

# 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 明治大学人文科学研究所 公開日: 2013-05-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 鈴井, 正敏 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10291/14262">http://hdl.handle.net/10291/14262</a>

強いトレーニングにおける自律神経の変動と  
NK細胞機能の関係について

鈴 井 正 敏

## Relationship between autonomic nerve activity and NK cell during intensive training

SUZUI Masatoshi

**PURPOSE:** Neutrophil and lymphocyte counts in the peripheral blood show opposite circadian patterns. These reflect corresponding changes in sympathetic and parasympathetic nerve activities, respectively. Natural killer (NK) cell strongly response to noradrenaline that is main neurotransmitter from sympathetic nerve during acute exercise. In this study, we measured heart rate variability (HRV) and peripheral blood adrenaline, noradrenaline concentrations, neutrophil and helper T cell, cytotoxic T cell and NK cell concentrations and cytotoxic activities (NKCA), to determine the relationships between autonomic nerve activity, catecholamine concentrations and neutrophils and lymphocyte subset distributions and NKCA. We also investigated the effects of intensive training on these interactions.

**METHODS:** Eight college-level female volleyball players undertook one-month of heavy pre-season training. Volleyball drills were performed 5 h/day, 6 days per week. Four morning resting blood samples were taken pre-training (PRE), on the 10th day of training (DURING), one day before the end of training (END) and one week after training (POST). Before each blood sample was collected, R-R intervals were measured with the subjects in a sitting position. Regression analyses were applied to determine the relationship between HRV, catecholamine concentrations, leukocyte subset counts and NKCA at each sampling time.

**RESULTS:** Circulating neutrophil and total lymphocyte counts remained unaltered throughout the experiment, except for previously reported changes in a small subset of NK cells (CD56<sup>bright</sup> NK cells) with decreased cytotoxicity. Peripheral blood concentrations of adrenaline and noradrenaline also remained unaltered. The HRV data indicated no changes in the natural log transformed (ln) high-frequency (HF) domain or low-frequency/HF domains (LF/HF). Neutrophil concentrations correlated positively with ln-LF/HF at PRE ( $r=0.840$ ,  $p=0.009$ ) and DURING ( $r=0.804$ ,  $p=0.016$ ). They also showed negative correlation with ln-HF at DURING ( $r=0.873$ ,  $p=0.005$ ). Lymphocyte concentrations correlated positively with ln-LF/HF ( $r=0.722$ ,  $p=0.043$ ) at PRE. These significant relationships were not seen after END. Total lymphocyte ( $p=0.021$ ), CD4 T cell ( $p=0.014$ ) and CD56<sup>dim</sup> NK cell ( $p=0.012$ ) concentrations showed significant correlations with adrenaline concentration at PRE.

**CONCLUSION:** The results suggest that neutrophil and lymphocyte distributions are regulated by

sympathetic nerve activity and that one-month of intensive training affects this relationship. While, there were no clear relationship between NK cell functions and autonomic nerve activities.

## 《個人研究第1種》

強いトレーニングにおける自律神経の変動と  
NK細胞機能の関係について

鈴井正敏

## I. はじめに

ナチュラルキラー（NK）細胞は生体内ではがん化やウイルス感染により変性した細胞を傷害するため、生体防御の最前線の役割を果たしていると考えられている。また、白血球分画のなかでも非常に反応性が高い細胞であり、心理的・生理的なさまざまなストレスに対して濃度や活性が変化する<sup>(24), (44)</sup>。身体的ストレスのひとつである運動に対しても同様で、一過性運動への反応は好中球とともに顕著な変化を示す。さらに、オーバートレーニングや一過性の激しい運動の後には傷害活性が低下することにより、上気道感染などへの感染率が増加する疑いがある<sup>(38), (43)</sup>。これに対し、比較的軽度な強度によるトレーニングではNK細胞傷害活性が増加し、上気道感染の感染率が低くなるという報告がある<sup>(39)</sup>。

筆者らの研究グループでは、これまで、強いトレーニングを1ヶ月間行った場合のNK細胞機能を検討してきた。その結果、強いトレーニングの終了時には主要なNK細胞分画で強い傷害活性を有するCD56<sup>dim</sup>NK細胞の濃度に変化はないが、傷害活性はトレーニング前に比べて低下することを報告している<sup>(52)</sup>。このとき、細胞当たりの傷害活性の指標であるlytic units（個々の細胞の活性）は低下することを明らかにしている。また、この低下には、NK細胞の分画で傷害活性が低いCD56<sup>bright</sup>NK細胞の増加が関与していることが疑われた。つまり、強いトレーニングは細胞分画の変化をもたらすこと、加えて細胞のターンオーバーを促進させ、未成熟な細胞の比率を増加させる可能性を示した。

競技スポーツでは長期の強化合宿（トレーニング）はよく行われる。そのようなハードな練習環境の中では逆にオーバートレーニングやオーバーリーチングといわれるディコンディショニングが生じることもある<sup>(7), (9), (14), (21), (22), (26), (27)</sup>。これはやる気の喪失をともなうパフォーマンスの低下であり、トレーニングによってパフォーマンスを上げたい競技者やコーチにおいてジレンマとなっている。とくにトップアスリートにおいては効果的なトレーニング強度とオーバートレーニングの境は紙一重であり、トレーニング条件の設定はセンシティブな問題となる。前述のNK細胞傷害活性の低下はディ

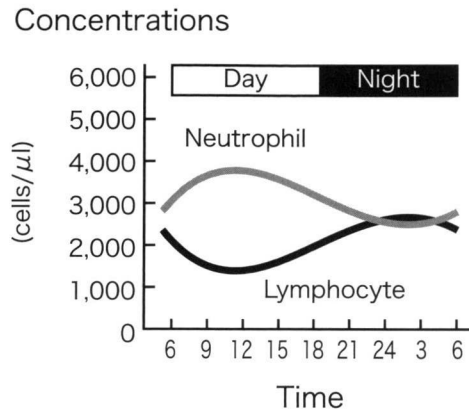


Figure 1. Circadian Rhythm Leukocyte Subsets Concentrations<sup>(1),(48)</sup>

コンディショニングの一面を表していると考えてよい。もしもこのような悪い変化の予兆となる指標があれば、競技者の体調管理を効率的に行うことができる。上述の免疫学的指標は直接的であり、その意味で有用であるが、測定するための機器や高額な費用がかかり、限られた環境でしか可能ではない。また、現場の状態を考えると時間的にも現実的ではない。

一方、このような免疫機能を調節する白血球の動態は自律神経の支配を受けていることが報告されている<sup>(1),(30),(56)</sup>。自律神経には生体の活性化を促す交感神経と休息の指令を出す副交感神経があり、この二つの神経系のバランスによって体内のホメオステシスが維持されている。細胞内に顆粒を含む好中球は病原に対して最初に対応する自然免疫の細胞であるが、この細胞の安静動態には交感神経が関係している。これに対して、獲得免疫の中心的役割を果たしているリンパ球の動態には副交感神経が関与している (Figure 1)。自律神経の状態を直接的に把握する方法も免疫指標と同じく限られた環境でしかできない。しかし、心拍数の変動から推定できることが示されている<sup>(3),(6),(12),(15),(25),(33),(34),(35),(36),(37),(40),(47),(55),(60)</sup>。心臓は自動性を有する臓器であるが、自律神経の活動によって拍動数を変動させる (Figure 2)。安静時の心拍数は見かけ上一定のように見えるが、実際には心拍の間隔 (R-R) にはゆらぎが存在する。このゆらぎを周波数解析することで高周波成分 (HF) と低周波成分 (LF) に分解することができる。HFには副交感神経の活動が、LFには交感神経と副交感神経の活動を合わせたものが反映されている。したがって、HFはそのまま副交感神経の指標とし、LFをHFで除した LF/HFを交感神経の指標とすることができる。この方法はR-R間隔を測定するだけで比較的簡単に行うことができるので、ストレスの測定や心機能評価など幅広い分野で利用されている。

以上のことから、本研究ではNK細胞を含む免疫細胞の動態と心拍変動を利用した自律神経の変動の関係およびその関係におよぼすトレーニングの影響を検討することにした (Figure 3)。

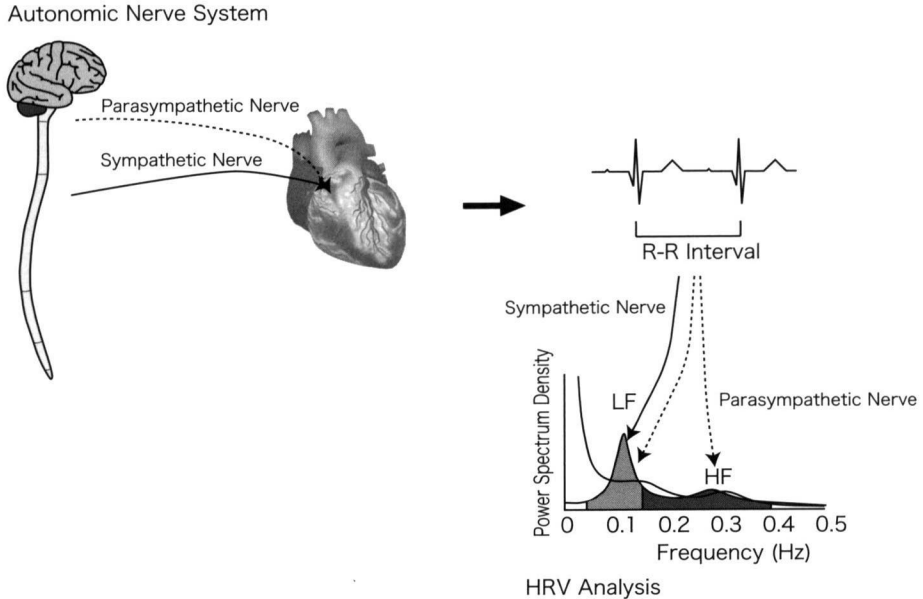


Figure 2. Relationships Between Autonomic Nerve Activity and HRV<sup>(15),(47)</sup>

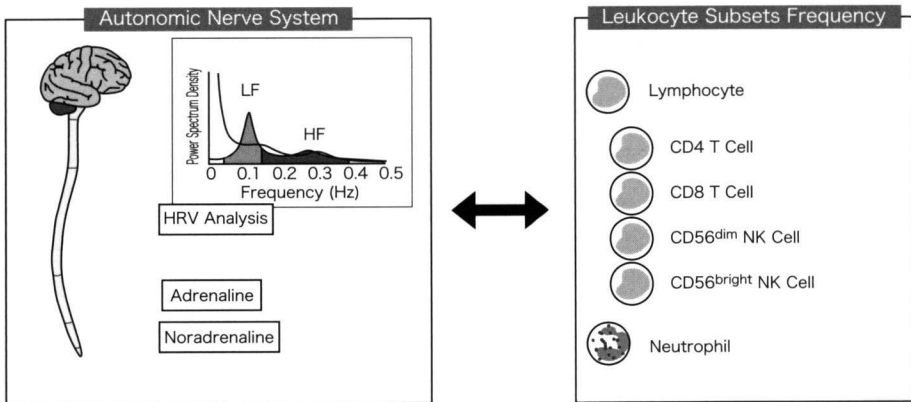


Figure 3. Relationship Between Autonomic Nerve Activity Index and Leukocyte Subsets Frequency.

## II. 研究方法

### 1. 被検者

被検者は大学バレーボール部に所属する健康な女性8名（年齢  $20.1 \pm 0.4$ （平均  $\pm$  標準誤差）歳；身長  $1.69 \pm 0.01$ m；体重  $62.6 \pm 2.3$ kg；体脂肪率  $27.2 \pm 1.4\%$ ；安静時心拍数  $60 \pm 2$  beats  $\cdot$  min<sup>-1</sup>；安静時収縮期血圧  $112 \pm 4$  mmHg；安静時拡張期血圧  $70 \pm 3$  mmHg）とした。すべての被検者に対して予め実験内容と実験に伴う危険性を説明した後、同意書に署名を得た。

## 2. トレーニング

夏休みに行く強化合宿をトレーニング期間として設定した。このトレーニング（強化合宿）では通常の練習の約2倍の練習時間となる一日5時間の練習を週6回、一ヶ月間継続して行った（Figure 4）。

トレーニング期間および、その前後の練習環境は以下の通りである。

チームは3月のはじめより練習に入り、4月中旬より5月下旬まで春季リーグ戦が行われた。その後、6月末の東日本大会までが前期の通常練習期間である。東日本大会終了後から8月のはじめまで前期試験のため個人練習期間となる。通常練習では約2時間30分にわたり、バレーボールの練習を行う。個人練習では軽いジョギングやストレッチなどの運動を行った。8月のはじめより9月初旬まで秋季リーグ戦のための合宿形式をとった集中トレーニングを1ヶ月間行った。この期間の練習量は通常練習の2倍の練習時間（午前2時間30分、午後2時間30分）が設定された。本研究ではこの期間をトレーニング期間として設定した。9月中旬から秋季リーグ戦が開始される。合宿トレーニングから秋季リーグ戦の間は練習量を通常練習よりも少なくし、テーパリングを行い、コンディションを整えた。その後は通常練習を行った。

## 3. 採血と身体的特性の測定

採血はコントロールとして東日本大会後の7月7日に第1回目（トレーニング前：PRE）を行い、第2回目は集中合宿トレーニング（8月3日～9月2日）開始8日目の8月10日（トレーニング中：DURING）に、第3回目はトレーニング終了直前の9月1日（トレーニング終了時：END）に、第4回目は回復期としてトレーニングが終了して1週間がたったテーパリング期間の9月10日（トレーニング後：POST）に行った（Figure 4）。被験者は午前8時に集まり、その日の体調について報告した。その後、体重、体脂肪率、血圧、心拍数を検査し、坐位にて前腕静脈より採血を行った。被検者には測定前日午後9時より、飲食、飲酒、薬剤の摂取をしないように指示した。全ての採血は同一時間に、気温20-25℃、湿度50-60%の環境で行った。

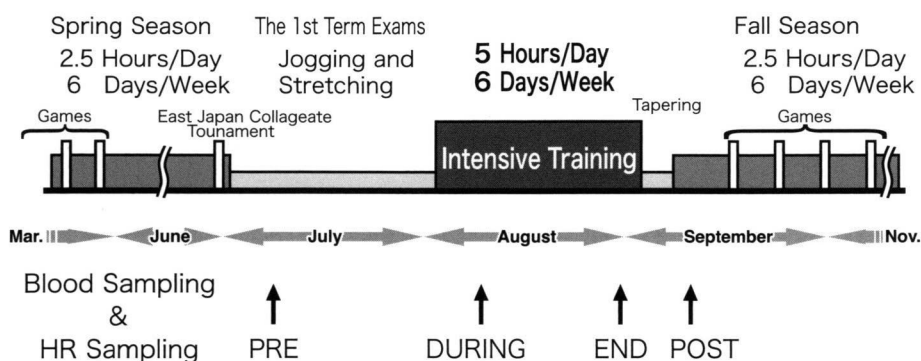


Figure 4. Experimental Protocol



#### 4. 血液分析

##### (1) 末梢血単核球 (PBMC) の分離

末梢血単核球 (PBMC) はヘパリン添加した血液をリン酸緩衝液 (phosphate buffered solution, PBS, 除Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, GIBCO) で1:1に希釈し, リンパ球分離液 (セパレートL, MUTO PURE CHEMICALS) 上に重層し, 密度勾配を利用した遠心分離 (400G, 30分間, Low Brake, 室温) により採取した。PBMCは10% FCS, ペニシリン (100IU/mL) 及びストレプトマイシン (100mg/mL) 添加のRPMI-1640 (Complete Medium, GIBCO) 中に4℃で測定まで保存した。

##### (2) 白血球およびリンパ球分画

総白血球数, および, リンパ球, 好中球比率はethylenediamine tetra-acetate (EDTA) で処理した血液2 mLを用いて, 全自動血球計測器 (Sysmex NE8000, Toa Medical Electronics Corp., Kobe) で測定した。リンパ球分画はPBMC (1×10<sup>6</sup>) をfluorescein isothiocyanate (FITC)-FL1, phycoerythrin (PE)-FL2, peridinin-chlorophyll (PerCP)-FL3の3カラーのモノクローラル抗体 (Becton Dickinson) により染色し, フローサイトメーター (FACScalibur, Becton Dickinson) およびコントロールソフト CellQuest (Becton Dickinson) を用いて, リンパ球ゲート内の蛍光度から決定した。ヘルパーT細胞 (CD4 T細胞) はCD (cluster of differentiation) 分類によるCD3+CD4+細胞とし, キラーT細胞 (CD8 T細胞) はCD3+CD8+細胞, NK細胞はCD3-CD16+CD56+細胞とした。NK細胞はさらにCD56の発現の強さでCD56dimNK細胞とCD56brightNK細胞に分類した。これらの細胞はすべてリンパ球ゲート内の比率で求め, その濃度はリンパ球中における比率と総リンパ球濃度を乗じた値とした。

##### (3) NK細胞活性<sup>(2), (16), (20), (41), (54)</sup>

NK細胞活性はPBMCをエフェクターとしてユーロピウム (Eu) でラベルした慢性骨髄性白血病腫瘍細胞 (K562) のターゲットを傷害する程度をアーカス蛍光光度計 (<sup>1251</sup>Delphia fluorometer, Pharmacia) で測定した<sup>(32)</sup>。対数増殖期のK562 (5×10<sup>6</sup>個) の細胞膜にユーロピウムをキレート結合させ, 細胞数を1×10<sup>5</sup>/mLに調製し, これをターゲット細胞として使用した。エフェクター細胞は2×10<sup>6</sup>/mLに濃度調整したPBMCを用い, ターゲット細胞浮遊液100mLに対して細胞数でエフェクター: ターゲット (E: T) 比が20: 1, 10: 1, 5: 1になるようにComplete Mediumで希釈分注した。Spontaneous release用にターゲット細胞だけのものとmaximum release用としてターゲット細胞に10% Triton X 100を加えたものも設定した。1,000rpmで1分間遠心し, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>で2時間恒温保存した後, 上清20μLを採取して, 96wells平底プレートに分注した。これにEnhancement solution (Pharmacia) 100μLを加え, ユーロピウムの遊離度をアーカス蛍光光度計で測定した。%細胞傷害性を以下の式で算出し, NK細胞活性とした。測定は三重検定で行なった。

$$\%細胞傷害性 = (\text{実験解離値} - \text{自然解離値}) / (\text{最大解離値} - \text{自然解離値}) \times 100$$

実験解離値: 各wellにおけるEuの遊離

最大解離値: maximum releaseによるEuの遊離

自然解離値: spontaneous releaseによるEuの遊離

つぎに, 単一NK細胞当たりの細胞傷害活性 (LU: Lytic Units / NK cell) を計算によって求め

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

た<sup>(8), (42)</sup>。今回は $10^4$ 個のターゲット細胞の15%を傷害するE:T比を片対数グラフ（X軸を対数表示でE:T比, Y軸を傷害活性）より判断し、そのときの末梢血単核球 $10^6$ 個当たりの傷害できるターゲットの数を推定し、さらにそれを末梢血単核球 $10^6$ 個当たりに含まれるNK細胞比率で除することによって算出した。算出式を以下に示す。

$$\text{Lytic Units (15\%)/NK} \times 10^{-5} = \text{Lytic Units}/[\% \text{NK cells} \times (1 \times 10^6 \text{ PBMC})]$$

なお、NK細胞活性および免疫学的解析は全て順天堂大学医学部免疫学教室（奥村康教授）にて行った。

### (4) カテコールアミン

血漿アドレナリン、ノルアドレナリン濃度は高速高速（高感度、高分解）液体クロマトグラフィー（HPLC：High Performance Liquid Chromatography）法により測定した。

## 5. 心拍数の測定と心拍変動の評価

心拍数は各タイムポイントの採血前に座位安静の状態、ポラール社製心拍計（Vantage NV）を用いて測定した。測定間隔は一拍毎（R-R）とし、4秒に一回の呼吸（15回/分）をくり返すように指示した。各被験者において300拍前後のデータを記録した。測定したR-RはPolar Precision Performance SW（Polar, Finland）にてテキスト出力し、インターネット上の心拍変動解析ソフトHRV Analysis Software, Ver. 1.1（The Biomedical Signal Analysis Group, Department of Applied Physics, University of Kuopio, Finland）<sup>(40)</sup>を利用して解析を行った。なお、HRV Analysis Softwareの利用に際しては予め作成者の承認を得た。

HRV Analysis Softwareは高速フーリエ変換を元にしたWelch's Periodogram<sup>(59)</sup>を利用したものである。本研究ではこのプログラムに内蔵されている漸近線モデルによってパワーを算出した。スペクトラム評価は測定開始直後を除く安定して連続する256拍を選択し、超低周波成分（VLF：0～0.04Hz）、低周波成分（LF：0.04～0.15Hz）と高周波成分（HF：0.15～0.4Hz）の3つの周波数帯に分解して行った。なお、時系列データ作成のための再サンプリングレートは2 Hzに設定した。算出したパワーのうちHFを副交感神経、LF/HFを交感神経の指標とした。これらの指標は分布の正規性を得るために対数変換（ln：natural log transformed）して利用した。

## 6. データ分析

データは表計算ソフトエクセル（Office 2008, マイクロソフト）を利用して整理した。結果は個人値または平均値および標準誤差で示した。統計分析にはStatView-J5.0（Abacus, CA, USA）を利用し、統計的有意は $p < 0.05$ とした。経時的な変化はone-factor ANOVAで検討し、さらに、個別のサンプリングタイム間の差はBonferroni's post hoc testを行った。各タイムポイントにおける2要因の関係は相関分析によって検討した。

## II. 結果

### 1. 白血球分画の変化 (Figure 5)

好中球, 総リンパ球, CD4 T細胞, CD8 T細胞, CD56<sup>dim</sup>NK細胞, CD56<sup>bright</sup>NK細胞の血中濃度の個人的な変化をFigure 5に示した。統計的に変化があったのはCD56<sup>bright</sup>NK細胞濃度だけで, ENDで有意に増加 ( $p < 0.001$ ) した。

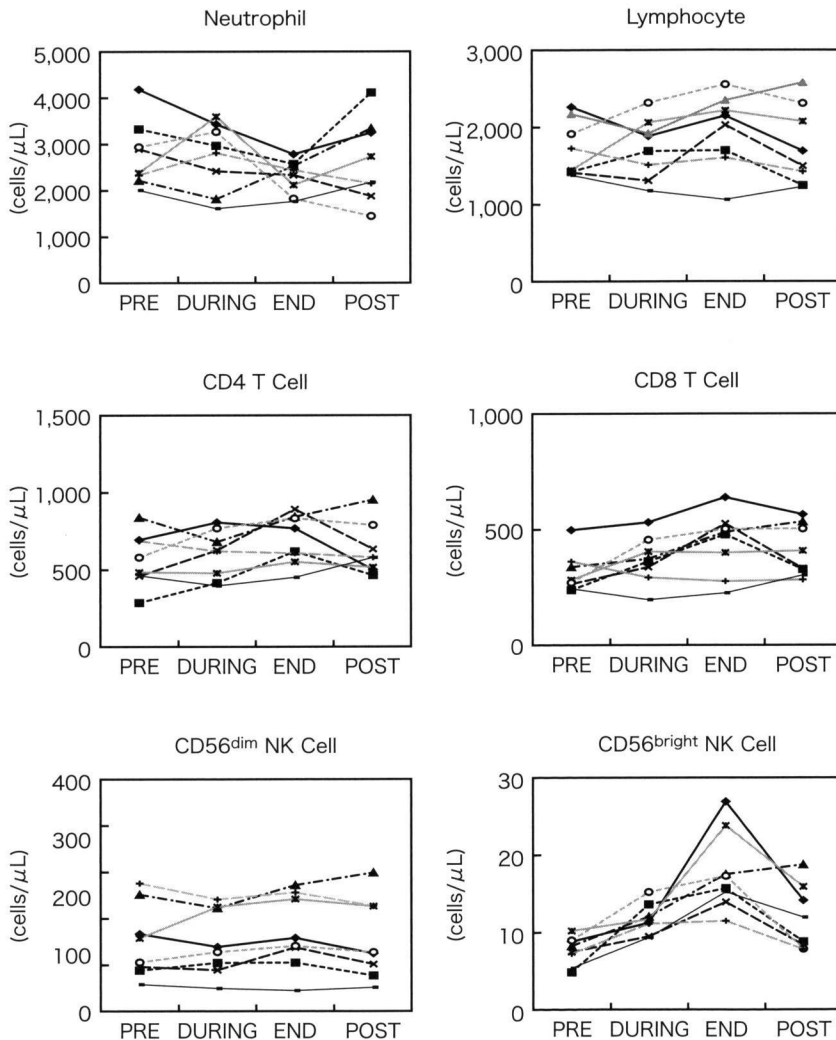


Figure 5. Individual changes in leukocyte subsets frequency during and post intensive training. There was significant change in CD56<sup>bright</sup>NK cell at END ( $p < 0.001$ )

## 2. 心拍変動の変化 (Figure 6)

交感神経の活動指標であるLF/HFと副交感神経の活動指標であるHFの個人的な変化をFigure 6に示した。どちらも実験を通して有意な変化はみられなかった。

## 3. NK細胞活性の変化 (Figure 7)

総NK細胞活性と細胞当たりの傷害活性であるLUの個人的な変化をFigure 7に示した。総NK細胞活性はENDに低下し ( $p=0.002$ )、POSTにはトレーニング前との差が見られなくなった (図8)。LUも同様にENDに有意な低下 ( $p=0.008$ ) が見られた。

## 4. カテコールアミン濃度の変化 (Figure 8)

血漿アドレナリン濃度とノルアドレナリン濃度の個人的な変化をFigure 8に示した。個人的な変動は見られるものの、どちらも実験を通して統計的に有意な変化はみられなかった。

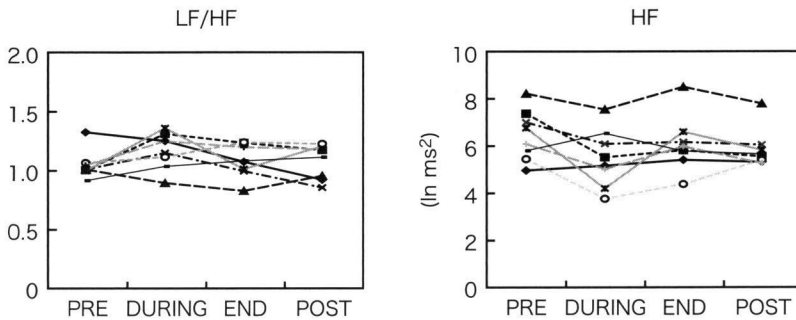


Figure 6. Individual changes in HRV during and post intensive training. There were no significant changes.

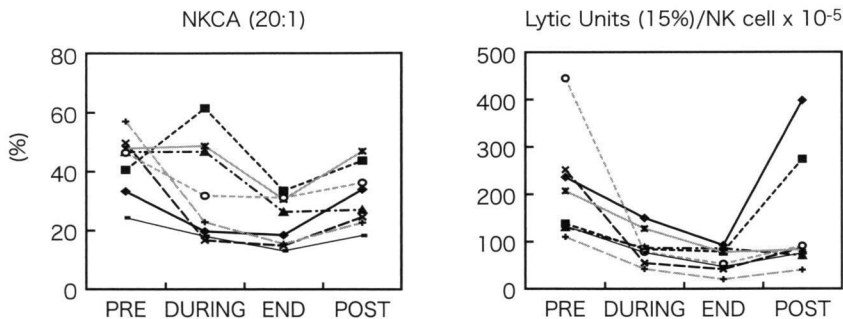


Figure 7. Individual changes in total and per NK cell cytotoxicity during and post intensive training. There were significant changes in NKCA ( $p=0.002$ ) and LU ( $p=0.008$ ) at END

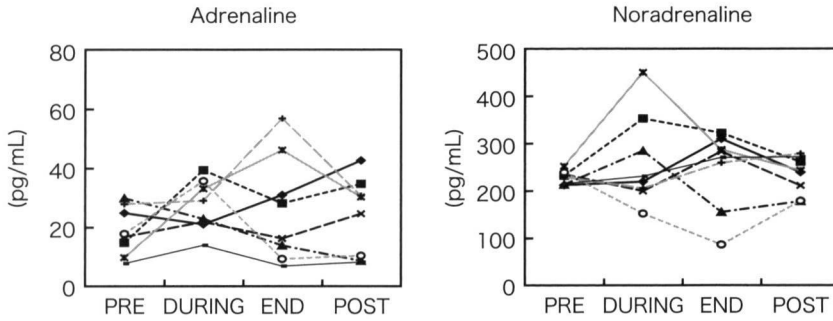


Figure 8. Individual changes in plasma catecholamine levels during and post intensive training. There were no significant changes.

5. 心拍変動と白血球分画およびNK細胞傷害活性の関係

(1) 好中球濃度との関係 (Figure 9)

交感神経の活動指標であるLF/HFとの関係ではPRE ( $r=0.840, p=0.009$ ) とDURING ( $r=0.804, p=0.016$ ) で正の有意な関係が示された。副交感神経の活動指標であるHFとの関係ではDURING ( $r=0.873, p=0.005$ ) で負の有意な関係が示された。

(2) 総リンパ球濃度との関係 (Figure 10)

LF/HFとの関係ではPRE ( $r=0.722, p=0.043$ ) で正の有意な関係が示された (Fig)。HFとの関係では統計的に有意な関係は示されなかった。

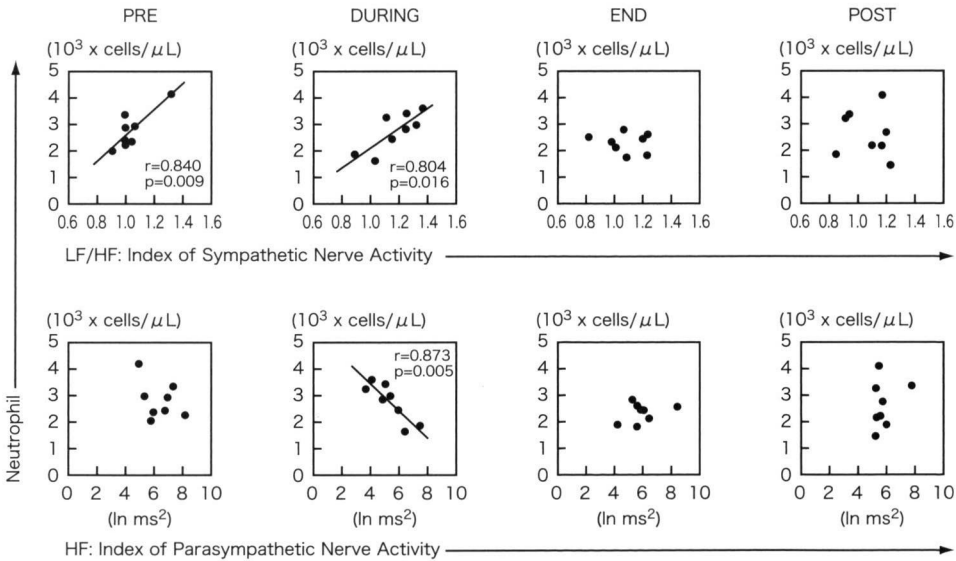


Figure 9. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and neutrophil frequency. Significant relations indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

## (3) CD4 T細胞濃度との関係 (Figure 11)

LF/HFとの関係では統計的に有意な関係は示されなかった。HFとの関係ではPOST ( $r=0.751$ ,  $p=0.032$ ) で正の有意な関係が示された。

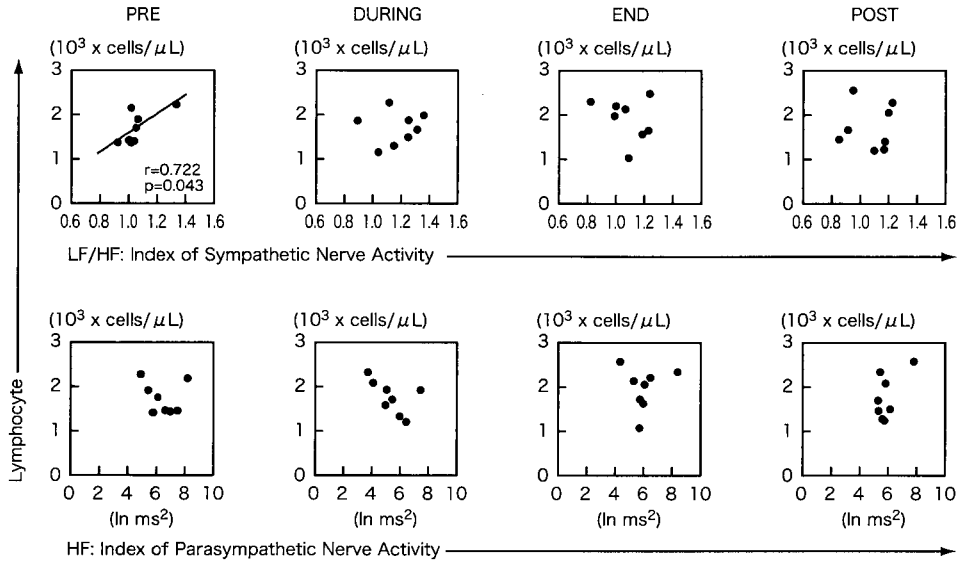


Figure 10. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and lymphocyte frequency. Significant relation indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

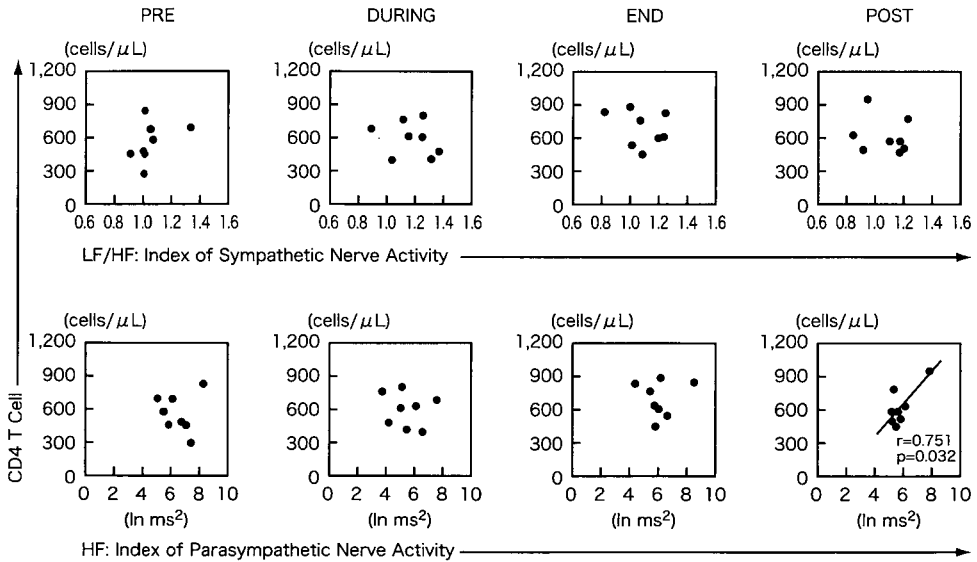


Figure 11. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and CD4 T cell frequency. Significant relation indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

## (4) CD8 T細胞濃度との関係 (Figure 12)

LF/HFとの関係ではPRE ( $r=0.892$ ,  $p=0.003$ ) で正の有意な関係が示された。HFとの関係では統計的に有意な関係は示されなかった。

(5) CD56<sup>dim</sup>NK細胞濃度との関係 (Figure 13)

LF/HFおよびHFとの関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

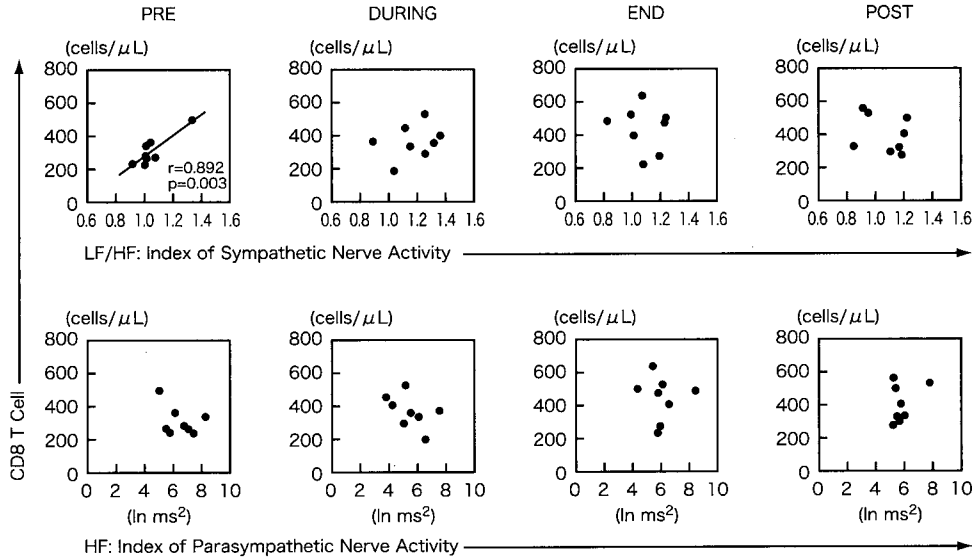


Figure 12. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and CD8 T cell frequency.

Significant relation indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

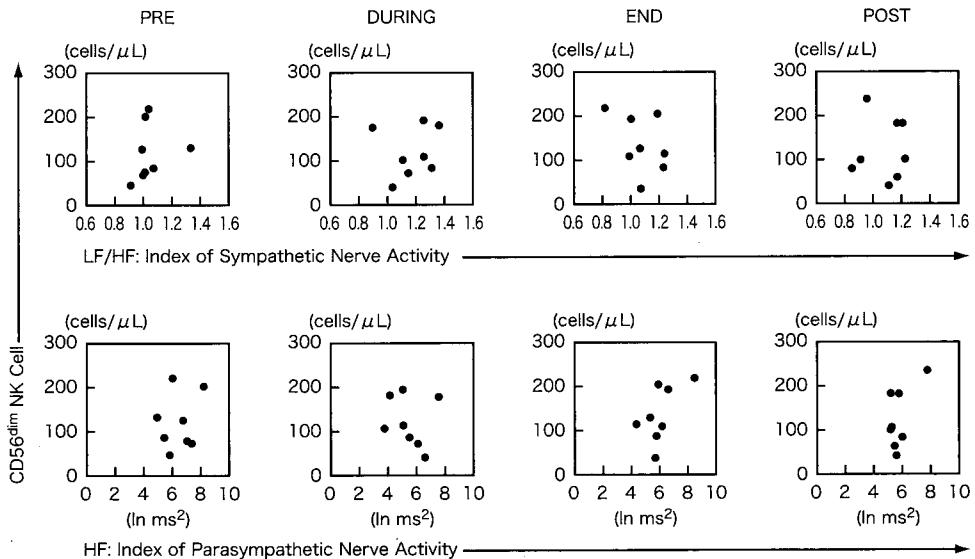


Figure 13. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and CD56<sup>dim</sup>NK cell frequency.

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

(6) CD56<sup>bright</sup>NK細胞濃度との関係 (Figure 14)

LF/HFおよびHFとの関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

## (7) NKCAとの関係 (Figure 15)

LF/HFおよびHFとの関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

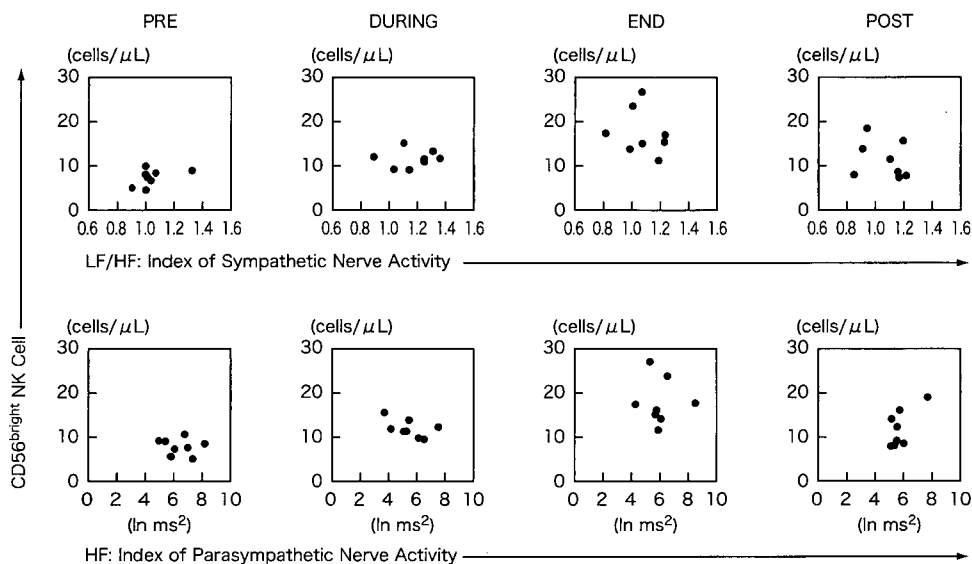


Figure 14. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and CD56<sup>bright</sup>NK cell frequency.

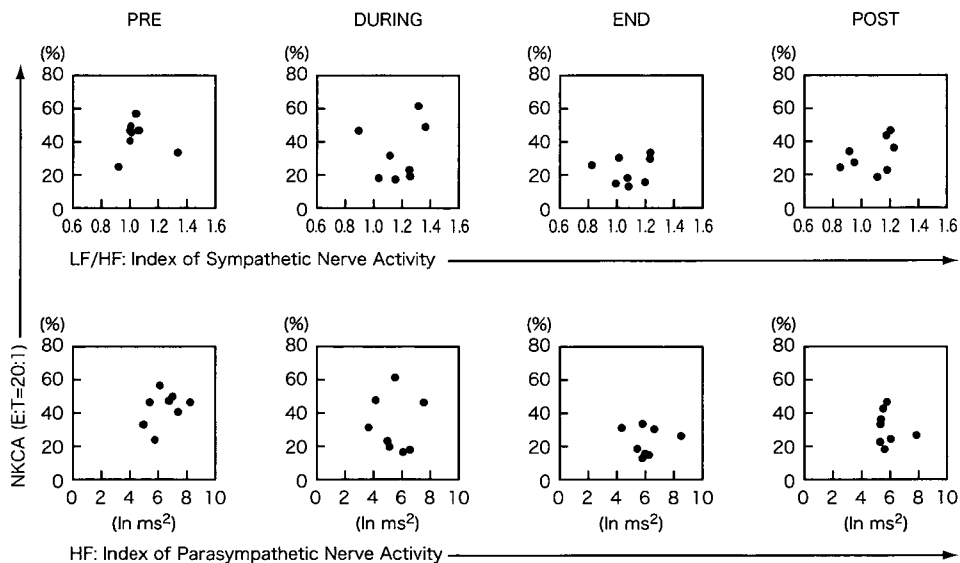


Figure 15. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and NKCA.



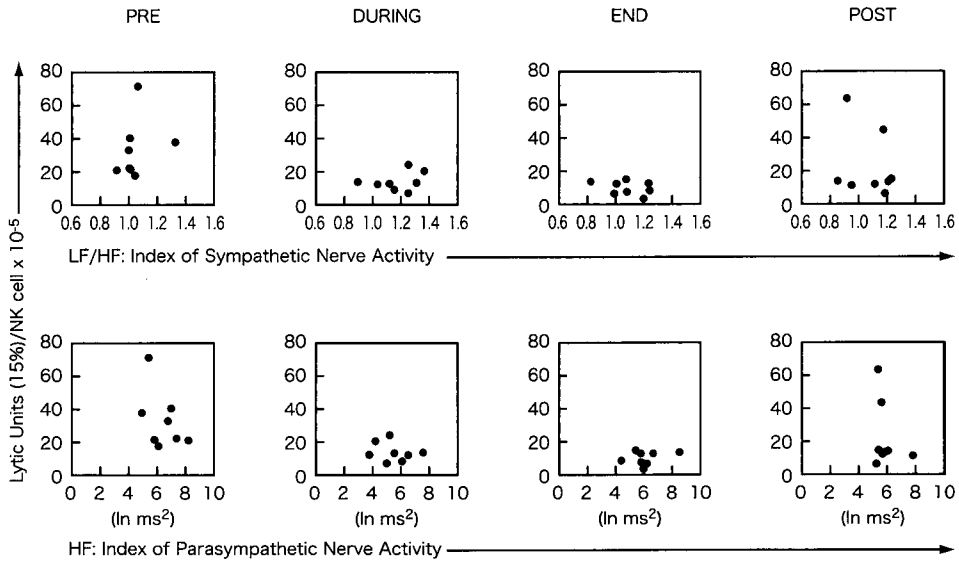


Figure 16. Changes in the relationship between parameters of autonomic nerve activities and Lytic Units.

(8) Lytic Unitsとの関係 (Figure 16)

LF/HFおよびHFとの関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

## 6. カテコールアミン濃度と白血球分画およびNK細胞傷害活性の関係

(1) 好中球濃度との関係 (Figure 17)

LF/HFおよびHFとの関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

(2) 総リンパ球濃度との関係 (Figure 18)

アドレナリン濃度との関係ではPRE ( $r=0.787$ ,  $p=0.021$ ) で正の有意な関係が示された。ノルアドレナリン濃度との関係ではPOST ( $r=0.830$ ,  $p=0.011$ ) で負の有意な関係は示された。

(3) CD4 T細胞濃度との関係 (Figure 19)

アドレナリン濃度との関係ではPRE ( $r=0.813$ ,  $p=0.014$ ) で正の有意な関係が示された。ノルアドレナリン濃度との関係ではPOST ( $r=0.814$ ,  $p=0.014$ ) で負の有意な関係は示された。

(4) CD8 T細胞濃度との関係 (Figure 20)

アドレナリン濃度およびノルアドレナリン濃度との関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

(5) CD56<sup>dim</sup>NK細胞濃度との関係 (Figure 21)

アドレナリン濃度との関係ではPRE ( $r=0.824$ ,  $p=0.012$ ) で正の有意な関係が示された。ノルアドレナリン濃度との関係では有意な関係は示されなかった。

(6) CD56<sup>bright</sup>NK細胞濃度との関係 (Figure 22)

アドレナリン濃度との関係ではDURING ( $r=0.807$ ,  $p=0.016$ ) で正の有意な関係が示された。ノル

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

アドレナリン濃度との関係では有意な関係は示されなかった。

## (7) NKCAとの関係 (Figure 23)

アドレナリン濃度との関係では有意な関係は示されなかった。DURING ( $r=0.807$ ,  $p=0.016$ ) で正の有意な関係が示された。ノルアドレナリン濃度との関係ではDURING ( $r=0.745$ ,  $p=0.034$ ) で正の有意な関係が示された。

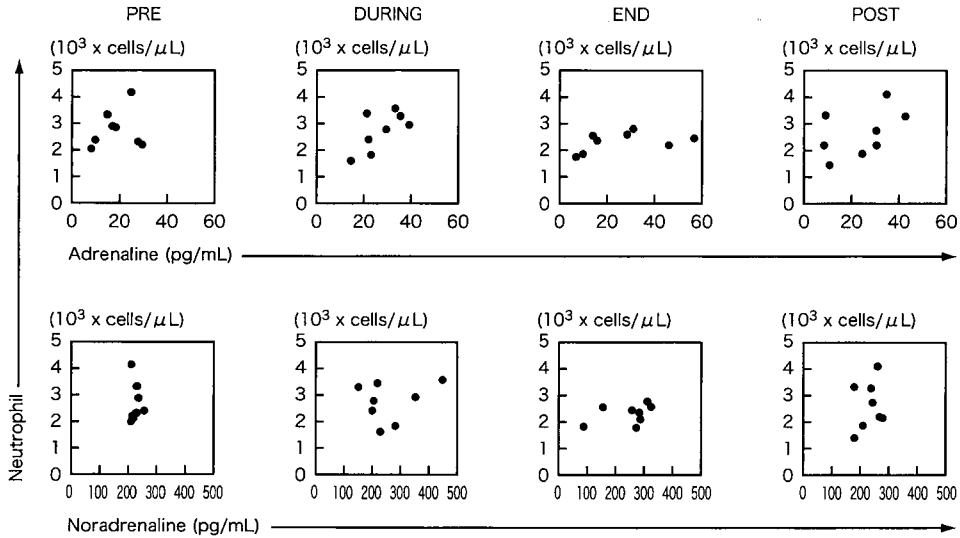


Figure 17. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and neutrophil frequency.

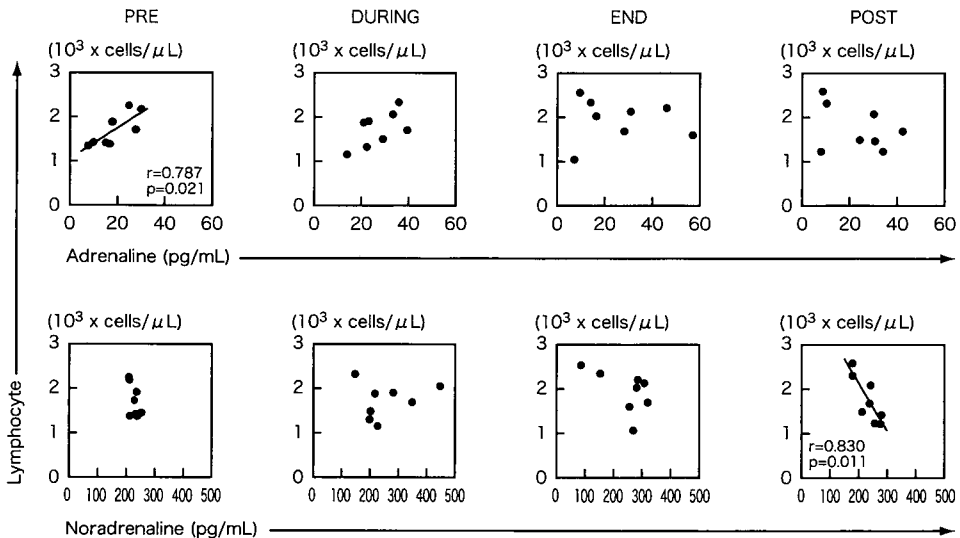


Figure 18. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and lymphocyte frequency. Significant relations indicated a regression line, a correlation coefficient and  $p$  value.

(8) Lytic Unitsとの関係 (Figure 24)

アドレナリン濃度およびノルアドレナリン濃度との関係では、いずれも統計的に有意な関係は示されなかった。

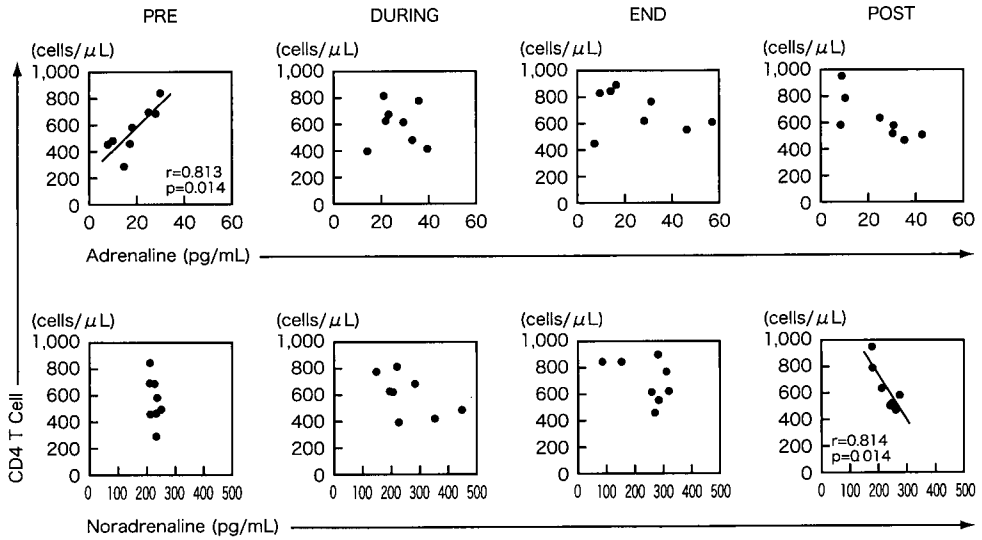


Figure 19. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and CD4 T cell frequency. Significant relations indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

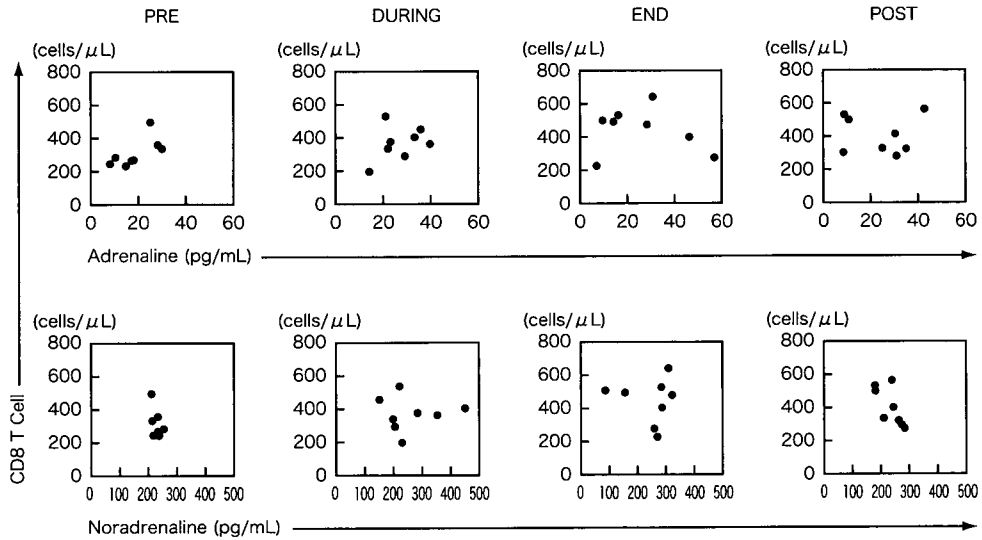


Figure 20. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and CD8 T cell frequency.

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

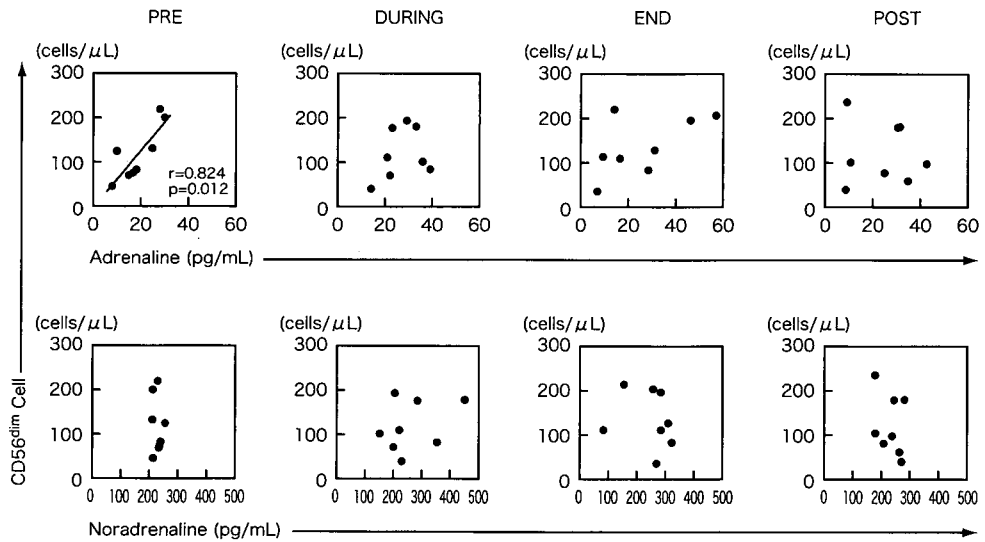


Figure 21. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and CD56<sup>dim</sup> cell frequency.

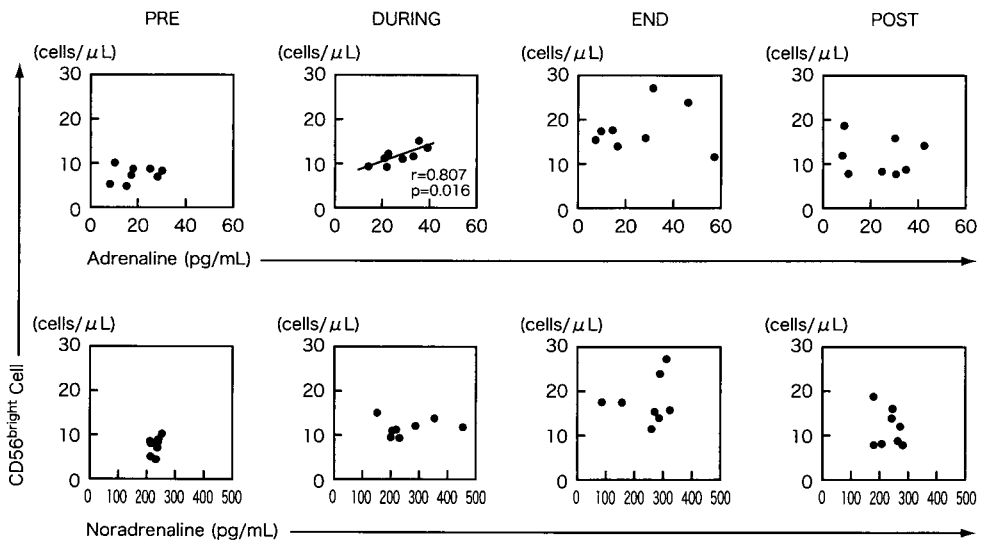


Figure 22. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and CD56<sup>bright</sup> cell frequency. Significant relation indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

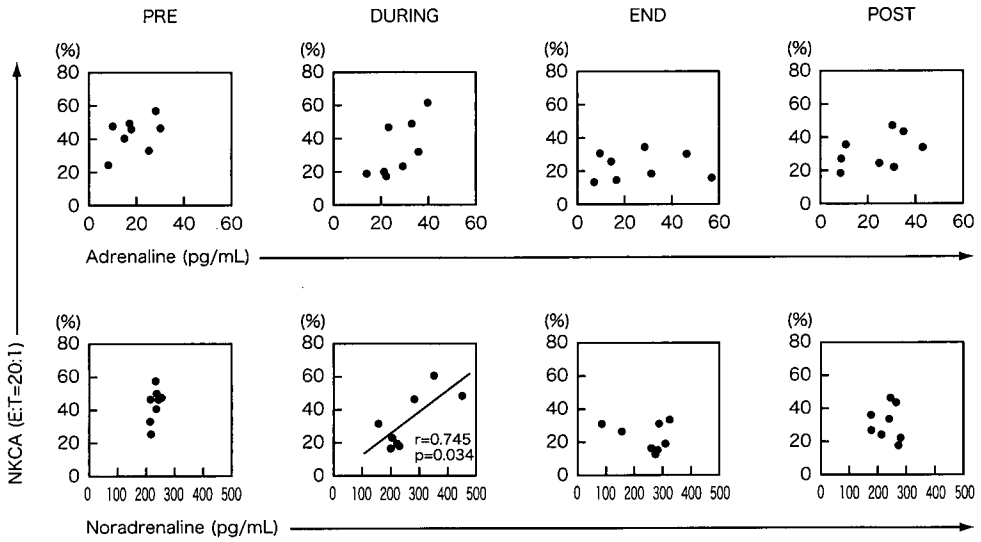


Figure 23. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and NKCA.

Significant relation indicated a regression line, a correlation coefficient and p value.

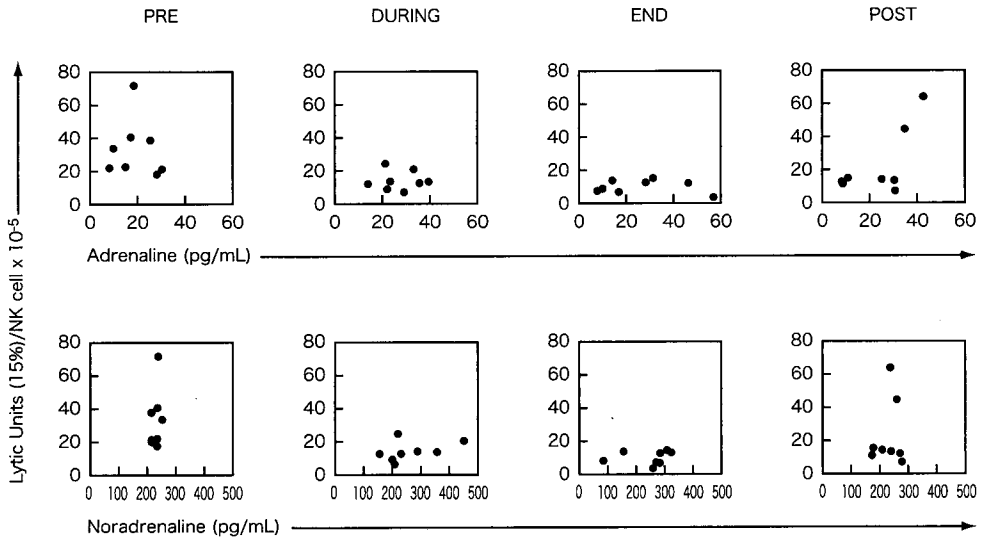


Figure 24. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and Lytic Units.

### Ⅲ. 考察

#### 1. 白血球分画, 心拍変動, NK細胞活性 (NKCA), カテコールアミン濃度の経時的变化

白血球分画はCD56<sup>bright</sup>NK細胞を除き, 実験を通して変化しなかった。また, 心拍変動, カテコールアミン濃度にも変化はみられなかった。心拍変動とトレーニングの関係に関して, これまでの報告ではオーバートレーニングで交感神経指標が上がる<sup>(31)</sup>, 逆に下がる<sup>(19)</sup>, 副交感神経指標が上がる<sup>(18)</sup>, 変わらないなど<sup>(4), (17)</sup>, コンセンサスは得られていない。今回の結果からも変化はみられず, 安静時のデータには強いトレーニングといえども大きなインパクトはないことが明らかとなった。

白血球分画で, 唯一, 有意な変化を示したのはCD56<sup>bright</sup>NK細胞のENDにおける増加である。NK細胞はCD56<sup>dim</sup>NK細胞とCD56<sup>bright</sup>NK細胞の分画がある。この二つの分画はどちらも異なる機能を持つ成熟細胞であると考えられている<sup>(11), (13)</sup>。CD56<sup>dim</sup>NK細胞は末梢血では総NK細胞中90%以上を占める主たる分画で細胞傷害活性が強い。一方, CD56<sup>bright</sup>NK細胞は数%の小さな分画でサイトカインの分泌や増殖能が高く, 調節機能を持つと考えられている。今回の結果ではNK細胞の傷害活性の低下は総NKCAにおいても, 細胞当たりにおいてもCD56<sup>bright</sup>NK細胞の増加に伴って生じている。NKCAの測定は純粋なNK細胞を用いて行うのではなく, 一定数のリンパ球を取り分けて行う<sup>(2), (16), (20), (32), (41), (54)</sup>。そのため, リンパ球中のNK細胞の比率が活性に影響する。すなわち, 弱い分画であるCD56<sup>bright</sup> NK細胞の増加が, 傷害活性の低下に関与していると考えられる。ただし, 小さな分画であるので全ての変化を説明できるほどの影響であったかは疑問が残る。トレーニングが主たる分画のCD56<sup>dim</sup> NK細胞自体を弱めることがなかったか, 検討する必要がある。

通常, 一過性の運動の影響はCD56<sup>dim</sup>NK細胞に強く表れる<sup>(50), (51)</sup>。CD56<sup>dim</sup>NK細胞は運動がはじまるとほかのリンパ球分画よりも大きな増加を示すが, 運動後は安静値を下回るような急激な低下を引き起こす<sup>(5), (43), (45), (46), (57)</sup>。このような細胞動態が直接的に傷害活性に反映されることになる。ただし, 個々の細胞の活性は変化しない。運動後の急激な濃度低下は血管壁, 肺, 肝臓, 脾臓などのプールへホーミングするためと考えられている。このようなNK細胞機能の運動後の低下は易感染性を増加させる可能性を示し, Pedersen et al.<sup>(43)</sup>の「オープンウィンドウ・セオリー」の元になったものである。また, 細胞数の低下はプールへのホーミングだけでなく, 他の要因の影響も考えられる。強度の高い運動では, 運動中の高濃度のカテコールアミンや活性酸素, または低酸素状態への曝露のために細胞機能の低下のみならず, 運動後にアポトーシスをもたらししている可能性がある<sup>(58)</sup>。つまり, 運動後の細胞数の急激な減少にはホーミングとアポトーシスの両方の関与があるのではないだろうか。もしも, アポトーシスが起これば, 細胞数の低下が刺激となり, CD56<sup>dim</sup>NK細胞は増殖することが予想される。一般的には運動によって低下した細胞数はすみやかに回復すると考えていい。しかし, 強いトレーニングでは増殖が間に合わずに回復が十分でないことが起こるかもしれない。その場合には細胞増殖能の高いCD56<sup>bright</sup>NK細胞が増殖し, さらにCD56<sup>dim</sup>NK細胞に分化するという考えは飛躍すぎるだろうか。Chan et al.<sup>(10)</sup>がCD56<sup>bright</sup>NK細胞を一定の条件下で培養するとCD56<sup>dim</sup>NK細胞に分化でき

ることを報告していることから、その可能性は否定できない。

## 2. 自律神経指標（HRVおよびカテコールアミン濃度）と白血球分画・機能との関係

### (1) 自律神経支配の影響

好中球とリンパ球の安静時濃度には対称的な日内変動があり（Figure 1）、これは自律神経によって調節されていると考えられている<sup>(1), (53)</sup>。すなわち、交感神経末端から分泌されたノルアドレナリンが好中球のアドレナリンレセプターに結合することにより、また、副交感神経末端から分泌されたアセチルコリンがリンパ球のアセチルコリンレセプターに結合することにより生じる調節である（Figure 25）<sup>(56)</sup>。このことから、好中球濃度には交感神経指標であるLF/HFが、リンパ球濃度には副交感神経指標であるHFが反映されると予想していた。

結果は好中球濃度とLF/HFではPRE（Figure 9;  $r=0.840$ ,  $p=0.009$ ）とEND（ $r=0.804$ ,  $p=0.016$ ）で正の相関が見られ、リンパ球では同じくLF/HFとの関係でPREに総リンパ球濃度（Figure 10;  $r=0.722$ ,  $p=0.043$ ）とCD8 T細胞（Figure 12;  $r=0.892$ ,  $p=0.003$ ）で正の相関が見られた。また、同じく交感神経の指標であるカテコールアミンとの関係を見るとアドレナリンと総リンパ球濃度（Figure 18;  $r=0.787$ ,  $p=0.021$ ）、CD4 T細胞（Figure 19;  $r=0.813$ ,  $p=0.014$ ）、CD56<sup>dim</sup>NK細胞（Figure 21;  $r=0.824$ ,  $p=0.012$ ）のPRE、CD56<sup>bright</sup>NK細胞（Figure 22;  $r=0.807$ ,  $p=0.016$ ）のDURINGで正の相関が見られた。これに対し、副交感神経指標であるHFと有意な正の相関を示したのはCD4 T細胞（Figure 11;  $r=0.751$ ,  $p=0.032$ ）のPOSTだけであった。

したがって、細胞濃度との関係では、好中球はもとより、リンパ球においても交感神経指標との関係がより明確であり、副交感神経指標との関係は強くないことが明らかとなった。

また、カテコールアミン濃度との関係では、アドレナリンでリンパ球分画においてもいくつかの正の関係が見られるものの、ノルアドレナリンでは総リンパ球濃度（Figure 18;  $r=0.830$ ,  $p=0.011$ ）とCD4 T細胞（Figure 19;  $r=0.814$ ,  $p=0.014$ ）のPOSTで負の相関が見られ、相反する関係が示された。実際には、リンパ球にも好中球と同様にアドレナリンレセプターが発現しており、末梢血への動員に

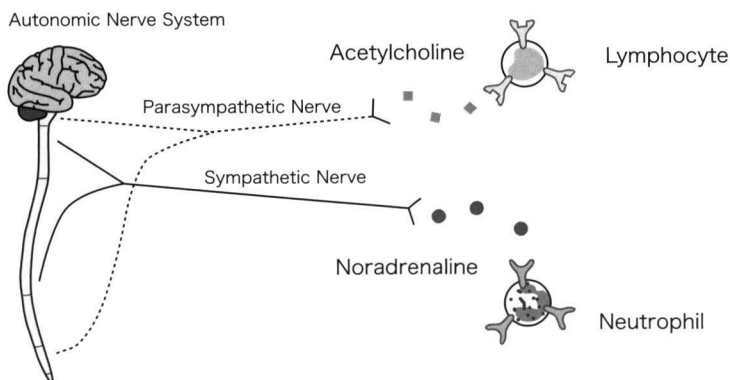


Figure 25. Relationships Between Autonomic Nerve Activity and HRV<sup>(56)</sup>.

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

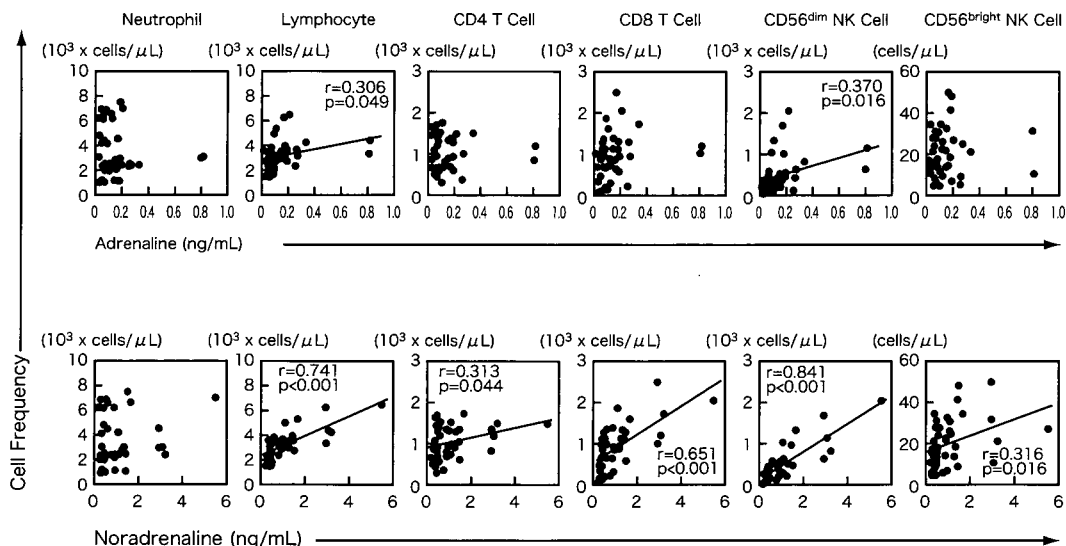


Figure 26. Changes in the relationship between plasma catecholamines level and cell frequency during incremental exercise.

関与していると考えられている<sup>(28)</sup>。とくに、運動時に生じるリンパ球分画の変化にはこの発現密度の違いが反映している。すなわち、NK細胞の発現が最も高く、つぎにCD8 T細胞、CD4 T細胞と続き、それが運動中の濃度変化（増加）の程度と一致する。ただし、運動の場合に相関が強いのはノルアドレナリン濃度との関係であり、アドレナリンとの関係はそれほど明確ではない。Figure 26に漸増負荷運動中のカテコールアミン濃度の変化に対する白血球分画の濃度との関係をプロットした（鈴木未発表データ）。統計的に有意な関係は漸近線と相関係数、p値を表示している。アドレナリン濃度とノルアドレナリン濃度との関係を見るとノルアドレナリン濃度の方が明確な関係を示していることが分かる。つまり、安静状態と運動時では細胞濃度の調節に際し、カテコールアミンの種類により、役割が違う可能性を示唆している。

## (2) トレーニングの影響

本研究の統計的な関係をTable 1に示した。有意な正の関係は交感神経系の指標との関係において主に示されていることは「2. (1) 自律神経支配の影響」で述べたとおりであるが、その多くはPREもしくはDURINGに生じており、ENDにおける有意な関係はない。つまり、トレーニングによってその関係が消失することになる。これは「1. 白血球分画、心拍変動、NK細胞活性（NKCA）、カテコールアミン濃度の経時的変化」のNK細胞の増殖における考察のように未成熟細胞が増加しているためではないだろうか。つまり、強いトレーニングによる細胞のターンオーバーは十分な回復時間が得られないためにNK細胞のみならず各分画で未成熟な細胞の比率を高めることになり、異なる反応を示した可能性がある。



Table 1. Statistical relations between parameters of autonomic nerve activity and leukocyte subsets frequency and NKCA.

Autonomic Nerve Activity	Cell Frequency / Function	Parameter	PRE	DURING	END	POST
Sympathetic	Neutrophil	HF/LF	+	+		
	Lymphocyte		+			
	CD4 T cell					
	CD8 T cell		+			
	CD56 <sup>dim</sup> NK cell					
	CD56 <sup>bright</sup> NK cell					
	NKCA					
	LU					
	Neutrophil	Adrenaline				
	Lymphocyte		+			
	CD4 T cell		+			
	CD8 T cell					
	CD56 <sup>dim</sup> NK cell		+			
	CD56 <sup>bright</sup> NK cell			+		
	NKCA					
	LU					
	Neutrophil	Noradrenaline				
	Lymphocyte					-
	CD4 T cell					-
	CD8 T cell					
	CD56 <sup>dim</sup> NK cell					
CD56 <sup>bright</sup> NK cell						
NKCA			+			
LU						
Parasympathetic	Neutrophil	HF		-		
	Lymphocyte					
	CD4 T cell					+
	CD8 T cell					
	CD56 <sup>dim</sup> NK cell					
	CD56 <sup>bright</sup> NK cell					
	NKCA					
	LU					

[+] indicated significant positive relation and [-] indicated significant negative relation.

### 3. NK細胞傷害活性と自律神経指標との関係

NKCAが有意な関係を示したのはDURINGにおいてノルアドレナリン濃度と正の関係 ( $r=0.745$ ,  $p=0.034$ ) を示しただけである。他のタイムポイントでの関係は見られず、とくに細胞濃度との関係

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

で見られたようなPREにおける関係は示されなかった。つまり、元もとあった関係がなくなるという現象はここではなかった。また、LUに関しては有意な関係を示す指標は見られなかった。

以上の結果より、まず、自律神経の指標と免疫指標は直接的な関係が見られないことが明らかとなった。NK細胞傷害活性の経時的な変化に対して、HRVやカテコールアミン濃度には変化がないことから、自律神経指標にはより強いホメオステイシスが働いていることが考えられる。さらに2つの指標の関係には時系列的な変化はみられず、自律神経指標からNK細胞傷害活性を推測することは困難であることが明らかとなった。

## V. まとめ

自律神経活動の指標となる心拍変動と血漿カテコールアミン濃度と免疫細胞濃度およびNK細胞傷害活性の関係とその関係におよぼす強いトレーニングの影響を検討した。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. 心拍変動の交感神経指標であるLF/HFと好中球濃度、リンパ球濃度、CD56<sup>dim</sup> NK細胞濃度には正の相関がPREで見られたこと。
2. アドレナリン濃度とリンパ球濃度、CD4 T細胞濃度、CD56<sup>dim</sup> NK細胞濃度には正の相関がPREで見られたこと。
3. 細胞濃度との有意な関係は主に交感神経活動指標との関係で見られた。
4. 交感神経活動指標と細胞濃度との有意な関係はENDでは見られなくなった。
5. 自律神経活動の指標からNK細胞傷害活性を推測するための明確な関係は見られなかった。

## VI. 謝辞

本研究は日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究C No. 11680058）によって行われましたNK細胞の動態に関する研究の補足として行わせていただきました。また、研究成果の一部は既に2009年 American College of Sports Medicine 56th Annual Meeting, Indianapolis, Indiana, U.S.A.<sup>(48)</sup>、および、2009年 The 9th Symposium of the International Society of Exercise and Immunology, Tubingen, Germany<sup>(49)</sup>において発表させていただきました。研究をすすめるにあたり、順天堂大学医学部免疫学教室 奥村康先生、八木田秀雄先生、竹田和由先生、順天堂大学スポーツ健康科学部 川合武司先生、順天堂大学健康管理室 高橋初恵先生、University of Toronto, Roy J. Shephard先生、Defence R & D Canada-Toronto, Pang N. Shek先生に多大なご協力をいただきました。とくに、研究パートナーとして、長年にわたり一緒に活動させていただいた順天堂大学医学部免疫学教室 故長尾夫美子先生には、心より感謝するとともにご冥福をお祈りいたします。報告の終わりにあたり、お礼を申し上げます。

## 参考文献

- (1) Abo T, Kawamura T, Immunomodulation by the autonomic nervous system: therapeutic approach for cancer, collagen diseases, and inflammatory bowel diseases. *Ther Apher*, 6(5), 348-357, 2002.
- (2) 安保徹, ナチュラルキラー (NK) 細胞活性. *日本臨床*, 53増刊号, 629-632, 1995.
- (3) Baselli G, Bolis D, Cerutti S, Freschi C, Autoregressive modeling and power spectral estimate of R-R interval time series in arrhythmic patients. *Comput Biomed Res*, 18(6), 510-530, 1985.
- (4) Bosquet L, Papelier Y, Léger L, et al., Night heart rate variability during overtraining in male endurance athletes. *J Sports Med Phys Fitness*, 43(4), 506-512, 2003.
- (5) Brahmi Z., Thomas JE, Park M, et al., The effect of acute exercise on natural killer-cell activity of trained and sedentary human subjects. *J Clin Immunol*, 5(5), 321-328, 1985.
- (6) Brennan M, Palaniswami M, Kamen P, Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans Biomed Eng*, 48(11), 1342-1347, 2001.
- (7) Brenner JS, Overuse injuries, overtraining, and burnout in child and adolescent athletes. *Pediatrics*, 119(6), 1242-1245, 2007.
- (8) Bryant J, Day R, Whiteside TL, et al., Calculation of lytic units for the expression of cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 146, 91-103, 1992.
- (9) Budgett R, Fatigue and underperformance in athletes: the overtraining syndrome. *Br J Sports Med*, 32(2), 107-110, 1998.
- (10) Chan A, Hong DL, Atzberger A, et al., CD56<sup>bright</sup> human NK cells differentiate into CD56<sup>dim</sup> cells: role of contact with peripheral fibroblasts. *J Immunol*, 179(1), 89-94, 2007.
- (11) Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA, The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11), 633-640, 2001.
- (12) DeBoer RW, Karemaker JM, Strackee J, Comparing spectra of a series of point events particularly for heart rate variability data. *IEEE Trans Biomed Eng*, 31(4), 384-387, 1984.
- (13) Farag SS, Caligiuri MA, Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev*, 20(3), 123-137, 2006.
- (14) Gabriel HH, Urhausen A, Valet G, et al., Overtraining and immune system: a prospective longitudinal study in endurance athletes. *Med Sci Sports Exerc*, 30(7), 1151-1157, 1998.
- (15) Gamelin FX, Berthoin S, Bosquet L, Validity of the polar S810 heart rate monitor to measure R-R intervals at rest. *Med Sci Sports Exerc*, 38(5), 887-893, 2006.
- (16) Hatam L., Schuval S, Bonagura VR, Flow cytometric analysis of natural killer cell function as a clinical assay. *Cytometry*, 16, 59-68, 1994.
- (17) Hedelin R, Kenttä G, Wiklund U, et al., Short-term overtraining: effects on performance, circulatory responses, and heart rate variability. *Med Sci Sports Exerc*, 32(8), 1480-1484, 2000.
- (18) Hedelin R, Wiklund U, Bjerle P, et al., Cardiac autonomic imbalance in an overtrained athlete. *Med Sci Sports Exerc*, 32(9), 1531-1533, 2000.
- (19) Hynynen E, Uusitalo A, Konttinen N, et al., Heart rate variability during night sleep and after awakening in overtrained athletes. *Med Sci Sports Exerc*, 38(2), 313-317, 2006.
- (20) Jacobs R, *Methods in Immunology, Psychoneuroimmunology*, Schedlowski M, Tewes, U, Kluwer Academic/Plenum Pub, NY, 143-165, 1999.
- (21) Kentta G, Hassmen P, Overtraining and recovery. A conceptual model. *Sports Med*, 26(1), 1-16, 1998.
- (22) Kreider RB, Fry AC, O'toole ML, *Overtraining in Sports*, Human Kinetics, Champaign, IL, 1998.

## 強いトレーニングにおける自律神経の変動とNK細胞機能の関係について

- (23) Kuipers H, Training and overtraining: an introduction. *Med Sci Sports Exerc*, 30(7), 1137-1139, 1998.
- (24) Lanier LL, The origin and functions of natural killer cells. *Clin. Immunol*, 95(1 Pt 2), S14-S18, 2000.
- (25) Lars H. Zetterberg, Estimation of parameters for a linear difference equation with application to EEG analysis. *Math Biosci*, 5(3-4), 227-275, 1969.
- (26) Lehmann M, Foster C, Dickhuth HH, et al., Autonomic imbalance hypothesis and overtraining syndrome. *Med Sci Sports Exerc*, 30(7), 1140-1145, 1998.
- (27) MacKinnon LT, Special feature for the Olympics: effects of exercise on the immune system: overtraining effects on immunity and performance in athletes. *Immunol Cell Biol*, 78(5), 502-509, 2000.
- (28) Maisel AS, Harris T, Rearden CA, et al., b-Adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise. *Circulation*, 82, 2003-2010, 1990.
- (29) Meeusen R, Watson P, Hasegawa H, et al., Brain neurotransmitters in fatigue and overtraining. *Appl Physiol Nutr Metab*, 32(5), 857-864, 2007.
- (30) Mori H, Nishijo K, Kawamura H, Abo T, Unique immunomodulation by electro-acupuncture in humans possibly via stimulation of the autonomic nervous system. *Neurosci Lett*, 320(1-2), 21-24, 2002.
- (31) Mourot L, Bouhaddi M, Perrey S, et al., Decrease in heart rate variability with overtraining: assessment by the Poincaré plot analysis. *Clin Physiol Funct Imaging*, 24(1), 10-18, 2004.
- (32) Nagao F, Yabe T, Xu M, et al., Application of non-radioactive europium (EU3<sup>+</sup>) release assay to a measurement of human natural killer activity of healthy and patient populations. *Immunol Invest*, 25(5&6), 507-518, 1996.
- (33) 中村好男, I-6章 心拍変動を用いた自律神経活動の評価法, 加賀谷淳子, 中村好男編「運動と循環—研究の現状と課題」, ナップ, 東京, 93-106, 2001.
- (34) 中村好男, 心拍ゆらぎが意味するもの—自律神経とカオス—. *Jpn J Sports Sci*, 14(5), 503-508, 1995.
- (35) 中村好男, 心拍変動パワースペクトルからみた自律神経活動. *体育の科学*, 44, 432-436, 1994.
- (36) 中村好男, 林直亨, 心拍数の神経性調節および心拍変動の定量的意義. *Jpn J Sports Sci*, 12(8), 489-493, 1993.
- (37) 中村好男, 山本義春, 心拍変動のスペクトルとフラクタル. *体育の科学*, 41, 515-523, 1991.
- (38) Nieman DC, Immune response to heavy exertion. 82(5), 1385-1394, 1997.
- (39) Nieman DC, Henson DA, Gusewitch G, et al., Physical activity and immune function in elderly women. *Med Sci Sports Exerc*, 25(7), 823-31, 1993.
- (40) Niskanen JP, Tarvainen MP, Ranta-Aho PO, et al., Software for advanced HRV analysis. *Comput Methods Programs Biomed*, 76(1), 73-81, 2004.
- (41) 西岡久壽彌, 嶋田孝吉, 真崎知生, 役に立つ免疫実験法 初版. 講談社, 東京, 231-232, 1992.
- (42) 押味和夫, NK細胞 初版. 金原書店, 東京, 151, 1993.
- (43) Pedersen BK., Ullum H, NK cell response to physical activity: possible mechanisms of action. *Med Sci Sports Exerc*, 26(2), 140-146, 1994.
- (44) Shephard RJ, Physical activity, training and immune response. Cooper Pub Group, IN, 1997.
- (45) Shephard RJ, Shek PN, Effects of exercise and training on natural killer cell counts and cytolytic activity: a meta-analysis. *Sports Med*, 28(3), 177-195, 1999.
- (46) Shinkai S, Shore S, Shek PN, et al., Acute exercise and immune function; Relationship between lymphocyte activity and changes in subset counts. *Int J Sports Med*, 13(6), 452-461, 1992.
- (47) Stauss HM, Heart rate variability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 285(5), R927-R931, 2003.

- (48) Suzui M, Takeda K, Yagita H, et al., Relationship between autonomic nerve activity and distribution of leukocyte subsets during intensive training. *Med Sci Sports Exerc*, 41(5), S266, 2009.
- (49) Suzui M, Takeda K, Yagita H, et al., Relationship between autonomic nerve activity and distribution of neutrophil and lymphocyte subsets during intensive training. *Symposium Abstract (ISBN 978-3-00-028944-6)*, 40, 2009.
- (50) Suzui M, Takeda K, Yagita H, et al., Changes in the proportions of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> natural killer cells during and after acute exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 38(5), S413, 2006.
- (51) Suzui M, Takeda K, Yagita H, et al., Changes in the proportions of CD56<sup>dim</sup> and CD56<sup>bright</sup> natural killer cells during incremental exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 37(5), S373, 2005.
- (52) Suzui, M, Kawai T, Kimura H, et al., Natural killer cell lytic activity and CD56 (dim), and CD56 (bright), cell distributions during and after intensive training. *J Appl Physiol*, 96(6), 2167-2173, 2004.
- (53) Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, et al., Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin Exp Immunol*, 110(3), 500-508, 1997.
- (54) 高木秀二, Killer細胞活性の測定法, リンパ球機能検索法 5 版. 矢田純一, 藤原道男 編, 中外医学社, 東京, 250-261, 1994.
- (55) Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology, Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation*, 93(5), 1043-1065, 1996.
- (56) Toyabe S, Iiai T, Fukuda M, et al., Identification of nicotinic acetylcholine receptors on lymphocytes in the periphery as well as thymus in mice. *Immunology*, 92(2), 201-205, 1997.
- (57) Tvede N., Kappel M, Halkj\_r-Kristensen J, et al., The effect of light, moderate and severe bicycle exercise on lymphocyte subsets, natural and lymphokine activated killer cells, lymphocyte proliferative response and interleukin 2 production. *Int J Sports Med*, 14(5), 275-282, 1993.
- (58) Wang JS, Lin CT, Systemic hypoxia promotes lymphocyte apoptosis induced by oxidative stress during moderate exercise. *Eur J Appl Physiol*, 108(2), 371-382, 2010.
- (59) Welch PD, The use of fast Fourier transform for the estimation of power spectra: A method based on time averaging over short, modified periodograms. *IEEE Trans Audio Electroacoust*, 15(2), 70-73, 1967.
- (60) 山本義春, 生体にみられる "ゆらぎ". *Jpn J Sports Sci*, 14(5), 471-474, 1995.