

# マウスにおけるショ糖および蜂蜜の摂取が運動時のグルタチオン動態に与える急性的影響について

今村友美<sup>\*1</sup>, 越智沙織<sup>\*2</sup>, 堀江 登<sup>\*1</sup>

\*1: 武庫川女子大学 生活環境学部 食物栄養学科

\*2: 武庫川女子大学大学院 生活環境学研究科 食物栄養学専攻

## Acute influence of intake of sucrose or honey on glutathione status in mice during exercise

Tomomi IMAMURA<sup>\*1</sup>, Saori OCHI<sup>\*2</sup> and Noboru HORIE<sup>\*1</sup>

\*1: Department of Food Science and Nutrition, School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University

\*2: Food Science and Nutrition Major, Graduate School of Human Environmental Sciences, Mukogawa Women's University

### Abstract

It is reported that reactive oxygen generate during physical exercise, and it has danger to give the body bad influence when its generation exceeds the antioxidant system of the body. Reduced glutathione (GSH) is the most abundant antioxidant thiol in animal, and plays an important role of decrease of oxidative stress. GSH is synthesized in liver mainly, then, released into blood. It is reported that hepatic GSH synthesis and release are affected by hormones, and GSH decreased in liver during fasting.

In this study, we tested whether intake of sucrose or honey might contribute depression of oxidative stress during exercise by preventing reduction of GSH level in vivo. ICR female mice were divided into non-exercise group [control E(-)] and exercise group [E(+)]. Exercise group were divided into three groups, they drank tap water [control E(+)] or solution of sucrose [sucrose E(+)] or honey [honey E(+)] freely without feedings for 16 hours until exercise start. Exercise group mice ran with treadmill for 60 minutes, then, after euthanasia by etherization, blood and several tissues were harvested.

Acute exercise decreased hepatic GSH, but sucrose E(+)group and honey E(+)group remained high level of hepatic GSH and GSH/glutathione disulfide (GSSG) ratio. Hence, glutathione redox state was reduction predominance. Intake of sucrose or honey decreased TBARS value regardless of having exercise or not.

Therefore, we suggested that we had better take energy sources such as sucrose or honey for not only maintenance of stamina but also prevention of the bio-oxidation during exhaustive exercise.

**Key words** : exercise(運動), glutathione(グルタチオン), sucrose(ショ糖), honey(蜂蜜)

## I. 緒 言

運動には体脂肪の減少, 除脂肪体重の増大, 体力の維持・増進, 基礎代謝の亢進, 生活習慣病等の疾病のリスクファクターの除去などの効果がある。近年, 生活習慣病の予防の観点から, 有酸素運動の重要性が注目される。一方, 過度の運動は, 逆に生体に悪影響を与える危険性が示唆される。その原因の1つが運動時における過剰な

活性酸素の発生である。運動時には, 酸素消費量が増大し, 安静時の10~20倍になり, 活動筋への酸素流入量は約100倍に増大し<sup>1)</sup>, それに伴って活性酸素の発生が増大することが数多く報告されている<sup>1-4)</sup>。活性酸素は, 生体内で生じる様々な反応に極めて重要な役割を果たしているが, その発生が過剰で, それを消去するための酸化能力を超えてしまうと, 生体に傷害を及ぼす危険性が生じる。この様な活性酸素を消去するためのメカニズム

が生体内には備わっており、さらに、我々が日常的に摂取する食品成分にも抗酸化活性を有するものが多く存在する。本研究では、それらの中でも特にグルタチオンに着目した。

グルタチオンは主に肝臓で合成され、グルタミン酸とシステインとグリシンの3つのアミノ酸が結合したトリペプチドである<sup>5,6)</sup>。その合成は主に律速酵素である glutamate cysteine ligase (GCL) によって調節される<sup>5-7)</sup>。グルタチオンは生体内で還元型グルタチオン (GSH) または酸化型グルタチオン (GSSG) として存在する。肝臓での GSH 合成や肝臓からの GSH 放出にはホルモンが関与しており<sup>8,9)</sup>、空腹時はアドレナリンやグルカゴンなどの分泌が亢進し、その影響で肝臓中の GSH 量が減少する<sup>10)</sup>。よって、空腹時の肝臓 GSH 量が減少している状態での運動は、グルタチオン系による抗酸化能が十分に発揮されないため、生体酸化防御系においてリスクが高まると考えた。

本研究では、空腹状態またはエネルギーを摂取した状態における消耗性の運動が、肝臓中の GSH を中心とした生体内の酸化還元状態に与える影響について検討した。さらに、本研究では、運動時に、効率のよいエネルギー源として容易に摂取することができることに重点をおき、エネルギー摂取の方法として、糖分を含んだ水溶液の摂取を選択した。糖分としては、一般的に手に入りやすいショ糖、そして、抗酸化性を有することが知られている蜂蜜<sup>11)</sup>を採用し、それぞれの水溶液の摂取が運動時の生体の酸化還元系に及ぼす急性的影響について実験動物を用いて検討した。

## II. 方 法

### 1. 実験動物

ICR 雌性マウス (11 週齢) (日本クレア) を非運動群 [コントロール (非運動) 群] および運動群に分け、運動群についてはさらに、コントロール (運動) 群、ショ糖 (運動) 群、蜂蜜 (運動) 群に分けた。すべての実験群において、解剖前 16 時間以後は餌を投与せず、飲水のみとした。非運動群および運動群のコントロール群には、給水瓶を用いて 16 時間にわたって水道水を自由摂取させた。蜂蜜 (運動) 群には、山田養蜂場里山のはちみつ (アカシア) を 15% の濃度で水道水に溶解したものを、コントロール群における水道水の代わりに、給水瓶を用いて自由摂取させた。ショ糖 (運動) 群には、15% 蜂蜜水と同等のエネルギーになるように調製したショ糖の水溶液を、同じく給水瓶を用いて自由摂取させた。運動群においては、水道水またはショ糖や蜂蜜の水溶液を運動負荷直前まで自由摂取させた。なお、動物実験は武庫川女子大学動物実験規定に従って行った。

### 2. 運動負荷方法

水道水またはショ糖や蜂蜜の水溶液を摂取させたマウスに運動を負荷した。運動負荷は小動物用トレッドミル装置 (竹井機器工業) を用いて、分速 29 m の走行運動を 60 分間行った。なお、運動負荷中は常に監視し、異常がみられたマウスは運動を中止し、データから除外した。運動群のマウスは運動負荷終了直後に解剖を行った。

### 3. 解剖

各実験群のマウスは、エーテル麻酔により安楽死させ、腹部後大静脈からの採血を行った。また、脳、肺、肝臓および骨格筋 (大腿四頭筋) を摘出した。血液は抗凝固剤として、3.8% クエン酸ナトリウム溶液を 1/10 容添加し、遠心分離後、血漿と血球層に分けた。

### 4. 血液生化学検査

#### 1) 血中グルコース濃度の測定

血漿サンプル中のグルコース濃度をグルコース C II-テストワコー (ムロターゼ・GOD 法, 和光純薬工業) を用いて測定した。操作は同測定キット添付の取扱説明書に従って行い、測定はマイクロプレート用分光光度計 (Infinite M200, PLATE manager V4, TECAN) を用いて、505 nm における吸光度を測定した。同様に測定した標準サンプルの吸光度より作成した検量線にて濃度を求めた。

### 5. 組織中のグルタチオン量の測定<sup>12, 13)</sup>

#### 1) サンプルの調製

摘出した器官は直ちに 9 倍量の 1 M 塩化カリウム溶液とともにホモジナイズし、10% ホモジネート溶液を作製した。300  $\mu$ l のホモジネート溶液に 18  $\mu$ l の 60% 過塩素酸溶液を加えてよく混和し、21,000  $\times$  g, 4°C で 10 分間遠心分離を行った。上清の 200  $\mu$ l に同量の 80 mM ヨード酢酸 (和光純薬工業) 溶液を加えてよく混和した。その後、300  $\mu$ l の飽和炭酸水素カリウム (和光純薬工業) 溶液を加えて混合し、遮光して 1 時間放置した。その後、200  $\mu$ l の 5%(v/v) 1-フルオロ-2,4-ジニトロベンゼン (和光純薬工業) エタノール溶液を加えて混合し、遮光して 4°C で 4 時間放置したものを高速液体クロマトグラフィー装置 (後記) にて分析した。

#### 2) 分析

調製したサンプルはシリンジ用フィルター (Minisart RC4, pore size 0.45  $\mu$ m, sartorius stedim biotech) でバイアル瓶へる過後、高速液体クロマトグラフィー装置 (HITACHI D-2000 Elite LaChrom; Organizer, UV Detector L-2400, Column Oven L-2300, Autosampler L-2200, Pump L-2130, Hitachi Model D-2000 Elite Chromatography Data Station Software HPLC System Manager) を用いて分析した。分析カラムは Develosil NH<sub>2</sub>-5 (4.6 mm  $\times$  250 mm)

(野村化学)を用い、温度 25°C に保ち、365 nm にて検出を行った。移動相 A は 80%(v/v) メタノール (高速液体クロマトグラフ用, 和光純薬工業), 移動相 B は 61.6 g の酢酸アンモニウム (和光純薬工業) を 209 ml の超純水に溶解し、640 ml のメタノールおよび 151 ml の酢酸 (精密分析用, 和光純薬工業) を混合したものを使用した。それぞれの移動相溶媒は、オムニポアメンブレン (JHWPO 4700, FILTER TYPE 0.45  $\mu$ mJH) でろ過し、超音波照射と同時に吸引脱気した後に、分析に用いた。分析は、濃度勾配プログラムを設定して行った。濃度勾配プログラムは、0 ~ 5 分は移動相 A の流量を 80% および移動相 B の流量を 20% に保ち、5 分 ~ 20 分は移動相 A の流量を 80% から 0 へ変化させ、移動相 B の流量を 20% から 100% に変化させた。続いて 20 分 ~ 25 分は移動相 A の流量を 0、移動相 B の流量を 100% に保ち、25 分 ~ 30 分は移動相 A の流量を 0 から 80% に変化させ、移動相 B の流量を 100% から 20% に変化させた。そして、30 分 ~ 35 分は移動相 A の流量を 80%、移動相 B の流量を 20% に保った。流速はプログラムの全ての段階において 1.0 ml/min の速度で分析した。GSH [グルタチオン(還元型), 和光純薬工業] および GSSG [グルタチオン(酸化型), 和光純薬工業] の水溶液を適宜希釈したものを標準サンプルとして同様に調製・分析し、そのピークエリアから検量線を作成し、サンプル中の GSH 量および GSSG 量を求めた。なお、結果は、CBB 色素試液 (ナカライテスク) を用いる Bradford 法によりホモジネート溶液中のタンパク質量を定量し、タンパク質 1 mg 当たりの量で示した。

## 6. GCL mRNA 発現の測定 (リアルタイム RT-PCR 法)

### 1) RNA の抽出および精製

抽出したマウスの肝臓の約 0.1 g を細かく刻み、直ちに RNeasy<sup>®</sup> RNA Stabilization Reagent (QIAGEN) に浸漬した。4°C で一晩インキュベートした後、RNeasy 溶液を取り除き、-80°C にて冷凍保存した。RNA の抽出および精製は Fast Pure RNA Kit (TaKaRa) を用いて行った。なお操作は同キット添付の取扱説明書に従って行った。

### 2) 逆転写反応 (cDNA の生成)

抽出および精製した total RNA は RNA 量を定量し、その 250 ng を用いて逆転写反応を行った。逆転写反応は Prime Script<sup>™</sup> RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて行った。なお、操作は同キット添付の取扱説明書に従って行った。逆転写反応後に得られた cDNA 溶液は 4°C にて保存した。

### 3) リアルタイム PCR 反応

得られた cDNA 溶液と SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて PCR 反応溶液を調製した。なお、操作は同キット添付の取扱説明書に従

て行い、PCR 反応および検出は Applied Biosystems 7500 を用いて行った。測定に用いた PCR プライマーはすべてタカラバイオ株式会社により合成されたものを使用した。その塩基配列は、GCL-M 用プライマーは Forward: 5'-ACCGGGAACCTGCTCAACTG-3', Reverse: 5'-GATT TGG GAACTCCATTCATTCAAG-3', GCL-C 用プライマーは Forward: 5'-TGGACACCCGATGCAGTATTC-3', Reverse: 5'-ATCCACCTGGCAACAGTCATTAG-3', GAPDH 用プライマーは Forward: 5'-AAATGGTGAAGGTCGGT GTG-3', Reverse: 5'-TGAAGGGGTCGTTGATGG-3' である。結果は、GCL-C および GCL-M の mRNA 発現量を house-keeping gene として測定した GAPDH の mRNA 発現量で除した値で示した。

## 7. チオバルビツール酸反応生成物 (TBARS) の測定<sup>14)</sup>

摘出した器官は直ちに、9 倍量の 1 M 塩化カリウム溶液とともにホモジナイズし、10% ホモジネート溶液を作製した。75  $\mu$ l のホモジネート溶液に 450  $\mu$ l の 1% りん酸 (ナカライテスク) 溶液を加えてよく混和し、さらに 20  $\mu$ l の 10 mM 2,6-ジ-*t*-ブチル-*p*-クレゾール (ナカライテスク) エタノール溶液を加えてよく混和した。その後、150  $\mu$ l の 0.67% TBA [2-チオバルビツール酸 (ナカライテスク)] 溶液を加えてよく混和し、80°C で 60 分間加温した。室温にて放冷後、600  $\mu$ l の 1-ブタノール (和光純薬工業) を加え、ボルテックスミキサーにて強く攪拌し、赤色の呈色物質をブタノール層に抽出した。その後、1,400  $\times$  g で 10 分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清 (ブタノール層) の 200  $\mu$ l を蛍光光度計 (Infinite M200, PLATE manager V4, TECAN) を用いて励起波長 515 nm、蛍光波長 553 nm における蛍光度を測定した。また、検量線作成のための標準液を TEP [1,1,3,3-テトラエトキシプロパン (ナカライテスク)] をエタノールに溶解したものを用いて調製し、同様に呈色させ、データは TEP 当量で求めた。なお、結果は、Bradford 法により定量したホモジネート溶液中のタンパク質 1 mg 当たりの量で示した。

## 8. 統計処理

統計処理は Sheffe 法による多重比較を行い、危険率 5% 未満を有意水準とした。

## III. 結 果

グラフには示さないが、16 時間当たりの飲水量はコントロール群 (非運動群 + 運動群) で平均 2.67 ml / 匹、シヨ糖 (運動) 群で平均 13.4 ml / 匹、蜂蜜 (運動) 群で平均 10.7 ml / 匹であった。

まず、血中グルコース濃度を Fig.1 に示す。血中グルコース濃度は、コントロール (非運動) 群とコントロール (運動) 群を比較すると、運動群で減少した。しかし、

運動群の中で比較すると、ショ糖群では、コントロール群より高値を示す傾向にあり、蜂蜜群ではコントロール群より高値であった。

次に、各器官における GSH 量の定量結果を Fig.2A に示す。まず、肝臓において、コントロール（非運動）群とコントロール（運動）群を比較すると、運動群で減少した。運動群におけるショ糖群および蜂蜜群においては、いずれもコントロール群と比べて高値であった。脳では、コントロール（非運動）群とコントロール（運動）群で有意な差はなかったが、運動群においては、ショ糖群および蜂蜜群でいずれも高値であった。肺においては、運動群におけるショ糖群および蜂蜜群で高値を示す傾向であった。筋肉においては各群間に有意な差はなかった。次に GSSG 量の結果を Fig.2B に示す。肝臓においては各群間に有意な差はなかった。脳においてはコントロール（非運動）群とコントロール（運動）群においては差がなかったが、運動群におけるショ糖群および蜂蜜群で低値であった。肺では各群間に有意な差はなかった。また、筋肉においても各群間に有意な差はなかった。次に、GSH/GSSG 比の結果を Fig.2C に示す。肝臓における GSH/GSSG 比はコントロール（非運動）群とコントロール（運動）群を比べると運動群において低下した。しかし、運動群においては、ショ糖群および蜂蜜群で高値であった。次に、脳における GSH/GSSG 比はコントロール（非

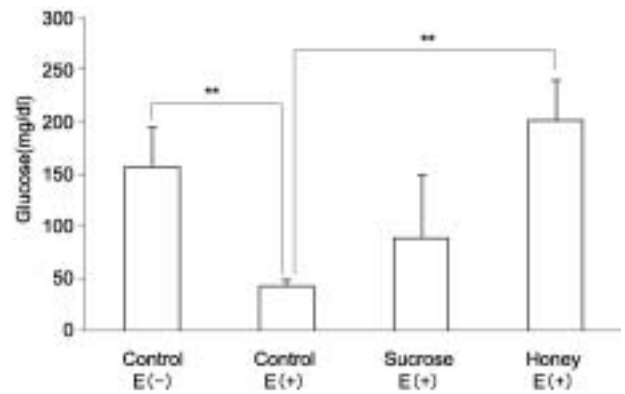


Fig.1 Influence of intake of sucrose or honey before exercise on plasma glucose level. Control E(-) group took only tap water and not exercised. Control E(+ group took only tap water and exercised. Sucrose E(+ group took sucrose solution and exercised. Honey E(+ group took honey solution and exercised. Values are means  $\pm$  SD (n=6). \*\*;P<0.01

運動）群およびコントロール（運動）群において差はなかったが、運動群においては、ショ糖群および蜂蜜群で高値を示した。肺においても、脳における GSH/GSSG 比の結果と同様に、運動群においては、ショ糖群および蜂蜜群で高値を示す傾向であった。筋肉においては各群間

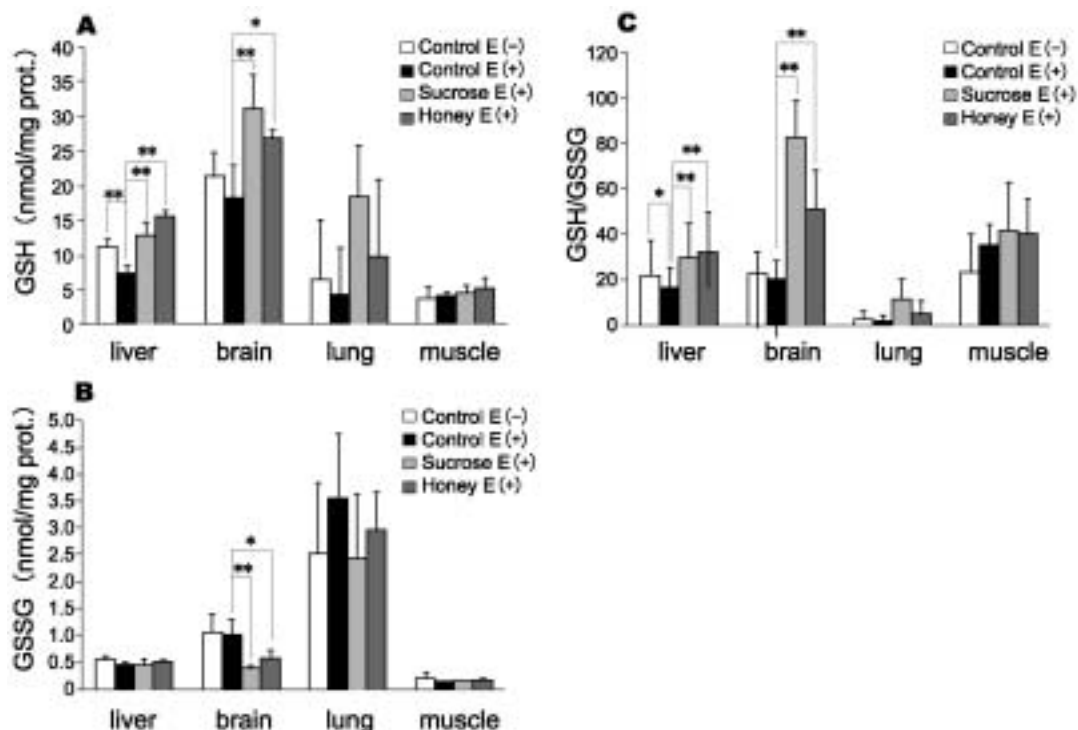


Fig.2 Influence of intake of sucrose or honey before exercise on tissue glutathione status: GSH content (A), GSSG content (B) and GSH/GSSG ratio (C). Control E(-) group took only tap water and not exercised. Control E(+ group took only tap water and exercised. Sucrose E(+ group took sucrose solution and exercised. Honey E(+ group took honey solution and exercised. Values are means  $\pm$  SD (n=6) in indicated tissue. \*;P<0.05, \*\*;P<0.01

に差はなかった。

次に、肝臓における GCL サブユニットである GCL-catalytic subunit (GCL-C) および GCL-modifier subunit (GCL-M) の mRNA 発現の定量結果を Fig.3 に示す。GCL-C および GCL-M とともに、コントロール (運動) 群においてコントロール (非運動) 群より減少する傾向を示した。さらに、運動群においては、GCL-C と GCL-M の mRNA 発現は、コントロール群と比較して、ショ糖群および蜂蜜群で低値になる傾向を示した。

次に、各器官における TBARS 値の測定結果を Fig.4 に示す。肝臓では、コントロール (非運動) 群およびコントロール (運動) 群間において差はなかったが、運動群においてコントロール群と比較してショ糖群で低値を示し、蜂蜜群においても低値を示す傾向であった。脳においては各群間に差はなかった。また、肺においては、ショ糖 (運動) 群において低値を示す傾向であった。筋肉における TBARS 値は、コントロール (非運動) 群と比較してコントロール (運動) 群で低値を示す傾向であったが、運動群間では差はなかった。

#### IV. 考 察

本研究では、運動時の糖分摂取の生体抗酸化系への影響を検討するために、マウスにショ糖または蜂蜜の水溶液を自由摂取させたのち、有酸素運動を負荷した。そして、グルタチオン系を中心とした酸化還元状態に関するパラメーターの測定を行った。

1 時間あたりの飲水量は、水道水を自由摂取させたコントロール群 (非運動群+運動群) において平均 0.17 ml / 匹、ショ糖 (運動) 群で平均 0.84 ml / 匹、蜂蜜 (運動) 群で平均 0.67 ml / 匹であり、ショ糖群または蜂蜜群においては、コントロール群と比較して多量に飲水した。これは実験に用いたマウスが本能的に甘いものを好むためであると考えが、さらに、高濃度のショ糖水や蜂蜜水を摂取させたため、浸透圧の上昇よりのどが渇き、さらに飲水するというサイクルに

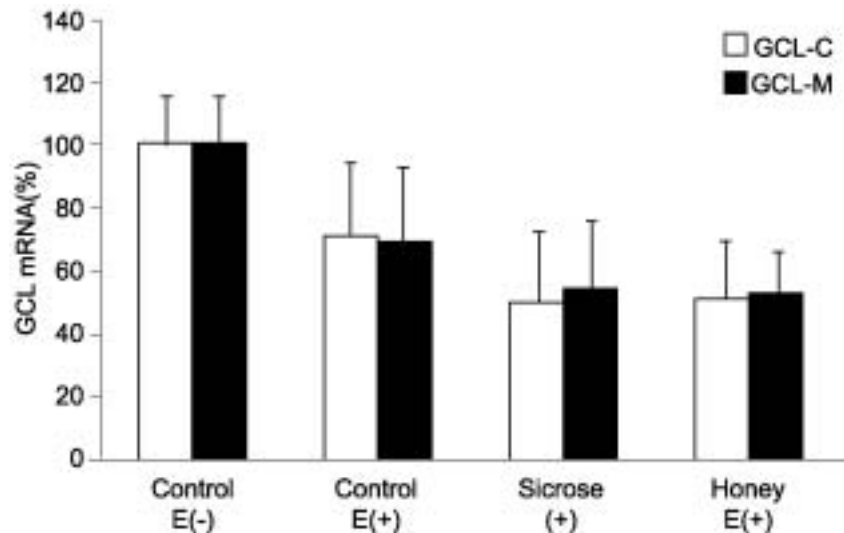


Fig.3 Influence of intake of sucrose or honey before exercise on mRNA expression of GCL subunits in liver. Control E(-) group took only tap water and not exercised. Control E(+) group took only tap water and exercised. Sucrose E(+) group took sucrose solution and exercised. Honey E(+) group took honey solution and exercised. Each bar are presented with percentages of Control E(-). Values are means ± SD (n=6).

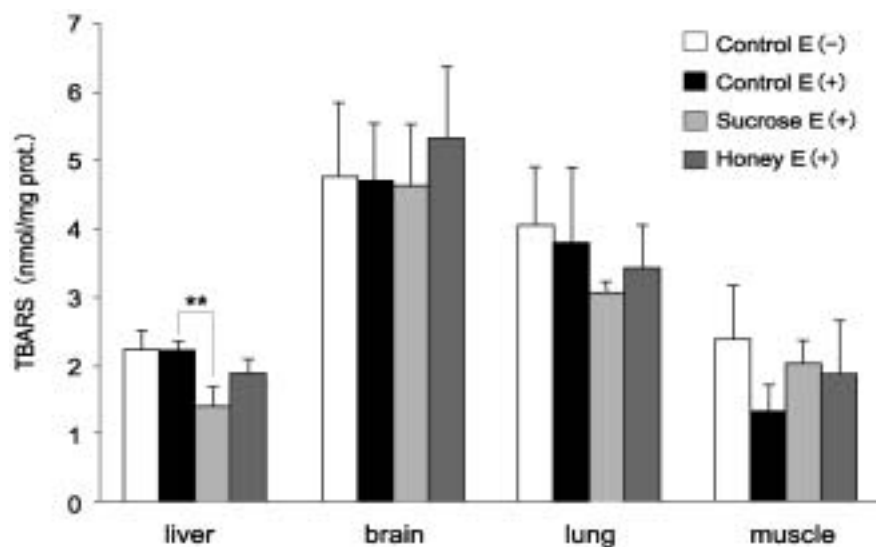


Fig.4 Influence of intake of sucrose or honey before exercise on TBARS. Control E(-) group took only tap water and not exercised. Control E(+) group took only tap water and exercised. Sucrose E(+) group took sucrose solution and exercised. Honey E(+) group took honey solution and exercised. Values are means ± SD (n=6) in indicated tissue. \*\*;P<0.01

陥っていた可能性を考える。

まず、解剖時の血中グルコース濃度についてである。コントロール群における非運動群と運動群を比較すると、運動群で減少した (Fig.1)。これは、持続性の有酸素運動負荷により、エネルギー源として血中グルコースが利用されたためと考える。運動群においては、コントロール

群と比較して、ショ糖群で高値を示す傾向がみられ、蜂蜜群ではさらに高値であった。ショ糖群および蜂蜜群では、糖分を含んだ水溶液を摂取したことにより、血中グルコース濃度が高値に保たれたため、運動負荷後も、コントロール（運動）群より高値を示したと推察する。また、蜂蜜群ではショ糖群と比較してより高値を示したが (Fig.1), これは、単一成分であるショ糖に対して蜂蜜にはグルコース、フルクトース、スクロースなどの数種の糖質やその他の成分が含まれることが影響したものと考える。データには示さないが、肝臓および筋肉中グリコーゲン量の定量結果も、血中グルコース濃度と似た傾向を示した。肝臓グリコーゲン量は、コントロール（非運動）群と比較してコントロール（運動）群では減少傾向を示し、運動群においては、ショ糖群および蜂蜜群でやや増加する傾向がみられた。よって、これらの結果より運動前の糖分摂取により運動後においても血糖が維持されていたことが示された。

次に、各器官における GSH, GSSG の定量結果および GSH/GSSG 比についてである (Fig.2)。GSH は直接的に活性酸素を消去する抗酸化物質であり、酵素的に GSSG へと酸化されることでも抗酸化性を発揮する<sup>7)</sup>。よって GSH/GSSG 比は酸化還元状態のパラメーターとなり、この値が高値を示すほどグルタチオンレドックス状態が還元型に傾いていることになる。肝臓中の GSH 量は激しい運動で減少することが報告されているが<sup>15-18)</sup>、本研究結果もそれと同様の結果が得られた (Fig.2A)。運動時の肝臓 GSH 量の減少は、肝臓での合成の抑制、消費の亢進もしくは肝臓からの放出が高まったためであると考えられる。運動時には肝臓においても活性酸素が発生すると考えるが、その活性酸素消去のために GSH が消費されたと推察する。アドレナリンやグルカゴンの作用により肝臓での GSH 合成系の抑制や<sup>8)</sup>、肝臓からの GSH 放出が亢進するため<sup>9)</sup>、運動によるそれらのホルモンの分泌増加も肝臓中 GSH 量の減少に関与していると考えられる。さらに、他の組織における活性酸素消去のためにも、肝臓から放出された GSH が作用したと推察する。一方、運動群においてコントロール群と比較して、ショ糖群および蜂蜜群で GSH 量は高値を示し、運動負荷による GSH 量の減少が抑制された (Fig.2A)。データには示さないが、ショ糖または蜂蜜の水溶液を摂取したマウスにおいて、水道水のみを摂取したマウスに比べて、安静時に、肝臓 GSH 量が増加したことを確認している。運動群におけるショ糖群または蜂蜜群では、糖分の摂取により血糖が維持され、水道水のみを摂取であったコントロール群に比べて、ホルモンの影響による肝臓 GSH 量の減少が抑制されたため、GSH 量が保たれ、運動による肝臓 GSH 量の減少を加味しても、GSH 量が高値であったと考える (Fig.2A)。運動群におけるショ糖群および蜂蜜群の肝臓では、コントロール群と比較して、GSH 量が高値を示したにもかかわらず

GSSG 量は増加しなかった (Fig.2B)。よって GSH/GSSG 比も高値となり (Fig.2C)、肝臓において、グルタチオンのレドックス状態が還元優位になった。次に、脳における GSH 量は、コントロール群において、非運動群と運動群を比較すると、運動群で減少する傾向がみられた (Fig.2A)。さらに、運動群間で比較すると、コントロール群と比較して、ショ糖群および蜂蜜群で高値を示した (Fig.2A)。これは肝臓における GSH 量の結果と同じ傾向であり、脳においても、ショ糖および蜂蜜の摂取が GSH 量の保持に働いたことが明らかとなった。さらに、脳においては、運動群におけるショ糖群および蜂蜜群で、GSSG 量の減少がみられた (Fig.2B)。このことは、GSH の GSSG への酸化が抑制されたことを一因として考える。コントロール（運動）群ではエネルギーを摂取していないため、ショ糖群や蜂蜜群と比較して、運動により発生した酸化ストレスに加え、脳において、酸化ストレスが増加していた可能性がある<sup>19)</sup>。GSSG 量の減少に伴い、ショ糖（運動）群および蜂蜜（運動）群で、GSH/GSSG 比がより高値を示した (Fig.2C)。よって、脳においても、ショ糖群や蜂蜜群においてグルタチオンのレドックス状態が還元優位になったことがわかった。肺における GSH 量も肝臓や脳での結果と同様に、運動群においてコントロール群と比較して、ショ糖群または蜂蜜群で高値を示す傾向がみられた (Fig.2A)。基本的に、GSH の細胞外への放出は不可逆的であるため<sup>20)</sup>、肝臓から放出された GSH は、全身の組織に運ばれると、細胞膜上に存在する  $\gamma$ -GTP によってアミノ酸に分解された後に細胞膜を通過し、再び GSH 合成系に入る。よって、脳や肺など肝臓以外の組織での GSH 量の増加の要因としては、肝臓での GSH 合成の促進、肝臓から血流中への GSH 放出の促進により他の組織へ運搬される GSH 量の増加、またはその組織における GSH の消費の抑制を考える。肝臓での GSH 量が高く保持されたことにより、脳や肺などの組織に運ばれた GSH 量が増加した可能性を推察する。一方で、グルタチオンの代謝回転の低い筋肉では GSH 量、GSSG 量および GSH/GSSG 比には、各実験群間に差はなかった (Fig.2A,B,C)。

次に、肝臓における GCL サブユニットの mRNA 発現の測定結果 (Fig.3) についてである。GCL のサブユニットである GCL-C および GCL-M は、別々の遺伝子にコードされており、それぞれに発現が調節される。それぞれの mRNA 発現が種々の酸化ストレス等により誘導されることが報告されており<sup>6,7)</sup>、GCL-C のみが酸化ストレスにより影響を受けたとの報告もある<sup>7)</sup>。よって、運動により生じる酸化ストレスによって、GCL mRNA 発現が亢進するとの考え方もできるが、実際のところは、激しいエネルギー消耗性の運動で GCL の両サブユニットの mRNA 発現が減少することを確認している<sup>21)</sup>。このことも、消耗性の運動直後に、肝臓における GSH 量が減少する一因

となっていると考える。運動群におけるショ糖群および蜂蜜群において、肝臓中の GSH 量が高値を示したのは (Fig.2A), 合成系が亢進しているためとの仮説を立てた。しかし、有意な差ではないが、GCL-C および GCL-M の両方ともその mRNA 発現は、ショ糖 (運動) 群および蜂蜜 (運動) 群で低下していた (Fig.3)。よって、結果的には、ショ糖や蜂蜜の摂取は、運動時に肝臓の GSH 量を高値に保つが、運動による GCL mRNA 発現の減少を抑制しないことが示された。

次に、脂質過酸化の総合的指標となる TBARS の結果 (Fig.4) についてである。TBARS 値が高値を示すほど脂質過酸化物質が多いことをあらわす。これまでに、激しい運動により活性酸素の発生が増大し、TBARS 値が上昇したことが報告されている<sup>15-22)</sup>。しかし、本研究で採用した運動負荷方法と実験方法の組み合わせでは、運動による TBARS 値の上昇は観察されなかった (Fig.4)。肝臓の TBARS 値は、運動群におけるショ糖群および蜂蜜群でコントロール群と比べて低下していた (Fig.4)。これは肝臓中 GSH 量が増加し GSH/GSSG 比が上昇していたことから (Fig.2A,C), ショ糖または蜂蜜の摂取によりレドックス状態が還元型であったことを一因として推察する。グルタチオンは水溶性の抗酸化物質であるため、他の脂溶性の抗酸化物質の還元を介して、間接的に脂質過酸化の抑制に影響したと考える。しかし、GSH は、グルタチオンペルオキシダーゼやグルタチオン-S-トランスフェラーゼの基質であり、これらの酵素は脂質ヒドロペルオキシドを還元するため<sup>23)</sup>、脂質過酸化を抑制しただけでなく、GSH 量の増加により脂質過酸化物質の還元が亢進した可能性も考える。しかし、脳、肺、筋肉においては各実験群間に差はなかった。よって、今回の実験系において、脳では、グルタチオンのレドックス状態と TBARS 値には関連性がみられなかったと考える。

本研究ではショ糖および蜂蜜の投与は強制投与ではなく、その水溶液の自由摂取という方法を採用し、結果として摂取量が異なり、ショ糖群のほうが蜂蜜群より多く摂取していた。両者の成分の違いだけでなく、このことも結果に影響を与えたと考えるが、肝臓および脳における GSH 量の結果は、ショ糖群および蜂蜜群でそれぞれほぼ同様の傾向であった。蜂蜜は抗酸化性を有することが報告されているため<sup>11)</sup>、運動時の生体酸化の抑制により効果的であると期待したが、今回採用した実験条件では、そのような結果は得られなかった。よって、蜂蜜は、その抗酸化性よりも、エネルギー源となり血糖を維持したことが、運動時における一部の器官のグルタチオン量を還元型の状態で保持することに影響していることがわかった。さらに、その際に GSSG を増加させないため、グルタチオンレドックス状態を還元型に保つことができ、生体内の抗酸化力の強化に寄与できると考える。しかし、蜂蜜は、ショ糖に比べて摂取量が少なかったにもかかわらず、

血中グルコース濃度をより高値に保ったことから、持久力維持の観点から運動時に補給するエネルギー源として優れていると考える。

空腹状態では、肝臓中の GSH 保持量が減少し、その状態での消耗性の運動は、グルタチオン系を中心とした生体抗酸化メカニズムにおいて、不利益をもたらすと考える。血糖値が低下した状態での一度に多量の糖分の摂取は、インスリン分泌を増大させ、結果として低血糖を招く危険性があるため、この点においては十分に注意が必要であるが、運動時のショ糖や蜂蜜などの糖分の摂取は、生体内の器官における GSH 量を維持する効果があることが示唆された。

ここで、高い持久力を要する運動において、カーボローディングによる持久力維持効果が知られている。一方で、GSH 合成阻害剤である Buthionine sulfoximine 投与によって生体内 GSH 量を欠乏させた動物においては、運動持続時間の短縮がみられたとの報告があり<sup>24)</sup>、GSH の持久力維持への関与が示唆される。これは、GSH が運動時の酸化ストレスの低減に関与しているためと考えるが、カーボローディングによるグリコーゲンの蓄積量増加が血糖の維持に作用し、GSH 量を高値に保つと推測するため、本研究結果は、生体酸化の抑制の面からもカーボローディングの必要性を支持するものと考えられる。

以上のことより、激しい有酸素運動時には、持久力維持のためだけでなく、酸化ストレスの抑制のためにも、ショ糖や蜂蜜などのエネルギー源となるものを摂取することが望ましいと考える。さらに、高齢期では、生体の抗酸化能力が減退すると考えられるため、有酸素運動の際には生体酸化の防止のために、より注意を払うべきであり、このような場合においては、運動時における糖分摂取が生体酸化のリスクの低減に役立つと期待する。

## 謝 辞

本研究は、山田養蜂場 みつばち研究助成基金の援助を受けて実施した。

## 引用文献

- 1) Sen CK: Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med*, **31**, 891-908, 2001
- 2) Sachdev S, Davies KJ: Production, detection, and adaptive responses to free radicals in exercise. *Free Radic Biol Med*, **44**, 215-223, 2008
- 3) Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, Fehrenbach E: Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects. *Exerc Immunol Rev*, **5**, 22-56, 1999
- 4) Alessio HM: Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc*, **25**, 218-224, 1993
- 5) Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND:

- Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr*, **134**, 489-492, 2004
- 6) Lu SC: Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J*, **13**, 1169-1183, 1999
  - 7) Lu SC: Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med*, **30**, 42-59, 2009
  - 8) Lu SC, Kuhlenkamp J, Garcia-Ruiz C, Kaplowitz N: Hormone-mediated down-regulation of hepatic glutathione synthesis in the rat. *J Clin Invest*, **88**, 260-269, 1991
  - 9) Lu SC, Garcia-Ruiz C, Kuhlenkamp J, Ookhtens M, Salas-Prato M, Kaplowitz N: Hormonal regulation of glutathione efflux. *J Biol Chem*, **265**, 16088-16095, 1990
  - 10) Leeuwenburgh C, Ji LL: Alteration of glutathione and antioxidant status with exercise in unfed and refed rats. *J Nutr*, **126**, 1833-1843, 1996
  - 11) Hegazi AG, Abd El-Hady FK: Influence of Honey on the Suppression of Human Low Density Lipoprotein (LDL) Peroxidation (In vitro). *Evid Based Complement Alternat Med*, **6**, 113-121, 2009
  - 12) Imamura T, Bando N, Yamanishi R: Beta-carotene modulates the immunological function of RAW264, a murine macrophage cell line, by enhancing the level of intracellular glutathione. *Biosci Biotechnol Biochem*, **70**, 2112-2120, 2006
  - 13) Fariss MW, Reed DJ: High-performance liquid chromatography of thiols and disulfides: dinitrophenol derivatives. *Methods Enzymol*, **143**, 101-109, 1987
  - 14) Mihara M, Uchiyama M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, **86**, 271-278, 1978
  - 15) Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione and glutathione ethyl ester supplementation of mice alter glutathione homeostasis during exercise. *J Nutr*, **128**, 2420-2426, 1998
  - 16) Leeuwenburgh C, Ji LL: Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys*, **316**, 941-949, 1995
  - 17) Pyke S, Lew H, Quintanilha A: Severe depletion in liver glutathione during physical exercise. *Biochem Biophys Res Commun*, **139**, 926-931, 1986
  - 18) Lew H, Pyke S, Quintanilha A: Changes in the glutathione status of plasma, liver and muscle following exhaustive exercise in rats. *FEBS Lett*, **185**, 262-266, 1985
  - 19) Santos RX, Cardoso S, Silva S, Correia S, Carvalho C, Crisóstomo J, Rodrigues L, Amaral C, Louro T, Matafome P, Santos MS, Proença T, Duarte AI, Seiça R, Moreira PI: Food deprivation promotes oxidative imbalance in rat brain. *J Food Sci*, **74**, H8-H14, 2009
  - 20) 坂内四郎, 立石紀子: 動物細胞のグルタチオン維持機構. 蛋白質 核酸 酵素, **33**, 1442-1449, 1988
  - 21) 今村友美, 越智沙織, 伊藤幸, 張菜菜, 土井千春, 野口紗代, 平野楨依子, 山本久美, 堀江登: マウスにおける運動が生体内グルタチオン動態に及ぼす急性的影響について. 健康・体力・栄養, **14**, 1-8, 2009
  - 22) Souza-Rabbo MP, Araújo AS, Fernandes TR, Oliveira AR, Belló-Klein A, Kaur K, Singal PK: Influence of exercise training frequency on cardiac and hepatic oxidative stress in rats. *Exp Clin Cardiol*, **8**, 201-205, 2003
  - 23) Marí M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC: Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxid Redox Signal*, **11**, 2685-2700, 2009
  - 24) Sen CK, Atalay M, Hänninen O: Exercise-induced oxidative stress: glutathione supplementation and deficiency. *J Appl Physiol*, **77**, 2177-2187, 1994