

博士論文

高強度運動によるリンパ球減少に対する
酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与

平成 20 年度

筑波大学大学院人間総合研究科スポーツ医学専攻

谷村 祐子

目次

第1章 序論	1
1.1. 本研究の背景	1
1.2. 本研究の目的	4
第2章 文献研究	5
2.1. 運動とリンパ球	5
2.1.1. リンパ球	5
2.1.2. 運動がリンパ球数に及ぼす影響	6
2.1.3. 運動によるリンパ球減少のメカニズム	9
2.2. 運動と酸化ストレス	11
2.2.1. 酸化ストレス	11
2.2.2. 運動による活性酸素の増加	13
2.3. 運動とリンパ球アポトーシス	15
2.3.1. リンパ球のアポトーシス	15
2.3.2. 運動とアポトーシス	15
2.4. 酸化ストレスとアポトーシス	17
第3章 本研究の課題・仮説・方法及び研究限界	18

3.1.	本研究の課題.....	18
3.2.	本研究の仮説.....	19
3.3.	本研究で用いた方法.....	19
3.3.1.	単細胞ゲル電気泳動法.....	19
3.3.2.	フローサイトメーター.....	23
3.4.	本研究の研究限界.....	24
3.4.1.	被験者.....	24
3.4.2.	運動様式.....	25
3.4.3.	測定方法.....	25
第4章	一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与（課題1）.....	26
4.1.	一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレスの関与（実験1-1）.....	26
4.1.1.	緒言.....	26
4.1.2.	方法.....	27
4.1.3.	結果.....	34
4.1.4.	考察.....	39
4.1.5.	結論.....	40
4.2.	一過性高強度運動によるリンパ球減少に対するリンパ球アポトーシスの関与（実験1-2）.....	41

4.2.1.	緒言.....	41
4.2.2.	方法.....	42
4.2.3.	結果.....	45
4.2.4.	考察.....	49
4.2.5.	結論.....	50
第5章	短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与（課題2）.....	51
5.1.	合宿トレーニングによるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与（実験2-1）.....	51
5.1.1.	緒言.....	51
5.1.2.	方法.....	53
5.1.3.	結果.....	56
5.1.4.	考察.....	64
5.1.5.	結論.....	67
5.2.	短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化的DNA損傷及びリンパ球アポトーシスの関与（実験2-2）.....	68
5.2.1.	緒言.....	68
5.2.2.	方法.....	70
5.2.3.	結果.....	74
5.2.4.	考察.....	83
5.2.5.	結論.....	88

第 6 章 総合討論	89
6.1. 本研究で得られた結果	89
6.2. 今後の研究課題	92
6.3. 今後の展望	93
第 7 章 結語	95
謝辞	97
参考文献	99

表のタイトル一覧

Table 1. Time sequence changes of apoptotic lymphocytes (%).	48
Table 2. The changes in total lymphocyte and its subset counts (cell/ μ l) with the training.....	58
Table 3. The changes in serum lipid peroxide (LPO) concentration (nmol/ml) with the training.....	59
Table 4. Physical characteristics.....	71
Table 5. Time sequential changes in lymphocyte intercellular superoxide.....	79
Table 6. Time sequential changes in serum lipid peroxide level.....	80
Table 7. Time sequence changes in % apoptotic lymphocytes.	82

図のタイトル一覧

Figure 1. Shema of changes of immunity parameters during and post exercise. (Revised ref. 82)	8
Figure 2. Output items of the Comet analysis.	22
Figure 3. (A) Normal lymphocyte, and (B) DNA-damaged lymphocyte.....	32
Figure 4. Time sequential changes in lymphocyte count pre- and post-exercise... 35	
Figure 5. Time sequential changes in % DNA in tail pre- and post-exercise.....	36
Figure 6. Time sequential changes in plasma levels of lipid peroxides (LPO) pre- and post-exercise.	37
Figure 7. Time sequential changes in plasma levels of cortisol pre- and post-exercise.	38
Figure 8. Time sequential changes in lymphocyte count pre- and post-exercise... 46	
Figure 9. Time sequential changes in intracellular superoxide level pre- and post-exercise.	47
Figure 10. The changes in CD95 ⁺ lymphocyte counts with the training	60
Figure 11. The changes in CD4 ⁺ CD95 ⁺ and CD8 ⁺ CD95 ⁺ lymphocyte counts with the training.....	61
Figure 12. The changes in the percentages of CD4 ⁺ CD95 ⁺ lymphocyte and CD8 ⁺ CD95 ⁺ lymphocyte with the training.....	62
Figure 13. The changes in serum cortisol concentrarion with the training.	63
Figure 14. Testing timeline. The exercise session consisted of 3 consecutive days of high intensity exercise (75 % of $\dot{V}O_{2max}$ for 1 h).	73
Figure 15. Time sequential changes in lymphocytes counts.	76

Figure 16. Time sequence changes in lymphocyte subset counts.	77
Figure 17. Time sequence changes in DNA-damaged lymphocytes.....	78
Figure 18. Time sequence changes in serum cortisol concentration.	81

本研究で使用する略語と記号

ALS	: alkali labile sites	アルカリラベル化部位
APC	: allophycocyanin	アロフェコシアニン
AT	: anaerobic threshold	無酸素性作業域値
BMI	: body mass index	体格指数
CD	: cluster of differentiation	白血球分化抗原
DNA	: deoxyribo nucleic acid	デオキシリボ核酸
DSBs	: double stand breaks	二本鎖損傷
ES	: effect size	エフィクトサイズ
ESR	: electron spin response	電子スピン共鳴法
FACS	: fluorescence activated cell sorter	蛍光標示式細胞分取器
FADU	: fluorometric analysis of DNA unwinding	DNA unwind 蛍光分析

FITC	: fluorescein isothiocyanate	フルオレセイン イソチオンオン酸塩
FSC	: forward scatter	前方散乱光
GO, xoG	: oxoguanine	オキソグアニン
H ₂ O ₂	: hydrogen peroxide	過酸化水素
HO [·]	: hydroxyl radical	ヒドロキシラジカル
HOCl	: hydrochloric acid	次亜塩素酸
hOGG1	: human 8-oxoguanine DNA glycosylase	ヒト 8-オキソグアニン DNA グリコシラーゼ
LPS	: lipopolysaccharide	リポポリサッカライド
LPO	: lipid peroxides	過酸化脂質
MHC	: major histocompatibility complex	主要組織適合複合体

MPO	: myeloperoxidase	ミエロペルオキシダーゼ
NADPH	: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニン ジヌクレオチドリン酸
NK	: natural killer	ナチュラルキラー
NO	: nitric oxide	一酸化窒素
$^1\text{O}_2$: singlet oxygen	一重項酸素
8-OHdG	: 8-hydroxy-deoxyguanosine	8-ヒドロキシデオグアノシン
$\text{O}_2^{\cdot -}$: superoxide radical	スーパーオキシドラジカル
ONOO^-	: peroxynitrite	ペルオキシ亜硝酸イオン
PE	: phycoeythin	フィコエリトリン
PWM	: pokeweed mitogen	ポークウィードマイトジェン
RNA	: ribonucleic acid	リボ核酸

ROS	: reactive oxygen species	活性酸素種
SCGE	: single cell gel electrophoresis	単細胞ゲル電気泳動法
SSC	: side scatter	側方散乱光
sIgA	: secretory immunoglobulin A	分泌型免疫グロブリン A
SSBs	: single strand breaks	一本鎖損傷
TBARS	: thiobarbituric acid reactive substance	チオバルビツール酸反応物質
TCR	: T cell receptor	T 細胞抗原受容体
Tc cell	: cytotoxic T cell	細胞傷害性 T 細胞
Th cell	: helper T cell	ヘルパー T 細胞
TNF	: tumor necrosis factor	腫瘍壊死因子
URTI	: upper respiratory tract infections	上気道感染症
$\dot{V}O_{2max}$: maximal oxygen uptake	最大酸素摂取量

XO : xanthin oxidase

キサンチンオキシダーゼ

研究業績

原著論文

1. **Yuko Tanimura**, Kazuhiro Shimizu, Kai Tanabe, Takeshi Otsuki, Ryohei Yamauchi, Yuichi Matsubara, Motoyuki Iemitsu, Seiji Maeda, Ryuichi Ajisaka. Exercise-Induced Oxidative DNA Damage and Lymphocytopenia in Sedentary Young Males. *Medicine & Science in Sports & Exercise* 40(8): 1455-1462, 2008.
2. **谷村祐子**, 清水和弘, 河野一郎, 鯨坂隆一. 若年アスリートにおける短期間高強度運動がリンパ球数とリンパ球アポトーシスに及ぼす影響. *スポーツ科学研究* 5: 235-245, 2008.
3. **Yuko Tanimura**, Michihiro Kon, Kazuhiro Shimizu, Fuminori Kimura, Ichiro Kono and Ryuichi Ajisaka. Effect of a six- day intensified Kendo training on lymphocyte counts and its expression of CD95. *European Journal of Applied Physiology* (accepted)

学会発表

1. **Yuko Tanimura**, Kazuhiro Shimizu, Ryohei Yamauchi, Kai Tanabe, Takeshi Otsuki, Motoyuki Iemitsu, Seiji Maeda, Ryuichi Ajisaka. Relation of the oxidative DNA damage to lymphocytopenia after high intensity exercise. The 11th Annual Congress of the European College of Sport Science, Lausanne, 2006.
2. **谷村祐子**, 清水和弘, 松原裕一, 田辺解, 大槻毅, 家光素行, 前田清司,

鯨坂隆一. 高強度運動後のリンパ球減少に対する活性酸素, アポトーシスの関与. 第 62 回日本体力医学会大会, 秋田, 2007.

3. **Yuko Tanimura**, Michihiro Kon, Kazuhiro Shimizu, Fuminori Kimura, Ichiro Kono and Ryuichi Ajisaka. Effects of 5-day Kendo practice on lymphocyte level and expression of lymphocyte apoptosis in young Kendo athletes. The 9th symposium of the international society of exercise and immunology, Sendai, 2007.
4. **谷村祐子**, 清水和弘, 鯨坂隆一. アスリートにおける短期間高強度運動後のリンパ球数及びリンパ球アポトーシス. 日本体育学会第 59 回学会, 東京, 2008.

第1章 序論

1.1. 本研究の背景

競技スポーツ選手が試合で最高のパフォーマンスを発揮し、良い成績を収めるには、心・技・体のバランスのとれたコンディショニングが必要である。コンディショニングはスポーツ選手において、その選手の持つ最高のパフォーマンスが得られるようにコンディションを整えることである。良いパフォーマンスの発揮には高いフィットネスとスキルが必要であるが、それらを向上させても病気や怪我が発生すればよい結果を残すことはできない。コンディショニングを成功させるためには、フィットネス・スキル・メンタル、医学、栄養、環境などの要因を総合的に整えていく必要がある。

スポーツ選手がコンディションを崩す要因として、不適切なトレーニングなどの様々なストレスが考えられる。それらのストレスは、物理・化学的ストレス、生理的ストレス、生物学的ストレス、精神的ストレスに分類することができる。

その中でも、生物学的ストレスとなるウイルスや細菌の感染はコンディションを崩す大きな要因となり得る。試合に向けてトレーニングの質・量を高める必要のあるアスリートは競技力を高めるフィットネス（行動体力）やスキルの向上が不可欠であるが、その一方で高強度トレーニングによって各種のウイルスや細菌に対する免疫機能（防衛体力）が低下する可能性がある。スポーツ現場においてはフィットネス（行動体力）のみが重視されがちであるが、防衛体力にも注意を払わなければコンディショニングの成果を得ることができない。以上のことから感染症に対する防衛体力として免疫機能を評価することは、コ

ンディショニングにおいて有用であると考えられる。

運動と免疫について、Nieman らは競技レベルの高強度運動は上気道感染症の罹患リスクを高めることを報告している (66)。また Pedersen らは 1994 年に「中等度の運動は免疫機能を促進し、長時間の高強度運動は回復期において一時的に免疫機能を低下させる」というオープンウィンドウ説を提唱した (83)。病原菌に対する日和見感染リスクが高まるオープンウィンドウな状態が長時間続くと微生物やウィルスの侵入を容易に許してしまう可能性があり、アスリートの感染症罹患リスクの増加が要因と考えられる。このように感染症罹患リスクが高まった状態で高強度トレーニングを継続することは、結果としてアスリートがもつ最高のパフォーマンスを発揮できず、オーバートレーニングの一要因となる可能性も考えられている。

生体内において、免疫系は神経系および内分泌系とともに密接に関係しあって内部環境の恒常性を維持している (88)。しかし、生体の適応能力を上回るような過度なストレスは、免疫系の低下を始めとする身体機能の低下を招くと考えられている。免疫機能の中心的役割を果たしているリンパ球と運動の関係については多くの報告があり (25, 46, 115, 124)、アスリートの感染症罹患リスクの増加に関連している可能性がある。

これまでに多くの先行研究が、高強度運動後の一時的なリンパ球減少を報告している。従来、リンパ球減少の主なメカニズムとしてコルチゾールの増加が考えられている (106)。しかしコルチゾールの増加を伴わない場合も、リンパ球が減少することが報告されている (32, 33, 113)。一方で先行研究は高強度運動によるリンパ球減少のメカニズムの一つとして活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) や細胞死 (アポトーシス) が関与している可能性を示唆している (55, 119)。

ROS はアポトーシスを誘導するイニシエーターの一つであるため、運動で発生した ROS がアポトーシスを引き起こす可能性が考えられる。これらはコルチゾールの増加を示さない研究 (16) のリンパ球減少を説明できる可能性がある。

運動時には安静時と比較して酸素摂取量が増大するため、生体で発生する ROS は安静時と比較して劇的に増加する (15)。ROS とは大気中に存在する安定した酸素に対し、比較的寿命が短く反応性に富む酸素分子種のことである。生体には ROS を生成する系と消去する系が存在しバランスを保っている。しかし、ROS 生成系が消去系の能力を超えると酸化ストレスとなりデオキシリボ核酸 (deoxyribo nucleic acid: DNA) , 細胞膜などの脂質, 蛋白質を傷害し, 細胞死, 老化, 癌化を引き起こす (2)。先行研究において、運動によって ROS の発生がリンパ球 DNA を傷害することが報告されている (9, 113)。また ROS はアポトーシスの誘導因子であり、アポトーシスは形態学的に DNA の断片化を伴うため、この DNA 傷害がアポトーシスを反映している可能性も示唆されている (107)。

運動による一時的なリンパ球減少は、酸化ストレスによるリンパ球アポトーシスによって生じている可能性がある。運動によって傷害されたリンパ球はアポトーシスによって排除されることによってリンパ球が減少する可能性も考えられる。

以上のことから、運動によるリンパ球の減少と酸化ストレス、アポトーシスの関連を個々に検討した先行研究はあるものの (108, 112)、総合的に関係性を検討した研究はない。運動による ROS の発生とリンパ球に着目し、高強度運動後に生じるリンパ球減少のメカニズムを解明することはアスリートのコンディションチェック、オーバートレーニングの予防に関する様々な問題に非常に重要な示唆を与えられると思われる。

1.2. 本研究の目的

本研究の目的は、高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与について検討することを目的とした。

上記の目的を達成するために以下の課題を設けた。

1. 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討する。
2. 短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討する。

これらの研究課題を遂行することで得られる本研究の知見は、防衛体力を損なうことのない効果的なトレーニングプログラムを策定するための一助となると考えられる。

第 2 章 文献研究

2.1. 運動とリンパ球

2.1.1. リンパ球

ヒトには感染防御，異物の除去，変異細胞や老廃物除去などの役割を持つ生体防御機能である免疫機能が備わっており，免疫機能の中心的役割を果たしているのは白血球である．白血球には好中球，好酸球，好塩基球から成る顆粒球と免疫機能の中心となる T 細胞，B 細胞，ナチュラルキラー（natural killer: NK）細胞から成るリンパ球がある．

リンパ球は末梢血やリンパ節，脾臓，皮膚，粘膜に存在し，生体の全身性免疫（主に異物の排除）に関与し，感染した抗原に対する特異的な反応及び二度目の抗原侵入に対して，二次応答と呼ばれるより強い反応を発揮する役割を持っている．

免疫は自然免疫と獲得免疫に大別される．自然免疫とは，生まれたときにすでに存在する免疫であり，微生物の侵入に対してすぐに働くため第一線の防波堤の役目を果たしている．自然免疫は補体，食細胞，好中球，好酸球，NK 細胞に代表される．NK 細胞はウイルスに感染した細胞や腫瘍細胞表面上マーカーを認識して攻撃するリンパ球の一つである．

また獲得免疫は，成長とともに発達していく免疫である．獲得免疫に関与する細胞は抗原特異性をもつ T 細胞及び B 細胞である．T 細胞はさらに大きく以下の 2 つに分類される．1 つはヘルパー T（helper T: Th）細胞であり，マクロファージや B 細胞によるクラス II 主要組織適合複合体（major histocompatibility complex: MHC）分子提示抗原を T 細胞抗原受容体（T cell receptor: TCR）によっ

て捕獲し、細胞傷害性 (cytotoxic T: Tc) 細胞の働きを制御し、B 細胞の抗体産生細胞の分化を補助する機能を持つ。この Th 細胞は細胞性免疫及び液性免疫の両方を調節する重要な役割を担っている。一方、Tc 細胞はクラス I MHC 分子抗原に反応し、非特異的に非自己の微生物などの細胞を攻撃する役割を持つ。

B 細胞は、B 細胞受容体によって非自己である抗原と反応しクラス II MHC 分子を介して抗原情報を Th 細胞に提示することで Th 細胞を活性化させる。活性化し増殖した Th 細胞は、サイトカインを産生し B 細胞を抗体産生細胞に分化させる。抗体産生細胞となった B 細胞は、Th 細胞から提示された抗原情報をもとに抗原特異的な抗体を産生する。

2.1.2. 運動がリンパ球数に及ぼす影響

運動はストレスの一種であり、免疫機能に影響を与えることが報告されている (26, 65)。適度な運動は免疫機能を亢進させることが報告されており (69, 70)、運動で免疫機能を高め、感染に対する抵抗力を高めようとする試みがなされている。ここでは運動時間 (期間) と運動習慣の違いについての文献を以下に記す。

一過性運動による免疫パラメータの変動は、パラメータの種類や評価方法によって異なる。Figure 1 に各パラメータの反応性の模式図を示す (82)。Figure 1 で示したように運動による主な免疫担当細胞数・機能の反応は白血球の分画によって異なる。

リンパ球は運動刺激に対してその数が増加するとされているが、その変動は白血球分化抗原 (cluster of differentiation: CD) で分類されたサブセットによって

やや異なる。獲得免疫の司令官的役割を果たす T 細胞数は運動中及び運動後に増加するものの、その後安静時よりも減少し元の値に戻る (57)。これらの変動はアドレナリンやコルチゾールなどのストレスホルモンが関与すると考えられているが (79)、運動強度や持続時間に加えてホルモン受容体の感受性や ROS の影響も考えられている (76, 83)。

一方、抗体産生を担う B 細胞数は運動刺激に対する変動は小さく、運動中及び運動直後にやや増加するが、その後速やかに元の値に戻る。抗体産生能も運動による影響を受けにくく、ポークウィードマイトジェン (pokeweed mitogen: PWM) やリポポリサッカライド (lipopolysaccharide: LPS) による細胞幼若化試験では運動後に必ずしも増加せず変化しないことがあると報告されている (25)。

非特異的免疫系の中心である NK 細胞は T 細胞と類似した働きをするが、運動刺激に対する反応性は T 細胞よりも高い (84)。運動中及び運動後の増加率が高いだけでなく、運動後に生じる一過性の細胞数の減少率も大きい。また、NK 細胞の活性は中等度及び高強度運動を数分持続すると、運動中あるいは運動後に亢進する。また、その細胞数の増加は運動の持続時間よりも運動強度に依存すると考えられている (85)。

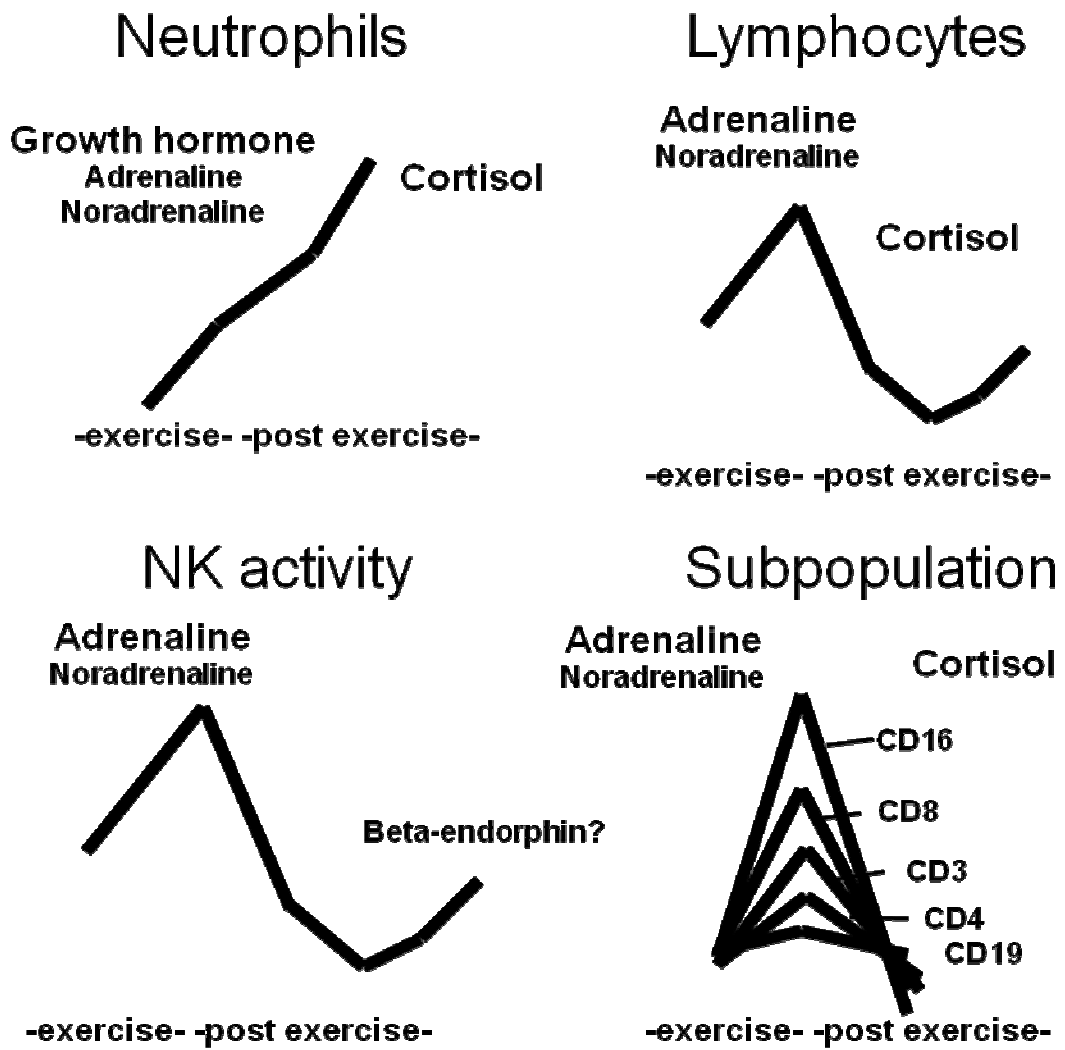


Figure 1. Shema of changes of immunity parameters during and post exercise.

(Revised ref. 82)

さらに、運動トレーニングが免疫機能に及ぼす影響について横断的な検討では、競技選手の安静時リンパ球は運動習慣のない対象よりも低値を示すことが報告されているが(34, 51), 差異はないという研究もある (80). Rhind らは特に競技選手における T 細胞数の低値を報告している (99). 縦断的な検討では, Verde らが激しいトレーニングを行っているランナーがさらにトレーニング量を増加したときに $CD4^+/CD8^+$ 比のさらなる低下がみられたと報告している (127). しかし, オーバートレーニングの者やシーズン中の競技選手は練習量が増加する前と比較してリンパ球数が変化しなかったことも報告されている (30, 43).

以上のことから、安静時のリンパ球数に関してはトレーニングによって低値になる傾向はあるが、アスリートにとっての真の安静時に測定することは難しいこともあり一定した見解が得られていない。しかし、リンパ球数の基準値が低値であることは、高強度運動後のリンパ球減少がより高度に低下する可能性を意味し、ウイルス感染に対する防御機構が低下する一因であるかもしれない。

2.1.3. 運動によるリンパ球減少のメカニズム

Pedersen らは中等度の運動は免疫機能を高める一方で、高強度の運動は、血中リンパ球濃度の低下, NK 細胞活性の低下, MHC 非拘束性細胞傷害の抑制, 粘膜の分泌型免疫グロブリン A (secretory immunoglobulin A: sIgA) の濃度減少が生じるため、長時間激運動後には一時的な免疫抑制状態が到来するという“オープンウィンドウ説”を提唱している (80, 83). この時期は 3-72 時間まで続き, ウィルスが生体に侵入すると, 容易に感染が成立すると考えられている. アス

リートがオーバートレーニングに至るような種々のストレスの組み合わせが、長期化した運動後の易感染性を引き起こす。よって“オープンウィンドウ説”は、アスリートがオーバートレーニング状態に至る誘因の一つである可能性がある (82)。

“オープンウィンドウ”の生じるメカニズムは未だ十分に解明されていない。しかし生理学的なリンパ球減少のメカニズムとしてコルチゾールの増加やアポトーシス細胞の増加について検討されつつある。

2.1.3.1. コルチゾール

リンパ球減少の主な理由の一つにはコルチゾールの影響が考えられている (16)。コルチゾールは副腎から放出されるストレスホルモンの一種である。高強度運動時にコルチゾール血中濃度は運動中に増加せず運動後に増加し、運動終了後においても安静時よりも高い値をしばらく維持し続ける。

コルチゾールが循環リンパ球数に影響を与えるメカニズムは明らかではないが、いくつかの説がある。一つはリンパ球の「再分布」であり、リンパ節から血管内にリンパ球が流入することを防ぎ、組織にリンパ球が移動することを促進する。Cupps らは、コルチゾールの静脈投与がリンパ球減少を引き起こすこと、リンパ球が血管内へ入るのを阻止し組織へ入ることを促すことを示している (16)。

コルチゾールは運動後の回復期において重要な役割を果たしている。無酸素性代謝閾値 (anaerobic threshold: AT) レベルで 90 分間のトレッドミル運動を行った直後のコルチゾール血中濃度は運動後 1 時間の循環リンパ球数と負の相関

関係を示す (26). これはコルチゾールが運動後のリンパ球減少に関連していることを示唆している. さらに, Okutsu ら (76) は運動で増加するコルチゾールがT細胞上のケモカインレセプターの発現を高めることによってリンパ節, 肺, 肝臓, そして骨髄へのリンパ球の移動を促していると報告している.

またコルチゾールはアポトーシスを調節することも報告されている (96). グルココルチコイドレセプター拮抗剤投与群と非投与群では, 非投与群の方が胸腺のDNA断片化が有意に少なかったことから, グルココルチコイドレセプターによってアポトーシスが調節されていることも示唆されている (42).

しかし, コルチゾール血中濃度の増加なしにリンパ球の減少がみられたという報告もあり (32, 33), コルチゾールのみがリンパ球減少に関与しているわけではないと考えられている.

2.1.3.2. アポトーシス

コルチゾールが運動終了後の回復期のリンパ球の減少に重要な役割を果たしていることは明らかになりつつあるが, 他の因子についても考慮されている. それはアポトーシス細胞の増加である. 詳細は, 2.3. 運動とリンパ球アポトーシスで後述する.

2.2. 運動と酸化ストレス

2.2.1. 酸化ストレス

大気中に存在する基底状態の酸素に比べて, 寿命が比較的短く生体内で酸化

反応に関与する酸素分子種を活性酸素種（ROS）と総称する。一般的に ROS とは原子または分子内に不対電子をもつフリーラジカルであるスーパーオキシドラジカル，ヒドロキシラジカルと，不対電子をもたない非ラジカルである一重項酸素，過酸化水素をさす。さらに広義の ROS には活性酸素種である一酸化窒素，ペルオキシ亜硝酸イオン，ミエロペルオキシターゼを触媒とした次亜塩素酸などがある。本論文ではこれらの ROS の生成が ROS 除去能力を超えて増加した状態を酸化ストレスと定義した。

酸化ストレスは，DNA，脂質，タンパク質を酸化傷害することが知られ，これらの指標を用いることによって半減期の短い ROS の発生を予測している。

ROS の発生源を以下に示す。

(1) ミトコンドリア電子伝達系

ミトコンドリアは，細胞における酸素消費の 90 %以上を占める器官である。酸素分子が電子伝達系の終末酵素によって 4 電子還元されて水となる過程において，その 1-15 %が ROS として漏出する。身体活動時には酸素摂取量が通常の 10-15 倍に達し，活動筋組織への酸素供給量は安静時の約 100 倍に達することから，身体活動中にはミトコンドリア電子伝達系から多量の ROS が発生すると考えられる。

(2) キサンチンオキシダーゼ（xanthin oxidase: XO）系

虚血-再灌流時に XO 系から多量の ROS が発生し，組織障害を引き起こすことはよく知られている。筋収縮時にも骨格筋内の XO 系から ROS が発生する。XO 阻害剤を用いた研究により，身体活動時に XO 系から発生する ROS が組織傷害を誘発する可能性が示唆されている。また，虚血-再灌流では傷害部位において二次的に集積してきた白血球中の

XO や好中球から発生する ROS の影響も重要である。

(3) その他

その他にミクロソーム内のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate: NADPH) —シトクロム c 還元酵素及び p450 系, カテコールアミンなどの生体物質の自動酸化, 筋損傷を伴う運動であれば細胞損傷部位に浸潤してきた好中球・マクロファージなどの貪食細胞にみられる NADPH オキシダーゼ系, あるいは一酸化窒素 (nitric oxide: NO) 産生系といった ROS 発生機構も考えられる。

リンパ球では活性化したリンパ球のミトコンドリアで ROS が発生することが報告されている (130)。

2.2.2. 運動による活性酸素の増加

身体活動の増加によって ROS が発生しているといわれているが, そのことを直接的に示した研究は少ない。これまでに ROS の直接測定が可能な電子スピン共鳴法 (electron spin response: ESR) を用いた研究では持久性運動直後に ROS が安静時以上に発生していることが認められている (3)。しかし, 身体活動で発生する ROS を高い精度で定量的に測定することは困難であると言わざるを得ない。したがって, これまでの多くの研究は酸化ストレスマーカーや抗酸化能力マーカーを測定し, 抗酸化物質を投与することで身体活動による ROS の発生とその影響を間接的に検討してきた (103)。

身体活動時に発生する ROS の発生量は, 運動習慣に影響されることがいくつ

かの研究で報告されている。ここでは、持久性アスリートにおいて持久性運動により発生した ROS，特にリンパ球の ROS による DNA 損傷と抗酸化機能に与える影響に着目し、持久性運動における ROS 発生と運動習慣の違いが及ぼす影響について検討した研究結果を示す。

Jammes らは最大運動後に血清脂質過酸化が増大し、抗酸化物質・酵素が減少したことを示している (45)。また一過性高強度運動による酸化ストレスがリンパ球の DNA 損傷を引き起こすと報告されている (17, 37, 56)。さらにリンパ球 DNA 損傷は抗酸化物質のサプリメントの投与によって防ぐことができると報告されている (36, 104, 117, 131)。これらのことからリンパ球の DNA 損傷が酸化ストレスによって生じると推測されているが、直接的に説明した研究はない。また一過性高強度運動後に増加した酸化ストレスは、1 日後にも増加していたことが報告されている (77)。

また、一過性運動により過酸化脂質は減少し、抗酸化酵素は増加したがトレーニング群と非トレーニング群の間に差がなかったことが報告されている (128)。Niess らは一過性運動に対する反応がトレーニング群の方が非トレーニング群よりも反応性が小さく、過酸化脂質の反応性も小さいことを報告した (73)。しかし安静時の酸化ストレスマーカーは非トレーニング群の方が高く、抗酸化物質の血中濃度は非トレーニング群の方が低かった。それはトレーニング群が習慣的な運動によって抗酸化システムのアップレギュレーションが生じているためだと考えられている (8)。これは運動トレーニングによって抗酸化物質の活性が上がったという先行研究によっても支持される (21)。

短期間の集中的なトレーニングと酸化ストレスについての知見は少ない。短期間集中的なトレーニングは、酸化ストレスの増加 (105)と抗酸化物質の増加

(125)を引き起こすことが報告されている。さらにトレーニング量の増加に伴って酸化ストレスが増加することも報告されている (22, 54)。これらは運動強度の増加や期間の増加に伴って、酸化ストレスが増加することを示唆している。

2.3. 運動とリンパ球アポトーシス

2.3.1. リンパ球のアポトーシス

アポトーシスとは形態学、生化学、分子学によって特異的に特徴づけられた細胞死の一種であり、個体がよりよい状態に保たれるために積極的に引き起こされる管理・調節された細胞の自殺のことである。形態学的には細胞が丸くなり、核が凝縮する。その後、DNA が短い単位（ヌクレオソームに相当）に切断され、細胞が小型の「アポトーシス小胞」と呼ぶ構造に分解する。これをマクロファージが貪食することによって異形細胞の排除が行われている。

アポトーシスを開始させるシグナルは、1) 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) などのサイトカインや CD95 Ligand (CD95L) による細胞外からのシグナル、2) DNA 損傷によるミトコンドリア自体からのシトクロム c の漏出によるもの、3) 小胞体ストレス（小胞体での異常なタンパク質の生成）によるものが考えられている。

2.3.2. 運動とアポトーシス

多くの研究により激しい運動はリンパ球や骨格筋にアポトーシスを引き起こすと報告されている (87)。グルココルチコイド、成長ホルモン、ROS、細胞内

カルシウム濃度の上昇, TNF などがアポトーシスを誘導する要因である. 上記のようないくつかの要因は, いずれも激運動で増加することが示されており (87), アポトーシスを生じさせる可能性が考えられる. ラットの胸腺は疲労困憊運動や身体活動の抑制で退化することが報告されている. 胸腺は T 細胞の産生部位なので, その退化は総 T 細胞数の減少を引き起こすと考えられる. Concordet と Ferry はラットにおいてトレッドミル運動後に胸腺の DNA 断片化が生じることから胸腺のアポトーシスが生じることを示唆した (13). しかし, 運動が必ずしもアポトーシスを誘導しているわけではなく, 90 分間の走運動を行ったラットの脾臓リンパ球数とグルココルチコイド血中濃度に関連はなく, コントロール群の脾臓リンパ球アポトーシス細胞数よりも少なかった.

ヒトでは TUNEL 法によってトレッドミル運動後の循環血液中のリンパ球 DNA 断片化の増加を示したことから, 運動によるリンパ球のアポトーシスが Mars ら (55)によって報告された. また, Green は運動による T 細胞の増殖能の低下は T 細胞のアポトーシスの増加によって生じることを示している (28). Mooren らは $80\% \dot{V}O_{2\max}$ の疲労困憊に至るトレッドミル運動により, リンパ球アポトーシス細胞数の 50% の増加がみられたことを示し (60), 運動 1 時間後のリンパ球減少がこのアポトーシスの増加で説明できる可能性を示唆している. 以上のように, 高強度運動によりリンパ球アポトーシスが増加することを示す研究は多く報告されている (63). しかし, $60\% \dot{V}O_{2\max}$ で 2 時間のトレッドミル運動を行っても, アポトーシス細胞数に変化を認めなかったとする報告もなされている (111). また Simpson らはアポトーシス細胞数の変化が一過性高強度運動後のリンパ球減少に寄与しないことを報告している (108).

近年, 短期間高強度運動がリンパ球のアポトーシスを増加させることが報告

されている (43, 120). Tuan らはアポトーシスの指標であるミトコンドリア膜電位が TNF- α や CD95 L と正相関することを報告しており (120), CD95L と CD95 の関係性については Mooren らの報告を支持する内容であった. しかし, これらの研究はリンパ球数との関連を検討していない. 横断的な研究ではアスリートと運動習慣のない対象を比較すると, リンパ球アポトーシスマーカーはアスリートの方が高値を示すことが報告されている (61).

2.4. 酸化ストレスとアポトーシス

酸化ストレスはアポトーシスのメディエーターの一つとして重要である. *in vitro* において過酸化水素は好中球のアポトーシスを引き起こすことが報告された (48). *in vivo* においても T 細胞の細胞死が引き起こされることが報告されている (118). これは T 細胞の活性化によって ROS が発生して, アポトーシスを引き起こしたことを示唆している (47). 好中球で発生する ROS は, カタラーゼや内因性の抗酸化物質であるグルタチオンによって抑制されている. 加えて, 内因性のグルタチオンはこれらの細胞で CD95 レセプターを介するアポトーシスを防いでいる. Quadrilatero らは抗酸化物質 (N-アセチル L-システイン) が一過性高強度運動で生じる腸のリンパ球アポトーシスを防ぐ効果があることを示唆した (90-92).

第 3 章 本研究の課題・仮説・方法及び研究限界

3.1. 本研究の課題

文献研究により，次の問題点が挙げられる．

1. 高強度運動によるリンパ球減少に対する検討において，メカニズムに関する知見が少ない．
2. 運動時に生じる酸化ストレスのリンパ球減少に対する役割について否定的な報告が多いが，アポトーシスのイニシエーターとしての役割について考えた知見は少ない．
3. 運動期間や運動習慣の違いによるリンパ球の減少を比較検討した研究は少ない．

以上の問題点を検討するために，高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討することを目的とした．

本研究では以下の 2 つの研究課題を設定した．

研究課題 1. 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討する（実験 1）．

一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレスの関与について検討する（実験 1-1）．さらに，一過性高強度運動によるリンパ球減少に対するリンパ球アポトーシスの関与について検討する（実験 1-2）．

研究課題 2. 短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討する（実験 2）．

実際の競技現場におけるリンパ球の変動と酸化ストレス，アポトーシスについて把握するために，合宿トレーニングによるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討する（実験 2-1）.さらに，若年男性とアスリートにおいて短期間高強度運動におけるリンパ球減少に対する運動で生じる酸化ストレス及びアポトーシスの関与について検討する（実験 2-2）.

3.2. 本研究の仮説

本研究の目的を達成するために，以下の 2 つの仮説を設定した.

1. 一過性高強度運動は一過性のリンパ球減少を示す. 運動で生じた酸化ストレスがリンパ球のアポトーシスを引き起こしリンパ球減少に関与する.
2. 集中的なトレーニングである短期間高強度運動は安静時のリンパ球を低下させ，運動で生じた酸化ストレスがリンパ球アポトーシスに関与する.

3.3. 本研究で用いた方法

3.3.1. 単細胞ゲル電気泳動法

本研究第 4 章及び第 5 章において用いた単細胞ゲル電気泳動法（single cell gel electrophoresis assay: SCGE）, 別名コメットアッセイ（comet assay）について以下に説明する. SCGE は，個々の細胞における定量的な DNA 損傷を評価するための簡便で速い検出力の高い方法である. SCGE は Cook ら (14)の方法に基づいて 1984 年に Ostling and Johanson によって開発された (78). SCGE は中性溶液下で細胞溶解と電気泳動を行い，染色には acridine orange を用いている. DNA 損

傷のある細胞は損傷 DNA が電気泳動によって引き伸ばされコメット（彗星）のように観察されることから comet assay とも呼ばれている。さらに 1988 年にはより感度の高い方法が開発された (109)。

観察対象である細胞はスライド上の薄いアガロースゲルに包埋され、細胞中のタンパク質を除去するために lysis solution によって溶解される。その後アルカリ性または中性条件下で細胞の DNA はほぐされた後、電気泳動にかけ蛍光色素によって染色される。電気泳動によって損傷した DNA 断片またはほぐされたクロマチンは核外に移動し、細胞から移動した DNA 断片量は、DNA 損傷に正比例する。

本方法はスーパーコイル状の DNA をほぐし、電気泳動によって一方の方向へ引っ張ることによって、電気泳動で切り離された DNA の小さな断片を評価している。SCGE は、DNA 損傷と同様にどの程度 DNA がほぐされているのかも評価することができる。また、SCGE によって見つけれられる最も単純なタイプの DNA 損傷は、二本鎖の損傷（double strand breaks: DSBs）である。DNA の DSBs は、DNA 断片になり、中性条件下で電気泳動をかけるだけで検出することができる。しかし、一本鎖の損傷（single strand breaks: SSBs）は DNA の二本鎖が切り離され、変性しない限り、DNA 断片に変化せず検出できないが、アルカリ条件下 (pH 12.1) で DNA を電気泳動にかけることによって DNA は断片化し検出できるようになる。他の種類の DNA 損傷は DNA が 13 より高い pH でアルカリ処理されると検出される部分で、アルカリでラベル化された部位（alkali labile sites: ALS）と広く呼ばれている。さらに DNA 損傷を誘導する特有のグリコシラーゼやエンドヌクレアーゼで処理することによって損傷の原因を特定することもできる。

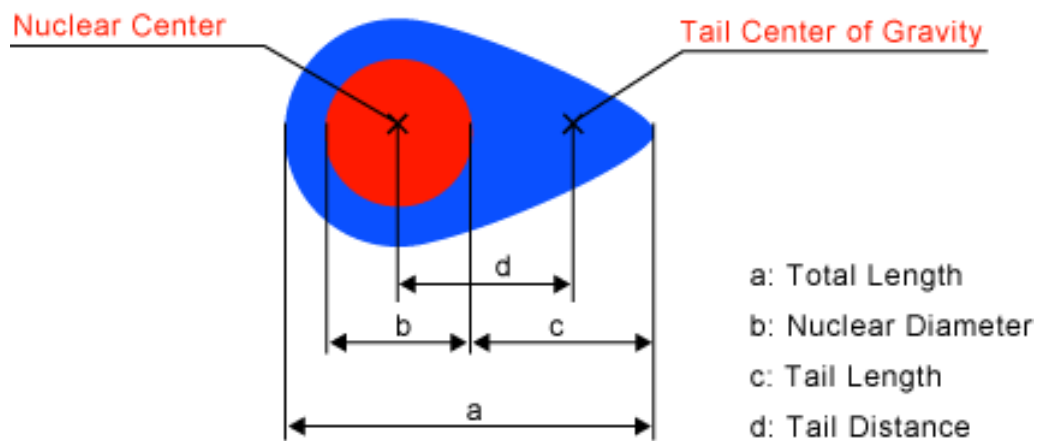
本研究ではヒト 8-オキシグアニン DNA グリコシラーゼ（human 8-oxoguanine

DNA glycosylase: hOGG1)を用いた. hOGG1 はオキソグアニン(oxoguanine: GO, oxoG) を特異的に認識する修復酵素で, oxoG 塩基を除去した後, 鎖切断を引き起こす働きをもつ. ROS で傷害されて結合が弱くなった DNA 鎖は hOGG1 によって切断されることで酸化に特異的な DNA 損傷として検出できる.

以上のように特定の DNA 損傷部位となる欠落部位をつくる状態をコントロールすることによって, DNA 損傷を特定する SCGE は有用である. そして, DNA 損傷が DNA の移動度の増加で検出できる一方, DNA の移動を抑制する DNA の結合や架橋に関しても SCGE は検出することができる.

SCGE は蛍光顕微鏡によって観察され, 得られた画像は様々な SCGE 分析用ソフトウェアによって解析されている (11). 最も一般的に用いられている指標は tail length, % DNA in tail と呼ばれる細胞の頭と尾の蛍光強度の比, そして tail moment である (Figure 2.). しかし, tail length はあまり有用でないとされており, その理由は全体的な tail の増加は初めの段階で生じるものであり, 低い DNA 損傷でも増加しやすい指標のためである. また, tail は損傷の程度に応じてその長さではなく輝度が増加するためである. tail length は背景に対して一定の蛍光強度を超えることによって tail の終わりを定義しているため, 画像解析のプログラムの閾値や背景を設定するには感度の高い指標だといえる.

最も有用な指標とされている % DNA in tail は損傷の頻度と直線性の相関が認められている (12). また, ソフトウェアの設定条件による影響も比較的受けず, 最大限幅広い範囲で損傷を識別することができる. そして, コメットが実際どのように見えているのかをはっきり示すことができる. 対照的に, 3 番目の指標である tail moment は損傷の程度と直線的な相関はなく, コメットの状態を反映しにくいとも言われている (11). しかし, tail moment を指標としたとき,



output parameter name	meaning
NuclearCenter	central coordinate of a nucleus
Ratio	= Sum of Tail Intensity / Sum of Cell Intensity
Sum of Tail Intensity	brightness total of a tail
Sum of Cell Intensity	brightness total of the whole cell
Tail Center of Gravity	center of gravity coordinate of a tail
Tail Distance	Nuclear center and tail distance with center of gravity
Tail Moment	= Tail Distance × Ratio
% DNA in tail	=100 × Ratio

Figure 2. Output items of the Comet analysis.

細胞の個体差が感度よく表されたとの報告もある (132). 現段階では, 有用な指標として確立されているのは% DNA in tail であり, tail moment については一定の見解が得られていないといえる.

3.3.2. フローサイトメーター

フローサイトメトリー法の測定原理は, 液体中に浮遊させた細胞を蛍光標示式細胞分取器 (fluorescence activated cell sorter: FACS) の細長い管 (フローセル) の中を流しながら, 個々の細胞にレーザー光を当て, 散乱光と蛍光を同時に測定することによって得た情報を解析することで, サンプルの特性を知る方法である.

一定波長の光線 (通常はレーザー光) を流体に当て, 光線に沿った方向の前方散乱 (forward scatter: FSC) と, 光線と直角の方向の側方散乱 (side scatter: SSC) を検出する. また微粒子を蛍光物質で標識し, レーザー光によって生じた蛍光を検出する蛍光検出器が一つかそれ以上備えられている. これらの検出器によって流体中の粒子が影響を及ぼした光, および蛍光を検出する. これらの検出されたピークから粒子の物理・化学的性質を推定することができる. 細胞の場合, FSC からは細胞の大きさが, SSC からは細胞内の複雑さ (核の形, 細胞内小器官, 膜構造などに由来) を分析できる.

本研究の第 4 章, 第 5 章においては 3 つの蛍光色素 (fluorescein isothiocyanate: FITC, phycoerythrin: PE, allophycocyanin: APC) を用いて測定した. これらの蛍光色素の組み合わせによってサンプルの特性を評価した. 細胞表面マーカーについては以下のモノクローナル抗体 CD3 (FITC, クローン: UCHL1,

DakoCytomation, Danmark), CD19 (APC, クローン: HTB19, Biolegend, U.S.A.), CD4 (APC, クローン: SFCI12T4D11, Immunotech, France), CD8 (FITC, クローン: B9.11, BeckmanCoulter, U.S.A.), そして CD95 (PE, クローン: 7C11, BeckmanCoulter, U.S.A.) を用いた. Annexin V は Annexin FITC (Immunotech, Marseille, France) キットを用いて検出した. また細胞内スーパーオキシドの指標として dihydroethidium (D23107; Introgen Corp, CA, U.S.A.) を用いた.

これらはソフトウェア (Cell Quest, BD Bioscience, U.S.A.) を用いてヒストグラム及びドットプロットに示し, 解析した. ネガティブコントロール (FITC/PE 標識 抗ヒト IgG) を基に, 陽性及び陰性を区別してリンパ球を測定した. 1 サンプルあたりリンパ球 10,000 個における陰性及び陽性細胞の割合を, リンパ球分画の各細胞の絶対値は, リンパ球の絶対値 (cells/ μ l) と各分画の陽性細胞率 (%) との積を用いて算出した.

3.4. 本研究の研究限界

3.4.1. 被験者

本研究は, 女性や高齢者を対象とした検討は行っていない. このように被験者の年齢および生活習慣に偏りがあり, 得られた知見を両性の全ての年齢層にそのまま適用することはできない. また本研究において統計的な有意水準に達しなかった一部の測定結果に関しては, 本研究における対象の例数が少ないことが一因であると考えられる. しかし, それらの結果の一部は Cohen の効果量 $D(10)$ を考慮することでいくらか意味があるものと考えられた.

3.4.2. 運動様式

本研究では、対象者に自転車エルゴメータを用いて定常負荷運動を一定時間行わせた測定とアスリートの合宿における測定から成る。したがって、得られた知見は限られた条件下におけるものであり、異なる条件下の運動強度や運動時間そして運動様式における検討は今後の課題として残る。

3.4.3. 測定方法

3.4.3.1. リンパ球スーパーオキシド

本研究において研究課題 1, 研究課題 2-2 においてリンパ球スーパーオキシドを測定した。採取血液より遠心にて集めたリンパ球層には単球が存在する。Wang ら (127)は運動直後では単球の ROS 産生が増加しなかったため、我々は単球の ROS 産生の影響は少ないと考えている。しかし、リンパ球のみに特異的な抗体を用いて ROS の産生量を測定したわけではない。

3.4.3.2. フローサイトメーター

本研究のリンパ球のサンプル調整において、一部全血法を用いた。全血法は lysis solution によって赤血球を溶血させる (114)。Lysis solution は細胞を減少させることも報告されているため、その一部しか検討されていない可能性もある。今後の課題として密度勾配法によるリンパ球のサンプル調整を行う必要もある。

第 4 章 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与 (課題 1)

4.1. 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレスの関与 (実験 1-1)

4.1.1. 緒言

高強度運動は、ストレスの一種であり免疫機能に影響を与えることは広く知られている。運動と上気道感染症罹患リスクの関係を表す J カーブ (66) のメカニズムは、運動後に一過性に免疫機能が抑制され感染罹患リスクの高まる”オープンウィンドウ” (83) で説明できる可能性が考えられる。高強度運動後にリンパ球が減少するメカニズムは未だ十分に解明されていないが、一つのメカニズムとしてコルチゾール濃度の増加が循環血液中のリンパ球を組織に流入させることによって生じると考えられている。しかし Green ら (32, 33) は高強度運動後にコルチゾール血中濃度の増加は認められたものの、リンパ球の変動は生じなかったことを報告している。それゆえ、高強度運動によるリンパ球減少にはコルチゾールの影響以外のメカニズムがあると考えられる。Tsai ら (119) は運動後のリンパ球数減少のメカニズムとして酸化的 DNA 損傷の関与を示唆している。

高強度運動は酸素摂取量を増加させ、ROS の産生を増加させる (2)。実際に、ROS は脂質、タンパク質、そして核酸を酸化させる。先行研究において、高強度運動は白血球 DNA を損傷させることが報告されている (38, 71, 129)。いくつかの研究は尿中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-hydroxy-deoxyguanosine: 8-OHdG) を用いて酸化的 DNA 損傷を評価しているが (75)、尿中 8-OHdG は間接的な DNA 酸化のマーカーと考えられている。さらに Inoue ら (44) は一過性の

水泳運動はリンパ球 DNA 損傷を有意に増加させると報告したが, Okamura ら (75)は運動トレーニング後にリンパ球 8-OHdG が変化しないことを報告した. この差異は DNA 修復酵素の活性の増加や持久性トレーニングによる内因性の抗酸化活性によって説明できるものであるかもしれない.

本研究の DNA 損傷の評価には SCGE を用いた (55, 86, 119). 従来の SCGE は DNA 損傷を評価するための方法であるが, 修復されなかった塩基の損傷を検出することはできない. 近年, 酸化に特異的な酵素を用いて酸化ストレス由来の DNA 損傷を検出することのできる SCGE が開発された (12). 本研究では酸化ストレス下で最も修飾を受けやすい部分の 8-oxo-7, 8-dihydroguanine (35)の塩基部分を修復する主酵素である hOGG1 (110)を用いた.

本研究の目的は, 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対して酸化ストレスの関与を検討することである.

4.1.2. 方法

4.1.2.1. 対象

対象者は, 喫煙・服薬及び運動習慣のない若年健常男性 15 名 [年齢 23.7 ± 1.5 歳, 身長 171.8 ± 6.2 cm, 体重 67.3 ± 5.8 kg, 体脂肪率 15.4 ± 2.9 % (平均値 \pm 標準偏差)] とした. 対象者には測定前日から測定終了までアルコール・カフェインの摂取及び激しい運動を控えるように指示した. 対象者に対して, 事前に実験の趣旨, 実験方法, 起こりうる危険性及び参加の任意性について十分説明し, 文書による参加の同意を得た. 本研究はヘルシンキ宣言の趣旨に従い, 且つ筑波大学大学院人間総合科学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施

した.

4.1.2.2. 実験デザイン

4.1.2.2.1. 運動負荷

4.1.2.2.1.a. 最大運動負荷テスト

本研究において用いた最大運動負荷テストの測定プロトコルは以下の通りである. 本テストは個々の酸素摂取量を相対的に決定するために実験 1-1 及び実験 1-2 において行った. 全ての対象者は自転車エルゴメータ (232CXL, コンビウエルネス, 東京) を用いた負荷運動によって最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake: $\dot{V}O_{2max}$) を測定した. エルゴメータに座り, 2 分間の安静後に 60 W から 100 W の負荷 (20 W/分のランプ負荷) で各 1 分毎の 3 分間のウォーミングアップを行い, その後, 疲労困憊に至るまで 30 W/2 分のランプ負荷運動を行った. テスト終了条件は①呼気ガス分析装置 (AE200S, ミナト医科学, 大阪) によりモニターされた酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) がプラトーに達した時点, ②ガス交換比が 1.10 を上回った時点, ③心拍数が予測最大心拍数 ($220 - \text{年齢}$) を超えた時点のうち, いずれか 2 つに該当した時点とした. ランプ負荷運動中の $\dot{V}O_2$ を呼気ガス分析装置を用いて一呼吸毎に測定し, それらの 30 秒毎の平均値より $\dot{V}O_{2max}$ を求めた.

4.1.2.2.1.b. 定常運動負荷テスト

定常運動負荷テストは、最大運動負荷テストの実施日から少なくとも4日間以上の間隔をあけて実施した。各被験者の50% $\dot{V}O_{2max}$ の強度で1分間のウォーミングアップを行い、引き続き75% $\dot{V}O_{2max}$ の強度で59分間の自転車ペダリング運動を行った。強度を75% $\dot{V}O_{2max}$ に維持するため、運動中に $\dot{V}O_2$ をモニターし、適宜運動強度を調節した。

4.1.2.2.2. 血液採取とサンプル調整

血液サンプルは定常運動負荷前の安静時 (PRE) , 運動直後 (P0) , 運動終了後1, 2, 3及び4時間後 (P1-P4) (合計6回) に翼状採血針を用いて肘前静脈より15 ml/回, 合計90 ml 採取した。対象者には定常運動負荷テスト前日の24時からテスト当日の運動終了4時間後までミネラルウォーター以外の飲食を控えるように指示した。ただし運動直後と運動終了1時間後の採血間に、全ての被験者に対して抗酸化作用の無い内容の同種・同量の軽食を摂取させた。全ての血液採取は7時から15時の間に行った。

血清分離は採取した血液を3000 rpm (4 ° C) で15分間遠心分離し、得られた血清を使用して過酸化脂質 (lipid peroxide: LPO) , コルチゾールの血中濃度を測定した。

リンパ球分離には採血した血液と等量のリン酸バッファー (phosphate buffered saline: PBS) 溶液の混和溶液を1:2の割合で加え、リンパ球分離液 (Ficoll-Paque, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) に静かに重層し、遠心分離 (3000 rpm,

30 分, 20 ° C) した. 単核球層を回収し PBS 溶液で 2 回洗浄した後, さらに遠心分離 (3000 rpm, 30 分, 20 ° C) した. 生じたペレットにセルバンカー (十慈フィールド株式会社, 東京) を加え, ピペッティングして細胞を浮遊させた後, クライオチューブに細胞浮遊液を分注し, これをリンパ球サンプルとした. このサンプルは DNA 損傷検出に使用するまで -80 ° C で凍結保存された.

4.1.2.3. 測定項目

4.1.2.3.1. リンパ球数

リンパ球数の測定は, 2 ml の血液を (株) 三菱化学メディエンスに依頼し, 多項目血球分析装置 (Sysmex SE-9000, Sysmex, 兵庫) を用いて行った. 白血球分画には鏡検法を用い, リンパ球数は白血球数と白血球分画の積により算出した.

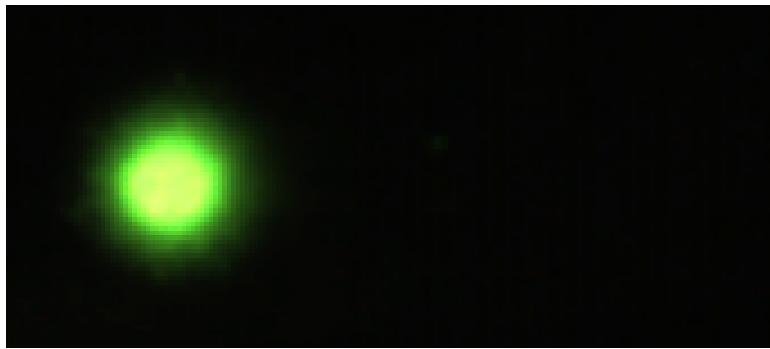
4.1.2.3.2. 酸化的 DNA 損傷

リンパ球の酸化的 DNA 損傷を検出するために SCGE を行った. なお, 本測定は hOGG1 FLARE Assay Kit (Trevigen, Gaithersburg, U.S.A.) のプロトコル (109) に準じた.

凍結保存されたリンパ球サンプルを 37 ° C で解凍し, これに高栄養液体培地である RPMI1640 (Invitrogen Corporation, California, U.S.A.) 1 ml を加え, 遠心分離 (3000 rpm, 30 分, 20 ° C) 後, 上清を取り除いたものに PBS 溶液を加え,

リンパ球細胞浮遊液とした。37 ° C に温めた低融点アガロース (1 % low melting point agarose: LMAgarose, 1×PBS) 100 µl をリンパ球細胞浮遊液 1 µl と混和させ、うち 75 µl を FLARE スライド上に満遍なく広げた。スライドにサンプルが接着するまで 4 ° C で一晩保存した後、スライドを冷却した 4 ° C の lysis solution (2.5 M sodium chloride, 100 mM EDTA pH 10, 10 mM tris base, 1% sodiumlauryl sarcosinate, 1 % TritonX-100) に 30 分間浸漬し、細胞溶解を行った。スライドについた余分な溶液を拭き取った後、室温の FLARE buffer (10 mM HEPES-KOH pH7.4, 10 mM EDTA, 0.1 M KCl) にスライドを浸し、hOGG1 酵素液を各サンプルエリアに 100 µl を加え、37 ° C で 60 分間高湿度の環境下で反応させた。続いて、スライドを pH 12.1 のアルカリ溶液 (500 mM EDTA pH 8.0, 3 M NaCl) に浸し、室温で暗所に置き 30 分間反応させた。次に pH 12.1 のアルカリ溶液で満たした水平型電気泳動槽にスライドを移し、室温で電気泳動を行った (30 V, 30 分間)。泳動後は余分な溶液を取り除いて 70 %エタノールに 5 分間浸し、中和させた。スライドに蛍光色素である SYBR Green I (励起光/発光 494 /521 nm) を 50 µl を加えて染色した後、蛍光顕微鏡でスライドを観察した。蛍光顕微鏡で観察した画像を、1 サンプルにつき最低 75 個、CCD カメラでコンピューターに取り込み、画像解析ソフト (コメントアナライザ ver 1.5, ユーワークス社, 茨城) で解析し、% DNA in tail を算出した。本実験で使用した指標の定義は第 3 章で Figure 2.に示し、得られた画像例を Figure 3.に示した。

(A)



(B)

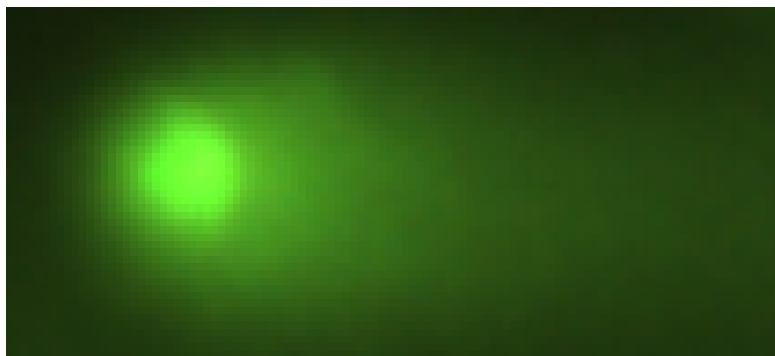


Figure 3. (A) Normal lymphocyte, and (B) DNA-damaged lymphocyte.

4.1.2.3.3. 血清マーカーの測定

血清中の LPO 濃度をヘモグロビンメチレンブルー法 (74)による LPO キット (協和メディックス社) で測定した。LPO は生体細胞膜などを構成する高度不飽和脂肪酸が ROS によって過酸化されることによって生じる物質であり、本研究では酸化ストレスの指標の 1 つとして用いた。

また、血清中のコルチゾール濃度を放射性免疫測定法 (100)により測定した。本研究では、コルチゾールをストレスホルモン及びアポトーシス誘因物質として測定した。

血液サンプルから測定された LPO とコルチゾールの運動後のデータは、全て運動後の血清量の変化率で補正した値とした。なお、この補正には Dill らの方法 (20)を用いた。

4.1.2.4. 統計処理

全ての統計量は平均値±標準偏差で示した。運動前後の変数の比較には反復測定の一元配置分散分析を行い、有意水準は $P < 0.05$ を用いた。Post-hoc テストには Bonferoni/Dunn 法の検定を用い、有意水準は $P < 0.0033$ とした。全ての統計処理には、統計解析ソフトウェア StatView5.0 日本語版 (SAS Institute Inc, North Carolina, U.S.A.) を用いた。また P 値が 0.1 未満で有意な差を示さなかったものについては効果の大きさを検討するために Cohen の D 値 (10)を用いた。

4.1.3. 結果

血中リンパ球濃度の変動を Figure 4.に示した. リンパ球濃度は PRE と比較して P0 に有意に増加し, P1 から P3 に有意に減少した. P4 では PRE の値と有意差を認めなかった.

SCGE を用いて酸化的 DNA 損傷の結果を% DNA in tail として評価し Figure 5. に示した. PRE と比較して P3 で有意な増加を示した. さらに P0 では増加傾向 ($P=0.0043$) を認め, Cohen D のエフェクトサイズ ($D=0.84$) は大きかった.

血清 LPO 濃度の変動を Figure 6.に示した. PRE と比較して P2 で有意な増加を示した.

血清コルチゾール濃度の変動を Figure 7.に示した. PRE と比較して P2 から P4 にかけて有意に減少した.

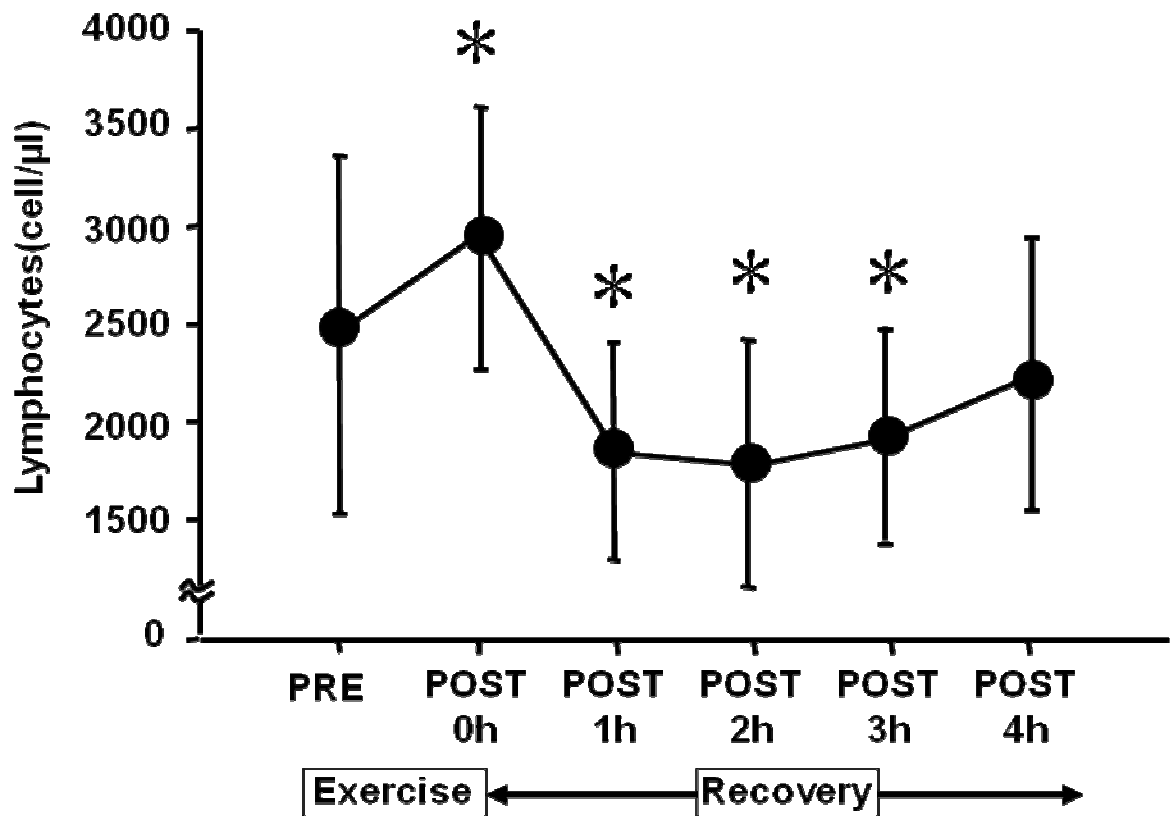


Figure 4. Time sequential changes in lymphocyte count pre- and post-exercise.

Values are adjusted according to blood volume changes following exercise and are expressed as the means \pm SD. These sequential changes in lymphocyte counts were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

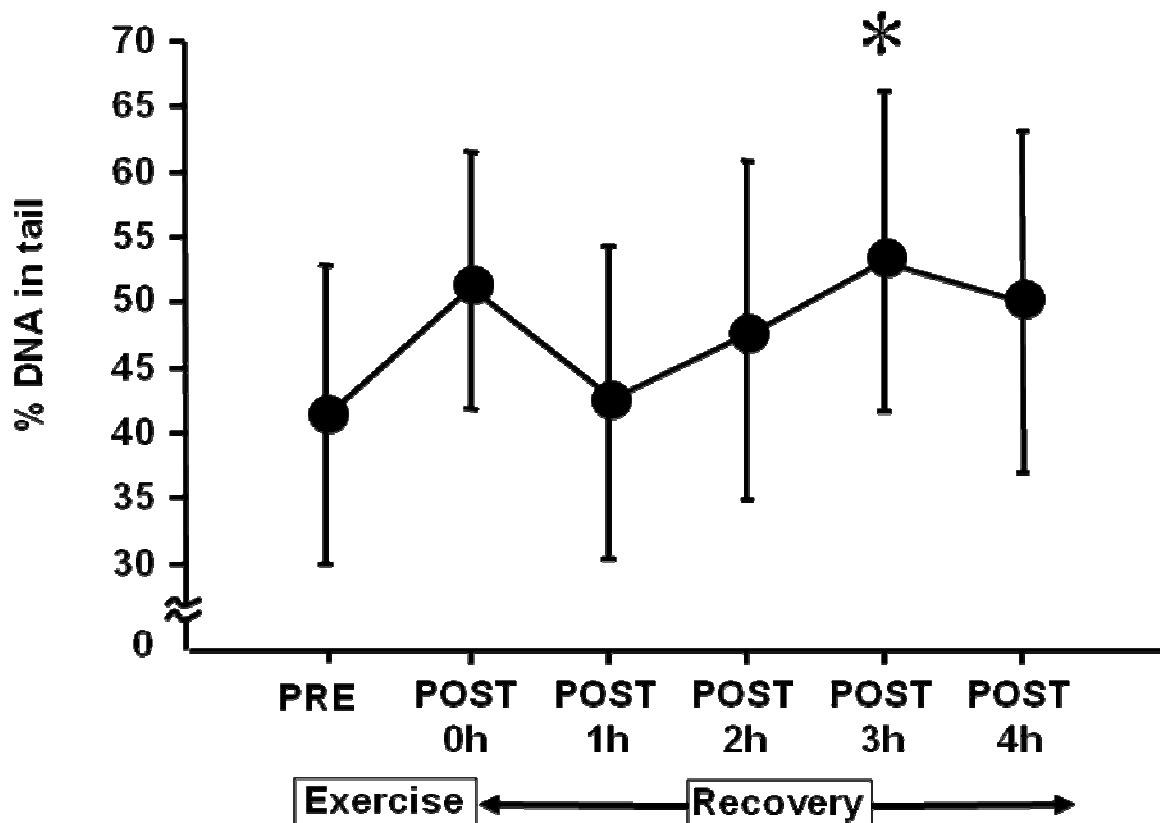


Figure 5. Time sequential changes in % DNA in tail pre- and post-exercise.

Values are expressed as the means \pm SD (n=14). These sequential changes in % DNA in tail were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

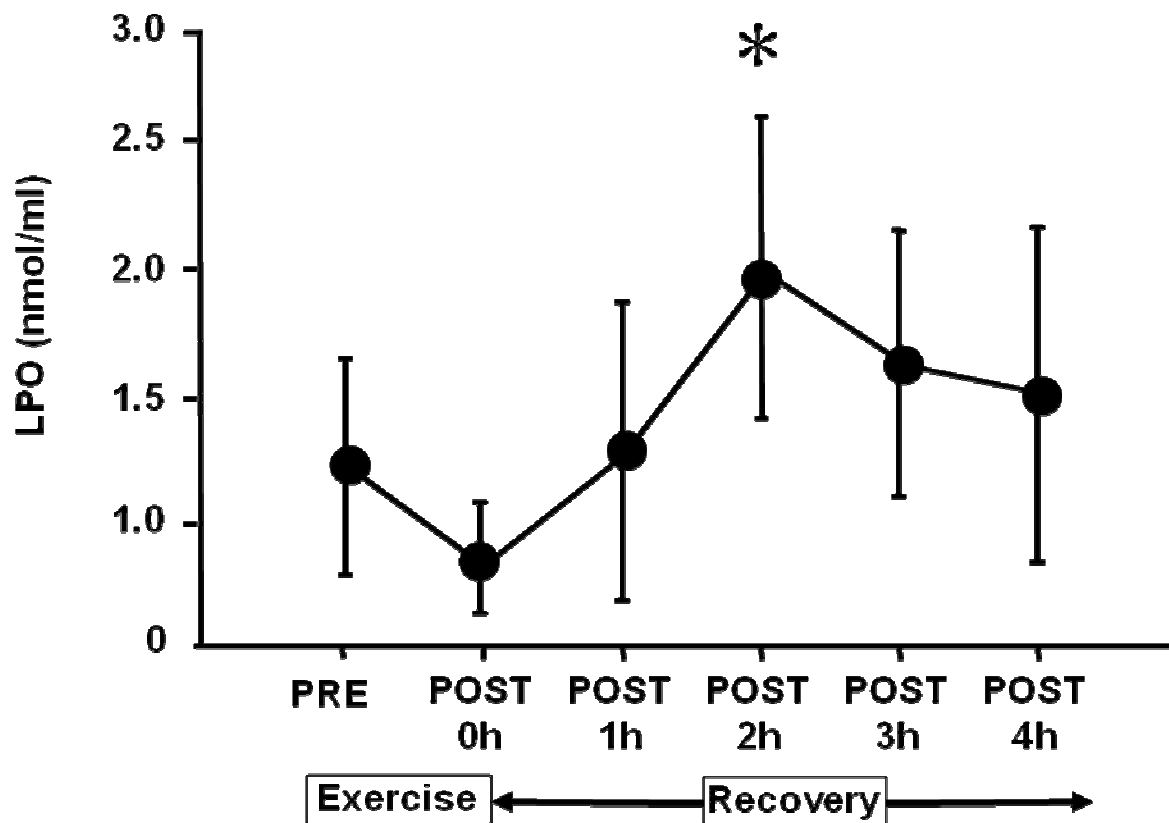


Figure 6. Time sequential changes in plasma levels of lipid peroxides (LPO) pre- and post-exercise.

Values are adjusted according to plasma volume changes following exercise and are expressed as the means \pm SD. These sequential changes in LPO were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

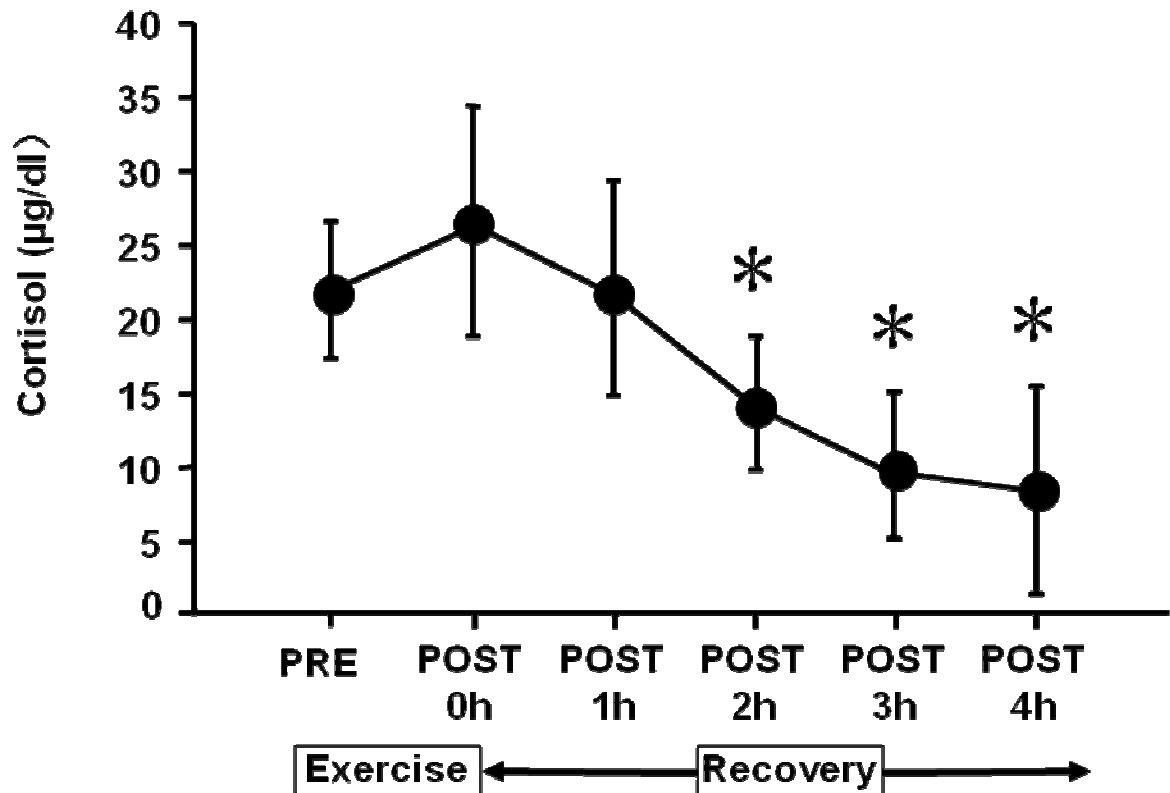


Figure 7. Time sequential changes in plasma levels of cortisol pre- and post-exercise.

Values are adjusted according to plasma volume changes following exercise and are expressed as the means \pm SD. These sequential changes in plasma levels of cortisol were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

4.1.4. 考察

本研究の結果は若年男性において一過性高強度運動後に生じるリンパ球減少がリンパ球の酸化的 DNA 損傷とともに生じることを示した。よって、酸化的 DNA 損傷は運動後のリンパ球減少と関係している可能性がある。

本研究において、高強度運動によるリンパ球の変動は先行研究と一致した (57, 80, 81)。コルチゾール血中濃度は 1 時間の運動直後に有意な変化は認められず、その後徐々に減少していった。コルチゾールが日内変動することはよく知られており、早朝に高値を示し夕方に低値を示す。よって、本研究のコルチゾールの減少は日内変動によるものと考えられる。しかし、Pedersen ら (80)は 1 時間程度の運動ではコルチゾールの増加はわずかな増加であることを報告している。

今回、我々は運動による酸化的 DNA 損傷を、hOGG1 を用いた SCGE によって初めて検出した。従来の SCGE は酸化的 DNA 損傷を検出するには信頼性が低く (11)、損傷を修復できない塩基を検出することができなかった。そのため、hOGG1 の利用は従来の SCGE よりも感受性が高いことが報告されている (9, 110)。一方で、運動後の酸化的 DNA 損傷の検出にはリンパ球の 8-OHdG が用いられることが多い (38, 73, 116)。現在、hOGG1 を用いた SCGE が 8-OHdG よりもより感受性が高いかどうかは不明である (12)。しかしながら、8-OHdG を用いた方法は、実験手技における分離、貯蔵などの過程で酸化を引き起こすため、運動による酸化を正確に反映しないことが報告されている (28)。

本研究においては、酸化的 DNA 損傷は P0 において増加傾向 ($P=0.0043$, $D=0.84$; Figure 5.) を示した。この結果は運動直後に酸化的 DNA 損傷の増加を示す先行研究 (71, 119, 129) と完全には一致しなかった。しかし、運動直後に酸化的 DNA 損傷の増加を示さない報告もある (73, 86)。この違いは運動の強度、時

間、環境そして採血のタイミングが関係している可能性がある。例えば、高地の低酸素環境下での運動は酸化 DNA 損傷を生じるが、平地では生じないという報告もある (59)。

酸化 DNA 損傷は PRE と比較して P3 で有意に増加した ($P < 0.0033$, Figure 5.)。過酸化脂質の指標として血清 LPO 濃度は、P2 で PRE と比較して約 1.6 倍有意に増加した。De Bont と Van Larebekera (18) は酸化した多価不飽和酸の産生物はデオキシヌクレオシドと反応するので、DNA 損傷の潜在的なメディエーターであることを述べている。その理由として、細胞外の発生源由来の ROS は遅延した DNA 損傷を引き起こすためである。

本研究では、高強度運動によるリンパ球減少とともに酸化ストレスマーカーの増加、酸化 DNA 損傷が引き起こされた。本研究で生じた運動 1-2 時間後のリンパ球の減少にはコルチゾールの関与も考えられるが、新たな知見として運動 3 時間後のリンパ球減少に酸化 DNA 損傷が関与している可能性が考えられる。

4.1.5. 結論

高強度運動によるリンパ球減少に対して酸化 DNA 損傷が関与している可能性がある。

4.2. 一過性高強度運動によるリンパ球減少に対するリンパ球アポトーシスの関与 (実験 1-2)

4.2.1. 緒言

実験 1-1 の結果は、高強度運動は運動後に一過性に免疫機能が抑制され感染症罹患リスクの高まる”オープンウィンドウ (83)”が生じることと矛盾しない結果であった。また酸化ストレスによるリンパ球の酸化的 DNA 損傷が生じた。リンパ球減少のメカニズムの一つとして注目されているアポトーシスは形態的に DNA の断片化が生じることが知られている。したがって実験 1-1 で生じたリンパ球酸化的 DNA 損傷はアポトーシスを反映している可能性がある。最近の研究 (60, 61, 80)では運動で生じるアポトーシスがリンパ球減少を引き起こし、免疫機能を低下させる可能性があると述べられている。Mars ら (55)は運動後のリンパ球のアポトーシスマーカーの増加を報告し、運動後のリンパ球減少と DNA 損傷の関連の一部が説明できる可能性を示唆した。また ROS は白血球アポトーシスを引き起こす細胞内経路を調節あるいは活性化する (72)。運動後のリンパ球酸化的 DNA 損傷とリンパ球アポトーシスに関連があるかは明らかではないが、先行研究 (86, 126)はこれらの関与について示唆している。さらにリンパ球減少に対する関与についての検討は行っていない。

本研究の目的は、一過性高強度運動によるリンパ球減少とリンパ球アポトーシスの関与を検討することである。

4.2.2. 方法

4.2.2.1. 対象

対象者は、喫煙・服薬及び運動習慣のない若年健常男性 10 名 [年齢 23.7±1.1 歳，身長 170.0±5.8 cm，体重 65.8±9.1 kg，体脂肪率 16.2±4.3 % (平均値±標準偏差)] とした。対象者には測定前日から測定終了までアルコール・カフェインの摂取及び激しい運動を控えるように指示した。対象者に対して、事前に実験の趣旨，実験方法，起こりうる危険性及び参加の任意性について十分説明し，文書による参加の同意を得た。本研究はヘルシンキ宣言の趣旨に従い，且つ筑波大学大学院人間総合科学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施した。

4.2.2.2. 実験デザイン

運動負荷，血液採取とサンプル調整は実験 1-1 と同様の方法を用いた。

(4.1.2.2.1. 運動負荷，4.1.2.2.2. 血液採取とサンプル調整 参照)

4.2.2.3. 測定項目

4.2.2.3.1. リンパ球数

実験 1-1 と同様の方法を用いた。(4.1.2.3.1. リンパ球数 参照)

4.2.2.3.2. リンパ球スーパーオキシド

分離したリンパ球 1,000,000 個を RPMI に再浮遊させ、そのうちの 495 μl を 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dihydroethidium (D23107; Introgen Corp, CA, U.S.A.) 5 μl に加えて、37°C で 15 分反応させた。反応後、リンパ球は RPMI で洗浄して再び再浮遊させた。この溶液をフローサイトメーターにて分析し、PRE の値を 100 % とした相対値を算出した。

4.2.2.3.3. アポトーシスマーカー

アポトーシス誘導因子である CD95 の測定には全血染色法を用いた。全血染色法は、先行研究において用いられている方法にしたがって行った。全血 100 μl を PE 標識抗ヒト CD95 モノクローナル抗体 (clone 7C11; Immunotech, Marseille, France) 2 μl 入りチューブに分注混和し、室温にて 15 分間暗所に静置した。さらに lysing solution (0.15 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NH_4Cl , 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KHCO_3 , 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-2Na) 1 ml を加えて転倒混和し、さらに室温にして 10 分間暗所に静置した。20 ° C, 3000 rpm で 5 分間の遠心後、白塊が沈殿していることを確認し、上清を取り除き、PBS (0.1 % 胎児血清アルブミン, 0.1 % NaN_3) 1 ml を加えて洗浄後、上記の PBS を 300 μl を加えて FACS 用チューブに分注した。

アポトーシスの構造変化を検出する Annexin V は、Annexin FITC (Immunotech, Marseille, France) キット (124) を用いて検出した。アポトーシスの初期段階において、細胞膜の内側に存在するホスファチジルセリン (phosphatidylserine: PS) が細胞表面上へ露出する。Annexin V は PS に高い親和性を持ち、特異的に結合

する。本研究ではこの細胞表面上の PS に結合した Annexin V を検出することによってアポトーシスを評価した。分離されたリンパ球は RPMI で洗浄し、3000 rpm で 5 分間、遠心して上清を取り除いた。分離したペレットはバインディングバッファー 5×10^6 /ml 濃度に調整されて氷上で安置した。Annexin V FITC 1 μ l とヨウ化プロピジウム 5 μ l を濃度調整した 100 μ l に加えて、氷上、暗所で 15 分間反応させた。リンパ球溶液はバインディングバッファー 400 μ l を加えて混和し、FACS 用チューブに分注した。

4.2.2.3.4. フローサイトメトリー解析

全てのリンパ球分画の分析はフローサイトメーター (FACSCalibur, Becton Dickinson Immunocytometry System, CA, U.S.A.) で分析した。フローサイトメーターによってレーザー光を照射し、散乱光及び蛍光を検出した。さらに散乱光によって細胞の直径及び細胞内部構造を判別しリンパ球を検出した。検出されたリンパ球のみを抽出し、細胞表面に結合した各蛍光抗体の発光限度を蛍光により検出した。FITC/PE 標識 抗ヒト IgG をネガティブコントロールとして用いた。1 サンプルあたりリンパ球 10000 個における陰性及び陽性細胞の割合を、ソフトウェア (Cell Quest, BD Bioscience, U.S.A.) を用いてヒストグラム及びドットプロットに示し、解析した。リンパ球分画の各細胞の絶対値は、リンパ球の絶対値 (cells/ μ l) と各分画の陽性細胞率 (%) との積を用いて算出した。

4.2.2.4. 統計処理

全ての統計量は平均値±標準偏差で示した。運動前後の変数の比較には反復測定の一元配置分散分析を行い、有意水準は $P < 0.05$ を用いた。Post-hoc テストには Bonferoni/Dunn 法の検定を用い、有意水準は $P < 0.0033$ とした。全ての統計処理には、統計解析ソフトウェア StatView5.0 日本語版 (SAS Institute Inc, North Carolina, U.S.A.) を用いた。また P 値が 0.1 未満で有意な差を示さないものについては効果の大きさを検討するために Cohen の D 値 (10)を用いた。

4.2.3. 結果

総リンパ球数の変動を Figure 8.に示した。PRE と比較して P0 で有意に増加し、P1-P4 で有意に減少した。

細胞内のスーパーオキシドレベルを Figure 9.に示した。PRE と比較して P0 で有意に増加した。

リンパ球 CD95 の発現と Annexin V を Table 1.に示した。リンパ球 CD95 の発現は全体に有意な変動は認められなかった。しかし PRE と比較して P3 で増加傾向 ($P = 0.029$) を認め、エフェクトサイズ ($D = 0.47$) も中程度の大きさを示した。さらに、リンパ球 Annexin V の発現は全体に有意な変動を認めなかった。

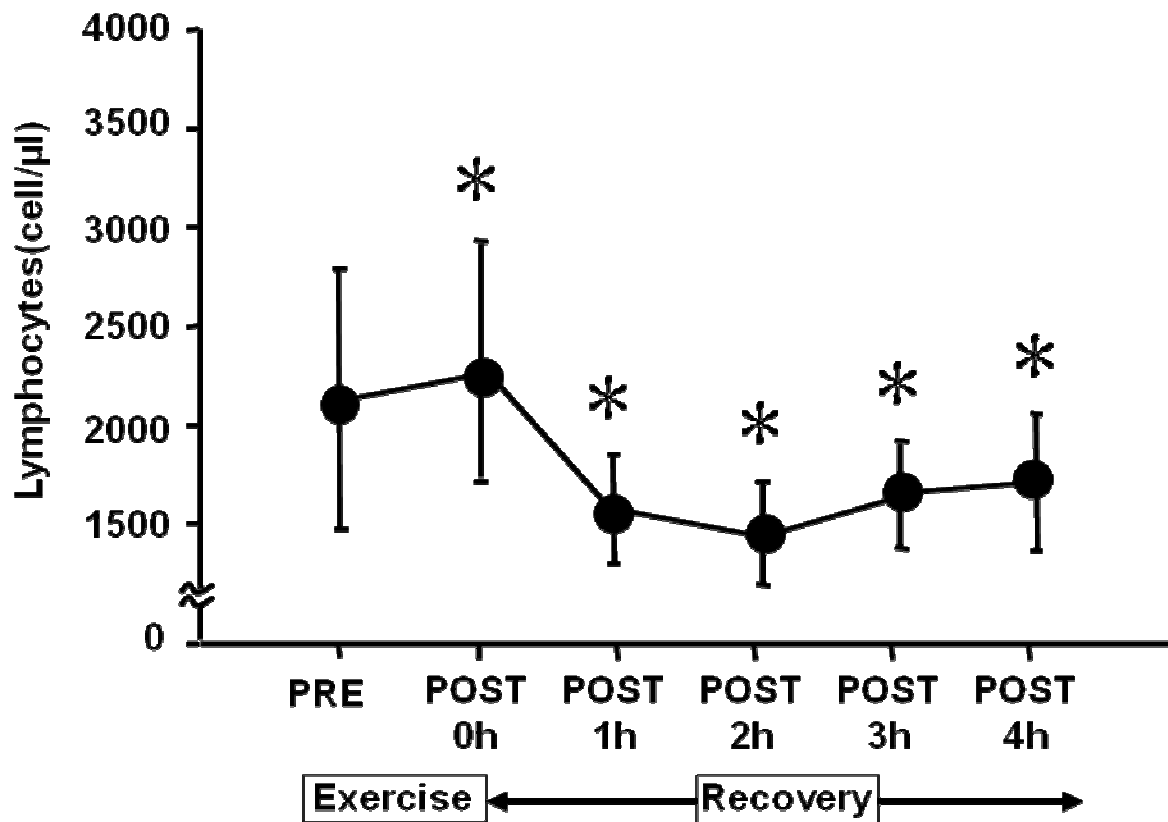


Figure 8. Time sequential changes in lymphocyte count pre- and post-exercise.

Values are adjusted according to blood volume changes following exercise and are expressed as the means \pm SD. These sequential changes in lymphocyte counts were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

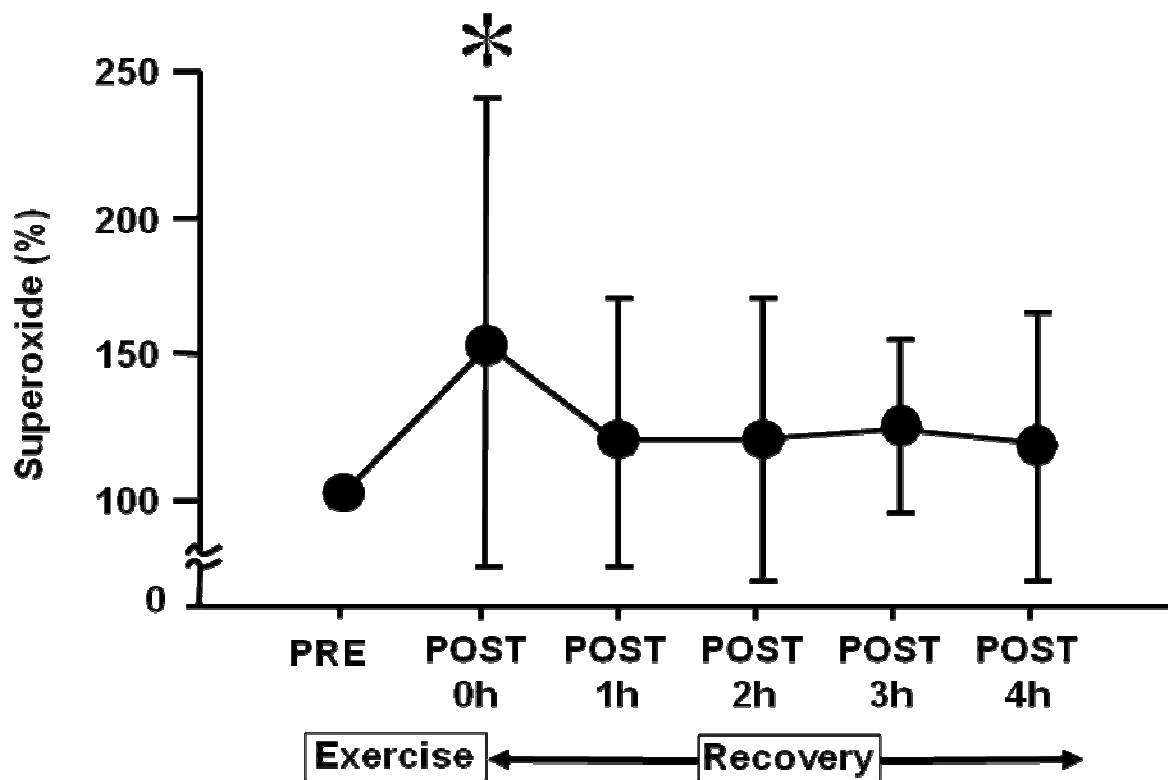


Figure 9. Time sequential changes in intracellular superoxide level pre- and post-exercise.

The ordinate is the relative value that assumed the quantity of ROS at PRE represented as 100 %. Values are expressed as the means \pm SD. These sequential changes in intracellular superoxide were significant by ANOVA ($P < 0.05$). *: Significant difference from pre-exercise by post-hoc test. 0 h = immediately after exercise. h = hour.

Table 1. Time sequence changes of apoptotic lymphocytes (%).

	PRE	POST				
		0h	1h	2h	3h	4h
CD95 ⁺ cell	36.8±7.3	35.5±9.2	36.8±7.9	38.8±7.2	40.3±7.4	39.6±7.9
Annexin V ⁺ cell	21.5±9.6	21.3±9.4	20.9±7.0	20.4±6.4	22.5±7.0	16.8±7.6

Values are the means \pm SD.

4.2.4. 考察

実験 1-1 のリンパ球減少や先行研究の結果と同様に高強度運動後に一過性のリンパ球減少が生じた。リンパ球スーパーオキシドは運動直後に有意に増加した。しかしながら、リンパ球アポトーシスマーカーは運動後に有意な増加を認めなかった。

スーパーオキシドが P0 に有意に増加したことは実験 1-1 で得た結果である P0 の酸化的 DNA 損傷の増加と関係があるのかもしれない。スーパーオキシドの発生源には 2 つあり、ひとつはミトコンドリア、そしてもう一つは血管内皮細胞に存在する XO である (15)。しかしながら、スーパーオキシドや他の ROS の発生源を本研究では規定できないためラジカルの発生源は不明である。

ROS はヒトのリンパ球においてアポトーシスやネクローシスなどの細胞死のトリガーとなる可能性がある (5)。アポトーシスはプログラミングされた細胞死あるいは「細胞の自殺」といわれており、ネクローシスとは異なり、アポトーシスは細胞の除去に伴う迅速な過程である。本研究の CD95⁺ 細胞は回復期の P3 で PRE よりも増加傾向を示したが、これらの変化には PRE と比較して統計的な差は認められなかった (Table 1.)。Timmons ら (116) は CD95⁺ 細胞は運動後の回復期において安静時よりもより多かったことを報告しており、これらのことから CD95 の最初のシグナルは ROS の増加であると考えられている。本研究においては、LPO の増加とスーパーオキシドの増加が関係した可能性が考えられる。しかし、Annexin V⁺ 細胞は統計的に有意な変化をもたらさなかった (Table 1.)。それ故、本研究はリンパ球の運動後のアポトーシスの増加を説明することができなかった。先行研究 (60, 61, 116) のいくつかは運動後の Annexin V⁺ 細胞と CD95⁺ 細胞の増加を報告している、本研究の結果はこれらの研究結

果と一致しなかった。疲労困憊運動は中等度の強度の運動よりもアポトーシスを生じやすい (60, 126)。よって、本研究で用いた運動強度はアポトーシスを引き起こす強度には十分でなかったかもしれない。また先行研究は2時間の高強度運動でアポトーシスの指標である7-アミノアクチノマイチンDのリンパ球数に対する割合は増加したことが報告されている (86)。しかし30分の運動でもアポトーシスレベルの増加がみられたとの報告もある (120)。以上のことから、アポトーシスは運動時間よりも運動強度に依存して発生する可能性が考えられた。本研究の1時間の運動は長時間のAnnexin V⁺細胞の増加が認められず、CD95⁺細胞の増加傾向が認められたことは、アポトーシスを抑制する物質として抗酸化物質の活性の変化によって説明できるのかもしれない (40)。他の可能性はDNAが傷害されてもDNA修復酵素が働くために、DNAが修復されることによって傷害されたリンパ球がアポトーシスを生じない可能性が考えられている。

4.2.5. 結論

一過性高強度運動によるリンパ球減少に対してリンパ球アポトーシスの関与は認めなかった。

第5章 短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与（課題2）

5.1. 合宿トレーニングによるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与（実験2-1）

5.1.1. 緒言

アスリートの多くは、日々の高強度トレーニングや競技会に向けた集中的なトレーニングを行うことでパフォーマンスを維持し高めている。しかし、先行研究において高強度運動はリンパ球減少を引き起こすと報告されている (53, 83)。さらには、アスリートの安静時のリンパ球数は運動習慣のない人と比較して低いことも報告されている (24, 49)。さらに、高強度トレーニングや競技会後の上気道感染症（upper respiratory tract infections: URTI）の罹患リスクの増加がアスリートにおいて報告されている (51)。URT I はNK細胞活性の低下とリンパ球増殖反応を抑制する (67)。NK細胞活性の低下はウィルスや細菌に対する宿主の保護機構を弱める (68)。加えて、高強度運動後のリンパ球増殖反応の抑制は $CD4^+$ 細胞の相対的な減少を一部説明している (121)。近年、Tリンパ球機能がアスリートの健康に関与することが報告されており (31, 50)、Green ら (32, 33) はTリンパ球のアポトーシスの増加が一過性運動後のTリンパ球の増殖機能を減少させることを示した。

リンパ球アポトーシスは、リンパ球減少のメカニズムの一つである可能性が示唆されている (55)。一過性運動がリンパ球アポトーシスを引き起こすことが報告されているが (60, 61, 116)、引き起こさないという研究 (111) もあり、リンパ球アポトーシスがリンパ球減少に関与しているかどうかについては一致した

見解が得られていない。Mooren らは最大酸素摂取量の高い群（60 ml/min/kg 以上）よりも低い群（55 ml/min/kg 以下）で安静時におけるリンパ球アポトーシスレベルが低いことを報告している (61)。また激運動はリンパ球アポトーシスを引き起こす一方で、中等度の運動は引き起こさないことを報告している (60)。したがって、リンパ球アポトーシスの動態は運動強度や対象者のトレーニングレベルにより影響を受ける可能性がある。さらに、Simpson ら (108) はリンパ球アポトーシスが一過性高強度運動後に生じるリンパ球減少には関与しないと述べている。短期間高強度運動ではリンパ球のアポトーシスの増加が報告されているが (43, 120)、リンパ球数の変化との関連については検討されていない。

高強度運動は ROS を増加させることが報告されている (3, 4)。集中的な高強度運動は酸化ストレスを増加させる (75, 95, 105)。Okamura らは 9 日間の合宿において、尿中の 8-OHdG が増加を示すことを報告した (75)。また ROS はアポトーシスの誘因物質の一つであり (107, 118)、活性化された T リンパ球が ROS を発生してアポトーシスを引き起こすことが示唆されている (47)。したがって、高強度運動がリンパ球を活性化させ、また高強度運動の連続が酸化ストレスを増加させ、アポトーシスを増加させる可能性がある。

そこで本研究では、競技現場におけるリンパ球数の動態と酸化ストレス、アポトーシスの発現を推定するために、6 日間の剣道合宿において総リンパ球、CD4⁺ 細胞と CD8⁺ 細胞におけるそれらの CD95 の発現、酸化ストレスマーカーの変化を検討することを目的とした。

5.1.2. 方法

5.1.2.1. 対象

対象者は、筑波大学剣道部に所属し春合宿（平成 18 年 3 月 25 日から同年 3 月 30 日）に参加した喫煙・服薬習慣のないアスリート男性 8 名 [年齢 19.6 ± 0.9 歳, 身長 172.7 ± 5.3 cm, 体重 71.9 ± 8.3 kg, 体格指数 (body mass index : BMI) 24.0 ± 1.7 kg/m², 剣道歴 12.5 ± 1.8 年 (平均±標準偏差)] とした. 通常期の練習は 1 日 2 時間, 週 5 日行っていた. 先行研究において, 平均的な日本人剣道選手の最大酸素摂取量は 46.8 ± 3.4 ml/min/kg であった (39). 対象者に対して, 事前に実験の趣旨, 実験方法, 起こりうる危険性及び参加の任意性について十分説明し, 文書による参加の同意を得た. 本研究はヘルシンキ宣言の趣旨に従い, 且つ筑波大学大学院人間総合科学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施した.

5.1.2.2. 実験デザイン

5.1.2.2.1 運動プロトコル

練習は午前 9 時から午前 11 時 30 分, 午後 2 時 30 分から午後 5 時 30 分の計 5 時間 30 分行った. 午前練習は, 準備体操, 素振り (20 分間), 切り返し及び基本練習 (40 分間), 休憩 (10 分間), 互角稽古 (60 分間), 掛かり稽古 (15 分間), 整理運動 (5 分間) とした. 午後練習は, 準備体操, 素振り (20 分間), 試合練習 (100 分間), 休憩 (10 分間), 互角稽古 (45 分間), 整

理運動（5 分間）とした。なお，10 分間の休憩時には水分補給を行った。水分補給はミネラルウォーターを自由飲水とした。

なお先行研究 (1)によると，各々の運動の強度は切り返し及び基本練習 $86 \pm 3 \% \text{HRmax}$ ，掛かり稽古 $88 \pm 3 \% \text{HRmax}$ ，そして五角稽古 $77 \pm 4 \% \text{HRmax}$ であるとされていることから，本研究の運動強度は高強度運動であったと考えられる。

5.1.2.2.2. 血液採取とサンプル調整

採血は，合宿 2 週間前（PRE），合宿初日（Day1），合宿 3 日目（Day3），合宿 5 日目（Day5），及び合宿終了 1 週間後（POST）に行い，いずれも午後 1 時半から午後 2 時 15 分の間に行った。

血液は肘正中静脈より採取した。採取した血液は，2 本の EDTA-2K 入りの採血管に分注した。血球成分測定用のサンプルとして全血を 4°C で冷蔵保存し，即日中に測定した。

5.1.2.3. 測定項目

5.1.2.3.1. リンパ球数

実験 1-1 と同様の方法を用いた。（4.1.2.3.1. リンパ球数 参照）

5.1.2.3.2. 血清マーカーの測定

実験 1-1 と同様の方法を用いた。 (4.1.2.3.3. 血清マーカーの測定 参照)

5.1.2.3.3. リンパ球表面マーカーの測定 (T 細胞, Th 細胞, Tc 細胞, CD95 陽性細胞)

本研究では, FACS によるリンパ球分画の分析を行った。全血染色法によるリンパ球分画の測定には, 3 種の蛍光色素 (FITC, PE, APC) のモノクローナル抗体を用いた。モノクローナル抗体は CD3 (FITC, クローン: UCHT1, DakoCytomation, Danmark), CD19 (APC, クローン: HTB19, Biolegend, U.S.A.), CD4 (APC, クローン: SFCI12T4D11, Immunotech, France), CD8 (FITC, クローン: B9.11, BeckmanCoulter, U.S.A.), そして CD95 (PE, クローン: 7C11, BeckmanCoulter, U.S.A.) を用い, CD3⁺ 細胞 (T 細胞), CD4⁺ 細胞 (Th 細胞), CD8⁺ 細胞 (Tc 細胞), CD95⁺ 細胞, CD4⁺CD95⁺ 細胞, CD8⁺CD95⁺ 細胞の細胞数とリンパ球全体に対する割合を測定した。1 サンプルにつき, 各抗体を 2 μ l ずつ使用した。アイソタイプコントロールは, マウス IgG1 (クローン: DAK-G01, DakoCyromation, Danmark) を用いた。

測定方法は実験 1-2 と同様の方法を行った (4.2.2.3.3. アポトーシスマーカー参照)。

5.1.2.3.4. フローサイトメトリー解析

フローサイトメトリー解析は，実験 1-2 と同様の方法を行った（4.2.2.3.4. フローサイトメトリー解析 参照）．

5.1.2.4. 統計処理

全ての統計量は平均値±標準偏差で示した．運動前後の変数の比較には反復測定の一元配置分散分析を行い，有意水準は $P < 0.05$ を用いた．Post-hoc テストには Bonferoni/Dunn 法の検定を用い，有意水準は $P < 0.005$ とした．全ての統計処理には，統計解析ソフトウェア StatView5.0 日本語版（SAS Institute Inc, North Carolina, U.S.A.）を用いた．また P 値が 0.1 未満で有意な差を示さないものについては効果の大きさを検討するために Cohen の D 値 (10)を用い， D 値が 0.8 以上のものについては結果として示した．

5.1.3. 結果

総リンパ球とリンパ球サブセットの $CD4^+$ 細胞と $CD8^+$ 細胞の変化を Table 2. に示した．総リンパ球数は Day3 で PRE と比較して有意な減少を示した． $CD8^+$ 細胞は PRE と比較し Day3 で有意に減少したが， $CD4^+$ 細胞の減少は有意ではなかった．

LPO は全体で有意な変化を示したが（ $P < 0.05$ ），PRE との比較では有意な変化を示さなかった（Table 3.）．

CD95 を発現したリンパ球の細胞数と総リンパ球数に対する割合を Figure 10. に示した. CD95⁺ 細胞数は PRE と比較して Day3 において有意に増加し, その割合は PRE と比較して Day1 と Day3 で有意に増加した. CD4⁺CD95⁺ 細胞数及び CD8⁺CD95⁺ 細胞数の変化を Figure 11. に示した. CD4⁺CD95⁺ 細胞数は PRE と比較して Day3 で有意に増加したが, CD8⁺CD95⁺ 細胞数は PRE と比較して Day3 で有意に減少した (Figure 11.) .

CD4⁺CD95⁺ 細胞及び CD8⁺CD95⁺ 細胞の総リンパ球数に対する割合の変化を Figure 12. に示した. CD4⁺CD95⁺ 細胞の割合は PRE と比較して Day3 で有意に増加した. しかし, CD8⁺CD95⁺ 細胞の割合は PRE と比較して有意な変化は認められなかった.

血清コルチゾール濃度を Figure 13. に示した. 血清コルチゾール濃度は PRE と比較して Day3 で有意な増加を示した.

Table 2. The changes in total lymphocyte and its subset counts (cell/ μ l) with the training.

	PRE	Day 1	Day 3	Day 5	POST
Lymphocytes	1919 \pm 583	1650 \pm 420	1494 \pm 506*	1729 \pm 465	1749 \pm 366
CD4 ⁺ cells	731 \pm 218	632 \pm 156	613 \pm 216	713 \pm 146	693 \pm 142
CD8 ⁺ cells	598 \pm 204	520 \pm 130	390 \pm 104*	502 \pm 124	534 \pm 158

Values are represented as the means \pm SD.

* $P < 0.05$: statistically significant different vs. PRE.

Table 3. The changes in serum lipid peroxide (LPO) concentration (nmol/ml) with the training.

	PRE	Day 1	Day 3	Day 5	POST
LPO	1.50± 0.29	1.46± 0.65	1.64± 0.29	1.61± 0.26	0.98± 0.21

Values are means ± SD.

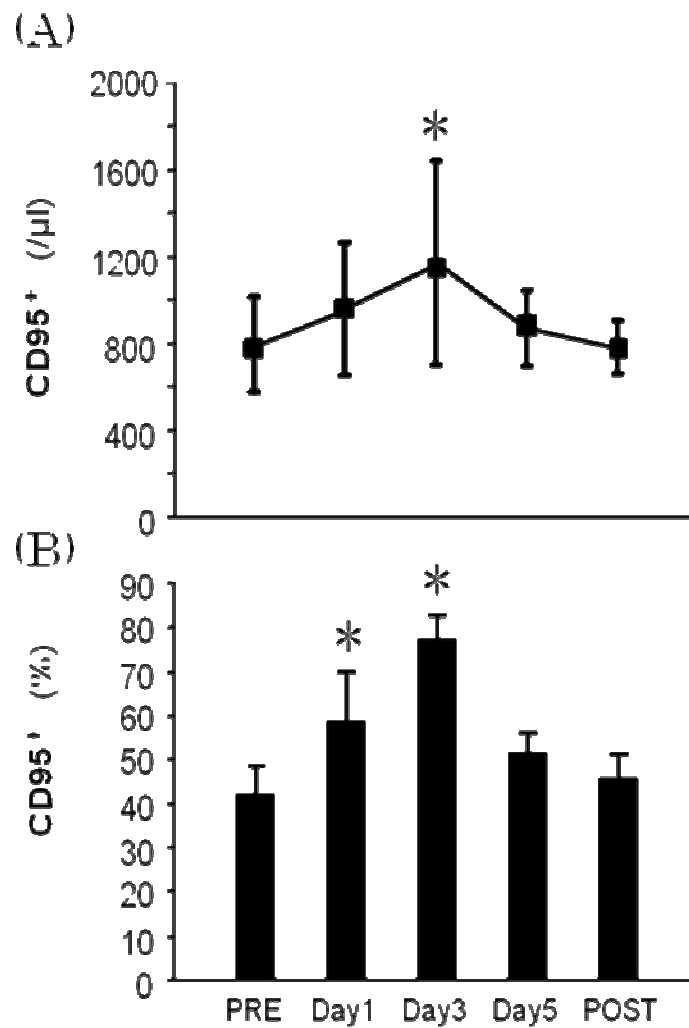


Figure 10. The changes in CD95⁺ lymphocyte counts with the training.

- (A) The total counts of lymphocytes expressing CD95⁺.
- (B) The percentage of CD95⁺ lymphocytes (CD95⁺ lymphocyte counts/total lymphocyte counts).

Values are represented as the means \pm SD.

*indicates statistically a significant difference versus PRE by post-hoc test ($P < 0.005$)

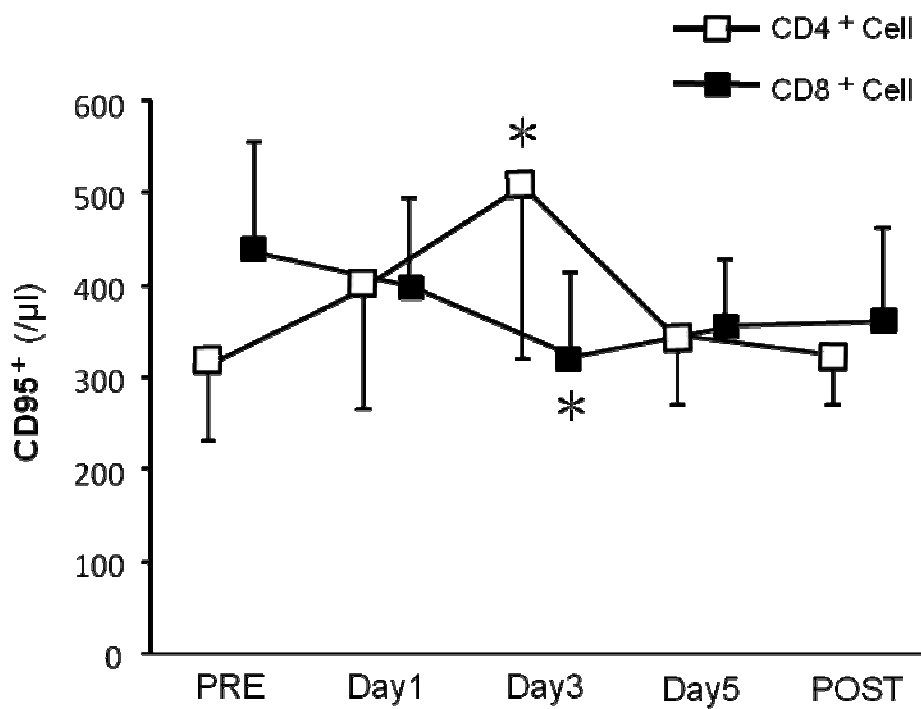


Figure 11. The changes in CD4⁺CD95⁺ and CD8⁺CD95⁺ lymphocyte counts with the training.

Values are represented as the means \pm SD.

*indicates statistically a significant difference versus PRE by post-hoc test ($P < 0.005$)

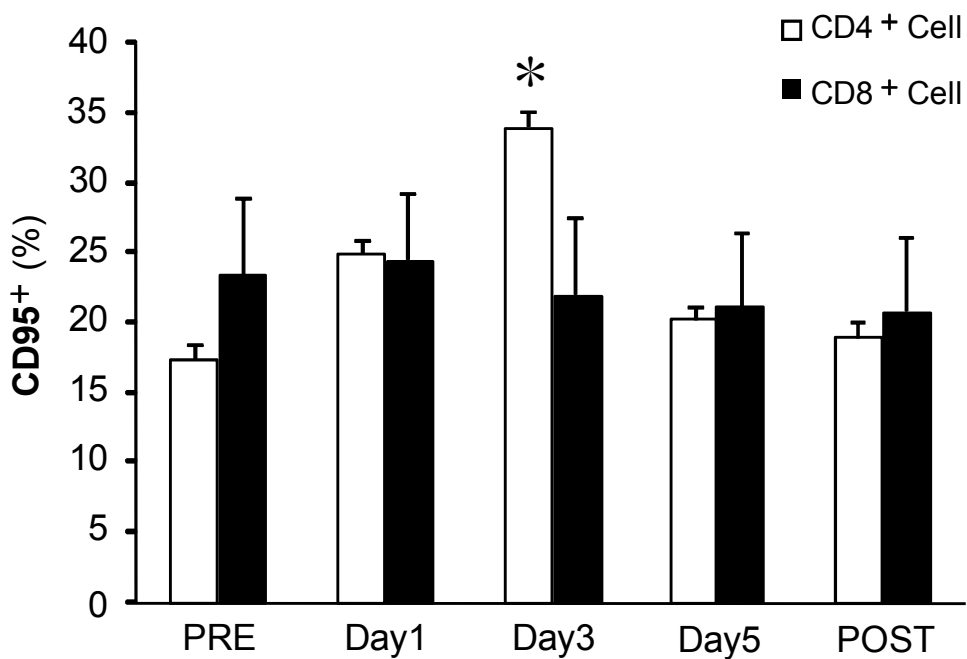


Figure 12. The changes in the percentages of CD4⁺CD95⁺ lymphocyte and CD8⁺CD95⁺ lymphocyte with the training.

The percentages were calculated by the ratio of CD4⁺ (CD8⁺) CD95⁺ lymphocyte counts and total lymphocyte counts.

Values are represented as the means \pm SD.

*indicates statistically a significant difference versus PRE by post-hoc test ($P < 0.005$)

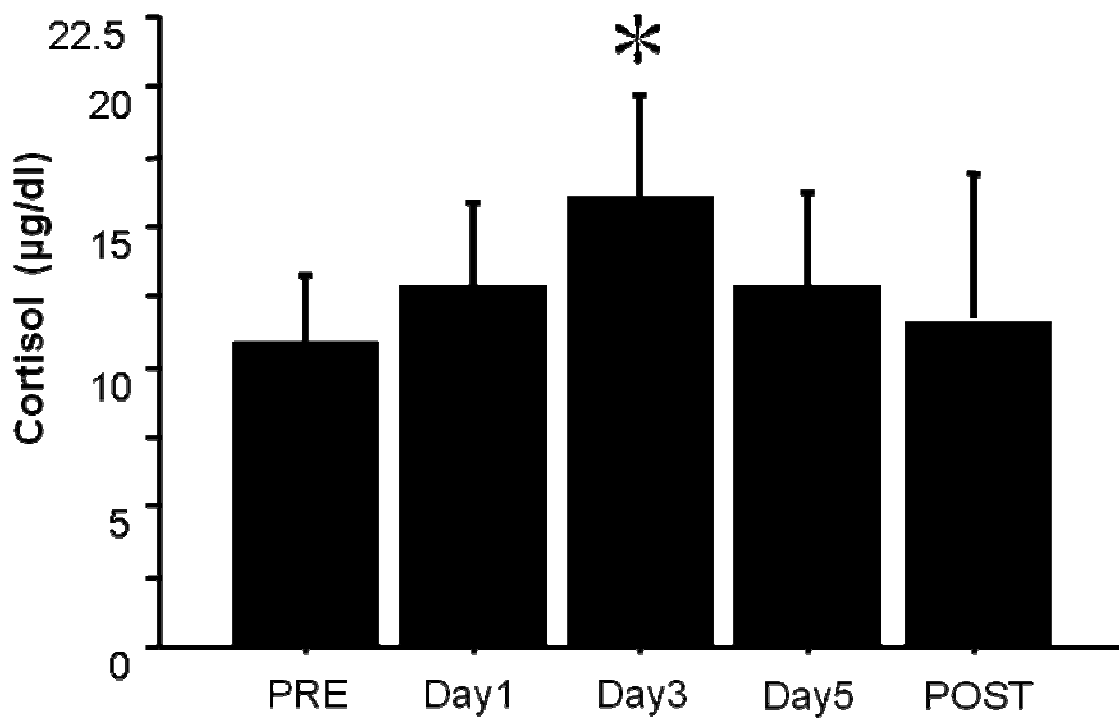


Figure 13. The changes in serum cortisol concentration with the training.

Values are represented as the means \pm SD.

*indicates statistically a significant difference versus PRE by post-hoc test ($P < 0.005$)

5.1.4. 考察

本研究では、アスリートにおいて短期集中型トレーニングによるリンパ球の減少と酸化ストレスマーカー、リンパ球アポトーシスマーカーの動態について検討した。6日間の高強度運動トレーニングは、リンパ球減少を引き起こし、 $CD95^+$ 細胞の有意な増加を示した。Tリンパ球については $CD8^+$ 細胞数は有意な低下を示したが、 $CD4^+$ 細胞数の減少は有意ではなかった。 $CD4^+CD95^+$ 細胞数はDay3で有意に増加し、 $CD8^+CD95^+$ 細胞数はDay3で有意に減少した。 $CD4^+CD95^+$ 細胞の割合はDay3で有意に増加し、 $CD8^+CD95^+$ 細胞の割合は有意な変動を認めなかった。また酸化ストレスマーカーは全体に有意な変化を認めなかった。

一過性高強度運動後のリンパ球 ($CD4^+$ 細胞と $CD8^+$ 細胞を含む) 減少についてはよく知られている (82, 83)。さらに高強度運動の繰り返しは安静時のリンパ球数 ($CD4^+$ 細胞と $CD8^+$ 細胞を含む) を低下させる (41, 53)。本研究においてはDay3で総リンパ球数と $CD8^+$ 細胞数が有意に減少したが、 $CD4^+$ 細胞は有意な変動を認めなかった。 $CD8^+$ 細胞数の減少について、5日間のサッカー合宿における先行研究と一致しているが $CD4^+$ 細胞数が減少しなかった点については一致しなかった (53)。

リンパ球数の高強度運動による変化のメカニズムはまだ十分に明らかになっていない。しかし、ストレスホルモンは運動による「リンパ球再分配」に関与していると考えられている。高強度運動はカテコラミンとコルチゾールを増加させ、カテコラミンはリンパ球増加に作用し、コルチゾールはリンパ球減少に関与している (76, 106)。コルチゾールの増加は循環血液から組織への移動をすることによってリンパ球の減少を引き起こす (23)。

本研究は午前中の運動（一過性運動）後に測定を行った。したがって、本研究の結果は一過性運動の影響を受けている可能性がある。本研究は $CD8^+$ 細胞の減少は認められたが $CD4^+$ 細胞の減少は認められなかった。一過性運動後における、運動前からのリンパ球の減少度は、 $CD4^+$ 細胞よりも $CD8^+$ 細胞の方が大きいと報告されている (29)。また、本研究において $CD4^+$ 細胞の減少が統計的に有意でないのは、運動によって反応した細胞が $CD8^+$ 細胞よりも少なかったためかもしれない。早朝に採血を行った先行研究 (53) は合宿後の測定で、リンパ球数と T 細胞 ($CD4^+$ 細胞, $CD8^+$ 細胞) は有意に減少した。本研究では、リンパ球数, $CD8^+$ 細胞は有意に減少したが $CD4^+$ 細胞は有意な変化が認められなかった。本研究では一過性高強度運動（午前のトレーニング）後の採血であったため、先行研究と差異が生じたと思われる。

短期間高強度運動における $CD95^+$ 細胞の動態の検討は本研究が初めてである。 $CD95$ をアポトーシス誘導パラメータとして用いた本研究はリンパ球全体の $CD95$ 発現の増加を示した。短期間高強度運動は Annexin V の発現と DNA 断片化によってリンパ球アポトーシスが増加することが報告されている (43, 120)。リンパ球アポトーシスの動態は、運動強度や対象者のトレーニング状態で変化することが報告されている (43, 61)。Mooren らはマラソン後の Annexin V の発現が最大酸素摂取量の高い群よりも低い群で有意に高値を示すことを報告している。また、 $CD95$ は両群で有意に増加したが両群間でその変化には差異がなかった (61)。本研究において、 $CD4^+CD95^+$ 細胞の増加を認めたが、 $CD4^+$ 細胞は有意な減少を認めなかった。それゆえ、リンパ球の $CD95$ 発現は有意に増加したが、アポトーシスは生じていない可能性がある。

本研究において、 $CD4^+CD95^+$ 細胞数は増加を示したが、 $CD8^+CD95^+$ 細胞数

は増加せず、CD4⁺ 細胞と CD8⁺ 細胞において CD95 発現に違いが生じることを示した。運動後の CD95⁺ 細胞数の増加を報告した Simpson らは、その増加は CD8⁺CD95⁺ 細胞数の増加によるものが大きいと報告している (108)。本研究との差異は、運動の時間や期間の違いによることが考えられる。

血清コルチゾール濃度は PRE と比較して Day3 で有意に高値を示した。コルチゾールはアポトーシスの誘導を調節している (96)。よって Day3 のコルチゾールの増加が、本研究の Day3 の CD4⁺CD95⁺ 細胞の有意な増加をもたらしたのかもしれない。しかし、Day3 の CD4⁺CD95⁺ 細胞の増加は CD4⁺ 細胞の減少を引き起こさなかった。一方、CD8⁺CD95⁺ 細胞数は Day3 で有意な減少をし、CD8⁺ 細胞は有意に減少した。よって、運動で生じる CD8⁺ 細胞の減少は血管から血管への細胞の移動によるものであるのかもしれない。すなわち、Day3 の CD8⁺ 細胞の減少は Day3 のコルチゾールレベルの増加と関係している可能性がある。

本研究において LPO は PRE と比較して有意な増加が認められなかった。しかし、合宿中は徐々に増加を示し Day3 で最も高値を示した。また合宿中である Day3、Day5 と比較して POST の LPO は有意に減少していた。これは、合宿後 2 週間はオフ期であったためにトレーニング量が減少して LPO が減少した可能性がある。Margonis らはトレーニング量が減少した期間は酸化ストレスが減少することを報告している (54)。このことからトレーニング量と酸化ストレスの発生量は関与していると考えられる。また PRE の測定前の運動の制限は特に行っておらず、日々のトレーニングが PRE の測定時の LPO を増加させた可能性は否定できない。また本研究において LPO はリンパ球減少及びリンパ球アポトーシスとの関与は低いものと考えられる。

本研究においてリンパ球数は Day5 で回復傾向であった。理由は明らかでない

が運動によるリンパ球数の変化には、様々なメカニズムが考えられる。リンパ球数の反応はコルチゾールによって影響を受けることが報告されている。本研究では、運動に対する慣れから Day5 でコルチゾールの減少が見られたためにリンパ球数の回復が生じたと思われる。他には合宿期間中にリンパ球の回復が見られた一つの理由としてコルチゾールの反応性の鈍化が考えられる (6, 19, 51)。さらには、総リンパ球と CD4⁺CD95⁺ 細胞は Day5 と POST で元の値に回復した。これはコルチゾールが回復したことや活性化リンパ球による影響が考えられる。

本研究にはいくつかの研究限界が存在する。第 1 に、CD95 レセプターはアポトーシス誘導因子の一つであるため、アポトーシスの発生を確定するマーカーではない。CD95 と同時に CD95 L や Annexin V を測定する必要がある。第 2 に、採血のタイミングである。本研究は運動後の採血であったために、一過性運動の影響を受けた可能性がある。したがって、より詳細な検討を行うために、早朝に測定を行う必要があると考えられる。

5.1.5. 結論

総リンパ球数と CD8⁺ 細胞数において 6 日間の剣道の高強度トレーニングは一時的に有意な減少を引き起こした。さらに、総リンパ球の CD95 発現細胞は増加したが、CD8⁺CD95⁺ 細胞数は有意な増加を示さなかった。また酸化ストレスマーカーは PRE と比較し有意な増加を示さなかった。よって、酸化ストレス、リンパ球アポトーシスは若年剣道アスリートの短期間高強度トレーニングにおいて T 細胞数減少に対する関連は低いと思われる。

5.2. 短期間高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化的 DNA 損傷及びリンパ球アポトーシスの関与 (実験 2-2)

5.2.1. 緒言

競技選手は高いパフォーマンス発揮を目的として、高頻度・高強度のトレーニングを日常的に行っている。しかし、この種のトレーニングがコンディションの低下を引き起こす可能性があることが問題とされている。オーバートレーニングを生じたアスリートは過度なトレーニングの累積によって免疫機能が低下していると考えられ (30), 例えばフルマラソン実施後に URTI の罹患リスクが増加することと関連している可能性がある (84, 85). このように急激な身体的ストレスの増加は免疫機能に影響を与える可能性があるため、急激にトレーニング量を増加させる短期間高強度運動におけるリンパ球の動態を検討することは重要である。

競技選手の安静時のリンパ球数やそのサブセット数は非競技選手と比較して低値であることが報告されている (31, 46). 一方で、競技選手において高強度のトレーニング前後で安静時のリンパ球数が変化しないという報告もある (23). これは、アスリートのリンパ球数は低値でも、単回の運動ストレスに対する抵抗性が強まっていることを意味している可能性がある。

一過性高強度運動後の回復期において、一時的にリンパ球数, $CD4^+$ 細胞数, $CD8^+$ 細胞数の低下が生じる (29, 82, 83). このようなリンパ球の減少はコルチゾールが循環血液中のリンパ球を組織に移動させることによって生じることが一因と考えられてきた (16). しかし、コルチゾールの増加のみがリンパ球減少の誘因ではない可能性も示唆されている (32, 33).

運動後のリンパ球減少のもう一つのメカニズムとしてリンパ球アポトーシスの増加が考えられている (55). 競技選手の安静時のリンパ球アポトーシスは競技レベルの高い選手の方が高値を示すことが報告されている (57). このことは、安静時のリンパ球数が競技選手の方が低いということに関連がある可能性がある。短期間高強度運動においては、競技者のリンパ球アポトーシスが徐々に増加することが報告されている (40, 109). 運動によるリンパ球アポトーシスの増加は、運動によるストレスで赤血球のターンオーバーが亢進するように (99), リンパ球においてターンオーバーが亢進してリンパ球数の減少を招く可能性がある。

一方、ROS は高強度運動で生じることが知られているが (2), 一過性高強度運動で生じる酸化ストレスの増加は運動習慣の有無に関係なく生じるとされている (89). さらに競技選手を対象とした連続的な高強度運動は酸化ストレスを一時的に増加させることが報告されている (105). これらの先行研究は血清酸化ストレスマーカーによって評価されている。先行研究において血清酸化ストレスマーカーよりも細胞の酸化ストレスマーカーの方が ROS に対する感受性が高いことが報告されており (89), ROS がリンパ球に与える影響は不明な点が多い。また、ROS はアポトーシスのイニシエーターとして働く (107). これは抗酸化物質の投与が運動による腸内リンパ球のアポトーシスの増加を防いでいることなどからも想定される (90-92).

本研究の目的は、短期間高強度運動によるリンパ球数減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を、アスリートと非アスリートを比較して検討することである。

5.2.2. 方法

5.2.2.1. 対象

対象は、若年男性トライアスロン選手7名（Trained: T 群）と運動習慣のない健常若年男性6名（Sedentary: S 群）とした。いずれの群も喫煙及び服薬習慣はなかった。T 群は、週5回1日平均2-3時間（週 15.6 ± 4.1 時間; 平均値±標準偏差）のランニング・スイム・バイクトレーニングを実施しており、競技歴は 2.5 ± 1.6 （平均値±標準偏差）年であった。S 群は定期的な運動を行っておらず、週3時間以上の運動を行っていないことを確認した。対象者の身体的特性を Table 4.に示す。対象者に対して、事前に実験の趣旨、実験方法、起こりうる危険性及び参加の任意性について十分説明し、文書による参加の同意を得た。本研究はヘルシンキ宣言の趣旨に従い、且つ筑波大学大学院人間総合科学研究科研究倫理委員会の承認を得て実施した。

5.2.2.2. 実験デザイン

5.2.2.2.1. 運動負荷

運動負荷は第4章の運動プロトコルを用いて最大酸素摂取量を測定し、連続的な定常負荷運動（ $75\% \dot{V}O_{2max}$ 1時間の自転車エルゴメータ運動）を3日間連続で行った。

Table 4. Physical characteristics.

	Trained (n= 7)	Sedentary (n=6)
Age (year)	21.3 ± 3.9	24.8 ± 3.0
Height (cm)	170.8 ± 3.5	170.6 ± 4.3
Weight (kg)	64.5 ± 3.9	64.6 ± 7.6
Body Mass Index (kg/m ²)	22.2 ± 1.0	22.3 ± 3.0
% Body fat (%)	14.1 ± 1.3	15.9 ± 4.7
$\dot{V}O_{2\max}$ (ml/min/kg)	52.6 ± 2.7*	40.4 ± 4.2

Values are represented as the means ± SD.

* $P < 0.05$: statistically significant different vs. Sedentary group

5.2.2.2.2. 血液採取とサンプル調整

血液サンプルは1日目と3日目の定常運動負荷前の安静時（D1, D3）とD3の採血から24時間後（D4）（合計3回）に翼状採血針を用いて肘前静脈より15 ml/回, 合計45 ml 採取した（Figure 14.）. 対象者には測定前日から測定終了までアルコール・カフェインの摂取と激しい運動を控えるように指示した.

サンプルの調整は, 第4章のプロトコールを用いて行った.

5.2.2.3. 測定項目

リンパ球数とそのサブセット細胞数, 酸化的DNA損傷マーカー, 血清コレステロール濃度, リンパ球表面マーカー, アポトーシスマーカーそしてフローサイトメトリー解析の方法については第4章 測定項目と同様の方法を用いた.

5.2.2.3.1. 血清過酸化脂質

血清過酸化脂質の測定はTBA法によるLPO-586（BIOTECH LPO-586, OXIS international, Inc.,OR, U.S.A.）を用いて行った（52）.

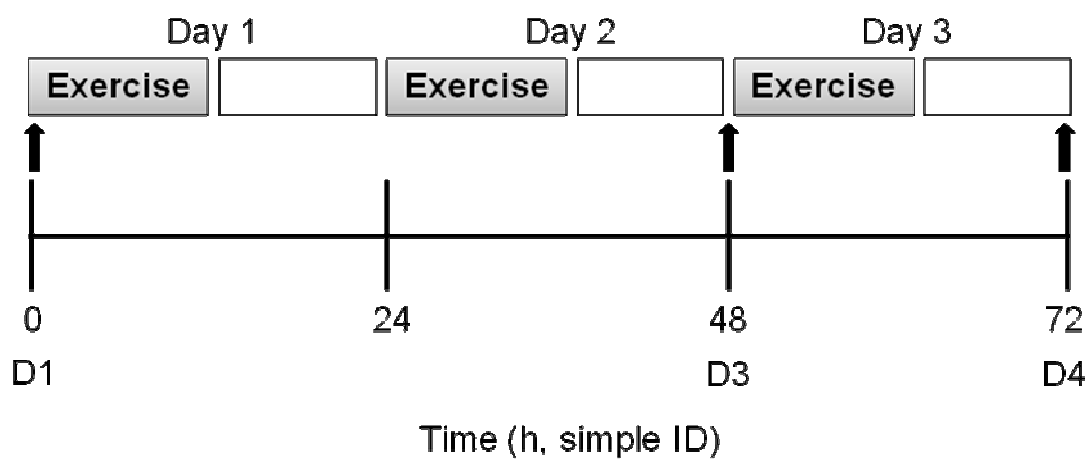


Figure 14. Testing timeline. The exercise session consisted of 3 consecutive days of high intensity exercise (75 % of $\dot{V}O_{2max}$ for 1 h).

5.2.2.4. 統計処理

全ての統計量は平均値±標準偏差で示した。項目間における平均値の差の検定には対応のない t 検定を用いた。また対象者の条件 (T 群 vs. S 群) と時間を要因とした測定項目の変化については反復測定二元配置分散分析を用いて行い、有意水準は $P < 0.05$ を用いた。事後検定は、Bonferoni/Dunn 法の検定を用いて多重比較検定を行い、有意水準は $P < 0.0167$ とした。統計処理には、統計解析ソフトウェア StatView 5.0 日本語版 (SAS Institute Inc, North Carolina, U.S.A.) を用いた。

5.2.3. 結果

リンパ球数は、両群の変動に有意な差異が見られた (Figure 15.)。D1 において T 群のリンパ球数は S 群よりも有意に低値を示した。さらに S 群のリンパ球数は D1 と比較して D3, D4 で有意な減少を示したが、T 群においては有意な変動を認めなかった。

サブセット別のリンパ球数に変動を Figure 16.に示した。CD19⁺ 細胞 (B 細胞) と CD8⁺ 細胞については 2 群間に差異を認めなかったが、CD4⁺ 細胞は D1 において T 群の方が S 群より有意な低値を認めた。さらに S 群の CD3⁺ 細胞と CD4⁺ 細胞において、D1 と比較して D3, D4 で有意な減少が認められた。

酸化 DNA 損傷の指標である % DNA in tail は、両群ともに経時的な増加がみられた (Figure 17.)。両群ともに PRE よりも D4 で有意な増加を示した。また、D4 では S 群よりも T 群で有意に高値を示した。

リンパ球内のスーパーオキシドレベルの変化を Table 5.に示した。両群間に

有意な差は見られず、各群においても経時的変化で有意な差は見られなかった。

血清 LPO の結果を Table 6. に示した。両群間に有意な変動の差は認められなかった。さらに各群においても経時的変化に有意な差は見られなかった。

血清コルチゾールの変動には、両群間に有意な差は認められなかった (Figure 18.)。しかしながら、S 群においては D1 と比較して D4 では減少傾向を認め ($P=0.0641$) , Cohen のエフェクトサイズ ($D=0.95$) は大であった。

CD95 発現細胞において、いずれのサブセットにおいても有意な変動は見られず、Annexin V⁺ 細胞においても有意な変動は認められなかった (Table 7.)。また T 群において、Annexin V⁺ 細胞では D1 と比較して D4 では減少傾向 ($P=0.096$) が認められ、エフェクトサイズ ($D=0.82$) は大であった。S 群においては CD3⁺CD95⁺ 細胞で、D1 と比較して D3 では減少傾向 ($P=0.03$) が認められ、エフェクトサイズ ($D=1.08$) は大であった。

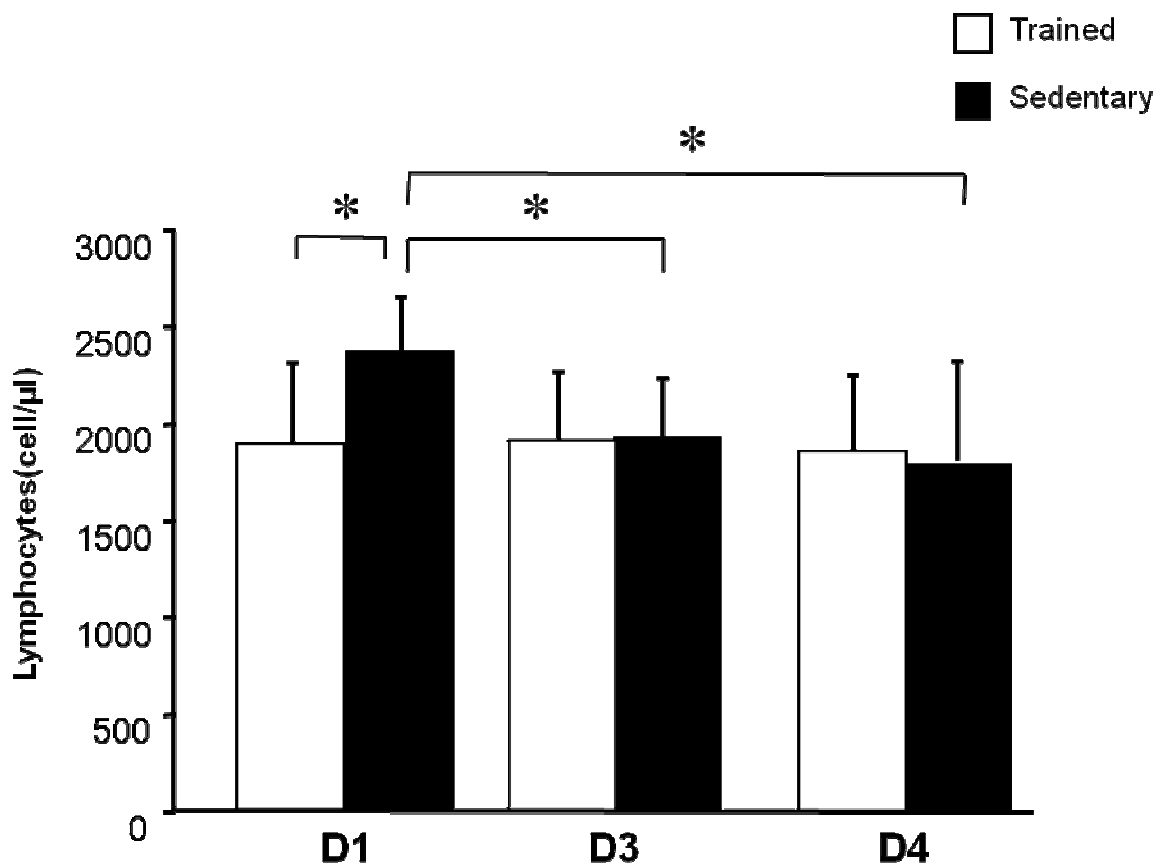


Figure 15. Time sequential changes in lymphocytes counts.

Values are represented as the means \pm SD.

* $P < 0.05$: statistically significant different

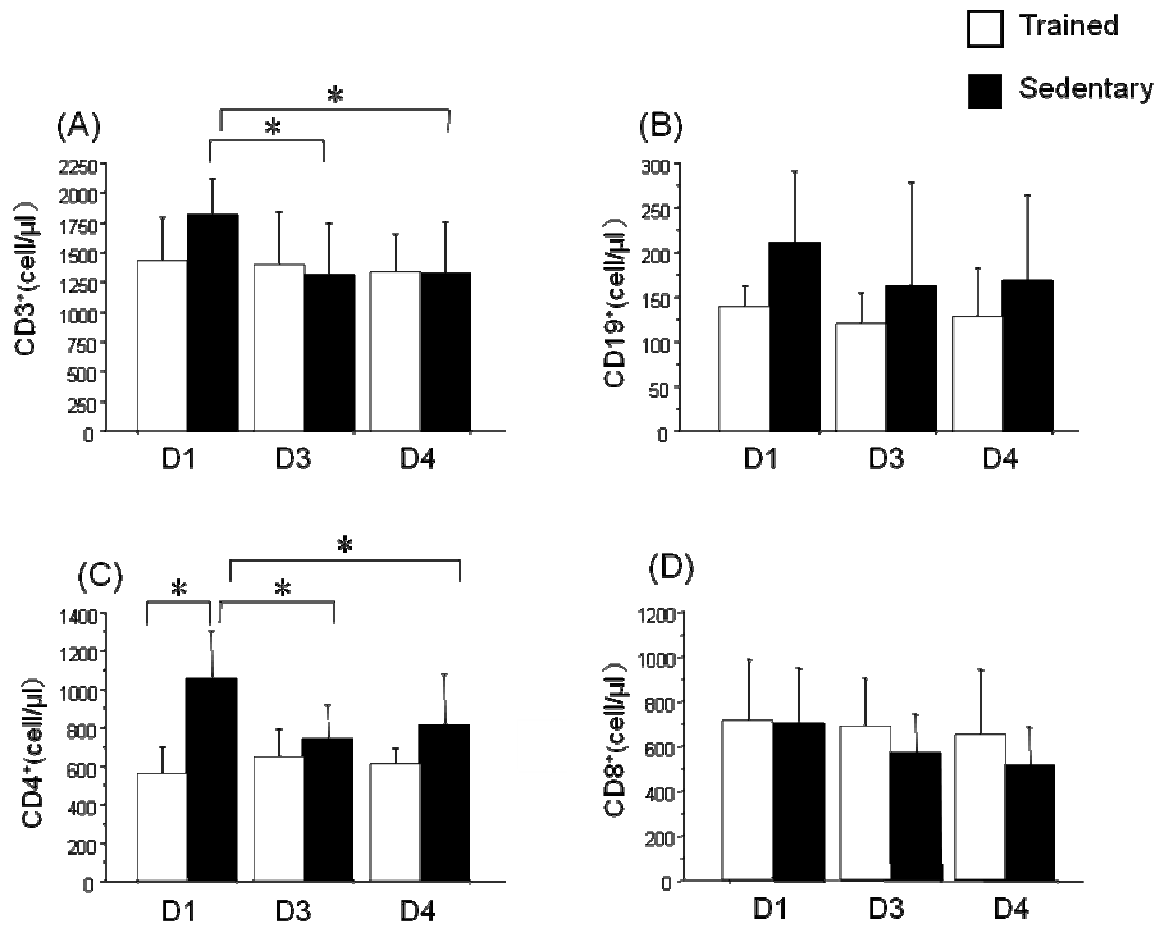


Figure 16. Time sequence changes in lymphocyte subset counts.

Values are represented as the means \pm SD.

* $P < 0.05$: statistically significant different

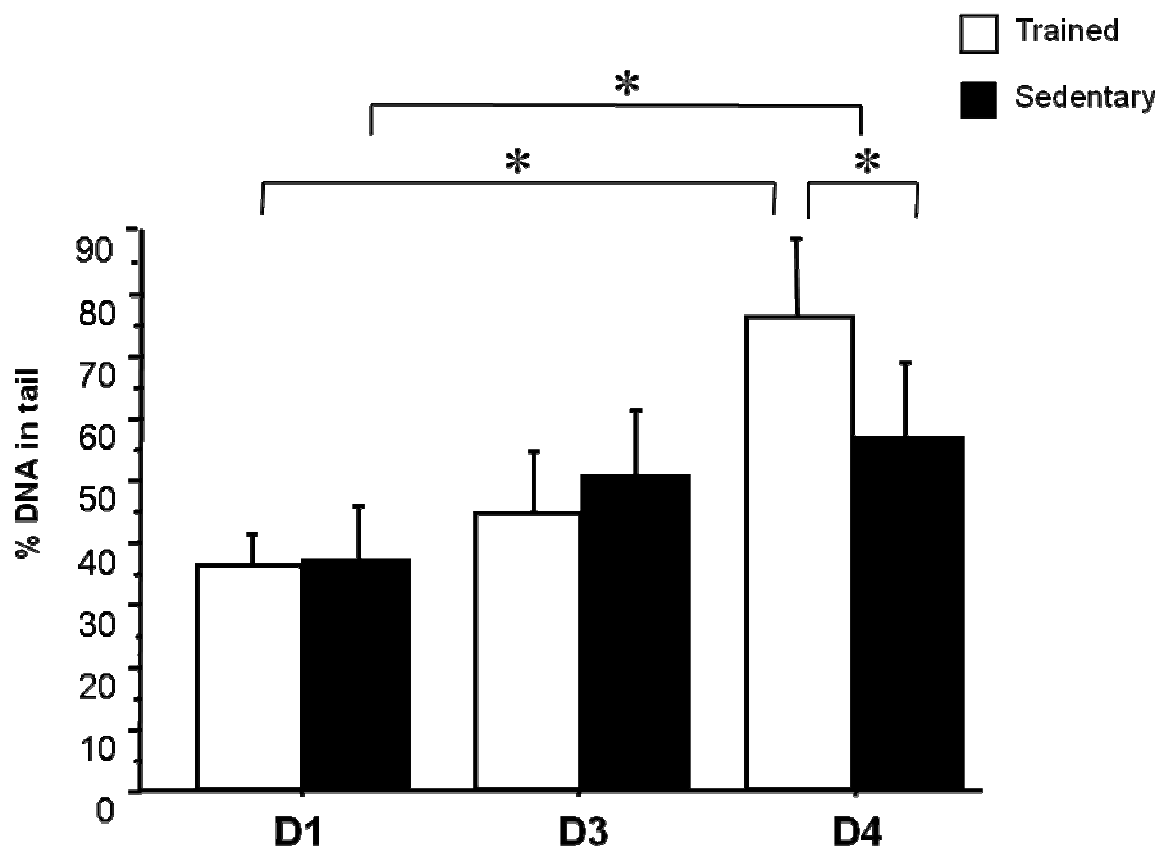


Figure 17. Time sequence changes in DNA-damaged lymphocytes.

Values are represented as the means \pm SD.

* $P < 0.05$: statistically significant different.

Table 5. Time sequential changes in lymphocyte intercellular superoxide.

	Superoxide (%)		
	D1	D3	D4
Trained (n=6)	100	101.0±34.6	97.0±41.4
Sedentary (n=6)	100	125.0±41.0	125.4±54.7

Values are represented as the means \pm SD.

The values are expressed relative changes as D1 (100%).

Table 6. Time sequential changes in serum lipid peroxide level.

	Lipid peroxide (μM)		
	D1	D3	D4
Trained (n=7)	1.05 \pm 0.50	1.02 \pm 0.36	0.93 \pm 0.31
Sedentary (n=6)	1.13 \pm 0.23	1.09 \pm 0.46	1.04 \pm 0.38

Values are represented as the means \pm SD.

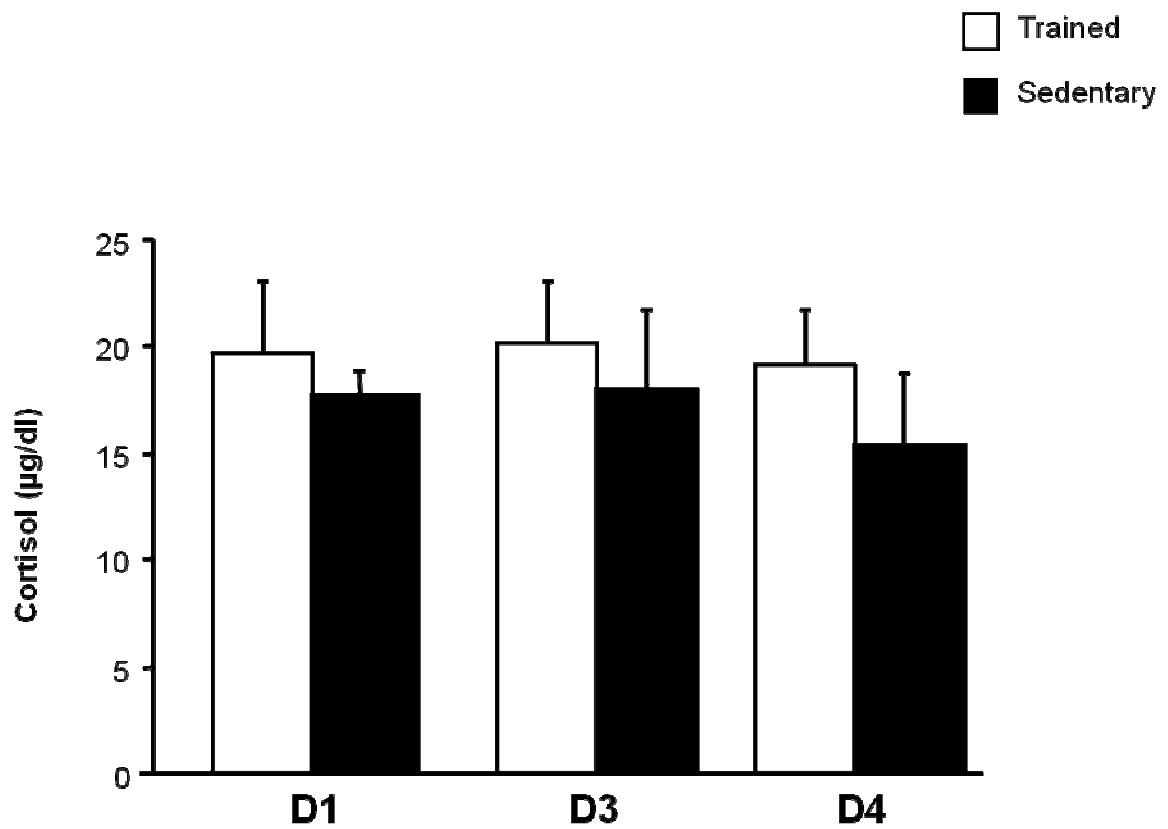


Figure 18. Time sequence changes in serum cortisol concentration.

Values are represented as the means \pm SD.

Table 7. Time sequence changes in % apoptotic lymphocytes.

	Trained (n=6)			Sedentary (n=6)		
	D1	D3	D4	D1	D3	D4
CD3 ⁺ CD95 ⁺	10.2± 9.4	8.6±6.2	8.0±5.3	7.6±3.6	4.5± 2.0	6.1±3.6
CD19 ⁺ CD95 ⁺	3.4± 1.9	3.1±2.2	2.5±1.1	3.0±2.6	1.8± 1.2	2.7±2.2
CD4 ⁺ CD95 ⁺	17.2± 6.8	16.0±4.7	15.8±6.1	16.1±3.0	13.7± 3.1	15.7±4.8
CD8 ⁺ CD95 ⁺	7.5±10.3	5.9±5.2	5.1±5.4	2.5±3.4	4.9± 9.0	1.7±2.3
Annexin V ⁺	21.6±11.4	18.3±9.7	13.8±6.9	22.4±7.0	22.7±10.0	21.3±8.7

Values are represented as the means ± SD.

5.2.4. 考察

本研究では、短期間高強度運動による血中リンパ球数変化に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与をアスリート群と非運動群を比較して検討した。

運動前安静時において T 群は S 群に比べて総リンパ球数、 $CD3^+$ 細胞数、 $CD4^+$ 細胞数の低値を示した。運動習慣の違いが安静時血中リンパ球数に与える影響は多数報告されており、例えば長距離ランナーを対象にした研究で、安静時のリンパ球数が低下していることが報告されている (34, 49)。本研究はこれらの研究結果と同様にアスリートの安静時リンパ球数は低値を示した。アスリートは日々長時間の運動を行うため、循環細胞数の抑制が持続すると考えられる。Galum らは、持久系アスリートの長時間運動後の白血球数は安静時と比較して 24-40 時間後まで低下が維持されることを報告している (27)。本研究においては測定 24 時間前からの運動のみの制限だったため、その前に行った運動の影響が残存している可能性は否定できない。さらに安静時のリンパ球サブセットについては、安静時の $CD4^+/CD8^+$ 比は競技者で非競技者よりも低いことが報告されている (46, 123)。本研究においても T 群の $CD4^+$ 細胞数が有意に低値を示したため、 $CD4^+/CD8^+$ 比は低下しており先行研究と一致する結果となった。

さらに安静時において運動習慣の違いによる酸化ストレスマーカー（酸化的 DNA 損傷、LPO、リンパ球内スーパーオキシド）にはいずれも有意な差を認めなかった。これは先行研究の結果とも一致し、身体トレーニングの持続により体内で抗酸化物質の増加が生じること (58)や、競技選手の抗酸化物質濃度は非競技選手よりも高値を示すこと (89)から説明されると考えられる。これらの研究から、アスリートは運動に対して発生する酸化ストレスに対して抵抗性が高

い可能性がある。

また、安静時の血中コルチゾール濃度については本研究では両群間に有意な差は認められなかった。先行研究においても運動習慣が安静時のコルチゾールレベルには影響を及ぼさなかったことが報告されている (7)。よって安静時のリンパ球数にコルチゾールが及ぼす影響は低い可能性が考えられた。しかしコルチゾールは、運動を開始してから増加するまでに時間がかかる。アスリートは毎日の運動トレーニングを行うことで、元のコルチゾール濃度に戻る前に次の運動をすることによってコルチゾールの増加が常に持続している可能性がある。本研究では、D1において両群間に有意な差はないが、測定値では T 群の方が高い。コルチゾールが増加してから作用するまでに時間差があるということは、測定ポイント以外で有意な増加が生じている可能性が否定できないために、コルチゾールの一過性の増加の持続が安静時のアスリートのリンパ球数の低値を説明している可能性が考えられる。

安静時のアポトーシスマーカーレベルには両群間に有意な差は認められなかった。Mooren らは、最大酸素摂取量が高い群で安静時のリンパ球アポトーシスマーカーである Annexin V の発現がリンパ球で高かったことを報告している (61)。しかし、Pittaluga らは、競技者と非競技者においてアポトーシスにより生ずるDNA 断片化に差異がなかったことを報告している (89)。これは、Pittaluga らの研究より、Mooren らの研究対象の最大酸素摂取量が高かったことが要因となっている可能性がある。本研究の T 群は先行研究の対象者と比較して、最大酸素摂取量が低かったため非アスリートとの差が有意でなかった可能性も考えられる。

T 群の総リンパ球数、及び全てのリンパ球数サブセットには有意な変動は認

められなかったが、S 群においては総リンパ球、CD3⁺ 細胞、CD4⁺ 細胞が、D1 に比し D3 , D4 で有意に低値を示した。同一日に同じ内容の高強度運動を 2 回行わせたデザインの研究では、1 回目の運動効果が2 回目の運動に累積的な影響を及ぼし、2 回目の運動からの免疫機能の回復が遅延することを報告している (97-99)。しかし、Ndon らは競技選手において、4 週間の集中的なトレーニング前後の一過性高強度運動に対するリンパ球の反応性は変化しないことを報告している (64)。したがって、本研究の T 群においては慢性的なトレーニングにより単回の運動のストレスが小さかったためリンパ球数が変化しなかったのかもしれない。一方、S 群においては、運動によるストレスが大きいため運動ストレスが累積し有意なリンパ球の減少が生じたと考えられる。Field らは同一日に行った高強度の反復運動で、1 回目と2 回目の運動後1 時間のCD8⁺ 細胞の値は運動前と比較して変化がなかったが、CD4⁺ 細胞は有意な低値を示したことを報告している (25)。これは連続的で急激なストレスは安静時に測定した場合、CD8⁺ 細胞よりCD4⁺ 細胞に強い影響を与えることを示唆しており、一過性高強度運動の反応においても同様の結果が得られている (29)。よって短期間高強度運動において S 群のCD4⁺ 細胞が有意に減少した結果と一致した。しかしながら、サブセットの変化の差異が何によって生じているかは未だ明らかではなく今後の検討が必要である。

酸化的DNA 損傷は、両群とも時間経過にしたがって有意な増加を示した。しかし、2 群間の増加の程度には差があり、T 群の増加の方が S 群よりも有意に大きかった。S 群、T 群ともにPREと比較してD4で有意な増加がみられた。連続的な運動においてリンパ球酸化的DNA 損傷を検討した研究は少ない。

Okamura らの報告では、9 日間の合宿において尿中 8-OHdGの増加を示したが、

リンパ球 8-OHdGでは有意な変化を示さなかったことを報告している(75). これはリンパ球DNA の修復機構が働くことによって生じたためと考えられている(44). また, ラットにおいては運動の連続に関わらず, 酸化的DNA 損傷は生じないことも報告されている(102). これらの先行研究は自発運動を行っているため, 運動強度が不足していたことが考えられる(102). またHartmann らは, トライアスロン実施後3 日目にDNA 損傷の有意な増加を認めている(37). 本研究のD4 の酸化的DNA 損傷の増加は運動の累積効果によるものでなく, 1 日目の運動の影響が4 日目に出現した可能性も否定できない. 両群において, 酸化的DNA 損傷の増加の仕方やD4 での差異については不明な点が多い. Niess らはマラソン実施後で, トレーニング群の方が非トレーニング群よりもDNA 損傷は低いことを報告している(73). 多くの研究は運動後のリンパ球DNA 損傷を検討している(73, 122). 本研究では運動終了24 時間後の検討に加え, 連続的な運動の影響を安静時の状態で検討している. 本研究において, トレーニング群の方がD4 で酸化的DNA 損傷が高かったという結果は, 常にトレーニングを行っているアスリートは, 酸化的DNA 損傷を受けている可能性を示唆している. しかしながら, この差異のメカニズムについては, 今後検討すべき課題である.

酸化ストレスの指標であるLPO とリンパ球スーパーオキシドは群間と経時的変化ともに有意な変化を示さなかった. 過酸化脂質を測定した先行研究は連続的な運動で増加することを報告している(125). 運動習慣のある競技選手では内因性の抗酸化物質が高いことから経時的に変化がなかったことを説明できる. また別の研究ではリンパ球のスーパーオキシドは運動直後に有意な増加を示した(126). 以上の結果から, リンパ球で発生するスーパーオキシドは発生しても, すぐに消去あるいは異なるROS に変換される可能性が考えられる.

本研究におけるコルチゾール血中濃度の変化は両群において有意な差を認めなかった。さらに経時的変化においては両群において運動期間中に有意な変動は認められなかった。一過性高強度運動では運動群は非運動群よりもコルチゾールの反応性が低いことが報告されている (7)。本研究において S 群でのリンパ球の減少は一過性運動時に生じるコルチゾールの増加が関与している可能性も考えられるため、作用するまでのタイムラグなどを今後検討する必要があると思われる。

リンパ球のアポトーシスマーカーである CD95⁺ 細胞, Annexin V⁺ 細胞のいずれにおいても両群の間に有意な変化を認めなかった。先行研究では、競技者において短期間高強度運動でリンパ球アポトーシスが徐々に増加していくことが報告されている (43, 119)。これらの研究は、80-85 % $\dot{V}O_{2max}$ 30 分の運動強度・時間で運動を行ったが、本研究では、75 % $\dot{V}O_{2max}$ 60 分であった。アポトーシスは強度が高いほど生じやすいと述べられて (62) いるため、本研究の運動強度はアポトーシスを生じるには低かったのかもしれない。また、マラソン実施の24 時間後にリンパ球アポトーシスが減少するという報告があり (61), アポトーシス細胞の増加は運動のDNA の修復機構の増加により修飾されることを示唆している。したがって、本研究の結果もDNA 修復酵素活性の増加といった修復機構が働いたことにより説明されるかもしれない (93, 101)。

本研究においてリンパ球酸化的DNA 損傷の有意な増加を示したが、血清酸化ストレスやリンパ球内のスーパーオキシドの有意な増加がみられなかった。しかし、運動直後や運動数時間後で増加した酸化ストレスがDNA を傷害することでD4 のリンパ球酸化的DNA 損傷の増加がみられた可能性がある。しかし、両群で酸化的DNA 損傷が有意な増加を示したことは、T 群のリンパ球変動に対し

てリンパ球酸化的DNA 損傷の関与が低いことを意味する可能性がある。本研究で用いたコメット法によるDNA 損傷は、修復系（抗酸化物質やDNA 修復酵素）の影響を除外した方法である。先行研究において競技選手の抗酸化物質濃度が高いこと (89)やトレーニングによってDNA 修復酵素の活性が上昇すること (94)を考えると、S 群では修復系の関与は小さくリンパ球の酸化的DNA 損傷がリンパ球減少に関与したと考えられる。

今後の研究課題としてDNA 修復酵素の活性や内因性の抗酸化物質を検討することが重要である。

5.2.5. 結論

T 群のD1 における安静時リンパ球の低値とS 群のリンパ球減少に対してリンパ球アポトーシスに関連する可能性が低いことが示唆された。しかし、S 群のリンパ球減少に対して酸化的DNA 損傷が一部関与する可能性が示唆された。

第6章 総合討論

6.1. 本研究で得られた結果

本研究は、防衛体力の一規定要因である免疫機能、特にリンパ球に着目し、運動後の回復期および運動期間中におけるリンパ球減少に対し酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与を検討することを目的とした。第2章の文献研究により明らかになった問題点から、2つの研究課題および仮説を設定し、その検証を行った。

第4章では、一過性高強度運動によるリンパ球減少に対して酸化ストレス及びアポトーシスの関与を検討した。その結果、一過性高強度運動によるリンパ球減少に対し、血清酸化ストレスマーカーは運動後の回復期において増加し、リンパ球スーパーオキシドは運動直後に増加した。これらは先行研究同様、高強度運動で酸化ストレスが増加し、リンパ球減少が生じたことを確認した。これらの関連性は先行研究においては認められていない。運動で生じた酸化ストレスはリンパ球の酸化的DNA損傷を引き起こした。DNA損傷は細胞そのものの傷害であることからリンパ球数は減少すると考えられた。しかし、傷害されたリンパ球においてアポトーシスが生じたことは確認できず、生体内で正常に処理されていない可能性が示唆された。一方で先行研究によってリンパ球減少に関与する可能性があると考えられたコルチゾールは本研究で用いた75% $\dot{V}O_{2max}$ 1時間の自転車エルゴメータ運動によるリンパ球減少において、運動1-2時間後のリンパ球の減少に対して運動による有意なコルチゾールの増加は認められなかったが、コントロール群の欠如等の理由からコルチゾールの影響の否定はできないと思われる。

第5章では、アスリートが日々うけているような急激なストレスを連続的に与えた場合を検討するために、短期間高強度運動における検討を行った。

研究課題2-1では、アスリートの合宿におけるリンパ球減少と酸化ストレスマーカー、リンパ球アポトーシスの動態を検討した。その結果、アスリートにおいても高強度運動の反復によりリンパ球は減少することを確認した。ただし酸化ストレスマーカーの増加は認められなかった。しかしPOSTの測定値がDay3、Day5と比較して有意な減少を示した。これはPREの測定は、測定前の運動を制限しておらず、POSTの測定では、測定前の運動を行っていないことが影響して有意な増加が見いだせなかった可能性がある。またアポトーシスマーカー陽性のリンパ球はリンパ球全体で検討するとリンパ球減少が生じたDay3で有意な増加を示した。しかしサブセット別でみるとCD4⁺細胞のアポトーシス細胞は増加していたが、CD4⁺細胞数の有意な変化はみられなかった。したがって、リンパ球減少に対するCD95発現の関与は低い可能性が示唆された。コルチゾール血中濃度はDay3で有意な増加を示しているため、研究課題2-1で生じたリンパ球減少はコルチゾールによる循環細胞の組織への流入の促進や組織から循環血流への流出の抑制が働いたものと考えられる。リンパ球減少とアポトーシスの関係性を示した先行研究はサブセット別の検討によって、その関与の可能性を否定できるのかもしれない。しかし、競技現場では測定前の運動制限がコントロールしにくいいため研究限界が多く、実験室レベルでの検討が必要であると考えた。

研究課題2-2では、アスリート（T群）と運動習慣のない対象（S群）を比較することによって運動習慣の差異が運動ストレスに対するリンパ球の動態、酸

化ストレスとアポトーシスマーカーに及ぼす影響を検討した。実験1で用いた75% $\dot{V}O_{2max}$ 1時間の自転車エルゴメータ運動を3日間連続で行うことによってT群のリンパ球数は有意な変化を示さず、S群のリンパ球数は有意な減少を示した。S群の血清酸化ストレスマーカーやリンパ球スーパーオキシドの有意な変化は認められなかったが、酸化的DNA損傷は有意な増加を示した。第4章の一過性高強度運動の研究結果より、血清酸化ストレスマーカーやリンパ球スーパーオキシドは運動24時間後では元の値に戻っていることが考えられる。また、SCGEで検出されたリンパ球DNA損傷は修復系については考慮されていないため、運動の累積効果によって増加したものと考えられる。しかし、高強度運動による酸化的DNA損傷は運動終了後から数時間後に生じることも報告されている。またアポトーシスマーカーは有意な増加を示さなかった。よってS群のリンパ球減少に対して酸化的DNA損傷は一部関与していた可能性が考えられた。しかし、T群のリンパ球は有意な変動を示さなかった。またS群と同様に血清酸化ストレスマーカーやリンパ球スーパーオキシドの有意な変化は認められなかった。しかし酸化的DNA損傷は有意な増加を示した。このことは長期間の運動トレーニングが内因性の抗酸化物質の増加やDNA修復酵素の活性の増加をもたらすことから、傷害されたリンパ球DNAが修復されることによってリンパ球の減少が生じなかった可能性が考えられた。またアポトーシスマーカーはS群と同様に有意な変動は認められなかった。以上のことから、過度のストレスの急激な暴露はリンパ球を減少させることが示唆された。そのメカニズムの一つとしてリンパ球の酸化的DNA損傷が関与している可能性があるが、アポトーシスによるDNA損傷の可能性は低いことが示唆された。しかし運動で生じる酸化ストレスがどのようにリンパ球を傷害するかは未だ不明な点が多い。

アポトーシスという生理的な作用で処理されないのであれば，抗酸化物質の服用などによってリンパ球減少を防ぐ必要があると思われる。

また研究課題2-1ではアスリートにおいてもリンパ球減少を認めたが，研究課題2-2ではアスリートではリンパ球減少は認められなかった。両課題とも高強度運動であったことから，運動時間も影響している可能性が示唆される。また，相対的な運動強度が同じでも競技現場と実験室では，精神的ストレスも異なると考えられるため両課題の結果の差異に影響したのではないかと考えられる。

高強度運動によるリンパ球減少に対して酸化ストレス，リンパ球アポトーシスの関与を検討したのは，知る範囲では本研究が初めてである。本研究で得られた知見は，運動によるリンパ球減少に対するメカニズムを検討する上で有用であるものと考えられる。

6.2. 今後の研究課題

本研究においては高強度運動で生じるリンパ球減少の原因として，運動によるROSの増加によってアポトーシスを引き起こすことを仮説とした。アポトーシスの評価指標としてフローサイトメーターによるCD95の発現，細胞の膜構造変化を検出するAnnexin Vを用いた。アポトーシスの評価は他にもDNA断片化を検出するTUNEL法やカスパーゼ系の酵素活性を検討する方法がある。またCD95発現だけでなく，CD95Lも検討すべき課題である。また運動によって抗アポトーシス物質の増加も報告されているため，体系的な検討が必要である可能性が考えられる。また本研究のリンパ球減少はオーバートレーニングの一要素

因と考えて行った。今後リンパ球の減少が臨的にどのような意味があるのか検討すべき課題である。さらに、タイムコースをより長く測定することによって、運動が免疫系にどのように影響をあたえるかも検討すべき課題である。

本研究は限られた条件下による一運動様式を検討したにすぎない。実際の競技現場では生物学的ストレスに加え、精神的ストレスもかかる。精神的ストレスはカテコールアミンなどのホルモン分泌に関与することも考えられ、ストレスホルモンはリンパ球減少に関与、またアポトーシスも促進することを報告されている。また第4, 5章の検討結果からはリンパ球減少に対してアポトーシスの関与は否定的であったが、リンパ球の酸化的DNA損傷の関与は示唆された。運動トレーニングはDNA修復酵素の活性を増加させるため、酸化的DNA損傷はDNA修復酵素によって修復される可能性は否定できない。また第5章において運動習慣のない若年者と競技選手での検討を行い、リンパ球の変動に差異があることを認めた。これは第5章の運動負荷が競技選手にとってそれほど高負荷でなかった可能性がある。以上のことから、同じ相対強度でも運動習慣の有無で反応性が異なるといえる。運動ストレスが免疫機能を代表するリンパ球に与える影響について検討することは、アスリートのコンディショニングの観点からより適切な運動を処方していく上で、重要な基礎的知見を提供するものと考えられる。

6.3. 今後の展望

アスリートにとって運動によるリンパ球数の減少は、URTIを招く危険性がある。URTIの罹患は日々の運動トレーニングにおいては、十分なトレーニング効

果が得られず、競技会においては最高のパフォーマンスを発揮できないことが考えられる。アスリートが運動トレーニングによって十分なトレーニング効果を得、最高のパフォーマンスを発揮するために URTI を予防することが重要である。本研究の結果より、リンパ球の減少には酸化的 DNA 損傷が一部関与することが示唆された。このことは抗酸化物質の服用などでリンパ球の低下を防ぐことができる可能性を示唆している。

さらに、運動習慣のない対象が急激に高強度運動を行うことによってリンパ球の減少が生じることも確認された。日々のトレーニング強度が、免疫学の観点からコンディショニングを考える際に重要であることが示唆された。

今後の研究課題で挙げられた問題点を解明すると同時に、競技現場のコーチやアスリートにとって有用な情報を提供していきたいと思う。

第7章 結語

本研究の目的は、高強度運動によるリンパ球減少に対する酸化ストレス及びリンパ球アポトーシスの関与について検討することである。

研究課題1では、一過性高強度運動によるリンパ球減少に対して、リンパ球アポトーシスの関与の可能性は低いですが、リンパ球酸化的DNA損傷が関与している可能性が示唆された。

研究課題2では、短期間高強度運動によるリンパ球減少に対して、リンパ球アポトーシスの関与の可能性は低いですが、リンパ球酸化的DNA損傷が関与している可能性が示唆された。また運動習慣では、トレーニング群の安静時リンパ球の低値と非アスリート群の連続的な高強度運動によるリンパ球減少に対してリンパ球アポトーシスと関連する可能性が低いことが示唆された。しかし、非アスリート群ではリンパ球減少に対して酸化的DNA損傷が一部関与する可能性が示唆された。

以上の結果から、若年男性において高強度運動によるリンパ球減少に対してリンパ球アポトーシスの関与は低いですが、酸化ストレスによるリンパ球の酸化的DNA損傷が関与する可能性があることが示唆された。

本研究の成果は、若年男性は高強度運動によって血中リンパ球の減少が生じることを確認した。そのメカニズムの一つとして、運動によって生じる酸化ストレスによるDNAの損傷が考えられた。またその酸化的DNA損傷にはリンパ球アポトーシスは関係しないことが示唆された。しかしながら、課題2-1でコルチ

ゾールの関与の可能性が示唆されたことや、課題 2-2 で運動習慣の違いによって反応の差異があることから、アスリートにおけるリンパ球減少は運動習慣のない対象とメカニズムが異なる可能性がある。これらは酸化ストレスによって傷害されたリンパ球の DNA は修復されている可能性を示唆するものである。今後は、アスリートを対象に高強度運動によるリンパ球減少についてのさらなる検討や、DNA 修復酵素や抗酸化物質など「修復」について検討していく必要があることと考える。以上のことは、高強度トレーニングを必要とするアスリートのコンディショニングにおいて新しい知見として意義のあるものとする。

謝辞

本稿を終えるにあたり、修士課程から博士課程に至るまで、専門分野外にも関わらず厳しくも温かい指導をして下さいました筑波大学大学院人間総合科学研究科教授 鯨坂隆一先生に心から感謝の意を表します。本博士論文の副査をお引き受けいただき、また筑波大学進学のかっかけを下さいました筑波大学大学院人間総合科学研究科教授 河野一郎先生、修士課程より温かい励ましとご助言を賜りました帝京平成大学地域医療学部教授（筑波大学名誉教授）目崎 登先生、ならびに同じく副査をお引き受けいただき、私の研究に助言、協力して下さいました筑波大学大学院人間総合科学研究科講師 前田清司先生にも心より感謝を申し上げます。筑波大学大学院人間総合科学研究科講師 飯田薫子先生には勉強会を始め、多大なご助言をいただきましたことに厚く御礼申し上げます。また測定器具を快く貸して下さいました筑波大学大学院人間総合科学研究科准教授 武政 徹先生に心より御礼申し上げます。実験法について懇切丁寧なご教授いただきました東京農業大学教授 三輪 操先生にも深い感謝の意を表します。5年間に渡る研究生活において、測定や研究の協力を頂きました早稲田大学スポーツ学術院助手 清水和弘先生、研究指導から論文作成における丁寧なご指導まで終始多大なるご協力を頂きました筑波大学大学院人間総合科学研究科研究員 田辺 解先生、聖カタリナ大学社会福祉学部講師 大槻 毅先生、環太平洋大学体育学部講師 家光素行先生に厚く御礼申し上げます。また、統計処理の方法についてご助言いただきました筑波大学大学院人間総合科学研究科助教 中田由夫先生にも心より感謝申し上げます。また研究全般の指導を頂きました筑波大学大学院人間総合科学研究科博士研究員 木村文律先生、学術振興財団研究員 相澤勝治先生にも厚く御礼申し上げます。そして、測定の被験者として

何度もご協力頂きました被験者の皆様，研究活動の全域にわたりお世話になりました筑波大学スポーツ医学研究室 OB を始めとした皆様にも心より感謝申し上げます．そして，大学院進学を支え応援して下さいました両親・家族に感謝の意を捧げます．最後に，筑波大学という最高の環境で研究を行えたこと，これまで出会いました全ての方に心から感謝致します．

参考文献

1. **Akimoto T, T. A, Koda Y, Waku T, Hayashi E, Tatsuno M, Sugiura K, Amano K, and Kono I.** Effect of repetitious intense exercise training on resting salivary IgA. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 47: 245-252, 1998.
2. **Alessio HM.** Exercise-induced oxidative stress. *Med Sci Sports Exerc* 25: 218-224, 1993.
3. **Ashton T, Rowlands CC, Jones E, Young IS, Jackson SK, Davies B, and Peters JR.** Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 77: 498-502, 1998.
4. **Banerjee AK, Mandal A, Chanda D, and Chakraborti S.** Oxidant, antioxidant and physical exercise. *Mol Cell Biochem* 253: 307-312, 2003.
5. **Battelli MG, Musiani S, Tazzari PL, and Stirpe F.** Oxidative stress to human lymphocytes by xanthine oxidoreductase activity. *Free Radic Res* 35: 665-679, 2001.
6. **Bishop NC, Walker GJ, Bowley LA, Evans KF, Molyneux K, Wallace FA, and Smith AC.** Lymphocyte responses to influenza and tetanus toxoid in vitro following intensive exercise and carbohydrate ingestion on consecutive days. *J Appl Physiol* 99: 1327-1335, 2005.
7. **Bloom SR, Johnson RH, Park DM, Rennie MJ, and Sulaiman WR.** Differences in the metabolic and hormonal response to exercise between racing cyclists and untrained individuals. *J Physiol* 258: 1-18, 1976.
8. **Bloomer RJ, and Fisher-Wellman KH.** Blood oxidative stress biomarkers: influence of sex, exercise training status, and dietary intake. *Gend Med* 5: 218-228, 2008.
9. **Briviba K, Watzl B, Nickel K, Kulling S, Bos K, Haertel S, Rechkemmer G, and Bub A.** A half-marathon and a marathon run induce oxidative DNA damage, reduce antioxidant capacity to protect DNA against damage and modify immune function in hobby runners. *Redox Rep* 10: 325-331, 2005.
10. **Cohen J.** Statistical power analysis for the behavioral sciences New Jersey, Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates, 1988, p. 20-27.
11. **Collins AR.** The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261, 2004.
12. **Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, and Stetina R.** Oxidative damage to

DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104 Suppl 3: 465-469, 1996.

13. **Concordet JP, and Ferry A.** Physiological programmed cell death in thymocytes is induced by physical stress (exercise). *Am J Physiol* 265: C626-629, 1993.

14. **Cook PR, and Brazell IA.** Detection and repair of single-strand breaks in nuclear DNA. *Nature* 263: 679-682, 1976.

15. **Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, and Wilson MT.** Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 30: 280-285, 2002.

16. **Cupps TR, and Fauci AS.** Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev* 65: 133-155, 1982.

17. **Davison GW, Hughes CM, and Bell RA.** Exercise and mononuclear cell DNA damage: The effects of antioxidant supplementation. *Int J Sport Nutr Exerc Metab* 15: 480-492, 2005.

18. **De Bont R, and van Larebeke N.** Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19: 169-185, 2004.

19. **DeRijk RH, Petrides J, Deuster P, Gold PW, and Sternberg EM.** Changes in corticosteroid sensitivity of peripheral blood lymphocytes after strenuous exercise in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 228-235, 1996.

20. **Dill DB, and Costill DL.** Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37: 247-248, 1974.

21. **Elosua R, Molina L, Fito M, Arquer A, Sanchez-Quesada JL, Covas MI, Ordonez-Llanos J, and Marrugat J.** Response of oxidative stress biomarkers to a 16-week aerobic physical activity program, and to acute physical activity, in healthy young men and women. *Atherosclerosis* 167: 327-334, 2003.

22. **Fatouros IG, Destouni A, Margonis K, Jamurtas AZ, Vrettou C, Kouretas D, Mastorakos G, Mitrakou A, Taxildaris K, Kanavakis E, and Papassotiriou I.** Cell-free plasma DNA as a novel marker of aseptic inflammation severity related to exercise overtraining. *Clin Chem* 52: 1820-1824, 2006.

23. **Fauci AS.** Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology* 28: 669-680, 1975.

24. **Ferry A, Picard F, Duvallet A, Weill B, and Rieu M.** Changes in blood leucocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 59: 435-442, 1990.

25. **Field CJ, Gougeon R, and Marliss EB.** Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J Appl Physiol* 71: 1089-1097, 1991.
26. **Gabriel H, Schwarz L, Steffens G, and Kindermann W.** Immunoregulatory hormones, circulating leucocyte and lymphocyte subpopulations before and after endurance exercise of different intensities. *Int J Sports Med* 13: 359-366, 1992.
27. **Galun E, Burstein R, Assia E, Tur-Kaspa I, Rosenblum J, and Epstein Y.** Changes of white blood cell count during prolonged exercise. *Int J Sports Med* 8: 253-255, 1987.
28. **Gedik CM, Boyle SP, Wood SG, Vaughan NJ, and Collins AR.** Oxidative stress in humans: validation of biomarkers of DNA damage. *Carcinogenesis* 23: 1441-1446, 2002.
29. **Gleeson M, and Bishop NC.** The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 10: 43-48, 2005.
30. **Gleeson M, McDonald WA, Cripps AW, Pyne DB, Clancy RL, and Fricker PA.** The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol* 102: 210-216, 1995.
31. **Green KJ.** Improving understanding of exercise effects on in vitro T-lymphocyte function--the role of fluorescent cell division tracking. *Exerc Immunol Rev* 8: 101-115, 2002.
32. **Green KJ, Croaker SJ, and Rowbottom DG.** Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *J Appl Physiol* 95: 1216-1223, 2003.
33. **Green KJ, and Rowbottom DG.** Exercise-induced changes to in vitro T-lymphocyte mitogen responses using CFSE. *J Appl Physiol* 95: 57-63, 2003.
34. **Green RL, Kaplan SS, Rabin BS, Stanitski CL, and Zdziarski U.** Immune function in marathon runners. *Ann Allergy* 47: 73-75, 1981.
35. **Grollman AP, and Moriya M.** Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet* 9: 246-249, 1993.
36. **Hartmann A, Niess AM, Grunertfuchs M, Poch B, and Speit G.** Vitamin-E Prevents Exercise-Induced DNA-Damage. *Mutation Research Letters* 346: 195-202, 1995.
37. **Hartmann A, Pfuhrer S, Dennog C, Germadnik D, Pilger A, and Speit G.** Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased

formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic Biol Med* 24: 245-251, 1998.

38. **Hartmann A, Plappert U, Raddatz K, Grunert-Fuchs M, and Speit G.**

Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9: 269-272, 1994.

39. **Hayashi K, Sumi K, and Horiyama K.** Characteristic of physical fitness in Japanese kendo champions from the view point of body composition and maximal oxygen uptake. *Reseach Journal of BUDO* 26: 25-33, 1993.

40. **Hildeman DA.** Regulation of T-cell apoptosis by reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 36: 1496-1504, 2004.

41. **Hoffman-Goetz L, Simpson JR, Cipp N, Arumugam Y, and Houston ME.** Lymphocyte subset responses to repeated submaximal exercise in men. *J Appl Physiol* 68: 1069-1074, 1990.

42. **Hoffman-Goetz L, Zajchowski S, and Aldred A.** Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. *Life Sci* 64: 191-200, 1999.

43. **Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, and Tsai K.** Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Med Sci Sports Exerc* 34: 438-442, 2002.

44. **Inoue T, Mu Z, Sumikawa K, Adachi K, and Okochi T.** Effect of physical exercise on the content of 8-hydroxydeoxyguanosine in nuclear DNA prepared from human lymphocytes. *Jpn J Cancer Res* 84: 720-725, 1993.

45. **Jammes Y, Steinberg JG, Bregeon F, and Delliaux S.** The oxidative stress in response to routine incremental cycling exercise in healthy sedentary subjects. *Respir Physiol Neurobiol* 144: 81-90, 2004.

46. **Kajiura JS, MacDougall JD, Ernst PB, and Younglai EV.** Immune response to changes in training intensity and volume in runners. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1111-1117, 1995.

47. **Kannan K, and Jain SK.** Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 7: 153-163, 2000.

48. **Kasahara Y, Iwai K, Yachie A, Ohta K, Konno A, Seki H, Miyawaki T, and Taniguchi N.** Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/APO-1)-mediated apoptosis of neutrophils. *Blood* 89: 1748-1753, 1997.

49. **Keen P, McCarthy DA, Passfield L, Shaker HA, and Wade AJ.** Leucocyte and erythrocyte counts during a multi-stage cycling race ('the Milk Race'). *Br J Sports Med* 29: 61-65, 1995.

50. **Krzywkowski K, Petersen EW, Ostrowski K, Kristensen JH, Boza J, and Pedersen BK.** Effect of glutamine supplementation on exercise-induced changes in lymphocyte function. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C1259-1265, 2001.
51. **Lancaster GI, Halson SL, Khan Q, Drysdale P, Wallace F, Jeukendrup AE, Drayson MT, and Gleeson M.** Effects of acute exhaustive exercise and chronic exercise training on type 1 and type 2 T lymphocytes. *Exerc Immunol Rev* 10: 91-106, 2004.
52. **Liu J, Yeo HC, Doniger SJ, and Ames BN.** Assay of aldehydes from lipid peroxidation: gas chromatography-mass spectrometry compared to thiobarbituric acid. *Anal Biochem* 245: 161-166, 1997.
53. **Malm C, Ekblom O, and Ekblom B.** Immune system alteration in response to increased physical training during a five day soccer training camp. *Int J Sports Med* 25: 471-476, 2004.
54. **Margonis K, Fatouros IG, Jamurtas AZ, Nikolaidis MG, Douroudos I, Chatzinikolaou A, Mitrakou A, Mastorakos G, Papassotiriou I, Taxildaris K, and Kouretas D.** Oxidative stress biomarkers responses to physical overtraining: implications for diagnosis. *Free Radic Biol Med* 43: 901-910, 2007.
55. **Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, and Chuturgoon A.** High intensity exercise: A cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 249: 366-370, 1998.
56. **Mastaloudis A, Yu TW, O'Donnell RP, Frei B, Dashwood RH, and Traber MG.** Endurance exercise results in DNA damage as detected by the comet assay. *Free Radic Biol Med* 36: 966-975, 2004.
57. **McCarthy DA, and Dale MM.** The leucocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med* 6: 333-363, 1988.
58. **Melikoglu MA, Kaldirimci M, Katkat D, Sen I, Kaplan I, and Senel K.** The effect of regular long term training on antioxidant enzymatic activities. *J Sports Med Phys Fitness* 48: 388-390, 2008.
59. **Moller P, Loft S, Lundby C, and Olsen NV.** Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans. *Faseb J* 15: 1181-1186, 2001.
60. **Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, and Volker K.** Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* 93: 147-153, 2002.

61. **Mooren FC, Lechtermann A, and Volker K.** Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports Exerc* 36: 1476-1483, 2004.
62. **Navalta JW, Sedlock DA, and Park KS.** Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *Int J Sports Med* 28: 539-542, 2007.
63. **Navalta JW, Sedlock DA, Park KS, and McFarlin BK.** Neither gender nor menstrual cycle phase influences exercise-induced lymphocyte apoptosis in untrained subjects. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 481-486, 2007.
64. **Ndon JA, Snyder AC, Foster C, and Wehrenberg WB.** Effects of chronic intense exercise training on the leukocyte response to acute exercise. *Int J Sports Med* 13: 176-182, 1992.
65. **Nehlsen-Cannarella SL, Nieman DC, Jessen J, Chang L, Gusewitch G, Blix GG, and Ashley E.** The effects of acute moderate exercise on lymphocyte function and serum immunoglobulin levels. *Int J Sports Med* 12: 391-398, 1991.
66. **Nieman DC.** Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 26: 128-139, 1994.
67. **Nieman DC.** Risk of Upper Respiratory Tract Infection in Athletes: An Epidemiologic and Immunologic Perspective. *J Athl Train* 32: 344-349, 1997.
68. **Nieman DC, Ahle JC, Henson DA, Warren BJ, Suttles J, Davis JM, Buckley KS, Simandle S, Butterworth DE, Fagoaga OR, and et al.** Indomethacin does not alter natural killer cell response to 2.5 h of running. *J Appl Physiol* 79: 748-755, 1995.
69. **Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, Warren BJ, Dotson RC, Butterworth DE, and Nehlsen-Cannarella SL.** Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc* 25: 823-831, 1993.
70. **Nieman DC, Nehlsen-Cannarella SL, Markoff PA, Balk-Lamberton AJ, Yang H, Chritton DB, Lee JW, and Arabatzis K.** The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections. *Int J Sports Med* 11: 467-473, 1990.
71. **Niess AM, Baumann M, Roecker K, Horstmann T, Mayer F, and Dickhuth HH.** Effects of intensive endurance exercise on DNA damage in leucocytes. *J Sports Med Phys Fitness* 38: 111-115, 1998.
72. **Niess AM, Dickhuth HH, Northoff H, and Fehrenbach E.** Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. *Exerc Immunol Rev* 5: 22-56, 1999.
73. **Niess AM, Hartmann A, Grunert-Fuchs M, Poch B, and Speit G.** DNA

damage after exhaustive treadmill running in trained and untrained men. *Int J Sports Med* 17: 397-403, 1996.

74. **Ohishi N, Ohkawa H, Miike A, Tatano T, and Yagi K.** A new assay method for lipid peroxides using a methylene blue derivative. *Biochem Int* 10: 205-211, 1985.

75. **Okamura K, Doi T, Hamada K, Sakurai M, Yoshioka Y, Mitsuzono R, Migita T, Sumida S, and Sugawa-Katayama Y.** Effect of repeated exercise on urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine excretion in humans. *Free Radic Res* 26: 507-514, 1997.

76. **Okutsu M, Ishii K, Niu KJ, and Nagatomi R.** Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R591-599, 2005.

77. **Orhan H, van Holland B, Krab B, Moeken J, Vermeulen NP, Hollander P, and Meerman JH.** Evaluation of a multi-parameter biomarker set for oxidative damage in man: increased urinary excretion of lipid, protein and DNA oxidation products after one hour of exercise. *Free Radic Res* 38: 1269-1279, 2004.

78. **Ostling O, and Johanson KJ.** Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298, 1984.

79. **Pedersen BK, Bruunsgaard H, Klokke M, Kappel M, MacLean DA, Nielsen HB, Rohde T, Ullum H, and Zacho M.** Exercise-induced immunomodulation--possible roles of neuroendocrine and metabolic factors. *Int J Sports Med* 18 Suppl 1: S2-7, 1997.

80. **Pedersen BK, and Hoffman-Goetz L.** Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev* 80: 1055-1081, 2000.

81. **Pedersen BK, Kappel M, Klokke M, Nielsen HB, and Secher NH.** The immune system during exposure to extreme physiologic conditions. *Int J Sports Med* 15 (Suppl 3): S116-S121, 1994.

82. **Pedersen BK, Rohde T, and Ostrowski K.** Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand* 162: 325-332, 1998.

83. **Pedersen BK, and Ullum H.** NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 26: 140-146, 1994.

84. **Peters EM, and Bateman ED.** Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey. *S Afr Med J* 64: 582-584, 1983.

85. **Peters EM, Goetzsche JM, Grobbelaar B, and Noakes TD.** Vitamin C supplementation reduces the incidence of postrace symptoms of upper-respiratory-tract

infection in ultramarathon runners. *Am J Clin Nutr* 57: 170-174, 1993.

86. **Peters EM, Van Eden M, Tyler N, Ramautar A, and Chuturgoon AA.** Prolonged exercise does not cause lymphocyte DNA damage or increased apoptosis in well-trained endurance athletes. *Eur J Appl Physiol* 98: 124-131, 2006.

87. **Phaneuf S, and Leeuwenburgh C.** Apoptosis and exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 393-396, 2001.

88. **Pierpaoli. W, and Spector. NH.** Neuroimmunomodulation: interventions in aging and cancer. First Stromboli Conference on Aging and Cancer. Stromboli, Sicily, June 7-11, 1987. Proceedings. *Ann N Y Acad Sci* 521: 1-361, 1988.

89. **Pittaluga M, Parisi P, Sabatini S, Ceci R, Caporossi D, Valeria Catani M, Savini I, and Avigliano L.** Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res* 40: 607-614, 2006.

90. **Quadrilatero J, and Hoffman-Goetz L.** N-acetyl-L-cysteine inhibits exercise-induced lymphocyte apoptotic protein alterations. *Med Sci Sports Exerc* 37: 53-56, 2005.

91. **Quadrilatero J, and Hoffman-Goetz L.** N-Acetyl-L-cysteine prevents exercise-induced intestinal lymphocyte apoptosis by maintaining intracellular glutathione levels and reducing mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun* 319: 894-901, 2004.

92. **Quadrilatero J, and Hoffman-Goetz L.** N-acetyl-l-cysteine protects intestinal lymphocytes from apoptotic death after acute exercise in adrenalectomized mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1664-1672, 2005.

93. **Radak Z, Apor P, Pucsok J, Berkes I, Ogonovszky H, Pavlik G, Nakamoto H, and Goto S.** Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci* 72: 1627-1633, 2003.

94. **Radak Z, Naito H, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Takahashi R, Cardozo-Pelaez F, and Goto S.** Exercise training decreases DNA damage and increases DNA repair and resistance against oxidative stress of proteins in aged rat skeletal muscle. *Pflugers Arch* 445: 273-278, 2002.

95. **Radak Z, Pucsok J, Boros S, Jofai L, and Taylor AW.** Changes in urine 8-hydroxydeoxyguanosine levels of super-marathon runners during a four-day race period. *Life Sci* 66: 1763-1767, 2000.

96. **Riccardi C, Zollo O, Nocentini G, Bruscoli S, Bartoli A, D'Adamio F, Cannarile L, Delfino D, Ayroldi E, and Migliorati G.** Glucocorticoid hormones in the

regulation of cell death. *Therapie* 55: 165-169, 2000.

97. **Ronsen O, Haug E, Pedersen BK, and Bahr R.** Increased neuroendocrine response to a repeated bout of endurance exercise. *Med Sci Sports Exerc* 33: 568-575, 2001.

98. **Ronsen O, Kjeldsen-Kragh J, Haug E, Bahr R, and Pedersen BK.** Recovery time affects immunoendocrine responses to a second bout of endurance exercise. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1612-1620, 2002.

99. **Ronsen O, Pedersen BK, Oritsland TR, Bahr R, and Kjeldsen-Kragh J.** Leukocyte counts and lymphocyte responsiveness associated with repeated bouts of strenuous endurance exercise. *J Appl Physiol* 91: 425-434, 2001.

100. **Sapin R, Schlienger JL, Gasser F, Pradignac A, and Grucker D.** Improved specificity of a new direct assay for urinary cortisol: application in corticoid treated patients. *Clin Chem Lab Med* 36: 855-858, 1998.

101. **Sato Y, Nanri H, Ohta M, Kasai H, and Ikeda M.** Increase of human MTH1 and decrease of 8-hydroxydeoxyguanosine in leukocyte DNA by acute and chronic exercise in healthy male subjects. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 333-338, 2003.

102. **Selman C, McLaren JS, Collins AR, Duthie GG, and Speakman JR.** Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Arch Biochem Biophys* 401: 255-261, 2002.

103. **Sen CK, Rankinen T, Vaisanen S, and Rauramaa R.** Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation. *J Appl Physiol* 76: 2570-2577, 1994.

104. **Senthilmohan ST, Zhang J, and Stanley RA.** Effects of flavonoid extract Enzogenol(R) with vitamin C on protein oxidation and DNA damage in older human subjects. *Nutr Res* 23: 1199-1210, 2003.

105. **Shing CM, Peake JM, Ahern SM, Strobel NA, Wilson G, Jenkins DG, and Coombes JS.** The effect of consecutive days of exercise on markers of oxidative stress. *Appl Physiol Nutr Metab* 32: 677-685, 2007.

106. **Shinkai S, Watanabe S, Asai H, and Shek PN.** Cortisol response to exercise and post-exercise suppression of blood lymphocyte subset counts. *Int J Sports Med* 17: 597-603, 1996.

107. **Simon HU, Haj-Yehia A, and Levi-Schaffer F.** Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 5: 415-418, 2000.

108. **Simpson RJ, Florida-James GD, Whyte GP, Black JR, Ross JA, and Guy K.** Apoptosis Does not Contribute to the Blood Lymphocytopenia Observed After Intensive and Downhill Treadmill Running in Humans. *Res Sports Med* 15: 157-174, 2007.
109. **Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL.** A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191, 1988.
110. **Smith CC, O'Donovan MR, and Martin EA.** hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21: 185-190, 2006.
111. **Steensberg A, Morrow J, Toft AD, Bruunsgaard H, and Pedersen BK.** Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *Eur J Appl Physiol* 87: 38-42, 2002.
112. **Sureda A, Tauler P, Aguilo A, Cases N, Fuentespina E, Cordova A, Tur JA, and Pons A.** Relation between oxidative stress markers and antioxidant endogenous defences during exhaustive exercise. *Free Radic Res* 39: 1317-1324, 2005.
113. **Tanimura Y, Shimizu K, Tanabe K, Otsuki T, Yamauchi R, Matsubara Y, Iemitsu M, Maeda S, and Ajisaka R.** Exercise-induced oxidative DNA damage and lymphocytopenia in sedentary young males. *Med Sci Sports Exerc* 40: 1455-1462, 2008.
114. **Terstappen LW, Meiners H, and Loken MR.** A rapid sample preparation technique for flow cytometric analysis of immunofluorescence allowing absolute enumeration of cell subpopulations. *J Immunol Methods* 123: 103-112, 1989.
115. **Tharp GD, and Preuss TL.** Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J Appl Physiol* 70: 2535-2538, 1991.
116. **Timmons BW, and Bar-Or O.** Lymphocyte expression of CD95 at rest and in response to acute exercise in healthy children and adolescents. *Brain Behav Immun* 21: 442-449, 2007.
117. **Tomasetti M, Littarru GP, Stocker R, and Alleva R.** Coenzyme Q10 enrichment decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 27: 1027-1032, 1999.
118. **Tripathi P, and Hildeman D.** Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* 9: 515-523, 2004.
119. **Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY, Hsu CF, and Kong CW.** Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic

exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 1465-1472, 2001.

120. **Tuan TC, Hsu TG, Fong MC, Hsu CF, Tsai KK, Lee CY, and Kong CW.** Deleterious Effects of Short-Term High-Intensity Exercise on the Immune Function: Evidence from Leukocyte Mitochondrial Alternations and Apoptosis. *Br J Sports Med* 2007.

121. **Tvede N, Pedersen BK, Hansen FR, Bendix T, Christensen LD, Galbo H, and Halkjaer-Kristensen J.** Effect of physical exercise on blood mononuclear cell subpopulations and in vitro proliferative responses. *Scand J Immunol* 29: 383-389, 1989.

122. **Umegaki K, Higuchi M, Inoue K, and Esashi T.** Influence of one bout of intensive running on lymphocyte micronucleus frequencies in endurance-trained and untrained men. *Int J Sports Med* 19: 581-585, 1998.

123. **Verde T, Thomas S, and Shephard RJ.** Potential markers of heavy training in highly trained distance runners. *Br J Sports Med* 26: 167-175, 1992.

124. **Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, and Reutelingsperger C.** A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51, 1995.

125. **Viguie CA, Frei B, Shigenaga MK, Ames BN, Packer L, and Brooks GA.** Antioxidant status and indexes of oxidative stress during consecutive days of exercise. *J Appl Physiol* 75: 566-572, 1993.

126. **Wang JS, and Huang YH.** Effects of exercise intensity on lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress in men. *Eur J Appl Physiol* 95: 290-297, 2005.

127. **Wang JS, Lee T, and Chow SE.** Role of exercise intensities in oxidized low-density lipoprotein-mediated redox status of monocyte in men. *J Appl Physiol* 101: 740-744, 2006.

128. **Wetzstein CJ, Shern-Brewer RA, Santanam N, Green NR, White-Welkley JE, and Parthasarathy S.** Does acute exercise affect the susceptibility of low density lipoprotein to oxidation? *Free Radic Biol Med* 24: 679-682, 1998.

129. **Wierzba TH, Olek RA, Fedeli D, and Falcioni G.** Lymphocyte DNA damage in rats challenged with a single bout of strenuous exercise. *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 10: 115-131, 2006.

130. **Williams MS, and Kwon J.** T cell receptor stimulation, reactive oxygen species, and cell signaling. *Free Radic Biol Med* 37: 1144-1151, 2004.

131. **Zhang M, Izumi I, Kagamimori S, Sokejima S, Yamagami T, Liu Z, and Qi B.** Role of taurine supplementation to prevent exercise-induced oxidative stress in healthy young men. *Amino Acids* 26: 203-207, 2004.

132. 岩堀恵祐, 宮田直幸, 中村裕紀, 青山光太郎 コメントアッセイにおける DNA 損傷評価指標の標準化. *EICA* 7: 193-196, 2002.