



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Investigation for the mechanism of quinolone antibacterial agent ofloxacin-induced chondrotoxicity in juvenile rats [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	後藤, 浩一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	乙第6906号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/56208
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Koichi_Goto_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名：後 藤 浩 一

学位論文題名

Investigation for the mechanism of quinolone antibacterial agent ofloxacin-induced chondrotoxicity in juvenile rats

（キノロン系抗菌薬オフロキサシンの幼若ラットにおける関節毒性
発症機序に関する研究）

これまでにキノロン系抗菌薬（キノロン薬）が幼若動物に関節毒性を引き起こすことは報告されているが、キノロン薬が直接軟骨基質に作用するのか、あるいは軟骨基質破壊に繋がる何らかの因子が関与するのかは未だ明らかではなかった。そこで本研究では、関節毒性発症に関与する因子を見出すため、1) キノロン薬 ofloxacin (OFLX) を投与した雄性幼若ラット（3 週齢）の関節軟骨における遺伝子発現変動を網羅的に解析するとともに、変動した遺伝子の局在を調べた。また、2) 関節毒性を示さないキノロン薬を投与した幼若ラットの関節軟骨について軟骨内薬物濃度を測定するとともに、OFLX を投与した幼若ラット関節軟骨で見出された関節毒性と関連すると考えられた遺伝子の発現を調べた。さらに、3) 尾懸垂処置を施した幼若ラットを用いて、軟骨に対する荷重負荷の病変形成及び関節毒性関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調べることで関節毒性発現機作を考察した。

1) OFLX の 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラット大腿骨遠位関節軟骨について、投与 2、4、8、及び 24 時間後に GeneChip を用いた遺伝子発現解析を実施した。その結果、投与 2 時間後に細胞内シグナルカスケード関連及びストレス反応関連遺伝子の、投与 4 及び 8 時間後に細胞死関連及び炎症反応関連遺伝子の、投与 8 及び 24 時間後に塩基性ロイシンジッパー転写因子及びストレス反応関連遺伝子の、投与 24 時間後に蛋白溶解関連及び糖タンパク関連遺伝子の発現変動が認められた。次に、OFLX の 100、300、あるいは 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラットの大腿骨遠位関節軟骨について、quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) により、GeneChip 解析で変動のあった遺伝子の発現を調べた。その結果、dual specificity phosphatase 1 (Dusp1、細胞内シグナルカスケード関連遺伝子)、tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a (Tnfrsf12a、細胞死関連遺伝子)、prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2、炎症反応関連遺伝子)、FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (Fos、炎症反応関連遺伝子)、metallothionein 1a (Mt1a、ストレス反応関連遺伝子)、plasminogen activator, urokinase receptor (Plaur、ストレス反応関連遺伝子)、及び matrix metalloproteinase 3 (Mmp3、

蛋白溶解関連遺伝子) の用量依存的な発現の増加、並びに somatostatin receptor 1 (Sstr1、糖タンパク関連遺伝子) 及び hyaluronan synthase 2 (Has2、糖タンパク関連遺伝子) の用量依存的な発現減少が認められた。さらに、Tnfrsf12a、Ptgs2、Plaur、及び Mmp3 遺伝子に対する *in situ* hybridization を実施した結果、これら遺伝子は、軟骨病変部位周辺で発現が増加することが確認された。以上、OFLX の関節毒性には、軟骨細胞における細胞死、炎症反応、ストレス反応、及び蛋白溶解関連遺伝子の発現増加により産生され则认为られるサイトカイン、ケモカイン、あるいはプロテアーゼが重要な役割を果たしていることが示唆された。

2) 新規キノロン薬 DC-159a 及び DX-619 の関節毒性を OFLX と比較するため、DC-159a、DX-619、あるいは OFLX の 300 あるいは 900 mg/kg/day を幼若ラットに 7 日間反復経口投与し、上腕骨及び大腿骨遠位関節軟骨について組織学的検査を実施した。また、DC-159a、DX-619、あるいは OFLX の 100、300、あるいは 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラットの大腿骨遠位関節軟骨について、軟骨内薬物濃度を測定した。さらに、DC-159a あるいは DX-619 の 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラットの大腿骨遠位関節軟骨について、OFLX を投与した幼若ラット関節軟骨において qRT-PCR で変化が認められた 9 遺伝子の発現を qRT-PCR で調べた。その結果、幼若ラットの上腕骨及び大腿骨遠位関節軟骨の組織学的検査では、OFLX の 300 mg/kg/day 以上で空洞形成及び軟骨細胞塊が認められたが、DC-159a 及び DX-619 では 900 mg/kg/day まで組織学的変化は認められなかった。大腿骨遠位関節軟骨内の薬物濃度測定では、DC-159a あるいは DX-619 の 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラットの軟骨内最高薬物濃度 (軟骨内 C_{max}) は、7 日間反復投与により関節病変が認められた OFLX の 300 mg/kg を投与した幼若ラット軟骨内 C_{max} とほぼ同等あるいはやや低かった。また、DC-159a あるいは DX-619 の 900 mg/kg を単回経口投与した幼若ラットの軟骨内薬物濃度時間曲線下面積 (軟骨内 AUC_{0-24h}) は、OFLX の 300 mg/kg を投与した幼若ラットの軟骨内 AUC_{0-24h} より高かった。さらに、DC-159a あるいは DX-619 を投与した幼若ラット大腿骨遠位関節軟骨では、Tnfrsf12a、Ptgs2、Plaur、及び Mmp3 遺伝子には明らかな変化が認められなかった。以上のことから、OFLX と比較して DC-159a 及び DX-619 の関節軟骨内への分布が低いことに加えて、軟骨内 Tnfrsf12a、Ptgs2、Plaur、及び Mmp3 遺伝子に明らかな変化が無かったことが、DC-159a 及び DX-619 で関節毒性が認められない原因であると考えられた。

3) キノロン薬関節毒性発症と軟骨に対する荷重負荷の関係を調べるため、OFLX の 900 mg/kg を幼若ラットに単回経口投与し、投与後速やかに 2、4、及び 8 時間後まで尾懸垂処置を施した幼若ラットの大腿骨遠位関節軟骨について、投与 8 時間後に組織学的検査を実施するとともに、Tnfrsf12a、Ptgs2、Plaur、及び Mmp3 遺伝子の発現量を qRT-PCR で調べた。その結果、通常飼育条件下では、関節軟骨に軟骨細胞核濃縮並びに軟骨基質の疎鬆化及び亀裂形成が認められ、Tnfrsf12a、Ptgs2、Plaur、及び Mmp3 遺伝子の発現増加あるいは増加傾向が認められた。しかし、尾懸垂時間の延長に伴い通常飼育条件下で認められた関節軟骨の組織学的変化及び遺伝子発現は軽減する傾向が認められ、尾懸垂 8 時間処置ではこれらの変化は認められなかった。

以上のことから、OFLX を投与した幼若ラット関節軟骨では、関節病変形成に関与すると考えられる *Tnfrsf12a*、*Ptgs2*、*Plaur*、及び *Mmp3* 遺伝子の発現が増加することが示された。さらに、これら遺伝子の発現増加及び軟骨における組織学的変化には、軟骨への荷重負荷が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。