

血中メトヘモグロビン濃度および 血清ヘモグロビン濃度に及ぼす運動強度の影響

三好奈々子*・河野俊貞**・塩田正俊

Methemoglobin and serum free hemoglobin concentrations
before and after 3 km running at differential running speed

MIYOSHI Naoko, KAWANO Toshisada and SHIOTA Masatoshi

(Received September 30, 2016)

Abstract

The present study was carried out to investigate the effect of exercise-induced oxidative stress on methemoglobin (Met-Hb), serum free hemoglobin (Hb) and lipoperoxide concentrations before and after 3 km run at differential running speed.

Met-Hb concentration in runners was higher than that in untrained subjects at rest, whereas RBC (red blood cell) count and Hb concentration were lower in runners than those in untrained subjects. No significant changes of serum free Hb and lipoperoxide concentrations occurred. Serum free Hb concentration was found to decrease at low running speed ($40\% \dot{V}O_{2max}$), and to increase at high running speed ($80\% \dot{V}O_{2max}$), although Met-Hb concentration did not change. Similarly, blood lactate concentration decreased at low running speed and increased at high running speed.

These results suggest that hemolysis to the red blood cells during running is caused by footstrike and fragility of RBC membrane, and partly oxidative stress associated with running at more than $80\% \dot{V}O_{2max}$.

Key Words: methemoglobin, serum free hemoglobin, lipoperoxide, lactate, running

I. 緒言

運動性貧血の原因は多岐にわたるが、多くは①赤血球の産生不足、②物理的溶血、③化学的物質による溶血等に分けられる。伊藤ら(1986)は、赤血球膜の浸透圧脆弱性を指標に、物理的衝撃、温度および乳酸の3因子の影響について検討している。この報告によれば、物理的衝撃の強度と時間が赤血球膜の脆弱化に関与すること、 50°C を越える温浴では老化赤血球および成熟赤血球の一部が溶血すること、乳酸性acidosisは赤血球膜を脆弱化するが、acidosisの

* 卒業生：山口大学教育学部スポーツ健康科学コース (Yamaguchi University, Faculty of Education, Department of Health and Sports Science)

** 河野内科小児科医院

解消に伴い回復すること、などを明らかにしている。最近では、赤血球溶血の原因として酸化ストレスの影響が検討され、その指標としてMet-hemoglobin (Met-Hb) や血漿 (血清) ヘモグロビン (Hb) が用いられている。Telford et al (2003) は、ランニングと自転車運動を負荷した際のMet-Hbと血漿Hbについて検討し、Met-Hb濃度に両運動間で差は認めなかったが、ランニング後の血漿Hb濃度が自転車運動後のそれに比べ有意に高値を示したことから、運動時の赤血球溶血はランニング中の着地による衝撃 (footstrike) が主な原因で酸化ストレスによるものではないと報告している。しかし、footstrikeのない水泳運動でも、血管内溶血の指標となる血漿ハプトグロビン濃度は水泳距離が長くなればなるほど低下するとの報告 (Selby and Eichner, 1986) もあり、ランニング時の溶血が単に衝撃によるものだけとは考えにくい。

酸化ストレスとして発生する活性酸素種 (Reactive oxygen species: ROS) は、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot -}$)、過酸化水素 (H_2O_2)、ヒドロキシラジカル (HO^{\cdot})、一重項酸素 (1O_2) であるが、これらは安静時でも消費される総酸素量の2~5%産生される (大野ら, 1995)。これらの活性酸素種は赤血球を傷つけることが予想されるが、血中Hbのうち1日約3%が自動酸化によりMet-Hbに変換され、同時に $O_2^{\cdot -}$ を産生する。産生されたMet-Hbは還元酵素により1%前後の量になる (Umbreit, 2007)。しかし、運動時の酸素消費量は安静時の10倍以上になり相対的に産生されるMet-Hbの量も増大すると考えられる。

荒尾ら (1992) は、運動強度が80% $\dot{V}O_2$ max以上で血清過酸化脂質濃度が有意に上昇することを報告している。また、乳酸が大量に発生した骨格筋ではpHが低下し、フェリチンから鉄が遊離し、Fenton反応を誘導し、有害なヒドロキシラジカル (HO^{\cdot}) を産生する。また、運動により増加するカテコールアミンは鉄イオンと複合体を形成し、白血球の活性酸素産生能を高め、脂質過酸化を促進すると考えられている (大野と跡見, 1998)。したがって、乳酸濃度が上昇するような運動では HO^{\cdot} が増加し、さらに白血球の活性酸素産生能も高まり、酸化ストレスは増大すると考えられる。

そこで本研究では、先ず陸上長距離選手と一般学生の安静時のMet-Hb濃度、血清Hb濃度、および他の貧血の指標となる血液成分に差があるかどうか、次いで運動強度の異なるランニング (80% $\dot{V}O_2$ max強度および40% $\dot{V}O_2$ max強度) が酸化ストレスの指標となるMet-Hb濃度および血清Hb濃度にどのような影響をもたらすか、について明らかにし、運動に伴う赤血球溶血の原因について検討することを目的とした。

II. 方法

1. 被検者

被検者は、Y大学陸上部に所属する長距離選手6名と不規則ではあるが運動を行なっている男子学生9名であった。長距離選手の年齢及び身体的特徴 (平均値±標準偏差) は、年齢は20.2±0.4歳、身長は171.8±5.0 cm、体重は57.7±3.9 kg、Body Mass Index (BMI) は16.8±0.8 kg/m²であり、また推定最大酸素摂取量は68.3±5.8 ml/kg/minであった。また一般男子学生の年齢及び身体的特徴は、年齢は20.4±0.7歳、身長は172.2±5.8 cm、体重は66.9±7.0 kg、BMIは19.4±1.6 kg/m²であった。

なお、本実験を行うにあたり、ヘルシンキ宣言 (1964年、2000年修正) の「人間を対象とする医学研究の倫理的原則」に基づき、本研究の目的、方法および運動負荷に伴う不快感や危険性などを被験者に説明し、同意を得た上で実験に参加させた。

2. 実験手順

被験者は、実験当日、K医院に集合し約30分の椅座位安静後に血圧測定、採血、体重および採尿を行った。その後、準備運動を行い、40%および80% $\dot{V}O_2\max$ に相当する目標心拍数になるように3,000 m走運動を行った。3,000 m走運動終了後に運動前の測定同様に、血圧、採血、体重測定を行った。なお被験者には実験開始2時間前からの飲食はしないように指示した。また、一般学生の採血については、食後2時間の安静状態でY大学保健管理センターにおいて行った。

3. 運動負荷試験

(1) 最大酸素摂取量の推定

最大酸素摂取量の推定は、トレッドミルを用い、傾斜3.5%で初速度190 m/min（5分間）から走り始め、その後2分間隔で20 m/minずつ速度を上げ、最大速度270 m/minまでで終了とした。運動負荷試験中、心拍数はハートレイト・モニター（バンテージXL、キャノン）を用い連続的に測定した。呼気ガスの採取はダグラスバック法を用い、各走行速度において1分間行った。採取した呼気ガスは呼気ガス分析装置（RESPINA-IH2、日本電気三栄株式会社）を用いて、酸素濃度および二酸化炭素濃度を求め、また呼気ガス量は乾式ガスメーター（品川精器）を用いて測定した。酸素濃度及び呼気ガス量から酸素摂取量を求めた。

各走行速度における心拍数および酸素摂取量から、回帰直線式を求め最大酸素摂取量を推定した。

(2) 3 km走試験

トレッドミル走行試験における心拍数および酸素摂取量から求めた回帰直線式から、40%および80% $\dot{V}O_2\max$ に相当する心拍数を求め、それぞれの目標心拍数（ ± 5 拍/分）をハートレイト・モニターにより確認しながら、3 km走試験を行った。40%および80% $\dot{V}O_2\max$ に相当する運動強度での3 km走は無作為に行われ、1週間以上の間隔をあけ実施された。

4. 測定項目及び測定方法

(1) 血中乳酸濃度および動脈血酸素飽和度（ SpO_2 ）の測定

運動前後の乳酸濃度の測定は、簡易型乳酸測定器（アークレイ）を用い測定した。また、運動前後にパルスオキシメータ（日本光電）を用いて、指先から SpO_2 を測定した。

(2) 血清メモグロビン濃度の測定

血清ヘモグロビン濃度の測定は、血清1 mlを用いて、シアンメトヘモグロビン法（ヘモグロビン-テストワコー、和光純薬）により測定した。

(3) メトヘモグロビン濃度の測定

メトヘモグロビン濃度の測定には、全血200 μ lに、蒸留水16 mlとリン酸緩衝液〔リン酸一カリウム溶液（1/10M- KH_2PO_4 ）とリン酸二ナトリウム溶液（1/10M- Na_2HPO_4 ）を62.5 : 37.5の割合で混合し、pH 6.6に調整〕を4.0 ml加え、3,000回転/分で10分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清5 mlを3本の試験管に分注し、1本に5%シアン化ナトリウム溶液を50 μ l、2本に20%フェリシアン化カリウム溶液を50 μ l添加し、さらに2本のうち1本には5%シアン化ナトリウム液を50 μ l添加し、よく混合した。これら3本と最初の上清1本とを630 nmおよび680 nmの吸光度（HITACHI 7010分光光度計、日立）でそれぞれ測定した。求めた吸光度から総ヘモグロビン量に対するメトヘモグロビン量の割合（%Met-Hb）を算出した。

(4) 血液検査項目および測定法

採血した血液は、一部（2 ml）は血球成分測定用として、また一部（2 ml）はメトヘモグロビン測定用として、残り（8 ml）は血清成分測定用として分注した。採血した血液はすぐ

に冷蔵保存し、血球成分およびメトヘモグロビン濃度は走運動終了後すぐに測定した。また、血清ヘモグロビン濃度については3,000回/分で10分間の遠心分離を行い、その後直ちに測定した。他の血清成分については遠心分離後、後日一括して測定するために -80°C で冷凍保存した。

血液検査項目は、赤血球数、白血球数、ヘモグロビン (Hb) 濃度、ヘマトクリット (Hct) 値 (以上、シスメックE-3000、東亜医用電子)、血清鉄 (Fe C-テストワコー、和光純薬)、過酸化脂質濃度 (Liperoxide-Test Wako、和光純薬) であった。

5. 統計処理法

各測定項目の値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。長距離選手および一般学生における安静時の測定項目の有意差検定には、等分散の検定後に t-検定を行った。運動強度別の測定項目の有意差検定には、反復測定による分散分析 (a repeated measures ANOVA) を用いた。交互作用が認められた場合にTukey-Kramer法で各因子の検定を行った。また、各強度での運動前値からの変化率 (%) を対応のある t-検定を用い検討した。相関係数はPearsonの積率相関係数を求め検定した。有意水準は、いずれも 5 %未満とした。なお、運動前後の血液成分については、Dill and Costill (1974) の方法により濃縮補正した値で示した。

III. 結果

1. 長距離選手と一般学生の安静時のMet-Hb濃度、Met-Hb率および血液性状

表 1 に、陸上長距離選手と一般学生の身体特性および血液成分等について示した。

安静時のMet-Hb濃度およびMet-Hb率 (%Met-Hb) は、長距離選手のそれら (0.30 ± 0.08 g/dl; $2.03 \pm 0.48\%$) が一般学生 (0.18 ± 0.11 g/dl; $1.15 \pm 0.69\%$) に比べいずれも有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。しかし、血清Hb濃度には両群間 (長距離選手: 10.80 ± 2.85 vs. 一般学生: 12.56 ± 5.54 mg/l) に有意な差は認めなかった。また、安静時の血中Hb値 (長距離選手 vs. 一般学生: 14.5 ± 0.6 vs. 15.3 ± 1.2 g/dl) は長距離選手で低い値を示す傾向 ($p=0.144$) にあり、また、ヘマトクリット値 (長距離選手 vs. 一般学生: 42.6 ± 2.1 vs. $46.0 \pm 2.9\%$) およびRBC数 (473.7 ± 17.3 vs. $503.6 \pm 30.5 \times 10^4/\mu\text{l}$) は有差に低い値であった。しかし、血清過酸化脂質濃度 (長距離選手 vs. 一般学生: 3.3 ± 1.0 vs. 4.0 ± 0.8 nmol/ml) では長距離選手が低い値を示す傾向 ($p=0.14$) にあった。

安静時のHb濃度と血清Hb濃度との間には $r=0.516$ ($p < 0.05$) の有意な関係が認められたが、Met-Hb濃度と血清過酸化脂質濃度 ($r=-0.406$, $p=0.136$)、および血清Hb濃度 ($r=0.111$) との間には有意な関係は認められなかった。

2. 異なる強度 (40%および80% $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$) での3 km走前後の血液成分の変化

図 1 に、運動前後のMet-Hb、血清Hb、血中乳酸および血清PLO濃度、白血球数および単球数について示した。

(1) Met-Hb濃度の変化

走前後のMet-Hb濃度には、交互作用に有意傾向がみられ ($p=0.0833$)、40% $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ 強度のランニングでは走後に低下傾向 (0.354 ± 0.118 から 0.291 ± 0.088 g/dl) にあり、走前値に対する走後のMet-Hb濃度の変化率は、 $-16.88 \pm 9.43\%$ の有意 ($p < 0.01$) な低下を示した。一方、80% $\dot{V}\text{O}_2\text{max}$ 強度のランニングでは走後に増加傾向 (0.242 ± 0.091 から 0.299 ± 0.110 g/dl) にあり、その変化率は $48.64 \pm 85.21\%$ であった。

(2) 血清Hb濃度の変化

走前後の血清Hb濃度は交互作用が認められ ($p < 0.01$)、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 10.59 ± 4.11 から 8.22 ± 3.00 mg/l (変化率: $-19.38 \pm 17.00\%$ 、 $p < 0.05$) に低下し、一方、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 11.02 ± 3.58 、 13.81 ± 4.66 mg/l (変化率: $26.63 \pm 21.18\%$ 、 $p < 0.05$) と有意な増加を示し、両強度間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。

(3) 血中乳酸濃度の変化

走前後の血中乳酸濃度には交互作用がみられ ($p < 0.01$)、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 1.383 ± 0.286 から 0.996 ± 0.161 mmol/l (変化率: $-22.86 \pm 10.30\%$ 、 $p < 0.01$) と低下し、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 1.400 ± 0.237 から 7.690 ± 2.485 mmol/l (変化率: $467.21 \pm 226.64\%$ 、 $p < 0.01$) に増加し、両強度間には有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

(4) 血清過酸化脂質濃度および動脈血酸素飽和度

血清過酸化脂質濃度は、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 3.506 ± 1.301 から 2.793 ± 0.536 nmol/ml、一方、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 3.066 ± 1.061 から 2.894 ± 0.442 nmol/mlの変化を示したが、有意な変化ではなかった。また、動脈血酸素飽和度は、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは $96.33 \pm 3.45\%$ から $98.50 \pm 0.84\%$ 、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは $95.60 \pm 1.82\%$ から $96.80 \pm 3.90\%$ と僅かな変化であった。

(5) 白血球数の変化

走前後の白血球数には交互作用 ($p < 0.001$) が認められ、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 5350.0 ± 781.7 から $5817.7 \pm 974.4 \times 10^4/\mu l$ ($8.47 \pm 4.13\%$ 、 $p < 0.01$) の増加し、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 5583.3 ± 1474.3 から $7914.1 \pm 21309.0 \times 10^4/\mu l$ (変化率: $41.92 \pm 8.48\%$ 、 $p < 0.001$) へ有意に増加した。また、単球 (Monocyte) 数にも交互作用 ($p < 0.01$) がみられ、40% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 283.5 ± 44.8 から $296.3 \pm 48.6 \times 10^4/\mu l$ ($4.79 \pm 9.00\%$) へ増加し、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは 274.2 ± 100.3 から $392.5 \pm 105.8 \times 10^4/\mu l$ (変化率: $49.51 \pm 34.88\%$ 、 $p < 0.05$) へと有意に増加した。

(6) Met-Hb濃度と血清Hb濃度と他の測定項目との相関関係

運動前後 (Δ) のMet-Hb濃度と有意な相関関係を示した項目は、単球数 ($r=0.680$ 、 $p < 0.05$)、血中乳酸濃度 ($r=0.537$ 、 $p < 0.05$) であり、血清Hb濃度 ($r=0.571$ 、 $p=0.516$) には相関関係の傾向が認められた。一方、血清Hb濃度とは、血中乳酸濃度 ($r=0.887$ 、 $p < 0.001$)、白血球数 ($r=0.830$ 、 $p < 0.001$) および単球数 ($r=0.649$ 、 $p < 0.05$) に有意な相関関係が認められた。

IV. 考察

本研究では、先ず陸上長距離選手と一般学生の安静時のMet-Hb濃度、血清Hb濃度、および他の貧血の指標となる血液成分に差があるかどうか、次いで運動強度の異なるランニング (80% $\dot{V}O_2$ max強度および40% $\dot{V}O_2$ max強度) が酸化ストレスの指標となるMet-Hb濃度および血清Hb濃度にどのような影響をもたらすか、について明らかにし、運動に伴う赤血球溶血の原因について検討することを目的とした。

(1) その結果、安静時の長距離選手のMet-Hb濃度は、一般学生に比べ有意 ($p < 0.05$) に高い値を示し、また、陸上長距離選手のHct値およびRBC数は一般学生に比べ、有意 ($p < 0.05$) に低値を示し、Hb濃度も低値を示す傾向にあった。これらの結果から、長距離選手では酸化ストレスによりMet-Hb濃度が増加し、溶血が促進し、RBC数およびHct値が低値を示す可能性が示唆された。

(2) ランニング強度の影響については、短時間 (約10~15分間) で40% $\dot{V}O_2$ max強度のラ

ンニングではMet-Hbおよび血清Hb濃度が低下し、一方、80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは血清Hb濃度、血中乳酸濃度および白血球数が顕著に上昇した。これらの結果から、低強度(40% $\dot{V}O_2$ max)のランニングでは酸化ストレスの軽減効果が、また、高強度(80% $\dot{V}O_2$ max)のランニングであっても運動に伴う酸化ストレスの影響は少ないこと、が示唆された。

これらのことから、ランニング後の赤血球溶血は、高い強度のランニング後の血中乳酸濃度上昇による赤血球膜脆弱性や一部は白血球数上昇による酸化損傷の亢進、あるいは高い強度のランニング時に発生する足底の衝撃などが複合的に作用し、引き起こしている可能性が考えられた。

1) 安静時のMet-Hb濃度および%Met-Hbについて

ヘモグロビン(Hb)はヘム(鉄とポルフィリンの複合体)とグロビンで合成される。そのHb中のヘム(Hb-Fe₂₊)が酸化され、Hb-Fe₃₊になったものをメトヘモグロビン(Met-Hb)という。通常、Met-Hbは、芳香族化合物(アニリン、ニトロベンゼンなど)や硝酸塩などの体内吸収によって生じることがよく知られており、また、過剰に産生されたMet-Hbはハイツ小体となり、脾臓で処理される。通常、血中Hbのうち1日約3%は自動酸化によりMet-Hbに変換され、同時にO₂⁻を産生する。産生されたMet-Hbは還元酵素により1%前後の量になる。一方、運動により産生された活性酸素は、赤血球中の鉄を酸化させMet-Hbを増加させると考えられるが、産生されたO₂⁻はdismutaseにより過酸化水素(H₂O₂)と酸素を産生する。次いでcatalaseにより過酸化水素(H₂O₂)はferrous hemoglobin(Fe₂₊)からFerryll hemoglobin(Fe₄₊)を産生し、さらにFerryll hemoglobin(Fe₄₊)は過酸化水素(H₂O₂)の作用によりFe₃₊とporphyrinに分解され、porphyrinは崩壊する(Umbreit, 2007)。したがって、運動に伴うMet-Hbの増加は貧血の一因となる可能性がある。しかし、運動選手のMet-Hbに関する報告は少ない。

本研究の長距離選手では安静時のMet-Hb濃度および%Met-Hbは0.30±0.08 g/dlおよび2.03±0.48%で一般学生のそれら(0.18±0.11 g/dl; 1.15±0.69%)に比べ有意(p<0.05)に高い値を示した。Telford et al (2003)は、トライアスロン選手(triathletes)の安静時の%Met-Hbは0.4~0.45%で非運動群の0.35%より高い値であったことを示している。したがって、長距離選手およびトライアスロン選手では%Met-Hbが高値を示すと考えられる。

ところで本研究の求めた%Met-HbとTelford et alが求めた%Met-Hbには違いがある。%Met-HbについてはVollaard et al (2006)もトライアスロン選手の安静時のMet-Hbは0.18%前後と報告しており、Telford et alの値と近い。また、Rechetzki et al (2012)は子どもの%Met-Hb(3.61~6.44%)を測定し成人(1.9~3.8%)よりも高いことを報告している。Rechetzki et alの報告した成人の%Met-Hbの値は本研究のそれに近い。これらの違いは一概には言えないが、本研究のように生化学的な手法で測定したか、光学的機器(Oximeter、Spectrometerなど)を用いて測定したかによるのかもしれない。

さて、運動選手と非運動選手との比較では、本研究の結果でもTelford et alの報告でも運動選手の%Met-Hbが非運動選手に比べ高い値を示しており、この点では一致している。Rechetzki et alは、子どもの%Met-Hb(3.61~6.44%)は成人(1.9~3.8%)よりも高いことを報告しているが、この原因として子どもではMet-Hbを還元する酵素(cytochrome b5 reductase enzyme)の活性が低下していること、その酵素の濃度が成人の60%程度であること、をあげている。しかし、本研究の長距離選手の還元酵素が低下しているとは考えにくい。また、Richards et al (2007)は、慢性疲労症候群(Chronic fatigue syndrome)の%Met-Hb(1.26%)が対象者(0.71%)より高値を示すと報告している。この原因として、慢性疲労症候群では脂

質過酸化脂質であるMDA (Malondialdehyde) 濃度が高いことを示している。本研究でも長距離選手と一般学生との血清MDA濃度を測定したが、有意な差はなかった。日頃の練習で慢性的な疲労を起こしている可能性はあるが定かではない。また、長距離選手の安静時の好中球の割合 (%) が高くなっていて、何らかの形 (足底衝撃など) で損傷した赤血球は異物排除の対象となり、好中球などによる酸化損傷の目標となる (Smith, 1995) 可能性がある。安静時の %Met-Hbの上昇の原因については明らかではないが、毎日のランニング練習に伴う疲労蓄積による酸化ストレスの上昇、運動後の好中球による酸化損傷などにより %Met-Hbが上昇し、結果としてRBC数およびHct値が低値を示した可能性が考えられる。

ヘモグロビンの働きは酸素を運搬することであり、Met-Hbの増加はその機能が低下することを意味し、長距離選手にとっては競技パフォーマンスを左右する重要な問題となる。本研究で求めた走前後の動脈血酸素飽和度には大きな変化はなかったが、さらなる検討が必要である。

2) 運動時のMet-Hb濃度および血清Hb濃度に及ぼす運動強度の影響

本研究の結果、強度別ランニング時のMet-Hbには交互作用に有意傾向 ($p=0.0833$) がみられ、40% $\dot{V}O_2\max$ 強度のランニングでは走前値に対する走後のMet-Hb濃度の変化率は ($-16.88 \pm 9.43\%$, $p < 0.01$) 低下し、一方、80% $\dot{V}O_2\max$ 強度のランニングでは走後に増加傾向 ($48.64 \pm 85.21\%$) を示した。この結果からは、低い強度のランニングではMet-Hbは産生されず逆に低下し、強い強度のランニングでは上昇することが推測される。

Telford et al (2003) は、トライアスロン選手を対象に、最大酸素摂取量の75%に相当するランニングと自転車運動を1時間負荷したときに %Met-Hbは約2倍に上昇したことを報告している。本研究で80% $\dot{V}O_2\max$ 強度のランニング後のMet-Hbが明確に上昇しなかった原因は、運動時間が短かったことが考えられる。一方で、Vollaard et al (2006) は、よく鍛錬されたトライアスロン選手を対象に、通常のトレーニング期間、オーバートレーニング期間および負荷を軽くするテーパリング期間におけるMet-Hbについて検討したが、Met-Hb水準は運動の結果として-12.1%の有意な低下を認められたと報告している。つまり、オーバートレーニングによっても酸化ストレスの指標としてのMet-Hbに変化を認めていない。また、Sentürk et al (2001) は、ラットを用い急性運動および慢性運動後の %Met-Hbを検討し、鍛錬ラットには変化はみられなかったが、非トレーニングラットで急性運動後に %Met-Hbが増加したと報告している。これらの報告から、酸化ストレスの指標としてのMet-Hbは高い強度の運動では上昇するが、低い強度の運動では低下する可能性が示唆される。しかし、運動後のMet-Hbの変化は運動強度の影響に加え対象者のトレーニング状態の影響も少なからずあるものと考えられる。

その他の酸化ストレスの指標と運動強度の関係は、運動強度が80% $\dot{V}O_2\max$ 以上で血清過酸化脂質濃度が有意に上昇すること (荒尾ら, 1992)、運動強度の増加に伴い骨格筋中の過酸化脂質のチオバルビツール酸反応性物質 (TBARS: Thibarbituric acid-reactive substances) が上昇すること (Alwssio et al, 1988)、また、3段階の運動負荷後の血清MDA濃度は、40% $\dot{V}O_2\max$ 強度の運動では有意に低下し、100% $\dot{V}O_2\max$ 強度の運動では有意に上昇したこと (但し、70% $\dot{V}O_2\max$ 強度の運動では変化なし) (Lovlin et al, 1987)、が報告され、80% $\dot{V}O_2\max$ 以上の強度の運動で酸化ストレスは高まる。しかし、Healthier et al (2000) は、持続的なトレーニングを行っている運動選手では酵素的および非酵素的な酸化防御システムが向上しており、脂質過酸化脂質の低下や疲労耐性の改善が起こっていることを報告している。しかし一方で、運動後に上昇した白血球や単球などは、運動中に何らかの刺激で損傷された赤血球など傷害細胞の

破壊や取り込み、壊死細胞の除去などに関与している可能性もある。Satoら（1994）は運動強度が高くなれば好中球のROS（次亜塩素酸イオン）生成が増加することを報告しており、運動中に損傷した赤血球が運動後に好中球による酸化損傷の対象となることは十分考えられる。それが安静時のMet-Hbの上昇やHb、RBC数、ヘマトクリット値に影響していたと考えられる。

3) 運動に伴う溶血性貧血について

運動時の赤血球の溶血の原因として酸化ストレスの影響が検討され、ランニングと自転車運動を负荷した際に、Met-Hb濃度に差は認めなかったが、ランニング後の血漿Hb濃度が自転車運動後のそれに比べ有意に高値を示したことから、運動時の赤血球溶血はランニング中の着地による衝撃（footstrike）が主な原因である報告されている（Telford et al, 2003）。しかし、footstrikeのない水泳運動でも、血管内溶血の指標となる血漿ハプトグロビン濃度は水泳距離が長くなればなるほど低下するとの報告（Selby and Eichner, 1986）もあり、ランニング時の溶血が単に衝撃によるものだけとは考えにくい。

弘（1982）は乳酸性アシドーシスによる赤血球浸透圧脆弱性について検討し、浸透圧の変化による赤血球膜の脆弱の開始には、乳酸濃度が20～40 mg%（2.2～4.4 mmol/l）まで上昇する必要があることを報告している。伊藤らも、いわゆるAnaerobic thresholdの運動強度を超える運動では、乳酸による代謝性acidosisが亢進し、赤血球膜の浸透圧脆弱性が起こる可能性を示唆している。本研究でも80% $\dot{V}O_2$ max強度のランニングでは血中乳酸濃度が 7.69 ± 2.49 mmol/lに増加しており、十分に赤血球膜の浸透圧脆弱が起こっていたと考えられる。さらに、赤血球膜が脆弱し、また、ランニング衝撃により損傷された赤血球などは、同時に上昇してきた白血球の標的となり活性酸素による酸化ストレスを受け、Met-Hbを増加させていたことも考えられる。ランニング後の赤血球溶血については、ランニングによる乳酸濃度および白血球数の上昇に伴う浸透圧上昇あるいは酸化ストレスなどにより赤血球膜の脆弱性が生じていた可能性もある。血清PLO濃度、血清Hb濃度の変化などを考え併せると、ランニング後の赤血球溶血は血中乳酸濃度および白血球数の上昇などによる赤血球膜脆弱性や酸化損傷と、強い強度（低い強度ではない）のランニング時に生じる足底の衝撃などが複合的に作用し、引き起こしている可能性が考えられた。

さて、これまで運動時の白血球数の上昇の意義は、血糖値の低下、体温上昇、ACTHなどストレスホルモン上昇に伴い白血球数が上昇することから、主には運動時の生体のストレス状態の反映と考えられているが（桜井ら、1990）、上記のような運動後のRBCなどの傷害細胞の破壊、取り込み、除去などにも関与している可能性も考えられる。

V. 結論

長距離選手では、Met-Hb濃度が一般学生より高く、そのため、酸化ストレスによる溶血が促進し、赤血球数およびHct値が低値を示す可能性が、また、本研究で用いた短時間のランニングでは40% $\dot{V}O_2$ max強度では酸化ストレスの軽減効果（Met-Hb濃度の低下）が、また、80% $\dot{V}O_2$ max強度であっても運動に伴う酸化ストレスの影響は少ないこと、などが示唆された。

これらのことから、ランニング後の赤血球溶血は、高い強度のランニング後の血中乳酸濃度上昇による赤血球膜脆弱性や一部は白血球数上昇による酸化損傷の亢進、あるいは高い強度のランニング時に発生する足底の衝撃などが複合的に作用し、引き起こしている可能性が考えられた。

VII. 文献

- Alwssio HM, Goldfarb AH, and Cutler RG: MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol* 255: C874-C877, 1988
- 荒尾 孝: 運動負荷と生体内過酸化脂質及び活性酸素消去酵素活性. *運動生化学* 3-4: 76-83, 1992.
- Dill DB and Costill DL: Calculation of percentage changes in volumes of blood, plasma, and red cells in dehydration. *J Appl Physiol* 37(2): 247-248, 1974.
- Healthier KV, Powers SK, Stewart DJ, Demirel HA, Shanely RA, and Naito H: Short-term exercise training improves diaphragm antioxidant capacity and endurance. *Eur J Appl Physiol* 81: 67-74, 2000
- 弘卓三: 代謝性アシドーシスによる赤血球浸透圧脆弱性の研究. *体力科学* 31: 279-290, 1982
- 伊藤 朗、栗林 徹、丹 信介、福家理映子、堀 太平、石瀬まゆみ、金高仁美、井川幸雄: 運動性貧血の関する研究. 物理的衝撃、温度、乳酸が赤血球膜浸透圧脆弱性に及ぼす影響. 筑波大学体育科学系紀要 9: 181-193, 1986.
- Lovlin R, Cottle W, Pyke I, Kavanagh M, and Belcastro AN: Are indices of free radical damage related to exercise intensity. *Eur J Appl Physiol* 56: 313-316, 1987
- 大野秀樹、跡見頼子: 鉄 (Fe) の反応は? ; 大野秀樹、跡見頼子、伏木 亨編 活性酸素と運動. 杏林書院 東京 第1版 pp 48-49, 1998.
- 大野秀樹、大石修司、木崎節子: 運動と活性酸素. *科学と生物* 33 (8) : 527, 1995
- Rechetzki KF, Henneberg R, da Silva PH, Nascimento AJ: Reference values for methemoglobin concentrations in children. *Rev Bras Hematol Hemoter* 34(1): 14-16, 2012
- Richards RS, Wang L, and Jelinek H: Erythrocyte oxidative damage in chronic fatigue syndrome. *Archives of Medical Research* 38:94-98, 2007
- 桜井智野風、鈴木政登、塩田正俊、町田克彦、松原茂、井川幸雄: 運動による白血球動態の意義. *体力科学* 39 (6) : 758, 1990
- Sato H, Suzuki K, Nakajima S, Sugawara K, Totsuka M and Sato k: Effects of acute endurance exercise and 8-week training on the production of reactive oxygen species from neutrophils untrained men. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 53: 431-440, 1994
- Selby GB and Eichner ER: Endurance swimming, intravascular hemolysis, anemia, and iron depletion. *Am J Med* 81: 791-794, 1986
- Sentürk ÜK, Gündüz F, OKTAY Kuru O, Aktekin MR, Kipmen D, Yalçın Ö, Bor-Küçükataç M, Yeşilkaya A, and Başkurt O: Exercise-induced oxidative stress affects erythrocytes in sedentary rats but not exercise-trained rats. *J Appl Physiol* 91: 1999-2004, 2001
- Smith JA: Exercise, training and red blood cell turnover. *Sports Med* 19(1): 9-31, 1995
- Telford RD, Sly GJ, Hahn AG, Cunningham RB, Bryant C, and Smith JA: Footstrike is the major cause of hemolysis during running. *J Appl Physiol* 94: 38-42, 2003.
- Umbreit J: Methemoglobin-It's not just blue: A concise review. *Am J Hematol* 82: 134-144, 2007
- Vollaard NJ, Cooper CE, and Shearman JP: Exercise-induced oxidative stress in overtraining and tapering. *Med Sci Sports Exerc* 38(7): 1335-1341, 2006

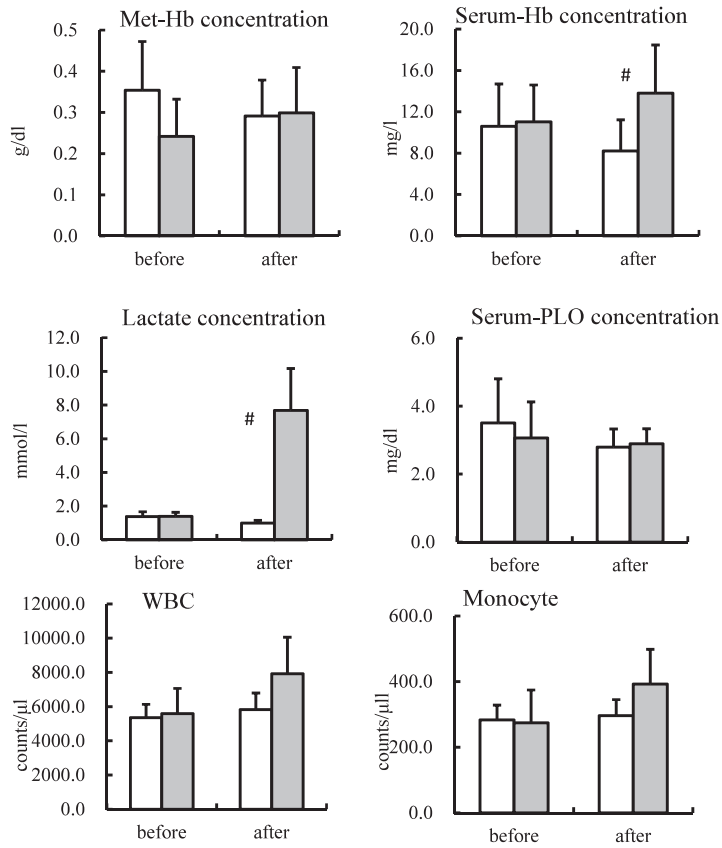


Figure 1. Changes of hematological indices before and after 3 km running

at different exercise intensity (40% $\dot{V}O_2\text{max}$ and 80% $\dot{V}O_2\text{max}$)

□ : 40% $\dot{V}O_2\text{max}$, ■ : 80% $\dot{V}O_2\text{max}$

: $p < 0.05$, 40% $\dot{V}O_2\text{max}$ vs 80% $\dot{V}O_2\text{max}$

Table 1. Characteristics and hematological indices of runner and control subjects

Characteristic	runner (n=6)	control (n=9)	p
Age (yr)	20.2 ±0.4	20.4 ±0.7	
Height (cm)	172.0 ±5.0	172.2 ±5.8	
Weight (kg)	58.1 ±3.8	66.9 ±7.0	* * *
Body mass inde (kg/cm ²)	19.6 ±0.7	22.9 ±1.6	* * *
$\dot{V}O_2$ max. (ml/kg/min)	68.3 ±5.8	—	
Methemoglobin (%)	2.03±0.48	1.15±0.69	*
Methemoglobin (g/dl)	0.30±0.08	0.18±0.11	*
Serum free hemoglobin (mg/l)	10.80±2.85	12.56±5.54	
Hemoglobin (g/dl)	14.5 ±0.6	15.3 ±1.2	
Hematrit (%)	42.6 ±2.1	46.0 ±2.9	*
Red blood cell (×10 ⁴ /μl)	473.7 ±17.3	503.6 ±30.5	*
MCV (μ ³ ; fl)	90.1 ±402	91.4 ±2.2	
MCH (pg)	30.8 ±1.1	30.4 ±1.4	
MCHC (%)	33.9 ±0.4	33.3 ±0.9	
White blood cell (/μl)	5466.7 ±932.6	5833.3 ±993.7	
Lymphocyte (%)	26.2 ±2.9	34.1 ±5.8	* *
Neutrophil (%)	66.7 ±3.7	55.6 ±7.4	* *
Monocyte (%)	5.0 ±0.6	5.6 ±1.5	
Eosinphil (%)	2.0 ±0.6	4.6 ±3.3	
Basophil (%)	0.1 ±0.2	0.2 ±0.4	
LPO (nmol/l)	3.3 ±1.0	4.0 ±0.8	

The mean blood measurements shown were taken at rest, just before the 2 running trails in runner subjects.

Values are mean ± standard deviations (SD)

*: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001, runner vs control

MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin,

MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration.

LPO: lipoperoxide