運動前のミネラルを含むサプリメント摂取が酸化ストレスマーカーおよび
糖・脂質代謝に及ぼす影響

名村 紗希¹, 田高 悠晟¹, 亀本 佳世子², 永山 千尋¹, 濱田 有香², 宮下 政司^{3*}

Effects of pre-exercise mineral-containing supplementation on oxidative stress markers, carbohydrate and lipid metabolism

Saki Namura¹, Yusei Tataka¹, Kayoko Kamemoto², Chihiro Nagayama¹,
Yuka Hamada² and Masashi Miyashita^{3*}

¹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 (Waseda University, Graduate School of Sport Sciences, 2-579-15 Mikajima, Tokorozawa, Saitama 359-1192, Japan)

²早稲田大学スポーツ科学研究センター, 〒359-1192 埼玉県所沢市三ヶ島2-579-15 (Waseda University, Waseda Institute for Sport Sciences, 2-579-15 Mikajima, Tokorozawa, Saitama 359-1192, Japan)

³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 (Waseda University, Faculty of Sport Sciences, 2-579-15 Mikajima, Tokorozawa, Saitama 359-1192, Japan)

Received: May 15, 2020 / Accepted: October 29, 2020

Abstract Little is known regarding the effects of mineral-containing supplementation on oxidative stress markers, carbohydrate and lipid metabolism in response to an acute bout of exercise in humans. The present study investigated whether prior mineral-containing supplementation can improve oxidative stress status and how this supplementation influences on carbohydrate and lipid metabolism after a single bout of cycling in young men. Twelve, healthy young men (aged 22.5 ± 2.4 years, mean $\pm$ SD) underwent two, 150-min trials in a random order. Each participant received oral administration of mineral supplement containing 13.4 mg of sulphur or placebo one minute before exercise. In both trials, participants cycled at 75% of heart rate reserve for 60 minutes and then rested for 90 minutes. Blood samples were collected pre-exercise supplementation, immediately after exercise, 30 minutes after exercise, 60 minutes after exercise and 90 minutes after exercise. Circulating concentrations of derivatives of reactive oxygen metabolites, biological antioxidant potential, glucose and insulin did not differ between trials. Elevated circulating concentrations of non-esterified fatty acids were observed immediately after exercise in the supplementation trial compared with the placebo trial (mean $\pm$ SD: 1.1 ± 0.5 and 0.9 ± 0.3 mmol/L, respectively; trial $\times$ time interaction, $p = 0.036$). The present study showed that acute mineral-containing antioxidant supplementation appears to have no effect on improving oxidative stress markers in response to a single bout of cycling in healthy young men. In addition, the findings of this study suggested that mineral-containing supplementation may influence lipids metabolism during exercise.

Jpn J Phys Fitness Sports Med, 70(2): 139-148 (2021)

Keywords: cycling exercise, supplementation, oxidative stress markers, carbohydrate and lipid metabolism

緒 言

運動時は骨格筋の酸素需要が増大することで、酸素摂取量が安静時の10-15倍に増加すると報告されており¹⁾, 活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) の生成が増加する。ROSは、異物の除去などの免疫作用に寄与

る一方で、酸化的傷害による幅広い機能障害を引き起こすことが知られており、臨床的には老化や生活習慣病などの様々な病態に関わっていると考えられている^{2,3)}。しかし生体には抗酸化能力が備わっており、抗酸化能力は、生体内でレドックス状態の恒常性および免疫機能の維持に作用することから⁴⁾, ROSと抗酸化能力のバランスのことを酸化ストレスと定義されている³⁾。

運動により誘発されるROS増大による酸化ストレス

*Correspondence: m.miyashita@waseda.jp

の曝露は、アスリートのコンディショニングおよび運動パフォーマンスへ影響を及ぼすと推測されている⁵⁾。一方で急性運動および継続的な運動トレーニングにより抗酸化能力が向上することも報告されている^{6,7)}。以上のことから、急性運動および継続的な運動トレーニングにより生体はROSに曝露されるが、同時に運動への適応により抗酸化能力を獲得すると考えられている。

ROSへの適度な曝露は抗酸化能力の獲得につながるが、過度な曝露はデオキシリボ核酸や脂質、タンパク質の過酸化により組織傷害を引き起こすため³⁾、対策として抗酸化作用を持つとされる成分を含むサプリメントの摂取が挙げられる。抗酸化物質の摂取は、筋損傷の抑制、運動パフォーマンスの改善、酸化ストレスの予防または軽減に働くことで、激しい運動がアスリートにもたらす傷害および疾病リスクを下げることに有用であると考えられている⁷⁾。抗酸化作用が認められているビタミンCやポリフェノールを含むサプリメントを摂取することで、運動により増加する酸化ストレスマーカーを低減すると示唆されている^{8,9)}。また、ミネラルの摂取は抗酸化能力の向上へ関与すると考えられている。銅や亜鉛は、スーパーオキシドディスムターゼの補因子として働き、運動誘発性酸化ストレスの低減に対し有用であると報告されている反面、有害であるという報告もあり、未だ検討が必要である¹⁰⁾。その他、ミネラルの一種である硫黄は抗酸化作用へ関与すると考えられている。含硫アミノ酸のシステインや、システインを含むグルタチオンは、構造中のチオール基(−SH)により生体内で抗酸化作用を示すことが報告されており^{11,12)}、硫黄化合物のメチルスルホニルメタンを運動前に摂取しその影響を検討した研究では、運動後24時間まで抗酸化作用が亢進することが報告されているが¹³⁾、ミネラル含有サプリメントの急性的な効果を検討した研究は限定されている。運動誘発性酸化ストレスに対する有用性をさらに検討する必要がある。一方、ミネラルは抗酸化作用へ関与するだけでなく、脂質代謝へも影響する可能性が示唆されており、カルシウム摂取量の増加により、貯蔵脂肪の分解が亢進することで血中の遊離脂肪酸が増加する可能性が示唆されていることから¹⁴⁾、糖・脂質代謝についても着目し検討する必要がある。

そこで本研究では、血液マーカーを用いて運動前のミネラルを含むサプリメントの摂取が酸化ストレスおよび糖・脂質代謝の応答に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。ミネラルを含むサプリメントの摂取により酸化ストレスの上昇が抑制され、運動中の脂質代謝が亢進するという仮説を立てた。

方 法

対象者 対象者は、早稲田大学に属する大学生および大

学院生の健常男性12名とした。本研究は、ヘルシンキ宣言を尊重し、対象者の人権および利益の保護に配慮した研究計画を行い、早稲田大学研究倫理委員会の承認(承認番号:2017-211)を得て実施した。対象者にはあらかじめ研究の目的、方法および実験に伴う苦痛および危険性について十分な説明を行い、書面にて参加に対する同意を得た。対象者の身体特性は、年齢 22.5 ± 2.4 歳、身長 173.7 ± 5.2 cm、体重 69.1 ± 7.4 kg、体格指数 22.9 ± 1.7 kg/m²、最大酸素摂取量 46.1 ± 6.1 mL/min/kg(すべて平均±標準偏差)であった。

実験デザイン 本試験の実施前に、本試験での運動負荷を決定するため、最大酸素摂取量の測定を実施した。測定は呼気ガス分析装置(Quark CPTe, COSMED)および自転車エルゴメーター(Ergomedic 874E, MONARK)を用いて、段階的に負荷量を増加させて測定した。ペダリング回数は60 rpmに固定し、疲労困憊に至るまで負荷を漸増させた。測定中、心拍計(RCX3, Polar)を用いて心拍数を測定した。

本試験はサプリメント試行とプラセボ試行の2試行を、一重盲検クロスオーバー比較試験にて実施した。試行間は1週間以上の間隔を空けて実施した。対象者に、本試験前日は激しい運動の実施およびアルコール類の摂取を控えるよう依頼した。本試験当日の血液項目への影響を考慮し、2試行の前日の身体活動量を活動量計(ライフレコーダーEX, スズケン)にて測定し、また前日の食事を2試行で統一するよう依頼した。

実験プロトコル 実験プロトコルをFig. 1に示した。対象者は空腹にて来室後、身長と体重を測定し、10分間座位安静を保った。その後1分間でミネラルを含むサプリメント3粒もしくはプラセボ3粒を水200 mLとともに摂取した。そして事前の運動負荷試験によって得られた安静時および最高心拍数からカルボーネン法を用いて算出した心拍予備能の75%相当の強度で60分間の自転車運動を行い、運動終了後は90分間座位安静を保った。サプリメント摂取前(0分)、60分の運動終了直後(60分)、運動終了30分後(90分)、運動終了60分後(120分)および運動終了90分後(150分)の計5回、真空採血管を用いて、対象者の上腕静脈より血液を採取した。また、血液の採取と同じ時間帯に、視覚的アナログスケール(Visual analog scale: VAS)を用いて全身、上肢および下肢の主観的疲労度の評価を行った。VASは、100 mmの水平線の左端を「まったく疲れていない」、右端を「すごく疲れている」として、対象者が現状を垂線で記入した。まったく疲れていない状態を0として、記入された垂線までの長さを測定し、その長さを値(mm)とした¹⁵⁾。心拍数は60分間の運動中、連続的に測定し、5分ごとの

平均値を解析に用いた。60分間の運動中の自覚的運動強度は、5分ごとにボルグスケール¹⁶⁾を用いて全身および下肢の自覚的運動強度を評価した。

試験食品 サプリメント試行では、市販品であるドクターズBAPミネラル（株式会社ウイスマー）を用いた。摂取量に関して、1日4粒と1日あたりの摂取量が規定されており、実験に参加する対象者に対する製品摂取の安全面の配慮から、1日の上限摂取個数未満の3粒とした。プラセボ試行では、食品カプセルNo.3（小林カプセル株式会社）と砂糖より作成したプラセボを用いた。サプリメント試行の試験食品3粒分の栄養成分は、エネルギー0.96 kcal、たんぱく質0.15 g、脂質0.00 g、炭水化物0.11 g、ナトリウム23.9 mg、カルシウム88.5 mg、カリウム23.4 mg、硫黄13.4 mgであった。プラセボ試行の試験食品3粒分の栄養成分は、エネルギー3.58 kcal、たんぱく質0.14 g、脂質0.00 g、炭水化物0.78 g、ナトリウム0.22 mg、カルシウム0.00 mg、カリウム0.00 mgであった。

血液検査項目 採取した血液を遠心分離して得られた血清を用いて、酸化ストレス関連指標として、活性酸素代謝物（Derivatives of reactive oxygen metabolites : d-ROMs）および抗酸化能力（Biological antioxidant potential : BAP）を測定した。糖・脂質代謝関連指標として、

グルコース、中性脂肪、遊離脂肪酸およびインスリンを測定した。また、筋疲労関連指標として、クレアチンキナーゼを測定した。

d-ROMsおよびBAPは、フリーラジカル解析装置（FREE Carrio Duo, 株式会社ウイスマー）を用いて測定した。活性酸素により、生体内で脂質やたんぱく質、ヌクレオチドなどの様々な物質が過酸化され、細胞内でヒドロペルオキシドが産生される。d-ROMs測定は、d-ROMsテストキット（株式会社ウイスマー）を用いて測定した。d-ROMs測定は血清内で呈色反応を引き起こさせ、505 nmの吸光度の変化量を計算することでヒドロペルオキシド濃度を算出し、生体内の酸化ストレス度合を総合的に評価するものである^{17,18)}。BAP測定は、BAPテストキット（株式会社ウイスマー）を用いて測定した。BAP測定は血清内で呈色反応を引き起こさせ、505 nmの吸光度の変化量を計算することで、血清中の三価鉄イオンを二価鉄イオンへ還元する力を反映しており、保持する還元作用を総合的に評価するものである^{17,19)}。

インスリンは、酵素免疫測定法にて測定を行い、ヒトインスリン測定キット（Insulin, Human, ELISA Kit, Mercodia）およびプレートリーダー（Sunrise Remote, Tecan Austria GmbH）を用いた。グルコース、中性脂肪、遊離脂肪酸、クレアチンキナーゼの測定は、株式会社江東微生物研究所に依頼した。グルコースは酵素法にて測

Fig. 1 A schematic representation of the study protocol.

The participants rested in a chair for 10 minutes after arriving the laboratory in the supplementation and placebo trials. Then, participants consumed either mineral-containing antioxidant supplements (i.e., the supplementation trial) or placebo supplements (i.e., the placebo trial). Thereafter, participants performed cycling exercise at 75% of heart rate reserve (HRR) for 60 minutes in both trials. Participants then rested in the laboratory for 90 minutes in both trials.

定を行い, 試薬 (L タイプワコー Glu2, 富士フィルム和光純薬株式会社) および自動分析装置 (JCA-BN8060, 日本電子株式会社) を用いた. 遊離脂肪酸は酵素法にて検査を行い, 試薬 (NEFA-HR II, 富士フィルム和光純薬株式会社) および自動分析装置 (JCA-BM8060, 日本電子株式会社) を用いた. クレアチンキナーゼは JSCC 標準化対応法にて測定を行い, 試薬 (L タイプワコー CK, 富士フィルム和光純薬株式会社) および自動分析装置 (JCA-BM8060, 日本電子株式会社) を用いた.

d-ROMs, BAP, インスリン, グルコース, 中性脂肪, 遊離脂肪酸およびクレアチンキナーゼの測定における変動係数はそれぞれ, 1.70%, 2.30%, 0.25%, 0.59%, 1.39%, 0.96%, 0.71% であった.

統計処理 本研究で得られた結果は全て平均値 $\pm$ 標準偏差で示した. 全ての統計処理には統計解析ソフト (SPSS Statistics version 22, IBM) を用いた. 両試行における前日の身体活動量の比較は, 対応のある t 検定を用いて検定した. また, 試行と時間を要因とした評価項目 (主観的運動強度, 心拍数, 主観的疲労度および血液検査項目) の変化について, 二元配置の分散分析を用いて検定した. 二元配置の分散分析において交互作用が認められた項目については, Bonferroni の調整による多重比較を行った. なお, 運動前安静時の値でばらつきが見られた中性脂肪とクレアチンキナーゼにおいては, サプリメント摂取前 (0 分) の値を基準として変化量を算出し, 統計解析を行った. 検定の有意水準は危険率 5% 未満とした.

結 果

本試験前日の身体活動量 本試験前日の歩数に関して, サプリメント試行 $8,085 \pm 5,567$ 歩/日, プラセボ試行 $6,596 \pm 2,980$ 歩/日であり, 試行間に差は認められなかった

($p=0.378$). 活動量計の装着時間で補正した歩数に関して, サプリメント試行 12.4 ± 8.4 歩/日・分, プラセボ試行 11.7 ± 6.0 歩/日・分であり, 試行間に差は認められなかった ($p=0.691$). 中強度以上の身体活動時間に関して, サプリメント試行 30.9 ± 27.0 分/日, プラセボ試行 28.1 ± 19.0 分/日であり, 試行間に差は認められなかった ($p=0.646$).

酸化ストレス関連指標 d-ROMs と BAP の経時的変化を Fig. 2 に示した. d-ROMs に関して, 時間の主効果を認めた一方で ($p<0.001$), 試行の主効果 ($p=0.250$) および試行と時間の交互作用 ($p=0.075$) は認められなかった. BAP に関して, 時間の主効果を認めた一方で ($p=0.005$), 試行の主効果 ($p=0.390$) および試行と時間の交互作用 ($p=0.937$) は認められなかった.

糖・脂質代謝関連および筋疲労関連指標 血中グルコース濃度, インスリン濃度, 中性脂肪濃度, 遊離脂肪酸濃度およびクレアチンキナーゼ濃度の経時的変化を Table 1 に示した. グルコース, インスリンおよびクレアチンキナーゼに関して, 各々時間の主効果を認めた一方で ($p<0.001$, $p=0.002$, $p<0.001$), 試行の主効果および試行と時間の交互作用は認められなかった. 遊離脂肪酸は, 時間の主効果 ($p<0.001$) および試行と時間の交互作用 ($p=0.036$) が認められた. 多重比較の結果, 60 分の運動終了直後 (60 分) のサプリメント試行 (1.1 ± 0.5 mmol/L) で, プラセボ試行と比較し (0.9 ± 0.3 mmol/L) 高値を示した ($p=0.024$).

運動中の自覚的運動強度および心拍数 運動中の自覚的運動強度と心拍数について 5 分ごとの平均値を Table 2 に示した. 全身および下肢の自覚的運動強度に関して,

Fig. 2 Serum concentrations of derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) (A) and biological antioxidant potential (BAP) (B) during the supplementation and placebo trials. Data are means $\pm$ SD for $n = 12$. Data were analysed using 2-factor ANOVA with repeated measures. There was a main effect of time ($p < 0.001$ for d-ROMs and $p = 0.005$ for BAP).

Table 1. Mean values at each time-point for glucose, insulin, triglycerides, non-esterified fatty acids (NEFA) and creatine kinase concentrations in the supplementation and placebo trials.

		0 min	60 min	90 min	120 min	150 min	p value
Glucose (mg/dL)	Supplementation	85.6 ± 5.8	77.2 ± 9.2	77.0 ± 6.5	79.2 ± 7.6	78.2 ± 8.2	Trial: p = 0.094 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.316
	Placebo	87.8 ± 6.2	80.7 ± 9.0	81.8 ± 7.1	83.5 ± 9.0	82.8 ± 9.2	
Insulin (mU/L)	Supplementation	4.8 ± 2.0	2.3 ± 3.0	2.4 ± 1.6	2.2 ± 1.0	2.4 ± 1.7	Trial: p = 0.910 Time: p = 0.002 Interaction: p = 0.523
	Placebo	5.3 ± 3.2	1.6 ± 1.2	2.8 ± 1.6	3.0 ± 2.4	2.6 ± 1.4	
Triglyceride (mg/dL)	Supplementation	64.2 ± 25.6	62.3 ± 24.8	61.3 ± 23.3	62.3 ± 23.7	63.0 ± 25.1	Trial: p = 0.762 Time: p = 0.251 Interaction: p = 0.484
	Placebo	85.2 ± 37.0	83.7 ± 37.0	80.3 ± 35.9	82.1 ± 36.1	83.1 ± 37.2	
NEFA (mmol/L)	Supplementation	0.5 ± 0.2	1.1 ± 0.5	0.9 ± 0.4	0.8 ± 0.3	0.9 ± 0.4	Trial: p = 0.077 Time: p < 0.001 *Interaction: p = 0.036
	Placebo	0.4 ± 0.2	0.9 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	
Creatine kinase (U/L)	Supplementation	241.0 ± 137.1	269.5 ± 145.5	250.3 ± 132.7	252.5 ± 132.3	254.5 ± 123.4	Trial: p = 0.668 Time: p = 0.014 Interaction: p = 0.079
	Placebo	155.6 ± 43.6	178.3 ± 47.8	166.0 ± 43.9	170.1 ± 43.0	177.4 ± 47.2	

Values are mean ± SD for n = 12. Means were compared using two-factor analysis of variance and post-hoc analysis was adjusted for multiple comparisons using the Bonferroni method. Post-hoc analysis of trial-by-time interactions: * p = 0.024 between the supplementation and placebo trials at the 60-min time point. For the analysis of triglycerides and creatine kinase, the obtained values were converted to the delta values (i.e., each delta value was calculated from each corresponding time-point value minus the baseline (i.e., 0 min) value).

各々時間の主効果 ($p < 0.001$, $p < 0.001$) を認めた一方で, 試行の主効果および試行と時間の交互作用は認められなかった. 心拍数に関して, 時間の主効果 ($p = 0.042$) を認めた一方で, 試行の主効果および試行と時間の交互作用は認められなかった.

主観的疲労度 サプリメント摂取前 (0分), 60分の運動終了直後 (60分), 運動終了30分後 (90分), 運動終了60分後 (120分) および運動終了90分後 (150分) の主観的疲労度を Table 3 に示した. 全身, 上肢, 下肢の全ての項目に関して, 時間の主効果を認めた一方で ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p < 0.001$), 試行の主効果および試行と時間の交互作用は認められなかった.

考 察

本研究では, 運動前のミネラルを含むサプリメントの摂取が酸化ストレスならびに糖・脂質代謝応答に及ぼす影響について検討するため, ミネラルサプリメントまたはプラセボサプリメント摂取前から60分間の運動後90分間までの150分間にわたって血液を採取し測定を行った. 本研究の結果より, ミネラルサプリメントの摂取による酸化ストレス関連指標であるd-ROMsならびにBAPへの影響は認められなかった. また, ミネラルを含むサプリメントの摂取により, 運動時の脂質代謝へ関与する可能性が示唆された.

活性酸素代謝物の指標であるd-ROMsの正常範囲は200–300 U.CARRと定義されている¹⁸⁾. 本研究では, 全測定を通してd-ROMsの平均値は正常範囲内であり, 仮説に反して試行間に有意な差は認められなかった. 抗酸化能力の指標であるBAPも全測定を通して試行間に有意な差は認められなかった. BAPの最適範囲は2,200–2,400 $\mu\text{mol/L}$ とされているが¹⁹⁾, 本研究のBAPは全測定を通して2,200 $\mu\text{mol/L}$ を上回り高値を示した. これには体力および身体活動レベルが関連していた可能性が考えられる. 先行研究において, 鍛錬者は中強度の運動後90分までは酸化ストレスが上昇しないこと⁵⁾, 習慣的にトレーニングを行っている鍛錬者は, 座りがちな習慣をもつ健康者よりも抗酸化酵素レベルが高いことが示唆されている⁷⁾. 本研究の対象者の最大酸素摂取量は $46.1 \pm 6.1 \text{ mL/min/kg}$ と本邦の身体活動ガイドラインで示されている同年代の基準値よりも高く²⁰⁾, 運動習慣について12名中10名が, 1週間に2回以上, 1回30分以上, 中・高強度の定期的な身体活動を行う運動習慣者であった. このことから, 本研究で60分間の運動後にd-ROMsが正常範囲を逸脱しなかった要因として, 対象者の全身持久力および身体活動レベルが一定の基準以上であり抗酸化能力が高かったことが関連していたと考えられる.

本研究で用いたミネラルを含むサプリメントのうち,

抗酸化能力に影響を及ぼすと考えられるのが硫黄である. 硫黄の水素化合物である硫化水素は, 過酸化水素やスーパーオキシドの直接除去へ働くことや, 抗酸化防御システムのアップレギュレーションを起こすことから, 抗酸化作用へ関与すると動物実験より報告されている²¹⁾. しかし硫化水素は元来有毒ガスであり, ヒトを対象とした研究は検討されておらず, 硫黄関連サプリメントの摂取と運動誘発性酸化ストレスについてのヒト研究の多くは, 硫黄を主成分とした栄養補助食品であるメチルスルホニルメタンサプリメントを用いている. 体重1 kg当たり100 mg/kgのメチルスルホニルメタンサプリメントを摂取した2時間後に, 最大酸素摂取量の75%の強度でトレッドミル走を行った際のサプリメントの急性効果について検討した先行研究では, 運動後24時間まで抗酸化作用の上昇がみられたと報告している¹³⁾. またメチルスルホニルメタンサプリメントの継続摂取による慢性効果を検討した研究では, 30日間メチルスルホニルメタンサプリメントを1日当たり3.0 g/日継続摂取すると抗酸化作用が増加したと報告している²²⁾. この機序として, メチルスルホニルメタンサプリメントの摂取が, NF- κ Bの転写活性を阻害することで, ROS産生に関与する酵素やサイトカインの発現を抑制するためである²³⁾. 本研究の仮説に反して本研究で試行間の差が認められなかった要因として2つ考えられる. 1つ目は, サプリメントの硫黄含有量である. 先行研究で用いられたメチルスルホニルメタンサプリメントの硫黄含有量は, 急性効果の検討では34.0 mg/kg, 慢性効果の検討では1022.1 mg/日であった^{13,22)}. しかし, 本研究で用いたミネラルサプリメントに含まれる硫黄含有量は全体量として13.4 mgであったことから, 生体の酸化ストレス応答に影響を与えるには硫黄含有量が不足していた可能性が考えられる. しかし, 本研究では摂取したサプリメントにおける血中の硫黄濃度を測定しておらず, メチルスルホニルメタンサプリメントと本研究で用いたミネラルを含むサプリメントの摂取による生体への影響を単純に比較することは難しい. 2つ目は, 摂取のタイミングである. メチルスルホニルメタンサプリメントの急性効果が認められたNakhostin-Roohiらの研究では運動2時間前にサプリメントを摂取しているが¹³⁾, 一方で本研究では運動直前に摂取している. 前述したとおり, 本研究では摂取後の血中の硫黄濃度を測定していないため, サプリメントの成分が体内へ吸収ならびに代謝されたかは不明であるが, 血中の硫黄濃度の上昇が不十分であったことが可能性として考えられる. さらに, 本研究のミネラルを含むサプリメントは, 先行研究とは成分が異なる上に, 抗酸化作用を引き起こすメカニズムが異なる可能性もあるため, 酸化ストレスに影響を示す硫黄の摂取量ならびに摂取タイミングについて, 検討が必要である.

Table 2. Mean values at each time-point for ratings of perceived exertion (RPE) and heart rate in the supplementation and placebo trials.

	5 min	10 min	15 min	20 min	25 min	30 min	35 min	40 min	45 min	50 min	55 min	60 min	p value
Whole -body													
RPE	Supplementation	11 ± 2	13 ± 2	13 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	15 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	Trial: p = 0.287 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.776
	Placebo	11 ± 2	12 ± 2	12 ± 2	13 ± 1	13 ± 2	14 ± 2	14 ± 1	14 ± 2	14 ± 1	14 ± 2	14 ± 2	
Lower -body													
RPE	Supplementation	12 ± 2	13 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	15 ± 2	Trial: p = 0.830 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.721
	Placebo	12 ± 2	13 ± 2	14 ± 2	14 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	15 ± 2	16 ± 2	16 ± 2	
Heart rate (bpm)	Supplementation	142 ± 17	151 ± 18	148 ± 16	148 ± 14	149 ± 11	149 ± 12	147 ± 15	147 ± 11	145 ± 13	143 ± 10	145 ± 12	Trial: p = 0.723 Time: p = 0.042 Interaction: p = 0.403
	Placebo	140 ± 15	147 ± 19	148 ± 17	149 ± 16	149 ± 13	147 ± 14	147 ± 15	147 ± 15	145 ± 14	145 ± 12	147 ± 13	

Values are mean ± SD for n = 12. Means were compared using two-factor analysis of variance.

Table 3. Mean values at each time-point for subjective ratings of fatigue in the supplementation and placebo trials.

		0 min	60 min	90 min	120 min	150 min	p value
Whole-body fatigue (mm)	Supplementation	16 ± 18	67 ± 19	35 ± 21	21 ± 21	16 ± 19	Trial: p = 0.800 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.369
	Placebo	17 ± 15	72 ± 10	31 ± 20	21 ± 18	17 ± 19	
Upper-body fatigue (mm)	Supplementation	10 ± 17	39 ± 23	21 ± 18	13 ± 14	12 ± 17	Trial: p = 0.825 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.416
	Placebo	15 ± 22	39 ± 21	18 ± 16	10 ± 14	10 ± 13	
Lower-body fatigue (mm)	Supplementation	13 ± 17	78 ± 16	41 ± 22	27 ± 26	23 ± 25	Trial: p = 0.190 Time: p < 0.001 Interaction: p = 0.763
	Placebo	23 ± 27	85 ± 9	47 ± 25	31 ± 27	25 ± 26	

Values are mean ± SD for n = 12. Means were compared using two-factor analysis of variance.

本研究のもうひとつの主眼点である糖・脂質代謝について、遊離脂肪酸濃度が運動直後にプラセボ試行と比較してサプリメント試行において高値を示した (Table 1)。この差異について、要因は2つ考えられる。1つ目は硫化水素と脂質代謝の関連性である。硫化水素は脾臓の β 細胞において、生体に貯蔵されている含硫アミノ酸を基質として、シスタチオニン β 合成酵素やシスタチオニリナーゼによって合成されるが¹²⁾、ラットの副腎髄質クロム親和性細胞において、この硫化水素合成酵素の発現があり、低酸素刺激によりカテコラミンや硫化水素の放出が誘発される可能性が報告されている²⁴⁾。さらに、外因性の硫化水素が、ラットの副腎髄質クロム親和性細胞からのカテコラミン放出を直接刺激することが示されている²⁵⁾。このカテコラミンは脂肪分解を調節する要素のひとつであり、 β -アドレナリン受容体に作用することで脂肪細胞内のcAMP濃度を上昇させる。そしてプロテインキナーゼAの活性化によりホルモン感受性リパーゼをリン酸化および活性化することで、結果的に脂肪分解が亢進されることが知られている²⁶⁾。このことから、本研究における遊離脂肪酸濃度の上昇は、内因性およびサプリメント摂取による外因性の硫化水素によりカテコラミン分泌が亢進することで、脂肪分解が亢進した可能性が考えられる。2つ目はカルシウムの作用が考えられる。絶食状態でカルシウム摂取が増加すると、貯蔵されている脂肪の分解の亢進により遊離脂肪酸が増加する可能性が示唆されている¹⁴⁾。また、肥満マウスを用いた研究において、脂肪細胞内における細胞内カルシウムの増加を刺激することでカルシウム摂取により脂肪分解が亢進することが報告されている²⁷⁾。このことから、サプリメントに含まれるカルシウムが脂肪分解へ関与し遊離脂肪酸濃度の上昇へ働きかけた可能性がある。しかしながら、本研究では脂質代謝について詳細な測定を行っていないため、ミネラルサプリメントの生理的な作用機序について更なる検討が必要である。

全身と下肢の自覚的運動強度、VASによる主観的疲労度および心拍数について、試行間に差は認められなかった。このことから、対象者にとって両試行は同等の運動負荷であったと考えられ、運動前の単回のミネラルを含むサプリメント摂取は主観的な運動強度、疲労度および心拍数に影響を与えないことが示唆された。VASによる主観的疲労度について試行間に差は認められなかったものの、先行研究^{28,29)}と同様に両試行ともに運動直後に高値、運動30分後以降は低値を示しており、自覚的な疲労度を伴う運動強度であった。これはd-ROMs値が両試行において運動直後に高値を示したことから推察される。

最後に、本研究の酸化ストレスマーカーとして用いたd-ROMsならびにBAPは生体内の酸化ストレスならびに抗酸化能力をそれぞれ総合的に評価する指標であ

る¹⁷⁻¹⁹⁾。しかし、ROSや抗酸化物質には多くの種類があり、ROSにはヒドロキシルラジカルやスーパーオキシドなどのフリーラジカルと、一重項酸素や過酸化水素、ヒドロペルオキシドなどの非ラジカルの活性酸素に大別される³⁰⁾。酸化ストレス指標として、これらのROSを直接的に評価した研究もあれば^{8,31)}、ROSによる反応生成物であるマロンジアルデヒドを測定して間接的に評価している研究や^{5,8,32-35)}、デオキシリボ核酸の酸化指標として尿中8-ヒドロキシ-デオキシグアノシンを測定した研究もある^{8,34,36)}。抗酸化物質には先述したスーパーオキシドディスムターゼ、グルタチオンペルオキシダーゼおよびカタラーゼだけでなく、酸化型グルタチオン、還元型グルタチオンおよびグルタチオンレダクターゼなどが挙げられ、抗酸化能力の指標として用いられている^{8,33,37-39)}。一方で、複数の評価指標を同一の研究内で検討したとしても、全ての項目において同じ応答はみられないように³⁸⁾、産生したROSや抗酸化物質を特定することは難しく、各々の指標を詳細に測定し検討するためには時間的ならびに金銭的な限界があることに留意する必要がある。

結 論

本研究の結果から、ミネラルを含むサプリメントの摂取による酸化ストレスマーカーへの影響は認められなかった。また、サプリメントに含まれる硫黄やカルシウムが、運動時の脂質代謝へ関与する可能性が示唆された。

利益相反自己申告：著者全員において利益相反はない。

著者貢献

著者SNとMMは研究デザインとプロトコルを概念化し、対象者を決定した。著者SN、YT、KK、CNとYHはデータの整理・分析および解釈を担当した。草稿は著者SNが担当した。著者CNとMMは原稿を批評し編集校正を担当した。すべての著者は、最終原稿を熟読した上で、投稿を承認した。

引用文献

- 1) Sen CK. Antioxidants in exercise nutrition. *Sports Med* 31: 891-908, 2001. doi: 10.2165/00007256-200131130-00001.
- 2) 江口裕伸, 藤原範子, 大河原知水, 鈴木敬一郎, 谷口直之: 酸化ストレスと健康, 生物試料分析, 32: 247-256, 2009.
- 3) 大石修司: 運動と酸化ストレス-活性酸素と抗酸化防御のバランスの重要性-, 国立医療学会誌, 69: 317-324, 2015.
- 4) Lee S, Hashimoto J, Suzuki T, Satoh A. The effects of exercise load during development on oxidative stress levels and antioxidant potential in adulthood. *Free Radic Res* 51: 179-186, 2017. doi: 10.1080/10715762.2017.1291939.

- 5) 長島未央子：長時間自転車運動が鍛錬者の酸化ストレス度及び血中ビタミン濃度におよぼす影響, 体力科学, 60: 279-286, 2011. doi: 10.7600/jspfsm.60.279.
- 6) Parker L, McGuckin TA, Leicht AS. Influence of exercise intensity on systemic oxidative stress and antioxidant capacity. *Clin Physiol Funct Imaging* 34: 377-383, 2014. doi: 10.1111/cpf.12108.
- 7) Pingitore A, Lima GP, Mastorci F, Quinones A, Iervasi G, Vassalle C. Exercise and oxidative stress: Potential effects of antioxidant dietary strategies in sports. *Nutrition* 31: 916-922, 2015. doi: 10.1016/j.nut.2015.02.005.
- 8) Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology* 189: 41-54, 2003. doi: 10.1016/S0300-483X(03)00151-3.
- 9) Myburgh KH. Polyphenol supplementation: Benefits for exercise performance or oxidative stress? *Sports Med* 44: S57-70, 2014. doi: 10.1007/s40279-014-0151-4.
- 10) Yavari A, javadi M, Mirmiran P, Bahadoran Z. Exercise-induced oxidative stress and dietary antioxidants. *Asian J Sports Med* 6: e24898, 2015. doi: 10.5812/asj-sm.24898.
- 11) Ida T, Sawa T, Ihara H, Tsuchiya Y, Watanabe Y, Kumagai Y, Suematsu M, Motohashi H, Fujii S, Matsunaga T, Yamamoto M, Ono K, Devarie-Baez NO, Xian M, Fukuto M, Akaike T. Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 7606-7611, 2014. doi: 10.1073/pnas.1321232111.
- 12) 居原 秀：活性イオウ分子による細胞毒性の調節機構, 日本薬理学雑誌, 147: 290-293, 2016. doi: 10.1254/fpj.147.290.
- 13) Nakhostin-Roohi B, Niknam Z, Vaezi N, Mohammadi S, Bohlooli S. Effect of single dose administration of methylsulfonylmethane on oxidative stress following acute exhaustive exercise. *Iran J Pharm Res* 12: 845-853, 2013. doi: 10.22037/ijpr.2013.1357.
- 14) 青江誠一郎：乳製品あるいはカルシウム摂取が体重および体組成に及ぼす影響, ミルクサイエンス, 57: 1-12, 2008. doi: 10.11465/milk.57.1.
- 15) Williamson A, Hoggart B. Pain: A review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs* 14: 798-804, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2702.2005.01121.x.
- 16) 小野寺孝一, 宮下充正：全身持久性運動における主観的強度と客観的強度の対応性：Rating of perceived exertionの観点から, 体育学研究, 21: 191-203, 1976. doi: 10.5432/jjpehss.KJ00003405473.
- 17) 永田勝太郎, 長谷川拓也, 広門靖正, 喜山克彦, 大槻千佳：生活習慣病と酸化ストレス防御系, 心身医学, 48: 177-183, 2008. doi: 10.15064/jjpm.48.3_177.
- 18) 関 泰一：d-ROMSテストによる酸化ストレス総合評価, 生物試料分析, 32: 301-306, 2009.
- 19) Sugita M, Kapoor MP, Nishimura A, Okubo T. Influence of green tea catechins on oxidative stress metabolites at rest and during exercise in healthy humans. *Nutrition* 32: 321-331, 2016. doi: 10.1016/j.nut.2015.09.005.
- 20) 厚生労働省：健康づくりのための身体活動基準 2013, 2013. <https://www.mhlw.go.jp/stf/houdou/2r9852000002xple-att/2r9852000002xpqt.pdf> (閲覧日 2020年 5 月 13 日)
- 21) Xiao Q, Ying J, Xiang L, Zhang C. The biologic effect of hydrogen sulfide and its function in various diseases. *Medicine (Baltimore)* 97: e13065, 2018. doi: 10.1097/MD.00000000000013065.
- 22) Kalman DS, Feldman S, Scheinberg AR, Krieger DR, Bloomer RJ. Influence of methylsulfonylmethane on markers of exercise recovery and performance in healthy men: A pilot study. *J Int Soc Sports Nutr* 9: 46, 2012. doi: 10.1186/1550-2783-9-46.
- 23) Butawan M, Benjamin RL, Bloomer RJ. Methylsulfonylmethane: Applications and safety of a novel dietary supplement. *Nutrients* 9: 290, 2017. doi: 10.3390/nu9030290.
- 24) Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadalla MM, Kumar GK, Snyder SH, Prabhakar NR. H2S mediates O2 sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10719-10724, 2010. doi: 10.1073/pnas.1005866107.
- 25) Zhu D, Yu X, Sun J, Li J, Ma X, Yao W. H2S induces catecholamine secretion in rat adrenal chromaffin cells. *Toxicology* 302: 40-43, 2012. doi: 10.1016/j.tox.2012.07.008.
- 26) 大沼 裕, 大澤春彦, 牧野英一：脂質分解系の調節, 糖尿病, 46: 736-738, 2003. doi: 10.11213/tonyoby1958.46.736.
- 27) Teegarden D. The influence of dairy product consumption on body composition. *J Nutr* 135: 2749-2752, 2005. doi: 10.1093/jn/135.12.2749.
- 28) 松田知華, 山田満月, 須永美歌子：女性アスリートにおける月経周期が短時間高強度運動時の酸化ストレスおよび抗酸化力に及ぼす影響, 日本運動生理学雑誌, 26: 9-18, 2019.
- 29) 石渡智子, 森藤雅史, 石島寿道, 青山友子, 菅間 薫, 神田和江, 鈴木克彦, 樋口 満：運動による自覚的疲労度とストレスホルモン・サイトカインとの関連性, 日本補完代替医療学会誌, 8: 67-73, 2011. doi: 10.1625/jcam.8.67.
- 30) 大野秀樹, 鈴木健二, 人見嘉哲, 木本紀代子, 伊藤長栄, 宮澤伸子, 木崎節子：運動とフリーラジカル, 体力科学, 50: 389-416, 2001. doi: 10.7600/jspfsm1949.50.389.
- 31) Alessio HM, Hagerman AE, Fulkerson BK, Ambrose J, Rice RE, Wiley RL. Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1576-1581, 2000. doi: 10.1097/00005768-200009000-00008.
- 32) Bloomer RJ, Fisher-Wellman KH. Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gen Med* 5: 218-228, 2008. doi: 10.1016/j.genm.2008.07.002.
- 33) Xu X, Ding Y, Yang Y, Gao Y, Sun Q, Liu J, Yang X, Wang J, Zhang J. β -glucan Salecan improves exercise performance and displays anti-fatigue effects through regulating energy metabolism and oxidative stress in mice. *Nutrients* 10: 858, 2018. doi: 10.3390/nu10070858.
- 34) Withee ED, Tippens KM, Dehen R, Tibbitts D, Hanes D, Zwickey H. Effects of Methylsulfonylmethane (MSM)

- on exercise-induced oxidative stress, muscle damage, and pain following a half-marathon: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Int Soc Sports Nutr* 14: 24, 2017. doi: 10.1186/s12970-017-0181-z.
- 35) Miyazaki H, Oh-ishi S, Ookawara T, Kizaki T, Toshinai K, Ha S, Haga S, Ji LL, Ohno H. Strenuous endurance training in humans reduces oxidative stress following exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 84: 1-6, 2001. doi: 10.1007/s004210000342.
 - 36) Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Yoshioka Y, Mitsuzono R, Migita T, Sumida S, Sugawa-Katayama Y. Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans. *Free Radic Res* 26: 507-514, 1997. doi: 10.3109/10715769709097821.
 - 37) Ortenblad N, Madsen K, Djurhuus MS. Antioxidant status and lipid peroxidation after short-term maximal exercise in trained and untrained humans. *Am J Physiol* 272: R1258-R1263, 1997. doi: 10.1152/ajpregu.1997.272.4.R1258.
 - 38) Takahashi M, Suzuki K, Kim HK, Otsuka Y, Imaizumi A, Miyashita M, Sakamoto S. Effects of curcumin supplementation on exercise-induced oxidative stress in humans. *Int J Sports Med* 35: 469-475, 2014. doi: 10.1055/s-0033-1357185.
 - 39) Ristow M, Zarse K, Oberbach A, Klötting N, Birringer M, Kiehntopf M, Stumvoll M, Kahn CR, Blüher M. Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 8665-8670, 2009. doi: 10.1073/pnas.0903485106.