

ヨモギ遠赤外焙煎抽出物の投与が運動負荷時の 脂質過酸化に及ぼす影響について

日本医科大学 三上俊夫

Effect of *Artemisia* Extract on Lipid Peroxidation during Exhaustive Exercise

by

Toshio Mikami

Department of Physical Education, Nippon Medical School

ABSTRACT

The *Artemisia* extract in pulverized form used in this study was prepared and supplied by boiling *Artemisia* leaves, which were roasted with far-infrared rays, and by evaporating the supernatant under a reduced pressure. The *Artemisia* extract is known to possess some antioxidants such as caffeoyl tannins. To investigate the temporary effects of *Artemisia* extract on in vivo lipid peroxidation induced by an exhaustive exercise, the *Artemisia* extract was administered to animals (mice) and female humans.

Female Balb/c mice were orally given *Artemisia* extract, vitamin C or water 1 h before and just before, and immediately after an exercise. The exercise was performed to exhaustion on a rodent treadmill. One hour after the end of exercise, the mice were killed by bleeding via the abdominal aorta, and the tissues (liver, kidney and gastrocnemius) were quickly dissected and frozen by liquid nitrogen. The amounts of TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) in the plasma and the homogenate of liver, kidney or gastrocnemius showed no significant difference among the *Artemisia* group, the vitamin C group and the water group.

The healthy women (mean age : 22 years) were given the *Artemisia*

extract or water just before and immediately after an exercise. They were subjected to an incremental exercise to exhaustion on a bicycle ergometer. The amount of post-exercise urinary TBARS excretion was higher than the control when the *Artemisia* extract was administered.

These results suggest that the temporary administration of the *Artemisia* extract before and after an exhaustive exercise improves urinary excretion of peroxidative substances rather than suppresses lipid peroxidation.

要 旨

ヨモギには抗酸化作用を有する物質がいくつか含まれている。そこで、遠赤外焙煎したヨモギ乾燥葉を熱水抽出し、その遠心上清を減圧濃縮して粉末化したヨモギ抽出物の、運動時の過酸化脂質の生成に対する抑制効果の有無を検討した。

実験1として、10週齢の雌の Balb/c マウスに、運動負荷の1時間前と運動直前および運動直後の計3回、蒸留水に溶解したヨモギ抽出物またはビタミンCを胃内投与しながら、疲労困憊に至る走運動をトレッドミルで負荷し、運動終了1時間後の血漿、肝臓、腎臓、腓腹筋の過酸化脂質を水のみ投与群と比較検討した。この結果、血漿および各組織のTBA反応物質(TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances)の量は、ヨモギ抽出物投与群、ビタミンC投与群、水投与群で有意な差は認められなかった。

実験2として、健康な女子学生に対し、運動前および運動直後にヨモギ抽出物を投与しながら、疲労困憊に至る自転車こぎ運動を負荷した際の尿中TBARS排泄量を調べた。この結果、ヨモギ抽出物投与は水投与時に比較して運動後の尿中TBARSの排泄を有意に増加させた。

以上の結果より、遠赤外焙煎ヨモギ抽出物の一過性投与は、激しい運動時の過酸化脂質の生成に対する抑制効果はほとんど認められなかったが、腎での過酸化脂質の排泄低下を改善する可能性が

示唆された。

緒 言

昨今は運動のもたらす良い影響のみならず、運動による弊害についての関心が高まっており、この点で「運動と活性酸素」の問題はとくに注目されている。すなわち、激運動時には活性酸素の生成が増加し、それにより脂質過酸化反応が亢進して、運動による種々の組織障害の誘因となることが考えられてきている。Daviesら¹⁾は、Electron spin resonance (ESR) を用いてラットの肝臓と筋肉で運動時の活性酸素の発生を報告している。Dillardら²⁾は、50% $\dot{V}_{O_{2max}}$ 強度での1時間の運動により、過酸化脂質生成の指標とされるペントンの呼気への排出が増加したことを報告している。

このような運動時の脂質過酸化反応に対して、天然抗酸化物質の作用が報告されている。とくに脂溶性ビタミンの一つであるビタミンE投与については、運動時の脂質過酸化に対する抑制効果がいくつか報告されている^{3~6)}が、水溶性の天然抗酸化物質については報告されていない。

本研究では天然抗酸化物質の一つとして日本で古くから和漢薬として親しまれ、消臭、抗菌、鎮痛、止血、強壯、抗炎症、抗酸化などの面でその生理活性が利用されているヨモギに着目し、このヨモギの遠赤外焙煎抽出物を取り上げた。ヨモギには抗酸化作用を有する物質がいくつか含まれていることが報告されてる^{7~9)}。また、ヨモギ遠赤

外焙煎抽出物質は水溶性で溶解度が高いことから、ビタミンCと同様に一回での多量投与が可能であり、また天然物質であることから多量投与の弊害が少ないことが予測され、運動負荷時のような一過性の活性酸素の生成亢進が起こる前に投与することにより、身体の抗酸化能を高めておくことが期待できる物質である。

そこで今回は、このヨモギの遠赤外焙煎抽出物の投与が、運動時に増加する脂質過酸化反応を抑制する効果について、水溶性の抗酸化物質として知られているビタミンCと比較しながら検討した。

1. 方法

1.1 ヨモギ遠赤外焙煎抽出物

本実験に用いるヨモギ遠赤外焙煎抽出物（以下はヨモギ抽出物と略）は協同乳業株式会社より販売されている Mei- α を用いた。このヨモギ抽出物は、遠赤外焙煎したヨモギ乾燥葉を熱水抽出し、その遠心上清を減圧濃縮して粉末化したものである。

1.2 実験1

実験動物は10週齢の雌の Balb/c マウス15匹とし、これをヨモギ抽出物投与群、ビタミンC投与群、水投与群の3群に分けた。各群とも運動負荷実験の1時間前、運動負荷の直前、運動直後の計3回、蒸留水に溶解した試料または蒸留水を経口投与用ゾンデにて胃内投与した。1回当たりの試料の投与量は Kimura ら⁹⁾ の報告にしたがって1g/kg 体重とし、一匹当たり合計3g/kg 体重で投与した。投与試料の濃度はヨモギ抽出物、ビタミンCともに200mg/ml とした。

運動負荷は、小動物用トレッドミルでの速度漸増法による走運動とした。トレッドミル速度10m/min で3分間のウォーミングアップの後、開始速度を15m/min とし、以後3分ごとに3m/min ずつ増加させ疲労困憊に至るまで走らせた。運動終了1時間後に腹部大動脈よりしゃ血して屠

殺し、肝臓、腎臓、腓腹筋を採取した。血液は遠心分離して血漿を採取した。血漿および組織試料は採取後、ただちに液体窒素にて凍結し、測定まで-80℃にて凍結保存した。

1.3 実験2

被験者は20~23歳の健康な成人女子9名（平均身長155.0±6.3cm, 平均体重51.8±4.6kg）である。被験者には軽い朝食を採らせて午前10時に実験室に集合させた。完全排尿の後、加温した蒸留水200ml に溶かしたヨモギ抽出物400mg を投与した。この投与量は Maxwell ら¹⁰⁾ がヒトにビタミンCを投与して報告の投与量に準じた。その後1時間の座位安静を保持した後、自転車エルゴメータによる運動負荷を実施した。運動負荷は0.5kp で2分間のウォーミングアップ後、開始負荷強度1.0kp とし、その後2分ごとに0.25kp ずつ負荷を増加させ疲労困憊に至るまで運動を行わせた。運動終了直後に再び運動前と同量のヨモギ抽出物を投与し、その後は座位安静を保ち、運動終了1および2時間後に採尿を行った。数日の間隔をおき、同様の実験プロトコールでヨモギ抽出物の代わりに蒸留水のみを投与する実験も行った。

1.4 組織および尿中過酸化脂質の測定

生体試料の過酸化脂質の測定法は数多く報告されているが、その中で最も広く実施されている方法は、過酸化脂質を酸性条件下でチオバルビツール酸(TBA)と加熱して生じる赤色色素、すなわちTBA反応物質(TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances)を定量する方法である。TBARSの測定は Kikugawa らの方法¹⁰⁾ と Draper らの方法¹¹⁾ を改良して以下に示すごとく行った。

組織は湿重量を測定した後、1.15% KCl を加え、テフロンホモジナイザーを用いて30% (w/v) ホモジネートを作成した。その後、ホモジネート0.05ml をネジふた付き試験管内に移し、8.1% ドデシル硫酸ナトリウム水溶液0.1ml, 20% 酢酸緩

衝液 (pH 3.0) 0.75 ml, 0.8%ジブチルヒドロキシトルエン酢酸溶液 0.025 ml, 0.8%チオバルビツール酸水溶液 0.75 ml, 蒸留水 0.35 ml を加えて混和し 5℃で60分間放置した後, 沸騰水浴中で60分間加熱した. 冷却後, 反応液 1.0 ml をメタノールと蒸留水にて前処理した固相抽出カラム (Alltech 社製エクストラクリーン C18) に注入した. 固相抽出カラムを蒸留水で洗った後, カラムに結合した試料を 3.0 ml のメタノールで溶出した. 溶出液を 40℃で加温しながら窒素ガスで溶媒を留去した後, 蒸留水 1.0 ml を加えて反応物を溶解し, この溶液 50 μ l を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に注入した. 尿サンプルは Kosugi らの方法¹⁰⁾ に従い, 2 倍希釈した尿 0.25 ml を 0.5%ジブチルヒドロキシトルエン酢酸溶液 0.025 ml, 0.5%チオバルビツール酸水溶液 0.75 ml, 蒸留水 0.25 ml と混和し 5℃で60分間放置した後, 沸騰水浴中で20分間加熱した. その後は組織サンプルの測定と同様に行った.

用いた HPLC のシステムは, HLD-803 D ポンプ (トソー社製), UVIDEC-100-III 紫外可視検出器 (日本分光社製), YMC A-303 ODS カラム (山村化学研究所) を用いた. また, HPLC へのサンプルの注入は 717 オートサンプラー (ウォーターズ社製) にて行った.

1.5 尿中クレアチニンの測定

尿中クレアチニンの測定はクレアチニン測定キット, クレアチニンテストワコー (和光純薬社製) により行った.

1.6 乳酸の測定

血中乳酸値の測定は乳酸測定キット (ベーリンガーマンハイム社製) により行った.

1.7 統計処理

本研究では, 得られたデータを平均 \pm 標準誤差として表示した. 平均値の差の検定には, 実験 1 の結果に対しては Student's unpaired t-test, 実験 2 の結果に対しては Student's paired t-test

を用いた. いずれの場合も $P < 0.05$ を有意水準とした.

2. 結果

2.1 実験 1

トレッドミル走の運動継続時間は, 水投与群 8.7 \pm 0.2 分, ビタミン C 投与群 9.8 \pm 0.1 分, ヨモギ抽出物投与群 10.3 \pm 0.5 分と 3 群間に有意な差は認められなかった. また, 運動終了時の血中乳酸値も, 水投与群 10.0 \pm 0.7 mM, ビタミン C 投与群 9.5 \pm 1.1 mM, ヨモギ抽出物投与群 9.6 \pm 0.9 mM と, 3 群間に有意な差は認められなかった.

運動終了 1 時間後の血漿 TBARS は, 水投与群 10.5 \pm 0.5 mmol/l, ビタミン C 投与群 12.3 \pm 0.7 mmol/l, ヨモギ抽出物投与群 10.0 \pm 0.3 mmol/l と 3 群間に有意な差は認められなかった. また, 図 1 に示すように肝臓, 腎臓, 腓腹筋中の TBARS にも 3 群間に有意な差は認められなかった.

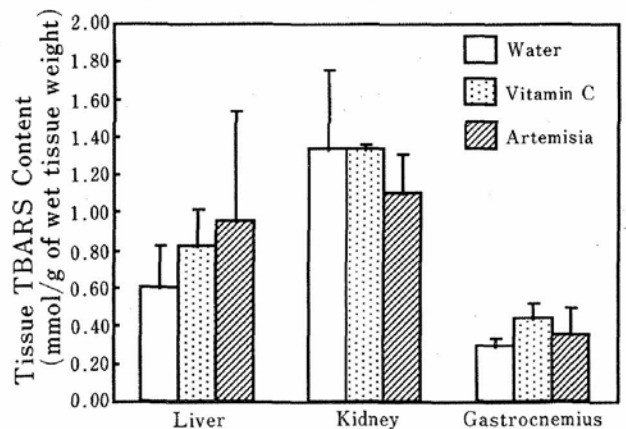


図 1 Effects of exhaustive exercise on tissue TBARS content

2.2 実験 2

水投与時とヨモギ抽出物投与時の自転車運動の運動継続時間は, おおの 16.9 \pm 1.3 分と 16.1 \pm 1.7 分で, 両実験条件間に有意な差は認められなかった. また, 運動 2 時間後の尿中クレアチニン排泄量も, 水投与時 0.81 \pm 0.08 mg/min, ヨモギ

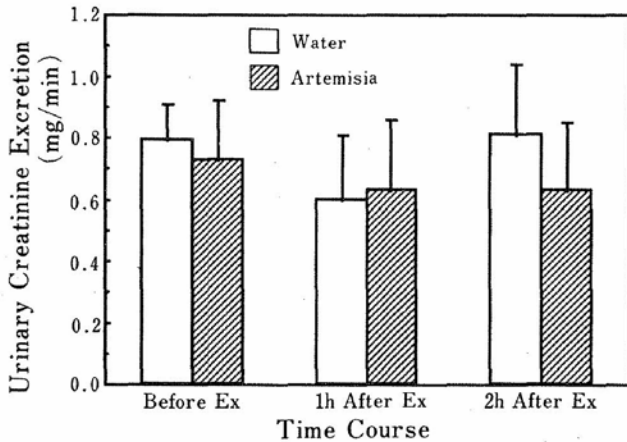
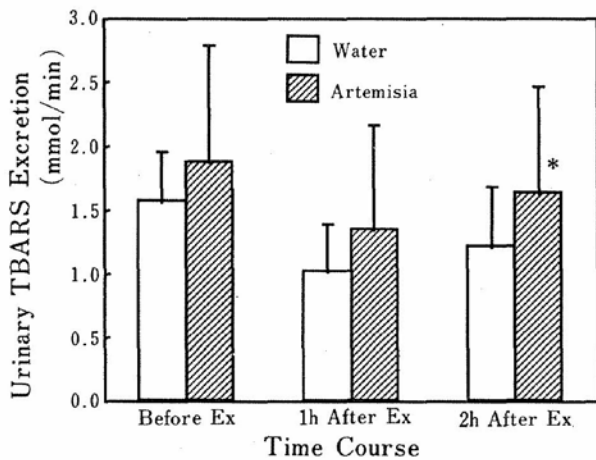


図2 Effects of exhaustive exercise on urinary creatinine excretion

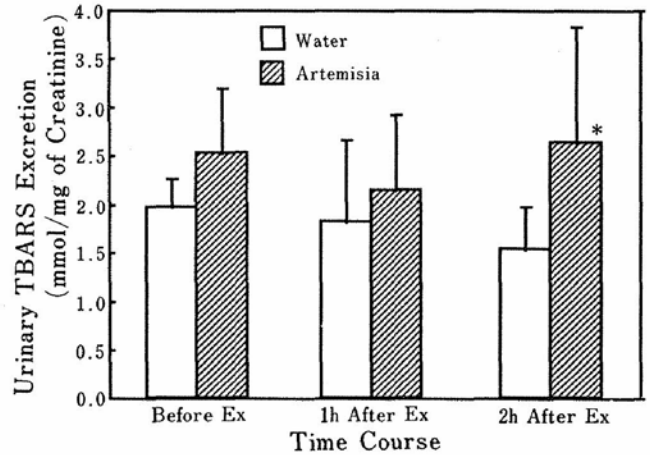


*Significantly different from the water group *P<0.05

図3 Effects of exhaustive exercise on urinary TBARS excretion

抽出物投与時 0.63 ± 0.08 mg/min と両実験条件間に有意な差は認められなかった (図2)。一方、運動2時間後の尿中 TBARS 排泄量は、水投与時 1.22 ± 0.15 mmol/min、ヨモギ抽出物投与時 1.63 ± 0.28 mmol/min と、ヨモギ抽出物投与時は水投与時に比べ有意な高値を示した (P<0.05) (図3)。

また、尿中排泄物の量は腎臓の糸球体ろ過量により影響を受けるため、尿中排泄量を糸球体ろ過量を表す尿中クレアチニン排泄量で補正した尿中 TBARS 排泄量を計算したところ、運動2時間後で水投与時 1.53 ± 0.16 mmol/min、ヨモギ抽出



*Significantly different from the water group *P<0.05

図4 Effects of exhaustive exercise on urinary excretion of TBARS per creatinine

物投与時 2.65 ± 0.40 mmol/min と、この場合もヨモギ抽出物投与時の方が水投与時に比べ有意な高値を示した (P<0.05) (図4)。

3. 考 察

女子学生に対し、疲労困憊に至る自転車こぎ運動を负荷した実験2において、運動前および運動直後のヨモギ抽出物の投与は、運動後の尿中 TBARS の排泄を有意に増加させた。

これまで、運動時の過酸化脂質生成に対する天然抗酸化物質の抑制効果については、脂溶性のビタミンEを中心に研究されてきた。ビタミンEは細胞膜を構成するリン脂質中に存在し、膜の高度不飽和脂肪酸が酸化を受けるのを防止している¹³⁾。これに対し、水溶性のビタミンCは細胞質に局在し、抗酸化作用の結果ビタミンEラジカルに変化したビタミンEを還元してビタミンEの再生に働くと考えられている¹⁴⁾。Sumidaら³⁾は、ヒトに1日300mgのビタミンEを1ヵ月間経口投与した場合、疲労困憊に至る運動後の血清過酸化脂質の上昇が抑制されることを報告している。Reddyら⁴⁾も、疲労困憊に至る水泳運動を负荷したときの肺の過酸化脂質の生成は、ビタミンE

を3倍ほど多く含む試料で飼育したラットで抑制されたことを報告している。

一方、水溶性のビタミンCについては、運動時の脂質過酸化に及ぼす単独投与の影響については報告がないが、ビタミンE、 β -カロチンとの混合投与が、運動負荷時の過酸化脂質生成に対して抑制効果があることが報告されている^{5, 6)}。しかし、これらの報告はすべて抗酸化物の長期間投与による効果を検討したもので、本実験のような一過性投与の効果を検討した報告はない。

ヨモギには *caffe tannin* と称される抗酸化作用を有するいくつかの物質が含まれている⁷⁾。本研究で用いた、ヨモギ遠赤外焙煎抽出物中にも抗酸化作用を有するいくつかの物質が含まれている。これらの中でとくに抗酸化作用として重要な物質は *coniferyl alcohol* であることが *in vitro* で認められている¹⁵⁾。また、ヨモギ抽出物を3週間投与したラットは、トレッドミルによる運動負荷時の血清過酸化脂質と血中乳酸の増加が抑制されることが報告されている¹⁶⁾。しかし、本研究のマウスを用いた運動負荷実験では、肝臓、腎臓、腓腹筋中の TBARS 量は、ヨモギ抽出物投与群とビタミンC投与群はともに水投与群と有意な差を示さなかった。これは、本実験で用いたマウスのビタミンEの栄養状態が良好であったため、さらに補充投与された抗酸化物質の効果が明確になりにくかったためと考えられる。また、胃内投与したビタミンCとヨモギ抽出物の吸収率についても不明であり、投与した全量がそのまま生体内で効果を発揮したかについては疑問が残る結果となった。

実験2の運動後の尿中 TBARS 排泄量は、水投与時では運動前値より低下したが、ヨモギ投与時では運動後の低下がみられず、両実験条件間で有意な差が認められた。これまでに尿中 TBARS 排泄量は、食事性の過酸化脂質を規制した条件下では、生体内での脂質過酸化の変化を示す良い指

標であることが報告されている^{17~20)}が、本実験のような激しい運動負荷が過酸化脂質の尿中排泄に与える影響については知られていない。一般に、激しい運動時には身体の血流が骨格筋に集中して、血流量が著しく低下し²¹⁾、クレアチニン、尿酸、尿素窒素などの尿中排泄量が著しく低下する。このことから、今回ヨモギ抽出物投与時で水投与時より運動後の尿中 TBARS 排泄が有意に高値であったことは、単にヨモギ抽出物投与時に、水投与時より過酸化脂質の生成量が高かったとも考えられるが、ヨモギ抽出物が運動後の腎機能の低下に対し抑制効果を与えた結果であるとも考えられる。しかし、マウスを用いた実験1において、腎臓の TBARS 量にはヨモギ抽出物投与群と水投与群で有意な差が認められなかったことから、ヨモギ抽出物の腎機能に与える効果についてはなお検討の必要がある。

4. 結 果

遠赤外焙煎したヨモギ乾燥葉より抽出したヨモギ抽出物の一過性投与が、運動時の過酸化脂質の生成に対して抑制効果を持つか否かについて、マウスおよびヒトにおける *in vivo* の実験で検討し以下の結果を得た。

1) マウスに対する運動前および運動後のヨモギ抽出物、あるいはビタミンCの一過性投与は疲労困憊に至る運動による血漿、肝臓、腎臓、腓腹筋の TBARS の増加に対して抑制効果は示さなかった。

2) 健康な女子学生に対し、運動前および運動直後にヨモギ抽出物を投与しながら、疲労困憊に至る自転車こぎ運動を負荷した場合、ヨモギ抽出物投与は水投与時に比較して運動後の尿中 TBARS の排泄を有意に増加させた ($P < 0.05$)。

以上の結果より、遠赤外焙煎ヨモギ抽出物の一過性投与は、激しい運動時の過酸化脂質の生成に対して抑制効果はほとんど認められなかったが、

腎での過酸化脂質の排泄低下の改善を示唆する結果が得られた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、研究の助成をいただいた財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝いたします。また、本実験に用いたヨモギ遠赤外焙煎抽出物を提供して下さった協同乳業株式会社研究所素材開発室の大石一二三氏、田濱弘継氏に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Davies, K. J. A., Quintanilha, A. T., Brooks, G. A., Packer, L. ; Free radicals and tissue damage produced by exercise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 1198-1205 (1982)
- 2) Dillard, C. J., Litov, R. E., Savin, W. M., Dumelin, E. E., Tappel, A. L. ; Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation, *J. Appl. Physiol.*, **45**, 927-932 (1978)
- 3) Sumida, S., Tanaka, K., Kitao, H., Nakadomo, F. ; Exercise-induced lipid peroxidation and leakage of enzymes before and after vitamin E supplementation, *Int. J. Biochem.*, **21**, 835-838 (1989)
- 4) Reddy, K. V., et al. ; Exercise-induced oxidant stress in the lung tissue role of dietary supplementation of vitamin E and selenium, *Biochem. Int.*, **26**, 863-871 (1992)
- 5) Kanter, M. M., Nolte, L. A., Holloszy, J. O., ; Effects of an antioxidant vitamin mixture on lipid peroxidation at rest and postexercise, *J. Appl. Physiol.*, **74**, 965-969 (1993)
- 6) Meydani, M., Evans, W. J., Handelman, G., Biddle, L., Fielding, R. A., Meydani, S. N., Burrill, J., Fiatarone, M. A., Blumberg, J. B., Cannon, J. G. ; Protective effect of vitamin E on exercise-induced oxidative damage in young and older adults, *Am. J. Physiol.*, **264**, R992-R998 (1993)
- 7) 木村善行, 有地 滋 ; タンニンの効用, *ファルマシア*, **22**, 1120-1123 (1986)
- 8) 藤田勇三郎, 上原郁恵, 森本泰子, 中嶋真由美, 波多野力, 奥田拓男 ; タンニンおよびフラボノイドによる自動酸化抑制機構 (第2報) ヨモギ類のカフェータンニン類によるリポキシゲナーゼ依存脂質過酸化抑制機構, *薬学雑誌*, **108**, 129-135 (1988)
- 9) Kimura, Y., Okuda, H., Okuda, T., Hatano, T., Agata, I., Arichi, S. ; Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII, Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 2028-2034 (1985)
- 10) Maxwell, S. R. J., Jakeman, P., Thomason, H., Leguen, C., Thorpe, G. H. G. ; Changes in plasma antioxidants status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation, *Free Rad. Res. Comms.* **19**, 191-202 (1993)
- 11) Kikugawa, K., Kojima, T., Yamaki, S., Kosugi, H. ; Interpretation of the thiobarbituric acid reactivity of rat liver and brain homogenates in the presence of ferric ion and ethylenediamine tetraacetic acid, *Anal. Biochem.*, **202**, 249-255 (1992)
- 12) Draper, H. H., Polensek, L., Hadley, M., McGirr, L. G. ; Urinary malondialdehyde as an indicator of lipid peroxidation in the diet and in the tissues, *Lipids*, **19**, 836-843 (1984)
- 13) Kosugi, H., Kojima, T., Kikugawa, K. ; Characteristics of the thiobarbituric acid reactivity of human urine as a possible consequence of lipid peroxidation, *Lipids*, **28**, 337-343 (1993)
- 14) Tappel, A. L. ; Vitamin E as the biological lipid antioxidant, *Vitam. Horm.*, **20**, 493-510 (1962)
- 15) Packer, J. E., Slater, T. F., Willson, R. L. ; Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature*, **278**, 737-738 (1979)
- 16) 田濱弘継, 大石一二三, 宮川豊美, 川村一男 ; ヨモギ葉中の抗酸化物質, および遠赤外焙煎処理効果, *日本農芸化学会講演要旨集*, 220 (1995)

- 17) 田濱弘継, 大石一二三, 宮川豊美, 川村一男; ヨモギ抽出物の運動能力に与える影響, および遠赤外焙煎処理効果, 日本栄養食糧学会講演要旨集, 20 (1995)
- 18) Dhanakoti, S. N., Draper, H. H. ; Response of urinary malondialdehyde to factors that stimulate lipid peroxidation in vivo, *Lipids*, 22, 643-646 (1987)
- 19) Piche, L. A. Draper, H. H., Cole P. D. ; Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty acids, *Lipids*, 23, 370-371 (1988)
- 20) Seto, H., Suzuki T., Ohkubo T., Kanoh, T. ; Increased urinary excretion of 2-thiobarbituric acid reactants in rats exposed to diesel engine exhaust. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 45, 582-589 (1990)
- 21) Draper, H. H., Hadley, M. ; A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde, *Xenobiotica.*, 20, 901-907 (1990)
- 22) 鈴木政登, 塩田正俊, 中島孝之; 運動の腎臓機能に及ぼす影響, デサントスポーツ科学, 1, 29-37 (1984)