

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750055

研究課題名(和文)尿酸値をコントロールするための食品中プリン体の吸収と尿酸への代謝動態の定量的解析

研究課題名(英文)Quantitative analysis of the absorption and metabolism of purines in order to control the uric acid levels

研究代表者

福内 友子 (FUKUUCHI, TOMOKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号：10389116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：個々のプリン体化合物に着目し、腸管吸収や肝臓での尿酸代謝における差異を定量的に解析することで、新たな尿酸値上昇リスク評価方法を確立するために、HPLCを用いて各種プリン体を一斉分析可能な方法の確立を目指した。確立した22種類のプリン体(ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基を含む)一斉分析法を用いて、ヒト肝癌由来細胞HepG2細胞を用いたプリン体の代謝動態評価系およびヒト大腸癌由来細胞Caco-2細胞を用いた小腸膜透過性評価系を構築した。本評価系を用いて尿酸値上昇リスクが高いとされる食品成分による影響について評価した結果、プリン体の小腸透過性よりむしろプリン代謝動態への寄与が認められた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate cellular uptake and purine transport, we developed a high-performance liquid chromatography method for intra- and extracellular purine quantification. The developed HPLC method was successfully applied to the qualitative analysis of 22 different intra- and extracellular purines, demonstrating that it is useful for studying the overall pattern of purine metabolism. This method could also be useful for evaluating metabolic dynamics of purines under a variety of conditions stimulated to culture cells. We used the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability and the HepG2 cells for human hepatic cells. As a result of evaluating the risk of rising uric acid levels by food ingredients, the contribution of the purine metabolism was observed rather than the intestinal permeability of the purine.

研究分野：分析化学

キーワード：尿酸値 HPLC プリン体 食品

1. 研究開始当初の背景

高尿酸血症・痛風の治療ガイドラインには、生活指導のひとつとして食事療法があげられており、その一項目にプリン体の摂取制限が示されている。当研究室は以前から食品に含まれる総プリン体含有量測定法確立し、300種類以上の食品・飲料について報告している。また近年、尿酸代謝、糖代謝と脂質代謝は相互に関連があることが明らかにされてきており、このような関連が糖尿病、高血圧などの心血管系リスクにどう関わっているかが検討されている。『尿酸は、バイオマーカーか病因か』といった血清尿酸値の意義をどのように解釈すべきかについては、現在も議論の余地は残されているものの、初期の糖尿病患者や心筋梗塞、高脂血症患者では高尿酸血症を合併しやすいことが臨床的によく知られている。高血圧治療では、血圧低下以上に血清尿酸値を低下させた方が心血管イベントを減らすといった報告もされており、日常的な食事を通した尿酸値コントロールの有用性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

食品中のプリン体化合物は総プリン体量(尿酸換算値)として評価されることが多いが、プリン体化合物の存在様式は核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基と様々であり、腸管での吸収および尿酸への代謝は一樣ではないことも考慮すべきである。本申請課題では、特に総プリン体含有量が少ないにも関わらず尿酸値上昇リスクが高いとされる食品・飲料に着目し、分子種別プリン体含有量を定量する。さらに、プリン体化合物の腸管吸収や肝臓での尿酸代謝における差異を定量的に解析することで、新たな尿酸値上昇リスク評価方法を探る。

3. 研究の方法

(1)食品中の分子別プリン体含有量の測定
これまでに報告している方法(K Kaneko *et al.*, 2014, T Fukuuchi *et al.*, 2013, N Yamaoka *et al.*, 2010)を用いて定量した。プリン体プロファイリングは、アデノシン、AMP、ADP、ATP はアデニンに、グアノシン、GMP、GDP、GTP はグアニンに、イノシン、IMP、IDP はヒポキサンチンに、キサントシン、XMP はキサントシンに換算して、対応する4種のプリン塩基量を求めた。総プリン体量から、別に測定したフリー塩基とヌクレオシド、ヌクレオチド塩基換算値を引くことにより、その差をDNA・RNA由来のプリン塩基量として求めた。

(2)尿酸およびプリン塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの微量一斉分析法の構築

測定対象は、塩基5種(アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサントシン、尿酸)、ヌクレオシド8種(アデノシン、グアノシン、イノシン、キサントシン、デオキシ)、ヌク

レオチド9種(ATP、ADP、AMP、cAMP、GTP、GDP、GMP、IMP、XMP)とした。HPLCにおけるメソッド開発は、いくつかの移動相とカラムを組み合わせて最適な分析条件を検討した。

(3)細胞内外のプリン体を定量するための前処理方法の構築

培養細胞は、24wellプレートに播種したものをを用いた。細胞内物質の抽出溶媒として、メタノール、アセトニトリル、過塩素酸、ギ酸などを用い、抽出効率と細胞内のプリン代謝動態への影響を比較検討した。さらに、これらのサンプル中には、分析対象ではない夾雑物が多種多様に含まれていることから、微量に含まれるプリン体の同定と定量のため、ピークシフト法を用いたプリン体一斉分析法の最適化も試みた。

(4)尿酸値上昇リスクが高いとされる食品成分によるプリン体腸管吸収およびプリン体肝代謝動態評価

確立した22種類のプリン体(ヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基を含む)の一斉分析法を用いて、プリン体分子種別の吸収及び尿酸への代謝動態の違いについて検討した。さらに、尿酸値上昇リスクが高いとされる食品成分として挙げられるフルクトースやエタノールの相加効果についても検討した。プリン体の小腸膜透過性については、ヒト大腸癌由来細胞であるCaco-2細胞を用いた*in vitro*透過および取り込みアッセイにて、代謝動態については、ヒト肝癌由来細胞HepG2細胞を用いた*in vitro*代謝アッセイにて検討した。

(5)食品中プリン体の分子種別プロファイリングおよびネットワークアプリケーション構築

ファイルメーカーにこれまで得られた食品中プリン体含有量およびエネルギーなどの食品成分データを入力し、データベースを作成した。

4. 研究成果

(1)食品中の分子別プリン体含有量の測定
献立に頻繁に使用される食材のプリン体含有量を順次測定しており、その結果については、論文および学会発表にて追加報告している。プリン体プロファイリングの結果、野菜、きのこ類はその約85%を核酸として、肉類は約65%を核酸、約20%を塩基やヌクレオシドとして含むことが明らかとなった。

(2)尿酸およびプリン塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチドの微量一斉分析法の構築

移動相とカラムの組み合わせにより、17種類の標準物質が良好な分離を示すHPLCメソッドを数パターン構築した。これらの方法を用いて、培養上清および細胞抽出液を測

定し、定量分析するための感度および夾雑物質との分離についても検討し、以下のように決定した。

- ・カラム：YMC-Triart C18(4.6 mmI.D.×250 mm,3 μm)
- ・移動相：A;80 mM リン酸アンモニウム緩液(pH 4.1) B;30%メタノール in A
- ・流速：0.6 mL/min, グラジエント溶出
- ・カラム温度：35
- ・検出波長：260 nm(PDA)

(3) 細胞内外のプリン体を定量するための前処理方法の構築

培養細胞系に含まれる代謝酵素をすばやく失活させ、かつ性質の異なる測定対象を効率よく抽出できる前処理方法について検討を重ねた結果、細胞内プリン体の抽出溶媒として、メタノール、アセトニトリル、過塩素酸溶液、水酸化カリウム溶液などを用い、抽出効率と細胞内のプリン代謝動態への影響を比較した。その結果、70%アセトニトリル溶液で、特にヌクレオチドの抽出効率が高いこと、ギ酸を添加した溶液中ではヌクレオチド類が加水分解すること、溶液の温度はそれほど分解に影響しないことが明らかになった。70%ACNの回収率については、以下の表に示す。

表1 細胞抽出液の回収率

Analyte	Cell extract with ACN:water (7:3).			
	Recovery (250 pmol, n = 3, %)		Recovery (500 pmol, n = 3, %)	
	Mean	RSD	Mean	RSD
ATP	87.2	5.1	89.6	2.3
ADP	96.3	1.9	94.4	1.2
AMP	91.2	1.3	91.3	0.4
cAMP	92.9	1	89.8	0.6
Ado	91.1	1	89.8	0.8
A	91.7	1.4	92.8	0.3
GTP	97.2	1.5	94.1	1.1
GDP	87.7	5.3	92.1	3.2
GMP	90.8	0.6	91.8	1.4
Guo	91.9	1.6	89.5	1.2
G	91.3	0.2	92.5	1.2
IMP	88.5	1.7	89.3	2.9
Ino	91.6	1	88.3	3.6
HX	91.2	0.3	92.2	1.1
XMP	91.5	0.2	92.4	1.1
Xao	91.1	1.4	91.4	0.8
X	92.5	0.8	94.4	0.4
UA	85.2	0.9	88.5	6.2
dAdo	85.1	1.4	84.7	0.6
dGuo	90.6	1.3	87.7	0.8
dIno	93.6	3	92.3	1.1
NAD ⁺	92.4	0.8	92.2	0.8

ピークシフト法については、酵素液は、ヌクレオチダーゼ、アルカリフォスファターゼ、アデノシンデアミナーゼ、プリンヌクレオチドフォスホリラーゼ、キサンチンオキシダーゼ、ウリカーゼの6種混合溶液、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.9) 中で、37 で 12 時間以上反応させると、すべてのプリン体のピークは消失可能であることが明らかになった。これらの代謝物であるアラントインは 260 nm で吸収を持たないので、クロマトグラムではアデニンとグアニンの酸化

体のピークのみ新たに検出される。同様の保持時間でも、夾雑物であるピークは酵素処理後も消失しないため、2 つを比較することでより正確なプリンヌクレオチド、ヌクレオチド、塩基の一斉分析が可能となった。

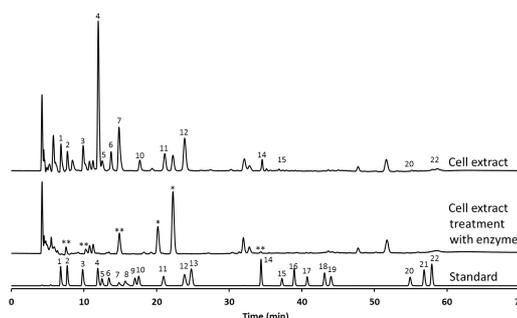


図1 細胞抽出液の酵素処理によるピーク消失

ピーク: 1. GTP, 2. GDP, 3. ATP, 4. ADP, 5. GMP, 6. IMP, 7. UA, 8. G, 9. HX, 10. XMP, 11. X, 12. A, 13. AMP, 14. NAD⁺, 15. Ino, 16. Guo, 17. dIno, 18. dGuo, 19. Xao, 20. Ado, 21. dAdo, and 22. cAMP

(4) 尿酸値上昇リスクが高いとされる食品成分によるプリン体腸管吸収およびプリン体肝代謝動態評価

細胞内へのプリン体取り込みでは、ヌクレオチドであるアデノシンの取り込みがもっとも多く、取り込み後は、アデノシンデアミナーゼによる急速なイノシンへの代謝とサルベージ経路による ATP 産生の上昇が認められた。一方で、グアノシンなどのグアニン塩基系の負荷では、グアナーゼおよびキサンチンオキシダーゼによる尿酸への代謝経路が活発であり、これらを多く含む食品の尿酸値上昇への寄与が示唆された。尿酸値上昇リスクが高いとされる食品成分による影響についても評価した結果、プリン体の小腸透過性よりむしろ代謝動態への関与が認められた。

急速な ATP 消費により尿酸値を上昇させることが知られているフルクトースやエタノールを HepG2 細胞培養液中に添加し、添加後 1 分から 120 分における細胞内外のプリン代謝動態を評価した結果、5 分以内の早い段階で ATP、GTP などヌクレオチド 3 リン酸の分解、それに伴うヌクレオチドおよび塩基の上昇、その後 30 分以降から細胞外へのプリン体 (IMP, XMP, ヒポキサンチンなど) 輸送およびヌクレオチドの再合成が確認された。このことにより、エタノールやフルクトース負荷は、細胞内における急速なプリン体分解を引き起こし、時間依存的に細胞外へと輸送され、細胞外で尿酸まで代謝されることによって、尿酸値上昇を引き起こす可能性が示唆された。

(5) 食品中プリン体の分子種別プロファイリングおよびネットワークアプリケーション構築

食品中プリン体のネットワークアプリケ

ーション構築においては、ファイルメーカーにこれまで得られた食品中プリン体含量およびエネルギーなどの食品成分データを入力し、食材におけるこれらのデータの閲覧および献立に合わせて、材料を選び数量を入力することにより、その献立に含まれる様々な情報を簡単に計算するところまで行えるようになった。食品中プリン体含有量は学会や論文を通じた研究者への発信のみではなく、長寿社会、予防医療学の観点から、栄養士、調理師、教育関係者、さらには一般家庭においても利用できるようなネットワークアプリケーション構築が不可欠であり、本項目に関しては、発展させる必要性があると考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Fukuuchi T, Morimura A, Kawatani M, Yamamoto K, Yamaoka N, Kaneko K. Characterizing substrate properties of purine-related compounds with purine metabolism enzymes for enzymatic peak-shift HPLC method.

Nucleos. Nucleot. Nucl., 33: 445-453, 2014 (査読あり)

DOI:10.1080/15257770.2013.863333

2. Kaneko K, Aoyagi Y, Inazawa K, Fukuuchi T, Yamaoka N.

Total Purine and Purine Base Content of Common Foodstuffs for Facilitating Nutritional Therapy for Gout and Hyperuricemia.

Biol. Pharm. Bull. 37 (5), 709-721, 2014 (査読あり).

DOI: 10.1248/bpb.b13-00967

3. Inazawa K, Sato A, Kato Y, Yamaoka N, Fukuuchi T, Yasuda M, Mawatari K, Nakagomi K, Kaneko K.

Determination and profiling of purines in foods by using HPLC and LC-MS.

Nucleosides, Nucleos. Nucleot. Nucl., 33: 439-444, 2014 (査読あり)

DOI: 10.1080/15257770.2013.865744

4. Fukuuchi T, Yasuda M, Inazawa K, Ota T, Yamaoka N, Mawatari K, Nakagomi K, Kaneko K.; A simple HPLC method for determining the purine content of beer and beer-like alcoholic beverages.

Anal Sci. 29(5), 511-517, 2013 (査読あり)

DOI: 10.2116/analsci.29.511

[学会発表](計 17 件)

1. 岡崎 良、福内 友子、山岡 法子、安

田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子希代子

Caco-2 細胞を用いたプリン体吸収の評価と消化管トランスポーターの発現変化について

日本薬学会 第 135 年会 2015、3、25-28、神戸

2. 加納 貴則、福内 友子、山岡 法子、金子希代子

光沢のある魚類に含まれるプリン体について

第 48 回 日本痛風・核酸代謝学会総会 2015、2、19-20、東京

3. 泉 元気、福内 友子、山岡 法子、金子希代子

プリン塩基、ヌクレオシドおよびヌクレオチドの一斉分析

第 48 回 日本痛風・核酸代謝学会総会 2015、2、19-20、東京

4. 福内 友子、森村 明音、泉 元気、柴田 瑶子、川谷 麻由美、山本 幸二郎、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

酵素反応によるピークシフト法を用いたプリンヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基の一斉分析について

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

5. 川谷麻由美、岡崎 良、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

2種類のカラムを用いたプリン体関連物質の同時測定法の開発

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

6. 柴田 瑶子、泉 元気、山本 幸二郎、川谷 麻由美、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

エタノール刺激による HepG-2 細胞内外の尿酸およびプリン代謝動態について

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

7. 山本幸二郎、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

細胞内外の尿酸及びプリン体定量法における前処理法の開発

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

8. 野中 陽平、鈴木 温子、加納 貴則、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

食品(珍味)に含まれるプリン体の測定

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

9. 鈴木 温子、野中 陽平、加納 貴則、福内友子、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

食品（緑黄色野菜）に含まれるプリン体の測定

第 27 回バイオメディカル分析科学シンポジウム 2014、8、20-21、東京

10. 福内友子、川谷麻由美、山本幸二郎、安田誠、山岡法子、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

細胞内および培養上清中のプリン代謝動態分析法の開発

日本薬学会第 134 年会(熊本)2014.03.27-30, 熊本(熊本)

11. 金子希代子、福内友子、稲沢克紀、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、藤森新

食品中プリン体の塩基別含有率の比較
第 47 回 日本痛風・核酸代謝学会 学術集会 2014.02.20-21, 神戸(兵庫)

12. 渡邊裕士、塚本夏希、福内友子、稲沢克紀、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

芋類、野菜類に含まれるプリン体の測定
第 57 回日本薬学会関東支部大会 2013.10.26, 板橋区(東京)

13. 玉野るり子、関根歩、橋本顕、山岡法子、福内友子、稲沢克紀、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

腸管モデル細胞を用いたプリン塩基透過性の検討
第 57 回日本薬学会関東支部大会 2013.10.26, 板橋区(東京)

14. 関根歩、玉野るり子、橋本顕、山岡法子、福内友子、稲沢克紀、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

腸管モデル細胞を用いたプリンヌクレオチド・ヌクレオシド透過性の検討
第 57 回日本薬学会関東支部大会 2013.10.26, 板橋区(東京)

15. 森村明音、福内友子、川谷麻由美、山本幸二郎、山岡法子、安田誠、馬渡健一、中込和哉、金子希代子

酵素反応によるピークシフト法を用いたプリン体定量法の最適化

第 26 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS2013) 2013.08.02-03, 品川区(東京)

16. Fukuuchi T, Morimura A, Kawatani M, Yamamoto K, Yamaoka N, Kaneko K.

Characterizing substrate properties of

purine-related compounds with purine metabolism enzymes for enzymatic peak-shift HPLC method.

15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man. 9-13 June, 2013, Madrid (Spain)

17. Inazawa K, Sato A, Kato Y, Yamaoka N, Fukuuchi T, Yasuda M, Mawatari K, Nakagomi K, Kaneko K.

Determination and profiling of purines in foods by using HPLC and LC-MS.

15th International Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man. 9-13 June, 2013, Madrid (Spain)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

福内 友子 (FUKUUCHI, TOMOKO)

帝京大学・薬学部・助教

研究者番号: 10389116

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし