

高強度トレーニングがコンディショニングおよび腸内細菌叢に及ぼす影響

赤澤暢彦¹、中村真理子¹、星川雅子¹、村上晴香²、水口賢司²、國澤純²、宮地元彦²

¹国立スポーツ科学センター、²医薬基盤・健康・栄養研究所

1. はじめに

アスリートは身体パフォーマンスを向上させるために強度の高いトレーニングが必要となる。一方、高強度トレーニングによる身体への負担はアスリートのコンディショニングを悪化させる可能性がある (MacKinnon 2000)。高強度トレーニングによるコンディショニング悪化は、内分泌応答や自律神経活動を介した心臓血管系・消化器系を含む全身の機能低下によって引き起こされ (Clark et al., 2016)、フィットネス低下、免疫機能低下、炎症反応亢進、胃腸障害などの形で現れることがある (Purvis et al., 2010)。すなわち、コンディショニングが低下しているアスリートでは、運動時心拍数および最大酸素摂取量 (maximal oxygen uptake: $\dot{V}O_{2max}$) の低下や、下痢などの胃腸症状を訴えることがしばしば見受けられる (MacKinnon 2000; Waterman and Kapur 2012)。実際に 30–50% のアスリートがトレーニング期間中に胃腸症状に苦しんでいることも報告されている (Diduch 2016)。これらのことから、アスリートのコンディショニングと腸内環境の関係を検討することは重要であると考えられる。

ヒトの腸内には約 1000 種類以上もの細菌が生息しており、宿主である人が摂取した栄養素をエネルギー源として生息しているのみならず、宿主が消化できなかった食物繊維を分解し、宿主に有益な短鎖脂肪酸の産生やビタミンなどの合成にも関与している。腸内細菌には、他にも、免疫機能、酵素活性、ホルモン分泌など生体の機能を担っていることが明らかにされつつある (Flint et al., 2015)。腸内細菌は複雑な生態系を形成しており、集合体としての腸内細菌叢の構成プロファイルや多様性は、宿主の健康状態を反映している (Clark et al., 2017)。すなわち、腸内細菌の多様性が小さくなりバランスが崩れると、免疫アレルギーや代謝異常を惹起し、肥満や生活習慣病につながる (Qin et al., 2012; Arumugam et al., 2011)。一方で、加齢や生活環境要因により腸内細菌叢の構成プロファイルにも適応が生じる。運動トレーニングは、腸内細菌叢の構成プロファイルや機能の変化を伴い、エネルギー代謝亢進や身体機能向上を助長させていることが示唆されている (Dalton et al., 2019)。Estaki et al., (2016) による報告では、一般健常者の腸内細菌叢プロファイルは有酸素性のフィットネスの指標である $\dot{V}O_{2max}$ と関連することが示されている。アスリートにおける腸内細菌叢構成プロファイルの解明は興味深いところであるが、アスリートの腸内細菌叢に関する報告は少ないのが現状である (Dalton et al., 2019)。

先行研究では、ラグビーのトップアスリートにおける腸内細菌叢は、多様性が大きいことや、アミノ酸の生合成、糖質代謝、短鎖脂肪酸合成などを担う経路の亢進と関係することが示されている (Barton et al., 2018)。さらに、大学水泳選手のトレーニング量は短鎖脂肪酸合成に関わる腸内細菌叢と正の相関関係があることが報告されている (Hampton-Marcell et al., 2020)。これらのことより、アスリートの腸内細菌叢はフィットネスやコンディショニングの変化と関係する可能性が考えられる。しかし、これらの研究でアスリートのフィットネスやコンディショニングは評価されておらず、トレーニングによるフィットネスおよびコンディショニングの変化と腸内細菌叢の変化との関連は明らかではない。

本研究は、アスリートのトレーニングにおけるピリオダイゼーションが腸内細菌叢、フィットネス、およびコンディショニングに及ぼす影響を調べることを目的とした。その目的を達成するために、ショートトラックナシ

ショナルチームの選手を対象に、トレーニング初期とトレーニング後期に糞便の採取とフィットネス測定、主観的コンディションに関する質問紙調査を行い、腸内細菌叢構成プロファイル、 $\dot{V}O_{2max}$ 、無酸素性パワー、主観的コンディションの変化と、それらの相互関係を調べた。

2. 研究方法

2.1 研究デザイン

本研究はトレーニングによるフィットネスおよびコンディションの変化と腸内細菌叢の変化との関連を明らかにするための縦断的観察研究である。

2.2 対象者

本研究では、日本スケート連盟ナショナルチームに所属するショートトラック選手9名(年齢 22 ± 4 歳、男性4名女性5名)を対象とした。すべての選手に対して事前に実験の目的と内容を説明し、研究に参加する同意を得て実施した。本研究は、国立スポーツ科学センターの倫理審査委員会の承認を得て実施された。

2.3 研究手順

ショートトラック選手におけるトレーニングピリオダイゼーションの影響を検討するために、トレーニング初期の5月およびトレーニング後期の8月に、各選手の糞便採取、排便状態調査、フィットネス測定、主観的コンディション評価を行なった。フィットネス測定を2日間にかけて、1日目にコンディション評価および漸増運動負荷テストと、2日目に90秒全力ペダリングテストを実施して、 $\dot{V}O_{2max}$ と無酸素性パワーを評価した。なお、トレーニングピリオダイゼーションの前後にて、それぞれ実施したフィットネス測定の前後5日以内の最も近い日に糞便を採取した。

2.4 測定項目

2.4.1. 腸内細菌叢

グアニジン溶液含有のスピッツにて保存された糞便をビーズ式ホモジナイザー (Cell destroyer PS1000; Bio Medical Science, Tokyo, Japan)にてホモジナイズし、各サンプルのDNAを抽出した (Gene Prep Star PI-80X; Kurabo Industries Ltd., Osaka, Japan)。細菌の16S rRNAにおけるV3-V4領域をPCR法にて増幅し、次世代シーケンサーIllumina MiSeq (Illumina Inc., CA, USA)にて塩基配列を決定した (Hosomi et al., 2017)。得られたシーケンスリードを Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) ソフトを用いて解析し、門レベルおよび属レベルにおける占有率を求めた。

2.4.2. 糞便状態・排便状況

対象者の糞便状態を簡便スケールによる質問紙にて評価した (Ohno et al., 2019)。対象者は、採便した際の1回の糞便の量、色、形状(硬さ)、臭い、爽快感、自覚症状の6項目に回答した。排便の量は、 2×10 cmの延長を基準に何本分に相当するか8段階(0.5~4本以上)で、色は薄い黄色~濃い茶色を6段階で、形状はブリストル形状スケールを用いて7段階で、臭いは、気にならない、普通、臭いの3段階で、爽快感はあり、普通、なし(残便感あり)の3段階で、自覚症状は快便、便秘、下痢、便秘および下痢(両方)の4段階で回答した。排便状況については、週当たりの排便回数(排便頻度)を6段階(週2

回以下～週 7 回以上)にて評価した。

2.4.3. フィットネス

有酸素性のフィットネスを自転車エルゴメーター (Power MaxIII, KONAMI LTD., Tokyo, Japan)を用いた漸増運動負荷テストによって測定した。十分なウォーミングアップの後、男子選手 120 W、女子選手 80 W からスタートし、初めの7ステージは 3 分毎に 40 W 漸増する負荷、8 ステージ以降は 3 分毎に 20 W 漸増する負荷で疲労困憊になるまで運動を実施した。運動中の酸素摂取量を自動呼気ガス分析装置 (AE310S, Minato Medical Science, Osaka, Japan)を用いて測定し、30 秒平均の最大値を $\dot{V}O_2\text{max}$ として評価した。無酸素性のフィットネスを自転車エルゴメーター (Power MaxIII, KONAMI LTD., Tokyo, Japan)を用いて、体重の 7.5%の負荷における 90 秒全力ペダリングから測定した。選手には、最初から全力でパワー発揮し、できるだけ維持するように指示した。本研究では、開始 30 秒の平均パワー発揮を無酸素性パワーとして評価した。また、体脂肪率および除脂肪体重を BODPOD (COSMED, Rome, Italy)にて測定した。

2.4.4. 主観的コンディション

主観的なコンディションを測定するために、リカバリー-ストレステスト (Recovery-Stress Questionnaire for athlete: RESTQ)を実施した (Kellmann et al., 2000)。RESRQ により、日常生活および競技パフォーマンスに関わるリカバリー状態とストレス状態の程度を 19 の項目にて評価でき、オーバートレーニングの指標としても使用されている。

2.5 解析および統計処理

すべてのデータは平均値±標準偏差で示した。本研究では、10 の門および 175 の属に分類された腸内細菌が検出され、属レベルについてはリード数が多かった上位 30 個について解析を行った。腸内細菌叢のクラスター解析のヒートマップおよび主座標分析 (Principal coordinate analysis: PCoA)には統計ソフト R を用いた。また、統計ソフト SPSS を用いて、ピリオダイゼーションの影響を検討するには Mann-Whitney U 検定を行い、各測定項目との相関関係には Spearman 検定を行なった。なお、糞便状態・排便状況の質問紙は 1 名の未記入者、無酸素性パワーは 1 名の未実施者がいたため、それぞれ 8 名で解析した。統計的有意水準は 5%未満とした。

3. 結果

対象選手の身体特性およびフィットネスの変化を表 1 に示す。本研究では体重の変化はなかったが、体脂肪率は有意に低下し、除脂肪体重は有意に増加した (all, $P < 0.05$)。無酸素性パワーは有意に増加し ($P < 0.05$)、 $\dot{V}O_2\text{max}$ の有意な変化は認められなかった ($P = 0.575$)。19 項目から成る RESTQ のうち、成功感および社会的リカバリーが有意に低下した (all, $P < 0.05$, 図 1)。表 2 に糞便状態・排便状況の変化を示す。排便量、色、形状、臭い、爽快感、排便頻度のスコアの有意な変化は認められなかった。

図 2 に、トレーニングピリオダイゼーション前後における各選手の腸内細菌叢の構成プロファイルを示す。ヒートマップではそれぞれの腸内細菌の占有率を標準化した値で色分けされており、類似した腸内細菌叢の構成プロファイルの傾向によってクラスタリングされている (図 2. A)。ほとんどの選手がピリオダイゼーションの前後で同じクラスターに分類されており、腸内細菌叢の構成プロファイルの変化は窺えな

かった。PCoA 解析では距離行列に基づいた腸内細菌の構成プロファイルが二次元で示されており、ピリオダイゼーション前後で異なるクラスターは認められず大きな変化は認められなかった(図 2. B)。図 3 に、門レベルおよび属レベルにおける腸内細菌のプロファイル変化を示す。門レベルでは、*Bacteroidetes* 門および *Proteobacteria* 門の占有率が有意に低下し、*Firmicutes* 門および *Actinobacteria* 門の占有率が有意に増加した(all, $P < 0.05$)。属レベルでは、*Bacteroides* 属の占有率が低下し、*Blautia* 属および *Bifidobacterium* 属の占有率が有意に増加した(all, $P < 0.05$)。また、*Fusicatenibacter* 属と *Anaerostipes* 属の占有率が増加する傾向がみられた($P = 0.066$, $P = 0.066$, respectively)。

解析した腸内細菌の中で変化した、もしくは変化した傾向が見られた細菌とフィットネスとの関係を図 4 に示す。 $\dot{V}O_{2\max}$ の変化は *Bacteroides* 属の占有率変化と有意な負の相関関係が認められた($r = -0.667$, $P < 0.05$)。無酸素パワーの変化は *Fusicatenibacter* 属の占有率変化と相関する傾向が見られた($r = -0.766$, $P < 0.05$)。また、ピリオダイゼーションによって有意な変化は認められていないが *Lachnospiraceae* 属の占有率変化は、有意に低下した社会的リカバリーと有意な正の相関関係が認められた($r = 0.667$, $P = 0.071$)。さらに、ピリオダイゼーションによる糞便状態・排便状況の変化においても、コンディションおよびフィットネスとの関係を検討した。ピリオダイゼーションにおける糞便の形状の変化と RESTQ およびフィットネスとの関係を図 5 に示す。ブリストルスケールのスコア変化は、社会的ストレスおよび感情的疲労感の変化と有意な負の相関関係が認められた($r = -0.905$, $r = -0.806$, $P < 0.05$, respectively)。また、無酸素性パワーの変化と有意な正の相関関係が認められた($r = 0.926$, $P < 0.05$)。一方、 $\dot{V}O_{2\max}$ との有意な相関関係は認められなかった($r = -0.639$, $P > 0.05$)。

4. 考察

本研究では、ショートトラックナショナル選手において、トレーニングのピリオダイゼーションが腸内細菌叢と糞便状態・排便状況、およびフィットネスとコンディションに及ぼす影響を検討した。クラスター解析による腸内細菌叢の構成プロファイルの変化や糞便状態・排便状況の変化については、トレーニングの初期と後期において個人内での大きな変化は認められなかった。ただし、腸内細菌の門レベルでは、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Actinobacteria* 門、*Proteobacteria* 門、かつ属レベルでは、*Bacteroides* 属、*Blautia* 属、*Bifidobacterium* 属で統計的に有意な変化が、*Fusicatenibacter* 属、*Anaerostipes* 属では変化する傾向が見られた。さらに、*Bacteroides* 属と $\dot{V}O_{2\max}$ の変化量は関係し、*Fusicatenibacter* 属と無酸素パワーの変化量も関連する傾向を示すものであった。また、ピリオダイゼーションによる有意な変化は認められなかったものの、*Lachnospiraceae* 属と RESTQ によるリカバリー状態の変化量は関連することが示された。これらの結果から、アスリートの腸内細菌にはピリオダイゼーションによって変化する細菌があり、フィットネスやコンディションと関連する可能性が示唆された。

腸内細菌は疾患や生活習慣と関連することが明らかになりつつあり、近年では運動との関連が注目されている。先行研究において、運動トレーニングが腸内細菌叢に及ぼす影響を縦断的に検討している報告がいくつかある。Coronin et al. (2018) は、一般健常者が 8 週間の軽度の運動トレーニングを行っても腸内細菌叢の大きな変化は認められなかったことを報告している。一方で、Allen et al. (2018) は、痩せと肥満者を対象に腸内細菌叢の構成プロファイルを検討している。彼らは、痩せと肥満者の腸内細菌叢の構成が運動トレーニング開始前では大きく異なっていたが、中等強度の有酸素性運動トレーニングを 6 週間行わせると差がなくなったことや、*Bacteroides* 属と *Faecalibacterium* 属の占有率が変化したことを示

した。Karl et al. (2017)は、軍人における高強度のインターバルトレーニングは4日間の短期間で、*Bacteroidetes*門および*Firmicutes*門の占有率を変化させ、腸内細菌叢の構成プロファイルを大きく変えたことを示している(Karl et al., 2017)。アスリートを対象にした研究では、ボート選手の腸内細菌叢は、コンディションを高めたレース期には選手全員が*Bacteroides*属における占有率が低下傾向、および*Rosebuila*属、*Subdoligranulim*属における占有率が増加傾向を示したことを報告している(Keohane et al., 2019)。本研究では、クラスター解析ヒートマップでは、トレーニングピリオダイゼーションの前後で、多くの場合、個人内でクラスタリングされており、腸内細菌叢の構成全体としての大きく異なることは認められなかった。また、*Faecalibacterium*属、*Rosebuila*属、*Subdoligranulim*属などの腸内細菌が変化する傾向は見出せなかったが、*Bacteroidetes*門や*Bacteroides*属の占有率が低下したこと、および*Firmicutes*門の占有率が増加したことは先行研究と一致する結果であった。結果が完全に一致しないのは、ベースラインでの腸内細菌叢の構成プロファイルやトレーニング内容が異なることに起因しているためと考えられる。これらのことから、アスリートにおけるトレーニングピリオダイゼーションは、腸内細菌の構成を大きく変えないまでも、変化する細菌も存在することが示唆された。

有酸素的なフィットネスを示す $\dot{V}O_{2max}$ は、トレーニングピリオダイゼーションによって有意な変化は認められなかった。本研究では、対象者の中でも比較的 $\dot{V}O_{2max}$ が高いと $\dot{V}O_{2max}$ はほとんど増加しないかむしろ低下する選手もあり、トレーニング初期での $\dot{V}O_{2max}$ はピリオダイゼーションによる $\dot{V}O_{2max}$ の変化と有意な負の相関関係が示された($r = -0.892$, $P < 0.05$)。ナショナルチームの選手は鍛錬されたフィットネスレベルの高い選手であり、増加しなかった選手に関しては $\dot{V}O_{2max}$ がすでに高い状態にあり天井効果によって大きく変化しなかった可能性が考えられる。一方、一般若年者の $\dot{V}O_{2max}$ はエネルギー源となる短鎖脂肪酸を産生する*Lacnospiraceae*属、*Roseburia*属、*Clostridiales*属などの菌属と正の相関関係を示すことが報告されている(Estaki et al., 2016)。本研究では、アスリートにおけるピリオダイゼーションによる $\dot{V}O_{2max}$ の個々の変化は、有意に低下した*Bacteroides*属の変化量と有意な相関関係にあった。先行研究においても、ラグビーのトップアスリートの腸内細菌叢は、非アスリート群に比べて*Bacteroides*属の占有率は低かったことが報告されている(Clarke et al., 2014)。*Bacteroides*属は有機酸、胆汁酸、タンパク質を代謝し宿主のエネルギーホメオスタシスの調節機能を有している(Nicholson et al., 2012)。タンパク質が過剰摂取されると、胃腸での*Bacteroides*属によるアミノ酸の発酵が促進されて、アンモニア、硫化水素、インドールなどの毒性をもつ副産物が蓄積される(den Besten et al., 2013)。運動時における血中アンモニア濃度の上昇は中枢性疲労を引き起こし、疲労困憊時のパフォーマンス低下に関与する(Guezennec et al., 1998)。したがって、*Bacteroides*属の低下はアンモニア蓄積を減少させ、運動時における血中アンモニア濃度の上昇を抑制することで漸増負荷テストのパフォーマンスに影響している可能性が考えられる。これらの結果から、アスリートにおける有酸素的なフィットネスのトレーナビリティには、腸内細菌の*Bacteroides*属の変化が一部関係することが示唆された。

無酸素的なフィットネスの指標である全力ペダリングによるパワー発揮はトレーニングピリオダイゼーションによって有意に増加し、その増加量は、腸内細菌のうち増加傾向を示した*Fusicatenibacter*属の増加量と関係する傾向がみられた。*Fusicatenibacter*属は、乳糖分解を促進させ、乳酸や短鎖脂肪酸など腸内の有機酸を生成する細菌である(Takada et al., 2013)。これらの有機酸は、大腸で吸収されると、門脈を通り、肝や筋においてグリコーゲンや脂肪酸に代謝されエネルギー源となる(Mascolo et al., 1991)。腸内細菌は筋のグリコーゲン貯蔵や乳酸代謝などの解糖系エネルギー代謝機構に関係するかもしれな

い。

本研究では、トレーニングピリオダイゼーションによって *Bifidobacterium* 属および *Blautia* 属の占有率の増加が認められた。*Bifidobacterium* 属や *Blautia* 属は、どちらも腸内に多く見られる優勢菌であり、多糖類を乳酸、酢酸、酪酸などの有機酸に発酵させることで、エネルギー代謝亢進、抗炎症作用、腸内 pH 維持など腸内のホメオスタシスに貢献する有用菌とされている (Mattarelli et al., 2014; Clark et al., 2016)。*Bifidobacterium* 属はプロバイオティックの一つとして使用されており、*Lactobacillus* 属と *Streptococcus* 属を組み合わせた栄養補助食品は、陸上長距離選手の暑熱下における疲労困憊時間を延長させることが報告されている (Shing et al., 2014)。しかし、この研究では、体内毒素のリポポリサッカライドや炎症マーカーのインターロイキン-6、インターロイキン-10 などを同時に検討しているがプロバイオティックスの効果や関与は認められず、疲労困憊時間延長に至る機序までは明らかにされていない。単一というよりむしろ複数の菌属が集団をなして生理機能に影響を及ぼしていることが考えられるが、このことに関してはさらなる研究が必要であると考えられる。

フィットネスを高めていくためには、トレーニング強度や量によるストレスとそれに対するリカバリーのバランスが重要となる (Lehmann et al., 1999)。大きなストレスを経験してもリカバリーが十分であれば問題はなく、ストレスとリカバリーのバランスが崩れるとフィットネスや競技技術の向上にも影響すると考えられている (Kellmann 2010)。ストレスとリカバリーを包括的に評価した RESTQ は、数日間でも変化するためにトレーニングやシーズンのピリオダイゼーションのモニタリングに適している (Kellmann and Kallus 2001)。Steinacker et al., (2000) は、ボート選手を対象にピリオダイゼーションで RESTQ を評価し、高強度トレーニングピリオドにおけるストレス状態の増加とリカバリー状態の低下は、コルチゾールやクレアチンキナーゼ活性と関係したことを報告している。また、Filaire et al., (2013) は、エリートテニス選手の 16 週間におけるトレーニング負荷は RESTQ のリカバリー状態の低下やアミラーゼとコルチゾールの増加と関係したことを報告している。本研究でもトレーニングの後期では、RESTQ における成功感および社会的リカバリーのスコアが低下しており、さらに社会的リカバリーの低下度は *Lacnospiraceae* 属の変化と有意な負の相関関係を示した。トレーニングピリオダイゼーションによってリカバリー状態が低下すると、一部の腸内細菌に反映される可能性があるかもしれない。

本研究では、糞便状態の形状の評価にブリストルスケール (Lewis et al., 1997) を用いた。ブリストルスケールは糞便の形状を、腸内通過時間がとても長く水分吸収が多いとされている硬便から、通過時間がとても短く水分吸収が少ないとされている水様便まで 7 つのカテゴリーで評価している。ブリストルスケールは、硬便の便秘状態から水様便の下痢状態までを簡便に評価できるツールとして臨床現場でも広く使用され (機能性消化管疾患診療ガイドライン 2014)、硬便と水様便の中央にカテコライズされる表面が滑らかで柔らかい普通便が理想的とされている。日本人 60 名を対象とした研究では、便の形状が腸内環境と関連しているだけでなく、生活の質に関わる項目の評価が便秘症状を有する者では低かったことも示されている (Tanabe et al., 2019)。つまり、腸内環境と関連する便形状の良否は、全身の不具合とも関連する可能性が考えられる。本研究では、ピリオダイゼーションの前後でブリストルスケールスコアの平均値の変化は認められなかった。しかし、硬便もしくは水様便から普通便へと理想的な方向に変化することを改善度として解析すると、ピリオダイゼーションによるブリストルスケールの改善度は、社会的ストレス感、疲労感、および無酸素パワー発揮の変化と有意な相関関係を示した。これらことから、トレーニングによるストレスや疲労が蓄積されると便の状態にも影響すると考えられた。

5. まとめ

本研究では、ショートトラック選手の腸内細菌叢をトレーニングピリオダイゼーションにおいて縦断的に検討した。ピリオダイゼーションによる腸内細菌構成プロファイルや糞便状態や排便状況の大きな変化はなかったが、*Bacteroides* 属の低下、*Blautia* 属の増加、*Bifidobacterium* 属の増加、*Fusicatenibacter* 属の増加傾向など変化を示す腸内細菌も存在することが明らかになった。さらに、変化した腸内細菌や排便状態の改善度は、 $\dot{V}O_2\text{max}$ 、無酸素パワーや疲労感などのストレス度の変化と関係することが示された。アスリートのトレーニング期におけるフィットネスやコンディションの改善には、特定の腸内細菌や糞便状態も一部関係していることが示唆された。これらのことは、アスリートのトレーニング期におけるコンディションを評価する一つの方法として糞便状態を活用でき、またコンディショニングやパフォーマンス増大に腸内細菌叢をターゲットとした介入の可能性を示唆する知見となると考えられた。

謝辞

本研究の遂行にあたり、研究にご協力いただきました日本スケート連盟ショートトラックナショナルチームの選手の皆様ならびにスタッフの皆様へ深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、研究助成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

- Allen JM, Mailing LJ, Niemi GM, Moore R, Cook MD, White BA, et al. Exercise Alters Gut Microbiota Composition and Function in Lean and Obese Humans. *Med Sci Sports Exerc.* 2018;50(4):747-57.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011;473(7346):174-80.
- Barton W, Penney NC, Cronin O, Garcia-Perez I, Molloy MG, Holmes E, et al. The microbiome of professional athletes differs from that of more sedentary subjects in composition and particularly at the functional metabolic level. *Gut.* 2018;67(4):625-33.
- Clark A, Mach N. Exercise-induced stress behavior, gut-microbiota-brain axis and diet: a systematic review for athletes. *J Int Soc Sports Nutr.* 2016;13:43.
- Clark A, Mach N. The Crosstalk between the Gut Microbiota and Mitochondria during Exercise. *Front Physiol.* 2017;8:319.
- Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut.* 2014;63(12):1913-20.
- Cronin O, Barton W, Skuse P, Penney NC, Garcia-Perez I, Murphy EF, et al. A Prospective Metagenomic and Metabolomic Analysis of the Impact of Exercise and/or Whey Protein Supplementation on the Gut Microbiome of Sedentary Adults. *mSystems.* 2018;3(3).
- Dalton A, Mermier C, Zuhl M. Exercise influence on the microbiome-gut-brain axis. *Gut Microbes.* 2019;10(5):555-68.
- den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res.* 2013;54(9):2325-40.
- Diduch BK. Gastrointestinal Conditions in the Female Athlete. *Clin Sports Med.* 2017;36(4):655-69.

- Estaki M, Pither J, Baumeister P, Little JP, Gill SK, Ghosh S, et al. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome*. 2016;4(1):42.
- Filaire E, Ferreira JP, Oliveira M, Massart A. Diurnal patterns of salivary alpha-amylase and cortisol secretion in female adolescent tennis players after 16 weeks of training. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(7):1122–32.
- Flint HJ, Duncan SH, Scott KP, Louis P. Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc Nutr Soc*. 2015;74(1):13–22.
- Guezennec CY, Abdelmalki A, Serrurier B, Merino D, Bigard X, Berthelot M, et al. Effects of prolonged exercise on brain ammonia and amino acids. *Int J Sports Med*. 1998;19(5):323–7.
- Hampton–Marcell JT, Eshoo TW, Cook MD, Gilbert JA, Horswill CA, Poretsky R. Comparative analysis of gut microbiota following changes in training volume among swimmers. *Int J Sports Med*. 2020 (in press)
- Hosomi K, Ohno H, Murakami H, Natsume–Kitatani Y, Tanisawa K, Hirata S, et al. Method for preparing DNA from feces in guanidine thiocyanate solution affects 16S rRNA–based profiling of human microbiota diversity. *Sci Rep*. 2017;7(1):4339.
- Karl JP, Margolis LM, Madslie EH, Murphy NE, Castellani JW, Gundersen Y, et al. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2017;312(6):G559–G71.
- Kellmann M. Preventing overtraining in athletes in high–intensity sports and stress/recovery monitoring. *Scand J Med Sci Sports*. 2010;20 Suppl 2:95–102.
- Kellmann M and Kallus KW. Recovery–stress questionnaire for athletes. *Human kinetics*, 2000
- Keohane DM, Woods T, O’Connor P, Underwood S, Cronin O, Whiston R, et al. Four men in a boat: Ultra–endurance exercise alters the gut microbiome. *J Sci Med Sport*. 2019;22(9):1059–64.
- Lehmann MJ, Foster C, Gastmann U, Keizer HA, Steinacker JM. Definition, types, symptoms, findings, underlying mechanisms, and frequency of overtraining and overtraining syndrome. *Overload, fatigue, performance incompetence, and regeneration in sport*. New York, NY: Plenum, 1999: 1–6.
- Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32(9):920–4.
- Nicholson JK, Holmes E, Kinross J, Burcelin R, Gibson G, Jia W, et al. Host–gut microbiota metabolic interactions. *Science*. 2012;336(6086):1262–7.
- 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*. 2000;78(5):502–9.
- Mascolo N, Rajendran VM, Binder HJ. Mechanism of short–chain fatty acid uptake by apical membrane vesicles of rat distal colon. *Gastroenterology*. 1991;101(2):331–8.
- Mattarelli P, Holzapfel W, Franz CM, Endo A, Felis GE, Hammes W, et al. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2014;64(Pt 4):1434–51.

- Ohno H, Murakami H, Tanisawa K, Konishi K, Miyachi M. Validity of an observational assessment tool for multifaceted evaluation of faecal condition. *Sci Rep*. 2019;9(1):3760.
- Purvis D, Gonsalves S, Deuster PA. Physiological and psychological fatigue in extreme conditions: overtraining and elite athletes. *PM R*. 2010;2(5):442–50.
- Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012;490(7418):55–60.
- Shing CM, Peake JM, Lim CL, Briskey D, Walsh NP, Fortes MB, et al. Effects of probiotics supplementation on gastrointestinal permeability, inflammation and exercise performance in the heat. *Eur J Appl Physiol*. 2014;114(1):93–103.
- Steinacker JM, Lormes W, Kellmann M, Liu Y, Reissnecker S, Opitz-Gress A, et al. Training of junior rowers before world championships. Effects on performance, mood state and selected hormonal and metabolic responses. *J Sports Med Phys Fitness*. 2000;40(4):327–35.
- Takada T, Kurakawa T, Tsuji H, Nomoto K. *Fusicatenibacter saccharivorans* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2013;63(Pt 10):3691–6.
- Tanabe A, Adachi K, Yamaguchi Y, Izawa S, Yamamoto S, Hijikata Y, et al. Gut Environment and Dietary Habits in Healthy Japanese Adults and their Association with Bowel Movement. *Digestion*. 2019:1–11.
- Waterman JJ, Kapur R. Upper gastrointestinal issues in athletes. *Curr Sports Med Rep*. 2012;11(2):99–104.
- 機能性消化管疾患診療ガイドライン 2014. 過敏性腸症候群 (IBS). 南江堂. 2014.

Table 1. The characteristics and fitness of subjects in incipient and late phase of training periodization.

	Incipient phase	Late phase
Age (years)	22 ± 4	–
Height (cm)	164.0 ± 5.0	–
Weight (kg)	59.3 ± 5.5	59.8 ± 5.3
Fat (%)	13.3 ± 4.5	11.4 ± 5.0 *
Fat-free mass (kg)	51.6 ± 6.9	53.2 ± 6.3 *
Anaerobic power (Watts)	579 ± 119	602 ± 110 *
Maximal oxygen uptake (mL/kg/min)	57.6 ± 7.9	57.8 ± 6.8

Data are shown in means ± SD. * P < 0.05 vs. incipient phase.

Table 2. The bowel conditions in incipient and late phase of training periodization.

	Incipient phase	Late phase
Stool volume (units)	3.5 ± 2.1	4.0 ± 2.2
Stool color (units)	4.0 ± 0.8	3.7 ± 1.0
Stool form (units)	4.6 ± 1.2	4.1 ± 0.9
Stool odour (units)	2.5 ± 0.5	2.3 ± 0.8
Stool exhilaration (units)	2.4 ± 0.5	1.7 ± 0.8
Frequency (units)	6.5 ± 0.8	5.8 ± 1.7

Data are shown in means ± SD.

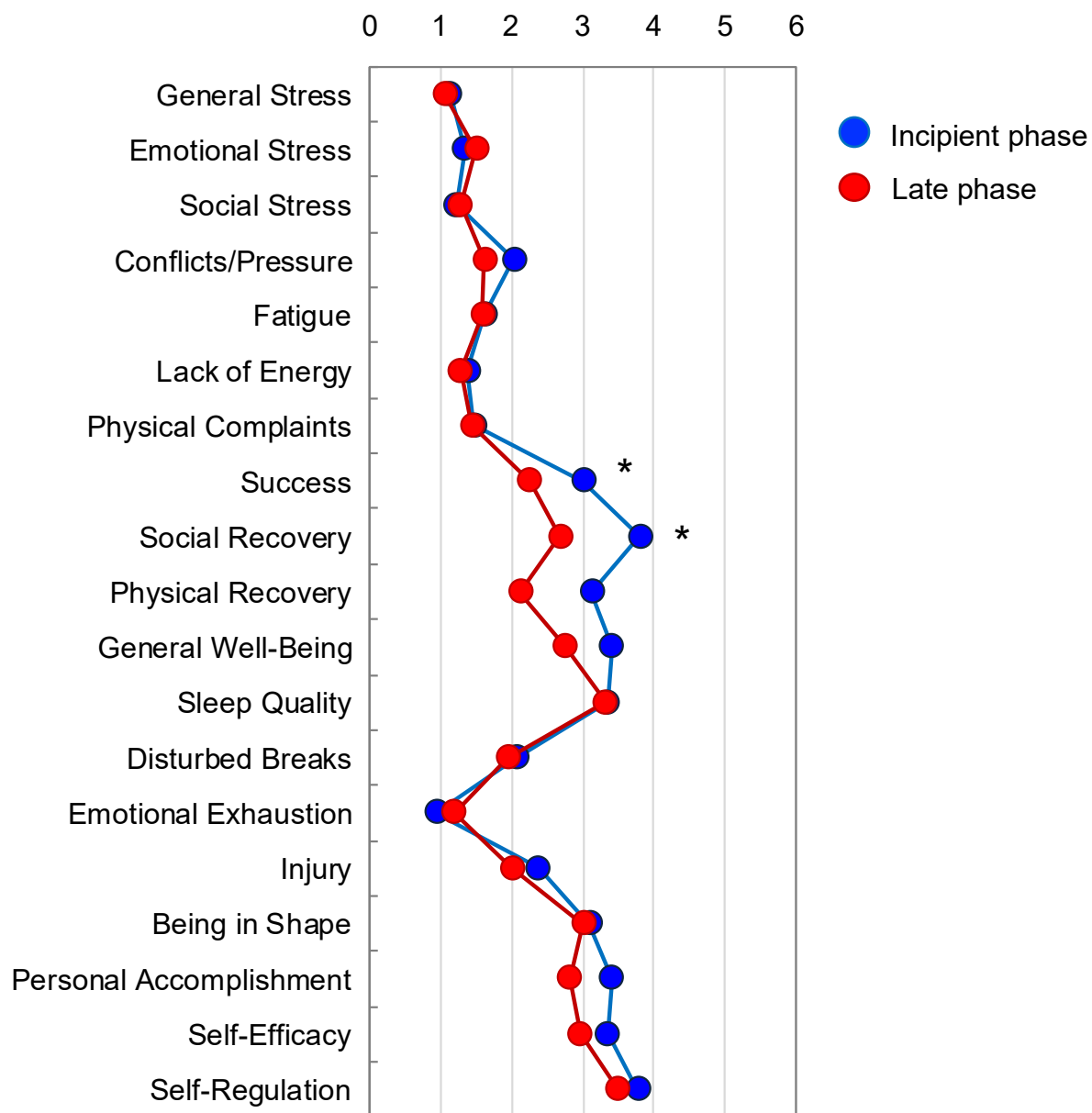


Figure 1. The effects of training periodization in Recovery–Stress questionnaire for athlete. * $P < 0.05$ vs. incipient phase.

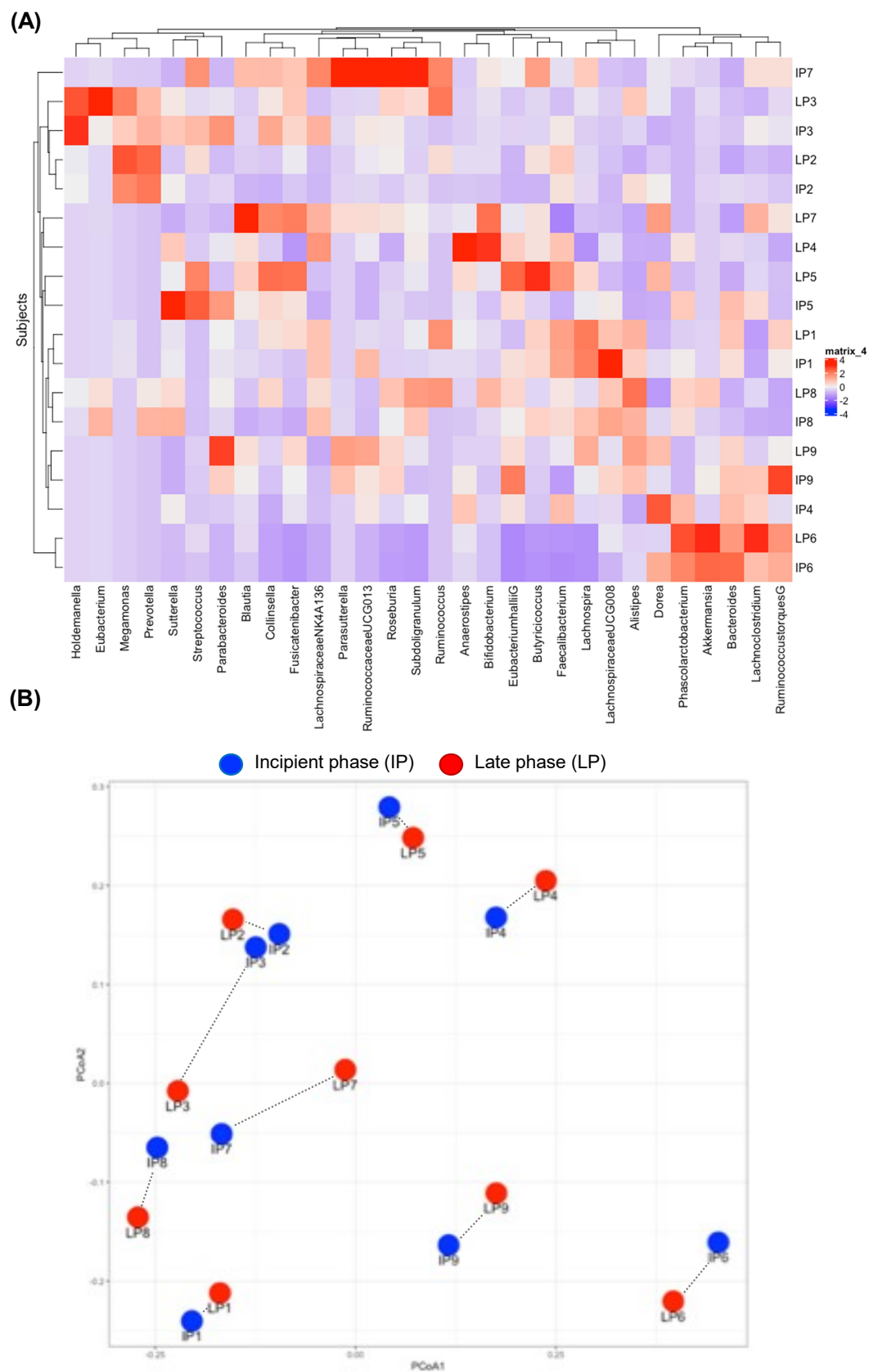


Figure 2. The (A) dendrogram heatmap and (B) principle coordinate analysis of genus abundance data in incipient phase (IP) and late phase (LP). Same number indicates same subjects. Dot lines indicate incipient and late phase in same subjects.

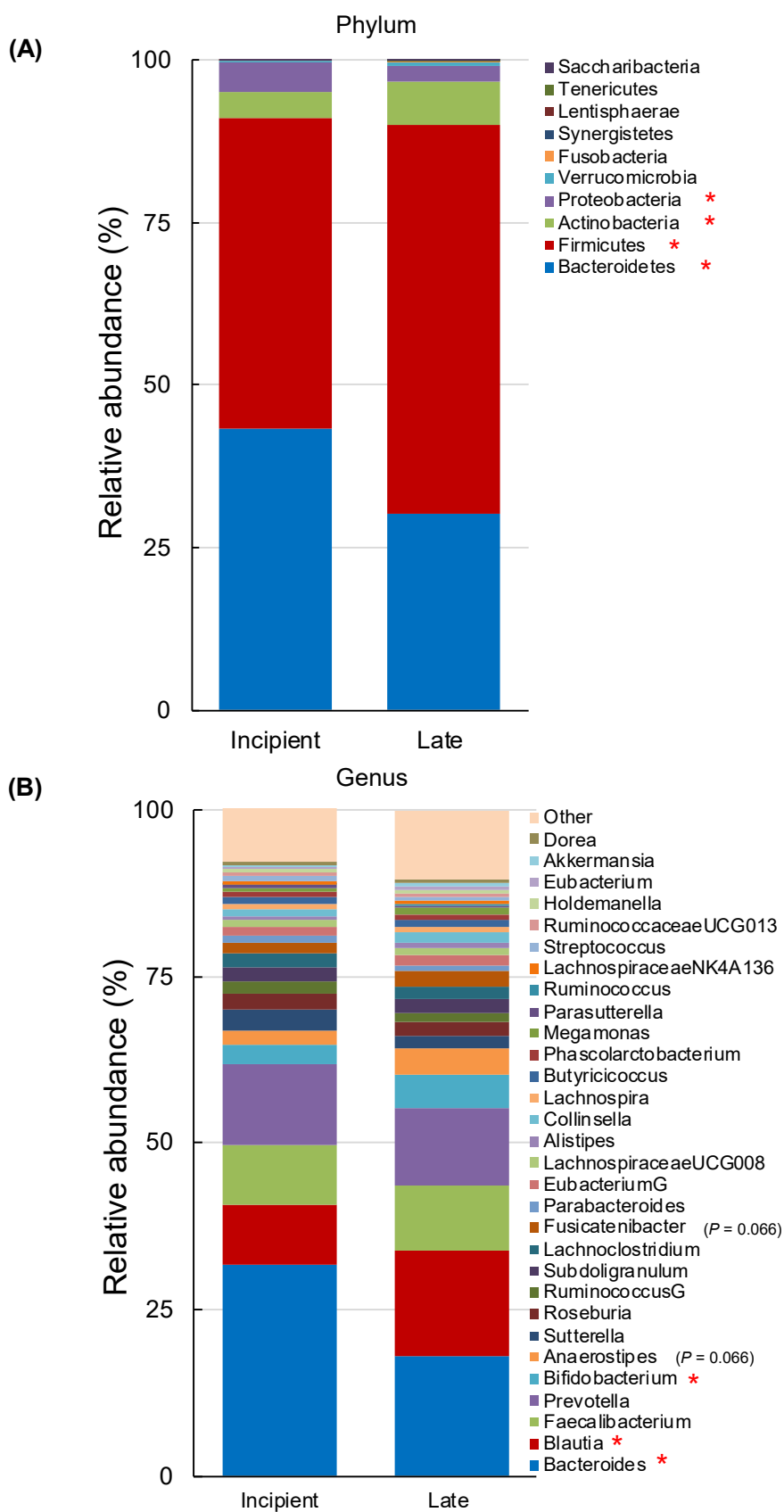


Figure 3. The changes in microbiota composition in (A) phylum level and (B) genus level. * $P < 0.05$ vs. incipient phase.

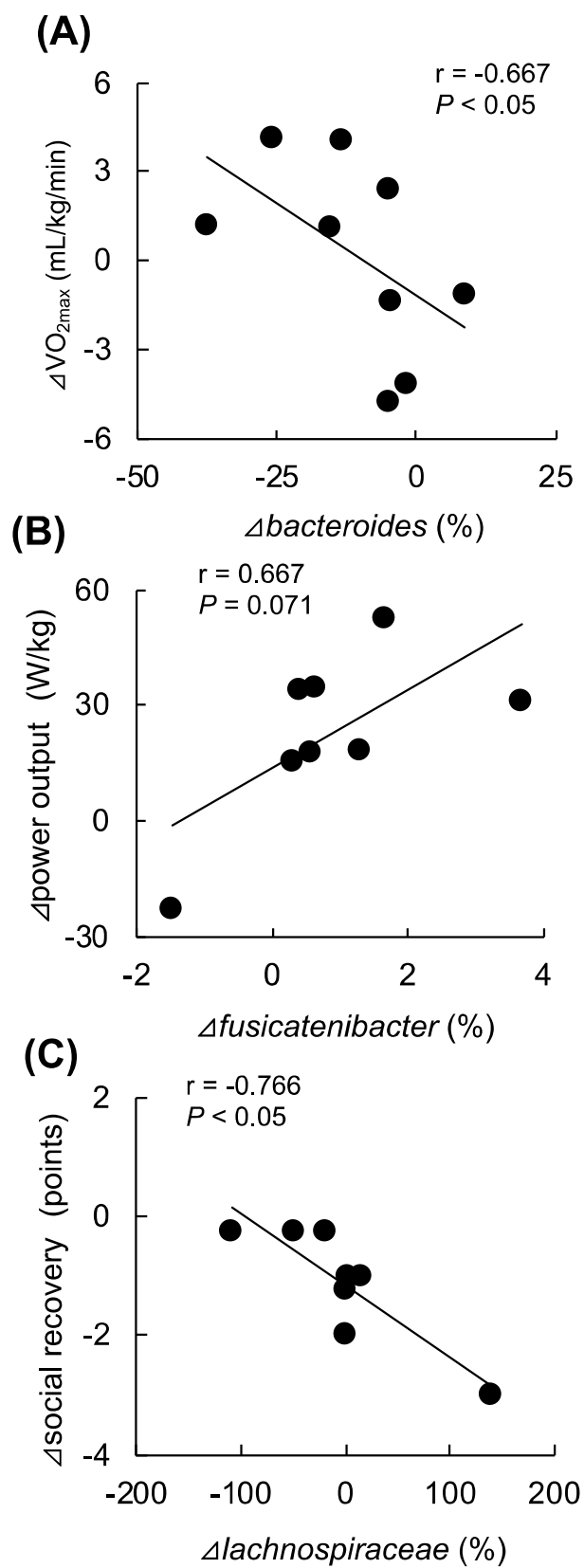


Figure 4. The relationship between the changes in (A) maximal oxygen uptake ($\dot{V}\text{O}_{2\text{max}}$) and *bacteroides*, (B) anaerobic power and *fusicatenuibacter*, (C) social recovery and *lachnospiraceae* before and after training periodization.

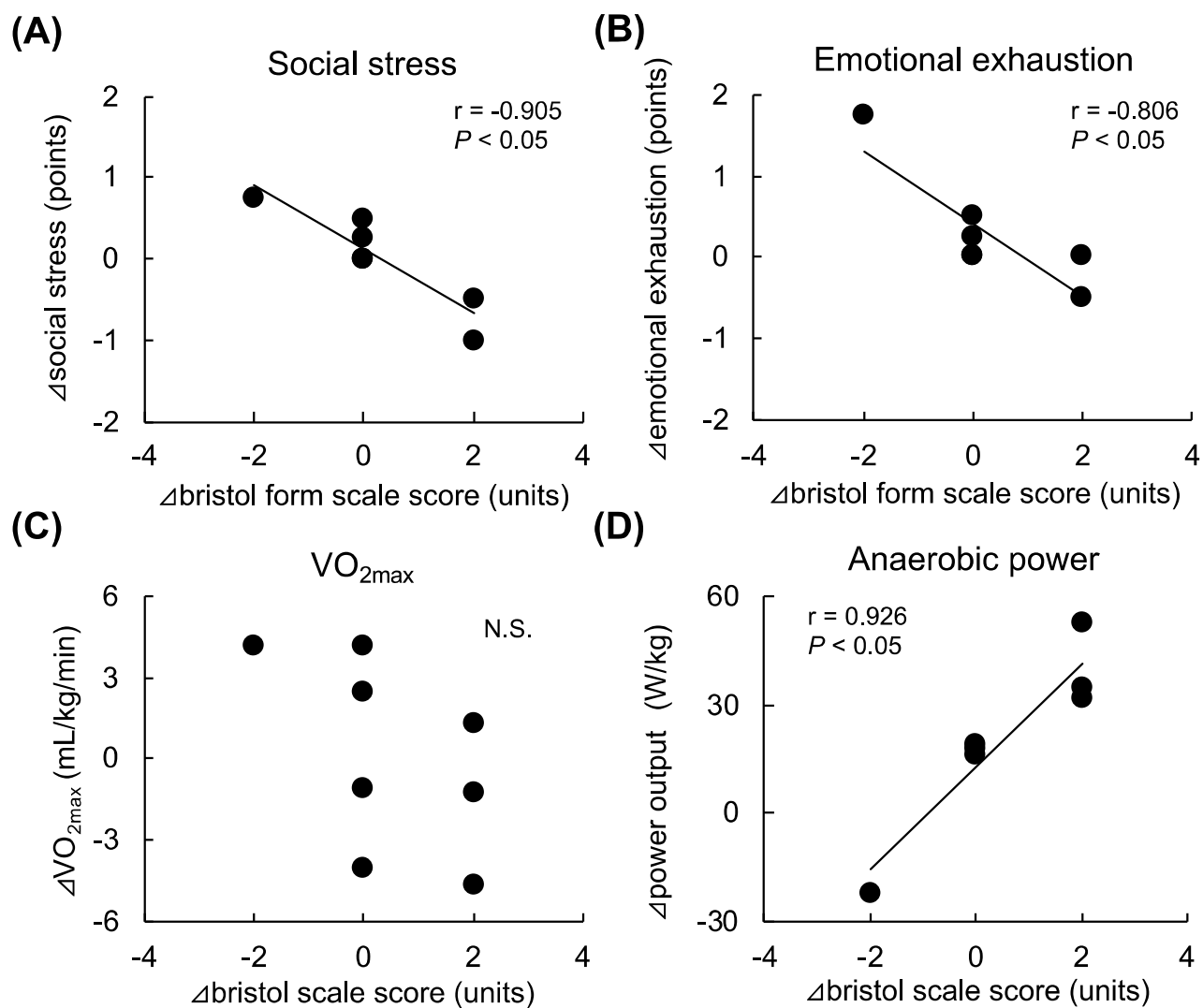


Figure 5. The relationship between the changes in (A) social stress, (B) emotional exhaustion, (C) maximal oxygen uptake ($\dot{V}O_{2max}$), and (D) anaerobic power and the improvements in Bristol scale before and after training periodization.