

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 松木 直章

激しい運動に伴って生じる骨格筋障害は、スポーツ医学や競走馬臨床の分野で大きな課題とされている。この骨格筋障害の発生機序について、フリーラジカルの関与が指摘されるようになった。膜リン脂質の構成成分である不飽和脂肪酸はフリーラジカルに対する感受性が高く、その過酸化が膜障害、ひいては骨格筋細胞障害の一因であると考えられている。一方、生体骨格筋あるいは骨格筋細胞におけるリン脂質過酸化反応の詳細は解析されていない。本論文はウマに対する最大運動負荷あるいは培養骨格筋細胞モデルを用いて骨格筋細胞におけるリン脂質過酸化反応を検討したもので、以下の3章から構成されている。

第1章では運動負荷時の馬の骨格筋におけるリン脂質過酸化反応について検討した。すなわち、臨床的に健康な馬4頭にトレッドミルを用いて最大運動負荷し、リン脂質過酸化反応産物の変動を観察した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるリン脂質過酸化物測定ではホスファチジルエタノールアミンヒドロペルオキシド (PE-OOH) ならびにホスファチジルコリンヒドロペルオキシド (PC-OOH) が検出可能で、前者は運動後に増加し、後者は有意な変動を示さなかった。脂肪酸過酸化物の主な分解産物であるマロンジアルデヒド (MDA) も運動後に増加し、とくに蛋白に結合した状態で観察された。また、いずれの実験馬についても運動による臨床的な骨格筋障害は認められなかった。これらの結果から、骨格筋障害を伴わない生理的な運動においても、骨格筋内ではリン脂質過酸化反応が生じることが明らかになった。

第2章では外因性フリーラジカルによる培養骨格筋細胞 (L6 細胞) のリン脂質過酸化反応について検討した。すなわち外因性フリーラジカルによる骨格筋細胞のリン脂質過酸化反応について検討するため、ラット骨格筋由来 L6 筋芽細胞をヒポキサンチン (1 mM) およびキサンチン酸化酵素 (0.0008-0.05 U/ml) に由来するスーパーオキシドラジカルに曝露した。HPLC によるリン脂質過酸化物測定では細胞内 PE-OOH ならびに PC-OOH 量は変動しなかったが、リン脂質組成の測定では PE 分画中のエタノールアミンプラズマローゲン (EtPL) が選択的に減少した。これらの結果から骨格筋細胞が酸化状況に陥ると、PE が優先的に酸化され、PE 分画の一部である EtPL が分解されることにより、他のリン脂質分子種の過酸化と分解を抑制したと考えられた。

第3章ではエネルギー代謝を阻害した培養骨格筋細胞（C2C12細胞）のリン脂質過酸化反応について検討した。すなわち内因性フリーラジカルによる骨格筋細胞のリン脂質過酸化反応について検討するため、マウス骨格筋由来C2C12細胞をミトコンドリア呼吸鎖を阻害する2 mM シアン化ナトリウム（CN）および解糖系を阻害する1 mM ヨード酢酸（IAA）で処理した。運動時の生体骨格筋と同様に、アデノシン3リン酸の減少ならびにイノシン1リン酸の細胞内蓄積が観察された。また、5'5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド（DMPO）をスピントラップ剤とした電子スピン共鳴法により内因性のヒドロキシラジカルおよび炭素中心ラジカルが検出された。これらの内因性フリーラジカルは鉄キレート剤であるデフェロキサミンの添加により消失したことから、鉄触媒フェントン反応による内因性フリーラジカル生成が確かめられた。さらに、培養上清中にMDAがされたことから、C2C12細胞においてリン脂質過酸化反応が存在したことが確認された。一方、ホスホリパーゼA2阻害剤はCNならびにIAAによる酸化的な膜障害を増悪した。このことから、PLA2を阻害したC2C12細胞ではリン脂質ヒドロペルオキシドが酵素的分解をうけることなく膜に蓄積し、膜障害をもたらすと考えられた。

このように本論文は、運動に伴って馬の骨格筋で生じるリン脂質過酸化反応を明らかにし、さらにリン脂質過酸化に対する防御機構の一端を解明したもので、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。