



野菜抽出酵素液を用いた短期間のファスティングがDNA酸化損傷に与える影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-07-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 神林, 勲, 日下部, 未来, 福土, 宗光, 橋本, 重子, 武田, 秀勝 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.32150/00009370

野菜抽出酵素液を用いた短期間のファスティングが DNA酸化損傷に与える影響

神林 勲
(北海道教育大学岩見沢校)

日下部 未来
(北海道教育大学大学院)

福士 宗光
(ケルプ研究所)

橋本 重子
(札幌医科大学保健医療学部研究生)

武田 秀勝
(札幌医科大学保健医療学部)

Effect of short-term fasting with fermented vegetables extract on oxidative DNA damage in a healthy man

Isao KAMBAYASHI, Miku KUSAKABE, Munemitsu FUKUSHI
Shigeko HASHIMOTO and Hidekatsu TAKEDA

1. はじめに

DNAを構成する塩基の1つであるグアニンは、活性酸素種の1つであるヒドロキシラジカル(Hydroxyl radical: $\cdot\text{OH}$)によって酸化修飾を受け、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-hydroxydeoxyguanosine: 8-OHdG)となる。8-OHdGは多くの修復酵素によってDNAから切り出され、血中を経て、尿中へ排出される。このことから、尿中の8-OHdG排泄量はDNA酸化損傷の指標として用いられ、ガンとの関係¹⁷⁾、運動^{9,10)}、老化^{7,14,19)}、喫煙^{16,18)}、茶⁶⁾やアルコール摂取²⁴⁾、ストレス^{2,12,20)}などの影響が検討されるようになってきた。

近年、短期間のファスティング(断食)が体重の減少のみならず、体調の維持・管理に有効であるとして注目されている。ケルプ研究所も健康の維持・増進を目的に、野菜抽出酵素液を用いた短期間のファスティングを推奨している。ファスティングには、体内の排泄作用を向上させたり、活性酸素種やフリーラジカルの生成を抑制したりする効果もあるとされている。いくつかの動物実験では、短期間の摂取カロリー制限によってDNAの酸化損傷が有意に低下したことが認められた^{3,4,5)}。

ケルプ研究所が製造・販売している野菜抽出酵素液(商品名F&E)は、57種類の野菜・果物を原材料に、糖の浸透圧を利用してエキスを抽出し、発酵させたものである。主な成分は表1に示した。この野菜抽出酵素液は、電子スピン共鳴装置(Electron Spin Resonance: ESR)を用いた我々のこれまでの測定により、*in vitro*において $\cdot\text{OH}$ に対して高い抗酸化作用のあることが認められている(平成18年度北海道体育学会研究大会で報告)。

表1 野菜抽出酵素液(F&E)の主な成分

水分	62.3g/100ml
タンパク質	0.1g/100ml
脂質	0.1g/100ml
炭水化物	59.0g/100ml
ナトリウム	27mg/100ml
カリウム	67mg/100ml
カルシウム	4mg/100ml
リン	2mg/100ml
鉄	0.1mg/100ml
マグネシウム	2mg/100ml
葉酸	18 μg /100g
ヨウ素	37ppm

(財)日本冷凍食品検査協会の試験結果より

そこで本研究では、野菜抽出酵素液のみを摂取した7日間のファスティングがDNA酸化損傷に与える影響を、尿中8-OHdG排泄量から事例的に検討を行った。また、生体内で活性酸素種の発生源であり、酸化ストレスの原因の1つ¹³⁾である好中球のスーパーオキシド生成能をファスティング前後で比較した。

2. 方法

1) 被検者

健常な成人男性1名(年齢42歳, 身長178.3 cm, 体重60.6 kg)であった。

2) 実験プロトコル

連続した44日間(平成17年7月11日から8月23日まで)を実験期間に設定した。そして、最初の23日間を日常生活期, 次の7日間をファスティング期, その後14日間を回復期とした。44日間の実験期間中, 生活習慣には大きな変化がないように留意させた。

被検者には, 実験期間中, 起床直後の早朝尿をすべて採取させ, その採取時刻を記録させた。採取された尿の量を計測後, 約5 mlをプラスチック製のチューブに移して密閉し, 分析まで-80℃で凍結保存した。なお, 被検者には就寝前に必ず排尿させ, その時刻を記録させた。また, 早朝尿の採尿後には衣服を着用していない状態で体重の計測を行わせた。

3) 尿中8-OHdG排泄量の分析

得られた尿サンプルは自然解凍され, 酵素免疫測定法(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA)による分析キット(日本老化制御研究所製)によって尿中8-OHdG濃度の分析に用いられた。分析法の詳細については先行研究⁹⁾に記載されている。

尿中8-OHdG排泄量の評価には, ELISA法で得られた濃度に尿量を乗じ, 蓄尿時間(就寝前の排泄時刻と起床後の採尿時刻から算出)で除した値(ng/h)を用いた。

4) 野菜抽出酵素液について

被検者はファスティング期において, 野菜抽

出酵素液を1日当たり400 ml(朝, 昼, 夕, 夜にそれぞれ100 ml)摂取した。野菜抽出酵素液のカロリーは100 ml当たり約250 kcalであることから, 被検者はファスティング期間中, 1日1000 kcalを摂取したことになる。なお, ファスティング期間中, 被検者には野菜抽出酵素液の摂取とともに, 水分を1日当たり1~1.5 l摂取するよう指示した。日常生活期と回復期には野菜抽出酵素液の摂取は行われなかった。

5) 好中球スーパーオキシド生成能の測定

5月から10月の各月とファスティング前(3日前)および直後(1日後)において採血を実施した。採血は午前9時から10時の間に実施し, ヘパリンコーティングしたシリンジを用いて肘静脈より25~30 ml採取した。

採取した血液は既報¹⁾に従い分離し, 好中球浮遊液を作成した。そして, 血球数を測定後, 刺激剤としてホルボルミリステートアセテート(Phorbol 12-Myristate 13-Acetate: PMA)を用いて二波長分光光度計によりシトクロムC還元法でスーパーオキシド生成能を測定した¹⁾。

6) データの分析

データは平均値と標準誤差で示した。各期の平均値の比較には一元配置の分散分析を用い, F値が有意な場合は適宜 Post-hoc 多重比較を行った。

3. 結果

1) 実験期間中の体重とBMIの変化(図1)

日常生活期の体重の平均値は 60.6 ± 0.1 kgであった。ファスティング期では体重は日々減少し, 7日目の体重は57.6 kgと日常生活期と比較しておよそ3 kg減少した。回復期に入ると体重は急激に回復したが, 平均体重は 59.4 ± 0.1 kgと日常生活期よりも約1 kg減少した。

2) 蓄尿時間(h)の推移(図2)

実験期間中の平均値は 7.12 ± 0.13 hであり, 実験期間中の蓄尿時間には大きな変化は認められなかった。

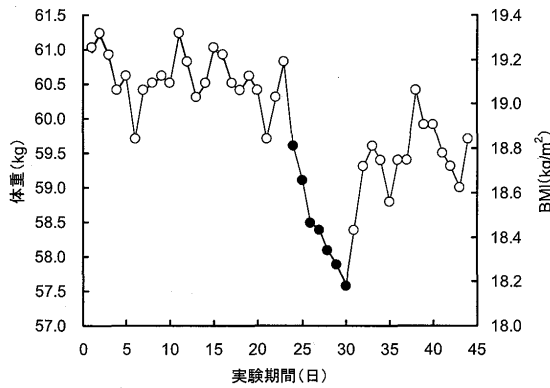


図1 実験期間中の体重とBMIの変化
黒丸はファスティング期間中の値。
以下、図中の黒丸は同様のことを示す。

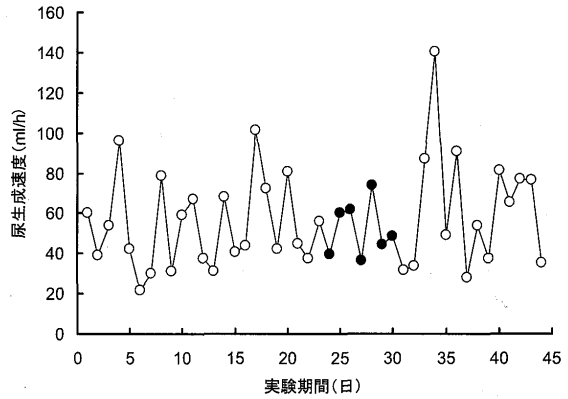


図3 実験期間中の尿生成速度の推移

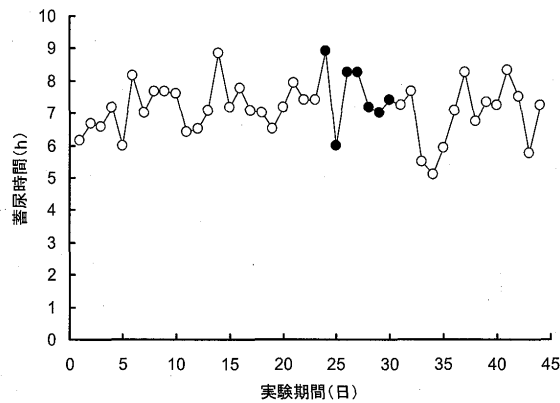


図2 実験期間中の蓄尿時間の推移

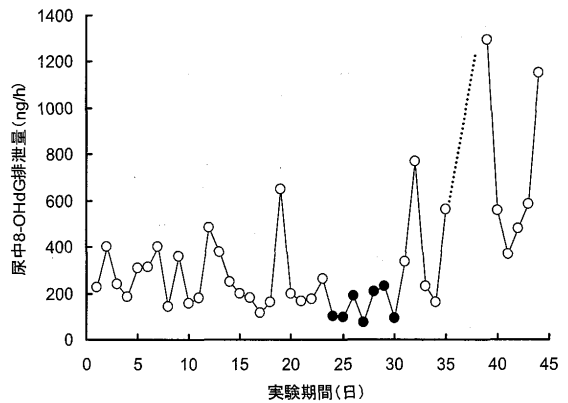


図4 実験期間中の尿中8-OHdG排泄量の変化

3) 尿生成速度 (ml/h) の変化 (図3)

尿生成速度とは、早朝尿の尿量 (ml) を蓄尿時間 (h) で除した値である。実験期間中の平均値は 56.6 ± 3.7 ml/hであり、周期的に変動する傾向を示した。ファスティング期間中は他の期間と比較し、やや低い傾向があるものの、周期的な変動は認められた。

4) 尿中8-OHdG 排泄量の変化 (図4)

日常生活期においては、おおよそ200から400 ng/hの間で推移していたが、ファスティング期では100から200 ng/hで推移した。一方、回復期では変動があるものの、値は大きく増加した。各期における尿中8-OHdG 排泄量の平均値の比較を行った (図5)。その結果、日常生活期 266.4 ± 27.0 ng/h、ファスティング期 141.7 ± 24.7 ng/h、回復期 590.3 ± 95.7 ng/hとなり、

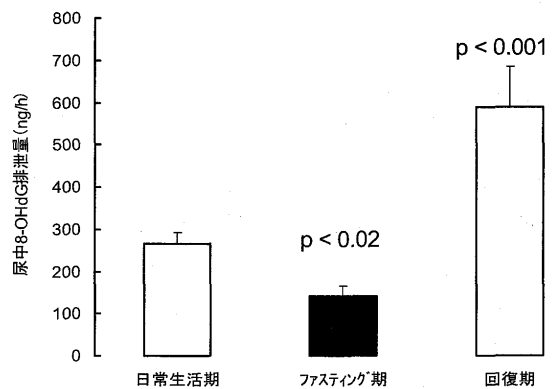


図5 各期間中の尿中8-OHdG排泄量の比較
有意差は日常生活期と比較した場合のもの。

ファスティング期と回復期はそれぞれ日常生活期よりも有意に低値 ($p < 0.02$) および高値 ($p < 0.001$) を示した。

5) 好中球スーパーオキシド生成能の変化

(図6)

5月から7月の値は約100 nmol/min/10⁷cells, ファスティング直前は112.7 nmol/min/10⁷cellsであった。しかしながら, ファスティング直後は58.5 nmol/min/10⁷cellsと半分程度まで減少した。以後3ヶ月は70~80 nmol/min/10⁷cellsで推移した。

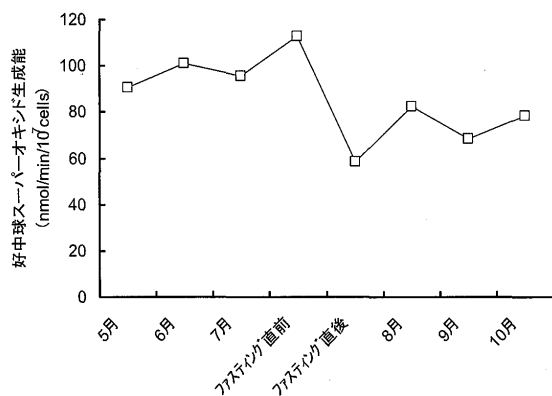


図6 ファスティング期前後の好中球スーパーオキシド生成能の推移。

4. 考察

野菜抽出酵素液を用いた7日間のファスティングにより, 尿中8-OHdG排泄量は日常生活時に比較して有意に低下した(図5)。この原因については, ファスティングによる生体内活性酸素種生成の抑制, 摂取した野菜抽出酵素液の高い抗酸化作用による影響と考えられる。

摂取カロリーの制限によって, 安静時の酸素摂取量が減少することが動物実験により報告されている²¹⁾。また, 摂取カロリー制限は, 代謝の減少をもたらす, フリーラジカルや活性酸素種の生成を低下させると言われている⁸⁾。本研究においても, 被検者は1日約1000 kcalの摂取であったことから, このような摂取状況が代謝の減少をもたらす, 活性酸素種の生成を減少させ, DNA酸化損傷が抑制されたと考えられる。Subudhi et al.²²⁾は, 大気中の酸素濃度が希薄な高地(4300 m)での実験ではあるが, 高地では摂取カロリーの低下により, 尿中8-OHdG排泄量が平地よりも有意に減少したこ

とを報告している。

好中球は体内に侵入した異物を非特異的に食胞し, 活性酸素種を生成してそれらを殺菌する。そのため, 好中球は生体防御機構の第1線を担うとされている。しかしながら, 望まない時や場所に活性酸素種が生成されると, それらは酸化ストレスの原因になってしまう。ラットの肺胞上皮細胞では, 好中球から生成された活性酸素種がDNA酸化損傷の原因となっていることが報告されている¹³⁾。これまでの我々の研究¹¹⁾では, 成人133名(18歳から79歳まで)の好中球スーパーオキシド生成能の値は, 79.5±28.5 nmol/min/10⁷cellsであることが認められている。被検者のファスティング前3ヶ月の値は約100 nmol/min/10⁷cellsと高値であり, 直前は112.7 nmol/min/10⁷cellsであった。しかしながら, ファスティング直後は58.5 nmol/min/10⁷cellsまで低下した。ファスティング中の経時変化は不明であるが, ファスティング中は生体に対する酸化ストレスをもたらす要因が減少したことを意味し, この減少もDNA酸化損傷の抑制につながったと推察される。好中球スーパーオキシド生成能は, その後3ヶ月は70~80 nmol/min/10⁷cellsと, ほぼ成人の平均値で推移した(図6)。ファスティングによりなぜ好中球スーパーオキシド生成能が低下し, それが3ヶ月も持続したのか, この低下が免疫機能に対してどのような影響があったのかは明らかではない。また, 野菜抽出酵素液の摂取による影響も考慮し, 今後より詳細な検討が必要である。

先行研究¹⁵⁾では, 女性52名を被検者に水以外は何も摂取しないファスティングを平均7.3日間(3~11日間)実施させたところ, その前後で尿中8-OHdG排泄量は変化しなかったことを報告している。本研究とは条件が異なるため単純に比較することは困難であるが, ファスティングのみでは日常生活時のDNA酸化損傷を低下させることはできないのかもしれない。本研究で被検者が摂取した野菜抽出酵素液は, それ自体に・OHに対してin vitroで高い抗酸化能があることが分かっている。図7は, ESRにおいてスピントラップ法を用いたシグナルを示している。シグナルAは, 緩衝液(0.2 mMの

DETAPAC を含む) 中で FeSO_4 (最終濃度 0.1 mM) と H_2O_2 (最終濃度 0.1 mM) を反応させて $\cdot\text{OH}$ を生成させ、ニトロン系トラップ剤である 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DEPO, 最終濃度 5 mM) で捕捉したものである (コントロール). この反応系にヒト血清を入れたものがシグナル B, 野菜抽出酵素液を入れたものがシグナル C である. ヒト血清や野菜抽出酵素液には $\cdot\text{OH}$ に対して消去能が存在するため, シグナル B と C はコントロールよりもシグナルが減少している. その減少はヒト血清ではコントロールの約 50% 度であるが, 野菜抽出酵素液ではほぼ 100% である. このように *in vitro* で $\cdot\text{OH}$ に対する高い抗酸化能を有している野菜抽出酵素液の摂取により, 生体内で生じた $\cdot\text{OH}$ も消去された可能性が考えられる. また, 野菜抽出酵素液を飼料に配合して与えられた養豚の肝臓では, 脂質過酸化が抑制される傾向にあることも認められており (未発表データ), 野菜抽出酵素液の摂取が体内の抗酸化能力を高め, DNA 酸化損傷を抑制した可能性が考えられる. 28名の健康な女性を被検者に, 野菜や果物の摂取を 2 週間に渡り増加 (約 2 倍) させた研究²²⁾において, リンパ球内や尿中の 8-OHdG レベルが摂取前に比較して摂取後に有意に低下したことが認められている. この報告は, 本研究の結果を支持するものと考えられる.

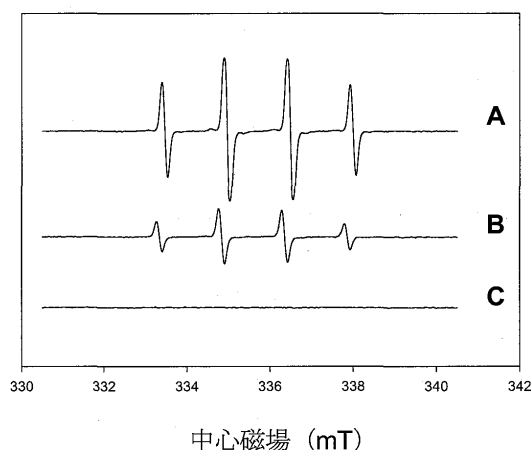


図7 電子スピン共鳴装置 (ESR) を用いてスピントラップ剤 (DEPO) で捕捉したヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) のシグナル
A: コントロール, B: ヒト血清を加えた場合, C: 野菜抽出酵素液を加えた場合.

野菜抽出酵素液を用いた 7 日間のファスティングにより, 被検者の体重は約 3 kg 減少した (図 1). 体脂肪率の測定を継続して行っていないものの, この減少は主に水分と脂肪量の減少によると推察される. 年齢と生活習慣から, 被検者の 1 日のエネルギー所要量は約 2500~2600 kcal と推定される. ファスティング期間中の 1 日の摂取カロリーは約 1000 kcal であったことから, 1 日あたり約 1500~1600 kcal, 7 日間では約 11000 kcal が不足していた計算になる. 脂質の有するエネルギー量は, 1 g 当たり 9.3 kcal であることから, 約 11000 kcal のエネルギー量は, 約 1200 g の脂肪量に相当する. 回復期の平均体重は, 59.4 ± 1.0 kg であり, ファスティング前の日常生活時の平均体重 60.6 ± 1.0 kg よりも 1.2 kg の減少であった. この値は, 推定された脂肪量の減少に相当する. このことから, 7 日間で減少した約 3 kg の体重は, 1.2 kg が脂肪量, 1.8 kg が水分であったと推察される. また, 体重の減少を詳細に観察すると, ファスティング最初の 3 日間の体重減少が大きく, 後半 4 日間の減少は緩やかになっている. よって, ファスティング期の体重減少は, 前半は排泄作用の増加による体水分の減少, 後半は脂肪量の減少が大きかったと考えられる.

5. おわりに

野菜抽出酵素液を用いた 7 日間のファスティングにより, DNA 酸化損傷の指標である尿中 8-OHdG 排泄量が有意に低下した. このことは, 体重の減少のみならず, 酸化ストレスの軽減という面からファスティングの有効性を示唆するものである. しかしながら, 8-OHdG が損傷と修復のバランスを示す指標であることから, 摂取カロリーの低下が DNA 損傷の修復機能を低下させ, 尿中に排泄される量が減少した可能性も示唆される²³⁾. また, ファスティング後, 通常の食習慣に移行させると, 尿中 8-OHdG 排泄量はファスティング前の日常生活時よりも有意に高値を示した (図 4 および 5). この原因については, 代謝の増加や DNA 修復機能の向上等も考えられる. 以上のことから, 今後は

DNA の修復機能に加えて、ファスティング後の回復期における食事のあり方についても詳細に検討する必要がある。

参考文献

- 1) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子 (1998) 活性酸素測定マニュアル. 講談社, pp.32-77.
- 2) Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tsurudome, Y., Itoh, H. and Kasai, H. (1998) Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 243:678-682.
- 3) Bevilacqua, L., Ramsey, J.J., Hagopian, K., Weindruch, R. and Harper, M.-E. (2004) Effect of short-term and medium caloric restriction on muscle mitochondrial proton leak and reactive oxygen species production. *Am. J. Physiol. Endocrinol.Metab.*, 286: E852-E861.
- 4) Chung, M.H., Kasai, H., Nishimura, S. and Yu, B.P. (1992) Protection of DNA damage by dietary restriction. *Free Radic.Biol.Med.*, 12: 523-525.
- 5) Gredilla, R., Barja, G. and Lopez-Torres, M. (2001) Effect of short-term caloric restriction on H₂O₂ production and oxidative damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J.Bioenerg.Biomembr.*, 33: 279-287.
- 6) Hakim, I.A., Harris, R.B., Brown, S., Chow, H.-H.S., Wiseman, S., Agarwal, S. and Talbot, W. (2003) Effect of increased tea consumption on oxidative DNA damage among smokers: A randomized controlled study. *J.Nutr.*, 133:3303S-3309S.
- 7) Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiyama, S. and Ozawa, T. (1992) Age-associated oxygen damage and mutation in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 189:979-985.
- 8) Heilbronn, L.K. and Ravussin, E. (2005) Calorie restriction extends life span - but which calories? *PLoS Med.*, 2(8):721-723.
- 9) 神林勲, 石村宣人, 中村寛成, 木本理可, 内田英二, 藤井博匡, 武田秀勝 (2004) 短時間の高強度間欠的は尿中8-OHdG 含有量を増加させる. *日本運動生理学雑誌*, 11(2): 61-67.
- 10) 神林勲, 石村宣人, 中村寛成, 木本理可, 内田英二, 藤井博匡, 武田秀勝 (2005) 運動による DNA 酸化損傷と好中球スーパーオキシド生成能の関係. *北海道体育学研究*, 40: 1-7.
- 11) 神林勲, 藤井博匡, 内田英二, 山崎朋子, 武田秀勝 (2005) 加齢と運動習慣が好中球の生体防御機構に与える影響. *デサントスポーツ科学*, 26: 153-162.
- 12) 木本理可, 神林勲, 内田英二, 許英海, 武田秀勝 (2005) 熟成ニンニク抽出液の摂取が大学生の臨床実習における尿中8-OHdG 排泄量, NK 細胞活性および POMS 得点に与える影響. *北海道教育大学紀要 (自然科学編)*, 56(1): 47-53.
- 13) Knaapen, A.M., Seiler, F., Schilderman, P.A., Nehls, P., Bruch, J., Schins, R.P. and Borm, P.J. (1999) Neutrophils cause oxidative DNA damage in alveolar epithelial cells. *Free Radic.Biol.Med.*, 27(1-2):234-240.
- 14) Lagorio, S., Tagesson, C., Forastiere, F., Axelson, O. and Carere, A. (1994) Exposure to benzene and urinary concentrations of 8-hydroxydeoxyguanosine, a biological marker of oxidative damage to DNA. *Occup.Envirion.Med.*, 51:739-743.
- 15) Lee, K.-H., Bartsch, H., Nair, J., Yoo, D.-H., Hong, Y.-C., Cho, S.-H. and Kang, D. (2006) Effect of short-term fasting on urinary excretion of primary lipid peroxidation products and on markers of oxidative DNA damage in healthy women. *Carcinogenesis*, 27(7): 1398-1403.
- 16) Loft, S., Astrup, A., Buemann, B. and Poulsen, H.E. (1994) Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J.*, 8:534-537.
- 17) Loft, S. and Poulsen, H.E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J.Mol.Med.*, 74(6):297-312.

- 18) Loft, S., Vistisen, K., Ewert, M., Tjonne-land, A., Overvad, K. and Poulsen, H.E. (1992) Oxidative DNA-damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in man. Influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis*, 13:2241-2247.
- 19) Macocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C. and Beal, M.F. (1993) Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann.Neurol.*, 34:609-666.
- 20) 鍋谷佳裕, 神林勲, 木本理可, 日下部未来, 内田英二, 藤井博匡, 武田秀勝 (2006) 教育実習時のストレスが生理的および心理的指標に与える影響. *北海道体育学研究*, 41:63
- 21) Reidy, S.P. and Weber, J.-M. (2004) Metabolism of normothermic woodchucks during prolonged fasting. *J.Exp.Biol.*, 207:4525-4533.
- 22) Subudhi, A.W., Jacobs, K.A., Hagobian, T.A., Fattor, J.A., Fulco, C.S., Muza, S.R., Rock, P.B., Hoffman, A.R., Cymerman, A. and Friedlander, A.L. (2004) Antioxidant supplementation does not attenuate oxidative stress at high altitude. *Aviat.Space Environ.Med.*, 75 (10):881-888.
- 23) Thompson, H.J., Heimendinger, J., Hagele, A., Sedlacek, S.M., Gillette, C., O'Neill, C., Wolfe, P. and Conry, C. (1999) Effect of increased vegetable and fruit consumption on makers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis*, 20 (12):2261-2266.
- 24) Yoshida, R., Shioji, I., Kishida, A. and Oga-awa, Y. (2001) Moderate alcohol consumption reduces urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by inducing of uric acids. *Ind.Health*, 39 (4): 322-329.

(助教授 健康・スポーツ科学専攻)