

## 《原著》

# サッカー選手の運動に伴う好中球機能の変動は血清オプソニン化活性により評価できるか？

小室輝明<sup>1,2</sup>、高橋一平<sup>1</sup>、梅田孝<sup>3</sup>、  
米田勝朗<sup>3</sup>、佐藤諭<sup>1</sup>、田中充洋<sup>4</sup>、  
徳田糸代<sup>1</sup>、大園研<sup>1</sup>、大沼由香<sup>1,5</sup>、  
中路重之<sup>1</sup>

1 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座  
2 京都産業大学  
3 名城大学  
4 明治大学  
5 弘前医療福祉大学

### キーワード

1. 血清オプソニン化活性
2. 好中球
3. 活性酸素種産生能
4. 食食能
5. サッカー選手

運動に伴う好中球機能を血清オプソニン活性で評価できるかを検討した。対象は、男子プロサッカー選手 20 名で、シーズン前中後の 3 回で、同様の運動を実施し、その際の直前直後の身体組成値、血液生化学検査値、好中球機能、血清オプソニン化活性を測定した。その結果、各調査期の好中球機能の変化率と血清オプソニン化活性の変化率の相関関係を検討したところ、シーズン前では、総 ROS 産生量の変化率と血清オプソニン化活性の変化率は有意な負の相関関係を示したが、シーズン中盤では負の相関傾向がみられ、シーズン終盤では相関関係を認めなかった。一方、総 PA の変化率は血清オプソニン化活性の変化率とすべての調査期において相関関係を示さなかった。以上より、身体的コンディションの良好な時期において軽～中等度の運動負荷レベルの運動では、血清オプソニン化活性の挙動は好中球 ROS 産生能の挙動と相関するため、好中球機能の変動を血清オプソニン化活性によって評価できると考えられた。しかし、身体的コンディションの悪化や運動負荷レベルの増大に伴って、血清オプソニン化活性による好中球機能の評価はできなくなる可能性が考えられた。

体力・栄養・免疫学雑誌 第 26 卷 第 1 号 40-48 頁 2016 年

### 緒言

身体活動は、適度であれば免疫力を高めて健康の維持増進に有効となるが、過剰な場合には逆に免疫は抑制されて健康を障害することが知られている。Matthews らは、上気道感染症と身体活動の関係を 12 ヶ月追跡し、中等度の身体活動が座業的な生活と比べて上気道感染症のリスクが 20%低下することを報告している<sup>1,2)</sup>。競技スポーツ選手においても、通常トレーニング期では非スポーツ選手と比べて上気道感染症のリスクは低い<sup>3)</sup>。しかし、強化トレーニング期では上気道感染症のリスクが高くなり<sup>4,6)</sup>、さらに、高強度な練習を繰り返すと、慢性的な免疫抑制が生じる可能性が指摘されている<sup>7,9)</sup>。

多くの競技スポーツ選手は自己記録の更新や目標とする大会での勝利を目指し、日々高強度、長時間、高頻度のトレーニングを実施している。しかしながら、彼らが実施するトレーニングは常に過負荷の原則にのっとり実施されるため、体力やパフォーマンスを向上させる反面、活動後の身体諸機能を低下をさせ、適切に回復できない場合には上記のような慢性的な免疫抑

制などをもたらす可能性が指摘されている<sup>10,11)</sup>。このため、競技スポーツ選手の日々およびシーズンを通したコンディション管理は重要である。

好中球は血中の免疫細胞の 6-7 割をしめ、体外から侵入、あるいは体内で発生した異物に対して貪食、破壊、それらを排除することによって、生体環境の維持において重要な役割を果たしている<sup>12)</sup>。貪食の過程で異物が血清中の抗体や補体などの可溶因子によりオプソニン化されると、好中球の異物除去機構は活性化されて、活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) や細胞内顆粒の放出による破壊・除去が亢進する。

これまで我々は、競技スポーツ選手を対象として、運動と好中球機能、すなわち好中球活性酸素種 (ROS) 産生能と貪食能 (phagocytic activity : PA)、血清オプソニン化活性 (serum opsonic activity : SOA) の関係を様々な運動負荷条件 (強度や時間)、運動実施環境 (通常期、強化合宿期、減量期、試合時など) で評価してきた。これにより、調整期におこなわれるような軽めの練習では運動後 ROS 産生能および PA は共に亢進を示し<sup>13)</sup>、好中球機能全体が亢進する可能性がみられた。また、

通常練習では ROS 産生能は亢進し、PA は不変から低下を示すのが一般的であった<sup>14,15)</sup>。一方、強化トレーニング期や試合など負荷が大きい運動後には、ROS 産生能、PA 共に低下し、好中球機能全体が抑制されることを報告してきた<sup>16-18)</sup>。一方、SOA については、軽度の運動負荷では変化が小さく<sup>14,19)</sup>、通常練習からマラソンのような高強度な運動により上昇を示すため、運動負荷が大きくなるにしたがって運動後の血清成分 (IgG や C3) の働きが低下した結果、好中球機能を活性化 (補完) する方向に変化する可能性を報告してきた<sup>20)</sup>。

しかし、このように競技スポーツ選手の好中球機能を直接評価するためには、実験試料が生きた細胞であるため、採血後速やかに好中球機能を測定する施設がスポーツ現場に近接している必要がある。また、同様の理由で、実験試料を保管できないために後日シーズン間の違いを評価することが出来なかった。一方で、SOA は試料が血清であり、冷凍による保管が可能である。そのため、研究室での測定が可能であり、さらに異なる時期に採取保管した試料を後から同時に測定でき、利便性が高い。その結果、これまでのフィールド調査で直接好中球機能を評価した研究は少なく、血清成分 (SOA や参加関連物質など) から好中球機能を推定した研究が行われてきた。しかし、SOA は採取血清中における標準好中球の機能評価であるため、被験者の好中球そのものの機能評価ではない。そのため、様々な運動条件で好中球機能の動態を SOA により評価できるか否かについての検証が必要と考えられるが、これまでは上記についての検討は行われていなかった。結果として、好中球機能と SOA を関係させて評価することは出来ず、このような事情が本研究分野の進捗の妨げとなってきた。

本研究では、男子プロサッカー選手を対象に、疲労が蓄積していないと考えられるシーズン前、疲労が蓄積してきたシーズン中盤、疲労していると考えられるシーズン終盤の計 3 回に各々一定の運動を負荷し前後の好中球機能の変化を検討した。その目的は、好中球機能の挙動でサッカー選手のシーズン期間中の身体コンディションを把握することにある。加えて、その際の好中球機能の動態と SOA の関係性を検討し、SOA による好中球機能推測の可能性を検討した。

## 対象者及び調査方法

### 1. 対象者及び調査期間

本調査は J2 リーグに所属する男子プロサッカー選手 20 名を対象とした。ポジションは、ゴールキーパー (GK) 2 名、ディフェンダー (DF) 8 名、ミッドフィールダー (MF) 4 名、フォワード (FW) 6 名であった。

本対象者の平均年齢は、25.0±5.1 歳、平均身長は 178.0±6.3cm、平均体重は 72.7±7.0kg、調査開始時 2 月 12 日の平均体脂肪率は 12.3±2.6%であった (表 1)。

調査はリーグ戦開幕 1 ヶ月前の 2007 年 2 月 12 日 (シーズン前)、リーグ戦開始 5 か月後の 2007 年 8 月 9 日 (シーズン中盤) とリーグ戦開始後 10 か月後で最終試合 10 日前の 2007 年 11 月 21 日 (シーズン終盤) の計 3 回実施した。また、この間対象者は、表 2 に示したような 1 週間のスケジュールでトレーニング、試合を実施した。また、3 回の調査日は表 3 に示したようなランニングを主体とした練習を負荷した。また、この練習前と練習後に以下に説明する身体組成値、血液生化学検査値、好中球機能、血清オプソニン化活性を測定した。なお、この練習はポジションに関係なく、全対象者が実施した。

本研究は弘前大学倫理委員会の承認を受け、調査開始以前に調査の目的、内容を被験者に十分に説明し、全対象者より書面での同意を得た上で実施した。

### 2. 身体組成値

身体組成値は身長を測定した後、マルチ周波数体組成計 (MC-190、TANITA、東京、日本) を用いてインピーダンス測定法にて、体重、体脂肪率、除脂肪体重、体脂肪量を測定した。

### 3. 血液検査項目

肘正中静脈より 20mL の採血を行った。EDTA 入り 2mL の末梢血は白血球数、好中球数、Hb、Hct、好中球 ROS 産生能と貪食能を測定するために使用した。残り 18mL の血液サンプルは 3000 回転/秒、10 分間で遠心分離し、血清を抽出した。また、得られた血清は、以下の血清成分を測定するまで -70℃で凍結保存した。血球成分では白血球数、好中球数は免疫関連項目として、Hb、Hct は脱水関連項目として測定した。血清成分は筋の変性・損傷状況を把握する目的で筋逸脱酵素 (AST、ALT、LDH、CK)、ストレス反応、炎症反応等を把握する目的で免疫関連指標である免疫グロブリン IgG、補体 C3 を測定した。

各検査項目の測定方法として、血球成分の全ての項目はシスメックス社の自動血球測定装置 (SysmexE-2100 and SE-9000、Kobe Japan) を用い測定した。また、各血清成分の測定方法はそれぞれ AST、ALT、LDH、CK : JSCC 標準化対応法、IgG、C3 : TIA (免疫比濁法)、であった。また、これらの値は、練習前後の体重、Hb、Hct の変化から脱水による影響を受けていたことが示唆されたため、前述した練習後の Plasma volume により脱水補正を行った。なお、本研究における各血液生化学検査の全ては、LSI メディエン

表 1. シーズン中の対象者の身体的特徴

	2 月 (シーズン前)	8 月 (シーズン中盤)	11 月 (シーズン終盤)
年齢 (歳)	25.0 ± 5.1	-	-
身長 (cm)	178.0 ± 6.3	-	-
練習前体重 (kg)	72.7 ± 7.0	71.4 ± 6.8 ††	72.1 ± 6.5 ‡
練習後体重 (kg)	72.0 ± 6.9 **	70.5 ± 6.5 **††	70.8 ± 6.5 **††
練習前体脂肪率 (%)	12.3 ± 2.6	10.7 ± 2.5 ††	11.8 ± 2.8 ††
練習前除脂肪量 (kg)	63.6 ± 5.0	63.7 ± 5.0	63.5 ± 5.1
練習前脂肪量 (kg)	9.1 ± 2.6	7.7 ± 2.3 ††	8.6 ± 2.5 ††

被験者=20, 平均値±標準偏差.

\*\* : p<0.01, 練習前後の比較.

†† : p<0.01, シーズン前との比較.

‡ : p<0.05, シーズン中盤との比較.

ス (旧三菱化学メディエンス) に委託し測定した。

#### 4. 好中球機能及び血清オプソニン化活性の測定方法

##### 好中球 ROS 産生量と PA の測定法

好中球 ROS 産生能と PA を FAC-Scan (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて two-color 法により測定した。

概略として、HE 試薬は、Hydroethidine 7mg を 1mL のジメチルアセトアミドで溶解し、さらに上記の内 10  $\mu$ L を PBS 5mL に加えて攪拌し、44.4  $\mu$ M に調整して作成した。全血 200  $\mu$ L と 44  $\mu$ L の HE 試薬を混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。そこから採取した 100  $\mu$ L に 25  $\mu$ L の 5 mg/mL の FITC-OZ 試薬を混合し、さらに 37°C で 35 分間インキュベートさせ、FITC-OZ を貪食させた。インキュベート終了後、各サンプルに溶血剤 1mL を加えよく混和し、赤血球の溶血を確認した後、固定剤 (Fixative; Polysciences Inc, Warrington, PA, USA) 250  $\mu$ L を注入し、5 分間静置した。アジ化ナトリウムを含む PBS にて 2 回遠心洗浄し、5% パラホルムアルデヒドを 50  $\mu$ L 注入したものをフローサイトメトリーの測定サンプルとした。なお、貪食量に関しては、測定する直前に 30  $\mu$ L の 0.25 mg/mL トリパンブルーを加えることにより、表面に付着し好中球に取り込まれていない FITC-OZ を除外した上で、蛍光強度を測定した。フローサイトメーターは、488 nm のアルゴンレーザーにより励起される蛍光色素 FL1 検出器 530 nm (緑色)、FL2 検出器 575 nm (赤色) を用いた。まず、前方散乱光と側方散乱光により好中球をゲーティングし、1 万個を収集した。その好中球の 1 万個当たりの蛍光色素、FITC (貪食能) と HE (ROS) の蛍光陽性細胞率 (%) と平均蛍光強度を乗じた累積蛍光強度 (CFI; Cumulative Fluorescence Intensity) により評価した。

##### SOA の測定法

化学発光法 (chemiluminescence : CL) は、ROS を感度よく検出するために有効である。本調査では化学発光剤として、ルシゲニン (bis-N-methylacridinium nitrate (Sigma, USA) : Lg) を用い血清オプソニン化活性を測定した。ルシゲニンは Hanks'balanced salt solution (HBSS) を加え、濃度が 0.5mM/L (pH 7.4) になるように調節した。

本調査では以下の方法によりオプソニン化ザイモザン (OZ) を作成した。Zymosan A (Sigma, USA) を 5 mg/mL の濃度で Hanks'balanced salt solution (HBSS) に懸濁し、塊を攪拌するために超音波処理を加えた。ザイモザン懸濁液 (5mg/mL) に対し、速やかに融解した被検者の血清を加え、37°C の温浴槽にて 30 分間振とうし、オプソニン化を行った。

基準となる好中球は 1 人の健常男性から採血し、MONO-POLY RESOLVING MEDIUM (Dainippon Pharmaceutical, Japan) によって好中球を分離し  $3.0 \times 10^3$  cells/ $\mu$ L になるように Hank's Balance salt solution (HBSS) に浮遊させた。化学発光の測定は 96 穴マイクロプレート (well capacity 400 $\mu$ L, Greiner Japan, Tokyo, Japan) を用い、この好中球浮遊液 50 $\mu$ L に対し、刺激物質としてオプソニン化ザイモザンを 50 $\mu$ L、さらに増感剤として 50 $\mu$ L のルシゲニンを加え、また HBSS を 100 $\mu$ L 加えた。最終濃度を 0.1mM、総量 250 $\mu$ L にして自動化学発光計測器 (Auto Luminescence Analyzer, Alfa system (Tokken, Funabashi, Japan)) にて測定した。全ての測定は 37°C の環境下で実施された。SOA の評価は、45 分間の発光曲線下面積を積分した Area under the curve (AUC) により行った。

#### 5. 統計解析

身体組成値、血液生化学検査、好中球機能および SOA の結果は、平均値±標準偏差で示した。練習前後の各項目の測定は Wilcoxon test にて解析した。シーズン間の多重比較は Tukey 法により検定した。また、シーズン別に血清オプソニン化活性と好中球機能の相関

表 2. シーズン中の被験者の 1 週単位のスケジュール

	10:00	14:00
月曜日	休養	休養
火曜日	フィジカルトレーニング ウォームアップ: 20 分 インターバルランニングと アジリティテスト: 30 分 クーリングダウン: 10 分	スキルトレーニング ウォームアップ: 20 分 スキルトレーニング (ボール) : 60 分 クーリングダウン: 10 分
水曜日	スキルトレーニング ウォームアップ: 20 分 スキルトレーニング (ボール) : 60 分 クーリングダウン: 10 分	休養
木曜日	スキルトレーニング ウォームアップ: 20 分 試合形式: 40 分 (20 分×2) クーリングダウン: 10 分	休養
金曜日	スキルトレーニング ウォームアップ: 20 分 スキルトレーニング (ボール) : 30 分 クーリングダウン: 10 分	休養
土曜日		試合 ウォームアップ: 20 分 試合: 90 分 (45 分×2) クーリングダウン: 10 分
日曜日	リカバリートレーニング ウォームアップ: 20 分 ジョギングまたはストレッチ: 15 分 クーリングダウン: 10 分	休養

ウォームアップとクールダウンはジョギングとストレッチにて構成  
アジリティテストは 150m のウィンドスプリント走をを 10 分ごとに行う

表 3. 測定日の 2 時間の運動負荷プログラム

内容	時間 (分)
ウォームアップ	15
35 メートルシャトルラン 6 セットとアジリティテスト	50
70m スプリント 3 セット	20
3200m ランニング	30
クーリングダウン	5

ウォームアップとクールダウンはジョギングとストレッチにて構成  
アジリティテストは 150m のウィンドスプリント走をを 10 分ごとに行う

関係を Spearman の順位相関係数により評価した。統計学的解析は、いずれの検定も SPSS Statistics 17.0 を利用し、 $p < 0.05$  で有意差あり、 $p < 0.1$  で傾向有りとした。

## 結果

表 1 は、本対象者の身体的特徴と練習前後の体重の変化を示している。体重はすべての調査時で練習前に比べ練習後に低下した (いずれも  $p < 0.01$ )。また、練習後の体重、体脂肪率、体脂肪量はシーズン前と比べてシーズン中盤および終盤で低下を示した (すべて

$p < 0.01$ )。また、シーズン中盤と比べてシーズン終盤で上昇した。

表 4 は、調査期間中の筋逸脱酵素値の変化を示している。AST、ALT、LDH、CK は全ての調査時で練習後に有意に上昇していた (すべて  $p < 0.01$ )。シーズン終盤の練習前後の AST、ALT、LDH、CK の変化率は、シーズン前やシーズン中盤の値に比べて有意に高い傾向にあった。

表 5 は調査期間中の白血球・好中球数、IgG、C3 の変化を示している。好中球数は全ての調査時で練習後に有意に上昇していた (いずれも  $p < 0.01$ )。シーズン



表 4. 筋逸脱酵素値の変化

	2 月 (シーズン前)		8 月 (シーズン中盤)		11 月 (シーズン終盤)	
AST (IU/L)						
練習前	25.6 ± 10.2		21.8 ± 6.7		21.5 ± 5.6	
練習後 <sup>a</sup>	29.2 ± 12.1	**	24.4 ± 7	**	28.2 ± 7.8	**
変化率 (%)	14.7 ± 18.6		12.2 ± 6.6		32.0 ± 14.5	††††
ALT (IU/L)						
練習前	24.2 ± 12.5		21.4 ± 8.7		22.1 ± 7.4	
練習後 <sup>a</sup>	26.1 ± 14.1	**	22.5 ± 8.9	**	24.5 ± 8.0	**
変化率 (%)	7.8 ± 8.3		5.7 ± 6.1		11.8 ± 8.4	†
CK (IU/L)						
練習前	261.9 ± 145.5		203.0 ± 103.2		182.6 ± 99.0	
練習後 <sup>a</sup>	338.5 ± 205.9	**	258.9 ± 120.6	**	303.2 ± 134.8	**
変化率 (%)	30.0 ± 20.3		28.5 ± 8.8		72.0 ± 31.8	††††
LDH (IU/L)						
練習前	224.8 ± 53.9		228.3 ± 30.6		202.1 ± 20.9	
練習後 <sup>a</sup>	250.7 ± 52.2	**	251.8 ± 32.1	**	266.5 ± 42.9	**
変化率 (%)	14.3 ± 20.6		10.6 ± 6.3		31.6 ± 14.3	††††

被験者=20, 平均値±標準偏差.

<sup>a</sup>: 血液濃縮により補正した値.

変化率=(練習後-練習前) × 100/練習前.

\*\* : p<0.01, 練習前後の比較.

† : p<0.05, †† : p<0.01, シーズン前との比較.

†† : p<0.01, シーズン中盤との比較.

表 5. 免疫細胞数、IgG、C3 の変化

	2 月 (シーズン前)		8 月 (シーズン中盤)		11 月 (シーズン終盤)	
白血球数 (μL)						
練習前	5120.0 ± 1016.0		5800.0 ± 1126.7		5545.0 ± 1056.5	
練習後 <sup>a</sup>	6097.6 ± 1461.5	*	5995.7 ± 1382.9		7395.6 ± 1566.9	**††
変化率 (%)	22.6 ± 34.2		6.1 ± 33.8		36.5 ± 35.5	†
好中球数 (μL)						
練習前	2576.9 ± 743.4		3034.9 ± 850.7		2835.5 ± 757.0	
練習後 <sup>a</sup>	3863.9 ± 1309.9	**	3975.8 ± 1425.2	**	5201.1 ± 1489.7	**††
変化率 (%)	61.2 ± 71.7		37.2 ± 68.0		93.4 ± 73.7	†
IgG (mg/dL)						
練習前	1167.5 ± 153.3		1188.7 ± 168.6		1208.5 ± 164.3	
練習後 <sup>a</sup>	1191.7 ± 181.5		1233.5 ± 198.2	**	1284.0 ± 189.6	**
変化率 (%)	2.1 ± 7.7		3.7 ± 5.5		6.3 ± 6.1	
C3 (mg/dL)						
練習前	100.6 ± 11.6		102.4 ± 14.4		102.6 ± 14.7	
練習後 <sup>a</sup>	99.9 ± 14.0		104.2 ± 14.5		105.2 ± 15.3	*
変化率 (%)	-0.8 ± 6.3		1.9 ± 4.1		2.5 ± 4.2	

被験者=20, 平均値±標準偏差.

<sup>a</sup>: 血液濃縮により補正した値.

変化率=(練習後-練習前) × 100/練習前.

\* : p<0.05, \*\* : p<0.01, 練習前後の比較.

† : p<0.05, シーズン前との比較.

†† : p<0.05, シーズン中盤との比較.

終盤の練習後の好中球数はシーズン前やシーズン中盤の値に比べて有意に高かった (いずれも p<0.05)。シーズン終盤の練習前後の好中球の変化率はシーズン前の値に比べて有意に高かった (p<0.05)。一方、IgG は

シーズン中盤とシーズン終盤において練習後に有意に上昇していた (いずれも p<0.01)。C3 はシーズン終盤において練習後に有意に上昇していた (p<0.05)。

表 6 は、調査期間中の好中球機能および血清オプソ

表 6. シーズン中に好中球の機能および血清オプソニン活性の変化

	2 月 (シーズン前)	8 月 (シーズン中盤)	11 月 (シーズン終盤)
ROS 産生量 (CFI)			
練習前	6464.7 ± 2648.7	7758.2 ± 4398.6	5385.2 ± 3168.1
練習後	10827.5 ± 6155.3 *	3517.1 ± 1902.8 **	2482.9 ± 2513.5 **
変化率 (%)	102.6 ± 167.3	-28.3 ± 68.0 ††	-42.1 ± 57.1 ††
PA (CFI) × 10 <sup>3</sup>			
練習前	104.9 ± 189.8	800.9 ± 321.8	191.5 ± 42.7
練習後	501.0 ± 216.0 **	797.8 ± 956.4	200.9 ± 44.9
変化率 (%)	17.8 ± 15.3	-2.9 ± 124.0 ††	7.6 ± 27.3 ††
LgCL・AUC (cpm) × 10 <sup>3</sup>			
練習前	1917.3 ± 787.4	383.3 ± 34.5	189.9 ± 22.8
練習後	1858.4 ± 720.5	448.6 ± 37.3 **	203.0 ± 30.0
変化率 (%)	-10.07 ± 56.5	18.5 ± 18.4	9.0 ± 24.3

被験者=20, 平均値±標準偏差.

ROS: 好中球活性酸素種, PA: 貪食能, LgCL: ルシゲニン依存化学発光応答, AUC: 濃度曲線下面積.

変化率= (練習後-練習前) × 100/練習前.

\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, 練習前後の比較.

††: p<0.01, シーズン前との比較.

表 7. シーズン中の好中球機能と血清オプソニン活性との相関

	2 月 (シーズン前)		8 月 (シーズン中盤)		11 月 (シーズン終盤)	
	LgCL・AUC (cpm)		LgCL・AUC (cpm)		LgCL・AUC (cpm)	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
ROS production (CFI)	-0.538	0.014	-0.391	0.088	0.325	0.162
PA (CFI)	0.316	0.175	0.141	0.552	0.129	0.587

ROS production: 好中球の活性酸素種の産生, PA: 好中球貪食能, LgCL: ルシゲニン依存化学発光応答, AUC: 濃度曲線下面積

ニン化活性の変化を示している。ROS 産生量は、シーズン前の練習後では有意に上昇していたが (p<0.05)、シーズン中盤とシーズン終盤においては練習後に有意な低下を示した (いずれも p<0.01)。また、ROS 産生量の変化率は、シーズン前に比べシーズン中盤とシーズン終盤の値が有意に低下していた (いずれも p<0.01)。

PA は、シーズン前の練習後では有意に上昇していたが (p<0.01)、シーズン中盤、シーズン終盤では有意な変化を示さなかった。また、PA の変化率は、シーズン前に比べシーズン中盤とシーズン終盤の値が有意に低下していた (いずれも p<0.01)。

一方、ルシゲニン依存性化学発光法による SOA は、シーズン中盤の練習後では練習後に有意に上昇し (p<0.01)、シーズン前とシーズン終盤では有意な変化は示さなかった。

表 7 は、各調査期の好中球機能の変化率と SOA の変化率の相関関係を示している。シーズン前では、ROS 産生量の変化率と SOA の変化率は有意な負の相関関係を示しているが (p=0.014)、シーズン中盤では負の相関傾向 (p=0.088)、シーズン終盤では相関関係を示さなかった。一方、PA の変化率は血清オプソニン化活性の変化率と全ての調査期において相関関係を示さな

かった。

## 考察

本研究では、好中球機能の挙動で男子プロサッカー選手のシーズン期間中の身体コンディショニングを把握する目的で、疲労が蓄積していないと考えられるシーズン前、疲労が蓄積してきたシーズン中盤、疲労していると考えられるシーズン終盤の計 3 回に各々一定の運動を負荷し、前後の好中球機能の変化を検討した。加えて、その際の好中球機能の動態と SOA の関係性を検討し、SOA による好中球機能推測の可能性を検討した。

筋逸脱酵素の増減は、その競技の練習量や強度を反映し、筋疲労の指標として有効であることが示されている<sup>21)</sup>。本結果では、全ての調査時の練習後に血清酵素値の有意な上昇が観察され、本対象者が 3 回の調査時に行った練習が常に彼らの筋組織を変性、損傷させるレベルの運動負荷であったことが示唆された。一方、練習を重ねるにつれ運動後の筋逸脱酵素値が減少し、練習に対する耐性ができることが指摘されている<sup>22,23)</sup>。しかし、本対象者でシーズン終盤の練習後の血清酵素値がシーズン前、中盤に比べ有意に高くなったことは、

約 10 ヶ月間のシーズン中の身体的ストレスが筋組織に慢性疲労をもたらした可能性を示唆するものであった。

運動により白血球の分画である好中球数が上昇することが明らかにされている<sup>14,24)</sup>。さらに、これらの上昇が運動により生じた筋組織の変性や損傷に対する炎症反応であると同時に運動そのものがストレスとなり、ストレスホルモンを介して引き起こされることが指摘されている<sup>25)</sup>。一方、本研究におけるこれらの練習に伴う変化率は、シーズン前、中盤に比べシーズン終盤に有意に高かった。すなわち、シーズン終盤は、生理的な疲労が回復しないまま積み重なって引き起こされる慢性疲労状態になり、同一運動負荷であっても練習による筋の変性、損傷とこれに伴い発現する炎症反応、ストレス反応の亢進が顕著となっていた可能性が考えられた。また、白血球数などと同様に、運動負荷に対する炎症反応、ストレス反応により免疫グロブリンや補体は亢進することが報告されており、本研究においても免疫グロブリンはシーズン中盤及びシーズン終盤において練習後に上昇し、補体はシーズン終盤において練習後有意に上昇した<sup>26)</sup>。

好中球の主な機能は、異物を取り込む食食と、細胞内顆粒の放出および膜における ROS 産生であり、競技選手のフィールド調査では、運動により ROS 産生能は、通常練習では亢進していることが多いが<sup>14,27)</sup>、競技会や疲弊するような高強度な運動後には低下することが観察されている<sup>17,18)</sup>。一方、食食能については、調整期の軽めの練習では亢進するが運動負荷レベルが中等度から重度の練習や競技会後には低下が観察されている<sup>13,14)</sup>。本調査においてシーズン前及び中盤では、両機能共に練習により上昇傾向がみられたが、シーズン終盤では低下傾向がみられた。本研究では 3 回の調査時に負荷した運動は全て同じ内容であり、シーズン進行に伴う身体的コンディションの変化により、各調査時の好中球機能の挙動に違いが生じたと考えられた。我々の研究により、1 日に 2 試合組まれた選手の好中球機能が、最初の試合後には亢進を示したが、次の試合後には低下を示し、その要因は、疲労の蓄積に伴うコンディションの悪化であると報告している<sup>18)</sup>。したがって、本結果でシーズン前、中盤と同様の運動が負荷されたにも関わらずシーズン後の運動負荷後のみこれが低下したことは、シーズン後の本対象者に著しい身体疲労が発現、蓄積し、運動負荷に対しこの機能が適切に反応できない、あるいは機能不全を起こしていた可能性を示唆していた<sup>13)</sup>。一方、競技選手における運動と SOA との関係について調査した研究では、通常練習では低下、上昇、変化無しなど様々であるが、競技会や高強度な練習後には上昇し、疲労したコンデ

ィションでは変化無しとなる可能性が報告されている<sup>18,20,28)</sup>。本調査においても、シーズン前、中盤、終盤の各々において、練習後の血清オプソニン化活性は変化無し、上昇、変化無しを示していた。

以上より、シーズン中盤から終盤におけるコンディショニング（練習と休息のバランスとその方法）及び感染症などの健康障害対策が必要と考えられた。

我々の研究室では、様々なスポーツのフィールド調査で全血中での好中球機能測定と同時に採取血清より SOA を測定し、これらの関係について言及してきた。すなわち、通常練習期から強化合宿前そして合宿後まで選手を追跡した調査において、通常練習期や合宿前の練習前後では ROS 産生能は亢進するが、合宿後には低下を示し、一方、SOA はこれとほぼ反対の挙動を示すことを報告した。さらに Mochida らは、追跡期間中の ROS 産生能と SOA の挙動変化の推移は負の相関関係を示し、好中球の諸機能が互いに補完的に働く可能性を提示した<sup>20)</sup>。本研究はこの Mochida らの研究を検証する意味を持っているが、本結果では、シーズン前において SOA は ROS 産生能と負の相関関係を示したが、中盤では相関傾向であり、終盤では有意な関係がみられなかった。すなわち、身体的疲労の蓄積が全くないシーズン前やこれが顕著ではない中盤では、対象者の身体的コンディションは良好なため、負荷された運動に対する ROS 産生能の挙動に対して SOA が補完的に働き、相関関係がみられたと考えられた。しかし、終盤では、期間中の好中球利用増加に伴う細胞のターンオーバーの促進により、活性化していない未成熟な好中球（ROS 産生能が低い）が循環血中に動員されたために相関関係が打ち消された可能性が推測された<sup>29,30)</sup>。

本研究では 3 回の調査時に負荷した運動は全て同じ内容であり、シーズン前は ROS 産生能も PA もともに上昇傾向を示しており通常練習レベルと考えられる。したがって、身体的コンディションの良好な時期において軽一中等度の運動負荷レベルの運動では、SOA の挙動は ROS 産生能および PA の挙動と相関するため、好中球機能の変動を血清オプソニン化活性によって評価できると考えられた。しかし、身体的コンディションの悪化や運動負荷レベルの増大に伴って、SOA による好中球機能の評価はできなくなる可能性が考えられた。

Mochida らによる研究結果と本研究結果には相違がみられたが、これは性差（Mochida らは女性選手、本研究は男子選手）、スポーツ競技の差（Mochida らは柔道、本研究はサッカー）、期間の差（Mochida らは約 2 か月の強化合宿、本研究は 10 か月のシーズン中）、あるいはそれらに関連した運動強度の差に拠るものかも

れない。さらに、Mochida らによる研究では、合宿全期間中の ROS 産生能、PA、SOA の挙動変化の推移の相関を検討しており、今回のように期別の検討は行われていない。SOA の有用性については今後さらに多くの場面での検証が必要である。

(受稿 2015/11/21 受理 2015/12/24)

## 謝辞

終始熱心なご指導を頂いた中路重之教授、高橋一平准教授、名城大学梅田孝教授に感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、ご支援を頂きました、弘前大学大学院医学研究科社会医学講座の皆様、そして、本研究に参加をしていただきました、湘南ベルマーレの皆様にご心より感謝申し上げます。

## 文献

- 1) Matthews CE, Ockene IS, Freedson PS, Rosal MC, Merriam PA, Hebert JR: Moderate to vigorous physical activity and risk of upper-respiratory tract infection. *Med Sci Sports Exerc* 2002;34:1242-8.
- 2) Yang X, Telama R, Hirvensalo M, Mattsson N, Viikari JS, Raitakari OT: The longitudinal effects of physical activity history on metabolic syndrome. *Med Sci Sports Exerc* 2008;40:1424-31.
- 3) Shephard RJ, Kavanagh T, Mertens DJ, Qureshi S, Clark M: Personal health benefits of masters athletics competition. *Br J Sports Med* 1995;29:35-40.
- 4) Nieman DC: Exercise, upper respiratory tract infection, and the immune system. *Med Sci Sports Exerc* 1994;26:128-39.
- 5) Pedersen BK, Bruunsgaard H: How physical exercise influences the establishment of infections. *Sports Med* 1995;19:393-400.
- 6) Nieman DC, Pedersen BK: Exercise and Immune Function. *Sports Med* 1999;27:73-80.
- 7) Mackinnon LT: Chronic exercise training effects on immune function. *Med Sci Sports Exerc* 2000;32:S369-76.
- 8) Smith LL: Overtraining, Excessive Exercise, and Altered Immunity. *Sports Med* 2003;33:347-64.
- 9) Greeson M: Immune function in sport and exercise. *J Appl Physiol* 2007;103:693-9.
- 10) Franklin CC, Weiss JM: Stopping sports injuries in kids: an overview of the last year in publications. *Curr Opin Pediatr* 2012;24:64-7.
- 11) Carfagno DG1, Hendrix JC 3<sup>rd</sup>: Overtraining syndrome in the athlete: current clinical practice. *Curr Sports Med Rep* 2014;13:45-51.
- 12) Silva MT: Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. *J Leukoc Biol* 2010;87:805-13.
- 13) Suda Y, Umeda T, Watanabe K, Kuroiwa J, Sasaki E, Tsukamoto T, Takahashi I, et al: Changes in neutrophil functions during a 10-month soccer season and their effects on the physical condition of professional Japanese soccer players. *Luminescence* 2013;28:121-8.
- 14) Umeda T, Yamai K, Takahashi I, Kojima A, Yamamoto Y, Tanabe M, Totsuka M, et al: The effects of a two-hour judo training session on the neutrophil immune functions in university judoists. *Luminescence* 2008;23:49-53.
- 15) Yamamoto Y, Nakaji S, Umeda T, Matsuzaka M, Takahashi I, Tanabe M, Danjo K, et al: Effects of long-term training on neutrophil function in male university judoists. *Br J Sports Med* 2008;42:255-9.
- 16) Chinda D, Nakaji S, Umeda T, Shimoyama T, Kurakake S, Okamura N, Kumae T, et al: A competitive marathon race decreases neutrophil functions in athletes. *Luminescence* 2003;18:324-9.
- 17) Suzuki M, Umeda T, Nakaji S, Shimoyama T, Mashiko T, Sugawara K: Effect of incorporating low intensity exercise into the recovery period after a rugby match. *Br J Sports Med* 2004;38:436-40.
- 18) Takahashi I, Umeda T, Mashiko T, Chinda D, Oyama T, Sugawara K, Nakaji S: Effects of rugby sevens matches on human neutrophil-related non-specific immunity. *Br J Sports Med* 2007;41:13-8.
- 19) Saito D, Nakaji S, Umeda T, Kurakake S, Danjo K, Shimoyama T, Sugawara K: Effects of long-distance running on serum opsonic activity measured by chemiluminescence. *Luminescence* 2003;18:122-4.
- 20) Mochida N, Umeda T, Yamamoto Y, Tanabe M, Kojima A, Sugawara K, Nakaji S: The main neutrophil and neutrophil-related functions may compensate for each other following exercise-a finding from training in university judoists. *Luminescence* 2007;22:20-8.
- 21) Pedersen BK: Exercise immunology. 1st ed., New York:Springer,1997:89-111.
- 22) Nosaka K, Clarkson PM: Muscle damage following

- repeated bouts of high force eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 1995;27:1263-9.
- 23) Clarkson PM, Nosaka K, Braun B: Muscle function after exercise-induced muscle damage and rapid adaptation. *Med Sci Sports Exerc* 1992;24:512-20.
- 24) Gabriel H, Schwarz L, Born P, Kindermann W: Differential mobilization of leucocyte and lymphocyte subpopulations into the circulation during endurance exercise. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol* 1992;65:529-34.
- 25) Pedersen BK, Kappel M, Klokke M: Possible role of stress hormones in exercise-induced immunomodulation. Pedersen BK, ed. *Exercise and immunology*. New York: Springer, 1997:39-60.
- 26) Kumae T, Kurakake S, Machida K, Sugawara, K: Effect of training on physical exercise-induced changes in non-specific humoral immunity. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 1994;43:75-83.
- 27) Umeda T, Saito K, Matsuzaka M, Nakaji S, Totsuka M, Okumura T, Tsukamoto T, et al: Effects of a bout of traditional and original sumo training on neutrophil immune function in amateur university sumo wrestlers. *Luminescence* 2008;23:115-20.
- 28) Miura M, Umeda T, Nakaji S, Liu Q, Tanabe M, Kojima A, Yamamoto Y, et al: Effect of 6 months' training on the reactive oxygen species production capacity of neutrophils and serum opsonic activity in judoists. *Luminescence* 2005;20:1-7.
- 29) Robson-Ansley PJ, Blannin A, Greeson M: Elevated plasma interleukin-6 levels in trained male triathletes following an acute period of intense interval training. *Eur J Appl Physiol* 2007;99:353-60.
- 30) Yang KD, Hill HR: Neutrophil function disorders: pathophysiology, prevention, and therapy. *J Pediatr* 1991;119:343-54.

## Can Serum Opsonic Activity Predict the Change in Neutrophil Functions in Professional Soccer Players?

Teruaki KOMURO<sup>1,2</sup>, Ippei TAKAHASHI<sup>1</sup>, Takashi UMEDA<sup>3</sup>, Katsuro YONEDA<sup>3</sup>, Satoshi SATO<sup>1</sup>, Mitsuhiro TANAKA<sup>4</sup>, Itoyo TOKUDA<sup>5</sup>, Ken OOHATA<sup>1,6</sup>, Yuka OONUMA<sup>1,7</sup>, Shigeyuki NAKAJI<sup>1</sup>.

- 1 Department of Social Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine
- 2 Kyoto Sangyo University
- 3 Meijo University
- 4 Meiji University
- 5 Hirosaki University of Health and Welfare

The validity of serum opsonic activity (SOA) to evaluate changes of neutrophil functions during professional soccer training was investigated. Subjects were 20 male professional soccer players. The same training session was carried out at three points pre-, during and post-tournament season. At each point, data on body composition parameters, blood biochemistry parameters, neutrophil functions (reactive oxygen species (ROS) production and phagocytic activity (PA)) and SOA were collected before and after the same training session. In terms of the relationship between changing rates of ROS production and PA, and SOA, significant negative correlation was observed between the changing rate of ROS production and SOA pre-tournament season, whereas it showed non-significant negative correlation during the tournament season, and no correlation post-tournament season. The changing rate of total PA was not correlated with the changing rate of SOA in all investigation points. Therefore, determination of SOA was considered valid when evaluating changes in neutrophil functions, only when players with good physical condition carry out light to medium level of physical exercise. However, it was suggested to become invalid with increasing amount of physical exercise that may affect players' physical conditions.

**Key words;** serum opsonic activity, neutrophil, reactive oxygen species, phagocytosis, soccer players

別刷請求先：高橋一平

〒036-8562 青森県弘前市在府町5 弘前大学大学院医学研究科社会医学講座

TEL: 0172-39-5041

FAX: 0172-39-5038

e-mail: ippei@hirosaki-u.ac.jp