トリヘプタノイン

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

Ultragenyx Japan 株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
C4	4-carbon：炭素数 4
C5	5-carbon (e.g., pentanoate)：炭素数 5（例：ペンタン酸）
CACT	carnitine/acyl-carnitine translocase：カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ
CAS	Chemical Abstract Service
CPT-I	carnitine palmitoyl transferase 1：カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I
CPT-II	carnitine palmitoyl transferase 2：カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II
DCI	daily caloric intake：1 日あたりのカロリー摂取量
FAOD	fatty acid oxidation disorders：脂肪酸代謝異常症
g	gram：グラム
INN	International Nonproprietary Name：国際一般名
JAN	Japan Accepted Name：日本医薬品一般的名称
L	liter/litre(s)：リットル
LC-FAOD	long-chain fatty acid oxidation disorders：長鎖脂肪酸代謝異常症
LCHAD	long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase：長鎖 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素
MCT	medium-chain triglycerides：中鎖脂肪酸トリグリセリド
mL	milliliter(s)：ミリリットル
TCA 回路	tricarboxylic acid cycle (Kreb’s cycle)：トリカルボン酸回路（クレブス回路）
TFP	trifunctional protein：三頭酵素
USAN	United States Adopted Name：米国一般名
UX007	Investigational Product/study drug, pharmaceutical-grade triheptanoin：治験薬／医薬品グレードのトリヘプタノイン
VLCAD	very long-chain acyl-CoA dehydrogenases：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素

目次

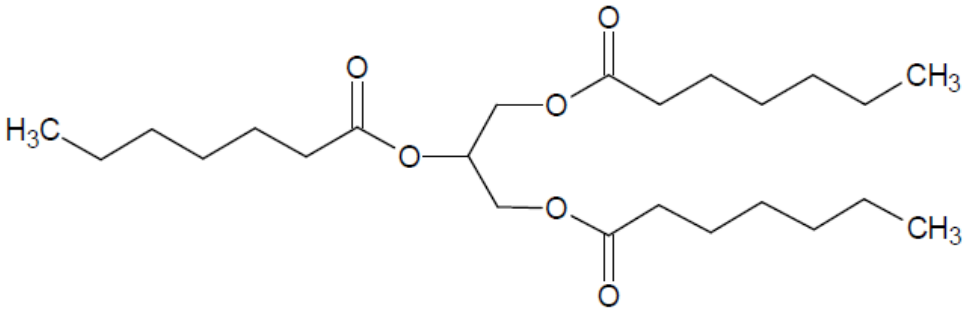
略号一覧表 2
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表 4
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 医薬品情報 4
2.6.1.2 トリヘプタノインの薬理学的性質 4
2.6.1.3 製剤処方 5
2.6.1.4 臨床適応 5
2.6.1.5 申請する適応疾患及び用法 6
2.6.1.6 参考資料 7

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.1 緒言

2.6.1.1 医薬品情報

機関	一般名
米国一般名（USAN）	Triheptanoin
国際一般名（INN）	Triheptanoin
日本医薬品一般的名称（JAN）	トリヘプタノイン（日本語） Triheptanoin（英語）
Chemical Abstract Service（CAS）の名称及び登録番号	Triheptanoin；620-67-7



分子量: 428.6 g/mol

分子式: $C_{24}H_{44}O_6$

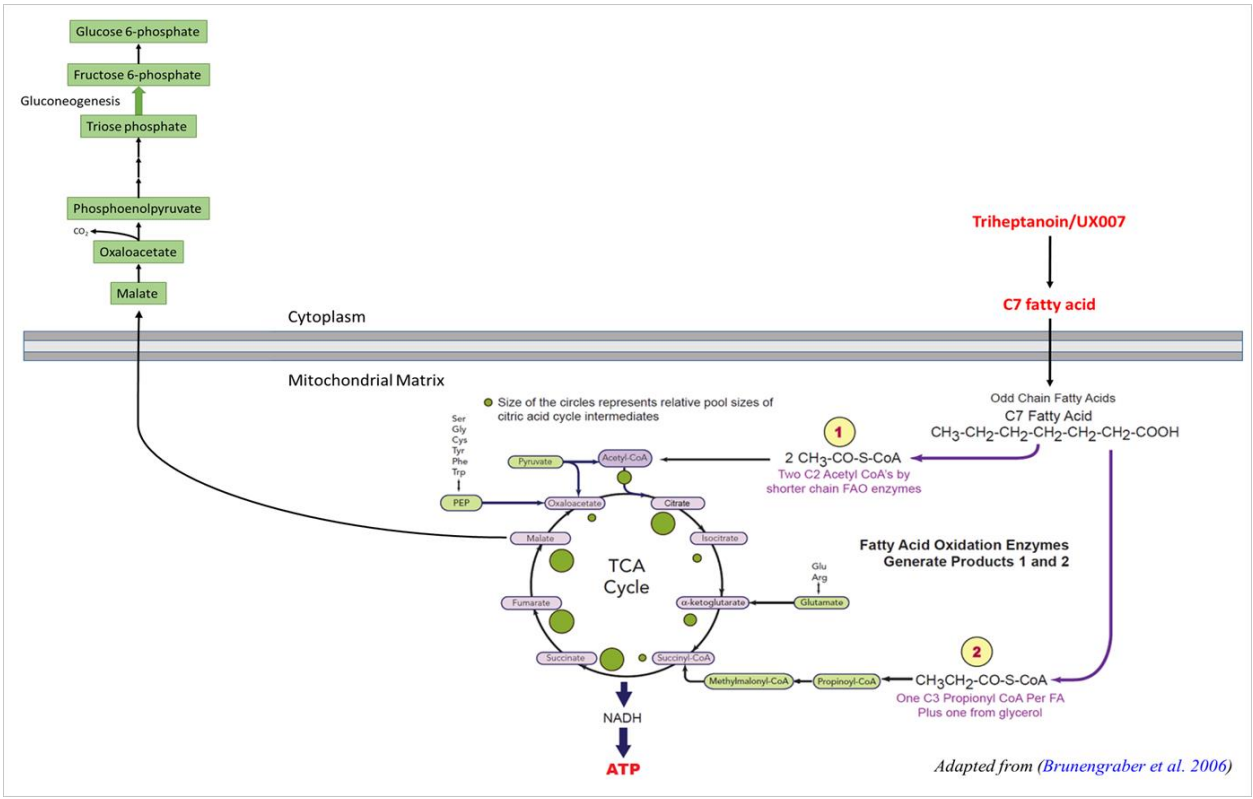
2.6.1.2 トリヘプタノインの薬理学的性質

トリヘプタノイン（UX007）は、グリセロール骨格上に炭素数 7 の脂肪酸が 3 つある奇数鎖中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）であり、長鎖脂肪酸代謝異常症（LC-FAOD）患者を対象としたエネルギー補充療法の基質とすることを目的としている。LC-FAOD は、食事中の長鎖脂肪酸のエネルギーへの変換に大きく関与するミトコンドリア酵素をコードする遺伝子の欠損により生じる、生命を脅かす常染色体劣性遺伝疾患の一群である。トリヘプタノインは、長鎖脂肪酸の酸化を標的とする酵素の有無に依存せず、主要活性代謝物（ヘプタン酸並びに C4 及び C5 ケトン体）に代謝される。このため、トリヘプタノインは、脂肪酸酵素欠損に関連する問題を抱える患者の、脂肪酸代謝異常症（FAOD）関連エネルギー不足に対処するよう位置付けられている。

経口摂取されたトリヘプタノインは、速やかに切断され、細胞膜及びミトコンドリア膜を直接拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収される。遊離ヘプタン酸は短鎖及び中鎖脂肪酸酸化酵素により代謝され、カルニチンサイクル及び LC-FAOD 患者で欠乏する長鎖脂肪酸酸化酵素を迂回する（Figure 1；Brunengraber et al. 2006 から抜粋）。これにより、関連するが異なる 2 つの経路、すなわち、エネルギーを産出するトリカルボン酸（TCA）回路の第一段階である、クエン酸へと濃縮されるアセチル CoA の産生（Figure 1、経路 1）、及び TCA 回路中間体を回復（アナプレロティック反応と呼ばれる工程）させ、糖新生に寄与するスクシニル CoA に変換される炭素数 3 の代謝物であるプロピオニル CoA の産生（Figure 1、経路 2）によりエネル

ギー代謝が回復する。プロピオニル CoA のアナプレロティック反応及び糖新生は奇数鎖脂肪酸に特異的な性質のため（Roe et al. 2002、Marin-Valencia et al. 2013、Deng et al. 2009）、トリヘプタノインは偶数鎖 MCT に対する優位性をもたらす可能性がある。MCT 及びトリヘプタノインはいずれも、アデノシン三リン酸（ATP）（及びケトン体）を産生するために LC-FAOD の欠損酵素を迂回するが、トリヘプタノインは TCA 回路の機能も回復し、感染、長期空腹又は運動により生じる急性代謝ストレス中の LC-FAOD 患者で枯渇する可能性のある糖貯蔵の回復を支援する。このため、トリヘプタノインは、これらの患者における急性代謝ストレスへの耐性を増強する可能性があるより頑健で安定したエネルギー状態をもたらす可能性がある。

Figure 1: Triheptanoin replaces TCA cycle intermediates in LC-FAOD via two metabolic pathways



2.6.1.3 製剤処方

製剤は、経口又は経管投与用の液体である。トリヘプタノインの液剤は、すべての動物試験及び臨床試験で使用されており、予定する市販製剤である。

トリヘプタノイン製剤は、500 mL を充填した複数回投与用ガラス瓶として供給される。詳細については、モジュール 3.2.P.1 の「製剤の説明」参照。

2.6.1.4 臨床適応

トリヘプタノインは、現行の管理方法で十分なコントロールを達成できない成人及び小児の LC-FAOD 患者の治療を目的とし、低脂肪／高炭水化物食と混ぜて投与することを予定している。

LC-FAOD は、食事中の長鎖脂肪酸のエネルギーへの変換に大きく関与するミトコンドリア酵素をコードする遺伝子の欠損により生じる、生命を脅かす常染色体劣性遺伝疾患の一群である。LC-FAOD 疾患群には、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ I（CPT-I）、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ II（CPT-II）、カルニチンアシルカルニチントランスロカーゼ

（CACT）、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素（VLCAD）、長鎖 3-ヒドロキシアシル CoA 脱水素酵素（LCHAD）及びミトコンドリア三頭酵素（TFP）の遺伝的欠損が含まれる。特に、CPT-II、VLCAD 及び LCHAD の欠損は、3 つの主な LC-FAOD 型であり、トリヘプタノインの臨床開発の焦点である。

LC-FAOD で最も影響を受ける組織は、骨格筋、肝臓及び心臓などのエネルギー要求が高く、エネルギーに対する脂肪酸酸化への依存が最も高い組織である。効果的に長鎖脂肪を代謝する能力が低下しているため、LC-FAOD 患者は、一般的な感染や中程度の運動などのエネルギー需要が高い期間に急性代謝クライシスのリスクがある。急性代謝クライシスは、横紋筋融解症、低血糖症又は心筋症として表れることがあり、高頻度で入院に至る。さらに、骨格筋の根本的な慢性エネルギー不足により、運動不耐を含む筋肉機能障害が引き起こされ、日常生活動作が影響を受け、この衰弱状態を抱える患者の健康関連の生活の質が低下する。

2.6.1.5 申請する適応疾患及び用法

トリヘプタノインは、LC-FAOD の治療を適応とする。

トリヘプタノインの推奨目標 1 日用量は、患者が処方される 1 日あたりの総カロリー摂取量（DCI）の 25%～35%であり、mL 換算し、4 回以上の投与に分け、食事又は軽食を摂取するときに半固形食又は液体に十分に混合する（添付文書参照）。

2.6.1.6 参考資料

Brunengraber, H, and Roe, CR. 2006. "Anaplerotic molecules: current and future." J.Inherit.Metab Dis. 29 (2-3):327-331.

Deng, S, Zhang, GF, Kasumov, T, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2009. "Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver." J.Biol.Chem. 284 (41):27799-27807.

Marin-Valencia, I, Good, LB, Ma, Q, Malloy, CR, and Pascual, JM. 2013. "Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain." J Cereb.Blood Flow Metab 33 (2):175-182.

Roe, CR, Sweetman, L, Roe, DS, David, F, and Brunengraber, H. 2002. "Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride." J.Clin.Invest 110 (2):259-269.

トリヘプタノイン

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

Ultragenyx Japan 株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
αKGDH	α-Ketoglutarate-CoA dehydrogenase：α-ケトグルタル酸 CoA 脱水素酵素
AcAc-CoA	acetoacetyl coenzyme A：アセトアセチル CoA
アシル CoA	acyl-coenzyme A：アシルコエンザイム A
ANOVA	analysis of variance：分散分析
ATP	adenosine triphosphate：アデノシン三リン酸
BHB	beta-hydroxybutyrate：β-ヒドロキシ酪酸
BHP	β-hydroxypentanoate：β-ヒドロキシペンタン酸
C4	4-carbon：炭素数 4
C5	5-carbon (e.g., pentanoate)：炭素数 5（例：ペンタン酸）
C7	7-carbon (e.g., heptanoate)：炭素数 7（例：ヘプタン酸）
C8	8-carbon (e.g., octanoate)：炭素数 8（例：オクタン酸）
CNS	central nervous system：中枢神経系
CO	cardiac output：心拍出量
CoA	coenzyme A：コエンザイム A
CS	citrate synthase：クエン酸合成酵素
ECG	echocardiography：心エコー検査
eFS	endocardial fractional shortening：心内膜の左室内径短縮率
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay：酵素結合免疫吸着測定法
FAO	fatty acid oxidation：脂肪酸酸化
FAOD	fatty acid oxidation disorders：脂肪酸代謝異常症
FFA	free fatty acid：遊離脂肪酸
FS	fractional shortening：左室内径短縮率
g	gram：グラム
GABA	gamma-aminobutyric acid：ガンマアミノ酪酸
GC-MS	gas chromatography/mass spectrometry：ガスクロマトグラフィー／質量分析法
GI	gastrointestinal：胃腸
G1D	glucose transporter I-deficient：グルコーストランスポーター1 欠損
GLUT1	glucose transporter 1：グルコーストランスポーター1
GMP	Good Manufacturing Practice：医薬品及び医薬部外品の製造管理及び品質管理に関する基準
GO	glucose oxidation：グルコース酸化
GPX	glutathione peroxidase：グルタチオンペルオキシダーゼ
GSH	glutathione concentration：グルタチオン濃度
hERG	human ether-a-go-go related gene：ヒト急速活性型遅延整流カリウムチャネル遺伝子
HEG-CoA	3-hydroxy-3-ethylglutaryl-CoA：3-ヒドロキシ-3-エチルグルタリル CoA
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A：3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA
HOMA	homeostasis model assessment：恒常性モデル評価
HPLC	high-performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィー
ID	intraduodenally：十二指腸内
IV	intravenously：静脈内
kg	kilogram：キログラム
LC-FAOD	long chain fatty acid oxidation disorders：長鎖脂肪酸代謝異常症
LC-MS	liquid chromatography-mass spectrometry：液体クロマトグラフィー／質量分析法

略語・用語	内容
LCT	long chain triglyceride：長鎖脂肪酸トリグリセリド
LVMI	left ventricular mass index：左室心筋重量係数
m	meter：メートル
MCT	medium-chain triglyceride：中鎖脂肪酸トリグリセリド
ME	malic enzyme：リンゴ酸酵素
MHD2	mitochondrial malate dehydrogenase：ミトコンドリアリンゴ酸脱水素酵素
min	minute(s)：分
mL	milliliter(s)：ミリリットル
mM	millimolar：ミリモル毎リットル
MRI	magnetic resonance imaging：核磁気共鳴画像
Na	sodium：ナトリウム
NMR	nuclear magnetic resonance：核磁気共鳴
PDH	pyruvate dehydrogenase：ピルビン酸脱水素酵素
PTZ	pilocarpine：ピロカルピン
QT	Q wave to T wave interval：Q 波と T 波の間隔
QTc	heart-rate corrected QT interval：心拍数で補正した QT 間隔
PK	pyruvate kinase：ピルビン酸キナーゼ
PK4	pyruvate kinase 4：ピルビン酸キナーゼ 4
PPCA	protective protein/cathepsin A：防御タンパク質／カテプシン A
Ra	rate of appearance：出現速度
RT-PCR	reverse transcriptase-polymerase chain reaction：逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
SCoAS	succinyl-CoA synthetase：スクシニル CoA 合成酵素
SE	status epilepticus：てんかん重積状態
SEM	standard error of the mean：標準誤差
SV	stroke volume：1 回拍出量
T30	30% of total energy value：総エネルギーの 30%
T7	triheptanoin-enriched diet at 7%：7%トリヘプタノイン添加食
TAG	triacylglyceride：トリグリセリド
TBAR	thiobarbituric acid reactive substance：チオバルビツール酸反応性物質
TCA 回路	tricarboxylic acid cycle (Kreb’s cycle)：トリカルボン酸回路（クレブス回路）
UX007	Investigational Product/study drug, pharmaceutical-grade triheptanoin：治験薬／医薬品グレードのトリヘプタノイン
$VLCAD^{-/-}$	very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損
WT	wildtype：野生型

目次

略号一覧表 2
2.6.2 薬理試験の概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.1.1 In vitro 薬理試験 6
2.6.2.1.2 In vivo 薬力学的試験 6
2.6.2.1.3 副次的薬理試験 7
2.6.2.1.4 安全性薬理試験 7
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 8
2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験 8
2.6.2.2.2 In vivo 薬力学的試験 8
2.6.2.2.2.1 トリヘプタノインの肝内薬理作用 11
2.6.2.2.2.1.1 ラット灌流肝における C4 ケトン体生成、C5 ケトン体生成及びアナプレロティック反応の相互関係（Deng et al. 2009） 11
2.6.2.2.2.1.2 正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口（IV）及び腸内（ID）代謝（Kinman et al. 2006） 16
2.6.2.2.2.1.3 正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口及び腸内代謝：脂質分解、糖産生及び肝アシル CoA プロファイルに対する影響（Gu et al. 2010） 21
2.6.2.2.2.2 トリヘプタノインの肝外薬理作用 26
2.6.2.2.2.2.1 神経の栄養源としてのヘプタン酸：正常マウス及びグルコーストランスポーター1 欠損（G1D）マウスにおけるエネルギー前駆体及び神経伝達物質前駆体（Marin-Valencia et al. 2013） 26
2.6.2.2.2.2.2 試験 I）極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD$^{-/-}$）マウスにおける心筋症の発現及び病理学的機序（Tucci et al. 2014）及び試験 II）トリヘプタノイン：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウスにおける長期作用（Tucci et al. 2017） 29
2.6.2.2.2.2.3 2 種類の慢性発作マウスモデルにおけるトリヘプタノイン飼料の抗痙攣作用（Willis et al. 2010） 37
2.6.2.2.2.2.4 トリヘプタノインは、圧過負荷ラットにおいて心室肥大を軽減し、心筋グルコース酸化を改善する（Nguyen et al. 2015） 40
2.6.2.3 副次的薬理試験 45
2.6.2.4 安全性薬理試験 46
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 47
2.6.2.6 考察及び結論 48
2.6.2.7 参考文献 51

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

トリヘプタノイン（UX007）は、グリセロール骨格上に炭素数 7 の脂肪酸が 3 つある奇数鎖中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）であり、長鎖脂肪酸代謝異常症（LC-FAOD）患者を対象としたエネルギー補充療法の基質とすることを目的としている。本疾患群は、長鎖脂肪酸をトリカルボン酸（TCA）回路のエネルギー基質へと変換する代謝経路の欠損により生じ、多くの臓器系でエネルギー代謝の欠損及びエネルギー欠乏状態が引き起こされる。利用可能なエネルギー基質がないことに加え、LC-FAOD の発病は TCA 回路中間体の枯渇と関連しており、これにより TCA 回路を介してアデノシン三リン酸（ATP）へ利用可能な基質でさえ代謝する能力が妨害される。この欠損は、心筋の TCA 回路中間体が枯渇している脂肪酸代謝異常症（FAOD）マウスモデルで認められている（Bakermans et al. 2013、Houten et al. 2010）。

現在、LC-FAOD は、細心の注意を払った空腹回避、低脂肪／高炭水化物食の維持、及び／又は長鎖脂肪酸代謝酵素の欠損を迂回するための食事中偶数鎖 MCT の経口摂取により管理されている。偶数鎖 MCT（例：オクタン酸）は、別経路でミトコンドリア膜を直接的に通過し、酸化されて、TCA 回路及び ATP 産生の重要な基質であるアセチル CoA を生成し、FAOD に対して臨床で使用されている（Kinman et al. 2006）。このため、偶数鎖 MCT 補充により、エネルギー基質を提供できるが、TCA 回路中間体は供給されない。追加のエネルギー基質の必要性と TCA 回路中間体の供給能力（アナプレロティック反応）の両方に対処する可能性に基づき、トリヘプタノインを LC-FAOD を対象とした検討に選択した。トリヘプタノインの薬理作用の評価は、トリヘプタノインの作用機序、並びに正常動物及び疾患動物モデルにおけるその肝臓及び肝臓外の薬理作用を実証している、公表された *ex vivo* 及び *in vivo* 試験を評価することにより行った（非臨床試験計画については、モジュール 2.4.1 を参照）。簡潔に説明すると、経口摂取されたトリヘプタノインは、速やかに切断され、（オクタン酸のように）細胞膜及びミトコンドリア膜を直接拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収される。遊離ヘプタン酸は短鎖及び中鎖脂肪酸酸化酵素により代謝される（長鎖脂肪酸とは異なり、カルニチンサイクルを迂回する）。ヘプタン酸はアセチル CoA 及びプロピオニル CoA へと代謝される。アセチル CoA は TCA 回路に入り、エネルギー代謝及び ATP 産生に必要とされる。空腹時及びエネルギー要求量が高い期間には、代わりに、ケトン体生成のために肝臓内でアセチル CoA を転用することができる。プロピオニル CoA はスクシニル CoA へとさらに代謝され、LC-FAOD 患者において二次的に欠損する可能性のある TCA 回路中間体を再供給する（アナプレロティック反応）。また、基質（特にスクシニル CoA）の可用性の向上及び TCA 回路の機能改善によっても、糖新生（Marin-Valencia et al. 2013）及びその後の肝グリコーゲン貯蔵の増加（Gu et al. 2010）などの下流プロセスが改善される。このため、奇数鎖中鎖脂肪酸であるトリヘプタノインは、偶数鎖 MCT と比べて、頑健で安定したエネルギー状態を作り出す可能性があり、それにより LC-FAOD 患者で感染、空腹又は運動により生じる代謝ストレスへの耐性が増強される。

これらの公表された食品グレードのトリヘプタノインに関する試験において、トリヘプタノインの作用機序及び薬理作用が十分に説明されており、その臨床開発が支持されたため、追加の非臨床試験は必要ないと考えられた。

食品グレードのトリヘプタノインの包括的な過去の臨床経験及び非臨床経験において、心血管系、中枢神経系（CNS）又は呼吸器の安全性上の懸念は報告されていない（モジュール 2.7.4 を参

照）ため、トリヘプタノインの安全性薬理試験は必要ないと考えられ、別途実施しなかった。

2.6.2.1.1 In vitro 薬理試験

トリヘプタノインの in vitro 薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.1.2 In vivo 薬力学的試験

トリヘプタノインの（1）肝内薬理作用及び（2）肝外薬理作用を実証した ex vivo 及び in vivo モデルを用いたトリヘプタノイン代謝とアナプレロティック反応及び糖新生の関係を検討した重要な文献 8 報がトリヘプタノインのベネフィットの理解に貢献している。非臨床研究の多くは、関与する試験動物種の 1 日あたりのカロリー要求量と一致するか、大きく上回る用量でのトリヘプタノインの強制経口投与又は混餌投与に基づいている。まとめると、これらの試験からトリヘプタノインの臨床使用で予定する経口投与経路が支持される。

正常なラット及びマウスへのトリヘプタノイン混餌の反復投与後及びトリヘプタノインの単回点滴静注後に、肝臓のアナプレロティック基質の濃度増加が認められた。ヘプタン酸の単回静脈内投与はアセチル CoA、プロピオニル CoA 及びグルコースの濃度増加と関連したことから、ヘプタン酸代謝により糖新生の基質が得られることが確認された（Marin-Valencia et al. 2013）。また、このことは、正常ラット肝臓を用いた ex vivo 灌流試験における組織中濃度でも検討された（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009）。トリヘプタノイン代謝から生成されるケトン体は、糖新生系であり（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009）、グリコーゲン貯蔵も増加させる可能性がある（Gu et al. 2010）。

進行性心筋症の表現型を有する極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD-/-）マウスを用いた試験において、トリヘプタノイン混餌の長期間（1 年）投与は忍容性が良好であり、肝臓のアナプレロティック反応が増加することが示された。これにより肝臓の脂質含量、複数酵素の活性及びタンパク質の発現が増加したが、そのすべてが肝臓の TCA 回路の活性増強と相関する（Tucci et al. 2017）。トリヘプタノインは、収縮機能不全の発現を完全に阻止しなかったものの、MCT 混餌を 1 年間投与した後に認められたこれらの動物における心機能不全や酸化ストレスを悪化させなかった（Tucci et al. 2014）。これらのデータから、長期のトリヘプタノイン混餌は本モデルで心臓を保護する可能性があることが示唆された。しかしながら、マウスにおける脂肪酸代謝はヒトと同一ではなく、この VLCAD-/-マウスモデルではヒトを完全に再現していないことを考慮することが重要である。このため、本試験（Tucci et al. 2014、Tucci et al. 2017）で認められた進行性の心臓病理の結果は、臨床での VLCAD 酵素欠損を正確に予測するものではない可能性がある。いずれにせよ、トリヘプタノインは、心疾患を悪化させた MCT オイルと比べて本モデルに対して保護的であった。

大動脈結紮により誘発した心圧過負荷に供したラットを用いた機能評価から、トリヘプタノイン混餌の短期投与により、心室肥大が軽減し、拡張機能が改善することが示された（Nguyen et al. 2015）。

トリヘプタノインの静脈内投与はアセチル CoA、プロピオニル CoA 及びグルコースの濃度増加と関連したことから、ヘプタン酸代謝により脳の糖新生の基質が得られることが、3 重標識した安定同位体標識試験に基づいて確認された。このことは、ヘプタン酸が、TCA 活性に直接影響を及ぼす細胞種（肝代謝以外）内に自由に拡散できることを示唆している（Marin-Valencia et al. 2013）。トリヘプタノイン混餌により、マウスてんかんモデルでアナプレロティック中間体濃度が

増加し、発作軽減の薬理学的ベネフィットと相関した（Willis et al. 2010）。これは、アナプレロティック中間体の作用が実証される別のモデルである。

2.6.2.1.3 副次的薬理試験

トリヘプタノインの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.1.4 安全性薬理試験

トリヘプタノインの安全性薬理試験は実施しなかった。トリヘプタノインのすべての臨床経験及び非臨床経験において、CNS や呼吸器の安全性上の懸念に関する徴候は報告されていない。脂肪酸としての基礎生化学はその他の通常の脂肪酸と同様と考えられ、生化学的に作用があるとは予想されない。

具体的に心血管リスク（例：QT 延長）を考慮すると、1950 年代以降、MCT は栄養として使用されており、1990 年代以降には、（早産児用粉ミルク及び遺伝性疾患の治療を含む）医療現場で使用が増えていることがよく知られている（Marten et al. 2006）。ヒト及び動物における MCT の毒性学的な特性に関する包括的な評価から、心血管リスクがないことを含めて、MCT の安全性が確認された（Traul et al. 2000）。この安全性を裏付けるデータには、複数の動物種における急性、亜慢性、及び慢性毒性試験、並びにヒトの対照試験から得られた所見が含まれており、いずれも心血管系の有害転帰は認められなかった。MCT を高用量（最大で総脂肪の 15～20%又は約 9～12 g/kg/日）投与した場合でも、血圧、心重量、血清脂質プロファイルに臨床的に意味のある変化は認められなかった。長鎖脂肪酸トリグリセリドと比較して、コレステロール及びトリグリセリドは同等又は良好な影響を示した。臨床試験においては、MCT は 1 g/kg/日までの投与量で忍容性が確認され、不整脈発生の可能性や血行動態への悪影響は認められなかった（Traul et al. 2000）。この期間に、QTc 間隔に対する MCT の影響を示唆する臨床データや非臨床データは確認されていない。MCT 投与後のヒトでの QT 延長に関する症例報告は確認されておらず、中鎖脂肪酸が hERG カリウムイオンチャネルを妨害するという in vitro 所見を認めた試験もない。トリヘプタノインはより一般的な偶数鎖 MCT と構造が類似するため、これらの知見はトリヘプタノインの安全性薬理評価に対して意義があり、また、QTc 間隔に対する影響を示唆するデータはない。MCT 及び食品グレードのトリヘプタノインの過去の使用に関する文献からの QT 延長や関連する臨床事象の報告がないことから、トリヘプタノインが QTc 間隔に影響を与える可能性はないことが示唆される。この知見は、心エコー検査（ECG）や有害事象のいずれのデータも、QTc 間隔に対するトリヘプタノインの影響を示さなかったとする、Ultragenyx 社主導の LC-FAOD 患者を対象とした医薬品グレードのトリヘプタノインの臨床試験のデータによりさらに裏付けられている。

トリヘプタノインの薬理作用を裏付ける公表された非臨床試験の一覧を 2 項の Table 1 及び薬理試験概要表（モジュール 2.6.3）に示す。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 In vitro 薬理試験

トリヘプタノインの *in vitro* 薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.2.2 In vivo 薬力学的試験

トリヘプタノインの薬理作用及び代謝に関する公表データが利用できることを考慮し、トリヘプタノインの効力を裏付ける試験は実施しなかった。LC-FAOD の治療への使用について示したトリヘプタノインの複数の重要な効力を裏付ける試験の一覧を Table 1 に示し、以下で説明する。肝内及び肝外の薬理作用を取り扱う目的別に、試験を分類する。すべての引用をモジュール 4.3 に示す。

Table 1Pharmacodynamic Studies of Triheptanoin

Study Type	Reference	Study Title	Animal or Model	Test Article	Dose/ Concentration	Route	Duration
Ex Vivo	(Marin-Valencia et al. 2013)	Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain	Adult C57BL/6J Mouse; transgenic Adult GLUT-1 Mouse	[5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate	150 mM infused at a rate providing 50% caloric requirement, equivalent to 95.9 ± 3.9 µmol heptanoate/min/kg	IV infusion	35 min
In Vivo	(Tucci et al. 2014)	Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD$^{-/-}$) mice	Adolescent VLCAD$^{-/-}$ Mouse	Medium chain triglyceride (MCT)	4.4% MCT	Dietary	12 months
	(Tucci et al. 2017)	Triheptanoin: long-term effects in the VLCAD$^{-/-}$ mouse		Triheptanoin (food-grade)	4.4% triheptanoin		
In Vivo	(Willis et al. 2010)	Anti-convulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models	Adult CF1 Mouse	Triheptanoin (food-grade)	Up to 20-35% caloric requirement	Dietary	up to 7.5 weeks
Ex Vivo	(Deng et al. 2009)	Interrelations between C4 Ketogenesis, C5 Ketogenesis, and Anaplerosis in the Perfused Rat Liver	Adult Sprague Dawley Rat	One of ([1-^{13}C]octanoate, [8-^{13}C]octanoate, [5,6,7-$^{13}C_3$]-heptanoate,[$^{13}C_3$]propionate, or (octanoate + heptanoate)	1 mM	Liver perfusion	Approx. 20 min
In Vivo	(Kinman et al. 2006)	Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats	Adult Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade)	10-40% caloric requirement	IV infusion (10-40% dose) or ID infusion (40%)	90-120 min

Study Type	Reference	Study Title	Animal or Model	Test Article	Dose/ Concentration	Route	Duration
In Vivo	(Gu et al. 2010)	Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile	Adult Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade) or Heptanoate-Na	40% caloric requirement	IV or ID infusion	125 min
In Vivo / Ex Vivo	(Nguyen et al. 2015)	Triheptanoin alleviates ventricular hypertrophy and improves myocardial glucose oxidation in rats with pressure overload	Adolescent Sprague Dawley Rat	Triheptanoin (food-grade for in vivo study) Glucose, heptanoate or oleate (for ex vivo heart perfusion)	7% or 30% total diet (kJ) for in vivo study 5 mM (glucose); 0.5 mM (oleate), 1.2 mM (heptanoate) for ex vivo	Dietary (in vivo); Isolated heart perfusion (ex vivo)	5 weeks (in vivo); 30-60 min perfusion (ex vivo)

2.6.2.2.2.1 トリヘプタノインの肝内薬理作用

2.6.2.2.2.1.1 ラット灌流肝における C4 ケトン体生成、C5 ケトン体生成及びアナプレロティック反応の相互関係（Deng et al. 2009）

目的: 本試験の目的は、オクタン酸及び／又はヘプタン酸を灌流したラット肝臓における C4 ケトン体生成及び C5 ケトン体生成とアナプレロティック反応の相互作用を検討することであった。

試験デザイン: 雄 Sprague-Dawley ラットに実験動物用標準飼料を 8～12 日間給餌した。*Ex vivo* 試験では、Table 2 に示すように、再循環しない 1 mM 脂肪酸を含有する重炭酸緩衝液及び 4 mM グルコースで、一晩絶食したラットから得た肝臓を 20 分間灌流した。14 及び 18.5 分時に流入部灌流液と流出部灌流液を回収した。20 分時に灌流を止めて、肝臓を凍結保存した。重要な評価項目は、ガスクロマトグラフィー／質量分析法（GC-MS）による肝灌流液からの脂肪酸取込み、C4 ケトン体及び C5 ケトン体の生成の定量であった。アシル CoA エステルの質量アイソトポマー分布を液体クロマトグラフィー／質量分析法（LC-MS）により求めた。スクシニル CoA/プロピオニル CoA 比を用いて、プロピオニル CoA からのアナプレロティック反応の相対速度を算出した。

質量アイソトポマー分布が得られる電子イオン化条件下で GC-MS により、分析対象物質の定量を行った。

Table 2: Study Design: Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver (Deng et al. 2009)

Group	Test Article	Concentration (mM)	Number of Perfusions[1]
1	[1-^{13}C] octanoate	1	6
2	[8-13C]octanoate	1	6
3	[5,6,7-$^{13}C_3$]-heptanoate	1	6
4	[$^{13}C_3$]propionate	1	6
5	octanoate + heptanoate	1 mM (per test article)	6
6	octanoate + heptanoate	1 mM (per test article)	6

[1] Perfusions were performed in the presence of selected unlabeled or ^{13}C-labeled substrates for a total of approximately 70 liver perfusion experiments.

結果: 本試験において、オクタン酸及びヘプタン酸を灌流したラット肝臓における C4 ケトン体及び C5 ケトン体の *ex vivo* 代謝が示されている。結果から、C8、C7 及び C4 脂肪酸の取込みと C4 ケトン体及び C5 ケトン体生成の関係、プロピオニル CoA などのアナプレロティック中間体の生成に対する C4 ケトン体生成及び C5 ケトン体生成の影響、ヘプタン酸及びプロピオン酸からのアナプレロティック反応の測定結果が示された。

C8、C7 及び C4 脂肪酸の取込みと C4 ケトン体及び C5 ケトン体の生成との関係: オクタン酸、ヘプタン酸及びプロピオン酸の取込み、並びに C4 ケトン体の生成を Figure 1 に示す。オクタン酸からの C4 ケトン体生成（Figure 1A）は、オクタン酸 1 分子から C4 ケトン体 2 分子が得られるため、効率的な工程である（推定収率は 80%～90%である）。オクタン酸と類似するプロファイルを示すヘプタン酸の取込みを Figure 1B に示す。ヘプタン酸 1 分子からプロピオニル CoA 1 分子とアセチル CoA 2 分子が得られるため、ヘプタン酸は C4 ケトン体生成と C5 ケトン体生成の両方に寄与する。非常に低収率の反応におけるプロピオン酸の取込み、並びに C4 ケトン体及び C5 ケトン体の放出を Figure 1C に示す。また、このことから、プロピオン酸濃度が高いとその他の脂

肪酸供給源（例：オクタン酸及びヘプタン酸）からの C4 ケトン体生成が阻害されることも示されている。

Figure 1: Comparison between the uptake of octanoate (*A*), heptanoate (*B*), or propionate (*C*) and the production of C_4 ketone bodies (β-hydroxybutyrate + acetoacetate) and C_4 ketone bodies (β-hydroxypentanoate + β-ketopentanoate).

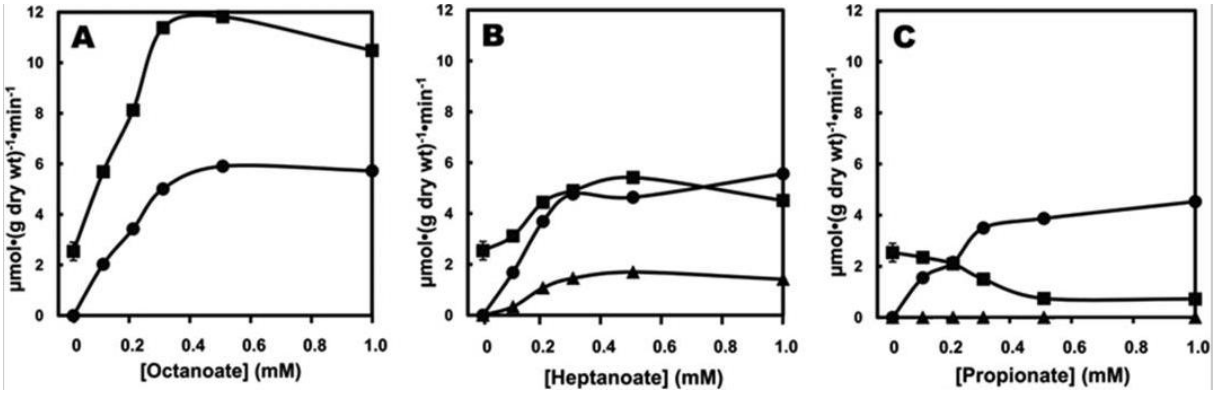


Figure legend: ●, fatty acid uptake; ■, C_4ketogenesis; ▲, C_5 ketogenesis). ***A***, no C_5 ketone bodies were detected in the presence of octanoate. ***A***, ***B***, ***C***, ***n*** = 6 at zero concentration of influent fatty acid; ***n*** = 1 for the other concentrations. All liver perfusions reported in this manuscript were conducted for 20 min. All rates of substrate uptake and production (C) were assayed on samples of influent and effluent perfusate taken at 14 and 18.5 min (collecting the samples over 1 min). All reported values are the means of the 14- and 18.5-min measurements.

オクタン酸及びヘプタン酸の取込みの競合阻害作用、並びにこれが C4 ケトン体生成及び C5 ケトン体生成にどのように影響するのかについて、Figure 2 で検討する。Figure 2A 及び Figure 2B から、(ヘプタン酸濃度が高い条件下であっても) 肝臓はヘプタン酸よりもオクタン酸の取込みを優先することが示されている。

Figure 2: Competition between octanoate and heptanoate for uptake by perfused rat livers.

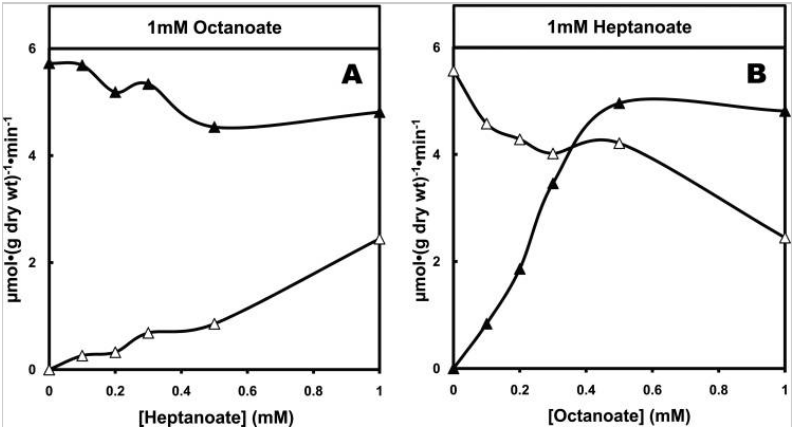


Figure legend: ***A***, constant 1 mM octanoate + increasing heptanoate concentration in influent perfusate. ***B***, constant 1 mM heptanoate + increasing octanoate concentration in influent perfusate. The ***vertical scale*** shows the uptake of octanoate (▲) and heptanoate (△).

一定濃度のオクタン酸に対してヘプタン酸濃度を上げながら加えたとき（Figure 3A）、C4 ケトン体の生成は影響を受けなかった。これとは対照的に、一定濃度のヘプタン酸に対してオクタン酸濃度を上げながら加えると、C4 ケトン体生成は大幅に増加する（Figure 3B）。

Figure 3: Competition between C_4 ketogenesis from octanoate and C_5 ketogenesis from heptanoate in perfused rat livers.

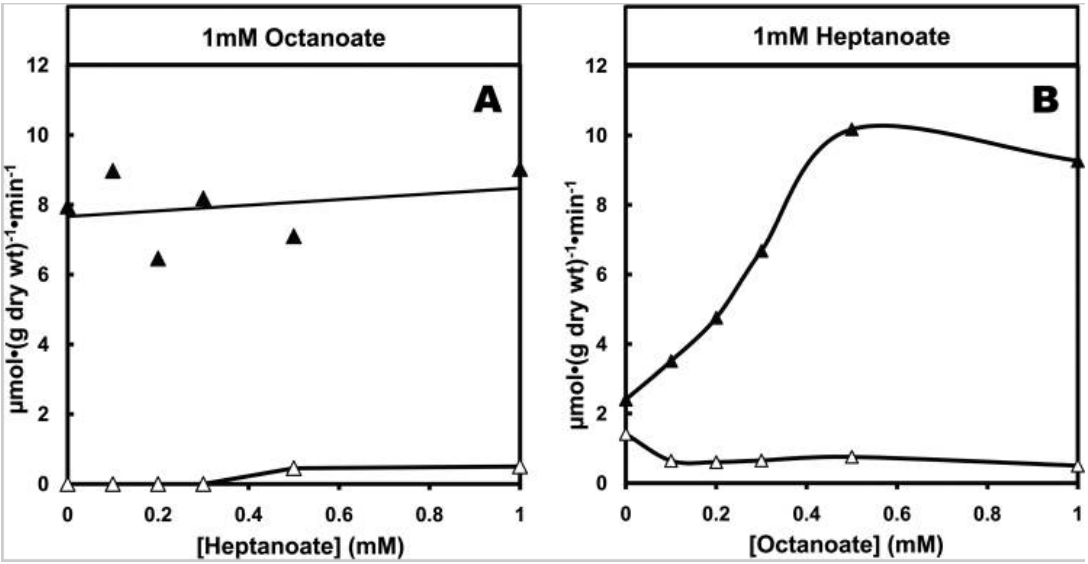


Figure legend: ***A***, constant 1 mM octanoate + increasing heptanoate concentration in influent perfusate. ***B***, constant 1 mM heptanoate + increasing octanoate concentration in influent perfusate. The ***vertical scale*** shows the production of C_4 ketone bodies (▲) and C_5 ketone bodies (▵).

ケトン体の標識 : 脂肪酸（オクタン酸又はプロピオン酸）の濃度増加の関係は、*ex vivo* 肝標本の流出部灌流液中で比例を下回って示される。重要なことに、低濃度のオクタン酸では、流出物として測定される基質は肝臓にほとんど残らなかった。

C4 ケトン体生成及びC5 ケトン体生成はアセチルCoA のプールを共有する : Figure 4 に示す標識パターンから、オクタン酸とヘプタン酸の両方の存在下、C4 ケトン体生成及び C5 ケトン体生成用のアセチル基がいずれかの脂肪酸供給源に由来することが示される。[1-^{13}C]ヘプタン酸のみで灌流した肝臓において（Figure 4A ; 0 mM オクタン酸）、アセチル CoA はヘプタン酸のみに由来した。オクタン酸濃度を増加させて[1-^{13}C]ヘプタン酸に加えると、β-ヒドロキシペンタン酸（BHP）の標識濃縮度が低下した（非標識オクタン酸の存在による）。濃縮に対する標識脂肪酸と非標識脂肪酸の濃度増加の関係を Figure 4B～D に示す。

Figure 4: Sharing of acetyl groups between C_4 and C_5 ketogenesis reflected by the mass isotopomer distribution of BHB and BHP.

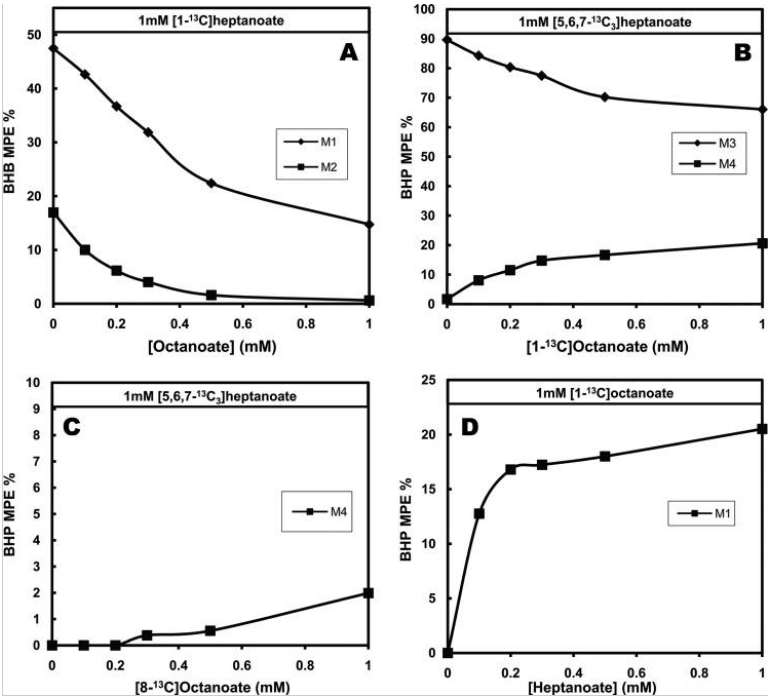
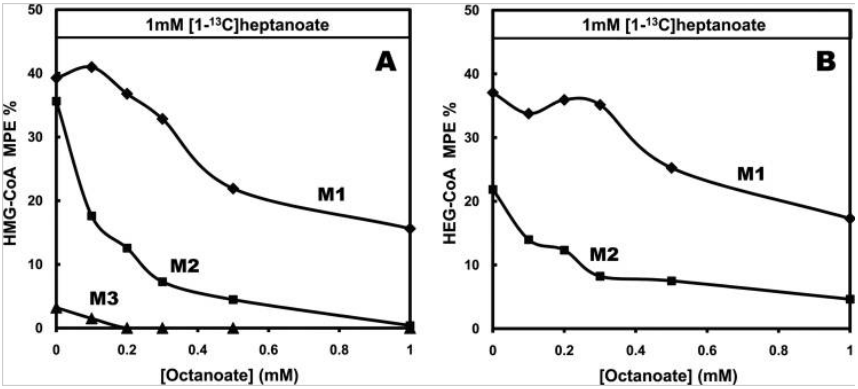


Figure legend: ***A***, labeling pattern of BHB in perfusions with constant 1 mM [1-^{13}C]heptanoate + increasing concentrations of unlabeled octanoate. ***B***, labeling pattern of BHP in perfusions with constant [5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate and increasing concentrations of [1-^{13}C]octanoate. ***C***, labeling pattern of BHP in perfusions with constant [5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate and increasing concentrations of [8-^{13}C]octanoate. ***D***, labeling pattern of BHP in perfusions with constant [1-^{13}C]octanoate and increasing concentrations of unlabeled heptanoate.

Figure 5 に示す標識パターンは、標識ヘプタン酸が一定で、非標識オクタン酸の濃度を増加させたときの、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA（HMG-CoA）（Figure 5A）及び 3-ヒドロキシ-3-エチルグルタリル CoA（HEG-CoA）（Figure 5B）への標識組込みの濃縮パターンを示している。Figure 4 に示すように、これにより、濃度関係に基づいて、両方の脂肪酸が HMG-CoA 及び HEG-CoA の中間体の生成に寄与することも示している。HMG-CoA 合成は、ヘプタン酸酸化に由来するアセチル CoA の使用が可能であり、HEG-CoA 合成はオクタン酸酸化に由来するアセチル CoA の使用が可能である。また、オクタン酸に由来するアセチル CoA を C5 ケトン体生成に使用できることも示唆されている。

Figure 5: Mass isotopomer distribution of HMG-CoA (A) and HEG-CoA (B) in livers perfused with constant 1 mM [1-13C]heptanoate and increasing concentrations of unlabeled octanoate.



ヘプタン酸及びプロピオン酸からのアナプレロティック反応：本試験において、アナプレロティック反応は、相対的又は絶対的なフラックスとして表現することができる。相対的アナプレロティック反応は、酸化のためのアセチル基を含む TCA 中間体の炭素数 4 の成分（プロピオニル CoA 前駆体）へのアナプレロティック基質の寄与率を指す。絶対的アナプレロティック反応は、単純に、アナプレロティック基質が TCA 回路に入る速度である。

相対的アナプレロティック反応は、アナプレロティック基質由来の TCA 中間体の割合として表現されるのに対し、絶対的アナプレロティック反応は、その基質が TCA 回路に流入する速度 mol・g^{-1}・min^{-1} の定量値として表される。

測定パラメータには、(i) ^{13}C トレーサー由来のスクシニル CoA 及びプロピオニル CoA 質量アイソトポマー濃縮度、並びに(ii) GC-MS 及び LC-MS により決定される基質取り込み及び C_5ケトン体産生速度が含まれる。

相対的アナプレロティック反応は、M3 濃縮スクシニル CoA と M3 濃縮プロピオニル CoA の比率として算出した。M3 は、炭素原子 3 個が同位体標識された質量アイソトポマーを指し、基質の同定及び定量に用いられる。

$$Relative\ Anaplerosis = \frac{M3\ succinyl - CoA}{M3\ propionyl - CoA}$$

絶対的アナプレロティック反応は基質フラックス測定から以下の式により算出され、μmol (g dry wt)$^{-1}$ min^{-1} として表される。

$$Absolute\ Anaplerosis = \frac{(Uptake\ of\ substrate - C5\ ketogenesis)}{Fractional\ anaplerosis\ from\ this\ substration}$$

このことは、スクシニル CoA から（ピルビン酸及びグルコースの生成に至る）オキサロ酢酸へ進む TCA 回路の各部分の速度と関連する。相対的アナプレロティック反応（Figure 6A）、絶対的アナプレロティック反応（Figure 6B）及びグルコース標識（Figure 6C）に対するアナプレロティック基質（標識化したプロピオン酸又はヘプタン酸）の濃度増加の影響について、Figure 6 に示す。[$^{13}C_3$]プロピオン酸のみからの相対的アナプレロティック反応は、[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸のみからの相対的アナプレロティック反応と比べて、基質濃度に伴い急速に増加した。絶対的アナプ

レロティック反応では逆のことが起こった（ヘプタン酸による絶対的アナプレロティック反応の速度はプロピオン酸によるものよりも速かった）。一定のオクタン酸を加えることで、ヘプタン酸のみからの相対的アナプレロティック反応ベネフィット（Figure 6A）、ヘプタン酸により引き起こされたアナプレロティック反応の絶対速度（Figure 6B）及びヘプタン酸のみからのグルコース標識（Figure 6C）が減弱する。

Figure 6: Anaplerosis and glucose labeling from increasing concentrations of [$^{13}C_3$]propionate (♦) or [5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate (■,▲).

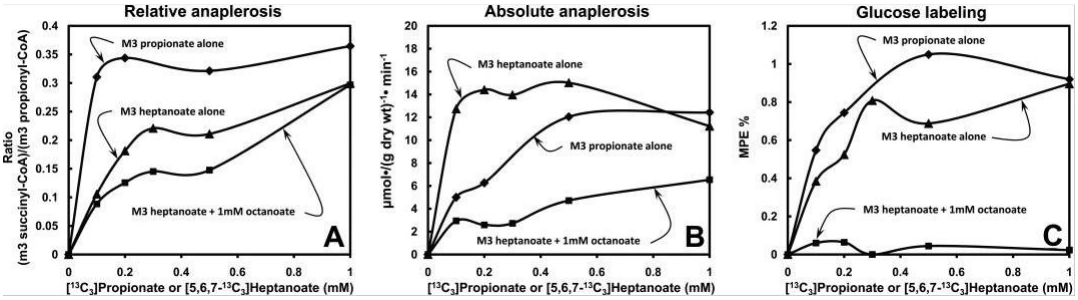


Figure legend: The perfusions with increasing [5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate concentrations were conducted in the absence (▲) or presence (■) of constant 1 mM [1-^{13}C]octanoate. ***A***, relative anaplerosis expressed as the m3 enrichment ratio (succinyl-CoA)/(propionyl-CoA). ***B***, absolute anaplerosis. ***C***, M2 + M3 labeling of glucose in the effluent perfusate.

考察及び結論：C4 ケトン体生成及び C5 ケトン体生成とアナプレロティック反応の相互作用を理解するとの観点から、オクタン酸、ヘプタン酸及びプロピオン酸の取込み及び収率が検討された。アセチル CoA 2 分子を産生するオクタン酸は、高効率の C4 ケトン体生成を支持する。ヘプタン酸 1 分子はアセチル CoA 2 分子とプロピオニル CoA 1 分子を生成する。全体として、ケトン体生成で、ヘプタン酸はオクタン酸よりもアセチル CoA の生成が少ないが、プロピオニル CoA の生成を介して糖新生を支援するという利点が追加される。検討した 3 つのトリグリセリド代謝物の中でプロピオン酸は収率が最も低いが、これはアセトアセチル CoA（AcAc-CoA）とアセチル CoA を相互変換する酵素である 3-ケトアシル CoA チオラーゼの活性と相関した。C4 ケトン体生成がグルコース代謝に由来するアセチル CoA を栄養源とすることができない理由（*in vivo* で 3-ケトアシル CoA チオラーゼがアセチル CoA から AcAc-CoA を生成できないことに起因する可能性が高い）を特定するため、このことは注目に値する。同様に、この酵素は、*in vivo* でプロピオン酸から C5 ケトン体が生成するのを妨げる。質量アイソトポマー分析により、C4 ケトン体生成、C5 ケトン体生成及びアナプレロティック反応の可逆性及び濃度勾配依存的な指向性が示された。

要約すると、本試験において、ヘプタン酸に由来するアセチル基は C4 ケトン体生成、C5 ケトン体生成、及びその後のアナプレロティック中間体への変換に使用でき、トリヘプタノインを投与後の C4 ケトン体の蓄積は、末梢組織における C4 ケトン体の利用に対する C5 ケトン体が介在する阻害から生じている可能性があることが示された。このことは、トリヘプタノインの肝臓における作用機序を理解する上で特に意義がある。代謝ストレス中にアセチル CoA はケトン体生成のため肝臓で転用されるが、非ストレス状態では、ATP 産生のため TCA 回路で利用される。

2.6.2.2.2.1.2 正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口（IV）及び腸内（ID）代謝（Kinman et al. 2006）

目的：本試験の目的は、LC-FAOD の急性代償不全に対する治療選択肢として、静脈内投与又は十二指腸内投与したときの正常ラットにおけるトリヘプタノイン代謝を検討することであった。門脈流出系を介したトリヘプタノインの初回通過代謝の役割を明示するため、2 つの投与経路を

検討した。

試験デザイン: 絶食した成熟雄 Sprague-Dawley ラット（体重 235～317 g、約 20 週齢、各群 6～7 例）を本試験で使用した。動物実験を 2 つの試験プロトコールに分けた。プロトコール 1 では、対照の生理食塩水又はトリヘプタノインのエマルジョンをカロリー要求量の 10%～40%の範囲の用量で、動物に 90 分かけて静脈内又は十二指腸内投与した。FAOD 患者を対象とした食品グレードのトリヘプタノインの最初の臨床試験（Roe et al. 2002）では、乳児用粉ミルク又は半固形食との混合物を利用した。本試験で使用したエマルジョン製剤は、急性代償不全を発現中であり、自分で食事を摂取できない患者に対しては、静脈内又は十二指腸内投与による治療が適切な場合がある。本プロトコールの評価項目は、最終安楽殺前（投与終了時）の投与中に採取した動脈血試料による。プロトコール 2 では、対照動物（各群 7～9 例）に生理食塩水を 120 分かけて静脈内投与し、試験動物にトリヘプタノインのエマルジョンをカロリー要求量の 40%に相当する用量で静脈内又は十二指腸内に投与した。生理食塩水又はトリヘプタノインの投与とともに、プロトコール 2 の動物に対し、[6,6-$^{2}H_2$]グルコース及び[U-$^{13}C_3$]グリセロールのトレーサーを追加で投与した。投与中及び最終安楽殺時（投与終了時）に動脈血試料を採取した。主な試験評価項目は、GC-MS により測定したヘプタン酸、C4 ケトン体、及び C5 ケトン体の血中濃度、並びにグルコース及びグリセロールの血中濃度であった。試験デザインを Table 3 に示す。

Table 3: Study Design: Parenteral (IV) and enteral (ID) metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats (Kinman et al. 2006)

Group Number	Test Article	Dose Level	Treatment Duration (min)	Route	Animal Number
Protocol 1					
1	Saline	0%	90	IV	6-7
2	Triheptanoin emulsion	10%	90	IV	6-7
3	Triheptanoin emulsion	20%	90	IV	6-7
4	Triheptanoin emulsion	30%	90	IV	6-7
5	Triheptanoin emulsion	40%	90	IV	6-7
6	Triheptanoin emulsion	40%	90	ID	6-7
Protocol 2					
1	Saline +tracer[1]	0%	120	IV	7-9
2	Triheptanoin emulsion + tracers[2]	40%	120	IV	7-9
3	Triheptanoin + tracers[2]	40%	120	ID	7-9
4	Triheptanoin + tracers[2]	40%	120	ID	7-9

IV: Intravenous; ID: intraduodenal

[1] Group 1 was also infused intravenously with [6,6-$^{2}H_2$]glucose (at 1.2 µmol·min^{-1}·kg^{-1}) and with [U-$^{13}C_3$]glycerol (1.5 µmol·min^{-1}·kg^{-1})

[2] Group 2-4 were also infused intravenously with [6,6-$^{2}H_2$]glucose (at 1.2 µmol·min^{-1}·kg^{-1}) and with [U-$^{13}C_3$]glycerol (3.7 µmol·min^{-1}·kg^{-1}). In group 4 the tracers were infused intraduodenally with the triheptanoin emulsion.

結果：これらの試験の結果を以下のように分類し、血中ヘプタン酸濃度推移、C5 ケトン体及び C4 ケトン体の血中濃度推移、グルコース及びグリセロールの動脈血中濃度推移を示す。

血中ヘプタン酸濃度推移（プロトコール 1）：トリヘプタノインのエマルジョンを静脈内投与すると、血中ヘプタン酸濃度が用量依存的に増加した（Figure 7）。一方、40%トリヘプタノインのエマルジョンを十二指腸内投与したときのヘプタン酸濃度は、非常に低かった（生理食塩水を投与した動物では、血中ヘプタン酸は検出不能であった）。

Figure 7: Time course of blood heptanoate concentration during infusion of saline (0%) or triheptanoin (at 10, 20, 30, or 40% of caloric requirement), which was infused from 0 to 90 min.

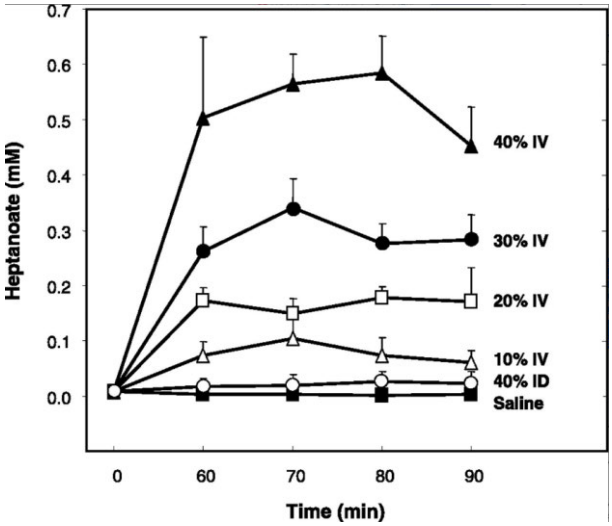
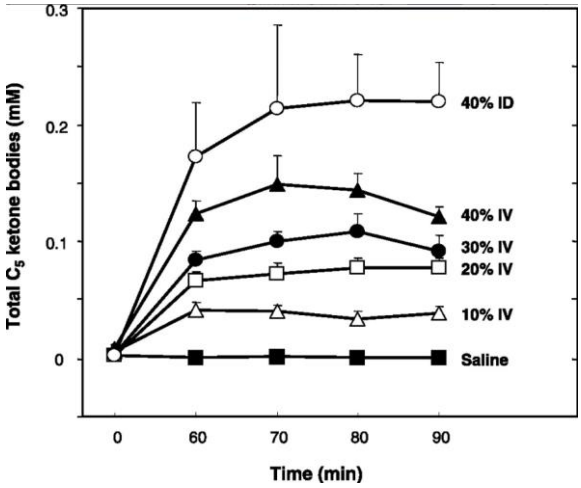


Figure legend: All infusions were intravenous (iv) except for 1 group, which received triheptanoin intraduodenally (id) at 40% of caloric requirement. Data are reported as means ± SE for all groups.

血中 C5 ケトン体濃度推移（プロトコール 1）：血中 C5 ケトン体濃度は、トリヘプタノイン静脈内投与の割合とともに増加した（Figure 8）。カロリー要求量の 40%で十二指腸投与した場合に C5 ケトン体の最高濃度となった。

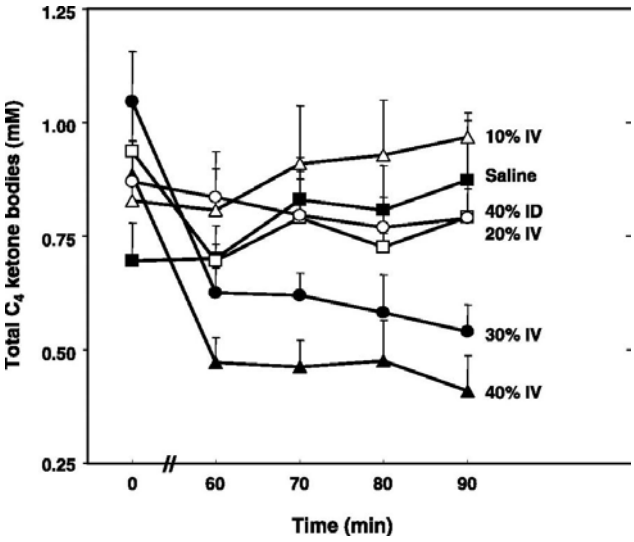
Figure 8: Time course of blood concentrations of total C5-ketone bodies



血中 C4 ケトン体濃度推移（プロトコール 1）：血中 C4 ケトン体の基礎濃度が高いことは、カニューレ挿入動物に対する麻酔の影響に起因した（Figure 9）。生理食塩水対照動物で認められた

高値は、絶食と麻酔を組み合わせたことに起因した可能性がある。C4 ケトン体は、生理食塩水を投与した動物で有意に増加したが、トリヘプタノインのエマルジョンをカロリー要求量の 20%～40%で静脈内投与したときに有意に低下した。十二指腸内投与した動物における血中 C4 ケトン体濃度は、経時的に有意に変化せず、生理食塩水投与の対照動物と同程度であった。

Figure 9: Time course of blood concentrations of total C4-ketone bodies



グルコース及びグリセロールの動脈血中濃度推移（プロトコール 2）：血中グルコース濃度は、40%トリヘプタノインのエマルジョンを静脈内投与した動物で、投与 100 分における血中グルコース濃度の低下があったことを除き、静脈内又は十二指腸内投与により有意な変化を示さなかった（Figure 10A）。グルコース出現速度（Ra）は、生理食塩水対照動物と比べて 40%トリヘプタノインのエマルジョンの十二指腸内投与を受けた動物の方が約 50%高かった（Figure 10B）。グリセロールの基礎濃度が高いこと（Figure 10C）は、ストレス及びストレス介在性脂質分解に起因した。血中グリセロールは、十二指腸内投与又は生理食塩水対照動物と比べて 40%トリヘプタノインのエマルジョンの静脈内投与を受けた動物の方が有意に高かった。

Figure 10: Time course of arterial blood glucose concentration (A), glucose rate of appearance (Ra; B), and glycerol concentration (C) in experiments of protocol 2 (groups 1–3).

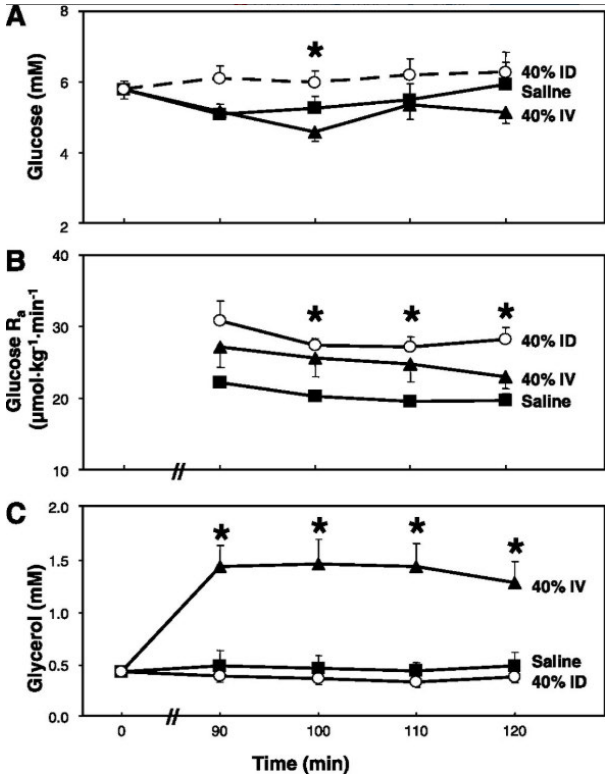


Figure legend: Saline (0%) or triheptanoin (40%) was infused from 0 to 120 min. Saline was infused parenterally, whereas 40% triheptanoin was infused iv or id. Data are presented as means ± SE (n = 7–9). The glucose concentration data of groups 3 and 4 were pooled. The glucose Ra data are shown only for groups 1–3 (iv infusion of labeled glucose).

考察及び結論：本試験では、自己投与できない FAOD 患者（例えば急性代償不全を発現した場合）への投与を支援するために、エマルジョンとして製剤化したトリヘプタノインを用いることにした。この状況では、患者は静脈内又は十二指腸内の投与経路のいずれかによる投与を必要とする可能性がある。門脈流出系を介したトリヘプタノインの初回通過肝代謝の影響が明示されたことに加えて、これらのデータから、投与経路が血中トリヘプタノイン代謝物の分布に強く影響を及ぼすことが示される。

十二指腸内投与したトリヘプタノインはヘプタン酸及びグリセロールへと加水分解され、効率的に肝臓により吸収された。トリヘプタノインのエマルジョンを十二指腸内投与したとき、ヘプタン酸及びグリセロールの循環血中濃度は非常に低く、C5 ケトン体の循環血中濃度は高かった。静脈内投与（カロリー要求量の 10%、20%、30%及び 40%）及び生理食塩水対照と比べて、ヘプタン酸とグリセロールの血中濃度が低いことは、効率的な肝消失による可能性が高かった。トリヘプタノインを十二指腸内投与したときのヘプタン酸とグリセロールの血中濃度が低かったことから、腸内加水分解に由来するグリセロールとヘプタン酸が肝臓により取り込まれ、消失したことが示される。

肝臓において、プロピオニル CoA はアナプレロティック糖新生又は C5 ケトン体の生成のいずれかに寄与する。末梢で、C5 ケトン体はアセチル CoA とプロピオニル CoA の両方へと代謝され

るため、肝外でもアナプレロティック反応に寄与する。本試験において、十二指腸内投与よりも静脈内投与の方が高かった TCA 前の代謝物（ヘプタン酸/C5 ケトン体）の血中濃度比により説明されるように、投与経路がアナプレロティック薬としてのトリヘプタノインの効果に影響を及ぼすことが示された。ヘプタン酸/C5 ケトン体の生成比は、トリヘプタノインの投与経路により異なった。逆の血中濃度プロファイルが静脈内投与後及び十二指腸内投与後に認められ、血中ヘプタン酸は十二指腸内投与よりも静脈内投与の方が高かったが、血中総 C5 ケトン体は静脈内投与よりも十二指腸内投与の方が高かった。この所見から、投与経路により異なる臨床適用（例：特定組織に供給する必要性）が支持される可能性が示唆される。

特に、トリヘプタノインに含まれるアセチル部分が C4 ケトン体の生成に寄与するものの、糖新生により絶食の影響が減弱され、ケトン体生成が低下する可能性があるため、カロリー要求量の 30%～40%でのトリヘプタノイン静脈内投与中に C4 ケトン体は予期せずに低下した。これは、トリヘプタノインの静脈内投与による脂質分解に対する影響と関連する可能性が高く、これにより、脂質分解速度はトリヘプタノインと関連する血中リポタンパク質リパーゼの活性化により上昇する可能性がある。これをさらに探索するため、グルコース出現速度（トレーサー標識と非標識を区別するために算出）を検討した。この速度は投与経路により異なった。トリヘプタノインの静脈内投与中、グルコース出現速度は有意に増加しなかったが（非糖新生系組織への分布による可能性が高い）、糖新生を促進するために肝臓に移行したトリヘプタノインの代謝からすべてのグリセロール及びヘプタン酸が生成されたため、トリヘプタノインの十二指腸投与はグルコース出現速度の増加を伴った。これらの対照的なパターンは、十二指腸内投与したトリヘプタノインが末梢血管系に到達せず、リパーゼ活性を活性化しないことに起因する可能性があった。

これらのデータから、トリヘプタノインの静脈内投与は、疾患症状（例：急性代償不全）の重症度により、食事によるトリヘプタノインを継続できない LC-FAOD 患者（初期の臨床試験で記載）を効果的に治療するために使用できるという仮説が裏付けられる。

2.6.2.2.2.1.3 正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口及び腸内代謝：脂質分解、糖産生及び肝アシル CoA プロファイルに対する影響（Gu et al. 2010）

目的：本試験の目的は、正常ラットにトリヘプタノインを静脈内投与したときの脂質分解プロセスを明らかにし、筋肉細胞及び心臓細胞に対する長鎖脂肪酸増加の影響を確認することであった。

試験デザイン：絶食した成熟雄 Sprague-Dawley ラット（体重 250～310 g、約 20 週齢、各群 6～7 例）を本試験で使用した。動物を 6 つの群に分けた。動物に 125 分かけて、生理食塩水対照を静脈内投与（第 1 群）、又はヘプタン酸部分からカロリー要求量の 40%をもたらす量のヘプタン酸ナトリウム若しくは 10%トリヘプタノインエマルジョンのいずれかを静脈内又は十二指腸内投与（第 2 群～第 6 群）した。投与中及び最終安楽殺時（投与終了時）に、動脈血試料を採取した。実験手順の一環として、第 3 群の動物にグリセロールも静脈内投与し、第 5 群の動物にグルコース及びインスリンも静脈内投与した。また、各群に[6,6-$^{2}H_2$]グルコース、[$^{13}C_3$]グリセロール及び[$^{13}C_{18}$]オレイン酸のトレーサーも静脈内投与した。試験デザインを Table 4 に示す。

本試験の重要な評価項目は、GC-MS による、動脈血グルコース、グリセロール、ヘプタン酸、C4 ケトン体、C5 ケトン体、オレイン酸の測定であった。さらに、肝組織中の短鎖及び中鎖アシル CoA を HPLC により測定した。血漿中インスリン濃度を ELISA で測定し、肝臓グリコーゲン含量を標準的な酸アルコール抽出／グリコーゲンの酸加水分解及びグルコース法の酵素アッセイ

により測定した。

Table 4: Study Design: Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats: Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile (Gu et al. 2010)

Group Number	Test Article	Triheptanoin Dose Level[1]	Treatment Duration (min)	Route	Animal Number
1	Saline[2]	0%	125	IV	6-7
2	Heptanoate-Na[3]	40%	125	IV	6-7
3	Heptanoate-Na + glycerol[4]	40%	125	IV	6-7
4	Triheptanoin[4]	40%	125	IV	6-7
5	Triheptanoin + glucose + insulin[5]	40%	125	IV	6-7
6	Triheptanoin[6]	40%	125	ID	6-7

IV: intravenous; ID: intraduodenal

[1] The rates of infusion of Na-heptanoate or triheptanoin were calculated on the basis of the weight of each rat and the caloric content of Heptanoic acid (7.7 kcal/g), leading to an average infusion rate of 42.3 +/- 0.09 µmol heptanoate equivalents·min^{-1}·kg^{-1}.

[2] Animals in this group also received 1.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [6,6-$^{2}H_2$]glucose, 1.5 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_3$]glycerol and 0.3 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_{18}$]oleate tracers by intravenous infusion

[3] Animals in this group also received 1.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [6,6-$^{2}H_2$]glucose, 3.7 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_3$]glycerol and 0.6 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_{18}$]oleate tracers by intravenous infusion

[4] Animals in this group also received 28.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} glycerol, in addition to 1.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [6,6-$^{2}H_2$]glucose, 3.7 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_3$]glycerol and 0.6 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_{18}$]oleate tracers by intravenous infusion

[5] Animals in this group also received 145 µmol·kg^{-1}·min^{-1} glucose, 4 mU·kg^{-1}·min^{-1} insulin, in addition to 1.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [6,6-$^{2}H_2$]glucose, 3.7 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_3$]glycerol and 0.6 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_{18}$]oleate tracers by intravenous infusion

[6] Animals in this group also received 28.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} glycerol, in addition to 1.2 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [6,6-$^{2}H_2$]glucose, 3.7 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_3$]glycerol and 0.6 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [$^{13}C_{18}$]oleate tracers by intravenous infusion, as well as 3.7 µmol·kg^{-1}·min^{-1} [1,1,2,3,3-$^{2}H_5$]glycerol intraduodenally.

結果：これらの試験の結果を以下のように分類し、血中ヘプタン酸、ヘプタン酸ナトリウム及び／又はトリヘプタノインのエマルジョンに対する C4 ケトン体、C5 ケトン体、グルコース及びグリセロールの反応、肝臓グリコーゲン含量及び肝臓中アシル CoA 濃度を示す。

血中ヘプタン酸:ヘプタン酸ナトリウム又はトリヘプタノインのエマルジョン投与に対する C4 ケトン体、C5 ケトン体、グルコース及びグリセロールの反応: 個別の代謝物プロファイルをプロットし、以下でさらに検討する。ヘプタン酸ナトリウムを静脈内投与後 20～120 分の間に、対照群と比べて、血中ヘプタン酸濃度は統計学的に有意に増加した。この変化は、グリセロール投与を追加することにより影響を受けなかった。トリヘプタノインの投与によりヘプタン酸濃度は顕著に増加した。グルコースとインスリンをトリヘプタノインに追加することで、ヘプタン酸濃度は対照群と比べてさらに増加した。Kinman らの試験（Kinman et al. 2006、2.6.2.2.2.1.2 項）で報告されたデータと同様に、トリヘプタノインの十二指腸内投与により、動脈血漿中濃度が非常に低くなった（おそらくはトリヘプタノインがヘプタン酸とグリセロールへと急速に加水分解されるためであり、対照群との有意差なし）。これらの変化を Figure 11 に図示する。

Figure 11: Profile of heptanoate concentrations in rat plasma.

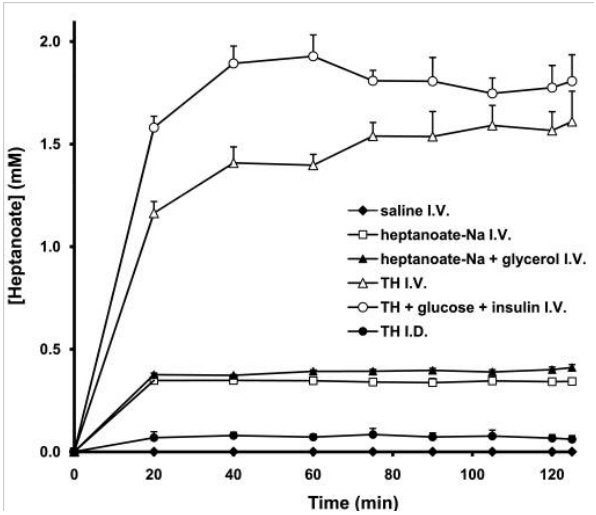
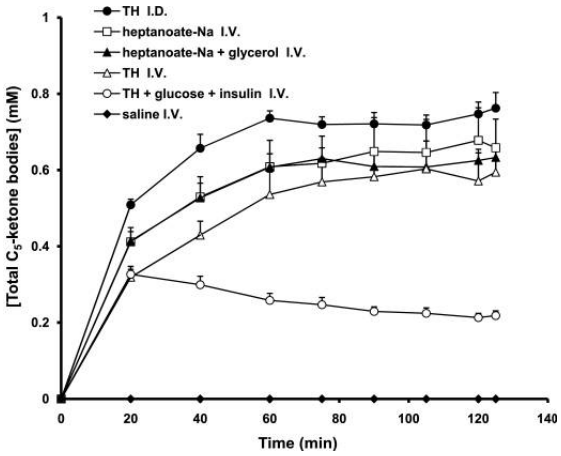


Figure legend: In this and subsequent figures, data are presented as means ± SE (n = 6). iv, Intravenous; TH, triheptanoin; id, intraduodenal.

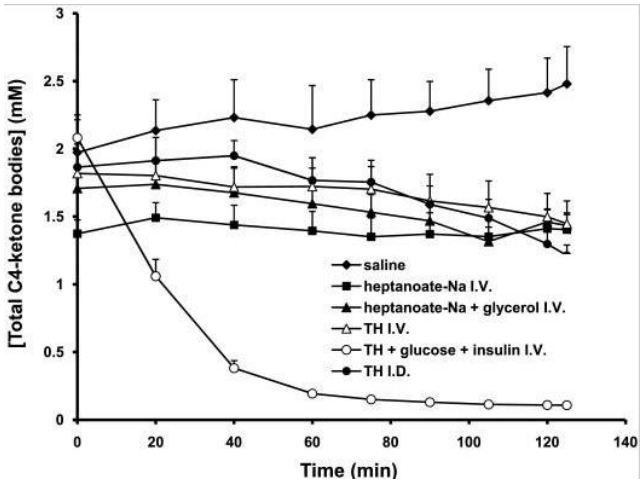
ヘプタン酸ナトリウム又はトリヘプタノインを静脈内又は十二指腸内投与したときの血漿中総C5 ケトン体濃度プロファイルを Figure 12 に示す。トリヘプタノインを十二指腸内投与することで、C5 ケトン体は最高濃度となり、ヘプタン酸は最低濃度となった（対照動物を除く）。

Figure 12: Profile of total C5-ketone body concentrations in plasma.



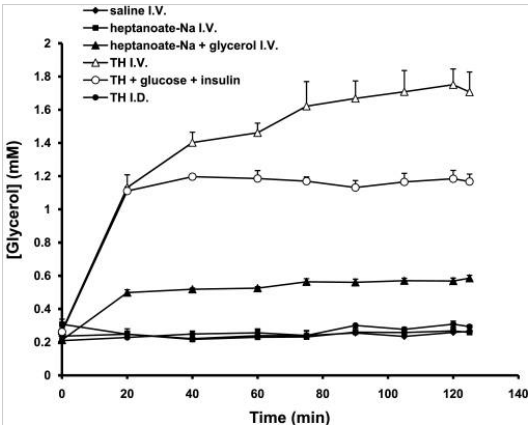
C4 ケトン体の基礎濃度はすべての投与群で高かった（Figure 13）。C4 ケトン体は麻酔の影響を受けたと考えられた（脳による取込みを低下させ、末梢で貯留を高く維持）。C4 ケトン体濃度の安定した増加が生理食塩水対照群の動物で認められたが、これは（一晩の）絶食期間に起因した。C4 ケトン体は、ヘプタン酸ナトリウムの静脈内投与により影響を受けなかったが、ヘプタン酸ナトリウム + グリセロール又はトリヘプタノイン単剤の静脈内投与後に低下した。同様の C4 ケトン体プロファイルが、トリヘプタノインの静脈内又は十二指腸内投与により認められた。C4 ケトン体の最も有意な低下（約 95%）が、トリヘプタノインのエマルジョンに加えてグルコースとインスリンを静脈内投与した動物で認められた。

Figure 13: Profile of total C4-ketone body concentrations in plasma.



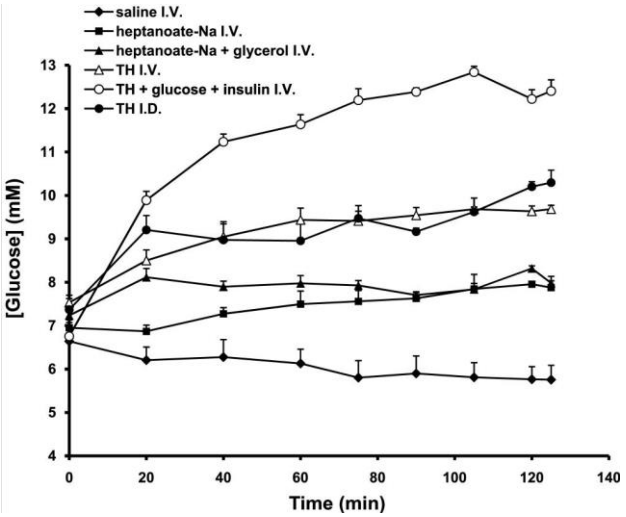
血漿中グリセロール濃度は、ヘプタン酸ナトリウムの静脈内投与又はトリヘプタノインの十二指腸内投与により影響を受けなかった。しかしながら、グリセロールとヘプタン酸ナトリウムを併用投与することで、対照群と比べて血中グリセロール濃度は有意に増加した。トリヘプタノインの静脈内投与により、血中グリセロール濃度の測定値が最高値となった。この作用は、グルコースとインスリンを追加時には鈍化した（Figure 14）。

Figure 14: Profile of glycerol concentrations in plasma.



血漿中グルコース濃度のプロファイルを Figure 15 に示す。予想よりも高い安静時グルコース濃度（6.6～7.4 mM）は、ストレスに起因した。生理食塩水を投与中に、グルコース濃度は正常範囲まで低下した。ヘプタン酸ナトリウム単剤又はグリセロールを追加して静脈内投与することで、対照群と比べてグルコース濃度が有意に増加した。また、トリヘプタノインによるグルコースの有意な増加も認められたが、投与経路に依存しなかった。グルコース濃度の最も大きな変化は、トリヘプタノイン、グルコース及びインスリンを静脈内併用投与後に認められた。

Figure 15: Profile of glucose concentrations in plasma.



対照群の肝臓グリコーゲン含量は非常に低かった（絶食期間に起因）。各実験群で肝臓グリコーゲン含量の増加が認められたが、各投与には糖新生系基質が関わるため驚きではない。肝臓グリコーゲン含量の最高値は、グルコース及びインスリンとともにトリヘプタノインの静脈内投与を受けた動物で認められた。

遊離 CoA の低値は、ヘプタン酸に由来するアシル CoA 濃度の増加と相関した。トリヘプタノインをグルコース及びインスリンとともに静脈内投与又はトリヘプタノインを十二指腸内投与したところ、いずれの場合もアシル CoA 濃度の増加を伴った。C4 ケトン体生成と C5 ケトン体生成の中間体濃度は一定を維持した。

考察及び結論：静脈内投与経路と十二指腸内投与経路の両方が LC-FAOD 患者で過去に臨床適用されているため、両経路について検討した。本試験は Kinman らの試験（Kinman et al. 2006）をさらに拡大して、肝内代謝と肝外代謝がトリヘプタノイン由来の糖新生系基質とアナプレロティック基質の可用性にどのように影響を及ぼすのかを比較することにより、投与経路がトリグリセリド代謝に及ぼす影響がさらに説明されている。

等モル量のヘプタン酸（トリヘプタノイン単剤又はグリセロール、グルコース及びインスリンとの併用）を静脈内投与することで、血漿中ヘプタン酸濃度に様々な影響がもたらされたが、トリヘプタノイン単剤とグルコース及びインスリンとの併用で最大の変化が認められた。グリセロールをヘプタン酸とともに投与することは、ヘプタン酸ナトリウム単剤投与で測定された血漿中ヘプタン酸濃度に影響を及ぼさなかった。投与形態（又はグリセロール、グルコース及びインスリンの追加）を問わず、120 分の投与終了までに血中ヘプタン酸濃度は安定したことから、すべての群でヘプタン酸代謝速度が同じであったことが示唆された。

トリヘプタノインの十二指腸内投与により、肝臓における取込み及び代謝に起因して血中ヘプタン酸濃度が非常に低くなったが（Kinman et al. 2006 と一致）、肝内代謝により本群で C5 ケトン体が最高値であった理由が説明されている。C4 ケトン体と C5 ケトン体のプロファイルは、実験処置と同様の増加を示した。この作用はインスリン追加時に阻害され、C4 ケトン体と C5 ケトン体の低下が認められた。このことから、インスリンがミトコンドリアの C4 ケトン体生成と C5 ケトン体生成に非常に速やかに影響を及ぼす可能性が示唆される。これは、脂質分解を阻害し、同時にケトン体生成を低下させるインスリンの能力により（食後状態と類似）類推可能である。

ヘプタン酸又はトリヘプタノインを投与することで、肝臓のアシル CoA 及び遊離 CoA が有意に変化した。ヘプタン酸ナトリウム又はトリヘプタノインを静脈内投与後の経時的な血漿中ヘプタン酸の安定化又はプラトー到達から、すべてのヘプタン酸当量が代謝されたことが示唆される。すべての実験群で対照群と比べて肝臓アセチル CoA が低下したにもかかわらず、ヘプタン酸ナトリウム及びトリヘプタノインの静脈内投与のそれぞれで、C4 ケトン体及び C5 ケトン体が増加した（インスリンを追加した場合を除く）。

これらのデータから、静脈内投与したときのトリヘプタノインの糖新生系特性及び意義のある肝臓中グリコーゲン貯蔵への寄与も確認される。

2.6.2.2.2 トリヘプタノインの肝外薬理作用

2.6.2.2.2.1 神経の栄養源としてのヘプタン酸：正常マウス及びグルコーストランスポーター1 欠損（G1D）マウスにおけるエネルギー前駆体及び神経伝達物質前駆体（Marin-Valencia et al. 2013）

目的：本試験の目的は、グルコース、グルタミン酸及びグルタミンの産生に対する静脈内投与したヘプタン酸の代謝的な影響、並びに脳における TCA 回路活性に対するアナプレロティック基質生成にヘプタン酸がどのように寄与するのかを、正常マウスとグルコーストランスポーター1（GLUT1）ノックアウトマウスの間で比較することであった。

試験デザイン：正常 C57BL/6J マウス（4 例、約 4 ヵ月齢、性別情報の記載なし）及び GLUT1 ノックアウトマウス（6 例、約 3 ヵ月齢、性別情報の記載なし）に[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸をカロリー要求量の 50%相当をもたらす速度で 35 分かけて単回静脈内投与した。投与終了時に脳を採取し、手作業で半球に分割した後に、液体窒素で凍結、-80°C で保存した。一方の半球を核磁気共鳴（NMR）分析に使用し、他方の半球を GC-MS 又は LC-MS 用に保存した。脳におけるヘプタン酸の動態及び影響をより良く理解するため、測定に含めた重要な評価項目は、脳中の TCA 回路中間体、アミノ酸及びアシル CoA の濃度及び／又は質量分析であった。グルコースの質量分布用に、血漿試料を分析した。試験デザインの概要を Table 5 に示す。

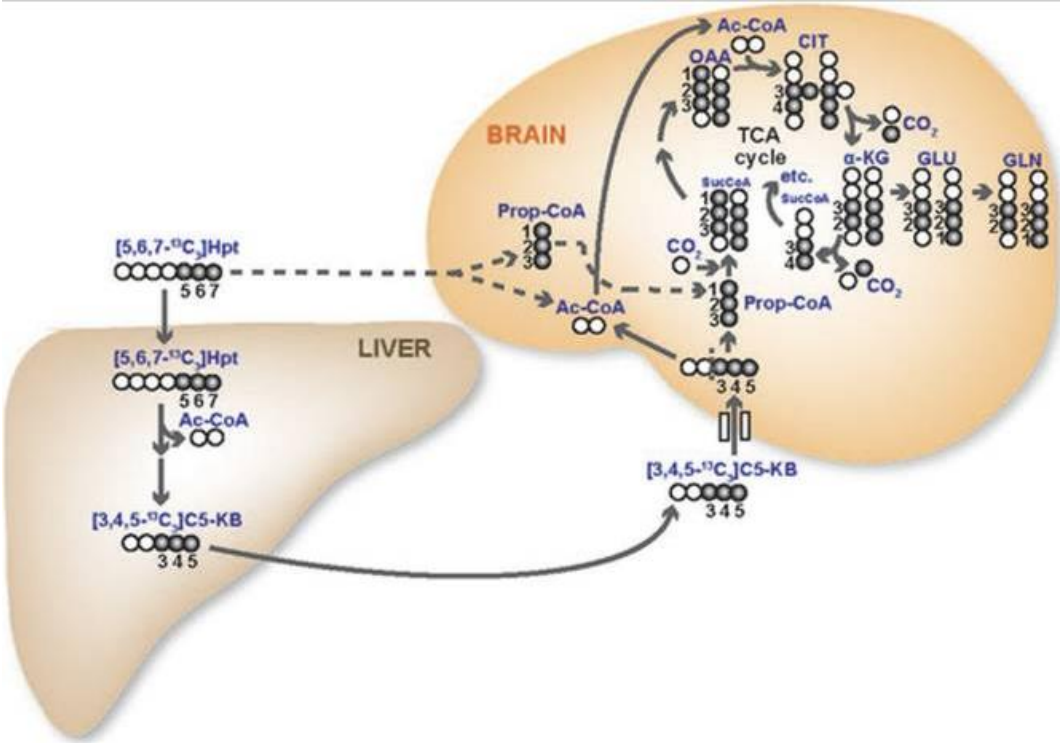
Table 5: Study Design: Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) mice (Marin-Valencia et al. 2013)

Group	Test Article	Species	Dose	IV Infusion Duration (min)	Animal Number
1	[5,6,7-^{13}C]Heptanoate	C57Bl/6J mice	50% caloric[1] intake	35	4
2	[5,6,7-^{13}C]Heptanoate	GLUT-1 transgenic mice	50% caloric[1] intake	35	6

[1] A 150 mM solution of [5,6,7-^{13}C]heptanoate was intravenously infused for 35 minutes in each conscious mouse at a rate that provided 50% of the caloric requirement. The infusion rates were calculated according to body weight and caloric content of heptanoate (7.7 kcal/g) by Gu et al, (2010). The rates used were 95.9 ± 3.9 µmol heptanoate/min/kg.

結果：肝臓及び脳におけるヘプタン酸代謝の模式図を Figure 16 に示す。この模式図は、多重標識した[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸から生じる可能性のある炭素標識の組合せを図示しており、^{13}C-NMR 分光法により示されるように、代謝物（及び標識炭素原子の行先）の供給源及び経過の解釈をサポートするものである。

Figure 16: Schematic diagram of [5,6,7-$^{13}C_3$]heptanoate and [3,4,5-^{13}C]C5-ketone body metabolism in the liver and brain.



血漿中グルコースの^{13}C の濃縮：[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸を投与後に、野生型動物と GLUT1 ノックアウト動物のいずれにおいても血中グルコース濃度は有意に増加したが、遺伝子型による差は認められなかった。[^{13}C]グルコースの質量アイソトポマー（各同位体原子数は同じだが、原子の位置が異なる異性体）別の分布の検討から、[M+2]及び[M+3]で高度の濃縮が認められたが、これは標識ヘプタン酸の代謝物として[1,2,3-$^{13}C_3$]スクシニル CoA が関与する糖新生プロセスから予想された。GLUT1 ノックアウト及び野生型にはグルタミン酸及びグルタミンの異なる標識パターンが認められ、いずれの動物群においてもグルタミンの全体的な ^{13}C 共鳴はグルタミン酸よりも高かったが、グルタミン酸 C4 の ^{13}C 共鳴はグルタミン C4 よりも高かった。これは、星状細胞のアセチル CoA が血漿中標識グルコース及び非標識ヘプタン酸の両方に由来する可能性を示している。グルタミン酸及びガンマアミノ酪酸（GABA）の標識パターンは、アナプレロティック反応を主導する[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸の[1,2,3-$^{13}C_3$]プロピオニル CoA への代謝と一致する。

脳のグルタミン酸、グルタミン、スクシニル CoA 及びプロピオニル CoA の質量分析：グルタミン[M+3]の濃縮は、遺伝子型に依存せず、グルタミン酸[M+3]よりも約 3 倍高かった。また、グルタミン[M+2]の濃縮もグルタミン酸[M+2]よりも高かったが、統計学的に有意ではなかった。[M+1]アイソトポマーの差は測定されなかった。
プロピオニル CoA の［M+3］の ^{13}C 濃縮は、野生型マウスと GLUT1 KO マウスで同等（約 70%）であり、標識ヘプタン酸が両群の動物の脳でアナプレロティック反応により炭素を供給したことを示した。

[^{13}C]ヘプタン酸と比べた[^{13}C]グルコースの代謝：NMR スペクトルから、 [5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸及び／又は[3,4,5-$^{13}C_3$]C5 ケトン体からのアナプレロティック中間体である[1,2,3-$^{13}C_3$]プロピオ

ニル CoA の生成が確認された。これは、質量分析法により検出された[M+3]のスクシニル CoA の存在によって裏付けられる。また、グルタミン酸スペクトルから、脳内ピルビン酸が多重標識されたことも示されたが、このことは、[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸を組み込んだ糖新生に由来する ^{13}C が濃縮したグルコースが、脳におけるピルビン酸のカルボキシル化とエネルギー産生の両方に対する基質を提供したことを意味する。[M+3]プロピオニル CoA の測定値は、[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸及び／又は[3,4,5-$^{13}C_3$]C5 ケトン体に由来する炭素骨格が脳内で直接的にプロピオニル CoA のレベルに代謝される可能性を証明しており、このことは、ヘプタン酸が脳において TCA 回路のアナプレロティック反応を直接引き起こす可能性を強く暗示している。

トリカルボン酸回路中間体、アミノ酸及びアセチル CoA の濃度：脳のアセチル CoA 濃度は野生型対照と比べて GLUT1 ノックアウト動物の方が統計学的に高かったことから、ヘプタン酸及び／又は C5 ケトン体は、正常動物よりも効果的に GLUT1 ノックアウト脳におけるアセチル CoA 濃度を増加させることが示される。いずれの動物群においてもグルタミンはグルタミン酸よりも高かったことから、ヘプタン酸及び C5 ケトン体はグリア細胞（GLUT1 ノックアウト脳では明らかに欠損）により主に代謝されることが示唆された。グルタミン濃度は、野生型対照と比べて GLUT1 ノックアウトマウスで有意に高かったが、これは、GLUT1 タンパク質がないことに対する潜在的な代償的機序として機能するグルタミン酸合成酵素を有する反応性星状細胞の存在と相関している。全体として、グルタミン酸又は GABA の濃度差は、動物群間で測定されなかった。コハク酸、フマル酸及びリンゴ酸濃度の遺伝子型による違いは認められなかった。

考察及び結論：本試験において、正常マウス及び GLUT1 ノックアウトマウスの脳におけるヘプタン酸の代謝を検討した。多重標識[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸を静脈内投与することで、それぞれの炭素を代謝後の下流の化学種まで溯ることができるようにした。このアプローチを講じることで、脳に到達する肝臓で産生されたヘプタン酸由来グルコースの代謝と脳に移行するヘプタン酸の直接代謝を区別した。データから、脳のような遠位組織において、ヘプタン酸の糖新生から肝臓で産生したグルコースと脳に移行したヘプタン酸に直接由来する炭素の両方が実証される。脳でのこのパターンを検査することにより、ヘプタン酸及び遠位組織に移行できる産生されたグルコースの複合効果を合理的に予測できる。^{13}C-NMR スペクトルから、^{13}C が濃縮されたグルコースが増加する[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸の間接的な代謝、及び脳におけるアナプレロティック反応を介した[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸及び／又は[3,4,5-$^{13}C_3$]C5 ケトン体の直接的な代謝（そして、この代謝が星状グリア細胞で起こること）が示された。グリア細胞及び神経細胞におけるヘプタン酸由来代謝物の対照的な濃度は、（脂肪酸を代謝することが知られる）グリア細胞におけるグルタミン酸合成酵素の活性及び TCA 回路活性の証拠となり、このことは、特異的に高いグルコース濃度を示した神経細胞と比べてこれらの細胞内の高いグルタミン酸濃度により実証された。これにより、ヘプタン酸の糖新生系特性を裏付ける証拠がさらに追加される。

本試験の主な焦点は、正常マウス及び GLUT1 ノックアウトマウスの脳における多重標識[5,6,7-$^{13}C_3$]ヘプタン酸の代謝経過を検討し、比較することであったが、ヘプタン酸代謝が LC-FAOD に関連する全身ベネフィットをどのように維持することができるのかも説明する多数の重要な所見がある。それには以下のものがある：

- ヘプタン酸代謝により糖新生の基質が得られることが確認された。
- ヘプタン酸がミトコンドリアへと直接的に（脳のグリア細胞で測定されたように、血液脳関門と細胞膜の両方）及び肝代謝（トリヘプタノインから）を介して膜をどのように拡散できるのかが説明せれた。ヘプタン酸の代謝により、グルコース及び TCA 活性に対する

アナプレロティック中間体の産生が増加する。

- 静脈内投与したヘプタン酸の代謝は、アセチル CoA 及びアナプレロティック中間体であるプロピオニル CoA の濃度増加と関連した。代謝物の細胞分布と TCA 基質との相関を組み合わせると、トリヘプタノインはすべての TCA 回路依存性の細胞種に対するエネルギー産生の供給源である可能性が示唆される。プロピオニル CoA は、TCA 回路活性に対するアナプレロティック反応に寄与するだけでなく、グルタミン及びグルタミン酸へと代謝する重要な中間体である（神経学的適応にとって需要なベネフィット）。

2.6.2.2.2.2.2 試験 I）極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD$^{-/-}$）マウスにおける心筋症の発現及び病理学的機序（Tucci et al. 2014）及び試験 II）トリヘプタノイン：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウスにおける長期作用（Tucci et al. 2017）

目的：これらの試験の目的は、極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD$^{-/-}$）マウスの心機能及び代謝状態に対する 1 年間のトリグリセリド高含量飼料（試験 I の通常［長鎖脂肪酸トリグリセリド；LCT］試料又は MCT 試料、試験 II の通常試料［LCT］又はトリヘプタノイン補充試料）の影響を検討することであった。

試験デザイン：FAOD のモデルとして C57/BL6+129scVLCAD マウス遺伝子型の交雑系統に対して、実験を実施した。5 週齢から 3 又は 12 ヵ月間、10～12 例の VLCAD$^{-/-}$マウス及び対照として用いる野生型同腹仔の群に対し、5%粗脂肪（LCT として）の通常飼料、又はトリグリセリド高含量飼料（4.4% MCT［試験 I］又は 0.6%大豆油［総脂肪の 5%に相当］を含むトリヘプタノイン［試験 II］）のいずれかを給餌した。これらの飼料は代謝可能な総エネルギーの 12%であった。複合試験デザインを Table 6 に示す。

試験 I では、画像検査、心臓のエネジェティクス及び心臓ホモジネート中の胎児発生時に典型的に発現する遺伝子の半定量の評価により、VLCAD$^{-/-}$マウスにおける MCT 飼料による心筋症の進行を明らかにした。また、肝臓中の脂質蓄積及び酸化ストレスマーカーも測定した。

試験 II では、血清生化学パラメータ（血中脂質、グルコース、インスリン及び遊離脂肪酸［FFA］）及び *in vivo* MRI による心臓形態・心機能の評価を含む、重要な評価項目を収集して、これらの動物におけるトリヘプタノイン飼料の影響を評価した。飼料に対する心適応の評価により、この機能データを評価した。さらに、肝臓中の脂質蓄積及び酸化ストレスマーカーを測定した。TCA 回路中間体を測定する代わりに、心臓及び肝臓のクエン酸合成酵素（CS）及び α-ケトグルタル酸 CoA 脱水素酵素（αKGDH）酵素の比活性、これらの活性がアナプレロティック反応に応答して増加することが知られるプロピオニル CoA カルボキシラーゼ、αKGDH 及びスクシニル CoA 合成酵素（SCoAS）のタンパク質濃度とどのように相関するのかを検討することにより、心臓及び肝臓におけるアナプレロティック作用を間接的に測定した。

CS 及び α-KGDH の酵素活性は、制御された条件下で連続型分光光度法アッセイにより評価した。 CS 活性は、アセチル CoA 及びオキサロ酢酸存在下で 5,5’-dithiobis-nitrobenzoic acid（DTNB）の還元を評価した。反応は 30°C で 5 分間行い 412 nm でモニターした。CS の比活性（mU/mg タンパク質）は、DTNB 還元後、412 nm で分光光度法により測定した。 αKGDH 活性は、NAD^+還元速度を 340 nm でモニターすることにより測定した。アッセイは、5.0 mM $MgCl_2$、40 µM rotenone、2.5 mM α-ketoglutarate、0.1 mM CoA、0.2 mM thiamine pyrophosphate 及び 1.0 mM NAD^+の存在下で実施した。αKGDH の特異的活性（mU/mg タンパク質）は、NAD^+の NADH への還元を分光光度法により 340 nm でモニタリングすることにより測定した。

このアプローチは、TCA 中間体の直接測定と比べて、長期間の飼料の影響を評価する上でより適していると考えられた。

Table 6: Combined Study Design: Study I - Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD$^{-/-}$) mice (Tucci et al. 2014); and Study II - Triheptanoin: long-term effects in the very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse (Tucci et al. 2017)

Group Number	Animal Background	Treatment Group	Treatment Duration	Animal Number
Study I: LCT and MCT diets				
1	WT	Normal (LCT) diet[1]	3 months	10-12
2	VLCAD$^{-/-}$	Normal (LCT) diet[1]	3 months	10-12
3	WT	Normal (LCT) diet[1]	6 months	10-12
4	VLCAD$^{-/-}$	Normal (LCT) diet[1]	6 months	10-12
5	WT	Normal (LCT) diet[1]	12 months	10-12
6	VLCAD$^{-/-}$	Normal (LCT) diet[1]	12 months	10-12
7	WT	MCT diet[2]	3 months	10-12
8	VLCAD$^{-/-}$	MCT diet[2]	3 months	10-12
9	WT	MCT diet[2]	6 months	10-12
10	VLCAD$^{-/-}$	MCT diet[2]	6 months	10-12
11	WT	MCT diet[2]	12 months	10-12
12	VLCAD$^{-/-}$	MCT diet[2]	12 months	10-12
Study II: Triheptanoin diet				
13	WT	Normal (LCT) diet[1]	3 months	10-12
14	VLCAD$^{-/-}$	Normal (LCT) diet[1]	3 months	10-12
15	WT	Triheptanoin diet[2]	12 months	10-12
16	VLCAD$^{-/-}$	Triheptanoin diet[2]	12 months	10-12

[1] Normal diet contains 5% crude fat.

[2] Animal diets were constructed so that triheptanoin fully replaced the normal long-chain fatty acid component, with the exception of the essential fatty acids. The fat-containing diet corresponded to 12% of total metabolizable energy, where 4.4% (from a total of 5%) was either normal (LCT), MCT or food-grade triheptanoin and the remaining 0.6% was derived from soybean oil that provided the required essential long-chain fatty acids. The nutrient concentrations were as follows: 94.8% dry matter, 17.8% crude protein, 5% crude fat, 5% crude fiber, 5.3% crude ash, 61.9% nitrogen-free extract, 36.8% starch, 14.8% dextrin, and 11% sugar. In both the normal and triglyceride-based diets, the proportion of carbohydrate and protein contents corresponded to 69% and 19% of metabolizable energy, respectively.

結果：VLCAD$^{-/-}$マウスにおける飼料中 MCT 又はトリヘプタノインの長期作用について以下に示し、体重及び血清生化学検査値に対する飼料の影響、心筋症の発現及び心臓エネルギー、肝臓内脂質蓄積及び酸化ストレス、肝臓におけるアナプレロティック反応の測定、長鎖アシルカルニチン及び脂肪組織へのトリヘプタノイン蓄積に対する影響で分類する。

体重及び血清生化学検査値に対する飼料の影響の要約：3 又は 12 ヵ月のいずれの時点においても、遺伝子型やトリヘプタノイン飼料に依存した動物体重に対する影響は認められなかった（これは試験 I の評価項目ではなかった）。血清トリグリセリド（TAG）濃度及び総コレステロール濃度は野生型同腹仔と比べて VLCAD$^{-/-}$動物の方が高かったが、長期投与により血清 TAG 濃度とコレステロール濃度は大きく変化しなかった。対照飼料群と比べて、トリヘプタノインを給餌した野生型動物で血清 TAG は有意に増加した。対照飼料群と比べて、トリヘプタノイン飼料により、VLCAD$^{-/-}$動物で血清グルコース値は有意に増加した。また、これには、対照群と比べたトリヘプタノイン群の VLCAD$^{-/-}$動物におけるインスリン濃度の有意な高値も伴った（直接測定及び恒常性モデル評価［HOMA］式による測定）。12 ヵ月時点で、対照群と比べて、トリヘプタノイン飼料

を給餌した野生型動物で顕著なインスリン濃度の増加が認められた。トリヘプタノインを給餌した VLCAD$^{-/-}$動物と比べて、対照飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物の方が C4 ケトン体濃度が高く、12 ヵ月まで C4 ケトン体は野生型動物と VLCAD$^{-/-}$動物の両方で低かった。

心筋症の発現及び心臓エネルギー代謝に対する飼料の影響の要約：VLCAD$^{-/-}$動物の心機能は、慢性的なエネルギー不足により加齢により悪化することが知られている（Tucci et al. 2014）。MRI 分析により、12 ヵ月までに VLCAD$^{-/-}$マウスで収縮機能障害の発現が認められた（Figure 17 参照）。VLCAD$^{-/-}$動物において、野生型動物と比べて収縮末期容積の増加及び駆出率低下が認められた。また、VLCAD$^{-/-}$動物では野生型と比べて心筋壁も薄く、収縮機能障害の所見が裏付けられた。

Figure 17: Effect of a long-term MCT diet on cardiac function of WT and VLCAD-/- mice.

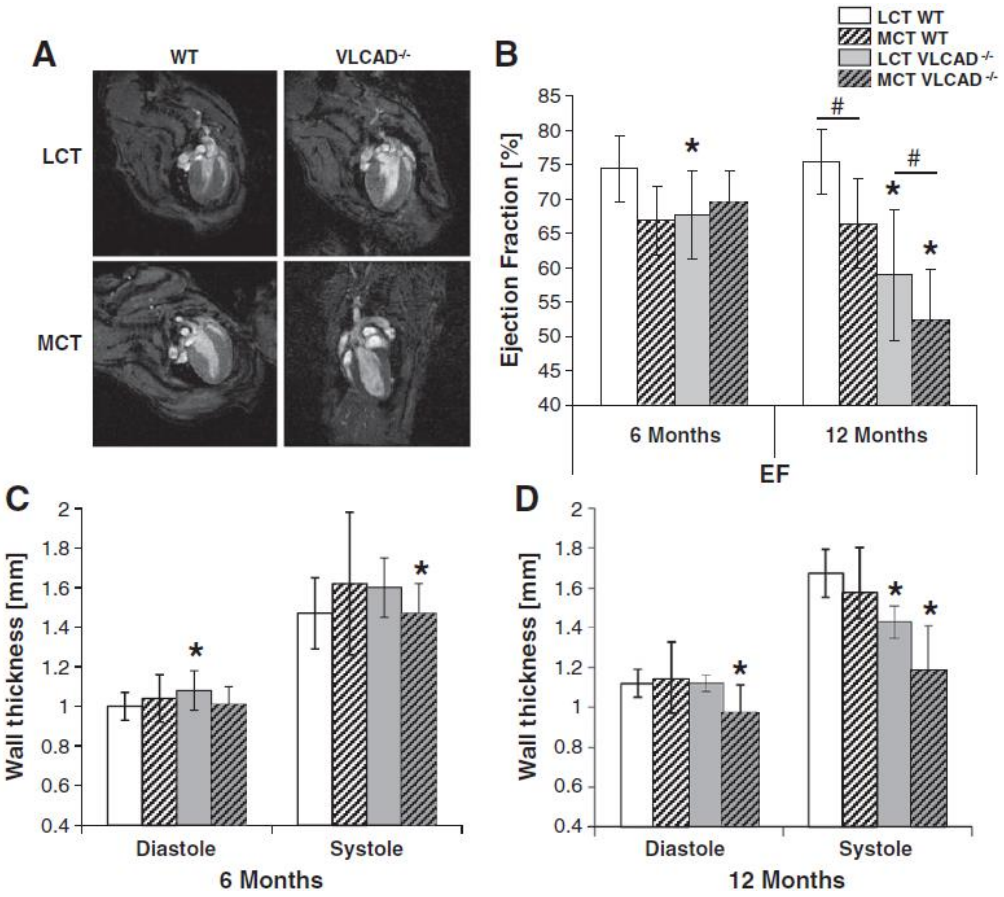
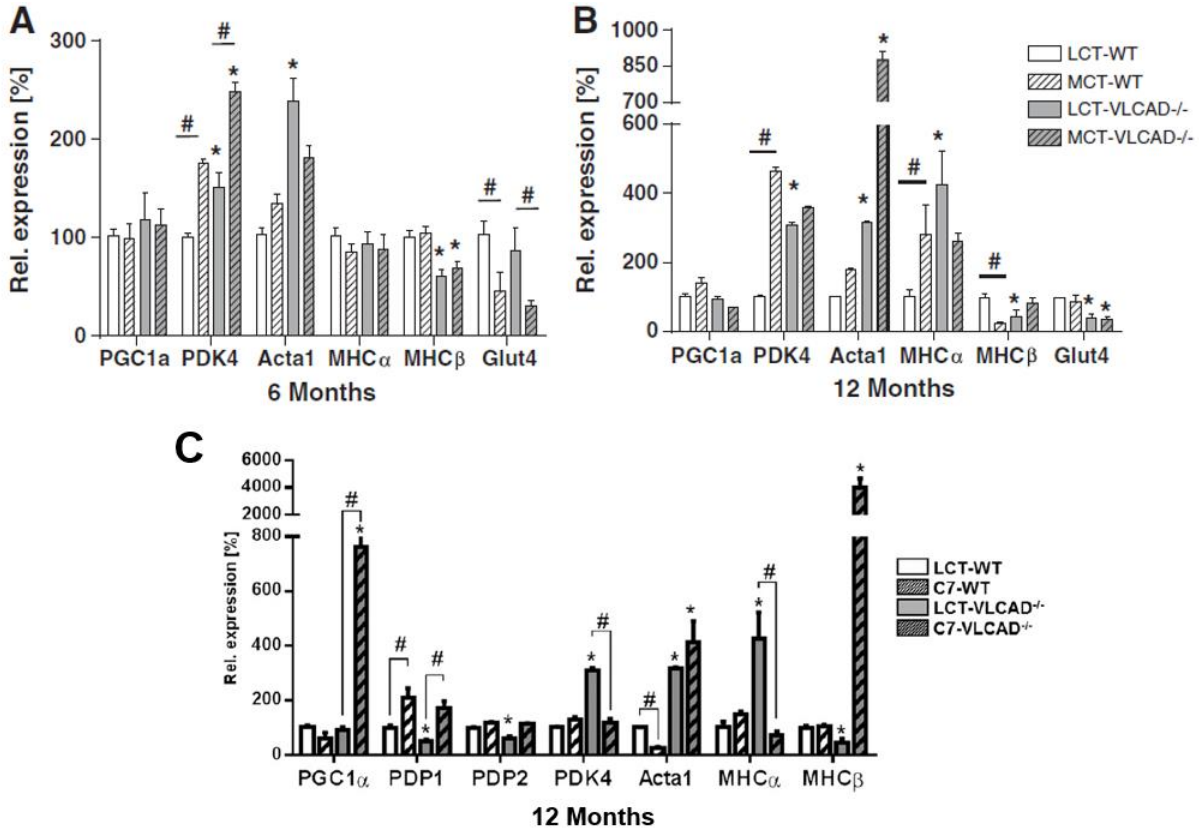


Figure legend: A) Representative long-axis ^{1}H-MR images in end-systole of WT and VLCAD$^{-/-}$ mice under either control or MCT diet at the age of 12 months. B) Ejection fraction of WT and VLCAD$^{-/-}$ mice under control and MCT diet at the age of 6 and 12 months. C+D) Diastolic and systolic wall thickness in mice at the age of 6 and 12 months. *indicates significant differences between WT and VLCAD$^{-/-}$ mice within a diet group. # indicates significant differences between WT and VLCAD$^{-/-}$ mice under different dietary conditions as compared to control diet (n=10-12)

MCT 飼料とトリヘプタノイン飼料のいずれも心臓表現型の発現に影響を及ぼさなかった。野生型同腹仔と比べて、トリヘプタノイン飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物で一部の機能パラメータが変化したが（例：収縮末期容積及び駆出率）、対照飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物ではこれらに有意差は認められなかった。心機能がより強く影響を受けなかった理由を検討するため、心臓エネルギー代謝に関わる遺伝子群を測定した。これらの遺伝子（PGC-1α、ピルビン酸脱水素酵素ホスファターゼ［PDP1 及び PDP2］、ピルビン酸キナーゼ 4［PK4］並びに胎児遺伝子プログラムの遺伝子である Act1、MHCa 及び MHCb）の相対的発現を Figure 18（A 及び B：MCT 飼料、C：トリヘプタノイン飼料）に要約する。トリヘプタノイン飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物において、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法による半定量で、PGC1a 及び PDP1 の増加が認められた（そ

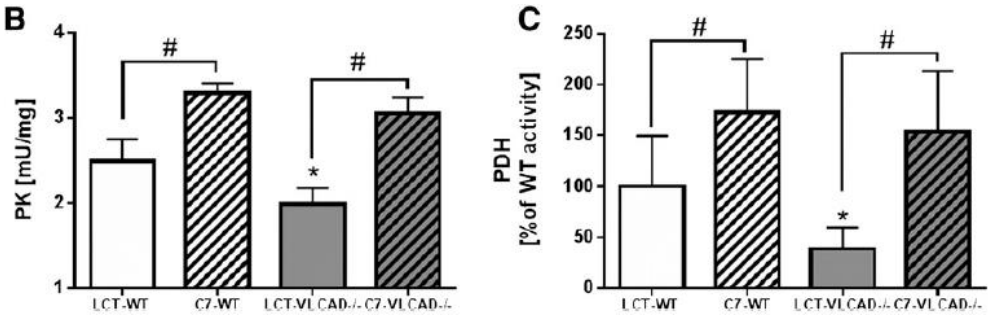
れぞれエネルギー需要が増加した状況及びグルコース酸化経路が刺激された状況で上方制御される)。トリヘプタノイン飼料を給餌した対照動物や VLCAD$^{-/-}$動物で PK4 は変化しなかったが、対照飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物では有意に増加した。胎児遺伝子プログラムの遺伝子は通常、心臓発生時に発現し、成人では下方制御されるが、心臓代謝障害時に検出される典型的な発現プロファイルを示した。

Figure 18: Expression of genes involved in cardiac energy metabolism and glucose oxidation in WT and VLCAD$^{-/-}$ mice



ピルビン酸キナーゼ（PK）及びピルビン酸脱水素酵素（PDH）の比活性を測定したところ、トリヘプタノイン飼料を給餌した動物で増加が認められ、VLCAD$^{-/-}$動物でより顕著に増加した（Figure 19 参照）。

Figure 19: Specific enzyme activities of pyruvate kinase (PK) and pyruvate dehydrogenase (PDH)



肝臓内脂質蓄積及び酸化ストレスに対するトリヘプタノインの影響の要約：対照飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物と比べて、VLCAD$^{-/-}$動物において、トリヘプタノインにより有意な肝臓内脂質蓄

積が生じた。酸化ストレスのレベルは肝臓内脂質蓄積により変化し、確立された一連のマーカー（タンパク質のカルボニル化、グルタチオンペルオキシダーゼ［GPX］活性、グルタチオン濃度［GSH］及びチオバルビツール酸反応性物質［TBAR］）を測定することで判定することができる。対照飼料は VLCAD$^{-/-}$動物や野生型動物でタンパク質のカルボニル化に影響を及ぼさなかったが、トリヘプタノイン飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物で増加した。GPX は、野生型動物と比べて VLCAD$^{-/-}$動物で飼料に依存せず有意に増加した。遺伝子型に関連した GPX の差に従い、GPX の基質である GSH は、野生型動物と比べて VLCAD$^{-/-}$動物の方が低かった。TBAR は VLCAD$^{-/-}$動物で増加したが、飼料による有意な影響を受けなかった。

トリヘプタノインは肝臓にアナプレロティック反応をもたらす：心臓及び肝臓の TCA 回路の 2 種類の酵素（CS 及び αKGHD）の比活性、並びに肝臓でアナプレロティック反応中に発現が増加する一連のタンパク質（プロピオニル CoA カルボキシラーゼ、αKGDH 及び SCoAS）を測定することで、アナプレロティック反応へのトリヘプタノインの寄与が明らかにされた。長期間にわたり発現する慢性的な影響を測定する方法として適切ではない TCA 中間体の評価より、むしろこのアプローチは、アナプレロティック反応に対する飼料の影響の長期的結果を求める上でより妥当と考えられた。1 年間の飼料曝露後にマウスで測定した酵素活性の長期変化を Figure 20 に要約する。心臓では、VLCAD$^{-/-}$マウスにおける CS 及び αKGDH の比活性は、野生型と比べて有意に低下したが、トリヘプタノインによって刺激若しくは、増加されなかった（Figure 20A、B）。CS の比活性は野生型マウスで有意に低下した。VLCAD$^{-/-}$マウスにおける αKGDH の比活性は、トリヘプタノイン飼料では低かった（Figure 20B）。また、これらの変化は、防御タンパク質／カテプシン A（PPCA）、αKGDH 及び SCoAS の増加を示さなかったタンパク質発現解析にも反映されたことから（Figure 20G）、長期のトリヘプタノイン使用により心臓のアナプレロティック反応は刺激されない可能性が示された。

肝臓では、CS 及び αKGDH の比活性は、トリヘプタノイン飼料を給餌した動物で強力に上方制御されたが（Figure 20D、E）、これらの変化が野生型動物と VLCAD$^{-/-}$動物の両方で測定されたように、遺伝子型に依存しなかった。また、タンパク質発現解析において SCoAS の増加も認められた（Figure 20H）。さらに、トリヘプタノイン飼料の給餌は、そのいずれもアナプレロティック反応に関与するリンゴ酸酵素（ME）及びミトコンドリアリンゴ酸脱水素酵素（MHD2）の強力な誘導と関連した（Figure 21）。これらの酵素発現の増加を合わせると、肝臓におけるアナプレロティック反応がトリヘプタノイン飼料により起こっていることが示唆される。

Figure 20: Cardiac and hepatic anaplerotic effects of triheptanoin in mice following 1 year of control of triheptanoin diet.

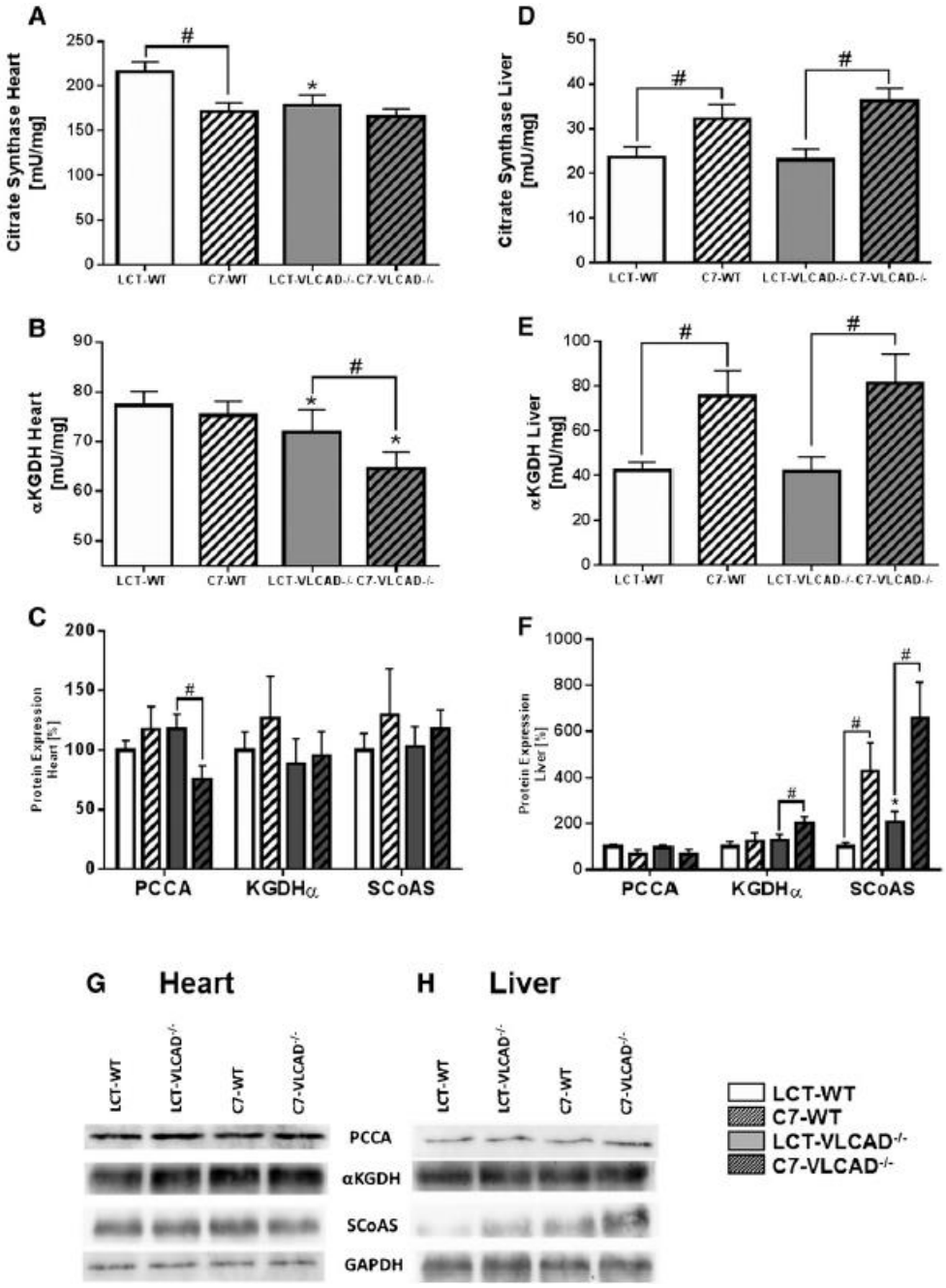


Figure legend: A-D: Citrate synthase enzyme activity. B-E: αKGDH enzyme activity. C, F, G, H: Immunodetection and quantification of protein expression (Western blot). Values are means +/- SEM (n=10-12/group). *Significant differences ($P<0.05$, two-way ANOVA and Student's t-test) between WT and VLCAD$^{-/-}$ mice under the same dietary regiment. #Significant differences ($P<0.05$, two-way ANOVA and Student's t-test) between mice of the same genotype under different dietary regimen. LCT, long-chain triglyceride; PCCA, propionyl-CoA carboxylase.

Figure 21: Upregulation of anaplerotic genes in the liver on triheptanoin diet.

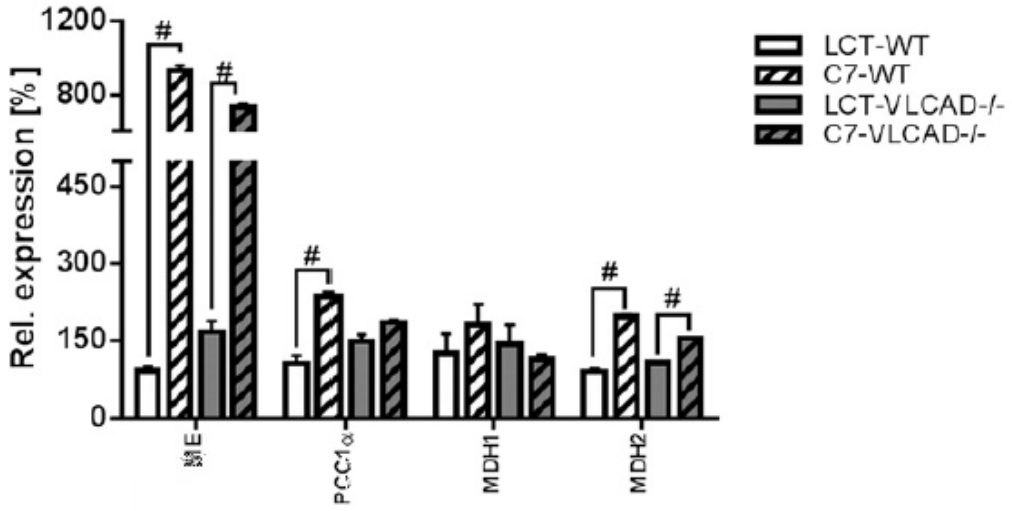


Figure legend: LCT, long-chain triglyceride diet; MDH1, cytosolic malate dehydrogenase; MDH2, mitochondrial malate dehydrogenase; ME, malic enzyme.

長鎖アシルカルニチン及び脂肪組織へのトリヘプタノイン蓄積に対する飼料の影響: 12 ヵ月間給餌した後、β-酸化（アナプレロティック反応に反映）の性能に関するパラメータとして、動物の乾燥血液スポット試料から長鎖アシルカルニチンを測定した。トリヘプタノイン給餌動物では、野生型と比べて長鎖アシルカルニチンが高濃度で測定された。奇数鎖脂肪酸トリグリセリド種の蓄積は認められなかった。遊離カルニチン及びアセチルカルニチン（C0 及び C2）の濃度は、野生型動物と VLCAD$^{-/-}$動物の両方で有意に低下した。対照飼料を給餌したとき、野生型マウスと比べて VLCAD$^{-/-}$マウスで 1 価不飽和長鎖アシルカルニチン（C16:1 及び C18:1）の含量が有意に増加した。

脂肪組織へのトリヘプタノインの蓄積: 炭素鎖が C10 以下の微量の脂肪酸のみが白色脂肪組織中で認められた。より長鎖の脂肪酸による飼料に依存した影響が、白色脂肪組織に遺伝子型に依存せず認められた（Figure 22 参照）。C12、C14、C17 及び C18 などの飽和脂肪酸含量の顕著な増加が認められた。1 価不飽和脂肪酸（C14:1、C16:1 及び C17:1）が大幅に増加した。C17 を除き、その他の奇数鎖脂肪酸トリグリセリド種は白色脂肪組織に蓄積しなかったことから、飼料により導入された C7 の組込み及びプロセシングが少ないことが示唆された。

Figure 22: Fatty acid profiles from adipose tissue of mice under either a control or a triheptanoin diet.

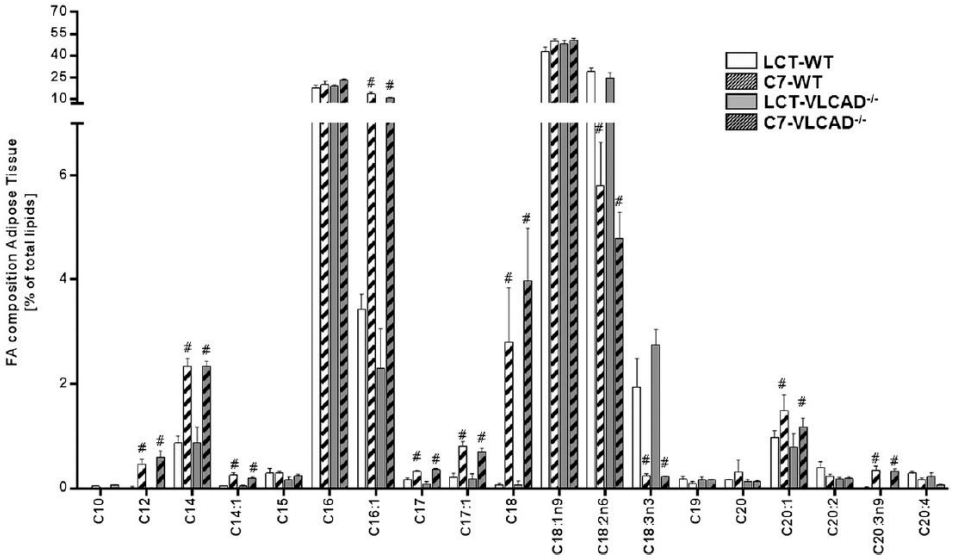


Figure legend: Values are means +/- SEM (n=10-12). #Significant differences (P<0.05, two-way ANOVA and Student's t-test) between mice of the same genotype under different dietary regimens. LCT, long-chain triglyceride.

考察及び結論：これらの試験において、トリグリセリド高含量飼料と対照飼料を給餌し、野生型動物と比較した VLCAD$^{-/-}$動物における心機能及び代謝状態に対する遺伝子型及び飼料の影響を理解することを研究の着目点とし、VLCAD$^{-/-}$マウスにおける飼料中 MCT 又はトリヘプタノインの長期作用を 1 年間検討した。長期間にわたる飼料変更に応答した組織中の代謝適応の臨床評価は困難なため、本試験では、MCT 又はトリヘプタノインのいずれかに基づく飼料が 12 ヵ月でマウスの組織代謝にどのように影響を及ぼすのかを探索した。通常、乳糜管により胸管へと吸収され、直接的な肝臓への脂質投入が回避されるその他の長鎖脂質とは異なり、中鎖脂質は消化管を通過し、門脈循環血内へと直接吸収されすぐに肝臓に移行する。トリヘプタノイン又は偶数鎖 MCT についてのこの理由のため、長期間にわたり多く投与することで、増加した脂質は肝臓に蓄積する（Tucci et al. 2014、Tucci et al. 2017）。

これらの試験において、経時的に機能的心代償不全に至る慢性的かつ継続するエネルギー不足により定義される、VLCAD$^{-/-}$マウスにおける特徴的な心臓の表現型が示された。試験 I において、Tucci らは（Tucci et al. 2014）、1 年を通じて MCT 飼料を与えた VLCAD$^{-/-}$動物も進行性の心機能低下、慢性エネルギー不足の悪化を示し、対照試料群と比べて回復や軽快を示すことなく、これらの動物で最終的に拡張型心筋症に至ることを報告した。これとは対照的に、トリヘプタノイン飼料（試験 II）は、VLCAD$^{-/-}$動物でより良好な忍容性を示し、進行性の心機能低下を伴わなかった。心毒性は、VLCAD$^{-/-}$マウスの表現型にも反映される VLCAD 欠損の典型的な臨床症状であるが、トリヘプタノインを投与した VLCAD$^{-/-}$マウスの心機能は、対照飼料を与えた VLCAD$^{-/-}$動物と比べて心機能のパラメータに差がなかった。しかしながら、この VLCAD-/-マウスモデルは、進行性病理を示すことなく、アナプレロティック中間体及び心臓エネルギーの枯渇を示す長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウスと比べて、ヒト表現型と一致しない（Bakermans et al. 2013）。このため、Tucci らの試験（Tucci et al. 2014、Tucci et al. 2017）で認められた進行性の病理は、臨床での VLCAD 酵素欠損を正確に予測するものではない可能性がある。飼料中トリヘプタノインは、上

方制御された心臓グルコース酸化に伴う上方制御された酵素比活性及び遺伝子発現と関連するにもかかわらず、トリヘプタノイン飼料によりこれらの動物の心臓症状は有意に改善されなかったが、表現型が悪化した同じモデルにおいて、結果は依然として MCT よりも優れていた。比較すると、トリヘプタノインは現在の標準治療である MCT よりも優れているが、本モデルはヒトの VLCAD 疾患を正確に再現していない。

トリヘプタノイン飼料の適用に伴う FAOD における臨床作用のエビデンスは、肯定的である。その他の試験において、*ex vivo* で灌流したときにトリヘプタノインはアナプレロティック中間体を心筋に供給することが示されているため、本試験で認められた中立的な機能の影響は混餌投与に由来するトリヘプタノインの選択的な動態による可能性があった。循環血中トリグリセリドの大部分が肝臓に維持され、ごく一部が末梢循環血に現れる選択的動態により、心臓におけるアナプレロティック反応が遺伝子やタンパク質発現のレベルでさえ検出できなかった理由を説明することができた。

心臓とは対照的に、肝臓におけるアナプレロティック反応がトリヘプタノイン飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物で強く示された。肝臓内脂質蓄積の観点からこれは興味深い重要な所見であり、対照飼料を給餌した動物と比べて、トリヘプタノイン飼料を給餌した VLCAD$^{-/-}$動物の肝臓内脂質蓄積で高値を示したが、酸化ストレス活性を引き起こさなかった。長鎖アシルカルニチンが白色脂肪組織ではなく肝臓に蓄積することから、これがエネルギー不足に応じて起こったことが示唆される（VLCAD$^{-/-}$表現型の特徴）。VLCAD$^{-/-}$動物において、トリヘプタノイン混餌による長期補充により、循環血中グルコース濃度が増加したが、インスリン濃度は高くならず、最終的にインスリン抵抗性に至った。

2.6.2.2.2.3 2 種類の慢性発作マウスモデルにおけるトリヘプタノイン飼料の抗痙攣作用（Willis et al. 2010）

目的: 本試験には、1）マウスを対象としたトリヘプタノイン含有飼料を確立し、その抗痙攣作用を慢性発作モデルで評価すること、及び 2）てんかんマウスにおける脳代謝物濃度の変化の程度、及びトリヘプタノイン給餌によりアナプレロティック反応を示唆する変化が生じるかどうかを明らかにすること、という 2 つの主な目標があった。

試験デザイン: 本試験を 3 つの独立した部分に分けた。試験デザインを Table 7 に要約する。カロリー摂取及び代謝に対する飼料の影響を評価するため（第 1 群～第 4 群）、成熟雄 CF1 マウス（28～34 g）に標準飼料又は 1 日あたりのカロリー摂取量の 35%に相当するトリヘプタノインを含有する飼料を 8 日間給餌し、投与期間中の摂餌量及び体重を重要な評価項目とした。終末尿試料を採取し（メチルマロン酸やメチルクエン酸などのプロピオン酸血症のマーカー）、液-液分配クロマトグラフィーにより有機酸を単離し、トリメチルシリル誘導体を GC-MS により定量した。さらに、別の試験を実施し、マウスに標準飼料又は 35%トリヘプタノイン飼料を 3 週間給餌した（第 3 群～第 4 群）。タンデム質量分析法により乾燥血液スポット試料からアシルカルニチン濃度を測定するため、終末血液を採取した。

本試験の 2 つ目の部分において、角膜キンドリングモデルマウス又は十分にキンドリングした角膜キンドリングモデルマウスに対するトリヘプタノインの抗痙攣作用を評価した。試験は、35%トリヘプタノイン飼料の抗痙攣効果の評価（第 5 群～第 6 群）、キンドリング誘発性発作に対するショ糖及びトリヘプタノイン投与（20%又は 35%）の影響の評価（第 7 群～第 10 群）、十分にキンドリングしたマウスにおける発作感受性に対する 35%トリヘプタノイン飼料の影響の評価（第 11 群～第 12 群）という 3 つの独立した段階に分けられた。十分にキンドリングしたマウス

は、ステージ 5 の発作が 4 回以上得られるまで 2 週間（標準飼料を給餌）角膜キンドリングを実施した。この時点で、動物を標準飼料又は 35%トリヘプタノイン飼料を 6 週間給餌する群に無作為割り付けした。混餌投与期間中、毎週、1 日 2 回、2 日連続で、動物に再度キンドリングを行った。本試験の重要な評価項目は発作スコア中央値であった。本試験は、35%の動物での抗痙攣作用の評価（第 5 群～第 6 群）、キンドリング誘発性発作に対するショ糖及びトリヘプタノイン投与（20%又は 35%）の影響（第 7 群～第 10 群）、最後に十分にキンドリングした動物における発作感受性に対する 35%トリヘプタノイン飼料の影響（第 11 群～第 12 群）という 3 つの独立した段階に分けている。

本試験の 3 つ目の部分において、ピロカルピン（PTZ）CF1 マウスモデルにおけるトリヘプタノインの抗痙攣作用を評価した（第 13 群～第 16 群）。PTZ を投与することで、CF1 マウス（26～43 g）にてんかん重積状態（SE）を誘発させた。SE 動物を体重別に標準飼料又はトリヘプタノイン（35%カロリー摂取量）を 3 週間給餌する群に無作為化したが、各群は給餌開始時期により区別された。最終安楽殺時に、β-ヒドロキシ酪酸及びグルコースの分析用に血液試料を採取した。TCA 回路中間体及びアシル CoA を分析し特徴を明らかにするため、脳を採取して凍結した。

Table 7: Study Design: Anti-convulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models (Willis et al. 2010)

Group Number	Treatment	Triheptanoin Dose Level	Route	Duration of Treatment	Animal Number
Study group: Caloric intake and metabolism					
1	Standard diet[1]	0%	Dietary	8 days	6
2	Triheptanoin diet[2]	35%	Dietary	8 days	6
3	Standard diet	0%	Dietary	7.5 weeks	7
4	Triheptanoin diet	35%	Dietary	7.5 weeks	7
Study group: Corneal Kindling[3] (assessment of anticonvulsant properties of triheptanoin)					
5	Standard diet	0%	Dietary	6 weeks	24
6	Triheptanoin diet	35%	Dietary	6 weeks	25
Study group: Corneal Kindling (impact of sucrose and triheptanoin dose level)					
7	Standard diet	0%	Dietary	6 weeks	20
8	Standard diet (no sucrose)	0%	Dietary	6 weeks	20
9	Triheptanoin diet	20%	Dietary	6 weeks	20
10	Triheptanoin diet (no sucrose)	35%	Dietary	6 weeks	20
Study group: Corneal Kindling (impact of triheptanoin in fully kindled animals)					
11	Standard diet	0%	Dietary	35 days	15
12	Triheptanoin diet	35%	Dietary	35 days	14
Study group: Pilocarpine model (Diet initiated immediately after PTZ)					
13	Standard diet	0%	Dietary	3 weeks	10-16
14	Triheptanoin diet	35%	Dietary	3 weeks	10-16
Study group: Pilocarpine model (Diet initiated approx. two weeks post PTZ)					
15	Standard diet (SE animals)	0%	Dietary	3 weeks	10-16
16	Triheptanoin diet (SE animals)	35%	Dietary	3 weeks	10-16

Abbreviations: SE = status epilepticus
[1] The standard diet contained coil as oil substitute.

[2] Triheptanoin 20 or 35% of caloric requirement. Diets were mixed fresh every 3-4 in the laboratory, dried and then supplied to animals. The 35% triheptanoin diet contained 170.5 g/kg triheptanoin.
[3] Mice were randomized into Standard v 35% triheptanoin diets only after four stage 5 seizures were obtained from kindling (on standard diet) for two weeks prior. After one week on diet and during five following weeks, mice were rekindled ever week twice a day on two consecutive days.

結果：本試験の結果を以下のように分類し、体重及び代謝に対する飼料中トリヘプタノインの影響、並びにキンドリングマウス及び PTZ 誘発性 SE マウスにおけるトリヘプタノインの抗痙攣活性を示す。

飼料、体重及びトリヘプタノイン代謝：標準飼料を給餌したマウスの外観は、35%トリヘプタノイン飼料を給餌したマウスと区別できなかった。群間で体重に統計学的な差はなかった。トリヘプタノインを給餌した動物と標準飼料を給餌した動物で、カロリー摂取量は同程度であった。ヘプタノイルカルニチン、ペンタノイルカルニチン及びプロピオニルカルニチンにより間接的に脂肪酸の代謝を測定し、トリヘプタノイン飼料を給餌した動物でそのすべてが有意に増加した。偶数鎖脂肪酸カルニチン代謝物の濃度は変化しなかったことから、トリヘプタノインは奇数鎖アシルカルニチンへと変換されたことが示された。トリヘプタノインを給餌した動物で、プロピオン酸血症の尿マーカーは低かった。

発作感受性に対するトリヘプタノインの影響（角膜キンドリングモデル）：マウスにトリヘプタノイン飼料又は標準飼料を 3 週間給餌し評価した。高用量（35%）トリヘプタノイン飼料投与群では、低用量（20%）トリヘプタノイン飼料投与群又は標準飼料投与群と比較して、キンドリング発作の発現が有意に遅延した。ショ糖なし飼料群及び低用量の 20%トリヘプタノイン飼料群では標準飼料投与群と比較して角膜キンドリング発作の発現に差はなかった。また、十分にキンドリングしたマウスでは、いずれの食餌間でも誘発発作の重症度に有意差は認められなかった。

発作感受性に対するトリヘプタノインの影響［ピロカルピン（PTZ）モデル］：PTZ を用いて、CF1 マウスに慢性てんかんを誘発した。PTZ 処置の直後にトリヘプタノイン飼料を開始したところ、SE マウスで強直性伸展の約 40%の回復と関連した。トリヘプタノイン飼料は、SE マウスや非 SE マウスにおける PTZ 誘発性慢性発作の閾値に影響を及ぼさなかった。トリヘプタノインは、SE マウスにおける強直性伸展発作の 30%増加した感受性を約 50%減弱したことから、抗痙攣特性は SE 発現後も現れる可能性があることが示された。

ピロカルピンモデルの慢性段階における血中及び脳中代謝物：SE マウスと非 SE マウスの脳中代謝物プロファイルから、てんかん組織において、非 SE マウスの脳と比べてマロニル CoA の有意な増加、プロピオニル CoA、アセチル CoA 及びβ-ヒドロキシブチリル CoA の低下を含む、代謝及び TCA 活性の変化が SE マウスの脳で認められることが示されている。さらに、アスパラギン酸及び GABA は非 SE マウスと比べて低下した。トリヘプタノイン飼料を給餌した SE 動物において、プロピオニル CoA 濃度が回復したが、アセチル CoA 濃度は回復しなかった。メチルマロニル CoA 及び HMG-CoA の濃度は、トリヘプタノインを給餌した SE マウスで増加したが、非 SE 動物では増加しなかった。非 SE 動物にトリヘプタノインを給餌することで、リンゴ酸が増加し、フマル酸が低下した。SE 動物と非 SE 動物の両方で、トリヘプタノイン飼料により脳中β-ヒドロキシブチリル CoA 濃度が 2 倍になったが、このことはβ-ヒドロキシブチリル CoA やグルコースの血漿中濃度に反映されなかった。定常状態の脳における TCA 中間体（スクシニル CoA 及びコハク酸又はクエン酸及びその代謝物であるグルタミン及びグルタミン酸など）に、発作状態又は飼料による有意な変化は認められなかった。

考察及び結論：本試験において、35%トリヘプタノインの混餌投与は CF1 マウスで 7.5 週間まで忍容性が良好であったことが示された。トリヘプタノイン給餌により、病的なプロピオン酸の過負荷は生じなかった。この用量で、トリヘプタノイン飼料は、角膜キンドリング及び PTZ 誘発性慢性てんかんにより説明される 2 種類の発作モデルで抗痙攣ベネフィットに寄与することができた。また、TCA 中間体の対照的な濃度が SE マウスと非 SE マウスの脳の間で認められたが、これは、35%トリヘプタノインの混餌投与によっても影響を受けた。3 週間のトリヘプタノイン給餌（1 日あたりのカロリー摂取量の 35%）により、SE の脳内でアナプレロティック前駆体代謝物（プロピオニル CoA 及びメチルマロニル CoA）が増加したが、アナプレロティックフラックスの増加と一致している。興味深いことに、トリヘプタノイン混餌は脳内 TCA 中間体の発作前状態に影響を及ぼさなかった。これは、TCA 中間体が（発作中に広範に放出される）グルタミン酸や GABA などの神経伝達物質の前駆体になることができる非臨床発作モデルにおける重要な知見であるが、これらのデータから、組織におけるトリヘプタノインの代謝とアナプレロティック中間体の産生を結びつけるさらなる証拠が得られるため、このことは LC-FAOD の治療におけるトリヘプタノインの役割も裏付けている。

2.6.2.2.2.2.4 トリヘプタノインは、圧過負荷ラットにおいて心室肥大を軽減し、心筋グルコース酸化を改善する（Nguyen et al. 2015）

目的：本試験の目的は、心筋症モデルにおける心臓の代謝及び機能に対するトリヘプタノインの作用を評価することであった。

試験デザイン：2 種類の方法により心臓の代謝に対するトリヘプタノインの作用を評価した。その内訳は、ラット心肥大モデルを用いた心臓の *in vivo* ECG 評価、及び単離したラット拍動心臓灌流を用いた脂肪酸及びグルコース酸化の *ex vivo* 評価であった。試験デザインを Table 8 に要約する。*In vivo* 試験では、心室肥大及び心不全を誘発するため、雄 Sprague-Dawley ラット（3 週齢）を大動脈結紮に供して、心圧過負荷を引き起こした。大動脈結紮の 1 週間後に、対照飼料又はカロリー摂取量の 7%若しくは 30%に相当するトリヘプタノインを含有する飼料のいずれかを 5 週間給餌する群に、ラットを無作為割り付けした。ECG 評価により心機能を明らかにした。この評価の測定項目は、拡張期及び収縮期の前壁厚、左室拡張終末期径、左室収縮終末期径、並びに拡張期及び収縮期の後壁厚であった。結紮動物の左室心筋重量係数及び体重を用いて、心室肥大を算出した。心内膜の左室内径短縮率（FS）パラメータから収縮機能を評価した。また、1 回拍出量（SV）、心拍出量（CO）及び僧帽弁流入パターンも算出した。中隔僧帽弁輪の拡張早期最高流速、拡張後期最高流速及び収縮期最高流速を測定するため、組織ドプラ評価を実施した。

アナプレロティック基質（グルコース）の非存在下でヘプタン酸により収縮機能が十分に維持されているかを評価するため、単離したラット拍動心臓灌流を作製した。さらに、灌流も使用して、脂肪酸及びグルコース酸化の測定、並びにアナプレロティック反応の間接的な測定（C5 ケトン体、BHP の血中濃度）により、大動脈結紮ラットにおける心臓の代謝及び機能に対するトリヘプタノイン飼料の長期作用を検討した。

評価項目には、血中 C5 ケトン体（BHP）濃度の定量及び心血管機能の評価があった。心電図により心機能を測定し、心臓グルコース酸化の指標として代謝を間接的に評価した。また、*ex vivo* 単離心臓灌流も実施して、心拍出力、脂肪酸酸化及びインスリン反応を検討した。

Table 8: Study Design: Triheptanoin alleviates ventricular hypertrophy and improves myocardial glucose oxidation in rats with pressure overload (Nguyen et al. 2015)

Group Number	Test Article	Dose Level	Route	Animal Number
In Vivo				
1	Saline	0%	Dietary	13-14
2	Triheptanoin	7%	Dietary	13-14
3	Triheptanoin	30%	Dietary	13-14
Ex Vivo				
1	Glucose and Oleate	5 mM and 0.4 mM	Perfusion (60 min)	4-5
2	Oleate	0.4 mM	Perfusion (60 min)	4-5
3	Heptanoate	1.2 mM	Perfusion (60 min)	4-5
4	Glucose and Oleate, Insulin	5 mM and 0.4 mM, 0.5 mU/mL	Perfusion (60 min) (including insulin perfusion in last 30 min)	4-5

結果：本試験により、圧過負荷により誘発した左室肥大モデルにおける心機能に対するトリヘプタノインの影響が示されている。結果は以下のように分類される。

唯一の基質としてのヘプタン酸により単離拍動心臓の収縮機能が維持された：オレイン酸を灌流した大動脈結紮ラットの心臓では、収縮性能を維持できなかった（Figure 23）。この作用はグルコース添加により回復したが、ピルビン酸のカルボキシル化を介したグルコース促進性アナプレロティック反応による可能性が高い。興味深いことに、ヘプタン酸を灌流した大動脈結紮心臓は、心拍出力のみが保護され、収縮機能障害が抑制された。

Figure 23: Heptanoate alone maintained cardiac performance in isolated working heart perfusion.

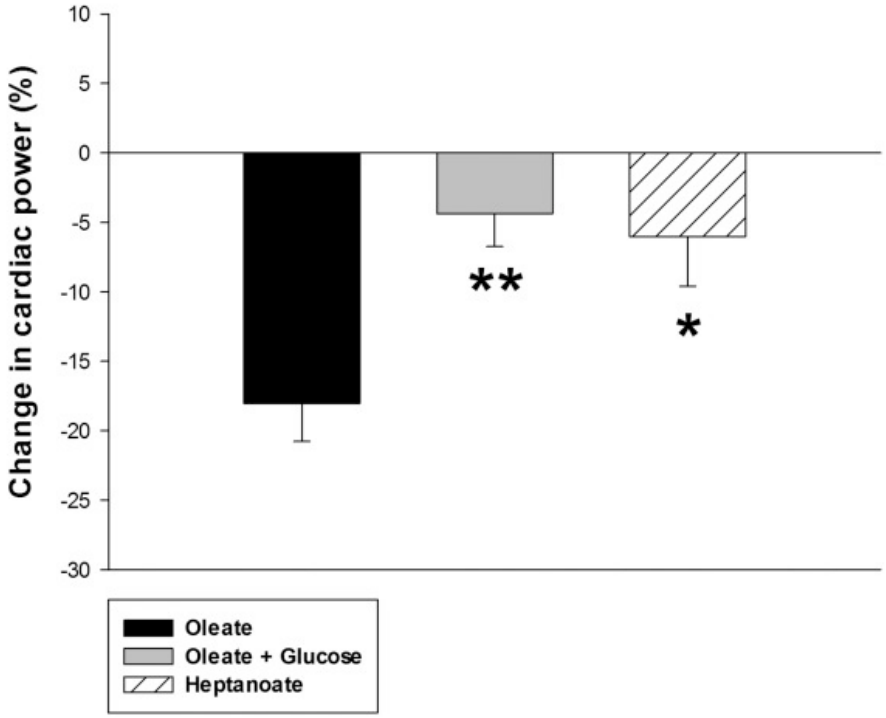


Figure legend: Relative changes in cardiac power compared with the first half of the 60-minute perfusion in normal hearts perfused with oleate as the sole substrate, with oleate and glucose, or with heptanoate as the sole substrate. Data are presented as mean ± SEM. n = 4–5 per group. **P* < .05; ***P* < .01 versus oleate alone.

トリヘプタノイン高含量飼料により、左室肥大が軽減し、拡張機能が改善した：30%トリヘプタノイン飼料を給餌した大動脈結紮動物で体重増加量が低下し、5 週間の投与期間終了時に、対照飼料を給餌した動物と比べて体重が約 14%低値を示した。左室心筋重量係数（左室肥大の軽減を示唆）は、対照飼料を給餌した大動脈結紮動物と比べて 30%トリヘプタノイン飼料を給餌した大動脈結紮動物で有意に低かった（Figure 24）。FS、SV 及び CO に差は認められなかった。組織ドプラ測定により、対照動物と比べて 30%トリヘプタノイン飼料動物で、拡張早期の僧帽弁輪部速度に対する経僧帽弁速度の比が有意に低く、拡張後期に対する拡張早期の僧房弁輪部速度比が有意に高いことが示されたことから、左室長軸の拡張期弛緩の改善が示唆された。まとめると、このことから、大動脈結紮による圧過負荷を有するラットにおいて 30%トリヘプタノイン飼料により肥大が軽減し、拡張機能が改善されたことが示唆される。

Figure 24: Effects of triheptanoin treatment on left ventricular hypertrophy and function in vivo in rats with pressure overload.

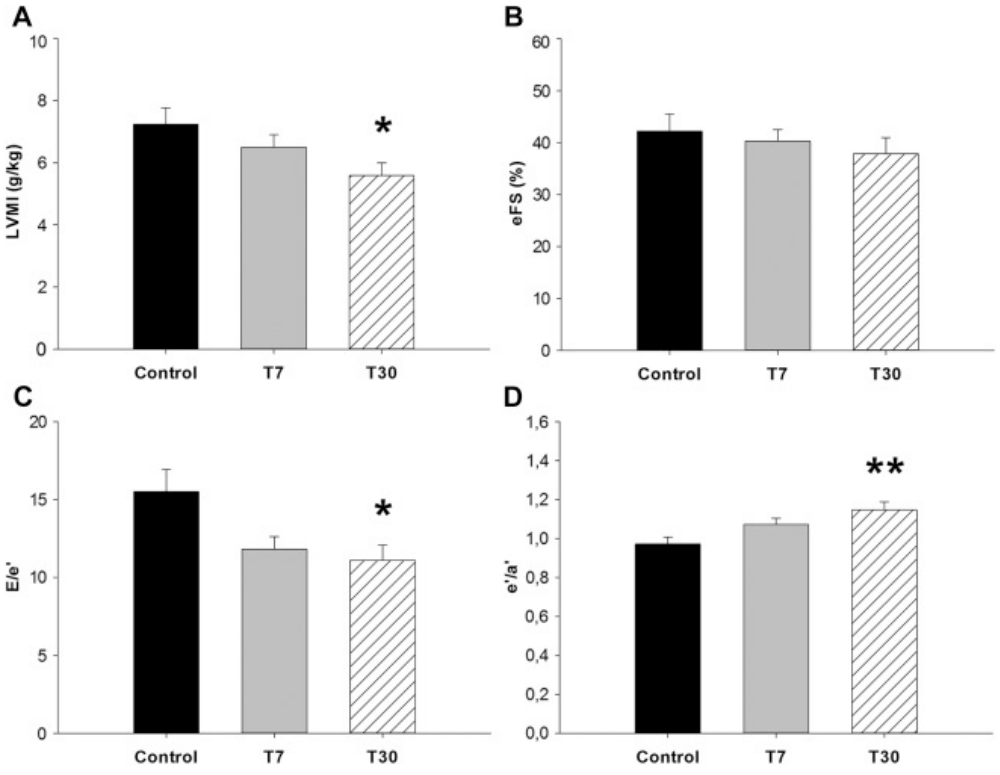


Figure legend: (A) Left ventricular mass index (LVMI), (B) endocardial fractional shortening (eFS), (C) E/e′ ratio, and (D) e′/a′ ratio in pressure-overloaded rats treated with a control diet or triheptanoin-enriched diet at 7% (T7) or 30% (T30) of total energy value. Data are presented as mean ± SEM. n = 13–14 per group. ****P*** < .05; *****P*** < .01 versus control.

トリヘプタノイン投与により心筋グルコース酸化が改善された：単離した拍動心臓灌流において心拍出力の変化は認められず、ECG による収縮機能に対する結果と一致した。心臓のオレイン酸酸化は群間で同程度であったが、心筋グルコース酸化速度は、7%トリヘプタノイン飼料及び対照飼料を給餌した動物の心臓と比べて、30%トリヘプタノイン飼料を給餌した動物の心臓の方が有意に速かった。これらの結果を Figure 25A～C に要約する。30%トリヘプタノインの心臓でグルコース酸化が誘導されたにもかかわらず、脂肪酸酸化に対するグルコースの比には群間で差がなかったことから、トリヘプタノインは酸化を介したエネルギー産生で基質選択に影響を及ぼさ

ないことが示された（Figure 25D 参照）。トリヘプタノインによる TCA 回路機能の回復により、優れた代謝と何らかの基質からのエネルギー産生を可能にしたものと予想される。

Figure 25: Effects of triheptanoin treatment on cardiac performance ex vivo and myocardial substrate oxidation in rats with pressure overload.

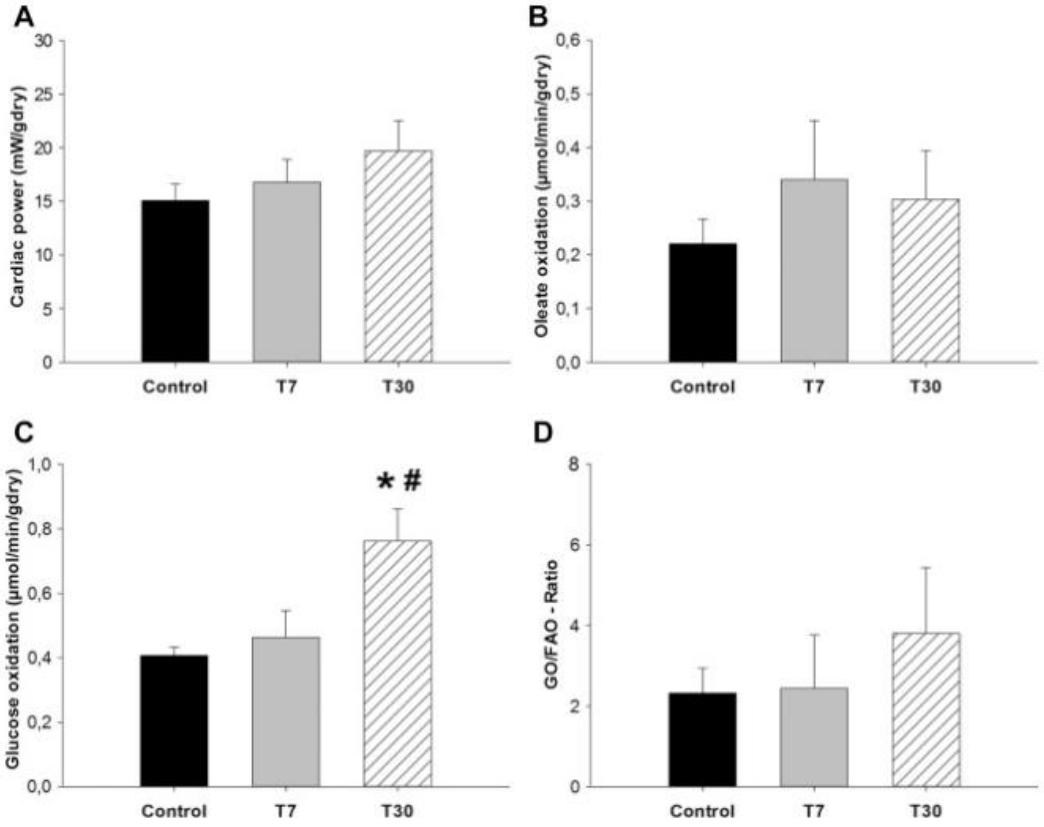


Figure legend: Changes in (A) cardiac power, (B) myocardial oleate oxidation, (C) myocardial glucose oxidation (GO), and (D) GO to fatty acid oxidation (FAO) ratio in pressure-overloaded rats treated with a control diet or triheptanoin-enriched diets at 7% (T7) or 30% (T30) of total energy value. Data are presented as mean ± SEM. n = 4–5 per group. ****P*** < .05 versus control. #***P*** < .05 versus T7.

トリヘプタノイン投与は心筋のインスリン感受性に影響を及ぼさなかった：心筋インスリン感受性の変化が拡張機能及びグルコース利用の改善と因果的に関連するかどうかを明らかにするため、心筋グルコース及び脂肪酸酸化のインスリン反応を測定した（Figure 26 参照）。単離心臓灌流において、すべての群で、インスリンによりグルコース酸化が増加し、オレイン酸酸化が抑制された（Figure 26A）。グルコース酸化のインスリン刺激性反応は、30%飼料群で程度が低かったが（Figure 26B）、インスリン処置による全体的なグルコース酸化速度は同程度であった。30%飼料群での不一致は、反応が鈍化したエビデンスというよりも、本群におけるベースラインのグルコース酸化速度が高いことに起因する可能性がある。インスリン刺激性の脂肪酸酸化の低下は、試料により影響を受けなかったことから（Figure 26C～D）、トリヘプタノイン投与の機能的及び代謝的作用は心筋インスリン感受性の変化に基づいていないことが示唆された。

Figure 26: Effects of triheptanoin treatment on cardiac insulin sensitivity.

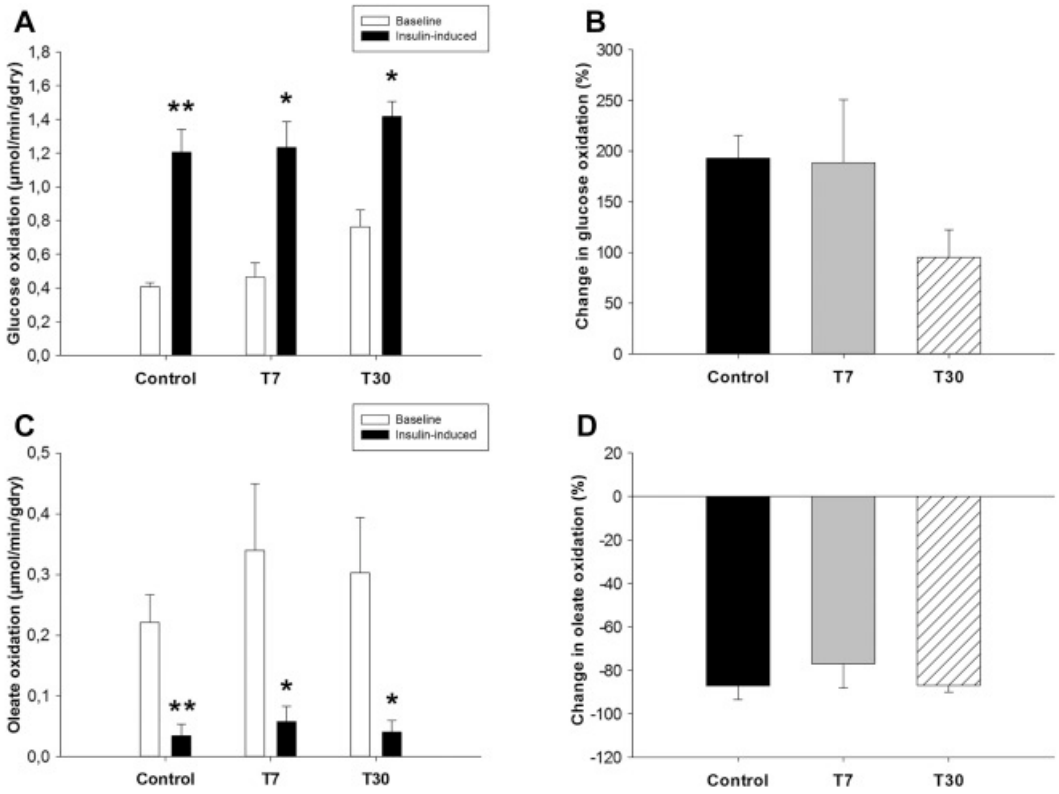


Figure legend: Insulin-induced (A) absolute and (B) relative changes in myocardial glucose oxidation and (C) absolute and (D) relative changes in myocardial oleate oxidation in pressure-overloaded rats treated with a control or triheptanoin-enriched diets at 7% (T7) or 30% (T30) of total energy value. Data are mean ± SEM. n = 4–5 per group. Significantly different vs baseline: * ***P*** < .05; ** ***P*** < .01.

血中β-ヒドロキシペンタン酸（BHP）濃度は心筋グルコース酸化速度と相関した：混餌投与したトリヘプタノインが肝代謝された後に生成する主な代謝物は C5 ケトン体である BHP である。トリヘプタノイン飼料又は対照飼料を給餌したラットから得た単離拍動心臓灌流で、飼料依存的な血中 BHP 濃度の増加が認められ、最高濃度は 30%試料群で認められた。心臓のグルコース酸化速度は、処置にかかわらず、循環血中 BHP 濃度と強く相関していた。

考察及び結論：本試験において、大動脈結紮により誘発した圧過負荷及び心室心筋症のモデルを用いて、心機能に対する飼料中トリヘプタノインの影響を評価した。大動脈結紮により誘発された変化は、FAOD で現れる典型的な心筋症を示しているため、アナプレロティック反応の低下によるエネルギー不足が疾患症状の特徴である LC-FAOD におけるトリヘプタノインの肯定的な作用の可能性を理解する上で意義がある。30%トリヘプタノイン飼料群で、大動脈結紮による圧過負荷に関連する後遺症を有する動物において、左室肥大が軽減され、拡張機能が改善された。機能改善は、心臓グルコース酸化速度の増加と関連したが、心臓脂肪酸酸化、インスリン感受性又はエネルギー基質としてのその他のグルコースへのシフトとは関連しなかった。

トリヘプタノインは TCA 回路にプロピオニル CoA を供給することによるアナプレロティック反応に寄与することが知られているが、取り組んだ本試験では、大動脈結紮により誘発した疑似疾患状態において心機能を維持するために、十分なエネルギーバランスを回復できるかどうかを理解しようとした。重要なことに、単離拍動心臓灌流において、ヘプタン酸単剤で心臓収縮機能の低下をオクタン酸とグルコースを併用したときと同じ程度に防ぐことができた。本試験の妥当

な結論は、圧過負荷による機能障害にもかかわらず、細胞エネルギー代謝が依然として可動し、アナプレロティック基質に感受性を示すということである。グルコースが心筋細胞に対する主なエネルギー供給源（ピルビン酸代謝）となる心疾患で説明される「基質の切り換え」現象の観点で、これは興味深いが、本試験では示されなかった。トリヘプタノインとグルコース酸化の正の相関から、これが本疾患モデルにおける心機能の保護又は回復に関与する機序の 1 つである可能性が示唆される。

その他の非臨床のエビデンスから、心臓肥大はアナプレロティック反応の変化と関連する可能性が高いことが示されているため、このデータは LC-FAOD に関連しており、トリヘプタノインによる TCA 回路の標的化した補充は、組織中エネルギー不足の疾患を治療する潜在的な治療アプローチであることが示唆される。

2.6.2.3 副次的薬理試験

トリヘプタノインの副次的薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.4 安全性薬理試験

トリヘプタノインの安全性薬理試験は実施していない。トリヘプタノインのすべての臨床経験及び非臨床経験において、心血管系、CNS や呼吸器のトリヘプタノインに関連した安全性上の懸念に関する徴候は報告されていない。

トリヘプタノイン及びその代謝物は血液脳関門を通過できるため、薬物乱用の可能性を評価しており、モジュール 2.6.6.9.3 に示す。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

トリヘプタノインの薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。トリヘプタノインは通常の食物に存在する他のトリグリセリドと類似することを考慮すると、薬力学的薬物相互作用の可能性は予測されない。

2.6.2.6 考察及び結論

LC-FAOD は心臓、筋肉及び肝臓のエネルギー不足に関連する疾患群を包含し、臨床的には横紋筋融解症、低血糖症、筋緊張低下及び心筋の筋力低下による全般的な心筋症として現れる可能性がある。LC-FAOD の発病は、細胞からのアナプレロティック TCA 中間体の枯渇と一部関連しており、TCA 回路活性を介して ATP への代謝が求められる還元当量を十分に TCA 回路で産生するために必要なエネルギー産生中間体の貯留の不均衡を生じる。ミトコンドリア膜を介した長鎖脂肪構造の漏出に加え（Roe et al. 2006）、TCA 中間体の不足は、代謝欠乏につながる低血糖症及びエネルギー不足にも関連し、TCA 回路中間体からの糖新生の必要性に拍車をかけている可能性がある。TCA 回路中間体と関連する LCAD のマウスモデルで心不全が認められていることから、FAOD 疾患機序のこの重要部分が確認されている（Houten et al. 2010）。この問題を悪化させるのは、通常、長鎖脂肪酸をミトコンドリアに輸送し、アセチル CoA 基質を TCA 回路に投入するために C14～18 脂肪酸の酸化に必要なミトコンドリアタンパク質の欠乏である。TCA 回路中間体の枯渇やアセチル CoA 産生能の欠如により、FAOD では、酸化的リン酸化からの効果的なエネルギー産生に障害が生じる。

長鎖脂肪からアセチル CoA を開裂させる能力がないため、LC-FAOD 患者は空腹時や疾患時にエネルギーを産生できない。現在の典型的な管理には、細心の注意を払った空腹回避、低脂肪／高炭水化物食の維持、及び／又は長鎖脂肪酸代謝酵素の欠損を迂回し、別の中鎖脂肪酸の酸化酵素セットを利用するための、主に炭素数 8 及び 10 の脂肪酸（例：トリオクタノインやトリデカノイン）で構成される、食事中偶数鎖 MCT の経口摂取がある。

奇数鎖中鎖脂肪酸としてのトリヘプタノインは、細胞のエネルギー不足に対しより効率的に対処すると考えられている。全身循環血中においてトリヘプタノインから直接加水分解される代謝物であるヘプタン酸は、輸送タンパク質を必要とせずに、ミトコンドリア内へと膜を直接拡散する。ミトコンドリア内に入るとヘプタン酸は代謝され、スクシニル CoA（炭素数 4 の中間体）に変換可能なプロピオニル CoA 1 分子を生成し、それにより TCA 回路中間体が回復する（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009、Gu et al. 2010）。アナプレロティック反応を経由する作用に加えて、トリヘプタノインは、オキサロ酢酸を TCA 回路からミトコンドリア外での糖新生に切り替えることにより、プロピオニル CoA からの局所糖新生を回復させているとも考えられている（Kinman et al. 2006、Marin-Valencia et al. 2013）。このため、トリヘプタノインは、MCT オイルには存在しない独特な二重機序により、LC-FAOD 患者におけるエネルギー不足に対処するために、長鎖脂肪酸酸化酵素の欠損を迂回させることができる。

オイル剤として又は混餌としての経口投与に由来するトリヘプタノインの代謝は、動物で十分に明らかにされており、TCA 活性及びグルコースの生成を維持するためにアナプレロティック中間体を補充することにより、疾患状態におけるエネルギー産生を回復することに関与することが実証されている（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009、Gu et al. 2010）。また、飼料中トリヘプタノインの肯定的な作用から、心室肥大のげっ歯類心血管モデルにおける拡張機能の改善が示され（Nguyen et al. 2015）、飼料を介して長期間トリヘプタノインを投与した VLCAD 酵素欠損マウスでの良好な忍容性が示された（Tucci et al. 2017）。代謝経路の理解により、LC-FAOD に関する臨床的説明並びに MCT 及びトリヘプタノインによる治療転帰への薬理学的な洞察が加えられ、臨床用量の選択も裏付けられる。トリヘプタノイン飼料を給餌した動物で示された TCA 活性のアナプレロティック反応及びエネルギー代謝に対する作用から、混餌投与に基づく臨床転帰も支持される可能性がある。

トリヘプタノイン（1 日あたりのカロリー摂取量の 35%）の 3 週間混餌投与により、発作傾向マウスの脳内のアナプレロティック中間体濃度が増加し、角膜キンドリング及び PTZ 誘発性慢性てんかんにより説明される 2 種類の発作モデルで抗痙攣ベネフィットに寄与する（Willis et al. 2010）。このことから、発作及び運動障害などの非 LC-FAOD 関連症状におけるエネルギーの産生及び回復に関するトリヘプタノインの作用機序が示され、これらの疾患状況における TCA エネルギー産生に対するアナプレロティック反応のベネフィットへの洞察がさらに追加される。

心血管系、CNS 又は呼吸器の安全性上の懸念に関する徴候は臨床及び非臨床で報告されていないため、トリヘプタノインの単独の安全性薬理試験や反復投与毒性試験への安全性薬理評価項目の組込みが必要とは考えられなかった。経口投与及び混餌投与されたトリヘプタノインは、全身移行前に速やかに代謝され微量ではあるが、トリヘプタノインとその代謝物は血液脳関門を通過できるため、薬物乱用の可能性を評価することは妥当である。この評価の一環として、トリヘプタノイン、ヘプタン酸又は BHP の放射性リガンド結合試験を実施した。乱用能又は他の向精神作用と関連する神経細胞部位での活性は検出されなかった。

トリヘプタノインは通常の飼料中のその他のトリグリセリドと構造が類似しているため、薬力学的薬物相互作用試験は必要とは考えられなかった。非臨床及び臨床の両方で薬物動態プロファイル及び速やかな代謝が示されており、活性代謝物が速やかに経路へと移行して、脂肪酸酸化及び TCA 回路活性を生じることが裏付けられている。

結論として、トリヘプタノインは、グリセロール骨格上に炭素数 7 の脂肪酸が 3 つある、精製された GMP 規格の奇数鎖 MCT であり、LC-FAOD 患者を対象としたエネルギー補充療法の基質とすることを目的としている。トリヘプタノインは、食物から供給される天然油由来のトリグリセリドと構造が類似する。経口摂取後、速やかに切断され、細胞膜及びミトコンドリア膜を直接拡散することができる炭素数 7 の遊離ヘプタン酸として吸収される。ヘプタン酸はアセチル CoA 及びプロピオニル CoA へと代謝される。MCT とトリヘプタノインの両方に共通する代謝物であるアセチル CoA は、ATP 産生に寄与する。プロピオニル CoA のアナプレロティック反応及び糖新生系の特性は奇数鎖脂肪酸に特異的であるため（Kinman et al. 2006、Deng et al. 2009、Gu et al. 2010）、トリヘプタノインは、偶数鎖中鎖脂肪酸を含有する MCT より優位である。MCT 及びトリヘプタノインはいずれも、FAO 酵素の欠損により生じる LC-FAOD の障害を迂回して、ATP 及びケトン体を生成するが、トリヘプタノインは TCA 回路の機能及びケトン体生成を回復させ、糖貯蔵の回復も支援する。Roe らの報告（Roe et al. 2002）から始まる一連の臨床関連の文献から、LC-FAOD 患者におけるトリヘプタノインの肯定的な治療ベネフィットが示唆される。しかしながら、LC-FAOD に対する承認された治療は存在せず、多くの患者は、注意深い疾患管理にもかかわらず、代謝代償不全を継続して発現する。新生児スクリーニングにより若齢患者の死亡率が改善されているが、早期介入にもかかわらず、LC-FAOD による臨床症状、死亡及び入院は高いままであることから（Spiekerkoetter et al. 2009、Lindner et al. 2011）、LC-FAOD の新規治療に対するアンメット・メディカル・ニーズが示唆される。数多くの公表された非臨床試験において、トリヘプタノインの代謝、及び LC-FAOD 患者で既に認められている外挿性のあるベネフィットを予測する動物におけるエネルギー供給源としての活用を裏付ける、その代謝物の薬理学的ベネフィットが示されている。ここで引用した非臨床薬理試験データから、動物におけるアナプレロティック基質の補充と相関する FAO 酵素欠損モデルにおける TCA 回路活性に対するトリヘプタノインのベネフィットが示されている。これらのデータから、肯定的な過去の臨床転帰の理解が強化され、臨床における LC-FAOD に対する効果が高い治療選択肢としてのトリヘプタノインの妥当性がさ

らに示される。

2.6.2.7 参考文献

Bakermans, AJ, Dodd, MS, Nicolay, K, Prompers, JJ, Tyler, DJ, and Houten, SM. 2013. "Myocardial energy shortage and unmet anaplerotic needs in the fasted long-chain acyl-CoA dehydrogenase knockout mouse." *Cardiovasc Res* 100 (3):441-9.

Deng, S, Zhang, GF, Kasumov, T, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2009. "Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver." *J.Biol.Chem.* 284 (41):27799-27807.

Gu, L, Zhang, GF, Kombu, RS, Allen, F, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2010. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile." *Am.J Physiol Endocrinol Metab* 298 (2):E362-E371.

Houten, SM, and Wanders, RJ. 2010. "A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid beta-oxidation." *J Inherit Metab Dis* 33 (5):469-77.

Kinman, RP, Kasumov, T, Jobbins, KA, Thomas, KR, Adams, JE, Brunengraber, LN, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2006. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats." Am.J.Physiol Endocrinol.Metab 291 (4):E860-E866.

Lindner, M, Gramer, G, Haege, G, Fang-Hoffmann, J, Schwab, KO, Tacke, U, Trefz, FK, Mengel, E, Wendel, U, Leichsenring, M, Burgard, P, and Hoffmann, GF. 2011. "Efficacy and outcome of expanded newborn screening for metabolic diseases--report of 10 years from South-West Germany." *Orphanet J Rare Dis* 6:44.

Marin-Valencia, I, Good, LB, Ma, Q, Malloy, CR, and Pascual, JM. 2013. "Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain." *J Cereb.Blood Flow Metab* 33 (2):175-182.

Marten B, Pfeuffer M and Schrezenmeir J (2006) Medium-chain triglycerides. *International Dairy Journal 16(11): 1374-1382.*

Nguyen, TD, Shingu, Y, Amorim, PA, Schwarzer, M, and Doenst, T. 2015. "Triheptanoin Alleviates Ventricular Hypertrophy and Improves Myocardial Glucose Oxidation in Rats With Pressure Overload." *J Card Fail.*

Roe, CR, and Mochel, F. 2006. "Anaplerotic diet therapy in inherited metabolic disease: therapeutic potential." *J.Inherit.Metab Dis.* 29 (2-3):332-340.

Roe, CR, Sweetman, L, Roe, DS, David, F, and Brunengraber, H. 2002. "Treatment of cardiomyopathy and rhabdomyolysis in long-chain fat oxidation disorders using an anaplerotic odd-chain triglyceride." *J.Clin.Invest* 110 (2):259-269.

Spiekerkoetter, U, Lindner, M, Santer, R, Grotzke, M, Baumgartner, MR, Boehles, H, Das, A, Haase, C, Hennermann, JB, Karall, D, de, KH, Knerr, I, Koch, HG, Plecko, B, Roschinger, W, Schwab, KO, Scheible,

D, Wijburg, FA, Zschocke, J, Mayatepek, E, and Wendel, U. 2009. "Management and outcome in 75 individuals with long-chain fatty acid oxidation defects: results from a workshop." *J.Inherit.Metab Dis.* 32 (4):488-497.

Traul KA, Driedger A, Ingle DL, et al. (2000) Review of the toxicologic properties of medium-chain triglycerides. *Food Chem Toxicol* 38(1): 79-98.

Tucci, S, Floegel, U, Beermann, F, Behringer, S, and Spiekerkoetter, U. 2017. "Triheptanoin: long-term effects in the very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse." J Lipid Res 58 (1):196-207.

Tucci, S, Flogel, U, Hermann, S, Sturm, M, Schafers, M, and Spiekerkoetter, U. 2014. "Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice." *Biochim Biophys Acta* 1842 (5):677-85.

Willis, S, Stoll, J, Sweetman, L, and Borges, K. 2010. "Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models." Neurobiol.Dis. 40 (3):565-572.

トリヘプタノイン

第 2 部 CTD の概要
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験概要表

Ultragenyx Japan 株式会社

略号一覧表

略語・用語	内容
アシル CoA	acyl-coenzyme A：アシルコエンザイム A
C4	4-carbon：炭素数 4
C5	5-carbon (e.g., pentanoate)：炭素数 5（例：ペンタン酸）
CF1	Carworth Farms strain 1
FAOD	fatty acid oxidation disorders：脂肪酸代謝異常症
g	gram：グラム
G1D	glucose transporter I-deficient：グルコーストランスポーター1 欠損
GLUT-1	glucose transporter 1：グルコーストランスポーター1
ID	intraduodenal：十二指腸内
IV	intravenous(ly)：静脈内
ka	absorption rate constant：吸収速度定数
kg	kilogram：キログラム
L	liter/litre(s)：リットル
LC-FAOD	long-chain fatty acid oxidation disorders：長鎖脂肪酸代謝異常症
m	meter：メートル
MCT	medium-chain triglyceride：中鎖脂肪酸トリグリセリド
min	minute(s)：分
Na	sodium：ナトリウム
PA	posteroanterior：後前方向
TCA 回路	tricarboxylic acid cycle (Kreb’s cycle)：トリカルボン酸回路（クレブス回路）
UX007	Investigational Product/study drug, pharmaceutical-grade triheptanoin：治験薬／医薬品グレードのトリヘプタノイン
VLCAD$^{-/-}$	very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損
WT	wild type：野生型

目次

略号一覧表 2
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験：一覧表 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験（Marin-Valencia et al, 2013） 5
2.6.3.3 効力を裏付ける試験（Tucci et al, 2014） 6
2.6.3.4 効力を裏付ける試験（Tucci et al, 2017） 7
2.6.3.5 効力を裏付ける試験（Willis et al, 2010） 8
2.6.3.6 効力を裏付ける試験（Deng et al, 2009） 9
2.6.3.7 効力を裏付ける試験（Kinman et al, 2006） 10
2.6.3.8 効力を裏付ける試験（Gu et al, 2010） 11
2.6.3.9 効力を裏付ける試験（Nguyen et al, 2015） 12
2.6.3.10 安全性薬理試験 13
2.6.3.11 薬力学的薬物相互作用 13
2.6.3.12 参考資料 14

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験：一覧表

被験物質：トリヘプタノイン／ヘプタン酸

試験の種類	試験系	投与方法	試験施設	試験番号／参考文献	CTD の記載場所
効力を裏付ける試験	*In vivo*、マウス、GLUT-1	点滴静注	NA	(Marin-Valencia et al. 2013)	4.3
	In vivo、マウス、VLCAD$^{-/-}$	経口（混餌）	NA	(Tucci et al. 2014)[a]	4.3
				(Tucci et al. 2017)	
	In vivo、マウス、CF1	経口（混餌）	NA	(Willis et al. 2010)	4.3
	In vivo、ラット、Sprague-Dawley	*Ex vivo* 肝灌流	NA	(Deng et al. 2009)	4.3
	In vivo、ラット、Sprague-Dawley	静脈内又は十二指腸内	NA	(Kinman et al. 2006)	4.3
	In vivo、ラット、Sprague-Dawley	点滴静注	NA	(Gu et al. 2010)	4.3
	In vivo、ラット、Sprague-Dawley	経口（混餌）	NA	(Nguyen et al. 2015)	4.3
副次的薬理試験	トリヘプタノインの副次的薬理試験は実施しなかった。				NA
安全性薬理試験	トリヘプタノインの正式な安全性薬理試験は実施していない。				NA
薬力学的薬物相互作用	トリヘプタノインの正式な薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。				NA

NA：該当せず

[a] Tucci et al, 2014 の被験物質は MCT であった。

2.6.3.2 効力を裏付ける試験（Marin-Valencia et al, 2013）

被験物質：ヘプタン酸

報告書／参考文献の標題	神経の栄養源としてのヘプタン酸：正常脳及びグルコーストランスポーターI 欠損（G1D）脳におけるエネルギー前駆体及び神経伝達物質前駆体
試験番号／参考文献	(Marin-Valencia et al. 2013)
動物種／系統	マウス／GLUT-1[a] 及び WT（C57BL/6J）対照
性別（雄/雌）／動物数	GLUT-1 マウス：4 例、WT マウス：6 例、性別の内訳：NA
投与方法	点滴静注
溶媒／投与形態	NA
投与量	50% DCI
投与期間	単回投与（ヘプタン酸を 95.9 ± 3.9 µmol/分/kg で 35 分かけて投与）
主な所見：ヘプタン酸は肝臓における糖新生の基質であり、ヘプタン酸由来の血漿中グルコースは脳で酸化される。	

VLCAD$^{-/-}$：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウス、WT：野生型マウス、NA：入手できず、DCI：1 日あたりのカロリー要求量
[a] 別名、G1D マウス。

2.6.3.3 効力を裏付ける試験（Tucci et al, 2014）

被験物質：MCT

報告書／参考文献の標題	極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損（VLCAD$^{-/-}$）マウスにおける心筋症の発現及び病理学的機序
試験番号／参考文献	(Tucci et al. 2014)
動物種／系統	マウス／VLCAD$^{-/-}$及び WT 同腹仔対照
性別（雄/雌）／動物数	各 10～12 例、3 及び 12 ヵ月齢の VLCAD$^{-/-}$及び WT、性別の内訳：NA
投与方法	経口、混餌
溶媒／投与形態	5%[a] 脂肪含有飼料（総脂肪の 4.4%が MCT 由来、残りの 0.6%が大豆油由来の脂肪）を動物に給餌した。
投与量	飼料中総脂肪は 1 日あたりの総代謝エネルギーの 12%を占め、総脂肪の 4.4%は MCT で構成された。
投与期間	12 ヵ月
主な所見：1 年を通じて MCT 飼料を与えた VLCAD$^{-/-}$動物は進行性の心機能低下、慢性エネルギー不足の悪化を示し、対照試料群と比べて回復や軽快を示すことなく、最終的に拡張型心筋症に至った。	

VLCAD$^{-/-}$：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウス、WT：野生型マウス、NA：入手できず
[a] これは代謝可能な総エネルギーの 12%に相当する。

2.6.3.4 効力を裏付ける試験（Tucci et al, 2017）

被験物質：トリヘプタノイン

報告書／参考文献の標題	トリヘプタノイン：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウスにおける長期作用
試験番号／参考文献	(Tucci et al. 2017)
動物種／系統	マウス／VLCAD$^{-/-}$及び WT 同腹仔対照
性別（雄/雌）／動物数	各 10～12 例、3 及び 12 ヵ月齢の VLCAD$^{-/-}$及び WT、性別の内訳：NA
投与方法	経口、混餌
溶媒／投与形態	5%[a] 脂肪含有飼料（総脂肪の 4.4%がトリヘプタノイン、残りの 0.6%が大豆油由来の脂肪）を動物に給餌した。
投与量	飼料中総脂肪は 1 日あたりの総代謝エネルギーの 12%を占め、総脂肪の 4.4%はトリヘプタノインで構成された。
投与期間	12 ヵ月
主な所見：心臓グルコース酸化の上方制御にもかかわらず、VLCAD 欠損マウスにおける収縮機能障害の発現をトリヘプタノイン飼料で防ぐことはできなかった。アナプレロティック作用は肝臓に限定され、肝臓脂質含量もトリヘプタノイン飼料により増加した。	

VLCAD$^{-/-}$：極長鎖アシル CoA 脱水素酵素欠損マウス、WT：野生型マウス、NA：入手できず
[a] これは代謝可能な総エネルギーの 12%に相当する。

2.6.3.5 効力を裏付ける試験（Willis et al, 2010）

被験物質：トリヘプタノイン

報告書／参考文献の標題	2 種類の慢性発作マウスモデルにおけるトリヘプタノイン飼料の抗痙攣作用
試験番号／参考文献	(Willis et al. 2010)
動物種／系統	マウス
性別（雄/雌）／動物数	各群雄 5～25 例
投与方法	経口、混餌
溶媒／投与形態	げっ歯類用トリヘプタノイン混餌
投与量	DCI の 35%
投与期間	3 週間連日投与
主な所見：35%トリヘプタノイン飼料（20%ではない）により角膜キンドリング発作の発現が遅延した。	

DCI：1 日あたりのカロリー摂取量

2.6.3.6 効力を裏付ける試験（Deng et al, 2009）

被験物質：ヘプタン酸

報告書／参考文献の標題	ラット灌流肝における C4 ケトン体生成、C5 ケトン体生成及びアナプレロティック反応の相互関係
試験番号／参考文献	(Deng et al. 2009)
動物種／系統	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄/雌）／動物数	雄 1 例
投与方法	*Ex vivo* 肝灌流（20 分灌流）
溶媒／投与形態	重炭酸緩衝液及び 4 mM グルコース
投与量	0～1 mM ヘプタン酸
投与期間	単回投与（20 分灌流）
主な所見：本試験の目的は、C4/C5 ケトン体生成又はアナプレロティック反応を指標に、トリグリセリド代謝物（オクタン酸、ヘプタン酸）を灌流したラット肝臓におけるエネルギー基質産生能を検討することであった。オクタン酸は、ヘプタン酸の取込みを阻害し、結果として、ヘプタン酸からの C5 ケトン体生成及びアナプレロティック反応を阻害することが示された。	

2.6.3.7 効力を裏付ける試験（Kinman et al, 2006）

被験物質：トリヘプタノイン

報告書／参考文献の標題	正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口及び腸内代謝
試験番号／参考文献	(Kinman et al. 2006)
動物種／系統	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄/雌）／動物数	各群雄 6～9 例
投与方法	静脈内又は十二指腸内投与 [a]
溶媒／投与形態	生理食塩水
投与量	DCI の 40%[a]
投与期間	単回投与
主な所見：本試験において、十二指腸内投与よりも静脈内投与の方が高かった、TCA 前の代謝物（ヘプタン酸/C5 ケトン体）の血中濃度比を検討することにより、投与経路がアナプレロティック薬としてのトリヘプタノインの効果に影響を及ぼすことが示された。	

DCI：1 日あたりのカロリー摂取量

[a] プロトコール 1（各群ラット 6～7 例の 6 群）では、生理食塩水又は 10%トリヘプタノインのエマルジョンをカロリー要求量の 0%、10%、20%、30%又は 40%の用量で静脈内投与又はカロリー要求量の 40%の用量で十二指腸内投与を 90 分かけて行った。プロトコール 2（各群ラット 7～9 例の 4 群）では、プロトコール 1 と同様にラットを準備した。動物に生理食塩水の静脈内投与（第 1 群）、トリヘプタノインの静脈内投与（第 2 群、カロリー要求量の 40%）又はトリヘプタノインの十二指腸内投与（第 3 群及び第 4 群、カロリー要求量の 40%）を 120 分かけて行った。

2.6.3.8 効力を裏付ける試験（Gu et al, 2010）

被験物質：トリヘプタノイン／ヘプタン酸ナトリウム

報告書／参考文献の標題	正常ラットにおけるアナプレロティック基質であるトリヘプタノインの非経口及び腸内代謝。II.脂質分解、糖産生及び肝アシル CoA プロファイルに対する影響
試験番号／参考文献	(Gu et al. 2010)
動物種／系統	ラット／Sprague-Dawley
性別（雄/雌）／動物数	各群雄 6～7 例
投与方法	静脈内又は十二指腸内投与
溶媒／投与形態	NA
投与量	DCI の 40%[a]
投与期間	単回投与

主な所見：

- トリヘプタノインを静脈内投与することで、脂質分解（LC-FAOD の治療過程で逆効果と考えられる）が増加したが、これらの脂肪酸の再エステル化により、脂肪酸の正味の増加は認められなかった。
- 十二指腸内投与経路は末梢脂質分解を刺激しなかったため、腸内投与は治療選択肢と考えることができる。
- トリヘプタノインを静脈内投与することで糖新生が十分に刺激されるため、治療にグルコース投与を補充する必要はない。
- 絶食した正常ラットを用いて本試験を実施したため、トリヘプタノインに対する脂質分解反応が基礎疾患により異なる可能性がある FAOD 患者に典型的なものと同じストレス条件に動物が供されていないことを、著者らは認めている。

DCI：1 日あたりのカロリー摂取量、NA：該当せず
a 動物に対し、ヘプタン酸部分からカロリー要求量の 40%が得られる用量で、ヘプタン酸ナトリウム又はトリヘプタノインを投与した。

2.6.3.9 効力を裏付ける試験（Nguyen et al, 2015）

被験物質：トリヘプタノイン／ヘプタン酸

報告書／参考文献の標題	トリヘプタノインは、圧過負荷ラットにおいて心室肥大を軽減し、心筋グルコース酸化を改善する
試験番号／参考文献	(Nguyen et al. 2015)
動物種／系統	ラット／Sprague-Dawley[a]
性別（雄/雌）／動物数	雄 13～14 例
投与方法	経口、混餌又は *ex vivo* 心臓灌流
溶媒／投与形態	NA
投与量	DCI の 7%又は 30%
投与期間	5 週間連日
主な所見：本試験において、大動脈結紮による圧過負荷を有するラットで、トリヘプタノイン飼料により心室肥大が軽減し、拡張機能が改善することが示された。また、飼料中濃度に依存して、心臓グルコース酸化も増加した。試験の *ex vivo* 灌流群において、収縮機能障害をグルコースと同程度に防ぐヘプタン酸の能力は、心臓におけるヘプタン酸の十分なアナプレロティック能を示唆している可能性がある。著者らは、トリヘプタノインによる TCA 回路の標的化した補充は、心肥大における心室リモデリング及び代謝リモデリングにアプローチすると結論付けた。	

DCI：1 日あたりのカロリー摂取量、NA：該当せず

[a] 本試験の *in vivo* 経口投与群では、圧過負荷を誘発するために大動脈結紮に供したラットを使用した。*Ex vivo* 心臓灌流では、未結紮の無処置動物を使用した。

2.6.3.10 安全性薬理試験

トリヘプタノイン又は UX007 の正式な安全性薬理試験は実施していない。

2.6.3.11 薬力学的薬物相互作用

トリヘプタノイン又は UX007 の正式な薬力学的薬物相互作用試験は実施していない。

2.6.3.12 参考資料

Deng, S, Zhang, GF, Kasumov, T, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2009. "Interrelations between C4 ketogenesis, C5 ketogenesis, and anaplerosis in the perfused rat liver." *J.Biol.Chem.* 284 (41):27799-27807.

Gu, L, Zhang, GF, Kombu, RS, Allen, F, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2010. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats. II. Effects on lipolysis, glucose production, and liver acyl-CoA profile." *Am.J Physiol Endocrinol Metab* 298 (2):E362-E371.

Kinman, RP, Kasumov, T, Jobbins, KA, Thomas, KR, Adams, JE, Brunengraber, LN, Kutz, G, Brewer, WU, Roe, CR, and Brunengraber, H. 2006. "Parenteral and enteral metabolism of anaplerotic triheptanoin in normal rats." *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab* 291 (4):E860-E866.

Marin-Valencia, I, Good, LB, Ma, Q, Malloy, CR, and Pascual, JM. 2013. "Heptanoate as a neural fuel: energetic and neurotransmitter precursors in normal and glucose transporter I-deficient (G1D) brain." *J Cereb.Blood Flow Metab* 33 (2):175-182.

Nguyen, TD, Shingu, Y, Amorim, PA, Schwarzer, M, and Doenst, T. 2015. "Triheptanoin Alleviates Ventricular Hypertrophy and Improves Myocardial Glucose Oxidation in Rats With Pressure Overload." *J Card Fail.*

Tucci, S, Floegel, U, Beermann, F, Behringer, S, and Spiekerkoetter, U. 2017. "Triheptanoin: long-term effects in the very long-chain acyl-CoA dehydrogenase-deficient mouse." *J Lipid Res* 58 (1):196-207.

Tucci, S, Flogel, U, Hermann, S, Sturm, M, Schafers, M, and Spiekerkoetter, U. 2014. "Development and pathomechanisms of cardiomyopathy in very long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficient (VLCAD(-/-)) mice." *Biochim Biophys Acta* 1842 (5):677-85.

Willis, S, Stoll, J, Sweetman, L, and Borges, K. 2010. "Anticonvulsant effects of a triheptanoin diet in two mouse chronic seizure models." *Neurobiol.Dis.* 40 (3):565-572.