

1. 疲労および疲労感の分子・神経メカニズムとその防御に関する研究
- 1.1. 慢性疲労症候群等の病的疲労の研究
- 1.1.1 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
- 1.1.1.1. 原因ウイルス分離・同定

大阪大学大学院医学系研究科 山西弘一

(1) 要 約 :

慢性疲労症候群(CFS)の外因として、何らかの病原体の持続感染によるサイトカイン類の異常産生とこれに続発する免疫系及び神経系の異常な反応が考えられている。本研究では、このような仮説に基づき、CFSの原因又は病状と関連性があると思われる微生物の同定を試みた。その結果、CFS患者の臨床検体中からのウイルス、マイコプラズマ等の分離・同定は出来なかった。

(2) 研究目的 : 研究を実施した目的

慢性疲労症候群(CFS)の病態の重要な特徴として、持続的なサイトカインの異常産生が挙げられる。この以上産生のメカニズムとして、何らかの微生物の持続感染によるサイトカイン類の異常産生とこれに続発する免疫系及び神経系の異常な反応が考えられている。本研究は、このような仮説に基づき、CFSの原因又は病状と関連性があると思われる微生物を同定することを目標としている。

具体的には、CFS患者の臨床検体中に存在するウイルス、マイコプラズマ等の分離・同定を試みることに及び、CFSとの関連の可能性が報告されているウイルス、マイコプラズマがどの程度の割合で、本邦に置けるCFSとかわりがあるのかについて検討することであった。

(3) 研究方法 : 試験研究の実験手法等

i) マイコプラズマ感染と CFS との関係。

湾岸戦争後症候群として知られる CFS において、高頻度のマイコプラズマ感染が見られるという報告がある[1]。我々は、国内の CFS 患者においても同様の所見が得られるかどうかの検討を行った。方法としては、*M. genus*, *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. penetrans* の DNA の検出を、患者の抹消血単核球に対して PCR を行うことによった。使用した PCR プライマーは、それぞれ *M. genus* : 5'-

GGGAGCAAACAGGATTAGATACCC-3'、
5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC-3'、 M. hominis : 5'-
ATACATCGATGTGCGAGCGAG-3'、 5'-CATCTTTTAGTGGCGCCTTAC-3' M.
fermentans : 5'-GGACTATTGTCTAAACAATTTCCC-3'、
5'-GGTTATTCGATTTCTAAATCGCCT-3'、 M. penetrans
5'-CATGCAAGTCGGACGAAGCA-3' 5'-AGCATTTCTCTTCTTACAA-3' 5'--3'
を用いた。末梢血単核球を分離し、この細胞から DNA を調製した。調製した DNA 1
μl を鋳型に 15μl の反応液で PCR を行い反応液 5μl をアガロースゲル電気泳動を
行った。48 検体に関して上記の PCR 検査を行った。

ii) 慢性疲労症候群患者からのウイルス分離。

CFS には、発熱、リンパ節腫脹、家族性の発症が見られるなど、急性のウイルス感染を思わせる所見も多い。これまでに報告されている以外のウイルスの感染を検討するために、CFS 患者からのウイルス分離を試みた。方法は、ヒトヘルペスウイルス(HHV-)6、HHV-7、HIVなどを血中より分離するのと同様の方法で、末梢血単核球分画を IL-2 及び PHA で刺激し、臍帯血単核球と共培養した後、細胞変性効果を観察することによった。70 例の CFS 患者血球に関して、分離を試みた。

iii) HHV-6 の中枢神経系における潜伏感染・再活性化

また、同時に HHV-6 の潜伏感染・再活性化と中枢神経系疾患との関係を検討する目的で、HHV-6 の中枢神経系における潜伏感染の機序に関する研究が当教室の助教授である、近藤らによって行われた。HHV-6 の脳内における潜伏感染・再活性化は、近藤らによって行われた研究により、反復性の熱性痙攣の原因であることが示されていたが[2]、最近、これに加えて、多発性硬化症などの神経疾患との関係が疑われている[3]。研究方法としては、近藤らが発見した、マクロファージにおける潜伏感染で発現する 4 種類の HHV-6 潜伏感染関連遺伝子の発現を、RT-PCR 法をもちいて、事故死した正常人の脳において検討した。また、*in vitro* においては、グリア細胞株及び初代培養アストロサイトに HHV-6 variant B を感染させた系に関して、ウイルス増殖と遺伝子発現を検討した。この際、潜伏感染特異的なプロモーターの活性を 5'-RACE 法の変法を用いて検討した。さらに、HHV-6B を感染させたグリア細胞を様々なサイトカイン類や増殖因子で刺激し、ウイルス再活性化に対する影響を検討した。

(4) 研究成果：

i) マイコプラズマ感染と CFS との関係。

48検体に関して検査を行ったが、結果はいずれのマイコプラズマに対しても陰性であった(図1A,1B,1C,1D)。マイコプラズマ陽性コントロールに対するPCRの結果は陽性であった。

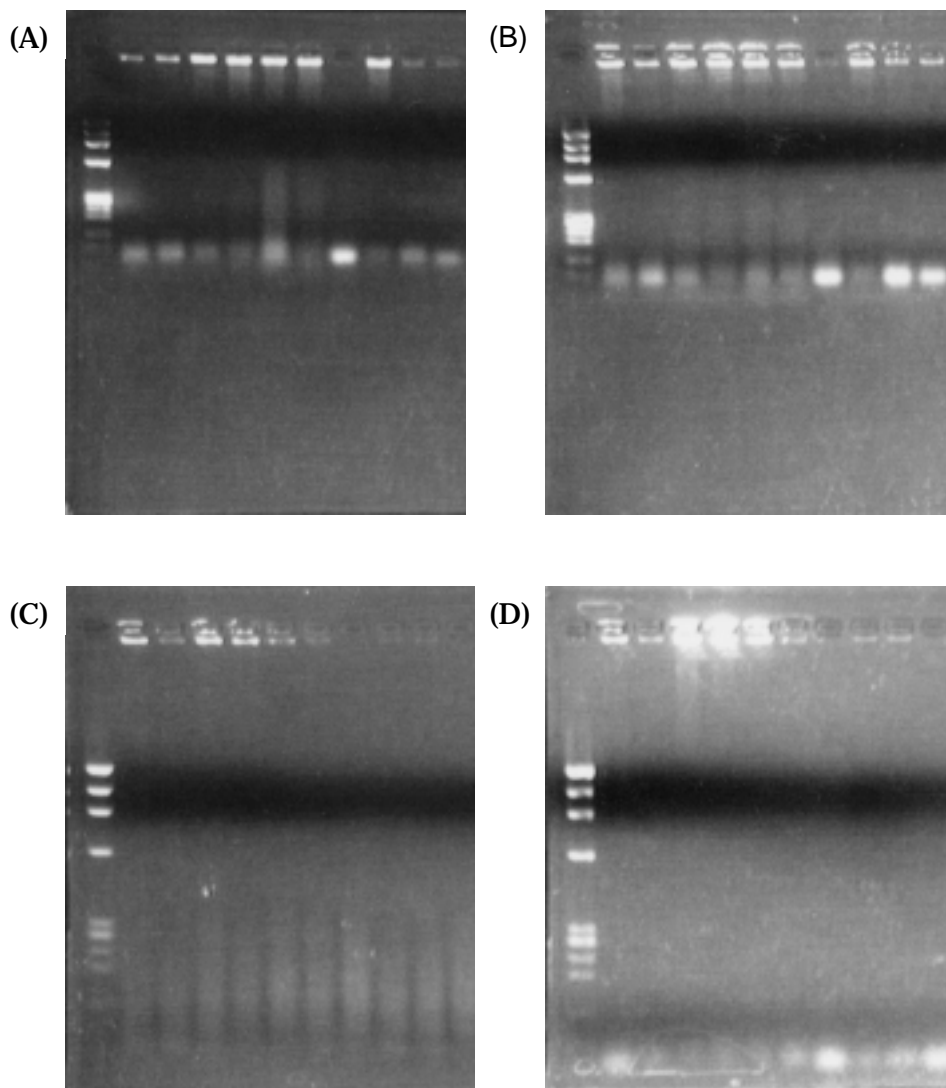


図1：PCR法による末梢血中からのマイコプラズマDNAの検出

図はそれぞれ、1A: *M. genus*; 1B: *M. hominis*; 1C: *M. fermentans*; 1D: *M. penetrans*を示す。

ii) 慢性疲労症候群患者からのウイルス分離。

70検体の慢性疲労症候群患者抹消血約3mlに対して、上記の培養条件にて約1ヶ月間の培養を行った。2例において、細胞のバルーニングが少数観察されたが、臍帯血単核球との共培養によって、この変性細胞の数を増加させることは出来ず。結果的にdilute out されてしまった。その他の検体では、ウイルス感染による細胞変性効果を思わせる細胞の変形は観察されなかった。

iii) HHV-6 の中枢神経系における潜伏感染・再活性化

1. 脳組織(10⁷細胞)において、4種類のHHV-6潜伏感染特異的遺伝子の発現を検討したところ10例中7例で陽性であった。さらに、この発現は、マクロファージにおける発現と種類及び発現量に差が見られなかった。
2. アストサイトの細胞株にHHV-6Bを感染させたところ、ウイルスの増殖は見られず、潜伏感染関連遺伝子の発現が見られた。また、この細胞においては、潜伏感染特異的プロモーターが前初期遺伝子IE1のプロモーターに比較して優位に活性化されていることが判明した。同様の現象は、初代培養アストロサイトにおいても観察された。

(5) 考 察 :

i) マイコプラズマ感染とCFSとの関係。

今回我々が行ったPCR法を用いた研究では、米国において報告されたマイコプラズマの感染は、CFS患者において認められなかった。この結果をもたらせた要因として、以下の可能性が考えられた。

1. 米国におけるマイコプラズマの検出は、湾岸症候群と呼ばれる、ストレスによって誘導されるCFSの1亜型にのみ見られるもので、本邦におけるCFSには当たらない。
2. 行った検査が4種類のマイコプラズマに限られていたために、CFS患者の末梢血中にあるマイコプラズマを見逃した。
3. 行ったPCR検査がsingle PCR法に限られていたため、十分な感度が得られず、CFS患者の末梢血中にあるマイコプラズマを見逃した。

このいずれの可能性が正しいかについては、更なる検討が必要であると考えられた。

ii) 慢性疲労症候群患者からのウイルス分離。

今回我々が行ったウイルス分離では、CFS 患者からのウイルスの分離は出来なかった。この原因については、以下の可能性が考えられる。

1. CFS 患者において、末梢血中でウイルス分離が可能なウイルスは存在しない。
2. 我々が用いた方法は、主として CD4 陽性の T 細胞で完全増殖を示すウイルスを分離培養する方法である。このため、もし CFS 患者の末梢血中にウイルスがいたとしても、これが CD4 陽性の T 細胞で増殖しない場合は、検出することが出来ない。このため、このようなウイルスが血中に存在していた可能性は残る。
3. 我々が用いたのと同様の方法を用いて、健常成人より、ヒトヘルペスウイルス 7 (HHV-7) が発見されている。今回我々が行ったウイルス分離では、HHV-7 は検出されなかった。このことは、今回のウイルス分離の感度があまり高くはなかったことを示している。

以上より、今回の研究においてウイルス分離が出来なかったことは、必ずしも CFS 患者の末梢血中に分離可能なウイルス感染（主として増殖性の感染）がないことを意味しない。結論を得るためには、更なる検討が必要なものと思われる。

iii) HHV-6 の中枢神経系における潜伏感染・再活性化

これらの結果から、中枢神経における HHV-6 の潜伏感染に関して、HHV-6 は、中枢神経系においては、グリア細胞であるアストロサイトで潜伏感染・再活性化を成立させていることが判明した、HHV-6 がマクロファージで潜伏感染・再活性化することは、既に近藤らにより報告されており、グリア細胞であるマイクログリアにおける HHV-6 の潜伏感染・再活性化が生じる可能性も大きい。近藤らは、これらの細胞におけるウイルスの潜伏感染・再活性化と、CFS との関係が重要であると考えている。

(6) 引用文献：

[1] A. Vojdani , P.C. Choppa , C. Tagle et al :

Detection of Mycoplasma genus and Mycoplasma fermentans by PCR in patients with Chronic Fatigue Syndrome. FEMS Immunol Med Microbiol 22:355-65, 1998

[2] K. Kondo K, H. Nagafuji, A. Hata et al. : Association of human herpesvirus 6

infection of the central nervous system with recurrence of febrile convulsions.
J Infect Dis 167:1197-200, 1993

- [3] S.S.Soldan, R. Berti, N. Salem et al : Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. Nat Med 3:1394-7, 1997

(7) 成果の発表

1) 原著論文による発表

ア) 国内誌

倉恒弘彦、近藤一博、生田和良、山西弘一、渡辺恭良、木谷照夫：感染症の新しい展開 慢性疲労症候群 日本内科学会誌題 9 0 卷 1 2 号 (2001)

イ) 国外誌

1. K. Kondo, K. Shimada, J. Sashihara, K et al.: Identification of human Herpesvirus 6 latency-associated transcripts. J Virol.;76(8): 4145-4151, 2002
2. K. Kondo, T. Kondo, K. Shimada et al: Strong interaction between human herpesvirus 6 and peripheral blood monocytes/macrophages during its acute infection. J Med Virol;67(3):364-9., 2002
3. Y. Hirata, K. Kondo and K. Yamanishi.: Human herpesvirus 6 down-regulates major histocompatibility complex class I in dendritic cells. J Med Virol.;65:576-83, 2001
4. Y. Mori, P. Dhepakson, K. Yamanishi et al.: Expression of human Herpesvirus 6B rep within infected cells and binding of its gene product to the TATA-binding protein in vitro and in vivo. J Virol.; 74(13): 6096-6104, 2000.
5. K. Tanaka-Taya, K. Kondo, K. Yamanishi et al: Reactivation of human herpesvirus 6 by infection of human herpesvirus 7. J Med Virol.; 60(3) : 284-289, 2000.
6. T. Taniguchi, K. Kondo, K. Yamanishi et al.: Structure of transcripts and proteins encoded by U79-80 of human herpesvirus 6 and its subcellular localization in infected cells. Virology; 271(2): 307-20, 2000.

2) 原著論文以外による発表: なし

3) 口頭発表

ア) 招待講演

近藤一博: 特別講演「ヘルペスウイルス感染と病気」

第7回慢性疲労症候群(CFS)研究会 2002年2月

近藤一博: 「Overview セミナー-HHV-6, 7」

第49回日本ウイルス学会・学術集会総会 2001年11月

イ) 応募・主催講演等

近藤一博、嶋田 和也、天羽 清子、山西弘一:

「HHV-6 と慢性疲労症候群の関係」

第49回日本ウイルス学会・学術集会総会 2001年11月

近藤一博、黒木尚長、山西弘一:

「HHV-6 の中枢神経系における潜伏感染の機序」

第48回日本ウイルス学会・学術集会総会 2000年10月

4) 特許等出願等: なし