

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

誌名	北海道教育大学紀要. 自然科学編
ISSN	13442570
著者名	木本,理可 神林,勲 内田,英二 許,栄海 武田,秀勝
発行元	北海道教育大学
巻/号	56巻1号
掲載ページ	p. 47-53
発行年月	2005年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



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

木本 理可・神林 勲*・内田 英二**・許 栄海***・武田 秀勝****

北海道教育大学大学院教育学研究科

*北海道教育大学教育学部札幌校保健体育研究室

**大正大学人間学部

***湧永製薬ヘルスケア研究所

****札幌医科大学保健医療学部

Effects of aged garlic extract supplementation on urinary 8-OHdG content,
NK-cells activity and POMS scores in clinical training
for university students

KIMOTO Rika, KAMBAYASHI Isao *, UCHIDA Eiji **, KYO Eikai *** and TAKEDA Hidekatsu ****

Graduate School of Education, Hokkaido University of Education, Sapporo 002-8502

*Department of Physical Education, Sapporo Campus, Hokkaido University of Education, Sapporo 002-8502

**Faculty of Human Studies, Taisho University, Tokyo 170-8470

***Healthcare Research Institute of Wakunaga Pharmaceutical Co.Ltd., Hiroshima 739-1195

****School of Health Science, Sapporo Medical University, Sapporo 060-8556

Abstract

The purpose of this study was to examine whether aged garlic extract (AGE) supplementation influence or not the change of urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) content, natural killer (NK) -cells activity and profile of mood states (POMS) scores during clinical training. Ten healthy male university students were recruited and participated in clinical training for 7 weeks for becoming physiotherapists. They were divided into two groups, AGE supplementation group (S-group, n=5) and control group (C-group, n=5). S-group was supplemented with AGE during clinical training. Urinary 8-OHdG content was analyzed by enzyme linked immunosorbent assay before (pre), after progress for 20 days (middle) and after (post) clinical training. NK-cells activity, which was analyzed by a standard 4-hour chromium release assay, and POMS test were measured at pre and post, respectively. In C-group, Urinary 8-OHdG content, NK-cells activity and POMS scores did not change during clinical training for 7 weeks. These results indicate that clinical training for 7 weeks does not bring about such a strong stress

for subjects. Therefore, we thought that significant effects of AGE supplementation in urinary 8-OHdG content and NK-cells activity could not be obtained in S-group. With POMS test, high fatigue and confusion scores at pre (60.6 ± 5.2 and 64.2 ± 4.2) significantly decreased at post (44.6 ± 2.2 and 49.8 ± 3.5), respectively. However, it is not clear if this change depend on AGE supplementation or effect of practice over clinical training. Further research needs to clarify effect of AGE supplementation on physiological and psychological stress.

Key words; AGE, university students, clinical training, 8-OHdG, NK-cells, POMS

I. 緒 言

現代社会の人々は、仕事場、家庭、学校、人間関係などにおいて心理的ストレスに満ちた環境で生活している。生体の恒常性は神経系、内分泌系および免疫系が相互に作用しあい、維持されている。しかしながら、疲労などのストレスが生体に負荷され、その刺激が強すぎたり、長期間負荷されたりすると、恒常性に乱れが生じる。この乱れが、病気に対する生体の抵抗性の低下をもたらし、消化器疾患、循環器疾患、呼吸器疾患、内分泌疾患およびがんなどの発症や進行に大きく関与することが近年、指摘されている¹⁰。ストレス、免疫、疾患の機能的関係について検討した *in vitro* での実験および臨床データの解析により、心理的ストレスのような生体心理学的要因が免疫機能に影響を与えることが示され、慢性のストレスは免疫機能の抑制を誘導することが報告されている⁹。また、心理的ストレスが生理的ストレスに影響を与えるという報告もある。

Asami ら¹ は、ラットにおいて抑圧の増大により尿中8-ヒドロキシ-デオキシグアノシン (8-hydroxy-deoxyguanosine ; 以下8-OHdG) 排泄量も増大したことを報告している。8-OHdGとは、DNAの塩基の1つであるグアニンのヌクレオチドが活性酸素種の1つである・OHによって酸化されたもので、酵素により修復される過程で細胞外に排出され、さらに血液を経て尿中に排泄される。8-OHdGには、毒性や突然変異誘発性の可能性があるため、非常に能率的に排泄される

ことから、酸化ストレスの程度を調べる優れた指標である。よって、この値が高いほど生体の酸化損傷の度合いが高いと考えることができる。生体の酸化損傷の蓄積が、生活習慣病等の疾病や老化を誘発あるいは促進すると言われている。

これらのことから、慢性的、長期的な心理的、生理的ストレスを減少させることは、人々が種々の疾病等の脅威を避け、健康で充実した生活を送るために重要である。熟成ニンニク抽出液 (Aged Garlic Extract ; 以下 AGE) は、抗ストレス作用¹¹、抗疲労作用⁵、免疫調節作用⁶ などに加えて、強い抗酸化作用^{2,4} を示す事が報告されている。これらの作用は、日常における心理的、生理的ストレスの軽減に役立つことが推測される。

そこで本研究は、理学療法士を目指している大学生を対象に、比較的強いストレスが長期的にかかることが予想される学外での実習 (臨床実習) の前、中、後に尿中8-OHdG 排泄量、NK細胞活性および感情の変化を調査することで、AGE 摂取が長期的ストレス抑制に与える影響を検討することを目的とした。

II. 方 法

A. 被 検 者

健康な男子学生10名を対象に測定を行った。被検者の平均年齢、身長および体重は、それぞれ 23.0 ± 1.9 歳、 169.6 ± 2.3 cm および 63.5 ± 3.9 kg であった。実験に先立ち、被検者全員に研究

の目的、意義、プロトコルならびに AGE の安全性について十分な説明を行い、自主的な参加を同意書により得た。その後10名を、AGE を摂取する者 (Supplement 群; 以下 S 群) 5 名, AGE を摂取しない対照者 (Control 群; 以下 C 群) 5 名に無作為に分けた。各群の身体特性はいずれの項目にも有意差はなかった (Table 1)。なお、被検者は臨床実習をはじめて経験するものとした。

Table 1 Physical characteristics in supplement and control groups.

		Means	SE	Range
Age (yr)	S	22.0	0.6	21-24
	C	24.0	2.8	21-35
Height (cm)	S	171.4	1.7	168-176
	C	167.8	2.7	161-175
Weight (kg)	S	60.2	2.4	53-66
	C	66.8	4.9	53-82

SE; Standerd error S; Supplement group, C; Control group

B. 実験の概要

本研究で対象となった臨床実習は、S 大学 H 学部のカリキュラムに必修単位として位置づけられている 7 週間の実習であり、病院の機能訓練室およびベッドサイドにおける運動器疾患の回復訓練、ミーティング参加等が主な内容である。まず、日常値を測定するため、実習開始 3 日前 (pre) に早朝尿の採取、午前 9 時に 7 ml の採血および POMS (Profile of Mood States ; 以下 POMS) を行った。その後、実習開始とともに S 群には AGE の経口摂取を開始させた。中間値の測定のため、実習 20 日後 (middle) に早朝尿の採取を行った。最終値の測定のため、実習終了の翌日 (post) に早朝尿の採取、午前 9 時に 7 ml の採血および POMS を行った。

C. AGE と摂取時期

AGE は湧永製薬株式会社で製造された。生ニ

ンニクを水性アルコール中で長期間抽出、熟成して作られるユニークなニンニク素材であり、次のような特徴を有している。①水溶性イオウ化合物が豊富で脂溶性イオウ化合物含量は低い、②長期間の抽出、熟成過程で穏やかな反応が進行し、抗酸化物質であるフルクトシルアルギニンやカルボリン誘導体などの新規成分が生成する、③揮発性イオウ化合物含量が低いためにニンニク特有の臭いがほとんどない、等である。AGE 中の水溶性イオウ化合物としては、S-アシルシステイン (SAC), S-アシルメルカプトシステイン (SAMC), γ-グルタミル-S-アシルシステイン (G-SAC), シクロアリン等が代表的で、揮発性のイオウ化合物であるジアリルスルフィド、ジアリルジスルフィド、ジメチルジスルフィド等のスルフィド類は、微量が確認される。その他、スピロスタノール型のサポニン (サポゲニン)、フルクトースおよびフラクトオリゴ糖、修飾レクチン等が含まれている¹²⁾。

本研究はその粉末カプセルを用いた。S 群には、臨床実習開始から実習終了までの 40 日間、AGE 摂取を行わせた。摂取方法は 1 日 9 カプセル (1 カプセル当たり 0.4 ml の AGE を含む) を水またはお湯とともに摂取することとした。

D. 尿中 8-OHdG 含有量の測定

採取した尿サンプルは分析時まで -80℃ で冷凍保存した。冷凍した試料を常温で解凍した後、遠心分離機 (パーソナル冷却遠心機 2700, 久保田商事株式会社製) を使い、2000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。そして、沈殿物を除いた上澄みを尿中 8-OHdG 含有量の分析に用いた。

尿中 8-OHdG 含有量の分析は、ELISA 法による測定キット (8-OHdG Check, 日本老化制御研究所製) を用いて行った。マイクロプレート (96 ウェル) の各ウェルに調整した試料と再構成した第一抗体 (Primary antibody) を分注し、マイクロプレートインキュベーター (MICRO PLATE INCUBATOR MPI-100, 旭テクノグラス社製) 内にて 37℃ で 1 時間反応させた。反応終了後、洗

浄液 (Washing solution) で3回洗浄を行った。そして、第2抗体 (Secondary antibody) を加え、再び37°Cで1時間反応させた。3回の洗浄の後、発色剤 (Chromatic solution) を加え、遮光した状態で15分間反応させ、反応停止液 (Reaction terminating solution) を加えた。吸光度の測定にはマイクロプレートリーダー (Bio Rad 社製) を使用し、各試料の吸光度より尿中8-OHdG濃度を定量した。各試料において3回の測定を行い、その平均値を尿中8-OHdG排泄量として評価した。

E. NK細胞活性の測定

NK細胞活性の測定には ^{51}Cr 放出試験⁸⁾を用いた。 ^{51}Cr 放出試験、NK細胞をエフェクター細胞とし、アイソトープ ($\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$) を標識した標的細胞 (K562) とするものである。それを一定時間37°Cの CO_2 インキュベーターで培養した後、培養上清中に放出されたアイソトープ量を測定した。そして、標的細胞傷害率 (%) を算出し、これをNK細胞活性とした。

F. POMSの測定

POMS日本語版は、緊張-不安 (Tension-Anxiety, T-A), 抑うつ-落ち込み (Depression-Dejection, D), 怒り-敵意 (Anger-Hostility, A-H), 活気 (Vigor, V), 疲労 (Fatigue, F), 混乱 (Confusion, C) の6つの気分尺度で構成された65項目からなる質問紙である。各項目に対して過去1週間そのような気分になることが「まったくなかった」(0点) から「非常にたくさんあった」(4点) の5段階で回答させ、尺度ごとのT得点を算出した。

G. 統計処理

測定した値はすべて平均値 \pm 標準誤差で表した。各群内における平均値の差の検定にはWilcoxonの符号付順位検定を用いた。なお、いずれの場合も危険率は5%未満とした。

III. 結果

A. 尿中8-OHdG排泄量の変化

S群, C群の尿中8-OHdG排泄量の変化についてFig.1に示した。実習における尿中8-OHdG排泄量は, S群の値が, pre $6.4 \pm 1.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, middle $6.7 \pm 1.1 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, post $8.1 \pm 2.4 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, C群の値が pre $7.2 \pm 1.5 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, middle $8.8 \pm 1.8 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, post $10.5 \pm 2.6 \text{ ng} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ であった。両群とも pre, middle, post と値が増加したが, その値に有意性は認められなかった。

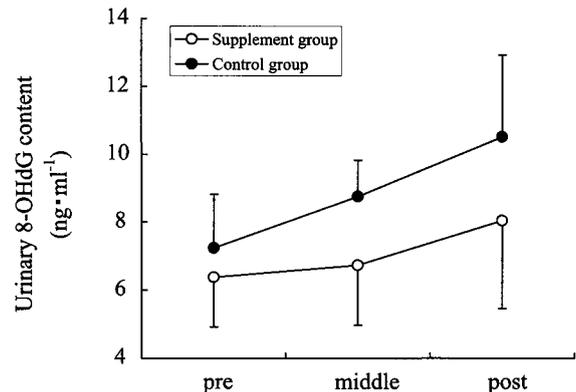


Fig. 1 Change of urinary 8-OHdG content at pre, middle and post.

B. NK細胞活性の変化

S群, C群のNK細胞活性の変化についてFig.2に示した。実習におけるNK細胞活性は, S群の値が, pre $35.2 \pm 5.4\%$, post $35.4 \pm 2.9\%$, C群の値が pre $33.6 \pm 2.2\%$, post $32.0 \pm 3.7\%$ であり, とともに pre, post において有意な変化は認められなかった。

C. POMSの変化

S群, C群のPOMSの値をTable 2に示した。preおよびpostにおいて, 両群間に差は認められなかった。preからpostへの比較では, S群の疲労と混乱の項目のみ有意な低値 ($p < 0.05$) が認められた。

IV. 考 察

本研究は、これまでに抗ストレス作用¹¹⁾をはじめ、疲労回復作用⁵⁾ 免疫調節作用⁶⁾ など多くの薬理作用が認められている AGE 摂取の影響を、臨床実習における尿中8-OHdG 排泄量、NK 細胞活性および POMS から検討した。

尿中8-OHdG 排泄量および NK 細胞活性は、S 群、C 群ともに、pre, middle, post において有意な変化は認められなかった (Fig. 1, 2)。この結果は、臨床実習による長期間のストレスが、これら2つの生理学的指標に変化を与えなかったことを示している。尿中8-OHdG 排泄量は DNA の酸化損傷の度合を表す指標であるが、活性酸素種による生体組織の酸化損傷の中でも DNA 損傷は脂質やタンパク質等の損傷に比べて起こりにくい。これまでに、抑圧等の精神的ストレスによる尿中8-OHdG 排泄量の上昇が認められている¹⁾ が、本研究で対象となった臨床実習におけるスト

レスは尿中8-OHdG 排泄量に影響を与えるほど強いものではなかったことが考えられる。

NK 細胞は、抗原の感作なしに標的細胞を殺傷することから、非特異的免疫の中心的な存在である⁸⁾。ウイルスやバクテリアなどの成長や増殖を抑制する作用をもち、最近では特に腫瘍細胞の生成・増殖・転移を制御するとして注目を集めている³⁾。NK 細胞活性を高めるサイトカインとして IL-2, INF γ があげられる。IL-2は細胞増殖、INF γ は NK 細胞の活性化に関わり、NK 細胞活性を高める。これまで、AGE がヒトにおいて IL-2, INF γ の産生を有意に増加させることが報告されている⁷⁾。さらに、ストレス負荷マウスにおいて観察される NK 細胞活性の低下が AGE 投与により抑制され、AGE 投与群は非ストレスマウスとほぼ同等の NK 細胞活性を示すことが確かめられている。そこで、本研究でも NK 細胞活性に対する AGE 摂取の効果を調査したが、今回の臨床実習においては、NK 細胞活性の低下も、AGE 摂取による NK 細胞活性の増加も認められなかった。

一方、POMS について、S 群と C 群における比較では、pre および post でも差が認められなかった。pre から post への比較では、C 群では変化が認められなかったが、S 群では疲労と混乱の項目が有意に低下した (Table 2)。このことから、AGE の摂取によって、実習によるストレスを軽減できた可能性が考えられる。しかしながら、POMS では、すべての T 得点が40から60の者が健常とされる。S 群の pre の T 得点をみると、疲労、混乱の項目で60を超える値になってい

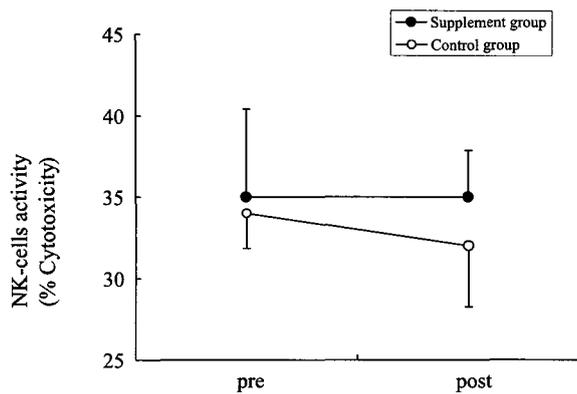


Fig. 2 Change of NK-cells activity at pre and post.

Table 2 T scores of POMS in supplement and control groups.

		Tension-Anxiety	Depression-Dejection	Anger-Hostility	Vigor	Fatigue	Confusion
Supplement group	pre	57.6 ± 5.7	55.6 ± 6.8	43.6 ± 3.1	48.8 ± 5.2	60.6 ± 5.2	64.2 ± 4.2
	post	50.2 ± 1.8	46.2 ± 1.9	41.0 ± 1.3	49.6 ± 5.6	44.6 ± 2.2*	49.8 ± 3.5*
Control group	pre	49.8 ± 3.2	45.4 ± 2.3	44.2 ± 2.7	43.8 ± 6.0	44.8 ± 3.7	52.0 ± 4.4
	post	56.4 ± 1.0	45.2 ± 2.2	44.0 ± 2.0	41.8 ± 3.8	52.2 ± 2.4	53.6 ± 4.9

S; Supplement group, C; Control group, *p<0.05 when compared with pre value.

る。先行研究によると、実習前では抑鬱状態（疲労感、不満感、憂鬱感など）が実習後に比べ有意に高いことが報告されており¹²⁾、本研究のS群の被検者においては、実習前からストレスを受けていたと考えられる。よって、S群のpreにおける疲労と混乱の項目の高いT得点が、postにおいてAGE摂取により低下したもののなのか、実習に対する慣れにより低下したのかは明らかではない。

TMD得点による検討も試みた。TMD得点とは活気得点以外のT得点の総和から活気得点を引き100を足した値であり、心理的ネガティブ指標となる。TMD得点は、S群の値がpre 332.8 ± 26.4 、post 282.2 ± 10.6 、C群の値がpre 292.4 ± 14.2 、post 309.6 ± 13.5 であり (Fig. 3)、両群間で有意差は認められなかった ($P=0.13$) もの、S群の平均値で15.2%の減少を示した。

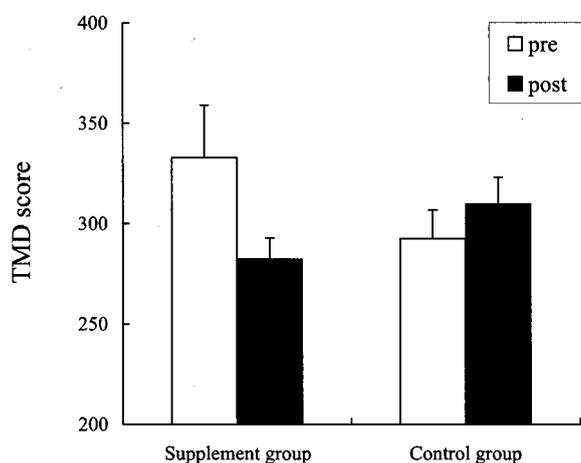


Fig. 3 Comparison of TMD score at pre and post.

以上の結果から、本研究で対象となった7週間の臨床実習におけるAGEの摂取は、疲労、抑圧など心理的ストレスの軽減に効果がある可能性が示唆された。

しかしながら、この臨床実習におけるストレスは、尿中8-OHdG排泄量およびNK細胞活性に影響を与えるほど強いものではなかったため、生理学的指標におけるAGE摂取の効果をみることはできなかった。

今後は、AGE摂取の効果をより強いストレス

状況下で検討し、その有効性を生理学的および心理学的指標の両面から検討していく必要があるだろう。

参考文献

- 1) Asami S, Hirano T, Yamaguchi R, Tsurudome Y, Itoh H, Kasai H. (1998) Effects of forced and spontaneous exercise on 8-hydroxydeoxyguanosine levels in rat organs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 243 : 678-82.
- 2) Horie T. and Itakura S. (1992) Identified diallyl polysulfides from an aged garlic extract which protects the membranes from lipid peroxidation. *Planta Med.* 58 (5) : 468.
- 3) 池上晴夫：スポーツ医学Ⅱ，朝倉書店，203-235，2000.
- 4) Imai J, Ide N, Nagae S, Moriguchi T, Matsuura H, and Itakura Y. (1994) Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 60 : 417-420.
- 5) 川島祐，落合康博，朱膳寺洋文 (1986) 運動部学生における疲労の観察とニンニク抽出液の抗疲労効果。基礎と臨床20(16) : 8229-8245.
- 6) Kyo E., Uda N., Kasuga S., Itakura Y. (2001) Immunomodulatory effects of aged garlic extract. *J.Nutr.* 131(3s) : 1075S-9S.
- 7) Morioka N., Sze L. L., Morton D. L., and Irie R. F. (1993) A protein fraction from aged garlic extract enhances cytotoxicity and proliferation of human lymphocytes mediated by interleukin-2 and concanavalin A. *Cancer Immunol. Immunother.*, 37:316-322.
- 8) 押見和夫：NK細胞，金原出版，23-32，1993.
- 9) Perna F. M., Schneiderman N., and LaPerriere A. (1997) Psychological stress, exercise and immunity. *Int.J.Sports.Med.*, 18 Supple 1:78-83.
- 10) 齋藤洋編 (2000) ニンニクの科学。朝倉書店，pp.201-205.
- 11) Takasuga N., Kotoo K., Fuwa T., Saito H. (1984) Effect of garlic on mice exposed to various stresses. *応用薬理*28(6) : 991-1002.
- 12) 糠野亜紀 (2003) 短期大学生の精神的健康状態に関する研究。和歌山信愛女子短期大学信愛紀要，44 : 49-51.

(木本 理可 札幌校・岩見沢校大学院生)

(神林 勲 札幌校助教)

(内田 英二 大正大学助教)

(許 栄海 湧永製薬ヘルスケア研究所
精神評価研究室室長)

(武田 秀勝 札幌医科大学教授)