●原 著●

閉塞性動脈硬化症における血中カルニチン濃度の意義

駒井 宏好^{1,2} 深山 紀幸^{1,2} 坂下 英樹^{1,2} 山本 暢子^{1,2} 進藤 俊哉³ 荻野 均⁴

要 旨：骨格筋代謝に関与するカルニチンの血中濃度を閉塞性動脈硬化症患者 130 例で測定した。アシルカルニチンと遊離カルニチンの比をカルニチン比とすると間歇性跛行群は 0.26 ± 0.13 ，重症下肢虚血群では 0.42 ± 0.22 ，透析例を除いてもそれぞれ 0.24 ± 0.10 ， 0.31 ± 0.14 と有意に重症下肢虚血群で高値(それぞれ $p < 0.01$ ， 0.05)を示した。性別，糖尿病，脂質異常症，慢性維持透析，重症下肢虚血を説明変数として多変量解析を行ったところカルニチン比は慢性維持透析($p < 0.001$)と重症下肢虚血($p < 0.01$)で有意な因子と判明した。カルニチン比は閉塞性動脈硬化症の下肢虚血の程度を示す可能性があり，重症化判定のバイオマーカーとなりうることを示唆された。(J Jpn Coll Angiol 2016; 56: 103–108)

Key words: peripheral arterial disease, critical limb ischemia, intermittent claudication, carnitine, biomarker

序 言

カルニチンはアミノ酸誘導体で骨格筋の酸化的代謝にかかわっており，閉塞性動脈硬化症(PAD)患者においてはその投与によって間歇性跛行(IC)患者の最大歩行距離を改善したとの報告もある¹⁻³⁾。しかし PAD 患者のカルニチンの血中濃度についてはまとまった報告はなく，PAD の発症，増悪における意義は知られていない。PAD は重症化すると四肢筋組織に供給される血流量の低下のみならず筋組織でのエネルギー効率や老廃物排泄にも問題が生じている可能性もありカルニチン血中濃度を測定することにより PAD の病態把握や増悪解明を新たな角度から検討できると考え本研究を行った。

対象と方法

本研究は東京医科大学病院，東京医科大学八王子医療センター，関西医科大学附属滝井病院(現・関西医科大学総合医療センター)を受診した PAD 患者 130 例を対象とした横断的研究である。年齢は 72.2 ± 7.0 (58–89) 歳，男女比は 102:28 であった。併存疾患として高血圧 94 例

(72%)，糖尿病 65 例(50%)，脂質異常症 56 例(43%)，慢性維持透析例 20 例(15%)であった。これらを初診時治療前の臨床症状より IC 群 90 例と重症下肢虚血(CLI)群 40 例に分けた。CLI の診断は病歴，画像診断，生理機能検査などにより TASC II の定義に準じて行った。それぞれの群の臨床パラメーターは **Table 1** のごとくであり各群の病態の性質上 ankle brachial index (ABI) は IC 群で高値をとり，慢性維持透析例は CLI 群で多かった。これらの患者より本人の書面による同意を得て午前中食間に静脈血 5 ml を採取し血漿に分離，凍結保存ののち血中カルニチン分画(総カルニチン，アシルカルニチン，遊離カルニチン)を酵素サイクリング法にて測定した。この測定法でのカルニチン濃度の基準値はそれぞれ総カルニチン $45 \sim 91 \mu\text{mol/L}$ ，アシルカルニチン $6 \sim 23 \mu\text{mol/L}$ ，遊離カルニチン $36 \sim 74 \mu\text{mol/L}$ であった。

各群間の平均値の比較は独立したサンプルの t 検定を用いて行った。カルニチンパラメーターと各種臨床パラメーターの相関は正規分布のパラメーターについては Pearson の相関係数を，正規分布しないパラメーターについては Spearman の順位相関係数を用いて分析した。またカルニチンパラメーターにおける臨床各因子の関与は単変量解析ののち線型回帰分析を用いて多変量解析を行った。各統計は SPSS statistics ver.20 (IBM) で行い統計値はすべて平均 $\pm$ 標準偏差で表した。 $p < 0.05$ を有意とした。

¹ 関西医科大学総合医療センター血管外科² 関西医科大学外科³ 東京医科大学八王子医療センター心臓血管外科⁴ 東京医科大学心臓血管外科第 53 回日本脈管学会総会(2012 年 10 月，東京)にて発表
doi: 10.7133/jca.16-00011

2016 年 5 月 10 日受付 2016 年 7 月 17 日受理

Table 1 Patients' profile

	IC group (n=90)	CLI group (n=40)	p
Age (year)	72.7±7.0	71.1±6.8	0.243
Gender (male:%)	74 (82.2)	28 (70)	0.164
Weight (kg)	59.2±11.6	59.4±12.2	0.908
BMI	22.6±3.4	23.3±5.3	0.366
ABI	0.66±0.20	0.53±0.21	0.025
Hypertension (%)	65 (72.2)	29 (72.5)	0.829
Diabetes (%)	40 (44.4)	25 (62.5)	0.090
Dyslipidemia (%)	41 (45.6)	15 (37.5)	0.338
End-stage renal disease (%)	7 (7.8)	13 (32.5)	0.001

IC: intermittent claudication, CLI: critical limb ischemia, BMI: body mass index, ABI: ankle-brachial index

本研究は関西医科大学附属滝井病院(現・関西医科大学総合医療センター)、東京医科大学、東京医科大学八王子医療センターのそれぞれの倫理委員会の承認を得て行った。本研究の一部は、文部科学省リーディングプロジェクト「オーダーメイド医療実現化プロジェクト」によって支援された。

結 果

カルニチンと重症度の関連

総カルニチン、アシルカルニチン、遊離カルニチンはIC群でそれぞれ61.4±14.5, 12.0±4.3, 49.4±13.2 μmol/Lであった。CLI群ではそれぞれ45.1±18.4, 11.6±4.9, 33.6±16.0 μmol/Lであり、総カルニチンおよび遊離カルニチンで有意にIC群に比較して低値をとった(すべて $p<0.001$) (Fig. 1)。カルニチンは透析で血中から排泄されるため透析例20例を除いて検討したところ総カルニチン、アシルカルニチン、遊離カルニチンはIC群でそれぞれ63.7±12.3, 12.1±4.3, 51.6±10.9, CLI群ではそれぞれ54.7±14.0, 12.4±5.4, 42.4±11.3 μmol/Lと、やはり総および遊離カルニチンがCLI群で低値をとった(それぞれ $p<0.01$)。アシルカルニチンと遊離カルニチンは相互関係がありカルニチン結合アシル基の飽和度を相対的に評価するためこれらの比をカルニチン比(アシルカルニチン濃度/遊離カルニチン濃度)というパラメーターで検討すると、全例での解析でIC群は0.26±0.13, CLI群では0.42±0.22, 透析例を省いてもIC群は0.24±0.10, CLI群では0.31±0.14と有意にCLI群で高値(それぞれ $p<0.01$, 0.05)を示した。

カルニチンと臨床パラメーターの関連

総カルニチン、カルニチン比と年齢およびbody mass index (BMI)の間には有意な相関関係はなかった。測定し

得た患者(n=92)でのABIとカルニチンパラメーターとの関連では総カルニチンとABIは有意($p<0.01$)な正の、カルニチン比とABIは有意($p<0.05$)な負の相関関係にあった(Fig. 2)。

単変量解析にて総カルニチン、カルニチン比は高血圧の有無で差はなかったが、男性では総カルニチンが高値($p<0.01$)、カルニチン比が低値($p<0.05$)を、糖尿病例では総カルニチンが低値($p<0.01$)、カルニチン比が高値($p<0.05$)を、脂質異常症例ではカルニチン比が低値($p<0.05$)を、慢性維持透析例では総カルニチンが低値($p<0.01$)、カルニチン比が高値($p<0.01$)をとった(Table 2)。性別、糖尿病、脂質異常症、慢性維持透析、CLIを説明変数として多変量解析を行ったところ総カルニチン、カルニチン比とも慢性維持透析($p<0.001$)とCLI($p<0.01$)が有意な説明変数となった(Table 3, 4)。

考 察

カルニチンは生体の脂質代謝に関与するビタミン様物質で、主に肉や乳製品からの食事で75%が供給され、25%は肝臓や腎臓で生成されている。体内においては、心筋、骨格筋、肝、脳組織に多く存在するがカルニチンの約98%が骨格筋に存在するといわれている⁴⁾。体内での主なカルニチンの働きとして1. β酸化のための長鎖脂肪酸のミトコンドリア内膜内への輸送促進、2. 有害なアシル化合物の細胞外への排泄、3. 細胞内での遊離coenzyme A量の調整作用があげられている⁵⁾。いずれも筋肉内のエネルギー効率を改善するために必須であり、とくに低酸素状態ではより重要と考えられる。血液中には骨格筋内の濃度の100分の1で存在し遊離カルニチンとアシルカルニチンの状態で筋肉細胞内とほぼ同様に分布する⁶⁾。β酸化に伴うエネルギー代謝の異常が存在する

A	B
C	

Figure 1 Carnitine levels in both groups

A) total carnitine, B) free carnitine, C) acyl carnitine

Total carnitine and free carnitine levels are significantly lower in the critical limb ischemia (CLI) group compared with the intermittent claudication (IC) group ($p < 0.001$ in both), whereas acyl carnitine level did not differ in each groups.

Figure 2 Relationship between ankle-brachial index (ABI) and carnitine ratio

Carnitine ratio (acyl carnitine/free carnitine) has a significant negative co-relationship with ABI ($r = -0.253, p < 0.05$).

状態であればアシルカルニチンが増え、遊離カルニチンが不足して上記のようなカルニチン本来の作用が低下するためその分画を調べることにより骨格筋レベルでの虚血の程度、もしくはエネルギー効率の低下を探ることが

可能と考えた。PADにおいては血中カルニチン濃度を詳しく分析した報告はないが、上記機序からICから重症化する患者をより早期に発見できるパラメーターになるとの仮説を立て検証してみた。

Table 2 Carnitine parameter and clinical factors

	Total carnitine (μmol/L)	p	Carnitine ratio	p
Gender				
male	58.3±17.5	0.017	0.29±0.15	0.014
female	49.5±15.4		0.38±0.24	
Hypertension				
Yes	57.8±17.2	0.115	0.32±0.17	0.760
No	52.2±18.3		0.31±0.20	
Diabetes				
Yes	51.0±18.6	<0.001	0.35±0.20	0.023
No	61.9±14.7		0.28±0.14	
Dyslipidemia				
Yes	59.6±15.9	0.050	0.27±0.12	0.016
No	53.5±18.6		0.35±0.21	
ESRD				
Yes	29.1±11.2	<0.001	0.60±0.19	<0.001
No	61.4±11.8		0.26±0.11	
CLI				
Yes	45.1±18.4	<0.001	0.42±0.22	<0.001
No	61.4±14.5		0.26±0.13	

ESRD: end-stage renal disease, CLI: critical limb ischemia

Table 3 Logistic regression analysis of factors affecting to total carnitine

Variable	β	p	95% confidence interval
Gender (male)	3.544	0.193	-1.813-8.902
Diabetes	-4.318	0.075	-9.077-0.441
Dyslipidemia	3.015	0.196	-1.572-7.603
ESRD	-25.934	<0.001	-32.5861--19.281
CLI	-4.248	0.001	-6.726-1.770

β: standardized regression coefficient, ESRD: end-stage renal disease, CLI: critical limb ischemia

Table 4 Logistic regression analysis of factors affecting to carnitine ratio

Variable	β	p	95% confidence interval
Gender (male)	-0.047	0.086	-0.101-0.007
Diabetes	-0.003	0.902	-0.051-0.045
Dyslipidemia	-0.033	0.154	-0.079-0.013
ESRD	0.297	<0.001	0.231-0.364
CLI	0.037	0.004	0.012-0.062

β: standardized regression coefficient, ESRD: end-stage renal disease, CLI: critical limb ischemia

IC 患者に比べ CLI 患者ではアシルカルニチンは変わらなかったが遊離カルニチンが低下し、カルニチン比も高値をとっていた。これは透析によりカルニチンが除去される慢性維持透析例を除いても同様の結果であり、CLI 患者では細胞内での慢性的な虚血により相対的にアシルカルニチンが増加しているものと考えられた。ただし総カルニチンが CLI で低下しており、カルニチンの摂取不足や生成障害なども存在している可能性も示唆された。IC 患者では運動能の低下に伴いアシルカルニチンが増加していると報告されている⁷⁾。Brevetti ら⁸⁾はより虚血の高度な PAD の骨格筋内カルニチン濃度は低下していると報告している。Hiatt⁹⁾はアシルカルニチン増加に表される骨格筋内での代謝異常が ABI に比してより正確な虚血肢の運動能力のマーカーになりうると述べている。われ

われのデータではアシルカルニチンはより虚血の高度な CLI 患者で増加している訳ではなかったが同時に総カルニチンや、アシル基を捕捉可能な遊離カルニチンが低下していた。慢性的に虚血状態にある CLI 患者ではカルニチンの生成または補給が需要に追いつかずこのようなバランスとなっていると考えられる。カルニチンのアシル基バッファーとしての利用率をアシルカルニチンと遊離カルニチンの比としてしてみると CLI では高値をとっておりやはり相対的なアシルカルニチン飽和状態にあると考えられた。体内でのカルニチンのほとんどは骨格筋内にあるためカルニチン量は筋肉量と関連がある可能性があったが、年齢、BMI とは相関はなかった。したがって臨床的に栄養状態不良、筋肉量低下があると言われている CLI だがそのこと自体がカルニチン量とは関連してい

る訳ではなく、むしろ筋肉内のエネルギー代謝の問題によるものと考えた。カルニチン比は ABI と有意な負の相関関係があり、多変量解析でも CLI であることが独立した説明因子であったことから虚血の程度とカルニチン代謝の関連が深いことが示唆された。

今回の研究より重症虚血状態の患者にカルニチンを投与することが治療的意味を持つかどうかは判断できない。しかし Milio ら¹⁰⁾は PGE1 とともにカルニチンを CLI 患者に投与することによりごく短期間の観察ではあるが有意な安静時痛の改善、潰瘍サイズの縮小、最大歩行距離の改善が認められたと報告している。De Marchi ら¹¹⁾は CLI 患者においてカルニチン投与により微小循環レベルでの改善を認めたとしている。IC 患者へのカルニチン投与のシステマティックレビューでも重症跛行患者がより治療の恩恵を受けている、ともされている¹²⁾。CLI ではカルニチン比が高値を示すこと、ABI とカルニチン比が有意な相関関係にあることなどからカルニチン比が重症化を予測するバイオマーカーになると考えられ以前からの報告とも合致していた。その他当研究の限界としてカルニチン代謝が服用薬や病悩期間に影響を受けているかどうかは解析できなかった。これは当研究が横断的なものであるためであった。またカルニチン代謝異常が虚血性障害の原因であるのか、結果であるのかは不明であった。今後前向き研究などでこれらが明らかにされることを期待するものである。

結 論

PAD による IC 患者および CLI 患者において血中カルニチン分画を測定した。カルニチン比は IC 患者に比し CLI 患者で有意に上昇しており PAD の虚血の程度を表す独立した因子となりうることが判明した。

利益相反

著者全員に利益相反はない。

文 献

- 1) Brevetti G, Diehm C, Lambert D: European multicenter study on propionyl-L-carnitine in intermittent claudication. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 1618–1624
- 2) Hiatt WR, Regensteiner JG, Creager MA, et al: Propionyl-L-carnitine improves exercise performance and functional status in patients with claudication. *Am J Med* 2001; **110**: 616–622
- 3) Brevetti G, Perna S, Sabba C, et al: Propionyl-L-carnitine in intermittent claudication: double-blind, placebo-controlled, dose titration, multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1995; **26**: 1411–1416
- 4) Evans AM, Fornasini G: Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet* 2003; **42**: 941–967
- 5) Bremer J: Carnitine—metabolism and functions. *Physiol Rev* 1983; **63**: 1420–1480
- 6) Ringseis R, Keller J, Eder K: Mechanisms underlying the anti-wasting effect of L-carnitine supplementation under pathologic conditions: evidence from experimental and clinical studies. *Eur J Nutr* 2013; **52**: 1421–1442
- 7) Hiatt WR, Nawaz D, Brass EP: Carnitine metabolism during exercise in patients with peripheral vascular disease. *J Appl Physiol* 1987; **62**: 2383–2387
- 8) Brevetti G, Angelini C, Rosa M, et al: Muscle carnitine deficiency in patients with severe peripheral vascular disease. *Circulation* 1991; **84**: 1490–1495
- 9) Hiatt WR: Carnitine and peripheral arterial disease. *Ann N Y Acad Sci* 2004; **1033**: 92–98
- 10) Milio G, Novo G, Genova C, et al: Pharmacological treatment of patients with chronic critical limb ischemia: L-propionyl-carnitine enhances the short-term effects of PGE-1. *Cardiovasc Drugs Ther* 2009; **23**: 301–306
- 11) De Marchi S, Zecchetto S, Rigoni A, et al: Propionyl-L-carnitine improves endothelial function, microcirculation and pain management in critical limb ischemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 2012; **26**: 401–408
- 12) Delaney CL, Spark JJ, Thomas J, et al: A systematic review to evaluate the effectiveness of carnitine supplementation in improving walking performance among individuals with intermittent claudication. *Atherosclerosis* 2013; **229**: 1–9

Plasma Carnitine Level in Peripheral Arterial Disease

Hiroyoshi Komai,^{1,2} Noriyuki Miyama,^{1,2} Hideki Sakashita,^{1,2} Nobuko Yamamoto,^{1,2}
Shunya Shindo,³ and Hitoshi Ogino⁴

¹Department of Vascular Surgery, Kansai Medical University Medical Center, Osaka, Japan

²Department of Surgery, Kansai Medical University, Osaka, Japan

³Department of Cardiovascular Surgery, Tokyo Medical University Hachioji Medical Center, Tokyo, Japan

⁴Department of Cardiovascular Surgery, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan

Key words: peripheral arterial disease, critical limb ischemia, intermittent claudication, carnitine, biomarker

The plasma carnitine fraction, which involves in skeletal muscle metabolism, was measured in 130 patients with peripheral arterial disease (PAD). The ratios of acyl carnitine and free carnitine (carnitine ratio) are 0.42 ± 0.22 in patients with critical limb ischemia (CLI) and 0.26 ± 0.13 in patients with intermittent claudication (IC), respectively, being significantly high in the patients with CLI ($p < 0.01$). Even in omitted hemodialysis patients, the carnitine ratio is higher in the patients with CLI than in the patients with IC (0.31 ± 0.14 vs. 0.24 ± 0.10 , $p < 0.05$). When the multivariate analysis was performed using gender, diabetes, dyslipidemia, chronic hemodialysis as the explanatory variables, dialysis ($p < 0.001$) and CLI ($p < 0.01$) are shown to be the significant determinant factors of carnitine ratio. These results indicate that carnitine metabolism is deeply related to the severity of ischemia in the muscle. The carnitine ratio may become a marker of severity of limb ischemia of PAD and a possible indicator of preclinical CLI.

(J Jpn Coll Angiol 2016; **56**: 103–108)