

日本薬科大学 学位論文 (2025 年度)

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～

*“Investigation of the efficacy of porcine liver degradation
products for brain fog associated with viral infection”*

~A New Approach to Long Covid~

主指導教員：松田 佳和 教授（臨床薬学領域）

佐藤 郁也（学籍番号：217003）

本論文で使用した略号一覧表

ACh	Acetylcholine (アセチルコリン)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)
CFT	Category fluency task (カテゴリー流暢性課題)
COVID-19	CoronaVirus Infectious Disease, emerged in 2019 (新型コロナウイルス感染症)
HDS-R	Hasegawa Dementia Scale-Revised (改訂長谷川式簡易知能評価スケール)
IFN	Interferon (インターフェロン)
IL	Interleukin(インターロイキン)
IL-1ra	Interleukin 1 receptor antagonist (IL-1 受容体拮抗薬)
LPA	Lysophosphatidic acid (リゾホスファチジン酸)
LPC	Lysophosphatidylcholine (リゾホスファチジルコリン)
LPE	Lysophosphatidylethanolamine (リゾホスファチジルエタノールアミン)
LPG	Lysophosphatidylglycerol (リゾホスファチジルグリセロール)
LPI	Lysophosphatidylinositol (リゾホスファチジルイノシトール)
LPS	Lipopolysaccharide (リポポリサッカライド)
MAP	Mitogen-Activated Protein Kinase (マイトジェン活性化蛋白質リン酸化酵素)
MMSE	Mini-Mental State Examination (ミニメンタルステート検査)
MoCA	Montreal Cognitive Assessment (簡易知能検査)
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B (核内因子 κ B)
NO	Nitric Oxide (一酸化窒素)
PA	Phosphatidic acid (ホスファチジン酸)
PC	Phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)

PE	Phosphatidylethanolamine (ホスファチジルエタノールアミン)
PEL	Porcine liver protease degradation products Extracted Lipids (ブタ肝臓分解物抽出脂質)
PET	Positron Emission Tomography (陽電子放出断層撮影)
PG	Phosphatidylglycerol (ホスファチジルグリセロール)
PI	Phosphatidylinositol (ホスファチジルイノシトール)
PLDP	Porcine Liver Decomposition Product (豚肝臓分解物)
PLDP	Porcine Liver protease Degradation Products (ブタ肝臓分解物)
poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic acid (ポリイノシン酸-ポリシチジル酸)
PS	Phosphatidylserine (ホスファチジルセリン)
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2 (SARS コロナウイルス 2)
SM	Sphingomyelin(スフィンゴミエリン)
TG	Triacylglycerol (トリアシルグリセロール)
TLR	Toll-Like Receptor (Toll 様受容体)
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α (腫瘍壊死因子 α)
VFT	Verbal fluency task (言語流暢性課題)
WMS-R	Wechsler Memory Scale-Revised (ウェクスラー記憶検査改訂版)

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

- 1) Anti-neuroinflammatory potential of porcine liver decomposition products in improving behavioral abnormalities: Effects on formalin- and LPS-induced inflammation

学術誌名 Biomedical Reports (2025年6月12日受理)

著者 Ikuya Sato, Tomoji Maeda, So Katsuyama, Takahiro Kawase, Teppei Kaku, Toru Takahashi, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, Takamitsu Tsukahara, and Yoshikazu Matsuda

共著者として発表したその他の論文

- 1) Pork Liver Decomposition Product May Improve Frontal Lobe Function in Humans-Open Trial

学術誌名 Brain Science

巻、号、頁 14, 586.

発行年月日 2024年

著者 Miiru Suzuki, Ikuya Sato, Masatsugu Sato, Hideki Iwasaki, Takahiro Saito, Masahiko Kimura, Kenichi Sako, Tomoji Maeda, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, and Yoshikazu Matsuda

- 2) AH2C の薄毛男性に対する有効性評価：ランダム化二重盲検比較試験

学術誌名 日本臨床皮膚外科学会雑誌

巻、号、頁 Vol32、No2、45-52 頁

発行年月日 2023年

著者 柳澤正之、杉本孝之、馬場香子、増田健二、高橋秀樹、中西美咲、鈴木美威瑠、佐藤郁也、佐藤将嗣、岩崎英毅、齊藤貴弘、松田佳和、勝田啓、佐藤明男

目次

第1章	序論	6
1.1	背景と目的	6
1.2	研究の必要性	9
1.3	本研究の位置づけ	10
第2章	PLDPの研究経緯	11
2.1	PLDPの概念と定義	11
2.2	これまでの研究成果	12
第3章	PLDP/PELによるIL-1 β 及びNOの産生抑制 (<i>in vitro</i>)	17
3.1	実験方法	17
3.2	結果	21
3.3	考察	24
第4章	PELによるマクロファージ系細胞に対する作用の検討 (<i>in vitro</i>)	26
4.1	実験方法	26
4.2	結果	27
4.3	考察	28
第5章	PLDPによるホルマリン鎮痛試験の効果 (<i>in vivo</i>)	30
5.1	実験方法	30
5.2	結果	32
5.3	考察	33
第6章	LPS誘発炎症モデルにおけるPLDPの効果 (<i>in vivo</i>)	34
6.1	実験方法	34
6.2	結果	38
6.3	考察	42
第7章	研究成果の総括	45
第8章	引用文献	52
第9章	謝辞	55
第10章	利益相反	56

第1章 序論

1.1 背景と目的

認知機能の低下や神経疾患の進行には脳炎症が関与していることが知られている。特に、脳炎症と認知機能障害の関連性を述べるためにはミクログリア細胞の役割が重要である。ミクログリアは脳内に存在するグリア細胞の一つであり、免疫機能を担う常在型組織マクロファージとして、炎症性メディエーターの産生と放出、さらには貪食機能を有している。ミクログリアは神経変性疾患における中枢神経系の炎症反応において中心的な役割を果たしている。例えば、ミクログリアの過剰な活性化や炎症性サイトカインの放出により、神経細胞の損傷や認知機能の低下を引き起こすことや、ミクログリアによる神経毒性の分子機構について、細胞内シグナル伝達経路や炎症性分子の役割について解明されている。特に、NF- κ B や MAP キナーゼ経路などのシグナル伝達経路が、ミクログリアの活性化や炎症性サイトカインの産生に重要な役割を果たしている¹⁾。また近年、SARS-CoV-2(新型コロナウイルス感染症)に罹患した患者は多くの場合、後遺症を残さず治癒するが、中には急性期を過ぎた後にも全身的症状や下痢などの消化器系、心血管系、精神神経系など症状が持続することがあり、Long Covid と呼ばれたりする。特に、全身倦怠感や Brain Fog²⁾と呼ばれる感染後長期にわたり症状が持続する患者(発症・診断・入院後 60 日以上あるいは急性期

からの回復・退院後 30 日以上経過しても症状が持続している患者) について、9,751 例のシステマティックレビューが報告されているが、1 つ以上の症状が持続している患者の割合は 72.5%であると報告されている³⁾。また 25,031 例のシステマティックレビューでは、感染後も何らかの症状が持続している患者の割合は 54.0%と報告されており、6 か月以上の長期間にわたって一定割合で存在している⁴⁾。症状としては、疲労・倦怠感(40.0%)、息切れ(36.0%)、睡眠障害・不眠(29.4%)、記憶障害(28.3%)、不安(22.1%)、集中困難(22.0%)、嗅覚障害(23.6%)、認知機能障害(17.6%)、味覚障害(15.6%)、うつ(14.9%)など、精神神経症状に関する事象が多い⁴⁾。これらの症状のうち、大脳に起因する症状を表す言葉として"brain fog"という用語が用いられている。Brain fog はぼーっとした感覚を指す一般用語で、記憶ができない、集中できないなどの認知機能に関する症状をいう²⁾⁵⁾。Brain fog は、慢性疲労症候群の一部として扱われている場合もある。慢性疲労症候群とは、6 か月以上続く、のどの痛み、新規発症の頭痛、持続的な筋痛・関節痛・筋力低下・疲労、易疲労性、集中困難、忘れやすさ、不眠、リンパ節の痛みなどを呈する疾患である。COVID-19 感染後の慢性疲労症候群は、患者の年齢とは関連がないが、女性、COVID-19 急性期の症状の数が多く、急性期の精神神経症状(めまい、頭痛、四肢筋力低下)が発症の予測因子となりうる⁶⁾。軽度の認知機能障害のスクリーニングに用いられる簡易認知

機能検査 Montreal Cognitive Assessment (MoCA) を用いた場合、急性期の精神神経症状が MoCA の低スコアと関連し、特に遅延再生の項目で低下していたが、COVID-19 急性期の症状の数や重症度とは関連していなかったと報告されている⁷⁾。また、COVID-19 後に疲労感を発現した患者の神経精神機能を評価すると、アパシー、遂行機能障害など全般的認知機能の低下がみられたと報告されている⁷⁾。

ヒトが COVID-19 やインフルエンザなどのウイルスに感染した際、急性炎症が引き起こされるが、炎症が生じると、インターロイキン (IL) -1β などの炎症性サイトカインやインターフェロン (IFN) などの抗ウイルス性サイトカインが末梢で産生される。ヒトでは末梢感染において、発熱のみならず、抑うつ症状と呼ばれる異常な心理的・身体的負担を感じることもある。これらは、初期には食欲不振や疲労感という症状として現れるが、後期になると認知機能障害として現れる⁸⁾¹⁰⁾。これらのことから、末梢で産生されるサイトカインが脳の炎症を引き起こし、脳機能に影響を及ぼすことが示唆される。脳におけるサイトカインの発現もまた、抑うつ症状に関与していると考えられている。最近の研究では、神経炎症と呼ばれるこの神経免疫学的反応が、様々な神経疾患の重要な前駆現象であることが明らかになっている¹¹⁾¹²⁾。これらの観察から、神経炎症の誘発と抑制のバランスをとることで健常な脳機能が維持されるために重要である¹³⁾。

1.2 研究の必要性

我々のグループは、豚肝臓分解物（PLDP）の認知機能に与える影響について研究を進めてきた。これまでの知見として、PLDP から抽出されたリゾリン脂質が、マウス由来のミクログリア細胞の活性化を促進し、ミクログリアの活性化は、炎症性サイトカインの産生や細胞内カルシウム濃度の上昇など、典型的な活性化マーカーの増加と関連していることを報告している¹⁴⁾。また、PLDP に含まれる成分がミクログリアの活性を調節し、神経炎症を抑制する可能性があることが示唆されている。すなわち、PLDP は神経変性疾患におけるミクログリアの機能を調節することで、神経炎症を軽減し、脳認知機能障害の進行を抑制する可能性がある。非認知症患者が PLDP を含むサプリメントを摂取し、認知機能に対する有効性を検討したプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験では、PLDP 群では、プラセボ群と比較して認知機能に有意な改善が見られたこと、特に注意集中力や情報処理速度の向上がみられ、QOL の向上も示された¹⁵⁾。また、健康な 40 歳以上の成人を対象に、PLDP を 4 週間経口摂取した際の、視覚記憶と遅延記憶への影響を検討したプラセボ対照二重盲検ランダム化比較試験では、プラセボ群と比較し、視覚記憶および遅延記憶の向上が観察され、特に、視覚的な情報の記憶力や、時間の経過後に情報を回想する能力において、有意な改善がみられている¹⁵⁾。

1.3 本研究の位置づけ

上述のとおり、PLDP は認知機能を改善する可能性、すなわちミクログリアを介した脳炎症性神経変性疾患に対する新しい治療法としての可能性がある。現在までのところ、COVID-19 やインフルエンザなどのウイルスに感染した際に引き続き起こる、Brain Fog や全身倦怠感などを引き起こす炎症に対する PLDP の有効性について、メカニズムを含め明確な知見は得られていない。今回、我々は PLDP のマクロファージを介した炎症を抑制する可能性を検討するため、*in vitro* 試験として①PLDP 及び活性本体と考えられる PLDP 由来脂質分画 (PEL) による NO 及び IL-1 β の産生抑制、それに続き、②PEL によるマクロファージ系細胞の活性化作用の検討をした。また、*in vivo* 試験として③ホルマリン鎮痛試験における PLDP の効果、④LPS 誘発炎症モデルにおける PLDP の効果について研究を進め、PLDP の Long-Covid 及び Brain fog に対する効果について検討を行った。

第2章 PLDP の研究経緯

2.1 PLDP の概念と定義

PLDP は、豚肝臓を分解処理することで得られる生成物であり、食品工業や医薬品分野において注目されている物質である。豚肝臓は、タンパク質、ペプチド、必須アミノ酸、ビタミン B 群、鉄や亜鉛などのミネラルを豊富に含む一方¹⁷⁾、生の状態では独特の風味や生臭みが強く、そのままの形での活用には限界がある。この問題を克服する手段として、酵素による分解や発酵を用いることで生成される PLDP が有効とされており、栄養価を保持しつつ摂取しやすい形態へと変換される点が評価されている。PLDP の製造過程においては、タンパク質が酵素反応により短鎖ペプチドや遊離アミノ酸に分解される。この分解プロセスは、栄養素の吸収効率を向上させるとともに、生理活性物質の形成を可能にする。特に、抗酸化作用を有するペプチドや免疫機能を調節する成分の生成が確認されており、PLDP は栄養補給素材にとどまらず、健康機能性食品や医薬品の基材としての利用が期待されている^{18) 19)}。また、PLDP は持続可能な資源利用の観点からも重要な意義がある。豚肝臓は畜産副産物として大量に生産されるが、食用に用いられるのは一部であり、その多くが廃棄されているのが現状である²⁰⁾。PLDP の製造によって、この未活用資源を高付加価値の生成物へと転換することが可能となり、食品廃棄物の削減や環境負荷の軽減にも貢献できると

考えられる。

すなわち、PLDP は食品資源の効率的利用に向けた有力な手段の 1 つとも考えられる。さらに、PLDP の化学的特性も食品や医療分野での応用展開されている。医療用途においては、動物モデルやヒト試験の結果に基づき、免疫調節作用や抗炎症作用が示唆されており、慢性疾患の予防や治療補助に向けた応用可能性が議論されている²¹⁾。

以上のように、PLDP は栄養価の高さや機能性に加え、環境保全および食品工業における経済性向上の観点からも重要な意義を持つ物質である。本研究では、PLDP の特性をさらに詳細に解明し、その応用可能性を探求することを目的としている。

2.2 これまでの研究成果

1. PLDP の成分分析と機能性評価

PLDP の化学組成に関する研究においては、特定の生理活性ペプチドやアミノ酸、微量元素が同定されている。これらの成分が抗酸化作用および抗炎症作用、さらには免疫系の調節に関与する可能性が示唆されている。当教室では、液体クロマトグラフィー質量分析法によって、PLDP 中のリン脂質の定量的な解析を実施した。その結果、PLDP にはホスファチジルコリン (PC) が最も多く含まれており、次いでリゾホスファチジルコリン (LPC)、ホスファチジルエタノー

ルアミン (PE) が含まれていた。また、PLDP には 24 種類の PC、17 種類の LPC、18 種類の PE、17 種類のリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、23 種類のホスファチジン酸 (PA)、13 種類のリゾホスファチジン酸 (LPA)、18 種類のホスファチジルセリン (PS)、15 種類のリゾホスファチジルセリン、20 種類のホスファチジルイノシトール (PI)、15 種類のリゾホスファチジルイノシトール (LPI)、15 種類のホスファチジルグリセロール (PG)、11 種類のリゾホスファチジルグリセロール (LPG) 及び 10 種類のスフィンゴミエリン (SM) が分子種として含まれていることを確認した。その中で、diacyl 34:1 PC、diacyl 34:2 PC、LPC は acyl 18:0 LPC、acyl 18:2 LPC、PE は diacyl 34:4 PE が多く含まれており、これらの分子種は PLDP の活性本体である可能性が考えられた (Table. 2-1)。

Table. 2-1 Results of PLDP component analysis

		Amount
Moisture* ¹		72.90%
Crude fat* ²		3.09%
Phospholipid* ³		
PC	Total Phosphatidylcholine	21.716 mg
LPC	Total Lysophosphatidylcholine	3.390 mg
PE	Total Phosphatidylethanolamine	2.569 mg
PI	Total Phosphatidylinositol	1.076 mg
SM	Total Sphingomyelin	0.764 mg
PA	Total Phosphatidic acid	0.648 mg
PS	Total Phosphatidylserine	0.085 mg

* 1 : Normal pressure heating drying method 105°C、 3 hours

* 2 : Ether extraction method

* 3 : LC/MS/MS method

2. 豚肝臓分解物の臨床薬学的評価

Matsuda らは、PLDP が非認知症患者における認知機能へ及ぼす影響について報告している¹⁵⁾。本研究では、改訂版長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R)を用い、PLDP の摂取が患者の記憶力や注意力を含む認知機能の向上への寄与を評価した結果、PLDP の摂取群においてこれらの機能が改善される傾向が認められ、特に、記憶保持力の向上と注意力の改善が顕著であった。このことから、PLDPが非認知症患者の認知機能をサポートする可能性が示唆されており、日常生活における認知機能維持の一助となることを報告している。また、

Matsuda らは、健康な 40 歳以上の成人を対象に、ウェクスラー記憶検査改訂版 (WMS-R) を用い、PLDP が認知機能に及ぼす効果を検討するランダム化二重盲検プラセボ対照試験を実施している¹⁶⁾。被験者を PLDP 摂取群とプラセボ群に分け、4 週間の介入期間後に視覚記憶および遅延再生能力の評価を行った結果、PLDP 摂取群ではプラセボ群と比較して視覚的情報を記憶する能力および一定時間後にその情報を正確に再生する能力が有意に向上していることが示された。さらに、試験期間中において重大な副作用はみられず、PLDP の短期的摂取は安全かつ有益であり、中高年者の認知機能維持および向上に寄与する可能性がある¹⁶⁾と述べている。さらに、Suzuki らは、PLDP がヒトの前頭葉機能に及ぼす影響を検討する目的で、本邦で汎用されている HDS-R のスコアが 15 点から 23 点の被験者を対象に、PLDP の経口投与による HDS-R の総点の変化と HDS-R の質問項目 (Q1~Q9 までの 9 項目) に対する変化について報告している²²⁾。投与 2 週間後と 4 週間後に HDS-R を実施し、PLDP 投与前と比較した結果、PLDP の摂食後 2 週間及び 4 週間の HDS-R について、有意なスコアの上昇が認められた。また、HDS-R のそれぞれの項目に関しては、PLDP は摂食後 2 週間で、言語の遅延再生を評価している Q7 及び言語流暢性課題を評価している Q9 のスコア、摂食後 4 週間においても Q7 のスコア及び Q9 のスコアを有意に上昇させていた。以上の結果から、PLDP は言語の遅延再生を改善させ、前頭葉

の機能を評価している言葉流暢性課題のスコアを高めることが明らかとなった。

これらの結果は、PLDP が前頭葉の機能を高め、うつ症状を予防や改善させる

可能性を示唆しているものと考えている。

第3章 PLDP/PEL による IL-1 β 及び NO の産生抑制 (*in vitro*)

3.1 実験方法

PEL の調製

PEL は PLDP (Lot.No.170130 ヤエガキ発酵技研株式会社) より Bligh & Dyer 法にて抽出した。PLDP と 0.2M の酢酸を等量混合し、PLDP の 5 倍量のメタノールと 2.5 倍量のクロロホルムを加え、Vortex で 1 ~ 2 分攪拌した。10 分放置し、クロロホルムと DDW を 5mL ずつ加え、1 分間攪拌した。3000rpm で 10 分間遠心分離し、上層を捨てて下層を回収した。回収した量と等量の洗浄用液 (水 : メタノール : クロロホルム = 47 : 48 : 3) を加え、3000rpm で 10 分間遠心分離した。上層を捨て、クロロホルム層を窒素ガスエバポレーターで乾燥させた。(Fig. 3-1)

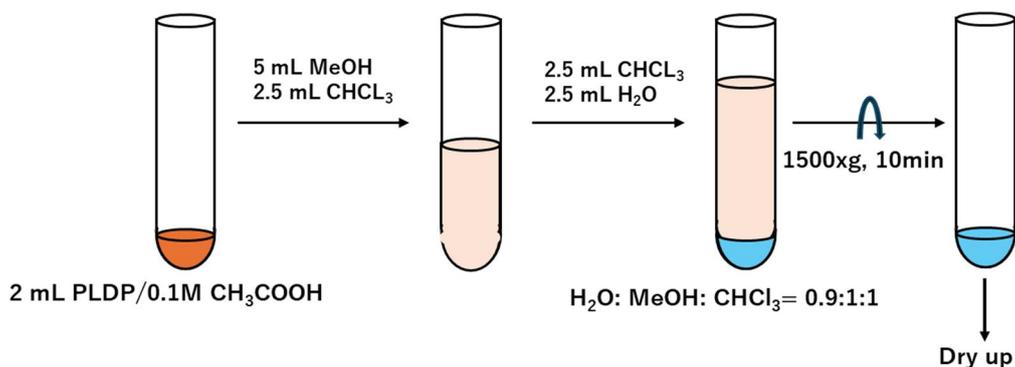


Fig. 3-1 Preparation of PEL

NO 及び IL-1 β 産生の抑制検討

マクロファージ系細胞である Raw 264.7 細胞を 24 ウェルのプレート (5×10^5 cells/well) で播種し 24 時間培養後、リポポリサッカライド (LPS: 0000130083, E.coli, B4, Sigma-Aldrich) 100 ng/mL で惹起させ、48 時間後に上清中の NO 及び IL-1 β を測定して、神経傷害因子の指標とした。PLDP の投与量は原液を 1000 倍希釈したものを、PEL の投与量は 12.5、25 及び 50 μ g/mL とした。なお、PLDP 及び PEL は LPS と同じタイミングで添加した。(Fig. 3-2)

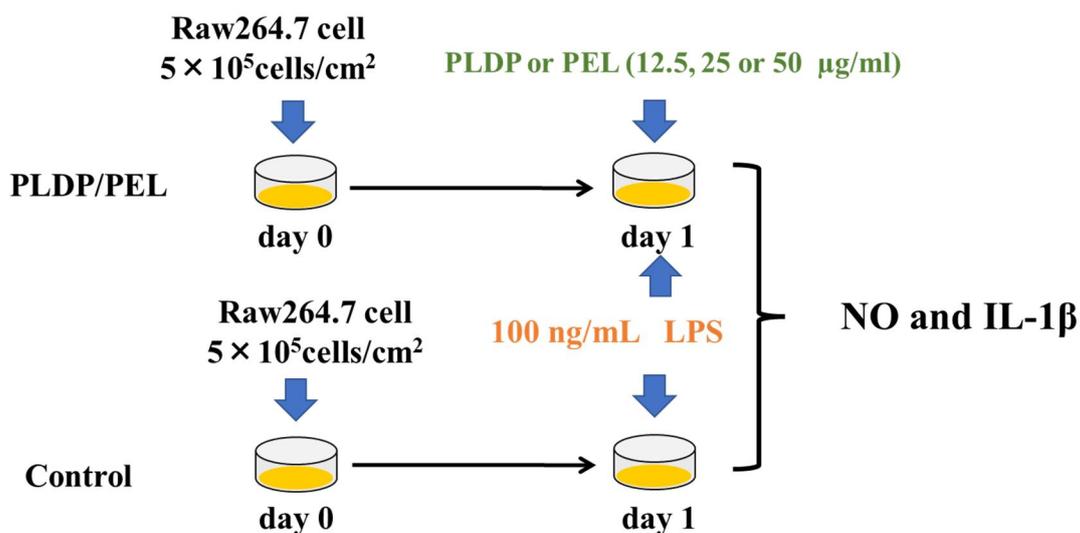


Fig. 3-2 Outline of the test for the PLDP/PEL's effect on inflammation inhibition

Raw 264.7 cells were seeded in a 24-well plate (5×10^5 cells/well) and cultured for 24 hours, then stimulated with lipopolysaccharide (100 ng/mL). After 48 hours, NO and IL-1 β in the supernatant were measured. The dose of PLDP was 1000 times diluted from the original solution, and the dose of PEL was 12.5, 25, and 50 μ g/mL. PLDP and PEL were added at the same time as LPS.

NO の測定

24 ウェルプレートから上清を回収し、5,000rpm で 5 分遠心分離し、上清の 100 μ L を 96 ウェルプレートに入れた。亜硝酸や亜硝酸イオンを検出する Griess 試薬を等量加えた。検量線用の NO スタンダードも同様に作成し、吸光度を 550nm で測定した。

IL-1 β の測定

24 ウェルプレートから上清を回収後、PBS(-)で洗浄し、(1 \times)Triton を加えてスクレイパーで細胞を回収した。13,000rpm で 10 分間遠心分離し、そこから 5 μ L をとり、(1 \times)cell Extraction Buffer PTR を 45 μ L 加え、全量を 50 μ L にした。IL-1 β 用のスタンダードと試料を 96 ウェルに入れ、50 μ L の Antibody Cocktail を加えた。シールして 1 時間一定のスピードで揺らしながらインキュベートした。(1 \times)wash buffer PT を 350 μ L で 3 回洗い、水滴を取り除いた。100 μ L の TMB Development Solution を加え、5 分間インキュベートした。100 μ L の停止液を加え、吸光度 450nm で測定した。

タンパク定量

細胞数によって産生される NO の発現量は変わるため、BCA タンパク質アッセイでタンパクの定量を行った。上清を回収した 24 ウェルを PBS(-)で洗い、界面活性剤の(1 \times)Triton を加え、スクレイパーで細胞を回収した。13,000rpm

で15分間遠心分離し、そこから5 μ Lをとり、水を45 μ L加え、全量を50 μ Lにした。タンパク定量用のスタンダードとWR(working reagent)とRIPA Solu(水45 μ L+(1 \times)Triton5 μ L)を作成した。96ウェルプレートにスタンダードと試料、RIPA Soluを25 μ Lずつ、WRを200 μ Lずつ加えた。37度に設定したインキュベータに30分静置した後、550nmの吸光度で測定した。

解析方法

データの正規性を確認した上で、各群間の平均値の比較には、対応の有無に応じて対応のあるt検定または対応のないt検定を用いた。すべての統計解析において、有意水準を $p < 0.05$ に設定し、有意差が認められた場合のみ統計的に意味があるものとして評価した。結果は平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で示した。

3.2 結果

PLDP の NO 産生抑制

LPS 刺激による NO 産生は、原液を 1000 倍希釈した PLDP で、約 50%の NO 産生抑制が観察されたが、コントロール群と比較して有意な差はみられなかった。(Fig. 3-3)

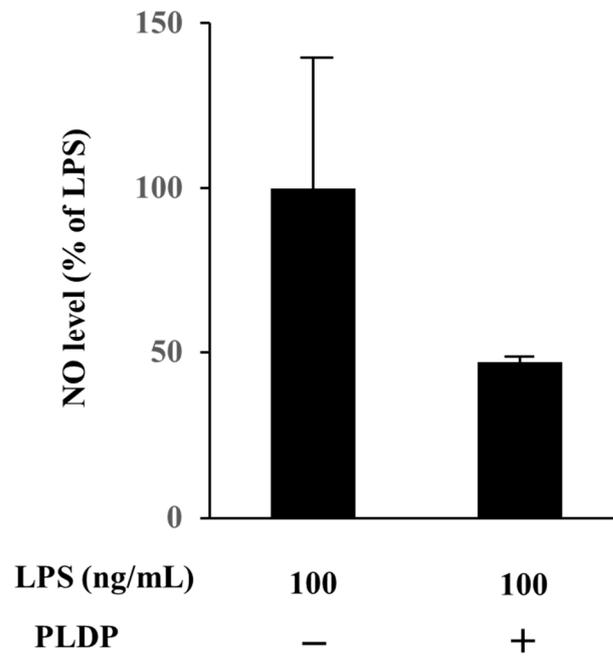


Fig. 3-3 PLDP inhibited LPS-induced NO level.

Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 3/group.

PEL の NO 産生抑制

PEL 濃度 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性はみられなかったものの、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では細胞毒性が観察された。(Fig. 3-4)

LPS 刺激による NO 産生は PEL 濃度 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で約 50%、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ では約 80%の NO 産生抑制がみられ用量依存傾向が見られたが、群間の有意差はなかった。(Fig. 3-5)

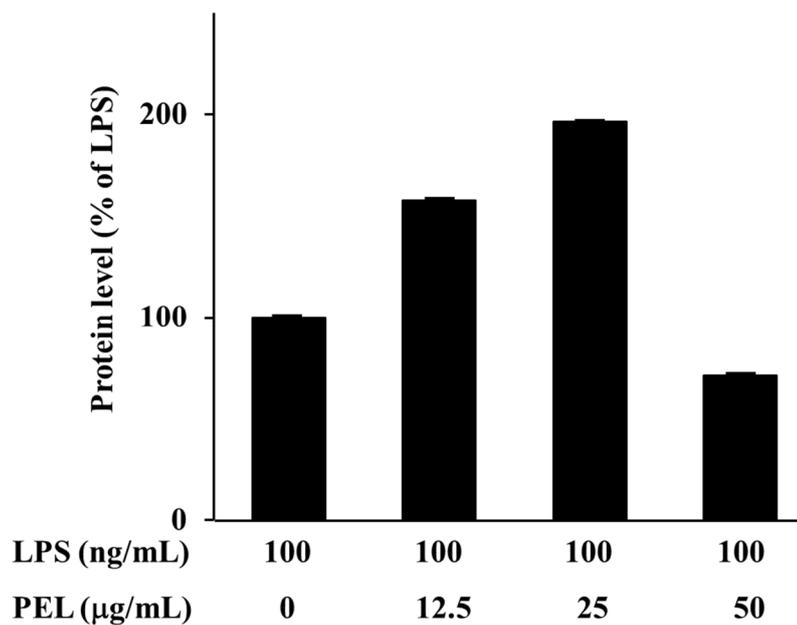


Fig. 3-4 Effect of PEL on the cell viability

Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 3/group.

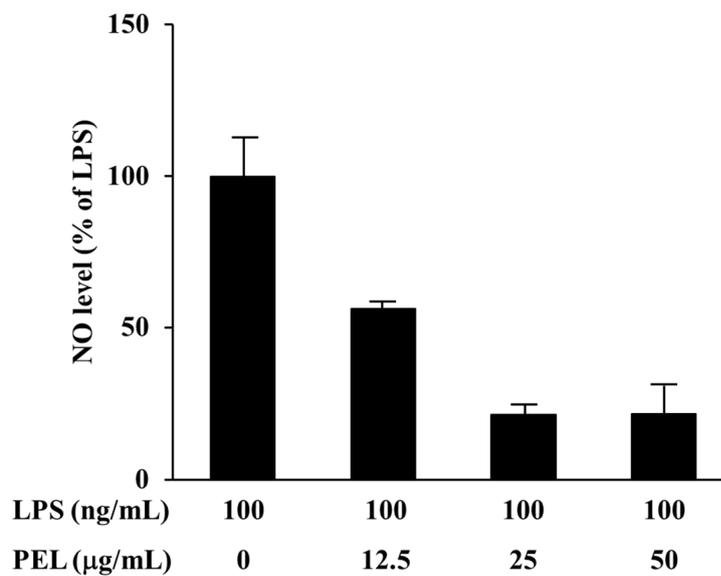


Fig. 3-5 PEL inhibited LPS-induced NO level.

Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 3/group.

PLDP 及び PEL の IL-1 β 産生に対する影響の検討

LPS 刺激による IL-1 β 産生は原液を 1000 倍希釈した PLDP で、約 95% の IL-1 β 産生抑制がみられた。(Fig. 3-6)

LPS 刺激による IL-1 β 産生は PEL 濃度 25 μ g/mL では約 93% の IL-1 β 産生の抑制がみられた。(Fig. 3-6)

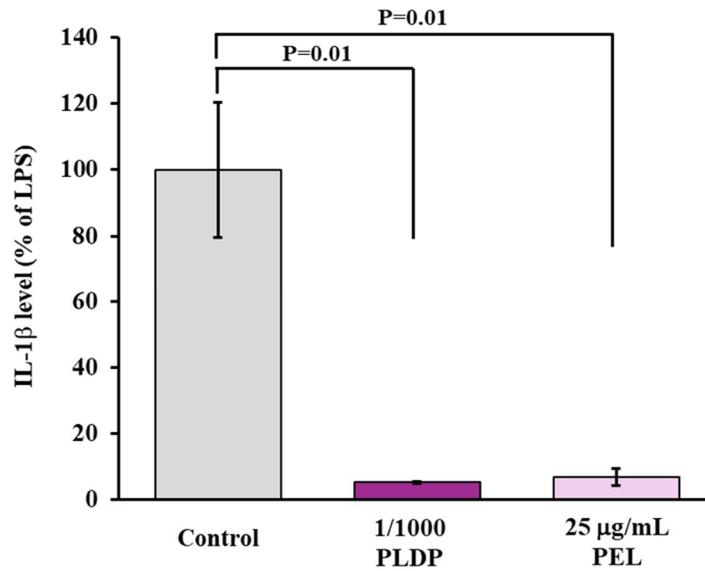


Fig. 3-6 PLDP inhibited LPS-induced IL-1 β expression

IL-1 β production induced by LPS stimulation (100 ng/mL) was inhibited by approximately 95% when PLDP was diluted 1000-fold from the original solution and by approximately 93% when PEL was used at a concentration of 25 μ g/mL. Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 3/group, Cont = LPS; PLDP = PLDP + LPS (P=0.01); PEL = PEL + LPS (P=0.01).

3.3 考察

本研究により、PLDP は Raw264.7 細胞において、LPS 刺激による NO 及び IL-1 β を抑制した。PLDP に由来するリン脂質は、マクロファージを介した炎症を抑制する可能性がある。細胞の炎症は神経変性疾患の発症に関与しており、PEL はこれらを抑制する可能性が示唆された。PLDP による認知機能の改善効果と神経炎症の抑制効果は、PEL 中に含まれる異なる分子がそれぞれ担っ

ている可能性がある。PEL は PLDP の活性本体を含んでいると考えており、特に PEL 中のホスファチジルコリン及びリゾホスファチジルコリンが主役を担っているものと考えている。しかしながら、PEL には多くのリン脂質も含まれており、それらの相加・相乗作用の可能性も考えられる。これらのメカニズムが明らかになれば、新たな創薬に発展する可能性があると期待される。さらに、PEL には、 α シヌクレインの異常凝集を抑制する分子が含まれていることが明らかにされており²³⁾、これらの分子を明らかにすることによって、新たな神経変性疾患の治療薬を創製できる可能性があると考えられる。なお、今回実施した PLDP 及び PEL の NO 産生抑制の検討では、有意差はなかったが、検討回数を重ね、精度を上げていくことで有意差が出るものと考えられた。

第 4 章 PEL によるマクロファージ系細胞に対する作用の 検討 (*in vitro*)

4.1 実験方法

PLDP のマクロファージ M1 及び M2 に対する影響の検討

PLDP (Lot.No.170130 ヤエガキ発酵技研株式会社) より抽出した脂質画分 (PEL) 及び LPS(100 ng/mL) で処理したマクロファージ系細胞である RAW264.7 細胞 (1×10^6 cell) を用いて行った。ブロック抗体として CD16/CD32 を 1 μ L、一次抗体として CD86 を 2 μ L 添加した。実験群は、1) cell のみ、2) PI(蛍光色素) のみ、3) CD86、4) PI+CD86 の 4 つに分け、フローサイトメトリー法にて比較を行った。(Fig. 4-1)

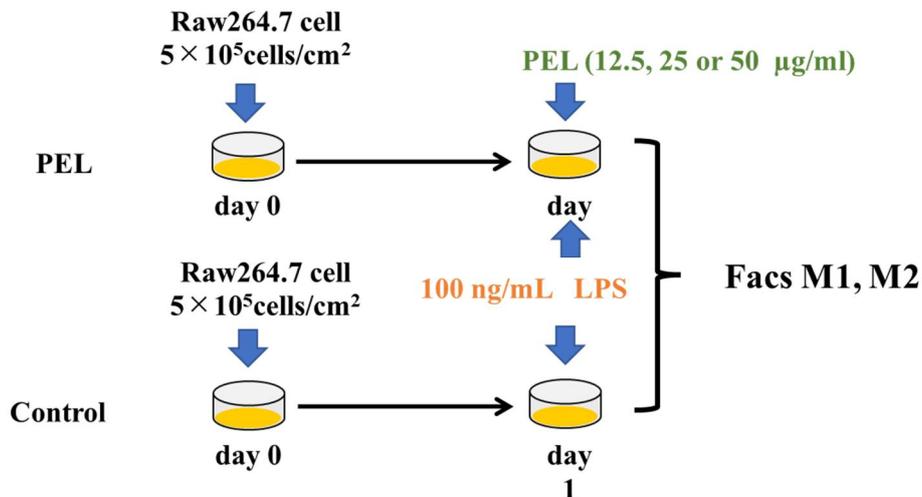


Fig. 4-1 Outline of the test for the PEL's effect on M1 and M2 macrophages.

The experiment was conducted using the lipid fraction (PEL) extracted from PLDP and RAW264.7 cells (1×10^6 cells) treated with LPS (100 ng/mL). 1 μ L of CD16/CD32 was added as a blocking antibody, and 2 μ L of CD86 for M1, CD206 for M2 were added respectively as a primary antibody. The experimental groups were divided into four groups: 1) cells only, 2) PI (fluorescent dye) only, 3) CD86, and 4) PI + CD86, and the results were compared using flow cytometry.

4.2 結果

PEL 群ではコントロール群と比較し、M2 型マクロファージの割合を増加させたことが観察された。したがって、PEL はマクロファージに作用して M2 型に誘導することによって、抗炎症作用を示すことが明らかとなった。(Fig. 4-2)

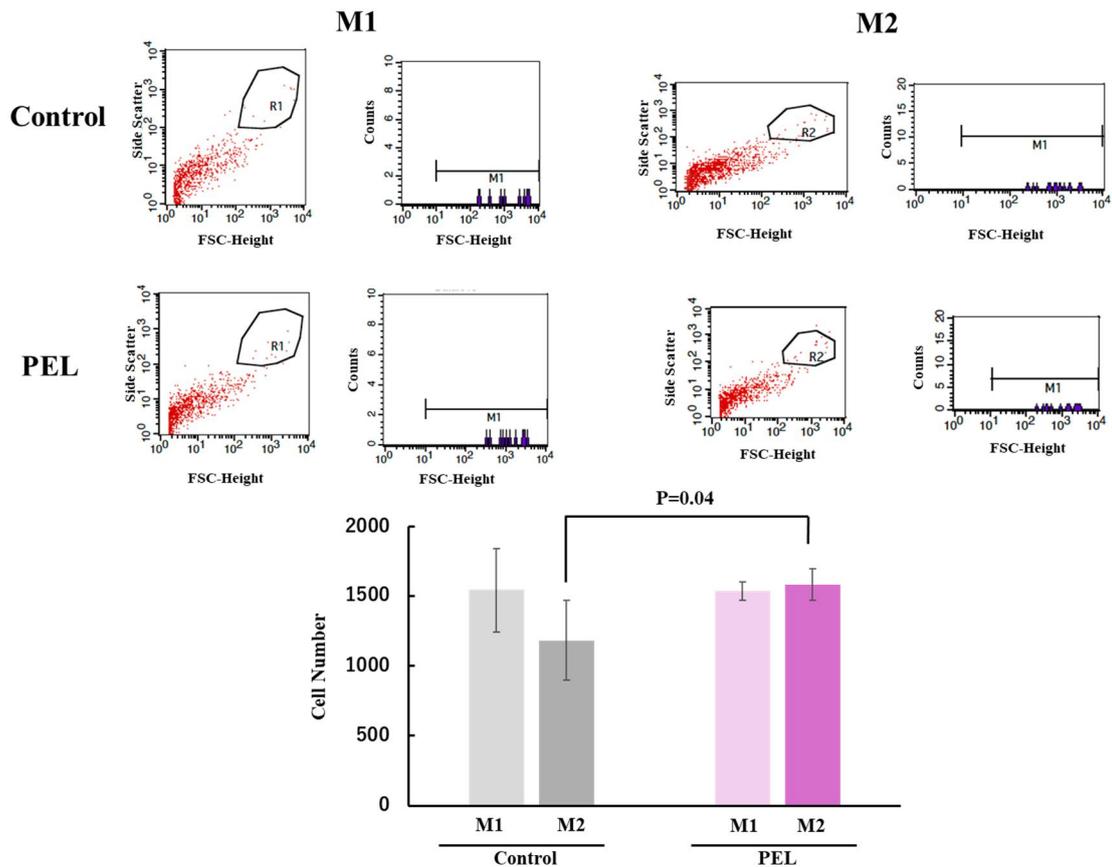


Fig. 4-2 PEL activates macrophages to induce the M2 macrophage.

Total phospholipids (PEL) were extracted from PLDP using the Bligh and Dyer method. Data are expressed as the mean \pm S.E., $n = 3$, Control = LPS (100 ng/mL), PEL = PEL (25 μ g/mL) + LPS (100 ng/mL). $P=0.04$.

4.3 考察

PLDP の認知機能改善効果は PC を含めたリン脂質群であると考えている。

しかしながら、*in vitro* によるミクログリア系の細胞増殖を指標に PLDP の効果を検討してみると、Ch や PC と異なった結果を示すことも確認している。これは、これまで PC やリン脂質群で報告された機序とは全く別の機序による可能

性を示唆するものである。本研究の結果、PEL はマクロファージに作用して M2 型へ誘導することによって、抗炎症作用を示すことが明らかとなった。

以上の点から、PEL は炎症性マクロファージを抑制するのではなく、抗炎症性マクロファージの割合を増やすことによって抗炎症作用を示すことが考えられる。すなわち、この作用が PLDP で認められる抗うつ作用や記憶の保持にも関与している可能性が考えられる。

ミクログリア系細胞は認知症の発症機序に関与していると考えられているアミロイド β を貪食し、神経保護的に作用している。また、PLDP に含まれるリゾホスファチジルコリンやリゾホスファチジルセリンはミクログリア細胞を介した神経保護的作用があること報告している。一方、これに反する事象の報告もあり、今後は、ミクログリアの機能についても検討する必要があると考える。

第5章 PLDPによるホルマリン鎮痛試験の効果 (*in vivo*)

5.1 実験方法

先行研究にて、PLDPはマクロファージ系細胞からの神経傷害因子である一酸化窒素(NO)、IL- β の放出を抑制した。そこで、本研究では、ddY系雄性マウスのホルマリン誘発性急性疼痛に対する、PLDPを経口投与した際の効果について行動薬理的に検討を行った。

被験物質

PLDP (Lot.No.170130 ヤエガキ発酵技研株式会社) を用いた。

試薬

ホルマリン(富士フイルム和光純薬;東京)、蒸留水(大塚製薬工場;徳島)、生理食塩液(大塚製薬工場;徳島)を使用した。ホルマリンは、生理食塩液で希釈した。

供与動物

体重20-26gのddY系雄性マウス(日本SLC;千葉)を使用した。実験に供するまで明暗サイクル12時間(明期7:00-19:00、暗期19:00-7:00)、室温 $23\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $52\pm 2\%$ の一定環境下で飼育した。なお、動物には固形飼料(SLC F2、日本クレア)および水道水を自由に摂取させた。本研究は、日本薬科大学の動物実験規程に則って計画・承認(AE20202-015)されたものであり、使用する動物数

を極限に抑え、苦痛を最小限にとどめて実施されたものである。

疼痛評価

炎症性疼痛モデルは、末梢神経を炎症性に刺激する化学物質を投与することにより疼痛や鎮痛を評価するものであり、広義の神経障害性疼痛モデルと考えられ、その1つがホルマリンテストである。本研究では Tan-No らの方法²⁴⁾に準じてホルマリンテストを行った。マウスは実験前に測定用の透明プラスチックケージ (22.0 cm×15.0 cm×12.5 cm) に1匹ずつ入れ、約1時間環境に順応させてから使用した。PLDP の皮下投与による抗侵害作用は、マウス後肢足蹠皮下 (i.pl.) に2%ホルマリン (20 μL) を投与した際に見られる疼痛関連行動 (舐めおよび噛み行動) を指標とした。行動観察は、2%ホルマリン投与直後から30分間の行動を測定した。PLDP の皮下投与は2%ホルマリン投与30分前に行った。

5.2 結果

マウス後肢足蹠皮下 (i.pl.) に 2 %ホルマリン (20 μ L) を投与した際に見られる疼痛関連行動 (舐めおよび噛み行動) は皮下投与 10 分以内に認められる疼痛様行動 (第 1 相性反応) と 10 分から 30 分の間認められる疼痛様行動 (第 2 相性反応) がある。本実験より、PLDP 投与群とコントロールでは、第 1 相性反応時間に有意差はなかったが、第 2 相性反応時間には有意差があった。(Fig. 5-1)

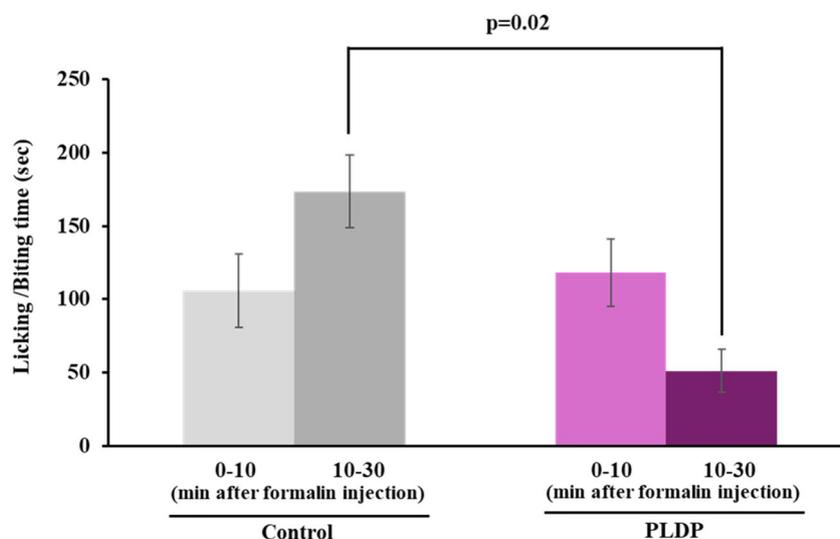


Fig. 5-1 PLDP significantly reduced phase II reaction time in a formalin-induced acute pain model.

PLDP was administered into the footpads of mice 30 min before the irritant formalin was administered. Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 7. P=0.02.

5.3 考察

マウス後肢足蹠皮下 (i.pl.) に 2%ホルマリン 20 μ L を投与した際に見られる疼痛様行動は、PLDP 群はコントロール群と比較し、皮下投与 10 分以内に認められる第 1 相性反応時間に有意差はなかったが、投与 10 分から 30 分間に認められる第 2 相性反応時間を有意に減少させた。ホルマリン誘発性急性疼痛モデルには炎症性サイトカインである IL- β の関与が考えられており、PLDP は *in vitro* で IL-1 β の産生を抑制していることから、PLDP による IL-1 β の産生抑制が *in vivo* でも示唆された。

ホルマリン誘発性急性疼痛モデルでは第 1 相性反応は主にオピオイド、第 2 相性反応はオピオイド及び NSAIDs にて抑えられるため、PLDP は主に後者を抑える効果があることが考えられる。本研究により PLDP の抗炎症効果を *in vivo* で確認できたが、今後は詳細な投与条件を検討する基礎的データとなった。一方、ホルマリン投与部位は変質しやすいために今後は別の方法で評価を行う必要がある。

第6章 LPS 誘発炎症モデルにおける PLDP の効果(*in vivo*)

6.1 実験方法

被験物質

PLDP (Lot.No.170130 ヤエガキ発酵技研株式会社) を用いた。

供試動物

C57BL/6J 系オスマウス (購入時 8 週齢、日本クレア) 24 匹を用いた。

8 週齢マウスを $25 \pm 1^\circ\text{C}$ に温度管理された部屋 (明暗 12 時間周期) に導入後、7 日間馴化を行なった。馴化終了後、体重が均一になるように群分けし、群毎にケージ (345×403×177 mm、日本クレア) に収容し試験を開始した。飼育期間中の飲水は自由摂取とした。本研究は、日本薬科大学の動物実験規程に則って計画・承認 (AE2024-017) されたものであり、試験は株式会社栄養・病理学研究所 (京都府綴喜郡宇治田原町立川間谷 11-1) で実施した。

試験群

試験群は以下の 3 群を設定した。

1 群：PLDP 及び LPS 無投与の陰性対照群 (n = 8)

2 群：PLDP 無投与、LPS 投与の陽性対照群 (n = 8)

3 群：PLDP 及び LPS 投与群 (n = 8)

被験薬の投与

試験開始後 2 日から 14 日まで、PLDP は 0.2 mL/20 g BW を強制経口投与した。1 及び 2 群には同量の生理食塩水を投与した。試験開始後 7 日から 14 日まで、毎日午前 10 時からオープンフィールド試験を実施し、初回オープンフィールド試験 (OFT1 日目) をベースラインとし、終了後に 2 及び 3 群には LPS (Sigma, E.coli 0111 B4) を生理食塩水で 0.1 mg/mL に調整した溶液を 0.1 mL/20 g BW 腹腔内投与した。1 群には同量の生理食塩水を投与した (Fig. 6-1)。

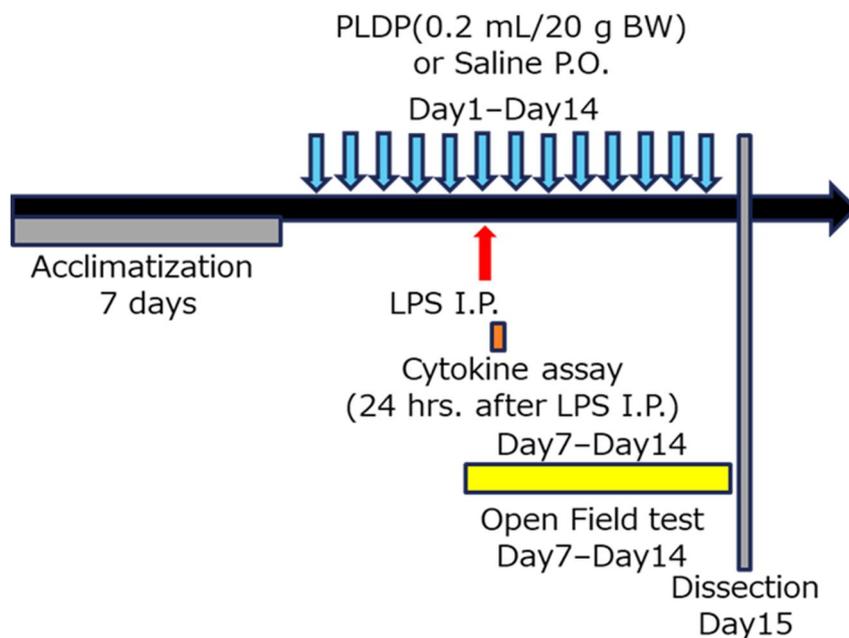


Fig. 6-1 Examination Schema

Eight-week-old C57BL/6J male mice were used for the experiment. The mice were placed in a room with a temperature control of $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ (12-hour light/dark cycle) and allowed to acclimate for 7 days. After acclimatization, the mice were divided into groups based on uniform body weight and housed in cages (345×403×177 mm, CLEA Japan) for the

start of the experiment. Water was allowed ad libitum during the breeding period. From 2 to 7 days after the start of the experiment, PLDP (0.2 mL/20 g BW) was orally administered to group 3. Group 1 (Saline) and Group 2 (LPS) were administered the same amount of saline. On the 7th day after the start of the experiment, LPS (Sigma, E. coli 0111 B4) adjusted to 0.1 mg/mL with saline was intraperitoneally administered to groups 2 and 3 at 0.1 mL/20 g BW. Group 1 administered the same amount of saline. All animals were autopsied 8 days after the start of the study.

オープンフィールド試験 (OFT)

100 lux の条件下で、アルコール消毒したオープンフィールド (500×500×400mm、小原医科産業株式会社) にマウスを入れ、10 分間の自発運動量や中央滞在時間の解析を行った。なお、オープンフィールド試験は午前 10 時に実施した。

血中サイトカインの定量

Cytometric bead array により IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ 、MCP-1 及び TNF- α 濃度を測定した。

解析方法

OFT で得られた総移動距離、探索行動、中央侵入回数、中央滞在時間のデータについては、初回オープンフィールド試験(OFT1 日目)をベースラインとし、OFT2 日目の変化量を算出し、Holm multiple comparison で群間比較を行った。血漿中サイトカイン濃度については、3 群間の平均値の差を比較するため、

Tukey-Kramer 法を用いた多重比較解析を実施した。さらに、データの分布に関する棄却検定にはスミルノフの棄却検定を用い、統計的な検証を実施した。なお、有意水準を $p < 0.05$ に設定した。

6.2 結果

オープンフィールド試験

OFT2 日目の平均総移動距離、探索行動回数、中央侵入回数及び中央滞在時間のベースラインからの変化率（平均値±標準誤差）の結果を **Fig. 6-2** に示す。

OFT2 日目の平均総移動距離の変化率（平均値±標準誤差）は、1 群で $76.3 \pm 4.6\%$ 、2 群で $34.2 \pm 2.4\%$ 、3 群で $43.2 \pm 3.0\%$ と 2 群が最も低値を示した。1 群と 2 群、1 群と 3 群で有意差がみられ、LPS 投与により総移動距離（変化率）の有意な低下がみられた。さらに、2 群と 3 群で有意差がみられたことから、PLDP の投与は LPS による総移動距離（変化率）の低下を有意に抑制することが確認された。

OFT2 日目の探索行動回数の変化率（平均値±標準誤差）は、1 群で $91.9 \pm 10.4\%$ 、2 群で $26.8 \pm 2.3\%$ 、3 群で $37.0 \pm 3.5\%$ と 2 群が最も低値を示した。1 群と 2 群、1 群と 3 群で有意差がみられ、LPS 投与により探索行動回数（平均値±標準誤差）の有意な低下がみられた。さらに、2 群と 3 群で有意差がみられたことから、PLDP の投与は LPS による探索行動回数（変化率）の低下を有意に抑制することが確認された。

OFT2 日目の中央侵入回数の変化率（平均値±標準誤差）は、1 群で $50.2 \pm 8.2\%$ 、2 群で $13.9 \pm 2.7\%$ 、3 群で $18.4 \pm 2.1\%$ と 2 群が最も低値を示した。1 群

と 2 群、1 群と 3 群で有意差がみられ、LPS 投与により中央侵入回数 (変化率) の有意な低下がみられた。なお、2 群と 3 群で有意差はみられなかった。

OFT2 日目の中央滞在時間の変化率 (平均値±標準誤差) は、1 群で 56.8±11.7 %、2 群で 15.5±4.3 %、3 群で 24.0±8.9 %と 2 群が最も低値を示した。1 群と 2 群、1 群と 3 群で有意差がみられ、LPS 投与により中央滞在時間 (変化率) の有意な低下がみられた。なお、2 群と 3 群で有意差はみられなかった。

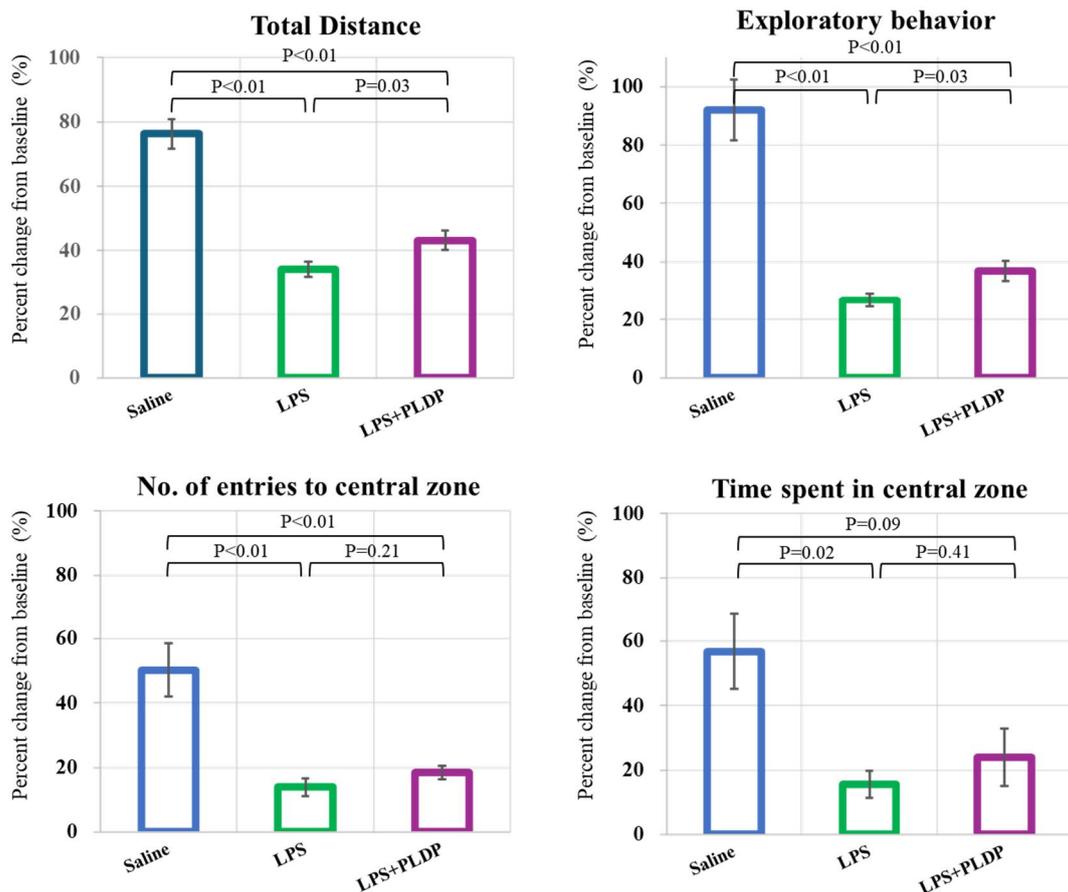


Fig. 6-2 PLDP significantly reduced the total distance and the number of exploratory behaviors in the OFT test.

PLDP or saline were orally administered daily for 5 days prior to LPS administration.

The LPS group received saline + LPS, and the PLDP group received PLDP + LPS. Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 8. P values less than 0.01 were indicated as P<0.01.

血漿中サイトカイン濃度

腹部大静脈血血漿中のサイトカイン濃度測定の結果を Fig. 6-3 に示した。

IL-12p70 の平均血漿中濃度(平均値 \pm 標準誤差)は 1 群で 2.46 ± 1.31 pg/mL、2 群で 0.21 ± 0.21 pg/mL、3 群で 0.00 ± 0.00 pg/mL と 1 群が最も高値を示し、2 群、3 群の順に低値を示したが、各群間で有意差はみられなかった。

TNF は、1 群で 5.95 ± 0.59 pg/mL、2 群で 39.93 ± 4.02 pg/mL、3 群で 31.14 ± 1.92 pg/mL と 2 群が最も高値を示し、1 群と 2 群及び 1 群と 3 群で有意差がみられたが、2 群と 3 群では有意差はみられなかった。

IFN- γ は、1 群で 1.32 ± 0.03 pg/mL、2 群で 2.24 ± 0.08 pg/mL、3 群で 1.86 ± 0.10 pg/mL と 2 群が最も高値を示し、1 群と 2 群、1 群と 3 群及び 2 群と 3 群で有意差がみられた。

MCP-1 は、1 群で 6.61 ± 2.19 pg/mL、2 群で 509.35 ± 100.98 pg/mL、3 群で 442.73 ± 67.12 pg/mL と 2 群が最も高値を示し、1 群と 2 群及び 1 群と 3 群で有意差がみられたが、2 群と 3 群では有意差はみられなかった。

IL-10 は、1 群で 2.68 ± 1.59 pg/mL、2 群で 17.70 ± 0.77 pg/mL、3 群で 17.18 ± 0.93 pg/mL と 2 群が最も高値を示し、1 群と 2 群及び 1 群と 3 群で有意差が

みられたが、2群と3群では有意差はみられなかった。

IL-6は、1群で 2.84 ± 0.71 、2群で 43.70 ± 6.17 、3群で 38.76 ± 5.49 と2群が最も高値を示し、1群と2群及び1群と3群で有意差がみられたが、2群と3群では有意差はみられなかった。

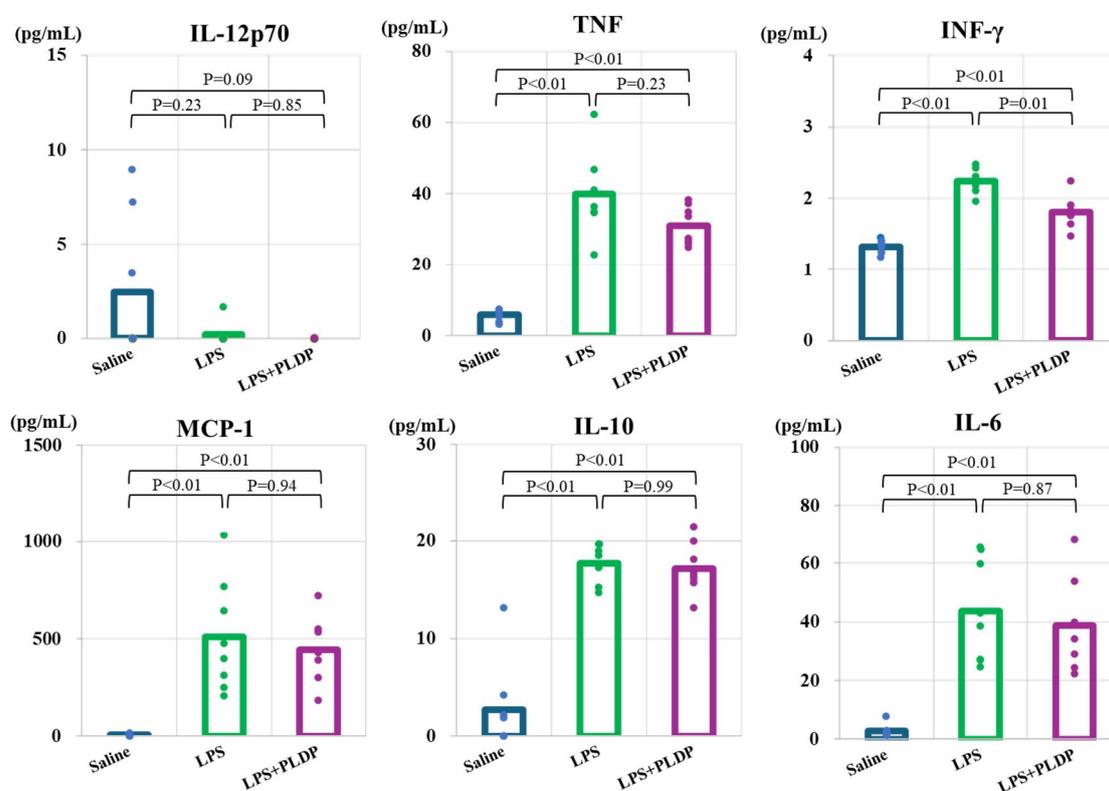


Fig.6-3 PLDP significantly reduced the cytokine INF- γ in LPS-induced inflammatory models.

PLDP and saline were orally administered daily for 5 days prior to LPS administration. The LPS group received saline + LPS, and the PLDP group received PLDP + LPS. Data are expressed as the mean \pm S.E., n = 8. P values less than 0.01 were indicated as P<0.01.

6.3 考察

本研究では PLDP 投与が LPS 投与による自発運動量の低下を改善する可能性が示唆され、血漿中の IFN- γ 発現抑制も改善傾向にあった。

本研究では LPS 誘発炎症モデルを用いたが、COVID-19 の病態の一部を再現するモデルとして注目されている。本研究で LPS を用いた根拠は以下の点に基づく。①LPS は トール様受容体 4 (TLR4) を介してマクロファージや単球を活性化し、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) やインターロイキン (IL) -6 などの炎症性サイトカインの分泌を誘導することが知られている。SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質の S1 サブユニット (S1) は、LPS と同様に Toll 様受容体 TLR4 を介したマクロファージの炎症性応答を促すこと²⁵⁾ や、スパイクタンパク質が TLR2 を介してマウスの全身炎症を引き起こすことが報告されている²⁶⁾。この炎症性応答は、COVID-19 患者、とりわけ重症例において観察される「サイトカインストーム」と呼ばれる過剰な炎症反応と類似しており、炎症性病態の研究において LPS モデルが有用であることを示唆している。②COVID-19 における重症化因子の一つとして免疫系の過剰活性化が挙げられる。特に、過剰な免疫応答は ARDS (急性呼吸窮迫症候群) や多臓器不全の原因とされている²⁷⁾。一方、LPS 投与により誘導される全身性炎症モデルや急性肺損傷モデルは、これらの病態を部分的に再現できることが示されており²⁸⁾、免疫過剰反応を標的とする

治療戦略の検討に適している。③COVID-19 患者では血管内皮細胞の障害が重要な病態の一つとして報告されており、血栓形成や組織障害の原因となることが知られている²⁹⁾。LPS は内皮細胞に炎症性変化を誘導し、内皮障害を介した血管病理のモデルとしても利用されている。このことから、COVID-19 の血管障害の研究においても LPS モデルが貢献し得ると考えられる。④COVID-19 感染では酸化ストレスの増加とミトコンドリア機能障害が病態進展に寄与していることが示されている。LPS 実験系においても、酸化ストレス応答の亢進やミトコンドリア異常が観察されており、COVID-19 に共通する病理学的特徴を再現できるモデルとして評価されている³⁰⁾。

一方で、本研究では、LPS + PLDP 群は LPS 群と比較して、自発運動と探索行動に有意な改善を示したものの、その他の指標には有意差は認められなかった。これは、マウスが探索行動を行う際、壁に触れ装置内の周辺部をより好んで歩行する“接触走性：thigmotaxis”という行動パターンを示すことから、OFT 装置内をまんべんなく歩行するのではなく、中央部への探索行動は極めて少なくなるため、PLDP の効果を正確に評価できなかった可能性が考えられる。

以上のことから、LPS は COVID-19 の病態の一部を再現し得るモデルであり、特に炎症反応や血管障害、酸化ストレス応答の研究において重要なツールであると結論づけられる。ただし、COVID-19 の全容を完全に再現することは困難

であり、ウイルス特異的な免疫応答やその他の複雑な病態を検討するには、補完的なモデルの利用が必要であると考えます。

今後は、メカニズム解明のため LPS 投与翌日の脳を採取し、モノアミン類及び炎症性サイトカイン類濃度測定や病理組織学的検査を実施する予定である。

第 7 章 研究成果の総括

本研究において、臨床試験において認知機能改善効果が認められている PLDP は 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 β 及び NO 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を示唆した。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 β が関与しているホルマリンテストにおける PLDP の効果を検討した結果、30 分前の 1 回投与で遅発相の痛み反応を抑制することを確認した。さらに、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- γ の上昇を改善する結果が得られた。したがって、今後はこれらの実験モデルを用いて、PLDP の至適投与量と投与日数、PLDP の活性本体と考えている PEL の至適投与量と投与日数を検討することが可能となったと言える。

我々は、PLDP が HDS-R において有意にスコアを上昇させることを確認してきた。また、WMS-R においても、視覚性記憶や言語・視覚の遅延再生を高めることも確認している。また、興味深い知見として、HDS-R スコアが 15~23 点

の被験者において、PLDP は言語性記憶の遅延再生や言語流暢性（カテゴリー流暢性課題）を改善させることを明らかにした。これらの結果は、PLDP による認知機能の改善には、遅延再生の改善や前頭葉の活性化が関わっているものと思われる。PLDP の機序として、脳内のミクログリア機能の調節を通じた炎症性サイトカインの抑制を考えている。すなわち、ミクログリアの過剰な活性化は神経炎症を引き起こし、認知機能や情動に悪影響を及ぼすことが知られているが、PLDP はこれを抑制することで、神経保護的に作用する可能性がある。

また、脳由来神経栄養因子（BDNF）の産生を促進し、神経細胞の分化、成熟、シナプス形成を助けることで、記憶力や学習能力の向上に寄与したと推察される²²⁾。これらの作用は、PLDP に含まれるリン脂質、多価不飽和脂肪酸、コリンといった成分に基づくものである。以上のことから、PLDP は神経炎症を改善させる効果が期待できると考えた。

今回の研究テーマである Long Covid 及び Brain Fog のメカニズムについては、いまだ詳細は解明されていないが、これまでの報告で注目すべきポイントは、「脳内の神経炎症」が病態の基礎として重要なファクターになっていることが明らかになっていることである。

Yamamoto らは、ラットにウイルス感染を模倣した Toll 様受容体-3 アゴニストであるポリリボイノシン酸：ポリリボシチジル酸（poly I:C）を腹腔内注射し

て神経炎症を誘導し、神経炎症が急性状態から慢性状態に移行するメカニズムを検討した。その結果、ラットは poly I:C 注射後数日間、一過性の発熱と長時間の自発活動抑制を示し、シクロオキシゲナーゼ-2 阻害剤 (NS-398) により発熱は抑制されたが、自発活動の改善はみられず、自発活動の抑制は発熱を引き起こしたアラキドン酸カスケードによって誘導されたものではないと報告している¹³⁾。さらに、大脳皮質を含む脳内でインターロイキン (IL) -1 β と IL-1 受容体拮抗薬 (IL-1ra) を過剰発現していた。IL-1ra の脳室内投与により脳内 IL-1 受容体を遮断すると、poly I:C による自発活動の抑制は完全に阻止され、セロトニン作動系を抑制することにより疲労様行動を生じさせることが報告されている。脳内インターフェロン (IFN) - α 発現の増幅も抑制されていた¹³⁾。これらの結果は、IL-1 β が神経炎症の重要な引き金であること、そして IL-1ra が神経炎症の慢性化を抑制すると報告している¹³⁾。また、Li らは、ウイルス感染モデルラットの脳内炎症を PET イメージングで定量評価し、その個体が呈する倦怠感と比較し、ウイルス感染による脳内炎症と倦怠感の関連について報告している³¹⁾。poly I:C をラット腹腔内投与 2 時間後より血中の炎症性サイトカインが著しく上昇すること、発熱が数時間にわたって持続し、自発行動量が著しく低下すること、自発行動は数日間かけてゆっくり回復することを報告している³¹⁾。これはすなわち、急性症状の発熱が治った後も、倦怠感が持続していることを示してい

る。また、脳内の活性化ミクログリアを特異的に認識する PET プローブ [18F]DPA-714 を用いて撮像の結果、迷走神経求心路に当たる孤束核や結合腕傍核で脳内炎症が有意に上昇しており、実際のウイルス感染と同様に、末梢組織から放出された炎症性サイトカインが脳血管内皮細胞や迷走神経求心路を刺激し、脳内で炎症を引き起こすことを報告している³¹⁾。さらに、脳内炎症が見られた各領域での[18F]DPA-714 の集積量（脳内炎症）と自発行動量の低下（倦怠感）の相関解析の結果、背側縫線核などでの脳内炎症が倦怠感と正に相関することが明らかとなり、背側縫線核に多く存在するセロトニン神経細胞との関連性が示唆されている³¹⁾。

これらの報告から、ウイルス感染による脳内炎症と倦怠感の関連を説明するメカニズムとして、①末梢組織に感染したウイルスは脳内の背側縫線核を中心に炎症を起こす、その結果、②脳内炎症によりセロトニン神経機能に異常を起こす、③セロトニン神経機能の異常が、最終的に長期にわたる倦怠感を引き起こすというメカニズムの存在が示唆されている。

Long Covid や Brain fog の病態にミクログリア由来の炎症が関与している可能性が示唆されることから、PLDP が病態の改善に寄与する可能性が考えられる。Shirato らは、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 S1 サブユニットが LPS と同様に TLR4 を介してマクロファージのシグナル伝達を活性化し、炎症性サイ

トカイン (IL-6、TNF- α) の産生を促進することを報告している²⁵⁾。また、Khan らは、同様にトール様受容体 2 (TLR2) を活性化し、NF- κ B シグナル経路を誘導することで炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6、TNF- α) の産生が増加することを報告されている²⁶⁾。これらの知見は、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質が TLR4 および TLR2 を介して炎症性病態を引き起こすことを示している。Khan らの、SARS-CoV-2 の炎症性反応が TLR を介した炎症メカニズムによるものであることを考慮すると、本研究で実施した LPS 誘発炎症モデルにおける PLDP の効果を検討した実験モデルは、Long COVID および Brain fog の病態を再現しているモデルと言える。したがって、LPS 誘発炎症モデルで異常行動や炎症性サイトカインの産生を抑制した PLDP は Long COVID および Brain fog に効果を示す可能性が期待される。一方、本研究では IFN- γ の有意な抑制を観察することができたが、その他の炎症性サイトカインも含め抑制傾向が観察されるのみであった。

PLDP の至適投与量と投与期間については詳細な検討が今後の検討課題である。本研究は、PLDP の効果を *in vivo* で検討した初めての報告である。若槻らは、オリーブに含まれる希少成分であるオレアセイン (OC) を 10 日間連続経口投与した後、LPS を腹腔内注射すると、マウスの抑うつ様行動が抑制されることを示した³²⁾。同様に、Hong らは、6 日間投与したシナモン水抽出物 (CWE)

を用いて、同等の所見を報告している³³⁾。これらの先行研究結果を参考に、短期投与での炎症誘発行動異常に対する効果を検討するため、本研究での PLDP の投与期間を 5 日間と設定した。一方、臨床試験では 2~4 週間にわたる PDP の長期投与により、記憶増強効果や前頭前皮質機能の改善が報告されている。これらの所見から、PLDP の至適投与量と投与期間は、試験条件や評価指標により異なる可能性が示唆される。今後の研究課題として、ホルマリン誘発炎症モデル及び LPS 誘発炎症モデルの両方を用い、PLDP と PEL の最も効果的な投与量と投与期間を検討する必要があると考える。

PLDP 及び PEL の神経炎症抑制の推定作用機序として、我々は、PLDP 及び PEL に含まれるリゾホスファチジルエタノールアミン (LPE) がマイトジェン活性化プロテインキナーゼ (MAPK) /細胞外シグナル制御キナーゼ 1/2 経路を活性化することを報告した³⁴⁾。さらに、培養大脳皮質ニューロンにおいて、LPE は複数のシグナル伝達カスケードを介して神経突起伸長を促進することが示され、これらの過程に G タンパク質共役型受容体が関与していることが示唆された(25)。さらに我々は、PEL が TLR4-NF- κ B シグナルを阻害し、STAT6 を介して M2 極化を促進する可能性があると考えている³⁵⁾。

PLDP および PEL の効果に基づく正確な分子機構を明らかにするためには、これらのシグナル経路に関与する転写調節機構に焦点を当てた今後の研究が必

要である。

本研究にはいくつかの限界が存在する。第一に、PLDP の最適な投与量および投与期間は、実験条件によって変動する可能性がある。本研究で用いたホルマリンおよび LPS による炎症誘発モデルにおける行動異常は、比較的影響を検出しやすい実験系である可能性がある。第二に、行動特性やサイトカイン産生といった評価指標の測定タイミングが最適ではなかった可能性があり、その結果、PLDP の効果の全体像を十分に把握できなかった可能性がある。第三に、PLDP の長期的な影響およびその臨床的意義については、現時点では明らかになっていない。PLDP の治療効果について確定的な結論を導くためには、長期観察を含む実験的評価や臨床試験を通じた包括的な検討が求められる。

それにもかかわらず、本研究では、ホルマリン誘発末梢炎症モデルおよび LPS 誘発中枢神経炎症モデルのいずれにおいても、PLDP が比較的短期間で測定可能な効果を示すことが明らかとなった。これらの知見は、当該モデルが PLDP の薬理作用をより詳細に検討するうえで有用なツールであることを示唆している。

以上の限界を踏まえつつも、本研究の結果は、COVID-19 に関連する Brain fog や認知機能障害を含む神経炎症性疾患に対する、PLDP の新たな治療戦略としての可能性を支持するものである。

第 8 章 引用文献

- 1) Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C. "Microglia in neurodegenerative disease." *Nature Reviews Neurology*. 2010;6(4):193-201.
- 2) Laura McWhirter, Heather Smyth, et al, "What is brain fog" *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2023 Apr;94(4):321-325.
- 3) Nasserie T, Hittle M, Goodman SN: Assessment of the frequency and variety of persistent symptoms among patients with COVID-19: A systematic review. *JAMA Netw Open* 4: e2111417, 2021.
- 4) Groff D, Sun A, Ssentongo AE, et al.: Short-term and longterm rates of postacute sequelae of SARS-Co V-2 infection: A systematic review. *JAMA Netw Open* 4: e2128568, 2021.
- 5) Sklinda K, Gorecki A, Dorobek M, et al.: Ischaemic background of brain fog in long-haul COVID-19—a nuclear magnetic resonance spectroscopy-based metabonomic analysis. Preliminary results. *Pol J Radiol* 86: e654-e660,2021.
- 6) Mirfazeli FS, Sarabi-Jamab A, Pereira-Sanchez V, et al.: Chronic fatigue syndrome and cognitive deficit are associated with acute-phase neuropsychiatric manifestations of COVID-19: A 9-month follow-up study. *Neurol Sci* 1-9, 2022.
- 7) Ortelli P, Ferrazzoli D, Sebastianelli L, et al.: Neuropsychological and neurophysiological correlates of fatigue in post-acute patients with neurological manifestations of COVID-19: Insights into ac hallenging symptom. *JN eurol Sci* 420: 117271, 2021.
- 8) Conn CA, McClellan JL, Maassab HF, Smitka CW, Majde JA, et al. (1995) Cytokines and the acute phase response to influenza virus in mice. *Am J Physiol* 268: R78–84.
- 9) Leon LR (2004) Hypothermia in systemic inflammation: role of cytokines. *Front Biosci* 9: 1877–1888.
- 10) Traynor TR, Majde JA, Bohnet SG, Krueger JM (2007) Interferon type I receptor-deficient mice have altered disease symptoms in response to influenza virus. *Brain Behav Immun* 21: 311–322.
- 11) Maes M, Yirmiya R, Noraberg J, Brene S, Hibbeln J, et al. (2009) The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metab Brain Dis* 24: 27–53
- 12) Magrone T, Marzulli G, Jirillo E (2012) Immunopathogenesis of neurodegenerative diseases: current therapeutic models of neuroprotection with special reference to natural products. *Curr Pharm Des* 18: 34–42.
- 13) Yamato M, Tamura Y, Eguchi A, Kume S, Miyashige Y, Nakano M, Watanabe Y, Kataoka Y. Brain interleukin-1 β and the intrinsic receptor antagonist control peripheral Toll-

- like receptor 3-mediated suppression of spontaneous activity in rats. *PLoS One*. 2014 Mar 12;9(3):e90950.
- 14) Tsukahara T, Hara H, Haniu H, Matsuda Y. The Combined Effects of Lysophospholipids against Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Oxidative Stress in Microglial Cells. *J Oleo Sci*. 2021 Jul 1;70(7):947-954.
 - 15) Matsuda Y, Haniu H, Tsukahara T, Inoue T, Sako K, Sugita K, Mabuchi T, Emizu T and Sato K, Effects of Porcine Liver Decomposition Product on the cognitive function in non-dementia patients. *Jpn.J.Med.Phram.Sci.*,2016;73(8):1057-1066. 2016(in Japanese).
 - 16) Matsuda Y, Haniu H, Tsukahara T, Uemura T, Inoue T, Sako K, Kojima J, Mori T and Sato K, Oral administration of porcine liver decomposition product for 4 weeks enhances visual memory and delayed recall in healthy adults over 40 years of age: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Exp Gerontol*, 111064. 2020.
 - 17) Chikwanha, O. C., Vahmani, P., Muchenje, V., Dugan, M. E. R., & Mapiye, C. Nutritional enhancement of sheep meat fatty acid profile for human health and wellbeing. *Food Research International*, 104, 25–38.2018.
 - 18) Borghardt J, Rosien B, Görtelmeyer R, Lindemann S, Hartleb M, Klingmüller M. Effects of a spleen peptide preparation as supportive therapy in inoperable head and neck cancer patients. *Arzneimittelforschung*. 2000 ; 50: 178–184.
 - 19) Elias R, Kellerby SS and Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008 ; 48 : 430–441.
 - 20) Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). (2022). Meat and meat products. In Market summaries. June 2022.
 - 21) Toldra, F., Mora, L., & Reig, M. New insights into meat by-product utilization. *Meat Science*, 120, 54–59. 2016.
 - 22) Suzuki M, Sato I, Sato M, Iwasaki H, Saito T, Kimura M, Sako K, Maeda T, Haniu H, Tsukahara T, Matsuda Y. Pork Liver Decomposition Product May Improve Frontal Lobe Function in Humans-Open Trial. *Brain Sci*. 2024 Jun 7;14(6):586.
 - 23) 塚原 完, 唐木 達哉, 羽二生 久夫, 上芝 洗貴, 松田 佳和. リン脂質混合物による α -シヌクレイン凝集阻害作用. *Medical Science Digest*, 2022. Vol 48 (1), 47-49.
 - 24) Tan-No K, Sakurada T, Yamada T, Sakurada S, Kisara K. Involvement of opioid receptors in the antinociception produced by in-tracerebroventricularly administered spantide in mice. *Neuropeptides*. 1995 Nov;29(5):293-9
 - 25) Shirato K, Kizaki T : SARS-CoV- 2 spike protein S 1 subunit induces pro-inflammatory responses via toll-like receptor 4 signaling in murine and human macrophages. *Heliyon*.: e06187, 2021.

- 26) Khan S, Shafiei MS, Longoria C, Schoggins JW, Savani RC, Zaki H : SARS-CoV- 2 spike protein induces inflammation via TLR 2 -dependent activation of the NF- κ B pathway. *Elife*.10 : e68563, 2021.
- 27) Ware LB, M A Matthay. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000; 342: 1334-1349.
- 28) Zhang X, Tian X, Wang Y, Yan Y, Wang Y, et al. Application of lipopolysaccharide in establishing inflammatory models. *J Inflamm Res*. 2024 Aug 30;17:5855-5869.
- 29) Pons S, Fodil S, Azoulay E, Zafrani L. The vascular endothelium : the cornerstone of organ dysfunction in severe SARS-CoV-2 infection. *Crit Care* 2020 : 24 : 353-368.
- 30) Bao M, Hofsink N, Plösch T. LPS versus Poly I:C model: comparison of long-term effects of bacterial and viral maternal immune activation on the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2022 Feb 1;322(2):R99-R111.
- 31) Li D, Hu D, Ochi Y, Arakaki W, Mawatari A, Shigeta M, Wu Y, Hayashinaka E, Neyama H, Tahara T, Wada Y, Li F, Doi H, Watanabe Y, Cui Y. Regional neuroinflammation induced by peripheral infection contributes to fatigue-like symptoms: a [¹⁸F]DPA-714 positron emission tomography study in rats. *Front Immunol*. 2023 Nov 9;14:1261256.
- 32) Wakasugi D, Kondo S, Ferdousi F, Mizuno S, Yada A, Tominaga K, Takahashi S, Isoda H. A rare olive compound oleacein functions as a TrkB agonist and mitigates neuroinflammation both in vitro and in vivo. *Cell Commun Signal*. 2024 Jun 4;22(1):309.
- 33) Hong JW, Yang GE, Kim YB, Eom SH, Lew JH, Kang H. Anti-inflammatory activity of cinnamon water extract in vivo and in vitro LPS-induced models. *BMC Complement Altern Med*. 2012 Nov 28;12:237.
- 34) Tsukahara T, Haniu H, Uemura T, Matsuda Y. Therapeutic Potential of Porcine Liver Decomposition Product: New Insights and Perspectives for Microglia-Mediated Neuroinflammation in Neurodegenerative Diseases. *Biomedicines*. 2020 Oct 22;8(11):446.
- 35) Shuo Wang, Mingkuan Lu, Yong Cao, Zaijin Tao, Zhenyu Sun, Xuanzhe Liu, Jingwen Liu, Shen Liu. Degradative polylactide nanofibers promote M2 macrophage polarization via STAT6 pathway in peritendinous adhesion. *Composites Part B: Engineering*. 2023 Mar. Volume 253; 110520.

第9章 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導とご助言を賜りました日本薬科大学薬学部 臨床薬学分野教授 松田 佳和先生に深く感謝申し上げます。

また、研究の審査に際し、有益なご助言を頂きました櫻田 誓教授、高野 英史教授に心より御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、多くの助言と貴重な資料をご提供いただきました日本薬科大学 臨床薬学分野 前田 智司教授に感謝申し上げます。さらに、本研究において多大なるご協力を頂きました松田教室の皆様、そして社会人大学院生として研究の機会を与えてくださった、あすか製薬株式会社事業開発本部の皆様、に厚く御礼申し上げます。

最後に、このような勉強の機会と環境を与え、支えてくれた家族に深く感謝いたします。また、私の学位取得への思いを理解し、進学を後押ししてくださった日本薬科大学薬学部 櫻田誓教授、勝山壮教授に心より感謝申し上げます。

佐藤 郁也

第 10 章 利益相反

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。