

一時的なビタミンC経口摂取が中高年者における 中強度有酸素運動後の酸化還元状態に与える影響

木 本 理 可¹ 神 林 勲² 塚 本 (日下部) 未 来³
内 田 英 二⁴ 東 郷 将 成⁵ 武 田 秀 勝⁶

Effect of acute oral supplementation with vitamin C on redox state after moderate aerobic exercise in middle-aged men

Rika Kimoto¹, Isao Kambayashi², Miku Tsukamoto-Kusakabe³
Eiji Uchida⁴, Masanari Togo⁵ and Hidekatsu Takeda⁶

Abstract

Reactive oxygen species may contribute to exercise-induced oxidative stress, and antioxidants may protect against it. This study examined the effectiveness of acute oral supplementation with vitamin C on redox state, i.e., biomarkers of oxidative stress and antioxidant capacity after moderate aerobic exercise in middle-aged men. Eight male volunteers (42-60 yr old) were participated in this study. They pedaled a cycle ergometer for 30 min at intensity of 50 % heart rate reserve (HRR) randomly with (EX+VC) and without (EX) oral supplementation with vitamin C. Subjects were twice supplemented with an oral dose of 1000 mg vitamin C at the time of 12 hours and 3 hours prior to exercise. Blood and urine samples were collected before exercise (baseline), immediately after exercise (0 h), 1 hour (1 h), 3 hours (3 h), 5 hours (5 h) and 24 hours (24 h) after exercise for analyzing lipid hydroperoxide (LPO), superoxide dismutase (SOD) and ESR-detected total antioxidant capacity (TAC) in serum and 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) in urine. There was no significant difference in biomarkers of antioxidant capacity between EX+VC and EX. On the other hand, urinary 8-OHdG level was tended to be higher in 3 h and 5 h, and serum LPO concentration attenuated in all sampling points in EX+VC although these differences did not reach to statistical significance. These data suggest that acute oral vitamin C supplementation prior to moderate aerobic exercise has no effect on redox state, but may have the adverse effects of oxidation on DNA and lipid in middle-aged men.

(Hokkaido J. Phys. Educ. Hlth. Sport Sci. 45 : 11–18, 2010)

Key words: Urinary 8-OHdG level, serum LPO concentration, serum total antioxidant capacity, serum SOD activity, heart rate reserve

1. 旭川工業高等専門学校
〒071-8142 旭川市春光台 2-2-1-6
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. 東海大学国際文化学部
〒005-8601 札幌市南区南沢 5-1-1-1
4. 大正大学人間学部
〒170-8470 東京都豊島区西巣鴨 3-20-1
5. 北海道教育大学大学院教育学研究科
〒068-8642 岩見沢市緑が丘 2-34-1
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. Asahikawa National College of Technology,
2-2-1-6 Shunko-dai Asahikawa 071-8142
2. Department of Sport Education, Hokkaido
University of Education Iwamizawa, 2-34-1
Midorigaoka Iwamizawa 068-8642
3. School of International Culture Relations,
Tokai University, 5-1-1-1 Minaminosawa Minami-
ku Sapporo 005-8601
4. Faculty of Human Sciences, Taisho University,
3-20-1 Nishi-sugamo Toshima-ku Tokyo 170-
8470
5. Graduated School of Education, Hokkaido
University of Education, 2-34-1 Midorigaoka
Iwamizawa 068-8642
6. School of Health Science, Sapporo Medical
University, Minami 1-jo Nishi 17-chome Chuo-
ku Sapporo 060-8556

連絡先 木本 理可

Corresponding author Rika Kimoto

緒 言

水溶性ビタミンとして知られているビタミンC (L-アスコルビン酸) は、低分子 ($C_6H_8O_6$) ではあるものの、ヒトは体内で合成できないため外部から摂取しなければならない。生体への作用は多岐に渡っており、コラーゲンやカルニチンの合成、副腎からのホルモン分泌などに関与する。これらの作用の中で、最も広範に知られているのは、還元物質としての抗酸化作用である。

ビタミンC 経口摂取が運動後の酸化還元状態、すなわち酸化ストレスや抗酸化能の指標に与える影響についての報告は多い。例えば、2週間にわたりビタミンC を1日当たり500 mg と1000 mg 摂取する2群を設定し、それぞれの群が最大酸素摂取量の75%に相当する負荷で30分間の走運動を実施したところ、脂質過酸化やグルタチオンには変化がなかったものの、ビタミンC の摂取量に依存してタンパクカルボニル化が抑制されたことが報告されている (Goldfarb et al., 2005)。また、1000 mg のビタミンC 摂取を10日間実施し、最大酸素摂取量の74 ~ 78%で1時間の自転車ペダリング運動をしたところ、運動誘発性の血漿脂質ペルオキシド濃度がビタミンC を摂取しない時と比較して有意に低下したことが認められている (Wilson et al., 2001)。一方、1日400 mg のビタミンC 摂取を3週間実施後、伸長性筋収縮を伴う1時間の全身運動 (Box-stepping) で血漿総抗酸化能の増加が認められたものの、血漿マロンジアルデヒド濃度には変化がなかったとされている (Maxwell et al., 1993)。以上のように、ビタミンC 摂取は、酸化ストレスや抗酸化能の指標に影響を与えるものの、摂取量、摂取期間および測定対象とされた指標などによって結果は異なると思われる。

ビタミンC 摂取が運動後の酸化ストレスや抗酸化能の指標に与える影響を検討したこれまでの先行研究では、対象とされた被検者は主に20~30歳の若年者であった。肥満や生活習慣病の予防や改善に運動が推奨されている現代において、運動が中高年者や高齢者の酸化ストレスや抗酸化能の指標に与える影響を検討することは重要である。なぜなら、高齢者は脂質過酸化が増加し (Olinescu et al., 1995; Pansarasa et al., 1999)、DNA酸化損傷の指標である尿中8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-hydroxy-deoxyguanosine; 8-OHdG) 含有量と加齢に有意な相関関係があり (Higashi et al., 2005)、生体内のビタミンC 含有量は加齢によって低下する (Ji and Hollander, 2000) こと等が報告されているからである。また、タンパク質の代謝や細胞新生能力が低下することに伴って、抗酸化酵素活性も低下すると考えられる。抗酸化能が低下し、酸化ストレスが高まっている中高年者や高齢者におけるビタミンC 摂取が運動後の酸化還元状態に与える影響を検討した研究は見当たらない。

本研究は、中高年者を対象とし、健康の維持・増進に貢献できる中強度有酸素運動を負荷する実験機会を得た。そこで、基礎的資料を得る目的で、運動前に一時的にビタミンC 摂取のある・なしの2条件を設定し、ビタミンC の摂取が運動後の酸化ストレスと抗酸化能の指標に与える影響を検討した。一時的な摂取にした理由は、Ashton et al. (1999) が自転車エルゴメーターによる疲労困憊までの漸増負荷運動の2時間前に1000 mg のビタミンC を摂取したところ、運動後の血中脂質過酸化濃度が抑制され、電子スピン共鳴 (electron spin resonance; ESR) 装置による測定で血漿中のフリーラジカル生成も低下したことを報告しているからである。運動前の一時的なビタミンC の摂取で運動による酸化ストレスを抑制できれば、定期的な摂取の必要はなく抗酸化物質の摂取方法についても基礎的資料を得ることができる。また、本研究において、抗酸化指標の1つとして用いた血清総抗酸化能 (total serum antioxidant capacity; TAC) は、著者らの研究グループで開発した新たな抗酸化能の測定法である (Kohri et al., 2009)。この方法は、血中の総合的な抗酸化能 (ROS 消去能) を評価することができるため、特定の抗酸化酵素・抗酸化物質の濃度や活性の変化と合わせて検討することで、生体における抗酸化能の変化をより具体的に評価できると考える。

そこで本研究は、中高年者における一時的なビタミンC 経口摂取と運動後の酸化還元状態を検討することを目的に、複数の酸化ストレス指標、抗酸化指標を測定する、ヒト介入による運動負荷実験を実施した。

方 法

1. 被検者

健康で非喫煙者である中高年男性8名 (年齢 48.8 ± 2.4 歳、身長 173.3 ± 1.6 cm、体重 66.6 ± 2.7 kg) を対象とした。すべての被検者はレクリエーションとして運動やスポーツを実施することはあるものの、定期的な運動や専門的なトレーニングに従事しているものはいなかった。実験に先立ち、ヘルシンキ宣言に基づいて、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、自主的な参加の同意を書面により得た。なお、本研究は、札幌医科大学の倫理委員会の承認を得て実施された。

2. 実験の概要

本研究では、酸化ストレス指標として尿中8-OHdG レベルと血清脂質ヒドロペルオキシド (lipid hydroperoxide; LPO) 濃度を、抗酸化指標として血清総抗酸化能 (total serum antioxidant capacity; TAC) と血清スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) 活性を測定した。まず、被検者の安静時 (baseline) の各指標を測定するために、午前7時から10時の間に採尿および採血を行った。その

後、自転車エルゴメーター（リイコー 500, ロード社製）による心拍予備力（heart rate reserve ; HRR）の50%で30分間の自転車ペダリング運動を課し、運動終了直後（0 h）、1時間後（1 h）、3時間後（3 h）、6時間後（6 h）および24時間後（24 h）に採尿と採血を行った（0 hは採血のみ）。被検者には、通常の運動（EX）とビタミンC経口摂取後の運動（EX+VC）という同一の運動を2度実施させた。どちらを先に実施するかは検者が無作為に決定し、同一被検者の実験は少なくとも1週間以上の間隔をあけた。運動前日の夕食から実験終了時までの食事は検者が準備した同一のものを被検者全員に摂らせ、EX+VCのみ運動前日の夕食時および運動当日の朝食時に1000 mg のビタミンC タブレット（ビタミンC 製剤 ビタミンC 「タケダ」, 武田薬品工業株式会社製）を水とともに経口摂取させた。また、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. 運動プロトコル

運動強度の決定は、汎用性と安全性を考慮して心拍数（heart rate ; HR）を用いた。まず、被検者に10分間の安静臥位をとらせ、胸部双極誘導により安静時心拍数（HR rest）を測定した。その値から、Karvonen and Vuorimaa (1988) の式に準じて、HRR を「 $220 - \text{年齢} - \text{HR rest}$ 」から計算し、各被検者の目標 HR を「 $\text{HRR} \times 0.5 + \text{HR rest}$ 」から決定した。被検者の目標HRの範囲は111 bpm ~ 124 bpm であり、平均値は 116.9 ± 1.7 bpm であった。

運動は、室温 $21.9 \pm 0.3^\circ\text{C}$ 、湿度 $37.0 \pm 0.8\%$ の実験室において、午前8時から11時の間に実施した。被検者は、自転車で3分間の安静状態を保持し、ウォーミングアップとして3分間の無負荷（0 watt）での自転車ペダリング運動を行った。そして、継続して目標 HR に達するまで負荷を漸増させた。運動は HR が目標値に到達した時点から30分間とし、ペダリング頻度は60 rpm を維持するよう指示した。運動中は目標 HR を維持するため、負荷の調節を行った。

運動中の酸素摂取量（oxygen uptake ; $\dot{V}\text{O}_2$ ）、二酸化炭素排出量（ CO_2 production ; $\dot{V}\text{CO}_2$ ）、換気量（ventilation ; $\dot{V}\text{E}$ ）および呼吸交換比率（respiratory exchange ratio ; RER）の測定は、自動呼気ガス分析装置（AE-280S, ミナト医科学社製）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呼吸ごとに移動平均し、さらに10秒毎に単純平均したものを分析に用いた。呼気ガス分析と同時に、胸部双極誘導により HR を連続的に記録し、5秒毎に単純平均したものをデータとした。運動の前後には、衣服を着用せず、体重の測定を行い、体重の減少に相当する水分（ミネラルウォーター）を運動終了から1時間以内に摂取させた。

4. 採尿および採血

採尿はbaseline, 1 h, 3 h, 6 hおよび24 h の5度行った。6 h から24 h までは自由に排泄させた。採血はbaseline, 0 h, 1 h, 3 h, 6 h および24 h の6度行った。採尿では、すべての尿を採取し、尿量を計測した後、2 ml を分析用に分注した。採取した血液は、30分間、 37°C で温浴の後、3500 rpm, 0°C で10分間遠心分離を施し、血清の抽出に供した。分注した尿および血清サンプルは分析時まで -80°C で冷凍保存した。

5. 酸化ストレス指標の測定

1) 尿中 8-OHdG レベル

冷凍し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10分間遠心分離を行った。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 レベルの分析は、ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法による測定キット（8-OHdG Check, 日本老化制御研究所製）を用いて行った。8 × 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サンプルと再構成した第一抗体を50 μl ずつ分注し、恒温槽（ CO_2 water jacketed incubator, Forma Scientific社製）内にて 37°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2抗体を100 μl 加え、再び 37°C で1時間反応させた。3回の洗浄の後、発色剤を100 μl 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、各サンプルの吸光度より尿中 8-OHdG 濃度を定量した。本研究での尿中 8-OHdG レベル（ $\text{ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ）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尿時からの経過時間で除したものをを用いた。

2) 血清 LPO 濃度

血清 LPO濃度の分析は、測定キット（Lipid hydroperoxide assay kit, Cayman chemical 社製）を用いて行った。冷凍した血清を常温で解凍した後、500 μl を試験管に入れ、キット中の試薬（Extract R）で飽和させたメタノールを500 μl 加え、混和させた。1 ml のクロロホルムを加え、完全に混和させた後、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、3000 rpm, 0°C で5分間遠心分離を行った。試験管の壁に沿ってパスツールピペットを入れ、底のクロロホルム層を回収することで、血清抽出サンプルを用意した。各サンプルにおいて、抽出サンプル500 μl とクロロホルム-メタノール溶液450 μl 混和させた試験管を2本ずつ用意し、サンプル自体の色の吸光度に与える影響を除外するため、一方にはトリフェニルホスフィン10 μl

加え, LPO を消去した. そして, すべての試験管にキット中の試薬 FTS Reagent 1 (0.2 M の塩酸に 4.5 mM で硫酸第一鉄を溶解したもの) と FTS Reagent 2 (メタノールに 3 % の濃度でチオシアン酸アンモニウムを溶解したもの) から調整した発色液を 50 μ l 加え, 5 分間室温で反応させた. その後, 反応液をガラス製の 96 ウェルマイクロプレートに分注し, 吸光度をマイクロプレートリーダー (Bio Rad 社製) で測定した. LPO 標準液 (Lipid Hydroperoxide Standard) を用いて, LPO 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からトリフェニルホスフィンを加えたものの吸光度を減じた数値より血清 LPO 濃度 (μ M) を定量した.

6. 抗酸化指標の測定

1) TAC

TAC の分析は, ESR 装置 (JES-REIX, 日本電子株式会社製) を用いて行った. ヒポキサンチン (HX) - キサンチンオキシダーゼ (XOD) 系でスーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) を発生させ, 血清による $O_2^{\cdot-}$ 消去能をスピントラップ法によって測定した. トラップ剤 DEPMPO (5-Diethoxyphosphoryl-5-methy-1-pyrroline-N-oxide) を用いた. Reaction Mixture として, リン酸緩衝液 (カルシウムマイナス) [PBS (-)] に HX, DETAPAC および DEPMPO をそれぞれの最終濃度が 0.5 mM, 5 mM, 10 mM になるように加えた. Reaction Mixture 70 μ l に XOD を 10 μ l 加え, 一方には PBS (-) を 10 μ l 加え (コントロール), 他方には血清を 10 μ l 加えた (サンプル). それをよく混和し, 25°C で 5 分間反応させた後, ガラス管で 10 μ l 吸い上げ, 5 分後にコントロールの ESR スペクトル (C spec) とサンプルの ESR スペクトル (S spec) を測定した. TAC の評価は, C spec から S spec を減じ, その値を C spec で除して 100 を乗じて値 (%) で行った.

2) 血清 SOD 活性

血清 SOD 活性の分析は, NBT (nitroblue tetrazolium chloride) 還元法による測定キット (SOD テストワーク, 和光純薬工業株式会社製) を用いて行った. 検体 (A), 盲検 (B), 検体盲検 (C), 試薬盲検 (D) 用の試験管をそれぞれ用意し, A, C の試験管に常温で解凍した血清を, B, D の試験管に蒸留水を 50 μ l ずつ入れ, 発色試液を 500 μ l ずつ加えた. 37°C で 10 分間反応させた後, A, B の試験管に調製した酵素液を, C, D

の試験管にブランク液を 500 μ l ずつ加え, 37°C で正確に 20 分間反応させた. 各試験管に反応停止液を加え, よく混和した後, 蒸留水を対照として分光光度計 (U-2010 spectrophotometer, 日立社製) により 560 nm で A, B, C および D の各吸光度を測定した. 血清 SOD 活性の評価は, 以下の式を用いて求めた. (吸光度 A - 吸光度 C) を (吸光度 B - 吸光度 D) で除し, 1 から減じて 100 を乗じた値 (%) で行った.

7. 統計処理

測定した値はすべて平均値 $\pm$ 標準誤差で表した. 50 % HRR における運動前と運動後の各測定値の差の検定には, 一元配置の分散分析 (Dunnett の多重比較) を用いた. EX と EX+VC の差の検定には, 繰り返しのある二元配置の分散分析を用い, 有意差が認められた場合には対応のある t 検定を用いて群間の差の検定を行った. なお, いずれの場合も危険率は 5 % 未満とし, 5 ~ 10 % を傾向があると判断した.

結 果

1. 両条件下における呼吸循環器系指標と体重の変化

目標 HR が 116.9 ± 1.7 bpm であったのに対し, 運動中の平均 HR は EX が 116.1 ± 2.2 bpm, EX+VC が 115.8 ± 2.3 bpm であり, EX, EX+VC とも目標 HR にほぼ相当した.

EX と EX+VC における平均 $\dot{V}O_2$, $\dot{V}CO_2$, $\dot{V}E$ および RER について Table 1 に示した. 両運動の測定値には有意な差は認められなかった. 運動前後の体重の変化は, EX で 0.39 ± 0.08 kg, EX+VC で 0.29 ± 0.03 kg であり, ほぼ同様の減少量であった.

2. EX と EX+VC における抗酸化能指標

Table 2 に, 運動前後における TAC および血清 SOD

Table 1 Respiratory data during exercise.

Variables	EX	EX+VC
$\dot{V}O_2(\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	14.6 ± 1.0	14.6 ± 0.8
$\dot{V}CO_2(\text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	14.9 ± 1.1	15.0 ± 0.9
$\dot{V}E(\text{l} \cdot \text{min}^{-1})$	32.2 ± 2.4	31.7 ± 0.8
RER	1.018 ± 0.009	1.024 ± 0.009

Averaged data from the start to the end of moderate aerobic exercise for 30 min are presented in table.

Table 2 Biomarkers of antioxidant capacity before and after exercise.

		baseline	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
TAC (%)	EX	54.6 ± 3.1	51.6 ± 1.7	50.6 ± 1.6	57.1 ± 2.2	56.5 ± 2.7	49.5 ± 1.5
	EX+VC	54.9 ± 3.1	56.9 ± 3.0	55.7 ± 3.4	53.2 ± 2.8	52.6 ± 2.0	48.9 ± 4.1
Serum SOD activity (%)	EX	11.6 ± 0.8	11.8 ± 0.6	11.4 ± 1.0	11.5 ± 1.0	11.9 ± 0.6	11.8 ± 1.0
	EX+VC	11.6 ± 0.5	12.9 ± 0.8	12.1 ± 1.1	11.4 ± 0.7	12.6 ± 0.7	12.0 ± 0.6

No significant difference was found in both biomarkers.

濃度の値を示した。どちらの運動条件においても、baselineと比較して運動後はいずれも有意な変化は認められなかった。そこで、両指標について運動後の値を、baselineを100とした相対値で評価した (Fig. 1)。その結果、TACおよび血清SOD活性ともいずれの測定時においてもEXとEX+VCの間で有意な差は認められなかった。

3. EXとEX+VCにおける酸化ストレス指標

Table 3に、運動前後における尿中8-OHdGレベルと血清LPO濃度の値を示した。どちらの運動条件においても、baselineと比較して運動後はいずれも有意な変化は認められなかった。そこで、両指標について運動後の値を、baselineを100とした相対値で評価した (Fig. 2)。その結果、尿中8-OHdGレベルは3 hでEXが58.8 ± 8.2, EX+VCが92.1 ± 16.5, 6 hでEXが97.3 ± 6.0, EX+VCが140.3 ± 27.2であり、EXに比較してEX+VCで高い傾向 (p < 0.1) が認められた。一方、血清LPO濃度はどの点においてもEXとEX+VCの間に有意な差は認められなかったが、EX+VCではEXに

比較し、常に低い値を示した。

考 察

EXとEX+VCの各指標の相対的变化を比較すると (Fig. 2), 尿中8-OHdGレベルでは3 hおよび6 hで高い傾向 (p < 0.1) が認められ、血清LPO濃度はEXとEX+VCの間に有意な差は認められなかったものの、EX+VCではEXに比べ、常に低い値を示していた。これらの結果は統計的な有意性には届かなかったものの、運動前の一時的なビタミンC経口摂取がDNAと脂質という2つの部位に対して、異なった影響を与える可能性があることを示している。

ビタミンCは動植物に広く分布する低分子の還元性物質であり、フリーラジカルに電子を与えて補足消去できるため、活性酸素補足物質として作用する。1976年にその抗がん作用が提唱されて以来、一般にもよく知られるようになり、疾病における活性酸素種の役割が明らかになるにつれて、ビタミンCの持つ活性酸素種補足作用がより注目されてきた (Bendich et al., 1986; 二木,

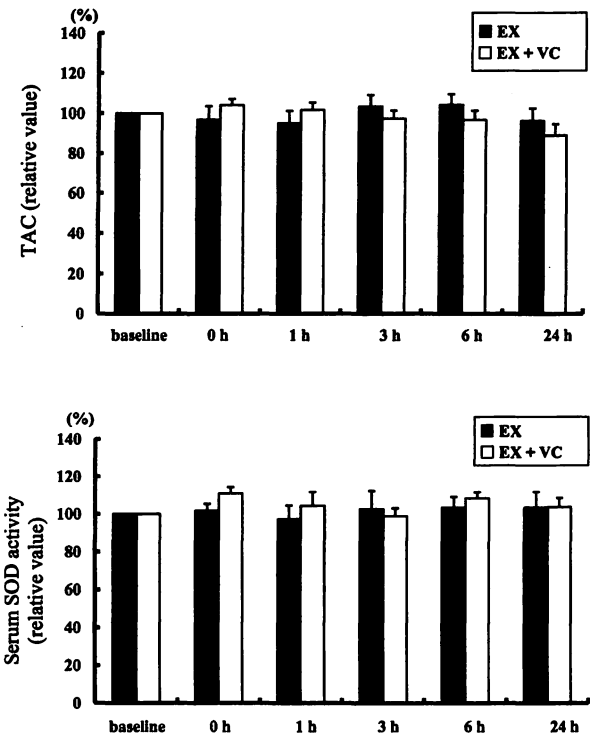


Fig. 1 Comparison of TAC (top) and serum SOD activity (bottom) before and after EX and EX+VC, respectively.

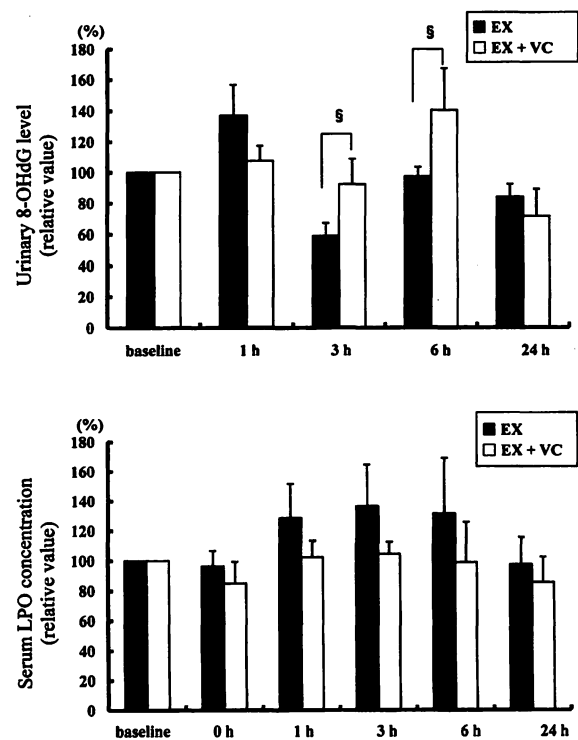


Fig. 2 Comparison of urinary 8-OHdG content (top) and serum LPO concentration (bottom) before and after EX and EX+VC, respectively. § p < 0.1

Table 3 Biomarkers of oxidative stress before and after exercise.

		baseline	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
Urinary 8-OHdG level (ng·kg ⁻¹ ·h ⁻¹)	EX	6.7 ± 0.9	n.m.	9.1 ± 1.6	4.2 ± 0.6	6.5 ± 0.8	5.6 ± 1.0
	EX+VC	8.2 ± 1.5	n.m.	8.6 ± 1.7	7.5 ± 2.3	11.4 ± 3.3	4.7 ± 0.6
Serum LPO concentration (μM)	EX	0.37 ± 0.04	0.36 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.43 ± 0.06	0.43 ± 0.08	0.28 ± 0.02
	EX+VC	0.38 ± 0.07	0.27 ± 0.04	0.29 ± 0.05	0.36 ± 0.07	0.42 ± 0.13	0.36 ± 0.09

No significant difference was found in both biomarkers. n.m.; not measured

1990; 福澤, 1994; 重岡, 1996). 脂質過酸化は何らかの活性酸素種によって不飽和脂肪酸から水素の引き抜きが起こり, 脂質ラジカルが生じることから始まる. この後に溶存酸素が脂質ラジカルとすばやく反応してペルオキシラジカルができ, ペルオキシラジカルは細胞膜中で他の不飽和脂肪酸に出会うと, その水素原子を引き抜き, 自らは脂質過酸化物 (LOOH) となり, ラジカル連鎖反応が進行する. この進行は脂質相内部で起こるため, 水溶性のビタミン C が直接連鎖反応を切断することはできない (Niki et al., 1985). しかしながら, ビタミン C は連鎖切断の中心的役割を担うビタミン E の再生作用を持ち, ビタミン E がラジカルを補足した結果生じるビタミン E ラジカルを素早く再生することにより脂質の酸化抑制に作用する. ビタミン E ラジカルが速やかに再生されないと, 脂質引き抜き反応により酸化が促進される可能性もあるため, ビタミン C の存在が酸化促進作用の進行を未然に防ぐとも言われる (Ingold et al., 1993). EX+VC における血清 LPO 濃度が EX に比較して, いずれの測定時でも低い値だったのは, 本研究におけるビタミン C の摂取が, 速やかなビタミン E の再生に寄与した結果であると考えられる. DNA 損傷の指標である尿中 8-OHdG レベルは EX+VC の 3 h および 6 h に高い傾向を示したが, これは作用した活性酸素種の違いによるものであると考えられる. 脂質は各種の活性酸素種により傷害されるのに対し, DNA は主に傷害性の高いヒドロキシラジカル (hydroxyl radical; $\cdot\text{OH}$) によって酸化修飾される (Cooke et al., 2005). ビタミン C は $\cdot\text{OH}$ とも速く (反応速度定数 $7 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) 反応することが知られるが, $\cdot\text{OH}$ は DNA 等の生体組織と拡散律速に近い速度 ($> 10^8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) で反応するため, $\cdot\text{OH}$ を補足消去するにはその発生部位付近に抗酸化物質が高濃度で存在する必要がある. 有酸素運動中は $\cdot\text{OH}$ が筋細胞内で多く発生したことが考えられるが, 今回のビタミン C 摂取では筋細胞内のビタミン C 濃度を高められなかった可能性が考えられる.

他方, 尿中 8-OHdG レベルに関しては, ビタミン C 自体が酸化ストレスの原因になった可能性もある. 食品中のビタミン C は抗酸化作用と酸化促進作用の 2 面性を持つことが知られている (Kanner et al., 1977). 食品中に遷移金属イオン (鉄イオンなど) が存在するとビタミン C は酸化促進作用を発揮することが明らかとなっている. ビタミン C は強力な還元物質であるため, Fe^{3+} を Fe^{2+} に還元することで $\cdot\text{OH}$ を発生させる (Child et al., 2001). Podmore et al. (1998) は 1 日あたり 500 mg のビタミン C 摂取によって, DNA 酸化損傷の指標の 1 つである酸化型アデニンの量が 2 倍以上増加することを報告しており, その原因としてビタミン C 酸化物のデヒドロアスコルビン酸の影響を示唆している. Cooke et al. (1998) は, ビタミン C の長期的な経口摂取により, 血清および尿中 8-OHdG レベルの有意な増

加が認められたことを報告している. このように生体内でビタミン C 濃度が増加した場合, 酸化剤としての作用も考えられることから, EX+VC で尿中 8-OHdG レベルが増加傾向を示したのかもしれない. しかしながら, 尿中 8-OHdG レベルは細胞内での 8-OHdG の切り出しと排泄のバランスによって決定する指標であることを考慮する必要もある. Cook et al. (1998) は, 自身の研究結果について, その変化がビタミン C による DNA 修復酵素の亢進に起因しているとし, この 8-OHdG レベルの増加は生体にとって正の影響であると報告している. 本研究での EX+VC における尿中 8-OHdG レベルの高まりが, 生体にとって負の影響なのか, 正の影響なのかを明らかにすることはできない. 今後更なる検討が必要であろう.

TAC および血清 SOD 活性は, EX と EX+VC の間に有意な差は認められなかった (Table 2). Ashton et al. (1999) は, 疲労困憊までの最大負荷運動の際に, 運動開始 2 時間前に 1000 mg のビタミン C を摂取させたところ, 血漿ビタミン C 濃度が摂取前後において, およそ $26 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ から $118 \mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$ に有意に増加したことを報告している. しかしながら, 本研究では EX と比較して, EX+VC において TAC の高まりは認められなかった. ESR によって測定された TAC は, 実験的に発生させた $\text{O}_2^{\cdot-}$ を消去することで血清中の総合的な抗酸化能力を評価している. ヒト血清中には, SOD やグルタチオンペルオキシターゼなどの抗酸化酵素とともに, 種々の低分子抗酸化物質が存在し, 酸素傷害に対する防御機構を形成している. 例えば, 水溶性抗酸化物質としてビタミン C 以外に, 尿酸, ビリルビン, 脂溶性抗酸化物質としてビタミン E, ユビキノール, カロテノイド類などがあり, これら抗酸化物質が協力して発生した活性酸素種を捕捉消去する. その中で, ビタミン C が抗酸化作用を果たす割合は 0~24% であると報告されている (Wayner et al., 1987) ことから, ビタミン C が血清全体の抗酸化作用に占める割合は比較的低く, その結果, TAC には変化が認められなかった可能性が考えられる.

以上のことから, 中高年者における運動前の一時的なビタミン C の経口摂取は, 酸化還元状態に影響を与えないものの, 酸化ストレスについては対象とする指標で結果が異なる可能性が示唆された.

総 括

本研究は, 健常な非喫煙中高年男性 8 名を被検者に, 心拍予備力の 50% に相当する中強度有酸素運動を 30 分間実施させた. そして, 運動前にビタミン C を一時的に経口摂取 (1000 mg $\times$ 2 回) する場合 (EX+VC) としない場合 (EX) の 2 条件を設定し, それが運動後の酸化還元状態に与える影響について検討した. 結果は以下の通りである.

1. EX と EX+VC の相対変化を比較すると、運動後、尿中 8-OHdG レベル は 3 h および 6 h で EX に比べ、EX+VC に高い傾向 ($p < 0.1$) が認められ、血清 LPO 濃度は EX と EX+VC の間に有意な差は認められなかったものの、EX+VC では EX に比べ、常に低い値を示した。

2. EX と EX+VC の相対変化を比較すると、TAC および血清 SOD 活性は有意な差は認められなかった。

以上のことから、中高年者において、運動前の一時的なビタミンCの経口摂取は酸化還元状態に影響を与えないものの、酸化ストレスについては対象とする指標で結果が異なる可能性が示唆された。

参考文献

- Ashton, T., Young, I.S., Peters, J.R., Jones, E., Jackson, S.K., Davies, B. and Rowlands, C.C. (1999) Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J. Appl. Physiol.*, 87 : 2032–2036.
- Bendich, A., Machlin, L.J. and Scandurra, O. (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Advance in Free Radical Biology & Medicine* 2 : 419–444.
- Childs, A., Jacobs, C., Kaminski, T., Halliwell, B. and Leeuwenburgh, C. (2001) Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic. Biol. Med.*, 15 : 745–753.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Podmore, I.D., Herbert, K.E., Mistry, N., Hickenbotham, P.T., Hussieni, A., Griffiths, H.R. and Lunec, J. (1998) Novel repair action of vitamin C upon in vivo oxidative DNA damage. *FEBS Lett.*, 20 : 363–367.
- Cooke, M.S., Evans, M.D., Dove, R., Rozalski, R., Gackowski, D., Siomek, A., Lunec, J. and Olinski, R. (2005) DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat. Res.*, 574 : 58–66.
- 福澤健治 (1994) リボソーム膜における α -トコフェロールの脂質過酸化抑制ならびにアスコルビン酸による再生ダイナミクス. *ビタミン*, 68 : 263–274.
- Goldfarb, A.H., Patrick, S.W., Bryer, S. and You, T. (2005) Vitamin C supplementation affects oxidative-stress blood markers in response to a 30-minute run at 75% VO_{2max} . *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.*, 15 : 279–290.
- Higashi, Y., Sasaki, S., Nakagawa, K., Kimura, M., Noma, K., Hara, K., Jitsuiki, D., Goto, C., Oshima, T., Chayama, K. and Yoshizumi, M. (2006) Tetrahydrobiopterin improves aging-related impairment of endothelium-dependent vasodilation through increase in nitric oxide production. *Atherosclerosis*, 186 : 390–395.
- Ingold, K.U., Bowry, V.W., Stocker, R. and Walling, C. (1993) Autoxidation of lipids and antioxidation by alpha-tocopherol and ubiquinol in homogeneous solution and in aqueous dispersions of lipids: Unrecognized consequences of lipid particle size as exemplified by oxidation of human low-density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90 : 45–49.
- Ji, L.L. and Hollander, J. (2000) Antioxidant defense: Effects of aging and exercise. In Radak Z, Free radical in exercise and aging, 1st Ed Chap 2, Human Kinetics, Champaign : 35–72.
- Kanner, J., Mendel, H. and Budowski, P. (1977) Prooxidant and antioxidant effect of ascorbic acid and metal salts in beta-carotene linoleate system. *J. Food Sci.*, 42 : 60–64.
- Karvonen, J. and Vuorimaa, T. (1988) Heart rate and exercise intensity during sports activities. Practical application. *Sports Med.*, 5 : 303–311.
- Kohri, S., Fujii, H., Oowada, S., Endoh, N., Sueishi, Y., Kusakabe, M., Shimmei, M., Kotake, Y. (2009) An oxygen radical absorbance Capacity-like assay that directly quantifies the antioxidant's scavenging capacity against AAPH-derived free radicals. *Analytical Biochemistry*, 386 : 167–171.
- Maxwell, S.R., Jakeman, P., Thomason, H., Leguen, C. and Thorpe, G.H. (1993) Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radic. Res. Commun.*, 19 : 191–202.
- 二木鋭雄 (1990) アスコルビン酸, グルタチオン, 活性酸素, 生物での生成・消去・作用の分子機構 (中野稔, 浅田浩二, 大柳善彦編), 共立出版: 東京, pp321–326.
- Niki, E., Kawakami, A. and Yamamoto, Y. (1985) Oxidation of lipids VIII. Synergistic inhibition of oxidation of phosphatidylcholine liposomes in aqueous dispersion by vitamin E and vitamin C. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 58 : 1971–1975.
- Olinescu, R., Talaban, D., Nita, S. and Mihaescu, G. (1995) Comparative study of the presence of oxidative stress in sportsmen in competition and aged people, as well as the preventive effect of selenium administration. *Rom. J. Int.*

Med., 33 : 47-54.

Pansarasa, O., Bertorelli, L., Vecchiet, J., Felzani, G. and Marzatico, F. (1999) Age-dependent changes of antioxidant activities and markers of free radical damage in human skeletal muscle. *Free Radic. Boil. Med.*, 27 : 617-622.

Podmore, I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P. and Lunec, J. (1998) Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 392 : 559

重岡 成 (1996) 食物とアスコルビン酸. 活性酸素と医食同源 (井上正康編), 共立出版: 東京, pp172-178.

Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Barclay, L.R. and Locke, S.J. (1987) The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate, and proteins to the total peroxyl radical-trapping antioxidant activity of human plasma. *Biochim. Biophys. Acta*, 924 : 408-419.

Wilson, R., Mansour, M.R., Stewart, A.D., Nimmo, I.A., Shepherd, M.J. and Riemersma, R.A. (2001) Lipid peroxidation in vivo is increased by exercise on a bicycle ergometer in athletes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 103 : 350-354.

(平成22年 3 月31日受付)
(平成22年 7 月12日受理)