

## ビタミンC投与が持久性トレーニングによる骨格筋の代謝関連酵素および抗酸化酵素活性の変化に及ぼす影響

矢田光一\*・鈴木克彦\*\*・的場秀樹\*\*\*

### Effects of vitamin C supplementation on low-intensity prolonged exercise training-induced changes of metabolic and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscle

Koichi YADA\*, Katsuhiko SUZUKI\*\* and Hideki MATOBA\*\*\*

#### Abstract

The purpose of this study was to determine the effects of vitamin C supplementation on low-intensity prolonged exercise training-induced changes of metabolic and antioxidant enzyme activities in rat skeletal muscle. Male Sprague-Dawley rats were assigned to one of four groups: a control group, exercise training group, vitamin C supplemented group, and vitamin C supplemented exercise training group. Rats in the vitamin C supplemented groups were given vitamin C (500 mg/kg/day). The vitamin C supplemented animals were given vitamin C in their drinking water during a 2-week pretraining period. The rats in the vitamin C supplemented groups were administered vitamin C with a feeding needle 1h before each training session in the training period. Rats in the exercise training groups swam without a load for 6 h in two 3 h bouts, separated by 45 min of rest. The rats performed the training once a day for 10 days. Vitamin C supplementation attenuated oxidative stress and increased glutathione level and catalase activity. Exercise training increased citrate synthase and hexokinase activities. However, vitamin C did not change these enzyme activities. These results suggest that vitamin C does not prevent the training-induced activation of metabolic enzymes, but attenuates oxidative stress via induction of antioxidants in skeletal muscle.

**Key words:** reactive oxygen species, antioxidant, low-intensity exercise, skeletal muscle adaptation

#### I. 緒言

運動時には活性酸素の発生量が増大すると報告さ

れている<sup>5)</sup>。生体には活性酸素の毒性から生体を保護する抗酸化防御機構が備わっているが、活性酸素

---

\* 早稲田大学大学院 スポーツ科学研究科 (〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島2-579-15)  
Graduate School of Sport Sciences, Waseda University

\*\* 早稲田大学 スポーツ科学学術院 (〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島2-579-15)  
Faculty of Sport Sciences, Waseda University

\*\*\* 徳島大学大学院 ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部 (〒770-8502 徳島県徳島市南常三島町1-1)  
Institute of Socio-Arts and Sciences, The University of Tokushima

の発生が過度の場合には、脂質、タンパク質および DNA の酸化が引き起こされる<sup>21)</sup>。この状態を酸化ストレスという。一過的な酸化ストレスの上昇は、骨格筋の張力の低下<sup>24)</sup>、炎症および筋損傷<sup>3)</sup>と関連付けられるため、抗酸化物質の摂取により酸化ストレスを軽減することが望ましいと考えられている。

一方、抗酸化物質投与がトレーニングによるミトコンドリア新生の増加を妨げ<sup>9)</sup>、インスリン感受性の改善を妨げることが示唆されている<sup>25)</sup>。これらの研究結果は、活性酸素が運動に対する生体適応のシグナルとして作用しており、抗酸化物質による活性酸素の消去はミトコンドリア新生、インスリン感受性の改善といったトレーニングに対する適応を抑制する可能性を示唆している。しかし、我々の以前の研究<sup>38)</sup>や他の研究<sup>10,39)</sup>は抗酸化物質の投与は持久性トレーニングによるミトコンドリア新生、インスリン感受性の改善を妨げないと報告しており、抗酸化物質投与がトレーニング適応に及ぼす影響に関しては一致した見解は得られていない。さらに、抗酸化物質としてビタミン C (以下 VC) を使用した Gomez-Cabrera et al.<sup>9)</sup>の研究では、運動トレーニングを行わない VC 投与群を設けておらず、VC がトレーニングによる適応を阻害するのか、VC 投与単独でも生体機能に影響を及ぼすのかは明らかではない。この点に関して、Strobel et al.<sup>30)</sup>は、運動トレーニング状況とは関係なくビタミン E (以下 VE) および $\alpha$ リポ酸の投与により骨格筋のミトコンドリア新生に関連するマーカーの低下が誘導されることを報告している。一方、抗酸化物質として $\alpha$ リポ酸をコエンザイム Q10に加えて使用した場合に、骨格筋の適応に有益な影響を及ぼすことが報告されている<sup>1,36)</sup>。さらに、抗酸化作用を有するフラボノイドの一種であるクエルセチンも骨格筋のミトコンドリア新生を誘導することが報告されており<sup>6)</sup>、使用した抗酸化物質の抗酸化作用以外の作用が影響している可能性もある。したがって、抗酸化物質投与がトレーニング適応に及ぼす影響を検討する場合には、抗酸化物質の種類の違いによる影響を考慮することも重要と言える。しかし、これまでの研究では、VC と VE などいくつかの抗酸化物質を併用して検討している報告はあるものの、VC 単独の投与がトレーニングによる骨格筋の適応を阻害するのか、VC がトレーニングに関係なく適応に影響を及ぼすのかに関しては十分な検討が行われていない。そこ

で本研究では、VC 投与が持久性トレーニングによる骨格筋の適応を阻害するが、単独投与による影響はないとの仮説を立て、低強度、長時間の持久性トレーニングによる骨格筋の抗酸化酵素および代謝関連酵素活性の変化に及ぼす VC 投与の影響を検討することを目的とした。

## II. 方法

### A. 実験動物

実験動物として Sprague-Dawley 系雄ラット (日本クレア株式会社) 28 匹を使用した。3 週齢時にラットを平均体重がほぼ等しくなるように VC 非投与 (No supplemented; N) 群 (n=14) および VC 投与 (VC supplemented; VC) 群 (n=14) に分け、VC 群には VC の投与を行った。15 日間後、5 週齢時に、N 群、VC 群のラットをそれぞれ 7 匹ずつ非トレーニング群 (Sedentary; S) 群およびトレーニング群 (Training; T) 群に分けた。したがって、最終的にラットは、VC 非投与非トレーニング (N+S) 群、VC 非投与トレーニング (N+T) 群、VC 投与非トレーニング (VC+S) 群および VC 投与トレーニング (VC+T) 群に分けられた。ラットには、市販の飼料 (Chow MF: オリエンタル酵母工業) および水道水を自由摂取させた。また、飼育室は温度を  $22.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ 、午前 8 時から午後 8 時までを明期、午後 8 時から午前 8 時までを暗期と設定し、ラットを飼育した。なお、本実験は、徳島大学の動物実験倫理審査委員会の承認を得て行われた。

### B. VC 投与

VC として、L (+) - アスコルビン酸 (ナカライテスク株式会社) を蒸留水に溶かして使用した。VC 投与群のラットには 1 日 500 mg/kg weight の VC を投与した。Gomez-Cabrera et al.<sup>9)</sup>は、この投与量の VC 投与によりトレーニングによるラット骨格筋の PGC-1 $\alpha$  およびミトコンドリア新生の指標であるシトクロム c のタンパク質量の増加が抑制されたと報告している。投与方法は、15 日間の投与期間中は飲料水に混ぜて自由に摂取させた。その期間中の VC 群の 1 日の体重 kg 当たりの VC 摂取量は  $518.0 \pm 0.7$  mg であった。トレーニング期間中は毎日運動開始の 1 時間前にゾンデを用いて経口投与した。

## トレーニングによる骨格筋酵素活性の変化に及ぼすビタミン C 投与の影響

## C. 水泳運動によるトレーニングプロトコル

T 群のラットには, Terada et al.<sup>34)</sup>の方法に準じて, 3 時間の水泳を45分間の休憩を挟んで2回, 計6 時間の水泳運動を10日間連続で負荷した。ラットは, 水面の面積が約200 cm<sup>2</sup>になるように数匹ずつ水槽で泳がせた。水温は36°Cに保った。

## D. 組織の摘出および保存, 骨格筋からの測定試料の調整

解剖は最後の運動から48時間経過後に行った。ジエチルエーテル麻酔下で, 上腕三頭筋を摘出し, 直ちに液体窒素により凍結させ, 分析まで液体窒素中に保存した。また, 尾部静脈よりヘパリン処理毛細管を用いて採血を行った。採血後300 gで3分間遠心し, 上清を血漿サンプルとして保存した。

また, 上腕三頭筋を9倍容の50 mMリン酸緩衝液(50 mMリン酸カリウム, 1 mM EDTAを含む, pH 7.4)に入れ, 氷冷中でホモジナイズした。さらに, 10000 gで15分間遠心し, 上清を取り出し, 活性酸素発生量, superoxide dismutase (SOD) および glutathione peroxidase (GPx) 活性, trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) の測定試料とした。

上腕三頭筋を9倍容の50 mMリン酸緩衝液(50 mMリン酸カリウム, 1 mM EDTAを含む, pH 6.8)に入れ, 氷冷中でホモジナイズした。さらに, 10000 gで15分間遠心し, 上清を取り出し, カルボニル化タンパクおよび catalase (CAT) 活性の測定試料とした。総グルタチオン量(total glutathione: TGSH)には, さらに, 1倍容の10%メタリン酸を加えて10000 gで5分間遠心して得た上清を用いた。

## E. 血漿 VC 濃度の測定

血漿の VC 濃度の測定は, Benzie and Strain<sup>4)</sup>の方法に基づいて行った。

## F. 酸化ストレス指標の測定

活性酸素の発生量の測定は, 活性酸素感受性蛍光色素プローブである 2, 7-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCFDA: Invitrogen-Molecular Probes, D399) を用いて, Koltai et al.<sup>15)</sup>の方法に準じて行った。なお, 活性酸素の発生量は, 得られた蛍光強度から N+S 群を基準として%で表した。

また, カルボニル化タンパクは, 測定用キット(Cayman Chemical Company)を用いて測定した。

さらに, 血漿の活性酸素代謝産物(d-ROMs)濃度を Verde et al.<sup>35)</sup>の方法に従って測定した。

## G. 抗酸化酵素活性の測定

抗酸化酵素として, SOD, GPx および CAT 活性を, 測定キット(Cayman Chemical Company)を用いて測定した。

## H. 非酵素的抗酸化能力の測定

血中の非酵素的抗酸化能力指標の ferric reducing antioxidant power (FRAP) の測定は, Benzie and Strain<sup>4)</sup>の方法に基づいて行った。

また, 骨格筋の非酵素的抗酸化能力指標として, TEAC を Re et al.<sup>23)</sup>の方法に従って測定した。

## I. 総グルタチオン量(TGSH)の測定

骨格筋の TGSH は測定キット(Cayman Chemical Company)を用いて測定した。

## J. 代謝関連酵素活性の測定

ミトコンドリア濃度の指標である citrate synthase (CS) 活性の測定は, Srere<sup>28)</sup>の方法に基づいて行った。糖代謝に関連する酵素である hexokinase (HK) 活性の測定は, Simoneau et al.<sup>27)</sup>の方法に基づいて行った。

## K. 統計処理

データはすべて平均値±標準誤差で示した。統計処理には SPSS (SPSS Varsion 19.0, SPSS Japan Inc.) を用いた。4 群間の比較には, 運動トレーニング(sedentary および training) と VC 投与(No supplemented および supplemented) を主効果として2 要因分散分析を行った。また, 交互作用が認められた場合には, Bonferroni の方法を用いて多重比較検定を行った。有意水準は5%未満とした。

## III. 結果

## A. 酸化ストレス指標

Figure 1 に骨格筋および血中の酸化ストレス指標の結果を示した。骨格筋において, H<sub>2</sub>DCFDA を用いて活性酸素発生量を測定した結果, 活性酸素の発生量は運動トレーニングによって有意差が認めら

れ、T群がS群に比べ有意に高値を示したがVC投与の影響は認められなかった ( $P < 0.05$ , Figure 1A)。また、骨格筋のカルボニル化タンパクに関しては、運動トレーニングとVC投与で交互作用が認められたため、Bonferroniの方法を用いて多重比較検定を行った。その結果、N+S群と比較してN+T群において有意に抗値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 1B)。さらに血中においては、血漿 d-ROMs 濃度について運動トレーニングおよびVC投与によって有意差が認められ、T群がS群に比べ有意に高値を示し、VC群がN群に比べ有意に低値を示した ( $P < 0.05$ , Figure 1C)。

### B. 非酵素的抗酸化能力指標

Figure 2に骨格筋および血中の非酵素的抗酸化能力指標の結果を示した。血漿VC濃度は運動トレーニングによって有意差が認められ、T群がS群に比べ有意に低値を示したがVC投与による影響は認められなかった (Figure 2A)。また、血漿FRAPおよび骨格筋のTEACはトレーニングおよびVC投与による影響は認められなかった (Figure 2B, C)。一方、骨格筋のTGSHは、トレーニングによる変化は認められなかったが、VC投与によって有意差が認められ、VC群がN群に比べ有意に高値を示した

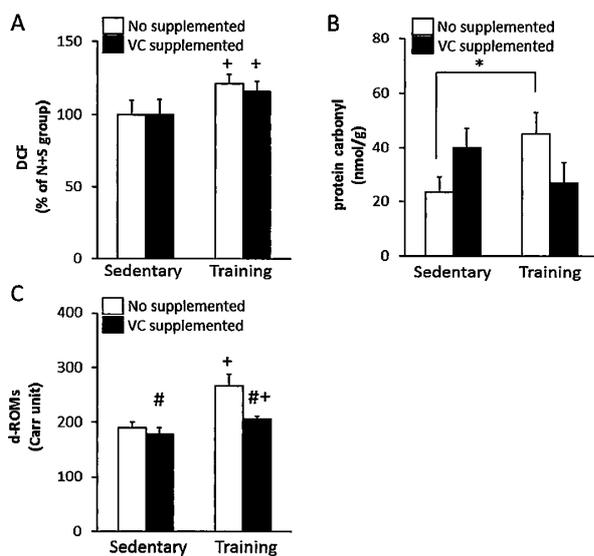


Figure 1 Markers of oxidative stress in skeletal muscle and plasma after training and vitamin C (VC) supplementation. means  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$ , vs no supplemented exercise group. +,  $P < 0.05$ , main effect for training. #  $P < 0.05$  main effect for VC supplement.

( $P < 0.05$ , Figure 2D)。

### C. 骨格筋抗酸化酵素活性

Figure 3に骨格筋の主要な抗酸化酵素であるSOD, CATおよびGPx活性の結果を示した。骨格筋のSOD活性およびCAT活性に関しては運動トレーニングによって有意差が認められ、SOD活性はT群がS群に比べ有意に高値を示し、CAT活性はT群がS群に比べ有意に低値を示した (Figure 3A, C)。さらに、SODに関してはVC投与の影響は認められなかったが、CAT活性はVC投与によって有意差が認められ、VC群がN群に比べ有意に高値を示した (Figure 3A, C)。GPx活性に関しては、トレーニングおよびVC投与の影響は認められなかった (Figure 3B)。

### D. 骨格筋代謝関連酵素活性

Figure 4に骨格筋のミトコンドリア含量を反映するCS活性および糖代謝に関連するHK活性の結果を示した。骨格筋のCS活性およびHK活性は運動トレーニングによって有意差が認められ、T群がS群に比べ有意に高値を示したが、いずれもビタミンC投与の影響は認められなかった (Figure 4A, B)。

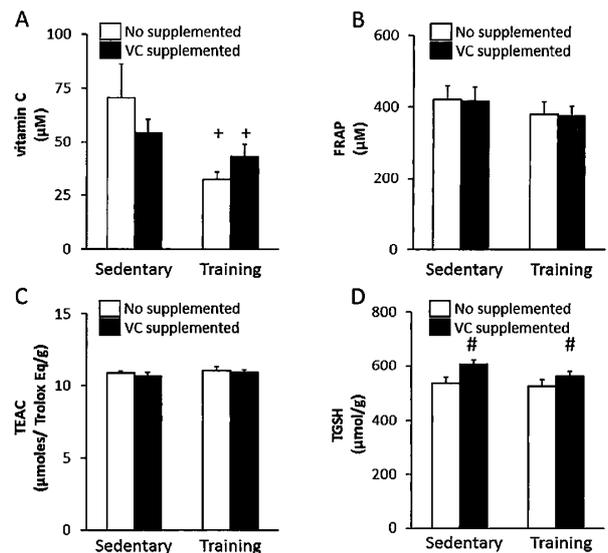


Figure 2 Non-enzymatic antioxidant in skeletal muscle and plasma after training and vitamin C (VC) supplementation. means  $\pm$  SE. +,  $P < 0.05$ , main effect for training. #,  $P < 0.05$ , main effect for VC supplement.

## トレーニングによる骨格筋酵素活性の変化に及ぼすビタミンC投与の影響

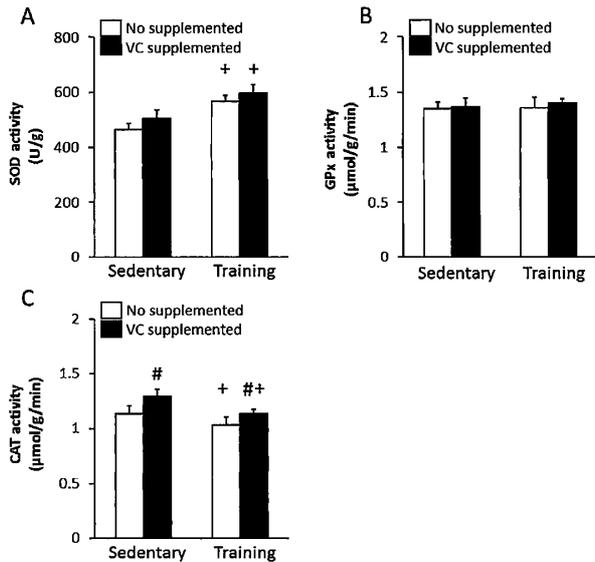


Figure 3 Antioxidant enzyme activities in skeletal muscle after training and vitamin C (VC) supplementation. means ± SE. +,  $P < 0.05$ , main effect for training. #,  $P < 0.05$ , main effect for VC supplement.

#### IV. 考察

本研究では、10日間の長時間水泳トレーニングが骨格筋の酵素活性の変化に及ぼすVC投与の影響を検討した。その結果、骨格筋において、抗酸化酵素であるCAT活性は、トレーニングでは低下するが、VC投与で増加することが示された。一方、SODならびに代謝関連酵素活性であるCSおよびHKの酵素活性はトレーニングにより上昇したものの、VC投与による影響は認められなかった。

本研究では、トレーニングモデルとして低強度長時間の持続的水泳トレーニングを用いた。先行研究で、本研究と同様のトレーニングにより、骨格筋のマスターレギュレーターである転写補助因子のPGC-1 $\alpha$ 、代謝関連酵素である $\beta$ -hydroxyacyl CoA dehydrogenase ( $\beta$ -HAD)、CSおよびHK活性、抗酸化酵素であるSOD2およびGPxのタンパク質量が増加することが報告されている<sup>10,34</sup>。本研究においても、10日間の長時間低強度の持続的水泳トレーニングによって、上腕三頭筋のCS活性、HK活性、SOD活性の上昇という適応が生じた。したがって、本研究で用いた運動様式は、骨格筋におけるトレーニング適応を誘導するのに十分な運動様式であったと言える。

運動時にはROSの産生が増加し、過度のROSは

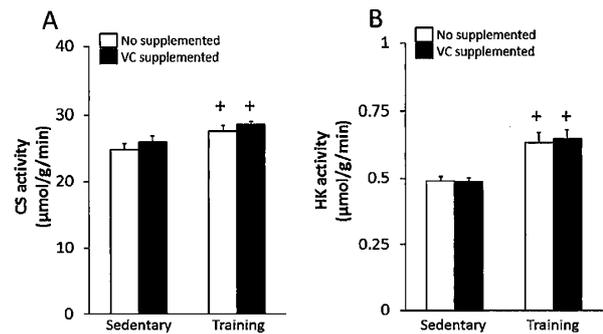


Figure 4 Metabolic enzyme activities in skeletal muscle after training and vitamin C (VC) supplementation. means ± SE. +,  $P < 0.05$ , main effect for training.

酸化ストレスを引き起こす<sup>21</sup>ことが知られている。本研究で用いた6時間の水泳運動では血漿中のTBARS (thiobarbituric acid reactive substances)が増加することが報告されており<sup>10</sup>、運動強度は低いもののROSを発生させる運動モデルであると考えられる。一方、ROSが骨格筋の適応に関与していることが報告されている<sup>29</sup>。ROSはAMPKまたはp38 MAPKの活性化を介して骨格筋適応のPGC-1 $\alpha$ 発現量の増加を引き起こし、ミトコンドリア新生などの骨格筋の適応を引き起こすと考えられている<sup>11,13</sup>。本研究では、運動時に発生するROSの消去を促進するために抗酸化物質として体重kgあたり500 mgのVCを投与した。このVC投与量は、体表面積1 cm<sup>2</sup>あたり0.24mgに相当し、ラット骨格筋において持久性トレーニングによるPGC-1 $\alpha$ およびミトコンドリア新生の指標であるシトクロムcのタンパク質量の増加を抑制したことがGomez-Cabrera et al.<sup>9</sup>により報告されている。しかし、先行研究の結果に反して本研究では、VC投与はトレーニングによる骨格筋の代謝関連酵素および抗酸化酵素活性の変化には影響を及ぼさなかった。本研究で測定した酵素 (CS, HK および SOD) の遺伝子はPGC-1 $\alpha$ に直接的または間接的に制御されていることが報告されている。Wende et al.<sup>37</sup>は、PGC-1 $\alpha$ 遺伝子を過剰発現させたマウスではCSのmRNA発現、活性およびHKのタンパク質量が増加することを報告している。また、過酸化水素によるSODおよびCATの遺伝子発現の増加が、PGC-1 $\alpha$ をノックダウンした場合に抑制されることが細胞

実験により示されている<sup>29)</sup>。したがって、本研究においてトレーニングによる酵素活性の変化がVC投与では変化しなかったのは、トレーニングによるPGC-1 $\alpha$ の発現の増加あるいは活性化がVC投与では変化しなかったためと推察される。また、本研究の結果と Gomez-Cabrera et al.<sup>9)</sup>の報告が異なる要因として、トレーニング時間およびトレーニング強度の違いが考えられる。先行研究は、75% $\dot{V}O_2$ maxで最大85分のトレッドミル走を負荷している。一方、我々は比較的低強度で6時間の水泳運動を負荷している。

PGC-1 $\alpha$ の活性化には様々なリン酸化酵素が関与しているが、運動強度の違いにより、骨格筋のPGC-1 $\alpha$ のリン酸化の割合が異なることが示されている<sup>7,33)</sup>。したがって、運動強度の違いによりPGC-1 $\alpha$ を活性化するシグナルとしてのROSの貢献度が異なる可能性がある。また、運動強度の増加により酸化ストレス度が上昇することから運動強度の違いによりROSの発生量、抗酸化能力などのレドックス状態が異なると考えられる<sup>32)</sup>。したがって、運動強度の違いがトレーニング適応に対する抗酸化物質投与の影響を変化させる可能性があると考えられる。しかしながら、現在のところ運動強度に着目してトレーニング適応に対する抗酸化物質投与の影響を検討している論文はないため、今後の検討課題である。

本研究では、ビタミンC投与1時間後の血漿VC濃度を測定した結果、VC投与によるVC濃度の有意な増加を認めることを確認した。したがって、VC濃度が高い状態で毎日の運動を開始していた。しかしながら、トレーニング後の血漿VC濃度がトレーニングにより低下し、かつVC投与の影響は認められなかった。先行研究によると血漿のVC濃度は激しい運動後2-3日は低下することが示されている<sup>8)</sup>。これは酸化ストレスの増加によりVCが消費されるためと考えられている。したがって、本研究において、トレーニングによるVC濃度の低下は最後の運動から48時間後に採血したため、VC濃度の低下が起きている状態であったと考えられる。さらに、VC投与による血漿のVC濃度の増加は24時間後には投与前の濃度に戻ることが示されている<sup>18)</sup>。VC投与で血漿VC濃度が増加しなかったのは、48時間後に採血を行ったためにVC濃度が投与前の濃度に戻ったためと考えられる。

本研究において、VC投与により、トレーニングに関係なく骨格筋のCATおよびTGSHの増加が引き起こされた。先行研究でも、VC投与により骨格筋<sup>26)</sup>、肝臓、脳および心臓<sup>31)</sup>でCAT活性が増加することが報告されている。また、VC投与により、赤血球のGSHが増加すること<sup>12)</sup>、グルタチオンが不足する場合に組織のVC濃度が低下すること<sup>19)</sup>が示されている。したがって、VC濃度とグルタチオン濃度は密接に関係していると考えられる。これらの結果は、VCが直接的に抗酸化能力を持つだけではなく、他の抗酸化防御機構を高めることを示唆している。

また、本研究では、VC投与によりトレーニング後の血漿VC濃度は変化しなかったものの、トレーニングによる骨格筋のカルボニル化タンパクの増加が抑制された。さらに、血漿のd-ROMs濃度がVC投与により有意に低値を示した。VC投与により、骨格筋のCAT活性ならびにTGSHが増加していたことから、本研究におけるVC投与による酸化ストレス低下は骨格筋のCAT活性の増加およびTGSHの増加の貢献があったと考えられる。

先行研究において、日常的にトレーニング行っている者はトレーニングを行っていない者と比較して安静時の酸化ストレスが低いと報告されている<sup>14)</sup>。また、高齢ラットにおいて、持久性トレーニングにより骨格筋の酸化ストレスが低下することが報告されている<sup>22)</sup>。しかし、本研究では、トレーニングにより酸化ストレス指標である骨格筋の活性酸素発生量およびタンパク質カルボニル濃度ならびに血中のd-ROMsが有意に増加した。先行研究において、Kumar et al.<sup>16)</sup>は、60日間連続の30分間の水泳運動により、ラットの心筋の過酸化脂質が増加したと報告している。さらに、Ogonovszky et al.<sup>20)</sup>は、オーバートレーニングを誘導するトレーニングとして、ラットに1日1時間の水泳運動を1週間に5回、4週間行った後に運動時間を4.5時間に増加して2週間負荷した結果、肝臓の酸化ストレスの増加を認めている。本研究ではトレーニング期間は短いものの、先行研究のトレーニングより持続時間の長い水泳運動を負荷している。したがって、10日間ではあるが毎日6時間の水泳運動はトレーニングとして激しいものであり、酸化ストレスの増加が引き起こされたと考えられる。もう一つの要因として、本研究では、トレーニングによるCAT活性の低下が認め

られたことが挙げられる。トレーニングによる骨格筋の CAT 活性の変化に関しては議論があるが、いくつかの研究はトレーニングにより低下すると報告しており、本研究の結果と一致している<sup>2,17)</sup>。CAT は過酸化水素を無毒化する抗酸化酵素の一種である。過酸化水素は、鉄などと反応することによりヒドロキシラジカルとなる。ヒドロキシラジカルは毒性が強く、脂質やタンパク質の酸化を引き起こす。したがって、本研究における酸化ストレスの増加は CAT 活性の低下に関係している可能性がある。

## V. 結論

本研究において、VC 投与は低強度長時間の持久性トレーニングによる骨格筋の酵素活性の変化には影響を及ぼさなかったが、トレーニングに関係なく抗酸化酵素である骨格筋のカタラーゼ活性および抗酸化物質であるグルタチオン濃度を増加させることが示された。また、骨格筋および血中の酸化ストレスを低下させることが示された。したがって、VC 投与は低強度長時間の持久性トレーニングによる骨格筋代謝関連酵素の増加には影響を及ぼさず、抗酸化能力を高めることにより酸化ストレスを軽減することが示唆された。

## VI. 文献

- 1) Abadi A, Crane JD, Ogborn D, Hettinga B, Akhtar M, Stokl A, Macneil L, Safdar A and Tarnopolsky M (2013) Supplementation with  $\alpha$ -lipoic acid, CoQ10, and vitamin E augments running performance and mitochondrial function in female mice. *PLoS One* 8(4): e60722.
- 2) Alessio HM and Goldfarb AH (1988) Lipid peroxidation and scavenger enzymes during exercise: adaptive response to training. *J Appl Physiol* 64(4): 1333-1336.
- 3) Aoi W, Naito Y, Takanami Y, Kawai Y, Sakuma K, Ichikawa H, Yoshida N and Yoshikawa T (2004) Oxidative stress and delayed-onset muscle damage after exercise. *Free Radic Biol Med* 37(4): 480-487.
- 4) Benzie IF and Strain JJ (1999) Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymol* 299: 15-27.
- 5) Davies KJ, Quintanilha AT, Brooks GA and Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise. *Biochem Biophys Res Commun* 107(4): 1198-1205.
- 6) Davis JM, Murphy EA, Carmichael MD and Davis B (2009) Quercetin increases brain and muscle mitochondrial biogenesis and exercise tolerance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 296(4): R1071-1077.
- 7) Egan B, Carson BP, Garcia-Roves PM, Chibalin AV, Sarsfield FM, Barron N, McCaffrey N, Moyna NM, Zierath JR and O'Gorman DJ (2010) Exercise intensity-dependent regulation of peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 mRNA abundance is associated with differential activation of upstream signalling kinases in human skeletal muscle. *J Physiol* 588(Pt 10): 1779-1790.
- 8) Gleeson M, Robertson JB and Maughan RJ (1987) Influence of exercise on ascorbic acid status in man. *Clin Sci* 73: 501-505.
- 9) Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Romagnoli M, Arduini A, Borrás C, Pallardo FV, Sastre J and Vina J (2008) Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in endurance performance. *Am J Clin Nutr* 87(1): 142-149.
- 10) Higashida K, Kim SH, Higuchi M, Holloszy JO and Han DH (2011) Normal adaptations to exercise despite protection against oxidative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 301(5): E779-784.
- 11) Irrcher I, Ljubcic V and Hood DA (2009) Interactions between ROS and AMP kinase activity in the regulation of PGC-1 $\alpha$  transcription in skeletal muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(1): C116-123.
- 12) Johnston CS, Meyer CG and Srilakshmi JC (1993) Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. *Am J Clin Nutr* 58(1): 103-105.
- 13) Kang C, O'Moore KM, Dickman JR and Ji LL (2009) Exercise activation of muscle peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  signaling is redox sensitive. *Free Radic Biol Med* 47(10): 1394-1400.
- 14) Knez WL, Jenkins DG and Coombes JS (2007) Oxidative stress in half and full Ironman triathletes. *Med Sci Sports Exerc* 39(2): 283-288.
- 15) Koltai E, Hart N, Taylor AW, Goto S, Ngo JK, Davies KJ and Radak Z (2012) Age-associated declines in mitochondrial biogenesis and protein

- quality control factors are minimized by exercise training. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 303(2): R127-134.
- 16) Kumar CT, Reddy VK, Prasad M, Thyagaraju K and Reddanna P (1992) Dietary supplementation of vitamin E protects heart tissue from exercise-induced oxidant stress. *Mol Cell Biochem* 111(1-2): 109-115.
  - 17) Laughlin MH, Simpson T, Sexton WL, Brown OR, Smith JK and Korthuis RJ (1990) Skeletal muscle oxidative capacity, antioxidant enzymes, and exercise training. *J Appl Physiol* 68(6): 2337-2343.
  - 18) Makanae Y, Kawada S, Sasaki K, Nakazato K and Ishii N (2013) Vitamin C administration attenuates overload-induced skeletal muscle hypertrophy in rats. *Acta Physiol (Oxf)* 208(1): 57-65.
  - 19) Martensson J and Meister A (1991) Glutathione deficiency decreases tissue ascorbate levels in newborn rats: ascorbate spares glutathione and protects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(11): 4656-4660.
  - 20) Ogonovszky H, Sasvari M, Dosek A, Berkes I, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Goto S and Radak Z (2005) The effects of moderate, strenuous, and overtraining on oxidative stress markers and DNA repair in rat liver. *Can J Appl Physiol* 30(2): 186-195.
  - 21) Powers SK and Jackson MJ (2008) Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiol Rev* 88(4): 1243-1276.
  - 22) Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F and Goto S (2002) Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 445(2):273-278.
  - 23) Re R, Pellegrini N, Protoggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26(9-10): 1231-1237.
  - 24) Reid MB (2001) Invited Review: redox modulation of skeletal muscle contraction: what we know and what we don't. *J Appl Physiol* 90(2): 724-731.
  - 25) Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR and Bluher M (2009) Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(21): 8665-8670.
  - 26) Shireen KF, Pace RD, Mahboob M and Khan AT (2008) Effects of dietary vitamin E, C and soybean oil supplementation on antioxidant enzyme activities in liver and muscles of rats. *Food Chem Toxicol* 46(10): 3290-3294.
  - 27) Simoneau JA, Lortie G, Boulay MR, Thibault MC, Theriault G and Bouchard C (1985) Skeletal muscle histochemical and biochemical characteristics in sedentary male and female subjects. *Can J Physiol Pharmacol* 63(1): 30-35.
  - 28) Srere P (1969) Citrate synthase. *Methods Enzymol* 13: 3-11.
  - 29) St-Pierre J, Drori S, Uldry M, Silvaggi JM, Rhee J, Jager S, Handschin C, Zheng K, Lin J, Yang W, Simon DK, Bachoo R and Spiegelman BM (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 127(2): 397-408.
  - 30) Strobel NA, Peake JM, Matsumoto A, Marsh SA, Coombes JS and Wadley GD (2011) Antioxidant supplementation reduces skeletal muscle mitochondrial biogenesis. *Med Sci Sports Exerc* 43(6):1017-1024.
  - 31) Suresh MV, Sreeranjit Kumar CV, Lal JJ and Indira M (1999) Impact of massive ascorbic acid supplementation on alcohol induced oxidative stress in guinea pigs. *Toxicol Lett* 104(3): 221-229.
  - 32) Takahashi M, Suzuki K, Matoba H, Sakamoto S and Obara S (2012) Effects of different intensities of endurance exercise on oxidative stress and antioxidant capacity. *J Phys Fitness Sports Med* 1(1): 183-189.
  - 33) Terada S, Kawanaka K, Goto M, Shimokawa T and Tabata I (2005) Effects of high-intensity intermittent swimming on PGC-1 $\alpha$  protein expression in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 184(1): 59-65.
  - 34) Terada S and Tabata I (2004) Effects of acute bouts of running and swimming exercise on PGC-1 $\alpha$  protein expression in rat epitrochlearis and soleus muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286(2): E208-E216.
  - 35) Verde V, Fogliano V, Ritieni A, Maiani G, Morisco F and Caporaso N (2002) Use of N, N-dimethyl-p-phenylenediamine to evaluate the oxidative status of human plasma. *Free Radic Res* 36(8): 869-873.

## トレーニングによる骨格筋酵素活性の変化に及ぼすビタミン C 投与の影響

- 36) Wagner AE, Ernst IM, Birringer M, Sancak Ö, Barella L and Rimbach G (2012) A combination of lipoic acid plus coenzyme Q10 induces PGC1 $\alpha$ , a master switch of energy metabolism, improves stress response, and increases cellular glutathione levels in cultured C2C12 skeletal muscle cells. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 835970.
- 37) Wende AR, Schaeffer PJ, Parker GJ, Zechner C, Han DH, Chen MM, Hancock CR, Lehman JJ, Huss JM, McClain DA, Holloszy JO and Kelly DP (2007) A role for the transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  in muscle refueling. *J Biol Chem* 282(50): 36642-36651.
- 38) Yada K and Matoba H (2014) Vitamin C supplementation does not alter high-intensity endurance training-induced mitochondrial biogenesis in rat epitrochlearis muscle. *J Physiol Sci* 64(2): 113-118.
- 39) Yfanti C, Akerstrom T, Nielsen S, Nielsen AR, Mounier R, Mortensen OH, Lykkesfeldt J, Rose AJ, Fischer CP and Pedersen BK (2010) Antioxidant supplementation does not alter endurance training adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 42(7): 1388-1395.  
(2014年 8月25日受付, 2014年12月 1日訂正,  
2015年 1月27日受理)