



Is sudden death with vitamin C deficiency caused by lack of carnitine ?

岡本，摩耶

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2006-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3505

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003505>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 89 】

氏 名・（本 籍）	岡本 摩耶 （ 兵庫県 ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第1711号
学位授与の 要 件	学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付	平成18年3月25日

【 学位論文題目 】

Is sudden death with vitamin C deficiency caused by lack of
carnitine ?

（ビタミンC欠乏による突然死はカルニチンの欠如に起因するか？）

審 査 委 員

主 査	教 授	西尾 久英
	教 授	奥村 勝彦
	教 授	横崎 宏

【 背 景 】

カルニチンは、ミトコンドリアのマトリックスへの長鎖脂肪酸の運搬に不可欠な物質で、 β 酸化によるエネルギー産生において必須の役割を担っている。それ故、カルニチンの欠乏はATP産生障害や肝・骨格筋・心筋などの組織における脂肪からのエネルギー産生の障害、さらには余剰脂肪の蓄積を引き起こす。カルニチンは、食餌から摂取する以外に、腎・肝・脳においてリジンとメチオニンから生合成されるが、この最終段階の酵素である γ -ブチロベタインヒドロキシラーゼは、ビタミンC(ASC)を補酵素とするオキシゲナーゼである。ASCの欠乏が壊血病(最終段階では突然死)を引き起こすことは周知されているが、カルニチンの生合成を含めた脂質代謝におけるASC欠乏の影響についてはほとんど知られていない。

カルニチン欠乏によるエネルギー産生障害が心筋細胞死を誘発し、壊血病においてよく知られた突然死を引き起こす可能性が考えられることから、本研究においては、ASC欠乏とそれによるカルニチン欠乏が脂質代謝とその結果として起こる突然死に及ぼす影響について検討を行った。なお、モデル動物としては、ヒトと同じビタミンC合成酵素が欠損しているため、生存にASCが不可欠であるODS(Osteogenic Disorder Shionogi)ラットを用いた。

【 方 法 】

本研究は神戸大学医学部倫理委員会によって承認された実験である(平成15年、承認第P021005号)。

i) 実験動物: ODSラット(5週齢、雌)

1週間の予備飼育終了後、以下の3群に分けて3週間飼育した。

① Car⁺/ASC⁺(対照群)

② Car⁺/ASC⁻

③ Car⁻/ASC⁻

*ASC⁺は0.1%のASC水溶液を自由摂取させ、ASC⁻はASCを含まない水を与えた。

Car⁺はアセチル-L-カルニチン水溶液(2.0g/kg)を自由摂取、Car⁻はCarを含まない水を与えた。

飼育期間終了後に屠殺し、血漿と心筋を採取した。

ii) ASCの定量

血漿及び10倍量のPBSによる心筋のホモジネートをポリリン酸水溶液で除タンパク後、化学誘導と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いる特異的・高感度測定法により測定した。

iii) カルニチンの定量

総カルニチン及び遊離カルニチン測定キット(カイノス社)を使用して定量し、総カルニチン量と遊離カルニチン量の差からアシルカルニチン量を算出した。

iv) 心筋の組織学的解析

定法により、顕微鏡及び電顕用組織標本を作製し、組織学的変化を検討した。

【 結 果 及 び 考 察 】

i) ASC及びカルニチン量

血漿及び心筋におけるASCとカルニチン量は、Table 1に示す通りである。血漿及び心筋におけるASC量は、ASC欠乏群(car⁺/ASC⁻, car⁻/ASC⁻)において有意に減少し、ゼロレベルとなった。これは過去の先行研究と同じ結果であり、ASC欠乏3週間ではASCレベルは脳を除いてゼロレベルになる。

car⁻/ASC⁻における血漿中の総カルニチン及びアシルカルニチン量は、それぞれ対照群の69.1%、40.4%であった。遊離カルニチン量については、car⁻/ASC⁻と対照群との間に有意な差は認められなかった。これにより、car⁻/ASC⁻における総カルニチン量の有意な減少は、アシルカルニチン量の減少によるものであると考えられる。また、car⁻/ASC⁻における心筋中の総カルニチン、遊離カルニチン及びアシルカルニチン量は、それぞれ対照群の31.6%、38.3%、25.0%と有意な低下が認められた。

ii) 心筋の組織学的検討

Figure 1は電子顕微鏡による心筋細胞であり、主としてミトコンドリアの形態変化を示す。car⁻/ASC⁻における脂肪滴の数が対照群に比べて増加していることが認められた(c)。一方、car⁺/ASC⁻と対照群との間には差は認められなかった(a, b)。以上の結果は、ASC欠乏は心筋細胞における脂肪滴の蓄積を引き起こし、カルニチンの投与がASC欠乏下においてもそれを抑制することを示唆している。また、car⁻/ASC⁻のミトコンドリアにおいては、対照群に比べてクリステ構造が不規則であるものや、マトリックスの電子密度が高いため、リソソーム様の形態をとっているものが認められた。

宮川ら(1995年)は、カルニチン欠損のモデル動物であるJVS(juvenile visceral

steatosis)マウスの心筋細胞において脂肪滴の蓄積が認められたと報告している。このマウスは、とりわけ幼若期において、カルニチンの投与なしには生存することが出来ずに突然死する。今回の研究で得られた $\text{car}^-/\text{ASC}^-$ の心筋細胞の電子顕微鏡写真は、この JVS マウスのものと酷似していることから、従来より謎とされてきた、ODS ラットにおける ASC 欠乏による突然死は、カルニチン欠乏によって引き起こされる脂質代謝異常によるものであると考えられる。また、乳幼児突然死症候群(SIDS)の一要因として、カルニチン関連物質の欠乏による脂質代謝異常が挙げられているが、本研究により、SIDS や壊血病などの突然死とカルニチン欠乏、及びカルニチンの生合成に不可欠な ASC の欠乏に関連性があることが示唆された。

Table 1
Carnitine and ASC concentrations in plasma and the heart

	ASC	Form of carnitine		
		Total	Free	Acylated
<i>Plasma (nmol/ml)</i>				
Control	23.8 ± 6.3 ^a	50.8 ± 8.3 ^a	37.2 ± 9.2 ^a	13.6 ± 1.1 ^a
Car ⁻ /ASC ⁻	0 ± 0 ^b	72.0 ± 5.0 ^b	54.9 ± 5.0 ^b	17.1 ± 1.5 ^b
Car ⁻ /ASC ⁻	0 ± 0 ^b	35.1 ± 4.7 ^a	29.6 ± 4.0 ^a	5.5 ± 0.8 ^b
<i>Heart (nmol/g tissue)</i>				
Control	209.5 ± 53.6 ^a	534.6 ± 28.6 ^a	263.3 ± 41.6 ^a	271.3 ± 17.3 ^a
Car ⁻ /ASC ⁻	0 ± 0 ^b	673.9 ± 20.0 ^b	402.6 ± 42.3 ^b	271.3 ± 22.5 ^a
Car ⁻ /ASC ⁻	0 ± 0 ^b	168.7 ± 28.5 ^a	100.8 ± 19.4 ^a	67.9 ± 9.2 ^b

Data are given as mean ± SD ($n=4$, for each group) and were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using StatView software (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Differences between the group means were considered significant at $P < 0.05$ using the Bonferroni/Dunn procedure generated by the StatView program. Within the heart and plasma groups, a different letter indicates a significant difference in the values in each column.



Fig. 1. Electron micrographs of cardiac muscle cells in ODS rats. (a) Control rat: small lipid droplets (arrowheads) were detected, and bundles of myofibrils ran in an orderly fashion in the cytoplasm. (b) $\text{Car}^-/\text{ASC}^-$ rat: similar to the control rat, small lipid droplets (arrowheads) and bundles of myofibrils running in an orderly fashion in the cytoplasm were observed. (c) $\text{Car}^-/\text{ASC}^-$ rat: there were increased numbers of lipid droplets (arrowheads), and a decrease in regularly arranged mitochondrial cristae. Mitochondria with highly electrondense matrices showed a lysosome-like appearance (arrows). (a-c 10,000 \times , Bar = 1 μm .)

神戸大学大学院医学系研究科 (博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1712 号	氏 名	岡本 摩耶
論文題目 Title of Dissertation	Is sudden death with vitamin C deficiency caused by lack of carnitine? ビタミン C 欠乏による突然死はカルニチンの欠如に起因するか?		
審査委員 Examiner	主 査 西尾 久英 西尾久英 Chief Examiner 副 査 奥村 勝彦 奥村勝彦 Vice-examiner 副 査 横崎 宏 横崎 宏 Vice-examiner		
審査終了日	平成 18 年 1 月 18 日		

(要旨は 1, 000 字 ~ 2, 000 字程度)

【 背 景 】

カルニチンは、ミトコンドリアのマトリックスへの長鎖脂肪酸の運搬に不可欠な物質で、 β 酸化によるエネルギーの役割を担っている。そのため、カルニチン欠乏はATP産生障害や肝・骨格筋・心筋などの組織における脂肪からのエネルギー産生の阻害、余剰脂肪の蓄積を引き起こす。カルニチンは、食餌から摂取する以外に、腎・肝・脳においてリジンとメチオニンから生合成されるが、この最終段階の酵素であるガンマー-ブチロベタインヒドロキシラーゼは、ビタミンC (ASC) を補酵素とするオキシゲナーゼである。しかし、カルニチンの生合成を含めた脂質代謝におけるASC欠乏の影響についてはほとんど知られていない。

研究者は、ASC欠乏に起因するカルニチン欠乏が脂質代謝に及ぼす影響について検討を行った。なお、モデル動物としては、ヒトと同じく、ビタミンC合成酵素が欠損しているODS (Osteogenic Disorder Shionogi) ラットを用いた。

【 方 法 】

本研究は神戸大学医学部倫理委員会の承認を得ている(平成15年、承認第P021005号)。

実験動物としては、ODSラット(5週齢、雌)を用いた。1週間の予備飼育終了後、 car^+/ASC^+ 群(対照群)、 car^+/ASC^- 群、 car^-/ASC^- 群の3群に分けて3週間飼育した。ここで、 ASC^+ は0.1%のASC水溶液を自由摂取させ、 ASC^- はASCを含まない水を与えた。 car^+ はアセチル-L-カルニチン水溶液(2.0g/kg)を自由摂取させ、 car^- はアセチル-L-カルニチンを含まない水を与えた。飼育期間終了後に屠殺し、血漿と心筋を採取した。

ASCの定量に関しては、血漿及び10倍量のPBSによる心筋のホモジネートをポリリン酸水溶液で除タンパク後、化学誘導と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、特異的・高感

度測定法により測定した。カルニチンの定量に関しては、総カルニチン及び遊離カルニチン測定キット(カインス社)を使用し、総カルニチン量と遊離カルニチン量の差からアシルカルニチン量を算出した。心筋の組織学的解析に関しては、定法により作製した光顕及び電顕用組織標本を用い、組織学的変化を検討した。

【 結 果 及 び 考 察 】

(1) ASC 及びカルニチン量

血漿及び心筋におけるASC量は、ASCを含まない水を与えた群(car^+/ASC^- 群、 car^-/ASC^- 群)において有意に減少し、ゼロレベルとなった。これは過去の先行研究と同じ結果であった。

car^-/ASC^- 群における血漿中の総カルニチン及びアシルカルニチン量は、それぞれ対照群(car^-/ASC^+ 群)の69.1%、40.4%であった。ただし、遊離カルニチン量については、 car^-/ASC^- 群と対照群との間に有意差は認められなかった。この結果により、 car^-/ASC^- 群における総カルニチン量の減少は、アシルカルニチン量の減少によるものであると考えられる。

また、 car^-/ASC^- 群における心筋中の総カルニチン、遊離カルニチン及びアシルカルニチン量は、それぞれ対照群の31.6%、38.3%、25.0%と有意な低下が認められた。

(2) 心筋の組織学的検討

car^-/ASC^- 群における脂肪滴の数は、対照群と比べて増加していた。一方、 car^+/ASC^- 群の脂肪滴の数は、対照群との間に差は認められなかった。以上の結果は、ASC欠乏は心筋細胞における脂肪滴の蓄積を引き起こし、カルニチンの投与がASC欠乏下においてもそれを抑制することを示唆している。

宮川ら(1995)は、カルニチン欠損のモデル動物であるJVS (juvenile visceral steatosis) マウスの心筋細胞において脂肪滴の蓄積が認められたと報告

ける得とに欠よ患者が然ルの
 期すで真トンに（生と突カ常
 若存研究したチ常病のこ児の異
 幼生研鏡いラニ異血シる幼他謝
 けはの微てODSル謝（壊チい乳の代
 わに回顯し、カ代症ルしそ質
 りし今子似た、質（ニてりそ質
 とな。電酷きは脂。乏カ連果、る
 、与るのとて死るた欠、關結はよ
 は投す胞のれ然れ欠、ASCはにのに
 スの死細もさ突さら、死乏こ序乏
 ウン然筋のとるこえり然欠、機欠
 マチ突心ス謎よ起考よ突のた立のた
 のニにのウリにきと果るASCま成質れ
 。カルマよ乏引る結れな。SIDS物さ
 。カ来car-/JVS来欠てあのら欠た（SIDS）連想
 る、出car-/JVS来欠てあのら欠た（SIDS）連想
 いてがたこ、るよの研認不さ候ンが
 しおとれ、らけにも本にに唆症チ在

をれれのし者と
 い常わらと究る
 つ異行め（SIDS）の研あ
 にのど認群も本が
 ト謝んに候た、格
 ッ代と者症得て資
 ラ質ほ患死をる
 損脂来）然見よ得
 欠る従病突知。を
 能す、血児なる位
 成連が壊幼要め学
 合關る（乳重認の
 生にあ症はてと）
 ASCンで乏いい積学
 、チの欠るつ集医
 はニもASCあにる（
 究ルたた死明あ士
 研カした然解値博る
 本、究か突因価、め
 て研なる原ては認