

博士論文

競技スポーツ現場における
唾液中一酸化窒素測定の意味

平成 30 年度

筑波大学大学院人間総合科学研究科
スポーツ医学専攻

曾根 良太

目次

略語一覧	IV
表のタイトル一覧	V
図のタイトル一覧	VI
第1章 序論	
1-1. 研究の背景	1
1-2. 研究の目的	5
1-3. 用語の定義	6
第2章 文献研究	
2-1. 運動と免疫機能	7
2-2. コンディション指標としての唾液	9
2-3. 一酸化窒素	11
2-4. 酸化ストレス	15
第3章 本研究の構成, 方法	
3-1. 本研究の構成	17
3-2. 本研究で用いた方法	20

第4章 検討課題1

「一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

4-1. 緒言	25
4-2. 方法	26
4-3. 結果	30
4-4. 考察	37

第5章 検討課題2

「試合期に向けた継続的なトレーニングが唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

5-1. 緒言	41
5-2. 方法	42
5-3. 結果	44
5-4. 考察	55

第6章 検討課題3

「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連」

6-1. 緒言	59
6-2. 方法	60
6-3. 結果	62
6-4. 考察	73

第7章 総合討論	
7-1. 本研究の目的	76
7-2. 本研究で得られた成果	77
7-3. 本研究で得られた成果の意義	79
7-4. 本研究の限界点	82
第8章 結論	84
謝辞	85
付記	87
引用文献	89
参考図書	99
参考資料	99

略語一覽

BAP: biological antioxidant potential

BMI: body mass index

d-ROM: derived from reactive oxygen metabolites

EIA: enzyme immunoassay

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

NO: nitric oxide

NOS: nitric oxide synthase

POMS: profile of mood status

RNOS: reactive nitrogen oxygen species

ROC: receiver-operating characteristics

ROS: reactive oxygen species

RTI: respiratory tract infection

SIgA: secretory immunoglobulin A

TP: total protein

VAS: visual analog scale

$\dot{V}O_{2peak}$: peak oxygen uptake

表のタイトル一覧

第3章 本研究の構成, 方法

Table 3-1. d-ROM および BAP の評価基準

第4章 検討課題1

Table 4-1. 対象者の身体特性

Table 4-2. 介入による各測定項目の変化

第5章 検討課題2

Table 5-1. 対象者の身体特性

Table 5-2. トレーニング期および試合期における運動量の変化

Table 5-3. トレーニング期および試合期における各測定項目の変化

Table 5-4. 群分けした際の対象者の振り分け

Table 5-5. 群分けした際の対象者の身体特性

第6章 検討課題3

Table 6-1. 対象者の所属競技の内訳

Table 6-2. 対象者の身体特性および各変数の男女比較

Table 6-3. 内科的疾患のアンケート調査結果

図のタイトル一覧

第1章 序論

Figure 1-1. 第17回アジア競技大会期間中に罹患した内科的疾患の発生数とその疾患種別

Figure 1-2. 酸化ストレスのイメージ図

第2章 文献研究

Figure 2-1. open window 説

Figure 2-2. 生体内の一酸化窒素産生経路

Figure 2-3. 運動と酸化ストレスの関係

第3章 本研究の構成, 方法

Figure 3-1. 本研究の全体像

第4章 検討課題1

Figure 4-1. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動時の唾液中一酸化窒素濃度変化量の推移

Figure 4-2. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動時の唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值変化量の推移

Figure 4-3. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動前後の d-ROM の変化量と (A) 唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值の変化量および (B) 唾液中一酸化窒素濃度の変化量との関連

Figure 4-4. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動前の唾液中一酸化窒素濃度と (A) d-ROM および (B) 唾液中 SIgA 分泌速度との関連

第5章 検討課題2

Figure 5-1. 唾液中一酸化窒素濃度のトレーニング期から試合期への変化

Figure 5-2. 唾液中一酸化窒素濃度変化量と (A) 総合的気分状態 (TMD) の変化量および (B) 疲労-無気力 (FI) の変化量との関連

Figure 5-3. 各群における (A) 唾液中一酸化窒素濃度および (B) 唾液中コルチゾール濃度の変化 (試合出場による群分け)

Figure 5-4. 各群における (A) 唾液中一酸化窒素濃度および (B) 唾液中コルチゾール濃度の変化 (学年による群分け)

第 6 章 検討課題 3

Figure 6-1. 唾液中一酸化窒素濃度の分布

Figure 6-2. 競技別の唾液中一酸化窒素濃度

Figure 6-3. 疾患別の唾液中一酸化窒素濃度の比較

Figure 6-4. 喘息あり群および喘息なし群における唾液中一酸化窒素濃度の比較

Figure 6-5. 喘息の既往に対する唾液中一酸化窒素濃度の ROC 解析

Figure 6-6. 唾液中一酸化窒素濃度と (A) d-ROM および (B) BAP との関連

第 1 章 序論

1-1. 研究の背景

競技スポーツを行うアスリートにとって、試合において最高のパフォーマンスを発揮して、良い競技成績を残すことは最大の目的であり、そのために日々激しい練習を実施している。一方で、試合に向けてコンディションを整えることは非常に重要であるにも関わらず、試合前にコンディションを崩し、思い通りのパフォーマンスを発揮できない選手も多い。

久木留ら（2005）による 2002 年のアジア大会日本選手団を対象とした調査では、試合前にコンディションを崩した経験のある選手は全体の 26.8%を占め、そのうち実際に試合に影響があった選手は 29.4%を占めたことを報告している（久木留 and 佐藤 2005）。また、日本オリンピック委員会による代表選手団報告書（2015）では、2014 年仁川にて開催された第 17 回アジア競技大会期間中（21 日間）において、アスリートが罹患した内科的疾患の 4 割を気道感染症（respiratory tract infection : RTI）が占めたことを報告している（Figure 1-1）。気道感染症とは、上気道感染症と下気道感染症に大別される。症状には、鼻水、鼻づまり、くしゃみ、咽頭痛、咳、頭痛、発熱、倦怠感、吐き気などの諸症状を伴う。この気道感染症は上述のようにアスリートにおいて最も罹患頻度の高い疾患であり、パフォーマンス発揮を困難にするだけでなく、チーム内外への蔓延リスクの増加や試合や練習からの長期離脱に繋がる可能性があることから、特に注意を要する疾患である。これらのことから、アスリートの

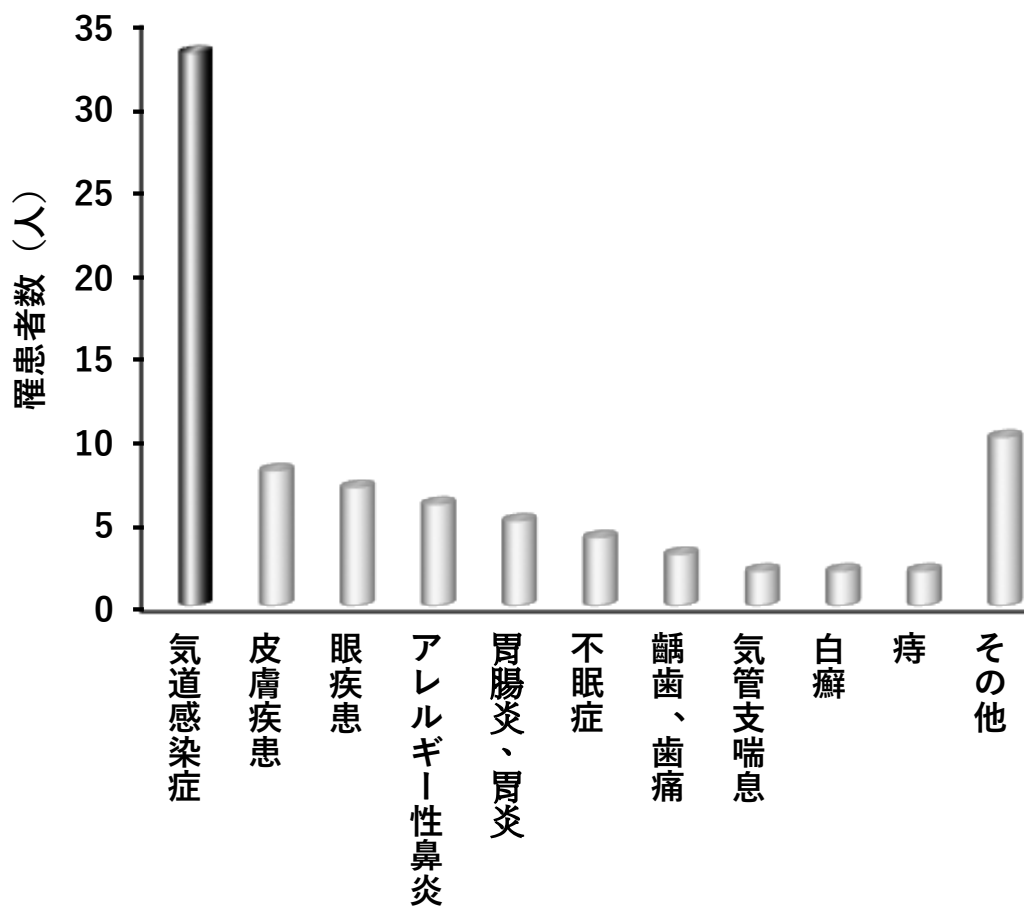
内科的なコンディション管理は、より良いパフォーマンスを発揮するために非常に重要であると考えられる。

競技スポーツ現場における内科的なコンディションを確認する生体試料は、簡単に採取できる簡便性が求められる。近年、アスリートの内科的なコンディション指標として、唾液が注目を集めている。唾液は、簡便かつ連続して採取が可能であることから、競技スポーツ現場におけるアスリートのコンディション評価に適した生体試料であると考えられている(清水 2011)。本研究では、唾液中成分の中でも唾液中一酸化窒素 (nitric oxide: NO) に着目した。唾液中一酸化窒素は、誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible nitric oxide synthase: iNOS) を介して産生され(Ulkar et al. 2012)、活性窒素酸素種 (reactive nitrogen oxygen species: RNOS) として口腔内の酸化に影響を与えている (Takahama et al. 2003; Takahama, Hirota, and Oniki 2006; Takahama, Hirota, and Takayuki 2008) ことから、唾液中一酸化窒素の過剰な産生は生体に対して悪影響を与えている可能性が考えられる。実際、全身性疾患であるリウマチ (Dervisevic et al. 2012)、局所性疾患である歯周病(Reher et al. 2007)、さらに自己免疫疾患の一種であるシェーグレン症候群(Konttinen et al. 1997)といった様々な疾患で唾液中一酸化窒素が高値を示すことが報告されている。

これらのことから、唾液中一酸化窒素の過剰な産生は活性酸素の産出に影響を与えることで、酸化ストレスの増加を引き起こし、疾患の発症や病態の進行に影響を与える可能性がある。そのため、唾液中一酸化窒素のモニタリングは、アスリートの酸化ストレスの程度とそれに関連する疾患への罹患リスクを予測するためのマーカーとして有益であると考えられる。

しかしながら、運動に対する唾液中一酸化窒素の応答に関する研究は、文献検索上、4件にとどまる(Panossian et al. 1999; Gonzalez et al. 2008; Rahman et al. 2010; Diaz et al. 2013). 数少ない先行研究の中でも、一過性運動に対して、唾液中一酸化窒素は増加する(Panossian et al. 1999; Rahman et al. 2010)や変動しない(Gonzalez et al. 2008)と一致した見解は得られていない。一方で、定期的な運動に対して、唾液中一酸化窒素は運動量依存的に増加するとの報告もある(Diaz et al. 2013).

一過性および定期的な運動に対して、唾液中一酸化窒素は応答することが示唆されていることから、競技スポーツ現場におけるコンディションマーカーにもなり得る可能性が考えられる。しかしながら、競技スポーツ現場で実施されているような運動に対する唾液中一酸化窒素の応答やアスリートにおける種々の疾患と唾液中一酸化窒素との関連については明らかではない。そのため、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素測定に意義は不透明である。



(日本オリンピック委員会. 2015 改変)

Figure 1-1. 第 17 回アジア競技大会期間中に罹患した内科的疾患の発生数とその疾患種別

1-2. 研究の目的

本研究では、非特異的免疫能を有し、種々の疾患との関連が報告されている唾液中一酸化窒素に着目して、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素測定の意味を明らかにすることを目的とし、これを達成するために以下の課題を設けた。

1. 一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響を明らかにする。
2. 試合期に向けた継続的な高強度運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響を明らかにする。
3. アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連を明らかにする。

これらの研究課題を明らかにすることで、競技スポーツ現場におけるアスリートの内科的コンディショニング管理における唾液中一酸化窒素測定の有用性についての知見が提供できるものと考えられる。

1-3. 用語の定義

若年男性

本研究では、18歳～30歳までの男性を若年男性と定義する。

唾液中一酸化窒素の評価

本検討における唾液中一酸化窒素は、市販のEIAキットを用いて、唾液サンプル中の代謝産物である亜硝酸塩 (NO_2^-) および硝酸塩 (NO_3^-) の総濃度を唾液中一酸化窒素濃度と定義することで評価した。

酸化ストレス

生体内の酸化還元状態は、活性酸素の産出と活性酸素を除去する抗酸化力のバランスによって決定される。本研究では、活性酸素の生成が活性酸素除去能（抗酸化力）よりも多い状態を酸化ストレスと定義する（Figure 1-2）。

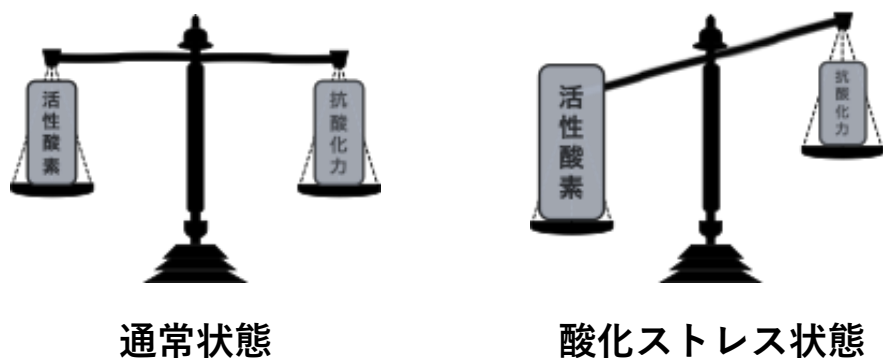


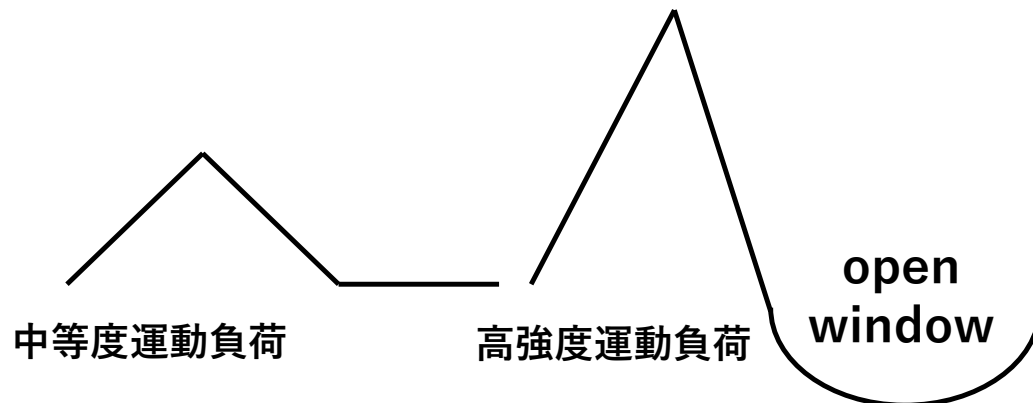
Figure 1-2. 酸化ストレスのイメージ図

第2章 文献研究

2-1. 運動と免疫機能

運動は強度や頻度によって免疫機能に異なった影響を与える(Gleeson 2007). 高強度運動後には, 免疫機能の低下が起こり, 感染に対して無防備に門戸を開いた状態である“open window theory (侵入門戸開放理論)”が提唱されている(Pedersen and Ullum 1994; Pedersen and Bruunsgaard 1995; Pedersen, Rohde, and Ostrowski 1998) (Figure 2-1). 高強度運動後の open window 期には, 獲得免疫の機能低下だけでなく, 自然免疫の機能低下も認められる(Nieman 1997; Ostrowski et al. 1999; Suzuki et al. 2000)ことから, ウイルスや細菌による感染リスクが高まるとされている. また, Nieman は運動と上気道感染症の関係について, 適度な運動習慣を持つ者は運動習慣のない者より罹患リスクが低く, 過度な運動を行っている者は罹患リスクが高まるとする“J-Shaped model (Jカーブモデル)”を提唱している(Nieman 1994). 先行研究では, 1日2時間以下の中等度運動を行っている者は, 運動習慣のない者に比べ上気道感染症の感染リスクが減少することが示されている(Matthews et al. 2002; Nieman et al. 1990). さらに, 継続した高強度運動によって罹患リスクを増加させることが報告されている(Heath et al. 1991; Cannon 1993). このように, 適度な運動は免疫機能を高めるが, 高強度の運動は免疫機能を低下させることが示されている. 回復期間を十分に置かずトレーニングを反復することにより, 慢性的な免疫機能の抑制が生じてしまう. そのため, 日々高強度の

トレーニングをしている競技スポーツ現場のアスリートにとって、免疫機能をモニタリングすることによるコンディション管理が重要である。



(Pederson, et al. *Acta Physiol Scand.* 1998 改変)

Figure 2-1. open window 説

2-2. コンディション指標としての唾液

2-2-1. 生体サンプルとしての唾液の利点

唾液の組成は、安静時、刺激時ともに、約 99%が水分であり、残る 1%未満が固体である。また、唾液分泌速度は、24 時間周期で変化し、午後 3 時頃にピークを示すとされている。一般的に唾液は、1 日につき 0.5L~0.6L 分泌される。唾液は主に、耳下腺、顎下腺、舌下腺からなる三つの大唾液腺および小唾液腺から分泌される。安静時には、耳下腺から 25%、顎下腺から 60%、耳下腺から 7~8%、小唾液腺から 7~8%が分泌されるが、刺激時の唾液では、耳下腺からの分泌割合が約 50%に増加する。また、唾液腺は、副交感神経と交感神経の二重支配を受けている。

唾液の採取にあたっては、非侵襲的で方法が容易であり、連続採取が可能であることから、スポーツ現場におけるアスリートのコンディション評価に適した生体試料であると考えられている(清水 2011)。

2-2-2. 運動に対する唾液中物質の応答

様々な唾液中成分の中でも、運動との関連が特に多く報告されているのが分泌型免疫グロブリン A (secretory immunoglobulin A: SIgA) である。2 量体 IgA は、タンパク質分解酵素から IgA を保護する分泌成分 (secretory component: SC) と複合体を形成している。SIgA は、粘膜上皮細胞から分泌される (口腔咽頭粘膜、消化管粘膜、鼻腔粘膜など)。唾液中 SIgA は、上気道感染症の初期防御機構の役割を担っている。先行研究において、唾液中 SIgA

と上気道感染症の関連が報告されている (Fahlman and Engels 2005; Klentrou et al. 2002). 唾液中 SIgA 分泌量が低下すると上気道感染症への罹患リスクが高まるとされている (Fahlman and Engels 2005). 運動と唾液中 SIgA の関係では、前述の J カーブモデル同様に、高強度トレーニングによって唾液中 SIgA の低下を示す (Neville, Gleeson, and Folland 2008; Yamauchi et al. 2011). 一方で、中等度トレーニングを継続することによって唾液中 SIgA は増加することが報告されている (Akimoto et al. 2003). また、ストレスシステムは視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamus-pituitary-adrenal: HPA) 軸などが重要な役割を果たしている (Chrousos 1998). 唾液中コルチゾールは、ストレスに対する視床下部下垂体の適応を表しており、様々な運動を含む身体的および精神的ストレスに対するバイオマーカーとして用いられてきた (Greiwe et al. 1999; Kirschbaum and Hellhammer 1994).

2-3. 一酸化窒素

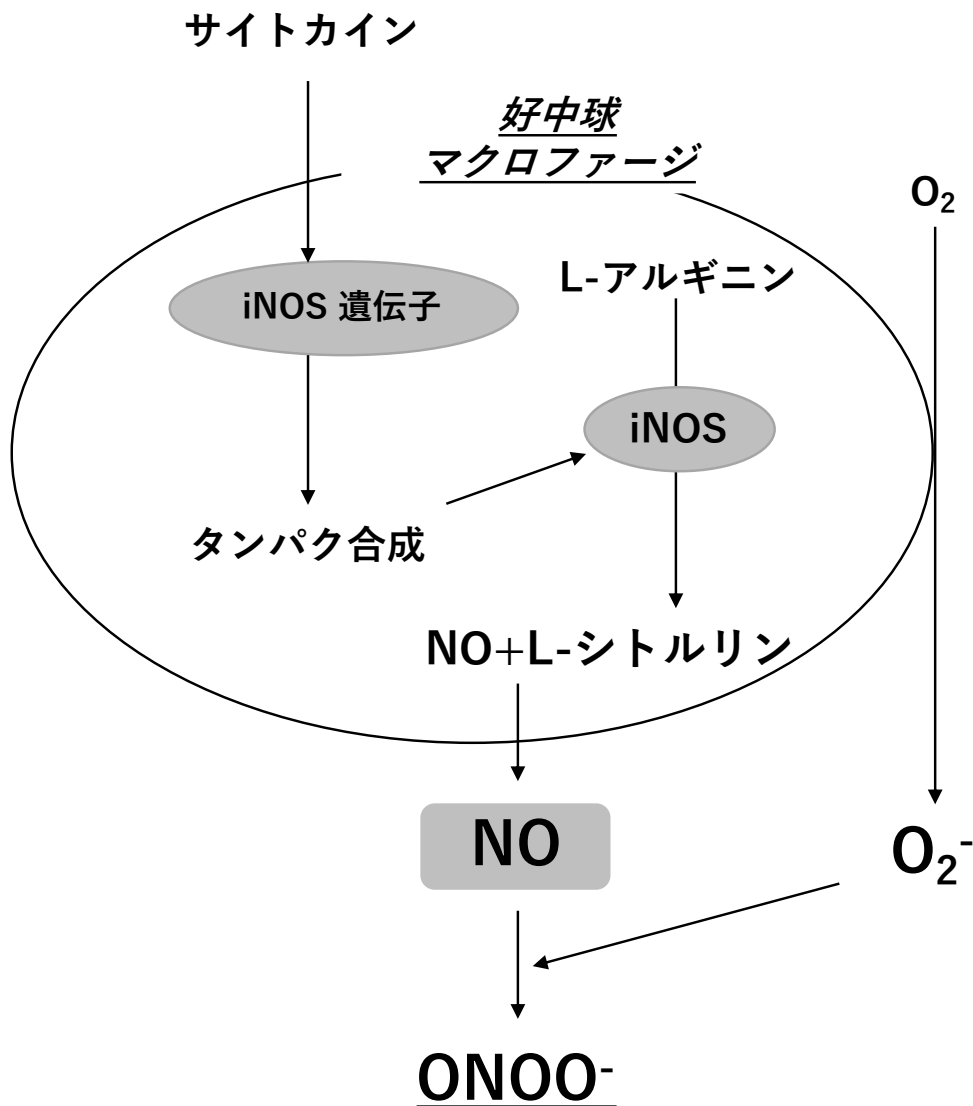
2-3-1. 生体内での一酸化窒素合成酵素の分布

分子内に不対電子をもって不安定な状態にあるものをラジカルと総称し、その中でも酸素原子をもつものを活性酸素あるいは活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) と呼ぶ。ROS とは、スーパーオキシド (O_2^-)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシルラジカル ($\cdot OH$)、一重項酸素 (O_2)などを指す。また、ROS の反応によって高度不飽和脂肪酸から生じるペルオキシラジカル ($ROO\cdot$) といった活性酸素種も ROS に含まれる。一方で、情報伝達物質としての一酸化窒素 (NO) は、酸素や ROS や様々な生体成分と反応して NO_2^- 、 NO_3^- 、ペルオキシナイトライト ($ONOO^-$) などに变化する。これらを ROS に対して活性窒素種 (reactive nitrogen species: RNS) と呼ぶことがある。さらに、これらをまとめて活性窒素酸素種 (reactive nitrogen oxygen species: RNOS) と示している報告もある (Takahama et al. *Methods Enzymol.* 2008)。一酸化窒素は、L アルギニンアミノ酸の 5 つの電子酸化した生成物であり、一酸化窒素合成酵素 (nitric oxide synthase: NOS) によって媒介される。NOS には、誘導型 NOS (inducible NOS: iNOS or NOS2)、血管内皮型 NOS (endothelial NOS: eNOS or NOS3)、神経型 NOS (neuronal NOS: nNOS or NOS1) の 3 種類が存在している (Nathan and Xie 1994)。それぞれの NOS は、iNOS がマクロファージ、血管平滑筋、白血球 (好中球)、eNOS が血管内皮、nNOS が神経系に多く分布していることが示されている (Valtschanoff et al. 1992; Yamamoto et al. 1993)。iNOS は、マクロファージか

ら分泌された種々のサイトカインによって誘導されることが報告されている (Xie et al. 1992).

2-3-2. 唾液中一酸化窒素の役割

唾液中一酸化窒素は、好中球およびマクロファージにて生成された iNOS を合成酵素として産出される (Ulkar et al. 2012). さらに、NO が NO₂ および NO₃⁻ に代謝され際に、O₂ と反応し ONOO⁻ が生じる (Beckman et al. 1990; Sugiura and Ichinose 2008). この ONOO⁻ が生体内に障害を与えるとされている (Sugiura and Ichinose 2008) (Figure 2-1). 生体内の一酸化窒素は、反応性の高い疎水性、揮発性のガスであり、寿命が非常に短い。そのため、産生後 NO₂ あるいは NO₃⁻ へとすばやく代謝される。本研究では、ヒト唾液中の生成物である NO₂⁻ を介して測定された一酸化窒素の存在が報告されていることから (Bodis and Haregewoin 1993), 唾液中一酸化窒素は、唾液中で産生された NO から代謝された NO₂⁻ および NO₃⁻ の 2 つの安定した物質を EIA キットによる測定で定量化した。唾液中一酸化窒素は、非特異的免疫と関連し、宿主防御および免疫反応として、大量に産生されることが示唆されている (Panossian et al. 1999). 実際に先行研究では、活性化されたマクロファージによって生成された NO は細胞増殖抑制特性を有しており (Moncada and Higgs 1993), 非特異的免疫において役割を果たす可能性が高いことも報告されている (Whittle 1995). これらのことから、唾液中一酸化窒素は、非特異的免疫能を反映するマーカーである可能性が考えられる。



(Sugiura and Ichinose. *Antioxid. Redox. Signal.* 2008 改変)

Figure 2-2. 生体内の一酸化窒素産生経路

2-3-3. 唾液中一酸化窒素と運動

これまでに唾液中一酸化窒素は口腔疾患(Konttinen et al. 1997; Reher et al. 2007)や全身疾患(Dervisevic et al. 2012; Rezaei and Mohhamadi 2018)と関連することが報告されている。しかしながら、運動に対する唾液中一酸化窒素の応答について検討している研究は非常に少ない(Panossian et al. 1999; Gonzalez et

al. 2008; Rahman et al. 2010; Diaz et al. 2013). Panossian らは、高強度運動後にアスリートの唾液中一酸化窒素が増加することを示しているが、高強度運動の強度設定については不明である (Panossian et al. 1999). また、15 分間のトレッドミルによるオールアウト運動によって唾液中一酸化窒素が増加したことが Rahman らによって報告されている (Rahman et al. 2010). さらに、観察研究によって、唾液中一酸化窒素は運動量依存的に増加を示す可能性が示唆されている (Diaz et al. 2013). これらのことから、唾液中一酸化窒素は、アスリートのコンディション指標として有用であると考えられる。しかしながら、唾液中一酸化窒素が運動に対するコンディション指標として確立されるためには、運動と唾液中一酸化窒素に関してより多くの知見が必要である。

2-4. 酸化ストレス

2-4-1. 活性酸素と酸化ストレス

酸化ストレスに関与する活性酸素種 (ROS) の毒性論には長く議論が行われてきた。これまでの研究で、ROS は様々な疾病に関与する酸化ストレスの病因として考えられている (Fridovich 1978)。ROS の中でも、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) や一重項酸素 (O_2) などの反応性の高い分子種は、生体に非特異的な損傷をもたらす毒性の強い物質であるとされている。これらの ROS の過剰生成によって、生体は非特異的な損傷を受け、生体の恒常性が失われる。

2-4-2. 運動と酸化ストレス

通常、酸素は体内に取り込まれた後、ミトコンドリア内のエネルギー (ATP) 産生系で利用される。しかし、酸素が生命維持に必要な ATP 産生に利用される過程においては、数%が活性酸素へと変化してしまう。運動時には、酸素摂取量が通常の 10~15 倍に達し、活動筋組織への酸素流量は安静時の 100 倍となる (Sen et al. 1994)。活性酸素の生成系と防御系のバランスが破綻した場合、すなわち防御系の許容範囲を生成量が上回った場合に酸化ストレスが生じる。先行研究では、運動誘発性の酸化ストレスが免疫機能低下 (Schneider and Tiidus 2007) や筋損傷・筋疲労 (Meeus et al. 2013) に繋がることが示唆されている (Figure 2-3)。そのため、アスリートのコンディションにおいて、活性酸素および酸化ストレスを評価することは重要であると考えられる。

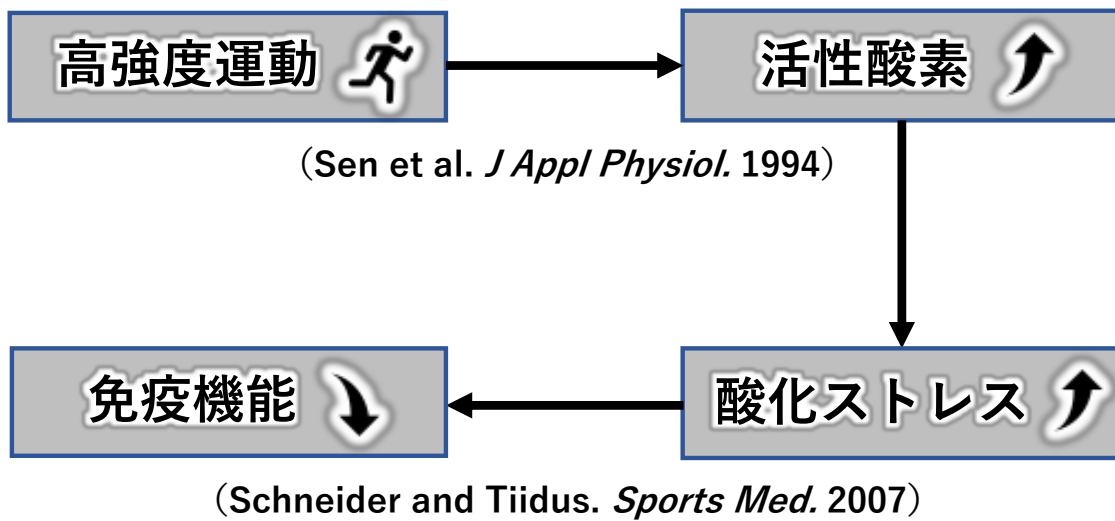


Figure 2-3. 運動と酸化ストレスの関係

2-4-3. 競技スポーツ現場における酸化ストレス評価

近年、競技スポーツ現場における酸化ストレスの評価指標として d-ROM が用いられている (Martarelli and Pompei 2009)。イタリアの Mauro Carratelli の 12 年間の研究の結果、d-ROM (derived from reactive oxygen metabolites) テストは開発された (Alberti et al. 2000)。d-ROM テストは、生体内の活性酸素やフリーラジカルを直接計測するのではなく、それらにより生じた血中の主にヒドロペルオキシド (ROOH) 濃度を呈色反応で計測し、生体内の酸化ストレスの状態を総合的に評価するものである。測定にあたっての必要な採血量は 250~300 μL と少ないことから、対象者の測定負担を軽減し、酸化ストレス度を評価することが可能である。

第3章 本研究の構成, 方法

3-1. 本研究の構成

これまでに唾液中一酸化窒素は種々の疾患と関連し、活性酸素に影響を及ぼす可能性を有することが明らかとなっている。さらに、唾液中一酸化窒素が運動誘発性ストレスに対して応答することも数報で報告されている。しかし、競技スポーツ現場を想定した高強度運動に対する唾液中一酸化窒素の応答や競技スポーツ現場で活躍するアスリートの唾液中一酸化窒素と疾患および酸化ストレスとの関係については不明な点が多いため、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定意義について不透明なのが現状である。

本博士論文では、「競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素測定の意義」を明らかにするために、「競技スポーツ現場で行われる高強度運動に対する唾液中一酸化窒素の急性応答や慢性応答について検討すること」および「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連を検討すること」を目的とした。本博士論文における目的を達成するために以下の3つの検討課題を設定した。本研究の全体像を Figure 3-1 に示す。

【検討課題 1】

「一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

これまでの先行研究において、唾液中一酸化窒素が運動に対して応答を示す可能性を有することが報告されている。しかし、競技スポーツ現場を想定した

一過性の高強度持久性運動に対する唾液中一酸化窒素の応答については不明である。

そこで、検討課題 1 では、唾液中一酸化窒素の高強度運動に対する急性応答を明らかにするために、習慣的な運動の影響を受けない若年男性を対象として、一過性の高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響について検討した。

【検討課題 2】

「試合期に向けた継続的な高強度運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

検討課題 1 において、競技スポーツ現場で実施される高強度運動が、唾液中一酸化窒素の急性応答に与える影響を検討した。その結果、一過性の高強度持久性運動は唾液中一酸化窒素の応答に影響を与える可能性が示唆された。しかし、競技スポーツ現場における試合に向けた高強度運動の継続が唾液中一酸化窒素に与える影響については不明である。

そこで、検討課題 2 では、唾液中一酸化窒素の高強度運動の継続に対する慢性応答を明らかにするために、アスリートを対象として、高強度運動の継続期間における縦断的な観察研究を実施した。トレーニング期および試合期における唾液中一酸化窒素を評価し、継続的な高強度運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響について検討した。

【検討課題3】

「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連」

検討課題1および2において、競技スポーツ現場を想定した高強度運動は、唾液中一酸化窒素の急性および慢性応答に与える影響を検討した。その結果、アスリートが実施する高強度運動は、唾液中一酸化窒素を増加させる可能性が示唆された。これまでに、唾液中一酸化窒素が種々の疾患と関連し、活性酸素の産出に関与する可能性が報告されている。アスリートにおいても、疾患を有する者がいると予想されるが、アスリートの唾液中一酸化窒素の測定値を解釈する上で、どのような疾患を反映し得るのかについて検討はされていない。

そこで、検討課題3では、大学トップアスリートを対象として唾液中一酸化窒素と疾患との関連について横断的手法を用いて検討した。

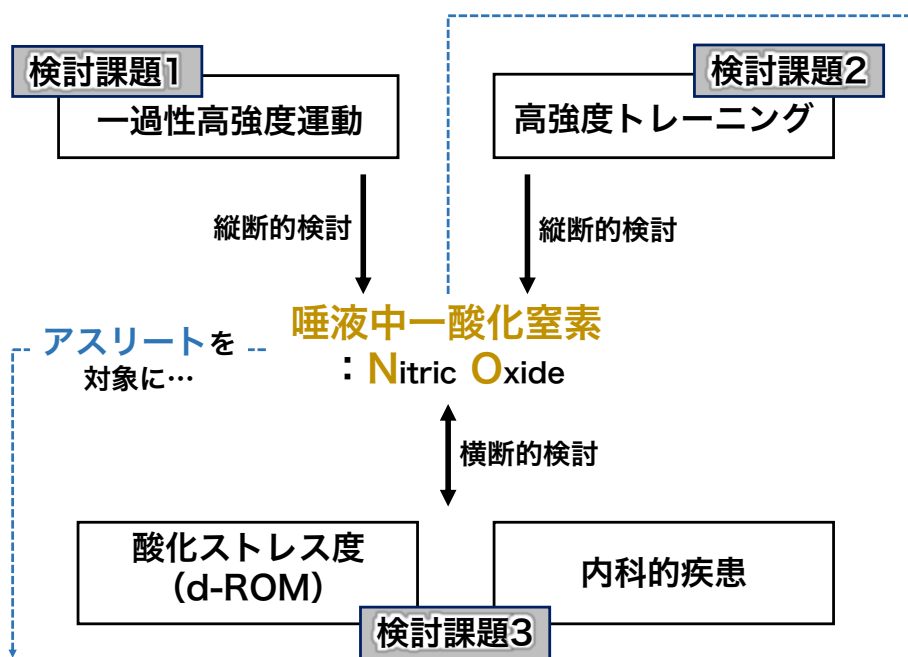


Figure 3-1. 本研究の全体像

3-2. 本研究で用いた方法

・唾液採取方法

唾液採取は、Akimoto らの先行研究において用いられた方法を採用した (Akimoto et al. 2003)。唾液採取の流れを下記に示す。対象者は座位安静状態で、ミネラルウォーターを使用して口腔内を 30 秒間×3 回すすいだ上で、座位姿勢にて 5 分間安静を取った。その後、滅菌綿 (SALIVETTE, SERSTED 社製) を 120 秒間に 120 回 (1 秒間に 1 回のペース) もしくは 60 秒間に 60 回咀嚼し、分泌された唾液をその滅菌綿に吸収させ、3,000rpm で 15 分間遠心して滅菌綿から分離させることで唾液を回収した。唾液サンプルは、容量を測定した後に -80°C で凍結保存した。

・唾液中一酸化窒素の測定

唾液中一酸化窒素濃度 ($\mu\text{mol/L}$) の定量には、市販の EIA キット (Nitric Oxide detection kit #ADI-917-010, Enzo Life Sciences 社製) を用いて測定した。

・唾液中 SIgA の測定

唾液中 SIgA 濃度 ($\mu\text{g/mL}$) の定量は、先行研究において用いられた方法を参考に ELISA 法によって測定した (Akimoto et al. 2003)。96 well のマイクロプレートに 20 mM の coating buffer (6 mM, NaCO_3 , 14 mM NaHCO_3 ; pH9.8) で 1,000 倍に希釈した Anti-Human Secretory Component (DACO 社製) を各

well に 100 μ L 加え, 4 $^{\circ}$ C で 8 時間以上静置して抗体を固相化した. 上清を除き, 1%BSA/PBS を 250 μ L ずつ加え, 常温にて 2 時間ブロッキングを行った. 冷凍保存した唾液は, 融解した後に, 10,000 rpm で 1 分間遠心した後に, 上清を 1%BSA/PBS によって 51 倍希釈した. 標準物質としてヒト SIgA (ICN Pharmanceuuticals 社製) を 6 段階の濃度に希釈した. ブロッキング終了後, 51 倍希釈した唾液サンプルを各 well に 100 μ L ずつ加え, ダイレクトミキサーを用いて常温で 1 時間振盪した. 振盪後, PBS によって 1,000 倍希釈した 0.05% Tween20 (Bio Rad 社製) 溶液を用いて各 well を 4 回洗浄し, 1%BSA/PBS で 1,000 倍希釈した Anti-Human IgA (MBL 社製) を各 well に 100 μ L ずつ加え, ダイレクトミキサーを用いて常温で 1 時間振盪した. 0.05% Tween20/PBS によって 4 回洗浄し, 反応基質液 OPD/0.05 M クエン酸/0.1 M Na₂HPO₄/30%H₂O₂ を各 well に 100 μ L ずつ加え, 常温にて 10 分間反応させた. その後, microplate reader を用いて 490 nm の吸光度を測定した. 標準物質であるヒト SIgA の吸光度より描かれた標準曲線より, 唾液中 SIgA 濃度を求めた. SIgA 濃度タンパク補正值 (SIgA/TP) (μ g/mg) は, SIgA 濃度 (μ g/mL) を総タンパク濃度 (TP) (mg/mL) で除して算出した. なお, 唾液中総タンパク濃度の定量には, 市販の測定キット (Pierce 660nm Protein Assay Kit, Thermo SCIENTIFIC 社製) を用いて測定した. さらに, 唾液中 SIgA 分泌速度は (μ g/min) は, 唾液分泌量 (mL/min) と唾液中 SIgA 濃度 (μ g/mL) との積により算出した.

・ d-ROM (酸化ストレス度) および BAP (抗酸化力) の測定

d-ROM (酸化ストレス度) (U.CARR) および BAP (抗酸化力)

($\mu\text{mol/L}$) の定量は, 先行研究において用いられた方法である FREE

CARRIO DUO (Diacron International 社製) を使用して測定した(Morimoto

et al. 2016; Morimoto et al. 2018). 採血方法は対象者への負担を考慮し, ラン

セットを用いた指先採血を採用した. この採血方法による測定は, FREE

CARIO DUO の取扱説明書にも記載されている方法であり, 測定値の信頼性は

肘正中皮静脈からの採血と差異ないものであると考えられる. 専用のマイクロベ

ットを用いて必要最低限量 (200 μL) の血液を採取した. 血液サンプルは採取

後すぐに 2 分間遠心した. d-ROM の測定は, 採取したサンプルを 20 μL 使用

して, 専用のキュベットに入れ, 約 5~10 秒間緩やかに転倒混和する. その

後, d-ROMs 呈色液を 20 μL キュベットに入れ, 再度約 5~10 秒間緩やかに転

倒混和する. 5 分間キュベットを測定装置にセットすることで, 測定結果が出

力される. 単位の U.CARR は任意単位であり, 1.U.CARR =

0.08mg/100nLH₂O₂である. BAP の測定は, BAP 呈色液を 50 μL 専用のキュ

ベットに入れ, 約 5~10 秒間緩やかに転倒混和する. 1st リードを行った後, 採取

したサンプルを 10 μL 入れ, 再度約 5~10 秒間緩やかに転倒混和する. 約 5 分間

キュベットを測定装置にセットすることで, 測定結果が出力される.

Morimoto らによる d-ROM および BAP の評価基準を Table 3-1 に示す

(Morimoto et al. 2016).

Table 3-1. d-ROM および BAP の評価基準

評価	基準値
d-ROM (酸化ストレス度測定)	U.CARR
正常範囲	250 - 300
ボーダーライン	301 - 320
軽度の酸化ストレス	321 - 340
中程度の酸化ストレス	341 - 400
強度の酸化ストレス	401 - 500
かなり強度の酸化ストレス	> 500
BAP (抗酸化力測定)	μmol/L
正常範囲	> 2,200
ボーダーライン	2,000 - 2,200
抗酸化力がやや不足	1,800 - 1,999
抗酸化力が不足	1,600 - 1,799
抗酸化力がかなり不足	1,400 - 1,599
抗酸化力が大幅に不足	< 1,400

・心理状態の調査

心理状態は、日本語版 Profile of Mood States (POMS 2) 短縮版 (金子書房, 東京) を用いて、怒り-敵意 (Anger-Hostility; AH), 混乱-当惑 (Confusion-Bewilderment; CB), 抑うつ-落ち込み (Depression-Dejection; DD), 疲労-無気力 (Fatigue-Inertia; FI), 緊張-不安 (Tension-Anxiety; TA), 活気-活力 (Vigor-Activity; VA) の 6 因子を評価し、標準化得点 (T 得点) として算出した。また、6 因子すべての素得点によって算出される総合的気分状態 (Total Mood Disturbance; TMD) を T 得点にて評価した。各因子の素得点は、0 点が最小得点であり、20 点が最大得点として記録される。一方、

素得点から算出される T 得点は因子によって最小および最大得点が異なるが、いずれの因子においても平均的な T 得点は 40~59 点である。

- ・ ROC 解析

ROC (Receiver-operating characteristics) 解析は、カットオフ値の判断のための統計手法である。カットオフ値とは、検査の診断能の評価に用いられる。ROC 解析では、カットオフ値を連続的に変化させた場合の感度、特異度の変化を求め、縦軸に感度、横軸に特異度 (=1-特異度) をとってグラフ上にプロットする方法である(三宅 2005)。カットオフ値の算出は、統計解析ソフトウェア JMP Pro version 12 (SAS 社製) を用いて行った。

第4章 検討課題1

「一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

4-1. 緒言

先行研究において、一過性のオールアウト運動が唾液中一酸化窒素を増加させることが報告されている(Rahman et al. 2010)。一方で、唾液中一酸化窒素は一過性運動によって変動しないといった報告もある(Gonzalez et al. 2008)。このように、一過性の運動に対する応答は一致した見解が得られておらず、運動強度も明確には設定されていない。さらに、これらの先行研究はいずれも単群における検討である。そのため、安静条件を設定した比較検討試験にて、競技スポーツ現場を想定した一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素に与える影響について検討する必要がある。本検討では、習慣的な運動の影響がない若年男性を対象として、一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響について検討した。

4-2. 方法

4-2-1. 対象者

本検討では、若年男性9名を対象とした。対象者は日常において、高強度運動を習慣的に行っておらず、現在の服薬および喫煙習慣はない。本研究では、一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の急性応答に及ぼす影響を検討するために、習慣的な運動習慣のない若年男性を対象とした。研究を開始するにあたり、すべての対象者に対し、事前に研究の主旨、実験方法、起こりうる危険性および参加の任意性について十分に説明し、書面にて研究参加への同意を得た。なお、本研究は「ヘルシンキ宣言」の趣旨に従い、且つ「筑波大学体育系研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した（体 27-99 号）。

4-2-2. 検討方法および測定項目

本研究では、ランダムクロスオーバーデザインにて、定常運動負荷を行わない安静条件および定常運動負荷試験を行う運動条件を実施した。本実験に先立ち、最高運動負荷試験により $\dot{V}O_{2peak}$ を測定した。その後、7日以上の間を空けて、室温が24–26 °Cの一定温度に保った静かな実験室で、安静条件もしくは運動条件を実施し、4日以上の間を空けて行っていない条件の実験を実施した。安静条件では、安静座位の状態を保ち、8:00（介入前）、9:00（介入直後）、10:00（介入1時間後）、11:00（介入2時間後）、12:00（介入3時間後）に測定を実施した。運動条件では、定常運動負荷試験の運動前（介入前）、運動直後（介入直後）、運動終了後1時間、2時間、3時間（介入1時

間後、介入 2 時間後、介入 3 時間後) に測定を実施した。なお、唾液中一酸化窒素の日内変動を考慮して、安静条件と運動条件の測定時間を合わせた。対象者へは、前日の運動および前日 22 時から当日の飲食 (水のみ許可) を控えるよう指示した。測定項目は、唾液中一酸化窒素濃度、唾液中 SIgA 濃度、唾液中総タンパク濃度、唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值 (SIgA/TP)、唾液量、唾液中 SIgA 分泌速度、身体組成および主観的疲労度とした。また、運動による酸化ストレスの増加の確認のため、両条件における介入前後でのみ d-ROM を測定した。

4-2-3. 最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) の測定

対象者は、自転車エルゴメーター (75XL3, コンビウエルネス社製) を用いた運動負荷によって、最高酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2peak}$) を測定した。運動中の呼気ガスは、呼気ガス分析装置 (AE-310S, ミナト医科学社製) を用いて測定した。運動負荷試験は、自転車エルゴメーターのサドルに座った状態にて 2 分間の安静後、10W からスタートして 3 分後に 100W になるように負荷 (30 W / min) を設定して 3 分間のウォーミングアップを行った。その後、1 分おきに 15W ずつ負荷を上げていくランプ負荷試験を用いて、オールアウト (疲労困憊) の基準を満たすまで継続した。試験中のペダル回転数は、電子メトロノームを用いて 60 rpm を保つようにし、1 分おきに RPE (ratings of perceived exertion) を確認した (Borg 1982)。オールアウトの基準は、①酸素摂取量 ($\dot{V}O_2$) がプラトーに達した時点 (一段階前の負荷と比べた場合の酸素摂取量

の上昇が 150 ml / min 以下) , ②呼吸交換比が 1.10 以上, ③運動時の心拍数が予測最大心拍数 (220 - 年齢) の 90%以上のうち, いずれか 2 つ以上に該当していることを条件とした. ランプ負荷試験中の $\dot{V}O_2$ を呼気ガス分析装置により, breath by breath 法にて測定し, それらの 30 秒間の平均値より $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ を求めた.

4-2-4. 定常運動負荷試験

対象者は, 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の負荷になるように漸増的に強度上げていく 10 分間のウォーミングアップを行った後, 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷で 50 分間の自転車ペダリング運動を行った. なお, 負荷試験中には運動強度を 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ の負荷に保つため, 5 分毎に $\dot{V}O_2$ を測定し, 得られた $\dot{V}O_2$ に応じて適宜運動強度の調節を行った.

4-2-5. 統計処理

Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性の確認を行った後, 介入前のデータに関しては, 対応のある t 検定もしくは Wilcoxon の順位和検定を用いて検定を行った. また, 条件による効果を検討するため, 繰り返しのある二元配置分散分析を用いた. 主効果または交互作用が有意であった場合, その後の検定に Dunnett 法を用いた. 各変数の関連性については, Spearman の順位相関係数

を用いて検討した。統計処理した各測定データ値は、平均値 ± 標準誤差で示し、統計学的有意水準は 5%とした。

4-3. 結果

対象者の身体特性を Table 4-1 に示す。Table 4-2 には、両条件における各測定データの変化を示す。一過性高強度持久性運動（80% $\dot{V}O_{2\text{ peak}}$ 負荷で 50 分間の自転車ペダリング運動）により、d-ROM は、持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{ peak}}$ 負荷運動後に有意に増加した（ $P < 0.01$ ）。運動条件では、主観的な疲労度が有意に増加した（ $P < 0.01$ ）。一方で、安静条件において、唾液中一酸化窒素は、介入前と比較して 1 時間の安静座位後すべての測定ポイントで有意に低下した。

運動前後の d-ROM の変化量と唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值の変化量（ $r_s = -0.117, P > 0.05$ ）（Figure 4-3-A）および唾液中一酸化窒素濃度の変化量（ $r_s = -0.500, P > 0.05$ ）（Figure 4-3-B）の間には有意な相関関係が認められなかった。また、運動介入前の唾液中一酸化窒素濃度と d-ROM の間には有意な相関関係は認められなかった（ $r_s = -0.368, P > 0.05$ ）（Figure 4-4-A）。一方で、運動介入前の唾液中一酸化窒素濃度と d-ROM の間に有意な負の相関関係が認められた（ $r_s = -0.817, P < 0.05$ ）（Figure 4-4-B）。

Table 4-1. 対象者の身体特性

	n = 9
年齢 (歳)	24 ± 0
身長 (cm)	175 ± 1
体重 (kg)	68 ± 2
BMI (kg/m ²)	22 ± 0
最高酸素摂取量 (mL/kg/min)	49.0 ± 4.6
運動時最大心拍数 (bpm)	183 ± 12

平均値 ± 標準誤差

Table 4-2. 介入による各測定項目の変化

n = 9		8:00	9:00	10:00	11:00	12:00	交互作用
		介入前	介入直後	介入 1 時間後	介入 2 時間後	介入 3 時間後	
d-ROM	安静	278 ± 12	278 ± 10	-	-	-	.019
(U.CARR)	運動	265 ± 10	289 ± 13**	-	-	-	
唾液中一酸化窒素濃度	安静	447 ± 65	353 ± 57**	367 ± 56*	355 ± 49**	303 ± 44**	.005
(μmol/L)	運動	388 ± 82	380 ± 76	389 ± 66	401 ± 63	365 ± 53	
唾液中 SIgA 濃度	安静	43 ± 13	30 ± 7	29 ± 6	30 ± 6	26 ± 3*	.153
(μg/mL)	運動	33 ± 8	32 ± 6	22 ± 4*	22 ± 3*	29 ± 6	
総タンパク濃度	安静	341 ± 70	218 ± 45	285 ± 56	308 ± 46	380 ± 80	.049
(μg/mL)	運動	220 ± 31	733 ± 143**	390 ± 62	380 ± 63	406 ± 74	
唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值	安静	0.14 ± 0.03	0.16 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.11 ± 0.03	0.09 ± 0.02**	.000
	運動	0.17 ± 0.05	0.06 ± 0.01**	0.07 ± 0.02**	0.07 ± 0.01**	0.08 ± 0.02**	
唾液量	安静	1.381 ± 0.316	1.464 ± 0.341	1.492 ± 0.358	1.550 ± 0.254	1.449 ± 0.246	.136
(mL/min)	運動	1.268 ± 0.285	1.056 ± 0.238	1.354 ± 0.308	1.360 ± 0.271	1.397 ± 0.253	
唾液中 SIgA 分泌速度	安静	44 ± 7	36 ± 6	38 ± 7	43 ± 8	35 ± 5	.338
(μg/mL)	運動	34 ± 6	29 ± 5	26 ± 3	27 ± 3	32 ± 4	
主観的疲労度	安静	20 ± 3	20 ± 3	19 ± 3	17 ± 3	17 ± 2	.000
(mm)	運動	21 ± 4	76 ± 7**	43 ± 6**	36 ± 6	27 ± 4	

平均値 ± 標準誤差. VS. 介入前 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

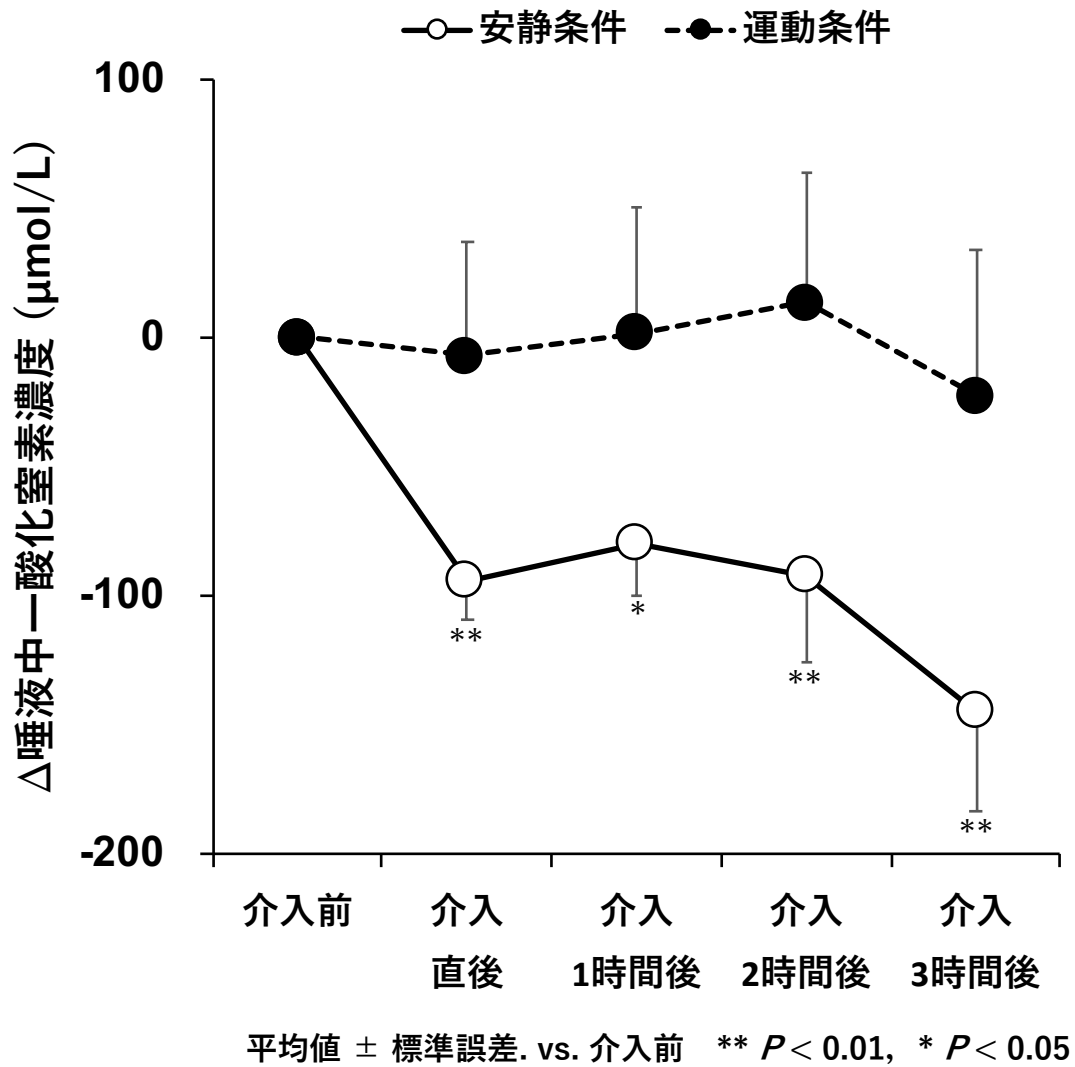


Figure 4-1. 一過性高強度持久性運動時の唾液中一酸化窒素濃度変化量の推移

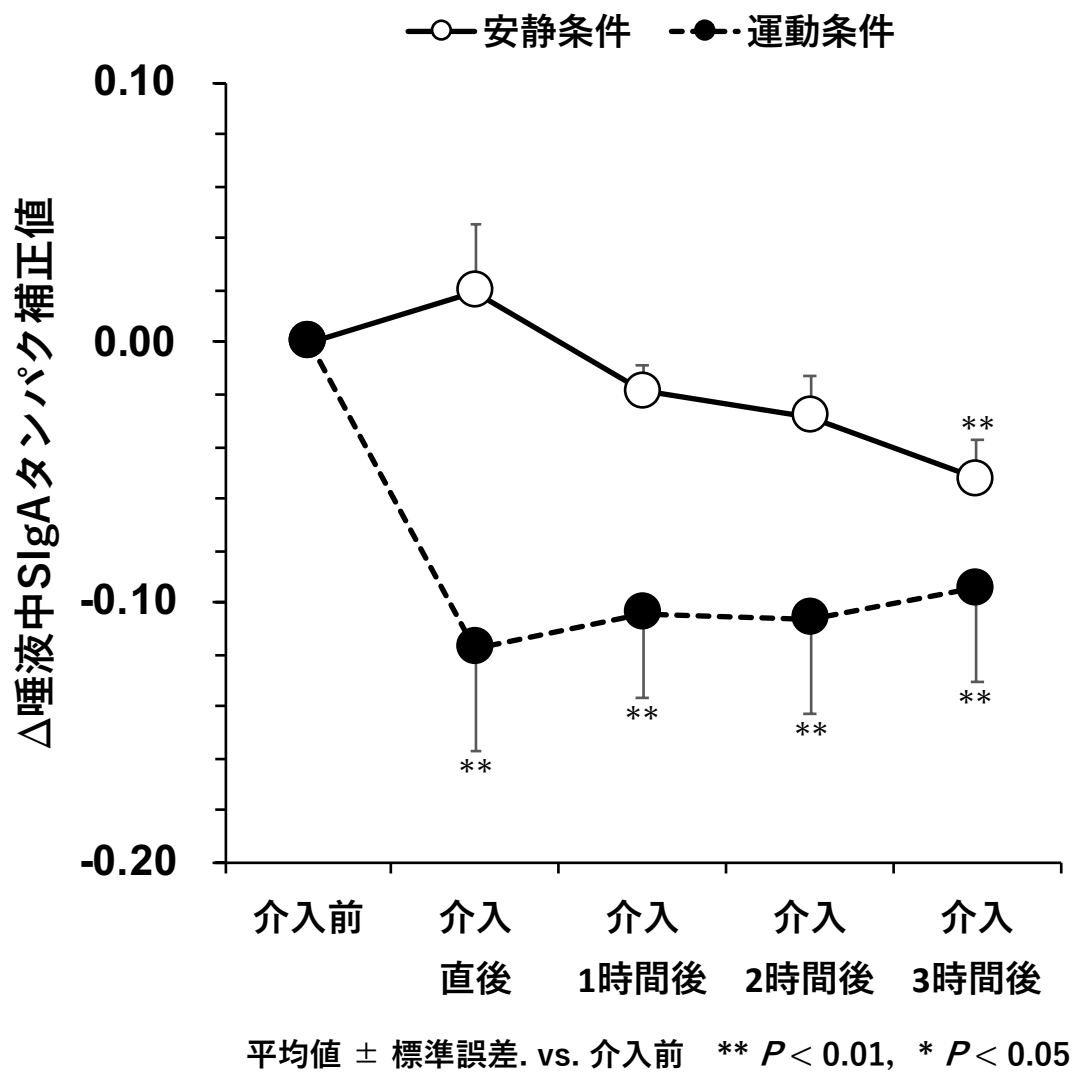


Figure 4-2. 一過性高強度持久性運動時の唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值変化量の推移

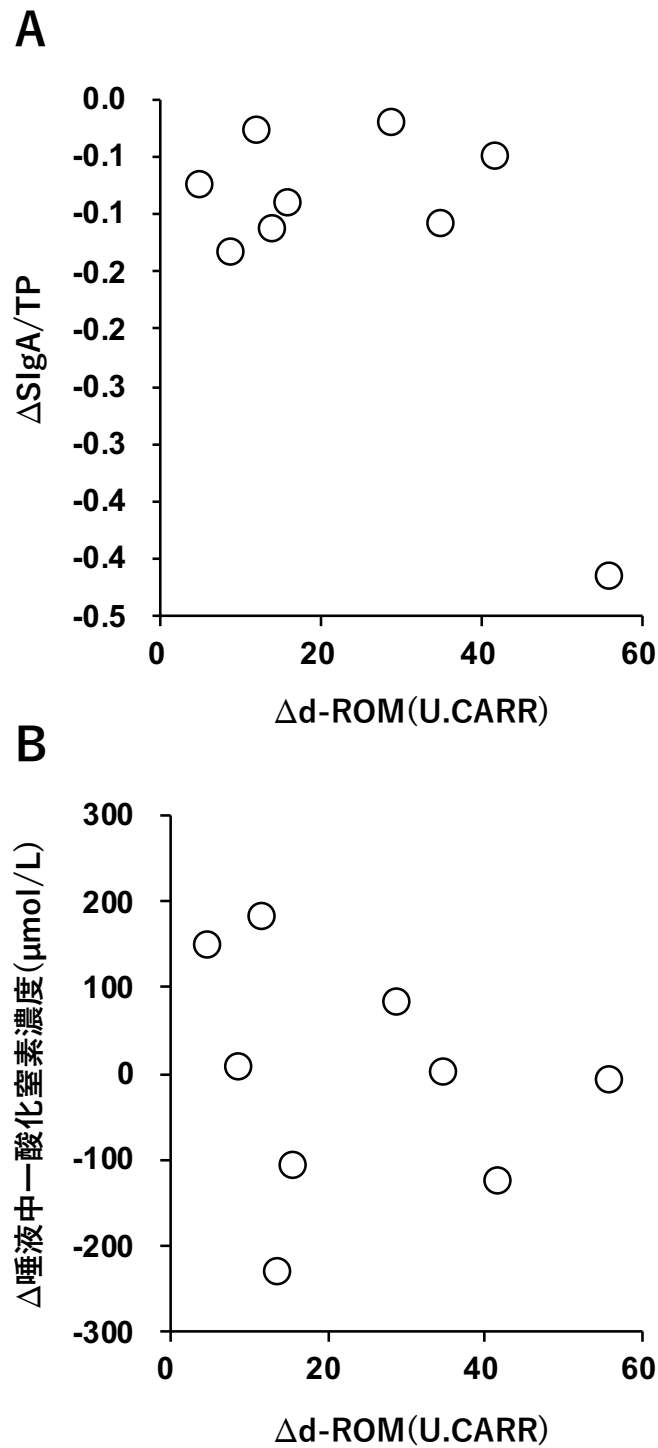


Figure 4-3. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動前後の d-ROM の変化量と (A) 唾液中 SIgA 濃度タンパク補正值の変化量および (B) 唾液中一酸化窒素濃度の変化量との関連

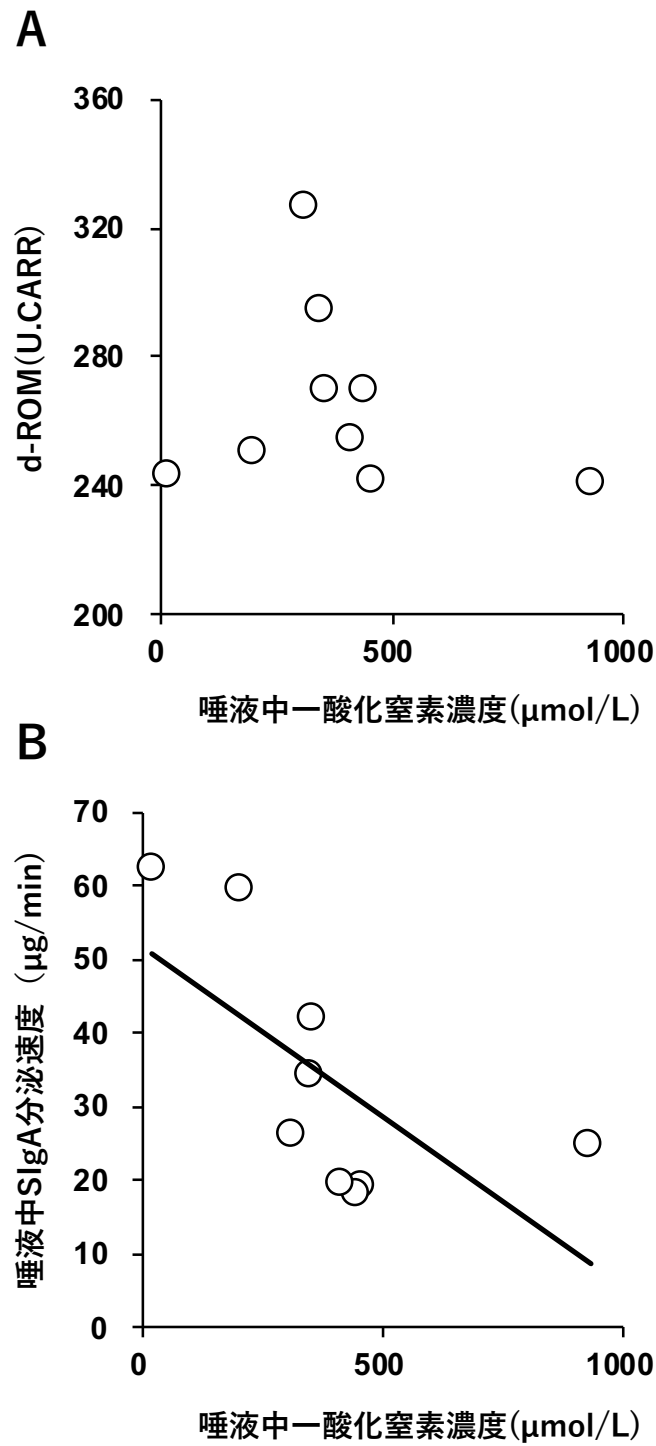


Figure 4-4. 持続的 80% $\dot{V}O_{2\text{peak}}$ 負荷運動前の唾液中一酸化窒素濃度と (A) d-ROM および (B) 唾液中 SIgA 分泌速度との関連

4-4. 考察

本検討では、習慣的な運動の影響がない若年男性を対象として、一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の急性応答に及ぼす影響について、安静条件を設定した上で比較検討した。その結果、安静条件で認められた唾液中一酸化窒素濃度の有意な低下は、一過性高強度持久性運動後には認められなかった。一方、口腔内局所免疫能を反映している唾液中 SIgA タンパク補正值 (SIgA/TP) は、運動条件で介入直後に有意に低下した。これらの結果から、競技スポーツ現場で実施されるような高強度持久性運動の実施は、口腔内局所免疫能を一時的に低下させ、唾液中一酸化窒素の応答に影響を及ぼす可能性が示唆された。

先行研究において、一過性高強度運動によって唾液中一酸化窒素濃度が増加を示すことを報告している (Panossian et al. 1999; Rahman et al. 2010)。一方で、高強度運動によって変動しないといった報告もある (Gonzalez et al. 2008)。このように、一過性高強度運動が唾液中一酸化窒素の応答に与える影響については一致した見解が得られていない。これらの先行研究は、コントロール条件 (安静条件) が設定されていないことが課題点として考えられる。唾液中一酸化窒素の代謝産物の一種である nitrite は夜間に高値を示すことが報告されており (Mirvish et al. 2000)、その他の唾液中成分同様 (Li and Gleeson 2004; Born et al. 2016) に、唾液中一酸化窒素も日内変動を有する可能性があることが考えられる。そのため、一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響を明らかにするためには、コントロール条件 (安静条件) を

設定した上で、比較検討する必要があった。また、比較検討する方法としてクロスオーバーデザインを採用した理由は、対象者が少人数のため、2条件の順番の影響を除外するためである。本検討において、安静状態にしているにも関わらず、8:00 から 12:00 にかけて唾液中一酸化窒素濃度の有意な低下が確認された。本博士論文で測定している nitrate は、nitrite 同様に唾液中一酸化窒素の代謝産物であり (Takahama, Hirota, and Oniki 2006), nitrite も含めた総量を唾液中一酸化窒素として定量化している。すなわち、夜間の高値である nitrite の影響によって、本検討における 8:00 の測定ポイントでは他の測定ポイント (9:00, 10:00, 11:00, 12:00) と比較して有意に高値を示した可能性が考えられる。また、抗菌作用を有し、免疫機能を評価するバイオマーカーとして、唾液中アミラーゼが使用されている (Chicharro et al. 1998 ; Papacosta and Nassis 2011)。唾液中一酸化窒素も、唾液中アミラーゼ同様に口腔内で抗菌作用を發揮していることが議論されている (Zetterquist et al. 1999; Doel et al. 2004)。抗菌作用を持つ唾液中成分が日内変動を有することからも、唾液中一酸化窒素が日内変動を有している可能性は十分に考えられる。しかしながら、安静条件で認められた唾液中一酸化窒素濃度の有意な低下は、運動条件では認められなかった。これらのことから、一過性高強度持久性運動は唾液中一酸化窒素の応答に対して、安静時とは異なる影響を与える可能性を有していると考えられる。

運動によって唾液中一酸化窒素濃度が増加したという先行研究では、運動介入において、Bruce's protocol を採用した短時間のオールアウト運動を実施している (Rahman et al. 2010)。しかしながら、オールアウト運動は、運動強度の定量化が難しく、短時間の運動となるため、競技スポーツ現場を想定した高強

度運動の影響を確認するための介入方法として利用されることは多くない。クロスオーバーデザインを用いて検討した本検討結果は、一過性高強度運動の唾液中一酸化窒素濃度に対する急性効果についてより明確に表していると考えられるが、オールアウトの有無が唾液中一酸化窒素の応答に影響を与えている可能性もある。オールアウト運動の終盤時には、換気量が増加するため酸素摂取量が運動の序盤時よりも大幅に増加している状態になる。すなわち、活性酸素の産出が過剰になっていることを意味しているため、唾液中一酸化窒素の応答にも本検討とは異なった影響を与えたと考えられる。

本検討の一過性高強度運動の強度設定は、先行研究より一過性の口腔内局所免疫能を反映する唾液中 SIgA が低下する強度を参考とした(Usui et al. 2011; Murase et al. 2016)。一過性運動に対する唾液中一酸化窒素の応答を検討している先行研究において、運動強度を明確にしている報告はない(Panosian et al. 1999; Rahman et al. 2010)。よって、本研究は競技スポーツ現場で実施されるレベルの運動強度を明確に設定した上で、唾液中一酸化窒素に対する一過性運動の急性効果について明らかとした点において新規性がある。

一方、他の先行研究において、唾液中一酸化窒素濃度が運動によっては変化しないことを報告している(Gonzalez et al. 2008)。本検討において唾液中一酸化窒素濃度が高強度持久性運動後に変化を示さなかったことは、この先行研究の結果を部分的に支持する結果となっている。本検討結果を含め、一過性運動に対する急性応答については、一致した見解が得られていない現状もあることから、今後さらなる研究で、様々な運動様式・強度における応答に関する知見の蓄積が求められる。

検討課題 1 では、運動習慣のない若年男性において、競技スポーツ現場で実施されるような一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の急性応答に及ぼす影響についてコントロール条件（安静条件）を設定したランダムクロスオーバーデザインにて縦断的検討を行った。その結果、唾液中一酸化窒素濃度は、安静条件では午前中に測定開始から時間の経過とともに有意な低下が確認されたが、運動条件では有意な変化が認められなかった。この結果は、唾液中一酸化窒素の応答は、一過性高強度運動の実施により安静時とは異なることを示している。これらのことから、競技スポーツ現場で実施されるような高強度持久性運動は、唾液中一酸化窒素の応答に一過性の影響を与える可能性が示唆された。

第5章 検討課題2

「試合期に向けた継続的なトレーニングが唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

5-1. 緒言

検討課題1において、競技スポーツ現場で行われる高強度持久性運動は、唾液中一酸化窒素の応答に安静時とは異なる影響を与えることを明らかとした。先行研究において、唾液中一酸化窒素濃度が運動強度依存的に増加することが報告されている(Diaz et al. 2013)。しかしながら、アスリートが最大のパフォーマンスを発揮することを目的とする試合期に向けた高強度運動の継続が唾液中一酸化窒素の慢性応答に及ぼす影響については明らかではない。本検討では、実際に競技スポーツ現場で活躍する大学ハンドボール選手において、試合期に向けた継続的な高強度トレーニングが唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響について検討した。さらに、先行研究において、試合への出場の有無が心理的尺度および生理学的指標にも影響を及ぼす可能性が示唆されている(Cunniffe et al. 2015)。しかしながら、試合への出場の有無や学年といった要因が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響については明らかではない。そこで、本検討では試合への出場や学年が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響についても検討した。

5-2. 方法

5-2-1. 対象者

本検討では、N大学女子ハンドボール部に所属する女子選手19名を対象とした。N大学女子ハンドボール部は、関東大学女子ハンドボール連盟1部に所属する強豪校であり、対象者は2016年秋季リーグの登録メンバーである。研究を開始するにあたり、すべての対象者に対し、事前に研究の主旨、実験方法、起こりうる危険性および参加の任意性について十分に説明し、書面にて研究参加への同意を得た。なお、本研究は「ヘルシンキ宣言」の趣旨に従い、且つ「早稲田大学 人を対象とする研究に関する倫理委員会」の承認を得て実施した(2016-155)。

5-2-2. 検討方法および測定項目

本研究は、秋季リーグ戦開始6週間前(トレーニング期)および秋季リーグ戦中(試合期)の2ポイントで測定を実施した。唾液中一酸化窒素濃度の日内変動を考慮し、対象者は両日ともに午前の同時刻に測定を行った。対象者へは、前日22時から当日の飲食(水のみ許可)を控えるよう指示した。測定項目は、Inner Scan 50(タニタ社製)を用いた体組成、唾液中一酸化窒素濃度、唾液中コルチゾール濃度、唾液量、POMS 2短縮版とした。また、女性アスリートを対象とするため、月経状態に関するアンケート調査を行った。

また、試合への出場が唾液中一酸化窒素の応答に与える影響については、対象者を、試合出場有群および試合出場無群に群分けして解析を行った。さら

に、学年が唾液中一酸化窒素の応答に与える影響についての検討では、対象者を、上級生（1,2年生）および下級生（3,4年生）に群分けして解析した。

5-2-3. 運動量の調査

トレーニング期および試合期における調査は、ウェアラブルデバイス（RCX5, Polar 社製）を用いて実施した。無作為に選ばれた 10 名の選手から得られた、総移動距離、平均心拍数、カロリー消費の平均値を運動量として評価した。

5-2-4. 統計処理

Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性の確認を行った後、対象者全体の経時的な変化を検討するため、対応のある t 検定もしくは Wilcoxon の順位和検定を用いて検定を行った。各変数の関連性については、Pearson の積率相関係数もしくは Spearman の順位相関係数を用いて検討した。各群における経時的な変化の差異を検討するため、繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。種効果または交互作用が有意であった場合、その後の検定に Bonferroni 法を用いた。統計処理した各測定データ値は、平均値 ± 標準誤差で示し、統計学的有意水準は 5%、有意傾向を 10%とした。

5-3. 結果

対象者の身体特性を Table 5-1 に示す。Table 5-2 には、トレーニング期および試合期における運動量の各測定データの変化を示す。総移動距離および平均心拍数は、有意差が認められなかった一方で、カロリー消費は、試合期で有意に減少した。トレーニング期から試合期における唾液中成分および POMS の各測定データの変化を Table 5-3 に示す。唾液中コルチゾール濃度および POMS 2 における緊張-不安 (TA) が、トレーニング期と比較して試合期で増加する傾向が認められた。トレーニング期から試合期における唾液中一酸化窒素濃度の変化を Figure 5-1 に示す。トレーニング期と比較して、試合期で有意に増加した。トレーニング期から試合期にかけての唾液中一酸化窒素濃度と POMS 2 の総合的気分尺度 (TMD) の変化量に有意な正の相関関係が認められた ($r_s = 0.477, P < 0.05$) (Figure 5-2-A)。また、唾液中一酸化窒素濃度と POMS 2 の疲労-無気力 (FI) の変化量には有意な正の相関関係が認められた ($r_s = 0.639, P < 0.01$) (Figure 5-2-B)。月経状態に関するアンケート調査では、トレーニング期に月経期であった対象者は 7 名で、試合期に月経期であった対象者は 1 名であった。トレーニング期における月経期群 (7 名; $339 \pm 64 \mu\text{mol/L}$) と月経期以外群 (12 名; $325 \pm 54 \mu\text{mol/L}$) で、唾液中一酸化窒素の測定値に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。

群分けした際の対象者の振り分けを Table 5-4 に、対象者の身体特性を Table 5-5 に示す。

・試合出場の有無による群分け

対象者 19 名を直前の秋季リーグ戦の試合に出場群（7 名）と非出場群（12 名）の 2 群に分類した。両群の唾液中一酸化窒素濃度および唾液中コルチゾール濃度の変化を Figure 5-3 に示す。両群において、唾液中一酸化窒素濃度および唾液中コルチゾール濃度に有意な変化は認められなかった。また、これらのデータに関して両群間に交互作用は認められなかった。

・学年による群分け

対象者 19 名を、対象者の学年によって下級生（1,2 年生）群（9 名）と上級生（3,4 年生）群（10 名）の 2 群に分類した。両群の唾液中一酸化窒素濃度および唾液中コルチゾール濃度の変化を Figure 5-4 に示す。唾液中一酸化窒素濃度は、下級生群でのみ増加傾向が認められた。さらに、下級生群でのみ唾液中コルチゾール濃度が有意に増加した。しかし、これらのデータに関して両群間に交互作用は認められなかった。

Table 5-1. 対象者の身体特性

	n = 19
年齢 (歳)	20 ± 0
身長 (cm)	161 ± 1
体重 (kg)	56 ± 1
BMI (kg/m ²)	22 ± 0
体脂肪率 (%)	22 ± 1

平均値 ± 標準誤差

Table 5-2. トレーニング期および試合期における運動量の変化

n = 10	トレーニング期	試合期	<i>P</i>
総移動距離 (km)	8.86 ± 0.91	8.34 ± 1.07	.203
平均心拍数 (bpm)	128 ± 2	124 ± 2	.186
カロリー消費量 (kcal)	1120 ± 58	1016 ± 39*	.043

平均値 ± 標準誤差. VS. トレーニング期 * $P < 0.05$

Table 5-3. トレーニング期および試合期における各測定項目の変化

n = 19	トレーニング期	試合期	P
唾液量 (mL/min)	1.538 ± 0.097	1.558 ± 0.097	.803
唾液中コルチゾール濃度 (µg/dL)	0.143 ± 0.020	0.199 ± 0.039	.066
POMS 2 短縮版 (T 得点)			
怒り-敵意 (AH)	45 ± 2	48 ± 2	.107
混乱-当惑 (CB)	54 ± 2	53 ± 3	.718
抑うつ-落ち込み (DD)	50 ± 2	51 ± 2	.566
疲労-無気力 (FI)	52 ± 2	51 ± 2	.756
緊張-不安 (TA)	56 ± 3	52 ± 3	.079
活気-活力 (VA)	58 ± 2	56 ± 2	.472
総合的気分状態 (TMD)	50 ± 2	50 ± 2	1.000

平均値 ± 標準誤差. VS. トレーニング期

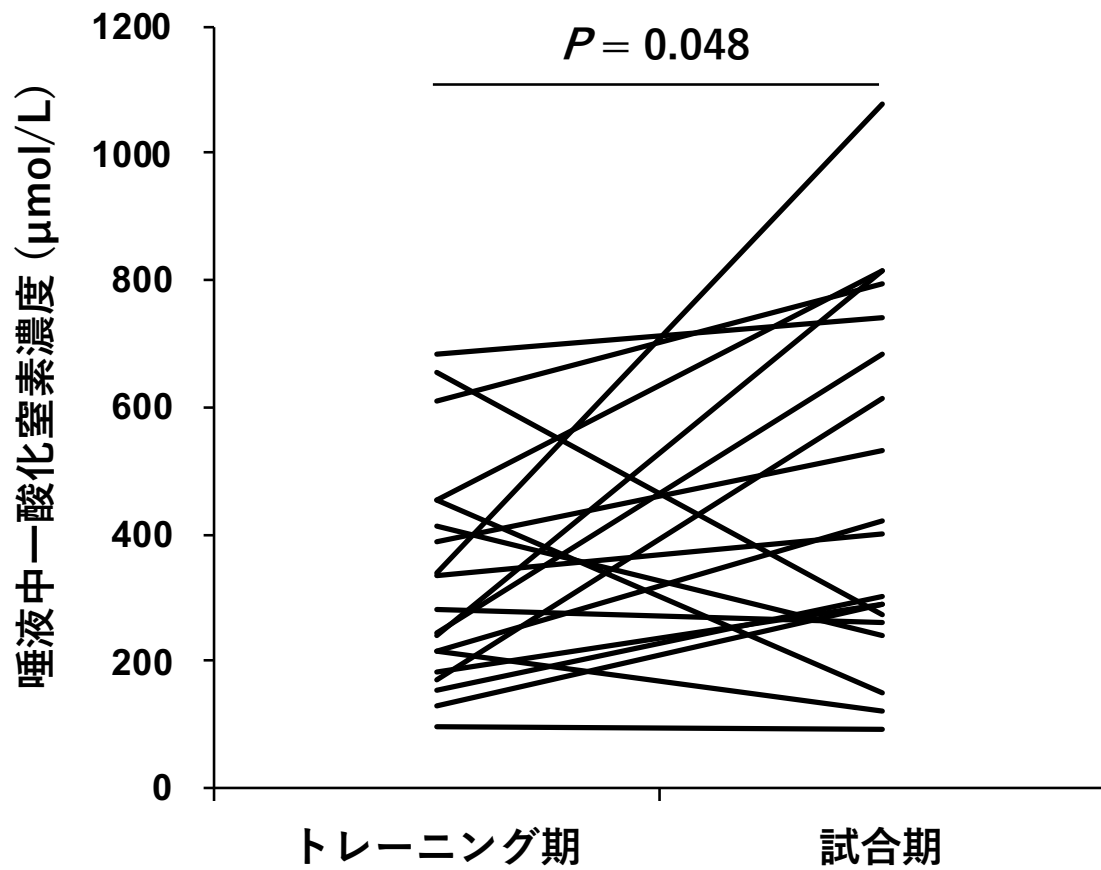


Figure 5-1. 唾液中一酸化窒素濃度のトレーニング期から試合期への変化

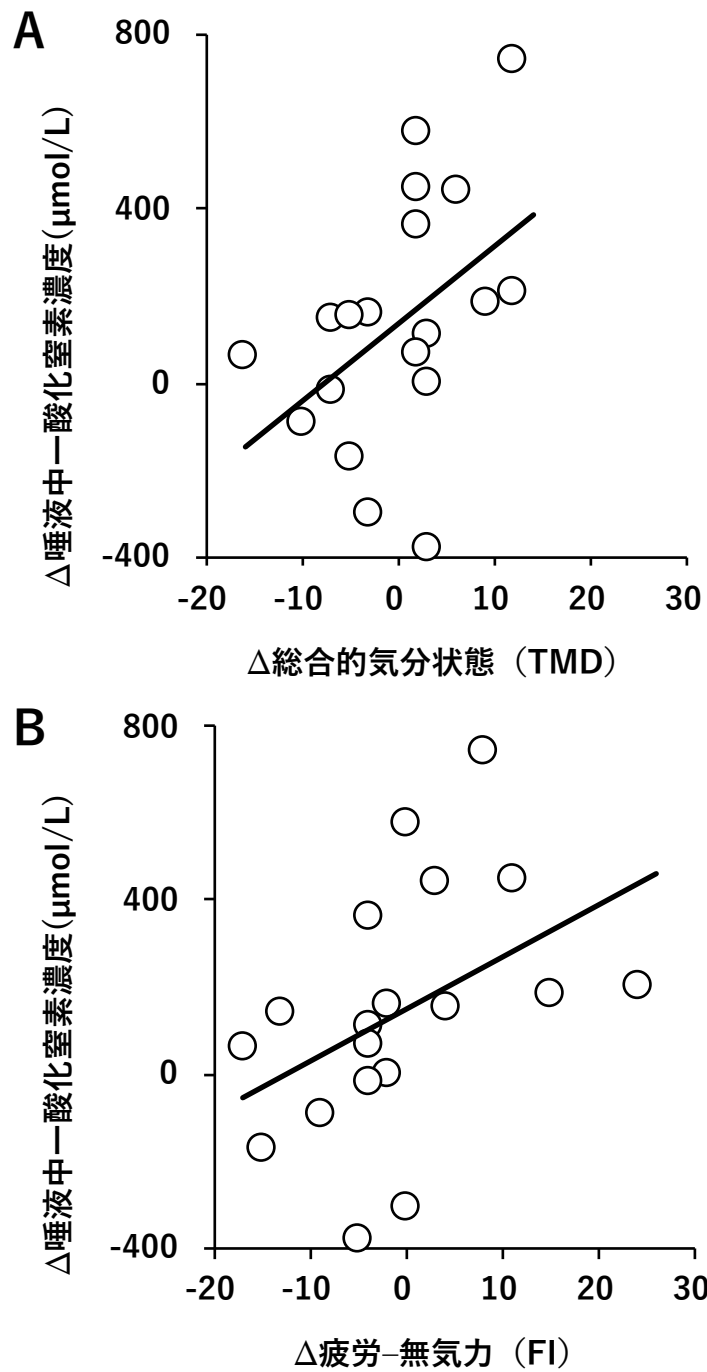


Figure 5-2. 唾液中一酸化窒素濃度変化量と (A) 総合的気分状態 (TMD) の変化量および (B) 疲労-無気力 (FI) の変化量との関連

Table 5-4. 群分けした際の対象者の振り分け

ID	試合出場による分類	学年による分類
	○ = 出場群 (7名)	◎ = 上級生群 (n = 10)
A1	○	◎
A2		◎
A3		◎
A4		◎
A5	○	◎
A6		◎
A7		◎
A8		◎
B1	○	◎
B2	○	◎
C1	○	
C2		
C3		
D1		
D2		
D3	○	
D4		
D5		
D6	○	

A : 4年生, B : 3年生, C : 2年生, D : 1年生

Table 5-5. 群分けした際の対象者の身体特性

	試合出場による分類		学年による分類	
	出場群 (n = 7)	非出場群 (n = 12)	上級生群 (n = 10)	下級生群 (n = 9)
年齢 (歳)	20 ± 0	20 ± 0	21 ± 0	19 ± 0
身長 (cm)	160 ± 1	161 ± 1	160 ± 1	161 ± 1
体重 (kg)	55 ± 1	57 ± 1	55 ± 1	58 ± 1
BMI (kg/m ²)	21 ± 1	22 ± 0	21 ± 0	22 ± 0
体脂肪率 (%)	22 ± 2	22 ± 1	21 ± 1	23 ± 1

平均値 ± 標準誤差

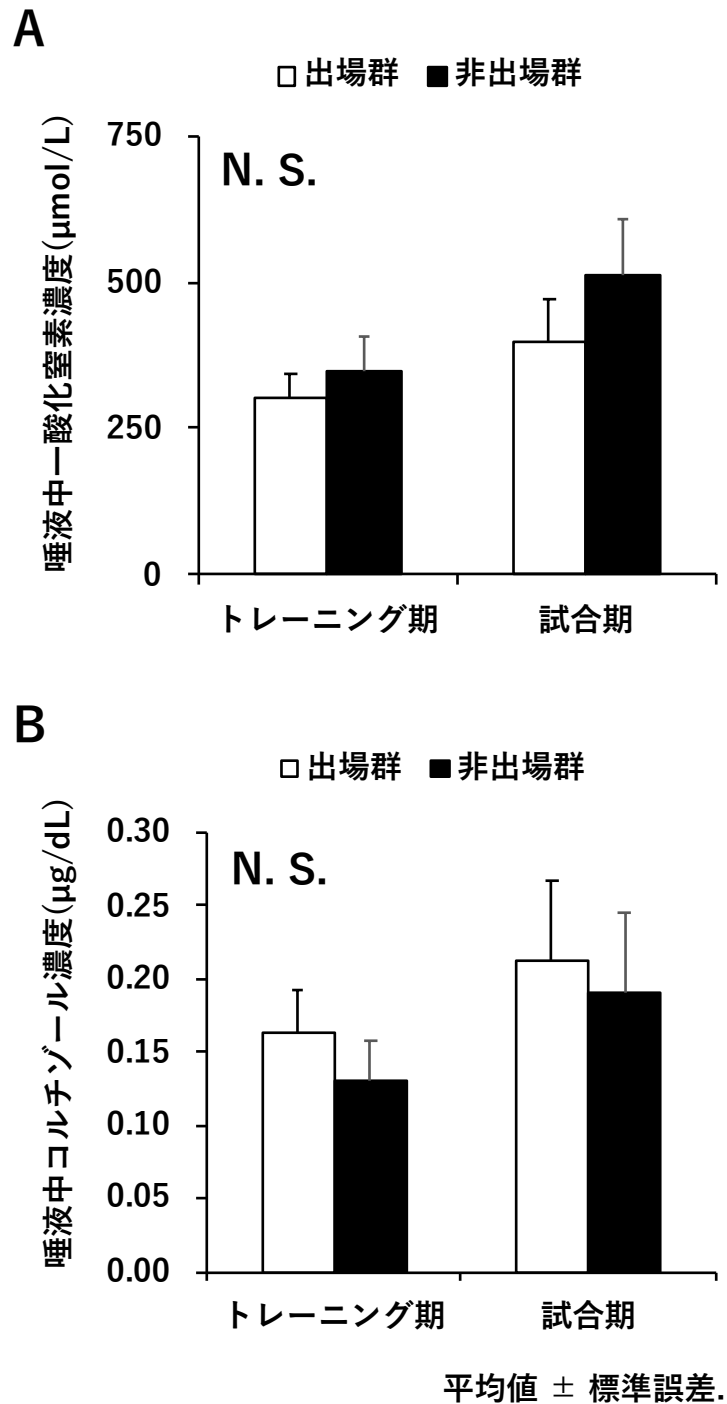
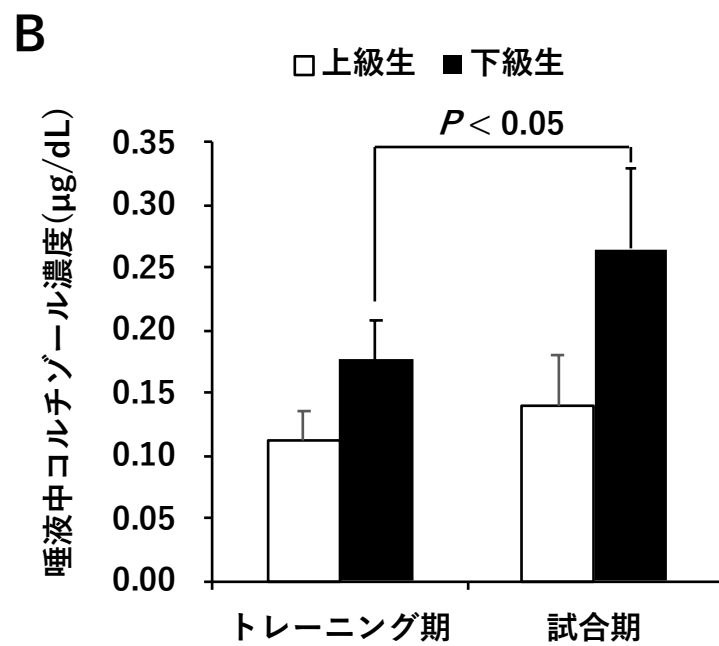
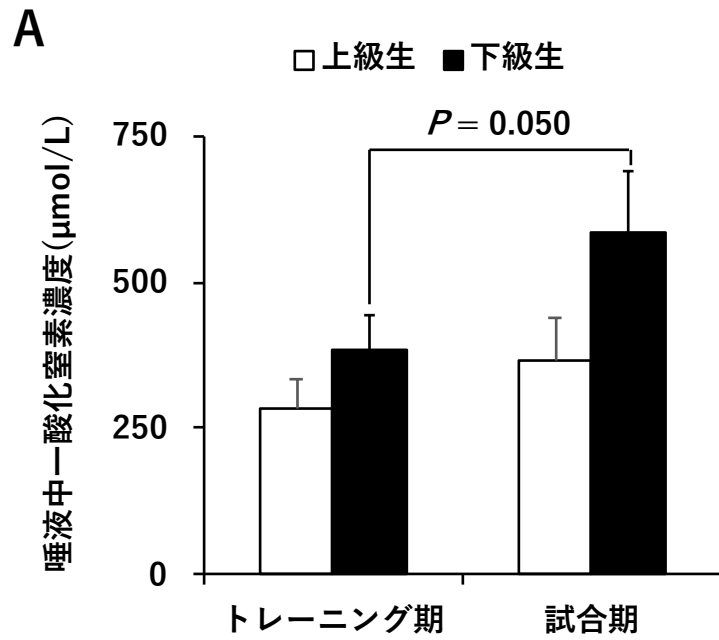


Figure 5-3. 各群の唾液中一酸化窒素濃度 (A) および唾液中コルチゾール濃度 (B) の変化 (試合出場による群分け)



平均値 \pm 標準誤差.

Figure 5-4. 各群の唾液中一酸化窒素濃度 (A) および唾液中コルチゾール濃度 (B) の変化 (学年による群分け)

5-4. 考察

本検討では、大学ハンドボール選手において、トレーニング期から試合期に向けた高強度トレーニングの継続が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響について縦断的な観察研究にて検討した。唾液中一酸化窒素濃度は、トレーニング期から試合期にかけて有意に増加を示した。さらに、唾液中一酸化窒素濃度の変化量は、心理的尺度である TMD および FI の変化量と有意な正の相関関係を示した。これらの結果から、競技スポーツ現場における試合期に向けた継続的な高強度トレーニングは、唾液中一酸化窒素の応答に影響を与える可能性が示唆された。加えて、試合に向けた心理的なストレスの変化に唾液中一酸化窒素の変化が関連する可能性が示唆された。

唾液中一酸化窒素と運動量に関する研究は、ほとんど報告がないが、Diaz らは、強度依存的に増加することが示唆されている (Diaz et al. 2013)。本検討においては、総移動距離および平均心拍数には有意な変化が認められなかった。また、カロリー消費量は試合期にかけて 100 kcal 程度の有意な低下であった。先行研究では、試合に向けたテーパリング期にはトレーニング量を 41~60%程度に低減させることがパフォーマンスに効果的であることが報告されている (Bosquet et al. 2007)。本検討のカロリー消費量は、トレーニング期から試合期にかけて 10%程度の低減であることから、本検討課題における対象者はトレーニング期から試合期に向けてのトレーニング量の減少が十分ではなく、継続的に高強度運動を実施していたと考えられる。唾液中一酸化窒素濃度は、トレーニング期から試合期にかけての継続的な高強度トレーニングによっ

て増加を示した。一方で、唾液中コルチゾール濃度および TA がトレーニング期から試合期にかけて増加傾向を示した。先行研究では、ゴルフ選手において、練習時と試合時には唾液中コルチゾール濃度の応答が異なることが報告されている (Kim et al. 2010)。また、He らはトレーニング期から試合期にかけて運動量が減少するにも関わらず、唾液中コルチゾール濃度は高値を維持することを示唆している (He et al. 2010)。これらの先行研究から、試合に対して運動誘発性のストレスとは異なる心理的ストレスが競技スポーツ現場のアスリートには負担がかかっていることが考えられる。本検討において、TA (不安-緊張) が試合期に向けて増加傾向を認められたことから、競技スポーツ現場のアスリートは主観的な心理的ストレスも感じている可能性が考えられる。

本検討において、唾液中一酸化窒素濃度の変化量と POMS 2 で評価した心理的尺度である TMD および FI の変化量との間に、有意な正の相関関係が認められた。この結果は、心理尺度がより悪くなった対象者ほど唾液中一酸化窒素濃度の増加が大きいことを示している。先行研究において、唾液中一酸化窒素濃度は心理的なストレスによっても増加を示すことも報告されている (Jin et al. 2013)。また、ハンドボール選手を対象とした研究では、よりレベルの高い大会に向けて不安が増加し、唾液中一酸化窒素濃度および iNOS が増加することを示している (Ulkar et al. 2012)。本検討のトレーニング期から試合期に向けての唾液中一酸化窒素濃度の増加には、心理尺度の変化が関連している可能性があると考えられる。

さらに、本検討では大学女子ハンドボール選手におけるトレーニング期から試合期への唾液中一酸化窒素濃度の増加および唾液中コルチゾール濃度の変動

に、試合への出場の有無と学年が与える影響についても検討した。対象者を試合への出場の有無および上級生（3,4年生）と下級生（1,2年生）で2群に分類し追加解析した結果、試合への出場の有無による分類では、唾液中一酸化窒素濃度および唾液中コルチゾール濃度の変化に交互作用は認められず、群内の経時的な変化も認められなかった。一方で、学年による分類では、交互作用は認められなかったものの、下級生群でのみ唾液中一酸化窒素濃度の増加傾向および唾液中コルチゾールの有意な増加を示した。このことから、唾液中一酸化窒素濃度の変動に、学年が影響している可能性が示唆された。先行研究においては、試合への出場の有無については、心理的尺度および生理学的指標にも影響を及ぼす可能性が報告されている (Cunniffe et al. 2015)。学年によって唾液中一酸化窒素濃度および唾液中コルチゾール濃度等の生理学的指標の応答が異なることは、本検討によって明らかとなった点である。身体的なストレスだけでなく精神的なストレスによっても免疫能に影響を与え、様々な体調不良症状を呈することが報告されている (Cannon 1993; Mackinnon and Hooper 1994; Cohen and Herbert 1996)。これらのことから、学年の違いは生理学的指標にも影響を及ぼす可能性を示しており、学年を考慮した心理的サポートを含めたコンディショニング管理の重要性が示唆された。

検討課題2では、競技スポーツ現場で活躍する大学ハンドボール選手を対象とした観察研究によって、トレーニング期から試合期に向けての継続的な高強度トレーニングが、唾液中一酸化窒素濃度を増加させることを示した。さらに、唾液中一酸化窒素濃度の増加と、心理尺度の悪化には、有意な正の相関関係が認められたことから、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定

は、試合期に向けた心理尺度の変化も反映している可能性を有することが示唆された。

第6章 検討課題3

「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連」

6-1. 緒言

先行研究において、唾液中一酸化窒素濃度はリウマチ(Dervisevic et al. 2012)、歯周病(Reher et al. 2007)やシェーグレン症候群(Kontinen et al. 1997)といった有疾患患者において高値を示すことが報告されている。しかしながら、競技スポーツ現場におけるアスリートの内科的疾患の状況と唾液中一酸化窒素の関係は明らかにされていない。また、唾液中一酸化窒素はRNOSとして酸化ストレスに影響を与える可能性が報告されているが(Takahama et al. 2003; Takahama, Hirota, and Oniki 2006)、それらの報告において本博士論文で使用している競技スポーツ現場で簡易的に活用できる酸化ストレス度(d-ROM)および抗酸化力の指標と唾液中一酸化窒素の関係は明らかにされていない。本検討では、競技現場における大学競技アスリートを対象に、唾液中一酸化窒素と疾患および酸化ストレス度との関係について検討した。

6-2. 方法

6-2-1. 対象者

本検討では、T大学体育会に所属する大学競技アスリート 250 名を対象とした。本検討における対象者の選定基準は、「各競技における全国大会経験者および日本代表経験者」のトップアスリートとした。対象者の所属する部活動内訳を Table 6-1 に示す。研究を開始するにあたり、各部活の責任者に事前に研究の主旨、実験方法、起こりうる危険性および参加の任意性について十分に説明した。責任者の許可が得られた体育会部活動のすべての対象者に対して、責任者への説明と同様の説明をした上で、書面にて研究参加の同意を得た。なお、本研究は「ヘルシンキ宣言」の趣旨に従い、且つ「筑波大学体育系研究倫理審査委員会」の承認を得て実施した（体 28-25 号）。

6-2-2. 検討方法および測定項目

本研究は、体成分分析装置（InBody 770, InBody 社製）を用いて体組成を測定し、室温を 24–26 °C の一定温度に保った静かな実験室での 10 分間の安静を保った後、自記式質問紙法によるアンケート調査を実施し、唾液の採取および血液の採取を行った。その後、採取した唾液より唾液量および唾液中一酸化窒素濃度、採取した血液より d-ROM, BAP を測定した。アンケートの項目は、1.プロフィールについて（年齢、性別、睡眠時間、食事時間、カフェイン・サプリメント等の摂取状況、身体活動時間、競技歴）、2.内科的疾患の既

往歴について（過去に医師から診断を受けた内科的疾患，現在の症状の有無，服薬状況），3.VAS を用いた主観的な疲労度およびパフォーマンスとした。

6-2-3. 統計処理

Shapiro-Wilk 検定を用いて正規性の確認を行った後，疾患別の唾液中一酸化窒素の比較を対応のない一元配置分散分析を用いて検討した。また，男女の比較および喘息の有無に関して，Mann-Whitney の *U* 検定を用いて検討した。さらに，カットオフ値を検討するために ROC (Receiver-operating characteristics) 解析を行った。カットオフ値は曲線下の面積で判断した。各変数の関連性については，Pearson の積率相関係数もしくは Spearman の順位相関係数を用いて検討した。統計処理した各測定データ値は，平均値 ± 標準偏差もしくは平均値 ± 標準誤差で示し，統計学的有意水準は 5%とした。

6-3. 結果

対象者の身体特性および各変数において男女を比較した結果を Table 6-2 に示す。対象者 250 名のうち、男性が 151 名、女性が 99 名であった。Figure 6-1 に、唾液中一酸化窒素における濃度別の分布を示す。各競技における唾液中一酸化窒素濃度の結果を Figure 6-2 に示す。内科的疾患の既往歴のアンケート結果を Table 6-3 に示す。Figure 6-3 に、疾患別の唾液中一酸化窒素濃度の結果を示す。一元配置分散分析の結果、3 群間に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$) が、アレルギー疾患者が最も高い平均値を示した。Figure 6-4 に、喘息あり群と喘息なし群の唾液中一酸化窒素濃度平均値の比較結果を示す。喘息あり群は喘息なし群と比較して、唾液中一酸化窒素濃度は有意に高値であった (Figure 6-4)。しかし、d-ROM は喘息なし群 (278 ± 3 U.CARR) と喘息あり群 (285 ± 6 U.CARR) の間に有意な差は認められなかった ($P > 0.05$)。さらに、ROC 解析によるカットオフ値の判定結果を Figure 6-5 に示す。喘息の有無に対する唾液中一酸化窒素濃度のカットオフ値 ($P = 0.019$) は $425 \mu\text{mol/L}$ (感度 ; 88.9%, 特異度 ; 61.8%, 曲線下面積 [AUC] ; 0.73) であった。

Figure 6-6 に、唾液中一酸化窒素濃度と酸化ストレスに関連する指標の関係を示す。本研究は、酸化ストレスに関連する指標として d-ROM (酸化ストレス度) および BAP (抗酸化力) を評価した。これらの指標と唾液中一酸化窒素濃度の関連について検討したところ、唾液中一酸化窒素濃度と d-ROM ($r_s = -0.054$, $P = 0.393$) (Figure 6-6-A), 唾液中一酸化窒素濃度と BAP ($r_s =$

0.073, $P = 0.251$) (Figure 6-6-B)の間には有意な相関関係は認められなかった。

Table 6-1. 対象者の所属競技の内訳

競技種目	計	男	女
サッカー	32	25	7
ハンドボール	25	13	12
バスケットボール	10	-	10
バレーボール	22	13	9
陸上競技（跳躍，短距離，中距離，長距離，混成）	73	47	26
剣道	18	8	10
柔道	17	12	5
水泳（競泳，水球）	33	23	10
テニス	10	3	7
バドミントン	10	7	3

Table 6-2. 対象者の身体特性および各変数の男女比較

	合計 (n = 250)	男子 (n = 151)	女子 (n = 99)	P
年齢 (歳)	20 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	.530
競技歴 (年)	11 ± 3	11 ± 3	11 ± 3	.292
身長 (cm)	171 ± 9	175 ± 6	164 ± 7**	.000
体重 (kg)	66 ± 11	71 ± 10	59 ± 7**	.000
BMI (kg/m ²)	22 ± 3	22 ± 3	22 ± 2*	.014
脂肪量 (kg)	13 ± 14	14 ± 18	13 ± 5**	.000
骨格筋量 (kg)	31 ± 6	34 ± 4	26 ± 3**	.000
除脂肪体重 (kg)	54 ± 10	60 ± 8	46 ± 6**	.000
体脂肪率 (%)	16 ± 6	12 ± 4	21 ± 4**	.000
唾液中一酸化窒素濃度 (μmol/L)	380 ± 198	383 ± 210	376 ± 179	.821
唾液量 (mL/min)	0.662 ± 0.273	0.647 ± 0.277	0.685 ± 0.265	.103
d-ROM (U.CARR)	278 ± 43	271 ± 42	289 ± 42**	.001
BAP test (μmol/L)	2136 ± 189	2154 ± 143	2108 ± 241*	.027
d-ROM / BAP 比	7.86 ± 1.34	8.13 ± 1.27	7.44 ± 1.34**	.000
主観的疲労度 (mm)	40 ± 21	37 ± 22	45 ± 18**	.003
主観的パフォーマンス (mm)	53 ± 19	56 ± 19	48 ± 18**	.001

平均値 ± 標準偏差. VS. 男子 ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

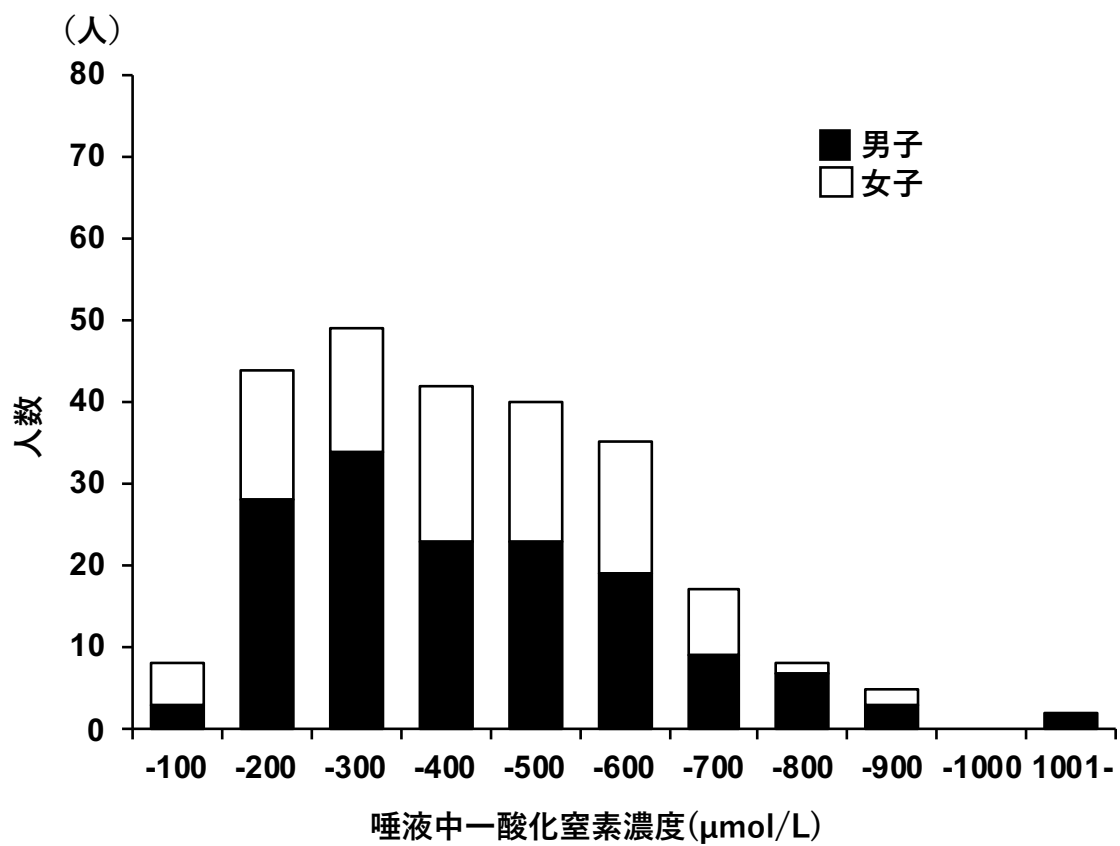


Figure 6-1. 唾液中一酸化窒素濃度の分布

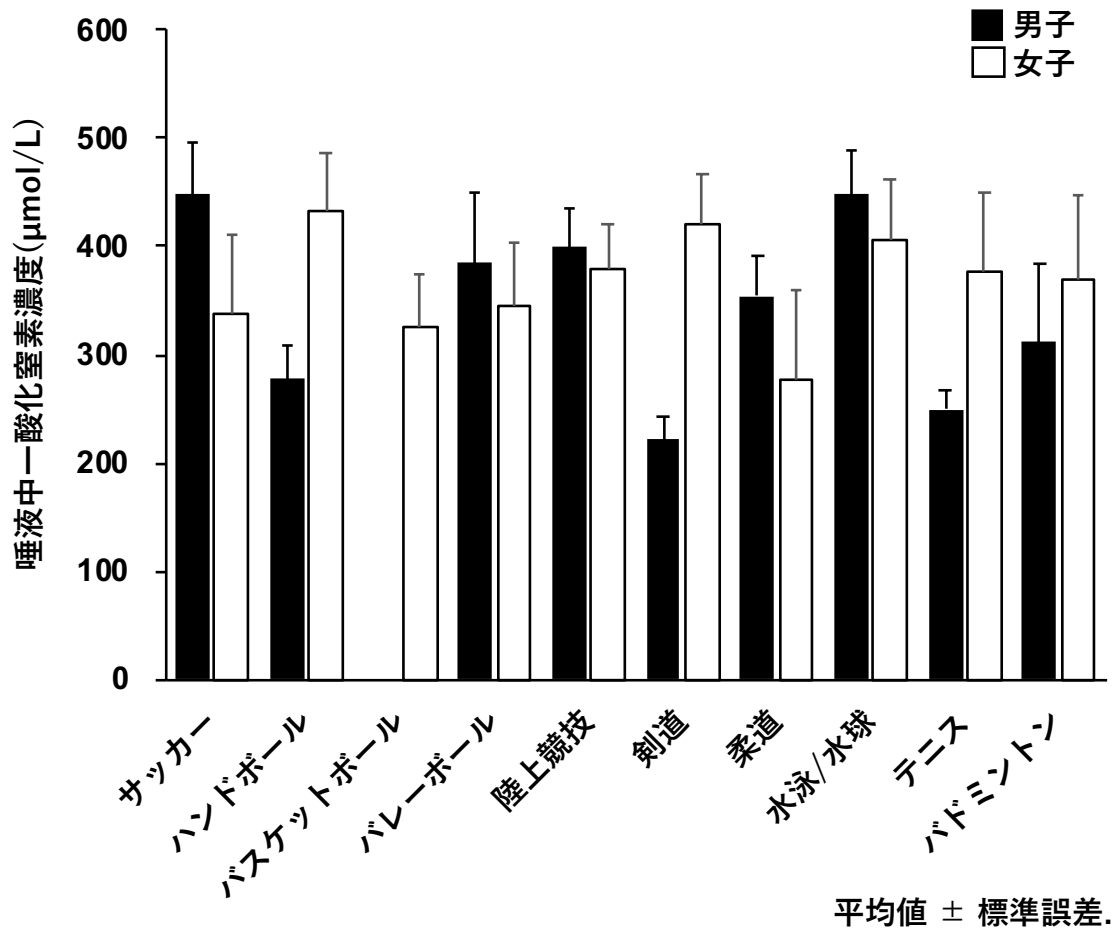


Figure 6-2. 競技別の唾液中一酸化窒素濃度

Table 6-3. 内科的疾患のアンケート調査結果

有疾患者	26 (人)	現在の症状		治療中 (人)
		あり (人)	なし (人)	
喘息	9	1	8	1
食物および薬物アレルギー	3	1	2	0
アレルギー性鼻炎	3	3	0	2
アレルギー性皮膚炎	3	3	0	1
非アレルギー疾患	8	2	6	2

非アレルギー疾患：貧血，不整脈，肺炎，胃腸炎など

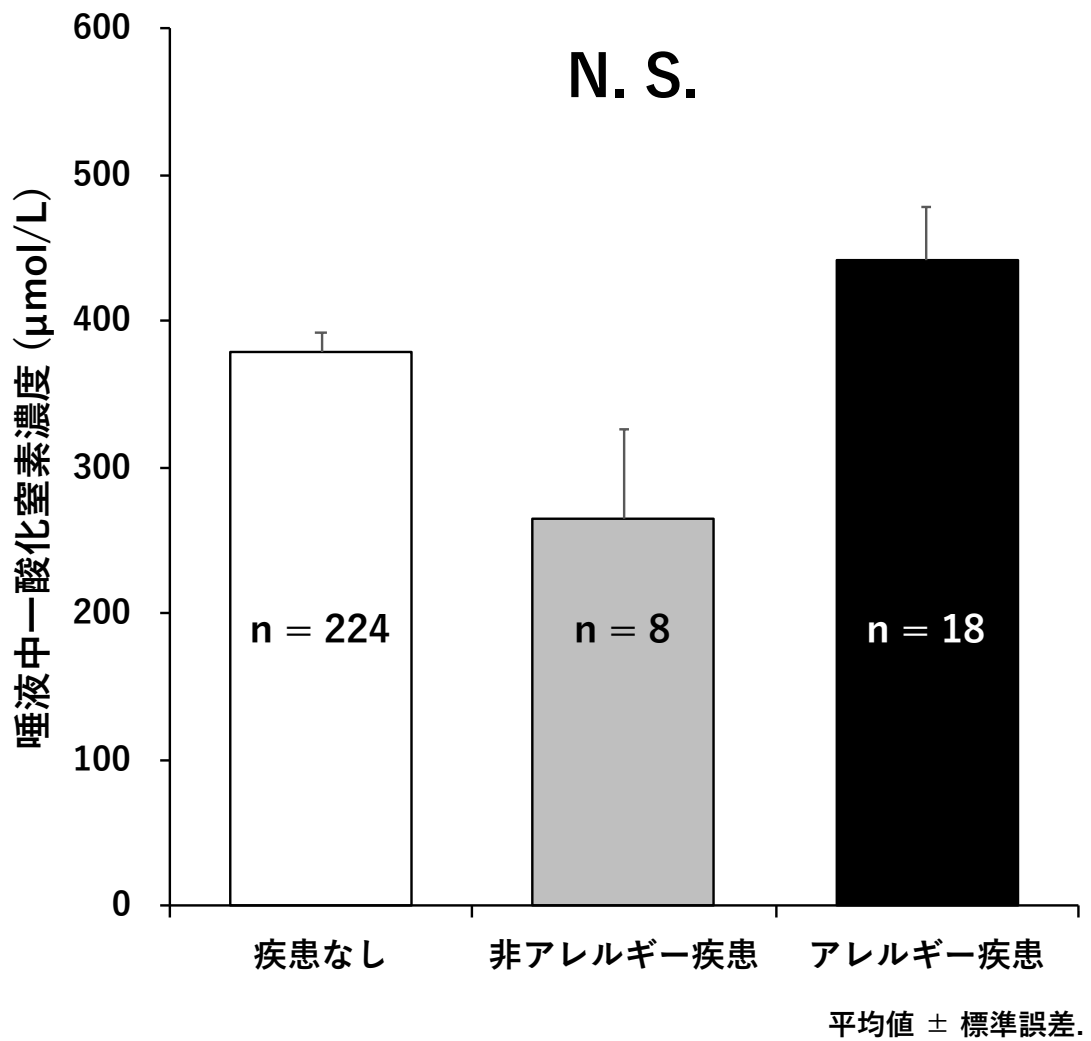


Figure 6-3. 疾患別の唾液中一酸化窒素濃度の比較

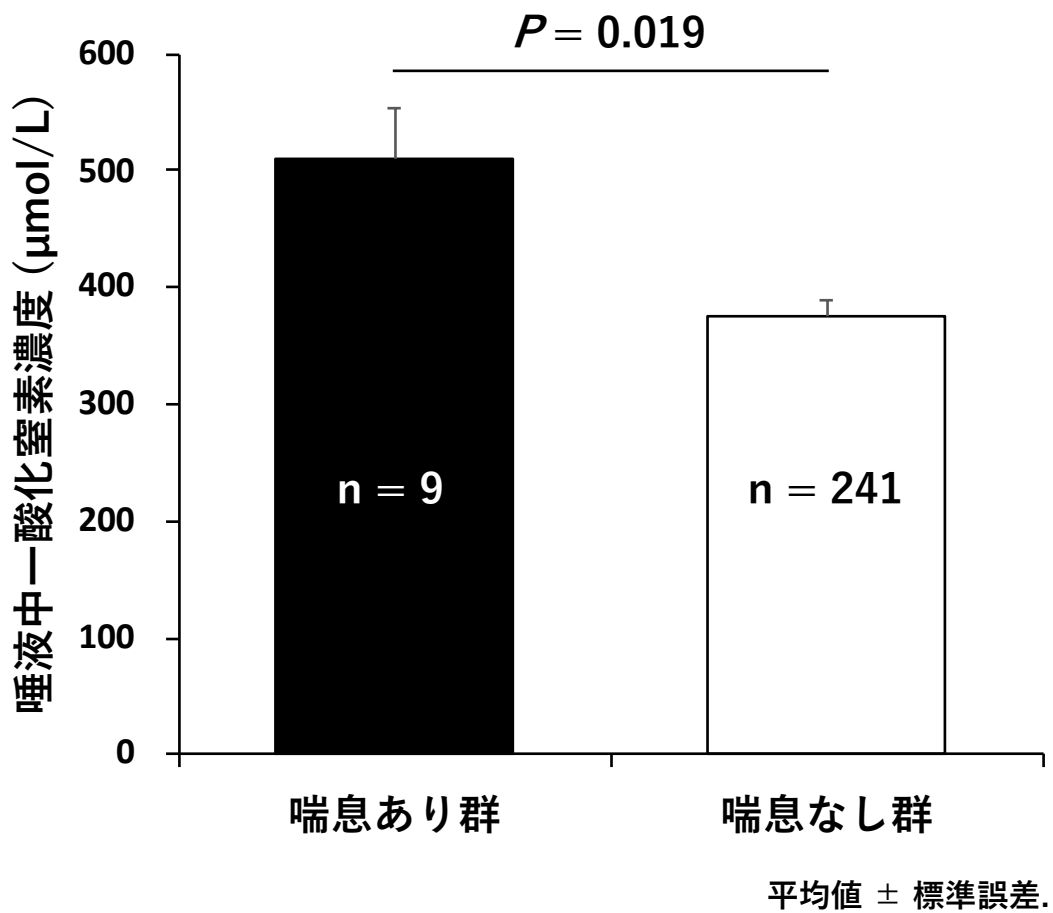


Figure 6-4. 喘息あり群および喘息なし群における唾液中一酸化窒素濃度の比較

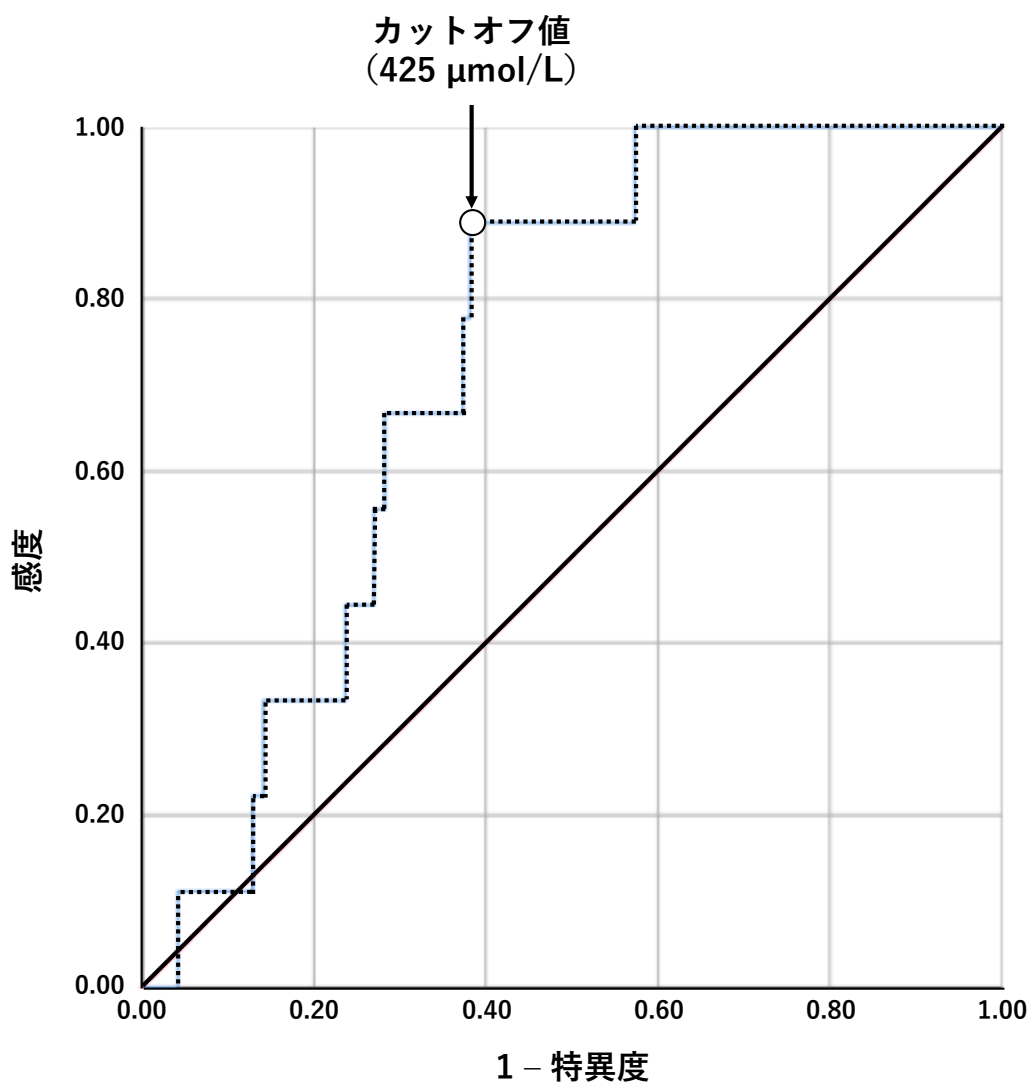


Figure 6-5. 喘息の既往に対する唾液中一酸化窒素濃度の ROC 解析

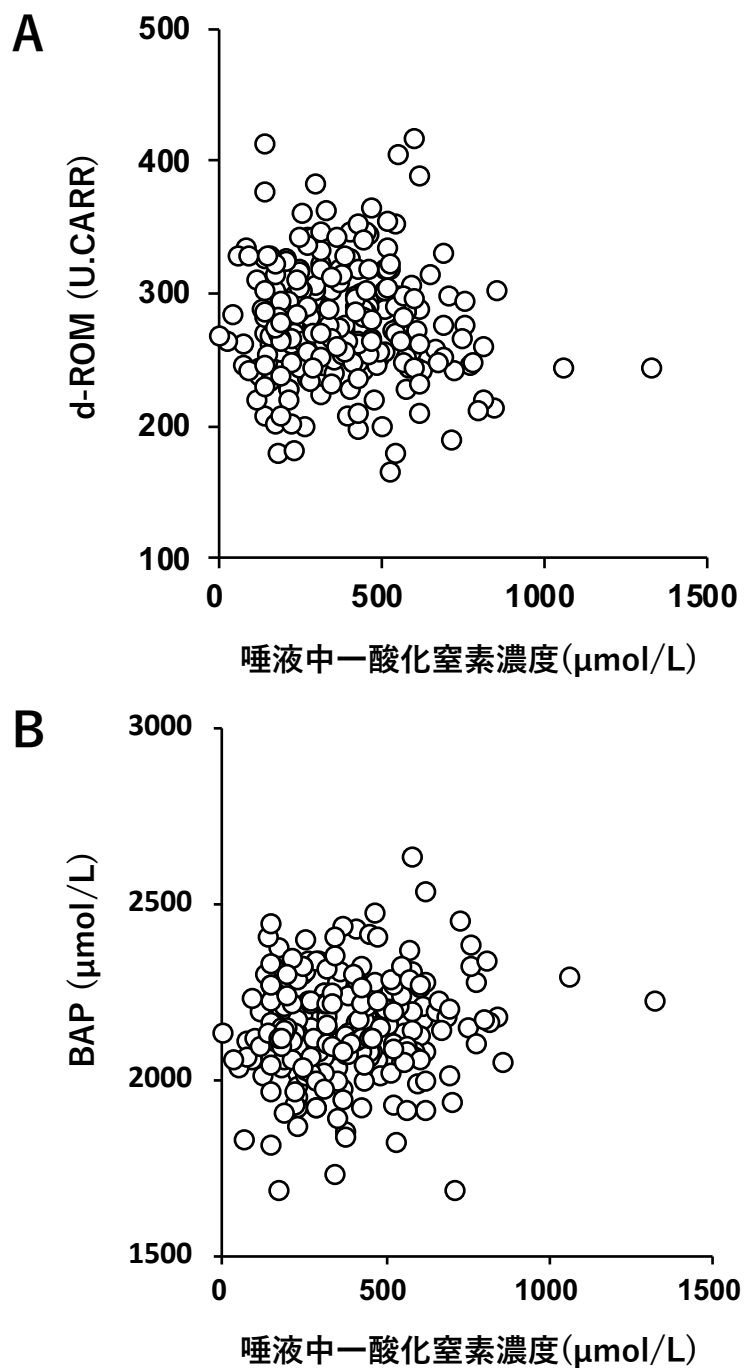


Figure 6-6. 唾液中一酸化窒素濃度と (A) d-ROM および (B) BAP との関連

6-4. 考察

本検討では、「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関係」を横断的に検討した。その結果、喘息の既往がある者は、既往がない者と比較して唾液中一酸化窒素濃度が有意に高値であった。さらに、喘息の既往の有無に対してROC解析を用いてカットオフ値(425 μ mol/L)を算出した。これらの結果から、競技スポーツ現場のアスリートにおいて、唾液中一酸化窒素は喘息(気道炎症状態)を潜在的に評価し得るコンディションマーカーである可能性が示唆された。一方で、大学競技アスリートの唾液中一酸化窒素濃度は、酸化ストレス指標であるd-ROMおよび抗酸化力指標であるBAPとの間に、横断的検討において有意な関係性は認められなかった。

これまでの先行研究で、リウマチ(Dervisevic et al. 2012)、歯周病(Reher et al. 2007)やシェーグレン症候群(Kontinen et al. 1997)といった炎症性疾患の患者において唾液中一酸化窒素濃度が高値であることが報告されている。本検討において、喘息の既往がある者は唾液中一酸化窒素濃度が高値を示した。これまでに、気道炎症の指標としては呼気中一酸化窒素が用いられてきた(Dweik et al. 2011)。呼気中一酸化窒素は、唾液中一酸化窒素同様にiNOS由来であることが報告されている(Ricciardolo et al. 2004)。iNOSは、炎症を有する唾液腺において発現が増加する(Correia et al. 2010)。これらのことから、唾液中一酸化窒素は喘息の既往によって誘発された気道炎症状態を反映している可能性があると考えられる。

一方で、唾液中一酸化窒素は、酸化ストレスと関連する可能性が先行研究によって報告されている (Takahama et al. 2003; Takahama, Hirota, and Oniki 2006). 別の先行研究では、本検討で酸化ストレス指標として用いた d-ROM と口腔炎症の関連を検討している (Tamaki et al. 2008; Tamaki et al. 2009; Tamaki, Tomofuji, et al. 2011). Tamaki らは、歯周病患者は健常者と比較して d-ROM が高値であることから、口腔炎症と d-ROM が関連する可能性を報告している (Tamaki, Takaki, et al. 2011). しかしながら、本検討においては唾液中一酸化窒素濃度と酸化ストレス指標の d-ROM および抗酸化力指標の BAP との間に有意な関係性は認められなかった. 本検討におけるアスリートの酸化ストレスと抗酸化力のバランスの指標である d-ROM / BAP 比の平均値は、基準値である 7.33 よりも高い値であったことから、生体内の酸化ストレス状態が良好である対象者が多かったと考えられる. 従って、酸化ストレス状態が良好な状態である対象者がほとんどであったために、酸化ストレスおよび抗酸化力の個人差が少なくなり、唾液中一酸化窒素との関係が見えにくくなってしまった可能性がある. 今後さらなる検討において、異なる年代のアスリートや同年代の非アスリートなど酸化ストレス状態が大きく異なることが予想される対象者との比較が必要である.

さらに本検討では、呼気中一酸化窒素は喘息患者の気道炎症状態に対する基準値がある (Dweik et al. 2011) ことから、唾液中一酸化窒素における喘息の有無に対する ROC 解析を行った. ROC 解析の結果、喘息の既往の有無に対するカットオフ値が $425\mu\text{mol/L}$ であることを明らかにした. すなわち、本検討の研究結果から、唾液中一酸化窒素濃度の測定によって $425\mu\text{mol/L}$ を基準値と

して、アスリートにおける喘息の有無を推定することが出来る可能性が示唆された。

検討課題3では、競技スポーツ現場で活躍するアスリートを対象とした唾液中一酸化窒素と疾患との関連についての横断的検討によって、喘息がアスリートの最も多い内科的疾患として抽出され、喘息を有する者は唾液中一酸化窒素濃度が高値を示した。さらに、喘息の有無に対する唾液中一酸化窒素濃度のカットオフ値を算出した。本検討から、唾液中一酸化窒素は気道の炎症状態を評価するためのコンディションマーカーとして有用である可能性が示唆された。

第7章 総合討論

7-1. 本研究の目的

本博士論文では、競技スポーツ現場で活躍するアスリートにおける内科的コンディショニング戦略のための知見を提供することを念頭におき、「非特異的免疫を発揮し、種々の疾患との関連が報告されている唾液中一酸化窒素に着目して、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素測定の意義を明らかにすること」を目的とした。

7-2. 本研究で得られた成果

【検討課題 1】

「一過性高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

検討課題 1 では、競技スポーツ現場を想定した高強度持久性運動が唾液中一酸化窒素の応答に与える一過性の影響について検討した。その結果、唾液中一酸化窒素濃度は、安静座位を継続しているにも関わらず午前中に経時的な低下を示した。一方、一過性高強度持久性運動により、安静姿勢で認められた唾液中一酸化窒素濃度の有意な低下は確認されなかった。さらに、一過性高強度持久性運動後に、口腔内局所免疫能を示す唾液中 SIgA タンパク補正值が低下したことから、本検討における持久性運動は競技スポーツ現場で実施されているレベルの高強度運動であることが確認された。これらの結果から、競技スポーツ現場で実施される一過性高強度持久性運動は、口腔内局所免疫能を低下させ、唾液中一酸化窒素濃度の応答に対して安静時とは異なる影響を示す可能性が示唆された。

【検討課題 2】

「試合期に向けた継続的な高強度トレーニングが唾液中一酸化窒素の応答に及ぼす影響」

検討課題 2 では、実際の競技スポーツ現場で実施されている高強度運動の継続が唾液中一酸化窒素の応答に与える慢性的な影響について、競技現場のアスリートを対象に、観察研究にて縦断的に検討した。その結果、唾液中一酸化窒素濃度は、トレーニング期から試合期にかけて有意な増加が示された。また、

トレーニング期から試合期に向けて高強度運動が継続されていたことが確認された。さらに、唾液中一酸化窒素濃度の増加には、試合に向けた精神的なストレスが関与している可能性が示唆された。

【検討課題 3】

「アスリートにおける唾液中一酸化窒素と疾患との関連」

検討課題 1 および検討課題 2 で、競技スポーツ現場で実施されるような一過性および継続的な高強度トレーニングは唾液中一酸化窒素の応答に影響を与えることが示された。しかしながら、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定がアスリートのどのような疾患を反映するのか、酸化ストレス度との関連については不明である。そこで検討課題 3 では、競技スポーツ現場で活躍するアスリートを対象として、唾液中一酸化窒素とアスリートが有する内科的疾患および酸化ストレスとの関連について、横断的に検討した。その結果、喘息の既往者は、喘息の有していない者と比較して、唾液中一酸化窒素濃度が有意に高値を示した。さらに、喘息に対する唾液中一酸化窒素濃度のカットオフ値は $425 \mu\text{mol/L}$ であることが示された。しかしながら、本検討課題において唾液中一酸化窒素濃度と d-ROM および BAP との間に、有意な関連は認められなかった。

7-3. 本研究で得られた成果の意義

これまでの先行研究において、運動に対する唾液中一酸化窒素の応答に関しては一致した見解が得られていない(Panosian et al. 1999; Rahman et al. 2010; Gonzalez et al. 2008). 検討課題 1 において、競技スポーツ現場で実施されるような一過性高強度持久性運動は、唾液中一酸化窒素の急性応答に影響を与えることが確認された。また、検討課題 2 では、実際の競技スポーツ現場のアスリートを対象として、高強度運動の継続が、唾液中一酸化窒素濃度を増加させることが示された。これらの結果から、唾液中一酸化窒素の測定は競技スポーツ現場で行なわれている高強度運動による運動誘発性ストレスを反映するコンディションマーカーとして有用であることが考えられる。さらに、唾液中一酸化窒素濃度の変化には、試合に向けた心理状態の変化が関与している可能性を示した。このことは試合期に向けての高強度運動の継続が、心理面にも影響を及ぼす可能性を示唆しており、試合に向けた心理的なサポートの重要性を示すデータである。

検討課題 1 では、運動前の唾液中一酸化窒素濃度と唾液中 SIgA 分泌速度との間に有意な負の相関関係が認められた。また、検討課題 3 では喘息の既往を有するアスリートは喘息を有さないアスリートと比較して唾液中一酸化窒素濃度が高値を示した。唾液中 SIgA 分泌速度の低下は、上気道感染症の発症と関連することが報告されている(Neville, Gleeson, and Folland 2008; Yamauchi et al. 2011). また、喘息患者は慢性的な下気道炎症を起こしている。これらのこ

とから、唾液中一酸化窒素は上気道および下気道の炎症状態を包括的に反映している可能性が示唆された。

さらに、検討課題 3 ではアスリートにおける喘息に対する唾液中一酸化窒素濃度のカットオフ値が 425 $\mu\text{mol/L}$ であると算出された。検討課題 2 では、検討課題 3 の対象者同様にアスリートを対象として縦断的に検討した。トレーニング期における唾液中一酸化窒素濃度の平均値は 330 $\mu\text{mol/L}$ であったのに対して、試合期における唾液中一酸化窒素濃度の平均値はカットオフ値を上回る 469 $\mu\text{mol/L}$ を示した。これらのことから、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定は、アスリートにおける喘息患者の識別のための指標としてだけでなく、トレーニングによる気道炎症への影響も反映し得るコンディションマーカーとして有用であることが示唆された。

これまでに、活性酸素と一酸化窒素の関係について多くの議論がされていることから、検討課題 1 および検討課題 3 において唾液中一酸化窒素濃度と酸化ストレスとの関係を検討した。しかしながら、両検討課題 (1 および 3) において唾液中一酸化窒素濃度と酸化ストレスマーカー (d-ROM) の間には有意な関連が認められなかった。唾液中一酸化窒素の産出に関わる好中球は、各種の刺激に応答し ROS 分子を生じさせる。この応答反応は炎症局所に浸潤する好中球ではあるが、末梢血中の好中球ではかなり低いとされている。このことから、唾液中一酸化窒素は喘息患者の気道という局所における炎症状態を反映した一方で、末梢血液からの採血によって評価される d-ROM においては喘息の有無による有意な差が認められず、唾液中一酸化窒素と d-ROM との関連が認められなかったと考えられる。また、唾液中一酸化窒素は ROS と相互に影響

響を与え、酸化ストレスとして生体に対して細胞傷害性を示す。さらに、一酸化窒素などのフリーラジカルは異物に対して攻撃する役割と生体防御能力を向上させる役割という生体にとって善・悪二面性の役割を有している。そのため、唾液中一酸化窒素の増加は、気道という局所における炎症反応を示している可能性がある一方で、生体防御反応として産生されている可能性もある。すなわち、炎症反応としての唾液中一酸化窒素の増加に対して、生体が適応することで、酸化ストレス状態の恒常性を保っている可能性も考えられる。

これらの成果は、競技スポーツ現場において唾液中一酸化窒素の測定を酸化ストレスとの関連を含めて横断的かつ縦断的に検討した貴重なデータであり、唾液中一酸化窒素の測定はアスリートのコンディショニング戦略において、気道炎症を反映するコンディションマーカーとして有用である点が期待される。

7-4. 本研究の限界点

検討課題 1 では、唾液中一酸化窒素濃度が安静座位姿勢にもかかわらず、午前中に低下することを示した。本検討結果から、日内変動の観察も今後検討していく必要があるが、今回の検討では日内変動を検討することを目的とはしていなかったため、午前中しか測定を実施していない点は研究の限界点である。

検討課題 2 では、本検討の運動量の調査にあたっては欠損値が多く、すべての対象者の運動量のデータを調査することができなかったことも限界点である。ポジションによっても、運動量が異なってくることが予想される。今回の検討では、解析対象データが少なかつたために、ポジションによる運動量の差異が唾液中一酸化窒素に及ぼす影響については検討できていない。

検討課題 3 において、大学トップアスリートを対象としていることから、被験者の負担を最小限に留めることを優先させ指先採血を採用し、少量の血液で測定が可能な酸化ストレスマーカーのみ（d-ROM および BAP）の測定となった点が研究の限界であった。その他の酸化ストレスマーカーと唾液中一酸化窒素との関連については今後の検討課題であるが、肘正中皮静脈からの採血が必要となる血液中の酸化ストレスマーカーとの関連の検討はアスリートを対象とした検討では現実的な方法ではない。尿中に排出される酸化ストレスマーカーである 8-OHdG との関連の検討は実現可能性のある今後の検討課題である。

また、唾液中一酸化窒素は、競技スポーツ現場においてアスリートの喘息等の気道炎症を反映するコンディションマーカーである可能性が示唆された。高強度運動時の換気量の増加によって、アスリートは気道にダメージを受けやす

いためコンディション管理の中で気道炎症状態を把握することは非常に重要である。本博士論文は、競技スポーツ現場において唾液中一酸化窒素を測定する重要性を示すデータであると考えられる。しかしながら、検討課題3における喘息の既往者数が非常に少ないことは研究の限界点である。気道炎症のコンディションマーカーとしての確立には、呼気中一酸化窒素との関連などについて、より慎重に検討を重ねていく必要がある。

本研究では、唾液中一酸化窒素濃度の高値はアスリートのコンディションに悪影響を及ぼしている可能性を示したが、コンディションが悪いアスリートに対する回復方法の検討は実施していない。競技スポーツ現場における内科的コンディション分野では、コンディション低下に対する早期回復、コンディション低下の予防方法についての検討が必要である。一方で、疾患への罹患を未然に防ぐことを重点に置いた本研究において、唾液中一酸化窒素の増加のタイムコースを詳細に検討できていない点も限界である。今後、疾患を未然に防ぐ上では、合宿期間などを対象にしてトレーニング開始から唾液中一酸化窒素が増加を示すまでの日数などを検討する必要がある。

最後に、本検討は競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定に着目しており、対象者はアスリートを含め基本的に健康な若年者である。そのため、異なる年齢層における唾液中一酸化窒素測定の意義については一切検討を行うことが出来ていない。今後は、「国民の健康」にも貢献できるよう対象者の範囲を広げて、唾液中一酸化窒素測定の意義を検討する必要がある。

第8章 結論

本博士論文では、「非特異的免疫能を有し、種々の疾患との関連が報告されている唾液中一酸化窒素に着目して、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素測定の意義を明らかにすること」の目的を達成するための3つの研究課題の結果から、以下の結論を得た。

競技スポーツ現場で実施されるような一過性高強度運動は、唾液中一酸化窒素の応答に安静時とは異なる影響を与えることが示された。また、競技スポーツ現場のアスリートを対象に、試合に向けた継続的な高強度運動が唾液中一酸化窒素を増加させることが示された。さらに、喘息を有するアスリートは、唾液中一酸化窒素が高値であることを示した。一方で、唾液中一酸化窒素とd-ROMとの間には関連が認められなかった。これらのことから、競技スポーツ現場における唾液中一酸化窒素の測定は、アスリートにおける病的な気道炎症状態を反映するコンディションマーカーとして有用である可能性が示唆された。本研究で得られた結果は、アスリートのコンディション管理戦略における唾液中一酸化窒素の有用性を確立するための重要な知見となるであろう。

謝辞

本研究を遂行し論文を作成するにあたり、修士課程入学から博士号取得までの5年間、懇切丁寧なご指導・ご助言を賜りました指導教員である筑波大学大
育系・渡部厚一准教授に深甚の謝意を表します。また、副指導教員として常に
私を気にかけてくださり、懇切丁寧なご指導・ご助言を賜りました筑波大学体
育系・前田清司教授に心より感謝申し上げます。さらに、博士論文の主査をご
快諾いただきご指導・ご助言を賜りました筑波大学人間系・和田恒彦准教授に
厚く御礼申し上げます。中間報告会・予備審査会において、競技スポーツ現場
の観点からの本論文に対し多くのご助言を賜りました筑波大学体育系・福田崇
助教に重ねて御礼申し上げます。そして、私が國學院大學在学中に研究者を志
すきっかけを与えてくださり、博士論文の副査をご快諾いただきました國學院
大學人間開発学部健康体育学科・林貢一郎准教授に心より感謝申し上げます。

共同研究においてデータ収集をご快諾いただきました筑波大学体育系・宮川
俊平教授にも深く感謝申し上げます。また、ゼミの合同合宿を始め、研究への
視野、研究遂行方法など多くのご助言を賜りました早稲田大学スポーツ科学学
術院・赤間高雄教授に厚く御礼申し上げます。本研究の準備から論文作成を行
う上で、多大なるご指導・ご助言・ご協力を頂きました早稲田大学スポーツ科
学学術院・枝伸彦講師に重ねて心より感謝申し上げます。

私に研究の基礎から懇切丁寧にご指導を賜りました国立スポーツ科学センタ
ー・清水和弘研究員、筑波大学体育系・木村文律研究員、愛知工業大学・今井

智子講師に心より厚く御礼申し上げます。また、研究のご助言から私生活まで大変お世話になりました筑波大学附属病院・松葉開氏，筑波大学スポーツ Research & Development コア・田原麗衣研究員，中島亮一研究員，国立スポーツ科学センター・赤澤暢彦博士に心より厚く感謝致します。

研究活動を通じて，多大な協力や励ましを賜りました筑波大学体育系・棚橋嵩一郎博士，小崎恵生博士，順天堂大学・熊谷仁博士，筑波大学人間総合科学研究科・西田智氏，田川要氏，佐藤智仁氏，筑波大学大学院人間総合科学研究科・渡部研究室の皆様ならびに OB，OG，関係者の皆様，筑波大学人間総合科学研究科スポーツ医学専攻の同期・先輩・後輩の皆様心より御礼申し上げます。また，被験者ならびに測定検者としてご協力頂いた皆様に心より厚く感謝致します。

最後に，私の選択する道をいつも温かく見守っていただいた家族の皆様心より深く感謝申し上げます。

付記

研究業績

筆者の研究業績を以下に示す.

【本博士論文に関連する原著論文】

Ryota Sone, Nobuhiko Eda, Keisei Kosaki, Momoko Endo, Koichi Watanabe

(2018) Influence of acute high-intensity exercise on salivary nitric oxide levels.

Journal of Oral Science (in press)

Ryota Sone, Kai Matsuba, Rei Tahara, Nobuhiko Eda, Keisei Kosaki, Subrina

Jesmine, Shumpei Miyakawa, Koichi Watanabe (2019) Assessment of salivary

nitric oxide levels in elite university athletes in Japan: Findings from a cross

sectional study design. *Journal of Clinical Medicine Research* 11(2):114-120

【本博士論文に関連する学会発表】

国際学会

Ryouta Sone, Koichiro Hayashi, Kazuhiro Shimizu, Yukichi Hanaoka, Koichi

Watanabe. Effects of physical and psychological stress on salivary nitric oxide in

young men. American College of Sports Medicine 62nd Annual Meeting, San Diego, USA, May, 2015 (Poster) (査読有り)

Ryota Sone, Kai Matsuba, Nobuhiko Eda, Koichi Watanabe. Effects on the oxidative stress and the oral immune function by acute high-intensity exercise. 5th NSCA International Conference. Chiba, Japan, Jan, 2017 (Poster) (査読有り)

Ryota Sone, Koichiro Hayashi, Nobuhiko Eda, Koichi Watanabe. Influence of difference of exercise intensity on salivary nitric oxide in young men. Minnesota, USA, Jun, 2018 (Poster) (査読有り)

国内学会

曾根良太, 松葉開, 渡部厚一. 高強度運動後の唾液中一酸化窒素の応答. 第 72 回日本体力医学会大会, 岩手, 2016 年 9 月 (ポスター) (査読有り)

引用文献

- Akimoto, T., Y. Kumai, T. Akama, E. Hayashi, H. Murakami, R. Soma, S. Kuno, and I. Kono. 2003. 'Effects of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects', *Br J Sports Med*, 37: 76-9.
- Alberti, A., L. Bolognini, D. Macciantelli, and M. Caratelli. 2000. 'The radical cation of N,N-diethyl-para-phenyldiamine: A possible indicator of oxidative stress in biological samples', *Research on Chemical Intermediates*, 26: 253-67.
- Beckman, J. S., T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, and B. A. Freeman. 1990. 'Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 1620-4.
- Bodis, S., and A. Haregewoin. 1993. 'Evidence for the release and possible neural regulation of nitric oxide in human saliva', *Biochem Biophys Res Commun*, 194: 347-50.
- Borg, G. A. 1982. 'Psychophysical bases of perceived exertion', *Med Sci Sports Exerc*, 14: 377-81.
- Born, D. P., R. Faiss, S. J. Willis, J. Strahler, G. P. Millet, H. C. Holmberg, and B. Sperlich. 2016. 'Circadian variation of salivary immunoglobulin A, alpha-amylase activity and mood in response to repeated double-pole sprints in hypoxia', *Eur J Appl Physiol*, 116: 1-10.
- Bosquet, L., J. Montpetit, D. Arvisais, and I. Mujika. 2007. 'Effects of tapering on performance: a meta-analysis', *Med Sci Sports Exerc*, 39: 1358-65.

- Cannon, J. G. 1993. 'Exercise and resistance to infection', *J Appl Physiol (1985)*, 74: 973-81.
- Chicharro, J. L., A. Lucia, M. Perez, A. F. Vaquero, and R. Urena. 1998. 'Saliva composition and exercise', *Sports Med*, 26: 17-27.
- Chrousos, G. P. 1998. 'Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture', *Ann NY Acad Sci*, 851: 311-35.
- Cohen, S., and T. B. Herbert. 1996. 'Health psychology: psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology', *Annu Rev Psychol*, 47: 113-42.
- Correia, P. N., G. H. Carpenter, K. L. Paterson, and G. B. Proctor. 2010. 'Inducible nitric oxide synthase increases secretion from inflamed salivary glands', *Rheumatology (Oxford)*, 49: 48-56.
- Cunniffe, B., K. A. Morgan, J. S. Baker, M. Cardinale, and B. Davies. 2015. 'Home Versus Away Competition: Effect on Psychophysiological Variables in Elite Rugby Union', *Int J Sports Physiol Perform*, 10: 687-94.
- Dervisevic, A., N. Babic, J. Huskic, S. Sokolovic, E. Nakas-Icindic, and L. Causevic. 2012. 'Concentration of nitric oxide in saliva of patients with rheumatoid arthritis.pdf', *Int J Collab Res Intern Med Public Health*, 4: 1442-51.
- Diaz, M. M., O. L. Bocanegra, R. R. Teixeira, S. S. Soares, and F. S. Espindola. 2013. 'Salivary nitric oxide and alpha-amylase as indexes of training intensity and load', *Int J Sports Med*, 34: 8-13.

- Doel, J. J., M. P. Hector, C. V. Amirtham, L. A. Al-Anzan, N. Benjamin, and R. P. Allaker. 2004. 'Protective effect of salivary nitrate and microbial nitrate reductase activity against caries', *Eur J Oral Sci*, 112: 424-8.
- Dweik, R. A., P. B. Boggs, S. C. Erzurum, C. G. Irvin, M. W. Leigh, J. O. Lundberg, A. C. Olin, A. L. Plummer, and D. R. Taylor. 2011. 'An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications', *Am J Respir Crit Care Med*, 184: 602-15.
- Fahlman, M. M., and H. J. Engels. 2005. 'Mucosal IgA and URTI in American college football players: a year longitudinal study', *Med Sci Sports Exerc*, 37: 374-80.
- Fridovich, I. 1978. 'The biology of oxygen radicals', *Science*, 201: 875-80.
- Gleeson, M. 2007. 'Immune function in sport and exercise', *J Appl Physiol* (1985), 103: 693-9.
- Gonzalez, D., R. Marquina, N. Rondon, A. J. Rodriguez-Malaver, and R. Reyes. 2008. 'Effects of aerobic exercise on uric acid, total antioxidant activity, oxidative stress, and nitric oxide in human saliva', *Res Sports Med*, 16: 128-37.
- Greiwe, J. S., R. C. Hickner, S. D. Shah, P. E. Cryer, and J. O. Holloszy. 1999. 'Norepinephrine response to exercise at the same relative intensity before and after endurance exercise training', *J Appl Physiol* (1985), 86: 531-5.
- He, C. S., M. L. Tsai, M. H. Ko, C. K. Chang, and S. H. Fang. 2010. 'Relationships among salivary immunoglobulin A, lactoferrin and cortisol in basketball players during a basketball season', *Eur J Appl Physiol*, 110: 989-95.

- Heath, G. W., E. S. Ford, T. E. Craven, C. A. Macera, K. L. Jackson, and R. R. Pate. 1991. 'Exercise and the incidence of upper respiratory tract infections', *Med Sci Sports Exerc*, 23: 152-7.
- Jin, L., L. Qin, D. Xia, X. Liu, Z. Fan, C. Zhang, L. Gu, J. He, I. S. Ambudkar, D. Deng, and S. Wang. 2013. 'Active secretion and protective effect of salivary nitrate against stress in human volunteers and rats', *Free Radic Biol Med*, 57: 61-7.
- Kim, K. J., S. Park, K. H. Kim, T. W. Jun, D. H. Park, and K. B. Kim. 2010. 'Salivary cortisol and immunoglobulin A responses during golf competition vs. practice in elite male and female junior golfers', *J Strength Cond Res*, 24: 852-8.
- Kirschbaum, C., and D. H. Hellhammer. 1994. 'Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications', *Psychoneuroendocrinology*, 19: 313-33.
- Klentrou, P., T. Cieslak, M. MacNeil, A. Vintinner, and M. Plyley. 2002. 'Effect of moderate exercise on salivary immunoglobulin A and infection risk in humans', *Eur J Appl Physiol*, 87: 153-8.
- Konttinen, Y. T., L. A. Platts, S. Tuominen, K. K. Eklund, N. Santavirta, J. Tornwall, T. Sorsa, M. Hukkanen, and J. M. Polak. 1997. 'Role of nitric oxide in Sjogren's syndrome', *Arthritis Rheum*, 40: 875-83.
- Li, T. L., and M. Gleeson. 2004. 'The effect of single and repeated bouts of prolonged cycling and circadian variation on saliva flow rate, immunoglobulin A and alpha-amylase responses', *J Sports Sci*, 22: 1015-24.

- Mackinnon, L. T., and S. Hooper. 1994. 'Mucosal (secretory) immune system responses to exercise of varying intensity and during overtraining', *Int J Sports Med*, 15 Suppl 3: S179-83.
- Martarelli, D., and P. Pompei. 2009. 'Oxidative stress and antioxidant changes during a 24-hours mountain bike endurance exercise in master athletes', *J Sports Med Phys Fitness*, 49: 122-7.
- Matthews, C. E., I. S. Ockene, P. S. Freedson, M. C. Rosal, P. A. Merriam, and J. R. Hebert. 2002. 'Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection', *Med Sci Sports Exerc*, 34: 1242-8.
- Meeus, M., J. Nijs, L. Hermans, D. Goubert, and P. Calders. 2013. 'The role of mitochondrial dysfunctions due to oxidative and nitrosative stress in the chronic pain or chronic fatigue syndromes and fibromyalgia patients: peripheral and central mechanisms as therapeutic targets?', *Expert Opin Ther Targets*, 17: 1081-9.
- Mirvish, S. S., K. J. Reimers, B. Kutler, S. C. Chen, J. Haorah, C. R. Morris, A. C. Grandjean, and E. R. Lyden. 2000. 'Nitrate and nitrite concentrations in human saliva for men and women at different ages and times of the day and their consistency over time', *Eur J Cancer Prev*, 9: 335-42.
- Moncada, S., and A. Higgs. 1993. 'The L-arginine-nitric oxide pathway', *N Engl J Med*, 329: 2002-12.
- Morimoto, M., T. Hashimoto, T. Kitaoka, and S. Kyotani. 2018. 'Impact of Oxidative Stress and Newer Antiepileptic Drugs on the Albumin and Cortisol Value in Severe Motor and Intellectual Disabilities With Epilepsy', *J Clin Med Res*, 10: 137-45.

- Morimoto, M., S. Satomura, T. Hashimoto, E. Ito, and S. Kyotani. 2016. 'Oxidative Stress Measurement and Prediction of Epileptic Seizure in Children and Adults With Severe Motor and Intellectual Disabilities', *J Clin Med Res*, 8: 437-44.
- Murase, Y., K. Shimizu, Y. Tanimura, Y. Hanaoka, K. Watanabe, I. Kono, and S. Miyakawa. 2016. 'Salivary extracellular heat shock protein 70 (eHSP70) levels increase after 59 min of intense exercise and correlate with resting salivary secretory immunoglobulin A (SIgA) levels at rest', *Cell Stress Chaperones*, 21: 261-9.
- Nathan, C., and Q. W. Xie. 1994. 'Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls', *Cell*, 78: 915-8.
- Neville, V., M. Gleeson, and J. P. Folland. 2008. 'Salivary IgA as a risk factor for upper respiratory infections in elite professional athletes', *Med Sci Sports Exerc*, 40: 1228-36.
- Nieman, D. C. 1994. 'Exercise, infection, and immunity', *Int J Sports Med*, 15 Suppl 3: S131-41.———. 1997. 'Immune response to heavy exertion', *J Appl Physiol (1985)*, 82: 1385-94.
- Nieman, D. C., S. L. Nehlsen-Cannarella, P. A. Markoff, A. J. Balk-Lamberton, H. Yang, D. B. Chritton, J. W. Lee, and K. Arabatzis. 1990. 'The effects of moderate exercise training on natural killer cells and acute upper respiratory tract infections', *Int J Sports Med*, 11: 467-73.
- Ostrowski, K., T. Rohde, S. Asp, P. Schjerling, and B. K. Pedersen. 1999. 'Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans', *J Physiol*, 515 (Pt 1): 287-91.

- Panossian, A. G., A. S. Oganessian, M. Ambartsumian, E. S. Gabrielian, H. Wagner, and G. Wikman. 1999. 'Effects of heavy physical exercise and adaptogens on nitric oxide content in human saliva', *Phytomedicine*, 6: 17-26.
- Papacosta, Elena, and George P. Nassis. 2011. 'Saliva as a tool for monitoring steroid, peptide and immune markers in sport and exercise science', *Journal of Science and Medicine in Sport*, 14: 424-34.
- Pedersen, B. K., and H. Bruunsgaard. 1995. 'How physical exercise influences the establishment of infections', *Sports Med*, 19: 393-400.
- Pedersen, B. K., T. Rohde, and K. Ostrowski. 1998. 'Recovery of the immune system after exercise', *Acta Physiol Scand*, 162: 325-32.
- Pedersen, B. K., and H. Ullum. 1994. 'NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action', *Med Sci Sports Exerc*, 26: 140-6.
- Rahman, Z. A., N. Abdullah, R. Singh, and W. Sosroseno. 2010. 'Effect of acute exercise on the levels of salivary cortisol, tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide', *J Oral Sci*, 52: 133-6.
- Reher, V. G., E. G. Zenobio, F. O. Costa, P. Reher, and R. V. Soares. 2007. 'Nitric oxide levels in saliva increase with severity of chronic periodontitis', *J Oral Sci*, 49: 271-6.
- Rezaei, Fatemeh, and Reza Mohhamadi. 2018. 'Comparison of Saliva Nitric Oxide between Chronic Kidney Disease Before and After Dialysis and with Control Group', *The Open Dentistry Journal*, 12: 213-18.
- Ricciardolo, F. L., P. J. Sterk, B. Gaston, and G. Folkerts. 2004. 'Nitric oxide in health and disease of the respiratory system', *Physiol Rev*, 84: 731-65.

- Schneider, B. S., and P. M. Tiidus. 2007. 'Neutrophil infiltration in exercise-injured skeletal muscle: how do we resolve the controversy?', *Sports Med*, 37: 837-56.
- Sen, C. K., T. Rankinen, S. Vaisanen, and R. Rauramaa. 1994. 'Oxidative stress after human exercise: effect of N-acetylcysteine supplementation', *J Appl Physiol (1985)*, 76: 2570-7.
- Sugiura, H., and M. Ichinose. 2008. 'Oxidative and nitrative stress in bronchial asthma', *Antioxid Redox Signal*, 10: 785-97.
- Suzuki, K., M. Yamada, S. Kurakake, N. Okamura, K. Yamaya, Q. Liu, S. Kudoh, K. Kowatari, S. Nakaji, and K. Sugawara. 2000. 'Circulating cytokines and hormones with immunosuppressive but neutrophil-priming potentials rise after endurance exercise in humans', *Eur J Appl Physiol*, 81: 281-7.
- Takahama, U., S. Hirota, T. Nishioka, and T. Oniki. 2003. 'Human salivary peroxidase-catalyzed oxidation of nitrite and nitration of salivary components 4-hydroxyphenylacetic acid and proteins', *Arch Oral Biol*, 48: 679-90.
- Takahama, U., S. Hirota, and T. Oniki. 2006. 'Quercetin-dependent scavenging of reactive nitrogen species derived from nitric oxide and nitrite in the human oral cavity: interaction of quercetin with salivary redox components', *Arch Oral Biol*, 51: 629-39.
- Takahama, Umeo, Sachiko Hirota, and Oniki Takayuki. 2008. 'Detection of Nitric Oxide and Its Derivatives in Human Mixed Saliva and Acidified Saliva.' in, *Nitric Oxide, Part F*.
- Tamaki, N., A. Takaki, T. Tomofuji, Y. Endo, K. Kasuyama, D. Ekuni, T. Yasunaka, K. Yamamoto, and M. Morita. 2011. 'Stage of hepatocellular

carcinoma is associated with periodontitis', *J Clin Periodontol*, 38: 1015-20.

Tamaki, N., T. Tomofuji, D. Ekuni, R. Yamanaka, and M. Morita. 2011. 'Periodontal treatment decreases plasma oxidized LDL level and oxidative stress', *Clin Oral Investig*, 15: 953-8.

Tamaki, N., T. Tomofuji, T. Maruyama, D. Ekuni, R. Yamanaka, N. Takeuchi, and T. Yamamoto. 2008. 'Relationship between periodontal condition and plasma reactive oxygen metabolites in patients in the maintenance phase of periodontal treatment', *J Periodontol*, 79: 2136-42.

Tamaki, Naofumi, Takaaki Tomofuji, Daisuke Ekuni, Reiko Yamanaka, Tatsuo Yamamoto, and Manabu Morita. 2009. 'Short-Term Effects of Non-Surgical Periodontal Treatment on Plasma Level of Reactive Oxygen Metabolites in Patients With Chronic Periodontitis', *Journal of Periodontology*, 80: 901-06.

Ulkar, B., S. Elgun, N. Ozmeric, B. Ozdemir, and D. Boynuegri. 2012. 'Periodontal nitric oxide pathway alteration due to precompetition anxiety in handball players', *J Periodontol*, 83: 204-10.

Usui, T., T. Yoshikawa, K. Orita, S. Y. Ueda, Y. Katsura, S. Fujimoto, and M. Yoshimura. 2011. 'Changes in salivary antimicrobial peptides, immunoglobulin A and cortisol after prolonged strenuous exercise', *Eur J Appl Physiol*, 111: 2005-14.

Valtschanoff, J. G., R. J. Weinberg, A. Rustioni, and H. H. Schmidt. 1992. 'Nitric oxide synthase and GABA colocalize in lamina II of rat spinal cord', *Neurosci Lett*, 148: 6-10.

- Whittle, B. J. 1995. 'Nitric oxide in physiology and pathology', *Histochem J*, 27: 727-37.
- Xie, Q. W., H. J. Cho, J. Calaycay, R. A. Mumford, K. M. Swiderek, T. D. Lee, A. Ding, T. Troso, and C. Nathan. 1992. 'Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages', *Science*, 256: 225-8.
- Yamamoto, R., D. S. Bredt, S. H. Snyder, and R. A. Stone. 1993. 'The localization of nitric oxide synthase in the rat eye and related cranial ganglia', *Neuroscience*, 54: 189-200.
- Yamauchi, R., K. Shimizu, F. Kimura, M. Takemura, K. Suzuki, T. Akama, I. Kono, and T. Akimoto. 2011. 'Virus activation and immune function during intense training in rugby football players', *Int J Sports Med*, 32: 393-8.
- Zetterquist, W., C. Pedroletti, J. O. Lundberg, and K. Alving. 1999. 'Salivary contribution to exhaled nitric oxide', *Eur Respir J*, 13: 327-33.
- 久木留 毅, 佐藤 満. 2005. '一流競技者の長時間移動を伴う海外遠征時のコンディション変化について', *専修大学社会体育研究所報*: 41-51.
- 三宅 一徳. 2005. '基準値(基準範囲)とカットオフ値の考え方', *日本内科学会雑誌*, 94: 2467-72.
- 清水 和弘. 2011. '免疫系指標と自律神経系指標によるコンディション評価 (特集 スポーツ医科学分野におけるコンディション評価)', *臨床スポーツ医学*, 28: 855-59.

参考図書

- 上畑鉄之丞 編 疲労の科学 日本評論社, 東京, 2010.
- 大野秀樹, 跡見順子, 伏木亨 編 活性酸素と運動 杏林書院, 東京, 1998.
- 大野秀樹, 木崎節子 編著 運動と免疫 ナップ, 東京, 2009.
- 大柳善彦 著 NOと医学 共立出版, 東京, 1993.
- 大柳善彦 著 NOと病気 化学同人, 京都, 1994.
- 大柳善彦 著 NOと疾患 医歯薬出版, 東京, 1994.
- 谷口直之 編 活性酸素の臨床への展望～NO（一酸化窒素）とSOD～ 医薬ジャーナル社, 大阪, 1994.
- 山本雅之 監修 実験医学増刊 活性酸素・ガス状分子による恒常性制御と疾患 羊土社, 東京, 2012.
- 吉川敏一 監修 酸化ストレスの医学 改訂第2版 診断と医療社, 東京, 2014.
- 渡部茂 監訳 唾液-歯と口腔の健康 原著第3版 医歯薬出版, 東京, 2008

参考資料

- 財団法人日本オリンピック委員会 第17回アジア競技大会（2014／仁川）日本選手団報告書 2015.