

氏 名 (本籍)	い 今	む 村	あ き ら 彰
学 位 の 種 類	医	学	博 士
学 位 記 番 号	医	第	1388 号
学位授与年月日	昭和 57 年 2 月 24 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当		
最 終 学 歴	昭和 49 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業		
学位論文題目	組織中カルニチンの定量法		

(主 査)

論文審査委員 教授 吉 永 馨 教授 石 森 章

教授 菊 地 吾 郎

## 論 文 内 容 要 旨

カルニチンは長鎖脂肪酸の酸化に必須の物質であり、この代謝異常は二次的にさまざまな障害をおこすことが知られている。臨床的にも、カルニチン欠乏による筋疾患のみならず、心筋梗塞、血液透析などさまざまな病態へのカルニチンの関与が注目されるようになってきた。またカルニチンは従来知られてきた糖・脂質代謝にも関与するため、熱量代謝を検討する際には同時にカルニチン代謝についても検討することが必要となった。しかし、カルニチンの定量法には基準法とすべきものがなく、各測定法によって得られた値は大きく異なっている。

組織中のカルニチンの定量法として、これまでいくつかの方法が考案されてきたが、現在では次の反応を利用した酵素法が広く用いられている。 $L\text{-カルニチン} + \text{アセチル CoA} \rightarrow \text{アセチルカルニチン} + \text{CoA SH}$ 。反応によって生じたSH基を定量する方法は組織中のSH基を有する物質の影響が大きいため、主として( $1\text{-}^{14}\text{C}$ )アセチル CoA を利用する方法が使われている。しかし、この方法はラジオアイソトープを用いるため操作が煩雑となるのみならず、測定結果も各研究者間で相反する場合がみられる。この原因として、組織に由来するアセチル CoA の酵素反応への関与が考えられるが、さらに、抽出の過程で生じた過塩素酸カリウムなどの塩による酵素反応の妨害も推測される。そこで、カリウムなどの陽イオンと溶解度積の小さい化合物をつくるケイフッ化水素酸を用いて塩の影響を除き、またイオン交換樹脂を用いて組織中のSH基を除いて、酵素反応により生じたSH基を5,5'-ジチオ-ビス-ニトロ安息香酸(DTNB)で定量することを可能とした。

### 測 定 方 法

組織中のカルニチンの抽出—組織を秤量し、これに適量の10%水酸化カリウムを加えて加水分解する。これに同量のケイフッ化水素酸を加えて振とうしたのち、炭酸カルシウムを加えて中和し、50%エタノールを加えて遠心沈澱した。その上清をイオン交換樹脂—アンバーライトIR—1.20( $\text{H}^+$ )—カラムクロマトグラフィにかけて十分に水洗したのち、2規定アンモニア溶液で溶出した。これを乾固したのち、再蒸留水に溶解させたものを組織抽出液とした。

酵素法によるカルニチンの定量—組織抽出液に1モルトリス緩衝液pH 8.0, EDTA, DTNB, アセチル CoA を加えて412  $m\mu$  で比色したのち、カルニチンアセチルトランスフェラーゼを加えて振とうし、反応終了後、412  $m\mu$  で比色して前値との吸光度差を求めた。

### 測定法の検討

カルニチンとSH基の分離抽出について—カルニチンはアンバーライトをとおすと、水相には全く溶出しなかったが、2規定アンモニア溶液には全量が溶出した。一方、組織中のSH基は

加水分解により経時的に増加するが、アンバーライトをとおすと水相中にその大部分が溶出して除去された。

塩の影響とその除去について — カリウムなどの陽イオンはカルニチンのアンバーライトへの吸着を阻害した。また一般に用いられている過塩素酸による除蛋白を行なったのちの水酸化カリウムによる中和溶液では、生成した過塩素酸カリウム溶液は、低濃度でも酵素反応を強く妨害することがみとめられた。この傾向は塩化カリウムや塩化ナトリウム、塩化カルシウムなどの溶液でも同様に観察された。そこで、加水分解終了後の操作に過塩素酸の代わりに、ケイフッ化水素酸と炭酸カルシウムを用いると、カルニチンのアンバーライトへの吸着は全く妨害されず、この抽出液は酵素反応を妨害しなかった。

肝組織中の妨害因子について — 肝組織中には前述の操作で除去されない反応妨害因子あるいは測定妨害因子が存在した。この因子の本体は不明であるが、組織抽出液、あるいは反応溶液を稀釈することにより、その影響を除去することができた。本測定法によるラット肝および筋組織に添加したL-カルニチンの回収率は $92 \pm 14.6\%$ であり、測定内再現性は変動係数 2.5 - 11.6%、測定間再現性は変動係数 3.4 - 11.6%であった。これらの結果、および測定に必要な組織重量が radiometric 法とほぼ同量であることから、本測定法は満足すべき精度を有するものと思われた。

## 審 査 結 果 の 要 旨

カルニチンは生体内にあって、脂肪酸のキャリアとして働き、その酸化が円滑に進行するために必須の物質である。各種の筋疾患、心筋梗塞、血液透析患者等におけるカルニチンの病態生理学的意義が問題にされている。

本論文の著者今村は、以上の動向を踏まえ、従来困難であったカルニチンの組織内濃度を測定しようとして本研究を行った。著者は、種々検討のすえ、定量すべき組織に先ず過量のNaOHを加え、加水分解を行い、これに同量のケイフッ化水素酸を加えて振とうしたのち、炭酸カルシウムで中和し、50%エタノールで沈澱させた。上清をアンバーライト IR-120 カラムに流し、水洗後、アンモニアで溶出し、これを乾固したのち再蒸溜水に溶解させて抽出した。

抽出物にアセチルCoAを加え、412m $\mu$ で比色したのち、カルニチンアセチルトランスフェラーゼを加えて振とうし、反応させたのち、再び412m $\mu$ で比色し、前値との差を求めて定量した。

本法は従来の方法に比してアイソトープを用いることなく、比較的簡単であろうことが証明された。

以上、この研究は、カルニチンの研究に一つの進歩をもたらしたものと言える。本法は今後ひろく用いられ、カルニチンの研究を進展させる原動力となるものと思われる。よって本論文は学位にあたいするものと評価する。