

論文の内容の要旨

獣医学専攻

平成9年度博士課程 入学

氏名 ポフィ・フェデリコ・マルティン

指導教官 小野 憲一郎

論文題目 : Studies on exercise-induced myopathy in horses

(和訳 馬における運動負荷に伴う筋肉傷害に関する研究)

馬で認められる運動負荷に伴う筋肉傷害は、獣医臨床上のみならず、運動生理学ならびにスポーツ医学の観点からも重要な課題である。これら筋肉傷害は運動時に認められる末梢性筋疲労の終末像として、筋の部分断裂を示す局所性筋損傷、横紋筋繊維の融解を示す運動性横紋筋融解症などに細分されるが、様々な因子が関与するため、その発症機序については不明の点が少なくない。運動負荷時の筋細胞では、局所的虚血、エネルギー供給の低下、代謝産物の蓄積、細胞内の pH の低下、細胞膜脱分極の阻害などが観察されているが、本症発症との関連は推測の域をでない。一方、虚血時には組織低酸素、無酸素的解糖系の亢進、高エネルギーリン酸化合物 (ATP やクレアチンリン酸) の分解などが引き起こされるとともに、血中あるいは病変部組織中の脂質過酸化反応産物の増加、酸化系酵素活性の変動などから、その発症因子としてフリーラジカルの重要性が指摘されている。フリーラジカルは、ATP などの分解最終過程であるヒポキサンチン・キサンチン・尿酸産生系、ミトコンドリア電子伝達系の障害、筋断裂にともなって遊走する白血球で産生され、生体膜リン脂質を過酸化して膜の構造を変化させるばかりでなく、その二次産物を通じて膜蛋白を修飾し、細胞の機能障害

や細胞死と密接に関連すると考えられる。また、これらの傷害は虚血が解除された再灌流時に増悪するため、いわゆる虚血・再灌流傷害として重要視されている。しかしながら、馬の運動負荷に伴う筋肉障害では、高エネルギーリン酸化合物の動態、フリーラジカルの産生、脂質過酸化による膜の障害、細胞内カルシウムの動態、あるいは細胞死の発現機序など、その詳細は不明である。そこで本研究では、マウス骨格筋株化細胞（C2C12 細胞）を用いた *in vitro* の系、ならびにトレッドミールで強制運動をさせた馬を用いた *in vivo* の系で、運動負荷に伴う筋肉傷害の発症メカニズムについて検討した。

まず、第1章では C2C12 細胞を分化させた後、一般に広く用いられている虚血条件、すなわち培養液からグルコースを除去した条件に加えて、アルゴンガス存在下で培養し、高エネルギーリン酸化合物、膜障害のマーカーとして培養上清中の LDH の変動、ならびに脂質過酸化のマーカーとしてチオバルビツール酸反応物質（TBARS）あるいはマロンジアルデヒド（MDA）、スピントラップ法によるフリーラジカルの産生、また共焦点レーザー顕微鏡による細胞内カルシウムの変動、さらに TUNEL 法と電気泳動法により核の DNA 断片化について検討した。また、虚血・再灌流は、白血球遊走を想定して虚血処置後、培養液にフリーラジカルの代表的物質である過酸化水素（ H_2O_2 ）を添加した条件で行った。

虚血：細胞内 ATP ならびに GTP 含量は、虚血後1時間で急速に、かつ有意に減少し、以後低値を維持した。また、最終産物である IMP は有意に増加し、さらに培養上清中のヒポキサンチン濃度も増加し、フリーラジカル産生系の基質が虚血により増加することが明らかとなった。また、上清中 MDA 濃度は虚血後1時間から有意に増加し、以後高値を維持した。一方、上清中の LDH 活性は虚血後2時間から有意に増加し、虚血により細胞死が誘発されることが考えられたが、細胞死のマーカーである PI 蛍光の増加は認められなかった。細胞内カルシウム濃度は、虚血後1時間から増加し、以後高値を維持した。TUNEL 陽性細胞は虚血2、3時間後に増加した。また、キサンチンオキシダー

ゼ活性は認められず、スピントラップ法によるフリーラジカルの産生も観察されなかった。したがって、骨格筋細胞では虚血により高エネルギーリン酸化合物の分解が生じ、フリーラジカル産生の基質となるヒポキサンチンの増加は認められるものの、キサンチンオキシダーゼ活性が存在しないため、フリーラジカルの産生は起こらないと考えられた。また、虚血のみでは細胞死は発現しないが、核 DNA 断片化が引き起こされると考えられた。上清中の TBARS の増加は、細胞内カルシウムの増加により引き起こされるフォスホリパーゼによる細胞膜からの脂質過酸化物の切り出しにより、膜の安定性が傷害され、LDH の増加を生じたものと推測された。

虚血・再灌流：虚血処置を行わなかった細胞に、再灌流のみを行った場合、 H_2O_2 の高濃度添加（1 および 5 mM）では ATP、GTP の急速かつ有意な減少が認められたが、低濃度添加（0.2 および 0.04 mM）では有意な変動を示さなかった。また、虚血を行った細胞に再灌流を行うと、高濃度添加ではいずれの高エネルギーリン酸化合物に変動は認められなかったが、低濃度添加では ATP、GTP が処置後 3 - 4 時間で増加した。したがって、生理的な虚血・再灌流条件は低濃度の H_2O_2 添加により再現できるものと考えられた。虚血・再灌流時の上清中の LDH 活性は、虚血のみを行った場合に比較して著しい高値を示した。しかしながら、再灌流単独では、前述した虚血単独の場合に比較して低値を示した。一方、上清中 TBARS 濃度は虚血を行わなかった場合に比較して、虚血・再灌流では処置後 1 時間から著しい高値を示し、フリーラジカルによる脂質過酸化、あるいは過酸化物の切り出しは虚血処置で増幅されると考えられた。細胞内カルシウム濃度は虚血・再灌流では増加し、これに伴って PI 蛍光で表現される細胞死が発現した。一方、スピントラップ法によるフリーラジカルの産生では、虚血を行わなかった場合には認められなかったが、虚血・再灌流では軽度ながら観察され、虚血処置がフリーラジカル産生系に何らかの影響を及ぼしていると考えられた。フリーラジカルのトラップ剤である DMSO、ならびに鉄のキレート剤である DFO を添加した場合、高エネルギーリン酸化合物は変動を示さなかったが、上清中 TBARS 濃度、LDH 活性が抑制される傾向を示した。した

がって、虚血・再灌流時には細胞死が発現し、また、虚血・再灌流は筋細胞外からのラジカル反応を増強させ、これらラジカルによる細胞膜過酸化ならびにカルシウム流入が細胞死の発現に関与するものと考えられた。

第2章ではトレッドミールを用いて、馬に強制運動負荷を行い、中殿筋組織中高エネルギーリン酸化合物、血中ヒポキサンチンならびに尿酸値、LDH ならびに CK 活性値、筋組織中の MDA 濃度の変動、筋組織中キサンチンオキシダーゼ活性、TUNEL 法ならびに電気泳動法による筋細胞の核の DNA 断片化について検討した。

運動負荷45分後に、筋組織中高エネルギーリン酸化合物のうち ATP ならびに GDP 濃度の有意な減少が認められたが、いずれも負荷後24時間で前値に復した。また、IMP は負荷後45分で、有意に増加した。血中ヒポキサンチン濃度は、負荷後30分で、尿酸濃度は45分で増加し、また筋組織中にはキサンチンオキシダーゼ活性の認められることから、in vivo においては筋細胞の近傍でフリーラジカルの産生が起こっていることが明らかとなった。血中 LDH 活性に変動は認められなかったが、CK 活性は負荷後45分、24時間で有意に増加した。筋組織中の MDA は負荷後45分で遊離ならびに蛋白結合型いずれも有意に増加したが、24時間後には前値に復した。筋細胞における核の DNA 断片化は、TUNEL 法、電気泳動法いずれにおいても負荷後45分、24時間後に有意に増加した。したがって、馬の運動負荷時にはフリーラジカルの産生亢進、膜の脂質過酸化、ならびに核の DNA 断片化を示す細胞の増加していることが明らかとなった。

以上の結果から、馬に認められる運動負荷にともなう筋肉傷害では、膜の安定性欠如とともに核の DNA 断片化を伴う細胞死が引き起こされていることが明らかとなり、またこの原因には、これまで重要視されていた嫌氣的代謝に基づく乳酸アシドーシスによるものではなく、むしろ高エネルギーリン酸化合物の分解、細胞内カルシウムの増加を介した膜の安定性低下、ならびにフリーラジカルによる膜の過酸化が重要であると考えられた。