

(倫理面の配慮)

本研究は大阪大学大学院医学研究科と北海道大学大学院保健科学研究所の倫理委員会の承認を得て行った。

C. 研究結果

Orbitrap LC/MS によりマウスの腸管リンパ液及び門脈に存在する TG について検討した。TG10 は TG10 200 μ L 投与群及び TG10 100 μ L 投与群の腸管リンパ及び門脈には検出されたが、サラダ油（長鎖脂肪酸のみ含有）投与群由来のリンパ及び門脈には検出されなかった。また、TG10 200 μ L 投与群及び TG10 100 μ L 投与群でキメラ TG 10:0/18:1/10:0 及び TG 10:0/18:2/10:0 はリンパ液には検出されたが、門脈には検出されなかった。さらに、リンパ液における TG の分布について検討したところ、リンパ液由来の LDL 及び HDL には TG10 及びキメラ TG は検出されなかったが、CM 及び VLDL には TG10、キメラ TG10:0/18:1/10:0 および TG 10:0/18:2/10:0 を検出した。なお、上記 TG 分子種は positive ion mode において $[M+NH_4]^+$ として現れたが $[M+Na]^+$ は観察されなかった。

D. 考察

経口摂取された TG10 の大部分は、口腔内・胃で舌リパーゼ、胃リパーゼ、胃酸の働きによりカプリン酸に加水分解されることが知られている。加水分解により生じたカプリン酸は、小腸から吸収され、門脈を介して、肝臓でほとんどが β 酸化を受け、エネルギーとして使われるため、体循環には到達しないと考えられてきた。今回、我々は、マウス小腸灌流法を用いて

採取した腸管リンパ管灌流液中のカイロミクロンおよび VLDL に TG10 およびキメラ TG が検出することに成功した。すなわち、経口投与された TG10 の一部は、口腔内・胃で加水分解されずに TG10 のままの形で小腸に到達し、TG10 およびキメラ TG としてリンパ系に達し、その後、体循環に入り、全身に供給されうるものと考えられた。(図 1)

今回の結果に基づき、経口投与した TG10 の胃での加水分解を防ぐ方法を考案すれば、より bioavailability の高い製剤の開発が可能になるのではないかと考えられる。今後、TG10 を腸溶カプセルに詰めることで胃での加水分解を回避し、より bioavailability の高い製剤を開発していく予定である。

E. 結論

TG10 を含む TG の液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) による検出方法を開発した。この検出法を用い、経口投与された TG10 の一部が、口腔内・胃での加水分解を免れ、TG10 の形で小腸に到達、吸収され、TG10 およびキメラ TG の形で腸管リンパ管に入りうることを証明した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

Detection of medium-chain triglyceride in fibroblast from adipose triglyceride

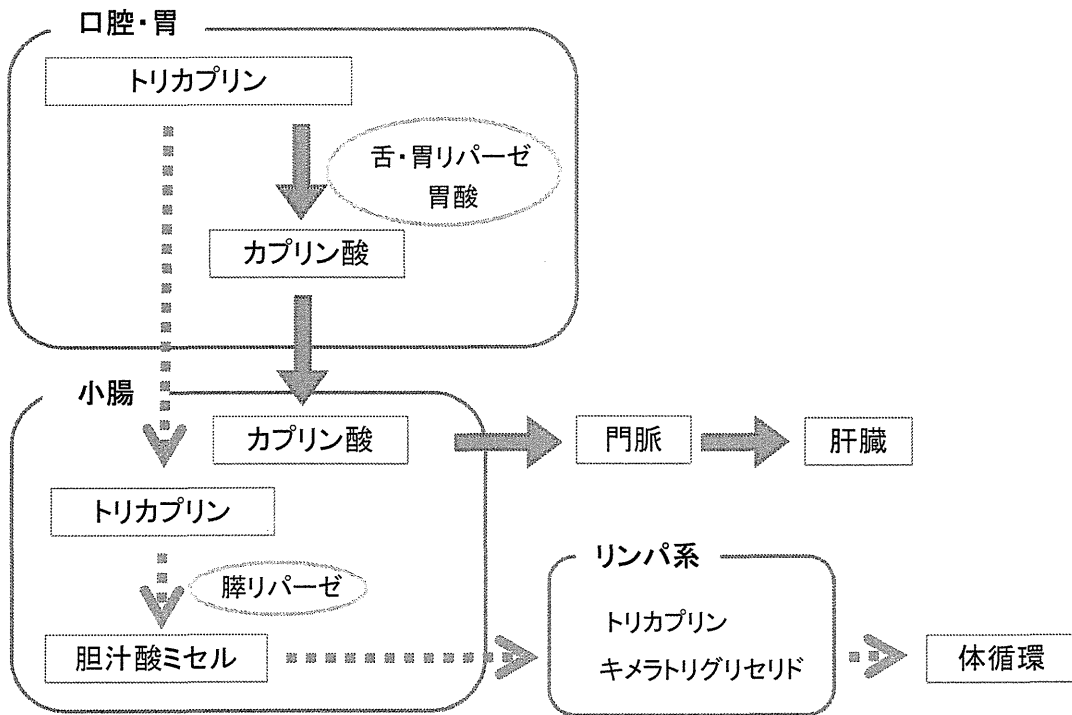
lipase deficiency by Orbitrap LC/MS
 Shu-Ping Hui, Ken-ichi Hirano, Rojeet Shrestha, Akira Suzuki, Satoshi Yamaguchi, Hironori Nagasaka, Syouta Fukuzawa, Hitoshi Chiba. The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease

む)

1. 特許取得
 カプリン酸の新規分析法に関する特許出願を予定している。
2. 実用新案登録
 なし
3. その他
 なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

図-1



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

カプリン酸 TG のイヌを用いた 7 日間反復経口投与毒性試験

研究分担者 加藤 良仁 興和株式会社 製品戦略部 課長

研究要旨

カプリン酸TGを150及び1500 mg/kgの用量で雄ビーグル犬に1日1回，7日間反復経口投与（カプセル投与）し，その毒性を検討した．動物は，9～10か月齢のビーグル犬，各群雄2匹を用いた．その結果，一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査ではカプリン酸TGによる異常は認められず，カプリン酸TGの7日間反復投与での本試験条件下における無毒性量は1500 mg/kgを超えると考えられた．

A. 研究目的

カプリン酸 TG の毒性を検索するために，ビーグル犬に 7 日間，経口カプセル投与した時の毒性について検討した．

B. 研究方法

カプリン酸 TG を 150 及び 1500 mg/kg の用量で雄ビーグル犬に 1 日 1 回，7 日間反復経口投与（カプセル投与）した．なお，対照群として空カプセル投与群を設定した．動物は，9～10 か月齢のビーグル犬，各群雄 2 匹を用いた．投与期間中，一般状態の観察，体重及び摂餌量の測定，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液生化学的検査を行い，剖検後に器官重量測定及び病理組織学的検査を行った．

（倫理面の配慮）

本試験は IACUC (Institutional Animal Care

and Use Committee, 動物実験審査委員会) によって承認を受けた (承認番号 2012-121)．なお，当試験施設は AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International, 国際実験動物管理公認協会) の認証を取得した施設である (認証番号 : 001182)．

C. 研究結果

測定及び検査の結果，一般状態，体重，摂餌量，眼科学的検査，尿検査，血液学的検査，血液生化学的検査，剖検，器官重量及び病理組織学的検査ではカプリン酸 TG による異常は認められなかった．

D. 考察

カプリン酸 TG の 150 mg/kg 及び 1500 mg/kg をビーグル犬に 7 日間反復カプセル投与したところ，本物質に起因する毒性兆

候は認められなかった。

E. 結論

カプリン酸 TG のビーグル犬における 7 日間反復投与での本試験条件下における無毒性量は 1500 mg/kg を超えると考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性等疾患克服研究事業）
分担研究報告書

中鎖脂肪酸投与による代謝変動の可視化

研究分担者 財満信宏 近畿大学 農学部 講師

研究要旨

研究代表者である平野賢一らは、中鎖脂肪酸を含有する食事療法によって、原発性中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）患者心臓における中性脂肪量の低下と骨格筋ミオパチーの改善を見出した。今後、中鎖脂肪酸を主成分とするTGCV治療薬が開発されることが期待されるが、中鎖脂肪酸の投与が原発性TGCV患者の組織代謝に対してどのような影響を与えるかは不明である。本研究では、組織代謝変動への影響を明らかにするために、中鎖脂肪酸（カプリン酸）を投与したATGL欠損マウスの心臓におけるホスファチジルコリン分子種と中性脂肪分子種を可視化し、カプリン酸非投与群（コントロール群）と比較した。その結果、いずれの分子種においてもコントロール群とカプリン酸投与群に大きな差は確認されなかった。

A. 研究目的

研究代表者である平野賢一らは、中鎖脂肪酸を含有する食事療法によって、原発性中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）患者心臓における中性脂肪量の低下と骨格筋ミオパチーの改善を見出した。今後、中鎖脂肪酸を主成分とするTGCV治療薬が開発されることが期待されるが、中鎖脂肪酸の投与が原発性TGCV患者の組織代謝に対してどのような影響を与えるかは不明である。本研究では、中鎖脂肪酸が組織代謝に及ぼす影響を評価するために、組織代謝変動を可視化することを目的とした。

B. 研究方法

ATGL欠損マウスにカプリン酸含有食（0，2，4，8％）で1週間飼育した。1週間後、マウスを安楽死させ、肝臓を摘出し、液体窒素で凍結させた。その後、肝臓の凍結切

片を作成し、質量顕微鏡法によって肝臓を解析した。

（倫理面の配慮）

本学では、大阪大学から提供された組織を解析し、動物実験は行っていない。動物実験は、大阪大学動物実験委員会の認可を受けて行なった。

C. 研究結果

中性脂肪の m/z に該当するピーク 243 種類を可視化し、コントロール群と各カプリン酸投与群と比較した結果、大きな差がある分子種は観察されなかった。ホスファチジルコリンの m/z に該当するピーク 6 種類を可視化し、コントロール群と各カプリン酸投与群と比較した結果、大きな差がある分子種は観察されなかった。

D. 考察

本研究条件下では、カプリン酸の投与によって、肝臓中性脂肪の組成に大きな影響は生じないと考えられ、カプリン酸含有中性脂肪は肝臓には蓄積しないと推測される。また、カプリン酸の投与はリン脂質代謝にも大きな影響を与えないと考えられる。

E. 結論

カプリン酸の投与が肝臓脂質代謝に大きな影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

IMS による組織内代謝変動の可視化-食品成分動態解析と病理解析への応用-

財満信宏, 河村幸雄

日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム (仙台 : 2013. 3. 24-28)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症モデル動物に対する中鎖脂肪酸療法の効果について

研究分担者 裏出良博 大阪バイオサイエンス研究所 第二研究部 部長
研究協力者 鈴木 朗 大阪大学大学院医学系研究科循環器内科学 特任研究員

研究要旨

Adipose triglyceride lipase(ATGL)遺伝子欠損マウス（以下 ATGL KO マウス）に対する中鎖脂肪酸（Medium chain triglyceride, MCT）療法の効果を解析する手法のひとつとして、 $[^{123}\text{I}]$ BMIPP-SPECT の可能性を検討した。MCT 投与マウスと通常飼料投与マウスとの比較で脂質代謝の差異を認めたため、マウスにおける MCT 療法の評価法の一つとして $[^{123}\text{I}]$ BMIPP-SPECT は有用であると考えられる。

A. 研究の目的

我々は中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyopathy, TGCV)のモデル動物である Adipose triglyceride lipase (ATGL) ノックアウトマウス(以下 ATGL-KO マウス)において、中鎖脂肪酸 (Medium chain triglyceride, MCT)オイルを用いた食餌療法の効果を検討・報告してきたが、本報告では MCT 療法による治療効果判定の手法を確立するため、心疾患診断薬である $[^{123}\text{I}]$ BMIPP を用いた SPECT (単光子放射線コンピュータ断層撮影)による心筋脂質代謝評価の有用性を検討した。

B. 研究方法

ATGL-KO マウスを人工授精により作出し、得られたホモ接合体マウスを、MCT 食を与えた群とコントロールとして(Long chain triglyceride, LCT)を与えた群に分け、飼育・給餌した。食餌療法は離乳（生後 4 週）と同時に開始した。

マウスはイソフルランによる導入麻酔の後、適宜低濃度イソフルランで麻酔を維持しながら、 $[^{123}\text{I}]$ BMIPP を頸静脈から投与し、実験動物用 PET/SPECT/CT 装置（浜松医科大学メディカルフォトリクス研究センター、GMI 社製 FX システム）による撮影を行った。経時的に撮像を行い、心臓やその他の臓器への取り込みや集積が検出可能かどうかを検討した。撮影後には各

臓器を取り出して、組織中の放射エネルギーを測定した。また、 $[^{123}\text{I}]$ BMIPP の最適投与量についても検討を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験は大阪大学、大阪バイオサイエンス研究所、浜松医科大学の審査委員会の許可を得、規程に従って実施した。実験においては動物の苦痛ができるだけ少なくなるような方法、手技に配慮し、最小限の動物数に対して行った。

C. 研究結果

実験動物用 PET/SPECT/CT 装置により、投与した $[^{123}\text{I}]$ BMIPP の取り込みを観察することが可能であった。ATGL-KO マウスは心臓への $[^{123}\text{I}]$ BMIPP 集積が WT に比べて有意に高値であったが、MCT 食群では抑制されていた。野生型 (WT) では背部褐色脂肪部位に $[^{123}\text{I}]$ BMIPP の集積が観察されたが、ATGL-KO マウスでは集積が観察されなかった。投与する $[^{123}\text{I}]$ BMIPP 溶液量を、心臓への負担がそれほど大きくない程度まで減量しても、撮像が可能であることを確認した。

D. 考察

$[^{123}\text{I}]$ BMIPP のマウスへの投与については、当初は尾静脈からの静注を試行したが、投与液量が多く、循環液量への負荷を考慮して緩徐に

注入する必要があるため、細い尾静脈からの静注は困難であった。そのため頸静脈からに投与経路を変更した。頸静脈からの投与は頸部の皮膚切開や、切開部の接合などの手技を要するが、その後の測定に対しては影響を与えなかったため、頸静脈からの投与が有用であると考えられる。しかし、注射部位で ^{123}I BMIPP が漏洩した場合には、SPECT 画像上でアーチファクトとなるので、慎重に投与操作を行う必要がある。

本実験において、SPECT 撮影中にマウスの死亡例があったが、これは ATGL-KO マウスが心不全を呈しているため、 ^{123}I BMIPP 溶液投与が心臓に過剰な負荷を与えたことが原因と考えられた。その後の検討で、SPECT 画像が劣化しない必要最小限のトレーサー量を決定した。また、その際の SPECT の撮影条件を設定しえた。

ATGL-KO マウスにおいて、心筋、および背部褐色脂肪部位への ^{123}I BMIPP 集積が、WT とは異なっていることが明らかになった。ATGL-KO マウスではこれらの組織における脂質代謝に変化があることが示唆された。今後は、各組織の遺伝子発現を測定するなどして、脂質代謝の変化について詳細に検討していきたい。

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症のモデルマウスである ATGL 欠損マウスにおいて、 ^{123}I BMIPP-SPECT により MCT 療法の治療効果を判定する手法を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

放射性標識脂肪酸誘導体を用いる薬効評価に関する研究

研究分担者 間賀田泰寛 浜松医科大学 メディカルフォトンクス研究センター 教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症治療薬として期待されるカプリン酸およびトリカプリンの生体内動態評価を可能とすることを目的として、これら化合物のC-11標識反応の開発とそのマウス体内動態に関する検討を行った。その結果、カプリン酸の α 位をC-11標識することが出来た。対応するトリカプリンには本標識体からの合成では、得ることが出来なかったため、今後 ω 位標識体を用いた検討を行う。また、C-11-カプリン酸のマウス体内動態について検討を行い、投与直後での心筋への取込が観察された。食事の影響や代謝物など、今後検討を行う。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症の治療薬として中鎖脂肪酸であるカプリン酸を構成成分とする中性脂肪、トリカプリンを標的として検討が進められている。医薬品とするためにはその薬物動態追跡が必要となる。また、病態モデルを用いたトリカプリンの体内動態もまだ詳細には知られていない。そこで本研究では、ポジトロン放出核種で標識されたトリカプリンおよびカプリン酸を開発し、その体内動態を解剖法あるいはPositron Emission Computed Tomography (PET)カメラを用いて追跡すること目的として検討を行った。

B. 研究方法

カプリン酸等の脂肪酸をポジトロン核種により標識合成を行う場合、大きく2種類の方法が考えられる。すなわち、 α 位カルボン酸をC-11標識する方法と、 ω 位にC-11

を導入する方法である。また、トリカプリンの合成法についてはさらにいくつかの方法が考えられるが、上記方法により脂肪酸を合成し、カルボン酸を活性化してグリセロールの水酸基とエステル化反応により導入することでトリグリセリドにする方法と、脂肪酸同様に ω 位を標識することとして、あらかじめトリグリセリド体として前駆体を準備する方法とがある。そこで、今回は合成の最も容易なカルボン酸をC-11標識することとし、これによりカプリン酸の合成を行い、マウスにおけるカプリン酸の体内動態について検討を行うとともに、本標識体からのトリカプリンの合成について検討を行うこととした。

C-11は浜松医科大学サイクロトロン施設設置のサイクロトロン、住友重機械製HM-12を用いることとし、自動合成装置は同じく浜松医科大学サイクロトロン施設に設置されている住友重機械製多目的合成装置を用

いて種々の検討を行った。

(倫理面の配慮)

本研究は、浜松医科大学動物実験委員会にて審査を受け、承認の後実施した。

C. 研究結果

カプリン酸の合成は図1に示す反応スキームに従って行った。すなわち、対応するグリニア試薬を用い、ジエチルエーテル溶媒中でサイクロトロンを用いて製造されたC-11-CO₂を吹き込むことにより、付加反応を行い、引き続き加水分解することにより、合成時間24分、高い反応収率で目的物を得ることが出来た。また、得られた標識体の分析試験を行ったところ、不純物は認めなかった(図2)。

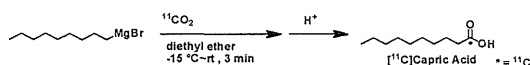


図1 C-11-カプリン酸の合成

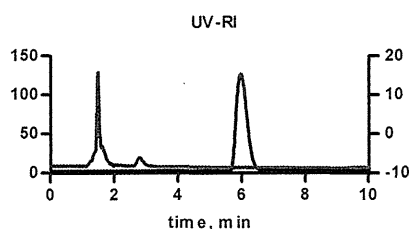


図2 C-11-カプリン酸の分析 HPLC

カラムはCosmosil AR-II、溶離液はアセトニトリル：メタノール：水：2M-HCL=500：200：300：2.5。赤線が放射能、青線はUV。

次いで、得られたC-11-カプリン酸を酸クロライドとし、あらかじめ調製したジカプリルグリセロールに付加反応を行うことでトリカプランとすることを試みた(図3)。

トリカプランに導入する際、1または3位の水酸基に導入場合と、2位の水酸基に導入する2種類が考えられたので、それぞれ対応する水酸基のみをフリーとした前駆体を合成した。次いでこれにC-11-カプリン酸クロライドとの反応について種々反応条件を検討したところ、これらについては想定した目的物を得ることが出来なかった。

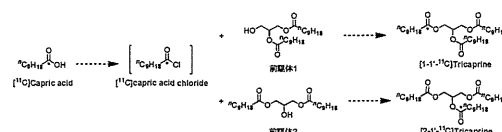


図3 C-11-トリカプリンの合成

また、得られたC-11-カプリン酸のマウス体内動態について、静脈内投与、経口投与についてそれぞれ検討を行った。その結果を図4(静脈内投与)および図5(経口投与)に示す。静脈内投与されたC-11-カプリン酸の放射能は投与直後に心筋へ取り込まれることが示された。その後、速やかな放射能の消失が認められた。また、腎臓へは投与早期から高い取り込みが観察された。他の臓器においても血中放射能のクリアランスとほぼ同等のクリアランス速度を示した。また、経口投与においては、血中への吸収は早期より観察されたが、1%dose/gと高値ではないものの、腸管からと考えられる吸収が観察された。

D. 考察

本研究班の開発目標である中鎖脂肪酸およびそのトリグリセリド体の体内動態を評価する目的で、C-11標識体の合成について検討を行った。その結果、グリニア反応によるカルボン酸のC-11標識は定量的に進

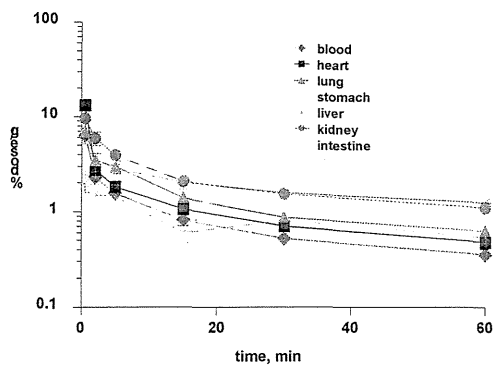


図4 C-11-カプリン酸静脈内投与によるマウス体内動態

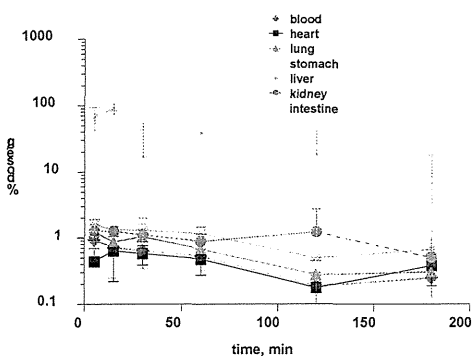


図5 C-11-カプリン酸の経口投与によるマウス体内動態

行することが示され、短時間内に十分かつ純度良く標識体を得ることが出来た。これを用いた C-11-トリカプリンの合成について検討を行ったところ、1 位水酸基への導入、2 位水酸基への導入のいずれについても反応はほとんど進行しなかった。反応原料はそれぞれ対応するジアシル体であるが、炭素鎖の長いアシル基が導入されているため、立体的な障害により、水酸基へのエステル化反応が進行しないものと考えられた。これについては今後、脂肪酸の ω 位を C-11 標識することとし、対応するトリグリセリド誘導体とした反応前駆体を準備して再度検討する予定である。これにより、生体内

で加水分解後は ω 位標識脂肪酸として挙動するため、C-11-カプリン酸についても、同様に ω 位を標識した ω -C-11-カプリン酸を合成して、再度体内動態を評価するものとする。

α -C-11-カプリン酸の体内動態を正常マウスを用いて検討を行った。マウスは試験前に絶食処置は行っていないため、血中脂肪酸量は高値を示していたものと予想される。静脈内投与したところ、投与直後である 30 秒後には心筋に血中より高い取り込みが認められ、心筋へ本脂肪酸が取り込まれたものと考えられた。その後、心筋からの放射能は速やかにクリアランスされ、投与 2 分以降はほぼ血中放射能と平行に減少することが認められた。この間の放射能の化学形については代謝物を評価していないので、不明であるが、中鎖脂肪酸であることから、肝臓等の末梢で β 酸化を受けて代謝され、短鎖となって排泄されるものと考えられるが、今後の検討が必要である。また、経口投与された場合については、胃内に経口ゾンデで直接投与したため、胃内の放射能が長時間にわたり高値を示している。これについては試験前に絶食にするなど、胃内容物の影響を強く受けると予想される。遊離脂肪酸は通常の経口投与された脂肪が腸管より吸収される際と同様の吸収経路を取るものと考えられる。血中への放射能量はそれほど高いものではないが、投与後早期から放射能の検出が認められ、吸収を受けているものと考えられる。この場合も、血中の代謝物を同定されていないため、詳細については不明であるが、パルミチン酸等の生体内由来脂肪酸とのトリグリセリドを形成しているものと予想された。

E. 結論

今回対象としている中鎖脂肪酸であるカプリン酸の α 位を C-11 標識することが出来た。対応するトリカプリンには本標識体からの合成では、得ることが出来なかったため、今後 ω 位標識体を用いた検討を行う。また、C-11-カプリン酸のマウス体内動態について検討を行い、投与直後での心筋への取込が観察された。食事の影響や代謝物など、今後検討を行う。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

非線形ラマン散乱顕微鏡による細胞内脂質の検出に関する研究

研究分担者 橋本 守 大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授

研究要旨

中鎖脂肪酸の細胞内動態，中鎖脂肪酸添加が及ぼす影響を詳細に観測することを目的として，非線形ラマン散乱顕微鏡を用いて，重水素置換した脂肪酸を細胞内で観測可能かどうかを検討した．重水素化ステアリン酸を加えて培養したTGCV細胞中では明白な CD_2 伸縮振動が観測された．一方，重水素化カプリン酸では明瞭な CD_2 伸縮振動の信号が確認できなかった．重水素化脂質を用いて，細胞内脂質を識別観測できることがわかったが，細胞内動態の検出には，さらなる検出感度の向上が望まれる．

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy, TGCV)において，食事療法中のカプリン酸 (C10:0) が，強い細胞内 TG 含量低下活性を持つことを見出しされた．これは，カプリン酸等の中鎖脂肪酸は，長鎖脂肪酸とは異なる代謝過程をたどるためである．そこで，本研究では，中鎖脂肪酸の細胞内動態，中鎖脂肪酸添加が及ぼす影響を詳細に観測することを最終目的としている．本年度は，非線形ラマン散乱顕微鏡を用いて，重水素置換した脂肪酸を観測可能かどうか検討した．

B. 研究方法

これまで，蛍光標識された脂肪酸を用いて，脂肪酸の代謝過程の追跡等が行われてきたが，蛍光分子は脂肪酸と同程度の分子非常に大きい．このため，蛍光標識された脂肪酸では，標識されていない脂肪酸の動

態を正しく反映していない可能性がある．

また，蛍光標識では退色の影響があり，長時間の観測に問題がある．そこで，アルキル鎖の水素を重水素に置換した重水素化脂肪酸を培養液に加え，培養した TGCV 線維芽細胞を，コヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS) 顕微鏡 で観測した．

(倫理面の配慮)

本研究では，遺伝子解析は施行していない．試料については研究実施前に実施計画に関して大阪大学の倫理委員会から文書による承認を得ている．

C. 研究結果

重水素化ステアリン酸を加えて培養した TGCV 細胞中では明白な CD_2 伸縮振動が観測された．一方，重水素化カプリン酸では明瞭な CD_2 伸縮振動の信号が確認できなかつ

た。また、重水素化カプリン酸で培養した TGCV 細胞で、 CH_2 伸縮信号の増強が観測された。

D. 考察

ステアリン酸とカプリン酸において、 CD_2 信号強度が異なる理由としては、代謝経路が異なるためであると考えられる。しかしながら、重水素化カプリン酸で明瞭な信号が検出されなかったが、これは CARS 顕微鏡特有の、非共鳴バックグラウンドの影響である。今後、非共鳴バックグラウンドの影響がない誘導ラマン散乱顕微鏡の適用を検討する。

重水素化カプリン酸で培養した TGCV 細胞で、 CH_2 伸縮信号の増強については、培養手順の検討を含め、より詳細な実験を行って行く必要がある。

E. 結論

重水素化置換脂肪酸によって、細胞内の脂肪酸の識別が可能であることが分かった。ただし、重水素化カプリン酸の検出は十分でなく、より微小な信号の取得方法を検討する必要がある。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

高速波長走査多焦点 CARS 顕微鏡による分子振動イメージング

橋本守, 南川丈夫, H. Cahyadi, 新岡宏彦,

荒木勉

第 35 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2W4III 生体分子イメージングへの新たな挑戦～ラマン分光, プローブレスイメージングによる分子機能解析とがん診断への応用～, (福岡: 2012. 12. 11-14)

Stimulated raman scattering microscopy with high-speed wavelength scanning laser

H. Cahyadi, N. Matsumura, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto,

第 60 回応用物理学関係連合講演会 (神奈川県: 2012. 12. 27-30)

Fast spectral coherent anti-stokes Raman scattering microscopy for detection of lipid accumulation in triglyceride deposit

cardiomyovasculopathy-indicated fibroblasts

H. Cahyadi, H. Niioka, K. Hirano, C. Ikegami-Nomura, T. Araki, and M. Hashimoto

平成 24 年度日本分光学会年次講演会 (東京: 2012. 11. 27-29)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

TGCV 患者 iPS 細胞を用いた擬人化マウスモデルの作製とモデルによる評価系の確立

研究分担者 千葉 俊明 琉球大学大学院医学研究科 細胞病理学講座 准教授

研究要旨

TGCV患者においては、心筋および血管平滑筋細胞内の中性脂肪含量が著明に増加しており、診断かつ病態における中心的な所見である。今回、上記事象をヒト生体内に近い環境で再現し、かつ診断・治療効果判定に利用できる評価系を確立するために、TGCV患者iPS細胞をNod-Scidマウス精巣内へ注入し、奇形腫を形成させる事により、その奇形腫内に発生する心筋・平滑筋細胞における中性脂肪蓄積を評価する系の確立を試みた。正常iPS細胞由来の奇形腫と比較し、TGCV奇形腫では平滑筋細胞および腸管様構造に付随する消化管平滑筋内での優位な中性脂肪蓄積が確認された。これにより、ヒト細胞をマウス体内で成育させ、かつマウスへの治療によって患者個別の治療評価が出来る系の樹立に成功した。

A. 研究目的

糖尿病患者においては心筋の中性脂肪含量が著明に増加しており、診断かつ病態における中心的な所見である。しかし、希少疾患であることから、それらの細胞を患者から容易に採取・生検することは困難である。故に、上記事象をヒト生体内に近い環境で再現し、かつ診断・治療効果判定に利用できる評価系を確立するためにTGCV患者iPS細胞を用いた擬人化モデルの作製を試みた。

B. 研究方法

7週齢の免疫不全Nod-Scidマウスの精巣内へ原発性TGCVもしくは正常ヒトiPS細胞を移植し、2-3ヶ月マウスを飼育する事で奇形腫を作製した。奇形腫の形成を腹部超音波で確認した後、マウス心臓・大動脈・肝臓およびiPS由来ヒト奇形腫を採取した。

Oil red O染色および免疫染色法にて奇形腫内の心筋・平滑筋細胞内における中性脂肪の蓄積を評価した。（倫理面の配慮）

本研究は、大阪大学動物実験委員会の認可をうけて行なった。

C. 研究結果

2種類の異なったTGCV-iPS細胞株および正常ヒトiPS細胞株を用いて、それぞれ4個+12個のTGCV奇形腫および10個の正常ヒト奇形腫を作製できた。TGCV奇形腫では平滑筋細胞のマーカーである α SMA、SMemb陽性の平滑筋細胞（血管構造を有する）および腸管様構造に付随するSMemb陽性の消化管平滑筋内での優位な脂肪蓄積が確認された。また、それらの蓄積した脂肪はOil Red O、Nile Blue染色およびADRP免疫染色により、細胞内中性脂肪であることが確認された。正常iPS細胞由来の奇形

腫および TGCV 奇形腫では線維芽細胞もしくは間質細胞と思われる細胞への少量の脂肪蓄積は散在性に認められるものの、正常 iPS 奇形腫では上記構造を有する平滑筋細胞への脂肪蓄積はまったく認めなかった。

また、マウス心筋および大動脈血管平滑筋における脂肪蓄積はどの群においても見られなかった。

D. 考察

患者由来奇形腫および正常ヒト由来奇形腫において発生する組織・細胞に差異はなく、ATGL 遺伝子欠損は少なくとも個体発生過程における分化異常を示さない事が予想された。また、正常環境下マウスの体内においても患者同様の中性脂肪蓄積がヒト奇形腫内で起きた事は、心筋・平滑筋細胞自身の遺伝子欠損による細胞内代謝異常が TGCV 発病の病態に重要である事が予想された。

E. 結論

以上より患者 iPS 細胞を用いて、3次元構造を有する分化したヒト平滑筋細胞での中性脂肪蓄積が証明・再現・評価できる擬人化モデルを作製する事ができた。また、擬人化モデルによって病態を再現できることから、正常 iPS 奇形腫を作製し、マウスを糖尿病化することで、二次性の DM-TGCV を再現・病態評価できる系へも利用できる高い可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

“Establishment of the Personification-Mouse Model with the TGCV Patient Specific iPS Cells”
Shunmei Chiba, Satoshi Yamaguchi, Akira Suzuki, Kazunari Arakaki1, Sen Matayoshi, Takaya Nakanishi1, Hirofumi Matsumoto1, Takumi Era, Miwako Nishio, Kumiko Saeki, Rajarajan Kuppusamy, Sean M. Wu, Ken-ichi Hirano, Seiya Kato.
The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit
Cardiomyovascularopathy (TGCV) and Neutral Lipid Storage Disease (NSLD) (19-20th April, 2013 at Osaka University Nakanoshima Center)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業）
分担研究報告書

マイクロミニブタを用いた糖尿病性TGCVモデルの開発

研究分担者 谷本昭英 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 教授

【目的】 マイクロミニブタにストレプトゾトシン (STZ) を単回投与することで1型糖尿病を誘発し、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) モデルを作製する。

【方法】 5頭のマイクロミニブタに STZを300mg/kg BW投与し、1型糖尿病を作製する。1週間のブドウ糖投与期間の後、高脂肪食による飼育を18日間行った。

【結果】 5頭中の1頭が実験中に死亡したが（剖検するも原因は特定できなかった。）、4頭においては予定期日まで生存させることができ、高血糖状態を誘導することができた。

【考察】 当初、STZ 投与直後のラ氏島の急激な破壊による低血糖のための死亡が予想され、飲水や食餌によるブドウ糖補充を行ったが、ブドウ糖非投与の個体においても生存し得たことから、STZ 投与直後においてもブドウ糖補充は必要ないと思われる。今回、STZ 300mg/kg 投与で十分な高血糖の誘導が見られたが、150 mg/kg 投与で同様の報告もあり、投与条件については検討の余地がある。今回実験では、STZ 投与後1週間から高脂肪・高コレステロール食を18日間負荷したが、中性脂肪蓄積心筋血管症は高コレステロール血症を伴わない中性脂肪の蓄積が心血管に見られる病態であり、糖尿病誘導後の長期観察のみで十分な中性脂肪の蓄積が見られるようであれば、普通食での飼育のほうが理想的である。

【結論】

マイクロミニブタにSTZ 単回投与により、1型糖尿病を誘発することに成功した。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCV のモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

A. 研究目的

研究目的は、マイクロミニブタにストレプトゾトシン (STZ) を単回投与することで1型糖尿病を誘発し、心血管系にトリグリセリドの蓄積が起る中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) モデルを作製することである。

B. 研究方法

実験には20~22ヵ月齢の雄性マイクロミニブタ、5頭を用いた。

STZ は濃度 100 mg/mL で 100 mM クエン酸緩衝液 (pH4.5) に溶解し、インフュージョンポンプを用いて、2 mL/min の速度で耳介静脈内に投与した。

総量は 300mg/kg BW とした。STZ 投与後は急激なラ氏島破壊による低血糖が予想されるため、ブドウ糖粉末をオブラートで包み、餌に混入させて与えた (3.3

g/kg/day, 1回給餌時に 1.1 g/kg)。また、混飲水

として朝と夕の給餌時間付近に、2L のボトルに 0.0250g/mL の濃度のブドウ糖混入飲水をセットし、次回セット前に回収した。回収時は残量を測定した。ブドウ糖混入飲水のボトルセット時も、自動給水による通常の水は常に飲めるようにしておいた。ブドウ糖投与期間は1週間とした。この間、簡易血糖値測定器を用いて、耳介静脈を一部注射針で傷つけて血液を1~2滴得て、血糖値を測定した。

経口ブドウ糖負荷試験は、STZ投与後8日、22日目で行った。ブドウ糖液 (1.5g/kg、4.5mL/kg、0.333g/mL) をディスポーザブルカテーテル及び注射筒を用いて経口投与した。ブドウ糖投与前、ブドウ糖負荷後、投与後30、60、90、120及び180分で採血し、ヘキソキナーゼ G-6-PDH 法にて測定した。

STZ 投与日から9日間は通常飼料を体重の

3%/body 与え、10 日以降は特殊配合飼料

(12%Fat+0.5%Cho) を 18 日間、3%/body 与えた。剖検日には (STZ 投与後 26 日目)、体重を測定後、メデトミジン水溶液 (ドミツール、1 mg/mL、0.04 mL/kg)、塩酸ケタミン水溶液 (50 mg/mL、0.1 mL/kg) 及びミダゾラム (10 mg/2 mL、0.04 mL/kg) を筋肉内投与し、採血後にペントバルビタールナトリウム水溶液 (64.8 mg/mL、0.5 mL/kg) の前大静脈洞からの静脈内投与あるいは耳介静脈内投与により麻酔を行い、放血安楽死させ、外表、内部器官及び組織を肉眼的に観察した。摘出した各臓器は、電子天秤を用いて重量を測定した。さらに、剖検時の体重から 1 kg あたりの相対重量を算出した。組織は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定した、パラフィン切片、HE 標本を作製した。

C. 研究結果

各動物において、STZ 投与後には空腹時血糖値が約 150~200mg/dL に上昇した。経口ブドウ糖負荷試験でも、STZ 投与後 8 日、22 日目のいずれにおいても、120 分値が約 200~300mg/dL と高値を示し、ブドウ糖のクリアランスの低下が見られた。

D. 考察

5 頭中 1 頭が実験中に死亡したが (剖検するも原因は特定できなかった)、4 頭においては予定期日まで生存させることができ、高血糖を誘導することができた。当初、STZ 投与直後のラ氏島の急激な破壊による低血糖のための死亡が予想され、飲水や食餌によるブドウ糖補充を行ったが、ブドウ糖非投与の個体においても生存し得たことから、STZ 投与直後においてもブドウ糖補充は必要ないと思われる。今回、STZ 300mg/kg 投与で十分な高血糖の誘導が見られたが、150 mg/kg 投与で同様の報告もあり、試薬節約のためにも検討の価値はあると考えられる。今回実験では、STZ 投与後 1 週間から高脂肪・高コレステロール食を 2 週間負荷したが、中性脂肪蓄積心筋血管症は高コレステロール血症を伴わない中性脂肪の蓄積が心・血管に見られる病態であり、糖尿病誘導後の長期観察のみで十分な中性脂肪の蓄積が見られるようであれ

ば、普通食での飼育のほうが理想的である。

E. 結論

マイクロミニブタに STZ 単回投与により、1 型糖尿病を誘発することに成功した。今後の研究で、心血管系にトリグリセリドの蓄積が確認出来れば、TGCV のモデル動物として、治療戦略の構築に重要なツールのひとつになることが予想される。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

The 2nd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease (April 19-20, 2013, Osaka, Japan)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

[IV]

研究成果の刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
平野賢一	中性脂肪蓄積心筋血管症	永井良三ら	先端医療シリーズ43 循環器疾患の最新医療	先端医療技術研究所	東京	2012	114-7
平野賢一、鈴木 朗	ATGL欠損症	遠藤文夫	先天代謝ハンドブック	中山書店	東京	2012	394-5
平野賢一、青山敏明	今注目されている中鎖脂肪酸とは	伊藤 浩	そうだったんだ！脂肪酸 循環器疾患との深い関係	文光堂	東京	2012	82-3

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
平野賢一、鈴木 朗	中性脂肪蓄積心筋血管症	医学のあゆみ	242	937-41	2012
平野賢一	中性脂肪蓄積心筋血管症	循環器内科	71	576-8	2012
平野賢一、長坂博範	脂質異常症と脂質蓄積症	Surgical Frontier	19	23-8	2012
Nakamura K, Hirano K, Wu SM.	iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases	Journal of cardiovascular translational research	6	46-53	2013