

# 学位論文審査結果の要旨

令和7年7月21日

学位論文題目： ウイルス感染に伴う Brain fog に対するブタ肝臓分解物の有用性の検討  
～Long Covid に対する新たなアプローチ～

学位申請者 佐藤 郁也

審査委員 主査 松田 佳和 

副査 櫻田 誓 

副査 高野 文英 

(論文の内容の要旨)

豚肝臓分解物(PLDP)は長谷川式簡易知能評価スケール改訂版(HDS-R)及びウェクスラー記憶検査改訂版(WMS-R)において、認知機能の総スコアを改善させ LPS 刺激を受けたマクロファージ様細胞 RAW264.7 細胞からの IL-1 $\beta$  の産生を抑制し、その機序として M2 型マクロファージへのシフトすることを明らかにした。また、この活性は PLDP の脂質画分である PEL で認められたことから、PLDP による慢性炎症の制御は PEL が主役を担っている可能性も示唆している。一方、PLDP に関する *in vivo* による知見は現状では殆どないと言える。その理由として、PLDP を評価する適切な病態モデルが無かったことが挙げられる。そこで病態の発症機序に IL-1 $\beta$  が関与しているホルマリン誘発性炎症モデルにおける PLDP の効果を検討した結果、30 分前の 1 回投与で第 2 相反応を抑制することを確認している。COVID-19 による Brain fog を想定した LPS 誘発炎症モデルにおける PLDP の効果を検討したところ、5 日間の連続経口投与で、LPS 投与による異常行動や IFN- $\gamma$  の上昇を改善する結果が得られた。

以上の結果から、PLDP は COVID-19 後の Brain fog を改善させる可能性が示唆された。Brain fog に対する有効な治療法がない状況下での重要な第一報と考えている。

(論文審査の結果の要旨)

学位申請者の論文は、「LPS 誘発炎症モデルおよびホルマリン疼痛試験を用いた豚肝臓分解物(PLDP)の抗炎症および疼痛抑制効果の評価」を主題とし、COVID-19 後遺症(Long COVID)に関連する神経炎症への臨床応用の可能性を探る論文である。申請者は、LPS 誘発炎症モデルを用いて PLDP が炎症性サイトカイン(特に IL-1 $\beta$ )の分泌を抑制し、マクロファージの M2 型への分化を誘導することを示している。また、ホルマリン疼痛試験では、第 2 相の疼痛の有意な抑制が確認され、PLDP が炎症性疼痛に対して有効であることを明らか

にしている。特に、この研究は、PLDP の主要成分であるリン脂質が抗炎症作用を発揮するメカニズムを解明するとともに、その効果を *in vitro* および *in vivo* モデルの両方で実証している点で優れている。

これらの結果から、PLDP が従来の抗炎症薬に比べて、副作用の少ない天然物由来の治療法として期待できることを示唆している。さらに、この研究は COVID-19 後遺症の一症状である Brain Fog の治療につながる可能性を持つ点で、社会的意義も非常に高いと評価できる。本研究の新規性は、以下の点にある。第一に、豚肝臓分解物という未利用資源に焦点を当て、その抗炎症作用を科学的に検証した点があげられる。PLDP の効果が示された研究は少なく、その作用メカニズムにまで踏み込んだ研究は本論文が初めてと言える。第二に、炎症モデルとして LPS 誘発炎症モデルに加え、ホルマリン疼痛モデルを組み合わせることで、炎症性疼痛に対する PLDP の効果を多角的に評価している点である。このような多面的なアプローチは、効果の再現性を高めるとともに、PLDP の応用範囲を広げるための有用な基盤を提供している。

また、本研究の優れている点は、基礎研究としての科学的な意義だけでなく、実用化への視点も考慮している点である。実際の医薬品開発やサプリメントとしての応用可能性を視野に入れた研究設計となっており、特に、COVID-19 後遺症のような未解決の医療課題に対する新しい治療戦略を提案する点は、高く評価できる。

しかしながら、本研究では、LPS 誘発炎症モデルやホルマリン疼痛試験といった急性炎症や疼痛モデルを用いており、Long COVID のような慢性的な病態を完全に再現しているわけではない。今後は、慢性炎症モデルやウイルス感染モデルを併用することで、さらに実際の臨床病態に近い知見を得ることが求められる。

以上の審査から、本学位論文は、PLDP の抗炎症作用と疼痛抑制効果を科学的に解明し、COVID-19 後遺症の治療法開発に向けた新たな可能性を提示した点で、独創性と実用性の両面において優れた研究成果であると言える。

以上のことから主査、副査は一致して本論文を学位論文として価値があるものと認めた。

#### (最終試験の結果の要旨)

最初に主査は、「佐藤郁也」に本研究の概略を述べさせた。次いで、主査・副査と「佐藤郁也」との間に次のような質疑応答が行われた。

問: PLDP が LPS 誘発炎症モデルにおいて効果を示した主なメカニズムは何であるか？

また、このメカニズムが Long COVID の病態にどのように関連するのか？

答: 第 1 のメカニズムとして、PLDP は LPS 刺激を受けたマクロファージからの NO や IL-1 $\beta$  の産生を抑制する。第 2 に、PLDP はマクロファージの M1 型から M2 型へのシフトを誘導する。

これら 2 つの要因により、PLDP は神経の炎症や慢性炎症を抑制する上で重要な役割を果たしていると考えられる。Long COVID との関連性については、感染後に炎症性サイトカインの過剰産生が脳に影響を及ぼし、神経炎症が生じていることが報告されている。この神経炎症は、ミクログリアの活性化により炎症性サイトカインが放出されることが一因と考えられ、それがブレインフォグや倦怠感と深く関連していると考えられる。したがって、今回明らかになった PLDP の M2 型マクロファージへの誘導作用によって、このような炎症を抑制し、神経機能を正常化することで、Long COVID によるブレインフォグや倦怠感の改善に寄与する可能性が示唆される。

問: ホルマリン疼痛試験において、PLDP はどのような疼痛反応を抑制したのか？

その結果をどのように解釈するのか？

答: 今回、PLDP が第 2 相反応を有意に抑制したことから、炎症性疼痛の段階において、PLDP が疼痛反応を抑

制していると考えられる。第 2 相反応では局所的な炎症メディエーターが重要な役割を果たしていると考えられる。その中で、今回の *in vitro* の研究で PLDP が IL-1 $\beta$  を抑制したことから、このサイトカインを抑えることで疼痛閾値を上げた可能性が示唆される。一方で第 1 相反応には影響が見られなかったという結果から、PLDP の作用は主に炎症に伴う二次的な疼痛をターゲットとした鎮痛効果を発揮している。

問: PLDP の効果が認められた *in vitro* および *in vivo* モデルの限界をどのように評価し、今後の研究にどのように活かすのか？

答: 本研究の限界の評価

① *in vitro* の限界: LPS 刺激を使用したマクロファージ培養モデルはシンプルな系であり、複雑な生体反応(血液脳関門や多様な細胞間相互作用)を再現できない。

② *in vivo* の限界: LPS 誘発モデルは炎症反応の評価に有用であるが、慢性疾患や感染後にみられる複雑な神経症状を完全に反映するものではない。

今後の研究に向けた活用

① 感染後の慢性炎症モデルや脳内サイトカイン動態を反映するモデルを構築する必要がある。

② PLDP や PEL の投与量、投与期間、投与方法を最適化するための検討が必要

③ PLDL の成分ごとの作用機序を詳細に解析し、相乗効果の可能性を検証する。

問: 実験デザインにおいて、LPS 誘発モデル以外のモデルを選択しなかった理由を教えてください(LPS 誘発モデルが他のモデルと比較し、良い点と悪い点)。また、他のモデルを用いるとすればどのような可能性が考えられるか？

答: LPS モデルを用いた理由の一つとして、多くの実績データが蓄積されている点が挙げられる。LPS モデルの限界については十分認識しているが、例えばポリ IC モデルの方が適している可能性もあると考えている。ただし、ポリ IC モデルと LPS モデルの結果にどの程度の違いがあるのかについては、既存の文献を調査したところ、どちらを用いても大きな差はないとの報告もある。そのため、この点については今後さらなる実験を通じて検討を進める必要があると考えている。今回 LPS モデルを選択した背景としては、特にマクロファージの炎症応答をターゲットとする研究目的に適していることが挙げられる。LPS モデルはこの分野で広く利用されており、信頼性のあるバックグラウンドを持つモデルであると判断した。また、COVID-19 感染者で見られるサイトカインストームの病態を研究する上でも LPS モデルは非常に有用なツールであると考えている。以上を踏まえ、LPS モデルを用いたことには十分な理由があると考えているが、今後はポリ IC モデルなど他のモデルも含めて比較検討を進めていきたいと考えている。

問: LPS の濃度を 100ng/mL で実施しているが、一般的には高濃度と考える。通常であれば、1ng/mL より対数的に増加させ、濃度を振って実施をした方が良いと考えるが、この点どのように考えるか？

答: 今回の試験は予備的検討でもあるため、これまでの過去のデータに基づき、LPS 濃度を 100ng/mL で実施しました。ご指摘のように、Long-Covid で想定される脳炎症は軽度なものであるため、低 LPS 濃度での実施が適している可能性があるが、今後、実施等については要検討したいと思います。

問: サイトカインについては、IL-1 $\beta$  のみ今回は検討しているが、経時的変化と TNF など他のサイトカインについても検討した方が良いと考える。

答: 今回は NO の産生抑制、IL-1 $\beta$  の産生抑制が確認できたので、次のステップとして実施を検討します。

問: ホルマリンテストに関して、ジクロフェナクなどの陽性対照を設定した方が良かったと考えるが、この点について見解を述べよ。

答:ご指摘の通り、陽性対照を設定することで PLDP の鎮痛効果、抗炎症効果の相対的な比較が可能だったと考えます。今回のホルマリンテストの結果は、今後の詳細な投与条件等の基礎的なデータが得られたと考えていますので、今後、PLPD の特性を評価する上で、適切な陽性対照の設定(ジクロフェナクなどの NSAID の適切性、神経保護作用のある薬剤のセレクションなどを含む)を検討して参ります。

問:LPS 誘発による炎症モデルの状態について、いわゆるエンドトキシンショックが起きている状況と推察されるが、その場合、PLDP の有効成分と考えられる PC や LPC が BBB の破綻により、直接作用していると考えられるが、どう考えるのか? PC や LPC のバイオアベイラビリティの観点も踏まえ、説明してほしい

答:PC の経口投与によるバイオアベイラビリティは 90%以上であるという報告があります。LPC の構造式を踏まえると PC と同様の BA があると考えています。ご指摘の通り、LPS の投与により BBB の破綻が起きている可能性はありますが、LPS 投与 24 時間後にはサイトカイン濃度が改善していることから、BBB の破綻は一時的なものと考えています。

問:PLDP がマクロファージの M1 から M2 へのシフトを促進している結果が得られているが、セカンドメッセンジャーを介した機序等についてはどのように考えるのか?

答:PLDP の活性本体と考えている LPC について、敗血症モデルにおける抗炎症効果は能動的 HMGB1 産生抑制作用によること、さらには、G タンパク共役型である G2A を介したものであることが報告されているため、これらの作用を介した作用機序があると考えています。

以上のように質問に対する応答は概ね適切であり、本研究の遂行に十分な学力を有しているものと認めた。