

運動時に増加する活性酸素を消去する ビタミンCとEの相互作用に関する研究

奈良女子大学 小城 勝相

Interaction between Vitamins C and E, Scavengers of Activated Oxygens which Increase during Exercise

by

Shosuke Kojo

Department of Food Science and Nutrition, Nara Women's University

ABSTRACT

To investigate *in vivo* interactions between antioxidant vitamins C and E, sparing effects of vitamin C on vitamin E as well as of vitamin E on vitamin C was evaluated using inherently scorbutic [Osteogenic Disorder Shionogi (ODS)] rats, which were divided into 4 groups (the control, vitamin E-deficient, vitamin C-deficient and simultaneously vitamins C and E-deficient). The levels of vitamins C and E in tissues were determined on 0, 14 and 21 day (d) of deficiency. On d 14, the vitamin E concentrations in plasma, liver, brain and lung of the vitamin C-deficient group were significantly lower than that of the control, supporting the literature concerning the sparing of vitamin E by ascorbate. The vitamin E concentration of the vitamin C-deficient group was also significantly lower in plasma, heart, liver, lung and kidney than that of the control on d 21. Based on 2-way ANOVA, significant interactions between vitamins C and E were observed on d 21 concerning vitamin E concentration in plasma, heart, lung, liver and kidney. The ascorbate levels in plasma, heart, liver, muscle and kidney of the vitamin E-deficient group were significantly lower than the corresponding control on d 21. Based on 2-way ANOVA, significant interactions between vitamins C and E were observed on d 21 concerning vitamin C concentration in plasma, heart, liver, kidney and muscle. These

results suggested a sparing effect of vitamin E on vitamin C and this effect was observed for the first time in the present study. The extent of the interaction depended on the nature of the tissue. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma and liver of the vitamin C-deficient rats were significantly higher than those of the control and the vitamin E-deficient groups on d 21. This result supported a view that the deficiency of vitamin C was more serious in raising oxidative stress than that of vitamin E. TBARS of the liver in the simultaneously vitamins C and E-deficient rats were significantly higher than those in all other groups, suggesting an additive effect of the deficiencies of vitamins C and E on TBARS.

要 旨

運動時に増加する活性酸素を消去する2つのビタミンC, Eの相互作用を, 我々が開発したビタミンCの正確な定量法を用いて動物実験で初めて明確にした. 人間と同様, ビタミンCを合成できないODSラットを4つのグループ(対照群, ビタミンC欠乏群, ビタミンE欠乏群, ビタミンC, E同時欠乏群)に分けた. これら4つの群の各臓器のビタミンC, E量の変化を正確に測定すると, 両ビタミンの間には相互作用が存在し, どちらのビタミンが欠乏しても他のビタミンの欠乏を引き起こすことが判明した. とくに試験管内の研究で提唱されていたビタミンCによるビタミンEの再生反応と共に, 試験管内の研究では存在しない逆の相互作用, すなわち, ビタミンEによるビタミンCの節約効果が動物実験によって初めて明らかにすることができた. 本研究により, 運動選手は筋肉をはじめとする臓器を活性酸素の障害から守るため, 両ビタミンの補給に注意すべきであることが明らかになった. 酸化障害のパラメーターであるチオバルビツール酸反応性物質(TBARS)についても両ビタミン間に相互作用が存在することが明らかになった.

緒 言

最近健康が国民の関心事となり, スポーツブームであるが, 単にスポーツをすれば健康にな

るのかという問題は古くから大きなテーマである. 最近では老化, 癌化, 動脈硬化などの病因として, 活性酸素によるラジカル反応が世界的に注目を集めている¹⁾. 動物種の寿命が単位体重当たりの酸素消費量に逆比例する²⁾ことが知られているが, このことは活性酸素の毒性を明確に示している. 一般に人間にはスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)をはじめ, 抗酸化系が存在することはよく知られている. しかし, スポーツによって酸素消費量が増加すると, それに伴って活性酸素も増加して臓器に障害を与える, つまりスポーツすることによってかえって老化を促進したり, 臓器に障害を引き起こすことになるが, このことは既に多くの研究で確認されている³⁾.

一方, 動物にも活性酸素の毒性を阻害する抗酸化系が存在している. その代表が水溶性ビタミンCと脂溶性ビタミンEである. これら2つのビタミンを充分とっていれば運動時の臓器の障害をかなりの程度防ぐことができ, スポーツが健康に直結すると考えられる. つまり健康を考える場合, スポーツだけでは不十分で, 食事を含めた総合的な配慮が必要であると考えられる. とくにスポーツ選手の場合は日常的に運動負荷をかけるので栄養状態, とくに抗酸化系の栄養素をチェックしなければ, 筋肉をはじめいろいろな臓器に障害を引き起こすことが考えられる.

ところが, これらビタミン間の相互作用についてはこれまで動物を用いた研究はほとんど行な

われていない。ビタミンC (VC) によるトコフェリルラジカルへの水素供与で、ビタミンE (VE) が再生することについては、多くの試験管内の (*in vitro*) 実験^{4, 5)} で、その反応速度まで決定されている。しかし、生体内 (*in vivo*) における、これらのビタミンの相互作用は、まだ明らかにされていない⁶⁾。これまで、様々な濃度の両ビタミンを含む餌を摂取させた動物モデルにおける、両ビタミンの変化を測定することによって、相互作用が研究されてきた⁷⁻¹²⁾。しかしながら、これらの研究におけるVCの測定方法は、半世紀前に開発された、比色定量法¹³⁾ である。最近、我々は、化学誘導と高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を組み合わせた新しい特異的な方法を開発した¹⁴⁾。その方法を用いて測定したラット血漿中の真のVC量と比較すると、比色に基づく従来の方法では特異性が低く、3倍も高い値を示すことを報告した¹⁴⁾。また、VC研究のよいモデルである遺伝的壊血病ラット (ODSラット)¹⁵⁾ における、VC欠乏時のVCの減少速度は、臓器によって異なることを、この新しい方法を用いて報告した¹⁶⁾。

本論文では上記の研究を進展させ、ODSラットをVC欠乏 (-C)、VE欠乏 (-E)、ビタミンC、E同時欠乏 (-C,-E) にさせ、特異的、高感度測定法^{14, 17)} を用いて臓器中の両ビタミンの量の変化を正確に測定することによって、VCとVEの生体内での相互作用を初めて正確に検討した。

1. 材料と実験方法

1. 1 試薬

デヒドロ-L-アスコルビン酸ビス ((2, 4-ジニトロフェニル) ヒドラゾン) は、文献¹⁴⁾ に従って調整した。他のすべての試薬は特級を用い、和光純薬 (株) から購入した。

1. 2 動物と飼料

実験動物の取扱いは、日本政府動物実験の指針 (1980年3月17条6号) に従って行った。5週齢オスODSラット (od/od) は日本クレア社 (株) から購入した。ラットは、温度 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、12時間明暗サイクルの条件下で飼育し、餌と水は自由摂取させた。最初の1週間、すべてのラットをAIN76処方に従った船橋農場 (株) 製の合成飼料と正常な発育維持に十分な量であるVCを $1\text{g}/\ell$ ¹⁵⁾ を含むイオン交換水により飼育した。予備飼育の後、ラットを4グループ [対照群、-C群、-E群、-C,-E群] に分け飼育した。各グループのラット数は4から5匹とした。-E群の餌は脂肪としてstripped (ビタミンEを除去した) コーンオイル ($5\text{g}/100\text{g}$) を含む、船橋農場製のものを用いた。対照群にはVCを $1\text{g}/\ell$ 含む水と、stripped コーンオイル ($5\text{g}/100\text{g}$) を用いて作製した餌に、all-rac- α -トコフェロールを $50\text{mg}/\text{kg}$ 添加した合成飼料を与えた。-C群には対照群と同じ飼料とVCを含まない水を与えた。-C,-E群にはVCを含まない水と、上記のVEを含まない飼料を与えた。

1. 3 分析方法

解剖予定日に、1日1匹ずつ解剖し、解剖したその日にすべての測定を行った。ラットをエーテル麻酔下にて開腹し、ヘパリンを含む注射筒で、下大静脈から血液を採集した。門脈から冷却した生理的食塩水を流し、灌流した後、臓器を取り出した。取り出した臓器は、冷却下、5倍量の 10mM のリン酸緩衝液を含む生理的食塩水 ($\text{pH } 7.2$) でホモジネートにした。すべての測定は2連の実験で行った。VCの測定は、前回報告した方法^{14, 15)} で行った。VEの測定は文献¹⁷⁾ に従った。HPLCと蛍光検出器 (島津RF-535) の条件は既報^{19, 20)} の通りである。チオバルピツール酸反応性物質 (TBARS) は文献²¹⁾ に従って測定し、臓器重量当たりのマロンジアルデヒド (MDA)

当量として表わした。

蛋白質量は牛血清アルブミンを標準物質として用い、Lowry等の方法²²⁾に従い測定した。

データは、平均±SDとして表わし、Stat View (Abacus Concepts, Berkeley, CA) を用い、ANOVAにて有意差検定を行った。各ビタミン間の相互作用を検討するために、すべての実験群のグループ平均は、two-way ANOVA²³⁾を用いて比較した。グループ平均間の有意差は、FisherのPLSDテストを用いて分析した。P<0.05を有意差とした。

2. 結果と考察

2.1 ODSラットの体重変化

対照群の体重 (g) は文献^{15, 23)}と同じく、順調に増加した。-E群の体重変化は対照群と変わらず、既報¹⁹⁾と同様、3週間のVE欠乏は体重変化に影響を及ぼさないことを示している。-C群と-C,-E群の体重は文献^{15, 23)}の報告と同じく、最初、順調に増加したが、欠乏14日目から減少しはじめた。欠乏14日目の-C群と-C,-E群の体重はそれぞれ、168.2±10.5, 166.5±10.4 gであり、対照群 (178.3±11.9)、-E群 (185.0±3.9) よりも有意に減少した。欠乏21日目の-C群と-C,-E群の体重は、それぞれ158.36±12.85, 162.54±13.46であり、これもまた、対照群 (216.08±5.59)、-E群 (209.74±13.28) よりも有意に低い数値を示した。

2.2 臓器中のVE量の変化

欠乏21日目の-C群の血漿中の α -トコフェロール (α -Toc) 量は対照群より有意に低値であった (図1)。他のトコフェロール (β , γ , δ) は本実験においては検出されなかった。同様の結果は、欠乏21日目の心臓、肺、肝臓、腎臓、欠乏14日目の血漿、脳、肺、肝臓においても見られた (図1)。2-way ANOVAで解析すると、VE濃度における、両ビタミン欠乏間の有意な相互作用

用は、欠乏21日目の血漿、心臓、肺、肝臓、腎臓において見られた。これらの結果は、*in vivo*において、VCがVEの消費を少なくしていることを示しており、*in vitro*^{3, 4)}での研究で示されているように、VCによるトコフェリルラジカルへの直接的な救済があることを支持している。このことは、モルモットにおける慢性的VC欠乏は、肝臓中のVE濃度を減少させるとの報告¹¹⁾と合致している。しかし、一方、最低VC量の餌を与えられたODSラットの臓器中のVE量が、最も高い値を示したという報告¹²⁾とは異なっている。この相違は、用いられたVCの投与量の違いによるものと考えられる。

欠乏14日目、21日目における、-E群と-C,-E群の全臓器中のVE濃度は、対照群、-C群より有意に低かった (図2)。-E群と-C,-E群間での有意な差は見られなかった。このことは、脳 (下記参照) を除く他の臓器では、VE欠乏によってVE量が低下したため、VCの影響が消失したものと考えられる。

2.3 臓器中のVC量の変化

14日目における対照群の血漿中のVC濃度は、-E群よりも有意に高値を示した (図2)。同様な結果は、欠乏14日目の心臓、腎臓、欠乏21日目の血漿、心臓、肝臓、腎臓、筋肉においても見られた。この結果は、これらの臓器において、VEが欠乏したことにより、VCの消費が促進されたものと考えられる。VEによるVCの救済効果は、*in vivo*での本実験において、初めて見いだされた。VEによって、モノデヒドロアスコルビン酸やデヒドロアスコルビン酸が、アスコルビン酸に直接的に再生されるという反応は反応論的に起こり得ないので、このことは、VE欠乏によって脂質層のラジカル反応が亢進し、その結果、細胞の水層における酸化的ストレスが上昇し、水層における強力な抗酸化剤であるVC²⁴⁾の消費を引き起こしたものと考えられる。

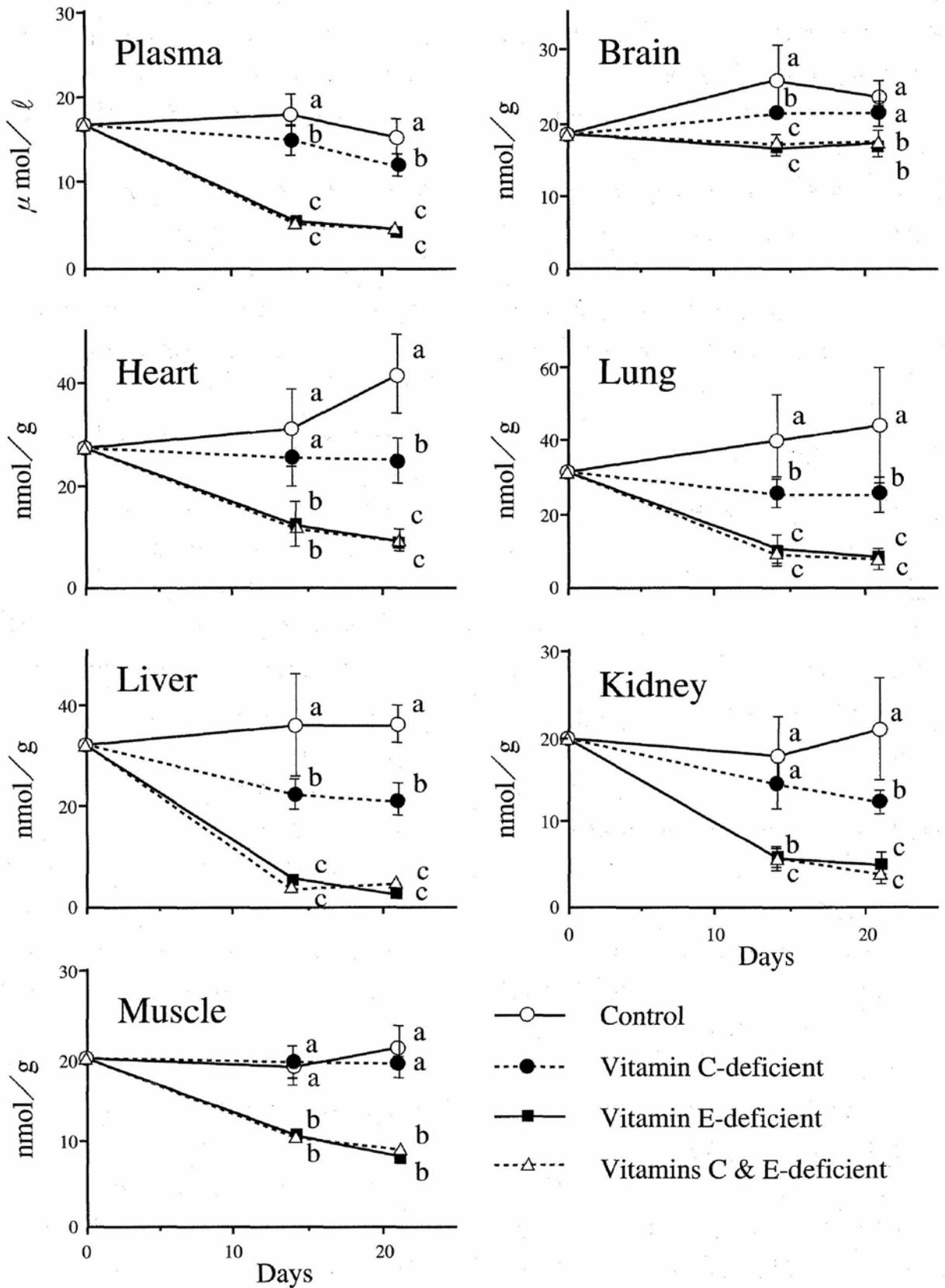


図1 対照群, -C群, -E群, -C, -E群の各群におけるVE量とその変化

Values are means \pm SD, $n=4$ or 5 . Different letters at each time point indicate significant differences among groups by Fisher's protected least significant difference test ($p<0.05$)

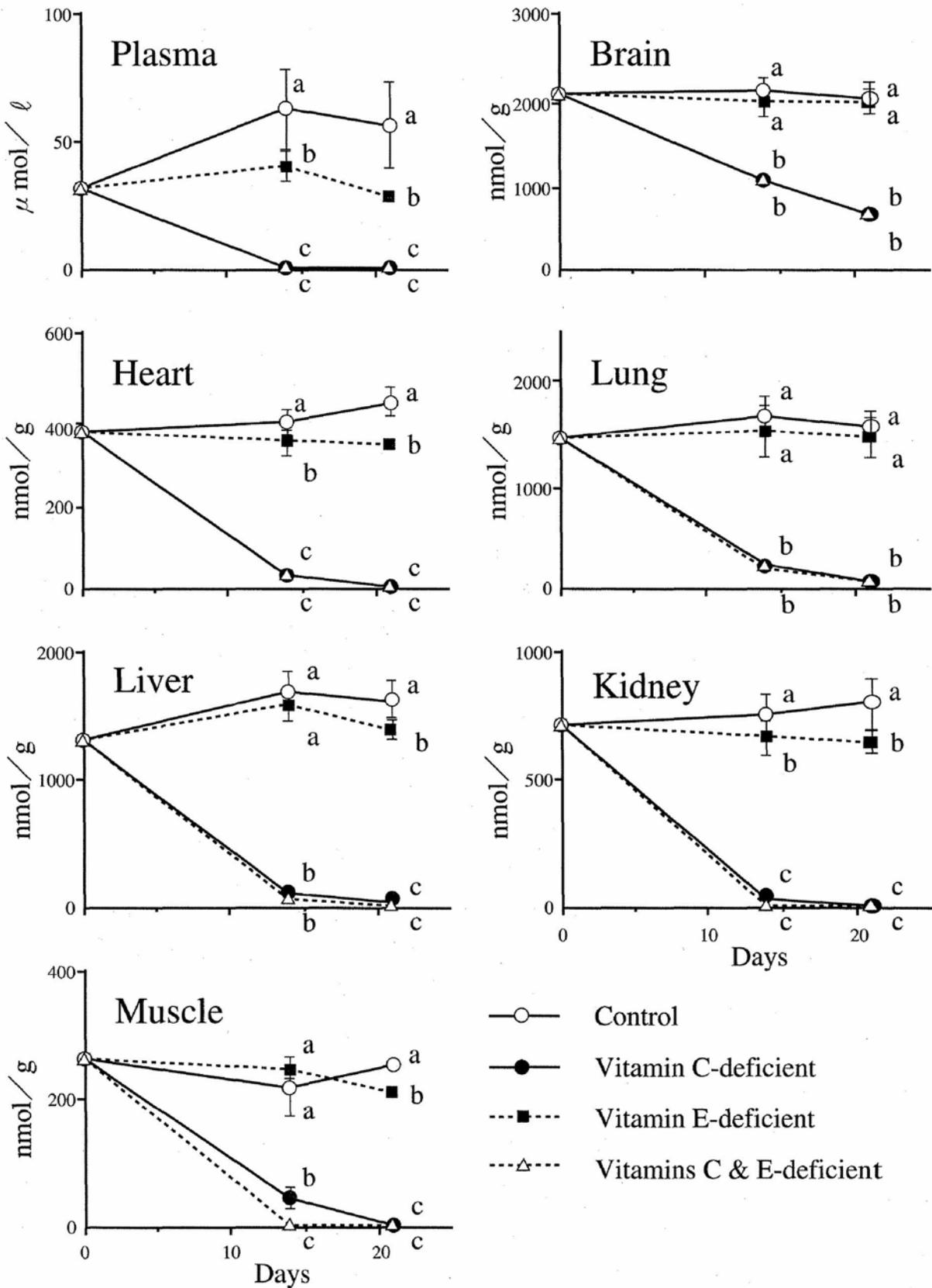


図2 対照群, -C群, -E群, -C, -E群の各群におけるVC量とその変化

Values are means \pm SD, n=4 or 5. Different letters at each time point indicate significant differences among groups by Fisher's protected least significant difference test ($p < 0.05$)

—C群において、全臓器中のVC量は速やかに減少した(図2)。この結果は我々の先の報告¹⁵⁾と同じである。欠乏14日目と欠乏21日目の全臓器において、—C群と—C,—E群のVC量は、対照群と—E群に比べ有意に減少した。欠乏14日目の血漿中の、これらの群(—C群と—C,—E群)におけるVC量は、検出限界以下であった。また、欠乏21日目の—C群と—C,—E群の両群における血漿、心臓、腎臓、筋肉中のVC量も検出限界以下となった。欠乏後14日目の—C,—E群の筋肉中のVC量は、—C群よりも有意に減少した。このことは、VEによる筋肉中のVCの救済効果が、現われていると考えられる。2-way ANOVAで解析すると、VC濃度に関して、VC、VE欠乏の有意な相互作用は14日目の血漿、筋肉、21日目の血漿、心臓、肝臓、腎臓、筋肉において見られた。

脳は、VC、VE欠乏期間中、両ビタミンともに、最も遅い減少傾向を示し^{15, 19)}、両ビタミンの相互作用は見られなかった(図1, 図2)。また、肺におけるVCに対する、VEの救済効果は検出できなかった。これらの結果から考えると、両ビタミンの相互作用には臓器によってその現われ方に差があること、また、本研究の方法論ではすべての臓器において、必ずしも明瞭に観察されるとは

表1 欠乏21日目の—C群、—E群、—C,—E群、および対照群における、血漿と肝臓中のTBARS

	血漿	肝臓
	nmol/g	
Control	9.14 ± 0.35 (a)	25.23 ± 1.13 (a)
—C	13.79 ± 1.28 (b)	33.72 ± 4.53 (b)
—E	8.96 ± 1.55 (a)	25.81 ± 1.82 (a)
—C,—E	12.98 ± 1.34 (b)	43.63 ± 2.01 (c)
Two-way ANOVA		
	P	
C	<0.001	<0.001
E	NS	<0.001
C*E	NS	<0.01

平均値±SDを示す。それぞれの組織でTBARSの後の記号の異なるものは有意差(P<0.05)があることを示す。NS=not significant (P≥0.05)

限らないことが判った。

2. 4 TBARSの変化

酸化ストレスの指標としてしばしば用いられるTBARSの測定を欠乏21日目に行なった。—C群と—C,—E群における、血漿、肝臓中のTBARSは、対照群、—E群と比べ有意に上昇した(表1)。このことは、VC欠乏による酸化ストレスは、VE欠乏による場合よりも強いことを示している。VC欠乏時におけるVCの減少は、VE欠乏時でのVEの減少よりも、その程度が大きいことを反映しているのかもしれない。しかし、本実験のTBARS測定結果からは、両ビタミンの相互作用は明らかではない。

—C,—E群における肝臓のTBARSは、他の群よりも有意に上昇したということは、両ビタミン欠乏に相加性があることを示している。2-way ANOVAによる解析では、TBARSに関する、両ビタミン欠乏間の有意な相互作用は、肝臓のみに現われている(表1)。脳、腎臓、心臓、肺、筋肉においては、4群間でのTBARSの有意な差は見られなかった。

3. 結 語

特異的、高感度測定法¹⁴⁾を用いて、2つの抗酸化ビタミン、VCとVEの相互作用を明らかにした。VEの減少はVC欠乏によって加速され、このことは、*in vitro*の研究^{3, 4)}によって示されているように、VCによるVEの再生が*in vivo*でも起こり得ることを支持している。一方、VEによるVCの救済効果は、*in vivo*での本実験において初めて観察された。VEによるVCの直接的な再生は起こり得ないので、この救済効果は、*in vitro*の研究では予測されなかったことである。この結果は、VE欠乏によって起こる、膜中での酸化ストレスの亢進は、細胞の水層に移り、結果として、強力な水溶性抗酸化剤であるVCの減少を引き起こすことを示している。2-way ANOVA

の解析によると、両ビタミン欠乏の有意な相互作用は、血漿、心臓、肺、腎臓、肝臓、筋肉において見られた。

以上より、動物の体内においてはビタミンCとEは緊密に相互作用していることが明らかとなった。そのため、運動を行なう選手はもちろん、一般の人々も運動する際にはこれら2つのビタミンを十分に摂取していることが望ましいと考えられる。とくに運動選手の場合、日常的な運動負荷による筋肉や他臓器の活性酸素による障害を防止するため、これら両ビタミンの摂取を心掛けるべきである。食事から取ることが自然であるが、体重制限などがある場合、適量のビタミン剤の投与を考えてもよいと考えられる。

謝 辞

本研究に対して、研究助成を賜った、財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深謝致します。

文 献

- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. ; Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview, *Methods Enzymol.*, 186, 1-85 (1990)
- Cutler, R. G. ; Antioxidants and Aging, *Am. J. Clin. Nutr.*, 53, 373S-379S (1991)
- Ji, L. L. ; oxidative stress during exercise : Implication of antioxidant nutrients, *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1079-1086 (1995)
- Mukai, K., Nishimura, M. & Kikuchi, S. ; Stopped-flow investigation of the reaction of vitamin C with tocopheroxyl radical in aqueous Triton X-100 micellar solutions, *The structure-activity relationship of the regeneration reaction of tocopherol by vitamin C. J. Biol. Chem.*, 266, 274-278 (1991)
- Packer, J. E., Slater, T. F. & Willson, R. L. ; Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C, *Nature (London)*, 278, 737-738 (1979)
- Burton, G. W., Wronska, U., Stone, L., Foster, D. O. & Ingold, K. U. ; Biokinetics of Dietary RRR- α -tocopherol in the male guineapig at three dietary levels of vitamin C and two levels of vitamin E. Evidence that vitamin C does not "spare" vitamin E in vivo, *Lipids*, 25, 199-211 (1990)
- Chen, L. H., Lee, M. S., Hsing, W. F. & Chen, S. H. ; Effect of vitamin C on tissue antioxidant status of vitamin E deficient rats, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 50, 156-162 (1980)
- Chen, L. H. ; An increase in vitamin E requirement induced by high supplementation of vitamin C in rats, *Am. J. Clin. Nutr.*, 34, 1036-1041 (1981)
- Chen, L. H. & Thacker, R. R. ; Effect of ascorbic acid and vitamin E on biochemical changes associated with vitamin E deficiency in rats, *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, 57, 385-390 (1987)
- Ginter, E., Kosinova, A., Hudecova, A. & Mlynarcikova, U. ; Parabolic response of hepatic microsomal hydroxylating system and lipids to graded doses of ascorbic acid in guinea pigs on low and high α -tocopherol intake, *J. Nutr.*, 114, 485-492 (1984)
- Hruba, F., Novakova, V. & Ginter, E. ; The effect of chronic marginal vitamin C deficiency on the α -tocopherol content of the organs and plasma of guinea-pigs, *Experientia*, 38, 1454-1455 (1982)
- Igarashi, O., Yonekawa, Y. & Fujiyama-Fujihara, Y. ; Synergistic action of vitamin E and vitamin C in vivo using a new mutant of Wistar-strain rats, ODS, unable to synthesize vitamin C, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 37, 359-369 (1991)
- Roe, J. H. & Kuether, C. A. ; Determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2, 4-DNPH derivative of dehydroascorbic acid, *J. Biol. Chem.*, 147, 399-407 (1943)
- Kishida, E., Nishimoto, Y. & Kojo, S. ; Specific determination of ascorbic acid with chemical derivatization and high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, 64, 1505-1507 (1992)
- Mizushima, Y., Harauchi, T., Yoshizaki, T. & Makino, S. ; A rat mutant unable to synthesize vitamin C, *Experientia*, 40, 359-361 (1984)
- Tokumar, S., Takeshita, S., Nakata, R., Tsukamoto, I. & Kojo, S. ; Change in the level of vitamin C and lipid peroxidation in tissues of the inherently scorbutic rat during ascorbate deficiency, *J. Agric. Food Chem.*, 44, 2748-2753 (1996)
- Buttriss, J. L. & Diplock, A. T. ; High-performance liquid chromatography methods for vitamin E in tissues, *Methods Enzymol.*, 105, 131-138 (1984)

- 18) American Institute of Nutrition ; Report of the American Institute of Nutrition ad hoc committee on standards for nutritional studies, *J. Nutr.*, 107, 1340-1348 (1977)
- 19) Kishida, E., Kamura, A., Tokumaru, S., Oribe, M., Iguchi, H. & Kojo, S. ; Re-evaluation of malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactive substances as indices of autoxidation based on the oxygen consumption, *J. Agric. Food Chem.*, 41, 1-4 (1993)
- 20) Tokumaru, S., Ogino, R., Shiromoto, A., Iguchi, H. & Kojo, S. ; Increase of lipid hydroperoxides in tissues of vitamin E-deficient rats, *Free Radic. Res.*, 26, 169-174 (1997)
- 21) Buege, J. A. & Aust, S. D. ; Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, 52, 302-310 (1978)
- 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. ; Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, 193, 265-276 (1951)
- 23) Welkowitz, J., Ewen, R. B. & Cohen, J. ; In : Introductory statistics for the behavioral sciences. 3rd ed. Academic Press, Inc. New York, NY. (1982)
- 24) Kimura, H., Yamada, Y., Morita, Y., Ikeda, H. & Matsuo, T. ; Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats, *J. Nutr.*, 122, 1904-1909 (1992)
- 25) Frei, B., England, L. & Ames, B. N. ; Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86, 6377-6381 (1989)