

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

DNAチップによる慢性疲労症候群の臨床研究

代表研究者 倉恒 弘彦（関西福祉科学大学健康福祉学部教授）

研究協力者 倉田 寛一（シスメックス株式会社中央研究所所長）

分担研究者 渡辺 恭良（大阪市立大学システム神経科学教授）

【背景】

慢性疲労症候群（CFS）は原因不明の重度の疲労が半年以上の長期にわたり持続する疾患であり、潜在的な患者数は非常に多いことが明らかとなっているが、客観的診断法が無いため診断率が低いことが問題となっている。我々は慢性疲労症候群及び慢性疲労疾患の客観的な診断技術の開発を目的として平成20年よりDNAチップを用いた血液による診断の可能性を検討してきた（「先行研究」）。

本共同研究では、新しく入手した臨床検体を用いて、これまでの研究において構築していたDNAチップによる診断法の検証を実施した。

【検体】

- ・ CFS患者 81検体
- ・ 健常人 61検体

【方法】

1) 検体の入手と保存

大阪市立大学 疲労クリニカルセンターにおいて、研究への参加について同意を得ることができたCFS患者81例および対照健常人61例から10mlの採血を行い、PAXgene RNA採血管（Becton Dickinson）中で-80℃で保存し、シスメックス中央研究所へ凍結した状態のまま輸送した。

2) 血液からtotal RNA抽出

PAXgene RNA採血管に採血された血液（1検体あたり2.5もしくは5.0ml）からPAXgene Blood RNA systemを用いてtotal RNAを抽出した。詳細な方法はキットに付属のマニュアル

ルに準拠した。

- 3) 全血由来total RNAからグロビンRNAの除去
2) で得られたtotal RNA溶液（総量10ugを超える場合は10ugに調整）を用いてGLOBINclear-Human kitによりグロビンmRNAの除去を行った。詳細な方法はキットに付属のマニュアルに準拠した。

4) GeneChip測定

グロビン処理前後の血液由来total RNA溶液から各2.0～2.5ugのRNAを用いて、ターゲットの作成を行った。得られた断片化されたデオチン化cRNAの中から15ugを用いてハイブリダイゼーションを行った。染色および洗浄はFluidic Station 450を用いて行い、スキヤニングはGeneChip Scanner 3000を用いて行った。詳細な方法はキットに付属のマニュアルに準拠した。

5)

（ア）発現データ抽出

スキヤニングした画像データはGeneChip Operating Software（GCOS）によってCELファイルへと変換し、GeneSpringソフトウェア上で正規化を行い、各サンプルにおける測定結果間の相関係数を算出した。なお正規化のアルゴリズムはMAS5.0を用いた。

6) データ解析

各検体（CFS 81検体、対照健常群61検体）について、先行研究において抽出した判別因子のスコアを算出しCFSと対照健常人との間の判別性能を評価した。

【結果】

1) 判別因子のスコア分布

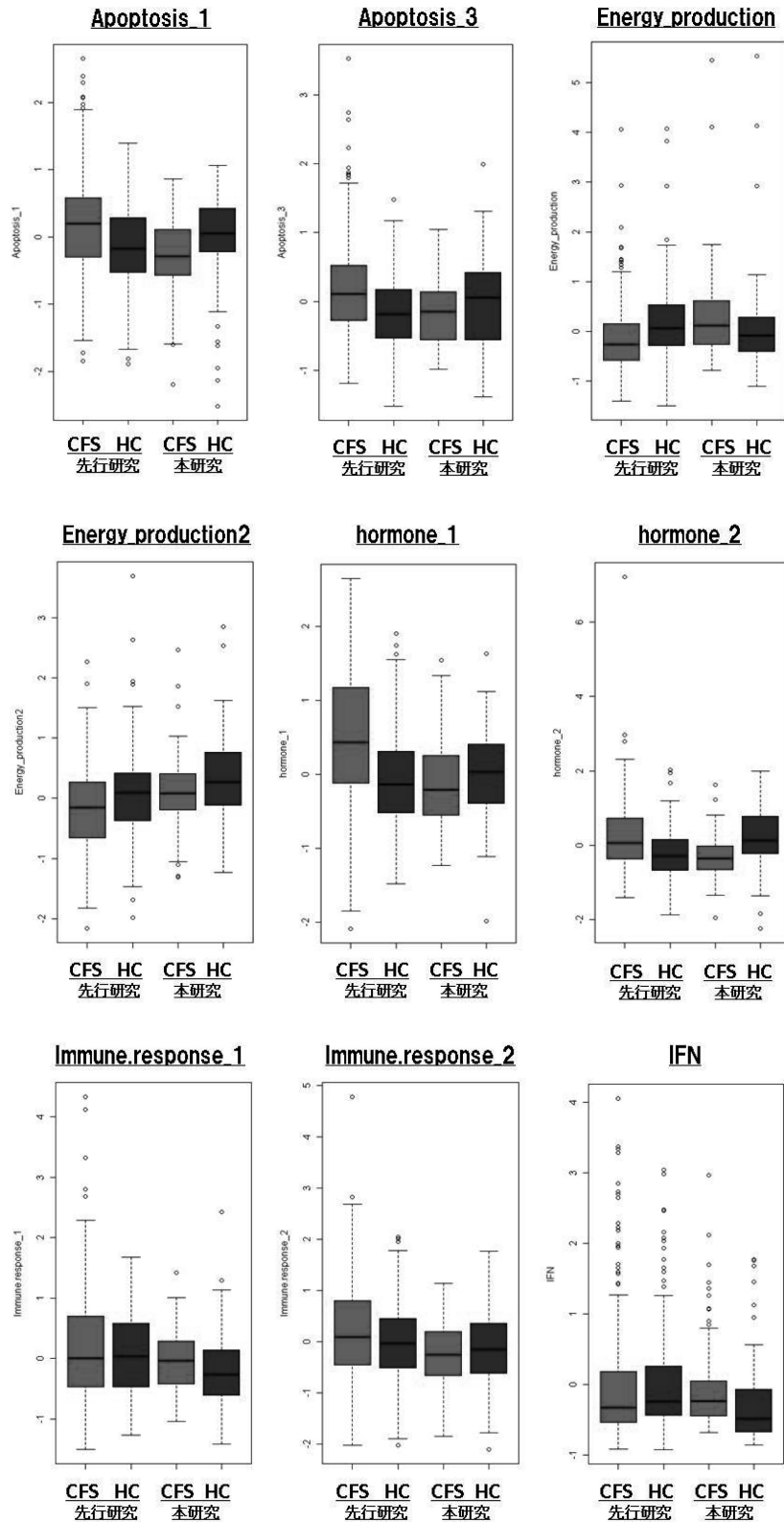
先行研究で得られていた9つの判別因子のスコア分布を以下に示す。

(左から先行研究CFS 229例、健常人 156例；今回の研究CFS 81例、健常人 61例)

残念ながら先行研究において観察されたCFS患者と健常人の間での差異が今回の検体において検証できなかった。

2) 判別式の性能検証

先行研究において作成した判別式の性能を今



回の検体のデータにより検証した。

結果を以下に示す。

9因子による判別性能

| | DNAチップ | |
|-----|--------|----|
| | CFS | HC |
| CFS | 27 | 52 |
| HC | 29 | 32 |

(感度34.2% 特異度52.5%)

【参考：先行研究における判別性能】

| | DNAチップ | |
|-----|--------|----|
| | CFS | HC |
| CFS | 173 | 56 |
| HC | 65 | 91 |

(感度75.5% 特異度58.3%)

先行研究により抽出された因子による判別性能を再現できなかった。

【考察】

結果として、先行研究において得られた判別式を再現することができなかった。再現性が得られなかった原因としては、①慢性疲労症候群と正常者との差異が極めて小さいこと、②先行研究と今回の研究の症例の違い、③検体を取得した時期や施設の違いなどによるサンプリングバイアスの影響を受けた可能性などが考えられる。

本研究から、末梢血白血球の遺伝子発現プロファイルによる慢性疲労症候群の判別診断は、当初期待した十分な感度・特異度を再現できず、方法論の再検討を要するものと考えられる。