

平成30年6月5日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18936

研究課題名(和文) 精神病発症危険状態(ARMS)患者における血清中不飽和脂肪酸濃度の変動解析

研究課題名(英文) Analyses of endogenous polyunsaturated fatty acid in serum from at-risk mental state subjects

研究代表者

小野里 磨優(ONOZATO, Mayu)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号：50610094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：精神病発症危険状態(ARMS)群と健常対照群の血清中不飽和脂肪酸(PUFA)及び3-ヒドロキシ酪酸(3-HB)を測定し、濃度を比較解析した。その結果、ARMS群において測定した全てのPUFAと3-HB濃度低下が認められ、統合失調症患者における報告と一致した。加えて、ARMS群血清中リノール酸及びオレイン酸濃度は、臨床症状スコアの1つである総合精神病理尺度と正の相関を示すことが明らかになった。ラットにEPA製剤を経口投与すると、血漿中EPA及びDHA濃度は増加したが、3-HB濃度増加は認めず、EPA製剤投与による3-HB濃度増加は難しいと推察された。

研究成果の概要(英文)：Serum concentrations of endogenous compounds, polyunsaturated fatty acid (PUFA) and 3-hydroxybutyric acid (3-HB), between individuals with at-risk mental state (ARMS) and healthy controls were compared. As a result, serum levels of all PUFAs and 3-HB were decreased in accordance with the previous reports in the schizophrenia patients. In addition, we found that serum linoleic acid and oleic acid levels in ARMS were positively correlated with PANSS general psychopathology score.

The commercial EPA ethyl ester was administered orally to male SD rat, and the profiles of PUFA levels in plasma were examined. The concentration of EPA and DHA in plasma significantly increased in the groups that received EPA ethyl ester (100 mg/kg), however, 3-HB levels were not increased.

研究分野：分析化学

キーワード：ARMS 不飽和脂肪酸 血清バイオマーカー EPA製剤

## 1. 研究開始当初の背景

統合失調症は、幻覚、幻聴を伴う陽性症状、引きこもり、自閉などの陰性症状、認知機能障害など重篤な症状が見られる精神疾患であり、その発症率は高く（人口の約1%）、青年期に発症し、寿命も健常者に比べて15年程度短いとされている<sup>1)</sup>。このため、適切な診断と早期治療の開始が望まれるが、現時点では数値で示される客観的で有効な診断方法がなく、診断は専門医の問診による判定法によるものである。このため、血液検査による診断手法の開発が急務となっており、近年では血液中の診断マーカーとなる生体成分の探索研究が多く行われている。

報告者が所属する東邦大・薬・薬品分析学教室でも、2011年からHPLCを用いて統合失調症患者の血清中生体分子（アミノ酸、脂肪酸、セロトニン、グルタチオン等）濃度を調べてきた。その結果、測定した成分のうち13種類の生体成分については健常人と患者との間で有意差が認められ、中でも患者血清中不飽和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid; PUFA）であるリノール酸及びアラキドン酸や脂肪酸の代謝体である3-ヒドロキシ酪酸（3-HB）濃度が有意に低下していることが明らかになった<sup>2)</sup>。脂肪酸は、エネルギー源や細胞膜の構成成分であると同時に神経伝達物質の調節を担う生理活性物質であり、我々にとって非常に重要な生体成分である。最近の研究では、脂肪酸を運搬する脂肪酸結合タンパク質（fatty acid binding protein; FABP）が統合失調症や自閉症などの精神疾患の発症に関与していることが明らかになり<sup>3)</sup>、さらに精神疾患とPUFAとの関連性への関心が高まっている。加えて、3-HBは、生体内でアセチル CoA を介して脂肪酸のβ-酸化により生成し、酸化ストレス抑制物質であることが報告されている<sup>4)</sup>。

最近では、精神病発症危険状態（At Risk Mental State; ARMS）と呼ばれる抗精神病薬の投与要件に満たない患者に対してEPA製剤を処方している医療施設も存在するが、これまでに脂肪酸濃度と3-HB濃度との相関や脂肪酸摂取に伴う脂肪酸以外の生体分子（特に3-HB）の濃度変動を追跡した研究報告例

はほとんどない。

一方で、先に行われたHPLCを用いた脂肪酸分析法<sup>5)</sup>は前処理に用いる血清量がこれまでの報告と比べて1/5～1/20程度で済むという非常に大きいメリットがあったが、測定可能な脂肪酸数が5種類と少ないことやEPAやDHAといった魚類に多く含まれるため食事を介して摂取することが期待できるω-6系脂肪酸の検出が出来ていないことが課題として残されていた。

## 2. 研究の目的

### PUFA・3-HB測定法の構築

PUFAについては、既報<sup>5)</sup>では測定対象としていなかったEPA及びDHAの検出が可能なHPLC測定条件を検討し、構築する。

一方、3-HBについては、前処理方法の検討及び測定条件を構築する。

### 基礎研究：EPA製剤経口投与ラット血漿中PUFA濃度の変動解析

ラットに異なる濃度のEPA製剤（EPAエチルエステル体）を経口投与し、ラット血漿中PUFAの経時的な濃度変動を比較解析する。併せて、3-HB濃度推移についても解析する。

### 臨床研究：ARMS群及び健常対照群における血清中PUFAと3-HB濃度変動の比較

東邦大学医療センター大森病院の精神科医（研究協力者：辻野）の協力の下、ARMS群と健常対照群における血清中PUFA・3-HB濃度比較を検討する。ARMS群においては、血清中PUFAの濃度変動と臨床症状スコアとの関連性を明らかにすることにより、血清中PUFAのバイオマーカーとしての可能性を評価する。

## 3. 研究の方法

### PUFA・3-HB測定法の構築

PUFA、3-HB共に、下記に示すように最適な前処理方法及び測定条件を構築した。

< PUFA >

当初は高感度測定を目指し、タンデムMS用誘導体化剤DAABD-AEを用いた誘導体化反応後にLC-MS/MSによる測定を検討した。DAABD-AEの*N,N*-dimethylamino-ethylamino

sulfonyl 基に由来する共通のプロダクトイオン ( $m/z$  151) をモニターすることで EPA 及び DHA を含む PUFA の検出が可能となった。しかし、本測定条件による測定は再現性が乏しく、安定した測定を継続することが出来なかったため、PUFA の誘導体化反応には既報<sup>5)</sup>と同様に DBD-ED を使用し、HPLC 測定に使用する移動相及びグラジエント条件を改良することにした。その結果、以下に記載する前処理法及び測定条件によりヒト血清・ラット血漿中 PUFA の検出が可能になった。

ヒト血清 (またはラット血漿) 10  $\mu$ L に IS (Heptadecanoic acid) を添加し、 $\text{CH}_3\text{CN}$ ・過塩素酸による除タンパク、クロロホルムによる液-液抽出をした後、誘導体化試薬 DBD-ED による蛍光誘導体化反応を行い、測定溶液を調製した。HPLC-蛍光検出法による測定は、カラムとして Cadenza CD-C18 (4.6  $\times$  250 mm, 3.0  $\mu$ m)、移動相として 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  (60/30/10) 及び 0.1% TFA in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{OH}$  (80/10/10) を使用し、グラジエント分析を行った。流速 1.0 mL/min、カラム温度 40、注入量 50  $\mu$ L、Ex. 450 nm、Em. 560 nm で蛍光検出した。

< 3-HB >

ヒト血清 (またはラット血漿) 10  $\mu$ L に IS (Propionic acid) を添加し、 $\text{CH}_3\text{CN}$ ・MeOH による除タンパク、誘導体化試薬 NBD-PZ による蛍光誘導体化反応後に固相抽出 (InertSep SCX) を行い、測定溶液を調製した。調製した溶液は LC-TOF-MS と HPLC-蛍光検出法の 2 通りで測定した。

LC-TOF-MS による測定は、カラムとして TSKgel ODS-80TsQA (2.1  $\times$  150 mm, 5.0  $\mu$ m)、移動相として 0.05%  $\text{HCO}_2\text{H}$  in MeOH/ $\text{H}_2\text{O}$  (40/60) を使用し、アイソクラティック分析を行った。流速 0.15 mL/min、カラム温度 50、注入量 20  $\mu$ L、ポジティブモード ( $m/z$  300-400) で測定した。

HPLC-蛍光検出法による測定は、カラムとして Cadenza CD-C18 (4.6  $\times$  250 mm, 3.0  $\mu$ m)、移動相として  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{MeOH}/0.1\%$  TFA in  $\text{H}_2\text{O}$  (10/20/70) を使用し、アイソクラティック分析を行った。流速 0.8 mL/min、カラム温度

60、注入量 10  $\mu$ L、Ex. 491 nm、Em. 547 nm で蛍光検出した。

### 基礎研究：EPA 製剤経口投与ラット血漿中 PUFA 濃度の変動解析

生理食塩水に懸濁した EPA 製剤 (15, 50, 100 mg/kg) を SD ラット (オス, 9 週齢) へ単回経口投与し、経時的に採血して血漿を得た。得られたラット血漿を上記に記載した方法で前処理・測定し、血漿中 PUFA 及び 3-HB 濃度推移を解析した。

### 臨床研究：ARMS 群及び健常対照群における血清中 PUFA と 3-HB 濃度変動の比較

本研究の目的・内容を文書にて十分に説明し、必要な研究参加の同意を文書にて得た後、ARMS 患者群の血清 ( $n=20$ ) を得た。同様に、学生ボランティア ( $n=42$ ) の血清を得た。得られたヒト血清を上記に記載した方法で前処理・測定し、血漿中 PUFA 及び 3-HB 濃度を比較解析した。併せて、血清中 PUFA 濃度と臨床症状スコアとの相関性を調べた。

## 4. 研究成果

### PUFA・3-HB 測定法の構築

< PUFA >

ラット血漿・ヒト血清を 3. に記載した方法により前処理・HPLC 測定すると、ピーク分離は良好であり、55 分以内に 7 種類の PUFA のピークが得られた。EPA 及び ALA のピークは非常に小さいが、ラット血漿・ヒト血清のいずれも 10  $\mu$ L を前処理に供することで定量には十分な検出感度を得ることが出来た。

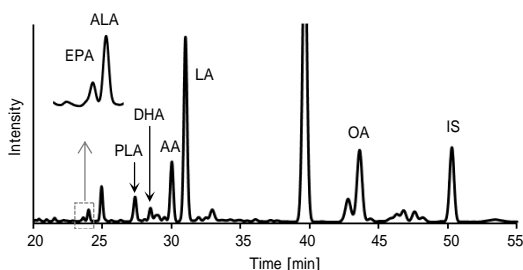


図 1 ラット血漿中 PUFA のクロマトグラム

< 3-HB >

ラット血漿を 3. に記載の方法により前処理・HPLC 測定すると、図 2 に示すように

32 分以内に 3-HB 及び IS が溶出した。一方、ヒト血清についても LC-TOF-MS 測定により 3-HB を検出することが出来た (図 3)。

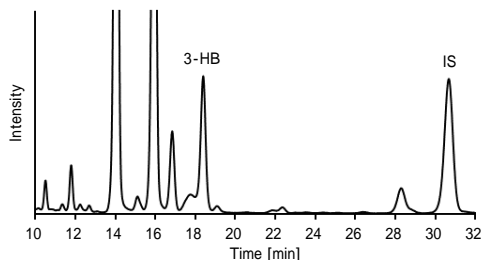


図 2 ラット血漿中 3-HB のクロマトグラム

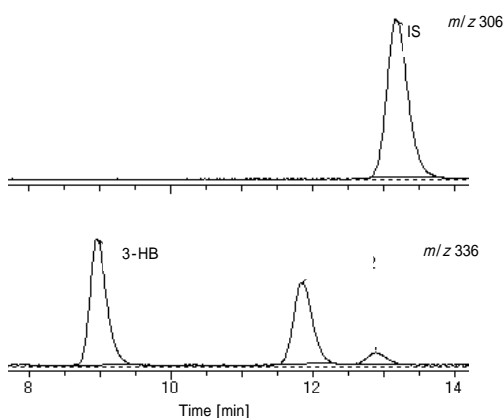


図 3 ヒト血清中 3-HB のクロマトグラム

### 基礎研究：EPA 製剤経口投与ラット血漿中 PUFA 濃度の変動解析

EPA 製剤投与後のラット血漿中 EPA 濃度 (図 4) は EPA 製剤濃度が 15, 50 mg/kg の場合には血漿中 EPA 濃度はコントロール群とほとんど変わらず、経時に伴う顕著な EPA 濃度増加も認められなかった。一方で、100 mg/kg 群では、投与直後から急激に EPA 濃度が増加し、特に血漿中 EPA 濃度は投与から 6 時間経過しても非常に高濃度に維持されていることが明らかになった。また、ラット血漿中 EPA 濃度-時間曲線下面積 (図 5) については、100 mg/kg 群において有意な増加が認められた。また、EPA 製剤投与後のラット血漿中では EPA のみでなく、その代謝体である DHA 濃度も EPA 濃度増加に伴って増加したが、他の脂肪酸は EPA 製剤の投与の影響を受けず、ほぼ一定であることが明らかになった。

一方、EPA 製剤投与 (100 mg/kg) 後のラット血漿中 3-HB 濃度は PBS 投与群と比較して、投与後 6 時間までは 3-HB 濃度は低下する傾

向が見られ、以降も顕著な 3-HB 濃度増加も認められなかった (図 7)。

以上の結果より、ラットへ投与する EPA 製剤濃度が非常に高濃度の場合 (100 mg/kg) のみ、ラット血漿中 EPA 及び DHA 濃度増加が認められたが、それに伴う 3-HB 濃度増加は得られず、EPA 製剤の投与によって血漿中 3-HB 濃度を増加させるのは難しいと推察された。

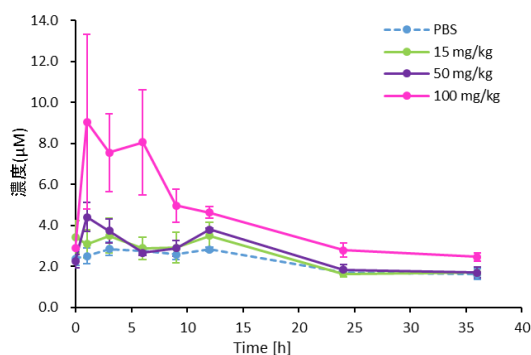


図 4 EPA 投与に伴うラット血漿中 EPA 濃度推移の比較

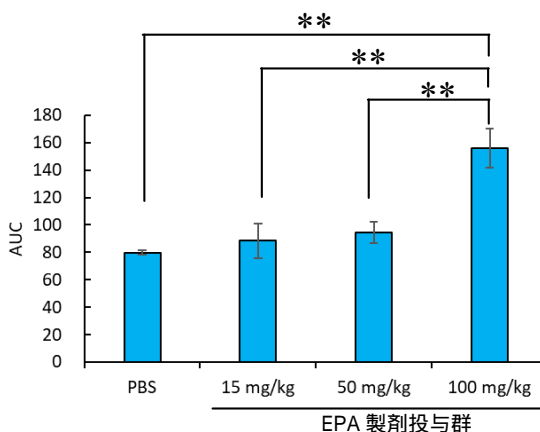


図 5 ラット血漿中 EPA 濃度-時間曲線下面積 (\*\*:  $p < 0.01$ )

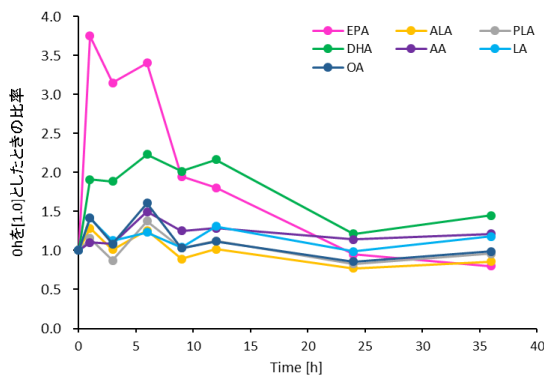


図 6 EPA 投与 (100 mg/kg) に伴うラット血漿中 PUFA 濃度推移の比較

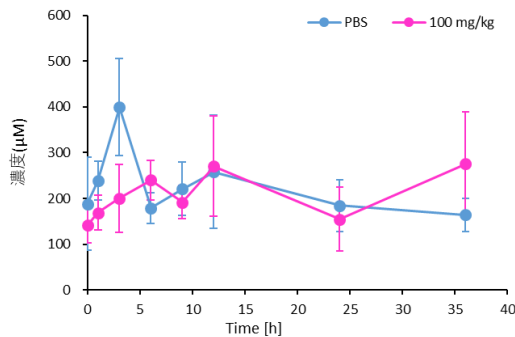


図 7 EPA 投与 (100 mg/kg) に伴うラット血漿中 3-HB 濃度推移

### 臨床研究：ARMS 群及び健常対照群における血清中 PUFA と 3-HB 濃度変動の比較

血清中 PUFA 濃度は、ARMS 群、健常対照群いずれも男女別に分けて解析した。

健常対照群と比較すると、ARMS 群の血清中 DHA (図 8) とオレイン酸 (OA) 濃度の有意な低下及びアラキドン酸、リノール酸 (LA)、パルミトレイン酸濃度が低下する傾向が認められた。脂肪酸の濃度低下は統合失調症においても報告<sup>2)</sup>されており、脂肪酸と統合失調症発症機序との関連が示唆された。

加えて、ARMS 群血清中 LA 及び OA 濃度は、どちらも臨床症状スコアの 1 つである総合精神病理尺度と正の相関を示した (LA:  $r = 0.7052, p = 0.0227$ , OA:  $r = 0.7052, p = 0.0227$ )。

更に、PUFA と同様に健常対照群と比べて、ARMS 群の血清中 3-HB 濃度も有意に濃度低下しており (図 9)、統合失調症患者血清における報告<sup>2)</sup>と一致した。この結果から、酸化ストレス作用を有する 3-HB 濃度が低下に伴う酸化ストレスの亢進が統合失調症の発症に関連していることが示唆された。

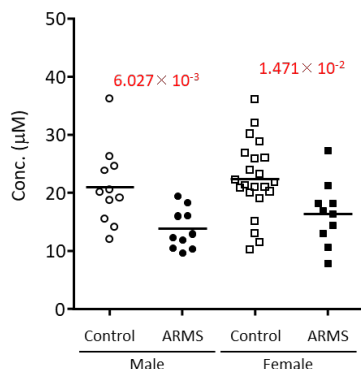


図 8 ARMS 群と健常対照群の血清中 DHA 濃度の比較

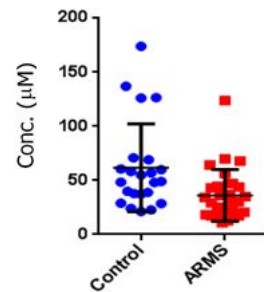


図 9 ARMS 群と健常対照群の血清中 3-HB 濃度の比較

### <引用文献>

- 1) Hennekens *et al.*, *Am Heart J.* **150**: 1115-1121 (2005).
- 2) Fukushima *et al.*, *PLoS ONE* **9**: e101652 (2014).
- 3) Shimamoto *et al.*, *Human Molecular Genetics.* **23**: 6495-6511 (2014).
- 4) Shimazu *et al.*, *Science* **9**: 211-214 (2013).
- 5) Nishikiori *et al.*, *J Chromatogr Sci.* **53**: 537-541 (2015).

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Onozato M, Nishikiori M, Iizuka H, Ichiba H, Sadamoto K, Fukushima T: Determination of sex-based differences in serum  $\gamma$ -linoleic acid and dihomogamma-linoleic acid using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 997: 116-121, 2015. 査読有 DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.05.011

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 小野里磨優, 辻野尚久, 雅樂晏里沙, 岡西佑紀奈, 奥村郁実, 小沼利穂, 小畑香菜, 庄司礼子, 田形弘実, 船渡川智之, 山口大樹, 片桐直之, 坂本達弥, 一場秀章, 根本隆洋, 水野雅文, 福島 健: 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中代謝物濃度の比較解析 第 138 回日本薬学会年会 2018
2. 小野里磨優, 辻野尚久, 雅樂晏里沙, 岡西佑紀奈, 奥村郁実, 小沼利穂, 小畑香菜, 庄司礼子, 田形弘実, 船渡川智之, 山口大樹, 片桐直之, 坂本達弥, 一場秀章, 根本隆洋, 水野雅文, 福島 健: 精神病発症危険状態 (ARMS) における血清中代謝物濃度の比較解析 第 14 回東邦大学 5 学部合同学術集会 2018

3. 川崎将人, 田中陽菜, 坂本達弥, 小野里磨優, 一場秀章, 福島 健:  
LC-MS/MS による EPA 製剤経口投与ラットの血中遊離不飽和脂肪酸濃度の解析  
第 137 回日本薬学会年会 2017
4. 辻野尚久, 福島 健, 片桐直之, 山口大樹, 飯塚英昭, 小野里磨優, 一場秀章, 根本隆洋, 水野雅文: 精神病発症危険状態(ARMS)における血清中低分子濃度解析  
第 13 回東邦大学 4 学部合同学術集会 2017
5. Tsujino N, Fukushima T, Katagiri N, Yamaguchi T, Iizuka H, Onozato M, Ichiba H, Nemoto T, Mizuno M:  
Biomarkers during the schizophrenia onset using quantitative analyses of serum metabolites at risk mental state  
The 10<sup>th</sup> International Conference on Early Intervention in Mental Health (IEPA 10) 2016
6. 辻野尚久, 福島健, 片桐直之, 山口大樹, 飯塚英昭, 小野里磨優, 一場秀章, 根本隆洋, 水野雅文: 精神病発症危険状態(ARMS)における血清中低分子濃度解析 ~ 中間報告 ~  
第 12 回東邦大学 4 学部合同学術集会 2016

〔その他〕

東邦大学薬学部薬品分析学教室

ホームページ

<http://www.lab.toho-u.ac.jp/phar/Analchem/article/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野里 磨優 (ONOZATO, Mayu)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号: 50610094