

フィチン酸の血清尿酸値改善効果に関する研究

池永, 武

<https://hdl.handle.net/2324/4475052>

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

フィチン酸の血清尿酸値改善効果に関する研究

九州大学大学院

薬学府創薬科学専攻

蛋白質創薬学分野

池永 武

2021 年

目次

略号一覧	2
序論	3
第 1 章	6
フィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害活性と高尿酸血症動物モデルにおける有効性に関する研究	
第 2 章	15
健常成人におけるフィチン酸の食後血清尿酸値に対する有効性に関する研究	
第 3 章	26
無症候性高尿酸血症者におけるフィチン酸の空腹時血清尿酸値に対する有効性に関する研究	
総括	36
引用文献	38
謝辞	45
発表論文	46

略号一覧

AUC	Area under curve
BMI	Body mass index
Cmax	Maximum concentration
CNT	Concentrative nucleoside transporter
DNA	Deoxyribonucleic acid
FAS	Full analysis set
GRAS	Generally Recognized As Safe
HPLC	High performance liquid chromatography
IAUC	Incremental area under curve
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
iCmax	Incremental maximum concentration
IMP	Inosine monophosphate
pH	potential hydrogen
PPS	Per protocol set
RNA	Ribonucleic acid
SBDD	Structure based drug design
SD	Standard deviation
SE	Standard error
Tmax	Time-to-maximum
UV	Ultraviolet
XO	Xanthine oxidase

序論

高尿酸血症は、尿酸の溶解度に基づき血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超える状態と定義されている [1]。高尿酸血症が持続すると、体内の尿酸プールが増加し、関節や腎尿路系に尿酸ナトリウム結晶が析出する。白血球がその結晶を貪食し、炎症を惹起するサイトカインを分泌することにより痛風関節炎が発症する [2]。また、尿酸結晶は、尿路結石 [3] ならびに慢性間質性腎炎による腎不全 [4] などの重篤な合併症も引き起こす。高尿酸血症において、高血圧 [5,6] やメタボリックシンドローム [7,8] などの生活習慣病や脳・心血管イベント [9,10] などの臓器障害の合併症が高頻度に認められている。そのことから、高尿酸血症は、生活習慣病や臓器障害の予測因子または危険因子である可能性が考えられている。

プリン体とは、プリンヌクレオチド（プリン塩基+糖+リン酸）、プリンヌクレオシド（プリン塩基+糖）、プリン塩基の総称で、DNA の構成因子となるなど、生命活動に必要不可欠な物質の一つである。プリン体は、赤身肉、赤身魚、レバー類等、幅広い食品に含まれており [1]、日常生活で摂取する機会が非常に多い。プリン体を過剰に摂取することにより一過性に血清尿酸値が上昇し [11]、それが慢性的に繰り返されることで空腹時血清尿酸値が上昇することが知られている [12,13]。Emmerson らは、高プリン体食を制限することで、吸収されるプリン体量を減らし、試験参加者の高い血清尿酸値を低下させたことを報告している [14]。従って、プリン体の過剰摂取を避けることが望ましいが、プリン体はほとんどの食品に含まれていることから、過剰摂取を意識し過ぎると栄養の偏りをきたすリスクがあり、精神的な苦痛も少なくない。そこで、プリン体の過剰摂取に注意すべき人にとっては、食後のプリン体の吸収を抑制し血清尿酸値の上昇を抑制する食品、もしくは尿中からの尿酸の排泄を促進し血清尿酸値の上昇を抑制する食品は有用な選択肢になり得ると考える。

食事由来のプリン体は、腸管腔内においてプリンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、プリン塩基へ代謝されるが、プリンヌクレオチドの吸収性が低いため、大部分がプリンヌクレオシド、プリン塩基として腸管から吸収される [15-17]。このことから、プリンヌクレオチドからプリンヌクレオシドおよびプリン塩基への代謝を抑制する

と、プリン体摂取後の血清尿酸値の上昇を抑制できる可能性がある (Fig. 1-1.)。我々は豆乳を乳酸菌で発酵させた上清について検討を行っていたところ、このような活性を有することを見出した。

大豆はプリン体を多く含む植物であり [18]，摂取することで一過性に血清尿酸値が上昇するが [19]，疫学研究では，空腹時血清尿酸値が低値の人ほど大豆製品の摂取量が多く [20]，また，豆乳摂取の頻度と高尿酸血症の有病率に有意な逆相関が認められること [21] が報告されている。その理由として，大豆中にプリン体の吸収を抑制する成分や腎臓における尿酸排泄を促進する成分が含まれる可能性が考えられる [19, 22]。そこで，著者は，動物試験およびヒト試験にて豆乳を乳酸菌で発酵した上清の食後血中尿酸値に対する影響を検討し，その有効性を確認した。さらに，乳酸菌豆乳発酵上清に含まれる成分である糖，ミネラル，ペプチド，リン化合物等について，プリンヌクレオチド代謝阻害作用を検討し，その有効成分としてフィチン酸を同定した [23]。

フィチン酸は，myo-イノシトールの六リン酸エステルであるが (Fig. 1-1.) [24]，豆類や穀類などの植物組織に存在する主要なリンの貯蔵形態であり，食品中ではフィチン（フィチン酸のカルシウム・マグネシウム混合塩）の形で存在することが多い。強い抗酸化作用や金属キレート作用があり，日本において，酸味料，pH 調整剤などの食品添加物として認められている。フィチン酸は，いくらかの微量元素およびミネラルの吸収を抑制する可能性があることから抗栄養素として考えられているが，抗酸化作用 [25]，抗がん作用 [26] および尿路結石の形成抑制作用 [27] など健康に有益な効果を示すことが報告されている。

第 1 章では，*in vitro* 試験にてフィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用に対する濃度依存性を検討し，高尿酸血症動物モデルにてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。第 2 章では，健常成人を対象にフィチン酸を単回摂取させ，プリン体負荷後の血清尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。さらに，第 3 章では，無症候性高尿酸血症者を対象にフィチン酸を 2 週間継続摂取させ，空腹時血清尿酸値に及ぼす影響を検討した。

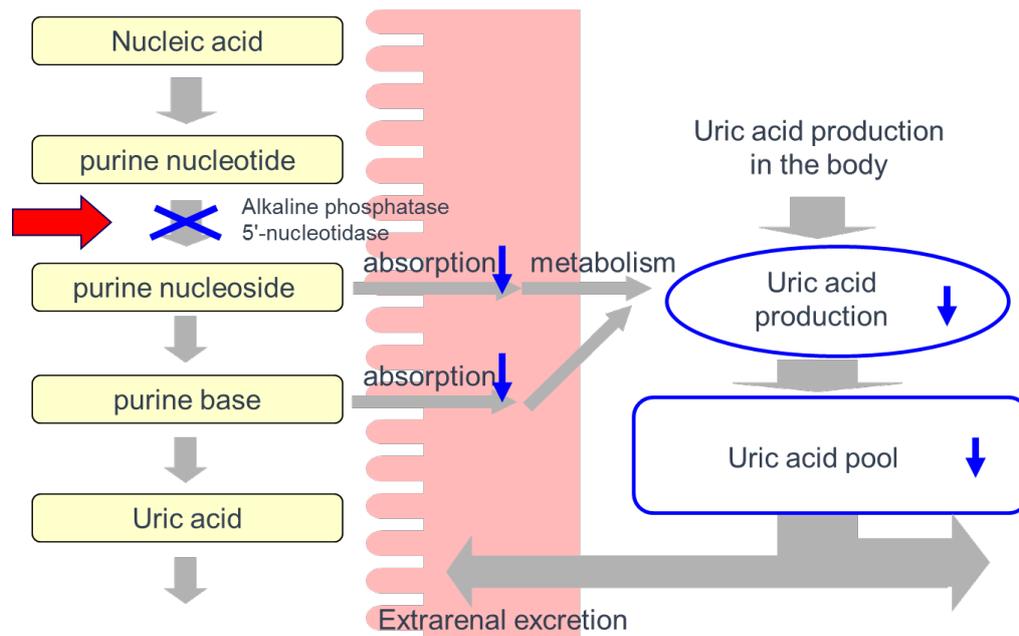


Fig. 1-1. Suppression of purine body absorption by inhibition of purine nucleotide metabolism

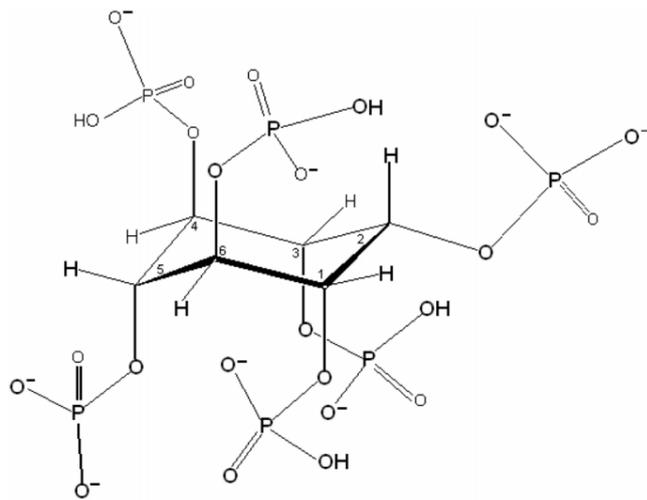


Fig. 1-2. The molecular structure of phytic acid at pH 6–7.

第1章

フィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害活性と高尿酸血症動物モデルにおける有効性に関する研究

第1節 要約

我々は、これまでに、乳酸菌豆乳発酵上清が、健常成人においてプリン体負荷後の血清尿酸値の上昇を抑制することを確認しており、その中からプリンヌクレオチド代謝阻害作用を持つ有効成分としてフィチン酸を見出している。本章では、*in vitro* 試験にてフィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用に対する濃度依存性を検討し、高尿酸血症動物モデルにてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。*In vitro* 試験は、基質として IMP、酵素としてラットの小腸粉末抽出物を用いそれらを反応させ、反応液に残存する IMP 濃度を測定することにより、フィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用を検討した。動物試験は、6週齢雄性の Wistar ラットにオキソ酸カリウムを腹腔投与した高尿酸血症動物モデルを用いた。プリンヌクレオチドおよびフィチン酸（低用量 30 mg/kg, 中用量 100 mg/kg, 高用量 300 mg/kg）を単回経口投与し、60分間の血漿尿酸濃度曲線下面積を評価した。フィチン酸は、*in vitro* 試験において濃度依存的にプリンヌクレオチド代謝阻害作用を示した。動物試験において、血漿尿酸値上昇曲線下面積（0-60分）は、対照群と比較して低用量群で差を認めなかったが、中用量群および高用量群で有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。フィチン酸は、高尿酸血症動物モデルにおいてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇を抑制した。フィチン酸は、ヒトにおいても食後の血清尿酸値の上昇を抑制する可能性が考えられた。

第2節 緒言

高尿酸血症は、痛風関節炎だけでなく、腎不全や尿路結石などの重篤な合併症のリスクを高める [3, 28-31]。さらには、高血圧 [5,6] やメタボリックシンドローム [7, 8] などの生活習慣病や脳・心血管イベント [9, 10] などの臓器障害の合併症のリス

クを高める可能性が考えられている。プリン体を多く含む食品である肉類や魚介類を多く摂取することにより、空腹時血清尿酸値が上昇し、痛風発症のリスクが高くなることが疫学研究より明らかになっている [12,13]。これらを予防するためには、プリン体を多く含む食事を制限することが望ましいが、それらを厳密に制限することはまず不可能に近い。そこで、プリン体の過剰摂取に注意すべき人にとっては、プリン体の吸収を抑制し、血清尿酸値の上昇を抑制する食品は有用な選択肢となることが考えられる。

我々は、これまでに、高尿酸血症モデルラットにおいて、ある食品成分がプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇を抑制することを見出している (data not shown)。さらに、その食品成分およびプリンヌクレオチドを高尿酸血症モデルラットの空腸結紮ループに注入した結果、プリンヌクレオチドは代謝されなかったことを確認している (data not shown)。食事由来のプリン体は、腸管腔内においてプリンヌクレオチド、プリンヌクレオシド、プリン塩基へ代謝され、吸収性が低いプリンヌクレオチドは吸収されずに、吸収性の良いプリンヌクレオシド、プリン塩基が腸管から吸収され、尿酸へと代謝されることが報告されている [15-17]。従って、ある食品成分で認めた食後血漿尿酸値の上昇抑制作用は、プリンヌクレオチド代謝阻害作用によるものであると考えた。

疫学研究において、豆乳摂取の頻度と高尿酸血症の有病率との間の負の相関が報告されている [21]。そこで、プリンヌクレオチド代謝阻害作用を持つ食品素材の候補として豆乳を乳酸菌で発酵させたものを考えた。我々は、これまでに、乳酸菌豆乳発酵上清にプリンヌクレオチド代謝阻害作用を確認し、健康成人においてプリン体負荷後の血清尿酸値の上昇を抑制することを確認した。さらに、*in vitro* 試験の結果から、乳酸菌豆乳発酵上清の中からプリンヌクレオチド代謝阻害作用を示す主な有効成分としてフィチン酸を同定した [23]。しかしながら、これまでにフィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用の詳細な検討は実施されておらず、また、動物における有効性も明らかにされていない。

本章では、*in vitro* 試験にてフィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用に対する濃度依存性を検討し、高尿酸血症動物モデルにてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上

昇に及ぼす影響を検討した。

第3節 方法

第1項 *In vitro* 試験

1. プリンヌクレオチド代謝阻害活性の測定

ラット腸アセトンパウダー (Sigma-Aldrich) をアッセイバッファー (0.01 M MgCl₂, 0.1 M Tris-maleate, pH6.8) で 100 mg/mL に調製したものを酵素液とした。inosine monophosphate (IMP) (Sigma-Aldrich) をアッセイバッファーで 9 mM に調製したものを基質液とした。検体液 (30 µL/well) , 基質液 (30 µL/well) および酵素液 (30 µL/well) を 96-Well UltraPlate (Sorenson BioScience) に添加し, 37°C, 30 分間の酵素を反応させた。反応液を 20 µL 分取し, マルチスクリーン HTS HV (Merck Millipore) に移し, 停止液 (0.33 M HClO₄, 180 µl/well) を添加し, 反応を停止させた。遠心分離し (1,080 × g, 10 分間, 室温) , ろ液を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の試料とした。HPLC の分析条件を下記に示した。

検出器 : SPD-20A (株島津製作所)

カラム : COSMOSIL C18-PAQ (4.6 mm I.D. × 150 mm, ナカライテスク株)

移動相 : 50 mM KH₂PO₄ (pH7.5)

流速 : 1.0 mL/min, 検出波長 : 254 nm, カラム温度 : 35 °C

試料注入量 : 10 µL

2. データ処理

各検体の阻害率は, 各検体液および対照液 (アッセイバッファー) を酵素反応させた後の IMP 濃度および酵素反応させない対照液の IMP 濃度から算出した。4-parameter logistic 回帰モデルを用いて IC₅₀ 値を推定した。統計解析は, SAS ソフトウェア (R9.4 SAS institute Japan) を用いた。

第2項 動物試験

1. 使用動物

6週齢雄性の Wistar (CrIj:WI) ラット (日本チャールス・リバー株) を購入し、 23 ± 2 °C、湿度 50 ± 10 %に維持された飼育室で6日間の馴化飼育を行った。馴化期間中は、市販固形飼料 (MF, オリエンタル酵母工業株) および水道水を自由に摂取させた。

2. 実験プロトコール

本研究は大塚製薬株動物実験指針に基づき、大塚製薬株ニュートラシューティカルズ事業部動物実験委員会の承認を受け実施された。

岡本らの方法 [32] に準じて、オキソ酸を腹腔投与した高尿酸血症モデルにプリン体を単回投与した実験系にて評価した。負荷するプリン体として 5'-イノシン酸ナトリウムと 5'-グアニル酸ナトリウムを等量含む市販調味料を用いた。

対照群 (n=10) , 低用量群 (n=10) , 中用量群 (n=10) , 高用量群 (n=10) で実施した。低用量はフィチン酸を 30 mg/kg, 中用量は 100 mg/kg, 高用量は 300 mg/kg となるように 2.0 mL の蒸留水に溶解し、ゾンデを用いて経口投与した。

3. 血漿尿酸値測定

ヘパリン処理した毛細管を用いて尾静脈から採血後、遠心分離し ($15,000 \times g$, 5分間, 室温) , 血漿を得た。被験物投与前, 投与後 30分, 60分の血漿を HPLC-UV法 [33] で分析し, 血漿尿酸値を得た。

4. 統計解析

対照群と各フィチン酸用量群を Williams 検定にて比較した。片側検定を行い, 有意水準は 2.5%とした。解析には SAS ソフトウェア (R9.3 SAS institute Japan) を用いた。

第4節 結果

第1項 *In vitro* 試験

フィチン酸のラット腸抽出物におけるプリンヌクレオチド代謝に対する阻害活性を検討した。フィチン酸 0.28~36.4 mM における結果を Fig. 1-3.に示した。フィチン酸は、濃度依存にプリンヌクレオチドの代謝を阻害し、50%阻害濃度 (IC₅₀) は 10.6 mM であった。

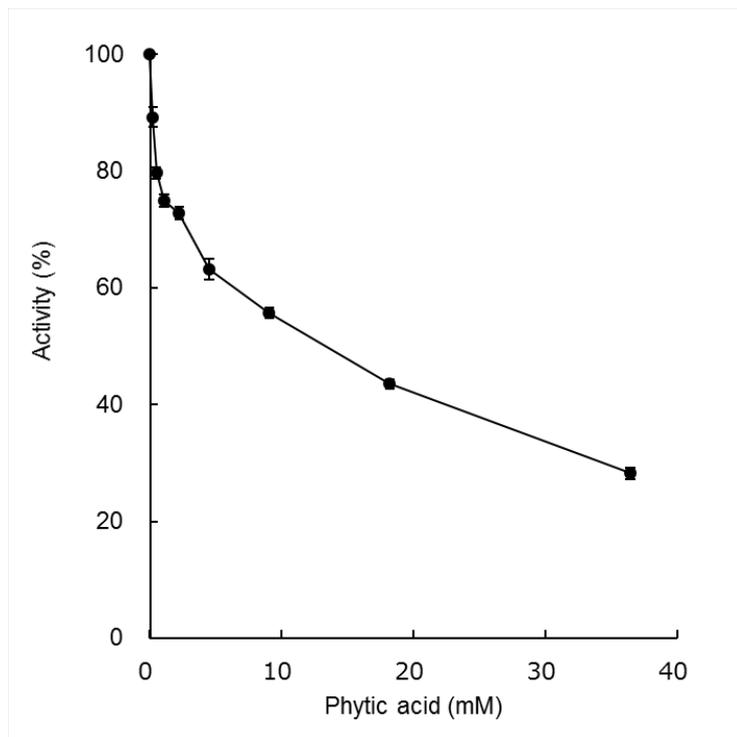


Fig. 1-3. Effect of increasing concentrations of phytic acid on the rate of reaction of purine nucleotide metabolism in intestinal extract. The results are expressed as mean \pm SE of three experiments.

第2項 動物試験

フィチン酸の動物における有効性およびその用量依存性を検討した。血漿尿酸値 iAUC (0-60 分) の結果を Fig. 1-4. に示した。血漿尿酸値 iAUC (0-60 分) は、対照群 (140±11 mg・min/dL) と低用量群 (153±8 mg・min/dL) の間に差を認めなかったが、中用量群 (110±7 mg・min/dL) および高用量群 (84±6 mg・min/dL) は対照群と比較して有意に低値を示した (中用量群 $P < 0.025$, 高用量群 $P < 0.005$) 。

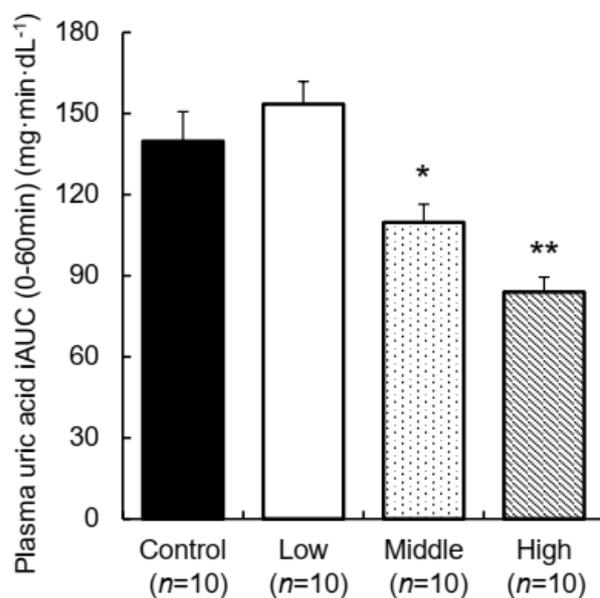


Fig. 1-4. Mean ± SE of the postprandial incremental area under the plasma uric acid response curve (iAUC) following oral administration of distilled water (control) and phytic acid (low dose 30 mg/kg, middle dose 100 mg/kg, high dose 300 mg/kg) over a period of 60 min.

* Control and phytic acid (middle dose) , $P < 0.025$.

** Control and phytic acid (high dose) , $P < 0.005$.

第5節 考察

フィチン酸のプリンヌクレオチド代謝阻害作用を *in vitro* 試験にて検討し、さらに、高尿酸血症動物モデルにて食後血漿尿酸値に及ぼす影響を検討した。その結果、フィチン酸は *in vitro* 試験において濃度依存的にプリンヌクレオチド代謝を阻害し、また、動物試験において用量依存的に血漿尿酸値の上昇を抑制した (Fig. 1-4.)。本章の結果は、従来の尿酸代謝改善薬と異なるプリンヌクレオチド代謝阻害という新たな作用機序に着目して、動物試験において血漿尿酸値改善作用を認めたはじめての報告である。

フィチン酸の食後血漿尿酸値上昇抑制の作用機序として、1) 尿酸合成抑制、2) 尿中尿酸排泄促進、あるいは3) プリン体吸収阻害が可能性として考えられる。フィチン酸は尿酸合成酵素であるキサンチンオキシダーゼ (XO) を阻害するが [34]、その作用 ($IC_{50} = 30 \text{ mM}$) は、痛風の治療薬であるアロプリノール ($IC_{50} = 5.9 \text{ }\mu\text{M}$) に比べ著しく低いことが報告されている [35]。さらに、臨床試験においてフィチン酸ナトリウム 1,400 mg (約フィチン酸 1,000 mg に相当) を単回摂取しても、血漿フィチン酸濃度はほとんど上昇しないことが報告されている [36]。尿酸合成抑制の主な作用部位は肝臓であるが、フィチン酸は XO 阻害活性が著しく低く、ほとんど吸収されないことから、フィチン酸の作用機序が尿酸合成抑制である可能性は低いことが考えられる。同様に、尿中尿酸排泄促進の作用部位は腎臓であることから、ほとんど吸収されないフィチン酸の作用機序が尿中尿酸排泄促進である可能性は低いことが考えられる。フィチン酸の最も可能性のある作用機序として、プリンヌクレオチド代謝の阻害によるプリン体吸収の阻害が考えられる。食品中の核タンパク質は、プロテアーゼによって腸管内で核酸となり、さらに腭ヌクレアーゼによって遊離ヌクレオチドとなる [37]。次に、遊離ヌクレオチドは、アルカリホスファターゼあるいはヌクレオチダーゼによってヌクレオシドに加水分解され、さらにヌクレオシダーゼによってプリンおよびピリミジン塩基に加水分解される [37]。動物試験では、吸収される主要な形態がプリンヌクレオシドであることが示唆されており [16, 38]、プリンヌクレオシドとその塩基の 90%以上が腸細胞に吸収されることが示唆されている [39, 40]。吸収されたヌクレオシドとその塩基のほとんどは速やかに代謝され尿酸と

なる [39, 40]。従って、著者は、腸管においてプリンヌクレオチド代謝を阻害し、プリンヌクレオシドとその塩基の吸収を抑えることで、食後血清尿酸値の上昇を抑制するという作業仮説を立てた。濃縮型ヌクレオシド輸送体 2 (CNT2) は、腸細胞の頂端膜で発現し、プリンヌクレオシドの吸収に寄与する主要な輸送体であるが [41, 42]、CNT2 阻害剤は、オマキザルにおいて食餌性 RNA により誘発される高尿酸血症を抑え、尿中尿酸排泄の増加を抑えたことが報告されている [43]。この結果は、プリンヌクレオシドとその塩基の吸収を阻害することで、食後の血清尿酸値の上昇を抑制するという作業仮説を裏付けている。フィチン酸は *in vitro* 試験においてプリンヌクレオチドからプリンヌクレオシドへの代謝を阻害することから、フィチン酸は腸管内のプリンヌクレオシドとそのプリン塩基の量を減らし、それらの吸収を抑制することが示唆される。従って、本章の実験からフィチン酸の有効性は、プリンヌクレオチド代謝を阻害することによるプリンヌクレオシドおよびその塩基の吸収を抑制することにより発揮されると考えられる。

プリンヌクレオチドを代謝する酵素は、プリンヌクレオチドやプリン塩基の吸収部位である小腸上部に多く分布しており、主にアルカリホスファターゼおよび 5'-ヌクレオチダーゼであることが報告されている [44-48]。本章で用いたラット腸により、プリンヌクレオチドは代謝されるが、その代謝にはアルカリホスファターゼおよび 5'-ヌクレオチダーゼが関与すると考えられる。フィチン酸は、本章において濃度依存的にプリンヌクレオチド代謝を阻害した結果を得たことから、フィチン酸はこれらの酵素を阻害したと考えられる。これらの酵素は 2 価の金属が活性部位に存在し、基質との相互作用に関与している [49,50]。フィチン酸は強い金属キレート作用があり [51]、濃度依存的にアルカリホスファターゼの活性を阻害する [52]。これらの 2 価の金属とキレートを形成することにより、酵素阻害作用を発揮していることが示唆された。この作用機序をターゲットとし、血清尿酸値を改善することは、食品だけでなく、医薬品の創成にも有用であると考えられる。今後、ITC, BIAcore などを用いて、フィチン酸、基質、プリンヌクレオチド関連代謝酵素相互作用のパラメーターの解析を行い、物理化学的な分子論的な相互作用を解析すること、3 者複合体を結晶化後で X 線結晶解析を行い、複合体解析の結果を得ることで、構造を基盤とした創薬 (SBDD)

に展開できると考えられる。

本章において、フィチン酸は、*in vitro* 試験において濃度依存的にプリンヌクレオチド代謝阻害作用を示した。さらに、高尿酸血症動物モデルにおいて用量依存的にプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇を抑制した。フィチン酸は、ヒトにおいても食後の血清尿酸値の上昇を抑制する可能性が考えられた。

第 2 章

健康成人におけるフィチン酸の食後血清尿酸値に対する有効性に関する研究

第1節 要約

第 1 章において、フィチン酸が高尿酸血症動物モデルにおいてプリン体投与後の血漿尿酸値の上昇を抑制することを確認した。しかしながら、ヒトにおける有効性は確認されていない。そこで、健康成人を対象にフィチン酸を単回摂取させ、プリン体負荷に伴う食後の血清尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。血清尿酸値が 7.0 mg/dL 未満の健康成人 48 名を対象に、無作為化二重盲検クロスオーバー比較試験を実施した。被験者は、プリン体を多く含む食事と一緒に対照飲料およびフィチン酸飲料（フィチン酸を 600 mg 含む）を摂取し、360 分間の血清尿酸値および尿中尿酸値を測定した。PPS 解析において、血清尿酸値上昇曲線下面積（0-360 分）は、対照飲料摂取期と比較してフィチン酸飲料摂取期で有意に低値を示し（ $P < 0.05$ ），また、累積尿中尿酸排泄量（0-360 分）は、低下を示す傾向があった（ $P < 0.10$ ）。本章の結果から、フィチン酸は、健康者において食後の血清尿酸値の上昇を抑制することが明らかとなった。フィチン酸は、健康者において食後の血清尿酸値の管理に役立つことが考えられる。

第2節 緒言

空腹時血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超えると、痛風関節炎だけでなく、腎不全や尿路結石などの重篤な合併症のリスクが高くなる [3, 28-31]。これらの病気を予防するためには、空腹時血清尿酸値を 7.0 mg/dL 未満に維持することが必要である。プリン体を多く含む食事を摂取することで、食後の血清尿酸値が上昇し、それを繰り返すことで空腹時血清尿酸値が上昇する [12, 13]。従って、空腹時血清尿酸値の上昇を抑制するためには、プリン体を多く含む食事を摂取した後の血清尿酸値の上昇を日常から抑える必要がある。そこで、第 1 章では、血清尿酸値を改善する候補成分であるフィチン酸について *in vitro* 試験において濃度依存的なプリンヌクレオチド代謝阻害作

用を確認し、さらに動物試験においてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇抑制作用を確認した。しかしながら、これまでヒトにおいてその有効性を確認していない。

医薬品や食品の薬理作用を評価する動物試験においては、供試動物としてラット、マウス等のげっ歯類が汎用されている [53, 54]。ヒトにおいて尿酸分解酵素が存在しないが、これらのげっ歯類には、尿酸分解酵素が存在し、両者において尿酸体内動態は大きく異なる。げっ歯類を用いて医薬品の薬理作用を評価する試験においては、ヒトにおける尿酸体内動態を考慮し、尿酸分解酵素を阻害するオキソ酸を投与する [54]。著者もこの動物モデルを用いてフィチン酸の有効性を確認したが [23]、動物モデルの結果をヒトへ外挿することに限界があるため、ヒトで有効性を確認する必要がある。

そこで本章では、健常成人を対象にフィチン酸を単回摂取させ、プリン体負荷に伴う食後の血清尿酸値の一過性の上昇に及ぼす影響を検討した。

第3節 方法

1. 被験者

事前検診において空腹時血清尿酸値が 7.0 mg/dL 未満の 20 歳以上 65 歳未満の男性および閉経後の女性（男性 24 名、女性 24 名、合計 48 名）を対象とした。ただし、痛風罹患あるいはその既往歴がある者、血清クレアチニン濃度が男性 1.3 mg/dL 以上、女性 1.0 mg/dL 以上の者、body mass index（BMI）が 30 kg/m² 以上の者、薬物および食物アレルギーのある者、重篤な既往のある者、アルコール多飲者および過度の喫煙者、試験に影響する可能性のある医薬品、特定保健用食品、健康食品等を常用している者、その他試験責任医師により本研究参加に不適切と判断された者は除外した。

割付け担当者は、スクリーニング時の年齢、性別、身長、体重、BMI、血清尿酸値上昇曲線下面積（iAUC）（0～360 分）、△最高血清尿酸値（iC_{max}）、最高血清尿酸値（C_{max}）、最高血清尿酸値到達時間（T_{max}）、累積尿中尿酸排泄量（0～360 分）、空腹時血清尿酸値、空腹時血糖値および空腹時中性脂肪値を指標とした

層別無作為化法により，24名ずつ A，B の 2 グループに分け，試験は，クロスオーバーデザインで実施した。

博多クリニック臨床試験審査委員会の承認を受け，「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にのっとり，本研究に参加を希望した者に対して試験内容，方法などについて十分な説明を行い，文書による同意を得て試験を実施した。

2. 試験飲料

フィチン酸 600 mg（築野食品工業㈱）を含む 50 mL の飲料をフィチン酸飲料とし，ミネラルウォーター 50 mL を対照飲料とした。フィチン酸の摂取量は，臨床試験で有効性を認めている乳酸菌豆乳発酵上清 300 mL に相当するプリンヌクレオチド代謝阻害活性から算出した [23]。

3. 試験方法

試験飲料の味の調整が困難であったため，プラセボを使用しなかったが，試験の盲検性を確保するために，試験食品割付け担当者以外の試験にかかわった全ての者は，割付け情報が分からないようにした無作為化二重盲検クロスオーバー比較試験にて実施した。事前検診，スクリーニング 1，スクリーニング 2，試験飲料摂取 1，試験飲料摂取 2，事後検診を検査日とし，休止期間を 1 週間とした。なお，被験者に対して，試験期間を通して，生活習慣（食生活，運動量など）を試験参加前の生活から大きく変化させないように指導した。プリン体負荷試験を行うスクリーニング試験および試験飲料摂取試験の実施日の 3 日前から前日までプリン体を多く含む食事の摂取，乳酸菌・ビフィズス菌・納豆菌などの生菌類，オリゴ糖・食物繊維を強化した食品，お腹の調子に影響を与える健康食品類・血糖値に影響を与える食品（特定保健用食品を含む），アルコール飲料を摂取しないように指示した。検査日前日には，規定食および水のみを摂取させた。検査前日 21：00 以降は絶食，禁煙とした。被験者にはスクリーニング 3 日前から事後検診までの期間，毎日被験者日誌および食事日誌を記入するように指示した。

被験者は、一夜絶食後 9:00 に試験飲料、プリン体負荷食（米飯 200 g, マグロ赤身約 196 g（プリンヌクレオチド相当量として 800 mg）, 濃口醤油 5 g）およびプリン体飲料（5'-イノシン酸ナトリウムと 5'-グアニル酸ナトリウムを等量含む市販調味料 0.5 g をミネラルウォーター 150 mL に溶解させたもの）を同時に、原則として 20 分以内に摂取した。10:00, 11:00, 13:00 にミネラルウォーター 100 mL を摂取し、試験飲料摂取前、摂取 30, 60, 120, 240, 360 分後に採血および採尿を行った。血液検査項目および尿検査項目は、それぞれ血清尿酸値（mg/dL）, 尿中尿酸値（mg/dL）とし、(株)エスアールエルにおいて測定した。

4. 評価項目

1) 有効性評価項目

主要評価項目を血清尿酸値 iAUC（0~360 分）, 副次評価項目を iCmax, 各採血時点の△血清尿酸値, 累積尿中尿酸排泄量（0~360 分）とした。

2) 安全性評価項目

理学的検査, 一般臨床検査（血液学的検査, 血液生化学検査, 尿検査）とした。試験責任医師は自他覚症状に基づき有害事象を評価した。

5. 統計解析

試験飲料摂取前の空腹時血清尿酸値を共変量としたクロスオーバーデザインを考慮した分散分析（要因として、試験飲料, 時期, 群および被験者）を行い、その誤差分散を用いて、対照飲料とフィチン酸飲料間の差について *t* 検定を行った。また、経時データの評価は、経時データの解析（混合モデルによる解析）を行った。両側検定を行い、有意水準は 5%とした。解析には SAS ソフトウェア（R9.3 SAS institute Japan）を用いた。解析は、試験食品を一度でも摂取した被験者を対象とする FAS（full analysis set）とプロトコールに適合しない被験者を除外した PPS（per protocol set）の双方を行ったが、主要評価解析は PPS 解析とした。

例数設計は、健康成人男性におけるフィチン酸含有食品（フィチン酸として 600 mg/serving）の単回摂取が食後血清尿酸値に及ぼす影響の検討した試験の結果に基

づいて行った（data not shown）。想定される血清尿酸値 iAUC（0～360分）の差を $35.4 \text{ mg} \cdot \text{min/dL}$ 、標準偏差を 65.1 とし、また、脱落が 15% 生じることを想定し、検出力 90%、相関係数 0.5、有意水準 0.05 を満たす例数を対応のある t 検定（両側）で算出した結果、48 例であった。

第4節 結果

被験者の組入れから解析までのフローを Fig. 2-1. に示した。188 名を対象に事前検診を実施し、選択基準に合致しない者 9 名、除外基準に抵触した者 18 名、参加を辞退した者 22 名、それ以外の理由で不参加となった被験者 16 名を除外した。事前検診で選抜された 123 名を対象に 1 次スクリーニングを実施した。1 次スクリーニングで除外基準に抵触した者 4 名、参加を辞退した者 15 名、血液検査で異常値を示した者 2 名、空腹時血清値に関連する指標の変動が大きい者 1 名、試験継続困難者 1 名を除外した。さらに、1 次スクリーニングで選抜された 100 名を対象に 2 次スクリーニングを実施した。2 次スクリーニングで除外基準に抵触した者 4 名、参加を辞退した者 3 名、血液検査で異常値を示した者 14 名、空腹時血清値に関連する指標の変動が大きい者 13 名、試験継続困難者 6 名、それ以外の理由で不参加となった被験者 12 名を除いた 48 名で割付けを行った。フィチン酸飲料摂取期にフィチン酸飲料を摂取する前に体調不良で参加を辞退した者が 1 名生じた。FAS 解析は割付けを行った全 48 名を対象としたが、PPS 解析においては、参加を辞退した者 1 名および医学専門家により解析対象として不適切と判断された 13 名（血清尿酸値が大きく変動した者 7 名、血糖値が大きく変動した者 3 名、推算糸球体濾過量が $60 \text{ ml/min/1.73m}^3$ 未満の者 3 名）を除く 34 名とした。解析対象者の背景因子を Table 2-1. に示した。

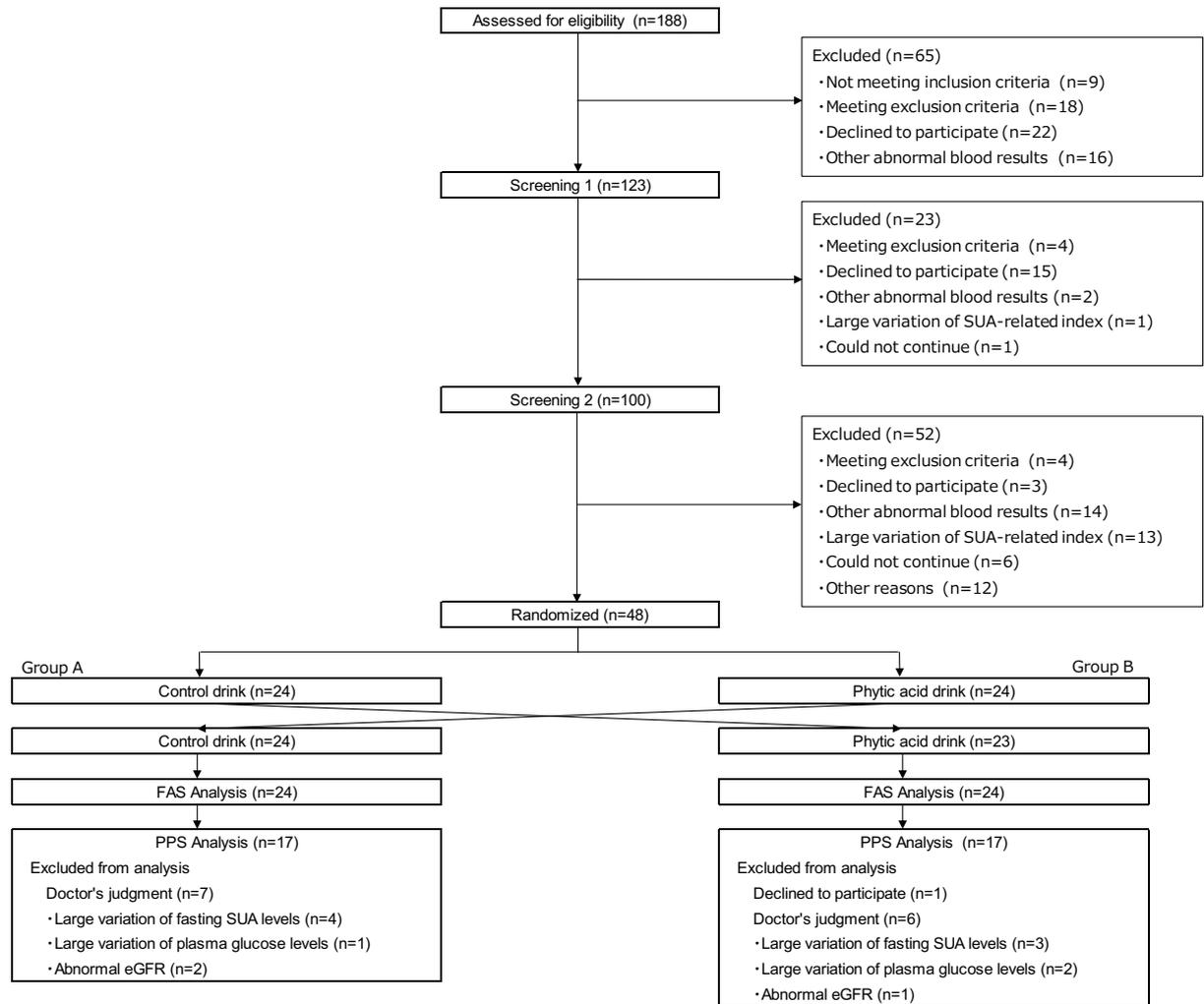


Fig. 2-1. Flow diagram of enrolment, random assignment, withdrawals and follow-up of study subjects

Table 2-1. Background characteristics of subjects (Per protocol set)

Number	Male (n = 16)	Female (n = 18)	All (n = 34)
Age (years)	38.3 ± 13.4	57.1 ± 4.9	48.3 ± 13.6
Height (cm)	171.1 ± 8.5	154.9 ± 4.0	162.5 ± 10.5
Weight (kg)	63.0 ± 6.5	52.1 ± 6.7	57.3 ± 8.6
BMI (kg/m ²)	21.6 ± 2.5	21.6 ± 2.1	21.6 ± 2.2
Serum uric acid (mg/dL)	5.5 ± 0.6	4.5 ± 1.0	5.0 ± 1.0
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	92.9 ± 13.4	80.6 ± 11.0	86.4 ± 13.5

eGFR, estimated glomerular filtration rate

Values are mean ± SD

1 有効性

プリン体負荷後の血清尿酸値の応答（血清尿酸値 iAUC）は、試験食品摂取前の空腹時血清尿酸値と関連性があったため、試験食摂取前の空腹時血清尿酸値を共変量とした共分散分析を実施した。対照飲料およびフィチン酸飲料を摂取した際の血清尿酸値の経時変化、血清尿酸値 iAUC および iCmax の結果を Fig. 2-2., Fig. 2-3. および Fig. 2-4. に示した。対照飲料、フィチン酸飲料を摂取した際の△血清尿酸値は、いずれの飲料も摂取後に上昇し、120 分でピークを示し、その後低下した。△血清尿酸値は、PPS 解析において対照飲料と比較してフィチン酸飲料で有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。血清尿酸値 iAUC は、対照飲料（PPS 解析 $536 \pm 15 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{dL}^{-1}$; FAS 解析 $518 \pm 16 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{dL}^{-1}$ ）と比較してフィチン飲料（PPS 解析 $522 \pm 15 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{dL}^{-1}$; FAS 解析 $509 \pm 14 \text{ mg} \cdot \text{min} \cdot \text{dL}^{-1}$ ）で有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。iCmax は、対照飲料（PPS 解析 $1.85 \pm 0.05 \text{ mg/dL}$; FAS 解析 $1.79 \pm 0.05 \text{ mg/dL}$ ）と比較してフィチン飲料（PPS 解析 $1.78 \pm 0.04 \text{ mg/dL}$; FAS 解析 $1.75 \pm 0.04 \text{ mg/dL}$ ）で有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。

累積尿中尿酸排泄量（0～360 分）の結果を Fig. 2-5. に示した。累積尿中尿酸排泄量（0～360 分）は、PPS 解析において対照飲料（ $325 \pm 11 \text{ mg}$ ）と比較してフィチン酸飲料（ $313 \pm 12 \text{ mg}$ ）で有意に低値を示し（ $P < 0.05$ ），FAS 解析において対照飲料（ $327 \pm 10 \text{ mg}$ ）と比較してフィチン酸飲料（ $305 \pm 11 \text{ mg}$ ）で低値を示す傾向があった（ $P < 0.10$ ）。

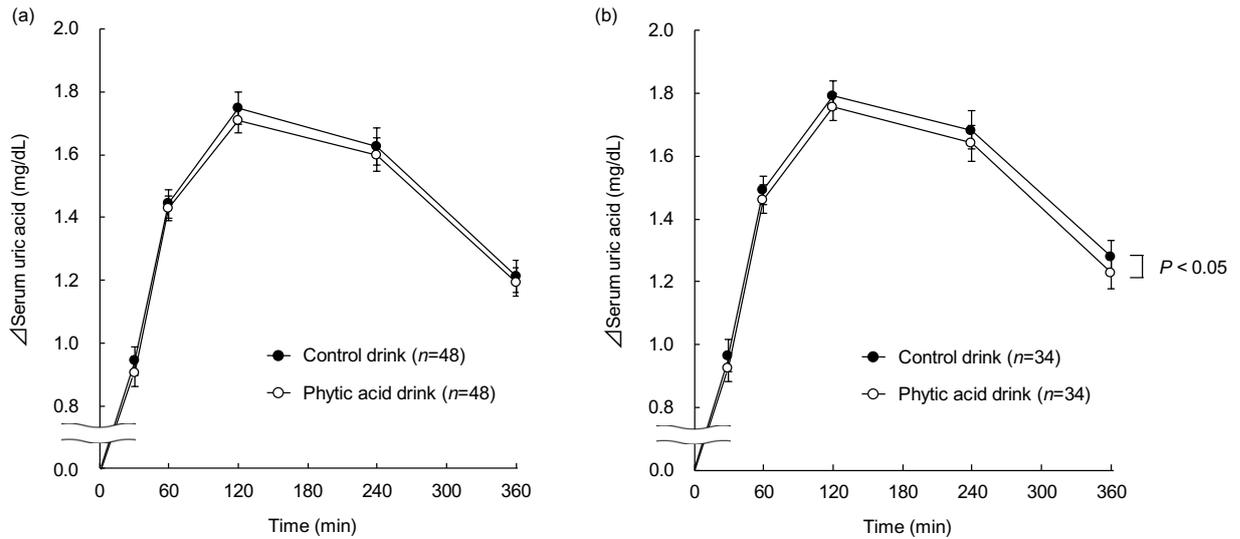


Fig. 2-2. Mean \pm SE incremental serum uric acid levels from baseline following consumption of control drink and phytic acid drink over a period of 360 min.

(a) Full analysis set. (b) Per protocol set.

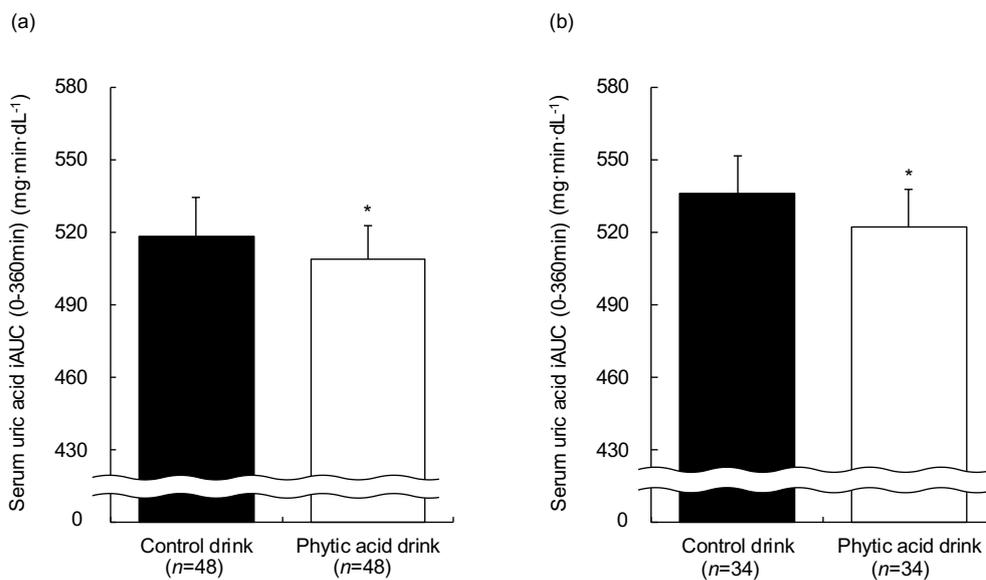


Fig. 2-3. Mean \pm SE of the postprandial incremental area under the serum uric acid response curve (iAUC) following consumption of control drink and phytic acid drink over a period of 360 min. (a) Full analysis set. (b) Per protocol set.

* Significant difference was observed between control drink and phytic acid drink, $P < 0.05$.

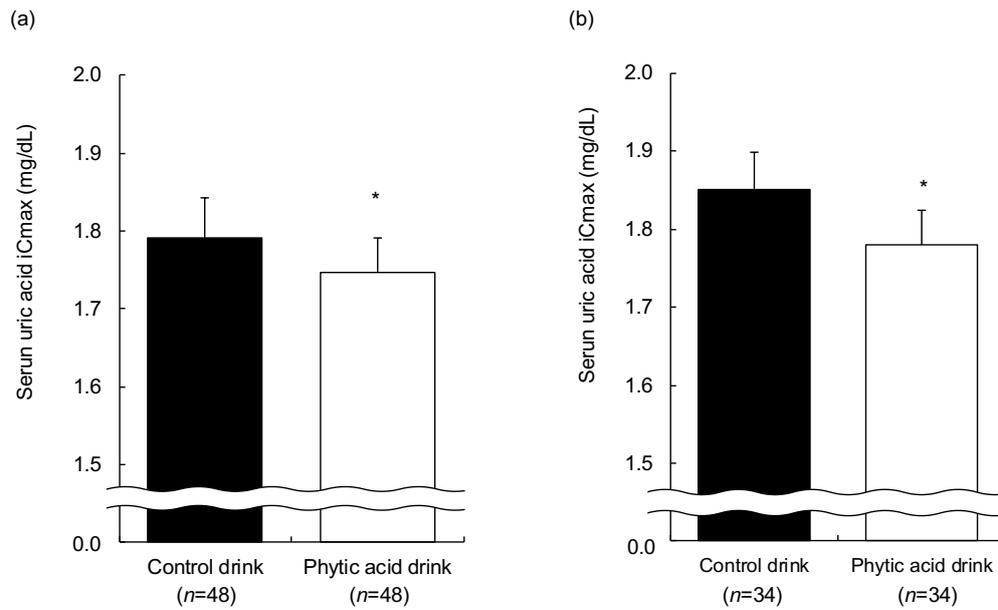


Fig. 2-4. Mean \pm SE of the postprandial incremental maximum serum uric acid concentration (iCmax) following consumption of control drink and phytic acid drink over a period of 360 min. (a) Full analysis set. (b) Per protocol set.

* Significant difference was observed between control drink and phytic acid drink, $P < 0.05$.

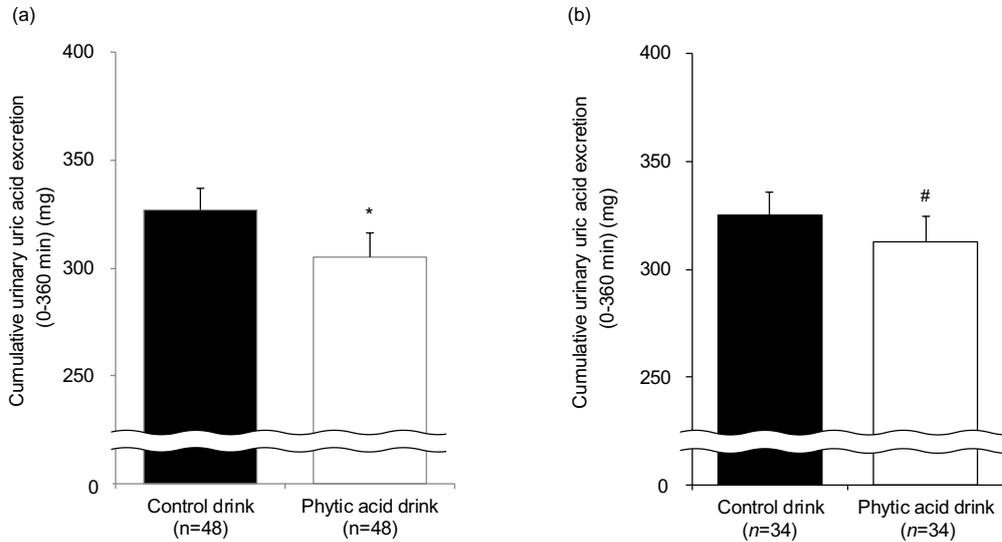


Fig. 2-5. Mean \pm SE of the postprandial cumulative urinary uric acid excretion following consumption of control drink and phytic acid drink over a period of 360 min. (a) Full analysis set. (b) Per protocol set.

* Significant difference was observed between control drink and phytic acid drink, $P < 0.05$.

Trend for a difference was observed between control drink and phytic acid drink, $P < 0.10$.

2 安全性

試験責任医師は、試験期間中に発症した有害事象を被験食品と関連性がないと判定した。また、臨床上問題となる所見も認めなかった。

第5節 考察

健常成人におけるフィチン酸の食後血清尿酸値の上昇に及ぼす影響を、無作為化二重盲検クロスオーバー比較試験にて検討した。その結果、対照飲料と比較してフィチン酸飲料は食後の血清尿酸値の上昇を有意に抑制した。

高尿酸血症やそれに関連する疾病を予防するためには、食後の血清尿酸値を抑制する食品成分が有用であることが考えられる。しかしながら、食品成分が健常者の食後の血清尿酸値の上昇を抑えたという報告はほとんどない。Ueda ら [55] は、空腹時血清尿酸値が 5.5 mg/dL から 8.0 mg/dL の被験者を対象に菊花ポリフェノールを摂取させた結果、7.1 mg/dL 以上の被験者を対象とした層別解析において、血清尿酸値 AUC (0~240 分) は対照群と比較して低値を示す傾向 ($P < 0.10$) があつたことを報告している。しかしながら、5.5 mg/dL から 7.1 mg/dL 未満の血清尿酸値が正常域にある被験者を含めた全被験者を対象とした解析においては、有意差あるいは傾向差を認めていない。その理由として、菊花ポリフェノールのメカニズムがキサンチンオキシダーゼ阻害作用および尿酸排泄促進作用であることが考えられる [56]。正常な空腹時血清尿酸値の被験者においては、尿酸合成や尿中尿酸排泄能は正常であり、介入によって是正する変化幅が少ないことが想定される。

本章の結果は、血清尿酸値が正常域にある健常者に対しても、食品由来の単一成分が食後の血清尿酸値の上昇を抑制する効果を示しえることを報告するはじめてのものである。また、フィチン酸に尿中尿酸排泄促進作用は確認されていないことから、フィチン酸の効果は、尿中尿酸排泄を促進したことによるものではなく、食事により摂取されたプリンヌクレオチドが、消化管内において吸収性の高いプリンヌクレオチドおよびプリン塩基へ代謝されることを阻害し、プリン体の吸収を抑制したことによるものであることが示唆される。菊花ポリフェノールと異なり、フィチン酸が 7.0

mg/dL 未満の被験者において有効性を示したのは、作用機序の違いによる可能性が考えられる。

本研究を実施する上ではいくつかの制限がある。まず、フィチン酸に独特の味があり、プラセボ飲料の調製が困難であったため、ミネラルウォーターを対照飲料として使用したことである。ただし、本研究は、ICH の基準に準じて盲検性を維持している。また、本研究の主要評価項目は、血清尿酸値という客観的な評価である。さらに、この血清尿酸値を客観的に評価できるようにするために、フィチン酸飲料と対照飲料を摂取する前日から摂取するまでの水の摂取量を同一とし、また、食事の種類およびその量を同一とし、さらに運動を厳密に管理し、なるべく同一条件を確保するようにした。従って、フィチン酸飲料と対照飲料の味の違いが試験結果に影響した可能性は低く、フィチン酸が食後の血清尿酸値を改善したと考えている。PPS 解析において、試験結果に影響を与える可能性のある被験者を除外したが、そのことで結果にバイアスがかかる可能性は残っている。しかしながら、FAS 解析も PPS 解析と同様な結果を得ることができ、結果に整合性があったことや PPS 解析において被験者を除外したことから、この可能性を排除できたと考えている。第二に、本研究におけるフィチン酸飲料の効果は有意であったが、その効果はわずかであった。食後血清尿酸値に対する効果は、対象者の健康状態によって異なることが考えられる。例えば、腎機能が低下し尿酸が蓄積し易い被験者においては、効果が高くなると考えられる。今後、様々な状態の被験者において、フィチン酸の食後血清尿酸値に及ぼす影響を検討することも必要と考えている。さらに、フィチン酸を継続摂取させた試験において、高尿酸血症やそれ関連した疾病との関連性が明らかとなっている空腹時血清尿酸値の評価も行っていきたい。

本章では、フィチン酸は、食後の血清尿酸値の上昇を抑制することが分かった。フィチン酸飲料は、食後の血清尿酸値の上昇を制御することで、高尿酸血症の予防に役立つ可能性が考えられる。

第3章

無症候性高尿酸血症者におけるフィチン酸の空腹時血清尿酸値に対する有効性に関する研究

第1節 要約

第2章において、フィチン酸の単回摂取は、血清尿酸値が7.0 mg/dL未満の健常者において食後の血清尿酸値の上昇を抑制することが明らかとなった。しかしながら、フィチン酸の継続摂取が、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで、高尿酸血症者を対象に、フィチン酸を継続摂取させ、空腹時血清尿酸値に及ぼす影響を検討した。血清尿酸値が7.0 mg/dLを超え、9.0 mg/dL以下の痛風発作、痛風結節、腎障害などの臨床症状のない無症候性高尿酸血症者31名を対象に、無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験を実施した。被験者は、プラセボ飲料またはフィチン酸飲料（フィチン酸を600 mg含む）を1日2回2週間継続摂取した。なお、休止期間は2週間とした。主要評価項目は空腹時血清尿酸値、副次評価項目は尿中尿酸/クレアチニン比とした。空腹時血清尿酸値は、プラセボ飲料摂取期と比較してフィチン酸飲料摂取期で有意に低値を示した（ $P < 0.05$ ）。尿中尿酸/クレアチニン比は、各摂取期の間で差を認めなかった。本章の結果から、フィチン酸600 mgを1日2回2週間摂取することで、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値を改善することが明らかとなった。

第2節 緒言

高尿酸血症者は、健常者に比べてプリン体負荷後の血清尿酸値が上昇し易く [11]、空腹時血清尿酸値に対する影響が大きいと考えられる。また、空腹時血清尿酸値が7.0 mg/dLを超えるに従い、痛風関節炎や腎不全などの病気のリスクが高くなるため、高尿酸血症者は健常者よりもさらに食後の血清尿酸値に注意を払わなければならない。フィチン酸は、健常者ではあるが、食後の血清尿酸値の上昇を抑制し、さらに、プリン体負荷後の血清尿酸値が上昇し易い人において、より効果を認める傾向があっ

た。高尿酸血症者は健常者に比べ、プリン体負荷後の血清尿酸値が上昇し易いことから、フィチン酸は高尿酸血症者においても効果を認める可能性が考えられる。

プリン体を多く含む食事を摂取することで、食後の血清尿酸値が上昇し、それを繰り返すことで空腹時血清尿酸値が上昇することが分かっているが、それを検証する介入試験等が行われておらず、食後の血清尿酸値と痛風関節炎や腎不全などの病気との関連性は明らかになっていない。一方で、空腹時血清尿酸値に関しては、疫学調査や介入試験が多く行われており、その臨床的な意義が明らかになっている。そこで本章では、高尿酸血症者を対象にフィチン酸を継続摂取させ、空腹時血清尿酸値に及ぼす影響を検討することとした。

血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超え 9.0 mg/dL 以下で、合併症が無い高尿酸血症者（無症候性高尿酸血症者）は、尿酸降下薬は投与されず、食事や運動などの生活指導が中心に行われる。この過程では食品の健康管理における役割は大きいと考え、従って、本章では無症候性高尿酸血症者を対象とした研究を実施した。

第3節 方法

1. 被験者

本研究は、無症候性高尿酸血症者（男性 27 名、女性 4 名、合計 31 名）を対象とした。選択基準は、1) 20 歳以上 65 歳未満、2) 空腹時血清尿酸値 7.0 mg / dL を超え 9.0 mg / dL 未満、3) 女性の場合、閉経後の状態（1 年以上の生理を認めない）とした。除外基準は、1) 高尿酸血症または痛風の治療を受けている者、2) 痛風あるいは痛風の既往歴がある者、3) 血清クレアチニン濃度が男性 1.3 mg/dL 以上、女性 1.0 mg/dL 以上の者、4) 食物および薬物アレルギーがある者、5) アルコール中毒者、6) 試験に影響する可能性のある薬剤または栄養補助食品を服用している者および 7) 試験責任医師により本研究参加に不適切と判断された者とした。

割付け担当者は、スクリーニング時の年齢、性別、身長、体重、BMI、血清尿酸値上昇曲線下面積（iAUC）（0～360 分）、 Δ 最高血清尿酸値（iCmax）、最高血清尿酸値（Cmax）、最高血清尿酸値到達時間（Tmax）、累積尿中尿酸排泄量（0

～360分) , 空腹時血清尿酸値を指標とした層別無作為化法により割付を行い, 試験はクロスオーバーデザインで実施した。

信濃坂クリニック臨床試験審査委員会の承認を受け, 「ヘルシンキ宣言」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」にのっとり, 本研究に参加を希望した者に対して試験内容, 方法などについて十分な説明を行い, 文書による同意を得て試験を実施した。

2. 試験飲料

試験飲料は, フィチン酸 600 mg (築野食品工業㈱) を含む飲料をフィチン酸飲料 (50 mL) およびそのプラセボ 50 mL とした。フィチン酸の量は, 第二章において用いた健常者における食後血清尿酸値を抑制した量 (600 mg) と同じとした。

3. 試験方法

本章の試験デザインは, 無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験とした。被験者は, 各試験飲料を昼食および夕食時に各 1 本ずつ 2 週間摂取した。休止期間は 2 週間とした。事前検診, スクリーニング, 摂取 1 日目, 摂取 8 日目, 摂取 15 日目, 事後検診を検査日とした。なお被験者に, 試験期間を通して, 生活習慣 (食生活, 運動量など) を試験参加前の生活から大きく変化させないように指導した。検査日前日には, 規定食および水のみを摂取させた。検査前日 21:00 以降は絶食, 禁煙とした。血液検査項目は血清尿酸値 (mg/dL) とし, また, 尿検査項目は尿中尿酸値 (mg/dL) , 尿中クレアチニン値 (mg/dL) とし, ㈱エスアールエルにおいて測定した。尿中尿酸/クレアチニン比は, スポット尿の尿中尿酸値およびクレアチニン値から算出した [57] 。

事前検診で選抜された被験者において, プリン体負荷試験が実施された。被験者は, 一夜絶食後 9:00 に試験飲料, プリン体負荷食 (米飯 200 g, プリンヌクレオチド相当量として 800 mg を含むマグロ赤身 213 g, 濃口醤油 5 g) およびプリン体飲料 (5'-イノシン酸ナトリウムと 5'-グアニル酸ナトリウムを等量含む市販調味料 0.5 g をミネラルウォーター 200 mL に溶解させたもの) を同時に, 原則として 20 分以内に摂取した。10:00, 11:00, 13:00 にミネラルウォーター 100 mL を摂取し, プリ

ン体食摂取前，摂取 30，60，120，240，360 分後に採血および採尿を行った。血液検査項目は血清尿酸値（mg/dL）とし，また，尿検査項目は尿中尿酸値（mg/dL），尿中クレアチニン値（mg/dL）とし，(株)エスアールエルにおいて測定した

4. 評価項目

1) 有効性評価項目

主要評価項目を空腹時血清尿酸値，副次評価項目を尿中尿酸/クレアチニン比とした。

2) 安全性評価項目

理学的検査，一般臨床検査（血液学的検査，血液生化学検査，尿検査）とした。試験責任医師は自他覚症状に基づき有害事象を評価した。

5. 統計解析

検定は，クロスオーバーデザインを考慮した分散分析（要因として，試験飲料，時期，群および被験者）を行い，群，被験食品，時期，時点（摂取 8 日目，15 日目）および被験食品×時点をモデルに組み入れた混合モデル（Crossover type）を用いた解析を行った。両側検定を行い，有意水準は 5%とした。解析には SAS ソフトウェア（R9.3 SAS institute Japan）を用いた。解析は，試験食品を一度でも摂取した被験者を対象とする FAS（full analysis set）とプロトコールに適合しない被験者を除外した PPS（per protocol set）の双方を行ったが，有効性に関する主要および副次評価は主要評価解析とした PPS 解析にて行った。

例数設計は，健康成人男性においてケルセチンを摂取させた試験の結果に基づいて行った [58]。想定される空腹時血清尿酸値の差を 0.44 mg/dL，標準偏差を 0.60 とし，また，脱落が 15%生じることを想定し，検出力 90%，相関係数 0.5，有意水準 0.05 を満たす例数を対応のある *t* 検定（両側）で算出した結果，30 例であった。

第4節 結果

被験者の組入れから解析までのフローを Fig. 3-1.に示した。120名を対象に事前検診を実施し、選択基準に合致しない者36名、除外基準に抵触した者14名、参加を辞退した者9名、それ以外の理由で不参加となった被験者2名を除外した。事前検診で選抜された59名を対象にスクリーニングを実施した。スクリーニングで空腹時血清尿酸値の変動が大きい者10名、その他の理由で不参加となった者9名、その他の血液指標で異常値を示した者4名、試験継続ができなかった3名、参加を辞退した2名を除外した。グループAとBに無作為に割り当てられた31名の被験者のうち、摂取期間を完了した28名をFAS解析の対象とした。摂取1日目の空腹時血清尿酸値の変動が大きい者（1.0 mg/dLを超える）2名、その他の理由で不参加となった者1名を除く25名をPPS解析の対象とした。PPS解析の解析対象者の背景因子を Table 3-1.に示した。

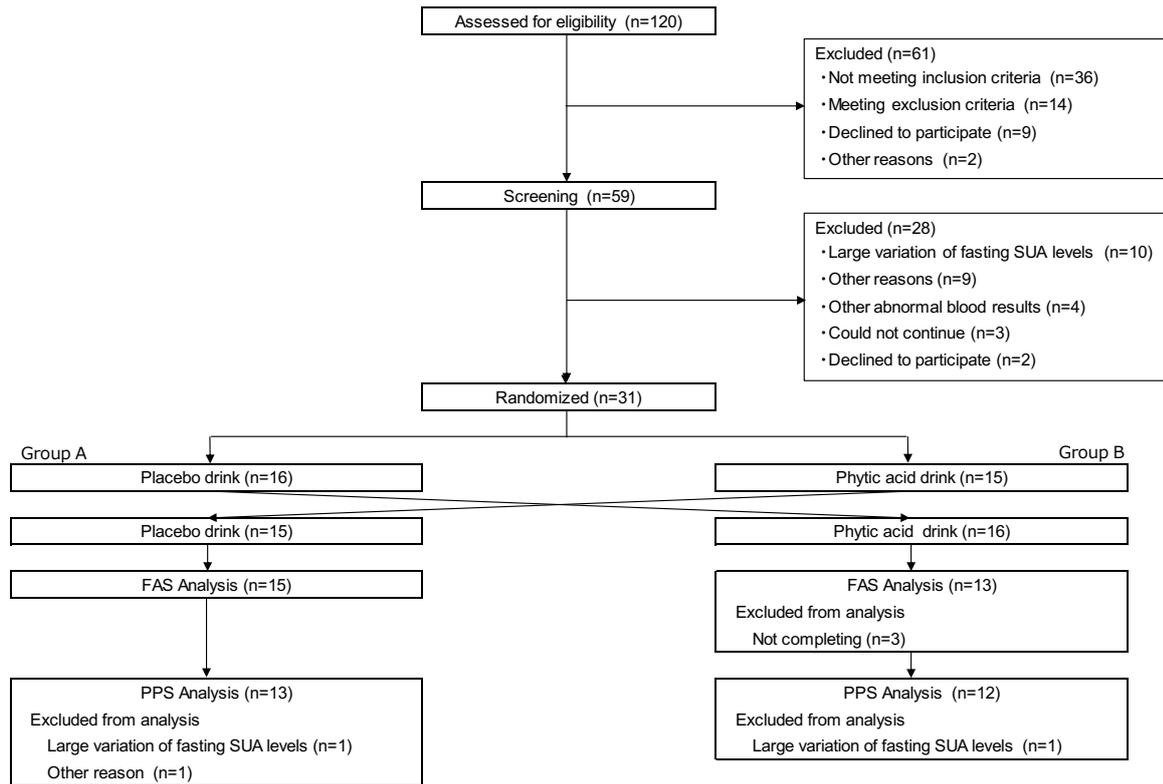


Fig. 3-1. Flow diagram of enrollment, random assignment, withdrawal, and follow-up of study subjects

Table 3-1. Subjects' background characteristics (Per protocol set)

Number	25
Sex	Male 22, Female 3
Age (years)	47.7 ± 11.9
Height (cm)	169.2 ± 7.6
Weight (kg)	69.3 ± 9.2
BMI (kg/m ²)	24.2 ± 3.5
Serum uric acid (mg/dL)	7.8 ± 0.5

Values are mean ± SD

1 有効性

空腹時血清尿酸値の結果（PPS 解析）を Fig. 3-2.に、空腹時血清尿酸値および尿中尿酸/クレアチニン比の結果（PPS 解析）を Table 3-2.に示した。空腹時血清尿酸値は、PPS 解析において、プラセボ飲料摂取期と比較してフィチン酸飲料摂取期で有意に低値を示し（ $P < 0.05$ ）、FAS 解析においては低値を示す傾向があった（ $P < 0.10$ ）。尿中尿酸/クレアチニン比は、各摂取期間の間で差を認めなかった。

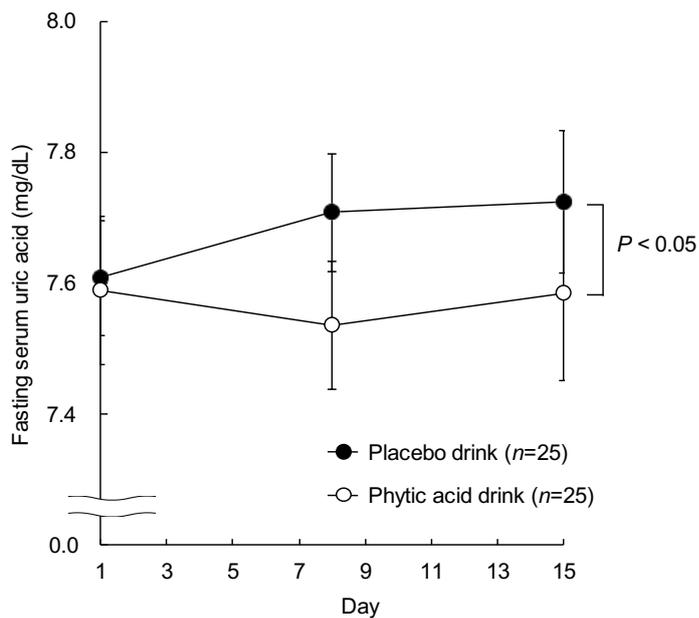


Fig. 3-2. Effect of consumption of phytic acid by 25 hyperuricemic subjects on serum uric acid levels. Comparison of serum uric acid at baseline and 8 and 15 days after the consumption of a drink containing 600 mg of phytic acid or placebo. (Per protocol set) Error bars indicate standard error. *A significant difference was observed between the placebo and phytic acid groups; $P < 0.05$.

Table 3-2. Effect of phytic acid on fasting serum uric acid levels and urinary uric acid to creatinine ratio. (Per protocol set)

	Phytic acid			Placebo			<i>P</i>
	Mean	SD	Mean difference	Mean	SD	Mean difference	
Serum uric acid (mg/dL)							
Baseline	7.59	0.57		7.61	0.44		
Day 8	7.54	0.49	-0.052	7.71	0.45	0.100	0.0437
Day 15	7.58	0.66	-0.004	7.72	0.54	0.116	
Urinary uric acid to creatinine ratio							
Baseline	0.38	0.09		0.38	0.10		
Day 8	0.36	0.07	-0.014	0.33	0.11	-0.045	0.6134
Day 15	0.33	0.07	-0.047	0.35	0.10	-0.022	

(Mean values and standard deviation; mean difference from baseline; *n*=25)

P values for the overall treatment effect between phytic acid and placebo.

2 安全性

試験期間中、有害事象または血清カルシウムおよび鉄濃度を含む臨床検査結果において臨床上問題となる所見を認めなかった。

第5節 考察

本研究は、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値に対するフィチン酸の反復摂取の影響を無作為化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー比較試験にて検討した初めての研究であり、フィチン酸を1日2回600 mg、2週間摂取することで、高尿酸血症の空腹時血清尿酸値を改善することを確認した。

機能性食品（ブルーベリー、アーモンド、マグロ抽出物、ケルセチンなど）を摂取させた臨床試験において、空腹時血清尿酸値を検討した研究が実施されているが、機能性食品をプラセボと比較した研究の例は少ない [58-61]。例えば、ブルーベリーを6ヶ月間継続摂取した研究において、3ヶ月目にプラセボと比較して空腹時血清尿

酸値が有意に低下している ($P < 0.05$) 報告 [59] , アーモンドを 12 週間継続摂取した研究において, 6 週間目と 12 週間目でプラセボと比較して空腹時血清尿酸値が有意に低下している ($P < 0.05$) 報告 [60] などがある。どちらの研究も空腹時血清尿酸値に効果を示すためには長い期間を必要としているが, フィチン酸はわずか 2 週間で効果を示した。効果を示すまでの期間の違いについては, これらの論文は尿酸合成の抑制と尿中尿酸排泄の促進に焦点を当てているが [58, 61] , 著者の研究では, フィチン酸が, プリンヌクレオチド代謝阻害によるプリン体の吸収の抑制に焦点を当てているという違いによるものと考えられる。

著者は, これまでの *in vitro* 試験, ラット空腸ループを用いた *ex vivo* 試験, 高尿酸血症動物モデルにおける検討および各種文献情報から, フィチン酸の作用機序を, 尿酸合成抑制や尿中尿酸排泄促進ではなく, プリンヌクレオチド代謝阻害によるプリン体の吸収抑制と考えている。尿中尿酸排泄の促進については, 健常者の食後血清尿酸値に対するフィチン酸の有効性を検討した研究においてだけでなく, 本研究においてもその作用を認めなかった。この結果は, フィチン酸の有効性が尿酸排泄の促進によるものではないことを支持する結果である。

著者は, これまでの研究結果から, 乳酸菌豆乳発酵上清からプリンヌクレオチド代謝阻害活性を示す主な有効成分として, フィチン酸を同定した。しかしながら, いくつかの論文において, フィチン酸をミネラルの吸収を妨げる抗栄養素として扱っている。そのため, 豆乳に含まれるフィチン酸を低減させ, ミネラルのバイオアベイラビリティを高めることなどの研究が行われている [62] 。そこで, フィチン酸のミネラルに対する影響を明らかにするために, 本研究において血清カルシウム濃度と血清鉄濃度を検討したが, 有意な結果は得られなかった。フィチン酸を日常生活で大量に摂取しているベジタリアン (ベジタリアン, 500-2,927 mg/日; オボベジタリアン, 615-5,770 mg/日) がいるが, ミネラル状態に問題あると報告されていない [63-65] 。フィチン酸は, 米国のサプリメントの食品添加物として使用されており, サプリメント利用者は, フィチン酸 610 mg/日 (90 パーセントイル) を摂取すると推定されるが, 問題等は報告されていない [66] 。さらに, 尿中フィチン酸濃度が高い人において, 12 ヶ月間の腰椎骨量の減少が抑制されていること, 10 年間の骨粗鬆症による骨

折と大腿骨近位部骨折の確率も低下していることから、フィチン酸の摂取量の増加が骨粗鬆症の発症を抑えることと報告されている [67]。これらの情報から、本章におけるフィチン酸量を毎日摂取してもミネラル状態に問題が生じないことが推察される。

この研究にはいくつかの制限がある。フィチン酸の摂取期間が2週間と短いことである。フィチン酸の効果が長期間持続するか判断するには、さらなる検討が必要である。また、本章では、少人数での女性でしか検討していない。従って、女性におけるフィチン酸の効果や性差を確認することが必要であると考えられる。

本章の結果は、高尿酸血症の空腹時血清尿酸値を改善したことを示唆している。フィチン酸飲料は、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値を改善し、痛風やそれに関連する病気の予防に有益である可能性が考えられる。

総括

第1章では、*in vitro* 試験にてプリンヌクレオチド代謝阻害作用に対するフィチン酸の濃度依存性を検討し、高尿酸血症動物モデルにてプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。フィチン酸は、*in vitro* 試験において濃度依存的にプリンヌクレオチド代謝阻害作用を示し、さらに、高尿酸血症動物モデルにおいて用量依存的にプリン体負荷後の血漿尿酸値の上昇を抑制した。従来の尿酸代謝改善薬と異なるプリンヌクレオチド代謝阻害という新たな作用機序で、動物試験において血漿尿酸値改善作用を示すことが分かった。

第2章では、健常成人を対象にフィチン酸を単回摂取させ、プリン体負荷後の血清尿酸値の上昇に及ぼす影響を検討した。食品成分が健常者の食後の血清尿酸値の上昇を抑えたという報告がほとんどない中で、フィチン酸はその有効性を示した。フィチン酸は、健常者において食後の血清尿酸値の上昇を抑制することで、空腹時血清尿酸値の上昇を抑制し、高尿酸血症の予防に役立つ可能性が考えられる。

第3章では、無症候性高尿酸血症者を対象にフィチン酸を2週間継続摂取させ、空腹時血清尿酸値に及ぼす影響を検討した。無作為化プラセボ対照比較研究において、食品成分が空腹時血清尿酸値を改善した報告例が少ない中で [58-61]、フィチン酸はその有効性を示した。また、フィチン酸以外の食品成分は、空腹時血清尿酸値を改善するまで6週間～3ヶ月と長期間必要であるが、フィチン酸は2週間と短い期間で効果を示した。フィチン酸は、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値を改善し、痛風関節炎だけでなく、腎不全や尿路結石などの病気の予防に役立つ可能性が考えられる。今後、長期的な介入試験により、その予防効果を検証することができると考えられる。

フィチン酸は、食品中ではフィチン（フィチン酸のカルシウム・マグネシウム混合塩）の形で存在することが多く、強い抗酸化作用や金属キレート作用がある [51]。プリンヌクレオチドをプリンヌクレシドに代謝する酵素として、アルカリホスファターゼ、5'-ヌクレオチダーゼが知られており、これらの酵素の活性部位には2価の金属が存在し、基質との相互作用に関与している [49,50]。フィチン酸は2価の金属とキレートを形成することにより酵素阻害作用を発揮していることが示唆された。

健常者の食後血清尿酸値の上昇を抑制したり、高尿酸血症者の空腹時血清尿酸値を

改善したりする食品成分はほとんどない中で、フィチン酸は有効性を示している。この結果は、フィチン酸以外の食品成分は、従来の尿酸代謝改善薬の作用機序である尿酸合成抑制作用あるいは尿酸排泄作用をターゲットとしているが、フィチン酸はプリンヌクレオチド代謝阻害によるプリン体の吸収抑制作用をターゲットとしていることが理由として考えられる。この作用機序をターゲットとすることは、食品だけでなく、医薬品創成においても有用であると考えられる。今後、フィチン酸、基質、プリンヌクレオチド関連代謝酵素相互作用の検討を行い、物理化学的な分子論的な相互作用を解析することが必要であると考えられる。さらに、3者複合体を結晶化後でX線結晶解析を行い、複合体解析の結果を得ることで、構造を基盤とした創薬（SBDD）に展開することが期待される。

引用文献

- [1] Development of Guideline for the management of hyperuricemia and gout in Japan 3rd edition (2019)
- [2] Ragab G, Elshahaly M, Bardin T. (2017) Gout: An old disease in new perspective - A review. *J Adv Res.* **8**, 495-511. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2017.04.008>.
- [3] Shekarriz B, Stoller ML. (2002) Uric acid nephrolithiasis: current concepts and controversies. **168**, 1307-1314. <https://doi.org/10.1097/00005392-200210010-00003>.
- [4] Zhou Y, Fang L, Jiang L, Wen P, Cao H, He W, Dai C, Yang J. (2012) Uric acid induces renal inflammation via activating tubular NF- κ B signaling pathway. *PLoS One.* **7**, e39738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039738>.
- [5] Taniguchi Y, Hayashi T, Tsumura K, Endo G, Fujii S, Okada K. (2001) Serum uric acid and the risk for hypertension and Type 2 diabetes in Japanese men: The Osaka Health Survey. *J Hypertens.* **19**, 1209-1215. <https://doi.org/10.1097/00004872-200107000-00005>.
- [6] Nakanishi N, Okamoto M, Yoshida H, Matsuo Y, Suzuki K, Tatara K. (2003) Serum uric acid and risk for development of hypertension and impaired fasting glucose or Type II diabetes in Japanese male office workers. *Eur J Epidemiol.* **18**, 523-530. <https://doi.org/10.1023/a:1024600905574>.
- [7] Sui X, Church TS, Meriwether RA, Lobelo F, Blair SN. (2008) Uric acid and the development of metabolic syndrome in women and men. *Metabolism* **57**, 845-852. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.01.030>.
- [8] Ryu S, Song J, Choi BY, Lee SJ, Kim WS, Chang Y, Kim DI, Suh BS, Sung KC. (2007) Incidence and risk factors for metabolic syndrome in Korean male workers, ages 30 to 39. *Ann Epidemiol.* **17**, 245-252. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2006>.
- [9] Tomita M, Mizuno S, Yamanaka H, Hosoda Y, Sakuma K, Matuoka Y, Odaka M, Yamaguchi M, Yosida H, Morisawa H, Murayama T. Does hyperuricemia affect mortality? A prospective cohort study of Japanese male workers. *J Epidemiol.* **10**, 403-409. <https://doi.org/10.2188/jea.10.403>.
- [10] Hakoda M, Masunari N, Yamada M, Fujiwara S, Suzuki G, Kodama K, Kasagi F. (2005)

Serum uric acid concentration as a risk factor for cardiovascular mortality; A longterm cohort study of atomic bomb survivors. *J Rheumatol.* **32**, 906-912.

[11] Clifford AJ, Riumallo JA, Young VR, Scrimshaw NS. (1976) Effect of oral purines on serum and urinary uric acid of normal, hyperuricemic and gouty humans. *J Nutr.* **106**, 428-434. <https://doi.org/10.1093/jn/106.3.428>

[12] Zöllner N. (1973) Influence of various purines on uric acid metabolism. *Bibl Nutr Dieta.* **19**, 34-43. <https://doi.org/10.1159/000394353>

[13] Choi HK, Liu S, Curhan G. (2005) Intake of purine-rich foods, protein, and dairy products and relationship to serum levels of uric acid: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Arthritis Rheum.* **52**, 283-289. <https://doi.org/10.1002/art.20761>.

[14] Emmerson BT. (1991) Identification of the causes of persistent hyperuricaemia. *Lancet.* **337**, 1461-1463. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93141-u](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93141-u).

[15] Carver JD, Walker WA. (1995) The role of nucleotides in human nutrition *J Nutr Biochem.* **6**, 58-72. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(94\)00019-I](https://doi.org/10.1016/0955-2863(94)00019-I)

[16] Sonoda T, Tatibana M. (1978) Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. *Biochim Biophys Acta.* **521**, 55-66. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(78\)90248-4](https://doi.org/10.1016/0005-2787(78)90248-4)

[17] Yokozawa T, Oura H, Okada T. (1982) Metabolic effects of dietary purine in rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo).* **28**, 519-526. <https://doi.org/10.3177/jnsv.28.519>

[18] 金子 希代子, 福内 友子, 稲沢 克紀, 山岡 法子, 藤森 新. (2015) 食品中プリン体含量および塩基別含有率の比較. *痛風と核酸代謝.* **39**, 7-21. <https://doi.org/10.6032/gnam.39.7>

[19] Garrel DR, Verdy M, PetitClerc C, Martin C, Brulé D, Hamet P. (1991) Milk- and soy-protein ingestion: acute effect on serum uric acid concentration. *Am J Clin Nutr.* **53**, 665-669. <https://doi.org/10.1093/ajcn/53.3.665>

[20] Chuang SY, Lee SC, Hsieh YT, Pan WH. (2011) Trends in hyperuricemia and gout prevalence: Nutrition and Health Survey in Taiwan from 1993-1996 to 2005-2008. *Asia Pac*

J Clin Nutr. **20**, 301-308.

[21] Villegas R, Xiang YB, Elasy T, Xu WH, Cai H, Cai Q, Linton MF, Fazio S, Zheng W, Shu X-O. (2012) Purine-rich foods, protein intake, and the prevalence of hyperuricemia: the Shanghai Men's Health Study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* **22**, 409-416. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2010.07.012>.

[22] Yamakita J, Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, Tsutsumi Z, Higashino K. (1998) Effect of Tofu (bean curd) ingestion and on uric acid metabolism in healthy and gouty subjects. *Adv Exp Med Biol.* **431**, 839-842. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5381-6_161.

[23] Ikenaga T, Noguchi H, Ishiyama T, Ishida H, Kakumoto K, Kohda N, Sugimura H, Yamamoto T. (2019) Effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria on postprandial serum uric acid level and its active ingredients. *Jpn Pharmacol Ther.* **47**, 637-645.

[24] Emsley J, Niazi S. (1981) The structure of myoinositol hexaphosphate in solution – ³¹P N. M. R. investigation, *Phosphorous Sulfur and Silicon and related Elements.* **10**, 159–171. <https://doi.org/10.1080/03086648108077394>

[25] Graf E, Empson KL, Eaton JW. (1987) Phytic Acid. A Natural Antioxidant. *J Biol Chem.* **262**, 11647-11650.

[26] Shamsuddin AM. (1995) Inositol Phosphates Have Novel Anticancer Function. *J Nutr.* **125(3 Suppl)**, 725S-732S. https://doi.org/10.1093/jn/125.3_Suppl.725S

[27] Curhan GC, Willett WC, Knight EL, Stampfer MJ. (2004) Dietary Factors and the Risk of Incident Kidney Stones in Younger Women: Nurses' Health Study II. *Arch Intern Med.* **164**, 885-891. <https://doi.org/10.1001/archinte.164.8.885>

[28] Campion EW, Glynn RJ, DeLabry LO. (1987) Asymptomatic hyperuricemia; Risks and consequences in the Normative Aging Study. *Am J Med.* **82**, 421-426. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(87\)90441-4](https://doi.org/10.1016/0002-9343(87)90441-4)

[29] Lin KC, Lin HY, Chou P. (2000) The interaction between uric acid level and other risk factors on the development of gout among asymptomatic hyperuricemic men in a prospective study. *J Rheumatol.* **27**, 1501-1505.

[30] Iseki K, Oshiro S, Tozawa M, Iseki C, Ikemiya Y, Takishita S. (2001) Significance of

hyperuricemia on the early detection of renal failure in a cohort of screened subjects. *Hypertension Res.* **24**, 691-697. <https://doi.org/10.1291/hypres.24.691>.

[31] Chonchol M, Shlipak MG, Katz R, Sarnak MJ, Newman AB, Siscovick DS, Kestenbaum B, Carney JK, Fried LF. (2007) Relationship of uric acid with progression of kidney disease. *Am J Kidney Dis.* **50**, 239-247. <https://doi.org/10.1053/j.ajkd.2007.05.013>.

[32] 岡本 完, 谷口 敦夫, 山中 寿, 鎌谷 直之. (2005) 血清尿酸値の一過性上昇に対するクレメジンの抑制作用. *痛風と核酸代謝.* **29**, 9-14.

[33] 日本臨床化学会, 試薬専門委員会. (1993) HPLC を用いる血清尿酸測定 の 勧告 法. *臨床化学.* **22**, 300-307.

[34] Muraoka S, Miura T. (2004) Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. *Life Sci.* **74**, 1691-1700. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.040>

[35] Kumar R, Darpan Sharma S, Singh R. (2011) Xanthine Oxidase Inhibitors: A Patent Survey. *Expert Opin Ther Pat.* **21**, 1071-1108. <https://doi.org/10.1517/13543776.2011.577417>

[36] Grases F, Simonet BM, Vucenik I, Prieto RM, Costa-Bauzá A, March JG, Shamsuddin AM. (2001) Absorption and Excretion of Orally Administered Inositol Hexaphosphate (IP(6) or Phytate) in Humans. *Biofactors.* **15**, 53-61. <https://doi.org/10.1002/biof.5520150105>

[37] Young JD, Cheeseman CI, Mackey JR, Cass CE, Baldwin SA. (2001) *Gastrointestinal Transport, Molecular Physiology.* Academic Press: San Diego; CA, 329-378.

[38] Kolassa N, Stengg R, Turnheim K. (1977) Adenosine Uptake by the Isolated Epithelium of Guinea Pig Jejunum. *Can J Physiol Pharmacol.* **55**, 1033-1038.

[39] Ho CY, Miller KV, Savaiano DA, Crane RT, Ericson KA, Clifford AJ. (1979) Absorption and Metabolism of Orally Administered Purines in Fed and Fasted Rats. *J Nutr.* **109**, 1377-1382. <https://doi.org/10.1093/jn/109.8.1377>

[40] Salati LM, Gross CJ, Henderson LM, Saviano DA. (1984) Absorption and Metabolism of Adenine, Adenosine-5'-Monophosphate, Adenosine and Hypoxanthine by the Isolated Vascularly Perfused Rat Small Intestine. *J Nutr.* **114**, 753-760. <https://doi.org/10.1093/jn/114.4.753>

- [41] Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside Transporter Proteins. (2009) *Curr Vasc Pharmacol.* **7**, 426-434. <https://doi.org/10.2174/157016109789043892>
- [42] Parkinson FE, Damaraju VL, Graham K, Yao SY, Baldwin SA, Cass CE, Young JD. (2011) Molecular Biology of Nucleoside Transporters and Their Distributions and Functions in the Brain. *Curr Top Med Chem.* **11**, 948-972. <https://doi.org/10.2174/156802611795347582>
- [43] Hiratochi M, Tatani K, Shimizu K, Kuramochi Y, Kikuchi N, Kamada N, Itoh F, Isaji M. (2012) Hypouricemic Effects of Novel Concentrative Nucleoside Transporter 2 Inhibitors through Suppressing Intestinal Absorption of Purine Nucleosides. *Eur J Pharmacol.* **690**, 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.06.015>
- [44] Wada H, Yagami I, Niwa N, Hayakawa T, Tsuge H. (2001) Distribution and properties of rat intestinal alkaline phosphatase isoenzymes. *Exp Anim.* **50**, 153-158. <https://doi.org/10.1538/expanim.50.153>.
- [45] Klaushofer K, Pavelka M (1975) Studies on 5'-nucleotidase histochemistry. III. 5'-Nucleotidase activity in smooth muscle cells of the rat's gastrointestinal tube *Histochemistry.* **43**, 373-385. <https://doi.org/10.1007/BF00490196>.
- [46] McAllan AB. (1980) The degradation of nucleic acids in, and the removal of breakdown products from the small intestines of steers. *Br J Nutr.* **44**, 99-112. <https://doi.org/10.1079/bjn19800014>.
- [47] Stow RA, Bronk JR. (1993) Purine nucleoside transport and metabolism in isolated rat jejunum. *J Physiol.* **468**, 311-324. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1993.sp019773>.
- [48] Andersen KJ, Schjønby H, Skagen DW. (1983) Enzyme Activities in Human and Rat Jejunal Mucosa. *Scand J Gastroenterol.* **18**, 241-249. <https://doi.org/10.3109/00365528309181590>
- [49] Llinas P, Stura EA, Ménez A, Kiss Z, Stigbrand T, Millán JL, Le Du MH. (2005) Structural studies of human placental alkaline phosphatase in complex with functional ligands. *J Mol Biol.* **350**, 441-451. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.068>
- [50] Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Sträter N. (2012) Crystal

- structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure*. 20, 2161-2173. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.10.001>
- [51] Erdman JW. (1979) Oilseed phytates: Nutritional implications. *J Am Oil Chem Soc*. **56**, 736-741.
- [52] Hayakawa T, Okada F, Tsutsui M, Sato N, Igaue I. (1991) Effect of Phytate on the Hydrolysis of *p*-Nitrophenyl Phosphate with Phosphatase from Various Sources. *Agric Biol Chem*. **55**, 651-657. <https://doi.org/10.1271/bbb1961.55.651>
- [53] Stavric B, Nera EA. (1978) Use of the uricase-inhibited rat as an animal model in toxicology. *Clin Toxicol*. **13**, 47-74. <https://doi.org/10.3109/15563657808988228>.
- [54] Dan T, Yoneya T, Onoma M, Onuma E, Ozawa K. (1994) Hypouricemic and uricosuric actions of AA-193 in a hyperuricemic rat model. *Metabolism*. **43**, 123-128. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(94\)90167-8](https://doi.org/10.1016/0026-0495(94)90167-8)
- [55] Ueda T, Honda S, Morikawa H, Kitamura S, Iwama Y, Nakagawa K. (2015) Chrysanthemum flower oil inhibits diet-induced serum uric acid elevation in adult male subjects. *Nutrafoods*. **14**, 151-158. <https://doi.org/10.1007/s13749-015-0035-8>
- [56] Honda S, Kawamoto S, Tanaka H, Kishida H, Kitagawa M, Nakai Y, Abe K, Hirata D. (2014) Administered chrysanthemum flower oil attenuates hyperuricemia: mechanism of action as revealed by DNA microassay analysis. *Biosci Biotechnol Biochem*. **78**, 655-661. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.890028>
- [57] Moriwaki Y, Yamamoto T, Takahashi S, Yamakita J, Tsutsumi Z, Hada T. (2001) Spot urine uric acid to creatinine ratio used in the estimation of uric acid excretion in primary gout. *J Rheumatol*. **28**, 1306-1310.
- [58] Shi Y, Williamson G. (2016) Quercetin lowers plasma uric acid in pre-hyperuricaemic males: a randomised, double-blinded, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr*. **115**, 800-806. <https://doi.org/10.1017/S0007114515005310>
- [59] Cheatham CL, Vazquez-Vidal I, Medlin A, Voruganti VS. (2016) Blueberry consumption affects serum uric acid concentrations in older adults in a sex-specific manner. *Antioxidants (Basel)*. **5 pii**, E43. <https://doi.org/10.3390/antiox5040043>

- [60] Jamshed H, Gilani AU, Sultan FA, Amin F, Arslan J, Ghani S, Masroor M. (2016) Almond supplementation reduces serum uric acid in coronary artery disease patients: a randomized controlled trial. *Nutr J.* **15**, 77. <https://doi.org/10.1186/s12937-016-0195-4>
- [61] Kubomura D, Yamada M, Masui A. (2016) Tuna extract reduces serum uric acid in gout-free subjects with insignificantly high serum uric acid: A randomized controlled trial. *Biomed Rep.* **5**, 254-258. <https://doi.org/10.3892/br.2016.701>
- [62] Rekha CR, Vijayalakshmi G. (2010) Bioconversion of isoflavone glycosides to aglycones, mineral bioavailability and vitamin B complex in fermented soymilk by probiotic bacteria and yeast. *J Appl Microbiol.* **109**, 1198-1208. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04745.x>
- [63] Harland BF, Peterson M. (1978) Nutritional status of lacto-ovo vegetarian Trappist monks. *J Am Diet Assoc.* **72**, 259-264.
- [64] Brune M, Rossander L, Hallberg L. (1989) Iron absorption: no intestinal adaptation to a high-phytate diet. *Am J Clin Nutr.* **49**, 542-545. <https://doi.org/10.1093/ajcn/49.3.542>
- [65] Schlemmer U, Frølich W, Prieto RM, Grases F. (2009) Phytate in foods and significance for humans: food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Mol Nutr Food Res.* **53 Suppl 2**, S330-S375. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900099>
- [66] GRAS Notice 000381: Phytic acid - Food and Drug Administration
- [67] López-González AA, Grases F, Monroy N, Marí B, Vicente-Herrero MT, Tur F, Perelló J. (2013) Protective effect of myo-inositol hexaphosphate (phytate) on bone mass loss in postmenopausal women. *Eur J Nutr.* **52**, 717-726. <https://doi.org/10.1007/s00394-012-0377-6>

謝辞

本論文提出の機会を与えて頂き、ご指導とご鞭撻を賜りました蛋白質創薬学分野植田正教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また、的確なご助言を頂きましたグローバルヘルス分野小柳悟教授、細胞生物薬学分野石井祐次准教授、国際医療福祉大学福岡薬学部阿部義人教授に心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり常に的確なご助言を頂きました大阪暁明館病院山本徹也センター長に心より感謝申し上げます。また、大学院で研究を行う機会を与えてくださった大塚製薬株式会社の皆様に心から感謝を申し上げます。最後に、社会人になりました後も陰ながらご支援頂きました家族に感謝申し上げます。

発表論文

1. Ikenaga T, Noguchi H, Ishiyama T, Ishida H, Kakumoto K, Kohda N, Sugimura H, Yamamoto T. (2019) Effect of soymilk fermented with lactic acid bacteria on postprandial serum uric acid level and its active ingredients. *Jpn Pharmacol Ther.* **47**, 637-645. (第1章に内容の一部を記載)
2. Ikenaga T, Noguchi H, Kakumoto K, Kohda N, Tsukikawa H, Matsuguma K, Yamamoto T (2020) Effect of phytic acid on postprandial serum uric acid level in healthy volunteers: a randomized, double-blind, crossover study. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **39**, 504-517. <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1656337>. (第2章の内容)
3. Ikenaga T, Kakumoto K, Kohda N, Yamamoto T (2019) Effect of Inositol Hexaphosphate (IP 6) on Serum Uric Acid in Hyperuricemic Subjects: a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Plant Foods Hum Nutr.* **74**, 316-321. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00735-9>. (第3章の内容)