

臨床研究

臍帯血移植患者における血清 carnitine 濃度と好中球生着との関連について

佐野史典, 近藤敏範, 松橋佳子, 兵るい, 是澤里紗, 薄聖子, 林清人, 田坂大象,
和田秀穂, 杉原尚

川崎医科大学 血液内科学

Correlation between serum L-carnitine concentration and neutrophil engraftment in patients with cord blood transplantation.

Fuminori Sano, Toshinori Kondou, Yoshiko Matsushashi, Rui Hyou, Risa Koresawa,
Seiko Susuki, Kiyoto Hayashi, Taizo Tasaka, Hideho Wada, Takashi Sugihara.

Department of Hematology, Kawasaki Medical School, Kurashiki, Japan

Corresponding author : 佐野 史典

住所 : 〒701-0192 岡山県倉敷市松島 577

電話 : 086-462-1111

FAX : 086-464-1194

e-mail : s.fuminori@gmail.com

【和文抄録】

同種臍帯血移植 (CBT) では移植片生着までの期間が移植の成績を左右する。透析患者のエリスロポエチン不応性貧血や肝硬変患者の血小板減少や白血球減少症に対して carnitine 補充が有効と報告されています。しかし、CBT 患者における carnitine 血中濃度を検討した報告はない。本研究では、2013 年 4 月から 2015 年 1 月までに当院で CBT を受けた患者 23 例において carnitine 血中濃度と血球回復との関連を後方視的に検討した。Free carnitine (FC) 血中濃度を移植前、day0、day7、day14 で測定し、生着との相関関係を分析した。FC 血中濃度は比較的 low 値 (中央値, $\mu\text{mol/L}$; 移植前 33.1, day0 43.2, day7 38.3, day14 37.8) であり、好中球生着までの日数は FC 血中濃度と逆相関となる傾向があった (移植前: $P=0.15$, $r=-0.33$, day0: $P=0.04$, $r=-0.43$, day7: $P=0.30$, $r=-0.23$, day14: $P=0.01$, $r=-0.55$)。以上の結果から、CBT 後の血球回復促進のための栄養素として carnitine の重要性が示唆された。

【英文抄録】

In cord blood transplantation (CBT), the duration until hematological engraftment has affect on the results of transplantation. Carnitine deficiency has been reported to cause erythropoietin refractory anemia in chronic hemodialysis patients and thrombocyte leukopenia of cirrhosis, and its supplementation can improve hematopoiesis in patients with hepatic or renal failure. Patients who receive CBT may suffer from carnitine deficiency, but there are no reports that have investigated the carnitine status in such patients. In this study, we determined the concentration of free carnitine (FC) and investigated the correlation between FC and engraftment in patients who received CBT. Twenty-three patients who received CBT at our hospital from April 2013 to January 2015 were enrolled in this study. One patient was excluded because of graft failure, therefore, 22 patients were evaluable. FC concentrations of the patients were sequentially monitored at 4 time points (before conditioning therapy, day 0, day 7, and day 14), basic laboratory data were gathered and their correlations with engraftment were analyzed. FC concentrations of the patients were generally low (before conditioning therapy: 33.1, day 0: 43.2, day 7: 38.3, and day 14: 37.8 $\mu\text{mol/L}$). Significant inverse correlation was observed between FC concentrations and days for neutrophil engraftment at day 0 and day 14 (before conditioning therapy: $P = 0.15$, $r = -0.33$, day 0: $P = 0.04$, $r = -0.43$, day 7: $P = 0.30$, $r = -0.23$, and day 14: $P = 0.01$, $r = -0.55$). These results suggest that carnitine is an important nutriment that promotes hematopoietic recovery after CBT.

Key Words : carnitine ; cord blood transplantation ; engraftment

緒 言

Carnitine は、生体の脂質代謝に関与するビタミン様物質でアミノ酸から生合成される。Carnitine は、エネルギー源である脂質を脂肪酸としてミトコンドリア内に取り込むために必要であり、また Coenzyme A (CoA) の調整作用ももっている。Carnitine の産生は肝臓・腎臓・脳でおこなわれ、小腸と腎臓においては organic cation transporter (OCTN) レセプターを介して吸収されている^{1) 2)}。また、carnitine の 98% は筋肉内にプールされている。したがって肝障害患者や腎障害患者は潜在的な carnitine 欠乏状態にあると想定され、補充療法により栄養状態の改善などが得られている。Carnitine の造血細胞系に果たす役割は不明な点が多いが、最近、透析患者の貧血、肝硬変患者の血小板減少や白血球減少に対する carnitine 補充の有効性が報告されている^{3) 4)}。

同種造血幹細胞移植治療は、難治性の造血器悪性腫瘍患者に対する治療として広く実施されているが、なかでも同種臍帯血移植 (allogeneic cord blood stem cell transplantation ; CBT) は移植後の移植片生着までの期間が移植の成績を大きく左右する。CBT 実施下にある患者は移植前処置に伴う肝障害や腎障害、下痢、食欲低下などの理由で carnitine 欠乏状態と想定されるが、CBT 患者における carnitine の血中動態を検討した報告はない。今回、我々は CBT を施行した患者における血清 free carnitine (FC) 血中濃度と血球生着との関連を後方視的に検討した。

対象と方法

2013 年 4 月から 2015 年 1 月まで当院において CBT を施行した 23 症例を対象とした。

移植前処置開始前 (移植前)、移植日 (day0)、移植後 7 日 (day7) と 14 日 (day14) において血清 FC 濃度を酵素サイクリング法で測定し、各血球の生着までに要した日数、輸注細胞数 (CD34 陽性細胞・全有核細胞数)、T-Cho、Alb、摂取カロリーとの関連性について統計解析ソフト EZR を用いて解析した。相関関係については、Spearman の順位相関係数の検定法を、中央値の比較については、Mann-Whitney 検定法を用いて解析した。摂取カロリーは前処置開始日を起点として、1 日の食事量を看護記録から抽出し、当院低菌食のエネルギー量 (2,000kcal/day) を基に算出した。なお、G-CSF 製剤の投与は原則、移植後 5 日目から開始した。

本研究は、川崎医科大学・同附属病院倫理委員会の承認 (No. 1802、1802-1) を得て実施した。

結 果

1. 患者背景

対象とした 23 症例を Table 1 に示す。年齢中央値は 58 歳 (16~71 歳) で、男女比は 16/7 であった。疾患は急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia ; ALL) が 8 例、(acute myeloid leukemia ; AML) が 5 例、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome ; MDS) が 8 例、悪性リンパ腫 (malignant lymphoma ; ML) が 2 例であった。前処置は骨髄破壊的移植が 8 例、骨髄非破壊的移植が 15 例であった。臍帯血の有核細胞数の中央値は $2.46 \times 10^7/\text{kg}$ で、CD34 陽性細胞数の中央値は $0.88 \times 10^5/\text{kg}$ であった。HLA 合致度は、HLA6/6 マッチが 3 症例、5/6 マッチが 2 症例、4/6 マッチが 18 症例であった。

2. 血球回復

生着が確認されたのは 22 症例で、生着不全が 1 症例であった。したがって、以後の解析は生着が確認された 22 例で実施した。好中球の生着日は、3 日間連続で好中球数 $500/\mu\text{l}$ 以上となった初日とし、生着日数中央値は 17 日 (8~29 日) であった (Fig1A)。赤血球と血小板の生着日は、それぞれ輸血不要で網赤血球 1.0%以上、血小板数 $20,000/\mu\text{l}$ 以上で判定し、生着日数中央値は赤血球が 30 日 (11~38 日)、血小板が 39 日 (25~79 日) であった (Fig1B C)。

3. Carnitine 血中濃度の推移

移植前、day0、day7 と day14 における FC 血中濃度の結果を Table 2 に示す。各ポイントにおける中央値はそれぞれ、移植前 $33.1 \mu\text{mol/L}$ (14.9~71.8)、day0 $43.2 \mu\text{mol/L}$ (15.6~81.8)、day7 $38.3 \mu\text{mol/L}$ (19.4~63.3)、day14 $37.8 \mu\text{mol/L}$ (21.4~64.2) であった。同測定法による FC の正常基準値は $36.0 \sim 74.0 \mu\text{mol/L}$ であり、CBT 患者は概して carnitine 欠乏状態であった。

4. Carnitine 血中濃度と血球回復の関連性

各ポイントにおける FC 血中濃度と、血球生着に要した日数との相関性について検討した (Table 2)。

好中球については FC 血中濃度が高い症例ほど好中球生着までの期間が短い傾向が認められ、day0 と day14 の FC 血中濃度との間に有意差を認めた (day0; $r=-0.43$, $P=0.04$, day14; $r=-0.55$, $P=0.01$)。また、移植前処置前 ($r=-0.33$ $P=0.15$) と day7 ($r=-0.23$ $P=0.30$) においても有意差は認められなかったものの、同様の傾向がみられた (Fig 2)。

赤血球と血小板の生着に関しても同様の検討をおこなったが、有意な相関はなかった。

5. 好中球生着と臍帯血輸注細胞数および carnitine 血中濃度の検討

臍帯血輸注細胞数と FC 血中濃度との関連性について検討したが、有意な相関は認めなかった ($n=22$, CD34+ cells, $p=0.41$; total nuclear cells, $p=0.81$)。

FC 血中濃度と逆相関のみられた好中球の生着に関して、臍帯血の輸注細胞数との関連性を検討した。好中球生着日数の中央値は day17 であり、day17 までに生着した群 (n=13) と生着までに 18 日以上を要した群 (n=9) との間で臍帯血 CD34 陽性細胞数と臍帯血有核細胞数を比較したところ、CD34 陽性細胞、有核細胞数ともに解析上有意な差はなかったが、CD34 陽性細胞数については day17 までに生着した群の方が高い傾向がみられた (CD34+ cells, median $0.77 \times 10^5/\text{kg}$ vs $0.63 \times 10^5/\text{kg}$, $p=0.22$; total nuclear cells, median $2.21 \times 10^7/\text{kg}$ vs $2.20 \times 10^7/\text{kg}$, $p=0.43$)。

6. Carnitine 血中濃度と栄養状態の関連性

Carnitine は主に食餌中に含まれるものが供給源となることから、各ポイントにおける FC 血中濃度と T-Cho, Alb および摂取カロリーとの関連性についても検討した。測定したいずれの時点においても FC 血中濃度との間に有意な相関は認めなかった (Table 3)。

考 察

CBT においては同種骨髄移植や同種末梢血造血幹細胞移植に比して血球生着の遅れや生着不全を来すことが問題とされているが、その原因としては輸注細胞数が少ないことが最大の原因である。また、好中球生着までの期間も輸注細胞数に依存すると報告されている⁵⁾。しかし、保存されている臍帯血の細胞数は限られたものであるため、CBT において血球回復を促進させる他の要因や手法が模索されている。

Carnitine は脂質代謝に関するビタミン様物質であるが、維持透析患者や肝不全患者においては生合成の低下や吸収不全により carnitine 欠乏状態にあり、これを補うことにより貧血の改善や白血球数や血小板数の改善が得られると報告されている^{3) 4)}。CBT 患者はアントラサイクリン系やビンカルカロイドなどの抗がん剤による OCTN 阻害作用のために carnitine 吸収が低下すること^{6) 7)}、食事が低下し中心静脈栄養管理となった際には carnitine 供給量が減少し、かつ、脂肪酸代謝が亢進し carnitine 消費量が増加すること、肝腎機能低下による carnitine 産生および再吸収障害、抗菌薬投与時には抗菌薬代謝産物に carnitine が抱合されることにより尿中排泄が促進すること⁸⁾、全身骨格筋量の低下 (sarcopenia) による carnitine 貯蔵量の低下⁹⁾ などの理由から潜在的に carnitine 欠乏状態にあると予想されるが、CBT 患者における carnitine 動態についての報告はない。今回の我々の検討では、CBT 患者における移植後早期の血清 FC の中央値は $33.1 \sim 43.2 \mu\text{mol/L}$ (基準値 $36.0 \sim 74.0 \mu\text{mol/L}$) と比較的低値であった。Day0 における FC 血中濃度がやや高値であったが、化学療法後に一過性の carnitine 血中濃度の上昇がおこることはこれまでも報告¹⁰⁾されている。

すなわち、day0 では前処置の化学療法による筋肉崩壊や、食事摂取量低下による脂肪酸代謝の亢進による carnitine 必要量の増大により、筋肉内にプールされていた carnitine が血中に放出された^{11) 12)}と考えられている。また、その後も造血幹細胞の脂肪酸代謝亢進¹³⁾などにより carnitine は必要とされる状態が続くため、血中 carnitine 濃度を維持しようとするが、抗がん剤治療に伴う OCTN 阻害作用による再吸収の低下^{6) 7)}や肝腎機能低下による合成低下、抗菌薬による尿中排泄の促進⁸⁾などにより、day7, 14 では徐々に減少していると考えられた。以上の結果から CBT 患者では概して carnitine 欠乏状態にあることが明らかとなった。

血球回復と carnitine 動態との関連性については、好中球の生着に要する期間についてのみ、血清 FC 濃度との相関が認められた。CBT における好中球生着に要する期間に関しては、一般的に輸注細胞数が多いほど早期に生着すると報告されており⁵⁾、我々の検討した 22 例においても、有意差はなかったものの同様の傾向がみられた。全体としての解析では輸注細胞数と血清 FC 濃度との間には有意な相関はみられず、carnitine が移植後の好中球生着に寄与している可能性が示唆された。しかしながら、今回の研究はごく少数例での検討であるため、さらに多数例での検討が必要であると考えられた。また近年、carnitine 欠乏症に対して levo-carnitine 製剤の保険適応が承認され、CBT 患者のような carnitine 欠乏状態にある症例に対しての carnitine 補充療法の有効性も検討していく必要がある。

Carnitine の造血促進に関するメカニズムは不明であるが、Vassiliadis らは、HL60 細胞に carnitine を投与することで、単球様細胞・好中球様細胞・樹状様細胞へ分化させると報告しており、分化を促進させる理由としては、carnitine の脂肪酸代謝への影響が推測されている¹⁴⁾。また、透析患者における腎性貧血患者への carnitine 投与が有効な理由として、赤血球膜に対する抗アポトーシス効果や赤芽球系コロニーの形成促進作用が報告されている^{3) 15)}。抗アポトーシス効果は好中球でも報告されている。Caspase3 による好中球のアポトーシスは calpain による X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) の切断により制御されているが、carnitine は calpain の活性を抑制すると報告されている^{16) 17)}。今回の検討で、赤血球生着について相関が得られなかった理由としては、移植後早期感染症 (20 症例)、生着症候群 (9 症例)、出血 (2 症例) などの合併症が関与したためと考えられた。

Carnitine は悪性腫瘍領域で、levo-carnitine 投与による食欲亢進作用⁹⁾や抗うつ作用¹⁸⁾も報告されており、造血器悪性腫瘍患者における carnitine の動態についても、今後、種々の疾患別あるいは異なる治療状況下での検討が必要である。加えて補充療法の有効性についても検討する必要がある。また、carnitine

の造血に関するメカニズムの解明も今後の検討課題である。

結 語

CBT患者における血清carnitine動態と造血回復との関連性について検討した。CBT患者では種々の理由によりcarnitine欠乏状態にあることが明らかとなった。また、少数例での検討ではあるが好中球生着との相関を認め、造血回復促進のための栄養素としてのcarnitineの重要性が示唆された。さらに多数例での検討と造血に関するメカニズムの解明が今後の課題である。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし。なお、本研究とは直接の関係はないが、血液内科学教室として Meiji Seika ファルマ株式会社、大日本住友製薬株式会社、大塚製薬株式会社、一般社団法人日本血液製剤機構、ブリストル・マイヤーズ株式会社、アステラス製薬株式会社、中外製薬株式会社、MSD 株式会社、エーザイ株式会社、協和発酵キリン株式会社、大正 富山医薬品株式会社、塩野義製薬株式会社、大鵬薬品工業株式会社から奨学寄付金を受領している。このことについては事前に本学の利益相反委員会へ申告し、適正に管理されている。

文 献

1)

Vaz FM, Wanders RJ.
Carnitine biosynthesis in mammals.
Biochem J. 2002; **361** :417-429.

2)

Kudoh Y, Aoyama S, Torii T, et al.
L-carnitine kinetics in chronic hemodialysis patients: comparison between oral and intravenous supplementation.
J Biochem Pharmacol Res. 2014; **2**: 117-124.

3)

Bonomini M, Zammit V, Pusey CD, De Vecchi A, Arduini A.
Pharmacological use of L-carnitine in uremic anemia: Has its full potential been exploited?.
Pharmacol Res. 2011; **63**: 157-164.

4)

Sarfraz M.
Management of thrombocytopenia in cirrhosis.

Indep Rev Jan. 2015; **17**: 75-85.

5)

Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, et al.

Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors.

N Engl J Med. 2001; **344**: 1815-1822.

6)

Hu C, Lancaster CS, Zuo Z, et al.

Inhibition of OCTN2-mediated transport of carnitine by etoposide.

Mol Cancer Ther. 2012; **11**: 921-929.

7)

Cynthia S. Lancaster, Chaixin Hu, Ryan M. Franke, et al.

Cisplatin-induced downregulation of OCTN2 affects carnitine wasting.

Clin Cancer Res. 2010; **16**: 4789-4799.

8)

Makino Y, Sugiura T, Ito T, Sugiyama N, Koyama N.

Carnitine-associated encephalopathy caused by long-term treatment with an antibiotic containing pivalic acid.

Pediatrics.2007; **120**:739-741.

9)

Busquets S, Serpe R, Toledo M, et al.

L-Carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer.

Clin Nutr. 2012; **31**: 889-895.

10)

Hockenberry MJ, Hooke MC, Gregurich M, McCarthy K.

Carnitine plasma levels and fatigue in children/adolescents receiving cisplatin, ifosfamide, or doxorubicin.

J Pediatr Hematol Oncol. 2009; **31**: 664-669.

11)

Gilliam LA, St Clair DK.

Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle : the role of oxidative stress.

Antioxid RedoxSignal. 2011; **15**: 2543-2563.

12)

Cederblad G, Larsson J, Nordström H, Schildt B.

Urinary excretion of carnitine in burned patients.

Burns. 1981; **8**: 102-109.

13)

Ito K, Carracedo A, Weiss D, et al.

A PML–PPAR- δ pathway for fatty acid oxidation regulates hematopoietic stem cell maintenance.

Nat Med. 2012; **18**: 1350-1358.

14)

Vassiliadis S, Evangeliou A, Basta E, et al.

The role of L-carnitine on a restricted number of myeloid leukemia progenitor cells: generation of atypical cell types.

Haematologia. 2002; **32**: 341-353.

15)

Kitamura Y, Satoh K, Satoh T, Takita M, Matsuura A.

Effect of L-carnitine on erythroid colony formation in mouse bone marrow cells.

Nephrol Dial Transplant. 2005; **20**:981-984.

16)

Sang Y, Zhou LJ, Jing L, Yuan L, Lu LX, Zhang QH.

Effect of valsartan and carnitine on cardiomyocyte Calpain-1 and Bcl-xl expressions of dogs with chronic alcohol intake-induced cardiomyopathy.

Zhonghua xin xue Guan Bing za zhi. 2011; **39**: 440-445.

17)

Kobayashi S, Yamashita K, Takeoka T, et al.

Calpain-mediated X-linked inhibitor of apoptosis degradation in neutrophil apoptosis and its impairment in chronic neutrophilic leukemia.

J Biol Chem. 2002; **277**: 33968-33977.

18)

Wang SM, Han C, Lee SJ, et al.

A review of current evidence for acetyl-L-carnitine in the treatment of depression.

J Psychiatr Res. 2014; **53** : 30-37.

Table 1 Characteristics of patients	
Characteristic	n
No. of patients	23
Age, median (range), yr	58 (16-71)
Gender	
Male	16
Female	7
Diagnosis	
ALL	8
MDS	8
AML	5
ML	2
Disease status	
CR1	14
CR2	8
PR	1
HLA matching	
6/6	3
5/6	2
4/6	18
Cell dose, median (range)	
TNC 10 ⁷ /kg	2.46 (1.77-4.11)
CD34 ⁺ cells 10 ⁵ /kg	0.83 (0.23-2.27)
Conditioning regimen	
MAC	8
RIC	15
GVHD prophylaxis	
Cyclosporine/MMF	10 8
Tacrolimus/MMF	8
Tacrolimus	7

ALL, acute lymphoblastic leukemia; AML, acute myeloid leukemia; MDS, myelodysplastic syndromes; ML, malignant lymphoma; TNC, total nucleated cell; RIC, reduced-intensity conditioning; MAC, myeloablative conditioning; GVHD, graft versus host disease; MMF, mycophenolate mofetil

Table 2		Correlation between period of engraftment and serum free carnitine concentration.							
		FC, $\mu\text{mol/L}$		Neutrophil		Reticulocyte		Platelet	
		Median	Range	r	p value	r	p value	r	p value
Before		33.1	(14.9-71.8)	-0.33	0.15	0.24	0.32	-0.03	0.89
Day0		43.2	(15.6-81.8)	-0.43	0.04	0.13	0.59	-0.12	0.62
Day7		38.3	(19.4-63.3)	-0.23	0.30	0.08	0.73	0.06	0.78
Day14		37.8	(21.4-64.2)	-0.55	0.01	0.19	0.42	-0.04	0.84

FC, free carnitine

Table 3		Correlation between serum cholesterol, albumin and free carnitine concentration.									
		FC, $\mu\text{mol/L}$		Cholesterol, mg/dL				Albumin, g/dL			
		Median	Range	Median	Range	r	p value	Median	Range	r	p value
Before		33.1	(14.9-71.8)	192	(82-244)	-0.18	0.47	4.1	(3.0-4.6)	0.16	0.50
Day0		43.2	(15.6-81.8)	187	(119-211)	-0.30	0.19	3.5	(2.3-4.6)	0.26	0.26
Day7		38.3	(19.4-63.3)	169	(108-218)	-0.36	0.12	3.5	(1.6-4.1)	0.20	0.36
Day14		37.8	(21.4-64.2)	149	(89-188)	-0.24	0.31	3.1	(1.9-4.3)	0.32	0.16

FC, free carnitine

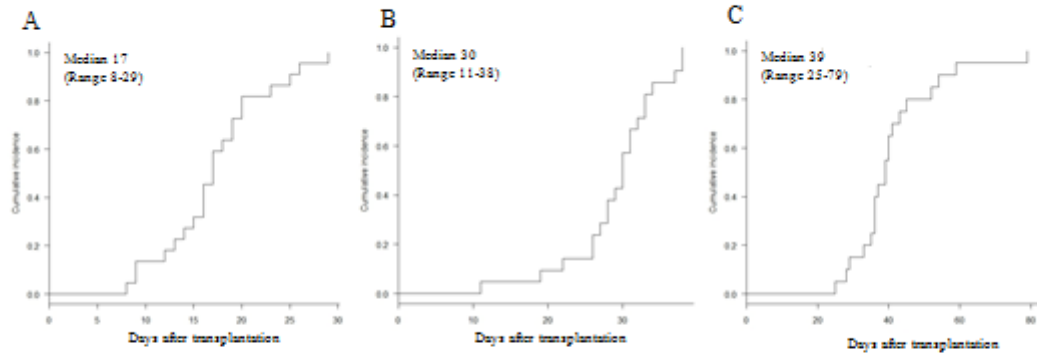


Fig. 1: Engraftment curves of 22 CBT cases.
 A : Neutrophil engraftment.
 B : Reticulocyte engraftment.
 C : Platelet engraftment.

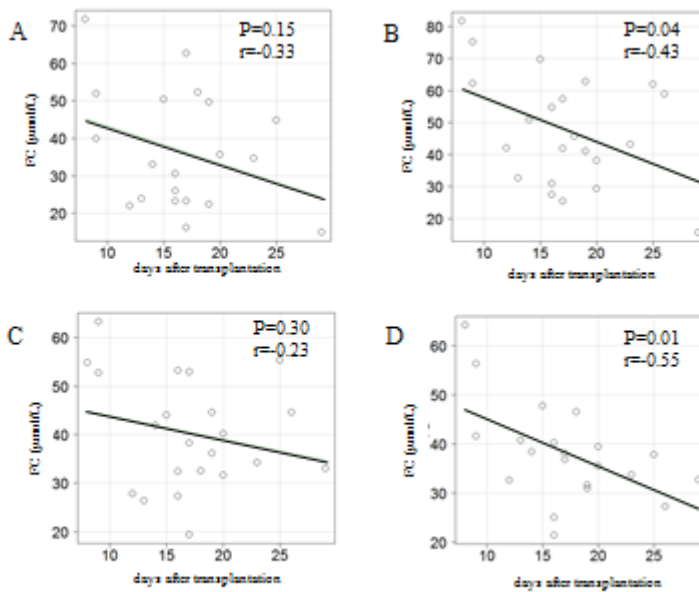


Fig2: Correlation between serum free carnitine concentration (FC) and neutrophil engraftment.

A : Correlation between days of neutrophil engraftment and FC at before conditioning
 B : Correlation between days of neutrophil engraftment and FC at day 0.
 C : Correlation between days of neutrophil engraftment and FC at day 7.
 D : Correlation between days of neutrophil engraftment and FC at day 14.