

3) Schlesselman JJ: Case-Control Studies. Design, Conduct, Analysis. New York, Oxford University Press, 1982.

4) 簗輪眞澄、梅家 模：慢性疲労症候群の疫学. Pharma Medica, 12(8): 19-31, 1994.

分担研究報告書

疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究

疲労／疲労感の分子神経メカニズムを探る

分担研究者 倉恒 弘彦 大阪大学医学部血液・腫瘍内科講師
渡辺 恭良 大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門部長

研究協力者 山口 浩二、待井 隆志、金倉 譲
大阪大学医学部血液・腫瘍内科
木谷 照夫 市立堺病院
高橋 守 旭化成工業株式会社診断薬事業部
Gudrun Lindh, Birgitta Evengård
カロリンスカ研究所フディング病院感染症部門
Bengt Långström ウプサラ大学 PET センター

研究要旨 慢性疲労症候群（CFS）は長期に続く疲労感と思考力の障害などを特徴とする病態であるが、未だその原因は明らかでない。我々は、エネルギー代謝の観点から検討したところ、CFSでは血清アシルカルニチンの異常が存在することを報告してきたが、最近このアシルカルニチンは脳に取り込まれ利用されていることも見出している。そこで、本研究ではCFS患者では脳におけるアシルカルニチン代謝異常が存在するのか否かを明らかにするため、8名のCFS患者と8名の健常対象者について局所脳血液量と局所脳アセチルカルニチン取り込みについて検討した。コンピューター上の1つの標準脳モデルを用いて群間比較を行ったところ、局所脳血液量はCFS群で前帯状回、眼窩前頭野、左側頭葉、海馬、中脳、橋など種々の部位において有意に低下していたが、局所脳アセチルカルニチン取り込みは極めて限られた部位である Brodmann 9 野と 24 野においてのみ低下しており、局所脳血液量低下との関連はみられなかった。さらに、マウスに [2-¹⁴C] acetyl-L-carnitine を投与し、脳代謝物解析を行ったところ、アセチルカルニチンのアセチル基は脳において興奮性の神経伝達物質（グルタミン酸、アスパラギン酸）の合成に利用されているが判明した。したがって、CFS患者で認められるアセチルカルニチン取り込み異常は、同部位における神経伝達物質の合成低下と結びついているものと思われ、CFS患者の臨床病態と密接に関連している可能性が示唆された。

A. 研究目的

疲労および疲労感は、高度に発展した現代社会に生きる多数の人々が日常向き合っている現象であり、人類普遍的な重要な問題である。米国における調査結果によると、2週間以上続く疲労感は人口の約24%に存在す

るとされ、その約60%が原因不明であった。

また、6カ月以上続く日常生活に支障を来すような原因不明の疲労を訴える患者数は、人口の2.2%にも及ぶという。これまで、運動後の疲労や疲労感の研究は、特にマラソンなどの長距離走のスポーツ科学の面から、

また、過労を視界に入れた労働衛生の観点から研究が成されているが、このメカニズムについては、未だ不明な部分が多い現状である。

一方、病的な疲労、ことに日常生活を維持できないほどの激疲労感や慢性疲労については、1988年に米国CDC (Centers for Disease Control) により、日本でも1991年に厚生省研究班(班長:木谷照夫、当時大阪大学教授、現市立堺病院長)により診断基準の定められた慢性疲労症候群という新しい疾患概念(分類)が知られるようになった。

厚生省CFS研究班により、慢性疲労症候群の原因についての研究が鋭意進められる中で、慢性疲労や病的疲労に関しての実態調査や研究は、今まさに遅ればせながらスタートしたところである。一方、人口の高齢化は世界的傾向であるが、加齢に伴って必然的に老化による病態、特に高次脳神経機能や知的能力の低下ならびに免疫機能の低下、さらに内的・外的環境因子がこれに拍車を掛けることになる。

従って、21世紀に向かい益々の高齢化社会の進展の中、一層疲労や疲労感が蔓延すると思われるので、それに対処する科学技術の検討・確立が切に望まれる。

疲労および疲労感の分子・神経メカニズムの研究についての現況をまとめると、マラソン後の脳脊髄液中のセロトニンおよびその代謝物の増加が知られるぐらいで、余り研究が進んでいると言えない。唯一の立脚点は、我々の慢性疲労症候群に対する研究成果であり、現在の作業仮説として、ウイルス感染、社会心理的ストレス⇒免疫・内分泌ホメオスタシスの悪循環⇒免疫抑制サイトカインの上

昇(TGF β など)⇒ニューロステロイドの低下⇒脳局所のアシルカルニチン代謝異常⇒ミトコンドリア障害⇒グルタミン酸・GABA(γ -アミノ酪酸)などの主要アミノ酸ニューロトランスミッターの低下継続⇒慢性疲労感という図式が大きな手がかりになっており、この仮説を実証・肉付けし、疲労一般の研究に適用すれば、世界に先駆けてこの分野をリードすることが可能である。

このような背景のもと、疲労や疲労感を招来する様々なストレス等の外的要因が、免疫系-内分泌系-神経系に与える影響の本質を発見し、疲労度の客観的・生物学的マーカーを見出すとともに、神経・免疫・内分泌のネットワーク機構とその失調・病態を制御する技術を確立して、これにより、易疲労性や慢性疲労感を克服・防御し、21世紀の人類のQuality of Life (QOL)を高いレベルに維持することが本研究の大目的である。

我々は、原因不明の強い疲労を主訴とする慢性疲労症候群(CFS)患者では疲労の程度と血清アシルカルニチン(ACR)濃度とに相関がみられるという新事実に気付いたことがきっかけで(Clin. Infect. Dis, 1994)、ポジトロン核種である ^{11}C を用いてACRを標識し(Nucl Med Biol, 1997)、PETを用いてサルやヒトにおけるその生体内動態の検討を行なったところ、生体には肝臓を中心としたACR動態制御機構が存在していることが明かとなり(Biochem Biophys Res Commun, 1996)、また血液ACRはこれまで脳内にはほとんど取り込まれないと考えられていたが、 ^{11}C による標識部位を変えて検討したところ、ACRは脳内に取り込まれ

利用されていることも見出した (Biochem Biophys Res Commun, 1997; Anal Chem, 1997)。

そこで、今回は脳内に取り込まれ利用されている ACR の代謝に CFS 患者では異常があるのか否か、また脳内に取り込まれたアセチルカルニチンは何に利用されているのかについて検討した。

B. 研究方法

1. ヒトにおける検討

対象：カロリンスカ研究所 (スエーデン) に通院中の女性 CFS 患者 8 名 (43.3 ± 7.4 歳) と年齢の一致する健常対象者 8 名 (女性) を対象とし、カロリンスカ研究所ならびにウプサラ大学 PET センターの倫理委員会の承認の元に実施した。

ポジトロン CT (PET)：PET による検査はウプサラ大学 PET センターにて行い、局所血液量の検討と局所アセチルカルニチン取り込み量について検討した。アセチルカルニチン代謝は食事の摂取により影響を受けるため、検査当日は被験者はすべて早朝より検査終了まで水分の摂取以外は絶食とした。

局所脳血液量については、約 900 MBq の $H_2^{15}O$ を投与し、Scanditronix/GEMS PC2048-15B scanner (GE Medical System, Milwaukee, WI, USA) を用いて、6.5mm の厚さで投与後 5 秒ごとに 17 scan、20 秒ごとに 2 scan (計 19 frames/125 秒) 行い検討した。

局所脳血液量の検討後、15 分間の休息を取り、その後約 600 MBq のアセチルカルニチン ($[2-^{11}C]$ acetyl-L-carnitine) を

投与し、投与後 60 秒ごとに 10 scan、3 分ごとに 10 scan、5 分ごとに 4 scan、10 分ごとに 3 scan (計 27 frames/90 分) 行い検討した。

被験者の脳は、大きさや形などにおいて個人差が認められるため、個人個人の成績をそのまま用いることは、部位別の量的変化をグループ間で検討するには適していない。

そこで、個々のデータは補正を行った後すべてスエーデン人用のコンピューターにて標準化された 1 つのモデルに移し、健常者群と CFS 群におけるグループ間の比較検討を行った。

2. マウスを用いた検討

脳内に取り込まれたアセチルカルニチンが何に利用されているのかを明らかにするため、 $[2-^{14}C]$ acetate より $[2-^{14}C]$ acetyl-L-carnitine を合成し、尾静脈より $[2-^{14}C]$ acetyl-L-carnitine ($300 \mu l$, $3.6 \mu Ci$, $64nM$) をマウスに投与し、投与後 20 分後にクロロホルムにて麻酔後断頭し、脳内におけるアセチルカルニチンについて代謝物解析を行った。

脳内代謝物解析：

摘出した脳に質量 3 倍量の Tris-HCl 緩衝液 (0.02M, pH 7.5, 40% ショ糖) を加えてブレンダーを用いてホモジナイズし、15,000G にて 15 分間遠心後上清を分離、15% トロクロ酢酸を半量加えた後 15,000G にて 15 分間遠心し除蛋白をおこなった。除蛋白後の上清は、3 匹づつ 1 つの検体にまとめ AG50-X4H⁺form 陽イオン交換カラム (bed volume 3.0 ml) を用いて分離後、吸着した分画を 2N アンモニアにて溶出し、薄層クロ

マトグラフィー（シリカゲルプレート、メルク社 F254 α ）を用い、メタノール、1-プロパノール、水、50:32:18 の展開溶媒を用いて検討した。

薄層クロマトグラフィーにより展開したプレートは、BAS-TR2040S イメージングプレートに 48 時間露光し、FLA-2000 イメージリーダーを用いて読みとり、MacBAS にて解析した。

C. 研究結果

1. 局所脳血液量について（図 1・表 1）:

CFS 群では、統計学的に有意に局所脳血液量が低下しているところが前帯状回、眼窩前頭野、左側頭葉、海馬、中脳、橋など種々の部位において認められた。一方、有意に局所脳血液量が増加している部位は認められなかった。

2. 局所脳アセチルカルニチン取り込みについて（図 1・表 1）:

局所脳アセチルカルニチン取り込みについては、自律神経系の調節や情動などに深く関連している Brodmann 24 野と意欲やコミュニケーションにおいて重要な Brodmann 9 野においてのみ有意に減少しており、局所脳血液量の低下とは無関係であった。有意に局所脳アセチルカルニチン取り込みが増加している部位は認められなかった。

3. マウスにおける脳代謝物解析

マウスの脳には投与した [2- 14 C] acetyl-L-carnitine の約 1.2% が取り込まれていた。AG50-X4H⁺form 陽イオン交換カラム (bed volume 3.0 ml) に吸着される分画と吸着されない分画についての検討では、

その大半が吸着した分画に含まれていた。薄層クロマトグラフィーにより解析した結果は、図 2 に示す如く、3 つのピークが認められ、特に興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸やアスパラギン酸の合成に [2- 14 C] acetyl-L-carnitine 由来のアセチル基が利用されていることが明かとなった。

D. 考察

これまで、CFS 患者に認められる脱力感などが、末梢の筋肉の異常によるものであるのか、それとも脳における異常感覚であるのかの議論が盛んに行われてきたが、我々の成績は少なくとも CFS 患者では前頭葉を中心に前帯状回、大脳基底核、脳幹部などに局所脳血液量の異常（低下）が存在していることが明かとなり、脳機能異常が存在していることが確認された。

また、アシルカルニチンに関しては局所脳血液量の異常とは関係していない局所脳アシルカルニチン取り込み異常が CFS 患者では存在していることが確認され、特に自律神経系の調節や情動などに深く関連している Brodmann 24 野と意欲やコミュニケーションにおいて重要な Brodmann 9 野においてのみ有意に減少していたことは極めて興味深い。

マウスの実験によりアセチル基は脳において興奮性の神経伝達物質（グルタミン酸、アスパラギン酸）の合成に利用されていることも明かとなり、CFS 患者では Brodmann 9 野と 24 野ではこれらの神経伝達物質の合成が低下していることが考えられ、CFS 患者の臨床病態と関連している可能性が示唆され

た。

多くのCFS患者ではアシルカルニチン代謝異常に加えて、種々のヘルペスウイルス感染の再活性化、免疫異常（NK活性低下やサイトカイン異常）、視床下部・下垂体・副腎系の異常などが報告されている。我々は、これまでCFS患者では血清アシルカルニチンの減少以外にも血清TGF β が上昇していることや最近神経ホルモンとして注目されている Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) が減少していることなどを報告してきたが、これらは個々に独立した異常ではなく、お互いに密接に関連して疲労を主訴とするCFSの病態に関わっている可能性が明らかになってきた。すなわち、我々が調べた過半数のCFS患者ではヒトヘルペス6型ウイルスの再活性化と血清TGF β の上昇が認められるが、ウイルスの再活性化に伴って増加したTGF β は *in vitro* の系においてDHEAの硫酸抱合を調節しているスルフォキナーゼ活性を抑制し、DHEA-Sを減少させることが明らかになった。また、DHEA-Sはカルニチンとアセチル基との結合を調節している acetylcarnitine transferase 活性と相関していることもわかり、DHEA-Sの減少がアセチルカルニチンの減少と関連することも判明した。

したがって、我々は現在の作業仮説として、ウイルス感染、社会心理的ストレス \Rightarrow 免疫・内分泌ホメオスタシスの悪循環 \Rightarrow 免疫抑制サイトカインの上昇（TGF β など） \Rightarrow ニューロステロイドの低下 \Rightarrow 脳局所のアシルカルニチン代謝異常 \Rightarrow ミトコンドリア障害 \Rightarrow グルタミン酸・GABA（ γ -アミノ酪酸）などの主

要アミノ酸ニューロトランスマITTERの低下継続 \Rightarrow 慢性疲労感という図式を考えており、この仮説を実証・肉付けし、疲労一般の研究に適用すれば、原因不明の疲労で苦しむ世界中の多くの人々を救う貴重な手がかりになると信じている。

E. 結論

1. CFS患者では局所脳血液量が低下しているところが前帯状回、眼窩前頭野、左側頭葉、海馬、中脳、橋など種々の部位において認められ、脳機能異常が臨床病態と関連している可能性が示唆された。
2. 局所脳アセチルカルニチン取り込みについては、極めて限られた部位である Brodmann 9野と24野においてのみ取り込み異常（低下）が存在しており、局所脳血液量低下とは関連はみられなかった。
3. マウスの実験により脳に取り込まれたアセチルカルニチンのアセチル基は脳において興奮性の神経伝達物質（グルタミン酸、アスパラギン酸）の合成に利用されているが明らかになった。
4. 以上の成績より、CFS患者で認められた Brodmann 9野と24野でのアセチルカルニチンの取り込み異常は、同部位における神経伝達物質の合成低下と結びついていることが考えられ、CFS患者の臨床病態と密接に関連している可能性が示唆された。

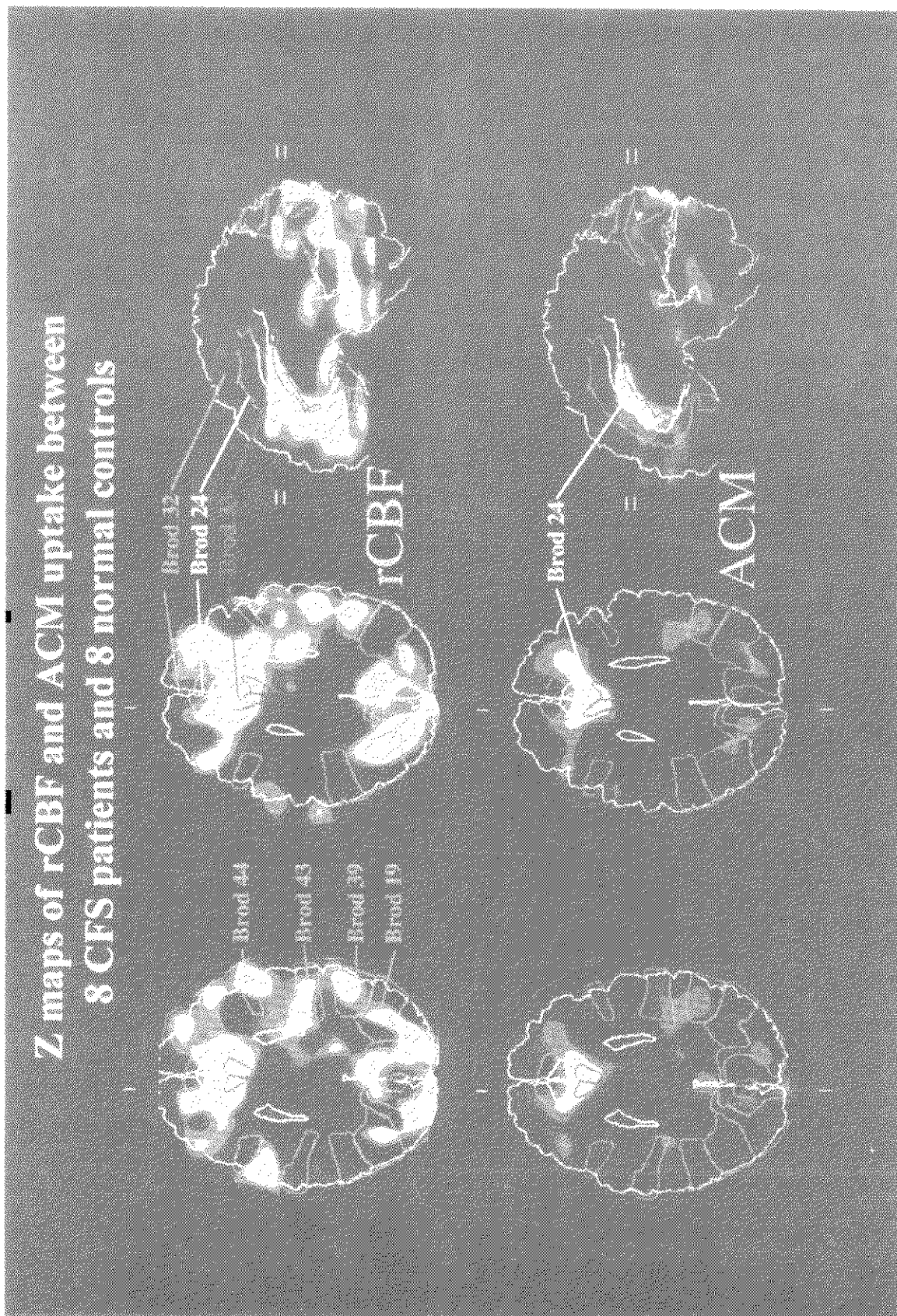


図 1. 局所脳血液量と局所脳アセチルカルニチン取り込みについて、CFS患者（8名）と正常対象者（8名）の群間比較においてCFS群が統計学的に有意に低下している部位（Z map）。

上段：局所脳血液量、下段：局所脳アセチルカルニチン取り込み。

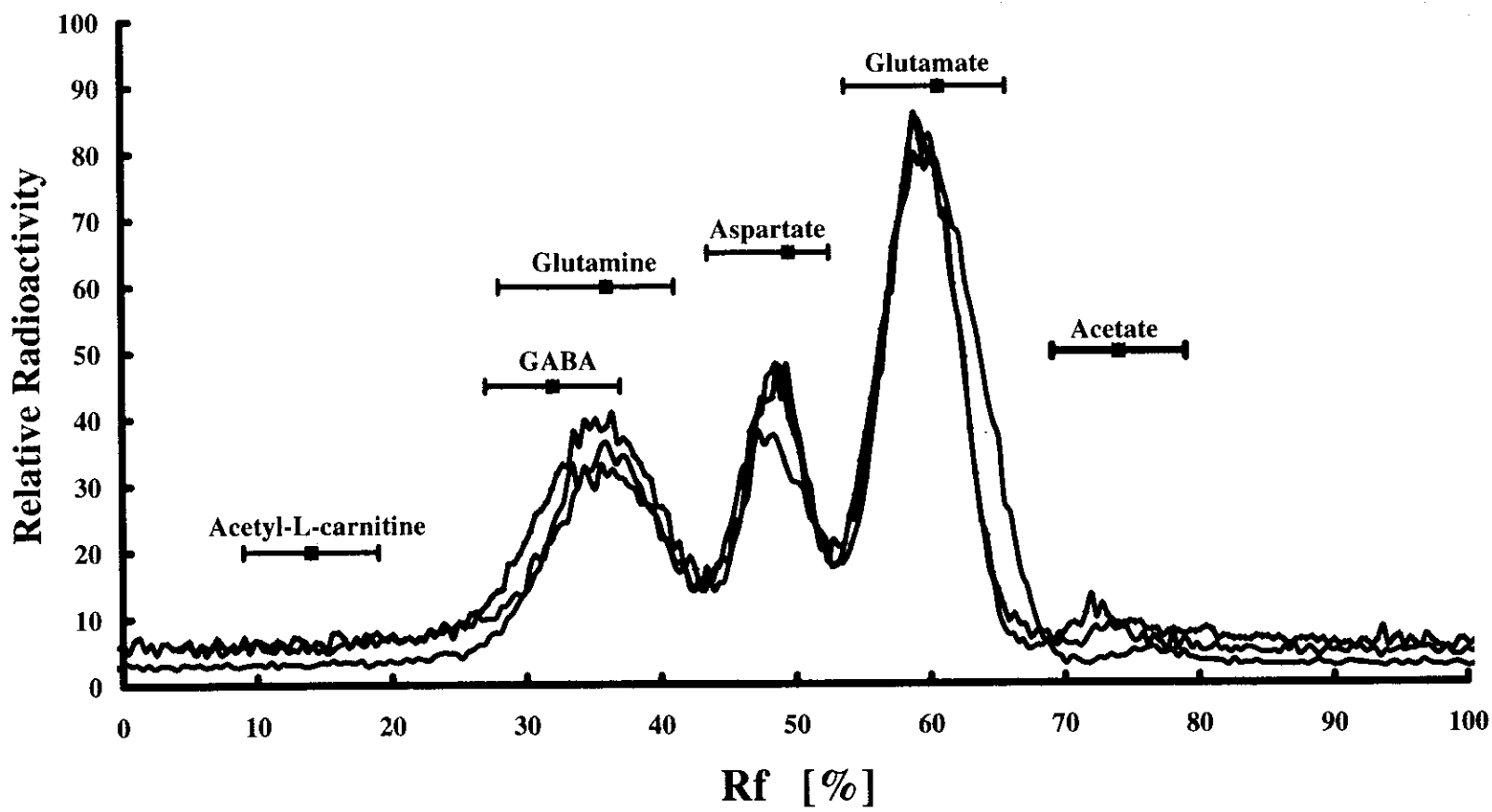


図 2. マウス脳代謝物解析 (薄層クロマトグラフィーによる解析)。いくつかの代表的なアミノ酸移動度は (←→) に示している。

Table 1 Localization of significant differences in $rCMR_{acetylcar}$ and $rCBF$ in CFS patients group relative to healthy control group

	Region	Side	Talairach-coordinates			z-value	Brodmann's area
			x	y	z		
$rCMR_{acetylcar}$	prefrontal	L	-22	26	26	1.96	9
	anterior cingulate	R	10	12	25	2.36	24
	anterior cingulate	L/R	2	19	17	2.21	24, 33
$rCBF$	prefrontal	L	-37	12	25	2.64	9, 46
	occipital	L	-19	-74	20	3.41	17, 18, 19
	occipital	R	20	-78	20	3.68	17, 18, 19
	angular gyrus	L	-51	-52	17	2.46	39
	motor	R	59	0	16	2.46	4, 6
	superior temporal gyrus	L	-52	-22	11	2.42	41, 42
	thalamus	L	-12	-26	10	2.32	
	premotor	L	-56	7	12	2.46	6, 44
	superior temporal gyrus	R	55	-26	6	2.84	22, 42
	thalamus	R	14	-29	6	2.11	
	superior temporal gyrus	L	-54	-42	5	2.64	
	middle temporal gyrus	L	-42	-64	0	3.23	21, 37
	putamen, globus pallidus, caudate, insula	L	-27	-14	3	2.91	
	putamen, globus pallidus, caudate	R	30	-22	-1	3.09	
	medial occipital	L	-17	-54	-3	2.84	19
	middle temporal gyrus	R	57	-36	-5	2.52	21
	anterior cingulate, medial prefrontal, orbitofrontal	L/R	2	31	-2	3.41	10, 11, 12, 24, 32, 33
	mesencephalus	L	-8	-22	-5	2.42	
	insula	L	-45	1	-8		
	hippocampus	R	29	-24	-9	2.74	
	pons		3	-30	-13	2.70	
	cerebellar vermis		2	-55	-14	2.56	
	parahippocampal gyrus	L	-18	-20	-17	2.84	
	anterior temporal	L	-49	-3	-16	2.84	21, 38
	anterior temporal	R	44	-1	-16	2.84	21, 38
	cerebellar hemisphere	R	22	-78	-24	2.70	

分担研究報告書

疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究 脳における疲労関連物質のイメージング

分担研究者 松村 潔 京都大学大学院情報学助教授

研究協力者 小林 茂夫 京都大学大学院情報学

倉恒 弘彦 大阪大学医学部血液・腫瘍内科

渡辺 恭良 大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門

Mats Bergström、Bengt Långström ウプサラ大学 PET センター

研究要旨 我々はポジトロン放出核種を用いた脳内物質代謝の画像化法を確立し、アセチルカルニチン、乳酸等の疲労関連物質研究に適用した。ラット脳スライスで、非刺激条件下に ^{11}C 標識乳酸の取り込みを経時的に画像化し、乳酸代謝とその部位局在性を検討した。第3位炭素を ^{11}C で標識した乳酸($^{11}\text{C}\text{H}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$)を培養液に加え、酸素の存在下で培養すると、大脳皮質で放射活性の取り込みが特に高く、培養容器の気相で有意な放射活性($^{11}\text{C}\text{O}_2$)が検出された。無酸素条件下ではスライスへの ^{11}C 標識乳酸の取り込みは低く、気相中の放射活性は背景レベルであった。 ^{11}C 標識乳酸の取り込みは低温でも抑制された。一方、カルボキシル基の炭素を標識した乳酸($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})^{11}\text{COOH}$)を加えた場合には放射活性の取り込みは低かった。以上のことから、脳スライスにおいて、乳酸は細胞に取り込まれた後、酸素存在下で速やかに TCA 回路に入り代謝されること、この反応は大脳皮質で特に高率であることが明らかとなったサルを用いた PET 実験では血液中の乳酸が脳で利用されている事が示された。運動疲労時のアシドーシスに関わる乳酸が脳で利用されることは、骨格筋-脳の物質ネットワークの存在を示唆する。

A. 研究目的

従来乳酸は嫌氣的代謝の結果生じた疲労原因物質と考えられてきた。しかし近年脳において乳酸がエネルギー基質として用いられている可能性が指摘されている。その代謝の脳内分布、調節機序等不明な点が多く残されている。さらに実際の生理的条件下にある脳で乳酸がどの様に用いられているか全く明らかにされてはいない。本研究では脳スライスにおける乳酸の代謝のイメージングを

^{11}C]Lactate を用いて行い、さらに実際の脳における乳酸の取り込みの PET 研究を行った。

B. 研究方法

実験には2種類の ^{11}C]Lactate を用いた。一つは第3位の炭素を ^{11}C で標識したもので略号を LAK とした。他の一つはカルボキシル基の炭素を ^{11}C で標識したもので略号を LAC とした。ラット脳のスライス標本を作

成し、クレブスリンガー液中で培養した。 $[^{14}\text{C}]$ Lactate のいずれかをスライスの培養液中に投与し60分間37度で培養した。スライスに集積した放射能をスライスを生かしたままイメージングプレートで画像化した。PET 実験には麻酔したサルを用いた。 $[^{14}\text{C}]$ Lactate のいずれかを静脈内に投与し、経時的に脳に集積する放射能を画像化した。

C. 研究結果

LAK をスライスの培養液中に投与し60分間37度で培養すると、大脳皮質を中心に高い取り込みが観察された。

この画像が、取り込まれた後そこに乳酸として留まっているものを反映しているのか、あるいは代謝経路に入った乳酸の中間代謝産物を反映しているのか明らかにするために、同一スライスで LAK と LAC の取り込みの画像を比較した。乳酸は細胞に取り込まれた後、乳酸脱水素酵素、ピルビン酸脱炭酸酵素によりクエン酸回路に入る。LAK の場合はクエン酸回路に入った後も ^{14}C を保持するが、LAC の場合はピルビン酸脱炭酸酵素により ^{14}C を二酸化炭素として失う。従ってもし LAK と LAC で ^{14}C の分布に差がなければそのイメージはピルビン酸脱炭酸酵素以前の状態を反映していることになり、もし LAK と LAC によるイメージに大きな差があれば、その差はクエン酸回路に入った乳酸、すなわち好氣的代謝の基質として利用されている乳酸を反映する。LAK と LAC によるイメージには大きな差違がみられ、取り込まれた乳酸のほとんどがクエン酸回路に入って好氣的代

謝を受けていることを示す。

さらにこの様な LAK の取り込みはスライスを無酸素の状態におくと完全に抑制される。またスライスのインキュベーション中に放出されるガスの中に放射活性が認められ、その値はやはり無酸素条件下では低下する。このことは LAK が細胞に取り込まれた後、好氣的代謝に利用されていることをさらに支持する。

ブドウ代謝と乳酸代謝の分布を比較するために、LAK で乳酸代謝のイメージを行った後、同一サンプルで ^{18}F FDG でブドウ糖代謝のイメージを行った。LAK によるイメージと、 ^{18}F FDG によるイメージは鏡像関係を示した。私はこの事実を説明するために次のような仮説を考えている。すなわち、 ^{18}F FDG は嫌氣的代謝の亢進している部位により多く集積し、逆に LAK は好氣的代謝が亢進している部位に集積する。この仮説の検証には今後の研究が必要である。しかし、この結果は LAK と ^{18}F FDG を用いることにより、脳内の好氣的、嫌氣的代謝のイメージングが可能であることを示唆する。

このような結果は脳スライス標本という特殊な状態でのみ成立するのか、あるいは生理的条件下にある脳でも起こりうるのか。この点について PET を用いて調べた。静脈から投与された LAK に由来する放射能は脳に多く蓄積したが、LAC 由来の放射能は脳にほとんど蓄積しない。スライスの実験で明らかのように、この差は乳酸の代謝産物がクエン酸回路に入ったことを表す。このことは生理的状況下でも乳酸が脳で好氣的代謝に利用さ

れていることを示す。

D. 考察

本研究では、生きている脳スライスにおける乳酸代謝の経時的イメージングに成功した。この成功は高エネルギー、短半減期というポジトロン核種の特性を生かしたことに拠るところが大きい。

脳スライスを用いることの意義は、局所的神経回路が保持されている、実験的操作が容易である、細胞が生きている、という点である。特に細胞が生きているという点は、代謝性トレーサーを用いた実験には不可欠であり、すりつぶした脳サンプルや、凍結切片では代謝性トレーサーを用いる実験は不可能である。また受容体結合実験は脳の膜分画や凍結切片でも可能であるが、今回の実験で示したように脳スライスでなければ観察できない現象がある。

今後はスライス中に蓄積した放射能がクエン酸回路の中間代謝物に由来するのか、あるいは別の物質例えばアミノ酸等に由来するのかを解析し、脳での乳酸代謝の意義を明らかにしたい。またヒトやサル脳の活性化で乳酸代謝がどのように変化するか明らかにしたい。

E. 結論

乳酸は脳に取り込まれ、その代謝物はクエン酸回路に入る。少なくともその一部はエネルギー基質として代謝されている。

分担研究報告書
疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究
ヒト由来ボルナ病ウイルスの分離

分担研究者 生田 和良 北海道大学免疫科学研究所血清学部門教授
 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫教授
 研究協力者 中屋 百合絵、中屋 隆明、高橋 宏和
 北海道大学免疫科学研究所血清学部門
 岩橋 和彦 麻布大学環境保険
 飴野 清 香川大学精神科
 谷山 弘行 酪農学園大学獣医

研究要旨 ボルナ病ウイルス (BDV) の増殖は、これまでモデル動物として用いられてきたラットよりも、スナネズミの脳内の方が高いことが明らかになった。そこで、このスナネズミの脳内接種法を用いて、慢性疲労症候群患者の末梢血単核球 (PBMC) からのウイルス分離法を確立することを目的に、本年度はヒト精神分裂病患者の脳内からの BDV 分離を検討した。その結果、分裂病患者の剖検脳(海馬、橋、小脳)内に BDV が存在することが、nested RT-PCR および in situ hybridization 法により確認できた。そこで、この BDV RNA シグナルが比較的強く認められた海馬および小脳からの BDV 分離を試みた。これらの脳ホモジネートを脳内接種し、その後 BDV RNA 陽性であったスナネズミ脳とヒトオリゴデンドロサイトとの共培養を行うことにより、BDV 持続感染細胞を樹立することができた。

A. 研究目的

BDV はウマやヒツジの脳炎 (ボルナ病) の原因ウイルスとして知られている。ヒトにおいても、精神疾患と BDV との何らかの関連性が示唆されている。私たちは、慢性疲労症候群との関連性について報告した。BDV RNA の存在が確認された PBMC からのウイルス分離法を確立することを目的に、BDV 感受性が高いスナネズミ脳内接種法の有効性を検討した。

B. 研究方法

1. 仔スナネズミと仔ラットの BDV 感受性は実験室株として世界的に用いられている BDV (MDCK 細胞に持続感染) を用いて判定した。動物当たり 2×10^4 個の MDCK/BDV 細胞を脳内接種した。対照として同数の非感染 MDCK 細胞を接種した。

接種後 10 日目および 20 日目で、脳内および末梢臓器における BDV の存在を nested RT-PCR 法により検討した。スナネズミは一群 3 匹ずつ、仔ラットは 2 匹ずつ用いた。

2. 患者脳サンプルは、香川医科大学精神神経科に入院もしくは来院歴があり、精神疾患以外の原因で死亡した患者 4 名の剖検脳組織を用いた。なお、剖検はすべて香川医科大学にて行われ、BDV 解析に当たっては遺族からの同意書を得たうえで行った。

3. BDV RNA の検出は、脳および末梢臓器の各組織から抽出した RNA サンプルを用いた nested RT-PCR により行った。増幅領域は、BDV p40 および p24 領域を行った。

また、脳組織における BDV mRNA の発現は、in situ hybridization 法を用いた。RNA プローブは、p40 および p24 の全長を TA クローニン

グベクターに組み込み、T7 プロモーターを利用して *in vitro* transcription によりジゴキシゲニン標識することにより作製した。

4. 脳組織からの BDV 分離は、剖検脳の BDV RNA が認められた領域のホモジネートを、仔スナネズミの脳内に接種し、接種後 10 日目および 20 日目で剖検を行った。その後、同様に BDV RNA が陽性であったスナネズミ脳領域とヒトオリゴデンドロサイト (OL) 細胞との共培養を行った。BDV の増殖は、抗 BDV p40 マウス単クローン抗体を用いた間接蛍光抗体法により判定した。

C. 研究結果

仔ラットと仔スナネズミへの BDV 接種を行い、10 日目および 20 日目のサンプルについて BDV p40 および p24 領域の nested RT-PCR を行ったところ、明かにスナネズミの脳内の方が広い領域に BDV 増殖が認められた。

そこで、この系を用いて精神分裂病患者剖検脳内 BDV の分離を試みた。精神分裂病患者 4 名の剖検脳の各領域を検索したところ、患者 2 (P2) の海馬、橋、小脳にのみ BDV RNA の存在が確認された。この結果は *in situ* hybridization においても確認できた。BDV 抗体検索においても P2 においてのみ陽性反応が認められた。

この BDV RNA 陽性であった P2 剖検脳の高馬および小脳からの BDV 分離を行うため、OL 細胞との共培養を行った。しかし、120 日間の観察期間内は BDV 抗原の発現は観察されなかった。そこで、これらの脳領域のホモジネートをスナネズミの脳内に接種した。スナネズミの脳内 BDV RNA 検出は、接種後 10 日目では陽性反応が認められなかったが、20 日目において BDV p24 のシグナルが脳と脊髄において認められた。このスナネズミの脳と OL 細胞との共培養を行ったところ、培養開始後 30 日で BDV 抗原の陽性反応が確認でき、45 日目で 1%

以下、60 日目で約 2%、70 日目で約 5%、80 日目で約 10%、100 日目で 70-80% が陽性細胞であった。RT-PCR 反応も陽性であった。一方、ウマ由来 BDV には高感受性の C6 細胞では同様の試みにおいて陽性反応は認められなかった。

D. 考察

今回、仔スナネズミの脳内への接種により、BDV 増殖は仔ラットよりも優れていることが明らかになった。そこで、この方法を用いて、BDV RNA 陽性であった精神分裂病患者剖検脳領域からの BDV 分離を試みた。その結果、海馬および小脳からのサンプル由来 BDV 分離が可能であった。今後、慢性疲労症候群患者の PBMC からの分離を同様の方法で検討したい。

文献

1. Kobayashi, T., Shoya, Y., Koda, T., Takashima, I., Lai, P. L., Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M.: Nuclear targeting activity associated with the amino terminal region of the Borna disease virus nucleoprotein. *Virology* 245, 53-64, 1998.
2. Iwahashi, K., Watanabe, M., Nakamura, K., Suwaki, H., Nakaya, T., Nakamura, Y., Takahashi, H. and Ikuta, K.: Positive and negative syndromes, and Borna disease virus (BDV) infection in schizophrenia. *Neuropsychobiology*.37.59-64,1998
3. Shoya, Y., Kobayashi, T., Koda, T., Ikuta, K., Kakinuma, M. and Kishi, M.: Two proline-rich nuclear localization signals in the amino- and carboxyl-terminal regions of Borna disease virus phosphoprotein.

- J. Virol., 72, 9755-9762, 1998.
4. Kohno, T., Goto, T., Takasaki, T., Morita, C., Nakaya, T., Ikuta, K., Sano, K., Kurane, I., Nakai, M. : Fine structure and morphogenesis of Borna disease virus (BDV). J. Virol., in press.

分担研究報告書

疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究 慢性疲労症候群患者血清中における IL-10, IL-4 及び IFN- γ について

分担研究者 西連寺 剛 鳥取大学医学部生体情報学教授
 研究協力者 小山 佳久、大西 英子 鳥取大学医学部生体情報学
 倉田 毅 国立感染症研究所感染病理部
 山西 弘一 大阪大学医学部細菌学
 倉恒 弘彦 大阪大学医学部血液・腫瘍内科
 木谷 照夫 市立堺病院

我々は前年度 CFS の少数の患者に於て、EBV 感染が考えられる症例を認めた。CFS 患者の多くはアレルギーを伴うのでサイトカイン IL-4, 及び IL-10 を測定した。少数の患者にこれらの極めて高い値が見られた。この IL-10, IL-4 及び EBV 感染と CFS の関わりを更に調べるため、CFS、伝染性単核球症 (IM) 及び、健康人について、日本、米国、スウェーデン人の血清中の IL-10(h+v), vIL-10, IL-4 及び IFN- γ を測定した。hIL-10 は、CFS 及び IM に於て高値を示す少数の患者が見られたが、少数の健康人にも有意な値が認められた。しかし vIL-10, IL-4 及び IFN- γ は、少数の CFS 及び IM に見られたが、健康人には見られなかった。このことから vIL-10, IL-4 及び IFN- γ の異常高値は一部の CFS 患者に於ける病態マーカーとなり得ると考えられる。

A. 研究目的

我々の研究は、CFS の病因として、EBV 感染がどのように関与しているかを明らかにすることである。全ての CFS が EBV 感染が要因ということとは否定されているが、その EBV 関与の実態は未だに不明瞭である。本研究は、CFS と診断された患者に於て、どの程度の割合で EBV 感染が関与しているかを患者血清中の、EBV 抗体、及び EBV 感染と密接に関係しているサイトカインを測定することにより、CFS と EBV との関わりを解明することを目的とする。

B. 研究方法

日本の CFS 患者血清は、大阪大、医、血液・腫瘍内科で収集された。米国の CFS 患者血清は A. Komaloff によって提供された。スウェ

ーデンの CFS は、倉恒によって収集された。

スウェーデンの IM 患者血清は G. Klein によって提供された。IL-4, hIL-10(h+v), vIL-10 及び IFN- γ の測定は ELISA 法を用いた。

C. 研究結果

1. IL-4

(1) CFS 患者

日本人 50 名中 5 名 (10%) に有意の値が認められた。スウェーデン人患者では 70 名中 2 名 (2.9%) のみに有意な値が検出された。

(2) IM 患者

米国人の患者 13 名中 2 名 (15.3%)、スウェーデン患者 15 名中 3 名 (20%) に有意な値が認められた。

(3) 健常人

日本人 87 名中 1 名 (1.1%) のみに低値で検出され、スウェーデン人 47 名中 0 名 (0%) と全く検出されなかった。

2. hIL-10(h+v)

(1) CFS 患者

日本人 47 名中 3 名 (6.4%) に極めて高値が検出された。スウェーデン人 71 名中 2 名 (2.9%) に検出された。その 1 名は極めて高値であった。

(2) IM 患者

米国人 13 名中 2 名 (15.4%)、スウェーデン人では 70 名中 2 名 (2.9%) に有意な値が見られた。

(3) 健常人

日本人 87 名中 5 名 (5.7%) に有意な値が見られた。スウェーデン人 47 名中 1 名 (2.1%) に低値が検出された。

3. vIL-10

(1) CFS 患者

日本人 47 名中 3 名 (6.4%)、スウェーデン人 71 名中 3 名 (4.2%) に高値が検出された。

(2) IM 患者

米国人 13 名中 2 名 (15.4%)、スウェーデン人では 15 名中 4 名 (2.7%) にそれぞれ高値が検出された。

(3) 健常人

日本人 87 名中 0 名 (0%)、スウェーデン人 47 名中 0 名 (0%) で全く検出されなかった。

4. IFN- γ

(1) CFS 患者

日本人 50 名中 3 名 (6%) に有意な値がみられた。スウェーデン人 71 名中 1 名 (1.4%) に高値が認められた。

(2) IM 患者

米国人 13 名中 0 名 (0%)、スウェーデン人では 15 名中 2 名 (1.3%) に高値が検出された。

(3) 健常人

日本人 87 名中 0 名 (0%)、スウェーデン人 47 名中 0 名 (0%) で全く検出されなかった。

D. 考察

本年度の研究に於て明らかになったことは、日本のみならず、スウェーデンの CFS の患者中にも少数であるが IL-4, hIL-10 及び vIL-10 の極めて高値を示す患者が見られたことである。hIL-10 は、健康人についても比較的高い値を示す一群の存在が明らかにされた。しかし、vIL-10 は CFS 及び IM にのみ見出され、健康人には全く検出されなかった。これらは、EBV 感染及び EBV の活性化と共に誘導されることが知られるサイトカインであるが、その直接的関連を持つものは vIL-10 である。vIL-10 は、EBV 遺伝子産物であり、EBV の複製に伴って産生されるのでこれらの抗体も当然産生される。この vIL-10 が見られた血清は EBV の抗体が存在しない。この事実は、EBV 感染にも拘わらず抗 vIL-10 抗体が産生されないことを示している。これら陽性を示す CFS 患者では明らかな免疫的な異常が示唆された。

IFN- γ の高値を示す患者も少ないながら検出された。今後は、これらのサイトカインを示す患者の分類を行い、病態、EBV 抗体及びサイトカイン値の変動を追跡することにより一群の CFS の病因が更に明らかになると考える。

E. 結論

vIL-10, IL-4 及び IFN- γ の異常高値は一部の CFS の患者に於ける病態のマーカーとなり得る。

分担研究報告書

疲労の実態調査と健康づくりのための疲労回復手法に関する研究 全身性エリテマトーデスと慢性疲労症候群における疲労の比較検討

分担研究者 西海 正彦 国立病院東京医療センター内科医長

研究要旨 全身性エリテマトーデス（SLE）の疲労の内容を分析し、慢性疲労症候群（CFS）の疲労と比較した。SLEの疲労は69%に認められた。SLEの疲労は発熱、脱毛、線維筋痛症（FM）を伴う例で頻度が高かった。SLEの疲労の程度はCFSのそれよりさらに高度であった。一方非活動期（寛解期）では、多くのSLEでは疲労が無かったが、CFSでは疲労の慢性化（回復のしにくさ）が窺えた。FMを伴わないSLEの寛解期で高度の疲労を認めていた4例は、SLE以外の病態がその原因と考えられた。

A. 研究目的

全身性エリテマトーデス（SLE）患者における疲労の内容を分析し、慢性疲労症候群（CFS）患者における疲労と比較検討することを目的とした。

B. 研究方法

国立病院東京医療センターの内科膠原病外来を受診したSLE患者82症例に対し、発症後（活動期）および治療後（非活動期）の疲労の有無を問診し、疲労の有無でSLE患者を分け、疲労を認めるSLE患者における臨床的特徴を比較検討した。

また疲労度をCFSで用いるperformance status（PS）の値で評価し、CFS患者のPSと比較した。

C. 研究結果

SLE 82例中、疲労は58例（78%）で認められた。その疲労の程度はPSで中央値は7であった。疲労感を伴うSLE患者に

特徴的な臨床的特徴は、SLEの診断に用いたARA基準の11項目や自己抗体の種類では無関係であったが、疲労を持つ群で、発熱、脱毛、線維筋痛症（fibromyalgia, FM）が有意に多かった（表1）。活動期のSLEの疲労度はPS3以上が多く、特にFMを併存する例でPS7以上の高い値（中央値8を示した（図1）。非活動期ではPSの中央値は0（疲労を感じない）であったが、4例でPS3以上を示した。しかしこれらの4例を詳細に検討すると、これらは糖尿病、肝障害、甲状腺疾患など、それらのみで疲労が起きうる疾患を併存していることが判明した（表2）。またこれらの疲労は何年にもわたって慢性的に存在していた（図2）。一方CFSでは寛解期においてもPSは2以上のものが多く、SLEと異なり、完全寛解例が少なかった。

D. 考察

疲労は膠原病のような炎症性（自己免疫）

疾患で共通に認められる臨床症状である。SLEの疲労については、活動性の一指標としては用いられているものの、診断基準の一項目としては認められておらず、研究報告も少ない。しかしSLE患者の訴えとしては、疲労感が最も辛い症状であったと述べる場合が少なくなく、SLEにおける疲労の研究は重要と考えられる。実際SLEの疲労の程度はCFSのそれと比較しても同等のものであった。FMを合併している場合は、事実疲労度が著しく高かったが、SLE自体の寛解期においても依然として疲労が残る場合がある(図1)ので注意が必要であると考えられた。

Wallace (1997)によれば、SLE自体以外のSLEの疲労の原因となる併存疾患(病態)としては、貧血、発熱、感染症、甲状腺機能不全症、ホルモン機能不全症、糖尿病、薬物(の副作用)、うつ状態、FM、感情的ストレスなどを挙げているが、本報告でも、寛解期におけるSLE患者の疲労感の原因として、これらの中のいくつかのものが含まれていた。

E. 結論

1. SLEの疾患活動性における疲労の出現頻度は78%と高頻度であり、その程度も中央値8と高度であった。
2. SLEの臨床所見と疲労度との関係では、SLE分類基準の11項目では相関が無く、発熱、脱毛、FMの有無で有意差を認めた。
3. SLEの非活動期では一般に疲労が存在せず(PSの中央値0)、寛解期のC

FSで疲労が依然として高いのと対照的であった。

4. 非活動期のSLEで疲労が認められた場合には、SLE以外の疲労の原因を検索すべきである。