

201131054A

厚生労働科学研究費補助金
食品の安全確保推進研究事業

抗酸化物質大量摂取時の安全性評価：
運動の有用作用に及ぼす影響

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹林 純

平成 24(2012)年 5 月

目 次

I. 総括研究報告

抗酸化物質大量摂取時の安全性評価:運動の有用作用に及ぼす影響

竹林 純 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 1

II. 分担研究報告

1. ビタミン C 合成不能ラット (ODS ラット) において、ビタミン C の摂取量が運動トレーニング時の有用な遺伝子応答等に及ぼす影響

竹林 純、加藤美智子 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 11

2. ビタミン C の大量投与が単回持久運動によるラット骨格筋の PGC-1 α および抗酸化酵素の発現に及ぼす影響

竹林 純、加藤美智子 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 19

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 27

総括研究報告書

抗酸化物質大量摂取時の安全性評価:運動の有用作用に及ぼす影響

主任研究者 竹林 純 独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部
食品分析研究室 精度管理担当研究員 (主任)

種々の疾病の発症及び増悪に関わる活性酸素・フリーラジカルの消去因子として、食品中に含まれている抗酸化物質に大きな関心が寄せられている。現在、抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品(抗酸化サプリメント)が多数流通している。我々は以前、これらの抗酸化サプリメントの中に、通常の食品と比較して 1,000 倍以上の濃度の抗酸化物質を含むものがあることを明らかにし、食経験を逸脱した量の抗酸化物質が摂取され得ることを示した。本研究はそれをふまえ、抗酸化サプリメントの安全性をより詳細に検証するものである。

抗酸化サプリメントの大量摂取時の安全性評価として、運動の有用作用に及ぼす影響に着目した。運動は、酸素消費の増大に起因する活性酸素の発生増加を伴うため、抗酸化サプリメントの利用が推奨されてきた。ところが近年、運動時に発生する活性酸素は種々の酵素や転写共役因子の発現を介して運動の有用面に寄与しており、抗酸化物質の大量摂取により活性酸素を消去すると運動の有用性が損なわれるという研究結果が報告された。そこで本研究では、抗酸化物質の種類・用量が運動の有用性に及ぼす影響について詳細に検討することを目的とした。2 年計画の 1 年目である今年度は、以下の研究を実施した。

1. 抗酸化物質の大量摂取が運動の有用作用を打ち消すかどうか検証するため、先行研究(Gomez-Cabrera *et al.*, 2008)を参考に評価系の確立を試みた。ODS ラットに 3 週間の運動トレーニングを行うと同時に、ビタミン C を 3 段階の用量で飲料水に混和して投与した。後肢筋肉において運動トレーニング後の PGC-1 α や抗酸化酵素の mRNA 発現レベル等を解析したが、ビタミン C が運動による有用な遺伝子応答を抑制することはなかった。
2. 先行研究の追試で評価系が確立できなかったため、他の研究(Wadley *et al.*, 2010)を参考に評価系を検討した。Wistar ラットに単回の運動負荷を行うと同時に、大量のビタミン C を強制経口投与あるいは腹腔内投与する系を用いて検討したが、ビタミン C が運動による有用な遺伝子応答を抑制することはなかった。

以上の検討では、ビタミン C の大量摂取が運動の有用性を打ち消すという結果は得られず、他の抗酸化物質や抗酸化サプリメントについて評価を行うための実験系を確立することができなかった。次年度は、運動が重要な治療法であると同時に酸化ストレスが高まっている糖尿病時に着目し I 型糖尿病モデルラットを用いて検討するとともに、運動による遺伝子応答だけではなく持久力向上等を指標とした評価系の検討を予定している。

研究協力者

加藤美智子 独立行政法人国立健康・栄養
研究所 食品保健機能研究部
食品分析研究室

A. 研究目的

種々の疾病の発症及び増悪に関わる活性酸素・フリーラジカルの消去因子として、食品中に含まれている抗酸化物質に大きな関心が寄せられている [1]。現在、活性酸素・フリーラジカルを消去する能力を有する抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品（抗酸化サプリメント）が多数流通している。

申請者らは、平成 21-22 年度の厚生労働科学研究「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の有効性・安全性に関する研究」において、国内流通している抗酸化サプリメント（30 品目） [2] の抗酸化能を、一般的な野菜（23 品目） [3] ・果物（13 品目） [4] の抗酸化能と比較検討した。ORAC 法を用いて、野菜・果物中に含まれる抗酸化物質の総量を数値化すると 1.7 ~ 52.2 $\mu\text{mol TE/g}$ となるのに対し、抗酸化サプリメントは 4 ~ 19,420 $\mu\text{mol TE/g}$ となり、一般的な野菜・果物と比較して非常に高い濃度の抗酸化物質を含んでいるサプリメントが複数存在することを明らかにした。これらの抗酸化サプリメントを利用する場合、通常の食事から摂取可能な範囲を逸脱した量の抗酸化物質を摂取する可能性が考えられた。また、抗酸化サプリメントの安全性について培養細胞等を用いて評価した結果、抗酸化力が高いものほど細胞毒性を示す傾向が認められた [5]。

抗酸化サプリメントに対する消費者意識調査 [6] では、一般消費者の 84 % が、何らかの健康食品（機能性食品）の利用経験があり、

そのうちそのうち 50 % が、抗酸化サプリメントを利用している/利用してみたいと回答した。一般消費者が抗酸化サプリメントに期待している健康影響としては、「日常的な健康の保持（66.3 %）」「生活習慣病の予防（58.5 %）」「特定の栄養素を補う（56.0 %）」「野菜・果物の不足を補う（55.4 %）」が多く、また抗酸化サプリメントを利用している/利用してみたいと回答した消費者のうちの過半数が「通常の食事では抗酸化力が足りない」「複数のサプリメントなどを組み合わせると良い」という科学的根拠に基づかない認識を有している事が明らかとなった。

さらに、西欧諸国を中心に、ORAC 法などで数値化した食品の抗酸化能を表示した食品が多数流通しており、我が国内でも幾つかの抗酸化能表示食品が流通している。抗酸化物質の摂取が健康の維持・増進に寄与する可能性はあるが、その 1 日必要量を示す科学的根拠は乏しい。そのため、抗酸化能表示食品においては「抗酸化値の高さ」のみが強調されている。これは国民に「抗酸化値が高いものを食べるほど健康に良い」という誤解を与え、抗酸化物質の大量摂取を惹起し得ると思われる。

このように現在、抗酸化物質の大量摂取を助長する下地ができつつあると言える。「いわゆる健康食品」の摂取量及び摂取方法等の表示に関する指針について [平成 17 年 2 月 28 日付け食安発第 228001 号] では、健康食品の摂取量について「安全性試験データ、通常の食生活における当該食品の摂取量等科学的根拠に基づき設定すること」とされているが、抗酸化サプリメントについては食経験を逸脱した量を摂取する可能性がある。また、科学的な安全性試験が実施されている抗酸化物質は一部のポリフェノール類等に限られており、大

部分の抗酸化サプリメントの安全性は現時点で充分検証されているとは言えない。本研究はこのような現状をふまえ、抗酸化サプリメントの安全性をより詳細に検証するものである。

本研究では、抗酸化サプリメント大量摂取の安全性評価として運動の有用性に及ぼす影響に着目した。運動は健康の維持・増進に大きく寄与するが、酸素消費量の増加による活性酸素の発生を伴うため、従来から運動時の抗酸化物質の補給が推奨されてきた。ところが近年、Gomez-Cabrera らは [7]、ラットにトレーニングを施すと、トレッドミル走行の持続時間が 2.9 倍延長するが、トレーニングと同時に大量のビタミン C を摂取させると持続時間は 1.3 倍にしかならないことを示した。さらに、Ristow らは [8]、ヒトを対象とした研究で、トレーニングと同時に大量のビタミン C 及び E を摂取すると、トレーニングによる耐糖能の改善が妨げられることを示した。両方の研究において、運動時に生じる活性酸素により抗酸化酵素 (SOD、GPx) の発現亢進等の生体にとって有用な応答が起こるが、抗酸化物質の大量摂取により活性酸素が消去されると同時に、これらの有用な応答も抑制されることが示唆されている。

このように先行研究において、抗酸化物質の大量摂取により運動の有用性が損なわれる可能性が示されているが、研究は健常な動物あるいはヒトを対象とした抗酸化物質の大量投与時に限られており、また用いられている抗酸化物質もビタミン C と E のみである。そこで本研究では、健常及び糖尿病動物モデルで種々の抗酸化物質標品および抗酸化サプリメントの摂取が運動の有用性に及ぼす影響について複数の用量で検討することを目的とした。2 年計画の 1 年目である本年度は先行研究

を基にビタミン C を用い健常動物での評価系の検討を行った。

B. 研究方法

1) ビタミン C 合成不能ラット (ODS ラット) において、ビタミン C の摂取量が運動トレーニング時の有用な遺伝子応答等に及ぼす影響

ビタミン C 合成能を欠く ODS ラット 30 匹 (8 週齢、オス) をビタミン C の投与量 (20、100、500 mg/kg/日) に従い 3 群に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 6 群に分けた。ビタミン C は飲料水に混和し投与した。運動群にはトレッドミルを用いて 3 週間の運動トレーニングを行った。最後の運動の 1 日 (23~25 時間) 後に腓腹筋及びヒラメ筋を摘出し、PGC-1 α 及び抗酸化酵素 (SOD1, SOD2, GPx1) の mRNA 発現量等を比較した。

2) ビタミン C の大量投与が単回持久運動によるラット骨格筋の PGC-1 α および抗酸化酵素の発現に及ぼす影響

8 週齢の Wistar 系雄ラットを安静群と運動群に分け、さらに各々をビタミン C 投与群と対照群に分けた。運動群にはトレッドミルを用いて、単回の運動を負荷した。ビタミン C 投与群には運動開始直前にゾンデを用い 2000 mg/kg のビタミン C を水に溶かして強制経口投与し、対照群には水を与えた。運動終了 4 時間後に血液及び腓腹筋およびヒラメ筋を個別に摘出し、血漿中ビタミン C 濃度を HPLC 法にて、骨格筋中の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて測定した。また、投与経路を腹腔内に変更し、ビタミン C の血中濃度を非生理的な濃度として同様の検討を行った。

C. 研究結果及び考察

1) ビタミン C 合成不能ラット (ODS ラット) において、ビタミン C の摂取量が運動トレーニング時の有用な遺伝子応答等に及ぼす影響

PGC-1 α および SOD2 の mRNA 発現に関しては運動およびビタミン C の摂取は無影響であった。SOD1 および GPx の mRNA 発現は運動により有意に増加したが、ビタミン C は用量に関わらず無影響であった。また、経口グルコース負荷試験を行い各群の耐糖能を比較したが、有意な差は認められなかった。血中ビタミン C 濃度は、ビタミン C 投与量に従って増加していたが、運動による影響は認められなかった。従って、この実験系では運動の有用性に及ぼす抗酸化物質大量摂取の影響を評価することは困難であると考えられた。

2) ビタミン C の大量投与が単回持久運動によるラット骨格筋の PGC-1 α および抗酸化酵素の発現に及ぼす影響

腓腹筋およびヒラメ筋における PGC-1 α の mRNA 発現は単回運動により顕著に増加したが、ビタミン C の大量経口摂取によりそれが抑制されることはなかった。腓腹筋においては、抗酸化酵素 SOD2 および SOD3 の有意な発現亢進が認められたが、ビタミン C の摂取はそれ無影響であった。また、腹腔内投与によりビタミン C の血中濃度を非生理的なレベルに高めても、運動による PGC-1 α の mRNA 発現亢進は抑制されなかった。以上の結果から、ビタミン C は大過剰量を摂取したとしても、単回運動時の有用な遺伝子応答を妨げないことが示唆された。

D. 結論

抗酸化物質大量摂取時の安全性評価として、ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用を阻害するという先行研究 [7] を基に検討した。運動時に骨格筋で誘導される PGC-1 α や抗酸化酵素等の有用な遺伝子応答を指標に検討したが、ビタミン C の大量摂取が運動の有用性を損なう可能性を示唆する結果が得られなかった。そのため、他の抗酸化物質標品および抗酸化サプリメントについて評価を行うための実験系の確立に至らなかった。ビタミン C の大量摂取は運動による有用な遺伝子応答を妨げないという報告も複数あり [9, 10]、抗酸化物質の摂取が運動時の骨格筋における遺伝子発現に及ぼす影響は単純ではないと考えられる。次年度は、運動が重要な治療法であると同時に酸化ストレスが高まっている糖尿病時に着目し I 型糖尿病モデルラットを用いて検討するとともに、運動による遺伝子応答だけではなく持久力向上等を指標とした評価系の検討を予定している。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

<参考文献>

- [1] Fang Y. Z., Yang S., Wu G., Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, **18**, 872-879 (2002).
- [2] 沖 智之, 竹林 純, 佐藤麻紀, 日本国内で流通している抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の抗酸化力に関する研究, 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の安全性・有効性に関する研究」総括・分担研究報告書, 30-36 (2011).
- [3] 竹林 純, 沖 智之, 陳 健斌, 日本において一般的に食されている野菜類からの抗酸化物質一日摂取量の推定, 平成 21 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の安全性・有効性に関する研究」総括・分担研究報告書, 15-21 (2010).
- [4] 竹林 純, 沖 智之, 日本において一般的に食されている果物類からの抗酸化物質一日摂取量の推定, 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の安全性・有効性に関する研究」総括・分担研究報告書, 8-16 (2011).
- [5] 松本 輝樹, 鈴木 萌夏, 横須賀 章人, 三卷 祥浩, 抗酸化物質を含むいわゆる健康食品の安全性評価について, 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の安全性・有効性に関する研究」総括・分担研究報告書, 37-45 (2011).
- [6] 後藤一寿, 竹林 純, 沖 智之, 卓 興鋼, 抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品に関する消費者意識調査, 平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金 食品の安心・安全確保推進事業「抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品の安全性・有効性に関する研究」総括・分担研究報告書, 71-99 (2011).
- [7] Gomez-Cabrera M. C., Domenech E., Romagnoli M., Arduini A., Borrás C., Pallardo F. V., Sastre J., Viña J., Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.*, **87**, 142-149 (2008).
- [8] Ristow M., Zarse K., Oberbach A., Klötting N., Birringer M., Kiehnopf M., Stumvoll M., Kahn C. R., Blüher M., Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8665-8670 (2009).
- [9] Wadley G. D., McConell G. K., High-dose antioxidant vitamin C supplementation does not prevent acute exercise-induced increases in markers of skeletal muscle mitochondrial biogenesis in rats. *J. Appl. Physiol.*, **108**, 1719-1726 (2010).
- [10] Higashida K., Kim S. H., Higuchi M., Holloszy J. O., Han D. H., Normal adaptations to exercise despite protection against oxidative stress. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **301**, E779-784 (2011).



独立行政法人
国立健康・栄養研究所
National Institute of Health and Nutrition

抗酸化物質大量摂取時の安全性評価 — 運動の有用作用に及ぼす影響 —

独立行政法人 国立健康・栄養研究所
食品保健機能研究部 食品分析研究室
研究代表者 竹林 純

1

【研究背景及び目的】



独立行政法人
国立健康・栄養研究所
National Institute of Health and Nutrition

抗酸化物質を含有するいわゆる健康食品 (抗酸化サプリメント) を取り巻く現状

- ・通常の野菜・果物と比較して 1000 倍以上の抗酸化物質を含有する商品が存在
- ・日常的な健康の保持や生活習慣病の予防、抗老化効果などへの過剰な期待
- ・「抗酸化能表示食品」の流通及び「数値競争」



抗酸化物質の大量摂取を助長する下地ができつつある

抗酸化物質の大量摂取が運動の有用性を損なう可能性が報告

(Gomez-Cabrera et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 87, 142-149 (2008), Ristow et al., *PNAS*, 106, 8665-8670 (2009))

- ・健全な動物またはヒトを対象とし、ビタミン C または E の大量摂取時に限った研究

【研究目的】 健全または糖尿病時に、種々の抗酸化物質の摂取が運動の有用性に及ぼす影響を解明

2

【運動と抗酸化物質摂取】

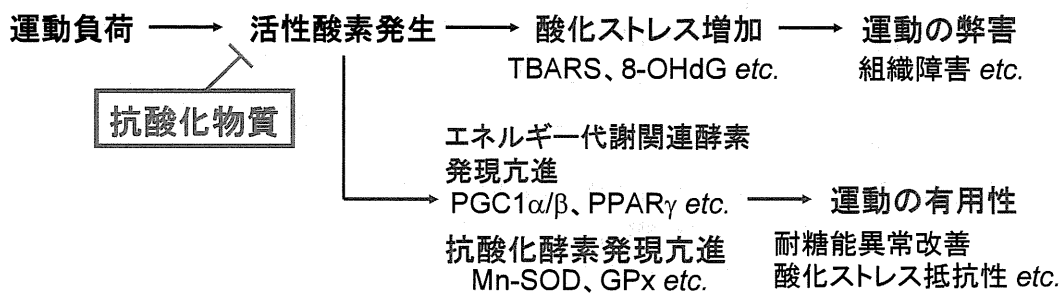
先行研究の概要

【トレーニングによる体力増強の阻害 (Gomez-Cabrera et al., 2008)】

ラットを運動トレーニングすると、トレッドミル走行可能時間が 2.9 倍に
⇒ ビタミン C を大量摂取させたラットでは 1.3 倍にしかならない

【運動による耐糖能改善の阻害 (Ristow et al., 2009)】

ヒトが運動トレーニングを行うと、耐糖能 (インスリン感受性) が改善する
⇒ ビタミン C (1000 mg/day) + E (400 IU/day) の摂取で改善は認められなくなる



3

【研究 1: 実験方法】

Gomez-Cabrera et al. (2008) の実験方法を参考に、評価系の確立を試みた

ODS ラット (8 週齢、♂)

トレッドミル運動
(15 ~ 20 m/min, + 5 度
30 ~ 60 min/d, 5 d/wk)

ビタミン C 投与
(20, 100, 500 mg/kgBW/d)
飲料水に混和して投与

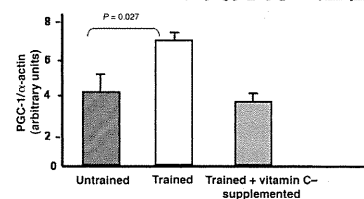
3 週間飼育 (各群 5 匹)

最後の運動の 24 時間後に解剖
(採血、ヒクク筋とヒラメ筋を摘出)

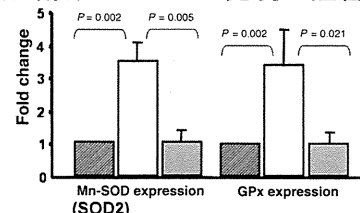
PGC-1α 及び抗酸化酵素の
mRNA 発現量を解析

先行研究の結果

PGC-1α のタンパク質発現が阻害される

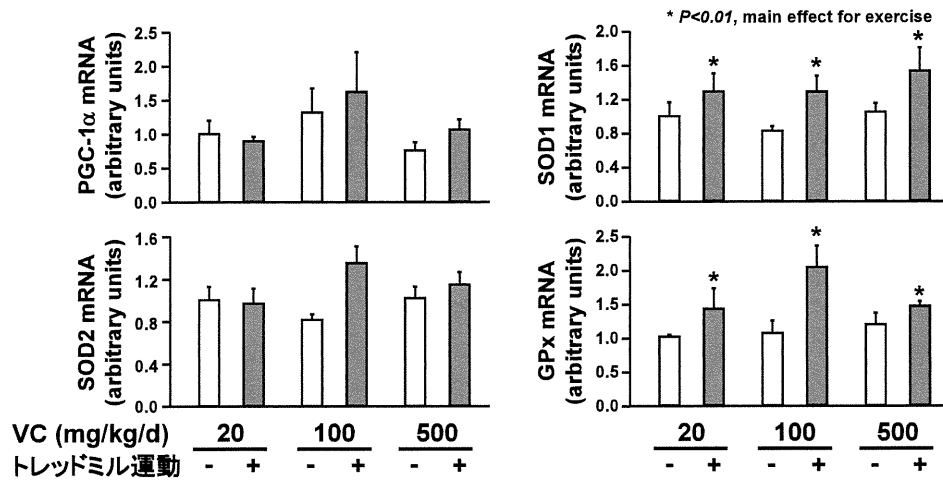


抗酸化酵素の mRNA 発現が阻害される



4

【研究 1: ヒフク筋およびヒラメ筋における mRNA 発現】



運動及びビタミン C の摂取量は PGC-1α, SOD2 の mRNA 発現量に無影響
 運動により SOD1 及び GPx 発現量は増加したが、ビタミン C の摂取量は無影響
 ⇒ 先行研究の再現性が得られず、評価系の確立に至らなかった

5

【研究 2: 実験方法】

独立行政法人
 国立健康・栄養研究所
 National Institute of Health and Nutrition

Wadley et al. (2010) の実験方法を参考に、評価系の確立を試みた

Wistar ラット (8 週齢、♂)

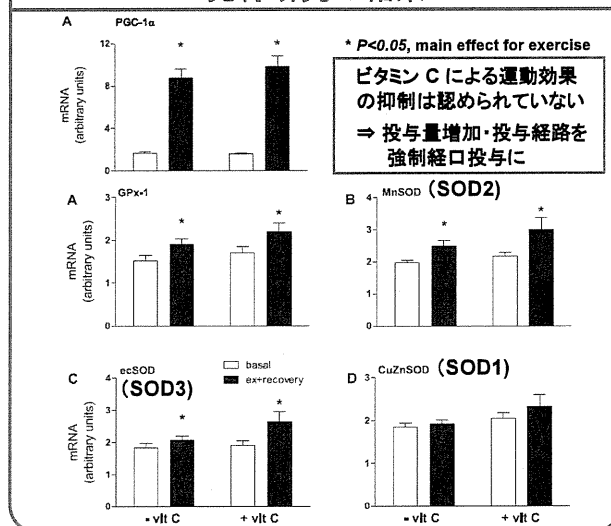
ビタミン C 投与
 (2000 mg/kgBW
 強制経口投与)

トレッドミル運動
 (10 m/min, 5 min
 15 m/min, 5 min
 20 m/min, 5 min
 25 m/min, 45 min
 + 5 度, 1 回)

運動の 4 時間後に解剖
 (ヒフク筋とヒラメ筋を摘出)

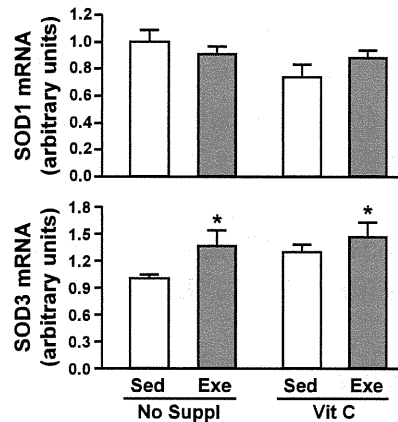
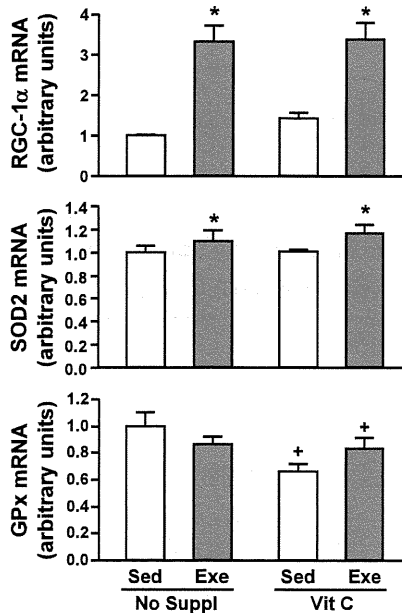
PGC-1α 及び抗酸化酵素の
 mRNA 発現量を解析

先行研究の結果



6

【研究 2: ヒフク筋における mRNA 発現】

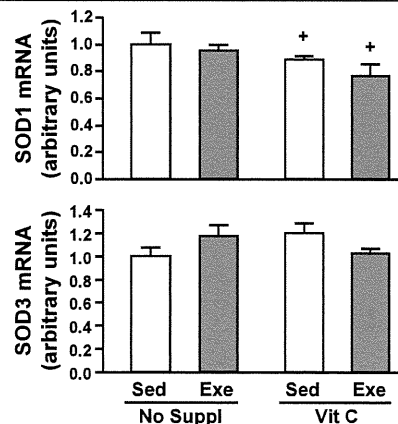
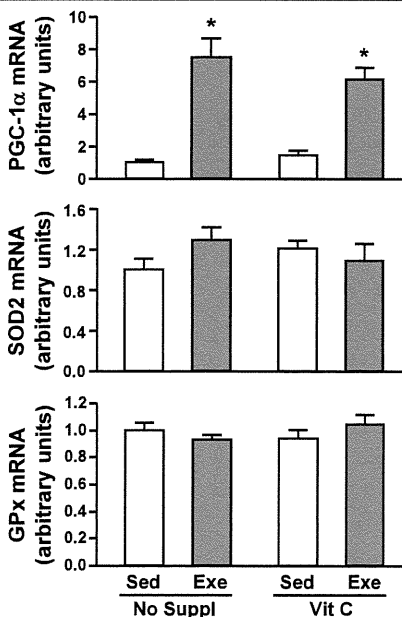


運動により PGC-1α の mRNA 発現量が顕著に増加、SOD2 および SOD3 も有意に増加したが、ビタミン C の大量摂取で増加が抑制されることはなかった

* $P < 0.01$, main effect for exercise, + $P < 0.05$, main effect for vitamin C

7

【研究 2: ヒラメ筋における mRNA 発現】



運動により PGC-1α の mRNA 発現量が顕著に増加したが、ビタミン C 投与の影響はなし
 ⇒ 腹腔内投与で血中ビタミン C 濃度を非生理的なレベルまで高めても、運動による PGC-1α 誘導に影響は認められなかった (data not shown)

* $P < 0.01$, main effect for exercise, + $P < 0.05$, main effect for vitamin C

8

【結果のまとめ・考察及び今後の研究内容】

種々の抗酸化物質の摂取が運動の有用性に及ぼす影響を解明するため、先行研究を参考に評価系の確立を試みた

大量のビタミン C 摂取が運動の有用性を損なう可能性を示唆する結果が得られず ⇒ 評価系の確立に至らなかった

ビタミン C・E の大量摂取は運動による有用な遺伝子発現を妨げないという複数の報告
⇒ 運動及び抗酸化物質の摂取が骨格筋における遺伝子発現に及ぼす影響は複雑

【次年度の研究予定】

- ・ I 型糖尿病モデルラットを用いて検討
- ・ 遺伝子発現ではなく、運動による持久力向上を指標に評価系を検討

ビタミン C の大量
投与時について検討



運動の有用性
を抑制



他の抗酸化物質
用量依存性について検討

平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)
分担研究報告書

ビタミン C 合成不能ラット (ODS ラット) において、ビタミン C の摂取量が運動トレーニング時の有用な遺伝子応答等に及ぼす影響

分担研究者 竹林 純 独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部
食品分析研究室 精度管理担当研究員 (主任)
研究協力者 加藤美智子 独立行政法人国立健康・栄養研究所 食品保健機能研究部
食品分析研究室 技術補助員

【目的】 先行研究において、ラットに運動トレーニングを行うと同時に大量のビタミン C を経口投与すると、トレーニングによる持久力の増加が妨げられ、後肢の骨格筋である腓腹筋およびヒラメ筋において運動による PGC-1 α 及び抗酸化酵素 (SOD2, GPx) の発現亢進が抑制されることが示された。この報告に着目し、抗酸化物質の大量摂取が運動の有用作用に及ぼす影響を評価するための実験系の確立を試みた。

【方法】 ビタミン C 合成能を欠く ODS ラット 30 匹 (8 週齢、オス) をビタミン C の投与量 (20、100、500 mg/kg/日) に従い 3 群に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 6 群に分けた。ビタミン C は飲料水に混和し投与した。運動群にはトレッドミルを用いて 3 週間の運動トレーニングを行った (トレッドミル速度: 15~20 m/分、傾斜: +5 度、時間: 30~60 分/日、頻度: 5 日/週)。最後の運動の 1 日 (23~25 時間) 後に腓腹筋およびヒラメ筋を摘出し、PGC-1 α および抗酸化酵素 (SOD1, SOD2, GPx1) の mRNA 発現量等を解析した。

【結果及び考察】 PGC-1 α および SOD2 の mRNA 発現量については運動およびビタミン C の摂取はいずれも無影響であった。SOD1 および GPx の mRNA 発現量は運動により有意に増加したが、ビタミン C は用量に関わらず無影響であった。また経口グルコース負荷試験を行い各群の耐糖能を比較したが、有意な差は認められなかった。血中ビタミン C 濃度は、ビタミン C 投与量に従って増加していたが、運動による影響は認められなかった。従って、この実験系では運動の有用性に及ぼす抗酸化物質大量摂取の影響を評価することは困難であると考えられた。

A. 研究目的

運動時には、酸素消費の増大により活性酸素が増加することが古くから知られており [1]、抗酸化サプリメントの利用が推奨されてきた。ところが近年、抗酸化サプリメントの摂取が運動の有用性を妨げるという報告が相次いでい

る。2008 年、Gomez-Cabrera ら [2] は、ヒトにおいてビタミン C (1 g/day) を大量摂取しても、8 週間の運動トレーニングによる VO_{2max} には影響しないことを示し、さらにラットにおいてビタミン C の大量経口摂取 (500 mg/kg) により、6 週間の運動トレーニング運動による

持久力の増加が抑制され、3 週間の運動トレーニングによる筋肉での有益な mRNA 発現 (PGC-1、NRF-1、mTFA、SOD2、GPx) が抑制されることを示した。さらに、2009 年、Ristow ら [3] は、ヒトにおいてビタミン C (1000 mg/day) と E (400 IU/day) の併用大量摂取により、4 週間の運動トレーニングによるインシュリン感受性亢進が抑制され、筋肉での PPAR γ 、PGC1 α/β 、SOD1/2、GPx の mRNA 発現も抑制されることを示した。

そこで、抗酸化サプリメントの大量摂取時の安全性を運動の有用作用に及ぼす影響に着目して評価するため、まずビタミン C について Gomez-Cabrera らの研究 [2] を参考とし、評価系の確立を試みた。また、ビタミン C は大量に摂取すると運動の有用性を妨げる可能性が示されているが、その不足については文献調査した限りでは検討されていなかった。一般的なラットおよびマウスはビタミン C を体内で生合成できるので、ヒトと同じくビタミン C を合成できない ODS ラットを用い、ビタミン C の不足についても併せて検討した。

B. 研究方法

【動物】

ビタミン C を生合成できない ODS/ShiJcl-od/od ラット (オス、7 週齢、30 匹) を日本クレアから購入し、ビタミン C 欠乏固形飼料 (CL-2、日本クレア) およびビタミン C を 2 mg/mL 含む飲料水を与え 1 週間予備飼育を行った後、下記の 6 群に分けた。グループ 1: 運動なし、ビタミン C (低、20 mgVC/kg/d); グループ 2: 運動なし、ビタミン C (中、100 mgVC/kg/d); グループ 3: 運動なし、ビタミン C (高、500 mgVC/kg/d); グループ 4: 運動あり、ビタミン C (低、20

mgVC/kg/d); グループ 5: 運動あり、ビタミン C (中、100 mgVC/kg/d); グループ 6: 運動あり、ビタミン C (高、500 mgVC/kg/d)。運動群は +5 度の傾斜をかけたトレッドミル (KN-73 R-10、夏目製作所) を用い 5 日/週の運動負荷を 3 週間行った。トレッドミルの速度および運動時間は実験スケジュールと共に図 1 に示した。ビタミン C は飲料水にアスコルビン酸 (和光純薬) を混和して投与し、前日の摂水量と体重から 20、100、500 mgVC/kg/d となるように飲料水中ビタミン C 濃度を適宜調整した。

【経口グルコース負荷試験】

3 週間の運動負荷の後、ラットを一晩絶食 (飲料水には引き続きビタミン C を混和) させた後、経口グルコース負荷試験を行った。生理食塩水に溶解したグルコース (0.2 g/mL) を経口投与 (2 g グルコース/kg) した後、経時的に尾静脈より採血し、血糖値をグルテスト Neo スーパー (三和化学研究所) を用いて測定した。

【骨格筋における遺伝子発現解析】

経口グルコース負荷試験を行った翌日、運動群はトレッドミルにて運動を行った。17:00 に全群の飲料水をビタミン C を含まない水道水に変更し、8 g のエサを与えた。運動終了後 23 ~ 25 時間にエーテル麻酔下、心臓から採血し屠殺した。下肢より腓腹筋及びヒラメ筋をまとめて摘出した。筋肉から ISOGEN II (ニッポンジーン) を用いて total RNA をプロトコールに準じ抽出し、total RNA 量を 260 nm の吸光度から求めた。抽出した RNA より逆転写を行い、cDNA を調製して mRNA 発現量の測定に用いた。mRNA 発現量は、

BIO-RAD の Mini Opticon Real-Time PCR System を用いて、SYBR Green 法にて、内部標準 GAPDH を用い、相対比として求めた。使用した Primer の配列を以下に示す。

[GAPDH] Forward Primer:

5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'、

Reverse Primer:

5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

[PGC1 α] Forward Primer:

5'-ACCCACAGGATCAGAACAAACC-3'、

Reverse Primer:

5'-GACAAATGCTCTTTGCTTTATTGC-3'

[SOD1] Forward Primer:

5'-AGCATGGGTTCCATGTCCATC-3'、

Reverse Primer:

5'-AGCCACATTGCCAGGTCTC-3'

[SOD2] Forward Primer:

5'-GACTAGGCCACAGGGCATTCA-3'、

Reverse Primer:

5'-ACTCAGAAACCCGTTTGCCTCTAC-3'

[GPx1] Forward Primer:

5'-CGACATCGAACCCGATATAGA-3'、

Reverse Primer:

5'-ATGCCTTAGGGTTGCTAGG-3'

【血中ビタミン C】

血漿中のビタミン C 濃度は、Lykkesfeldt らの方法 [4] に準じて前処理した後、Ziegler らの方法 [5] に準じて HPLC にて測定した。

【統計処理】

結果は、平均値±標準誤差で示した。統計学的解析は Statcel 3 (オーエムエス出版) を用いて 2-way ANOVA で解析した。その後の検定を行う場合は Tukey-Kramer 法にて行い、

$p < 0.05$ を有意とした。

C. 結果および考察

今回の研究では、ビタミン C を生合成できない ODS ラットを用いて、ビタミン C が運動の有用作用に及ぼす影響を低中高の 3 つの用量で検討した。先行研究 [2] において、運動の有用作用が打ち消されるのが 500 mgVC/kg/d であるためこれを高用量とした。一方、日本クレアの資料によると ODS ラットは、ビタミン C の摂取量が 10 mgVC/kg/d 程度で半数が欠乏症である壊血病を発症する。そのため、低用量を 20 mgVC/kg/d に設定した。そして、中間の 100 mgVC/kg/d を中用量とした。今回の実験では、運動の有無にかかわらず、ビタミン C の欠乏症状が認められたラットはいなかった。

体重増加量は、運動の有無により差はなかったが、ビタミン C の投与量による差が認められた (表 1)。Tukey-Kramer 法で群間の比較を行った結果、ビタミン C 高用量群 (グループ 3 および 6) で他の群と比較して体重増加量が有意に低かった。これらビタミン C 高用量群では、飲料水中のビタミン C 含量が 5 mg/mL 程度となり、その酸味のためか摂水量が他の群より少なかったことがその原因ではないかと推察される。毎日の節水量と飲料水中のビタミン C 濃度から計算したビタミン C 摂取量は、全群おおよそ設定値通りとなった (表 1)。血中ビタミン C 濃度はビタミン C の投与量が増えるに従って有意に高まり (Tukey-Kramer 法)、運動の影響は認められなかった (表 1)。

ビタミン C および E の大量摂取により運動トレーニングによる耐糖能改善効果が打ち消されるという報告 [3] を受け、経口グルコー

ス負荷試験で耐糖能の評価を行ったが、運動の有無およびビタミン C の摂取量は負荷後血糖値の曲線下面積に無影響であった (図 2)。先行研究 [3] は健常なヒトを対象とした研究であるが、耐糖能を経口グルコース負荷試験ではなく、グルコースクランプ法によるインスリン抵抗性で評価している。糖尿病ではない健常動物では、経口グルコース負荷試験では運動による耐糖能の改善が評価できず、ビタミン C の過剰あるいは不足がどのような影響を及ぼすかを評価することは困難だと考えられた。

トレッドミル運動において酷使される後肢の筋肉である腓腹筋及びヒラメ筋における、PGC-1 α および抗酸化酵素 (SOD1、SOD2、GPx1) の mRNA 発現量を解析した (表 2)。転写共役因子 PGC-1 α は運動により誘導され、ミトコンドリア生合成などにおいて中心的な役割を果たすが、種々の抗酸化酵素の発現も制御していることが分かっている [6]。PGC-1 α を筋肉特異的にノックアウトしたマウスでは、運動能力の低下 [7] や抗酸化酵素のタンパクレベルでの減少 [8] が見られる。先行研究 [2, 3] では、運動により PGC-1 α のタンパク質あるいは mRNA 発現レベルが上昇するが、ビタミン C (および E) の大量摂取により、その上昇が打ち消されている。ところが、今回の研究では PGC-1 α の mRNA 発現量については、運動およびビタミン C 摂取で有意な影響は認められなかった (表 2)。運動負荷後の PGC-1 α の発現レベルは経時的に変動する [9]。今回、運動終了 1 日 (23~25 時間) 後に筋肉を摘出し mRNA 発現量を評価したが、PGC-1 α の mRNA レベルはもっと早い段階で上昇し、1 日後はベースラインまで戻ってしまっている可能性が考えられた。

スーパーオキシドジスムターゼ 1 (SOD1) は Cu/Zn-SOD と呼ばれ、細胞質に存在する。一方 SOD2 は Mn-SOD と呼ばれ、ミトコンドリアに局在している。グルタチオンペルオキシダーゼ 1 (GPx1) は複数ある GPx のアイソザイムのうち最も豊富であり、細胞質に存在している。先行研究 [2,3] では運動によりこれらの mRNA 発現レベルが上昇するが、ビタミン C (および E) の大量摂取により、その上昇が打ち消されている。今回の研究では、SOD1 および GPx1 の mRNA 発現が運動により有意に上昇したが、ビタミン C の摂取量は無影響であった (表 2)。また、SOD2 に関しては運動およびビタミン C の摂取量は無影響であった。

Ristow ら [3] は、運動により発生する活性酸素が PGC-1 α 等の転写共役因子を誘導し、耐糖能の改善や抗酸化酵素の発現亢進に寄与していると考えしている。今回の実験系では、ビタミン C の摂取量を必要最低量から大過剰量まで大きく振って検討を行った。血中ビタミン C 摂取量に従って血中濃度が大きく変動しており (表 1)、運動時に発生する活性酸素の量に大きく影響していると予想される。しかしビタミン C の摂取量は、運動による SOD1、GPx1 の mRNA 発現亢進に無影響であった。従って、この実験系では抗酸化物質の摂取量が運動の有用作用に及ぼす影響を評価することは困難であると考えられた。また、今回の実験では、3 週間の運動トレーニングを行ったが、今後、種々の抗酸化物質について評価を行うためには、もっと短期間で結果が得られる評価系が望ましいと考えられた。

D. 結論

抗酸化物質の摂取が運動の有用作用に及

ばす影響を評価するため、Gomez-Cabrera らの先行研究 [2] を基に評価系の確立を試みた。ビタミン C 合成能を欠く ODS ラットに 3 用量のビタミン C を混水投与し (20、100、500 mg/kg/日) それぞれに運動群と非運動群を設け比較した。運動時酷使される後肢の筋肉である腓腹筋及びヒラメ筋において、運動トレーニングにより抗酸化酵素 SOD1 および GPx1 の mRNA 発現量が増加したが、ビタミン C の投与は用量に関わらず無影響であった。また、PGC-1 α および SOD2 の mRNA 発現量には、運動およびビタミン C の摂取量のどちらも無影響であった。従って、この実験系では抗酸化物質の摂取が運動の有用性に及ぼす影響を評価することは困難であると考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

F. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

<参考文献>

- [1] Ji L. L., Antioxidants and oxidative stress in exercise. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **222**, 283-292 (1999).
- [2] Gomez-Cabrera M. C., Domenech E., Romagnoli M., Arduini A., Borrás C.,

Pallardo F. V., Sastre J., Viña J., Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am. J. Clin. Nutr.*, **87**, 142-149 (2008).

- [3] Ristow M., Zarse K., Oberbach A., Klötting N., Birringer M., Kiehnopf M., Stumvoll M., Kahn C. R., Blüher M., Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 8665-8670 (2009).

- [4] Lykkesfeldt J., Loft S., Poulsen H. E., Determination of ascorbic acid and dehydroascorbic acid in plasma by high-performance liquid chromatography with coulometric detection--are they reliable biomarkers of oxidative stress?, *Anal. Biochem.*, **229**, 329-335 (1995).

- [5] Ziegler S. J., Meier B., Sticher O., Rapid and sensitive determination of dehydroascorbic acid in addition to ascorbic acid by reversed-phase high-performance liquid chromatography using a post-column reduction system. *J. Chromatogr.*, **391**, 419-426 (1987).

- [6] St-Pierre J., Drori S., Uldry M., Silvaggi J. M., Rhee J., Jäger S., Handschin C., Zheng K., Lin J., Yang W., Simon D. K., Bachoo R., Spiegelman B.M., Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, **127**, 397-408 (2006).

- [7] Handschin C., Chin S., Li P., Liu F.,

- Maratos-Flier E., Lebrasseur N. K., Yan Z., Spiegelman B. M., Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knock-out animals. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30014-30021 (2007).
- [8] Geng T., Li P., Okutsu M., Yin X., Kwek J., Zhang M., Yan Z., PGC-1 α plays a functional role in exercise-induced mitochondrial biogenesis and angiogenesis but not fiber-type transformation in mouse skeletal muscle. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **298**, C572-579 (2010).
- [9] Terada S., Tabata I., Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 α protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **286**, E208-216 (2004).

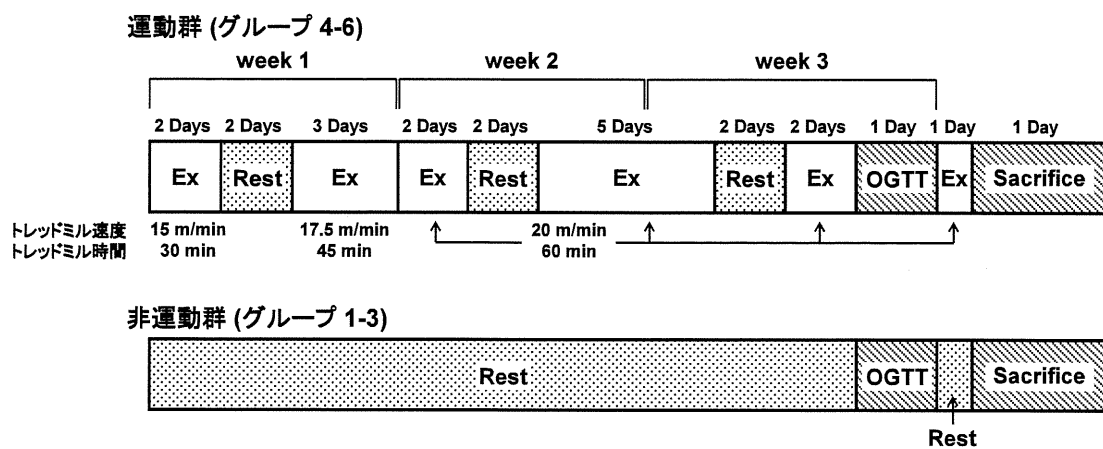


図 1. 実験スケジュール (Ex: 運動、OGTT: 経口グルコース負荷試験)

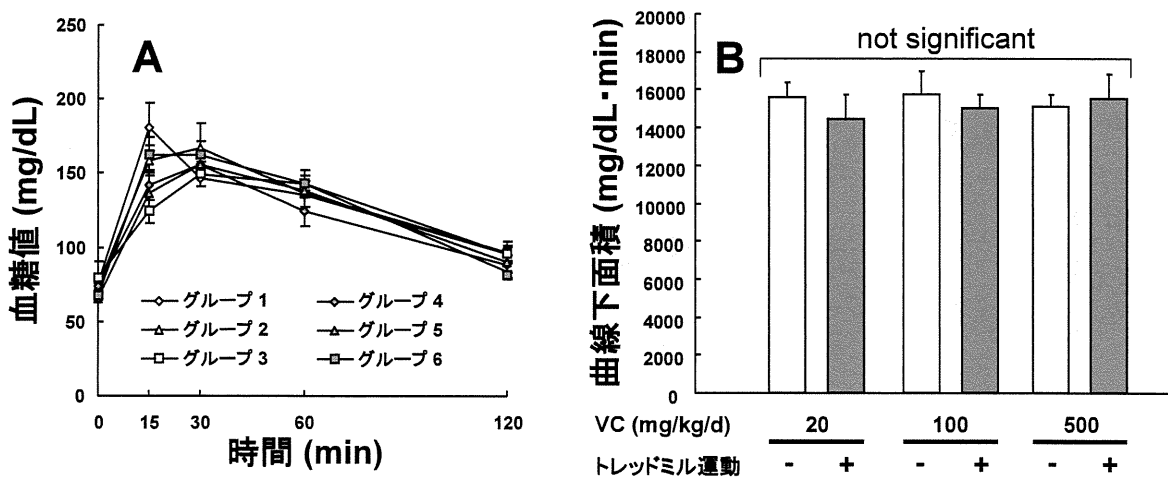


図 2. 経口グルコース負荷試験 (A) タイムコース、(B) 曲線下面積

表 1. 体重増加量、ビタミン C 摂取量および血漿中ビタミン C 濃度

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	グループ 5	グループ 6	2-way ANOVA		
匹数	5	4 [†]	5	5	5	5			
運動	なし	なし	なし	あり	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量	低	中	高	低	中	高			
体重増加量 (g) [†]	64.9 ± 3.9	59.8 ± 3.8	55.5 ± 1.6	60.7 ± 1.4	67.4 ± 2.6	53.4 ± 3.8	NS	<i>p</i> < 0.01	NS
ビタミン C 摂取量 (mg/kg/d)	20 ± 0	99 ± 1	489 ± 3	20 ± 0	101 ± 0	492 ± 4	<i>p</i> < 0.01	<i>p</i> < 0.01	NS
血漿中ビタミン C 濃度 (μM)	9.6 ± 0.3	17.7 ± 1.8	33.6 ± 1.9	9.6 ± 0.6	21.5 ± 1.3	34.2 ± 1.0	NS	<i>p</i> < 0.01	NS

[†] 予備飼育終了から経口グルコース負荷試験前日までの体重増加量

[‡] 経口グルコース負荷試験後の回復が充分でなかったラット 1 匹を除外した

NS = not significant

表 2. 腓腹筋およびヒラメ筋における mRNA 相対発現量

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	グループ 5	グループ 6	2-way ANOVA		
匹数	5	4 [†]	5	5	5	5			
運動	なし	なし	なし	あり	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量	低	中	高	低	中	高			
PGC-1α	1.00 ± 0.21	1.32 ± 0.36	0.76 ± 0.13	0.89 ± 0.07	1.62 ± 0.59	1.06 ± 0.16	NS	NS	NS
SOD1	1.00 ± 0.17	0.84 ± 0.06	1.06 ± 0.11	1.30 ± 0.22	1.30 ± 0.20	1.54 ± 0.28	<i>p</i> = 0.017	NS	NS
SOD2	1.00 ± 0.13	0.81 ± 0.05	1.02 ± 0.11	0.97 ± 0.15	1.35 ± 0.17	1.15 ± 0.12	NS	NS	NS
GPx1	1.00 ± 0.03	1.05 ± 0.18	1.18 ± 0.18	1.41 ± 0.30	2.02 ± 0.31	1.45 ± 0.07	<i>p</i> < 0.01	NS	NS

[†] 経口グルコース負荷試験後の回復が充分でなかったラット 1 匹を除外した

NS = not significant