

博士論文

高尿酸血症・痛風を含む生活習慣病の食事療法に
向けたプリン体定量と食事性酸負荷の検討

帝京大学大学院薬学研究科

博士課程 2020 年度修了見込み

高柳ふくえ

指導教員 金子希代子

【目次】

要 旨	
略語集	・ ・ ・ 1
I. 緒 言	・ ・ ・ 3
II. 実験の部	・ ・ ・ 6
第I部 発酵食品中の総プリン体および遊離プリン体の測定	・ ・ ・ 6
1 章 高尿酸血症・痛風の食事療法	・ ・ ・ 6
1－1 背景・目的・ ・ ・	
1－2 高尿酸血症の病態・治療	
1－3 プリン体について	
2 章 実験方法	・ ・ ・ 9
2－1 試薬	・ ・ ・ 9
2－2 総プリン体測定	・ ・ ・ 12
[1] 標準試料の調製	
[2] 回収率の確認	
[3] HPLC 条件①（総プリン体測定）	
[4] 標準試料の検量線	
2－3 プリン体分子種別の測定	・ ・ ・ 16
[1] 標準試料の調製	
[2] HPLC 条件②（プリン体分子種別測定）	
[3] 標準試料の検量線	
2－4 発酵食品および測定試料	・ ・ ・ 19
[1] 発酵食品	
[2] 魚介類の ATP 分解経路と発酵微生物のプリン代謝経路	
[3] 測定試料	
[4] 食品処理フローチャート	
[5] 酵素処理	
[6] HPLC 測定	
3 章 発酵食品および浸漬によるめかじきの総プリン体と遊離プリン体分子種の測定結果	・ ・ ・ 26
3－1 発酵食品中の総プリン体量の比較	
3－2 酒粕漬	
3－3 めか漬	
3－4 西京味噌漬	
3－5 アンチョビオイル漬	
3－6 考察	・ ・ ・ 36
小 括	・ ・ ・ 38

第Ⅱ部 治療食の食事性酸負荷およびプリン体量の算出と尿 pH の検討	
	・ ・ ・ 39
1 章 目的	・ ・ ・ 39
2 章 方法	・ ・ ・ 39
3 章 常食および特別治療食の食事性酸負荷およびプリン体量の算出	
	・ ・ ・ 43
3－1 病院食について	
3－2 食事性酸負荷について	
3－3 腎臓における酸排泄機構について	
3－4 算出方法	
3－5 食事種類別の PRAL 値および NEAP 値とプリン体量	
3－6 常食・治療食 8 種類の食事の集計結果	
3－7 考察	・ ・ ・ 53
4 章 臨床研究	・ ・ ・ 54
4－1 患者の疾患名、基本情報、治療薬	
4－2 入院患者の尿 pH の推移	
4－3 患者別の入院前および入院中の食事の PRAL 値	
4－4 健常人と患者の尿 pH と P/K 比および eNAE との比較	
4－5 考察	・ ・ ・ 59
小 括	・ ・ ・ 63
Ⅲ. 総 括	・ ・ ・ 64
Ⅳ. 参考文献	・ ・ ・ 65
謝 辞	・ ・ ・ 72

【要旨】

【背景・目的】「高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第3版」では高尿酸血症・痛風患者は年々増加傾向にあり、治療方針として食生活を含む生活習慣改善の重要性を示している。高尿酸血症は肥満、高血圧、糖代謝異常などと深く関係していることから、摂取カロリー制限や飲酒制限などの食事指導が行われるほか、1日に摂取するプリン体は400 mg程度とされている。しかし制限の多い食事指導では患者の食べる楽しみが無くなり食事療法の継続が困難となることが予想される。そこで本研究では、食品に呈味をもたらす美味しくなるという理由や腸内環境改善で注目度の高い発酵食品に着目し、発酵食品を用いた食事を高尿酸血症・痛風患者の食事指導に役立てることを目的とした。魚（めかじき）を酒粕、糠、西京味噌に漬けることで、魚の味に関与すると言われている核酸旨味成分であるイノシン酸（IMP）などのプリン体がめかじき中で増加すると仮説を立て、総プリン体のみではなく遊離で存在しているプリン体を分子種別に測定し検証した（表1）。

臨床研究では、高尿酸血症と他の生活習慣病が合併することから、これらの食事療法に着目し、まず当研究室で報告したプリン体測定値を用いて帝京大学医学部附属病院で提供されている糖尿病などの治療食

表1 発酵食品の種類

発酵食品	主な微生物	原材料
酒粕	麹菌<酵母菌	米、麹、酵母菌
糠	乳酸菌（植物性）	米ぬか、塩
西京味噌	麹菌>酵母菌	麹、大豆、塩
アンチョビオイル漬け	乳酸菌（動物性）	カタクチイワシ、塩、油

のプリン体量を明らかにした。また高尿酸血症・痛風および糖尿病患者では酸性尿を呈することが見られるため、常食、糖尿病食、心臓病食中の、食事に由来する含硫アミノ酸に起因する不揮発性酸による腎酸負荷を数値化する PRAL（potential renal acid load）値や推定内因性酸産生値 NEAP（net endogenous acid production）値についても評価した。さらに、大学病院に入院し病院給食により食事を管理された患者で、これらの食事療法における尿 pH への影響について検討するため、入院翌日、3～5 日後、退院日の計 3 回の早朝尿 pH を測定し、経時的な尿 pH の変化と食事由来の成分との相関についてまとめた。

I 発酵食品中の総プリン体および遊離プリン体の測定

【方法】浸漬・保存方法：酒粕、糠、西京味噌を使用し、めかじきの酒粕漬け、糠漬け、西京味噌漬けを作製した（浸漬期間 1 日と 3 日）。カタクチイワシを塩漬け後オイル漬けし（保存 4 か月）アンチョビを作製した。

総プリン体の測定方法：食品中に含まれるプリン体種（核酸である DNA、RNA およびヌクレオチド、ヌクレオシド）を酸加水分解によりプリン塩基まで分解し定量した。測定対象は、プリン塩基であるアデニン（A）、グアニン（G）、ヒポキサンチン（HX）、キサンチン（X）、尿酸（UA）とした。測定装置は SHIMADZU LC-20A を用いて、カラムは Shodex Asahipak GS 320HQ（7.6 mmI.D.×300 mm）を使用し、カラム温度は 35℃とした。移動相は 150 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 2.8）で流速 0.6 mL/min、紫外可視検出器を使用して検出波長は 260 nm とした。

遊離プリン体の測定方法：遊離で存在している食品中の分子種別プリン体（プリン塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド）を定量した。測定対象はプリン塩基 5 種（アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸、キサンチン）、ヌクレオシド 4 種（アデノシン

(Ado) , グアノシン (Guo) , イノシン (Ino) , キサントシン (Xao))、ヌクレオチド 8 種 (ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, IMP, XMP) とした。カラムは YMC-Triart C18 (4.6 mmI.D.×250 mm, 3 μm) を使用した。移動相 A は 80 mM リン酸アンモニウム緩衝液 (pH 4.1) 移動相 B は 30 % Methanol in A で流速 0.6 mL/ min グラジエント溶出、PDA 検出器を使用して検出波長は 260 nm とした。

【結果】表 2 に示すように、めかじきの総プリン体量は 125.5～156.4 mg/100g であり、

ヒポキサンチン類は総プリン体の 70%以上を占めていた。めかじきを発酵食品に浸漬するとめかじきのヒポキサンチン類および総プリン体は有意に減少または減少傾向を示した。中でも酒粕漬けでは 1 日漬け後、3 日漬け後の両方でめかじきのヒポキサン

チン類と総プリン体が有意に減少していた。糠漬けでは 1 日漬け後、西京味噌では 3 日漬け後でヒポキサンチン類が減少していた。一方で酒粕は、含有するプリン体が他の発酵食品より多く (87.6～94.9 mg/100 g)、めかじきを漬けることによりヒポキサンチン類が有意に増加した。めかじきの遊離プリン体では (図 1)、ヒポキサンチン類である Ino が最も多く、IMP とヒポキサンチンはほぼ同量含まれていた。また酒粕に 3 日漬けるとめかじきの IMP、Ino、ヒポキサンチンが有意に減少した¹⁾。同様に比較した結果、西京味噌に漬けためかじきで減少したヒポキサンチン類は Ino であったのに対して、糠に 1 日、3 日漬けためかじきでは IMP が増加し、Ino とヒポキサンチンの減少が見られた。カタクチイワシに多く含有していた IMP は塩漬け後オイル漬けしたアンチョビで減少し Ino、Guo が増加した²⁾。

【考察】めかじきで減少したプリン体量が発酵食品で増加したプリン体量と近似した値であったことから、プリン体はめかじきから発酵食品に移行したことが考えられた。3 種類の発酵食品で異なる結果となったことは、発酵食品の成分、発酵に関与した微生物の影響も考えられた。魚介類に多く含有するヒポキサンチン類は核酸旨味成分である IMP に由来する割合が高いと予想したが、めかじきは IMP の代謝物である Ino を多く含有していた。めかじきを発酵食品 (酒粕や西京味噌³⁾) に漬けると IMP を含むヒポキサンチン類が減少したことから、発酵食品による呈味はアミノ酸など他の旨味成分の影響と推察した。一方、糠漬けのめかじきでは IMP と他のヌクレオチドの増加が見られたことから、糠に含まれる成分によりめかじきの核酸由来の高分子が代謝されたか、もしくはヌクレオチドの代謝が抑制された可能性も考えられた。

表 2 発酵浸漬前後の変化 *p < 0.05 **p < 0.01 漬け前 VS 漬け後

食品名	めかじき				発酵食品			
	HX類		総プリン体		HX類		総プリン体	
プリン体量 (mg/100g)	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後
発酵食品種類/状態								
酒粕1日漬	114.5	78.1**	156.4	103.3*	22.4	47.0**	87.6	105.2
酒粕3日漬	106.4	69.7**	153.0	97.3**	24.6	50.9**	94.9	108.9
糠1日漬	101.3	76.5*	125.5	102.4	1.5	19.7	25.6	45.0**
糠3日漬	99.1	70.8	126.1	92.9	1.7	14.1	27.7	41.87*
西京味噌1日漬	119.3	95.6	149.7	132.8	19.1	15.3	40.9	20.9*
西京味噌3日漬	117.7	77.2*	139	102.4	12.5	34.9*	25.5	34.4

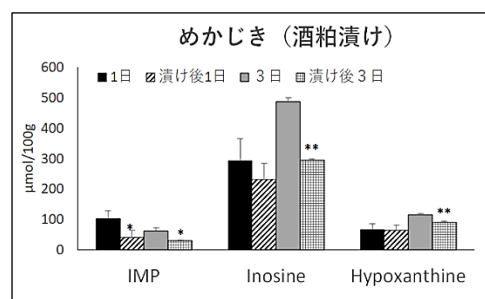


図 1 遊離 HX 類の組成 *p < 0.05 **p < 0.01 1日 VS 漬け後1日3日

II 治療食の食事性酸負荷およびプリン体量の算出と尿 pH の検討

【方法】帝京大学医学部附属病院において提供されている 28 日分の常食および治療食（糖尿病食と心臓病食）の 1 日毎のプリン体量はプリン体データを栄養管理ソフトに登録し求めた。PRAL 値や NEAP 値および P/K 比を下記に示す算出式より求めた。臨床研究計画書に基づき患者に同意を得た後、入院前の食事内容は FFQ（食事摂取頻度調査表）を用いて確認した。尿 pH を含む臨床検査値は入院翌日、3～5 日後、退院日の 3 回取得して食事内容との相関性について検討した。

【算出式】
PRAL 値(mEq/d)= $0.4888 \times \text{たんぱく質(g/d)} + 0.0366 \times \text{リン(mg/d)} - 0.0205 \times \text{カリウム(mg/d)}$
 $- 0.0125 \times \text{カルシウム(mg/d)} - 0.0263 \times \text{マグネシウム(mg/d)}$
NEAP 値(mEq/d)= $(54.5 \times \text{たんぱく質摂取量(g/d)} / \text{カリウム摂取量(mEq/d)}) - 10.2$
P/K 比=たんぱく質(g) / カリウム(mEq)

【結果】常食、糖尿病食、心臓病食を比較した結果、プリン体値は 310～411 mg/日と心臓病食が最も高く、太刀魚など高プリン含有の魚を使用した献立では 601mg/日となった。酸負荷の指標である PRAL 値(-7.3～34.4mEq/日)および NEAP 値(38.2～70.9mEq/日)は日間変動が大きかった。P/K 比は 0.8～1.2 であった。常食を含めた 3 種類の食事の中でやや高い PRAL 値であった心臓病食は 13.5 ± 5.5 mEq/日であった。これまでに報告されている健常人の相関式(Kanbara ら 2012)を基に作成したグラフに患者 6 名の入院中 2 回分の尿 pH と P/K 比をプロットした結果(図 2)、投与された薬剤(酸化 Mg1500 mg/日、1 日 3 回)の影響を受けた尿 pH が 7.5 となった以外は 6.0 以下に分布する傾向であった。

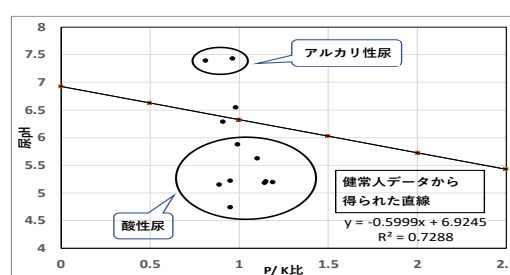


図 2 健常人と患者の分布

【考察】献立中の 1 日のプリン体量がほぼ 400 mg となった理由は、プリン体量が中程度(100～200 mg/100g)の食材が適量(80～100g/食程度)使用されていたことが挙げられる。PRAL 値の日間変動の要因として病院給食では栄養素の偏りを無くするため多くの食材を使用していることが考えられた。心臓病食では脂肪酸の構成比率も調整していることから、食材選択を限定したことがプリン体量や食事性酸負荷の数値に影響したと推察した。患者が入院中に摂取した食事の PRAL 値や NEAP 値は高値ではなかったため、図 2 の P/K 比(0.8～1.2)から推定される尿 pH は 6.0 を超えると予想したが、投与された薬剤による尿のアルカリ化を除くと患者は依然として酸性尿を呈していた。その理由として、本研究では食事のみで患者の尿 pH を変化させるには期間が短かったことや患者のこれまでの生活習慣が影響し適正体重でなかったなど患者背景も関与したことが考えられた。

【結論】発酵によりめかじきの総プリン体やヒポキサンチン類が減少する傾向にあることから、IMP などの核酸旨味成分の増減は見られたが、高尿酸血症・痛風患者への食事療法として発酵食品は推奨したい調理加工法である。酸性尿を呈する患者には、体重コントロールなどの生活習慣の改善とともに、食事由来する酸摂取量も念頭において日々の適切な食事摂取の継続を推奨する。

【参考文献】

- 1) Takayanagi.F,et al.Nucleosides,Nucleotides and Nucleic Acids,2018,37,348-352.
- 2) Takayanagi.F,et al. Nucleosides,Nucleotides and Nucleic Acids,2020,in press.
- 3) 高柳ふくえ他「痛風と尿酸・核酸」44,(2),2020.

【略語表】

ACN	acetonitrile	アセトニトリル
A	adenine	アデニン
Ado	adenosine	アデノシン
ADP	adenosine 5'-diphosphate	アデノシン 5'ジリン酸
AMP	adenosine 5'-monophosphate	アデノシン 5'モノリン酸
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'トリリン酸
BMI	body mass index	ボディマスインデックス
CCD	cortical collecting duct	皮質集合管
CKD	chronic kidney disease	慢性腎臓病
COPD	chronic obstructive pulmonary disease	慢性閉塞性肺疾患
DHA	docosahexaenoic acid	ドコサヘキサエン酸
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
DT	distal tubule	遠位尿細管
DW	distilled water	蒸留水
eGFR	estimated glomerular filtration rate	推算糸球体濾過量
ENT	equilibrative nucleoside transporter	受動核酸型ヌクレオシドトランスポーター
EPA	eicosapentaenoic acid	エイコサペンタ塩酸
FFQ	food frequency questionnaire	食事摂取頻度調査
GDH	glutamate dehydrogenase	グルタミン酸デヒドロゲナーゼ
GDP	guanosine 5'-diphosphate	グアニン 5'ジリン酸
GTP	guanosine 5'-triphosphate	グアニン 5'トリリン酸
GMP	guanosine 5'-monophosphate	グアニン 5'モノリン酸
G	guanine	グアニン
GUD	guanine deaminase	グアニンデアミナーゼ
Guo	guanosine	グアノシン
HClO ₄	perchloric acid	過塩素酸
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPT	hypoxanthine phosphoribosyl transferase	ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ
HX	hypoxanthine	ヒポキサンチン
IMCD	inner medullary collecting ducts	髄質内部集合管
IMP	inosine 5'-monophosphate	イノシン 5'モノリン酸
LDL	low density lipoprotein cholesterol	低密度リポタンパクコレステロール
Ino	inosine	イノシン

ISN	IMP and pyridine-specific 5'-nucleotidase	IMP およびピリジン特異的 5'-ヌクレオチダーゼ
LNS	Lesch-Nyhan syndrome	レッシュナイハン症候群
Meoh	methanol	メタノール
MFA	monounsaturated fatty acids	一価不飽和脂肪酸
NAE	renal net acid excretion	腎酸排泄量
eNAE	estimated renal net acid excretion	推定腎酸排泄量
NBCe1-A	electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1 variant A	起電性重炭酸ナトリウム共輸送体 1-A
NCD	non-communicable diseases	非感染性疾患
NEAP	net endogenous acid production	推定内因性酸排泄量
NSAIDs	non-steroidal anti-inflammatory drugs	非ステロイド性抗炎症薬
PDA	photodiode array detector	フォトダイオードアレイ検出器
PFA	polyunsaturated fatty acids	多価不飽和脂肪酸
PNP	purine nucleoside phosphorylase	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ
PFC	protein、fat、carbohydrate balance	たん白質、脂肪、炭水化物
PRAL	potential renal acid load	潜在的腎酸負荷
PRPP	5-phosphoribosyl 1-diphosphate5'	ホスホリボシルトランスフェラーゼ
P/K	protein/potassium	たん白質/カリウム
RNA	ribonucleic acid	リボ核酸
SFA	saturated fatty acids	飽和脂肪酸
TA	titration acid	滴定酸
TAL	Thick ascending limb of loop of Henle	ヘンレ上行
UA	uric acid	尿酸
UOX	urate oxidase	尿酸オキシダーゼ
URAT-1	urate transporter-1	尿酸トランスポーター 1
UV	ultraviolet	紫外線
X	xanthine	キサンチン
Xao	xanthosine	キサントシン
XMP	xanthosine5'- monophosphate	キサントシン 5'-モノリン酸
XO	xanthine oxidase	キサンチンオキシダーゼ

【1. 緒言】

生活習慣病とは、食事や運動・喫煙・飲酒・ストレスなどの生活習慣が深く関与し発症する疾患の総称である。具体的には糖尿病、高血圧症、脂質異常症、高尿酸血症・痛風、悪性新生物などが列挙される。国際的には、これに慢性閉塞性肺疾患（COPD）を加え、非感染性疾患（NCD）と称される¹⁾。これら疾患は合併症を引き起こす場合も多く、虚血性心疾患、脳血管疾患などに発展すれば生活機能の低下・要介護状態へと進行する。生活習慣病は遺伝要因の他、環境要因のうち、殊に食習慣と密接な関係がある。生活習慣病は、以前は「成人病」と呼ばれており成人でも生活習慣の改善により予防可能で、成人ではなくとも発症する可能性があることから、1996年に「生活習慣病」と改称され、日本の食事が過剰なエネルギー摂取と糖質の多い食事に変化したなど食事の欧米化も生活習慣病の発症に影響している²⁾。

糖尿病、高血圧症、脂質異常症、高尿酸血症・痛風などの各疾患に関連するガイドライン³⁻⁶⁾には、治療指針として、薬物治療と共に、生活習慣の改善および食事療法が疾患の重症化および合併症の発症を抑制する役割を果たすことから、具体的な食事指導内容が示されている。食事療法では、食事の構成（主菜・主食・副菜・乳製品・果物など）を正して、適正な摂取量とした上で、過剰な栄養素を減らし不足している栄養素を加え、適切な礎となる食生活を患者に勧めることが望ましい。バランスの崩れた食事に健康に良いと言われている特定の食品だけを追加しても、その効果は十分に得られず、さらにバランスを崩す可能性が考えられる。

高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第3版の治療指針では、薬物治療の有無に関わらず全ての患者に摂取エネルギー制限や飲酒制限など食生活を含む生活習慣の改善を示している⁶⁾。また食事指導の一つに、プリン体摂取量は400 mg/日程度とされている。プリン体とは、DNA、RNAを含む核酸や、旨味成分として知られるイノシン酸（IMP）やグアニル酸（GMP）を含むヌクレオチド、ヌクレオシド、プリン塩基などを指し、プリン体分子種は生物中に幅広く存在している。食事から摂取されたプリン体は消化管でヌクレオチドまで分解され、腸管に存在するヌクレオチダーゼやアルカリホスファターゼによってヌクレオシドや塩基となり、ヌクレオシドトランスポーター（ENT）によって吸収される他、多くが腸細胞に吸収されたのち代謝される^{7,8)}。また、肉類や魚介類の過剰摂取により痛風発症リスクがそれぞれ1.4倍、1.5倍になることやアデニン（A）類やヒポキサンチン（HX）類が血清尿酸値を上昇させやすいことも報告されている^{9,10)}。このことから食事中のプリン体量に加え、プリン体分子種の組成を明らかにし、血清尿酸値への影響を考慮する必要がある。

金子らのグループはこれまでに食品中のプリン体含有量をおよそ360品目について測定し、公表している^{11,12)}。ガイドラインでは食品をプリン体含有量別の5段階に分

類し、「非常に多い（300 mg以上/100g）」に分類された食品の摂取量は注意するとしている。さらに一食あたりのプリン体量を示すことで適正な食品摂取量の目安を示している。また熱処理などの調理によってプリン体量が低減することやプリン体種の組成が変化していることなどを見出し¹³⁻¹⁵⁾、日頃の食事摂取量の目安を示し、調理工夫を凝らし、食べ過ぎに注意することなど高尿酸血症、痛風患者への具体的な食事指導に役立てている。また、食事療法は患者に必要な栄養素の摂取のみならず患者の嗜好や美味しさにも配慮することが一要素となっており、生涯に渡って食生活の改善や食事療法を継続することに繋がると考えられる。

これまでに高尿酸血症・痛風患者への食事療法として、低脂肪乳製品（スキムミルク）やコーヒーなどの摂取が血清尿酸値を低下させること^{16,17)}やプリン体が水溶性を示すことから茹でこぼすなどの調理法が報告されている¹⁸⁾。しかし、先に述べたように特定の食品のみを摂取する食事指導では栄養素の過不足が生じてしまう可能性が考えられる。また、下茹でした肉や魚を、調味料や油脂を使用して再調理すればプリン体は低減出来ても摂取カロリーは逆に増加することが懸念される。

そこで著者は、これまでに食品に呈味を与える発酵食品に着目し、美味しくなるという理由から発酵食品に浸漬する調理加工によるプリン体量の変化について検討した。最初に検討した鶏肉の塩麴漬（漬け時間 3 時間）では、塩麴浸漬前後の鶏むね肉の総プリン体を測定した結果、浸漬後の鶏むね肉のヒポキサンチン類が僅かに減少したことを見出した。塩麴は麴の酵素などにより肉を軟化し、塩味も適度に添加できる万能な調味料である。日本では、これら塩麴と西京味噌の麴菌、酒粕の酵母菌、ぬか漬の乳酸菌、納豆の枯草菌、酢の酢酸菌など発酵微生物が多種に関わる食品が存在する¹⁹⁾。これら発酵食品の中で調理加工に使用される酒粕・ぬか・西京味噌に魚（めかじき）を浸漬することで、浸漬後の魚の核酸旨味成分である IMP などのプリン体が増加し、美味しくなるのではないかと考えた。総プリン体測定法²⁰⁾でプリン体合計量を定量するとともに、プリン体分子種により血清尿酸値への影響が異なることから、遊離プリン体を一斉分析する方法²¹⁾を用いてプリン体を分子種別に測定することとした。

また、高尿酸血症は他の生活習慣病である糖尿病や高血圧症、脂質異常症などの疾患を合併する場合が多いことが知られている。高尿酸血症・痛風患者や糖尿病患者では酸性尿がみられるが、尿中の尿酸溶解度は尿 pH により異なり、pH6.0 以下では、尿酸飽和度を超えていること²²⁾や尿路結石の原因になること²³⁾から酸性尿の改善としてアルカリ化療法剤が使用される場合もある。酸性尿の原因は、体内の酸塩基平衡によるもの²⁴⁾、BMI²⁵⁾やインスリン抵抗性²⁶⁾、医薬品の影響など様々な因子に加え、食事に由来する含硫アミノ酸に起因する不揮発性酸が影響することも原因の一つに挙げ

られている^{27,28)}。これまでに、腎臓から排泄される尿中成分の測定で得られる NAE（酸排泄量）と尿 pH が逆相関することが報告されている²⁹⁾。また、尿中の成分を直接測定せずに、腎臓への酸負荷を食事の成分から数値化する PRAL 値（食事性酸負荷値）と体表面積から推定できる eNAE（推定酸排泄量）と尿 pH も同様に逆相関することが報告されている³⁰⁾。さらに、PRAL 値や推定内因性酸産生値 NEAP 値を用いた疫学研究では、食事性酸負荷の高い食事が酸性尿に関わり、高尿酸血症や糖尿病などの発症リスクと関係することが報告されている^{31,32)}。食事性酸負荷の数値（PRAL 値）は、含硫アミノ酸を多く含む肉類や魚介類の摂取量と、野菜や果物との摂取量のバランスを示す。すなわち、肉類や魚介類の摂取量が少なく、野菜や果物の摂取量が多いと酸負荷は低い値となる。しかし、疾患の治療を目的とした栄養管理である病態栄養では食事性酸負荷のように一部の栄養素のみを考慮した治療食を検討しないため、医療従事者であっても PRAL 値や NEAP 値についてあまり注目していない。また、これまで食事性酸負荷と疾患について報告されている疫学調査では食事摂取頻度調査表（FFQ）などの食事調査を用いて食事性酸負荷を算出しているため、実際の食事摂取量から正確に食事性酸負荷を算出していない。さらにプリン体量を併せて考慮した報告はない。

そこで、本研究では帝京大学医学部附属病院の栄養部で提供している糖尿病や心臓病における治療食の食事性酸負荷、P/K（protein/potassium）比およびプリン体量を明らかにした。さらに、以前の健常人の報告では、酸性度の高い食事と低い食事に分けて摂取し、尿 pH を測定したところ食事の影響を受け尿 pH が変化したことから³³⁾³⁴⁾、治療食のみで管理された患者が摂取した全ての成分から食事性酸負荷値を算出し、その食事由来の成分と患者尿 pH の経時的な変化との相関について調べ、治療食による尿 pH への影響について明らかにした。

生活習慣病は、本邦における死亡原因の約 50%、その治療費は国民医療費の約 30% を占めるため²⁾、社会全体に与える影響は大きい。疾患に至ったこれまでの食生活を含む生活習慣を見直すには、個々人の食事内容についてエネルギーや特殊な栄養素の摂取の他にも、日頃から食事性酸負荷を念頭におき、食習慣および生活習慣の是正が重要である。

本研究では、これまで日本でよく知られている発酵食品を使用した調理加工法を再考した結果、新たなプリン体低減となる調理加工法であることが示され、高尿酸血症・痛風患者の食事指導に役立つことが考えられる。また、食事性酸負荷を念頭においた栄養管理は病態栄養の新たな視点として、生活習慣病の治療や予防の一助となることが考えられる。

【II. 実験の部】

第I部 発酵食品中の総プリン体および遊離プリン体の測定

1 章 高尿酸血症・痛風の食事療法

1-1 背景・目的

本邦における高尿酸血症患者は 1000 万人以上、痛風患者は 135 万人（2019 年）と報告されている³⁵⁾。「高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第 3 版」では患者は年々増加傾向にあり、2010 年頃には成人男性の 20～25%に高尿酸血症がみられたとの報告がある⁶⁾。生体内の尿酸は、自己のエネルギー代謝の結果から産生する内因性尿酸産生と食事由来の外因性プリン体が生体内の尿酸プール（1200 mg 程度）に蓄積される。そのうち 700 mg 程度が腸管と腎臓から排泄されるが、過剰に摂取されたプリン体は尿酸プールを増加させ、血清尿酸値を上昇させる。生体内でプリン体はアミノ酸などから作られる新生経路（*de novo* 合成経路）とプリン塩基からの再利用経路（*salvage* 経路）により、DNA、ATP などを生成し、核酸代謝、エネルギー代謝の結果、ヒトでは最終的に尿酸に代謝され腎臓と腸管から排泄される。過剰に摂取したプリン体は消化管で吸収されてプリン代謝経路に入り体内の尿酸プールを増加させ増加した尿酸は血中の尿酸濃度に反映される（Fig.1）。

本研究では、食品に呈味をもたらし美味しくなるという理由や腸内環境改善で注目度が高いことから発酵食品に着目し、発酵食品を用いた食事を高尿酸血症・痛風患者の食事指導に役立てることを目的とした。魚（めかじき）に、米を麴で糖化させ酵母を加えた酒粕、乳酸菌を多く含有するぬか、麴で大豆を熟成させた西京味噌に漬けることで、魚の味に関与すると言われている核酸旨味成分であるイノシン酸（IMP）などのプリン体がめかじき中で増加すると仮説を立て、総プリン体のみではなく遊離で存在しているプリン体を分子種別に測定し検証することを目的とした。

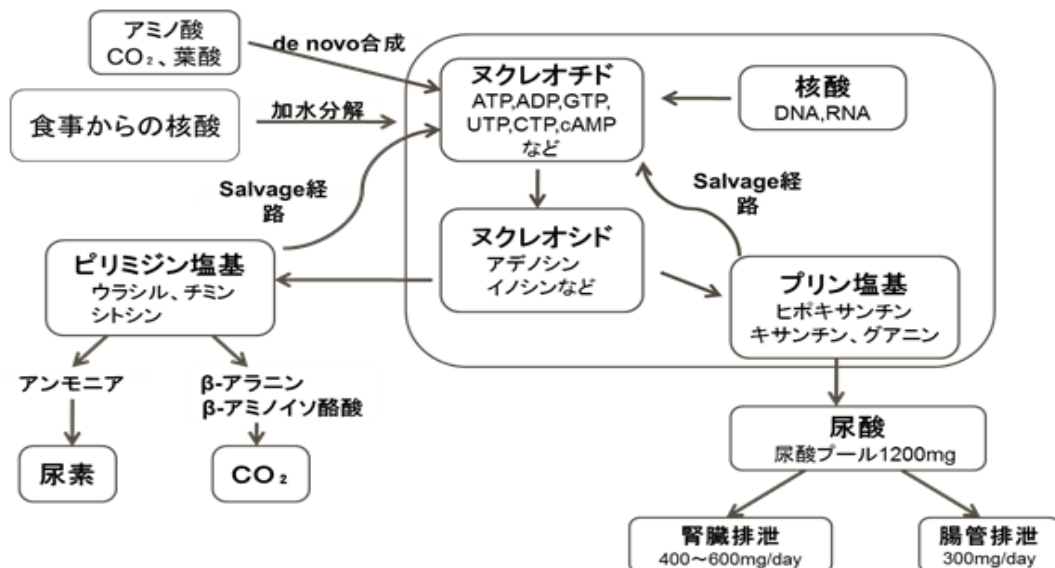


Fig.1 体内でのプリン代謝経路

1-2 高尿酸血症の病態・治療

高尿酸血症とは、性・年齢を問わず、血清尿酸値が 7.0mg/dL を超えるものと定義する。高尿酸血症の結果、尿酸ナトリウムが関節などに沈着し痛風を発症する。歴史的には、痛風は欧米では古くから知られている関節疾患であるが、本邦では明治以降初めて報告された疾患である⁶⁾。高尿酸血症の病型分類では尿酸産生過剰型、尿酸排泄低下型、腎外排泄低下型、それら混合型に分類され、多くは尿酸排泄低下型であるとされている。また、これまでに尿酸産生亢進をきたす核酸代謝関連酵素の遺伝子変異では Lesch-Nyhan 症候群（HGPRT 酵素欠損）や PRPP 合成酵素過剰症が報告されている³⁶⁾。尿酸排泄低下を来す原因では、尿酸排泄トランスポーター（輸送体）の単一遺伝子異常と多遺伝子異常などが原因になることが明らかになった^{37,38)}。食事からのプリン体過剰摂取は尿酸産生過剰型に関係する。「高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第3版」の治療アルゴリズムでは、痛風関節炎または痛風結節の有無により薬物治療の介入は異なるが、生活指導は全ての患者に推奨され（Fig.2）、食事指導として ①適正なエネルギーの摂取②飲酒制限③水分摂取の推奨④プリン体は 400 mg/日程度など食生活の改善が勧められている。また、高尿酸血症・痛風は、脂質異常症や高血圧症などを合併しやすいため、これらの食事療法も並行して行うことは有効である。厚生労働省の循環器疾患基礎調査である NIPPON DATA90 によると、肉類に多く含まれる飽和脂肪酸摂取量と血清総コレステロール、LDL コレステロールが正の相関を示し³⁹⁾、「高血圧治療ガイドライン 2019」では、多価不飽和脂肪酸の摂取が推奨されている⁴⁾。そのためには、プリン体制限に加えて、飽和脂肪酸の多い肉類の摂取量を控え、 ω -3 多価不飽和脂肪酸であるエイコサペンタエン酸（EPA）やドコサヘキサエン酸（DHA）が豊富な魚介類の適切な摂取も推奨される。治療薬には、尿酸生合成阻害薬（キサンチンオキシダーゼ阻害薬）、尿酸排泄促進薬（URAT-1 阻害薬）、アルカリ化療法剤（クエン酸カリウム・クエン酸ナトリウム配合薬）、痛風発作治療薬（抗発作薬、NSAIDs）などがある。

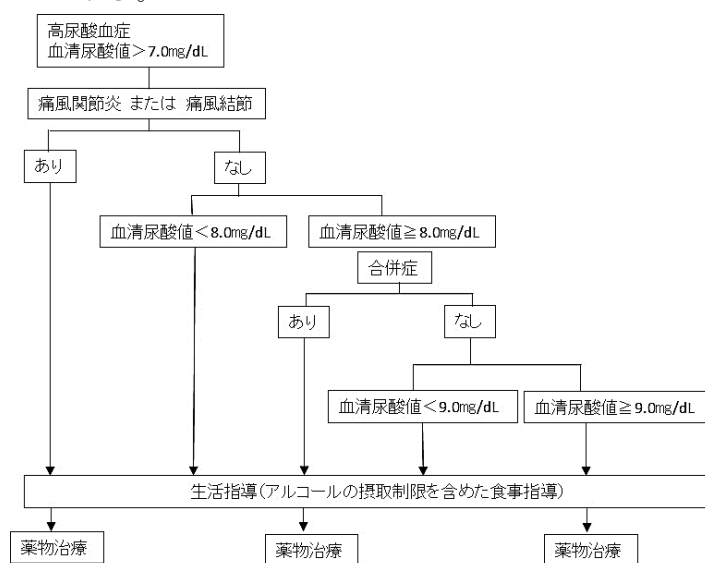


Fig.2 高尿酸血症・痛風患者の治療指針

引用元：高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第3版

1-3 プリン体について

プリン体とは、構造中にプリン骨格をもつ代謝産物の総称で、DNA、RNA などの核酸や旨味成分で知られるイノシン酸 (IMP)、グアニル酸 (GMP) を含むヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基などのプリン体分子種があり、生物中に幅広く存在している。食品中のプリン体には、核酸の形で存在する食材として主に野菜や穀類などがあり、遊離プリン体のうちヒポキサンチン類が多く含有される食材として肉類や魚介類があげられる。これらプリン体を測定する方法として HPLC を用いた報告があり、シーフードや肉の部位別の総プリン体として報告されている^{40, 41)}。一方、当研究室で確立されたプリン体測定法は、総プリン体測定法（ピークシフト法）²⁰⁾と遊離で存在するプリン体分子種の一斉分析法²¹⁾の2つの測定法がある。プリン体は水溶性を示し、低分子の状態で測定することから逆相カラムが用いられている他、総プリン体測定ではプリン塩基を SEC（サイズ排除）とイオン交換（溶離液の条件で検討）を用いて分離できる。血清尿酸値への影響として一日の総プリン体量を 400 mg/日と考慮すると共に、プリン体分子種による負荷を検討する必要があるため、これら2つの測定法により食品中のプリン体の含有量と組成を明らかにすることができる。

構造中にアデニン塩基を有するものをアデニン (A) 類、グアニン塩基を有するものをグアニン (G) 類、ヒポキサンチン塩基を有するものをヒポキサンチン (HX) 類、キサンチン塩基を有するものをキサンチン (X) 類と分類した (Fig.3)。食品中の総プリン体測定ではアデニン類、グアニン類、ヒポキサンチン類、キサンチン類を合計し、総プリン体含量 (mg/100g) として、1: 非常に少ない (50 mg 以下/100g)、2: 少ない (50-100 mg/100g)、3: 中程度 (100-200 mg/100g)、4: 多い (200-300 mg/100g)、5: 非常に多い (300 mg/100g 以上) とガイドラインに準じて5つに分類した。

核 酸	ヌクレオチド	ヌクレオシド	塩 基	
DNA RNA	ATP, ADP, AMP,	アデノシン	アデニン	A類
	GTP, GDP, GMP	グアノシン	グアニン	G類
	IMP (イノシン酸)	イノシン	ヒポキサンチン	HX類
	XMP	キサントシン	キサンチン 尿酸	X類

Fig.3 プリン体の種類と分類

2 章 実験方法

2-1 試薬

5つのプリン塩基（アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、キサンチン、および尿酸）、3つのヌクレオシド（Ado、Guo、Ino）、5つのヌクレオチド（ADP、AMP、GDP、GMP、およびXMP）、リン酸二水素アンモニウム、およびリン酸、リン酸二水素ナトリウム水和物、水酸化ナトリウム、メタノール（HPLCグレード）は富士フィルム和光純薬工業（大阪、日本）から購入した。ATP、GTP、IMP、アセトニトリル（ACN、HPLCグレード）は、Sigma-Aldrich（東京、日本）から購入した。Xaoは東京化成工業（東京、日本）から購入し、メタノール（MeOH、HPLCグレード）は関東化学株式会社（東京、日本）から購入した。以下に測定対象物とした17種類のプリン体種の構造式を示す。（Fig.4-6）

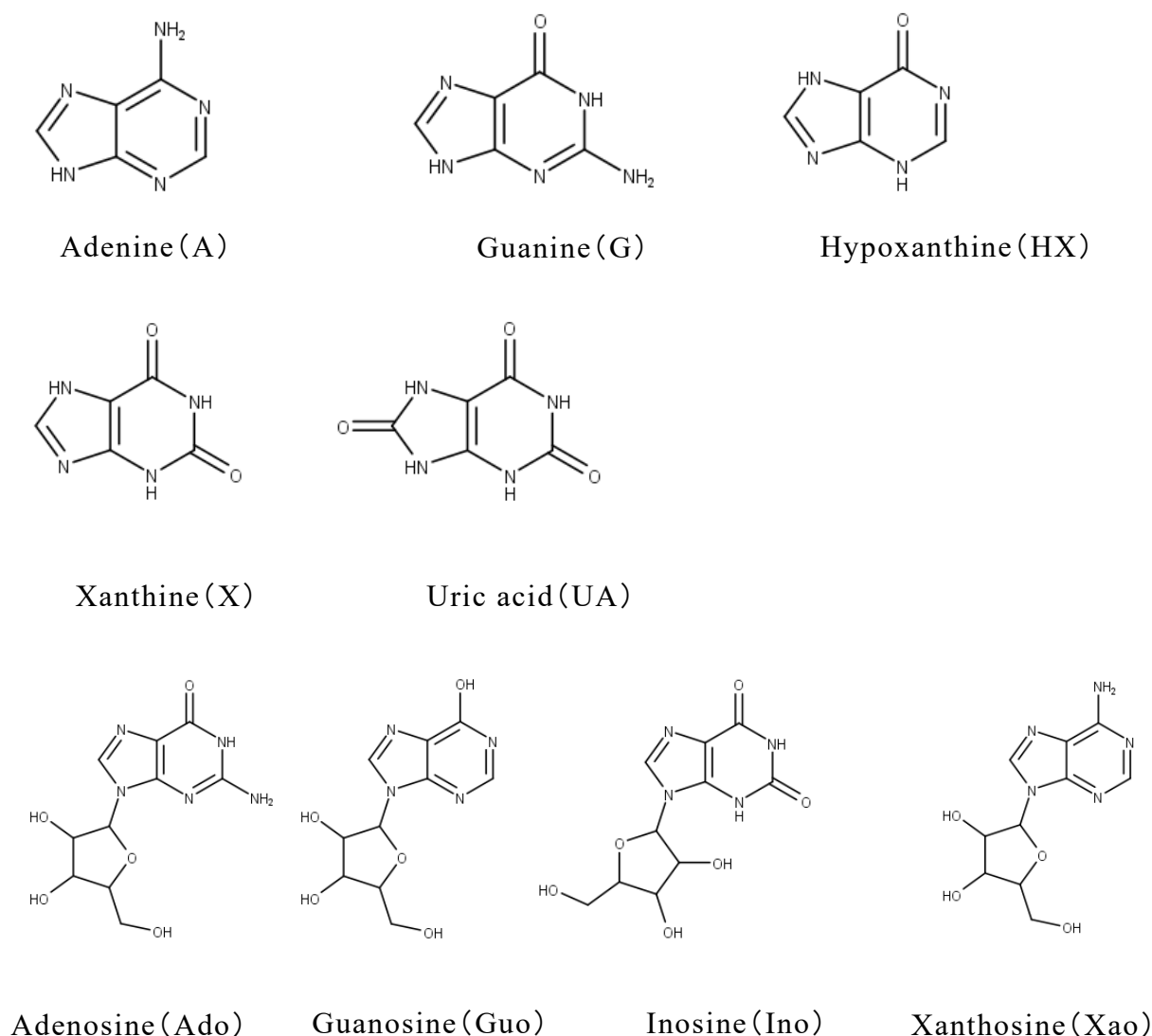
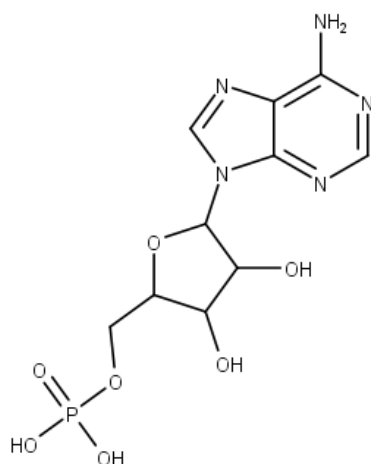
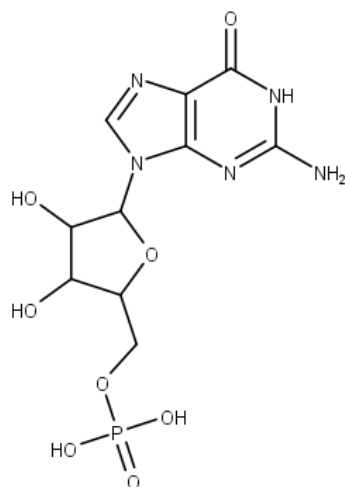


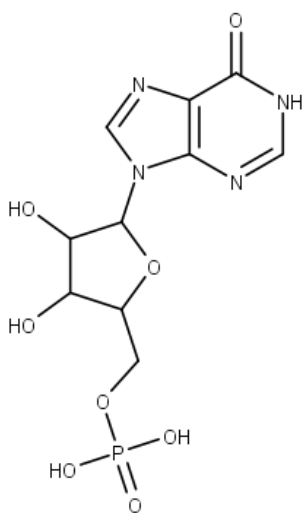
Fig.4 測定対象としたプリン塩基 5 種とヌクレオシド 4 種の化合物の構造式



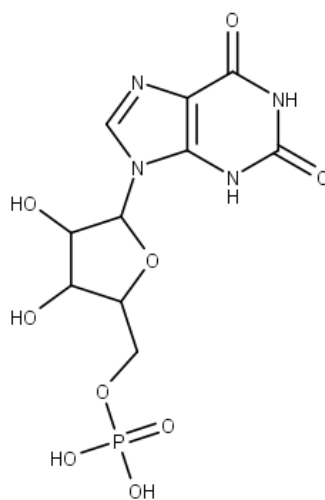
AMP



GMP

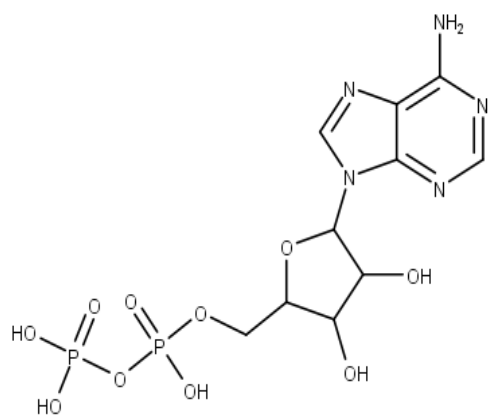


IMP

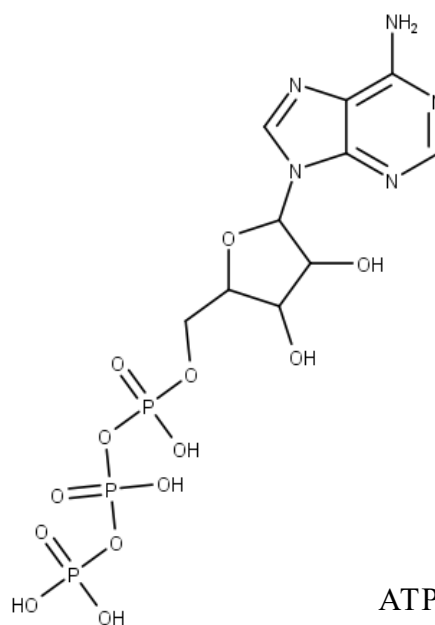


XMP

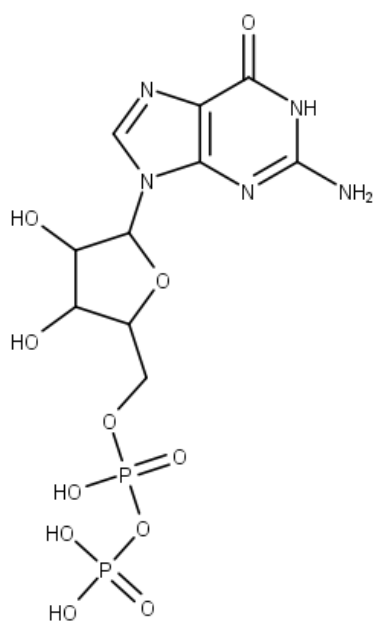
Fig.5 測定対象としたモノヌクレオチド 4 種類の化合物の構造式



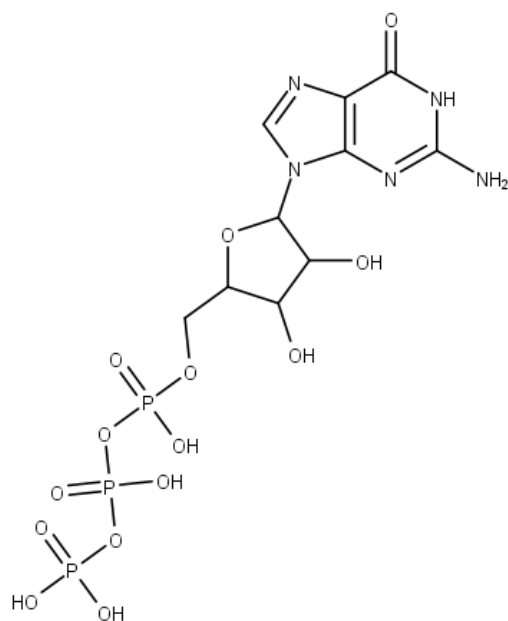
ADP



ATP



GDP



GTP

Fig.6 測定対象としたヌクレオチド 4 種類の化合物の構造式

2-2 総プリン体測定

[1] 標準試料の調製

① アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸をそれぞれ約 25 mg 量りとり、50 mL メスフラスコに入れ、1M NaOH を 1 mL 加え試料を溶解させた。その後、Milli-Q 水でメスアップした。キサンチンは 25.0 mg 採取し、溶けにくい為 100 mL メスフラスコに入れ同様の操作を行った。各塩基の溶液(25.0 mg/50 mL)を 200 μ L ずつ（キサンチンのみ 400 μ L）量りとり、20 mL メスフラスコに入れ Milli-Q 水でメスアップし、これを 5 つの塩基の混合液の原液とした。濃度は 200 ng/40 μ L とした。各プリン塩基の原液は 4°C に保存し、保存期間は最大 3 か月とした。

② ①で調製した混合液の原液から 5 mL とり、50 mL メスフラスコに入れ、Milli-Q 水でメスアップし、10 倍希釈液を調製、更に同様の操作で 100 倍希釈液を調製した。

③ 混合液の 100 倍希釈液 50 μ L、10 倍希釈液 10 μ L、20 μ L、40 μ L、混合液の原液 10 μ L、20 μ L、40 μ L の順番で HPLC を用い測定し検量線を作成した。検量線は 2.5～200 ng の間で良好な直線性が得られた。（結果は、[4] 標準試料の検量線の作成にて示した。）

[2] 回収率の確認

食品のプリン体量を測定する前に、前処理操作により、どの程度の塩基回収率があるかを確認するため、まず ATP、GTP を使用し、前処理実施後の回収率を求めた。

① ATP、GTP を各々 100.46 mg と 49.25 mg ずつ採取し、蒸留水を 1 mL、500 μ L ずつ加え、100 mg/mL としたものを試料とした。

② 試料を各々 30 μ L 採取し、70%過塩素酸 30 mL を加え、攪拌後 100°C で 60 分間反応させる。（加水分解により ATP、GTP に結合するリン酸基や糖が外れて、プリン塩基であるアデニンとグアニンになる。）

③ 過塩素酸処理した試料から 5 mL 採取し、水酸化カリウム溶液による中和を行った。

④ 遠心分離後、上清 10 mL を採取し、氷中で 10 分放置する。

⑤ 再度遠心分離を行った後、得られた上清から 20 μ L 採取したものをを用いて HPLC 条件①により塩基測定を行った。遠心分離はいずれも 4°C、3500 rpm（HITACHI hinac CT6E）にて 15 分間行った。

[理論値の算出]

理論値とは試料が 100%回収されたと仮定した場合に含有するアデニン、グアニンの量である。理論上、上記の操作により、ATP、GTP は共に 3 mg となるが、遠心して得られた上清 20 μ L 中に含まれるアデニンとグアニンの測定値と、計算で求めた理論値と比較し、回収率を確認した。

ATP から生成されるアデニン（g/ μ L）

$$\frac{3.0138(\text{mg})}{785.45(\text{g})} \times \frac{5(\text{mL})}{30.06(\text{mL})} \times \frac{10(\text{mL})}{5 + \text{KOH の量}(\text{mL})} \times \frac{5(\text{mL})}{10(\text{mL})} \times \frac{20(\mu\text{L})}{5000(\mu\text{L})} \times 10^6 \times 135.1$$

GTP から生成されるグアニン (ng/μL)

$$\frac{2.955(\text{mg})}{866.59(\text{g})} \times \frac{5(\text{mL})}{30.06(\text{mL})} \times \frac{10(\text{mL})}{5 + \text{KOH の量}(\text{mL})} \times \frac{5(\text{mL})}{10(\text{mL})} \times \frac{20(\mu\text{L})}{5000(\mu\text{L})} \times 10^6 \times 151.13$$

理論値と測定値から算出した回収率を以下、Table 1 に示す。

Table 1 アデニン、グアニンの回収率 単位：%

	アデニン	グアニン
1 回目	79.7	106.0
2 回目	121.5	89.9
3 回目	100.7	110.3
4 回目	89.2	91.3
5 回目	83.2	92.0
平均	94.9	97.9
相対標準偏差(%)	17.7	9.7

上記結果から、アデニンは相対標準偏差が大きかったが、3 回目以降の結果から回収率 91%、相対標準偏差は 7.2 であったことから、食品試料の測定が行えると判断し、測定を開始した。

[3] HPLC 条件① (総プリン体測定)

全てのプリン体をプリン塩基まで分解して測定する方法で、以下の条件にて測定を行った²⁰⁾。測定対象は、アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸、キサンチンのプリン塩基 5 種類とした。標準試料のクロマトグラムを Fig.7 に示した。

装置 : SHIMADZU LC-20A
カラム : Shodex Asahipak GS320HQ(7.6 mmI.D.x300 mm)
カラム温度 : 35°C
移動相 : 150 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.8)
流速 : 0.6 mL/min
検出波長 : 260 nm(UV)

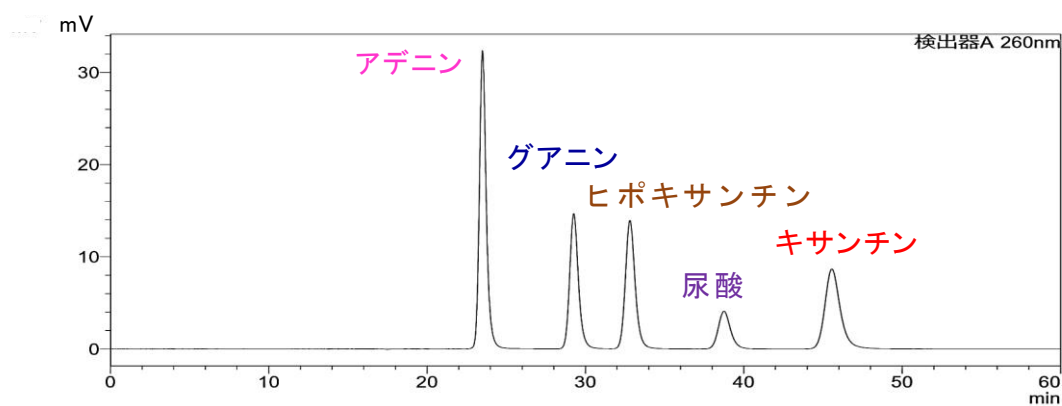


Fig.7 標準試料のクロマトグラム (5 塩基)

[4] 標準試料の検量線

以下に濃度を 7 点、同一濃度 3 回の測定値の平均値から検量線を作成し示した (Fig.8)。

いずれも 2.5~200ng の範囲で良好な直線性が得られた。

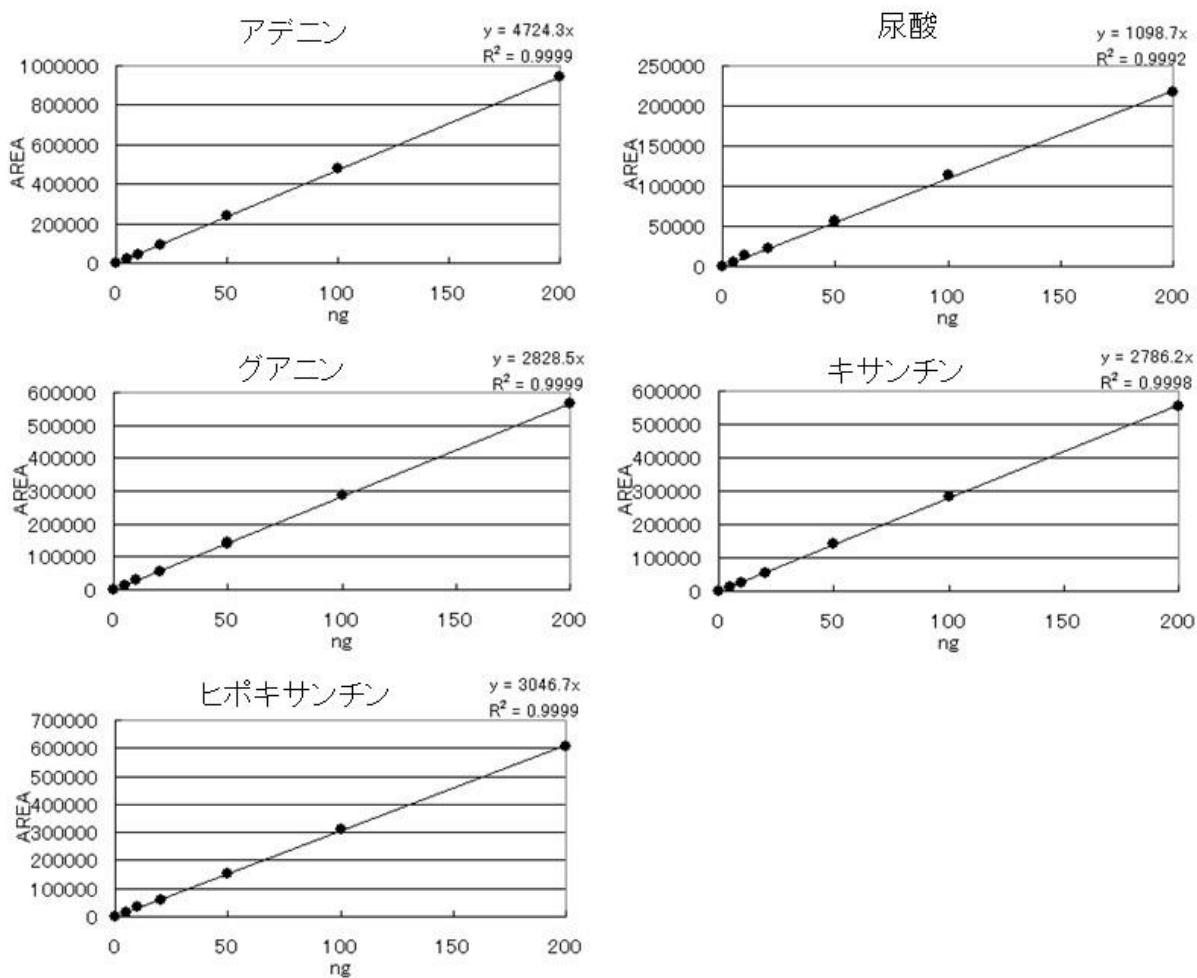


Fig.8 標準試料（プリン塩基 5 種）の検量線

2-3 プリン体分子種別の測定

[1] 標準試料の調製

各試薬（塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド）の 10mM 溶液を作製し、①塩基の混合液、②ヌクレオシドの混合液、③A グループ(ATP,ADP,AMP)の混合液、④G グループ(GTP,GDP,GMP)の混合液、⑤その他(IMP,XMP)の混合液を作製し、①～⑤各溶液を 1 mMとした。尿酸とキサンチンは、少量の 1 M 水酸化カリウム溶液を使用して溶解した。①～⑤の溶液を 20 μ L ずつ採取し、0.02M塩酸を 100 μ L 加え、最終的に Milli-Q 水で 0.1mM (1000pmol/10 μ L) とした。ストック溶液を Milli-Q 水で希釈し、0.1～100 μ M の範囲の溶液にした。

[2] HPLC 条件②（プリン体分子種別測定）

プリン体を酸加水分解せずに遊離プリン体を一斉分析する方法²¹⁾で、食品中の分子種別プリン体（プリン塩基、ヌクレオシド、ヌクレオチド）を定量した。測定対象はプリン塩基 5 種（アデニン、グアニン、ヒポキサンチン、尿酸、キサンチン）、ヌクレオシド 4 種（アデノシン（Ado）、グアノシン（Guo）、イノシン（Ino）、キサントシン（Xao））、ヌクレオチド 8 種（ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, GMP, IMP, XMP）とした。以下に測定条件を示した。標準試料のクロマトグラム（Fig.9）を示した。

測定装置 : SHIMADZU LC-20A システム
カラム : YMC-Triart C18 (250 \times 4.6 mm id、3 μ m mm, YMC)
カラム温度 : 35 $^{\circ}$ C
移動相 : 80 mM リン酸アンモニウム緩衝液(pH 4.1)
80 mmol H₃PO₄ / NH₄H₂PO₄ 100 : 9 (v / v)
移動相 B : 30 % Methanol in A グラジエント溶出
流速 : 0.6 mL / min
検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (PDA)
検出波長 : 260 nm

15～30 分で 25% B への直線勾配。30～40 分でイソクラティック溶離 25% B; 40～50 分で 50% B への直線グラジエント溶離とした。その後、1%に再平衡化し、20 分間再平衡化した。以下、標準試料のクロマトグラムを示す。

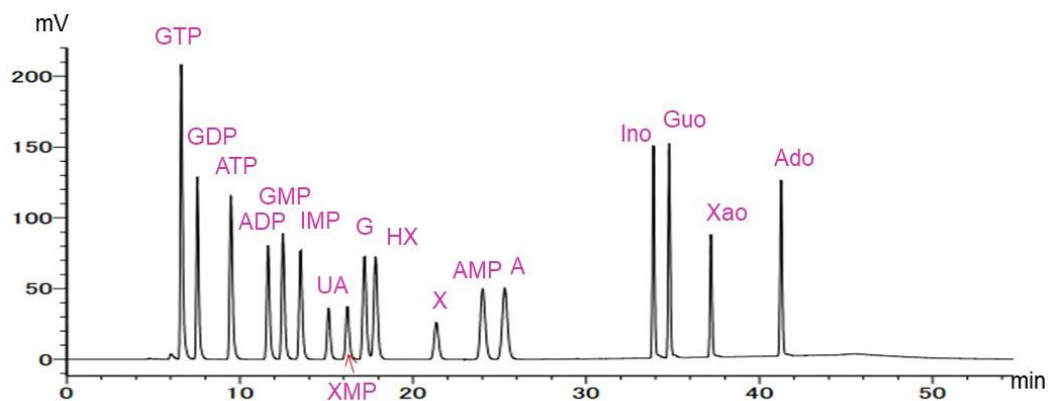
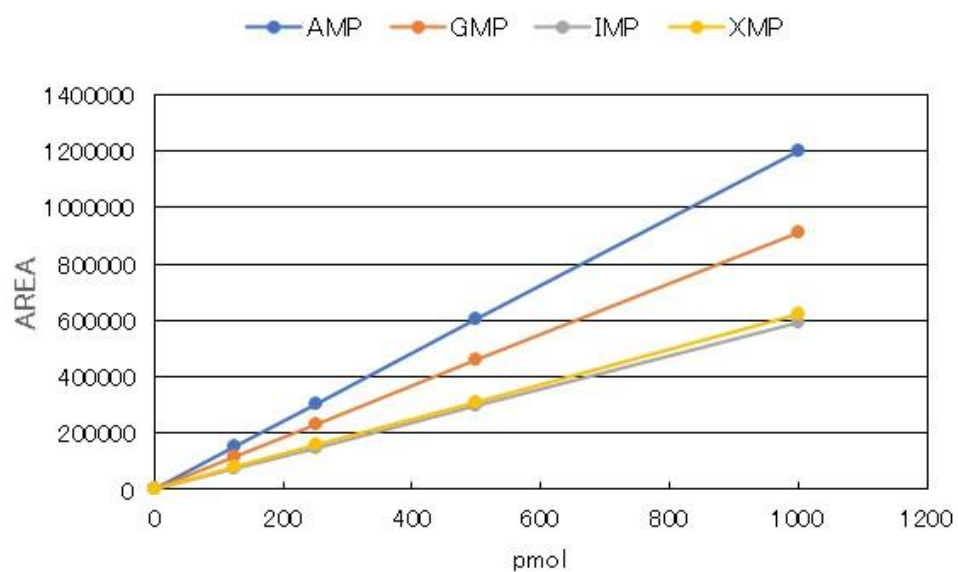
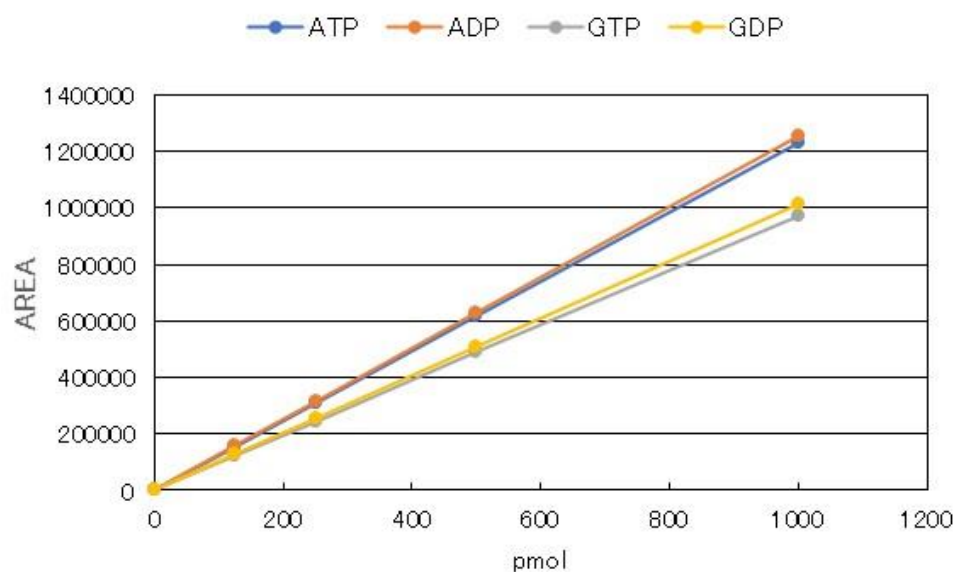


Fig.9 標準試料 17 種類のクロマトグラム

[3] 標準試料の検量線

標準試料の濃度を 4 点、同一濃度 3 回の測定値の平均値から検量線を作成し以下に示した(Fig.10)。いずれも 125~1000pmol の範囲で良好な直線性が得られた。



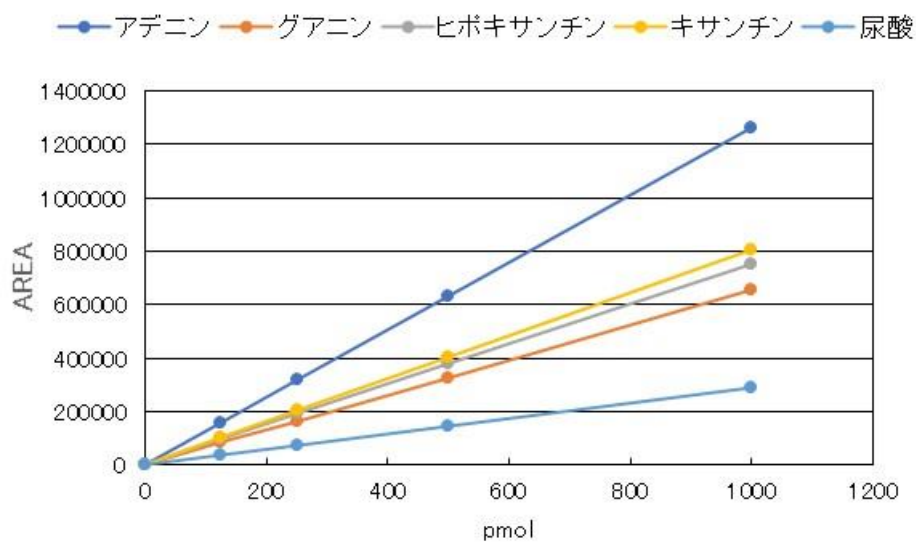
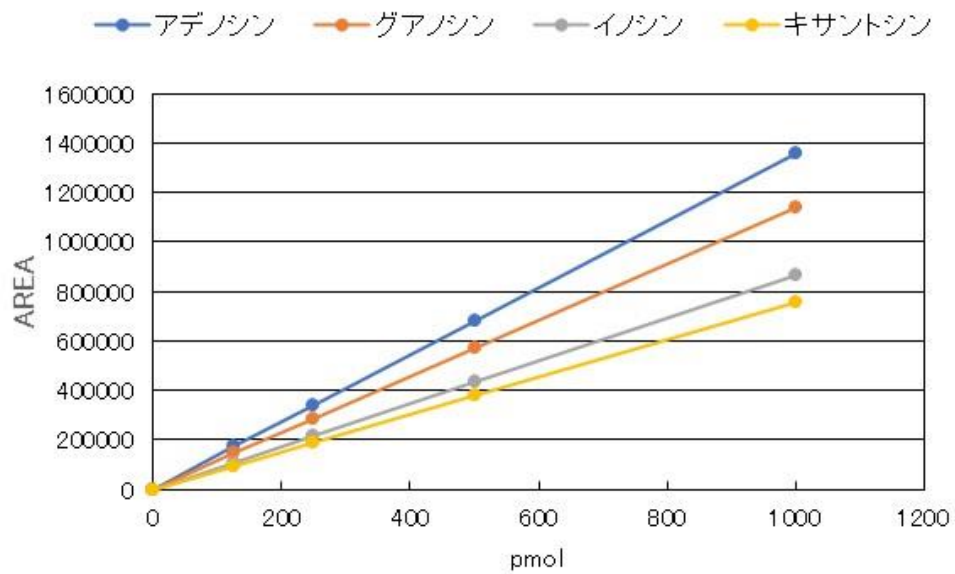


Fig.10 標準試料（ヌクレオチド、ヌクレオシド、塩基）の検量線

2-4 発酵食品および測定試料

[1] 発酵食品

日本は古来より、微生物およびその酵素を利用して醸造・発酵食品を生産してきた。自然発酵的に起こった生命現象をいかに再現性良く、かつ上手に行うかという人類の努力の変遷の歴史である。味噌や醤油のような発酵調味料は世界に知られる「和食」のエッセンスである。世界で食されている発酵食品としてチーズやヨーグルト、キムチなど乳酸菌を使用した食品、酵母を利用したワイン、麴を利用したテンペ、アンチョビのような長期期間発酵させた食品がある⁴²⁾。これら発酵食品は健康増進への期待も大きく、世界の一部の国（カナダ、インド）では食事ガイドラインに発酵食品の摂取量が記されていることが報告されている⁴³⁻⁴⁵⁾。本研究に使用した発酵食品について、主な微生物や原材料について Table 2 に示した。

Table 2 発酵食品の種類と発酵微生物および原材料

発酵食品	主な微生物	原材料
酒粕	麴菌<酵母菌	米、麴、酵母菌
ぬか	乳酸菌（植物性）	米ぬか、塩
西京味噌	麴菌>酵母菌	麴、大豆、塩
アンチョビオイル漬け	乳酸菌（動物性）	カタクチイワシ、塩、油

これら発酵食品について、調べたことを以下に記した⁴⁶⁾。

酒粕：日本酒を製造される際の搾り粕であり、米を麴で糖化させ、清酒酵母を加えてアルコール発酵をさせる。酵母は子囊菌酵母 *Saccharomyces*（真核生物）で、日本食品標準成分表 2020 によると塩分は含有されていない。ビタミンや食物繊維など多くの栄養素を含んでいる。ペプチドやレジスタントプロテイン、アデニシルメチオニンなど機能性成分を含有している⁴⁷⁾。調味料として使用される他、甘酒や粕汁などに使用される。

ぬか：玄米を精米する際、外皮や胚芽などの廃棄物。ぬかと塩でぬか床として使用されている。乳酸菌 *Lactobacillus*（原核生物）で塩分 6-8g/100g を含有する。糖分から乳酸を産生し、徐々にぬか床のpHは低下していく⁴⁸⁾。野菜の他、肉や魚を漬ける。へしこは長期間、魚を糠漬けにした福井県の郷土料理である。特定の乳酸菌はプリン体を摂り込み、プリン代謝に影響を及ぼすとの報告がある⁴⁹⁾。

西京味噌：米味噌で淡黄色を呈し甘味がある。麴歩合が高く、熟成期間が短い。麴菌 *Aspergillus*（真核生物）、塩分 6g/100g を含有し、他の味噌より塩分は少ない。

麴の酵素が大豆や米のでんぷんや蛋白質を分解し、ブドウ糖やアミノ酸を生成する。

アンチョビ：カタクチイワシなど小魚を塩漬け後、オイル漬けして作製される。乳酸菌と自己消化酵素により熟成されるが、微生物は複雑に存在する。微生物がプリン体を分解するとの報告もある⁵⁰⁾。

本研究では上記の発酵食品以外に塩糍やもろみ酢の総プリン体測定を行った。これら食品の説明についても追記した。

塩麴：麴、塩、水を混ぜて発酵させた調味料で、麴菌 *Aspergillus* (真核生物) が産生する酵素の働きで肉や魚を軟化させる。

もろみ酢：泡盛精製時の副産物で黒麴菌、酵母の発酵により生成される。クエン酸やアミノ酸を多く含有する。分類は清涼飲料水であり、食酢（酢）に分類されない。

[2] 魚介類の ATP 分解経路と発酵微生物のプリン代謝経路

魚介類は漁獲後、筋肉中の高エネルギー物質は急速に代謝され、ATP、ADP、AMPへと代謝される。魚介類の筋肉には AMP デアミナーゼの活性が高く、アデノシンデアミナーゼの活性が低いことから保管中における筋肉中には IMP (イノシン酸)、または AMP が多量に生成されると言われている⁵¹⁾。これらのことから魚介類の ATP 分解経路は下図のようにアデニン類からヒポキサンチン類へと代謝される (Fig.11)。

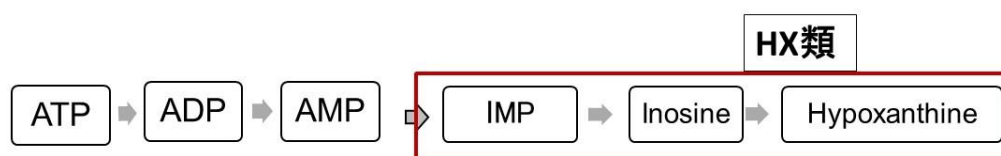


Fig.11 魚介類の ATP 分解経路

一方、発酵食品では発酵微生物の種類により保有する酵素が異なる。酒粕に關与する酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* では、ISN、PNP、HPT がある。ぬかには、多種多様な発酵微生物が含まれるが代表的な乳酸菌 *Lactobacillus* 属の *plantarum* や *brevis* では ISN と PNP がなく、ヌクレオシダーゼや HPT があることがわかっている。さらに西京味噌の麴菌 *Aspergillus oryzae* には ISN があるが、HPT のようなサルベージ経路が存在せず、ヒポキサンチンから下流のキサンチンや尿酸に代謝する XO や尿酸を代謝する UOX が存在する⁵²⁾ (Fig.12)。

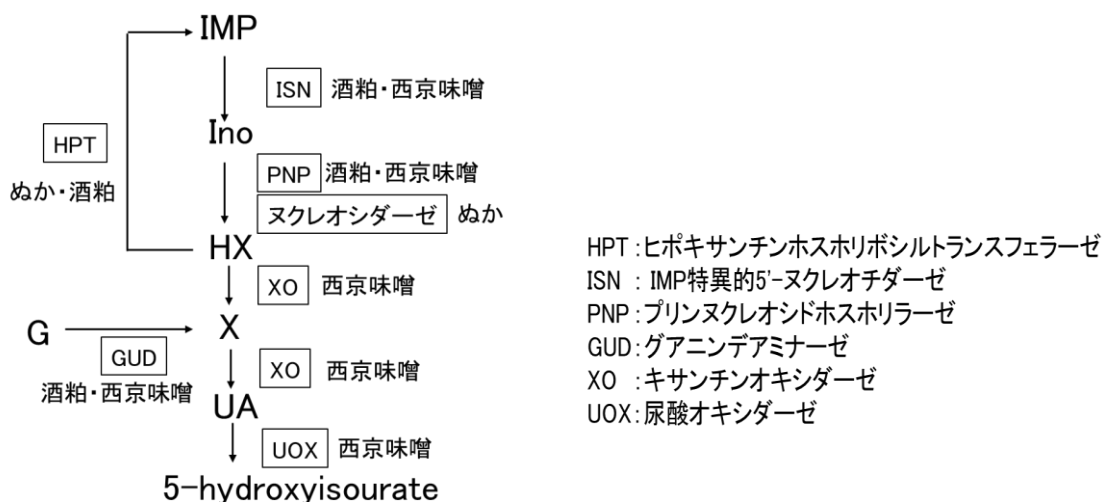


Fig.12 発酵微生物のプリン代謝経路

[3] 測定試料

i) 入手方法

めかじきは魚屋で国産（宮城県産）の切り身を入手した。一切れ 70g 位の切り身が 3 切れで 1 パックにされており、切り身の形は四角いものを選んだ。カタクチイワシは入手困難であったため焼津水産より寄贈されたカタクチイワシを使用した。酒粕は板粕のもので保存しやすいもの、ぬかはすぐに利用できる熟成されたぬか床、西京味噌は味噌専門店で販売されていた京都で作られたもので冷所にて保存されていた一袋 250 g 入りのものを入手した。塩糍はパック入りで調味料として使用されるもの、もろみ酢はインターネットにて瓶入りのものをそれぞれ購入した。本研究でめかじきを使用した理由として、これまでにプリン体量が測定されていなかった魚介類であったことや病院給食でよく使用される食材であることから選択した。

ii) 浸漬・保存方法

めかじき 3 切れのうち 2 切れは発酵食品漬け用として、水分をプロワイプで軽く拭きとり、同量の発酵食品（酒粕、ぬか、西京味噌）に浸漬し、ラップにて包み保存した（Fig.13）。一切れは浸漬期間を 1 日に、もう一切れは浸漬期間を 3 日とし、冷所（4℃）に保存した。アンチョビの作製方法は、長崎近海で獲れたカタクチイワシを冷凍で入手し、解凍後、頭、内臓、背骨、尾びれを削除した後、新鮮な切り身を重量の 40% の塩化ナトリウムで約 2 ヶ月冷所（4℃）にて保存後、水分を拭き取り、オリーブオイルで約 2 ヶ月保存した。

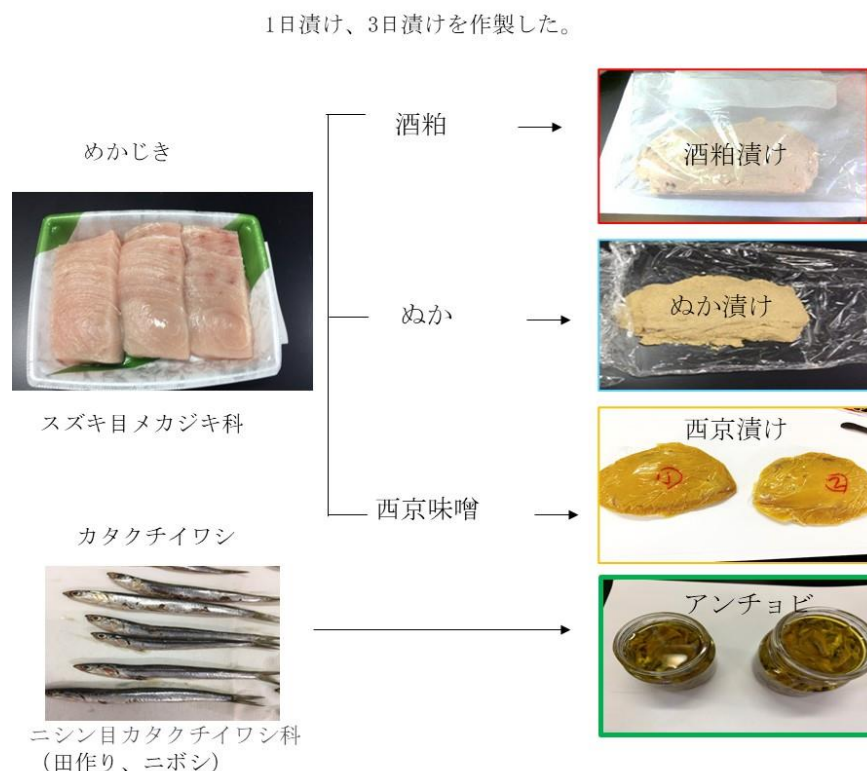


Fig.13 めかじきの発酵食品浸漬後の状態およびカタクチイワシの塩漬け後オイル漬けの状態

浸漬方法は西京漬けを例として、時系列と共に示した (Fig.14)。発酵食品に漬けた、めかじきは表面に付着した発酵食品をゴムベラで丁寧に拭き取り、めかじき (1 日漬け後、3 日漬け後) と発酵食品 (1 日漬け後、3 日漬け後) に分けた (Fig.14 左側)。一方、3 切れのうち残りの 1 切れのめかじきと残りの発酵食品は、ラップに包み冷所で保存した。1 日保存の試料としてめかじきを約半分 (約 35g) 切り分け、測定試料とした。残りの半分 (約 35g) は引き続き 3 日保存した後、測定試料とした。発酵食品は 1 日および 3 日保存したものをそれぞれ測定試料とした (Fig.14 右側)。各試料とも約 5g および約 50 mg のものを 3 サンプル採取して測定し、総プリン体および分子種別の測定値とした。

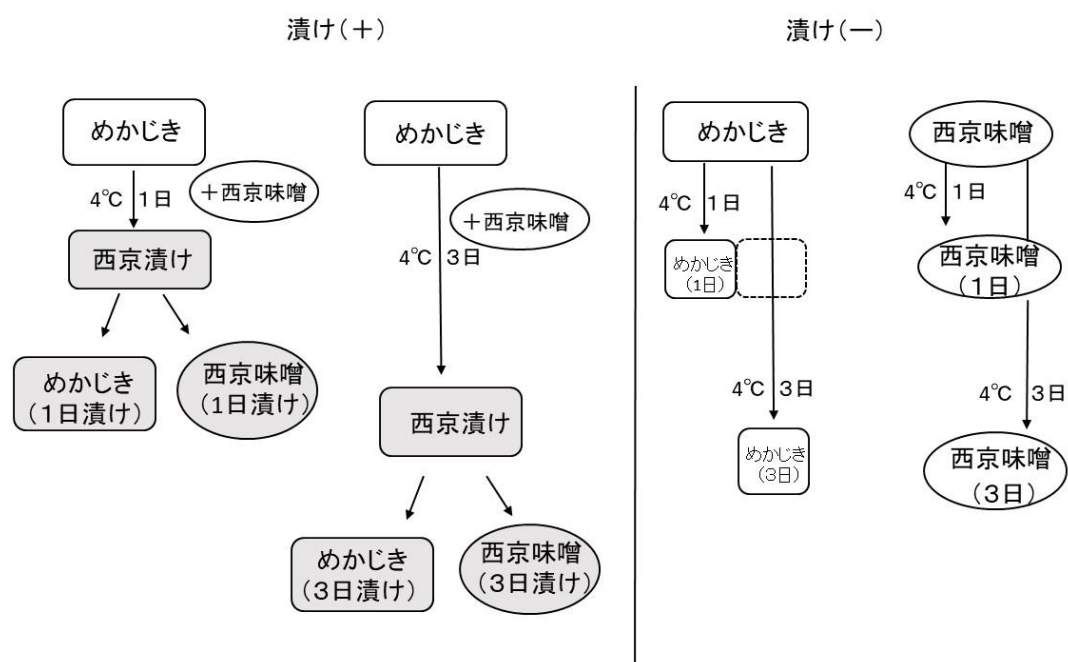


Fig.14 魚の浸漬方法とサンプリング方法

[4] 食品処理フローチャート

総プリン体測定に加え、遊離で存在するプリン体分子種についても測定することから食品処理の方法が異なるため、以下に食品処理のフローチャートを示した。左側の①に、全てのプリン体（核酸・ヌクレオチド・ヌクレオシド）をプリン塩基に分解して分析する方法の食品処理を示し、右側の②に遊離プリン体を分子種別に分析する際の食品処理方法を示した。（Fig.15）



Fig.15 食品処理のフローチャート

① 全てのプリン体を塩基にする方法（総プリン体測定）

測定試料（めかじき、発酵食品）を 5～10g の範囲で計量し、重量が揃ったものを 3 つサンプルとし 50ml の遠沈管に採取した。Milli-Q 水を 10mL 加え、あらかじめハサミで粗く細断した後、ポリトロンホモジナイザー（POLYTRON PT3100）を用いて 14,000rpm、およそ 3 分間処理する。破碎時は遠沈管の底部を氷で冷却しながら行った。-80℃で冷却後、凍結乾燥（FREEZ VAC51S-12M）を 48 時間行い、水分が完全に除去されているか確認した。凍結乾燥後の試料は重量を測定し、あらかじめ測定した遠沈管の重量から差し引いて試料の乾燥後の重量を求めた。乾燥後の試料を酸加水分解するため、過塩素酸 30mL を加え、ナスフラスコに移したのち、100℃ 60 分で

攪拌しながら酸加水分解を行った。酸加水分解後の試料を 5 mL 採取し、水酸化カリウム溶液にて中和後、3500pm,15 分間遠心し上清を採取した。

② プリン体を分子種別に分析する方法（プリン体分子種別の測定）

測定試料（めかじき、発酵食品）を 50～100 mg 採取し、重量が揃ったもの 3 つをサンプルとした。冷却した 70%アセトニトリル 1ml 入りの 1.5ml チューブに試料を入れ、ハサミで細断したのち、ホモジネートした。遠心後、上清を採取し、①遠心エバポレーター（Genevac 社 miVac DuoLV）で乾固した。さらに沈殿物に 70%アセトニトリルを 500 μ L 加え、ホモジネート（パワーマッシャーⅡ ニッピ）後、上清を採取し、②遠心エバポレーターにて乾固した。①と ②の、2 つの試料を 70%アセトニトリルで再溶解し、前処理（MonoSpinTMC18 10,000 g \times 2 分）したのち、遠心乾固したものを移動相（100 μ L）で再溶解し、ろ過（0.45 μ m フィルター,12,000 g \times 4 分）して HPLC 測定試料とした。

[5] 酵素処理

ピークの同定と夾雑物の影響を排除する目的でキサンチンオキシダーゼ (XO, X2252-100UN、微生物由来) を用いて酵素処理を行った。ブランク、処理、未処理の三つに分け、ブランクとして 0.6M グリシルグリシン緩衝液 (pH8.2) を 100 μ L、キサンチンオキシダーゼを 20 μ L、Milli-Q 水を 100 μ L 加えたものを作った。次に、処理として、食品サンプルを 100 μ L、0.6M グリシルグリシン緩衝液を 100 μ L、キサンチンオキシダーゼを 20 μ L 加えたものを作った。未処理として、食品サンプルを 100 μ L、0.6M グリシルグリシン緩衝液を 100 μ L Milli-Q 水を 20 μ L 加えたものを作った。ブランク、処理は 37 $^{\circ}$ C で 3 時間反応させた後、12000 rpm で 4 $^{\circ}$ C、4 分遠心し、未処理は 0.45 μ m フィルターにて 3000 rpm で 4 $^{\circ}$ C、4 分遠心した後、「処理」、「未処理」のサンプルを HPLC にて測定した。Fig. 16 に酵素処理、未処理のクロマトグラムを示した。酵素処理後にアデニン、グアニン、ヒポキサンチンのピークが消失し、①尿酸および②グアニンの酸化体が出現した。酵素処理前から酵素処理後のピーク面積を差し引きすることで夾雑物の影響を除去するとともに、ピークの同定を行った。

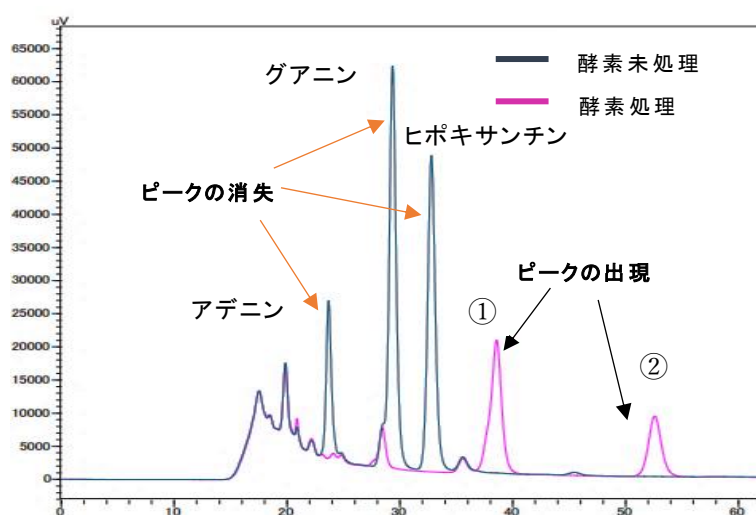


Fig.16 酵素処理および未処理のクロマトグラム

[6] HPLC 測定

プリン体は 2-2 [3] に示す方法により、分子種別プリン体は、2-3 [2] に示した条件にて測定した。測定は各試料 3 サンプルとし、平均値を算出した。漬け前および漬け後の有意差検定は Student's *t* test を行い、*: $p < 0.05$ および **: $p < 0.01$ で示した。0.0 は、定量限界(300 pg or 15 pmol)以上, 0.0499-- (四捨五入で切り捨てる) の間の定量値を示す。N.D.は検出限界(100 pg or 5 pmol)以下を示す。

3 章 発酵食品および浸漬によるめかじきの総プリン体と 遊離プリン体分子種の測定結果

3-1 発酵食品中の総プリン体量の比較

発酵食品のプリン体量を比較した結果を Table 3 に示した。酒粕、ぬか、西京味噌は漬け前のものを示した。発酵食品の中で、最もプリン体量が多いのは酒粕であった。次いで西京味噌、ぬか、もろみ酢で、塩糀は最も少ない結果であった。

Table 3 発酵食品中の総プリン体量の比較					mg/100g
食品	アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
酒粕	27.0 ± 4.6	31.7 ± 10.7	22.4 ± 0.0	6.5 ± 0.2	87.6 ± 14.1
ぬか	8.8 ± 2.2	14.6 ± 4.7	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.4	25.6 ± 6.7
西京味噌	0.7 ± 0.1	13.2 ± 7.1	19.1 ± 1.6	7.9 ± 1.5	40.9 ± 10.2
塩糀	0.3 ± 0.1	6.2 ± 1.7	7.4 ± 1.0	0.0	13.8 ± 2.8
もろみ酢	6.9 ± 0.5	3.8 ± 0.5	4.2 ± 0.3	4.2 ± 0.2	20.9 ± 0.4

3-2 酒粕漬け⁵³⁾

酒粕 1 日漬け、3 日漬けの総プリン体測定の結果を Table 4,5 に示す。めかじきの漬け前（漬けずに 4℃で保存）の総プリン体量は 153.0～156.4 mg/100g であり、ヒポキサンチン類は総プリン体の 70%以上を占めていた。めかじきを発酵食品に浸漬するとめかじきの 1 日漬け後、3 日漬け後の両方においてヒポキサンチン類とグアニン類および総プリン体が有意に減少した。一方、酒粕は、含有するプリン体が他の発酵食品より多く（87.6～94.9 mg/100 g）、めかじきを漬けることにより 1 日漬け、3 日漬けの両方でヒポキサンチン類が有意に増加した。

Table 4 めかじき酒粕1日漬け 浸漬前後の比較						mg/100g
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	18.9 ± 2.2	22.2 ± 9.9	114.5 ± 8.6	0.8 ± 0.0	156.4 ± 21.7
めかじき	漬け後	15.4 ± 6.8	7.1 ± 0.1*	78.1 ± 11.5**	2.8 ± 0.4	103.3 ± 13.9*
酒粕	漬け前	27.0 ± 4.6	31.7 ± 10.7	22.4 ± 0.0	6.5 ± 0.2	87.6 ± 14.1
酒粕	漬け後	22.8 ± 3.3	30.3 ± 9.8	47.0 ± 6.8**	5.1 ± 0.5	105.2 ± 9.8

Table 5 めかじき酒粕3日漬け 浸漬前後の比較						mg/100g
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	22.6 ± 3.5	17.7 ± 2.5	115.2 ± 22.6	1.9 ± 0.4	152.9 ± 20.9
めかじき	漬け後	13.7 ± 0.2	10.3 ± 2.1**	69.7 ± 10.4**	3.7 ± 0.1	97.3 ± 11.3**
酒粕	漬け前	35.2 ± 12.2	27.0 ± 17.8	24.6 ± 3.6	8.0 ± 2.7	94.9 ± 29.6
酒粕	漬け後	25.8 ± 8.3	26.6 ± 2.9	50.9 ± 4.8**	5.6 ± 0.1	108.9 ± 20.6

* p < 0.05 **p < 0.01 漬け前 VS 漬け後

Table 6 にめかじき、Table 7 に酒粕のプリン体分子種別の結果および Fig.17 にめかじき酒粕漬の遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化を示す。めかじきの漬け前では、ヒポキサンチン類である Ino が最も多く、IMP とヒポキサンチンはほぼ同量含まれていた。一方、酒粕の漬け前ではヒポキサンチン類は主に塩基であるヒポキサンチンであった。めかじきの 3 日漬け後では IMP、Ino、ヒポキサンチンが有意に減少した。何も漬けずに保存した、めかじきの漬け前（1 日）と漬け前（3 日）を比較すると Ino（291.5→486.6 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ）とヒポキサンチン（66.4→111.2 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ）が約 2 倍程度増加した結果に比べ、漬け後（1 日）と漬け後（3 日）では Ino（230.7→294.4 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ）とヒポキサンチン（62.7→88.6 $\mu\text{mol}/100\text{g}$ ）はやや増加した結果であった（Fig.17）。

Table 6 めかじきの浸漬前後のプリン体分子種の組成

	$\mu\text{mol}/100\text{g}$			
	1 日 漬 け		3 日 漬 け	
	漬 け 前	漬 け 後	漬 け 前	漬 け 後
ATP	2.6 ± 0.8	2.0 ± 0.9	3.4 ± 0.8	2.6 ± 0.9
ADP	6.1 ± 1.8	5.6 ± 1.8	9.8 ± 1.5	8.1 ± 0.4
AMP	2.4 ± 3.4	2.5 ± 3.5	17.9 ± 1.0	$9.4 \pm 0.8^{**}$
Ado	0.1 ± 0.1	0.0	4.9 ± 3.6	0.0
A	0.0	$0.3 \pm 0.1^{**}$	0.0	$0.5 \pm 0.0^{**}$
GTP	0.5 ± 0.2	0.3 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.3
GDP	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.2 ± 0.1
GMP	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.2	$1.2 \pm 0.1^*$
Guo	0.6 ± 0.3	$2.2 \pm 0.2^{**}$	0.9 ± 0.2	3.4 ± 1.5
G	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.3	$1.1 \pm 0.2^*$
IMP	101.4 ± 26.6	$40.5 \pm 22.3^*$	60.6 ± 12.3	$28.5 \pm 2.2^*$
Ino	291.5 ± 73.1	230.7 ± 53.4	486.6 ± 13.7	$294.4 \pm 4.6^{**}$
HX	66.4 ± 18.0	62.7 ± 18.3	115.2 ± 3.3	$88.6 \pm 5.2^{**}$
UA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
XMP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Xao	0.3 ± 0.5	1.1 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.9
X	2.6 ± 1.0	$8.5 \pm 1.2^{**}$	5.3 ± 0.4	16.9 ± 1.6

Table 7 酒粕の浸漬前後のプリン体分子種別の組成 $\mu\text{mol}/100\text{g}$

	1 日 漬 け		3 日 漬 け	
	漬 け 前	漬 け 後	漬 け 前	漬 け 後
ATP	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.1 ± 0.0
ADP	7.2 ± 1.2	6.7 ± 0.3	5.0 ± 2.6	1.1 ± 1.3
AMP	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ado	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
A	0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1
GTP	0.5 ± 0.3	0.4 ± 0.3	0.9 ± 0.6	0.8 ± 0.6
GDP	0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.1
GMP	1.0 ± 0.7	1.0 ± 0.5	2.7 ± 0.9	2.4 ± 0.9
Guo	10.4 ± 2.3	10.5 ± 0.6	12.8 ± 1.7	12.4 ± 1.2
G	1.6 ± 0.1	1.5 ± 0.1	1.7 ± 0.5	1.3 ± 0.4
IMP	5.4 ± 1.7	$13.5 \pm 1.3^{**}$	7.0 ± 0.8	$19.5 \pm 3.9^{**}$
Ino	4.4 ± 1.9	$53.5 \pm 12.4^{**}$	5.1 ± 0.9	$119.1 \pm 32.9^{**}$
HX	60.0 ± 15.1	66.9 ± 4.9	57.3 ± 10.0	68.5 ± 15.9
UA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
XMP	0.1 ± 0.1	0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1
Xao	0.7 ± 0.8	0.4 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.0
X	25.9 ± 3.6	24.3 ± 0.7	26.0 ± 6.5	20.3 ± 6.2

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 漬 け 前 VS 漬 け 後 N.D.:Not detected.

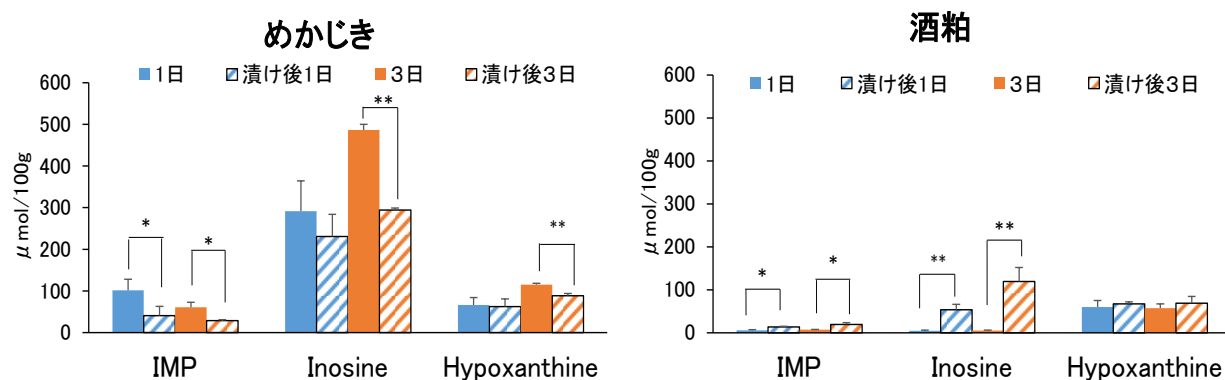


Fig.17 めかじき酒粕漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化

3-3 めか漬け

めか 1 日漬け、3 日漬けの総プリン体の結果を Table 8,9 に示す。めかじきの漬け前の総プリン体は 125.5 mg/100g で、そのうちヒポキサンチン類は 101.3mg と 70%以上を占めていた。一方、めかの漬け前の総プリン体は 25 mg/100g と非常に少ないに分類され、プリン体の多くはアデニン類、グアニン類であった。めかじきの 1 日漬け後のヒポキサンチン類と 3 日漬け後のアデニン類が有意に減少、キサンチン類が有意に増加していた。めかの 1 日漬け後、3 日漬け後の両方で総プリン体が有意に増加した。

Table 8 めかじきめか1日漬け 浸漬前後の比較		mg/100g				
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	16.0 ± 1.3	7.3 ± 1.0	101.3 ± 14.9	1.0 ± 0.1	125.5 ± 18.1
めかじき	漬け後	12.2 ± 2.8	10.7 ± 1.9	76.5 ± 3.8*	3.1 ± 1.1*	102.4 ± 12.5
めか	漬け前	8.8 ± 2.2	14.6 ± 4.7	1.5 ± 0.3	0.7 ± 0.4	25.6 ± 6.7
めか	漬け後	5.9 ± 2.8	15.3 ± 1.7	19.7 ± 12.6	4.1 ± 0.8**	45.0 ± 8.5**

Table 9 めかじきめか3日漬け 浸漬前後の比較		mg/100g				
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	10.3 ± 0.3	15.1 ± 7.9	99.1 ± 30.5	1.6 ± 1.5	126.1 ± 26.4
めかじき	漬け後	5.8 ± 2.1*	11.6 ± 3.5	70.8 ± 14.9	4.7 ± 1.0	92.9 ± 13.9
めか	漬け前	7.9 ± 3.1	17.5 ± 1.0	1.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	27.7 ± 3.4
めか	漬け後	8.1 ± 1.1	18.0 ± 1.0	14.1 ± 7.7	1.7 ± 2.4	41.9 ± 7.0*

* p < 0.05 **p < 0.01 漬け前 VS 漬け後

Table 10 にめかじき、Table 11 にめかのプリン体分子種別の結果と Fig.18 にめかじきめか漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化を示す。めかじき

の漬け前で多く含有したヒポキサンチン類は Ino が最も多く、次いでヒポキサンチン、IMP であった。めかでは総プリン体の結果でみられたアデニン類やグアニン類は、核酸由来のものと推察したが、アデニン類 8.8mg/100g(65μmol/100g)を Ado にすると(1.6 倍として)104μmol/100g であったことから、換算値からヌクレオシドである Ado や Guo であったことが示された。めかじきの 1 日漬け後、3 日漬け後では IMP が増加し、Ino とヒポキサンチンの有意な減少が見られた (Fig.18)。一方、めかの 1 日漬け後と 3 日漬け後の Ado、アデニン、GMP、Guo が有意に減少し、3 日漬け後の Ino、ヒポキサンチン、キサンチンが有意に増加した。

Table 10 めかじきの浸漬前後のプリン体分子種別の組成

 $\mu\text{mol}/100\text{g}$

	1 日漬け		3 日漬け	
	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後
ATP	0.2 ± 0.1	$3.7 \pm 0.5^{**}$	0.8 ± 0.5	$3.4 \pm 1.3^*$
ADP	3.5 ± 0.8	$11.7 \pm 2.8^{**}$	5.1 ± 2.4	$10.6 \pm 2.4^{**}$
AMP	2.7 ± 0.4	$17.4 \pm 0.5^{**}$	5.6 ± 1.6	$16.7 \pm 1.0^{**}$
Ado	12.5 ± 0.4	$1.6 \pm 0.4^{**}$	11.5 ± 0.9	$1.3 \pm 1.2^{**}$
A	0.2 ± 0.0	$5.0 \pm 0.6^{**}$	0.1 ± 0.2	$4.0 \pm 0.8^*$
GTP	0.5 ± 0.0	$2.9 \pm 0.4^{**}$	0.7 ± 0.1	$2.6 \pm 0.2^{**}$
GDP	0.3 ± 0.0	$1.8 \pm 0.0^{**}$	0.3 ± 0.0	$1.4 \pm 0.1^*$
GMP	0.0	0.1 ± 0.1	0.0	0.1 ± 0.3
Guo	0.4 ± 0.1	$34.3 \pm 1.6^{**}$	0.2 ± 0.1	$26.9 \pm 8.5^*$
G	0.0	0.0	0.4 ± 0.3	0.0
IMP	4.0 ± 0.3	$46.8 \pm 3.0^{**}$	3.8 ± 0.2	$47.0 \pm 6.2^{**}$
Ino	471.8 ± 16.4	$316.1 \pm 19.1^{**}$	388.2 ± 55.0	335.2 ± 11.6
HX	166.4 ± 12.4	$85.8 \pm 2.5^{**}$	243.7 ± 29.8	$95.6 \pm 19.4^{**}$
UA	0.0	N.D.	N.D.	N.D.
XMP	N.D.	N.D.	N.D.	0.0
Xao	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.2
X	8.2 ± 0.4	$6.7 \pm 0.4^{**}$	8.5 ± 0.0	10.9 ± 0.0

Table 11 めかの浸漬前後のプリン体分子種別の組成

 $\mu\text{mol}/100\text{g}$

	1 日漬け		3 日漬け	
	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後
ATP	0.6 ± 0.0	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.0
ADP	0.0	0.0	0.0	0.0
AMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Ado	101.9 ± 11.4	$58.4 \pm 15.9^*$	84.7 ± 6.9	$26.5 \pm 6.9^{**}$
A	23.5 ± 0.8	$18.3 \pm 1.3^{**}$	18.2 ± 0.7	$13.6 \pm 0.7^{**}$
GTP	0.0	0.0	0.0	0.0
GDP	0.0	0.0	0.0	0.0
GMP	8.4 ± 0.0	$5.5 \pm 0.0^*$	5.9 ± 0.0	$4.7 \pm 0.0^*$
Guo	121.9 ± 4.2	$79.9 \pm 9.3^{**}$	91.6 ± 5.4	$63.1 \pm 5.4^{**}$
G	16.5 ± 0.6	$9.4 \pm 1.7^{**}$	0.0	4.6 ± 0.0
IMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Ino	5.6 ± 0.3	89.5 ± 91.8	4.1 ± 0.3	$124.0 \pm 0.3^{**}$
HX	2.4 ± 0.1	49.7 ± 50.0	1.7 ± 0.1	$66.2 \pm 0.1^{**}$
UA	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
XMP	2.9 ± 0.1	$1.9 \pm 0.0^*$	2.0 ± 0.2	0.0
Xao	2.8 ± 0.7	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.3	1.6 ± 0.3
X	1.2 ± 0.1	6.7 ± 6.2	1.0 ± 0.1	$12.5 \pm 0.1^{**}$

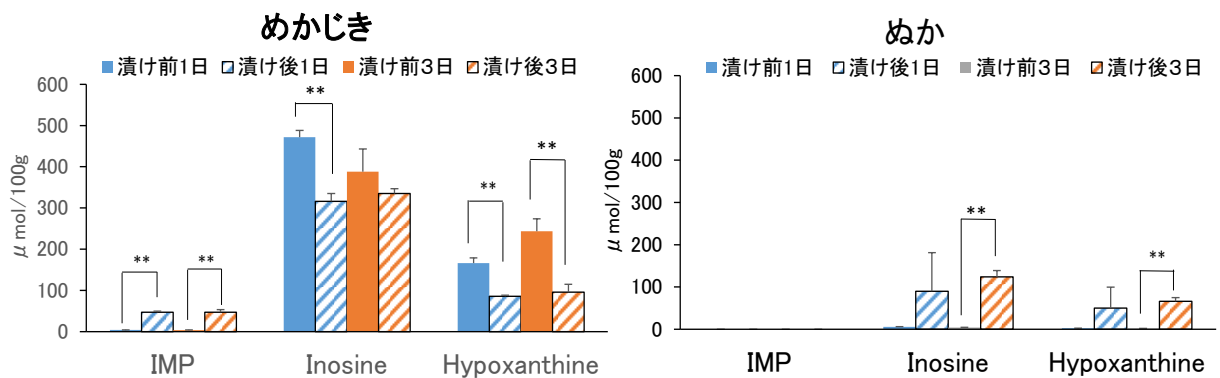
* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 漬け前 VS 漬け後 N.D.:Not detected.* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ 漬け前 VS 漬け後

Fig.18 めかじきめか漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化

3-4 西京味噌漬け⁵⁴⁾

西京味噌漬けの1日漬け、3日漬けの総プリン体の結果を Table 12,13 に示す。めかじきの漬け前の総プリン体量は、139.0~149.7 mg/100g であった。西京味噌の漬け前の総プリン体量は、25.5~40.9 mg/100g で赤味噌や白味噌に含まれる総プリン体量に近似していた。西京味噌の1日漬け後のグアニン類、キサンチン類および総プリン体が西京味噌の漬け前（1日）に比べ有意に減少した。めかじきの3日漬け後では、ヒポキサンチン類が有意に減少し、西京味噌の3日漬け後で有意に増加した。

Table 12 めかじき西京味噌1日漬け 浸漬前後の比較		mg/100g				
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	15.0 ± 2.3	14.4 ± 3.5	119.3 ± 26.9	1.1 ± 0.2	149.7 ± 30.4
めかじき	漬け後	17 ± 4.8	16 ± 2.8	95.6 ± 13.9	4.3 ± 1.1	132.8 ± 19.8
西京味噌	漬け前	0.7 ± 0.1	13.2 ± 7.1	19.1 ± 1.6	7.9 ± 1.5	40.9 ± 10.2
西京味噌	漬け後	0.4 ± 0.2	2.8 ± 0.8*	15.3 ± 3.0	2.7 ± 0.7*	20.9 ± 4.5*

Table 13 めかじき西京味噌3日漬け 浸漬前後の比較		mg/100g				
		アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
めかじき	漬け前	14.6 ± 2.3	5.7 ± 3.5	117.7 ± 6.7	1.1 ± 0.2	139 ± 12.2
めかじき	漬け後	9.4 ± 4.8	13.6 ± 2.8	77.2 ± 10.9*	2.1 ± 1.1	102.4 ± 9.8*
西京味噌	漬け前	1.6 ± 0.7	6.2 ± 1.6	12.5 ± 0.0	5.2 ± 0.4	25.5 ± 6.0
西京味噌	漬け後	0.8 ± 0.2	8.3 ± 3.4	34.9 ± 1.4*	4.3 ± 1.4	34.4 ± 7.6

* p < 0.05 ** p < 0.01 漬け前 VS 漬け後

Table 14 にめかじき、Table 15 に西京味噌のプリン体分子種別の結果と Fig.19 にめかじき西京味噌漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化を示す。

めかじきの漬け前（1日）、漬け前（3日）の遊離プリン体は IMP、Ino、ヒポキサンチンが多く、分子種別プリン体の多くはヒポキサンチン類であった。めかじきの3日漬け後では、Ino、ヒポキサンチンが有意に減少した。めかじきの漬け前（1日）には、XMP は検出されなかったが、めかじきの3日漬け後で観察され、キサンチンも増加していた。一方、西京味噌の漬け前の主要なプリン体種はヒポキサンチン、キサンチン、グアニンであったが、西京味噌の1日漬け後または3日漬け後では、Ino、ヒポキサンチン、キサンチンが有意に増加した。

Table 14 めかじきの浸漬前後のプリン体分子種別の組成

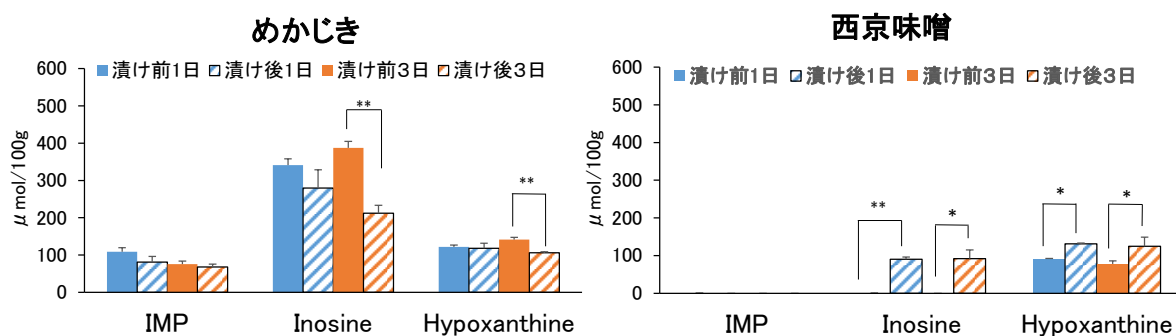
 $\mu\text{mol}/100\text{g}$

	1 日漬け		3 日漬け	
	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後
ATP	0.0	0.0	0.0	0.2 ± 0.0
ADP	7.0 ± 1.0	11.4 ± 1.2	7.2 ± 1.0	8.4 ± 0.9
AMP	4.0 ± 10.7	4.0 ± 0.4	0.8 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Ado	2.2 ± 0.0	0.0	0.8 ± 0.6	1.1 ± 0.5
A	0.0	0.0	0.0	0.4 ± 0.0
GTP	0.0	0.0	5.6 ± 1.3	4.3 ± 0.5
GDP	0.0	0.0	0.1 ± 0.0	0.0
GMP	0.6 ± 0.6	0.0	0.5 ± 0.1	0.2 ± 0.1
Guo	0.2 ± 0.1	0.0	0.2 ± 0.3	0.4 ± 0.1
G	0.0	0.0	2.1 ± 0.5	0.0
IMP	109.0 ± 0.0	80.9 ± 15.2	75.7 ± 8.2	68.1 ± 7.5
Ino	341.3 ± 0.1	$279.7 \pm 49.0^*$	387.2 ± 17.4	212.3 ± 21.1
HX	122.0 ± 0.3	118.2 ± 13.5	141.3 ± 6.3	$106.2 \pm 2.3^*$
UA	0.0	0.0	0.0	0.0
XMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Xao	0.0	0.0	0.2 ± 0.3	0.1 ± 0.1
X	3.6 ± 4.5	18.1 ± 0.5	4.6 ± 0.2	21.5 ± 0.9

Table 15 西京味噌の浸漬前後のプリン体分子種別の組成

	1 日漬け		3 日漬け	
	漬け前	漬け後	漬け前	漬け後
ATP	0.0	0.0	0.0	0.0
ADP	0.0	0.0	0.0	0.0
AMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Ado	0.0	0.0	0.0	0.0
A	0.0	0.0	0.0	0.0
GTP	0.0	0.0	0.0	0.0
GDP	0.0	0.0	0.0	0.0
GMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Guo	0.0	0.0	0.0	0.0
G	12.5 ± 2.7	8.0 ± 0.5	33.9 ± 24.3	40.7 ± 10.7
IMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Ino	0.0	93.6 ± 2.2**	0.0	91.7 ± 23.2*
HX	91.3 ± 5.5	131.0 ± 2.2*	78.1 ± 8.0	124.9 ± 23.8*
UA	0.0	0.0	0.0	0.0
XMP	0.0	0.0	0.0	0.0
Xao	0.0	0.0	0.0	0.0
X	33.8 ± 1.9	36.8 ± 0.5	28.6 ± 2.7	32.3 ± 5.9*

* p < 0.05 **p < 0.01 漬け前 VS 漬け後



* p < 0.05 **p < 0.01 漬け前 VS 漬け後

Fig.19 めかじき西京味噌漬けの遊離プリン体における浸漬前後のHX類の変化

3-5 アンチョビオイル漬け⁵⁵⁾

Table 16 にアンチョビオイル漬けの総プリン体の結果を示す。アンチョビの原材料であるカタクチイワシの総プリン体量は 303.9 mg/100g と極めて多いプリン体量であった。塩漬け後、オイル漬けしたアンチョビではアデニン類、ヒポキサンチン類、総プリン体の有意な減少が見られた。カタクチイワシの総プリン体量が多い理由として、ヒポキサンチン類の含有量を超えるグアニン類が寄与していた。

Table 16 カタクチイワシとアンチョビの総プリン体の比較					mg/100g
	アデニン類	グアニン類	ヒポキサンチン類	キサンチン類	総プリン体
カタクチイワシ	24.9 ± 1.0	156.0 ± 12.8	121.8 ± 2.8	1.2 ± 0.0	303.9 ± 15.8
アンチョビ	0.5 ± 0.1*	183 ± 3.7	87.6 ± 1.3**	1.7 ± 0.0**	272.8 ± 2.0*

* p < 0.05 ** p < 0.01 カタクチイワシ VS アンチョビ

Table 17 にアンチョビオイル漬けのプリン体分子種別の結果と Fig.20 にアンチョビオイル漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類の変化を示す。カタクチイワシに多く含有していた IMP は塩漬け後オイル漬けしたアンチョビで減少し Ino、Guo、HX、G が増加した (Fig.20)。発酵後、ATP、ADP、AMP、Ado、A、GTP、GDP、GMP、XMP、X および IMP は減少したが Guo、G、Ino、Xao、HX が増加した。魚種類での HX 類の比較では、めかじきには Ino が多く、カタクチイワシでは IMP が多く含有されていた。

Table 17 カタクチイワシとアンチョビオイルのプリン体分子種別の組成
μmol/100g

	カタクチイワシ	アンチョビ
ATP	3.4 ± 0.1	0.0
ADP	8.7 ± 3.0	0.0
AMP	3.3 ± 0.7	0.0
Ado	0.4 ± 0.2	0.0
A	0.4 ± 0.1	0.0
GTP	1.2 ± 0.4	0.0
GDP	0.9 ± 0.1	0.0
GMP	2.6 ± 0.5	0.0
Guo	9.3 ± 1.5	82.8 ± 3.6**
G	6.5 ± 2.1	12.6 ± 2.4**
IMP	388.3 ± 91.3	57.7 ± 2.4*
Ino	147.3 ± 28.1	340.3 ± 12.3**
HX	37.4 ± 5.2	80.6 ± 2.3**
UA	0.0	N.D.
XMP	0.2 ± 0.1	0.0
Xao	0.4 ± 0.2	1.4 ± 0.3*
X	8.8 ± 0.6	7.9 ± 0.4

* p < 0.05 ** p < 0.01 カタクチイワシ VS アンチョビ N.D.: Not detected.

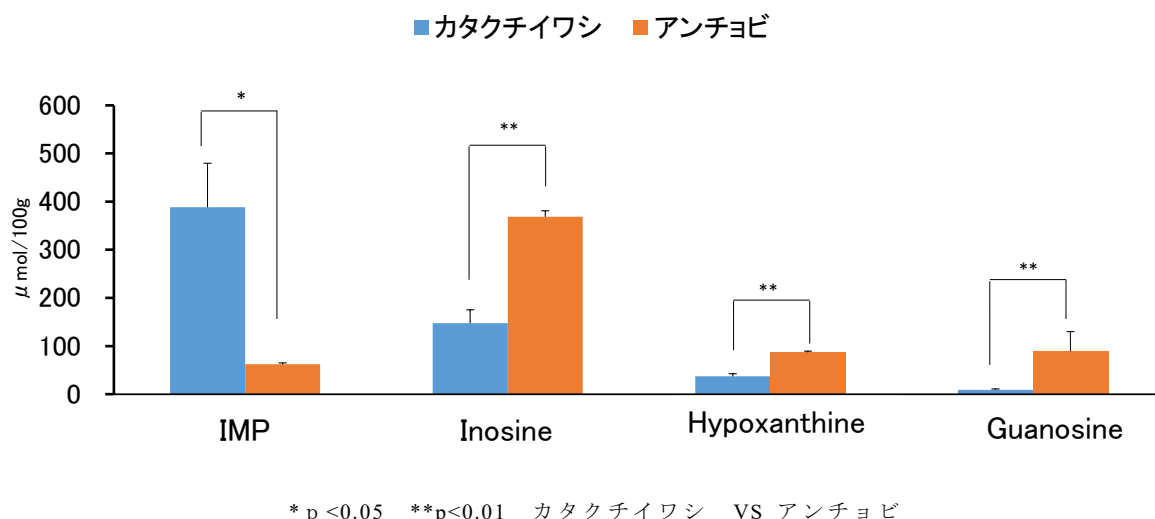


Fig.20 アンチョビオイル漬けの遊離プリン体における浸漬前後の HX 類およびグアノシンの変化

3-6 考察

酒粕漬けの総プリン体では、漬け後のめかじきで減少したヒポキサンチン類は、漬け後の酒粕で増加した値と近似していたことから、ヒポキサンチン類は漬け側に移行したことが考えられた。一方、漬け後のめかじきのグアニン類の減少は漬け後の酒粕では変化が無かったことや僅かに増加したキサンチン類の結果から、酒粕の成分や微生物である酵母菌に含まれるグアニンデアミナーゼの影響が考えられた。分子種別では酒粕のアデニン類、グアニン類に寄与するヌクレオシドやヌクレオチドは僅かであったことから、総プリン体で見られたアデニン類、グアニン類は多くが核酸由来のものであることが示された。酒粕に漬けためかじきでヒポキサンチン類の減少が漬けていないめかじきより少なかったことから Ino からヒポキサンチンへの代謝を酒粕に含有される成分や発酵微生物が抑制し、発酵食品の特徴の一つである保存効果をもたらした可能性が考えられた⁵⁰⁾。

ぬか漬けの総プリン体の結果では、酒粕漬け同様、めかじきのヒポキサンチン類はぬか側へ移行したことが考えられた。ぬかに多く含有される乳酸菌はこれまでにプリン体を取り込むことやプリン代謝に影響を与えたことが報告されている^{49,50)}。また、ぬかに含有される乳酸菌が生菌であることなどを考慮した結果、めかじきにおける IMP の増加は、IMP がプリン代謝の中間体であることから魚肉中の ATP 分解経路の上流にある ATP や ADP の分解によるものと考えたが、ATP、ADP などのヌクレオチドが増加していたことから、核酸などがぬかの成分によって代謝されたこと、もしくは乳酸菌の持つ HPT によりヒポキサンチンが IMP へサルベージされたことや IMP から Ino へ代謝する IST がいないことから IMP の代謝が抑制されたなど、乳酸菌の保有する酵素の有無がプリン代謝へ影響した可能性が考えられた。

西京漬けの総プリン体では、西京味噌を3日冷所保存するのみでアデニン類を除くプリン塩基に減少傾向が見られたことから、保存中における西京味噌の成分によるプ

リン体の経時的変化があった可能性が考えられた。めかじきの3日漬け後のヒポキサンチン類がめかじきの漬け前と比較し、およそ30%減少し、減少したヒポキサンチン類の値は、西京味噌側で増加した値と近似していたことから、めかじきで減少したIno、ヒポキサンチンは西京味噌に移行したことが考えられた。西京味噌の漬け前および漬け後、いずれにもIMPは見られなかったことから、味噌中にはIMPは含まれていないか、もしくは味噌中の麹菌にはHPTがないことやISTとPNPを有し、さらにXOや尿酸オキシダーゼも有することからIMPからIno、ヒポキサンチンへと代謝し、ヒポキサンチンより下流のキサンチン、尿酸、5-ヒドロキシイソ尿酸へと代謝された可能性が考えられた。発酵食品浸漬による魚の美味しさはIMPのみの関与ではなく、アミノ酸など他の成分の影響⁵⁶⁾があるものと考えられた。

アンチョビオイル漬けの総プリン体では、グアニン類が極めて多かったが、光沢のある魚介類の皮には、グアニン結晶が存在することが報告されており⁵⁷⁾、測定時に皮を除去しなかったことが影響したのと考えられた。アデニン類の有意な減少は、以前「へしこ」で測定されたものと同様であった。へしことは、さばとイワシをぬかに1年以上浸したもので、アンチョビのように長い発酵年月によって作製する⁵⁸⁾。アンチョビでも同様にアデニン類が発酵中に代謝され、魚介類の自己消化酵素や発酵微生物の長期的な影響を受けたことが示唆された。分子種別では、ATP、ADP、AMP、およびAdoがさらに分解され、IMPおよびInoに代謝された可能性が考えられた。グアニンは、100gあたり僅か6.5 μ molであったが、総プリン体の結果ではグアニン類が多く含有していたことから、魚の皮に存在するグアニン結晶が70%ACN溶液では溶解しなかったことが示された。めかじきとカタクチイワシでヒポキサンチン類の組成が異なった理由として、魚の形状が1尾と切り身であったなど、魚を入手した際の形状から、鮮度の違いがあったことが考えられた。熟成したアンチョビは発酵微生物が複雑に存在し、その結果、本研究においてアンチョビのプリンヌクレオチドが分解され、そのほとんどがAdoを除くヌクレオシドと塩基へ代謝されたこと、さらに長期間の発酵によりプリン塩基に代謝された可能性も考えられた⁵⁵⁾。

発酵食品の比較では、酒粕や西京味噌のヒポキサンチン類を分子種別でみると、ヒポキサンチン塩基であるのに対し、ぬかのアデニン類、グアニン類はヌクレオシドである、Ado、Guoであることが示された。酒粕と西京味噌には酵母や麹が含有されていることから、酵母由来の高分子が麹のISNやPNPによって塩基まで代謝された可能性が考えられた。一方、ぬかは穀類の外皮の成分であることから核酸由来のプリン体が多く含有されると予想したが、AdoとGuoが多く検出されたため、ぬかの成分や乳酸菌を含む発酵微生物がプリン代謝経路に影響し、ヌクレオシドとなったと推察した。もろみ酢の原材料は黒麹と米で糖化し、酵母によってアルコールが産生された際のもろみを圧搾した汁であるが、酒粕と異なりプリン体は少なかったことは、液体であったことでプリン体成分が希釈された可能性が考えられた。発酵食品の原材料は米や大豆であることからヒポキサンチン類などは含有しないと予想したが、含まれる分子種や量に違いがみられたことから、異なる発酵微生物が関わることで発酵微生物そのものや発酵微生物由来のプリン代謝酵素が影響したのと考えられた。

小 括

古来より日本で食されていた発酵食品を用いた調理加工法を再考した結果、めかじきでは、IMPには増減が見られたが、いずれも総プリン体は減少傾向であり、血清尿酸値を上昇させやすいヒポキサンチン類が発酵食品に浸漬すると全てにおいて減少または減少傾向がみられた。めかじきで減少したプリン体量が発酵食品で増加したプリン体量と近似した値であったことから、プリン体はめかじきから発酵食品に移行したことが考えられ、発酵食品に漬ける調理加工法は高尿酸血症の食事療法として勧められる方法であることを結論づけた。3種類の発酵食品で異なる結果となったことは、発酵食品の成分、または、発酵に関与した微生物の影響が示唆された。これらの発酵食品は、調理時に塩分を追加せずに呈味、風味、塩味を増し、調理油を使用せずに、魚摂取量も1切れ70g程度と適量であることから、減塩とエネルギー摂取量の抑制に寄与する事が考えられる。発酵食品には、発酵微生物に含有される成分もプリン体量に影響したことが示された。酒粕は魚の漬物以外の用途として粕汁や甘酒に使用し、食すことがあるため、高尿酸血症・痛風患者では使用量に注意することを推奨する。

以上の結果から、高尿酸血症・痛風および生活習慣病患者の食事療法において魚介類の適切な摂取が求められていることを踏まえると、酒粕漬け、ぬか漬け、西京漬けを献立に加えることにより、美味しさを保ちながら、患者の嗜好に合わせた食事指導に役立つと考えた。

第Ⅱ部 治療食の食事性酸負荷およびプリン体量の算出と尿 pH の検討

1 章 目的

生活習慣病の中で、高尿酸血症、糖尿病の患者では酸性尿を呈することが多くみられる。近年、臨床研究で、高尿酸血症と共に見られる酸性尿は糖尿病などの生活習慣病の発症因子の一つとして報告されている⁵⁹⁾。体内では体液の酸塩基平衡の調節として肺から呼吸により揮発性酸が、腎臓から不揮発性酸が排泄される。食事に由来する酸（含硫アミノ酸等）は腎臓で処理されることから、食事の成分から算出できる PRAL（potential renal acid load）値を潜在的な腎酸負荷を表す指標としている²⁷⁾。腎臓は濾過重炭酸イオン（ HCO_3^- ）再吸収と毎日産生される不揮発性酸量の見合った量の酸排泄により、酸塩基平衡に貢献している。この過程全体は尿中の酸を定量して求めた腎酸排泄量（NAE：renal net acid excretion）と呼ばれ、たん白質量と NAE を調べた報告では、たん白質摂取量が多いほど NAE が増加し²⁸⁾、NAE が高いほど尿 pH が低下すると報告されている²⁹⁾。さらに PRAL 値から NAE を推定した eNAE は尿 pH と相関すること³⁰⁾や FFQ を用いて PRAL 値を算出した後の eNAE と尿 pH との相関についても報告されている⁶⁰⁾。このように NAE と尿 pH との関連が報告される中で、食事性酸負荷がインスリン抵抗性発症の危険因子である可能性を示唆されている⁶¹⁾。しかし、病院食の基盤となる各疾患の病態に向けた栄養管理では、食事性酸負荷や高尿酸血症の食事療法で注意すべき、食事中的プリン体量はこれまで検討されていない。このような背景から本研究では、帝京大学医学部附属病院における治療食の食事性酸負荷の指標である PRAL 値や推定内因性酸産生値 NEAP 値、プリン体値を明らかにし、これら治療食を摂取した患者の尿 pH への影響を検討することを目的とした。

2 章 方法

本研究では、「生活習慣病の食事療法に関する研究」と題して、帝京大学医学部附属病院の栄養部および内科との共同研究とし、大学院臨床薬学履修コース「病院実務研修 1」の研修期間に行った。3 つの期間「臨床研究準備期間」「研究計画書の作成期間」「臨床研究期間」に分けて実施した。「臨床研究準備期間」では、臨床研究に必須の e-ラーニングによる研修として ICR 臨床研究入門および CITI JAPN の医学研究者標準コースを修了し、先行研究について調査した。また、共同研究者との研究の方法、患者リクルートの基準について、打合せを行った。「研究計画書の作成期間」では、臨床研究の為に必要な以下の書類についての作成を行った。

- ・研究計画書
- ・患者説明文書
- ・同意書、同意撤回書
- ・情報公開文書
- ・人を対象とする医学系研究に関する倫理指針該当研究申請書（事前確認用、申請用）
- ・研究計画書および説明文書作成時の各チェックリスト
- ・患者対応表、飲水表、患者情報記入用紙

上記の書類は臨床研究センター（TARC）へ相談後、倫理審査委員会へ提出した。倫理審査委員会の開催は定期開催となっているため開催日を確認し申請した。

審査結果を待つ期間に、食事性酸負荷やプリン体量の算出を行った。病院食の治療食献立の算出は、本研究において臨床研究対象患者の摂食が予想される常食、糖尿病食、心臓病食の 1600～1800kcal の選択メニューを含む 8 種類の食種について検討した。臨床研究を行うにあたり、共同研究者以外の医師への説明が必要であったため、医師が行う朝カンファレンスに参加し、研究説明を行った。また、尿検体は温度管理が必要であることから、保存方法について病棟看護師に説明を行った。その後、「臨床研究期間」では、研究計画書に基づき、内科病棟に入院した患者で糖尿病食、心臓病食を摂取する患者のリクルートは内科医師が行い、適格基準を満たす患者であるかを確認した後、入院した患者の部屋へ訪室し、研究説明を行ってから、同意を得た。基準を満たした 6 名について、尿 pH を含む臨床検査値を入院翌日、3～5 日後、退院日、の計 3 回取得して食事内容との相関性について検討した。入院前の食事内容は、数ある食事調査の中から検討した結果、食事摂取頻度調査表(FFQ)を用いることとした。患者には飲水の確認と食事調査も依頼することから、飲水用のお茶を配布したため、お茶ペットボトルの購入や食事摂取頻度調査表の購入・集計依頼などを行った。臨床研究は 2020 年 8 月 13 日～10 月 6 日までの期間に入院患者 6 名について行った。以下、研究計画書より抜粋した、臨床研究のデザイン、対象、観察項目、スケジュールを示す。

（１）研究デザイン：前向き観察研究

（２）研究対象

帝京大学附属病院の内科に入院中の患者であり、下記基準を満たす者。

i 適格基準

- ① 年齢 20 歳以上 80 歳以下の日本人で、帝京大学医学部附属病院へ、1～2 週間の予定で入院している患者（内科病棟に入院した患者で糖尿病食、心臓病食を摂取する患者）。
- ② 特別治療食（糖尿病食、心臓病食）の中で、給与栄養量がエネルギー 1600-1800kcal、たん白質 70-72g を摂取する患者。

ii 除外基準

- ① 尿アルカリ化薬、リン吸着薬、カリウム抑制薬、利尿薬（炭酸脱水素酵素阻害薬）を服用している患者。
- ② 腎機能障害者(eGFR45mL/min 以下)またはその既往者。
- ③ 慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者。
- ④ 妊娠中あるいは妊娠の可能性がある者。
- ⑤ その他、試験責任医師または試験分担医師が不適当と判断した者。

iii 観察項目

- ① 治療食中の PRAL、NEAP、プリン体量
- ② 入院中の食事摂取量および飲料の種類と飲水量

飲料調査表に患者自身が飲水量を記入し、正確に把握する。尚、飲水（お茶、

清涼飲料、嗜好飲料含む)の種類による生体への影響も考慮する必要があることから、対象患者には統一したお茶(ペットボトル入り 500ml)を一人に対して1日3本、提供する。

- ③ 患者背景：性別、年齢、既往歴、現病歴、食歴(24時間思い出し法またはFFQ調査票で行う)。
- ④ 入院時の身体測定、バイタルサイン：身長・体重・BMI・血圧・脈拍数(体重は臨床検査時にも測定する)。
- ⑤ 投薬、治療内容
- ⑥ 臨床検査値は血液学的、血液生化学的、尿検査を実施する。詳細項目はTable 18に示す。検査実施のスケジュール(第2病日、第5～7病日、退院日)はFig.21に、患者リクルートおよび実施検査と食事の把握までのフローをFig.22に示す。

Table 18 臨床検査項目

血液学的検査	総蛋白、アルブミン
血液生化学的検査	総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、中性脂肪、尿酸、尿素窒素、クレアチニン(Cre)、e-GFR、ナトリウム、クロール、カリウム、カルシウム、血糖、HbA1c、重炭酸イオン、リン、マグネシウム、IRI、HOMA-IR
尿検査	尿 pH、尿 Cre、尿酸、蛋白(定性)、ナトリウム、クロール、リン、マグネシウム、カルシウム、カリウム

尿 pH は病院内で行われる臨床検査とは別に、pH メーター(HORIBA)を用いて測定するため尿採取後、2本の容器に分注し、1本は臨床分析学研究室にて、随時 pH 測定を行った。

担当医師が該当患者に治療上必要な臨床検査を実施し、臨床検査値の確認は、担当医師および管理栄養士が行う。著者は、薬学研究科臨床薬学履修コース4年・病院実務研修履修のために研修を行っていることから、試験参加患者のデータのみ研究分担当患者担当医師または研究指導者が著者に開示することとした。

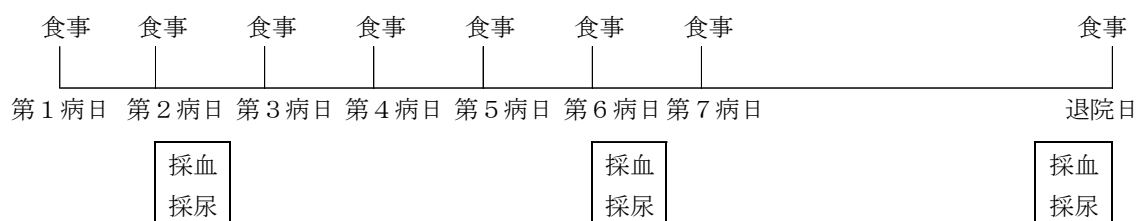


Fig.21 患者の食事摂取と採血・採尿のスケジュール

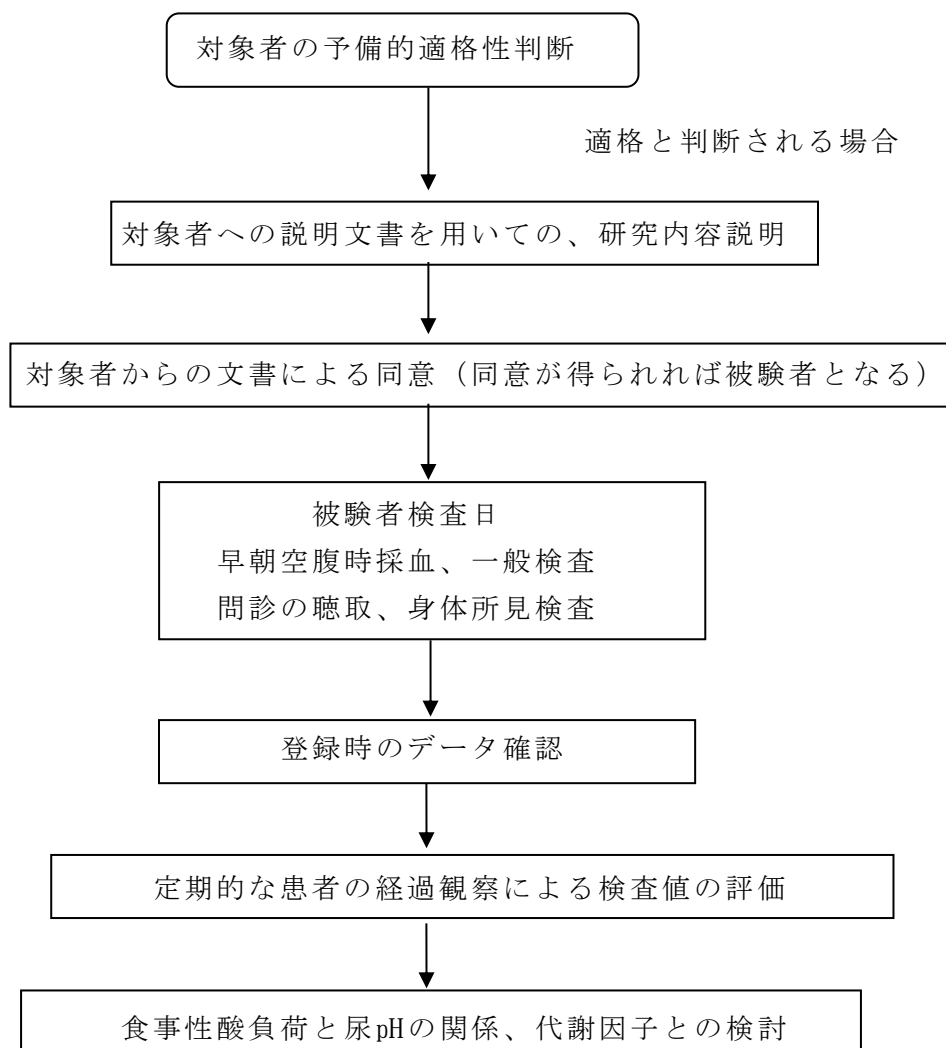


Fig.22 患者リクルートおよび実施検査と食事の把握までのフロー

以上の経過を経て、本研究は帝京大学の倫理審査委員会の承認を得て行われた。
(帝倫20-086)

3 章 常食および特別治療食の食事性酸負荷およびプリン体量の算出

3-1 病院食について

入院加療中に患者に提供される病院食は一般食と治療食に分けられ、糖尿病食や心臓病食は治療食に分類される。治療食は病態栄養や食事摂取基準に準拠して、適正に栄養価が計算されている。本研究において全ての患者が摂取した糖尿病食 1600kcal(エネルギーコントロール食)の1日分の栄養素組成を Table 19 に示した。これらの数値から食事性酸負荷等を算出式から求めた。プリン体は当研究室でこれまで報告した値を栄養管理ソフトに入力し算出したことで、栄養素組成に新たにプリン体量の表記が加わった。1600kcal エネルギーコントロール食の P:F:C 比は 17:26:44 となっていた。SMP 比とは脂肪酸の組成を示し、飽和脂肪酸 (SFA)・一価不飽和脂肪酸 (MFA)・多価不飽和脂肪酸 (PFA) を 3:4:3 にすることを目標にしている。

Table 19 1人1日当たり栄養価

エネコン1600	
エネルギー(kcal)	1605
たんぱく質(g)	68.3
脂質(g)	46.5
炭水化物(g)	226.8
食塩相当量(g)	5.1
カリウム,K(mg)	2447
カルシウム,Ca(mg)	501
マグネシウム,Mg(mg)	252
リン,P(mg)	1011
プリン体(mg)	310.4
食物繊維 (g)	14.3
穀類エネルギー比(%)	44.4
たんぱく質エネルギー比(%)	17
脂肪エネルギー比(%)	26.1
炭水化物エネルギー比(%)	56.5
SMP比(%)	33.3 : 39.6 : 27.1

エネコン 1600 : エネルギーコントロール食 1600kcal

3-2 食事性酸負荷について

食事の主要な構成成分はたん白質、炭水化物、脂肪である。組織灌流が十分な時には酸素は十分に組織に利用され、二酸化炭素と水になる。通常、二酸化炭素は肺から効果的に体外に排泄される揮発性酸となるのに対し、不揮発性酸はメチオニンやシステインなどの硫黄含有アミノ酸による食事性のアミノ酸代謝により生じる⁶²⁾(Fig.23)。食事性酸負荷とは、食事に由来する不揮発性酸とその酸を緩衝するアルカリ塩との差として腎酸負荷を数値化したもので PRAL 値や NEAP 値があり、下記に示した式で求めることが出来る。PRAL 値は食品中のミネラル組成および各ミネラルの消化吸収率を考慮して設定された指標である²⁷⁾。式が示すように、たん白質（肉・魚介類等）などとカリウムなど（野菜・果物）の摂取量の差により変動する。また、腎臓から排泄される酸（NAE）は尿中の酸緩衝物質であるアンモニウムイオンとリン酸などの滴定酸から重炭酸イオンを差し引き算出されるが、摂取した食事成分から推定して求められる eNAE（推定酸排泄量）は PRAL 値と体表面積の値により計算し、求めることができる²⁷⁾。

食事性酸負荷の算出式

$$\begin{aligned}\text{PRAL (mEq/day) 値} &= 0.4888 \times \text{protein intake(g/day)} \\ &\quad + 0.0366 \times \text{phosphorous(mg/day)} \\ &\quad - 0.0205 \times \text{potassium(mg/day)} \\ &\quad - 0.0125 \times \text{calcium(mg/day)} \\ &\quad - 0.0263 \times \text{magnesium(mg/day)} \\ \text{NEAP(mEq/day)値} &= [54.5 \times \text{protein intake(g/day)} \\ &\quad \div \text{potassium intake (mEq/day)}] - 10.2 \\ \text{P/K 比} &= \text{たん白質 (g)} / \text{カリウム (mEq)}\end{aligned}$$

腎臓から排泄される酸の算出式

$$\begin{aligned}\text{腎酸排泄量} \quad \text{NAE} &= \text{TA (滴定酸)} + \text{NH}_4^+ - \text{HCO}_3^- \\ \text{推定腎酸排泄量} \quad \text{eNAE} &= \text{PRAL} + 41 \text{ mEq} \times \text{体表面積 } \text{m}^2 / 1.73 \text{ m}^2\end{aligned}$$

肝臓で含硫アミノ酸の異化によって生じた SO_4^{2-} は、血液中の Na^+ と一緒に腎臓に運ばれる。腎臓では H^+ の尿細管への排出と HCO_3^- の血液への移行が起きるが、これらを生成する物質は尿細管細胞で産生される CO_2 と H_2O である。 HCO_3^- が血液に戻り、含硫アミノ酸の異化で生じた H^+ を緩衝するために使われた HCO_3^- が回収される Fig.23^{62,63}。

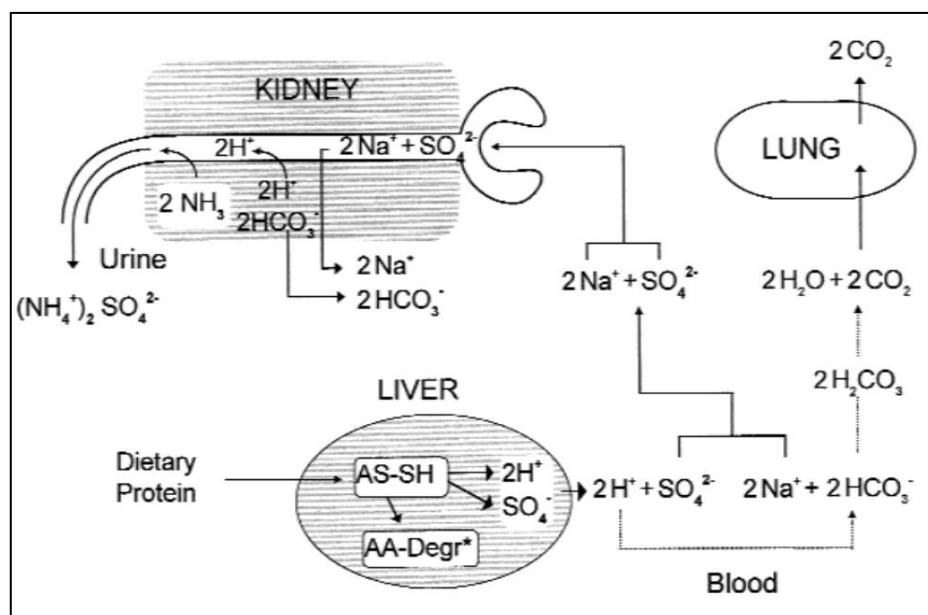


Fig.23 食事から摂取された含硫アミノ酸の異化で生成された酸の流れ

引用：T Remer. Influence of diet on acid-base balance. Semin Dial. 13(4):221-6, (2000).

Fig.24 は L. Lee Hamm らが報告した⁶⁴、対照食または酸負荷食 (NH_4Cl を含む) の成人における相対的な尿中の滴定可能な酸およびアンモニアの比較である。酸負荷食により多くのアンモニアが尿中排泄されることがわかる。

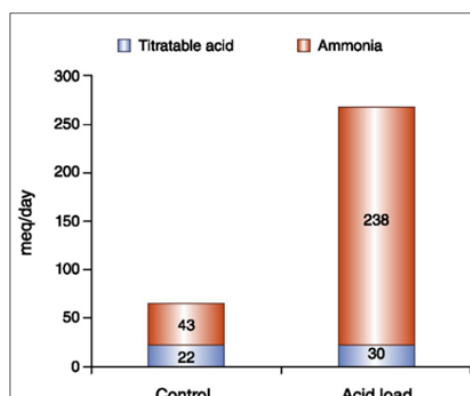


Fig.24 NAE における滴定酸とアンモニアの相対的役割

引用：L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith. Acid-Base Homeostasis. CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

3-3 腎臓における酸排泄機構について

腎臓による酸排泄は、重炭酸イオン HCO_3^- （含硫アミノ酸で消費された血漿重炭酸イオンを含む）を再吸収するために行われる他、過剰な酸は滴定可能な酸（主にリン酸）の排泄とアンモニウムイオン (NH_4^+) の排泄という2つのプロセスによって行われる。

近位尿細管には Na^+/H^+ 逆輸送体(NHE3)や H^+ -ATPase が、ヘンレ上行には Na^+/H^+ 逆輸送体(NHE3)が、集合管間在細胞には H^+ -ATPase と胃壁にも存在する H^+K^+ -ATPase が発現し、尿細管腔に H^+ を分泌することにより、アンモニアの生成および分泌から NH_4^+ の排泄、さらに HCO_3^- の回収に寄与している⁶³⁻⁶⁶。重炭酸イオンは近位尿細管で80%、ヘンレ上行で15%、集合管で5%が回収される(Fig.25)。

1) 重炭酸イオンの回収機構

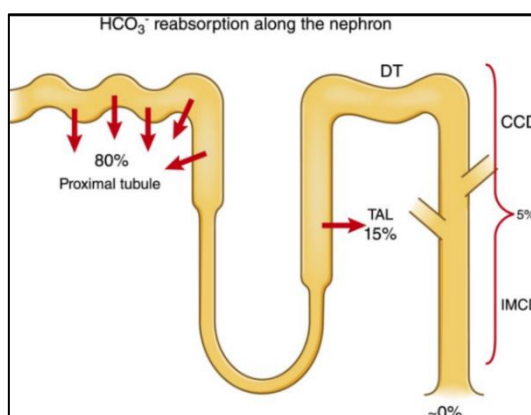


Fig. 25 ネフロンにおける重炭酸イオンを回収するセグメント。TAL (ヘンレ上行)、DT (遠位尿細管)、CCD (皮質集合管)、IMCD (髄質内部集合管)

引用：L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith.

Acid-Base Homeostasis. CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

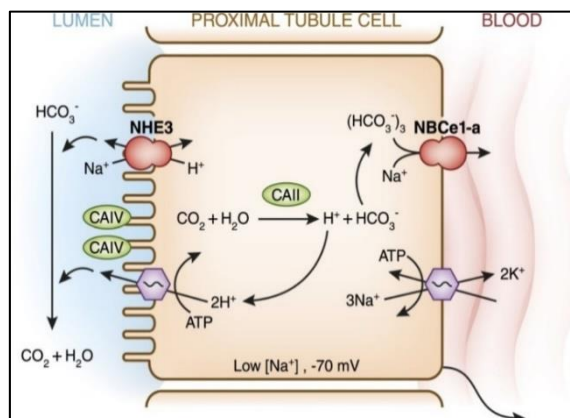


Fig. 26 近位尿細管における重炭酸イオンの回収と酸排泄機構

引用：L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith.

Acid-Base Homeostasis. CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

重炭酸イオンは Fig.26 が示すように NHE3 から排泄された酸と炭酸脱水酵素 IV (CA) により二酸化炭素となり細胞内に移行した後、炭酸脱水酵素 II により重炭酸イオンとなり起電性重炭酸ナトリウム共輸送体 1 (NBCe1-a) を介して血液中に戻る。NAE は 1 つの Na^+ イオンを 1 つの H^+ イオンに交換し、内腔から細胞への Na^+ 勾配（内腔で約 140 mEq / L、細胞で 15~20 mEq / L）によって駆動される。細胞内 Na^+ は基底膜側の $\text{Na}^+ / \text{K}^+ \text{-ATPase}$ によって維持される。

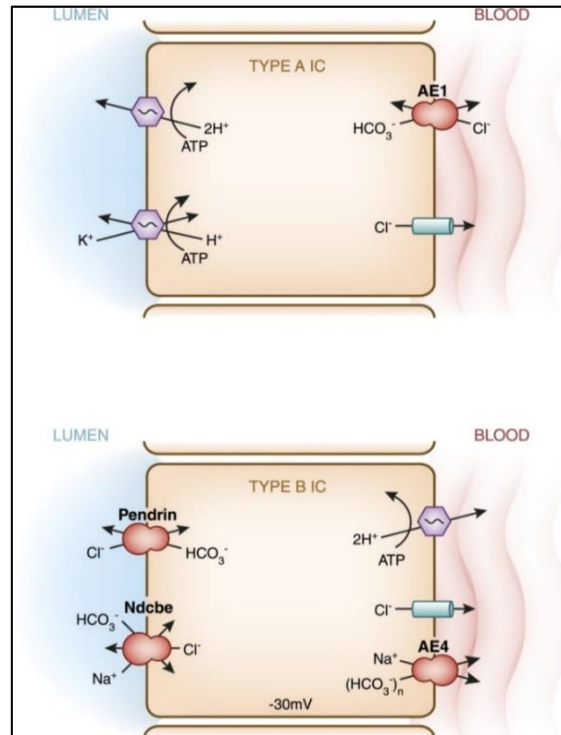


Fig.27 集合尿細管のタイプ A 間在細胞における 2 種類の酸排泄機構（上）とタイプ B 間在細胞におけるペンドリンによる重炭酸イオン排泄機構と Ndcbe (Na^+ 駆動型の $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ 交換体) による重炭酸イオン再吸収機構（下）

引用：L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith.

Acid-Base Homeostasis. CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

集合管には、タイプ A 間在細胞に H^+ -ATPase と H^+K^+ -ATPase の 2 種類の酸排泄機構が存在しており、タイプ B 間在細胞にペンドリンによる重炭酸イオン排泄機構と Ndcbe (Na^+ 駆動型の $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ 交換体) による重炭酸イオン再吸収機構、基底膜側には AE4 (anion exchanger 4) があり重炭酸イオンのまま膜透過が可能となっている⁶⁷⁾。

2) アンモニア排泄機構

腎臓ではグルタミンは Na^+ と共輸送で近位尿細管細胞内に入り、ミトコンドリアの PDG（リン酸依存性グルタミナーゼ）によって分解されアンモニウムイオン (NH_4^+) とグルタミン酸塩 (Glu^-) になる。 Glu^- は GDH（グルタミン酸デヒドロゲナーゼ）によってさらに代謝され、 α -ケトグルタル酸となり 2 つ目の NH_4^+ を産生し、その後グルコースを産生する (Fig.29)。産生された NH_4^+ は近位尿細管の NAE3 を介して Na^+ と交換することにより排泄される。このように腎臓での酸排泄は尿緩衝物質である NH_4^+ が酸全体の 2/3、残りの 1/3 をリン酸などの滴定酸が占める。

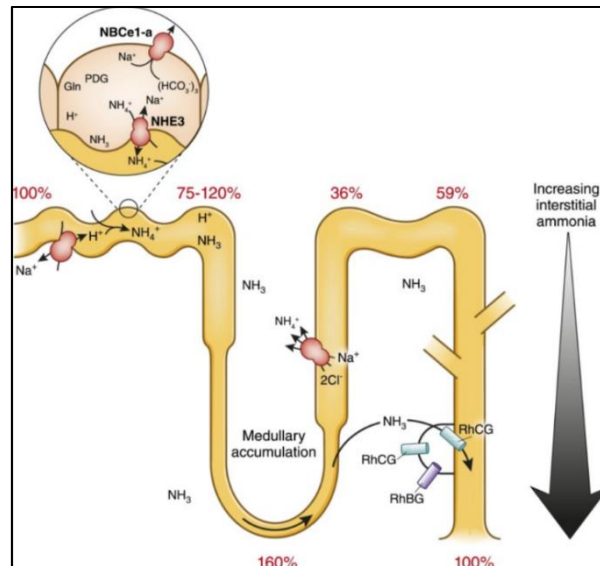


Fig.28 近位尿細管におけるグルタミン代謝によるアンモニア排泄機構

引用 : L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith. Acid-Base Homeostasis. CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

近位尿細管でアンモニアは 75-120%排泄され、太い上行脚では NH_4^+ は Na^+ と 2Cl^- により再吸収される。集合管において、Rh たん白質は、 $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ 輸送を担っている。

Gln : グルタミン

PDG : リン酸依存性グルタミナーゼ

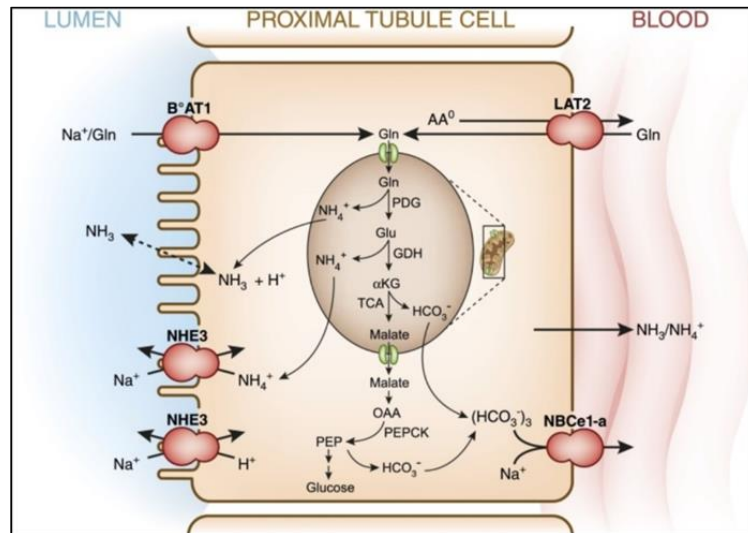


Fig.29 近位尿細管でのアンモニア (NH_3) 生成の概略図。

近位尿細管細胞ではグルタミン (Gln) がリン酸依存性グルタミナーゼ (PDG) によってアンモニウム (NH_4^+) に代謝されることを示している。

AA⁰ : 中性アミノ酸

B⁰AT1 : B 型中性アミノ酸トランスポーター

GDH : グルタミン酸デヒドロゲナーゼ

α KG : α ケトグルタル酸塩

LAT2 : L 型アミノ酸トランスポーター-2

OAA : オキサロ酢酸

PEP : ホスホエノールピルビン酸

PEPCK : ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ。

引用 : L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith. Acid-Base Homeostasis.

CJASN, 10 (12), 2232-2242, (2015).

3-4 算出方法

献立中のプリン体量を算出するために、栄養部で使用されている栄養管理システム「ニュートリメイト」(大和電設工業株式会社)の食品マスターに当研究室で報告している食品中のプリン体量を入力し、登録した。食事性酸負荷を示す PRAL 値、NEAP 値および P/K 比は、本研究にて患者が摂食すると考えられる常食、糖尿病食(エネルギーコントロール食) 1600、1800kcal、心臓食 1600、1800kcal の A、B 選択メニューを入れた 8 種類について調べた。A、B の選択メニューとは、患者の嗜好で、2 つの献立から食事を選択できるよう、異なる食材で作成された献立で、基本献立を A として作成し、次に B の献立を展開するため、A に肉類が多く、B には魚介類が多く使用されている傾向がある。病院食は 28 日で 1 サイクルとなっており No.1 から No.28 まで作成されている。ニュートリメイトから各食事献立のたん白質(g)、P(リンmg)、K(カリウムmg)、Ca(カルシウムmg)、Mg(マグネシウムmg)、プリン体量(mg)をプリントして Excel に入力し、上記の算出式より求めた。

3-5 食事種類別の PRAL 値および NEAP 値とプリン体量

帝京大学医学部附属病院における常食、糖尿病食、心臓病食の 1600-1800kcal の選択メニューを含む 8 種類の食種における 28 日分で 1 サイクルになっている献立の 1 日ごとの PRAL 値 (Fig.29)、NEAP 値 (Fig.30) およびプリン体量 (Fig.31) の推移を示した。PRAL 値は 1 日当たり -7.3~34.4mEq、NEAP 値は 38.2~70.9mEq と献立によって変動が大きい結果であった。プリン体の平均値は 310-411mg/日で 太刀魚など高プリン含有の魚を使用した献立では 1 日あたり 642.4mg となった。食事性酸負荷 (PRAL 値、NEAP 値) とプリン体量には相関は見られなかった (データ示さず)。

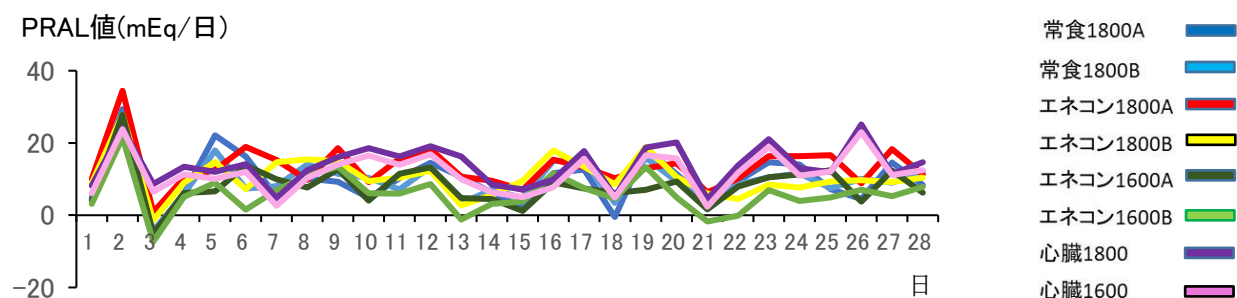


Fig.29 常食、糖尿病食、心臓病食の 1600-1800kcal の PRAL 値の 28 日間の推移

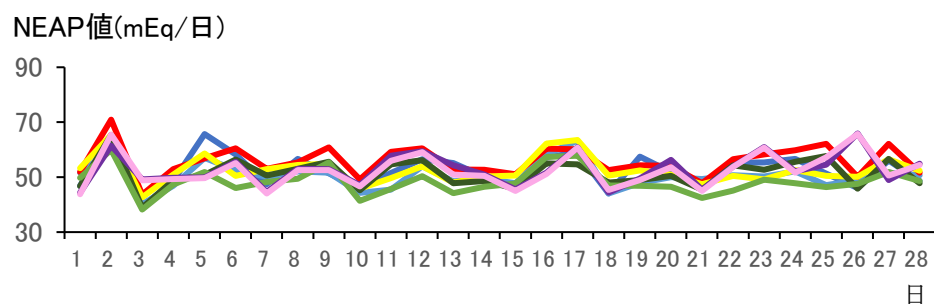


Fig.30 常食、糖尿病食、心臓病食の 1600-1800kcal の NEAP 値の 28 日間の推移

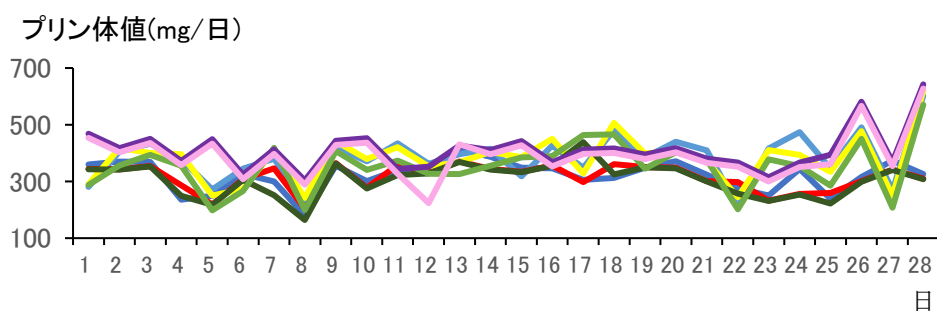


Fig.31 常食、糖尿病食、心臓病食の 1600-1800kcal のプリン体値の 28 日間の推移

3-6 常食・治療食8種類の食事の集計結果

常食・治療食8種類の食事における PRAL 値(Fig.32)、NEAP 値(Fig.33)、プリン体量(Fig.34)の集計結果を比較したグラフを示す。PRAL 値とプリン体量は心臓病食がやや高く、本研究で患者に提供された糖尿病食 1600kcal（エネコン 1600A,B）は、PRAL 値、NEAP 値ともに高値ではなく、食事性酸負荷値もプリン体量も、ほぼ中央値に局在し、高い値ではなかったが、極めて低い値でもなかった。

PRAL 値 (mEq)

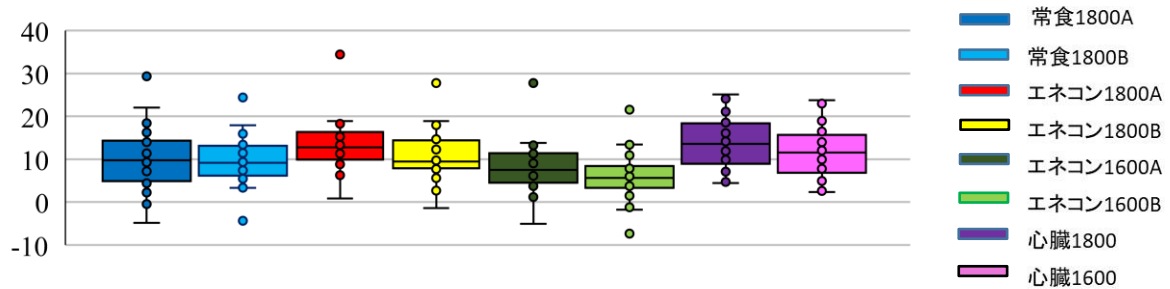


Fig.32 常食、糖尿病食、心臓病食種間 の PRAL 値の比較

NEAP 値 (mEq)

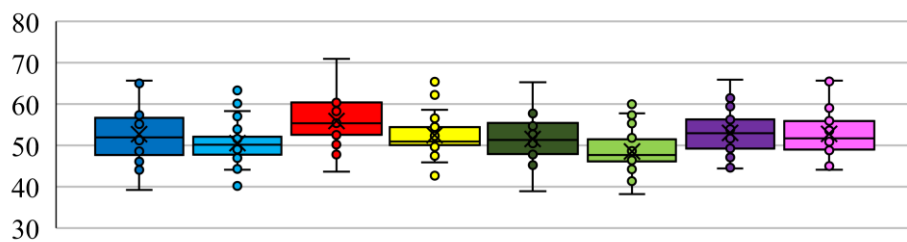


Fig.33 常食、糖尿病食、心臓病食種間 の NEAP 値の比較

プリン体量 (mg)

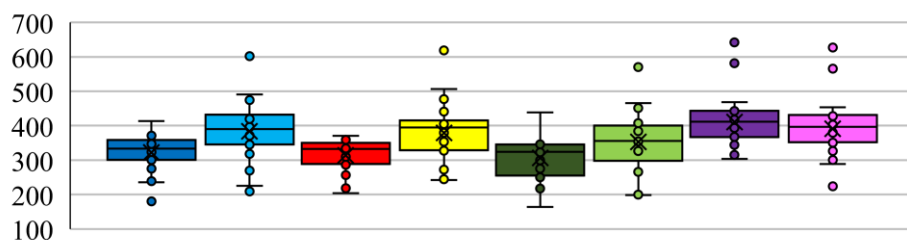


Fig.34 常食、糖尿病食、心臓病食種間 のプリン体量の比較

3-7 考察

本研究では、今まで行われていない、入院中の患者が摂食する食事から食事性酸負荷やプリン体量について算出した。その結果、食事性酸負荷やプリン体量は、献立№1～28の中で変動がみられたが、病院食で使用する食品群は、米、パン、めん、その他穀類、ジャガイモ、その他イモ、砂糖類、油脂動物性、油脂植物性、豆・味噌、豆・大豆製品、魚介生物、塩蔵缶詰、魚介練り製品、獣鳥肉生物、獣鳥肉加工品、卵、牛乳、牛乳その他、野菜緑黄色、野菜漬物、野菜その他、果実類、海草類、調味料、調理加工品と26項目からなる食品を組み合わせしており、多様な食材が使用されていることが変動の理由であることが示された。光沢のある魚介類の皮にグアニンが含まれていることから総プリン体量として太刀魚などは高プリン含有魚となるが、グアニンは血清尿酸値に影響を与えないこと、摂取量が80g程度と適量であるため、血清尿酸値への影響はないことが考えられた。心臓病食は不飽和脂肪酸を増やす目的から魚介類の献立が多く、良質なたん白質の摂取量が多くなり、調理加工品の使用量が少ないことが、食事性酸負荷が高値であった理由に挙げられた。PRAL値とNEAP値は算出式に同様の因子（たん白質とカリウム）が含まれていることから並行した結果となった。プリン体量は選択メニューのBでやや高い値となったが、選択メニューのBは魚メニューが多い事が影響した可能性が考えられる。また、食事性酸負荷（PRAL値やNEAP値）とプリン体量に相関がみられなかった要因には、プリン体量とたん白質摂取量が相関しないことや食事性酸負荷は野菜や果物の摂取量が影響することが考えられた。

さらに、食事性酸負荷の概念はたん白質とカリウムの摂取量について注意が必要な慢性腎臓病の食事療法に関連することが考えられる。野菜や果物の摂取量が少なく、食事性酸負荷の高い食事が慢性腎臓病の進行と相関関係を示すとの報告がある⁶⁸⁾。CKD診療ガイドライン⁶⁹⁾では、CKD病期分類のステージG3a A1-A3の食事療法について、たん白質を0.8-1.0g/体重kg/日とし、高カリウム血症に注意は必要であるが、カリウム制限は行われていない。仮に、体重50kgの患者ではたん白質50gを全て牛肉モモ肉脂身付きに換算すると牛肉量は約260gとなりPRAL値は7.8になるが、野菜を300g摂取すれば、PRAL値は-8.4となり、合計するとPRAL値は-0.6となる。このように食事性酸負荷は慢性腎臓病の病態栄養において野菜や果物の摂取を推奨または抑止する際の一つの指標となる可能性が考えられた。

4 章 臨床研究

4-1 患者の疾患名、基本情報、治療薬

対象患者の入院時の疾患、基本情報、治療薬について患者 A-C を Table 20 に患者 D-F を Table 21 に示した。A から F までの 6 名の患者で E の患者を除き、糖尿病の強化インスリン療法の患者であった。年齢は 50 歳代から 70 歳代、性別は男性 3 名、女性 3 名であり、BMI が 25 以上の患者は A、B、D であった。治療薬に利尿薬は含まれていなかった。

Table 20 患者 A-C の疾患名、基本情報、治療薬

患者名	A	B	C
疾患名 既往歴	子宮頸部腫瘍 糖尿病、高血圧	糖尿病、 心筋梗塞、高血圧	糖尿病
年齢	64	69	69
身長(cm)	160.5	168.2	158.6
体重(kg)	82.7	83.9	50.6
BMI	32.1	29.6	20.1
BSA(m ²)	1.8	1.9	1.5
SUA (mg/dL)	6.3	7.8	4.9
eGFR (min/mL)	62.3	47.1	84.4
尿pH	5.34	5.34	6.24
治療薬	イルベサルタン錠50mg 2錠 アムロジピンベシル酸塩錠5mg1錠 ベサフィブラート200mg2徐放錠 ブデソニド・ホルモテロール フマル酸塩水和物吸入剤 インスリンリスプロ6-6-6-0 インスリングラルギン0-0-0-8	クロピドグレル硫酸塩錠75mg 1錠 ピソプロロールフマル酸塩錠5mg 1錠 オルメサルタンメドキシミル0D20mg 1錠 フェブキシostat錠10mg 1錠 アトルバスタチンカルシウム水和物 0D錠10mg2錠 エゼチミブ錠10mg1錠 ミロガバリンベシル酸塩5mg2錠 インスリンリスプロ8-8-8-0 インスリングラルギン0-0-0-10	インスリンリスプロ5-5-5-0 インスリングラルギン0-0-0-6 酸化マグネシウム500mg 3錠

Table 21 患者 D-F の疾患名、基本情報、治療薬

患者名	D	E	F
疾患名 既往歴	糖尿病、高血圧	非ST上昇型心筋梗塞、 高血圧	糖尿病、糖尿病性 網膜症
年齢	63	73	55
身長(cm)	159.5	144.0	172.1
体重(kg)	71.5	47.4	68.6
BMI	28.1	22.8	23.2
BSA(m ²)	1.7	1.4	1.8
SUA (mg/dL)	4.6	4.5	6.3
eGFR (min/mL)	64.5	77.4	84.1
尿pH	5.25	6.64	5.37
治療薬	レバミピド錠100mg 2錠 イルベサルタン錠50mg 2錠 アトルバスタチンカルシウム 水和物OD錠10mg 1錠 アムロジピンベシル酸塩錠5mg1錠 エルデカルシトールカプセル0.75μg 1錠 メコバラミン錠500μg3錠 ラロキシフェン塩酸塩錠60mg 1錠 ボノプラザンフマル酸塩10mg 1錠 ツムラ六君子湯 3包 アスコルビン酸・パントテン酸 カルシウム錠配合錠 6錠 プレガバリンカプセル5mg2錠 セレコキシブ錠200mg1錠 インスリンリスプロ5-5-5-0 インスリングルラルギン0-0-0-6	アスピリン腸溶錠100mg1錠 プラスグレル塩酸塩錠3.75mg1錠 ロスバスタチンカルシウム OD錠2.5mg錠 ペリンドプリルエルブミン錠 4mg 1錠 ニコランジル錠5mg3錠 ランソプラゾールOD錠15mg1錠 ツムラ大建中湯エキスを顆粒 6包 酪酸菌製剤細粒 ルビプロストンカプセル24μg 2C	インスリンリスプロ8-8-8-0 インスリングルラルギン 0-0-0-24 プレガバリンカプセルOD錠75 mg 1T デュロキセチン塩酸塩カプセル20mg 1C

4-2 入院患者の尿 pH の推移

A-F の 6 名の患者の入院中の尿 pH の推移を Fig.35 示した。尿 pH は 6.0 以下を酸性尿とすることから緑色の破線を記した。入院翌日、3～5 日後、退院日の計 3 回の早朝尿 pH を測定した。C の患者は酸化 Mg の影響で尿の pH が 3～5 日後以降に上昇した。入院翌日から酸性尿を示した A、B、D の患者は、退院日までのおよそ 10 日間を経過しても依然として酸性尿であった。

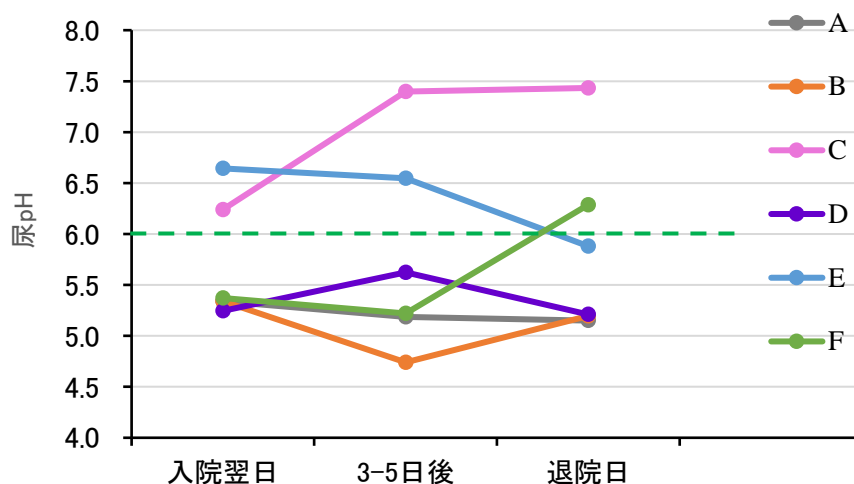


Fig.35 患者 6 名の入院中の尿 pH の推移

4-3 患者別の入院前および入院中の食事の PRAL 値

入院前および入院中の A から F (6 名) の患者の食事から算出した PRAL 値を Fig. 25 に示した。入院前の栄養素は食事調査表 (FFQ) を用いて算出した。6 名全ての患者の入院中の PRAL 値は 10mEq/日以下で、酸性尿を呈した A,B,D の患者の PRAL 値も高値ではなかった。B,D の患者の入院前の PRAL 値は高い傾向であった。一方で C、E の患者は入院前 PRAL 値が高くなかったこと、BMI が 25 以下であったことから、推定腎酸排泄量の式が示すように、腎からの酸排泄が多くなかったために入院時の尿 pH が正常値を示したと考えた。

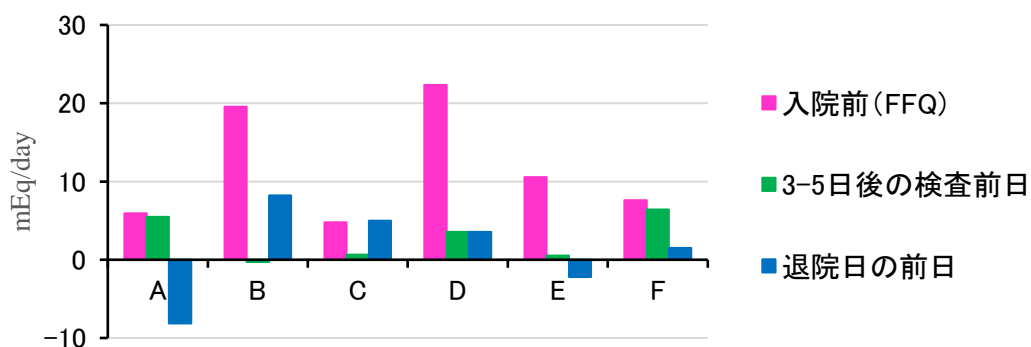


Fig.36 患者別の入院前および入院中の PRAL 値の比較

4-4 健常人と患者の尿 pH と P/K 比および eNAE との比較

患者の尿 pH が健常人とどれくらい異なるか調べるために、報告されている⁷⁰⁾健常人のデータを赤の直線で示し、患者 A-F の 6 名の入院中 3 回分の尿 pH と P/K 比をプロットした結果を Fig.37 に示す。酸性尿の上限である pH6.0 は緑色の破線で示した。P/K 比はたん白質とカリウムの比であるから肉類が多く野菜が少ないと高くなり、逆に肉類に比べ野菜類が多いと低値を示す。患者の食事の P/K 比を入院中の献立から算出すると 0.8~1.2 であった。そのため、健常人の直線から推定すると尿 pH は 6.0 以上になると予想したが、全体の 2/3 の尿 pH は 6.0 以下に分布した。一方、症例 C では投与された薬剤の影響を受け尿 pH が 7.5 となり、症例 F では PRAL 値の低下と尿 pH の上昇が認められる傾向があった。6 名の入院中の食事のプリン体値は一日あたり 165~457 mg であった。プリン体摂取量と血清尿酸値 ($r=0.059$ $p=0.854$)、プリン体摂取量と尿中尿酸排泄量 (簡便法) ($r=0.37$ $p=0.228$) では相関は見られなかった。

これまでに、健常人が 3 種類の食事 (ビーガン、オボベジタリアン、雑食) を摂取した際の 3 日間の FFQ 調査から算出した eNAE と尿 pH で逆相関が見られたとの報告があることから ($r=-0.54$, $p=0.02$)⁷¹⁾、C2, C3 のデータは医薬品の影響を受けた可能性を考慮し、排除して検討した結果、eNAE と尿 pH では、相関は認められなかった ($r=-0.46$ $p=0.07$)。しかし、患者が服用した酸化マグネシウム 500 mg 3 錠 (1500mg \times 24.305/40.30) を摂取した Mg 量として PRAL 式に代入し eNAE を算出した結果、 $r=-0.76$ $p<0.001$ となり、PRAL 値から算出する eNAE と尿 pH の間に負の相関が認められた (Fig.38)。

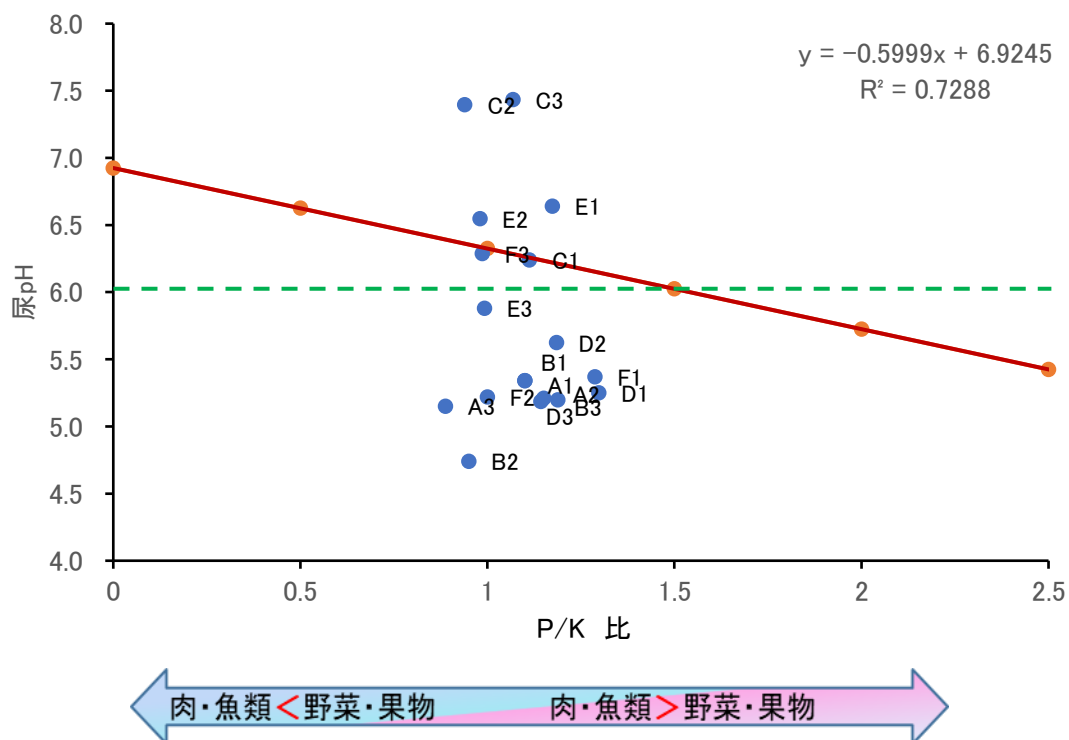


Fig.37 健常人と患者の尿 pH と P/K 比の分布

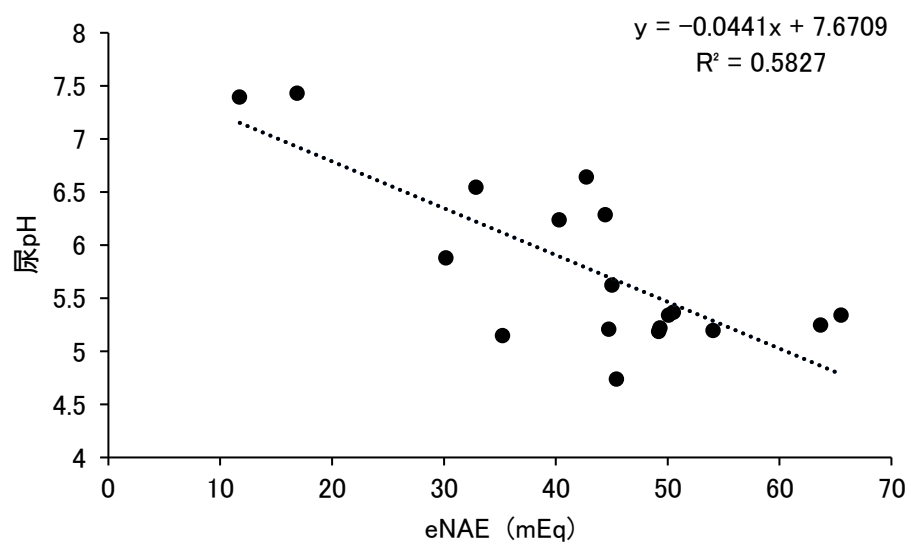


Fig.38 尿 pH と eNAE (酸化 Mg 含む) の散布図

4-5 考察

患者の尿 pH と食事成分との関係について検討を行うため、PRAL 値から算出した eNAE と尿 pH の関連を調べた結果、医薬品（酸化 Mg）の成分を含めた場合において関連が認められた。このことから酸化 Mg 内服による尿のアルカリ化は食事性酸負荷を用いた eNAE によって説明できるものと考えられた。また、食事性酸負荷式のパラメーターである、たん白質摂取量および P、K、Ca、Mg の尿中排泄量と尿 pH の関係を調べた結果、PRAL 式のプラスの因子であるたん白質では相関が見られなかったが（ $r = -0.31$ $p = 0.20$ ）（Fig.39）、尿中 P と尿 pH は負の相関が見られた（ $r = -0.49$ $p = 0.04$ ）（Fig.40）。

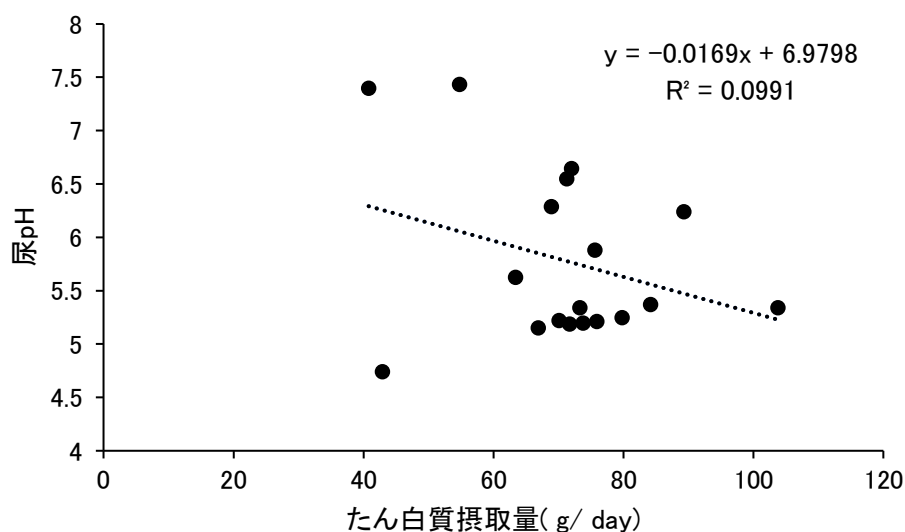


Fig.39 たん白質摂取量と尿 pH の散布図

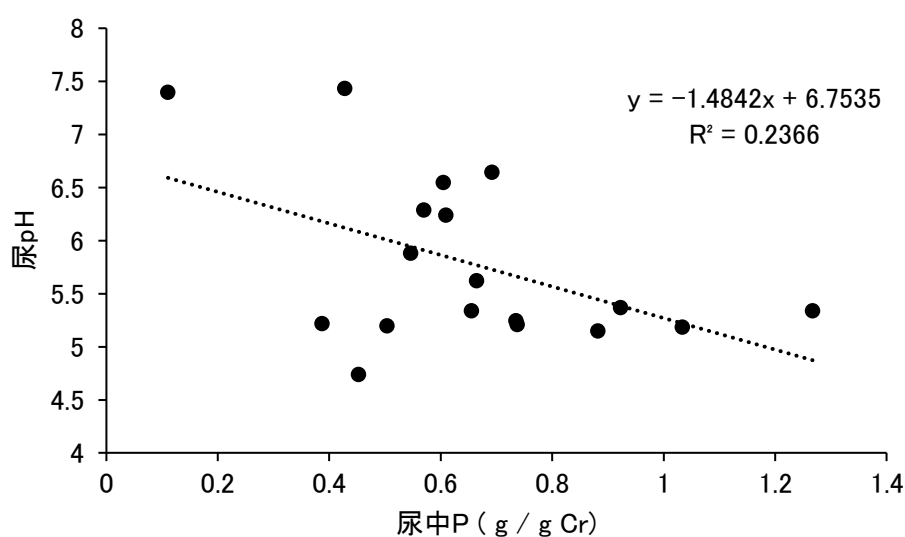


Fig.40 尿中 P と尿 pH の散布図

一方、PRAL 式のマイナス因子である K、Ca、Mg で検討した結果、尿中 Ca 以外の尿中 K ($r = 0.66$ $p = 0.003$) と尿中 Mg ($r = 0.67$ $p = 0.003$) では正の相関が見られた (Fig.41、42、43)。このことから、本研究において尿中に排泄される成分と尿 pH が関係していることが示された。

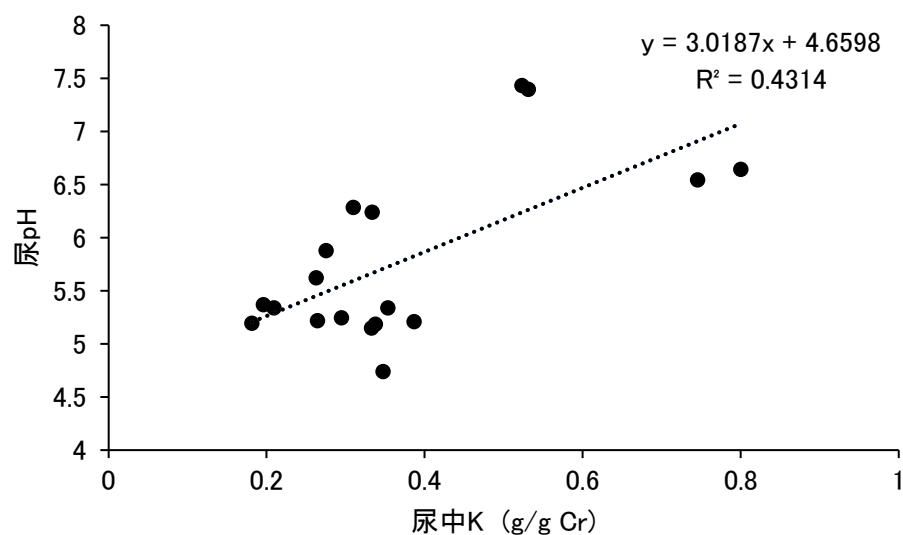


Fig.41 尿中 K と尿 pH の散布図

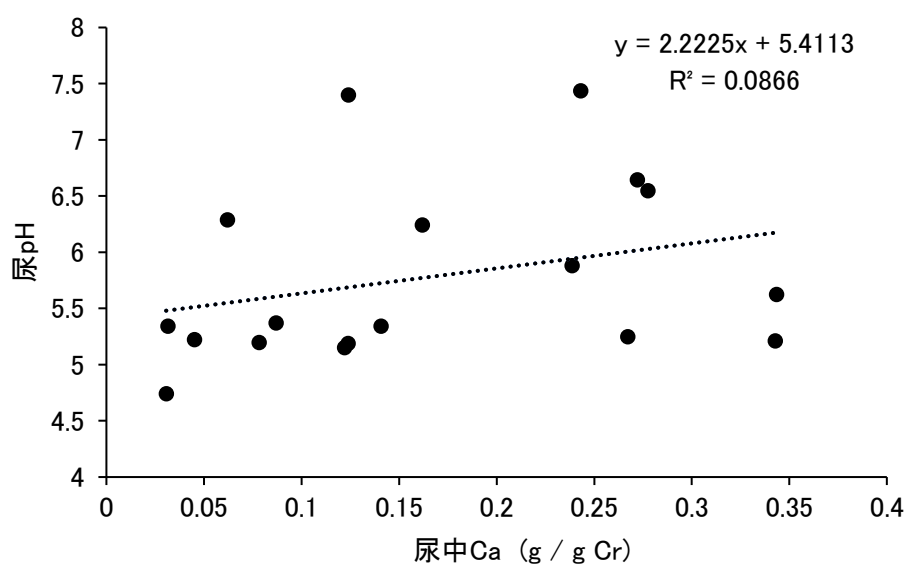


Fig.42 尿中 Ca と尿 pH の散布図

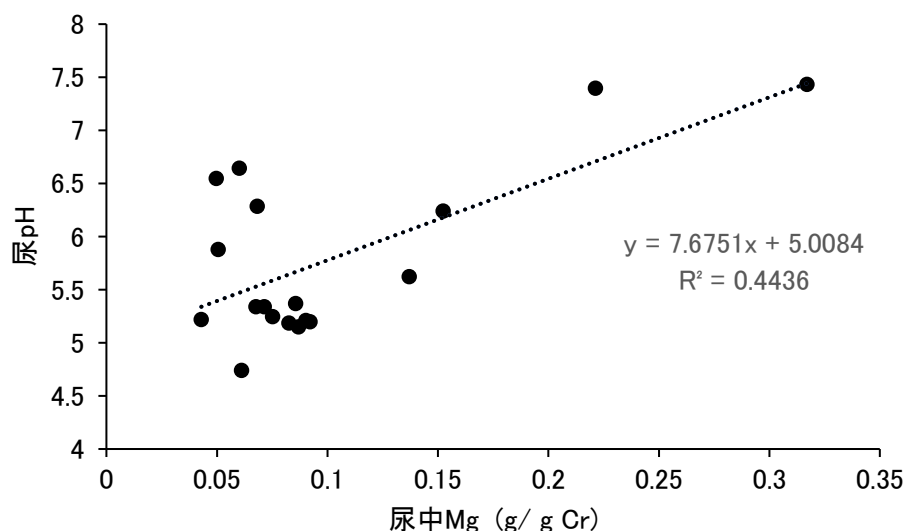


Fig.4.3 尿中 Mg と尿 pH の散布図

尿 pH の低下には①食事に由来する腎酸負荷に因るもののうち、NAE（酸排泄量）および eNAE が寄与するもの、②病態に因るもの、③治療薬に因るものが考えられた。本研究において①は、入院中、食事性酸負荷は継続して低値ではなかったことが尿 pH を変動しなかった理由と考えられた。②は、腎尿細管で排泄する酸を緩衝するものとして酸排泄量の式が示すように腎臓から排泄される NH_4^+ が大きな役割を果たしている⁶²⁻⁶⁶）。腎臓で排泄される NH_4^+ は先に述べたようにミトコンドリアの PGA や GDH が作用することや、尿細管腔内で炭酸から二酸化炭素に変換する炭酸脱水酵素IVや尿細管細胞内で二酸化炭素から炭酸に変換する炭酸脱水酵素IIが作用することで NH_3 産生と重炭酸イオンの回収を行っていることから、患者が酸性尿を呈していたことは、腎尿細管のグルタミン代謝の過程における NH_3 産生の低下が考えられた。例えば基底膜側の NBCe1-A の欠失が、近位尿細管の NH_3 生成に関与する複数の酵素の発現レベルを変化させる可能性が示唆されている⁷²）。また、インスリン抵抗性の一つの腎症状は尿中 NH_4^+ と pH の低下である可能性を結論付けている報告があること⁷³）や2型糖尿病患者の食事、体の大きさ、年齢を調製した後も酸性尿が持続し、尿における NH_4^+/NAE が健常人と比して、低下しているとの報告がある⁷⁴）。近位尿細管の NHE3 における腎脂肪症が NH_4^+ 分泌を減少させることが細胞やラットを用いた研究で報告されている⁷⁵）。また、アジルサルタンが NHE3 尿細管発現を抑制するとマウスを用いた研究で報告がある⁷⁶）。このことから尿の酸性化には、患者の軽度な腎機能障害が影響したことやインスリン抵抗性の病態が背景にあることが考えられた。③は、尿 pH をアルカリ化する酸化マグネシウムや尿 pH を酸性化するアスコルビン酸など患者が服用している医薬品の影響があったものと考えられた。患者 E はアスピリン服用中のため、ランソプラゾール OD 錠 15 mg/日を朝服用しており、集合管に存在する $\text{H}^+\text{K}^+\text{-ATPase}$ を PPI（プロトンポンプインヒビター）が阻害すれば集合管での酸排泄が低下し、NAE は低下することも考えられた。しかし、ランソプラゾール OD の半減期は

1.78hr±1.57 であること⁷⁷⁾ や服用時間が朝食後であることから尿採取時の時点では、集合管への影響は少なかったものと推察した。その他の要因として激しい運動後は乳酸アシドーシスを生じることや、夜間睡眠中は夜間の血液低酸素分圧を反映して、ともに尿は酸性に傾くことが知られている。本研究では入院中のため激しい運動は行われていなかったが、採尿時間が早朝であったため、血液低酸素分圧の影響を受けた可能性も考えられた。また、BMI と酸性尿が関連すること、eNAE が示すように体表面積に比例する有機酸排泄量の増加が考えられることから、酸性尿を呈した患者の多くは適正体重ではなかったことが尿の pH が正常化しなかった原因一つとして考えられた。

入院前の患者の食事の PRAL 値はやや高い傾向であり、B と D の患者は 20mEq/日であったことや BMI も 25 以上で、酸性尿を示していたことなどから、糖尿病の食事療法に加え、食事性酸負荷を念頭に入れ、今後の食生活を見直すことを推奨する。しかし、糖尿病患者では高カリウム血症の発症が危惧されるため、食事性カリウム値の設定は病院食で 2500 mg 程度であった。食事摂取基準 2020 では、成人におけるカリウム目安量が約 2000～2500 mg と糖尿病患者には最適な量である。一方、目標量が約 2600～3000 mg となっており、健常人の食事ではカリウムの多い野菜、果物、海藻、イモ類を摂取して酸負荷の低い食事の推奨が可能となることが考えられる。

健常人データとの比較 (Fig.37) では、入院中に患者が摂取した食事の P/K 比が高値でも低値でもなく、健常人のような分布はみられなかったが、F の患者では健常人のデータに近い傾向が認められたことから、さらに長期の経過観察を継続した場合、食事の影響がみられた可能性が考えられた。食事中的プリン体量と臨床検査値に相関が見られなかった理由は、適正なエネルギー摂取量であったことや食事中的プリン体値がほぼ 400 mg 以内であり、尿酸プールを増加させる食事内容ではなかったことが挙げられた。

本研究では入院が必要な糖尿病患者の治療中の尿 pH と食事性酸負荷を検討した観察研究であったため、全ての患者で食事を統一化することや食事内容を変更すること、酸塩基平衡に影響する医薬品や病態を全て排除することは不可能であった。しかし、病院給食で管理された食事のみを摂取した糖尿病と心疾患患者の正確な酸負荷量およびプリン体量を算出することができ、さらに医薬品に含有される Mg 量も食事性酸負荷値に含め検討すること、尿 pH や尿中尿酸などについて検討を行うことができたと考ええる。

小 括

実際に摂取された食事の正確な酸負荷量を算出するため病院治療食を対象として検討した結果、治療食の PRAL 値は 1 日当たり、 $-7.3 \sim 34.4 \text{mEq}$ 、NEAP 値は $38.2 \sim 70.9 \text{mEq}$ 、P/K 比は $0.8 \sim 1.2$ で、献立内容により日ごとに異なった。治療食は PFC バランス、塩分量、食物繊維、脂肪酸組成などが適正に計算され作られていることから、肉類などのたん白質量に対して、野菜・果物・いも・海藻類が多いため、食事性酸負荷は高くないことが示された。プリン体値(平均) は $310 \sim 411 \text{mg/日}$ で、プリン体摂取量と血清尿酸値、尿酸排泄量、尿 pH の相関は認められなかった。また、PRAL 値から算出した P/K 比と尿 pH にも相関が認められなかったが、酸化 Mg を含めた eNAE は尿 pH と相関が見られ、医薬品成分による尿アルカリ化が示された。本研究では病院で供される食事のみで患者の尿 pH の変化が現れるには期間が短かった可能性がある。また、患者の病態による影響やこれまでの生活習慣が影響し、適正体重でなかったなど、患者背景も関与したことが考えられた。まずは自分の適正体重を認識することから始め、適切な食事療法の継続が望まれる。

【Ⅲ. 総 括】

本研究では、発酵食品を使用した調理を高尿酸血症・痛風患者の食事指導に役立てることを目的とし、さらに美味しくなる調理加工法として3種類の発酵食品に魚を浸漬し、検討した。2つのプリン体測定法を用いて、食品中の総プリン体とプリン体分子種を測定することで、浸漬前後のプリン体の変化について検証した。酒粕漬け、ぬか漬け、西京漬けのいずれにおいても、魚に含有され、血清尿酸値を上昇されるヒポキサンチン類を低減したことが明らかになった。核酸旨味成分であるIMP量は発酵食品により異なったが、Inoやヒポキサンチンは低減することが検証できた。本研究で検証した発酵食品を使用した献立は、高尿酸血症・痛風の食事療法として勧められるだけでなく、低エネルギー調理法であることから他の生活習慣病患者にも推奨できると考える。

病院食の食事性酸負荷や総プリン体量を評価した結果、適正な数値であった。さらに、患者6名について患者が摂取した食事の成分を正確に把握し、これら食事の酸負荷やプリン体値を算出した。そして、患者が摂取した食事と尿pHを検討した結果、酸性尿は患者の病態や治療薬の影響を受けた可能性が大きかった。また、短期間の食事療法では、ほとんどの患者で尿pHの正常化などの改善が見られなかった。しかし、一部の食事成分と尿pHの関連が見出されたことから、病態栄養において食事性酸負荷を用いた新たな視点は、生活習慣病の食事療法において今後さらなる研究が必要と考えられる。

食生活の見直しは健康寿命の延伸に貢献するとともに、食がもたらす患者のQOL向上にも繋がると考えられる。本研究で得られた知見は生活習慣病の食事療法の一助となることが期待される。

【IV 参考文献】

- 1) 一般社団法人日本生活習慣病予防学会
<http://www.seikatsusyukanbyo.com/>.
- 2) 生活習慣病とは？ | E-ヘルスネット（厚生労働省）.
<https://www.e-healthnet.mhlw.go.jp/information/metabolic/m-05-001.html>.
- 3) 日本糖尿病学会編著：糖尿病診療ガイドライン 2019,南江堂(2019).
- 4) 日本高血圧学会編著：高血圧治療ガイドライン 2019,ライフサイエンス出版：(2019).
- 5) 日本動脈硬化学会編著：動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017 年版,日本動脈硬化学会（2017）.
- 6) 一般社団法人日本痛風・核酸代謝学会：高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン第3 版, (2018)..
- 7) Carver JD,, Walker WA., The role of nucleotides in humannutrition. *J Nutr Biochem* .6,58-72, (1995).
- 8) Onoda T., Tatibana M., Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim BiophysActa*. 521,55–66, (1978)
- 9) H. K. Choi., K. Atkinson., E. W. Karlson., W. Willett., and G. Curhan., “Purine-Rich Foods, Daily and Protein Intake, and the Risk of Gout in Men,” *N. Engl. J. Med.* 350, (11), 1093–1103, (2004).
- 10) Brulé, D., Sarwar, G. & Savoie, L. Changes in serum and urinary uric acid levels in normal human subjects fed purine-rich foods containing different amounts of adenine and hypoxanthine. *J. Am. Coll. Nutr.* 11, 353–358 (1992).
- 11) Kaneko, K., Aoyagi, Y., Fukuuchi, T., Inazawa., K. & Yamaoka, N. Total Purine and Purine Base Content of Common Foodstuffs for Facilitating Nutritional Therapy for Gout and Hyperuricemia. *Biol. Pharm. Bull.* 37, 709–721, (2014).
- 12) Kaneko K., Takayanagi F., Fukuuchi T., Yamaoka N., Yasuda M., Mawatari K., and Fujimori S. Determination of total purine and purine base content of 80 food products to aid nutritional therapy for gout and hyperuricemia. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. Apr 20:1-9, (2020).
- 13) Yamaoka, N., Kaneko K., Kudo Y., Aoki M., Yasuda M., Mawatari K., Nakagomi.K., Yamada Y., and Yamamoto T. Analysis of Purine in Purine-Rich Cauliflower. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 29, (4–6), 518– 521, (2010).
- 14) Inazawa K., Sato A., Yamaoka N., Fukuuchi T., Yasuda M., Mawatari K., Nakagomi K. and Kaneko K. Determination and Profiling of Purines in Foods by Using HPLC AND LC-MS. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 33, 439–444, (2014).
- 15) Fukuuchi T., Iwasaki M., Yamaoka N., Kaneko K. Study of the changes in the purine content in foods after heat cooking. *Gout and Nucleic acid Metabolism*. 42, (2),165-172, (2018).
- 16) Nicola Dalbeth , Sumwai Wong, Greg D Gamble, Anne Horne, Barbara Mason, Bregina

- Pool, Lynette Fairbanks, Fiona M McQueen, Jillian Cornish, Ian R Reid, Kate PalmanoDalbeth Acute Effect of Milk on Serum Urate Concentrations: A Randomised Controlled Crossover Trial. *Annals of the Rheumatic Diseases* .69, (9), 1677-1682, (2010).
- 17) Kyu Yong Park., Hyun Jung Kim., Hyeong Sik Ahn., Sun Hee Kim., Eun Ji Park., Shin-Young Yim., Jae-Bum Jun., Effects of Coffee Consumption on Serum Uric Acid: Systematic Review and Meta-Analysis. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 45, (5) ,580–86, (2016).
 - 18) Li, Tingting, Likun Ren, Dangfeng Wang, Minjie Song, Qiuying Li, and Jianrong Li. Optimization of extraction conditions and determination of purine content in marine fish during boiling. *Peer J* .7,1-23, e6690, (2019).
 - 19) 一般社団法人日本発酵文化協会：発酵検定公式テキスト,株式会社実業之日本社,40-57, (2018).
 - 20) Kaneko K., Yamanobe T., and Fujimori S. Determination of Purine Contents of Alcoholic Beverages Using High Performance Liquid Chromatography. *Biomedical Chromatography* .23, (8), (2009).
 - 21) T. FUKUUCHI, N. YAMAOKA, and K. KANEKO, “Analysis of Intra- and Extracellular Levels of Purine Bases, Nucleosides, and Nucleotides in HepG2 Cells by High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Sci.*31,(9), 895–901, (2015).
 - 22) Klinenberg JR., Goldfinger SE., Seegmiller JE., The effectiveness of the xanthine oxidase inhibitor allopurinol in the treatment of gout. *Ann Intern Med.* 62,639-647, (1965).
 - 23) Frassetto, Lynda, and Ingrid Kohlstadt. Treatment and Prevention of Kidney Stones: An Update. *American Family Physician* 84, (11) ,1234–42, (2011).
 - 24) Adeva, M. M. & Souto, G. Diet-induced metabolic acidosis. *Clinical Nutrition.* 30, 416–421, (2011).
 - 25) Najeeb, Qazi, Imran Masood, Neeru Bhaskar, Harnam Kaur, Jasbir Singh, Rajesh Pandey, K. S. Sodhi, Suvarna Prasad, Sheikh Ishaq, and Ruhi Mahajan. Effect of BMI and urinary pH on urolithiasis and its composition. *Saudi J. Kidney Dis. Transpl.* 24, 60–66, (2013).
 - 26) McCarty, M. F. Acid-base balance may influence risk for insulin resistance syndrome by modulating cortisol output. *Med. Hypotheses.* 64, 380–384, (2005).
 - 27) REMER, T. & MANZ, F. Potential Renal Acid Load of Foods and its Influence on Urine pH. *J. Am. Diet. Assoc.* 95, 791–797, (1995).
 - 28) Welch, Ailsa A., Angela Mulligan., Sheila A., Bingham, and Kay Tee Khaw. Urine PH Is an Indicator of Dietary Acid-Base Load, Fruit and Vegetables and Meat Intakes: Results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Population Study. *British Journal of Nutrition.* 99, (6), 1335–43, (2008).

- 29) Remer T., Manz F., Estimation of the renal net acid excretion by adults consuming diets containing variable amounts of protein. *American Journal of Clinical Nutrition*. 59, (6), 1356-1361, (1994).
- 30) N. Abate, M. Chandalia, A. V. Cabo-Chan, O. W. Moe, and K. Sakhaee, The metabolic syndrome and uric acid nephrolithiasis: Novel features of renal manifestation of insulin resistance. *Kidney Int.* 65, (2), 386–392, (2004).
- 31) Shamima A., Kurotani K., Kashino I., Goto A., Mizoue T., Noda M., Sawada N., Tsugane S., Iwasaki M., Sasazuki S., Yamaji T., Shimazu T., Hanaoka T., Ogata J., Baba S., Mannami T., Okayama A., Kokubo Y., Miyakawa K., Saito F., Koizumi A., Sano Y., Hashimoto I., Ikuta T., Tanaba Y., Sato H., Roppongi Y., Takashima T., Suzuki H., Miyajima Y., Suzuki N., Nagasawa S., Furusugi Y., Nagai N., Ito Y., Komatsu S., Minamizono T., Sanada H., Hatayama Y., Kobayashi F., Uchino H., Shirai Y., Kondo T., Sasaki R., Watanabe Y., Miyagawa Y., Kobayashi Y., Machida M., Kobayashi K., Tsukada M., Kishimoto Y., Takara E., Fukuyama T., Kinjo M., Irei M., Sakiyama H., Imoto K., Yazawa H., Seo T., Seiko A., Ito F., Shoji F., Saito R., Murata A., Minato K., Motegi K., Fujieda T., Yamato S., Matsui K., Abe T., Katagiri M., Suzuki M., Matsui K., Doi M., Terao A., Ishikawa Y., Tagami T., Sueta H., Doi H., Urata M., Okamoto N., Ide F., Goto H., Fujita R., Sakiyama H., Onga N., Takaesu H., Uehara M., Nakasone T., Yamakawa M., Horii F., Asano I., Yamaguchi H., Aoki K., Maruyama S., Ichii M., Takano M., Tsubono Y., Suzuki K., Honda Y., Yamagishi K., Sakurai S., Tsuchiya N., Kabuto M., Yamaguchi M., Matsumura Y., Sasaki S., Watanabe S., Akabane M., Kadowaki T., Inoue M., Noda M., Mizoue T., Kawaguchi Y., Takashima Y., Yoshida Y., Nakamura K., Takachi R., Ishihara J., Matsushima S., Natsukawa S., Shimizu, H. Sugimura H., Tominaga S., Hamajima N, Iso H., Sobue T., Iida M., Ajiki W., Ioka A., Sato S., Maruyama E., Konishi M., Okada K., Saito I., Yasuda N., Kono S., Akiba S., Isobe T., and Sato Y. High dietary acid load score is associated with increased risk of type 2 diabetes in Japanese men: The Japan public health center-based prospective study. *J. Nutr.* 146, 1076–1083, (2016).
- 32) Esche J., Krupp D., Gert Mensink., B. M. & Remer. Thomas. Estimates of renal net acid excretion and their relationships with serum uric acid and hyperuricemia in a representative German population sample. *Eur. J. Clin. Nutr.* 74, 63–68, (2020).
- 33) Kanbara A. & Seyama I. Effect of urine pH on uric acid excretion by manipulating food materials. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 30, 1066–1071, (2011).
- 34) Kanbara A., Hakoda M. & Seyama I. Urine alkalization facilitates uric acid excretion. *Nutr. J.* 9, (45), 2-5, (2010).
- 35) Hakoda M., Kasagi F., Future trends for the number of gout patients in Japan G. *Gout and Uric & Nucleic Acids* .44 (1), 33-39, (2020).
- 36) 山田裕一: 「高尿酸血症・低尿酸血症, 日本臨床 増刊号, 74(9), 114-119, (2016).
- 37) Matsuo H., Ichida K., Takada T., Nakayama A., Nakashima H., Nakamura T.,

- Kawamura Y., Takada Y., Yamamoto K., Inoue H., Oikawa Y., Naito M., Hishida A., Wakai K., Okada C., Shimizu S., Sakiyama M., Chiba T., Ogata H., Niwa K., Hosoyamada M., Mori A., Hamajima N., Suzuki H., Kanai Y., Sakurai Y., Hosoya T., Shimizu T., and Shinomiya N. Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: A function-based genetic analysis in a Japanese population. *Sci. Transl. Med.* 1, (5), 5-11, (2009).
- 38) Ichida K., Matsuo H., Tappei Takada., Akiyoshi Nakayama., Keizo Murakami., Toru Shimizu., Yoshihide Yamanashi., Hiroshi Kasuga., Hiroshi Nakashima, Takahiro Nakamura, Yuzo Takada, Yusuke Kawamura, Hiroki Inoue, Chisa Okada, Yoshitaka Utsumi, Yuki Ikebuchi, Kousei Ito, Makiko Nakamura, Yoshihiko Shinohara, Makoto Hosoyamada, Yutaka Sakurai, Nariyoshi Shinomiya, Tatsuo Hosoya, and Hiroshi Suzuki. Decreased extra-renal urate excretion is a common cause of hyperuricemia. *Nat. Commun.* 3, 764, 1-7, (2012).
- 39) Nakamura Y., Okuda N., Tanvir Chowdhury Turin, Fujiyoshi A., Okamura T., Hayakawa T., Yoshita K., Miura K., Ueshima H. Fatty acids intakes and serum lipid profiles: NIPON DATE 90 and the national nutrition monitoring. *J Epidemiol.* 20, s544-8, (2010).
- 40) Qu X, Sui J, Mi N, Lin H. Determination of four different purines and their content change in seafood by high-performance liquid chromatography. *J Sci Food Agric.* 97(2), 520–5, (2017).
- 41) Rong S, Zou L, Zhang Y, Zhang G, Li X, Li M Yang F, Li C, He Y, Guan H, Guo Y, Wang D, Cui X, Ye H, Liu F, Pan H, Yang Y. Determination of purine contents in different parts of pork and beef by high performance liquid chromatography. *Food Chem.* 170,303–7, (2015).
- 42) Tamang, J. P., Watanabe, K. & Holzapfel, W. H. Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Frontiers in Microbiology* . 7, 377, (2016).
- 43) Stephan Ebner, Linda N Smug, Wolfgang Kneifel, Seppo J Salminen, Mary Ellen Sanders. Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union. 20,(43),16095-16100, (2014).
- 44) Stephanie N. Chilton, Jeremy P. Burton, Gregor Reid. Inclusion of Fermented Foods in Food Guides around the World. *Nutrients.*7,(1), 390-404, (2015).
- 45) Şanlıer, N., Gökçen, B. B. & Sezgin, A. C. Health benefits of fermented foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 59, 506–527 (2019).
- 46) 横田 篤,大西康夫,小川順.応用微生物学 第3版,29-48,243-255, (2016).文永堂出版.
- 47) 峰時俊貴, 酒粕の機能特性とそれを活かした商品開発,日本醸造協会.109,(1),11-20, (2014).
- 48) 中島春紫,日本の伝統 発酵の化学 微生物が生み出す「旨さ」に秘密. 株式会社講談社,158-164, (2018).

- 49) Yamada, N., C. Iwamoto, H. Kano, N. Yamaoka, T. Fukuuchi, K. Kaneko, and Y. Asami. Evaluation of purine utilization by *Lactobacillus gasseri* strains with potential to decrease the absorption of food-derived purines in the human intestine. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 35, 670–676, (2016).
- 50) Xiao, Yuanxun, Congxin Zhang, Xianli Zeng, and Zhichao Yuan. Microecological Treatment of Hyperuricemia Using *Lactobacillus* from Pickles. *BMC Microbiology*. 20, (1),195, (2020).
- 51) Hong, Hui, Joe M. Regenstein, and Yongkang Luo. The Importance of ATP-Related Compounds for the Freshness and Flavor of Post-Mortem Fish and Shellfish Muscle: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 57, (9), 1787-1798 ,(2015).
- 52) KEGG PATHWAY Database Purine metabolism.
https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway.
- 53) Takayanagi F, Fukuuchi T, Yamaoka N, Kaneko K., The observed variation in the purine composition of food after soaking in sake lees. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 37, (6), 348-352, (2018).
- 54) 高柳 ふくえ, 福内 友子, 山岡 法子, 安田 誠, 馬渡 健一, 奥 直人, 金子 希代子. 西京味噌浸漬によるめかじきのプリン体組成の変化. 痛風と尿酸・核酸. 44, (2), 177-185, (2020).
- 55) Takayanagi F, Fukuuchi T, Yamaoka N, Kaneko K., Measurement of Total Purine Content and Free Nucleosides, Nucleotides and Purine Bases Composition in Japanese Anchovies (*Engraulis Japonicas*) Using Highperformance Liquid Chromatography. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 39, (10-12), 1458-1464, (2020).
- 56) Kurihara K., Umami the Fifth Basic Taste: History of Studies on Receptor Mechanisms and Role as a Food Flavor. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 1-11, (2015).
- 57) Gur, Dvir, Yael Politi, Berta Sivan, Peter Fratzl, Steve Weiner, and Lia Addadi. Guanine-Based Photonic Crystals in Fish Scales Form from an Amorphous Precursor. *Angewandte Chemie International Edition*.52, (1), 388–91, (2013).
- 58) Itou, K., Akahane Y., Comparison of Proximate and Water Extractive Components in Raw Mackerel with Those in a Fermented Mackerel Food Heshiko. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 65, (5), 878–885, (1999).
- 59) 原茂子,尿酸・(酸性尿)と諸疾患との関連性,人間ドック,35,(2),132-144,(2020).
- 60) Maalouf, Naim M., Mary Ann Cameron, Orson W. Moe, and Khashayar Sakhaee. MetabolicBasis for Low Urine PH in Type 2 Diabetes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 5,(7),1277–81, (2011).
- 61) Moghadam, S. K., Bahadoran, Z., Mirmiran, P., Tohidi, M. & Azizi, F. Association between dietary acid load and insulin resistance: Tehran Lipid and Glucose Study. *Prev. Nutr Food Sci*. 21, 104–109, (2016).
- 62) T Remer. Influence of diet on acid-base balance. *Semin Dial*. 13, (4),221-6, (2000).

- 63) 錦見盛光、福島和明、古市幸雄、「酸性食品」「アルカリ性食品」の栄養学的意義についての再考. 名古屋女子大学紀要.59,29-39, (2013).
- 64) L. Lee Hamm, Nazih Nakhoul and Kathleen S. Hering-Smith. Acid-Base Homeostasis.*Renal Physiology*. 10, (12), 2232-2242, (2015).
- 65) カラー図解よくわかる生理学の基礎第 2 版 p184-187 監訳 佐久間康夫 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル 2017.08.22.
- 66) バーン/レヴィカラー基本生理学 p338-408 監訳 坂東武彦,小山省三,西村書店 2003.05.30.
- 67) Ankita Roy, Mohammad M. Al-bataineh and N ria M. Collecting Duct Intercalated Cell Function and Regulation. *Renal Physiology*. 10, (2), 305-324, (2015).
- 68) Toba, Koji, Michihiro Hosojima, Hideyuki Kabasawa, Shoji Kuwahara, Toshiko Murayama, Keiko Yamamoto-Kabasawa, Ryohei Kaseda, et al. Higher Estimated Net Endogenous Acid Production with Lower Intake of Fruits and Vegetables Based on a Dietary Survey Is Associated with the Progression of Chronic Kidney Disease.*BMC Nephrology*. 20, 421, 2-11, (2019).
- 69) エビデンスに基づく CKD 診療ガイドライン 2018,日本腎臓学会, 東京医学社, (2018).
- 70) 神原 彩,三浦 芳助,瀬山 一正. 高尿酸血症・痛風の食を通じた予防策の試案 痛風と核酸代謝. 36, (2) ,95-103, (2012).
- 71) L. M. Ausman, L. M. Oliver, B. R. Goldin, M. N. Woods, S. L. Gorbach, and J. T. Dwyer, Estimated Net Acid Excretion Inversely Correlates With Urine pH in Vegans, Lacto-Ovo Vegetarians, and Omnivores. *J. Ren. Nutr.* 18, (5), 456–465, (2008).
- 72) Hyun-Wook Lee, Gunars Osis, Autumn N. Harris, Lijuan Fang, Michael F. NBCe1-A Regulates Proximal Tubule Ammonia Metabolism under Basal Conditions and in Response to Metabolic Acidosis. *J Am Soc Nephrol*. 29, (4), 1182-1197, (2018).
- 73) K. Sakhaee, Recent advances in the pathophysiology of nephrolithiasis. *Kidney International*. 75, (6), 585–595, (2009).
- 74) Maalouf, Naim M., Mary Ann Cameron, Orson W. Moe, and Khashayar Sakhaee. Metabolic Basis for Low Urine PH in Type 2 Diabetes. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 5, (7), 1277–81, (2010).
- 75) Bobulescu, I. Alexandru, Dubree, Michele Zhang, Jianning McLeroy, Paul Moe, Orson W. Effect of renal lipid accumulation on proximal tubule Na⁺/H⁺ exchange and ammonium secretion Journal of clinical medicine. *Am J Physiol Renal Physiol* .294, 1315–1322, (2008).
- 76) Masaki Hatanaka, Jun-Ya Kaimori, Satoko Yamamoto, Isao Matsui, Takayuki Hamano, Yoshitsugu Takabatake, Carolyn M. Ecelbarger, Shiro Takahara, Yoshitaka Isaka, Hiromi Rakugi. Azilsartan Improves Salt Sensitivity by Modulating the Proximal Tubular Na⁺-H⁺ Exchanger-3 in Mice. *PLoS ONE*. 11, (1), 1-16, (2016).
- 77) プロトンポンプ・インヒビター 日本薬局方 ランソプラゾール腸溶性口腔内

崩壊錠 ランソプラゾール OD 錠 30mg 「日医工」 Lansoprazole OD 添付文書.

謝辞

本研究および本論文を作成するにあたり、終始あたたかいご指導と激励を賜りました、臨床分析学研究室の金子希代子教授に心から感謝の意を表します。

臨床分析学研究室 山岡法子准教授、福内友子講師を始め、医薬品分析学研究室の奥直人教授、馬渡健一准教授、安田誠講師には研究やセミナーを通じて本研究に対する様々なご指導、ご教授頂きました。さらには研究者としての研究に対する姿勢・態度といった貴重なアドバイスを頂きましたこと、この場を借りて感謝の意を表したいと思います。

人体機能形態学研究室の細山田真教授や富岡直子講師には英論セミナーを通して尿酸について広く深くご指導頂きましたこと厚く御礼申し上げます。また博士論文をご審査いただきました、厚味厳一教授、出口芳春教授、細山田真教授、渡邊真知子教授に深甚の謝意を表します。

臨床研究を行うにあたり、共同研究を御快諾いただきました、帝京大学医学部附属病院内科学講座の塚本和久教授、内野卓也助教、野村高広助手、帝京大学臨床研究センターの宇野希世子准教授、栄養部の朝倉比都美課長、内田加奈江主任、本木菜津美係員に多大なご協力、ご指導を賜りましたこと御礼申し上げます。

この4年間のうち、最終学年の1年間はこれまで経験したことのないコロナ禍での対応、それに伴う先生方のご負担は相当なものだと推察致します。そのような中でも親身になってご指導くださったおかげで、無事に博士課程を終えることができましたことを心より御礼申し上げます。

また、研究を手伝ってくれた研究室配属生の皆さん、いつも明るく、楽しい会話で励ましてくださり、本当にありがとうございました。

最後に、長期にわたる学生生活を支えてくれた兄姉と、いつもそばに寄り添い支えてくれた家族に感謝致します。

2021 年 3 月