

原 著

健常高齢者における抗酸化食品（ピーマン）による 酸化ストレスの改善の効果

網 中 雅 仁¹⁾ 近 藤 雅 雄²⁾ 饗 場 直 美²⁾
 田 口 浩 子²⁾ 大 田 麗²⁾ 栗 原 典 子²⁾
 柘 植 光 代²⁾ 岡 純³⁾ 梶 本 雅 俊⁴⁾
 池 田 真 紀⁵⁾ 山 内 博⁵⁾ 高 田 礼 子¹⁾
 吉 田 勝 美¹⁾

- 1) 聖マリアンナ医科大学医学部予防医学教室
- 2) 独立行政法人国立健康・栄養研究所栄養疫学プログラム
- 3) 東京家政大学家政学部栄養学科
- 4) 相模女子大学学芸学部食物学科
- 5) 北里大学医療衛生学部公衆衛生学教室

Effect of improvement of oxidative stress in health elderly subjects by antioxidation food: Green pepper.

Masahito Aminaka¹⁾ Masao Kondo²⁾ Naomi Aiba²⁾
 Hiroko Taguchi²⁾ Urara Ohta²⁾ Noriko Kurihara²⁾
 Mitsuyo Takushoku²⁾ Jun Oka³⁾ Masatoshi Kajimoto⁴⁾
 Maki Ikeda⁵⁾ Hiroshi Yamauchi⁵⁾ Ayako Takata¹⁾
 Katsumi Yoshida¹⁾

- 1) Department of Preventive Medicine, St.Marianna University School of Medicine
- 2) Nutritional Epidemiology Program, National Institute of Health and Nutrition
- 3) Faculty of Home Economics, Tokyo Kasei University
- 4) Faculty of Arts and Sciences, Sagami Women's University
- 5) Department of Public Health, School of Allied Health Science, Kitasato University

要約

抗酸化食品であるピーマンを用いての酸化ストレスの改善に関して、高齢健常者において介入実験を実施した。対象者は高齢健常者17名（平均年齢68.9±4.65歳、男性9名、女性8名）で、被検者はピーマ

受付：平成18年12月27日 採用：平成19年1月26日

別刷請求宛先：網中雅仁

〒216-8511 川崎市宮前区菅生2-16-1 聖マリアンナ医科大学予防医学教室

Received: December 27, 2006 Accepted: January 26, 2007

Reprint Requests to Masahito Aminaka, Department of Preventive Medicine, St Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Miyamae-Ku, Kawasaki 216-8511 Japan

ンを一日に約100 g (4個) を2週間継続的に摂取した。その結果、ピーマンの摂取後においては、酸化了的DNA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-OHdG) は統計学的に有意な低下傾向を示した (t-test, $p < 0.05$)。グルタチオンペルオキシダーゼ活性、血球中過酸化脂質、スーパーオキシドジスムターゼ活性、カタラーゼ活性なども減少傾向を示した。また、尿中ポルフィリンは酸化了的ストレスの改善指標に応用が期待された。本研究から、抗酸化食品であるピーマンの積極的な摂取は、尿中8-OHdGを用いた評価から、酸化了的ストレスの改善に効果が認められた。身近な抗酸化食品であるピーマンの持続的な摂取は、高齢健常者の病気の予防、そして、QOL向上などへの効果が期待された。

(臨床環境15:124~130, 2006)

《キーワード》酸化了的ストレス、8-OHdG、ルテオリン、ピーマン、高齢健常者

Abstract

In this study we investigated the influence of changes in eating habits on oxidative stress. This was achieved by carrying out an intervention experiment that involved changing the intake of anti-oxidative foods in normal healthy subjects. We studied 17 healthy, elderly subjects (mean age 68.9 ± 4.65 years old; 9 men, 8 women) who ate approximately 100 g of green peppers per day in their diet over a fortnight. As a result of this change in diet, we observed characteristic trends in the levels of glutathione peroxidase and lipoperoxide activity in blood cells and decreased levels of glutathione peroxidase activity in serum. Endoglobular superoxide dismutase, urinary 8-hydroxy deoxyguanosine and porphyrin levels were also decreased. Active intake of anti-oxidative foods improved the oxidative stress response in vivo and increased the immune response. Our study indicates that an increased intake of the foods rich in antioxidants contributes to an improvement in oxidative stress and appears to reinforce immune activity. These results suggest that alimentary therapy has promise in preventive medical care as it may have the potential to improve quality of life (QOL) in both elderly and healthy people.

(Jpn J Clin Ecol 15:124~130, 2006)

《Key words》oxidative stress, 8-OHdG, luteolin, green pepper, health elderly subjects

I. 緒言

酸化了的ストレスは発癌、炎症、動脈硬化、糖尿病、肥満など多くの疾患と関連し、免疫機能の低下も示唆されている¹⁾。高齢者は成人健常者に比較して生理的機能や栄養摂取量など様々な要因により生命維持機能が減少する²⁾。我が国では高齢化が進み、高齢者に対する健康寿命の延伸や疾病予防、生活の質 (QOL) 向上のための生活習慣改善も必然的に必要な時代となり、そのなかで QOL の向上には酸化了的ストレスの抑制は DNA 損傷や免疫機能に関連することから重要と考えられている。高齢健常者が経済的かつ肉体的な負担をせずに QOL を向上させる手段として、抗酸化食品を利用した食生活の改善が論じられている^{3~5)}。しかし、抗酸化食品の摂取と酸化了的スト

レスの抑制効果に関して⁶⁾、未だ十分な科学的根拠が集積されている状況にはなく、今後の重要な研究課題と考えられている。

最近、抗酸化作用を有するピーマンが注目され、その作用効果はルテオリンによることが示唆されている⁵⁾。他方、酸化了的 DNA 損傷の有効な指標として8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) が多くの研究分野で注目されている^{7,8)}。著者ら^{8,9)} は日本人成人健常者における尿中8-OHdG濃度を年齢、性差別に求めた結果、尿中8-OHdG濃度は年齢や性差の影響を強く受けないことを明らかにした。さらに、生活習慣と尿中8-OHdG濃度の関係を解析した結果、発ガン性金属元素との間に高い相関関係を認めている⁹⁾。

本研究は高齢健常者の生活習慣改善に関する基

礎的資料の獲得を目的に、酸化ストレスの抑制効果が期待されるルテオリンの高含有食品であるピーマンの持続的摂取による効果を検証した。

II. 対象と方法

1. 被検者及び介入実験の方法

被検者は健康な高齢者17名（男性9名、女性8名、平均年齢 68.9 ± 4.65 歳）であった。被検者は介入実験の実施にあたって予備期間を1週間とし、日々における緑黄色野菜の摂取状況を調査した。また、介入実験の実施期間は2週間に設定して、毎日調理方法を変えたピーマン約100g（4個）を昼食時に宅配弁当として配膳した。なお、実験期間の中間日は日曜であったために、当日の昼食は自由摂取であった。

2. インフォームドコンセントについて

被検者には実験への参加及び研究試料の採取前に国立健康・栄養研究所の倫理規定に基づく承認により、ヘルシキ宣言に則った研究の趣旨、測定項目について説明し、同意を得た上で本研究をおこなった。

3. 試料の採取方法

対象者からは、ピーマン摂取前後に尿及び血液を採取した。血液は採取後に血球と血清に分離した。試料は遮光して凍結状態のまま輸送し、測定まで -80°C にて保存した。

4. 測定方法

尿中8-ヒドロキシデオキシグアノシン（8-OHdG）濃度の測定には、尿中8-OHdG測定キット（日本老化制御研究所、袋井）を使用し、ELISA法によって求めた¹⁰⁾。尿試料を遠心分離器により1000回転で5分間の遠心分離を行い、上清 $50\mu\text{l}$ を採取した。吸光度測定にはマイクロプレートリーダー（TECAN Spectra3, Austria）を使用した。

尿中ポルフィリン濃度の測定には、HPLC-蛍光検出法を用いた¹¹⁾。分析装置にはJAS.CO GULLIVER SERIES（日本分光、東京）を使用した。分析条件として逆相分配カラム（Finepak C18-5 4.6mmI.D.X150mm、日本分光、東京）を使用した。カラム温度 40°C 、流量は $1\text{ml}/\text{min}$.

に設定した。試薬は特級およびクロマトグラフィー用特級（和光純薬、大阪）を使用した。

試料は、0.08%ヨウ素含有酢酸を等量加えて混和し、試料中に含まれるポルフィリノーゲンを酸化させた。その後、1000回転で10分間の遠心分離を行い、上清をHPLC測定試料とした。

化学形態別に測定した尿中ポルフィリンは uroporphyrin(Uro)、heptacarboxylate porphyrin(Hepta)、hexacarboxylate porphyrin(Hexa)、pentacarboxylate porphyrin(Penta)、coproporphyrin I (4-carboxylate porphyrin I isomer; CP I)、coproporphyrin III (4-carboxylate porphyrin III isomer; CP III)などで、標準試料にPorphyrin marker Kit (Porphyrin Products, USA)を使用した。

尿中8-OHdGおよびポルフィリン濃度は、尿中クレアチニン（cr.）濃度でそれぞれ補正した。尿中クレアチニン濃度の測定は、クレアチニンテストワコー（和光純薬、大阪）を用いた。

血清中および血球中の過酸化脂質（TBARS）値は八木蛍光法¹²⁾によって求めた。グルタチオンペルオキシダーゼ（GSH-Px）活性、スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）活性およびカタラーゼ（CAT）活性については各測定キットを用いた（和光純薬、大阪）。

測定結果の解析には、Stat-View for Windows Ver.5.0を使用し統計学的処理を行った。

III. 結果

被検者17名のピーマン2週間連続摂取前後における尿中8-OHdGの平均濃度は、摂取前が $14.2 \pm 5.61\text{ ng}/\text{mg cr.}$ 、摂取後が $12.2 \pm 6.08\text{ ng}/\text{mg cr.}$ で13.9%の減少、両者間には統計学的な有意差

表1 被検者17名のピーマン摂取前後における尿中8-OHdG濃度の変化

	尿中8-OHdG濃度 ng/mgクレアチニン
摂取前	14.2 ± 5.61
摂取後	$12.2 \pm 6.08^*$

平均値±標準偏差
*, $p < 0.05$

が認められた(表1; t-test, $p < 0.05$)。17名の被検者をここに比較した場合(図1)、10名において明確な減少(平均27.3%)が観察され、1名に変化がなかった。これに対して、6名の値にはやや上昇傾向(平均10.7%)が認められた。

表2には、被検者17名のピーマン2週間連続摂取前後における4種類の血清と血球中抗酸化指標値を示した。このうち、血清と血球中GSH-Px濃度は摂取前に比較して摂取後の値は明確な減少傾向

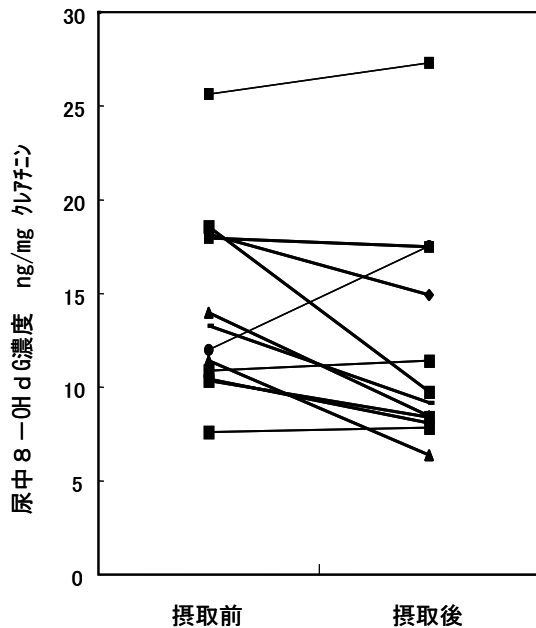


図1 被検者17名における個々人のピーマン摂取前後における尿中8-OHdG濃度の変化

向が示され、統計学的な有意差が認められた(t-test, $p < 0.05$, $p < 0.01$)。さらに、血球中のTBARSとSOD濃度には減少傾向が示された。

表3には被検者17名における摂取前後の6種類の尿中ポルフィリン濃度を比較して示した。6種類の尿中ポルフィリン濃度は全て摂取後の値が減少傾向にあったが、Hepata以外は統計学的な有意差は認められなかった。次に、尿中CP1/CP3比についてみると、摂取後の値に減少が認められた。

表4には被検者17名のピーマン2週間連続摂取前後における尿中8-OHdGと尿中ポルフィリン濃度との間の相関関係を示した。両者間には統計学的に有意な負の相関関係が成り立っていた。なお、尿中8-OHdGと尿中CP1/CP3比の間には相関関係は認められなかった。

IV. 考察

本研究では抗酸化食材としてピーマンを用いた。ピーマンはシソ科植物であり、抗酸化物質であるルテオリンを多く含んでいる。ルテオリンはセリ、セロリ、レタス、春菊、ピーマンに有まれるなど、含有する植物に特異性がある。その代表的な野菜がピーマンである。ピーマンのルテオリン含有量は、季節変動を考慮しても他の野菜より高いことも明らかになっている^{13,14}。したがって被検者に対するルテオリン摂取状況の調整が容易であり、各人の摂取量をほぼ同程度に均等化することができるため、食事による介入実験には適した食品で

表2 被検者17名のピーマン摂取前後における抗酸化指標の変化

項目	摂取前	摂取後
血清		
TBARS (nmol/ml)	0.30 ± 0.01	0.34 ± 0.01
GSH-Px (U/mg-TP)	3.88 ± 0.96	3.13 ± 0.01*
血球		
TBARS (nmol/ml)	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.02*
GSH-Px (U/mg-TP)	68.2 ± 15.1	52.3 ± 20.6**
SOD (IU/MDA ml)	5.50 ± 1.03	5.16 ± 0.94
CAT (U/ml)	348 ± 55.4	363 ± 38.6

平均値±標準偏差 t-test, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$

表3 被検者17名のピーマン摂取前後における尿中ポルフィリン濃度と化学形態比の変化

化学形態	尿中ポルフィリン濃度 mg/g クレアチニン	
	摂取前	摂取後
Uro	25.8 ± 11.6	20.5 ± 8.98
Hepta	4.54 ± 1.88	3.36 ± 1.40*
Hexa	0.82 ± 0.58	0.63 ± 0.40
Penta	1.11 ± 0.65	1.10 ± 0.78
CP I	21.3 ± 11.2	18.7 ± 6.68
CP III	50.3 ± 25.7	47.0 ± 22.9
化学形態の比		
CP I / CP III	0.53 ± 0.38	0.45 ± 0.17

平均値±標準偏差 Uro；ウロポルフィリン Hepta；ヘプタポルフィリン
Hexa；ヘキサポルフィリン Penta；ペンタポルフィリン
CP I；コプロポルフィリン I CP III；コプロポルフィリン III t-test、*、P<0.05

表4 被検者17名の尿中8-OHdG とポルフィリン濃度における相関関係

8-OHdG	Uro	Hepta	Hexa	Penta	CP I	CP III	Total-Por
摂取前	-0.392	-0.506*	-0.645**	-0.593**	-0.522*	-0.800***	-0.815***
摂取後	-0.646*	-0.743***	-0.539*	-0.426	-0.642**	-0.763***	-0.818***

Uro；ウロポルフィリン Hepta；ヘプタポルフィリン Hexa；ヘキサポルフィリン Penta；ペンタポルフィリン
CP I；コプロポルフィリン I CP III；コプロポルフィリン III
Total Por；Uro+Hepta+Hexa+Penta+CP I +CP III
t-test、*、p<0.05；**、p<0.01；***、p<0.001

あったと考える。

本研究により、ピーマンの継続的かつ積極的な摂取により、酸化 DNA 損傷の指標である 8-OHdG 濃度の減少傾向を認めた。また、他の生体内酸化ストレス指標である血球中 TBARS 濃度の有意な低下も確認された。さらに抗酸化酵素である GSH-Px 活性は有意に低下し、SOD 活性も低下傾向を示した。このような体内酸化物および抗酸化酵素活性の低下は生体内での酸化ストレス抑制による結果であることが示唆され、抗酸化食材であるピーマンの摂取による影響であることを示唆していた。また、本研究に平行して被検者の酸化ストレスと免疫機能の関係を検討した結果、介入実験前後の CD4 サブセットの比較では、Th1：IFN- γ + / IL4-、Th2：IFN- γ + / IL4+ 及びリンパ球幼若化能 (Con-A) に有意な上昇傾向、そして、Th0：IFN- γ + / IL4- に有意な低下を確認し、ピーマン摂取によって免疫機

能の改善することも報告されている⁵⁾。一方、8-OHdG と Por との関係について検討した結果、有意な負の相関が認められた (表4)。Por 代謝は P450 の生成やホメオスタシスの維持に関与することが知られている¹⁵⁾。我々は加齢に伴い Por 代謝や排泄の研究結果が低下していくことも明らかにしている¹⁶⁾。介入実験前において被検者はヘム代謝の抑制傾向にあったと推測できるが、抗酸化食品摂取による改善を 8-OHdG と Por の相関から解明するには至らなかった。しかし、介入実験後の CP I / CP III 比は介入実験前に比較して低下傾向を示していた (表3)。我々は、これまでに生体内における酸化ストレスの亢進が CP I / CP III 比を上昇させることを確認しており¹⁶⁾、CP I 生成には酸化ストレスが深く関与しているものと推察している。本介入実験の結果からも有意差は示されず、すなわち酸化ストレス抑制と CP I / CP III 比の低下傾向という関連性

を証明する結果を補充したと考えている。

また、本研究と平行して対象者に対するピーマン摂取と緑黄色野菜の充足確率（日本人の食事摂取基準から比較した個々の栄養成分摂取量が充足する可能性を確率；＝真理値表密度）も調査された。すなわち、高齢者では緑黄色野菜の摂取量が低いことが問題となっているが、今回の対象者においても介入実験前の緑黄色野菜の充足確率が介入実験前で20-60%と低値であった。しかし今回の介入実験によって介入期間中の充足確率は、ほぼ100%以上を維持し、さらに配食の無かった休日においても介入前に比べて緑黄色野菜の摂取量が自発的に増量されていた⁵⁾。このような高齢者に対する積極的な介入実験は自発的な食生活にも影響をもたらすことが推察できた。また、ピーマン摂取による他の栄養素の摂取充足確率においても、ビタミンB₁が105.3%、B₂が104.8%、Aが174.8%、Cが203.8%に上昇し、特に抗酸化作用が証明されているビタミンA及びCの改善は著しい状況であった⁴⁾。

近年、ルテオリンは炎症性サイトカイン産生を抑制し、 α -グルコシダーゼ活性阻害、 α -リポキシゲナーゼ活性阻害、コレステロール酸化抑制作用を有し、抗酸化作用や抗アレルギー作用、抗がん作用、免疫力の向上作用などが報告され、また、*in vitro*による酸化的ストレス防御及びX線照射によるネクロシスやアポトーシスなどの細胞死を抑制する効果が他の抗酸化物質に比較して強いことが報告されている^{3,4,6)}。これらのことから、ルテオリンは病気を未然に防ぐ予防医学への応用や治療としての効果も期待される。さらに、ピーマンのような抗酸化食材を積極的に摂取することは、生体の免疫機能向上に寄与し、免疫能との関係が憂慮される化学物質過敏症患者の発症予防や予後の症状改善にも効果が期待できると考える。

文献

- 1) 河井一明、葛西宏：DNA 損傷と変異のメカニズム：酸化的ストレスによる8-OH-dGの生成と修復酵素の応答. 環境変異原研究26：143-148、2004
- 2) 熊谷俊一、林伸英、他：老年症候群・老年症候検査・免疫機能. 総合臨床52：2209-2217、2003
- 3) 近藤雅雄、饗場直美、他：高齢者の食生活と免疫強化. アンチ・エイジング医学-日本抗加齢医学会雑誌2：337-342、2006
- 4) 饗場直美、近藤雅雄、他：日本型食生活の生体調節機能効果の解明、高齢者のQOL向上のために免疫能の健全性を保持する日本型食生活の解析. 農林水産省研究助成報告書、2005
- 5) 本部比呂絵、酒元誠治、他：在宅高齢者の栄養状態と免疫能に及ぼす配食サービスの効果. 栄養学雑誌62：19-23、2004
- 6) Hiroshi Kasai, Susumu Nishimura: DNA damage induced by asbestos in the presence of hydrogen peroxide. Gann 75: 841-844, 1984
- 7) Hiroshi Kasai, Naoko Iwamoto-Tanaka, et al: Life style and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage: Effects of exercise, working conditions, meat intake, body mass index, and smoking. Jpn J Cancer Res 92: 9-15, 2001
- 8) Hiroshi Yamauchi, Masahito Aminaka, et al: Evaluation of DNA damage in patients with arsenic poisoning: urinary 8-hydroxydeoxyguanine. Toxicol Appl Pharmacol 198: 291-296, 2004
- 9) Shingo Kimura, Hiroshi Yamauchi, et al: Evaluation of urinary 8-hydroxydeoxyguanine in health Japanese people. Basic Clinical Pharmacol Toxicol 98: 496-502, 2006
- 10) Higeru Saito, Hiroshi Yamauchi, et al: Quantitative determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanine (8-OHdG) by using ELISA. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 107: 39-44, 2000
- 11) 網中雅仁、山内博、他：日本人健常者の尿中

- ポルフィリン濃度に関する研究. 臨床環境医学11: 29-35、2002
- 12) 八木国夫: Thiobarbituric acid 蛍光法による血漿または血清中の過酸化資質の微量定量法. ビタミン 49: 403-405、1975
- 13) 井奥加奈、高田陽子、他: ピーマンを主とした市販野菜類のフラボノイド含有量における季節変動. 日本食品科学工学会誌 52: 190-195、2005
- 14) Kimura M, Arai Y, et al: Japanese intake of flavonoids and isoflavonoids from foods. J Epidemiol 8: 168-175, 1998
- 15) 近藤雅雄: ヘム生合成関連物質の測定意義. ポルフィリン12: 73-88、2003
- 16) 網中雅仁、山内博、他: 尿中ポルフィリンを用いた無機ヒ素曝露の生物学的指標に関する研究. 臨床環境医学15: 41-49、2006