技術論文

HPLC 法によるヒト血しょう中のイミダゾールジペプチド およびその代謝物の同時定量

塩谷茂信^{1,2}, 鈴木貴則², 米山 明², 柳内延也^{1,2*}, 萩原昌司¹, 鍋谷浩志¹

¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構食品研究部門

² 東海物産株式会社研究部

An Improved Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Quantification of Levels of Imidazole Dipeptides and Their Metabolites in Human Plasma

Shigenobu Shiotani^{1,2}, Takanori Suzuki², Akira Yoneyama², Nobuya Yanai^{1,2*},
Shoji Hagiwara¹ and Hiroshi Nabetani¹

¹ Food Research Institute, NARO, 2-1-12, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642

² Research Division, Tokai Bussan Co. Ltd., 1-10-5 Iwamotochou, Chiyoda, Tokyo 101-0032

Imidazole dipeptides are generally present in animal foods as a mixture of anserine and carnosine. When ingested orally, both dipeptides are absorbed from the intestinal tract and immediately hydrolyzed to their constituent amino acids in blood. A reversed phase-HPLC method using acetonitrile solvent was developed for the quantification of imidazole dipeptides and their metabolites in blood. However, due to the overlapping of serum components and deproteinizing reagents, it was difficult to simultaneously determine the plasma levels of these compounds, especially that of 1- or 3-methyl histidine, using this system. To solve this, we modified the solvent and used an isocratic condition without acetonitrile to prolong the retention time of imidazole dipeptides and their metabolites. Consequently, this system was able to quantify imidazole dipeptides and their related metabolites without removal of the deproteinizing reagents. Further, we evaluated whether there are differences in plasma concentrations and bioavailability of different commercial products. Alterations in plasma levels of imidazole dipeptides and related compounds in 10 normal volunteers who orally ingested two different commercial products in a double-blinded and crossover study were measured using the modified method. Although the plasma levels of anserine were only 1/10 of 1-methyl histidine, the C_{max} of anserine was observed at 40 min after ingestion and was similar for both commercial products. There were no differences in the bioavailability and plasma levels of the related compounds of the two commercial imidazole dipeptides. These results indicate that the modified HPLC method was applicable for the simultaneous and precise determination of human plasma levels of imidazole dipeptides and their metabolites.

(Received Nov. 4, 2016; Accepted Mar. 16, 2017)

Keywords : imidazole dipeptides, oral ingestion, plasma concentration, modified RP-HPLC, bioavailability

キーワード : イミダゾールジペプチド, 経口摂取, 血中濃度推移, 改良逆相-HPLC 法, 生物学的利用能

イミダゾールジペプチドはβ-アラニンとL-ヒスチジンから構成されるペプチドの総称であり、カルノシンとそのメチル化誘導体であるアンセリンおよびバレニンの3種類が脊椎動物の骨格筋や脳組織などに存在している¹⁾。アンセリンは構成アミノ酸のヒスチジンの1位の窒素が、そして鯨などの水棲哺乳類に特有のバレニンは3位の窒素がそれぞれメチル化されたものである(図1)。これらのイミダゾールジペプチドは抗酸化作用を持ち、筋肉組織のpH平衡能や抗疲労作用、および嗅覚組織に必須な金属のキレー

ト作用など多彩な機能性をもつことが知られている。さらに、これらの作用に加えて、イミダゾールジペプチドには神経細胞のエネルギー代謝改善²⁾や記憶力の低下を抑制する効果³⁾も確認されており、生活習慣病を予防する効果が期待される動物由来の健康機能性成分である。

食品や生体内に存在するイミダゾールジペプチドの定量は、これまで主としてアミノ酸自動分析計が用いられてきた。しかし測定に長時間を要することから、これに代わる迅速簡便な定量法として各種HPLC法が開発されてい

¹ 〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12, ² 〒101-0032 東京都千代田区岩本町1-10-5

*連絡先 (Corresponding author), nyanai@affrc.go.jp

図1 イミダゾールジペプチドの構造式

る⁴⁾⁵⁾。一方、イミダゾールジペプチドの生体内機能を探索する上で不可欠である血中濃度推移の測定法として、これらの HPLC 法にはそれぞれ問題点があった。その一つに、経口摂取されたイミダゾールジペプチドは腸管から吸収されて血中へ移行すると速やかにカルノシン分解酵素⁶⁾の作用を受けてカルノシンはβ-アラニンとヒスチジンへ、アンセリンはβ-アラニンと1-メチルヒスチジンへ、そしてバレニン⁷⁾はβ-アラニンと3-メチルヒスチジンへ分解されるが、経口摂取後のこれら代謝物の血中濃度推移の測定では、いずれの HPLC 法でも十分な結果が得られなかったことがある。これは測定の障害になる血しょうタンパク質を除去するためにトリクロロ酢酸 (TCA) や過塩素酸 (PCA) などのタンパク質除去剤が使用されているが、これらのピークがクロマトグラムに大きく出現して (図2参照)、イミダゾールジペプチド代謝物のピークと重なるためであった。

Dunnett ら⁷⁾は TCA や PCA に代えてスルホサリチル酸を除タンパク質剤として用いているが、そのピークの影響は依然大きく、HPLC 測定の前に血しょう試料を吸着剤へ吸着させて除タンパク質剤やその他の妨害物質を除去する処理を行わなければならなかった。この処理は多数の検体を測定する場合には極めて煩雑であり、かつ操作の過程で測定物質の損失などを生じさせることもあった。除タンパク質剤の違いや試料調製法の煩雑さに起因すると考えられるが、イミダゾールジペプチドの経口摂取後の血中濃度のこれまでのデータでは、研究報告によって異なる場合もあった。

本研究では、経口摂取後の血中イミダゾールジペプチドとその代謝物濃度を迅速簡便に測定できる方法として Dunnett らが報告した逆相-HPLC 法をさらに改良することを試みた。すなわち、除タンパク質剤としてスルホサリチル酸より効果的な TCA を用い、その除去処理を必要としない血しょう中のイミダゾールジペプチドとその代謝物

であるヒスチジン、1-および3-メチルヒスチジンを同時に定量可能な条件の検討を行った。その結果、Dunnett らの方法の溶離液組成からアセトニトリルを除き、アイソクラティック条件で通液すると、イミダゾールジペプチドとその代謝物のカラム保持時間の延長が図れ、この条件下では TCA の除去処理を必要とせずに血しょう中のイミダゾールジペプチドとその代謝物が同時定量できることが判明した。また、分析終了後、ただちに40%アセトニトリルを含有する溶離液を通液してカラムを洗浄することによって、連続して血しょう試料の測定を行うことが可能であった。また、本研究ではこの改良逆相-HPLC 法を用いて、2社から市販されている鶏肉由来精製イミダゾールジペプチド製品間に腸管吸収速度や生物学的利用能に差異があるか否かを試験した。1群を5名ずつ2群とし、合計10名の健康な被験者を対象に、二重盲検クロスオーバー方式で経口摂取させてその血中濃度推移を測定したので、その結果も併せて報告する。

実験方法

1. 試薬類

イミダゾールジペプチドの定量に用いたカルノシンとアンセリン-硝酸塩、L-ヒスチジン、1-および3-メチルヒスチジンはいずれもシグマ-アルドリッチ社 (セントルイス、モンタナ州) より購入した。その他の試薬は和光純薬 (東京) より購入した。市販のイミダゾールジペプチド粉末製品はいずれも鶏肉エキスから精製された A 社と B 社の2種類の粉末を用いた。イミダゾールジペプチドの含量はともに40%であった (表1)。

2. 改良 HPLC 法の分析条件

(1) HPLC

Dunnett らの方法⁷⁾に従って、逆相系-HPLC カラムは TSK gel ODS-80Ts (東ソー製、150×4.6mm, 5μm) を用いた。ポンプは島津製作所製 SCL-10 を用いて、流速 0.8 mL/min で送液した。検出器 (島津製作所製, SPD-10A) 波長は 220nm を用いた。また、試料注入量は 10 μL とした。なお、本法の検出限界と定量下限値は JIS の高速液体クロマトグラフィー通則⁸⁾に従って求めた。すなわち、波長 220nm における検出器出力のノイズ N を試料溶液を含まない空試験のクロマトグラムから算出し、試料溶液のクロマトグラムの各成分のピーク強度 S が N の3倍、10倍となる値を検出限界、定量下限値とした。

(2) 溶離液

原法の溶離液は4%アセトニトリルを含有する 200mM リン酸二水素アンモニウム/100mM ペンタンスルホン酸ナトリウム (pH2.0) であるが、除タンパク質剤として効果的な TCA を用い、またこの除去処理を必要としないようにするために溶離液を変更した。すなわち、溶離液中の塩とイミダゾールジペプチドおよびその代謝物がイオン対を

形成し、中性物質としてカラムを移動するので有機溶媒を含まない水系の溶離液のほうが保持時間は長くなるので、0分から25分まではアセトニトリルを含有しない上記の塩類溶液を溶離液としてアイソクラティックの条件で通液した。そして25分から5分間、40%アセトニトリルを含有する溶離液でカラムを洗浄した後、アセトニトリルを含有しない出発溶離液を15分間通液してカラムを再平衡化した。

(3) 血しょう試料の調製

解凍した被験血しょう試料から速やかに450 μ L採取し、TCAの最終濃度が5%になるように50% TCA溶液50 μ Lを添加して攪拌した後、直ちに4℃、2000 $\times g$ 、10分間遠心分離してタンパク質を沈殿除去した。上清を0.45 μ mのろ過膜(ADVANTEC, DISMIC-13)でろ過してHPLC測定用の被験試料とした。測定値は2回測定の平均値で表した。また、Dunnettらの溶離液の条件と本報の条件を比較するために、被験者3名のイミダゾールジペプチド摂取前の血しょう試料を用いて、イミダゾールジペプチドおよびその代謝物の標準品を添加して、それぞれの条件でHPLCを行った。

3. 被験者への投与と採血

ヘルシンキ宣言に基づく東海物産株式会社ヒト試験に関わる倫理委員会の承認を経て(承認番号2016-01)、10名の健康な被験者(男性6名、女性4名、平均年齢38.7 $\pm$ 10.2歳)からインフォームドコンセントを取得した。また、試験を開始する前にUMIN臨床試験登録システム(UMIN-CTR)に登録した(試験ID:UMIN000023079)。被験試料の摂取と採血は小川町メディカルクリニック(東京都千代田区)において医師立ち会いのもとで行った。二重盲検クロスオーバー方式による識別不能の条件で包装された2社のイミダゾールジペプチド粉末製品を、1社の製品につい

て5名ずつ、温湯に溶解して経口摂取してもらった(イミダゾールジペプチド摂取量として1g)。採血は静脈留置針を用いて、摂取前(0分)、摂取後20、40、60および120分に行い、ヘパリン加採血管へそれぞれ5mLずつ採血した。2週間のウォッシングアウト期間の後に、摂取する市販製品を交換して、再び1社の製品について5名ずつ、同様に経口摂取してもらった。採血された血液は直ちに氷水中で冷却し、4℃において2000 $\times g$ 、10分間遠心分離し、約1.5 mLの血しょうを採取した。血しょうは直ちに-80℃で凍結保管した。

4. 統計解析

分析値を得た後に、二重盲検のキーを開封した。クロスオーバー方式を採用したので、まず10名の被験者について、1回目と2回目の摂取時期による差異の有無と、摂取した市販製品間での差異の有無を調べるために分散分析法(ANOVA法)で統計解析を行った。また、10名の被験者のデータを市販品別にまとめて同様にANOVA法で差異の有無を解析した。イミダゾールジペプチドとその代謝物の血中濃度推移については、摂取前と摂取後の各経過時間との間の変化として対のあるStudentの t 検定法で解析した。いずれの場合も p 値が0.05未満を統計的に有意の差とした。

実験結果

1. 原法と改良法の溶離液でのイミダゾールジペプチドとその代謝物の測定

イミダゾールジペプチドおよびその代謝物の各標準品は、Dunnettらの溶離液の条件で完全に分離して測定される(図2A)。しかし、標準品非添加と添加の3名の被験者血しょう試料ではいずれも図2BおよびC(被験者の代表例として1名の被験者のクロマトグラムを示す)のように

図2 アセトニトリル含有溶離液を用いたHPLCのクロマトグラム

A, 標準品(いずれも10 μ M); B, TCAで除タンパク質処理したヒト血しょう; C, 標準品(いずれも20 μ M)を添加してTCAで除タンパク質処理したヒト血しょう。

1, 1-メチルヒスチジン; 2, L-ヒスチジン; 3, 3-メチルヒスチジン; 4, アンセリン; 5, カルノシン。A, B, およびCはDunnettらの溶離液条件に従って4%アセトニトリルを含有する200mMリン酸二水素アンモニウム/100mMペンタンスルホン酸ナトリウム(pH2.0)を用いて、流速0.8mL/minの条件で通液した。カラムはTSK gel ODS-80Ts(東ソー製, 150 $\times$ 4.6mm, 5 μ m), 検出器波長は220nmを用いた。

図3 改良溶離液を用いたHPLCのクロマトグラム

A, 標準品 (いずれも 100 μ M) ; B, TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう ; C, 標準品 (いずれも 10 μ M) を添加して TCA で除タンパク質処理したヒト血しょう。

1, 1-メチルヒスチジン ; 2, L-ヒスチジン ; 3, 3-メチルヒスチジン ; 4, アンセリン ; 5, カルノシン。0分から25分までDunnettらの溶離液からアセトニトリルを除いた溶離液をアイソクラティックの条件で通液したこと以外は、図2と同じ条件でHPLCを行った。

なり、TCAで除タンパク処理した血しょうではTCAと血しょう成分の大きなピークがヒスチジンと1-および3-メチルヒスチジンのピークと重なり、定量が不可能な状態となった。

Dunnettらは図2Bに示した妨害物質を除去するために、スルホサリチル酸で除タンパク処理した試料を固相抽出カラムへ吸着させ、スルホサリチル酸と妨害物質を1Mリン酸溶液で溶出除去した後に吸着材を乾燥させ、アセトニトリルを含有するHPLC用の溶離液を用いて目的物質を溶出させて被験試料としているが、本報ではこれらの処理を省略した。すなわち、除タンパク質剤としてTCAを用い、HPLC溶離液からアセトニトリルを除いた200mMリン酸二水素アンモニウム/100mMペンタンスルホン酸ナトリウム(pH2.0)のアイソクラティック条件で溶出し、目的物質の保持時間の延長を図った。この条件では分析に要する時間が3倍程度延長したが、TCAや妨害物質の除去処理を必要とせずに、これらのピークとのオーバーラップを防ぎ、ヒスチジンと1-および3-メチルヒスチジンの定量が可能な分離状態となった。図3には被験者3名のうち1名

の血しょう試料のクロマトグラムを代表例として示す。

また、イミダゾールジペプチドを摂取した後のイミダゾールジペプチドとその代謝物の経時的血中濃度推移を二重盲検クロスオーバー試験に参加した1名の被験者の血しょう試料で示すと図4のクロマトグラムの通りであった。イミダゾールジペプチド摂取後120分までTCAや血しょう成分に影響を受けることなくこれらの物質の定量が可能であった。

イミダゾールジペプチド摂取前の血しょう中にはヒスチジンと微量の1-および3-メチルヒスチジンのピークが観察されるが、アンセリンとカルノシンのピークは全く観察されなかった。しかし、摂取20分後には1-メチルヒスチジンの上昇が認められ、また微量であるがアンセリンピークも認められた。一方、カルノシンは検出されなかったがその構成成分であるヒスチジンは恒常的にヒト血しょう中に存在しており、イミダゾールジペプチド摂取後60分まで僅かに増加することが観察された。また、ヒスチジンと同様にヒト血しょう中に恒常的に存在している3-メチルヒスチジンの濃度に変化は認められなかったが、アンセリ

図 4 イミダゾールジペプチドおよび代謝物の経時的血中濃度推移のクロマトグラム

A, 0 分 (摂取前) ; B, 摂取後 20 分 ; C, 摂取後 40 分 ; D, 摂取後 60 分 ; E, 摂取後 120 分.

1, 1-メチルヒスチジン ; 2, L-ヒスチジン ; 3, 3-メチルヒスチジン ; 4, アンセリン.

市販イミダゾールジペプチド製品の経口摂取前 (A) および摂取後 20~120 分 (B~E) に採血した同一被験者血液から血しょうを分離し, TCA で除タンパク質処理した後に図 3 と同じ HPLC 条件で測定した.

ンの構成成分である 1-メチルヒスチジンは経口摂取後, 60 分まで経時的に増加し, 120 分でもほぼ同じ濃度で維持されることが示された.

2. 検出限界と定量下限値

改良逆相-HPLC 法によりイミダゾールジペプチドとその代謝物の検量線を作成した. 図 5 に示す通りいずれの化

合物でも直線性が認められた. また, 検量線作成と並行して検出限界と定量下限値を設定したが, 波長 220nm における空試験の検出器出力 (ノイズ, N) が 0.15mV であったことより, 検出限界は $S/N=3$ として 0.45mV, また定量下限値は $S/N=10$ として 1.5mV となった. これらの値を検量線のデータから換算すると, ヒスチジンと 1-および

図5 イミダゾールジペプチドおよび代謝物の検量線

A, イミダゾールジペプチド; B, イミダゾールジペプチド代謝物。▲, アンセリン; ●, カルノシン; △, 1-メチルヒスチジン; ○, ヒスチジン; ×, 3-メチルヒスチジン。

標準品5種類を含有する混合溶液 (2.5~20 μg/mL の濃度範囲) を図3と同じHPLC条件で分離し, 検量線を作成した。各試料のピーク面積値は2回測定の平均値。

3-メチルヒスチジンの濃度は, 前者が平均で0.1 μg/mLであり, 後者は平均で0.3 μg/mLであった。各標準品の添加回収試験の結果では, 回収率は全て95%であり, Dunnettらの方法と同等であった。

さらに, 市販の精製イミダゾールジペプチド粉末中のアンセリンとカルノシンをこの溶離液の条件下で定量した結果は表1に示す通りである。鶏肉に由来する2社の市販品イミダゾールジペプチド製品中のアンセリンとカルノシンの含有比は2.7と2.4であり, ほぼ同等であった。

3. 二重盲検-クロスオーバー法による市販鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能の比較

二重盲検クロスオーバー法により市販されている2社の鶏肉由来イミダゾールジペプチドの生物学的利用能について比較検討したが, イミダゾールジペプチドとその代謝物の血中濃度推移に各被験者の摂取時期と市販製品の間大きな差は認められなかった。そこで市販の製品別にそれぞれ10名の被験者のデータをまとめて解析を行った。経口摂取後に血中に出現するイミダゾールジペプチドとその代謝物はアンセリン, ヒスチジン, 1-メチルヒスチジンの3種であった (図6)。このうち, カルノシンの構成アミノ酸であるヒスチジンは大きな増加ではなかったが, 市販品間でほぼ同じ増加を示した。1-メチルヒスチジンとアンセリンは, 測定時間によって若干の差が製品間で観察されたが,

表1 市販鶏肉由来精製イミダゾールジペプチドの成分定量

市販品	総含量 (%)	アンセリン (%)	カルノシン (%)	A/C 含有比*
A社製品	40.6	29.6	11.0	2.7
B社製品	40.1	28.3	11.8	2.4

*アンセリン/カルノシン

これは数名の被験者のバラツキによるもので, 統計的に有意な差ではなかった。また, 血中に出現するこれら3つの化合物は摂取前と比べて摂取後20分から統計的に有意に増加し ($p < 0.05$), アンセリンを除いてこの増加は120分まで維持される結果であった。

イミダゾールジペプチドの市販製品間の生物学的利用能を比較するために, そのパラメーターとして1-メチルヒスチジンとアンセリンの摂取後120分までの血中濃度推移からAUC (曲線下濃度面積) と C_{max} (血中最高濃度) を計測した (表2)。その結果, 1-メチルヒスチジンとアンセリンのAUCと C_{max} では市販の製品間に差異は認められなかった。なお, 0~120分の測定におけるアンセリンの C_{max} は摂取後40分に観察され, 1-メチルヒスチジンは60分であった。

考 察

多様な機能性を持つイミダゾールジペプチドの吸収と体内への輸送はその他のペプチドや栄養素とは異なった様式で行われている⁹⁾。経口摂取されたイミダゾールジペプチドはタンパク質分解酵素の作用をほとんど受けることなく腸管の受容体¹⁰⁾を経由して吸収され, 門脈血中へ移行する。門脈血中にはカルノシン分解酵素⁶⁾が存在し, ここで速やかにβ-アラニンとL-ヒスチジンに分解されて末梢循環血液により各組織へ輸送, 分配される。そしてエネルギー代謝が大きい骨格筋や脳組織などにはカルノシン合成酵素が存在しており¹¹⁾, 組織中でカルノシンが再合成されて様々な生体機能を発揮していると考えられている。

これに対してヒトの組織ではアンセリンが存在することはほとんどないと言われているが, 経口摂取されたアンセリンもカルノシンと同様に腸管で吸収され¹²⁾, 速やかにカルノシン分解酵素によりβ-アラニンと1-メチルヒスチジンに分解される。カルノシン分解酵素によるアンセリンの分解では, アンセリンが酵素抵抗性を示すためにその分解速度はカルノシンよりも遅いことが知られているが¹³⁾, ヒトの各組織では迅速に再びカルノシンへ合成されていると考えられる。

多様な生体機能を持つイミダゾールジペプチドの体内動態を解析することは, その生理的意義を理解する上で極めて重要である。ヒトでのイミダゾールジペプチド経口摂取後の血中動態を調べた報告が幾つかあるが^{14)~16)}, 血中や尿中にカルノシンが分解されずに存在する結果や血しょう中

図 6 二重盲検クロスオーバーによる市販鶏肉由来精製イミダゾールジペプチド粉末経口摂取後のイミダゾールジペプチドおよびその代謝物の血中濃度推移

市販イミダゾールジペプチド A 社製品 (●), および B 社製品 (○) それぞれを摂取した後, 120 分までの被験者血しょう中の各化合物の血中濃度推移を図 3 と同じ HPLC 条件で測定した. 各シンボルは 10 名の平均値, バーは±SD を示す. * はイミダゾールジペプチド製品の摂取前 (0 分) と摂取後の各時間の間で統計的有意差が観察された ($p < 0.05$, 対のある Student の t 検定法)

表 2 市販イミダゾールジペプチド製品経口摂取後の血中動態のまとめ

被験食	1-メチルヒスチジン		アンセリン	
	AUC_{0-2} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	AUC_{0-2} ($\mu\text{g} \cdot \text{h/mL}$)	C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)
A 社製品	14.6±2.1	9.0±1.3	1.7±2.2	1.7±2.1
B 社製品	16.9±5.5	10.9±2.7	1.6±1.2	1.5±1.0
ANOVA	NS	NS	NS	NS

NS: not significant

ではアンセリンが僅かに検出されたがカルノシンは検出されなかった結果などが報告されている. しかしながら, 血しょうや組織中のイミダゾールジペプチドの代謝物である 1-および 3-メチルヒスチジンの測定に関してはまだ十分に検討されてこなかった. アミノ酸自動分析計に代わり, 各種 HPLC 法でこれらの化合物を定量する方法が開発されてきたが, 血しょう成分や除タンパク質剤などの影響で正確にこれらの化合物を定量できなかったことが主な原因であったと考えられる.

本研究では血中のイミダゾールジペプチドとその代謝物

を同時に定量できるより適切な測定法を検討するために, 血しょう中のイミダゾールジペプチドを定量する目的で開発された Dunnett らの HPLC 法⁷⁾ について, さらに改良を加えた. 彼らの方法は短時間で分析が可能な利点を持つ一方で, 被験試料中の成分や除タンパク質剤などのピークが測定すべき化合物のピークとオーバーラップするために被験試料からこれらの成分や化合物, 特に除タンパク質剤を除去する前処理が必要であった. また, 原法の 4% アセトニトリルを含有する溶離液はイオン対逆相-HPLC 法では一般的に使用されるものであるが, この溶離液を使用した場合には TCA などの除タンパク質剤や血しょう成分のピークが 1-メチルヒスチジンのピークとオーバーラップし, またヒスチジンと 3-メチルヒスチジンの分離が悪い欠点があった.

アセトニトリルを除いた本報の溶離液では, 図 2 に示したように, TCA などの影響を受けることなく, 1-メチルヒスチジンの定量が可能であり, 3-メチルヒスチジンとヒスチジンとの分離も良好であった. また, このアセトニトリルを含有しない溶離液をアイソクラティックの条件で通液してイミダゾールジペプチドとその代謝物を同時定量す

る方法は、1回の測定が終了した後に40%のアセトニトリル含有溶離液でカラムを洗浄することにより連続して使用することが可能であった。

改良した逆相-HPLC法を用いて、健康な被験者を対象に二重盲検クロスオーバー方式で市販の鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能の比較検討を行った。イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能は、被験者にイミダゾールジペプチド1gを経口摂取して貰い、経口摂取後の血中濃度推移を測定することで行った。その結果、経口摂取後20分で血中に出現するイミダゾールジペプチドは鶏肉イミダゾールジペプチドの主要成分であるアンセリンではなく、その分解産物である1-メチルヒスチジンであった。このことは腸管吸収されたイミダゾールジペプチドが門脈血の中でカルノシン分解酵素により速やかに分解されることを示している。そして1-メチルヒスチジンの約1/10の濃度であったがアンセリンが検出された。これはカルノシン分解酵素の分解から免れたアンセリンが血中へ移行してきたものと考えられる。一方、もう一つの成分であるカルノシンは被験者全員で全く検出されなかったが、その構成アミノ酸であるヒスチジンは僅かな増加が観察された。

市販の鶏肉由来イミダゾールジペプチド製品の生物学的利用能に関しては、摂取時期や製品間でアンセリンとその代謝物である1-メチルヒスチジンの血中濃度の変化に大きな差はなかった。さらに、市販製品別に10名の被験者に分けてそのAUCと C_{max} （表2）を比較しても大きな差は認められなかった。このことは製品中のイミダゾールジペプチドを構成するアンセリンとカルノシンの含有比率に違いがなければ、腸管吸収や血中移行もほとんど同じであることを示唆するものであった。また、これらの結果はアンセリンを主体とするマグロエキスを由来イミダゾールジペプチドの経口摂取による血中濃度推移¹⁵⁾より若干低い値であったが極めて近似しているものであった。

以上のことより、本研究で改良を加えた逆相-HPLC法による血しょう中のイミダゾールジペプチドとその代謝物の定量法は、イミダゾールジペプチドの各種生活習慣病予防効果を検証するヒトを対象とした研究を行う上で有用であると考えられた。

要 約

食品中のイミダゾールジペプチドはカルノシンとアンセリンの混合体として存在している。これらを経口摂取すると腸管から吸収され、血中で速やかに分解されてその構成アミノ酸となる。血中のイミダゾールジペプチドとその代謝物である構成アミノ酸の同時定量法としてアセトニトリルを含有する溶離液を用いた逆相-HPLC法が報告されている。しかし、これらの方法で用いられる溶離液では血しょう成分や除タンパク質剤のピークがオーバーラップす

るために、血しょう中のイミダゾールジペプチド代謝物、特に1-または3-メチルヒスチジンを同時定量することが困難であった。これを解決するために、我々はアセトニトリルを含有しない溶離液をアイソクラティックの条件で通液してイミダゾールジペプチドとその関連物質の保持時間を長くし、定量が可能な方法に改良した。その結果、血しょう成分や除タンパク質剤の影響を受けることなく同時定量が可能であった。この改良法を用いて市販されている2社の鶏肉由来精製イミダゾールジペプチド粉末製品を10名の健康な被験者に経口摂取してもらい血中濃度推移と生物学的利用能に差異があるか否かを二重盲検クロスオーバー方式で試験した。アンセリン濃度は1-メチルヒスチジンの約1/10であったが、その血中最高濃度 C_{max} は摂取後40分に観察され、2社の鶏肉由来製品で同等であり、市販されているイミダゾールジペプチドの製品間には血中濃度推移も生物学的利用能にも差異は認められなかった。これらの結果から、本改良逆相-HPLC法はヒト血しょう中のイミダゾールジペプチドおよびその代謝物を精度よく同時定量できる分析法であることが示された。

筆者らは本研究に被験者として参加して頂いた東海物産株式会社の社員の皆様に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Boldyrev, A.A., Aldini, G., and Derave, W. (2013). Physiology and pathophysiology of carnosine. *Physiol. Rev.*, **93**, 1803-1845.
- 2) Corona, C., Frazzini, V., Silvestri, E., Lattanzio, R., La Sorda, R., Piantelli, M., Canzoniero, L.M. T., Ciavardelli, D., Rizzarelli, E., and Sensi S.L. (2011). Effects of dietary supplementation of carnosine on mitochondrial dysfunction, amyloid pathology, and cognitive deficits in 3xTg-AD mice. *Plos One*, **6**, e17971.
- 3) Hisatsune, T., Kaneko, J., Kurashige, H., Cao, Y., Satsu, H., Totsuka, M., Katakura, Y., Imabayashi, E., and Matsuda, H. (2016). Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People. *J. Alzheimer Dis.*, **50**, 149-159.
- 4) Abe, H. and Ohmama, S. (1987). Effect of starvation and seawater acclimation on the concentration of free L-histidine and related dipeptides in the muscle of eel, rainbow trout and Japanese dace. *Comp. Biochem. Physiol.*, **88B**, 507-511.
- 5) Teahon, K. and Rideout, J.M. A. (1992). Sensitive and specific high performance liquid chromatographic assay for imidazole dipeptides and 3-methylhistidine in human muscle biopsies, serum and urine. *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 16-22.
- 6) Jackson, M.C., Kucera, C.M., and Lenney, J.F. (1991). Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin. Chim. Acta*, **196**, 193-205.
- 7) Dunnett, M. and Harris, R.C. (1992). Determination of carnosine and other biogenic imidazoles in equine plasma by isocratic reversed phase ion-pair high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, **579**, 45-53.
- 8) Japanese Industrial Standard. (2011). General rules for high performance liquid chromatography. JIS K 0124.

- 9) Stellingwerff, T., Decombaz, J., Harris, R.C., and Boesch, C. (2012). Optimizing human in vivo dosing and delivery of β -alanine supplements for muscle carnosine synthesis. *Amino Acids*, **43**, 57-65.
- 10) Son, D.O., Satsu, A., Kiso, Y., and Shimizu, M. (2004). Characterization of carnosine uptake and its physiological function in human intestinal epithelial Caco-2 cells. *Biofactors*, **21**, 395-398.
- 11) Drozak, J., Veiga-da-Cunha, M., Vertommen, D., Stroobant, V., and Van Schaftingen, E. (2010). Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J. Biol. Chem.*, **285**, 9346-9356.
- 12) Geissler, S., Zwarg, M., Knütter, I., Markwardt, F., and Brandsch, M. (2010). The bioactive dipeptide anserine is transported by human proton-coupled peptide transporters. *FEBS J.*, **277**, 790-795.
- 13) Pegova, A., Abe, H., and Boldyrev, A. (2000). Hydrolysis of carnosine and related compounds by mammalian carnosinases. *Comp. Biochem. Physiol. B, Biochem. Mol. Biol.*, **127**, 443-446.
- 14) Gardner, M.L., Illingworth, K.M., Kelleher, J., and Wood, D. (1991). Intestinal absorption of the intact peptide carnosine in man, and comparison with intestinal permeability to lactulose. *J. Physiol.*, **439**, 411-422.
- 15) Park, Y.J., Volpe, S.L., and Decker, E.A. (2005). Quantitation of carnosine in humans plasma after dietary consumption of beef. *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 4736-4739.
- 16) Kubomura, D., Matahira, Y., Masui, A., and Matsuda, H. (2009). Intestinal absorption and blood clearance of L-histidine-related compounds after ingestion of anserine in humans and comparison to anserine-containing diets. *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1781-1785.

(平成 28 年 11 月 4 日受付, 平成 29 年 3 月 16 日受理)