

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。

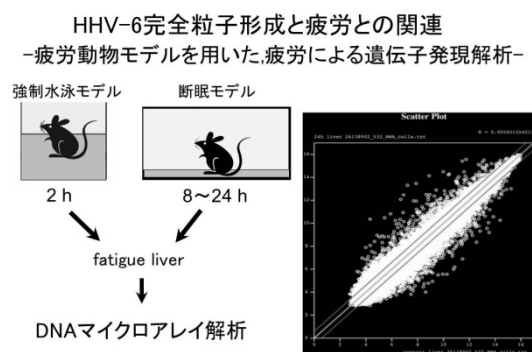
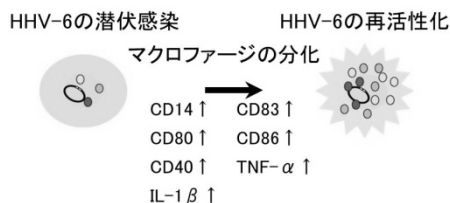


図1. 疲労負荷マウスのDNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析

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



マクロファージの分化に伴い、HHV-6は再活性化する

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

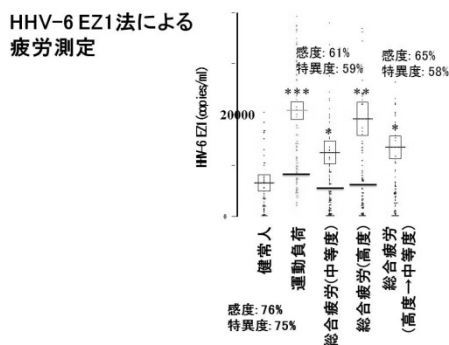


図3. 唾液中全HHV-6 DNA量と疲労負荷との関係
QIAGEN社のEZ1 virus kitを用いて、唾液中の全DNAを回収し、HHV-6 DNA量と疲労との関係を検討した。

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。

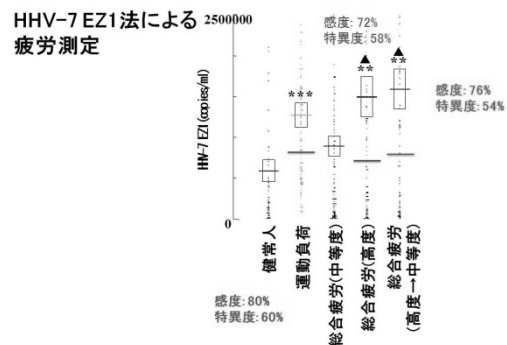


図4. 唾液中全HHV-7 DNA量と疲労負荷との関係
QIAGEN社のEZ1 virus kitを用いて、唾液中の全DNAを回収し、HHV-7 DNA量と疲労との関係を検討した。

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

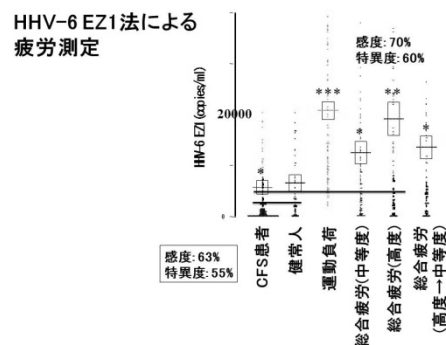


図5. 唾液中全HHV-6 DNA量と慢性疲労症候との関係

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され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。

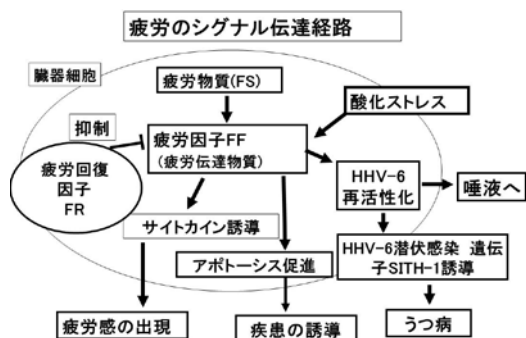


図6. 疲労のシグナル伝達経路とHHV-6再活性化との関係

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)

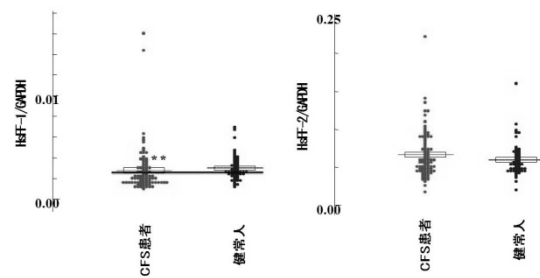


図7. 疲労因子 (FF) と慢性疲労症候群との関係
CFS患者と健常人の、末梢血における疲労因子 (FF) 発現量を検討した。

血液中疲労回復因子(FR)と慢性疲労症候群(CFS)

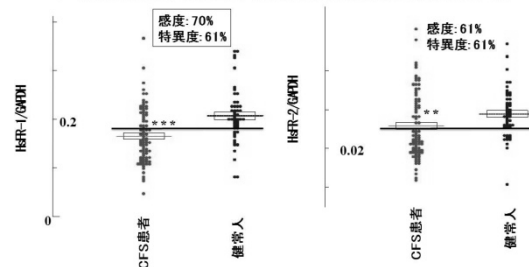


図8. 疲労回復因子 (FR) と慢性疲労症候群との関係

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。

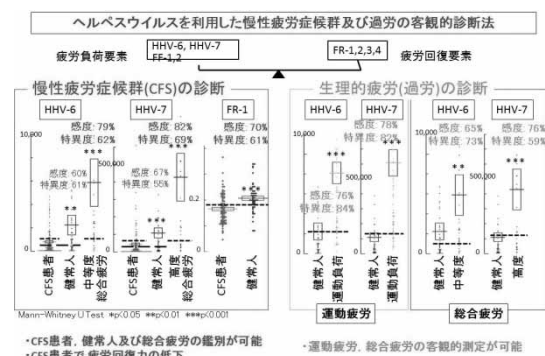


図9. 唾液中HHV-6、HHV-7と血中疲労回復因子 (FR) による各種疲労測定感度・特異度のまとめ

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のものであり、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)。