



Application of ^1H -NMR spectroscopy for qualitative measurement of muscle carnitine levels

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中島, 寛明 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1529

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 252号	学位授与年月日	平成 9年 5月16日
氏 名	中 島 寛 明		
論文題目	Application of ¹H-NMR spectroscopy for qualitative measurement of muscle carnitine levels (筋カルニチン量の定性的測定のための¹H-NMR スペクトロスコピーの応用)		

博士(医学) 中 島 寛 明

論文題目

Application of ^1H -NMR spectroscopy for qualitative measurement of muscle carnitine levels
(筋カルニチン量の定性的測定のための ^1H -NMRスペクトロスコピーの応用)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

カルニチンの測定は一般に放射性同位元素を使用した方法(RI法)が用いられるが、感度が高い反面、放射性物質を扱う難点がある。そこで、比較的容易に試料中の多種の物質を同時に測定することができる ^1H -NMR spectroscopy (^1H -MRS)を用いて、筋肉のカルニチン含有量の測定が可能かどうかについて検討した。

〔材料ならびに方法〕

ラットのヒラメ筋及び腓腹筋またはヒトの大腿四頭筋を、1:9倍容となるよう蒸留水でホモジネートし、総カルニチン測定にはこのホモジネートに等量の0.2N水酸化カリウム溶液を加えて37℃1時間の水解を行った後に、また遊離カルニチン測定には水解を経ずにそのまま、等量の0.6N過塩素酸により除蛋白を行った。さらに、中和後遠沈することによって余剰過塩素酸を取り除いた筋肉の抽出液を凍結乾燥した後、内部基準として0.1mgの3-trimethylsilyl-propionate(TSP)を含有するpH(pD)7.2のリン酸緩衝化重水0.6mlを加え、上清をJOEL社製GSX-270WB分光器を使用して共鳴周波数270MHz、128回積算で測定した。分光器の設定は、パルス角45°、掃引幅3000Hz、3.0秒間隔、サンプル採取点16Kとし、重水の化学交換 ^1H はhomogated-decoupling法により抑制した。カルニチンの各 ^1H 共鳴のうち3.23ppmの化学シフトを示すN-メチル基のシグナルが単一で十分な強度を持ち、再現性があったので、試料管に含まれる一定量のTSPに対するN-メチル基のシグナル強度比によってカルニチンを定量した。

〔結果〕

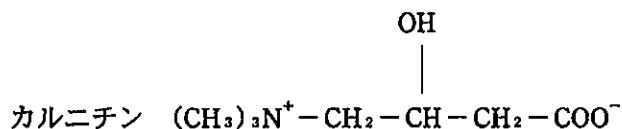
筋肉に含まれる物質のうちフォスホリルコリンN-メチル基とタウリンSC-H₂が、カルニチンN-メチル基と同様の化学シフトを示した。このうち、カルニチンN-メチル基とタウリンSC-H₂の化学シフトは溶液のpH(pD)によって変化し、pH(pD)7.0より酸性側ではカルニチンN-メチル基とフォスホリルコリンN-メチル基のシグナルが3.22ppm付近で重複し、pH(pD)7.9よりアルカリ側ではカルニチンN-メチル基とタウリンSC-H₂のシグナルが3.23ppm付近で重複した。また、これらのシグナルは、溶液のpH(pD)を7.2に調整したときに最もよく分離することができた。しかし、シグナル面積による測定を行う場合、これらのシグナルはカルニチンN-メチル基シグナルに対し影響を与えており、シグナル高比による測定の方が、同時にMcGarry & Foster変法によって測定した値と、より近似した値を求めた。ラット骨格筋にDL-カルニチンを加えて測定した回収率は97.8%(SD=5.5, n=5)で、CV値は6.8%(n=5)であった。ヒト骨格筋の総及び遊離カルニチンはそれぞれ19.2(SD=5.8)と5.4(SD=5.0)nmole/mg non-collagen proteinであった。同時にMcGarry & Foster変法によって測定した値と比較して、相関係数0.959でよく一致していた。

〔結論〕

ラット及びヒト骨格筋に含まれるカルニチンを、生検材料の過塩素酸抽出液を用い、 ^1H -MRS によって定量可能かどうか検討した。検討はカルニチンN-メチル基シグナルを用いて行ったが、この化学シフトは検体のpH(pD)によって変化し、筋肉においては重複が問題となるタウリン、ホスホリルコリンのシグナルに対して、溶液をpH(pD)7.2に調整することによって最もよく分離することができた。この結果、カルニチンN-メチル基シグナルの評価においては必ず、溶液のpH(pD)を考慮にいれなければならないと思われた。 ^1H -MRS で測定したヒト骨格筋中総及び遊離カルニチン量は、同時に測定したRI法による結果と比較してよく一致しており、 ^1H -MRSを用いて、骨格筋内カルニチン含有量の定量が可能であった。 ^1H -MRSはRI法に比べて感度の点で劣るが、放射性物質を使用しない利点があり、同時に多数の物質が測定可能であるため、筋疾患の臨床及び基礎的研究に役立つ可能性があると考えられた。

論文審査の結果の要旨

高分解能プロトン核磁気共鳴（以下 ^1H -NMR）を用いて生体試料中の低分子質量の有機代謝物（とくに有機酸）の検出を試みた報告はこれまでにもある。それらの有機代謝物は多くは有機酸であり、それらのミトコンドリアマトリックスへの輸送単体として重要な役割をもっているカルニチンは有機酸代謝酵素の欠損で増量する場合が予想される。また、それ自体の欠損による有機酸の代謝障害も考えられる。申請者らは ^1H -NMRを用いたカルニチンの半定量的測定法について検討した。



試料はSDラットの後肢筋（soleus/gastrocnemius complex）ないしヒト骨格筋のホモジネートの除タンパク上清を凍結乾燥したものである。また、3-メチルシリルプロピオン酸（TSP）を内部基準（internal standard）として用いた。標準試料であるDL-カルニチンを用いた場合N-メチルシグナルはpH7.2の条件で3.23ppmに単一のピークを示した。生体試料の場合カルニチンのそれに近い化学シフトを示すものに、ホスホリルコリン（3.22）、タウリン（3.24、3.26、3.28）がある。

申請者らは試料溶液のpHを変えることによりこれらの化学シフトがどのような変動を示すかを検討した。その結果、カルニチンのN-メチルシグナルに近いシグナルを示すホスホリルコリンとタウリンのうちホスホリルコリンのシグナルはpHを低下させても変動しないが、カルニチンのそれは3.22に移動しホスホリルコリンのN-メチルシグナルに一致する変化を示す。またタウリンのS-CH₂シグナルはpHを低下させることによってカルニチンのピークから分離する。申請者らはこれらの性質を利用してカルニチンのシグナルをより確実に同定することができることを見出した。また、ホスホリルコリンとタウリンの同時測定も可能である。

このような性質を利用して生体試料中の遊離カルニチン量を測定した結果はnモル/mg非コラーゲンタンパク単位で3.6（ラット筋）、15.4（ヒト筋）であった。試料を予めアルカリ処理して得られた総カルニチン量はラット4.4（同単位）、ヒト19.2（同単位）である。このように、今回の研究によって溶液のpHがシグナルの同定に役立つことがわかったのは従来のデータの解釈に一石を投じるものであり今後の臨床例への応用が期待される。

以上より、今回の仕事によって、有機酸代謝で重要な役割をもつカルニチンの ^1H -NMR 測定におけ

るシグナルの同定並びに類似物質との識別が十分に検討された。従って、生体組織のアミノ酸、カルボン酸画分についての多数成分の一斉分析における分解能が向上し、物質動態の追跡範囲が拡大されたことが評価された。

なお、審査の過程において、次のような質疑がなされた。

- 1) なぜ筋肉を試料に選んだのか
- 2) ^1H -NMRがカルニチンの測定に向いている点は
- 3) アイソトープ法との優劣—感度及び物質の識別能力—について
- 4) トリメチルシリルプロピオン酸 (TSP) を内部基準に使用する理由
- 5) 必要な検体量について
- 6) DL-カルニチンによる検量線の精度
- 7) pH以外で検体の化学シフトを変化させる因子
- 8) アシルカルニチンの分別的アルカリ処理はあるか
- 9) カルニチンデヒドロゲナーゼを用いたサイクリング法について
- 10) カルニチンを必要とする酵素反応は
- 11) アシルカルニチンをミトコンドリア内に輸送する機構
- 12) 遊離カルニチンを細胞質に逆輸送する機構
- 13) カルニチンの生合成経路について
- 14) タウリンは尿中に排泄されるか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点に関しても十分理解していて、本論文は博士(医学)の学位論文に相応しいことを審査委員会委員全員が一致して評価した。

論文審査担当者 主査 教授 藤 田 道 也

副査 教授 藤 瀬 裕 副査 講師 宮 嶋 裕 明