

氏 名 (本籍)	矢 部 光 一 (東京都)
学 位 の 種 類	博士 (獣医)
学 位 記 番 号	獣医博甲第 1 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 1 5 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学 位 論 文 題 目	キノロン系抗菌剤 Ofloxacin により誘発されたイヌ 関節症の臨床病理学的研究
審 査 委 員	主査 岩 手 大 学 教 授 岡 田 幸 助 副査 帯広畜産大学 教 授 松 井 高 峯 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 三 森 国 敏 副査 岐 阜 大 学 教 授 柵 木 利 昭

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

キノロン系抗菌剤は高い抗菌活性、幅広い抗菌スペクトラムおよび良好な組織移行性を示すことから、主に経口剤として種々の感染症の治療に用いられている。しかし、幼若動物に投与すると、四肢関節を中心に、関節軟骨の水疱形成を特徴とした関節症を誘発する。特にイヌはこの関節症に最も高い感受性を示す。本研究では ofloxacin (OFLX) による幼若イヌ関節症について、その発生メカニズムの解析を試みた。

第 I 章では、OFLX の関節症惹起用量ならびに血中および関節軟骨内の薬物濃度について幼若イヌ (3 ヶ月齢) を用いて検討した。すなわち、OFLX の 5、10 および 20 mg/kg/day を雄性幼若イヌに経口 8 日間反復投与した。その結果、関節症は肉眼的に 10 mg/kg/day から関節軟骨の水疱としてみられ、組織学的には関節軟骨中間層における空洞形成として観察された。関節軟骨における水疱形成の発現頻度は 上腕および大腿骨近位 > 大腿骨遠位 > 上腕骨遠位の順に高く、また好発領域 (上腕骨頭背側、大腿骨頭背側および大腿骨頭靭帯周囲) が限定されていた。好発領域はイヌにおける荷重領域と一致することから、荷重が関節症の発生因子の 1 つとして推測された。この検討から、OFLX の最小関節症誘発用量は 10 mg/kg/day であり、無毒性量は 5 mg/kg/day と考えられた。薬物動態解析では OFLX の用量依存的な血中濃度推移および関節軟骨組織への移行が認められ、関節症発現における閾値は血中で 4.5  $\mu$ g/ml 前後、関節軟骨で 9.0  $\mu$ g/g 前後と判断された。

第 II 章では、キノロン剤誘発関節症の特徴である感受性の年齢差を、幼若 (3 ヶ月齢) および成熟イヌ (18 ヶ月齢) を用い、OFLX の血中、滑液中および関節軟骨内濃度で比較した。OFLX の

20 mg/kg/day を雄性幼若および成熟イヌに経口 8 日間反復投与した。その結果、関節症は幼若イヌにのみ認められ、成熟イヌではなんら変化はみられなかった。組織学的検査では幼若イヌと成熟イヌの関節軟骨に明らかな差異が認められ、成熟イヌでは石灰化層および石灰化線がみられ発達した関節軟骨組織形態を示した。薬物動態解析では OFLX の血中および滑液中濃度に両月齢間に明らかな差異はみられなかった。興味深いことに、関節軟骨内濃度は幼若イヌよりも成熟イヌで高値を示し、感受性の年齢差は関節軟骨内の薬物濃度の差異のみでは説明することができなかった。以上を勘案すると、幼若イヌでの関節症の発現には OFLX の関節軟骨への移行とともに、未成熟な軟骨組織に対する特異的作用が関与するものと推測された。

第 III 章では、幼若イヌ (3 ヶ月齢) における水疱 (空洞) 形成過程を病理組織学的に精査した。雄性幼若イヌに OFLX の 20 mg/kg/day を経口単回および 2 日間反復投与した。空洞形成の初期変化として、関節軟骨中間層における軟骨細胞の変性および壊死、基質の水腫性変化および膠原線維の露出が観察された。基質では水腫性の領域から関節軟骨表層にかけて、safranin O 染色では染色性の低下がみられ、基質におけるプロテオグリカンの減少が示唆された。電子顕微鏡学的検査ではこれらの所見に一致して、中間層の軟骨細胞における粗面小胞体腔の拡張を特徴とする、細胞領域基質におけるプロテオグリカン顆粒の減少が観察された。また同時に、ミトコンドリアの腫大も認められた。壊死軟骨細胞周囲では著しい同顆粒の減少とともに軟骨細胞と領域基質との解離がみられた。空洞周囲の領域間基質ではプロテオグリカン顆粒の減少とともに、膠原線維の凝集、減少および消失が観察された。以上の結果より、水疱 (空洞) 形成過程において、軟骨細胞の粗面小胞体腔の拡張にリンクした軟骨基質でのプロテオグリカンの減少が重要であることが推察された。

第 IV 章では、幼若イヌ初代培養関節軟骨細胞を用い、細胞周期 (DNA 合成) およびプロテオグリカン合成における OFLX の作用について検討した。雄性幼若イヌ (3 ヶ月齢) の上腕骨近位および大腿骨遠位より関節軟骨組織を採取し、酵素消化により軟骨細胞を分離して培養した。OFLX の添加濃度は関節症発現における関節軟骨内薬物濃度をもとに 6.3 - 100  $\mu\text{g/ml}$  とした。その結果、OFLX は高濃度 (100  $\mu\text{g/ml}$ ) においても細胞周期に影響を与えず、細胞障害性 (細胞増殖抑制) も認められなかった。しかし、プロテオグリカン合成に対し、関節症発現における関節軟骨内濃度の閾値 (9.0  $\mu\text{g/g}$ ) 近傍である 12.5  $\mu\text{g/ml}$  より濃度依存的な抑制作用を示した。したがって、*in vitro* 系での関節軟骨細胞におけるプロテオグリカン合成低下は投与初期の形態学的変化である細胞領域基質におけるプロテオグリカン顆粒の減少を裏づけるものであり、この減少が OFLX 誘発関節症の発現に大きな役割を果たしていると考えられた。

以上、OFLX による幼若イヌの関節症発現メカニズムは、関節軟骨に充分量の薬剤が分布すると、関節軟骨中間層における軟骨細胞の粗面小胞体腔の拡張を惹起し、プロテオグリカン産生は抑制され、プロテオグリカン顆粒の減少がみられる。その後、細胞領域基質のプロテオグリカンはさらに減少し、水腫性変化が生じる。同時に軟骨細胞と基質のネットワークは障害され、軟骨細胞は壊死に陥る。水腫性変化は膠原線維の凝集、減少および消失とともに領域間基質にもおよび、軟骨組織は脆弱化し、それに荷重 (成長) が加わることにより水疱 (空洞) が形成されるものと考えられた。また、粗面小胞体腔の拡張とともにミトコンドリアの腫大もみられ、ミトコンドリア障害によるプロテオグリカン減少も相乗的に関与している可能性が推測された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、キノロン系抗菌剤 ofloxacin (OFLX) による幼若イヌ関節症の発生メカニズムの全貌を明らかにする一助として本研究を試み、その病理発生について科学的根拠を提供した。キノロン剤は幼若動物に四肢関節軟骨の水疱形成を特徴とした関節症を誘発（関節毒性）することから、ヒト小児ならびに幼若動物での使用は制限されている。イヌはキノロン剤誘発関節症に最も感受性が高く、イヌにおける関節症の発生メカニズムの解析は、小児（幼若動物）に使用可能な次世代キノロン剤の開発に有益な情報をもたらすものと考えられる。

1. 幼若イヌにおける OFLX 経口 8 日間反復投与時の最小関節症誘発用量 (10 mg/kg/day) および無毒性量 (5 mg/kg/day) を明らかにした。また、荷重を関節症の発生因子の 1 つとして推測した。発現薬物動態解析では関節症発現における OFLX の閾値は血中で 4.5 µg/ml 前後、関節軟骨で 9.0 µg/g 前後であることを明らかにした。
2. キノロン剤誘発関節症の感受性の年齢差について、OFLX を幼若および成熟イヌに経口 8 日間反復投与して比較した。関節症は幼若イヌにのみに発現し、成熟イヌでは変化はみられなかった。しかし、薬物動態解析では関節軟骨内薬物濃度は幼若イヌよりも成熟イヌで高値を示し、感受性の年齢差は関節軟骨内薬物濃度の差異のみでは説明することができなかった。
3. 幼若イヌにおける OFLX の水疱形成過程を病理組織学的に検索した。その結果、水疱形成の初期変化として、中間層軟骨細胞の粗面小胞体腔拡張および細胞領域基質でのプロテオグリカン減少を明らかにした。
4. 幼若イヌ初代培養軟骨細胞において、OFLX は関節症発現における関節軟骨内濃度の閾値 (9.0 µg/ml) 近傍より濃度依存的なプロテオグリカン合成抑制作用を示すことを明らかにした。この結果は、形態学的初期変化である基質でのプロテオグリカン減少を裏づけるものであると考えられた。

本研究により、OFLX による幼若イヌの関節症発現メカニズムは、関節軟骨に充分量の薬剤が分布すると、関節軟骨中間層軟骨細胞の粗面小胞体腔拡張を惹起し、プロテオグリカン産生は抑制され、基質におけるプロテオグリカン減少により水腫性変化が生じる。同時に軟骨細胞と基質のネットワークは障害され、軟骨細胞は壊死に陥る。脆弱化した軟骨組織に荷重（成長）が加わることでより水疱が形成されるものと考えられた。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : A non-arthropathic dose and its disposition following repeated oral administration of ofloxacin, a new quinolone antimicrobial agent, to juvenile dogs

著 者 名 : YABE, Koichi MURAKAMI, Yoichi NISHIDA, Saori SEKIGUCHI, Masayasu FURUHAMA, Kazuhisa GORYO, Masanobu and OKADA, Kosuke

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 63 (8): 867-872, 2001

#### 既発表学術論文

- 1) 題 目 : Müllerian tumor (atypical polypoid adenomyoma) with sex-cord differentiation arising from the oviduct in an adolescent cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*)

著 者 名 : SATOH, Hiroshi KAI, Kiyonori YABE, Koichi FUJII, Fumitaka and FURUHAMA, Kazuhisa

学術雑誌名 : Toxicologic Pathology

巻・号・頁・発行年 : 31 (2): 2003 (in press)