

2. 2-5A 合成酵素活性

日本の健康成人の5人と比較したところ、CFS日本人患者8名中2名に高値(40 pmol/dl)が検出された。しかし他の6名及びスウェーデン人5名では健康成人5名と同程度(<30 pmol/dl)であった(図1)。

3. 2-5A 合成酵素活性とサイトカイン

2-5A 合成酵素活性が高値を示したCFS患者2名のうち、1名はhIL-10及びvIL-10が、他の1名はIFN- α 及びIFN- γ の値が高値を示していた(図1)。しかし、サイトカインの高値が認められなかったCFS患者2名及び日本の健康成人2名では、いずれも低値であった。このように、サイトカイン異常を示すCFS患者において、2-5A 合成酵素活性が高い傾向が認められた。

D. 考察

本研究では、CFSにおいてIFN- α 値は高い傾向は見られなかった。しかしCFS患者血清の一部において2-5A 合成酵素活性の上昇が確認された。さらに、この酵素活性の上昇にはサイトカインの異常高値が伴っている傾向が見られた。これらより、一部のCFSではサイトカイン異常やそれに引き続いて起こる2-5A系の調節機構に異常が存在するといえる。IFNによって誘導される2-5A 合成酵素の活性上昇は抗ウイルス作用として知られており、健康成人では主にウイルス感染初期で働く系であると考えられる。それ故、健康成人でも一過性でIFN- α や2-5A 合成酵素活性が高値の例も存在する。つまりCFS患者においては何らかの要因で2-5A系が存続し続けている。その要因はウイルスの再活性化かもしれない。またCFS患者に於いては、2-5Aによって誘導されるRNase活性を制御しているRNase inhibitor levelが低下しているという報告がある。今後サイトカインや2-5A系、そしてそ

の下流に存在するRNase inhibitor level異常の相互関係を解析し、これらシグナルの調節異常を明らかにすることにより、CFS病態を解明できることが期待される。

E. 結論

一部のCFS患者にみられる2-5A 合成酵素活性の異常高値は、サイトカイン異常と共にその病態解明の手掛かりとなりうる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Sairenji, T.: Epstein-Barr virus (EBV) infection and gastric carcinoma: The approach through EBV infected epithelial cell lines. *Jpn. J. Infect. Dis.* 52: 110-112, 1999.
- Gao, X., Tajima, M. and Sairenji, T.: Nitric oxide down-regulates Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines. *Virology* 258: 375-381, 1999.
- Izawa, M., Mori, T., Satoh, T., Teramachi, A. and Sairenji, T.: Identification of an alternative form of caspase-9 in human gastric cancer cell lines: a role of a caspase-9 variant in apoptosis resistance. *Apoptosis* 4: 321-325, 1999.
- 西連寺 剛: EB ウイルスの B 細胞内活性化機構、臨床と微生物 26: 471-475, 1999
- Kanamori, M., Tajima, M., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Miyazawa, Y., Okinaga, K., Kurata, T. and Sairenji, T.: Differential effects of TPA on cell growth and Epstein-Barr virus reactivation in epithelial cell lines derived from gastric tissues and B cell line Raji. *Virus Genes* 20: 113-121, 2000.
- Ikuta, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y. and

Sairenji, T.: Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. *Microbes and Infection* 2: 1-6, 2000.

7. Fukuda, M., Satoh, T., Takanashi, M., Hirai, K., Ohnishi, E., and Sairenji, T.: Inhibition of cell growth and Epstein virus(EBV) reactivation by CD 40 stimulation in EBV-transformed B cells. *Viral Immunol.*(in press).
8. Sairenji, T., Tajima, M., Takasaka, N., Gao, X., Kanamori, M., Murakami, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Ito, H., Miyazawa, Y., and Kurata, T.: Characterization of EBV infected epithelial cell lines from gastric cancer bearing tissues. *Epstein-Barr virus and human cancer.* edited by Takada, K., and Sixbey, J, Springer Verlag, Barling-Heidelberg, New York, Tokyo (in press).
9. 西連寺 剛: EB ウイルスの潜伏感染と再活性化 「LIP, 4」(菜根出版), (in press)

2. 学会発表

国際学会

1. Sairenji, T., Takasaka, N., Murakami, M., Gao, X., Kanamori, M., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Itoh, H. and Kurata, T.: "Epstein-Barr virus (EBV)-genome positive epithelial cell lines derived from gastric tissues and EBV infection." *Herpesviruses and Human Cencer (U.S.-Japan Cooperative Cancer Research Seminar)* (Program & Abstracts, p.12), Hawaii, USA. January 24-25, 1999.
2. Sairenji, T.: "Epstein-Barr virus (EBV) infection in EBV - genome positive epithelial cell lines and the tumorigenesis in SCID

mouse."

Second NHRI Confence on Tumor Associated Herpesviruses (Program & Abstracts, p. 8), Tayouan, Taiwan. May 8-9, 1999.

国内学会

1. 西連寺 剛: EBV の潜伏感染と再活性化。第 9 回感染研シンポジウムプログラム・抄録集, p. 5 (東京) 1999 年 5 月
2. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛: 健常人における EB ウイルス感染の再評価。第 9 回 EB ウイルス感染症研究会プログラム・抄録集, p. 8 (東京) 1999 年 5 月
3. 西連寺 剛、大西英子、小山佳久、山西弘一、倉恒弘彦、倉田 毅: 慢性疲労症候群 (CFS) と EB ウイルス感染の関わりについて。第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 20 (広島) 1999 年 5 月
4. 星川淑子、佐藤幸夫、村上雅尚、金森美紀子、西連寺 剛、貝原信明、井藤久雄: 胃癌における EBV の感染実態とその感染様式。第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 20 (広島) 1999 年 5 月
5. 金森美紀子、高橋朋子、田中公夫、鎌田七男、田島マサ子 西連寺 剛: FISH 法を用いた細胞内 EBV DNA の解析。第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 21 (広島) 1999 年 5 月
6. Xiangrong Gao, 田島マサ子、西連寺 剛: Nitric Oxide Down-Regulates Epstein-Barr Virus Reactivation in Epithelial Cell line. 第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 21 (広島) 1999 年 5 月
7. 斎藤夕絵、星川淑子、村上雅尚、西連

- 寺 剛：EBV 前初期遺伝子蛋白 ZEBRA の 186 番目セリンのアラニンへの置換と EBV 活性化誘導能の消失について。第 16 回中国・四国ウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 22 (広島) 1999 年 5 月
8. 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛：胃癌組織由来 Epstein-Barr ウイルス感染上皮細胞株に対する transforming growth factor- β の及ぼす影響について。第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 23 (福岡) 1999 年 6 月
 9. 金森美紀子、高橋朋子、田中公夫、田島マサ子、鎌田七男、西連寺 剛：EBV 感染上皮細胞株における EB ウイルスの存在様式。第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 24 (福岡) 1999 年 6 月
 10. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛：健康人における EB ウイルス感染の多様性。第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 42 (福岡) 1999 年 6 月
 11. 村上雅尚、星川淑子、貝原信明、井藤久雄、倉田毅、西連寺 剛：胃癌組織からの新たな EBV ウイルス感染上皮細胞株の樹立とその性状。第 14 回ヘルペスウイルス研究会プログラム・抄録集, p. 53 (福岡) 1999 年 6 月
 12. 金森美紀子、鎌田七男、田島マサ子、沖永功太、宮澤幸久、西連寺 剛：EBV 感染上皮細胞株における EB ウイルス DNA コピー数の変動。第 58 回日本癌学会総会プログラム・抄録集, p. 438 (広島) 1999 年 9 月～10 月
 13. 村上雅尚、貝原信明、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛：胃癌組織由来の新たな EBV 感染上皮細胞株の樹立。第 58 回日本癌学会総会プログラム・抄録集, p. 439 (広島) 1999 年 9 月～10 月
 14. 天白 晶、佐藤幸夫、原田信志、西連寺 剛：EB ウイルスエンベロープ蛋白 gp350/220 遺伝子 BLLF-1 の欠失について。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 93 (横浜) 1999 年 11 月
 15. 福田 誠、田島マサ子、西連寺 剛：胃癌組織由来 EBV 感染上皮細胞株に対する TGF- β 1 刺激による細胞増殖及び潜伏感染 EBV 再活性化に及ぼす影響。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 100 (横浜) 1999 年 11 月
 16. 星川淑子、佐藤幸夫、村上雅尚、金森美紀子、井藤久雄、西連寺 剛：EBV 陽性胃癌における EBV 遺伝子発現。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 101 (横浜) 1999 年 11 月
 17. 金森美紀子、田島マサ子、佐藤幸夫、星川淑子、宮澤幸久、沖永功太、倉田 毅、西連寺 剛：TAP は低濃度で細胞増殖を促進し、高濃度で EB ウイルスを活性化する。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 102 (横浜) 1999 年 11 月
 18. 高 祥榮、田島マサ子、西連寺 剛：上皮系細胞株に恒常的に発見される NO は EBV の再活性化を抑制する。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 102 (横浜) 1999 年 11 月
 19. 斎藤夕絵、星川淑子、佐藤幸夫、井藤久雄、倉田 毅、西連寺 剛：186 番目セリン変異体 ZEBRA における EBV 活性化誘導能の消失とエレクトロポレーションによる EBV 再活性化。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 103 (横浜) 1999 年 11 月
 20. 村上雅尚、星川淑子、佐藤幸夫、井藤

久雄、倉田 毅、西連寺 剛：一つの胃癌組織から樹立された2つの EB ウイルス感染細胞株について。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. (横浜) 1999 年 11 月

21. 生田和史、佐藤幸夫、星川淑子、西連寺 剛：EB ウイルス感染の唾液、血清中抗体及び末梢リンパ球からの検討。第 47 回日本ウイルス学会総会プログラム・抄録集, p. 255 (横浜) 1999 年 11 月

22. 生田和史、大西英子、山西弘一、倉恒弘彦、木谷照夫、西連寺 剛：慢性疲労症候群患者血清中におけるインターフェロン α について。第 5 回慢性疲労症候群 (CFS) 研究会・講演要旨集 p.26 (大阪) 2000 年 2 月

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

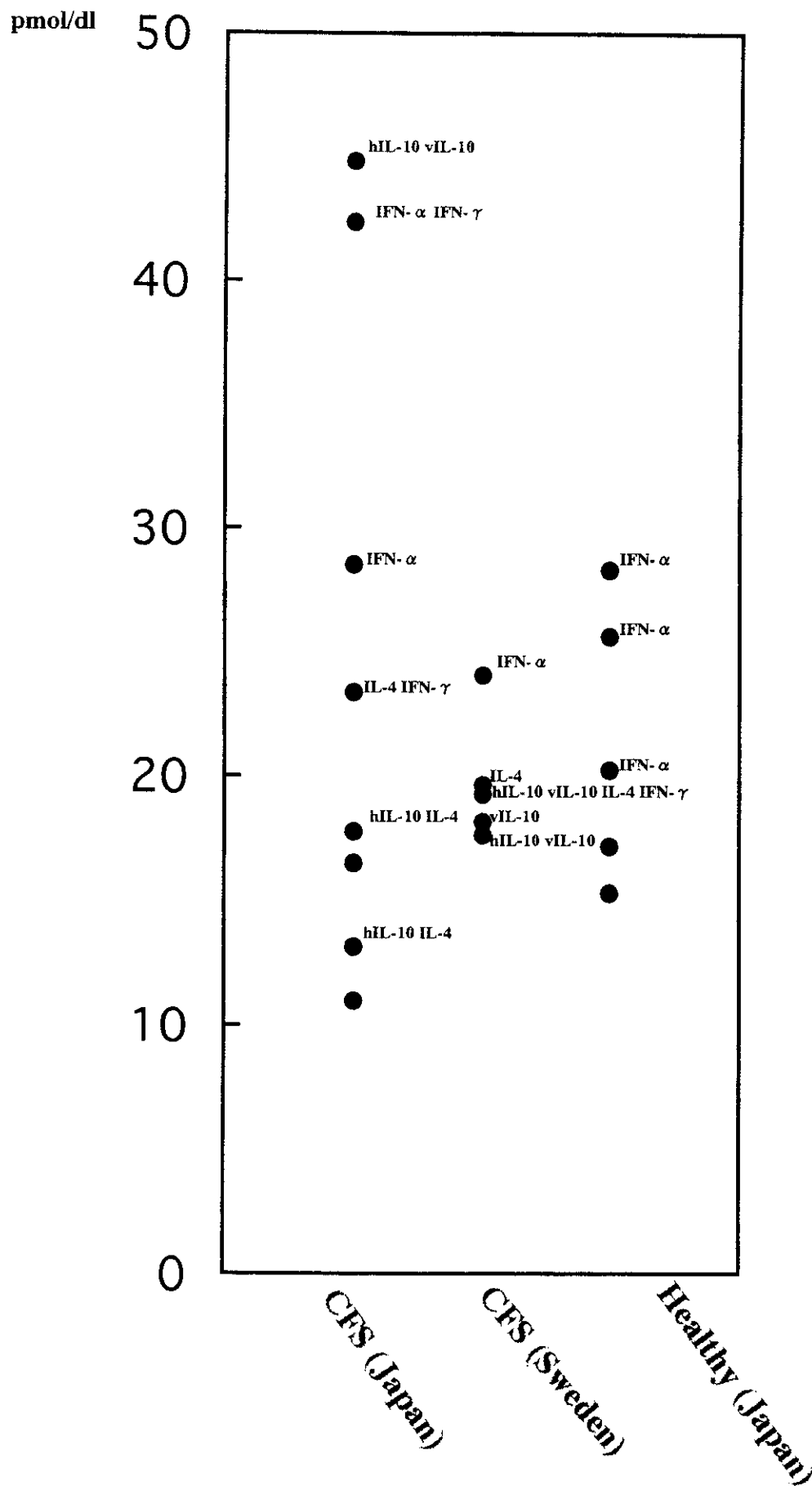


図1 CFS患者及び健康成人血清中における2-5A合成酵素活性

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 自己免疫性疲労症候群患者から検出される自己抗体、抗 Sa 抗体の対応抗原 について

分担研究者 伊藤保彦 日本医科大学付属第二病院小児科講師

研究要旨 われわれはこれまで慢性的不定愁訴を有する児童の約半数が抗核抗体陽性である事実に注目し、陽性患者の約 40%から新たな自己抗体（抗 Sa 抗体）が検出されることなどから、自己免疫性疲労症候群(autoimmune fatigue syndrome; AIFS)という新たな疾患概念を提唱してきた。その後 AIFS から CFS へと進行する症例を経験したが、進行例では 80%以上が抗 Sa 抗体陽性であった。今回の検討で、この抗 Sa 抗体の対応抗原(Sa 抗原)は 70kD の不溶性核抗原であることが判明するとともに、Konstantinov らが成人 CFS 患者において報告した自己抗体の対応抗原とされるラミン B1 とは異なることが明らかとなった。今後さらに抗原解析を続け、自己免疫機序による疲労の発生メカニズムに迫っていきたい。

A. 研究目的

これまでわれわれは、慢性的不定愁訴を有する児童の約半数から抗核抗体が検出される事実に着目し、抗核抗体陽性群では疲労が最も多い症状であることと、その約 40%から 62kD 蛋白に対する新たな自己抗体（抗 Sa 抗体）が検出されることなどから、自己免疫性疲労症候群 (Autoimmune fatigue syndrome, AIFS)という疾患概念を提唱して来た¹。その後、AIFS 患者のフォロー中に慢性疲労症候群(CFS)に進行する症例が認められることを報告したが、CFS 進行例ではこの抗 Sa 抗体の陽性率が 80%以上と一段と高いことがわかった²。したがって抗 Sa 抗体は CFS への進行のリスクファクターと考えられる。

一方、Tan のグループの Konstantinov らは成人 CFS 患者から、68kD の不溶性核 envelope 蛋白に対する抗体が検出されると報告し、その対応抗原はラミン B1 としている³。そこで、AIFS と CFS の関係を探るためにも、我々の言う抗 Sa 抗体と彼らの言う抗ラミン B1 抗体との関

係を明らかにすることが、今回の検討の目的である。

B. 研究方法

実は、これまで抗 Sa 抗体を報告してからすでに 3 年以上経過しながら、その対応抗原の characterization がなかなか思うように進まなかったのには訳があった。当初患者血清のスクリーニングに用いた HeLa 細胞の抽出液（われわれは昔から Ro/SSA の研究を中心にしてきたもので、whole extract ではなくて水溶性画分だけを用いていた⁴）では 62kD のバンドとして検出されるが、ヒトのリンパ球を用いるとバンドが検出されない。そのうえ、補充のために新たに同様に作成した HeLa 抽出液では 68kD のバンドとして検出されたりするため、一時は培養細胞中のマイコプラズマプロダクトか何かではないかと疑ったりしていた。

そこで今回の検討であるが、オリジナルな HeLa 抽出液によるスクリーニングで抗 Sa 抗体の有無が判明している AIFS 患者 122 例の血清

を、種々の抗原で反応性を再確認してみた。抗原としてはヒトの末梢血単核球および HeLa 細胞を用い、Tan のグループは不溶性抗原と言っているので、水溶性画分と不溶性画分に分けて抽出液を作成した。また、検出されたバンドに合わせてニトロセルロース膜を切り出して Affinity elution を行い、反応している各抗体の交差反応性を検討した⁵。さらに、ザイメッド社製のマウス抗ラミン B1 モノクローナル抗体との比較も行った。

オリジナルの HeLa 抽出液の作成方法を詳述すると、まず、大量培養した HeLa 細胞は約 2ml のペレットの状態に-30℃に保存し、凍結融解を繰り返した後に 2 倍量の蒸留水を加えて超音波破碎した。われわれはこれまで Ro/SSA や La/SSB などの ENA の研究をしてきたため、ここで一旦遠心して不溶性成分を除いてから SDS-PAGE を行うが、その遠心は不溶性成分が邪魔にならない程度でよく、3000 回転、5 分程度であった。したがって、後述するように、この上清部分に不溶性成分がある程度混入していた可能性が強いと思われる。今回の検討ではまず、扱う細胞の量を少量にしてすべてエプンドルフチューブで処理するようにし、またどの段階でも凍結保存はせず、凍結融解を繰り返すプロセスも省いてすぐに超音波破碎を行った。水溶性画分と不溶性成分を分けるのにも、マイクロフュージで 13000 回転、30 分遠心した。上清は出来るだけピペットを沈渣に近づけないように採取し、沈渣成分は更に 3 回洗浄してから sample buffer を加えて煮沸した。できあがった抽出液も凍結保存せずに SDS-PAGE を施行した。

C. 研究結果

図 1 に 3 年前に最初に報告したゲルを示す。

オリジナルな HeLa 抽出液ではこのように 62kD の位置のバンドが検出された。最も反応の強い患者名の頭文字から抗 Sa 抗体と名付けた。図 2~4 はすべて同じ 40 名の AIFS 患者血清の分析結果であるが、まず、オリジナルな HeLa 抽出液では図 1 と同様に 62kD 付近にバンドが認められる(図 2)。ところが、全く同じ血清を用いても、ヒト末梢血単核球の水溶性画分を抗原とすると図 3 のように全くバンドが検出されない。それが、同じヒト末梢血単核球でも不溶性成分を抗原として用いると、図 4 のように 70kD と 62kD の doublet のバンドとして検出される。40 例のこの doublet のバンドの有無は図 2 における 62kD のバンド、すなわち抗 Sa 抗体の有無と全例一致していた。オリジナルな HeLa 抽出液と、ヒト末梢血単核球不溶性成分抽出液の比較は計 122 例の患者血清について行ったが、抗 Sa 抗体の有無と 62/70kD doublet の有無は完全に一致していた。

そこで、affinity elution 法で各バンドに反応する抗体を取り出して、それぞれの交差反応性を検討した。図 5 は、A の部分は抗原として HeLa 細胞の不溶性画分を、B の部分はオリジナルの HeLa 細胞抽出液を流してある。どちらも lane 1 は affinity elution の元となった患者血清で、lane 2 は A の 70kD のバンドから、lane 3 は A の 62kD のバンドからの eluate を反応させた。Lane 4 は陰性コントロールとして A の 40kD 付近のバンドから採ったものである。同様に lane 5 はオリジナルな HeLa 抽出液(B)の方の 62kD のバンドからの eluate、すなわち抗 Sa 抗体を反応させた。Lane 6 は B の側からの陰性コントロールでやはり 40kD 付近のバンドから elute したものである。Lanes 2, 3, 5 を見ると、A のダブルレットに反応する抗体はお互いに交差反応するばかりでなく、オリジナルな HeLa 抽出液の 62kD 抗原にも反

応している。同様に、B の 62kD 抗原から採った抗 Sa 抗体は A のダブルレットと交差反応することがわかった。そしてマウス抗ラミン B1 モノクローナル抗体との比較をしたところ、図6に示すように、ラミン B1 は 62/70kD doublet の中間の位置に泳動されており、抗 Sa 抗体の対応抗原とは明らかに異なるものであることが判明した。

D. 考察

われわれの提唱する AIFS という疾患概念は、CFS の診断基準に関わりなく、原因不明の慢性的不定愁訴を有する患者で、抗核抗体陽性のものを指す。しかし後に CFS や線維筋痛症の診断基準を満たすようになる患者が含まれていることが明らかになっており⁶、これらの疾患とも密接に結びついている。これまで CFS 患者の中に抗核抗体陽性の 1 群が存在することは知られていたが、このような患者は AIFS の重症型と考えることができる⁷。CFS はおそらくヘテロな疾患群であり、少なくともその一部については自己免疫が深く関与しているものと思われる⁸。

今回の結果から、われわれが抗 Sa 抗体と呼んでいる自己抗体の対応抗原は、不溶性の 70kD 核蛋白であり、これまで報告してきた 62kD 蛋白はその degradate である可能性が強いということがわかった。そこで、Konstantinov らの報告した抗ラミン B1 抗体と非常に類似していると考え、モノクローナル抗体と比較したところ、確かに不溶性画分の 70kD バンドと近い位置に反応するが、62kD の位置には反応せず、さらにゲル中に SDS を含まない条件で泳動すると Sa 抗原とラミン B1 は位置が異なっていた。Konstantinov らが報告した自己抗体と抗 Sa 抗体はそれでも同じものをみている可能性は否定で

きない。それはすなわち彼らの抗原同定に疑問が持たれるということである。いずれにせよ、ラミン B1 とは異なる抗原であることが判明したことで、今後 Sa 抗原の同定をさらに進め、その生化学的性状を明らかにしていきたいと考えている。

参考文献

- 1 Itoh Y, et al: Autoimmunity, 25, 243-250, 1997
- 2 Itoh Y, et al: Jpn. J. Rheumatol., 8, 429-437, 1998
- 3 Konstantinov K, et al: J. Clin. Invest., 98, 1888-1896, 1996
- 4 Itoh Y, et al: Clin. Exp. Immunol., 81, 45-51, 1990
- 5 Itoh Y, et al: Autoimmunity, 14, 57-66, 1992
- 6 伊藤保彦他：日医大誌, 66, 239-244, 1999
- 7 伊藤保彦他：小児内科, 29, 1035-1039, 1997
- 8 伊藤保彦他：小児科, 39, 1509-1515, 1998

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 伊藤保彦, 福永慶隆, 五十嵐徹, 吉田順子, 立麻典子, 今井大洋, 土屋正巳, 村上睦美：自己免疫性疲労症候群と線維筋痛症の関係についての検討. 日医大誌, 66, 239-244, 1999
- 2) 伊藤保彦：抗核抗体陽性慢性疲労症候群. スポット小児科医, 33, 6-7, 1999
- 3) Itoh Y, Igarashi T, Tatsuma N, Imai T, Yoshida J, Tsuchiya M, Murakami M, Fukunaga Y: Immunogenetic Background of Patients with Autoimmune Fatigue Syndrome. Autoimmunity, (in press)

2. 学会発表

- 1) 伊藤保彦, 五十嵐徹, 福永慶隆: 自己免疫性疲労症候群患者における不溶性核抗原に対する自己抗体. 第43回日本リウマチ学会総会 1999. 6.3-5. 札幌
- 2) 伊藤保彦: 小児の慢性疲労症候群と自己免疫. 第4回日本医科大学アレルギー-感染免疫懇話会. 1999. 6. 29 東京
- 3) 伊藤保彦, 立麻典子, 五十嵐徹, 福永慶隆: 自己免疫性疲労症候群患者から検出される自己抗体, 抗 Sa 抗体の対応抗原について. 第9回日本小児リウマチ研究会 1999.10.23. 東京
- 4) 伊藤保彦: 自己免疫性疲労症候群患者から検出される自己抗体, 抗 Sa 抗体の対応抗原について. 厚生省厚生科学研究事業「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」班会議 1999.12. 6. 東京

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

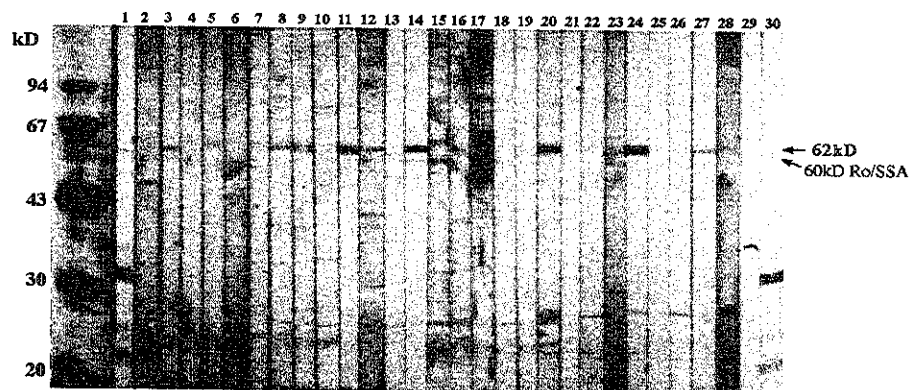


図1：オリジナルな HeLa 細胞抽出液を抗原とした AIFS 患者血清
29 例の Western immunoblot 解析. (文献1より引用)

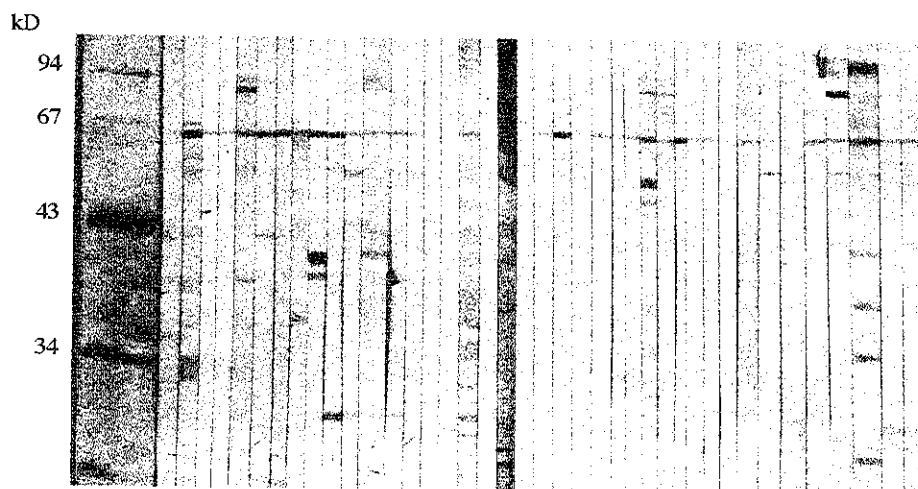


図2：オリジナルな HeLa 細胞抽出液を抗原とした AIFS 患者血清
40 例の Western immunoblot 解析. 図1同様 62kD 付近に
反応が認められる.

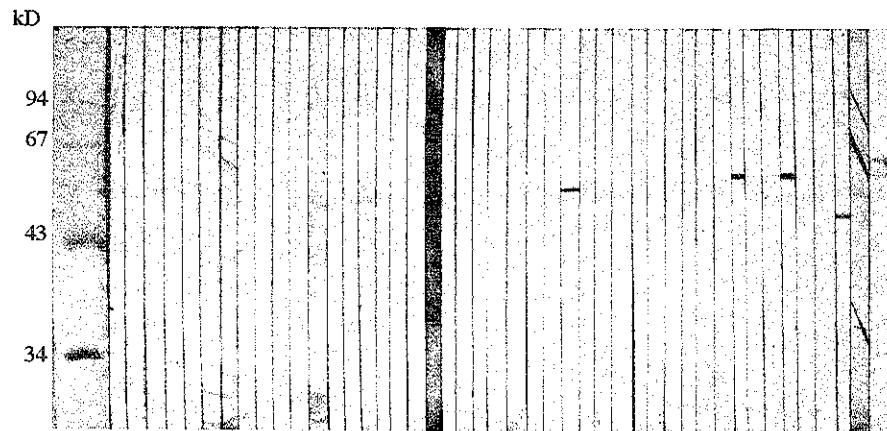


図3：ヒト末梢血単核球水溶性画分の抽出液を抗原としたAIFS患者血清40例のWestern immunoblot解析。血清は図2のものと同一。反応はほとんど認められない。

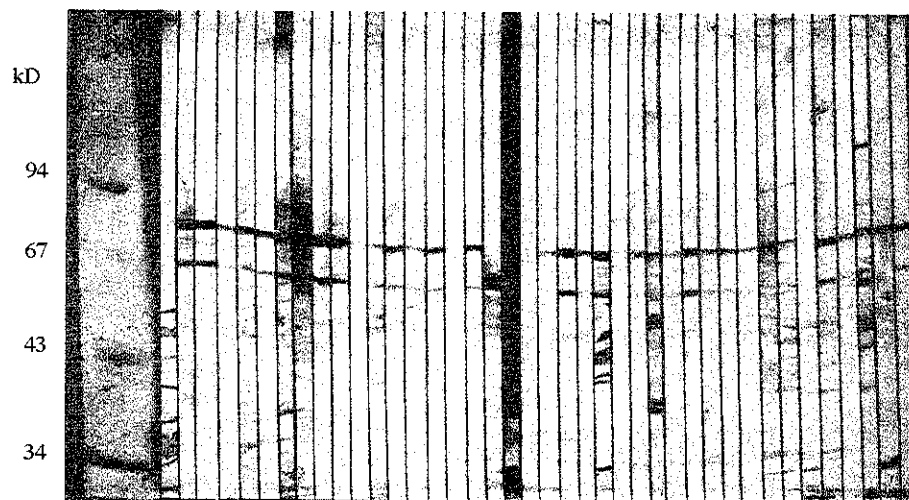


図4：ヒト末梢血単核球不溶性画分の抽出液を抗原としたAIFS患者血清40例のWestern immunoblot解析。血清は図2、図3のものと同一。70kDおよび62kDのdoubletとして検出される。

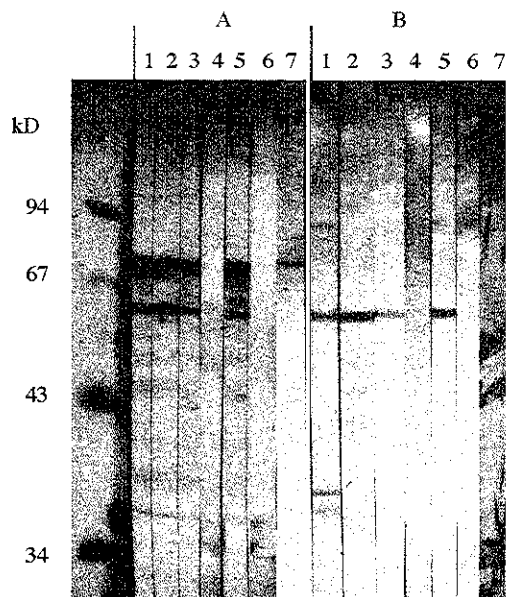


図5 : Affinity elution 法による交差反応性の検討. 抗原は今回作成した HeLa 細胞不溶性画分抽出液(A), とオリジナルな HeLa 細胞抽出液(B). 反応させた抗体は, 1 : eluate の元となった患者血清, 2 : A の 70kD バンドからの eluate, 3 : A の 62kD バンドからの eluate, 4 : A の 40kD バンドからの eluate (negative control), 5 : B の 62kD バンドからの eluate, 6 : B の 40kD バンドからの eluate (negative control), 7 : マウス抗ラミン B1 モノクローナル抗体.

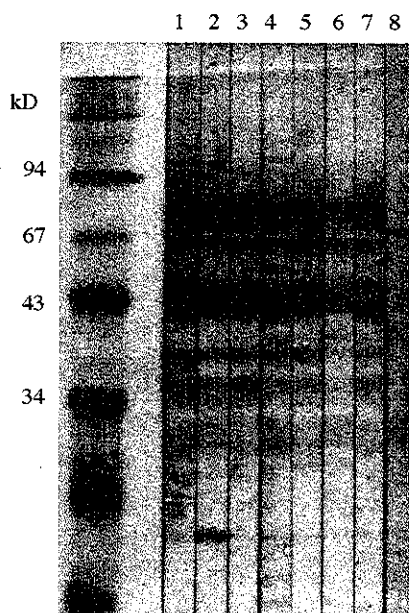


図6 : HeLa 細胞核不溶性画分を抗原とした Western immunoblot. ゲル中に SDS を含まない条件で泳動した. Lanes 1~8 : 抗 Sa 抗体陽性患者血清, lane 9 : マウス抗ラミン B1 モノクローナル抗体.

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
 疲労負荷マウスにおける抗酸化物質代謝動態

分担研究者 井上正康 大阪市立大学医学部第一生化学教室教授
 研究協力者 笠原恵美子 大阪市立大学医学部第一生化学教室

研究要旨 急性及び慢性の疲労病態における酸化ストレスの関与を明らかにするために、トレッドミルによる疲労負荷マウスにおいて抗酸化物質の体内レベル及びその代謝動態を検討した。トレッドミルで 1.2 m/min 24 時間走行させたマウスを用いてロータロッドで疲労強度を測定したところ、コントロールマウスと比較して有意に疲労していることが判明した。これら疲労負荷マウスの肝腎のグルタチオンレベルはコントロール群に比べて低下傾向を示した。一方、脳・筋肉・プラズマ中グルタチオンレベルに変化は認められなかった。また、肝・腎・脳・筋肉・プラズマ中のアスコルビン酸レベルは 2 群間で著明な差は見られなかった。

以上の結果より、疲労状態では生体内のレドックスバランス、特に肝腎のグルタチオンサイクルが大きく変動していることが示唆された。

A. 研究目的

生体は多量の酸素をエネルギー産生に利用している。平時でも、その数%は中間生成物である活性酸素種 ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$ など) となっている。これら活性酸素種に対し、生体内にはスーパーオキシドジスムターゼ (SOD), カタラーゼ, グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) およびグルタチオン (GSH), α -トコフェロール, アスコルビン酸, 尿酸, ビリルビンなど、種々の抗酸化酵素や抗酸化物質が存在し、活性酸素種の代謝バランスを保っている。生体内の酸化(物質)と還元(物質)のレドックスバランスが活性酸素優位になった状態を酸化ストレスと呼ぶが、これが生体の機能制御や病態発現に深く関与している¹⁾。

今回、急性及び慢性の疲労病態における抗酸化物質の関与を知る目的で、疲労モデルマウスを作成し、その内因性抗酸化物質の動態を検討した。

B. 研究方法

〈動物〉

動物は 8-9 週齢 C57BL、雄マウスを用い、自由摂食下で実験を行った。

〈疲労負荷条件〉

円型トレッドミル(OSAKA MICRO SYSTEM)を用いて 1.2 m/min でマウスを 24 時間走行させ、各臓器を採取した。

〈疲労度測定〉

ロータロッド (MK-660A 室町機械株式会社) を 10 rpm で回転させ、ロータからマウスが落下するまでの滞在時間を測定して疲労の指標とした。

〈サンプル処理〉

エーテル麻酔下にマウスの腹大動脈よりヘパリン採血した後、4℃の生食で臓器を灌流した。血液は採血後直ちに 4℃ 15,000 rpm で遠心し、プラズマを分離後に最終濃度 5% の TCA で酸処理した。各臓器は採取後直ちに最終濃度 5% の TCA でホモジナイズし、4℃ 10,000 rpm で 30 分遠心後、上清を採取して測定に用いた。

〈総グルタチオン量 (GSH+GSSG) の測定〉

Tietze と Ellman らの酵素リサイクリング方法により、総グルタチオンを測定した。NADPH とグルタチオンレダクターゼ存在下に GSH と GSSG のリサイクリング法により DTNB から TNB の生成速度を 412 nm の吸光度変化により検出した。

〈アスコルビン酸の測定〉

VX-ODS カラムを用いた HPLC により、L-ECD-6A(shimadzu)で検出した。また、総アスコルビン酸量はサンプルを 5 mM DTT で還元した後、同様に測定した。

C. 研究結果

〈トレッドミル負荷後の疲労度〉図 1

1.2 m/min で 24 h 走行させたマウスは、コントロ

ール群に比べ、ロータロッドでの滞在時間が約 1/2 に短縮していた。この事はマウスに疲労が負荷されていることを示している。したがって、以降の実験はこの負荷条件を用いて行った。

〈臓器グルタチオン濃度〉図 2

疲労負荷マウスでは、コントロール群に比べ、肝腎のグルタチオンレベルが低下傾向を示した。一方、脳・筋・血液・プラズマには変化がみられなかった。

〈臓器アスコルビン酸濃度〉図 3

肝・腎・脳・筋肉・プラズマ中のアスコルビン酸、及び総アスコルビン酸レベルは、これら 2 群間で著明な差は見られなかった。

D. 考察

GSH は、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の存在下に過酸化水素 (ROOH) や過酸化水素 (H₂O₂) を還元処理したりフリーラジカル (FR) と直接反応することにより酸化ストレスから生体を防御する。生体に酸化ストレスが負荷されると、このグルタチオン代謝動態が変動し、レドックス状態を正常に維持するように働く。逆に、グルタチオン代謝動態に異常があれば、酸化ストレスによる様々な病態を誘起しうる^{1,2)}。

肝から分泌された GSH の約 60~70% は腎に移行し、近位尿管細胞膜表面に局在する γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP) とジペプチダーゼにより速やかに分解される。残りの 30~40% も両酵素を有する他の上皮系組織で分解されて同様の挙動を示す。このように、肝、腎をはじめとする臓器間で GSH を代謝回転させて再利用するシステムが高速で機能し、細胞内外の GSH 動員量を同程度に維持している。このため、血中 GSH の定常濃度は ~ 数 10 μ と低い、その総代謝量は細胞内のそれに劣らない³⁾。

このチオール代謝系に影響する諸因子は、レドックス変化を介して生体にさまざまな代謝変化を誘起する。グルタチオンやシステインを含む低分子チオールは、さまざまな酵素や受容体の活性、ホルモン作用、細胞内シグナル伝達、遺伝子発現、細胞増殖分化などに関与する。酸化還元状態の変化が、SH/S-S 変換を介して細胞の代謝を制御していることも知られている。特に、反応中心に活性な遊離 SH 基あるいはジスルフィド基を有する酵素群では、GSH/GSSG の存在比の変化やチオレドキシンの

の作用などにより、その活性が制御されている。

好氣的生物では活性酸素種は常に産生分解されているので、酸化ストレスが容易に誘起される。そのため、種々の病態時に組織や細胞を活性酸素ストレスから保護する上に、肝腎を中心とする上記のグルタチオン代謝サイクルはきわめて重要である⁴⁾。

今回の実験で、トレッドミルによる疲労負荷マウスでは肝腎のグルタチオンレベルが減少していた。上述したように、生体内グルタチオンは肝腎代謝サイクルを形成しているので、これらマウスの肝腎グルタチオンレベルの低下は、グルタチオンサイクルの変動を示唆するものである。一方、臓器内アスコルビン酸レベルに著明な変化は見られなかったことより、生体内の酸化ストレス状態においては、グルタチオンがアスコルビン酸よりも優位に消費される可能性が考えられる。

今後、タウリンや尿酸などの酸化還元パラメータもあわせて測定をすることにより、疲労状態における酸化還元動態を更に詳しく解明していく予定である。また GSH 合成を阻害した動物や抗酸化物質を補給した動物で疲労度に変化がみられるかを検討していく予定である。

参考文献

- 1) Inoue, M. et al : Biochemical and clinical aspects of extracellular glutathione and related thiols. In *Biothiols*(eds:L.Packer,E.Cadenas), PP 287-304, Marcel Dekker Inc. New York,1995
- 2) Nakazono, K. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88:10045-10048, 1991.
- 3) Inoue, M. : Interorgan metabolism and transport of glutathione and related compounds. In *Renal Biochemistry*. Kinne, R. ed PP 225-69, Elsevier, North-Holland, 1985
- 4) Inoue, M., Nobukuni, Y., Ando, Y., Morino, Y. : Interorgan metabolism of glutathione as the defence mechanism against oxidative stress. In *Nephrotoxicity of Antibiotics and Immunosuppressants*. Tanabe, T., Sakai, B., Hook, J. ed PP 51-60, Elsevier, North-Holland, 1986

E. 研究発表

1. 論文発表

- なし
- 2. 学会発表
なし

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

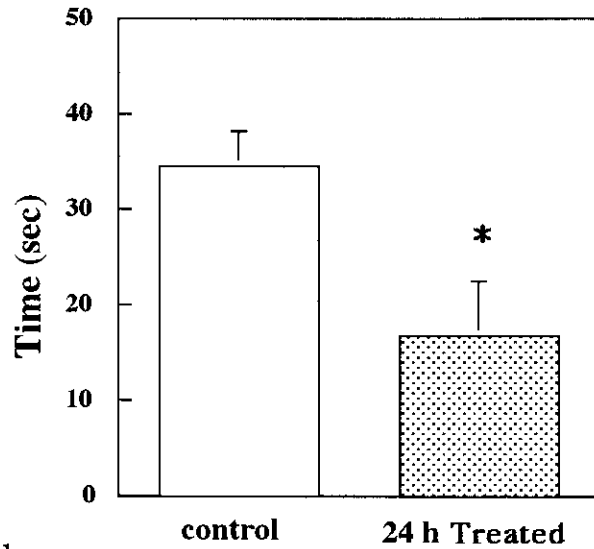


図-1
疲労負荷マウスのロータロッド滞在時間はコントロールに比べて優位に短縮していた。

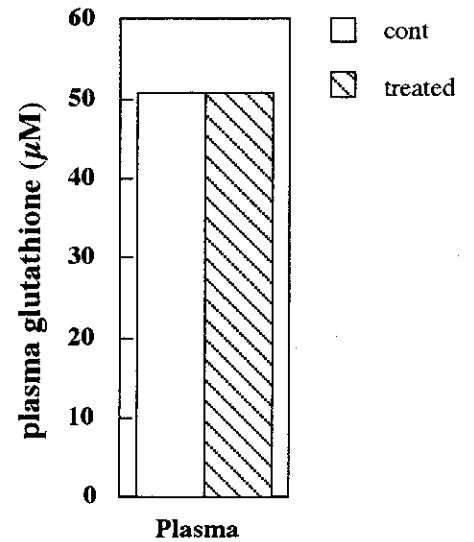
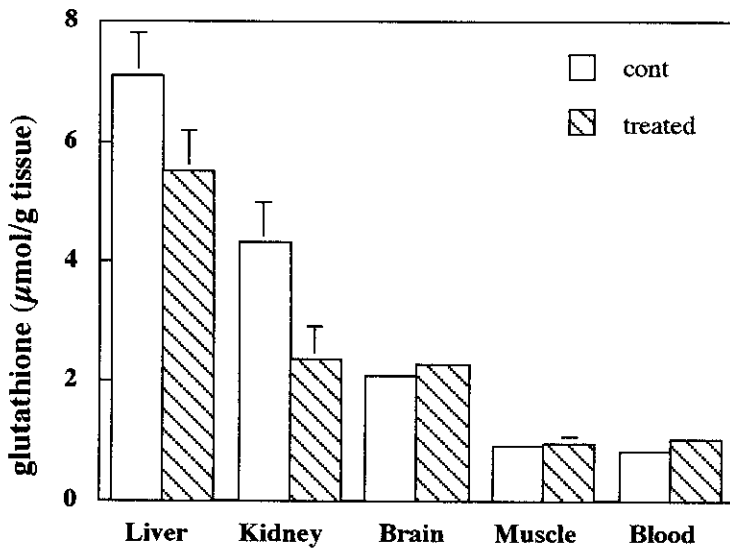


図-2
疲労負荷マウスの肝・腎グルタチオンレベルはコントロールに比べて低下傾向を示した。脳・筋肉・血液・プラズマ中のグルタチオンレベルに著明な差はみられなかった。

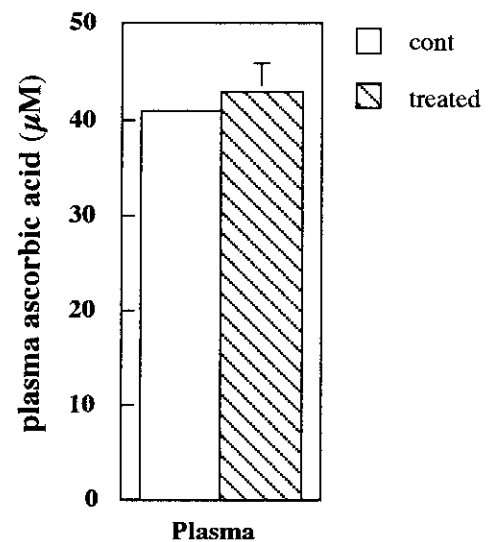
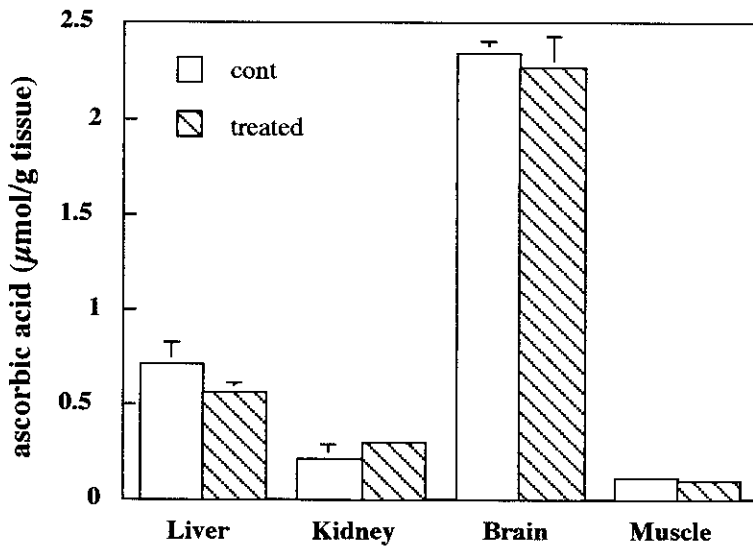


図-3
肝・腎・脳・筋肉・プラズマ中のアスコルビン酸レベルに著明な差はみられなかった。

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
 ــــــــــــــــ不登校児の事象関連電位ــــــــــــــــ

分担研究者 三池輝久 熊本大学医学部発達小児科教授
 研究協力者 友田明美 熊本大学医学部発達小児科
 上土井貴子 熊本大学医学部発達小児科
 村山伸樹 熊本大学工学部電気システム工学科教授
 伊賀崎伴彦 熊本大学工学部電気システム工学科
 宮崎 誠 熊本大学工学部電気システム工学科

研究要旨 中学生の2%、高校生の5%程度、大学生においては更に高率に存在する不登校状態は慢性疲労状態であり青少年達の閉じこもりの主な原因となっている。この状態はこれまでに知られた疾患概念では理解が困難である。疲労感の回復には少なくとも数カ月から数年を要するが後遺症としての易疲労性はそれ以上に長い月日に渡って患者達を苦しめる。患者数の多さと長期の闘病生活を考えるときこの病態の早期解明と治療法の確立は高齢化する日本社会において急を要する大きな問題である。青少年期における学校社会からの離脱が単なる学校嫌いや怠けとはことなる中枢性の慢性的疲労状態が含まれており彼らの思考、記憶、集中、判断、認知、持久などの全ての能力において障害が存在することを明確にし脳における原因病態を探りその治療法を確立する為、今回不登校児における事象関連電位（P300）の検討を行った。

A. 研究目的

不登校状態においては、成人の慢性疲労状態に類似した臨床症状が認められること、かなひろいテストではワーキングメモリの低下が存在することや SPECT 検査において前頭葉、後頭葉領域での血流低下を我々は指摘し、脳機能の低下状態が存在することを報告した。また深部体温の測定で不登校状態にあっては睡眠時の体（脳）温が高く脳温低下が不十分であることと体温低下の日内リズムとホルモンの分泌時計が同期していないことを既に報告している。自律神経機能の機能障害もほぼ全例に存在しており疲労の共通の身体所見として、自律神経異常が存在することを示唆されている。

脳機能における認知力の低下は彼等の特徴とも

言える臨床症状であるが、認知を司る神経細胞群の機能評価としての事象関連電位（P300）が延長している基礎的なデータを得ており、詳細な検討を行う必要があると考え、今回不登校児における事象関連電位（P300）の検討を行った。

B. 研究方法

1) 対象

対象となる不登校児の診断基準^{1)~3)}を、1)年間60日以上（連続・非連続を問わず）不登校状態にある、2)全身倦怠感、頭痛（片頭痛を除く）、腹痛、嘔気、めまい、立ち眩み、筋痛、睡眠障害、記憶力・思考力・集中力低下等の何れか1つ以上の愁訴のため通常の学校生活が困難である、3)少なくとも1人以上の小児科医が診察に当たり、患

児の病歴、理学的検査および適切な検査所見によっても他の疾患が除外される、とした。

以上の診断基準を満たし、熊本大学発達小児科外来を'99年1月から'99年11月に初診した9~18歳までの計38名(男児26名,女児12名,平均14.0±2.4歳)を対象とした。

2) 測定方法

実験装置の概略を図1に示す。被験者は開眼安静状態で、ディスプレイの前に置かれた椅子に座らせた。被験者とディスプレイとの距離は約1m、ディスプレイの高さはほぼ被験者の目の高さにあわせた。ディスプレイに○(Target)または×(Non-target)の画像を呈示し、視覚刺激を行った。呈示する画像の頻度は、それぞれ○が20%, ×が80%で、呈示時間300ms, 呈示間隔2000msでランダムに呈示した。実験は50回○, ×画像を呈示を1セットとし、被験者1セットあたり5セット行った。

脳波は国際10-20法に基づくFz, Cz, P3, Pz, P4, O1, O2 探査電極とし、両耳朶連結を基準電極として画像呈示100ms前から呈示後1000msをサンプリング間隔1msで記録した。また瞬目や眼球運動によるアーチファクト除去するため同時に眼電図(EOG)を記録し、電位が150μVを超えたものは記録を棄却した。

また被験者の注意を促すために、画像呈示後1000ms後のキュー音を合図に、○が呈示されたときに限って利き手に持ったボタンを押すように指示した。

C. 研究結果

小児型CFS(不登校児)のP300は、以下の3タイプに分類できた(表1)。

- 1) タイプ1: 潜時延長を示すグループ、
- 2) タイプ2: non-target において振幅異常を示すグループ、
- 3) タイプ3: 正常範囲のグループ。

各タイプで比較検討すると潜時延長を示すグループは若年齢に多かったが、うつスコアに関して特に有意差は認められなかった(図2, 3)。また患者の愁訴数を小クライテリアで比較検討すると、タイプ3(正常範囲のグループ)に比べて、タイプ1(潜時延長を示すグループ)、2(non-target において振幅異常を示すグループ)で有意に多かった(図4)。

表1. 不登校児のタイプ別P300所見

	潜時 (msec)	Target (μV)	Nontarget (μV)	N
健常児	423.0 ±59.75	19.06 ±6.91	2.62 ±4.42	84
TYPE1	560.2 ±61.65	18.87 ±7.82	4.45 ±5.87	11
TYPE2	350.9 ±30.05	20.91 ±6.78	11.86 ±2.75	11
TYPE3	379.1 ±34.94	18.13 ±5.69	3.11 ±2.74	16

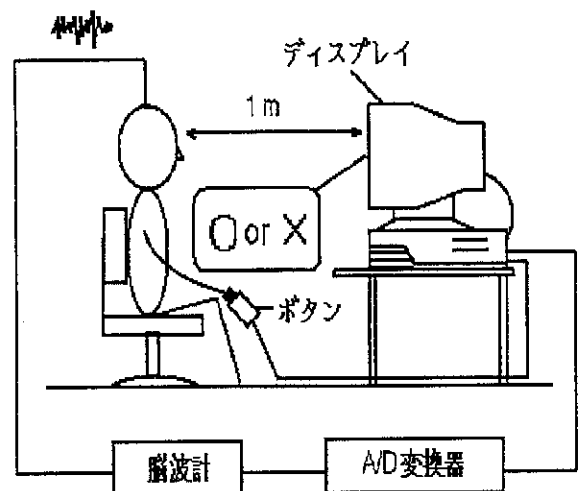


図1. P300検査装置

年齢との関連性

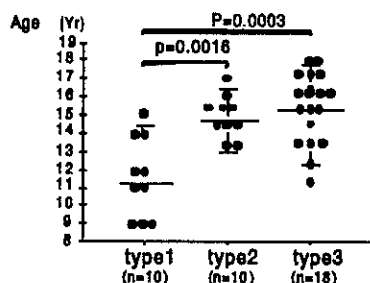


図2. 不登校児のP300所見と年齢との関連性について

うつスコアとの関連性

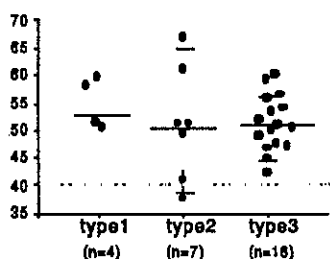


図3. 不登校児のP300所見とうつスコアとの関連性について

CFS小クライテリア数との関連性

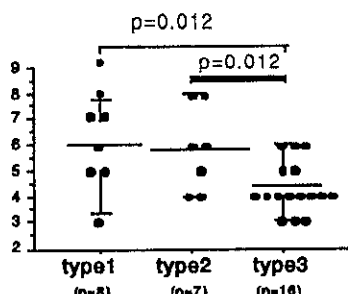


図4. 不登校児のP300所見とCFS小クライテリアとの関連性について

D. 考察

中学生の2%、高校生の5%程度、大学生においては更に高率に存在する小児型慢性疲労症候群（不登校状態）は日常の学校生活を送れないほど慢性疲労状態であり、青少年達の閉じこもりの主な原因となっている。この状態はこれまでに知られた疾患概念では理解が困難である。疲労感の回復には少なくとも数カ月から数年を要するが、後遺症としての易疲労性は、それ以上に長い月日に渡って患者達を苦しめる。患者数の多さと長期の闘病生活を考えるとき、この病態の早期解明と治療法の確立は、高齢化する日本社会において急を要する大きな問題である。我々は問題解決の鍵は体内時計を司る脳、記憶・情動を支配する脳の発生分化に関わる遺伝子にあると考えるに至った。青少年期における学校社会からの離脱が、単なる学校嫌いや怠けとは異なる中枢性の慢性的疲労状態が含まれており、彼らの思考、記憶、集中、判断、認知、持久などの全ての能力において障害が存在することを明確にし、脳における原因病態を探り、その治療法を確立する必要がある。彼等のMRspectroscopy (MRS)の検討の結果、前頭葉領域にコリンの異常な蓄積が認められることを観察してきた¹⁾。脳血流をキセノン CT を検討することによってさらに詳細に観察し、ほぼ80%の例で脳血流の減少が認められその95%が後頭葉、35%が前頭葉領域であることも観察している³⁾。脳機能における認知力の低下は彼等の特徴とも言える臨床症状であるが、これまでの検討により、認知を司る神経細胞群の機能評価としてのp300が延長している基礎的なデータを既に得ていた。さらに慢性疲労症候群(CFS)の成人例(37.6 ± 8.9歳)における認知機能の低下⁴⁾は以前より指

摘されていたが、若年齢での検討はこれまであまりなされていない。今回の我々の検討により、小児型CFSでは特異なP300所見が得られることがわかったが、さらに症例数を増やして検討するとともに臨床症状との関連性を詳細に検討する必要があると考えられた。今後は、大阪大学、大阪バイオサイエンス研究所との共同研究にてPET解析による局所脳血流、局所脳グルコース代謝などの脳機能について検討し、本病態の解明を中枢疲労という観点から明らかにしたい。臨床的な治療法としてこれまでにミトコンドリア機能異常を考えたカルジオクローム療法や、高気圧酸素療法などを試みて来たが、今後はこれらの結果をふまえて、小児型慢性疲労症候群（CFS）ともいふべき不登校状態にある患児達への治療法の確立を計りたい。

E. 結論

1. 小児型CFS（不登校児）38名のP300を検討した。
2. 小児型CFS（不登校児）のP300は、以下の3タイプに分類できた。
 - 1) タイプ1：潜時延長を示すグループ、
 - 2) タイプ2：non-targetにおいて振幅異常を示すグループ、
 - 3) タイプ3：正常範囲のグループ。
3. 各タイプで比較検討すると、潜時延長を示すグループは若年齢に多かった。また患者の愁訴数を小クライテリアで比較検討すると、タイプ3（正常範囲のグループ）に比べて、タイプ1、2で有意に多かった。

参考文献

1. Tomoda A, et al : Brain Dev., 21, 51-55, 1999.
2. Tomoda A, et al : Biol. Psychiatry 51, 71-76, 1996.
3. 三池輝久：講談社,1-80, 1997.
4. Scheffers, et al : Neurology, 42, 1667-1675, 1992.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomoda A, Miike T, Yamada E, Ogawa M, Honda H, Moroi T, Ohtani Y, Morishita S. Chronic fatigue syndrome (CFS) in childhood. Brain & Development, 21: 51-55, 1999.
- 2) Tomoda A, Miike T, Iwatani N, Ninomiya T, Mabe H, Kageshita T, Ito S. Effect of long-term melatonin administration on melanin metabolism and skin color in school phobic children and adolescents with sleep disturbance. Curr Ther Res, 60: 607-612, 1999.
- 3) 三池輝久, 上土井貴子, 二宮敏郎, 白石晴士, 友田明美, 岩谷典学. 不登校状態の実態調査と生活リズムの変調に関する研究（分担研究者 三池輝久）平成10年度厚生科学研究（子ども家庭総合研究事業）報告書（第3/6）, 20-23, 1999
- 4) 三池輝久, ほか. 生体リズムと健康一生体リズムと不登校（不出社）学会センター関西, 39-64, 1999
- 5) 三池輝久, ほか. 生体リズムを基本に一ふえるフクロウ症候群 食べもの通信社, 31-41, 1999

2. 学会発表

- 1) 池澤誠, 友田明美, 三池輝久, 伊賀崎伴彦, 村山伸樹. 不登校児のP300. 第11回臨床神経生理研究会（熊本）1999年8月21日~8月22日

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし