

試験方法そのものの権利関係を明らかにしておく必要がある。

(1) 臨床試験

- ① 第Ⅰ相試験
- ② 第Ⅱ相試験
- ③ 第Ⅲ相試験

2. 審査

非臨床試験、臨床試験の結果を報告書にまとめ、また要約した概要を作成して厚生労働省に提出するわけであるが、この事務手続を代行できる者がいると研究者は研究に特化できる。その代行権限などの法的基盤を確立する必要がある。

D. 考察

医薬品開発は、自然界に存在する無数にある物質から特定の成分を抽出・合成をしてランダムに合成しなければならないので、大手製薬会社の多額の資金、人的資源を必要としてきた。他方、本プロジェクトのような用途発明的な医薬品の開発方法は、アイデア次第でシーズの発掘や効率的な新薬開発方法をとることが可能であるので、ベンチャー会社を創立することもできよう。

この方法による創薬プロセスは、大学で行われる研究の中で有望な研究成果を特許化し、ベンチャーへ技術移転またはベンチャー企業を設立するが、販売までのプロセスは同じであり、研究開発・非臨床試験→臨床試験（期間4~7年とされる。第Ⅰ相試験、第Ⅱ相試験、第Ⅲ相試験）→承認申請→製造販売となる。基礎研究で特許を取得した場合、特

許期間は20~25年であり、非臨床試験から承認申請し、販売となると10~15年にかかるので、実質的には特許に基づく独占販売期間は約10年となる。

次にこのようなベンチャー的なアプローチを取る場合の留意点をあげる。

1. 概要

大学ベンチャーは、経営者が大学教授など研究者である場合が多く、経営の目的を理解せず経営し、失敗するリスクがあるので、法的素養のある経営アドバイザーが必要となる。

(1) 特許出願前の学会発表

学会発表を特許出願前に発表をする場合がある。一方、特許出願を行うためには発明の「新規性」が必要になる。特許の出願以前に発表をすると、自分の発明の新規性が失われ、特許を受けることができなくなる。例外規定もあるが、予め法的支援者をプロジェクトに入れておく方が良い。

(2) ネガティブデータ

創薬はネガティブデータが開発のヒントになる場合がある。また、ネガティブデータも収集・管理を続ければ知的財産となりうる。研究者は論文を書くのに不要なネガティブデータを捨ててポジティブデータのみを集めがちとなる。ネガティブデータの整理・保管も徹底すべきである。

(3) 他人の特許

「特許権の効力は、試験又は研究のためにする特許発明の実施には、及ばない（特許法69条）」とあり、研究者は研究

等を行う場合、特許侵害は起こらないが、その侵害とならない範囲の特定が難しいので、法曹と協調することが望ましい。

2. 人材

ベンチャーは少人数での組織立ち上げとなることから、経営層の力量が経営に直接影響を与える。従って人材の構成が成功の鍵と言える。

(1) 経営経験者の有無

経営者は企業全体を見て適切な指示と行動をとらなければならないことから、経験者が望ましい。

(2) 事業開発経験者の有無

創薬ベンチャーは研究と開発を進めシーズを作り出し、大手製薬企業を相手に交渉をしてライセンス契約を結ぶのが一般的である。経営者が交渉を取りまとめることが可能であっても、経営判断や資金調達などに追われてしまい交渉に手が回らなくなる場合がある。研究から交渉までの事業開発プロセスを経験した人物を雇うことが望ましい。或いは、そのような分野の企業と連携することが望ましい。

3. 知財・法務

投資や知財の法的基盤を整備する必要がある。特に知財の権利関係を押さえておかなければならないが、様々な契約関係にも留意する必要がある。

(1) 投資契約

投資契約は、投資家とベンチャー企業間で交わされる契約である。投資家は経

営が悪化した場合に備え、様々な条項を要求する。「役員を選任条項」「通知条項」「承諾条項」などがある。特に「株式の買い取り条項」で「個人補償」の定めである。最悪の場合自己破産となる。

(2) 特許権

ベンチャーは大学での基礎研究の成果を特許化しそれを移転する。ここで移転に不備があって実施権はベンチャーが持っているが、特許権は大学が持っている、ライセンス契約時にトラブルとなる可能性がある。この場合特許取得に関する費用負担と権利帰属との関係などに考慮する必要がある。また、その特許の市場・研究開発分野での有効性（強さ）とその利用についての計画を立案しておく必要がある。

4. データのマネージメント

企業とライセンス契約の交渉を行う場合、データの確認が必要となることから、データマネージメントを行う必要がある。デジタル化することで、膨大なデータの管理を容易にすることが可能である。ライセンス交渉に必要なデータはその都度異なるが、最低限必要な情報は、医薬品申請に求められるデータである。このデータ常に意識して整理しておくべきである。製薬企業にとっても効率的にデータを評価することができる。データが散在しているだけではただのデータだが、マネージメント対象とすれば大切な財産となる。

5. 継続・最終処分

ベンチャーの継続か幕引きかの判断時

期と条件について、予め明確に定めて
関係者が一致した認識を持つておく必要
がある。その上で次ぎのステップについ
て検討すべきである。

なし

3. その他

なし

(1) . 成功→継続

規模を大きくするのか、経営の安定化
に労力と時間を割くのかを検討する。

(2) . 成功→譲渡

株式売却、IPO、ライセンス契約、資本
提携、M&A など最も良い方法を検討する。

(3) . 失敗→継続

資金調達を含めた継続に向けての再生
計画を立てる。

(4) . 失敗→解散

人材、資金、ノウハウなどの財産処分
を予め検討しておくトラブルが少ない。

E. 結論

本プロジェクトのような創薬開発の場
合は、知財に留意したベンチャー的アプ
ローチが望ましい。

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

中性脂肪蓄積心筋血管症の研究

研究分担者 南都伸介 大阪大学大学院医学系研究科 先進心血管治療学寄付講座 教授
研究協力者 吉田雅言 大阪大学大学院医学系研究科 先進心血管治療学寄付講座 特任研究員

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症について、冠動脈造影の所見、あるいは冠動脈 CT の所見による診断基準を設けるために現在症例を蓄積中である。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症の疾患概念を冠動脈造影、心臓 CT などの点から確立させること。

B. 研究方法

重症冠動脈疾患における冠動脈造影や心臓 CT の所見を蓄積し、中性脂肪蓄積心筋血管症の可能性がないか検討している。

冠動脈造影や心臓 CT から中性脂肪蓄積心筋血管症と診断できるような基準や指標を見出すことを行っている。

また、様々なイメージングデバイス（血管内超音波装置や光干渉断層法など）の使用も検討中である。

（倫理面への配慮）

現時点では患者さんに中性脂肪蓄積心筋血管症が強く疑われない限り、通常の冠動脈造影・心臓 CT の説明を行い、同意を得ている。

C. 研究結果

現段階では中性脂肪蓄積心筋血管症を積極的に疑う症例がなく、重症冠動脈疾患を注意深く観察している状態である。特に現在は糖尿病合併の重症冠動脈疾患が中性脂肪蓄積心筋血管症に近い病態を呈している可能性があり、症例を蓄積している。

D. 考察

中性脂肪蓄積心筋血管症を見出すために冠動脈造影・心臓 CT は重要な役割を担うと思わ

れるが、症例数が現段階で少ないこともあり、診断基準を見出すにはいたっていない。

E. 結論

現在症例の蓄積を行っている。

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

（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 診断基準の作成 — 定量的冠動脈 CTA 法の糖尿病 TGCV 例への応用 —

研究分担者 内藤博昭 独立行政法人国立循環器病研究センター 病院長

研究要旨

冠動脈 CTA 画像の定量的解析法 (NCVC システム) を構築し、虚血性心疾患疑い例と糖尿病 TGCV 疑い例に応用した。結果、前者の非狭窄冠動脈壁厚 (1.3mm)・壁内脂質含有率 (39%) に対し、後者では両指標ともに高値傾向を示し、脂質が外膜側から壁内に入り込む断面像を呈した。以上より NCVC システムが TGCV 診断基準形成に寄与する可能性が示された。

A. 研究目的

X線 CT では、脂肪組織、軟部組織、石灰化成分や造影剤を含む血液は各々特有の CT 値を示す。そこで CTA 画像から境界 CT 値を設定して冠動脈の各構成成分を分離する定量的解析法 (NCVC システム) を応用し、TGCV 例の冠動脈壁性状評価が可能かを検証する。

B. 研究方法

冠動脈 CTA 画像に対し、冠動脈外縁と内腔の境界 CT 値 (各々脂肪組織 (-100Hu) または大動脈内腔 (実測) と推定壁 CT 値 (50Hu) の半値) を設定して外部と内腔形状を抽出し、三次元画像と中心軸に垂直な断面像を作成。短軸断面での断面積から①平均内腔直径と②壁厚、③脂質と④石灰化の含有率を算出した。さらに多短軸面の同値を加算平均し、冠動脈全長およびセグメント単位での①～④の平均値を算出した。脂質 CT 値の上限は 40Hu、石灰化 CT 値の下限は 700Hu とした。虚血性心疾患疑い 15 例と糖尿病 TGCV 疑い 4 例に本法を応用、①～④の指標を算出し解析した。

(倫理面への配慮)

虚血性心疾患疑い例への NCVC システム応用は、センター倫理委員会の承認済み。TGCV 例

への本格応用は倫理委員会申請予定。

C. 研究結果

虚血性心疾患疑い例での左冠動脈前下行枝狭窄例の三次元表示像を図 1 に、正常と狭窄冠動脈の短軸断面表示像を図 2 に示す。赤色は内腔、黄色は脂質成分を表し、後者は外膜側を取り巻くように存在することが可視化できた。壁厚は非狭窄部で平均 1.3mm、壁脂質含率は 39%であった。糖尿病 TGCV 疑い 4 例のうち冠動脈ステント留置の 1 例を除く 3 例の短軸断面では、通常の虚血性心疾患例に比して外膜側の脂質成分が顕著で、壁内への侵入像を認めた。指標では、症例 1 は壁厚と脂質含量の高値とともに、経過観察での壁肥厚の軽減と石灰化の増加傾向が示された (表)。

D. 考察

NCVC システムは、冠動脈 CTA データに基づく 1) 内腔・壁・壁内脂質・石灰化の三次元/短軸断面表示、2) 上記①～④の指標計測、3) 同指標の冠動脈長軸に沿うグラフ表示からなる解析法である。内腔の「正常」部分を指示することで、冠動脈造影における QCA 手法を全長に適用でき、セグメント単位での狭窄率評価

が可能である。短軸面での内腔・外縁断面積の円仮定算出による壁厚は、非狭窄冠動脈でも病理報告(1mm)よりやや厚いが、主に外膜厚みの過大評価によると考えられる。壁内脂質は概ね外膜側を取り巻く層状に描出され、これは周囲脂肪組織との部分容積効果の他、褐色脂肪や vasa vasorum の多寡を反映して壁の活動性に対応する可能性がある。今回の糖尿病 TGCV 疑い例では、この外膜脂肪層が厚いのみでなく、通常の虚血性心疾患例では稀な壁内進展パターンを呈していた。

E. 結論

NCVC システムを用いて、糖尿病 TGCV 例の冠動脈 CTA から、壁性状(肥厚・壁内脂質・石灰化)についての定量評価と三次元表示による可視化の可能なことが明らかになった。従って本システムは TGCV 例での診断基準作成に十分応用できるものと思われる。

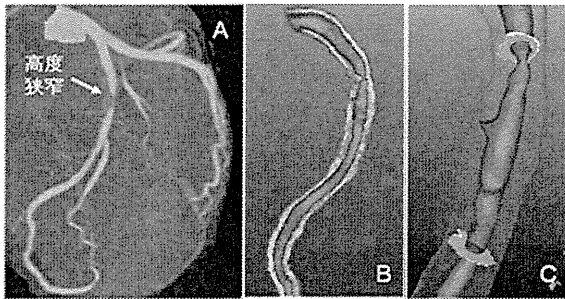


図1 左冠動脈 CTA (冠動脈狭窄例)

A: 通常の CTA (MIP 法)、BC:NCVC システム三次元表示像)

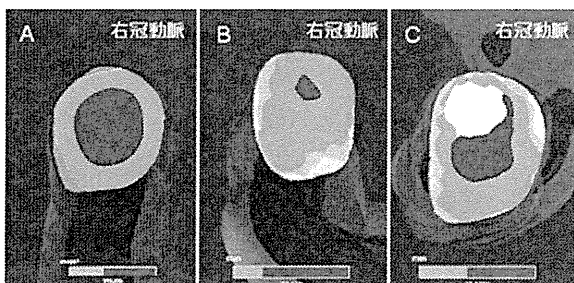


図2 冠動脈断面像 (NCVC システム)

A:正常例、BC:冠動脈狭窄例 (同一例)

指標	一回目 (2011年)	二回目 (2012年)	三回目 (2013年)
外径 (mm)	5.5	5.4	5.3
内腔径 (mm)	2.9	3	2.9
壁厚 (mm)	1.3	1.2	1.2
壁内脂質 (%)	47	46	45
壁石灰化 (%)	1.1	1.8	3.4

表 冠動脈計測値の経過変化 (症例1)

左冠動脈主幹部(#5)～前下行枝(#6～#7)の平均

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Naito H, Higashi M, Noguchi T: Quantitative coronary CT angiography: A proposed system for assessment of lipid accumulation in coronary arterial wall.

The 2nd International Symposium on TGCV & NLSA, Program and abstracts, p8, 2013.

2) Kono AK, Higashi M, Morisaki H, Morisaki T, Naito H, Sugimura K. Prevalance of dual extasia in Loey's-Dietz syndrome: comparison with Marfan syndrome and normal controls. Plos One 8 (9); 2013

2. 学会発表

1) 内藤博昭、東 将浩、野口輝夫: 定量的冠動脈 CTA: NCVC システムの提案. 第75回日本心臓血管放射線研究会 2012年7月7日(東京)

2) Naito H, Higashi M, Noguchi T: Quantitative coronary CT angiography: A proposed system for assessment of lipid accumulation in coronary arterial wall.

The 2nd International Symposium on TGCV & NLSA April 20, 2013 (Osaka)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

I. 研究協力者

独) 国立循環器病研究センター 東 将浩

大阪大学医学部放射線医学 富山憲幸

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患克服研究事業））
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 特任研究員

研究要旨

これまで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、食用中鎖脂肪酸 (Medium chain triglyceride, MCT; カプリル酸 C8:0 とカプリン酸 C10:0 の混合トリグリセリド)オイルを用いた食餌療法の効果を検討・報告してきた。本年度はトリカプリン(C10)の薬理・薬効試験を開始するに先立ち、モデルマウスにおける予備試験を行った。トリカプリン含有飼料を与えた場合は、食用 MCT オイルを与えた ATGL-KO マウスに比べて寿命が延長した。この結果より、食用 MCT オイルよりもトリカプリンの方が薬効が高いことが推察された。

A. 研究の目的

我々は中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)のモデル動物である ATGL-KO マウスにおいて、食用中鎖脂肪酸 (MCT) オイルを用いた食餌療法の効果を検討・報告してきた。研究班の *in vitro* における研究において、食用 MCT オイルを構成する脂肪酸の中で、カプリル酸(C8)よりカプリン酸(C10)の方がより効果大きいことが見出されたため、カプリン酸を対象としたマウス予備試験を行った。ATGL-KO マウスは心筋細胞内への著しい脂肪蓄積のため、若年で死亡するが、食用 MCT オイル含有飼料を与えることで寿命が延長することがわかっている。今回はカプリン酸含有飼料での寿命への効果を検討した。

B. 研究方法

まず、各種濃度 (2%, 4%, 8%) のカプリン酸含有飼料を作成し、野生型マウスにおいて摂餌量と体重を指標として、マウスの摂餌に障害とならない飼料中カプリン酸の濃度を検討した。次に、カプリン酸トリグリセリド (トリカプリン) を合成した。ATGL-KO マウスに対しトリカプリン含有飼料 (5%) を与え、その寿命を観察した。

(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

野生型マウスにおいて、2%と4%カプリン酸含有飼料は良好に摂餌し体重も順調に増加した。しかし8%カプリン酸含有飼料の場合、摂餌量はたいへん少なく、これに伴い体重も減少した。この結果よりカプリン酸含有飼料の濃度は4~8%が適当であることが判明した。

次に ATGL-KO マウスに対し5%トリカプリン含有飼料を与えたところ、食用 MCT オイル飼料を与えた場合の寿命、84~93 日に比し、92~114 日へと延長した。

D. 考察

高濃度のカプリン酸含有飼料ではマウス摂餌量が低下するが、これはカプリン酸の刺激味によるものと推測される。ヒトにおいて高濃度カプリン酸を経口にて摂取する場合は、カプセル化等を検討する必要があると考える。

トリカプリン含有飼料を与えた ATGL-KO マ

ウスの寿命が、食用 MCT オイル飼料を与えた場合に比べて延長したことは、食用 MCT オイルよりトリカプリンの方が薬効が高いことを示唆するもの考える。今後はマウスの n 数を増やして再度確認するとともに、研究班では、すでにマウスによる [123I]-BMIPP-SPECT 法を開発しているので、トリカプリンの体内動態を検討するなどして、動物を使用してトリカプリンの薬効をさらに詳細に検討したい。また、動物を使ったトリカプリンの毒性試験を実施し、医薬品開発のための基礎データを得る予定である。

E. 結論

ATGL-KO マウスの寿命延長効果において、食用 MCT オイルよりトリカプリンの方が寿命の延長効果が高かった。TGCV に対するトリカプリンの有用性を示唆するものとする。

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（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

カプリン酸測定法に関する研究

研究分担者 惠 淑萍 北海道大学大学院保健科学研究院 准教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）は心筋細胞や冠状動脈硬化巣などに中性脂肪が蓄積することで重症心不全、不整脈を引き起こす難病である。本研究班はTGCVの治療法として中鎖脂肪酸油（Medium Chain Triglyceride, MCT）を含有する医薬品開発を行っている。本研究では、MCTの成分であるカプリン酸（FFA10:0）の新規HPLC定量法を確立した。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）患者の治療法として中鎖脂肪酸油（Medium Chain Triglyceride, MCT）は有効であると証明された。MCTの組成成分であるカプリン酸（FFA10:0）を正確に定量するために新規HPLC分析法の開発を試みた。

B. 研究方法

FFA10:0をニトロフェニルヒドラジン（NPH）によるラベル化法でFFA10-NPHを標準物質として得た。また、ウンデカン酸（FFA11:0）もNPHと反応させ、FFA11-NPHを内部標準物質（IS）として合成した。同様に、代表的な長鎖飽和脂肪酸であるパルミチン酸（FFA16:0）、ステアリン酸（FFA18:0）からFFA16:0-NPH及びFFA18:0-NPHをそれぞれ合成した。なお、FFA16:0-NPH及びFFA18:0-NPHのISとしてFFA17-NPHを合成した。合成した標品及び内標準物質の構造の確認はLTQ XL（Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, MA, USA）を用いる質量分析により行った。

C. 研究結果

合成した標品の構造はLC/MSにより確認した。FFA10-NPHについては1.0~200.0 pmol/injectionの範囲で良好な検量線を得た。FFA10-NPHの検出限界（S/N=3:1）は0.6 pmol、定量限界（S/N=4:1）は1.0 pmolであった。FFA10:0の新規HPLC定量法を確立することができた。

D. 考察

脂肪酸分析は、脂肪酸をメチルエステルに転換してからガスクロマトグラフィー（GC）で測定する方法が汎用されている。メチルエステル化されたFFA10:0は揮発性が高まり、室温でも気化するため、この方法はFFA10:0の定量に向かない。さらに、脂肪酸を血清から抽出操作する過程でもFFA10:0を失いやすい。本研究で、脂肪酸-NPH誘導体に変換後、HPLC法にて分析することにより高精度かつ高感度にFFA10:0を定量することができた。本法では、脂肪酸に極性の高い官能基を結合するため揮発性を抑えることができ、FFA10:0の良好な回

収率を得ることができた。また、NPH は強い UV 吸収を示すために測定感度の面でも有利である。内標準物質として FFA11:0-NPH と FFA17:0-NPH を用いたことで、抽出や分析の過程での脂肪酸の損失に影響されない信頼性の高い測定が可能となり、良好な正確性と再現性が得られた。

E. 結論

カプリン酸の新規 HPLC 定量法を開発することができた。今後は、MCT 服用前後の TGCV 患者血中総 FFA10:0 濃度を測定するに本法を応用する予定である。

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許出願

カプリン酸定量方法

（特願 2013-224897、出願日：平成 25 年 10 月 30 日）

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（難治性疾患克服研究事業））
分担研究報告書

2型糖尿病モデル *db/db* マウスでみられる adipose triglyceride lipase の活性低下は
糖尿病心筋症を増悪させている

研究分担者 小林邦久 福岡大学筑紫病院 内分泌・糖尿病内科 教授
（共同研究者 井上智彰 九州大学大学院医学研究院 病態制御内科学 大学院生）

研究要旨

糖尿病状態における adipose triglyceride lipase (ATGL) の発現および活性の低下が糖尿病心筋症の発症・進展に影響をおよぼしている可能性について検討した。 *db/db* マウスの心筋においてトリグリセリド (TG) ・ジグリセリド (DAG) の含量は増加していた。心筋における ATGL の mRNA および蛋白発現は *db/db* マウスで有意に低下していた。補助因子 CGI-58 の mRNA 発現は対照と変化は認めなかったが、蛋白量は有意な低下を認めた。ホルモン感受性リパーゼの発現は変化を認めなかった。トリグリセリド合成に関与する酵素の発現は亢進していた。 *db/db* マウス心筋における蛋白キナーゼ C (PKC) のリン酸化は増加しており、酸化ストレスマーカー 8-OHdG は増加、抗アポトーシス因子 Bcl-2 は低下していた。糖尿病状態における ATGL 活性低下は DAG-PKC 経路の活性化を介して酸化ストレス亢進・アポトーシスを惹起し糖尿病心筋症の 1 因となっている可能性が考えられた。

A. 研究目的

糖尿病患者における心筋症は中性脂肪蓄積心筋血管症の心病変と類似している。われわれは、糖尿病状態における adipose triglyceride lipase (ATGL) の活性低下が糖尿病心筋症の発症・進展に影響をおよぼしている可能性について検討した。

なった。Folch 法を用いて脂質を抽出し、中性脂肪 (TG) ・ジグリセリド (DAG) 含量を測定した。心筋から抽出した mRNA ・蛋白を quantitative RT-PCR 法・ウエスタンブロット解析をもちいて、ATGL とその補助因子である CGI-58、ホルモン感受性リパーゼや TG 合成・酸化ストレスに関わる因子の発現を評価した。

B. 研究方法

2型等尿病モデル C57BL/KsJ *db/db* マウス（雄性）と対照として C57BL/KsJ *db/+* を通常食にて 10 週齢あるいは 20 週齢まで飼育し、絶食採血の後に心筋を採取した。心筋切片は oil red O 染色をおこ

（倫理面の配慮）

本研究は、九州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

10週齢の *db/db* マウスの心筋においては対照と比較して oil red O 陽性の脂質沈着を強く認めた。TG・DAGの含量は有意に増加していた。*db/db* マウス心筋における ATGL の mRNA・蛋白の発現は有意に低下していた。ATGL の補助因子である CGI-58 の mRNA は変化を認めなかったが、蛋白発現は有意に低下していた。ホルモン感受性リパーゼの発現には変化を認めなかった。トリグリセリド合成酵素である MGAT1・DGAT1 の発現は亢進しており、脂質合成転写因子の SREBP-1c の発現も有意に亢進していた。*db/db* マウス心筋における蛋白キナーゼ C (PKC) のリン酸化は増加しており、酸化ストレスマーカー8-OHdG は増加を認めた。アポトーシス誘導因子である BAX に変化を認めなかったが、抗アポトーシス因子 Bcl-2 は有意に低下していた。

D. 考察

長い罹患歴をもつ糖尿病患者においては糖尿病心筋症とよばれる中性脂肪蓄積をとともなう心筋運動障害を認め、生命予後不良に関与していると考えられている。今回のわれわれの検討で糖尿病状態における心筋が中性脂肪蓄積心筋血管症と類似した遺伝子・蛋白発現パターンを示していることが示された。TG合成系の酵素の発現は上昇している一方で分解系の酵素の発現に変化がなかったことが、TG・DAGの蓄積に関与していると考えられる。また DAG 増加による PKC 活性化が NAD(P)H オキシダーゼ活性化をもたらす、酸化ストレスの亢進による心筋のア

ポトーシスを惹起している機序が考えられた。以上のことは糖尿病心筋症が「二次性」中性脂肪蓄積心筋血管症である可能性を支持する結果と考えられた。

E. 結論

糖尿病状態における心筋障害（糖尿病心筋症）の発症・進展に ATGL の発現低下が関与している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

Downregulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in *db/db* mice.

Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R.

Biochem Biophys Res Commun. 438(1): 224-229, 2013

2. 学会発表

Adipose triglyceride lipase is downregulated in *db/db* mouse heart - an aggravating mechanism of diabetic cardiomyopathy

Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Takayanagi R

The Second International Symposium on Neutral Lipid Storage Disease (Osaka: 2013.4.19-20)

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（難治性疾患克服研究事業））
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。特に、これまでC-11標識体の合成が出来なかった、トリカプリンについて、 ω 位標識体として、反応条件を検討することでC-11-トリカプリンを得ることが出来た。本化合物は脂溶性が高く、投与のための製剤化の工夫が必要であるため、対応する ω -C-11カプリン酸の合成と合わせて、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。これまでカプリン酸の α 位をC-11標識することが出来たが、対応するトリカプリンは本標識体からの合成では、得ることが出来なかった。そこで本年度は、 ω 位標識体を得ることを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。これまで合成の最も容易なカルボン酸をC-11標識してカプリン酸の合成を行うことが出来た。そこで、本標識体を用いてトリカプリンの合成を二つの合成ルートから試みた（図1）。C-11-カプリン酸のカルボン酸を酸塩化物としてジグリセリドとのエステル反応を試

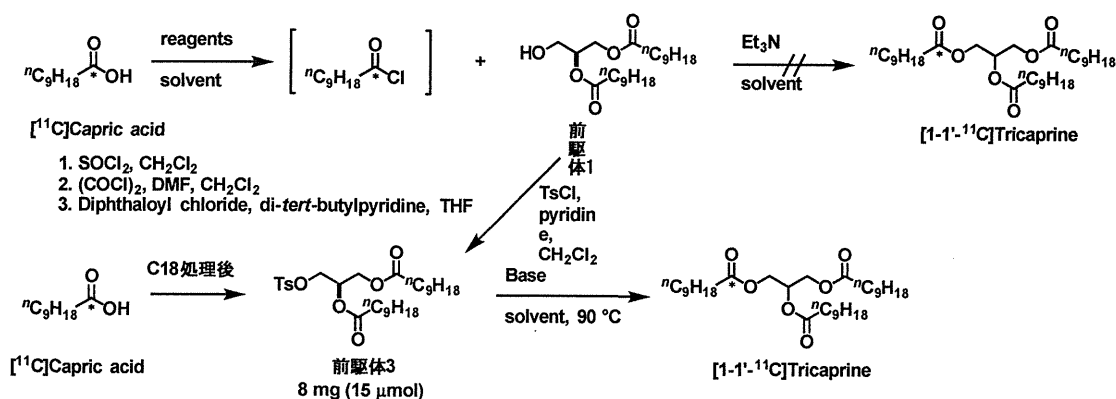


図1 α -C-11-カプリン酸からのトリカプリンの合成スキーム

みたが、本反応は全く進行しなかった。次いで、ジグリセリドの水酸基を活性化した前駆体を合成し、これと C-11-カプリン酸との反応を試みた (図1)。その結果、極少量の生成物を確認することは出来たが実用量を得ることは出来なかった。そこで α 位標識体を用いた合成法に替えて、脂肪酸の ω 位を C-11 標識する方法について検討することとした。

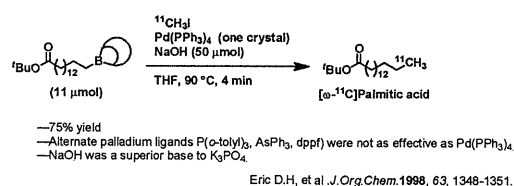
C-11 は浜松医科大学サイクロトロン施設設置のサイクロトロン、住友重機械製 HM-12 を用いることとし、自動合成装置は同じく浜松医科大学サイクロトロン施設に設置されている住友重機械製多目的合成装置を用いて種々の検討を行った。

(倫理面の配慮)

本研究に関連する動物実験は、浜松医科大学動物実験委員会にて審査を受け、承認を受けている。

C. 研究結果

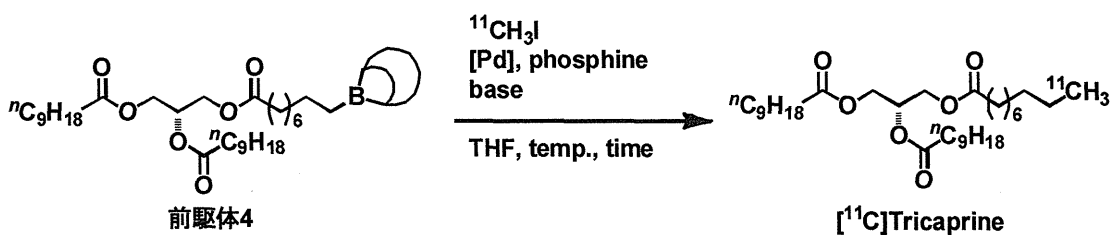
脂肪酸の ω 位に C-11 を導入する反応は通常、 $\text{sp}^3\text{-sp}^3$ 炭素結合形成反応を行うこととなり、アルキル基同志のカップリング反応となるため一般的に難しい。これまで、



Eric D.H, et al. J.Org.Chem.1998, 63, 1348-1351.

図2 Pd 触媒を用いる炭素-炭素結合反応スキーム

同様の反応として、ホウ素誘導体を前駆体に用い、パラジウムを利用したアルキル鎖のメチル化反応が報告されている (図2)。そこで本反応を利用することとし、前駆体の合成を行った。ついで既存の反応条件に従い C-11 ヨウ化メチルを用いるメチル化反応を行ったところ、反応は進行するものの、低収率であった。そこで種々反応条件を検討したところ、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{P}(\text{o-tolyl})_3$, Cs_2CO_3 の系を用いることで、十分な変換効率で目的物を得ることが出来た (図3)。すなわち、対応するホウ素試薬を用い、テトラヒドロフラン溶媒中でサイクロトロン、自動合成装置を用いて製造された C-11-ヨウ化メチルを添加して加熱することにより付加反応を行い、HPLC にて分取精製することにより目的物を得た (図4)。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5)。



Entry	[Pd]	Phosphine	Base	temp., °C	time	変換率, %**
						^{11}C Tricaprine
1*	Pd(PPh ₃) ₄	none	NaOH	90	10	10
2	Pd ₂ (dba) ₃	P(o-tolyl) ₃	K ₂ CO ₃	90	10	19
3	Pd ₂ (dba) ₃	P(o-tolyl) ₃	K ₂ CO ₃	120 (MW)	10	64
4	Pd ₂ (dba) ₃	P(o-tolyl) ₃	Cs ₂ CO ₃	90	10	88
5	Pd ₂ (dba) ₃	P(o-tolyl) ₃	Cs ₂ CO ₃	120 (MW)	10	67

*Eric D.H, et al. J.Org.Chem.1998

**Radiochemical Conversion analyzed by HPLC

図3 ω-C-11-トリカプリンの合成スキームと反応条件検討

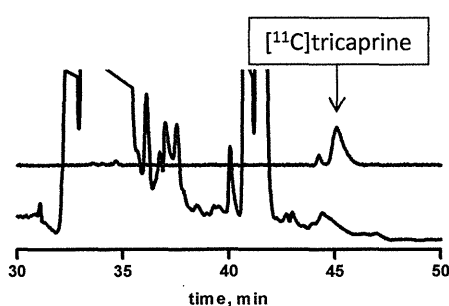


図4 ω-C-11-トリカプリンの分取 HPLC チャート (分取条件: Column; COSMOSIL AR II 10 x 250 mm, 5 μm, Eluent; CH₃CN : C₂H₅OH = 85:15, Rate; 6 mL/min, UV; 210 nm)

本標識体のマウス体内動態検討を計画したが、トリカプリンは脂溶性が高く、C-11の高い比放射能による標識体で極微量の化学量ではあるものの、生理食塩水に溶解することは出来なかった。今後、自動合成装置を用いて可能な製剤化の方法について検討する必要があることが示された。

D. 考察

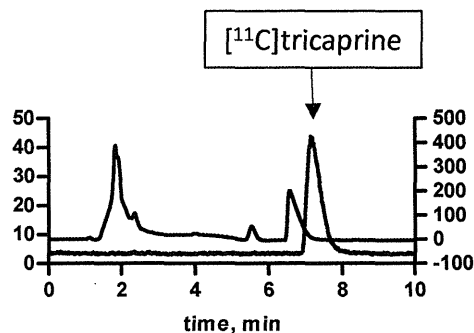


図5 ω-C-11-トリカプリンの分析 HPLC チャート (分析条件: Column; XBridge 4.6 x 150 mm, 5 μm, Eluent; CH₃CN : C₂H₅OH = 85:15, Rate; 1.0 mL/min, UV; 210 nm、標品を同時に重ねて分析)

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ている。その結果、昨年度までにグリニア反応によるカルボン酸のC-11標識反応は定量的に進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。しかしながら、これを用いたC-11-トリカプリンの合成については、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、前駆体のステリックヒンドランスがあるものと考えられ、反応はほとんど進行しなかった。そこで、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検討を行った。その結果、既知の反応条件とは異なり、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、 $\text{P}(\text{o-tolyl})_3$ 、 Cs_2CO_3 の系を用いることで、高収率で標識体を得ることが出来た。また、本反応は加熱反応であるが、この際、マイクロ波照射することで収率が高くなることが示された。しかしながら C-11-トリカプリンは脂溶性が高く、生理食塩水溶液として製剤化することが出来ないことが示された。C-11 標識体は比放射能が高いため、C-11 標識体の化学量も極微量ではあるが、何らかの製剤化の工夫が今後必要であることが示された。この際、術者の被曝回避の観点から自動合成装置を用いた製剤化が必要となる。

本反応により得られた C-11-トリカプリンに対応する C-11-カプリン酸についても、今後同様に ω 位を標識した ω -C-11-カプリン酸を合成して、体内動態を評価するものとする。

昨年度の検討において、 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したが、 α 位の標識体であるため、細胞内における β 酸化により迅速に母体化合物より C-11 が脱離されると考えられ、体内動態についてもそれら代謝物、特に C-11- CO_2 の動態を多く含む可能性を否定できない。今回合成した ω 位標識体についても同様に β 酸化を受けることは有り得るが、 α 位標識体に比較すると遅いものと考えられるので、

特にトリカプリンの体内動態について興味深い。そのためにも本化合物は脂溶性が高いことから適当な製剤化が求められる。

E. 結論

今回対象としている中鎖脂肪酸のトリグリセリドであるトリカプリンの ω 位をC-11 標識することが出来た。対応するカプリン酸についても今後合成検討を行う。また、 ω -C-11-トリカプリン、 ω -C-11-カプリン酸のマウス体内動態についても今後検討を行う。

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

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、高速波長走査レーザーを用いた誘導ラマン散乱顕微鏡を開発した。誘導ラマン散乱を用いることで、重水素化した脂質と通常の脂質を明瞭に分別することが可能となり、重水素化によって特定の脂肪の追跡の目処がたった。

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。この目的を達成するために、誘導ラマン散乱顕微鏡を開発し、その高性能化をはかった。

B. 研究方法

ピコ秒モードロックレーザーと、これと同期できるように改造した高速波長走査が可能な AOFT レーザーを用いて、誘導ラマン散乱顕微鏡を構築した。AOFT レーザーを 20 MHz で変調し、ピコ秒モードロックレーザーに現れる 20MHz 成分をロックイン検出する。市販のロックイン検出器では十分なイメージング速度が得られないため、ロックイン増幅器も自作した。

3T3-L1 細胞から分化させた脂肪細胞の観測を行った。また、培養液に重水素化ステアリン酸を加えて培養し、CH 伸縮振動 (2845 cm^{-1}) と CD 伸縮振動 (2100 cm^{-1}) のイメージングを行った。

(倫理面への配慮)

該当せず。

C. 研究結果

CH 伸縮振動で脂質を可視化した。誘導ラマン散乱を用いて、1 秒/image で十分な SN 比で観測可能であることが分かった。また、重水素化した脂質も 1 秒/image で可視化することができた。30 ms/image でも、細胞内の脂質の観測が可能であった。波長走査も 20 ms で行うことができ、細胞内の脂質、および重水素化した脂質両者を観測可能であることが分かった。

D. 考察

高速に波長走査しながら、観測可能であることから、細胞内の脂質と、重水素化によって特定の脂質を追跡して観測可能であることが分かった。また、コヒーレントアンチストークスラマン散乱では、非共鳴バックグラウンドによって、重水素化脂質か、それもと通常の脂質か判断が難しかったが、誘導ラマン散乱を用いることで、両者を明瞭に区別できることが分かった。

E. 結論

開発した誘導ラマン散乱顕微鏡で、1 秒/image で十分な SN 比で培養細胞の脂質を観測可能なことが分かった。また、重水素化した

脂質も十分観測可能であることが分かった。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

橋本 守, Harsono Cahyadi, 新岡 宏彦, 荒木 勉,

“高速広帯域波長走査レーザを光源とした多焦点 CARS 顕微鏡”, 光アライアンス, Vol. 25, No. 3, pp. 16-20 (2014).

2. 学会発表

M. Hashimoto, H. Cahyadi, H. Niioka, and T. Araki, “Hyper-spectral coherent Raman microscopy using acousto-optic tunable filter laser”, Japan Taiwan Bilateral Conference on Biomedical and Plasmonic Imaging, Taipei, Taiwan, Feb. 25-26 (2014).

橋本 守, “高速広帯域波長走査レーザーを用いた非線形ラマン散乱イメージング”, 医用分光学会研究会, 三国観光ホテル, 福井県坂井市 Dec. 7-8 (2013).

H. Cahyadi, Iwatsuka, H. Niioka, T. Araki, and M. Hashimoto, “Spectral stimulated raman scattering microscopy with high-speed tunable laser for detection of cellular lipid uptake”, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy (ICAVS7), Kobe, Japan, Aug. 25-30 (2013).

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