

学 位 論 文

ヒト前頭葉機能に及ぼす豚肝臓分解物の臨床薬学的評価

日本薬科大学大学院薬学研究科

207004 鈴木美威瑠

指導教授：松田佳和

目次

第1章 序論.....	1
参考文献.....	2
第2章 PLDP 中のリン脂質及びリゾリン脂質定量解析.....	4
2-1 研究目的.....	4
2-2 材料.....	4
2-3 脂質分画の調製.....	4
2-4 機器分析とデータ処理 ⁴⁾	5
2-5 結果.....	5
2-6 参考文献.....	6
2-7 図表の部.....	7
第3章 豚肝臓分解物による認知及び前頭葉の機能に関する臨床薬学的研究.....	22
3-1 要旨.....	22
3-2 緒言.....	23
3-3 材料と方法.....	24
1. 倫理.....	24
2. 被験者のリクルート.....	24
3. ブタ肝臓分解物：PLDP.....	26
4. HDS-R 測定のオープン試験.....	26

5.	研究デザイン	26
6.	統計	27
3-4	結果	27
3-5	考察	28
3-6	結語	31
3-7	利益相反の開示	31
3-8	参考文献	31
3-9	図表の部	36
第4章	結語	42
第5章	謝辞	43
第6章	利益相反の開示	44

本論文は、以下の原著論文に基づいたものである。

- 1) Miiru Suzuki, Ikuya Sato, Masatsugu Sato, Hideki Iwasaki, Takahiro Saito, Masahiko Kimura, Kenichi Sako, Tomoji Maeda, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, and Yoshikazu Matsuda, Pork Liver Decomposition Product May Improve Frontal Lobe Function in Humans—Open Trial, *Brain Science*, Jun;14(586). doi.org/10.3390/brainsci14060586, 2024.

略語一覧

PLDP	Porcine Liver Decomposition Product (豚肝臓分解物)
HDS-R	Hasegawa Dementia Scale-Revised (改訂長谷川式簡易知能評価スケール)
WMS-R	Wechsler Memory Scale-Revised (ウェクスラー記憶検査改訂版)
MMSE	Mini-Mental State Examination (ミニメンタルステート検査)
TG	Triacylglycerol (トリアシルグリセロール)
PC	Phosphatidylcholine (ホスファチジルコリン)
Ach	Acetylcholine (アセチルコリン)
PS	Phosphatidylserine (ホスファチジルセリン)
LPS	Lysophosphatidylserine (リゾホスファチジルセリン)
LPC	Lysophosphatidylcholine (リゾホスファチジルコリン)
PE	Phosphatidylethanolamine (ホスファチジリエタノールアミン)
LPE	Lysophosphatidylethanolamine (リゾホスファチジリエタノールアミン)
PA	Phosphatidic acid (ホスファチジン酸)
LPA	Lysophosphatidic acid (リゾホスファチジン酸)
PI	Phosphatidylinositol (ホスファチジルイノシトール)
LPI	Lysophosphatidylinositol (リゾホスファチジルイノシトール)
PG	Phosphatidylglycerol (ホスファチジルグリセロール)
LPG	Lysophosphatidylglycerol (リゾホスファチジルグリセロール)
SM	Sphingomyelin(スフィンゴミエリン)
VFT	Verbal fluency task (言語流暢性課題)
CFT	Category fluency task (カテゴリー流暢性課題)
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor (脳由来神経栄養因子)

要旨

ブタ肝臓分解物 (Porcine Liver Decomposition Product : PLDP) は、ブタの肝臓ホモジネートをプロテアーゼで処理し、高圧蒸気滅菌後にカプセル充填した機能性表示食品であり、ホスファチジルコリン (PC) を含む多様なリン脂質が多く含まれている。

本研究では、PLDP に含まれるリン脂質について液体クロマトグラフィー質量分析法によって分子種レベルの定量を行うとともに PLDP の効果について改訂長谷川式簡易知能評価スケール (Hasegawa Dementia Scale-Revised : HDS-R) を指標としたオープン試験で実施し、総スコアとともに各質問項目における効果を評価することとした。その結果、『機能性リン脂質』を基盤とした創薬の可能性について考察することとした。

【PLDP 中のリン脂質及びリゾリン脂質定量解析】

PLDP 中のリン脂質解析については、液体クロマトグラフィー質量分析法によって、定量を行うこととした。定量したリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、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)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、ホスファチジン酸 (PA)、リゾホスファチジン酸 (LPA)、ホスファチジルセリン (PS)、リゾホスファチジルセリン (LPS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、ホスファチジルグリセロール PG、リゾホスファチジルグリセロール (LPG) 及びスフィンゴミエリン (SM) とした。

その結果、PLDP には PC が最も多く含まれており、次いで LPC、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 LPE、23 種類の PA、13 種類の LPA、18 種類の PS、15 種類の LPS、20 種類の PI、15 種類の LPI、15 種類の PG、11 種類の LPG 及び 10 種類の 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 が多く含まれていた。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る。

【ヒト前頭葉機能に及ぼす豚肝臓分解物の臨床薬学的評価】

PLDP は、ブタ肝臓ホモジネートをプロテアーゼで処理し、カプセルに充填することによって得られた。PLDP は視覚記憶を増強し、記憶想起を遅らせることが 3 つの臨床試験ですでに確認されており、その作用はホスファチジルコリン(PC)を含む様々なリン脂質によるものと考えている。本研究では、認知機能の低下に伴う、うつ症状に対する PLDP の臨床評価を行った。この臨床試験は、日本ではミニメンタルステート検査(MMSE)と同様に、一般的に使用されている HDS-R を用いて実施した。倫理的配慮から、PLDP 投与前のスコアを対照としてオープン試験を実施した。試験の選択基準として試験の同意取得日の年齢が 20 歳以上の者、HDS-R においてスコアが 15 以上 23 以下の者、試験に先立ち試験の目的及び内容を説明し、被験者本人から文書同意が得られる者とした。本試験では、PLDP を 1 日 4 カプセルで経口投与し、投与 2 週間後と 4 週間後に HDS-R を実施した。HDS-R スコアの有意な増加は、PLDP 投与後 2 週間および 4 週間で観察された。また、HDS-R スコアの各項目について、遅延再生を評価する質問項目では PLDP 投与後 2 週間および 4 週間で有意に増加し、言語流暢性課題を評価する質問項目が認められた。以上の結果から、PLDP が言語記憶の遅延想起を改善する効果の再現性を確認した。言語流暢性課題が前頭葉機能に反映されていると知られており、うつ病患者では言語流暢性課題による前頭前野の活性化の低下が報告されている。さらに、言語流暢性課題のスコアの増加は、PLDP が前頭葉機能を高め、抑うつ症状を予防または改善する可能性があることを示唆している。本研究で観察された効果は、既存の抗うつ薬の作用機序とは異なる可能性があり、新たな抗うつ薬の発見につながる可能性があると考えている。

PLDP に多く含まれているリン脂質は diacyl 34:1 PC、diacyl 34:2 PC、acyl 18:0 LPC、acyl 18:2 LPC、diacyl 34:4 PE であり、これらのリン脂質が PLDP の活性本体である可能性が考えられる。また、微量に含まれているリン脂質についても活性が高い可能性もあり、PLDP のリン脂質について、その作用を検討することは今後の重要な課題と言える。

第1章 序論

健康寿命の延伸は、本邦において早急に取り組まなければならない重要な問題である。この健康寿命に大きな影響を与えているのが、認知症の発症と言っても過言ではない。2012年の時点で約462万人と推計されていた認知症高齢者は、2025年には700万人を超えるとも言われている^{1,2,3)}。著者の所属する研究室では、認知症対策に関する臨床薬学的研究を行っており、PLDPを2週間及び4週間の摂取することによって、HDS-Rのスコアが有意に上昇することをオープン試験とプラセボ対象二重盲検試験で報告してきた⁴⁾。また、Matsudaらはウェクスラー記憶検査改訂版(WMS-R)においも、40歳以上の健常成人における視覚性記憶と遅延再生の促進も報告している⁵⁾。これらの報告から、PLDPは加齢による記憶の獲得や再生の低下を改善させる可能性が期待されている。

PLDPには、多様な脂質成分が含まれていることは薄層クロマトグラフィー法で確認している。脂質は生命活動にとって不可欠な成分であり、プロスタグランジンなどに代表される生理活性物質として多様な生理機能を示している。食事から摂取する脂質は主にトリアシルグリセロール(TG)、リン脂質及びコレステロールであり、その機能性と作用機序を研究することは、「機能性脂質」として、新たな創薬に繋がる可能性がある。

代表的なリン脂質であるホスファチジルコリン(PC)は、肝機能の正常化を中心とした脂質代謝異常の改善などが知られており、実験動物におけるコリン欠乏食摂取や長期アルコール投与による脂肪肝・肝硬変の進展に対して抑制的に働くことが報告されている⁶⁾。

また、脳機能との関係では、認知症におけるコリン作動系神経伝達機構の異常を是正するために、神経伝達物質であるアセチルコリン(Ach)の前駆物質であるコリンの補充療法が試みられており、PCとして摂取することで腸管から吸収され、血中コリン濃度が顕著に増加することが報告されている⁷⁾。コリン作動性ニューロンに異常の見られる認知症モデルマウスを用いた実験では、卵黄由来PCの投与により記憶能力の向上と血清コリン濃度、海馬内のコリンとAchの増加が観察されている⁸⁾。また、ホスファチジルセリン(PS)は脳に多く含まれるリン脂質であり、脳機能

との関連が注目されている。老齢ラットを用いた動物実験において、食事 PS 摂取がシナプトソームからの Ach 放出や Na⁺, K⁺-ATPase 活性増強などをもたらしたことから、脳機能の改善を期待した研究が進められてきた。ヒトへの臨床応用も試みられ、認知症や記憶障害に対する有効性が報告されている⁹⁾。

以上のように PLDP はリン脂質を活性本体として、認知機能を改善させる効果があることを考えているが、その効果の詳細や作用機序については不明な点が残る。また、活性本体となるリン脂質の分子種を同定することは、新たな創薬に繋がる可能性が期待できる。そこで本研究では、PLDP に含まれるリン脂質について液体クロマトグラフィー質量分析法によって分子種レベルの定量を行うとともに PLDP の効果を HDS-R をオープン試験で評価し、総スコアとともに各質問項目における効果を検討することとした。その結果、『機能性リン脂質』を基盤とした創薬の可能性について考察することとした。

参考文献

1. Department of Psychiatry, University of Tsukuba Dementia prevalence in the urban area and correspondence to life functional disorder of dementia. Available from: [http://www. Tsukuba -psychiatry.com](http://www.Tsukuba-psychiatry.com). 2014
2. Tanigawa D, Misu S, Sawa R, Cross-sectional relationships between depression and psychological elements of pain for elderly people requiring long-term care. *Psychogeriatrics*, 2: 177–184, 2014.
3. Kiyohara Y. *Advances in aging and health research*. Japan Foundation for Aging and Health. 1: 25–34, 2013.
4. 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.*, -73(8):1057-1066. 2016(in Japanese).

5. 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.
6. 日比野英彦：“機能性脂質のフロンティア”、佐藤清隆、柳田晃良、和田俊監修、CMC出版、p128、2004.
7. Zeisel SH, Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis, *J Am Coll Nutr*, Oct;11(5):473-81. doi:10.1080/07315724.1992.10718251. 1992.
8. Chung SY, Moriyama T, Uezu E, Uezu K, Hirata R, Yohena R, Masuda Y, Kokubu T and Yamamoto S, Administration of phosphatidylcholine increases brain acetylcholine concentration and improves memory in mice with dementia, *J Nutr Jun*;125(6):1484-9. doi: 10.1093/jn/125.6.1484. 1995.
9. 酒井正士、“脳機能と栄養”、横越英彦編、幸書房、p267、2004.

第2章 PLDP 中のリン脂質及びリゾリン脂質定量解析

2-1 研究目的

PLDP 中のリン脂質解析については、液体クロマトグラフィー質量分析法によって、定量を行った。定量対象としたリン脂質は、ホスファチジルコリン (PC)、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)、リゾホスファチジルエタノールアミン (LPE)、ホスファチジン酸 (PA)、リゾホスファチジン酸 (LPA)、ホスファチジルセリン (PS)、リゾホスファチジルセリン (LPS)、ホスファチジルイノシトール (PI)、リゾホスファチジルイノシトール (LPI)、ホスファチジルグリセロール (PG)、リゾホスファチジルグリセロール (LPG) 及びスフィンゴミエリン (SM) とした。

リピドーム分析は、液体クロマトグラフィートリプル四重極質量分析法 (LC-TQMS) を使用して、Lipidome lab Multiphospholipid Scan パッケージ (株式会社リピドームラボ、秋田、日本) で実施した。

2-2 材料

超高性能液体クロマトグラフィー (UPLC)/MS 品質のメタノール、イソプロパノール、およびクロロホルムは、富士フイルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から入手した。超純水は、Milli-Q 給水システム (Millipore、米国マサチューセッツ州ミルフォード) から入手した。

2-3 脂質分画の調製

リン脂質分析は、前述の方法に基づく液体クロマトグラフ トリプル四重極質量分析 (LC-TQMS) を使用して、Lipidome lab Phospholipid Scan パッケージ (株式会社リピドームラボ、秋田県、日本) で実施した^{1,2)}。脂質分画は、Bligh-Dyer 法³⁾を使用して、PC を含む総脂質をサンプルから抽出した。下部/有機相のアリコートに N₂ 下で蒸発乾固し、残渣を LC/MS/MS 測定のためにメタノールに溶解した。

2-4 機器分析とデータ処理⁴⁾

LC-MS/MS 分析は、ACQUITY UPLC H-Class (Waters) を備えた Xevo TQ-XS 質量分析計を使用して行った。脂質は、勾配溶媒系を使用して、Waters X-Bridge C18 カラム (3.5 μm 、内径 150 mm \times 1.0 mm) で 40°C で分離した。移動相 A はイソプロパノール/メタノール/水 (5/1/4 v/v/v) 5 mM ギ酸アンモニウムおよび 0.05% 水酸化アンモニウム (水中 28%) を補充。移動相 B は、5 mM ギ酸アンモニウムおよび 0.05% 水酸化アンモニウム (水中 28%) を補充したイソプロパノールで、流速は 80 $\mu\text{L}/\text{min}$ であった。脂質画分は陽イオンモードの多重反応モニタリング (MRM) を使用して測定した。定量値は下記内部標準法により算出した。表 1 に内部標準溶液リストを示した。また、必要に応じて分子量から重量換算も実施した。

内部標準法

定量値 (pmol) = 検出ピークの面積値/(内部標準物質面積値) \times 内部標準物質添加量 (pmol)

2-5 結果

測定したリン脂質の定量値を表 2~14 に示した。また、表 15 にはそれぞれのリン脂質定量値を示した。PLDP には PC が最も多く含まれており、次いで LPC、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 LPE、23 種類の PA、13 種類の LPA、18 種類の PS、15 種類の LPS、20 種類の PI、15 種類の LPI、15 種類の PG、11 種類の LPG 及び 10 種類の 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 が多く含まれていた。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。

2-6 参考文献

1. Shindou H, Koso H, Sasaki J, Nakanishi H, Sagara H, Nakagawa KM, Takahashi Y, Hishikawa D, Iizuka-Hishikawa Y, Tokumasu F, Noguchi H, Watanabe S, Sasaki T and Shimizu T. Docosahexaenoic acid preserves visual function by maintaining correct disc morphology in retinal photoreceptor cells. *J Biol Chem.* 292, 12054-12064. 2017.
2. Yamamoto T, Endo J, Kataoka M, Matsuhashi T, Katsumata Y, Shirakawa K, Yoshida N, Isobe S, Moriyama H, Goto S, Yamashita K, Nakanishi H, Shimanaka Y, Kono N, Shinmura K, Arai H, Fukuda K and Sano M. Decrease in membrane phospholipids unsaturation correlates with myocardial diastolic dysfunction. *PLoS One.* 13, e0208396. 2018.
3. Bligh, E.G. and Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology* 37, 911-917. 1959.
4. Houjou T, Yamatani K, Nakanishi H, Imagawa M, Shimizu T and Taguchi R, Rapid and selective identification of molecular species in phosphatidylcholine and sphingomyelin by conditional neutral loss scanning and MS3. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18: 3123–313, 2004.

2-7 図表の部

表 1.内部標準溶液リスト

製品名	メーカー	型番	最終濃度(pmol)
15:0-18:1-d7-PC	Avanti Polar Lipids	791637	100
15:0-18:1-d7-PE	Avanti Polar Lipids	791638	100
15:0-18:1-d7-PA	Avanti Polar Lipids	791642	20
15:0-18:1-d7-PS	Avanti Polar Lipids	791639	20
15:0-18:1-d7-PI	Avanti Polar Lipids	791641	20
15:0-18:1-d7-PG	Avanti Polar Lipids	791640	20
1-1(Z)-Hexadecenyl-2-Palmitoyl- d9-sn-glycero-3-PC	Cayman chemical	27589	100
1-1(Z)-Hexadecenyl-2-Palmitoyl- d9-sn-glycero-3-PE	Cayman chemical	27590	100
18:1-d7 LPC	Avanti Polar Lipids	791643	100
18:1-d7 LPE	Avanti Polar Lipids	791644	100
18:1-d7 LPA	Avanti Polar Lipids	LM1701	20
18:1-d7 LPS	Avanti Polar Lipids	858141	20
18:1-d7 LPI	Avanti Polar Lipids	850103	20
18:1-d7 LPG	Avanti Polar Lipids	858127	20
12:0 SM(d18:1/12:0)	Avanti Polar Lipids	860583	100

表 2 PC の定量値(mg/1.136g of PLDP)

00024 diacyl 32:0 PC	0.626
00025 diacyl 32:1 PC	0.327
00030 diacyl 34:0 PC	0.005
00031 diacyl 34:1 PC	3.121
00032 diacyl 34:2 PC	2.946
00036 diacyl 36:0 PC	0.002
00037 diacyl 36:1 PC	0.449
00038 diacyl 36:2 PC	2.792
00039 diacyl 36:3 PC	1.957
00040 diacyl 36:4 PC	2.940
00041 diacyl 36:5 PC	0.322
00046 diacyl 38:0 PC	0.004
00047 diacyl 38:1 PC	0.063
00048 diacyl 38:2 PC	0.008
00049 diacyl 38:3 PC	0.348
00050 diacyl 38:4 PC	2.489
00051 diacyl 38:5 PC	1.678
00052 diacyl 38:6 PC	1.158
00057 diacyl 40:0 PC	0.000
00058 diacyl 40:1 PC	0.001
00059 diacyl 40:2 PC	0.001
00060 diacyl 40:3 PC	0.003
00061 diacyl 40:4 PC	0.030
00062 diacyl 40:5 PC	0.173
00063 diacyl 40:6 PC	0.270
total PC	21.720

表 3 LPC の定量値(mg/1.136g of PLDP)

01008 acyl 16:0 LPC	0.539
01009 acyl 16:1 LPC	0.033
01012 acyl 18:0 LPC	0.879
01013 acyl 18:1 LPC	0.485
01014 acyl 18:2 LPC	0.660
01017 acyl 20:0 LPC	0.001
01018 acyl 20:1 LPC	0.004
01019 acyl 20:2 LPC	0.008
01020 acyl 20:3 LPC	0.076
01021 acyl 20:4 LPC	0.528
01022 acyl 20:5 LPC	0.027
01023 acyl 22:0 LPC	0.001
01024 acyl 22:1 LPC	0.000
01025 acyl 22:2 LPC	0.001
01026 acyl 22:3 LPC	0.001
01027 acyl 22:4 LPC	0.023
01028 acyl 22:5 LPC	0.064
01029 acyl 22:6 LPC	0.061
total LPC	3.390

表 4 PE の定量値(mg/1.136g of PLDP)

02024 diacyl 32:0 PE	0.001
02025 diacyl 32:1 PE	0.005
02030 diacyl 34:0 PE	0.000
02031 diacyl 34:1 PE	0.112
02032 diacyl 34:2 PE	0.196
02036 diacyl 36:0 PE	0.000
02037 diacyl 36:1 PE	0.089
02038 diacyl 36:2 PE	0.518
02039 diacyl 36:3 PE	0.153
02040 diacyl 36:4 PE	0.221
02041 diacyl 36:5 PE	0.012
02046 diacyl 38:0 PE	0.000
02047 diacyl 38:1 PE	0.000
02048 diacyl 38:2 PE	0.004
02049 diacyl 38:3 PE	0.093
02050 diacyl 38:4 PE	0.679
02051 diacyl 38:S PE	0.252
02052 diacyl 38:6 PE	0.099
02057 diacyl 40:0 PE	0.000
02058 diacyl 40:1 PE	0.000
02059 diacyl 40:2 PE	0.000
02060 diacyl 40:3 PE	0.001
02061 diacyl 40:4 PE	0.012
02062 diacyl 40:5 PE	0.052
02063 diacyl 40:6 PE	0.069
total PE	2.570

表 5 LPE の定量値(mg/1.136g of PLDP)

03008 acyl 16:0 LPE	0.096
03009 acyl 16:1 LPE	0.005
03012 acyl 18:0 LPE	0.643
03013 acyl 18:1 LPE	0.112
03014 acyl 18:2 LPE	0.134
03017 acyl 20:0 LPE	0.001
03018 acyl 20:1 LPE	0.003
03019 acyl 20:2 LPE	0.002
03020 acyl 20:3 LPE	0.018
03021 acyl 20:4 LPE	0.164
03022 acyl 20:5 LPE	0.005
03023 acyl 22:0 LPE	0.001
03024 acyl 22:1 LPE	0.002
03025 acyl 22:2 LPE	0.000
03026 acyl 22:3 LPE	0.002
03027 acyl 22:4 LPE	0.034
03028 acyl 22:5 LPE	0.032
03029 acyl 22:6 LPE	0.026
total LPE	1.280

表 6 PA の定量値(mg/1.136g of PLDP)

00024 diacyl 32:0 PA	0.001
00025 diacyl 32:1 PA	0.001
00030 diacyl 34:0 PA	0.001
00031 diacyl 34:1 PA	0.007
00032 diacyl 34:2 PA	0.007
00036 diacyl 36:0 PA	0.017
00037 diacyl 36:1 PA	0.118
00038 diacyl 36:2 PA	0.022
00039 diacyl 36:3 PA	0.013
00040 diacyl 36:4 PA	0.045
00041 diacyl 36:5 PA	0.004
00046 diacyl 38:0 PA	0.000
00047 diacyl 38:1 PA	0.009
00048 diacyl 38:2 PA	0.017
00049 diacyl 38:3 PA	0.041
00050 diacyl 38:4 PA	0.148
00051 diacyl 38:5 PA	0.031
00052 diacyl 38:6 PA	0.014
00057 diacyl 40:0 PA	0.000
00058 diacyl 40:1 PA	0.010
00059 diacyl 40:2 PA	0.011
00060 diacyl 40:3 PA	0.017
00061 diacyl 40:4 PA	0.060
00062 diacyl 40:5 PA	0.030
00063 diacyl 40:6 PA	0.024
total PA	0.650

表 7 LPA の定量値(mg/1.136g of PLDP)

01009 acyl 16:0 LPA	0.014
01010 acyl 16:1 LPA	0.000
01012 acyl 18:0 LPA	0.059
01013 acyl 18:1 LPA	0.027
01014 acyl 18:2 LPA	0.000
01017 acyl 20:0 LPA	0.001
01018 acyl 20:1 LPA	0.000
01019 acyl 20:2 LPA	0.001
01020 acyl 20:3 LPA	0.003
01021 acyl 20:4 LPA	0.043
01022 acyl 20:5 LPA	0.001
01023 acyl 22:0 LPA	0.001
01024 acyl 22:1 LPA	0.001
01025 acyl 22:2 LPA	0.000
01026 acyl 22:3 LPA	0.000
01027 acyl 22:4 LPA	0.007
01028 acyl 22:5 LPA	0.010
01029 acyl 22:6 LPA	0.005
total LPA	0.170

表 8 PS の定量値(mg/1.136g of PLDP)

02024 diacyl 32:0 PS	0.000
02025 diacyl 32:1 PS	0.000
02030 diacyl 34:0 PS	0.000
02031 diacyl 34:1 PS	0.002
02032 diacyl 34:2 PS	0.001
02036 diacyl 36:0 PS	0.000
02037 diacyl 36:1 PS	0.011
02038 diacyl 36:2 PS	0.006
02039 diacyl 36:3 PS	0.002
02040 diacyl 36:4 PS	0.005
02041 diacyl 36:5 PS	0.000
02046 diacyl 38:0 PS	0.000
02047 diacyl 38:1 PS	0.001
02048 diacyl 38:2 PS	0.001
02049 diacyl 38:3 PS	0.007
02050 diacyl 38:4 PS	0.023
02051 diacyl 38:5 PS	0.004
02052 diacyl 38:6 PS	0.003
02057 diacyl 40:0 PS	0.000
02058 diacyl 40:1 PS	0.002
02059 diacyl 40:2 PS	0.001
02060 diacyl 40:3 PS	0.001
02061 diacyl 40:4 PS	0.003
02062 diacyl 40:5 PS	0.009
02063 diacyl 40:6 PS	0.004
total PS	0.080

表 9 LPS の定量値(mg/1.136g of PLDP)

03009 acyl 16:0 LPS	0.009
03010 acyl 16:1 LPS	0.000
03012 acyl 18:0 LPS	0.229
03013 acyl 18:1 LPS	0.037
03014 acyl 18:2 LPS	0.008
03017 acyl 20:0 LPS	0.001
03018 acyl 20:1 LPS	0.001
03019 acyl 20:2 LPS	0.001
03020 acyl 20:3 LPS	0.005
03021 acyl 20:4 LPS	0.031
03022 acyl 20:5 LPS	0.001
03023 acyl 22:0 LPS	0.002
03024 acyl 22:1 LPS	0.001
03025 acyl 22:2 LPS	0.000
03026 acyl 22:3 LPS	0.000
03027 acyl 22:4 LPS	0.006
03028 acyl 22:5 LPS	0.008
03029 acyl 22:6 LPS	0.007
total LPS	0.350

表 10 PI の定量値(mg/1.136g of PLDP)

04024 diacyl 32:0 PI	0.001
04025 diacyl 32:1 PI	0.005
04030 diacyl 34:0 PI	0.000
04031 diacyl 34:1 PI	0.013
04032 diacyl 34:2 PI	0.057
04036 diacyl 36:0 PI	0.002
04037 diacyl 36:1 PI	0.016
04038 diacyl 36:2 PI	0.060
04039 diacyl 36:3 PI	0.062
04040 diacyl 36:4 PI	0.118
04041 diacyl 36:5 PI	0.003
04046 diacyl 38:0 PI	0.000
04047 diacyl 38:1 PI	0.001
04048 diacyl 38:2 PI	0.015
04049 diacyl 38:3 PI	0.116
04050 diacyl 38:4 PI	0.447
04051 diacyl 38:5 PI	0.100
04052 diacyl 38:6 PI	0.016
04057 diacyl 40:0 PI	0.000
04058 diacyl 40:1 PI	0.000
04059 diacyl 40:2 PI	0.000
04060 diacyl 40:3 PI	0.002
04061 diacyl 40:4 PI	0.018
D4062diacyl140:5 PI	0.014
04063 diacyl 40:6 PI	0.007
total PI	1.080

表 11 LPI の定量値(mg/1.136g of PLDP)

05009 acyl 16:0 LPI	0.021
05010 acyl 16:1 LPI	0.001
05012 acyl 18:0 LPI	0.749
05013 acyl 18:1 LPI	0.042
05014 acyl 18:2 LPI	0.027
05017 acyl 20:0 LPI	0.001
05018 acyl 20:1 LPI	0.001
05019 acyl 20:2 LPI	0.007
05020 acyl 20:3 LPI	0.038
05021 acyl 20:4 LPI	0.154
05022 acyl 20:5 LPI	0.004
05023 acyl 22:0 LPI	0.000
05024 acyl 22:1 LPI	0.000
05025 acyl 22:2 LPI	0.000
05026 acyl 22:3 LPI	0.001
05027 acyl 22:4 LPI	0.011
05028 acyl 22:5 LPI	0.009
05029 acyl 22:6 LPI	0.001
total LPI	1.070

表 12 PG の定量値(mg/1.136g of PLDP)

06124 diacyl 32:0 PG	0.000
06125 diacyl 32:1 PG	0.004
06130 diacyl 34:0 PG	0.000
06131 diacyl 34:1 PG	0.025
06132 diacyl 34:2 PG	0.033
06136 diacyl 36:0 PG	0.000
06137 diacyl 36:1 PG	0.006
06138 diacyl 36:2 PG	0.036
06139 diacyl 36:3 PG	0.029
06140 diacyl 36:4 PG	0.073
06141 diacyl 36:5 PG	0.007
06146 diacyl 38:0 PG	0.000
06147 diacyl 38:1 PG	0.000
06148 diacyl 38:2 PG	0.000
06149 diacyl 38:3 PG	0.007
06150 diacyl 38:4 PG	0.028
06151 diacyl 38:5 PG	0.019
06152 diacyl 38:6 PG	0.013
06157 diacyl 40:0 PG	0.000
06158 diacyl 40:1 PG	0.000
06159 diacyl 40:2 PG	0.000
06160 diacyl 40:3 PG	0.000
06161 diacyl 40:4 PG	0.001
06162 diacyl 40:5 PG	0.002
06163 diacyl 40:6 PG	0.002
total PG	0.290

表 13 LPG の定量値(mg/1.136g of PLDP)

07109 acyl 16:0 LPG	0.006
07110 acyl 16:1 LPG	0.001
07112 acyl 18:0 LPG	0.014
07113 acyl 18:1 LPG	0.020
07114 acyl 18:2 LPG	0.011
07117 acyl 20:0 LPG	0.000
07118 acyl 20:1 LPG	0.000
07119 acyl 20:2 LPG	0.001
07120 acyl 20:3 LPG	0.001
07121 acyl 20:4 LPG	0.004
07122 acyl 20:5 LPG	0.000
07123 acyl 22:0 LPG	0.000
07124 acyl 22:1 LPG	0.000
07125 acyl 22:2 LPG	0.000
07126 acyl 22:3 LPG	0.000
07127 acyl 22:4 LPG	0.001
07128 acyl 22:5 LPG	0.001
07129 acyl 22:6 LPG	0.001
total LPG	0.060

表 14 SM の定量値(mg/1.136g of PLDP)

07002 d18:1/C16:0 SM	0.540
07003 d18:1/C16:1 SM	0.011
07004 d18:1/C18:0 SM	0.097
07005 d18:1/C18:1 SM	0.011
07006 d18:1/C20:0 SM	0.011
07007 d18:1/C20:1 SM	0.005
07008 d18:1/C22:0 SM	0.009
07009 d18:1/C22:1 SM	0.001
07010 d18:1/C24:0 SM	0.070
07011 d18:1/C24:1 SM	0.009
total SM	0.760

表 15 それぞれのリン脂質定量値(mg/1.136g of PLDP)

total PC	21.716
total LPC	3.390
total PE	2.569
total LPE	1.279
total PA	0.648
total LPA	0.173
total PS	0.085
total LPS	0.348
total PI	1.076
total LPI	1.067
total PG	0.287
total LPG	0.061
total SM	0.764

第 3 章 豚肝臓分解物による認知及び前頭葉の機能に関する臨床薬学的研究

3-1 要旨

ブタ肝臓分解物（Porcine Liver Decomposition Product：PLDP）は、ブタの肝臓ホモジネートをプロテアーゼで処理し、高圧蒸気滅菌後にカプセル充填した機能性表示食品であり、ホスファチジルコリン（PC）を含む多様なリン脂質が多く含まれている。本研究では、これまでの臨床試験で認知機能の改善効果が認められている PLDP について、本邦で汎用されている HDS-R のスコアで 15 点から 23 点の被験者を募集し、PLDP の連続経口投与による 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検討した。試験は、臨床試験担当医が倫理的に判断し、安全な試験を行う前提で、オープン試験による検討を行うこととした。本試験では、PLDP を 1 日 4 カプセルで経口投与し、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。

その結果、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。今後は、PLDP の活性本体を明らかとし、創薬シーズや新たな抗うつ治療の一部へと発展すればと期待している。

キーワード

ブタ肝臓分解物 (PLDP)、改訂長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R)、言語の遅延再生、言語流暢性課題、前頭前野機能

3-2 緒言

ブタ肝臓分解物 (Porcine Liver Decomposition Product : PLDP) は、ブタの肝臓ホモジネートをプロテアーゼで処理し、高圧蒸気滅菌後にカプセル充填した機能性表示食品であり、ホスファチジルコリン (PC) を含む多様なリン脂質が多く含まれている (第 2 章 表 15)。Matsuda らは、この PLDP を 2 週間及び 4 週間の摂食することによって、HDS-R のスコアが有意に上昇することをオープン試験とプラセボ対象二重盲検試験で報告している¹⁾。また、Matsuda らはウェクスラー記憶検査改訂版 (WMS-R) においも、40 歳以上の健常成人における視覚性記憶と遅延再生の促進も報告している²⁾。これらの報告から、PLDP は加齢による記憶の獲得や再生の低下を改善させる可能性が期待されている。PLDP による記憶の獲得と再生の促進に関する機序としては、PLDP 中に含まれるホスファチジルコリン (PC) がアセチルコリン (Ach) へと生合成され、記憶の獲得を促進する可能性を考えているが³⁾、それ以外の作用機序は不明である。

一方、Tsukahara らは PLDP に含まれる脂質画分が抗炎症性 M2 型ミクログリアを相対的に増加させ、脳内の微小炎症を抑制させる可能性を報告している^{4,5)}。最近の研究成果によると、脳の微小な炎症性反応が多く、精神疾患の病態に関わることが示されており⁶⁾、PLDP が記憶の獲得と再生以外にも精神疾患等に効果を示す可能性が考えられる。このことは、PLDP がどのような臨床効果を示すかを検討することによって PLDP に含まれる活性本体の解明や精神神経疾患の発症機序の解明に繋がるものと期待しているところである。

HDS-R は見当識や様々な質的に異なる記憶に関する項目で構成されており測定時間の短さや簡便さから本邦において汎用されている認知機能検査である。HDS-R は年齢、見当識、3 単語の即時記銘と遅延再生、計算、数字の逆唱、物品記銘、言語流暢性の 9 項目からなる 30 点満点の検査であり^{7,8)}、それぞれの質問項目に対する PLDP の効果を確認することは、PLDP の臨床効果

と作用機序を解明するための情報として意味があるものと考えている。

そこで本研究では、これまでの臨床試験で効果が認められている PLDP の用量で、それぞれの質問項目に対する効果を検討することとした。また、PLDP のプラセボ対象二重盲検試験における結果では、被験者の HDS-R の初期値が高く、PLDP の効果が不明瞭であったことから、臨床試験担当医が倫理的に判断し、安全で倫理的な試験を行う前提で、事前スクリーニングで HDS-R のスコアが 15 点から 23 点の被験者について、PLDP 摂食後 2 週間と 4 週間における HDS-R の総スコアと質問項目のスコアについて、オープン試験による検討を行うこととした。

3-3 材料と方法

1. 倫理

この研究は厚生労働省の「ヒト対象倫理ガイドライン」に従って実施した。すべての参加者はヘルシンキ宣言に従って書面によるインフォームドコンセントを提供した。研究プロトコルは、日本薬科大学研究機関倫理委員会（承認日：2015 年 10 月 11 日、NPUEC 20151011）および医療法人社団讃友会あべクリニック治験審査委員会の承認（承認日：2015 年 8 月 12 日、AbeEC 20150812）を得て実施した。さらに、この研究は、大学病院医療情報ネットワーク (UMIN000021530)にも登録し、CONSORT ガイドラインに従って実施した。さらに、本研究の客観性を確保するために、受託研究機関（株式会社リライフ）に試験を依託して実施することとした。

2. 被験者のリクルート

本研究は、森内科クリニック（東京）で行った。森内科クリニックに来院し、以下の選択基準と除外基準に合致した被験者の協力で実施した。また、本試験の例数は、PLDP の用量検討試験（高用量群：8 例、低用量群：5 例）及びプラセボ対照二重盲検試験（プラセボ群 25 例、PLDP 群：25 例）を参考に被験者の倫理的配慮から 10 名以上のオープン試験で実施することとした。

【選択基準】

- ① 試験の同意取得日の年齢が 20 歳以上の者
- ② HDS-R においてスコアが 15 以上 23 以下の者
- ③ 試験に先立ち試験の目的及び内容を説明し、被験者本人から文書同意が得られる者。

【除外基準】

- ① 認知症治療薬を継続して服薬しなくてはならない者、また認知症治療薬の服薬を開始する者
(本試験が不成立となるため)
- ② HDS-R に影響を与えることが予想される医薬品を服用している者 (本試験が不成立となるため)
- ③ HDS-R に影響を及ぼす脳疾患の既往又は合併症を有する者 (本試験が不成立となるため)
- ④ 嚥下困難を有する者 (本製品によって誤嚥を起こす可能性があるため)
- ⑤ 本試験の趣旨をご理解いただけない者 (有害事象を招く恐れがあるため)
- ⑥ 本試験中に受けている治療が変わる可能性がある者 (本試験が不成立となるため)
- ⑦ HDS-R の実施が困難な者 (本試験が不成立となるため)
- ⑧ 豚肉・豚レバーに対しアレルギーを有する者 (被験者の安全性を確保するため)
- ⑨ 悪性腫瘍及び重度な心・腎・肝障害、呼吸器疾患、循環器疾患などの合併症を有する者 (被験者の安全性を確保するため)
- ⑩ その他、試験担当医師が試験に組み入れることが不相当と判断した者

3. プタ肝臓分解物：PLDP

本研究に供した PLDP（ヤエガキ発酵技研工業株式会社製造）は豚肝臓をニュートラーゼ（エンド型プロテアーゼ）で処理した後、加熱滅菌を行ってエキス状としたものを基本とした。これに、賦形剤（デキストリン、コーンスターチ、マルトデキストリン）とともにカプセルに充填したものを（335mg/カプセル）を株式会社シュガーレディ化粧品より供与を受けた。PLDP の 1 日摂食量におけるカプセル内容物の組成は第 2 章表 15 に示した。PLDP は室温で暗所保管とし、被験者には密封容器に入れて手渡しした。

4. HDS-R 測定のオープン試験

HDS-R は、一般の高齢者の中から認知症の高齢者をスクリーニングすることを目的に用いられる簡易的な認知機能テストで、信頼性の高い評価方法として、日本国内の多くの医療機関で使用されている。その内容は 9 つの質問で構成されており、それぞれの質問は年齢（Q1）、日時の見当識（Q2）、場所の見当識（Q3）、言葉の即時記銘（Q4）、計算（Q5）、逆唱（Q6）、言葉の遅延再生（Q7）、物品記銘（Q8）、言語流暢性（Q9）などの評価項目となっている（表 1）。

HDS-R はこれまでの報告を参考にして^{1) 2)}、PLDP の摂食前、摂食後 2 週間と 4 週間に実施した。

5. 研究デザイン

PLDP 臨床試験の結果を表 3 に示す。表 3 に示したすべての研究は、4 週間の研究期間を有していた。HDS-R および WMS-R は、投与前および投与後 2 週間および 4 週間後に実施された。さらに、研究 1 および 2 は、HDS-R スコアが 20 以上の参加者を対象に実施された。表 3 に示されているように、PLDP を 1 日あたり 4 カプセル投与すると、HDS-R および WMS-R スコアが有意に増加した。さらに、2 つの二重盲検プラセボ対照試験では、プラセボ群に有意な変化は観察されなかった。そのため、倫理的配慮から、対照群を設けないオープン試験となり、PLDP 投与

前の値の変化に基づいてデータが評価された。

6. 統計

得られた結果は、平均値±標準偏差として表記し、統計的有意差は、分散分析の後、対応のない t 検定とウェルチの t 検定で解析した。

3-4 結果

図 1 に被験者リクルートを示した。13 名の被験者候補に試験内容について説明を行い、試験参加の同意を得た。その後、1 名が認知機能に影響を及ぼす医薬品を服用していたため、また 1 名は同意の撤回によって試験対象から除外した。その結果、HDS-R が 15 点以上 23 点以下で文書による同意の得られた 65 歳から 86 歳の 11 名の被験者で試験を行うこととした。(年齢：77±3 歳、HDS-R：21.4±0.7)。

表 2 には被験者の年齢、HDS-R 及び被験者の受診目的を示した。試験に参加した、被験者の性別は男性 5 名、女性 6 名であり、平均年齢は 77±3 歳であった。11 名の被験者の HDS-R のスコアは 21.4±0.7 であった。

図 2 は HDS-R が 15 点以上 23 点以下の被験者において、PLDP 摂食前、摂食後 2 週間及び 4 週間の HDS-R について、実測値と変化分を示した。PLDP の摂食は、摂食前に 21.4±2.3 であった HDS-R を摂食後 2 週間では 24.0±4.4 及び 4 週間では 25.3±3.6 と有意な上昇させた。また、変化分においても PLDP の摂食は 2 週間で 2.6±2.7、4 週間で 3.9±3.0 と有意な上昇を認めた。

図 3 は HDS-R における各質問 (Q1~9) における、PLDP の摂食後 2 週間及び 4 週間の変化分を示した。PLDP は摂食後 2 週間で、Q7 のスコアを 1.1±1.4 及び Q9 のスコアを 1.1±1.6 と有意な上昇が認められた。また、PLDP の摂食後 4 週間においても Q7 のスコアは 1.6±2.2 及び Q9 のスコアは 1.2±1.7 と有意に上昇していた。その他の質問項目においては、PLDP の摂食後 2 週間において、Q2 と Q6 のスコアの上昇傾向、摂食後 4 週間においては Q2 のスコアの上昇傾向が認められたが統計的に有意な差は得られなかった。

3-5 考察

本試験では、PLDP の摂食は、HDS-R が 15 点から 23 点の被験者において、2 週間及び 4 週間で HDS-R のスコアを投与前に比較して有意に上昇させた。また、HDS-R の質問項目別に評価した場合、言語の遅延再生及び言語流暢性のスコアを有意に上昇させることが明らかとなった。Matsuda らは、PLDP を 2 週間及び 4 週間連続摂食することによって、HDS-R の上昇を報告している¹⁾。この試験において、HDS-R が 15 点から 23 点で軽度認知障害の可能性のある被験者においても PLDP の有効性を確認することができた。また、PLDP の 4 週間連続摂食によって、WMS-R における記憶の遅延再生スコアと視覚性記憶のスコア増加も報告している²⁾。本研究において、PLDP の摂食は、HDS-R の総スコアを上昇させ、これまでの報告を再現させる結果が認められた。また、PLDP は、言語の遅延再生のスコアを上昇させ、WMS-R で認められた結果と同様の結果が得られた。一方、日時の見当識や数字の逆唱については上昇傾向が観察されたが、有意な変化は認められなかった。さらに、Q8 の物品記名においては、変化が認められず、WMS-R で得られた結果と異なっていた。この点については、今後、評価法や解析法の違いによる結果の相同性について検討する必要があると考えている。

言語流暢性課題 (Verbal fluency task : VFT) は、語想起課題とも呼ばれ、言語評価や認知機能のスクリーニング検査でよく用いられる神経心理検査である。HDS-R においても標準化された検査バッテリーに含まれており、Q9 がカテゴリー流暢性課題(Category fluency task: CFT)として該当している。CFT は前頭機能に加え、意味を手掛かりに語を想起する能力が求められる⁹⁾。さらに、Audenaert らは CFT 課題中の脳血流量を SPECT によって測定し、左下前頭皮質と左前頭葉前部と右下前頭皮質が活性化することを報告し¹⁰⁾、Gourovitch らも健常者に対し PET で CFT 課題中の前頭前野の活動をj確認している¹¹⁾。本研究において、PLDP の摂食は Q9 のスコアを有意に上昇させたことから、PLDP には前頭部の血流を増やし、その機能を向上させる可能性があるものと期待される。

うつ病に関しては、これまでの研究結果から扁桃体を中心とする情報伝達系回路と側坐核を中

心とする報酬系回路が前頭前野を中心とする神経回路と複雑に絡み合っており、病態を形成すると考えられている^{12, 13, 14)}。さらに、うつ病患者 10 例と年齢、性をマッチングさせて健常者 10 例について VFT 遂行中の脳活動を機能的磁気共鳴画像法 (fMRI) により比較したところ、うつ病患者では VFT 遂行中に賦活される左前頭前野の機能低下が報告されている¹⁴⁾。以上の点を考慮すると、PLDP は前頭葉の機能を賦活化し、抗うつ効果が期待できるものと考えている。また、この効果は、神経伝達物質やその受容体に直接作用する現行の医薬品とは異なる機序で効果を示す可能性が示唆される。この点に関しては、さらに詳細な検討が必要と考えている。

PLDP の活性本体に関する研究については、Tukahara らが PLDP 中の脂質画分やリゾリン脂質群が SIM-A9 ミクログリアを LPS で刺激した際に放出される炎症性サイトカインや活性化酸素を抑制することを報告している^{4,5,15)}。脳内において、ミクログリアは神経炎症に関与しているほか、神経回路形成や神経伝達の恒常性維持において重要な役割を担っていること示唆されている^{16,17)}。また、活性化したミクログリアを標的とする PET imaging によると、うつ病患者の抑うつ症状と前頭前皮質、前帯状皮質及び海馬におけるミクログリアの活性化が正の相関を示すことも報告されており¹⁸⁾、自殺念慮の強さとミクログリアの活性化と相関も指摘されている¹⁹⁾。また、ラットにおける反復的な社会敗北ストレスモデルにおいて、交感神経系を介して骨髄造血が促進され、未熟な単球が脳内に移行してミクログリアが活性化することが報告されており、心理的社会的ストレスによる情動反応 (不安様行動) により、末梢由来の単球と脳内ミクログリアが相互に神経炎症を増幅させることが示唆されている²⁰⁾。したがって、PLDP は脳内のミクログリアの機能を調節して、前頭葉の機能を高め、その結果として CFT のスコアを高めている可能性が考えられる。このことは、PLDP が抗うつ効果を示す可能性を示唆するものであり、今後、さらに詳細な検討が必要であると考えている。

PLDP にはホスファチジルコリンが含まれており、コリンの供給源となっている。Mirja Kaizer Ahmmed らや Jing Wen らは、 ω -3 多価不飽和脂肪酸を含む LPC が、脳の発達と神経細胞の成長に重要な役割を果たす可能性を報告している^{21,22)}。また、Murota は、PC がコリンと多価不飽和脂肪酸の吸収に重要であることを報告している²³⁾。これらは、PLDP に含まれるコリンや多価不

飽和脂肪酸によって、本研究結果で認められた効果が出ている可能性が考えられる。さらに Inoue らは、コリン塩化物の長期投与は八方向放射状迷路によるラットの学習記憶の獲得過程と保持過程を促進し、その機序の一つとして海馬の脳由来神経栄養因子 (BDNF) の産生亢進を報告している²⁴⁾。海馬及び大脳皮質のニューロンやミクログリアから産生される BDNF は神経細胞の分化、成熟及び生存、軸索伸長やシナプス形成など神経の発達や神経伝達の修飾、神経再生さらに学習、記憶において重要な役割を担っている²⁵⁾。この BDNF の作用は炎症性サイトカインで抑制されることが知られている²⁶⁾。これらの報告は、PLDP 中に含まれるリン脂質がコリンや脂肪酸を介して、神経保護的に作用するとともに、ミクログリアで産生される炎症性サイトカインを抑制し、BDNF の産生を亢進させた結果、本研究で認められた結果が得られた可能性が考えられる。これらについては、今後も詳細な検討が必要と考えている。

以上の結果から、PLDP は言語性記憶の遅延再生を改善させる効果があることが明らかとなった。また、言葉流暢性課題のスコアを高めることは、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が示唆された。その機序としては、ミクログリアで産生される炎症性サイトカインの抑制や BDNF の産生亢進が関与していると考えられる。本研究で認められた効果は、既存の抗うつ薬等の作用機序とは異なる可能性が考えられ、これまでにない新たな抗うつ薬として創薬に結び付くことを期待している。今後は、動物モデル等で詳細な検討が必要と考えている。

本研究は、PLDP の認知機能改善効果について、HDS-R の評価項目別に検討し、PLDP の特性を確認することを目的として実施した。その結果、PLDP に抗うつ効果がある可能性を確認することができた。ただし、この研究にはいくつかの課題がある。まず、倫理的な理由により、臨床試験はオープン試験で行っており、結果は少数の被験者によるものである。第二に、PLDP による前頭葉の活性化については前頭葉の機能を直接測定していないため、可能性を示したにすぎない。第三に、PLDP の抗うつ効果があるかどうかを検証する必要がある。第四に、同種類の類似薬での有効性を比較できていない。したがって、本研究の結果を詳細に検証するためには、今後の研究が必要であると考えている。

また、PLDPに多く含まれているリン脂質は diacyl 34:1 PC、diacyl 34:2 PC、acyl 18:0 LPC、acyl 18:2 LPC、diacyl 34:4 PE であり、これらのリン脂質が PLDP の活性本体である可能性が考えられる。また、微量に含まれているリン脂質についても活性が高い可能性もあり、PLDP のリン脂質について、その作用を検討することは今後の重要な課題と言える。

3-6 結語

本研究により、PLDP は脳内の微弱な炎症を制御し、前頭葉の機能を高めることが推察される。このことは PLDP がうつ症状の予防や改善させる可能性を示唆するものである。

今後は、動物実験等で抗うつ効果や抗不安効果を検討する必要があるとともに、その活性本体を明らかにすることで新たな抗うつ薬の創製に繋がるものと期待している。

3-7 利益相反の開示

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。

3-8 参考文献

- 1) 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).
- 2) 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.
- 3) Cohen EL and Wurtman RJ, Brain acetylcholine: control by dietary choline. *Science*, 191 : 561-562, 1976.
- 4) Tsukahara T, Haniu H, Uemura T and Matsuda Y. Porcine liver decomposition product-

- derived lysophospholipids promote microglial activation in vitro. *Scientific Reports*, 10: 3748, <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60781-1>, 2020.
- 5) Tsukahara T, Haniu H, Uemura T and Matsuda Y, Therapeutic potential of porcine liver decomposition product: New insights and perspectives for microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Biomedicines*, 8(11) 446-446 2020.
 - 6) Kato T, Neuro-immunological hypothesis of psychiatric diseases via microglia. *Jpn.J. Biological Psychiatry*, 21(4), 229-236, 2010(in Japanese).
 - 7) Otsubo T, Tanaka K, Koda R, Shinoda J, Sano N, Tanaka S, Aoyama H, Mimura, M, Kamijima, K, Reliability and validity of Japanese version of the Mini-International Neuropsychiatric Interview. *Psychiatry Clin. Neurosci.* 59, 517–526. 2005.
 - 8) Nagai C, Neuropsychological assessment methods for general clinician. https://doi.org/10.15082/jsnt.39.3_241, 2022(in Japanese).
 - 9) Toda T, Nagami S and Fukunaga S, Efficacy of verbal fluency task in patient with Alzheimer's disease. *JAHS*, 9(2), 142-148, 2018.
 - 10) Audenaert K, Brans B, Van Laere K, Lahorte P, Versijpt J, Van Heeringen K and, Dierckx R, Verbal fluency as a prefrontal activation probe: a validation study using 99mTc-ECD brain SPET. *Eur J Nucl Med.* Dec;27(12):1800-8. doi: 10.1007/s002590000351, 2000.
 - 11) Gourovitch ML, Kirkby BS, Goldberg TE, Weinberger DR, Gold JM, Esposito G, Van Horn JD and Berman KF, A comparison of rCBF patterns during letter and semantic fluency. *Neuropsychology*, Jul;14(3):353-60. doi: 10.1037//0894-4105.14.3.353, 2000.
 - 12) Anand A, Li Y, Wang Y, Wu J, Gao S, Bukhari L, Mathews VP, Kalnin A and Lowe MJ, Activity and connectivity of brain mood regulating circuit in depression: a functional magnetic resonance study. *Biol Psychiatry*, May 15;57(10):1079-88. doi: 10.1016/j.biopsych.2005.02.021, 2005.
 - 13) Drevets WC, Videen TO, Price JL, Preskorn SH, Carmichael ST and Raichle ME, A

- functional anatomical study of unipolar depression. *J Neurosci*, Sep;12(9):3628-41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.12-09-03628.1992, 1992.
- 14) Simon Surguladze SS, Brammer MJ, Keedwell P, Giampietro V, Young AW, Travis MJ, Williams SCR and, Phillips ML, A differential pattern of neural response toward sad versus happy facial expressions in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*, Feb 1;57(3):201-9. doi: 10.1016/j.biopsych.2004.10.028, 2005.
- 15) Tsukahara T, Hara H, Haniu H, Matsuda Y, The Combined Effects of Lysophospholipids against Lipopolysaccharide-induced Inflammation and Oxidative Stress in Microglial Cells. *JOS* 70(7) 947-954, 2021.
- 16) Badimon A, Strasburger HJ, Ayata P, Chen X, Nair A, Ikegami A, Hwang P, Chan AT, Graves SM, Uweru JO, Ledderose C, Kutlu MG, Wheeler MA, Kahan A, Ishikawa M, Wang YC, Loh YHE, Jiang JX, Surmeier DJ, Robson SC, Junger WG, Sebra R, Calipari ES, Kenny PJ, Eyo UB, Colonna M, Quintana FJ, Wake H, Gradinaru V and Schaefer A, Negative feedback control of neuronal activity by microglia. *Nature*, Oct;586(7829):417-423. doi: 10.1038/s41586-020-2777-8. Epub 2020 Sep 30. 2020.
- 17) Ransohoff RM, A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?. *Nat Neurosci*, 19:987-991, 2016.
- 18) Setiawan E, Wilson AA, Mizrahi R, Rusjan PM, Miler L, Rajkowska G, Suridjan I, Kennedy JL, Rekkas PV, Houle S and Meyer JH, Role of translocator protein density, a marker of neuroinflammation, in the brain during major depressive episodes, *JAMA Psychiatry*. Mar;72(3):268-75. doi: 10.1001/jamapsychiatry.2014.2427. 2015.
- 19) Holmes SE, Hinz R, Conen S, Gregory CJ, Matthews JC, Anton-Rodriguez JM, Gerhard A and Talbot PS, Elevated Translocator Protein in Anterior Cingulate in Major Depression and a Role for Inflammation in Suicidal Thinking: A Positron Emission Tomography Study. *Biol Psychiatry*. Jan 1;83(1):61-69.

doi: 10.1016/j.biopsycho.2017.08.005. Epub 2017 Aug 12. 2018.

- 20) McKim DB, Niraula A, Tarr AJ, Wohleb E, Sheridan JF and, Godbout JP, Neuroinflammatory Dynamics Underlie Memory Impairments after Repeated Social Defeat. *J Neurosci.* Mar 2;36(9):2590-604. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2394-15.2016.
- 21) Ahmmed MK, Hachem M, Ahmmed F, Rashidinejad A, Oz F, Bekhit AA, Carne A, Bekhit AED, Marine Fish-Derived Lysophosphatidylcholine: Properties, Extraction, Quantification, and Brain Health Application, *Molecules*, Mar 30;28(7):3088. doi: 10.3390/molecules28073088.2023.
- 22) Wen J, Satyanarayanan SK, Li A, Yan L, Zhao Z, Yuan Q, Kuan-Pin Su KP and Su H, Unraveling the impact of Omega-3 polyunsaturated fatty acids on blood-brain barrier (BBB) integrity and glymphatic function. *Brain, Behavior, and Immunity*, 115, January, 335-355, 2024.
- 23) Murota K, Digestion and absorption of dietary glycerophospholipids in the small intestine: Their significance as carrier molecules of choline and n-3 polyunsaturated fatty acids, *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volume 26, 101633. 2020.
- 24) Inoue T, Matsuda Y, Sato T, Sakurada C, Haniu H, Tsukahara T, Sugita K, Mabuchi T, Emizu T, Sato K, The impact of repeated administration of choline chloride on spatical cognitive memory in rats. *Jpn.J.Med.Phram.Sci.*, 73(8):1009-1016. 2016;(in Japanese).
- 25) Rose CR, Blum R, Kafitz KF, Kovalchuk Y and Konnerth A, From modulator to mediator: rapid effects of BDNF on ion channels. *Bioessays.* Nov;26(11):1185-94. doi: 10.1002/bies.20118. 2004.
- 26) Tong L, Prieto GA, Kramár EA, Smith ED, Cribbs DH, Lynch G and Cotman CW, Brain-derived neurotrophic factor-dependent synaptic plasticity is suppressed by interleukin-1 β via p38 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci.* Dec 5;32(49):17714-24. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1253-12.2012. 2012.

27) Miiru Suzuki, Ikuya Sato, Masatsugu Sato, Hideki Iwasaki, Takahiro Saito, Masahiko Kimura, Kenichi Sako, Tomoji Maeda, Hisao Haniu, Tamotsu Tsukahara, and Yoshikazu Matsuda, Pork Liver Decomposition Product May Improve Frontal Lobe Function in Humans—Open Trial, *Brain Science*, Jun;14(586). doi.org/10.3390/brainsci14060586, 2024.

3-9 図表の部

表 1 改訂長谷川式簡易知能評価スケール (HDS-R) の質問項目

	Question items
Q1	Age
Q2	Orientation to dates
Q3	Orientation to place
Q4	Verbal memory
Q5	Attention
Q6	Recent memory
Q7	Delayed recall of verbal memory
Q8	Visual memory
Q9	Word recall/verbal fluency tasks

質問は年齢 (Q1)、日時の見当識 (Q2)、場所の見当識 (Q3)、言葉の即時記銘 (Q4)、計算(Q5)、逆唱 (Q6)、言葉の遅延再生(Q7)、物品記銘 (Q8)、言語流暢性 (Q9) などの評価項目となっている。

表 2 被験者の年齢、HDS-R 及び被験者の受診目的

Patient No.	Age	HDS-R	Gender	Purpose of visit
No.1	80	23	Male	Hypertension
No.2	75	21	Male	Prostatic hyperplasia
No.3	53	23	Male	Hypertension
No.4	84	22	Male	Edema
No.5	86	23	Female	Osteoporosis
No.6	84	19	Male	Dyslipidemia
No.7	79	28	Female	Hypertension
No.8	80	23	Female	Hypertension
No.9	65	23	Female	Hypertension
No.10	79	23	Female	Diabetes
No.11	84	17	Female	Hypertension
Mean ±SD	77±3	21.4±0.7		

Purpose of visit : 被験者の受診目的を示した。

表3 PLDP のこれまでの臨床評価

Study indicator	Study design	subject	Result
HDS-R [1]	Dose confirmation test (open test)	Low dose(N=5) Age:81±4 High dose(N=8) Age:75±4	No effect at 2 cap/day, significant increase at (4 cap/day)
	Placebo-controlled double-blind study & safety confirmation study	Placebo(N=25) Age:58±4 PLDP(N=25) Age:60±4	Placebo(4cap/day): no significant change PLDP(4cap/day): Significant increase No change in safety
WMS-R [2]	Placebo-controlled double-blind study	<u>Under 40 years</u> Placebo(N=15) Age:24±2 PLDP(N=15) Age:25±3 <u>Over 40 years</u> Placebo(N=15) Age:58±8 PLDP(N=13) Age:63±15	PLDP(4cap/day): Significant score increases compared to placebo in visual memory and delayed recall (aged over 40 years)

[] は引用文献番号を示している。

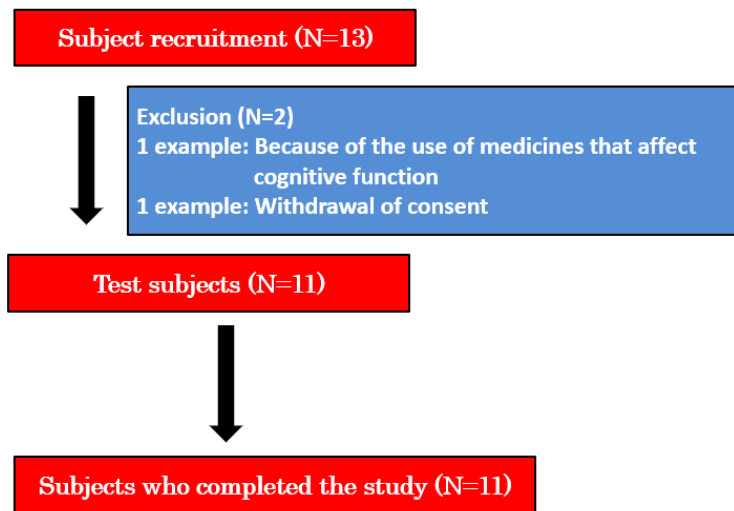


図1 被験者リクルート

13名の被験者候補に試験内容について説明を行い、試験参加の同意を得た。その後、1名が認知機能に影響を及ぼす医薬品を服用していたため、また1名は同意の撤回によって試験対象から除外した。その結果、HDS-Rが15点以上23点以下で文書による同意の得られた65歳から86歳の11名の被験者で試験を行うこととした。

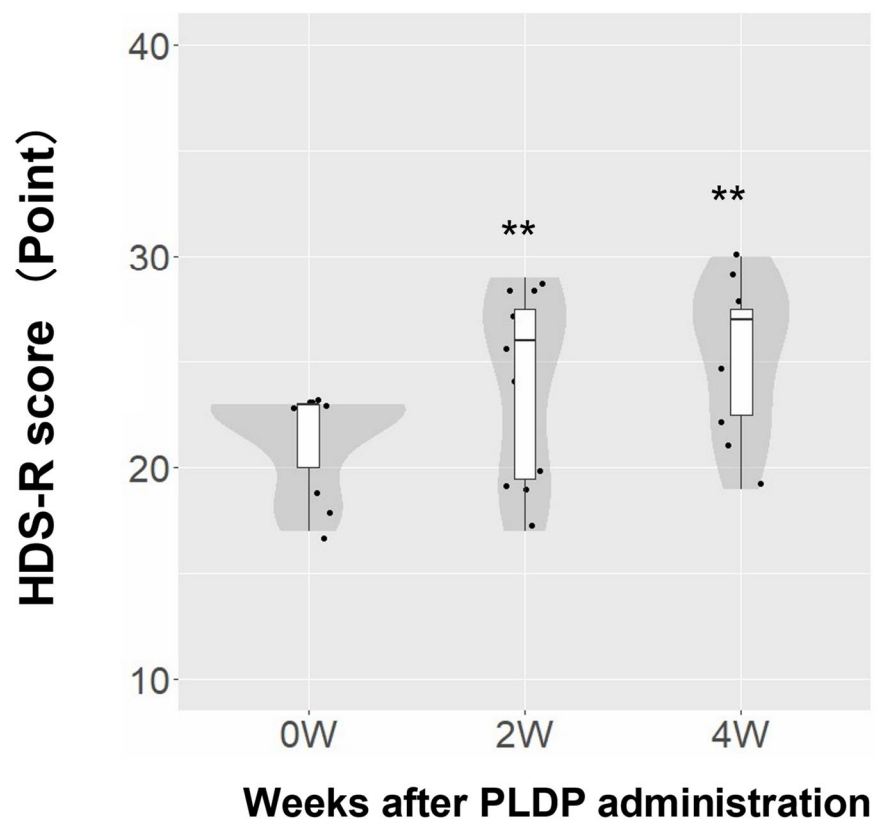


図2 参加者における PLDP 投与後の HDS-R スコアの変化。

箱ひげ図とバイオリン図のプロットは HDS-R スコアの分布と密度を表す。

** ; $P < 0.01$ vs 投与前値。2 W は $P = 0.009$ 、4 W は $P = 0.002$ 。

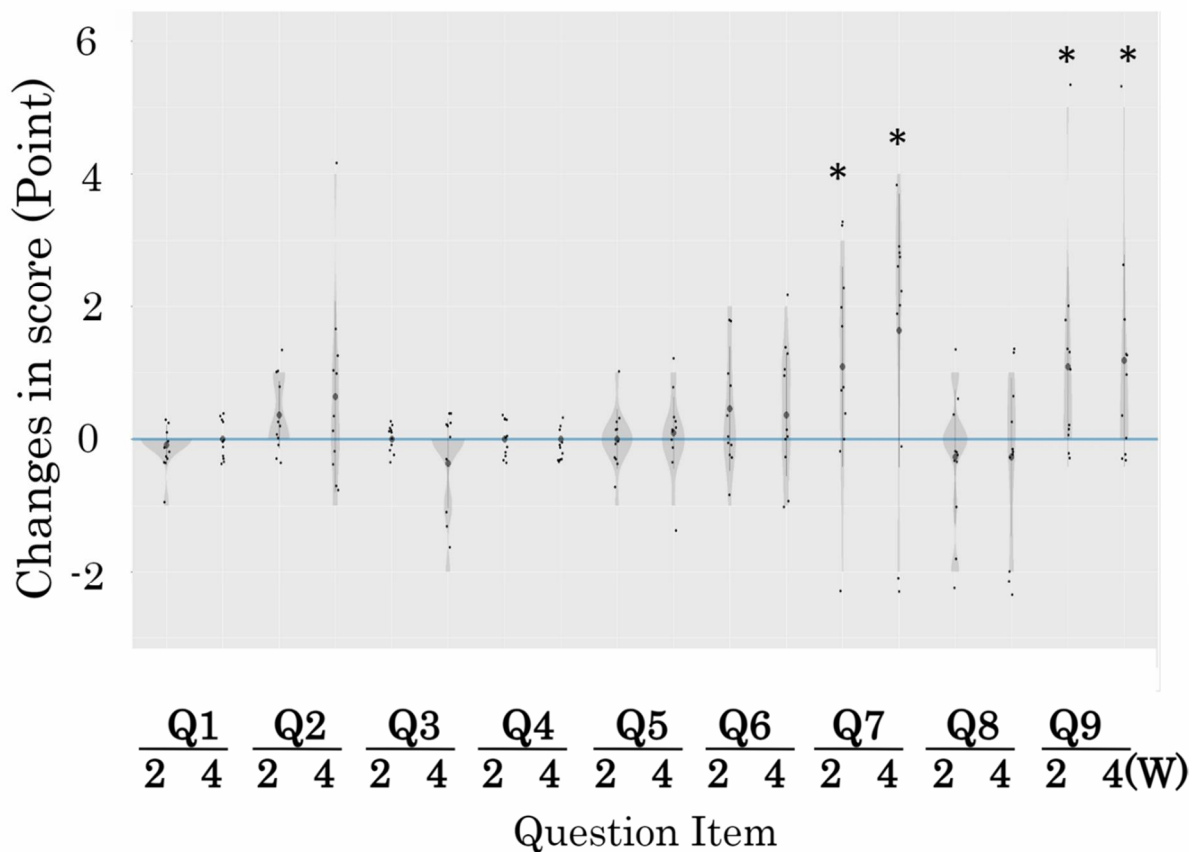


図3 HDS-Rにおける各質問（Q1～9）における、PLDPの摂食後2週間及び4週間の変化分
 Q1：年齢、Q2：日時の見当識、Q3：場所の見当識、Q4：言葉の即時記銘、Q5：計算、Q6：
 数字の逆唱、Q7：言葉の遅延再生、Q8：物品記銘、Q9：言語流暢性課題
 *； $P < 0.05$ 、 p 値は以下の通り。Q7 2W は $P = 0.0379$ 、4W は $P = 0.0251$ 、Q9 2W は
 $P = 0.0379$ 、4W は $P = 0.0344$ 。

第4章 結語

本研究では、PLDPに含まれるリン脂質について液体クロマトグラフィー質量分析法によって分子種レベルの定量を行い、PLDPの効果についてHDS-Rをオープン試験で評価し、総スコアとともに各質問項目における効果を検討することを目的とし研究を行った。

第2章ではそれぞれのリン脂質定量値を測定した結果、PLDPにはPCが最も多く含まれており、次いでLPC、PEが含まれていることが確認できた。これらの分子種がPLDPの活性本体である可能性を確認できたという点で、意義が大きかったと言える。

第3章ではPLDPが前頭葉の機能を高めることを確認できた。そのことよりHDS-RにおけるCFTのスコアを高めていることが示唆される。機序としては、ミクログリアで産生される炎症性サイトカインの抑制やBDNFの産生亢進が関与している可能性からPLDPが抗うつ効果を示す可能性を示唆している。今後として、動物モデル等で詳細な検討が必要であるが、新たな知見を得ることができた。

PLDPは脳内の微弱な炎症を制御し、前頭葉の機能を高めることが推察される。このことはPLDPがうつ症状の予防や改善させる可能性を示唆するものである。

また、PLDPに含まれるリン脂質は主にPCはdiacyl 34:1 PC、diacyl 34:2 PC、LPCはacyl 18:0 LPC、acyl 18:2 LPC、PEはdiacyl 34:4 PEであり、これらのリン脂質について、その作用を検討することにより、新たな抗うつ薬としての創薬に繋がる可能性が考えられた。

本研究により、新たな知見から今後、PLDPのリン脂質をベースとした新たな抗うつ薬や抗不安薬への可能性に繋げることで今後の治療効果の向上や医薬品開発の推進へも大きく貢献することが可能となる。

第5章 謝辞

本研究の遂行にあたり、指導教官として終始多大な御指導ならびに、有益なる御助言を賜りました日本薬科大学薬学部 松田佳和教授に深く感謝申し上げます。

本論文作成にあたり、ご助言ならびに多数の資料を提供頂いた日本薬科大学臨床薬学分野（分野主任・前田智司教授）に感謝申し上げます。

また、いつも励まし、支えて下さいました本研究室の皆様に感謝申し上げます。

第6章 利益相反の開示

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。