

ている。TGを構成する脂肪酸には、長鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸があるが、ATGLは長鎖脂肪酸TGの加水分解に関与する。そこで、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を行うことで、ATGL欠損でも代謝可能な中鎖脂肪酸TGが増えることで、エネルギー利用ができるようになると考えられる。画像診断による心機能的な改善は得られていないが、明らかなBNPの低下と四肢筋力の改善が得られており、食事療法の効果が得られている可能性がある。

E. 結論

TGCVにおける新たな治療法として中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法は有用である可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

主論文としての報告は無し。

2. 学会発表

1)第2回中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)国際シンポジウム

2013年4月19日(金)~20日(土)

大阪大学中之島センター。

2)第17回日本心不全学会学術集会

2013年11月28日(金)~30日(日)

大宮ソニックシティ

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

予定無し。

2. 実用新案登録

無し

3. その他

特記すべき事項なし。

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

CNT-01 の小腸由来脂質及びリポ蛋白質に及ぼす影響の検討

研究分担者 瀬川波子 福岡大学医学部 生化学 准教授

研究要旨

本研究では中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)の治療法として、中鎖脂肪酸を含有する医薬品開発を行っている。CNT-01は、TGCVの治療薬として検討を進めている物質である。本研究は、CNT-01の経口投与が小腸からの脂質（中性脂肪（TG）、リン脂質（PL）、コレステロール（Cho））及びリポ蛋白質の産生への影響についてマウスを用いて検討した。小腸からの脂質及びリポ蛋白質の産生の測定は、以前開発したマウスのin situ灌流モデルを用いた。CNT-01の経口投与は、CMを含むリポ蛋白質全分画のTG濃度及びTG含有量を減少し、小粒子中性脂肪リッチリポ蛋白質の粒子径を減少した。以上の結果により、CNT-01に含まれるの中鎖脂肪が小腸で吸収された後、リポ蛋白質に組み込まれて、長鎖脂肪の産生を抑制したことを示した。

A. 研究目的

TGCV の治療薬として検討している CNT-01 の経口投与において、小腸からの脂質及びリポ蛋白質の産生への影響を検討することを目的とする。

B. 研究方法

野生型マウスを無作為に対照群（n=6）と CNT-01 投与群（n=6）に分け、それぞれ正常飼料と 8% CNT-01 を含有飼料で飼育した。CNT-01 投与 10 日後に、以前開発したマウスの in situ 灌流モデルを用いて小腸から産生した脂質及びリポ蛋白質を含有するリンパ液を収集した。リンパ液灌流液中のリポ蛋白質（カイロミクロン（CM）、超低比重リポ蛋白質（VLDL）、低比重リポ蛋白質（LDL）、高比重リポ蛋白質（HDL））の分離及び総コレステロー

ル（TC）、中性脂肪（TG）、リン脂質（PL）、遊離コレステロール（FC）などの脂質濃度の測定は、online-HPLC を用いて行った。コレステロールエステル（CE）濃度は、TC と FC 濃度より計算した。対照群と CNT-01 投与群の脂質パラメーターの群間比較は、Wilcoxon rank sum test にて行った。

（倫理面の配慮）

各種倫理委員会の規定を順守し研究を遂行した。

C. 研究結果

CNT-01 の経口投与は小腸由来各リポ蛋白質分画 CM, VLDL, LDL, HDL 中の TG 濃度及び TG 含有量を明らかに減少した。CNT-01 投与により、中性脂肪リッチリポ蛋白質（TRL）中の小粒子 TRL

の粒子径が減少した。小腸由来コレステロール及びリン脂質濃度は、CNT-01の投与により有意に減少しなかった。

D. 考察

CNT-01の経口投与は、小腸からの長鎖中性脂肪の産生を抑制したことを示した。

CNT-01の経口投与により、小腸由来のコレステロール及びリン脂質が影響されなかったことは、CNT-01は小腸からのリポ蛋白質の産生粒子数に影響を及ぼさないことを示した。CNT-01が選択的にリポ蛋白質の中性脂肪含有量を減少したことから、CNT-01は小腸に吸収され、リポ蛋白質に取り込まれることによって、長鎖脂肪の産生が減少したと考えられる。

小腸由来リポ蛋白質は、血中に分泌された後の血中動態はさらに検討する必要がある。

E. 結論

CNT-01の経口投与は、小腸由来長鎖脂肪の産生を抑制した。

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

Effects of CNT-01 on the Production of Lipids and Lipoproteins from the Small Intestine in Mice. Bo Zhang, Satoshi Yamaguchi, Ken-ichi Hirano.

The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit
Cardiomyovascuopathy and Neutral Lipid Storage Disease
(Tokyo, JAPAN : 2015.3.14)

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（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)活性測定系の
開発のための ATGL 活性抑制抗体の作成

研究分担者 高木敦子 国立循環器病研究センター研究所 分子薬理部 室長

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovascuopathy: TGCV)の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL活性測定系を開発することを目的とする。細胞内の測定されたリパーゼ活性のうち、ATGLが寄与する部分を決定するためには、ATGL活性を抑制できる抗ヒトATGLポリクローナル抗体が必要である。単一バンドまで精製したCOS1細胞で発現させたHis6-ATGLを抗原とし、ウサギに免疫することで、ATGL活性を抑制する抗体を作成することに成功した。

A. 研究目的

ATGL 活性測定系を開発し、臨床検体に応用することで、TGCV の早期発見、早期治療を可能とすることを最終目的とする。臨床検体を測定していく上で問題となるのは他のリパーゼの混在であり、測定されたリパーゼ活性のうち、ATGL が寄与する部分を決定するためには、ATGL 活性を抑制できる抗ヒト ATGL ポリクローナル抗体が必須である。ATGL 抗体を調製し、その存在下と非存在下で活性を比較する必要がある。そこでまず、活性を保持した状態で、単一バンドまで精製した COS1 細胞で発現させた His6-ATGL を抗原とし、ウサギに免疫することで、ATGL 活性を抑制する抗体を作成することを、平成 26 年度の目的とする。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA はヒト白血球から得て、His6 tag を N 末端にもつ pcDNA4/HisMax C ベクター (Invitrogen 社)にクローン化されたものを、小林邦久先生 (福岡大学 筑紫病院 内分泌・糖尿病内科 教授) から譲渡いただいた。アフリカミドリザルの腎臓由来株化細胞である COS1 にエレクトロポレーション法あるいは Lipofectamine (Life Technologies) 試薬によりプラスミドを導入し、2 日間培養後、細胞を界面活性剤で可溶化した。これを出発材料として、HisTrap カラム (GE Healthcare) クロマト法にて His6-ATGL の精製を行った。リパーゼ活性は ^3H -トリオレインを含むトリオレイン/リン脂質粒子を基質として、ウシ血清アルブミン存在下で測定された。

(倫理面の配慮)

本研究は、一般化した株化動物細胞を利用するものであるため、臨床研究に関する倫理面の問題はないと判断した。ウサギでのポリクローナル抗体作成に関しては、所属機関から動物実験の承認を得ている。組換え DNA 及び放射性同位体使用の実験の許可は得ている。

C. 研究結果

SDS-PAGE 電気泳動後の CBB 染色により His6-ATGL タンパクは ATGL 活性を保持したまま、単一バンドとして純化できた。

精製 His6-ATGL の pH 依存性を調べたところ、pH7 から pH 8.5 が ATGL の至適 pH 領域と考えられた。

精製 His6-ATGL を抗原とし、ウサギ 1 匹に、1 回につき約 100 μ g ずつ、免疫した。第 5 回目の免疫の 1 週間後、試採血を行い、ATGL 活性抑制を調べた。抗血清 20 μ L で、精製ヒト His6-ATGL 活性 (160 nmole/h/mL) を 80% 抑制できた。さらに、100%抑制をめざすため、第 6 回目の免疫を行なう予定である。

D. 考察

精製 His6-ATGL の pH 依存性から調べられた pH7 から pH 8.5 おけるリパーゼ活性が ATGL に由来するものであることが、推測される。しかし、この pH 域のすべてのリパーゼ活性が ATGL に由来するかどうかは不明である。それ故、ATGL 抗体の有りと無しで、リパーゼ活性を測定し、ATGL の寄与分を知る必要がある。今回、精製ヒト His6-ATGL 活性

(160 nmole/h/mL) を 80% 抑制できる抗体が作成できているが、測定精度をあげるためには、100%抑制をめざす必要があり、第 6 回目の免疫後の抗体価を期待したい。

E. 結論

TGCV の早期発見、早期治療を可能とするため、ATGL 活性測定系開発に必須の ATGL 活性(160 nmole/h/mL) を 80%抑制する抗体の作成に成功した。

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

Development of human adipose triglyceride lipase (ATGL) specific measurement system: production of rabbit anti-human ATGL antibody neutralizing ATGL activity. Atsuko Takagi, Yasuyuki Ikeda, Kuniyoshi Kobayashi, Ken-ichi Hirano The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy and Neutral Lipid Storage Disease (Tokyo, JAPAN : 2015.3.14)

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（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発

研究分担者 田嶋祥子 興和株式会社 医薬事業部 製品戦略部 第三課

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する治療薬の開発を進めていく過程において、GLP基準下における反復毒性試験・遺伝毒性試験、信頼性基準下における安全性薬理試験の企画し、実施した。また、医師主導治験の実施に向けて全体スケジュールを研究代表者および関連する研究分担者、研究協力者等と必要に応じて打ち合わせを行った。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症に対する FIH 試験実施に必要な非臨床試験を実施する。

B. 研究方法

薬事相談の結果に基づき、FIH 試験実施のために必要な各種非臨床試験を実施した。

（倫理面の配慮）

審査委員会の承認をうけ、規定に従い研究を実施した。

C. 研究結果

イヌおよびラットを用いた 4 週間反復投与試験では、無毒性量を得た。遺伝毒性試験では、判定は陰性であった。安全性薬理試験では、中枢神経系、呼吸器系及び循環器系に影響はなかった。また、薬物動態試験、胚・胎児発生に関する毒性試験を予備的に実施した。

D. 考察

今後は医師主導治験の進捗によって、必要な非臨床試験を計画する必要がある。

E. 結論

FIH 試験実施のために必要な非臨床試験は全て終了し、次年度の医師主導治験実施に問題となる結果は得られなかった。

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

糖尿病マイクロミニピッグの開発

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 分子細胞病理学分野 教授

【目的】マイクロミニブタに糖尿病を誘発し、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】マイクロミニブタに STZ を 150～250mg/kg BW あるいは ALX 88～150mg/kg BW を投与した。投与直後より普通食による飼育を行った。また、化学物質による誘発以外の方法として、腭全摘による糖尿病モデルの作成を試みた。

【結果】STZ 投与により、高血糖状態に加えて高トリグリセリド血症を誘導することができたが、2 週間から 2 ヶ月の間に、著明な衰弱、体重減少が見られたため、動物愛護の観点から試験を中止し、安楽死させた。また、アロキサン投与では糖尿病はできなかった。腭全摘モデルでは、術後より高血糖を来し、食事後のインスリン投与により 200 mg/dL 程度の高血糖を維持することが可能であった。

【考察】STZ 投与で著明な高血糖が観察されたが、糖尿病の悪化と考えられる衰弱のため、長期の飼育は困難であった。インスリンによる血糖管理の必要性が示唆された。アロキサンについては、投与量の検討が必要であると考えられた。腭全摘は薬剤投与に比べて簡便ではないが、術後の状態は STZ 投与より良好でインスリン投与で血糖の維持も可能であった。

【結論】腭全摘モデルにおいて、短期観察ながら糖尿病モデルの作成に成功した。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

マイクロミニブタにストレプトゾトシン (STZ) あるいはアロキサン (ALX) を単回投与することで糖尿病を誘発し、高トリグリセリド血症に基づいて、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。これらの薬剤投与によるラ氏島破壊は、投与量決定の困難さ、副作用の問題があり、安定した糖尿病の誘導と維持が簡単ではないことが前年度に推察されたため、今年度は、STZ の濃度の変更、ALX によるラ氏島破壊の検討および腭全摘モデルの検討を行い、前年度の結果と比較検討することで、TGCV の病態にもっとも近いモデルの作成を試みる。

B. 研究方法

実験には 9 ヶ月齢の雄性マイクロミニブタを

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 150～250mg/kg BW とした。ALX は濃度 200 mg/mL になるように 1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液及び生理食塩液に溶解させ pH7.0 に調整した。インフュージョンポンプを用いて、2 min の速度で耳介静脈内に投与した。投与直後から連日、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。食餌は投与日から通常飼料を体重の 3%/body 与えた。今回の実験では、高コレステロール・高脂肪食負荷は行わなかった。

腭全摘術は以下の手順で行った。アトロピン筋肉内投与および鎮痛処置のための塩酸ブプレノルフィン投与を術前に行い、塩酸メドミジン

水溶液（ドミツール）、塩酸ケタミン水溶液およびミダゾラムの筋肉内投与とイソフルランにて全身麻酔を施した。皮膚切開時の鎮痛薬としてキシロカイン2%注射液を皮下投与し、開腹・膵臓を全摘出し、離脱部位を縫合・結紮した。手術翌日より3日間は1日1回、マイシリンゾル明治を筋肉内に0.05 mL/kgで投与する。また術後はケトプロフェンを1回筋肉内投与し、以降2日間、1日1回、同様に鎮痛処置を行った。また、急性膵炎対策としてFOY投与を手術日に行った。手術翌日より、体重の2~3%量を目安に1日1回給餌し、直後に0.1IU/kgのインスリンを投与した。膵外分泌酵素の補充のために、リパクレオン製剤を混餌で与えた。

（倫理面への配慮）

所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し研究を遂行した。

C. 研究結果

STZ投与後はいずれの実験条件でも、2日目より、空腹時血糖値が約200~400mg/dLに上昇した。STZ投与後の2週間から2ヶ月の間に、著明な体重減少と発動の低下、衰弱が見られ、動物愛護の観点から、実験を中止し安楽死させた。ALXの投与では、今のところ明瞭な高血糖状態は確認されていない。

膵全摘動物では、術後順調に経過している。食後の血糖は約500mg/dLにおよび、インスリン1回投与により、血糖値は約200mg/dLに低下、維持された。全身状態は約1ヶ月経過時点では問題ない。術創部の感染や解離などは観察されていない。軟便や脂肪便は見られない。

D. 考察

STZ 150mg/kg BWでも十分に高血糖を誘導することができたが、この間の健康状態良好ではない。STZ 300mg/kg BW投与の動物と比較してかなり良好であったが、STZの副作用あるいは糖尿病による衰弱のコントロールが困難であった。投与量が少ないにもかかわらず、前年度のように、安定したモデルの作成には至らず、モデルの再現性には大きな疑問が残る。個体差の影響も考えられたが、詳細は不明である。また、ALX

投与で高血糖が誘導されないことは、マイクロミニピッグにおいては、化学的なラ氏島破壊が十分ではなく、モデル作成法としては適切ではない可能性の考えられた。

膵全摘モデルは、手術操作に加えて術前処置、術後管理を必要とし、STZやALX投与に比べて煩雑であるが、術後は良好に経過し、いまのところは高血糖を維持しながら著明な体重減少や衰弱も観察されていない。膵酵素の補充により、脂肪便の出現も完全に抑制されている。化学物質によるラ氏島の破壊は簡便であるが、効果のばらつきや副作用、衰弱による脱落などが頻繁であり、マイクロミニピッグにおいては膵全摘によるモデル作成のほうが有効であるかも知れない。

TGCVは高コレステロール血症を伴わないトリグリセリドの蓄積が心・血管系に見られる病態であり、膵全摘による糖尿病の長期観察で著明なトリグリセリドの蓄積が見られるようであれば、有用なモデル動物になり得ることが示唆された。

E. 結論

マイクロミニブタにSTZ単回投与により、糖尿病を誘発することに成功したが、病態の維持と再現性には問題があった。一方、膵全摘モデルの作出は比較的煩雑であったが、今のところ高血糖状態の維持と再現性は確認できた。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。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

TGCV 診断基準の作成 一定量の冠動脈 CTA 法の TGCV 例への応用—

研究分担者 内藤博昭 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原発性・特発性TGCV例に応用した。結果、NCVCシステムの冠動脈断面像は、前者に対し、後者では原発性・特発性ともに脂質成分が外膜側から壁内に大きく入り込む特徴的断面像を呈した。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）を開発し、原発性・特発性TGCV例の冠動脈壁性状評価における有用性とTGCV診断基準形成に寄与する可能性を検証する。

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）および大動脈内腔（実測）と推定壁CT値（50Hu）の半値）を設定して外膜側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平均内腔直径、平均壁厚、脂質と石灰化の含有率を算出し、セグメント単位で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例と原発性TGCV1例、特発性（糖尿病）TGCV4例にNCVCシステムを応用し解析した。

（倫理面への配慮）

虚血性心疾患疑い例へのNCVCシステム応用については、国立循環器病研究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

NCVCシステムにより脂質成分の分布について見ると、正常例ではごく軽微に、虚血性心疾患疑い例での左冠動脈前下行枝狭窄例では中等度に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、壁脂質含量は39%であった。これに対してTGCV例では、原発性・特発性ともに、通常の虚血性心疾患例に比して短軸断面での外膜側の脂質成分が顕著で、壁内への塊状～島状の侵入像を認めた。

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) 内腔・壁・壁内成分計測、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。短軸面での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。TGCV 例では、原発性・特発性ともに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著しい壁内進展パターンを、冠動脈の広範囲で呈していた。

E. 結論

NCVC システムを用いて、TGCV 例の冠動脈 CTA から壁性状(肥厚・壁内脂質・石灰化)の三次元表示・断面表示による可視化の可能なことが明らかになり、本症での外膜側脂質成分の特徴的な壁内伸展パターンが示された。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考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Sugiyama M, Fukuda T, Sanda Y, Morita Y, Higashi M, Ogo T, Tsuji A, Demachi J, Nakanishi N, Naito H. Organized thrombus in pulmonary arteries in patients with chronic

thromboembolic pulmonary

hypertension; imaging with cone beam computed tomography.

Jpn J Radiol.

32(7):375-82,2014

2) Fukuda T, Matusda H, Sanda Y, Morita Y, Minatoya K, Kobayashi J, Naito H. CT findings of risk factors for persistent type II endoleak from inferior mesenteric artery to determine indicators of preoperative IMA embolization.

Annals of Vascular Diseases.

7(3);274-9,2014

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

研究協力者

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（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症の診断基準における腎障害の位置づけの検討

研究分担者 長澤康行 兵庫医科大学 内科学 腎透析科 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)の早期発見、早期治療を可能とするための、“中性脂肪蓄積心筋血管症 の診断の手引き“の作成にあたり、腎障害の位置づけを検討した。中性脂肪蓄積心筋血管症の症例において、慢性腎不全症例が報告されている一方で、疫学調査での中性脂肪蓄積心筋血管症 の保因者において、検尿異常や腎機能障害を多く認めることは無かった。これらのことから今回、中性脂肪蓄積心筋血管症 の診断の手引きには腎障害は項目として組み込まれなかった。今後、重症度の項目としての腎障害の関与などを検討していく。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症の早期発見、早期治療を可能とするための、“中性脂肪蓄積心筋血管症 の診断の手引き“の作成にあたり、腎障害の位置づけの検討を行う。

B. 研究方法

疫学調査での、中性脂肪蓄積心筋血管症の保因者における、検尿異常・腎機能低下の頻度を検討し、保因者と非保因者の間で、腎機能障害・蛋白尿の頻度の差を検討し、中性脂肪蓄積心筋血管症における腎障害の位置づけを検討した。

(倫理面の配慮)

本研究の疫学調査は、研究班の代表者より、大阪大学の倫理委員会の承認を得ている。

C. 研究結果

疫学調査での、中性脂肪蓄積心筋血管症の保因者・非保因者における、検尿異常・腎機能低下の頻度の差を認めなかった。このため、“中性脂肪蓄積心筋血管症 の診断の手引き“の診断項目に腎障害は含まれなかった。

ただ、中性脂肪蓄積心筋血管症 として、報告された中では、腎障害を有する者を多く認めており、心不全に伴う 2 次性腎障害、糖尿病合併症例における糖尿病性腎症の関与などが考えられ、今後も継続して、腎障害の関与を検討し、中性脂肪蓄積心筋血管症 の重症度分類作成の折には、一項目としてさらに検討を重ねる。

E. 結論

“中性脂肪蓄積心筋血管症 の診断の手引き“の診断項目に腎障害は含まれな

った。今後も重症度の一項目としての検討を継続する。

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

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（難治性疾患実用化研究事業）
 分担研究報告書

希少疾患である心筋症・心筋炎の発見と診断精度向上を目指した
 心筋生検カンファレンスの試み

研究分担者 中村浩士 山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)をはじめとした心筋症・心筋炎の早期発見、早期治療を可能とするため、循環器医と病理医を中心とした地域での取り組みが必要と考えた。山口大学附属病院循環器内科ならびに学外施設に対して心筋生検カンファレンスを施行した。

A. 研究目的

TGCVをはじめとする希少疾患である心筋症並びに心筋炎の発見と診断精度を上げる目的で、心筋生検検査行った症例において、各施設の循環器専門医と病理専門を交えた上で心筋生検カンファレンスを行い、症例ベースの診断根拠を明確にすること。

B. 研究方法

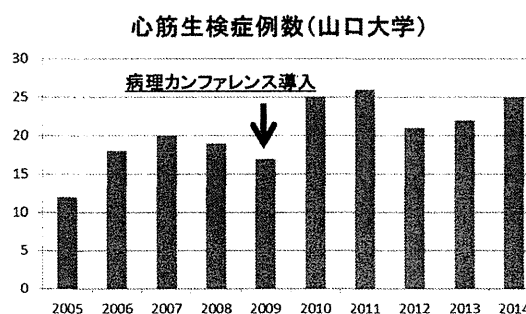
心筋生検検査の臨床的意義を向上させる目的で、2009年より以下の行動目標を実施した。1)炎症性マーカーを含む免疫染色を行う。2)病理画像は総てデジタル化する。3)症例数5例程度を基準に臨床カンファレンスを臨床現場にて行う。この際に、専修医や研修医など臨床現場に係った医師の参加も広く募る。4)患者認証は総て番号で行った。

(倫理面への配慮)

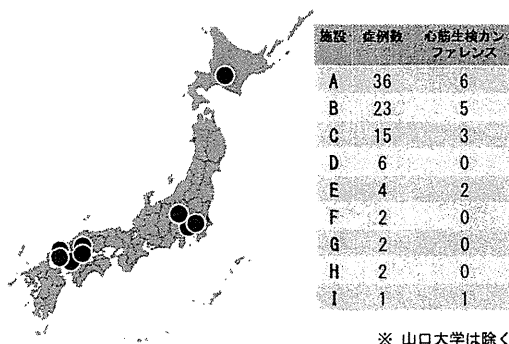
所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し研究を遂行した。

C. 研究結果

山口大学での個別診療カンファレンス前後での症例数の変化は以下の通りであった。



更に、山口大学外で心筋生検カンファレンスを実施した9病院の分布と症例数は以下のとおりであった。



D. 考察

心筋生検カンファレンスを実施することで、1)診断や治療をもう一度見直すきっかけになった。2)病理組織を通した臨床経験を重ねる事ができた。3)教育的モチベーションを上げることができた。

E. 結論

今回の検討では、疑いを含む TGCV 症例は認められなかったが、心筋生検カンファレンスは、中性脂肪蓄積心筋血管症を含む希少心筋疾患のスクリーニングと診断に有用と思われた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

- ・ Isolated cardiac sarcoidosis requiring open-chest myocardial biopsy for differentiation from malignant lymphoma.
J Cardiol Case. 9, 239-242, 2014.
- ・ Clinical history and colliquative myocytolysis are keys to the diagnosis of shoshin beriberi.
Case Rep Pathol. 2014, 506072, 2014.
- ・ Heart failure in which coronary spasms played an important role.
Intern Med. 53, 227-232, 2014.
- ・ Analysis of Risk Prediction in the Principal Organs Based on Pathological Findings of Cutaneous Small-Vessel Vasculitis. 2015(submitting)

2. 学会発表

TNNI3 と MYBP3 の重複遺伝子変異を有した姉妹例における心筋病理組織の検討.
第 101 回日本循環器学会中国地方会 (出雲)

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

An extensive myocardial infarction model animal, method for preparation thereof, and application for drug screening and regenerative medicine.
Hiroshi Nakamura, Masunori Matsuzaki, Tsutomu Yoshida. (米国特許: 10-141608)

2. 実用新案登録

- ・ 広範囲心筋梗塞病態モデル動物及びその作成方法並びにそのモデル動物を用いて行う薬物のスクリーニング方法. 中村浩士、松崎益徳、吉田勉、山口 TLO (特開: 2002-209473)
- 分離心筋梗塞モデルを応用した心筋再生方法. 中村浩士、松崎益徳、山口 TLO (特開 2005-229927)

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

剖検例を用いた冠動脈血管内イメージング像と病理組織像の対比

研究分担者 羽尾裕之 兵庫医科大学 病院病理部 准教授

研究要旨

我々は剖検で得られた冠動脈組織を用いて、冠動脈血管内イメージング画像と病理組織像との詳細な対比を行い、現在行われている血管内イメージングである光干渉断層法と冠動脈血管内視鏡の診断精度を検証した。これまでの研究材料および研究手法を用いて、今後冠動脈血管内イメージングを用いた中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)における冠動脈病変検出の可能性を検討する。

A. 研究目的

冠動脈の評価には、血管内超音波・光干渉断層法・血管内視鏡などの血管内イメージングが行われ、プラークの組織性状の把握やそれに基づく治療の選択、インターベンション後の治療効果判定に用いられている。しかし、血管内イメージング像と病理組織像との対比はこれまでほとんど行われておらず、病理学的な裏付けがないまま画像の読影が行われてきた。そこで我々は、当院における剖検例を用いて *ex vivo* における冠動脈血管内イメージング像と病理組織像を対比し、画像診断の精度を検討した。

B. 研究方法

平成 22 年 4 月から平成 26 年 8 月まで兵庫医科大学病院における 60 剖検例・685 病変の冠動脈の病理組織像を血管内イメージング法である光干渉断層法 (optical coherence tomography, 以下 OCT)・血管内視鏡 (coronary angiography,

以下 CAS) で得られた画像と対比し、これらの画像診断の精度を検討した。冠動脈は固定前に画像評価を行った後、病理組織標本を作製した。

(倫理面の配慮)

本研究は、病理解剖承諾書において、遺族より検体の研究利用の承諾を得られた症例にのみ行う。さらに兵庫医科大学倫理委員会にて剖検で得られた組織検体を用いた研究について承認を得ている。

(承認番号第 297 号)

C. 研究結果

OCT では脂質成分に富む不安定プラークと診断された病変に、病理組織学的に細胞外脂質沈着・微小石灰化・ヘモジデリン沈着・壁在性の器質化血栓・表層性石灰化などを示す安定プラークが含まれていた。OCT による不安定プラークの検出感度は 91%であったのに対し、陽性的中率は 48%であった。CAS では約半数のプラークが脂質を含む黄色プラークと診

断された。しかし黄色プラークには壊死コアを含まない細胞外脂質の沈着や表層の泡沫細胞浸潤、石灰化などの安定プラークが多数含まれていた。CASによる不安定プラークの検出感度は83%であったが、陽性的中率は22%と低かった。血管内超音波とOCTを併用することで、プラーク組織性状の陽性的中率は向上した。

D. 考察

血管内イメージングを用いて、冠動脈プラークの組織性状の診断が広く臨床の場で行われている。画像診断における病理組織学的な裏付けは重要であり、本研究で得られた知見は、今後TGCVの冠動脈病変の血管内イメージングによる検出に寄与すると考える。

E. 結論

現在の冠動脈内イメージングは高い検出感度を持っているが、陽性的中率は低く、複数の画像診断デバイスを組み合わせることで、陽性的中率が向上した。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Fujii K, Hao H et al. Accuracy of optical coherence tomography, grayscale intravascular ultrasound and their combination for the diagnosis of coronary thin-cap fibroatheromas: An ex vivo validation Study. JACC Cardiovasc Imag *in press*, 2015.

2. Hao H et al. Neointimal hemorrhage after drug eluting stent implantation: Possible role for development of neoatherosclerosis. JACC Cardiovasc Interv 7:1196-1197, 2014.

3. Fujino A, Hao H et al. Restenosis after drug-eluting stent implantation in a patient with polycythemia vera; Optical coherence tomography and pathological findings. JACC Cardiovasc Interv *in press*, 2015

4. Kawakami R, Hao H et al. Drug-eluting stent implantation on calcified nodule: Ex vivo intravascular images and histopathology. JACC Cardiovasc Interv *in press*, 2015

2. 学会発表

羽尾裕之：冠動脈血管内イメージングと病理組織像の対比 -74 剖検例の検討から分かったこと- (シンポジウム：血管内イメージングを検証する) 第46回日本動脈硬化学会総会・学術集会，東京，2014.7

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（難治性疾患実用化研究事業）
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 機能創成専攻 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。重水素化した脂質を用い、標的とした脂質を誘導ラマン散乱により可視化した。中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy、TGCV)患者の線維芽細胞に、重水素化した長鎖脂肪酸、中鎖脂肪酸を加えて培養し、重水素信号の取得を行った。培養1日後、長鎖脂肪酸を加えた細胞では明瞭に重水素の信号が得られたが、中鎖脂肪酸を加え培養した細胞では殆ど重水素の信号は得られず、脂肪酸鎖長による代謝経路の違いが確認された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV)において、食事療法中の中鎖脂肪酸が、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、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。これらの脂質の動態を細胞レベルで観測するためには、一般的に脂肪酸に蛍光色素を標識しその蛍光を観測することが行われてきた。しかしながら、観測しているのは蛍光色素であり必ずしも脂質そのものを観測している訳ではない。そこで、脂質を最低の修飾により観測することを目的として、重水素化脂質の観測を行った。

B. 研究方法

TGCV 患者から採取した線維芽細胞を、250 μM の重水素化した中鎖脂肪酸(重水

素化オクタン酸)、あるいは長鎖脂肪酸(重水素化ステアリン酸)で培養し試料として用いた。重水素信号の取得には、誘導ラマン散乱を用いた。誘導ラマン散乱は分子振動を用いて可視化する手法である。脂質の CH_2 伸縮振動は 2845 cm^{-1} であるが、水素を重水素で置換した CD_2 伸縮振動は 2100 cm^{-1} に低下する。

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 の誘導ラマン成分をロックイン検出するため、検出器、ロックイン増幅器も自作し観測に用いた。

(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

重水素化長鎖脂肪酸を与え 1 日培養した TGCV 細胞では、 2100 cm^{-1} の CD_2 伸縮振動と、 2945 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動で同等な強度の信号が得られた。一方、重水素化中鎖脂肪酸を与え 1 日培養した TGCV 細胞では、 2945 cm^{-1} の CH_2 伸縮振動は、長鎖脂肪酸を与えた試料と同等な信号強度が得られたが、 2100 cm^{-1} の CD_2 伸縮振動は観測することができなかった。

D. 考察

長鎖脂肪酸と中鎖脂肪酸において、 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。これまで、他の非線形ラマンである coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)顕微鏡では、4 日培養した試料でないと、両者の明白な違いを観測することができなかった。これは誘導ラマン散乱の方が、CARS で問題となる非共鳴バックグラウンドの影響がないためであると考えられる。

今回の観測には、固定した試料を用いていたが、比較的短時間培養した試料でも観測することが可能であったので、今後培養下の生きたままの細胞の観測が可能であると考えられる。

E. 結論

重水素化長鎖脂肪酸と重水素化中鎖脂

肪酸で、1 日培養後において代謝経路の違いによる脂肪酸の蓄積の違いが観測された。

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

M. Hashimoto, “Nonlinear Coherent Raman Imaging using Fast and Wide Spectral Tuning Mode-locked Laser”, Optics & Photonics International Congress 2014, The 3rd Advanced Lasers and Photon Sources (Yokohama, JAPAN: 2014/4/22-25).

M. Hashimoto and T. Araki, “Nonlinear Raman imaging using fast tunable picosecond laser”, 32nd Physics Congress of the Physics Society of the Philippines (Quezon, PHILIPPINE: 2014/10/17-20).

M. Hashimoto, S. Fukushima, and T. Araki, “Nonlinear Raman imaging to trace the lipid in cells using deuterated lipid”, The 3rd International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovascularopathy Neutral Lipid Storage Disease (Tokyo, JAPAN: 2015/3/14).