

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

これまでに我々は、唾液中に再活性化するヒトヘルペスウイルス（HHV-6とHHV-7を定量することによる、生理的な疲労の測定法を開発してきた。本年度は、この方法によって慢性疲労症候群（CFS）患者疲労が測定できるか否かを検討した。HHV-6およびHHV-7はCFS患者において健常人よりも高頻度で再活性化が生じることが報告されて来たが、これには異論も多い。また、従来の再活性化の検出は、血液中でのウイルスDNAの測定によって行われていたため、再活性化ウイルス量と免疫低下によるウイルスの増殖量との区別がついていなかった。本研究における唾液中HHV-6、HHV-7の定量は、免疫の影響を比較的受けることなくウイルスの再活性化頻度および量を観察できるものなので、CFSとHHV-6、HHV-7の再活性化が関係するかを直接的に検討することが可能である。

この検討を行った結果、CFSとHHV-6、HHV-7の再活性化には診断価値がある程度の強い関係は見出せなかった。これに対し、運動疲労や精神疲労の負荷がかかった対象者では、HHV-6、HHV-7の再活性化量は健常人コントロールに比して大きく増加していた。このことから、CFS患者の疲労と、運動疲労や精神疲労の負荷がかかった対象者の疲労は本質的に異なったものであり、唾液中HHV-6、HHV-7を定量することによって、両者を区別できることが明らかとなった。

### 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23年度は、これらの実績を踏まえ、HHV-6、HHV-7による疲労測定法が慢性疲労症候群(CFS)の診断に有用であるかどうかの検討を行った。

## B. 研究方法

### 1. 慢性疲労症候群患者におけるHHV-6、HHV-7再活性化量の唾液中ウイルスDNA量による検討

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。これまでの研究によって、HHV-6およびHHV-7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、HHV-7の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。

また、昨年度の検討によってウイルスが完全粒子を形成するために必要な、潜伏感染細胞の分化・活性化が疲労によって促進されることが判明した。このため、HHV-6、HHV-7の定量は、全ウイルスDNAを測定する方法(EZ1法)と完全ウイルス粒子のみを採取してウイルスDNAを定量する方法(TM法)の両者によって行った。

### 2. HHV-6、HHV-7再活性化の比較による生理的疲労とCFSとの異同の検討

唾液中ウイルスDNA量によるHHV-6、HHV-7再活性化測定法がCFS診断に有用であるかどうかを検討するために、CFS患者と健常人コントロールの比較に加えて、CFS患者と同様に疲労感を訴える、肉体疲労負荷のかかった対象者と、精神的疲労負荷のかかった対象者とCFS患者との比較も行った。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。

## C. 研究結果

### 1. 慢性疲労症候群患者におけるHHV-6、HHV-7再活性化量の唾液中ウイルスDNA量

#### による検討

HHV-6およびHHV-7はCFS患者において健常人よりも高頻度で再活性化が生じることが報告されて来たが、これには異論も多い。また、従来の再活性化の検出は、血液中でのウイルスDNAの測定によって行われていたため、再活性化ウイルス量と免疫低下によるウイルスの増殖量との区別がついていなかった。本研究における唾液中HHV-6の定量は、免疫の影響を比較的に受けることなくウイルスの再活性化頻度および量を観察できるものなので、CFSとHHV-6の再活性化が関係するかを直接的に検討することが可能である(図1)。唾液中に出現するHHV-7は、HHV-6に比してDNAが非常に多いため、再活性化したウイルスが一端体内で増殖した後に唾液中に放出される可能性も考えられる(図2)。しかし、実際は、後述する様に、CFS患者における免疫低下はHHV-7の唾液への放出量に影響を及ぼすことはなかった。

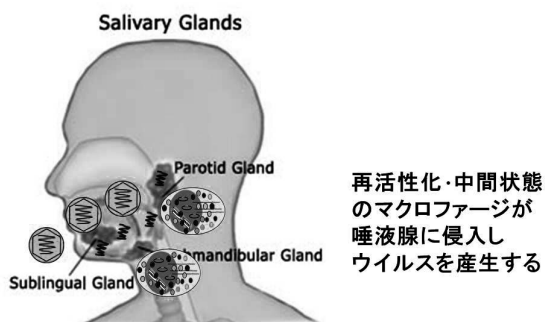
CFS患者と健常人の唾液中HHV-6量の比較を図3に示す。大阪市立大学の疲労クリニックにて採取されたCFS患者唾液と健常人コントロール唾液において検討を行った。この結果、唾液中の全HHV-6 DNA量は、CFS患者唾液と健常人コントロールで統計上有意な差が見られなかった。しかし、完全粒子を構成するHHV-6はCFS患者で有意に低値を示すことが判明した。これまでの検討において、完全粒子の測定法の法が、全ウイルスDNA測定に比してより鋭敏に疲労を反映することが判っている。このため、HHV-6の再活性化を利用した疲労測定においては、CFS患者の方が健常人コントロールよりも疲労度が低いという結果になった。

HHV-6の再活性化は、疲労因子(FF)によって生じるので、この結果は、昨年までに検討したCFS患者では健常人コントロールよりもFFが低値であるという結果と矛盾しない。

同様に、CFS患者と健常人の唾液中HHV-7量の比較を図4に示す。唾液中の全HHV-7 DNA量は、CFS患者唾液と健常人コントロールで統計上有意な差が見られなかった。しかし、完全粒子を構成するHHV-7はCFS患者で有意に低値を示すことが判明した。HHV-6と同様にHHV-7においても、完全粒子の測定法の方が、全ウイルスDNA測定に比してより鋭敏に疲労を反映する

ことが判っている。このため、HHV-7の再活性化を利用した疲労測定においても、CFS患者の方が健常人コントロールよりも疲労度が低いという結果になった。

### HHV-6の潜伏感染からの再活性化

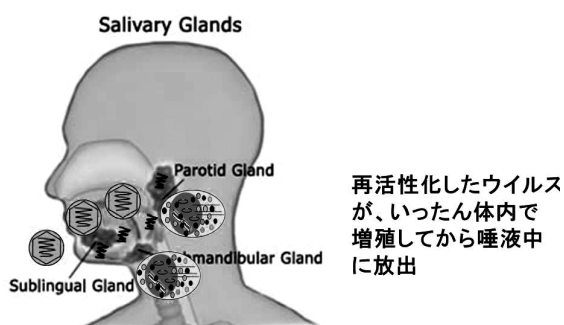


免疫の影響をあまり受けずにウイルスが放出

図1：HHV-6の再活性化と唾液中への放出

唾液中HHV-6の定量は、免疫の影響を比較的受けることなくウイルスの再活性化頻度および量を観察できるものなので、CFSとHHV-6の再活性化が関係するかを直接的に検討することが可能である。

### HHV-7の潜伏感染からの再活性化



ウイルス量は疲労と免疫低下に影響される

図2：HHV-7の再活性化と唾液中への放出

唾液中に出現するHHV-7は、HHV-6に比してDNAが非常に多いため、再活性化したウイルスが一端体内で増殖した後に唾液中に放出される可能性も考えられる。しかし、実際は、後述する様に、CFS患者における免疫低下はHHV-7の唾液への放出量に影響を及ぼすことはなかった。

### CFS患者での唾液中HHV-6の定量

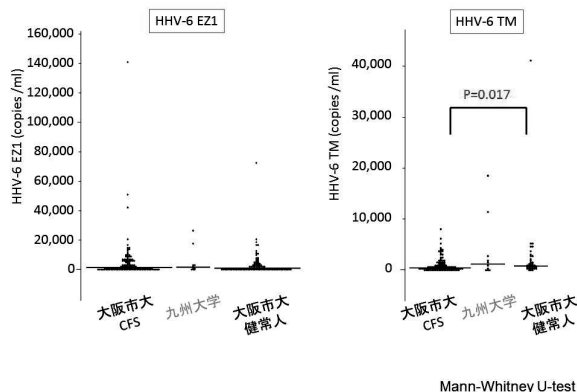


図3：CFS患者と健常人の唾液中HHV-6量の比較

CFS患者と健常人の唾液中HHV-6量の比較を示す。大阪市立大学の疲労クリニックにて採取されたCFS患者唾液と健常人コントロール唾液において検討を行った。この結果、唾液中の全HHV-6 DNA量は、CFS患者唾液と健常人コントロールで統計上有意な差が見られなかった。しかし、完全粒子を構成するHHV-6はCFS患者で有意に低値を示すことが判明した。

### CFS患者での唾液中HHV-7の定量

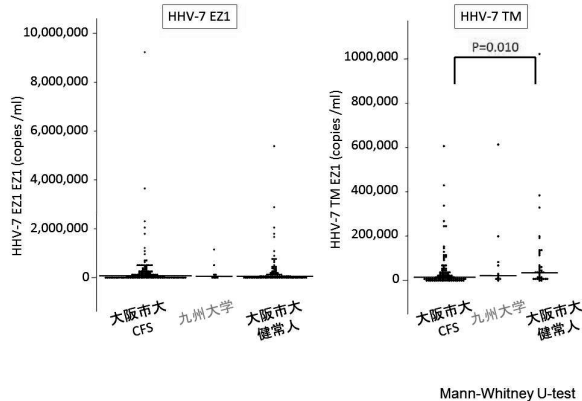


図4：CFS患者と健常人の唾液中HHV-7量の比較

唾液中の全HHV-7 DNA量は、CFS患者唾液と健常人コントロールで統計上有意な差が見られなかった。しかし、完全粒子を構成するHHV-7はCFS患者で有意に低値を示すことが判明した。

## 2. HHV-6、HHV-7再活性化の比較による生理的疲労とCFSとの異同の検討

唾液中のHHV-6、HHV-7再活性化量がCFS患者と健常人コントロールで大きな差がないという結果は、一見、唾液中HHV-6、HHV-7の測定

による疲労測定法がCFSの診断には利用できないことを意味する様に感じられた。しかし、実際の臨床現場では、CFS患者と診断上の鑑別が必要とされるのは、肉体的な負荷や精神的な負荷によって生理的な疲労を感じている人であると考えられる。

このため、唾液中HHV-6、HHV-7の測定による疲労測定法が、このような目的で利用可能であるかどうかの検討を行った。この結果、HHV-6、HHV-7ともに運動負荷や運動労働と精神負荷の両者による総合疲労において、CFS患者や健常人コントロールに比して非常に高い値を示すことが判った(図5、6)。この方法では、何らかの客観的指標がなければ難しいと考えられる慢性疲労とCFSとの鑑別が簡単な唾液の検査のみで行えるため、臨床の現場で非常に有用な手段となると考えられる。

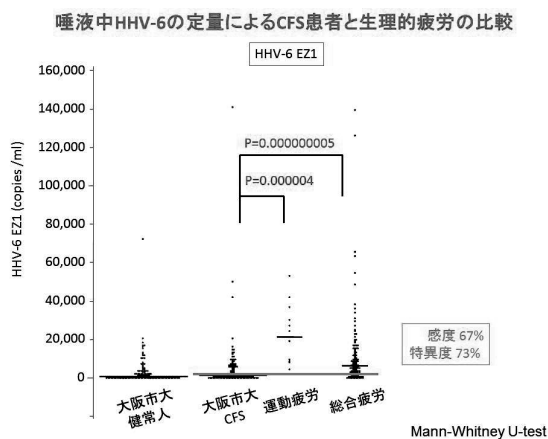


図5：CFS患者と疲労負荷対象者の唾液中HHV-6量の比較

唾液中HHV-6の値は、運動負荷や運動労働と精神負荷の両者による総合疲労において、CFS患者や健常人コントロールに比して非常に高い値を示した。

唾液中HHV-7の定量によるCFS患者と生理的疲労の比較

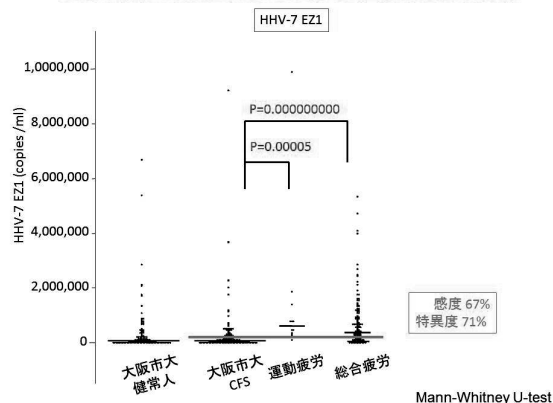


図6：CFS患者と疲労負荷対象者の唾液中HHV-7量の比較

唾液中HHV-7の値は、運動負荷や運動労働と精神負荷の両者による総合疲労において、CFS患者や健常人コントロールに比して非常に高い値を示した。

#### D. 考察

疲労の客観的な検査法は、運動負荷や精神負荷による疲労を定量化することで、健康管理や抗疲労薬や疲労回復法の開発に貢献できると考えられる。検査法のなかでも、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。また、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。

今年度は、唾液中HHV-6、HHV-7による疲労測定法がCFSの診断に利用可能であるかどうかを詳細に検討した。この結果、CFS患者と健常人コントロールとではHHV-6、HHV-7の再活性化量に差が見出せなかったが、診察の際に「疲労感」を訴える運動負荷や精神負荷のかかった人とCFS患者でのウイルス量は大きな違いが観察された。このことは、実際の診察にあたっては、この検査がCFS患者の診断に極めて有用である

ことを示すものと考えられた。

## E. 結論

唾液中HHV-6、HHV-7による疲労測定法がCFSの診断に利用可能であるかどうかを詳細に検討した結果、この検査がCFS患者の診断に極めて有用であることが判明した。

## 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. N. Kobayashi, K. Shimada, A. Shimizu and K. Kondo  
Identification of SITH-1 as novel latent protein of Human Herpesvirus 6 (HHV-6) associated with chronic fatigue syndrome (CFS) and mood disorders.  
International Congress of Virology 2011 (Sep.14 Sapporo 2011)
2. A. Shimizu, N. Kobayashi, K. Kondo  
Application of human herpesvirus-6 (HHV-6) for the gene therapy vector  
International Congress of Virology 2011 (Sep.14 Sapporo 2011)

国内学会

1. 近藤一博  
慢性疲労症候群  
(第40回日本女性心身医学会学術集会7月23日 2011 東京)
2. 小林伸行  
身体表現性障害と慢性疲労症候群  
(第40回日本女性心身医学会学術集会7月23日 2011 東京)
3. 近藤一博  
ヘルペスウイルス再活性化と疲労シグナル伝達経路の研究による疲労病態の把握  
(第7回日本疲労学会、名古屋、2011年)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

特許取得

1. 近藤一博、小林伸行  
「ヘルペスウイルスの潜伏感染に関与する因子及びその利用」  
2012年2月10日（登録番号 特許第4920084号）
2. 近藤一博  
「HHV-7による生理的疲労度評価方法およびその利用」  
2011年9月2日（登録番号 特許第4812708号）

特許出願

1. 近藤一博  
「HHV-7による病的疲労度評価方法およびその利用」  
2011年6月10日（出願番号 特願2011-129778）
2. 近藤一博  
「生物学的試料中の疲労関連物質を検出する方法」  
2011年9月2日（出願番号 特願2011-502767）