



〈特集：企業セミナー（第33回年次学術集会より）〉

酵素サイクリング法を原理としたカルニチン測定試薬の紹介

伊藤 美夏瀬

Introduction of carnitine measurement reagents for highly sensitive enzymatic cycling

Minase Ito

Summary Carnitine is a low-molecular-weight compound that is essential for the transport of long-chain fatty acids to the mitochondrial inner membrane and plays an important role in energy metabolism in vivo. Carnitine deficiency reduces mitochondrial ATP production and causes various clinical symptoms, such as hypoglycemia, cardiomyopathy, myasthenia, fatigue, and muscle cramps. Carnitine deficiency is known to occur in patients undergoing long-term hemodialysis, in patients receiving drugs such as valproic acid, or in children on enteral nutrition. If clinical symptoms are observed and other clear causes are ruled out, carnitine deficiency should be suspected. T-Carnitine Reagent Kainos and F-Carnitine Reagent Kainos are in vitro diagnostic reagents available for highly sensitive enzymatic cycling, and can be used with a general-purpose automated analyzer to measure total carnitine and free carnitine levels. Assessment of total carnitine and free carnitine levels using these reagents contributes to the diagnosis of carnitine deficiency by the blood carnitine fractionation test.

Key words: Total carnitine, Free carnitine, Acyl carnitine, Carnitine deficiency, Principle of enzyme cycling method, β -oxidation

I. はじめに

1. カルニチンの発見と検査のあゆみ

カルニチン(Carnitine)は、1905年にロシアの科学者により牛の筋肉抽出液中から発見された。1960年代から1980年代にかけて生理作用や治療に対する有効性が確認され、本邦では、1990年にL-カルニチン製剤が発売され、特定症例（プロピオン酸血症およびメチルマロン酸血

症）に対する適用が承認された。さらに2011年には「カルニチン欠乏症」へ適応が拡大され、様々な原因によるカルニチン欠乏症に対する治療薬として使用されている。

カルニチン検査としては、2012年に「先天性代謝異常症が強く疑われた患者」に対して「タンデムマスを用いた血中カルニチン分析」が保険収載された。2016年には小児科学会が中心となり「カルニチン欠乏症の診断・治療指針

株式会社カイノス 学術部
〒113-0033 東京都文京区本郷2-38-18
Tel :+81-3-3816-4480
Fax:+81-3-3816-6544
URL : <http://www.kainos.co.jp>

KAINOS Laboratories, Inc.
38-18, Hongo 2-chome, Bunkyo-ku, Tokyo,
113-0033, JAPAN

2016¹⁾」が作成され、カルニチン欠乏症の診断基準が明確になると共に、臨床に有用な検査法として酵素サイクリング法を用いた「カルニチン2分画検査」が報告された。この酵素サイクリング法によるカルニチン測定は、当社が1993年に自動分析装置で測定可能な研究用試薬として開発・発売したものであり、2018年2月に「血中カルニチン2分画検査」が保険収載されたことで、小児の経腸栄養管理患者、人工乳もしくは治療用特殊ミルクを使用している小児患者、透析患者やバルプロ酸投与患者のカルニチン欠乏症について保険適用された。現在は同年11月に公表された「カルニチン欠乏症の診断・治療指針 2018²⁾」に従い、血中カルニチンの検査が実施されている。

2. カルニチンとは

カルニチンは分子量161.2の低分子化合物で、生物学的活性をもつL体と拮抗作用をもつD体の2つの構造体が存在し、脂肪酸代謝に必須なビタミン様物質である(Fig. 1)。カルニチン必要量の25%が肝臓や腎臓で、必須アミノ酸のリジンとメチオニンから生合成され、残りの75%は食事により供給される。カルニチンは、ラム・マトン・ランプなどの赤身の肉類や魚、乳製品などに豊富に含まれる。このため、肝機能・腎機能の低下やカルニチンを含む食品の摂取が十分でない場合、カルニチン欠乏症を起こす可能性がある。

生体内でカルニチンは「脂肪酸と結合していない遊離カルニチン(Free carnitine, F-Car)」と「脂肪酸とエステル結合しているアシルカルニチン(Acylcarnitine, A-Car)」の2つの形態で存在している。F-Carと脂肪酸のエステル結合はカルニチンアシルトランスフェラーゼによって触媒さ

れ、アシル基が可逆的にcoenzyme A (CoA)とカルニチンの間を転移する。A-Carのアシル基の炭素数の違いは、種々の有機酸代謝異常症、脂肪酸代謝異常症では疾患に特異的なアシル基のA-Carが上昇するため、疾患の鑑別の際に重要視されている。

生体内に存在するカルニチンの約98%は骨格筋と心筋の筋肉中に貯蔵されるため、骨格筋量が少ない乳幼児、女性、高齢者、重症心身障害児(者)、サルコペニアや悪液質を伴った患者は体内カルニチンプールが少なく、カルニチン欠乏症に陥りやすいとされる。それ以外にカルニチンは、肝臓、腎臓に約1.6%、細胞外液中に約0.6%と少量ながら存在する。

カルニチンは腎臓から尿中を経由して排泄される。その際、L-カルニチンの90%以上が腎尿細管のカルニチントランスポーターにより再吸収されるが、A-Carは多くが再吸収されず尿中に排泄される。この腎尿細管でのF-Carの再吸収障害は、生体のホメオスタシスに大きな影響を与える。

3. カルニチンの働き

カルニチンは現在までに、4つの生理作用があることが報告されている^{3,4)}。

1つめは、脂肪酸代謝における長鎖脂肪酸のミトコンドリア内への輸送である。

カルニチンは長鎖脂肪酸のミトコンドリアマトリックス内への輸送に必須な物質であり、長鎖脂肪酸の酸化によるエネルギー代謝(ATP産生)にとって極めて重要な物質といえる。

2つめは、細胞毒であるアシル化合物をカルニチンエステルとして細胞内より除去し尿中へ排泄する働きである。

アシル化合物(例えばプロピオン酸血症におけるプロピオニルCoAなど)の蓄積はミトコンドリア内の様々な酵素反応を阻害し、細胞毒性を発揮する。生体はアシルCoAのアシル基をA-Carとして細胞内より除去し最終的に尿中へ排泄しており、F-Carは内在性の解毒剤の役割をもっている。

3つめは、ミトコンドリア内のCoA/acyl-CoAの比率調整である。

カルニチンはアシルCoAからアシル基を受け取ることで遊離CoAを供給する。カルニチ

L-カルニチン (遊離カルニチン)

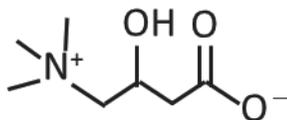


Fig. 1 カルニチン構造式

ンが欠乏し遊離CoA プールが維持できなくなると、脂肪酸代謝だけではなく、糖新生、尿素回路、解糖系、TCA 回路などにも悪影響を与える。

4つめは、スーパーオキシドディスムターゼ(Superoxide dismutase, SOD)などの抗酸化酵素の発現増強作用、アポトーシス抑制作用などにより、抗酸化作用、抗炎症作用、生体膜安定化作用、線維化抑制作用などを発揮することである。これは近年になって見いだされたカルニチンの作用で、カルニチン欠乏によってこれらの作用が減弱して発症する病態などが注目されている。

カルニチンが欠乏すると、ミトコンドリア内のATP産生が低下し、低血糖、心筋症、筋無力症、疲労感、筋痙攣などの臨床症状が引き起こされる他、脂肪酸酸化障害による脂肪肝、肝肥大、また、尿素サイクル停止による高アンモニア血症から、脳症を起こす危険性がある。

これらの臨床症状が認められ、その他の明確な原因が否定される場合には、カルニチン欠乏症の可能性を疑い、確認を行う必要がある。

II. カルニチン欠乏症の検査と診断

カルニチン欠乏症の診断の流れとして、「カルニチン欠乏症の診断・治療指針 2018」に「カルニチン欠乏症の臨床症状・臨床徴候又は一般臨床検査所見が認められる際には血中カルニチンの2分画検査を実施し、結果からカルニチン

欠乏症の有無を診断する」ことが推奨されている²⁾。

検査ではガイドラインに従い、血中のカルニチン濃度を測定し、血中のF-Car濃度が20 $\mu\text{mol/L}$ 未満の場合はカルニチン欠乏症、血中のF-Car濃度が20 $\mu\text{mol/L}$ 以上、36 $\mu\text{mol/L}$ 未満、またはF-CarとA-Carの比が0.4以上の場合には、カルニチン欠乏症が発症する可能性が極めて高い状態と診断される(Fig. 2)。検査の結果、「カルニチン欠乏症」及び「カルニチン欠乏症の可能性が高い」と診断された場合には、治療法としてカルニチン製剤の投与が検討される。

カルニチン欠乏を発症する原因として、先天性代謝異常症等による供給不良^{5,6,7)}、投与薬剤の影響による体内からのカルニチンの排泄亢進⁹⁾、経腸栄養が原因となる食事からの摂取不足^{5,8)}、肝硬変・肝不全による生合成低下⁹⁾、透析を行う際に起さる血中からのカルニチン除去^{9,10,11)}等が挙げられる。

これらのカルニチン欠乏により起こる各症状の治療には、現状ではカルニチンの補充が唯一の方法である。血中カルニチン2分画検査には保険点数が適用され、酵素サイクリング法を用いたF-Car、総カルニチン(Total carnitine, T-Car)測定それぞれに95点の検体検査実施料、2項目で190点を請求することが可能である(Fig. 3)。保険適用の際には、透析患者では6ヶ月に1回を限度とするなどの留意事項があるため確認が必要である¹²⁾。

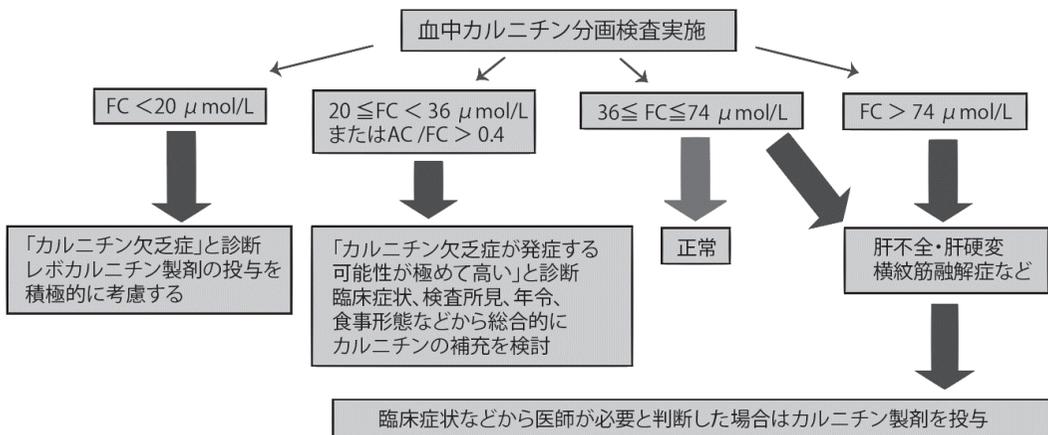


Fig. 2 血中カルニチン値における診断の流れ

出典：カルニチン欠乏症の診断・治療指針 2018 日本小児連協協議会栄養委員会委員

測定項目	測定方法	保険点数	区分番号
遊離カルニチン	酵素サイクリング法	95点	D007 血液化学検査 23
総カルニチン	酵素サイクリング法	95点	D007 血液化学検査 23

留意事項

1. 総カルニチン及び遊離カルニチンは、関係学会の定める診療に関する指針を遵守し、酵素サイクリング法により測定した場合に算定する。
2. 本検査を先天性代謝異常症の診断補助又は経過観察のために実施する場合は、月に1回を限度として算定する。
3. 静脈栄養管理若しくは経腸栄養管理を長期に受けている筋ジストロフィー、筋萎縮性側索硬化症若しくは小児の患者、人工乳若しくは特殊治療用ミルクを使用している小児患者、バルプロ酸ナトリウム製剤投与中の患者、Fanconi 症候群の患者又は慢性維持透析の患者におけるカルニチン欠乏症の診断補助若しくは経過観察のために、本検査を実施する場合は、月に1回を限度として算定する。
4. 同一検体について、本検査と区分番号「D010」特殊分析の「8」先天性代謝異常症検査を併せて行った場合は、主たるもののみ算定する。

Fig. 3 保険点数と留意事項

出典：令和4年厚生労働省告示第54号 別表第一 区分番号D007 血液化学検査23
 厚生労働省保険局医療課 令和4年3月4日 保医発0304第1号 別添1 p.296

Ⅲ. 検査キット

カルニチン測定試薬は「T-Carnitine試薬カイノス」と「F-Carnitine試薬カイノス」（株式会社カイノス）が上市されており¹³⁾、試薬構成は同じ内容で、標準液(L-カルニチン 50 μmol/L)と反応試液 (I)、凍結乾燥品である反応試薬 (II) で構成されている (Fig. 4)。

試薬を使用する際には反応試薬 (II) に溶解液1ボトルを全量加え、転倒混和して完全に溶解し、2試薬で測定を行う。試薬調製後は1ヶ月間の安定性が確認されている。

また別売で専用のカルニチンコントロール血清があり、こちらも凍結乾燥品で、精製水で溶解し使用する。溶解後の安定性は2週間まで確認されている。



Fig. 4 T-Carnitine試薬カイノス キット

T-Carnitine試薬カイノスを用いてT-Carを、F-Carnitine試薬カイノスを用いてF-Carを測定し、T-CarからF-Carを差し引くことで、A-Car濃度を得ることができる (T-Car - F-Car = A-Car)。血中のT-Car、F-Car濃度に加え、A-Car/F-Car比によりF-Carの相対的欠乏の評価が可能となる。

Ⅳ. 測定の概要

1. 酵素サイクリング法

T-Carnitine試薬カイノス及び、F-Carnitine試薬カイノスの反応原理には高感度な酵素サイクリング法^{14,15,16)}を用いている (Fig. 5)。酵素サイクリング法は酵素の基質特異性、反応特異性を利用し、目的物質のみを酵素によるサイクリング反応で増幅定量する方法である。

2. 測定原理

T-Carの測定は、第1反応で検体中のA-Carをアシルカルニチンエステラーゼ (acylcarnitine esterase, ACE) の作用で特異的に加水分解し、L-カルニチンに変換する。以降の第2反応はT-Car、F-Car測定試薬とも酵素サイクリング法に基づいて行われる。

検体中のカルニチンはThio-NAD⁺の存在下、カ

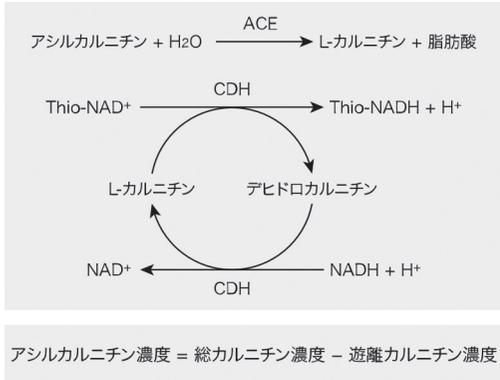


Fig. 5 T-Carnitine試薬カイノス 測定原理

ルニチンデヒドロゲナーゼ(Carnitine dehydrogenase, CDH)の作用によりデヒドロカルニチンに変換され、β-チオニコチンアミドアデニンジヌクレオチド還元型(Thio-NADH)を生成する。変換されたデヒドロカルニチンはNADHとCDHの存在下でL-カルニチンに戻され、β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド酸化型(NAD⁺)を生成する。

この反応が繰り返されることでThio-NADHが経時的に生成され、生成したThio-NADHの吸光度変化を主波長405 nmで測定することで検体中のT-Car濃度を算出する。

前処理反応に用いているアシルカルニチンエステラーゼの各アシル基に対する反応性をKm値と確認した結果、Km値の小ささからいずれのA-Carとも速やかに反応することがわかる(Table 1)。

使用しているカルニチンデヒドロゲナーゼはL-カルニチンに対し高い基質特異性を示し、類似構造を持つ化合物はもとより鏡像異性体の関

Table 1 ACEの各基質に対するKm値

ACEの各基質に対する Km値	
アセチルカルニチン	8x10 ⁻⁵ M
プロピオニルカルニチン	6x10 ⁻⁵ M
ヘキサノイルカルニチン	4x10 ⁻⁵ M
オクタノイルカルニチン	4x10 ⁻⁵ M
デカノイルカルニチン	4x10 ⁻⁵ M
ラウロイルカルニチン	4x10 ⁻⁵ M
ミリストイルカルニチン	4x10 ⁻⁵ M
パルミトイルカルニチン	6x10 ⁻⁵ M

Table 2 カルニチンデヒドロゲナーゼの基質特異性

Substrate specificity	Relative activity (%)
L-carnitine	100
D-carnitine	0
Choline	0
Betaine	0
Dimethyl glycine	0
Sarcosine	0
Γ-Amino-β-hydroxyl-n-butyric acid	0
L-Tartric acid	0
L-Malic acid	0
n-Butylalcohol	0
sec-Butylalcohol	0
tert-Butylalcohol	0
iso-Propylalcohol	0
Ethanol	0
Glycerol	0
2,3-Butanediol	0
1,2-Propanediol	0
2,3-Propanediol	0
NAD⁺	100
NADP ⁺	0
Thio-NAD⁺	15

Table 3 Km値

Km value
9.3 mM for L-carnitine
0.14 mM for NAD ⁺
0.40 mM for Thio-NAD ⁺

係にあるD-カルニチンには全く反応しない酵素を使用している(Table 2)。

あわせて酵素サイクリング法に使用する酵素の必須条件として、NAD⁺とThio-NAD⁺の両方の補酵素に反応する必要があり、NAD⁺とThio-NAD⁺に対するKm値に差が無いことも二つの補酵素を用いたサイクリング反応を可能としている(Table 3)。

3. 測定装置とパラメーター

生化学分析装置日立7180形自動分析装置の測定パラメーターは、血清7.2 μLに第1試薬120 μL、第2試薬60 μLを添加し、第2試薬添加後1分から約4分間の吸光度変化量から1分間あたりの吸光度変化量を計算し、既知濃度の標準液及び検体の吸光度変化量から比例計算によりT-Car (F-Car測定試薬の場合はF-Car) の濃度が算出される(Fig. 6)。

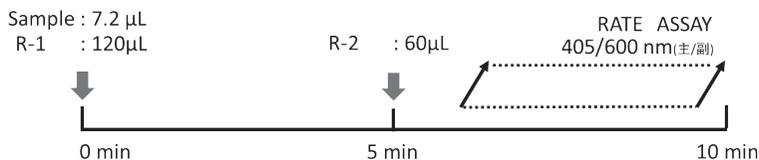


Fig. 6 測定パラメーター

V. 基礎性能

Table 4 同時再現性

T-Carnitine	管理検体1	管理検体2	管理検体3
測定回数n	20	20	20
平均値 \bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	30.7	59.8	179.6
標準偏差 SD($\mu\text{mol/L}$)	0.30	0.60	1.47
変動係数 CV(%)	1.0	1.0	0.8

F-Carnitine	管理検体1	管理検体2	管理検体3
測定回数n	20	20	20
平均値 \bar{x} ($\mu\text{mol/L}$)	21.1	49.1	173.1
標準偏差 SD($\mu\text{mol/L}$)	0.28	0.51	1.67
変動係数 CV(%)	1.3	1.0	1.0

1. 再現性

献血検体を用いたヒトプール血清にL-カルニチンを添加し、3濃度のカルニチン管理検体を調製した(株式会社カイノス 倫理審査委員会 課題番号: 2014-01)。管理検体3濃度をそれぞれ連続20回測定し、変動係数(coefficient of variation, CV)を算出した結果、T-CarはCV:0.8~1.0%、F-CarはCV:1.0~1.3%と良好なCVが得られた(Table 4)。

2. 直線性

カルニチン水溶液(約200 $\mu\text{mol/L}$)を10段階希釈して測定した結果、T-Car、F-Car共に200 $\mu\text{mol/L}$ までの直線性が確認された(Fig. 7)。

3. 干渉物質の影響

ビリルビンF、ビリルビンC、溶血ヘモグロビン、乳び、イントラリピッド、アスコルビン酸が試料に共存した場合の測定値への影響を検討した。ビリルビンF、ビリルビンC、溶血ヘモグロビン、乳びは干渉チェックAプラス(シスメックス株式会社)を用いた。検討は、献血検体を用いたヒトプール血清に各干渉物質を添

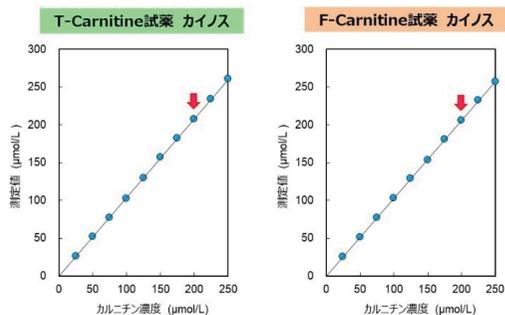


Fig. 7 直線性

Table 5 共存物質の影響

干渉物質	添加濃度	T-Carnitine試薬 カイノス	F-Carnitine試薬 カイノス
ビリルビンF	20 mg/dL	100%	101%
ビリルビンC	20 mg/dL	105%	102%
溶血ヘモグロビン	300 mg/dL	93%	90%
乳び	3,000濁度	102%	99%
イントラリピッド	5%	102%	99%
アスコルビン酸	100 mg/dL	102%	100%

加した系列を用いて5段階希釈し、測定値への影響を確認した。その結果、ビリルビンF: 20 mg/dL、ビリルビンC: 20 mg/dL、溶血ヘモグロビン: 300 mg/dL、乳び: 3,000ホルマジン濁度、アスコルビン酸: 100 mg/dLまで測定値に影響を与えなかった(Table 5)。

4. タンデムマス法との相関性

液体クロマトグラフ質量分析計(Liquid Chromatograph-Mass Spectrometry, LC-MS/MS)による測定は、大塚製薬株式会社 診断事業部分析センターにて実施した¹³⁾。分析は、L-カルニチンのD9ラベル体(Cambridge Isotope Laboratories社Cat.No.:DLM-3555-0)を内部標準とし、LC/MS/MSシステム(AB SCIEX社 QTRAP 5500)を用いた同位体希釈法による定量分析を行った。

全解析対象症例281例を対象に、T-Car及びF-Carについて酵素サイクリング法とタンデム

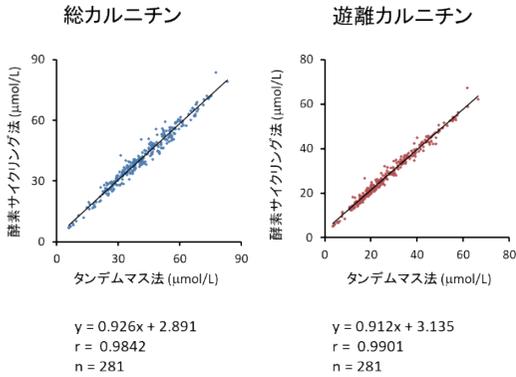


Fig. 8 タンデムマス法との相関性

マス法との相関性を検討した。

T-Car、F-Carの相関係数はそれぞれ $r=0.9842$ 、 $r=0.9901$ で回帰式の傾きは1に近似した値を示し良好な相関が認められた(Fig. 8)。

5. 血清と血漿との反応性

健康成人50例より同時に採取した血清、EDTA血漿およびヘパリン血漿を用いて、血清検体と血漿検体での相関を検討した¹³⁾。T-Car、F-Carのいずれにおいても、EDTA血漿およびヘパリン血漿ともに、相関係数0.99以上の良好な相関を示した(Fig. 9)。このことから検査材料として、血清検体に加え、血漿検体も使用可能と考えられた。

VI. まとめ

カルニチンは生体内で複数の重要な働きを担っており欠乏すると、多様な臨床徴候を示す。生体内のカルニチンが欠乏しているかは、酵素サイクリング法を使用した「血中カルニチン2分画検査」を行うことで簡便に診断することが可能であり、2018年2月に保険適用されて以来、カルニチン欠乏症の診断補助を目的として内科(腎臓内科)、小児科、神経内科、外科(脳外科)等において広く用いられている。

弊社が販売する「T-Carnitine試薬カイノス」、 「F-Carnitine試薬カイノス」は酵素サイクリング法を用いた体外診断用医薬品であり、LC-MS/MSのような特殊な分析装置を必要とせず、汎用分析装置を用いて約10分でT-CarとF-Carを定量することができる。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

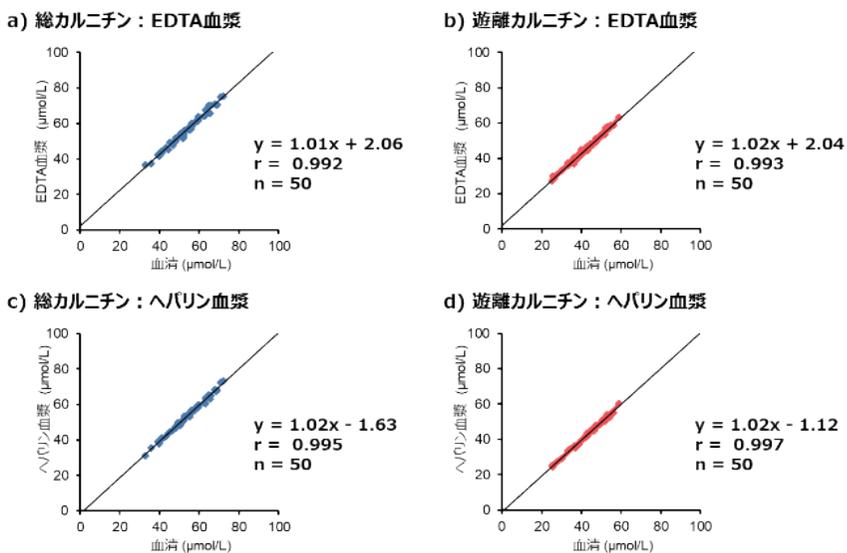


Fig. 9 血清・血漿検体の相関性

文 献

- 1) 日本小児科学会:カルニチン欠乏症の診断・治療指針2016.日本小児科学会誌121:9-13,2017.
- 2) 日本小児科学会:カルニチン欠乏症の診断・治療指針2018.日本小児科学会誌123:1-65,2019.
- 3) Rebouche CJ, Dennis J Paulson: CARNITINE METABOLISM AND FUNCTION IN HUMANS. *Ann Rev Nutr*,6:41-66,1986.
- 4) 中山夏樹:カルニチンのすべて～カルニチン欠乏症を起こさないために～.医学図書出版,東京,2023.
- 5) 高柳正樹:カルニチンの臨床.生物試料分析,35,4:281-292,2012.
- 6) 桑島正道:続発性カルニチン欠乏症.日本臨床,60,Suppl.4:706-709,2002.
- 7) Pons R, Darryl C. De Vivo: Primary and Secondary Carnitine Deficiency Syndromes. *J Child Neurol*,10, Suppl.2: 2S8-2S24,1995.
- 8) 脇坂晃子,新井田要,他:重症心身障害児(者)における経腸栄養剤と抗てんかん薬による低カルニチン血症発症の検討.脳と発達,45,6:445-450,2013.
- 9) 秋葉隆,秋澤忠男編:透析療法ネクストXVII.透析患者におけるカルニチン補充療法について.医学図書出版株式会社,東京,2014.
- 10) 樋口輝美,堀田直,他:レボカルニチンが著効した血液透析患者の1例.透析会誌,48,8:477-482,2015.
- 11) 樋口輝美,堀田直,他:血液透析患者の心機能に対するレボカルニチンの効果.透析会誌,47,5:305-312,2014.
- 12) 位田忍:L-カルニチン欠乏症の診断と治療指針.外科と代謝・栄養,54,2:49-52,2020.
- 13) 伊丹儀友,青山真也,他:酵素サイクリング法を測定原理とするカルニチン測定試薬KDK-1201の臨床的評価.臨床検査,58,5:651-658,2014.
- 14) 津島慶三,加瀬尚純:血中カルニチンの測定法.臨床透析,16,2:167-173,2000.
- 15) 村上隆之,杉本建郎,他:カルニチン測定キットによる血清,尿カルニチン値の検討.小児科診療,58,6:1083-1086,1995.
- 16) Takahashi M, Shigeru Ueda et al.: Carnitine Determination by an Enzymatic Cycling Method with Carnitine Dehydrogenase. *Clin Chem*,40,5:817-821,1994.