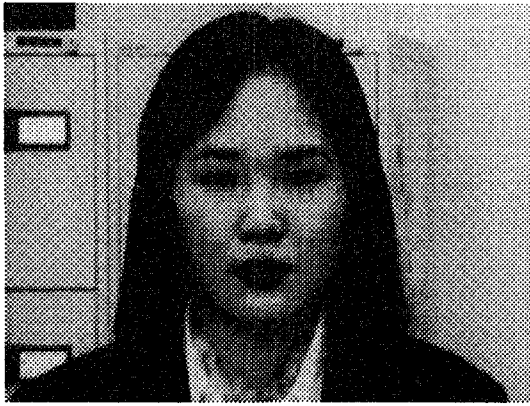


(b) 赤外原画像

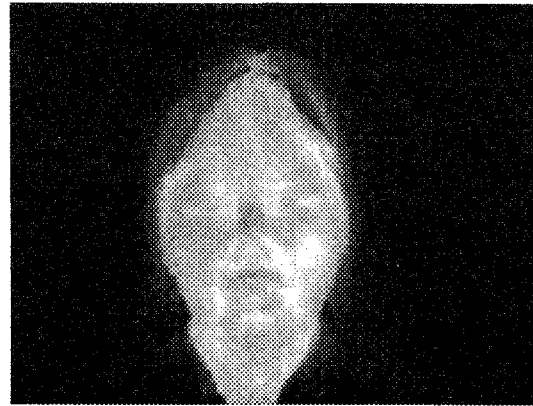


(c) 目、眉領域認識画像

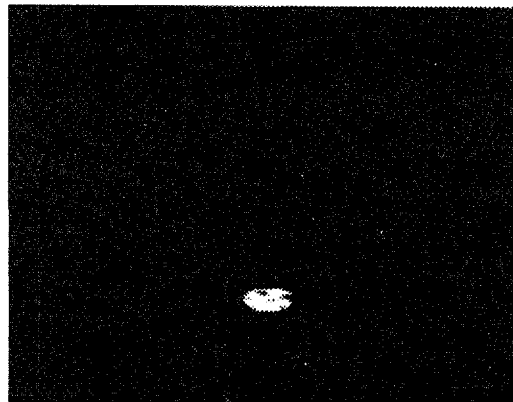
図3-3.10 目、眉領域の認識



(a) 可視原画像



(b) 赤外原画像



(c) 唇領域認識画像

図3-3.11 唇領域の認識

3.2.4 まとめ

特徴部位の認識アルゴリズムを開発するにあたって、

- (1) 両眉，両目候補領域の抽出には輝度情報を用いる。
- (2) 両眉，両目の認識には各候補領域の面積と位置情報を用いる。
- (3) 唇の認識には色情報を用いる。

この3つの情報をもとに特徴部位の認識を行った。

本年度に開発した部位認識アルゴリズムは、両眉、両目に関しては輝度、面積、位置の各情報を用いているため、多少の擾乱には対応可能なロバスト性がある。また、唇の認識にはH S V系均等知覚色空間の色相と彩度を用いているため、照明条件に影響されないアルゴリズムである。

3.3 特徴部位の追跡

3.3.1 開発目的

非接触皮膚温計測においては、任意に移動する人物を計測対象としている。その条件下で皮膚温を計測するには、認識した部位を絶えず追跡する必要がある。そこで、前節で求められた顔面内特徴部位を、テンプレートマッチングにより追跡するアルゴリズムを開発した。

3.3.2 特徴部位追跡アルゴリズム

(1) テンプレートマッチングによる部位認識

3.2節で述べた部位認識アルゴリズムにより認識された各特徴部位の重心および外接四角形の頂点の座標値が、画像処理装置からテンプレートマッチング装置へ転送される（図3-1.1参照）。さらにテンプレートマッチング装置には、画像処理装置から顔領域抽出画像が送られてきている。この顔領域抽出画像における各特徴部位の外接四角形内の画像をテンプレート画像として登録する。

登録されたテンプレート画像を用いて、顔抽出処理により抽出された顔領域抽出画像に対して、テンプレートの縦横1.5倍の検索エリアにおいて、正規化相関によるテンプレートマッチングにより、両眉、口の3候補領域の抽出を行う。

通常テンプレートマッチングによる特徴部位の認識においては、正規化相関の相関値のしきい値は90%以上の値を設定し、相関値の高いものを認識する。しかし、このようなテンプレートマッチングによる特徴部位認識は、登録したテンプレート画像に非常に近い画像を探すため、われわれがターゲットにしている人物画像のような画面上を移動し、姿勢の変化を伴うような対象物に対しては、認識率の低下が弱点としてあげられる。

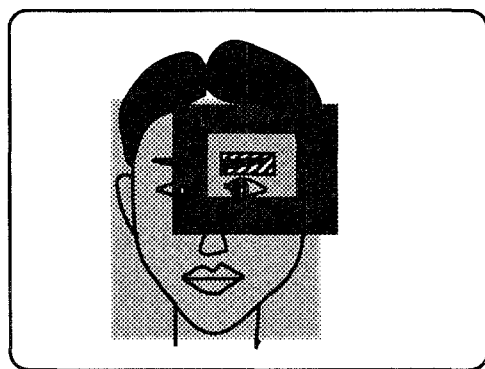
そこで、今回われわれが開発したアルゴリズムにおいては、人間の移動に伴う特定部位の形状の変化に対応するため、この相関値のしきい値を60%程度まで引き下げている。相関値のしきい値を引き下げることにより、人物の前後への動きや、横を向くといった頭の回転にも対応可能になった。

しかし、単純にしきい値の引き下げを行うと、対象物以外にミスマッチしてしまう可能性が高くなってしまう。そこで、サーチエリアをできるだけ小さくし、また各部位の位置関係を拘束条件として導入することでミスマッチの低減を試みた。

(2) サーチエリア面積の可変化

(1)の処理により両眉および口の3候補領域を求める際に、全画面に対してこの処理を行うと、先程述べたように認識したい部位以外にもマッチしてしまう可能性がある。また処理時間も数秒になり、以前の処理よりも時間がかかる。

そこで、われわれは、テンプレートのサーチエリアを可変にし、ミスマッチングの解消と処理時間の向上を図った。



-  テンプレート領域
-  サーチエリアA：テンプレート領域の2.25倍のエリア
-  サーチエリアB：テンプレート領域の4倍のエリア
-  サーチエリアC：画像処理により求めた顔のエリア

図3-3.12 サーチエリア

a. 可変サーチエリアのエリア決定法

各サーチエリアの面積は登録されているテンプレート領域の縦横1.5倍の面積をサーチエリアAとする。次に、登録されているテンプレート領域の縦横2倍の面積をサーチエリアBとする。そして最後に、画像処理装置により求められた顔領域の外接四角形をサーチエリアCとする（図3-3.12）。

この顔領域の外接四角形の決定手法としては、まず顔領域抽出画像を縦横両方向に輝度値の射影加算を取り、輝度値のヒストグラムを作る（図3-3.13）。そしてこのヒストグラムにおいてピーク値の5%付近にしきい値を設定する事により外接四角形が求められる。

最大サーチエリアが顔領域に限定できることは、顔以外の紛らわしい背景領域を考慮に入れる必要がないために認識・追跡アルゴリズムが非常に単純化できる。

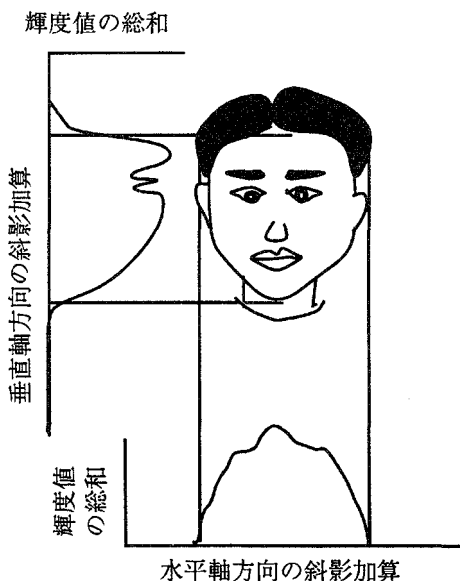


図3-3.13射影加算による顔領域の決定

b. 可変アルゴリズム

処理の流れについて以下に述べる。まず、サーチエリアA内においてサーチを行う。この領域で両眉、口の3候補とも発見できた場合（図3-3.14(b)）は次項に示す位置関係による認識を行う。もし、1候補でも発見できないとき（図3-3.14(c)）には、発見できなかった部位のサーチエリアをサーチエリアBへと拡張し再度サーチを行う（図3-3.14(d)）。サーチエリアBでも発見できなかったときには最終ステップとしてサーチエリアCにサーチエリアを拡張し再度サーチを行う（図3-3.14(e)）。

万一、顔領域全体においても両眉、口の候補領域が発見できないときには、対象となっている人物が完全に横を向いて両眉、口の3領域が画面上に映し出されていない場合等が考えられる。このような場合にはその画像における部位認識は行わず、次の画像の処理に進む。

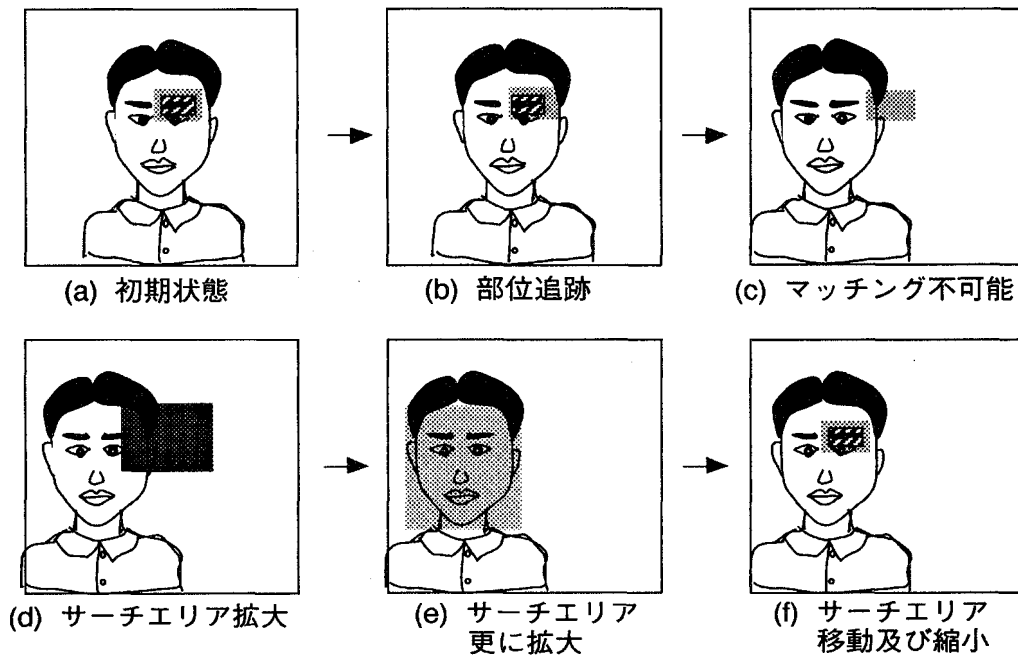


図3-3.14 サーチエリアの面積変化

(3) 両眉、口の3候補領域の面積および顔面内における相対的位置関係による認識

上記(1)、(2)の処理により求められた両眉、口の3候補領域をまず、ラベリング処理を施すことにより、各候補領域の重心および面積を求める。

求められた面積と最初に登録したテンプレートの面積とを比較し、候補領域の面積が一定値以下のものは除去する。

次に、位置関係による認識を行う。図中において右眉の重心座標をRG (x_0 , y_0)、左眉の重心座標をLG (x_1 , y_1)、口の重心座標をMG (x_2 , y_2)とする。Lは正面を向いているときの眉と口の距離、Mは同じく正面を向いているときの両眉間の距離、 α はLの80%である(図3-3.15)。この3点の拘束条件として以下の条件を与える。

X方向：両眉の位置関係

$$x_0 < x_1 \quad (\text{式3-3.8})$$

(右眉より左眉の方が画面上では右)

$$\frac{M}{2} < x_1 - x_0 \quad (\text{式3-3.9})$$

(顔は60°以上横を向かない)

$$x_0 \leq x_2 \leq x_1 \quad (\text{式3-3.10})$$

(口は両眉の間にある)

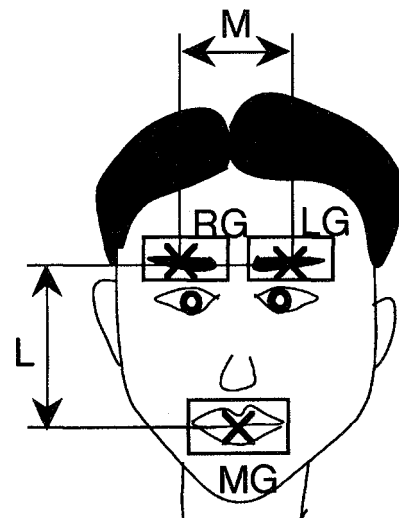


図3-3.15 両眉と口の位置関係

Y方向：眉と口の関係

$$y_0 < y_1 \quad y_2 < y_1 \quad (\text{式3-3.11})$$

(眉より口の方が画面上では下)

$$\frac{L}{2} < y_2 - y_0, \quad \frac{L}{2} < y_1 - y_0 \quad (\text{式3-3.12})$$

(眉と口の距離は初期値の50%より大)

右眉と左眉の関係

$$|y_1 - y_0| < L - \alpha \quad (\text{式3-3.13})$$

(右眉と左眉の高さの差は口との高さの差よりも小さい)

認識手法は、まず両眉、口領域各々の認識用の三枚のパターンマッチングボードから、マッチング率の上位3位の候補領域を用意する。この候補領域に対して右眉第一位候補領域を基準とし、左眉、口領域の各第一候補領域が6つの拘束条件式を満たすか判断を行う。

拘束条件式を満たさない場合は、口領域を第二候補にして判断を行う。以下、上記拘束条件式を満たすまで、各候補領域の順位を下げて判断を行う。

もし、両眉、口の各第3候補領域まで判断を行っても、拘束条件式を満たさない場合はその画像内での認識は行わず、次画像での認識を行う。

3.3.3 検証実験

本アルゴリズムを検証するために簡単な検証実験を行った。

(1) 実験方法

通常のオフィス環境において、正面を向いた人物の上半身の赤外・可視画像を連続的に取得し、その画像から任意に画像を選び両眉および口の認識・追跡の検証を行った。

(2) 実験結果

実験結果を図3-3.16に示す。図中のクロスカーソルは、本アルゴリズムにより認識された両眉および口領域の重心位置を示している。この図からも分かるように本アルゴリズムにより両眉および口領域の認識・追跡が可能となった。

また、不特定の人物に対しても、対応可能であることが確認できた（図3-3.17）。



(a) 正面



(b) 左向き



(c) 右向き

図3-3.16 両眉，口の認識・追跡



(a) 正面



(b) 左向き



(c) 右向き

図3-3.17 両眉，口の認識・追跡

3.3.4 まとめ

顔面内特徴部位の追跡を行うために、テンプレートマッチングによる追跡アルゴリズムの開発を行った。

今回開発を行った追跡アルゴリズムは、従来行われているテンプレートマッチングによる部位認識とは異なり、相関値のしきい値を下げている。またミスマッチング対策および高速化のためにサーチエリアの可変換、認識部位の位置関係を用いている。これらの手法を取り入れることにより本手法で人物の移動に高速に追尾可能となった。また、各個人に対して、テンプレートを登録するため、不特定の人物にも対応できる。

3.4 頭部姿勢の決定と温度計測点の計測

前節で述べたテンプレートマッチングにより、移動後の特徴部位の座標値（画面上での）が連続的にもとまる。本節では、移動後の特徴部位の座標値から顔面上の温度計測点を求める手法について説明する。

計測処理を開始する前に、あらかじめ、正面画像を用い3カ所の特徴部位の座標値と複数の温度計測点の座標値を決める。ここで、3カ所の特徴部位の初期座標をそれぞれ、 $P(x,y)$, $Q(x,y)$, $R(x,y)$ とし、 n 番目の温度計測点の初期座標を $M_n(x,y)$ とする。

特徴部位の追跡によって求められた、移動後の特徴部位の座標値を $P'(x,y)$, $Q'(x,y)$, $R'(x,y)$ とすると、そのときの n 番目の温度計測点の座標値 $M'_n(x,y)$ は、アフィン変換によって、以下のようにして求めることができる。

まず、 (P,Q,R) から (P',Q',R') へのアフィン変換のパラメータ a,b,c,d,e,f を次の連立方程式を解くことによって求める。

$$P'_x = aP_x + bP_y + c$$

$$P'_y = dP_x + eP_y + f$$

$$Q'_x = aQ_x + bQ_y + c$$

$$Q'_y = dQ_x + eQ_y + f$$

$$R'_x = aR_x + bR_y + c$$

$$R'_y = dR_x + eR_y + f$$

より

$$\begin{bmatrix} a \\ b \\ c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} P_x & P_y & 1 \\ Q_x & Q_y & 1 \\ R_x & R_y & 1 \end{bmatrix}^{-1} \cdot \begin{bmatrix} P'_x \\ Q'_x \\ R'_x \end{bmatrix}$$

$$\begin{bmatrix} d \\ e \\ f \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} P_x & P_y & 1 \\ Q_x & Q_y & 1 \\ R_x & R_y & 1 \end{bmatrix}^{-1} \cdot \begin{bmatrix} P'_y \\ Q'_y \\ R'_y \end{bmatrix}$$

従って、新しい温度計測点座標はパラメータ a,b,c,d,e,f を用いて次のように変換できる。

$$\begin{aligned}
m_1x' &= am_1x + bm_1y + c \\
m_1y' &= dm_1x + em_1y + f \\
&\dots\dots\dots \\
m_6x' &= am_6x + bm_6y + c \\
m_6y' &= dm_6x + em_6y + f
\end{aligned}$$

本アルゴリズムを用いて、温度計測点をマッピングした例を図 3-3.18～ 図 3-3.22 に示す。

十字のクロスカーソルが、特徴部位の座標であり、Xのカーソルが本アルゴリズムを用いて写像された温度計測点である。

図 3-3.18は、初期画像である。この画像の特徴部位の座標値とユーザが指定した計測点(Xのカーソル)の座標値をもとに、マッピングが行なわれる。

図3-3.19と図3-3.20 は顔が回転した場合である。図3-3.21 と図3-3.22 は前後に動いて、見かけの大きさが変化した場合である。

いずれの場合にも、正確にマッピングが行なわれていることがわかる。

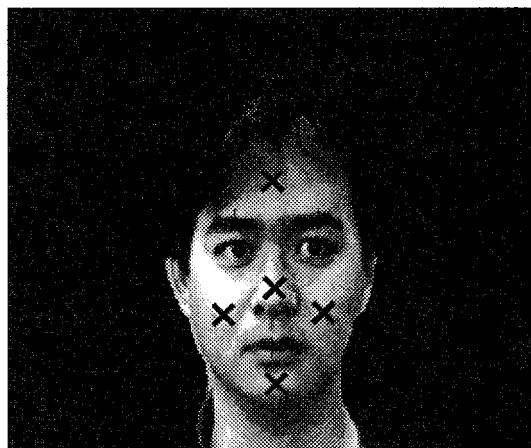


図 3-3.18 温度計測点設定（初期画像）

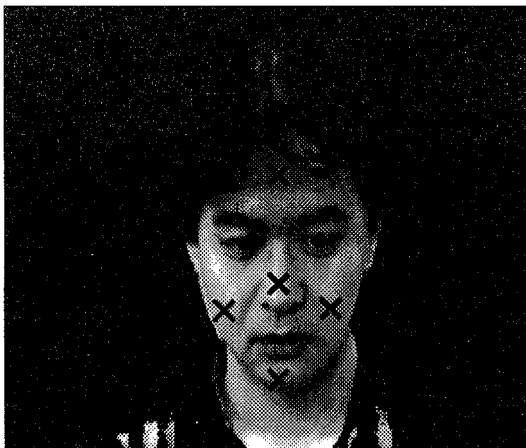


図 3-3.19
温度計測点マッピング (下向き)

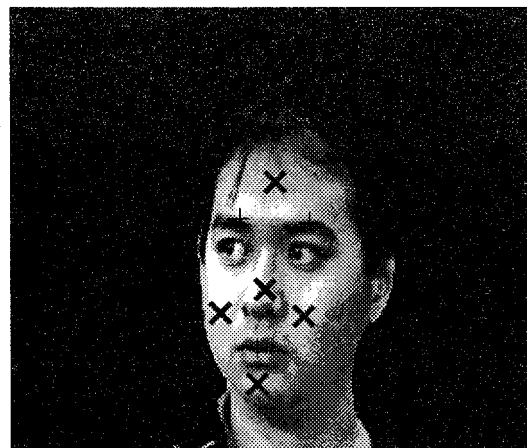


図 3-3.20
温度計測点マッピング (左向き)

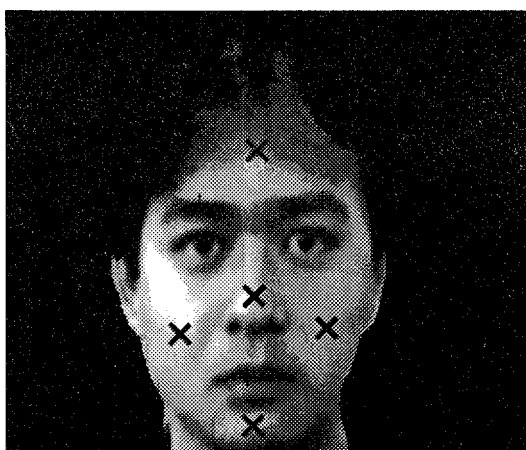


図 3-3.21
温度計測点マッピング (前進)

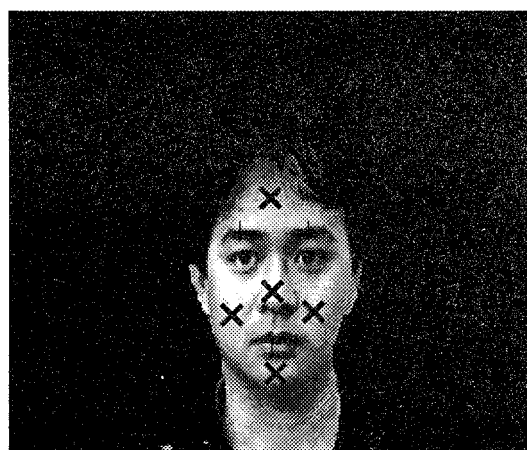


図 3-3.22
温度計測点マッピング (後退)

4. あとがき

4.1 成果応用の展望

各種の生理計測は、人間感覚の客観的評価に有効であるが、計測すること自体が被験者に影響を与えるという問題が存在している。この問題は、非接触計測を行わないかぎり、解決不可能な問題である。

生理量の中で皮膚温は、赤外画像を用いれば非接触計測が可能であり、また、感覚発生に伴う自律神経活動の影響を受けて変動するため、感覚推定に有効である。特に顔面皮膚温は、種々の生活環境下で安定して非接触計測できるため、枚方研究室では、この生理量を主対象として研究を進めてきた。

本研究の成果として、複雑背景から人物の領域を実時間で抽出する技術、顔面の特徴的な部位を抽出・認識する技術、特徴部位を追跡し頭部の姿勢を計測する技術などの人物画像処理技術を確認し、それらの技術を複合することで、非接触で皮膚温を計測する技術を開発することができた。また、枚方研究室で並行して実施している「皮膚温による感覚量推定手法の研究開発」の成果を複合し、ストレスや温冷感を非接触・実時間で推定できる可能性を示した。

本研究成果を原子力発電所のオペレータや、一般オフィスのワーカーに適用すると、作業者に負荷をかけることなく、実時間でストレスの評価が可能になるので、健康と作業の管理に示唆を与え、ヒューマンエラーを防止することができる。（図3-4.1）

また、一般の製品を使用する際のストレス度を実時間で評価すれば、使いやすい製品開発の指標となる。さらに、温熱や視環境等の各種環境下におけるストレス度を評価すれば、快適環境の構築に指標を与えることができる。

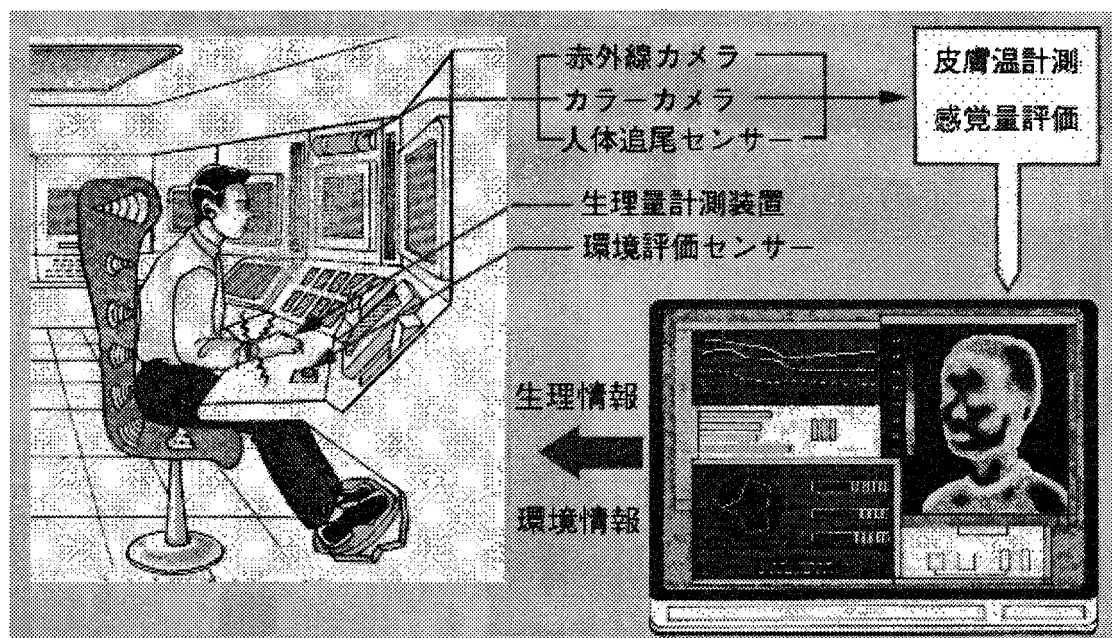


図3-4.1 非接触皮膚温計測装置成果応用

4.2 第2期研究への展開

第1期に開発を行った非接触皮膚温計測システムは、皮膚温計測のための人物画像処理アルゴリズム開発のため、汎用の画像処理装置やテンプレートマッチング装置・EWSを組み合わせたシステムであり、実験機的な要素が強い。今後は、小型で信頼性が高く、電源をいれるだけで直ちに計測が開始できよう、専用画像処理ハードウェアの開発やプログラムのファームウェア化を行い、計測システムとしての完成度を高める。

皮膚温以外に、非接触マーカーレスで計測できる物理量として、動作が考えられる。第1期に開発した人物画像処理技術を応用し、画像処理による動作の計測技術を確立し、副次動作を計測することで、皮膚温から推定されるストレスの補正を試みる。

今回、非接触皮膚温計測システムに組み込んだ皮膚温によるストレス推定式は、皮膚温絶対値の個人差補正を行っているものの、同じストレッサーを加えた場合のストレスの感じかたの個人差補正と皮膚温反応の個人差補正は行っていない。さらに高精度で皮膚温によるストレスの推定を行うためには、これらの個人差補正を行ってゆく必要がある。

また、ストレス指標を作成するためにストレスグループで行う共同研究においては、緊張作業と単調作業によって生じる一過性のストレスを指標化するための中心的研究室となり、実験計画の作成、実験装置の開発、実験、評価を担当する予定である。なお、この共同研究では、対人ストレスも指標化することを考慮する予定である。共同実験では、心電図、呼吸、瞬目、脳波、血圧、血流、発汗、皮膚温、皮膚インピーダンス、唾液、尿を全て計測し、これらの生理量データのうち、皮膚温、血流、発汗、脳波は、皮膚温によるストレスの指標化を行うために当研究室で解析を行う予定である。また、慢性ストレスを指標化する実験の実験計画作成に協力するとともに、実験で計測された皮膚温データの解析を担当し、さらに、データベースの構築にも協力してゆく。

研究担当者氏名

福島清司 (平成6年4月1日から平成6年11月30日まで担当)

鈴木龍司

松本和夫

西條淳夫

高見正人

池元真佐美

吉田博明

増田光博

第4章 ストレス指標物質計測技術 の研究開発

第4章 ストレス指標物質計測技術の研究開発

(品川研究室)

1. ストレス指標物質計測技術開発

1.1 唾液中カテコールアミンの自動分析法の構築

1.1.1 MFカラムを除蛋白カラムとした自動分析法

(1) MFカラムにおけるカテコールアミンの安定的な分離条件検討

MFカラムでのカテコールアミン（以下CA。同様に、エピネフリンをE、ノルエピネフリンをNE、ドーパミンをDAとする）のピーク形状は、そのロットあるいは使用履歴によってバラツキが大きいことが既に確認されており、本年度までの検討においては、良好なピーク形状が得られるカラムを暫定的に使用してきた。しかしながら、最終的な技術開発を目標とする今年度研究を進めていく上で、また、装置化を考えた場合、使用履歴によるバラツキの少ない分離条件を設定する必要がある。そこで、装置開発研究において設定した分離条件を参考にし、未使用カラムにおいてCAの良好なピーク形状が得られる分離条件を検討した。また、最終目標であるCA、コルチゾール（以下CS）一体型システムのために、MFカラムにおける蛋白成分、CAおよびCSの相互分離の検討も同時に行なった。検討した分離条件を表4-1.1に示した。

表4-1.1 分離条件

分離条件A	2mM ケン酸ナトリウム、5mM テンソルホン酸ナトリウム、10%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 1.0ml/min
分離条件B	2mM ケン酸ナトリウム、5mM SDS、10%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 1.0ml/min
分離条件C	2mM リン酸ナトリウム、3mM SDS、10%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 1.0ml/min
分離条件D	5mM リン酸ナトリウム、1-3mM SDS、10%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 1.0ml/min
分離条件E	10-30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、8or10%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5,1.0ml/min
分離条件F	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件G	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、10%メタノール、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件H	30mM リン酸ナトリウム、5mM SDS、13%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件I	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、3mM EDTA、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件J	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、20mM EDTA 8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件K	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、0.1% TEA、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件L	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、0.2% TEA、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
分離条件M	30mM リン酸ナトリウム、1mM SDS、0.2% プリチルアミン、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
検出器	UV検出器 270nm
試料液	CA標準溶液(10nmol/ml) *試料液の半量はMFカラムのキャリアー
試料注入量	400μl

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, EDTA: Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid

TEA: Tri-ethanol Amine

未使用カラムについて、従来の分離条件Aで得られたクロマトグラムを図4-1.1に示した。ピーク前方にブロードなピークが出現した。

イオンペア剤をSDSに変更した分離条件Bにおいても、CAの保持が強くなったこ

とで若干改善されているように見えるが、やはり図4-1.2のようにプロードなピークが出現した。バッファー系をリン酸系に変更した分離条件Cにおいては図4-1.3のようにほぼ良好なピークが得られたことから、分離条件D、EについてのCAのピーク形状およびCA、CS、蛋白成分の分離状態について更に検討を行なった結果、図4-1.4に示すように分離条件Fにおいて最も良好なピーク形状と相互分離が達成できた。

しかし、この分離条件Fにおいても別の未使用カラムについて検討した場合、図4-1.5に示したようにプロードなピークが再度出現した。また、ピーク形状が崩れるのはCAに特異的で、CSについてはどの分離条件においても安定した良好なピークが得られた。

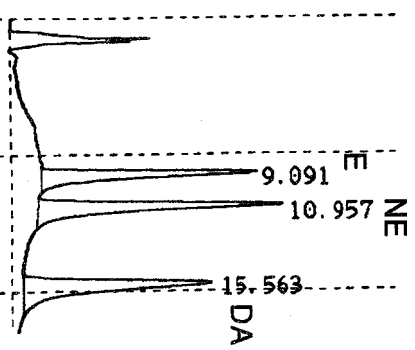
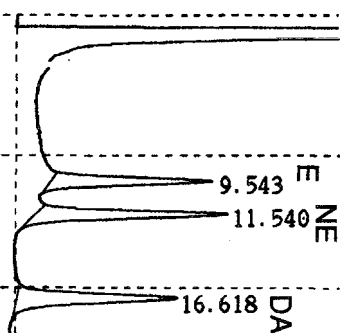
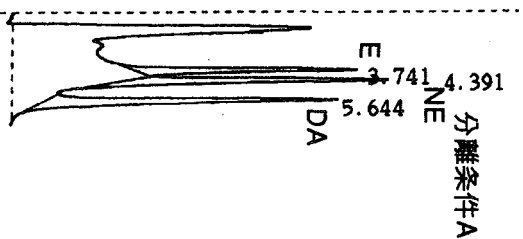


図4-1.1 従来の分離条件におけるクロマトグラム

図4-1.2 分離条件Bにおけるクロマトグラム

図4-1.3 分離条件Cにおけるクロマトグラム

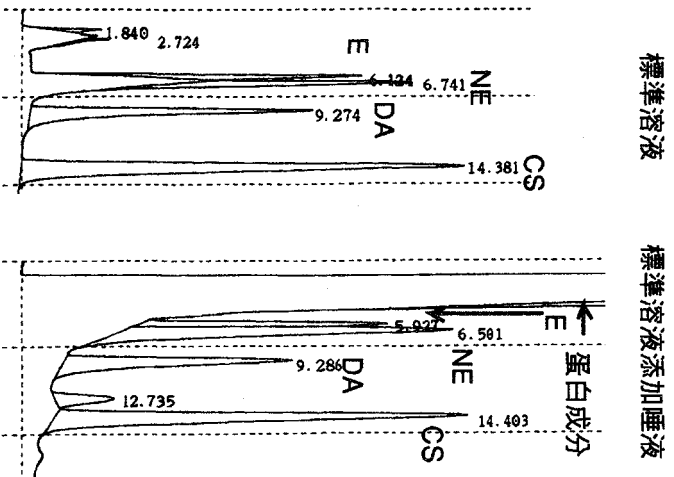


図4-1.4 分離条件Fにおけるクロマトグラム

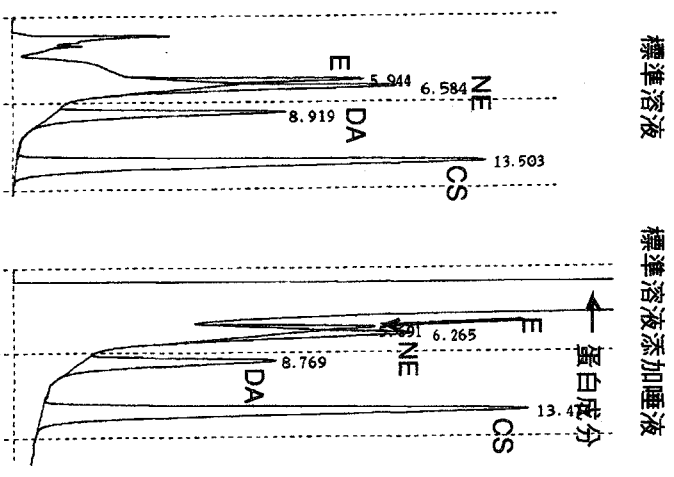


図4-1.5 分離条件Fにおける未使用カラムでのクロマトグラム

有機溶媒をメタノールに変更した分離条件Gでは図4-1.6に示すようにさらにピーク形状が悪化した。また、イオンペア剤濃度を変更した分離条件Hにおいてもブロードなピークが出現し、分離条件の問題ではなく、他の要因の介在が示唆された。

即ち、カラム充填剤の表面活性がブロードなピーク形状の原因と仮定し、この活性部位をマスクするために溶離液にエチレンジアミン四酢酸2ナトリウム（以下、EDTAと略す）を添加した分離条件I, Jで測定を行なったが、図4-1.7に示すように効果は認められなかった。

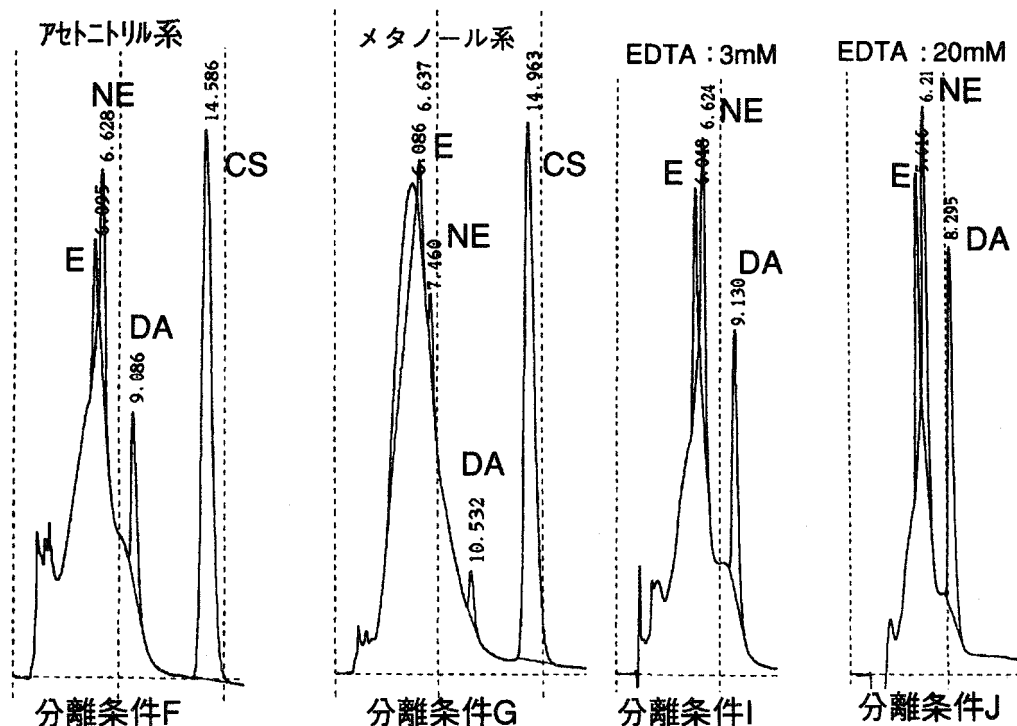


図4-1.6 分離条件F,Gにおけるクロマトグラム

図4-1.7 分離条件I,Jにおけるクロマトグラム

これまでの検討結果から、CA標準溶液を十数回注入することによってブロードなピークが消滅していることから、これを確認するためにCA標準溶液(10nmol/ml, 400 μ l)注入回数による未使用カラムのピーク形状経時変化を調べた結果、図4-1.8に示したように13回目から良好なピークが得られた（分離条件F）。これは、総CAとして約150nmol (52nmol $\times$ 3成分) を注入したことに相当する。

この結果から、アミンを注入することでピーク形状に改善効果が得られると考え、溶離液にトリエタノールアミン（以下、TEAと略す）を添加した分離条件Kで測定を行なった。その結果、図4-1.9に示すように添加の効果が認められ、さらに、1度TEAで処理したカラムにおいては、TEAを添加しない溶離液でも良好なピーク形状を示した。

しかしながら、同様の分離条件Lで未使用カラムについて測定を行なった場合、やはり図4-1.10のようにブロードなピークが出現した。また、添加剤をブチルアミンに変更した分離条件Mで測定した結果も、図4-1.11に示すようになり、若干の効果は認められたが、良好なピーク形状は得られなかった。

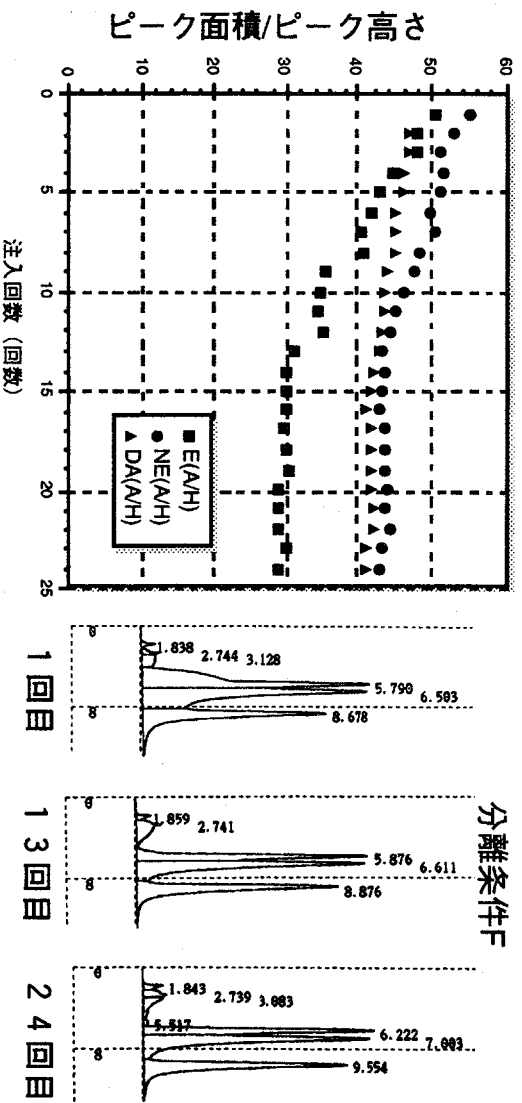


図4-1.8 CA標準溶液注入によるピーク形状変化とクロマトグラム

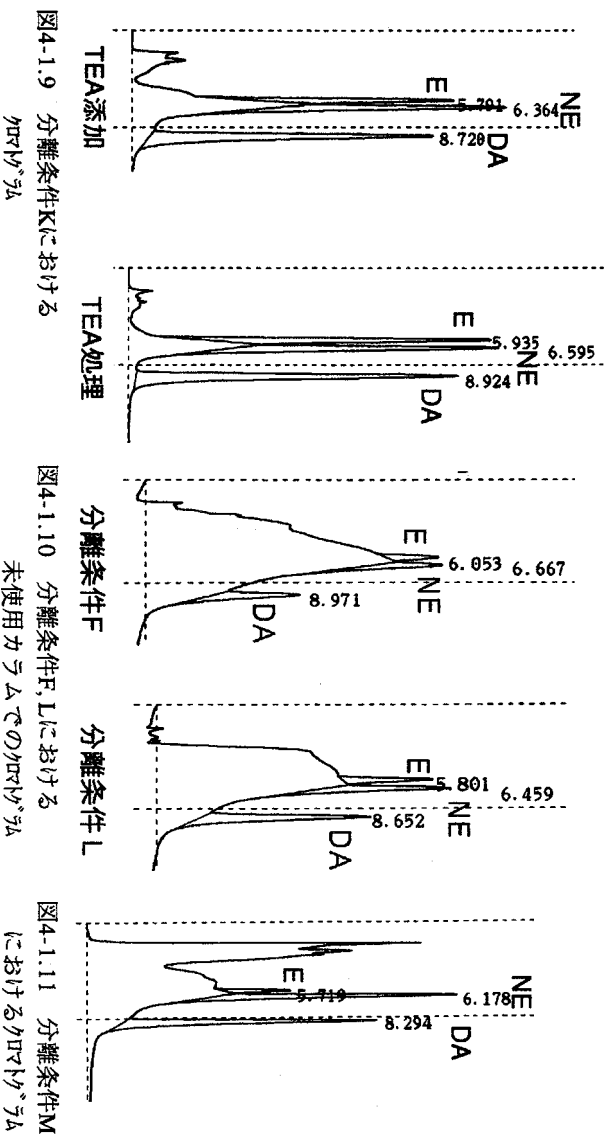


図4-1.9 分離条件Kにおける
クロマトグラム

図4-1.10 分離条件F, Lにおける
未使用カラムでのクロマトグラム

図4-1.11 分離条件M
におけるクロマトグラム

(2) CA標準溶液注入時に出現するブロードなピークの同定

MFカラムの充填剤には、親水性のジオール基の他に、その細孔内にフェニル基が導入されているが、ブロードなピークの出現はこのフェニル基が原因とも考えられたため、フェニル基のみが導入されているカラムによりCAを測定し、検討を試みた。未使用フェニルカラムにより得られたクロマトグラムを図4-1.12に示した。このカラムを使用した場合にはブロードなピークは出現せず、この結果から、MFカラムにおけるブロードなピークの出現は、分離条件の問題ではないこと、即ちCA成分とイオンペア剤とのイオンペア形成が不安定であること、およびフェニル基との相互作用が原因ではないことが更に確認できた。次に、多波長検出器を用いてブロードなピークとEピークの吸収スペクトルを測定した結果、図4-1.13に示したように、ブロードなピークのスペクトルはEのそれとは異なり、Eが酸化されたアドレノクロームのスペ

クトルに良く一致した。

この結果から、ブロードなピークは、CAが酸化されたものであり、この酸化がカラム内部（充填剤表面の活性部位）で起こり、かつ酸化物が本カラムに十分に保持されないため、酸化生成物は反応と同時に直ちに溶出し、本体CAの前に溶出するブロードなピークになるものと推察された。また、フェニルカラムにおいてブロードなピークが出現しないのは、充填剤表面の活性部位が十分に封鎖されているためであると考えられた。

表4-1.2に上記実験の測定条件を示した。

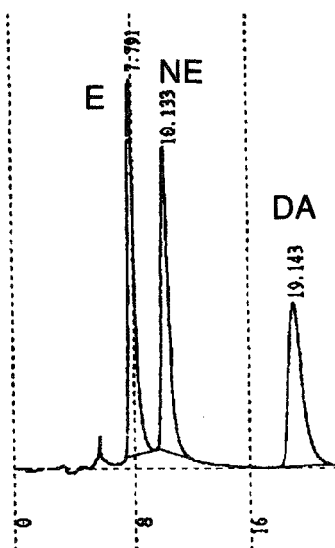


図4-1.12 フェニルカラムにおけるCA標準溶液のクロマトグラム

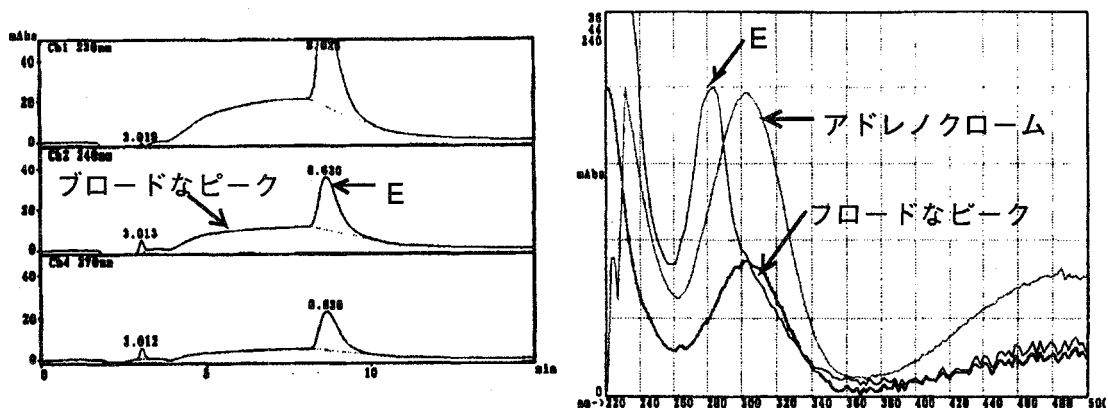


図4-1.13 MFカラムにおけるEのクロマトグラムとブロードなピーク、Eおよびアドレノクローム（Eの酸化物）のUV吸収スペクトル

表4-1.2 測定条件

カラム	MFカラム(10cm)、フェニルカラム(15cm)
分離条件	30mM リン酸2ナトリウム、1mM SDS、8%アセトニトリル、pH7.5(HCl) 0.5ml/min
検出器	UV検出器 270 nm、多波長検出器
試料液	CA標準溶液、E標準溶液(10nmol/ml)
試料注入量	400 μ l

(3) 充填剤表面の活性部位処理効果の検討

フロードなピークの出現は、MFカラム充填剤表面の活性部位の存在が原因であることが明らかになったことから、これを処理するため、希塩酸(0.005N, 400 μ l)や還元剤としてのビタミシンC(1mg/ml, 10mg/ml, 400 μ l)を注入し、その後Eの測定を行ったが、図4-1.14に示したようにいずれの場合においても改善効果は認められなかった。

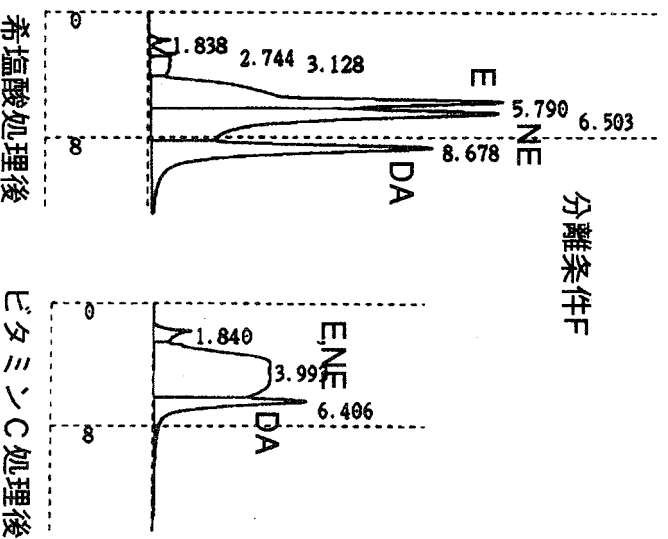


図4-1.14 活性部位処理後のMFカラムにおけるクロマトグラム

(4) 混入金属除去の検討

MFカラムの充填剤に使用されているシリカゲルは金属不純物の少ないものであるが、システムに導入した際にシステムの接液部(金属配管、ポンプヘッド等)からの金属不純物が充填剤に吸着し、それが触媒となってCAが酸化されることも考えられた。

そこで、この金属不純物を除去するために、金属に対する配位性が非常に強いヒノキチオールメタノール溶液(0.2%)でカラムを洗浄した。その結果、図4-1.15(1)に示すようにフロードなピークは消滅し、良好なクロマトグラムが得られるようになった。そこで、このカラムをシステムに導入して測定を行ったが、数カ月使用後、CA標準溶液のクロマトグラムのCAピークが非常に小さくなったため、MFカラムでの分離挙動を再度確認した。図4-1.15(2)に示すように3成分の分離が極度に悪化していることがわかったが、分離の悪化は最終的に得られるCAピーク面積に大きな影響はないと考えられた(分離していてもフェニルホウ酸カラムに導入されればよいから)。しかし、ここでの問題はCAピークの前に出現したフロードなピークであった。

そこで、MFカラムを交換するため既に確認済みの新規MFカラムの分離状態を確認したが、図4-1.16に示すように以前分離が良好であったカラムもCAピークの前に

アロードなどピークが出現した。また、この現象は再度ヒノキチオール処理を行っても改善されなかった。

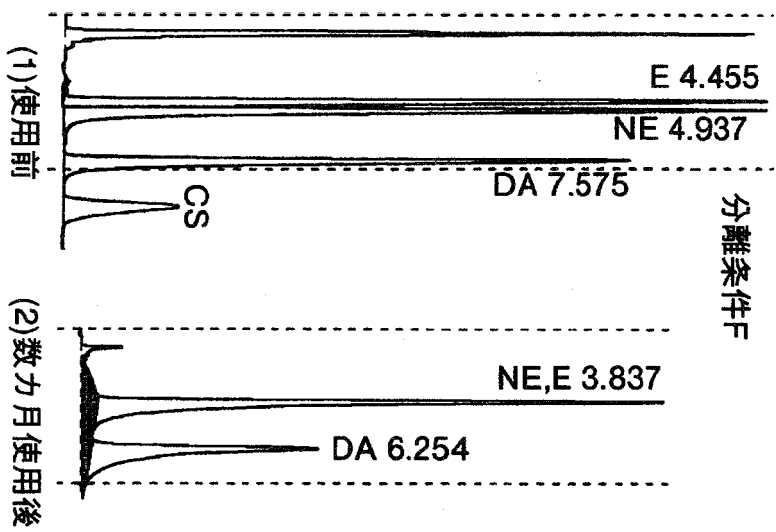


図4-1.15 金属不純物除去処理後のMFカラムにおけるクロマトグラム

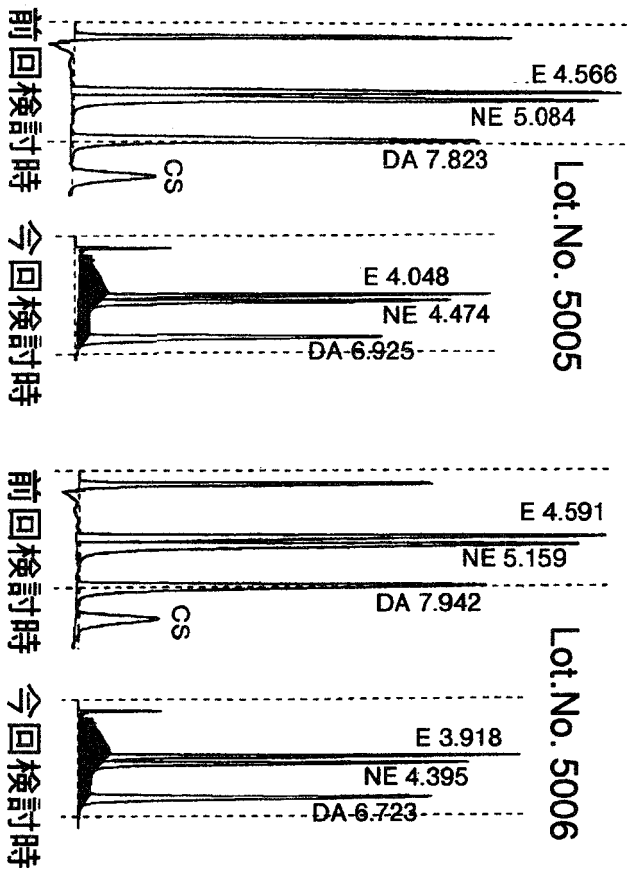


図4-1.16 新規MFカラムにおける分離状態 (分離条件F)
 前回：CA標準溶液 10nmol/ml, 400 μ l 注入
 今回：CA標準溶液 100nmol/ml, 50 μ l 注入

次に、新たにMFカラムを充填してもらった結果、ヒノキチオール処理したポンプおよびバツカーを用いて充填したカラムにおいて、図4-1.17に示すように良好なクロマトグラムが得られた。

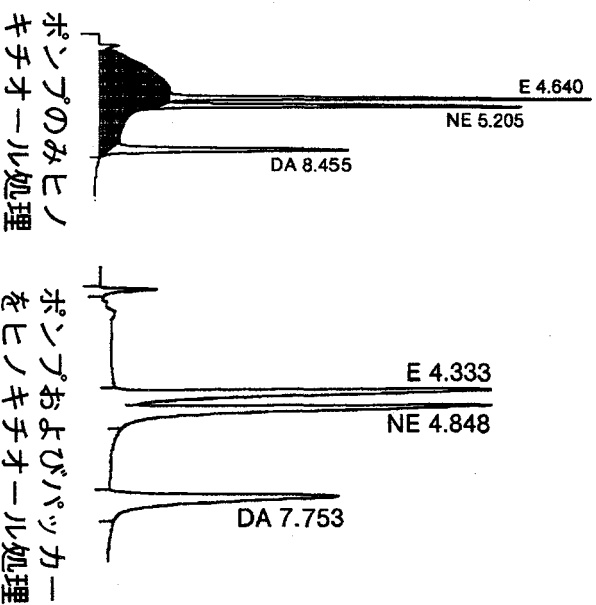


図4-1.17 MFカラム充填環境からの金属除去の効果
CA標準溶液100nmol/ml, 50 μ l 注入

しかしながら、このカラムをCAシステムに導入し標準溶液を測定した結果、やはり以前のピーク面積は得られなかった。そこで、再度原因を明らかにするために次の測定を行った。

- ① 標準溶液をカチオン交換（分離）カラムに直接導入し測定
- ② フェニルホウ酸（濃縮）カラムで濃縮後、分離カラムに導入し測定

* 流路系は通常のCAシステムのままでMFカラムの代わりにPEEK配管を装備。
フェニルホウ酸への試料導入は0～11分まで。分離カラムへの導入時間は従来どおり。

- ③ MFカラムで分離後、フェニルホウ酸カラムで濃縮し、分離カラムに導入し測定（通常のCAシステム）

* MFカラムからフェニルホウ酸への導入は0～11分まで。

それぞれのクロマトグラムを図4-1.18に示した。①と②のピーク面積はほぼ一致するものの、③のそれは1/10程度であった。UV検出でMFカラムにおける分離を確認した時はカラム内でCAの酸化は起こっていないと考えられたものでも、この結果のように、CAが微量の場合には少量の分解（酸化）が影響を大きく与えると考えられ、この分解を皆無とすることは現状の条件下では極めて困難であると判断した。

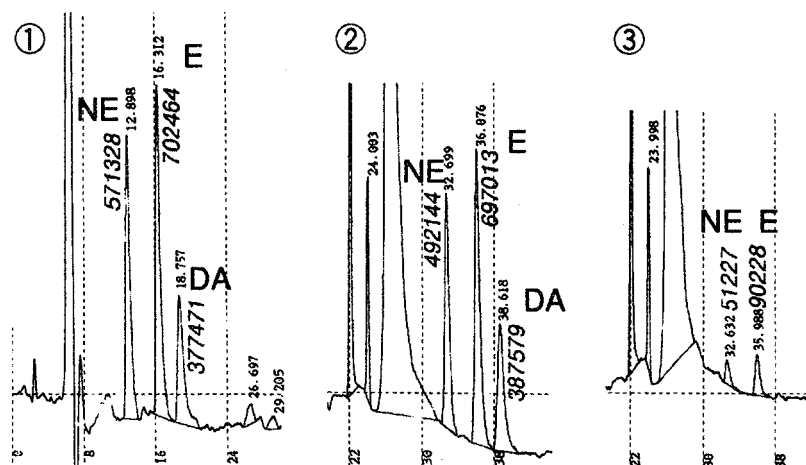


図4-1.18 ①、②および③のシステムにおけるクロマトグラムとピーク面積値

1.1.2 他の除蛋白カラムの検討 (CA、CS、蛋白の相互分離)

これまでの検討により、MFカラム内に残存するあるいは蓄積される極微量の金属によるものと考えられるCAの分解が認められ、本研究で取り扱うようなpmolレベルのCAの分解の抑制についての課題を完全に解決することはかなり困難であり、また時間もかかると思われたため、別の除蛋白および相互分離用カラムの検討を行なった。

(1) 除蛋白カラムの選択

今回検討を行なった3種のカラムおよび分離条件を下記に示した。なお、分離条件はMFカラムのもの (分離条件F) を基本とした。

① TSKprecolumn BSA-ODS (東ソー製), 3.5cm

多孔性ポリマーゲルの表面 (細孔内を除く) に牛血清アルブミン (以下、BSAと略す) を結合させ、細孔内にオクタデシル基を結合させたもの。

30mM Citrate Buffer / 0, 5, 10% acetonitrile or methanol / 0, 2mM SDS / pH7.5

② L-1180カラム (化学品検査協会製), 3.5cm

多孔性シリカゲルの表面 (細孔内を除く) に親水基を結合させ、細孔内にオクタデシル基を結合させたもの。

30mM Citrate Buffer / 0, 5% acetonitrile or methanol / 0, 2mM SDS / pH7.5

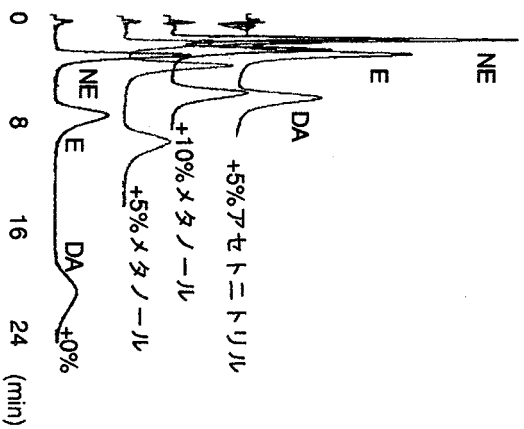
③ TSKprecolumn PW (東ソー製), 3.5cm

高速ゲル濾過クロマトグラフィー用の多孔性ポリマーゲル。

15, 30mM Citrate Buffer / 0, 3, 5% acetonitrile or methanol / 0, 2mM SDS / pH7.5

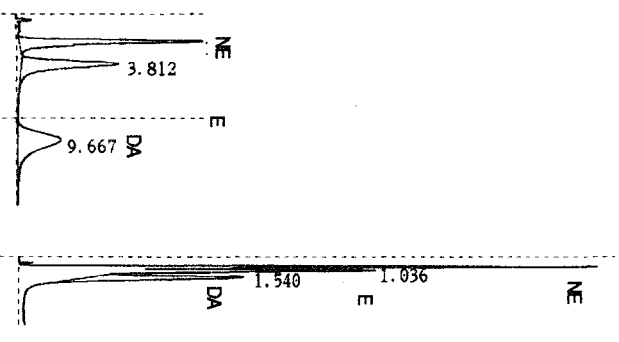
BSA-ODSカラムにおけるCAのクロマトグラムを図4-1.19に示した。溶離液の有機溶媒率が上がるとリテンションタイムが早くなった。ここで蛋白成分との分離とCAが完全に溶出する時間を考慮すると5%アセトニトリルもしくは10%メタノールを添加した場合に、前処理条件は良好であると考えられたが、数日間カラムを安定化後に同条件で測定を行なった結果、図4-1.20に示したようにクロマトグラムは再現されず、CAに対する保持力が弱くなってしまった。そこで、イオンペア剤であるSDS 2mMを添加したが、DAの溶出が非常に遅くなってしまった (約30分)。

また、L-1180カラムにおけるCAのクロマトグラムを図4-1.21に示したが、蛋白成分との分離とCAの溶出時間を考慮すると不適当であった。



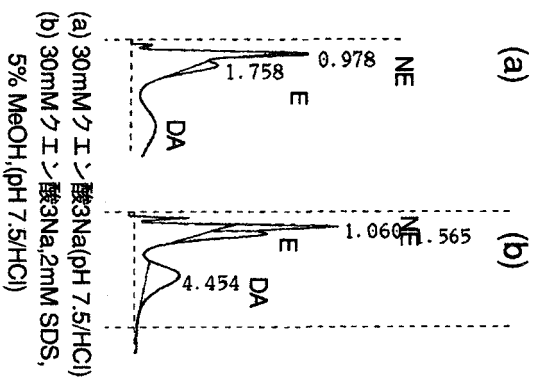
溶離液：30mMクエン酸3Na+有機溶媒(pH 7.5)
試料：100nM CA, 50ul

図4-1.19 BSA-ODSカラムにおける
CAの分離挙動



溶離液：30mMクエン酸3Na, 5%MeOH(pH 7.5)
試料：100nM CA, 50ul

図4-1.20 BSA-ODSカラムの再現性



(a) 30mMクエン酸3Na(pH 7.5/HCl)
(b) 30mMクエン酸3Na, 2mM SDS,
5% MeOH, (pH 7.5/HCl)

図4-1.21 L-1180カラムにおけるCAの分離挙動

次にPWカラムにおけるCAのクロマトグラムを図4-1.22に示した。この場合、SDSを添加することにより適当な保持が得られたが、さらに蛋白成分との分離を良好にするため、SDSの添加量とバッファの塩濃度について検討した。SDS濃度を1~4mMで変化させた結果、SDS濃度が2mMの時比較的大きな保持を示した。塩濃度を15mM

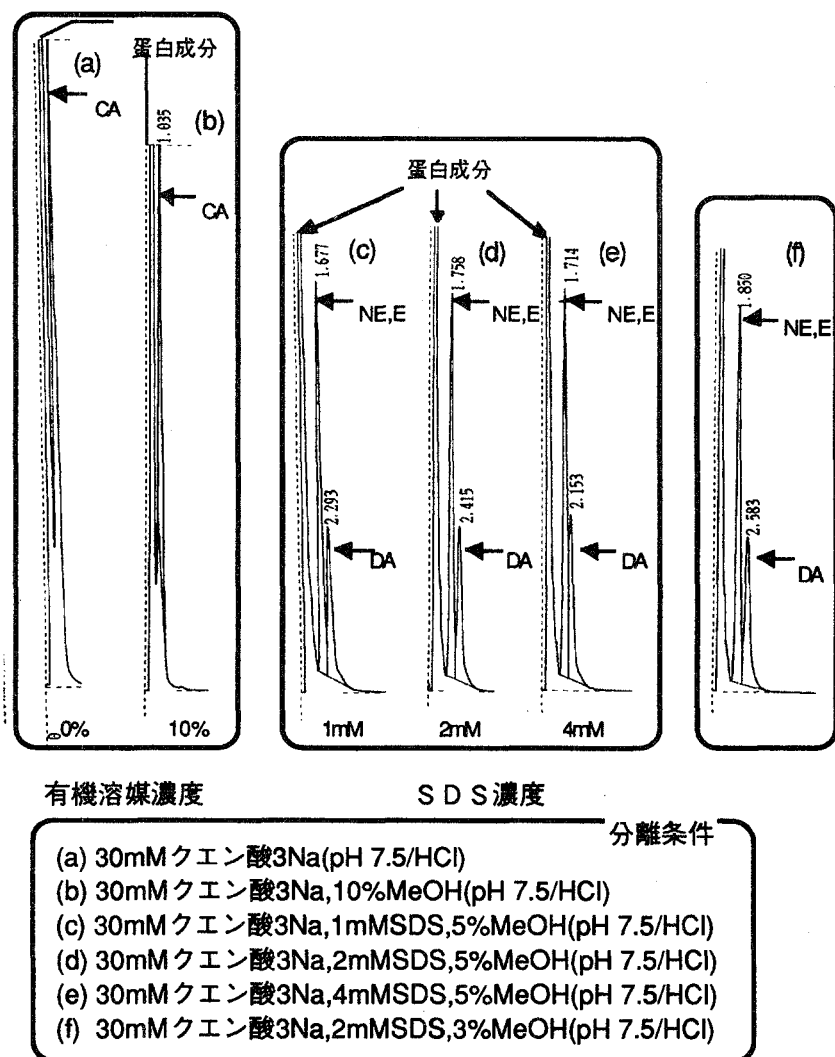


図4-1.22 PWカラムにおけるCAの分離挙動

にすることにより、図4-1.23に示すように保持が強くなり蛋白成分との分離が良好となった。

塩濃度をさらに下げることにより蛋白成分との分離は完全になると思われるが、緩衝能を考慮し15mMのままとした。また、メタノール濃度を下げることによっても分離は可能と考えられるが、CSの保持時間、ピーク形状を考慮し、5%のままとした。

以上の結果から、除蛋白カラムにはPWカラムを用い、分離条件は15mMクエン酸3ナトリウム、2mM SDS、5%メタノール、(pH 7.5 / HCl)とした。

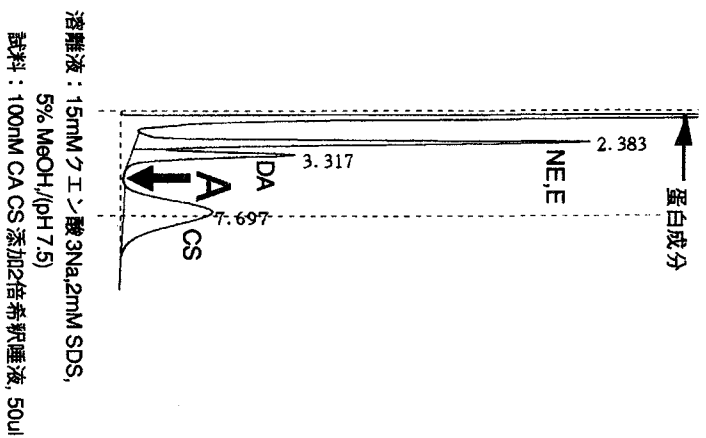


図4-1.23 PWカラムにおける最終条件でのCAの分離挙動

(2) PWカラムにおけるCA損失の確認

下記の3条件における(分離カラムのみ、フェニルホウ酸カラムと分離カラム、そしてフルシステム) CAピークの面積値を比較する事によってPWカラム内でのCAの損失について検討した。また、PWカラムを交換してロット間のバラツキを確認した。測定条件は以下の通り。

① 標準溶液をカチオン交換(分離)カラムに直接導入し測定(SCX)。

② フェニルホウ酸(濃縮)カラムで濃縮後、分離カラムに導入し測定(PB+SCX)。

* 流路系は通常のCAシステムのままでPWカラムの代わりにPEEK配管を装備。

分離カラムへの導入タイミング(タイムプログラム)は従来どおり。

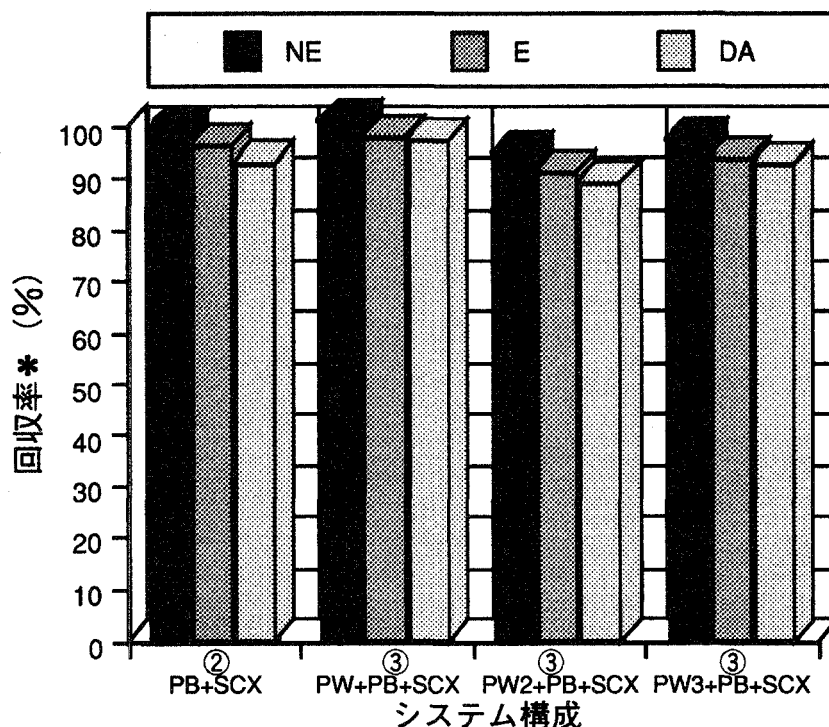
* フェニルホウ酸への導入は0~5.1分まで。

③ PWカラムで分離後、フェニルホウ酸カラムで濃縮し、分離カラムに導入し測定(通常のCAシステム:PW+PB+SCX)。

* PWカラムからフェニルホウ酸への導入は1.4~6.5分まで。

測定結果を図4-1.24に示した。①~③の平均ピーク面積はほぼ一致し、前回の10%程度に比較し、90%以上の良好な回収率が得られた。また、別の2本のPWカラムにおいても同様の結果となり、カラムロット間の変動の少ないことが確認できた。3種のCAの比較では、NE, E, DAの順で分解が生じ易くなる傾向が観察された。

この結果から、MFカラムを用いた場合に発生したカラム内でのCAの酸化は、PWカラム内では起こっていないことが確認できた。



※SCXカラムのみを通した場合の面積を100とする①

試料：0.5pmol/ml, 800ul

図4-1.24 ①のシステムに対する②および③のシステムにおけるCAの回収率

1.1.3 PWカラムによる最終システムの構築

(1) PWカラムからフェニルホウ酸カラム（濃縮カラム）への溶出液導入時間の検討

CSとの同時分析システムを構築するためには、PWカラムからCSシステムへの導入タイミング、つまり図4-1.23におけるA点の設定が重要となる。そこで、PWカラムからCAシステムへの導入時間として1.4～4.7, 5.2, 5.7, 6.2, 8.0分の5つを設定し、CAピークの回収率をもとめ、切り出し時間の許容範囲を確認した。

図4-1.25に6つの切り出し時間における標準溶液および標準添加唾液のCAピークの面積値をバラツキと共に示した。図4-1.23からわかるように、DAとCSピークの谷の中心は約5.2分であり、5.2分以上においては面積値はほとんど変化がないが、4.7分では若干低い傾向があった。また、バラツキについては変化は認められなかった。

この結果から、A点を5.2分以降に設定すれば問題ない回収率が得られることがわかったが、CSについても同様の検討を行い、その結果も考慮した上で最終的な判断を持つこととした。

(2) 検量線の作成

PWカラムを導入したシステムにおいて検量線を作成した結果、図4-1.26に示すように0.05～1.00pmol/ml（絶対注入量0.04～0.80pmol）の範囲で良好な直線性が得られた。なお、PWカラムからの切り出し時間は1.4～5.2分とした。

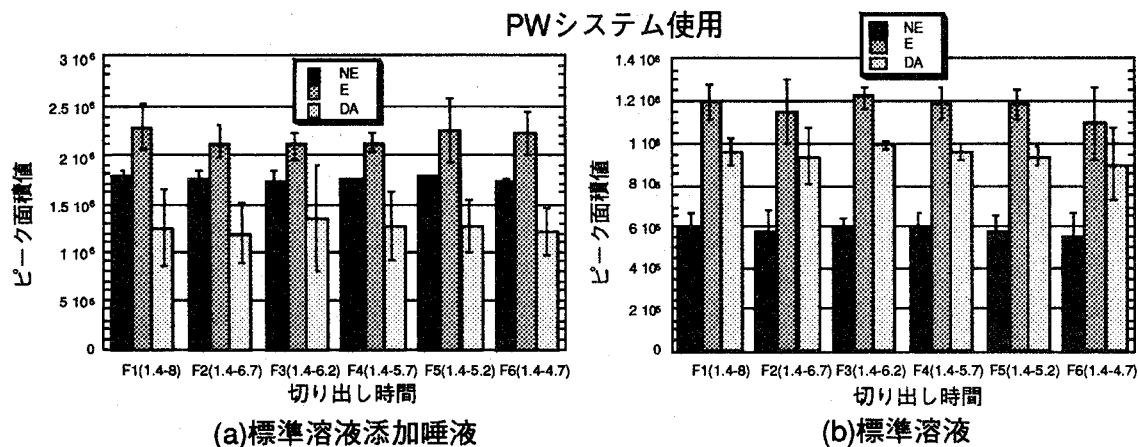


図4-1.25 各切り出し時間におけるCAのピーク面積値

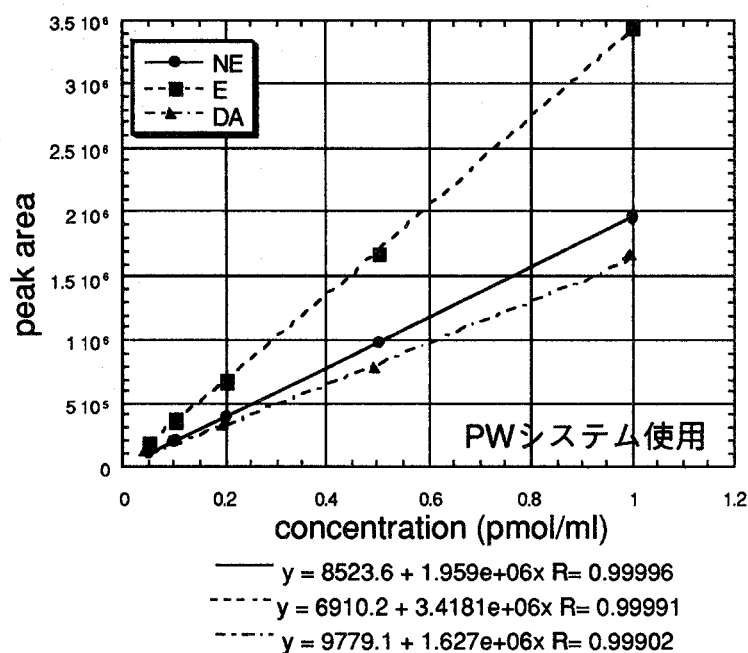


図4-1.26 PWカラムを用いたシステムにおける検量線

(3) 分析精度および添加回収率

CA標準溶液を添加した唾液（唾液中1pmol/ml）を測定し、このシステムにおける添加回収率と分析精度をもとめた。

男女各1名の唾液に添加したCAの回収率を表4-1.3に示した。2名間で差はあるが、NEが99および104%、Eが93および105%に対し、DAが若干低い傾向があり90および94%程度となったが、全般的には良好な回収率が得られた。また、変動率については、標準溶液無添加唾液の場合に大きく、特にE、DAにおいて大きかった。これは、NEが定量限界付近、EおよびDAが定量限界以下（通常の蛍光検出器を使用）であったことが原因と考えられた。しかしながら、標準溶液添加唾液の場合には2~4%程度であり、唾液中1pmol/mlレベルの分析精度については良好であった。

表4-1.3 添加回収実験結果 (n=5)

	Male			Female		
	NE	E	DA	NE	E	DA
A (pmol / ml)	0.300	0.051	0.056	0.537	0.000	0.048
cv %	16.20	56.65	24.13	14.94	0.00	41.52
B (pmol / ml)	1.289	0.983	0.955	1.574	1.045	0.922
cv %	3.83	1.83	1.81	3.04	2.06	3.20
B-A	0.989	0.931	0.899	1.038	1.045	0.944
recovery (%)	98.9	93.1	89.9	103.8	104.5	94.4

A: 唾液 B: 標準溶液添加唾液 (1pmol / ml Saliva)

1.1.4 最終測定条件

再構築された唾液中CA測定用HPLCシステムを図4-1.27に、測定条件を表4-1.4に示した。

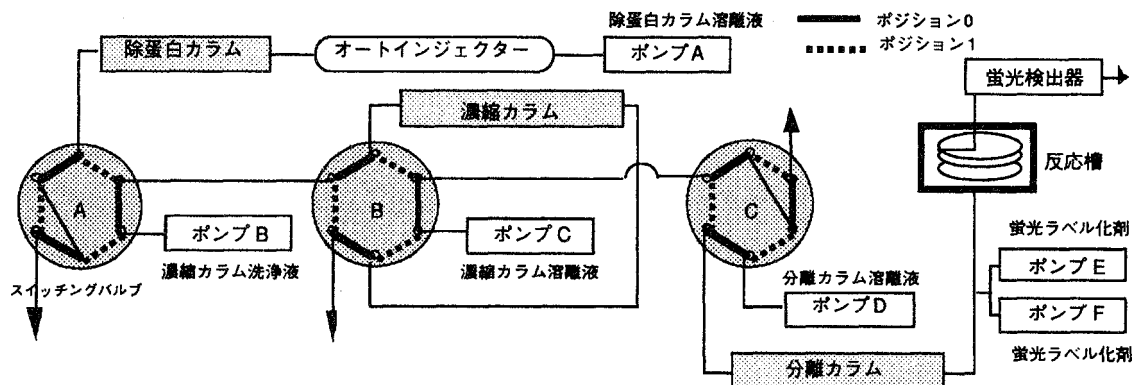


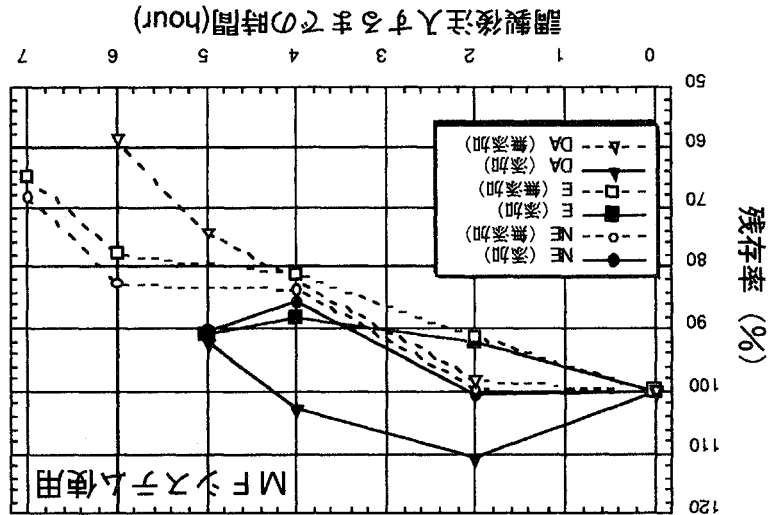
図4-1.27 再構築された唾液中CA測定用HPLCシステムの概略図

表4-1.4 再構築された唾液中CA測定用HPLCシステムの環境

除蛋白カラム	TSK precolumn PW 6.0φ×35mm, 40℃ (東ソー製)
PUMP A	15mM クエン酸3ナトリウム、2mM トリメチル硫酸ナトリウム、5%メタノール、pH7.5(HCl)、0.5ml/min
濃縮カラム	TSK - gel Bronate 5PW 6.0φ×75mm、40℃ (東ソー製)
PUMP B	40mM クエン酸3ナトリウム、5%メタノール、pH7.5(HCl)、1.5ml/min (洗浄用)
PUMP C	40mM クエン酸3ナトリウム、5%メタノール、pH3.5(HCl)、0.8ml/min (脱離用)
分離カラム	Senshu Pak SCX 4.6φ×250mm、40℃ (センシュー科学製)
PUMP D	40mM クエン酸3ナトリウム、5%メタノール、pH3.5(HCl)、0.8ml/min
PUMP E	3mM フェリジンナトリウム / 70%エタノール溶液、0.3ml/min
PUMP F	DPE 5g、ナトリウムヘキサフルオロリン酸20g/l、70%エタノール溶液、0.3ml/min
検出器	蛍光検出器 F-1080 (日立製作所製) EX. 350nm EM. 480nm
試料液	2倍希釈唾液 (半量は除蛋白カラム用溶離液)
注入量	800 μl

前年度構築されたシステムからの変更点は除蛋白用カラムとその溶離液、そして試料溶液の希釈倍率と注入量である。このシステムにより1pmol / mlレベルの唾液中CAの自動定量が可能となり、その分析時間は約45分、分析精度は変動率で約3%となっ

図4-1.28 オートサンブライ上標準試料溶液中CAの安定性における
ピロ亜硫酸ナトリウムの添加効果



1.2.1 試料溶液の安定化の検討と安定性の確認
まず、CA標準試料溶液の安定化検討を行った。
CA標準試料溶液中にピロ亜硫酸ナトリウムを添加し(1mg/ml)、オートサンブライ上(4℃)でのCA安定性を調べた。
図4-1.28に、ピロ亜硫酸ナトリウム添加CA標準溶液と無添加CA標準溶液のオートサンブライ上(約4℃)での経時安定性を示した。添加したものは無添加のものにくらべて若干安定性が良く、溶液調製5時間後で約90%の残存率であった。

1.2 唾液中CAの安定化と試験法の確立
前年度までの検討において、唾液中でCAが速やかに分解することや試料調製後オートサンブライ上でも分解が進むことが分かっている。
そこで、既に文献^{4-1.1)~4-1.3)}で報告されている安定化剤を試料溶液中および唾液中に添加し、その効果について検討し、唾液中CA試験法として確立した。

また、後述するようにCSとの同時分析システムとしての構築にも十分な可能性を示すことができた。
本システムの問題は、分離カラムであるカチオン交換カラムの安定性であり、選択性には欠けるが安定性の良い逆相系(ODS)カラムへの変更も今後検討する必要があると考えられた。
なお、以降報告する内容の中には、除蛋白カラム変更前のデータも含まれており、それらを区別するため、MFカラムを使用したシステムで得られたデータには"MFシステム使用"と、PWカラムを使用したシステムで得られたデータには"PWシステム使用"と表示することとした。ただし、MFシステムによるデータは、本項で述べた分解が生じた時点のものではないことを付記しておく。

次に、実際の唾液を処理した試料溶液に対する安定化剤の効果を検討した。

唾液に標準添加し、MFカラムの溶離液で2倍希釈後濾過した測定試料溶液にピロ亜硫酸ナトリウムまたは還元型グルタチオン+Ethylene Glycol Bis(β -aminoethylether)-N, N', N'-tetracetic Acid (以下、EGTAと略す)をそれぞれ1mg/ml、0.9mg、0.6mg/mlとなるように添加し、無添加のものとのCA安定性の差を調べた。また、CAが比較的安定であると言われている酸性条件下 (pH 4.5) での安定性も検討した。

図4-1.29に、安定化剤添加測定試料溶液と無添加測定試料溶液のオートサンブローラック上 (約4℃) での経時安定性を示した。この結果、安定化剤の効果が認められ、そのなかでも特にグルタチオン+EGTAを添加し、MFカラム溶離液のpHが7.5の条件下のものは、試料溶液調製後24時間で3成分ともに約100%の残存率であり、55時間でNEが80%、EおよびDAが100%と良好であった。pHのCA安定性への影響は、一般的に酸性の方が良いと思われるが、結果は逆となった。これは、濃縮のためにpHを中性付近にしなければならぬ本システムにとっては好ましい結果となった。

以上の結果から、試料調製時に用いる希釈液は、除蛋白カラムの溶離液 (最終的にはPWカラムの溶離液) に還元型グルタチオンとEGTAを添加(それぞれ1.8mg/ml, 1.2mg/ml)したものをを用いることとした。

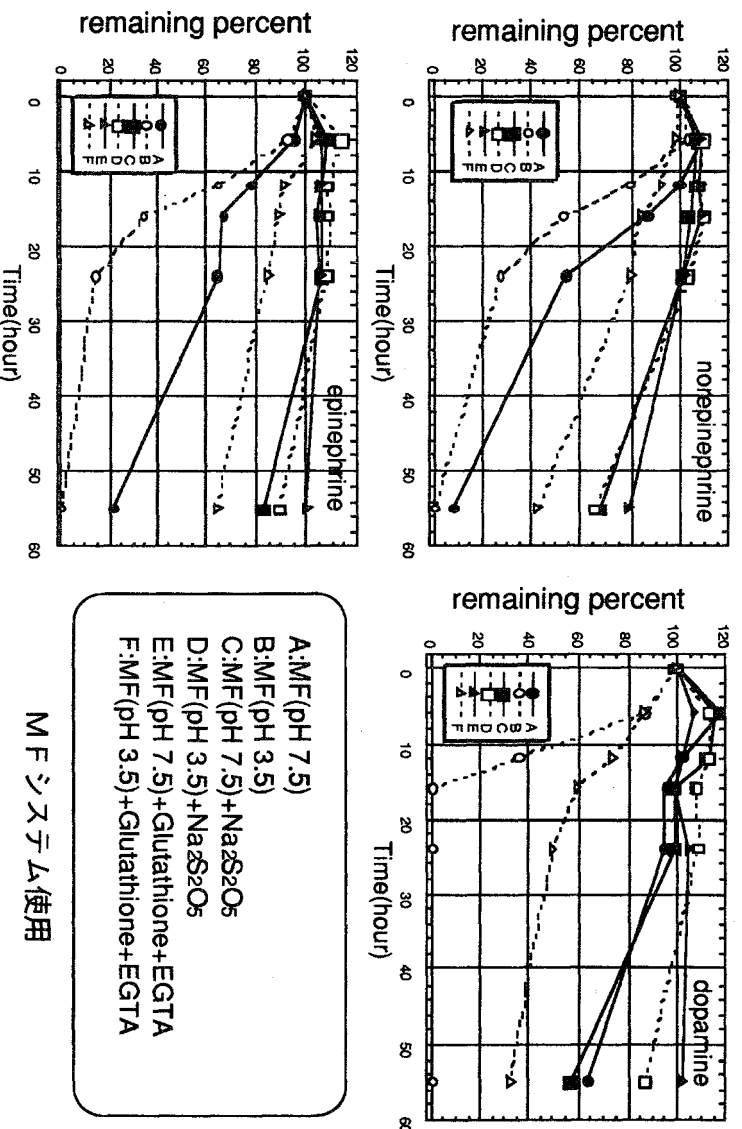


図4-1.29 オートサンブローラ上唾液試料溶液中CAの安定性における
ピロ亜硫酸ナトリウムおよびグルタチオン+EGTAの添加効果とpHの影響

1.2.2 唾液中CAの安定化の検討と安定性の確認

CA標準溶液を添加した唾液 (唾液中1pmol/ml)を以下の条件で保存し、CAの残存率を測定した。(男女各1名)

- ① CA添加唾液（唾液中1pmol/ml）を室温保存（直後、1,3,6,24,48,72時間）
- ② CA添加唾液（唾液中1pmol/ml）を冷蔵（4℃）保存（直後、1,3,6,24,48,72時間）

図4-1.30に試料①及び②の唾液中CAの残存率の経時変化を示した。唾液中に添加したCAの残存率は、2名の試料共に室温保存では急激に減少し1日後には0～十数%となってしまったが、冷蔵保存では比較的緩やかで1日後でNE：約60%、E：約30%、DA：約70%、さらに3日後ではNE：約40%、E：約10%、DA：約40%であった。同様の目的で予備的に行った事前検討の結果を図4-1.31に示したが、冷蔵保存では緩やかに減少し、冷凍保存においてもDAが20%ほど分解してしまった。

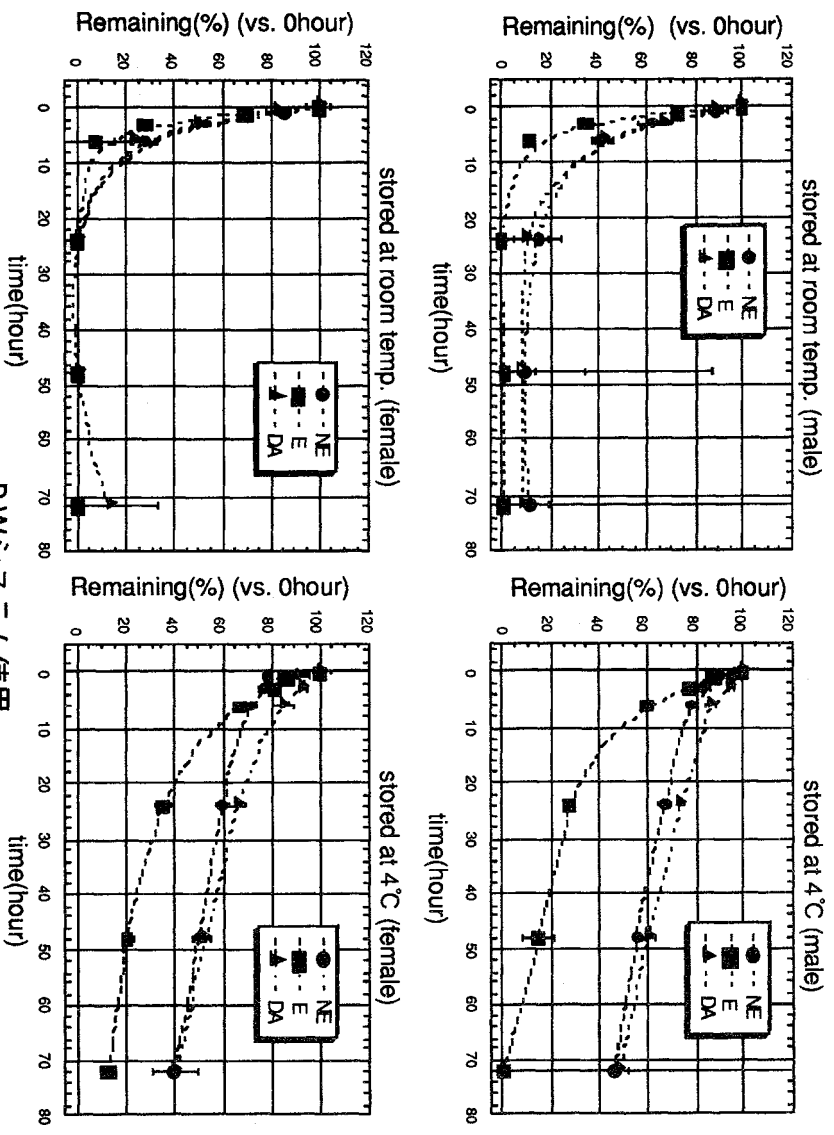


図4-1.30 室温および冷蔵保存（4℃）における唾液中CA（1pmol/ml）の安定性

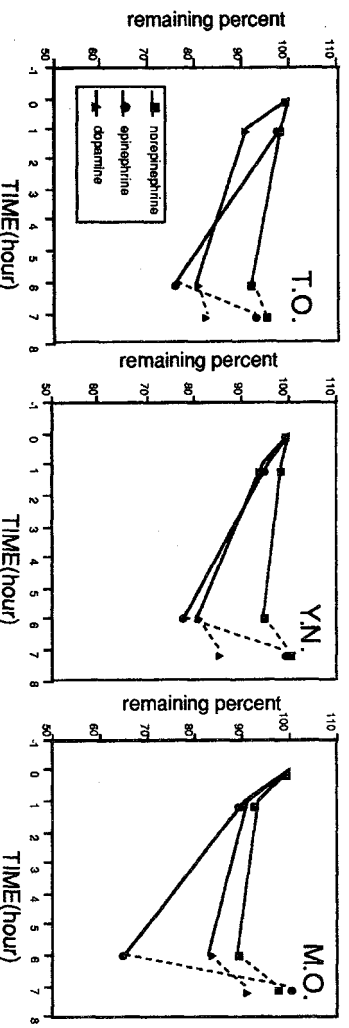


図4-1.31 冷蔵保存（4℃）における唾液中CA（4pmol/ml）の安定性

*7時間後のみ-85℃保存

今回の検討でも結果は再現され、CA3成分のなかでEの減少が最も大きかった。また、男女各1検体のみの結果ではあるが、性差を示すような例は認められなかった。

さらに、92年度に実施したオフライン法（条件は図中に記載。保存後、前処理に1時間弱を要し、注入する試料液は0.25N酢酸溶液である）での安定性実験においても図4-1.32に示すように同様の結果であったが、分解の傾向はDAで最も大きく、今回とは異なる結果であった。

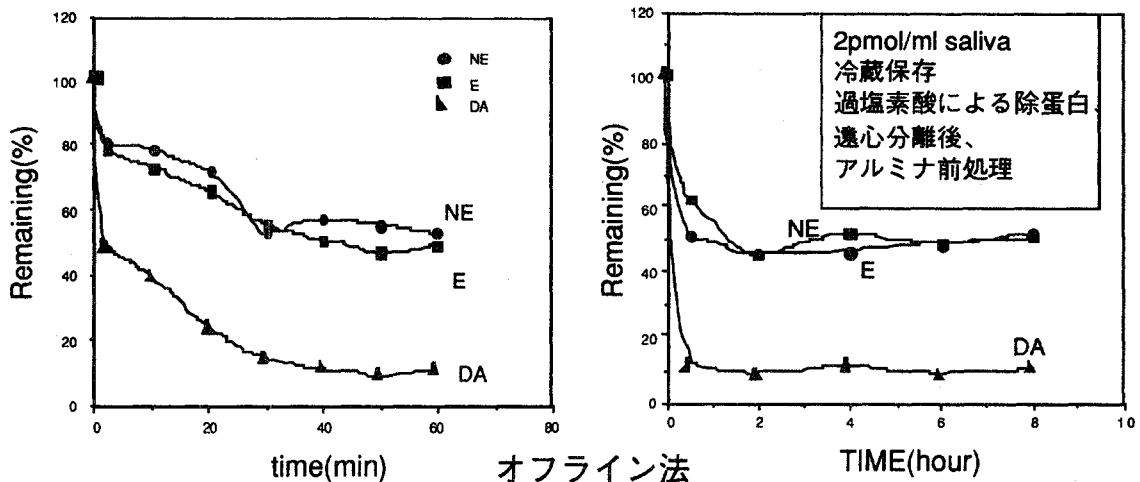


図4-1.32 冷蔵保存（4℃）における唾液中CA（2pmol/ml）の安定性

いずれにしても、唾液をそのまま保存すれば、唾液中のCAが分解してしまうことは明らかであり、唾液採取後、直ちに試料処理（希釈・濾過）、測定が困難であることを想定すれば、試料溶液の場合と同様に安定化剤の添加等の検討が必要となった。

そこで、試料溶液中CAの安定化で良好な結果が得られた添加剤、還元型グルタチオンとEGTAを以下の条件でCA添加唾液に添加し、その経時安定性を確認した。

- ③ CA添加唾液（唾液中1pmol/ml）に高濃度安定化剤（唾液中 EGTA0.6mg, 還元型グルタチオン0.9mg/ml）を添加し、冷凍(-85℃)保存（直後、1週間, 1, 2.5, 3.5ヵ月）
- ④ CA添加唾液（唾液中1pmol/ml）に低濃度安定化剤（唾液中 EGTA6μg, 還元型グルタチオン9μg/ml、高濃度の1/100、CAに対してモル比でそれぞれ約15000倍、30000倍）を添加し、冷凍(-85℃)保存（直後、1週間, 1, 2.5, 3.5ヵ月）

図4-1.33に安定化剤を添加した試料③及び④の唾液中CAの残存率の経時変化を示した。唾液中も試料溶液中の場合と同様にEの減少が最も大きく、1ヵ月後における残存率が若干低めではあるが、経時3.5ヶ月において低濃度安定化剤存在下で75～90%の残存率であり、さらに高濃度安定化剤存在下では90～100%の残存率と、良好な結果が得られた。

これらの結果から、唾液試料は、採取後遠心分離し、直ちに安定化剤を添加し冷凍保存することが必要であることが示された。また、出来るだけ速やかな測定が最も望ましいことも再確認された。

確立された試験法を図4-1.34に示した。

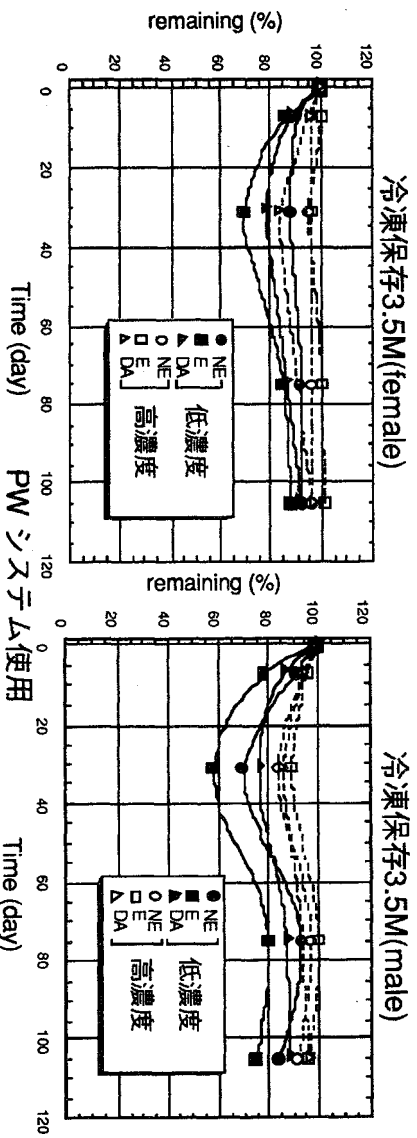


図4-1.33 唾液中CA (1pmol/ml) の安定性に対する安定化剤添加効果 (冷凍保存-85℃)

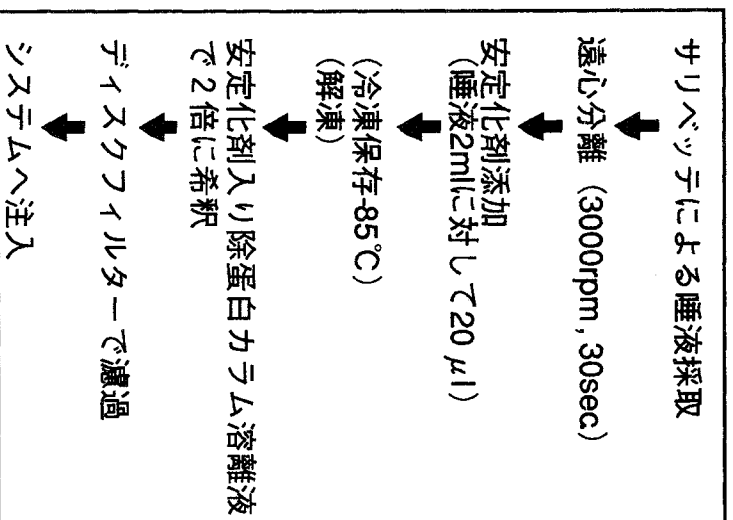


図4-1.34 唾液中CA測定の実験法

1.2.3 研究室以外での保存法

これまでの検討の結果から、サリベッタにて採取後、遠心分離し直ちに安定化剤を添加することによりその分解を10%以下 (3.5ヶ月間) に抑制することが可能となった。しかしながら、研究室以外で唾液を採取した場合 (自宅、フイールド等) には遠心分離器がなく、遠心分離して安定化剤を添加するのが不可能な場合も考えられる。そこで、唾液採取した綿に安定化剤入りの除蛋白カラム溶離液を直接しみ込ませて冷蔵 (4℃) 保存することを考え、男女各1名のCA添加唾液 (唾液中1pmol/ml) 2.5mlを唾液採取用の綿 (サリベッタ) にしみ込ませ、さらに安定化剤を添加した除蛋白カラム溶離液 (EGTA 1.2mg, 還元型 γ -Wafafon 1.8mg/ml) 2.5ml (1.2.2における③、高濃度に相当) をしみ込ませて冷蔵 (4℃) 保存したのについてCAの経時安定性を検討した (直後、1, 3, 6, 24, 48, 72時間)。

図4-1.35に唾液採取後の綿に安定化剤入り除蛋白カラム溶離液を染み込ませ、冷蔵保存した場合のCAの残存率の経時変化と、同条件で保存した前記（1.2.2）の安定化剤無添加の結果を示した。添加1時間後から72時間後までほとんど変化はなく、全てにおいて80～90%の残存率であった。

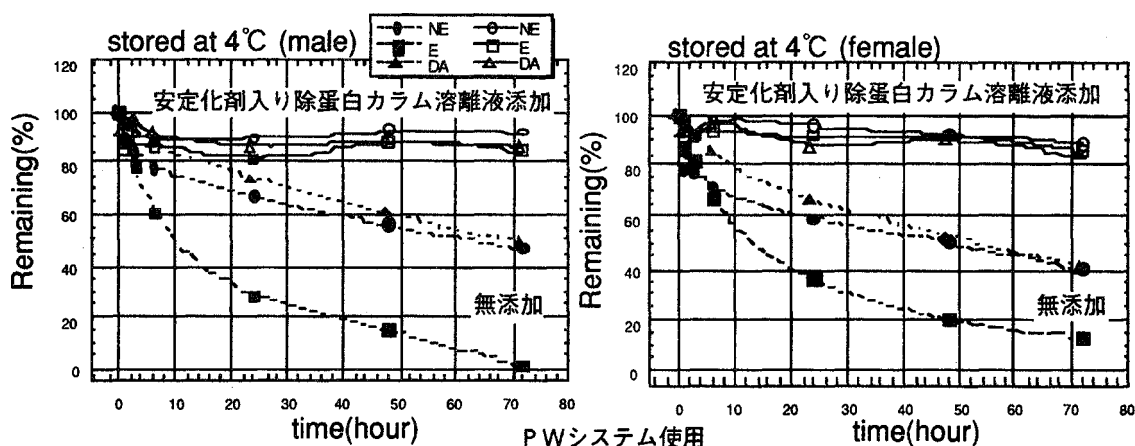


図4-1.35 研究室外で採取した唾液中CA安定性における安定化剤入り除蛋白カラム溶離液添加効果（冷蔵保存）

この結果から、研究室以外で採取した唾液については、採取後直ちに一定量の安定化剤入り除蛋白カラム溶離液2mlを綿に染み込ませる方法をとることとした。

なお、採取した唾液量については、各量（1～3ml）の唾液を染み込ませた綿に一定量の除蛋白カラム溶離液を添加し、遠心分離して得られた液量と染み込ませた唾液量の関係から求める方法をとることとした。

1.3 唾液中CA、CS同時分析用連続非一体型汎用HPLC装置の構築

1.1.2, 1.1.3において、除蛋白カラムをMFカラムからPWカラムに変更して唾液中CA、CSの分離条件を検討し、CA画分を切り出してCA自動分析の最終システムを構築した。そこで、CSについてもPWカラムの適用を検討し、唾液中CA、CSを同時に分析できるシステムを目指した。即ち、1.1.3で検討した分離条件に基づいて、PWカラムからCS画分を切り出し、CNカラムに導入した。HPLCシステムを図4-1.36に、HPLC条件および前処理を表4-1.5に示した。

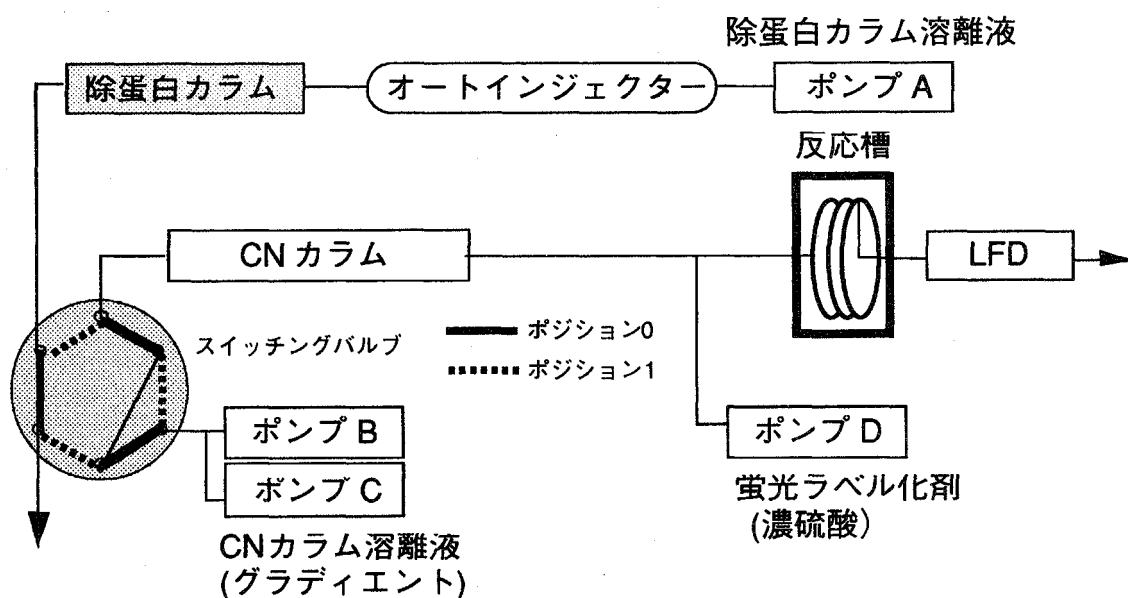


図4-1.36 CS測定用HPLCシステム

表4-1.5 CSオンライン分析のHPLC条件および前処理 (PWカラム)

除蛋白カラム	TSK precolumn PW (東ソー) 4.6mmi .d.×35cm
分析カラム	CAPCELL PAK CN (SHISEIDO) 4.6mmi .d.×250cm
カラム温度	40℃
キャリアー CN-A	10%アセトニトリル
キャリアー CN-B	アセトニトリル A/B グラディエント 0.5ml/ml
キャリアー PW	15mM ケン酸ナトリウム, 2mMSDS, 5%メタノール, pH7.5 1.0ml/min
反応液 D	硫酸 0.75ml/min
反応条件	反応コイル 0.25mmi .d.×2.5m (ダイトロン)、反応温度100℃
検出器	レーザー-蛍光検出器 LF-8010 (TOSOH) 488nmAr (10mW), 537nmBPF
タイムプログラム	0.0 RV.A=0, B.CONC =0, T.FLOW =0.5
	4.7 RV.A=1
	13.0 RV.A=0
	13.0 B.CONC =0(アセトニトリル10%)
	18.0 B.CONC =27.7(アセトニトリル35%)
	34.0 B.CONC =27.7(アセトニトリル35%)
	35.0 B.CONC =0(アセトニトリル10%)
	35.0 STOP
標準溶液	CS1pmol / ml (溶媒の半量は水、半量はPWキャリアーになるように調製)
唾液試料	唾液1ml + PWキャリアー1ml (2倍希釈) →ろ過 (両用フィルター)
注入量	800μl

1.3.1 PWカラムからのCSの回収、CNカラムでの濃縮・分離

はじめに、PWカラムからの回収を調べるために、①CNカラムのみで分離したときと、②PWカラムからCS画分を切り出してCNカラムに導入して濃縮・分離したときのCSピーク面積値を比較した。それぞれのクロマトグラムを図4-1.37に示した。②のときにCSのピークの直前にベースラインのもりあがりがあり、PWカラム由来の妨害ピークと考えられた。CSの回収率についてはピーク高さから計算すると、101.1%でほぼ回収されていると考えられた。また、MFカラムとPWカラムの比較を表4-1.6に示したが、CSの保持時間はPWカラムで約27分（アセトニトリル濃度が35%になってから約9分）であり、これはMFカラムの29分（アセトニトリル濃度が35%になってから約9分）に一致している。したがって、PWキャリアを導入してもCNカラム先端での濃縮・分離が十分できていると考えられた。

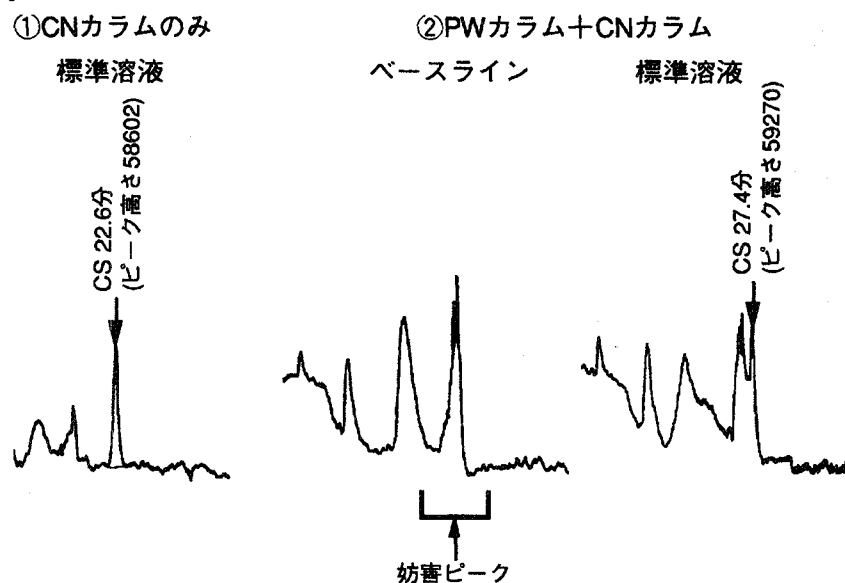


図4-1.37 PWカラムから切り出したCSのクロマトグラム

表4-1.6 MFカラムとPWカラムの比較

	MF カラム	PWカラム
キャリアー	2mMクエン酸ナトリウム, 5mM オクタンスルホン酸ナトリウム, 10% アセトニトリル, pH6.5	15mMクエン酸ナトリウム, 2mMSDS, 5%メタノール, pH7.5
CNカラムへの導入時間	7-15分	4.7-13分
アセトニトリル10→35%	15-20分	13-18分
保持時間	29分	27分

1.3.2 CSとPW妨害ピーク、サリベッテ妨害ピークの分離

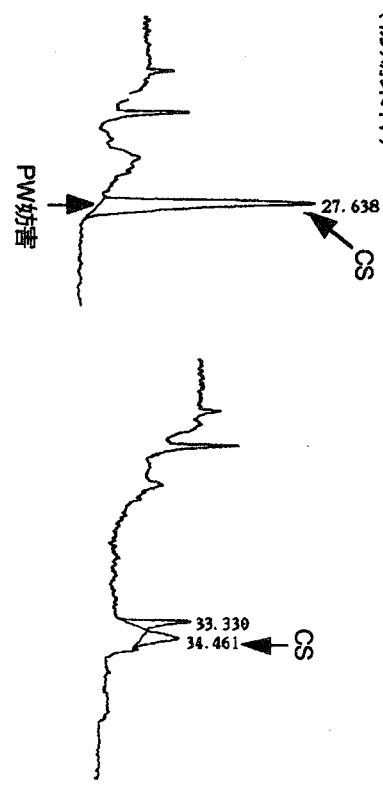
②で溶出した妨害ピークについては、再び①の状態にしPWカラムから導入されると同量のキャリアーを流すとこの妨害ピークが出現し、この妨害ピークはPWカラム由来で

はなくキャリアー由来であることが分かった。次に、PWカラムを50%メタノールで洗浄すると一時的には消えるが、再度②の状態にすると分析途中で再び現われ除去しきれなかったことから、キャリアーによるものとの考えが支配的となった。そこで、この妨害ピークとCSの分離の検討を行うことにした。一方、実際の唾液試料ではサリベッテからの妨害ピークがあるが、除蛋白カラムをPWカラムに変更したことにより、分離モードの違いのためMFカラムのときとは異なるサリベッテ妨害ピークが出現した。そこで、PW妨害ピーク、サリベッテ妨害ピーク、CSの3者の分離をするためにグラディエント条件の検討を行った。

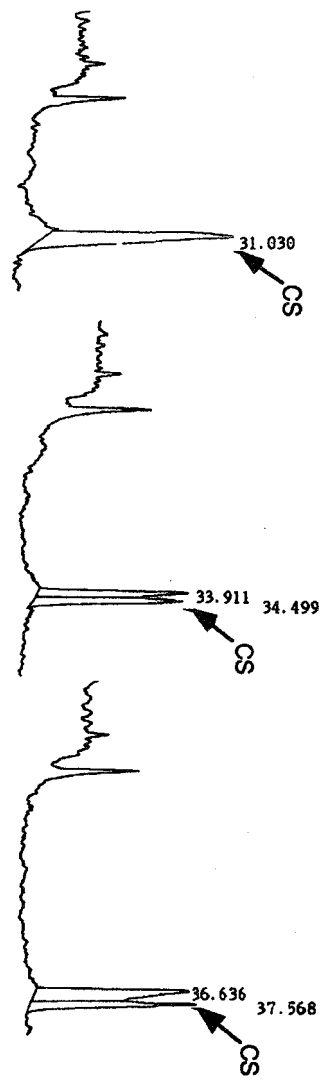
結果を図4-1.38に示した。グラディエント速度は同じでアセトニトリル最終濃度を低くした条件(②)ではCSのピークがブロードになってしまい、アセトニトリル最終濃度は同じでグラディエント速度を落とした条件(③~⑦)でPW妨害ピークとCSは徐々に分離した。⑥の条件ではPW妨害ピークとCSが分離したがサリベッテ妨害ピークと重なり、⑦の条件でPWカラム妨害ピーク、サリベッテ妨害ピーク、CSが分離したので、これを最終条件とした。

また、このPW妨害ピークについては、先述のように、キャリアー中のイオンペア剤のSDSに由来し、またこのSDSのために硫酸を加えた後の反応コイル内でつまりが生じることも分かってきた。今後は、最初の課題として、反応コイル内のつまりを解決するためにイオンペア剤の種類を検討する必要があるが、同時にCAの分離、妨害ピークの溶出位置等、分離の再検討も課題となる。しかしながら、基本的な問題が明らかとなっていること、そしてPWカラムでかなりブロードなピークとなったCSもCNカラム先端で十分に濃縮されることが明らかとなったことから、CA、CSの同時自動分析の可能性を十分示すことができた。当然のことではあるが、改善した、また、最終的な分離条件の下では、PWカラムからの切り出し時間、唾液への標準添加回収を再確認する必要がある。

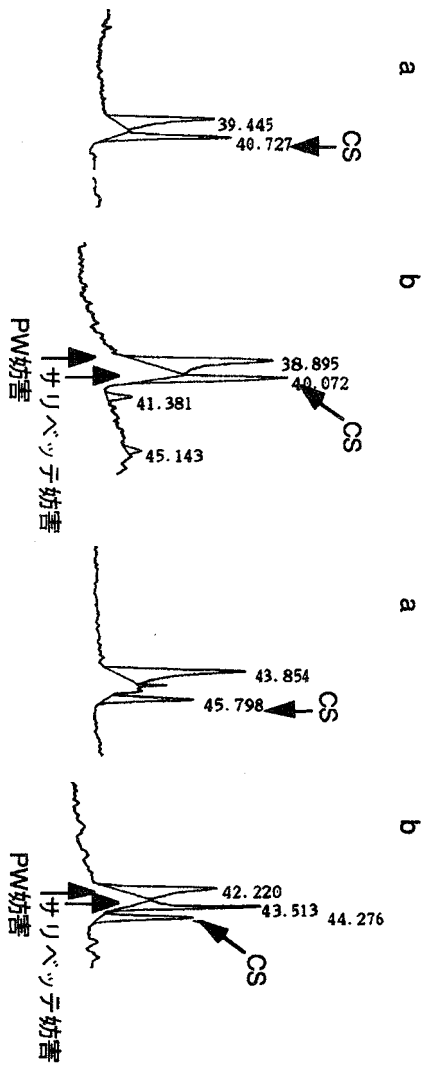
① γ -ヒトリル10→35% (5分間) ② 10→25% (3分間)
(初期条件)



③ 10→35% (10分間) ④ 10→35% (15分間) ⑤ 10→35% (20分間)



⑥ 10→35% (25分間) ⑦ 10→35% (30分間)



試料: ①~⑤ 標準溶液

⑥、⑦ 標準溶液 (a) とサリベッタを通した標準溶液 (b)

図4-1.38 CSとPWカラム妨害ピーク、サリベッタ妨害ピークの分離

1.4 唾液中CSのバックグラウンド及び標準化の検討

CSはSelye、Frankenhäuserによりストレス指標物質であることが提唱されており、こ

れに基づいて我々はストレス検知の検討を進めてきたが、一方ではCSを体内時計の指標とする事実（サーカディアンリズム）もあり、まずはこの事実の検証のために、唾液中CSの日内変動（サーカディアンリズム）、日間変動、年齢差、性差、個人差（標準偏差）を、男女36名、延べ60日分の唾液試料について測定することで行った。また、CSには日内変動があるために、その標準値は時間によって決まることが知られているが、この時間のファクターを相殺して日内変動を平滑化できるかどうか、ストレス検知を1点のみで実施できるかどうかの重要な鍵となっている。そこで、CSと同時に蛋白成分を前年度確立したHPLCシステムで測定し、CSのクロマトグラムと蛋白成分のクロマトグラムからCS標準化指標の検索を同時に行った。またこの検討の一環として、唾液分泌速度の変化がCS濃度の変化として表現されている可能性も否定できなかったことから、唾液分泌速度とCS濃度の関係を、男女各3名分の唾液試料の測定結果から考察した。

CSのHPLC条件および前処理を表4-1.7に、蛋白成分のHPLC条件および前処理を表4-1.8に示した。ただし、1.4、1.6のCS測定を除蛋白カラムにはMFカラムを使っている。

唾液試料の採取と保存は、以下のように行った。唾液の採取は採取補助用具のサリベッテを用いた。採取の30分前以降は飲食を禁止した。また、歯磨き直後は血液が混入することがあるため採取は歯磨き前にした。サンプルは回収後にめだった着色があれば着色状態などを記録し、定量値との関連をみた。サリベッテを遠心分離（3500r.p.m., 5min）して唾液を得たが、得られた唾液は自然採取と比較し粘性が低かった。サリベッテの容器ごと冷凍保存（-85℃）し、測定時に解凍して使用した。保存期間は最長のもので約1ヵ月だった。解凍時には沈澱物はほとんどなく、十分に振盪して試料を均一にしてから、CS測定用と蛋白測定用にマイクロピペットでそれぞれ必要量を量りとり使用した。採取時間は1日5回（起床後、10:00、13:00、16:00、就寝前）、採取日数は5日間（94年2月1日～94年2月18日の勤務日より任意の下記条件に合致する日を選択）とした。

表4-1.7 CSオンライン分析のHPLC条件および前処理 (MFカラム)

除蛋白カラム	CAPCELL PAK MF Phenyl -1 (SHISEIDO) 4.6mmi .d.×100mm
分析カラム	CAPCELL PAK CN (SHISEIDO) 4.6mmi .d.×250mm
カラム温度	40℃
キャリアー CN-A	10%アセトニトリル
キャリアー CN-B	アセトニトリル A/B グラデーション 0.5ml/min
キャリアー MF	10%アセトニトリル(2mMクエン酸ナトリウム、5mM オクタンスルホン酸ナトリウム、pH6.5) 0.5ml/min
反応液D	硫酸 0.75ml/min
反応条件	反応コイル 0.25mmi .d.×2.5m(タテロン)、反応温度115℃
検出器	レーザー蛍光検出器 LF-8010 (TOSOH) 488nmAr (10mW), 537nmBPF
タイムプログラム	0.0 RV.A=0, B.CONC =0, T.FLOW =0.5
	7.0 RV.A=1
	15.0 RV.A=0
	15.0 B.CONC =0(アセトニトリル10%)
	20.0 B.CONC =27.7(アセトニトリル35%)
	36.0 B.CONC =27.7(アセトニトリル35%)
	37.0 B.CONC =0(アセトニトリル10%)
	37.0 STOP
前処理	唾液500 μ l+水500 μ l+MFキャリアー1ml (4倍希釈) →ろ過 (両用フィルター)
注入量	400 μ l
繰り返し回数	n = 1

表4-1.8 蛋白成分分析のHPLC条件および前処理

カラム	CAPCELL PAK C8 ϕ 4.6mm ×35mm
カラム温度	40℃
キャリアー	A液:0.1%TFA/水、B液:0.085%TFA/アセトニトリル、B:15→60%(15分間)
流速	1.5ml/min
検出器	UV検出器 214nm
前処理	唾液500 μ l+水1ml (3倍希釈) →ろ過 (水系フィルター)
注入量	60 μ l
繰り返し回数	n = 1

1.4.1 個人の日間変動

被験者は、6名 (20代男女、30代男女、40代男女、各1名)。表4-1.9参照。

表4-1.9 被験者情報

No.	年齢	性別	氏名	備考	No.	年齢	性別	氏名	備考
6	20代	男	M.T.		24	30代	女	M.F.	
12	20代	女	N.J.		29	40代	男	Y.S.	
18	30代	男	Y.S.		31	40代	女	K.T.	

採取日は、日常値を測定するため、期間の中から平均的な生活パターンの日を選択してもらい、当日のスポーツ（昼休み、就業後）や多量の飲酒、前日の多量の飲酒や徹夜など（翌日に影響のあること）は禁止した。また、5日間は連続でなくてもよいことにした。

記録用紙をつくり、当日及び前日の生活記録（起床、出宅、出社、退社、帰宅、就寝時間）と当日の主な業務内容（実験、書類作成など、2時間単位くらいで）を記録し提出してもらった。この記録紙から5日間の生活パターンと、それが一定かどうかの確認をし、定量値で異常があった場合の参考とした。

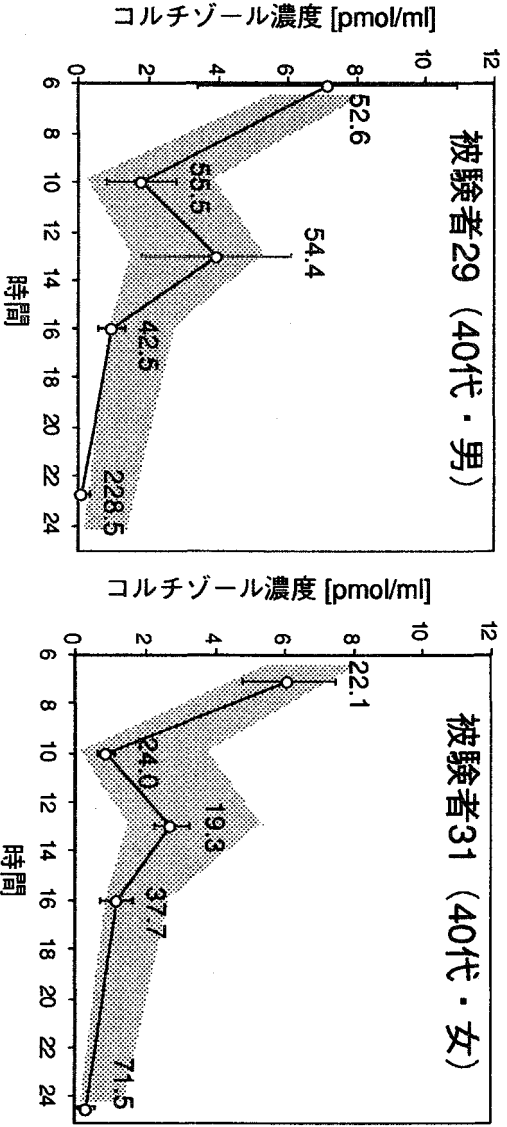
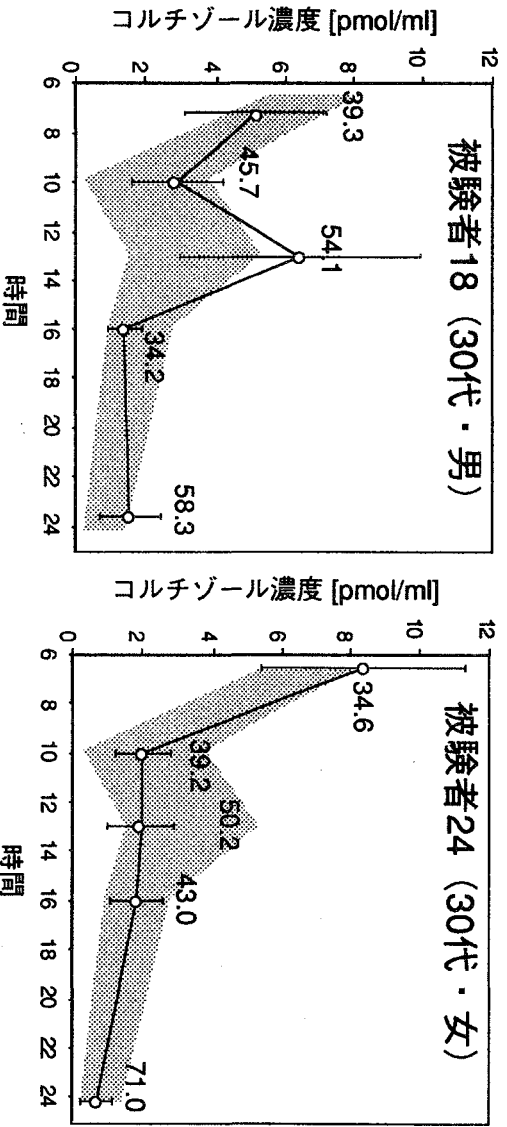
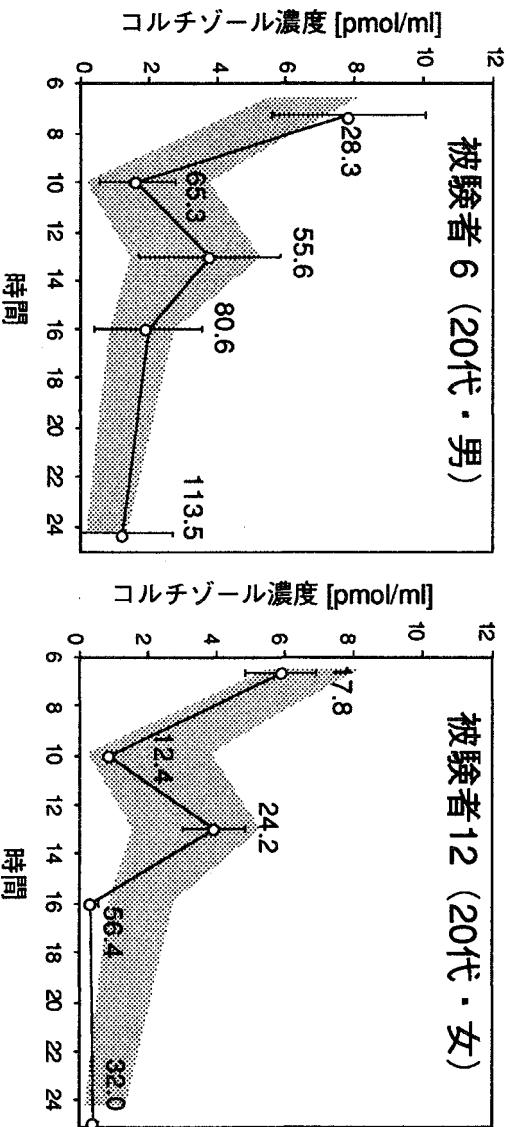
得られた測定値から最大値、最小値の棄却検定によって異常値を検出した。棄却検定にはDixonの検定（ $p < 0.05$ ）を使用した。同一人、同一時点（データ数5）で検定した結果、異常値は2個検出された。しかし、異常値と記録との関連は特に認められず、棄却は行わなかった。

5日間の日間変動の測定結果（6名）を表4-1.10、図4-1.39に示した。図4-1.40には5日間の日間変動（健常人1名）を示した文献値を示した^{4-1.4)}。

表4-1.10 CSの日間変動

		コルチゾール濃度 [pmol/ml]						
		被験者6	被験者12	被験者18	被験者24	被験者29	被験者31	6名平均
起床後	av.	5.19	7.15	6.11	8.36	5.91	7.87	6.76
	SD	2.04	3.77	1.35	2.90	1.05	2.22	1.23
	cv%	39.3	52.6	22.1	34.6	17.8	28.3	18.2
10:00	av.	2.87	1.77	0.87	2.00	0.87	1.66	1.67
	SD	1.31	0.98	0.21	0.79	0.11	1.09	0.75
	cv%	45.7	55.5	24.0	39.2	12.4	65.3	44.9
13:00	av.	6.45	3.95	2.73	1.94	3.90	3.77	3.79
	SD	3.49	2.15	0.53	0.97	0.94	2.09	1.53
	cv%	54.1	54.4	19.3	50.2	24.2	55.6	40.3
16:00	av.	1.39	0.94	1.18	1.82	0.34	1.96	1.27
	SD	0.47	0.40	0.44	0.78	0.19	1.58	0.59
	cv%	34.2	42.5	37.7	43.0	56.4	80.6	46.8
就寝前	av.	1.53	0.10	0.30	0.66	0.40	1.26	0.71
	SD	0.89	0.23	0.21	0.47	0.13	1.44	0.57
	cv%	58.3	228.5	71.5	71.0	32.0	113.5	80.2

図4-1.39に示すように、同一人においては日間でパターンがあまり変化しないことが確認された。同一人、同一時点でのSDは表4-1.9に示すように被験者によって異なるが、時間で比較すると変動の大きい起床後と食事の影響の考えられる13:00がやや大きい傾向が認められた。この起床後と13:00を除いて考えればSDで約0~1であり、グラフ内に示したCV%（ただし、11:00はデータ数2、14:00と20:00はデータ数4）で文献値と比較すると、データ数の少ない11:00と22:00を除き同程度かやや大きかった。したがって、個人のある時間の日常値データがあれば、測定値がその平均値+1SDより十分大きいとき異常値とみなすことができ、1回の測定で異常値を検知できると考えられた。



* 5日間の平均値±1SD, 数字はCV%
 * は36名の個人差の平均値±1SD

図4-1.39 CSの日間変動

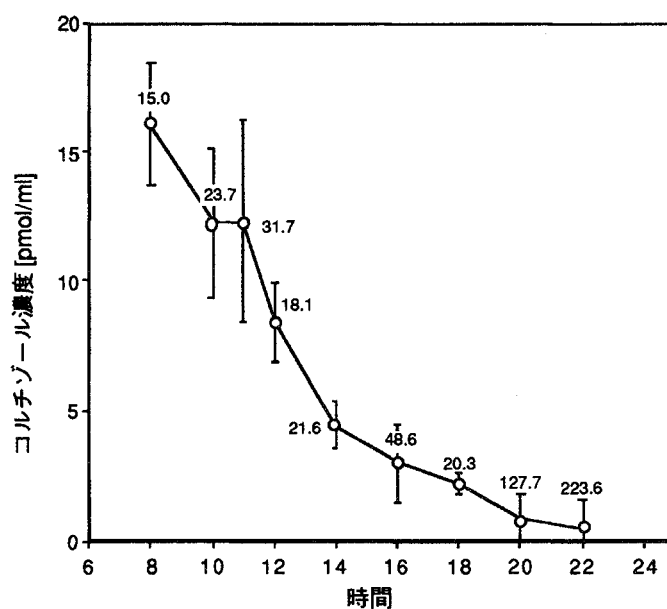


図4-1.40 唾液中CSの5日間の日間変動（健常人1名）

1.4.2 拡大実験（36名）と結果の解析

(1) 実験デザイン及び測定値、並びにクロマトグラム

採取時間は1日3回（10:00、13:00、16:00）、採取日数は1日（94年2月1日～94年2月10日の勤務日より任意の下記条件に合致する日を選択）とした。被験者は36名であった（表4-1.11参照）。

表4-1.11 被験者情報

20代				30代				40代				50代			
性別	No.	氏名	備考	性別	No.	氏名	備考	性別	No.	氏名	備考	性別	No.	氏名	備考
男	1	N.H.		男	13	T.T.		男	25	A.Y.		男	32	H.F.	
	2	N.S.			14	T.N.			26	E.H.			33	M.K.	
	3	T.H.			15	S.Y.			27	F.S.			34	T.T.	
	4	S.K.			16	H.K.			28	Y.K.					
	5	K.T.			17	A.M.			29	Y.S.	*				
	6	M.T.	*		18	Y.S.	*								
小計	6名			6名				5名				3名			
女	7	N.E.		女	19	I.R.		女	30	N.M.		女	35	S.T.	
	8	T.M.			20	S.M.			31	K.T.	*		36	A.Y.	
	9	M.M.			21	Y.K.									
	10	W.A.			22	T.H.									
	11	K.A.			23	M.J.									
	12	N.J.	*		24	M.F.	*								
小計	6名			6名				2名				2名			
合計	12名			12名				7名				5名			

採取日は、日常値を測定するため、期間の中から平均的な生活パターンの日を選択してもらい、当日のスボーツ（昼休み、就業後）や多量の飲酒、前日の多量の飲酒や徹夜など（翌日に影響のあること）は禁止した。

記録用紙をつくり、当日及び前日の生活記録（起床、出宅、出社、退社、帰宅、就寝時間）と当日の主な業務内容（実験、書類作成など、2時間単位くらいで）を記録し提出してもらった。この記録紙から生活パターンの確認をし、定量値で異常があった場合の参考とした。

表中の*印の6名は1.4.1の日間変動を測定した6名であり、5日間の平均値を一人分のデータとして使用した。したがって、起床後、就寝前は6名分（30測定値/1時点）、10:00、13:00、16:00は36名分（60測定値/1時点）のデータとなる。

得られた測定値から最大値、最小値の棄却検定によって異常値を検出した。棄却検定にはDixonの検定（ $p < 0.05$ ）を使用した。同一時点（データ数36）で検定した結果、異常値は検出されず、棄却は行わなかった。

CS、蛋白成分の代表的なクロマトグラムを図4-1.41に示した。

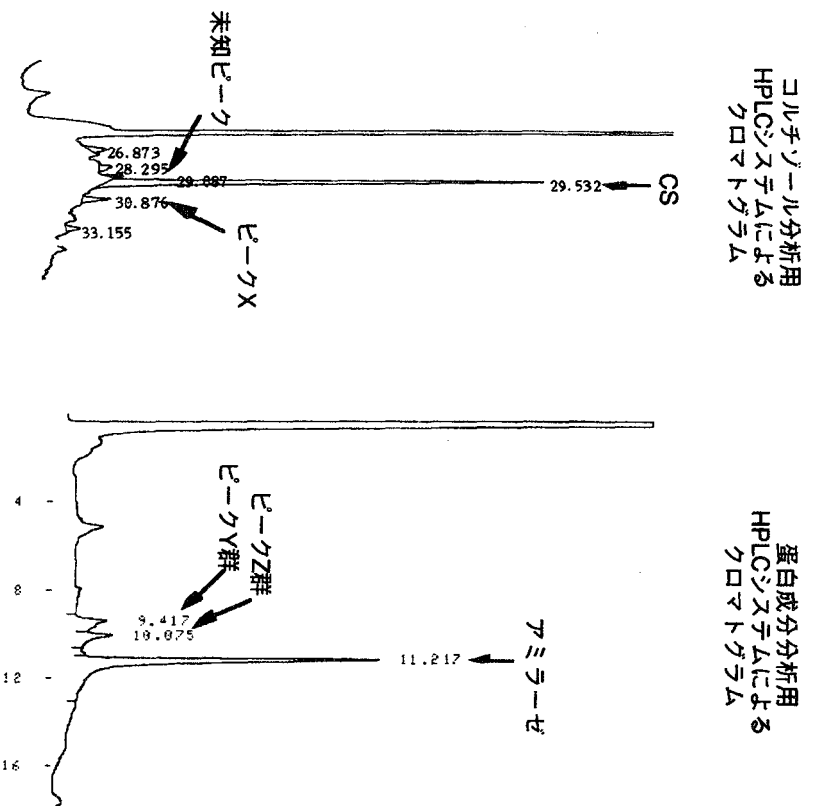


図4-1.41 CS、蛋白成分の代表的なクロマトグラム

- (2) 日内変動、年齢差、性差、個人差（標準偏差）等の結果解析と文献値等からの考察
- a. 日内変動

36名（起床後と就寝前は6名）の日内変動、個人間変動の測定結果を表4-1.12、図

4-1.42に示した。

表4-1.12 CSの日内変動、個人間変動

	コルチゾール濃度 [pmol/ml]				
	起床後(n=6)	10:00(n=36)	13:00(n=36)	16:00(n=36)	就寝前(n=6)
av.	6.76	1.91	3.33	1.74	0.71
SD	1.23	1.73	1.86	0.89	0.57
cv%	18.2	90.5	56.0	51.1	80.2

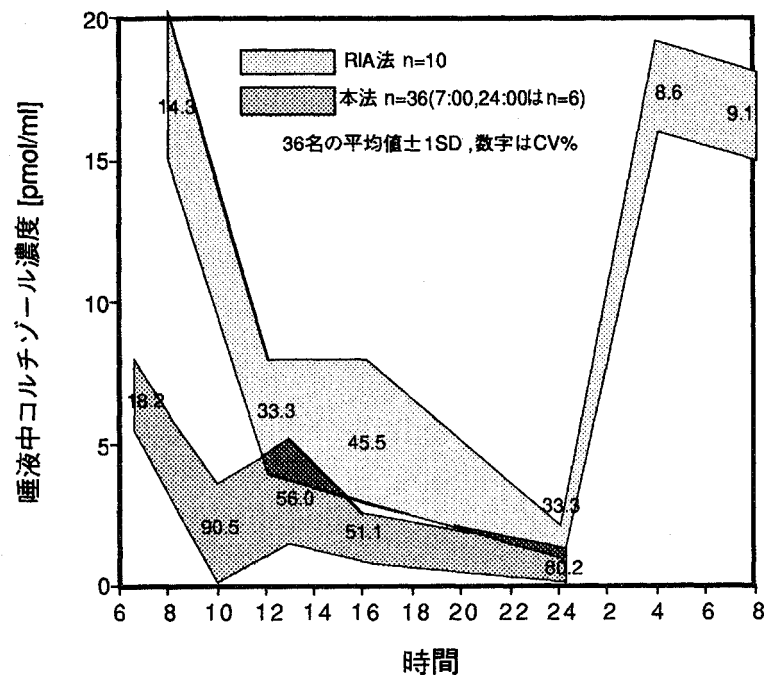


図4-1.42 CSの日内変動

図4-1.42内にはRIA法により測定した10名の日内変動の文献値^{4-1.4)}も同時に示した。起床後最大値(5~10pmol/ml)をとった後、減少し(1~3pmol/ml)、夕方から就寝前まで一定状態(0~2pmol/ml)に入るというパターン(サーカディアンリズム)が確認され、文献のパターンとほぼ一致した。また、ほとんどの被験者で13:00に再び上昇する(2~6pmol/ml)現象が認められた。個々の測定値をみると、この13:00が起床後より高い値をとる例もあり、逆にこの上昇が認められなかった(10:00から13:00にかけて減少している)例は36名中6名(被験者3, 14, 24, 27, 28, 32)だった。食事をとった後、消化に使われる胃酸の分泌を促進するためにCSが分泌されることが知られており^{4-1.5)}、これはその影響と考えられた。作業負荷による血漿中CS濃度の変化を食事時間とともに示した文献^{4-1.6)}を図4-1.43に示したが、コントロールをみると、食事開始後約30分から上昇し、起床後約1時間と同程度まで上昇し、約2時間後にもとの濃度にもどっている。この場合は血漿中だが、唾液中でも同様と考えられる。一方、本実験での食事の制限は採取30分前以降は飲食禁止としているので、13:00では食後30分以上経っていることになるが、昼食の影響がでて

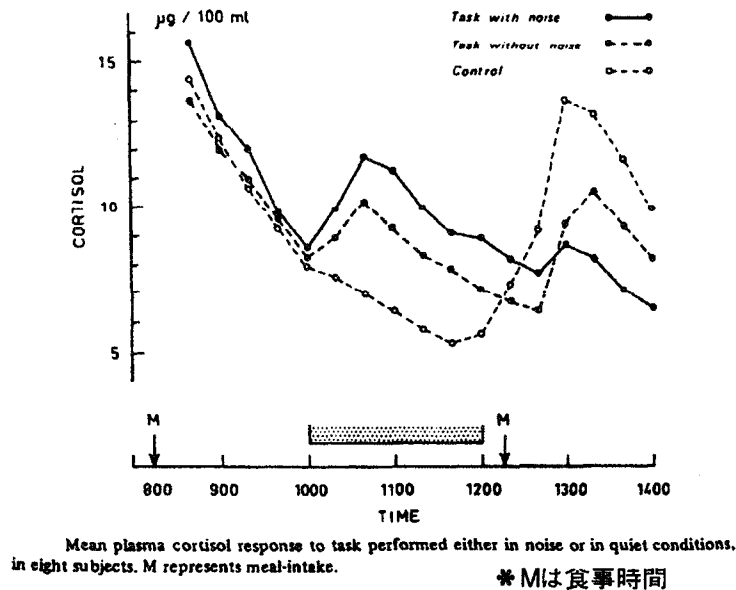


図4-1.43 作業負荷時の血漿中CS濃度の変化

いると考えられた。この上昇のなかった6名に確認したところ、全員昼食をとっていた。また、被験者24については5日間のデータをとっているが、5日のうち2日は若干上昇が認められたものの5日間のパターンはほとんど一定であった。しかしながら、5日間とも昼食をとっていることから、昼食の影響がどうかは被験者によるものと考えられた。なお、図4-1.42内の文献結果では12:00と16:00に測定しているために、昼食の影響がでなかったと考えられた。したがって、採取時間を食事の前か食事開始後2時間程度以上にすれば、食事の影響をなくして本来の日内変動が得られると考えられた。

また、唾液中CS濃度の文献値を表4-1.13にまとめ^{4-1.7) ~ 4-1.11)}、同時間での本法との定量値の差を示した。文献値は本法より高い値をとっているが、文献値はRIAで測定しており、RIAではコルチゾン等の唾液中に共存する類似のステロイドとの交差反応が確認されている^{4-1.12)}ので、これはその影響と考えられる。RIAでのコルチゾンの交差反応率は約30%と報告されており^{4-1.13)}、これを考慮すると起床後の約10pmolの差はコルチゾンの約30pmolに相当し、報告されている唾液中のコルチゾン濃度、約15~30pmol/ml^{4-1.14) ~ 4-1.16)}とだいたい一致している。また、この差を時間ごとにみると^{4-1.4)}、起床後では約10pmolだが、この差は一定に保たれているわけではなく、時間とともに小さくなっており、このことはコルチゾンにも日内変動があることを示唆している。唾液中コルチゾン濃度を午前と午後で測定している報告があり^{4-1.14)}、この測定値は午前で約30pmol/ml、午後で約15pmol/ml程度となっている。したがって、唾液腺を経て唾液中に放出されたCSがコルチゾンに更に転換することなく、またストレスでコルチゾンが変化しないと考えれば、コルチゾン濃度に影響されない本法は、唾液中にCSの約2倍以上存在するコルチゾンの日内変動を含めてとらえないため、より正確に唾液中CS濃度からストレス検知ができるといえる。しかしながら、

コルチゾンがRIA法（本研究で使用する）に及ぼす影響、並びにコルチゾンの日内変動及びストレス負荷時の変化等は明らかではなく、現在のRIA法ではコルチゾンの交差反応率は低いとも言われており、これらは今後の研究課題ともなろう。また、本法へのコルチゾンの影響は以前に感度比では約1/4000であることが確認されているが、実際の試料にコルチゾンを添加して再測定することも必要と考えられる。本法でコルチゾンを検出するにはポストカラム反応（硫酸の添加）前にUV検出器を通過させる方法が考えられるが、実際にはかなり背圧がかかりセルの破損等につながるものと予想される。したがって、コルチゾンの測定には他の方法を検討する必要があるだろう。

表4-1.13 唾液中CS濃度の文献値 (pmol/ml)

採取時間	文献値 (RIA)			同時間での本法との定量値の差*
	被験者	文献番号	定量値	
早朝	9名男性	8	10.99	4.23(起床後と比較)
早朝	37名男性	9	12.90	6.14 (%)
早朝	34名女性	9	13.70	6.94 (%)
早朝	105名子供	9	12.29	5.53 (%)
早朝	19名男性	10	11.30	4.54 (%)
早朝	45名女性	10	14.01	7.25 (%)
早朝	19名男性	11	11.24	4.48 (%)
早朝	29名女性	11	15.47	8.71 (%)
8:00	10名成人	4	17.5	10.74 (%)
10:00	9名成人	7	4.33	2.42
12:00	10名成人	4	6.0	2.67 (13:00と比較)
16:00	%	4	5.5	3.76
20:00	%	4	3.5	2.79(就寝前と比較)
24:00	%	4	1.5	0.79 (%)
4:00	%	4	17.5	—
			定量値合計	平均値
早朝	男性	84名	1004.47	11.96
	女性	108名	1544.88	14.30
* 本法 (HPLC、36名男女) の定量値				
起床後	6.76pmol/ml			
10:00	1.91pmol/ml			
13:00	3.33pmol/ml			
16:00	1.74pmol/ml			
就寝前	0.71pmol/ml			

b. 年齢差、性差

年齢別、男女別の同一時点での平均値、SD、CV%を表4-1.14、図4-1.44に、各グループの差の検定 (t検定) の結果を表4-1.15に示した。男女別では女性の方が10:00、13:00でやや低い傾向があるが、統計的に有意 ($p<0.05$, t検定) な差はなかった。年齢別でも統計的に有意 ($p<0.05$, t検定) な差はなかった。表4-1.11に示した早朝データを集計し、男女別の総平均値を求めて比較すると、それぞれ11.96pmol/ml (男性)、14.30pmol/ml (女性) と女性がかなり高い数字となった。本法による結果とは相反する結果となったが、早朝と日中の違いもあり、また、ストレス検知が日中に行われるであることを考えると、今回の実験の範囲では年齢、男女別にそれぞれの日常値を設定する必要はないと結論できた。念のため、5日間の日間変動をみたデータを総平均し男女別に早朝データを比較したが、それぞれ6.74pmol/ml (男性)、6.79pmol/ml (女性) となり、顕著な差は認められなかった。ただし、女性の場合、妊娠期に徐々に増加するという報告^{4-1.13)}、^{4-1.14)}もあるため、性周期との関連については検討する必要がある。

表4-1.14 年齢別、男女別のCSS測定結果

	総平均	20代	30代	40代	50代	男	女
10:00av.	1.91	1.40	1.74	2.28	3.04	2.65	1.00
SD	1.73	1.17	1.88	1.92	2.13	1.96	0.74
CV%	90.54	83.96	107.77	84.21	69.84	73.95	74.06
13:00av.	3.33	3.64	2.98	2.87	4.09	3.63	2.97
SD	1.86	2.28	1.60	1.25	2.24	2.34	0.97
CV%	55.95	62.59	53.78	43.58	54.76	64.47	32.63
16:00av.	1.74	1.40	2.15	1.67	1.64	1.76	1.72
SD	0.89	1.06	0.92	0.58	0.33	0.65	1.14
CV%	51.12	75.75	42.88	34.37	20.18	36.97	66.66

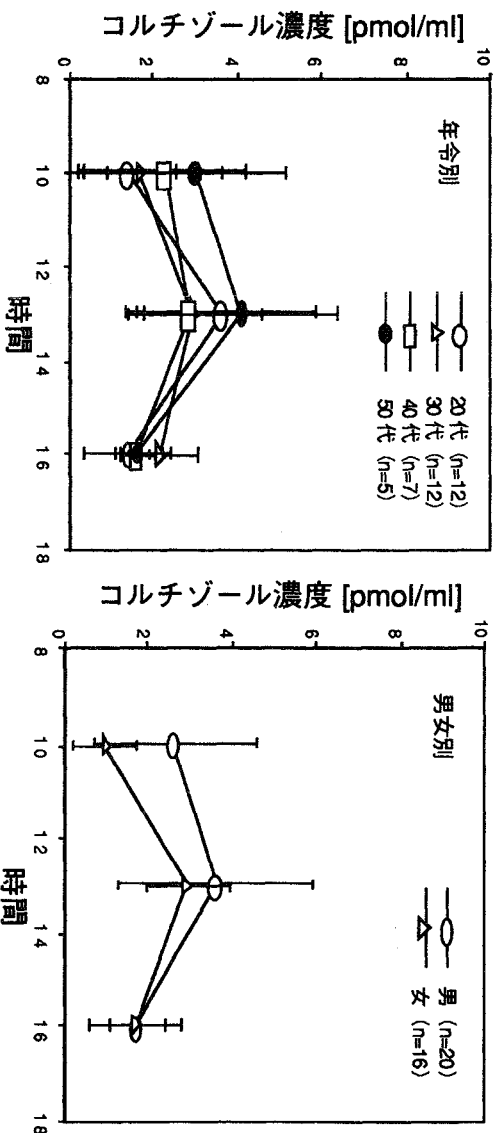


図4-1.44 年齢別、男女別のCSS測定結果

表4-1.15 年齢差、性差の検定結果 (t検定、 $p < 0.05$)

	T ($p < 0.05$)	検定結果		
		10:00	13:00	16:00
男性と女性	2.03			
〃	2.44*	3.18	1.05	0.14
〃	2.73**			
20代と30代	2.07	0.54	0.81	1.83
20代と40代	2.11	1.25	0.82	0.62
20代と50代	2.13	2.07	0.38	0.49
30代と40代	2.11	0.59	0.16	1.22
30代と50代	2.13	1.25	1.16	1.17
40代と50代	2.23	0.65	1.22	0.11

* $p < 0.02$ ** $p < 0.01$

c. 個人差 (標準偏差)

36名の個人間のバラつきは表4-1.12に示すようにSDで約1~2であり、図4-1.42内の文献の10人のSDの0.5~2.5と比較しても同程度だった。したがって、ある時間の測定値がその時間の平均値+1SDより十分大きければ異常値とみなすことができ、連続測定ではなく、またコントロールをとらない1回の測定で異常値を検知できると考えられた。たとえば、10:00の36名の測定値は平均値1.91pmol/ml, SD1.73なので、10:00の測定値が3.64pmol/ml (平均値+1SD) より十分大きければ異常値とみなすことができると考えられる。また、1.4.1の日間のバラつき (起床後、10:00、13:00、16:00、就寝前の5測定値/1時点) をこの個人間のバラつき (10:00、13:00、16:00の36測定値/1時点) と比較すると、10:00、13:00ではかなり小さく、16:00ではほぼ同程度になった。したがって、個人の10:00、13:00の日常値データがあればより明確に異常値を検出できると考えられた。

1.4.3 日内変動の平準化 (標準化) の検討

CSには1.4.1, 1.4.2に示したように日内変動があり、標準値といっても時間によるため、時間を決めて測定する必要がある。そこで、1.4.1、1.4.2の測定結果を使って平準化 (標準化) の検討を行った。即ち、日内変動を相殺して平滑化するために、CSと同じ日内変動をもつものを検索した。このようなもので補正すると日内で一定の標準値が決まり、時間を決めて測定する必要がなくなると考えられる。

一方、CSの個人間のバラつき、日間のバラつきはCV%で約20~80%とやや大きく、このバラつきが小さくなればより明確な異常値検知ができると考えられる。このようなバラつきは、唾液分泌速度の変動で唾液中CS濃度が変化するために生じている可能性もある。そこで、尿中のクレアチニンに相当するような唾液分泌指標となるようなものを検索した。これで補正すると唾液分泌速度の影響が無視でき、結果としてCSの値のバラツキが小さくなると予想し、その挙動をみた。勿論、これらの標準化指標はストレスなどのCS変動要因で動かないことが前提となる。

(1) 対象ピークの決定

CS、蛋白成分の代表的なクロマトグラムはそれぞれ図4-1.41に示すようであり、CSの他に、被験者、時刻に関わらず高頻度に溶出する標準化指標の候補として、CS

の直前に溶出する未知ピーク (UN)、CSの約1.3分後に溶出するピークX (X)、アミラーゼ (AM)、アミラーゼの前に溶出する蛋白成分ピークY群 (Y)、ピークZ群 (Z)、3つの蛋白成分の和 (Y+Z+AM, (AM')) を対象ピークとして選択し、この6つの成分について整理し解析した。

なお、CS以外の成分は標準品がないため定量はできないが、UNとXについてはCSの各測定日の検量線式、Y、Z、AMについては蛋白質標準溶液(リボヌクレアーゼ (RBN)、チトクロームC (Cyt)、リゾチーム (Lys)、牛血清アルブミン (BSA)、ミオグロビン (Myo)、オブアルブミン (OVA) 各0.16mg/ml、20 μ l、クロマトグラムを図4-1.45に示した)の各測定日のピーク面積から、各測定日の感度がほとんど一定であることを確認し、ピーク面積値で解析することにした。

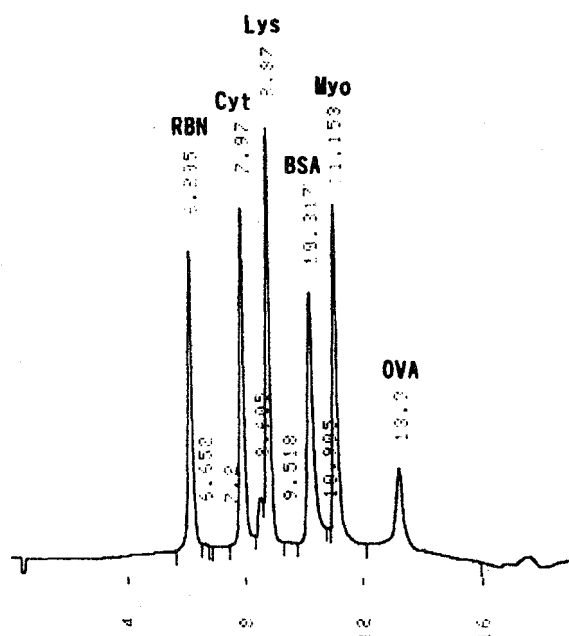


図4-1.45 蛋白質標準溶液のクロマトグラム

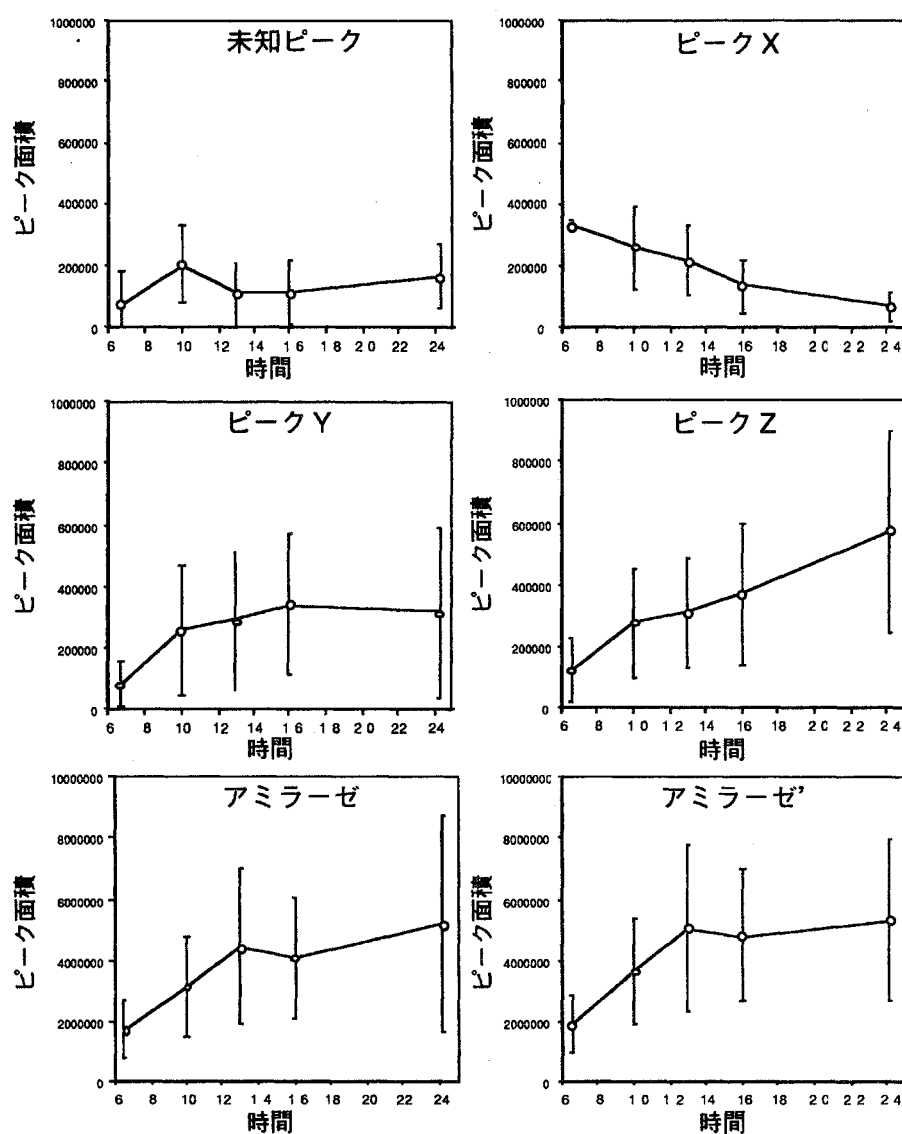
(2) 対象ピークの日内変動、日間変動、個人差

36名(起床後と就寝前は6名)の日内変動、個人間変動の測定結果を表4-1.16、図4-1.46に、日間変動の代表例として被験者24の5日間の日間変動の測定結果を表4-1.17に示した。未知ピークは量も少なく、検出感度の問題もあり、変動率が大きくなり、同一人でも検出されない場合もあった。しかしながら、日内ではほぼ一定の傾向を示した。ピークXは夜になるにつれて減少するCSに類似したパターンが確認された。一方、蛋白成分のピークY、ピークZ、AMは3者ともCSとは対照的に夜になるにつれて増加する傾向が認められた。個人間のバラつき、日間変動のバラつきは表4-1.16、表4-1.17に示すとおりであり、CSと比較してCV%が小さい傾向のあるものはなかった。

未知ピークの解析は、ピーク面積50000以下のものを0として36名全てについて解析を行っていたが、100000以下の被験者を除いて再解析した結果を表4-1.18に示した。再解析後は10:00、13:00、16:00とも、個人間のバラつきがかなり小さくなった。

表4-1.16 各対象ピークの日内変動、個人間変動

	CS[pmol/ml]	未知ピーク面積	ピークX面積	ピークY面積	ピークZ面積	AMピーク面積	Y+Z+AM
起床後 av.	6.76	71506	325800	81552	125014	1699011	(AM) 1905577
(n=6名) SD	1.23	111169	18861	74567	101222	909540	911631
cv%	18.2	155.5	5.8	91.4	81.0	53.5	47.8
10:00 av.	1.91	202359	257791	255684	275231	3109178	3640093
(n=36名) SD	1.73	123180	134501	208216	178059	1611983	1728785
cv%	90.5	60.9	52.2	81.4	64.7	51.8	47.5
13:00 av.	3.33	110980	214844	289118	307533	4410513	5007164
(n=36名) SD	1.86	96154	113483	220907	177937	2556382	2699377
cv%	56.0	86.6	52.8	76.4	57.9	58.0	53.9
16:00 av.	1.74	113546	134046	343702	372424	4067035	4783161
(n=36名) SD	0.89	100462	87706	227199	227999	1984909	2119610
cv%	51.1	88.5	65.4	66.1	61.2	48.8	44.3
就寝前 av.	0.71	165269	69015	312693	573372	5153746	5268922
(n=6名) SD	0.57	101829	47395	274471	329679	3529238	2601654
cv%	80.2	61.6	68.7	87.8	57.5	68.5	49.4



*36名の平均値±1SD

図4-1.46 各対象ピークの日内変動

表4-1.17 被験者24の各対象ピークの日間変動

	CS[pmol/ml]	未知ピーク面積	ピークX面積	ピークY面積	ピークZ面積	AMピーク面積	Y+Z+AM
起床後 av.	6.76	71506	325800	81552	125014	1699011	(AM) 1905577
(n=6名) SD	1.23	111169	18861	74567	101222	909540	911631
cv%	18.2	155.5	5.8	91.4	81.0	53.5	47.8
10:00 av.	1.91	202359	257791	255684	275231	3109178	3640093
(n=36名) SD	1.73	123180	134501	208216	178059	1611983	1728785
cv%	90.5	60.9	52.2	81.4	64.7	51.8	47.5
13:00 av.	3.33	110980	214844	289118	307533	4410513	5007164
(n=36名) SD	1.86	96154	113483	220907	177937	2556382	2699377
cv%	56.0	86.6	52.8	76.4	57.9	58.0	53.9
16:00 av.	1.74	113546	134046	343702	372424	4067035	4783161
(n=36名) SD	0.89	100462	87706	227199	227999	1984909	2119610
cv%	51.1	88.5	65.4	66.1	61.2	48.8	44.3
就寝前 av.	0.71	165269	69015	312693	573372	5153746	5268922
(n=6名) SD	0.57	101829	47395	274471	329679	3529238	2601654
cv%	80.2	61.6	68.7	87.8	57.5	68.5	49.4

表4-1.18 未知ピーク再解析結果

	未知ピーク面積			CS/未知*E6			CS*未知*E-5		
	10:00	13:00	16:00	10:00	13:00	16:00	10:00	13:00	16:00
再解析前	202359	110980	1.74	12.95	36.12	14.27	2.95	3.60	2.02
50000 以上	123180	96154	0.89	17.82	31.59	9.93	2.63	3.49	2.18
(n=36,36,36)	60.9	86.6	51.1	137.6	87.5	69.6	88.9	97.1	108.0
再解析後	243224	188951	176004	8.81	24.91	12.96	3.17	6.19	3.44
100000 以上	107123	78948	82256	12.54	21.43	9.21	2.57	3.34	2.20
(n=28,17,21)	44.0	41.8	46.7	142.3	86.0	71.1	81.1	53.9	64.1

(3) CSの標準化検討

日内変動の相殺の検討としては、蛋白成分がCSとは対照的に増加する傾向が認められたことから、まず、蛋白成分とCS濃度の積をとれば日内変動が平滑化されてカーブが直線に近付くと考えた。結果をAM, AM' を代表例として図4-1.47に示したが、この補正値は13:00で最高値をとり、13:00を除いて考えるとCSの日内変動のカーブよりやや緩やかなカーブになったものの、やはり夜になるにつれて減少するカーブは変わらなかった。しかしながら、早朝と夜の差は補正前の約10倍に比較し、2倍近くの差に減少したとも言える。また、昼食時の上昇を異常値と考え、(昼食時(13:00) / 日常値(10:00)) の比を比較すると、補正前1.74に比較し、補正後2.67 (AM), 2.59と、昼食の影響をより明確にとらえていると考えることもできた。なお、AM, AM' の日内変動に昼食による変化があまり認められないことも、CSの昼食時の上昇が唾液分泌速度の減少によるものではないことの裏付けになる。

次に、唾液分泌指標の検索として、各対象ピークの面積値を使って、CSとこれらの積と商を計算しその挙動をみた。36名の結果(個人間変動)を表4-1.19、6名の5日間の結果(日間変動)を表4-1.20に示した。CV%を比較するとCSと同程度かそれ以上で、日間のバラつきも、個人間のバラつきも小さくなることはなかった。また、未知ピークについては再解析後のピーク面積値を使った計算も行い、結果を表4-1.18に示したが、ピーク面積値のバラつきが小さくなったのに対し、積と商のバラつきは小さくならなかった。

したがって、CSでデータの標準化にはいたらなかった。ただし、未知ピークについては、今回は検出限界に近い感度でみているが、今後分離条件や検出感度をさらに

改善して測定すれば、日内ではほぼ一定の傾向を示しているので、唾液分泌の指標に使用できる可能性もあると考えられた。

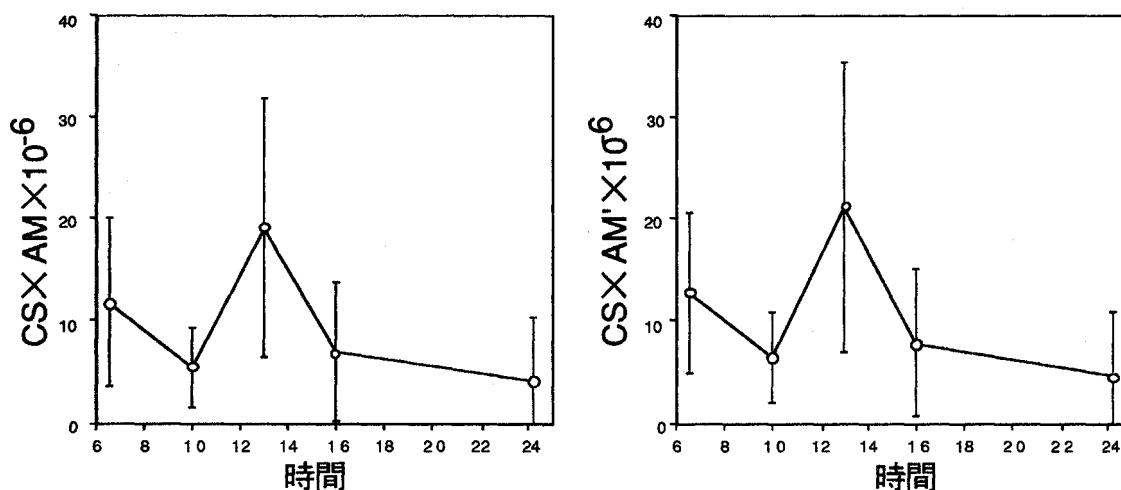


図4-1.47 蛋白成分の面積値とCS濃度の積

表4-1.19 各対象ピークとCS濃度の積および商（個人間変動）

CS/UN *E6	CS*UN *E-5	CS/X *E6	CS*X *E-5	CS/Y *E6	CS*Y *E-5	CS/Z *E6	CS*Z *E-5	CS/AM *E7	CS*AM *E-6	CS/AM' *E7	CS*AM' *E-6
12.95	2.95	7.34	6.06	18.42	4.70	10.82	5.02	8.98	5.71	7.12	6.68
17.82	2.63	5.66	7.81	24.15	5.73	13.01	4.68	11.87	5.44	8.57	6.02
137.6	88.9	77.0	129.0	131.1	121.8	120.2	93.3	132.2	95.3	120.3	90.1
36.12	3.60	16.52	8.62	19.11	9.74	13.49	10.98	10.00	15.26	8.32	17.33
31.59	3.49	7.38	10.56	15.03	9.43	8.04	9.96	7.28	14.06	5.58	15.28
87.5	97.1	44.7	122.5	78.6	96.9	59.6	90.7	72.8	92.1	67.1	88.2
14.27	2.02	13.50	2.39	12.44	5.91	6.43	6.82	5.66	6.96	4.53	8.23
9.93	2.18	9.05	1.78	24.76	5.20	4.50	5.96	4.34	4.92	3.17	5.54
69.6	108.0	67.0	74.5	199.1	88.0	70.0	87.4	76.7	70.6	69.8	67.3

表4-1.20 被験者24の各対象ピークとCS濃度の積および商（日間変動）

CS/UN *E6	CS*UN *E-5	CS/X *E6	CS*X *E-5	CS/Y *E6	CS*Y *E-5	CS/Z *E6	CS*Z *E-5	CS/AM *E7	CS*AM *E-6	CS/AM' *E7	CS*AM' *E-6
34.01	21.86	25.88	27.23		0.00	122.69	2.36	356.81	2.21	313.69	2.45
15.40	8.21	7.70	11.20		0.00	81.37	2.26	155.25	1.32	161.60	1.21
45.3	37.6	29.8	41.1			66.3	95.9	43.5	59.6	51.5	49.7
4.70	8.81	7.37	5.67	33.97	1.00	15.99	3.09	23.49	2.19	17.83	2.60
1.89	3.87	1.81	2.90	17.27	0.95	10.78	2.19	15.33	1.87	9.04	1.90
40.2	44.0	24.6	51.1	50.8	94.8	67.4	70.8	65.2	85.5	50.7	73.3
5.88	6.83	11.86	3.21	15.11	2.40	8.88	4.58	18.47	2.45	13.54	3.14
4.02	3.13	7.10	1.28	7.53	1.97	5.27	2.15	16.73	0.63	11.09	0.90
68.3	45.9	59.9	39.9	49.8	81.9	59.4	46.8	90.6	25.7	81.9	28.5
4.96	6.71	11.61	2.92	38.93	1.56	10.69	3.70	18.32	1.93	14.69	2.46
1.94	3.23	4.30	1.44	51.42	0.95	7.53	1.22	10.70	0.67	9.21	0.78
39.1	48.2	37.1	49.2	132.1	61.3	70.4	32.9	58.4	34.9	62.7	31.6
1.74	2.64	5.84	0.98	7.67	1.21	1.57	6.20	6.33	0.80	3.75	1.54
0.96	2.42	1.83	1.33	9.02	1.44	2.16	8.94	3.95	0.75	3.17	1.76
55.4	91.7	31.4	135.7	117.5	118.9	137.4	144.1	62.4	93.2	84.6	114.0

1.4.4 唾液分泌速度との関連検討

1.4.3 で示したようにCSデータの標準化は困難だった。一方、ストレスがかかると唾液分泌が抑制される、たとえば緊張して唾液が出にくくなるというようなことは日常によく経験することであるが、それによってCS濃度が上昇する可能性が考えられる。そこで唾液分泌速度とCS濃度の関係を詳細に検討した。

表4-1.21に被験者を示した。

4分間で唾液がサリベットの飽和量を超えていると感じた被験者（6名中3名）については、分泌量が正確に測定できない可能性があるので、採取時間を3分間に変更した。

表4-1.21 被験者情報

	年齢	性別	氏名	備考
A	30代	男	Y.S.	採取時間3分
B	40代	男	Y.S.	
C	30代	男	O.T.	
D	20代	女	N.E.	採取時間3分
E	20代	女	T.M.	試料不足のため1回測定
F	20代	女	T.M.	採取時間3分
採取時間	1日3回（10：00、13：00、16：00） 正確に4分間			
採取日数	1日			

1つの唾液試料から2つの試料溶液を調製して測定し、2回の平均値から唾液分泌速度（容量）とCS濃度を求めた。被験者Eは試料不足のため1回測定した。

唾液分泌速度は重量と容量から測定した。重量は採取後の重量からサリベットの重量を差し引いて求めた。容量の測定は、サリベットで採取して得られた唾液に一定量の内部標準を添加し、あらかじめ既知の容量の水に内部標準を添加したときの検量線より計算して求めた。内部標準にはCC100pmol/ml 100 μ l（10pmol）を用いたが、CCは約30分（CSの約4.0分後）に溶出し、唾液中の成分やサリベットの妨害成分と重ならないことを確認した。

分泌速度の測定結果を表4-1.22、図4-1.48に示した。重量からの計算結果と容量からの計算結果ではほとんど差がないことを確認した。分泌速度は被験者によってかなり差があり、0.1～1.2ml/min、CV%で50～70%と、CS濃度の個人差より大きかった。6名の平均は0.5ml/min程度で、1ml採取するのに約2分だった。また、同一人では日内でほとんど一定であり、CV%で10～30%だった。

表4-1.22-1 唾液分泌速度[g/min]の測定結果

	分泌速度[g/min]					
	10:00	13:00	16:00	1日の平均値	SD	CV%
被験者A M,30	0.7350	0.7492	0.9881	0.8241	0.1422	17.3
被験者B M,40	0.6711	0.5018	0.5028	0.5585	0.0975	17.5
被験者C M,30	0.4260	0.6373	0.6059	0.5564	0.1140	20.5
被験者D F,20	0.3863	0.4345	0.7962	0.5390	0.2240	41.6
被験者E F,20	0.2264	0.1382	0.1788	0.1811	0.0442	24.4
被験者F F,20	1.3044	1.0348	1.2782	1.2058	0.1487	12.3
6名の平均値	0.6249	0.5826	0.7250	0.6442		
SD	0.3824	0.3037	0.3853	0.3430		
CV%	61.2	52.1	53.1	53.2		

表4-1.22-2 唾液分泌速度[ml/min]の測定結果

	分泌速度[ml/min]					
	10:00	13:00	16:00	1日の平均値	SD	CV%
被験者A M,30	0.7389	0.7467	0.9693	0.8183	0.1308	16.0
被験者B M,40	0.6836	0.4583	0.4595	0.5338	0.1297	24.3
被験者C M,30	0.3742	0.5908	0.6234	0.5295	0.1354	25.6
被験者D F,20	0.3118	0.3545	0.8703	0.5122	0.3109	60.7
被験者E F,20	0.1655	0.0841	0.1236	0.1244	0.0407	32.7
被験者F F,20	1.3994	0.9711	1.3566	1.2424	0.2359	19.0
6名の平均値	0.6122	0.5343	0.7338	0.6268		
SD	0.4443	0.3098	0.4294	0.3740		
CV%	72.6	58.0	58.5	59.7		

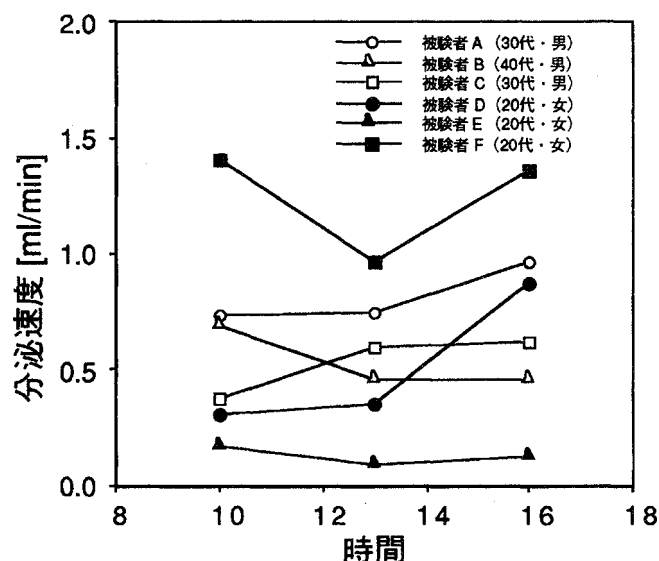


図4-1.48 唾液分泌速度の変化

CS濃度 (pmol/ml) の測定結果を表4-1.23、図4-1.49に、(CS濃度 [pmol/ml] ×分泌速度 [ml/min]) を表4-1.24に示した。CS濃度は36名の日常値測定の実験結果と同様に13:00に上昇するパターンが認められ、測定値もほとんど36名の実験結果の範囲だったが、13:00の被験者Bで平均値±1SDの範囲をやや下回り、食事の影響がなかった例と考えられた。また、(CS濃度×分泌速度)のバラつきはCS濃度のバラつきより小さくなることはなく、CS濃度と分泌速度に相関がないことが予想された。

表4-1.23 CS濃度の測定結果

	CS濃度[pmol/ml]		
	10:00	13:00	16:00
被験者A M,30	1.2384	3.2509	0.4306
被験者B M,40	1.0134	1.4153	0.8498
被験者C M,30	1.1598	1.5442	0.6497
被験者D F,20	0.9661	3.0509	1.0777
被験者E F,20	1.2465	3.3773	0.9477
被験者F F,20	1.0775	2.6553	1.0106
6名の平均値	1.1169	2.5490	0.8277
SD	0.1170	0.8645	0.2450
CV%	10.5	33.9	29.6

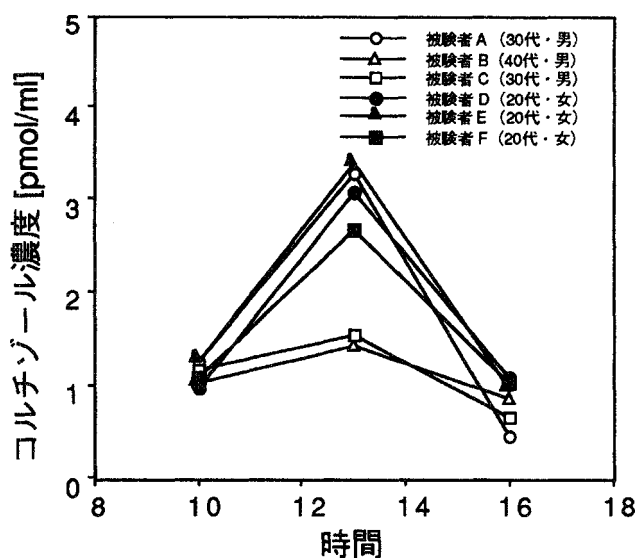


図4-1.49 CS濃度の変化

表4-1.24 CS濃度*分泌速度の測定結果

	CS濃度[pmol/ml]*分泌速度[ml/min]		
	10:00	13:00	16:00
被験者A M,30	0.9150	2.4274	0.4174
被験者B M,40	0.6927	0.6486	0.3905
被験者C M,30	0.4340	0.9123	0.4050
被験者D F,20	0.3012	1.0816	0.9379
被験者E F,20	0.2063	0.2841	0.1171
被験者F F,20	1.5079	2.5785	1.3709
6名の平均値	0.6762	1.3221	0.6065
SD	0.4835	0.9547	0.4597
CV%	71.5	72.2	75.8

次に、分泌速度に対するCS濃度をプロットし、時間ごとに近似式を求めた結果を図4-1.50に示した。相関係数はほとんど0に近く、分泌速度とCS濃度に相関はなかった。したがって、CS濃度は分泌速度に影響をされず、唾液分泌速度が下がってCS濃度が上昇しているという可能性はないことが分かった。このとき、未知ピークについてはピーク面積100000前後で詳細な解析はできなかったが、被験者Eと被験者Fで唾液分泌速度に約10倍の差があるのに対し、未知ピーク面積は同程度だった。また、唾液中のCS濃度が分泌速度によらず一定であるという知見は、唾液腺が血液のフィルターで唾液が血液の一種のろ液である^{4-1.14}という考えを裏付けるものといえる。

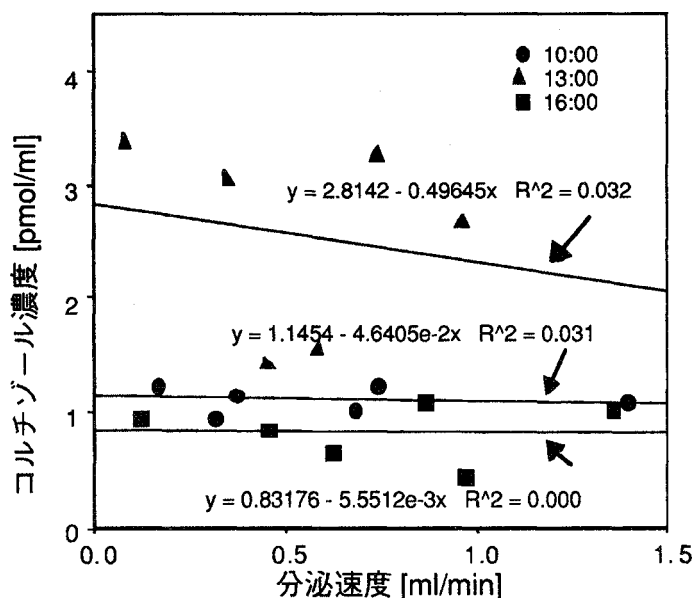


図4-1.50 唾液分泌速度とCS濃度の関係

1.4.5 まとめ

唾液中CSには日内変動があり、平均値0.71（就寝前）～6.76pmol/ml（起床後）、SDで約1～2pmol/mlの個人差、約0～1pmol/mlの日間変動があることが分かった。したがって、ストレスの検知をCS濃度の変化で判断する場合には、これ以上にCS濃度が上昇する必要があり、そのようなストレスのみが検知可能と考えられた。日常値には年齢差や性差は認められず、年齢、男女別にそれぞれの日常値を設定する必要はないことを確認した。また、CS濃度は分泌速度に影響をされず、ストレス負荷時には唾液が出にくくなった結果としてCS濃度が高くなっている、という可能性は否定された。

残された課題としては、CSデータの標準化については①未知ピークの分離条件や検出感度を改善して唾液分泌の指標に使用する検討、また、日常値に性差は認められなかったが②女性の性周期との関連の確認、コルチゾンについては、③コルチゾンの日内変動及びストレス負荷時の変化の確認、④コルチゾンがRIA法に及ぼす影響の確認（交差反応率の測定）、⑤本法へのコルチゾンの影響の確認（コルチゾンを添加した実際の試料を測定）、また、コルチゾンの測定が必要であれば、⑥本法でコルチゾンを検出する方法（UV検出など）の検討などが挙げられる。

1.5 唾液中CAのバックグラウンド

1.5.1 小規模実験での唾液中CA濃度の確認

前年度行った予備的な唾液中CAの測定において図4-1.51に示すクロマトグラムが得られ、唾液中遊離CAがサナブmol/mlレベル～数pmol/mlレベルを中心に検出された。

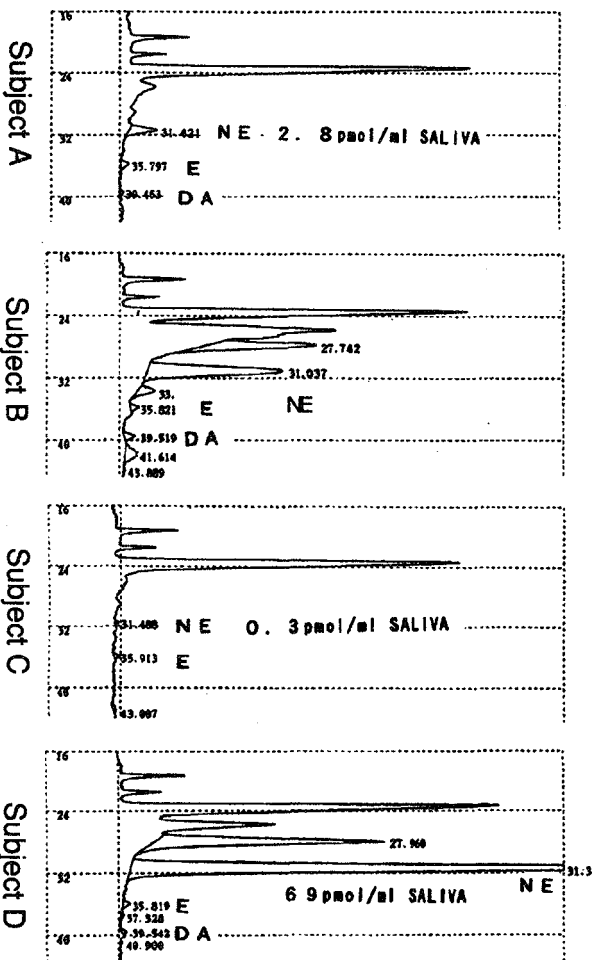


図4-1.51 唾液のクロマトグラム (93年度報告)
4倍希釈唾液を400 μ l注入 MFシステム使用

本年度は、遊離CAに加えて抱合性CA (硫酸抱合体、グルクロン酸抱合体) にも着目し、加水分解した唾液を本システムで測定することによって遊離CAと抱合性CAを合わせたトータルCAとしての検出も試みた。

まず、2名の唾液を用いて抱合性CAの存在を予備的に検討した。図4-1.52に示した唾液中抱合性CAの加水分解法で加水分解した唾液を本システムで測定した結果、塩酸加水分解法によって得られた試料については、図4-1.53に示すようなクロマトグラムが得られ、

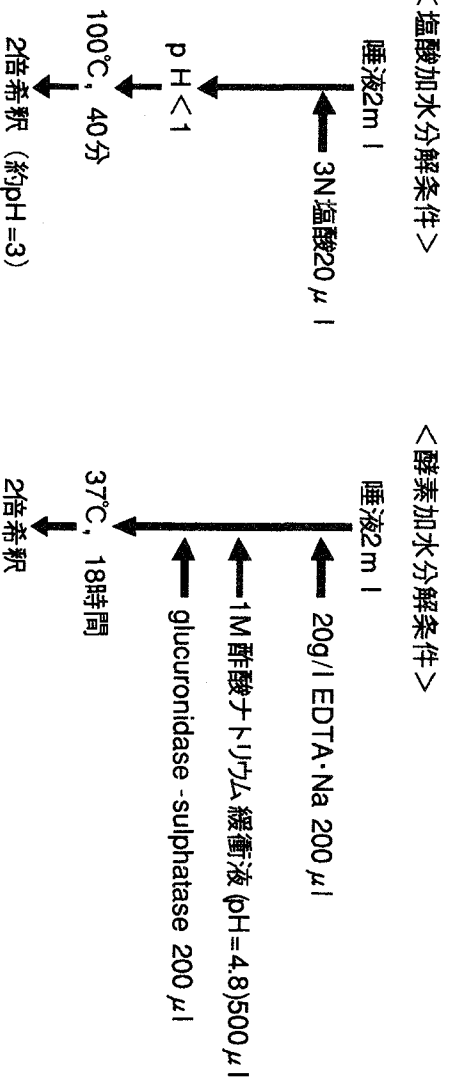


図4-1.52 唾液中トータルCA (遊離CA+抱合性CA) 測定のための唾液の加水分解法

トータルNE, EおよびDAがそれぞれ約1、0.2および2pmol/ml検出された。また、唾液のクロマトグラム31.2分の未知ピークが消失した。この結果から、唾液中には抱合性CAが存在することが示唆され、以前の測定において、約32分にしばしば出現した未知ピークは、今回出現せず、そのピークが抱合性CAである可能性は薄れた。

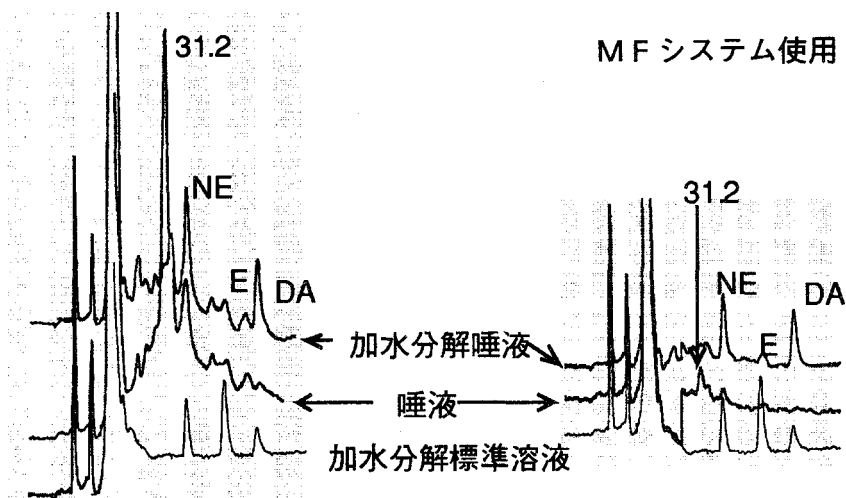


図4-1.53 唾液と加水分解唾液のクロマトグラム (2名)

なお、酵素加水分解唾液については多くの妨害ピークが出現し、測定不可能であった。

次に、抱合性CAの存在量を確認するために、5名の唾液についてその測定を行った。

図4-1.54に唾液中および塩酸加水分解唾液中CAのクロマトグラムを示した。

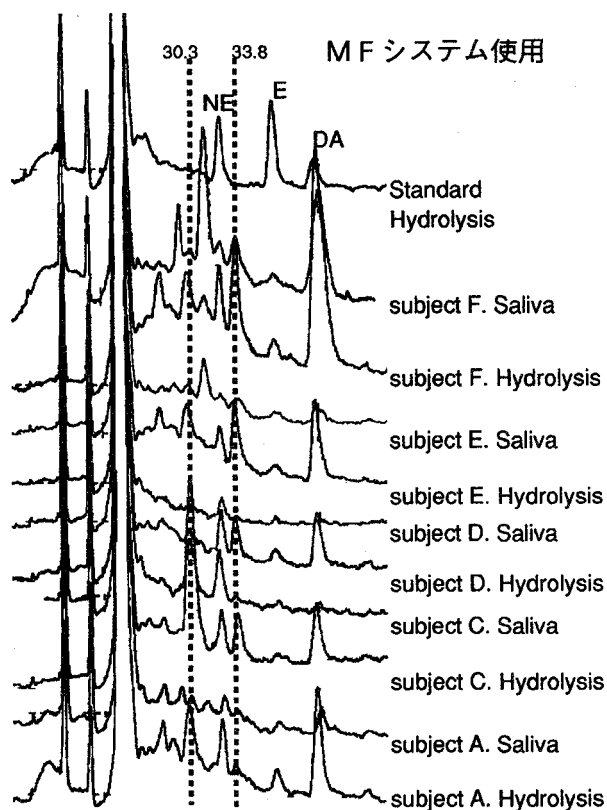


図4-1.54 唾液および加水分解唾液のクロマトグラム

前記の2名の結果と同様に、5名の唾液とも加水分解することによってNEおよびDAが増加し、31.5分付近の未知ピークが消失もしくは減少した。この結果から、唾液中には抱合性CAが存在することが確認できた。濃度は表4-1.25に示したように、遊離CAと抱合性CAとのトータルとしては、NE, DAそれぞれ約0.2~1.0, 0.7~4.0pmol/mlであった。Eについては若干検出されたものの0.2mol/ml以下であり、ほとんど定量は不可能であった。また、今回の実験では、加水分解唾液から30.3分と33.8分に新たなピークの出現あるいは増加が確認された。

表4-1.25 唾液中のトータルCA濃度（遊離CA+抱合性CA）（pmol/ml）

	予備検討測定値		今回の測定値				
	subject A	subject B	subject F	subject E	subject D	subject C	subject A
NE-1	1.01	0.59	0.43	0.20	0.31	0.31	0.37
NE-2	1.02	0.56	0.43	0.20	0.27	0.30	0.38
av.	1.02	0.58	0.43	0.20	0.29	0.30	0.38
DA-1	1.28	1.13	3.65	1.31	0.88	1.09	1.65
DA-2	1.44	1.08	3.25	1.25	0.73	0.98	1.81
av.	1.36	1.10	3.45	1.28	0.80	1.03	1.73

1.5.2 拡大実験（38名）と結果の解析

(1) 実験デザインおよび測定値

前項（1.4.2）のCSについての拡大実験と同様の実験を計画し、その測定を行った。ただし、CAの場合は採取後速やかに分解が始まることから、前項（1.2.3）での検討結果をふまえて、図4-1.55に示したように、研究室採取分（10：00、13：00、16：00）については採取後直ちに遠心分離し安定化剤を添加後、冷凍保存し、自宅採取分（起床時、就寝前）については採取後直ちに安定化剤入り除蛋白カラム溶離液1mlを綿に染み込ませて冷凍保存後、研究室に持参してもらった。

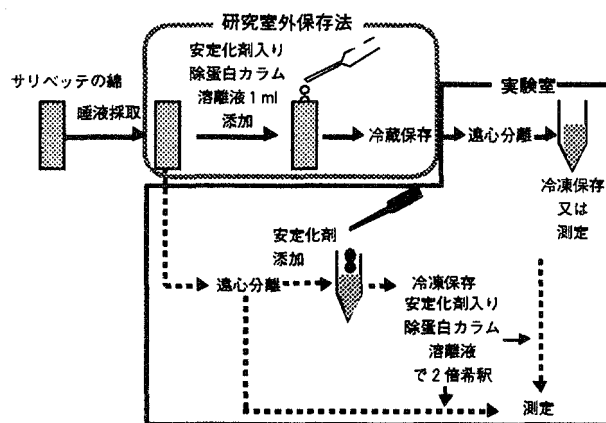


図4-1.55 研究室外保存法

実際に採取された唾液量は、各量（0～2.5ml）の唾液を染み込ませたサリベットの綿に安定化剤を含んだ除蛋白カラム溶離液1mlをそれぞれ添加し、遠心分離して得られた液量（重量）と染み込ませた唾液量との関係から求めた。図4-1.56にその検量線を示したが、良好な直線関係が得られ、求められた唾液量から希釈倍率を計算し、定量値の補正に用いた。

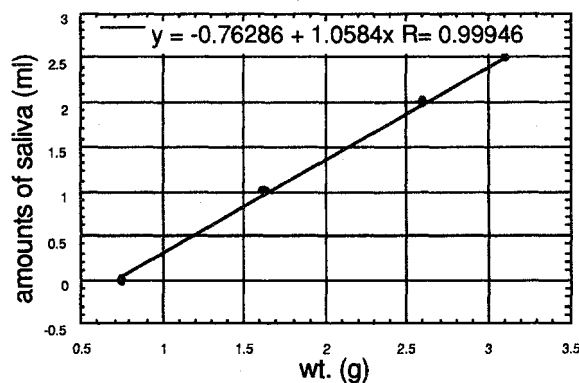


図4-1.56 サリベットの綿に採取された唾液量を求めるための検量線

図4-1.57に測定結果を示した。この結果からは、CSのようなサーガディアンリズムは確認できなかった。また、異常値と思われる幾つかのデータを除いては、平常時唾液中の遊離CAの存在量は、NE、EおよびDAがそれぞれ0～0.1、0～0.04以下、0～1.2pmol/mlと判断された。異常値の各時点での発生頻度は、NE 10:00 2/8名 0.2～0.3pmol/ml, E 13:00 1/8名 0.1pmol/ml, DA 13:00 1/8名 8pmol/mlで頻度は少ないが、上記の平常時範囲に比較すると2～10倍高い量となっており、何らかの心理的・生理的変化との関わりが示唆された。しかしながら、今回のデータは1日分のデータであり、残りの4日分および30人分の測定と解析の結果を待って最終的な判断をする予定である。

PWシステム使用

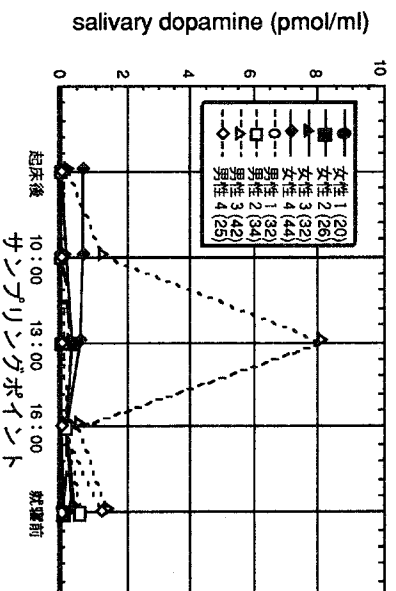
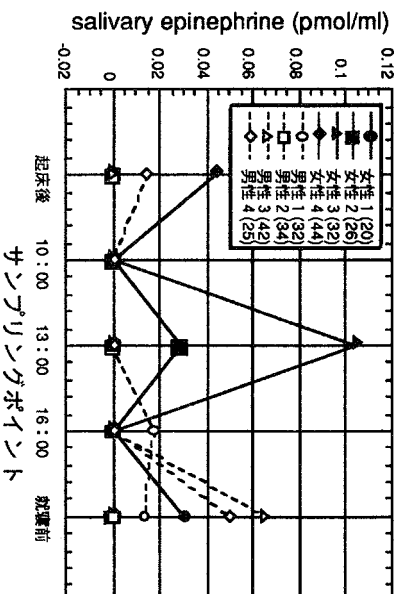
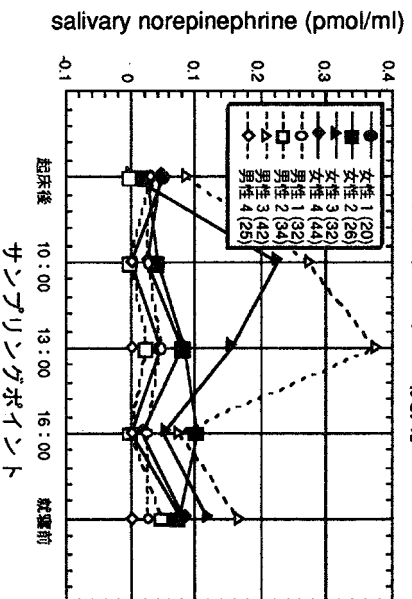


図4-1.57 唾液中CAの日中変動

1.6 唾液中CA、CSによるストレス検知予備実験

CSについては、1.4 で取得したバックグラウンドデータをふまえて、ストレス検知の検討を予備的に行った。即ち、36人の日常値データとの比較、課題負荷前、負荷後の経時変化、コントロール日との比較から検知可能なストレスについて考察した。一方、CAについてはバックグラウンドの整備と検知予備実験を平行して実施した。ストレス課題としては日常的にあるようなものとして発表、作業、運動などを使った。

1.6.1 発表ストレスの検知

表4-1.26に実験の概要を示した。

表4-1.26 実験の概要

内容：社内での発表				
被験者：3名				
	年齢	性別	氏名	備考
発表A	A	50代 男	K.T.	発表時間14:10～15:10
	B	20代 女	O.M.	〃 9:40～10:15
	C	20代 男	S.S.	〃 14:45～15:20
採取時間：発表時間の1時間前、直前、1時間後、2時間後に測定				
内容：社内での発表				
被験者：1名				
発表B	年齢	性別	氏名	備考
	30代	男	O.T.	
	採取時間：当日は発表時間の約2時間前から30分～1時間おきに測定 コントロールとして翌日の日内変動30分～1時間おきに測定			

(1) CS

結果を図4-1.58に示したが、発表Aでは36人の日常値データとの比較から、発表Bではコントロール日との比較から考察した。

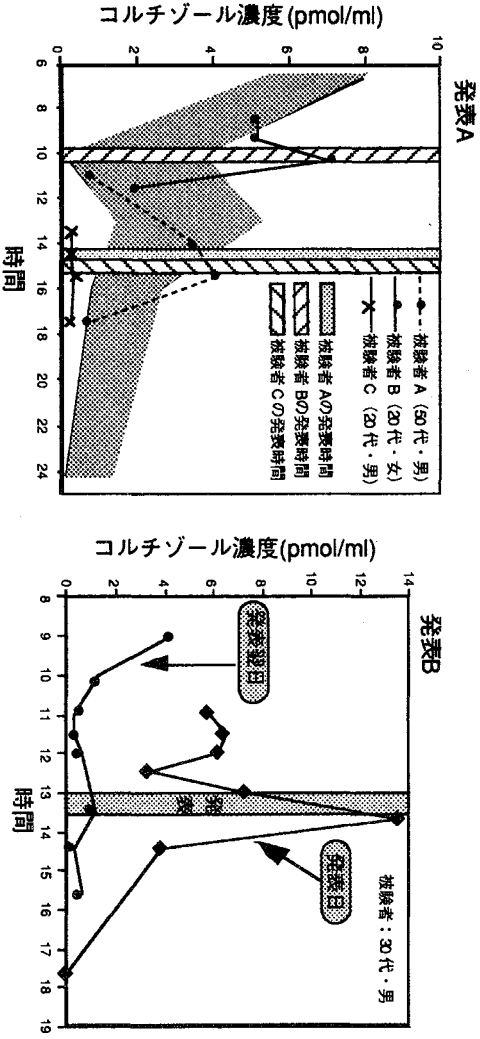


図4-1.58 発表時のCS濃度の変化

発表Aの結果を36人の日常の日内変動とともに示した。被験者Aと被験者Bは発表直前から発表直後にかけてCSの上昇が認められ、そのパターンからストレスが検知できたと考えられた。また、最高値は被験者Aが発表直後（15：15）に4.03pmol/ml、被験者Bが発表直後（10：20）に7.05pmol/mlで、これは日常値の平均値+1SD以上であり、異常値として検出できたと考えられた。被験者Cについては、CSの上昇は認められず0.2～0.4pmol/mlの範囲で一定で、日常値と比較しても小さい値であり、ストレスとして検知できなかった。

発表Bの結果をコントロール日の日内変動とともに示した。発表直前から発表直後にかけてCSの上昇（約7pmol/ml）が認められ、最高値は約14pmol/mlだった。これをコントロール日（発表翌日）とのパターン、測定値と比較すると、明らかにストレスが検知できたと考えられた。また、発表の直前直後だけでなく発表前もコントロ

ール日に比べて高めであり、36人の日常値データ（平均値+1SDは10:00で3.64、13:00で5.19）との比較からも11:00~12:00の3点は異常値とみなせ、発表前の緊張を捉えているとも考えられた。

食事との関連については、発表Aの被験者Aの発表直前が食事開始後約2時間、発表Bの発表直前が食事開始後約1時間、直後が約1.5時間であり、食事の影響の可能性はある。ただし、発表Aの被験者Aの発表直後は4時間後なので、この上昇は食事の影響とは考えにくい。また、発表Bについてはコントロール日も食事をとっていることから、食事の影響ではないということが言える。このように、食事の影響が考えられる時間帯ではコントロールとの比較が必要になってしまうため、やはりストレス検知の際には食事開始後2時間程度は避けたほうが良いと考えられる。

発表については尿中と唾液中のCS変化を報告した例があり^{4-1.17}（図4-1.59）、コントロール日との比較で、尿中では発表直後、唾液中では発表直前と直後に有意に上昇していることから、唾液の即時応答性が示されている。その測定値（唾液中）は最高時（発表直後、12:30）に約12pmol/mlで、日常値との差は約7pmol/ml、直前からの上昇幅は約2pmol/mlであり、本検討の発表Aの被験者B、発表Bの結果にほぼ相当している。なお、この文献での発表時間は10:30~12:30だった。

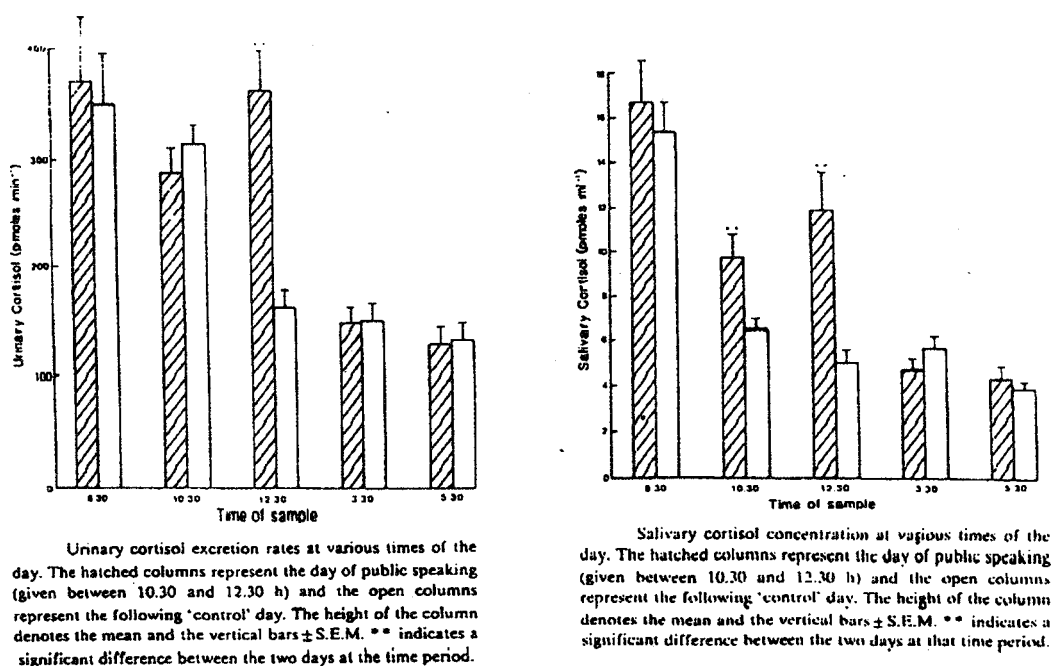


図4-1.59 発表時の尿中および唾液中CS濃度の変化

次に、発表A、Bとこの文献値を合わせて、発表時間と上昇幅の関係を表4-1.27にまとめた。この結果からは午前中の方が上昇幅が大きい印象を受けるが、被験者、発表内容が違うために詳細な考察はできない。午前と午後の感度の差についてさらに検討するためには、同一人で午前と午後で同様な負荷をかけて比較するか、多数の被験者で午前群と午後群で同様な負荷をかけて比較する等の方法でみる必要がある。

表4-1.27 発表時間とCS濃度の上昇幅[pmol/ml]

		発表時間	直後の測定値	日常値	日常値との差	直前の測定値	直前からの上昇幅
発表A	被験者A	14:10～15:10	4.03	1.74(16:00)	2.29	3.44	0.59
	被験者B	9:40～10:15	7.05	1.91(10:00)	5.14	5.12	1.93
	被験者C	14:45～15:20	0.36	1.74(16:00)	-1.38	0.26	0.10
発表B		13:00～13:40	14	1(コントロール日)	13	7	7
文献(29名の平均)(13)		10:30～12:30	12	5(コントロール日)	7	10	2

午前と午後で多数の被験者を使って同様な負荷をかけた例としては、暗算課題前後のCSの変化と香りの影響をみた報告^{4-1.18)} (図4-1.60) があるが、午前の日内変動の減少のカーブに関わらず、午前午後とも暗算課題によるCSの上昇が確認されている(図中香りなし群)。香りによる緩和効果についても、午前と午後で確認されているが、その減少幅は午前の方が大きく、緩和効果がよく捉えられているといえる(図中PF1条件群)。ただし、この報告は香りによる緩和効果をみることが目的であり、暗算課題の影響を日常値(暗算課題なし)と比較して考察しているわけではない。また、この測定はRIAで行っており、その上昇幅は2pmol/ml程度である。したがって、午前と午後でどちらが上昇を捉えやすいかについては、本法でも確認する必要がある。

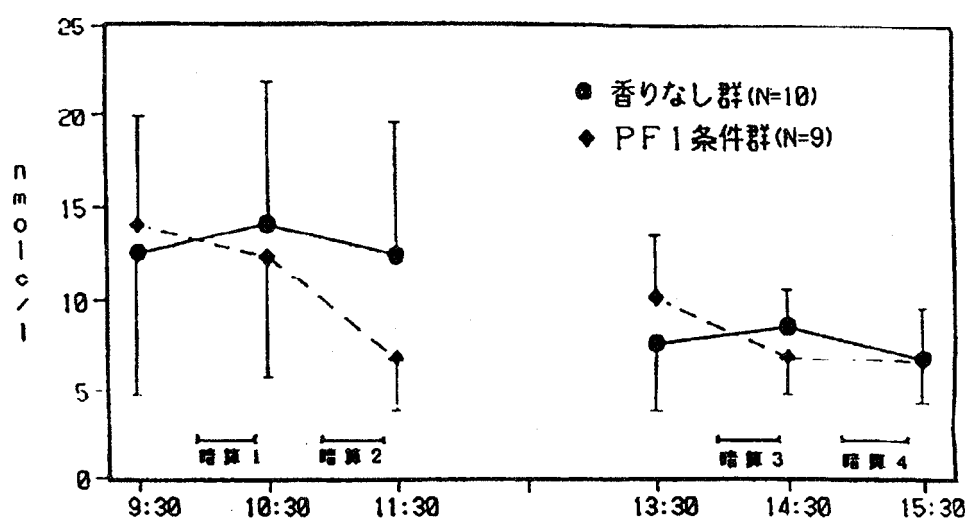


図4-1.60 暗算課題時の唾液中CS濃度の変化

また、今回の検討では質問紙などによる情動の測定を行わなかった。被験者CのようにCS濃度の上昇が認められなかった場合、緊張はしたが変化がなかったのか、緊

張しなかったから変化がなかったのか明らかでなく、情動とCS濃度を検討していく必要がある。

程度に差はあるが、このような発表の心理ストレスの検知は可能と考えられた。ただし、1時点（発表直後）の測定値からの判断ができるかどうかを考えると、測定時間の選抜が必要と考えられた。

なお、未知ピークについては、発表Aではピーク面積値が小さく解析できなかった。発表Bにおいて、CS濃度が上昇したとき、未知ピーク的面積はほとんど一定であることを確認した。したがって、CS濃度の上昇は唾液の分泌が抑制されるためではないことが言え、このことから未知ピークを標準化指標にできる可能性が示唆された。

(2) 遊離及びトータルCA

発表時およびその前後の唾液を定量した結果を図4-1.61に示したが、発表ストレスによる遊離CAには、以前の結果と同様に顕著な変化は認められなかった。しかしながら、1名 (Subject Y) の発表当日の発表1時間後の唾液から多量のNEが検出されたほか、各ポイントにおいてサナプリングポイントのCAが確認された。

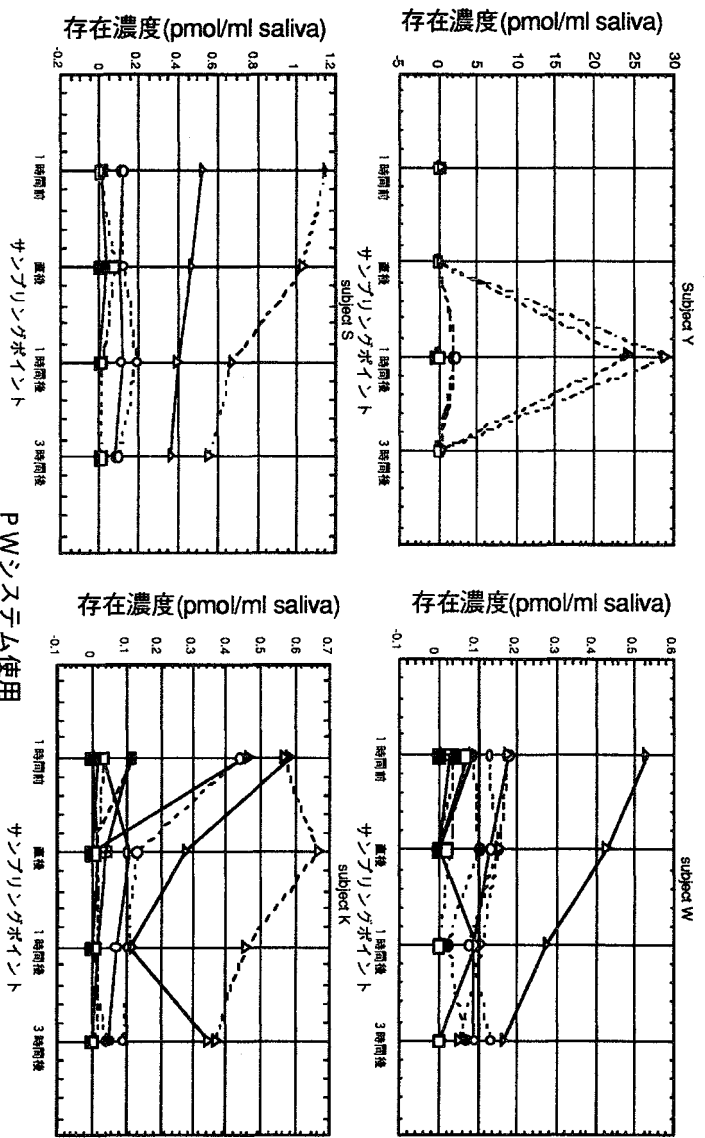


図4-1.61 発表前後の唾液中遊離およびトータルCA

また、初めての講演会前後の唾液を定量した結果、図4-1.62に示したように、遊離DAは講演終了直後に減少した後回復し、遊離NEは1時間後に増加した後2時間後には減少傾向を示した。遊離Eについては定量限界以下であった。

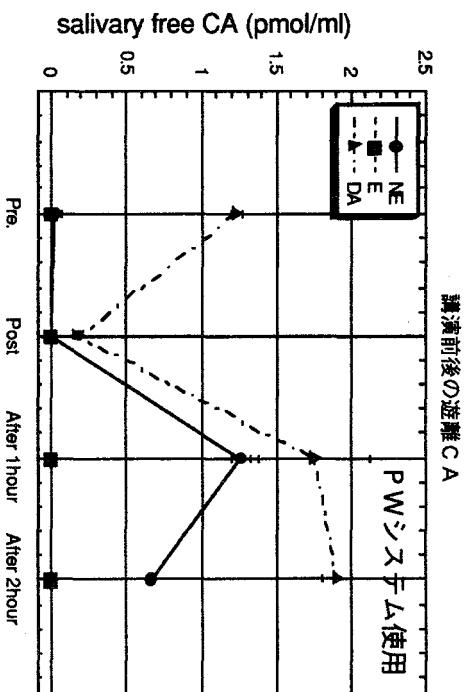


図4-1.62 講演会前後の唾液中遊離CA

1.6.2 運動ストレスの検知

表4-1.28に実験の概要を示した。

表4-1.28 実験の概要

内容：運動（サッカー、バスケットボール）				
被験者：5名				
	年齢	性別	氏名	備考
A	30代	男	O.T.	サッカー
B	20代	女	N.K.	バスケットボール
C	30代	男	H.K.	〃
D	20代	男	S.T.	〃
E	20代	女	O.M.	〃

採取時間：開始前、開始から約5～10分おきに5時点の計6時点測定（サッカーは12:30より開始、バスケットボールは19:40より開始）

(1) CS

結果を図4-1.63に示した。

サッカーでは、開始後やや上昇し、最大値で約6pmol/mlをとった後再び減少し開始前と同程度になった。この被験者についてはコントロール日の測定を行っていたので開始時間の12:00の日常値をグラフ内に示したが、その測定値と比較すると日内変動からの偏差と考えられた。

バスケットボールでは、開始後しばらくしてから徐々に増加していく傾向が認められた。開始時間の16:00の日常値の平均値（1.74pmol/ml, SD0.89pmol/ml）と比較すると、被験者Cの最大値は平均値+2SD、被験者Dの最大値は平均値+1SD以上で、日内変動からの偏差と考えられた。

このように運動ストレスは一部検知されたが、この検討はゲーム中であり心理的要因も含まれているため、運動ストレスとしてさらに考察するためには、より定量化さ

れ、かつ心理的な要因を除いたエルゴメーターのような負荷課題を使って検討する必要があると考えられた。

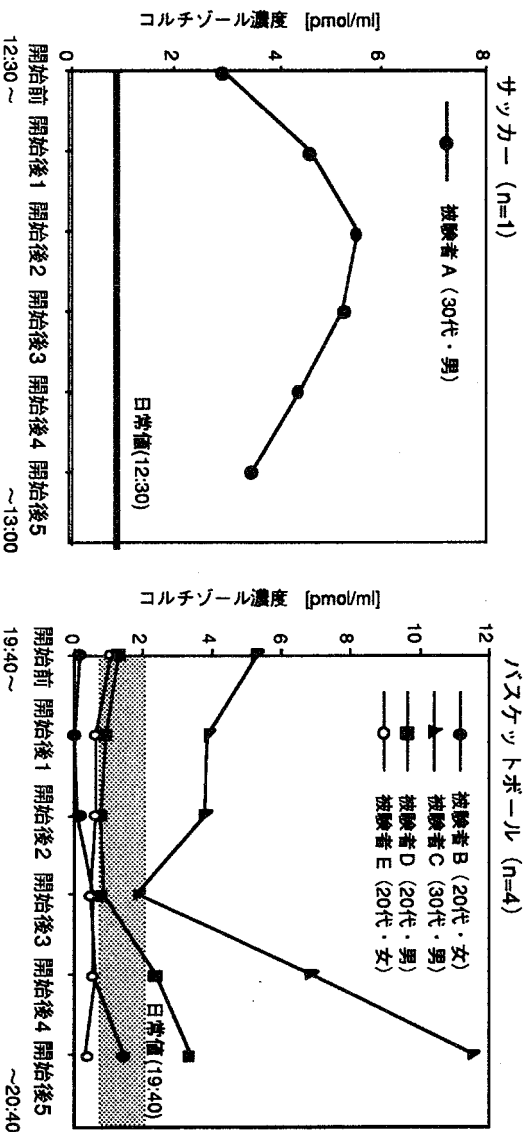


図4-1.63 運動時のCS濃度の変化

(2) 遊離及びトータルCA

まず、血中遊離CAの上昇がある程度知られている運動ストレス^{41,42)}について、バスケットボールのゲーム中に採取した唾液を測定し予備的な検討を行った。図4-1.64に示すように5名から採取した唾液のうち2名の唾液から遊離CAが検出され

(NE:0.46pmol/ml)、血中遊離CA濃度がある程度上がれば唾液中からも検出可能であると考えられた。また、検討したいいくつかの検体 (図4-1.64の被験者C) からは、NEの直前に溶出する未知ピークが確認された。これは、以前からも時折認められており、増減が顕著であること、並びに本試験法がCAに対して高選択的検出をする方法であることから、CA関連物質である可能性が高く、今後解析が必要と考えられた。

再度バスケットボール開始前後の唾液を採取し測定を行った。クロマトグラムを図4-1.65および図4-1.66に示した。遊離NE, DAについては、個人差は大きいものの開始後濃度上昇を示す傾向がいずれの被験者においても認められ、上記の結果が確認できた。上昇以降の濃度変化は小さく、今回の実験の範囲では消失することはなかった。さらに、サッカー開始前後の唾液についても測定を行った。クロマトグラムと、経時変化をそれぞれ図4-1.67および図4-1.68に示した。開始前にはCAピークは存在しなかったが、開始直後、NEおよびDAピークが検出され、それぞれ約0.4~0.9pmol/ml程度であった。また、開始後、それぞれの濃度の経時変化はほとんどなかった。

本実験は、運動負荷時に血中濃度が上昇すると言われている遊離CAを唾液中から検出することを目的としていたため、定量的な運動負荷をかけていない。よって、今後は、定量的な負荷 (エルゴメーターなどを用い、負荷量を調節する) および負荷前後とCA濃度との関係を更に検討していく必要があると考えられた。

MFシステム使用

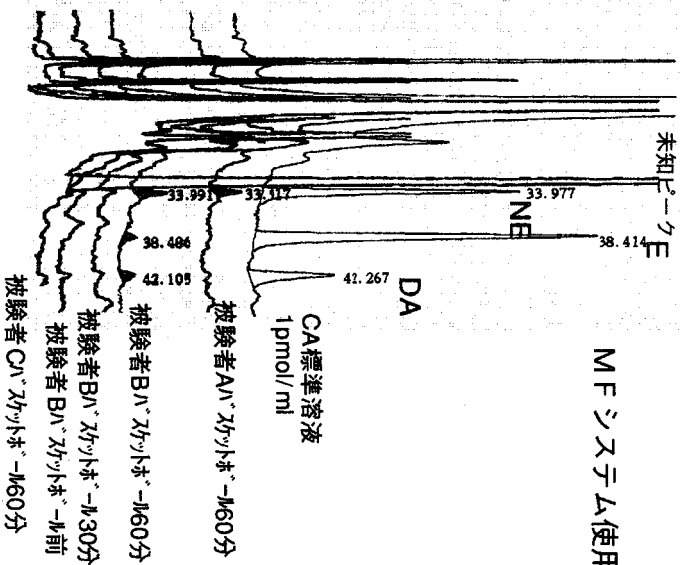


図4-1.64 バスケツトボール時の
唾液のクロマトグラム

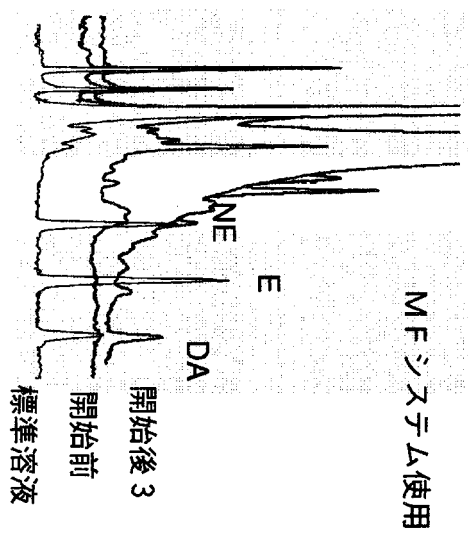


図4-1.65 バスケツトボール時の
唾液のクロマトグラム

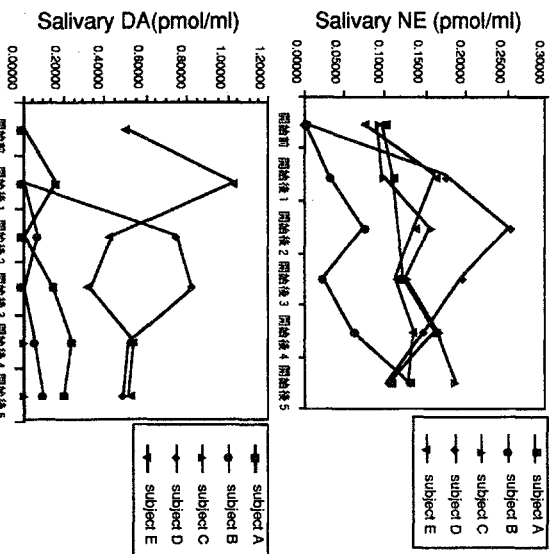


図4-1.66 バスケツトボール時の
唾液中遊離CA

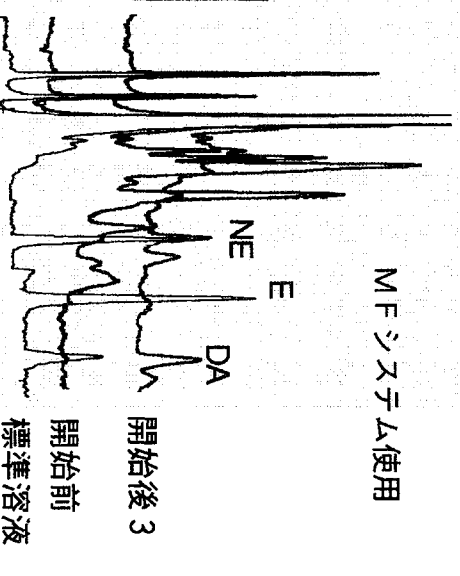


図4-1.67 サッカー時の唾液のクロマトグラム

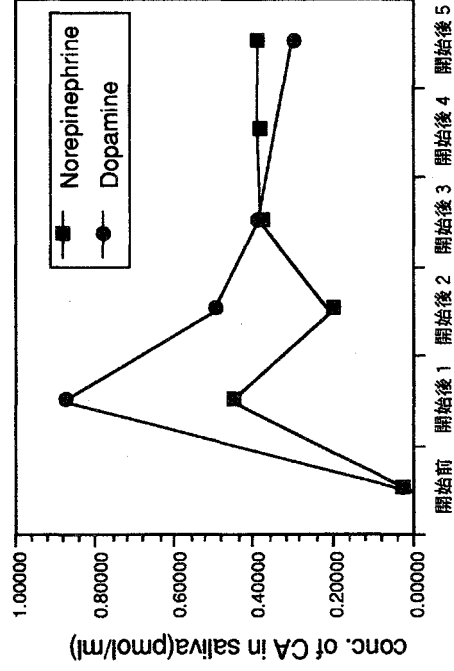


図4-1.68 サッカー時の唾液中遊離CA

1.6.3 その他の日常的ストレスの検知

(1) CSによる徹夜作業ストレスの検知

表4-1.29に実験の概要を示す。

表4-1.29 実験概要

内容：締切の迫った徹夜作業				
被験者：3名				
	年齢	性別	氏名	備考
A	20代	女	T.R.	食事時間は全員共通で1日目の12:00と20:40の2回のみ
B	20代	女	O.Y.	
C	30代	男	A.T.	
採取時間：12:00から約2時間おきに翌日の12:00まで				

この課題は、作業ストレスの他に24時間の日内変動、締め切り間際という心理的要素も含めてみている。結果を36人の日常の日内変動とともに図4-1.69に示した。

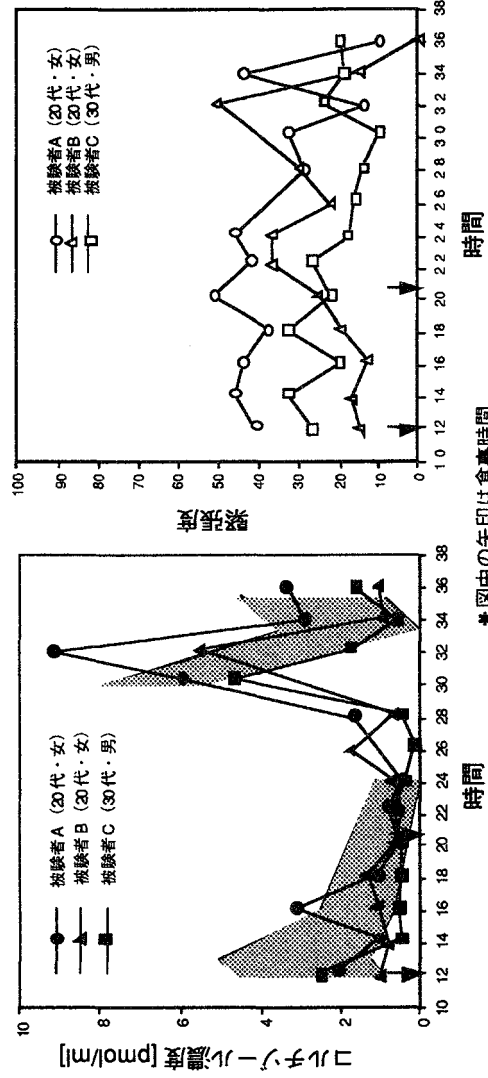


図4-1.69 徹夜作業時のCS濃度および緊張度の変化

12:00では1~3pmol/mlであり、その後やや減少し24:00くらいまで一定状態になり、その後急上昇して翌日6:00~8:00に5~9pmol/mlの最大値をとった後減少し、12:00に1~3pmol/mlにもどるというサーカディアンリズムが得られ、3名はほぼ同様な傾向を示した。これを日常の日内変動と比較するとそのパターンに偏差は認められなかった。

また、測定値はほとんど日常値の範囲で、被験者Aの16:00と8:00で日常値から有意に高い値をとっていた。また、パターンをみると被験者Bの2:00に上昇が認められた。この実験では情動の変化(覚醒度、緊張度、恐怖、怒り、嫌悪、悲しみ、喜び)を質問紙により同時に測定していたので、その中の緊張度についてグラフに示したが、この3点で、特別な情動の変化や食事などの行動の変化はなかった。また、クロマトグラムのCS以外のパターンをみても、とくに変化は認められなかったので、唾液分泌の減少も考えにくかった。この作業ストレス、締切間際の心理ストレスではCSの上昇は認められなかった。

作業ストレスをみた例としては、作業最中の血漿中CSの変化を、ノイズのあるなしで比較した報告^{4-1.17)}(図4-1.43)や、約2時間の暗算課題を負荷し、唾液中CSの変化を、香料のあるなしで比較した報告^{4-1.18)}(図4-1.60)があり、これらでは作業によりCSが有意に上昇しており、その上昇幅は唾液の例で約2pmol/ml程度(測定はRIA)となっている。しかし、これらの作業が約2時間程度の短時間であるのに対し、ここで検討した24時間以上継続した作業の場合は、長時間ストレスのかかった状態で、ある種の適応も起こっていると考えられた。

(2) CSによるエステティックの効果検出

実験の概要を表4-1.30に示す。

表4-1.30 実験の概要

内容：結婚式前前日、エステティック実施				
被験者：1名				
	年齢	性別	氏名	備考
A	20代	女	S.M.	エステティック14:00~16:30
採取時間：エステティック直前、直後を含めて計5時点				

この課題は結婚式というある種の心理的ストレスと、エステティックによる緩和効果をみている。結果を36人の日常の日内変動とともに図4-1.70に示した。CS濃度は0.8~2.0pmol/mlで日常の日内変動の範囲であり、1点測定での異常値の検出はできなかった。ただし、パターンをみると、エステ後の4、5点目でやや減少しており、経時変化をみることによってエステティックの緩和効果がある程度確認できたといえる。

(3) 痛みストレスの検知

通常、血液採取時には血中遊離CAが上昇するといわれている。そこで、血液採取時に採取した唾液について測定を行った。その結果、図4-1.71に示すように、採血前には遊離CAは検出されていないが、採血中および採血直後の唾液から遊離NEが検出された。この場合、唾液中NE濃度は血漿中の約1/10であり、血漿中濃度は既に報告されている値(数pmol/ml)に一致する値が得られた。

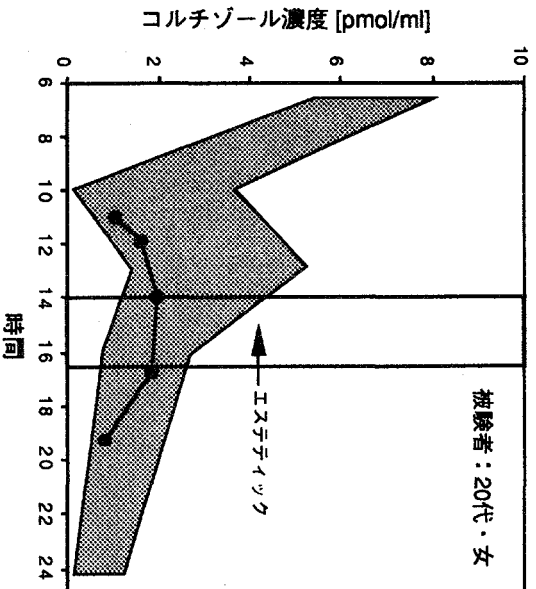


図4-1.70 エステライツク実施時のCS濃度の変化

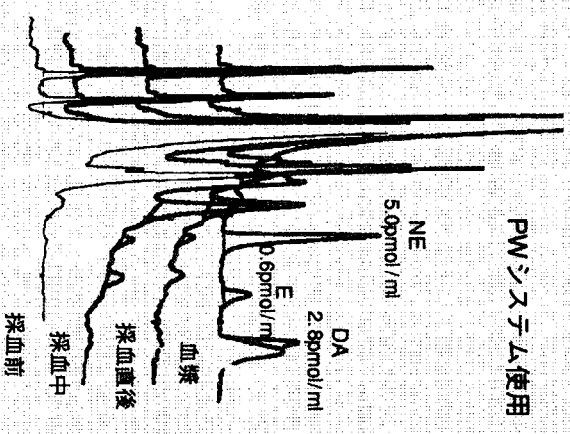


図4-1.71 採血時およびその前後の唾液のクロマトグラム

1.7 唾液中CA測定用HPLCシステムの更なる高感度化と安定化についての予備検討

1.7.1 化学発光検出系による高感度化の予備検討

現在の蛍光検出系を用いたシステムにおける定量限界は 0.1 pmol/ml レベルであるが、日常標準値（定量限界付近と考えられる）の詳細な検討やそれに伴う精度の向上の必要性に対処するためには、更なる高感度化が必要となる。高出力レーザー蛍光検出系における検討では、定量限界で 10 fmol/ml レベルが達成されたが、装置系が大型であり実際的ではないし、レーザー管の寿命の問題もある。

そこで今回は、高出力レーザー蛍光検出系を用いた場合に匹敵する感度が報告されている化学発光検出系の導入を考え、その検討を行った。

(1) システム構成部品の選択と構築

化学発光検出系HPLCシステムを用いた尿中及び血中CAの分析については既に報告^{4,11,19)}されており、また、この検出系を用いた血中及び尿中CA測定用専用分析計も既に販売されている。

本研究では、文献の分析システムを基に、今年度確立した最終システムであるPWシステムへの導入を考慮して表4-1.31に示す機器を選択した。これは、最終的に現在のシステムと同様の前処理システムを有する図4-1.72に示すシステムを構築するための機器であり、点線で囲った以外の部分にあたる。

表4-1.31 導入したシステム構成部品

溶離液用ポンプ：	LC-10AD（島津製作所製）
反応液用ポンプ：	LC-10AT（島津製作所製）
カラム恒温槽：	CTO-10A（島津製作所製）
化学反応槽：	CRB-6A（島津製作所製）
化学発光検出器：	CLD-10A（島津製作所製）

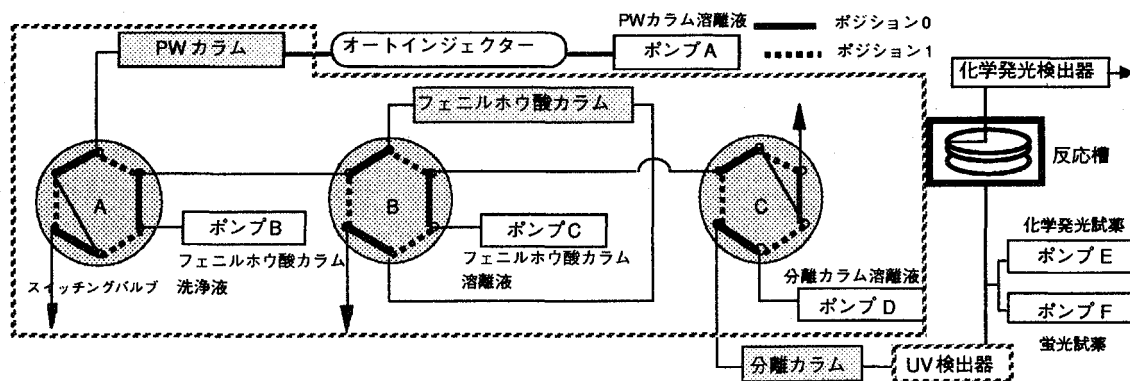


図4-1.72 唾液中CA測定用化学発光系HPLCシステム

(2) 分離条件検討

まず、この系に最適な分離条件の予備的な検討を行なった。なお、分離カラムには、通常この系で使用されているODSカラム（Capcell Pak UG18）と現行のシステムで使用しているカチオン交換カラム（Senshu Pak SCX）を用いた。検討した分離条件を表4-1.32に示した。

表4-1.32 分離条件
－ODSカラム分離条件－

分離条件A：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,5mMSOS,(pH 3.2)/アセトニトリル=9:1 1.0ml/min
分離条件B：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,2mMSDS,(pH 3.2)/アセトニトリル=9:1 1.0ml/min

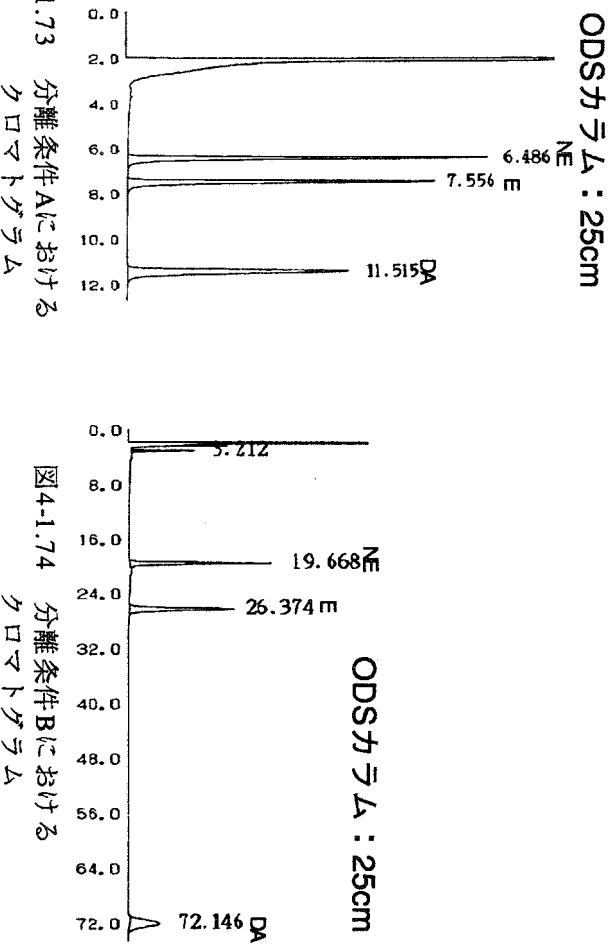
－SCXカラム分離条件－

分離条件C：	40mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/アセトニトリル=95:5 0.8ml/min
分離条件D：	40mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/アセトニトリル=85:15 0.8ml/min
分離条件E：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/アセトニトリル=9:1 0.8ml/min
分離条件F：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/メタノール=9:1 0.8ml/min
分離条件G：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/アセトニトリル=9:1 0.5ml/min
分離条件H：	75mM酢酸ナトリウム,2.5mMリン酸2水素ナトリウム,(pH 3.2)/メタノール=9:1 0.5ml/min

* SOS：Sodium Octane Sulfonate，SDS：Sodium Dodecyl Sulfate *

試料；CA標準溶液 20 μ mol/ml, 300 μ l/inj.

まず始めに、日本分光（化学発光検出系CA専用分析計を販売している）の報告^{4-1.19}にある分離条件A（但し、報告では15cmカラムを用いて、流速0.5ml/minで測定）で測定を行なった結果、図4-1.73に示すクロマトグラムが得られた。しかし、この分離挙動ではNEとEのピーク間隔が非常に狭く、妨害ピークと重なる可能性が高いことから、イオンペア剤をSDSに変更し保持を強くした。その結果、図4-1.74に示すように、NEとEのピーク間隔は大きくなったがDAの保持が大きくなりすぎってしまった。



そこで次に、現行のシステムにおいて良好な相互分離が得られているカチオン交換カラムの検討に移行した。溶離液については、化学発光系の反応効率の点から、前記条件と同じ塩を用いることとした。

現行のシステムにおける溶離液と同等の塩濃度である分離条件C、Dにおけるクロマトグラムは図4-1.75に示したとおりであり、保持が大きかった。そこで、塩濃度を報告されている濃度（分離条件Aと同じ）まで上げた分離条件E、Fで測定した結果、図4-1.76に示すように3成分が良好な分離を示した。なお、図4-1.77には、報告されている条件である15cmカラムを用いた流速0.5ml/min（分離条件G、H）のクロマトグラムを示した。

最終的な条件については、化学発光検出システムにおける唾液のクロマトグラムを測定し、妨害ピークや分析時間を考慮して決定する。

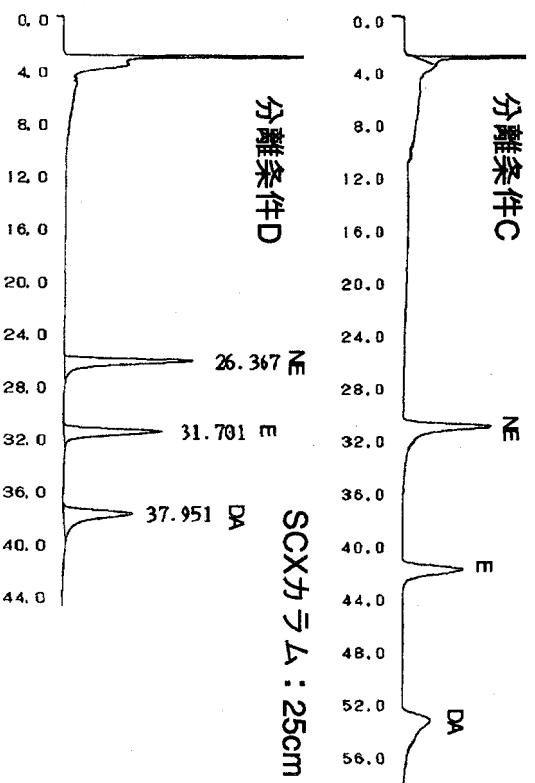


図4-1.75 分離条件C, Dにおけるクロマトグラム

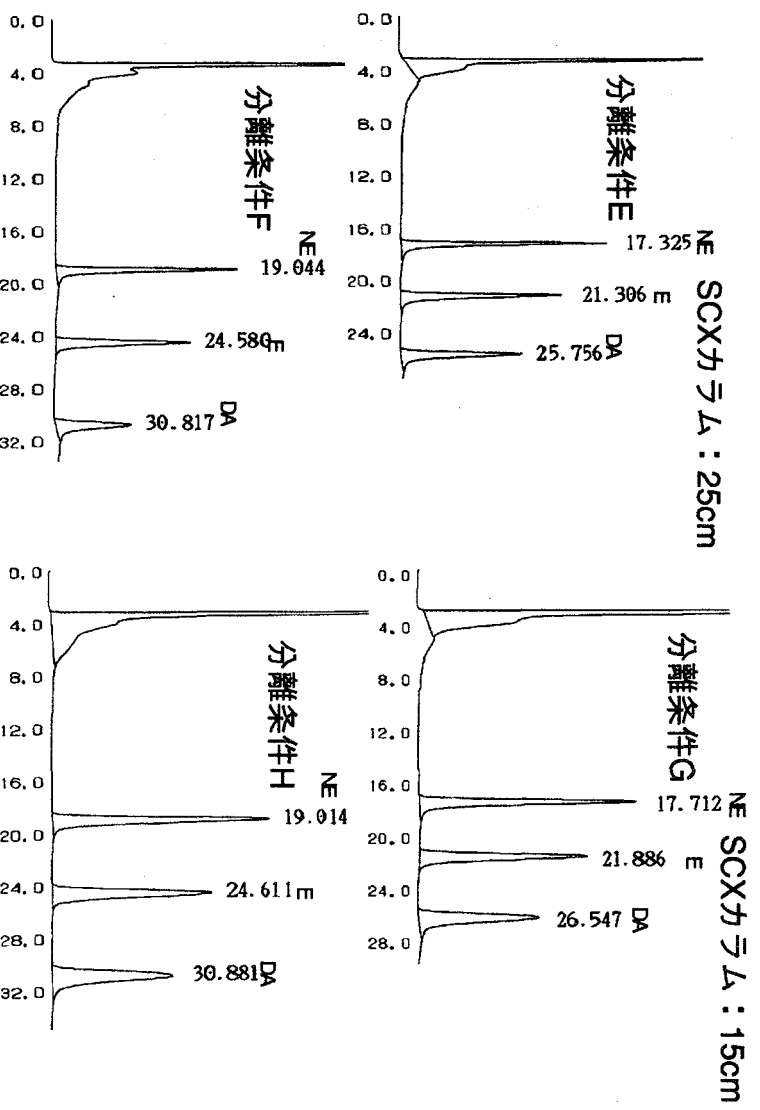


図4-1.76 分離条件E, Fにおけるクロマトグラム

図4-1.77 分離条件G, Hにおけるクロマトグラム

1.7.2 ODSカラムを用いた分離系の安定化の予備検討

現行システムで分離カラムとして用いているカチオン交換カラム (SCX) は、耐久性が悪く、約150時間の使用で分離が悪化する。そこで、一般的に選択性には欠けるが安定性が良いと言われているODSカラム (Cappcell Pak UG18, 25cm) を分離カラムとして使用することを考え、その分離条件を検討した。

ODSカラム系分離の初期条件は、現行の反応系を崩さないために現行システムの分離

用溶離液にイオンペア剤（オクタンスルホン酸ナトリウム：SOS）を添加した分離条件Aを用いた。その時のクロマトグラムを図4-1.78に示したが、DAの溶出が約48分と非常に遅くなってしまったため、メタノール濃度を上げた分離条件Bで再度測定を行った。その結果、図4-1.79に示したようなクロマトグラムが得られた。

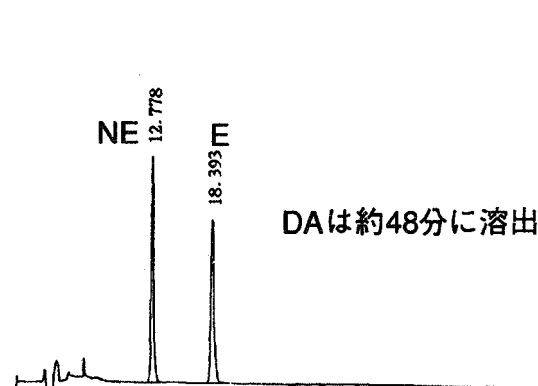


図4-1.78 分離条件Aにおける
クロマトグラム

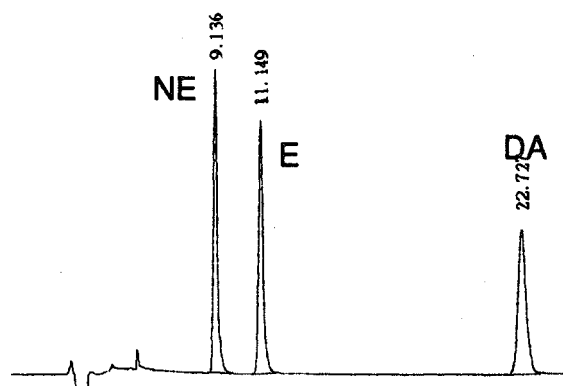


図4-1.79 分離条件Bにおける
クロマトグラム

カチオン交換（SCX）カラムのクロマトグラムと比較すると、分離時間は同程度であるがNEとEのピークが近接してしまった。文献等のODSカラムにおけるクロマトグラムの溶出挙動も同様であることから、分離条件Bを暫定的な条件として設定した。

① 分離条件A：40mM クエン酸ナトリウム, 2mM SOS, 5% メタノール；0.8ml/min

② 分離条件B：40mM クエン酸ナトリウム, 2mM SOS, 10% メタノール；0.8ml/min

そして、このODSカラム系分離条件Bの優劣を判断するために、前項（1.6.1(2)）で測定した講演前後の唾液中遊離CAの測定をこの系でも行った。カチオン交換カラムおよびODSカラムの両システムにおけるクロマトグラムを図4-1.80に示した。ODSカラム系におけるピーク形状は良好であり、イオン交換系で検出されたNEおよびDAについてはほぼ同じ面積値が得られたことから、懸念されていた分離カラム内での分解等はないものと判断された。しかしながら、ODS系では、カチオン交換カラム系で検出されなかったEが検出されたものもあり、Eが酸化分解を受けやすいと考えると今後の検討課題ともなった。検出されたEは、量的には極めて少なく、また、近辺に数種のピークが存在し、更にピークのテーリング上にいること等十分な確認に至っているわけでもない。また、懸念されたNEとEのピーク間の妨害ピークは、今回の測定では出現しなかったが、いくつかの高濃度の未知ピークを確認した。これらの未知ピークは尿のクロマトグラムに類似するものであった（特にピークA：約32.7分とピークB：約50.7分）。

今回の測定は1名の唾液のみであったので、次年度は測定検体数および測定回数を増やし、安定性、定量性および情報量を考慮して分離系を決定する予定である。

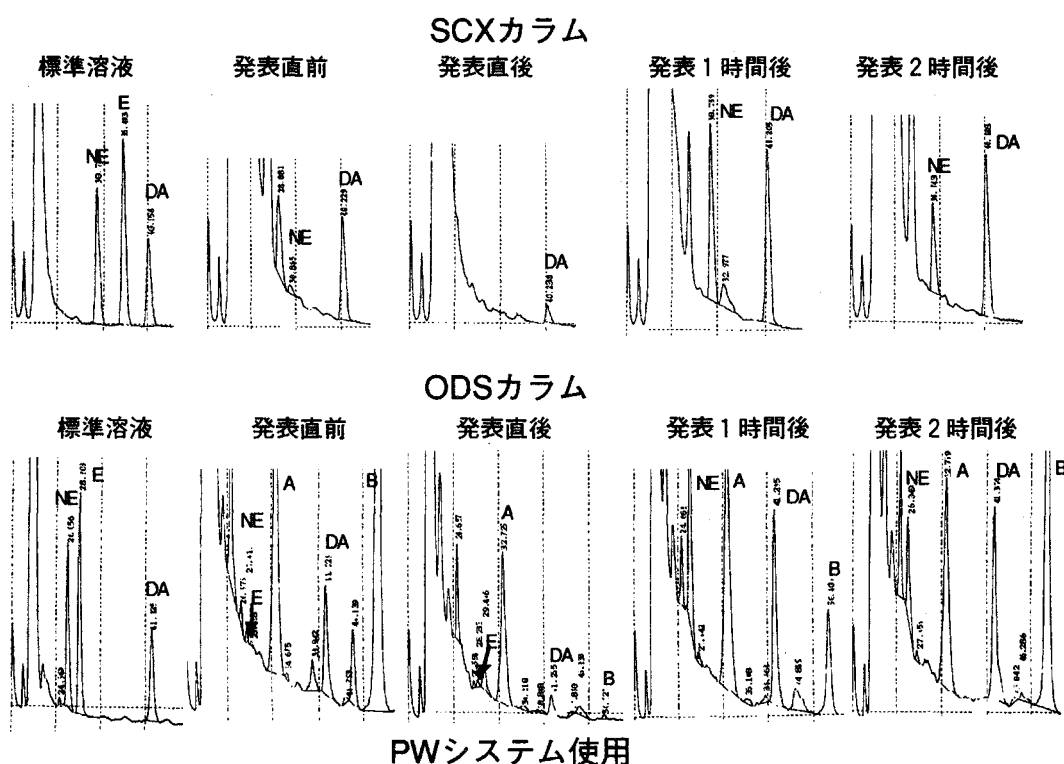


図4-1.80 両システムにおける唾液のクロマトグラムの比較

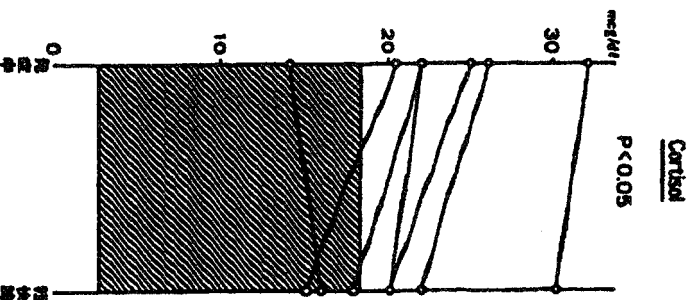
1.8 予備実験に対する文献などからの総括的考察と今後の課題

日常的にあるようなストレス課題を使って、バックグラウンドデータをもとに、CSによるストレス検知の予備検討を行った。心理ストレスについては、発表ストレスをコントロール日との比較や負荷前後の経時変化と考えあわせ十分に検知でき、エステティックの緩和効果も経時変化をみることによってある程度確認できた。運動ストレスについては、サッカーとバスケットボールの一部の被験者で検知された。したがって、この測定法でストレスをある程度検出できることを確認した。

測定法としては、一般に使用されているRIA法と比較して、本法は、唾液中でCSがコルチゾンに転換せず、ストレスでコルチゾンが変化しないと考えたとき、唾液中にCSの約2倍以上存在するコルチゾンの日内変動を含めてとらえないため、より正確に唾液中CS濃度からストレス検知ができるといえた。したがって、ストレス負荷によって唾液中CS濃度が上昇したときのコルチゾン濃度の変化については確認する必要がある。

また、ストレス検知を考えると、今回の検討では1時点の測定値のみからの判断は難しい場合もあり、やはり負荷前後の測定やコントロール日の測定が必要とも考えられた。最終的に1時点の測定でストレスを検知する場合の測定時間については、起床後付近は変動が大きいこと、食事の影響が食事開始後2時間程度である可能性があること、午前中の方が濃度が高いことを考慮すると、10:00~12:00くらいが適当と考えられた。また、午前と午後の感度の差については、今回の実験では、発表で午前中の方が上昇度が大きいという結果だったが、被験者、発表内容が違うために考察はできなかった。このことについても更に検討して、最適な時間を検討する必要がある。

また、ストレス課題については、今回の検討ではストレス検知を確認するために日常的な負荷課題を使った。ストレスと唾液または血液中CSの関係をみるための負荷課題としては、発表、作業がよく使用されている。これら以外の例としては、ICUでの精神症状発症時を呈した患者の血中CS（測定は10:00）をみた報告⁴⁾¹⁾²⁰⁾（図4-1.81）があり、発症中は軽快時と比較し有意に上昇していることから、精神症状が発症しているときにはストレスが加わっていることを示している。また、血漿中CSが妊娠時に徐々に増加し、分娩の種類によっても異なることを示し、ストレスと関連づけている報告⁴⁾¹⁾¹³⁾がある。これらは発表や作業などの一時的なストレスに対して慢性的なストレスといえるが、慢性的なストレスに曝露された場合、脳下垂体-副腎の適応があつて、CSは通常の値になるという報告がある⁴⁾¹⁾¹⁷⁾。今後の課題としては、一時的ではなく慢性的に緊張状態にあるときのCSの測定、たとえば緊張度の高い仕事をしている群と一般の群の日常値の比較などが考えられる。また、ストレス状態に長時間おかれたときの慣れ（たとえば不快な状態（悪臭、拘束）に長時間曝露したときのCS変化の測定）や、同じストレスが繰り返されるときの適応（たとえば同様な課題を連続で数日間続けたときのCS変化の経日変化の測定）についても確認する必要がある。



*斜線は正常範囲

図4-1.81 ICUでの精神症状発症時を呈した患者の血中CS（測定は10:00）

また、今回の検討では情動について質問紙などによる確認を行わなかった。発表の被験者Cのように上昇が認められなかった場合、緊張はしたが変化しなかったのか、緊張しなかったから変化しなかったのか明らかではなく、今後はストレスを負荷したときにCS濃度と同時に情動も測定して、その相関をみていく必要がある。その場合は定量的なストレス

ス負荷課題が必要になってくるが、今回の検討の中ではそのような課題はなかった。定量的な課題の代表としては暗算課題のようなものが考えられるが、課題前後の変化を香料の影響とともにみた報告^{4,11,18)}でその変化は1pmol/ml程度であり、またこの測定はRIAで行っているため、この課題でどの程度の上昇があるかは明らかではない。したがって、本法でも測定し、定量的な課題として使用できるようなものを探索し確立する必要がある。今後は、このようにしてより明確に定義されたストレス課題を、バックグラウンド（年齢、性別のみでなく、性格、病歴など）の明確な被験者に負荷し、検討数を増やし、ストレスとCS、情動の関係を考察する。

一方、CAについては、運動ストレスが比較的明瞭に捉えられたが、日常値もCSの様に一定の標準値を示さないことから、かなりの量が検出されたとき、それがストレス状態であるものとも定義できよう。いずれにしても、両者とも定量的な検討の必要があり、次年度の課題としたい。

2. ストレス指標物質測定装置開発

2.1 はじめに

これまでストレス指標物質測定装置の開発においては、フィールド実験に使用可能なコンパクトで、少量の非侵襲な生体試料中のストレス指標物質を迅速に測定する装置の開発を目的に種々の検討を行ってきた。この目的を達成するために、高速液体クロマトグラフ（以下、HPLCと略す）を用いることを考え、また汎用のHPLCではなく、少量の非侵襲な生体試料中のストレス指標物質を高感度に、またフィールド実験に使用可能なコンパクトな装置を設計するために複雑な誘導体化システムが不必要な装置として、セミマイクロHPLCの導入を考えた。

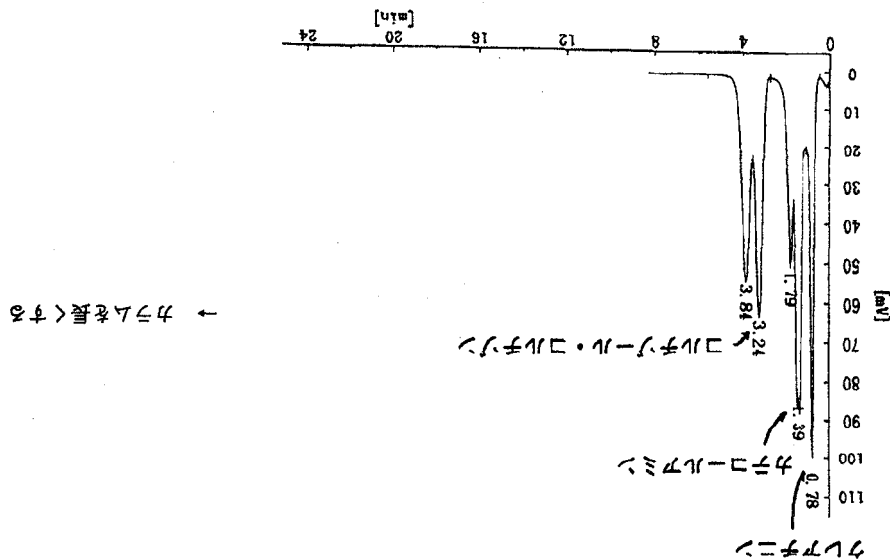
平成3年度から4年度にかけて、既存の装置（(株)医理化製）をもとにセミマイクロフローを可能とするための種々の検討を行い、問題点を解決してきた。その後、ストレス指標物質測定装置プロトタイプの基本となるカラムスイッチングバルブを組み込んだ複合システムについて検討してきた。平成5年度からは、実試料（主として尿）をセミマイクロHPLC基本システムに適用し、その検出感度等の確認を行った。さらには、カラムスイッチングバルブを組み込んだセミマイクロHPLC複合システムに実試料（主として尿）を適用するにあたり、前処理カラムとして用いるMF充填剤を充填したセミマイクロ前処理カラムにおけるストレス指標物質の溶離挙動を、またカラムスイッチング後の分析カラムにおけるストレス指標物質の溶離挙動を詳細に検討してきた。そして、これらの結果を、セミマイクロHPLCとして上市されている「ナノスペース」（(株)資生堂製）を用い、ストレス指標物質測定装置プロトタイプA（主として尿中のストレス指標物質を測定する装置）を構築し、種々の検討を行ってきた。

平成6年度においては、尿中のストレス指標物質を測定する装置であるストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及び最適化を行い、さらに高感度化を目指したストレス指標物質測定装置プロトタイプBの構築を行った。ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及び最適化においては、尿中のストレス指標物質の補正物質であるクレアチニンを同時に測定する必要性から、まずMF充填剤を充填したセミマイクロ前処理カラムの最適化を図り、カラムを内径1.5mm、長さ35mmから内径1.5mm、長さ50mmに変更し、この3成分の分離を良好なものにした。また分析カラムにおいても、クレアチニン、CA及びCS・コルチゾンの各溶離条件を詳細に検討し、最適化を図った。特に、CAについては、定量性の確認（検量線の直線性及び添加回収実験）について検討した。ストレス指標物質測定装置プロトタイプB（主として唾液中のストレス指標物質を測定する装置）の構築においては、高感度化を図るため濃縮カラムを組み込むことが必要となる。そこでまずCA濃縮専用充填剤の開発を行った（本開発結果は、特許として出願した）。この充填剤は、主として唾液中のCAの測定に適用することを考えた（本検討は、ストレス指標物質測定技術の成果を応用し、行っていく予定である）。また唾液中のCS・コルチゾンを測定するために、ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及び最適化の検討において得られた成果を応用し、2カラムスイッチシステム系における検出限界について調べ、また3カラムスイッチシステム系を構築し、唾液中のCS・コルチゾンをこのシステムにより測定することが可能であることを確認した。以下、上記の研究成果について述べる。

検出	UV 254nm
流速	100 μ l/min
移動相	5mM リン酸緩衝液、5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム 5mg/l EDTA-2Na、(pH=6.0)
温度	35℃
カラム	CAP CELL PAK MF Ph-1 (1.5mmi.d. x 35mm)

表4-2.1 HPLC条件

図4-2.1 内径1.5mm、長さ35mmの前処理カラムを用いたときのクロマトグラム



2.2.1 前処理カラム (セミクロMFカラム) の最適化

これまで前処理カラムとしては、当社製MF充填剤を内径1.5mm、長さ35mmのステンレス製カラムに充填したものを、CA及びCS・コルチゾンの分離について、リン酸緩衝液の濃度、リン酸緩衝液の濃度/アセトニトリルの組成比及びイオンペア剤の種類・濃度について検討してきた。その後、ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及びその最適化の検討を行う過程において、尿中のストレス指標物質の補正物質であるクレアチニンを同時に測定する必要性から、さらに前処理カラムにおいてクレアチニン、CA及びCS・コルチゾンの3成分の分離条件について検討するとともに前処理カラムの長さ(35mm及び50mm)についても検討を開始した。

これまでに得られた知見を参考に、イオンペア剤としては1-オクタンスルホン酸ナトリウムを用い、これらの分離挙動を調べた。図4-2.1に内径1.5mm、長さ35mmの前処理カラムを用いたときのクロマトグラムを示す。CAとCS・コルチゾンは良好に分離されているが、クレアチニンとCAはやや分離が悪く、またクレアチニンの保持は約0.8分と小さい。

2.2 ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及びその最適化の検討

そこで、分離の系を変更することは最小限に抑え（分析カラムとの整合性のため）、全体の保持を大きくする方法としてカラムの長さを、35mmから50mmにすることにした（内径1.5mm、長さ35mmを内径1.5mm、長さ50mmの前処理カラムに変更することにより、その保持力は約1.3倍になる）。

また、イオンペアの形成について検討するために、移動相のpHについても検討した。図4-2.2にpH=4.85、図4-2.3にpH=6.02における各クロマトグラムを示す。pHの減少とともに、CAの保持が小さくなる現象が見られた。

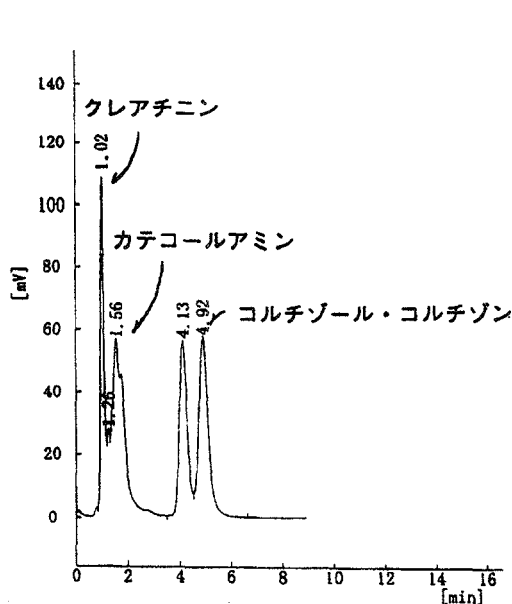


図4-2.2 pH=4.85における
クロマトグラム

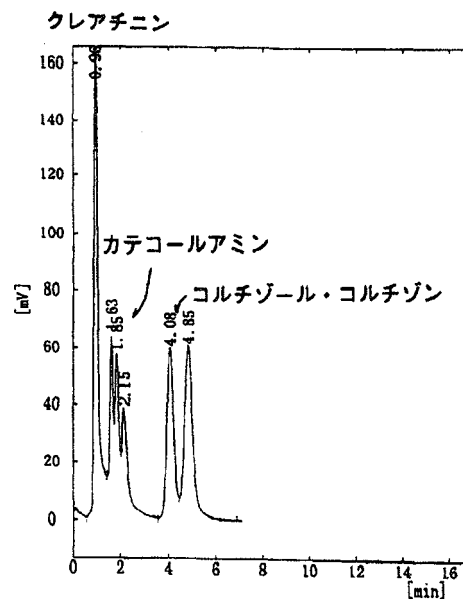


図4-2.3 pH=6.02における
クロマトグラム

以上の結果から、前処理カラムには内径1.5mm、長さ50mmを用い、移動相には5mMリン酸緩衝液、5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム（pH=6.0）を用いることにした。

2.2.2 分析カラムにおける最適化

(1) クレアチニン

クレアチニンはその特性から、一般に尿中の種々の成分を測定するときの補正物質として用いられている。クレアチニンは大変親水性が大きく、また尿中における濃度も約0.7mg/mlであり、尿中のストレス指標物質に比較して約10000倍以上も存在する。したがって、クレアチニンに関しては高感度に分析する必要性はなく、ここでは汎用カラム（4.6mm i.d. x 250mm）を用いて検討することにした。

a. クレアチニンのUVスペクトル

図4-2.4にクレアチニンのUVスペクトルを示す。235nm付近に極大吸収が存在するが、上述したようにクレアチニンの濃度は大変大きいため、検出波長は吸収強度が約1/20である265nmに設定することにした。

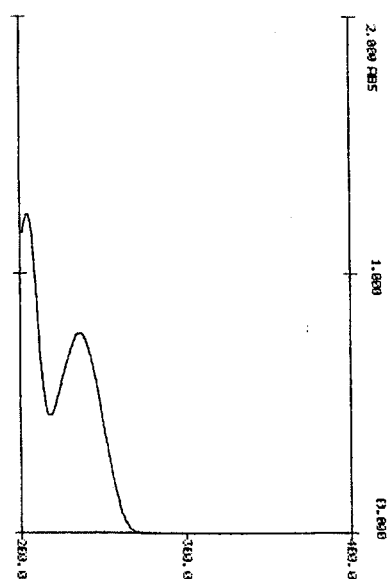


図4-2.4 クレアチニンのUVスペクトル

b. クレアチニンの溶離挙動の検討

図4-2.5に、りん酸緩衝液系において測定したときのクロマトグラムを示す。

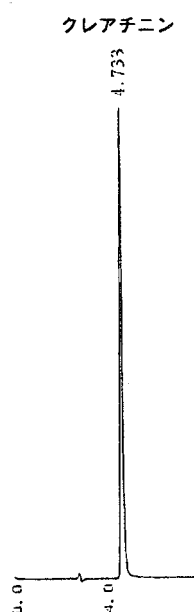


図4-2.5 りん酸緩衝液系において測定したときのクロマトグラム

表4-2.2 HPLC条件

カラム	CAP CELL PAK C18 UG120 (4.6mmi.d. x 250mm)
温度	35℃
移動相	100mM りん酸緩衝液
流速	1.0ml/min
検出	UV 265nm

またイオンペア法により測定したときのクロマトグラムを、図4-2.6（イオンペア剤として1-オクタンスルホン酸ナトリウムを使用）及び図4-2.7（イオンペア剤として1-デカンスルホン酸ナトリウムを使用）に示す。

りん酸緩衝液系及びイオンペア系ともに、クレアチニンは良好に保持されていた。またイオンペア系においては、アルキル基の大きい1-デカンスルホン酸ナトリウムを用いた系のほうが保持は大きかった。最終的な分析移動相は、これら3種類の分析移動相と前処理移動相の整合性を考慮し、決定することになる。

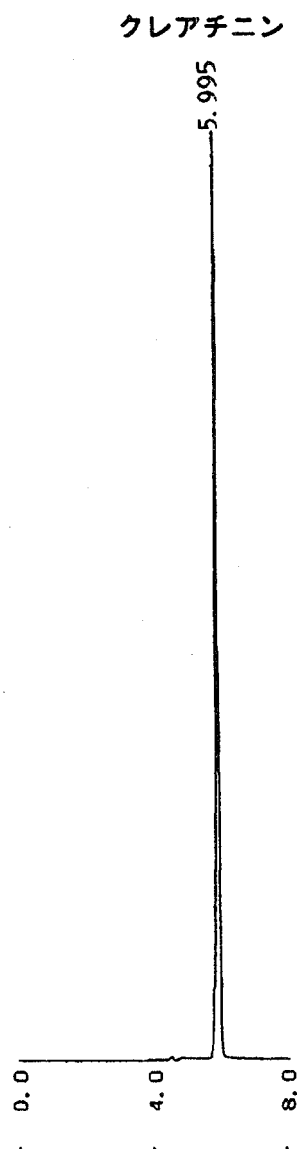


図4-2.6
100mM りん酸緩衝液／アセトリル＝80／20
5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、pH＝2.3
500 μ l/min

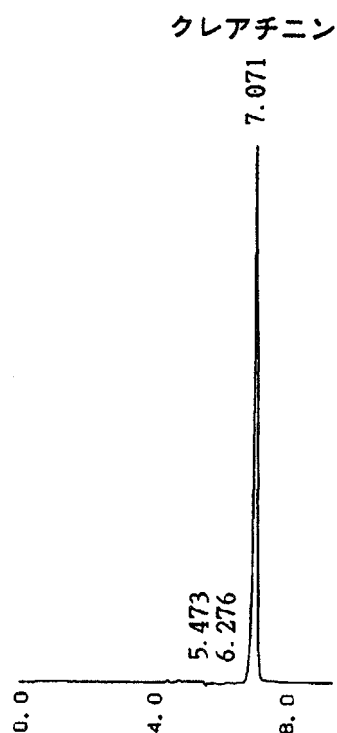


図4-2.7
100mM りん酸緩衝液／アセトリル＝75／25
5mM 1-デカンスルホン酸ナトリウム、pH＝2.3
500 μ l/min

カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6mm i.d. x 250mm)
温度：35℃
検出：UV 265nm

(2) CA

CAは、イオンペア法を用い溶離させ、ECD検出器により検出することを考えている。そこで、前処理移動相と分析移動相のイオンペア剤の種類および濃度については整合性を図るため同一にすることを考え、分析移動相のイオンペア剤の種類および濃度は、5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムに設定した。りん酸緩衝液の濃度は50mMに設定し、りん酸緩衝液/アセトニトリル=93/7、5mg EDTA-2Na、pH=2.3とした。この分析移動相において得られたクロマトグラムを図4-2.8に示す。CAの各ピーク (NE、E及びDA) は良好に分離していることがわかる。

また、汎用カラム (4.6mm i.d. x 250mm) での結果ではあるが、強カチオン交換カラム (当社試作品) によるCAのクロマトグラムを図4-2.9及び図4-2.10に示す。このカラムの特長は、CAのようなカチオンを選択的に分離・溶出させることができることであり、尿のように代謝物や他の生体成分を多く含む試料の分析にはその選択的なモードゆえ有用である可能性がある。

(3) CS・コルチゾン

CS・コルチゾンはともに中性物質であり逆相分配によって保持されるため、保持は一定の温度下では、移動相のりん酸緩衝液の濃度及びりん酸緩衝液/アセトニトリルの組成比によって決定される。これまで、カラム温度は35℃、15mM りん酸緩衝液/アセトニトリル=76/24の条件下で行ってきたが、10mM りん酸緩衝液/アセトニトリル=76/24あるいは10mM りん酸緩衝液/アセトニトリル=78/22の系について、カラムスイッチの系において検討した。

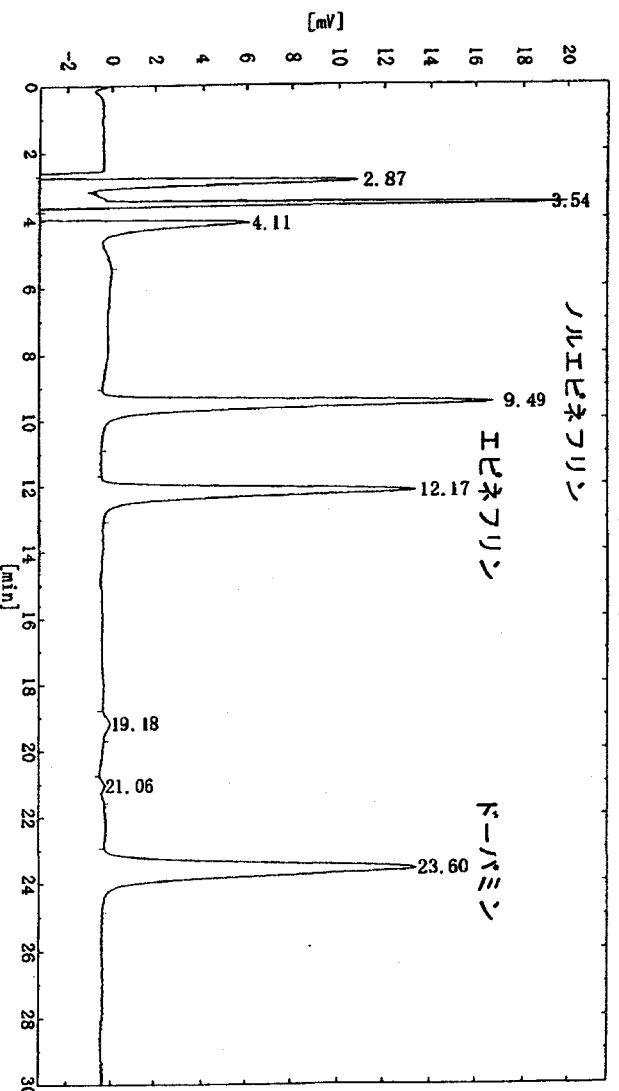


図4-2.8 50mM りん酸緩衝液系におけるCAのクロマトグラム

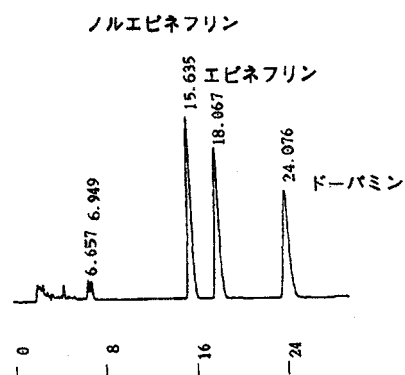


図4-2.9 強カチオン交換カラム（当社試作品）によるCAのクロマトグラム

表4-2.3 HPLC条件

カラム	強カチオン交換カラム（当社試作品） 4.6mmi.d. x 250mm
温度	35℃
移動相	0.1M NaH ₂ PO ₄ /アセトニトリル=95/5、pH=3.50
流速	1.0ml/min
検出	UV 254nm

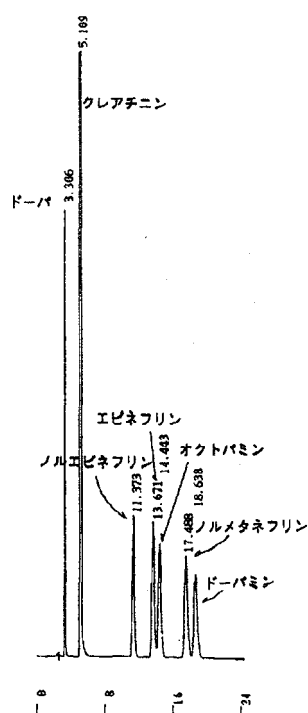


図4-2.10 強カチオン交換カラム（当社試作品）によるCAのクロマトグラム

表4-2.4 HPLC条件

カラム	強カチオン交換カラム（当社試作品） 4.6mmi.d. x 250mm
温度	35℃
移動相	0.2M NaOAc + 0.02M AcOH、pH=5.61
流速	1.0ml/min
検出	UV 254nm

2.2.3 カラムスイッチ系での改良及び最適化

2.2.1において得られた以下の前処理条件を用いて、カラムスイッチング法の改良及び最適化について検討した。

表4-2.5 前処理HPLC条件

カラム	CAPCELL PAK MF Ph-1 (1.5mm x 50mm)
温度	35℃
移動相	5mM リン酸緩衝液/アセトニトリル=98/2、 5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、pH=6.0
流速	100 μ l/min

(1) クレアチニン

a. 分析移動相に100mM リン酸緩衝液を用いたとき

図4-2.11に、尿を20 μ l注入し0.8~1.0分をカラムスイッチすることにより得られたクロマトグラムを示す。標準系における保持時間との比較から、約9.5分のピークがクレアチニンと考えられた。

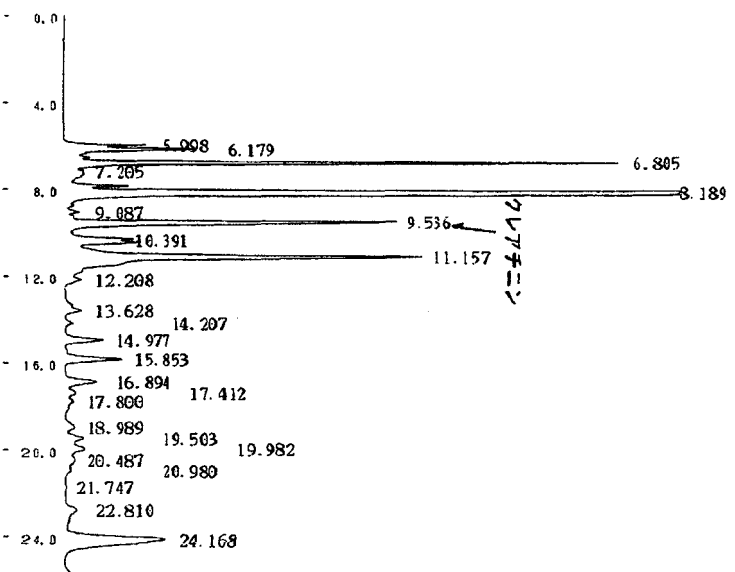


図4-2.11 100mM リン酸緩衝液におけるクロマトグラム

b. イオンペア系の移動相を用いたとき

図4-2.12 (イオンペア剤として1-オクタンスルホン酸ナトリウム)及び図4-2.13 (イオンペア剤として1-デカンスルホン酸ナトリウム)に、尿を20 μ l注入し0.8~1.0分をカラムスイッチすることにより得られたクロマトグラムを示す。分析カラムにおける挙動と同様にして、1-デカンスルホン酸ナトリウムを用いたほうがクレアチニンの保持は大きかった。

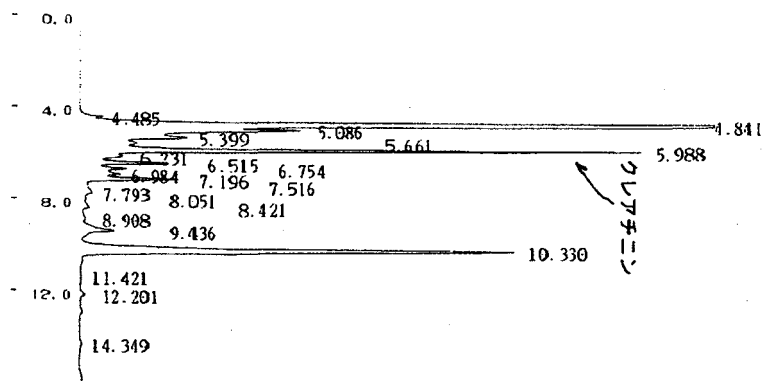


図4-2.12 1-オクタデンスルホン酸ナトリウム系におけるクロマトグラム

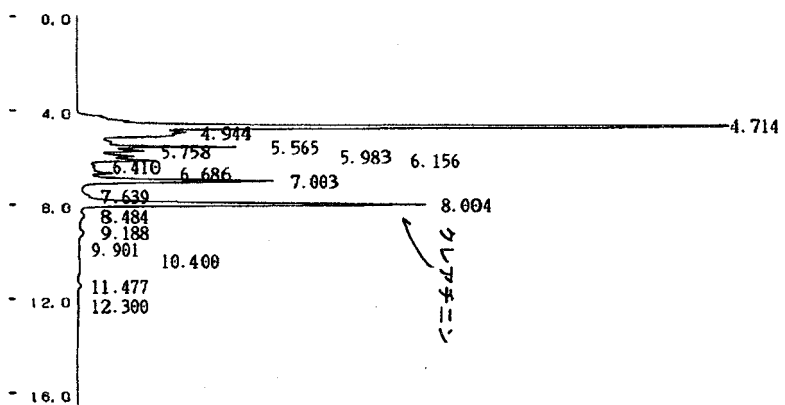


図4-2.13 1-デカンスルホン酸ナトリウム系におけるクロマトグラム

分析時間から考えると、100mMのりん酸緩衝液よりイオンペア系のほうが有利と考えられ、また前処理移動相との整合性を考え、1-オクタンスルホン酸ナトリウムをイオンペア剤とした系を使用することにした。

(2) CA

a. りん酸緩衝液の濃度の最適化

2.2.2において分析移動相には、50mMのりん酸緩衝液系を用い最適化を図ったが、ここでは実際にカラムスイッチングを行うため、50mM りん酸緩衝液系と100mM りん酸緩衝液系について比較し再確認を行った。分析HPLC条件は、以下のとおりである。

表4-2.6 分析HPLC条件

カラム	CAP CELL PAK C18 UG120 (1.5mm x 250mm)
温度	35℃
移動相	(a) 50mM りん酸緩衝液／アセトニトリル=94／6、5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5mg／1 EDTA-2Na、pH=2.3 あるいは (b) 100mM りん酸緩衝液／アセトニトリル=94／6、5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5mg／1-EDTA-2Na、pH=2.3
流速	100 μ l/min
検出	ECD 650mV

標準試料を用いて得られたクロマトグラムを図4-2.14及び図4-2.15に示す。これらのクロマトグラムから、100mM りん酸緩衝液系に比較して50mM りん酸緩衝液系における各CAの保持のほうが、大きいことがわかった。これは、移動相中のイオン濃度の増加にともない、イオンペア形成が困難になるためと考えられた。

図4-2.16及び図4-2.17に、尿を20 μ l注入し、得られたクロマトグラムを示す。移動相のりん酸緩衝液の濃度を50mMに設定したほうが、100mM系より尿中のCAと各妨害ピークの分離は良好であり、(a)の移動相を用いカラムスイッチングを行うことにした。

しかしながら、尿を試料とした場合、性差あるいは個人差により代謝物や他の生体成分等の妨害成分の存在量は大きく異なると考えられ、さらに改良・最適化について検討する必要があると考えられた（強カチオン交換充填剤をセミマイクロカラムに充填し、分析カラムとする等）。

b. 標準系におけるCAの試料注入量とピーク面積及び高さの関係の検討

平成5年度にCS・コルチゾンについて検討した方法と同様にして、100ng/mlのCA溶液を用い、5 μ l、10 μ l、20 μ l、25 μ l、30 μ lおよび50 μ l注入し、各CAのピーク面積及び高さとして試料注入量の関係を調べた。図4-2.18及び図4-2.19に試料注入量とピーク面積及び高さの関係を表わすグラフを、それぞれ示す。ともに30 μ lまで（すなわち、注入絶対量として3ng）の試料を注入しても直線関係は保たれ、定量性は失われないことがわかった。

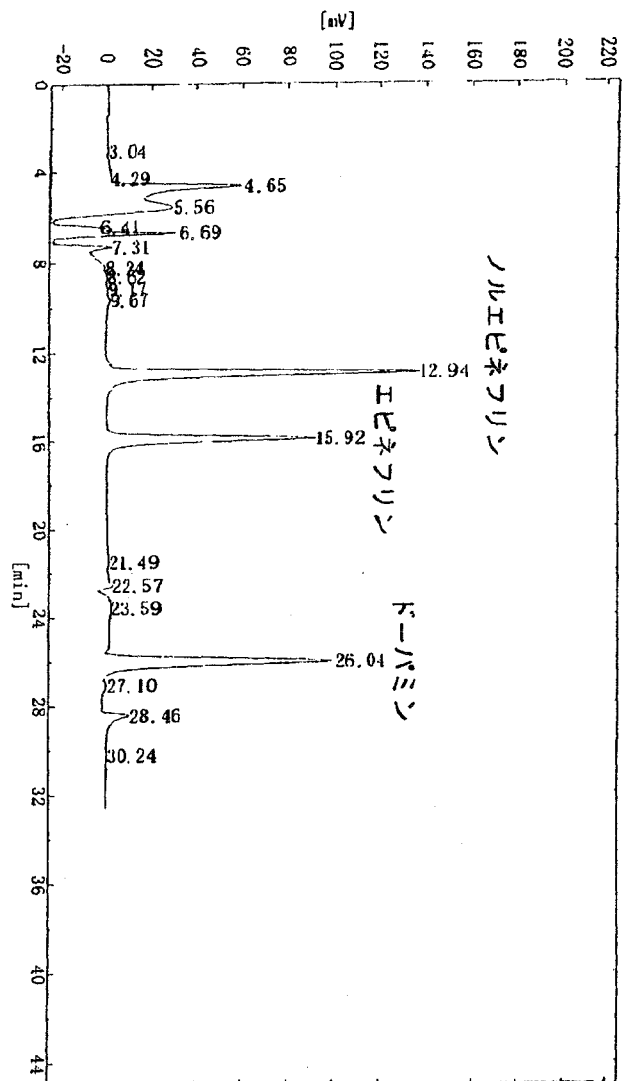


図4-2.14 (a)の移動相におけるクロマトグラム (標準系)

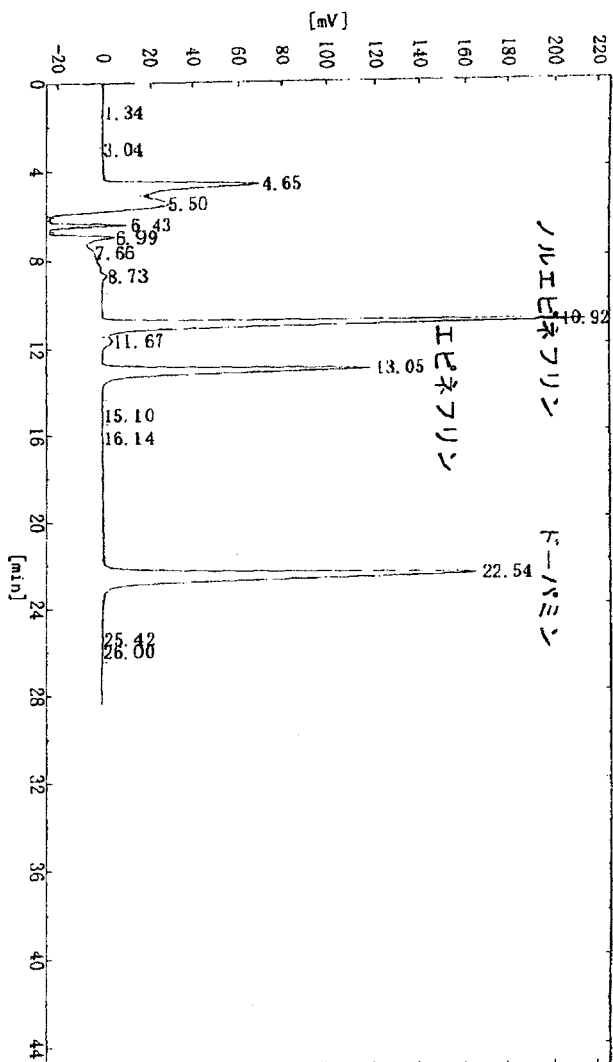


図4-2.15 (b)の移動相におけるクロマトグラム (標準系)

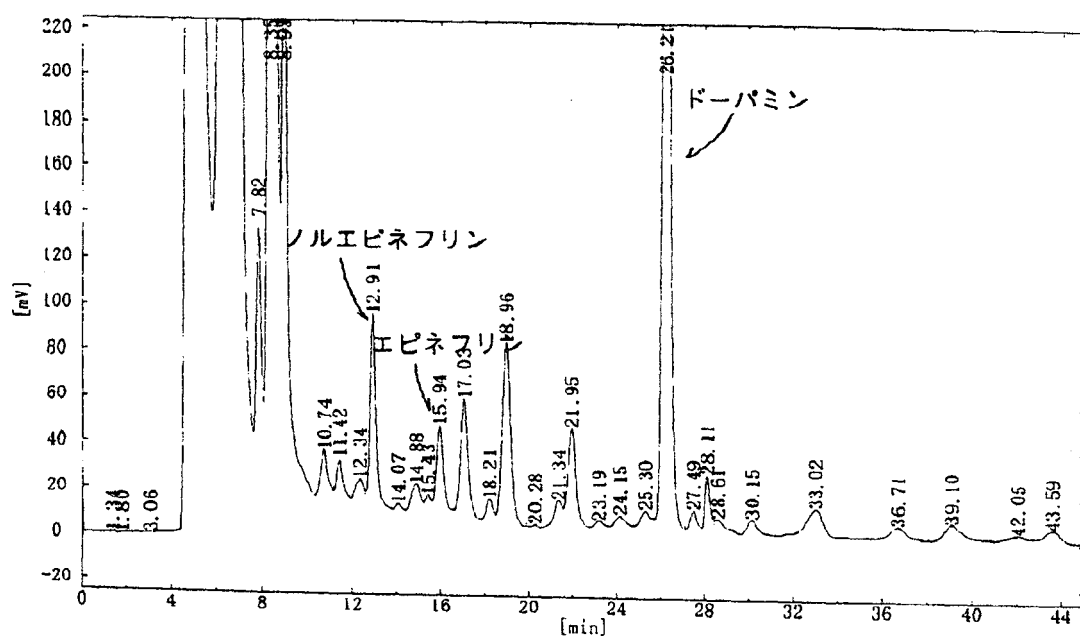


図4-2.16 (a)の移動相における尿20 μ l注入時のクロマトグラム

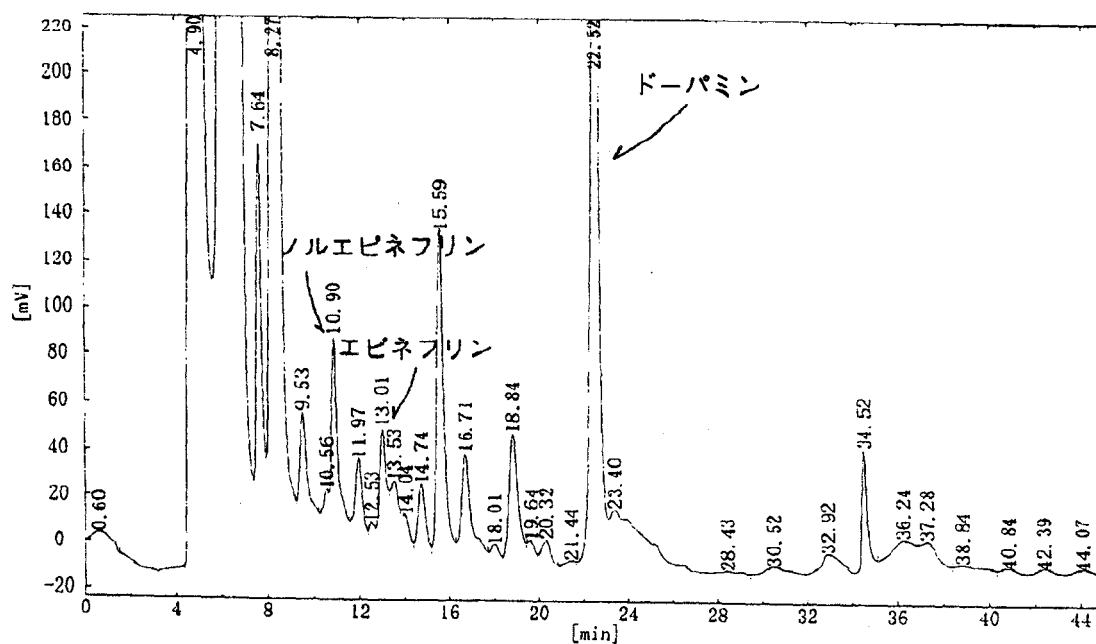


図4-2.17 (b)の移動相における尿20 μ l注入時のクロマトグラム

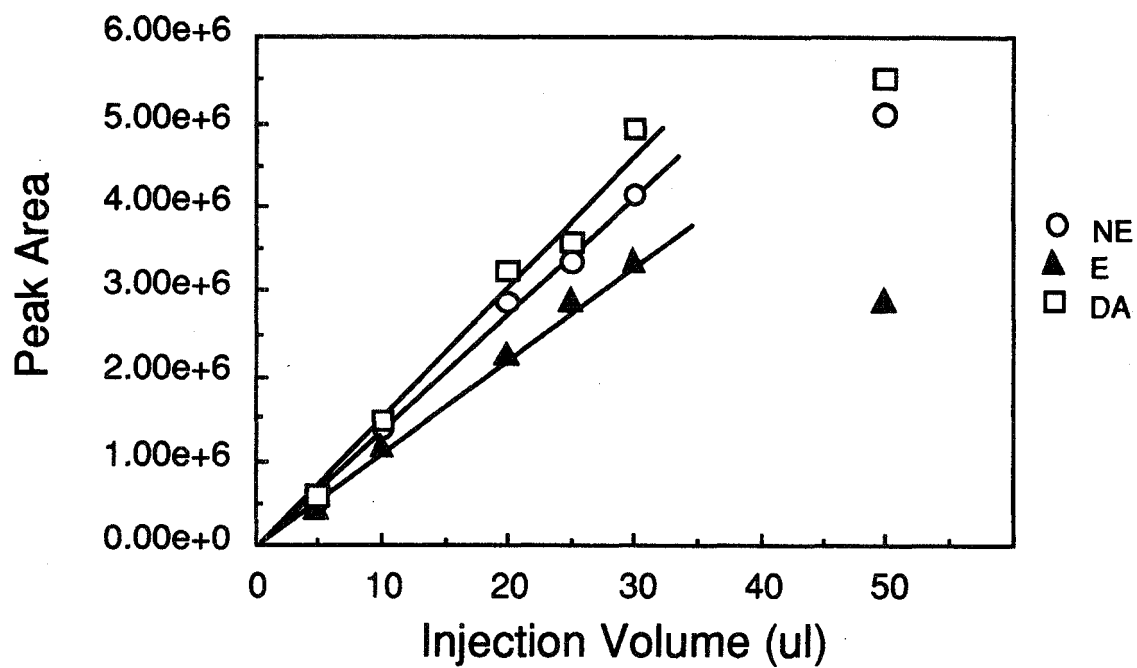


図4-2.18 試料注入量とピーク面積の関係

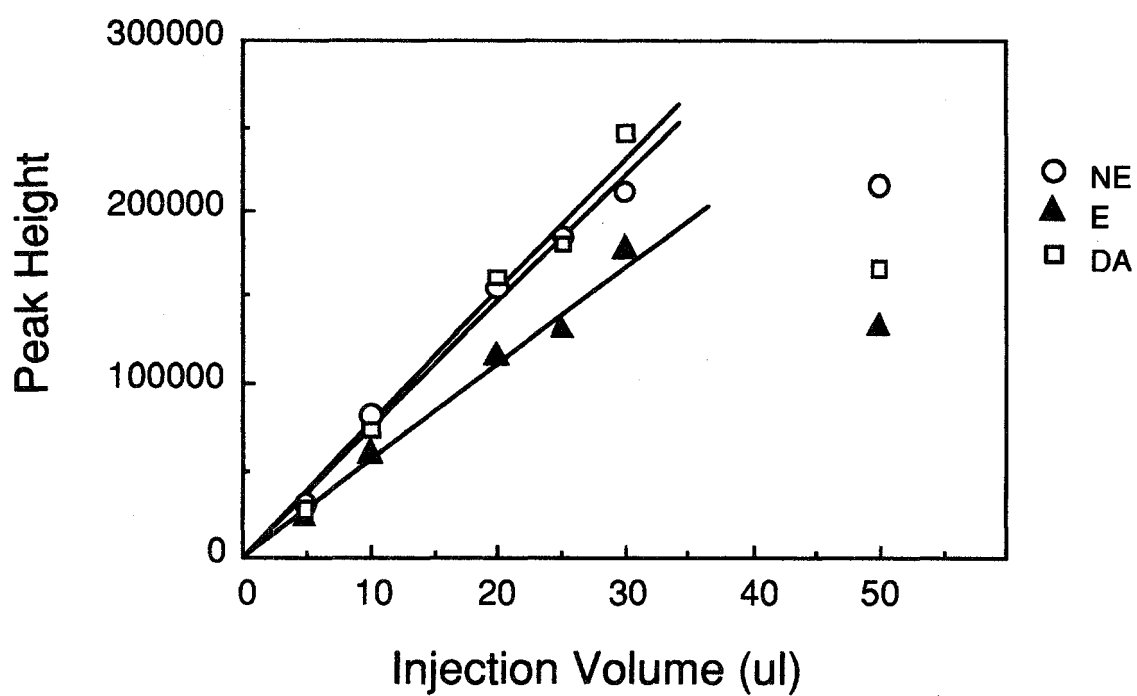


図4-2.19 試料注入量とピーク高さの関係

c. 添加回収実験及び再現性

ヒト尿1.0mlにCAを100pmol添加し、20 μ l注入することにより、その添加回収率と再現性について調べた。得られた結果を、表4-2.7に示す。

表4-2.7 添加回収実験結果

ストレス指標物質	n	回収率 (%)		CV (%)	
ノルエピネフリン	1	91.2	平均	92.6	2.49
	2	89.9			
	3	94.3			
	4	92.2			
	5	95.6			
エピネフリン	1	75.6	平均	78.4	6.80
	2	85.3			
	3	78.9			
	4	71.2			
	5	80.9			
ドーパミン	1	102.3	平均	107.3	5.43
	2	110.5			
	3	114.3			
	4	100.3			
	5	108.9			

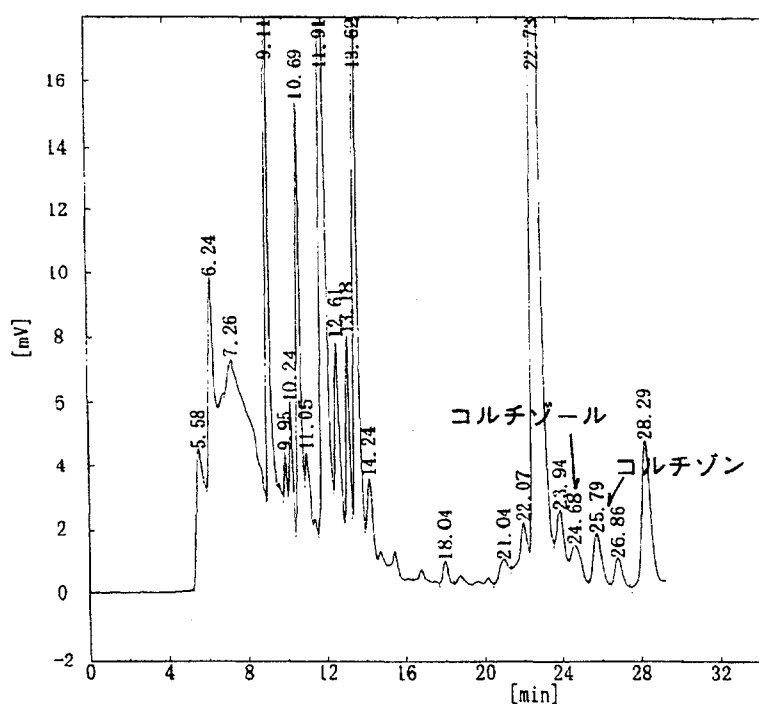
NEの回収率及び再現性は良好であったが、Eについては回収率は低く、再現性も良くなかった。またDAの回収率はやや大きい傾向にあった。Eの回収率が低いのは、Eのピークの付近に妨害成分が存在し、これがEの回収率に影響を与えていると考えられた。一方、DAはNE及びEに比較して、約10倍ほど存在し試料注入量の微小なバラツキが回収率に影響を与えている可能性があると考えられた。

(3) CS・コルチゾン

内径1.5mm、長さ35mmの前処理カラムを用い、設定したカラムスイッチング系に尿を適用し、データの蓄積を図ってきたところ、CSのピークの前に大きな未知ピークの出現が認められ、CSとこのピークが重なるケースが起こった。図4-2.20にその典型的なクロマトグラムを示す。またこのときのHPLC条件を以下に示す。

表4-2.8 HPLC条件

前処理 HPLC条件	カラム	CAP CELL PAK MF Ph-1 (1.5mmi.d. x 35mm)
	温度	35℃
	移動相	5mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=98／2、 5mM 1-オクタスルホン酸ナトリウム (pH=6.0)
	流速	100 μ l/min 2.50～5.47分をカラムスイッチング
分析 HPLC条件	カラム	CAP CELL PAK C18 UG120 (1.5mmi.d. x 250mm)
	温度	35℃
	移動相	10mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=76／24
	流速	100 μ l/min
	検出	UV 242nm

図4-2.20 内径1.5mm、長さ35mmの前処理カラムを用いた
カラムスイッチング系におけるクロマトグラム

そこで、前処理カラムを 内径1.5mm、長さ35mmから 内径1.5mm、長さ50mmに変え、他の HPLC条件は同一にして測定したときのクロマトグラムを図4-2.21に示す。また分析移動相の10mM リン酸緩衝液／アセトニトリルの比率を76／24から78／22に変えたとき得られたクロマトグラムを図4-2.22に示す。

前処理カラムを 内径1.5mm、長さ35mmから 内径1.5mm、長さ50mmに変えることにより、未知ピークとCSの分離が達成され、分析移動相の10mM リン酸緩衝液／アセトニトリルの比率を76／24から78／22に変えることにより、さらに未知ピークとCSの分離が達成された。

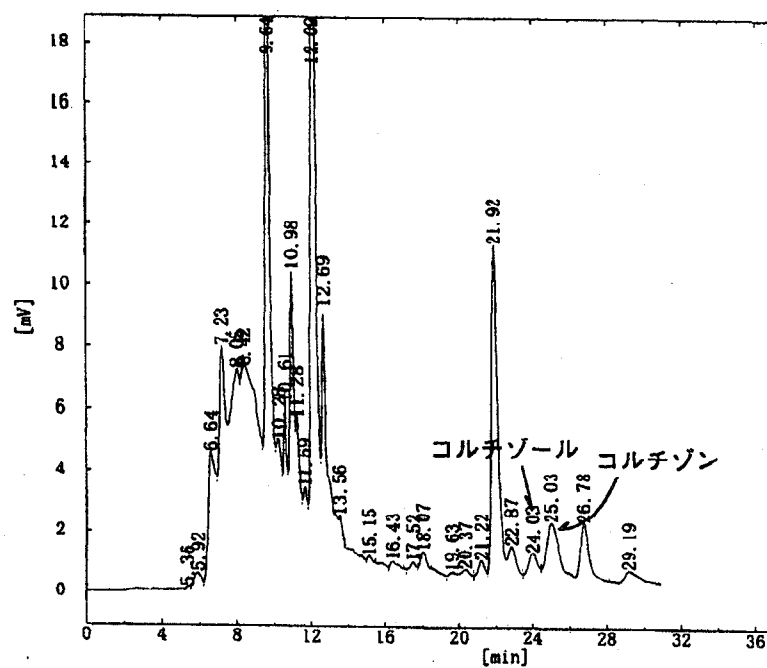


図4-2.21 内径1.5mm、長さ50mmの前処理カラムを用いた
カラムスイッチング系におけるクロマトグラム

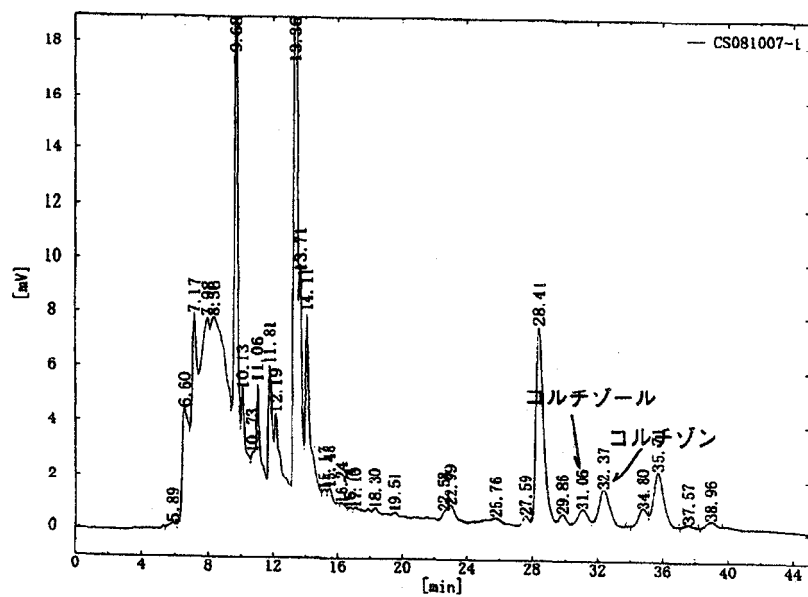


図4-2.22 分析移動相を10mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=78／22
にしたときのクロマトグラム

2.3 ストレス指標物質測定装置プロトタイプBの開発

2.3.1 CA濃縮専用充填剤の開発

唾液を試料とするストレス指標物質測定装置プロトタイプBは、唾液中におけるストレス指標物質の存在量が尿の約1/10であるため、尿を試料とするプロトタイプAよりも約10倍以上の感度の向上が要求される。そのため、ストレス指標物質測定装置プロトタイプAに濃縮カラムを組み込んだシステム、あるいはポストラベル方式による蛍光検出システム等を考える必要がある。

ここでは、唾液中のCAを測定する目的で、CA濃縮専用充填剤の開発の検討内容について報告する。

(1) CA濃縮専用充填剤の合成

シリカゲルをシリコンポリマーで被覆したポリマーコート型シリカゲルを用い、これにアリルグリシジルエーテルを反応させた後、m-アミノフェニルホウ酸を反応させCA濃縮専用充填剤を得た（反応試薬量及び反応時間等については、文献^{4-2.1)}を参考に詳細に検討した）。図4-2.23に、この反応のプロセスを示す。

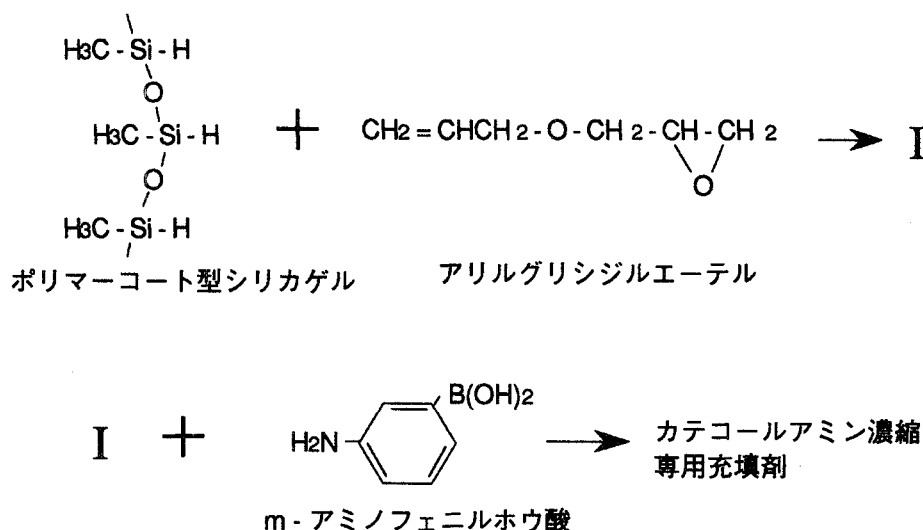


図4-2.23 CA濃縮専用充填剤の合成のプロセス

本充填剤は、中性～アルカリ性領域においてシス-ジオール骨格を有する化合物（CAや糖等）と錯体を形成し、これらの化合物を吸着する。また酸性領域においては、逆に錯体を形成することができず、吸着していたシス-ジオール骨格を有する化合物を解離するという性質を有している。この性質を利用してCAを濃縮することを考えた（なお、本発明については特許を作成し、出願を行った）。

(2) CA濃縮専用充填剤の評価

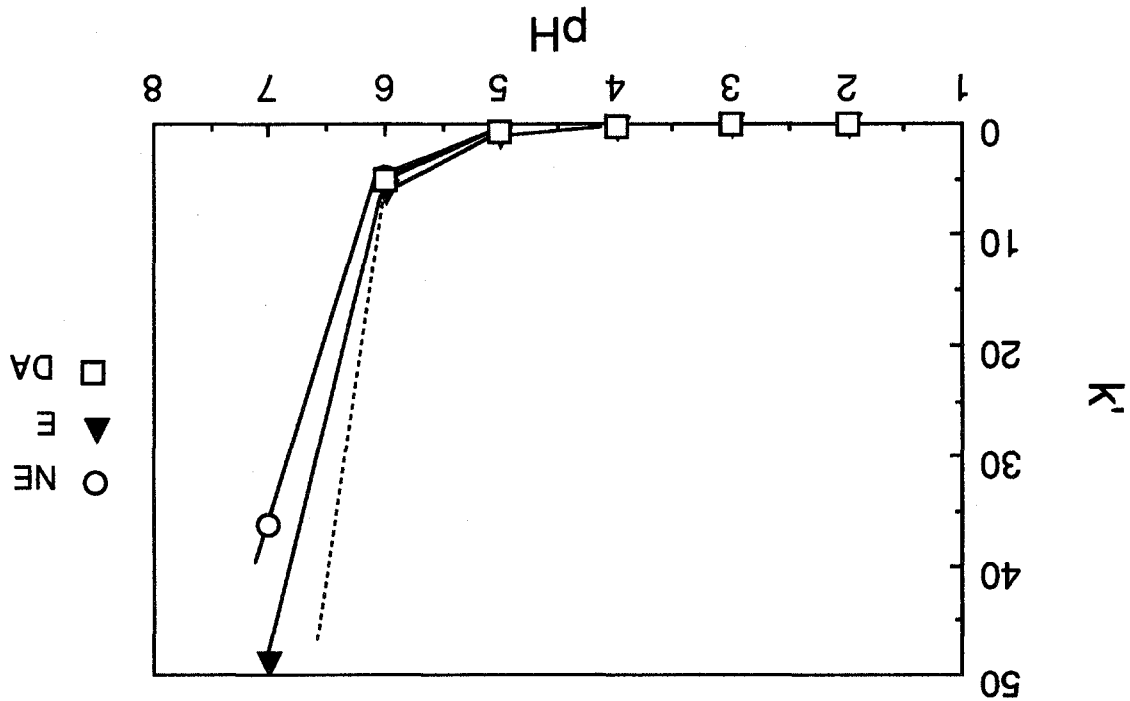
この充填剤を内径1.5mm、長さ35mmのカラムに充填し、以下のHPLC条件下で移動相のpHを変化させ、CAの保持比（ k' ）との関係を調べた。

CS及びコルチゾルの検出限界は、 1ng/ml であった（試料注入量は $100\mu\text{l}$ ）。この検出限界は約 3pmol/ml に相当し、唾液中のCSの濃度（高いレベル）に匹敵することになった。また、このシステムは誘導体化等の複雑なシステムではなく、UV検出による簡便なシステムであり、このシステムを基本にしてよりコンパクトな装置を開発することが可能と考えられた。さらにこのUV検出による簡便なシステムにおいては、CSだけでなく硫酸発色による蛍光誘導体化法では検出することができないコ

いた）。また分析移動相には 10mM リン酸緩衝液/アセトニトリルの比率 $=76/24$ を用いた。また、前処理カラムには内径 1.5mm 、長さ 50mm のもので述べた条件を用いた。ただし、HPLC条件は、 $2.2.3$ の(3)のところでCS及びコルチゾルの検出限界について検討した。HPLC条件は、 $2.2.3$ の(3)のところで図4-2.25に2カラムシステム及び1カラムシステムのタイグラムを示す。このシステムを用い、

2.3.2 ストレス指標物質測定装置プロトタイプBの構築
(1) 2カラムシステム系における検討

図4-2.24 移動相のpHとCAの保持比（ k' ）の関係



得られた移動相のpHとCAの保持比（ k' ）の関係を、図4-2.24に示す。

試料	CA (各 100ng/ml)
検出	UV 254nm
流速	$100\mu\text{l/min}$
移動相	15mM リン酸緩衝液/アセトニトリル $=94/6$
温度	35°C
カラム	$1.5\text{mm i.d.} \times 35\text{mm}$

表4-2.9 HPLC条件

ルチゾンも同時に測定することが可能である。しかしながら、唾液中におけるCSの濃度は、 3pmol/ml 以下のこともありさらなる感度の向上が必要である。そこで、2カラムスイッチシステムにさらに濃縮カラムを組み込んだ3カラムスイッチシステムを考えた。

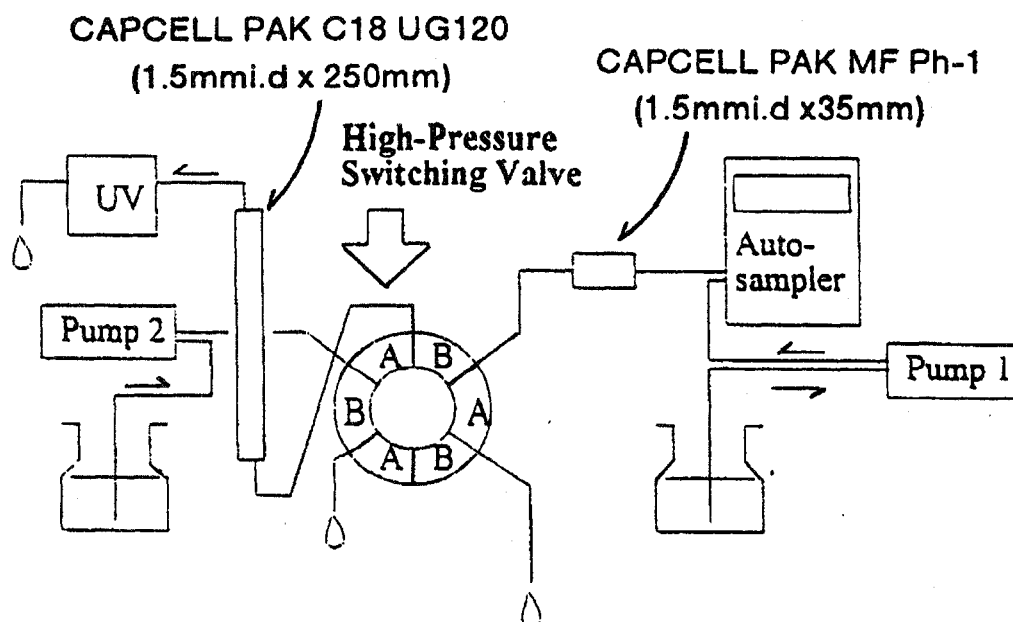


図4-2.25 2カラムスイッチシステムのダイアグラム

(2) 3カラムスイッチシステム系における検討

図4-2.26に3カラムスイッチシステムのダイアグラムを示す。

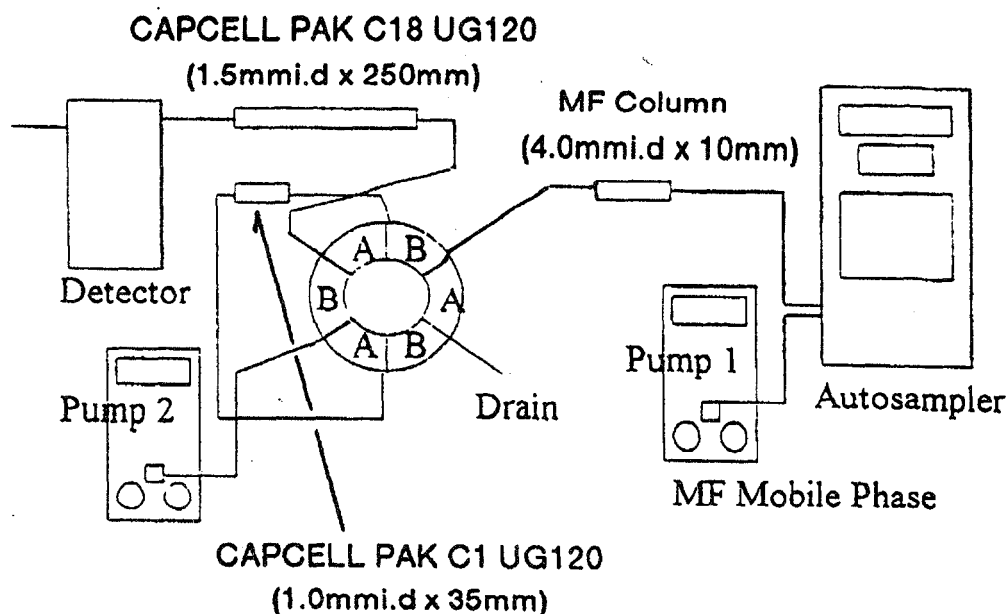


図4-2.26 3カラムスイッチシステムのダイアグラム

このシステムを用い、唾液中のCS及びコルチゾンの測定について検討した。用いたHPLC条件は、以下のとおりである。

表4-2.10 HPLC条件

前処理 HPLC 条件	カラム	CAP CELL PAK MF Ph-1 前処理カートリッジ (4.0mmi.d. x 10mm) 及び CAP CELL PAK C1 UG120 (1.0mmi.d. x 35mm)
	温度	35℃
	移動相	100mM KH ₂ PO ₄
	流速	1.0ml/min 及び 100 μ l/min
	試料注入量	唾液 50 μ l
分析 HPLC 条件	カラム	CAP CELL PAK C18 UG120 (1.5mmi.d. x 250mm)
	温度	35℃
	移動相	100mM KH ₂ PO ₄ /アセトニトリル=75/25
	流速	100 μ l/min
	検出	UV 242nm

得られたクロマトグラムを、図4-2.27に示す。約26～27分にCS及びコルチゾンが検出された。本検討では、唾液を希釈しないで50 μ l直接注入することにより測定を行ったが、一般に唾液は粘性を有するため、試料注入は希釈した唾液を注入する必要があると考えられた。

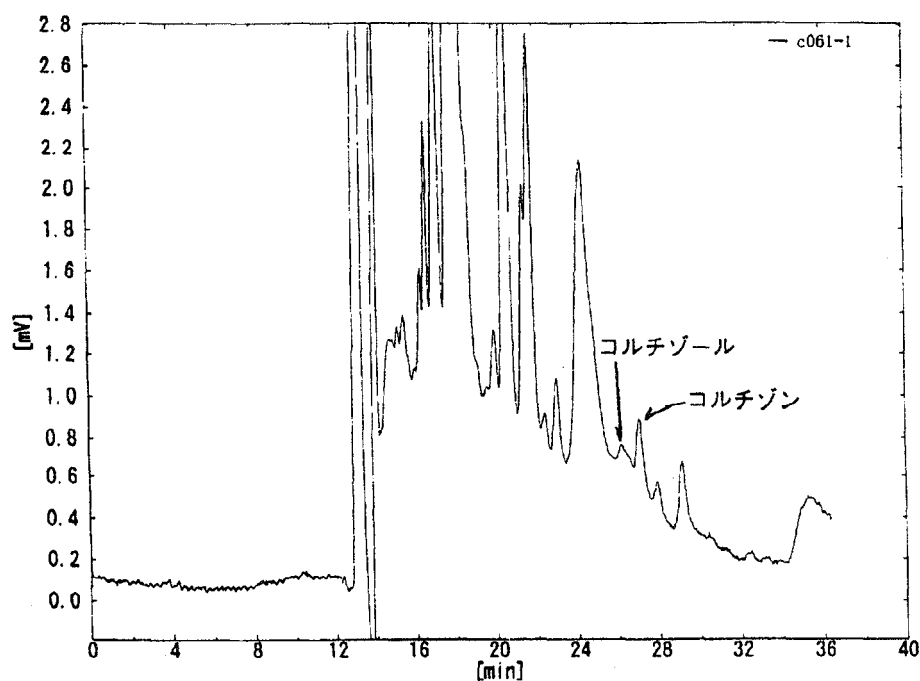


図4-2.27 3カラムスイッチシステムにおける唾液中CS及びコルチゾンのクロマトグラム

2.4 まとめ

2.4.1 ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及び最適化

尿中のストレス指標物質（CA及びCS・コルチゾン）及びその補正物質となるクレアチニンを測定する系を設定することを考え、前処理カラム及び分析カラムにおいて、これらの物質の溶離条件を前処理カラムと分析カラムの整合性を考慮しつつ詳細に検討した。

その結果、以下のような系を設定した。

(1) 前処理HPLC条件

- ① カラム：CAPCELL PAK MF Ph-1 (1.5mmi.d. x 50mm)
- ② 温度：35℃
- ③ 移動相：5mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=98／2、
5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (pH=6.0)
- ④ 流速：100 μ l/min
- ⑤ 試料注入量：尿 20 μ l

(2) クレアチニンの分析HPLC条件 0.8～1.0分をカラムスイッチング

- ① カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6mmi.d. x 250mm)
- ② 温度：35℃
- ③ 移動相：100mM リン酸緩衝液 (pH=6.50) (あるいはイオンペア系)
- ④ 流速：1.0ml/min
- ⑤ 検出：UV 265nm

(3) CAの分析HPLC条件 1.3～3.0分をカラムスイッチング

- ① カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (1.5mmi.d. x 250mm)
- ② 温度：35℃
- ③ 移動相：50mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=94／6、5mg/l EDTA-2Na
5mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (pH=2.3)
- ④ 流速：100 μ l/min
- ⑤ 検出：ECD 650mV

(4) CS及びコルチゾンの分析HPLC条件 3.47～6.03分をカラムスイッチング

- ① カラム：CAPCELL PAK C18 UG120 (1.5mmi.d. x 250mm)
- ② 温度：35℃
- ③ 移動相：10mM リン酸緩衝液／アセトニトリル=76／24 (あるいは78／22)
- ④ 流速：100 μ l/min
- ⑤ 検出：UV 242nm

これらのHPLC条件を基本にして、さらに改良及び最適化を図っていく予定である。

2.4.2 ストレス指標物質測定装置プロトタイプBの開発

(1) CA濃縮用充填剤の開発

シリカゲルをシリコーンポリマーで被覆したポリマーコート型シリカゲルを用い、m-アミノフェニルホウ酸を反応させ、ホウ酸基を導入したCA濃縮用充填剤を合成した。これをカラムに充填し、その基本特性について調べたところ、中性領域において

はCAを強く保持し、酸性領域においてはほとんど保持せず、ホウ酸基をもつCA濃縮用充填剤の特長を有していた。

(2) ストレス指標物質測定装置プロトタイプBの構築

2カラムスイッチシステム及び3カラムスイッチシステム（ともにUV検出による簡便なシステム）を構築した。2カラムスイッチシステムにおけるCS及びコルチゾンの検出限界は、約3pmol/mlであり、唾液中のCSを測定することが可能なレベルであった。また2カラムスイッチシステムは、硫酸による蛍光誘導体化法では測定することができないコルチゾンも同時に測定することが可能であった。

2カラムスイッチシステムにさらに濃縮カラムを組み込んだ3カラムスイッチシステムは、2カラムスイッチシステムよりさらに高感度であり、唾液を50 μ l注入することにより唾液中のCS及びコルチゾンが測定可能であった。

3. あとがき

3.1 第1期のまとめ

3.1.1 ストレス指標物質計測技術開発

CS、CAをストレス指標物質として限定し、非侵襲的採取が可能ではあるが、血液の「一種のろ液」として以外、生体液としての位置付けが十分なされていない唾液を対象として、これらの指標物質を少量(2ml以下)で、かつ迅速に(1日15検体以上)分析する技術の開発が直接的な目標であったが、一方では装置開発に向けてのリード情報提供のための研究として、更にはプロジェクト全体の前提条件となっていたCS、CAのストレス指標物質としての可能性を見極めるためのリード研究としても位置付けられている。技術開発においてのポイントは、既に放射性同位元素を用いる免疫学的手法(RIA)法によりかなりの情報が蓄積されていた唾液中CSの濃度が pmol/ml (重量で10~100億分の1 g/ml)であることから、高感度な検出法の開発と未知に近い唾液中の他成分の妨害を最小限にとどめること、即ちRIA法では通常実施されない目的物質の分離、単離手段を付与することであったが、後者については本研究受託時点から当研究室の基幹技術の一つである高速液体クロマトグラフィー関連技術を応用することが前提となっていた。また、CAについては唾液中に関する報告例がほとんどなかったことから、その存在の確認、挙動の検討自体も開発のポイントとなった。高感度検出については、研究開始初期からレーザーの利用に着目し、試作機によりその可能性を探ってきたが、研究2年目に実用装置が初めて市場に導入され、これを導入したことで1~10 fmol (重量で1~10兆分の1 g)の検出感度が達成できたし、学会等においても実用化に関しては比較的初期の段階で報告できた。しかしながら、この感度は、レーザーから本来期待される感度に比較すると極めて不十分なものであり、最終的な感度の達成はあらゆる部分の最適化、濃縮システムの開発導入等総合的な技術開発の産物であると言える。逆相系カラムにおけるCSの先端濃縮、分離機能の統合についても理論的には考えられるものの、実用開発された例はそれほど多くはなく、関連する技術の複合化・総合的利用により、目標達成を常に意識した研究が進められてきたとまとめることができる。CAについては、血液、尿の専用自動分析機器が既に市場に導入され、実用化されている状況においては、そのポイントは唾液と言う対象側にあり、特にCAの存在、これらの安定性、そして安定化、抱合体の検索等本研究により得られた知見は、装置開発には必要不可欠な情報となろう。第1期の技術開発の直接的な数字目標であった唾液2ml以下、1日15検体以上、非連続・非一体型については、各々唾液0.1~0.4ml、1日20検体以上、連続(自動、CS・CA同時)・非一体型として目標をかなり上回る形で達成することができた。また、唾液の採取法、実際の試験操作法等についても、直ちに実用に供せるように各段階について精査な確認実験が終了しており、所謂、測定試験法として開発が完全に終了している。一方の目標としたCS・CAのストレス指標物質としての位置付けについては、前者が多数の聴衆を前にした発表という日常的な心理ストレスに対し、ある程度の感度を有することが確認できた他、ストレス検知のベースラインとなる日常値データ(標準値)がCSについて完備でき、CAについては測定が終了し、一部解析が終了した状態となっている。

3.1.2 ストレス指標物質測定装置開発

フィールド実験に使用可能なコンパクトで、少量の非侵襲な生体試料中のストレス指標物質を迅速に測定することを目的に、ストレス指標物質測定装置の開発を行ってきた。

この目的を満足させる手段として、高速液体クロマトグラフィーによる測定を考え、また、フィールド実験に使用可能なコンパクトで、少量の非侵襲な生体試料中のストレス指標物質を高感度に分析するという点から、汎用HPLCではなく、セミマイクロHPLCを考えた。

平成3年度から4年度にかけて、既存の装置をもとにセミマイクロフローを可能とするための種々の検討を行い、またストレス指標物質測定装置プロトタイプAの基本となる前処理カラム及びスイッチングバルブを組み込んだ複合システムについても問題点を抽出しそれらを解決してきた。そして平成5年度からは、実試料（主として尿）をこれらのシステムに適用し、セミマイクロHPLCの有効性について確認し、セミマイクロHPLCとして上市されている「ナノスペース」（(株)資生堂製）を用い、ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの構築を行ってきた。これを受けて平成6年度では、ストレス指標物質測定装置プロトタイプAの改良及び最適化について詳細に検討を行うことにより、尿中のストレス指標物質であるCAとCSを、補正物質であるクレアチニンと同時に測定する系を設定し、その装置を構築した。さらにストレス指標物質測定技術の結果及び上記の検討結果を踏まえ、唾液中のストレス指標物質を測定するストレス指標物質測定装置プロトタイプBについても構築し、唾液中のCSについては測定することが可能となった。また同時にCA濃縮専用充填剤を開発した（本発明は、特許として出願した）。

以上より、第1期においてはセミマイクロ仕様によるストレス指標物質測定装置プロトタイプA（主として尿を試料とする）及びストレス指標物質測定装置プロトタイプB（主として唾液を試料とする）の構築を図り、実用機へのステップを図った。

3.2 成果応用の展望

3.2.1 ストレス指標物質計測技術開発

第1期で開発されたシステム、測定試験法は、本研究の最終的な目標であるセミマイクロHPLCを基本とする小型一体型連続測定装置の開発、実用化にいたるまでの中間的な測定装置として、本研究に必要な情報を提供していく重要な手段となることは明らかである。同時に、装置開発研究に対しても、それが同じ技術を基本とするものであることから、多くの有用な情報を与えるものであることも明らかであるし、この部分は本来の目標とされていた部分でもある。ストレス指標としての確立については、CAの測定結果は、指標としての有用性を検討していく上でのベースを与えるものであり、今後の研究の方向に重要な示唆を提供するものと考えられる。

3.2.2 ストレス指標物質測定装置開発

ストレス指標物質測定装置プロトタイプA（主として尿を試料とする）及びストレス指標物質測定装置プロトタイプB（主として唾液を試料とする）を用い、非侵襲な生体試料

を適用させることにより、ストレスをストレス指標物質であるCAとCS、さらにはコルチゾンについても測定することが可能であり、ストレスを評価することが可能であると考えられる。

3.3 第2期研究への展開

3.3.1 ストレス指標物質計測技術開発

本研究は、第2期においては1年間に限って継続することとなっているが、成果応用の項で述べた如く、中間的な装置としての位置付けを十分に発揮し、ストレス指標確立に向けてのデータの蓄積に努めたい。即ち、単なるストレス検知ではなく、定量的なストレス負荷と測定結果の定量的な取り扱いの可能性をCSについて検討すること、CAが出現する状況を探し、ストレスと唾液中CAとの関連を明確にすることが主たる目標として挙げられる。測定装置そのものとしては、今年度検討に着手したもう一つの高感度検出手段である化学発光検出法の検討であり、更に高感度化が達成できれば、より微小なCAの変動とストレスとの関連を追究することが可能となろう。いずれにしても、「生理」と「相関」の二つの研究をつなぐ媒体研究としての位置付けが最重要課題であり、有用な情報提供を目的に上記の研究計画を進行させたい。

3.3.2 ストレス指標物質測定装置開発

第1期において得られた成果とストレス指標物質測定技術の成果を結合させ、実用機への明確なステップを図ることを予定している。

具体的には、ストレス指標物質測定装置プロトタイプA（主として尿を試料とする）のさらなる改良及び最適化を推進し、カラムの選択及び粒子径の検討（ファーストカラムの使用、 $3\mu\text{m}$ の充填剤を充填したセミマイクロカラムの使用及びセミマイクロカラム仕様の強カチオン交換カラムの使用等）を行い、分離及び分析時間等の短縮を図っていく予定である。また、ここで得られた成果とストレス指標物質測定技術の成果を結合させ、さらにはCA濃縮専用充填剤を充填したセミマイクロカラムを用い、唾液中のCAの測定装置（ストレス指標物質測定装置プロトタイプB）の実用機へのステップを図っていく予定である。

3.4 文献

- 4-1.1) K.O.Schwab, G.Heubel, H.Bartelsh, Eur. J. Chem. Clin. Biochem., 30(9), 541-544, 1992
- 4-1.2) H.Thomas et al, Life Sciences, 43, 19-26, 1988
- 4-1.3) H.Weicker, Int. J. Sports Medicine, 9(2), 68-74, 1988
- 4-1.4) R.F.Walker, Front. oral Physiol., 5, 33-50, 1984
- 4-1.5) 真島英信, 生理学, 改訂第18版, 559, 1993
- 4-1.6) G.Brandenberger et al, Biological Psychology, 10, 239-252, 1980
- 4-1.7) Sudo, A., Ind. Health, 26, 263, 1988
- 4-1.8) Peter, J. et al, "Immunoassay of Steroids in Saliva", 9th Tenovus Workshop Cardiff 1982, Alpha Omega, Cardiff, 1984

- 4-1.9) Al-Ansari, A. et al, Ann.Clin.Biochem., 19, 163, 1982
- 4-1.10) Guehot, J. et al, Hormone Res., 16, 357, 1982
- 4-1.11) Fiet, J. et al, Interet du dosage du cortisol dans la salive, Nouv.Pressmed 10, 2664, 1981
- 4-1.12) Vessey, B. et al, Experientia, 28, 1104, 1972
- 4-1.13) Jun Noma et al, Journal of Chromatography, 568, 35-44, 1991
- 4-1.14) P.M.M.Meulenberg et al, Clin.Chem., 36(1), 70-75, 1990
- 4-1.15) Stephen E.Wade et al, Journal of Liquid Chromatography, 14(9), 1813-1827
- 4-1.16) M S L Lo et al, Singapore Med J , 33, 170-173, 1992
- 4-1.17) J.R.Bassett et al, International Journal of Psychophysiology, 5, 265-273, 1987
- 4-1.18) 谷田正弘、菊池晶夫, 第26回味と匂いのシンポジウム論文集, 305, 1992
- 4-1.19) S.Higashidate, K.Imai, Analyst, 117, 1863-1868, 1992
- 4-1.20) 篠崎正博、無敵剛介、加来信雄, ICUとCCU, 14(11), 1049, 1990
- 4-2.1) M. Glad, S. Ohlson, L. Hansson, M.O. Mansson and K. Mosbach,
J. Chromatogr., 200 (1980) 254.

3.5 研究担当者

表4-3.1に研究担当者を示す。

表4-3.1 研究担当者

氏名	所属	備考	氏名	所属	備考
高松 翼	品川研究室		大津 裕	品川研究室	
奥村達也	品川研究室		神田武利	品川研究室	
中島由紀	品川研究室				