

分担研究報告書

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 $\alpha$  および抗酸化酵素の発現に及ぼす影響

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】ビタミン C の大量摂取が、3 週間の運動トレーニングによる有用な遺伝子応答を打ち消すという先行研究を参考に検討したが、再現性が得られず、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が確立できなかった。そこで、他の先行研究を参考に、ビタミン C の大量摂取が単回運動による有用な遺伝子応答に及ぼす影響について検討した。

【方法】[実験 A] 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 時間後に血液及び後肢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。[実験 B] 投与経路を経口から腹腔内に変更し、ビタミン C の血中濃度を非生理的な濃度が高めて同様の検討を行った。

【結果】[実験 A] 腓腹筋およびヒラメ筋における PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現は運動により顕著に増加したが、ビタミン C の大量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 の摂取はそれに無影響であった。[実験 B] 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 $\alpha$  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。

A. 研究目的

11~18 ページに記載したように、ビタミン C の大量摂取 (500 mg/kg/d) がラットにおいて 3 週間の運動トレーニングによる有用な遺伝子応答を打ち消すという先行研究 [1] を参考

に検討を行ったが、再現性が得られず、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が確立できなかった。多くの文献で運動時に PGC-1 $\alpha$  の発現が増加することが示されているが、その再

現性が得られなかった原因として、運動負荷を行った後、筋肉を摘出するまでの時間が最適ではなかった可能性が考えられた。また、今後種々の抗酸化物質の摂取が運動の有用作用に及ぼす影響を評価するためには、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。

そこで、ラットを単回運動負荷すると、運動終了後 4 時間で、腓腹筋において PGC-1 $\alpha$  や抗酸化酵素等の遺伝子発現が亢進することを示した Wadley らの研究 [2] に着目した。しかし、この研究では Gomez-Cabrera らの報告 [1] と異なり、ビタミン C の大量経口摂取 (500 mg/kg) で、運動による有用な遺伝子応答は抑制されていない。両者の実験系を比較すると、ビタミン C の投与量は同じであるが、運動の有用作用を打ち消した Gomez-Cabrera らの報告 [1] ではビタミン C が運動直前に強制経口投与されているのに対し、Wadley らの研究 [2] では飲料水に混ぜて投与されており、運動時のビタミン C の血中濃度が異なる可能性が考えられた。また、Gomez-Cabrera ら [1] が腓腹筋およびヒラメ筋の両方を用いて解析を行っていたのに対し、Wadley ら [2] は腓腹筋のみを用いて解析を行っていた。腓腹筋は白筋であり、赤筋であるヒラメ筋よりミトコンドリア含量が少ない。運動時にはミトコンドリアで活性酸素の発生が大きく増加すると考えられるので、腓腹筋ではビタミン C 投与の影響が少ない可能性が考えられた。

そこで、Wadley らの研究 [2] を基に、ビタミン C の投与方法を強制経口投与とし、さらに用量を 2000 mg/kg に増加して運動時の有用な遺伝子発現におよぼす影響について検討した。また、腓腹筋とヒラメ筋を個別に摘出し、

それぞれ解析した (実験 A)。

結果は Wadley らの結果を支持するもので、ビタミン C の大量投与で運動による有用な遺伝子発現は抑制されなかった。そこで、より明確な結論を得るため、投与経路を腹腔内に変更してビタミン C の血中濃度を非生理的な濃度まで引き上げ検討を行った (実験 B)。

## B. 研究方法

### 【動物】

#### 実験 A

Wistar ラット (オス、7 週齢、24 匹) を日本クレアから購入し、固形飼料 (CE-2、日本クレア) および水道水を与え 1 週間予備飼育を行った。予備飼育の間に、トレッドミル走行に馴化させた。ラットは下記の 4 群に分けた。グループ 1: 運動なし、ビタミン C なし; グループ 2: 運動なし、ビタミン C (2000 mgVC/kg); グループ 3: 運動あり、ビタミン C なし; グループ 4: 運動あり、ビタミン C (2000 mgVC/kg)。ビタミン C 投与群 (グループ 2 および 4) には、ミリ Q に溶解したビタミン C (アスコルビン酸) (200 mgVC/mL) をゾンデで強制経口投与 (10 mL/kg、2000 mgVC/kg) し、グループ 1 および 3 には水を投与した。強制経口投与後すぐに、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) を用い単回の運動負荷 (10 m/min, 5 min  $\rightarrow$  15 m/min, 5 min  $\rightarrow$  20 m/min, 5 min  $\rightarrow$  25 m/min, 45 min) を加えた。

#### 実験 B

Wistar ラット (オス、7 週齢、28 匹) を日本クレアから購入し、固形飼料 (CE-2、日本クレア) および水道水を与え 1 週間予備飼育

を行った。予備飼育の間に、トレッドミル走行に馴化させた。ラットは下記の 4 群に分けた。グループ 1: 運動なし、ビタミン C なし; グループ 2: 運動なし、ビタミン C (2000 mgVC/kg); グループ 3: 運動あり、ビタミン C なし; グループ 4: 運動あり、ビタミン C (2000 mgVC/kg)。ビタミン C 投与群 (グループ 2 および 4) には、ミリ Q に溶解したアスコルビン酸ナトリウム (和光純薬) (0.225 g/mL、0.2 gVC/mL 相当) を腹腔内投与 (10 mL/kg、2000 mgVC/kg) した (アスコルビン酸だと水に溶解した際 pH が酸性となり腹腔内投与に適さないため、pH が中性付近となるアスコルビン酸ナトリウムを投与した)。グループ 1 および 3 にはアスコルビン酸ナトリウム水溶液と等張の 6.6 % 食塩水を腹腔内投与 (10 mL/kg) した。腹腔内投与後すぐに、運動群は + 5 度の傾斜をかけたトレッドミルを用い単回の運動負荷 (25 m/min, 60 min) を加えた。

#### 【骨格筋における遺伝子発現解析】

運動終了 4 時間後にエーテル麻酔下、心臓から採血し屠殺した。下肢より腓腹筋およびヒラメ筋を個別に摘出した。筋肉の mRNA 発現量は 12~13 ページに示した方法と同一の方法で解析し、内部標準として GAPDH および Rps18 (実験 A) または GAPDH (実験 B) を用い相対比で表した。追加して使用した Primer の配列を以下に示す。

[Rps18] Forward Primer:

5'-AAGTTTCAGCACATCCTGCGAGTA-3'、

Reverse Primer:

5'-TTGGTGAGGTCAATGTCTGCTTTC-3'

[SOD3] Forward Primer:

5'-GGTTGAGAAGATAGGCGACAC-3'、

Reverse Primer:

5'-CTCAGGTCCCCGAACTCATG-3'

#### 【血中ビタミン C】

血漿中のビタミン C 濃度は、13 ページに示した方法で測定した。

#### 【腓腹筋の総 SOD 酵素活性測定】

総 SOD 酵素活性は、SOD Assay Kit - WST (同仁化学) を用い、プロトコールに従って測定した。Protein Quantification Kit-Rapid (同仁化学) を用い測定した総タンパク質で結果を補正した。

#### 【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。

### C. 結果および考察

#### 実験 A

ビタミン C の血中濃度を表 1 に示す。ビタミン C (2000 mg/kg) の強制経口投与により、血漿中ビタミン C 濃度は約 2.5 倍に増加した。Wadley らの研究 [2] では、ビタミン C (500 mg/kg) の飲料水に混和した投与により、血中ビタミン C 濃度が約 1.3 倍に増加したと報告されており、今回の実験の方がビタミン C 投与の影響が大きいと考えられた。また、運動負荷によっても有意に血漿中ビタミン C 濃度が高くなったが (表 1)、これは運動時に副腎からビタミン C が放出されることが原因であることが示唆されている [3]。

腓腹筋における、PGC-1 $\alpha$  および抗酸化酵素 (SOD1、SOD2、SOD3、GPx1) の mRNA 発現量を表 2 に示した。SOD3 は、細胞外腔に存在する SOD のアイソザイムである。運動

により PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現が顕著に増加し、SOD2 および SOD3 の mRNA 発現も有意に増加したが、ビタミン C の大量経口投与でそれが打ち消されることはなかった。また、SOD1 の mRNA 発現については、運動およびビタミン C の投与は無影響であった。これらの結果は Wadley らの報告 [2] と一致していた。一方、GPx1 の mRNA 発現量については、運動は無影響であったが、ビタミン C の摂取により有意に抑制されていた。腓腹筋の SOD 発現量については、mRNA だけでなく酵素活性（総 SOD 活性）による評価も行ったが、運動およびビタミン C の投与は無影響であった（表 3）。

ヒラメ筋における、PGC-1 $\alpha$  および抗酸化酵素（SOD1、SOD2、SOD3、GPx1）の mRNA 発現量を表 4 に示した。ヒラメ筋においても、腓腹筋と同様に PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現量が運動負荷により顕著に増加したが、各抗酸化酵素の発現量には運動負荷は無影響であった。ビタミン C の投与は、SOD1 の mRNA 発現を有意に抑制したが、PGC-1 $\alpha$  および他の抗酸化酵素の mRNA 発現には無影響であった。

## **実験 B**

実験 A において、ビタミン C の大量経口摂取は単回運動による有意な遺伝子応答を抑制しないと言う Wadley らの報告 [2] を支持する結果が得られた。そこで、より明確な結論を得るため、ビタミン C の投与経路を腹腔内に変更し、血中ビタミン C 濃度を非生理的なレベルまで高めて実験 A と同様の検討を行った。

ヒラメ筋における、PGC-1 $\alpha$  および抗酸化酵素（SOD1、SOD2、SOD3、GPx1）の mRNA

発現量を表 5 に示した。運動により PGC-1 $\alpha$  の mRNA 発現が顕著に増加したが、ビタミン C の腹腔内投与でそれが打ち消されることはなかった。また、各抗酸化酵素の mRNA 発現については、運動およびビタミン C の投与は無影響であった。

## **D. 結論**

単回の運動負荷により、運動 4 時間後の腓腹筋およびヒラメ筋において顕著な PGC-1 $\alpha$  の mRNA の発現亢進が認められたが、ビタミン C の大量経口摂取により、それが打ち消されることはなかった。運動は腓腹筋において SOD2 および SOD3 の mRNA を有意に増加させたが、ビタミン C の大量経口摂取はそれには無影響であった。ビタミン C の投与経路を腹腔内に変更し、血中濃度を非生理的なレベルに高めて同様の検討を行ったが、運動による PGC-1 $\alpha$  の発現亢進がビタミン C により抑制されることはなかった。

以上の結果から、健全なラットでは、単回運動時の骨格筋における有用な遺伝子応答に、ビタミン C の過剰摂取は影響しないことが示唆された。

## **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] 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).
- [2] 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).
- [3] Umegaki K., Daohua P., Sugisawa A., Kimura M., Higuchi M., Influence of one bout of vigorous exercise on ascorbic acid in plasma and oxidative damage to DNA in blood cells and muscle in untrained rats. *J. Nutr. Biochem.*, **11**, 401-407 (2000).

表 1. 血漿中ビタミン C 濃度 (実験 A)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
匹数	6	6	6	6			
運動	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量 (mg/kg)	0	2000	0	2000			
血漿中ビタミン C 濃度 ( $\mu\text{M}$ )	74 $\pm$ 5	198 $\pm$ 10	89 $\pm$ 5	217 $\pm$ 8	$p = 0.036$	$p < 0.01$	NS

表 2. 腓腹筋における mRNA 相対発現量 (実験 A)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
匹数	6	6	6	6			
運動	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量 (mg/kg)	0	2000	0	2000			
PGC-1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.04	1.42 $\pm$ 0.10	3.44 $\pm$ 0.36	3.17 $\pm$ 0.33	$p < 0.01$	NS	NS
SOD1	1.00 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.07	0.95 $\pm$ 0.06	NS	NS	NS
SOD2	1.00 $\pm$ 0.06	1.08 $\pm$ 0.02	1.20 $\pm$ 0.07	1.21 $\pm$ 0.06	$p < 0.01$	NS	NS
SOD3	1.00 $\pm$ 0.05	1.19 $\pm$ 0.08	1.28 $\pm$ 0.11	1.32 $\pm$ 0.11	$p = 0.038$	NS	NS
GPx1	1.00 $\pm$ 0.09	0.71 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.05	0.85 $\pm$ 0.07	NS	$p = 0.016$	NS

NS = not significant

表 3. 腓腹筋における総 SOD 酵素活性 (実験 A)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
匹数	6	6	6	6			
運動	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量 (mg/kg)	0	2000	0	2000			
SOD 活性 (U/mg protein)	29.2 ± 1.5	34.7 ± 2.1	28.7 ± 2.0	31.4 ± 2.4	NS	NS	NS

NS = not significant

表 4. ヒラメ筋における mRNA 相対発現量 (実験 A)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
匹数	6	6	6	6			
運動	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動 x VC
ビタミン C 投与量 (mg/kg)	0	2000	0	2000			
PGC-1 $\alpha$	1.00 ± 0.16	1.44 ± 0.29	7.50 ± 1.22	6.13 ± 0.73	$p < 0.01$	NS	NS
SOD1	1.00 ± 0.09	0.89 ± 0.03	0.95 ± 0.04	0.77 ± 0.08	NS	$p = 0.032$	NS
SOD2	1.00 ± 0.11	1.21 ± 0.09	1.29 ± 0.12	1.09 ± 0.17	NS	NS	NS
SOD3	1.00 ± 0.07	1.20 ± 0.08	1.17 ± 0.10	1.02 ± 0.05	NS	NS	$p = 0.038^{\dagger}$
GPx1	1.00 ± 0.05	0.93 ± 0.07	0.93 ± 0.04	1.04 ± 0.07	NS	NS	NS

NS = not significant

$\dagger$  グループ 1 - 4 について 1-way ANOVA で解析した結果有意差なし

表 5. ヒラメ筋における mRNA 相対発現量 (実験 B)

匹数 運動 ビタミン C 投与量 (mg/kg)	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
	8 なし 0	7 なし 2000	7 あり 0	6 あり 2000	運動	VC	運動 x VC
PGC-1 $\alpha$	1.00 $\pm$ 0.15	0.83 $\pm$ 0.12	6.60 $\pm$ 0.89	10.84 $\pm$ 4.26	$p < 0.01$	NS	NS
SOD1	1.00 $\pm$ 0.15	0.77 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.89	1.03 $\pm$ 4.26	NS	NS	NS
SOD2	1.00 $\pm$ 0.09	0.80 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.05	1.18 $\pm$ 0.15	NS	NS	NS
SOD3	1.00 $\pm$ 0.15	1.21 $\pm$ 0.36	1.14 $\pm$ 0.34	1.39 $\pm$ 0.25	NS	NS	NS
GPx1	1.00 $\pm$ 0.14	0.77 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.48	1.16 $\pm$ 0.24	NS	NS	NS

NS = not significant



## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

### 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
なし					

