薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
110 (3) 225-234 (1990)

ミトコンドリア機能賦活作用を有する塩化レボカルニチンのラット心筋
ホモジネートにおける低酸素条件下での脂肪酸及び
グルコースの酸化に対する作用

山田博明,^a 弘中 豊,^{*,b} 濱 堯夫^a

神戸学院大学薬学部,^a アース製薬(株) 開発 II 部^b

Effects of Levocarnitine Chloride, a New Mitochondrial Function
Reactivating Agent, on Fatty Acid and Glucose Oxidation under
Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Heart

Hiroaki YAMADA,^a Yutaka HIRONAKA,^{*,b} and Takao HAMA^a

Faculty of Pharmaceutical Science, Kobe-Gakuin University,^a 518, Arise,
Ikawadani, Nishi-ku, Kobe 673, Japan and Earth Chemical Co.
Ltd. Development Dept. Sec. II,^b 3218-12, Sakoshi,
Ako-shi, Hyogo 678-01, Japan

(Received October 25, 1989)

The effects of levocarnitine chloride [LC-80, (–)-(R)-(3-carboxy-2-hydroxypropyl)-trimethylammonium chloride] on the oxidation of [U-¹⁴C]palmitate, [U-¹⁴C]glucose and [2-³H]glucose under hypoxic conditions in homogenates from the rat heart were investigated. LC-80 at concentrations of 0.5 and 1.0 mM caused significant and concentration-dependent increases in the depressed ¹⁴CO₂ production from [U-¹⁴C]palmitate or [U-¹⁴C]glucose oxidation under hypoxia up to 50 min after the addition of LC-80. In contrast, a marked increase in ³H₂O production from [2-³H]glucose oxidation under hypoxia was observed, and LC-80 at concentrations of 0.5 and 1.0 mM caused further significant and concentration-dependent enhancement of ³H₂O production up to 50 min after the addition of LC-80. Moreover, LC-80 at a concentrations of 1.0 mM significantly restored the marked depression of pyruvate dehydrogenase complex activity and mitochondrial respiratory function under hypoxia. These results suggested that LC-80 has an improving effect on myocardial metabolism under ischemia by enhancing fatty acid and glucose metabolisms.

Keywords—carnitine (levocarnitine chrolide); mitochondrial function; rat heart homogenate; myocardial metabolism; [U-¹⁴C]palmitate oxidation; [U-¹⁴C]glucose oxidation; [2-³H]glucose oxidation; pyruvate dehydrogenase activity; hypoxia; ischemic heart disease

緒 言

1955 年, Fritz¹⁾ によって *L*-カルニチンが肝ホモジネートにおけるパルミチン酸の酸化を促進させることが報告されて以来, *L*-カルニチンは生体内において長鎖脂肪酸をミトコンドリアのマトリックス内の β 酸化の場所まで輸送するキャリアーとして重要な役割を担っていることが認められている。

他方, 1973 年に Engel ら²⁾ によって報告された筋カルニチン欠乏症 (myopathic carnitine deficiency) 及び 1975 年に Karpati ら³⁾ によって報告された全身性カルニチン欠乏症 (systemic carnitine deficiency) などの原発性カルニチン欠乏症 (primary carnitine deficiency) の患者においては, 筋肉内の遊離 *L*-カルニチンレベルが著しく低下しているために, これらの患者から採取した筋肉のホモジネートにおいては長鎖脂肪酸の酸化が抑制されており, その結果として脂肪沈着と筋力低下の生ずることが報告されている。さらに, 遺伝的な代謝障害⁴⁾やある種々の疾患⁵⁾においては, 二次的な *L*-カルニチン欠乏症 (secondary carnitine deficiency) の生じることが確認されており, 特に, 虚血又はヒポキシアの状態にある心筋では遊離 *L*-カルニチンレベルが著明に減少していると

ともに、脂肪酸の代謝異常が生じて長鎖アシル CoA や長鎖アシルカルニチンなどの脂肪酸中間代謝産物が蓄積することが報告されている。^{6,7)}

塩化レボカルニチン [(-)-(R)-(3-carboxy-2-hydroxypropyl)trimethylammonium chloride, LC-80]

(Fig. 1) は虚血心筋における遊離 L-カルニチンレベルの減少を抑制することにより、ミトコンドリア呼吸活性の低下を抑制して脂肪酸の代謝異常を阻止

し、心筋のエネルギー代謝を改善させることが動物試験において明らかにされている。^{6,7)} また、臨床試験においても LC-80 を投与した虚血性心疾患患者の運動耐容能は有意に上昇すること⁸⁾ など虚血性心疾患治療薬としての有用性が示唆されている。今回、我々は LC-80 の心筋エネルギー代謝改善作用について詳細な検討を行う目的で、ラット心筋ホモジネートを用いた *in vitro* の実験において、低酸素条件下での脂肪酸又はグルコース酸化に対する LC-80 の作用について検討したので報告する。

(-)-(R)-(3-carboxy-2-hydroxypropyl) trimethylammonium chloride (levocarnitine chloride; LC-80)

Fig. 1. Chemical Structure of LC-80

実験の部

実験材料

1. 実験動物 生後 8 週齢 (体重 300—350 g) の Sprague-Dawley 系雄性ラットを日本チャールスリバーより購入し、室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $60 \pm 5\%$ 、12 時間明暗サイクル (6:00 AM—6:00 PM) の人工環境下で固形飼料 (CRF-1, 日本オリエンタル酵母) 及び水道水を自由に摂取させて、少なくとも一週間以上飼育した後に使用した。

2. 使用薬物 LC-80 (金剛化学株式会社) は蒸留水に溶解後、KOH で中和 (pH 7.4) して使用した。なお、コントロールとして、1.0 mM の濃度の LC-80 水溶液を KOH で中和した際に生成すると考えられる 1.0 mM の濃度の KCl 溶液を使用した。その他、本実験では ATP (adenosine 5'-triphosphate, 和光純薬), ADP (adenosine 5'-diphosphate, 和光純薬), CoA (coenzyme A, Sigma), sucrose (和光純薬), BSA (bovine serum albumin; fraction V; fatty acid free, Pentex), mannitol (和光純薬), NAD (α -nicotinamideadenine dinucleotide, Sigma), TPP (thiamine pyrophosphate chloride, 和光純薬), HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, 和光純薬), TES [N-tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid, 和光純薬] などの試薬を用いた。また、酸化基質として $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ palmitic acid (800.0 mCi/mmol), $[\text{U-}^{14}\text{C}]$ glucose (265.0 mCi/mmol) 及び $[\text{1-}^{14}\text{C}]$ pyruvate (8.5 mCi/mmol) は New England Nuclear Corp. より、また、 $[\text{2-}^3\text{H}]$ glucose (29.1 Ci/mmol) は Amersham Corp. よりそれぞれ購入して使用した。なお、これらの標識化合物の放射化学的純度は 99.9% 以上であることを確認して使用した。

実験方法

1. 心筋ホモジネートの調製 ラットを sodium pentobarbital (40 mg/kg, i.p.) で麻酔した後、心臓を速やかに摘出し氷冷した生理的食塩液中で血管、左右心房及び右心室自由壁などを取り除いた。そして、左心室内及び心表面に付着している凝血塊を洗浄して取り除き水分を濾紙で十分に拭きとった後、左心室自由壁及び心室中隔の重量を測定した。なお、ラットの心臓摘出は非絶食下で行ったが、摘出時間及び心筋ホモジネートを調製する時間は実験毎に定時 (9:00 AM—10:00 AM) に行った。

Traeger ら⁹⁾の方法に従って、重量を測定した心筋に 10 倍容の homogenate medium (KCl 100 mM, TES 100 mM, MgSO_4 5 mM, ATP 1 mM, pH 7.4) を加え、ポリトロノホモジナイザーを用いて 30 秒間ホモジナイズした後、クボタ (KR/600P) 遠心機を用いて、 4°C で 800 rpm, 5 分間 ($500 \times g$) 遠心分離して得られた上清を心筋ホモジネートとして以下の実験に使用した。

心筋ホモジネートの蛋白量は BSA¹⁰⁾を標準として、ビュレット法により測定した。

2. 基質酸化反応の実験 (1) 基質の酸化—心筋ホモジネート (30—40 mg 蛋白/ml) 1.0 ml と incubation medium (KCl 140 mM, TES 100 mM, MgSO_4 5 mM, K_2HPO_4 16 mM, ATP 1 mM, ADP 2 mM, CoA 0.1 mM, sucrose 120 mM, pH 7.4) 0.8 ml を特別注文により作製した 2 個の側枝を有するワールブルグガラス受器 (新日本理科) に入れた。そして、恒温振盪器 (XY-1D, ヤマト) を用いて 37°C で 5 分間インキュベーションした後、受器の側枝に予め入れておいた基質溶液 200 μl を加えて反応を開始させ更にインキュベーションを 70 分間継続した。

反応を開始して 10, 20, 30, 40, 50, 60 及び 70 分後の各時間で生成するラベル代謝産物 ($^{14}\text{CO}_2$ 又は $^3\text{H}_2\text{O}$) は以下に述べる方法により測定した。なお、基質溶液として 7.5 mM palmitic acid と 40 mM glucose を一緒に蒸留水に溶解したものを使用した。脂肪酸の酸化について検討する場合には 7.5 mM の $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{palmitic acid}$ を 10% BSA と結合させた後蒸留水に溶解し、同時に非標識の 40 mM glucose を添加した。また、グルコースの酸化について検討する場合には、 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ 及び $[2\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$ をそれぞれ蒸留水に溶解し、同時に 10% BSA と結合させた非標識の 7.5 mM の palmitic acid を添加した。なお、これらの基質水溶液の放射活性は 2000000 dpm/ml とした。

(i) $^{14}\text{CO}_2$ の測定: 10 N H_2SO_4 を 250 μl 添加して基質酸化反応を停止させた後、ワールブルグ受器のウェル内に設置しておいた 25% phenethylamine を吸収させた濾紙に生成された $^{14}\text{CO}_2$ を 45 分間吸着させた。この濾紙に液体シンチレーションカクテル (ACS II, Amersham) 10 ml を加えて一夜放置した後、液体シンチレーションカウンター (460 型, パッカード) を用いて $^{14}\text{CO}_2$ を測定した。

(ii) $^3\text{H}_2\text{O}$ の測定: 10 N H_2SO_4 を 250 μl 添加して基質酸化反応を停止させた後、10 N NaOH を 200 μl 添加して pH を 5—6 に調整してクボタマイクロ遠心機 (KR-1500) を用いて、10000 rpm で 4 分間 ($9000 \times g$) 遠心分離を行い上清を得た。そして、Dowex-borate 樹脂 (200—100, Dowex) カラムを用いて、残っている $[2\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$ を吸着させることにより、 $^3\text{H}_2\text{O}$ のみを蒸留水で流出させた。この蒸留水に液体シンチレーションカクテル (ACS II, Amersham) 10 ml を加えて一夜放置した後、液体シンチレーションカウンター (460 型, パッカード) を用いて $^3\text{H}_2\text{O}$ を測定した。

(2) 実験プロトコール——通常の操作によって調製した心筋ホモジネートにおける各基質の酸化反応、すなわち正常酸素下での基質酸化反応 (正常酸素対照群) に対して、低酸素条件下での基質酸化反応 (低酸素群) を検討するために以下に述べる特別な操作によって心筋ホモジネートの調製及び基質の酸化反応を行った。

心筋ホモジネート調製の際に使用する homogenate medium 及び基質の酸化反応に使用する incubation medium, 更に薬物、試薬及び各基質を溶解した蒸留水などは予め窒素ガスを十分に通気して溶液内の酸素分圧が 0 mmHg になったことをデジタル pO_2 モニター (POG-202-SII, ユニークメデイカル) で確認した後を使用した。また、ラットの心臓摘出から心筋ホモジネートの調製及びワールブルグガラス受器に添加するまでの一連の実験操作については、窒素ガスを絶えず流入して低酸素の状態にした大型無菌箱 (山陽器材) の中で行うとともに、インキュベーションの途中で添加する各基質及び LC-80 又は KCl 溶液はワールブルグガラス受器の 2 つの側枝にそれぞれ予め入れておくことにより、基質酸化反応を開始して停止させるまでの間受器の栓は一度も開けることなく実験を行った。

このように、今回の実験では人工的に可能な限り低酸素にした条件下における基質の酸化反応について検討した。なお、0.5 mM 及び 1.0 mM の濃度の LC-80 (LC-80 群), 又はその対照群である 1.0 mM の濃度の対照群 (KCl 溶液) は低酸素条件下で基質酸化反応を開始して 20 分後に添加した。そして、添加後は 10 分毎に 50 分後までラベル化合物の生成を測定した。

3. その他の実験 (1) Pyruvate Dehydrogenase 複合体 (PDHC) 活性の測定——Graziella ら¹¹⁾の方法に従って、心筋ホモジネートを日立遠心機 (SCR20BA) を用いて、8500 rpm で 4 分間 ($11600 \times g$) 遠心分離して得られた粗ミトコンドリア分画を 10 倍容の reaction medium (NAD 2.5 mM, CoA 1 mM, TPP 0.3 mM, KH_2PO_4 10 mM, MgCl_2 10 mM, β -mercaptoethanol 10 mM, CaCl_2 1 mM, HEPES-KOH 30 mM, pH 8.0) に懸濁した。そして、その懸濁液 2 ml をワールブルグガラス受器に入れて恒温振盪器 (XY-1D, ヤマト) を用いて 37°C で 4 分間インキュベーションした後、受器の側枝に予め入れておいた $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{pyruvate}$ 溶液を 200 μl 添加して更に 10 分間のインキュベーションを行った。反応の停止及び生成する $^{14}\text{CO}_2$ の測定は実験方法 2. の (i) の場合と全く同様に行った。実験は実験方法 2. における実験と同様に正常酸素対照群及び低酸素群について検討し、LC-80 1.0 mM 又は 1.0 mM KCl 溶液は $[1\text{-}^{14}\text{C}]\text{pyruvate}$ 溶液の添加と同時に受器のもう一方の側枝から添加した。

(2) ミトコンドリア呼吸活性の測定——非標識の 0.75 mM palmitate 及び 4 mM glucose を基質として添加 30 分後の心筋ホモジネートを 8500 rpm で 4 分間遠心分離して粗ミトコンドリア分画を得た。この粗ミトコンドリア分画を isolation medium (mannitol 225 mM, saccharose 75 mM, Trizma base 10 mM, EGTA-4H 1 mM pH 7.4) で 2 回洗浄した後、reaction medium (KCl 10 mM, KH_2PO_4 5 mM, K_2HPO_4 5 mM, mannitol 300 mM, Trizma base 10 mM, EDTA-4H 0.2 mM pH 7.4) に懸濁して呼吸活性の測定に用いた。

実験は実験方法 2. における実験と同様に、正常酸素対照群及び低酸素群について検討し、LC-80 1.0 mM 又は 1.0 mM KCl 溶液は基質溶液の添加 20 分後に受器のもう一方の側枝から添加した。

ミトコンドリアの状態 3 (state 3) 及び状態 4 (state 4) における酸素消費速度は自記呼吸酸素測定装置 (PO-100A 型, 柳本製作所) を用いて測定し, 呼吸活性のパラメーターとして呼吸調節率 (RCR) 及び ADP/O 比を次式に従って算出した。

$$\text{RCR} = \text{state 3 酸素消費速度 (n atoms/min/mg 蛋白)} / \text{state 4 酸素消費速度 (n atoms/min/mg 蛋白)}$$

$$\text{ADP/O 比} = \text{添加した ADP 濃度 (100 nmol)} / \text{state 3 で消費された酸素原子量 (n atoms)}$$

ミトコンドリアの蛋白量は BSA¹⁰⁾ を標準としてビュレット法により測定した。

4. 統計学的処理 実験の成績は平均±標準誤差で示し, 有意差検定には対応のない Student's *t*-test 法を用いて行い, $p < 0.05$ の場合を有意な変化とみなした。

結 果

1. [U-¹⁴C]Palmitate の酸化に対する作用

正常酸素対照群における ¹⁴CO₂ の生成量は, [U-¹⁴C]palmitate で標識された基質溶液の添加直後より 40 分後までインキュベーション時間の経過とともにほぼ直線的に著明な増加を示した (Fig. 2). そして, 50 分から 70 分後における ¹⁴CO₂ 生成量の増加はやや低下したもののプラトーに達することなく更に増加することが認められ, 総生成量 (70 分後における ¹⁴CO₂ の生成量) は 2.63 (μmol/100 mg 蛋白) 前後の値を示した。

他方, 低酸素群においては基質溶液を添加して 20 分後までの ¹⁴CO₂ 生成量は正常酸素対照群に比較すると有意に低下しており, この状態に 1.0 mM の KCl を添加しても添加 20 分後にはすでにプラトーに達し, ¹⁴CO₂ の総生成量 (KCl 添加 50 分後における ¹⁴CO₂ の生成量) は正常酸素対照群のわずか 37% 程度の値を示したにすぎなかった。しかしながら, LC-80 群においては, LC-80 の添加 10 分より 50 分後まで ¹⁴CO₂ の生成量は対照群に比較すると濃度依存的に有意な増加を示し, ¹⁴CO₂ の総生成量 (LC-80 添加 50 分後における ¹⁴CO₂ の生成量) は LC-80 の 0.5 mM 及び 1.0 mM の濃度でそれぞれ対照群の 1.4 倍及び 1.7 倍程度の増加を示した。

2. [U-¹⁴C]Glucose の酸化に対する作用

正常酸素対照群における ¹⁴CO₂ の生成量は, [U-¹⁴C]glucose で標識された基質溶液の添加直後より 70 分後までインキュベーション時間の経過に従ってほぼ直線的に著明な増加を示した。しかし, 総生成量は, 7.4 (μmol/100 mg 蛋白) 前後の値しか認められず, [U-¹⁴C]palmitate 酸化におけるそれと比較するとわずか 5% 程度の生成量にすぎなかった (Fig. 3)。

Fig. 2. The Effects of LC-80 on the [U-¹⁴C]-Palmitate Oxidation under Normoxic or Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Hearts

The point of the arrow represents the addition of KCl or LC-80 in homogenates. Each points in the figure represents the mean±S.E. of 6 rats.

a) $p < 0.01$, significant differences from the KCl treated group; b) $p < 0.01$, significant differences from the normoxic group.

○, normoxic group. Hypoxic group: ●, KCl 1.0 mM; ▲, LC-80 0.5 mM; ■, LC-80 1.0 mM.

Fig. 3. The Effects of LC-80 on the [U-¹⁴C]-Glucose Oxidation under Normoxic or Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Hearts

The point of the arrow represents the addition of KCl or LC-80 in homogenates. Each points in the figure represents the mean±S.E. of 6 rats.

a) $p < 0.01$, significant differences from the KCl treated group; b) $p < 0.01$, significant differences from the normoxic group.

○, normoxic group. Hypoxic group: ●, KCl 1.0 mM; ▲, LC-80 0.5 mM; ■, LC-80 1.0 mM.

他方、低酸素群においては基質溶液を添加して 20 分後までの $^{14}\text{CO}_2$ 生成量は正常酸素対照群に比較すると [U- ^{14}C]palmitate 酸化の場合と同様に有意な低下を示した。その後、1.0 mM の KCl を添加しても $^{14}\text{CO}_2$ の生成量は正常酸素対照群に比較すると有意に低い値を示したままであったが、[U- ^{14}C]palmitate 酸化の場合とは異なって添加 50 分後においてもプラトーに達することなく軽度ではあるが増加が続いた。また総生成量の低下の割合も正常酸素対照群の 46% 程度であり、[U- ^{14}C]palmitate 酸化の場合 (63%) に比較すると明らかに軽度であった。つぎに、LC-80 群においては、0.5 mM の LC-80 添加後における $^{14}\text{CO}_2$ 生成量はやや増加する傾向を示したものの対照群との間に有意差は認められなかった。しかし、1.0 mM の LC-80 添加によって添加 10 分から 50 分後までの $^{14}\text{CO}_2$ 生成量は対照群に比較して有意に増加することが認められ、総生成量は対照群の 1.4 倍程度の増加を示した。

3. [2- ^3H]Glucose の酸化に対する作用

正常酸素対照群における $^3\text{H}_2\text{O}$ の生成量は、[2- ^3H]glucose で標識された基質溶液の添加直後より 70 分後までプラトーに達することなくインキュベーション時間の経過に従ってほぼ直線的に増加することが認められ、総生成量は $2.4(\mu\text{mol}/100 \text{ mg 蛋白})$ 前後の値を示した (Fig. 4)。

他方、低酸素群においては、[U- ^{14}C]palmitate 及び [U- ^{14}C]glucose の酸化の場合とは逆に基質溶液を添加して 20 分後までの $^3\text{H}_2\text{O}$ 生成量は正常酸素対照群に比較すると有意な増加を示した。その後、1.0 mM の KCl を添加しても添加 20 分後までの $^3\text{H}_2\text{O}$ 生成量は更に直線的に有意な増加を示したが、30 分後にはほぼプラトーに達した。しかし、 $^3\text{H}_2\text{O}$ の総生成量は正常酸素対照群の 2.2 倍にも達した。つぎに、LC-80 群においては、LC-80 添加後の $^3\text{H}_2\text{O}$ 生成量の増加は対照群よりも有意に大きく、添加 10 分より 50 分後までプラトーに達することなく濃度依存性に著明な増加を示した。特に、1.0 mM の LC-80 添加による $^3\text{H}_2\text{O}$ の総生成量は正常酸素対照群の 3.4 倍程度及び対照群の 1.5 倍程度の増加を示した。

4. PDHC 活性に対する作用

正常酸素対照群における [1- ^{14}C]pyruvate からの $^{14}\text{CO}_2$ 生成量に比較して、低酸素群における対照群では 35% 程度の有意な生成量の低下が認められた。一方、LC-80 の 1.0 mM 群においては、対照群とは逆に正常酸素対照群の 1.2 倍程度の有意に高い $^{14}\text{CO}_2$ の生成量が認められた (Fig. 5)。

Fig. 4. The Effects of LC-80 on the [2- ^3H]Glucose Oxidation under Normoxic or Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Hearts

The point of the arrow represents the addition of KCl or LC-80 in homogenates. Each point in the figure represents the mean $\pm$ S.E. of 6 rats.

a) $p < 0.01$, significant differences from the KCl treated group; b) $p < 0.01$, significant differences from the normoxic group.

○, normoxic group. Hypoxic group: ●, KCl 1.0 mM; ▲, LC-80 0.5 mM; ■, LC-80 1.0 mM.

Fig. 5. The Effects of LC-80 on the [1- ^{14}C]Pyruvate Oxidation under Normoxic or Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Hearts

Each bar in the figure represents the mean $\pm$ S.E. of 5 rats.

a) $p < 0.01$, significant differences from the KCl treated group; b) $p < 0.01$, significant differences from the normoxic group.

Fig. 6. The Effects of LC-80 on the Mitochondrial Respiratory Function under Normoxic or Hypoxic Condition in Homogenates from Rat Hearts

Each bar in the figure represents the mean $\pm$ S.E. of 6 rats.

a) $p < 0.05$, b) $p < 0.01$, significant differences from the KCl treated group, c) $p < 0.01$, significant differences from the normoxic group. QO₂, oxygen consumption in state 3; RCR, respiratory control ratio.

5. ミトコンドリア呼吸活性に対する作用

正常酸素対照群におけるミトコンドリア呼吸活性と比較し、低酸素群における対照群は呼吸活性を示すパラメーターである状態 3 における酸素消費速度、RCR 及び ADP/O 比のいずれについても有意な低下を示した (Fig. 6).

しかし、LC-80 の 1.0 mM 群においては、対照群と比較すると状態 3 における酸素消費速度、RCR 及び ADP/O 比のいずれのパラメーターも有意に高値を示し、正常酸素対照群と比較しても RCR のみが 22% 程度の有意な低下を示しただけで、他の 2 つのパラメーターについては、ほぼ同程度の値を示した。

考 察

長鎖脂肪酸をミトコンドリアのマトリックス内へ輸送するキャリアーである *L*-カルニチンは遊離脂肪酸を主要なエネルギー源として好氣的なエネルギー代謝を営んでいる心筋や骨格筋 (赤筋) において高濃度存在しており、組織内酸素濃度が正常な場合には長鎖脂肪酸の酸化を促進させることが報告されている。¹²⁾

他方、虚血又は低酸素状態に陥った心筋においては遊離 *L*-カルニチンレベルが著明に低下しているとともに、組織内酸素濃度の低下によるミトコンドリアの酸化的リン酸化機構の障害によって蓄積した reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) が β -酸化を抑制するために脂肪酸の酸化が抑制され、長鎖アシル CoA や長鎖アシルカルニチンなどの脂肪酸中間代謝産物が異常に増加することが知られている。^{6,7)} したがって、今回、組織内酸素濃度の低下した心筋における脂肪酸又は糖の代謝に対して *L*-カルニチン (LC-80) がどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的で、ラット心筋ホモジネートを用いて低酸素条件下における 3 種類の標識された基質の酸化に対する LC-80 の作用について検討した。

全身に血液を送るポンプとして休むことなく収縮と弛緩を繰り返している心臓は大量のエネルギーを必要とする組織であり、そのためにエネルギー源として遊離脂肪酸をはじめブドウ糖、乳酸及びアミノ酸まで基質として貪欲に利用するが、好氣的条件下においてこれらの基質が利用される割合は遊離脂肪酸、ブドウ糖及び乳酸でそれぞれおよそ 60%, 30% 及び 10% であり、遊離脂肪酸は糖質類に優先して酸化されることが知られている。¹³⁾ このことは、基質として 0.75 mM palmitate と 4 mM glucose を一緒に使用した今回の実験においても確認された。すなわち、正常酸素対照群において [U-¹⁴C]glucose の酸化によって生成される ¹⁴CO₂ の量は [U-¹⁴C]-palmitate の酸化によって生成されるそれに比較するとわずか 5% 程度にすぎないという結果が得られ、心筋ホモジネートによる実験ではあるが好氣的条件下ではエネルギー源として糖に優先して脂肪酸が利用されるという心筋エネルギー代謝系の特徴と考えられる結果であった。

また心筋ホモジネートに加えた incubation medium の成分として遊離 CoA は充分な量を添加したのに対して、L-カルニチンは全く添加しなかったにもかかわらず、[U-¹⁴C]palmitate の添加 70 分後においても ¹⁴CO₂ の生成量は依然として増加していたことから、70 分間のインキュベーション時間においても [U-¹⁴C]palmitate の酸化に必要な遊離 L-カルニチン濃度は心筋組織内に充分存在していることが推測された。なお、今回の実験では、実験方法の項で述べたごとく心筋ホモジネートの調製に使用した溶液及び基質や薬物などの溶解に使用した蒸留水はすべて窒素ガスを充分に通気して酸素分圧を 0 mmHg とし、また、心筋摘出から心筋ホモジネート調製までの全実験操作を窒素ガスを絶えず流入させて低酸素状態とした大型無菌箱内で行い、さらに、インキュベーション中も栓を全く開けることなく基質や薬物を添加できるように工夫されたワールブルグ受器を用いて実験を行ったので、外部から供給される酸素は全く無く、基質の酸化に使用される酸素は心筋組織内にわずかに残存するものだけであると考えられるところから実験の条件設定を低酸素であるとした。

そして、この方法によって作製した低酸素条件下で、低酸素群（対照群）における [U-¹⁴C]palmitate 及び [U-¹⁴C]glucose の酸化は正常酸素対照群に比較するといずれも有意に抑制されたにもかかわらず、[U-¹⁴C]glucose の酸化による ¹⁴CO₂ 生成量の低下の割合は正常酸素対照群の 46% 程度であったのに対し、[U-¹⁴C]palmitate の酸化によるそれは 63% にも達したこと、また、[U-¹⁴C]palmitate の添加 40 分後には ¹⁴CO₂ の生成量がすでにプラトーに達してしまっただけでなく、虚血又は低酸素時における心筋エネルギー代謝の障害は糖代謝よりも脂肪酸代謝において強く発現することが示唆された。

前述のごとく、虚血又は低酸素に陥った心筋において異常に蓄積する長鎖アシル CoA や長鎖アシルカルニチンなどの脂肪酸中間代謝産物による有害作用についてはよく知られており、特に長鎖アシル CoA についてはミトコンドリア内から細胞質への ATP 転送を調節しているアデニンヌクレオチド転移酵素 (adenine nucleotide translocase)¹⁴⁾ や TCA サイクルにおいて重要な働きをしている citrate synthase,¹⁵⁾ glutamate dehydrogenase,¹⁶⁾ malate dehydrogenase¹⁶⁾ などの酵素、更には acetyl CoA carboxylase,¹⁷⁾ fatty acyl CoA synthetase¹⁸⁾ 及び carnitine acyltransferase¹⁹⁾ など種々の脂肪酸代謝系酵素の活性を特異的に阻害すること、更に心筋細胞膜の Na⁺-K⁺ ATPase 活性を阻害すること²⁰⁾ 及びミトコンドリアにおける酸化的リン酸化機構を抑制すること²¹⁾ など様々な有害作用を示すことが報告されている。

すなわち、Fig. 7 に示すごとく低酸素群（対照群）では組織内酸素濃度の減少により蓄積した NADH によって β-酸化が抑制され、その結果として異常に増加した palmitoyl CoA による上述の種々の有害作用のために [U-¹⁴C]palmitate 及び [U-¹⁴C]glucose の酸化が抑制されることが推測される。特に、palmitoyl CoA による有害作用のうち脂肪酸代謝系に関連する酵素活性の阻害作用によって糖代謝よりも脂肪酸代謝の方が強く抑制されるという今回の実験結果が得られたものと考えられた。一方、低酸素群において LC-80 を添加すると [U-¹⁴C]palmitate 及び [U-¹⁴C]glucose の酸化は濃度依存性に有意に促進されることが認められた。今回の実験では心筋ホモジネート中の遊離 L-カルニチン及び脂肪酸中間代謝産物の濃度を測定していないので、低酸素群（対照群）で遊離 L-カルニチン濃度の減少と脂肪酸中間代謝産物濃度の増加が惹起され、また、LC-80 の添加によって脂肪酸中間代謝産物が抑制されるかどうか明らかではないものの、LC-80 の添加によって [U-¹⁴C]palmitate 及び [U-¹⁴C]glucose の酸化が明らかに促進されたことのメカニズムとして、心筋ホモジネート中の遊離 L-カルニチン濃度の増加によって脂肪酸中間代謝産物の異常な増加、特に palmitoyl CoA の増加が抑制されて上述の種々の有害作用が阻止されたことによるものであることが推測された。Shug ら⁶⁾ 及び Suzuki ら⁷⁾ も麻酔イヌを用いた急性冠不全実験において、L-カルニチンを前投与して虚血心筋内の遊離 L-カルニチンレベルの低下を阻止することにより長鎖アシル CoA 及び長鎖アシルカルニチンレベルの増加は有意に抑制されるとともに、アデニンヌクレオチド転移酵素活性の低下と ATP 及びクレアチンリン酸レベルの低下が抑制されることを報告しており、L-カルニチンの虚血心筋に対する薬理効果のメカニズムとして心筋内遊離 L-カルニチンの減少を是正することによる脂肪酸中間代謝産物の蓄積阻止という虚血心筋の代謝改善作用で説明している。

さらに最近、L-カルニチンによるアシル CoA 蓄積阻止のメカニズムについて新しい概念が提唱されている。すなわち、L-カルニチンの生体内における役割として従来よりよく知られている長鎖脂肪酸のアシル基をミトコンドリアマトリックス内へ輸送するキャリアーとしての働き以外に、ミトコンドリア内における [アシル CoA/CoA] 比を調節する modulator としての役割が指摘されている。²²⁾ これは、何らかの原因によってミトコンドリ

Fig. 7. The Schema Showing the Pathway of Myocardium Metabolism under Ischemia and the Improving Effect of LC-80 on Ischemic Myocardial Metabolism

—, normal process; ·····, abnormal process; -||-, inhibition.

Pal. CoA, palmitoyl CoA; Pal. Car., palmitoylcarnitine; Acet. CoA, acetyl CoA; Acet. Car., acetylcarnitine; ANT, adenine nucleotide translocase; CT, carnitine translocase; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CAT, carnitine acetyltransferase; PDHC, pyruvate dehydrogenase complex.

ア内で異常にアシル CoA 濃度が増加した場合、遊離の L-カルニチンが一定濃度以上存在すればカルニチンアシルトランスフェラーゼの働きにより $[\text{アシル CoA}] + [\text{カルニチン}] \rightleftharpoons [\text{アシルカルニチン}] + [\text{CoA}]$ の平衡反応が右方へ移動し L-カルニチンはアシル CoA と結合してアシルカルニチンとなりミトコンドリア外へ運び出されるた

めにアシル CoA の濃度が減少するとともに、TCA サイクルなどの主要な代謝系において重要な役割をはたしている遊離 CoA 濃度が増加するのでエネルギー代謝が促進されると同時にミトコンドリア呼吸活性も改善されて ATP の産生が回復してくるというメカニズムである。この L-カルニチンの新しい生体内における機能は、遺伝的に有機酸を代謝する酵素が欠損しているために、肝などのミトコンドリア内でアシル CoA が異常に増加していることが推測されている有機酸代謝異常症の患者に L-カルニチンを投与すると、血中及び尿中のアシルカルニチン排泄量が著明に増加するという事実からも裏づけられている。^{23,24)}

したがって、今回の実験において LC-80 が低酸素条件下で脂肪酸及び糖代謝を促進させたこと、更にミトコンドリア呼吸活性の低下についても明らかに抑制したことの作用メカニズムとして、[アシル CoA/CoA] 比を正常状態に調節する modulator としての作用、換言すればエネルギー代謝及びミトコンドリア呼吸機能にとって有害なアシル基を排泄して消去する scavenger としての作用メカニズムが推測されたが、このことを明らかにするためには今後さらに詳細な研究が必要であろう。さらに、今回の実験では各基質の酸化反応終了時までワールブルグ受器の栓を全く開けていないことから、LC-80 が低酸素条件下で脂肪酸及び糖の代謝を顕著に促進させたことは、虚血又は低酸素時の心筋において少量の限られた組織内酸素濃度を有効に利用してエネルギー代謝を改善させる作用、すなわち外部からの酸素供給が無い場合にも残っている酸素だけを有効に利用してエネルギー代謝を促進させるという作用を有することも示唆された。

つぎに、心筋が虚血又は低酸素の状態に陥ると、エネルギー代謝は好氣的代謝から嫌氣的代謝の方向へ傾くために嫌氣的解糖系が亢進し代償的な ATP 産生の行われることが知られている。²⁵⁾ 我々の実験結果でも、正常酸素対照群に比較して低酸素群 (対照群) では $[2\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$ の酸化が促進されて $^3\text{H}_2\text{O}$ の生成量が著明に増加することが認められた。そして、この $^3\text{H}_2\text{O}$ 生成量の増加は LC-80 を添加することによって更に促進されることが認められたことから、LC-80 は好氣的なエネルギー代謝だけでなく嫌氣的解糖系についても亢進させることが示唆された。この結果について更に詳細な検討を行う目的で、嫌氣的解糖系で生成された pyruvate を acetyl CoA へと変換させる酵素である PDHC 活性に対する LC-80 の作用について検討を行った。その結果、低酸素の条件下で著明に低下した PDHC 活性は LC-80 を添加することによって有意に回復することが認められた。

この結果からはつぎのことが推測される。すなわち、Fig. 7 に示すごとく虚血又は低酸素によってエネルギー代謝が好氣的代謝から嫌氣的代謝の方向へと傾いて嫌氣的解糖系が亢進した心筋では、ミトコンドリアにおける TCA サイクルが抑制されているためにアセチル CoA が蓄積するとともに [アセチル CoA/CoA] 比が増加しており、この増加した [アセチル CoA/CoA] 比によって PDHC 活性が抑制される結果として pyruvate からの乳酸産生が増加することが知られている。これに対し、心筋内の遊離 L-カルニチン濃度が増加すると先述の modulator としての作用によって、増加したアセチル基はアセチルカルニチンとしてミトコンドリア外へ除去されるので [アセチル CoA/CoA] 比が低下して PDHC が再び活性化されるために、乳酸の産生が抑制されるとともに pyruvate の TCA サイクルへの流入もスムーズとなり、結果的に嫌氣的解糖系及び糖代謝全体が促進されることが考えられる。

桐本ら²⁶⁾も麻酔開胸イヌを用いて高 FFA 血症下に人工呼吸の回数を減少させることによって低酸素の状態とした心臓において、乳酸の冠動・静脈血濃度較差は L-カルニチンを静脈内投与することによって有意に抑制されたことから、L-カルニチンは虚血心筋における嫌氣的エネルギー代謝を抑制して乳酸産生を阻止することを報告している。

なお、嫌氣的エネルギー代謝の亢進によって産生された乳酸は、解糖系に働く種々の重要な酵素活性を阻害すること²⁷⁾及びミトコンドリアの酸化的リン酸化機構を抑制すること²⁸⁾など虚血心筋に対して様々な有害作用を及ぼすことが知られている。したがって、LC-80 によって糖代謝が促進されたことは、代償的に ATP の産生を促進させる作用以外に虚血心筋にとって有害な乳酸の蓄積阻止という作用も LC-80 によるエネルギー代謝の改善作用に関与している可能性が示唆された。

以上、ラット心筋ホモジネートを用いて低酸素の条件下で $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{palmitate}$ 、 $[\text{U-}^{14}\text{C}]\text{glucose}$ 及び $[2\text{-}^3\text{H}]\text{glucose}$ の酸化に対する LC-80 の作用について検討した結果、LC-80 は脂肪酸代謝の改善作用だけでなく糖代謝の促進作用も示した。したがって、今回の実験結果から、LC-80 は虚血又は低酸素時における心筋のエネルギー代謝を改善させる作用を有することが明らかとなり、虚血性心疾患治療薬として有用であることが強く示唆された。

引用文献

- 1) I. B. Fritz, *Am. J. Physiol.*, **197**, 297 (1959).
- 2) A. G. Engel, C. Angelini, *Science*, **179**, 899 (1973).
- 3) G. Karpati, S. Carpenter, A. G. Engel, G. Watters, J. Allen, S. Rothman, G. Klassen, O. A. Mamer, *Neurology*, **25**, 16 (1974).
- 4) S. M. Matsui, M. J. Mahoney, L. E. Rosenberg, *N. Engl. J. Med.*, **308**, 857 (1983).
- 5) D. A. Stumpf, W. D. Parker, C. Angelini, *Neurology*, **35**, 1041 (1985).
- 6) A. L. Shug, J. H. Thomsen, J. D. Foltz, N. Bittar, M. I. Klein, J. R. Koke, P. J. Huth, *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 25 (1978).
- 7) Y. Suzuki, T. Kamikawa, N. Yamazaki, *Jpn. Heart J.*, **22**, 377 (1981).
- 8) 吉利 和, 他, 臨床薬理, **20**, 687 (1989).
- 9) L. Traeger, D. W. Edington, *Exp. Aging Res.*, **9**, 3 (1983).
- 10) G. C. Webster, *Biochem. Biophys. Acta*, **207**, 317 (1970).
- 11) V. Graziella, B. Gravaglia, S. DiDonato, *Muscle Nerve*, **11**, 720 (1988).
- 12) T. Bohmer, P. Molstad, "Carnitine Biosynthesis, Metabolism, Function," Ed. by R. A. Frenkel, J. D. McGarry, Academic Press, New York and London, 1980, p. 73.
- 13) J. R. Neely, H. E. Morgan, *Annu. Rev. Physiol.*, **36**, 413 (1974).
- 14) A. L. Shug, E. Shrago, N. Bittar, J. D. Folts, J. R. Koke, *Am. J. Physiol.*, **228**, 689 (1975).
- 15) O. Wieland, L. Weiss, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **13**, 26 (1963).
- 16) A. Kawaguchi, K. Bloch, *J. Biol. Chem.*, **251**, 1406 (1976).
- 17) W. M. Bortz, F. Lynen, *Biochem. Z.*, **337**, 505 (1963).
- 18) J. F. Oram, J. A. Idell-Wenger, J. R. Neely, *J. Biol. Chem.*, **250**, 73 (1975).
- 19) J. Bremer, K. R. Nourum, *J. Biol. Chem.*, **242**, 744 (1967).
- 20) J. M. Wood, B. Bush, B. J. R. Pitts, A. Schwartz, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 677 (1977).
- 21) J. M. Wood, E. T. Wallick, A. Schwartz, *Biochem. Biophys. Acta*, **486**, 331 (1977).
- 22) E. P. Brass, R. A. Beyerinck, *Biochem. J.*, **250**, 819 (1988).
- 23) D. W. Secombe, F. Snyder, H. G. Persons, *Lancet*, **II**, 1401 (1982).
- 24) S. DiDonato, M. Rimoldi, B. Garavaglia, G. Vziel, *Clin. Chim. Acta*, **139**, 13 (1984).
- 25) A. J. Liedtke, S. H. Nellis, L. F. Whitesell, C. Q. Mahar, *Am. J. Physiol.*, **243**, H691 (1982).
- 26) 桐本 吏, 大谷かおり, 山田博明, 藤澤茂樹, 弘中 豊, 日薬理誌, **93**, 119 (1989).
- 27) M. J. Rovetto, W. F. Camberton, J. R. Neely, *Circ. Res.*, **37**, 742 (1975).
- 28) L. C. Armiger, J. B. Gavin, P. B. Herdson, *Lab. Invest.*, **31**, 29 (1974).