

加齢と運動習慣が好中球の生体防御機構に与える影響

北海道教育大学	神 林 勲
(共同研究者) 札幌医科大学	藤 井 博 匡
大 正 大 学	内 田 英 二
北海道教育大学	山 崎 朋 子
札幌医科大学	武 田 秀 勝

Effect of Aging and Exercise Habit on Superoxide-generating Activity of Neutrophils

by

Isao Kambayashi

Hokkaido University of Education Sapporo

Hirotsada Fujii

School of Health Science, Sapporo Medical University

Eiji Uchida

Faculty of Human Studies, Taisho University

Tomoko Yamazaki

Health Administration Center, Hokkaido University of Education

Hidekatsu Takeda

School of Health Science, Sapporo Medical University

ABSTRACT

Superoxide production was studied in purified neutrophils of 122 healthy male humans aged from 18 yr to 79 yr to determine whether bacterial killing ability were altered by aging and daily exercise habit. Subjects were classified to 6 generation

groups. Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) -stimulated superoxide-generating activity of neutrophils was measured by the cytochrome c reduction assay. With respect to exercise habit and superoxide-generating activity, athletes between the ages of 18 and 24 who belonged in sport clubs of university (86.0 ± 32.5 nmol/min/ 10^7 cells), and people 25 and over doing regular exercise for health (73.8 ± 24.3 nmol/min/ 10^7 cells) did not differ in age-matched counterparts (97.0 ± 36.6 and 70.7 ± 21.3 nmol/min/ 10^7 cells), respectively. A significant negative correlation (-0.219) was found between age and superoxide-generating activity of neutrophils in all subjects. However, activity of the youngest generation (between 18 and 24 yr) denoted significantly higher than that of other generations. There was also no significant relationship between age and superoxide-generating activity of neutrophils in people 25 and over. It is suggested that neutrophils bacterial killing is not altered by exercise habit in any generation and by aging in people 25 and over, although young generation (18-24 yr) possesses specifically high superoxide-generating activity of neutrophils.

要 旨

本研究の目的は、加齢と運動習慣が好中球の殺菌能の指標であるスーパーオキシド生成能に与える影響を検討することである。被検者には参加の同意が得られた健康な122名の男性（18歳から79歳）を用い、年齢によって6つの世代にグルーピングされた。好中球スーパーオキシド生成能はPMA刺激によるシトクロームC還元法により測定された。18歳から24歳において大学で運動部に所属する者および25歳以上で定期的に運動を行っている者の好中球スーパーオキシド生成能は、同世代の運動習慣のないものと差がなかった。年齢と好中球スーパーオキシド生成能には有意な負の相関関係（ -0.219 ）が認められた。しかしながら、18歳から24歳までの世代のみが他の世代に比較して有意な高値を示し、25歳以上の被検者では年齢と好中球スーパーオキシド生成能に相関関係はなかった。以上の結果から、運動習慣は好中球の殺菌能には影響を与えず、18歳から24歳

までの世代は特異的に殺菌能が高いが、25歳以上では加齢による影響がないことが明らかとなった。

緒 言

好中球は循環白血球の50～60%を占め、非特異的免疫の中心的な役割を果たしており、生体防御機構の第1線を担っている^{1,2)}。体内に侵入した異物や微生物の殺菌過程において、好中球に存在するNADPH (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) オキシダーゼはスーパーオキシドを生成する。これらがより反応性の高い活性酸素種に変換され、殺菌作用に役立てられている。よって、好中球のスーパーオキシド生成能を評価することで、個人の有する殺菌能の優劣を判断できると考えられる。

好中球スーパーオキシド生成能は、血液から単離した好中球に液性刺激物質やオプソニン化ザイモザン等を加え、生成されたスーパーオキシドをシトクロームCに還元させる方法により

細胞数当たりで定量することができる。刺激剤の1つであるPMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) は好中球の細胞膜に存在する受容体を通過し、PKC (protein kinase C) に直接作用することでNADPHオキシダーゼを活性化させる。そして、NADPHオキシダーゼはペントースリン酸経路から供給されたNADPHから電子を受け取り、それを分子状酸素に渡すことでスーパーオキシドを生成する。

これまでに、一過性の運動負荷が好中球スーパーオキシド生成能に与える影響が報告されている。それによれば、1時間以内で終了するような中程度の運動では好中球スーパーオキシド生成能は変化しない^{3,4)} が、30分以内の短時間でも疲労困憊まで至るような運動では低下する^{5,6,7)} ことが報告されている。また、ヨガのような静的運動では変化しないことが認められている⁸⁾。このように一過性の運動負荷の影響に対して、継続的な運動習慣が好中球スーパーオキシド生成能に与える影響については明らかにされていない。

高齢者は感染症に対する抵抗性が低く、死亡率も高いことが報告されている^{9,10)}。高齢者の好中球数は正常値を示す¹¹⁾ ことから、殺菌能をはじめとする好中球機能の低下が生じていると考えられる。これまで、高齢者群と若年者群の好中球スーパーオキシド生成能が比較・検討されているが、差はない^{12,13,14,15)}、若年者群が高い¹⁶⁾、高齢者群が高い¹⁷⁾ と一致した結果が得られていない。また、好中球スーパーオキシド生成能について、幅広い年齢層を対象とした横断的な研究は実施されていない。

そこで本研究は、18歳から79歳までの健康な成人男性122名を被検者に、運動習慣と加齢がPMA刺激とシトクロームC還元法により評価された好中球スーパーオキシド生成能に与える影響を検討することを目的とする。

1. 研究方法

1. 1 被検者

健康的な日常生活を営んでいる18歳(大学1年生)から79歳までの男性122名(身長 170.6 ± 6.4 cm, 体重 65.8 ± 8.5 kg, BMI 22.6 ± 2.7 m²/kg)を対象とした。被検者には本研究の目的、方法および測定に伴う危険性を文書により事前に説明した。そして、同意書に署名を得てからすべての測定を実施した。また、被検者には身体特性や生活習慣に関するアンケート調査の記入を実施してもらった。

1. 2 採血および好中球浮遊液の作成

午前9時から10時の間に、ヘパリンコーティングしたシリンジを用いて、肘静脈より約20mlの採血を行った。

好中球浮遊液の作成は既報¹⁸⁾に従った。血液から好中球を単離するため、シリンジ内に血液量の約3分の2に相当する2%デキストラン溶液を加えて混和し、赤血球層と好中球を含む血漿層に分離させ、血漿層のみをプラスチックチューブに移した。そして他のプラスチックチューブに予め準備された10mlのFicoll-Paque溶液(Amersham Pharmacia Biotech AB社製)に重層し、2000rpm, 15℃で30分間遠心分離した。遠心後、分離した上層と中間層(リンパ球・単球・血小板)をアスピレーターにより吸引除去し、好中球と若干の赤血球を含む下層の細胞のみを残した。そして赤血球を取り除くために、0.1% NaCl溶液により低張処理し、30秒後に1.7% NaClを加えて等張に戻した後、1300rpm, 15℃で5分間遠心分離した。遠心後、上層を吸引除去し、0.9% NaCl溶液を加え、1300rpm, 15℃で5分間遠心分離を行った。この行程を2度実施した。最後の遠心処理後、上澄みを取り除き、リン酸緩衝生理食塩水〔以下

PBS (－) を加え、マイクロチューブに移し変えて単離好中球のみの1mlの好中球浮遊液を作成した。なお、マイクロチューブ内の好中球数および生存率を自動血球計測器 (NucleoCounter, ChemoMetec 社製) により測定した。

1. 3 好中球スーパーオキシド生成能の測定

既報¹⁸⁾に従い、二波長分光光度計 (556 型二波長自記分光光度計, 日立製作所製) を用いて、シトクローム C 還元法により実施した。測定時の緩衝液を PBS (－) に MgCl_2 とグルコースをそれぞれ最終濃度 1mM と 5mM になるように加えて作成し、37℃で保持した。刺激物質には、ジメチルスルフォキシド (和光純薬工業株式会社製) で 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整された PMA (Sigma 社製) を使用した。なお、キュベット内には好中球数が 1×10^6 個になるように浮遊液量を決定した。

測定手順として、キュベットに緩衝液と好中球浮遊液を入れ 37℃で5分間のインキュベーションを行った。その後、1.2mM の Cyto C (Ferricytochrome C, Sigma 社製) を 30 μl 加えて 37℃で1分間のインキュベーションを行い、ベースラインをペンレコーダー (REC 101, Pharmacia 社製) で記録した。次に、PMA を 10 μl 加えて攪拌し、Cyto C とスーパーオキシドの還元反応を開始させ、それを 540nm と 550nm の2波長で数分間計測した。各検体につき3回の測定を行った。それぞれの検体において SOD (Superoxide dismutase, Sigma 社製) を 10 μl 加え、Cyto C とスーパーオキシドの還元反応が停止することを確認した。なお、分光光度計による測定中もキュベット内の温度は 37℃に保った。好中球スーパーオキシド生成能 ($\text{nmol}/\text{min}/10^7 \text{ cells}$) は、測定で得られた最大傾斜線の傾きを算出し、その値を Cyto C の

吸光度係数 19.1 で除すことで求めた。

1. 4 統計処理

得られたデータは平均値と標準偏差で表した。平均値の差の検定には一元配置の分散分析を用い、F 値が有意な場合には適宜 post-hoc テストを実施した。また、変数間の相関関係には Pearson 積率相関分析を用いた。いずれの場合も有意水準は 5% 以下とした。

2. 研究結果

好中球浮遊液における生存率は被検者全員の平均値で $95.3 \pm 2.1\%$ であった。好中球スーパーオキシド生成能は最高値 $155.7 \text{ nmol}/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ 、最低値 $13.0 \text{ nmol}/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ と約 10 倍の開きが認められ、被検者全員の平均値は $79.5 \pm 28.5 \text{ nmol}/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ であった。

被検者を年齢により、6 群にグルーピングした。すなわち、18 歳から 24 歳以下を Group1 (G1, $n=53$)、25 歳以上 34 歳以下を Group2 (G2, $n=16$)、35 歳以上 44 歳以下を Group3 (G3, $n=15$)、45 歳以上 54 歳以下を Group4 (G4, $n=16$)、55 歳以上 64 歳以下を Group5 (G5, $n=9$)、そして 65 歳以上を Group6 (G6, $n=11$) とした。各グループの身体特性および好中球生存率を表 1 に示した。また、喫煙習慣、肥満 (BMI が 26.5 以上) および生活習慣病の罹患状況を表 2 に示した。生活習慣病に関しては、いずれも軽度な症状であった。高血糖状態は好中球スーパーオキシド生成能を低下させるという報告^{19, 20)}があるが、本研究の被検者 2 名の値はそれぞれ 58.4 と $105.7 \text{ nmol}/\text{min}/10^7 \text{ cells}$ であり、そのような傾向は特に認められなかった。また、喫煙習慣、肥満および他の生活習慣病と好中球スーパーオキシド生成能との間にも特徴的な関係はなかった。

次に運動習慣と好中球スーパーオキシド生成

表1 Physical characteristics and neutrophils viability in each group

	N	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (m ² /kg)	Viability (%)
G1	53	171.9 ± 5.5	64.2 ± 9.2	21.7 ± 2.8	95.0 ± 2.1
G2	16	173.9 ± 4.7	72.1 ± 9.5*	23.8 ± 2.8	95.9 ± 2.0
G3	15	173.4 ± 6.7	64.5 ± 3.4	21.6 ± 2.9	94.7 ± 2.7
G4	16	168.8 ± 4.7	69.1 ± 6.8	24.2 ± 1.7	96.6 ± 1.5
G5	9	169.0 ± 4.7	65.6 ± 5.3	23.0 ± 1.5	95.8 ± 2.4
G6	11	161.6 ± 5.9*	61.1 ± 7.6	23.4 ± 2.1	95.1 ± 1.2

G1; the age of 18 and 24, G2; the age of 25 and 34, G3; the age of 35 and 44, G4; the age of 45 and 54, G5; the age of 55 and 64, G6; 65 and over. * denotes significant difference ($p < 0.05$) when compared with other groups.

表2 The numbers of smoking, obesity and life style sickness in each group

	Smoking	Obesity	Diabetes	Hyperlipemia	Hypertension
G1	5	2	0	0	0
G2	2	1	1	1	0
G3	4	3	0	0	1
G4	2	0	0	2	2
G5	3	0	1	1	0
G6	2	0	0	4	2
Summation	18	6	2	8	5

G1; the age of 18 and 24, G2; the age of 25 and 34, G3; the age of 35 and 44, G4; the age of 45 and 54, G5; the age of 55 and 64, G6; 65 and over. Obesity; BMI ≥ 26.5 .

能の関係を検討した。まず、大学生（18歳から24歳）において、運動部で活動している者26名（鍛錬者群）と過去3年間定期的な運動を行っていない者27名（非鍛錬者群）に分けた。所属していた運動部は、野球、バスケットボール、バレーボール、ラグビー、陸上競技、柔道など多岐にわたっていた。鍛錬者群（ 86.0 ± 32.5 nmol/min/ 10^7 cells）と非鍛錬者群（ 97.0 ± 36.6 nmol/min/ 10^7 cells）の好中球スーパーオキシド生成能には差は認められなかった。25歳以上で過去3年間定期的に運動を行っている者20名（運動群）と行っていない者47名（非運

動群）をアンケート結果により分類した。運動群は週2回以上、1回30分以上の運動・スポーツを実施している者を分類し、実施されていた運動・スポーツはウォーキング、パークゴルフ、テニスなどの有酸素運動であった。大学生の結果と同様に、運動群（ 73.8 ± 24.3 nmol/min/ 10^7 cells）と非運動群（ 70.8 ± 21.3 nmol/min/ 10^7 cells）で差は認められなかった。

上述の結果より本研究では被検者全員を対象に、加齢と好中球スーパーオキシド生成能の関係を検討した。図1は各群の好中球スーパーオキシド生成能を比較したものである。G1の値

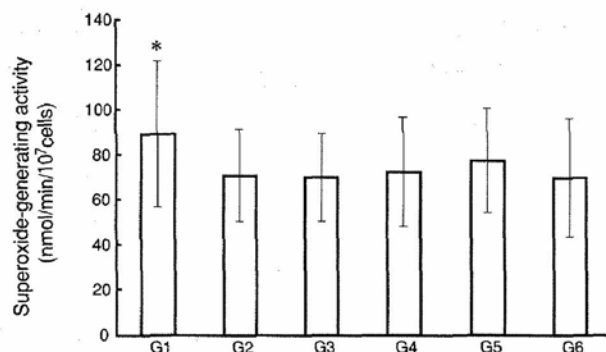


図1 Superoxide-generating activity of neutrophils in different age groups.

* denotes significant difference ($p < 0.05$) when compared with other groups. G1; the age of 18 and 24 ($n = 53$), G2; the age of 25 and 34 ($n = 16$), G3; the age of 35 and 44 ($n = 15$), G4; the age of 45 and 54 ($n = 16$), G5; the age of 55 and 64 ($n = 9$), G6; 65 and over ($n = 11$).

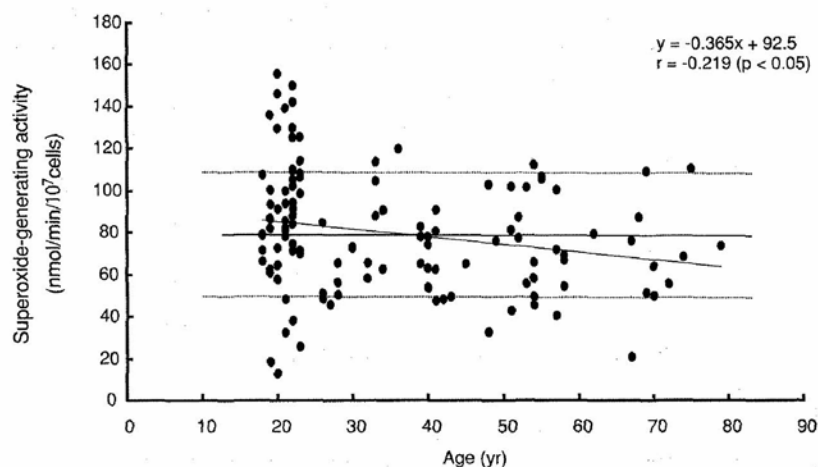


図2 Superoxide-generating activity of neutrophils with aging.

A solid line and two dotted lines denote mean value (79.5 nmol/min/10⁷cells) and ± 1 standard variations (51.0 and 108.0 nmol/min/10⁷cells), respectively.

(89.2 $\pm$ 32.5 nmol/min/10⁷ cells) は他の群の値 (G2 ; 70.8 $\pm$ 20.5 nmol/min/10⁷ cells, G3 ; 69.8 $\pm$ 19.6 nmol/min/10⁷ cells, G4 ; 72.3 $\pm$ 24.3 nmol/min/10⁷ cells, G5 ; 77.2 $\pm$ 23.2 nmol/min/10⁷ cells, G6 ; 69.7 $\pm$ 26.3 nmol/min/10⁷ cells) よりも有意に高値であった。

年齢と好中球スーパーオキシド生成能の相関関係を検討したところ、相関係数 (-0.219) は低いものの有意な負の相関関係が認められた (図2)。しかしながら、G1を抜いた25歳以上 (G2からG6まで) の被検者では有意な相関関係は得られなかった ($r=0.042$, $y=0.066x+68.4$)。

3. 考 察

殺菌能の指標である好中球のスーパーオキシド生成能に関して、本研究では次のような知見を得た。①生成能は喫煙や軽度な生活習慣病、運動習慣などには影響されない。②生成能は18歳から24歳の世代が他の世代に比較して高い状態にあり、加齢によっては緩やかに減少する傾向があるが、25歳以上では加齢による影響は認められない。

これまで一過性の運動負荷が好中球スーパーオキシド生成能に与える影響については検討さ

れているものの、運動習慣のある、なし、もしくは鍛錬者と非鍛錬者に焦点をあてて比較した研究は見当たらない。Hack et al.⁵⁾ は非常によくトレーニングされた長距離ランナーとトライアスロン選手の安静時の好中球スーパーオキシド生成能は、非鍛錬者のそれと差がないことを報告している。しかしながら、Hack et al.⁶⁾ はまた安静時の好中球スーパーオキシド生成能が非鍛錬者と差がない長距離ランナーにおいて、重要な試合がありトレーニング強度の高い時期は、トレーニング強度の低い持久走が中心な時期よりも好中球スーパーオキシド生成能が低いことを認めている。一過性の運動負荷による研究結果においても、好中球スーパーオキシド生成能は中程度の運動強度では変化しない^{3,4)} が、短時間でも疲労困憊にまで至る運動では運動後に低下する^{5,6,7)} と報告されている。これらの知見から運動の影響を検討する場合、行っている運動の強度により好中球スーパーオキシド生成能に与える影響が異なると考えられ、本研究では競技スポーツに従事している大学生と健康のために運動・スポーツを行っている他の世代を区別して比較を行った。その結果、大学生と他の世代のどちらにおいても、運動習慣が好中

球スーパーオキシド生成能に与える影響は認められず、日常の運動習慣は好中球スーパーオキシド生成能に影響を与えないことが明らかとなった。

運動習慣の影響がなく、喫煙や生活習慣病との間にも特徴的な傾向が認められなかったことから、本研究では被検者全員を対象に加齢が好中球スーパーオキシド生成能に与える影響を検討した。被検者全員を対象にした場合、年齢と好中球スーパーオキシド生成能の相関関係は $r=-0.219$ と低いながら有意であった (図2)。しかしながら、25歳以上では相関関係は認められず ($r=0.042$)、群ごとの比較ではG1が他の群に比較して有意に高値を示し、G2からG6には差はなかった (図1)。このことから、好中球スーパーオキシド生成能は18歳から24歳の世代が特異的に高く、その後、約10年間で低下した能力は、およそ80歳まではほとんど変化しないと考えられる。

図2には被検者122名の平均値 ($79.5 \text{ nmol/min}/10^7 \text{ cells}$) と ± 1 標準偏差 ($51.0 \text{ nmol/min}/10^7 \text{ cells}$ と $108.0 \text{ nmol/min}/10^7 \text{ cells}$) に相当するラインが示されている。本研究で用いた方法で好中球スーパーオキシド生成能を測定すると、その値は一般的に $50 \sim 100 \text{ nmol/min}/10^7 \text{ cells}$ になることが示されている¹⁸⁾。よって、図2のラインはほぼ一般的な値の範囲に相当する。G1に属する18歳から24歳では、 ± 1 標準偏差を超える者が多い。他の世代では ± 1 標準偏差を超える者は少なく、ほぼ一般的な範囲に収まっている。このことから、18歳から24歳までの世代では好中球スーパーオキシド生成能は極端に高い値や低い値が多く、25歳以上になると加齢とともに $50 \sim 100 \text{ nmol/min}/10^7 \text{ cells}$ の範囲に収束していくと考えられる。18歳から24歳の世代で大きな個人差が存在する理由については明らかではなく、今後の

検討課題である。

先行研究では若年者群 (およそ20歳から40歳の範囲) と高齢者 (およそ65歳から95歳の範囲) 群の2群における好中球スーパーオキシド生成能が比較されている。その結果については一致していないものの、群間に差はないという報告が多い^{12, 13, 14, 15)}。Indelico et al.¹⁶⁾ は、若年者36名 (20歳から30歳) と高齢者35名 (65歳から93歳) の好中球スーパーオキシド生成能を比較し、若年者群が有意に高いことを認めている。一方、Scott et al.¹⁷⁾ は若年者10名 (23歳から30歳) と高齢者7名 (71歳から79歳) を比較し、高齢者群の好中球スーパーオキシド生成能の方が有意に高いことを報告している。このような結果の不一致は、対象とした被検者の違いによると考えられるが、若年者群と高齢者群に差がないという報告が多いことは本研究の結果と一致すると思われる。他の哺乳動物においても、加齢はPMA刺激による好中球スーパーオキシド生成能に影響を与えないことが報告されている²¹⁾。また、Whyte et al.²²⁾ は血液から分離された直後の好中球と、24時間培養された好中球のスーパーオキシド生成能をPMA刺激で比較し、好中球それ自体に時間経過 (加齢) の影響はないことを認めている。

本研究で用いたPMAは好中球スーパーオキシド生成能を測定する刺激物質として多くの研究で用いられている^{23, 24, 25, 26, 27, 28, 29)}。PMAは好中球の膜を通過してPKCに結合している特殊な受容体もしくはPKC自体に直接結合すると考えられている³⁰⁾。これによりPKCは活性化され、これが引き金となって細胞質と細胞膜に分かれて局在するNADPHオキシダーゼがリン酸化され、スーパーオキシドを生成する呼吸バースト (respiratory burst) が生じる^{31, 32)}。本研究の結果はこの一連の生理学的プロセスおよびNADPHオキシダーゼ活性は25歳以降、

加齢による影響を受けないことを示唆する。Idelicato et al.¹⁶⁾ は、高齢者のPMA受容体数とPKCが細胞質内タンパクを膜へトランスロケーションさせる能力は、若年者と違いがないことを報告している。また、我々はPMA刺激による好中球スーパーオキシド生成能に差がない若年者群と高齢者群では、NADPHオキシダーゼ活性自体にも差がないことを認めている（未発表データ）。24歳以下の若年者で非常に高い値や低い値を示す者が多い理由やそれが加齢によって一般的な値にまで変化する原因について明らかではなく、今後より詳細な検討を加えて行く。また、それらの課題を解明する一助として、18歳以下のより低年齢層の好中球スーパーオキシド生成能も測定する予定である。

4. まとめ

殺菌能の指標である好中球スーパーオキシド生成能を18歳から79歳までの男性122名を対象に検討した。その結果、運動習慣や喫煙、軽度な生活習慣病は好中球スーパーオキシド生成能に影響を与えないことが明らかとなった。また、年齢と好中球スーパーオキシド生成能には有意な負の相関関係 ($r=-0.219$) が認められたが、25歳以上の世代ではそのような関係は得られなかった。18歳から24歳までの世代の好中球スーパーオキシド生成能は、25歳以上の各世代よりも有意に高かった。以上のことは、好中球の殺菌能は25歳以上では加齢による影響はなく、個人のもつ先天的な要因によって決定されていることが示唆される。18歳から24歳までの世代で個人差が大きい理由については今後の研究課題である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、研究助成を賜りました財団法人石本記念デサントスポーツ科学

財団に心から深謝いたします。また、本研究の実施にあたりご協力頂きました北海道教育大学札幌校スポーツ生理学研究室の院生および学生（中村寛成君、木本理可さん、守田和代さん）、そして多くの被検者の皆様に心より感謝致します。

文 献

- 1) Smith, J.A., Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leuko. Bio.*, 56:672-686 (1994)
- 2) Smith, J.A., Exercise immunology and neutrophils. *Int. J. Sports Med.*, 18:S46-S55 (1997)
- 3) Cannon, J.G., Orencole, F.S., Fielding, A.R., Meydani, M., Meydani, N.S., Fiatarone, A.M., Blumberg, B.J. and Evans, J.W., Acute phase response in exercise: interaction of age and vitamin E on neutrophils and muscle enzyme release. *Am. J. Physiol.*, 259:R1214-R1249 (1990)
- 4) Pyne, D.B., Smith, J.A., Baker, M.S., Telford, R.D., Weidemann, M.J., Neutrophil oxidative activity is differentially affected by exercise intensity and type. *J. Sci. Med. Sport*, 3:44-54 (2000)
- 5) Hack, V., Strobel, G., Rau, J.-P. and Weicker, H., The effect of maximal exercise on the activity of neutrophil granulocytes in highly trained athletes in a moderate training period. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 65:520-524 (1992)
- 6) Hack, V., Strobel, G., Weiss, M. and Weicker, H., PMN cell counts and phagocytic activity of highly trained athletes depend on training period. *J. Appl. Physiol.*, 77 (4) :1731-1735 (1994)
- 7) Kambayashi, I., Fujii, H., Takeda, H., Momma, M., Itaki, C., Uchida, E., Ishimura, N., Yamaguchi, M., Nakamura, T., Masuda, C. and Inazawa, T., Effect of maximal exercise on superoxide-generating activity of neutrophils. Suda, T., Asao, H. and Moriya, K. (eds) *Proceedings of the international council on health, physical education and sports in Northeast Eurasia 2002*, pp.18-24 (2003)
- 8) Kambayashi, I., Takeda, H., Fujii, H., Yamaguchi, M., Momma, M., Itaki, C., Uchida, E., Nakamura, T., Masuda, C., Ishimura, N., Obata, Y. and Fukushi,

- M., Effect of yoga on enzymatic activities of neutrophils and natural killer cells. Suda, T., Asao, H. and Moriya, K. (eds) *Proceedings of the international council on health, physical education and sports in Northeast Eurasia 2002*, pp.25-30 (2003)
- 9) Yoshikawa, T. and Norman, D.C. (eds) *Epidemiology of infectious diseases*. New York, Tokyo, Igaku-shoin, Inc., p3-7 (1987)
- 10) National Center for Health Statistics (U.S) *Vital statistics of the university states*, Washington, DC:US Government Printing Office, 81-93 (1990)
- 11) Colins, J.M., Scott, R.B., McClish, D.K., Taylor, J.R. and McLean Grogan, W., Altered membrane anisotropy gradients of plasma membrane of living peripheral blood leukocytes in ageing and Alzheimer's disease. *Mech. Ageing Dev.*, 59:153-162 (1991)
- 12) Fülöp, T.Jr., Varga, Z., Nagy, J.T. and Fóris, G., Studies on opsonized zymozan, FMLP, carbachol, PMA and A23187 stimulated respiratory burst of human PMNLs. *Biochem. Inter.*, 17 (3) :419-426 (1988)
- 13) Lipschitz, D.A., Udupa, K.B., Indelico, S.R. and Das, M., Effect of age on second messenger generation in neutrophils. *Blood*, 78 (59) :1347-1354 (1991)
- 14) Tortorella, C., Ottolenghi, A., Pugliese, P., Jirillo, E. and Antonaci, S., Relationship between respiratory burst and adhesiveness capacity in elderly polymorphonuclear cells. *Mech. Ageing Dev.*, 69:53-63 (1993)
- 15) Biasi, D., Carletto, A., Dell'agnola, C., Caramaschi, P., Montesanti, F., Zavateri, G., Zeminian, S., Bellavite, P. and Bambara, L.M., Neutrophil migration, oxidative metabolism, and adhesion in elderly and young subjects. *Inflammation*, 20 (6) :673-681 (1996)
- 16) Indelico, S.R., Udupa, K.B., Balazovich, K.J., Boxer, L.A. and Lipschitz, D.A., Effect of age on phorol-ester stimulation of human neutrophils. *J. Gerontol.*, 45 (3) :B75-B80 (1990)
- 17) Scott, R.B., Wood, H.E., Martin, S., Kukreja, R.C. and Hess, M.L., Superoxide radical production after phorbol ester stimulation in neutrophils of aged donors. *Exp. Gerontol.*, 25:523-532 (1990)
- 18) 浅田浩二, 中野稔, 柿沼カツ子 (編) *活性酸素測定マニュアル*. 第4版, 講談社, 東京, pp.1-244 (1998)
- 19) Nielson, C.P. and Hindson, D.A., Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vivo. *Diabetes*, 38:1031-1035 (1989)
- 20) Perner, A., Nielsen, S.E. and Rask-Madsen, J., High glucose impairs superoxide production from isolated blood neutrophils. *Intensive Care Med.*, 29:642-645 (2003)
- 21) Alvarez, E., Ruiz-Gutierrez, V., Sobrino, F. and Santa-Maria, C., Age-related changes in membrane lipid composition, fluidity and respiratory burst in rat peritoneal neutrophils. *Clin. Exp. Immunol.*, 124:95-102 (2001)
- 22) Whyte, M.K., Meagher, L.C., MacDermot, J. and Haslett, C., Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, 150 (11) :5124-5134 (2000)
- 23) Abramson, J.S., Lyles, D.S., Heller, K.A. and Bass, D.A., Influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction. *Infect. Immun.*, 37 (2) :794-799 (1982)
- 24) DeChatelet, L.R., Lees, C.J., Walsh, C.E., Long, G.D. and Shirley, P.S., Comparison of the calcium ionophore and phorbol myristate acetate on the initiation of the respiratory burst in human neutrophils. *Infect. Immun.*, 38 (3) :969-974 (1982)
- 25) Yamazaki, M., Matsuoka, T., Yasui, K., Komiyama, A. and Akabane, T., Dopamine inhibition of superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 83:967-972 (1989)
- 26) Pyne, D.B., Baker, M.S., Fricker, P.A., McDonald, W.A., Telford, R.D. and Weidemann, M.J., Effects of an intensive 12-wk training program by elite swimmers on neutrophil oxidative activity. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 27 (4) :536-542 (1995)
- 27) Itou, T., Iida, T. and Kawatsu, H., Kinetics of oxygen metabolism during respiratory burst in Japanese eel neutrophils. *Dev. Comp. Immunol.*, 20 (5) :323-330 (1996)
- 28) Lopes, L.R., Laurindo, F.M., Mancini-Filho, J., Curi, R. and Sannomiya, P., NADPH-oxidase activity and lipid peroxidation in neutrophils from rats fed fat-rich diets. *Cell Biochem. Funct.*, 17:57-64 (1999)
- 29) Peake, J., Wilson, G., Hordern, M., Suzuki, K.,

- Kanemitsu, Y., Nosaka, K., Mackinnon, L. and Coombes, J., Changes in neutrophils surface receptor expression, degranulation, and respiratory burst activity after moderate- and high-intensity exercise. *J. Appl. Physiol.*, 97:612-618 (2004)
- 30) Neidel, J.E., Kuhn, L.J. and Vandenbark, G.R., Phorbol diester receptor copurifies with protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:36-40 (1983)
- 31) Andrew, P.C. and Babior, B.M., Endogenous protein phosphorylation by resting and activated human neutrophils. *Blood*, 61:333-340 (1983)
- 32) Andrew, P.C. and Babior, B.M., Phosphorylation of cytosolic protein by resting and activated human neutrophils. *Blood*, 64:883-890 (1984)