

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 Boffi Federico Martin

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。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、フリーラジカルの産生などが指摘されているが、本症発症との関連は推測の域をでない。本論文は、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もので、以下の2章から構成されている。

まず、第1章ではC2C12細胞を分化させた後、培養液からグルコースを除去し、アルゴンガス存在下で培養する虚血条件、また、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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>）を添加して培養する虚血・再灌流の両条件で培養した際の、高エネルギーリン酸化合物、培養上清中のLDHチオバルビツール酸反応物質（TBARS）の変動、フリーラジカルの産生、また細胞内カルシウムの変動、さらに核のDNA断片化について検討した。

虚血：細胞内ATPならびにGTP含量は、虚血後、急速に、かつ有意に減少し、またIMPは有意に増加した。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TBARSならびにLDH濃度は虚血後有意に増加したが、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、虚血後増加し、以後高値を維持した。DNA断片化を示すTUNEL陽性細胞は虚血後増加した。また、スピントラップ法によるフリーラジカルの産生は観察されなかった。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、フリーラジカルの産生は起こらないと考えられた。また、虚血では核DNAの断片化は引き起こされるものの、細胞死は発現しないと考えられた。

虚血・再灌流：虚血・再灌流時では、培養上清中LDH活性は虚血のみ、あるいは再灌流のみの場合に比較して有意な高値を示した。また、上清中TBARS濃度も処置後著しい高値を示し、フリーラジカルによる脂質過酸化ならびに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。また、細胞内カルシウム濃度は増加し、これに伴って細胞死が発現した。一方、虚血・再灌流ではフリーラジカルの産生が観察され、虚血処置はフリーラジカル産生系を増強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、上清中TBARS、LDH濃度は有意に抑制された。したがって、虚血・再灌流時には細胞死が発現し、ラジカル産生は増強され、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章では馬に強制運動負荷を行い、中段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TBARS (MDA) 濃度の変動、キサンチンオキシダーゼ活性、核のDNA断片化について検討した。

運動負荷後、筋組織中ATPならびにGDP濃度の有意な減少とIMP濃度の有意な増加が認められた。血中ヒポキサンチン、尿酸濃度は有意な増加を示した。筋組織中にはキサンチンオキシダーゼ活性が認められ、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。また、負荷後、血中CK活性、筋組織中の遊離ならびに蛋白結合型MDAが有意に増加した。一方、核のDNA断片化が、TUNEL法、電気泳動法いずれにおいても認められた。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、フリーラジカルの産生にともなう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った。この原因は、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、アポトーシス経路の活性化、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。

このように本論文は、獣医学上重要な問題である、馬の運動負荷にともなう筋肉傷害の発症機序を明らかにしたもので、獣医学の学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。