

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32643

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16238

研究課題名(和文) 食事に由来するプリン体の体内動態の解明と高尿酸血症予防への応用

研究課題名(英文) A study of metabolic dynamics of purine derived from daily diet for prevention of hyperuricemia

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、食品を分子種(核酸、ヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基)別に定量すると共に、分子種別での腸管吸収や代謝動態の違いについて検討し、血清尿酸値上昇に寄与しやすい分子種について明らかにした。さらに、血清尿酸値上昇のリスク因子とされるフルクトースおよび関連する他の糖類、または有機酸などの食品成分を同時負荷した際、プリン体代謝動態に変動があることも明らかにし、食品成分による食品成分負荷による尿酸値上昇への影響についても示した。食事の観点から、年々増加傾向にある痛風・高尿酸血症の予防について考える一助としたい。

研究成果の概要(英文)：Purines in foods are often evaluated as the total purine amount (in terms of uric acid), but the purine form exists in various ways, such as nucleic acids, nucleotides, nucleosides, purine bases. These metabolic processes to uric acid, intestinal absorption, and/or more reuse efficiency as energy should be considered also not uniform. Thus, both the amount of total purines in the food and the what types of purine are included are important that should be taken into consideration regarding nutritional therapy for gout or hyperuricemia with particular respect for the restriction of dietary purines. In this study, we determined 19 types of purine (nucleotides, nucleosides and purine bases) content of daily foods. Furthermore, I aimed to evaluate the effects of purines and other ingredients contained in food on intestinal absorption, and / or extra- and intracellular purine metabolism in cultured cells.

研究分野：分析化学

キーワード：尿酸値 プリン体 旨み 食品 一斉分析

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省の国民生活基礎調査によると、2010年に「痛風で通院中」と答えた人は全国で95万7千人、1986年と比べて4倍近くまで右肩上がりに増加している。また、最近の本邦における2つの大規模な調査結果によれば、痛風の予備軍である高尿酸血症の頻度は、成人男子30歳代で30%に達したと報告されている。高尿酸血症・痛風は代表的な生活習慣病であり、食事療法、飲酒制限、運動の推奨といった生活指導は、重要な役割を有する。『高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第2版』によると、食事療法として、「適正なエネルギーの摂取、プリン体・果糖の過剰摂取制限、十分な飲水が勧められる」と提示されている。

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、生活指導に役立てるため、300種類以上の食品・飲料についての測定値を毎年報告し続けている。

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、腸管吸収および尿酸への代謝過程、さらにエネルギーとしての再利用率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、HPLCシステムを用いた一斉分析をすることで、食品中プリン体プロファイリングを作成するとともに、食品ごとのプリン体化合物の腸管吸収や肝臓での尿酸への代謝動態の差異を定量的に解析することを目的とする。これまで理解が難しかったプリン体含有量と尿酸値上昇に相関がない食品についても、論理的な情報提供が可能となる。

3. 研究の方法

(1)食品中の分子別プリン体含有量の測定
プリン塩基5種類(アデニン(A)、ヒポキサンチン(HX)、キサンチン(X)、尿酸(UA))、ヌクレオシド4種類(アデノシン(Ado)、グアノシン(Guo)、イノシン、キサンチン)、ヌクレオチド10種類(ATP、ADP、AMP、cAMP、GTP、GDP、GMP、IMP、XMP、NAD⁺)を測定対象とした。定量はすでに報告している、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衝液(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)の条件を用いた。サンプルはすべて、アセトニトリルを加えて除タンパクを行い、乾固した上清を移動相Aで再溶解し、0.45μm フィルターを通過後、測定した。

(2)食品・飲料の成分によるプリン体吸収過程への影響評価

消化管における吸収様式の評価には、透過性膜状に単層培養し腸管上皮様に分化させたヒト結腸癌由来細胞 Caco-2 細胞を用い、経時的に透過液を回収した。回収したサンプルは、前処理後 HPLC にて定量した。

(3)尿酸値上昇リスクが高いとされる食品・飲料(ビール、果物など)の成分による尿酸への代謝過程への影響評価

プリン代謝動態の評価には、ノンコートプレート上に播種した Caco-2 細胞および HepG2 細胞を用い、細胞外液および細胞抽出液を回収した。回収したサンプルは、前処理後 HPLC にて定量した。

(4)ヒト尿酸代謝モデル動物(ウリカーゼノックアウトマウス)を用いた尿酸値上昇メカニズムの評価

ウリカーゼを欠損させた UKO マウスと、ウリカーゼの特異的阻害剤であるオキソソル酸(OA)投与マウスを高尿酸血症モデルマウスとし、高プリン体食の負荷によるプリン・ピリミジン塩基10種をLC-MSで測定して血中濃度及び尿中排泄量の変動を比較した。また、各臓器中のキサンチンオキシダーゼ活性、ウリカーゼ活性も合わせて測定した。

4. 研究成果

(1)食品中の分子別プリン体含有量の測定
プリンリッチ野菜類は、核酸の比率が多く、フリーで存在するプリン体は比較的少ないこと、肉類は、IMP、イノシン、ヒポキサンチン(HX)などのHX塩基類含有率が多いこと、ビールは、グアノシン(Guo)、アデノシン(Ado)などのヌクレオシドが多いことが、プロファイリングにより明らかになった。食材のプリン体含量を順次測定し、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た。

さらに、食品は生で食べるものを除き、多くの場合何らかの熱処理により調理され食されていることから、プリン体一斉分析法を用いて、食品に含まれるプリン体、特に旨味成分であるイノシン酸(IMP)やグアニル酸(GMP)の分解について、加熱温度・加熱時間・加熱方法(湯煎、電子レンジ)の違いに着目し分析を試みた。その結果、旨味成分であるIMP、GMPは電子レンジより湯煎での加熱の方が分解しにくいことが明らかになった。鶏もも肉中からの溶出を検討した結果、アデニン(A)類やグアニン(G)類は水に溶出しなかったが、HX類は湯煎で60%、電子レンジではほぼ100%溶出した。また、食品の違いにより同じ加熱方法でもプリン体の溶出や分解の違いが認められたことから、食品により患者に合った適切な加熱方法を選択し調理することを推奨する。

(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

プリン体化合物の存在様式別評価

透過試験の結果、アデニン、ヒポキサンチンなどの塩基は、比較的透過しやすいことが明らかになった。ヌクレオチドやヌクレオシドは代謝を受けやすく、特にアデノシン負荷では、透過液中においてアデノシンは認められず、代謝物であるイノシンが経時的に増加した。細胞内外におけるプリン代謝動態試験の結果、アデニンやアデノシン、イノシン負荷により、細胞内 ATP レベルが大きく増加することから、負荷されたプリン体は主に、細胞内への取り込み後サルベージされ、再利用されていると考えられる。以上の結果より、肉類は、イノシンやヒポキサンチンなどの消化管吸収を増加させることにより、また、アデノシンなどのヌクレオシドを多く含むビールも同様に、消化管でのイノシンへの代謝を介して、血清尿酸値上昇に寄与していると示唆された。プリンリッチ野菜類に含まれるアデニンなどのフリー塩基は、細胞内でサルベージされやすいこと、また、アデニンそのものとして吸収されるため、血清尿酸値上昇につながりにくいことが示唆された。

フルクトースや有機酸などの食品成分の影響

フルクトースは、その代謝に伴うアデニンヌクレオチドの分解亢進によって、血清尿酸値を上昇させる。また、疫学的にも、ショ糖の摂取量と比例して血清尿酸値が増加することが報告されている。

グルコース、フルクトース、スクロースなどの各種糖質の負荷、およびこれらとプリン体化合物の同時負荷による細胞内外のプリン代謝動態を経時的に評価した。

プリン体とフルクトース同時負荷による一斉モニタリングにより、フルクトース単独負荷では認められなかった、ATP 産生と分解の経時的な転換、IMP やイノシン系列の代謝亢進などが明らかになった。プリン体とフルクトースを同時に摂取した際には血清尿酸値上昇のリスクが増大する可能性が示唆された。また有機酸負荷では、特に乳酸負荷により、腸管側への尿酸分泌が大きく亢進することが明らかになった。

旨み成分のモノヌクレオチドを多く含む食品

プリン体の中でもイノシン酸 (IMP) やグアニル酸 (GMP) は旨み成分として知られている。今回の研究では、旨みスープ (鶏がらスープの素、ほんだし、コンソメスープの素) のプリン体を測定し、旨みスープ曝露による細胞内プリン代謝動態を評価することを目的とした。鶏がらスープの素添加の場合のみ、HepG2 細胞内で IMP やイノシンだけでなく、キサンチンや尿酸の上昇が認められた。鶏がらスープでは、IMP 単独や他のスープ添加と異なり、鶏がらスープに含まれる成分の影響

を受けてプリン代謝が進んでいると考えられる。(図1)

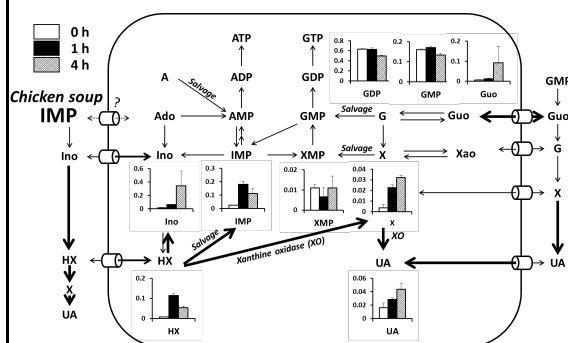


図1. 鶏がらスープの素添加による細胞内外プリン体射動態の経時的変動

(4) ヒト尿酸代謝モデル動物を用いた尿酸値上昇メカニズムの評価

OA 投与マウスと UKO マウスの尿酸濃度を比較すると、血漿中・尿中ともに UKO マウスで約 50 倍多かった。尿酸の代謝物である

アラントイン (Alt) は、OA 投与マウスの血漿中で検出され、UKO マウスでは確認できなかった。Alt の尿中排泄量は、OA 投与マウスで約 20 倍多かった。UKO マウスでは、尿酸の前駆体である HX が尿中で多いことが明らかになった。OA 投与マウスに高プリン体食を負荷すると、血漿中尿酸濃度は変化なく、尿中排泄量が約 5 倍増加した。Alt は、血漿中で約 1/2 倍に減少し、尿中に変化がなかった。UKO マウスに高プリン体食を負荷すると、尿酸は血漿中・尿中ともに約 1.5 倍増加した。Alt は、血漿中で検出されず、尿中で約 1/3 倍に減少した。UKO マウスは高プリン体食を与えることで血漿中・尿中の尿酸の値が有意に増加する一方で、OA 投与マウスでは、血漿中尿酸値への影響が認められないことから、尿酸クリアランスが亢進した、もしくは、ウリカーゼ阻害が不十分であった可能性が考えられる。本申請課中には、食品負荷まで至らなかったが今後、UKO マウスのヒト尿酸代謝モデルとしての有用性に期待したい。

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5件)

1. Fukuuchi T, Kobayashi M, Yamaoka N, Kaneko K.

Evaluation of cellular purine transport and metabolism in the Caco-2 cell using comprehensive high-performance liquid chromatography method for analysis of purines. 査読有り

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 35(10-12), pp. 663-669, 2016 Dec;35,

DOI: 10.1080/15257770.2016.1205195

2. Inazawa K, Yamaguchi S, Hosoyamada M, Fukuuchi T, Tomioka NH, Yamaoka N, Kaneko K.

Urinary excretion of uric acid, allantoin, and 8-OH-Deoxyguanosine in uricase-knockout mice. 査読有り

Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 35(10-12), pp. 559-565, 2016 Dec;35

DOI: 10.1080/15257770.2016.1163376

3. Yamada N, Iwamoto C, Kano H, Yamaoka N, Fukuuchi T, Kaneko K, Asami Y

Evaluation of purine utilization by Lactobacillus gasseri strains with potential to decrease the absorption of food-derived purines in the human intestine. 査読有り

Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 35(10-12), pp. 559-565, 2016 Dec;35

DOI: 10.1080/15257770.2015.1125000

4. Fukuuchi T, Iyama N, Yamaoka N, Kaneko K.

Simultaneous quantification by HPLC of purines in umami soup stock and evaluation of their effects on extracellular and intracellular purine metabolism. 査読有り

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2018 Apr 13:1-7.

DOI:10.1080/15257770.2018.1453074.

5. Takayanagi F, Fukuuchi T, Yamaoka N, Kaneko K.

The observed variation in the purine composition of food after soaking in sake lees. 査読有り

Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2018 May 11:1-5.

DOI: 10.1080/15257770.2018.1465185.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 福内 友子, 山岡 法子, 金子 希代子
Caco-2 細胞を用いたプリン体の消化管吸収と代謝動態の一斉モニタリング
第 49 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2016.2.18-19、大阪

2.河野 眞土加、早川 洸、秋元 南、東 奈実、
酒井 紫帆、富岡 直子、福内 友子、山岡 法子、
安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、細山田 真、金子 希代子

LC-MS を用いた高プリン体食負荷におけるマウス血しょう、尿および臓器中のプリン・ピリミジン塩基の体内動態の評価

日本薬学会 第 136 年会、2016. 3.26-29 , 横浜市

3.早川 洸、河野 眞土加、東 奈実、福内 友子、
山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

尿酸及び核酸負荷によるマウスのプリン・ピリミジン塩基の尿中排泄量と血漿中濃度の変動

日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 , 横浜市

4.秋元 南、伊藤 佑里恵、妻倉 佑弥、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 細胞へのグルコース、フルクトース負荷におけるプリン代謝動態の変動

日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 , 横浜市

5.高柳 ふくえ、神代 くるみ、樋口 華捺、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（塩糍）に含まれるプリン体の測定及び塩糍浸漬によるプリン体の種類別変化

日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 , 横浜市

6.神代 くるみ、高柳 ふくえ、樋口 華捺、丸山 莉加子、福内 友子、
山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

動脈硬化予防が期待できる食材中のプリン体含量の測定

日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 , 横浜市

7.樋口 華捺、高柳 ふくえ、神代 くるみ、福内 友子、
山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

豆類に含まれるプリン体量の測定

日本薬学会 第 136 年会、2016.3.26-29 , 横浜市

8.妻倉 佑弥、伊藤 佑里恵、福内 友子、山岡 法子、
安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

HepG2 細胞への糖負荷におけるプリン代謝動態の変動

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2015.9.3-4、東京

9.松原 祐希、丸山 莉加子、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（麺類など）に含まれるプリン体の測定

第 17 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム、2015.9.3-4、東京

10.東 奈実、酒井 紫帆、山岡 法子、富岡 直子、
細山田 真、福内 友子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子

動物モデルにおける漢方薬のプリンピリミジン代謝への作用

第 50 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2016.2.16-17、東京
11.丸山莉加子、松原 祐希、山岡 法子、福内友子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
調味料および主食となる食材に含まれるプリン体の定量
第 50 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2016.2.16-17、東京

12.金子 希代子、山岡 法子、福内友子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、藤森 新
アルコールが尿酸代謝に悪い理由
第 50 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2016.2.16-17、東京

13.伊藤 佑里恵、妻倉 佑弥、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
HepG2 細胞へのフルクトース、プリン塩基負荷におけるプリン代謝動態の変動
日本薬学会第 137 年会、2017.3.24-27、仙台市

14.高柳 ふくえ、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
酒粕浸漬による食品中プリン体の種類別変化
第 30 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2017)、2017. 8.28-29、東京

15.伊山 望、岩崎 円香、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
旨味スープのプリン体測定と培養細胞を用いたプリン代謝に関する検討
第 61 回日本薬学会関東支部大会 2017.9.16 日、東京

16.Takayanagi F, Fukuuchi T, Yamaoka N, Yasuda M
Change in the purine composition of food by soaking in sake lees
The 17th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man PP17、
2017.9.20-24、Gdańsk (Poland)

17.Fukuuchi T, Iyama N, Yamaoka N, Yasuda M
Measurement of purine content in umami soup and evaluation of ITS effects on extra- and intracellular purine metabolism using HPLC simultaneous determination
The 17th Symposium on Purine and Pyrimidine Metabolism in Man PP17、
2017.9.20-24、Gdańsk (Poland)

18.熱処理による食品中のプリン体含量の変動

岩崎 円香、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子希代子
第 51 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2018.2.22-23、鳥取

19.高柳 ふくえ、野中 陽平、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
糠漬け、塩糍漬け発酵によるプリン体の変化
第 51 回日本痛風・核酸代謝学会総会、
2018.2.22-23、鳥取

20.高田 彩、内藤 彰菜、渡辺 理士、山岡 法子、福内友子、中込 和哉、馬渡 健一、安田 誠、金子 希代子
パプリカなどの緑黄色野菜に含まれるプリン体の測定
日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-27、金沢

21.内藤 彰菜、高田 彩、渡辺 理士、山岡 法子、福内友子、中込 和哉、馬渡 健一、安田 誠、金子 希代子
健康食品中のプリン体量の測定
日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-27、金沢

22.渡辺 理士、高田 彩、内藤 彰菜、山岡 法子、福内友子、中込 和哉、馬渡 健一、安田 誠、金子 希代子
洋菓子及びその材料に含まれるプリン体量について
日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-27、金沢

23.高柳 ふくえ、福内友子、山岡 法子、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
めかじき、米糠および糠漬け中のプリン体測定
日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-27、金沢

24.渡邊 楊叡、秋山 秀樹、東 奈実、福内友子、山岡 法子、富岡 直子、細山田 真、安田 誠、馬渡 健一、中込 和哉、金子 希代子
高尿酸血症モデルマウスにおける漢方薬のプリン・ピリミジン代謝への影響
日本薬学会第 138 年会、2018.3.25-27、金沢

〔図書〕(計 2 件)

1.金子 希代子、福内友子、山岡 法子
【高尿酸血症・低尿酸血症-最近の診断と治療-】高尿酸血症の臨床 高尿酸血症・痛風の検査・診断・治療 酒類中のプリン体含量と尿酸値との関連
日本臨床(74)、pp:288-293

2.金子 希代子、山岡 法子、福内友子
高尿酸血症・低尿酸血症-最近の診断と治療-】高尿酸血症の臨床 高尿酸血症の病理・病態 二次性高尿酸血症(産生過剰型・排泄低下型・混合型) 非薬物性(高プリン体食品、アルコール、果糖)の要因による高尿酸血症
日本臨床(74)、 pp:161-165

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://teikyo.purine-lab.com/>

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

(4)研究協力者

なし