

表 1: CFS の病因

1. 感染症  
ウイルス、細菌、マイコプラズマ、  
クラミジア、その他
2. 免疫異常  
NK 活性の低下、サイトカイン異常  
リンパ球・単球の機能異常など
3. 内分泌異常  
HPA axis の異常、  
神経ホルモンの異常
4. 代謝異常  
筋代謝異常、アシルカルニチン異常
5. 精神・神経疾患  
心因性精神疾患、ストレスとの関連  
うつ病・神経症の亜型  
脳機能異常

表 2:

病因として報告された感染症

1. ウイルス感染症  
EBウイルス  
コクサッキーBウイルス  
ヒトヘルペス6型ウイルス  
ポルナ病ウイルス  
サイトメガロウイルス  
インフルエンザウイルスなど
2. 細菌感染症
3. クラミジア感染症
4. マイコプラズマ感染症  
mycoplasma genus  
M. fermentans  
M. hominis  
M. penetrans
5. 真菌感染症
6. リケッチア感染症

表 3 : マイコプラズマ感染症

	C F S n=100	GWS n=60	controls n=160
M. genus	52%	55%	15%
M. fermentans	32%	36%	8%
M. hominis	9%	5%	3%
M. penetrans	6%	3%	2%

Aristo Vojdani and Al Robert Franco:  
(Journal of CFS 5:187-197,1999)

表 4 : マイコプラズマ感染症の治療

対象 : 86 名の C F S / G W S 患者  
P C R にて マイコプラズマ 陽性  
治療 :  
下記投薬を 6 週間を 1 サイクル  
として 6-7 サイクル 施行  
doxycycline (200-300mg/d)  
ciprofloxacin (1500mg/d)  
azithromycin (500mg/d) or clarithromycin (800mg/d)  
結果 : 抗生剤投与を受けた 87 例中 69 例が回復し、  
P C R 検査結果が陰性化

Nicolson G et. al:  
(Second World Congress on CFS and Related  
Disorders, Brussels, September 9-12, 1999)

**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**  
**ボルナ病ウイルスと慢性疲労症候群との関連**

分担研究者 生田和良 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野教授  
 研究協力者 朝長啓造、笹尾芙蓉子、渡辺真紀子、小林剛、神谷亘  
 大阪大学微生物病研究所ウイルス免疫分野  
 倉恒弘彦 大阪大学医学部腫瘍・血液内科学教室

**研究要旨** ボルナ病ウイルス (BDV) は向神経性のマイナス鎖 RNA ウイルスである。BDV は広範囲な感染性宿主域を持ち、最近の研究でヒトへの感染も明かとなった。我々は BDV 感染と慢性疲労症候群 (CFS) との関連を追求する目的で、CFS 患者における BDV 感染の検索を行った。今回検索した CFS 患者のうち BDV 抗体陽性者は 26 名中 5 名、BDV 遺伝子陽性者は 22 名中 5 名と、健常者における BDV の検出率と比べて有為に高い割合を示した。また、BDV の p40 および p24 タンパク質に対する抗体がともに陽性であった検体 2 例はいずれも BDV 遺伝子も陽性と診断され、体内における BDV の活性化を示唆するものであった。以上の結果はこれまでの我々の報告してきた結果にほぼ一致している。さらに我々は、BDV 感染による慢性疲労のモデル動物を作成する試みとして、スナネズミに対する BDV の感染実験を行った。その結果、BDV の感染によりスナネズミは高率に後躯麻痺、食欲減退、および無気力などの症状を発症し、それはウイルスの感染力価ならびに脳内における BDV の広がりに関連していると考えられた。さらに、BDV p24 遺伝子導入度トランスジェニックマウスを作成し、原因不明の神経症状と p24 タンパク質の脳内での発現部位との相関性を見い出した。

#### A. 研究目的

ボルナ病は、ヨーロッパ中東部において 250 年以上前より知られていたウマに脳膜脳脊髄炎をもたらす疾患である。その名前は、1894 年にウマに大流行が見られた旧東ドイツのボルナ地方の名前に由来している。ボルナ病を発症したウマは、歩行不全、知覚過敏などの神経症状を呈し、しばしば死に至る。この疾患は、その後ボルナ病ウイルス (Borna Disease Virus: BDV) の中枢神経系への感染が原因で引き起こされることが明らかとなった。BDV は、ウマの他にヒツジ、ウシ、ネコ、ダチョウなどの動物にも自然感染していることが現在までに明らかになっているが、その多くは不顕性感染であり、病気との関連が明らかではない。また、BDV は、鳥類からげっ歯類さらには霊長類までの幅広い動物に感染し、病原性を発揮することがわかっている。実験感染では、スナネズミに後躯麻痺などの症状を引き起こすことが証明され、ボルナ病を研究する上での有力な動物モデルとなっている。

1985 年にドイツ・ギーゼン大学の Rott らにより、精神分裂病患者の脳脊髄液中に BDV

に対する抗体が存在することが報告され<sup>1)</sup>、BDV がヒトにも病原性を持つ可能性が初めて示唆された。その後、他のグループによっても、精神分裂病やうつ病患者が高率に抗 BDV 抗体を有するという報告が相次ぎ、BDV と内因性精神疾患との関連性が注目されるようになった。しかし、健常な献血者においても抗 BDV 抗体が認められることから、BDV と精神疾患との関連性については現在までのところ不明である。

一方、慢性疲労症候群 (Chronic Fatigue Syndrome: CFS) は、時として集団発生が認められ、その発症時に咽頭痛、発熱、呼吸器症状などの感冒様症状が多く症例に認められることなどから、ウイルス感染症をその病因として想定し、原因ウイルスを同定する試みが世界中でなされてきた<sup>2)</sup>。現在までに、コクサッキー B 型ウイルス、Epstein-Barr ウイルス、ヒトヘルペスウイルス 6 型および 7 型、ヒト T 細胞白血病ウイルス II 型、スプーマウイルスおよび C 型肝炎ウイルスなどが CFS の病因として候補に挙げられているが、CFS との明確な関連性はいまだ明らかにされていない。我々はこれまでに健常者を含め、様々な疾患患者におけ

る BDV の血清学的および分子疫学的検査を行ってきた。その中で、BDV のゲノムおよび抗体保有率が精神疾患患者で有意に高いことを報告した<sup>3, 4)</sup>。さらに、うつ病症状などの病状が多くの患者に認められる CFS 患者においても BDV 感染との関連性を示唆する結果を得ている。また、最近の研究により、家族性の CFS 患者における BDV の感染も報告した<sup>5)</sup>。

そこで本研究の目的は、CFS 患者における BDV 感染の状況のさらなる追求を行い、BDV 感染と CFS 発症の関連性を探ることにある。さらに、慢性疲労のモデル動物の作成を目指し、実験動物、特に BDV に高感受性であるスナネズミでの BDV の感染を試みると同時に、BDV p24 遺伝子発現トランスジェニックマウスを作成することにある。

## B. 研究方法

**CFS 患者血液サンプル：**26 名の CFS 患者由来血液サンプルは大阪大学医学部の倉恒弘彦先生より供与された。患者血液サンプルは、即日中に血漿および末梢血単核球 (PBMC) の分離を行い、血漿については抗 BDV 抗体の検出をウェスタンブロット法にて、また PBMC より RNA の抽出を行い、BDV 遺伝子の検索を PCR 法にて解析を行った。

**CFS 患者血漿中の抗 BDV 抗体の検出：**BDV の p40 および p24 タンパク質は、その遺伝子領域を含む cDNA を大腸菌の発現ベクターである pGEX に組込んだ後、グルタチオン S 転移フェラーゼ (GST) との組換えタンパク質として発現、精製した。発現した組換え p40 および p24 タンパク質は SDS-PAGE にて解析後、メンブレンに転写、100 倍希釈の CFS 患者由来血清と反応させ、血清中の抗 p40 ならびに p24 抗体の存在をコニカイムノステイン HRP-1000 により検出を行った。

**nested RT-PCR 法による BDV 遺伝子の検出：**CFS 患者 PBMC より Isogen (ニッポンジーン社) を用いて抽出した RNA 約 1  $\mu$ g を鋳型に、RT-PCR を行った。逆転写および 1st PCR には tTh polymerase を使用した Ez tTh RT-PCR Kit (Perkin-Elmer 社) を、またプライマーには、BDV の p24 遺伝子領域に特異的な配列を用いた。1st PCR 産物はさらに、AmpliTaq Gold を使用し

た nested PCR により増幅を行い BDV の p24 遺伝子に特異的な遺伝子領域の検出を行った。

**細胞とウイルス：**ラットグリオーマ由来 C6 細胞、およびウマ由来 BDV He80-1 株が持続感染した C6 細胞 (C6BV 細胞) は 10% FCS を含む DMEM で培養した。これら細胞より凍結融解法により細胞破碎液を抽出し、スナネズミへのウイルス接種源として用いた。

**スナネズミへの BDV 実験感染：**10<sup>1</sup> から 10<sup>4</sup> Focus Forming Unit (FFU)/ml の各力価のウイルス量を含む細胞破碎液約 20  $\mu$ l (0.2~200 FFU/スナネズミの相当) を生後 24 時間以内の新生仔スナネズミに脳内接種を行った。コントロールとして非感染の C6 細胞破碎液の接種を行った。接種後、スナネズミの体重の増加、抗 BDV 抗体の上昇、神経症状の発症などを観察した。また、各ウイルス量を接種したスナネズミは接種後それぞれ 20 日、25 日および 30 日目に解剖に供し、脳組織を含む臓器の採材を行った。

**感染スナネズミの病理学的解析：**BDV 接種スナネズミの脳組織よりパラフィン切片を作成し、その病理学的所見、ウイルス遺伝子 (p40 ならびに p24 遺伝子) ならびにウイルスタンパク質の分布、アポトーシス細胞の存在を、それぞれ H E 染色、in situ hybridization、免疫染色、ならびに TUNEL 法を用いて解析を行った。

**p24 トランスジェニックマウスの作成：**GFAP もしくはセロトニンレセプター遺伝子プロモーターの下流に、BDV の p24 遺伝子をコードしている cDNA を ES 細胞へ遺伝子導入を行い、定法により p24 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの作成を行った。

## C. 結果および考察

### 1) CFS 患者における BDV の保有状況

大阪大学医学部に来院した CFS 患者 26 名 (男性 14 名、女性 12 名; 年齢 22-46 歳、平均年齢 34 歳) の血液より得た PBMC および血漿を用いて、上述した方法により血清学的診断および分子生物学的診断を行った。大腸菌由来組換えタンパク質を用いたイムノブロット法により確認された抗 BDV 抗体の保有状況の結果を表 1 に示す。26 名中、p24 抗原のみに反応し

た血清は 1 例、p40 抗原のみに反応したものは 2 例、また p24 および p40 抗原両方に反応性を示したものは 2 例であった。従って、p40 もしくは p24 抗原のどちらかに反応した血清は 26 名中 5 名 (19%) と診断された。一方、p24 遺伝子領域をターゲットとした PCR の結果、PBMC 由来の RNA 中にシグナルを確認できたのは、検索した 22 名中 5 名 (23%) であった (表 1)。また、これら陽性者の中で、ウイルス遺伝子および抗体がともに陽性であった検体は 2 例であった。

以前に我々の研究室において行った日本国内 25 名の CFS 患者 (男性 15 名、女性 10 名) における同様の解析においては、BDV 遺伝子陽性者が 25 例中 3 名 (12%)、p24 抗体陽性者が 25 名中 6 名 (24%) となっている<sup>6)</sup>。同様に我々が行った献血者 100 名の BDV 検査では、BDV の遺伝子陽性率が 5% であり、抗体陽性率が 1% であった結果を考えあわせると、CFS 患者における BDV 陽性率は有為に高いと考えられた。さらに、これらの結果は 1991 年 3 月から 1995 年 4 月にかけて行われた検査においても確認されている。

今回検索を行った CFS 患者 26 名中、抗 BDV 抗体が p40 および p24 とともに陽性であった検体 2 例 (女性、30 代) はいずれも BDV 遺伝子も陽性と診断された (表 1)。我々は以前に CFS の家族内発症例における BDV 感染の解析について発表している<sup>6)</sup>。その解析の中で、発症時に症状が重く、BDV 遺伝子が常に陽性と診断された患者 (父親および長女) では、抗体価 (抗 p40、p24 および gp18) の上昇が認められ、その後も重い病態が持続していたのに対し、発症時の症状が軽く一部の抗原のみに抗体反応が認められた母親および次男では、BDV 遺伝子の検出が困難であるという結果を得ている。このことは、抗体価が上昇している患者ではウイルス粒子が体内で活発に産生され続けた結果、BDV に対する抗体価が上昇し、さらに PBMC 中のウイルス遺伝子の検出も可能になったのではないかと考えられた。今回の検索において認められた p40 および p24 抗体陽性ならびにウイルス遺伝子陽性の 2 検体についてもこのような可能性が考えられるものと思われる。今回検索を行った CFS 患者陽性例においては抗体価の上昇ならびにウイルス遺伝子の検出などの追跡

調査を行う必要がある。

## 2) スナネズミを用いた BDV 感染モデル動物の確立

BDV を接種したラットおよびスナネズミでは感染後、体重減少、後躯麻痺およびその他の神経症状を発症し、全身衰弱に陥ることが報告されている。我々は、BDV 感染による疲労のモデル動物の確立を目指して、スナネズミへの BDV の感染実験を行った。ウイルスカ価の異なる感染細胞破碎液をそれぞれ 10 から 20 匹の新生仔スナネズミへ脳内接種 (0.2~200 FFU/スナネズミ) を行い、その全身症状を観察した。また、接種スナネズミは感染後 20 日、25 日および 30 日目に解剖に供し、脳組織を中心にその病理学的検索ならびに BDV の感染状況を観察した。

**全身症状：** 200 および 20 FFU を接種したスナネズミ群において接種後 20 日目頃より、コントロール群と比較して顕著な体重減少が認められた (図 1)。また、それに伴いほとんどのスナネズミにおいて後躯麻痺、盲目、食欲減退、知覚過敏および無気力などの症状が確認された (図 2)。一方、0.2 および 2 FFU を接種したスナネズミ群においては、顕著な体重減少は認められず、神経症状もほとんど確認されなかった。

**抗 BDV 抗体：** 200 FFU を接種したスナネズミ群においては接種後 25 日目に、また、20 FFU を接種したスナネズミ群においては接種後 30 日目に、抗 p24 抗体の上昇がその血漿中に確認された。一方、そのほとんどのスナネズミにおいて、p40 抗原に対する抗体の上昇は接種後 30 日目までには観察されなかった。また、0.2 および 2 FFU を接種したスナネズミ群においては、いずれの抗原に対する抗体の上昇も接種後 30 日目までには認められなかった。

**病理学的所見：** 接種後 30 日目に 200 および 20 FFU を接種したスナネズミ群の脳皮質および小脳に軽度の血管性細胞浸潤が認められた。また、脳内における BDV の広がりを確認するために、BDV の p40 および p24 遺伝子のアンチセンスをターゲットとした *in situ hybridization* を行った。その結果、200 FFU を接種したスナネズミ群で、接種後 25 日目に p40 および p24 遺伝子に対する陽性シグナルが脳

皮質、小脳および橋付近に散在して認められた。一方、接種後 30 日目には p24 に対するシグナルは脳全体に散見され (図 3)、ウイルスの脳全体への広がり示唆していたのに対し、p40 に対する陽性シグナルは大脳皮質、小脳のみで散見される程度であった。また、20 FFU を接種したスナネズミ群においては、接種後 30 日目において、200 FFU を接種したスナネズミ群の 25 日目程度の陽性反応が p40 および p24 両プローブにおいて認められた。また、p40 および p24 に対するポリクローナル抗体を用いた免疫化学染色の結果も *in situ hybridization* より得られた脳内におけるウイルスの分布およびその広がり状況を示す結果が得られた。また、これら脳内におけるウイルスの広がり確認された接種スナネズミにおいて、神経細胞の BDV 感染によるアポトーシスを観察するために TUNEL 法を用いて染色を行った。その結果、症状が重篤で、脳全体にウイルスの広がり認められたスナネズミにおいても、非感染群と同様に顕著なアポトーシス陽性細胞は認められなかった。

以上の結果より、BDV は新生仔スナネズミに対して高感受性であり、その接種により、高頻度に後躯麻痺、食欲減退、および無気力などの症状を発症することが確かめられた。またその発症には、適度なウイルス力価の接種が必要であると考えられた。今回の検索では、200 および 20 FFU を接種したスナネズミ群において発症を認めたが、200 FFU を接種したスナネズミ群の中には接種後 30 日目以前に死亡する個体もあり、スナネズミにおける BDV の持続感染系の確立には 20 FFU 程度の接種量が良いと思われた。一方、発症には BDV の感染脳内における広がり重要であると考えられたが、ウイルスの広がり脳全体に確認された個体においてもその炎症像は軽度であり、また顕著なアポトーシス像も認められず、その発症機序にはウイルスに対する免疫応答ならびにウイルスの直接的、間接的な作用が関わっていると思われる。さらに、スナネズミにおいて感染後 p40 に対する抗体の上昇の遅延が認められた点は、ヒトにおける血清学的疫学調査において BDV の p24 に対する抗体のみが検出され、p40 に対する抗体反応が認められない検体の割合が高いことを考えるきわめて興味深い知見であり、今

後その機序についても解明を行っていききたい。今後は、スナネズミにおける持続感染モデルの確立とその病状の詳細な検討を行い、これらモデル動物の疲労度を測定する指標の確立を試みる必要がある。

### 3) BDV p24 トランスジェニックマウスの作成

BDV p24 遺伝子を発現している数系統のトランスジェニックマウスを作成した。系統 1 は生後、原因不明の神経症状を発症、歩行不全、激しい首振りが認められた。系統 2 は成長、活動とも正常で、コントロールとの間に顕著な差は認められなかった。しかし、両系統とも脳内におけるニューロン成長因子の 1 つである BDNF の有為な低下が観察された (図 4)。また、p24 抗体による免疫化学染色の結果、両系統とも p24 タンパク質の発現が小脳顆粒層に、また激しい症状を示した系統 1 のみで大脳皮質の神経網にも多い発現が認められた (図 5)。これらトランスジェニックマウスの詳細な解析は現在進行中である。

## D. 結論

BDV がヒトに感染することは最近のさまざまな研究により明確となってきた。我々も分裂病患者やパーキンソン病患者の剖検脳を用いてヒトにおける BDV 感染の直接的証拠を得ている<sup>7)</sup>。また最近ある分裂病患者の脳よりスナネズミを介することにより、ヒト由来 BDV の分離にも成功した。

一方、CFS と BDV の関連については、最近の報告においてもその関連性を認めるものまたは認めないものと、その結果は様々である。しかしながら、我々の調査においては、これまでに報告してきた結果とほぼ一致する BDV 陽性率が今回の調査においても確認された。今後、CFS の診断基準は国や地域によって差があり、また CFS が単一病因と言うよりはいくつかの要因が関与して生じる症候群と考えられている点を考慮した検討を続ける必要がある。CFS の家族内発生例を含む現在までの我々の研究によって得られた知見は、BDV の感染が CFS 発症の一つの引き金となり得る可能性を示唆しており、今後、BDV 陽性患者における詳細な持続性の疲労感に関する病態把握が必要であると思

われる。

また、今回の研究により、BDV の感染によってスナネズミが高率に無気力などの症状を呈することが確認された。また、トランスジェニックマウスにおいて BDV p24 タンパク質のみの発現により神経症状を発症させることにも成功した。今後、これら実験動物の詳細な病態を解析し、疲労に関するモデル動物の検討を行う予定である。

#### 参考文献

- 1) Rott R et al.: Science, 288, 755-756, 1985.
- 2) Levy JA et al.: Clin. Inf. Dis., 18 (Suppl 1), S117, 1994.
- 3) Nakaya T et al.: FEBS Lett., 378, 145-149, 1996.
- 4) Kitani T et al.: Microbiol. Immunol., 40, 459-462, 1996.
- 5) Nakaya T et al.: Microbiol. Immunol., 43, 679-689, 1999.
- 6) 中屋隆明他：日本臨床, 55, 3064-3071, 1997.
- 7) 朝長啓造他：カレントセラピー, 17, 26-30, 1999.

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) 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. 73, 760-766, 1999.
- 2) Nakaya, T., Takahashi, H., Nakamura, Y., Kuratsune, H., Kitani, T., Machii, T., Yamanishi, K., and Ikuta, K.: Borna disease virus infection in two family clusters of patients with chronic fatigue syndrome. Microbiol. Immunol. 43, 679-789, 1999.
- 3) Nakamura, Y., Nakaya, T., Hagiwara, K., Momiyama, N., Kagawa, Y., Taniyama, H., Ishihara, C., Sata, T., Kurata, T., and Ikuta, K.: High susceptibility of Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) to Borna disease virus. Vaccine 17, 480-489, 1999.
- 4) Nakamura, Y., Watanabe, M., Kamitani, W., Taniyama, H., Nakaya, T., Nishimura, Y., Tsujimoto, H., Machida, S., and Ikuta, K.: High prevalence of Borna disease virus in domestic cats with neurological disorders in Japan. Vet. Microbiol., in press.
- 5) Hagiwara, K., Kamitani, W., Takamura, S., Taniyama, H., Nakaya, T., Tanaka, H.,

Kirisawa, R., Iwai, H., and Ikuta, K.:

Detection of Borna disease virus in a pregnant mare and her fetus. Vet. Microbiol., in press.

- 6) 朝長啓造, 生田和良: パーキンソン病とボルナ病ウイルス感染. Current Therapy 17, 26-30, 1999.
- 7) 岩橋和彦, 吉原英児, 中村和彦, 福西勇夫, 伊藤正裕, 飴野清, 西野佳以, 生田和良: 精神分裂病におけるボルナ病ウイルス感染とセロトニンレセプター5HT<sub>2</sub>. 最新精神医学 4, 611-614, 1999.

##### 2. 学会発表

- 1) 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、生田和良。ボルナ病ウイルス 0.8kb(X/P)mRNA の翻訳様式。第 47 回日本ウイルス学会学術集会 (10 月 横浜)
- 2) 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良。ボルナ病ウイルスの選択的スプライシングとその発現調節。第 47 回日本ウイルス学会学術集会 (10 月 横浜)
- 3) 渡辺真紀子、小林剛、神谷亘、谷山弘行、朝長啓造、生田和良。新生仔スナネズミにおけるボルナ病ウイルスの病態解析。第 47 回日本ウイルス学会学術集会 (10 月 横浜)
- 4) 朝長啓造、小林剛、渡辺真紀子、生田和良。ボルナ病ウイルスの選択的スプライシング機構の解明。第 128 回日本獣医学会学術集会 (10 月 熊本)
- 5) 小林剛、渡辺真紀子、朝長啓造、岸雅彦、生田和良。ボルナ病ウイルスの翻訳様式および相互作用。第 128 回日本獣医学会学術集会 (10 月 熊本)
- 6) 渡辺真紀子、小林剛、朝長啓造、生田和良。抗原検出 ELISA を用いた培養細胞およびスナネズミ脳における BDV 抗原の定量。第 128 回日本獣医学会学術集会 (10 月 熊本)

#### F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

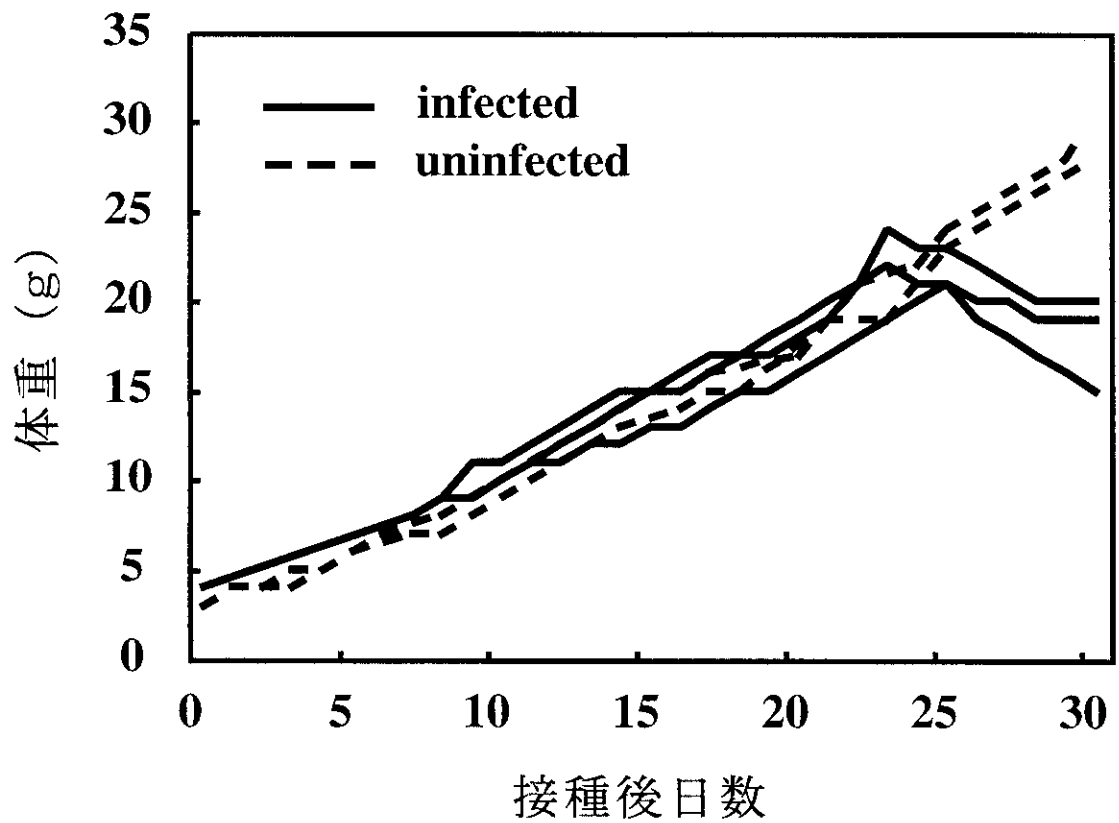


図1 BDV 接種後のスナネズミの体重変化

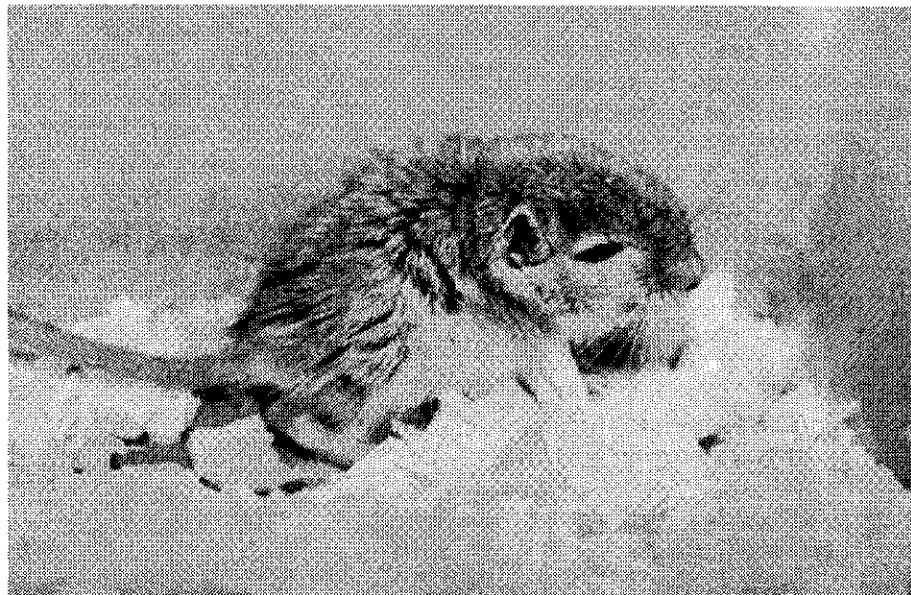


図2 神経症状を呈した BDV 感染スナネズミ

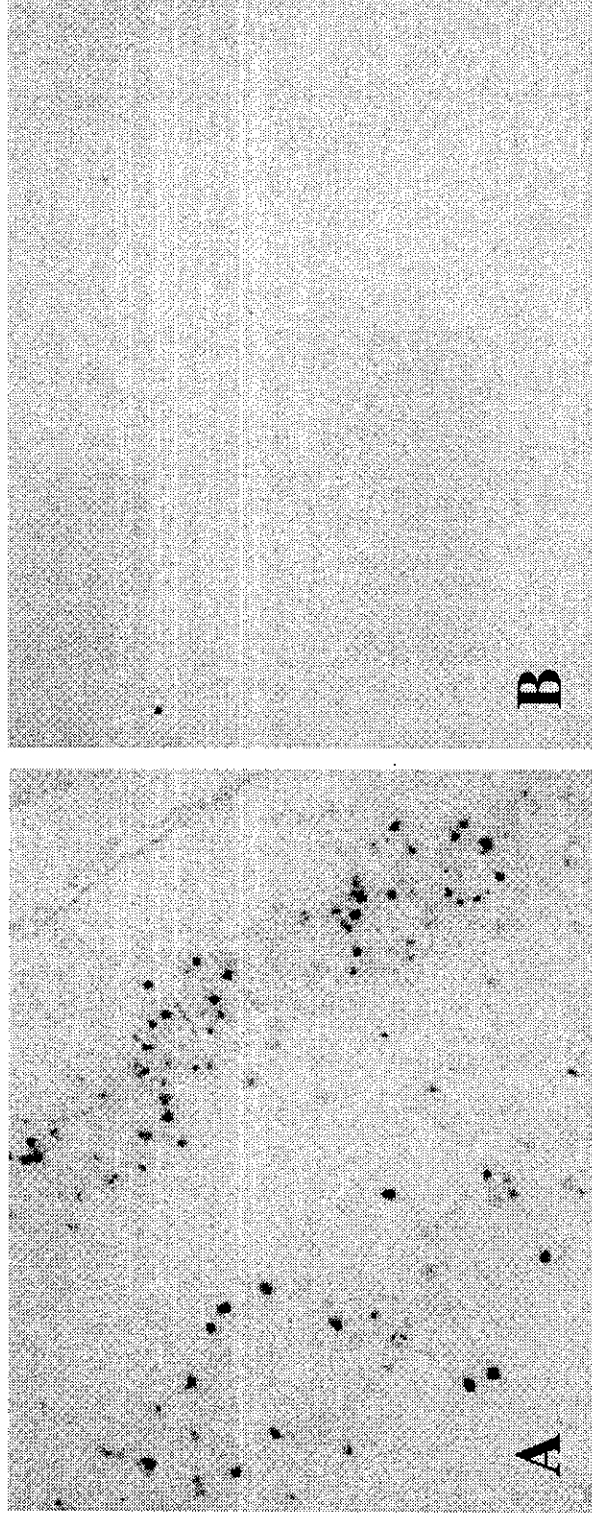


図3 in situ hybridization による、スナネズミ脳内のBDV RNAの検出  
A: BDV 接種スナネズミ B: 非感染スナネズミ

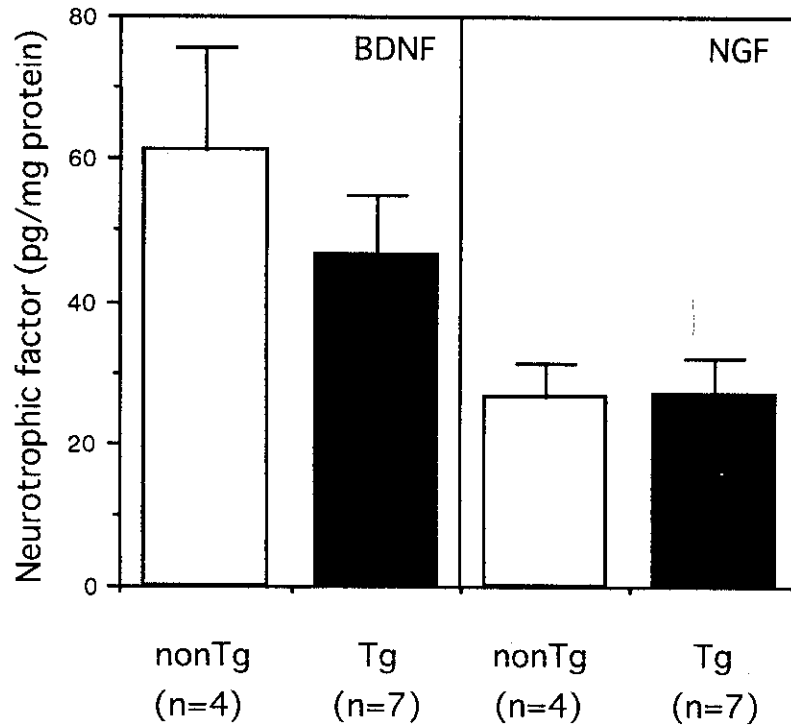


図4 GFAP プロモーターの下流に BDV p24 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス脳内における BDNF (brain-derived neurotrophic factor)ならびに BGF (nerve growth factor)のタンパク質の検出

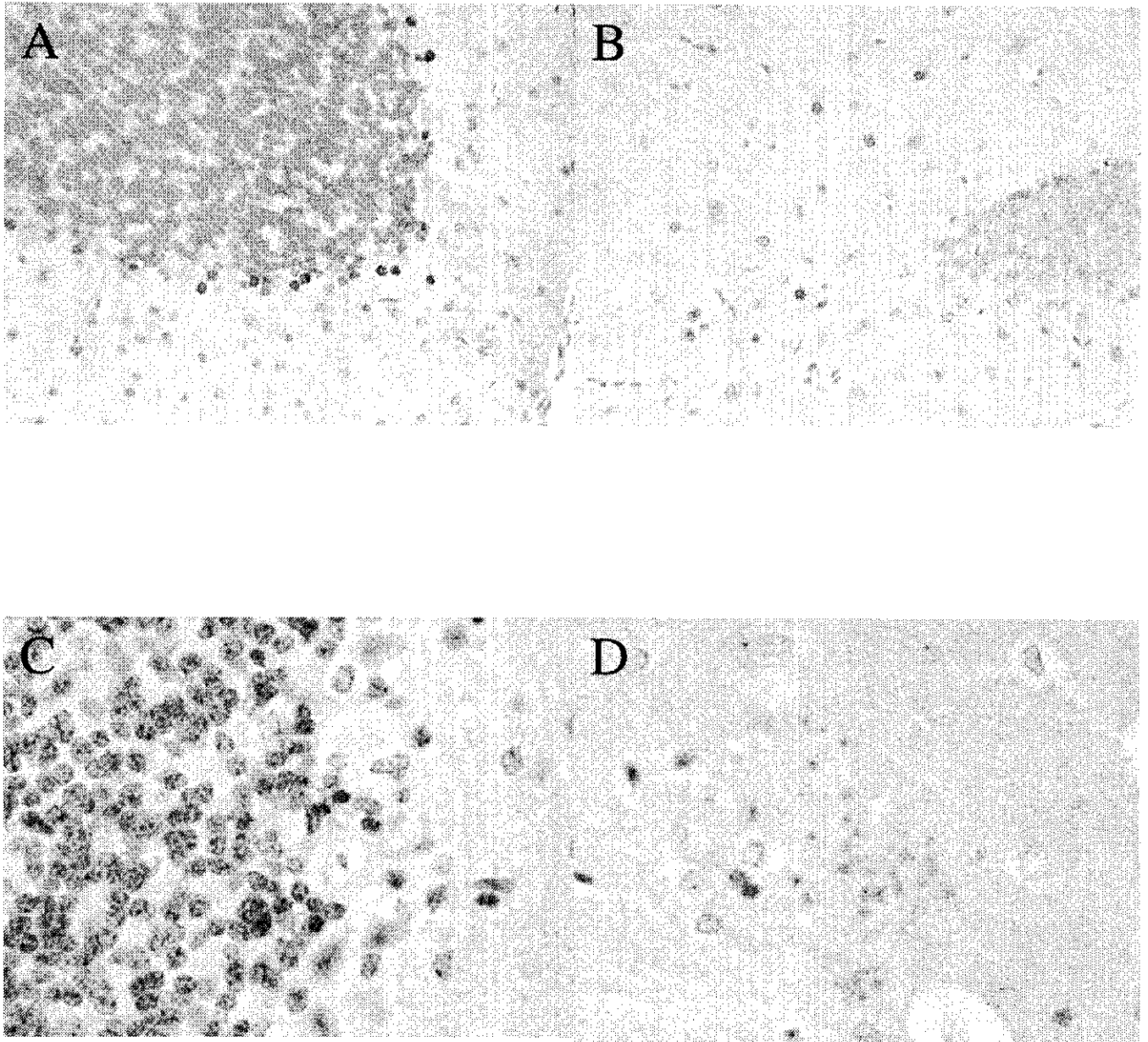


図5 GFAP プロモーターの下流に BDV p24 遺伝子を導入したトランスジェニックマウス脳内における BDV p24 タンパク質の発現（抗 BDV p24 抗体を用いた免疫染色）

A: 症状を呈しなかった個体で、小脳プルキンエ細胞層にそって陽性細胞が認められる。

B: 症状を呈しなかった個体で、アンモン角の髄質内に散在性に少数の陽性細胞が認められる。

C: 症状を呈した個体で、小脳の顆粒層内に少数の陽性細胞が認められた。

D: 症状を呈した個体で、アンモン角の髄質内に巣状性に陽性細胞が認められる。

表1。CFS患者26名におけるBDV検査結果

#	年齢	性別	抗BDV抗体		BDV RNA
			抗p24	抗p40	
1	30	女	—	—	+
2	29	男	—	—	+
3	28	男	—	—	—
4	34	女	—	—	—
5	26	男	—	—	—
6	35	男	—	—	—
7	39	女	—	—	—
8	39	男	—	—	—
9	25	男	—	—	—
10	33	男	—	—	—
11	42	男	—	—	—
12	24	男	—	—	+
13	46	女	—	—	—
14	37	男	—	—	—
15	22	女	—	—	—
16	35	女	—	—	—
17	34	女	+	+	+
18	36	女	—	—	—
19	35	女	+	+	+
20	26	男	—	—	—
21	30	女	+	—	—
22	32	男	—	+	—
23	35	女	—	—	NT
24	39	女	—	—	NT
25	34	女	—	—	NT
26	32	女	—	+	NT

NT; not tested

## 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 慢性疲労症候群におけるエネルギー代謝としてのレプチンの検討

分担研究者 松本 美富士 愛知県豊川市民病院内科副院長  
研究協力者 難波 大夫 愛知県豊川市民病院内科

**研究要旨** 慢性疲労症候群(CFS)は激しい疲労以外に多彩な身体的、精神・神経症状を呈し、その発症に生体のエネルギー代謝異常が一部は関与していることが推測される。生体のエネルギー代謝の調整に脂肪組織が産生する生理活性物質として、レプチンが重要である。レプチンは中枢神経を介して摂食行動に影響を与えるとともに、交感神経系への影響も知られている。慢性疲労とレプチンとの関係を明らかにするため、CFS 患者におけるレプチンの動態について検討を行った。

CFS 患者では血中レプチン濃度は **body mass index (BMI)** とよく相関するが、対照健常人に比して BMI が低いにもかかわらず、血中レプチン濃度は有意に高い。BMI 補正血中レプチン濃度でも対照健常人より有意に高い。CFS 患者において、血中レプチン濃度は血中  $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TGF}\beta 1$  と有意な相関がみられたが、疲労の指標を含めた臨床徴候、その他の検査所見などとは有意な相関がみられなかった。因子分析では CFS 患者の血中レプチン濃度の変動に BMI 以外に、 $\text{TGF}\beta 1$  が独立した因子であった。CFS 患者では BMI 以外に、抑制性サイトカインである  $\text{TGF}\beta 1$  によって、レプチン濃度が調整され、エネルギー代謝異常を来し、CFS にみられる慢性疲労とともに、摂食行動異常に関わっている可能性がある。

#### A. 研究目的

慢性疲労症候群(CFS)は原因不明の病態であり、激しい疲労感以外に多彩な身体、神経・精神症状を伴う。これら CFS の症状の中には、生体のエネルギー代謝と関連するものが存在する。一方、脂肪組織は単なるエネルギーの貯蔵のみならず、各種生理的活性物質を産生、分泌し、活発に生体のエネルギー代謝を調整している。これら生理活性物質は **adipocytokines** と呼ばれ、 $\text{TNF}\alpha$ 、レプチンが主要なものである。レプチンは摂食抑制因子であり、レプチン受容体を介して脂肪組織・レプチン・脳下垂体系を形成している。また、レプチンは摂食抑制作用以外に、神経系、内分泌系にも作用し、種々の生物作用をもっていることが明らかにされている。さらに、慢性疲労に際して摂食行動に変化がみられ、生体にエネルギー代謝に影響を与える。慢性疲労における生体のエネルギー代謝を明らかにするため、CFS 患者をモデルとして **adipocytokines** の動態について検討を行った。

#### B. 研究方法

対象は本邦厚生省診断基準を満たす自験 CFS 症例の 30 例であり、対照として性、年齢を一致させた健常人 42 名を用いた。血中 **adipocytokines** (レプチン、 $\text{TNF}\alpha$ )、および  $\text{TGF}\beta 1$  は単クローン性抗体による ELISA 法によ

り、血中  $\beta$ -エンドルフィンが多クローン性抗体による ELISA 法で測定した。また、**natural killer (NK)** 細胞活性は K562 細胞を標的細胞とし、 $^{51}\text{Cr}$  放出試験により測定した。末梢血中  $\gamma\delta\text{T}$  細胞比率は単クローン性抗体を用いた FACS 解析によった。血中アシルカルニチン(ACR)濃度は酵素サイクル法により測定した。

この研究にあたっては研究の目的、その意義、調査内容、実験内容がすべて **in vitro** によるものである点、個人情報保護の点、情報提供の方法、研究結果の公表の方法などについて説明し、同意を得た上で行われたものである。

#### C. 研究結果

CFS 患者においても、健常人と同様に血中レプチン濃度は BMI と高い相関性 ( $r=0.731$ ,  $P < 0.0001$ ) を示していた (図 1)。しかし、CFS 患者群では健常人に比して、有意 ( $P=0.0023$ ) に高い血中レプチン濃度を示した。CFS 群の BMI は健常人に比して有意 ( $P < 0.0001$ ) に低い値を示し、BMI 補正した血中レプチン濃度は CFS 群において健常人より有意 ( $P < 0.0001$ ) に高い値を示していた (図 2) 一方、女性患者のレプチン濃度、および BMI 補正レプチン濃度は男性患者に比して、それぞれ有意 ( $P < 0.0001$ ) に高い値を示していた。

CFS 患者では BMI とは独立して高値をとる血中レプチン濃度を CFS の慢性疲労、その他の臨床徴候、臨床検査所見との関連で検討すると、TNF $\alpha$ と有意 ( $P=0.01$ )な正の相関を示したが、疲労の程度である performance status (PS) score、血中 ACR 濃度、NK 細胞活性、 $\beta$ -エンドルフィン濃度、あるいは末梢血  $\gamma\delta$ T 細胞比率とは有意な相関は認められなかった (表 1)。また、BMI 補正のレプチン濃度も TNF $\alpha$ と有意 ( $r=0.61$ ,  $P=0.01$ )な相関がみられたが、他の項目とは有意な相関はみられなかった。しかしながら、レプチン濃度は血中 TGF $\beta$ 1 濃度と有意 ( $r=0.64$ ,  $P=0.001$ )な正の相関がみられ、同様に BMI 補正のレプチン濃度も TGF $\beta$ と有意 ( $r=0.663$ ,  $P=0.0007$ )な正の相関を示していた (図 3)。このように CFS 患者の血中レプチンは BMI 以外に、CFS にみられるいくつかの病態と関連して変動するが、血中レプチンの因子分析では BMI と TGF $\beta$ 1 の 2 つが抽出された。すなわち、CFS 患者の血中レプチン濃度は BMI, TGF $\beta$ 1 がそれぞれ独立した変動要因 ( $P=0.012$ )であることを示していた。

#### D. 考察

CFS 患者には多彩な身体的、神経・精神症状が出現するが、その臨床徴候の発現病態については不明な部分が多い。CFS の病因、病態に神経・内分泌・免疫系の異常が相互に関連していることは、これまでの多くの研究から明らかである。そのなかで免疫系の異常として、各種サイトカイン異常が報告され、CFS の一部の徴候はサイトカインの過剰による反応、病態と類似したものがあつた。また、中枢神経系を介した内分泌異常に起因する病態、あるいは類似病態があつた。このような神経・内分泌・免疫系のネットワークからのアプローチが多彩な臨床を呈する疾患の病態解明に重要である。

一方、脂肪組織は静的なエネルギー貯蔵組織でなく、生体のエネルギー代謝の調整のために種々の生理活性物質を産生、分泌し、その恒常性維持のためダイナミックに調整している。これら生理活性物質は adipocytokines と呼ばれ、その主なものは TNF $\alpha$ 、レプチンである。adipocytokines のなかで摂食抑制作用を有するものとして、レプチンが発見された。レプチンは最近の研究により、多彩な生物学的作用を有し、古典的な生体のエネルギー代謝の調整、のみならず生殖、自律神経系、

内分泌系への効果なども明らかにされている。また、レプチンの産生、分泌に他のサイトカインによる影響を受け、相互に反応し合っていることも示されつつあつた。CFS 患者でも骨格筋を含めた生体にエネルギー代謝の異常の存在が内分泌異常、カルニチン代謝異常の面から想定されている。今回の研究は生態のエネルギー代謝の恒常性維持に重要な生理活性物質であるレプチンについて検討を行ったものである。その結果、CFS 患者では BMI が健常人より低いにも関わらず、血漿レプチン濃度は高く、BMI とよく相関する以外に、免疫抑制性サイトカインである TGF $\beta$ 1 による影響を受けることが明らかにされた。しかし、CFS の病勢を反映する PS score や血漿中 ACR 濃度とは有意な相関が認められなかった。CFS 患者にレプチンの変動は CFS の病勢とは関連していないことを示唆している。今後、経時的測定によって病勢との関連を明らかにする必要がある。

一般に、健常人では血漿中レプチン濃度の上昇は肥満に伴って出現し、摂食抑制に作用し、抗肥満的に働くが、CFS では BMI が低いにも関わらず、血漿レプチン濃度は高く、CFS 患者ではレプチン反応系に異常の存在を示唆している。すなわち、血漿中レプチン濃度を反映した生理作用が発現しにくく、レプチンリセプターを含めたレプチンの反応機構に障害があるかも知れない。この障害は CFS 患者では増加している TGF $\beta$ 1 による作用である可能性が推測される。今後、さらにレプチン反応系についての検討が必要である。

#### E. 結論

CFS 患者のエネルギー代謝異常の点から adipocytokines の一つであるレプチンについて検討を行った。CFS 患者では血漿中レプチン濃度は健常人よりも BMI が低いにも関わらず、高値であり、女性患者ではさらに高値であつた。血漿中レプチン濃度は BMI, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 と有意な正の相関を示し、BMI 補正レプチン濃度も TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ 1 濃度と有意な相関がみられた。因子分析において CFS 患者の血漿中レプチン濃度は BMI, TGF $\beta$ 1 がそれぞれ独立した因子であつた。したがって、CFS 患者のエネルギー代謝異常に抑制性サイトカインである TGF $\beta$ 1 とレプチンが相互に関連して関与していることが推測された。

**参考文献**

- 1) 海老原健他：ホルモンと臨床、47、539-547、1999.
- 2) 関原久彦他：内科、84、1071-1080、1999.
- 3) Rosenbaum M et al: New Engl. J. Med., 341、913-917、1999.
- 4) Casanueva FF et al: Front Neuroendocrinol. 20、317-363、1999.
- 5) Fontana MP et al: Am. J. Kidney Dis. 34、824-831、1999.

**F. 研究発表**

## 1. 論文発表

- 1) 松本美富士：線維筋痛症候群。日本臨床、57、364-369、1999.
- 2) 松本美富士：慢性疲労症候群の病因、病態と免疫異常。日本臨床免疫学会会誌、22、111-122、1999.
- 3) 松本美富士：膠原病類縁疾患、診療における病態把握と治療のコツ。日本内科学会雑誌、88、1990-2011、1999.
- 4) 松本美富士：話題の疾患、慢性疲労症候群。総合リハビリテーション、27、1163-1164、1999.
- 5) 松本美富士：私の提案、難病に悩むIさんについて思うこと。医事研究、10、34、1999.
- 6) 松本美富士：話題の疾患、線維筋痛症候群。感染炎症免疫、29、50-52、1999.
- 7) 松本美富士：慢性疲労症候群。Journal of Clinical Rehabilitation、8、535-535、1999.

## 2. 学会発表

なし

**G. 知的所有権の取得状況**

## 1. 特許取得

なし

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

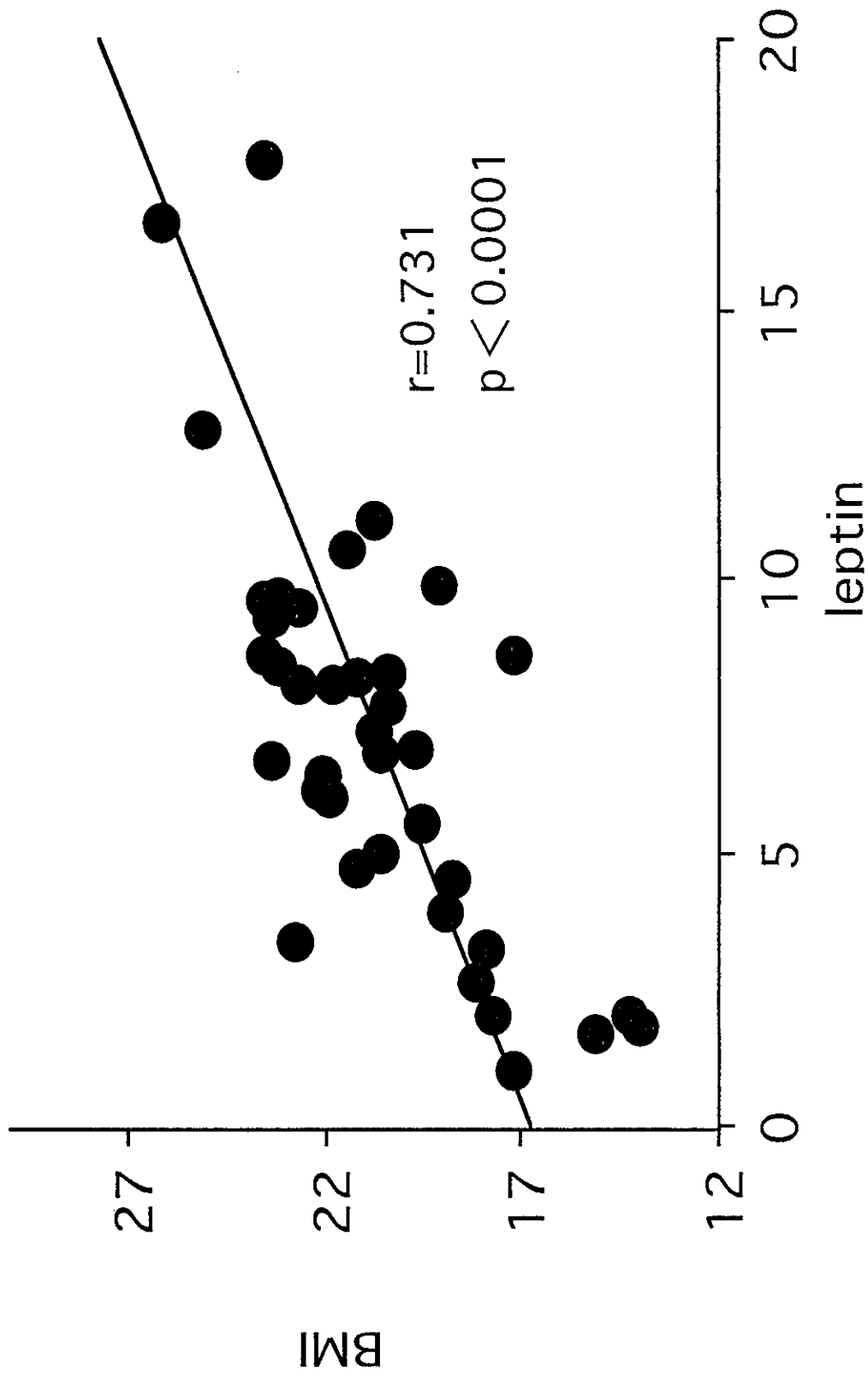


図1 慢性疲労症候群患者の血漿中レプチンと Body Mass Index (BMI)との関連

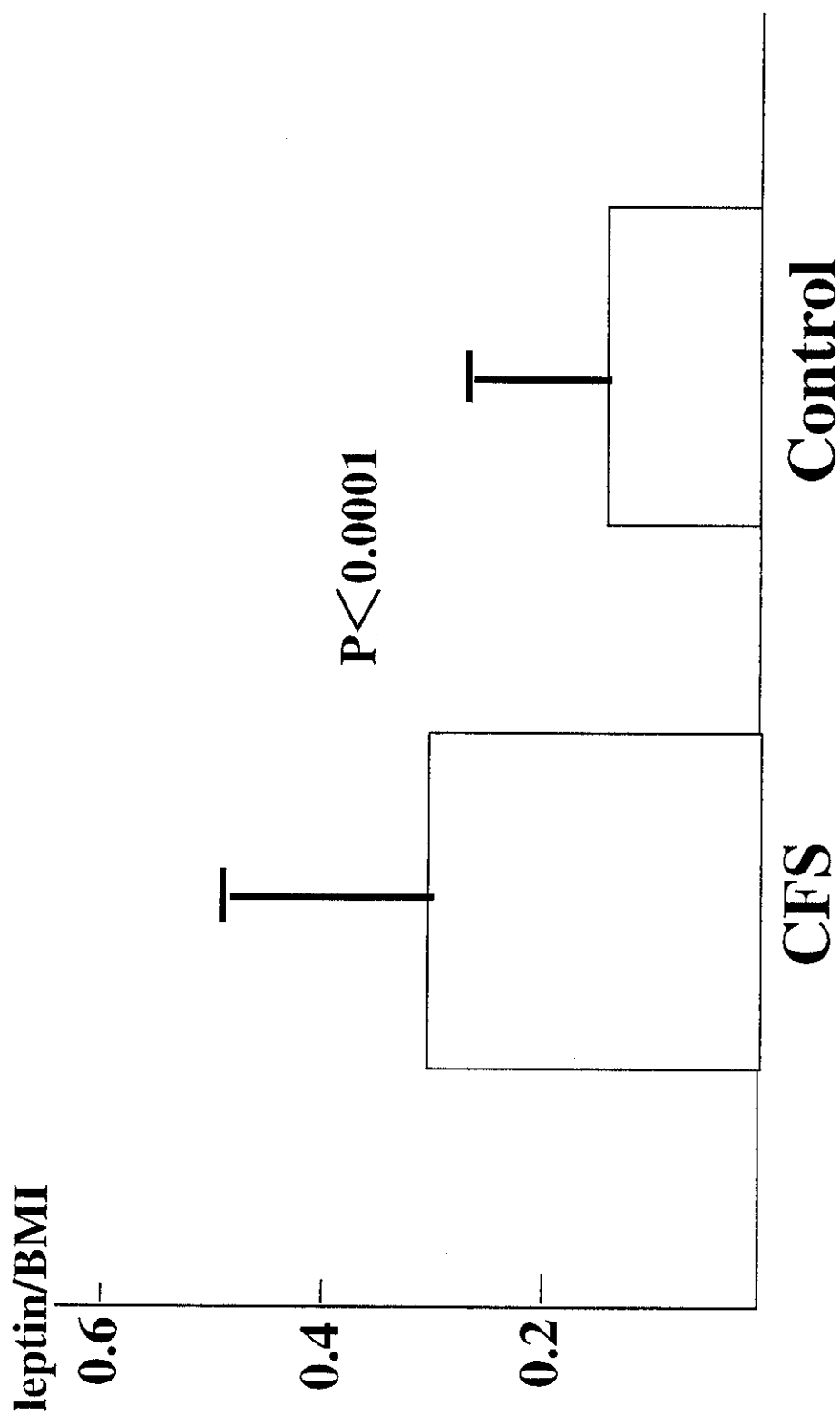


図2 慢性疲労症候群、健康人におけるBody Mass Index (BMI)補正血漿レプチン濃度の比較

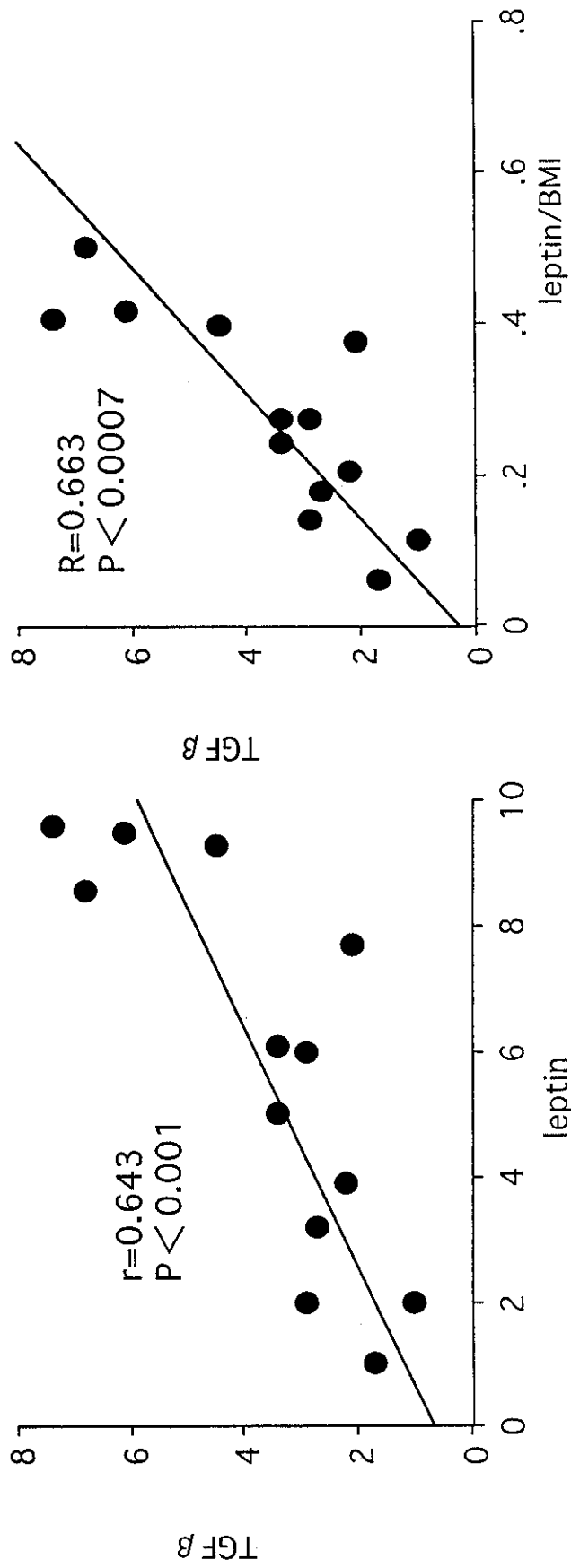


図3 慢性疲労症候群における血漿レプチン濃度とTGF $\beta$ 1濃度の関連

表 1 慢性疲労症候群における血漿レプチン濃度  
と臨床病態との関連

	TNF $\alpha$	ACR	NK Cell	$\beta$ end	$\gamma$ $\delta$ T cell	PS Score
Leptin R=	0.59	0.16	0.22	0.60	0.08	0.01
P=	0.01	0.52	0.33	0.21	0.84	0.94
Leptin R=	0.61	0.12	0.21	0.54	0.11	0.03
(Adjusted with BMD) P=	0.01	0.63	0.35	0.27	0.78	0.84

ACR: acylcarnitine,  $\beta$  end:  $\beta$  endorphin, PS: performance status

## 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 2-5A 合成酵素について

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 生田和史、大西英子 鳥取大学医学部生体情報学  
 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  
 渡辺恭良 大阪バイオサイエンス研究所神経科学部門  
 倉田 毅 国立感染症研究所感染病理部

**研究要旨** 慢性疲労症候群 (CFS) における EBV の関与を調べるために、我々は CFS 患者血清中のサイトカインを測定し、一部の CFS 患者血清中に vIL-10、IL-4 及び IFN- $\gamma$  の異常高値を見出した。最近 CFS 患者において 2-5A 合成酵素が上昇するという報告が多く見られる。我々は「ウイルス感染→IFN- $\alpha$  の上昇→2-5A 合成酵素の上昇→2-5A の上昇→CFS 様症状」という経路を仮定し、IFN- $\alpha$  および 2-5A 合成酵素について検討した。CFS 患者血清 92 例 (本邦 40 例、スウェーデン 52 例) 及び健康成人血清 (本邦 32 例) において、CFS では 3 例に、健康成人血清では 4 例に高値が認められた。2-5A 合成酵素の活性は CFS 血清 13 例及び健康成人血清 5 例についてテストした。その結果、本邦 CFS の 2 例に高値が認められた。サイトカインの異常高値を伴った血清中に 2-5A 合成酵素の高い傾向が見られた。CFS 患者において vIL-10 と 2-5A 合成酵素の高値は、EBV の関与を強く示唆した。これらの結果から、一部の CFS 患者においてはウイルス感染に伴った 2-5A 合成酵素上昇が考えられ、本疾患の病態との関連が考えられる。

#### A. 研究目的

本研究は、CFS と診断された患者に於て、どの程度 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、さらにはウイルス感染で誘導されると考えられる 2-5A 合成酵素の活性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

本邦及びスウェーデンの CFS 患者血清は、倉恒によって収集された。IL-4、hIL-10(h+v)、vIL-10、IFN- $\alpha$  及び IFN- $\gamma$  の測定は ELISA

法を用いた。2-5A 合成酵素の活性測定には、

2-5A キット '栄研' (栄研化学) を用いた。CFS 患者及び健康成人について、IL-4、hIL-10、vIL-10、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  が高値のものを 14 名、これらのサイトカインが検出限界値未満である CFS 患者 2 名、健康成人 2 名の合計 18 名を選びテストした。

#### C. 研究結果

##### 1. IFN- $\alpha$

日本人 CFS 患者 40 名中 1 名に、スウェーデン人患者では 52 名中 2 名に有意な高値が認められた。また日本人健康成人 32 名中 4 名に高値が検出された。