

リスクの同定、並びに診断・治療技術の開発」(承認番号1499)に準拠した研究計画「慢性疲労の診断技術の開発に関する研究」を、横浜国立大学ライフサイエンス研究倫理委員会に倫理審査申請し、同臨床研究倫理審査専門委員会において承認(承認番号2)された研究方法に従い、研究対象者に対しての人権擁護上に派生する事象に対し配慮し、また研究対象者に対する不利益、危険性が排除されていること、研究参加を取りやめることの自由等を、十分に説明し、同意を得た上で実施した。

また、他機関で同様に取得された測定結果に関しては、匿名化された形態でのみデータを受領し、個人情報特定されない様式のデータのみを、解析にあたっては使用した。

C. 研究結果

起立試験における自律神経応答

CFS患者と健常人のTP(=LF+HF)の起立試験応答の時系列をFig.1に示す。

ほとんどの健常人は起立によりTPが上昇しその後もとの値へと減衰する様子が見られたが、CFS患者では変化がみられない例が多かった。

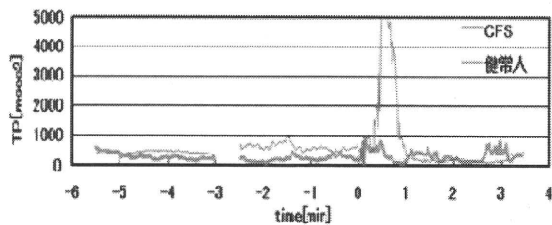


Fig.1

データ項目ごとの群間比較

データセンター収録データと別途計算した自律神経機能代表値の計120項目について、CFS患者群と健常人群の群間比較を行った。統計的に有意な水準($p < 0.05$)を示したデータ項目は54であった。それらから抜粋した例をTable 1にまとめた。

データ項目の感度・特異度

統計的に有意な水準($p < 0.05$)を示した54データ項目について、ROC曲線を作成し、感度並びに特異度を計算したTable 2に、6データ項目のみ抜粋して、結果を示す。それらの項目で感度・特異度を算出したところ、客観的な項目におい

ては認知課題検査(単純計算課題)において測定された反応時間が、感度・特異度が総合的に高かった。

血液検査による項目は有意差が出なかったが、抗酸化指標であるBAPのヒストグラムにCFS群、健常人群それぞれで双峰性が確認された。

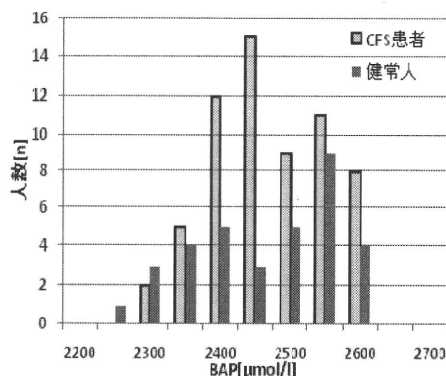


Fig.2 BAP 測定値のヒストグラム

この結果はCFS群、健常人群それぞれに属性の異なる集団が混在している可能性がある。CFS患者群の双峰のピーク頂点と健常人群の双峰のピーク頂点がほぼ一致すること、またBAPの健常基準範囲が $2,541 \pm 61 \mu \text{mol/l}$ という報告があることから、CFS患者群でBAPの値が高い分布に属するCFS患者と低い分布に属するCFS患者とは弁別して、検討する必要があるといえる。

BAP計測値を開始点とした診断決定木—十分な尤度比を与える決定木

CFS患者と健常人をBAPの値により低群・高群に分け、それぞれの群で決定木を作成した。決定木作成には群間比較で有意な差のあった問診以外の客観的な項目を対象とした。全てのCFS患者と健常人を正しく分類できる最大の木を作った後、交差確認法により最適なサイズに剪定した。交差確認法の計算結果からは、BAPの低群・高群共に1段階の分岐が最適であった。

BAPと組み合わせた最適な診断決定木をFig. 3に示す。この診断法は感度0.69、特異度0.93であった。確定診断に際しては、高い特異度が求められる。また、検査性能を表す指標である尤度比を計算したところ、得た診断決定木の尤度比は9.9であり、十分に高い尤度比を与えた。

Table 1 t検定において $p < 0.05$ を示したデータ項目

大項目 細項目	p	CFS患者 \geq 健常人
(BAP::dROM)	(0.056)	>
CRF::AMIL	0.00014	>
単純計算課題::反応時間_線上なし_メジアン	1.6E-55	>
反応時間_メジアン	0.00023	>
反応時間_線上あり_メジアン	0.00063	>
dif_5_95%_	0.0015	>
dif_線上あり_5_95%_	0.011	>
dif_線上なし_5_95%_	0.015	>
デュアルタスク::MRT1	1.2E-65	>
TRTduall	1.6E-55	>
MRT32	2.9E-55	>
TRTsingle	7E-55	>
TRTduall2	0.00019	>
MRT31	0.00026	>
MRT3122	0.00096	>
MRT2	0.0013	>
CESD::SUM	6.8E-105	>
疲労問診::身体疲労	1.49E-235	>
精神疲労	4.01E-165	>
膠原病様症状	5.94E-14	>
前頭葉機能障害	9.36E-13	>
感染	2.65E-12	>
自律神経失調	2.84E-12	>
不眠	9.68E-11	>
過眠	2.62E-10	>
不安抑うつ	1.38E-05	>
自律神経機能検査::average (HR) (1::閉眼座位)	0.038	>
average (HR) (2::開眼座位)	0.0036	>
average (HR) (3::開眼起立)	0.0074	>
average (HR) (4::開眼立位)	0.013	>
average[ln {P(HF)}] (3)	0.023	<
average[ln {P(HF)}] (2)	0.011	<
average[ln {P(HF)}] (1)	0.033	<
average[ln {P(LF)}] (3)	0.0133	<
average[ln {P(HF+LF)}] (3)	0.0071	<
average[ln {P(HF+LF)}] (1)	0.019	<
average[ln {P(DC (直流成分))}] (4)	0.02	<
average[ln {P(DC)}] (3)	0.031	<
average[ln {P(DC)}] (2)	0.004	<
average[ln {P(HF+LF+DC)}] (3)	0.015	<
average[ln {P(HF+LF+DC)}] (2)	0.038	<
average[ln {P(HF+LF+DC)}] (1)	0.027	<

Table 2 6データ項目についての最適カットオフ値と感度・特異度

項目名	P 値	最適カットオフ値	感度	特異度
CRF::AMIL	0.00014	47.000	0.646	0.667
単純計算課題::反応時間_メジアン	0.00023	1.167	0.729	0.625
単純計算課題::dif_5_95%_	0.0015	1.490	0.562	0.729
自律神経機能検査::average (HR) (2)	0.0036	68.570	0.700	0.560
average (HR) (3)	0.0074	78.960	0.600	0.580
average (HR) (4)	0.013	81.840	0.500	0.680

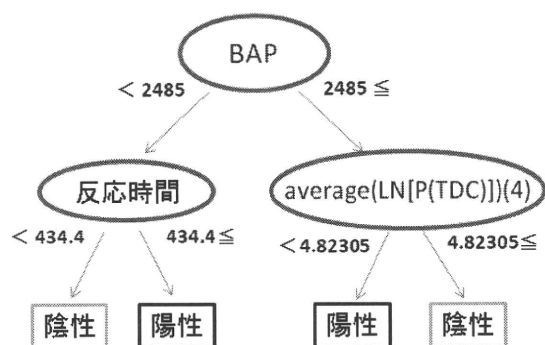


Fig.3 交差確認法により最適なサイズに選定された診断決定木

(反応時間：認知課題検査における反応時間)

D. 健康危険情報

(総括研究報告書にまとめて記入)

E. 研究発表

1. 論文発表

(1) M. Takeda, K. Kondo, M. Yamada, J. Koizumi, T. Mashima, A. Matsugami, M. Katahira, "Solubilization and structural determination of a glycoconjugate which is assembled into the sheath of *Leptothrix cholodnii*." Int. J. Biol. Macromol., 46 (2), 206-211, (2010).

(2) D.M. Sahabi, M. Takeda, I. Suzuki, J. Koizumi, "Comparison of arsenate, lead, and cadmium adsorption onto aged biofilter media." J. Environ. Eng., 136 (5), 493-500, (2010).

2. 学会発表

(1) 小泉淳一、増田久美子、瀬古裕也、西田 優、田島世貴、倉恒弘彦：「予防医療を目的とした自律神経機能検査」、日本疲労学会誌、6 (1)、40 (2010).

(2) 大川尚子、田島世貴、藤原和美、池上 徹、廣澤巖夫、三戸秀樹、倉恒大輔、大平辰朗、塩見格一、小泉淳一、笹部哲也、山口浩二、倉恒弘彦：「精神作業疲労に対する森林浴の疲労回復効果」、日本疲労学会誌、6 (1)、105 (2010).

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 小泉淳一 外 1名：「自律神経機能診断装置、生体モニタリングシステムおよびプログラム」、特願2010-278979 (平成22年12月15日)

(2) 小泉淳一：「自律神経機能年齢の判定システム及び判定方法」、特願2011-007680 (平成23年1月18日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

自律神経機能異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する
客観的な疲労診断法の確立と慢性疲労診断指針の作成

慢性疲労患者における唾液の生物学的評価

分担研究者 近藤 一博（東京慈恵会医科大学ウイルス学講座教授）
研究協力者 小林 伸行（東京慈恵会医科大学ウイルス学講座助教）

研究要旨

唾液検査は採取が簡単であるため、日常の疲労測定に有用な検査である。我々は、唾液中に再活性化するヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）を定量することによる疲労測定法を開発し、HHV-6の潜伏感染・再活性化機構を突き詰めることによって、疲労因子（FF）を同定した。今年度は、HHV-6の再活性化機構をさらに検討することによって、HHV-6に加えてHHV-7の疲労測定における有用性を示すことができた。また、FFを抑制する因子を検討し、疲労回復因子（FR）を同定することにも成功した。さらに、HHV-6、HHV-7、FF、FRと各種生理的疲労、慢性疲労症候群（CFS）との関係を検討し、これらの因子が運動疲労、総合疲労、CFSを感度・特異度良く測定可能であることを見いだした。

A. 研究目的

「疲労」は休みなく心身を使うことによって生体機能に障害が生じた状態を、「疲労感」は疲労を脳が主観的に定量する感覚を指す。「疲労感」は、報酬や、やり甲斐などでマスクされ易いため、「疲労感」のみで「疲労」を定量しようとすると、様々な問題が生じる。そこで、「疲労」を客観的に測定するために、疲労によって変化する生体のバイオマーカーを発見し、これを利用して疲労を測定する様々な方法が検討されている。

唾液検査は採取が簡単で、日々の生活の上で疲労をチェックする方法として有用な検査手段を提供してくれる可能性がある。しかし、現在行なわれている検査では、短期的なストレスを測定することは可能であるが、ストレスの蓄積の結果生じる疲労を測定することはできない。我々は、疲れるとヘルペスがでるという良く知られた現象をヒントに、唾液中に再活性化するヒトヘルペスウイルス6（HHV-6）を定量することによる疲労測定法を開発した。

今回の研究では、（HHV-6）の潜伏感染・再活

性化機構を突き詰めることによって、疲労因子（FF）の候補を選択肢、さらに、マウスの疲労モデルを検証することにより、疲労因子（FF）を同定することに成功した。また、FFは、ヒトの末梢血を検体とした検査においても、客観的に疲労を検査できることが判明した。さらに、FFの測定は、精神疲労と肉体疲労の両者において有効であることが判明した。

これにより、唾液中HHV-6測定と血液中のFFの測定という、2つの客観的疲労測定法を得ることができた。

平成22年度は、これらの実績を踏まえ、（HHV-6）による疲労測定法のメカニズムの再検討、FFの発現を抑制する疲労回復因子（FR）の同定、（HHV-6）による疲労測定に加えてHHV-7による疲労測定法の開発を目的とした。さらに、これらの疲労測定法の感度・特異度の検討も目的とした。

B. 研究方法

1. 疲労とHHV-6潜伏感染細胞の分化と活性化の

関係の検討

これまでの検討によって、HHV-6再活性化の誘導因子が疲労であることと、HHV-6再活性化における遺伝子発現誘導が疲労因子 (FF) によって生じることが示唆された。今回は、これ以外の再活性化因子を検討するために、疲労負荷動物のDNAマイクロアレイ解析を行った。マウスに対する疲労負荷は、倫理的な観点と、疲労負荷を日常生活の負荷と類似の物にするという観点から、2時間の水泳と8～24時間の低水位の水侵負荷を行った (図1)。

2. HHV-6、HHV-7再活性化と疲労との関係の検討

上記の疲労とHHV-6潜伏感染細胞の分化と活性化の関係の検討によって、疲労負荷は、HHV-6の潜伏感染部位であるマクロファージの分化と活性化を促進することが判った。このことは、HHV-6と類似の潜伏感染部位・機構をもつと考えられるHHV-7においても同様の現象が生じることを示唆していた。

そこで、HHV-6と同様、HHV-7を用いた疲労の測定においても、HHV-6と同様の能力がえられるかどうかを検討した。

3. 慢性疲労症候群患者におけるHHV-6再活性化の検討

慢性疲労症候群 (CFS) は、強い疲労感を特徴とする原因不明の慢性疾患で、何らかの感染因子が原因であると考えられている。HHV-6の再活性化が疲労によって生じることが明らかになったので、CFS患者におけるHHV-6再活性化の検討を行った。方法としては、唾液中に再活性化するHHV-6の全DNAを、Real-time PCR法を用いてDNA量の定量を行った。

4. 慢性疲労症候群患者における疲労因子 (FF) と疲労回復因子 (FR) の検討

HHV-6再活性化研究から、疲労因子 (FF) と疲労回復因子 (FR) を見いだした。FFは、末梢臓器において疲労を発生させ、FRはFFの効果を抑制する因子である。強い疲労感を特徴とする慢性疾患であるCFS患者におけるFFとFRのmRNA発現量を、逆転写Real-time PCR法で検討した。

C. 研究結果

1. 疲労とHHV-6潜伏感染細胞の分化と活性化の関係の検討

疲労因子 (FF) 以外の再活性化因子を検討するために、疲労負荷動物のDNAマイクロアレイ解析を行った。マウスに対する疲労負荷は、2時間の水泳と8～24時間の低水位の水侵負荷を行った (図1)。他のグループによる先行研究などから、疲労によって数千の遺伝子の発現が変化することが知られている。今回の実験でも、約5,000種類の遺伝子の発現が上昇または低下することが見いだされた。その中で、HHV-6の潜伏感染部位であるマクロファージの分化や活性化に関係する分子である、CD14、CD83、CD80、CD86、CD40、TNF- α 、IL-1 β の発現量を検討した。

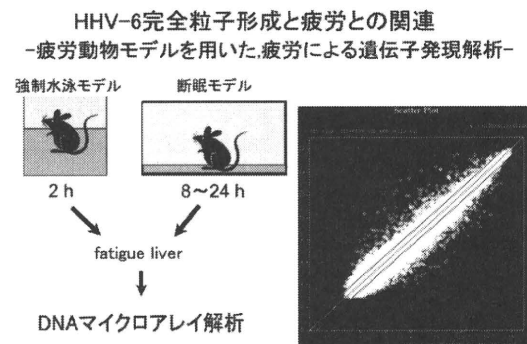


図1. 疲労負荷マウスのDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析

2時間の水泳と8～24時間の低水位の水侵負荷を行った後、DNAマイクロアレイ解析によって約20,000遺伝子のmRNA発現量の変化を検討した。

マクロファージでのHHV-6再活性化

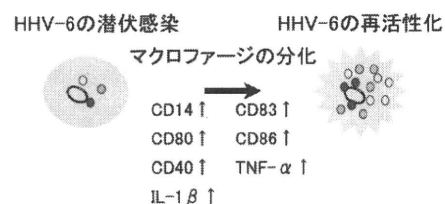


図2. 疲労によるマクロファージの分化誘導と活性化

マクロファージの分化や活性化に関係する分子である、CD14、CD83、CD80、CD86、CD40、TNF- α 、IL-1 β の発現が上昇した。

その結果、何れの疲労刺激においても、これらの分子のmRNAの発現の促進が観察され、疲労がマクロファージの分化・活性化を生じさせることが判った。さらに、マクロファージの遊走に関係する受容体であるCCR7の発現も上昇していることが判った。これらの現象より、疲労は疲労因子 (FF) を介する経路の他に、潜伏感染細胞であるマクロファージの分化・活性化、走化性の亢進を介しても、HHV-6再活性化を誘導することを示すものと考えられた。このことは、HHV-6が疲労という現象と想像以上に密接な関係を持つことを示すものと考えられた。

2. HHV-6、HHV-7再活性化と疲労との関係の検討

上述の様に、疲労とHHV-6潜伏感染細胞の分化と活性化の関係の検討によって、疲労負荷は、HHV-6の潜伏感染部位であるマクロファージの分化と活性化を促進することが判った。HHV-6と類似の潜伏感染部位・機構をもつと考えられるHHV-7においても同様の現象が生じることが考えられた。

そこで各種の疲労負荷においてHHV-6とHHV-7の測定を行ったところ、運動疲労、総合疲労ともに、疲労測定に使用可能であることが判った (図3、4)。また、その感度・特異度は両者で同程度であった。

これまで、HHV-6、HHV-7のウイルス学的性質から、HHV-7の再活性化はHHV-6に比べてより長時間を要するものと考えてきた。今回の疲

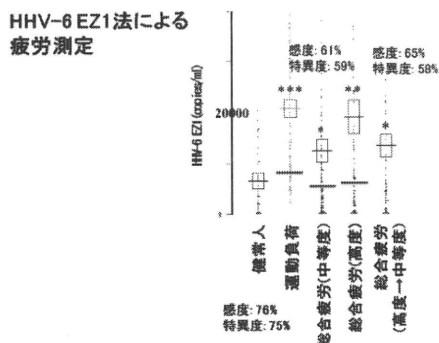


図3. 唾液中全HHV-6 DNA量と疲労負荷との関係
QIAGEN社のEZ1 virus kitを用いて、唾液中の全DNAを回収し、HHV-6 DNA量と疲労との関係を検討した。

労測定においても、両者を比較すると、HHV-7の方がより長期的に蓄積した疲労を表す傾向があった。

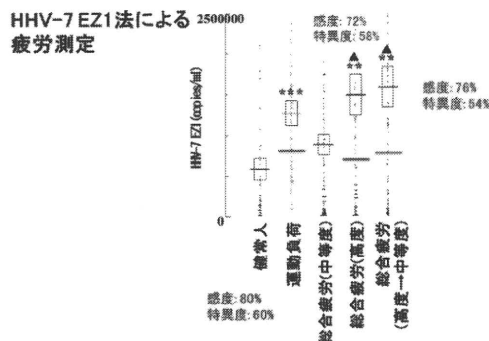


図4. 唾液中全HHV-7 DNA量と疲労負荷との関係
QIAGEN社のEZ1 virus kitを用いて、唾液中の全DNAを回収し、HHV-7 DNA量と疲労との関係を検討した。

3. 慢性疲労症候群患者におけるHHV-6再活性化の検討

慢性疲労症候群 (CFS) は、強い疲労感を特徴とする原因不明の慢性疾患で、何らかの感染因子が原因であると考えられている。HHV-6も関連ウイルスの一つであると考えられており、CFS患者でHHV-6再活性化が亢進しているとする報告もある。ただし、現在ではCFS患者における単純なHHV-6再活性化に関しては、否定的な意見が多い。

HHV-6の再活性化が疲労によって生じることが明らかになったので、CFS患者におけるHHV-6再活性化の検討を行った。方法は、唾液中に再活性化するHHV-6の全DNAと、唾液中に

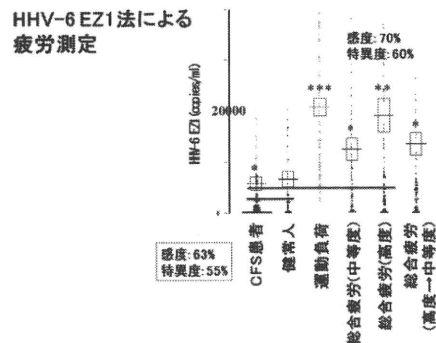


図5. 唾液中全HHV-6 DNA量と慢性疲労症候との関係

QIAGEN社のEZ1 virus kitを用いて、唾液中の全DNAを回収し、HHV-6 DNA量とCFSとの関係を検討した。

完全粒子として放出されるHHV-6 DNAを対象とし、Real-time PCR法でDNA量の定量を行った。

その結果、CFS患者でのHHV-6再活性化は、唾液中に再活性化されるHHV-6の全DNAと、唾液中に完全粒子として放出されるHHV-6 DNAの両者において、HHV-6再活性化は、CFS患者では増加せず、むしろ減少する傾向があることが判った(図5)。これは、CFSにおける疲労が通常の生活における疲労とは異なり、疲労感のみが亢進していることを示すものと考えられた。

4. 慢性疲労症候群患者における疲労因子 (FF) と疲労回復因子 (FR) の検討

これまでの研究において、我々は疲労負荷によって末梢臓器細胞中で発現し、疲労の原因となる疲労因子 (FF) と、FF発現を抑制し、細胞内で疲労を抑制する働きを考えると考えられる疲労回復因子 (FR) を同定した(図6)。HHV-6再活性化の研究からは、CFSの疲労が疲労負荷によって生じる生理的な疲労とは、異なるものであることが示唆された。そこで、我々は、CFSの疲労と生理的疲労との異動およびCFSの病態を理解する目的で、CFS患者におけるFFとFRの測定を行った。この結果、CFS患者では、FF、FRともに健常人に比して有意に低い傾向があった(図7、8)。これは、HHV-6再活性化の検討と同様に、CFSの疲労が生理的疲労とは異なることを示すものであった。さらに、CFS患者で有意に疲労回復因子であるFRが低いという現象は、CFS患者の疲れやすいという病態と関係するものであると考えられた。

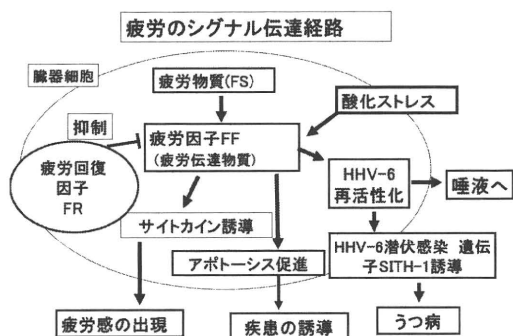


図6. 疲労のシグナル伝達経路とHHV-6再活性化との関係

疲労因子 (FF)、疲労回復因子 (FR)、HHV-6再活性化、HHV-6 SITH-1遺伝子発現関係を示す。

血液中疲労因子(FF)と慢性疲労症候群(CFS)

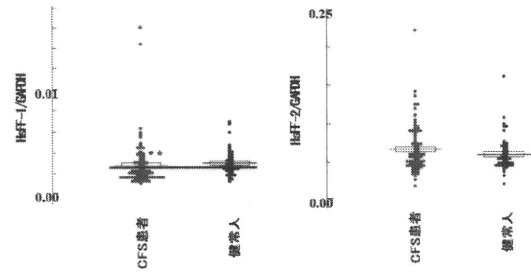


図7. 疲労因子 (FF) と慢性疲労症候群との関係 CFS患者と健常人の、末梢血における疲労因子 (FF) 発現量を検討した。

血液中疲労回復因子(FR)と慢性疲労症候群(CFS)

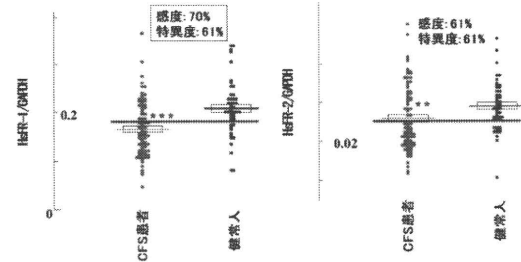


図8. 疲労回復因子 (FR) と慢性疲労症候群との関係

CFS患者と健常人の、末梢血における疲労回復因子 (FR) 発現量を検討した。感度・特異度は、FRの量でCFSを診断するとした場合の感度・特異度を表す。

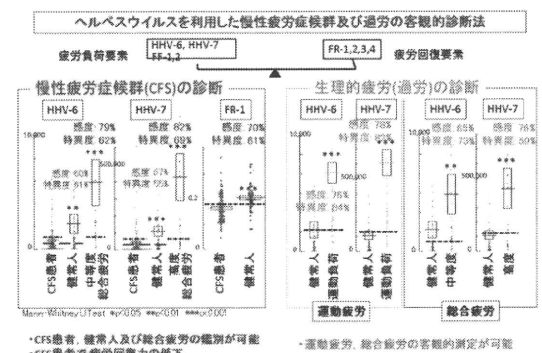


図9. 唾液中HHV-6、HHV-7と血中疲労回復因子 (FR) による各種疲労測定感度・特異度のまとめ

HHV-6、HHV-7は、各種生理的疲労だけでなくCFSも感度・特異度良く測定が可能であることが判明した。また、FRはCFSの診断に有効であった。

D. 考察

唾液検査は採取が簡単であるため、日常の疲労測定に有用な検査法を提供することが期待される。しかし、これまで製品化されている方法は、短時間のストレス反応による交感神経系の反応を検出するもので、いわゆる疲労の測定には不向きであった。我々は、唾液中に再活性化するヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) を定量することによる疲労測定法を開発し、HHV-6の潜伏感染・再活性化機構を突き詰めることによって、疲労因子 (FF) を同定した。今年度は、HHV-6の再活性化機構をさらに検討することによって、HHV-6に加えてHHV-7の疲労測定における有用性を示すことができた。また、FFを抑制する因子を検討し、疲労回復因子 (FR) を同定することにも成功した。

HHV-6、HHV-7、FF、FRと各種生理的疲労、慢性疲労症候群 (CFS) との関係を検討したところ、これらの因子が運動疲労、総合疲労、CFSを感度・特異度良く測定可能であることが判った。特に有用なものを図9にまとめた。これらの方法で得られた感度・特異度は、優秀ながんマーカーに匹敵またはそれ以上ものであり、充分実用的なレベルであると考えられた (図9)。

E. 結論

疲労のバイオマーカーとして、唾液中HHV-6、HHV-7、血中の疲労因子 (FF)、疲労回復因子 (FR) 測定法を開発した。これらを用いた疲労測定法は、感度・特異度良く各種の生理疲労と慢性疲労症候群を測定することが可能であった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

学会発表

国際学会

1. K. Kondo

Symposium: Brain Science on Fatigue.

Identification of a novel HHV-6 latent-protein associated with CFS and mood disorders.

Neuro 2010 (Sep.4 Kobe 2010)

国内学会

1. 嶋田和也、近藤一博

ヒトヘルペスウイルス6 (HHV-6) の細胞特異性とスプライシング関連因子SART3の発現量に関する解析

(第58回日本ウイルス学会、徳島、2010年)

2. 小林伸行、清水昭宏、嶋田和也、近藤一博

新規ウイルス濃縮法を用いた、ヒトヘルペスウイルス (HHV-6) 再活性化機構の検討

(第58回日本ウイルス学会、徳島、2010年)

3. 清水昭宏、嶋田和也、小林伸行、近藤一博

組み換えhuman herpesvirus 6B (HHV-6B) のヒトゲノムへのintegration機構の解析

(第58回日本ウイルス学会、徳島、2010年)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特許取得

1. K. Kondo

Method for Assessing Fatigue Level and Applications Thereof

U.S. Patent No. 7,824,888 (Nov. 2 2010)

特許出願

1. K. Kondo

PROTEIN BASED METHODS FOR ASSESSING FATIGUE LEVEL AND APPLICATIONS THEREOF.

2010年9月15日 (U.S.12/883,349)

2. K. Kondo, N.Kobayashi

FACTOR INVOLVED IN LATENT INFECTION WITH HERPESVIRUS, AND USE THEREOF

2010年3月 (Israel 204641、Philippines 1-2010-500601、South Africa 2010/02424、Canada 2701668、EPC 8833887.6 他15ヶ国)。

自律神経機能異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する
客観的な疲労診断法の確立と慢性疲労診断指針の作成

労働者の慢性疲労に関する疫学的調査

分担研究者 酒井 一博（財団法人労働科学研究所所長）

研究要旨

通常の睡眠期では十分な回復が得られず、慢性的な疲労状態が継続するメカニズムには、現代的な労働のあり方とストレス、就労をめぐる社会環境や生活習慣が大きく影響することが知られている。本調査研究では、労働者の慢性疲労に関わる今日的な危険因子の抽出と解明を目的に多数例の質問紙調査を実施し、各種属性における特性を明らかにした。

A. 研究目的

1. 現代人の疲労訴え率レベルの推定
 2. 生活・労働と慢性疲労の構造的な関係解明
 3. 慢性疲労へのストレスの関与
 4. 参加型質問紙調査法の開発
 5. 倉恒らによって確立された慢性疲労インデックスとの関連分析
- などを目的に本疫学調査と取り組んだ。

B. 研究方法

質問紙調査票を新たに開発した。フェースは9問（F1～F9）、前月の労働時間を詳細に厳密に質問した。本編では、疲れとストレス、疲れの性質と疲れの程度のほか、連続48時間にわたる、勤務と睡眠時間の実態調査、参加型調査法の試行など、17問について質問した（Q1～Q17）。さらに、本調査の位置付けを明確にするために、慢性疲労インデックス問診票への回答も要請した。

大数例の調査実施前の予備的調査として6事業所に535部配布したところ、339部有効回答（回答率63.4%）を得た。

（倫理面への配慮）

調査票の冒頭において回答の承諾確認を求め、了解をとった。

C. 研究結果

- ・疲れやだるさを感じている人は63%であった。
- ・休日出勤や長時間労働は労働者の慢性疲労と関連するが、仕事の単調さ、運動不足、喫煙などは慢性疲労との関連があまりないという結果を得た。
- ・慢性疲労との関連の深い事柄について因子分析を行ったところ、第1因子として「職務不安の因子」が抽出された。第2因子は「労働時間」、第3因子は「家庭生活」、第4因子は「労働環境」、第5因子が「ライフイベント」、そして第6因子が「生活習慣」の因子であった。
- ・「疲れている」人の群と、「元気な」人の群では、疲労構造が明らかに異なっていた。
- ・慢性疲労は疲労症状が増えるだけでなく、ストレスの関与が大きいことが示された。
- ・現在、本調査分として、2,170部以上の回答を得て分析中である。近々、論文化の予定である。

D. 研究発表

1. 酒井一博ほか. 質問紙調査結果からみた労働者の慢性疲労兆候
 2. 酒井一博ほか. 慢性疲労状況に関する仮想評価設問の試み
- 以上、日本人間工学会第52回大会、東京（2011年6月6～7日開催、演題提出済み）

自律神経機能異常を伴い慢性的な疲労を訴える患者に対する
客観的な疲労診断法の確立と慢性疲労診断指針の作成

ラットにおけるストレス反応のテレメトリー計測

分担研究者 局 博一（東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻）

研究要旨

急性のストレス負荷によって自律神経機能をはじめとする全身の生理学的変化がもたらされることが知られているが、そのような生体反応は時々刻々と変化するため、正確なストレス反応を把握するためには、リアルタイムに観察することが必要である。本研究では、正常ラット（n=9）に2時間の水浸刺激（底面から2cmの深度、水温22℃）を与えた際の心拍数、心拍変動、体温（頸部皮下温）および活動量に及ぼす影響をテレメトリー法によって観察した。水浸刺激は、連続3日間にわたって明暗周期の明期開始時点の5時間後から2時間行った。その結果、水浸刺激負荷時の心拍数は水浸刺激負荷前日およびシヤム負荷（水浸なしの条件）の同じ時間帯における心拍数に比べて明瞭に高い値を示した。また体温は、水浸刺激負荷時に上昇傾向を示し、2日目および3日目では明瞭であった。一方、活動量には明瞭な差異が観察されなかった。心拍変動解析では、自律神経機能のバランス状態を示すLFパワー/HFパワーの比率は、水浸刺激負荷時に上昇傾向を示した。本研究で行われた水浸刺激に対する生体反応は急性のストレス反応として捉えることができた。ラットのストレス反応を心電図、体温、活動量を同時記録するテレメトリー法によって追跡することが可能であり、慢性疲労モデル動物への応用の可能性が示唆された。

A. 研究目的

慢性疲労研究では、生体のストレス反応を様々な指標を用いて明らかにすることが求められている。それらのうち心拍変動解析は自律神経機能を比較的簡便に測定する上で有用性が高い方法として注目されている。実験動物においても生体内部情報をテレメトリーシステムによって計測し、データを自動的に取得できる方法が以前から開発されており、医薬品や食品の安全性試験や効果判定などに広く用いられている。本研究では、心電図、体温、活動量を同時記録することが可能なテレメトリー送信機を用いて、ラットにおける短時間のストレス負荷に対する反応性を調べることを目的とした。

B. 研究方法

1) 供試動物、心電図記録法

成熟雄ラット（Slc: Wistar; 8週齢; 9匹）（SPF）をペントバルビタール（ネンプタール）の30-40mg/kgの腹腔内投与による全身麻酔下を施した上で、心電図・体温・活動量計測用テレメトリー送信機本体（weight=3.9g, volume=1.9cc; TA10ETA-F20, Data Science, St. Paul, MN）をラットの頸背部皮下に外科的に埋入した。本体に接続された記録電極（リード線の先端）は+側を左後肢大腿部の皮下に、マイナス側を右肩甲部の皮下に設置し、標準肢II誘導の心電図が記録できるようにした。

ラットは1匹ずつ個別のポリカーボネートケージに収容し、照明および温度の制御が可能なインキュベーションチャンバー内（容積m³）で、6匹（6ケ

ジ)を同時に飼育した。チャンバー内の照明条件は、L(明期)=8:00-12:00、D(暗期)=20:00-8:00の12時間周期とし、温度条件は24℃とした。飼育期間中は自由飲水、自由摂餌とした。

2) ストレス負荷条件および観察プロトコル

供試ラットをテレメーター送信機の埋入手術後1週間以上の回復期間を経たのちに、水浸ストレスの負荷実験に供した。

水浸刺激は、供試ラットのホームケージと同じ条件のポリカーボネート製容器に水深が底面から2 cmになるように摂氏22度の水を張り、容器内にラット(1匹)を静かに収容した。水浸刺激は明期の開始から5時間後の13:00から開始し、15:00までの2時間とした。この水浸刺激を3日間にわたって同じ時刻に行った。また、4日目には、上記の容器内に水を入れずに他の条件は等しくした条件下でラットを収容した(シヤム)。

3) データ取得、解析方法

テレメーター送信機からの心電図信号は受信ボードに無線で伝送され、受信ボードからA-Dコンバーターを介して、PCに内蔵のソフトウェア(ECG processor analyzing system、SRV2W、Softron SBP2000)を用い解析した。心電図のサンプリングレートは1msecとした。

C. 研究結果

1) 心拍数、体温、活動量

心拍数、体温、活動量の経時的变化の1例を図1に示す。いずれも明瞭な日リズムを示した。すなわち、心拍数、体温、活動量は暗期に高く、明期に低い変化を示した(図1)。心拍数および体温は水浸刺激の期間中は、刺激前の対照およびプラセボに比べて明らかに高い値を示した(図2)。

2) 自律神経機能(心拍変動解析)

交感神経と副交感神経の両方の活動を反映するLFパワーは、第1回目(Water 1)~3回目(Water 3)の水浸刺激で明瞭な変化が認められなかった。副交感神経の活動を反映するHFパワーは、水浸刺激時に低下する傾向が示された。自律神経バランスの指標であるLFパワー/HFパワー(LF/HF比)は、第1回目(Water 1)~第3回目(Water 3)の水浸刺激において増大す

る傾向が示された。(図3)。

D. 考察

本研究において、ラットへの短時間の水浸刺激によって引き起こされる生理的反応をテレメトリー法によって観察することが可能であることが示された。水浸刺激によって同時に生じた心拍数の増加は交感神経の活動の上昇あるいは副交感神経の活動低下が考えられる。自律神経バランスを反映する指標であるLF/HF比が水浸刺激中に増大する傾向があることから、水浸刺激は自律神経バランスを相対的に交感神経側に強める効果があるものと考えられる。ヒトの慢性疲労患者では、心拍変動解析によって交感神経の緊張性が健常者にくらべて上昇することが知られている。

水浸刺激中には体温の上昇が認められた。この反応は交感神経活動の増大による、いわゆるストレス性体温上昇と推測される。すなわち、交感神経活動が活発になることで筋肉、褐色脂肪組織、肝臓や心臓などの臓器の代謝が亢進し、体温上昇を招いたものと思われる。

E. 結論

本研究で行われた水浸刺激に対する生体反応は急性のストレス反応として捉えることができた。ラットのストレス反応を心電図、体温、活動量を同時記録するテレメトリー法によって追跡することが可能であり、慢性疲労モデル動物への応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究業績

【論文発表】

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許所得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

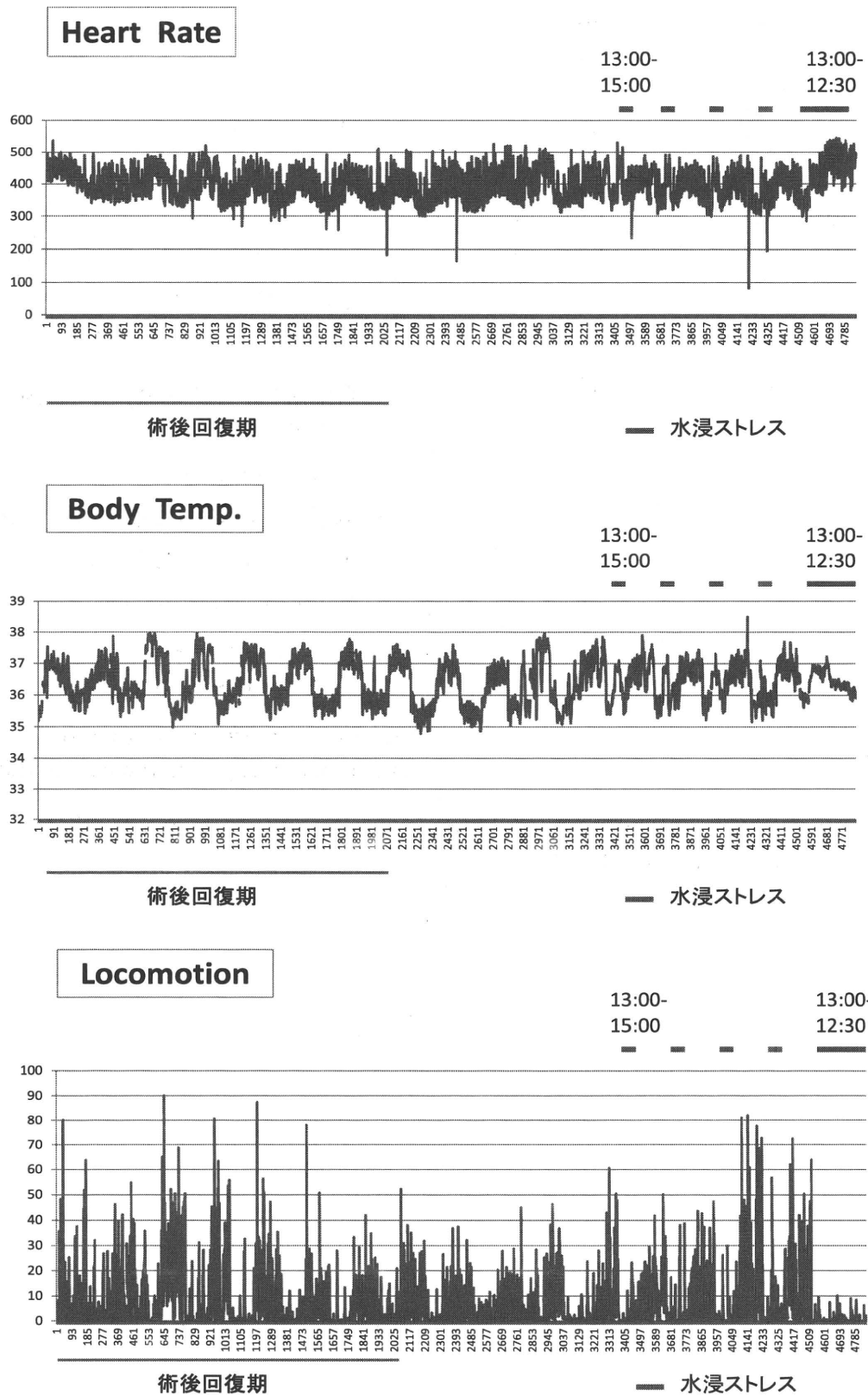
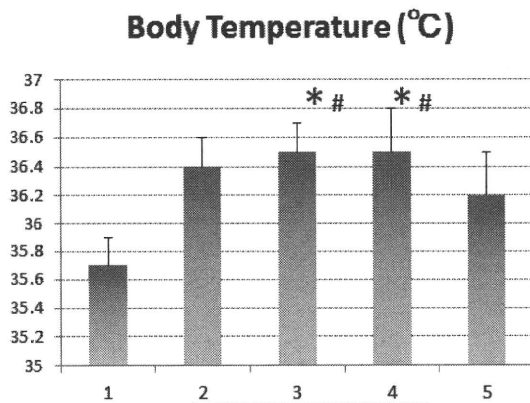
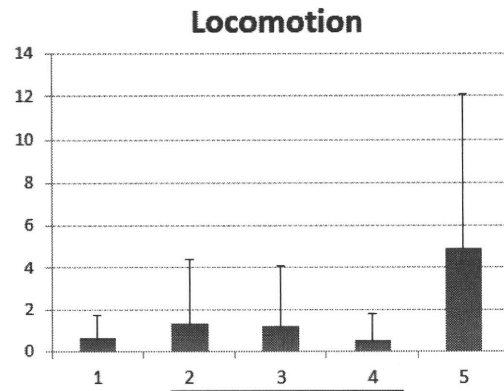
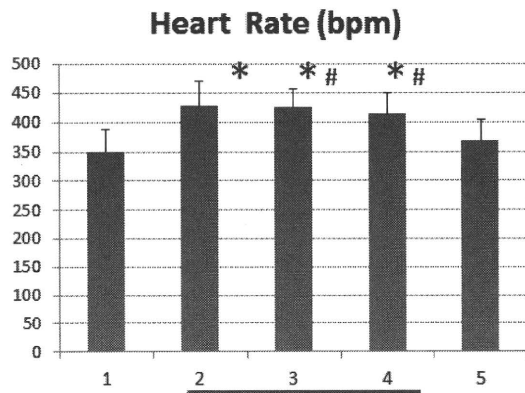


図1. テレメーター送信機の埋め込み手術後の回復期および水浸刺激の期間における心拍数（上）、体温（中）および活動量（下）の記録例（1匹のラット）



1: 水浸ストレス前日の同じ時間帯 (13:00-15:00)

2: 水浸ストレス1回目 (13:00-15:00)

3: 水浸ストレス2回目 (13:00-15:00)

4: 水浸ストレス3回目 (13:00-15:00)

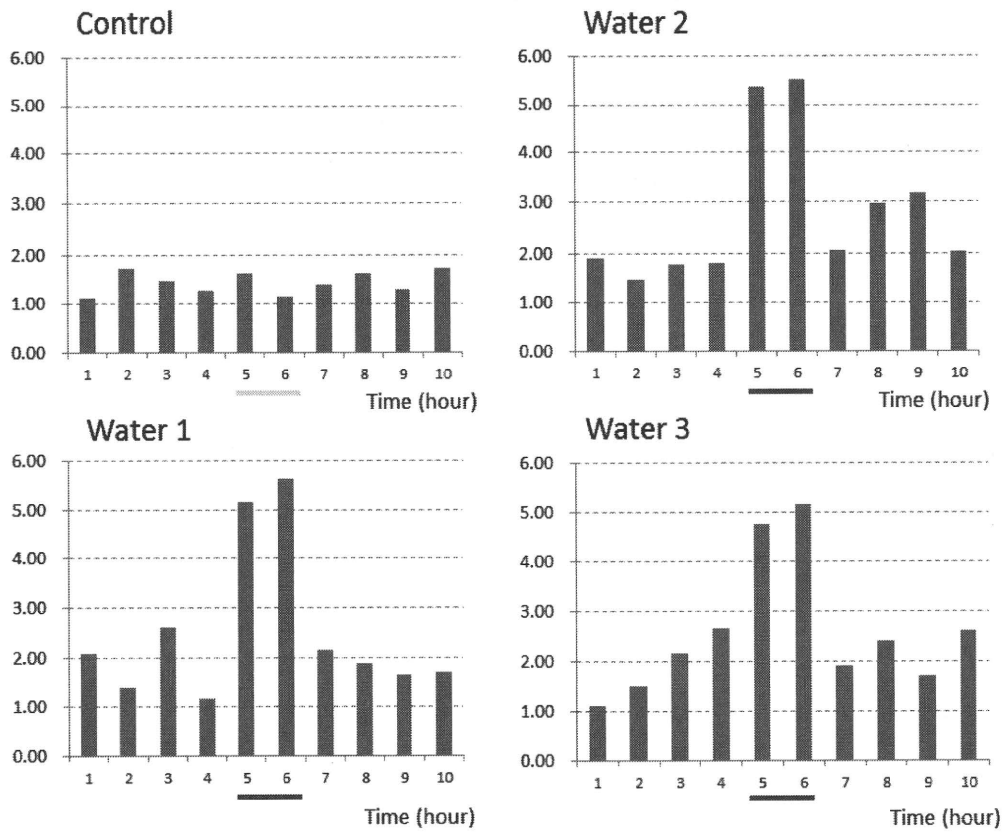
5: Placebo (13:00-15:00)

* : $P < 0.05$ vs 1

: $P < 0.05$ vs 5

Body temperature was measured at subcutaneous region in the dorsal thorax.

図2. 水浸刺激による心拍数 (heart rate)、体温 (body temperature) および活動量 (locomotion) の変化



LF/HF Ratio

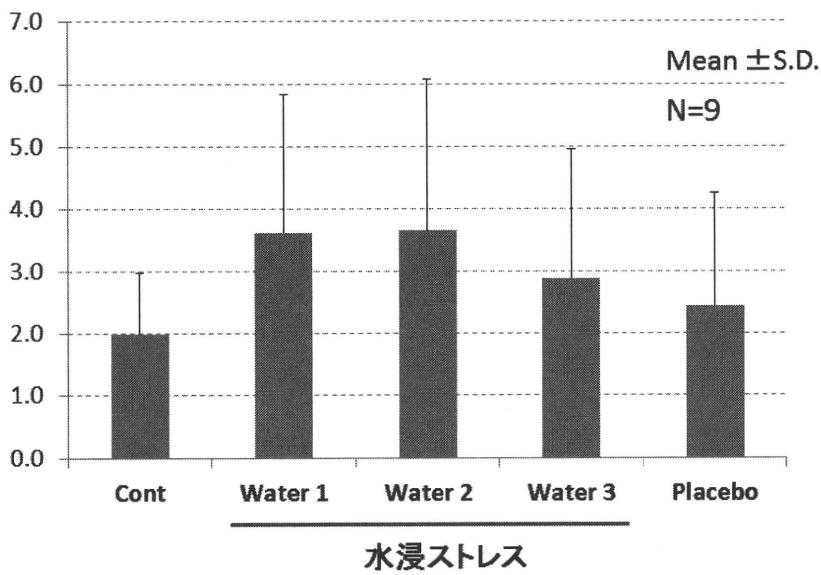


図3. 水浸刺激によるLF/HF比の変化

1個体の水浸刺激前後の変化（上図）および全個体の水浸刺激時の平均（下図）。

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukuda S., Kuratsune H., Tajima S., Takashima S., Yamaguchi K., Nishizawa Y., Watanabe Y.	Premorbid personality in chronic fatigue syndrome as determined by the Temperament and Character Inventory.	Compr Psychiatry	51 (1)	78-85	2010
Koyama H., Fukuda S., Shoji T., Inaba M., Tsujimoto Y., Tabata T., Okuno S., Yamakawa T., Okada S., Okamura M., Kuratsune H., Fujii H., Hirayama Y., Watanabe Y., Nishizawa Y.	Fatigue is a predictor for cardiovascular outcomes in patients undergoing hemodialysis.	Clin J Am Soc Nephrology	5 (4)	659-66	2010
Fukuda S., Hashimoto R., Ohi K., Yamaguchi K., Nakatomi Y., Yasuda Y., Kamino K., Takeda M., Tajima S., Kuratsune H., Nishizawa Y., Watanabe Y.	A functional polymorphism in the Disrupted-in-schizophrenia 1 gene is associated with chronic fatigue syndrome.	Life Sciences	86 (19-20)	722-725	2010

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takeda M., K. Kondo, M. Yamada, J. Koizumi, T. Mashima, A. Matsugami, M. Katahira	Solubilization and structural determination of a glycoconjugate which is assembled into the sheath of <i>Leptothrix cholodnii</i> .	Int. J. Biol. Macromol.	46 (2)	206-211	2010
D. M. Sahabi, Takeda M., I. Suzuki, J. Koizumi	Comparison of arsenate, lead, and cadmium adsorption onto aged biofilter media.	J. Environ. Eng.	136 (5)	493-500	2010
Kuratsune H, Umigai N, Takeno R, Kajimoto Y, Nakano T.	Effect of crocetin from <i>Gardenia jasminoides</i> Ellis on sleep: a pilot study.	Phytomedicine	86 : (19-20) :	722-725	2010
Tajima S, Yamamoto S, Tanaka M, Kataoka Y, Iwase M, Yoshikawa E, Okada H, Onoe H, Tsukada H, Kuratsune H, Ouchi Y, and Watanabe Y	Medial orbitofrontal cortex is associated with fatigue sensation.	Neurology research international 電子ジャーナル	Article ID 671421.		Jun 10, 2010
Shishioh-Ikejima N, Ogawa T, Yamaguti K, Watanabe Y, Kuratsune H, Kiyama H.	The increase of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the plasma of chronic fatigue syndrome patients.	BMC Neurol. 電子ジャーナル	10	73-	Aug 23, 2010
Furuta RA, Miyazawa T, Sugiyama T, Kuratsune H, Ikeda Y, Sato E, Misawa N, Nakatomi Y, Sakuma R, Yasui K, Yamaguti K, Hirayama F.	No association of xenotropic murine leukemia virus-related virus with prostate cancer or chronic fatigue syndrome in Japan.	Retrovirology 電子ジャーナル	8	20-	Mar 17, 2011
倉恒 弘彦、中富 康仁、 神楽 美香、田島 世貴、 山口 浩二、松井 徳造、 西沢 良記	慢性疲労症候群患者に対する1日2回服用タイプの補中益気湯の治療効果	Progress in Medicine	30 (2)	505-510	2010
田島 世貴、山口 浩二、 倉恒 弘彦	生理学的バイオマーカーによる疲労の計測 アンチ・エイジング医学	日本抗加齢医学会雑誌	6 (3)	329-334	2010
野島 順三、宮川真由美、 児玉 麻衣、本木由香里、 常岡 英弘、市原 清志、 日野田裕治	自動分析装置BM-1650による酸化ストレス度の測定	医学検査	59 (3)	199-207	2010

