

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）

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

平成 25 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 平野賢一

平成 26 年 (2014 年) 3 月

## 目 次

- . 平成 25 年度研究班名簿
  
- . 総括研究報告
  - 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  
平野 賢一
  
- . 分担研究報告
  1. 植田 初江  
心臓移植適応疾患の病理学的所見に関する研究
  2. 青江 秀史  
創薬プロセスと知的財産
  3. 南都 伸介  
中性脂肪蓄積心筋血管症の研究
  4. 内藤 博昭  
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
  5. 裏出 良博  
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
  6. 恵 淑萍  
カプリン酸測定法に関する研究
  7. 小林 邦久  
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
  8. 間賀田 泰寛  
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
  9. 橋本 守  
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

10. 長澤 康行  
中性脂肪蓄積心筋血管症における腎障害の研究
11. 羽尾 裕之  
中性脂肪蓄積心筋血管症における冠動脈プラークの  
血管内イメージングと病理組織像との対比
12. 小谷 順一  
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  
(診断機器：冠動脈)の研究
13. 瀬川 波子  
トリカブリン経口投与による体内動態把握と検出法の検討
14. 財満 信宏  
質量顕微鏡法を用いた TGCV 診断にむけた基礎的検討
15. 杉村 宏一郎  
中性脂肪蓄積心筋血管症の1例
16. 高木 敦子  
脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)  
活性測定系の開発に必須の ATGL 活性抑制する抗体作成のための抗原調製
17. 中村 浩士  
中性脂肪蓄積心筋血管症に関する調査研究  
心血管病研究の為にモデル作成と治療について
18. 山田 壮亮  
ATGL 欠損マウスを用いた血管障害カフモデルの研究
19. 谷本 昭英  
ストレプトゾトシン誘発糖尿病マイクロミニピッグの開発
20. 安井 洋子  
TGCV 患者に対する中鎖脂肪酸食事療法に関する研究
21. 千葉 俊明  
iPS 細胞を用いた中性脂肪蓄積心筋血管症に関する研究
22. 田嶋 祥子  
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  
医薬品開発のプランニング

. 研究成果の刊行に関する一覧表

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班（重点研究分野）

区 分	氏 名	所 属 等	
研究代表者	平野 賢一	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	助教
研究分担者	植田 初江	独立行政法人国立循環器病研究センター病理部	部長
	青江 秀史	大阪大学 知的財産センター	センター長
	南都 伸介	大阪大学先進心血管治療学	教授
	内藤 博昭	国立循環器病研究センター 病院	病院長
	裏出 良博	大阪バイオサイエンス研究所第2研究部分子行動生物学部門	研究部長
	恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院	准教授
	小林 邦久	福岡大学医学部筑紫病院	教授
	間賀田 泰	浜松医科大学メディカルフォトニクス研究センター	教授
	橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科	准教授
	長澤 康行	兵庫医科大学 腎臓内科	講師
	羽尾 裕之	兵庫医科大学 病理学	准教授
	小谷 順一	大阪大学 循環器内科	講師
	瀬川 波子	福岡大学医学部	准教授
	財満 信宏	近畿大学農学部応用生命化学科	講師
	杉村 宏一郎	東北大学大学院 循環器内科	院内講師
	高木 敦子	国立循環器病研究センター 分子薬理部	室長
	中村 浩士	山口大学 地域医療推進学	准教授
	山田 壮亮	産業医科大学 細胞病理学	講師
	谷本 昭英	鹿児島大学医学部 分子細胞病理学	教授
	安井 洋子	大阪市立大学大学院生活科学研究科	准教授
	千葉 俊明	琉球大学医学部	准教授
	田嶋 祥子	興和株式会社 製戦略部	
	研究協力者	青山 敏明	日清オイリオグループ株式会社
黒田 宙		東北大学病院 神経内科	助教
池田 善彦		国立循環器病研究センター病理部	医長
川口 克廣		小牧市民病院 循環器科	循環器科部長
吉田 権言		大阪大学 先進心血管治療学講座	医員
千葉 仁志		北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学講座	教授
藤井 健一		兵庫医科大学 循環器内科	講師
鈴木 朗		大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
長坂 博範		宝塚市立病院 小児科	部長
山口 知是		大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	研究員
事務局	石井 麻貴	大阪大学バイオ関連多目的研究施設 平野研究室 〒565 - 0874 大阪府吹田市古江台6-2-3 T E L 06 - 6872 - 8215 F A X 06 - 6872 - 8219 e-mail makiishii@cnt-osaka.com	秘書
経理事務担当者	川上 政博	大阪大学大学院医学系研究科 研究支援室研究連携係 T E L 06 - 6879 - 3075 F A X 06 - 6879 - 3070 e-mail i-kenkyurenkei@office.osaka-u.ac.jp	係長

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））

総括研究報告書

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

研究代表者 平野賢一 大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学 助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症（Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy, 以下TGCV）は、申請者らが我が国の心臓移植症例より見出した新規疾患概念である。原発性TGCVは細胞内中性脂肪分解の必須酵素であるAdipose triglyceride lipase（以下ATGL）の遺伝的な欠損により、心筋及び冠状動脈に中性脂肪が蓄積するため、重症心不全、不整脈、虚血性心疾患が引き起こされる予後不良の疾患である（Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008）。本研究の目的は希少疾患であるTGCVに対してカプリン酸の有用性を検討し、それを主成分とする医薬品を開発することである。

平成25年度の厚生労働省 難治性疾患等克服研究事業では、TGCVの臨床診断法を開発し、その診断基準を作成していくとともに、臨床治験に向けた症例登録システムを開始した。また、医薬品としてカプリン酸製剤を開発するために、投与されたカプリン酸の体内動態を評価するための評価方法の開発を行った。

研究分担者氏名・所属機関及び所属機関における職名

植田 初江	独立行政法人国立循環器病研究センター病理部 部長
青江 秀史	大阪大学知的財産センター センター長
南都 伸介	大阪大学先進心血管治療学 教授
内藤 博昭	国立循環器病研究センター病院 病院長
裏出 良博	大阪バイオサイエンス研究所第2研究部分子行動生物学部門 研究部長
恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院 准教授
小林 邦久	福岡大学医学部筑紫病院 教授
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
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 准教授
長澤 康行	兵庫医科大学腎臓内科 講師
羽尾 裕之	兵庫医科大学病理学 准教授
小谷 順一	大阪大学医学系研究科循環器内科 講師
瀬川 波子	福岡大学医学部 准教授

財満 信宏	近畿大学農学部応用生命化学科 講師
杉村 宏一郎	東北大学大学院 循環器内科 院内講師
高木 敦子	国立循環器病研究センター分子薬理部 室長
中村 浩士	山口大学地域医療推進学 准教授
山田 壮亮	産業医科大学細胞病理学 講師
谷本 昭英	鹿児島大学医学部分子細胞病理学 教授
安井 洋子	大阪市立大学大学院生活科学研究科 准教授
千葉 俊明	琉球大学医学部 准教授
田嶋 祥子	興和株式会社 製品戦略部

## A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV) は、心筋及び冠状動脈に中性脂肪が蓄積する結果、青年～壮年層において重症心不全、不整脈、冠動脈硬化症を来す予後の極めて悪い疾患である。原発性 TGCV の原因として、細胞内 TG 分解の必須酵素である ATGL の遺伝的欠損が知られているが、その病態形成には心筋細胞内 TG 含量の増加が関与しているものと考えられている。本研究の目的は、強力な細胞内 TG 含量低下作用を有するカプリン酸を主成分とする医薬品を開発することである。

## B. 研究方法

1. カプリン酸製剤の薬物動態の把握のための放射性ラベル体の作製およびカプリン酸代謝経路把握のための小腸灌流実験の実施 (張、間賀田)  
我々の開発しているカプリン酸の実際の投与形態であるトリカプリンの C-11 標識体の作成をするための条件検討を行った。マウス小腸灌流系を用いて、カプリン酸の代謝経路の解明を試みた。

2. 血清中カプリン酸の定量的評価法の確立と標準物質の作製 (恵)

カプリン酸の血中濃度モニタリングのために、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量的測定系を構築するための標準物質の作成および測定条件の検討を行った。

3. 動物モデルを用いたカプリン酸製剤の有効性評価と非げっ歯類続発性 TGCV モデルの作成 (裏出、谷本)

我々の開発しているカプリン酸製剤の実際の投与形態であるトリカプリンと MCT オイルで原発性 TGCV のモデル動物である ATGL 欠損マウスにおいて有効性に差がみられるかを検討した。また、続発性 TGCV のモデル動物を作成するため、マイクロミニプタのストレプトゾトシンによる糖尿病化を試みた。

4. 動物モデルを用いた ATGL の心血管疾患への関与に関する基礎的検討 (小林、山田)

糖尿病モデルマウスである db/db マウスにおける ATGL 発現について検討した。また、ATGL 欠損マウスに血管障害モデルの一つであるカフモデルを行い、

ATGL 欠損の血管障害に対する影響を検討した。

5. 原発性・続発性 TGCV の診断基準の作成および診断のための検査法の開発 (植田、財満、小谷、内藤、長澤、南都、羽尾、平野)

原発性・続発性 TGCV の診断基準を確立するとともに、スクリーニング検査として有用な検査法を見出すため、各種画像診断法を用いて、TGCV 症例の特徴的所見を見出すことができるかどうかを検討した。また、これらの画像診断による結果と同時に病理学的な検討も行い、各画像検査所見の臨床的な意義について検討した。

6. 原発性 TGCV の国際的な症例登録システムの構築 (平野)

希少疾患である原発性 TGCV の国際的な症例登録システムを構築し、運用を開始した。

(倫理面への配慮)

本研究に参与するすべてのものは、「世界医師会ヘルシンキ宣言」(2008年ソウル修正版)及び「臨床研究に関する倫理指針」(平成20年7月31日改訂版)に従う。

## C. 研究結果

1. カプリン酸製剤の実際の投与形態であるトリカプリンの C-11 標識体の作成に成功した。(間賀田)
2. カプリン酸測定系(定性)の開発(恵)高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いたカプリン酸の定量測定系の開発に成功した。
3. マイクロミニプタに対してストレプトゾ

トシンを投与し、マイクロミニプタを糖尿病化することに成功した。(谷本)ATGL欠損マウスにおいて、トリカプリンは(カプリン酸以外の中鎖脂肪酸を多く含む)MCTオイルと比較し、寿命の延長効果が大きかった。TGCVに対して、トリカプリンがMCTオイルよりも有効性が高いと考えられた。(裏出)

4. 糖尿病モデルマウスであるdb/dbマウスにおいて心筋におけるATGL発現(mRNA量および蛋白質量)の減少を認め、ATGL活性の低下が糖尿病状態での糖尿病心筋症の発症に關与している可能性が考えられた。(小林)また、ATGL欠損マウスに血管障害モデルの一つであるカフモデルを行い、ATGL欠損マウスで血管障害の増加を認めた。(山田)

5. ヒト末梢血液由来白血球を用いてのATGL活性の測定系の開発し、その測定系の検証のための抗体作成を開始した。(高木)汎用血球計算機を用い、パラメーターとして、BASO-WX/WYを用いた末梢血白血球への中性脂肪蓄積のスクリーニング検査法を開発した。(平野)<sup>123</sup>I-BMIPPを用いた心臓核医学検査で、single photon emission computed tomography (SPECT)法により撮像された画像を用いて算出されたwash out rateは、TGCV症例で著明な低下を認めていた。<sup>123</sup>I-BMIPPを用いた心臓核医学検査がTGCVのスクリーニング検査となりうる可能性が示された。(平野)冠動脈CTデータの3次元解析システムであるNCVCシステムを用いて、少数例のTGCV症例の冠動脈を解析し、冠動脈への脂質成分の蓄積を認めた。(内藤)

6. 原発性TGCVの国際的な症例登録システムを立ち上げ、症例の登録を開始した。(平野)

#### D. 考察

##### 1. トリカプリンの薬物動態の把握

トリカプリンの C-11標識体の作成に成功したことにより、今後、動物を用いたトリカプリンの薬物動態の把握が可能となると期待される。また、血中カプリン酸の定量的測定法が確立したことにより、将来的な健常人における正常域の決定、TGCV 症例における治療域の決定(至適血中濃度の決定および至適投与量の決定)が可能となった。

##### 2. TGCV 診断法の確立

末梢血由来白血球を用いた ATGL リパーゼ活性測定系、汎用血球計算機による高く白血球への中性脂肪蓄積のスクリーニング法、<sup>123</sup>I-BMIPP を用いた心臓核医学検査により、従来確定診断のために実施されていた骨格筋生検・心筋生検などの侵襲的検査法やゲノム DNA シーケンシングなどに代わって、より非侵襲的に、より簡易に TGCV の確定診断する方法が確立できる可能性が示された。今後、これらの方法について、診断法の開発と並行して、臨床データを蓄積していくことが重要であると考えられた。また、各種画像診断法(冠動脈 CT、冠動脈 OCT、冠動脈内視鏡など)と病理学的診断・質量顕微鏡などの検査法による結果を多数例で比較することで、各種画像診断法の TGCV 診断における有用性について明らかにしていくことができると考えている。

#### E. 結論

原発性・続発性 TGCV に対する診断法の確立のため、新規検査法を開発するとともに、既存の各種画像検査法による検査結果の検討を行った。将来的な臨床治験の実施に向けて、国際的な症例登録システムの運用を開始した。また、カプリン酸製剤の臨床応用に向けた薬物動態・有効性評価を実施するための予備的な検討を行った。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, Kobayashi K, Nakamura H, Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, Hui SP, Toda T, Kuroda H, Chiba H, Hirano K

Peripheral leucocytes' anomaly detected with routine automated hematology analyzer sensitive to adipose triglyceride lipase deficiency manifesting neutral lipid storage disease with myopathy/triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.

Mol Genet Metab Rep. doi:

10.1016/j.ymgmr.2014.05.001 2014

Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M

A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy.

Neuromuscl Dis doi: 10.1016/j.nmd.

2014.04.001 2014

Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A,



Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K  
Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique  
J Lipid Res. 55(5) 905-918 2014

Shimizu K, Ogura H, Wasa M, Hirose T, Shimazu T, Nagasaka H, Hirano K  
Refractory hypoglycemia and subsequent cardiogenic shock in starvation and refeeding: report of three cases.  
Nutrition. in press

Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T  
Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovascularopathy  
Orphanet J Rare Dis. 8(1) 197 2013

Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M  
Genetic mutations in the adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor-gamma in patients with triglyceride deposit cardiomyovascularopathy.  
Biochem Biophys Res Commun. 443(2) 574-579 2014

Ikeda Y, Hirano K (equal contribution),

Fukushima N, Sawa Y  
A novel type of human spontaneous coronary atherosclerosis with triglyceride deposition  
Eur Heart J. 35(13) 875 2014.

Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R  
Down regulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice.  
Biochem Biophys Res Commun. 438(1) 224-229 2013

Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S, Nakanishi T, Matsumoto H, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Hirano K, Kato S  
Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity  
Biochem Biophys Res Commun. 434(3) 534-540 2013

Nakamura K, Hirano K, Wu SM  
iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases  
J Cardiovasc Trans Res. 6(1) 46-53 2013

## G. 知的所有権の取得状況

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

心臓移植適応疾患の病理学的所見に関する研究

研究分担者 植田初江 国立循環器病研究センター 病理部 部長

研究要旨

日本では平成9年臓器移植法が制定された2年後に第1例目の脳死心臓移植が施行され、平成25年12月時点で185例の心臓移植が日本国内で施行された。この中の2症例は中性脂肪蓄積心筋血管症（Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV）であった。また、国立循環器病研究センターでは57例が実施された。今年度は当センターでのこれら57例について今回、レシピエントの原疾患について検討したので報告する。

A. 研究目的

当センターでこれまで施行された心臓移植例の原疾患を病理学的に詳細に解析することで、慢性心不全を呈する、移植適応となる疾患の病態を明らかにする。

B. 研究方法

我が国では、平成9年臓器移植法が制定されてから2年後に第1例目の脳死心臓移植が施行されて以来、平成25年12月末までに185例の心臓移植が国内で行われた。そのうち、本研究班のTGCVは2例が心筋症を呈し、大阪大学で心移植を受けた。平成25年12月までに、国立循環器病研究センター（National Cerebral and Cardiovascular Center: NCVC）では57例が実施された。本年度はNCVCの経験例57例を中心に、心臓移植の適応、実施に至った原疾患についての病理所見を病理学的に検討した。

これまで当センターで心移植を受けた症例の摘出心については、摘出直後の未固定の状態ですべて凍結保存し、その後は10%緩衝ホルマリン溶液にて固定し、病理組織標本を作製して組織診断した。剖検室では病理医が立会い、肉眼的に心臓弁を含む心臓を観察し、構造の異常がないか、肉眼的病変はないか判定を行った。現在行われている心移植の術式は modified bicaval 法であ

るが、両心房はレシピエント側に一部残されるため、左右房室弁の2,3cm上部で切除され、最終的には両大血管の流出路、半月弁が取り除かれた状態で病理検査に提出される。この状態での心重量を測定し、両心室腔がみえるよう水平断に断面をいれ、写真撮影、および病理標本とした。

倫理面への配慮は日本病理学会の病理検体取扱い指針に従い、通常の病理組織としての配慮を行った。研究においては、患者情報はすべて匿名化した。

C. 研究結果

摘出心の病理標本の肉眼所見および組織所見がレシピエントの病理最終診断となった。当センターで施行された57例中52例に左室補助心臓（LVAS）が装着されていたが、心内腔は拡大したままで、左室壁の19-45%の線維化が認められた。心臓移植レシピエントは平均年齢37歳、男性46例（80.7%）、移植前原疾患は拡張型心筋症36例（63.2%）、拡張相肥大型心筋症9例（15.8%）、拘束型心筋症1例、不整脈源性右室心筋症2例、二次性心筋症9例（15.8%）であった。二次性心筋症の内訳はBecker型筋ジストロフィー4例、心サルコイド症2例、虚血性心疾患2例、糖原病1例であった。摘出心の平均重量は409gであった。術前のLVAS装着

は52例(91%)、平均装着期間は30ヵ月であった。臨床的に拡張型心筋症(dilated cardiomyopathy: DCM)と診断され、移植前の心筋生検でもDCMの病理診断であった症例の移植時摘出心では、心サルコイド症が2例、炎症性拡張型心筋症が1例、また肥大型心筋症(hypertrophic cardiomyopathy: HCM)の臨床診断であった1例は糖原病であった。NCVC57症例にはTGCVは認めなかった。一方、ドナーは平均39歳、男性32例(56.1%)であった。これまで周術期死亡0例、液性拒絶による循環不全0例であった。1例を移植4年後に骨髄異形性症候群からの敗血症で失い、もう1例が術後8ヶ月に腹膜炎、敗血症で死亡したが、その他は全例生存し、移植後の経過は良好でほとんどの症例が社会復帰した。術後急性期の心機能低下による循環不全は7例で認められたが、治療により回復した。

#### D. 考察

心移植適応となる疾患は回復見込みのない心不全例で、現状では特に拡張型心筋症を主体とした慢性心不全例が対象となっている。今日NCVCでの心移植実施例ではTGCV例は認めなかったが、ARVC、Becker型筋ジストロフィー、糖原病などの希少疾患が心移植の中に認められた。これまでは拡張型心筋症、拡張相肥大型心筋症などの特発性心筋症が移植適応の主体であったが、今後、心不全を呈する希少疾患の移植適応症例として増えてくると思われる。

本邦では2例のTGCVが心移植を受けており、希少疾患の心移植適応についての病理学的評価も重要となっている。

#### E. 結論

当センターで行われた心臓移植時摘出心の病理について報告した。レシピエントの摘出心の病理学的評価は重要であり、病理で摘出心の最終診断することは今後の移植適応疾患の選別にも大切である。

#### F. 健康危険情報

該当なし。

#### G. 研究発表

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  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし

#### 参考文献

植田初江, 池田善彦, 松山高明 他. 心臓移植の病理 —50例の経験—. 日本病理学会誌 2012;101(2):27.

Hirano K, Ikeda Y, Zaima N, Sakata Y, Matsumiya G. Triglyceride deposit cardiomyovascularopathy. N Engl J Med 2008;359:2396-8.

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

創薬プロセスと知的財産

研究分担者 青江秀史 大阪大学知的財産センター長

研究要旨

近年の創薬は多検体同時合成法や、薬効を高速で調べるハイスループット・スクリーニングを導入し、またロボットによる自動化を行うことで、合成や薬効評価の高速化を図っている。他に、遺伝子解析を利用した創薬も行われているが、本稿では、従来から一般的に行われてきた創薬のプロセスを取り上げて、法的分野の者が創薬プロセスの基本と知的財産との関係を整理した。

A. 研究目的

従来から一般的に行われてきた創薬のプロセスを取り上げて、法的分野の者が創薬プロセスの基本と知的財産との関係を整理することを目的とした。

B. 研究方法

創薬プロセスと一般的な新商品開発・販売プロセスを比較し、プロセスの各段階で生じる知的財産を浮き彫りにした。

C. 研究結果

1. 一般的な創薬プロセス

近年の創薬は多検体同時合成法や、薬効を高速で調べるハイスループット・スクリーニングを導入し、またロボットによる自動化を行うことで、合成や薬効評価の高速化を図っている。他に、遺伝子解析を利用した創薬も行われているが、本稿では、従来から一般的に行われてきた創薬のプロセスを取り上げて、法的分野の者が創薬プロセスの基本と知的財産

との関係を整理する一助としたい。

1. 調査段階

医療現場の問題点からニーズを発見して新薬開発の手掛かりを調べる。また、ニーズではなく既存の製品分野や各社の開発動向から次に開発すべき薬も調べる。他に新薬開発の手助けとも障壁ともなる法律、制度を調べる必要があるので、調査段階で、調査する項目は多岐にわたる。

(1). 調査計画書

(2). 動向調査書

(3). 調査報告書

などが成果物として作成される。知的財産分野的には著作権法の対象としての著作物である。この段階での著作権法の観点からの留意点は「引用」「職務著作」である。

また、本報告書の取り扱い(保管期間、文章・データの加筆削減などの権限者とその記録、公表手続き、活用(利用)手続き、著作権者、保管責任など；以下、取

り扱い)が決定するまでは、通常「秘密」として取り扱われるので、不正競争防止法の観点からの留意点として「営業秘密」がある。

## 2. 企画段階

調査に基づき、研究開発の分野を決定する。企画会議で研究開発責任者を交えた関係者会議にかけ、予算と人を確保する。この段階では予算要求書の取り扱いについて文書化しておく必要がある。

## 3. 研究と開発段階

### (1). 新物質作成

合成、微生物、バイオなどの技術で多数の「薬候補」をつくり、薬の研究開発の出発点となる基本化合物や開発候補品を発見(決定)する。次に効果のある化合物を選別するため「スクリーニング(薬効評価)」と呼ばれる、試験管内・動物試験を行う。新物質作成とスクリーニングは主に同時並行で行われる。

通常、スクリーニングというと次の4つの方法を言う。

無作為に化合物を製造して有効な化合物を発見する方法

人の生体成分、動植物、鉱物などから有効成分を抽出する方法。

薬として効き目がある化合物を加工、よりよい薬を作る方法

新しいメカニズムに基づく薬を作る方法

これらの方法を行うにあたって留意すべき点は、素材データや参考文献、報告書などの既存の文献やデータの著作権、利用ライセンスの有無などを確認すること

である。その上で自らの方法によって作られた報告書や実験データの取り扱いについて文書化しておく必要がある。留意点として成功事例だけでなく、失敗データの取り扱いも定めておく必要がある。

### (2). 開発戦略

対象としての化合物が出来上がると、開発戦略を立てる。開発品目として関係者会議で承認を得て先のプロセスへと進める。この段階で一般的な新商品の調査から製品出荷までのプロセスと知的財産に関する認識を全員で一致させ、本プロジェクトに当てはめたプロセスを可視化する必要がある。その上でプロジェクトの進捗状況の情報共有を徹底する必要がある。

「参照次頁 商品化作業の手順と作業項目」

第一行程	調査	企画	決定 → 次工程
目標	商品化に先立ち各種状況を客観的・定量的に調査する	商品化を企画し、コンセプトに基づいて商品要素を検討する ビジネスプランの作成	調査によりコンセプトの正しさについてチェックを行う。 さらに気付かなかった他の購買動機はないかを調査し商品化を決定する
作業項目	調査計画の立案 調査目的・対象明確化 調査計画の立案 動向調査 市場/技術動向 競合他社の動向 欧米のビジネス動向 社内の動向 ユーザーニーズ調査(1) 日常活動でのアイデア収集 パソ通フォーラム運用 ユーザ団体の要望 要望連絡票 ヒアリング調査 世の中の制度/動向 標準化 法制度 特許・実用新案 当社ビジネス状況の把握 商品全般 戦略商品 技術開発状況 関連会社分業連携状況 調査報告書の作成 一般調査報告書 特定テーマ調査報告書	ターゲットの仮定 商品マップの作成 ユーザーニーズの再確認 購買の予測 商品の位置づけの明確化 自社商品 他社商品 商品コンセプトの設定 名称 キャッチフレーズ 商品体系等 商品イメージ立案 機能の検討 使用の検討 商品企画書の作成 ユーザーニーズ調査(2) テストマーケティング 製品の必要性の検討 ビジネスプランの策定 商品戦略 市場戦略 販売戦略 開発戦略 ビジネスプラン(1)の作成 ビジネスプランの作成 関係者 幹部	商品要素のチェック 機能 デザイン 価格 コンセプトの決定 ターゲット セールスポイント プロトタイプ作成 デザイン サイズ/重量 機能/操作性/性能 ユーザーニーズの詳細調査 プロトタイプによるニーズ調査 商品化案の作成 商品開発計画書の作成 ビジネスプラン(2)の作成 開発のオーソライズ プロジェクトとしての決定 関係部門長へのオーソライズ 幹部へのオーソライズ
主なアウトプット	調査報告書(特定) 調査報告書(一般)	ビジネスプラン(1) 商品企画書	商品開発計画書 ビジネスプラン(2)
作業体制	情報交換方法 調査担当明確化 調査報告方法明確化 調査内容管理利用方法	商品企画会議 企画の必要性の明確化 作業計画立案 企画内容作成	開発連絡会議 作業計画立案/組織 仕様検討/決定 開発関連情報交換
知的財産・ノウハウ	○調査計画書の作成方法 ○情報収集方法 ○アイデア一元管理方法 ○消費者行動原理の把握 ○市場調査方法 ○調査報告書の作成方法	○ビジネスプラン作成方法 ○コンセプト作成方法 ○商品企画方法 ○ユーザーニーズ調査方法 ○仕様検討方法 ○名称の付け方	○商品化版要件検討方法 ○プロトタイプ技法 ○商品開発計画作成方法

第二工程	開発	→ 確認 →	発表 → 次工程
目標	コンセプトに基づき各部門で具体的に商品の開発を行う。広告、キャンペーンのラフスケッチを作成する	実際にテスト使用しての商品に対する感想がコンセプトと一致しているかの確認。どのくらいの需要が見込めるか？	どの様な広告、発表を行えば意図したコンセプトが伝わるかを考える
作業項目	社内体制の明確化 開発/販売体制の明確化 商品・製品仕様の詳細検討と決定 製品詳細機能/仕様の検討 商品形態の決定 詳細仕様書の作成 マニュアル執筆計画作成 生産計画の立案 生産計画の作成 生産ラインの整備 製品版の作成 販売戦略の立案 発表商品の課題整理 商品の最終確認 販売計画/名称決定 価格/損益 販売戦略のまとめ 発表戦略の立案 発表方法の立案 発表月ツールの作成 拡販月ツールの作成 社内研修会の検討 社外発表の検討 販売戦略の作成 評価	開発元の報告 開発状況での報告 関連部門での評価 開発状況での評価 現物によるユーザ評価 デザインの確認 性能/操作性確認 サイズ/重量の確認 安全性の確認 価格の確認 市場性や競争の確認 需要の確認 他社状況の調査と評価 製品の最終確認(ハード) 製品テスト 製品検査報告書 生産開始 製品の最終確認(ソフト) 製品テスト 製品検査報告書 商品として販売することの最終決定 客観状況の総合整理 関係部門へのオーソライズ 幹部へのオーソライズ 社内関連部門への通知 発表作業の準備	商品発表方針の立案 発表方法の検討/確定 発表準備体制の確立 発表責任者の明確化 体制/作業場所/ルールの明確化 発表準備作業計画を明確にする 全体作業計画の立案 個別作業計画の立案 販売戦略の立案 販売計画の立案 生産計画の立案 拡販支援計画の立案 価格/損益の立案 発表準備作業 発表作業全体の決定 各種拡販ツール作成 デモプロの作成 発表イベントの準備と実施 社内研修会 社外発表の実施 ユーザ説明会の実施 発表効果の評価 商品浸透度の評価 商品評判の評価 反省と対応
主なアウトプット	発表戦略 詳細仕様書	製品検査報告書 商品評価結果報告書	SA/SEハンドブック 概説書・デモプロ 説明資料(AV化)
作業体制		商品テスト体制 調査担当明確化 調査報告方法/一元化 対応要項示唆	商品化・発表会議 作業計画立案 発表準備 社内発表
知的財産・ノウハウ	○仕様書作成方法 ○マニュアル執筆方法 ○品質向上方法 ○開発技術継承方法	○市場調査方法 ○テスト方法	○発表戦略立案方法 ○発表準備方法 ○広報方法

第三工程	販売	→ 評価
目標	商品を拡販していく上での各種施策(広告、キャンペーン、社員教育)と適月支援を行う	販売予測と実情とを比較して今後の対応を決める。商品を評価し、改良か破棄かを決定する
作業項目	販売支援 拡販ツールの提供 デモの実施と支援 展示会への出展 販売作業 販売方針を立案する 説明会を開催する 提案書を提出する 受注する 適月支援 資料の作成と配布 営業・SE説明会の実施 Q/A対応 早期ユーザ対応 情報交換の場の設定 適月作業 適月計画の立案 資金と体制の確保と作業の実施 運月の評価と反映 教育・技術指導 ユーザ/SE/ディーラ教育 自習書の作成 製品提供・導入作業 製品提供準備/作業 製品のインストール 本番稼働	計画と実体の評価 提供時期の計画と実績 販売計画と実績の比較 今後の販売予想 ユーザ満足度評価 説明会・デモの評価 適月済ユーザの評価 他社動向調査 新商品への対応状況 他社/業界の新しい動き 機能改良・追加項目調査 改良要望項目の調査 追加要望項目の検討 商品改良項目の検討 改良項目洗い出し選定 商品改良の決定 項目決定スケジュール作成 商品強化の実施 商品改良計画作成決定 商品の廃案の検討と決定 商品の市場性の検討 商品の廃品の検討 廃業に伴う問題点検討 廃案スケジュール検討 廃案の決定 関連部門へ通知する ユーザへ通知
主なアウトプット	SEハンドブック 事例集 要望連絡票	新商品検討要請書 商品改良計画書
作業体制	販売・適月WG 販売支援計画/組織化/実施 適月支援計画/組織化/実施	商品評価 /改良計画
知的財産・ノウハウ	○販売支援作業方法 ○適月支援作業方法 ○教育方法 ○展示方法 ○ナレーション方法	○商品評価方法 ○商品改良方法 ○商品廃業方法



### (3) 非臨床試験段階

臨床試験に先立って試験をするが、本報告書の記載時期では、このプロセスに小職が入っていないので、現段階で小職が理解しているプロセスと留意点を述べることにする。以下、～ は試験項目である。同時並行してビジネス（営業的な意見）戦略も策定する必要がある。

毒性試験

薬効薬理試験

薬物動態試験

一般薬理試験

製造方法検討

物性検討

製剤検討

この全ての試験・検討において自らが作成した実験データ（動画・写真の添付が望ましい）、記録（改竄できないような仕組みが必要）と他者の参考文献、データとの区別が必須である。

### 4. 確認

治験届臨床試験を行うための計画書を厚生労働省に提出。治験審査委員会における専門家・第三者の臨床試験の必要性の審議でクリアする必要がある。この場合の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

第 相試験

第 相試験

第 相試験

### 5. 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。

(1) 承認申請

(2) 審査センター

(3) 薬事・食品衛生審議会

(4) 承認・許可

#### (1) 非臨床試験段階

臨床試験に先立って試験をするが、本報告書の記載時期では、このプロセスに小職が入っていないので、現段階で小職が理解しているプロセスと留意点を述べることにする。以下、～ は試験項目である。同時並行してビジネス（営業的な意見）戦略も策定する必要がある。

毒性試験

薬効薬理試験

薬物動態試験

一般薬理試験

製造方法検討

物性検討

製剤検討

この全ての試験・検討において自らが作成した実験データ（動画・写真の添付が望ましい）、記録（改竄できないような仕組みが必要）と他者の参考文献、データとの区別が必須である。

### 1. 確認

治験届臨床試験を行うための計画書の厚生労働省提出。治験審査委員会における専門家・第三者の臨床試験の必要性の審議でクリアする必要がある。この場合の

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

第 相試験

第 相試験

第 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 相試験、第 相試験、第 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。「役員の選任条項」「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わ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っておく必要がある。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

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



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

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平均内腔直径と壁厚、脂質と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 ~ 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、~ 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 ~ 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。

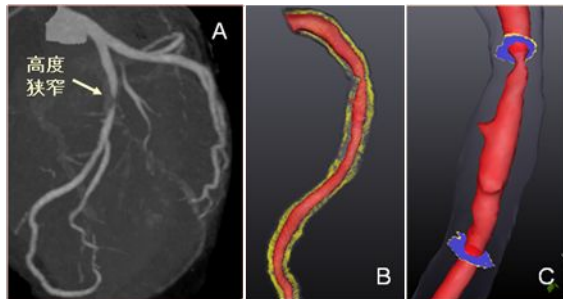


図1 左冠動脈 CTA (冠動脈狭窄例)  
A: 通常の CTA (MIP 法)、BC:NCVC システム三次元表示像

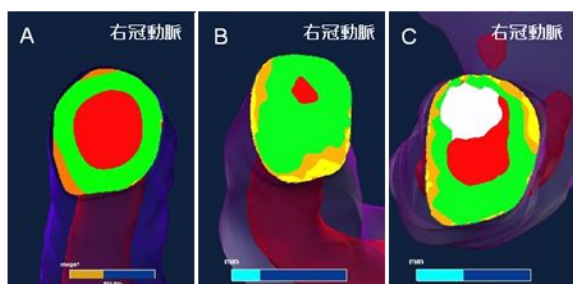


図2 冠動脈断面像 (NCVC システム)  
A:正常例、BC:冠動脈狭窄例 (同一例)

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(#6) ~ 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 2<sup>nd</sup> International Symposium on TGCV & NLSO, 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 2<sup>nd</sup> International Symposium on TGCV & NLSO 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)の方がより効果が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 恵 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し、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 メディカルフォトニクス研究センター 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、 $\alpha$ 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  $\beta$ -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 $\alpha$ 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、 $\beta$ 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、 $\alpha$ 位カルボン酸をC-11標識する方法と、 $\beta$ 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 $\alpha$ 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

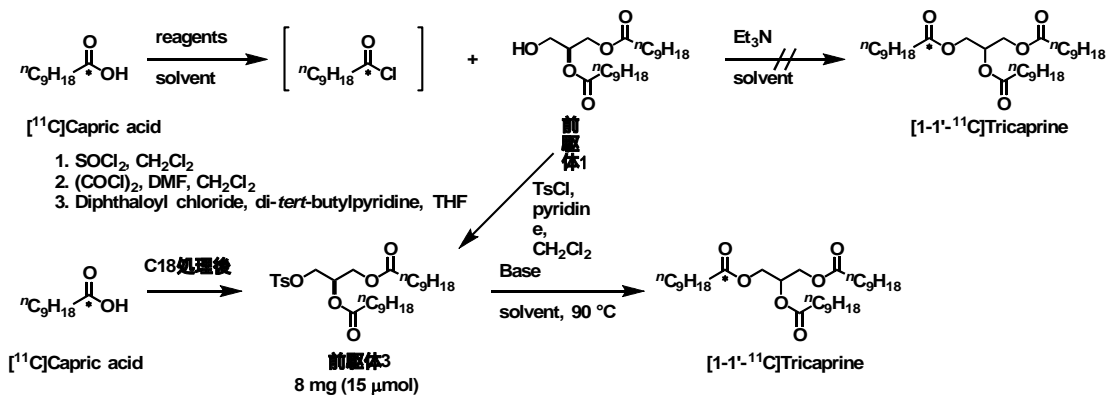


図1 -C-11-カプリン酸からのトリカプリンの合成スキーム

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。そこで位標識体を用いた合成法に替えて、脂肪酸の位を C-11 標識する方法について検討することとした。

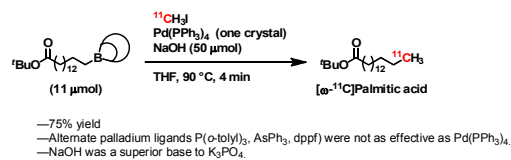
C-11 は浜松医科大学サイクロトロン施設設置のサイクロトロン、住友重機械製 HM-12 を用いることとし、自動合成装置は同じく浜松医科大学サイクロトロン施設に設置されている住友重機械製多目的合成装置を用いて種々の検討を行った。

(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

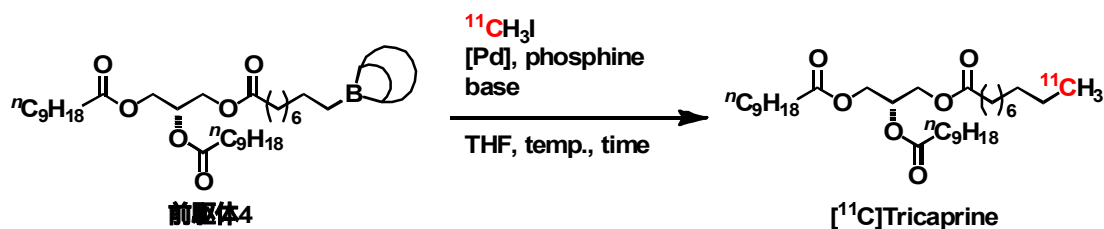
脂肪酸の位に C-11 を導入する反応は通常、sp<sup>3</sup>-sp<sup>3</sup> 炭素結合形成反応を行うこととなり、アルキル基同志のカップリング反応となるため一般的に難しい。これまで、



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、Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub>, P(o-tolyl)<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 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, %**
						[ <sup>11</sup> C]Tricaprine
1*	Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub>	none	NaOH	90	10	10
2	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	P(o-tolyl) <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	90	10	19
3	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	P(o-tolyl) <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	120 (MW)	10	64
4	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	P(o-tolyl) <sub>3</sub>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	90	10	88
5	Pd <sub>2</sub> (dba) <sub>3</sub>	P(o-tolyl) <sub>3</sub>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	120 (MW)	10	67

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

\*\*Radiochemical Conversion analyzed by HPLC

図3 -C-11-トリカプリンの合成スキームと反応条件検討

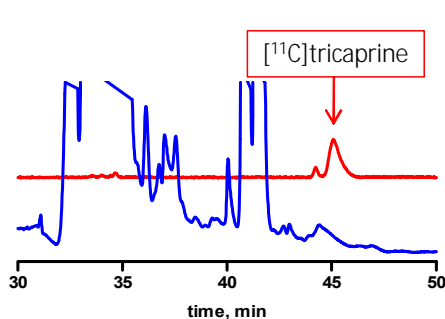


図4 -C-11-トリカプリンの分取 HPLC  
 チャート (分取条件: Column; COSMOSIL AR II 10 x 250 mm, 5 μm, Eluent; CH<sub>3</sub>CN : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 85:15, Rate; 6 mL/min, UV; 210 nm)

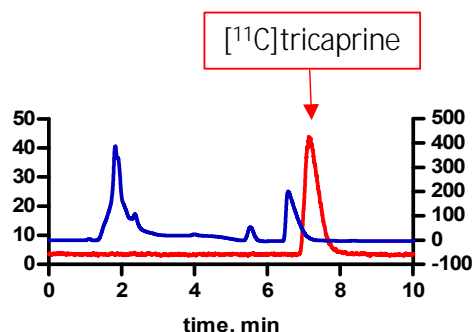


図5 -C-11-トリカプリンの分析  
 HPLC チャート (分析条件: Column; XBridge 4.6 x 150 mm, 5 μm, Eluent; CH<sub>3</sub>CN : C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH = 85:15, Rate; 1.0 mL/min, UV; 210 nm、標品を同時に重ねて分析)

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

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 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、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ 、 $\text{P}(\text{o-tolyl})_3$ 、 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  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-トリカブ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-トリカブリンに対応する C-11-カブリン酸についても、今後同様に 位を標識した -C-11-カブリン酸を合成して、体内動態を評価するものとする。

昨年度の検討において、-C-11-カブリン酸の体内動態を正常マウスを用いて検討したが、位の標識体であるため、細胞内における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- $\text{CO}_2$  の動態を多く含む可能性を否定できない。今回合成した 位標識体についても同様に酸化を受けることは有り得るが、位標識体に比較すると遅いものと考えられるので、

特にトリカブ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ブリンの 位を C-11 標識することが出来た。対応するカブリン酸についても今後合成検討を行う。また、-C-11-トリカブリン、-C-11-カブ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

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 cardiomyovasculopathy、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 ( $2845\text{ cm}^{-1}$ ) と CD 伸縮振動 ( $2100\text{ cm}^{-1}$ ) 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であることが分かった。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ー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

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における腎障害の研究

研究分担者 長澤康行 兵庫医科大学腎・透析科 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症において、しばしば尿蛋白が認められ腎不全が発症する。また、2型糖尿病の中に、本疾患に関連しているものがあることが報告されている。本疾患の診断基準を作成するにあたって、腎障害に関する基準の作成を行った。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症において、しばしば尿蛋白が認められ腎不全が発症する。また、2型糖尿病の中に、本疾患に関連しているものがあることが報告されている。本疾患の診断基準を作成するにあたって、腎障害に関する基準の作成を行う。

B. 研究方法

中性脂肪蓄積心筋血管症の診断基準を作成するにあたって、本研究の研究班会議において討論を行い、特に腎障害に関しての意見を述べた。

(倫理面への配慮)

特に倫理的な問題はない。

C. 研究結果

2型糖尿病において糖尿病性腎症は代表的合併症である。この腎障害に中性脂肪蓄積心筋血管症により腎障害が関与していると考えられる症例を選択するにあたり、当初腎生検を考慮したが、糖尿病性腎症において腎生検が一般的でないため、検尿異常を認めることで診断項目とした

D. 考察

中性脂肪蓄積心筋血管症の2型糖尿病の進展に関する症例については、現在研究段階であり、本診断基準の腎障害の項目についても今

後、症例を集積しつつ検討が必要である。

E. 結論

中性脂肪蓄積心筋血管症の診断基準を作成した。

F. 健康危険情報

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

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における冠動脈プラークの血管内イメージングと病理組織像との対比

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

本研究の目的は TGCV 症例の心移植時摘出心もしくは剖検例を用いて、冠動脈病変の血管内イメージング像と病理組織像を対比し、TGCV における冠動脈プラークの病態を明らかにすることである。本年度は 74 剖検例から採取した冠動脈で、通常の粥状動脈硬化病変を対象に画像と病理の対比を行った。血管内イメージングは病変検出感度が高いものの、病変性状の認識の特異度は低いことが明らかになった。

A. 研究目的

冠動脈病変の評価は、血管造影に加えて光干渉断層法(Optical coherence tomography, 以下 OCT)・血管内視鏡(Coronary angiography, 以下 CAS)などの血管内イメージングが広く臨床応用されている。中性脂肪蓄積心筋血管症(triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, 以下 TGCV)の典型的な冠動脈病変は形態学的に空胞変性を伴った平滑筋細胞による求心性内膜肥厚が特徴的であるが、血管内イメージングによる画像所見は不明な点が多い。TGCV 症例の心移植時摘出心もしくは剖検例を用いて、TGCV の冠動脈病変の OCT, CAS による画像所見と病理組織像を対比し、TGCV の冠動脈プラークの病態を明らかにする。

B. 研究方法

本年度はコントロールとして兵庫医科大学病院における剖検 74 症例から採取した冠動脈で通常の粥状動脈硬化病変を対象に検討した。剖検で採取した心臓から冠動脈を外し、固定前に OCT, CAS により冠動脈プラークの評価を行った。画像を記録後、冠動脈はホルマリン固定を行い約 5mm 間隔で水平断として標本を作製した。

C. 研究結果

OCT で脂質成分に富む不安定プラーク(破綻の危険性の高いプラーク)と診断されたが、組織

学的には細胞外脂質の沈着・微小石灰化・ヘモジデリン沈着・壁在性の器質化血栓を示す安定プラークと判断された症例が約 40%と高率に含まれていた。また CAS で黄色プラークと診断された病変には表層性の石灰化病変が約 30%に含まれていた。血管内イメージングは病変検出感度が高いものの、病変性状の認識の特異度は低いことが明らかになった。

D. 考察

TGCV の疾患概念が広く認知された際、組織が採取困難な冠動脈の評価は、画像診断が重要な役割を果たす。しかし今回の研究からも現在の血管内イメージングには限界点もあり、今後は新たなデバイスでのプラーク画像と病理組織像との対比を行いたい。

E. 結論

血管内イメージングを用いて臨床病理学的に TGCV の病態を明らかにし、OCT, CAS での TGCV の診断基準の確立を目指す。

F. 健康危険情報

特になし。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Fujii K, Hao H et al: In-stent Thin-cap Fibroatheroma After Drug-eluting Stent Implantation: Ex Vivo Evaluation of Optical Coherence Tomography and Intracoronary Angioscopy. JACC Cardiovasc Interv. *in press*, 2014

Hao H, Fujii K et al: Different Findings in a Calcified Nodule between Histology and Intravascular Imaging Such as Intravascular Ultrasound, Optical Coherence Tomography and Coronary Angioscopy. JACC Cardiovasc Interv. *in press*, 2014

別紙 4

### 2. 学会発表

Hao H, Fujii K, et al: The true character of lipid rich plaque by intravascular imaging: Message from pathologist to cardiologist. European Society of Cardiology Congress 2013, Amsterdam, Holland, 2013.9

## 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

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に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品の開発（診断機器：冠動脈）の研究

研究分担者 小谷順一 大阪大学大学院医学系研究科 特任講師（常勤）

研究要旨

光干渉断層法 (Optical Coherence Tomography: OCT) を用いて中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) に対する冠動脈診断の応用について剖検心を用いて検討した。対照症例との画像を比較・検討を行い、十分に解析可能な画像が取得された。OCT 診断 による TGCV 所見は、特異的な内膜肥厚を認め、生体における診断並びに医薬品介入による病勢の評価の際には、今後重要な診断機器と期待される。

A. 研究目的

本研究の目的は、血管造影で検出が困難な代謝性疾患の早～中期病変を生体における侵襲的画像診断法による組織性状診断を用いて診断する、あるいは診断の補助となる手法を模索する事である。

Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy (TGCV)などの代謝性疾患の問題点として代謝されない物質の細胞内蓄積がある。血管のような管腔臓器においては、血管壁の肥厚による内腔狭小化がびまん性に生じる。主たる血管の評価は冠動脈造影法による狭窄の検出であるが、求心性に内腔狭小が生じた場合は診断が困難である。このような背景から、同様の進行性の冠動脈内腔狭小を呈する移植後冠動脈症においては、血管を断層像として評価できる血管内超音波法 (IVUS) による研究が1990年代後期から米国を中心に多く進められてきた。近年、本邦においてもより微細な血管の構造を観察できる光干渉断層法 (OCT)が臨床応用可能となった。今回、我々はこのOCTを用いて血管性状の組織評価が妥当であるかを検証した。

B. 研究方法

TGCV が疑われる症例と通常の動脈硬化を呈した剖検心に対してOCTを施行する。剖検心は、国立循環器病研究センターに保存されている検体を用いた。すでに診断的病理診断が施行されており、冠状動脈が区域ごとに切断

されているために、各血管のもっとも長い区域を観察対象とした。これらの血管1枝における組織性状のばらつきの検証を行い（長区域に、任意の3部位を選択して短軸を表示する）短軸像において、内膜 (intima)、中膜 (media)、外膜 (adventitia)の3層構造の同定可能と、media+plaque complexにおける組織性状診断を行った。

(倫理面への配慮)

剖検例に対する研究では、その匿名性はもちろんのこと、生体と変わらない手技による観察を行った。

C. 研究結果

剖検心3例のうち、2例は肉眼においても高度動脈硬化を呈した。いずれの検体も冠状断による幾つかの切片であり冠動脈は幾つかの区域で欠損していた。このため、冠状動脈の評価においては遠位部・中部・近位部においてそれぞれ区域的な評価を行った。しかしながら、内腔を生理食塩水で灌流・充満させる事ですべての標本で約10mm長の観察区域は最低確保する事が可能であった。動脈硬化症例においては血管内の器質化血栓を確認した。通常の動脈硬化性疾患の中では、長軸像及びいずれの短軸像においても内腔は保たれているが血管壁の構造パターンは非動脈硬化部位と全く異なり、3層構造は消失していた。

一方、TGCV が疑われる症例においては、長軸像ではより明らかであるが、中膜弾性板に含まれる黒色帯は遠位部から近位部にかけて辺縁不明瞭ではあるが連続的に確認可能であり、これは側枝の存在部分でもその構築は均一であった。内膜は均一で厚いがこれに関しても血管内の空間的構築にばらつきがなく、通常動脈硬化とはその様相は大きく異なる。また、通常の動脈硬化に見られる粥腫形成は見られなかった。

#### D. 考察

通常動脈硬化性疾患は、局所的な斑状の動脈硬化の進行により粥腫（プラーク）が形成されるとされる。これは、病理学の大系や従来の冠動脈造影を基盤とした診断法で明らかになった知見であるが、今回の OCT 所見においても、一致する結果が見られた。特に、今回検討した任意の3部位は長軸像にて狭窄を示さない部分であるだけに、sub-clinical な動脈硬化の検出といって過言は無い。一方これらの事を利用したのが、今回の TGCV が疑われる症例に対する OCT である。このように比較する事によって、より明らかに肥厚した内膜の存在と、それが斑状・区域性を持たずにほぼ均一に存在することが OCT 画像で提示された。内腔の凹凸がほとんど無く内腔が保たれていることから、冠動脈造影法では異常所見を検出する事は困難であると思われる。しかしながら、このような OCT 所見は特異的で有り、今後の代謝・蓄積性疾患の診断や病勢診断にこのような手法が有用であることが示唆された。

#### E. 結論

剖検症例に対し、臨床ツールを用いてこれまで診断法が確立していない難病診断へのアプローチを模索した。内腔と血管壁及びその構造を検討することで、これまでの内腔診断に拠る解剖学的検査法の限界が明らかになった。今回のいわゆる AI (autopsy imaging) の知見を元に、OCT を用いた組織診断などの補完診断が今後臨床に導入されることが期待される。

#### 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

無し

#### 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

トリカブリン経口投与による体内動態把握と検出法の検討

研究分担者 瀬川波子 福岡大学医学部 生化学 准教授

研究協力者 山口知是 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

中性脂肪蓄積心筋血管症の治療薬として開発を進めているトリカブリンは、経口投与を行うと、胃でカブリン酸に分解され、小腸で吸収され、門脈を経て肝臓で代謝されるため、全身に到達しにくいと考えられているが、その体内での動態は完全には解明されていない。経口投与されたトリカブリンの体内動態を明らかにするため、マウスにトリカブリンを経口投与し、小腸灌流法を行い、リンパ管から灌流液を採取し、得られた灌流液に対して液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）による解析を行った。

A. 研究目的

我々は、細胞実験および遺伝子改変動物（ATGL 欠損マウス）を用い、中鎖脂肪酸であるカブリン酸による中性脂肪蓄積に対する有効性を示してきた。また、少数例の中性脂肪蓄積心筋血管症（TGCV）症例に対して、市販の中鎖脂肪酸（中鎖脂肪酸含有トリグリセリド）による食事療法を行い、有効性を認めている。

従来、経口投与された中鎖脂肪酸含有トリグリセリドは胃で加水分解を受け、中鎖脂肪酸は門脈を経て肝臓で酸化を受けるため、経口投与された中鎖脂肪酸が体循環に入ることはないと考えられてきた。しかし、上記のごとく、経口投与された中鎖脂肪酸含有トリグリセリドが動物およびヒトで心臓・骨格筋などの臓器に効果を示していることから、経口投与された中鎖脂肪酸が体循環に入る経路

が存在する可能性が示唆された。

本研究の目的は、マウス小腸灌流法により得られた灌流液中の脂肪酸組成を明らかにすることで、中鎖脂肪酸の体循環に入る経路について明らかにすることである。

B. 研究方法

トリカブリンを強制投与した野生型マウスを麻酔下で開腹し、マウス小腸灌流法の如く各血管を結紮、灌流を行うと共に、リンパ管へ注射針を装着したチューブを挿入し、自然落下により灌流液を採取した。

採取した灌流液を超遠心法を用いて各リポ蛋白分画へ分離（CM、VLDL、LDL、HDL、LPDS）し測定試料とした。測定試料は液体クロマトグラフィー質量分析法（LC/MS）を用いて、各リポ蛋白分画にお

けるトリグリセリドの分析を行った。

(倫理面の配慮)

大阪大学の審査委員会の承認を受け、規定に従い研究を実施した。

#### C. 研究結果

血清、腸管リンパ管からの灌流液より超遠心法を用いて分離したカイロミクロンイロミクロン (CM) 分画および超低密度リポ蛋白 (VLDL) 分画にカプリン酸を含有するトリグリセリド (カプリン酸と長鎖脂肪酸を含有するキメラトリグリセリド) を検出することができた。

#### D. 考察

本研究より、経口投与されたトリカプリンの一部は、長鎖脂肪酸とのキメラトリグリセリドの形で小腸リンパ系に入ることが確認できた。小腸リンパ系に認められたキメラトリグリセリドは、肝臓での酸化を受けることなく、体循環に入ると考えられるので、経口投与されたトリカプリンが体循環に入り、全身的な効果を示す可能性が示唆された。また、胃での加水分解を免れるようデザインされた腸溶カプセルなどの投与方法の工夫により、小腸からの吸収効率を増加させることで、bioavailability の高い製剤の開発が可能である可能性も示された。

#### E. 結論

経口投与されたトリカプリンの一部が、カプリン酸を含有するトリグリセリド (カプリン酸と長鎖脂肪酸のキメラトリグリセリド) の形で小腸リンパ系に入る

ことが示された。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K. Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique.

J Lipid Res. 55:(5) 905-918, 2014  
First Published on February 25, 2014,  
doi:10.1194/jlr.M047761

##### 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（難治性疾患克服研究事業））  
分担研究報告書

質量顕微鏡法を用いた TGCV 診断にむけた基礎的検討

研究分担者 財満信宏 近畿大学農学部 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV) の特徴は、心筋及び冠状動脈への中性脂肪 (TG) の蓄積である。そのため、本疾患の診断には、病理検体において TG を検出することが重要である。一般的な病理染色では、コレステロールと TG の識別が困難である。本研究では、TG とコレステロールを区別して可視化することが可能な質量顕微鏡法を用い、TGCV 診断に向けた TG 検出のための基礎的な検討を行った。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) の特徴は、心筋及び冠状動脈への中性脂肪 (TG) の蓄積である。TGCV の診断のためには、組織上の TG を高感度かつ半定量的に測定することが重要である。質量顕微鏡法による TG の高感度測定法の検討例はないため、本研究では高感度 TG 検出を実現するための前処理方法を検討した。

B. 研究方法

安楽死させた ddY マウスから脂肪組織を採取し、液体窒素で速やかに凍結した。その後、クライオスタットによって 10  $\mu$ m の凍結切片を作成した。作成した凍結切片を A 液（未発表のデータのため、非公開とする）、B 液、もしくは C 液で洗浄した後、質量顕微鏡法によって脂肪組織を解析し、TG を検出した。

（倫理面の配慮）

本研究は、近畿大学動物実験委員会の認可を受けて行った。

C. 研究結果

A 液、B 液で処理した切片で検出される TG はコントロール切片と比較し、感度が低下する傾向にあった。一方、C 液で洗浄した切片から検出される TG は 1.5 倍程度検出強度が増加した。

D. 考察

C 液による処理によって、TG 検出の感度が向上することが示された。C 液によって、TG のイオン化を阻害する組織上の分子が除去されたことが原因であると考えられるが、詳細な機構については今後のさらなる検討が必要である。

## E. 結論

脂肪組織のTG検出の高感度化に成功した。今後は、この手法によって、筋組織などに存在する微量のTGを高感度に検出できるかどうかを検討する必要がある。

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

## F. 健康危険情報

該当せず

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Genetic Mutations in Adipose Triglyceride Lipase and Myocardial Up-regulation of Peroxisome Proliferated Activated Receptor- $\gamma$  in Patients with Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy.  
Ken-ichi Hirano, Tatsuya Tanaka, Yoshihiko Ikeda, Satoshi Yamaguchi, Nobuhiro Zaima, Kazuhiro Kobayashi, Akira Suzuki, Yasuhiko Sakata, Yasushi Sakata, Tatsushi Toda, Norihide Fukushima, Hatsue Ishibashi-Ueda, Daniela Tavian, Hironori Nagasaka, Shu-Ping Hui, Hitoshi Chiba, Yoshiki Sawa, Masatsugu Hori  
Biochem. Biophys. Res. Commun. In press.

### 2. 学会発表

Screening for triglyceride deposit cardiomyovasculopathy in type 2 diabetes mellitus patients.  
Nobuhiro Zaima, Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ishibashi-Ueda, Mitsutoshi Setou, Ken-ichi Hirano  
The 2<sup>nd</sup> International Symposium on Triglyceride Deposit Cardiomyovasculopathy and Neutral Lipid Storage Disease  
(Osaka, JAPAN : 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

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の1例

研究分担者 杉村宏一郎 東北大学大学院医学系研究科 循環器内科 助教  
研究協力者 黒田 宙 東北大学大学院医学系研究科 神経内科 助教

研究要旨：

重症心不全を合併した中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) に対し、従来の心不全治療に加え、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を行い、臨床経過を検討した。BNP 1141pg/dl、LVEF 22%と重症心不全、動揺する高CPK血症 (86~2724 IU/L) と右上肢にMMT 1-2/5 の筋力低下を認めたと、約2年の治療経過で心不全症状、ミオパチーの軽快とともに、BNP 値、CPK 値も低下した。

A. 研究目的

Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy (TGCV)は心筋障害を合併する稀な代謝性筋疾患である。極めて希少疾患であるがゆえに、診断法だけでなく治療法においても、確立されたものはない。しかし、心筋障害は極めて重症であり、予後の大きく関係していることから、その治療方法に確立が必要であることは明白である。以上から、実際の診療からTGCV症例の特徴、診断方法、治療方法の確立を目指した。

B. 研究方法

当院では2011年2月にTGCVと診断した60歳の男性の一例を、経過観察している。通常的心不全治療に加え、市販の中鎖脂肪酸含有オイルを使用した食事療法を加えることで、その効果を検討した。

C. 研究結果

症例は60歳の男性。2002年1月より拡張型心筋症と診断され、外来で加療を行っていた。クレアチニンキナーゼの高値が持続するため、2010年11月に神経内科へ紹介したが、本人が精査を希望せず、経過を見ることとなった。その後は近医へ通院していたが、2011年より心不全急性増悪を繰り返すようになった。本人の右上肢筋力低下に対する精査の希望があり、2012年2月20日当院神経内科に入院したが、息切れの

増悪と食欲低下があり、BNPも1411pg/dlと上昇したため、23日に心不全の急性増悪の診断で当科に転科となった。NYHA Ⅱ度、Swan-Ganzカテーテルでは肺動脈楔入圧27mmHgと上昇、心係数は1.6L/min/m<sup>2</sup>と著しい低下を認めた。また、左室駆出率(LVEF)は心臓超音波検査で22%と著しく低下していた。強心薬、利尿剤で開始を開始し、内服治療を加え、症状は軽快した。筋生検と心筋生検では、筋細胞内に脂肪滴の蓄積を認め、遺伝子検査ではATGL/triglyceride lipase 酵素の遺伝子PNPLA2 遺伝子に変異を認めたため、中性脂肪蓄積心筋血管症と診断した。現在はACE阻害薬、抗アルドステロン薬、遮断薬の心不全治療に加え、中鎖脂肪酸含有オイルによる食事療法を開始、経過を診ている。LVEFは25%といまだに低値であるが、BNP137pg/dlと心不全は軽快傾向を示している。右上肢のミオパチー症状も軽快している。

D. 考察

TGCVは細胞内中性脂肪(TG)を加水分解する酵素:ATGLの欠損により、心筋細胞内に中性脂肪が蓄積すること、また、エネルギーとして利用できないことから心筋障害を来することが知られている。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 の加水分解に關与する。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

Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M,

A novel mutation in PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: A case report and literature review.

Neuromuscl Disord. In press (2014).

##### 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

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  
開発に必須の ATGL 活性抑制する抗体作成のための抗原調製

研究分担者 高木敦子

独立行政法人 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 cardiomyovascularopathy: 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。臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、真に ATGL を測定していることを、ATGL 抗体によって活性が抑制されることで示すことが必須である。ATGL に対する抗体の作成に必要な抗原を以下のように調製した。COS1 細胞において発現された組換えヒト His6-ATGL 蛋白の発現条件および HisTrap カラムでの精製条件を検討し、蛋白の銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で精製することができた。

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。平成 24 年度の成果である COS1 細胞に導入した組換え His6-ATGL の生化学的性格付により確立された、ATGL 活性測定条件を基に、臨床検体の ATGL 活性測定系の開発を行う。測定された活性が真に ATGL 由来であることを確認するため、ATGL 活性を抑制する抗体の作成のための抗原調製を平成 25 年度の目的とした。

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。

プラスミドは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で導入された。His6-ATGL と His6-CGI-58 精製は可溶化細胞画分より HisTrap カラムクロマト法にて行った。リパーゼ活性は  $^3\text{H}$ -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。

B. 研究方法

組換えヒト ATGL cDNA とヒト CGI-58 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

(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、倫理面の問題は無いと判断した。動物を使用した実験は行っていない。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

臨床検体において ATGL 活性をトリオレインを基質として測定する場合、ATGL のリパーゼ活性以外にもリパーゼは存在すると考えられるので、真に ATGL を測定していることを、ATGL 抗体による活性抑制により示すことが必須である。

市販の ATGL 抗体は、ウエスタンブロットには使用できるが、ATGL のリパーゼ活性を抑制できないことがわかった。ATGL 活性を抑制することができる抗体を作成するため、抗原として使用する活性を保持した精製 ATGL を調製することを試みた。精製出発材料として、COS1 で発現された組換え His6-ATGL 蛋白を含む細胞可溶化液を用いた。HisTrap カラムのアプライ条件、カラム条件、溶出条件を検討し、活性のある状態で、蛋白銀染色法で、単一バンドにまで精製することができた。しかし、純度は高いが、微量しか精製 His6-ATGL が得られないので、COS1 細胞での His6-ATGL 発現の条件検討を行った。エレクトロポレーションキュベットあたり 20 ~ 40  $\mu\text{g}$  DNA 及び、2.5 日、4.5 日、6.5 日の条件を検討し、40  $\mu\text{g}$  DNA で、2.5 日の条件を使用することで、最も効率良く ATGL 活性を得ることができた。現在、抗原とする精製 ATGL 蛋白をこの方法で蓄積している途上である。

ATGL の活性促進因子として CGI-58 が知られている。ATGL 活性測定系に添加する必要性がある可能性があるため、同様の方法で、His6-CGI-58 蛋白の精製も行った。

### D. 考察

CGI-58 蛋白の真の ATGL 活性促進効果を調べる必要がある。予備的実験では、ATGL と CGI-58 が完全に単一でなかったため、持ち込みも考えられ、その促進効果は 2 倍程度であった。

今回、2 つの蛋白とも精製できたので、促進効果を調べ、ATGL 活性測定系の確実に役立てることができるようになった。

### E. 結論

今後、臨床検体を測定していくうえで、つねに、測定されたリパーゼ活性が真に ATGL に由来するものであることを確認するためには、ATGL 抗体の存在下と非存在下での活性を比較する必要がある。HisTrap カラムでの His6-ATGL 精製および発現条件を検討し、蛋白銀染色法で単一バンドまで、活性のある状態で、精製できた。

### 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

高木敦子、池田康行、小林邦久、平野賢一

脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (adipose triglyceride lipase; ATGL) の生化学的特徴について

第 86 回 日本生化学会大会 2013 年 9 月 11 日-13 日 パシフィコ横浜

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

中性脂肪蓄積心筋血管症に関する調査研究  
心血管病研究の為のモデル作成と治療について

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

副腎皮質ステロイドはグルココルチコイド受容体を介して心筋保護的に作用することが報告されているが、心血管病に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。そこで、マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。

A．研究目的

グルココルチコイドの作用は細胞種によって大きく異なる。グルココルチコイドが心筋細胞では、フォスホリパーゼ A2、シクロオキシゲナーゼ 2(COX2)の発現を誘導して、プロスタグランジンの産生を促進し、心筋保護に働いていることが報告されている。しかし、心血管病に対するステロイド治療の是非に関して見解は定まっていない。

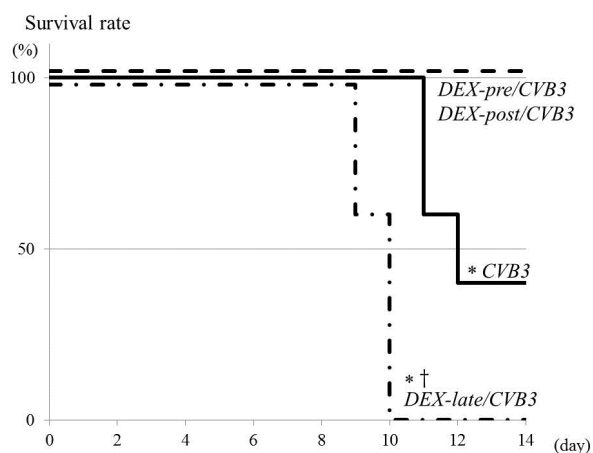
B．研究方法

マウスウイルス性心筋炎モデルを用いて dexamethasone の効果を詳細に検討した。3週令 A/Jマウスに coxsackievirus B3(CVB3)2 × 10<sup>4</sup> PFU を腹腔内投与し心筋炎を作成した。CVB3 のみを投与した群（CVB3 群）、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した後、6日目に CVB3 を投与した群（DEX-pre/CVB3 群）、CVB3 を投与した後、dexamethasone 0.15ml/日を5日間投与した群（DEX-post/CVB3 群）の3群を作成した。14日後にマウスの心筋を採取し、左室内径、壁

厚、ウイルス力価（TCID<sub>50</sub>）を測定し、それぞれ3群間を比較した。また COX-2 阻害実験として、NS-398 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を投与した群（NS-398/CVB3）、CVB3 のみを投与した群、NS-398 と CVB3 を接種し dexamethasone 連日投与した群（NS-398/DEX-pre/CVB3 & NS-398/DEX-post/CVB3）の生存分析を行った。

C．研究結果

CVB3 群は、左室内径の拡張と壁厚の減少、ウイルス力価の上昇を認めしたが、DEX-pre/CVB3、DEX-post/CVB3 群においてはその変化は有意に抑制されていた（図1）。NS-398 を用いた阻害実験ではウイルス接種と共に NS-398 を使用した群の方が全例とも超早期に死亡したが dexamethasone の早期投与により生存率を有意に改善した。



#### D . 考察

マウスウイルス性心筋炎において dexamethasone 早期投与はウイルス性心筋炎の治療に有効であり、その一因として COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。

#### E . 結論

心血管病に対するステロイドの新しい機序として、COX-2 が心筋保護的に作用している可能性が示唆された。さらに、この心筋保護効果は感染直後の急性期に限定（時間依存性）されることが確認された。

#### F . 健康危険情報

副腎皮質ステロイドのひとつであるグルココルチコイドは、大量かつ長期使用に伴いステロイド性糖尿病やミオパチーの有害事象が報告されており、これは中性脂肪蓄積心筋血管症の治療と拮抗する。そのため、使用に際しては投与量、使用する病態や期間、ならびに投与方法等を慎重に検討する必要がある。現段階におけるヒトでの研究には倫理的に問題があるため、動物実験で代替する（山口大学動物使用計画審査：23-S02）。

#### G . 研究発表

##### 1 ) 論文発表

Nakamura H, Kunitsugu I, Matsuzaki M,

Fukuda K, Sano M: Diverse stage-dependent effects of glucocorticoids in a murine model of viral myocarditis. *Journal of Cardiology* 61, 237-242, 2013.

Oda S, Fujii Y, Takemoto H, Nomura S, Nakayama H, Toyota Y, Nakamura H, Teragawa H: A Case of heart failure in which coronary spasm played an important role. *Internal Medicine* in press.

Kuno T, Nakamura H, Endo Y, Saito K, Yamazaki H, Motoda H, Numasawa Y, Shimizu K, Takahashi T. Clinical history and colliquative myocytolysis are keys to diagnosis of Shoshin beriberi. *Internal Medicine* submitting.

佐野元昭, 勝俣良紀, 伊藤秀之, 中村浩士: 心臓・腎臓疾患病態形成とプロスタグランジン. *血栓と循環* 21, 172-177, 2013.

##### 2 ) 学会発表

中村浩士、長谷川明洋、白井睦訓、矢野雅文: ウイルス性心筋炎における CD69 の役割についての検討. 第 35 回心筋生検研究会(東京 / 2013 年 11 月 1 日)

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

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)

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)

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)

ATGL 欠損マウスを用いた血管障害カフモデルの研究

研究分担者 山田壮亮 産業医科大学第二病理学 講師

研究要旨

ATGL 欠損による脂質代謝異常が動脈硬化を促進させるメカニズムを解明するために、ATGL 欠損マウスを用いて、血管障害モデルの一つであるカフモデルを施行した。ATGL 欠損による脂質（特に中性脂肪）代謝異常は、当モデルにおける外膜側よりの刺激を誘発している可能性が示唆された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(TGCV)は、中性脂肪が心筋細胞や冠状動脈、骨格筋などに蓄積し、重症心不全や冠動脈求心性狭窄、ミオパチー等を惹き起こす疾患である。現在までのところ、TGCV の原因遺伝子として、*adipose triglyceride lipase (ATGL)*が報告されている。ATGL knockout mouse、ヘテロ(ATGL<sup>+/-</sup>)及びホモ(ATGL<sup>-/-</sup>)を用いて、血管障害モデルを作製し、TGCV 発症のメカニズムの一端に触れたい。

B. 研究方法

右大腿動脈にカフを巻き付け留置し、10 日後にカフと共に動脈を採取した。外膜炎や低酸素刺激等を起因とした血管障害モデルの一つ、カフモデルを施行することで、内膜肥厚による求心性狭窄をイメージした。

(倫理面への配慮)

特に手術時において、動物の苦痛を和らげるため、イソフルラン吸入麻酔を施行した。

C. 研究結果

Wild type (C57BL/6J) では、内膜肥厚が軽微なのに対し、ATGL<sup>+/-</sup>と ATGL<sup>-/-</sup>では有意に進展しており、ATGL<sup>+/-</sup>>ATGL<sup>-/-</sup>>WT の順で、各群間

に有意差が認められた。また、WT と比較して ATGL<sup>-/-</sup>では、外膜マクロファージの集簇が有意に高度であった。

D. 考察

当カフモデルでは 'response to injury hypothesis' で最も重要な初期 event である、血管内皮障害が理論上、起き得ない。そこで、動脈硬化発症メカニズムにおける outside-in signaling の重要性が、我々に認識される。これは外膜における炎症細胞（マクロファージを含む）から産生される、TNF- $\alpha$  といった cytokine だけでなく、外膜に豊富に存在する脂肪細胞から産生される adipokine や cytokine も、その大きな一翼を担っていよう。特に後者は、ATGL 欠損による脂質代謝異常 (TGCV) と動脈硬化との関連性における研究において、重要な factor の一つになり得ることが、現在までの実験結果より示唆された。

E. 結論

ATGL 欠損による脂質代謝異常は、当モデルにおける外膜側よりの刺激を誘発している可能性があり、今後その signal 経路を模索すべきであろう。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

第 103 回日本病理学会総会（広島、2014 年）

第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会（東京、2014 年）

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



## ストレプトゾトシン誘発糖尿病マイクロミニピッグの開発

研究分担者 谷本昭英 国立大学法人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

### 研究要旨

**【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】**1頭のマイクロミニブタに STZを 250mg/kg BW投与し、1型糖尿病を作製する。STZ 投与直後より普通食による飼育を行った。STZ 投与食後のブドウ糖補充は行わない。

**【結果】**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。また、メカニズムは不明であるが、Insulin に対する反応性の低下も観察された。

**【考察】**今回の実験条件では、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。STZ 250mg/kg 投与でも著明な高血糖に加えて、持続的高トリグリセリド血症が観察された。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、普通食での飼育でよりヒトの病態に近いと考えられた。

**【結論】**マイクロミニブタに STZ 単回投与により、1型糖尿病と高トリグリセリド血症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、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とである。今年度は、STZ の濃度の変更、STZ 投与直後のブドウ糖補充の省略、普通食での飼育を行い、前年度の実験条件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。

食餌は STZ 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。

STZ 投与後4週と6週において、Insulin tolerance test (ITT)を行った。Insulin はそれぞれ、0.1 および 0.2 U/kg BW を頸静脈内投与し、投与前、投与後15分、30分、60分、90分および120分後に、血糖値を測定した。

### B. 研究方法

実験には9ヵ月齢の雄性マイクロミニブタ1頭を用いた。STZは濃度100 mg/mLで100 mL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250mg/kg BWとした。STZ 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

### C. 研究結果

STZ 投与後の2日目より、空腹時血糖値が約300~400mg/dL に上昇した。経口GTTにおいては、試験前の絶食によっても血糖値の十分な低下が見られず、ブドウ糖負荷後の血糖値の低下も遅く、グルコースクリアランスの遅延を認めた。ITTにおいては、0.1 および 0.2 U/kg BW のいずれの Insulin 濃度でも、血糖値の十分

な低下は見られず、Insulin 感受性の低下の存在が示唆された。血中の総コレステロールは約 100mg/dL と正常範囲であったが、トリグリセリドは約 400~700mg/dL であり、持続的な高値が見られた。

現在、飼育継続中 (STZ 投与後 16 週) で、体重が減少傾向にあるが (約 1 kg 減) 健康状態に問題はなく経過している。

#### D. 考察

STZ の投与条件が 250mg/kg BW でも十分に高血糖を誘導することができた。この間の健康状態は STZ 300mg/kg BW 投与の動物と比較してかなり良好であり、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た。

今回実験では、STZ 投与直後から普通で飼育したところ、高トリグリセリド血症が持続性に見られた。同様の高トリグリセリド血症は、前年度にも STZ 投与直後の普通食飼育期間に観察されたが、高脂肪食負荷によりトリグリセリドが低下したことは、興味深い現象であるが、メカニズムや意味は不明である。また、マウスにおいて同様の STZ 誘発性の糖尿病モデルを作成した際には、高トリグリセリド血症にはならない (personal communication) ことが言われており、この点は、マイクロミニブタのヒトの病態モデルを再現する実験動物としての優秀さを示している。

ITT の結果からは、Insulin 感受性の低下が疑われたが、これが持続的高トリグリセリド血症によるものか現在のところは不明であり、今後の検討課題のひとつである。

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、糖尿病誘導後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、普通食での飼育のほうが理想的であり、今年度の実験条件は、十分にこれに該当する結果と考察された。

#### E. 結論

マイクロミニブタに STZ 単回投与により、1 型

糖尿病と高トリグリセリド血症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。

現在も、高血糖および高トリグリセリド状態のブタを継続して飼育中であり、6 か月以上の飼育後に剖検に付し、生化学的、組織学的および MS imaging による心血管へのトリグリセリドの蓄積を検討する予定である。

#### F. 健康危険情報

該当せず

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

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

TGCV 患者に対する中鎖脂肪酸食事療法に関する研究

研究分担者 安井洋子

大阪市立大学大学院 生活科学研究科 食・健康科学専攻 准教授

研究要旨

遠隔地における中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV) 患者に食事療法を継続させることを目的とし介入方法を検討した。症例 2 例のうち、症例 1 は 40 歳代女性。要介護認定により介護施設、訪問ヘルパーを利用しての食事環境のため、保健師、ヘルパー責任者、介護に関する行政責任者による支援者と研究班によるチームを組み、情報共有を開始することで、中断していた食事療法を再開することができた。症例 2 は、60 歳代男性。研究グループから供与したタブレット型端末 (iPad) の利用によりコミュニケーションがとれ、中鎖脂肪酸含有食品の宅配提供の継続および、食事療法を継続することができた。その結果、右上肢の挙上範囲が広範囲へ改善した。

A. 研究目的

中鎖脂肪酸食事療法の TGCV 患者への効果を最終目的とする。この目的には食事療法の継続が必要となる。食事療法の継続は中鎖脂肪酸含有食品の入手、特殊な食品摂取のため自己啓発が必須であり、精神的サポートが必要となる。遠隔地においては近隣と比較し介入が困難な状況となるため、遠隔地への食事療法継続の介入方法について平成 25 年度の目的とする。

B. 研究方法

症例 1 (40 歳代女性) は、ADL 低下のため要介護認定により介護施設、訪問ヘルパーを利用しての食事環境である。そ

のため、保健師、ヘルパー責任者、介護に関する行政責任者による支援者と研究班によりチームを組み、メーリングリストを作成し情報を共有した。メーリングリストの管理は本研究班の事務局とした。メーリングリストを活用して、専属管理栄養士、調理師と支援者との情報交換会を遠隔地より実施。また症例と更なるコミュニケーションを図るため訪問面談や指導を複数回行った。

症例 2 は、家族による食支援があるため家族と電話による状況確認、iPad により本人とコミュニケーションをとりながら中鎖脂肪酸含有食品摂取状況の確認と食品補充を実施した。

(倫理面の配慮)

専門・専属の管理栄養士が食事療法について説明し患者の同意を得ている。食事療法介入時は患者の意見を尊重しつつ、受入れ状況や気持ちにも配慮し、介入継続としている。

#### C. 研究結果

症例1について：メーリングリストによる正確な情報が把握できるまでは食事療法を中断していた。結果3年前と比較し握力(右：15.5、左：15.9)、腸腰筋(右：4.2、左：4.2)、大腿四頭筋(右：3.2、左：4.3)、前脛骨筋(右：1.0、左：2.0)は低下を示した。その後、メーリングリストによる正確な情報を把握することで、施設での入浴、食事療法の啓発などより適切な介入方法を検討することが可能となった。症例本人から食事療法再開の意思表示があった。

症例2について：症例と研究者とのコミュニケーションツールであるiPadは顔が見えるため本人の身体状況が確認できた。また、支援する家族とコミュニケーションを取ることは、信頼関係を築き食事療法継続につなげている。結果、右上肢の挙上範囲が広がった。

#### D. 考察

遠隔地での家族以外の支援による食事療法の継続には、定期的に現状を正確に把握し情報共有することが必要とされる。そのため、近隣に情報共有できる支援者を募り、コミュニケーションを取ることが必須である。また、遠隔地への訪問は患者背景の環境を把握することができ、

近隣支援者との信頼関係を結ぶためにも意義のある行動と思われる。

今後、顔・身体状況、食事摂取量が正確に把握できるiPadやパソコン管理など更なる検討が必要と思われる。

#### E. 結論

遠隔地での家族以外の支援による食事療法の継続は、近隣の支援者を募り情報共有することで適切な介入ができた。また、家族による支援は患者のみならず家族とコミュニケーションをとることで食事療法の継続ができ、身体状況に好変化をもたらした。

#### 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

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（難治性疾患克服研究事業））  
分担研究報告書

iPS 細胞を用いた中性脂肪蓄積心筋血管症に関する研究

研究分担者 千葉俊明 琉球大学 細胞病理学 准教授  
研究代表者 平野賢一 大阪大学 循環器内科 助教

研究要旨：

中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV) 症例由来、皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を作成、NOD-SCID マウスに移植、奇形腫中の心筋細胞、血管平滑筋細胞の表現型を検討した。また、iPS 細胞移植 NOD-SCID マウスを糖尿病化し得るか否かについて検討した。

A. 研究目的

Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy (TGCV)は、心筋細胞、血管平滑筋細胞に中性脂肪が蓄積する結果、重症心血管を呈する難病である。本研究は、TGCV 症例由来 iPS 細胞を用いた TGCV の病態解明を目的とする。

B. 研究方法

TGCV 症例 1 例 (Hirano K, et al. N Engl J Med. 2008) の皮膚線維芽細胞より、iPS 細胞を作成、NOD-SCID マウスに移植、形成される奇形腫を病理学的に解析した。また、糖尿病に続発する TGCV 病態解明のため、NOD-SCID マウスの糖尿病化が可能か否かについて検討した。

C. 研究結果

1 .TGCV 症例由来奇形腫中の心筋細胞及び血管平滑筋細胞に、中性脂肪の蓄積を観察した。

2 . 奇形腫移植後の NOD-SICD マウスは、ストレプトゾシンを用いることにより、既報 (Kim et al. PLoS ONE 7: e41105, 2012) の如く、糖尿病化しえた。

D. 考察

これまでのところ明らかな TGCV の原因は、細胞内 TG 分解の必須酵素である Adipose

triglyceride lipase (ATGL)の遺伝的欠損である。当研究班では、これまで 8 例の ATGL 欠損症を把握している。その一例より、皮膚線維芽細胞を得て (Hirano K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 443: 574-579, 2014) 、iPS 細胞を作成した。その *in vitro*, *in vivo* における分化には、大きな異常は認められなかった。分化の早期の段階から奇形腫中の心筋細胞、血管平滑筋細胞には、TG 蓄積が観察しえた。最近、心症状、ミオパチー症状を未だ呈していない若年例でも、MR spectrometry などで詳細を検討すると心臓、骨格筋に TG 蓄積が観察、報告されている。以上から本症においては、ATGL 遺伝子欠損により、若年時から潜在的に TG 蓄積が発症、進行していると考えられ、本症における早期診断、治療の必要性が示唆される。

E. 結論

iPS 細胞は、TGCV の病態解明に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  
なし
2. 学会発表

第2回中性脂肪蓄積心血管症 (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

H. 知的財産権の出願・登録状況

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に対する中鎖脂肪酸を含有する医薬品開発のプランニング

研究分担者 田嶋祥子 興和株式会社 製品戦略部

研究分担者 橋本 彰 興和株式会社 製品戦略部

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、医薬品医療機器総合機構(PMDA)にて事前面談を実施し、予備毒性試験、GLP毒性試験、GMP製造に向けた計画を作成した。

A. 研究目的

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、医薬品医療機器総合機構(PMDA)にて事前面談を実施し、今後、追加実施する予備毒性試験（げっ歯類）及びGLP毒性試験（げっ歯類、非げっ歯類）、治験薬GMP製造に向けた計画を作成する。

また、その過程において各機関との試験計画の作成、GLP試験実施施設及びGMP製造施設の選定を行う。

B. 研究方法

医薬品医療機器総合機構(PMDA)にて事前面談を実施し、事前面談の結果をもとに、今後実施する各種試験、製造に関してプランニングを行った。

また、研究機関、製造機関との研究会議において会議記録の作成、情報の共有を行い、試験体制を整えた。

（倫理面の配慮）

審査委員会の承認を受け、規定に従い研究を実施した。

C. 研究結果

予備毒性試験（げっ歯類）及びGLP毒性試験（げっ歯類、非げっ歯類）、治験薬GMP製造の計画を作成した。

また、試験実施機関の選定を行い、必要経費について算出を行った。

D. 考察

GLP毒性試験において実施可能な体制が整っており、予備毒性試験が終了後、結果をみて実施する。

GMP製造に関しては製造技術の技術移転に関して検討する必要がある。

E. 結論

次年度においてGLP毒性試験が終了し、PMDAにおいて対面助言を行う事が可能である。

また、GMP 製造の技術移転に関して製造機  
関との調整を行う。

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



研究成果の刊行に関する一覧表

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
Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, Kobayashi K, Nakamura H, Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, Hui SP, Toda T, Kuroda H, Chiba H, Hirano K	Peripheral leucocytes' anomaly detected with routine automated hematology analyzer sensitive to adipose triglyceride lipase deficiency manifesting neutral lipid storage disease with myopathy/triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Mol Genet Metab Rep.	in press		2014
Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, Sugimura K, Sakata Y, Ikeda Y, Hirano K, Aoki M	A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Neuromuscul Disord	in press		2014
Yamaguchi S, Zhang B, Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, Yamada S, Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, Hirano K	Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by an in situ perfusion technique	J Lipid Res.	55(5)	905-918	2014
Shimizu K, Ogura H, Wasa M, Hirose T, Shimazu T, Nagasaka H, Hirano K	Refractory hypoglycemia and subsequent cardiogenic shock in starvation and refeeding: report of three cases	Nutrition.	in press		2014
Hara Y, Kawasaki N, Hirano K, Hashimoto Y, Adachi J, Watanabe S, Tomonaga T	Quantitative proteomic analysis of cultured skin fibroblast cells derived from patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Orphanet J Rare Dis.	8(1)	197	2013
Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Kobayashi K, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M	Genetic mutations in the adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor-gamma in patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Biochem Biophys Res Commun.	443(2)	574-579	2014
Ikeda Y, Hirano K (equal contribution), Fukushima N, Sawa Y	A novel type of human spontaneous coronary atherosclerosis with triglyceride deposition	Eur Heart J.	35(13)	875	2014

Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R	Down regulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice	Biochem Biophys Res Commun.	438(1)	224-229	2013
Lin Y, Chiba S, Suzuki A, Yamaguchi S, Nakanishi T, Matsumoto H, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Hirano K, Kato S	Vascular smooth muscle cells isolated from adipose triglyceride lipase-deficient mice exhibit distinct phenotype and phenotypic plasticity	Biochem Biophys Res Commun.	434(3)	534-540	2013
Nakamura K, Hirano K, Wu SM	iPS Cell Modeling of Cardiometabolic Diseases	J Cardiovasc Trans Res.	6(1)	46-53	2013
Fukuda T, Matuda H, Doi S, Sugiyama M, Morita Y, Yamada M, Yokoyama H, Minatoya K, Kobayashi J, Naito H.	Evaluation of automated 2D-3D image overlay system utilizing subtraction of bone narrow image for EVAR: feasibility study.	European Journal of Vascular and Endovascular Surgery	46(1)	75-81	2013
Kono AK, Higashi M, Morisaki H, Morisaki T, Naito H, Sugimura K.	Prevalence of dural ectasia in Loeys-Dietz syndrome: comparison with Marfan syndrome and normal controls.	PloS One	8(9)	e75264	2013
Hashimura H, Kiso K, Yamada N, Kono A, Morita Y, Fukushima K, Higashi M, Noguchi T, Ishibashi-Ueda H, Naito H, Sugimura K.	Myocardial impairment detected by late gadolinium enhancement in hypertrophic cardiomyopathy: comparison with 99mTc-MIBI/tetrofosmin and 123I-BMIPP SPECT.	Kobe J Med Sci.	59(3)	E81-92	2013
Inoue T, Kobayashi K, Inoguchi T, Sonoda N, Maeda Y, Hirata E, Fujimura Y, Miura D, Hirano K, Takayanagi R.	Downregulation of adipose triglyceride lipase in the heart aggravates diabetic cardiomyopathy in db/db mice.	Biochem Biophys Res Commun.	438(1)	224-229	2013
橋本 守、Harsono Cahyadi、新岡 宏彦、荒木 勉	高速広帯域波長走査レーザーを光源とした多焦点CARS顕微鏡	光アライアンス	25(3)	16-20	2014
Fujii K, Hao H, Imanaka T, Kawano T, Takayama T, Hirayama A, Yamada T, Ishibashi-Ueda H, Hirota S, Masuyama T	In-stent Thin-cap Fibroatheroma After Drug-eluting Stent Implantation: Ex Vivo Evaluation of Optical Coherence Tomography and Intracoronary Angioscopy	JACC Cardiovasc Interv.	7(4)	446-447	2014

Hao H, Fujii K, et al	Different Findings in a Calcified Nodule between Histology and Intravascular Imaging Such as Intravascular Ultrasound, Optical Coherence Tomography and Coronary Angioscopy	JACC Cardiovasc Interv.	in press		2014
Zhang B, Kawachi E, Matsunaga A, Imaizumi S, Noda K, Uehara Y, Miura S, Yoshinaga K, Kuroki M, Saku K	Reactivity of direct assays for low-density lipoprotein (LDL) cholesterol toward charge-modified LDL in hypercholesterolemia	Circ J	76(9)	2241-2248	2012
Noda K, Zhang B, Iwata A, Nishikawa H, Ogawa M, Nomiya T, Miura S, Sako H, Matsuo K, Yahiro E, Yanase T, Saku K, Investigators SS	Lifestyle changes through the use of delivered meals and dietary counseling in a single-blind study. The STYLIST study	Circ J	76(6)	1335-1344	2012
Morii J, Miura S, Shiga Y, Sugihara M, Arimura T, Sako H, Zhang B, Uehara Y, Saku K	Comparison of the efficacy and safety of irbesartan and olmesartan in patients with hypertension (EARTH study)	Clin Exp Hypertens	34(5)	342-349	2012
Saku K, Zhang B, Noda K, Tsukahara H	The cutting-edge of medicine; smoking and coronary artery disease	Nihon Naika Gakkai Zasshi	101(3)	779-786	2012
Saku K, Noda K, Zhang B, Yanase T	Series: Clinical study from Japan and its reflections: lifestyle changes through the use of delivered meals and dietary counseling in a single-blind study--the STYLIST study--	Nihon Naika Gakkai Zasshi	101(7)	2096-2102	2012
Ike A, Shirai K, Nishikawa H, Zhang B, Kawamura A, Iwata A, Mori K, Ogawa M, Miura S, Noda K, Saku K	Series: clinical study from Japan and its reflections; impact of glycemic control on the clinical outcome in diabetic patients with percutaneous coronary intervention:--from the FU-registry--	Nihon Naika Gakkai Zasshi	101(2)	504-511	2012
Zhang B, Kawachi E, Miura S, Uehara Y, Matsunaga A, Kuroki M, Saku K	Therapeutic approaches to the regulation of metabolism of high-density lipoprotein. Novel HDL-directed pharmacological intervention and exercise	Circ J	77(11)	2651-2663	2013
Uehara Y, Ando S, Yahiro E, Oniki K, Ayaori M, Abe S, Kawachi E, Zhang B, Shioi S, Tanigawa H, Imaizumi S, Miura S, Saku K	FAMP, a novel apoA-I mimetic peptide, suppresses aortic plaque formation through promotion of biological HDL function in ApoE-deficient mice	J Am Heart Assoc	2(3)	e000048	2013

Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Zhang B, Hirose S	Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy	Brain Dev	in press		2013
Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S	A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells	Mol Brain	6	19	2013
Noda K, Takahira M, Zhang B, Saku K	Series: Clinical study from Japan and its reflections; introduction of a randomized, double-blind, controlled, comparative trial of formula food in visceral fat obesity: FLAVO study	Nihon Naika Gakkai Zasshi	102(8)	2087-2092	2013
Hirano K, Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, Zaima N, Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, Toda T, Fukushima N, Ishibashi-Ueda H, Tavian D, Nagasaka H, Hui SP, Chiba H, Sawa Y, Hori M	Genetic Mutations in Adipose Triglyceride Lipase and Myocardial Up-regulation of Peroxisome Proliferated Activated Receptor- in Patients with Triglyceride Deposit Cardiomyovascuopathy	Biochem. Biophys. Res. Commun.	443(2)	574-579	2013
中村浩士	野本論文に対する Editorial Comment	心臓	in press		2014
中村浩士	膠原病における心血管合併症	月刊循環器 CIRCULATION	in press		2014
Oda S, Fujii Y, Takemoto H, Nomura S, Nakayama H, Toyota Y, Nakamura H, Teragawa H	Heart failure in which coronary spasms played an important role.	Intern Med.	53(3)	227-232	2014
佐野元昭、勝俣良紀、伊藤秀之、中村浩士	心臓・腎臓疾患病態形成とプロスタグランジン	血栓と循環	21	172-177	2013
中村浩士	中島論文に対する Editorial Comment	心臓	43	161-162	2013
Nakamura H, Kunitsugu I, Matsuzaki M, Fukuda K, Sano M	Diverse stage-dependent effects of glucocorticoids in a murine model of viral myocarditis.	Journal of Cardiology	61(3)	237-242	2013

<p>"Otsuka H, Arimura T, Abe T, Kawai H, Aizawa Y, Kubo T, Kitaoka H, Nakamura H, Nakamura K, Okamoto H, Ichida F, Ayusawa M, Nunota S, Isobe M, Matsuzaki M, Doi YL, Fukuda K, Sasaoka T, Izumi T, Ashizawa N, Kimura A</p>	<p>Prevalence and distribution of sarcomeric gene mutations in Japanese patients with familial hypertrophic cardiomyopathy</p>	<p>Circulation Journal</p>	<p>76(2)</p>	<p>453-461</p>	<p>2012</p>
<p>杉山英太郎、竹中孝、加藤瑞季、簗島暁帆、武藤晴達、乗安和将、藤田雅章、佐藤実、別役徹生、井上仁貴、寺西純一、岡本洋、菊地健、植村一仁、中村浩士、長谷部直幸</p>	<p>完全房室ブロックで発症し、腹腔鏡下肝生検にて確定診断しえた、サルコイドーシスの1例</p>	<p>日本サルコイドーシス/肉芽腫性疾患学会雑誌</p>	<p>32</p>	<p>119-126</p>	<p>2012</p>