

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）

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 26 年度総括・分担研究報告書

研究代表者 平野賢一

平成 27 年 (2015 年) 3 月

目 次

- . 平成 26 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 . 青江 秀史
創薬プロセスとビジネスプランにおける知的財産
 - 2 . 稲葉 亨
中性脂肪蓄積心筋血管症のスクリーニングに有用な検査法の開発
 - 3 . 植田 初江
中性脂肪蓄積心筋血管症における CD36 の発現に関する検討
 - 4 . 江副 幸子
診断基準の策定～好中球空胞による評価～
 - 5 . 加藤 良仁
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
 - 6 . 恵 淑萍
毒性試験に備えたカプリン酸定量法の技術移転及び健常人における
カプリン酸濃度の検討
 - 7 . 小澤 純二
症例探索 - 2 型糖尿病患者における TGCV 合併例-
 - 8 . 小谷 順一
中性脂肪蓄積心筋血管症における形態学的異常の評価法の確立
-とくに冠動脈疾患の進展について-
 - 9 . 小林 邦久
糖尿病患者の心臓拡張機能に影響を与える因子の検討
 - 10 . 財満 信宏
剖検組織を用いた続発性 TGCV の探索

- 1 1 . 杉村 宏一郎
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
- 1 2 . 瀬川 波子
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
- 1 3 . 高木 敦子
脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ(Adipose triglyceride lipase: ATGL)
活性測定系の開発のための ATGL 活性抑制抗体の作成
- 1 4 . 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の開発
- 1 5 . 谷本 昭英
糖尿病マイクロミニピッグの開発
- 1 6 . 内藤 博昭
TGCV 診断基準の作成 定量的冠動脈 CTA 法の TGCV 例への応用
- 1 7 . 長澤 康行
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
- 1 8 . 中村 浩士
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
- 1 9 . 羽尾 裕之
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
- 2 0 . 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
- 2 1 . 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
- 2 2 . 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
MCFA 食の継続の必要性和介入方法について検討
- 2 3 . 安野 哲彦
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
- 2 4 . 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

. 研究成果の刊行に関する一覧表

[]

平成 26 年度研究班名簿

平成 26 年度 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班

区 分	氏 名	所 属 等	職 名
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	青江 秀史	大阪大学 知的財産センター	センター長
	稲葉 亨	京都府立医科大学 感染制御・検査医学教室	講師
	植田 初江	国立循環器病研究センター病院 病理部	部長
	江副 幸子	大阪大学医学部附属病院 未来医療センター	講師
	加藤 良仁	興和創薬株式会社 学術部 大阪学術課	課長
	恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院 病態解析学分野	教授
	小澤 純二	大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学	助教
	小谷 順一	大阪大学大学院医学系研究科 内科学講座 循環器内科学	特任講師
	小林 邦久	福岡大学筑柴病院 内分泌・糖尿病内科	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	東北大学大学院医学系研究科 循環器内科学	助教
	瀬川 波子	福岡大学医学部医学科 生化学	准教授
	高木 敦子	国立循環器病研究センター研究所 分子薬理部 構造機能研究室	室長
	田嶋 祥子	興和株式会社 医薬事業部 製品戦略部	
	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	教授
	内藤 博昭	国立循環器病研究センター病院	病院長
	長澤 康行	兵庫医科大学 内科学 腎・透析科	講師
	中村 浩士	山口大学医学部 地域医療推進学講座	准教授
	羽尾 裕之	兵庫医科大学病院 病院病理部	准教授
	橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科 機能創成専攻 生体工学領域	准教授
間賀田 泰寛	浜松医科大学 メディカルフォトリクス研究センター	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	
安野 哲彦	福岡大学医学部 腎臓・膠原病内科	助教	
山田 壮亮	産業医科大学 第 2 病理学	講師	
研究協力者	青山 敏明	日清オイリオグループ株式会社	執行役員
	池田 善彦	国立循環器病研究センター病院 病理部	医長
	石田 良雄	市立貝塚病院	副院長
	恩田 弘明	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
	川口 克廣	小牧市民病院 循環器内科	副院長
	川口 博明	鹿児島大学共同獣医学部獣医学科 病態予防獣医学講座	准教授
	黒田 宙	東北大学大学院医学系研究科 神経内科学分野	助教
	小林 俊秀	理化学研究所 小林脂質生物学研究室	主任研究員
	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	特任研究員
	須見 友子	近畿大学農学部応用生命化学科 応用細胞生物学研究室	修士 2 年生
	千葉 仁志	北海道大学大学院保健科学研究院 健康科学分野	教授
	土井 健史	大阪大学大学院薬学研究科 創成薬学専攻	教授
	中谷 大作	大阪大学医学部附属病院 未来医療開発部 未来医療センター	特任准教授
	中村 歩	大阪大学医学部附属病院 薬剤部	薬剤主任
	長坂 博範	宝塚市立病院 小児科	部長
	原 康洋	医薬基盤研究所 プロテオームリサーチセンター	特任研究員
	藤井 健一	兵庫医科大学 内科学 循環器内科	講師
	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	特任研究員
	山本 彩実	近畿大学農学部 応用生命化学科 応用細胞生物学研究室	研究支援者
	ジュリアン	北海道大学大学院保健科学研究院 健康科学分野	特任助教
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附講座	医員	
和田 崇男	大阪大学医学部附属病院 栄養マネジメント部 栄養管理室	調理長	
事務局	石川 麻央 矢部 淑恵	大阪大学パ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 丁目 2 番 3 号 T E L 06-6872-8215 F A X 06-6872-8215 e-mail lab@cnt-osaka.com	事務補佐員
経理事務担当者	垣淵 康之	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

[]

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))
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

研究代表者らにより提唱された新規疾患概念である中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)(Hirano K, et al. N Engl J Med, 2008)に対して「中鎖脂肪酸含有医薬品(治験薬コード CNT-01)の開発」が本研究の目的である。非臨床段階(ステップ1)の3年目にあたる本年度は、医薬品医療機器総合機構(PMDA)による対面助言を基に、GLP 基準下での毒性試験、安全性薬理試験などを実施し、CNT-01 の安全性を評価した。代表研究者所属機関附属病院薬剤部に製造設備を構築し、GMP 基準下での治験原薬製造を行った。また、これまで6年間の研究班の成果をまとめ、TGCV の診断のてびき(初版)を作成、公開した。First-in-human 試験として、特発性 TGCV を対象とする第 I/IIa 相試験を実施するため、その治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書を作成、所属研究機関附属病院において、利益相反委員会、治験審査委員会での承認を経て、治験届を提出、臨床段階(ステップ2)に入った。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

青江 秀史	大阪大学知的財産センター センター長
稲葉 亨	京都府立医科大学感染制御・検査医学教室 講師
植田 初江	国立循環器病研究センター病院病理部 部長
江副 幸子	大阪大学医学部附属病院未来医療センター 講師
加藤 良仁	興和創薬株式会社学術部大阪学術課 課長
恵 淑萍	北海道大学大学院保健科学研究院病態解析学分野 教授
小澤 純二	大阪大学大学院医学系研究科内分泌・代謝内科学 助教
小谷 順一	大阪大学大学院医学系研究科内科学講座 循環器内科学 特任講師
小林 邦久	福岡大学筑紫病院内分泌・糖尿病内科 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	東北大学大学院医学系研究科循環器内科学 助教
瀬川 波子	福岡大学医学部医学科生化学 准教授
高木 敦子	国立循環器病研究センター研究所分子薬理部構造機能研究室 室長

田嶋 祥子	興和株式会社医薬事業部製品戦略部
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 教授
内藤 博昭	国立循環器病研究センター病院 病院長
長澤 康行	兵庫医科大学内科学腎・透析科 講師
中村 浩士	山口大学医学部地域医療推進学講座 准教授
羽尾 裕之	兵庫医科大学病院病理部 准教授
橋本 守	大阪大学大学院基礎工学研究科機能創成専攻生体工学領域 准教授
間賀田 泰寛	浜松医科大学メディカルフォトリクス研究センター 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
安野 哲彦	福岡大学医学部腎臓・膠原病内科 助教
山田 壮亮	産業医科大学第2病理学 講師

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症(Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy, TGCV)は、心筋および冠状動脈に中性脂肪(以下、TG)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 adipose triglyceride lipase (ATGL)の遺伝的欠損が知られており、その病態形成として心筋細胞内TG含量の増加が関与しているものと考えられている。また、本研究班による剖検心の解析から遺伝的原因が未だ明らかでない特発性TGCVも存在する。本研究の目的は、TGCVに対する中鎖脂肪酸を主成分とする医薬品(治験薬コードCNT-01)を開発することである。

B. 研究方法

1) GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験の実施

ラット、イヌの血漿中濃度測定法バリデーション、ラットおよびイヌ4週間反復投与毒性試験、無麻酔イヌに対する心血管に及ぼす影響、ラットに対する呼吸系、神経系に対する影響、hERG試験、ラット小核試験、復帰突然変異試験、ほ乳類細胞における染色体異常試験、ラット経口投与後の吸収分布排泄試験、ラット胚胎児発生試験、原薬の品質試験など、非臨床試験を順次実施する(加藤、田嶋)

2) 医師主導治験の実施計画書等の作成、治験審査委員会(IRB)への申請、治験届提出

上記GLP基準下の各種試験成績やPMDAによる対面助言による指示のもと、治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書などを作成し、所属研究機関附属病院において、利益相反委員会、IRBでの承認を経て、治験届を提出する(平野、加藤、田嶋)

3) GMP 基準下での治験原薬製造技術移転

GMP 基準下での治験原薬製造は大阪大学医学部附属病院薬剤部にて行うこととし、製造技術を薬剤部内 GMP 製造施設に技術移転したのち、治験薬原薬製造システムを立ち上げる(平野)

4) 治験原薬 GMP 製造

大阪大学医学部附属病院薬剤部において、GMP 基準下治験原薬の予備製造を行う。(平野)

5) 診断基準の作成、公開

原発性 TGCV のスクリーニングに有用と思われる末梢血を用いた簡便な検査法の開発を目指す(稲葉、江副)。冠動脈血管内イメージング検査法や心臓シンチグラム検査(BMIPP)を用いた TGCV の新しい評価方法を開発する(小谷、小林、内藤、羽尾、間賀田)。これら画像診断による検討と同時に病理学的、生理学な検討も行い(植田、小林、財満)。臨床的意義について検討する。これらの研究成果を反映した「TGCV 診断基準(初版)」を策定し公開する(平野、小林、中村、長澤)。

6) 末梢血多核白血球の細胞内リパーゼ活性測定系の開発

TGCV の診断及び、治験の際の評価項目の一つとするため、末梢血多核白血球を用いたリパーゼ活性測定系を開発する(高木)。

7) CNT-01 の体内動態、薬効薬理試験
放射性標識脂肪酸誘導体を用いた薬物動態、CNT-01 を用いて野生型マウス、ATGLKO マウスへの薬効薬理について検討する(間賀田、瀬川、平野)

8) 健常人における中鎖脂肪酸濃度の検討

研究協力者 大分大学 臨床薬理センター
今井浩光先生らとともに、健常人における中鎖脂肪酸濃度を検討する(恵)。

9) TGCV 国際登録システムの活用促進
研究班では、昨年度から TGCV および中性脂肪蓄積症(Neutral lipid storage disease, NLSLD)の国際的な症例登録システムを構築し、その運用を開始している。今年度はその利用を促進することを目的として、第3回 TGCV/NLSLD 国際シンポジウムを開催し、各国の研究者との情報共有を行う。(平野)

10) 本研究班における知的財産の整備を行う(青江)。

(倫理面への配慮)

本研究に関与するすべての者は、「世界医師会ヘルシンキ宣言(2008年ソウル修正版)」および「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) GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験の実施

CNT-01 の血中での有効成分であるカプリン酸の血中濃度測定技術を、測定受託

業者に技術移転した。これにより毒性試験における血中濃度の定量が可能となり薬物動態の評価が可能となった(恵)。続いて、治験実施に向けて必要な各種非臨床 GLP 試験を実施し、高用量(無毒性量 1,000mg/kg 以上)でも CNT-01 の安全性が確認しえた(加藤、田嶋)。

2) 医師主導治験の実施計画書等の作成、IRB への申請、治験届提出
PMDA による対面助言に基づいて、First-in-human 試験として特発性 TGCV を対象とする第 I/IIa 相試験を計画し、その治験実施計画書、患者同意説明文書、治験薬概要書などを作成した。所属研究機関附属病院における利益相反委員会、治験審査委員会 (IRB) での承認を経て治験届を提出し、PMDA からの照会事項にも対応した(平野、加藤、田嶋)。

3) GMP 基準下での治験原薬製造技術移転、製造設備の立ち上げ
GMP 基準下での治験原薬製造は大阪大学医学部附属病院薬剤部にて行うこととし、製造技術を薬剤部内 GMP 製造施設に技術移転したのち、治験薬原薬製造システムを構築した(平野)。

4) 治験原薬 GMP 製造
大阪大学医学部附属病院薬剤部において、GMP 基準下治験原薬の予備製造を行った。当初の計画通りの製造を行うことができたことにより、治験薬原薬製造システムの性能を確認した。(平野)

5) 診断基準の作成、公開

TGCV 症例に認められる多核白血球の空胞化に着目して、末梢血塗抹標本を詳細に観察、自動血液分析装置での本症のスクリーニング検査法の開発に向け、検討を重ねている。(稲葉、江副)。冠動脈イメージング検査法(定量的冠動脈 CTA 法(NCVC システム)等)や心臓シンチグラム検査(BMIPP)が、TGCV の診断基準の一項目になりうるか検討を重ねた。(小谷、小林、内藤、羽尾、間賀田)。また、剖検組織を用いた病理学的検討(植田、財満)も行い、臨床的意義について検討した。これまでの6年間の厚労省難病 TGCV 研究班の研究成果をまとめ「TGCV 診断基準(初版)」を策定し、平成 27 年 3 月 14 日に公開した(平野、小林、中村、長澤)。

6) TGCV 国際登録システムの活用促進
研究班では、昨年度から TGCV および中性脂肪蓄積症(Neutral lipid storage disease, NLSD)の国際的な症例登録システムを構築し、その運用を開始している。今年度はその利用を促進することを目的として、国内外の専門家、研究者の参加を得て第 3 回 TGCV/NLSD 国際シンポジウムを開催した。各国の研究者との情報の共有化を行い、国内治験ののちのグローバル治験実施の基礎を構築した。また、症例登録システムの利用推進もなされ、海外の症例登録数を増加させることに成功した。(平野)

7) 健常人における中鎖脂肪酸濃度の検討

研究協力者 大分大学 臨床薬理センター
今井浩光先生らとともに、健常人 100 名の、血中、中鎖脂肪酸の濃度を測定した。わが国の健常人ボランティアでは、約半数が検出感度以下であった(恵)。

8) TGCV モデル動物の開発とそれらを用いた薬効薬理試験(山田、谷本)

TGCV で生じる冠動脈求心性狭窄のメカニズムは明らかになっておらず、原発性 TGCV モデル動物である ATGL KO マウスにおいて通常では血管病変は認めないが、我々は動脈壁の外膜側からカフ刺激を加えることにより、TG 蓄積動脈硬化マウスモデルを作成することに成功している。このモデル動物を使い、CNT-01 投与において血管病変に与える影響を検討したところ、ATGL 欠損による脂質代謝異常が血管外膜側からの刺激を誘発している可能性を見出した。

また、昨年度から引き続き、マイクロミニプタ(MMP)を用いた特発性 TGCV モデル動物の開発を行っている。(谷本)
ストレプトゾシン(STZ)を用いて MMP を糖尿病化することに成功しており、今後は CNT-01 投与による心血管系への中性脂肪蓄積に対する影響を検討していく。

9) 細胞内カプリン酸の動態評価とメタボローム解析

ATGL 欠損症由来皮膚線維芽細胞を用いて、非線形ラマン散乱顕微鏡により、重水素標識した中鎖脂肪酸の細胞内動態の観察、中鎖脂肪酸添加が及ぼす細胞内脂

質動態の変化を検討したところ、脂肪酸鎖長による代謝経路の違いがあることを示唆する結果を得た(橋本)。

10) 末梢血多核白血球の細胞内リパーゼ活性測定系の開発

ATGL 活性やタンパク量を特異的に測定できる系の確立を目指している。今年度は、ATGL に対する中和抗体の作成を行った(高木)。

11) 放射性標識脂肪酸誘導体を用いた薬物動態試験

放射性同位体で標識した C11 標識カプリン酸、C11 標識カプリン酸 TG を用い、マウスにおける吸収・代謝・分布・排泄について検討した。C11 標識カプリン酸は投与初期に心筋に高く取り込まれることが示された(間賀田)。

12) CNT-01 を用いた薬効薬理試験(非 GLP)

野生型マウス小腸由来リポ蛋白に与える影響について検討、アポ B 含有リポ蛋白の産生低下が明らかになった(瀬川)。
ATGL KO マウスの寿命と CNT-01 の投与量との間に、線形性が確認しえた(平野)。

13) 中鎖脂肪酸食事療法継続中の

TGCV 症例の継続的評価、栄養指導
在宅で中鎖脂肪酸食事療法継続中の TGCV の 2 症例を対象とし、在宅での食事療法の効果とその問題点について検討した(杉村、安井)。

14) TGCV 類縁疾患症例の解析
大阪及び九州において、類縁疾患と考えられる症例を見出した(小澤、安野)。

15) 本研究班における知的財産の整備
本研究の過程で生じる様々な知的財産の整備について検討した(青江)。

D. 考察

中鎖脂肪酸含有医薬品を開発し治験開始を目指している本研究は、本年度が非臨床段階(ステップ1)の3年目にあたる。必要な非臨床試験は全て実施され、問題はなかった。研究は順調に進み、First-in-human 試験の治験届を提出して、臨床段階(ステップ2)に入ることができた。これと同時に、糖尿病性 MMP の開発(谷本)や ATGL 欠損マウスを用いた血管障害カフモデルの開発(山田)といった動物モデルを用いた基礎的研究も引き続き行い、CNT-01 の作用メカニズムを詳細に明らかにしたいと考えている。

E. 結論

TGCV に対する診断法の確立のため様々な新規検査法の開発を進め、この結果を盛り込んだ「TGCV 診断基準(初版)」を策定し、平成 27 年 3 月 14 日、「TGCV 診断の手引き」を公開した。「中鎖脂肪酸含有医薬品(治験薬コード CNT-01)の開発」は順調に進捗した。必要な GLP 基準下の毒性試験および安全性薬理試験を実施したのち、医師主導治験の実施計画書等を作成して IRB へ申請し、治験実施が承認された。GMP 基準下での治験原薬の製造システムの構築も終了し、治験原

薬の予備製造も問題なく完了した。治験実施に向けて準備を進めている。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirano K, Ikeda Y, Sugimura K, Sakata Y Cardiomyocyte steatosis and defective washout of iodine-123-b-methyl iodophenyl-pentadecanoic acid in genetic deficiency of adiposetriglyceride lipase
Eur Heart J 36: 580 2015

Higashi M, Hirano K (equal contribution), Kobayashi K, Ikeda Y, Issiki A, Otsuka T, Suzuki A, Yamaguchi S, Zaima N, Hamada S, Hanada H, Suzuki C, Nakamura H, Nagasaka H, Miyata T, Miyamoto Y, Kobayashi K, Naito H, Toda T. Distinct cardiac phenotype between two homozygotes born in a village with accumulation of a genetic deficiency of adipose triglyceride lipase. Int J Cardiol. 192: 30-32, 2015.

Shrestha R, Hui SP, Imai H, Hashimoto S, Uemura N, Takeda S, Fuda H, Suzuki A, Yamaguchi S, Hirano K, Chiba H
Plasma capric acid concentrations in healthy subjects determined by UV-labeled HPLC. Ann Clin Biochem. 2015 Jan 13. pii: 0004563215569081.

Ikeda Y, Zaima N, Hirano K, Mano M, Kobayashi K, Yamada S, Yamaguchi S, Suzuki A, Kanzaki H, Hamasaki T, Kotani J, Kato S, Nagasaka H, Setou M, Ishibashi-Ueda H

Coronary triglyceride deposition in contemporary advanced diabetics
Pathol Int 64(7) 325-335 2014

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. 1 249-253 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 24 634-641 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. 30(9) 1090-1092 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.

2. 学会発表

・平野賢一

「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」
第 36 回心筋生検研究会・2014/11/28・29
ウイックあいち(愛知県産業労働センタ
ー)

・鈴木朗、和田淳、長坂博範、越智康浩、
千葉仁志、恵淑萍、平野賢一
「中性脂肪蓄積心筋血管症における
Jordans' anomaly を自動血球分析装置で
検出する」

・和田淳、鈴木朗、山本志緒里、越智康
浩、恵淑萍、千葉仁志、平野賢一
「他項目自動血球分析装置
XE-5000 WBC/BASO チャンネルによる、
中性脂肪蓄積心筋血管症判別原理の検
証」

・恵淑萍、シュレスタ ロジート、平野
賢一、鈴木朗、千葉仁志
「中鎖脂肪酸の HPLC 法による定量分

析」
第 61 回日本臨床検査医学会学術集
2014/11/22 ~ 25 福岡国際会議場

・恵淑萍、Rojeet Shrestha、平野賢一、
鈴木朗、千葉仁志
「機能性脂肪酸に関する分析」
第 21 回 日本未病システム学会 学術総
会
2014 / 11 / 1・2
千里ライフサイエンスセンター

・恵淑萍、ロジート シュレスタ、平野賢
一、鈴木朗、千葉仁志
「LC/MS による誘導体化脂肪酸の分析」
第 39 日本医用マススペクトル学会年会
2014/10/16・17 三井ガーデンホテル千葉

・ロジート シュレスタ、恵 淑萍、
平野賢一、鈴木朗、千葉仁志
「HPLC 法によるカプリン酸の定量分
析」
第 94 回北海道医学大会 2014/10/4
札幌グランドホテル グランドホール

・原康洋、佐野聖三、橋本裕希、川崎直
子、
平野賢一、鈴木朗、山口知是、朝長毅
「ATGL ノックアウトマウス心筋のプロ
テオーム解析」 日本ヒトプロテオーム
学会 2014/7/17・18 つくば国際会議場

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

[]

分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）
分担研究報告書

創薬プロセスとビジネスプランにおける知的財産

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

創薬プロセスの初期段階において、様々な成果の発表、或いはビジネスプランの作成が検討されることは少ない。しかしながら、その検討は新薬が市場へ出るには大切な要素を含む。そこで法的分野の者が、その行程に携わることによって、その行程における留意点と知的財産との関係を整理することにした。

A. 研究目的

従来から一般的に行われてきた創薬の最終プロセスを取り上げて、法的分野の者が創薬プロセスとビジネスプラン作成の留意点と知的財産との関係を整理することを目的とした。

あらかじめ創薬後に事業化や商品化を実現することを念頭に、まず調査し企画する必要がある。それを実現するにあたっては、実現可能な計画を定量的に作成し、それに基づいて決定し、推進するのが望ましい。この計画書を「ビジネスプラン」と称し、その必要性、内容、作成方法、留意点等を説明する。

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、ビジネスプラン作成段階で生じる知的財産を浮き彫りにした。

・この計画書は、本創薬プロジェクトの関連する人々が、基本的な考え方を共有し作成すると同時に、その知的財産を一元化することが肝要である。

C. 研究結果

I. 一般的な創薬プロセスにおけるビジネスプランのひな型

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中でビジネスプラン作成上の留意点と知的財産との関係を整理した。

(1) ビジネスプランとその意義

ビジネスプランとは新薬を中心とした事業や商品を新たに起こすに当って、予めその内容や方策を明確に記述し、プロジェクトの全貌を関係者に理解できるようにしたものである。このようにプランを共有することは創薬のプロセスの中で、計画のもれや不明確な事業を浮き彫りにすることができる。

D. 考察

1. 調査段階

また、研究者だけでなく関係者にプロ

プロジェクトの全貌を理解させ、ベクトルあわせを可能にし、いわゆる PDCA サイクルの後にプロジェクトを評価するときの基準として活用することができる。

(2) ビジネスプランの種類

通常、新事業型と新商品型ではビジネスプランが異なる。今回の場合は従来の薬品業界の販売ルートを想定し新商品型のビジネスプランを対象とした。

2. ビジネスプランの内容

(1) 概要 「全体のポイント」を要約するこれは関係者全員が全貌を理解できるレベルとして、通常 1 枚程度に纏めることが望ましい。

その時、「新薬(商品)の理念・戦略・作戦」を医療現場の問題点からニーズを発見して新薬開発のプロセスが始まっているので、そのニーズの確認を行う。

次に既存の製品分野や薬品会社の開発動向を調査し新たな薬の特長から、次に開発すべき薬も調べる。その際の留意点として、特許だけでなく、パッケージデザインのイメージ(意匠)、薬品の名称(商標)などの知的財産関係を後行程で決める必要があるという認識を共有しておくことが望ましい。

(2) 新薬型のビジネスプランの内容

背景 新薬の必要性、市販する必要性も同様に確認することが必要である。

目的 その薬によっての世の中への貢献する方法を確認する。本プロジェクトに関係する大学と各社の本新薬の意義を確認する。

商品の定義 新薬を商品として市場に出すことを前提としているので、今後は商品と称する。商品名称を検討する。特に新薬の素材名のような最終顧客が分かりにくい名称は避けるべきである。また効用との関係も整理するために、商品のコンセプトとキャッチフレーズ、最終顧客(購買層)の対象の確認が必要である。

商品内容 新商品の分かりやすい形状の検討が必要である。この場合、薬としての効用に関係する項目をクリアした上で、一般的な商品として形状、質量、色、などの検討が必要である。また、効用についての可能な表現と最終購入者へ理解しやすい表現を検討する。特に、信頼性についての言及が必要である。加えて、既存の商品との互換性、標準的な物との相違、特長等の記載を検討する。

商品の市場 最終購買層の市場の特長を整理する。特にその市場での新商品の位置を新規性、互換性、価格などで確認する。その上で参入の意義を確定する。特に販売見込みの概算が必要である。

影響(効用) 薬の効用ではなく、新商品によって変わるビジネスモデル、生活モデルなどの社会的スタイルへの影響を想定する。

価格 売り出しの影響に鑑みた価格設定から大量販売時の価格を設定する。

出荷時期 初期、大量出荷の時期を設定し時期を早める条件を整理する。

販売方法 販売チャネル、販売方法、通販などのルートの検討と市場マネージメント(市場範囲、契約条件など)に関する計画を立案する。

販売促進 マスコミ発表戦略、販売促

進方法、宣伝などの対費用効果の検討を行う。

コスト 調査費、設計費、試作費、新薬開発費、製造原価、販売経費、拡販費用、マニュアル費、人件費、設備費などを積算する。

売上 販売目標の設定を行う。

商品教育 商品意義や効用などの啓蒙と教育方法を検討する。

権利関係 特許権、商標権（名称）、意匠権（外装パッケージ、容器）、著作権（論文、商品説明文、プログラムなど）等の知的財産権に加えノウハウ、守秘義務契約などを整理する。

3. 推進体制

ビジネスプラン作成時に望まれる推進体制は、その新商品の市場への効果、予算などによって大きく影響されるので、まずはプロジェクトチームで、次のような機能を持つ体制を構築する必要がある。プロジェクト責任者。プロジェクト委員会：親委員会、開発部会、適用部会、宣伝部会等。担当部門として企画、開発、宣伝、販売、教育部門に加え一般事務部門などである。

4. スケジュール

調査 - 企画 - 検討 - 計画 - 決定 - 確認 - 検証 - 評価 - 再計画といった行程毎にアクションプランを策定して行く必要がある。

E. 結論・留意点

今回のプロジェクトを通じて、今後の参考になる視点を整理する。

- ・初めは小さく調査・企画の行程を進めていく過程で、確実な部分から明確にして行く。

- ・全員の大きな目標として最初から「概要としてビジネスプラン」を作成するという大枠を設定する。

- ・関係者の分野が広範囲の場合は、すでにある他ビジネスプランを参考にすることで意識合わせをする。

- ・新しい分野か否か調査を徹底する。

- ・本プロジェクトとの関係で広がる動きを整理し本筋を確認する。

- ・プロジェクトに関係する人々を明確に洗い出し、メンバーにする必要がある。

- ・各分野で当然と思われることこそ可視化して整理する。（他部門から見ると理解できないことも多い。）

- ・企画内容は研究者の観点ではなく、企業レベル視点で記述し検討するとよい。

- ・企画内容は、「部門の立場」を出さないようにする。

- ・計画案は関連他部門へのヒアリングを早めにするのがよい。特に反対意見を大事にすることが望ましい。

- ・計画は、一つだけ提案するといったやり方ではなく、少なくとも3案は併記し、それぞれのメリット、デメリット、条件等を整理しておくことが必要である。

- ・計画は具体的・定量的・客観的に表現し判断・評価する場合に、基準になるようにすることが必要である。

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

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

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等実用化研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症のスクリーニングに有用な検査法の開発

研究分担者 稲葉 亨 京都府立医科大学 感染制御・検査医学 講師

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)では、末梢血白血球に中性脂肪が蓄積し、粗大な空胞を形成するのが特徴的であり、Jordan 異常として知られている。(株)堀場製作所が製作販売する自動血球計数器 Pentra シリーズは白血球細胞質の脂肪含量に応じて白血球自動分類を行うため、Jordan 異常を有する好中球を数分以内に簡便にスクリーニング可能なことが判明した。さらに、その変化を定量評価するために、Pentra MS CRP で得られた白血球分布パターンの数値化を行った。

A. 研究目的

TGCV では末梢血白血球に中性脂肪が蓄積し、粗大な空胞を形成するのが特徴的であり、Jordan 異常として知られている。Jordan 異常は一般的には末梢血塗抹標本を顕微鏡下で目視分類する際に同定されるが、日常診療では必ずしも末梢血目視分類は実施されない。従って、より汎用性のある末梢血白血球自動分類で Jordan 異常を同定出来れば、無症候例も含めて短時間で簡便に TGCV のスクリーニングが可能である。この目的に適した自動血球計数器を検討し、さらに TGCV スクリーニングの為に客観的基準を確立することを、平成 26 年度の目的とする。

B. 研究方法

当院では 2012 年から各種の自動血球計数器の基礎的性能を比較評価してきた。その一環として堀場製作所製 Pentra MS

CRP を用いて某患者の末梢血白血球自動分類を実施した際、極めて特徴的な好中球分布パターンの異常を認めた。そこで、末梢血目視分類を実施したところ、典型的な Jordan 異常を認めた。当該患者は心症状や筋症状を認めておらず、原発性 TGCV に特徴的な ATGL 遺伝子変異の有無も確認出来ていない。しかし、典型的 Jordan 異常を呈することから、上記の Pentra MS CRP における好中球分布パターンの異常が Jordan 異常の特徴的所見であるか、さらにこの分布異常を定量的に評価するため、Pentra MS CRP の白血球自動分類用パラメーターを内部コンピューターにより数値化する。

(倫理面の配慮)

本症例は典型的な Jordan 異常を認めるが、TGCV に合致する症状は全く認めておらず、原発性 TGCV の可能性は低い。患者およびその家族には ATGL 遺伝

子検査についても文書で同意を得ている。

一方、血球計数器の検討には通常診療時に採取された血液の残余分を使用するため、検討に際して新たな身体的危害が生じる可能性は考えられない。また、残余血は連結可能匿名化後に検討に使用する。

C. 研究結果

Pentra MS CRP は他メーカーの主な血球計数器とは異なって Chlorazol black E (CBE) 染色時の吸光度の違いにより白血球自動分類を行っており、当該患者における好中球分布パターンの異常は、好中球細胞質における脂肪含量増加を意味した。また、当該患者の好中球空胞は oil red 陽性であり、中性脂肪を含有することが判明した。

そこで、Pentra MS CRP の基礎的性能評価時の好中球分布パターンを見直して、健常人結果をもとに CBE 染色時の吸光度の定量化を行い、健常人パターンの閾値を設定した。

D. 考察

Pentra MS CRP の有する独特の白血球自動分類原理を利用することにより、TGCV 患者に特徴的な Jordan 異常を 50 μ L 以下の微量血液を用いて 5 分以内に同定可能であり、同機種は今後、多数の臨床検体を用いたスクリーニングに有用な検査機器と思われた。

E. 結論

Pentra MS CRP は Jordan 異常の迅速スクリーニングに有用な自動血球計数器

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

今年度はなし

2. 学会発表

今年度はなし

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

中性脂肪蓄積心筋血管症における CD36 の発現に関する検討

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

正常な心筋細胞では、CD36 などのトランスポーターを介して長鎖脂肪酸 (LCFA) を取り込む。細胞内中性脂肪分解系に異常が存在する原発性中性脂肪蓄積心筋血管症 (Triglyceride deposit cardiomyovasculopathy) における CD36 の発現について解析し、2 型糖尿病を伴う特発性 TGCV 例との病理組織学的な比較検討を行った結果、原発性 TGCV では、特発性 TGCV 例と異なり心筋細胞膜における CD36 の過剰発現が認められた。

A. 研究目的

正常な心筋細胞では、CD36 などのトランスポーターなどで長鎖脂肪酸 (LCFA) を取り込み、主要なエネルギー源として利用している。今回、adipose triglyceride lipase (ATGL) 欠損を伴う原発性 TGCV 例における、心筋細胞の CD36 の発現について病理組織学的に解析し、2 型糖尿病を伴う特発性 TGCV 例と比較検討を行った。

B. 研究方法

ATGL 欠損を伴う原発性 TGCV2 例の心臓移植時摘出心と 2 型糖尿病を伴う特発性 TGCV2 例の剖検心について、10% 中性緩衝ホルマリンにて固定された組織から心筋を採取し、それらのパラフィン切片標本作製し、CD36 に対する免疫染色及び、蛍光抗体法を用いて施行した。
(倫理面への配慮)

本研究は病理組織学的解析であり、遺伝子解析は施行していない。摘出心につ

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。また、剖検症例についての研究協力の同意は、遺族の自由意思で決めていただいた、臓器の一部の医学研究目的使用について承諾され、既に署名をいただいている剖検承諾書をもって同意とすることについて当センター倫理委員会から文書による承認を得ている。

C. 研究結果

特発性 TGCV2 例の剖検心では、間質の血管内皮細胞において CD36 の発現が認められ、心筋細胞においては陰性であったのに対し、原発性 TGCV2 例の摘出心では、血管内皮細胞に加えて心筋細胞において過剰発現が認められた。

D. 考察

CD36 などのトランスポーターを介して細胞内へ取り込まれた長鎖脂肪酸 (LCFA) は、ミトコンドリアに輸送され

てβ酸化を受けて ATP を産生する系と、一旦、トリグリセリドとなり速やかに ATGL などで加水分解を受け、ミトコンドリアに輸送されてβ酸化を受ける系とが存在する。原発性 TGCV では、ATGL などの細胞内中性脂肪分解系に異常が存在し、細胞内の脂肪滴として TG が蓄積する。細胞内の TG 含量が増加すると、細胞内 TG 増加を誘発する重要な転写因子である peroxisome proliferated activated receptor- γ (PPAR γ) が活性化されることが、既に証明されているが、今回、その下流の分子である CD36 が心筋細胞において過剰発現していたことから、LCFA がさらに細胞内に流入し細胞内に TG が増強していく positive feed back 機構 (LCFA の悪性サイクル) が、TGCV の病態の首座を占めると考えられた。

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

共同研究者
池田善彦 国立循環器病研究センター
臨床病理科

E. 結論

ATGL 欠損を伴う原発性 TGCV においては、2 型糖尿病を伴う特発性 TGCV と異なり、心筋細胞においても CD36 の過剰発現が認められた。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

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

診断基準の策定～好中球空胞による評価～

研究分担者 江副幸子 大阪大学大学院医学系研究科 血液・腫瘍内科学 講師

研究要旨

原発性中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)では、末梢血多核顆粒球に中性脂肪が蓄積し、Jordans'奇形と呼ばれる空胞を形成する。Adipocyte Triglyceride Lipase(ATGL)遺伝子に明らかな遺伝子異常を持たない特発性 ATGL と診断する症例においても、末梢血白血球細胞質内の空胞の存在について検討を行い、病態との関連において診断の手がかりになりうるか、また、診断基準としての妥当性について検討した。

A. 研究目的

本研究は、TGCV の診断基準を策定することをそのテーマの中に含む。

診断基準の一つとして好中球細胞質内空胞の評価の有用性について検討する。

中性脂質蓄積症 (NLSD) においては末梢血顆粒球に脂肪の蓄積を認め、塗抹標本で多くの空胞を有することが知られており、これを Jordans'奇形と呼んでいる。

本研究においては、明らかな ATGL 遺伝子異常を有する中性脂肪蓄積心筋血管症 (TGCV)と明らかな遺伝子異常を持たない特発性 ATGL と診断する症例も含め、本疾患患者の末梢血白血球細胞質内の空胞について検討を行い、病態との関連において診断の手がかりになりうるかと考え、診断基準としての妥当性について検討した。

B. 研究方法

単球は本来健常人においても多数の空

胞を有することが多く、疾患としての評価が困難であることから、健常人の末梢血ではほとんど空胞を持たない多核顆粒球を評価対象とした。

対象は、ATGL 欠損症例 2 例、ATGL 異常を持たない特発性 TGCV 症例 6 例、健常人 1 例、他の脂質異常、糖尿病等症例 13 例であり、それぞれ末梢血塗抹メイ・ギムザ(MG)染色標本の顕鏡において好中球 100～200 個をカウントし、そのうち空胞を持つ好中球の比率を算出した。

(倫理面の配慮)

所属機関附属病院臨床研究倫理委員会において承認を得た。

C. 研究結果

ATGL 欠損症例では全例において 100%の顆粒球で著明な空胞を認めた。一方、健常人及び他の脂質異常症等においては空胞を有する顆粒球が 10%未満であ

るのに対し、ATGL 欠損を持たないが病態として特発性 TGCV と診断しうる症例においては 10%～60%の好中球において空胞を認めたことから、これらの症例では ATGL 欠損症と同様に多臓器に中性脂肪を蓄積し、臓器の障害をきたす病態が有することが示唆された。

なし
3. その他
なし

D. 考察

これらの結果により、多核顆粒球における空胞（Jordans'奇形）は原発性および特発性 TGCV の診断に有用なツールであると考えられる。なお、採血の日により空胞の比率に大きな差があり、その原因については現在のところ不明である。採血前の諸条件をそろえるなど、さらに再現性のある方法の確立が必要であると考える。

本研究においては、さらに多数の症例での解析を行い、原発性および特発性診断基準としての有用性を明らかにする。

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

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 加藤良仁 興和創薬株式会社 学術部大阪学術課 課長

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、医師主導治験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分担研究者、研究協力者等と打ち合わせを行い、プロジェクトを推進した。

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、全体スケジュールへの助言と医薬品医療機器総合機構(PMDA)への薬事相談に同席し、プロジェクトを推進する。

B. 研究方法

研究機関、製造機関等との研究会議において、情報の共有を行い、医師主導治験実施のための体制を整えた。

（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

2月24日に大阪大学のIRB委員会に諮問することができた。

D. 考察

次年度に治験を開始するための準備が終了した。今後は医師主導治験の実施を推進する必要がある。

E. 結論

医師主導治験を開始するためにプロジェクトを推進し、次年度に開始する準備が整った。

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

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

毒性試験に備えたカプリン酸定量法の技術移転及び健常人における
カプリン酸濃度の検討

研究分担者 恵 淑萍 北海道大学 大学院保健科学研究院 教授

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)を1日でも早く克服するため、治療薬の有効成分であるカプリン酸定量法の技術移転及び正常人におけるカプリン酸の濃度検討を目的とする。カプリン酸定量法の技術を移転するために、まず分析に必要なカプリン酸及び内標準物質の誘導体化物と共に、確定した測定法のパラメーターを委託業者に渡した。また、血清中カプリン酸値に影響を与える背景因子を探索するために、健常者血清カプリン酸濃度測定を行った。

A. 研究目的

TGCV 治療薬の有効成分であるカプリン酸定量法の技術移転及び正常人におけるカプリン酸(FFA10:0)の濃度を測定することで、TGCV を1日でも早く克服することを最終目的とする。本目的を実現するために、まず化学合成したカプリン酸及び内標準物質の誘導体化物と共に、確立した測定法のパラメーターを委託業者に渡した。また、血清中カプリン酸値に影響を与える背景因子を探索するために、健常者血清カプリン酸濃度の測定を行った。

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。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。

(倫理面への配慮)

大分大学と北海道大学でそれぞれ倫理審査の承認を得た。(大分大学承認番号: 715 ; 北海道大学認定番号: 14-17)

C. 研究結果

化学合成した標準物質の合成した FFA10-NPH、内標準物質 FFA11-NPH、及びそれらの NMR データーを委託業者に提供した。また、上記合成品を用いて、確立したカプリン酸の HPLC 定量法のパラメーターも委託業者に渡した。更に、血清中カプリン酸値に影響を与える背景因子を探索するために、大分大学の収集した健常者 (n=106) 血清カプリン酸濃

度を測定した。カプリン酸の濃度は 0.3 ± 0.4 (Mean \pm SD) $\mu\text{mol/L}$ であった。また、106人中50人からカプリン酸が検出されなかった。今後はトリカプリンの治療を受ける TGCV 患者の血中濃度を測定する予定である。

D. 考察

GLP 基準下毒性試験に備えたカプリン酸定量法の技術移転を完成したことで、TGCV 治療薬であるカプリン酸の臨床試験に大変有用であると考えられる。また、前年度で確立した 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。この方法を用いて今年度は、健常者の血液中のカプリン酸濃度を決定した。大阪大学、大分大学との共同研究で、日本人の健常者の中鎖脂肪酸濃度を初めて報告した。明らかになったことは、日本人では中鎖脂肪酸であるカプリン酸濃度は非常に低い、半分の人には検出できないということである。中鎖脂肪酸は乳製品や最近話題のココナツオイルに多いため、これらを摂取すると血中濃度は大きく増加し、脂肪代謝への影響が現れると期待される。

E. 結論

今年度はカプリン酸定量法の技術移転を完成した。また、初めて健常者血液中のカプリン酸濃度を決定した。今後は、カプリン酸を主成分とする治療薬の服用前後の 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

Nishimukai M, Maeba R, Yamazaki Y, Nezu T, Sakurai T, Takahashi Y, Hui SP, Chiba H, Okazaki T, Hara H. Serum choline plasmalogens, particularly those with oleic acid in sn-2, are associated with proatherogenic state. *J Lipid Res.* 55(5) 956-965. 2014.

Shrestha R, Hui SP*, Imai H, Hashimoto S, Uemura N, Takeda S, Fuda H, Suzuki A, Yamaguchi S, Hirano K, Chiba H. (*CA) Plasma capric acid concentrations in healthy subjects determined by high-performance liquid chromatography. *Ann Clin Biochem.* In press, 2015.(*CA)

2. 学会発表

中鎖脂肪酸の HPLC 法による定量分析。恵 淑萍, シュレスタ ロジート, 平野賢一, 鈴木 朗, 千葉仁志 (第 61 回臨床検査医学会学術集会、福岡), 2014. 11.

中性脂肪蓄積心筋血管症における Jordans' anomaly を自動血球分析装置で検出する。鈴木 朗, 和田 淳, 長坂博範, 越智康浩, 千葉仁志, 恵 淑萍, 平野賢一 (第 61 回臨床検査医学会学術集会、福岡), 2014. 11.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許出願

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

症例探索 - 2 型糖尿病患者における TGCV 合併例 -

研究分担者 小澤純二 大阪大学大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学 助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy:TGCV)を合併する 2 型糖尿病症例を探索する。TGCV 合併 2 型糖尿病の臨床的特徴を明らかにして、早期発見・早期治療につなげられるようにすることを目的とする。

当院外来通院 2 型糖尿病患者において治療抵抗性の心疾患を有する患者を中心に探索を行った結果、新たに候補として見つかった一例を報告する。

A. 研究目的

2 型糖尿病における TGCV 合併例の臨床的特徴を明らかにして、TGCV の早期発見、早期治療につなげられるようにすることを目的とする。

B. 研究方法

大阪大学医学部附属病院内分泌・代謝内科において本研究分担者の外来を通院加療中の 2 型糖尿病患者約 300 名を対象とする。同対象者の中で TGCV の臨床的特徴とされる成人発症で治療抵抗性の心不全、狭心症、不整脈の経過を有する患者を検索する。

（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

スクリーニングの結果、現在 24 年間の糖尿病罹病期間を有する 50 歳男性が候補として挙げられた。同患者は 26 歳時に

2 型糖尿病の診断、内服治療を受けるも血糖管理不良であった。36 歳時に急性心筋梗塞を発症（#3;100%,#4;90%）、同時期から心室頻拍を中心とする不整脈を呈し、抗不整脈薬で治療されたが治療抵抗性であった。36 歳時にインスリン治療が開始となり、一日所要インスリン量は当初 28 単位であったが増加し、49 歳時には 320 単位に至った。インスリン負荷試験による K 値は 0.25%/min（正常約 5%/min、当科入院 2 型糖尿病患者 163 名の中央値 1.56%/min）と著明なインスリン抵抗性を示した。本例は冠動脈狭窄を繰り返し認め、47 歳時（#1;75%）、48 歳時（#7;75%）にインターベンションを施行されている。

本患者は糖尿病による細小血管合併症も進展しており、41 歳時に網膜症により左眼失明、43 歳時に末期腎症により血液透析導入となっている。さらに 40 歳時には肝障害を呈し、肝生検を施行、non-alcoholic steatohepatitis の診断をされている。

現在本患者は本研究分担者外来、循環器内科、消化器内科に通院加療中、近医にて維持透析を継続している。

D. 考察

本例は難知性冠動脈疾患および不整脈を有する点で TGCV の合併を疑う。特発性 TGCV 症例で糖尿病合併はみられるが、本例のような著明なインスリン抵抗性の存在はこれまで報告されていない。本例の診断・解析を進めることで TGCV における脂肪蓄積と糖尿病発症に関わる病態との関連が明らかとなり、両者に対する包括的アプローチへの展開も期待される。

・今後の予定

上記患者に対し、説明と同意取得の上、Jordans'奇形の有無、BMIPP シンチにおける心筋での脂肪酸 wash out rate の低下の有無などを検討し、診断を進める。

E. 結論

TGCV 合併の 2 型糖尿病症例を探索、一例の候補を見出し、今後検査・診断予定である。

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

The 3rd international symposium
on triglyceride deposit
cardiomyovasculopathy 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（難治性疾患等実用化研究事業）
分担研究報告書

中性脂肪蓄積心筋血管症における形態学的異常の評価法の確立
-とくに冠動脈疾患の進展について-

研究分担者 小谷順一 大阪大学大学院医学系研究科 循環器内科学 特任講師

研究要旨：中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)の心機能低下には冠動脈の変性のみならず内腔狭小に伴う虚血の担う部分が大きい。一般的な心筋虚血の評価は心筋における局所の虚血の証明をもって行われるが、心筋変性の存在、また介入療法の早期導入を考慮して内腔狭小に至らない状態での直接的な冠動脈の早期のスクリーニング法・病期進展の評価法を確立する事が肝要である。本研究では疾患特異的な構造的特徴の把握のために直達的に光干渉断層法(optical coherence tomography: OCT)を用いて冠動脈を観察し、汎発性に存在する肥厚した内膜+中膜という特異的所見を得た。これは診断基準を考えるうえできわめて重要な所見と考えられる。

A. 研究目的

TGCV は、中性脂肪の代謝異常により惹起される疾患である。冠状動脈においては、汎発性に変化が見られることが特徴である（びまん性変化）。一方、食事や薬品による介入による臓器および身体機能改善が期待されていることから（早期介入の重要性）、疾患が進行し、血管内腔の狭小化が顕著となる虚血状態に陥る以前に血管の構造変化を捉えることが臨床重要である。以上より直達的に光干渉断層法 (optical coherence tomography: OCT)を用いてその疾患特異的な構造的特徴を検討した。

B. 研究方法

イメージングシステム及び解析：臨床応用を念頭に、現在臨床で使用されてい

る OCT のカテーテルシステム (St. Jude Medical 社 製 ILUMIEN OPTIS™ imaging system) を使用した。取得画像はハードディスクにデジタル保存し、解析は off-line review work station (LightLab imaging/St. Jude Medical)にて行った。

撮像手技：冠状動脈にガイドワイヤーを先行させて冠状動脈の走行を確認した。血管壁の評価を十分に行うために、内腔の虚脱に対してはホルマリン液による加圧灌流を行った。この際に空気・血流停止後に形成された血栓を除去し、十分な視野を確保した。

疾患の表現形が全身にびまん性の変化をもたらすことからすべての冠動脈に汎発性の変化が見られる (homogeneous) との仮説から対象血管内における長軸の

観察と、その中の任意の 3 カ所の短軸像比較、さらに空間的に独立した 3 本の冠動脈の相同性を同様の方法で比較検討する。対照として同性の検体にて同じ観察を行った(Ctl.)。

(倫理面の配慮)

所属機関附属病院臨床研究倫理委員会において承認を得た。

C. 研究結果

主要冠動脈 3 枝にすべてに対し OCT を施行する事ができた。但し、剖検心の保存の状態(冠状断による保存)から大動脈分岐部から近位部の病変の観察が主体であった。回旋枝の 12mm の観察以外は中間部迄の観察が可能であった。右冠動脈は遠位側の後下降枝(#4PD)分岐部の確認が可能であった。

動脈硬化性変化：右冠動脈入口部にかけて右冠尖に石灰化の沈着を認めた。その他いずれの冠動脈内にも斑状の動脈硬化性変化は認められなかった。一方、Ctl. 症例では、いずれの部分も動脈硬化性変化を認めた。

対象血管内における heterogeneity: TGCV においては側枝を含む冠動脈の長軸像と、任意の 3 カ所におけるそれぞれの短軸像は、いずれも homogeneous に肥厚した内膜 + 中膜を認めた。これは側枝にも連続した変化であった。これは通常の動脈硬化性変化とは明らかに異なっている。

病変の空間的 heterogeneity: 3 本の冠動脈の構造的な相同性を比較したところ、TGCV においてはすべての血管の任意の短軸像が同様の変化を示した。すなわち、

非常に均一な変化が冠動脈全体に認められていた。

TGCV 症例における断層像の特徴：輝度の高い外膜・明瞭な弾性板(+中膜)と肥厚した内膜を認める。

D. 考察

代謝異常・蓄積疾患の特徴はその好発臓器はあるものの、全身臓器・組織に未分解物質の蓄積がみられる。今回我々は冠動脈のみを観察部位としたが、その仮説である空間的に homogeneous な変化を OCT 所見として捉える事が出来た。また全体的に肥厚した内膜を認めるものの巣状の動脈硬化性変化に乏しい冠動脈であり、対照症例との違いは著明であった。しかしこれはただ単に、年齢的な違いであった可能性は否定できない(検体は 30 歳代であり対照は 70 歳代)。一方、右冠動脈入口部に見られた石灰化はその場所から大動脈石灰化であるとの評価もできるが若年にしては早い変化であるとも考えられる。

OCT による断層像の評価では、輝度の高い外膜と全体的に肥厚した(内膜・中膜・弾性板)が特徴的であった。斑状の動脈硬化性変化を伴わない内膜 + 中膜肥厚を呈する冠動脈はこの疾患特異的であると言える。今後は、組織性状評価などの情報による変性平滑筋の輝度解析が今後望まれる。このような断層像の生体組織診断に加えて冠動脈全体に広がる同様の変化は、TGCV の診断基準を考えるうえできわめて重要である。また OCT を用いた診断法の確立は疾患スクリーニングのみならず、生体内において繰り返し施

行する事が可能であることから治療介入の効果判定を客観的に評価することが可能であり、今後の臨床応用が期待される。

E. 結論

OCT を用いた TGCV の特異的な形態学的所見を明らかにすることができた。その特徴は、斑状に形成される通常の動脈硬化性変化に拠らない内膜 + 中膜の肥厚で、これは空間的偏在を認めず汎発性に存在する。

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

糖尿病患者の心臓拡張機能に影響を与える因子の検討

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

研究要旨

インスリン抵抗性状態による高インスリン血症が、ATGL の発現低下・PKC 活性化を介して糖尿病心筋症の発症・進展に関与している可能性を検討するため、糖尿病患者の心臓拡張機能に影響を与える因子の検討をおこなった。教育入院患者にドプラ心エコーを施行し、拡張早期の僧房弁口血流速波高（E） 僧帽弁輪運動速波高（e'）の比（E/e'）を計測し各因子との関連を分析した。E/e'は年齢・空腹時インスリン（IRI）と有意な正の相関を示した。目的変数を E/e'、説明変数を年齢・BMI・空腹時 IRI・HbA1c とした重回帰分析でも、年齢・空腹時 IRI と有意な関連を示した。以上の結果から、糖尿病患者において、高インスリン血症が心臓拡張機能障害の増悪因子である可能性が示唆された。

A. 研究目的

インスリン抵抗性状態における高インスリン血症が ATGL 発現低下・PKC 活性化を介して特発性中性脂肪蓄積心筋血管症の病因となっている可能性を検討するために、糖尿病患者において心臓拡張機能に影響を与える因子を検討した。

B. 研究方法

糖尿病教育入院患者にドプラ心エコーを施行し、拡張早期の僧房弁口血流速波高（E） 僧帽弁輪運動速波高（e'）の比（E/e'）を計測し、性別・BMI・HbA1c・空腹時血糖・空腹時 IRI・総コレステロール・LDL・HDL・中性脂肪・クレアチニンクリアランス・尿中アルブミンとの関連を分散分析およびステップワイズ法を用いた重回帰分析をおこない検討した。

（倫理面の配慮）

本研究は、個人情報完全に除いた検査データを二次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。

C. 研究結果

E/e'は年齢および空腹時 IRI と有意な正の相関を示した。目的変数を E/e'、説明変数を年齢・BMI・空腹時 IRI・HbA1c とした重回帰分析でも、年齢および空腹時 IRI と有意な関連を示した。

D. 考察

ATGL に異常を認めない特発性中性脂肪蓄積心筋血管症は糖尿病の長期罹患症例において認められることが知られている。我々はインスリン抵抗性モデル動物の高インスリン血症状態において ATGL

活性が低下しており心筋内の中性脂肪含量が増加していることを報告した。このことがさらに心機能低下と関連しているかについて今回検討をおこなった。心臓の拡張機能がインスリン濃度と正相関を示したことから、糖尿病心筋症が特発性中性脂肪蓄積心筋血管症と関連している可能性が示唆された。今後さらに詳細な検討をおこなっていく。

2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

E. 結論

相関係数分析・重回帰分析において、糖尿病患者の E/e' は、年齢・空腹時 IRI との有意な正の相関が示された。糖尿病患者における高インスリン血症が心臓拡張機能障害の増悪因子であ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

なし

2. 学会発表

糖尿病患者の心臓拡張機能に影響を与える因子の検討

井上智彰，井口登與志，小林邦久，園田紀之，前野彩香，佐々木修二，高柳涼一
第 52 回日本糖尿病学会九州地方会（熊本：2014.10.31-11.1）

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（難治性疾患実用化研究事業）
分担研究報告書

剖検組織を用いた続発性 TGCV の探索

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。原発性 TGCV は ATGL の変異によって生じることが平野班長らによって明らかにされた。しかしながら、これまでの研究によって、ATGL が正常でありながらも TGCV 様のフェノタイプを呈する患者群も存在する可能性が示されている。冠動脈における TGCV を解析するためには、コレステロールと TG を区別して可視化することが必須であるが、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。そこで本研究では、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、ATGL 正常群の冠動脈を解析した。その結果、ATGL 正常群の一部で、血管平滑筋に TG が蓄積している群がいることを見出した。

A. 研究目的

TGCV の特徴は、心筋及び冠状動脈への TG の蓄積である。原発性 TGCV は ATGL の変異によって生じることが平野班長らによって明らかにされた。しかしながら、これまでの研究によって、ATGL が正常でありながらも TGCV 様のフェノタイプを呈する患者群も存在する可能性が示されている。本研究は質量顕微鏡法を用いて、ATGL 正常群の冠動脈における TGCV 様フェノタイプの病理像を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

冠動脈は国立循環器病センターから提供された。冠動脈の切片を作成した後、マトリックスとして

2,5-Dihydroxybenzoic acid を塗布し、LTQ-XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) に供した。画像解析は ImageQuest software (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

(倫理面の配慮)

本研究は、近畿大学農学部、国立循環器病センター、大阪大学医学部の倫理委員会の承認を受けた後に行った。

C. 研究結果

冠動脈中の TG とコレステロールエステルの分布が可視化された。コレステロールエステルは病変の中心部に存在しているのに対し、TG は辺縁部に存在していた。免疫染色によって TG の分布と一致

する細胞種を探索した結果、血管平滑筋の分布とよく一致することが分かった。

D. 考察

ATGL 正常群の冠動脈で観察された TG の分布は血管平滑筋の分布と一致していたことから、血管平滑筋内での TG 代謝に何らかの変動が起きていることが示唆された。TG 代謝変動が血管にどのような影響を与えるのかは不明であり、今後の研究が必要である。

E. 結論

ATGL 正常群の冠動脈における TG とコレステロールエステルの分布の違いを明らかにした。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

Ikeda, Y., Zaima, N., Hirano, K., Mano, M., Kobayashi, K., Yamada, S., Yamaguchi, S., Suzuki, A., Kanzaki, H., Hamasaki, T., Kotani, J., Kato, S., Nagasaka, H., Setou, M., Ishibashi-Ueda, H: Coronary triglyceride deposition in contemporary advanced diabetics.

Pathol Int. 64, 325-335, 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

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（診断機器：冠動脈）の研究

研究分担者 杉村宏一郎 東北大学大学院 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。BNP1141pg/dl、LVEF22%と重症心不全を認め、右上肢にMMT4点、下肢にMMT4点の筋力の低下を認めたが、約2年の治療経過でBNP137pg/dlへ改善し、右上肢、下肢筋力もMMT5点へ改善を認め右上肢にMMT4点、下肢にMMT4点の筋力の低下を認めた。

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。

（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

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/m²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、β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。右上肢にMMT4点、下肢にMMT4点の筋力の低下は、いずれもMMT5点へ改善している。

D. 考察

特記すべき事項なし。

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思われる。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

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

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

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 cardiomyovasculopathy: 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。そこで先ず、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無いと判断した。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

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

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】マイクロミニピグに糖尿病を誘発し、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】マイクロミニピグに 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、膵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。膵全摘モデルでは、術後より高血糖を来とし、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。膵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】膵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

マイクロミニピグ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膵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ピグ

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 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。

膵全摘手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、塩酸メドト

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0.1U/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 定量的冠動脈 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 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中で、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の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

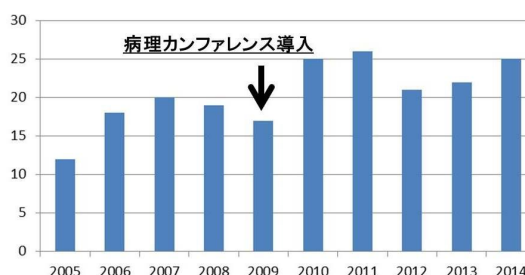
心筋生検検査の臨床的意義を向上させる目的で、2009年より以下の行動目標を実施した。1)炎症性マーカーを含む免疫染色を行う。2)病理画像は総てデジタル化する。3)症例数5例程度を基準に臨床カンファレンスを臨床現場にて行う。この際に、専修医や研修医など臨床現場に係った医師の参加も広く募る。4)患者認証は総て番号で行った。

(倫理面への配慮)

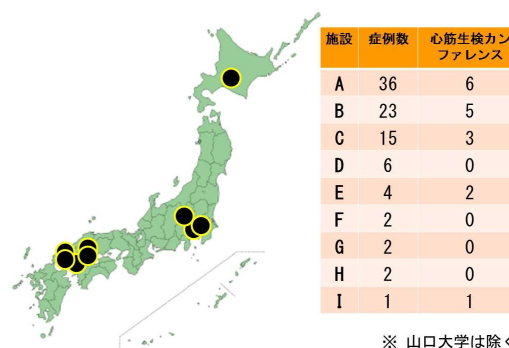
所属する研究機関で定めた倫理規定等を遵守し研究を遂行した。

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。
心筋生検症例数(山口大学)



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 Cardiovas 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 Cardiovas 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 Cardiovas 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).

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

放射性標識脂肪酸誘導体を用いる薬効評価に関する研究

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

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症治療薬として期待されるカプリン酸およびトリカプリンの生体内動態評価を可能とすることを目的として、これら化合物の C-11 標識反応の開発とそのマウス体内動態に関する検討を行った。さらに今年度はカプリン酸の心筋代謝中鎖脂肪酸としての有用性を確認するため、同じ中鎖脂肪酸に分類される C-11-オクタン酸を合成し、その体内動態を比較検討した。その結果、C-11-カプリン酸は中鎖脂肪酸でありながら、投与初期に心筋に高く取り込まれることが示された。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症の治療薬として中鎖脂肪酸であるカプリン酸を構成成分とする中性脂肪、トリカプリンを標的として検討が進められている。医薬品とするためにはその薬物動態追跡が必要となる。また、病態モデルを用いたトリカプリンの体内動態もまだ詳細には知られていない。そこで本研究では、ポジトロン放出核種で標識されたトリカプリンおよびカプリン酸を開発し、その体内動態を解剖法あるいは Positron Emission Computed Tomography (PET)カメラを用いて追跡すること目的として検討を行った。これまでカプリン酸の α 位を C-11 標識することが出来たので、炭素 10 個を有するカプリン酸の有用性を確認することを目的として、同様に中鎖脂肪酸に分類される、炭素 8 個を有するオクタン酸とその体内動態を比較検討することとした。

B. 研究方法

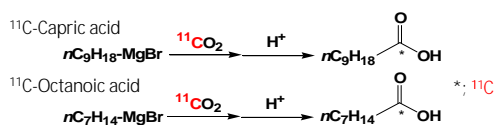
C-11 標識オクタン酸は α 位標識 C-11 カプリン酸と同様に、対応するグリニア試薬を用いて合成することとした。すなわち、本施設に設置の住友重機械工業製サイクロトロン、CYPRIS-12S を用いて加速した陽子線をターゲットボックス内に封入した 99.99995%の純窒素ガスに照射し、 $^{14}\text{N}(p,\alpha)^{11}\text{C}$ の核反応により C-11 を製造した。得られた C-11 は CO₂ の化学形として自動合成装置中に回収され、グリニア反応および引き続き加水分解により目的とする C-11-オクタン酸を得た。

得られた C-11-オクタン酸を 6 週齢 ddY マウスに尾静脈より投与し、一定時間後にと殺して、血液、各臓器を取り出した。それぞれ組織重量、放射エネルギーを測定して、各臓器への取り込み量を %dose/g として求めた。

（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。



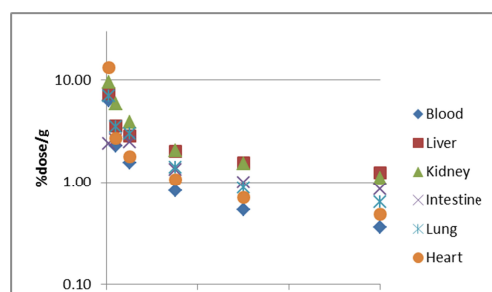
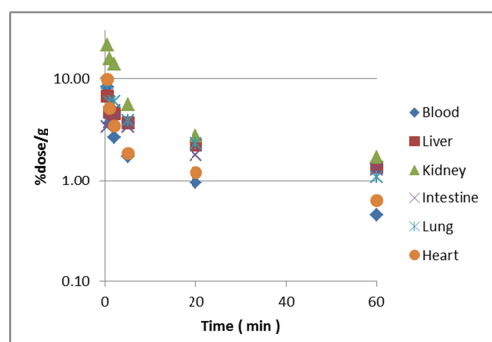
C-11 標識中鎖脂肪酸の合成

C. 研究結果

C-11-オクタン酸は自動合成装置を使用することにより、対応するグリニア試薬を用いて、C-11-カプリン酸同様、高い放射化学的収率、放射化学的純度で得ることが出来た。

両標識体共に、血中からのすみやかなクリアランスを示した。心筋への両標識体の取り込み量を比較したところ、C-11-カプリン酸の方が投与初期において高い取り込みを示した。特に投与 30 秒後の早期には、心筋/血液比が約 2 となり、C-11-オクタン酸の 1.1 に比較して高い取り込みを示した。その後、両標識体共にすみやかなクリアランスを示した。また、両標識体とも相対的に高い肺への取り込みを示した。

D. 考察



C-11-カプリン酸のマウス体内動態

両標識体はいずれも中鎖脂肪酸に分類される。また、長鎖脂肪酸としてはパルミチン酸などが生体内に存在し、心筋ではエネルギー源として用いられるとともに、肝臓ではより高分子へと変換され蓄積されることが知られている。これに対し、C-11-オクタン酸は肝臓においてβ酸化により代謝されることが知られている。C-11-カプリン酸は炭素鎖の長さとしてC-11-オクタン酸より炭素2個分長いのみであるが、C-11-オクタン酸に比較して、脂溶性の違いによるものと考えられる投与早期における高い心筋への取り込みが観察されたが、肝臓へのリテンションについては大きな違いは認められなかった。また、いずれの標識体も相対的に高い肺への集積が認められることから、今回の検討では評価していないが、体内でβ酸化を受け、C-11-CO₂として呼気中へ排出されているのではないかと予想された。

E. 結論

カプリン酸の心筋代謝中鎖脂肪酸としての有用性を確認するため、同じ中鎖脂肪酸に分類されるC-11-オクタン酸を合成し、その体内動態を比較検討した。その結果、C-11-カプリン酸は中鎖脂肪酸でありながら、投与初期に心筋に高く取り込まれることが示されるとともに、β酸化により代謝されていることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当せず

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

TGCV 患者に対する中鎖脂肪酸食事療法に関する研究
MCFA 食の継続の必要性と介入方法について検討

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

遠隔地に居住する在宅における中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)患者の中鎖脂肪酸(MCFA)を含むMCFA食の継続の必要性と介入方法について検討したので報告する。対象は背景が異なる2症例。症例1は40歳代女性で、TGCVの症状であるmyopathyが進行し、家族による食事・生活支援が乏しく介護施設、訪問介護員を利用するなど社会的支援を必要としていた。コンプライアンスが悪くMCFA食の継続が不十分であり、そのため、体重は減少し日常生活動作(activities of daily living:ADL)は大幅に低下した。一方、症例2は60歳代男性で、充足した家族の食事・生活支援、医療者側とのコミュニケーションが維持できたことにより、約2年6ヵ月間MCFA食を継続することで体重の維持だけではなく、筋肉量増加によりADLが向上した。TGCV患者に対しMCFA食の継続はADLに影響を与えるなど必須である。特に遠隔地においては患者とコミュニケーションを維持し信頼関係を築くなど、積極的な介入・支援が重要であり患者のQOLに影響を与えた。

A. 研究目的

Adipose Triglyceride Lipase(ATGL)遺伝子に変異を有するTGCV患者に対し、中鎖脂肪酸を含むMCFA食摂取の必要性和、食事継続の介入方法について検討した。TGCV患者においてMCFA食の継続は重要であるが、継続するためにはMCFAの食品選定と使用方法および入手が適切かつ容易であり、効率の良い食事摂取方法であることが必要とされる。また、患者自身のモチベーションを維持することが必須となる。我々は、遠隔地に居住する在宅でのMCFA食について2症例介入し、食事記録により継続状況と栄

養素摂取状況について評価した。また、外来通院時の体成分分析装置Inbody測定結果による、体重、体脂肪量、筋肉量の変化についても検討した。

B. 研究方法

ATGL遺伝子に変異を有し、myopathyを認める症例で、東北地方に居住する在宅療養中の2症例を対象とした。

■症例1(40歳代女性)

家族による食事・生活支援は乏しく、TGCVの症状であるmyopathyが進行しADLが低下したため、食事・生活は通所介護サービス(デイサービス)や訪問介

護員など社会的援助を必要としていた。MCFA 含有食はデイサービスでの昼食時に提供した。電話やメールにて食事摂取、身体状況の把握および精神的サポートを行った。より正確に状況を把握するため介護施設や近隣の支援者と電話や電子メールにより情報入手した。また、ADL 確認のため不定期ではあるが患者訪問を行った。

■症例 2 (60 歳代男性)

Myopathy による四肢の筋力低下を認めるが、社会的支援は不要である。家族による食事・生活支援は充足し、MCFA 食摂取状況、身体状況を患者本人と家族により電話や電子メールにて確認した。食事記録は毎月連続する 3 日間の食事内容を記録、撮影し、郵送にて送付されたデータから栄養価を計算し評価した。また、毎月の外来通院時(東北大学病院)の体成分分析装置 Inbody 測定結果による体重、体脂肪量、筋肉量について解析し評価した。これらの結果および MCFA 食についてのアドバイスを適宜行った。身体状況確認、直接的コミュニケーションをとるため、不定期に患者本人と家族を訪問した。

(倫理面の配慮)

本研究は大阪大学の倫理委員会の承認を得て実施した。

C. 研究結果

症例 1 について：MCFA 食は在宅で摂取することはなく、介護施設で MCFA 含有食品を昼食時 3 回/週の摂取のみであった。リハビリは介護施設では困難であり

継続していなかった。普段のエネルギー摂取量は 400 ~ 600kcal/日と少なく身体活動レベルが低い 30 ~ 49 歳女性の日本人の食事摂取基準(2015 年版)の推定エネルギー必要量 1750kcal/日の 1/4 ~ 1/3 程度に相当し、H26 年 4 月に 33.9kg (BMI 14.1kg/m²)あった体重が約 1 年後の 3 月には 31kg (BMI:12.9kg/m²)に減少した。また、四肢の筋力低下により右手を自力で動かすことができなくなり、洗顔、歯磨き、トイレでの排尿排便は完全介護を要するなど、ADL が大幅に低下した。

症例 2 について：MCFA 食の摂取は家族の支援により外食時も継続し、リハビリも同様に継続していた。約 2 年 6 ヶ月間の摂取エネルギーの平均は 1503±147kcal で、体重は MCFA 食摂取前には 51kg (BMI 20.8kg/m²)であったが現在も 50.8kg (BMI 20.7kg/m²)と維持し、MCFA 以外の油脂摂取量 40.1g が 28.4g に減量することにより体脂肪量は 16kg から 14.3kg に減少した。筋肉量は 33.1kg から 34.6kg に増加することで、上腕を拳上維持することが可能となりお箸を従来とおり持つことや、自動車の運転が可能になった。MCFA 食を継続摂取することで、ADL が向上した。

D. 考察

症例 1 は、家族の支援はなく限られた社会的支援であり、また、遠隔地のため積極的なコミュニケーションをとることが僅少であったため、MCFA 食の摂取、リハビリに対する患者のモチベーションを維持することができなかった。その結果、体重、筋肉量が減少し ADL も大幅に

低下した。しかし、介護施設での昼食時には MCEFA 含有食品を摂取し、訪問時に共食すると摂取量が増加したことは、社会的支援の継続や積極的なコミュニケーションをとることで MCEFA 食の継続が可能になると考える。症例 2 においては、MCEFA 食の調理、食品の利用など家族の支援や患者および家族と定期的にコミュニケーションをとることで、患者のモチベーションが維持され MCEFA 食およびリハビリを約 2 年 6 ヶ月間継続するに至っている。その結果、体重は維持、筋肉量が増加し、体脂肪量が減少を示し、自動車の運転やの農作業の手伝いが可能となるなど QOL 向上につながった。

MCEFA 食の継続には医療者が現状を定期的に、正確に把握し情報共有することが重要と思われる。そのためには、患者の近隣で支援者を募り、積極的にコミュニケーションをとることが必要である。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ある活動であり、在宅での食事療法に影響を与えることが分かった。

E. 結論

TGCV 患者において MCEFA 食、リハビリを継続することで、体重維持、筋肉量増加、体脂肪量が減少し、その結果、患者の QOL が向上した。しかし、継続困難な状態が続くと体重および筋肉量も減少し ADL も大幅に低下した。遠隔地に居住する在宅での MCEFA 食の継続は、患者のみならず家族や近隣支援者とコミュニケーションを積極的にとることが重要であ

る。積極的なコミュニケーションは、患者との信頼関係を築き患者のモチベーションを高め在宅での食事療法の継続をもたらした。医療者の積極的な介入・支援が患者 QOL に影響を与えた。

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 安野哲彦 福岡大学病院 医学部腎臓・膠原病内科 助教

研究要旨

中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)は心筋細胞や骨格筋に中性脂肪が蓄積する疾患である。細胞内中性脂肪分解の必須酵素である Adipose triglyceride lipase(ATGL)の作用不全が原因とされている。福岡大学にて TGCV と特徴が似ており類縁疾患と考えられる症例を経験しており、その病態解明を行っている。スフィンゴミエリンの蓄積、カルニチン製剤が著効しており、その病態解明のために次世代シーケンス、質量分析にて解析を継続している。

A. 研究目的

中性脂肪蓄積心筋血管症は心筋細胞や骨格筋に中性脂肪が蓄積する疾患である。細胞内中性脂肪分解の必須酵素である Adipose triglyceride lipase(ATGL)の作用不全が原因とされている。福岡大学にて TGCV と特徴が似ており類縁疾患と考えられる症例を経験しており、その病態を解明するため研究を開始した。

B. 研究方法

患者から得られた線維芽細胞を用いて、電子顕微鏡、脂質の蛍光染色、エクソーム解析、質量分析による解析。エルカルチン、ニーマンピック病の治療薬であるミグルスタットを投与し変化をみる。
(倫理面の配慮)
遺伝性疾患の可能性があり、遺伝病性疾患として福岡大学病院の倫理委員会にて承認されている。

C. 研究結果

電子顕微鏡による解析では線維芽細胞内にスフィンゴミエリンの蓄積を疑う形態があり、質量分析においてもスフィンゴミエリンが通常の 1.5 倍検出された。ミグルスタットの投与にてスフィンゴミエリンの蓄積が減ることを確認した。エクソーム解析と質量分析による解析は終了しており、病態解明に向けた分析を行っている。

D. 考察

スフィンゴミエリンの蓄積が特徴的な疾患は、ニーマンピック病が知られているが、特徴的な身体的所見、遺伝子、生化学的な解析でも否定的だった。ATGL 欠損症はエルカルチンの効果がないとされているが、本症例に投与したところ筋力低下などの身体所見が改善した。特徴的な所見がなく確定診断には至ってい

ないため、次世代シーケンスによる責任遺伝子の同定、質量分析による生化学的解析が必要である。

E. 結論

TGCV の類縁疾患を解析しており、この症例を通して、さらに TGCV の病態を解明することを目標としている。

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

Tetsuhiko Yasuno, Kenji

Osafune et al.

Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency

Biochemical and Biophysical Research Communications

448 (2014) 175-181

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

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、ひいては中性脂肪蓄積心筋血管症 (triglyceride deposit cardiomyovasculopathy: TGCV)の表現形の一つである求心性内膜肥厚の病態メカニズムを解明することを目的とする。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、ホモ(ATGL^{-/-})を用いた血管障害モデルを作製し、TGCV の phenotype として、上記の中でも特に重要な冠動脈求心性狭窄発症のメカニズムを詳らかにしたい。

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。

さらに、ATGL^{-/-}の大動脈由来平滑筋細胞(SMCs)を培養し、3μ pore sizeの transwell chamberを用いて、chamber内に遊走因子の一つである platelet-derived growth factor (PDGF)-BBを、chamber外に炎症性サイトカインである tumor necrosis factor (TNF)-αを各々加え、22時間後に chamber底部のフィルター下面へ遊走 migrationしたSMCsの個数を計測した。

(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

対照群である wild type (WT; C57BL/6J)では内膜肥厚が軽微なのに対し、ATGL^{-/-}では有意に進展しており、血管内腔が高度に求心性狭窄を呈していた。これら肥厚内膜を構成するのは主に遊走

migration してきた SMC であった。*ATGL*^{-/-}の大腿動脈壁では、肥厚内膜から外膜にかけて脂肪沈着が同定されている。また、WT と比較して *ATGL*^{-/-}では、外膜に浸潤するマクロファージの集簇が有意に高度であり、これらマクロファージに一致して TNF- α の高発現を伴っていた。

さらに *in vitro* 実験において、chamber 内に PDGF-BB を加えた際にのみ（つまり、chamber 外の TNF- α の存在如何に関わらず）*ATGL*^{-/-}の SMCs では、WT に比べて、遊走細胞の数が有意に多く見られた。

D. 考察

当カフモデルでは‘response to injury hypothesis (inside-out-signaling)’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。ここに、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- α 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 等々も、その大きな一翼を担っていることが推察されよう。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 の一つになり得るかもしれない。しかしながら、現在までの *in vivo* および *in vitro* 実験の結果からは、inside-out-signaling による *ATGL* 欠損 SMCs の遊走能亢進が、内膜肥厚を進展させる可能性に言及されたのみであり、outside-in-signaling 因子

に関しては今後の課題である。

E. 結論

当カフモデルは、TGCV の一表現形である冠動脈求心性狭窄の有益な動物モデルである。*ATGL* 欠損による脂質代謝異常が外膜側よりの刺激 (outside-in-signaling) を誘発している可能性があることを見出したことより、そのメカニズムを解明する発端となり得る。今後その signal 経路をさらに模索すべく検討中である。

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

- ・第 104 回日本病理学会総会（名古屋、2015 年 4 月）「*ATGL* 欠損 SMCs の遊走能亢進は、動脈内膜肥厚を進展させる」
- ・第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会（仙台、2015 年 7 月 発表予定）
- ・第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会（東京、2014 年 7 月）「Depletion of Adipose Triglyceride Lipase Exacerbates Cuff Injury-Induced Vascular Remodeling By Increased Medial Apoptosis and Enhanced Adventitial Inflammation」

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

[]

研究成果の刊行一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
武田晴治, <u>惠 淑萍</u> , 千葉仁志	バイオセンサの迅速・簡易・高機能化技術と課題解決書：過酸化脂質・酸化LDL測定のためのバイオセンサ	天願ルイス	バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発	(株)技術情報協会	東京	2014	9節
<u>長澤康行</u>	第3章小児における脂質状態の評価第4章小児におけるコレステロール低下薬物療法	日本腎臓学会	慢性腎臓病の脂質管理のためのKDIGO診療ガイドライン	東京医学社	東京	2014	18-22
<u>長澤康行</u>	高齢者における鋳質コルチコイド反応性低ナトリウム血症について	萩原俊男 樂木宏美	高齢者における鋳質コルチコイド反応性低ナトリウム血症について	先端医学社	東京	2014	190
<u>羽尾裕之</u>	病理医からみた冠動脈イメージングモダリティ	天野哲也	循環器内科	科学評論社	東京	2014	555-559

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
Higashi M, <u>Hirano K</u> , Kobayashi K, Ikeda Y, Issiki A, Otsuka T, Suzuki A, Yamaguchi S, <u>Zaima N</u> , Hamada S, Hanada H, Suzuki C, <u>Nakamura H</u> , Nagasaka H, Miyata T, Miyamoto Y, <u>Kobayashi K</u> , <u>Naito H</u> , Toda T.	Distinct Cardiac Phenotype between Two Homozygotes Born in a Village with Accumulation of a Genetic Deficiency of Adipose Triglyceride Lipase.	Int J Cardiol	192	30-32	2015
<u>Hirano K</u> , Ikeda Y, <u>Sugimura K</u> , Sakata Y.	Cardiomyocyte steatosis and defective washout of iodine-123-b-methyliodophenyl-pentadecanoic acid in genetic deficiency of adiposetriglyceride lipase.	Eur Heart J	36(9)	580	2015
Ikeda Y, <u>Zaima N</u> , <u>Hirano K</u> , Mano M, <u>Kobayashi K</u> , <u>Yamada S</u> , Yamaguchi S, Suzuki A, Kanzaki H, Hamasaki T, <u>Kotani J</u> , Kato S, Nagasaka H, Setou M, <u>Ishibashi-Ueda H</u> .	Coronary triglyceride deposition in contemporary advanced diabetics.	Pathol Int	64(7)	325-335	2014
Suzuki A, Nagasaka H, Ochi Y, <u>Kobayashi K</u> , <u>Nakamura H</u> , Nakatani D, Yamaguchi S, Yamaki S, Wada A, Shirata Y, <u>Hui SP</u> , Toda T, Kuroda H, Chiba H, <u>Hirano K</u> .	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.	1	249-253	2014
Kaneko K, Kuroda H, Izumi R, Tateyama M, Kato M, <u>Sugimura K</u> , Sakata Y, Ikeda Y, <u>Hirano K</u> , Aoki M.	A novel mutation of PNPLA2 causes neutral lipid storage disease with myopathy and triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Neuromuscul Disord	24(7)	634-641	2014
Yamaguchi S, <u>Zhang B</u> , Tomonaga T, Seino U, Kanagawa A, Nagasaka H, Suzuki A, Miida T, <u>Yamada S</u> , Sasaguri Y, Doi T, Saku K, Okazaki M, Tochino Y, <u>Hirano K</u> .	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, <u>Hirano K</u> .	Refractory hypoglycemia and subsequent cardiogenic shock in starvation and refeeding: report of three cases	Nutrition.	30(9)	1090-1092	2014
Hara Y, Kawasaki N, <u>Hirano K</u> , 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
<u>Hirano K</u> , Tanaka T, Ikeda Y, Yamaguchi S, <u>Zaima N</u> , Kobayashi K, Suzuki A, Sakata Y, Sakata Y, <u>Kobayashi K</u> , Toda T, Fukushima N, <u>Ishibashi-Ueda H</u> , Tavian D, Nagasaka H, <u>Hui SP</u> , Chiba H, Sawa Y, Hori M.	Genetic mutations in adipose triglyceride lipase and myocardial up-regulation of peroxisome proliferated activated receptor- γ in patients with triglyceride deposit cardiomyovasculopathy	Biochem Biophys Res Commun.	443(2)	574-579	2014
Ikeda Y, <u>Hirano K</u> (equal contribution), Fukushima N, Sawa Y.	A novel type of human spontaneous coronary atherosclerosis with triglyceride deposition	Eur Heart J.	35(13)	875	2014
<u>Inaba T</u> , Nomura N, Takahashi M, Ishizuka K, Yoshika K, Yuasa S, Nakanishi M, Fujita N.	Characteristic scattergram of white blood cells obtained using the Pentra MS CRP hematology analyzer in a patient with neutral lipid storage disease	Laboratory Hematology	19	27-29	2013
Sata H, Shibayama H, Maeda I, Habuchi Y, Nakatani E, Fukushima K, Fujita J, <u>Ezoe S</u> , Tadokoro S, Maeda T, Mizuki M, Kosugi S, Nakagawa M, Ueda S, Iida M, Tokumine Y, Azenishi Y, Mitsui H, Oritani K, Kanakura Y.	Quantitative polymerase chain reaction analysis with allele-specific oligonucleotide primers for individual IgH VDJ regions to evaluate tumor burden in myeloma patients.	Exp Hematol.	in press	in press	2015
Miyaoka T, Furuya M, Horiguchi J, Wake R, Hashioka S, Tohyama M, Mori N, Minabe Y, Iyo M, Ueno S, <u>Ezoe S</u> , Murotani K, Hoshino S, Seno H.	Efficacy and safety of yokukansan in treatment-resistant schizophrenia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial (a Positive and Negative Syndrome Scale, five-factor analysis).	Psychopharmacology (Berl).	232	155-164	2015

Fuda H, Watanabe M, <u>Hui SP</u> , Joko S, Okabe H, Jin S, Takeda S, Miki E, Watanabe T, Chiba H.	Anti-apoptotic effects of novel phenolic antioxidant isolated from the Pacific oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) on cultured human hepatocytes under oxidative stress	Food Chemistry	176	226-233	2015
Shrestha R, <u>Hui SP*</u> , Imai H, Hashimoto S, Uemura N, Takeda S, Fuda H, Suzuki A, Yamaguchi S, <u>Hirano K</u> , Chiba H. (*CA)	Plasma capric acid concentrations in healthy subjects determined by high-performance liquid chromatography	Ann Clin Biochem	in press	in press	2015
Shrestha R, <u>Hui SP*</u> , Miura Y, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Fuda H, Chiba H (*CA)	Identification of molecular species of oxidized triglyceride in plasma and its distribution in lipoproteins	Clin Chem Lab Med	in press	in press	2015
<u>惠 淑萍</u>	LC/MS を用いた過酸化脂質および生理活性脂質の分析	臨床病理	62(3)	283-290	2014
Ohkawa F, Takeda S, <u>Hui SP</u> , Sakurai T, Jin S, Fuda H, Chiba H.	Evaluation of antioxidant activity of natural and synthetic compounds against LDL oxidation using CNT electrodes	IEEE Sensors J	14(2)	532-537	2014
Nagasaka H, Tsukahara H, Okano Y, <u>Hirano K</u> , Sakurai T, <u>Hui SP</u> , Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T.	Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first early of life	Clinica Chimica Acta	433	1-4	2014
Nishimukai M, Maeba R, Yamazaki Y, Nezu T, Sakurai T, Takahashi Y, <u>Hui SP</u> , Chiba H, Okazaki T, Hara H.	Serum choline plasmalogens, particularly those with oleic acid in sn-2, are associated with proatherogenic state	J Lipid Res	55(5)	956-965	2014
Shrestha R, <u>Hui SP*</u> , Sakurai T, Yagi A, Takahashi Y, Takeda S, Jin S, Fuda H, Chiba H. (*CA)	Identification of molecular species of cholesteryl ester hydroperoxides in very low-density and intermediate-density lipoproteins	Ann Clin Biochem	51(6)	662-671	2014
Fujita Y, <u>Kozawa J</u> , Iwahashi H, Yoneda S, Uno S, Yoshikawa A, Okita K, Eguchi H, Nagano H, Imagawa A, Shimomura I.	Increment of serum C-peptide measured by glucagon test closely correlates with human relative beta-cell area	Endocrine Journal	in press	in press	2015

Fukuda S, Hirata A, Nishizawa H, Nagao H, Kashine S, Kimura T, Inoue K, Fujishima Y, Yamaoka M, <u>Kozawa J</u> , Kitamura T, Yasuda T, Maeda N, Imagawa A, Funahashi T, Shimomura I.	Systemic arteriosclerosis and eating behavior in Japanese type 2 diabetic patients with visceral fat accumulation.	Cardiovascular Diabetology	14	8	2015
Okita K, Iwahashi H, <u>Kozawa J</u> , Okauchi Y, Funahashi T, Imagawa A, Shimomura I.	Usefulness of the insulin tolerance test in patients with type 2 diabetes receiving insulin therapy.	Journal of Diabetes Investigation	5	305-12	2014
Nagata I, Ike A, Nishikawa H, <u>Zhang B</u> , Sugihara M, Mori K, Iwata A, Kawamura A, Shirai K, Uehara Y, Ogawa M, Miura S, Saku K.	Associations between lipid profiles and MACE in hemodialysis patients with percutaneous coronary intervention: from the FU-Registry	J Cardiol	65	105-111	2015
Ike A, Shirai K, Nishikawa H, Iwata A, Yahiro E, Sugihara M, Kawamura A, Uehara Y, <u>Zhang B</u> , Ogawa M, Mori K, Miura SI, Saku K.	Associations between different types of hypoglycemic agents and the clinical outcome of percutaneous coronary intervention in diabetic patients-From the FU-Registry	J Cardiol	in press	in press	2014
Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, <u>Zhang B</u> , Hirose S.	Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy	Brain Dev	36	613-619	2014
Ishii A, Kanaumi T, Sohda M, Misumi Y, <u>Zhang B</u> , Kakinuma N, Haga Y, Watanabe K, Takeda S, Okada M, Ueno S, Kaneko S, Takashima S, Hirose S.	Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy	Epilepsy Res	108	420-432	2014

Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, Araki A, Tanabe Y, Arai H, Yamashita S, Ohashi T, Oda Y, Ichiseki H, Hirabayashi S, Yasuhara A, Kawawaki H, Kimura S, Shimono M, Narumiya S, Suzuki M, Yoshida T, Oyazato Y, Tsuneishi S, Ozasa S, Yokochi K, Dejima S, Akiyama T, Kishi N, Kira R, Ikeda T, Oguni H, <u>Zhang B</u> , Tsuji S, Hirose S.	Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood	Neurology	82	482-490	2014
Shimizu T, Miura S, Tanigawa H, Kuwano T, <u>Zhang B</u> , Uehara Y, Saku K.	Rosuvastatin activates ATP-binding cassette transporter A1-dependent efflux ex vivo and promotes reverse cholesterol transport in macrophage cells in mice fed a high-fat diet	Arterioscler Thromb Vasc Biol	34	2246-2253	2014
Takata K, Imaizumi S, Kawachi E, Suematsu Y, Shimizu T, Abe S, Matsuo Y, Tsukahara H, Noda K, Yahiro E, <u>Zhang B</u> , Uehara Y, Miura S, Saku K.	Impact of cigarette smoking cessation on high-density lipoprotein functionality	Circ J	78	2955-2962	2014
Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, <u>Zhang B</u> , 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
Sugiyama M, Fukuda T, Sanda Y, Morita Y, Higashi M, Ogo T, Tsuji A, Demachi J, Nakanishi N, <u>Naito H</u> .	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
Fukuda T, Matusda H, Sanda Y, Morita Y, Minatoya K, Kobayashi J, <u>Naito H</u> .	CT findings of risk factors for persistent type endoleak from inferior mesenteric artery to determine indicators of preoperative IMA embolization.	Annals of Vascular Diseases	7(3)	274-9	2014

中尾俊之、菅野義彦、 <u>長澤康行</u> 、 金澤良枝、秋葉 隆、佐中 孜、 渡邊有三、政金生人、友 雅司、 平方秀樹、秋澤忠男、水口 潤	慢性透析患者の食事療法基準	日本透析学会雑誌	47(5)	287-291	2014
<u>長澤康行</u>	体液量の評価	腎と透析	7	15-18	2014
神出 計、樂木宏美、 <u>長澤康行</u> 、 田村尚久、曾根正勝	二次性高血圧 up-to-date 何をどこまで検査する	日本内科学会雑誌	103	188-197	2014
<u>Nagasawa Y</u> , Hasuike Y, Nanami M, Kuragano T, Nakanishi T.	Albuminuria and hypertension: the chicken or the egg?	Hypertens Res	38(1)	8-10	2014
Mikuni M, <u>Nakamura H</u> , Muto M, Ikeda E.	Analysis of Risk Prediction in the Principal Organs Based on Pathological Findings of Cutaneous Small-Vessel Vasculitis.	Intern Med.	in press	in press	2015
Sugiyama E, Takenaka T, Kato M, Minoshima A, Muto H, Noriyasu K, Fujita M, Sato M, Betsuyaku T, Inoue H, Okamoto H, Kunishige H, Ishibashi Y, Tsukamoto E, <u>Nakamura H</u> , Hasebe N.	Isolated cardiac sarcoidosis requiring open-chest myocardial biopsy for differentiation from malignant lymphoma.	J Cardiol Case.	9	239-242	2014
Kuno T, <u>Nakamura H</u> , Endo Y, Saito K, Yamazaki H, Motoda H, Numasawa Y, Shimizu K, Takayashi T.	Clinical history and colliquative myocytolysis are keys to the diagnosis of shoshin beriberi.	Case Rep Pathol.	2014	506072	2014
Oda S, Fujii Y, Takemoto H, Nomura S, Nakayama H, Toyota Y, <u>Nakamura H</u> , Teragawa H.	Heart failure in which coronary spasms played an important role.	Intern Med.	53	227-232	2014
<u>中村浩士</u>	心筋炎モデルから考える心筋炎の病態	呼吸と循環	63	937-41	2015
<u>中村浩士</u>	膠原病における心血管疾患	臨床循環器	4	19-24	2014

Fujii K, <u>Hao H</u> , Shibuya M, Imanaka T, Fukunaga M, Miki K, Tamaru H, Sawada H, Naito Y, Ohyanagi M, Hirota S, Masuyama T.	Accuracy of optical coherence tomography, grayscale in travascular ultrasound and their combination for the diagnosis of coronary thin-cap fibroatheromas: An ex vivo validation Study	JACC Cardiovasc Imag	in press	in press	2015
Fujino A, <u>Hao H</u> , et al.	Restenosis after Drug-Eluting Stent Implantation in a Patient with Polycythemia Vera; Optical Coherence Tomography and Pathological Findings.	JACC Cardiovas Interv	in press	in press	2015
Kawakami R, <u>Hao H</u> , et al.	Drug-Eluting Stent Implantation on Calcified Nodule: Ex Vivo Intravascular Images and Histopathology.	JACC Cardiovas Interv	in press	in press	2015
<u>Hao H</u> , Fujii K, Imanaka T, Kawakami R, Kawano T, Takayama T, Hirayama A, <u>Ishibashi-Ueda H</u> , Masuyama T, Hirota S.	Neointimal hemorrhage after drug eluting stent implantation: Possible role for development of neoatherosclerosis.	JACC Cardiovas Interv	7	1196-1197	2014
<u>Yasuno T</u> , Osafune K, Sakurai H, Asaka I, Tanaka A, Yamaguchi S, Yamada K, Hitomi H, Arai S, Kurose Y, Higaki Y, Sudo M, Ando S, Nakashima H, Saito T, Kaneoka H.	Functional analysis of iPSC-derived myocytes from a patient with carnitine palmitoyltransferase II deficiency	Biochemical and Biophysical Research Commuications	448	175-181	2014