

201234030A

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 竹林 純

平成 25(2013)年 5 月

目 次

I. 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
竹林 純 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 1

II. 分担研究報告書

1. ビタミン C の大量経口摂取が、ラットにおいて運動トレーニングによる持久力増加等に及ぼす影響

竹林 純、加藤美智子 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 7

2. ビタミン C の大量経口摂取が、2 型糖尿病モデルラットにおいて運動トレーニングによる耐糖能改善等に及ぼす影響

竹林 純、加藤美智子 (独立行政法人 国立健康・栄養研究所)

----- 16

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 24

IV. 研究成果の刊行物・別刷

----- 25

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、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、通常の商品と比較して 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、種々の抗酸化物質の大量摂取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に検討を行った。

前年度の検討では、ビタミン C の大量投与が運動による有用な遺伝子応答を抑制するという結果は得られなかった。そこで今年度は、動物個体レベルで、ビタミン C の大量投与が運動の有用作用に及ぼす影響について以下の研究を実施した。

1. Wistar ラットを、ビタミン C 非投与群、大量投与群に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 4 群に分けた。ビタミン C は運動 4 時間前に強制経口投与した。運動群にはトレッドミルを用いて 6 週間の運動負荷を行った。各群の運動持久力を、トレッドミルを用いて疲労困憊するまでの強制走行試験を行い評価した。運動群では静止群と比較して、走行距離が増加したが、ビタミン C の大量投与によりそれが抑制されることはなかった。
2. 2 型糖尿病とした Wistar ラットを、ビタミン C 非投与群、大量投与群に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 4 群に分けた。ビタミン C は運動 4 時間前に強制経口投与した。運動群にはトレッドミルを用いて 3 週間の運動負荷を行った。各群の耐糖能を、経口糖負荷試験を行い評価した。運動群では静止群と比較して、耐糖能の改善が認められたが、ビタミン C の大量投与によりそれが抑制されることはなかった。

このように、本研究では、ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用を妨げるという結果は得られなかった。抗酸化物質の大量摂取が運動の有用性に及ぼす影響は単純ではなく、運動の種類や強度、実験動物の遺伝的背景等の様々な影響を受け変化する可能性がある。従って、健康増進目的で行う中強度運動時の知見をさらに蓄積する必要があると考えられる。

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。

そこで、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、運動時に発生する活性酸素は運動の有用作用に寄与しており、抗酸化物質の大量摂取により活性酸素が消去されると、運動の有用作用も同時に打ち消されてしまうと言う幾つかの報告がなされている [7、8]。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って、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 [7、8]。

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、研究を開始した。

昨年度の研究では、種々の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、動物を用いて遺伝子応答レベルで評価する実験系を確立するため、先行研究 [7] を参考にビタミン C を用いて検討を行ったが、ビタミン C の大量投与が運動による有用な遺伝子応答を抑制するという結果は得られなかった。そこで本年度は、遺伝子応答レベルではなく動物個体レベルで、ビタミン C の大量投与が運動の有用作用に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) ビタミン C の大量投与が、運動による持久力増加に及ぼす影響の検証

37 匹の Wistar ラット (5 週齢、オス) を、ビタミン C 非投与群、投与群 (750 mg/kg) に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 4 群に分けた。ビタミン C はゾンデを用いて運動 4 時間前に強制経口投与した。運動群にはトレッドミルを用いて 6 週間の運動負荷を行った (トレッドミル速度: 25 → 30 m/分、運動時間: 10 → 60 分/日)。持久力は、トレッドミルを用いて疲労困憊するまでの強制走行試験を行い、走行可能距離で評価した。

2) ビタミン C の大量投与が、2 型糖尿病時の運動による耐糖能改善に及ぼす影響の検証

38 匹の Wistar ラット (7 週齢、オス) を、ストレプトゾトシンおよびニコチンアミドを腹腔

内投与することで 2 型糖尿病とした。ビタミン C 非投与群、投与群 (750 mg/kg) に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 4 群に分けた。ビタミン C はゾンデを用いて運動 4 時間前に強制経口投与し、運動群にはトレッドミルを用いた 3 週間の運動負荷を行った (トレッドミル速度:20 m/分、運動時間:60 分/日)。耐糖能を経口糖負荷試験 (OGTT) で評価すると共に、血液検査 (グリコアルブミン等) でも評価した。

C. 研究結果及び考察

1) ビタミン C の大量投与が、運動による持久力増加に及ぼす影響の検証

6 週間の運動負荷により、運動群では静止群と比較して、疲労困憊するまでにトレッドミル上を走行した距離が約 1.6 倍となったが、ビタミン C の大量投与によりそれが抑制されることはなかった。従って、先行研究 [7] の結果と異なり、ビタミン C の大量投与により、運動による持久力の増加は妨げられないことが示唆された。最後の運動負荷の 20 時間後に腓腹筋を摘出し、PGC-1 α および SOD2 の mRNA 発現量、SOD 酵素活性を評価したが、運動およびビタミン C の摂取は無影響であった。これらは高強度の運動負荷により増加することが知られていることから、今回の運動負荷は先行研究ほど強くなく、それが、結果の不一致の一因である可能性が考えられる。ただ、今回の運動強度は、持久力を増加させる十分な強度であった。従って、ビタミン C の大量摂取は、健康増進目的で行う中強度運動時には、その有用作用を妨げない可能性が示唆された。

2) ビタミン C の大量投与が、2 型糖尿病時

の運動による耐糖能改善に及ぼす影響の検証

3 週間の運動負荷により、運動群では静止群と比較して、OGTT で評価した耐糖能の顕著な改善が認められたが、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。また、過去 1~2 週間の血糖コントロールの指標として利用される血中グリコアルブミン値も、運動による改善が認められたが、ビタミン C の大量摂取は無影響であった。これらのことから、ビタミン C の大量摂取は、2 型糖尿病に対する運動療法の効果を妨げないことが示唆された。

D. 結論

昨年度の研究で、ビタミン C の大量投与は運動による有用な遺伝子応答を抑制しないという、先行研究 [7] と一致しない結果が得られたため、本年度は動物個体レベルで、ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用に及ぼす影響について検討した。その結果、ビタミン C の大量摂取は、運動による持久力の増加および耐糖能の改善を妨げることはなかった。

近年、我々が得た結果と同じく、ビタミン C 及び 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、先行研究 [7, 8] と相反する結果が複数報告されている [9, 10]。従って、抗酸化物質の大量摂取が運動の有用性に及ぼす影響は単純ではなく、運動の種類や強度、実験動物の遺伝的背景等の様々な影響を受け変化すると考えられる。健康増進目的で行う中強度運動時の知見をさらに蓄積する必要があると考えられる。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Jun Takebayashi, Tomoyuki Oki, Jun Watanabe, Koji Yamasaki, Jianbin Chen, Maki Sato-Furukawa, Megumi Tsubota-Utsugi, Kyoko Taku, Kazuhisa Goto, Teruki Matsumoto and Yoshiko Ishimi
Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods
Journal of Food Composition and Analysis, **29**, 25-31 (2013).

(2) 竹林 純、沖 智之、渡辺 純、山崎 光司、陳 健斌、古川(佐藤)麻紀、坪田(宇津木)恵、卓 興鋼、後藤 一寿、松本 輝樹、石見 佳子
日本において一般的に食されている野菜・果物の親水性抗酸化能およびこれらの食品からの親水性抗酸化物質一日摂取量の推算
ビタミン, **87**, 274-276 (2013), 印刷中

2. 学会発表

(1) 加藤美智子、竹林 純、松本 輝樹、石見 佳子
ビタミン C の大量摂取が単回持久運動によるラット骨格筋の PGC-1 α 及び抗酸化酵素の発現に及ぼす影響
第 66 回日本栄養・食糧学会大会, 2012 年 5 月 20 日(仙台)

(2) 竹林 純、加藤 美智子、松本 輝樹、石見 佳子

ビタミン C の大量経口摂取が持久性トレーニングを行ったラットにおいて運動持久力および抗酸化酵素活性に及ぼす影響
第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 25 日(名古屋)

(3) Jun Takebayashi, Tomoyuki Oki, Jun Watanabe, Koji Yamasaki, Jianbin Chen, Maki Sato-Furukawa, Megumi Tsubota-Utsugi, Kyoko Taku, Kazuhisa Goto, Teruki Matsumoto and Yoshiko Ishimi
Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimation of daily intake
20th International Congress of Nutrition (ICN), Sep 15-20, 2013, Granada, Spain (発表予定)

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, 三巻 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., Kiehntopf 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).

ビタミン C の大量経口摂取が、ラットにおいて運動トレーニングによる持久力増加等に及ぼす影響

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

【背景・目的】 運動は、酸素消費の増大に起因する活性酸素の増加を伴うため、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、活性酸素が持久力向上等の運動の有用性に重要な役割を果たしていることが示されており、ビタミン C の大量経口摂取により運動の有用作用が阻害されることが報告された。しかし、前年度の研究にて、動物を用いて先行研究の追試を行った結果、運動時の有用な遺伝子応答は、ビタミン C を大量に摂取しても抑制されることはなかった。そこで本研究では、遺伝子応答レベルではなく動物個体レベルで、ビタミン C の大量経口摂取が運動トレーニングによる持久力向上を妨げるか否か検討した。

【方法】 Wistar ラットを運動群と非運動群に分け、それぞれをビタミン C 投与群 (750 mg/kg 体重) と非投与群の計 4 群に分けた。運動群には傾斜 +15 度のトレッドミルを用いた持久性トレーニングを週 4~5 日行った。トレーニングは徐々に速度と時間を増し、最大で速度 30 m/分、時間 60 分/日で行った。2、4、6 週間の持久力トレーニングを運動群に行った時点で、全群の持久力を測定した。持久力はトレッドミルによる速度漸増走行試験を行い、疲労困憊となるまでに走行した距離で評価した。その後、運動群にはさらに 1 週間の運動トレーニングを行い、最後の運動トレーニング終了 20 時間後に腓腹筋を摘出し、PGC-1 α 、SOD2 の mRNA 発現レベルおよび SOD の酵素活性を測定した。

【結果・考察】 2 週間の持久性トレーニングにより、運動群の持久力は非運動群と比較して 60 % 程度増加したが、ビタミン C の大量経口摂取によりそれが阻害されることはなかった。持久性トレーニングを 4、6 週間まで続けた結果、持久力のさらなる向上は認められなかったが、ビタミン C により持久力が低下することもなかった。また、運動トレーニングおよびビタミン C 投与の有無により、腓腹筋における PGC-1 α 、SOD2 の mRNA 発現レベルおよび SOD の酵素活性に変化は認められなかった。これらは高強度の運動負荷時に発現が亢進することが知られている。従って、今回の運動トレーニングは中程度の負荷であり、それが先行研究と結果が異なった一因である可能性がある。ただ、今回の運動強度は、持久力を増加させるために充分であった。このように、ビタミン C の大量摂取は、健康増進目的で行う中強度運動時には、その有用作用を妨げない可能性が示唆された。

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たんぱく質、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。

これらの報告を受け、昨年度の研究では、種々の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、動物を用いて遺伝子応答レベルで評価する実験系を確立するため、先行研究 [2] を参考にビタミン C を用いて検討を行ったが、ビタミン C の大量投与が運動による有用な遺伝子応答を抑制するという結果は得られなかった。同様の、先行研究 [2] に背反する実験結果が、近年、複数の研究者から報告されている [4, 5]。そこで、今年度は、本課題の発端となった先行研究 [2, 3] の検証を行うことを目的とした。

本研究では、Gomez-Cabrera らによる先行研究 [2] の検証を行うため、ビタミン C の大

量摂取が、運動による持久力増加を抑制するか、動物個体レベルで検討した。

B. 研究方法

【動物試験】

Wistar ラット (オス、4 週齢、42 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 週間の予備飼育を行った。予備飼育の間に、全てのラットに対し、トレッドミル運動への馴化を行った後、後記の方法により運動持久力を評価した (条件 1)。トレッドミル運動に馴化できなかった 5 匹 (25 m/分 の速度で 10 分間のトレッドミル走行ができなかった個体) を除外し、残りの 37 匹を持久力に差がないように下記の 4 群に分けた。グループ 1: 運動トレーニングなし、ビタミン C なし; グループ 2: 運動なし、ビタミン C (750 mgVC/kg); グループ 3: 運動トレーニングあり、ビタミン C なし; グループ 4: 運動トレーニングあり、ビタミン C (750 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 (75 mgVC/mL) を、ゾンデで強制経口投与 (10 mL/kg、750 mgVC/kgBW) し、ビタミン C 非投与群 (グループ 1 および 3) には等量のミリ Q を投与した (10 mL/kg)。運動群 (グループ 3 および 4) は、強制経口投与 4 時間後に、後記の条件で 4~5 日/週の運動トレーニングを行った。非運動群 (グループ 1 および 2) はトレッドミルに対する馴化が失われないように、2 日/週の短時間のトレッドミル走行を行った。運動トレーニングを 2, 4, 6 週間実施した時点で、全てのラットを対象に持久力の測定を行った。その後、運動群にはさらに 1 週間の運動トレーニングを行い、最後の運動トレ

ーニング終了 20 時間後に、全てのラットをエーテル麻酔下、心臓から採血し屠殺し、腓腹筋、心臓を摘出し、PGC-1 α 、SOD2 の mRNA 発現レベル、総 SOD 酵素活性を測定した。表 1 に動物実験のスケジュールを示した。

動物試験は、独立行政法人国立健康・栄養研究所の実験動物研究審査委員会により、倫理審査を受け、承認された後実施した。

【運動トレーニング】

運動群には、週に 4~5 日の運動トレーニングを実施した。運動トレーニングはビタミン C を強制経口投与した 4 時間後に開始した。+15 度の傾斜をつけたトレッドミル (ラット・マウス兼用型トレッドミル MK-680、室町機械) を用い行った。走行部の末端の電極から電気刺激を行い、ラットの走行を促した。運動トレーニングを開始する前に、3 分間のウォーミングアップ (10 m/分、1 分 \rightarrow 15 m/分、1 分 \rightarrow 20 m/分、1 分) を行った。運動トレーニングは速度 25 m/分、時間 10 分/日から開始し、徐々に速度と時間を増した (最大で速度 30 m/分、時間 60 分/日)。具体的な速度と時間は表 1 に示した。非運動群は、トレッドミルへの馴化を失わないように週に 2 日、ウォーミングアップのみを行った。

【運動持久力の測定】

運動持久力は、+ 15 度の傾斜をつけたトレッドミル上を下記の条件で走行させ、ラットが疲労困憊し、電極から電気刺激を受けても自力で走行部に復帰できなくなるまでに走行した距離で運動持久力を評価した。なお、測定の前には、運動トレーニングと同様の 3 分間のウォーミングアップを行った。

条件 1 (速度漸増): 速度 25 m/分 から開始し、10 分おきに 5 m/分 ずつ段階的に速度を増加させた (ウォーミングアップ、3 分 \rightarrow 25 m/分、10 分 \rightarrow 30 m/分、10 分 \rightarrow 35 m/分、10 分 \rightarrow 40 m/分、10 分 \rightarrow ...)。

条件 2 (速度一定): 25 m/分 の速度で疲労困憊により走行できなくなるまでの走行距離を評価した。

【遺伝子発現解析】

腓腹筋から 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 および Rps18 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'

[Rps18] Forward Primer:

5'-AAGTTTCAGCACATCCTGCGAGTA-3'、

Reverse Primer:

5'-TTGGTGAGGTCAATGTCTGCTTTC-3'

[PGC-1 α] Forward Primer:

5'-ACCCACAGGATCAGAACAAACC-3'、

Reverse Primer:

5'-GACAAATGCTCTTTGCTTTATTGC-3'

[SOD2] Forward Primer:

5'-GACTAGGCCACAGGGCATTCA-3'、

Reverse Primer:

5'-ACTCAGAAACCCGTTTGCCTCTAC-3'

【総 SOD 酵素活性の測定】

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

Gomez-Cabrera らによる先行研究 [2] において、ラットに 500 mg/kg/d のビタミン C を経口投与することにより、運動トレーニングによる持久力増加が妨げられることが報告されている。一方、Higashida らによる研究 [5] では、ラットに 750 mg/kg/d のビタミン C と 150 mg/kg/d のビタミン E を経口投与しても、運動トレーニングによる有用な遺伝子応答が妨げられないことが報告されている。そこで、そのため、本研究ではビタミン C の用量として 750 mg/kg/d を用い、毎回の運動トレーニングの 4 時間前に水に溶かして強制経口投与した。

運動トレーニングはトレッドミルを用いた走行負荷を行い、ラットが途中で疲労困憊とならないように留意しつつ、走行の速度および時間を調整して行った (表 1)。運動持久力を、運動群に 2、4、6 週間の運動トレーニングを実施した時点で、速度を 25 m/min から 10 分おきに 5 m/min 刻みで漸増させたトレッドミル走行試験を行い (運動持久力の測定: 条件

1)、疲労困憊するまでに走行した距離で評価した (表 2)。2 週間の運動トレーニングを行った時点で、運動群 (グループ 3 および 4) は非運動群 (グループ 1 および 2) と比較して、持久力が有意に増加し、走行可能距離が 64 % 増加した。運動トレーニングを 4、6 週間続けると、非運動群に対する運動群の走行距離の増加は、それぞれ 62、59 % であった。これは、運動トレーニング 2 週間の時点とほぼ同じであり、持久力のさらなる向上は認められなかった。ビタミン C の大量摂取はいずれの時点においても運動持久力に無影響であった。

運動トレーニング 2、4、6 週間の時点でのトレッドミル走行可能距離を比較すると (表 2)、非運動群だけでなく運動群においても、時間の経過に従い距離が短くなる傾向が認められた。トレッドミルには +15 度の上り坂の傾斜をつけており、ラットの体重増加により次第に走行が困難となったと考えられた [6]。そのため、6 週間の時点での走行試験では、トレッドミルの速度が速すぎて走行を止めてしまうラットが複数認められた。体力が残っているにもかかわらず走行できないラットがいるため、ビタミン C の大量摂取の影響が充分評価できていない可能性を考え、トレッドミルの速度を 25 m/min に固定して (運動持久力の測定: 条件 2) 走行試験を行った (表 3)。その結果、運動群は非運動群と比較して、有意な持久力の増加が認められるが、ビタミン C の大量摂取によりそれが妨げられることはないことが確認された。

先行研究 [2] で、トレッドミル走行時に酷使される後肢の筋肉である腓腹筋において、3 週間の運動トレーニングにより PGC-1 α および SOD 2 の発現が亢進するが、ビタミン C

の大量摂取によりそれが妨げられることが報告されている。それに対し、我々の昨年の検討においては、これらの分子の mRNA 発現は単回運動刺激により有意に増加するが、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。そこで、7 週間の運動トレーニングを行った時点で、全群のラットを解剖し、腓腹筋における PGC-1 α および SOD 2 の mRNA を測定した (表 4)。しかし、本研究では、運動トレーニングおよびビタミン C の摂取は、どちらの遺伝子発現にも無影響であった。PGC-1 α および SOD 2 は運動負荷後に一過性に発現が亢進すると考えられるが、昨年の検討では運動終了 4 時間後に測定しているのに対し、今年度の検討では 20 時間後に測定していることが、運動トレーニングによる影響が認められなかった原因であると考えられた。そこで、SOD 2 の mRNA より長時間にわたって変動すると考えられる総 SOD 活性を測定した (表 5)。腓腹筋に加えて、運動時に同様に酷使されると考えられる心臓 (心筋) について測定したが、運動トレーニングおよびビタミン C の大量摂取は総 SOD 活性に無影響であった。

今回の研究は、運動トレーニングによる持久力増加がビタミン C により妨げられた Gomez-Cabrera らによる先行研究 [2] と類似した条件で実施しているが、何点か異なる点がある。まず、運動トレーニングの強度が異なり、先行研究では 30 m/分 の速度で 85 分/日の運動トレーニングを行っている。本研究でも、それに準じようと考えたが、一部のラットが途中で走れなくなってしまうため、最大 30 m/分 の速度で 60 分/日の運動トレーニングしか行えなかった。そのため、先行研究 [2] では 6 週間の運動トレーニングによりビタミン C

非投与群で運動持久力が 186 % 増加しているが、本研究での増加は 60 % 程度であった (表 2)。また、本研究では、運動終了 20 時間後の腓腹筋における PGC-1 α および SOD 2 の mRNA 発現量は、7 週間の運動トレーニングにより増加しなかった (表 4)。一方、先行研究 [2] では、運動終了 48 時間後に測定しているにも関わらず、3 週間の運動トレーニングにより PGC-1 α 、SOD 2 の増加が認められており、これらの分子が恒常的に発現亢進していると考えられる。これらのことから考察すると、先行研究 [2] では、本研究より高い強度の運動トレーニングが負荷されており、その結果、より多くの活性酸素が発生しているため、ビタミン C の大量摂取の影響が顕著に現れている可能性が考えられた。また、本研究と先行研究で用いたラットの種類は同じであるが週齢が異なり、本研究が 5 週齢のラットを使用しているのに対し、先行研究は 3 ヶ月齢 (12 週齢) のラットを使用している。抗酸化酵素の活性は年齢により変動することが知られており [7]、これも運動およびビタミン C 大量摂取の影響が先行研究と一致しなかった一因である可能性が考えられる。

上記のように、本研究と先行研究 [2] では幾つかの相違点があるが、本研究で負荷した運動トレーニングは、持久力を増加させるために十分な負荷であった。従って、ビタミン C を大量摂取しても、健康増進目的で行う中強度の運動トレーニングによる持久力の増強は妨げられない可能性が考えられた。

D. 結論

ビタミン C の大量摂取が、運動トレーニングによる持久力の増加を妨げると言う先行研究 [2] の検証を動物実験にて行った。運動ト

レーニングにより運動持久力は有意に増加したが、ビタミン C による抑制は認められなかった。先行研究と異なる結果が得られた原因として、我々の研究で行った運動トレーニングが先行研究と比較して低負荷であった可能性が考えられる。ただ、今回の研究では先行研究と比較して負荷が低いと言っても、持久力を増加させるために十分な運動強度であり、健康増進目的で行う中強度の運動トレーニングによる持久力の増強は、ビタミン C の大量摂取により妨げられない可能性が考えられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

竹林 純、加藤 美智子、松本 輝樹、石見佳子

ビタミン C の大量経口摂取が持久性トレーニングを行ったラットにおいて運動持久力および抗酸化酵素活性に及ぼす影響

第 67 回日本栄養・食糧学会大会, 2013 年 5 月 25 日(名古屋)

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., Kiehntopf 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] 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).
- [5] 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).
- [6] Dohm G. L., Tapscott E. B., Barakat H. A., Kasperek G. J., Influence of fasting on glycogen depletion in rats during exercise. *J. Appl. Physiol.*, **55**, 830-833 (1983).
- [7] 水上茂樹、五十嵐脩責任編集, 加齢による抗酸化酵素の活性変化, 活性酸素と栄養, 157-159 ページ, 光生館 (1995).

表 1. 実験スケジュール

日数	運動群	非運動群
1	トレーニング 1 (25 m/min, 10 分)	休み
2	トレーニング 2 (25 m/min, 15 分)	ウォーミングアップ
3	トレーニング 3 (25 m/min, 20 分)	休み
4	休み	休み
5	休み	休み
6	トレーニング 4 (25 m/min, 25 分)	ウォーミングアップ
7	トレーニング 5 (25 m/min, 30 分)	休み
8	トレーニング 6 (25 m/min, 35 分)	休み
9	トレーニング 7 (25 m/min, 40 分)	ウォーミングアップ
10	トレーニング 8 (25 m/min, 45 分)	休み
11	休み	休み
12	休み	休み
13	持久力テスト (条件 1)	ウォーミングアップ
14	休み	持久力テスト (条件 1)
15	トレーニング 9 (25 m/min, 50 分)	休み
16	トレーニング 10 (25 m/min, 55 分)	ウォーミングアップ
17	トレーニング 11 (25 m/min, 60 分)	休み
18	休み	休み
19	休み	休み
20	トレーニング 12 (25 m/min, 60 分)	ウォーミングアップ
21	トレーニング 13 (25 m/min, 60 分)	休み
22	トレーニング 14 (25 m/min, 60 分)	休み
23	トレーニング 15 (25 m/min, 60 分)	ウォーミングアップ
24	トレーニング 16 (25 m/min, 60 分)	休み
25	休み	休み
26	休み	休み
27	持久力テスト (条件 1)	ウォーミングアップ
28	休み	持久力テスト (条件 1)

運動トレーニングは +15 度の傾斜をつけたトレッドミルで実施
 運動トレーニングの 4 時間前に、ビタミン C を強制経口投与 (750 mg/kg)

日数	運動群	非運動群
29	トレーニング 17 (26 m/min, 60 分)	休み
30	トレーニング 18 (27 m/min, 60 分)	ウォーミングアップ
31	トレーニング 19 (28 m/min, 60 分)	休み
32	休み	休み
33	休み	休み
34	トレーニング 20 (29 m/min, 60 分)	ウォーミングアップ
35	トレーニング 21 (30 m/min, 60 分)	休み
36	トレーニング 22 (30 m/min, 60 分)	休み
37	トレーニング 23 (30 m/min, 60 分)	ウォーミングアップ
38	トレーニング 24 (30 m/min, 60 分)	休み
39	休み	休み
40	休み	休み
41	持久力テスト (条件 1)	ウォーミングアップ
42	休み	持久力テスト (条件 1)
43	持久力テスト (条件 2)	休み
44	持久力テスト (条件 2)	持久力テスト (条件 2)
45	持久力テスト (条件 2)	持久力テスト (条件 2)
46	休み	休み
47	休み	休み
48	休み	休み
49	トレーニング 25 (25 m/min, 60 分)	休み
50	トレーニング 26 (25 m/min, 60 分)	休み
51	トレーニング 27 (25 m/min, 60 分)	休み
52	トレーニング 28 (25 m/min, 60 分)	休み
53	休み	休み
54	休み	休み
55		
56	トレーニング 29 (25 m/min)	解剖
57	⇒ 運動終了後 20 時間後に解剖	
58		

表 2. 運動持久力 (条件 1: 速度漸増)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
運動トレーニング	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動×VC
ビタミン C 投与	なし	あり	なし	あり			
トレッドミル走行距離 (m)							
トレーニング前	791 ± 127 (9) [†]	744 ± 111 (9)	736 ± 110 (9)	743 ± 102 (10)	NS	NS	NS
トレーニング (2 週間)	457 ± 84 (9)	564 ± 72 (9)	767 ± 35 (9)	901 ± 96 (10)	$p < 0.01$	NS	NS
トレーニング (4 週間)	438 ± 38 (9)	460 ± 31 (9)	770 ± 57 (8)	683 ± 49 (9)	$p < 0.01$	NS	NS
トレーニング (6 週間)	417 ± 34 (9)	430 ± 38 (9)	715 ± 52 (6)	637 ± 52 (7)	$p < 0.01$	NS	NS

平均 ± 標準誤差を示す。

[†] 括弧内の数字は n 数。運動群で実験の経過に伴い n 数が減少している理由は、死亡、怪我またはトレッドミルへの馴化が失われたことにより、運動持久力の測定ができなかったことによる。

NS = not significant ($p > 0.05$)

表 3. 運動持久力 (条件 2: 速度一定)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
運動トレーニング	なし	なし	あり	あり	運動	VC	運動×VC
ビタミン C 投与	なし	あり	なし	あり			
トレッドミル走行距離 (m)							
トレーニング (6 週間)	1621 ± 260 (9) [†]	1355 ± 157 (9)	2511 ± 397 (7)	2000 ± 266 (8)	$p < 0.01$	NS	NS

平均 ± 標準誤差を示す。

[†] 括弧内の数字は n 数。運動群で実験開始時より n 数が減少している理由は、死亡、怪我またはトレッドミルへの馴化が失われたことにより、運動持久力の測定ができなかったことによる。

NS = not significant ($p > 0.05$)

表 4. 腓腹筋における 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	2-way ANOVA		
運動トレーニング	なし	なし	あり	あり			
ビタミン C 投与	なし	あり	なし	あり	運動	VC	運動×VC
n 数	9	8	7	9			
PGC-1 α	1.00 \pm 0.06	1.37 \pm 0.16	1.31 \pm 0.26	1.06 \pm 0.07	NS	NS	$p = 0.04^\dagger$
SOD2	1.00 \pm 0.05	1.08 \pm 0.08	1.08 \pm 0.13	0.91 \pm 0.07	NS	NS	NS

平均 \pm 標準誤差を示す。

† グループ 1 ~ 4 について 1-way ANOVA で解析したところ、有意差なし ($p > 0.05$)。

NS = not significant ($p > 0.05$)

表 5. 腓腹筋および心臓における総 SOD 酵素活性 (U/mg protein)

	グループ 1	グループ 2	グループ 3	グループ 4	2-way ANOVA		
運動トレーニング	なし	なし	あり	あり			
ビタミン C 投与	なし	あり	なし	あり	運動	VC	運動×VC
n 数	9	9	7	9			
腓腹筋	32.1 \pm 1.5	31.6 \pm 1.3	30.2 \pm 1.4	31.1 \pm 2.2	NS	NS	NS
心臓	57.6 \pm 5.9	53.5 \pm 4.1	56.7 \pm 3.3	55.0 \pm 4.0	NS	NS	NS

平均 \pm 標準誤差を示す。

NS = not significant ($p > 0.05$)

分担研究報告書

ビタミン C の大量経口摂取が、2 型糖尿病モデルラットにおいて運動トレーニングによる耐糖能改善等に及ぼす影響

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

【背景・目的】 ビタミン C の大量摂取により、運動トレーニングによる持久力増加が妨げられるという先行研究について、ラットを用い検証した結果、ビタミン C による抑制は認められなかった。そこで、ビタミン C の大量摂取により、運動トレーニングによる耐糖能改善が妨げられるという先行研究について、糖尿病モデルラットを用いて検証した。

【方法】 Wistar ラットを、ストレプトゾトシンおよびニコチンアミドを腹腔内投与することで 2 型糖尿病とした。ビタミン C 非投与群、投与群 (750 mg/kg) に分け、それぞれをさらに非運動群、運動群の 2 群の計 4 群に分けた。ビタミン C はゾンデを用いて運動 4 時間前に強制経口投与し、運動群にはトレッドミルを用いた 3 週間の運動トレーニングを行った (トレッドミル速度:20 m/分、運動時間:60 分/日)。耐糖能を経口糖負荷試験 (OGTT) で評価すると共に、血液検査 (グリコアルブミン等) でも評価した。

【結果・考察】3 週間の運動負荷により、運動群では静止群と比較して、OGTT で評価した耐糖能の顕著な改善が認められたが、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。また、過去 1~2 週間の血糖コントロールの指標として利用される血中グリコアルブミン値も、運動による改善が認められたが、ビタミン C の大量摂取は無影響であった。これらのことから、ビタミン C の大量摂取は、2 型糖尿病に対する運動療法の効果を妨げないことが示唆された。

A. 研究目的

近年、ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用 (持久力増加、耐糖能改善) を打ち消すことを示唆する報告がなされ [1、2]、ビタミン C 等の抗酸化物質を運動時に補給することの是非が議論されている。しかし、今回、7~15 ページに記載したように、ビタミン C の大量摂取 (750 mg/kg/d) がラットにおいて運動トレーニングによる持久力増加に及ぼす影響に

ついて検討した結果、先行研究 [1] の結果と異なり、ビタミン C による持久力増加の抑制は認められなかった。我々の研究で負荷した運動トレーニングが、先行研究 [1] と比較して低強度であった可能性があるが、健康増進目的で行う中程度の運動強度のトレーニング時には、ビタミン C の大量摂取により、持久力の増強が妨げられない可能性が示された。

Ristow ら [2] 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耐糖能改善 (インシュリン感受性亢進) が抑制されることを示した。この研究は、健常なヒトを対象としたものであるが、運動による耐糖能改善は 2 型糖尿病の治療上大変重要である。従って、糖尿病の患者に対しても先行研究 [2] と同様のことが起きるなら、2 型糖尿病に対する運動療法が、ビタミン C の大量摂取により妨げられる危険性が考えられた。そこで、本研究では、本研究では、ビタミン C の大量摂取が、2 型糖尿病時に運動による耐糖能の改善を抑制するか、ラットを用いて検討した。

B. 研究方法

【動物試験】

Wistar ラット (オス、7 週齢、52 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 2 週間の予備飼育を行った。2 型糖尿病とするため、予備飼育の間に、42 匹のラットには下記の処置 [3] を行い、残りの 10 匹は比較のため何も処置をせず健常のままとした。

予備飼育 4 日目に、ラットを一晩絶食させた後、生理食塩水に溶解したニコチンアミド (和光純薬) (24 mg/mL) を腹腔内投与し (5 mL/kg、120 mg ニコチンアミド/kg)、15 分後にクエン酸緩衝液に溶解させたストレプトゾトシン (和光純薬) (12 mg/mL) を腹腔内投与した (5 mL/kg、60 mg ストレプトゾトシン/kg)。7 日後、随時血糖値を測定し、200 mg/dl 以下のものには再度、同様にニコチンアミド、ストレプトゾトシンを腹腔内投与した。2 日後、再度随時血糖を測定し、血糖値が 150 mg/dl 以上のラット (38 匹) を 2 型糖尿病ラットとした。随時血糖値に差がないように下記の 4 群に

分けた。グループ 1: 運動トレーニングなし、ビタミン C なし; グループ 2: 運動なし、ビタミン C (750 mgVC/kg); グループ 3: 運動トレーニングあり、ビタミン C なし; グループ 4: 運動トレーニングあり、ビタミン C (750 mgVC/kg)。健常ラットはグループ 5 とした (運動トレーニングなし、ビタミン C なし)。

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 (75 mgVC/mL) を、ゾンデで強制経口投与 (10 mL/kg、750 mgVC/kgBW) し、ビタミン C 非投与群 (グループ 1 および 3) には等量のミリ Q を投与した (10 mL/kg)。運動群 (グループ 3 および 4) は 5 日/週の運動トレーニングを行った。運動トレーニングを 3 週間実施した時点で、全てのラットを対象に経口糖負荷試験 (OGTT) を行い、耐糖能を評価した。その後、運動群にはさらに 1 週間の運動トレーニングを行い、最後の運動トレーニング終了 22 時間後に、全てのラットをエーテル麻酔下、心臓から採血し屠殺し、ヘパリン血漿中のグリコアルブミン濃度等を測定した。表 1 に動物実験のスケジュールを示した。

動物試験は、独立行政法人国立健康・栄養研究所の実験動物研究審査委員会により、倫理審査を受け、承認された後実施した。

【運動トレーニング】

運動群には、週に 5 日の運動トレーニングを実施した。運動トレーニングは、ビタミン C の強制経口投与 4 時間後に開始した。傾斜をつけないトレッドミル (ラット・マウス兼用型トレッドミル MK-680、室町機械) を用いて行った。走行部の終端の電極から電気刺激を行い、ラットの走行を促した。運動トレーニングを開始する前に、3 分間のウォーミングアップ (10 m/

分、1分 → 15 m/分、1分 → 18 m/分、1分) を行った後、速度 20 m/分、時間 60 分/日の運動トレーニングを行った。

【経口糖負荷試験 (OGTT)】

3 週間の運動トレーニングを行った後、OGTT を実施した。ラットを一晩絶食させた後、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。運動群の OGTT は運動終了後 21 ~22 時間後に開始した。

【血液生化学検査】

ヘパリン血漿中の、グリコアルブミン、中性脂肪 (TG)、HDL、LDL、遊離脂肪酸濃度については、三菱化学メディエンス株式会社に依頼し、分析を実施した。

【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) を用いて行った。2 型糖尿病モデルラット (グループ 1~4) における運動トレーニングおよびビタミン C 大量摂取の影響を、2-way ANOVA で解析した。また、グループ 5 (正常ラット) を含むグループ 1~5 の結果について、1-way ANOVA で解析し、有意差 ($p<0.05$) が認められた場合、Tukey-Kramer 法による多重比較検定を行った。

C. 結果および考察

糖尿病は、自己免疫等によりインスリンがほとんど分泌されなくなる 1 型糖尿病と、インスリン分泌低下とインスリン感受性低下を原因と

する 2 型糖尿病がある。これらのうち、2 型糖尿病が糖尿病患者の大部分を占め、過食、運動不足などの生活習慣の乱れが誘引となる。運動による耐糖能改善は 2 型糖尿病の運動療法として非常に重要である。先行研究 [2] では、健常なヒトを対象として、ビタミン C と E の大量摂取により、運動による耐糖能改善が打ち消されることが示されている。そこで、本研究では、2 型糖尿病モデルラットにビタミン C を大量摂取させた場合、運動による耐糖能改善が妨げられるかどうか検討した。

ニコチンアミドとストレプトゾトシンを腹腔内投与することで、2 型糖尿病モデルラットを作成した [3]。ストレプトゾトシンは膵臓の β 細胞を傷害しインスリンを枯渇させ実験的に糖尿病を誘発する薬物であるが、ニコチンアミドを予め投与しておくことで、一部の β 細胞が保護され、インスリン分泌が完全には枯渇せず、インスリン分泌低下による 2 型糖尿病モデル動物が作成できる。この方法で作成した 2 型糖尿病モデル動物は、肥満を伴わず、空腹時血糖値は健常と同程度であるが、糖負荷を行うと血糖値異常を示す (図 1-A)。

作成した 2 型糖尿病モデルラットに、トレッドミルを用いて運動トレーニングを行った。走行負荷の強さは、持久力増加を目的とした試験で行った条件 (+15 度の上り坂、最大 30 m/分 の速度で 60 分間の走行運動) より低強度のものとした (傾斜なし、20 m/分 の速度で 60 分間の走行運動)。これは、糖尿病による体力低下に配慮したためであり、運動トレーニングの途中で疲労困憊して走れなくなったラットはいなかった。

3 週間の運動トレーニングを行った後、OGTT を実施した (図 1)。曲線下面積 (AUC) により耐糖能を評価した結果 (図