ラットおよびヒトにおけるL-カルノシンの代謝

古田 盛, 外山 誠司, 三輪 昌弘, 佐野 廣

ゼリア新薬工業株式会社 中央研究所 〒360-01 埼玉県大里郡江南町大字押切2512-1

Key words : L-carnosine, L-histidine, β -alanine, metabolism, absorption, excretion, rat, human.

Studies on the Metabolic Fate of L-Carnosine in Rats and Humans

Shigeru FURUTA, Seiji TOYAMA, Masahiro MIWA and Hiroshi SANO

Central Research Laboratories, Zeria Pharmaceutical Co., Ltd.,
2512-1 Oshikiri, Konan-machi, Osato-gun, Saitama-ken 360-01, Japan

Summary

The metabolic fate of L-carnosine in rats was studied after administration of [^{14}C -U-histidine]-L-carnosine (^{14}C -(his)-L-carnosine) or [^{14}C - β -alanine]-L-carnosine (^{14}C -(ala)-L-carnosine).

1. The blood level of radioactivity reached the maximum concentration ($C_{\max}$) at 4hr after oral administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine in rats, and the level was almost constant thereafter up to 120hr. On the other hand, the blood levels of radioactivity reached the $C_{\max}$ at 0.5hr after oral administration of ^{14}C -(ala)-L-carnosine, and declined with a half-life of 3.9hr within the first 6hr and the half-lives in the periods between of 6-24hr and 24-120hr were 19.7hr and 91.9hr, respectively.

2. Male rats excreted 7.9% of administered dose in urine, 6.3% in feces and 37.0% with expired air during 120hr after oral administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine. On the other hand, after administration of ^{14}C -(ala)-L-carnosine the excretion of radioactivity into the urine, feces and expired air were 5.4%, 1.8% and 80.2%, respectively.

The radioactivity in the carcass after administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine and ^{14}C -(ala)-L-carnosine were 44.4% and 9.6%, respectively.

3. The blood concentrations and excretion of radioactivity of [^{14}C -U]-L-carnosine were similar to those after administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine.

4. The disappearance of unchanged L-carnosine in plasma followed first-order kinetics with the half-life of 15min after intravenous administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine to rats, and then the appearance of L-carnosine (the metabolite of L-carnosine) was very rapid and reached the $C_{\max}$ at 0.5hr. When the plasma sample after intravenous administration was treated with sulfosalicylic acid (SSA), the radioactivity of SSA supernatant declined as a function of time.

5. *In vitro*, L-carnosine was converted to L-histidine in the presence of human plasma within 15min at room temperature.

6. The present studies indicate that L-carnosine was converted to L-histidine and β -alanine in rats and humans, of which L-histidine was further utilized for the incorporation of endogenous high molecular substances.

緒 言

L-カルノシン (β -アラニル-L-ヒスチジン) は, Gulewitsch らによって発見されたジペプチドであり¹⁾, 動物の骨格筋中に多く存在する²⁾ ことが知られている. L-カルノシンの薬理作用についてはまだ十分解明されていないが, 従来より組織修復作用, 免疫調節作用, 抗潰瘍作用, 神経伝達物質様作用, 活性酸素除去作用などが報告されている³⁻⁶⁾.

今回, L-ヒスチジンまたは β -アラニン部位に ^{14}C で標識したL-カルノシンを用いて, L-カルノシンの生体内動態を検討した. また, ヒト血漿中でのL-カルノシンの代謝を検討し, ラットとの関連を調べた.

実験材料および方法

1. 標識化合物

[U- ^{14}C -histidine]-L-カルノシン (以下, ^{14}C -(his)-L-カルノシン) はアマシャムまたは根本特殊化学で合成されたものを使用した (比放射能: 3.57MBq/mg または4.93MBq/mg). [^{14}C -3- β -alanine]-L-カルノシン (以下, ^{14}C -(ala)-L-カルノシン) はアマシャムにより合成されたものを使用した (比放射能: 0.49MBq/mg). [U- ^{14}C]-L-ヒスチジン (以下, ^{14}C -L-ヒスチジン) は NEN より購入した (比放射能: 7.16 MBq/mg). 放射化学的純度は薄層クロマトグラフィー (TLC) で検定したところ, それぞれ95%以上であった. これらの構造および標識位置は Fig. 1 に示した.

2. 試 薬

L-カルノシン (lot No. 308) は浜理薬品で合成されたものを使用した. L-ヒスチジンは Merck より購入した. メタノールは液体クロマトグラフ用 (国産化学), o-フタルアルデヒド (OPA), N-アセチル-L-システインは蛍光分析用 (ナカライテスク), Brij-35, ほう酸, 水酸化ナトリウムはアミノ酸自動分析用 (ナカライテスク) を使用した. 液体シンチレーターはインスタゲル (Packard), ハイオニクフロー (Packard), アトムライト (NEN), 組織溶解剤としてソルエン

Fig. 1 Chemical structures of ^{14}C -(his)-L-carnosine (a), ^{14}C -(ala)-L-carnosine (b) and ^{14}C -L-histidine (c) (*; ^{14}C -labeled position)

-350 (Packard) を使用した. その他は試薬特級を使用した.

3. 動物試験

1) 動 物

7 週齢の SD 系雄性ラット (日本チャールスリバー, 体重200 g 前後) を用いた. ラットは水, 固型飼料 (MF, オリエンタル酵母) を自由に摂取させ, 室温 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 湿度 $55 \pm 10\%$ の条件下で 1 週間以上予備飼育した後, 18 時間絶食し実験に供した.

2) 投与量および投与方法

経口投与試験では, ラットに ^{14}C -(his)-L-カルノシン, ^{14}C -(ala)-L-カルノシンまたは ^{14}C -L-ヒスチジンの水溶液を $0.17\text{mmol}/5\text{ml}/\text{kg}$ の用量で経口用ゾンデを用いて強制経口投与した. それぞれの投与放射能は約 $3.9\text{MBq}/\text{kg}$ とした. 静脈内投与試験では, ラットにエーテル麻酔下, ポリエチレンチューブ SP35 (夏目製作所) を用い大腿動脈および大腿静脈にカニューレを施し覚醒後, 試験に用いた. 大腿静脈に施したカニューレより ^{14}C -(his)-L-カルノシンの生理食塩水溶液 ($0.35\text{mmol}/20.5\text{MBq}/\text{ml}$) を $1\text{ml}/\text{kg}$ の用量で急速静脈内投与を行った.

3) 血液中放射能濃度

^{14}C -(his)-L-カルノシン, ^{14}C -(ala)-L-カルノシンまたは ^{14}C -L-ヒスチジンを経口投与し, 所定時間にエーテル麻酔下, 頸静脈よりヘパリン

処理した注射筒を用いて血液を約100 μ l 採取し放射能を測定した。

4) 尿, 糞, 呼吸排泄

ラットに ^{14}C -(his)-L-カルノシン, ^{14}C -(ala)-L-ヒスチジンまたは ^{14}C -L-ヒスチジンを経口投与後, 個別に代謝ケージ (メタボリカ CO_2 , 杉山元医理機器) に収めた。自然排泄された尿, 糞を経時的に採取し, 呼吸は, モノエタノールアミンの入った捕集瓶に導き排泄された $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し, それぞれの放射能を測定した。投与後120時間でラットをエーテル麻酔死させ, 0.5M水酸化ナトリウムおよびトルエンを加えて120時間加熱溶解し, 屍体内残存放射能を測定した。

5) 血漿中L-カルノシンおよびその代謝物濃度推移

ラットに大腿静脈に施したカニューレより ^{14}C -(his)-L-カルノシンを急速静脈内投与し, 大腿動脈に施したカニューレよりヘパリン処理したマイクロスピッツを用い, 所定の時間に採血を行い, 採取した血液は遠心分離 (3000rpm, 10分) して血漿を得た。血漿の放射能を測定し, 同時に未変化体および代謝物の検討のため, 血漿100 μ l に30%スルホサリチル酸 (SSA) 50 μ l を加え混和後遠心分離 (5000rpm, 10分) してその上清50 μ l を HPLC に供した。また, このときの残渣の放射能についても測定し, 血漿総放射能に対するL-カルノシンおよびL-ヒスチジン濃度の割合を式1および2より算出した。

$$\text{Pcar} (\%) = \text{Fcar} \times (\text{T} - \text{SR}) / \text{T} \quad (1)$$

$$\text{Phis} (\%) = \text{Fhis} \times (\text{T} - \text{SR}) / \text{T} \quad (2)$$

Pcar : 血漿総放射能に対するL-カルノシン放射能濃度

Phis : 血漿総放射能に対するL-ヒスチジン放射能濃度

Fcar : SSA 上清中総放射能に対するL-カルノシン放射能濃度

Fhis : SSA 上清中総放射能に対するL-ヒスチジン放射能濃度

T : 血漿総放射能

SR : SSA 不溶性画分総放射能

4. HPLC によるL-カルノシンおよび代謝物の分析

装置はポンプに LC-6A (島津製作所), インジェクターに REODYNE (レオダイナ), カラムオープンに CTO-6A (島津製作所), 蛍光検出器として RF-530 (島津製作所), OPA 反応槽として CRB-1B (島津製作所) を用い, OPA による蛍光ポストカラム法により分析した。分析条件を Table I に示した。蛍光検出器からの分離液をフラクションコレクターで集め, L-カルノシンおよびL-ヒスチジン, 1-および3-メチルヒスチジン, ヒスタミン, ウロカニン酸の溶出位置の放射能を測定した。

5. 放射能の測定

血液100 μ l に組織溶解剤ソルエン-350 2ml を加え溶解後, 過酸化ベンゾイル飽和のトルエン溶液0.4ml を加え50 $^{\circ}\text{C}$ で一晩振とうして脱色した後, ハイオニックフロー10ml を加えた。血漿100 μ l に直接アトムライト10ml を加えた。SSA 処理した血漿残渣は, さらに SSA 50 μ l にて洗浄後, ソルエン-350 2ml に溶解し放射能を測定した。尿および呼吸は水で希釈し, その500 μ l に

Table I Analytical condition of HPLC

Column : Cosmosil 5C ₁₈ (4.6 I.D. $\times$ 250 mm, nacalai tesque)
Column temp. : 45 $^{\circ}\text{C}$
Mobile phase : 10mM H_3PO_4 contained 30mM 1-pentane sulfonate (pH 2.5)
Mobile phase flow rate : 1.2ml/min
Reaction reagent : OPA (1.6g) and N-Ac-Cyc (2 g) in MeOH : 20% Brij-35 : 0.2M borate buffer (pH9.2) = 10 : 2 : 1000
Reaction reagent flow rate : 1.2ml/min
Reaction coil temp. : 45 $^{\circ}\text{C}$
Wavelength : Ex 348nm, Em 450nm

アトムライト10mlを加えた。糞は水を加え搅拌均匀一化し、その500 μ lにアトムライト10mlを加えた。屍体内残存量は溶解液を搅拌均匀一化し、糞と同様に処理した。HPLCの溶離液には直接インスタゲルを20ml加えた。これらを液体シンチレーションカウンター Tricarb 2000 CA (Packard) で放射能を測定した。計数効率の補正は外部標準線源によるチャンネル比法によった。

6. ヒト血漿中での代謝

健康人男性の血漿100 μ lに ^{14}C -(his)-L-カルノシン (0.35 μ mol/21.0KBq/ml)の水溶液50 μ lを添加し、室温で所定時間放置後、30% SSAを加え混和後、遠心分離 (5000rpm, 10分) してその上清50 μ lをHPLCに供した。

結果

1. 血液中放射能濃度推移

ラットに ^{14}C -(his)-L-カルノシン, ^{14}C -(ala)-L-カルノシンまたは ^{14}C -L-ヒスチジンを経口投与した後の血液中放射能濃度推移を Fig. 2 に示した。 ^{14}C -(his)-L-カルノシン投与後の血中放

射能濃度は、投与後4時間で最高値 ($t_{\max}$) に達し、投与後120時間まではほぼ同じ濃度で推移した。一方、 ^{14}C -(ala)-L-カルノシンは投与後30分で最高濃度に達し、その後3相性に消失した。消失半減期は、 $t_{\max}$ から6時間においては 3.94 ± 0.16 時間 (平均値 $\pm$ 標準偏差), 6時間から24時間においては 19.69 ± 4.50 時間, 24時間から120時間においては 91.87 ± 15.48 時間であった。一方、 ^{14}C -L-ヒスチジンをラットに経口投与した後の血液中放射能濃度推移は ^{14}C -(his)-L-カルノシンの推移ときわめてよく一致し、ともに、放射能が血中に残存する傾向が認められた。

2. 尿, 糞, 呼気中放射能排泄率

^{14}C -(his)-L-カルノシン, ^{14}C -(ala)-L-カルノシンまたは ^{14}C -L-ヒスチジンを経口投与した後の放射能の尿, 糞, 呼気中累積排泄率を Fig. 3 に示した。 ^{14}C -(his)-L-カルノシンは投与後120時間までに投与量の37%が呼気中に排泄され、尿および糞中排泄はそれぞれ7.9%および6.3%を示した。また、投与後120時間における体内残存量は44.4%を示した。一方、 ^{14}C -(ala)-L-カル

Fig. 2 Blood concentrations of total radioactivity after oral administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine (●), ^{14}C -(ala)-L-carnosine (○) and ^{14}C -L-histidine (△) to rats (Dose; 0.17mmol/kg). Each point is the mean $\pm$ S.D. (n=3).

Fig. 3 Cumulative excretions of radioactivity in urine, feces and expired air(CO_2) after oral administration of ^{14}C -(his)-L-carnosine (a), ^{14}C -(ala)-L-carnosine (b) and ^{14}C -L-histidine (c) to rats (Dose; 0.17 mmol/kg)
 $\triangle$, Urine; $\square$, Feces; $\circ$, Expired air; $\bullet$, Total
 Each point is the mean $\pm$ S.D. (n=3).

Fig. 4 Plasma concentrations of ^{14}C -(his)-L-carnosine ($\bullet$) and total radioactivity ($\circ$) after bolus intravenous injection of ^{14}C -(his)-L-carnosine to rats (Dose; 0.35 mmol/kg)
 Each point is the mean $\pm$ S.D. (n=3).

Fig. 5 Percentage of radioactivity of sulfosalicylic acid (SSA) soluble fraction ($\circ$), ^{14}C -(his)-L-carnosine ($\triangle$) and ^{14}C -L-histidine ($\bullet$) in plasma after bolus intravenous injection of ^{14}C -(his)-L-carnosine to rats (Dose; 0.35 mmol/kg)
 Each point is the mean $\pm$ S.D. (n=3).

ノシンは投与後120時間までに、呼気中に80.2%, 尿中に5.4%, 糞中に1.8%が排泄され、体内残存量は9.6%であった。また、 ^{14}C -L-ヒスチジンは投与後120時間までに、呼気中に41.4%, 尿中に7.0%, 糞中に4.9%が排泄され、体内残存量は42.8%であり、 ^{14}C -(his)-L-カルノシンのそれ

とよく一致した。

3. 血漿中L-カルノシンおよびその代謝物推移

ラットに ^{14}C -(his)-L-カルノシンを静脈内投与したのちの血漿中放射能濃度および未変化体L-カルノシンの推移を Fig. 4 に示した。血漿中

Fig. 6 Percentage of radioactivity of ^{14}C -(his)-L-carnosine (○) and ^{14}C -L-histidine (●) in sulfosalicylic acid (SSA) soluble fraction of human plasma at room temperature

総放射能濃度は投与後2時間まで減少し、その後増加する傾向を示した。血漿中L-カルノシンは消失半減期15分で一相性に減少し、投与後4時間では検出されなかった。

また、血漿をSSAで処理したとき、SSA上清の放射能の血漿中総放射能に占める割合は経時的に減少し、L-カルノシンの放射能の割合も上清のそれよりも急速に減少した。一方、L-ヒスチジンの放射能の割合は投与後30分まで増加し、その後緩やかに減少した (Fig. 5)。

また、SSA上清をHPLCにより測定した際、1-および3-メチルヒスチジン、ヒスタミン、ウロカニン酸の溶出位置には放射能は検出されなかった。

4. ヒト血漿におけるL-カルノシンの代謝

ヒト血漿中に ^{14}C -(his)-L-カルノシンを添加し室温に放置したとき、Fig. 6に示したようにL-カルノシンは急速に減少し、それに対応してL-ヒスチジンが増加した。添加したL-カルノシンは、15分後にはすべてL-ヒスチジンに代謝された。

考 察

ラットに ^{14}C -(his)-L-カルノシンおよび ^{14}C -(ala)-L-カルノシンを経口投与した後の血液中の放射能濃度を比較した。 ^{14}C -(his)-L-カルノシンは投与後4時間まで上昇した後、ほぼ一定の

濃度で推移したのに対し、 ^{14}C -(ala)-L-カルノシンは投与後30分で最高濃度に達した後、投与後24時間までは半減期約4時間で消失し、2種類の標識体の放射能濃度は異なった推移を示した。また、 ^{14}C -(his)-L-カルノシンおよび ^{14}C -(ala)-L-カルノシン投与後120時間までの尿、呼気中排泄率および屍体内残存量より算出した吸収率はともに90%前後であり、L-カルノシンの吸収はきわめて良好であった。 ^{14}C -(his)-L-カルノシンおよび ^{14}C -(ala)-L-カルノシンの主排泄経路は呼気排泄であったが、投与後120時間までの排泄率は投与量の37%および80%であり、大きく異なった。さらに、投与後120時間における体内残存量は ^{14}C -(his)-L-カルノシンが44%であるのに対し、 ^{14}C -(ala)-L-カルノシンは10%であった。このカルノシンの標識位置の違いによる体内動態の違いを検討する目的で、 ^{14}C -L-ヒスチジンの血中放射能濃度推移および排泄パターンを検討したところ、 ^{14}C -(his)-L-カルノシンのそれときわめてよく一致し、カルノシンが投与後ヒスチジンと β -アラニンに水解され、それぞれの代謝過程を経ることが示唆された。

次に、ラットにおけるL-カルノシンの代謝を検討する目的で、静脈内に ^{14}C -(his)-L-カルノシンを投与したときの血漿中未変化体のL-カルノシンおよびL-ヒスチジンの濃度推移を検討した。L-カルノシンの血漿中からの消失は著しく速く、消失半減期は15分であった。また、L-カルノシンの消失にともないL-ヒスチジンの一過性の増加が認められた。これにより、L-カルノシンが投与後L-ヒスチジンに速やかに代謝されることが明らかとなった。

また、 ^{14}C -L-カルノシンを静脈内投与したとき、L-カルノシンの血漿からの急激な減少に比べ、血漿中総放射能は投与後1時間まで減少したが、その後増加傾向を示した。さらに、血漿をSSAで処理した後の遠心上清の放射能 (SSA可溶画分; アミノ酸などの低分子物質^{7,8)}) がL-カルノシンの減少よりは緩やかであるが経時的に減少した。これらは、L-カルノシンが蛋白構成アミノ酸であるL-ヒスチジンを経て、各組織中成分として incorporate された後、その一部が血漿蛋白成分として移行されることに起因すると考

えられた。また、L-ヒスチジンは、さらにL-および3-メチルヒスチジン、ヒスタミン、ウロカニン酸などに代謝され、その一部はグルタミン酸を経て TCA 回路で CO_2 にまで代謝されることが知られている⁹⁾。今回の結果において、L-カルノシン投与後の血漿中にL-ヒスチジンの代謝物は認められなかったが、これはL-ヒスチジンの肝ミトコンドリア内での代謝が著しく速いためと考えられた。一方、 β -アラニン側はミトコンドリア内で β -alanine-oxoglutarate aminotransferase または D-3-aminoisobutyrate aminotransferase によりマロン酸セミアルデヒドに代謝され、さらにアセチル CoA またはアセトアルデヒドとなり、最終的に CO_2 となることが知られている¹⁰⁾。 ^{14}C -(ala)-L-カルノシン投与後、80%以上の放射能が体外へ速やかに排泄され、屍体内残存量が ^{14}C -(his)-L-カルノシン投与後のそれに比較し低い値を示したが、これらは、 β -アラニンがL-ヒスチジンと異なり非蛋白構成アミノ

酸であることに起因するものと考えられた。

L-カルノシンの代謝酵素であるカルノシナーゼは、ラット、ヒトなどの脊椎動物の多くの組織に存在しており、ラット血漿中には存在しないが、ヒト血漿中に存在することが報告されている^{11~13)}。ラットにおいては、肝、腎、心臓、肺、脳、小腸などの多くの組織において、カルノシナーゼが存在している¹¹⁾ ことより、血漿中L-カルノシンは全身の組織で代謝を受けるため、消失が著しく速いと考えられた。一方、ヒト血漿に ^{14}C -(his)-L-カルノシンを添加したとき、L-カルノシンは半減期5分で急速に減少し、かつ、ほぼ定量的にL-ヒスチジンとなることが明らかとなった。このことより、ヒトにおいては、生体外より投与されたL-カルノシンは血漿を含む各組織で速やかに代謝されると考えられ、ラットと同様、L-カルノシンはL-ヒスチジンと β -アラニンに分解され、その後、それぞれの代謝経路にしたがって代謝されるものと推定された。

文 献

- 1) Gulewitsch, W. and Amiradzibi, S. : *Ber. Drch. Chem. Ges.*, **33** : 1902-1903 (1900).
- 2) Davey, C.L. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **89** : 303-308 (1960).
- 3) Nagai, K., Suda, T., Kawasaki, K. and Mathuura, S. : *Surgery*, **100** : 815-821 (1986).
- 4) 山川晃弘 : 昭和医学会雑誌, **35** : 113-126 (1980).
- 5) Harding, J. Margolis, F.L. : *Brain Research*, **110** : 351-360 (1976).
- 6) Hartman, P.E. Hartman, Z. and Ault, K.T. : *Photochem. Photobiol.*, **51** : 59-66 (1990).
- 7) 医薬品開発のためのファーマコキネティクス実験法, 花野 学, 梅村甲子郎, 伊賀立二編, ソフトサイエンス社, P.47 (1985).
- 8) Qureshi, G.A. and Qureshi, A.R. : *J. Chromatogr.*, **491** : 281-289 (1989).
- 9) アミノ酸代謝と生体アミン, 生化学実験講座11, 日本生化学会編集, 東京, 化学同人発行, P.565-593 (1976).
- 10) Mizota, C., Fujimoto, S., Kikugawa, M., Kimura, Y. and Tamaki, N. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **34** : 223-236 (1988).
- 11) Wood, T. : *Nature*, **180** : 39-40 (1957).
- 12) Lenney, J.F., Peppers, S.C., Kucera-Orallo, C.M. and George, R.P. : *Biochem. J.*, **228** : 653-660 (1985).
- 13) Lenney, J.F., George, R.P., Weiss, A.M., Kucera, C.M., Chan, P.W.H. and Rinzler, G.S. : *Clinica. Chimica. Acta*, **123** : 221-231 (1982).