

## 2. サブテーマ毎，個別項目毎の概要

### 2. 1. 慢性疲労症候群等の病的疲労の研究（生田和良・倉恒弘彦）

慢性疲労症候群（CFS）に到る仮説を図（ポンチ絵）に示す。CFSの病因としては、発症時にしばしば発熱、咽頭痛、リンパ節腫脹などの急性感冒様症状が認められることや、上述の如く集団発生の報告があることよりも第1に感染症の関与が疑われてきた。その代表的なウイルスとしては、EBウイルス、ヒトヘルペスウイルス6、ボルナ病ウイルス等があげられる。そこで、第1班の「慢性疲労症候群等の病的疲労の研究」では、(1)「慢性疲労症候群原因ウイルスとサイトカイン異常に関する研究」の研究として原因ウイルス分離・同定（山西）、ボルナ病ウイルスと慢性疲労症候群の関連（生田）、疲労病態におけるウイルス感染と免疫応答異常（西連寺）を行なった。次に、神経系、内分泌系、免疫系は神経伝達物質やホルモン、サイトカインなどを介してお互いに関連していることが知られており、CFS患者においても、神経系、内分泌系、免疫系の様々な異常が認められている。我々は、この中でもTGF- $\beta$ やインターフェロン（IFN）などのサイトカインの異常が多くのCFS患者で共通して認められることより疲労に到るカスケードの主要な役割を担っている可能性を考えている。そこで、疲労と関連が疑われるサイトカインの作用と共に脳内産生部位や作用部位を明らかにするため、疲労病態におけるウイルス感染と免疫応答異常（西連寺）とともに(2)慢性疲労症候群に関わる代謝動態の研究、疲労状態にいたるまでの脳内代謝動態の解明（松村）を行なった。

また、我々はCFS患者では神経ホルモン（dehydroepiandrosterone sulfate：DHEA-S）や血清アシルカルニチン（ACR）が減少しており臨床症状と関連していることを見出してきたが、ACRは脳に取り込まれて利用されていること、TGF- $\beta$ の上昇がDHEA-Sの減少と関連していること、DHEA-Sの減少がACRの低下と結びつくこと、IFNの異常がリボヌクレアーゼを介してカルニチン代謝の異常にも影響していることなども判明、ACRやカルニチンの代謝異常がCFSの疲労感と結びついている可能性が浮上してきた。そこで、慢性疲労症候群に関わる代謝動態の研究としてアセチルカルニチントランスポーターの研究（三輪）、カルニチン欠損と疲労病態の関係（佐伯）を行ないカルニチンの代謝異常と疲労との関連について検討した。

さらに、最近小児の不登校が大きな社会問題となってきているが、このような児童の多くが原因不明の疲労・倦怠感を訴えている。そこで、小児のCFSとして(3)不登校状態の研究（三池）を行い脳内代謝やリズム異常と疲労との関連を検証した。以下に各研究の概略と成果を記すが、今回の班研究では仮説の科学的な裏付けが得られるだけでなく疲労のメカニズムに直結した新たな発見が多く見つかってきている。

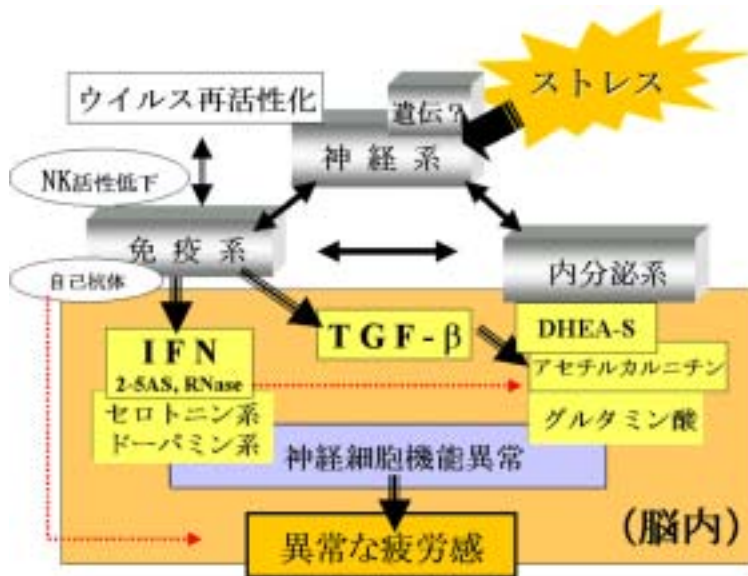


図1．慢性疲労に陥るメカニズム（仮説）

### (1) 慢性疲労症候群原因ウイルスとサイトカイン異常に関する研究、

本サブテーマの研究目的は、慢性疲労症候群（CFS）という病的疲労を引き起こす原因としてのウイルス学的側面を検討し、その病態への関与を明らかにすることにある。本研究で取り上げた病原体は、ヘルペスウイルス科に属する Epstein-Barr virus (EBV)（西連寺）と human herpesvirus-6 (HHV-6)（山西）、またボルナウイルス科に属するボルナ病ウイルス（BDV）（生田）である。一般に、ヘルペスウイルスは、成人のほとんどが既に持続感染しており、これまでもその活性化と CFS との関連性が米国のグループから指摘されていたものである。一方、BDV は疫学的研究からうつ病など精神疾患との関連性が示唆されてきたものである。この他、CFS との関連性が指摘されたマイコプラズマ（山西）についてもわが国の患者において検討した。わが国の CFS 患者ではマイコプラズマとの関連性は認められなかったが、EBV、HHV-6、BDV についてはわが国の CFS 患者との関連性が認められた。特に、それぞれのモデル系を用いて検討した結果、サイトカインの動態異常とウイルス持続感染、潜伏からのウイルス活性化、中枢神経系へのウイルス持続感染、中枢神経系機能物質の異常などが CFS 病態に関わっていると考えられた。

#### 個別項目毎の概要

**原因ウイルス分離・同定(山西):** CFS 患者において高率に HHV-6 潜伏感染特異的蛋白 (ORF160) に対する異常な免疫反応が認められ、このような現象が認められる患者では、より強い疲労感を感じていることを見出した。CFS 患者で、この抗 ORF160 抗体が高率に検出される機序は不明であるが、自己免疫反応の結果である可能性が示唆された。さらに、この現象と疲労感との関連性を追及する目的で、脳内における HHV-6 の潜伏感染・再活性化機序を検討した。潜伏感染特異的遺伝子産物の発現が脳内において認められること、また in vitro において発熱因子である IL-1 に曝すことにより潜伏からの再活性化現象が認められることを明らかにした。一方、わが国の CFS 患者ではマイコプラズマとの

関連性は認められなかった。

**ボルナ病ウイルスと慢性疲労症候群の関連 (生田):** BDV が CFS 患者との関連性が高いことが疫学的に明らかになった。BDV では、モデル動物が使えることから、各種モデル動物を用いた病体解析を行い、BDV の脳内持続感染により神経細胞の機能異常が引き起こされる結果を得た。特に、BDV は潜伏からの活性化に神経栄養因子 (NGF) が関わること、BDV 持続感染細胞は高温などのストレス環境においてアポトーシス死を高率に引き起こすこと、BDV 蛋白のひとつである p24 リン酸化蛋白が神経突起伸張に関わる amphoterin (= high mobility group 1; HMG1)との結合性を示し、神経ネットワークの破綻が引き起こされる可能性のあることを示した。実際、p24 リン酸化蛋白を脳内に発現するトランスジェニックマウスでは、神経栄養因子 (BDNF) やセロトニンリセプターの低下、高攻撃性、学習能力の低下などが認められた。

**疲労病態におけるウイルス感染と免疫応答異常 (西連寺):** CFS 患者からの末梢血におけるサイトカインの動態異常について検討し、このようなサイトカイン均衡の攪乱が EBV の再活性化に基づいて引き起こされていることを明らかにした。特に、健常者では認められない EBV 蛋白のひとつ、vIL-10 が CFS 患者において検出され、EBV 感染細胞障害性 T 細胞を抑制している可能性を明らかにした。また、潜伏感染 EBV の活性化機序として細胞表面の CD40 からのシグナルが関わること、また、疲労および免疫抑制に関わるサイトカインである TGF- $\beta$  1 が EBV 感染細胞から産生され、特に高濃度の TGF- $\beta$  1 に曝すことにより潜伏からの EBV 再活性化が促進されることを見出した。

## (2) 慢性疲労症候群に関わる代謝動態の研究

**疲労状態にいたるまでの脳内代謝動態の解明 (松村):** 感染・炎症時の一連の中枢神経症状 (疲労感、痛覚過敏、発熱、食欲不振等) には複数のサイトカインが関与している。そこで、これらサイトカインの産生部位、作用部位を解析する方法を確立、この系を用いた検討により IL-1 受容体は脳血管内皮細胞と脳室周囲器官に平常時でも発現しているが感染・炎症時にその発現量が増加すること、IL-6 受容体は大脳皮質の神経細胞に平常時で発現しているが感染・炎症時には脳血管内皮細胞に誘導されること、IL-1 受容体と IL-6 受容体は同一の脳血管内皮細胞に発現し相互誘導が認められることを見出した。また、慢性疲労症候群の原因の一つとしてウイルス感染が疑われている。そこで、ウイルス感染時の疲労・発熱を再現するモデルとして 2 本鎖 RNA (polyIC) 腹腔内投与をしたラットを作成、自発輪回し行動の低下 (疲労の指標) および発熱が引き起こされることを確認した。これまで、感染症の時には発熱と共に疲労倦怠感がみられることより、同一のメカニズムである可能性が考えられてきたが、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) 阻害剤を用いた検討により、COX-2 は polyIC による発熱を抑制したが、輪回し行動の低下には影響しないことを発見、疲労感発熱の二次的作用ではなく発熱とは独立した機構で起こる可能性を示した。

**アセチルカルニチントランスポーターの研究 (三輪):** 慢性疲労症候群患者でみられる疲労には仮説に示す如く脳におけるアセチルカルニチンの代謝異常が関わっていることより、アセチルカルニチントランスポーターの異常が関係していることが予想される。そこ

で、第1期研究ではラットの脳における cDNA ライブラリーを作成、クロスハイブリ法を用いてアセチルカルニチントランスポーター類似クローンを15個単離し塩基配列を決定した。単離されたクローンの多くはこれまでカルニチントランスポーターとして知られている OCTN1 か OCTN2 のどちらかであったが、2つのクローンはアセチルカルニチントランスポーター類似の新たな蛋白をコードしていることが判明した。これらの cDNA は OCTN1 および OCTN2 と部分的な相同性を有しているものの、約 1/3 の小分子で、1回膜貫通型蛋白をコードしていた。新しく見出された 2b-1 および 11 は、培養細胞株の発現系において、それ単独では AC 輸送活性を示さなかったが、OCTN2 の輸送活性を数倍増強した。OCTN1 の AC 輸送活性は検出限界以下であった。これらの事実は、OCTN2、2b-1 および 11 が脳における AC 輸送に深く関与していることを示唆しており、第2期研究では CFS 患者におけるアシルカルニチン異常との関連など臨床例について検討を進める予定である。

**カルニチン欠損と疲労病態の関係 (佐伯):** 本研究では、カルニチンの細胞膜輸送蛋白質の欠損に基づく JVS (juvenile visceral steatosis) マウスが絶食によって自発行動低下、食餌量の減退を起こすことから、これを疲労モデルとしてその発症機構の解明を行った。JVS マウスの絶食による行動低下はカルニチン投与によって回復するが、カルニチンを含まない食餌の投与によっても回復することから直接カルニチンの有無によって起こるのではない。JVS マウスの検討にて、絶食によって酸化ストレスを受けていること、絶食 JVS マウスの脳内 c-fos 発現は橋核(延髄)での発現が著しく低下していることが明らかになった。また、長鎖脂肪酸代謝の律速酵素である carnitine palmitoyltransferase I の阻害剤である methyl palmoxirate (MP)を通常のマウスに投与することによって、JVS マウスと同様な、絶食による自発行動減少モデルが作成できることより、長鎖脂肪酸代謝障害が行動量低下の主因であることが判明した。次に、JVS マウスにおいてはカルニチン欠乏による心肥大が認められる。そこで、心肥大が疲労と関連している可能性を考慮し、心肥大に伴う遺伝子発現異常についても検討したところ、心肥大に伴って発現変動する新たな遺伝子 carnitine deficiency-associated gene expressed in ventricle-1(CDV-1)と CDV-3 を発見、それぞれゲノム遺伝子および cDNA 構造を明らかにした。CDV-1 は、JVS マウス心室において特異的に発現低下し、カルニチン投与によって正常レベルを保つが、甲状腺機能亢進による心肥大、およびヒトレニン・アンギオテンシン系発現亢進マウスにおける心肥大においても、同様に発現が低下しており、カルニチン欠乏よりも心肥大に関連した遺伝子であることも判明した。

**(3)不登校状態の研究 (三池):** 不登校状態は成人の慢性疲労症候群に極めて類似した臨床症状を示す。その病態は、自律神経症状に始まり、生活リズムの破綻、強い倦怠感、思考力の低下、免疫機能不全など中枢神経機能に関連した多彩なものとなる。そこでまず自律神経機能について医学生理学的な検討を開始し、副交感神経の衰弱を確認した。さらに深部体温リズム、ホルモン分泌リズム、睡眠・覚醒リズムなどの生体リズムの破綻が存在しあかかも慢性的な時差ぼけ状態であることを突き止めた。中枢神経機能の評価の中で P 3

00脳波の結果は認知障害が明らかに存在することを裏付けており、学習記憶の障害をはじめとする脳機能低下の背景には SPECT、Xe-CT 検査による前頭葉、視床領域での血流低下およびMRSにおける前頭葉のコリン蓄積があることが明らかになった。

## 2.2. 疲労および疲労感の分子・神経メカニズムの解明（渡辺恭良）

### (1) 疲労感の脳担当部位とその部位の役割

- 1) 睡眠剥奪（断眠）による疲労蓄積をもたらす脳の神経伝達の変化について、PET を用いたインビボの受容体結合実験により探り、断眠によってベンゾジアゼピン受容体結合活性が、安静時コントロールに比べ著しく増大することを見出した。この結果は、GABA<sub>A</sub>/Bz 受容体に関わる抑制性神経回路による調節機構が、長時間覚醒しつづけることによって生ずる疲労からの回復機構に密接に関係していることを示唆している。
- 2) サルを用いて、長期の訓練により熟練した手続き学習課題を用い疲労の有無について検討し、100回に及ぶ課題の連続反復試行により試行中の反応時間が経時的に遅延することを見出した。これはサルにおける疲労または疲労感の表出と密接な関係にあると考えられ、熟練した手続き学習課題の強制的な連続試行における行動解析がサルにおける疲労の評価に有用である可能性が強く示唆された。ここで確立したサルの疲労評価法によって、24時間の断眠による疲労状態や緑の香りによる疲労緩和効果を認めた。[以上、1)、2)、尾上]
- 3) マウス脳におけるヒドラペプチド Hym176 様免疫陽性は、視床下部、視床、中脳、中隔、側坐核、扁桃核などに多く見られ、その脳内地図を詳細に完成した。Hym176 をラットの側脳室、または尾静脈に注入し、15分から1時間後に血清中の脳下垂体前葉ホルモンの分泌量の変化を測定した。その結果、成長ホルモンの血中濃度が50%上昇した。また Hym176 の脳室内投与により脳内セロトニン濃度が20%低下し、ドーパミン代謝率が2倍に増加した。一方、ラット脳から抗 Hym176 抗体で認識される神経ペプチドを抽出した。精製を行い、このスクリーニングを3段階行った結果、抗 Hym176 抗体に強く反応する分画が1本得られたので、アミノ酸配列分析を行った。現在までに、N末の10アミノ酸までの分析が終了したが、検索の結果、既知の蛋白の一部がプロセッシングされてできた、40アミノ酸からなる哺乳類新規脳内ペプチドを得た。(岡戸)
- 4) 平成11年度は、健常被験者12名を対象としてコミックビデオ視聴中の局所脳血流をPETを用いて測定し、笑いの表情と補足運動野、左被殻の関連を明らかにした。平成12年度は健常被験者を対象として感情を伴わない作り笑いの最中の局所脳血流をH<sub>2</sub><sup>15</sup>O-PETを用いて測定し、作り笑いに比べ感情を伴う笑いでは内側前頭前野、前頭眼窩野、左前部側頭葉、左鉤、両側側頭後頭皮質、後頭葉皮質が賦活されることを明らかにした。これらのうち内側前頭前野、前頭眼窩野は自覚的な情動体験に關与すると考えられた。左前部側頭葉、左鉤、両側側頭後頭皮質、後頭葉皮質の賦活はコミックビデオの視覚処理過程が反映されたものと考えられた。一方、健常被験者を対象として、1時間程度のコミックビデオ視聴による笑いによりナチュラルキラー

細胞（NK）活性が上昇することを示した。この際情動的要素のないコントロール刺激視聴ではNK活性の上昇は見られずNK活性の上昇が笑いによるものであることが実証された。コミックビデオ視聴、コントロールビデオ視聴ともに有意に緊張不安、抑うつ、怒り・敵意などのネガティブな気分を改善したが、笑いでは疲労予防効果が示された。（志水）

- 5) 疲労状態における脳活動・神経回路を解明するため、複合ストレスをラットに負荷して疲労動物を作成する試みを行い、また、疲労の定量的な評価方法についても動物の行動量等の検討を行った。劇的な疲労モデルとして、ピペット洗浄機にラットを投入し、迫り来る水の恐怖からのパニックと救命のために垂らされたロープを使って水から逃れるという日頃行わない運動のために、30分間の負荷で取り出しても1時間以上も動かない疲労困憊モデルを作成することに成功した。また、一方で、ケージの中に浅く張った水の中で毎日過ごす断眠による過労死モデルをも作成し、その行動評価と血中・脳内物質変化を追跡した。双方のモデルともに、脳内のドーパミン・セロトニンなどのモノアミンレベルに変化があることが判明した。また、疲労感に関わる脳部位を探るために、神経の活動状況の指標となる c-fos 蛋白の発現を免疫組織化学法によって調べ、後部帯状回などの関与を明らかにした。また、疲労は一種の脳の酸化過多状態とも考えられ、動物モデルの一つとして、中枢神経が過度に長時間活動したときに引き起こされると考えられる中枢神経組織酸化動物を作製し、行動及びその神経活動や脳血流の変化を観察した。中枢神経組織酸化は脳内目的領域への光増感色素の投与と同領域への脳外からの光照射によって達成した（光酸化法）。光酸化法により限局された脳内目的領域のみを短時間に、またさまざまな程度に酸化することに成功し、動物の行動とくに脳波が徐波化すること、モノアミンレベルが変化することを明らかにした。
- 6) ヒトにおいても、精神的疲労や運動後疲労を起こし、その疲労度を定量的に把握する方法を行動ビデオや集中力検査法で明らかにすることができるデータを得た。また、嗅覚・味覚などとそれらを想起することにより、脳活動度を fMRI で測定できることが判明し、その回路活動を指標にして、疲労度の客観的評価による指標との対応づける研究を開始した。集中力検査法の一つである Advanced Trail Making Test (ATMT) を少し長時間行うことができるように改良して疲労負荷かつ評価の手段として使い、次々と PET scan を行い、局所脳血流量の変化（脳活動部位の変化）を定量した。疲労度には、Visual Analogue Scale (VAS) を用いて、それとの相関性が高い脳部位を検出した。疲労度と相関して、大脳皮質ブロードマン11野の一部の活動が上昇することが判明した。この部位が、実際に疲労感と関係するのかどうかは、異なった疲労負荷により共通項として抽出される必要がある。[以上、5) 6) 渡辺]

## (2) 疲労生体信号と神経・免疫・内分泌相関の調整

- 1) 感染性疲労動物モデルとして、Poly I:C 投与動物の行動観察を行い、これが疲労モデル足りうることを明らかにした。Poly I:C を無条件刺激、サッカリン水を条件刺激

にして、行動量の低下（疲労）を条件付けすることに成功した。この結果は、疲労の神経回路の存在の証明の一つの大きな根拠を与えた。また、セロトニン系を抑制する薬物によって、条件付けによる行動量の低下がブロックされた。また、異なる動物モデルとして、暑熱暴露による環境疲労ラットの自発行動量は、一日のみ一過性に低下した。一方、Poly I:C による免疫疲労ラットは、行動量の低下が少なくとも一週間は持続した。大脳皮質および視床下部のインターフェロン- mRNA 量も、暑熱暴露では一過性に増加するのみであったが、Poly I:C ラットは一週間後も増加していた。また、Poly I:C ラットでは、脳内 5-HT トランスポーターの mRNA 量が一週間後も増加していた。（片淵）

- 2) ラットに対し、2時間の拘束ストレスを用い、ストレスに対する生体反応を血漿 ACTH 濃度を指標として追跡した。一回の拘束直後、2日後、7日後、21日後に採血を行い、血漿 ACTH 濃度を測定した。その結果、ストレス後の長時間に及ぶ ACTH 動態にストレス時の脳内オキシトシンが修飾因子として関与することを明らかにした。また、IL-1 ストレスによる血漿 ACTH 濃度の上昇は、CYP-450 阻害剤であるエコナゾールを投与してその代謝産物である EET 合成を阻止しても影響がなかった。一方、拘束ストレスにエコナゾール投与実験を組み合わせると、ストレス直後の一時的応答においても、2日後の長期応答においても ACTH 濃度を上昇させた。つまり CYP-450 代謝産物はストレス時に作用し、OXT の長期応答のみへの作用と異なり、ACTH の一時的及び長期的、両応答に対し促進的に作用することが判明した。また、ストレス時に「緑の香り」を嗅がせると ACTH 応答が抑制されることが判明した。（中島）
- 3) 明暗コントロール下で飼育したラットで、暗期直前にアセチルカルニチン（ALC）を腹腔内（200 mg/kg）あるいは脳室内（3 nmol）に投与したところ、3時間及び1日摂食量は有意に減少した。そこで、脳スライス標本を用いて摂食中枢ニューロン活動に対する ALC の作用を検討したところ、1 nM の投与では記録したニューロンの約7割で一過性の促進とそれに続く長い抑制が認められた。鉄に過酸化水素を作用させるとヒドロキシラジカルが発生するが、この反応系に ALC を添加しておく、ラジカルの発生量は15%にまで減少した。また、モデル神経細胞である PC-12 細胞にヒドロキシラジカルを作用させると40%の細胞で細胞死が生ずるが、ALC を添加しておく、細胞死が生ずる細胞の数は20%と有意に減少した。いずれの実験も ALC が抗酸化作用をもつことを示した。生後2~3ヶ月令でボケ症状を呈する老化促進モデルマウスでは生後2ヶ月目から酸化ストレスにより脂質過酸化物が脳で有意に増加する。そこで、抗酸化作用を有する ALC を生後21日目から2日に1回、100~400 mg/kg の濃度で腹腔内に3ヶ月間にわたり投与し、受動的回避学習課題によりボケ症状を調べたところ、ボケ症状は有意に改善されていることが判明した。また、脂質過酸化物の量も対照に比べ有意に減少していた。拘束ストレス後、ラットの3時間並びに夜間摂食量は有意に減少する。そこで、拘束後の摂食中枢セロトニン量を調べたところ、セロトニンは拘束後一過性に増加した。しかし、拘束時に緑の香り（trans-2-hexanal）



をラットに嗅がせておくと、セロトニンの増加は有意に減少し、また3時間摂食量も有意に回復した。これは、緑の香りに疲労（ストレス）に対する癒しの作用があることを示唆する。（佐々木）

4) 疲労病態モデルを用いて、脳心循環病態やエネルギー代謝病態などにおける活性酸素代謝病態を解析し、循環制御やエネルギー代謝が活性酸素種間のクロストークにより支配される様相を明らかにした。マウス用に改良した回転ドラム型トレッドミルを用いて昼夜に渡り様々な強度の無休息運動ストレスを負荷して解析した結果、低速運動により疲労病態モデルを確立出来ることが判明し、慢性疲労が睡眠障害により加速増強されることが判明した。疲労病態において、理学的測定法と生化学的測定法を併用した。理学的パラメーターとしてはロタロッドによる回転試験が有用であるが、特にそれへの適応速度が疲労度を鋭敏に反映することが判明した。還元型(GSH)および酸化型グルタチオン(GSSG)、アスコルビン酸などを解析した結果、疲労負荷によりこれらの抗酸化物質のレベルと酸化還元状態が著変することが判明した。特に、睡眠と関係が深い脳内物質 GSSG の増加が顕著であり、疲労と睡眠病態の分子関連が確認された。一方、48時間断眠運動を負荷したラットのエネルギー代謝と活性酸素関連代謝への影響を検討した。自発運動量を open field 法で解析した結果、コントロール群と比較して、実験群では自発運動量が増加傾向を示した。この際、疲労負荷動物でどのような遺伝子群が顕著な変動を示すかを microarray 法で解析した結果、正常状態の脳で発現している多数の遺伝子群の発現が、疲労負荷群では極度に低下することが判明した。現在、その遺伝子群の機能単位の解析、及びそれに対するカルニチン投与の影響を解析中である。

5) さらに、疲労時の組織ミトコンドリアにおけるエネルギー代謝病態（カルニチン代謝病態を含む）活性酸素産生動態、抗酸化防御系の変動を解析した。これらの解析により、カルニチンがミトコンドリアでの酸化を介してエネルギー代謝を活性化し、これによりミトコンドリア依存性の細胞死を強力に抑制することが判明した。これらの研究成果を踏まえ、エネルギー代謝病態を基盤とする疲労病態には易可逆的な急性疲労と難可逆性の慢性疲労病態があり、後者では神経細胞のアポトーシスが関与する可能性を提唱し、以下の実験を行った。各種ストレスで誘起される神経系細胞 PC12 のアポトーシスがカルニチンで顕著に抑制されること、およびそのメカニズムはミトコンドリア膜電位の病態変化阻止に起因することが判明した。また、筋肉細胞系のアポトーシスとして典型的なカエルの尾部筋肉細胞に着目し、これに対するカルニチンの影響を解析した。解析の結果、尾部筋肉細胞のアポトーシスもカルニチンで著明に抑制された。そのメカニズムもミトコンドリア膜電位病態の阻止を介することが判明した。

一方、回転トレッドミル中で48時間断眠運動を負荷したラットのエネルギー代謝と活性酸素関連代謝への影響を検討した。自発運動量を open field 法で解析した結果、コントロール群と比較して、実験群では自発運動量が増加傾向を示した。この際、疲労負荷動物でどのような遺伝子群が顕著な変動を示すかを microarray 法で解析した。



解析の結果、正常状態の脳で発現している多数の遺伝子群の発現が、疲労負荷群では極度に低下することが判明した。現在、その遺伝子群の機能単位の解析、及びそれに対するカルニチン投与の影響を解析中である。[以上、4) 5) 井上]

## 2.3. 疲労病態制御技術の開発 (倉恒弘彦)

### (1) 疲労の定量化・指標化と疲労を和らげる生活の提言

#### 疲労の定量化及び指標化技術の開発

人は疲労状態に陥ると注意力・集中力が低下し反応時間の遅延や2つのことを同時に処理する能力の低下がみられることに着目し、このような疲労に伴う脳機能の低下を定量的に評価するための Advanced Trail Making Test (ATMT) や Dual Task Test (DTT) を開発した。ATMT とは、タッチパネルディスプレイ上に提示された1~25までの数字を素早く押す視覚探索反応課題を用いて疲労の客観的評価を行なうものであり、target 毎の探索反応時間が測定でき、易疲労性を客観的に評価できることが確認された。また、ディスプレイ上に1から5の数字を連続100回呈示し、できるだけ速やかかつ正確にボタン押しで反応させるタスク(X課題)とともに画面上部のランダムな位置に50%の出現確率で標的的刺激である図形(円)を呈示して同時に第二課題行なう DTT では、疲労状態ではエラー数(特に Omission Error)が増加することが判明した。さらに、運動後の疲労ではこのような脳・神経機能は一見代償されているように思われたが、反応時間のばらつきが大きいことが明らかになり、反応時間の変動係数を調べることにより代償されているような疲労状態をも検出できることが判明した。

疲労に伴う行動の変化についての検討では、モーションピクチャーシステムを用いて行動の俊敏性や行動特性を評価したところ、運動負荷による疲労では断続立ち座りにより移動距離が短縮され、パフォーマンスの低下を最小限にするための代償反応がみられたが、疲労を定量化できるような指標は見いだすことは出来なかった。そこで、アクティグラフを用いて行動量を検討したところ、20~40歳代の健常者の検討では加齢とともに行動量が少し減少する傾向がみられ、特に40代の男性で顕著であった。CFS患者の検討では、現在のところ症例数が少なく統計的な評価はできていないが、睡眠時間の延長とともに覚醒時における行動量の低下が顕著であり、病的な慢性疲労の指標となる可能性が示唆された。

疲労感の強さの評価を主観に頼るのではなく、客観的な数値に置き換えて評価することを可能とした本研究は、年間数千億円もの極めて莫大な費用を投じて行われている多くの疲労回復手法の正確な評価を可能とするものであり、経済的観点からも極めて重要なものである。

#### 伝承療法等の評価と疲労を和らげる生活の提言

疲労や疲労感の軽減に奏功すると言われてきた伝承療法等について、健康・保健関係の文献・雑誌等を収集するとともに、機器メーカー、和漢薬メーカー、製薬メーカー等に対

するヒアリングを行い、情報を整理した。これらの情報をもとに、伝承療法等の内容、効果等についての第1次データベースを作成した。また、第1次データベース作成をふまえ、無作為に抽出した15歳～64歳までの大阪府民3,000人を対象にアンケート調査を行い（有効回収票は1,219件、有効回収率40.6%）、市民、疲労や疲労感の軽減に奏功すると言われてきた伝承療法等の活用状況と効果を把握し、第2次データベースを作成した。

その結果によると、疲れやだるさを感じたことのある人の伝承療法等の活用状況では、全体の94.1%の人が何らかの形で活用しているが、伝承療法別の活用状況ではかなりのばらつきがみられた。最も多く活用されているのは、入浴（56.0%）で、次いでコーヒー（36.2%）、入浴剤（32.7%）、ビタミン剤（28.0%）、日本茶（26.4%）、体操（22.6%）、お酒（22.6%）、栄養ドリンク剤（21.9%）など入浴系と食品系が多く、最も少ないものでカラーパンクチャー、色体テープ、身体中心集団療法がいずれも0.2%となっている。また、健康保険が適用されている漢方薬および医師の同意があれば健康保険の適用になる療法（あんま・マッサージ、指圧、灸、鍼）については、マッサージ（19.5%）から灸（2.2%）までばらつきがみられた。多くの人は複数の伝承療法を活用しており、入浴や食品を中心に、マッサージ、指圧、鍼灸、睡眠、運動等を組み合わせて実施していた。

伝承療法等の効果については、活用されている割合の高低に関わらず、効果が「あった」と認めている人の割合も高低がみられた。例えば、活用されている割合が18.1%の「笑い」については、55.3%の人が効果が「あった」と認めていた。また、健康保険が適用されている漢方薬や、医師の同意があれば健康保険の適用になる療法等（あんま、マッサージ、指圧、鍼、灸）については、効果が「あった」と認めている人の割合は他の療法よりも高かった。効果がみられた伝承療法としては、指圧、マッサージ、あんま、整体、ヨガ、鍼灸、カイロプラティック、温泉、サウナ、入浴等の身体に直接働きかける療法を挙げる人が多いが、アニマルセラピー、森林浴、笑い等を挙げる人もいる。活用状況と効果との相関は必ずしも高くないという結果であった。

## (2)疲労病態の治療技術の開発に関する研究

本研究では疲労病態の治療技術の開発や慢性疲労の予防に向けた提言を目指して以下に述べる～の研究を行った。これらの研究成績により、医療機関受診患者における疲労の有症率は66.8%で、そのほぼ半数の人では以前に比べて仕事などの能率や作業量の低下が認められ、疲労は社会生活に支障を来す原因の1つとなっていること、日常生活における生理的疲労に対しては入浴やコーヒーが有効であると感じていること、茶には運動性疲労の回復に有効である成分と、精神疲労の回復に効果がみられる成分が含まれており、この相乗作用により疲労回復もたらしていると推測されることなどが明らかになった。また、ポジトロンCTを用いた検討にて、慢性的な疲労病態では前頭葉（特に前帯状回、前頭前野）における神経細胞の活動性が低下しており、特に脳でグルタミン酸、アスパラギン酸やGABA等の神経伝達物質の生合成に利用されるアシルカルニチンの取り込みが前頭前野と前帯状回において明らかに低下していることが世界で初めて示された。さらに、疲労モデル動物を用いて補中益気湯（TJ-41）およびacetyl-L-carnitineの疲労除去効果を重量

負荷強制遊泳試験にて評価したところ、TJ-41 はストレス負荷に伴い発現する疲労感の除去作用および回復促進作用を、acetyl-L- carnitine は疲労回復促進作用を有する可能性が明らかになり、またセロトニン再吸収阻害剤やドーパミン分泌を促す薬剤が一部の症例では疲労・倦怠感の治療薬となりうることも確認された。

#### 一般医療機関受診患者の疫学調査とリスクファクターの検討：

厚生省疲労研究班が一般地域住民を対象に疲労の疫学調査を実施した同一の地域において医療機関外来受診者調査を平成 12 年度に実施、調査票発送数 2180 通のうち有効回答 1767 通 (81.1%) を得た。その結果によると、医療機関を受診患者における疲労の有症率は 66.8% で、男に比べて女では疲労を感じる割合が高かった。年齢との関連では、35-44 歳群がもっとも多く、病気による疲労は年齢が増えるに従い増加したが、過労や原因不明の疲労は 35-44 歳がピークで加齢と共に減少した。疲労の程度についての調査では、以前に比べて仕事などの能率や作業量の低下を認める人が全体で 49.6% あり、この割合は病気による疲労が 59.9% と最も高かったが、明確な原因による疲労、原因不明ともに 40% を超えており、疲労・倦怠が社会生活に支障を来す原因の 1 つとなっている実態が明らかになった。しかし、医療機関にかかった人の主訴を調べてみると、疲労を主訴に受診した患者は 1 割程度に過ぎず、疲労・倦怠感はあまりに一般的な徴候であるが故に身体の異常を知らせる重要なアラーム兆候とは捉えていないものと思われる。6 ヶ月を超える慢性的な疲労・倦怠感疲労がみられる患者の約 2/3 にみられ、その半数以上の人以前に比べて仕事などの能率や作業量の低下を訴えており、慢性的な疲労が現在社会における生活の質の低下に関連していることが明らかになった。

#### 神経伝達物質の脳内代謝に影響を与える薬剤の慢性疲労症候群 (CFS) 患者への有効性の検証：

うつ病患者に対してセロトニン再吸収阻害剤(フルボキサミン：商品名デプロメール)やドーパミン分泌を促すアマンタジン (商品名：シンメトレル) にて治療を行うと疲労/倦怠感の軽減がみられることがあることより、疲労・倦怠感と改善にこのような薬剤が有効である可能性が考えられる。そこで、大阪大学医学部附属病院に通院している CFS 患者における有効率の検証を行ったところ、フルボキサミン投与では 35.7% の症例が有効/著効であり、アマンタジンは 47.4% の症例が有効/著効であった。したがって、セロトニン再吸収阻害剤やドーパミン分泌を促す薬剤が一部の症例では疲労・倦怠感の治療薬となりうることを確認され、疲労・倦怠感にセロトニン神経系やドーパミン神経系が関与している可能性が示唆された。

CFS 患者の脳内代謝異常 (セロトニン代謝、ドーパミン代謝、局所脳血流量、アセチルカルニチン代謝など) の検討：疲労感を最終的に認知しているのは脳であることより、慢性疲労を認める代表的な疾患である慢性疲労症候群 (CFS) 患者の脳内代謝異常 (セロトニン代謝、ドーパミン代謝、局所脳血流量、アセチルカルニチン代謝など) をポジトロンエミッショントモグラフィー (PET) を用いて検討した。スウェーデンのカロリンスカ研究所フディングゲ病院に通院中の CFS 患者 8 名と年令・性の一致する健常者 8 例に

対してウプサラ大学 PET センターとの共同研究として局所脳血流量やアシルカルニチン代謝について検討を行ったところ、CFS患者群では脳の前頭前野、前帯状回、眼窩前頭野、島皮質、視覚野などの神経細胞の活動性が低下しており、特に前頭前野と前帯状回においては有意にアシルカルニチンの取り込みが低下していることが判明した。また、前述の如くセロトニン再吸収阻害剤やドーパミン分泌を促すシンメトレルは激しい疲労を訴える患者の一部では有効であることよりセロトニン代謝はやドーパミン代謝について検討したところ、まだ preliminary な解析ではあるが前帯状回においてセロトニン合成が低下している可能性が明らかになった。このことは、疲労の治療として SSRI などが有効であることを示唆するものであり、極めて重要な所見である。セロトニン代謝とドーパミン代謝に関する詳細な解析は現在も進行中であり、来年度には脳内代謝のどのような変化が慢性疲労と直接結びついているのかを明らかにすることにより、異常な疲労/疲労感を治療する技術の開発につなげたいと考えている。

**アセチル-L-カルニチンの脳内代謝物分析：**[2-<sup>14</sup>C]acetyl-L-carnitine (ACM)をマウスに経静脈的に投与し、その脳内代謝産物の解析を試みたところ、ACM はグルタミン酸、アスパラギン酸や GABA 等の生合成に利用されていることが明らかになった。また、その取り込みを酢酸比較したところ、神経細胞が密に存在する大脳皮質、小脳顆粒層、延髄、視床、海馬、弓状核、乳頭体、膝状体、橋、手綱核、下丘、延髄等の領域で高く、大脳皮質では、  
、  
層に取り込まれているのが観察された。脳ホモジネートの分析の結果では、酢酸は有機酸分画へ代謝される割合が多く、一方アセチルカルニチンはアミノ酸分画へ代謝される割合が多かった。以上の結果より、PET解析にて明らかになってきたCFS患者における前頭前野と前帯状回のアシルカルニチン取り込み低下は、同部位におけるグルタミン酸、アスパラギン酸、GABA等の生合成低下という脳代謝異常と結びついてCFS患者にみられる慢性疲労などの臨床症状の原因となっているという全く新たな知見が発見された。

**疲労の回復手法の1つとして用いられている緑茶の成分であるカフェイン、テアニン、アルギニンの作用について動物を用いて科学的検証：**カフェイン投与群では血中ドーパミンが対照群に比較して有意に上昇することが明らかになった。ドーパミンの上昇は、A系神経伝達物質として作用し、快感や意欲をもたらしていることが推察される。一方、アルギニン投与群もドーパミンのやや上昇傾向がみられたが、3種混合物投与群ではカフェイン単独投与群に比較してその上昇が低く、カフェインのドーパミンへの影響をテアニンが抑制することが判明した。また、アドレナリンや、ノルアドレナリンも同様の上昇傾向がみられた。一方、疲労の指標物質の1つであるケトン体、3ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸について検討したところ、テアニン及びアルギニン投与群において対照群に比べて減少傾向がみられた。考案：茶には運動性疲労の回復に有効である成分と、精神疲労の回復に効果がみられる成分が含まれており、この相乗作用により疲労回復もたらしていることが推測された。

**疲労モデル動物の確立と疲労治療薬としての漢方薬および acetyl-L-carnitine の有用性**：長期水浸拘束ストレス負荷ラットの行動学的（新規環境下における自発運動量、重量負荷強制遊泳試験）および生化学的（血漿中 total carnitine, free carnitine, 各種臓器中 glutathione, ascorbic acid レベル）が評価され、その特徴が検証された。その結果、本モデル動物は疲労モデルあるいは疲労しやすい動物モデルとして確認された。そこで、本疲労モデル動物を用いて補中益気湯（TJ-41）および acetyl-L-carnitine の疲労除去効果を重量負荷強制遊泳試験にて評価したところ、TJ-41 はストレス負荷に伴い発現する疲労感の除去作用および回復促進作用を、acetyl-L-carnitine は疲労回復促進作用を有する可能性が示唆された。