

REHSE「高校生による環境安全とリスクに関する自主研究活動支援事業」

2023年度 研究活動報告書

痛風を防ぐ食品の探索
—食品成分のキサンチンオキシダーゼ阻害効果—

高槻高等学校 SS 課題研究化学3班

1. 背景（研究の動機）

高槻高等学校が位置する高槻市の特産品として椎茸が挙げられる。干し椎茸にはうま味成分としてグアニル酸が多量に含まれており、グアニル酸は体内でキサンチンオキシダーゼ(XO)を含む酵素の働きにより尿酸へと酸化され、痛風の原因となる事が知られている。令和4年国民生活基礎調査によると日本国の全人口の内、1%である約130万人が痛風を患っている事となりこれは他の疾患と比較して非常に患者数が多い事から痛風は健康に対するリスクが極めて大きい疾患の一つであると考えた。痛風治療薬としてXOを阻害することにより尿酸値を下げるアロプリノール等が実用化されているが、摂取した際に副作用として発疹、かゆみ、貧血、腎機能異常、下痢、全身倦怠感、脱毛等といった症状が現れることがある。治療薬を用いなくとも特定のXO阻害効果を持つ食品の摂取により尿酸生成を抑えることで痛風治療薬による副作用を避けることが可能となると考え研究を開始した。

2. 背景（前年度までの成果）

各国で健康食材とされ、香辛料として使用されるタマネギ、ショウガ、ニンニクにはXO阻害効果があるのではないかという仮説を立て、これらの食品を水、エタノールを用いて抽出し後述の実験Iと同様に実験を行った。

その結果、エタノールに溶解出したタマネギ、ニンニクの成分と水に溶解出したショウガ、ニンニクの成分には現在XO阻害薬として用いられているアロプリノールと同等のXO阻害効果が確認できた。(添付資料①)

3. 目的

食品の経口摂取を通じてXOを阻害することにより痛風を予防、もしくは症状を軽減するために私たちはアロプリノールと同様にXOを効率よく阻害する食品を見つけ、食べ合わせによる影響の有無を研究目的としている。

4. 研究の成果

(A)実験I

XO阻害効果を持つ試料の探索を目的として実験Iを行った。

(A.a)実験概要

以下の表の通りに溶液を調製する。

	基本試料(μL)	コントロール(μL)	ブランク(μL)
試料(15mg/L)	600	600	0
純水	0	0	600
リン酸緩衝液 (1/15mM、pH7.5)	1000	1400	1000
XO(0.28U/mL)	400	0	400

これらの溶液を25℃で15分間インキュベートし、全ての溶液にキサンチン水溶液(0.15mM)1000μLを加え、追加で30分間、25℃でインキュベートを行う。その後全ての溶液に塩酸(1.0M)1000μLを加え反応を停止させた後、吸光度を計測し阻害率を求める。

阻害率は以下の式の通りとする。

$$\text{阻害率(\%)} = \frac{\text{ブランク(abs)} - \{ \text{基本試料(abs)} - \text{コントロール(abs)} \}}{\text{ブランク(abs)}} \times 100$$



(A.b)実験結果

	基本試料	コントロール	ブランク	阻害率(%)
レモン果汁	0.130	0.103	0.112	76.3
緑茶	0.101	0.075	0.082	68.3
コーヒー	0.204	0.175	0.112	74.6
リンゴジュース	0.116	0.077	0.105	62.9
アロプリノール	0.111	0.080	0.111	73.1

実験 I で用いた全ての試料で阻害効果が確認された。

(A.c)考察

レモン果汁に含まれるアスコルビン酸、コーヒーに含まれるクロロゲン酸、緑茶に含まれるカテキンはいずれも抗酸化物質であり、消化管を経由して体内に吸収されることが知られている。そのため XO 阻害効果を有すると考える。また、リンゴに含まれる抗酸化物質であるプロシアニジンも直接体内に吸収されることが知られている。そのためリンゴを摂取する際は胃酸の濃度を維持することで XO 阻害効果が期待できる。なお、この実験段階では、実験手法について試行錯誤を行っていたため、十分に実験条件を揃えることができず、一部のコントロール値、ブランク値にばらつきが生じている。

(B)実験 II

実験 I で XO 阻害効果が確認された試料同士を混合した際の XO 阻害効果の干渉の有無について実験を行った。

(B.a)実験概要

実験 I で阻害効果が確認された試料としてレモン果汁、コーヒー、リンゴジュースを用いる。レモンジュースとコーヒー、リンゴジュースとコーヒーを 1:1 の割合で混合した溶液を用いて実験 I と同様の実験を行い、試料単体の際の阻害率と比較を行う。

(B.b)実験結果

	基本試料	コントロール	ブランク	阻害率(%)
レモン果汁	0.154	0.130	0.142	83.1
コーヒー	0.227	0.195	0.142	77.5
リンゴジュース	0.146	0.120	0.142	81.7
レモン果汁+コーヒー	0.171	0.157	0.142	90.1
リンゴジュース+コーヒー	0.189	0.157	0.142	77.5
アロプリノール	0.134	0.120	0.133	89.5

実験 II で用いた試料全てで相乗効果は確認されなかった。

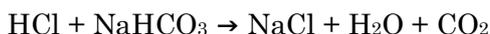
(B.c)考察

実験 II で用いた試料同士で相殺、相乗効果は見られない。そのため、これらの食品を同時に経口摂取することによる XO 阻害効果に問題はないと考える。

(C)実験Ⅲ

体内で生じる中和反応によって阻害効果が変わらないことを確認するために胃酸に含まれている塩酸と膝液に含まれている炭酸水素ナトリウムを用いて実験を行った。

以下、塩酸と炭酸水素ナトリウムの反応式である。



上記の式の通り最終生成物として塩化ナトリウムが生じる。この塩化ナトリウムが阻害効果に影響しないことを確かめるために予備実験を行った。

(C₁)予備実験

(C_{1.a})実験概要

溶媒を水、塩化ナトリウム水溶液(0.10M)の2種類とし、実験Ⅰと同様にして実験を行った。

(C_{1.b})実験結果

	基本試料	コントロール	ブランク	阻害率(%)
緑茶	0.0568	0.0401	0.045	62.9
コーヒー	0.1643	0.1322	0.045	28.7
リンゴジュース	0.0577	0.0285	0.045	35.1
緑茶+NaCl	0.0602	0.0424	0.045	60.4
コーヒー+NaCl	0.1608	0.1253	0.045	21.1
リンゴジュース+NaCl	0.0791	0.0414	0.045	16.2

予備実験で用いた3試料全ての阻害効果に大きな変化は確認されなかった。

(C_{1.c})考察

今回の実験で阻害率の大きな変化が確認されなかったため、塩化ナトリウムは予備実験で用いた食品に含まれるXO阻害効果に対する大きな影響を持たないと考える。

(C₂)本実験

(C_{2.a})実験概要

実験Ⅰで阻害効果が確認された試料として緑茶、リンゴジュース、コーヒーを用いる。15mg/Lとなるよう水で希釈した試料に塩酸(0.10M)1.0mLを加え静置した後、炭酸水素ナトリウム水溶液(0.10M)10mLを加えて反応させる。その後実験Ⅰと同様に実験を行う。

(C_{2.b})実験結果

	基本試料	コントロール	ブランク	阻害率(%)
緑茶 +HCl+NaHCO ₃	0.0722	0.0578	0.0321	55.4
リンゴジュース +HCl+NaHCO ₃	0.1222	0.1114	0.0321	61.0
コーヒー +HCl+NaHCO ₃	0.0311	0.0185	0.0321	60.7

今回用いた3試料全ての阻害効果に変化は確認されなかった。

(C_{2.c})考察

消化管内で起こる中和反応を模した環境変化による影響は見られなかったため、今回の実験に用いた食品試料を経口摂取によるXO阻害効果を期待できる。

5. 研究成果の発表

①日時：2023年2月24日(木) 8:40~12:30

発表の場：高槻中学校高等学校 SSH 課題研究校内発表会

発表題目：食品のキサンチンオキシターゼ阻害効果

発表形態：ポスター発表(添付資料②)

発表者名：箱崎大輝(2年)、辻井結菜(2年)、加藤愛梨(2年)、朝霧ゆり花(2年)

②日時：2023年3月18日(土) 13:00~16:30

発表の場：高槻中学校高等学校 グローバルサイエンスフォーラム

発表題目：食品のキサンチンオキシターゼ阻害効果

発表形態：ポスター発表(添付資料②)

発表者名：箱崎大輝(2年)、辻井結菜(2年)、加藤愛梨(2年)、朝霧ゆり花(2年)

③日時：2023年11月14日(火) 12:40~13:00 (TST/UTC+08:00)

発表の場：国立陽明交通大学

発表題目：“Xanthine Oxidase Inhibitory Activity by Dietary Constituents”

発表形態：英語口頭発表(添付資料③)

発表者名：箱崎大輝(2年)、辻井結菜(2年)、加藤愛梨(2年)、朝霧ゆり花(2年)

④日時：2024年2月14、15日(水、木) (予定)

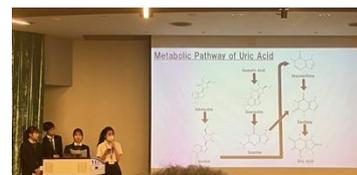
発表の場：沖縄科学技術大学院大学

発表題目：“Xanthine Oxidase Inhibitory Activity by Dietary Constituents”

発表者名：箱崎大輝(2年)、辻井結菜(2年)、朝霧ゆり花(2年)、加藤愛梨(2年)

発表形態：英語口頭発表

発表者名：箱崎大輝(2年)、辻井結菜(2年)、加藤愛梨(2年)、朝霧ゆり花(2年)



6. 「環境安全とリスク」に関する意見と感想

高校の実験室で安全に行える実験には制限があるので、高校生の私たちが痛風のリスクを削減するためにできることを模索するのが大変だった。また実験をするにあたって正確な値を出すことに努めつつ、安全に配慮した実験を行うことが大切であると考えた。

7. 今後の課題

昨年度からの研究でキサンチンの代謝経路に基づいた実験により、食品本来の XO 阻害効果を探索した。さらに今年度は摂取後の体内の pH 変化による阻害効果への影響および食品を混合することによる相乗効果の有無について研究を行った。しかし、体内における pH 変化以外の条件では阻害効果を確認していないので、具体的には体内の温度変化や他の酵素の影響下などでの阻害効果の有無を検証したい。

8. まとめ

私たちは薬剤を使用せずに痛風を予防する食品の探索を目標に実験を行った。コーヒー、茶、レモン果汁、リンゴは実際に経口摂取する際に生じる有効成分同士の混合や体内の pH 変化を考慮した上で現在医療現場において実用化されている痛風治療薬であるアロプリノールと同等の XO 阻害効果が確認された。今後も加熱や酵素同士の相互作用など、生体内の環境を模擬した実験を重ねていきたい。

添付資料① 前年度の研究成果

試料	抽出溶媒	阻害率
タマネギ	水	
	エタノール	48.5
ショウガ	水	54.5
	エタノール	
ニンニク	水	43.4
	エタノール	53.5

注：記していない箇所には不正な値が現れた。



食品のキサンチンオキシダーゼ阻害効果

高槻高等学校 1年GSコース
朝霧 ゆり花 加藤 愛梨 辻井 結菜 箱崎 大輝

研究の目的

尿酸はキサンチンがキサンチンオキシダーゼ(XO)という酵素により酸化することで生成され、痛風の原因となる。食品からXOを阻害する作用のある成分を抽出し、XO阻害効果を調べる。

仮説

各国で健康食材とされ、香辛料として使用されるタマネギ、ショウガ、ニンニクにはXO阻害効果があるのではないかと考えられる。

実験方法

- 1.各食品から水もしくはエタノールを用いて抽出する。(この抽出液を以下試料という)
- 2.試料とXOが入った試験管、試料のみが入った試験管(酵素ブランク)、XOのみが入った試験管(試料ブランク)を用意する。
- 3.各試験管に緩衝液とキサンチン水溶液を入れ、25°Cでインキュベートして反応を促進させる。
- 4.塩酸でXOを失活させた後、290nmで吸光度を測定し、阻害率を求め、試料の代わりにXO阻害薬であるアロプリノールを用いた場合の結果と比較する。

考察

- ・タマネギの抽出液(水)では逆にキサンチンの酸化が促進されたと考えられる。
- ・ショウガの抽出液(エタノール)ではショウガに含まれている290nmの光をよく吸収する成分がXOによって変化したと考えられる。
- ・阻害率が50%近くとなった試料ではアロプリノールと同等のXO阻害効果があったと考えられる。

参考文献

A.P.Sweeney, S.G.Wyllie, R.A.Shalliker, J.L.Markham. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. Journal of Ethnopharmacology. P273-277. 75. 2001.

結論

エタノールに溶解出したタマネギ、ニンニクの成分と水に溶解出したショウガ、ニンニクの成分には阻害薬と同等のキサンチンオキシダーゼ阻害効果が確認できた。

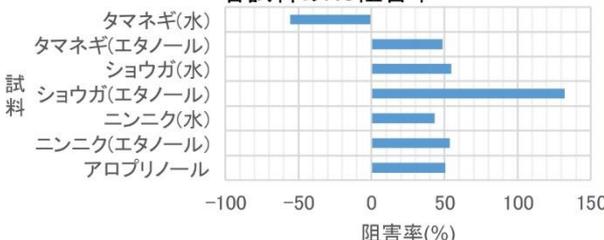
結果

阻害率は次の式で求めた。

$$\left(1 - \frac{\text{試料ありの吸光度} - \text{酵素ブランクの吸光度}}{\text{試料ブランクの吸光度}}\right) \times 100[\%]$$

試料	抽出溶媒	吸光度	酵素ブランク	変化量	試料ブランク	阻害率
タマネギ	水	0.633	0.479	0.154	0.099	-55.6
	エタノール	0.172	0.121	0.051	0.099	48.5
ショウガ	水	0.241	0.196	0.045	0.099	54.5
	エタノール	0.437	0.469	-0.032	0.099	132
ニンニク	水	0.259	0.203	0.056	0.099	43.4
	エタノール	0.184	0.138	0.046	0.099	53.5

各試料のXO阻害率



今後の展望

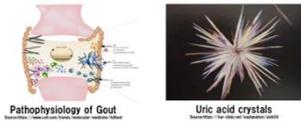
食品に含まれているどの物質がXOを阻害しているのかを確認したい。また、ショウガ(エタノール)吸光度が100%を超えたので、結果が正しいかを確認するために実験回数を増やしたい。

添付資料③ 国立陽明交通大学にて英語口頭発表で用いたスライド

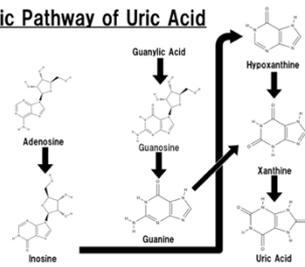


Introduction and Abstract

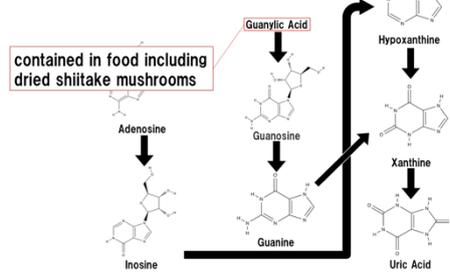
Gout (痛風) ... A common disease among males. Too much uric acid in your body causes sharp crystals to form in your joints and triggers chronic pains.



Metabolic Pathway of Uric Acid

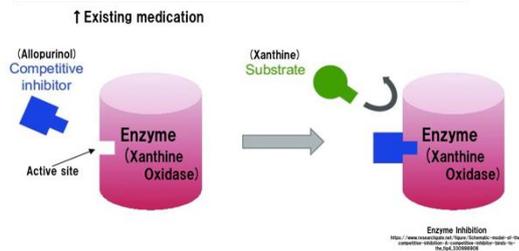


Metabolic Pathway of Uric Acid

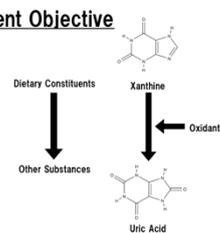


Metabolic Pathway of Uric Acid

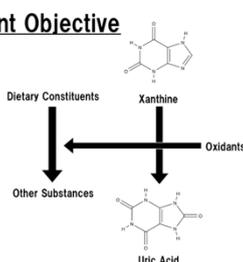
How allopurinol inhibits Xanthine Oxidase



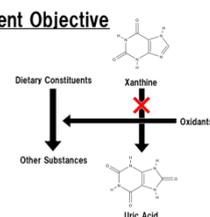
Experiment Objective



Experiment Objective



Experiment Objective



Objective: inhibiting the effects of xanthine oxidase by dietary constituents

Materials and Methods

- 1st Experiment:** (I) Extract dietary constituents and melt them into ethanol or water.
 (II) Prepare an experimental group and two control groups.
 One without xanthine oxidase (enzyme control group) and another without any sample (sample control group).
 (III) Maintain all groups at an optimum temperature of xanthine oxidase (25°C) and incubate them.

	Enzyme Control Group	Sample Control Group	Experimental Group
Dietary Constituent	○	✗	○
Xanthine Oxidase	✗	○	○

Materials and Methods

Evaluation Methods: Measure absorbances of sample solution at 290nm and derive an inhibition rate.
 Subsequently, compare them with a rate of a known xanthine oxidase inhibitor (allopurinol) and evaluate the inhibitory activity of each sample.



a wavelength absorbed by uric acid but penetrated by xanthine

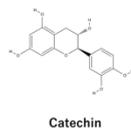
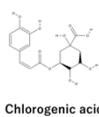
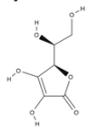
Materials and Methods

- 2nd Experiment:**
 Ascertain if there is a synergism by mixing efficacious dietary constituents together.
 Next, append xanthine oxidase to them, and evaluate inhibition rates.



Consideration (1st experiment)

- Ascorbic acid, chlorogenic acid and catechin which are each contained in lemon, coffee, and green tea are all antioxidants absorbed via the digestive track.
- They exhibit inhibition effect in our body.



Results and Consideration (2nd experiment)

Sample (15 µg/mL, Solvent:Water)	Inhibition Rates [%]
lemon juice	83.1
coffee	77.5
apple juice	81.7
lemon juice + coffee	90.1
apple juice + coffee	77.5
allopurinol	89.5

All samples have no or little synergic effect.

- Respective dietary constituents do not interfere with each other.

References

- A.P.Sweeney, S.G.Wyllie, R.A.Shaliker, J.L.Markham. Xanthine oxidase inhibitory activity of selected Australian native plants. Journal of Ethnopharmacology. P273-277. 75. 2001.
- Cleveland Clinic. "Gout". <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/4755-gout>. (reference:2023-11-4)
- <https://www.britannica.com/science/competitive-inhibition>

Materials and Methods

Evaluation Methods: Measure absorbances of sample solution at 290nm and derive an inhibition rate.
 Subsequently, compare them with a rate of a known xanthine oxidase inhibitor (allopurinol) and evaluate the inhibitory activity of each sample.

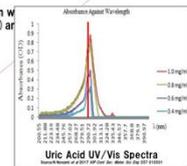


Materials and Methods

Evaluation Methods: Measure absorbances of sample solution at 290nm and derive an inhibition rate.
 Subsequently, compare them with a rate of a known xanthine oxidase inhibitor (allopurinol) and evaluate the inhibitory activity of each sample.



a wavelength absorbed by uric acid but penetrated by xanthine

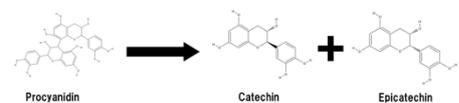


Results (1st experiment)

Sample (15 µg/mL)	Solvents	Inhibition Rates (%)
apple juice	water	62.9
green tea	water	68.3
lemon juice	water	74.6
coffee	water	76.3
garlic	water	0
onion	water	17.4
onion	ethanol	60.8
ginger	water	-15.6
ginger	ethanol	77.2
allopurinol	TWEEN80	73.1

Consideration (1st experiment)

- Procyanidin, an antioxidative substance mainly contained in apple, is disassembled into components such as catechin or epicatechin and then absorbed in our stomach and upper part of small intestine.
- Should avoid ingesting with a lot of water to maintain concentrations of stomach acid.



Future Outlook

- These experiments carried out in vitro.
- The surroundings were different from the body. ex) pH, heating, other enzymes, etc.
- We are planning to repeat these experiments in similar surroundings to that internally.