

低分子化ポリフェノールの摂取が高強度間欠的運動時の酸化ストレスおよび血清総抗酸化能に与える影響

塚本(日下部) 未来¹ 神林 勲² 北館 健太郎³
飯嶋 孝行⁴ 木本 理可⁵ 武田 秀勝⁶

Effect of polyphenol converting into a low-molecular form on oxidative stress and serum total antioxidative capacity in high-intensity intermittent spring exercise

Miku Tsukamoto-Kusakabe¹, Isao Kambayashi², Kentaro Kitadate³
Takayuki Iijima⁴, Rika Kimoto⁵ and Hidekatsu Takeda⁶

Abstract

The purpose of this study was to examine effect of Oligonol supplementation on oxidative stress and antioxidant capacity following high-intensity intermittent sprint cycle exercise. Eighteen male students were assigned to Oligonol group (OG) and Placebo group (PG). OG supplemented with Oligonol (200 mg/day) for 2 weeks. After that, all subjects performed intermittent spring cycle exercise for 20-sets. Each set consisted of 7-sec maximal pedaling (resistance was set at 8% of body weight) and 53-sec recovery (unloaded pedaling by 60rpm). Oxygen uptake and heart rate were measured continuously during exercise. Blood samples were collected before exercise (baseline), just after exercise (0h) and 1-hour after exercise (1h) for serum oxidative low density lipoprotein (oxLDL), Hexanoyl-Lys adduct:HEL, Protein carbonyl concentration, total antioxidant capacity (TAC) and uric acid level. Urine samples were also collected at baseline and 1h for 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) level and isoprostane level. Oxygen uptake during exercise was significantly ($p < .001$) higher in OG than PG. On the other hand, Serum oxLDL concentration was significantly ($p < .05$) lower in OG than PG at any time points. Serum TAC, uric acid and urinary 8-OHdG level significantly increased after exercise in both groups, however, no difference was found in OG and PG. We suggest that Oligonol supplementation increases oxygen uptake during exercise. It seems likely that supplementation might be reduced oxidative stress during rest and exercise in spite of no change in antioxidant capacity.

(*Hokkaido J. Phys. Educ. Hlth. Sport Sci.* 45 : 1-9, 2010)

Key words: oligonol, exercise, redox index

1. 東海大学国際文化学部
〒005-8601 札幌市南区南沢5条1丁目1-1
2. 北海道教育大学岩見沢校スポーツ教育課程
〒068-8642 岩見沢市緑が丘2-34-1
3. 株式会社アミノアップ化学
〒004-0839 札幌市清田区真栄363番地32ハイテクヒル真栄
4. 札幌市立札幌中学校
〒007-0807 札幌市東区東苗穂7条1丁目1-1
5. 旭川工業高等専門学校
〒071-8142 旭川市春光台2-2-1-6
6. 札幌医科大学保健医療学部
〒060-8556 札幌市中央区南1条西17丁目

1. School of International Cultural Relations, Tokai University, 5-1-1-1 Minaminosawa Minami-Ku Sapporo 005-8601
2. Department of Sport Education, Hokkaido University of Education Iwamizawa, 2-34-1 Midorigaoka Iwamizawa 068-8462
3. AMINO UP CHEMICAL CO., LTD, High-Tech Hill Shinei 363-32 Shinei, Kiyota, Sapporo 004-0839
4. Sapporo Municipal, Satsunae Junior High School, 7-1-1-1 Higashinaebo Higashi-Ku Sapporo 007-0807
5. Asahikawa National College of Technology, 2-2-1-6 Shunko-dai Asahikawa 071-8142
6. School of Health Science, Sapporo Medical University, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-ku Sapporo 060-8556

連絡先 塚本未来

Corresponding author Miku Tsukamoto

緒 言

ヒトは呼吸によって常に酸素を体内に取り込み、その後の代謝過程において反応性の高い活性酸素種 (reactive oxygen species; 以下ROS) が生成される。ROSは、酸素代謝以外においても、タバコ、紫外線、放射線、激しい運動によっても生成され、老化や病気、疲労などの原因であることが知られている。

生体内で生成されるROSには、スーパーオキシド (superoxide; 以下 O_2^-)、過酸化水素、一重項酸素、ヒドロキシルラジカル等があり、多くのROSは O_2^- に由来する (大野ら, 2000)。また、体内にはいくつかの O_2^- の生成源があり、ミトコンドリアでは電子伝達系、細胞質ではキサンチンオキシダーゼ系、好中球ではニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; 以下NADPH) オキシダーゼ系の過程において O_2^- が生成する (増田ら, 2002)。ROSは生体内において、脂質過酸化、酵素不活性、DNA損傷等を広い範囲で引き起こすといわれている (Bolzan et al., 1997)。一方で、生体内にはROSを消去または除去するための抗酸化能が備わっている。スーパーオキシドジスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、カタラーゼ等の抗酸化酵素や、ビタミンCやビタミンE、尿酸等の非酵素的な抗酸化物質がこの抗酸化能を担っている。生体内の恒常性維持にはROS生成と抗酸化能とのバランスが重要であり、ROS生成が抗酸化能の能力を上回ると、種々の疾病の誘発・促進など、生体に負の影響をもたらす。この状態を酸化ストレスという。ROS生成は酸素消費量に比例する (大野ら, 2000) ため、運動時に酸化ストレスを増大させると報告する先行研究も少なくない (Margonis et al., 2007; Close et al., 2004; Goldfarb et al., 2005; Sacke et al., 2003)。よって、運動誘発性酸化ストレスから生体を防御するためには、ROSを速やかに消去しなければならない。

近年、生体内の抗酸化能を向上させることを目的とし、ビタミンCやE、ポリフェノール等の抗酸化物質を多く含んだ食品やサプリメントが積極的に摂取されるようになってきた。とくに、サプリメントの有効性は広く評価されており、日常生活やスポーツの場面において用いられている。抗酸化物質の1つであるポリフェノールは、植物の葉や花、茎などに含まれる苦味・渋味成分であり、抗酸化活性、動脈硬化抑制、コレステロール、血糖値上昇の抑制、抗アレルギーなどの機能を有している (吉川ら, 2004)。ポリフェノールの機能性は、*in vitro*において強力な種々の作用を示すものの、ポリフェノール自体が高分子であるため、生体吸収が低く、*in vivo*での効果は期待されるほど高くない。本研究では、低分子化ポリフェノール [Oligonol (オリゴノール: (株) アミノアップ化学社製)] 摂取における運動負荷時の影

響を検討することを目的とする。オリゴノールは、オリゴマー・ポリフェノールの略で、ライチ果実由来の高分子のポリフェノールポリマーを低分子化させた、世界初の低分子化ポリフェノールである。主な特徴は、従来のポリフェノールよりも生体吸収性が優れていることにある。これまでの検証により、オリゴノールとライチ果実ポリフェノール100mgを成人ボランティアにそれぞれ摂取させたところ、血中のポリフェノール濃度は、ライチ果実由来ポリフェノールよりもオリゴノールの方が摂取後4時間まで高く、オリゴノールの生体利用性が示されている (若命, 2007)。ヒト第1相安全性試験においても、血圧、血液生化学検査に異常は認められず、食品としての安全性が確認されている (1日当たり600mgまで)。また、陸上競技選手を対象に、オリゴノール (200mg/day) を26日間摂取させたところ、疲労感、疲労回復が顕著に改善していることが報告されている (Ohno et al., 2008)。さらに、腹囲85cm以上、血中脂質に1つ以上の異常値を持つ成人ボランティアにオリゴノール (200mg/day) を10週間摂取させると、腹部CTスキャンにおいて皮下脂肪面積および内臓脂肪面積が減少した (Sakurai et al., 2008) と報告されており、オリゴノールの機能性が多様な場面で期待できると考えられる。付加価値の高い製品開発が求められている中、製品の機能性を科学的検証に基づいてデータを取得し、しかも、ヒト介入試験などによるデータの蓄積が重要である。

そこで、本研究では、2週間のオリゴノール摂取が高強度運動負荷時における酸化ストレス指標および抗酸化指標の面から検討した。

方 法

1. 被検者

被検者は、運動部活動に所属する男子大学生18名 (年齢 19.9 ± 0.3 歳、身長 175.3 ± 1.1 cm、体重 67.9 ± 1.1 kg、BMI 22.1 ± 0.3 kg/m²) であった。実験に先立ち、全員に本研究の趣旨および安全性について十分な説明を行い、自主的な参加を同意書により得た。なお、被検者は全員非喫煙者であった。

2. 実験の概要

漸増負荷運動により、各被検者の最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$) を測定し、さらに身体組成、最大パワーを測定した。各被検者を身体特性、 $\dot{V}O_{2max}$ および平均パワーが均等になるように、オリゴノール摂取群 (Oligonol group; 以下O群) と、プラセボ摂取群 (Placebo group; 以下P群) の2群に分けた。なお、本研究は二重盲検法を用いた。2週間のサプリメント摂取後、自転車エルゴメーターによる高強度間欠的運動を課し、運動前 (Baseline)、運動終了直後 (0 h) および1時間後 (1 h) に採血と採尿を行った (0 hは採血

のみ実施)。なお、本研究では酸化ストレス指標として尿中8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; 以下8-OHdG) レベル、尿中F₂-イソプラスタン (15-isoprostane F_{2t}; 以下 F₂-IsoPs) レベル、血清ヘキサノイルリジン (N ϵ -(Hexanoyl)Lysine; 以下HEL) 濃度、血清酸化低比重リポタンパク (low density lipoprotein; 以下LDL) 濃度および血清カルボニル化タンパク (protein carbonyl; 以下PC)濃度を、抗酸化指標として血清 O₂⁻ 消去能、血清アルコキシラジカル (alkoxyl radical; 以下 \cdot RO) 消去能および血清尿酸値を測定した。また、食事は生体内の酸化ストレスや抗酸化システムに影響を与える要因であるため、運動当日の朝食から実験終了時までの飲食は、検者が準備した同一のものを被検者全員に摂取させた。さらに、運動前日から実験終了時まで、運動と飲酒を行わないよう指示した。

3. 運動プロトコール

1) 漸増負荷運動

運動は自転車エルゴメーター (COMBI社製) を用いて、室温25.8 \pm 1.2 $^{\circ}$ C、湿度48.5 \pm 3.4 %の実験室において行った。被検者には、体重と体脂肪率を測定させ、ストレッチ運動などウォーミングアップを約20分間行わせた。被検者は、自転車エルゴメーターに乗り、サドルの高さを調節し、運動中足がペダルから外れないように、足とペダルをテープで固定した。その後、エルゴメーター上で4分間の安静状態を保持した後、3分間、60 wattsの負荷でメトロノームのリズムにあわせた毎分60回転 (60 rpm) のペダリング運動を行った。その後、60 rpmを維持した状態で、毎分30 watts増加するランブ負荷法により疲労困憊に至るまでの漸増負荷運動を実施した。なお、疲労困憊の判断は、50 rpm以上でペダリングできなくなった時点とした。

2) 高強度間欠的運動

運動は自転車エルゴメーター (Power max) を用いて、室温27.2 \pm 0.2 $^{\circ}$ C、湿度59.6 \pm 1.3 %の実験室において行った。被検者は、体重、体脂肪率を測定し、ウォームアップとしてのストレッチ、自転車エルゴメーターを用いた、100 wattの負荷での10分間のペダリング運動を行った。自転車エルゴメーターの椅子の高さとハンドルの位置を調節した後、靴とペダルを粘着性のテープにより固定し、呼吸ガス分析用のガスマスクを装着した。被検者は、自転車エルゴメーター上で3分間安静状態を保持した後、高強度間欠的運動として、体重 \times 0.08 kpの負荷で7秒間の全力ペダリング運動、無負荷の状態で53秒間、60 rpmを維持したペダリング運動を1セットとし、それを20セット行わせた。各セットにおいて全力ペダリング時の7秒間の平均パワーを記録し、体重あたりの相対値を分析に用いた。運動の前後には衣服を着用しない状態で、体重の測定を行い、体重の減少量に相当す

る水分 (市販のミネラルウォーター) を運動終了から30分以内に摂取させた。

4. サプリメント摂取

O群にはオリゴノール (1日200 mg) を、P群にはプラセボ (環状デキストリン、麦芽エキス、微粒酸化ケイ素の混合物、1日200 mg) を2週間摂取させた。本研究は、それぞれ粉末カプセルを使用した。摂取に際してオリゴノールの効果に影響を及ぼすと考えられるビタミン剤、滋養強壮剤、漢方製剤、総合感冒薬などの併用を避けるよう被検者に指示した。

5. 呼吸ガス分析

漸増負荷運動中および高強度間欠的運動中の呼吸循環器系指標酸素摂取量 (Oxygen uptake; 以下 $\dot{V}O_2$)、二酸化炭素摂取量 (CO₂ production; 以下 $\dot{V}CO_2$)、換気量 (Ventilation; 以下 $\dot{V}E$)、および呼吸交換比 (Respiratory exchange ratio; 以下RER) の測定は、自動呼吸ガス分析装置 (ミナト医科学社製、AE-300S) を用いて、安静時から運動終了まで breath-by-breath 法によって行った。測定されたデータを8呼吸毎に移動平均し、さらに15秒毎に単純平均したものを分析に用いた。得られた $\dot{V}O_2$ のうち、ウォームアップ時から運動終了時までの $\dot{V}O_2$ の総量を総酸素摂取量とした。また、呼吸ガス分析と同時に、スポーツ心拍数計 (POLAR社製 RS400TM) により心拍数 (Heart rate; 以下HR) を連続的に15秒毎に測定した。得られた心拍数のうち、最も高い値を最高心拍数とした。

6. 採尿および採血

採尿はBaseline および1 hの2度行った。運動終了後から1時間後の採尿までの間は安静座位とし、運動による水分の損失を補うため、市販のミネラルウォーターを運動による体重の減少分摂らせた。採血は、Baseline、0 h および1 hの3度、翼付静注針 (テルモ社製) を用いて、肘静脈より行った。採取した血液は、30分間、37 $^{\circ}$ Cで温浴の後、3500 rpm、0 $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離を施し、血清の抽出に供した。分注した血清サンプルは分析時まで-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存した。

7. 酸化ストレス指標の測定

1) 尿中 8-OHdG レベルの測定

凍結させた尿サンプルを常温で解凍した後、遠心分離機 (パーソナル冷却遠心機2700, 久保田商事株式会社製) を用い、2000 rpmで5分間遠心分離を行った。そして、沈殿物を除いた上澄みを尿中 8-OHdG レベルの分析に用いた。

尿中 8-OHdG 濃度の分析は、酵素結合免疫測定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay; 以下ELISA) 法による測定キット (New 8-OHdG Check, 日本老化制御研究所) を用いて行った。8 \times 12ウェルのマイク

ロプレートのそれぞれのウェルに調整した尿サンプルと再構成した第一抗体を 50 μ l ずつ分注し、マイクロプレートインキュベーター（旭テクノグラス社製, Micro plate incubator MPI-100）内にて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液で 3 回洗浄を行った。そして、第二抗体を 100 μ l 加え、再び 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。3 回の洗浄の後、発色剤を 100 μ l 加え、遮光した状態で 15 分間反応させ、反応停止液を加えた。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー（Bio Rad 社製）を使用した。測定キットに含まれている 8-OHdG 標準液（Standard 8-OHdG solution）を用いて、8-OHdG 濃度と吸光度の標準曲線を作成した。この標準曲線を用い、各尿サンプルの吸光度により尿中 8-OHdG 濃度を定量した。本研究での尿中 8-OHdG レベルは、尿中 8-OHdG 濃度に尿量を乗じ、被検者の体重および前回排泄時からの経過時間で除したものをを用いた。

2) 尿中 F₂-IsoPs レベルの測定

凍結させた尿サンプルを常温で解凍した後、遠心分離機（パーソナル冷却遠心機 2700, 久保田商事株式会社製）を用い、2000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。そして沈殿物を除いた上澄みを尿中 F₂-IsoPs レベルの分析に用いた。

尿中イソプラスタンの濃度の分析には、ELISA 法による測定キット（尿中イソプラスタン ELISA Kit, 日本老化制御研究所）を用いて行った。8 \times 12 ウェルのマイクロプレートのそれぞれのウェルに標準液または、調整した尿サンプルを 100 μ l ずつ分注した。その後、全てのウェルに HRP 標識-15-isoprostane F_{2t} 試薬を 100 μ l ずつ分注し、室温で 2 時間インキュベートした。反応終了後、ウェルの反応液を捨て、洗浄液で 3 回洗浄を行った。そして、発色試薬を各ウェルに 200 μ l ずつ分注し、15 分間のインキュベーションを行った後、全てのウェルに反応停止液を加えた。吸光度の測定には、マイクロプレートリーダー（Bio Rad 社製）を使用した。標準液を用いて、尿中イソプラスタン濃度と吸光度の標準曲線（検量線）を作成した。この標準曲線を用い、各尿サンプルの吸光度より尿中イソプラスタン濃度を定量した。本研究での尿中イソプラスタンレベルは、尿中イソプラスタン濃度に尿量を乗じ、被検者の体重および前回排尿時からの経過時間で除したものをを用いた。

3) 血清 HEL 濃度の測定

血清 HEL 濃度の分析は、ELISA 法による測定キット（ヘキサニールリジン測定キット, 日本老化制御研究所社製）を用いて行った。冷凍した血清を常温で解凍した後、血清のタンパク質分解処理のため、サンプル 300 μ l に対し調整した前処理用酵素試薬 60 μ l を混合し、37 $^{\circ}$ C で 15 時間インキュベーションを行った。その後、分画分子量 1000 D の限外濾過フィルタを通過させ、濾

液をキットでの測定に用いた。

8 \times 12 ウェルのマイクロプレートのそれぞれのウェルに標準液またはサンプルを 50 μ l 分注した。その後、1 次抗体試薬を全てのウェルに 50 μ l 加え、4 \sim 7 $^{\circ}$ C で 15 時間インキュベートを行った。反応終了後、洗浄液を用い、3 回洗浄を行った後、2 次抗体試薬を全てのウェルに 100 μ l 分注し、室温で 1 時間インキュベーションを行った。反応終了後、3 回洗浄を行い、発色試薬を全ウェルに 100 μ l 分注し暗所室温にて 15 分間反応させた。反応終了後、反応停止液 100 μ l を全ウェルに加え、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm における吸光度を測定した。標準液を用いて、血清 HEL 濃度と吸光度の標準曲線を作成した。この標準曲線を用い、各血清サンプルの吸光度より血清 HEL 濃度を定量した。

4) 血清酸化 LDL 濃度の測定

血清酸化 LDL 濃度の分析は、ELISA 法による測定キット（酸化 LDL 測定キット, 日本老化制御研究所社製）を用いて行った。冷凍した血清サンプルを常温で解凍した後、8 \times 12 ウェルのマイクロプレートのそれぞれのウェルに洗浄液を用い 5 回洗浄を行った後、それぞれのウェルにサンプルまたは、標準液を 100 μ l 分注し、室温で 4 時間振とうした。その後、洗浄液により 5 回洗浄し、全てのウェルに希釈済みコンジュケート試薬を 100 μ l 分注し、室温にて 1 時間振とうした。反応終了後、洗浄液で 5 回洗浄し、TMB 試薬を全ウェルに 100 μ l 分注し、室温暗所で 15 \sim 25 分インキュベーションを行った。その後、反応停止液を全てのウェルに 50 μ l 分注し、反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm における吸光度を測定した。標準液を用いて、サンプル中の酸化 LDL 濃度と吸光度の標準曲線を作成した。この標準曲線を用い、各サンプルの吸光度より血清酸化 LDL 濃度を定量した。

5) 血清 PC 濃度の測定

血清 PC 濃度の分析は、測定キット（カルボニル化蛋白測定キット, 日本老化制御研究所社製）を用いて行った。冷凍した血清サンプルを常温で解凍した後、8 \times 12 ウェルのマイクロプレートのそれぞれのウェルにサンプルまたは、標準液を 200 μ l 分注し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベーションを行った。反応終了後、洗浄液により 5 回洗浄し、全てのウェルに希釈済みブロッキング試薬を 250 μ l 分注した後、室温にて 30 分間インキュベーションを行った。反応終了後、洗浄液で 5 回洗浄し、ビオチン標識-抗 DNP 抗体を全ウェルに 200 μ l 分注した後、37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベーションを行った。さらに、反応終了後、洗浄液により 5 回洗浄し、希釈済み HRP 標識-ストレプトアビジンを全てのウェルに 200 μ l 分注し、室温で 1 時間インキュベーションを行った。反応終了後、洗浄液を用い、5 回洗浄し、発色液を各ウェルに、200 μ l 分注した後、室温にて 5 分間反応させた。その後、

反応停止液を全てのウェルに 100 μ l 分注し、反応を停止させ、マイクロプレートリーダーを用い、450 nm における吸光度を測定した。標準液を用いて、サンプル中の PC 濃度と吸光度の標準曲線を作成した。この標準曲線を用い、各サンプルの吸光度より血清 PC 濃度を定量した。

8. 抗酸化指標の測定

1) 血清総抗酸化能の測定

O_2^- 消去能および $\cdot RO$ 消去能の分析は、既報 (Kohri et al., 2009) に若干の修正を加えて、ESR (JES-RE1X, 日本電子株式会社製) を用いたスピントラップ法にて実施した。前処理した混合液に光ファイバー式可視光照射装置 (RUVF-203SR, ラジカルリサーチ社製) にて可視光を照射することにより O_2^- および $\cdot RO$ を発生させ信号を検出し (Control signal), 一方では同じ系に血清を添加した際の O_2^- および $\cdot RO$ の信号を検出した (Serum signal)。なお、トラップ剤には、CYPMPO (2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2 λ 5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole1-oxide) を用いた。

血清 O_2^- 消去能の測定は、Control signal としてリポフラビン (20 μ M) を 5 μ l, EDTA (50 mM) を 10 μ l, CYPMPO (100 mM) を 10 μ l, リン酸緩衝液 (Phosphate buffered; PB) (100 mM) を 75 μ l 加え、Serum signal としてリポフラビン (20 μ M) を 5 μ l, EDTA (50 mM) を 10 μ l, CYPMPO (100 mM) を 10 μ l, PB (100 mM) を 45 μ l, リン酸緩衝生理食塩水 [Phosphate buffered saline; PBS (-)] にて10倍希釈した血清試料 30 μ l を加え、それぞれをよく混和した後、シリンジ付きディスプレイセルで 100 μ l の混合液を吸い上げ、それを ESR にセットし、信号を検出した。

血清 $\cdot RO$ 消去能の測定には、Control signal として AAPH (2,2'-azobis (amidinopropane) dihydrochloride) (10 mM) を 10 μ l, CYPMPO (100 mM) を 10 μ l, PB (100 mM) を 80 μ l 加え、Serum signal として AAPH (10 mM) を 10 μ l, CYPMPO (100 mM) を 10 μ l, PB (100 mM) を 50 μ l, PBS (-) にて10倍希釈した血清サンプル 30 μ l を加え、それぞれをよく混和した後、シリンジ付きディスプレイセルで 100 μ l の混合液を吸い上げ、それを ESR にセットした。ESR の測定条件は、いずれも Sweep width = \pm 7.5 mT, Sweep Time = 2 min, Gain = 2.5 \times 100, Modulation Width = 1.0 \times 0.1 mT, Time constant = 0.3 sec, Center Field = 336.2 mT, Power = 6 mW, Frequency = 9.43 GHz で行った。また、血清 O_2^- および $\cdot RO$ 消去能には、前述したそれぞれの系に標準物質である Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (50 μ M) を添加した O_2^- および $\cdot RO$ 信号 (Trolox signal) を評価基準として用いた。血清 O_2^- および $\cdot RO$ 消去能の評価

には、スピントラップ剤 CYPMPO (2-(5,5-Dimethyl-2-oxo-2 λ 5-[1,3,2]dioxaphosphinan-2-yl)-2-methyl-3,4-dihydro-2H-pyrrole1-oxide, CYP) と抗酸化物質 (AOx) が、単位濃度あたりで反応した O_2^- および $\cdot RO$ 濃度の比率を以下の式 (1) で算出し (式参照; [I_0 : Control signal で、全ての O_2^- または $\cdot RO$ 発生量に対応, I : 抗酸化物質存在下での ESR 信号, $I_0 - I$: 抗酸化物質が消去した O_2^- または $\cdot RO$ 量]), [mmol/l Trolox equivalent] に換算して求めた。

$$[(I_0 - I) / I] / [(AOx) / (CYP)] \dots (1)$$

2) 血清尿酸値の測定

血清尿酸値の測定は、ウリカーゼ POD 法を用いて外注分析を行った。

9. 統計処理

測定結果は、全て平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で表した。変数の経時的変化については、Stat View を用いた反復測定分散分析を行い、有意差が認められた場合は適宜 Bonferroni 法にて Post-hoc 多重比較を行った。また、群間に有意差が認められた場合は、適宜対応のない t 検定を行った。危険率は、すべて 5% 未満で有意とした。

結 果

1. 漸増負荷運動

漸増負荷運動の継続時間 (min), 最大運動負荷 (watts) および $\dot{V}O_2$ max (ml/kg/min) は、それぞれ O 群 10.15 \pm 0.23, 333 \pm 10, 53.0 \pm 3.1, P 群で 10.36 \pm 0.23, 345 \pm 12, 53.5 \pm 3.5 であった。また、最大心拍数 (bpm) と RER が、それぞれ O 群で 192.8 \pm 2.4, 1.27 \pm 0.02, P 群で 192.8 \pm 2.4, 1.27 \pm 0.02 であることから、各被検者は疲労困憊に達したと考えられる。

2. 高強度間欠的運動時の呼吸循環器系指標と体重の変化

両群における平均 $\dot{V}O_2$, % $\dot{V}O_2$ max, $\dot{V}CO_2$, $\dot{V}E$, RER および HR について Table 2 に示した。運動全体の $\dot{V}O_2$ (Fig.1) において、O 群は P 群と比較して、有意 ($p < .001$) に高値を示した。運動後の体重の変化 (kg) は、O 群で -0.56 \pm 0.05, P 群において -0.63 \pm 0.09 であり、ほぼ同様の減少量であった。なお、最後までこぎきれなかった被検者がいたこと、また自動呼気ガス分析装置の不具合で測定できなかったため、P 群のうち 3 人のデータを除外した。

3. 酸化ストレス指標

血清酸化 LDL 濃度 (Table 3) は Baseline, 0 h および 1 h において、P 群と比較して O 群で有意 ($p < .05$) に低値を示した。しかしながら、経時的変化は認められなかった。尿中 8-OHdG レベル (Table 3) は Baseline

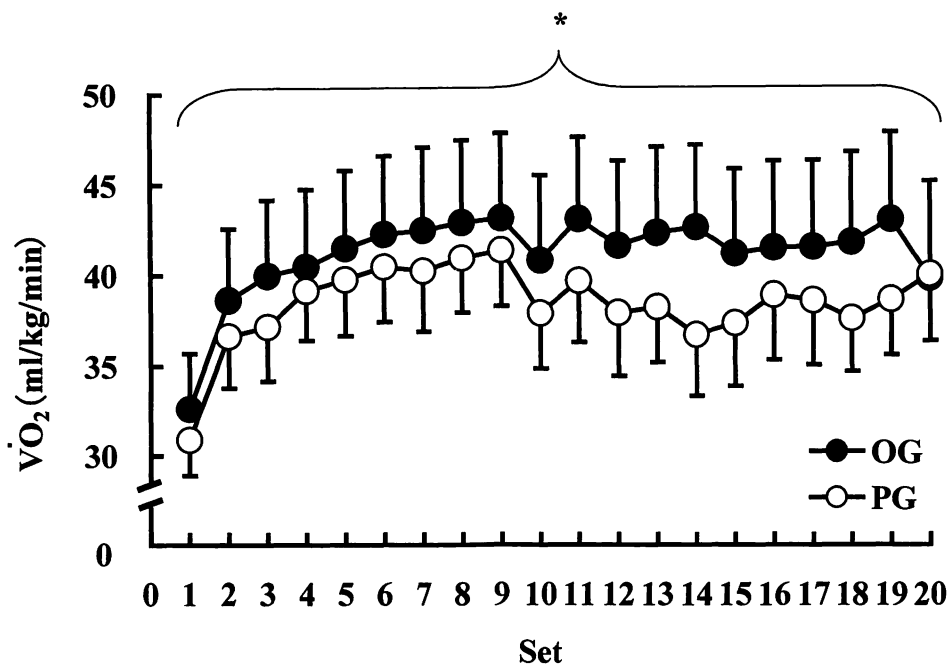


Fig. 1 $\dot{V}O_2$ kinetics during high-intensity intermittent sprint exercise in oligonol (n=6) and placebo (n=9) groups, respectively. ** (p<.001) vs P group

Table 1 Physical characteristics in Oligonol and Placebo groups.

Variables	Group	Mean	SE	Range
Age (years)	O	20.4	0.3	19-22
	P	19.4	0.3	18-20
Height (cm)	O	176.3	1.6	168.8-181.9
	P	174.3	1.4	171.0-184.0
Weight (kg)	O	67.5	1.6	61.1-74.9
	P	68.3	1.7	61.2-78.4
BMI (kg/m ²)	O	21.7	0.6	18.0-24.5
	P	22.5	0.4	20.2-24.0
$\dot{V}O_{2max}$ (ml/kg/min)	O	53.0	3.1	39.2-67.0
	P	53.5	3.5	40.5-75.2

Table 2 Respiratory data during high-intensity intermittent sprint exercise.

Variables	O group (n=9)	P group (n=6)
$\dot{V}O_2$ (ml/kg/min)	41.1 ± 4.5	38.2 ± 3.0
% $\dot{V}O_{2max}$ (%)	81.2 ± 8.1	76.0 ± 7.3
$\dot{V}CO_2$ (ml/kg/min)	44.3 ± 4.4	40.8 ± 2.3
$\dot{V}E$ (l/min)	94.9 ± 3.6	92.3 ± 3.2
RER	1.10 ± 0.02	1.08 ± 0.03
HR (bpm)	163.0 ± 3.9	164.0 ± 3.4

Mean ± SE

Table 3 Change of oxidative stress markers before and after high-intensity intermittent spring exercise.

Variables	Group	Baseline	0 h	1 h
Urinary 8-OHdG level (ng/kg/h)	O	7.12 ± 1.33 [#]	—	19.44 ± 2.32 ^{*§}
	P	4.04 ± 0.82	—	14.60 ± 2.20 [*]
Urinary F ₂ -ISoPs level (ng/kg/h)	O	3.53 ± 1.64	—	2.33 ± 0.65
	P	1.21 ± 0.22	—	1.83 ± 0.66
Serum HEL concentration (mmol/L)	O	28.0 ± 7.0	32.4 ± 6.4	33.1 ± 6.2
	P	31.0 ± 6.5	34.2 ± 6.7	33.4 ± 8.6
Serum oxidative LDL concentration (ng/ml)	O	125.2 ± 55.6 [#]	148.2 ± 64.7 [#]	136.4 ± 61.6 [#]
	P	708.7 ± 250.9	847.7 ± 336.2	724.8 ± 275.6
Serum PC concentration (nmol/mg)	O	0.063 ± 0.013	0.096 ± 0.012	0.101 ± 0.015
	P	0.082 ± 0.017	0.090 ± 0.016	0.094 ± 0.013

* (p<.001) vs Baseline, § (p<.08), # (p<.05) vs Pgroup

Mean ± SE

Table 4 Change of antioxidant capacity markers before and after high-intensity intermittent spring exercise.

Variables	Group	Baseline	0 h	1 h
Serum O ₂ ⁻ scavenging capacity (mmol/L Trolox equivalent)	O	1.87 ± 0.21	2.12 ± 0.21	1.81 ± 0.11
	P	2.02 ± 0.51	2.17 ± 0.38	2.32 ± 0.32
Serum ·RO scavenging capacity (mmol/L Trolox equivalent)	O	1.28 ± 0.18	1.96 ± 0.27 [*]	2.26 ± 0.35 [*]
	P	1.08 ± 0.10	1.76 ± 0.15 [*]	1.77 ± 0.28 [*]
Serum uric acid level (mg/dl)	O	6.16 ± 0.41	6.77 ± 0.39	10.54 ± 0.41 ^{**}
	P	5.41 ± 0.20	6.03 ± 0.23	9.37 ± 0.44 ^{**}

* (p<.01) vs Baseline, ** (p<.001) vs Baseline, 0 h

Mean ± SE

において、P群と比較してO群で有意 (p<.05) に高値を示し、1 h ではP群と比較してO群で高い傾向 (p<.08) を示した。また、両群ともに Baseline と比較して1 h において有意 (p<.001) に高値を示したが、Baseline の値を1としたときの1 h の変化率において、両群に有意な差は認められなかった。その他の酸化ストレス指標 (Table 3) において、群間差や経時的な変化を示さなかった。

4. 抗酸化指標

血清 ·RO 消去能 (Table 4) において、群間差は認められなかった。また、両群ともに Baseline に比較して0 h と1 h で有意 (p<.01) に高値を示した。血清尿酸値 (Table 4) は1 h において、P群と比較してO群で高い傾向 (p<.08) を示したものの、有意な差は認められなかった。また、両群ともに Baseline および0 h と比較して1 h で有意 (p<.001) に高値を示した。血清 O₂⁻ 消去能 (Table 4) は、群間差や経時的な変化を示さなかった。

考 察

運動時の疲労や運動後の筋肉痛などは、運動にとりまう酸化ストレスの増大に関係していることから (Nikolaidis et al., 2008), 全てのアスリートにおいて運動時の ROS 生成をすみやかに軽減することが重要である。本研究では、オリゴフェノール経口摂取によって抗酸

化能指標を向上させ、高強度間欠的運動時の酸化ストレスを軽減できるのではないかと考えられたが、抗酸化指標においては群間に有意差はみられなかった。抗酸化指標である血清尿酸値は、両群ともに Baseline と0 h に比較して1 h において増加 (p<.001) した。高強度間欠的運動のような全力ペダリング運動とローパワーでのペダリング運動の繰り返しは、活動筋内の脱酸素化や再酸素化を引き起こし、虚血-再灌流と同様の状態であったと考えられる (Groussard et al., 2003)。虚血や激しい運動時には、キサンチンオキシダーゼ系が活性化して尿酸生成が増大する。先行研究 (Suzuki et al., 2006) においても、激運動後の尿酸値の増加が示されている。以上のことから、高強度間欠的運動は再灌流に伴うキサンチンオキシダーゼ系の活性化が1 h における血清尿酸値を増加させたと考えられる。これまでの報告で、血清尿酸値の増加は血清総抗酸化能を増加させることが示されている (Benzie et al., 1996) が、血清総抗酸化指標である O₂⁻ および ·RO 消去能に群間差がなく、経時的変化では、·RO 消去能のみにおいて運動後に有意な高値を示した (Table 4)。本結果より、血清総抗酸化指標は、ラジカル種によって異なる消去作用を示した。O₂⁻ に対して特異的に反応する抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼは、運動中の変動が少なく、·RO 消去に関与する種々の抗酸化物質が主に動員されたと考えられる。個々の抗酸化物質は、抗酸化ネットワークを反映するため、血清尿酸値のように増加するものだけではなく、変化しない、もしくは減少する抗酸化物質の影響も推察さ

れる。著者らの研究室では、これまでの検証において、*in vitro*においてオリゴノール自体の高い抗酸化能を評価しており、また、日常安静時におけるオリゴノール摂取時のラジカル消去能（総抗酸化能）は、摂取前と比較して、摂取後に高い傾向を示すことを明らかにしている（いずれも未報告データ）。ESRを用いる抗酸化能評価は、特異的にROS消去能を測定できる唯一の手法であるが、ラジカル種の違いによる抗酸化能評価の検討は少ない。著者らは、同様の運動負荷時に、ラジカル種によって異なる消去能を示すことを明らかにしている（日下部ら, 2009）が、本結果より、抗酸化物質摂取時の影響は明らかにすることはできなかった。今後は、血中の抗酸化物質の濃度とラジカル消去能を合わせて抗酸化指標を評価すると新しい知見が得られるかもしれない。

酸化ストレス指標である血清酸化LDL濃度（Table 3）は、Baseline, 0 h および 1 h において P 群と比較して、O 群で有意 ($p < .05$) に低値を示した。通常、LDL は LDL 受容体を通して肝臓に取り込まれるが、酸化 LDL はスカベンジャー受容体を通してマクロファージに取り込まれる。LDL を多量に取り込んだマクロファージは泡沫化し、血管内皮細胞障害、アテローム性動脈硬化を引き起こすと考えられている。本研究の結果より、水溶性の抗酸化物質であるオリゴノールは、血中においてコレステロールの輸送を担う LDL の酸化を軽減に何らかの関与があると推察されるが、オリゴノール摂取前の値からの比較ができないために、決定的な結果には至らなかった。

その他の酸化ストレス指標では、尿中 F₂-IsoPs レベル、血清 HEL 濃度および血清 PC 濃度において、群間差や経時的な変化は認められなかった（Table 3）。これまでの先行研究において、脂質過酸化指標は、運動後早期に変化しないことが報告されている（Close et al., 2004; Goldfarb et al., 2005; Cannon et al., 1990; Sacheck et al., 2000:2003）。Nikolaidisら（2007）は、女性を対象とした等速性収縮運動によって、運動終了 2 ~ 4 日後に血漿 PC 濃度が運動前と比較して有意に高値を示したことを報告している。このように、酸化ストレス指標には一時的な変動を示す指標と長期的な変動を示す指標があると考えられる。したがって、本研究においても 1 h 以降に酸化ストレス指標の経時的な変化や群間差が認められたかもしれない。尿中 8-OHdG レベル（Table 3）は、両群ともに Baseline に比較して 1 h で有意 ($p < .001$) に高値を示し、これまでの我々の研究室の研究結果（神林ら, 2004）と一致した。また、Baseline における尿中 8-OHdG レベルは、P 群と比較して O 群において有意に高値 ($p < 0.05$) を示した。尿中 8-OHdG レベルが高いことは、種々の疾病のリスクと関係があることから、好ましい状態であるとは言えない。しかしながら、低すぎても好まし状況ではないという考えもある。低濃度の ROS 生成は、シグナル伝達の役割を担い、抗酸化酵素の発現にとって重要である

と認識され始めており（Gomez-Cabrera et al., 2005）、ROS のホルミシス理論として提唱されている（Radak et al., 2005）。よって、本研究で示された 8-OHdG レベルの程度は、オリゴノール経口摂取によって安静時のエネルギーの代謝が亢進され、血流改善によって、血中の 8-OHdG が洗い出されたため（wash out）、尿中により多く排泄された可能性も否定できない。オリゴノール摂取が尿中 8-OHdG レベルへの何らかの生体機構が作用したと考えられるが、その詳細については、今後検討の余地がある。

ROS の生成は $\dot{V}O_2$ に比例するため運動時には酸化ストレスを増大させる可能性があり（野口, 2003）、本研究においても O 群では酸化ストレスが増大することが予想された。運動全体の $\dot{V}O_2$ は、O 群において 3 名の欠損値があるものの、P 群と比較して O 群で高値を示している（Fig. 1）。本研究では O 群は運動全体の $\dot{V}O_2$ が高値を示しているにもかかわらず、0 h や 1 h における O 群と P 群の酸化ストレス指標に有意な差は認められなかった（血清酸化 LDL 濃度は除く）。このことから、2 週間のオリゴノール摂取より、運動中の $\dot{V}O_2$ 増加に伴って増大する脂肪やタンパク質の酸化損傷の軽減が推察されるが、詳細なメカニズムまでは明らかにすることはできなかった。

まとめ

本研究では、2 週間のオリゴノール経口摂取が抗酸化能を向上させ、運動時の酸化ストレスを軽減できるかどうかを、高強度間欠運動前後の酸化ストレス指標および抗酸化指標から検討することを目的とした。被験者は大学で運動部に所属し、日常定期的に運動を行っている健康な男子学生 18 名であり、オリゴノールを摂取する群（O 群）9 名、オリゴノールを摂取しない対照群（P 群）9 名に分けられた。主な結果は以下の通りである。

1. 血清酸化 LDL 濃度 (ng/ml) は、両群ともに Baseline に比較して運動後の変化は認められなかったが、Baseline, 0 h, 1 h において、P 群の 708.7 ± 250.9 , 847.7 ± 336.2 , 724.8 ± 275.6 に対し、O 群は 125.2 ± 55.6 , 148.2 ± 64.7 , 136.4 ± 61.6 であり、O 群は P 群に比較して有意 ($p < .05$) に低値を示した。
2. 尿中 8-OHdG レベル (ml/kg/min) については、両群ともに Baseline に比較して、1 h において有意 ($p < .001$) に高値を示し、さらに Baseline において P 群の 4.04 ± 0.82 に対し、O 群は 7.12 ± 1.33 であり、O 群は P 群に比較して有意 ($p < .05$) に高値を示した。
4. 血清尿酸値 (mg/dl) については、両群ともに Baseline と 0 h に比較して、1 h において有意 ($p < .001$) に高値を示した。また、血清総抗酸化能において、群間差は認められなかった。

このように、2 週間のオリゴノール経口摂取は、血清総抗酸化能に対して効果を示さなかったものの、酸化ス

トレス指標の軽減に関与する可能性が示唆された。

参考文献

- Benzie, IF., Strain, JJ. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FLAP) as a measure of "antioxidant power": the FLAP assay. *Anal. Biochem.*, 239 : 70-76.
- Bolzan, A. D., Bianchi, M. S. and Bianchi, N. O. (1997) Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in human blood-influence of sex, age and cigarette smoking. *Clin. Biochem.*, 30 : 449-454.
- Close, GL., Ashton, T. and Cable, T. (2004) Eccentric exercise, isokinetic muscle soreness : the role of reactive oxygen species. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 91 : 615-621.
- Goldfarb, A. H., Bloomer, R. J. and McKenzie, M. J. (2005) Combined antioxidant treatment effects on blood oxidative stress after eccentric exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.*, 37 : 234-239.
- Groussard, C., Rannou-Bekono, F., Machefer, G., Chevanne, M., Incent, S., Sergent, O., Cillard, J. and Gratas-Delamarche, A. (2003) Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 89 : 14-20.
- Gomez-Cabrera, M., Borrás, C., Pallardo, F. V., Sastre, J., Ji, L. L. and Vina, J. (2005) Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats. *J. Physiol.*, 567 : 113-120.
- 神林勲, 石村宣人, 中村寛成, 内田英二, 武田秀勝, 藤井博匡 (2004) 短時間の高強度間欠的運動は尿中8-OHdG含有量を増加させる。日本運動生理学雑誌, 11 : 61-67.
- 日下部未来, 神林勲, 白井夕貴, 高橋寿美子, 木本理可, 武田秀勝 (2009) 高強度間欠的運動が血清総抗酸化能に与える影響。北海道体育学研究, 44 : 1-7.
- Margonis, K., Fatouros, I.G., Jamurtas, A.Z., Nikolaidis, M.G., Douroudos, I., Chatzinikolaou, A., Mitrakou, A., Mastorakos, G., Papassotiriou, I., Taxildaris, K. and Kouretas, D. (2007) Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining : implications for diagnosis. *Free. Radic. Biol. Med.* 43 (6) : 901-910.
- 増田和美, 田辺解, 久野譜也 (2002) 運動と酸化ストレスと健康, 筑波大学体育科学系紀要, 25 : 1-11.
- Nikolaidis, M.G., Paschalis, V., Giakas, G., Fatouros, I.G., Koutedakis, Y., Kouretas, D. and Jamurtas, A.Z. (2007) Decreased blood oxidative stress after repeated muscle-damaging exercise. *Med. Sci. Sports. Exerc.* 39 (7) : 1080-1089.
- 野口和美, 田辺解, 久野譜也 (2002) 運動と酸化ストレスと健康, 筑波大学体育科学系紀要, 25 : 1-11.
- 大野秀樹, 跡見順子, 伏木亨 (2000) 身体運動・栄養・健康生命科学 Q&A : 活性酸素と運動 (第2版). 杏林書院 : 東京, pp.14-139.
- Ohno, H., Sakurai, T., Hisajima, T., Abe, S., Kizaki, T., Ogasawara, J., Ishibashi, Y., Imaizumi, K., Takemasa, T., Haga, S., Kitadate, K., Nishioka, H. and Fujii, H. (2008) The supplementation of Oligonol, the new lychee fruit-derived polyphenol converting into a low-molecular form, has a positive effect on fatigue during regular track-and-field training in young athletes. *Adv. Exerc. Sports. Physiol.*, 13 : 93-99.
- Radak, Z., Pucsek, J., Boros, S., Josphai, L. and Taylor, A. W. (2000) Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super marathon runners during a four-day race period. *Life. Sci.*, 66 : 1763-1767.
- Sacheck, J. M., Decker, E.A. and Clarkson, P.M. (2000) The effect of diet on vitamin E intake and oxidative stress in response to acute exercise in female athletes. *Euro. J. Appl. Physiol.*, 83 : 40-46.
- Sacheck, J. M., Milbury, P.E., Cannon, J. G., Roubenoff, R. and Blumberg, J. B. (2003) Effect of vitamin E and eccentric exercise on selected biomarkers of oxidative stress in young and elderly men. *Free. Radic. Biol. Med.*, 34 (12) : 1575-1588.
- Sakurai, T., Nishioka, H., Fujii, H., Nakano, N., Kizaki, T., Radak, Z., Izawa, T., Haga, S. and Ohno, H. (2008) Antioxidative effects of a new lychee fruit-derived polyphenol mixture, Oligonol, converted into a low-molecular form in adipocytes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(2) : 463-476.
- Suzuki, K., Peake, J. and Nosaka, K. (2006) Changes in markers of muscle damage, inflammation and HSP70 after an Ironman triathlon race. *Euro. J. Appl. Physiol.*, 98 : 525-534.
- 若命浩二. (2007) ライチ果実由来低分子化ポリフェノールの機能性. *Food Style* 21, 11-65.
- 吉川敏一, 河野雅弘, 野原一子 (2004) 活性酸素・フリーラジカルのすべてー健康から環境汚染までー. 丸善株式会社 : 東京, p.100.

(平成22年3月31日受付)
(平成22年7月12日受理)