

若年アスリートにおける短期間高強度トレーニングがリンパ球数と リンパ球アポトーシスに及ぼす影響

Effect of short-term high-intensity training on lymphocyte counts and lymphocyte apoptosis in young athletes

谷村祐子¹, 清水和弘^{1,2}, 河野一郎¹, 鯉坂隆一¹

Yuko Tanimura¹, Kazuhiro Shimizu^{1,2}, Ichiro Kono¹, Ryuichi Ajisaka¹

¹筑波大学大学院人間総合科学研究科スポーツ医学専攻

²早稲田大学スポーツ科学学術院

¹Graduate School of Comprehensive Human Science, University of Tsukuba,

²Faculty of Sport Sciences, Waseda University

キーワード: リンパ球, アポトーシス, 短期間高強度トレーニング

Keywords: lymphocyte, apoptosis, short-term high-intensity training

抄 録

【目的】 短期間高強度トレーニングが安静時リンパ球数及びリンパ球アポトーシスに及ぼす影響について、若年男性アスリートと運動習慣のない若年男性を対象として比較検討すること。

【方法】 男性トライアスリート(Trained: T群)7名と運動習慣のない成人男性(Sedentary: S群)6名(年齢21.3±3.9歳及び24.8±3.0歳)を対象とした。対象者は、3日間連続で75% $\dot{V}O_{2max}$ ・1時間の自転車運動を行った。測定は1日目運動前(D1), 3日目運動前(D3), そして最後の運動から24時間後(D4)とし、リンパ球数, リンパ球アポトーシスを誘導するCD95の発現をCD3⁺(T細胞), CD19⁺(B細胞), CD4⁺(ヘルパーT細胞), CD8⁺(細胞傷害性T細胞)別に検討した。さらにリンパ球アポトーシスを検出するAnnexin Vの発現をフローサイトメーターによって検討した。

【結果】 D1においてT群のリンパ球数はS群よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。リンパ球数の変動において、S群はD1と比較してD3, D4で有意な減少を示したが($p < 0.05$), T群は有意な変化を認めなかった。サブセット別のリンパ球数では、D1においてT群のCD4⁺細胞数はS群よりも有意に低かった ($p < 0.05$)。さらにS群のCD3⁺細胞数とCD4⁺細胞数において、D1と比較してD3, D4で有意な減少が認められた ($p < 0.05$)。CD95⁺細胞は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においても有意な変動は認められなかった。

【結論】 アスリートは対照群に対し安静時リンパ球数が減少していたが、短期間高強度トレーニングによるさらなるリンパ球数の減少を認めなかった。運動習慣の有無に関わらず、安静時と運動後のリンパ球減少にはアポトーシスの関連が低い可能性が示唆された。

スポーツ科学研究, 5, 235-245, 2008年, 受付日:2008年11月3日, 受理日:2008年12月4日

連絡先: 鯉坂隆一 筑波大学人間総合科学研究科スポーツ医学専攻

〒305-8574 茨城県つくば市天王台1-1-1 総合研究棟D 618号室

TEL/Fax 029-853-5600(3961) E-mail:ajisakas@taiiku.tsukuba.ac.jp

I. 序 論

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、競技現場において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。特に競技選手のコンディション低下の要因として、上気道感染症 (Upper-respiratory tract infection: URTI) への罹患があげられ (Nieman 1994), トレーニングや競技会におけるパフォーマンスの低下に関係すると考えられている (Gleeson et al. 1995). Peters and Bateman はフルマラソンの実施後に URTI の罹患者が多かったことを報告しており、またいくつかの先行研究においても同様の見解が示されている (Peters and Bateman 1983; Peters et al. 1993).

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 (Pierpaoli, and Spector, 1988). 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。リンパ球は免疫機能の中心的役割を果たしており、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (Natural Killer) 細胞等のサブセットが存在する。特に T 細胞は獲得免疫の中心的役割を担い、ヘルパー T (T-helper: Th) (CD4⁺) 細胞と細胞傷害性 T (T-cytotoxic: Tc) (CD8⁺) 細胞のサブセットが存在する。Th 細胞は主に免疫応答の調節、Tc 細胞は主にウィルス感染細胞などを排除する機能を有する。これらの細胞と運動の関係については多くの報告があり (Field et al. 1991; Tharp and Preuss 1991), T 細胞の機能低下は一過性高強度運動で生じることが報告されており (Kajiura et al. 1995; Verde et al. 1992), アスリートの易感染性に関連している可能性がある。

一過性高強度運動後の一時的な免疫抑制か

らの回復期において、病原微生物に対する日和見感染リスクが高まる状態である「オープンウィンドウ」が引き起こされることが知られている (Pedersen et al. 1998; Pedersen and Ullum 1994). このオープンウィンドウの時期が長期間続くとウィルスの侵入を容易に許す可能性がある。一過性高強度運動はリンパ球数、CD4⁺細胞、CD8⁺細胞を一時的に減少させる (Gleeson and Bishop 2005; Pedersen et al. 1998; Pedersen and Ullum 1994). 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細胞を組織に移動させることによって生じると考えられてきた (Cupps and Fauci 1982). しかし、コルチゾールの増加が見られなくても、リンパ球減少が生じる報告もある (Green et al. 2003; Green and Rowbottom 2003; Tanimura et al. 2008).

リンパ球減少のもう一つのメカニズムとしてリンパ球のアポトーシスの可能性が考えられている (Mars et al. 1998). アポトーシスは修復不全の細胞の除去に働く生理的反応である。また、Green は運動による T 細胞の増殖能の低下はアポトーシスの増加によって生じることを示している (Green 2002). 一過性運動において、アポトーシスの増加やリンパ球減少との関連を示唆する報告もあるが (Mooren et al. 2002; Mooren et al. 2004; Timmons and Bar-Or 2007), リンパ球アポトーシスは生じない (Steensberg et al. 2002) あるいはリンパ球減少とは関係しないとする報告もみられる (Simpson et al. 2007). しかしながら、多くの研究が一過性運動による検討であり、合宿や競技会前の集中トレーニングのような短期間高強度トレーニングの影響を検討した研究は少ない。

競技選手の安静時のリンパ球数やサブセット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 (Green et al. 1981; Keen et al. 1995). 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 (Ferry et al. 1990). 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. しかし, 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 (Mooren et
al. 2004). さらに短期間高強度トレーニングにお
いては, 競技選手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 (Hsu et al.
2002; Tuan et al. 2007). 運動によるストレスで赤
血球の破壊が亢進するように (Smith 1995), リン
パ球において破壊が亢進してリンパ球の低下を
招く可能性がある. したがって, リンパ球アポトー
シスの増加がアスリートのリンパ球減少に関与す
る可能性も考えられる. 以上述べたようにアスリー
トにおける運動によるリンパ球数の減少のメカニズ
ムについては不明な点が多い.

本研究の目的は, 短期間高強度トレーニング
が安静時リンパ球数及びリンパ球アポトーシスに
及ぼす影響について, 若年男性アスリートと運動
習慣のない若年男性を対象として比較検討する

ことである.

II. 方 法

1. 対象

対象者は, 若年男性トライアスロン選手 7 名
(Trained: T 群)と運動習慣のない若年健常男性
6 名 (Sedentary: S 群)とした. いずれの群も喫煙
習慣及び服薬習慣は無かった. T 群は, 週 5 回 1
日平均 2~3 時間 (週 15.6±4.1 時間; 平均±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±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は表 1 に示し
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.

表 1. 対象者の身体的特性

	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	22.2 ± 1.0	22.3 ± 3.0
% Body fat	14.1 ± 1.3	15.9 ± 4.7
$\dot{V}O_{2max}$ (ml/min/kg)	52.6 ± 2.7*	40.4 ± 4.2

平均値±標準偏差. *p<0.05 vs. Sedentary

2. 実験手順

1) 最大酸素摂取量の測定

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) を用いた最大運動負荷
試験によって最大酸素摂取量 ($\dot{V}O_{2max}$) 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/min のランプ負荷) で 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/min 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-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により, breath by breath 法にて測定し, それらの 30 秒毎の平均値より $\dot{V}O_{2max}$ を求めた.

2) 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 1 週間以上の間隔をあけて実施した. 50% $\dot{V}O_{2max}$ の負荷で 1 分間のウォーミングアップを行い, 75% $\dot{V}O_{2max}$ の負荷で 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 $\dot{V}O_2$ を測定し, 適宜運動強度を調節した.

上記の定常負荷運動を同一時刻に 3 日間連続で行った.

3) 血液採取とサンプルの調整

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. 対象者には測定前日から測定終了までアルコール及び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.

Annexin V の測定は分離したリンパ球を用いた. リンパ球分離をするために, 採血した血液 2 ml にリン酸バッファー (Phosphate Buffered Saline: PBS) 溶液 2 ml を加えた. この溶液に対して, リンパ球分離液 (Ficoll-Paque, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 4 ml を静かに重層し, 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.

3. 測定項目

1) リンパ球数

白血球数の測定は, 2 ml の血液を採取し (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) を用いて測定した. 白血球分画には鏡検法を用いた. 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.

2) リンパ球サブセットとアポトーシスマーカー

本研究では, fluorescence activated cell sorter (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 (fluorescein isothiocyanate: FITC, phycoerythrin: PE, allophycocyanin: 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 社, デンマーク), CD19 (APC, クローン: HTB19, Biolegend 社, アメリカ), CD4 (APC, クローン: SFCE112T4D11, Immunotech 社, フランス), CD8 (FITC, クローン: B9.11, BeckmanCoulter 社, アメリカ), そして CD95 (PE, クローン: 7C11, BeckmanCoulter 社, アメリカ) を用い, CD3⁺細胞 (T 細胞), CD4⁺細胞 (Th 細胞), CD8⁺細胞 (Tc 細胞), CD19⁺細胞 (B 細胞), CD95⁺細胞, CD3⁺CD95⁺細胞, CD19⁺CD95⁺細胞, CD4⁺CD95⁺細胞, CD8⁺CD95⁺細胞を測定した. ネガティブコントロールは, マウス IgG1 (クローン: DAK-GO1, DakoCytomation 社, デンマーク) を用いた. 1 サンプルにつき, 各抗体を 2 μ l ずつ使用し, 全血 100 μ l と混和し, 室温にて 15 分間暗所静置した. さらに Lysing Solution (0.15 mol \cdot L⁻¹ \cdot NH₄Cl, 10 mmol \cdot L⁻¹ KHCO₃, 0.1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA-2Na) 1 ml を加えて転倒混和し, さらに室温にて 30 分間暗所静置した. 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 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.

Annexin V の測定は, Annexin-FITC (Immunotech, Marseille, France) キットを用いて検出した (Vermes et al. 1995). 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を RPMI 1.5 ml を加えて混和し, 3000 rpm で 5 分間, 遠心して上清を取り除いた. 分離したペレットにバインディングバッファーを加えて $5 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度に調整し, 氷上で安置した. Annexin V-FITC 1 μl とヨウ化プロピジウム 5 μl を $5 \times 10^6/\text{ml}$ 濃度に調整されたリンパ球分離液 100 μl 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 μl を加えて混和し, FACS 用チューブに分注した.

3) フローサイトメトリ解析

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, San Jose, 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. 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 抗体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 10,000 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 社) 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/ μl) と各分画の陽性細胞率 (%) との積を用いて算出した.

4. 統計

全ての測定値は, 平均値 \pm 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の二元配置分散分析を用いて解析し, 有意水準は 5 % 未満とした. 事後検定は, Bonferoni/Dunn テストにて多重比較検定を行った. 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.

III. 結果

1. リンパ球数とサブセット別の変動

リンパ球数は, 両群の変動に有意な差異が見られた (図 1). 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の変動を図 2 に示した. $\text{CD}19^+$ 細胞 (B 細胞) と $\text{CD}8^+$ 細胞については群間と変動に有意な差異を認めなかった. D1 において T 群の $\text{CD}4^+$ 細胞数は S 群よりも有意に低値を示したが, $\text{CD}3^+$ 細胞は両群間に有意な差異を認めなかった. さらに S 群の $\text{CD}3^+$ 細胞と $\text{CD}4^+$ 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が, T 群においては有意な変動を認めなかった.

2. リンパ球アポトーシス

リンパ球のアポトーシスマーカーの変動を表 2 に示した. D1 において T 群の $\text{CD}8^+\text{CD}95^+$ 細胞の

比率が S 群よりも高かったが統計学的な差異は無く, CD95⁺細胞の変動において, いずれのサブセットにおいても有意な群間差及び変動は見ら

れず, Annexin V⁺細胞においても有意な群間差及び変動は認められなかった(表 2).

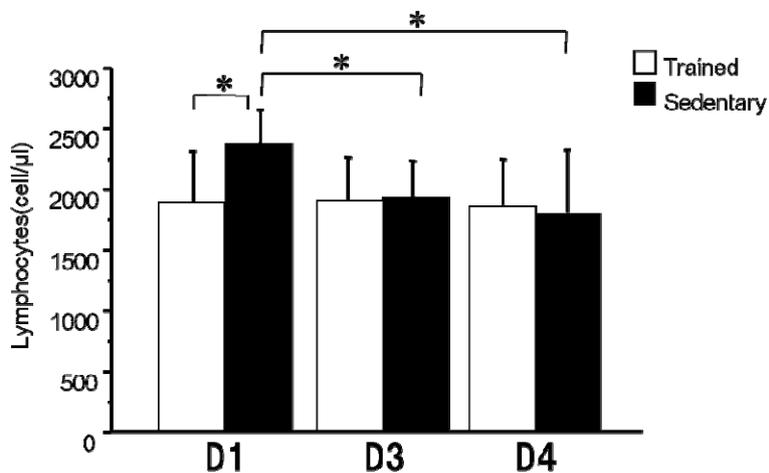


図 1. リンパ球数の変動
 平均値±標準偏差. *: p < 0.05.

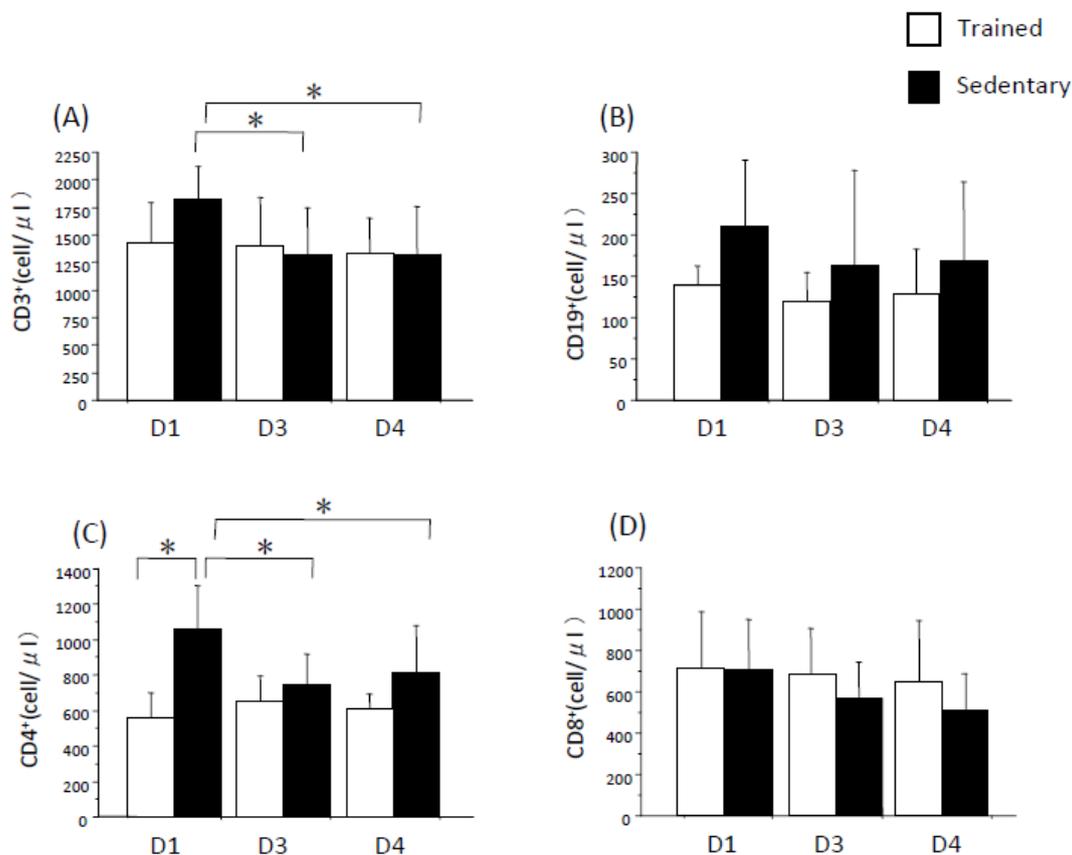


図 2. リンパ球サブセット別の変動 (A) CD3⁺ (B) CD19⁺ (C) CD4⁺ (D) CD8⁺
 平均値±標準偏差. *: p < 0.05.

表 2. リンパ球アポトーシス指標の変動

	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						

平均値 ± 標準偏差. *p<0.05 vs. Sedentary

IV. 考察

1. リンパ球数

本研究では、アスリートにおける短期間高強度トレーニングがリンパ球数とリンパ球アポトーシスに及ぼす影響を非運動群と比較して検討した。

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、CD4⁺細胞数の低値を示した。運動習慣の違いが安静時リンパ球数に与える影響は多数報告されており、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 (Green et al. 1981; Keen et al. 1995)。本研究はこれらの研究結果と同様の結果を得た。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。Galun et al.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時間後まで低下を維持していることを報告している (Galun et al. 1987)。本研究においては測定24時間前からの運動のみの制限しかしていなかったため、その前に行った運動の影響が持続している可能性は否定できない。さらにリンパ球サブセットについては、安静時のCD4⁺/CD8⁺比が競技者の方が非競技者よりも低いことが報告されている (Kajiura et al. 1995; Verde et al. 1992)。本研究においてもT群のCD4⁺が有意な低値を示し、先行研究と一致する結果となった。

T群の総リンパ球数、全てのリンパ球サブセット

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が報告されている (Ronsen et al. 2001a; Ronsen et al. 2002; Ronsen et al. 2001b)。しかし、Ndon et al. 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 (Ndon et al. 1992)。したがって、T群においては慢性的なトレーニングにより一回の運動に対するストレスが少な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、運動に対す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 et al.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⁺の値は運動前と比較して変化がなかったが、CD4⁺は有意な低値を示すことを報告している (Field et al. 1991)。これは、連続的な急激のストレスはCD8⁺よりCD4⁺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 (Gleeson and Bishop 2005)。よって短期間高強度トレーニングにおいて

S群のCD4⁺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。

2. リンパ球アポトーシス

リンパ球のアポトーシスマーカーであるCD95⁺細胞, Annexin V⁺細胞はいずれにおいても両群の間に差異は無く、かつ有意な変化は認められなかった。したがって、T群の安静時のリンパ球数の低下や連続した運動ストレスによるS群のリンパ球の減少には、リンパ球のアポトーシスとは関連が低い可能性が示唆された。

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もある (Mooren et al. 2004)。これは、アポトーシス細胞の増加は運動トレーニングによるDNAの修復機構の増加により抑制されることを意味すると示唆されている。したがって、本研究の結果もDNA修復酵素活性の増加などの修復機構が働いたことにより説明されるかもしれない (Radak et al. 2003; Sato et al. 2003)。一方、他の先行研究では、競技選手において短期間高強度トレーニング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 (Hsu et al. 2002; Tsai et al. 2001)。これらの研究は80-85% $\dot{V}O_{2max}$ 30 min 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 minであった。強度が高いほどアポトーシスが生じやすいという報告もあるため (Navalta et al. 2007)、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。安静時のリンパ球アポトーシスについて、Mooren et al. は最大酸素摂取量が高い群でAnnexin Vの発現が高かったと報告している (Mooren et al. 2004)。しかしPittaluga et al. は、競技者と非競技者のアポトーシスを検出するDNA断片化に差がなかったことを報告している (Pittaluga et al. 2006)。これはMooren et al.の方

がPittaluga et al.の研究よりも対象の最大酸素摂取量が高かったことが要因である可能性がある。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競技者との差がなかった可能性も考えられる。したがって、今後より最大酸素摂取量の高いアスリートに対する検討および、より高い運動強度での検討が必要である。

アポトーシスは、誘導、決定、実行という過程を経て、形態学的変化(核や細胞の断片化)や生化学的变化を伴って生じる。本研究では、アポトーシス誘導因子の一つであり、細胞表面上に存在するCD95⁺細胞を測定した。さらに、アポトーシス実行後の形態的な変化であるPSの細胞表面上への露出を利用し、PSと特異的に結合するAnnexin Vを検出することによってアポトーシスを評価した。本研究において、CD95⁺細胞とAnnexin Vの有意な変動や群間の差異が生じなかったということは、運動によるアポトーシスの誘導、アポトーシスの形態学的変化が起こらなかった可能性を意味する。以上のことから、本研究のS群のリンパ球の減少には、リンパ球アポトーシスが関与する可能性が低いことが考えられた。しかしながら、本研究では数多くあるアポトーシス関連因子の一部の測定であったことに加え、短期間の変動を検討したものである。今後は、他のアポトーシス関連因子や長期間にわたっての運動の影響を検討する必要がある。

V. まとめ

本研究では、男性トライアスリートと運動習慣の無い若年男性の短期間高強度トレーニングにおけるリンパ球数の変動とリンパ球アポトーシスの反応を比較検討した。その結果、T群のリンパ球数は安静時においてS群と比較して有意に低値を示した。アポトーシスのマーカーは両群ともに有意な差は見られなかった。さらに、短期間高強度

トレーニングにおける反応性ではS群のリンパ球, CD3⁺細胞, CD4⁺細胞がD3, D4において有意な減少を示した. しかしT群においては有意な変動は認められなかった. アポトーシスマーカーにおいても経時的変化に両群で有意な変動は見られなかった. 以上のことから, 若年健常者においては運動習慣の有無に関わらずリンパ球の減少にアポトーシスが関与する可能性が低いことが示唆された.

文 献

- Cupps TR, Fauci AS (1982) Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. *Immunol Rev* 65: 133-155
- Ferry A, Picard F, Duvallet A, Weill B, Rieu M (1990) Changes in blood leucocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 59: 435-442
- Field CJ, Gougeon R, Marliss EB (1991) Circulating mononuclear cell numbers and function during intense exercise and recovery. *J Appl Physiol* 71: 1089-1097
- Galun E, Burstein R, Assia E, Tur-Kaspa I, Rosenblum J, Epstein Y (1987) Changes of white blood cell count during prolonged exercise. *Int J Sports Med* 8: 253-255
- Gleeson M, Bishop NC (2005) The T cell and NK cell immune response to exercise. *Ann Transplant* 10: 43-48
- Gleeson M, McDonald WA, Cripps AW, Pyne DB, Clancy RL, Fricker PA (1995) The effect on immunity of long-term intensive training in elite swimmers. *Clin Exp Immunol* 102: 210-216
- Green KJ (2002) Improving understanding of exercise effects on in vitro T-lymphocyte function--the role of fluorescent cell division tracking. *Exerc Immunol Rev* 8: 101-115
- Green KJ, Croaker SJ, Rowbottom DG (2003) Carbohydrate supplementation and exercise-induced changes in T-lymphocyte function. *J Appl Physiol* 95: 1216-1223
- Green KJ, Rowbottom DG (2003) Exercise-induced changes to in vitro T-lymphocyte mitogen responses using CFSE. *J Appl Physiol* 95: 57-63
- Green RL, Kaplan SS, Rabin BS, Stanitski CL, Zdziarski U (1981) Immune function in marathon runners. *Ann Allergy* 47: 73-75
- Hsu TG, Hsu KM, Kong CW, Lu FJ, Cheng H, Tsai K (2002) Leukocyte mitochondria alterations after aerobic exercise in trained human subjects. *Med Sci Sports Exerc* 34: 438-442
- Kajiura JS, MacDougall JD, Ernst PB, Younglai EV (1995) Immune response to changes in training intensity and volume in runners. *Med Sci Sports Exerc* 27: 1111-1117
- Keen P, McCarthy DA, Passfield L, Shaker HA, Wade AJ (1995) Leucocyte and erythrocyte counts during a multi-stage cycling race ('the Milk Race'). *Br J Sports Med* 29: 61-65
- Mars M, Govender S, Weston A, Naicker V, Chaturgoon A (1998) High intensity exercise: A cause of lymphocyte apoptosis? *Biochem Biophys Res Commun* 249: 366-370
- Mooren FC, Bloming D, Lechtermann A, Lerch MM, Volker K (2002) Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. *J Appl Physiol* 93: 147-153
- Mooren FC, Lechtermann A, Volker K (2004) Exercise-induced apoptosis of lymphocytes depends on training status. *Med Sci Sports*

- Exerc 36: 1476-1483
- Navalta JW, Sedlock DA, Park KS (2007) Effect of exercise intensity on exercise-induced lymphocyte apoptosis. *Int J Sports Med* 28: 539-542
 - Nieman DC (1994) Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 26: 128-139
 - Pedersen BK, Rohde T, Ostrowski K (1998) Recovery of the immune system after exercise. *Acta Physiol Scand* 162: 325-332
 - Pedersen BK, Ullum H (1994) NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc* 26: 140-146
 - Peters EM, Bateman ED (1983) Ultramarathon running and upper respiratory tract infections. An epidemiological survey. *S Afr Med J* 64: 582-584
 - Peters EM, Goetzsche JM, Grobbelaar B, Noakes TD (1993) Vitamin C supplementation reduces the incidence of postrace symptoms of upper-respiratory-tract infection in ultramarathon runners. *Am J Clin Nutr* 57: 170-174
 - Pierpaoli. W, Spector. NH (1988) 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
 - Pittaluga M, Parisi P, Sabatini S, Ceci R, Caporossi D, Valeria Catani M, Savini I, Avigliano L (2006) Cellular and biochemical parameters of exercise-induced oxidative stress: relationship with training levels. *Free Radic Res* 40: 607-614
 - Radak Z, Apor P, Pucsok J, Berkes I, Ogonovszky H, Pavlik G, Nakamoto H, Goto S (2003) Marathon running alters the DNA base excision repair in human skeletal muscle. *Life Sci* 72: 1627-1633
 - Sato Y, Nanri H, Ohta M, Kasai H, Ikeda M (2003) 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
 - Simpson RJ, Florida-James GD, Whyte GP, Black JR, Ross JA, Guy K (2007) Apoptosis Does not Contribute to the Blood Lymphocytopenia Observed After Intensive and Downhill Treadmill Running in Humans. *Res Sports Med* 15: 157-174
 - Smith JA (1995) Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med* 19: 9-31
 - Steensberg A, Morrow J, Toft AD, Bruunsgaard H, Pedersen BK (2002) Prolonged exercise, lymphocyte apoptosis and F2-isoprostanes. *Eur J Appl Physiol* 87: 38-42
 - Tanimura Y, Shimizu K, Tanabe K, Otsuki T, Yamauchi R, Matsubara Y, Iemitsu M, Maeda S, Ajisaka R (2008) Exercise-induced oxidative DNA damage and lymphocytopenia in sedentary young males. *Med Sci Sports Exerc* 40: 1455-1462
 - Tharp GD, Preuss TL (1991) Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J Appl Physiol* 70: 2535-2538
 - Timmons BW, Bar-Or O (2007) Lymphocyte expression of CD95 at rest and in response to acute exercise in healthy children and adolescents. *Brain Behav Immun* 21: 442-449
 - Tsai K, Hsu TG, Hsu KM, Cheng H, Liu TY,

- Hsu CF, Kong CW (2001) Oxidative DNA damage in human peripheral leukocytes induced by massive aerobic exercise. *Free Radic Biol Med* 31: 1465-1472
- Tuan TC, Hsu TG, Fong MC, Hsu CF, Tsai KK, Lee CY, Kong CW (2007) Deleterious Effects of Short-Term High-Intensity Exercise on the Immune Function: Evidence from Leukocyte Mitochondrial Alterations and Apoptosis. *Br J Sports Med*
 - Verde T, Thomas S, Shephard RJ (1992) Potential markers of heavy training in highly trained distance runners. *Br J Sports Med* 26: 167-175
 - Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C (1995) 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