

## 高アンモニア血症を呈する疾患における カルニチン代謝に関する研究

森 俊彦

札幌医科大学小児科学講座 (主任 千葉峻三 教授)

### Studies on Carnitine Metabolism of Various Disorders Accompanied by Hyperammonemia

Toshihiko MORI

*Department of Pediatrics, Sapporo Medical College*

(Chief : Prof. S. CHIBA)

**ABSTRACT** Recently, the carnitine status of various disorders accompanied by hyperammonemia has been studied, and carnitine deficiency syndromes, secondary to a variety of genetic disorders, have been found.

The author measured the serum and tissue carnitine levels of various disorders accompanied by hyperammonemia. In patients with ornithine transcarbamylase (OTC) and carbamylphosphate synthetase (CPS-I) deficiencies, free carnitine levels in the serum were decreased and acylcarnitine levels were increased. These findings were also observed in liver tissues. However, the serum and hepatic carnitine concentrations of congenital hyperammonemic patients with other cytosolic enzyme deficiencies of the urea cycle were within normal limits. Carnitine levels in the serum and liver tissues of some patients with OTC deficiency decreased gradually with age. In the patient with CPS-I deficiency, the mean blood ammonia levels decreased significantly, accompanied by an increase in serum and urine free carnitine levels after oral administration of L-carnitine (10mg/kg/day). The serum free carnitine levels of patients receiving sodium valproate (VPA) therapy decreased and their acylcarnitine free carnitine ratios increased. There existed a definite correlation between serum free carnitine and blood ammonia.

Primary cultured rat hepatocytes were used to study the effect of VPA on the levels of ammonia and urea synthesis in culture medium. The addition of VPA to the culture medium resulted in an increase of ammonia and a decrease of urea synthesis. The carnitine content of hepatocytes and citrulline synthesis by hepatocytes were also decreased following VPA addition, but OTC and CPS-I activities were unchanged. When L-carnitine was added with VPA to the medium, the levels of ammonia decreased and urea synthesis increased. These observations indicate that VPA-induced hyperammonemia is caused by inhibition of citrulline synthesis followed by hepatic carnitine deficiency, and suggest that L-carnitine may be effective in preventing VPA-induced hyperammonemia.

In future studies, the carnitine status in congenital hyperammonemia and VPA therapy should be investigated, since oral administration of L-carnitine may be effective in patients with secondary carnitine deficiency.

(Received March 27, 1991 and accepted April 18, 1991)

**Key words:** Carnitine, Hyperammonemia, Ornithine transcarbamylase deficiency, Sodium valproate, Primary cultured hepatocytes

## 1 結 言

高アンモニア血症の成因としては、先天性および後天性に大別されるが、前者には尿素サイクル酵素異常症、有機酸血症など、後者には肝疾患、Reye 症候群などが上げられる。最近、これらの疾患のなかに、カルニチン代謝異常を伴うことが明らかにされてきて<sup>1-5</sup>、カルニチン代謝と高アンモニア血症との関係がクローズアップされるようになった。カルニチンは脂肪酸の $\beta$ 酸化系に関連して、長鎖脂肪酸のミトコンドリアへの輸送担体としての働きのほかに、様々な原因で蓄積した有害なアシル CoA を無害なアシルカルニチンに変えて排泄するという重要な役割を持っている<sup>6</sup>。そのため、カルニチンが欠乏すると有害なアシル CoA の細胞内蓄積により脂肪酸、TCA サイクル、糖新生、尿素サイクルなどの諸代謝が阻害され、多彩な生化学的異常を呈するが、その中の一つの高アンモニア血症との関連が注目されている。また、抗けいれん剤として広く用いられているバルプロ酸ナトリウム（以下 VPA と略す）投与時に見られる高アンモニア血症との関連も注目されている<sup>7,8</sup>。しかし、現在までのところ低カルニチン血症がどのように尿素サイクルに影響を及ぼすかは明らかではない。そこで、最初に著者は種々の原因により高アンモニア血症を呈した症例の血清および組織のカルニチンを測定した。特に、ヒトにおける血清カルニチン値と血中アンモニア値の関係を示す良いモデルである VPA 投与症例について、詳細に検討を加えた。次に、尿素サイクルとカルニチン代謝の関係を同時に検討することができる最も適切な *in vitro* の系として成熟ラット初代培養肝細胞をもちいて、VPA を種々の濃度で培地中に添加した時の、肝細胞の尿素合成とそれにもなう培地アンモニアの変化を検討し、興味ある知見がえられたので報告する。

## 2 方 法

### 2.1 臨床例

#### 2.1.1 対 象

対象は札幌医科大学小児科に入院した先天性高アンモニア血症 15 例（カルバミルリン酸合成酵素（以下 CPS と略す）部分欠損症 1 例、オルニチントランスカルバミラーゼ（以下 OTC と略す）欠損症 7 例、シトルリン血症 II 型 4 例、アルギニノコハク酸尿症 1 例、リ

ジン血症を伴った高アンモニア血症 1 例、高オルニチン血症・高アンモニア血症・ホモシトルリン尿症（以下 HHH と略す）1 例）、OTC 欠損症のヘテロ 3 例および国立療養所小樽病院入院中の、代謝性疾患や肝障害のない重症心身障害児 48 例である。

#### 2.1.2 方 法

各症例の血清、尿および組織（筋肉、肝、腎臓、脳）のカルニチンを McGarry and Foster の方法<sup>9</sup>を一部改変し以下の様に測定した。カルニチン測定に用いた組織は $-80^{\circ}\text{C}$ で測定まで保存し、血清および尿は $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。遊離カルニチン値の測定は $^{14}\text{C}$ -Acetyl CoA と carnitine acetyltransferase を用い、L-carnitine+acetyl CoA  $\rightleftharpoons$  acetylcarnitine+CoA SH の反応によって形成された labeled acetylcarnitine を unreacted acetyl CoA より anion exchange resin を用いて分離し、その放射活性を測定した。また、この反応は可逆反応であるため、形成される CoA SH を trap するために N-ethylmaleimide を用いた。血清および尿は直接、肝、腎、脳は 10 倍量の、筋肉は 20 倍量の 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EGTA, pH 7.4 を加えホモジナイズしたもの 50  $\mu\text{l}$  を検体とした。実際の測定は、エッペンドルフチューブ（2 ml 容量）を用い、2.8 mM phosphate-buffer, pH 7.3 600  $\mu\text{l}$ , 5 mM N-ethylmaleimide 400  $\mu\text{l}$ , 0.62 mM acetyl CoA (Sigma Chemical Co.) 40  $\mu\text{l}$ ,  $^{14}\text{C}$ -AcetylCoA (60 mCi/mmol, Amersham) 0.02  $\mu\text{Ci}$  (10  $\mu\text{l}$ ) を含む反応液に検体 50  $\mu\text{l}$  を加え、1 unit carnitine acetyltransferase (Sigma Chemical Co.) 5  $\mu\text{l}$  を加えて反応を開始した。37 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間放置後エッペンドルフチューブを氷水中に入れ反応を中止させたのち、0.22 ml の DDW を含む Dowex 2-X 8 anion exchange resin (Bio-Rad Laboratories) 0.3 ml をあらかじめ分注したスピッツに反応液を移し、攪はん後氷水中に 10 分間放置した。この操作を 2 回繰り返した後、2000 rpm で 15 分間遠沈し、上清 0.5 ml に Aquasol 2 (New England Nuclear) 5 ml を加え、放射活性を液体シンチレーションカウンター (Tri-carb 8300, Packard Instrument Co., Inc.) で測定した。標準曲線は 2.5, 5, 10 nmol の L-カルニチン（アース製薬より供与）を用いて作成し、盲検は DDW を用いた。総カルニチン値（遊離カルニチン+アシルカルニチン）は、検体 50  $\mu\text{l}$  に 1 M Tris-base 100  $\mu\text{l}$  および

0.4 N KOH 50  $\mu$ l を加え pH 13 とし, 37°C で 1 時間放置しアシルカルニチンを遊離カルニチンに水解した後, 0.575 N HCl 200  $\mu$ l を加え pH 7.3 とした後, 遊離カルニチンと同様に測定した. 本測定法の同時再現性は, CV. 2.8% で日差再現性は CV. 4.8% であった. 腎尿管の遊離カルニチンの再吸収率は Matsuda らの方法<sup>10</sup> にて算出した. 重症心身障害児 48 例は, VPA 服用者 22 例と非服用者 28 例の 2 群に分け, 血清カルニチン値, 血中アンモニア値, 肝特異酵素 (GOT, GPT), VPA の投与量および血中濃度について比較検討した. 年齢, 体重およびエネルギー摂取量は両群間に差はなく, 食事内容よりカルニチンの摂取量も同等とかがえられた. また, VPA の服用期間は全例 6 カ月以上であった.

## 2.2 初代培養肝細胞

### 2.2.1 研究対象

ウィスター系雄ラット体重約 200 g を用い, Tanaka らの方法<sup>11</sup> に従って肝細胞の分離精製をおこなった. 初代培養は, 5% のウシ胎仔血清 (GIBCO Laboratories) を含む WilliamsE 培地 (以下 WE と略す, Flow Laboratories) に  $5 \times 10^5$  細胞/ml の濃度に肝実質細胞を希釈し, 10% コラーゲン (新田ゼラチン) 溶液で処理した Plastic culture dish に  $10^5$  細胞/0.2 ml/cm<sup>2</sup> の蒔き込み数で静置培養した. 気相は 5% CO<sub>2</sub>-95% 空気とした. 培養液にはインスリン (ノボルンテ, ノボ社) およびデキサメサゾン (デカドロン, 塩野義) をそれぞれ  $10^{-9}$  M, およびアプロチニン (Bayer) を 5 unit/ml の濃度で添加した. 約 3 時間後, dish 面への細胞の接着を確認した後, ウシ胎仔血清を含まない WE に交換し, 以後無血清 WE を 24 時間毎に交換した. 以後 3 日以内に以下の実験をおこなった.

### 2.2.2 研究方法

#### 2.2.2.1 VPA の添加方法および培養時間

VPA を Hanks' complete 培養液 (Hanks' Hepes solution, 8 mM glucose, pH 7.4) に 0~500  $\mu$ g/ml の濃度で添加し, 24 時間培養後, 培地中のアンモニアと尿素窒素を測定した. また, 培養肝細胞の CPS-I, OTC 活性, シトルリン合成能および遊離カルニチン含量を測定した. 次に, VPA を 200  $\mu$ g/ml の濃度で添加した培地に L-カルニチンを 0~500  $\mu$ M の濃度で添加し, 同様に 24 時間培養し培地中のアンモニアと尿素窒素を測定した.

#### 2.2.2.2 培養液中のアンモニアおよび尿素窒素の測定

アンモニアの定量は, 培養液 1 ml に 10% タングステ

ン酸ナトリウム 0.5 ml および 1 N 硫酸 0.5 ml を加え混和し, 3000 rpm 5 分間遠心し, 得られた上清 0.5 ml を用いて, 藤井・奥田法<sup>12</sup> に準じておこなった. 尿素窒素は, ジアセチルモノオキシム法<sup>13</sup> で測定した.

#### 2.2.2.3 培養肝細胞の CPS-I および OTC 活性の測定

6 cm $\phi$  シャーレ 1 枚分の肝細胞に 20% Glycerol, 2 mM Dithiothreitol および 0.2% cetyltrimethylammonium bromide を含む 0.02 M Tris-HCl pH 7.2, 1 ml を加えホモジナイズし Enzyme source とし, CPS-I 活性は Nuzum and Snodgrass の方法<sup>14</sup> で, OTC 活性は Schmike の方法<sup>15</sup> に従って測定した.

#### 2.2.2.4 培養肝細胞のシトルリン合成能の測定

Yamazaki らの方法<sup>16</sup> を培養肝細胞用に改変して行った. すなわち, 培養肝細胞を VPA を各濃度に調整した培地で 24 時間培養した後, 培養液をのぞき, 細胞を 37°C, PBS (-) で 2 回洗浄したあと, 3.5 cm $\phi$  シャーレーあたり, standard component (70 mM Tris-HCl, 12 mM KCl, 1 mM EGTA, 5 mM potassium phosphate, 16.6 mM KHCO<sub>3</sub>, 10 mM ornithine, 10 mM NH<sub>4</sub>Cl, 25 mM manitol, pH 7.4) 750  $\mu$ l, 1 mM succinate 50  $\mu$ l, 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> 50  $\mu$ l, DDW 50  $\mu$ l をあらかじめ加え, 反応は 3 mM ATP 50  $\mu$ l を加えて開始した. 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% 空気中で培養し 0, 5, 10, 20, 30 分後に 5 M PCA 200  $\mu$ l で反応を中止させ, 反応液および肝細胞を 3000 rpm 5 分間遠心し, 上清のシトルリンを Ceriotti and Spanerio の方法<sup>17</sup> で測定した. Blank は ATP を加える前に PCA を加えたものを用いた. 沈渣を 0.1 N NaOH で溶解し, 一部で蛋白定量を行った.

#### 2.2.2.5 培養肝細胞の遊離カルニチン含量の測定

10 cm $\phi$  シャーレ 1 枚分の肝細胞に, 0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EGTA, pH 7.4, 0.5 ml を加えてホモジナイズしたものを McGarry and Foster の方法<sup>9</sup> を一部改変して測定した. 蛋白定量には, ホモジネイトの一部を 10 倍量の 0.05 N NaOH で 18 時間室温放置したのを用いた.

蛋白定量測定は, Protein assay kit (Coomassie Brilliant Blue G-250, Bio-Rad Laboratories) を用いて行った.

なお, 以上の実験はすべて triplication で行った.

## 3 結果

### 3.1 臨床例における検討

#### 3.1.1 先天性高アンモニア血症

Table 1 Serum and hepatic carnitine levels of patients with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency

Cases	Sex	Age	Enzyme activities (% of controls)	Liver tissue	Serum carnitine (n mol/ml)				Hepatic carnitine (n mol/mg NCP)			
					Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio	Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio
1	M	28 days	not detected	autopsy	28.7	18.1	46.8	0.63	3.26	3.15	6.41	0.97
2	M	6 days	6%	autopsy	36.8	28.8	65.6	0.78	3.01	2.61	5.62	0.87
3	M	3 mo 3 yrs	9%	biopsy autopsy	21.8	30.9	52.7	1.42	5.91	2.82	8.73	0.32
					17.3	27.2	44.5	1.57	2.86	1.85	4.71	0.65
4	M	3 mo	15%	autopsy	48.2	31.8	80.0	0.66	2.93	1.26	4.19	0.43
5	F	6 yrs 9 yrs 10 yrs	17%	biopsy biopsy autopsy	38.7	35.6	74.3	0.92	7.54	2.16	9.70	0.29
					19.1	56.9	76.0	2.98	5.68	3.91	9.59	0.69
					6.3	30.5	36.8	4.85	3.26	1.65	4.91	0.51
6	F	30 yrs	45%	biopsy	43.2	27.5	70.7	0.64	5.24	2.97	8.21	0.57
7	M	1 yrs	5%	biopsy	25.6	17.4	43.0	0.68	n. d.			

## Controls

Serum		Liver									
Newborns (n=25)	Newborns (n=17)	33.9±7.5	15.2±7.8	49.5±11.5	0.46±0.26	4.10±1.12	1.61±0.25	5.71±1.55	0.42±0.25		
1-11 mo (n=51)	1 mo-5 yrs (n=11)	37.4±9.9	21.3±8.9	58.8±14.8	0.60±0.31	5.16±0.60	2.24±0.56	7.40±0.85	0.45±0.21		
1-10 yrs (n=20)	>6 yrs (n=10)	59.6±11.7	29.7±12.6	80.8±20.5	0.55±0.16	9.34±1.20	2.03±0.35	11.37±0.69	0.24±0.12		
Adults (n=20)		53.5±13.0	28.6±10.1	78.0±9.7	0.60±0.30						

M: male, F: female, n: number of cases, NCP: non collagen protein, n. d.: not determined

Table 1はOTC欠損症の臨床生化学的所見を示したものである。OTC欠損症では7例中3例(症例3, 5, 7)に血清遊離カルニチンの低下, 6例中4例(症例3, 4, 5, 6)に肝遊離カルニチン含量の低下がみられた。そのうち2例では, 年齢とともにカルニチン欠乏は著明になっていった。症例5は, OTC部分欠損症の女児であるが, 10歳時までは低蛋白食と安息香酸ナトリウムの併用により正常の発育をしていたが, 急性増悪のため高アンモニア血症性昏睡におちいり, 種々の治療にもかかわらず死亡した例である。治療開始48時間後と死亡時には, 著明な血清遊離カルニチンの低下とA/F比の増加がみられた(Fig. 1)。また, 剖検肝においても肝カルニチン含量は低下していたが, 腎および脳では低下がみられなかった(Table. 2)。CPS部分欠損症例は生後53日目に高アンモニア血症性昏睡にて入院した。入院時正常であったカルニチン値は12時間後には血清遊離カルニチンの低下とA/F比の増加がみられた。腹膜透析, 安息香酸ナトリウムなどの薬物療法とともにL-カルニチン(20 mg/kg/day)を併用し, 高アンモニア血症の改善に伴い血清カルニチン値も正常となった(Fig. 2)。透析液中の遊離カルニチン値は

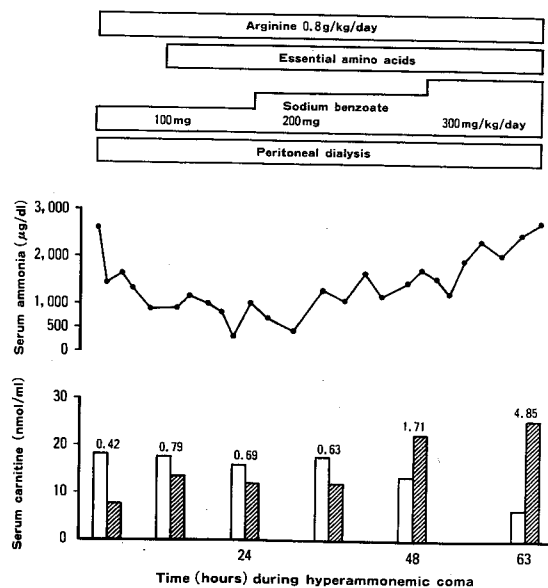
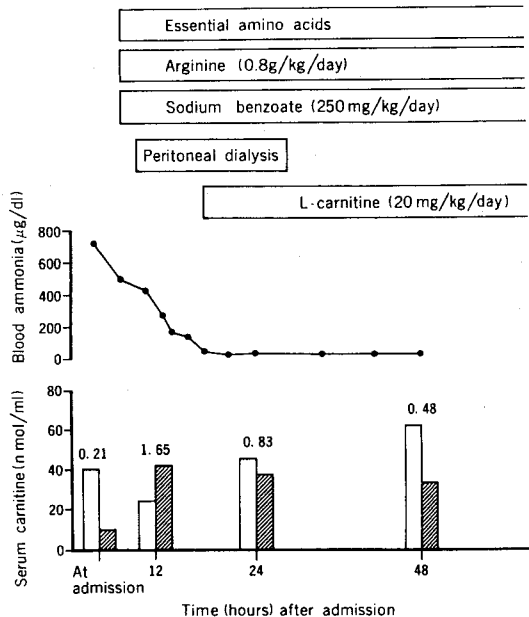


Fig. 1 Clinical course and serum carnitine concentrations of a patient with partial ornithine transcarbamylase deficiency during hyperammonemic coma. Open columns: free carnitine; closed columns: acyl carnitine; numbers: acyl free ratio.

**Table 2** Serum and tissue carnitine concentrations of a patient with partial ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency

Age	Serum carnitine (n mol/ml)				Hepatic carnitine (n mol/mg NCP)				Renal carnitine (n mol/mg NCP)				Brain carnitine (n mol/mg NCP)			
	Free	Acyl	Total	Acyl/ Free	Free	Acyl	Total	Acyl/ Free	Free	Acyl	Total	Acyl/ Free	Free	Acyl	Total	Acyl/ Free
6 yrs	38.7	35.6	74.3	0.92	7.54	2.66	9.70	0.29	n. d.				n. d.			
9 yrs	19.1	56.9	76.0	2.98	5.68	3.91	9.59	0.69	n. d.				n. d.			
10 yrs	6.3	30.5	36.8	4.85	3.26	1.65	4.91	0.51	5.16	3.94	9.10	0.76	1.22	3.86	5.08	3.16
Controls	59.6 ±11.7	29.7 ±12.6	89.3 ±20.5	0.55 ±0.16	9.34 ±1.20	2.03 ±0.35	11.37 ±0.69	0.24 ±0.12	6.45 ±0.91	1.89 ±0.75	8.33 ±1.39	0.29 ±0.10	1.24 ±0.57	4.02 ±2.85	5.37 ±2.67	3.12 ±0.56
	(n=20)				(n=10)				(n=6)				(n=14)			

NCP: non collagen protein, n: number of cases, n. d.: not determined



**Fig. 2** Clinical course and serum carnitine concentrations of a patient with carbamylphosphate synthetase-I deficiency after admission. Open columns: free carnitine; closed columns: acyl carnitine; numbers: acyl free ratio.

4.6 nmol/ml であり、腎尿細管での遊離カルニチンの再吸収能は低下していなかった。意識回復とともに特殊治療乳による低蛋白食 (1.5~1.7 g/kg/day) を開始し、安息香酸ナトリウムおよびL-アルギニンの投与は中止した。L-カルニチン投与は20日間続け、中止後35日および60日目の血清カルニチン値は正常であり、肝カルニチン含量は正常の4倍に増加していた。しか

し、生後7カ月時に再び血清遊離カルニチン値は著明に低下し、A/F比も増加したのでL-カルニチン (10 mg/kg/day) 投与を再開した。L-カルニチン治療前後の血中アンモニア値はそれぞれ、135.2±42.5 μg/dl (n=74) および103.1±19.0 μg/dl (n=22) (P<0.01) であり、蛋白摂取量も増量 (1.8~2.0 g/kg/day) することができた。患児は生後11カ月現在、蛋白制限のみで正常な発達をとげており、血清カルニチン値も正常である (Table 3)。

塩化アンモニウムの負荷試験による保因者診断<sup>17</sup>にてOTC欠損症のヘテロと判明した母親 (症例2, 3, 6の母親) では血清遊離カルニチン値は正常の下限より低下しており、A/F比の増加もみられた (Table 4)。

他の尿素サイクル酵素欠損による先天性高アンモニア血症例やHHH例では、血清および肝にてカルニチンが低下している症例はなかった (Table 5)。

### 3・1・2 VPA 投与例

血中アンモニア値はVPA投与群では非投与群に比べて有意な高値を示した。しかし、血中アンモニア値とVPA投与量および血中濃度との間には有意な相関は見られなかった。血清遊離および総カルニチン値はVPA投与群では非投与群に比べて有意に低値を示したが、アシルカルニチン値は有意な差はなかった (Table 6)。また、血清遊離カルニチン値と血中アンモニア値の間で相関係数-0.38で負の相関がみられ (Fig. 3)、A/F比と血中アンモニア値の間で相関係数0.59の正の相関がみられた (Fig. 4)。VPA投与量と血清遊離カルニチン値の間で相関係数-0.46で負の相関がみられたが (Fig. 5)、血清遊離カルニチン値とVPA血中濃度との

**Table 3** Carnitine concentrations in serum, urine, liver and peritoneal dialysis fluid in the patient with carbamylphosphate synthetase-I deficiency

	Serum carnitine (n mol/ml)			
	Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio
After termination of L-carnitine therapy				
35 days	35.7	22.7	58.4	0.64
60 days	37.7	10.6	48.3	0.28
5 months	11.5	16.5	28.0	1.44
After administration of L-carnitine (10mg/kg/day)				
7 days	48.5	25.5	74.0	0.53
1 months	58.2	26.9	85.1	0.46
3 months	55.0	23.8	78.8	0.43
controls	37.4	21.3	58.7	0.60
1-11 mo (n=51)	± 9.9	± 8.9	±14.8	±0.31
	Liver carnitine (n mol/mg NCP)			
	Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio
35 days after termination of L-carnitine therapy	17.18	2.74	19.92	0.16
controls	3.99	2.15	6.14	0.54
1-11 mo (n=15)	±0.63	±0.31	±1.36	±0.18
	Urine carnitine (n mol/mg creatinine)			
	Free	Acyl	Total	RRFC (%)
5 months after termination of L-carnitine therapy	ND	98.4	98.4	
After administration of L-carnitine (10mg/kg/day)				
7 days	285.0	415.3	700.2	98.8
3 months	885.1	454.1	1339.2	98.4
controls	685.3	854.7	1540.3	98.5
(n=30)	±438.0	±350.2	±528.7	± 1.3 (n=17)
	Peritoneal dialysis fluid (n mol/ml)			
	Free	Acyl	Total	
	4.6	37.6	42.2	

RRFC: renal reabsorption of free carnitine, NCP: non collagen protein,

ND: not detectable, n: number of cases.

**Table 4** Serum carnitine concentrations of heterozygotes with ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency

Subjects	Age (yrs)	Loading tests of ammonium chloride	Serum carnitine (n mol/ml)			
			Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio
mother (Case 2)	31	positive	34.8	36.0	70.8	1.04
mother (Case 3)	32	positive	32.5	36.9	69.4	1.14
mother (Case 4)	28	negative	48.2	31.8	80.0	0.66
mother (Case 6)	56	positive	33.7	38.6	72.3	1.15
controls (n=20)			53.5±13.0	28.6±10.1	78.0±9.7	0.60±0.30

n: number of cases

Table 5 Serum and hepatic carnitine levels of patients with congenital defects of the urea cycle

Cases	Age	Hepatic enzyme activities (% of controls)		Serum carnitine (n mol/ml)				Hepatic carnitine (n mol/mg NCP)				
				Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio	Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio	
Citrullinemia (tyre II)	1	6 mo	ASS	30%	31.4	24.1	55.5	0.77	10.26	2.73	12.93	0.27
	2	9 mo	ASS	40%	42.4	20.2	62.6	0.48	5.28	1.88	7.16	0.36
	3	31 yrs	ASS	25%	103.2	109.3	212.5	1.06	5.99	2.87	8.86	0.48
	4	56 yrs	ASS	26%	68.3	21.1	89.4	0.31	7.05	1.80	8.85	0.26
Argininosuccinic aciduria	6 mo	ASase	6%	50.6	33.2	83.8	0.66	6.21	1.04	7.25	0.17	
Hyperlysinemia with hyperammonemia	22 yrs	Arginase ASS	29% 22%	77.1	20.5	97.6	0.27	11.26	0.65	11.91	0.06	
Hyperornithinemia, hyperammonemia and homocitrullinuria (HHH)	41 yrs	normal activities in urea cycle enzymes		77.0	12.0	89.0	0.16	7.48	2.75	10.23	0.37	
1-11mo				37.4±9.9	21.3±8.9	58.8±14.8	0.60±0.31	3.99±0.63	2.15±0.31	6.14±1.36	0.54±0.18	
Controls						(n=51)				(n=15)		
Adults				53.5±13.0	28.6±10.1	78.0±9.7	0.60±0.30	9.34±1.20	2.03±0.35	11.37±0.69	0.24±0.12	
						(n=20)				(n=10)		

ASS: Argininosuccinate Synthetase, ASase: Argininosuccinase, NCP: non collagen protein, n: number of cases.

Table 6 Serum carnitine concentrations, blood ammonia values and hepatocellular enzymes in the patients

	NO.	carnitine (n mol/ml)				ammonia (μg/dl)	S-GOT (IU/l)	S-GPT (IU/l)
		Free	Acyl	Total	Acyl/Free ratio			
VPA (+)	22	32.1* (± 9.3)	26.1 (± 4.6)	58.2* (±10.1)	0.92* (±0.41)	69.9* (±41.8)	27.6* (± 4.5)	19.0* (±11.5)
VPA (-)	26	43.1 (± 8.8)	27.1 (± 4.1)	70.2 (±11.3)	0.64 (±0.12)	43.4 (±10.8)	20.3 (± 8.0)	13.9 (± 5.7)

\* P<0.005; VPA (+) VS. VPA (-)

間では有意な相関はみられなかった。S-GOT および S-GPT 値は VPA 投与群で有意な高値を示したが、異常値を示した例はなかった。また、有意差検定は Student-t 検定による。

### 3・2 培養肝細胞に対する VPA の影響

#### 3・2・1 培養液中のアンモニア値と尿素窒素値の変化

培地中に VPA を添加すると、培地中の尿素窒素は VPA 濃度 50 μg/ml より低下し、200 μg/ml 以上ではコントロールの 1/2 以下に低下していた。一方、アン

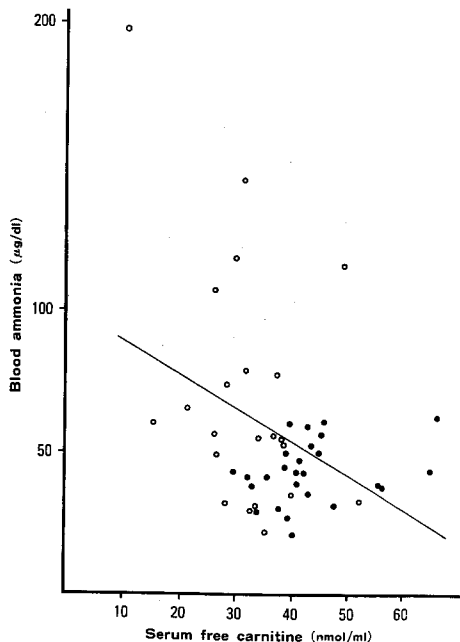
モニアは上昇し 200 μg/ml 以上ではコントロールの 2 倍以上になっていた (Fig. 6)。

#### 3・2・2 培養肝細胞の CPS-I 活性および OTC 活性

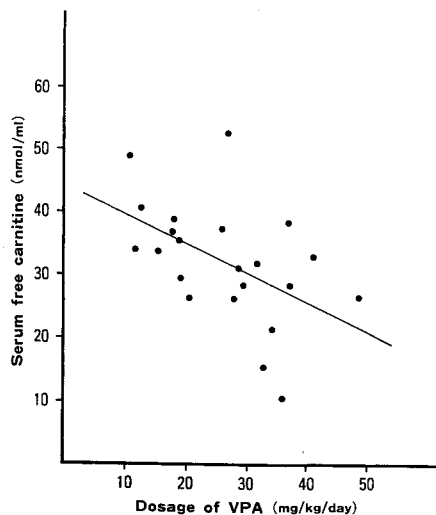
培地中に VPA を添加しても、VPA 濃度 500 μg/ml でも CPS-I および OTC 活性の低下は見られなかった (Fig. 7)。

#### 3・2・3 培養肝細胞の遊離カルニチン含量

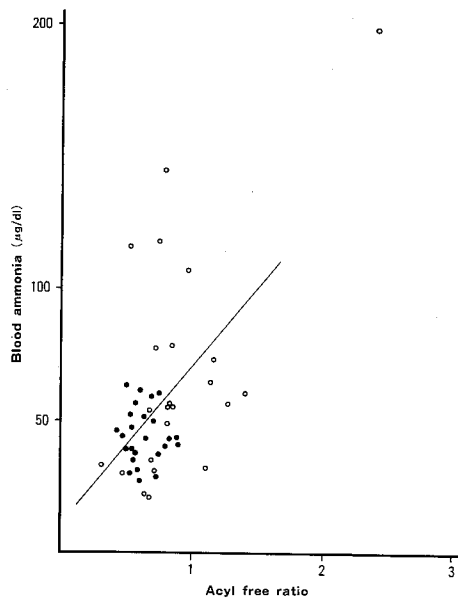
培地中に VPA を添加すると、肝細胞内の遊離カルニチン含量は、VPA 濃度 50 μg/ml より低下し、200 μg/ml



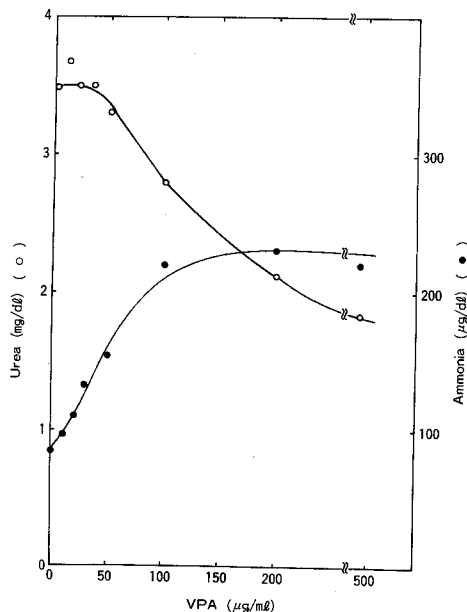
**Fig. 3** Relationship between serum free carnitine concentrations and blood ammonia values in the patients receiving anticonvulsants in combination with (○) or without (●) VPA. Calculated regression line,  $Y=99.63-1.16X$ , where Y is blood ammonia levels and X is serum carnitine concentrations. Coefficient of correlation ( $r=-0.38$ ,  $n=48$ ,  $P<0.01$ ).



**Fig. 5** Relationship between the dosage of VPA and serum free carnitine concentrations in the patients receiving VPA. Calculated regression line,  $Y=44.06-0.451X$ , where Y is serum free carnitine concentrations and X is dosage of VPA. Coefficient of correlation ( $r=-0.49$ ,  $n=22$ ,  $P<0.05$ ).



**Fig. 4** Relationship between acyl free ratios and blood ammonia values in the patients receiving anticonvulsants in combination with (○) or without (●) VPA. Calculated regression line,  $Y=10.14+59.04X$ , Where Y is blood ammonia levels and X is acyl free ratios. Coefficient of correlation ( $r=0.59$ ,  $n=48$ ,  $P<0.001$ ).



**Fig. 6** Effects of VPA on the concentration of urea and ammonia during the culture of hepatocytes. Hepatocytes were cultured in Hanks' complete-Hepes solution containing VPA at concentrations ranging from 0 to 500  $\mu\text{g/ml}$  for 24 hr. Aliquots of incubation medium were taken and the concentration of urea (○) and ammonia (●) was measured.



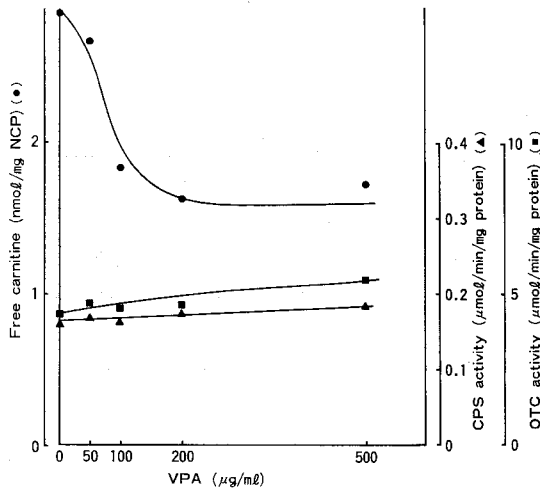


Fig. 7 Changes of free carnitine contents, CPS-I activity and OTC activity in the hepatocytes by VPA. (●): free carnitine contents; (▲): CPS-I activity; (■): OTC activity.

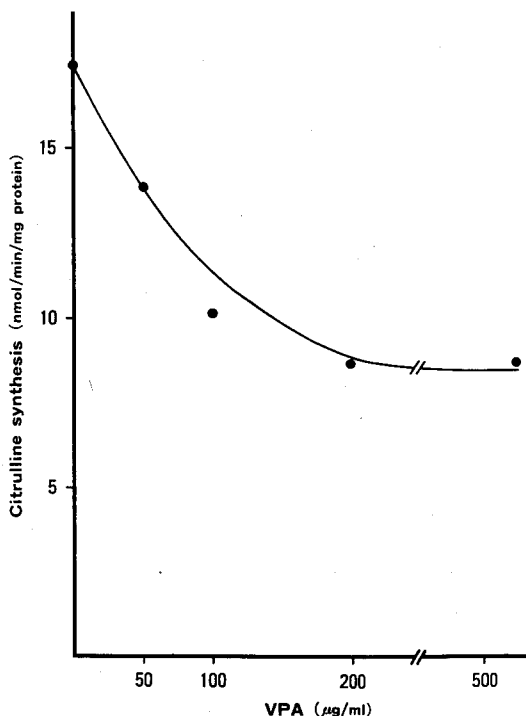


Fig. 8 Effects of VPA on citrulline synthesis in the hepatocytes. Hepatocytes were cultured in Hanks' complete-Hepes solution containing VPA at concentrations ranging from 0 to 500 µg/ml for 24hr and citrulline synthesis of hepatocytes was measured by the method of Yamazaki<sup>16</sup> with some modifications.

ml ではコントロールの約 60%になっていた (Fig. 7).

### 3・2・4 培養肝細胞のシトルリン合成能

培地中に VPA を添加すると、肝細胞のシトルリン合成能は、VPA 濃度 50 µg/ml より低下しており、200 µg/ml ではコントロールの約 1/2 になっていた (Fig. 8).

### 3・2・5 L-カルニチン添加の影響

VPA を 200 µg/ml の濃度で添加した培地に L-カルニチンを加えて 24 時間培養すると、培地中の尿素窒素は L-カルニチン濃度 20 µM より上昇し、一方アンモニアは低下した。しかし、L-カルニチンの量依存性は見られなかった (Fig. 9).

## 4 考 案

カルニチンは小児期における脂肪酸酸化とミトコンドリア機能の保護に必要な物質であり、生体内では 2 つの重要な働きをもっている。1 つはエネルギー源である長鎖脂肪酸をミトコンドリア内に転送する働きで、もう 1 つはミトコンドリア内に蓄積したプロピオン酸などの短鎖脂肪酸を short chain acylcarnitine としてミトコンドリア外に排出する働きである。カルニチン欠損症は 1973 年に Engel and Angelini<sup>18</sup> により

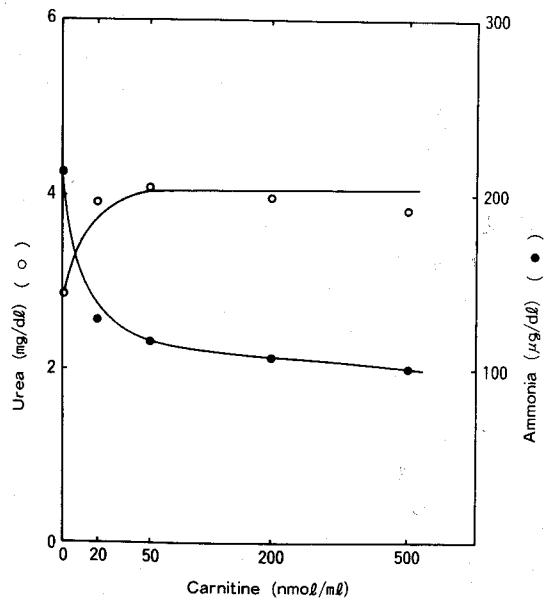


Fig. 9 Effects of L-carnitine on ammonia detoxication and urea synthesis in hepatocytes. L-carnitine was added at concentrations ranging from 0 to 500 nmol/ml in Hanks' complete-Hepes solution containing 200 µg/ml VPA. (○): urea; (●): ammonia.

初めて報告されて以来、一次性および二次性カルニチン欠損症として次々に報告されている。一次性カルニチン欠損症は全身型と筋型に大別されており<sup>19</sup>、二次性カルニチン欠損症は、尿素サイクル異常症<sup>4</sup>、プロピオン酸血症<sup>1</sup>、Reye 症候群<sup>2,20</sup>、血液透析<sup>21</sup>、中心静脈栄養<sup>22</sup> など小児期の様々な疾患および病態で見られることが報告されている。

OTC 欠損症をはじめとする先天性尿素サイクル酵素異常症は、新生児期より高アンモニア血症にて発症し、死亡例も多く予後不良な疾患である。従来より本疾患の治療は、アンモニアの産生抑制を目的とした、蛋白制限を基本とし、安息香酸ナトリウムや L-アルギニンなどの薬物療法が主として行われているが、その効果は必ずしも十分とは言えず、良好にコントロールされていた症例でも感染症などを契機に高アンモニア血症性昏睡におちいり重篤な経過をとる例も多い。最近、カルニチンの高アンモニア血症における役割が注目され、1984 年に O'Conner ら<sup>23</sup> はアンモニア毒性の動物実験にてカルニチンを投与し、血中アンモニアの低下と尿素合成の促進効果を報告し、1988 年には Ohtani ら<sup>4</sup> が OTC 欠損症にて二次性カルニチン欠損症が見られ、L-カルニチン投与が高アンモニア発作の予防に有効であったと報告し、高アンモニア血症の治療薬として L-カルニチンがにわかに注目されている。しかし、OTC 欠損症におけるカルニチン低下の原因は不明であり、他の先天性尿素サイクル酵素異常症については、カルニチン代謝の報告はほとんどない。

今回の研究結果より、OTC 欠損症のほか、CPS 欠損症においても血清遊離カルニチン値の低下が見られることが明らかになった。しかし、サイトゾールに局在する酵素欠損症ではカルニチン値は血清および肝においても低下している症例は見られなかった。このことは、OTC や CPS-I などのミトコンドリアに局在する酵素欠損症は、重症例が多く、より強力な蛋白制限を受けていたことが一因と考えられるが、個々の疾患において重症度が異なるため、症例ごとでの経過を追った検索が必要である。また、OTC 欠損症では、経過を追って検索しえた症例では加齢とともにカルニチンの低下が見られることが明らかにされた。また、OTC 欠損症のヘテロの母親も正常の下限より低下しており、OTC 欠損症では年齢とともにカルニチン欠乏が著明になっていくことが示唆された。

OTC 欠損症における二次性カルニチン欠損症の原因としては、蛋白制限（カルニチンは蛋白中のリジンやメチオニンより生合成される）、尿中への過剰排泄（腎

尿管の遊離カルニチンの再吸収能の低下による）や安息香酸ナトリウムの投与（Benzoyl CoA の蓄積による）およびカルニチンの含まれていない治療用特殊ミルクの使用などが考えられている。また、高アンモニア血症性昏睡時に腹膜透析を行う場合は、透析液中への喪失も考えられる。著者の CPS 部分欠損症の症例では腹膜透析液中にカルニチンが排泄されており、カルニチンの低下に腹膜透析が影響している可能性が考えられた。また、カルニチン合成を司る臓器のうち肝のみにカルニチンが低下しており、肝におけるカルニチン合成能の低下もカルニチン欠損症の成因として考えられた。

OTC 欠損症や CPS 欠損症ではカルニチンの低下が高アンモニア血症の憎悪因子になる可能性があり、今回の結果でも CPS 欠損症では L-カルニチン投与により血中アンモニア値の低下と、蛋白摂取量も増加が可能になったことより、今後は、低蛋白食および安息香酸ナトリウムなどの薬物療法とともに L-カルニチンの併用が必要であると考えられた。また、L-カルニチンの投与量に関しては、全身型カルニチン欠損症では 100~150 mg/kg/day が勧められているが、今回の結果より 10~20 mg/kg/day の比較的少量投与でも十分に血清カルニチン値を正常にすることが可能であることがわかった。

VPA は 8 個の炭素鎖よりなる分岐鎖脂肪酸で、1963 年に Meunier らによって抗痙攣作用が発見されて以来、抗てんかん剤として広く使用されている薬剤であるが、その副作用として、Reye 様症候群や致死性の肝障害があることは従来より知られていた。VPA は構造上 1 分子の酢酸に 2 個のプロピオニール基を有する有機酸であり、プロピオン酸血症やメチルマロン酸血症と同じようにミトコンドリア障害を起こすことが考えられ、実際、高アンモニア血症<sup>7</sup> や低カルニチン血症<sup>8</sup> の報告がある。

今回の臨床例の結果でも、VPA 投与群ではコントロールに比べ、血中アンモニア値の増加と血清遊離カルニチン値の低下および A/F 比の増加が見られた。また、血中アンモニア値は血清遊離カルニチン値および A/F 比と相関しており、カルニチンレベルの低下が血中アンモニア値の上昇と密接な関係を持っていることが示唆された。そこで、以上の臨床例より明らかになった現象を細胞レベルで解析するために、尿素サイクルとカルニチン代謝を同時に検討することができる最も適切な *in vitro* の系として成熟ラット初代培養肝細胞を用いた。

培地中に VPA を添加すると肝細胞による尿素合成は抑制され、培地中のアンモニアは上昇した。この時の肝細胞の遊離カルニチン含量は低下していたが、ミトコンドリアの酵素である OTC や CPS-I の活性は変化なく、VPA による細胞障害による尿素合成の抑制は否定された。そこで、肝細胞によるシトルリン合成能を測定したところ尿素合成と同様に低下が見られた。また、VPA とともに L-カルニチンを添加すると、尿素合成は回復され、培地中のアンモニアも低下した。したがって、VPA による高アンモニア血症の機序としては、肝細胞でのカルニチンの低下によりシトルリン合成にいたる経路のどこかが障害されるためと考えられた。すなわち、カルニチンの低下によりミトコンドリアでの脂肪酸の  $\beta$  酸化の低下がおこると、acetyl CoA や ATP レベルの低下がおこり、特に、N-acetyl glutamate が低下すると、細胞内での CPS-I の活性が障害され尿素合成が低下するものと推測される。このように肝細胞での遊離カルニチンレベルの低下が高アンモニア血症の発症に重要な役割を持っていることが明らかになったが、生体内では肝でのカルニチンの利用が亢進すると、血清より肝へのカルニチンの輸送の促進や、肝での内因性カルニチンの合成の促進がおこり、肝においてはかならずしも血清レベルと同等にカルニチンが低下しているとはかぎらないと予想される。実際、今回の臨床例での検討でも、血中アンモニア値が異常高値を示したのは一部のみで、重篤な症状を呈した症例はいなかった。しかし、肝疾患などで肝におけるカルニチンの合成能が低下している症例や、OTC 欠損症、有機酸血症および低栄養などの VPA 以外に二次性カルニチン欠損症を引き起こす要因のある場合は、肝におけるカルニチンも低下し重篤な症状を呈する可能性がある。

## 5 結 論

高アンモニア血症を呈する疾患における血清および組織のカルニチンを測定し、また高アンモニア血症とカルニチンとの関連を明らかにする目的で、初代培養肝細胞を用いて種々の検討を行い以下のような結果を得た。

1. 先天性高アンモニア血症例では、OTC 欠損症のほか CPS 欠損症でも二次性カルニチン欠損症が見られることが明らかとなった。しかし、OTC 欠損症や CPS 欠損症以外の尿素サイクル異常症では血清および肝でのカルニチンの低下は見られなかった。また、OTC 欠損症の一部では年齢とともに血清および肝カルニチン

の低下がみられた。CPS 部分欠損症例では L-カルニチン (10 mg/kg/day) 投与後、血清および尿カルニチンの増加とともに血中アンモニア値が有意に低下した。

2. VPA 投与例では、血中アンモニア値の上昇と、血清遊離カルニチン値の低下および A/F 比の上昇がみられた。また、血中アンモニア値と血清遊離カルニチン値の間には有意な負の相関が見られた。

3. 初代培養肝細胞を用いた検討より、VPA による高アンモニア血症は肝細胞でのカルニチンの低下を介するシトルリン合成抑制による尿素合成の低下によることが示唆され、L-カルニチン投与が高アンモニア血症の予防に有効であると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導をいただいた札幌医科大学小児科学講座、大柳和彦助教授、土山晃博士並びに長尾雅悦博士に感謝の意を表します。また、御校閲いただいた札幌医科大学小児科学講座、千葉峻三教授に深謝いたします。

## 文 献

1. Roe, C.R. and Bohan, T.P.: L-carnitine therapy in propionic acidaemia (letter to editor). *Lancet* **1**, 1411-1412 (1982).
2. Roe, C.R.: Relative carnitine insufficiency in Reye's syndrome and other metabolic disorders. In: Pollack, J.D.: Reye's syndrome IV, The National Reye's Syndrome Foundation, Ohio, 201-215 (1985).
3. Mastuda, I. and Ohtani, Y.: Carnitine status in Reye and Reye-like syndromes. *Pediatr. Neurol.* **2**, 90-94 (1986).
4. Ohtani, Y., Ohyanagi, K., Yamamoto, S. and Mastuda, I.: Secondary carnitine deficiency in hyperammonemic attacks of ornithine transcarbamylase deficiency. *J. Pediatr.* **112**, 409-414 (1988).
5. Engel, A.G. and Rebouche, C.J.: Carnitine metabolism and inborn errors. *J. Inher. Metab. Dis.* **7** (Suppl.), 38-43 (1984).
6. Stumpf, D.A., Parker, W.D. and Angelini, C.: Carnitine deficiency, organic acidemias and Reye's syndrome. *Neurology* **35**, 1041-1045 (1985).
7. Coulter, D.L. and Allen, R.J.: Hyperammonemia with valproic acid therapy. *J. Pediatr.* **99**, 317-319 (1981).
8. Ohtani, Y., Endo, F. and Mastuda, I.: Carnitine

- deficiency and hyperammonemia associated with valproic acid therapy. **J. Pediatr.** **101**, 782-785 (1982).
9. McGarry, J. D. and Foster, D. W.: A improved and simplified radioisotopic assay for the determination of free and esterified carnitine. **J. Lipid Res.** **17**, 277-281 (1976).
  10. Mastuda, I., Ohtani, Y. and Ninomiya, N.: Renal handling of carnitine in children with carnitine deficiency and hyperammonemia associated with valproate therapy. **J. Pediatr.** **135**, 131-134 (1986).
  11. Tanaka, K., Sato, M., Tomita, Y. and Ichihara, A.: Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. **J. Biochem.** **84**, 937-946 (1978).
  12. 奥田拓道, 藤井節郎: 血中アンモニア直接比色定量法. **最新医学** **21**, 622-627 (1966).
  13. Ceriotti, G. and Spandrio, L.: A spectrophotometric method for determination of urea. **Clin. Chim. Acta** **8**, 295-299 (1963).
  14. Nuzum, C. T. and Snodgrass, P. T.: Multiple assays of five urea-cycle enzymes in human liver homogenates. In: Grisolia, A.: The urea cycle. 325-355, Wiley-Interscience Publication, New York (1976).
  15. Schmike, R. T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in rat liver. **J. Biol. Chem.** **237**, 459-470 (1962).
  16. Yamazaki, R. K. and Graetz, G. S.: Glucagon stimulation of citrulline formation in isolated hepatic mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.** **178**, 19-25 (1977).
  17. 土山 晃, 板倉慶弘, 田村弥生子, 大柳和彦, 中尾亨: 先天性尿素サイクル酵素異常症における尿中オロト酸の意義について一特に保因者診断一. **日児誌** **87**, 1614-1618 (1983).
  18. Engel, A. G. and Angelini, C.: Carnitine deficiency of human skeletal muscle with associated lipid storage myopathy: A new syndrome. **Science** **179**, 899-902 (1973).
  19. Angelini, C., Trevisan, C., Isaya, G., Pegolo, G. and Uergani, L.: Clinical varieties of carnitine and carnitine palmitoyltransferase deficiency. **Clin. Biochem.** **20**, 1-7 (1987).
  20. Hinshaw, W. B., Glenn, J. L. and Hatch, K. M.: Serum carnitine in Reye's syndrome. **N. Engl. J. Med.** **302**, 1423 (1980).
  21. Bohmer, T., Bergrem, H. and Eiklid, K.: Carnitine deficiency induced during intermittent haemodialysis for renal failure. **Lancet** **1**, 126-128 (1978).
  22. Penn, D., Schmidt-Sommerfeld, E. and Pascu, F.: Decreased tissue carnitine concentrations in newborn infants receiving total parenteral nutrition. **J. Pediatr.** **98**, 976-978 (1981).
  23. O' Connor, J. E., Costell, M. and Grisolia, S.: Protective effect of L-carnitine on hyperammonemia. **FEBS. Lett.** **166**, 331-334 (1984).

---

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学小児科学講座 森 俊彦