

201234030B

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～24 年度 総合研究報告書

研究代表者 竹林 純

平成 25(2013)年 5 月

目 次

I. 総合研究報告書

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 14

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 15

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)

【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、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、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以下の検討を行った。

平成 23 年度

【研究方法】 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、先行研究を参考にビタミン C を用いて検討した。

【結果及び考察】 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。このように、ビタミン C の大量摂取が、遺伝子応答レベルで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。

平成 24 年度

【研究方法】前年度の検討では、先行研究で示された結果と異なり、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、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。

【結果及び考察】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、個体レベルにおいても、ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用を打ち消すと言う結果は得られなかった。

【結論】ビタミン C の大量摂取が運動の有用作用を妨げるか否かを、動物実験により、遺伝子応答レベル、個体レベルで評価したが、先行研究の結果と異なり、ビタミン C による抑制は認められなかった。近年、我々が得た結果と同じく、ビタミン C の大量摂取は運動による有益な遺伝子応答を妨げないという報告が複数なされている。これらのことから、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。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ことが必要だと考えられる。

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考えられる。

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定されており、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。

平成 23 年度は、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。

平成 24 年度は、前年度の検討では、先行研究 [7] で示された結果と異なり、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ことから、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

H23-1) 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。

H23-2) 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。

H24-1) 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。

H24-2) 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

H23-1) 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。

H23-2) 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 の摂取はそれに無影響であった。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。

H24-1) 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。

H24-2) 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

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、動物を用い検討したが、ビタミン C の大量摂取が運動による有用な遺伝子応答を妨げることはなかった。当初の計画では、ビタミン C 以外の抗酸化物質および抗酸化サプリメントについても、順次その安全性を遺伝子レベルで評価する予定であった。しかし、先行研究と背反する結果が得られたことから、遺伝子レベルではなく動物個体レベルで、ビタミン C の大量摂取が運動の有用性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] と背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).



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】



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

- ・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
- ・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
- ・「抗酸化能表示食品」の流通及び「数値競争」

H21-22 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安全性・有効性に関する研究」(研究代表者 竹林) で実施



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))

- ・健常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】 健常または糖尿病時に、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】



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

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 (500 mg/kg/day) させたラットでは 1.3 倍にしかない

【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

運動負荷 → 活性酸素発生 → 酸化ストレス増加 → 運動の弊害
 組織障害 etc.

抗酸化物質

↓

エネルギー代謝関連酵素
発現亢進
PGC1 α/β , PPAR γ etc. → 運動の有用性

抗酸化酵素発現亢進
Mn-SOD, GPx etc. → 耐糖能異常改善
酸化ストレス抵抗性 etc.

3

【研究概要】



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

当初の研究計画

【一年目計画】

1. 先行研究を基に、ビタミン C が運動の有用作用を打ち消すことを確認⇒評価系を確立
2. 種々の抗酸化物質について評価を行う
3. 市販の抗酸化サプリメントについて評価を行う

【二年目計画】

糖尿病モデル動物を用い、種々の抗酸化物質および市販の降参かサプリメントの大量摂取が運動の有用性に及ぼす影響を評価する

実施した研究の内容および結果の概要

【一年目実施】

1. ビタミン C の大量経口摂取は、運動 (3 週間) による有用な遺伝子応答を抑制せず
2. 他の先行研究を参考に、ビタミン C が運動 (1 回) による有用な遺伝子応答に及ぼす影響を評価
 - ・経口大量投与では抑制は認められなかった
 - ・腹腔内大量投与でも抑制は認められなかった
 ⇒ 評価系の確立に至らず ⇒ 前提の再検証が必要

【二年目実施】

1. ビタミン C の大量経口摂取が、運動による持久力増加に及ぼす影響について健常ラットで検証
⇒ ビタミン C による抑制は認められず
2. ビタミン C の大量経口摂取が、運動による耐糖能改善に及ぼす影響について糖尿病ラットで検証
⇒ ビタミン C による抑制は認められず

4

H23-1. 評価系の検討

ビタミン C の大量投与が運動負荷 (3 週間) による遺伝子発現変化に及ぼす影響

【方法】(参考: Gomez-Cabrera et al., 2008)

ODS ラット (8 週齢、♂)

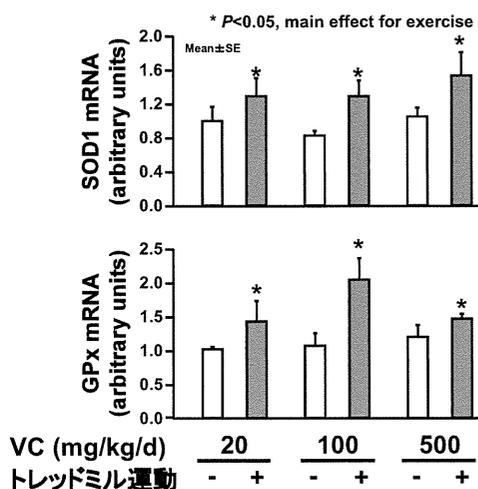
ビタミン C 投与
(20, 100, 500 mg/kgBW/d)
飲料水に混和して投与

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

3 週間飼育 (各群 5 匹)

最後の運動の 24 時間後に解剖
(採血、ヒフク筋とヒラメ筋を摘出)

PGC-1 α 及び抗酸化酵素の mRNA 発現量を解析



PGC-1 α , SOD2 の mRNA 発現量には、運動およびビタミン C の摂取はいずれも無影響

5

H23-2a. 評価系の検討

ビタミン C の大量投与が運動負荷 (1 回) による遺伝子発現変化に及ぼす影響

【方法】(参考: Wadley et al. (2010))

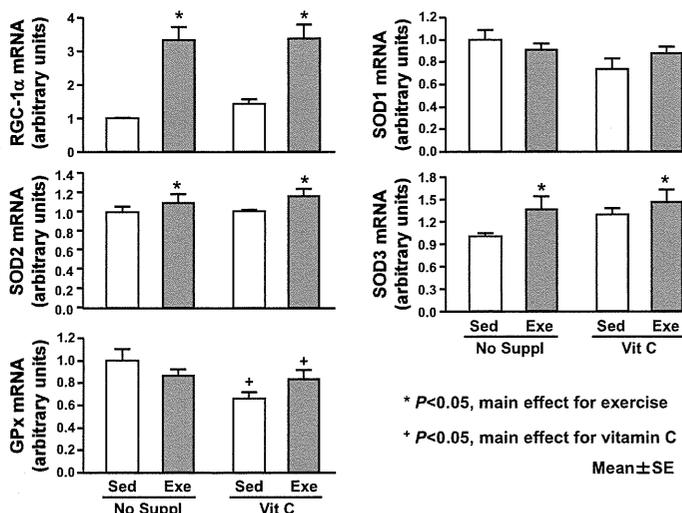
Wistar ラット (8 週齢、♂)

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
(ヒフク筋を摘出)

PGC-1 α 及び抗酸化酵素の mRNA 発現量を解析



運動により PGC-1 α 、SOD2 および SOD 3 の mRNA 発現量が増加したが、ビタミン C 投与の影響はなし

6

H23-2b. 評価系の検討

ビタミン C の大量投与が運動負荷 (1 回) による遺伝子発現変化に及ぼす影響

【方法】(参考: Wadley et al. (2010))

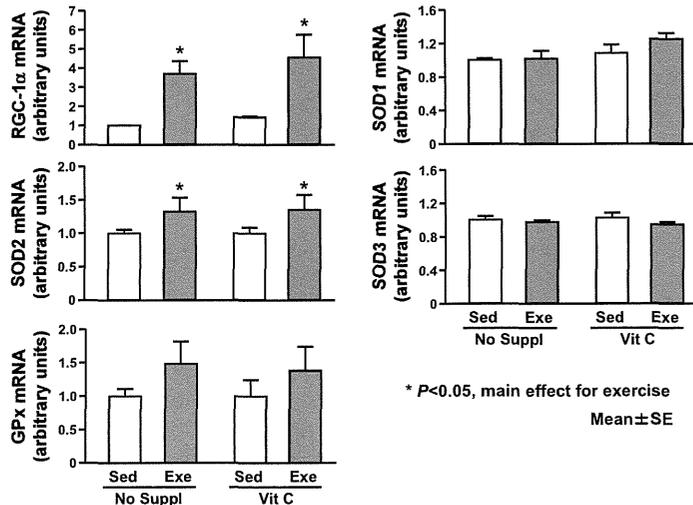
Wistar ラット (8 週齢、♂)

ビタミン C 投与
(2000 mg/kgBW
腹腔内投与)

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
(ヒク筋を抽出)

PGC-1 α 及び抗酸化酵素の
mRNA 発現量を解析



運動により PGC-1 α 、SOD2 の mRNA 発現量が増加したが、ビタミン C 投与の影響はなし

7

H24-1. 先行研究結果の検証

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

【方法】(参考: Gomez-Cabrera et al., 2008)

Wistar ラット (5 週齢、♂)

ビタミン C 投与
(750 mg/kgBW/d
強制経口投与)

トレッドミル運動
(25 ~ 30 m/min, + 15 度
10 \rightarrow 60 min/d, 5 d/wk)

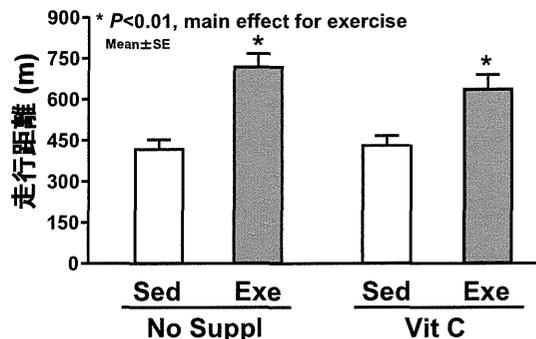
6 週間飼育 (各群 9 ~ 10 匹)

持久力テストを実施

トレッドミルを用いて、疲労困憊のため走行不可能となるまで速度漸増強制走行試験を行い、走行可能距離で持久力を評価

【先行研究】

ラットを運動トレーニング (6 週間) すると、トレッドミル走行可能時間が 2.9 倍に
 \Rightarrow ビタミン C を大量摂取 (500 mg/kg/day) させたラットでは 1.3 倍にしかならない



6 週間の運動負荷によりラットの持久力が増加したが、ビタミン C による抑制は認められなかった

8

H24-2. 先行研究結果の検証

ビタミン C の大量投与が、運動による耐糖能改善に及ぼす影響の検証

【方法】

Wistar ラット (7 週齢、♂)

ニコチンアミドおよびストレプトゾトシンを腹腔内投与し
2 型糖尿病動物を作成

ビタミン C 投与
(750 mg/kgBW/d)
強制経口投与

トレッドミル運動
(20 m/min, 0 度)
(60 min/d, 5 d/wk)

3 週間飼育 (各群 9 ~ 10 匹)

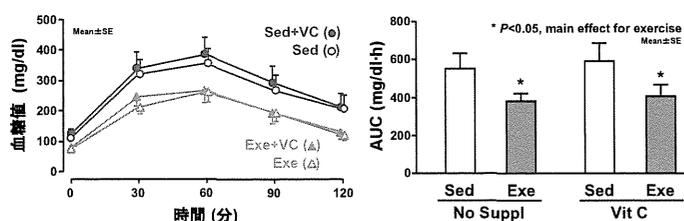
経口糖負荷試験を実施

【先行研究】

ヒト (健常) 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) の摂取で改善が完全に消失する

⇒ 糖尿病時の運動療法の効果を妨げる可能性がある



3 週間の運動トレーニングにより、2 型糖尿病モデルラットにおいて耐糖能異常の改善が認められたが、これはビタミン C の摂取により抑制されなかった

9

【結果のまとめ】

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

ビタミン C および E 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))

種々の抗酸化物質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

【評価系の検討】大量のビタミン C 投与が運動時の有用な遺伝子応答を抑制するという結果が得られず

【先行研究の結果を検証】ビタミン C の大量摂取は、運動トレーニングによるラットの持久力増強を抑制せず、2 型糖尿病ラットの耐糖能異常改善作用も阻害しなかった

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

⇒ 抗酸化物質の摂取が運動の有用性に及ぼす影響は複雑であり、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ると考えられる

10

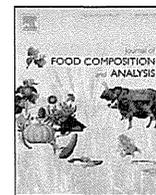
研究成果の刊行に関する一覧表

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
Jun Takebayashi Tomoyuki Oki Jun Watanabe Koji Yamasaki Jianbin Chen Maki Sato-Furukawa Megumi Tsubota-Utsugi Kyoko Taku Kazuhisa Goto Teruki Matsumoto 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
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)



Original Research Article

Hydrophilic antioxidant capacities of vegetables and fruits commonly consumed in Japan and estimated average daily intake of hydrophilic antioxidants from these foods

Jun Takebayashi^{a,*}, Tomoyuki Oki^b, Jun Watanabe^c, Koji Yamasaki^d, Jianbin Chen^a, Maki Sato-Furukawa^b, Megumi Tsubota-Utsugi^e, Kyoko Taku^f, Kazuhisa Goto^b, Teruki Matsumoto^a, Yoshiko Ishimi^a

^a Department of Food Function and Labeling, Incorporated Administrative Agency, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan

^b National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, National Agriculture and Food Research Organization, 2421 Suya, Koshi, Kumamoto 861-1192, Japan

^c National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8642, Japan

^d Taiyo Kagaku Co., Ltd., 1-3 Takara-cho, Yokkaichi, Mie 510-0844, Japan

^e Department of Department of Nutritional Epidemiology, Incorporated Administrative Agency, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan

^f Center for International Collaboration and Partnership, Incorporated Administrative Agency, National Institute of Health and Nutrition, 1-23-1 Toyama, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8636, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2012

Received in revised form 15 September 2012

Accepted 2 October 2012

Keywords:

Antioxidant capacity (AOC)

Hydrophilic-oxygen radical absorbance

capacity (H-ORAC) assay

Daily intake

Vegetables and fruits

Polyphenol content

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)

assay

Method comparison

Food analysis

Food composition

ABSTRACT

The sum of hydrophilic antioxidants of 23 vegetables and 13 fruits commonly consumed in Japan was evaluated by a modified hydrophilic-oxygen radical absorbance capacity (H-ORAC) method. The “typical vegetable” and “typical fruit” in Japan contained hydrophilic antioxidants that are equivalent to 6.95 and 12.23 μmol Trolox per g of the edible portion, respectively, on average. Hence, the daily intake of hydrophilic antioxidants from vegetables and fruits was estimated to be 4423 μmol Trolox equivalent (TE)/d based on data of the National Health and Nutrition Survey in Japan. However, the biological significance of these antioxidant values has not yet been clarified. To address this issue, our data will provide a foundation for high-quality epidemiological studies aimed at elucidating the relationship between daily intake of antioxidants and health. In addition, the comparison of the results of the H-ORAC assay with those of polyphenol content and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay was also studied. The H-ORAC values had a strong positive correlation with polyphenol contents ($r = 0.956$), and were 1.0–18.2-times higher than the antioxidant capacities evaluated by the DPPH assay.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

There is growing evidence that reactive oxygen species (ROS) are related to many diseases and that foods rich in antioxidants may contribute to overall health and disease prevention (Lotito and Frei, 2006; Osawa and Kato, 2005). There is a wide variety of different types of antioxidants in foods, and these antioxidants occasionally act coordinately in the body. Therefore, the efficacy of

dietary antioxidants needs to be investigated not only from the viewpoint of individual antioxidants but also from the viewpoint of the sum of antioxidants contained in foods, that is, the concept of “antioxidant capacity” (AOC) of foods. Valtueña et al. (2008) found in a human trial that food selection based on AOC of foods can modify antioxidant intake, systemic inflammation, and liver function without altering markers of oxidative stress. Thus, not only individual antioxidants but also AOC of foods may be helpful to improve dietary quality for maintenance of good health.

Several observational epidemiologic studies showed significant associations between AOC intake and health (Brighenti et al., 2005; Psaltopoulou et al., 2011; Puchau et al., 2009, 2010; Serafini et al., 2002), whereas other studies showed no significant association (Devore et al., 2010; Mekary et al., 2010). One possible reason for this discrepancy in results is that appropriate AOC databases were

* Corresponding author. Tel.: +81 3 3203 8063; fax: +81 3 3205 6549.

E-mail addresses: jtake@nih.go.jp (J. Takebayashi), tomooki@affrc.go.jp (T. Oki), nabej@affrc.go.jp (J. Watanabe), kyamasaki@taiyokagaku.co.jp (K. Yamasaki), mutsugy@nih.go.jp (M. Tsubota-Utsugi), takuk@nih.go.jp (K. Taku), gotok@affrc.go.jp (K. Goto), teruki@nih.go.jp (T. Matsumoto), ishimi@nih.go.jp (Y. Ishimi).

not used; i.e., the databases contained data for a limited number of food items and/or AOC values of foods marketed in a foreign country. Hence, to obtain more conclusive evidence from epidemiological studies, an AOC database of higher quality is required.

An oxygen radical absorbance capacity (ORAC) method is one of the most widely used methods for evaluating AOC due to known and unknown antioxidants present in tested foods (Prior et al., 2005). Peroxyl radical-scavenging activities of water-soluble and lipid-soluble antioxidants in samples are evaluated by the hydrophilic ORAC (H-ORAC) and lipophilic ORAC (L-ORAC) methods, respectively (Prior et al., 2003). Rautiainen et al. (2008) reported that more than half of ORAC intake from all foods in Sweden is attributed to vegetables and fruits. In vegetables and fruits, H-ORAC values are usually much higher than L-ORAC values (Wu et al., 2004a).

The final goal of this study is to elucidate the relationship between daily intake of antioxidants and health. For this purpose, a reliable analytical method is needed to establish an appropriate AOC database of foods for epidemiological studies. Recently, the analytical precision of the H-ORAC method was improved (Watanabe et al., 2012). This improved H-ORAC method is one of the few analytical methods for evaluating AOC of foods validated by an interlaboratory test in accordance with internationally harmonized protocol (Horwitz, 1995). Based on this reliable method, an antioxidant database of foods suitable for the Japanese population has been developed. This database will enable high-quality epidemiological studies concerning daily intake of antioxidants and health in Japan. In our preliminary note (Takebayashi et al., 2010), H-ORAC values of 23 vegetables commonly consumed in Japan have been reported and the daily intake of hydrophilic antioxidants from these vegetables in Japan has been estimated for the first time to our knowledge. However, the sample size for each vegetable was very limited ($n = 1$), and thus representative values and variances of the H-ORAC values for each vegetable were unknown. In addition, foods other than vegetables, especially fruits, appear to contribute to the daily AOC intake. Hence, in this study, H-ORAC values of 23 vegetables and 13 fruits from 3 independent samples each were obtained and daily intakes of hydrophilic antioxidants from these vegetables and fruits in Japan were estimated.

2. Materials and methods

2.1. Selection of vegetable and fruit samples

The most consumed vegetables and fruits in Japan were selected for this study according to the annual report on the family income and expenditure survey in Japan for 2005–2009 (Statistics Bureau; Ministry of Internal Affairs and Communications, Japan). This survey showed annual purchase weights per household for raw vegetables and fruits, and the weight for 23 vegetables shown in Table 1 and 13 fruits shown in Table 2 accounted for 83.4% and 84.5% of the total weights for purchased raw vegetables and fruits, respectively. Percentage of intake for each vegetable was calculated as follows:

$$\text{Percentage of intake (\%)} = \frac{[W \times (100 - R)/100]}{[\sum\{W \times (100 - R)/100\}} \times 100,$$

where W (g) is the annual purchase weight per household of each vegetable, R (%) is the discarded (or inedible) portion from the Standard Tables of Food Composition in Japan – 2010 – (Council for Science and Technology; Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan), and $\sum\{W \times (100 - R)/100\}$ (g) is the sum of the estimated annual intake per household of the 23

vegetables listed in Table 1. Percentage of intake for each fruit was calculated in the same manner.

2.2. Chemicals

Sodium fluorescein, 2,2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (AAPH), Folin-Ciocalteu reagent, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) were purchased from Wako Pure Chemical Industries (Osaka, Japan) and Trolox was obtained from Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA). All other reagents were of analytical grade.

2.3. Food sample preparation

The 23 vegetables and 13 fruits shown in Tables 1 and 2 were independently purchased in raw form in 3 prefectures of Japan (more details on where and when the samples were collected are shown in the footnotes of Tables 1 and 2). In each case, most of the samples were acquired from one local market, but some samples were bought on the Internet due to unavailability. At least 2 units and 200 g in total for each vegetable and fruit were collected. These samples were cooled on crushed ice before cutting to avoid loss of antioxidants by enzymes such as polyphenol oxidases, and inedible portions were removed. Then, sample size was reduced by sub-sampling, and the edible portions were snap frozen by liquid nitrogen and were promptly freeze-dried. The freeze-dried samples were milled until homogeneous by using a Grindomix GM 200 knife mill (Retsch, Haan, Germany) and stored at -20°C . The antioxidants in the freeze-dried samples were then extracted by using an accelerated solvent extraction system (Dionex, ASE-200) as described by Wu et al. (2004b) with some modifications. Briefly, each freeze-dried sample was first subjected to extraction with hexane/dichloromethane (1:1) followed by extraction with methanol/water/acetic acid (90:9.5:0.5; MWA), and then the H-ORAC assay, measurement of polyphenol content, and DPPH assay were performed using the same MWA extracts.

2.4. H-ORAC assay

The interlaboratory precision of the original H-ORAC method (Prior et al., 2003) has been shown to be insufficient (Watanabe et al., 2010), and some methodological improvements to assure satisfactory interlaboratory precision have been made (Watanabe et al., 2012). In this study, this improved H-ORAC method was used. Briefly, the MWA extracts were diluted 10-fold with an assay buffer (75 mM KH_2PO_4 – K_2HPO_4 at pH 7.4) and then further diluted with the assay buffer containing 10% MWA. Trolox calibration solutions (6.25, 12.5, 25 and 50 μM in the assay buffer containing 10% MWA) were made to obtain a standard curve. The diluted MWA extract, Trolox calibration solution or blank (35 μl), fluorescein (115 μl , 110.7 nM in the assay buffer), and AAPH (50 μl , 31.7 mM in the assay buffer) were incubated in the assay buffer at 37°C in a 96-well plate sealed with a plastic film. The fluorescence (Ex. at 485 nm, Em. at 528 nm) was monitored every 2 min for 90 min by a Powerscan HT instrument (DS Pharma Biomedicals, Osaka, Japan). The net area under the curve (AUC) was calculated by subtracting AUC for the blank from that for the sample or standard, and the H-ORAC value for each sample was determined by comparison of net AUC for the sample with that for the Trolox standard. More details are shown in the reference (Watanabe et al., 2012). Data are expressed as moles of Trolox equivalent to the amount of water-soluble antioxidants contained in a sample, that is, μmol Trolox equivalent (TE) per gram fresh weight of the edible portion ($\mu\text{mol TE/g}$). Each value is the average of determinations for two separately prepared extracts

Table 1
H-ORAC values for vegetables commonly consumed in Japan.

Sample name	Item No. ^a	Percentage of intake (%) ^b	H-ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) ^c							Contribution (%) ^g	Polyphenol content (mg GAE/g) ^h	DPPH radical scavenging capacity ($\mu\text{mol TE/g}$) ^j
			1 ^d	2 ^e	3 ^f	Average	SD	RSD (%)	Max/Min			
Onion, bulb	06153	11.2	6.71	13.17	12.28	10.72	3.50	32.7	2.0	17.4	0.61	0.59
Cabbage, head	06061	11.1	3.74	3.88	2.40	3.34	0.82	24.6	1.6	5.3	0.27	1.04
Japanese radish (daikon), root without skin	06134	10.1	3.93	2.93	4.78	3.88	0.92	23.8	1.6	5.6	0.16	0.59
Tomato, fruit	06182	8.6	3.14	3.43	2.86	3.14	0.29	9.1	1.2	3.9	0.28	1.18
Potato, tuber	02017	8.0	6.85	7.72	5.53	6.70	1.10	16.5	1.4	7.7	0.46	1.22
Cucumber, fruit	06065	6.6	1.68	1.54	1.69	1.63	0.08	5.2	1.1	1.5	0.15	0.30
Carrot, root with skin	06212	6.4	5.26	1.46	3.35	3.36	1.90	56.6	3.6	3.1	0.22	0.74
Chinese cabbage, head	06233	6.1	3.10	3.33	1.96	2.80	0.74	26.4	1.7	2.4	0.22	0.82
Mung bean sprout	06291	4.4	6.17	6.05	5.57	5.93	0.32	5.3	1.1	3.7	0.45	0.46
Crisp lettuce, head	06312	4.3	2.61	1.09	3.02	2.24	1.02	45.4	2.8	1.4	0.15	0.54
Eggplant, fruit	06191	3.4	15.55	28.62	38.79	27.65	11.65	42.1	2.5	13.4	1.39	8.26
Pumpkin, fruit	06046	3.2	3.88	2.78	3.17	3.28	0.56	17.0	1.4	1.5	0.32	0.97
Spinach, leaves	06267	2.8	8.20	10.59	7.29	8.69	1.70	19.6	1.5	3.5	0.35	0.75
Welsh onion (nebuka-negi), leaves, blanched	06226	2.4	2.32	2.72	2.79	2.61	0.26	9.8	1.2	0.9	0.26	0.57
Sweet potato, tuberous root	02006	2.2	6.18	5.28	7.33	6.26	1.03	16.4	1.4	2.0	0.51	2.47
Taro (satoimo), corm	02010	1.7	8.33	7.15	14.83	10.10	4.14	41.0	2.1	2.4	0.46	2.47
Green sweet pepper, fruit	06245	1.6	6.95	7.15	11.83	8.64	2.76	32.0	1.7	2.0	0.84	4.14
Edible burdock, root	06084	1.5	52.17	68.85	77.19	66.07	12.74	19.3	1.5	13.9	3.18	19.37
Broccoli, inflorescence	06263	1.3	11.00	18.74	18.55	16.10	4.41	27.4	1.7	3.1	0.98	3.59
Edamame	06015	1.1	13.32	14.75	8.82	12.29	3.09	25.2	1.7	1.9	0.61	1.74
Shiitake mushroom	08011	1.0	2.58	3.06	2.94	2.86	0.25	8.8	1.2	0.4	0.21	0.62
East Indian lotus root, rhizome	06317	0.8	19.57	27.18	21.60	22.78	3.94	17.3	1.4	2.5	1.64	12.76
Bamboo, shoot ^j	06149	0.5	2.06	4.51	8.39	4.99	3.19	64.0	4.1	0.4	0.64	0.34

^a Item numbers in the Standard Tables of Food Composition in Japan.

^b The percentage of intake for each vegetable was estimated from the data in the annual report on the family income and expenditure survey in Japan for 2005–2009 and in the Standard Tables of Food Composition in Japan – 2010. Details are shown in Section 2.

^c The H-ORAC value for each vegetable is expressed as moles of Trolox that are equivalent to the amount of water-soluble antioxidants contained in 1 g of the raw vegetable ($\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)/g}$ of edible portion).

^d The samples were commercially purchased in Kumamoto, Japan in June or July of 2009. The H-ORAC values presented in this column are from the reference (Takebayashi et al., 2010).

^e The samples were commercially purchased in Nagoya, Japan in November or December of 2009 or January 2010.

^f The samples were commercially purchased in Ibaraki, Japan in August 2010.

^g The estimated contribution of each vegetable to hydrophilic AOC intake from vegetables. Details are described in Section 2.

^h The polyphenol content for each vegetable is expressed as mg of gallic acid that are equivalent to the amount of polyphenols contained in 1 g of the raw vegetable (mg gallic acid equivalent (GAE)/g of edible portion). The average values from 3 independent samples each are given. For details see Supplementary Data (Table S1).

ⁱ The DPPH radical scavenging capacity for each vegetable is expressed as μmol of Trolox that are equivalent to the amount of water-soluble antioxidants contained in 1 g of the raw vegetable ($\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)/g}$ of edible portion). The average values from 3 independent samples each are given. For details see Supplementary Data (Table S3).

^j Bamboo shoots, canned in water, were used because raw bamboo shoots were seasonally unavailable.

from one freeze-dried sample of each vegetable and fruit to reduce the error associated with extraction and measurement of H-ORAC.

2.5. Calculations of the averaged H-ORAC values for “typical vegetable” and “typical fruit” consumed in Japan and contribution of each vegetable and fruit to hydrophilic AOC intake

To obtain the averaged H-ORAC value for “typical vegetable” consumed in Japan, the H-ORAC values for 23 vegetables were weighted-averaged considering their consumptions as follows:

Averaged H-ORAC value for “typical vegetable” ($\mu\text{mol TE/g}$)

$$= \sum \{H\text{-ORAC} \times P/100\},$$

where H-ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) is the H-ORAC value for each vegetable, and P (%) is the percentage of intake for the corresponding vegetable.

The contribution of each vegetable to intake of hydrophilic antioxidants from vegetables was calculated as follows:

$$\text{Contribution (\%)} = H\text{-ORAC} \times P / \text{Avg. H-ORAC},$$

where Avg. H-ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) is the averaged H-ORAC value for “typical vegetable”.

The averaged H-ORAC value for “typical fruit” and contribution of each fruit were calculated in the same manner.

2.6. Measurement of polyphenol content

Polyphenol content was determined according to the method described in International Organization for Standardization (ISO) 14502-1 on the basis of the Folin-Ciocalteu assay (ISO, 2005) with slight modifications. Briefly, the MWA extract was diluted more than two-fold with water. The diluted MWA extract, gallic acid solution or blank (1.0 ml) was dispensed into tubes. A 1/10 dilution of the Folin-Ciocalteu reagent in water (5.0 ml) was added to each tube. After an interval of 3–8 min, a sodium carbonate solution (7.5%, w/v, 4.0 ml) was added. The tubes were then allowed to stand at room temperature for 60 min, and the absorbance at 765 nm was measured. The concentration of polyphenol in the MWA extract was calculated from the standard curve for gallic acid ranging from 10 to 50 $\mu\text{g/ml}$. Data are expressed as milligrams of gallic acid equivalents per gram (mg GAE/g). Each value is the average of determinations for two separately prepared extracts from one freeze-dried sample of each vegetable and fruit to reduce

Table 2
H-ORAC values for fruits commonly consumed in Japan.

Sample name	Item No. ^a	Percentage of intake (%) ^b	H-ORAC ($\mu\text{mol TE/g}$) ^c							Contribution (%) ^e	Polyphenol content (mg GAE/g) ^h	DPPH radical scavenging capacity ($\mu\text{mol TE/g}$) ⁱ
			1 ^d	2 ^e	3 ^f	Average	SD	RSD (%)	Max/Min			
Banana	07107	20.5	8.69	8.61	5.14	7.48	2.03	27.1	1.7	12.5	0.62	3.56
Apple	07148	20.0	16.89	ND ^j	19.14	18.02	–	–	1.1	29.5	0.85	4.26
Satsuma mandarin, juice sacs, early ripening type	07028	19.5	13.28	12.93	14.49	13.57	0.82	6.0	1.1	21.6	0.77	1.72
Japanese pear	07088	7.6	1.89	ND	1.28	1.58	–	–	1.5	1.0	0.12	0.32
Strawberry	07012	5.7	34.32	29.79	36.30	33.47	3.34	10.0	1.2	15.7	2.29	15.74
Japanese persimmon (kaki), nonastringent	07049	4.9	7.54	4.75	4.62	5.64	1.65	29.2	1.6	2.3	0.74	5.48
Watermelon	07077	4.9	1.84	1.79	1.98	1.87	0.10	5.3	1.1	0.7	0.14	0.30
Grape	07116	4.0	3.23	4.21	4.21	3.88	0.57	14.6	1.3	1.3	0.29	1.21
Grapefruit, juice sacs	07062	3.3	17.23	21.28	15.89	18.13	2.80	15.5	1.3	4.9	1.01	3.38
Peach	07136	3.1	28.59	ND	17.96	23.28	–	–	1.6	5.9	0.92	5.71
Melon, open culture	07135	2.8	2.80	1.86	2.99	2.55	0.60	23.7	1.6	0.6	0.28	1.03
Kiwifruit	07054	2.0	6.45	7.66	9.02	7.71	1.28	16.6	1.4	1.3	0.90	5.78
Valencia orange, juice sacs	07041	1.7	18.91	21.21	20.26	20.13	1.16	5.8	1.1	2.8	1.24	3.43

^a Item numbers in the Standard Tables of Food Composition in Japan.

^b The percentage of intake for each fruit was estimated from the data in the annual report on the family income and expenditure survey in Japan for 2005–2009 and in the Standard Tables of Food Composition in Japan – 2010. Details are shown in Section 2.

^c The H-ORAC value for each fruit is expressed as moles of Trolox that are equivalent to the amount of water-soluble antioxidants contained in 1 g of the raw fruit ($\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)/g}$ of edible portion).

^d The samples were commercially purchased in Kumamoto, Japan in August or September of 2009.

^e The samples were commercially purchased in Nagoya, Japan in November or December of 2009 or January 2010.

^f The samples were commercially purchased in Ibaraki, Japan in August or September of 2010.

^g The estimated contribution of each fruit to hydrophilic AOC intake from fruits. Details are described in Section 2.

^h The polyphenol content for each fruit is expressed as mg of gallic acid that are equivalent to the amount of polyphenols contained in 1 g of the raw fruit (mg gallic acid equivalent (GAE)/g of edible portion). The average values from 2 or 3 independent samples each are given. For details see Supplementary Data (Table S2).

ⁱ The DPPH radical scavenging capacity for each fruit is expressed as μmol of Trolox that are equivalent to the amount of water-soluble antioxidants contained in 1 g of the raw fruit ($\mu\text{mol Trolox equivalent (TE)/g}$ of edible portion). The average values from 2 or 3 independent samples each are given. For details see Supplementary Data (Table S4).

^j ND means not determined.

the error associated with extraction and measurement of polyphenol content.

2.7. DPPH assay

The DPPH radical scavenging capacity was measured by the method described previously (Oki et al., 2003) with a slight modification. Briefly, the MWA extracts were diluted two-fold with a 10% methanol aqueous solution and then further diluted with a 50% methanol aqueous solution. Trolox calibration solutions (40, 80, 120 and 160 μM in a 50% methanol aqueous solution) were made to obtain a standard curve. The diluted MWA extract, Trolox calibration solution or blank (100 μl), a 200-mM 2-morpholinoethanesulphonic acid (MES) buffer (pH 6.0) (50 μl), and a DPPH solution (50 μl , 0.8 mM in ethanol) were pipetted to each well of a 96-well plate. After the reaction mixture had been allowed to stand for 20 min at 30 °C, its absorbance at 520 nm was measured (Multiskan JX, Thermo Labsystems Oy, Vantaa, Finland). The DPPH radical scavenging capacity was expressed as moles of Trolox equivalent per gram ($\mu\text{mol TE/g}$). Each value is the average of determinations for two separately prepared extracts from one freeze-dried sample of each vegetable and fruit to reduce the error associated with extraction and measurement of DPPH radical scavenging capacity.

3. Results and discussion

3.1. H-ORAC values of vegetables and fruits commonly consumed in Japan

The H-ORAC values, which reflect the sum of hydrophilic antioxidants contained in samples, for the 23 vegetables are shown

in Table 1. The values ranged from 1.63 to 66.07 $\mu\text{mol TE/g}$. The relative standard deviation (RSD) of H-ORAC values from 3 independent samples each ranged from 5.2 to 64.0%, and their max/min ratios ranged from 1.1 to 4.1. The five vegetables possessing the most potent antioxidative activities were edible burdock, eggplant, East Indian lotus root, broccoli and edamame in that order. The averaged H-ORAC value for “typical vegetable” in Japan was obtained by weighted averaging the H-ORAC values for vegetables evaluated according to their consumption as shown in Section 2. As a result, the averaged H-ORAC value for “typical vegetable” was calculated to be 6.95 $\mu\text{mol TE/g}$. Then the contribution of each vegetable to intake of hydrophilic antioxidant from vegetables was calculated as shown in Section 2. The top five vegetables contributing to hydrophilic AOC intake were onion, edible burdock, eggplant, potato and Japanese radish (daikon) in that order. Of them, onion, potato and Japanese radish (daikon) had medium H-ORAC values, but they were frequently consumed. The contributions of edible burdock and eggplant were due to their high H-ORAC values rather than their percentages of intake.

The H-ORAC values for the 13 fruits ranged from 1.58 to 33.47 $\mu\text{mol TE/g}$ (Table 2). The RSD of H-ORAC values from 3 independent samples each ranged from 5.3 to 29.2%, and their max/min ratios ranged 1.1–1.7. The five fruits possessing the most potent antioxidative activities were strawberry, peach, Valencia orange, grapefruit and apple in that order. The weighted average of H-ORAC values for “typical fruit” was calculated to be 12.23 $\mu\text{mol TE/g}$. The top five fruits contributing to hydrophilic AOC intake were apple, Satsuma mandarin, strawberry, banana and peach in that order. Of them, apple, strawberry, and peach possessed both high H-ORAC values and intake frequencies, whereas the H-ORAC values for Satsuma mandarin and banana were medium levels, but their consumption frequencies were high.