

温熱暴露による白ねずみの 血清酵素活性値の変化

小林 義雄 (中京大学) 梁 柱 哲 (慶南大学校)
南 相 烈 (慶南大学校) 荒井 康夫 (名古屋女子大学)

Changes in serum enzyme activities during heat exposure in rats

Yoshio Kobayashi, Joo-Chul Yang*,
Sang-Yul Nam*, and Yasuo Arai

*Chukyo University, Yung Nam University,
and Nagoya Women's University*

Serial changes in serum enzymes of muscular origin such as creatine phosphokinase (CPK), its cardiac isoenzyme, aldolase (ALD) and isocitrate dehydrogenase (ICDH) were studied in unacclimatized male rats (Sprague-Dawley) during and after hot environmental conditions (34 °C, 50–70 % RH).

The first group of the rats (Group H) was exposed to the heat for 4 hours a day for 25 days while the second group (Group R) was also exposed to the identical conditions. However, thereafter, they were raised under normal temperature (24 °C) for another 25 days. The third group as control (Group C) was raised under the

* Professor of Physical Education

normal temperature for 50 days.

As results, the followings were observed ;

1. Serum CPK activity significantly increased during the early days of the exposure. However, the values of the activity returned to the control level within a few days. Right after completion of the heat exposure, the CPK activity indicated a tendency to increase but not significant.

2. Three electrophoretic fractions were observed in CPK of Group C. The high percentages were found in CPK-MM and CPK-BB while the ratio for CPK-MB was very small. The increase in serum CPK activity for Group H might be due to an increase in CPK-MB. There were no significant differences between Groups R and C.

3. Early responses of serum ALD activity to the heat exposure was significant. The activity of Group R was slightly lower than that of Group C during recovery period from the heat exposure, but not significant.

4. Serum ICDH activity significantly increased at the early part of the heat exposure. Thereafter, however, the activity quickly decreased to the level of Group C, and no changes were observed throughout the recovery period.

5. In summary, significant increases in serum enzymes was found during heat exposure. Especially, an increase in CPK-MB isoenzyme was notable. It may be clear that these changes were due to the cellular injuries or an increase in the permeability of cellular membrane.

本研究の目的は白ねずみを安静状態で温熱環境(34℃, 相対湿度50-70%)に暴露した期間中及び回復期の血清中のクレアチンフォスフォキナーゼ(CPK), とそのイソ酵素(CPK-isozyme), アルドラーゼ(ALD)及び

イソクエン酸脱水素酵素 (ICDH) の活性値の変化の相互関係を観察し検討することである。

実験方法

体重 170–190 グラムの Sprague–Dawley 系の雄の白ねずみを 2 週間、飼育し実験環境に適応させた。これらの白ねずみを各 7 匹ずつ対照群、温熱暴露群、回復群に分けた。対照群 (C 群) は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–70 % に維持された飼育室で 50 日間飼育した。温熱暴露群 (H 群) は室温 $34 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–70 % の温熱環境に午前 9 時から午後まで一日 4 時間 25 日間、温熱暴露した。温熱暴露以外の時間は室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 50–70 % に維持された飼育室で飼育した。回復群 (R 群) は H 群と同じ時間、25 日間温熱暴露した後、C 群と同じ環境下で 25 日間飼育した。両群とも白ねずみ用の固形飼料と水を自由に摂取させた。

H 群は温熱暴露開始 1, 3, 6, 13, 25 日間に温熱処理 30 分後に頸動脈から採血した。R 群はその後、26, 28, 31, 38, 50 日目に採血した。C 群の採血は飼育開始後、13, 25, 38, 50 日間に行った。

採取した血液は常温で 15 分間放置した後、30 分間 3000 rpm で遠心し血清を分離した。血清は分析時まで冷凍庫 (-35°C) に保存した。

分析方法

1) 血清 CPK (Creatine phosphokinase): 本酵素の活性値 (Sigma Unit/ml) は Fiske & Subbarow 法 (1925) の Sigma Chemical Company (1981) による変法に従い Sigma Chemical Company (St. Luis, USA) 社製のキットを用いて測定した。測定は常温で Bausch & Lomb (USA) 社製の分光光度計 Model Spectronic 20 で波長 660 nm で行った。

2) 血清 CPK イソ酵素 (Creatine phosphokinase isoenzyme): 血清 $1-2 \mu\text{l}$ を Sigma Chemical company (1983a) の変法に従い、LKB multiphor system の寒天ゲル (agarose gel) 上で pH6.9, 25°C で 25 分間電気泳動を行った。泳動後、CPK イソ酵素用試薬で処理し 37°C で 20 分間、40–60 分間で乾燥させた。泳動パターンは GelmanDCD 16 型

の蛍光光度計 (波長 366 nm) で分画を確認し, その面積から各イソ酵素の百分比を求めた。試薬は全て Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) 社製のキットを用いた。

3) 血清 ALD (Aldolase): 本酵素の活性値 (Sibley-Lehninger Unit/ml (S-L Unit/m) は Sibley & Lehninger (1948) の変法 (Sigma Chemical Company 1981a) により Sigma Chemical Company 社製のキットを用いて測定した。

4) 血清 ICDH (isocitric dehydrogenase): King (1967) の変法 (Sigma Chemical company 1983b) に従い, 常温で Bausch & Lomb 社製の分光光度計 Model Spectronic 20 を用い波長 390 nm で測定した。試薬は Sigma Chemical Company (St. Louis, USA) を用いた。活性値は Sigma Unit/ml で表示した。

実験結果は Snedecor & Cochran (1967) の方法に基づき, t-検定を行い有意性の検討を行った。

結 果

1) 血清 CPK

H 群, R 群及び C 群の各採血日における血清 CPK 活性の変化を表 1 及び図 1 に示す。C 群では実験開始日の血清 CPK 活性は 65.7 ± 3.3 Sigma Unit/ml であった。その後, 徐々に減少傾向であったが実験終了まで有意な変化は見られなかった。H 群では温熱暴露 1 日目に 99.3 ± 6.7 Sigma Unit/ml に上昇し, 3 日目には逆に減少し, 更に 6 日目には再び増加した。しかし, これらの値は全て C 群と有意な差はなかった。

C 群の 25 日目の値は 53.9 ± 6.1 Sigma Unit/ml であった。R 群の 28 日目の値はこれよりも若干高い 66.0 ± 5.8 Sigma Unit/ml であったが有意差はなかった。R 群の値は速やかに C 群の値に近づき, その後一定の値を維持した。

表 1 温熱暴露群, 回復群および対照群の血清 CPK 活性値

温度 (°C)	採血日 (日目)	血清 CPK 活性値 (Sigma Units/ml)	
		平均値	標準誤差
対照群 24 ± 1 (n=7)	0	65.7	3.3
	13	64.1	3.5
	25	53.9	6.1
	38	52.0	3.2
	50	43.2	1.6
温熱暴露群 34 ± 1 (n=7)	1	99.3**	6.7
	3	58.7	3.9
	6	76.6	5.0
	13	55.5	4.9
	25	55.2	3.6
回復群 24 ± 1 (n=7)	26	55.0	2.5
	28	66.0	5.8
	31	47.2	1.9
	38	54.8	4.4
	50	45.5	3.1

** は対照群と危険率 1% 水準で有意な差があることを示す。

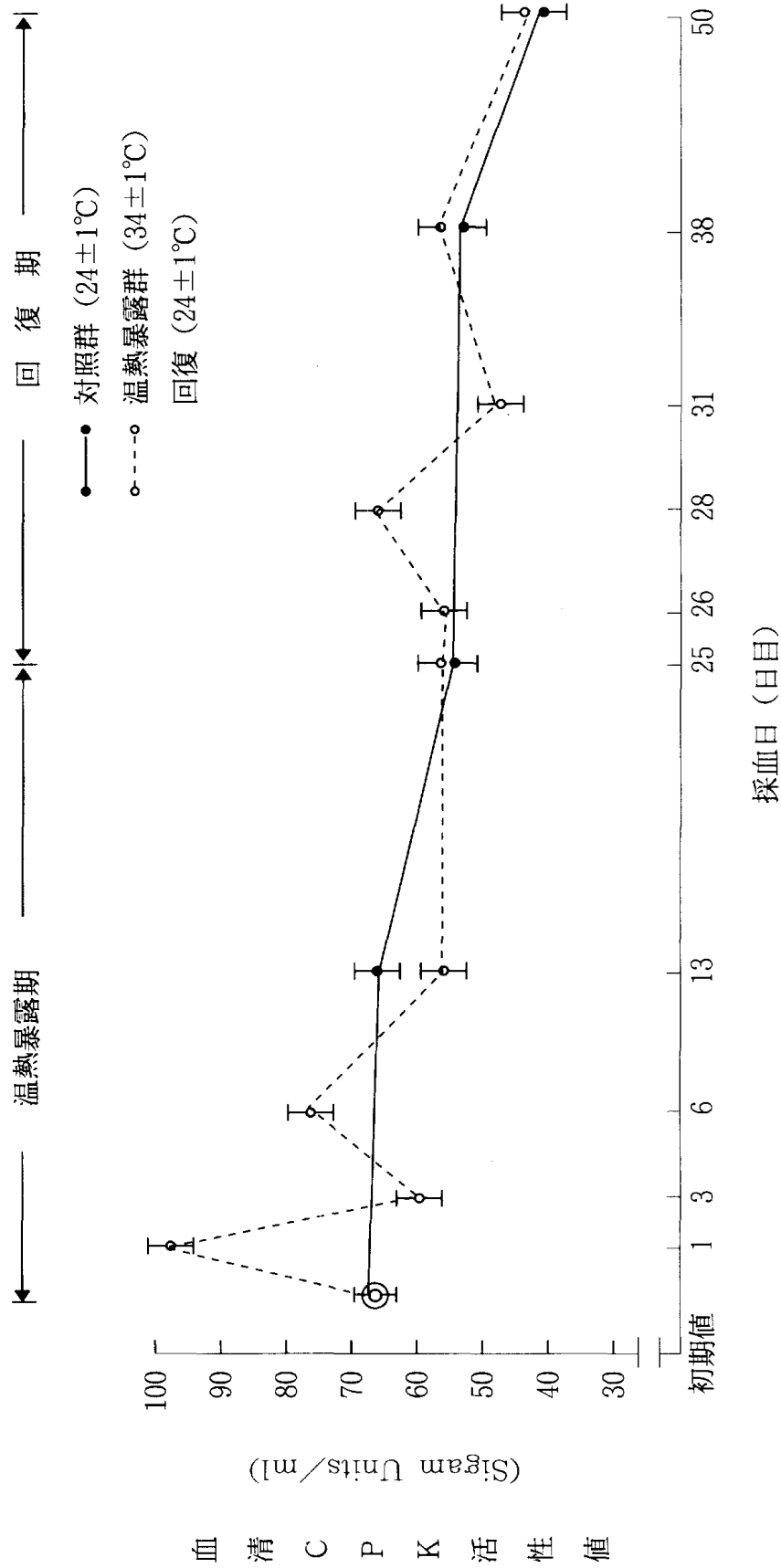


図1 温熱暴露群、回復群および対照群の血清CPK活性値の変化
 実線は対照群の値、破線は温熱暴露群と回復群の値を示す。
 平均値と2標準誤差の範囲を示す。

2) 血清 CPK イソ酵素

実験期間中の血清 CPK イソ酵素の各分画の百分比の変化の結果を表 2 と図 2 に示す。C 群の実験開始日の電気泳動像には BB-CPK (BB-CPK₁) と MM-CPK (MM-CPK₃) の二つの分画のみが 2.94% と 97.06% それぞれが現れていた。実験の期間中ずっと MM-CPK が BB-CPK に比較して高い百分比を示した。MB-CPK は 38 日目に 4.0% 現れたのみであった。温熱暴露により H 群では血清 CPK 活性は初期値より増加し、これに伴って CPK イソ酵素の MB-CPK 分画が 3 日目 8.92%, 六日目 9.00%, 13 日目 11.22%, 25 日目 26.50% が徐々に増加した。回復期において R 群では血清 CPK の総括性値は徐々に減少し、その後一定の値を維持したが、これに伴って MB-CPK の百分比は 26 日目 12.02%, 28 日目 4.24%, 31 日目 3.32%, そして遂に 38 日と 50 日目では 0% となり、完全に消失した。また R 群の血清 CPK の総括性値は C 群の値に短時間で戻るが、CPK イソ酵素の百分比はそれに比べて長時間かかって回復することが明らかになった。

表 2 温熱暴露群, 回復群および対照群の血清 CPK イソ酵素活性値

温度 (°C)	採血日 (日目)	百分比 (%)		
		MM	MB	BB
対照群 24±1 (n=7)	0	97.06	0.00	2.94
	13	94.13	0.00	5.87
	25	57.90	0.00	42.10
	38	48.94	4.00	47.06
	50	62.75	0.00	37.25
温熱暴露群 34±1 (n=7)	1	100.00	0.00	0.00
	3	91.08	8.92	0.00
	6	45.70	9.00	45.30
	13	51.79	11.22	36.99
	25	46.79	26.50	26.71
回復群 24±1 (n=7)	26	48.67	12.02	39.31
	28	59.67	4.24	36.09
	31	55.03	3.32	41.65
	38	55.88	0.00	44.12
	50	67.20	0.00	32.80

各イソ酵素活性値は血清 CPK の総括性値の百分比として示してある。

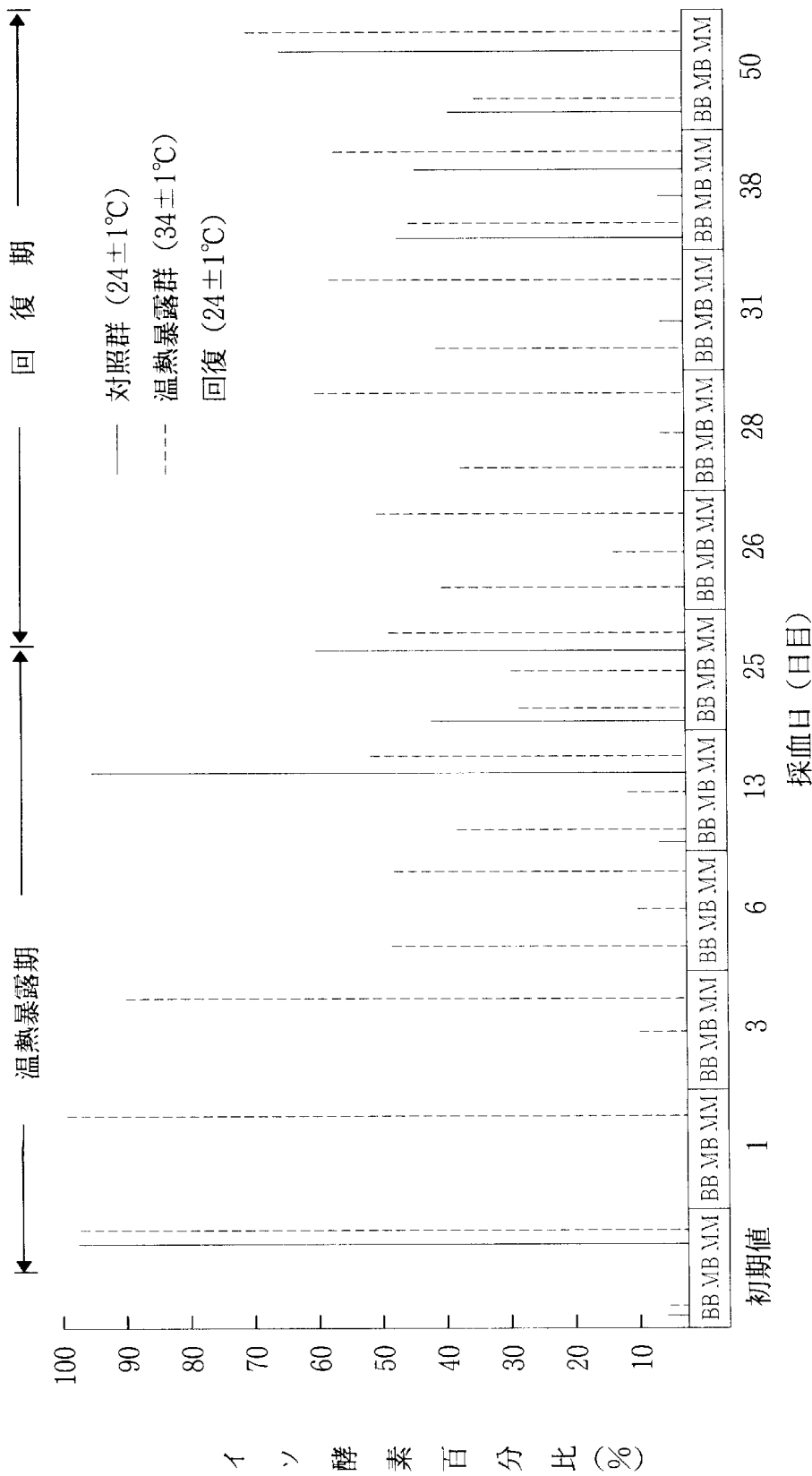


図2

温熱暴露群, 回復群および対照群の血清C P Kいそイソ酵素の百分比各イソ酵素活性値は血清C P Kの総括活性値の百分比として示してある。
 B Bは電気泳動で最も陽極側にあり, M Mは最も陰極側にあるイソ酵素である。
 実線は対照群の値, 破線は温熱暴露群と回復群の値を示す。

3) 血清 ALD 活性

C 群, H 群及び R 群の血清 ALD 活性の結果を表 3 および図 3 に示す。C 群では実験開始日に 67.0 ± 2.65 S-L Unit/ml, 25 日目 76.3 ± 15.93 S-L Unit/ml, 50 日目 56.3 ± 3.13 S-L unit/ml となり 25 日目から 50 日目にかけて若干減少傾向を示すがこれらの値は実験開始の初期値と有意差はなかった。H 群では温熱暴露で大きな変化が見られた。1 日目において 102.4 ± 8.02 S-L Unit/ml に有意に増加し ($p < 0.05$), 3 日目では 54.7 ± 6.65 S-L Unit/ml, 6 日目 52.5 ± 3.48 S-L Unit/ml に有意に減少した ($p < 0.05$)。それ以後 25 日目までは C 群との有意な差は見られず, 一定の値を維持した。R 群では回復初日である 26 日目に 48.3 ± 3.50 S-L Unit/ml に有意に ($p < 0.01$) 減少し, その後は 50 日目まで C 群の値に比べ低い一定値をとる傾向であった。

表 3 温熱暴露群, 回復群および対照群の血清 ALD 酵素活性値

温度 (°C)	採血日 (日目)	血清 ALD 活性値 (S-L Units/ml)	
		平均値	標準誤差
対照群 24 ± 1 (n=7)	0	67.0	2.65
	13	72.1	3.40
	25	76.3	15.93
	38	63.3	7.04
	50	56.3	3.13
温熱暴露群 34 ± 1 (n=7)	1	102.4**	8.02
	3	54.7	6.65
	6	52.5	3.48
	13	68.0	11.22
	25	66.7	10.53
回復群 24 ± 1 (n=7)	26	48.3**	3.50
	28	65.6	4.66
	31	57.3	4.04
	38	49.7	5.34
	50	46.0	3.80

** は対照群と危険率 1% 水準で有意な差があることを示す。

* は対照群と危険率 1% 水準で有意な差があることを示す。

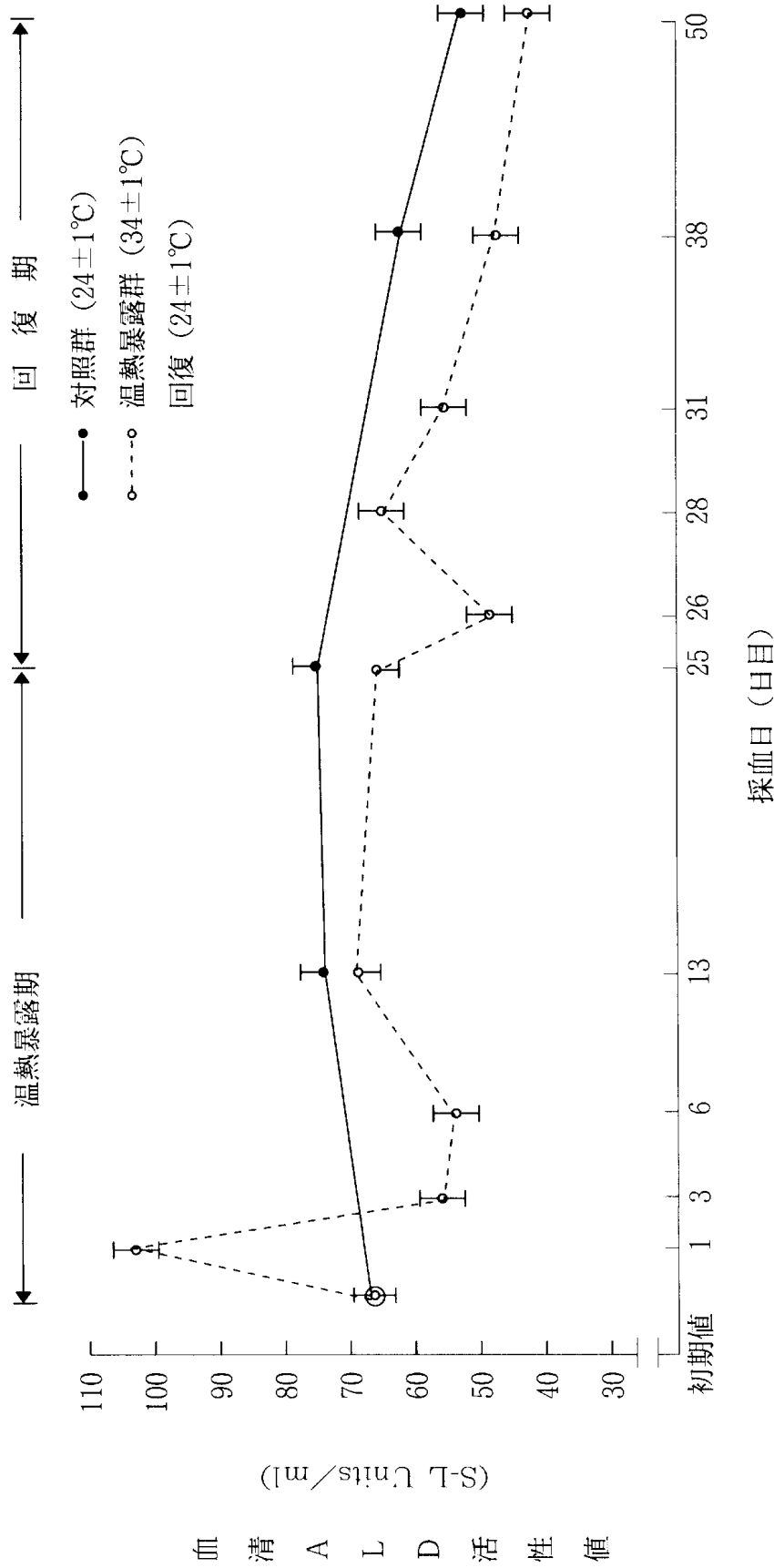


図3 温熱暴露群、回復群および対照群の血清ALD活性値の変化
 実線は対照群の値、破線は温熱暴露群と回復群の値を示す。
 平均値と2標準誤差の範囲を示す。

4) 血清 ICDH 活性

C群の実験開始日の活性値は 594 ± 24.7 Sigma Unit/ml であり, 50日の実験期間中, 一定の値を保った (表4, 図4)。H群では温熱暴露1日目に 748 ± 8.59 Sigma Unit/ml ($p < 0.01$), 762 ± 10.7 Sigma Unit/ml ($p < 0.01$) と有意に高い値を示した。それ以後減少し25日目までにC群の値に近づいた。R群の値は回復期間中はほぼ安定した値を示し, C群との有意な差は見られなかった。

表4 温熱暴露群, 回復群および対照群の血清ICDH酵素活性値

温度 (°C)	採血日 (日目)	血清ICDH活性値 (Sigma Units/ml)	
		平均値	標準誤差
対照群 24 ± 1 (n=7)	0	591	24.70
	13	676	25.70
	25	680	7.86
	38	714	24.50
	50	660	8.73
温熱暴露群 34 ± 1 (n=7)	1	748**	87.58
	3	690**	5.58
	6	762**	10.70
	13	669	8.00
	25	686	24.20
回復群 24 ± 1 (n=7)	26	664	5.50
	28	671	7.82
	31	714	18.60
	38	682	8.23
	50	639	7.35

**は対照群と危険率1%水準で有意な差があることを示す。

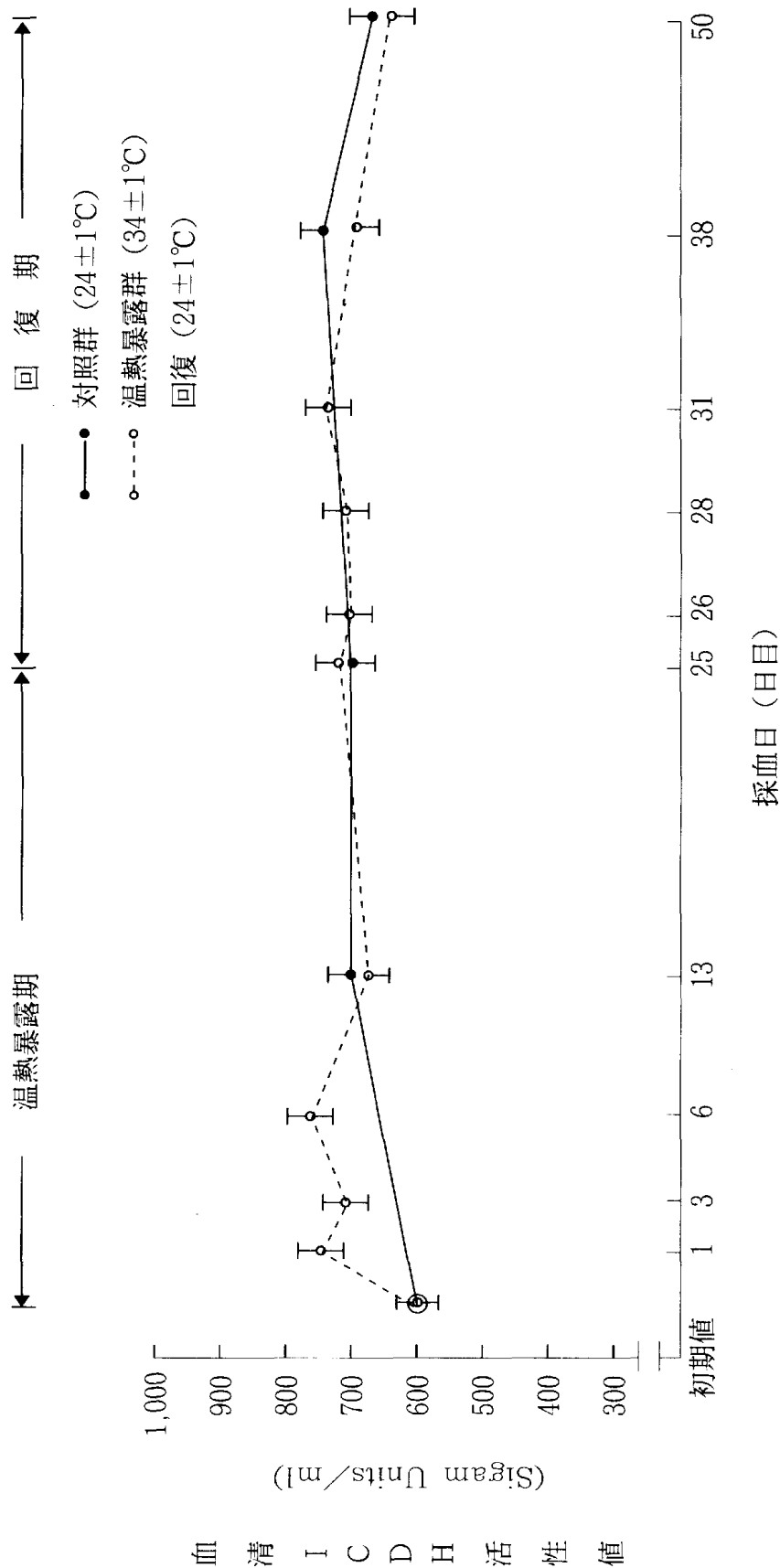


図4 温熱暴露群、回復群および対照群の血清 I C D H 活性値の変化
 実線は対照群の値、破線は温熱暴露群と回復群の値を示す。
 平均値と2標準誤差の範囲を示す。

考 察

本実験により対照群よりも温熱暴露初期において血清 CPK, 血清 MB-CPK, 血清 ALD, 血清 ICDH の活性が有意に上昇し, 温熱暴露終期及び回復初期には対照群の安定した値に戻ることがわかった。

筋収縮において重要な役割をもつ CPK は骨格筋と心筋に多量に存在するが, 肝と赤血球には, ほとんど存在しない。一般的に筋運動の直後, 血清 CPK の活性値が上昇することが報告されている (Aebi et al., 1961; Baumann et al. 1962; Colombo et al. 1962; Schneider & Heise 1963; 長尾ら, 1979; 堤ら, 1980)。一方 Griffiths ら (1966) は長時間の筋運動は血清 CPK 活性値の明らかな増加が見られるが, 短時間の運動は血清 CPK 活性値の変動をもたらさないと報告している。一方心筋障害の時にも血清 CPK の活性値が大きく上昇する (Duma & Siegel, 1965; Hunt & Baile, 1967)。これに対して細胞膜の損傷がなくても筋細胞膜の透過性の変化により, 多量の細胞内 CPK が流失するという報告もある (Schmidt et al., 1963)。本研究の温熱暴露初期における血清 CPK 活性の増加は, 筋細胞の損傷ではなくて, 温熱処理により CPK に対する筋細胞膜の透過性が増した結果であると考えられる。

血清 CPK には電気泳動によって陽極に移動する主に脳そして若干の肺および平滑筋由来の BB-CPK (CPK₁), また陰極に移動する主に骨格筋, そして若干の心筋由来の MM-CPK (CPK₃) の三つのイソ酵素があることが知られている (Van der Veen & Willebrands 1966, Dawson & Fine 1967)。筋性異栄養症 (Silveman et al., 1974) と心臓障害 (Roe et al., 1972; Mercer, 1974; Rogers et al., 1977) により血清 MB-CPK 活性値が有意に上昇する。本研究では温熱暴露期および回復初期に血清 MB-CPK の活性値が増加し, 回復初期から中期にかけて対照群に値に戻った。(表 2, 図 2)。また表 1 と図 2 見られる温熱暴露による血清 CPK 活性値の増加と同期して血清 MB-CPK の割合が増加した。これは血清 CPK 活性の増加は血清 MB-CPK の増加が見られるという報告 (長尾ら 1979) と似た結果であった。血液内に離脱する酵素の増加が, その由来する臓器組織に対するストレスの指標と考えられるならば, 本研究における温熱暴

露による血清 CPK 活性値, 特に MB-CPK の増加は温熱暴露は心筋及び若干の骨格筋と平滑筋に最もストレスを与えたことを示していると考えられる。

ALD は種々の組織細胞中に多量に存在しており正常な条件下では, 血清 ALD 活性値は安定しているが, 広範囲の組織の破壊による細胞内 ALD の離脱により血清 ALD 活性値の上昇が起こる (Baker, 1953; Sibley & Fleisher, 1954; Sibley, 1958)。組織破壊の例として急性組織障害 (Sibley & Fleisher, 1957), 心筋梗塞 (Volk ら, 1956) 肝実質障害 (Bruns & Puls, 1957) あるいは筋疾患, 特に筋性異栄養症 (Schapira ら, 1955; Aronson & Volk, 1957; Okinaka ら, 1961) などがある。また筋運動直後において血清 ALD の活性値が上昇したという報告もある (Atland & Highman, 1961)。本研究では温熱暴露初期において血清 ALD 活性値の有意な増減が現れたが, その後すぐ温熱暴露末期まで対照群に比べて若干低い値を示した。回復初期には対照群に比べて有意に減少し, その後対照群より若干低い値を回復期末期まで保った。(表3及び図3)。Bedrak (1965a) は熱ストレスにより犬の血清 ALD が処理初期に上昇したと報告しているが本実験の結果もこれに一致した。

ICDH は体の組織内に広く分布しており (Hoffman, 1970), 肝細胞障害により血清 ICDH 活性値は大幅に上昇するが, 心筋梗塞では血清 ICDH 活性値は変化がないという (Wolfson & Williams-Ashman, 1957; Sterkel ら, 1958; Duma ら, 1965; Kachmer, 1970)。温熱暴露された白ねずみの骨格筋細胞, 心筋細胞および肝細胞ミトコンドリア分画中の ICDH は有意な変化が見られなかったと報告しているが (Torlinska ら, 1982), 本実験では温熱暴露初期に血清 ICDH 活性値が有意に上昇した。しかし血清 CPK 活性値, 血清 CPK イソ酵素百分比, および血清 ALD 活性値に比べると, その変化の幅は比較的小さく, 最も温熱暴露による影響の少ない酵素であると考えられる。

前述したように, ストレスに暴露された動物の血清酵素活性値の上昇の一般的要因として細胞膜透過性の増加がある (Blair et al., 1961; Highman & Atland, 1962; Zieler, 1956; Fowler et al., 1968)。それに加えて温熱ストレスと筋運動によるこれらの血清酵素活性値の上昇を引き起こ

す可能性のある因子として緩徐な脱水作用があげられる。また温熱処理による電解質濃度の変動もこれらの血清酵素活性値の変動の間接的な要因として考えられる。運動負荷時には血清電解濃度のうち Na, K, Cl 等の濃度が増加する。その中でも最も変化の著しいのは血清 K 濃度であり運動強度に従って大きく変化するからである (後藤と堤, 1971)。

温熱暴露により熱射病, 熱性筋肉痛が起こる。熱射病の生成は高温と低い相対湿度もしくは低温と高い相対湿度のもとでもたらされる (O'Donnell & Clpwes, 1972)。また水分損失 (脱水) と熱蓄積による直腸温が上昇する。熱射病と熱性筋肉痛は視床下部の熱調節中枢に非可逆的な損傷をもたらし人体深部から末梢に向けての熱伝達を減少させる (Shapiro et al. 1978)。一方, 高温に暴露すると発汗により水分及び電解質の過度の損失がおこる。このような場合高温下における運動遂行能力と耐性が減少し過温症となる (Pitts et al., 1944; Buskirk et al., 1958; Saltin 1964a, b; Craig & Cummings 1955; Greenleaf & Castle 1971)。本研究において見られた温熱暴露による血清逸脱酵素活性値の上昇はこれらのことも影響を与えているのかも知れない。

筋作業を続けるためには最適の温度があり, 低温度または高温度では筋持久力を十分に発揮することができない。Nukada & Muller (1955) によれば下肢の場合 10°C, 前腕では 18°C の外部環境温度が最適条件であり, この時の筋温度は 35-39°C であるという。一方, 高温下で円滑に運動することのできる能力と耐性は高温馴化を通して向上するという (Bass et al., 1955; Buskirk et al. 1958; Wyndham 1973; Rowell 1974; Mitchell et al. 1976)。本研究において温熱暴露初期において上昇した血清逸脱酵素活性値が速やかに減少し, それ以後回復終了まで対照群と差がなかったことは, 少なくとも血清逸脱酵素に関するかぎり高温馴化がかなり速いことがわかった。

以上の結果を総合すると, 持続的な温熱暴露によって組織障害が引き起こされ細胞膜透過性が増加し細胞の恒常性に異常がおこり酸素が細胞外へ流失し血清酸素活性値が増加したものであると考えられる。細胞障害はこれらの酵素が触媒する代謝に異常をもたらすと考えられる。

要 約

本研究は温熱環境に Sprague-Dawley 系雄白ねずみを暴露した期間中および回復期の血清クレアチンフォスフォキナーゼ (creatine phosphokinase), 血清クレアチンフォスフォキナーゼのイソ酵素 (creatine phosphokinase isozyme), 血清アルドラーゼ (aldolase) 及びイソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase) の活性値の変化を観察した。温熱暴露群 (H 群) は 34 °C, 相対湿度 50-70 % の温熱環境にて午前 9 時から午後 1 時までの毎日 4 時間, 25 日間暴露した。回復群 (R 群) は H 群と同様に温熱暴露した後は 25 日間 24 °C で飼育した。対照群 (C 群) は 24 °C で 50 日間飼育した。

1) 血清 CPK 活性値は温熱暴露初期に有意に増加したが, 短期間の内に C 群の値に帰した。回復期においては初期に上昇の傾向が見られたが有意な差ではなかった。その後, 回復期においては変化がみられなかった。

2) C 群の CPK の電気泳動像には 3 つの分画が見られたが, 主に MM-CPK 及び BB-CPK であり, MB-CPK の割合は非常に少なかった。H 群での血清 CPK 活性値の増加は CPK のイソ酵素である MB-CPK の有意な増加が反映したものであることが明らかになった。R 群では C 群との差は見られなかった。

3) 温熱暴露初期に血清 ALD 活性値は有意に高い値を示した。回復期においては C 群よりも若干低い値を示したが有意ではなかった。

4) 温熱暴露初期において血清 ICDH 活性値は有意に上昇したが, すみやかに減少し C 群の値に戻り, その後, 回復期終了まで変化は見られなかった。

5) 本研究の結果をまとめると, 34 °C の温熱暴露により血清 CPK, CPK イソ酵素, 血清 ICDH 活性値のすべてに影響が見られた。特に MB-CPK イソ酵素の割合の上昇が顕著であった。これらは細胞損傷あるいは細胞膜透過性の増加によるものだと考えられた。

参考文献

- Aebi, U., R. Richterich, J. P. Colombo, and E. Rossi, 1961: Progressive Muscular Dystrophy. Biochemical identification of the carrier state in the recessive sexlinked juvenile (Duchenne) type by serum creatine phosphokinase determinations. *Enzyme*. 1: 61-64.
- Altland, P. D., and B. Highman, 1961: Effects of exercise on serum enzyme values and tissues of rats. *Am. J. physiol.* 201: 393-395.
- Aronson, S. M., and B. W. Volk, 1957: Studies on serum aldolase activity in neuromuscular disorders. *Am. J. Med.* 12: 414-421.
- Baker, R., 1953: Serum aldolase and its relationship to the hormonal control of cancer. *J. Urology*. 69: 426-429.
- Bass, D., C. Kleeman, M. Quinn, A. Henschel, and A. Hegnauer, 1955: Mechanisms of acclimatization to heat in man. *Medicine* 34: 323-380.
- Baumann P., R. Richterich, J. Escher, and G. Schonholzer, 1962: Das Verhalten von serum-Enzymen bei sportlichen Leistungen. *Schweiz Z. Sport-med.* 10: 33-38.
- Bedrak, 1965 a: Blood serum enzyme activity of dogs exposed to heat stress and muscular exercise. *J. Appl. Physiol.* 20: 587-590.
- Blair, E., R. Hook, H. Tolley, and G. E. Bunce, 1961: Serum glutamic oxalacetic transaminase content in hypothermia. *Science*. 133: 105-106.
- Bruns, F., and S. W. Puls, 1954: Die Aktivität der serum aldolase bei Erkrankungen der Leber: Ein neuer enzymatischer Test. *Klin. Wochenschr.* 32: 656-669.
- Buskirk, E., P. Lampietro and D. Bass, 1958: Work performance after dehydration; effects of physical condition and heat acclimatization. *J. Appl. Physiol.* 12: 189-194.
- Colombo, J. P., R. Richterich and E. Rossi, 1962: Serum Kreatin-Phosphokinase: Bestimmung and Diagnostische Bedeutung. *Klin Wochenschr.* 40: 37-44.
- Craig, E., and E. Cummings, 1966: Dehydration and muscular work. *J. Appl. physiol.* 21: 670-674.
- Dawson, D. M., I. H. Fine, 1967: Creatine kinase in human tissues. *Arch. Neurol.* 16: 175-180.
- Duma, R. J., and A. L. Siegel, 1965: Serum creatine phosphokinase in acute myocardial infarction. 115: 443-451.
- Fiske, C. H., and Y. Scbarow, 1925: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* 66: 375-379.

- Fowler, W. M., G. W. Gardner, H. H. Kazeruniam, and W. A. Lauusrted, 1968: The effect of exercise on serum enzymes. *Arch. Phys. Med. Rehad.* 49: 554-565.
- 後藤芳雄, 堤 達也, 1971: 運動負担時の血清酵素活性並びに血清電解質の変動体力研究. 21: 31-41.
- Greenleaf, J., and B. Castle, 1971: Exercise temperature regulation in man during hypohydration and hyperhydration. *J. Appl. Physiol.* 30: 847-853.
- Griffiths, P. D., 1965: Serum creatine kinase and exercise. *Brit. Med. J.* 2: 167-171.
- Highman, B., and P. D. Altland, 1962: Serum enzyme and histopathologic changes in rats after cold exposures. *Proc. Soc. Expll. Biol. Med.* 109: 523-526
- Hoffman, W. S., 1970: *The Biochemistry of clinical medicine*, 4th ed., year Book, Chicago. pp. 61,64,444-445.
- Hunt, D., and M. Bailie, 1967: The value of serum creatine phosphokinase estimations in the diagnosis of myocardial infarction. *Med. J. Aust.* 2: 1031-1034.
- Kachmar, J. F., 1970: Enzymes. In *Fudamentals of Clinical Chemistry*. Ed by N. W. Tize, Saunders, Philadelphia, pp. 449-453.
- King, J. 1967: Thesis, Institute of medical Laboratory technology, London.
- Mercer, D. W., 1974: Separation of tissue and serum creatinekinase isoenzymes by ion-exchange column choromatography. *Chlin. Chem.* 20: 36-42.
- Mitchell, D., L. C. Senay, C. H. Wyndham, A. J. Van Rensburg, G. G. Rogers, and N. B. Strydom, 1976: Acclimatization in a hot, humid enviroment: energy exchage, body temperature, and sweating. *J. Appl. Physiol.* 40: 768-778.
- 長尾憲樹, 小野三嗣, 池田道明, 山本隆宣, 清水悟, 小野寺昇, 田中弘之, 1979: 20 km走回復期1週にわたる血中逸脱酵素の変動. *体力科学* 28: 338-339
- Nukada, A., und E. A. Muller, 1955: Haullempertur und Leistungstahigkeit in Extremitaten bei dynamischer. Arbeit. *Int. z. angew. Physiol. einsche. Arbeits Physiol.* 16: 61-73
- O' Donnell, T., and G. Clowes, 1972: The cirulatory abnormalities of heat stroke. *N. Engl. J. Med.* 287: 734-737.
- Okinaka, S. H. Kumagai, S. Ebashi, H. Sugita, H. Momoi, Y. Toyokura, and Y. Fujie, 1961: Serum creatine phosphokinase. Activity in pro-

- gressive muscular dystrophy and neuromuscular diseases. *Arch. Neurol.* 4: 520-525
- Pitts, G., R. Johnson, and F. Consdazio, 1944: Work in the heat as affected by intake of water, salt and glucose. *Am J. Physiol.* 142: 253-259.
- Roe, C. R., W. E. Limbird, G. S. Wagner, and S. T. Nierenberg, 1972: Combined isoenzyme analysis in the diagnosis of myocardial injury. Application of electrophoretic methods for the detection and quantitation of the creatine phosphokinase MB isoenzyme. *J. Lab. Clin. Med.* 80: 577.
- Rogers, W. J., H. G. McDaniel, L. R. Smith, J. A. Mantle, R. O. Russell, and C. E. Rackley, 1977: Correlation of angiographic estimates of myocardial infarct size and accumulated release of creatine kinase MB isoenzyme in man. *Circulation.* 56: 199-205.
- Rowell, L., 1974: Human cardiovascular adjustments to exercise and thermal stress. *Physiol. Rev.* 54: 75-159.
- Saltin, B., 1964 a: Aerobic and anaerobic work capacity after dehydration. *J. Appl. Physiol.* 19: 1114-1118.
- Saltin, B., 1964 b: Circulatory response to submaximal and maximal exercise after thermal dehydration. *J. Appl. Physiol.* 19: 1125-1132.
- Schapira, G., J. C. Dreyfus, F. Schapita, and H. Krch, 1955: Glycogenolytic enzymes in human progressive muscular dystrophy. *Am. J. Physiol. Med.* 35: 313-319.
- Schmidt, E., F. W. Schmidt, H. D. Horn, and U. Ger; ad, 1963: The importance of the measurement of enzyme activity in medicine, In *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmeyer, H. U., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. Academic Press, New York.
- Schneider, K. W., und E. R. Heise, 1963: Die diagnostische Bedeutung einer erhauten kreatin Phosphojinase Aktivitat in Serum. *Deutch Med. Wschr.* 88: 520-530.
- Shapiro, Y., A. Magazanik, R. Vdassin, G. M. Ben-Baruch, E. Shvartz, and Y. Shoenfeld, 1979: Heat in tolerance in former heatstroke patients. *Ann. Intern. Med.* 90: 913-916.
- Sibley, J. A. L. Lehninger, 1948: Determination of aldolase in animal tissues. *J. Biol. Chem.* 177: 859-872.
- Sibley, J. A., and G. A. Fleisner, 1954: The clinical significance of serum aldolase. *Cproc Staff Meet., Mayo. Clin.* 29: 591-603.
- Sibley, J. A., 1958: Significance of serum aldolase levels. *Ann. NY. Acad.*

- Sci. 75: 339-345.
- SigmaChomicalCompany, 1981 b: Sigma Technical Bulletin No. 661.
- SigmaChomicalCompany, 1983 a: Sigma Technical Bulletin No. 754-EP.
- SigmaChomicalCompany, 1983 b: Sigma Technical Bulletin No. 176.
- Silverman, L. M., J. R. Mendell, and H. D. Gruemer. 1974: Creatine kinase isoenzymes in muscular dystrophy. Clin. Chem. 20: 865-872.
- Snedecor, G. M., W. G. Cochran, 1967: Statistical Methods, 2nd ed., Ames. Iowa, . State Univ. Press. pp. 50-65.
- Sterkel, R. L., J. A. Spencer, S. K. Wolfson, Jr., and H. G. Williams-Ashman 1958: Serum isocitric dehydrogenase activity with particular reference to liver disease. J. Lab. & Clin. Med. 52: 176-184.
- Torlinska, T., J. Kozlik, D. Kruk, A. Z. Gryczaka, and H. Krauss, 1982: Activity of certain enzymes in the mitochondrial and cytoplasmic fractions of liver cells myocardium and skeletal muscle of the rat during short-lasting hypothermia. Acta. Physiol. Pol. 33: 5-6.
- 堤達也, 青木和江, 後藤芳雄, 喜多尚武, 1980: 運動筋での低酸素状態が考えられる継続運動時の血漿グリセロール, 血漿酵素の変動, 体力研究: 45: 1-15
- VanderVeen, K. J., A. F. Willebrands, 1966: Isoenzymes of creatine phosphokinase in tissue extracts and in normal and pathological sera. Clin. Chim. Acta. 13: 312-316.
- Volk, B. W., S. Losner, S. M. Aronson, and H. Lew, 1956: The serum aldolase level in acute myocardial infarction. Am. J. M. Sci. 232: 38-43.