

ノルディックウォーキングを用いたセルフリーDNA動態の検証 時野谷勝幸^{1,2}, 長津恒輝^{3,4}, 土屋亮太⁴, 竹越一博⁵, 杉山康司⁴

¹東京都立大学, ²日本学術振興会, ³順天堂大学, ⁴静岡大学, ⁵筑波大学

1. 緒言

新型コロナウイルス (COVID-19) が未曾有のパンデミックを引き起こしている現代、レクリエーション運動には、制限が設けられている。”With コロナ”という言葉为背景に新しい生活様式が模索されている中、スポーツ庁は、ウォーキングを推奨している。実際のスポーツ庁の調査では、運動実施の種類において、ウォーキングが 62.4%を占め、なおかつ週 3 日以上の実施者が多いと報告している (スポーツ庁, 2020)。ウォーキングの 1 つにノルディックウォーキング (NW) という歩行様式が北欧を中心に広まっている (INWA, 2021)。先行研究によると、酸素消費量はウォーキング時よりも 10%以上を得られるにも関わらず、下肢への負担軽減に加え、主観的運動強度もウォーキングと比較してほとんど変わらない (Saunders et al. 2008; Ernst and Gerald. 2009; Sugiyama et al. 2013)。NW は、ウォーキングよりも毎回の運動量を十分に確保できるため、健康の維持・増進につながり、生活の質を向上させる。

一方、健康に継続的に運動を実施するためには、生体の負担を客観的にモニタリングできるバイオマーカーの開発が求められる。近年注目を集めているバイオマーカーにセルフリーDNA (cell free DNA: cfDNA) がある。cfDNA は、細胞の腫瘍組織などの DNA 断片が血中へ漏出しているため、がんや出生前診断などに使用されている (Gai and Sun, 2009)。cfDNA は、約 180bp 程の断片 DNA として、血中を循環している (Jiang and Dennis Lo, 2016)。また、妊婦の尿から胎児の DNA を検出した際に、そのサイズが、30~50bp であることも明らかとなってきた (Tsui et al. 2012)。先行研究において、一過性運動によって血中の cfDNA は、上昇することが報告されている (Breitbach et al. 2012; Beiter et al. 2014)。さらに、この上昇は急激なもので、運動後、速やかに減少することも明らかとなっている。

運動中は生体にかかる負担として、骨格筋の構造上、収縮様式に応じてエネルギー需要による代謝的ストレスと物理的な負荷によるメカニカルストレスの 2 種類が挙げられる (Tee et al. 2007; Garnier et al. 2020)。運動による cfDNA の上昇は、これらのストレスが関与している可能性が高い。生体に対するこれらのストレスの加わり方は、歩行条件を変えることによって可能となる。特に上り坂の歩行では、短縮性収縮が中心となる代謝的ストレスが大きくなる一方で、下り坂の歩行では、伸張性収縮が中心となるメカニカルストレスが大きくなる。しかしながら、これらストレスの影響に着目した研究は少なく、cfDNA の総量やサイズ変化にも着目した研究は存在しない。加えて、NW というウォーキングとは異なる歩行様式の影響について cfDNA の変動も検証することで、ウォーキングと cfDNA の両者に新たな知見を見出すことができる。

そこで本研究の目的は、ノルディックウォーキングがセルフリーDNA の濃度やサイズに及ぼす影響を代謝的およびメカニカルストレスの観点から検証することとした。

2. 研究方法

2.1 研究倫理

本実験は、筑波大学医の倫理委員会の承認を受けて実施している（承認番号：1435-1）。対象者は、実験開始の前に研究目的・方法ならびに起こりうる危険性を文書および口頭にて説明し、インフォーム・コンセントを得た。

2.2 対象者

運動習慣のある健康な成人男性7名を対象に実験を行った。全ての対象者は、日本ノルディックウォーキング振興会が定めるノルディックウォーキングの指導資格を有する者であった。各対象者の身体的パラメータは、表.1 に示す通りである。

2.3 プロトコル

本研究のプロトコルを図.1 に示す。実験は、平地歩行 (Walking: W)、平地ノルディックウォーキング (Nordic walking: NW)、上り坂ノルディックウォーキング (Uphill NW: UNW)、下り坂ノルディックウォーキング (Downhill NW: DNW) の4条件を実施した。勾配は、平地で0%、上りおよび下りで±15%で実施した。また本実験の条件実施は、ランダム試行とした。加えて、条件の休息は、最低でも48時間の間隔を空けて実施した。なお、ポールを使用する条件において、ポールの長さは日本ノルディック振興会推奨である身長に0.68を掛けた数値に調節した。

対象者の実験前日の統制として、一夜絶食（水の補給のみ可）、アルコール摂取、激運動を禁止した。実験当日は、採血を行う60分前に規定食（200kcal）を摂取し、健康状態を確認した。なお、安静日の採尿については、規定食摂取1時間後に採尿を行った。その後、携帯型心拍数測定装置および表面筋電図用EMG電極（EMG Isolater SX2300; Biometrics社）を装着した。トレッドミル上で呼気ガス代謝測定のために口と鼻を完全に覆うマスクを装着した。その後、呼気ガス代謝および筋電図（EMG）測定を開始した。仰臥位で5分間の安静後、漸増負荷法を用いたウォーミングアップを行った。漸増負荷は、60～90m/minまで10m/minずつ2分毎に漸増させ、計8分間行った。その後、安静代謝に戻るまで座位安静を保ち、本実験として60分間の歩行条件を実施した。なお、開始30分後に1分間の給水（200mL）の時間を設けた。実験室の気温および湿度はほぼ一定になるように努め、平均室温は $21.9\pm 1.3^{\circ}\text{C}$ 、平均湿度は $44.9\pm 13.9\%$ であった。

2.4 呼気ガスおよび心拍数

安静中および運動中をそれぞれ5秒間隔で測定した。呼気濃度の測定は実験前に既知濃度の3種混合ガス（ N_2 ベース、 O_2 :14.98%、 CO_2 :4.62%）を用い、校正されたガス分析器（ミナト医科学社）により測定した。本研究は、ダグラスバック法に基づいて流量計を用い呼気量を5秒間毎に定量した。

運動時心拍数（HR）の測定は、心拍センサー（HRM-Tri; ガーミン社）を胸部に装着し、専用の時計（ForeAthlete® 230J; ガーミン社）と同期した後、安静代謝測定時から本実験が終了するまでのRR間隔を連続して測定した。

2.5 筋電図

各対象筋において、全て左側に電極を装着した。電極装着の前に、筋電図導入部分を皮

膚処理（スキンプュア；日本光電工業社）により皮膚抵抗を落とし、アルコール綿で拭き取った。アルコールの乾燥後、EMG 電極を各対象筋の筋腹に装着した。アンプ内蔵型 EMG（EMG Isolater SX2300；Biometrics 社）を使用し、サンプリング周波数を 1 kHz として A/D 変換（Power Lab 16/30；AD Instruments）を介し、パーソナルコンピュータに取り込み、生体データ解析ソフト（LabChart7.3.7Japanese；AD Instruments）を用いて連続記録した。

2.6 血液生化学

各条件前後、肘静脈から採血を行った。血清分離剤ゲルおよび凝固促進剤入りの血清採血管（9 mL）を用いて採血し、30 分間室温で静置した後、3000 rpm で 15 分間遠心分離した。抽出した血清は、-30°C で解析まで凍結保存した。分離した血清は、遊離脂肪酸、ミオグロビン、クレアチニン、尿素窒素の測定を行うために、つくば i-Laboratory LLP へ検査委託として提出した。

血糖値は、自己検査用グルコース測定器アキュチェックアビバナノおよびアキュチェックアビバストリップ F (Roche Diabetes Care Inc.) を用いて測定した。また血中乳酸値は、簡易測定器である Lactate Pro2 および Lactate Pro2 センサー（アークレイ株式会社）を用いて行った。

2.7 血清および尿中 cfDNA

血清 cfDNA は、Plasma/Serum Cell-Free Circulating DNA Purification Mini Kit (Norgen Biotek Inc.)、尿中 cfDNA は、Urine Cell-Free Circulating DNA Purification Midi Kit (Norgen Biotek Inc.) を用い、それぞれ説明書にしたがって抽出した。核酸抽出に用いたサンプル量は、血清を 500 μ L、尿を 10mL とし、最終溶出量については、血清を 30 μ L、尿を 50 μ L とした。

抽出した cfDNA は、Expert2100 ソフトウェアを搭載した Agilent2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.) と High Sensitivity DNA マイクロチップ (Agilent Technologies Inc.) を組み合わせたオンチップ電気泳動法による DNA 分析によって測定した。定量化とサイジングは分子量標準ラダーと 2 つの DNA 内部標準によって正規化され、そのサイズはソフトウェアによって自動的に計算された。電気泳動後のゲルイメージについて、35 および 10,380bp の 2 つの主要なピークは、サイジングを計算するために使用される 2 つのサイズマーカーを表し、ベースラインからの差はサンプル中の cfDNA の濃度を示す。また血清の cfDNA のサイズを 50-300bp と 301bp 以上の 2 つのパターンに分けて解析を行った。

2.8 統計処理

測定結果は全て平均値 \pm 標準偏差 (Mean \pm SD) で表し、2 条件間の比較には、対応のある t 検定を用いた。また 2 条件比較の中で、時間の要因を加えた統計処理は、対応のある二要因分散分析 (Two-way ANOVA) を行った。さらに 3 条件の比較には、対応のある一要因分散分析 (One-way ANOVA) を行った。加えて、3 条件比較の中で、時間の要因を加えた統計処理は、対応のある二要因分散分析を行った。One-way ANOVA での有意差が認められた場合、または Two-way ANOVA での交互作用が有意であった場合、いずれも多重比較検定として Bonferroni 法を用いて解析を行った。統計処理には、GraphPad Prism 7

(GraphPad Software, Inc.) を用いた。有意水準はいずれも 5%未満とし、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ で示した。

3. 結果

3.1 ウォーキングおよびノルディックウォーキング比較

呼気ガスパラメータにおいて、酸素摂取量は、条件間における主効果が認められた (図.2-A)。換気量は、交互作用が認められ、15、30、45 分地点で、NW が W 条件と比較して有意に高い値を示した (図.2-B)。さらに、RER および心拍数については、時間における主効果が認められた (図.2-C,D)。

上肢 (三角筋および上腕三頭筋) EMG は、交互作用が認められ、全ての地点で、NW が W 条件と比較して有意に高い値を示した (図.3-A,B)。また下肢 EMG については、前脛骨筋において差が認められなかった一方で、外側広筋において、交互作用が認められ、15 分地点で、W が NW 条件と比較して有意に高い値を示した (図.3-C,D)。

また血中の生化学パラメータの変化量は、条件間に有意な差はなかった (図.4; 表.2)。

血清 cfDNA 濃度は、サイズに関わらず、条件間で有意な差は認めなかったものの、10% 未満の値を示す結果となった (図.5-A,B)。泳動図の結果では、200bp 付近で、ピークが確認された (図.5-C)。また 301bp 以上の血清 cfDNA については、さまざまな位置で濃度の増加が見られたが、一致したピークを読み取ることはできなかった (図.5-D)。一方で、尿中 cfDNA 濃度は、条件間に有意な差はなかった (図.6-A)。泳動図の結果では、両条件において 35bp 付近で、ピークが確認された (図.6-B,C)。

3.2 異なる勾配条件におけるノルディックウォーキング比較

呼気ガスパラメータにおいて、酸素摂取量は、交互作用が認められ、全ての地点で、各条件間で有意な差を示した (図.7-A)。換気量についても、交互作用が認められ、15、30 分地点で、各条件間で有意な差を示し、45、60 分地点で、UNW が NW および DNW 条件と比較して有意に高い値を示した (図.7-B)。また、RER は時間における主効果が認められた (図.7-C)。心拍数については、交互作用が認められ、15 分地点で、各条件間で有意な差を示し、30、45、60 分地点で、UNW が NW および DNW 条件と比較して有意に高い値を示した (図.7-D)。

上肢 (三角筋および上腕三頭筋) EMG は、時間における主効果が認められた (図.8-A,B)。一方、下肢 EMG については、外側広筋において、条件間における主効果が認められた (図.8-C)。また前脛骨筋においては、交互作用が認められ、15、60 分地点で、各条件間で有意な差を示し、30、45 分地点で、NW が UNW および DNW 条件と比較して有意に低い値を示した (図.8-D)。

血中の生化学パラメータの変化量は、遊離脂肪酸において、UNW、DNW、NW の順に高い値を示し、全ての条件間に有意な差が認められた (図.9-A)。加えて、ミオグロビンについては、DNW が NW 条件と比較して有意に高い値を示した (図.9-B)。またクレアチニンおよび尿素窒素については、UNW が、NW および DNW 条件と比較して、有意に高い値を示した (図.9-C,D)。また血糖値および血中乳酸値に差はなかった (表.2)。

血清 cfDNA 濃度は、サイズに関わらず、UNW が、NW および DNW 条件と比較して、

有意に高い値を示した (図.10-A,B)。加えて、泳動図の結果では、W および NW 条件比較と同様な結果が見られた (図.10-C,D,E)。一方で、尿中 cfDNA 濃度は、条件間に有意な差はなかった (図.11-A)。さらに泳動図の結果でも、W および NW 条件比較と同様な結果が見られた (図.11-B,C,D)。

全ての運動条件後の血清 cfDNA 濃度 (50-300bp) と尿中 cfDNA 濃度の相関を検討した結果、有意な相関関係は認められなかった (図.12)。加えて、両者の運動前後の変化量に対する相関関係も認められなかった (データは示していない)。

4. 考察

本研究では、血中および尿中 cfDNA に及ぼす影響を検討するために、ウォーキングおよび勾配条件の異なるノルディックウォーキングをトレッドミル上で 60 分間行った。また歩行条件が異なることを生理学的観点からも明らかとするために、呼気ガスパラメータおよび表面筋電図の測定も行った。

W および NW 条件を比較した結果、酸素摂取量および換気量について、W と比較して NW 条件で、高値を示した。表面筋電図の結果において、NW 条件は上肢筋群の動員が生じるため、W 条件と比較して有意に高値を示した。これらは先行研究と一致し、歩行様式が明らかに異なる条件であったと言える (Saunders et al. 2008; Ernst and Gerald. 2009; Sugiyama et al. 2013)。一方で、NW は下肢の負担軽減が報告されているように、本研究においても外側広筋で、開始 15 分の地点で NW 条件は、W 条件よりも有意な低値を示していた。加えて、NW 条件の筋放電は、開始から終了地点までほとんど変化していないことから、安定した歩行が行えていたと考えられる。一方で、W 条件は、開始 30 分地点で有意でないものの、NW よりも高く、30 分以降で同等の動員を示す結果となった。この結果は、ウォーキングの序盤では、下肢に負担がかかっていることを示しており、先行研究と一致する (Sugiyama et al. 2013)。血液指標についても、2 条件間で有意な差はなく、エネルギー代謝が上昇する NW では、遊離脂肪酸の上昇を予想していたが、変化はなかった。実際に酸素摂取量は上昇しているため、アセチルカルニチンのような他の脂質酸化に関する指標の測定も行うことが、今後の検討課題である。エネルギー代謝の需要が高まる NW 条件では、血清および尿中 cfDNA 濃度の上昇が想定されたが、W 条件と比較して、差は認められなかった。

勾配の異なる条件下でのノルディックウォーキングを比較した結果、酸素摂取量について、全ての条件間で有意な差を示した。また、換気量および心拍数についても同様な結果が得られたが、時間の経過に伴い、最終的に NW と DNW 条件での有意な差が消失する結果を示した。一方で、RER については、有意な差が生じていないことから、生体内でのエネルギー代謝機構は同様であると考えられる。この結果に伴って、血中の遊離脂肪酸は、UNW 条件が他の 2 条件と比較して有意に高値を示したことから、脂質代謝が亢進していると言える。加えて、NW と DNW 条件で有意な差を確認したことから、DNW 条件でも脂質代謝が亢進している結果となった。先行研究においても下り坂のランニングで脂質酸化が平地よりも亢進していることが報告されている (Alkahtani et al. 2020)。これらのことから、メカニカルストレスの多い下り坂でも 60 分間の歩行は、脂質酸化が亢進することが示された。また血中の腎機能マーカーとなるクレアチニンおよび尿素窒素は、UNW 条件が他の 2 条

件と比較して有意に高値を示した。この結果は、UNW 条件では、腎機能が低下していることを示している。実際にエネルギー代謝が最も高いため、全身の血流量は UNW 条件が最も高いことが想定され、運動中の血流が骨格筋を中心に循環するため、脳を除く内臓の血流が低下したことによって、腎機能の低下が引き起こされた可能性が考えられる (Katch et al. 2011)。表面筋電図の結果は、上肢筋群で時間に対する主効果を示した一方で、下肢では条件で有意な差が確認された。外側広筋については、交互作用は認められなかったものの、条件間の主効果が認められた。特に前脛骨筋では、30 および 45 分地点で UNW と DNW 条件の有意な差が消失したが、60 分地点では、全条件間に有意な差が認められた。これらの結果から、UNW 条件は、他 2 条件と比較して明らかにメタボリックストレスに対する負荷が高かったことが示される。また一方で、ミオグロビン濃度は、DNW 条件と比較して、NW 条件でのみ有意な高値を示した。下り坂の歩行では、伸張性収縮が大きくなることでメカニカルストレスの負荷が大きくなるため、逸脱酵素であるミオグロビンの血中濃度が上昇したと考えられる。先行研究においても、伸張性収縮は短縮性収縮よりも血中の筋損傷マーカーが上昇することが示されている (Lavender and Nosaka. 2008)。

血清 cfDNA 濃度は、メタボリックストレスが最も高い UNW 条件が、サイズに関わらず有意な高値を示した。運動により上昇する血中 cfDNA は、アポトーシスおよびネクローシス細胞に由来すると考えられてきた (Atamaniuk et al. 2008)。しかし近年では、新たな細胞死プロセスであるネットーシス (NETosis) と呼ばれる好中球の免疫応答により、好中球細胞外トラップ (Neutrophil extracellular traps: NETs) という網目状の構造物を放出する (Zawrotniak and Rapala-Kozik. 2013)。これが cfDNA の由来であると考えられている。NETs の形成には、血小板の上昇が関連しており、この血小板の上昇は、循環カテコールアミン濃度に制御されている (Wang and Cheng. 1999)。本研究では、これらを測定していないが、酸素摂取量の増加や遊離脂肪酸の増加から UNW 条件で、血中のカテコールアミン濃度が上昇している可能性が考えられる。そのため、UNW 条件において、血中 cfDNA 濃度の上昇が生じたと考えられる。また一方で、DNW 条件における筋損傷マーカーであるミオグロビンの上昇は、ネクローシスを引き起こしている可能性が考えられるが、血中 cfDNA 濃度に影響を及ぼさなかった。これらの結果を踏まえると、血中 cfDNA 濃度は、メタボリックストレスによる放出が示唆される。これらをさらに検証するために、平地での NW 条件において、本研究で得られた UNW 条件のエネルギー代謝に速度を上昇させて実施することで、より詳細に明らかになると考えられる。先行研究において、ウォーキングおよび NW を同一のエネルギー代謝にして実施した場合、ウォーキングで、NW より高速で歩行することが明らかになっている (Tokinoya et al. 2016)。このように、NW の速度を上げて歩行した場合にも、cfDNA が上昇するか検証することで、よりメタボリックストレスに由来する可能性を見出すことにつながる。一方で、尿中 cfDNA 濃度に、有意な差は生じなかった。この原因の 1 つに尿中の cfDNA は、標準偏差が大きくなってしまったことが挙げられる。また血中の解析とは異なり、安静条件の尿は、別日の尿であったため、変化量に影響を及ぼした可能性が高い。先行研究において、フルマラソン後の尿中 cfDNA 濃度が有意な上昇を示している (Shishikura and Tokinoya et al. 2021, preprint) ことや 30 分間の一過性ランニングによって上昇する (未発表データ) ことが明らかになっている。本研究において、60 分間のウォーキングは、血中乳酸の有意な上昇も生じていないことから、運動強度は、低強

度であったと考えられる。このことから尿中 cfDNA 濃度の上昇を捉えるためには、運動強度が関連していると推察される。

5. 結論

ノルディックウォーキングを用いた勾配の異なる条件下では、メタボリックストレスが大きい上り坂条件において、血清 cfDNA 濃度は上昇することが明らかとなった。またメカニカルストレスが大きい下り坂条件においては、筋損傷による血清 cfDNA 濃度の上昇の影響は小さいと考えられる。さらに血中および尿中 cfDNA に関連がないことが示唆された。

本研究は、勾配の違いによって生体へのストレスを変化させた条件下で cfDNA を検討した。しかし、NW はメタボリックストレスが下り坂条件においても平地よりかかるため、今後は、筋の収縮様式のみに着目したレジスタンス運動で検討を行うことや、平地でのメタボリックストレスを上げる実験によって、本研究の課題をさらに追求できると思われる。

6. 謝辞

本研究の遂行にあたり、静岡大学人文学部高宮圭佑氏、萩原琢麻氏には、多大なるご協力を得ましたことを、心より感謝申し上げます。また静岡大学杉山康司教授の講座に所属するゼミ生の皆様には、測定補助を行って頂きましたことを、感謝の意として、ここに表します。最後に本研究に対し、研究助成金を受け賜りました公益財団法人ミズノスポーツ振興財団に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- Alkahtani S, Aljuhani O, Alkhalidi N, Almasuod N, Hezam O, Aljaloud I, Dawoud HAH, Abdusalam A. Impact of Acute Eccentric versus Concentric Running on Exercise-Induced Fat Oxidation and Postexercise Physical Activity in Untrained Men. *Biomed Res Int.*, 2020.
- Atamaniuk J, Stuhlmeier KM, Vidotto C, Tschan H, Dossenbach-Glaninger A, Mueller MM. Effects of ultra-marathon on circulating DNA and mRNA expression of pro- and anti-apoptotic genes in mononuclear cells. *Eur J Appl Physiol* 104(4): 711–717, 2008.
- Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, Schild M, Steinacker J, Mooren FC, Niess AM. Neutrophils release extracellular DNA traps in response to exercise. *J Appl Physiol.* 117(3):325–333, 2014
- Breitbach S, Tug S, Simon P. Circulating Cell-Free DNA: An Up-Coming Molecular Marker in Exercise Physiology: *Sports Medicine. Sport Med.* 42(7):565–586, 2012
- Ernst AH and Gerald S. Energy expenditure and comfort during nordic walking with different pole lengths. *J Strength Cond Res.* 23(4): 1187-1194, 2009
- Gai W and Sun K. Epigenetic biomarkers in cell-free DNA and applications in liquid biopsy. *Genes (Basel).* 10(1), 2019

Garnier Y, Lepers R, Assadi H, Paizis C. Cardiorespiratory Changes during Prolonged Downhill Versus Uphill Treadmill Exercise. *Int J Sports Med* 41(2): 69–74, 2020.

International Nordic Walking Federation (INWA). <https://www.inwa-nordicwalking.com>. 2021

Jiang P and Dennis Lo YM. The Long and Short of Circulating Cell-Free DNA and the Ins and Outs of Molecular Diagnostics. *Trends Genet.* 32(6):360–371, 2016

Katch VL, McArdle WD & Katch FI (2011) Essentials of exercise physiology. In *The Cardiovascular System and Exercise*, 4th ed., pp. 319-322.

Lavender AP, Nosaka K. Changes in fluctuation of isometric force following eccentric and concentric exercise of the elbow flexors. *Eur J Appl Physiol* 96(3): 235–240, 2006.

Saunders MJ, Hipp GR, Wenos DL, Deaton ML. Trekking poles increase physiological responses to hiking with- out increased perceived exertion. *J Strength Cond Res.* 22(5):1468-1474, 2008

Shishikura Y, Tokinoya K, Aita Y, Sekine N, Sugasawa T, Yoshida Y, Kosaki K, Kumamoto S, Ishikura K, Kuji T, Kawakami Y, Nabekura Y, Maeda S, Takekoshi K. The dynamics of cell-free DNA from urine and blood after a full marathon. Preprint, 2021

Sugiyama Koji, Kawamura M, Tomita H, Katamoto S. Oxygen uptake, heart rate, perceived exertion, and integrated electromyogram of the lower and upper extremities during level and Nordic walking on a treadmill. *J Physiol Anthropol.* 32(2): 1-9, 2013

Tee JC, Bosch AN, Lambert MI. Metabolic consequences of exercise-induced muscle damage. *Sport Med.* 37(10): 827–836, 2007.

Tokinoya K, Sugiyama K, Suzuki Y, Endo M, Ohmori H. A comparison of the degree of perceived exertion by participants in nordic walking and level walking at equal levels of relative exercise intensity. *Sport Exerc Med - Open J* 2(1): 1–6, 2016.

Tsui NBY, Jiang P, Chow KCK, Su X, Leung TY, Sun H, Chan KCA, Chiu RWK, Lo YMD. High Resolution Size Analysis of Fetal DNA in the Urine of Pregnant Women by Paired-End Massively Parallel Sequencing. *PLoS One.* 7(10): 1–7, 2012.

Wang J shyan and Cheng L ju. Effect of Strenuous, Acute Exercise on α_2 -Adrenergic Agonist–Potentiated Platelet Activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:1559-1565, 1999

Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - Formation and implications. *Acta Biochim Pol* 60: 277–284, 2013.

スポーツ庁. 令和元年度「スポーツの実施状況等に関する世論調査」について, 2020

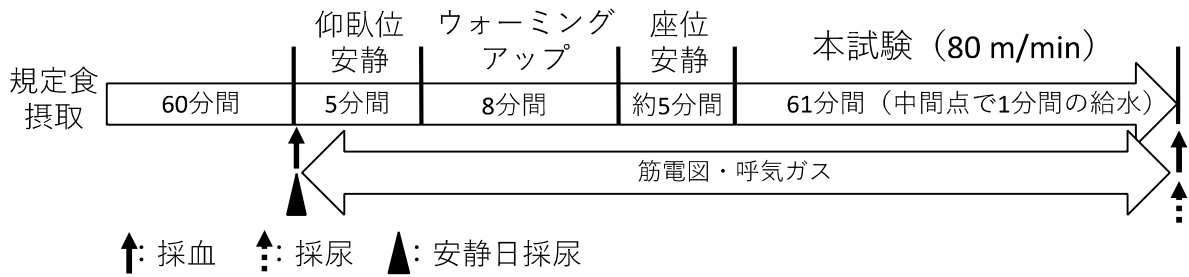


図.1 実験プロトコル

対象者は、規定食摂取1時間後に採血を実施した後、仰臥位安静を5分間行った。その後ウォーミングアップとして、60m/minの速度から90m/minの速度まで2分毎に10m/minずつ漸増負荷を行うウォーミングアップを行なった。座位安静にて、心拍数および酸素摂取量が安静値に戻ったことを確認してから61分間の本試験を実施した。なお、本試験開始から30分後に給水（200mLの水）のため、1分間の休息を入れた。本試験終了後、直ちに採血を行った。また採尿は、採血後に行なった。また安静日の採尿は、規定食摂取1時間後に行なった。

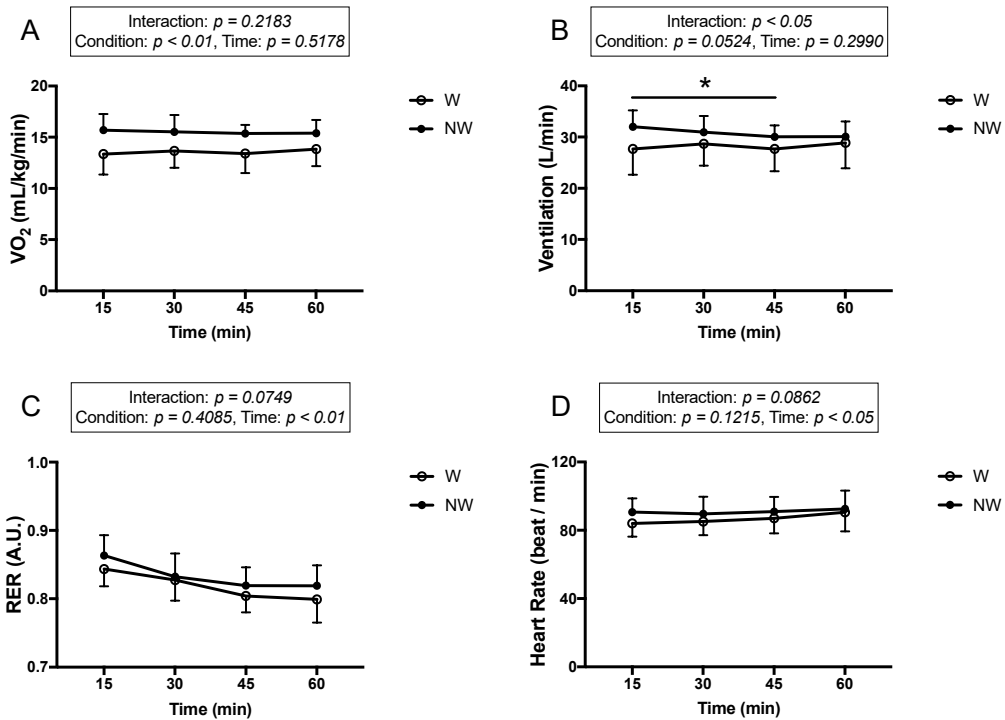


図.2 ウォーキングおよびノルディックウォーキングにおける呼吸循環機能

60分間の歩行中における結果を15分毎に示した(各条件: n=7)。各ポイントの5分前からの平均値を算出した。結果は全て平均値±標準偏差で示した。

A, 体重あたりの酸素摂取量 (VO₂) ; B, 換気量; C, 呼吸交換比 (RER) ; D, 心拍数

*: 条件間の有意差 (p < 0.05)

W, ウォーキング; NW, ノルディックウォーキング

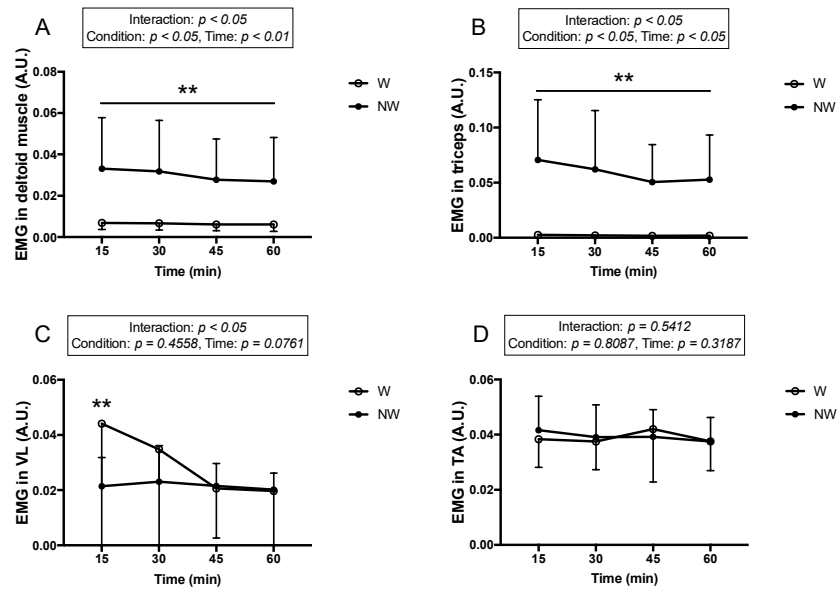


図.3 ウォーキングおよびノルディックウォーキングにおける筋電図 (EMG)

60分間の歩行中における結果を15分毎に示した(各条件: $n=7$)。各ポイントの5分前からの平均値を算出した。結果は全て平均値 \pm 標準偏差で示した。

A,三角筋; B,上腕三頭筋; C,外側広筋(VL); D,前脛骨筋(TA)

** :条件間の有意差 ($p < 0.05$)

W,ウォーキング; NW,ノルディックウォーキング

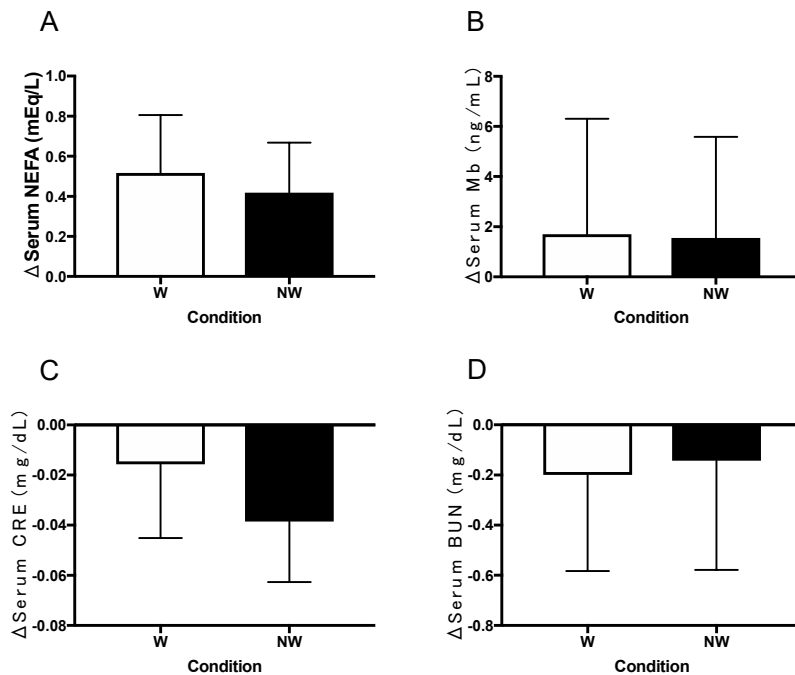


図.4 ウォーキングおよびノルディックウォーキングにおける血中マーカー

60分間の歩行前後における変化量の結果を示した(各条件: $n=7$)。結果は全て平均値 \pm 標準偏差で示した。

A,遊離脂肪酸(NEFA); B,ミオグロビン(Mb); C,クレアチニン(CRE); D,尿素窒素(BUN)

W,ウォーキング; NW,ノルディックウォーキング

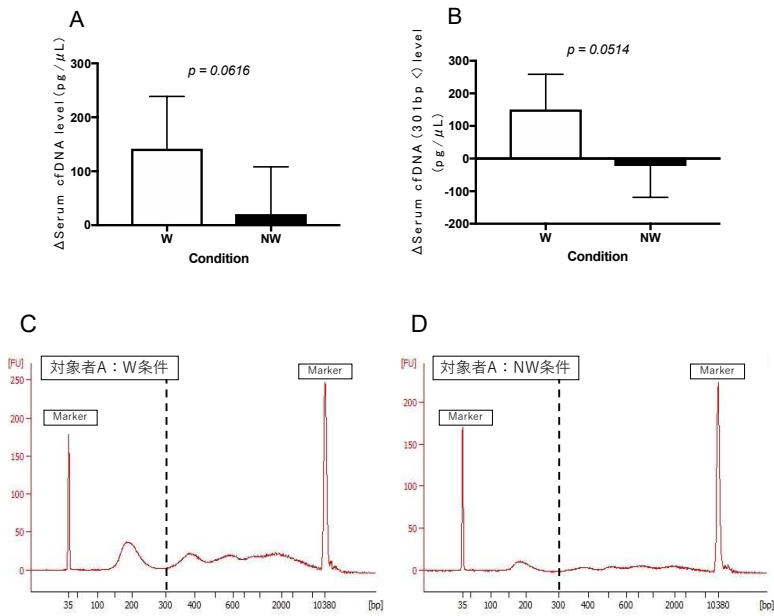


図.5 ウォーキングおよびノルディックウォーキングにおける血中cfDNA濃度とサイズ分布

60分間の歩行前後における変化量の結果を示した（各条件: n=7）。結果は全て平均値±標準偏差で示した。CおよびDの図中にある破線は、血清cfDNA濃度をサイズで分けて検討する際に決定した境界線を示す。

A,血清cfDNA(50-300bp); B,血清cfDNA(301bp以上); C,W条件における代表者1名の泳動図; D,NW条件における代表者1名の泳動図

W,ウォーキング; NW,ノルディックウォーキング

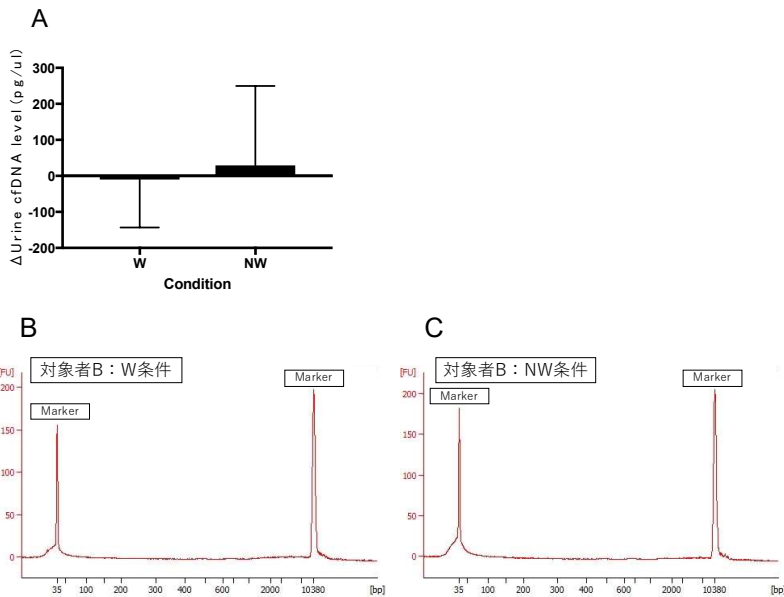


図.6 ウォーキングおよびノルディックウォーキングにおける尿中cfDNA濃度とサイズ分布

安静日の尿中cfDNAに対する60分間の歩行後における尿中cfDNAの変化量の結果を示した（各条件: n=7）。結果は全て平均値±標準偏差で示した。

A,尿中cfDNA濃度(30bp付近); B,W条件における代表者1名の泳動図; C,NW条件における代表者1名の泳動図

W,ウォーキング; NW,ノルディックウォーキング

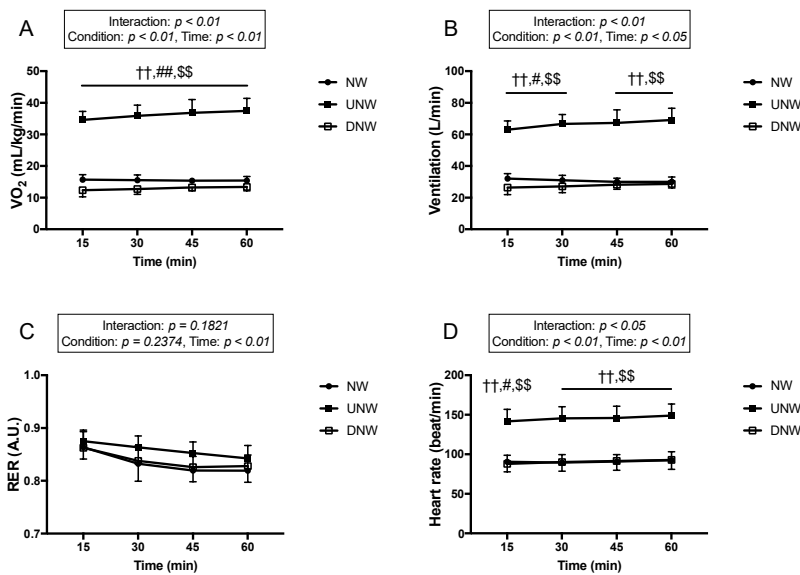


図.7 異なる勾配条件のノルディックウォーキングにおける呼吸循環機能

60分間の歩行中における結果を15分毎に示した(各条件: n=7)。各ポイントの5分前からの平均値を算出した。結果は全て平均値±標準偏差で示した。

A,体重あたりの酸素摂取量(VO₂) ; B,換気量; C,呼吸交換比(RER) ; D,心拍数

†† :NWとUNW条件間の有意差 ($p < 0.01$)

#, ## :NWとDNW条件間の有意差 ($p < 0.05, p < 0.01$)

\$\$:UNWとDNW条件間の有意差 ($p < 0.01$)

NW,ノルディックウォーキング; UNW,上り坂ノルディックウォーキング; DNW,下り坂ノルディックウォーキング

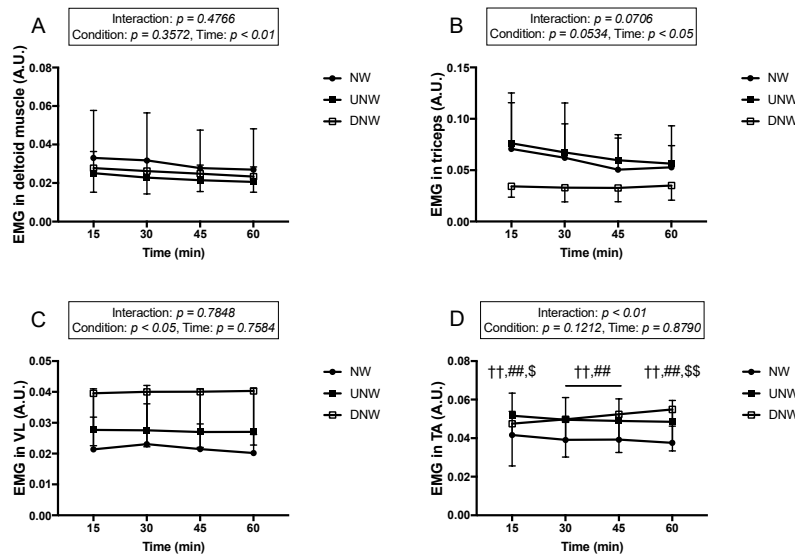


図.8 異なる勾配条件のノルディックウォーキングにおける筋電図評価

60分間の歩行中における結果を15分毎に示した(各条件: n=7)。各ポイントの5分前からの平均値を算出した。結果は全て平均値±標準偏差で示した。

A,三角筋; B,上腕三頭筋; C,外側広筋(VL) ; D,前脛骨筋(TA)

†† :NWとUNW条件間の有意差 ($p < 0.01$)

:NWとDNW条件間の有意差 ($p < 0.01$)

\$\$, \$\$\$:UNWとDNW条件間の有意差 ($p < 0.05, p < 0.01$)

NW,ノルディックウォーキング; UNW,上り坂ノルディックウォーキング; DNW,下り坂ノルディックウォーキング

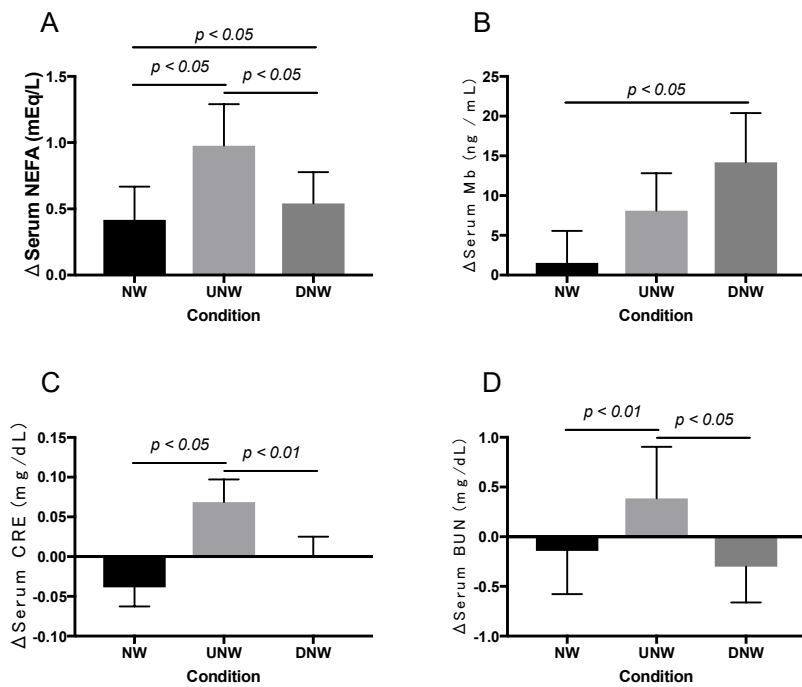


図.9 異なる勾配条件のノルディックウォーキングにおける血中マーカー
60分間の歩行前後における変化量の結果を示した(各条件: n=7)。結果は全て平均値
±標準偏差で示した。

A,遊離脂肪酸(NEFA);B,ミオグロビン(Mb);C,クレアチニン(CRE);D,尿素窒素
(BUN)

NW,ノルディックウォーキング;UNW,上り坂ノルディックウォーキング;DNW,下り坂ノ
ルディックウォーキング

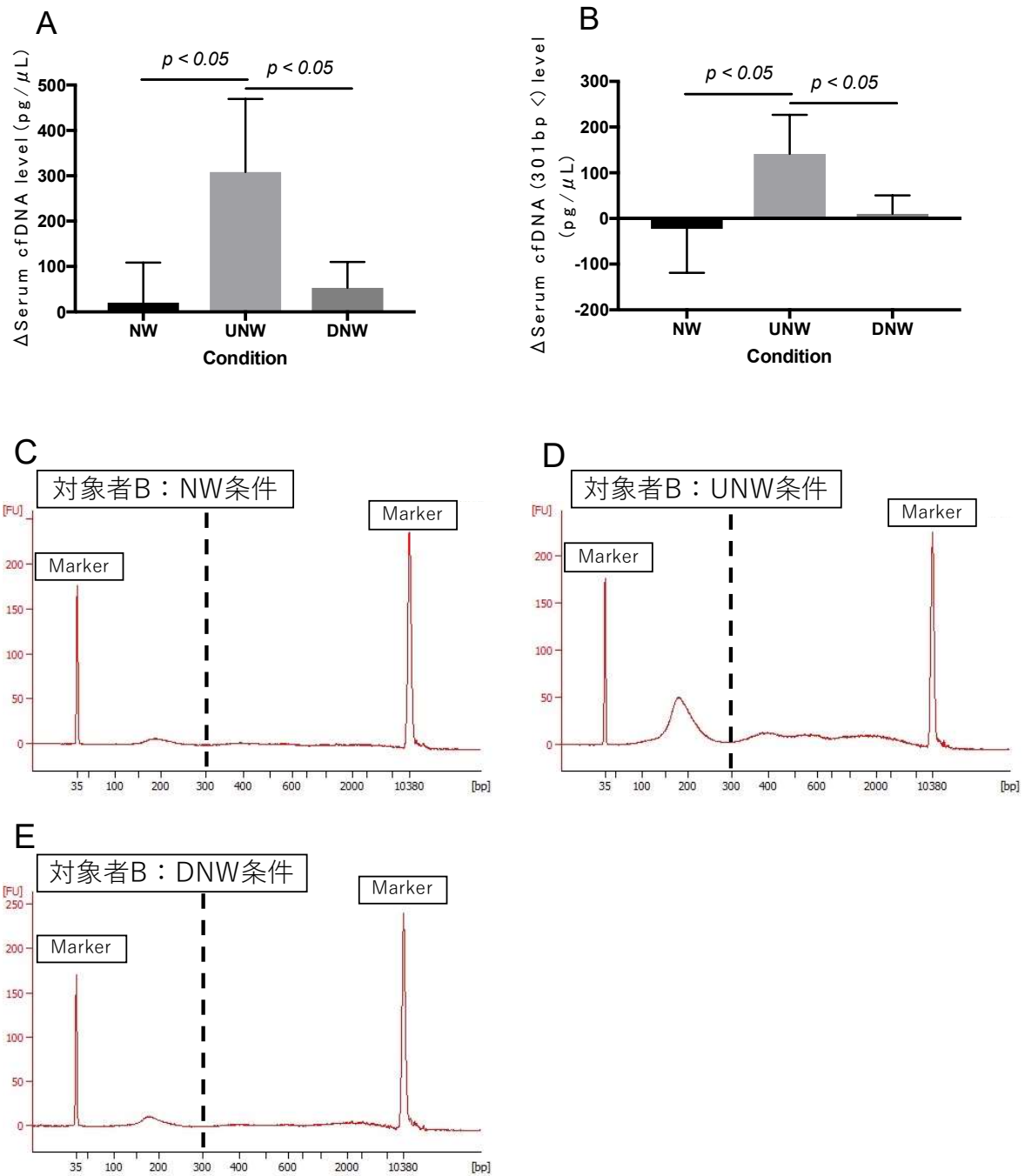


図.10 異なる勾配条件のノルディックウォーキングにおける血中cfDNA濃度とサイズ分布

60分間の歩行前後における変化量の結果を示した(各条件: n=7)。結果は全て平均値±標準偏差で示した。CおよびDの図中にある破線は、血清cfDNA濃度をサイズで分けて検討する際に決定した境界線を示す。

A,血清cfDNA(50-300bp); B,血清cfDNA(301bp以上); C,NW条件における代表者1名の泳動図; D,UNW条件における代表者1名の泳動図; E,DNW条件における代表者1名の泳動図
NW,ノルディックウォーキング; UNW,上り坂ノルディックウォーキング; DNW,下り坂ノルディックウォーキング

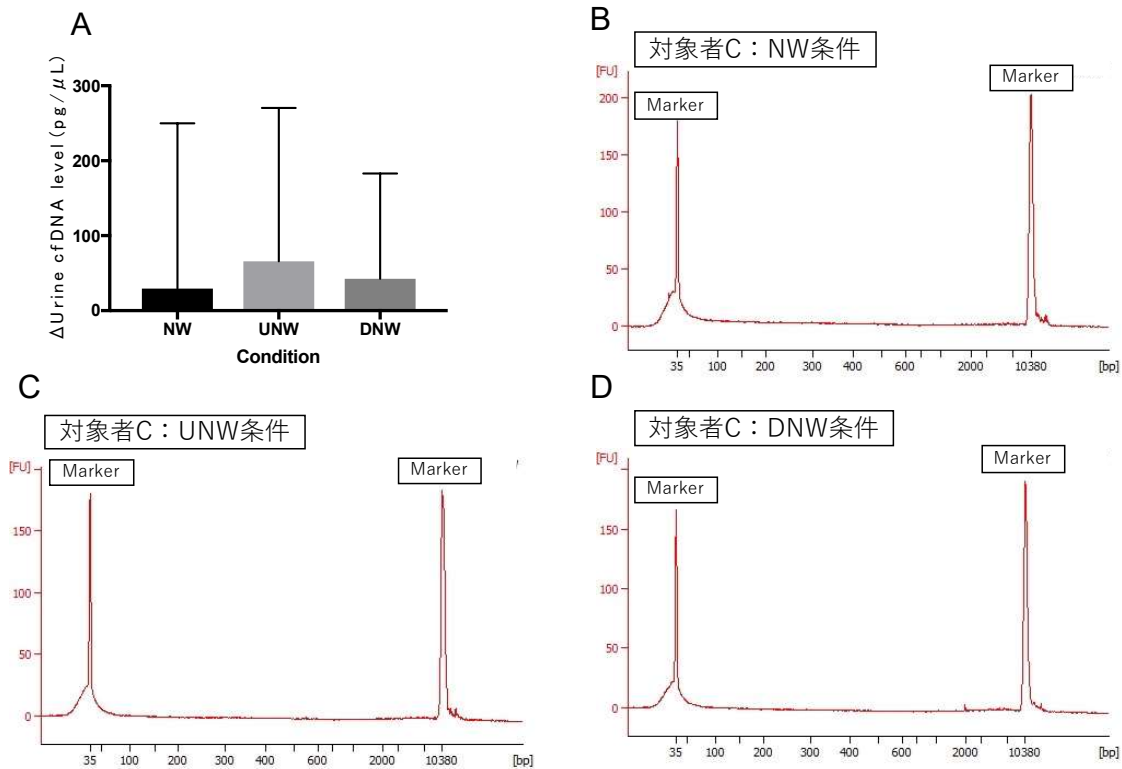


図.11 異なる勾配条件のノルディックウォーキングにおける尿中cfDNA濃度とサイズ分布
 安静日の尿中cfDNAに対する60分間の歩行後における尿中cfDNAの変化量の結果を示した(各条件:
 n=7)。結果は全て平均値±標準偏差で示した。
 A,尿中cfDNA濃度(30bp付近); B,NW条件における代表者1名の泳動図; C,UNW条件における代表者1名の泳動
 図; D,DNW条件における代表者1名の泳動図
 W,ウォーキング; NW,ノルディックウォーキング

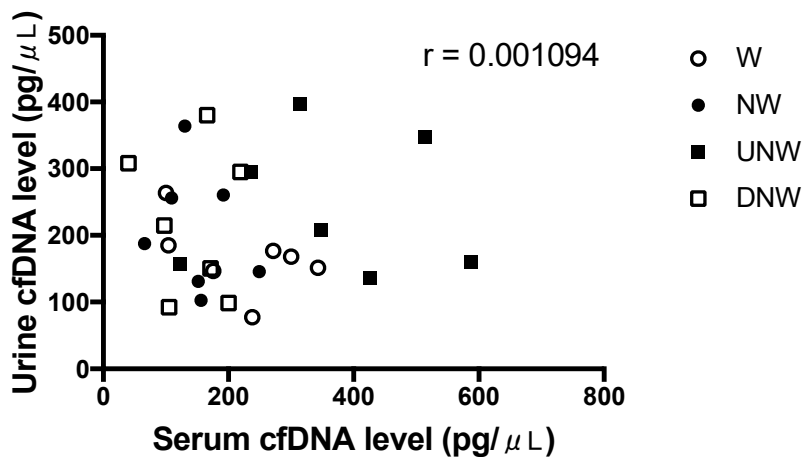


図.12 ウォーキングおよび異なる勾配条件のノルディックウォー
 キング後における血中および尿中cfDNA濃度の相関図
 60分間の歩行後における結果を示した(各条件: n=7)。血清cfDNA濃度
 のサイズは、300bp以下の値を示した。

表 1. 対象者の身体的特性

年齢	身長	体重	体脂肪率	血圧 (収縮期/拡張期)
(歳)	(cm)	(kg)	(%)	(mmHg)
22.1 ± 1.4	175.6 ± 5.7	72.8 ± 7.2	11.3 ± 4.6	116 ± 3.6 / 63 ± 5.6

結果は全て平均値 ± 標準偏差で示した (n=7)。

表 2. 各条件の前後における血糖値
および血中乳酸値の変化量

条件	Δ血糖値	Δ血中乳酸値
	(mg/dL)	(mmol/L)
W	15.0 ± 15.7	0.1 ± 0.5
NW	0.5 ± 19.6	-0.4 ± 0.6
UNW	1.8 ± 13.0	0.0 ± 0.7
DNW	4.8 ± 20.0	-0.1 ± 0.4

結果は全て平均値 ± 標準偏差で示した (各条件 n=6)。1名は測定できなかった。

W, ウォーキング; NW, ノルディックウォーキング;
UNW, 上り坂ノルディックウォーキング; DNW, 下り
坂ノルディックウォーキング